

Ученому секретарю
диссертационного совета
Д 501.001.42
Северину А.В.
МГУ имени М.В.Ломоносова
119991, г. Москва,
Ленинские горы, 1, стр. 10

УТВЕРЖДАЮ

Директор

АО «НИФХИ им. Л.Я. Карпова»

Кф.-м.н. Кононов О.Е.



2016

Отзыв

ведущей организации на диссертационную работу Егоровой Байирты Владимировны на тему «Комплексообразование Ac^{3+} , Eu^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+} , Bi^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} пиридин- и фенил-содержащими азакраун-эфирами», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.14 - радиохимия

Диссертация Егоровой Байирты Владимировны на тему «Комплексообразование Ac^{3+} , Eu^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+} , Bi^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} пиридин- и фенил-содержащими азакраун-эфирами» посвящена исследованию новых хелаторов для применения их в качестве составных частей радиофармпрепаратов (РФП).

Получение новых радиофармпрепаратов для направленной доставки терапевтической или диагностической дозы к опухолевым клеткам является важной задачей современной медицины. Точная доставка лекарственного средства, в особенности РФП, обеспечивает наибольший эффект для поражённых тканей и меньшую токсическую нагрузку на здоровые ткани, а при диагностике создаёт лучшее соотношение сигнал/шум, что позволяет корректно локализовать область поражения. Кроме того, альфа-излучающие радионуклиды, ввиду короткой длины свободного пробега альфа-частиц эффективны только при попадании внутрь клетки, то есть для РФП на их основе помимо нахождения клетки, необходимо

проникновение через мембрану, а Оже-излучающие радионуклиды обеспечивают полное уничтожение клетки, находясь только внутри ядра в непосредственной близости к молекуле ДНК. Таким образом, крайне важным представляется сохранение целостности меченой макромолекулы-вектора, а разработка РФП для направленной доставки радионуклидов в пораженные ткани является актуальной задачей. В связи с этим необходим поиск и исследование лигандов, способных быстро связывать радионуклиды в устойчивые комплексы. Хелатирующие агенты, в том числе краун-эфиры, используются для введения радионуклидов в состав биологических реагентов (например, пептиды или моноклональные антитела), осуществляющих их направленный транспорт к раковым клеткам. К хорошо разработанным системам для связывания катионных форм радионуклидов относятся циклические полиаминополикарбоксилаты. Несмотря на уже имеющиеся в литературе данные об аза-макроциклических хелаторах для радионуклидов, разработка новых их типов, а также модификация известных, удовлетворяющая определенному набору требований, остается *актуальной задачей*, решавшейся в представленной диссертации.

Научная новизна представленной диссертации обусловлена полученными результатами для серии новых азакраун-эфиров. Показано влияние последовательного увеличения макроциклической полости и введения пиколиловых и карбоксильных групп на комплексообразующие свойства лигандов.

В литературном обзоре описаны радионуклиды, основной химической формой которых являются катионы. Приведены данные по используемым и исследуемым в настоящее время радионуклидам, способы их получения и наработки, а также проблемы, встречающиеся при их получении. При этом рассмотренные радионуклиды проявляют разные химические свойства, ведь связывание в РФП подразумевает образование химических соединений, и литературный обзор затрагивает только наиболее популярные радионуклиды: некоторые редкоземельные элементы, характеризующиеся близкими химическими свойствами, схожий с ними катион актиния, средней жёсткости катионы висмута и свинца и более мягкие катионы меди.

Далее показаны два класса наиболее используемых в настоящее время в ядерной медицине лигандов для связывания металлов: ациклические и

макроциклические. Несмотря на успешные синтезы модифицированных ациклических полиаминополикарбоксилатов, призванных улучшить устойчивость *in vivo* комплексов с ними, «золотым стандартом» остается макроциклический лиганд – азакраун аналог 12-краун-4 – H_4DOTA и его гомологи H_4TETA , СВ-TE2A. Однако, для образования РФП с этими лигандами требуются либо повышенные температуры до $100^\circ C$, либо продолжительное время синтеза, сравнимое с периодом полураспада некоторых радионуклидов, например, $Bi-213$, 212 .

