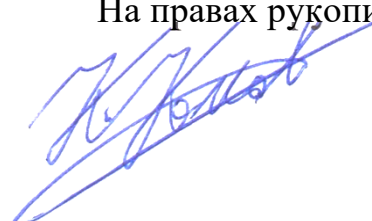


НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР

«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

На правах рукописи



КОКОВ КОНСТАНТИН ВЛАДИМИРОВИЧ

**ПОЛУЧЕНИЕ СВИНЦА-212 И ЕГО СОЕДИНЕНИЙ
ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Специальность 1.4.1. Неорганическая химия

Специальность 1.4.13. Радиохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, профессор

академик РАН Панченко В.Я.

Москва

2022

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Таргетная терапия злокачественных образований: производство радионуклида ^{212}Pb и использование терапевтических комплексов (обзор литературы)	13
1.1 <i>Комплексные соединения и радионуклиды для таргетной терапии.....</i>	<i>13</i>
1.2 <i>Получение радионуклида ^{212}Pb.....</i>	<i>23</i>
Глава 2. Методическая часть	33
2.1 <i>Реактивы и материалы</i>	<i>33</i>
2.2 <i>Измерение активности радионуклидов</i>	<i>34</i>
2.3 <i>Синтез прототипов РФП.....</i>	<i>36</i>
2.4 <i>Определение радиохимической чистоты прототипов РФП</i>	<i>36</i>
2.5 <i>Методика определения кинетической стабильности.....</i>	<i>39</i>
Глава 3. Производство ^{212}Pb на лабораторном генераторе.....	41
3.1 <i>Лабораторный генератор ^{212}Pb</i>	<i>41</i>
3.2 <i>Технология получения ^{212}Pb на лабораторном генераторе.....</i>	<i>43</i>
3.3 <i>Математическое описание генератора ^{212}Pb</i>	<i>45</i>
3.4 <i>Подготовка ионообменной смолы с ^{228}Th</i>	<i>50</i>
3.5 <i>Металлический ториевый реактор.....</i>	<i>54</i>
3.6 <i>Объем-накопитель радионуклида ^{212}Pb.....</i>	<i>54</i>
3.7 <i>Получение ^{212}Pb на генераторе</i>	<i>56</i>
3.8 <i>Исследование механизма эманирования ^{220}Rn</i>	<i>58</i>
3.9 <i>Радионуклидная и химическая чистота продукта.....</i>	<i>66</i>
3.10 <i>Ториевый реактор из органических материалов.....</i>	<i>68</i>
3.11 <i>Концепция проектирования генераторов ^{212}Pb</i>	<i>71</i>
Глава 4. Получение прототипов РФП	77
4.1 <i>Методика мечения адресных молекул радионуклидом ^{212}Pb.....</i>	<i>77</i>
4.2 <i>Условия, влияющие на выход мечения</i>	<i>78</i>
4.3 <i>Определение радиохимической чистоты</i>	<i>79</i>
4.4 <i>Синтез $^{210}\text{Pb}/^{212}\text{Pb}$]DOTATATE.....</i>	<i>82</i>

4.5 Синтез $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$	85
Глава 5. Исследование свойств меченых радиоконъюгатов.....	88
5.1 Исследование кинетической стабильности $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$	88
5.2 Исследование стабильности $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$	89
5.3 Исследование цитотоксичности $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$	90
Заключение	93
Список условных обозначений и сокращений.....	95
Список литературы.....	96

Введение

Актуальность работы. Онкологические заболевания в настоящее время являются одной из самых распространенных причин смертности среди населения, при этом постоянный рост заболеваемости характерен для всех регионов мира. В 2020 г. по данным Всемирной организации здравоохранения было зарегистрировано более 19 млн новых онкологических больных, при этом за это же время от рака умерло около 10 млн человек [1]. Тенденция к увеличению новых случаев весьма тревожная, характерная именно для онкологической заболеваемости и сохраняющаяся на протяжении последних десятилетий [2]. Специалисты из самых различных областей науки, медицины и техники погружены в поиск и улучшение методов лечения онкологических заболеваний. На данный момент общепринятыми методами являются хирургическое вмешательство, лекарственное лечение (химиотерапия), а также лучевая терапия, в процессе которой злокачественная клетка повреждается и перестаёт функционировать под воздействием ионизирующего излучения. При этом каждый из методов лечения рака имеет свои недостатки, которые необходимо учитывать при планировании лечения каждого пациента в зависимости от его состояния здоровья и характеристик очагов поражения.

При хирургическом вмешательстве практически весь объем опухоли удаляется из организма механически. Однако микроскопические остатки опухоли остаются, что может привести к образованию новых очагов поражения. Кроме того, при наличии множественных опухолей в других местах организма – метастазов – хирургическое вмешательство во многих случаях становится невозможным. При химиотерапии лекарственному воздействию подвергаются все органы и ткани в организме, что приводит к пагубным последствиям не только для раковых клеток, но и для здоровых тканей. Это может приводить к различным нарушениям функций организма. В процессе лучевой терапии область с пораженным участком тела подвергается облучению ионизирующим излучением (протонами,

электронами, γ -квантами, др.) при помощи медицинских ускорителей заряженных частиц. Под воздействием излучения происходит поражение раковых клеток и их последующая гибель, что приводит к замедлению, и, в идеале, к остановке роста (локализации) опухоли. Однако существует вероятность, что под воздействие излучения может попасть не только опухоль, но и окружающие ее здоровые органы. В частности, в случае меланомы радужки глаза существует риск облучения критически важного органа – головного мозга.

В этой связи вызывает интерес перспективный метод терапии рака под названием таргетная терапия, принцип действия которой заключается в адресной доставке лекарственного агента направленно к поверхности раковой клетки, в то время как здоровые клетки не будут подвергаться воздействию препарата. Впервые подходы к принципам таргетной терапии были высказаны немецким ученым Паулем Эрлихом (1908 г.). Он предположил, что можно найти молекулу, которая бы воздействовала на заданный биологический объект, например, уничтожала патогенные микробы или раковые клетки, но не влияла на организм человека. Такие, в то время гипотетические, молекулы он называл «волшебными пулями» [3].

В качестве лечебного агента, который воздействует на опухолевую клетку после его доставки к поверхности последней, могут использоваться не только специализированные химические соединения, но также и радиоактивные атомы (радионуклиды) [4]. В этом случае образующееся при распаде радиоактивного ядра излучение поражает раковые клетки и одновременно с этим минимально затрагивает окружающие здоровые ткани; такой метод воздействия на клетки носит название радионуклидной терапии (РНТ). В рамках РНТ используются радиоизотопы, при распаде которых образуются α - и β -частицы. α -частица (энергия 4-8 МэВ), представляющая собой ядро атома ${}^4\text{He}$, имеет короткий пробег в ткани (<100 мкм) и высокую линейную передачу энергии, что с большой вероятностью приводит к возникновению двунитиевых разрывов ДНК, менее эффективно поддающихся

репарации клеткой по сравнению с одиночными разрывами, возникающими под воздействием β -частиц (энергия 0,2-2 МэВ), пробег которых на несколько порядков превышает пробег α -частиц (<10 мм). Для уничтожения опухолевой клетки требуется лишь несколько распадов α -частиц на клеточной мембране [5]; при этом обеспечивается приемлемый с точки зрения дозиметрии уровень облучения окружающих здоровых тканей. Кроме того, в силу короткого пробега α -частиц, α -эмиттеры особенно уместно применять в случае гематологических заболеваний, микрометастазов, а также при наличии одиночных злокачественных клеток. Именно эти преимущества и вызывают интерес к α -эмиттерам в качестве терапевтических агентов для радионуклидной терапии. В то же время главными препятствиями на пути широкого внедрения в клиническую практику препаратов, меченных α -эмиттерами, являются высокая стоимость и ограниченная доступность последних. В этой связи актуальность данной работы представляется обоснованной.

В настоящей работе в качестве адресных соединений использовалась молекула DOTATATE, представляющая собой комплекс из хелатора DOTA и октапептида октреотата, обладающего высокой аффинностью взаимодействия с рецепторами соматостатина SSTR2, гиперэкспрессия которых наблюдается у клеток нейроэндокринных опухолей. DOTATATE использовался в качестве модельной молекулы для разработки технологии получения радиофармацевтического препарата, поскольку эта молекула в комплексе с рядом радионуклидов представляет собой хорошо изученную систему с точки зрения применения в ядерной медицине. После достижения устойчивого получения меченого комплекса DOTATATE для присоединения терапевтического агента использовался инновационный комплекс DOTA-HSA-ZHER2, состоящий из хелатора DOTA, человеческого сывороточного альбумина (ЧСА, англ. Human Serum Albumin – HSA) и нового адресного вектора ZHER2, обладающего высокой аффинностью к антигену HER2/neu на поверхности клеток рака молочной железы. В качестве носителя, на котором

закрепляют таргетные молекулы, выбран ЧСА, который не приводит к иммунологическим реакциям у человека. В составе молекулы ЧСА имеется большое количество доступных аминогрупп, которые возможно ковалентно связать с адресными молекулами, что позволяет добиться контролируемого количества внесенных векторов на одну молекулу ЧСА. Кроме того, для достижения терапевтического эффекта РФП должен находиться в кровотоке достаточное время для того, чтобы достичь органа-мишени и связаться с рецептором опухолевой клетки. Как известно, время полувыведения белков через почки коррелирует с их молекулярной массой, по причине чего период полувыведения молекул с массой менее 60 кДа оценивается в 0,5-2 часа. Молекулярная масса конъюгата, состоящего только из адресной молекулы, хелатора и радионуклида, как правило, не превышает 50 кДа (в среднем, около 30 кДа). В этом случае значительная часть конъюгата будет выведена почками до того, как успеет связаться с клетками-мишенями. Введение ЧСА (69 кДа) в состав радиоконъюгата позволяет не только создать центр молекулы, вокруг которой происходит конъюгация адресных молекул, но и увеличивает общую молекулярную массу комплекса и время его нахождения в кровотоке, благотворно влияя на фармакокинетические характеристики соединения. В этой связи представляет важность комплексообразование сложных носителей с радионуклидами и достижение их оптимальных фармакокинетических характеристик.

В основу разработки технологии получения нового радиофармпрепарата для направленной терапии онкологических заболеваний положено получение РФП, обладающего одновременно набором следующих свойств: сниженным риском возникновения конфликта радиоконъюгата с иммунной системой пациента; высокой специфичностью; относительной простотой технологии его получения. Принимая это во внимание, в качестве терапевтического агента в данной работе использовался β -эмиттер ^{212}Pb , дочерние нуклиды (^{212}Bi и ^{212}Po) которого подвергаются α -распаду, благодаря чему ^{212}Pb может рассматриваться как *in vivo* генератор α -эмиттеров и ввиду оптимального

периода полураспада (10,64 ч) также рассматриваться в качестве модельного радионуклида для перспективного использования других альфа-излучающих радионуклидов в комплексе с адресными молекулами. Нарботка ^{212}Pb осуществлялась в разработанной генераторной системе, позволяющей получать радионуклид непрерывно для проведения экспериментальных исследований в различных областях физики и медицины.

Целью работы являлось получение соединений на основе ^{212}Pb для потенциального радиофармацевтического применения. Для достижения поставленной цели решению подлежали следующие **задачи**:

1. Разработать лабораторный генератор ^{212}Pb на основе материнского ^{228}Th . Нарбатываемый ^{212}Pb должен находиться в химической форме, пригодной для использования в синтезе комплексных соединений.
2. Подтвердить химическую и радионуклидную чистоту продукта, получаемого на разработанном генераторе ^{212}Pb .
3. Провести синтез комплексного соединения $[\text{}^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$, содержащего наработанный ^{212}Pb , служащего в качестве модельного соединения для адресной доставки. Определить радиохимическую чистоту синтезированного комплекса.
4. Провести синтез комплекса $[\text{}^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$ для адресной доставки, содержащего наработанный ^{212}Pb в качестве терапевтического агента.
5. Разработать методику определения радиохимической чистоты синтезированного $[\text{}^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$ методом гелевой фильтрационной хроматографии.
6. Определить степени кинетической стабильности (сохранения в первоначальной химической форме) синтезированных соединений в физиологических средах.

Личный вклад автора. В теоретической части работы автор провел анализ литературы по теме производства ^{212}Pb и его применения в ядерной медицине. В экспериментальной части работы автор самостоятельно

выполнил модернизацию и оптимизацию генератора, основанного на принудительном удалении ^{220}Rn из объема с источником. При непосредственном участии автора были проведены исследования по влиянию влажности на эманирование ^{220}Rn из материала источника и был создан новый вариант генератора, основанный на принципе диффузии ^{220}Rn . Автором самостоятельно проведен синтез меченых соединений ^{212}Pb]DOTATATE и ^{212}Pb]DOTA-HSA-ZHER2 с использованием наработанного ^{212}Pb . Автором была определена радиохимическая чистота меченых адресных молекул на основе методов тонкослойной и гель-фильтрационной хроматографии, определялась радионуклидная чистота препарата при помощи α -спектрометрии. Кроме того, автором самостоятельно исследована кинетическая стабильность меченных наработанным ^{212}Pb адресных молекул.

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые проведены исследования по синтезу комплексных соединений свинца-212 и адресной молекулы DOTATATE, а также конъюгата «хелатор-человеческий сывороточный альбумин-HER2/neu-специфичный адресный вектор» DOTA-HSA-ZHER2, а также исследование их кинетической стабильности. Впервые:

- разработан лабораторный генератор ^{212}Pb на основе эманирования ^{220}Rn из ионообменной смолы, служащей сорбентом материнского источника;
- проведены реакции комплексообразования ^{212}Pb и молекул для молекулярно-прицельной терапии: DOTATATE и DOTA-HSA-ZHER2, а также определены значения радиохимической чистоты меченых соединений методами тонкослойной и гель-фильтрационной хроматографии;
- получены значения кинетической стабильности синтезированных соединений ^{212}Pb]DOTATATE и ^{212}Pb]DOTA-HSA-ZHER2 в физиологических средах.

Научная и практическая значимость. Описанные в работе варианты исполнения генератора ^{212}Pb обладают высокой технологической простотой,

что в перспективе обеспечивает автоматизацию его работы, доступность производства в серийном цикле для расширения возможностей получения ^{212}Pb для исследований. Разработанные методики получения меченых комплексов, содержащих ^{212}Pb , позволяют перейти к аналогичным исследованиям по синтезу РФП, содержащих другие перспективные терапевтические α -эмиттеры. Показанная в работе кинетическая стабильность молекул ^{212}Pb]DOTATATE и ^{212}Pb]DOTA-HSA-ZHER2 свидетельствует о пригодности нарабатываемого на генераторе ^{212}Pb для использования в дальнейшей разработке технологии препарата.

Положения, выносимые на защиту:

- Лабораторный генератор ^{212}Pb на основе материнского ^{228}Th позволяет непрерывно получать целевой ^{212}Pb высокой радионуклидной чистоты, пригодный для синтеза комплексных соединений для исследований в области ядерной медицины.
- Нароботанный ^{212}Pb эффективно образует комплексные соединения с молекулами DOTATATE и DOTA-HSA-ZHER2, используемыми в молекулярно-прицельной терапии рака.
- Стабильность меченых соединений ^{212}Pb]DOTATATE и ^{212}Pb]DOTA-HSA-ZHER2 в физиологических средах сохраняется, что говорит о сохранении их терапевтического потенциала и в целом о пригодности радионуклида для получения перспективных соединений для таргетной терапии.

Основные результаты представлены в следующих **публикациях**:

1. Boldyrev P. P., Egorova B. V., **Kokov K. V.**, Perminov Yu. A., Proshin M. A., and Chuvilin D. Yu. Physical and chemical processes on the ^{212}Pb radionuclide production for nuclear medicine // Journal of Physics: Conference Series. – 2018. – Vol. 1099, ID 012003. – P. 1-7.
2. Chuvilin D. Yu., **Kokov K. V.**, Egorova B. V., Makoveeva K. A., Perminov Yu. A., and Proshin M. A. Synthesis and investigation of a preparation based on

^{212}Pb -labeled DOTATATE synthetic peptide for therapy of neuroendocrine tumors // AIP Conference Proceedings. – 2019. – Vol. 2101, ID 020021. – P. 1-8.

3. **Кокков К. В.**, Демченко А. Г., Егорова Б. В., Ларкин А. А., Люндуп А. В., Маковеева К. А., Моисеева А. Н., Панченко В. Я., Прошин М. А., Решетов И. В., Чувилин Д. Ю. Получение и исследование комплекса ^{212}Pb]DOTATATE для терапии нейроэндокринных опухолей // Медицинская физика. – 2019. – № 4 (84). – С. 52-59.

4. **Кокков К. В.**, Егорова Б. В., Ларкин А. А., Маковеева К. А., Перминов Ю. А., Прошин М. А., Чувилин Д. Ю. Лабораторный генератор радионуклида ^{212}Pb для исследований в области ядерной медицины // Прикладная физика. – 2020. – № 1. – С. 64-70.

5. **Kokov K.**, Demchenko A., Egorova B., Larkin A., Lyundup A., Makoveeva K., Moiseeva A., Panchenko V., Proshin M., Reshetov I., Chuvilin D. Production and Investigation of Radiopharmaceutical Nanoconstruction ^{212}Pb]DOTATATE for Therapy of Malignant Neoplasms // Journal of Surface Investigation X-ray Synchrotron and Neutron Techniques. – 2020. – № 14. – P. S99-S104.

6. Pankratov A. A., Nemtsova E. R., Plyutinskaya A. D., Vorontsova M. S., Chuvilin D. Yu., Egorova B. V., **Kokov K. V.**, Deev S. M., Lebedenko E. N., Proshkina G. M., Shul'ga A. A., Golovachenko V. A., Shegai P. V., Kaprin A. D. Specific Cytotoxicity of Targeted ^{177}Lu and ^{212}Pb -Based Radiopharmaceuticals // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – № 171. – P. 627-632.

7. **Kokov K. V.**; Egorova B. V.; German M. N.; Klabukov I. D.; Krashennnikov M. E.; Larkin-Kondrov A. A.; Makoveeva K. A.; Ovchinnikov M. V.; Sidorova M. V.; Chuvilin D. Y. ^{212}Pb : Production Approaches and Targeted Therapy Applications // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14, ID 189. – P. 1-21.

Результаты работы также были представлены на 13 конференциях: «Ломоносов-2017», «Ломоносов-2018», «Ломоносов-2019», «Производство α -эмиттеров в РФ и перспективы создания РФП на их основе» (2017, 2019), XV Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа,

Международная научная конференция «Physical and Chemical Processes in Atomic Systems» (2017, 2019), III Всероссийская конференция по молекулярной онкологии, IX Российская конференция по радиохимии «Радиохимия-2018», V Международная научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Isotopes: technologies, materials and application», «Радиофарма-2019», Международный симпозиум «Ядерная медицина», а также на 11-м Международном симпозиуме по таргетной α -терапии (г. Оттава, Канада, 2019), мировом научном мероприятии, посвященном вопросам таргетной терапии рака.

Структура и объем диссертации. Диссертация выполнена на 108 листах печатного текста и состоит из:

- введения;
- обзора литературных данных;
- главы, посвященной методической части работы;
- трех глав, посвященных основным результатам работы;
- заключения.

Список цитируемой литературы включает 129 источников. Работа содержит 28 рисунков и 8 таблиц.

Глава 1. Таргетная терапия злокачественных образований: производство радионуклида ^{212}Pb и использование терапевтических комплексов (обзор литературы)

1.1 Комплексные соединения и радионуклиды для таргетной терапии

Разработка Ж. Келлером и С. Мильштейном методики создания линии моноклональных антител (мАт), принесшая им Нобелевскую премию (1984 г.), открыла новую эру в биологии и медицине [6]. На базе этой методики начал разрабатываться многообещающий метод диагностики и лечения рака – иммунотерапия («адресная» доставка или «таргетная» терапия). Его суть состоит в том, что искусственно созданные антитела под определенные маркеры раковых клеток обладают специфической способностью направленной доставки к злокачественным клеткам прикрепленных к антителам препаратов. В качестве таких препаратов, или терапевтических агентов, могут выступать радионуклиды, излучение которых при распаде может приводить к гибели раковых клеток. В этом случае говорят о так называемой радиоиммунотерапии (РИТ), в то время как более общее наименование метода звучит как радионуклидная терапия (РНТ). В частности, в случае использования радиофармпрепаратов на базе синтетических пептидов, таких как октреотид и его модификации [7,8], говорят о пептидорецепторной радионуклидной терапии (ПРРТ).

Более глубокое понимание различий между раковыми и здоровыми клетками привело к разработке методов терапии, которые основаны на прямом действии на клетки опухоли с помощью моноклональных антител (мАт), специфичных к опухолевому антигену (см. рис. 1.1). Несмотря на то, что подобные методы показывают значительные успехи в лечении рака, существует острая потребность в увеличении их эффективности. Один из таких способов, как было сказано, состоит в присоединении к антителам высокотоксичных радионуклидов, благодаря чему энергия излучения нуклида расходуется прямо на уничтожение опухолевой клетки. В радиофармпрепаратах терапевтического назначения радионуклид является

основным лечебным началом, позволяющим локализовать лечебную дозу излучения непосредственно в органе-мишени или в пораженных клетках и, соответственно, обеспечить минимальное облучение окружающих здоровых тканей.

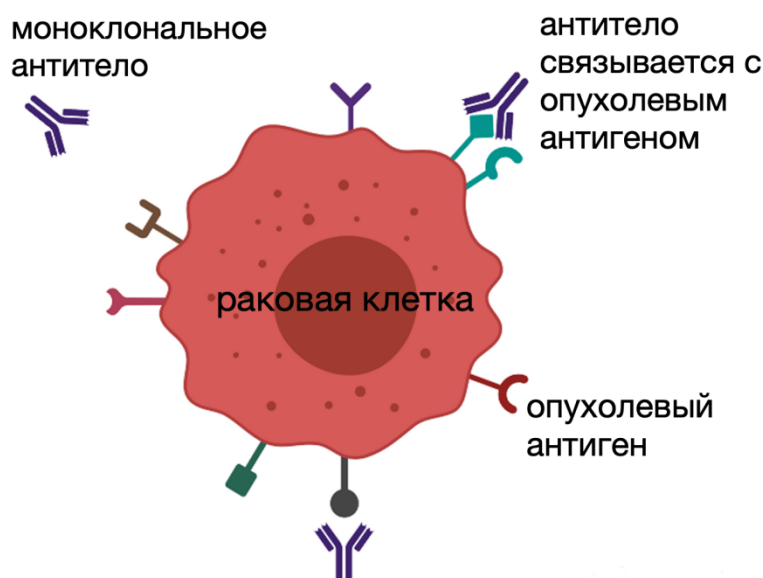


Рисунок 1.1. Моноклональное антитело атакует опухолевую клетку

Такие цитотоксичные радионуклиды (β - и α -эмиттеры) могут быть локализованы в пределах опухолевой ткани с целью терапевтического воздействия при помощи соответствующих адресных агентов. В качестве таких агентов, как было сказано, могут служить моноклональные антитела и их модификации, а также пептиды, связывающиеся с рецепторами на поверхности клеток. Одобрение Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США двух меченых моноклональных антител анти-CD20, ^{90}Y -меченного ибритумомаб тиуксетана (торговое название Зевалин) в 2002 году и ^{131}I -меченного тозитумомаба (торговое название Бексаар) в 2003 году являются своего рода историческими событиями в деле разработки меченых МАТ для терапии онкологических заболеваний [9]. Использование меченых антител рекомендовано не только в качестве самостоятельной лечебной практики, но также и в сочетании с другими методами терапии.

Ключ к использованию радионуклидов в медицине лежит в механизме радиационного поражения клеток. Ионизирующие излучения (ИИ) различных типов, потоки частиц или фотонов, проникая через живой объект, осуществляют на своем пути акты ионизации, разбивая молекулы на отдельные ионы, что в итоге наносит непоправимый вред клетке, прекращая ее жизнедеятельность либо сразу, либо через несколько циклов деления. Мерой воздействия ИИ на живой объект является затраченная излучением на ионизацию в определенной массе вещества энергия, которая носит название поглощенной дозы и измеряется в греях (Гр). Существует три основных механизма взаимодействия ИИ с клеткой [10]. Первым механизмом являются т.н. хромосомные aberrации – одиночные или двойные разрывы нитей спирали ДНК в месте акта ионизации. Вторым механизмом, приводящим к гибели клетки, является ионизационное повреждение внутриклеточных мембран, на которых осуществляются сложные процессы клеточного метаболизма органелл клетки. Наконец, третьим механизмом служит образование большого количества свободных радикалов и перекисей, которые со временем образуют ядовитые для структур клеток соединения. Повреждения ДНК могут быть вызваны как эндогенными (например, ошибки репликации ДНК), так и экзогенными факторами, такими как ионизирующее излучение (ИИ) или воздействие некоторых химических веществ. Существует несколько разновидностей повреждений ядерной ДНК: сшивки внутри одной цепи и между двумя цепями, сшивки ДНК с обслуживающими ее белками, а также одно- и двунитевые разрывы. Двунитевой разрыв является наиболее токсичным повреждением для клетки и представляет собой одновременный разрыв двух комплементарных цепей ДНК в одном и том же месте [11].

При воздействии ИИ на клетку однострелевой разрыв ДНК может возникнуть как во время прямого столкновения высокоэнергетической частицы или фотона с цепью, так и в результате столкновения цепи со свободными радикалами. Такие радикалы образуются при расщеплении ионизирующим излучением молекул воды, находящихся вблизи ДНК [12]. При

возникновении двунитевого разрыва клетка напрягает множество внутренних ресурсов для его устранения, поскольку некоторое количество «незалеченных» разрывов приводит к неминуемой клеточной гибели. Отсюда видно, что двунитевой разрыв является наиболее токсичным повреждением ДНК для клетки, и процесс его репарации наиболее трудоемок. В этой связи намеренная генерация двунитевых разрывов в раковых клетках-мишенях путем воздействия ИИ является эффективным инструментом уничтожения клеток и, как следствие, опухоли.

α - и β -излучение отличается так называемая линейная передача энергии (ЛПЭ) – способность излучения каждого вида передать веществу на участках своего пути одинаковой длины меньшее или большее количество энергии, то есть, осуществить меньшее или большее число актов ионизации. Поток β -излучения способен осуществить лишь одиночные хромосомные повреждения, в то время как α -излучение способно вызвать множественные двунитевые разрывы ДНК. Таким образом, использование α -излучающих радионуклидов (α -эмиттеров) позволяет заметно уменьшить возможность репарации ионизационных поломок клеткой и, следовательно, увеличить биологический эффект излучения. Вместе с тем β -эмиттеры широко используются как в диагностике, так и в терапии рака. Наиболее распространенные радионуклиды для диагностики: ^{123}I , ^{201}Tl , ^{111}In , ^{68}Ga – а также ряд радионуклидов для ПЭТ-томографии [13].

Одним из используемых радионуклидов для диагностики является ^{111}In ($T_{1/2}$ 2,83 д). В частности, сцинтиграфия с аналогами соматостатина, меченными ^{111}In , применяется за рубежом уже довольно давно при проведении диагностического поиска опухолей нейроэндокринной системы. В нашей стране был разработан аналогичный препарат под названием «Октреотид- ^{111}In » (торговое название Октреоскан) активностью 185 МБк [14]. Вместе с тем, в настоящее время Октреоскан активно заменяется на октреотид, меченный ^{68}Ga (^{68}Ga -ДОТА-ТАТЕ и ^{68}Ga -ДОТА-НОС) из-за ряда преимуществ ^{68}Ga , получаемого из генератора на основе ^{68}Ge , и техники ПЭТ. В целом,

существует целый ряд синтетических аналогов соматостатина, так или иначе являющихся химическими модификациями октреотида [15]. В частности, широкое применение находит так называемый Tyr^3 -октреотат, который и используется в настоящей работе. Tyr^3 -октреотат улучшает нацеливание на определенные типы опухоли. Разновидности аналогов соматостатина в зависимости от их строения (последовательности аминокислот) имеют разные наименования, такие как ланреотид, вапреотид и др. [16]. Кроме того, клинические исследования показали, что с помощью меченого октреотида можно обнаружить как минимум 80% всех известных гастроэнтеропанкреатических эндокринных опухолевых областей и до 90% карциноидных опухолей [17].

Несколько β -эмиттеров используются в исследованиях с терапевтическими РФП, однако наиболее распространенным является радионуклид ^{177}Lu [18]. Растущий интерес к разработке радиофармпрепаратов на основе ^{177}Lu обусловлен, во-первых, пригодностью его ядерных характеристик для использования в радиоиммунотерапии, и, во-вторых, хорошо изученной химией мечения. Кроме того, использование РФП с ^{177}Lu позволяет проводить дозиметрию в режиме реального времени, так как ^{177}Lu испускает γ -излучение низкой энергии. Поскольку ^{176}Lu обладает высоким сечением поглощения нейтронов (2100 бн), облучение нейтронами мишеней обогащенного ^{176}Lu , проводимое в реакторах со средним потоком, позволяет получать большие количества ^{177}Lu требуемой активности [19,20]. Как показали различные исследования, β -излучение ^{177}Lu является приемлемым для таргетной терапии небольших опухолей и микрометастазов [21–23]. Доставка в лечебные учреждения, удаленные от места производства ^{177}Lu , возможна без больших потерь активности, поскольку период полураспада этого нуклида составляет 6,7 дней. Кроме того, такой период полураспада также является приемлемым с точки зрения *in vivo* характеристик локализации адресной биомолекулы, в частности моноклонального антитела [24]. Первый из зарегистрированных радиофармацевтических препаратов для

пептидорецепторной радионуклидной терапии (торговое название Lutathera) был одобрен в 2017 г. для лечения гастроэнтеропанкреатических нейроэндокринных опухолей. РФП представляет собой меченый комплекс $[^{177}\text{Lu}]\text{DOTATATE}$. Меченые пептиды, такие как $[^{177}\text{Lu}]\text{DOTATATE}$ выводятся, главным образом, через почки, при том что в некоторой степени они реабсорбируются и удерживаются в почках [25]. Таким образом, одним из главных ограничивающих факторов использования меченых β -эмиттерами пептидов является почечная токсичность. В целом препараты на основе $[^{177}\text{Lu}]\text{DOTATATE}$, показывают хорошие результаты как с точки зрения локализации опухоли, так и с точки зрения выживаемости пациентов [26,27].

В качестве связующего звена между радионуклидом и адресной биомолекулой служат так называемые бифункциональные хелатирующие агенты (БФХА), представляющие собой простые хелаторы с реакционноспособными функциональными группами, которые могут связываться с нацеливающими векторами (пептидами, антителами, т.д.), и по этой причине также играют одну из ключевых ролей в таргетной радионуклидной терапии. БФХА должны придавать высокую *in vivo* стабильность меченой биомолекуле для обеспечения минимальной дозы облучения на нецелевые органы. Выбор БФХА, таким образом, зависит от термодинамической и кинетической стабильности комплексов, содержащих включенный радиоактивный ион металла [28]. Макроциклический хелатор DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота) и его аналоги являются наиболее подходящими БФХА для мечения биомолекул такими нуклидами, как ^{90}Y и ^{177}Lu [29,30]. Существует несколько принципиальных требований к хелаторам. Требуется высокая термодинамическая устойчивость образуемых комплексов, поскольку химические концентрации РФП в организме составляют величину 10^{-15} - 10^{-12} М, что делает диссоциацию комплекса катион-хелатор вероятной. Кроме того, важна кинетическая устойчивость комплексов, так как в биологической среде присутствует большое количество конкурирующих за хелатор катионов

микроэлементов, а также различные комплексоны для связывания катиона радионуклида (сывороточные белки, ферменты и др.), содержание которых на порядок превышает концентрацию молекул РФП. Наконец, радионуклиды, применяемые в ядерной медицине, характеризуются относительно короткими периодами полураспада, от нескольких минут до дней. Поэтому убыль радиоактивности при синтезе РФП должна быть минимальной, что требует быстрой подготовки радионуклида и, собственно, быстрого образования комплекса с хелатором (конъюгатом). Эти три основных требования ставят условия на характеристики существующих и перспективных хелаторов.

Радионуклидная терапия с α -эмиттерами ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi или ^{212}Pb (*in vivo* генератор ^{212}Bi) в качестве терапевтических агентов рассматривается как перспективный метод лечения рака, начиная с 1980-х годов [31]. α -частицы демонстрируют высокую цитотоксичность, а именно, в экспериментах *in vitro* было показано, что при однократном пересечении α -частицей ядра клетки вероятность ее поражения составляет 20-40% [32–34]. Относительная биологическая эффективность (ОБЭ) излучения с высоким ЛПЭ демонстрирует независимость от мощности дозы и эффективна даже при условиях гипоксии, т.е., независимо от фазы клеточного цикла и концентрации кислорода в клетке. α -частица характеризуется плотным ионизирующим треком, что, как было сказано, позволяет говорить о возникновении с большой вероятностью двунитевых разрывов ДНК, практически не поддающихся репарации клеткой [35–39]. Одиночная раковая клетка может, теоретически, быть умерщвлена путем взаимодействия только с единственной α -частицей, проходящей через ядро этой клетки [40–42]. Ряд доклинических исследований показал, что α -эмиттеры могут быть более эффективными по сравнению с β -эмиттерами при условии их введения в организм в соответствующих количествах [43,44]. Однако, главными препятствиями на пути широкого внедрения в клиническую практику αAt и пептидов, меченых α -эмиттерами, являются высокая стоимость и ограниченная доступность последних. В то время как существует более чем 100 α -излучающих радионуклидов, лишь

немногие из них пригодны для применения в ядерной медицине. Большинство из них обладает периодом полураспада, являющимся слишком коротким или слишком длинным для применения с учетом условий клинической практики. Кроме того, их производство экономически затруднительно, либо же еще не разработана приемлемая для этих изотопов химия мечения. В связи с этим наиболее часто используемыми на практике изотопами являются ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi и ^{225}Ac . ^{212}Bi и ^{212}Pb являются многообещающими терапевтическими радионуклидами, обладающими хорошо описываемой химией комплексообразования с антителами, и относительно легко могут быть произведены с помощью лабораторных генераторов, наиболее распространенным видом которых является в настоящее время $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ -генератор, который будет рассмотрен ниже более подробно.