В литературном обзоре диссертации показано, что структура комплекса в большой степени определяет его кинетическую и термодинамическую устойчивость. В связи с этим диссертантом рассматриваются структурные особенности комплексов с ациклическими и макроциклическими лигандами, влияние на строение комплекса различных модификаций лигандов, а также координационной химии катионов.

Таким образом, в диссертации с позиций термодинамической и кинетической устойчивости комплексов, кинетики комплексообразования, а также анализа структуры была исследована серия новых водорастворимых азакраун соединений, содержащих арильный фрагмент, с катионами меди, свинца, висмута, актиния и редкоземельных элементов. В рамках оценки пригодности лигандов для РФП неизбежными характеристиками являются их радиолитическая устойчивость и химическая токсичность по отношению как к раковым, так и здоровым клеткам. Эти параметры также были оценены в диссертации.

Для установления констант комплексообразования с радионуклидами, для которых существуют стабильные аналоги: $Cu-64,67$, $Pb-212$, $Y-90$, $Lu-177$ – использовался метод потенциометрического титрования при миллимолярных концентрациях лигандов и катионов, с Bi^{3+} и Ac^{3+} - метод жидкостной экстракции, сорбции и растворимости с использованием $Bi-207$ и $Ac-225$ при индикаторных концентрациях катионов. Численная обработка данных потенциометрического титрования и оптимизация моделей комплексообразования осуществлялись с помощью программы «Hyperquad». Достоверность полученных значений констант комплексообразования доказана проведением исследования для некоторых комплексов параллельно несколькими методами. Для этих целей удачно были выбраны катионы иттрия и европия, для которых помимо метода конкурирующей

реакции сорбции с радиоактивными метками Y-90 и Eu-152 был использован метод потенциометрического титрования, а для катионов европия дополнительно проведены флуориметрические измерения.

Описание структур наиболее устойчивых комплексов проведено с двух сторон: теоретическое моделирование на основе квантово-химических расчетов и экспериментальное определение спектроскопическими методами: УФ-спектроскопией поглощения, флуоресцентной спектроскопией с временным разрешением (TRLIFS), а также с помощью синхротронного излучения (EXAFS).

Для первичной оценки радиационной устойчивости лигандов использовано гамма-излучение и масс-спектрометрия, а цитотоксичность охарактеризована с использованием лейкемических клеточных линий.

Главной экспериментально определенной характеристикой лигандов служит их кислотность, на которую оказывают влияние размер макроцикла, число донорных атомов азота и их расположение в макроцикле, наличие карбамидных атомов азота, а также подвесные карбоксильные и пиколиловые группы.

Получены новые данные по константам устойчивости комплексов с Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ac^{3+} , Vi^{3+} и PZЭ^{3+} в широком диапазоне pH. Использованный набор методов позволил в полной мере определить константы устойчивости образуемых комплексов со всеми рассмотренными катионами. Катионы Cu^{2+} и Pb^{2+} , характеризующиеся различной координационной химией, образуют комплексы не только разной стехиометрии, но и различной устойчивости. Наиболее устойчивы комплексы с Cu^{2+} .

PZЭ и Ac^{3+} , как и ожидалось, образуют комплексы близкой устойчивости в пределах 1-2 порядков величины, причём только с лигандами, обладающими карбоксильными группами, что объясняется их наибольшей пирсоновской жесткостью по сравнению со всеми остальными рассмотренными в данной работе катионами. В качестве меры этой жесткости автором использован параметр ионности образуемых катионом связей, взятый из литературы.