Применение α -эмиттеров, таких как ^{213}Bi или ^{225}Ac в пептидорецепторной радионуклидной терапии вызывает огромный интерес. Несмотря на обозначенную выше эффективность пептидов, меченных ^{177}Lu , некоторые из опухолей обладают радиорезистивностью к β -излучению. Пептиды, меченные α -эмиттерами, могут обеспечить терапевтический эффект при воздействии на метастатические, химиорезистентные и гипоксические НЭО, обладающие радиорезистивностью. Ряд доклинических исследований [45–47] показал эффективность и умеренную токсичность α -эмиттеров, при этом клинических испытаний пока проведено недостаточно много. В частности, впервые [^{213}Bi]DOTATOC был использован для лечения пациентов с метастазами опухоли, резистентными к [^{90}Y]/[^{177}Lu]DOTATOC [48]. Устойчивый эффект наблюдался у всех пациентов, подвергавшихся введению препарата, в течение более 2 лет наблюдений. Тем не менее, излучение с высокой линейной передачей энергии может приводить к различным и менее поддающимся репарации повреждениям, которые вероятно могут в дальнейшем вызывать образование вторичных новообразований [49].

Радионуклид ^{212}Pb служит в качестве *in vivo* генератора α -эмиттера ^{212}Bi , тем самым «увеличивая» его короткий период полураспада с 56 мин до 10,6 ч.

Главным преимуществом мечения ^{212}Pb вместо ^{212}Bi является то, что посредством ^{212}Pb поглощенная в мишени доза на единицу введенной активности более чем в 10 раз больше по сравнению с ^{212}Bi и ^{213}Bi [50]. Период полураспада ^{212}Pb , равный 10,6 ч, также делает более простым приготовление РФП и его введение, а также дает возможность более удобно и эффективно провести все операции по производству РФП по сравнению с короткоживущим ^{212}Bi .

Первые работы о возможности терапевтического применения ^{212}Pb начали появляться с конца 1980-х годов [51–54]. Для *in vivo* исследований использовали мышей с трансплантированными эпителиальным раком яичников и раком Эрлиха. Для изучения характера опухолей брюшной полости использовали внутрибрюшинную инъекцию. Опухоль подвергалась воздействию меченых коллоидов гидроксидов железа, а именно, 15-50 мкКи (555 кБк–1850 кБк) в форме $[\text{}^{212}\text{Pb}]\text{Fe}(\text{OH})_2$ демонстрировали существенное увеличение периода выживаемости мышей, тогда как у 24% наблюдалась полная ремиссия. Однако, неоднородное распределение массы коллоидов, приводящее к их неравномерному биораспределению, привело к сорбции активности на толстой кишке и соответствующим некротическим поражениям.

Большинство дальнейших исследований с ^{212}Pb проводилось с молекулами-мишенями: пептидами и моноклональными антителами, обладающими специфичностью к определенным антигенам на поверхности тех или иных раковых клеток. В этой связи для безопасного применения высокотоксичного альфа-излучения для начала требовалось определить диапазон применимых доз, или т.н. толерантную дозу (предельную дозу от терапевтического средства, не вызывающую неприемлемых побочных эффектов). Толерантные дозы оценивались в различных работах [55–57], кроме того, эмпирически было показано, что эффективность радиоиммунотерапии на основе ^{212}Pb существенно зависит от размера и/или возраста трансплантированной опухоли. Наиболее вероятно, что этот эффект

вызван отсутствием перекрестного эффекта (cross-fire) альфа-излучения по сравнению с бета-излучением, что в принципе делает терапию крупных опухолей ^{212}Pb малоэффективной. Следует отметить, что присутствие β -частиц ($E_{\beta\text{max}} = 574$ кэВ), испускаемых самим ^{212}Pb не создает эффект cross-fire. Это, очевидно, объясняется активностью вводимого ^{212}Pb (на уровне МБк) по сравнению с уровнями активности ГБк для традиционных β -излучающих радиофармпрепаратов с ^{177}Lu ($E_{\beta\text{max}} = 498$ кэВ) и ^{90}Y ($E_{\beta\text{max}} = 2280$ кэВ) [58,59]. В экспериментах *in vivo* использовались активности ^{212}Pb не выше 20–40 мкКи (740–1480 кБк) [60–65].

Моноклональные антитела, меченные ^{212}Pb , выводятся без удержания в органах и, соответственно, не происходит облучения здоровых тканей. Однако, был выявлен токсический эффект на ткань костного мозга, который связан с метаболическими процессами после интернализации меченого антитела в злокачественной клетке [57]. Кроме того, диссоциация меченого антитела приводит к накоплению Pb^{2+} в печени, накапливающей радионуклид после диссоциации ^{212}Pb DOTA–mAb в кислой среде. Поэтому для комплексообразования с Pb^{2+} был предложен новый хелатор TCMC, комплексы с которым являются более устойчивыми в кислых условиях комплексами [66], что делает его более предпочтительным по сравнению с DOTA в составе комплексов с ^{212}Pb . По этой причине конъюгат TCMC с трастузумабом был тщательно исследован в ряде работ [62,63,67–69].

Доклинические исследования комплексов на основе синтетических пептидов, меченных ^{212}Pb , начали проводиться лишь недавно [70,71]. Биоконъюгат DOTAMTATE (TCMC-TATE) был исследован в рамках доклинических исследований на животных для терапии НЭО [70]. В рамках исследования максимальная толерантная доза ^{212}Pb DOTAMTATE в 20-40 мкКи. Было показано, что значительную роль играет режим фракционирования вводимых инъекций препарата с различным периодом между инъекциями: введение 3-15 мкКи приводит к 100% выживаемости мышей, при этом введение 2-20 мкКи и 1-40 мкКи обеспечивает только 50%

выживаемость через 30 недель после начала лечения из-за значительной гематологической токсичности [70]. Согласно успешным результатам этого доклинического исследования [^{212}Pb]DOTAMTATE для лечения нейроэндокринных опухолей клинические испытания были начаты в 2018 году и в настоящее время продолжаются [72]. Первые клинические испытания ^{212}Pb были проведены с 2011 по 2015 годы [73–75]. 18 пациентов со злокачественными новообразованиями, экспрессирующими рецепторы типа HER-2: раком яичников и толстой кишки – подлежали введению препарата на основе ^{212}Pb и HER-2-специфичных адресных молекул. Было показано, что при увеличении дозы стабилизация заболевания имела более выраженный и продолжительный характер [75]. Главный вывод этого исследования заключался в том, что даже самая высокая доза среди исследованных не вызывала серьезной гематологической, почечной или печеночной токсичности, что означает возможность увеличения дозы и использования этой терапии в сочетании с другими агентами [75].

1.2 Получение радионуклида ^{212}Pb

Как было сказано, особый интерес представляет радионуклид ^{212}Pb , поскольку сам он является β -эмиттером, но его дочерние нуклиды ^{212}Bi и ^{212}Po подвергаются α -распаду, благодаря чему ^{212}Pb рассматривается как *in vivo* генератор α -частиц [76]. ^{212}Pb принадлежит цепочке распада родительского ^{228}Th и может быть произведен с помощью лабораторных генераторов.

Выбор определенного α -излучающего нуклида для применения в ядерной медицине определяется следующими требованиями [77–79]:

- энергия излучаемых в процессе распада ДПР α -эмиттера β -частиц должна быть минимальной;
- энергия α -частиц должна быть такой, чтобы её пробег не превышал несколько клеточных диаметров;
- α -эмиттер должен обладать минимальным побочным излучением, т.е. выход α -частиц должен быть по возможности максимальным;

- период полураспада ($T_{1/2}$) должен быть достаточно большим для проведения операций выделения и всех необходимых процедур мечения и введения в организм, но, с другой стороны, достаточно коротким для оптимального времени лечения пациента и снижения риска токсичности;
- α -эмиттеры должны быть химически пригодны для молекулярного мечения, чтобы иметь прочную связь с молекулой-носителем.

Исходя из указанных требований, среди множества существующих α -излучающих радионуклидов, лишь немногие имеют потенциал для использования в радиотерапии. На сегодняшний день внимание исследователей более всего привлекают такие α -эмиттеры, как ^{211}At , ^{225}Ac , ^{223}Ra , ^{224}Ra , ^{212}Pb , ^{212}Bi и ^{213}Bi [77,78,80]. Большой интерес представляют радионуклиды с периодом полураспада в пределах 1 часа (^{212}Bi и ^{213}Bi), поскольку позволяют достичь наибольшей дозовой нагрузки на облучаемую ткань и свести к минимуму облучение здоровых тканей за счёт малого времени пребывания источника излучения в организме.

Специфические свойства цепочки распада того или иного радионуклида могут играть ключевую роль в методе производства интересующих дочерних радионуклидов. Например, ^{228}Th содержит газообразный ^{220}Rn в своей цепочке распада, благодаря чему дочерний ^{212}Pb может быть получен путем выделения газообразного ^{220}Rn . Далее в рамках обзора литературы была предпринята попытка систематизировать методы получения ^{212}Pb , которые представляют научный и промышленный интерес, а также позволяют проследить эволюцию идей по производству этого перспективного радионуклида. Также будут рассмотрены некоторые способы получения родительских радионуклидов ^{212}Pb , а именно ^{228}Th и ^{224}Ra . Сведения представлены в виде подпунктов, каждый из которых посвящен отдельному классу методов, при этом в пределах одного класса методы получения представлены в хронологическом порядке.

Разделение ^{220}Rn и материнских радионуклидов. Одна из первых методик выделения дочерних радионуклидов ^{228}Th , была представлена в 1930-

х годах [81,82]. Было обнаружено, что бариевые соли жирных кислот продемонстрировали наличие чрезвычайно высокой эманлирующей способности для ^{222}Rn и ^{220}Rn [81]. Сухой порошкообразный материал с коэффициентом эманирования, близким к 100%, оказался удобным источником для генераторов, основанных на принципе выделения ^{220}Rn для последующего получения ^{212}Pb путем его распада в отдельном объеме. В работах [83] и [81] было изучено влияние изменений давления газа и поверхностной плотности слоя на коэффициент эманирования. Плотность слоя сухих источников радона и его изотопов представляет собой ключевой параметр для достижения высокого коэффициента эманирования, а именно, очевидно, что выход газа увеличивается с истончением слоя. В работе [82] предприняли попытку разработать универсальный источник ^{220}Rn для получения его короткоживущих дочерних радионуклидов для экспериментальных исследований. В работе использовали метиловый спирт в качестве растворителя, что позволило осадить взвесь частиц $[\text{}^{228}\text{Th}][\text{Ba}(\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2)]$ (стеарат бария) с химическим выходом 99,5% при комнатной температуре. Такой источник ^{220}Rn далее помещался в колонку с отверстиями для входа и выхода газа между двумя тефлоновыми и стальными дисками с диаметрами пор 9 и 5 микрон, соответственно. Когда комнатный воздух проходил через такой тонкий источник ^{220}Rn , выход превышал значение 95%. В дальнейшем источники этого типа использовались при исследовании образования аэрозольных частиц с ионами дочерних радионуклидов ^{220}Rn [84,85]. Также этот принцип был реализован в [86]. Порошок гидроксида природного тория служил источником ^{220}Rn для исследования коэффициентов диффузии его дочерних радионуклидов при различных значениях влажности. Аргон или чистый комнатный воздух пропускали в баллон с источником, после чего ионы ^{220}Rn перемещались из объема с исходным источником в расположенный далее детектор частиц.

Примечательный подход был предложен в [87] на основе вышеупомянутого явления высокого коэффициента эманирования радона из

соли стеарата бария. В рамках этого подхода сухой нитрат ^{228}Th был использован для синтеза $[\text{}^{228}\text{Th}][\text{Ba}(\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2)]$ согласно [82]. После осаждения взвеси частиц он был завернут в специальные мембранные фильтры, образуя своеобразные «пакеты». Суть установки заключалась в том, чтобы поместить исходные пакеты в объем камеры для сбора желаемых продуктов распада ^{220}Rn на ее стенках. Однако коэффициент выхода ^{212}Pb при активности источника 40-50 МБк снизился с 50% до 11% в течение 1 года из-за радиолитического повреждения сухого источника ^{228}Th .

Чтобы избежать разрушительных эффектов радиолиза, была предпринята попытка создать источник с низким отношением радиоактивности к массе [88]. Он был основан на концепции сбора ^{220}Rn , эманлирующего из $[\text{}^{232}\text{Th}/\text{}^{228}\text{Th}]$ стеарата бария, и состоял из двух первичных отсеков, источника ^{228}Th и сборщика ^{220}Rn . $[\text{}^{228}\text{Th}]$ стеарат бария был сложен тонкими слоями внутри емкости специальной конструкции. Через него непрерывно пропускали сухой воздух, направляя газообразный ^{220}Rn клетки в стеклянный барботер, который служил сборщиком ^{212}Pb , с метанолом или н-гексаном при температурах ниже точки конденсации ^{220}Rn . После его конденсации и распада до ^{212}Pb последний может быть выделен для дальнейшего использования путем восстановления в растворе HNO_3 . Итоговая эффективность установки составила приблизительно 70%, и теоретически она может обеспечивать активность ^{212}Pb до 1,2 Ки, однако существуют некоторые проблемы с удобством для персонала и безопасностью такой установки.

Электростатическое осаждение. Вместе с тем один из первых подходов был основан на принципе сбора посредством электрического притяжения и адсорбции ионов дочерних радионуклидов [89]. Пластины, на которые подавались противоположные потенциалы, были помещены в литровой бутылки. На положительную алюминиевую пластину помещали гидроксид ^{228}Th . Разность потенциалов между положительной пластиной и отрицательной платиновой катушкой составляла значение от 1200 до 1500 В. При этих условиях происходило перемещение положительно заряженных

ионов ^{212}Pb к отрицательной пластине с последующим растворением активности, в частности, в азотной кислоте концентрации 3 М. Итоговая эффективность установки составила порядка 20%, в связи с чем потребовались другие методы эффективного производства ^{212}Pb . Вопрос о наличии ионов ^{224}Ra на поверхности катушки не был прояснен. Гидроксид ^{228}Th был получен осаждением из раствора $^{228}\text{Th}(\text{HNO}_3)_4$. Далее был предложен подход для получения дочерних радионуклидов ^{228}Th в [90]. Химически очищенный ^{232}U без носителя электростатически осаждали на стальной пластине и хранили в течение 4 лет для накопления дочерних нуклидов. После размещения этого источника на расстоянии 0,2 мм от слюдяного материала-приемника последние, будучи ядрами отдачи, начали накапливаться в материале для дальнейшего применения. После такого облучения материала в вакуумной камере α -спектрометрический анализ показал, что ^{232}U -пиков не наблюдается на поверхности мишени, что служило доказательством, что все ионы были перенесены к поверхности только за счет эффекта отдачи. Таким образом, этот подход не может быть использован для производства единственно радионуклида ^{212}Pb .

Далее, в эпоху 2010-х методы получения ^{212}Pb и родственных ему радионуклидов продолжали разрабатываться. Был разработан перспективный метод лечения опухолей, названный диффузной α -эмиттерной лучевой терапией [91]. После нанесения ^{228}Th на поверхность кремния с помощью выпаривания раствора HCl , содержащего ^{228}Th , его ДПР ^{224}Ra покидает (20-30%) поверхность и из-за наличия потенциала (2-3 кэВ) на стальной акупунктурной игле осаждается на ней. Несмотря на относительно низкую вероятность десорбции ^{224}Ra с поверхности кремния, доля атомов, достигающих игл, составляет более 95% при расстоянии 5-15 мм между источником ^{224}Ra и иглой. Затем эти иглы используются для противоопухолевых процедур в соответствии с протоколами брахитерапии.

Наконец, в работе [92] представлен способ гальванизации нитрата тория, $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$, на диск из нержавеющей стали, находящийся в ванночке с 1 М

HNO_3 . Далее в [93] описано использование ^{228}Th для калибровки кремниевых детекторов. В частности, ^{228}Th был подвергнут гальванизации на поверхности платины, затем в процессе эманирования ^{220}Rn образующийся ^{212}Pb в итоге осаждался на отрицательно заряженных штыревых электродах.

Химические методы. В одной из первых работ [94] ^{228}Th было получено с помощью обработки технического мезотория, полученного из руд, содержащих продукты распада ^{232}Th , ^{238}U . Кроме того, в работе [95] раствор ^{228}Th в 3 М HNO_3 был использован для разработки генератора для получения ^{224}Ra без носителя. В частности, после выпаривания остаток ^{228}Th растворяли в 0,1 М HCl и затем пропускали через смолу Chromosorb W с последующим элюированием ^{224}Ra с выходом приблизительно 75%.

Новый подход к производству ^{212}Pb с помощью ионообменной хроматографии был представлен в [96]. Генератор состоял из двух основных частей: первая колонка с абсорбентом Na_2TiO_3 и вторая колонка с катионообменной смолой D-50. ^{228}Th вместе с изотопом ^{224}Ra (на уровне до 1 мКи) были абсорбированы в первой колонке путем пропускания содержащего их разбавленного раствора соляной кислоты. Элюирование ^{220}Rn проводили с помощью H_2O с последующим нанесением ^{212}Pb во второй колонке. Затем из второй колонки возможно элюировать ^{212}Pb раствором 2 М HCl с максимальным выходом до 85%. К сожалению, данный подход обнаружил ряд недостатков, а именно, не исключена вероятность утечки ^{228}Th по системе через вторую колонку.

По этой причине авторы разработали улучшенный генератор ^{212}Pb [97]. Он базируется на использовании ^{224}Ra с гораздо более коротким (3,6 дня) периодом полураспада в качестве родительского источника. Разделение ^{224}Ra и ^{228}Th ранее было проведено с использованием анионообменной смолы путем образования молекул анионов нитрата ^{228}Th в концентрированной HNO_3 . А именно, после двойной перколяции ^{228}Th -содержащего раствора через обменную колонку он выпаривался, после чего ^{224}Ra с продуктами его распада элюировался 0,1 М раствором HCl для последующего использования в

генераторе ^{212}Pb . Основным узлом генератора является тефлоновая трубка с катионообменной смолой AGMP-50 с общим объемом слоя смолы 150 мкл.

Генератор можно элюировать 0,5-2 М HCl или 0,2-2,0 М HI с выходом 50% и 90% для ^{212}Bi и ^{212}Pb , соответственно. В случае «свежего» генератора проскок родительского ^{224}Ra составляет менее 1 ppm, а проскок в «отработанной» установке по причине радиолиза увеличился, но был менее 0,04%. Этот генератор позволяет работать с уровнями активности до 15 мКи, что, по сути, является минимально необходимым значением для терапевтического использования ^{212}Pb [88]. $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ -генератор уже более 30 лет используется для исследований с радионуклидом ^{212}Pb [60,71,98–101]. В настоящее время он широко поставляется фирмами OranoMed LLC. (Франция), а также ORNL (США) [98,102–104]. $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ -генератор от OranoMed LLC. позволяет элюировать свинец 0,4 М ацетатом аммония [105].

Стоит отметить вопросы об очистке раствора после смыва радионуклидов. В то время как авторы $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ -генератора предложили собственную процедуру получения ультрачистого раствора для предполагаемых реакций с адресными молекулами, исследователи [106] предложили другой удобный подход для удаления любых следов из конечного раствора $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ -генератора. Элюат перколировали через колонку, заполненную катионообменной смолой Dowex-50X8-100, для удаления остаточного ^{224}Ra , затем полученный элюат пропускали через анионообменную колонку Dowex-1X-200, чтобы позволить всем исходным остаткам смолы и фрагментам уйти с этим элюатом, и наконец, элюировали ^{212}Pb из этой анионообменной колонки 2 М HCl для дальнейшей обработки.

В [107] авторы разработали новую методику, в которой двойной каскад из двух последовательных ионообменных колонок позволял получать раствор высокой радионуклидной чистоты. А именно, после прохождения раствора с родительскими и дочерними радионуклидами через колонку, специфичную к дочерним радионуклидам, через «дочернюю» колонку проходил элюент, который, захватив дочерние ионы, пропускаясь через колонку, специфичную

к родительским радионуклидам, для дополнительной очистки элюата от родительских изотопов.

В [108] был разработан генератор для производства ^{212}Pb и ^{224}Ra из ^{228}Th . Преподготовленная раствором 4 М HNO_3 последовательная комбинация колонок, содержащих смолы UTEVA, Sr resin и Prefilter resin загружалась раствором ^{228}Th с ДПР. ^{228}Th удерживается UTEVA смолой и ^{212}Pb удерживается на смоле Sr resin, в то время как ^{224}Ra проходит через колонки без сорбции. Затем следует элюирование ^{212}Pb и ^{228}Th , однако, высокая эффективность генератора была продемонстрирована не с ^{228}Th , а с использованием ^{227}Th и его ДПР ввиду отсутствия ^{228}Th у авторов. Также была предпринята попытка [109] выделить ^{212}Pb из ^{232}U в рамках двухэтапной процедуры. Во-первых, ^{224}Ra элюировали 0,1 М HNO_3 из колонки HDEHP с нанесенным ^{232}U . Далее ^{212}Pb был отделен от ^{224}Ra на катионообменной смоле Dowex 50x8 путем элюирования раствором 1,0 М HCl .

Стоит упомянуть про метод получения ^{212}Pb с использованием ^{228}Ra [110]. Гидроксид металлического тория осаждали с помощью аммиака из нитрата металлического тория с целью разделения ^{232}Th от ^{228}Ra , остающегося в растворе, с его последующей анионообменной очисткой в 8 М HNO_3 . Далее, сам генератор состоит из двух ионообменных колонок, первая из которых специфична к ^{228}Ra (смола Dowex 50x8), после пропускания через которую элюат проходит вторую колонку (Dowex 1x8) для сбора ^{212}Pb . Он может быть повторно выделен и сконцентрирован растворами HBr .

В настоящее время компания OranoMed LLC. (Франция) успешно реализует извлечение ^{212}Pb из соли металлического тория, образующейся в ядерных реакторах [103]. Эффективное разделение, очистка и концентрирование ДПР ^{232}Th являются большим подспорьем в области производства и широкой доставки $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ генераторов [103]. Также следует отметить, что $^{212}\text{Pb}(\text{HNO}_3)_2$ коммерчески доступен от OranoMed LLC [111].

Несмотря на различные преимущества этих генераторов, использующих различные катионные и анионообменные свойства дочерних изотопов ^{228}Th ,

они могут представлять неудобство для некоторых областей применения по причине относительно короткого периода полураспада ^{224}Ra (3,6 д) и, как следствие, необходимости перезагрузки каждые 2-3 недели.

Описанные методы получения обозначенных радионуклидов представлены в табл. 1.1 в хронологическом порядке, с указанием первого упоминания реализации метода в литературе. Отдельный интерес представляют методы работы с нитратом металлического тория, поскольку в настоящее время в США имеются запасы этого вещества в количестве 3200 тонн [112], или 6300 ГБк, что при наличии отлаженной методики выделения ^{228}Th обеспечивает неограниченную доступность последнего.

Таблица 1.1. Сводная таблица по литературным данным

№ п/п	Получаемый РН	Материнский радионуклид	Тип выделения	Ссылка (год)
1	^{220}Rn	^{228}Th	Удаление ^{220}Rn	1951 [81]
2	^{212}Pb	^{232}Th	Электростатическое осаждение ^{212}Pb	1959 [89]
3	^{228}Th	^{232}Th	Очистка ионным обменом	1962 [94]
4	^{220}Rn	^{228}Th	Удаление ^{220}Rn	1967 [82]
5	^{224}Ra	^{228}Th	Экстракционная хроматография	1974 [95]
6	^{220}Rn	^{228}Th	Удаление ^{220}Rn	1979 [85]
7	^{220}Rn	^{232}Th	Удаление ^{220}Rn	1979 [86]
8	$^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$	^{232}U	Ядра отдачи	1980 [90]
9	^{212}Pb	$^{228}\text{Th}/^{224}\text{Ra}$	Ионный обмен	1982 [96]
10	^{212}Pb	^{224}Ra	Ионный обмен	1988 [97]
11	^{212}Pb	^{228}Th	Диффузия ^{220}Rn	1994 [87]
12	^{212}Pb	^{228}Th	Удаление ^{220}Rn	2001 [88]
13	^{212}Pb	$^{228}\text{Th}/^{224}\text{Ra}$	Электростатическое осаждение ^{224}Ra	2007 [91]
14	$^{212}\text{Pb}/^{224}\text{Ra}$ (теоретич.)	^{228}Th (теоретич.)	Экстракционная хроматография	2011 [108]
15	^{212}Pb	^{232}U	Ионный обмен	2013 [109]

Ниже представлена динамика публикаций, связанных с использованием ^{212}Pb в ядерной медицине, включая статьи о генераторах и обзоры (рис. 1.2). Учитывались статьи, индексируемые в Web of Science и Scopus. Видно, что интерес к ^{212}Pb быстро растет, особенно в последнее десятилетие, что может свидетельствовать об обнадеживающих результатах доклинических и клинических исследований, о чем было сказано выше.

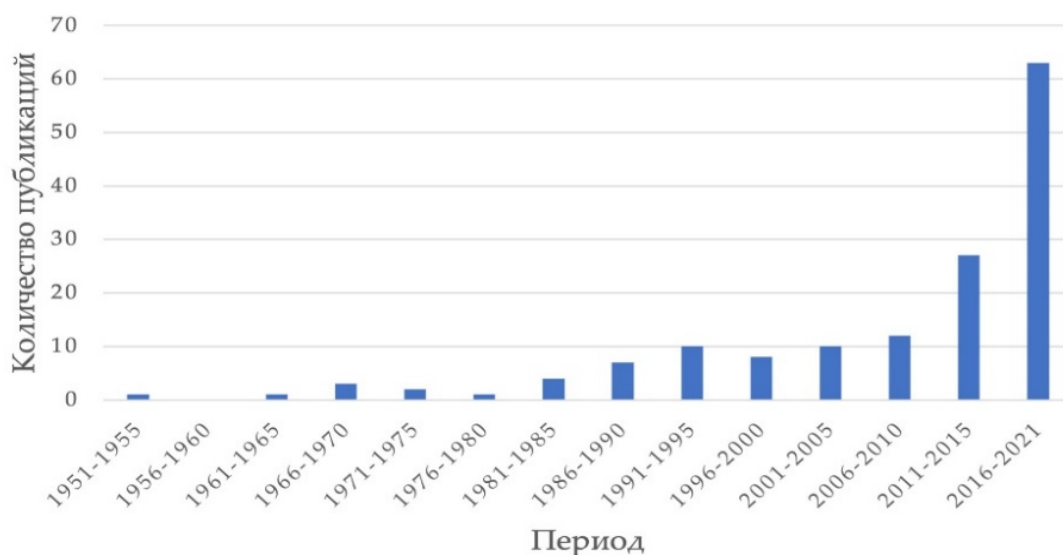


Рисунок 1.2. Динамика публикаций использования ^{212}Pb в ядерной медицине

Материал приведенного литературного обзора позволяет заключить, что на сегодняшний день разработка радиофармацевтических препаратов на основе ^{212}Pb для терапии онкологических заболеваний является актуальной задачей, и возрастающая необходимость в клиническом применении РФП говорит о потребности наличия простых, но эффективных методов для производства ^{212}Pb , интерес к которому только начинает нарастать ввиду его перспективности и, вместе с тем, постепенного преодоления препятствий по его ограниченной доступности. В этой связи представляется актуальным наличие технологически простой установки для получения ^{212}Pb высоких эксплуатационных характеристик, что значительно облегчит в будущем задачу широких поставок генератора на медицинские площадки. При этом желательно исключить использование концентрированных растворов кислот и экстремальных температур во время рабочего цикла.

Глава 2. Методическая часть

2.1 Реактивы и материалы

В работе использовали деионизованную воду 17,8 МОм×см (Медиана-фильтр). Все растворы приготавливались на основе этой воды. Все использованные в работе реактивы относились к классу особо чистых реагентов, с нормированным содержанием примесей катионов и анионов:

- Гидроксид натрия 50% NaOH (Компонент-Реактив)
- Соляная кислота 30% HCl (SigmaAldrich GmbH.)
- Хлорид натрия NaCl (SigmaAldrich GmbH.)
- Карбонат натрия Na₂CO₃ (Merck)
- спирт этиловый медицинский 95%

Также использовались:

- диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА) C₁₄H₂₃N₃O₁₀, M = 393,35 г/моль;
- ионообменная смола DOWEX 1×8, ×4, ×2 (Cl--форма, 200-400 mesh)

Синтетический пептид DOTATATE (DOTA-DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr) был любезно предоставлен НИЦ «Курчатовский институт» – ИРЕА, а также ЗАО «Синтез пептидов» в виде лиофилизата. Он представляет собой комплекс из синтетического октапептида октреотата, специфичного к рецепторам соматостатина типа SSTR2, и присоединенного к нему БФХА, способного образовывать прочные координационные связи с большим количеством катионов. В качестве такого хелатора была использована DOTA (1,4,7,10-тетраазоциклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусная кислота). Молекулярная масса DOTATATE составляет 1435,63 Да.

Рекомбинантный полипептид ZHER2 был предоставлен институтом биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). ZHER2 (молекулярная масса 8,2 кДа, специфическое связывание с HER2 с K_D = 22 пМ) наработан в

клетках *E. coli* BL21(DE3) [pET39-ZHER2-Cys] и выделен с помощью аффинной хроматографии.

Биоконъюгат ZHER2-ЧСА-ДОТА был получен и предоставлен ООО «Технологии медицинских полимеров». Конъюгат ЧСА-ДОТА получен путем конъюгации ЧСА с NHS-эфиром ДОТА (1,4,7,10-тетраазациклододекан тетрауксусная кислота), служащим в качестве хелатирующего агента и способным образовывать прочные координационные связи с катионами металлов. Полученный конъюгат ЧСА-ДОТА активирован гетеробифункциональным линкером sulfo-SIAB и конъюгирован с HER2-специфичным полипептидом ZHER2. В результате в качестве адресного носителя получен биоконъюгат ZHER2-ЧСА-ДОТА. Соотношение компонентов в полученных конъюгатах варьируется в зависимости от условий конъюгации. Состав конъюгата, использованного в настоящей работе: ZHER2-ЧСА-ДОТА (1-2 молекулы ZHER2 на 1 условную молекулу конъюгата; 4,1 молекулы ДОТА на 1 условную молекулу конъюгата; суммарная молекулярная масса ~90 кДа).

На протяжении всей работы использовались общепринятые консенсусные номенклатурные правила в области радиофармацевтической химии, изложенные в [113]. Изотопный состав тория, который выделяли из ^{233}U для дальнейшего использования в генераторе ^{212}Pb , составлял: ^{229}Th – 6,81%; $^{230}\text{Th} \cong 0,08\%$; ^{228}Th – следы; ^{232}Th – 93,11% [114].

2.2 Измерение активности радионуклидов

В связи с тем, что в цепочке распада родительского ^{228}Th на каждом этапе вплоть до образования ^{212}Pb все промежуточные компоненты являются α -эмиттерами (см. табл. 2.1), для определения радионуклидной чистоты наработанного образца использовался α -спектрометрический метод анализа. Радионуклидная чистота продукта является ключевым параметром при применении в ядерной медицине. Требуемая радионуклидная чистота регламентируется в фармакопейной статье или нормативной документации производителя РФП, также могут быть установлены пределы для

специфических примесей, при этом радионуклидные примеси, активность которых составляет не более 0,01 % от активности основного радионуклида в течение указываемого срока годности РФП, обычно не приводят.

Таблица 2.1. α -эмиттеры в ряду ^{228}Th (в скобках приведено значение квантового выхода) и их основные энергетические линии

Нуклид	Период полураспада	Энергия α -частиц, кэВ
^{228}Th	1,9116 лет	5340,36 (27,2 %)
		5423,15 (72,2 %)
^{224}Ra	3,66 сут	5448,60 (5,06 %)
		5685,37 (94,92 %)
^{220}Rn	55,6 с	6288,08 (99,886 %)
^{216}Po	0,145 с	6778,30 (99,9981 %)
^{212}Bi	60,55 мин	6050,78 (69,91 %)
		6089,88 (27,12 %)
^{212}Po	0,299 мкс	8784,37 (100 %)

Для α -спектрометрического анализа наработанного образца из выделенного раствора ^{212}Pb отбирали аликвоту 30 мкл и затем наносили на металлическую подложку таким образом, чтобы жидкость была равномерно распределена на поверхности в форме окружности диаметром 6 мм. Поверхностная активность ^{212}Pb при этом составляла порядка нескольких десятков кБк/см². После этого препарат высушивали в течение двух часов при комнатной температуре в вытяжном шкафу. Сухой остаток на подложке помещали в α -спектрометр ORTEC Alpha Suite Alpha Duo с разрешающей способностью до 20 кэВ, на расстоянии 1 см от детектора.

Активность всех радиоактивных образцов определялась по интегралам фото-пику γ -линий 239, 583 и 727 кэВ от распадов ^{212}Pb , ^{208}Tl и ^{212}Bi , соответственно, измеренных полупроводниковым Ge-детектором, соединенным с многоканальным анализатором (ORTEC GEM-25185). Сопроводительное программное обеспечение (ORTEC GammaVision) обеспечивало пересчет зарегистрированных сигналов от детектора в значение активности в Бк при условии помещения образца в калибровочную точку. Во всех случаях, за исключением измерения активности на пластинах ТСХ,

калибровочная точка располагалась в 20 см от поверхности детектора по его оси симметрии. В случае измерения активности фрагментов ТСХ-пластин, последние помещались на расстоянии 10 см от поверхности детектора, в каждом случае перпендикулярно оси симметрии. Это позволяло в терминах отношений cps более достоверно рассчитать значения радиохимического выхода реакции мечения. Время экспозиции на γ -спектрометре составляло от 1 до 60 мин, в зависимости от отклонения значения активности (или cps) соответствующего образца.

2.3 Синтез прототипов РФП

Для проведения реакции мечения комплексов использовали пробирки Eppendorf. В пробирку Eppendorf (1,5 мл), вносили необходимые количества раствора с радионуклидом в 0,1 М HCl и буферных растворов для создания подходящих значений pH. В каждом случае реакцию смесь термостатировали при различной температуре в течение соответствующего промежутка времени. Термостатирование сосудов с реакционными смесями проводилось в лабораторной печи фирмы BINDER с принудительной конвекцией, обеспечивающей точность поддержания температуры $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Детальные описания методик синтеза описаны в Главе 4.