В диссертации предложена и применена экспериментальная схема определения констант комплексообразования азокраун-эфиров с Vi^{3+} : при низких значениях pH – жидкостная экстракция с раствором ди-2-этилгексил фосфорной кислоты в толуоле, при более высоких pH – изменение растворимости Vi^{3+} . Все

рассчитанные значения научно обоснованы с точки зрения строения лигандов и заряда образуемых комплексов: лиганды, содержащие только макроциклическую полость, образуют комплексы с стехиометриями $Vi:L=1:2$ и $Vi:L=1:1$, тогда как хелаторы с карбоксильными или пиколиловыми группами только $Vi:L=1:1$. Показано, что от заряда комплекса ViL^{n+} зависит образование им гидроксидных форм $ViL(OH)_n$.

Все полученные значения логарифмов констант комплексообразования коррелируют между собой и с литературными данными, что находит отражение в линейных соотношениях свободных энергий реакций комплексообразования и протонирования, построенных для катионов Cu^{2+} , Pb^{2+} и Vi^{3+} и макроциклических хелаторов. Наклоны полученных прямых сопоставлены автором с жесткостью катионов: наиболее «мягкий» Cu^{2+} характеризуется наименьшим наклоном. Полученные линейные зависимости могут быть использованы при прогнозировании констант комплексообразования макроциклических лигандов с Cu^{2+} , Pb^{2+} и Vi^{3+} по их кислотности.

Несмотря на невысокие значения констант устойчивости образуемых комплексов с РЗЭ показана их устойчивость в изотоническом растворе и сыворотке, что положительно характеризует рассматриваемые лиганды для применения их в РФП.

Взаимное дополнение теоретического расчета структуры комплексов и экспериментальных спектроскопических результатов позволило описать строение наиболее устойчивых комплексов с РЗЭ и Vi^{3+} . Согласно представленным результатам, образование комплексов осуществляется по краун-эфирной полости и карбоксильным группам. При этом хелатирование РЗЭ лигандом с меньшим макроциклом (аналогами 15-краун-5) обеспечивается односторонним расположением карбоксильных групп относительно макроциклической полости. В то же время Vi^{3+} образует комплексы с транс-изомером, что приводит к более близкому расположению катиона к полости и объясняет большую устойчивость комплексов с Vi^{3+} по сравнению с РЗЭ. Для лиганда с большим размером макроцикла (аналогом 18-краун-6) при координации и РЗЭ, и Vi^{3+} карбоксильные группы располагаются с двух сторон полости, но межатомные расстояния до катиона опять же более коротки в случае Vi^{3+} , что подтверждается результатами

спектроскопии рентгеновского поглощения. Во всех случаях показано, что карбамидные и пиридиновый атомы азота наименее вовлечены в комплексообразование, что наглядно подтверждается нецелочисленным значением количества молекул воды в координационной сфере Eu^{3+} , определенное методом TRLIFS. Показано, что жесткий фенильный фрагмент в L4 приводит к координации катионов РЗЭ карбонильным атомом кислорода. Рассчитанные значения межатомных расстояний, 2-3 ангстрем, соответствуют длинам связей, традиционно образуемых катионами РЗЭ и Bi^{3+} с O, N – донорными лигандами, в том числе в комплексах с H_4DOTA и H_5DTPA .

Важным свойством рассмотренного класса азакраун-эфиров является продемонстрированная быстрая скорость комплексообразования, сравнимая с ациклическим лигандом H_5DTPA : комплексы с исследуемыми лигандами образуются в течение 1-2 минут при комнатной температуре, что демонстрирует целесообразность использования этого класса лигандов для создания РФП.

Проведённое исследование продуктов радиолиза наиболее перспективных из рассмотренных лигандов показало, что наименее устойчивыми, по крайней мере, при воздействии гамма-излучения являются связи с подвесными карбоксильными и карбонильными группами. Однако, экспериментальная проверка комплексообразующей способности наиболее перспективных лигандов относительно Bi^{3+} показала, что закономерности образования комплексов до и после воздействия дозы в 330Гр не изменяются.