2.4 Определение радиохимической чистоты прототипов РФП

Радиохимическая чистота представляет собой отношение активности радионуклида, который присутствует в препарате в заявленной химической форме основного вещества (то есть в составе комплекса с адресной молекулой), к общей активности радионуклида в этом препарате, выраженное в процентах. Определение радиохимической чистоты РФП, изготовленного в медицинской организации, перед введением пациенту является обязательным в большинстве развитых странах мира. Очевидно, контроль радиохимической чистоты необходимо проводить и на этапе получения прототипов РФП для первичного контроля методики на предмет обеспечения допустимого уровня радиохимической чистоты.

Радиохимическую чистоту прототипа препарата на основе DOTATATE определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинах TLC-SG (Pall Corporation) с 0,1 М водным раствором лимонной кислоты/цитрата натрия ($C_6H_8O_7/Na_3C_6H_5O_7$) в качестве подвижной фазы, в которой несвязанный с пептидом радионуклид продвигается с фронтом подвижной фазы, а комплекс радионуклида с пептидом остается на старте [115].

В пробирку 50 мл помещали 2 мл подвижной фазы. Пластины ТСХ разделялись на полосы размером $1,5 \times 10$ см, каждая из которых маркировалась на расстоянии 1,5 см от одного из краев пластины для обозначения старта. На старт пластины порциями по 6 мкл наносилось 6-18 мкл исследуемого раствора, после чего пластина помещалась в пробирку с элюентом так, что край пластины опускался на 2-3 мм в элюент, в то время как пятно от образца оставалось выше уровня элюента. По достижении элюентом верхнего края пластины, она подвергалась высушиванию в вытяжном шкафу в течение 20 мин. Затем полосы разрезали на две части: стартовую (0-2,5 см от нижнего края) и остальную (2,5-10 см) – соответствующие связанному с пептидом и свободному радионуклиду. Активность радионуклида на каждом фрагменте пластины измерялась на детекторе из сверхчистого германия с многоканальным анализатором. Выход реакции мечения определялся отношением сигнала (cps) на фрагменте пластины со стартом к значению сигнала, измеренного на всей пластине. Для более точного разделения пластин проводилась процедура проведения цифровой автордиографии для визуализации геометрического места компонентов активных образцов. Снимки исполнялись на приборе Cyclone Storage Phosphor System, с программным сопровождением OptiQuant. Вышесказанное более ясно иллюстрирует рис. 2.1.

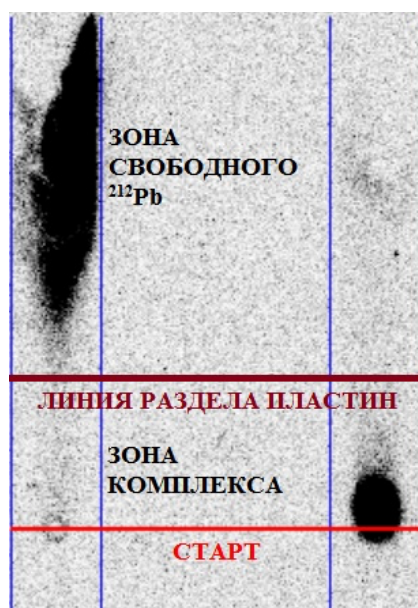


Рисунок 2.1. Снимок, полученный на автордиографической системе. Левая пластина – образец «свободного» ^{212}Pb , правая пластина – ^{212}Pb]DOTA-TATE

Поиск наиболее подходящих условий проведения тонкослойной хроматографии для определения радиохимического выхода реакций мечения проводили с более долгоживущим радионуклидом ^{210}Pb , который выделяли с помощью экстракционной хроматографии на Sr-resin (Triskem Inc.) согласно методике, описанной во многих работах (напр., см. [116]). Коротко, раствор ^{226}Ra с дочерними радионуклидами в 1 М HNO_3 загружали на колонку, заполненную смолой Sr-resin, которая предварительно была уравновешена с 1 М HNO_3 . Для смыва радия, полония и висмута использовали 0,1 М HNO_3 . Наличие следовых количеств ^{214}Bi и ^{210}Bi из исходного раствора в фракциях ^{210}Pb не оказало влияния на исследование ввиду проведения эксперимента более чем через 30 дней после выделения, когда ^{214}Bi уже полностью распался, а ^{210}Bi , будучи дочерним радионуклидом ^{210}Pb , практически (>90%) находится в состоянии радиоактивного равновесия с ^{210}Pb .

Радиохимическую чистоту (РХЧ) меченого соединения DOTA-HSA-ZHER2 определяли методом эксклюзионной хроматографии на гель-фильтрационной колонке (ГФК) Illustra NAP-5 Column (GE HealthCare), уравновешенной 0,1 М MES. Радиоактивно меченые конъюгаты элюировали тем же буфером, а несвязавшиеся с конъюгатом радионуклиды смывали

раствором 0,1 М лимонной кислоты. РХЧ определяли как процентное отношение суммарной активности всех фракций, содержащих радиоконъюгат, к суммарной активности во всех фракциях смывочных растворов. Детально описанный процесс определения РХЧ далее описан в соответствующем параграфе в Главе 4.

2.5 Методика определения кинетической стабильности

Для успешного применения синтезированного радиофармпрепарата он должен обладать достаточной устойчивостью с целью сохранения своих нацеливающих свойств [117]. Нестабильность комплекса может привести не только к снижению нацеливающих функций, но также и к образованию радиоактивных соединений, могущих связываться и накапливаться в здоровых тканях, что приведет к значительному повышению поглощенной дозы в здоровых органах.

РФП считается стабильным при радиохимической чистоте препарата не менее 90% в течение всего срока годности препарата [117]. Определение стабильности препарата проводят с помощью выявления радиохимической чистоты препарата после выдержки в течение необходимого времени в соответствующем физиологическом растворе, как правило, в изотоническом растворе или в сыворотке крови.

В связи с этим была предпринята попытка оценки кинетической стабильности комплекса $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$ при комнатной температуре в физиологических средах – изотоническом растворе и сыворотке крови человека, на протяжении периода полураспада ^{212}Pb , составляющего 10,64 ч. Стабильность комплекса определялась спустя фиксированные промежутки времени после разведения в средах (1, 3, 6, 10 ч), в случае обеих сред раствор с препаратом разбавлялся средой в отношении 1:10. Для определения стабильности в изотоническом растворе спустя каждый из означенных промежутков времени после разведения из образовавшейся смеси забиралась аликвота, которая подвергалась анализу на ТСХ аналогично описанным выше процедурам. При исследовании стабильности препарата в сыворотке крови

спустя 1, 3, 6, 10 ч для анализа от смеси отбиралась аликвота объемом 200 мкл. При нахождении в такой среде после диссоциации комплекса $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$ высвобожденный ^{212}Pb может связываться с белками сыворотки или их фрагментами. Поэтому, разделяя белковую фракцию от остальной среды, можно оценить, какая часть комплекса осталась стабильной, а какая – подверглась диссоциации с последующим связыванием высвобожденного ^{212}Pb с белками сыворотки крови. По этой причине в аликвоту добавлялось 400 мкл этанола для денатурации белков сыворотки [118], с которыми связываются свободные ионы Pb^{2+} после диссоциации комплекса $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$. Затем, после денатурации белков под воздействием этанола, сосуд с аликвотой охлаждался в холодильнике до 4°C . После охлаждения для отделения белковой фракции смесь подвергалась центрифугированию (5 мин, относительное центробежное ускорение 5000g) для осаждения денатурированных белков. После осаждения жидкость, содержащую стабильный комплекс (супернатант) отбирали для измерений на γ -спектрометре. Таким образом, стабильность определяли отношением активности, оставшейся в супернатанте к исходной активности аликвоты.

Кинетическую стабильность $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$ определяли по РХЧ препарата после выдержки при температуре 37°C в растворе 0,9% NaCl, а также эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС) (HyClone Laboratories) в течение 1, 2 и 3 ч методом эксклюзионной хроматографии на ГФК. Стабильность рассчитывали, как процентное отношение радиоактивности в элюате, содержащем радиокоњугат, к суммарной активности препарата, нанесенного на ГФК.

Глава 3. Производство ^{212}Pb на лабораторном генераторе

3.1 Лабораторный генератор ^{212}Pb

Для эффективного терапевтического использования $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ в клинике должны быть доступны активности порядка 10 ГБк [88]. Принцип генератора, который в настоящее время наиболее широко применяется для производства $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$, включает в себя элюирование ионообменной колонки, заполненной радионуклидом ^{224}Ra , с помощью кислот HCl или HI [97]. ^{224}Ra -генератор, производящий активность 10-20 ГБк, требует перезарядки каждые 3-6 сут. Столь частая замена генератора весьма неудобна по причине высокой энергии γ -квантов, испускаемых при распаде ^{208}Tl (2,6 МэВ), дочернего радионуклида ^{224}Ra . Если вместо ^{224}Ra в качестве первичного источника использовать более долгоживущий ^{228}Th (см. рис. 3.1), то замены требуются только каждые 4-6 лет. В этом случае имеет место существенное сокращение затрат на производство и транспортировку, а также сокращение дозовой нагрузки на персонал.

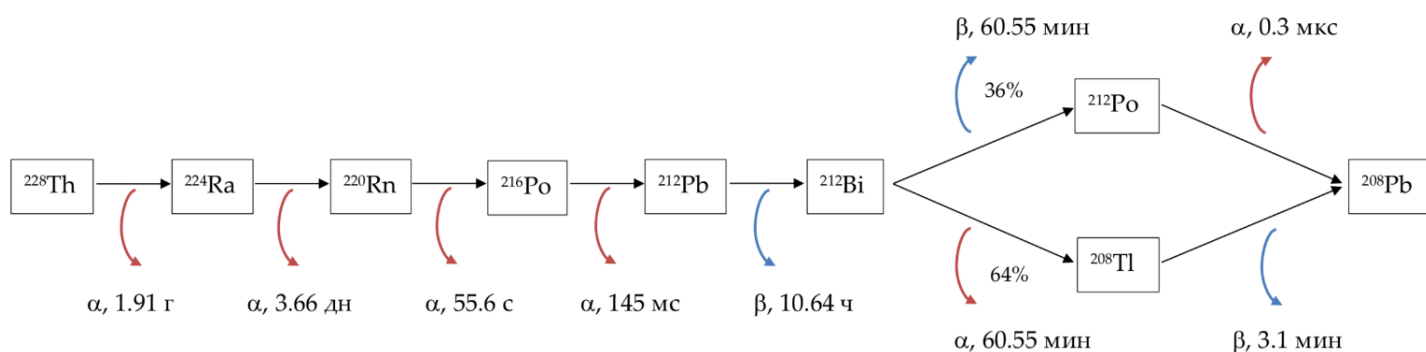


Рисунок 3.1. Цепочка распада ^{228}Th

В рамках данной работы предложен новый вариант генератора ^{212}Pb для исследований в области ядерной медицины. Он основан на сборе ^{212}Pb , образующегося при распаде ^{220}Rn , эмигрирующего из ионообменной смолы с ^{228}Th . Первый вариант исполнения генератора, основанный на принудительном удалении ^{220}Rn из объема с источником, был разработан ранее [119]. Однако, он подвергся существенной модернизации, состоящей в замене составляющих частей и определении оптимальных условий работы,

позволившей заметно повысить эффективность наработки ^{212}Pb , что подробнее будет описано далее. Принципиальная схема такого генератора ^{212}Pb состоит из двух связанных контуров-модулей (рис. 3.2):

- воздушного, в состав которого входит емкость с сильноосновным анионитом – ^{228}Th -содержащей ионообменной смолой, из которой происходит эманирование ^{220}Rn , и приемника выносимого ^{220}Rn ;
- жидкостного, имеющего в составе накопитель и систему элементов для обеспечения смыва ионов ^{212}Pb со стенок накопителя.

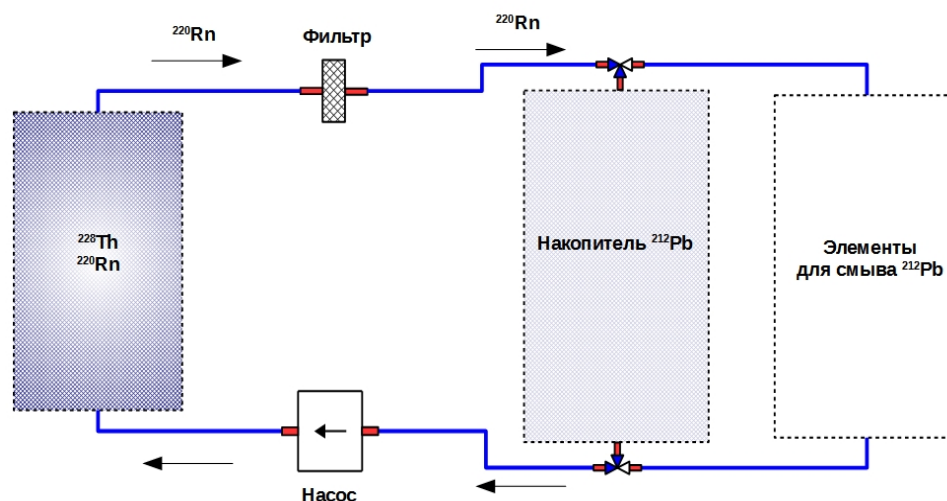


Рисунок 3.2. Принципиальная схема генератора

Такая модульная схема позволяет использовать различные источники и накопители независимо друг от друга. Таким образом, при смене любого из узлов, например, с целью изучения механизмов эманирования радона или осаждения свинца в накопителе, генератор сохранит возможность непрерывного производства ^{212}Pb .

Ионообменная смола с изотопом ^{228}Th располагается в специальном объеме, далее называемом как ториевый реактор. С помощью насоса через систему непрерывно во все время накопительного цикла прокачивается воздух, который проходит через реактор и выносит эманлируемый из смолы газообразный ^{220}Rn в отдельный объем-накопитель. После распада ^{220}Rn образуется ^{212}Pb , который осаждается на поверхности накопителя в форме Pb^{2+} , PbCl^+ и PbCl_2 ввиду обеспечения конструкцией генератора микрокапель

НСI на стенках накопителя. Благодаря такому разделению твердой фазы с материнским нуклидом и газообразной фазы с ^{220}Rn исключается возможность попадания долгоживущих материнских изотопов в конечный продукт, что обеспечивает высокую радионуклидную чистоту препарата и позволяет исключить операции по его очистке. Отсутствие долгоживущих примесей родительских радионуклидов было подтверждено α -спектрометрическими измерениями, результаты которых показаны далее.

3.2 Технология получения ^{212}Pb на лабораторном генераторе

Предложенный описанный выше принцип получения ^{212}Pb был реализован в установке, схема которой показана на рис. 3.3. Как было сказано, принципиальная схема генератора ^{212}Pb , работающего на особенности цепочки распада ^{228}Th , состоит из двух связанных контуров:

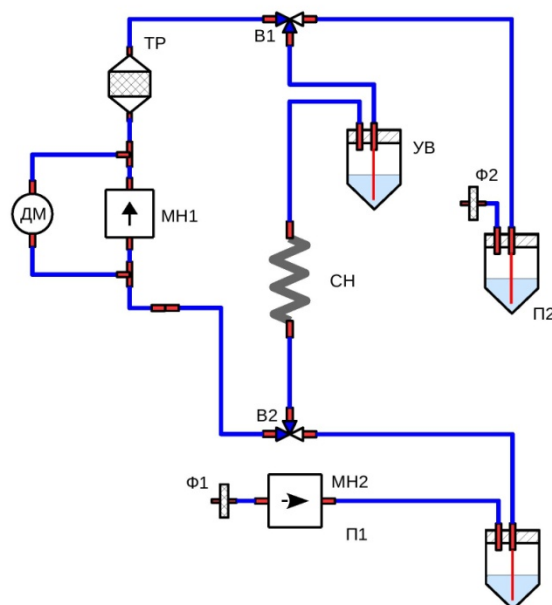


Рисунок 3.3. Технологическая схема генератора. ТР — ториевый реактор, МН1-МН2 — мембранные насосы, СН — спиральный накопитель, УВ — увлажнитель воздуха, ДМ — дифференциальный манометр, Ф1-Ф2 — воздушные фильтры, В1-В2 — электромагнитные клапаны, П1-П2 — пробирки для элюата и продукта, соответственно

– воздушного, в состав которого входит источник ^{220}Rn (ториевый реактор – ТР), воздушный насос – МН1 и объем-накопитель ^{212}Pb – СН;

– жидкостного, в состав которого входит сосуда для смыва и сбора раствора после смыва ^{212}Pb , жидкостный насос – МН2 и собственно накопитель.

Для обеспечения эффективного осаждения свинца на стенках накопителя 1) в системе поддерживалось состояние насыщенного пара путем включения в систему увлажнителя воздуха, содержащей раствор 0,1 М HCl, и 2) выполнялось условие существенного превышения объема накопителя над паразитными объемами (отношение не менее 10:1, соответственно) ториевого реактора и коммуникаций.

В системе генератора ^{212}Pb предполагается использование мембранных фильтров шприцевой насадки с наконечниками типа Луер-лок. Один из фильтров помещался сразу после ториевого реактора на предмет задержки твердых аэрозольных частиц в случае выхода из строя выходного фильтра ториевого реактора. Кроме того, рекомендуется применение фильтра последовательно сразу после элемента-накопителя, что позволит предотвратить попадание твердых частиц с родительским нуклидом в накопитель при выключенном генераторе в случае выхода из строя входного фильтра ториевого реактора. В схеме генератора используются мембранные фильтры марки Millipore с диаметром мембраны 33 мм и диаметром пор 0,45 мкм. Обозначенный диаметр пор материала позволяет полностью исключить прохождение твердых частиц с родительским нуклидом далее по системе, при этом, что было проверено дополнительно, при указанном значении диаметра мембраны фильтр не препятствует прохождению воздуха по системе и не создает избыточного давления в контуре.

Согласно данным о химической стойкости различных материалов, в качестве материала фильтров в условиях работы генератора (присутствие паров соляной кислоты) могут использоваться гидрофобные политетрафторэтилен (ПТФЭ) и поливинилиденфторид (ПВДФ), ацетат целлюлозы или восстановленная целлюлоза. В рабочей установке в процессе осушения генератора использовались мембранные фильтры из ПТФЭ, в

процессе накопления продукта – фильтры из ПВДФ, по причине одинаковой химической стойкости в обозначенных пределах концентрации соляной кислоты. Все элементы установки связывались между собой с помощью силиконовых трубок, все соединения производились герметичными фитингами типа Луер-лок. Далее будут рассмотрены вопросы разработки важнейших элементов генератора.

3.3 Математическое описание генератора ^{212}Pb

Принцип работы генератора может быть описан математически для оптимальной разработки и конструирования подобных установок. Предполагается, что в работе генератора участвуют два рабочих объема, так называемые «реактор» и «накопитель», как было описано ранее. Поскольку реактор тоже обладает объемом, в пределах которого происходит распад ^{220}Rn до ^{212}Pb , он может включаться в модель в качестве «паразитного» накопителя, и в рамках модели будет рассматриваться как расположенный в конце всей системы, что с точки зрения распределения концентрации ^{220}Rn является более корректным. Модель состоит из двух частей. Первая описывает распределение концентрации ^{220}Rn в зависимости от объемной координаты вдоль системы. Вторую часть модели составляет расчет активности в сечении на выходе из реактора. Это позволяет учесть объемность источника газообразного ^{220}Rn . Оба эти фактора не могут быть упрощены, т.к. по своим масштабам сравнимы с наиболее характерными пространственными и временными величинами в системе. При построении модели использовались следующие допущения:

1. В реакторе равномерно по всему объему источника происходит непрерывный распад родительского нуклида до газообразного ^{220}Rn , одновременно с этим образовавшийся ^{220}Rn потоком воздуха выводится в накопитель. При постоянной скорости потока в системе установится стационарный процесс, в результате которого одно и то же количество атомов ^{220}Rn будет проходить через любое поперечное сечение с течением времени и, как следствие, вслед за этим будет иметь место не изменяющаяся во времени зависимость концентрации ^{220}Rn от координаты вдоль системы.

2. Движение газа вдоль системы ламинарное, то есть равномерно и без движения частиц противоположно направлению потока в каком-либо сечении. Приведем значения числа Рейнольдса для скоростей потока до 1 л/мин и геометрии всех коммуникаций и накопителей в рамках данной работы, а именно, для диаметра цилиндрических трубок и накопителей от 1 мм до 24 мм:

$$Re_1 < Re < Re_2$$

$$Re = \frac{\rho v D}{\eta}$$

Где Re – число Рейнольдса, $\rho = 1,2 \text{ кг/м}^3$ – плотность газа при температуре 20°C , D – диаметр цилиндра движения газа, $\eta = 18,1 \text{ мкПа}\cdot\text{с}$ – динамическая вязкость газа при температуре 20°C , $v = \frac{\mu}{S} \text{ [м/с]}$ – скорость потока газа, μ – объемная скорость потока $[\text{м}^3/\text{с}]$, S – площадь сечения. Тогда:

$$Re_1 = \frac{\rho v_1 D_1}{\eta} = \frac{\rho \frac{\mu}{S_1} D_1}{\eta} \approx 60$$

$$Re_2 = \frac{\rho v_2 D_2}{\eta} = \frac{\rho \frac{\mu}{S_2} D_2}{\eta} \approx 359$$

Общеизвестно, что границей начала турбулентных участков движения для газа является $Re_{кр} = 1200$, следовательно во всем упоминаемом в работе диапазоне скоростей потока и диаметров коммуникаций и накопителей движение является ламинарным.

3. Модель не рассматривает потери газа во внешнее пространство, благодаря чему имеет место равновесие активности радионуклидов в цепочке ^{228}Th до ^{220}Rn включительно в пространстве генератора.

По определению, концентрация $n(x)$ является величиной, для которой справедливо уравнение (1), где N – полное число атомов ^{220}Rn , x_0 – линейная координата конца системы, в данном случае координата на выходе из реактора. Сама концентрация определяется стандартным образом через уравнение (2), где $p(x)$ – функция распределения по координате, N_0 – полное

число атомов ^{220}Rn , V_0 – полный объем системы. При этом переход от линейной координаты к координате-объему возможен однозначно ввиду постоянства скорости потока газа-носителя и представлен в (3).

$$N = \int_0^{x_0} dN = \int_0^{x_0} dx \cdot n(x) \quad (1)$$

$$n(x) = \frac{N_0}{V_0} \cdot p(x) \quad (2)$$

$$n(V) = \frac{N_0}{V_0} \cdot p(V) \quad (3)$$

Далее, распространению частиц ^{220}Rn служит движение воздуха, в течение которого количество атомов ^{220}Rn , проходящих через поперечное сечение в каждой из координат, уменьшается по закону радиоактивного распада, или:

$$p(V) = C \cdot e^{-\lambda t} = C \cdot e^{-\lambda \frac{V}{\mu}} \quad (4)$$

где C – постоянная, λ – постоянная распада ^{220}Rn , μ – объемная скорость потока воздуха. Итого для концентрации получаем выражение:

$$n(V) = \frac{N_0}{V_0} \cdot C \cdot e^{-\lambda \frac{V}{\mu}} \quad (5)$$

Константа C находится из очевидного условия нормировки:

$$N_0 = \int_0^{V_0} dN = \int_0^{V_0} dV \cdot n(V) = \int_0^{V_0} dV \cdot \frac{N_0}{V_0} \cdot C \cdot e^{-\lambda \frac{V}{\mu}} \quad (6)$$

Отсюда находим значение константы C (7) и окончательно выражение для концентрации (7а):

$$C = \frac{V_0 \lambda}{\mu (1 - e^{-\lambda \frac{V_0}{\mu}})} \quad (7)$$

$$n(V) = \frac{k}{\mu} \cdot \frac{e^{-\lambda \frac{V}{\mu}}}{1 - e^{-\lambda \frac{V_0}{\mu}}} \quad (7a)$$

где k – коэффициент пропорциональности.

На рис. 3.4 представлены расчетные данные зависимостей концентрации ^{220}Rn вдоль объема системы (трубка постоянного сечения) для трех значениях суммарного объема системы (150 мл, 350 мл, 600 мл) для скорости потока 250 мл/мин. Как было сказано, «хвост» кривой относится к т.н. паразитному

объему, приходящемуся на реактор – источник ^{220}Rn . Видно, что если в установке используется реактор объемом 50 мл, то при уменьшении объема системы до 150 мл паразитный объем может заключать в себе до 20% выделяемого ^{212}Pb (см. рис. 3.4).

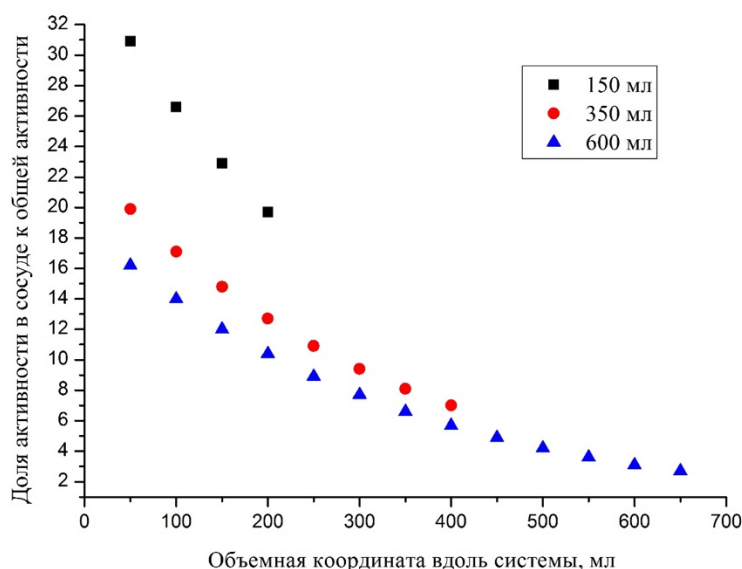


Рисунок 3.4. Распределение концентрации ^{220}Rn при 250 мл/мин

Далее, для расчета отношения активности ^{220}Rn в сечении на выходе из реактора к активности источника рассмотрим модель реактора в виде цилиндра постоянного сечения, объем которого равномерно заполнен источником постоянной удельной активности. Тогда для произвольного бесконечно малого объема dV , содержащего dN_{init} атомов ^{220}Rn , будет справедливо, что спустя время t движения dN_{init} атомов до выхода из реактора его достигнет количество dN атомов (8):

$$dN = dN_{init} \cdot e^{-\lambda t} = dN_{init} \cdot e^{-\lambda \frac{V_{reac} - V}{\mu}} \quad (8)$$

Очевидно, что ввиду равномерности источника ^{220}Rn справедливо выражение для dN_{init} (9), в результате чего для общего числа атомов ^{220}Rn на выходе из реактора получаем (10):

$$dN_{init} = \frac{N_0}{V_{reac}} \cdot dV \quad (9)$$

$$N = \int_0^{V_{reac}} dN = \int_0^{V_{reac}} dV \cdot \frac{N_0}{V_0} \cdot e^{-\lambda t} = \int_0^{V_{reac}} dV \cdot \frac{N_0}{V_{reac}} \cdot e^{-\lambda \frac{V_{reac}-V}{\mu}} = \dots = \frac{\mu N_0}{\lambda V_{reac}} \cdot (1 - e^{-\lambda \frac{V_{reac}}{\mu}}) \quad (10)$$

Более интересно следующее выражение для отношения числа выходящих из реактора частиц ^{220}Rn к общему числу частиц ^{220}Rn в реакторе, которое неизменно во времени ввиду замкнутости системы и, как следствие, равновесия ^{220}Rn с родительскими радионуклидами:

$$\frac{N}{N_0} = \frac{\mu}{\lambda V_{reac}} \cdot (1 - e^{-\lambda \frac{V_{reac}}{\mu}}) \quad (11)$$

Полученное выражение иллюстрирует зависимость отношения активности, достигающей выхода реактора, к производимой в реакторе активности, из которого видно, что при одной и той же скорости потока воздуха и удельной активности источника с увеличением объема реактора доля покидающего реактор ^{220}Rn уменьшается (см. рис. 3.5).

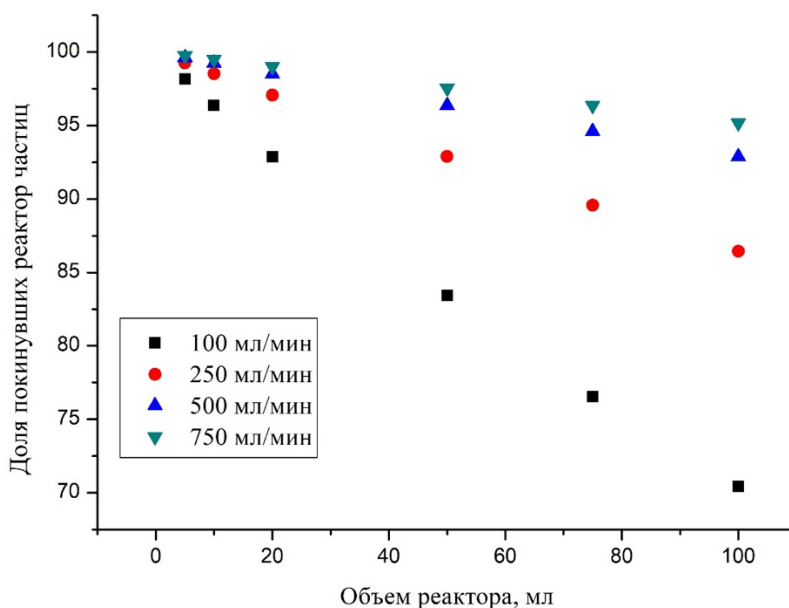


Рисунок 3.5. Зависимость процента покинувшего реактор ^{220}Rn от объема при различных скоростях потока воздуха

Очевидно, что уменьшение объема реактора ведет к увеличению выхода ^{212}Pb и коэффициента полезного действия всей установки в целом.

3.4 Подготовка ионообменной смолы с ^{228}Th

В качестве материала, содержащего ^{228}Th , использовалась ионообменная смола марки DOWEX. Помимо ионообменной смолы, в качестве подходящего вещества-носителя для родительского ^{228}Th и эманулирующего ^{220}Rn можно использовать, как было показано в обзоре литературы, соли насыщенных жирных кислот. Степень эманирования радона через материал в зависимости от конкретной соли может достигать 100%. Для ^{220}Rn эти величины меньше из-за его короткого периода полураспада, но тем не менее в случае лаурата и пальмитата составляют высокие значения в 96% и 98% соответственно. Уникальное в этом смысле слова поведение бариевых солей всегда представляло большой интерес для исследователей.

На способность эманирования газа из любого вещества влияют два фактора:

- 1) скорость диффузии эманулирующего атома к поверхности твердой частицы;
- 2) конфигурация поверхности твердых частиц, которая определяет долю захваченных атомов отдачи.

Таким образом, высокая способность к эманированию газа из твердых частиц может обуславливаться либо необычно высокой скоростью диффузии атома радона через кристаллическую решетку твердой среды, либо высокой специфичностью поверхности, либо обоими факторами. Второй из перечисленных факторов практически не зависит от температуры, что нельзя сказать о процессе диффузии.

Авторы [83] пришли к объяснению высокого выхода радона из солей бария теоретически. При помощи зависимостей, связывающих параметры диффузии и параметры эманулирующих атомов, они показали, что радиус твердых частиц для высокого выхода должен равняться $3 \cdot 10^{-5}$ см. Но радиус частиц, в частности, стеарата бария составляет 10^{-2} см. Отсюда авторы сделали вывод, что данные частицы состоят из микрокристаллов (10^{-5} см), и высокий выход радона обуславливается диффузией в воздухе между

микрочастицами в пределах одной частицы. Разумеется, также имеет место диффузия между самими частицами.

Несмотря на высокую пригодность использования стеарата бария в качестве носителя родительского нуклида, в качестве исходного сырья в генераторе в данной работе использовали порошок ионообменной смолы, содержащей ^{228}Th . Такой выбор был сделан по причине технологической простоты получения ^{228}Th -содержащей ионообменной смолы по сравнению с солями стеариновой кислоты, синтез которых представляет собой сложный технологический процесс. Для получения такой смолы в раствор, содержащий смесь радионуклидов ^{228}Th , ^{229}Th , ^{232}Th и их дочерних продуктов распада, добавляли сильноосновный анионит DOWEX-1. Изотопный состав такого раствора, который выделяли из ^{233}U длительной выдержки (порядка 50 лет), как уже было сказано, составлял: ^{229}Th – 6,81%; $^{230}\text{Th} \cong 0,08\%$; ^{228}Th – следы; ^{232}Th – 93,11%.

20 мл раствора смеси радионуклидов ^{228}Th , ^{229}Th и их ДПР в 8 М HNO_3 смешивали с 5-6 мл сильноосновного анионита DOWEX-1. Согласно значениям констант образования анионных нитратных комплексов тория [120] в среде 8 М HNO_3 весь торий находится в виде анионных комплексов $\text{Th}(\text{NO}_3)_5^-$ (2%), $\text{Th}(\text{NO}_3)_6^{2-}$ (98%), которые замещают хлорид-ион (нитрат-ион) на смоле DOWEX-1. После выдержки в течение 1 часа практически весь торий сорбируется на смоле. Затем раствор декантировался, а влажная смола высушивалась в вытяжном шкафу. При высушивании анионные нитратные комплексы тория аналогично хлорид-ионам остаются связанными с аммониевыми группами на смоле, что позволяет далее использовать эту сухую смолу в качестве источника ^{220}Rn .

Выбор ионообменной смолы в качестве сорбента ^{228}Th оправдывается тем, что такие смолы обладают способностью к набуханию, возникающему из-за разницы осмотического давления между внешним раствором и раствором внутри пор смолы. Такое увеличение гранул сорбента приводит к увеличению воздушного зазора между гранулами настолько, чтобы энергия отдачи ^{220}Rn

полностью поглощалась в пределах этого пространства без внедрения в структуру сорбента. В ходе увлажнения смолы ее объем увеличивается 1.5–3 раза; при этом происходит расширение пор, что способствует выходу радона. Кроме того, молекулы воды занимают сорбционные вакансии, в том числе и на поверхности гранулы, блокируя сорбцию радона, и тем самым увеличивают его подвижность. Возможно, что эманирование радона из увлажненной смолы повышается в результате увеличения подвижности ^{224}Ra , предшественника ^{220}Rn . Накопленный в смоле радий, переходящий в раствор, приводит к снижению пространственных затруднений диффузии радона и способствует его эманированию. Следует заметить, что для производства ^{212}Pb не нужно проводить процедуру аффинажа, поскольку выделение ^{212}Pb происходит на фазовом уровне (твердое тело-газ-жидкость), поэтому загрязненность тория не скажется на конечном продукте.