В рамках оценки пригодности использования в РФП в диссертации проведены эксперименты по цитотоксическому влиянию краун-эфиров, проявляющих наиболее эффективные хелатирующие свойства. Показано, что раковые клетки, по крайней мере, лейкозов более восприимчивы к присутствию лигандов, чем клетки крови здоровых доноров. Согласно полученным в диссертации кривым доза-эффект полуметальные концентрации для лейкемических клеток на порядок ниже, чем для клеток здоровых доноров. Интересно, что пиридин-содержащий лиганд L3b оказался на порядок более токсичным, чем фенил-содержащий L4, однако, в любом случае, как отмечено в диссертации, все полученные значения выше концентраций в РФП, что обуславливает принципиальную возможность применения рассматриваемых азакраун-эфиров.

Содержание диссертации изложено в последовательной и логичной форме на 124 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, заключения, списка использованной литературы и приложения, содержит 59 рисунков и 15 таблиц.

Достоверность результатов диссертации Егоровой Байирты Владимировны подтверждается опубликованными статьями в таких авторитетных изданиях, как *Radiochimica Acta* и *Journal of Physical Organic Chemistry*. Публикации соискателя в полной мере отражают наиболее существенные положения и важные выводы диссертации. Материалы диссертации доложены на 8 научных конференциях, в том числе на 4 международных. Диссертация вносит не только определенный научный вклад, но и обладает практической значимостью.

Автореферат в полной мере отражает цели, задачи, основные положения диссертации, полностью соответствует ей по содержанию и выводам.

Предложенные методики, результаты и выводы диссертационной работы можно использовать при дальнейшем поиске перспективных лигандов, как макроциклических, так и ациклических для создания РФП, а также при разработке протоколов синтеза РФП на основе азакраун-эфиров.

В целом диссертация заслуживает высокой оценки. Однако при ее прочтении возникают следующие вопросы и замечания:

- 1) Использованный метод конкурентного взаимодействия подразумевает отсутствие участия комплекса или самого лиганда в реакции с конкурирующим агентом – сорбентом или экстрагентом. Проверялся ли этот момент при проведении экспериментов с рассматриваемыми лигандами?
- 2) Для оценки радиолитической устойчивости лигандов использованы дозы гамма-излучения согласно данным для ^{90}Y . Что можно сказать относительно доз, получаемых от других применяемых РФП?

Замечания:

- При оценке дозы необходимо учитывать, что влияние корпускулярного излучения, применяемого для терапии, отличается от гамма-излучения;
- Температура экспериментов по определению констант устойчивости комплексов указана только для потенциометрического титрования;

- В экспериментальной части отсутствует как таковое описание методов масс-спектрометрии, использованных автором для определения продуктов радиолиза;

Указанные недостатки имеют второстепенный характер и не влияют на общую положительную оценку диссертации. Выполнено большое по объему и ценное по содержанию исследование. Представленные результаты получены впервые, они имеют как теоретический, так и практический интерес.

Диссертация Егоровой Б.В. на тему «Комплексообразование As^{3+} , Eu^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+} , Bi^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} пиридин- и фенил-содержащими азакраун-эфирами», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.14 – «Радиохимия», соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным п.9 «Положения №842 о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ 24 сентября 2013 г. Автор работы, Егорова Байирта Владимировна, достойна присуждения степени кандидата химических наук по специальности 02.00.14 – «Радиохимия».

Отзыв на диссертацию заслушан и одобрен «23» декабря 2016 г. на заседании НТС АО «НИФХИ им. Л.Я. Карпова» протокол № 4.