Одним из важнейших вопросов является проблема химической чистоты полученного на генераторе продукта. Поскольку во время наработки ^{212}Pb одновременно происходит его распад, то вместе с накоплением целевого радионуклида в том же объеме происходит накопление стабильного ^{208}Pb , конечного элемента цепочки распада ^{228}Th . Ввиду замкнутости системы количество нуклидов ^{212}Pb и ^{208}Pb может быть описано с помощью системы дифференциальных уравнений:

$$\frac{dN}{dt} = A_0 - \lambda N \quad (12)$$

$$\frac{dn}{dt} = \lambda N \quad (13)$$

где N – количество атомов ^{212}Pb , A_0 – активность ^{220}Rn , участвующего в образовании ^{212}Pb в объеме накопителя, λ – постоянная распада ^{212}Pb , n – количество атомов ^{208}Pb . Таким образом, уравнение (11) описывает образование ^{212}Pb из ^{220}Rn и его распад, уравнение (12) – образование стабильного изотопа свинца из ^{212}Pb . Решение системы дифференциальных уравнений (11-12) при граничных условиях (13):

$$N(t=0) = 0; N(t=0) = A_0 \quad (14)$$

представляют собой следующие выражения:

$$N = \frac{A_0}{\lambda} (1 - e^{-\lambda t})$$

$$n = \frac{A_0}{\lambda} (\lambda t + e^{-\lambda t} - 1)$$

Наибольший интерес представляет собой зависимость удельной активности от времени накопления. Удельная активность в данном случае понимается как отношение активности ^{212}Pb в образце к общему количеству атомов этого элемента:

$$\theta(t) = \frac{A(t)}{N(t)+n(t)} = \frac{1 - e^{-\lambda t}}{t} \quad (15)$$

На рис. 3.6 представлены расчетные данные зависимости удельной активности $\theta(t)$ в зависимости от времени накопления в соответствии с формулой (15), значение удельной активности нормировано на максимальную величину (в момент начала накопления).

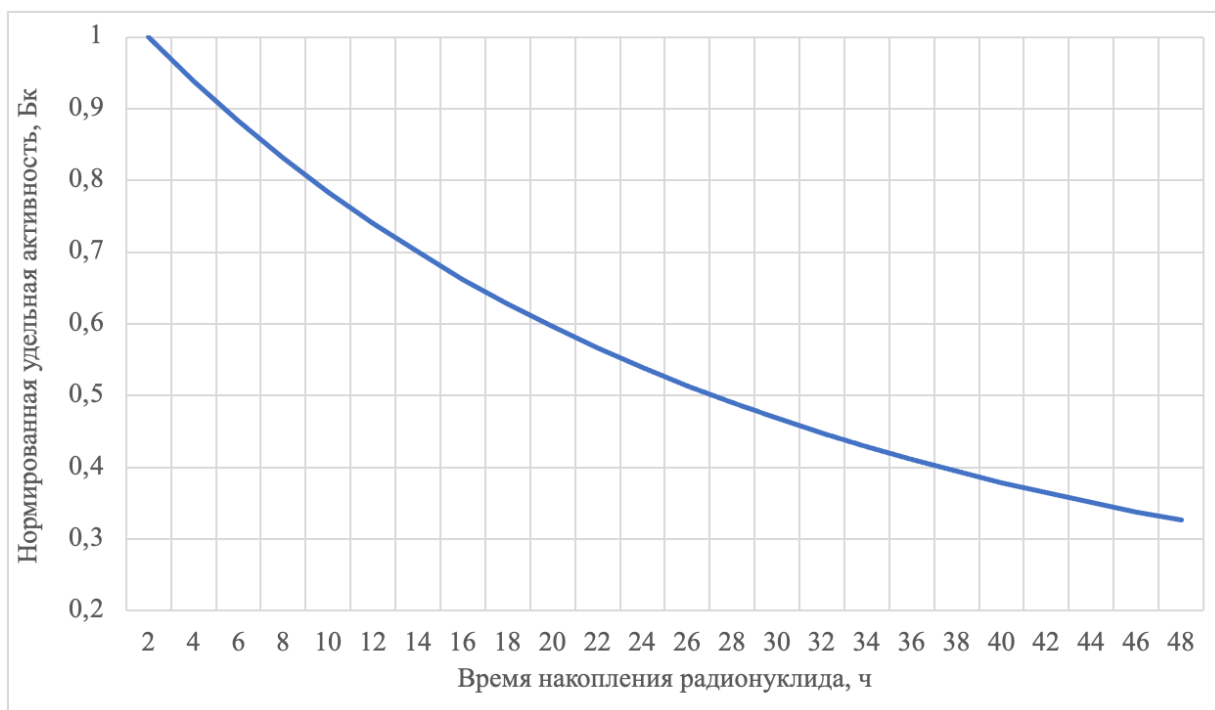


Рисунок 3.6. Удельная активность ^{212}Pb в зависимости от времени накопления

Из рис. 3.6 видно, что уже при времени накопления 24 ч удельная активность продукта генератора упадет вдвое. Большие времена накопления поэтому могут вызывать понижение эффективности процесса мечения адресных молекул.

3.5 Металлический ториевый реактор

Ториевый реактор был изготовлен сваркой металлических элементов с целью формирования цилиндрической емкости, с двумя отверстиями для входа и выхода воздуха (см. рис. 3.7). Все элементы, за исключением уплотняющего диска, изготовлены из циркония ввиду его высокой химической стойкости.

На одной из граней полого цилиндра (1) было проделано отверстие, другая грань отсечена; внутрь этой конструкции помещался стакан (3) для дальнейшего погружения в него ^{228}Th -содержащей смолы. Далее, конструкция покрывалась крышкой (2); герметичность обеспечивалась уплотняющим диском из радиационнстойкой резины (6). Для предотвращения уноса твердых частиц из реактора, на выходе и входе были помещены фильтры Петрянова (7), закреплявшиеся на гранях стакана при помощи специальных поддерживающих дисков (4).

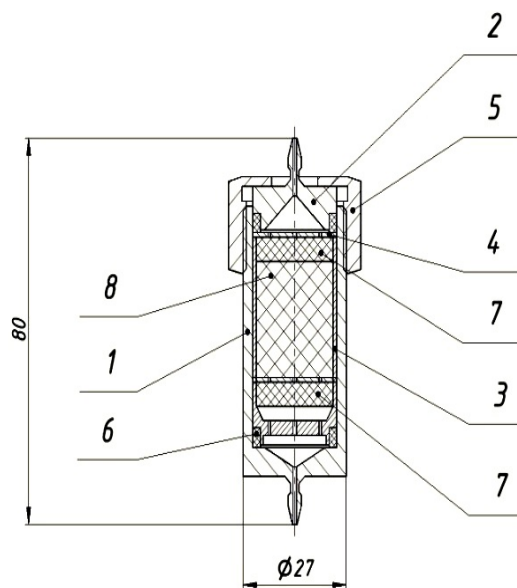


Рисунок 3.7. Металлический ториевый реактор. 1 — корпус, 2 — крышка, 3 — стакан, 4 — поддержка, 5 — гайка, 6 — уплотняющий диск, 7 — фильтры Петрянова, 8 — смола

3.6 Объем-накопитель радионуклида ^{212}Pb

Спиральный накопитель предназначен для сбора целевого радионуклида ^{212}Pb . Он представляет собой свернутую в спираль вокруг

полого металлического барабана тонкую трубку из фторированного этиленпропилена (ФЭП) длиной 30 м и внутренним диаметром 2 мм, общий объем накопителя ~100 мл. На стенках накопителя осаждается ^{212}Pb , образующийся при распаде проходящего в нем вместе с потоком воздуха радона ^{220}Rn . ФЭП был выбран по причине приемлемых химических и физических характеристик, главным образом из-за высокой химической стойкости и низкой смачиваемости. Последнее обстоятельство играет важную роль для смыва осажденного ^{212}Pb .

В среде 0,1 М HCl, согласно константам устойчивости [121], Pb^{2+} в растворе присутствует в виде PbCl^+ (60%), Pb^{2+} (20%) и PbCl_2 (20%), что позволяет смывать его со стенок накопителя. Ввиду высокого значения произведения растворимости PbCl_2 ($1,6 \cdot 10^{-5}$), образование нерастворимого соединения может происходить в присутствии 0,1 М Cl^- только при содержании Pb^{2+} : $c(\text{Pb}^{2+}) > 1 \cdot 10^{-3}$ М, что на 7 порядков больше образующегося в рассматриваемом генераторе.

Смыв ^{212}Pb с поверхности накопителя производится путем прокачки раствора 0,1 М соляной кислоты HCl суммарным объемом 10 мл через спираль с помощью мембранного насоса, подключенного отдельно и параллельно с первым насосом, осуществляющим прокачку воздуха при рабочем режиме.

Для обеспечения минимального количества потерь жидкости были очень тщательно рассчитаны условия установки спирали (угол наклона спирали, плотность намотки) во избежание образования областей, где может скапливаться жидкость. Благодаря этому был достигнут равномерный подъем спирали по цилиндрической поверхности, без резких перепадов и искусственных гидрозатворов.

Перед спиральным накопителем помещался увлажнитель воздуха, в котором находилось 5 мл 0,1 М HCl. За полный цикл работы генератора из увлажнителя испарялось жидкости в объеме до 2 мл, что позволяло поддерживать состояние насыщенного пара, что послужило увеличению осаждения ^{212}Pb . Образующийся в результате распада ^{220}Rn радионуклид ^{212}Pb

осаждается на стенках спирали, и увеличение осаждения ^{212}Pb при наличии микрокапель раствора HCl на стенках используемой в качестве накопителя ФЭП-трубки может быть обусловлено сродством образующегося Pb^{2+} к водным хлорид-содержащим растворам по причине образования им хлоридных комплексов [121] в дополнение к нелетучему характеру Pb^{2+} в используемых нормальных условиях.

3.7 Получение ^{212}Pb на генераторе

В составе установки имеются следующие приборы: расходомер для измерения скорости потока воздуха (Microbridge Airflow Sensors), а также мембранный насос (АЖК В2002). После окончания цикла накопления насос выключался, и производилось переключение клапанов, в результате чего объем-накопитель включался в контур смыва. Раствор 0,1 М HCl прокачивался через трубку накопителя, после чего отбирался образец объемом до 0,5 мл и проводилось измерение активности для определения общей смывтой активности ^{212}Pb .

Раствор, после прокачки через спиральный накопитель и увлажнитель воздуха, поступал в пробирку для продукта, при этом в спирали оставалось порядка 1 мл при общем объеме смывочного раствора 10 мл. Прокачка осуществлялась мембранным насосом в течение 12 минут; дальнейшая работа насоса не приводила к снижению жидкости в спирали. Пробирка с продуктом демонтируется для дальнейшего использования ^{212}Pb .

Радиометрические измерения накопителя после смыва радионуклида показали, что на стенках трубки остается порядка 30% ^{212}Pb . Снижение или увеличение концентрации кислоты не оказывало заметного эффекта на количество смываемого свинца с трубки, что может свидетельствовать о пространственной недоступности связанного с поверхностью катиона Pb^{2+} для поступающей в динамическом режиме кислоты.

В процессе накопления целевого радионуклида экспериментальные возможности насоса не позволяли плавно в широком диапазоне менять скорость прокачки, поэтому задавалось две величины: 250 мл/мин и 400

мл/мин. Такое увеличение скорости потока воздуха незначительно повышает максимальный выход продукта приблизительно с 32% до 37%. Этот результат подтвердил высказанные ранее выводы из математической модели генератора, а именно, что поток газа-носителя изменяет пространственное распределение ^{212}Pb вдоль системы, сохраняя при этом общий стационарный процесс накопления.

Итого можно заключить, что эффективность накопления ^{212}Pb в данном генераторе составляет $(37\pm 3)\%$. При увеличении скорости потока больший выход ^{212}Pb можно объяснить тем, что большая поверхностная площадь частиц смолы обдувается воздухом, что позволяет эффективнее уносить газообразный ^{220}Rn из реактора. Наиболее благоприятным случаем является наличие кипящего слоя в реакторе.

На описанной установке была достигнута объемная активность до 800 кБк/мл, что является приемлемым как для экспериментов *in vitro*, так и для, в определенных пределах, доклинических испытаний [122–124]. Для широкого применения в доклинических испытаниях предполагается, что предложенный ^{212}Pb -генератор будет заправлен ^{228}Th -содержащей смолой более высокой удельной активности. В заключение отметим, что для более простой процедуры смыва радионуклида, проводившейся вручную, вместо спирального накопителя может использоваться система герметичных пробирок из полипропилена. Схема установки приведена на рис. 3.8.

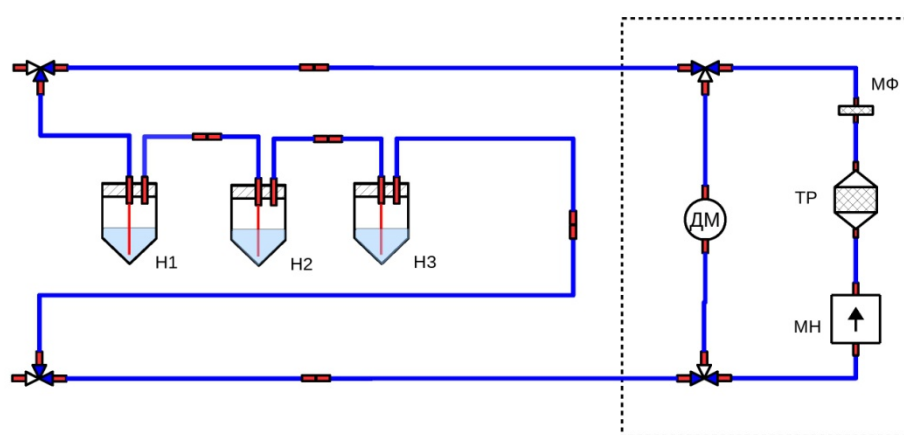


Рисунок 3.8. Схема наработки для ручного смыва ^{212}Pb

Как было сказано, абсолютная автономность двух модулей генератора позволяет использовать любые типы реакторов и накопителей независимо друг от друга. Накопитель, представляющий собой систему нескольких соединенных последовательно герметичных цилиндрических полипропиленовых 50 мл сосудов, оснащенных подводящей ко дну поливинилхлоридной трубкой и такой же трубкой для вывода, удобен в случае необходимости быстрого смыва ^{212}Pb в ручном режиме без участия контура смыва. Данное исполнение накопителя использовалось при необходимости ручного смыва ^{212}Pb со стенок, и также показало свою эффективность в качестве приемника ^{212}Pb . Разумеется, такой режим смыва возможен только при соответствующе малых значениях активности источника для предотвращения облучения оператора.

3.8 Исследование механизма эманирования ^{220}Rn

Несмотря на описанное удобство производства источника ^{220}Rn в виде ^{228}Th -содержащей ионообменной смолы, необходимо более детально исследовать проблемы, связанные с повышением коэффициента эманирования, а также провести оценку влияния различных условий (скорости продувки, влажности сорбента и т.п.) на его значение для нахождения наиболее эффективных параметров работы генератора.

Оценка эффективности выноса ^{220}Rn в данной работе основана на измерении остаточной активности ^{212}Pb в источнике-сорбенте с течением времени. Первоначально все радионуклиды в цепочке ^{228}Th находятся в равновесии в объеме реактора в силу его герметичности. Тогда после уноса ^{220}Rn , могущих покинуть объем сорбента, со временем установится равновесие между ^{220}Rn , не покинувшими реактор, и его дочерним ^{212}Pb , активность которого может быть измерена. Число атомов ^{212}Pb в реакторе, содержащем ^{228}Th , описывается дифференциальным уравнением

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda N + qL(1 - \alpha)$$

где λ – постоянная распада ^{212}Pb , N – число атомов ^{212}Pb , q – постоянная распада ^{220}Rn , L – число атомов ^{220}Rn , α – доля атомов ^{220}Rn , выносимая из гранул смолы газом-носителем. Решение уравнения:

$$N(t) = (1 - \alpha) + \alpha e^{-\lambda t}$$

При полном выносе атомов ^{220}Rn из реактора ($\alpha = 1$) $N(t)$ соответствует кривой распада ^{212}Pb (см. рис. 3.9):

$$N(t) = e^{-\lambda t}$$

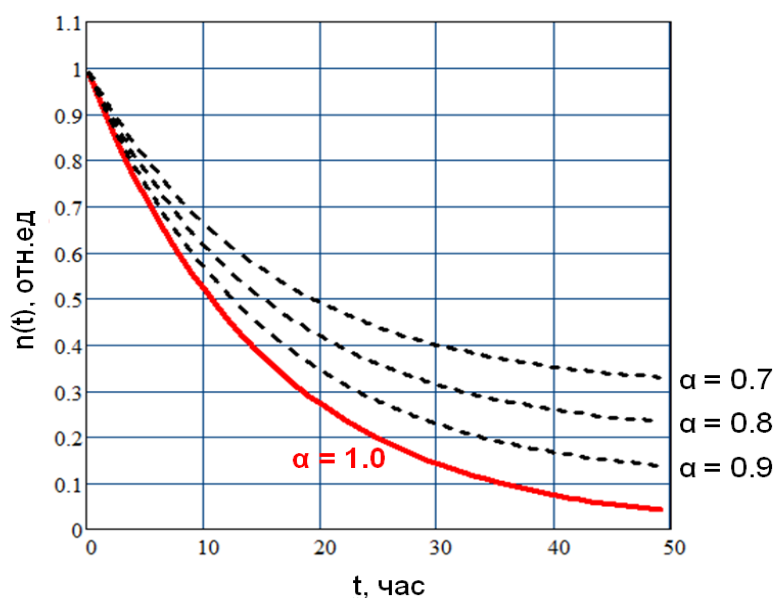


Рисунок 3.9. Количество атомов ^{212}Pb в емкости в зависимости от времени при различных коэффициентах эманирования ^{220}Rn

Исследование будет корректно в случае исключения формирования комков смолы и влияния поверхностной плотности слоя, в связи с чем была изготовлена емкость, в которую помещалась ^{228}Th -содержащая ионообменная смола массой 0,648 г; конфигурация насыпи смолы составила 15 мм в высоту и 10 мм в диаметре. На входе и выходе емкости закреплялись фильтры Петрянова для предотвращения уноса твердых частиц. Схема детектирования активности ^{212}Pb в емкости во время продувки показана на рис. 3.10.