Директор по инновационной деятельности
АО «научно-исследовательский
физико-химический институт имени Л.Я. Карпова»,
доктор химических наук
Дуфлот Владимир Робертович
249033, Калужская область, г. Обнинск,
Киевское шоссе, дом 6
Тел. +7 910 516 00 49, e-mail: duflot@karpovipc.ru



подпись

Подпись Дуфлота Владимира Робертовича
заверяю, ученый секретарь института,
кандидат физико-математических наук
Корулин Александр Викторович



подпись

Сведения о ведущей организации

по диссертационной работе Егоровой Б.В. на тему: «Комплексообразование Ac^{3+} , Eu^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+} , Bi^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} пиридин- и фенил-содержащими азакраун-эфирами», представленной на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.14 – радиохимия

Почтовый индекс, адрес, web-сайт, электронный адрес организации	249033, Калужская обл., г. Обнинск, Киевское шоссе, д.б. http://www.karpovipc.ru/ , fc1@karpovipc.ru
Полное наименование организации в соответствии с уставом	Акционерное общество «Ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский физико-химический институт имени Л. Я. Карпова»
Сокращённое наименование организации	АО НИФХИ им. Л.Я.Карпова
Наименование подразделения	Комплекс по производству радиофармпрепаратов
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Isolation of medicine-applicable actinium-225 from thorium targets irradiated by medium-energy protons. Aliev R.A., Vasiliev A.N., Ostapenko V.S., Kalmykov S.N., Ermolaev S.V., Lapshina E.V., Zhuikov B.L., Kokhanyuk V.M., Zakharov N.V., Pozdeev V.V., Myasoedov B.F. Solvent Extraction and Ion Exchange. 2014. V. 32. № 5. P. 468-477. 2. Radiation-chemical preparation of poly(vinyl alcohol) hydrogels. Dufлот A.V., Kitaeva N.K., Dufлот V.R. Radiation Physics and Chemistry. 2015. V. 107. P. 1-6 3. Оценка характеристик молибден-технециевых генераторов из регенерированного урана на реакторе ВВР-ц. Грачев А.Ф., Поздеев В.В., Кочнов О.Ю., Захаров Н.В., Крашенинников А.И. Радиохимия. 2014. Т. 56. № 4. С. 360-363. 4. Инновационный радиофармпрепарат для локальной радиотерапии. Дуфлот В.Р., Дубова Е.А., Больбит Н.М., Алтыникова Т.В. Инновации и инвестиции. 2013. № 4. С. 169-174. 5. Производство осколочного ^{99}Mo с замкнутым циклом по урану на ядерном реакторе ВВР-ц. Кочнов О.Ю., Поздеев В.В., Крашенинников А.И., Захаров Н.В. Радиохимия. 2012. Т. 54. № 2. С. 173-177. 6. Синтез и свойства термочувствительных полимер белковых конъюгатов, меченых изотопами радиоактивного йода. Больбит Н.М., Дуфлот В.Р., Дубова Е.А., Гайворонский А.В., Лобанова Е.И., Алтыникова Т.В. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2013. № 6. С. 30-39. 7. Термочувствительный радиофармпрепарат для локальной радиотерапии на основе меченого изотопом ^{131}I полимер-белкового конъюгата. Больбит Н.М., Дуфлот В.Р., Дубова Е.А., Алтыникова Т.В. В мире научных открытий. 2013. Т. 43. № 7.3. С. 30-48. 8. Стерилизация многослойных протеолипосом. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Багирова Н.С., Дмитриева Н.В., Дуфлот В.Р., Барышников А.Ю. Российский биотерапевтический журнал. 2012. Т. 11. № 1. С. 13-17. 9. Производство ^{99}Mo медицинского назначения и молибден-технециевых генераторов в НИФХИ им. Л.Я. Карпова. Поздеев В.В., Кочнов О.Ю., Крашенинников А.И., Степанов В.И., Грачев А.Ф. Атомная энергия. 2014. Т. 117. № 2. С. 93-97. 	

Директор АО НИФХИ им. Л.Я. Карпова



О.Е. Кононов