Емкость на рис. 3.10 обозначена как «реактор», активность ^{212}Pb измерялась детектором на основе особо чистого германия, описанным в Главе 2. Реактор помещался на расстоянии 20 см и 40 см от детектора, т.к. прибор

подвергался калибровке в этих двух точках, отстоящих от поверхности детектора на указанных расстояниях. В случае повышенной загруженности детектора образец перемещался на расстояние с 20 см до 40 см для корректных показаний сигнала. Время экспозиции составляло от 300 до 600 сек.

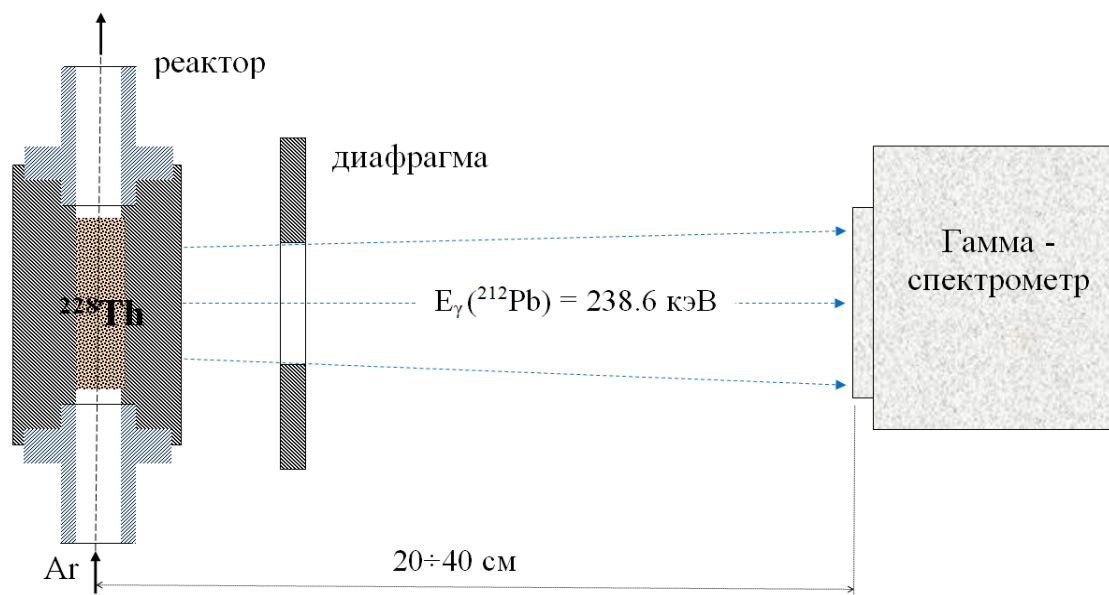


Рисунок 3.10. Схема детектирования активности ^{212}Pb

На рис. 3.10 также изображена диафрагма, представляющая собой комбинацию свинцовых пластин толщиной 5 мм, которая служила экраном для предотвращения детектирования активности от соединительных узлов и шлангов на входе и выходе из реактора. Схема продувки емкости изображена на рис. 3.11, на котором приняты обозначения: Ar – баллон с аргоном, РРГ – расходомер газа, ФВН – элементы для нейтрализации радиоактивного газа.

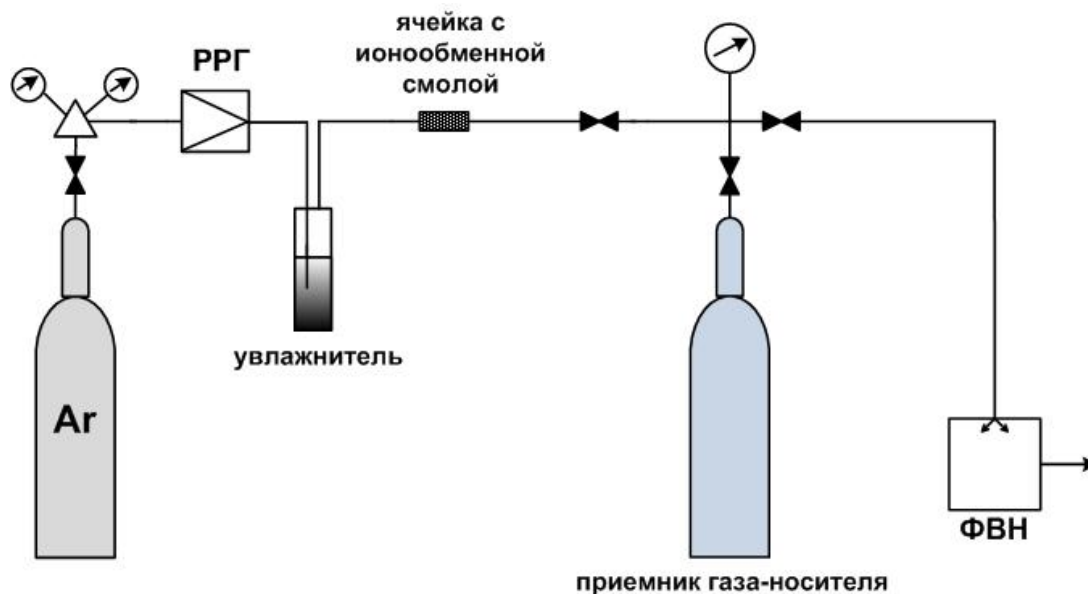


Рисунок 3.11. Схема продувки реактора

Выход ^{220}Rn определяли в зависимости от расхода газа-носителя, в качестве которого служил чистый аргон, и при наличии увлажнения смолы. Первоначально заметного выноса ^{220}Rn не наблюдалось при расходах газа-носителя до уровня $1125 \text{ см}^3/\text{мин}$. Предварительное просушивание смолы при температуре 80°C в течение 4-х часов не послужило сколь-либо значимому увеличению выхода ^{220}Rn . В связи с этим исследования продолжили проводить при наличии увлажнителя газа-носителя для увлажнения смолы. Вмонтированный в систему сосуд заполнялся деионизованной водой для создания водяных паров. При этом условии эксперименты по выносу ^{220}Rn проводились при расходах аргона $750 \text{ см}^3/\text{мин}$ и $150 \text{ см}^3/\text{мин}$. В этом случае доля активности ^{212}Pb от первоначальной составила 44% и 49%, соответственно. Таким образом, в случае увлажнения смолы значение коэффициента эманирования ^{220}Rn составило порядка 50-55%. При этом, при продолжительности продувки 72 ч из увлажнителя испарилось и прошло через емкость 69 г воды, при этом масса смолы увеличилась на 0,321 г. Таким образом, смола поглощает влагу в массовом отношении 1:2.

Далее представляло интерес исследование диффузии ^{220}Rn и возможность выделения ^{212}Pb без принудительного удаления ^{220}Rn потоком газа-носителя. Для этого были изготовлены фторопластовые емкости-

накопители внутренним диаметром $d_{\text{вн}} = 13$ мм и высотой $h = 60$ мм. Накопители герметично присоединялись к реактору симметрично с двух сторон, после чего производилось накопление ^{212}Pb в течение 72-х часов. Смыв ^{212}Pb со стенок накопителей производился вручную раствором 0,1 М HCl, при этом эффективность смыва с поверхности фторопласта составила 75%. Поскольку выход ^{220}Rn увеличивался при наличии увлажнения смолы, нижняя емкость наполнялась деионизованной водой в объеме 1-2 мл для создания состояния насыщенного пара. В этих условиях активность осажденного на стенках ^{212}Pb составила 41% от исходной активности в емкости с ^{228}Th -содержащей ионообменной смолой. Потери в накоплении $\sim 10\%$ по сравнению с предыдущим случаем могли быть обусловлены осаждением ^{212}Pb на стенках емкости, а также частичным осаждением на гранулах смолы по вине атомов ^{220}Rn , претерпевших распад до достижения выхода из реактора за счет пассивной диффузии.

Для более детального изучения диффузии ^{220}Rn из отдельной гранулы ионообменной смолы был изготовлен экспериментальный генератор, схема которого показана на рис. 3.12. Определению подлежал выход ^{220}Rn из гранул в зависимости от влажности смолы без потока газа-носителя.

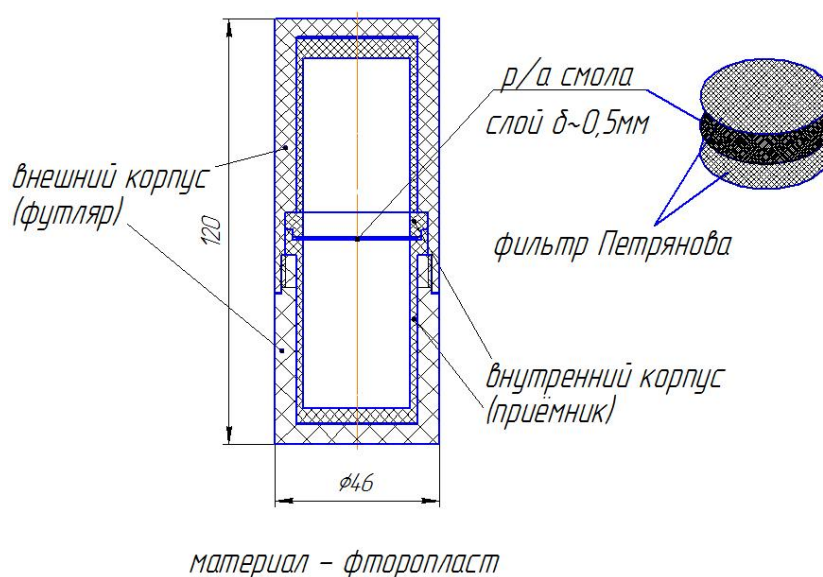


Рисунок 3.12. Схема экспериментального генератора на тонком слое

В центральной части реактора, изготовленного из фторпласта, располагалась смола массой 0,29 г, ограниченная фильтрами Петрянова, так что толщина слоя составляла $\sim 0,5$ мм, что практически составляло равномерный моно- либо дислой гранул смолы. Накопление и смыв с фторпластовых приемников осуществлялся аналогично процедуре, описанной выше. Увлажнение смолы также осуществлялось добавлением деионизованной воды (~ 1 мл) в нижний приемник. В этих условиях коэффициент эманирования ^{220}Rn без добавления воды и с увлажнением составил соответственно $(14\pm 3)\%$ и $(56\pm 2)\%$. Результаты обеих серий экспериментов по изучению выхода ^{220}Rn из большого и малого слоев смолы представлены в табл. 3.1.

Таблица 3.1. Результаты исследований эманирования ^{220}Rn

Выход радона из смолы, % (α)				
	«Слой» ($h = 15$ мм, $D = 10$ мм)		«Гранула» ($h \approx 0.5$ мм, $D = 30$ мм)	
	«Сухой»	«Влажный»	«Сухой»	«Влажный»
«Продувка»	5 $Q = 1125$ $\text{см}^3/\text{мин}$	56 $Q = 750$ $\text{см}^3/\text{мин}51Q = 150\text{см}^3/\text{мин}$	-	-
«Диффузия»	-	41 $Q = 0$	14 $Q = 0$	56 $Q = 0$

Столь существенное увеличение выхода ^{220}Rn из реактора может объясняться структурой ионообменной смолы и изменениями, происходящими при ее насыщении влагой. В [124] обнаруживается, что вместе

с повышением влажности воздуха с 20% до 60% коэффициент эманирования радона увеличивается почти в 3 раза. Предположительно, такой эффект имеет место по причине захвата ядер после распада присутствующей в порах и на поверхности смолы водой [125]. На основании полученных результатов был сконструирован экспериментальный генератор для получения ^{212}Pb методом пассивной диффузии. Чертеж генератора приведен на рис. 3.13, линейные размеры, если не обозначено иное, указаны в мм.

Экспериментальный генератор состоит из центральной части, изготовленной из нержавеющей стали, в которую помещалась ^{228}Th -содержащая ионообменная смола массой 5 г. Смола ограничивалась круглым мембранным PTFE фильтром диаметром 47 мм и размером пор 0,5 мкм, исключающим проскок частиц смолы за пределы центральной части, объем которой составляет 18 мл. Превышение объема рассчитано на увеличение объема смолы в случае ее увлажнения. Конструкция генератора обеспечивала герметичное резьбовое соединение с двух сторон по одному накопителю ^{212}Pb , в качестве которого служила полипропиленовая пробирка объемом 50 мл с резьбой стандарта M24.

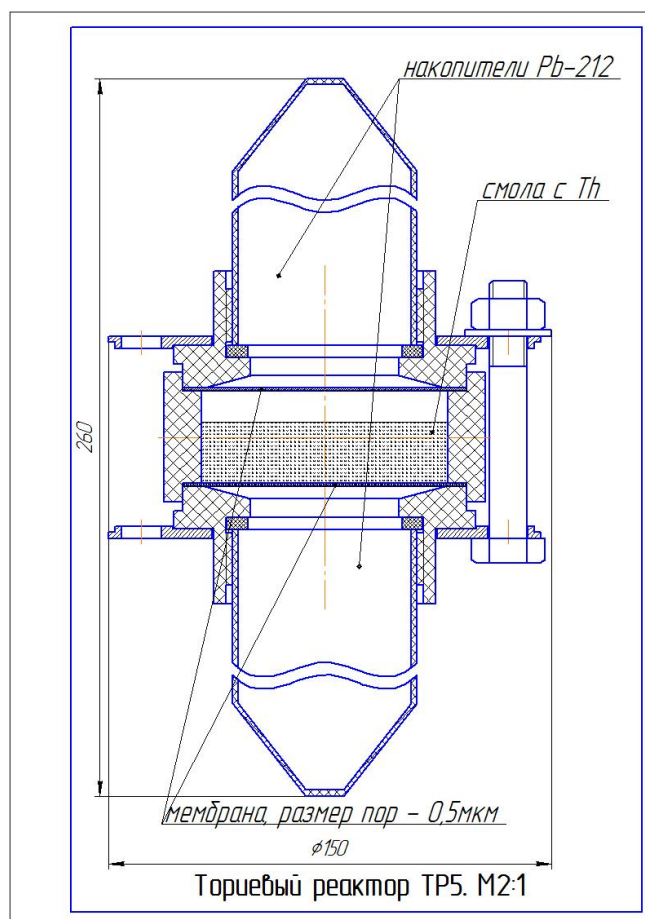


Рисунок 3.13. Схема экспериментального генератора

После помещения смолы в центральную часть пробирки-накопителя прикручивались к источнику ^{220}Rn , тем самым образуя экспериментальный генератор для накопления ^{212}Pb и последующего его смыва с поверхности полипропиленовых накопителей, который осуществлялся раствором 0,1 М HCl . Итоговая высота слоя и поверхностная плотность составила соответственно 7 мм и $0,4 \text{ г/см}^2$. При увлажнении среды в генераторе его КПД при времени накопления 48 ч составил значение 40%.

Меньшее по сравнению с показанным выше значением коэффициента эманирования в 51-56% (см. табл. 3.1) объясняется качественно следующим образом. При увеличении содержания воды коэффициент диффузии будет уменьшаться. В частности, при низком содержании воды ^{220}Rn может легко диффундировать через пустые поры. При увеличении содержания воды в поровом пространстве поры будут заполнены жидкостью, поэтому ^{220}Rn будет медленно диффундировать из-за разницы в коэффициентах диффузии

жидкости и воздуха. Это приводит к уменьшению коэффициента диффузии с увеличением содержания воды.

Таким образом, проведены исследования эманирования ^{220}Rn из ионообменной смолы в зависимости от плотности слоя и влажности смолы. Показано, что коэффициент эманирования может достигать 56% в случае влагоудержания смолы, предположительно, за счет захвата ядер отдачи водой и предотвращением внедрения в структуру сорбента. Сконструирован экспериментальный генератор, основанный на пассивной диффузии ^{220}Rn из материала-сорбента. Такой простейший в технологии и использовании генератор позволяет непрерывно получать радионуклид ^{212}Pb с эффективностью до 40%.

3.9 Радионуклидная и химическая чистота продукта

α -спектр конечного продукта ^{212}Pb представлен на рис 3.14. Измерения выполнены на двухкамерном α -спектрометре с кремниевым детектором фирмы ORTEC, модель 576А. Калибровка выполнена с помощью набора.

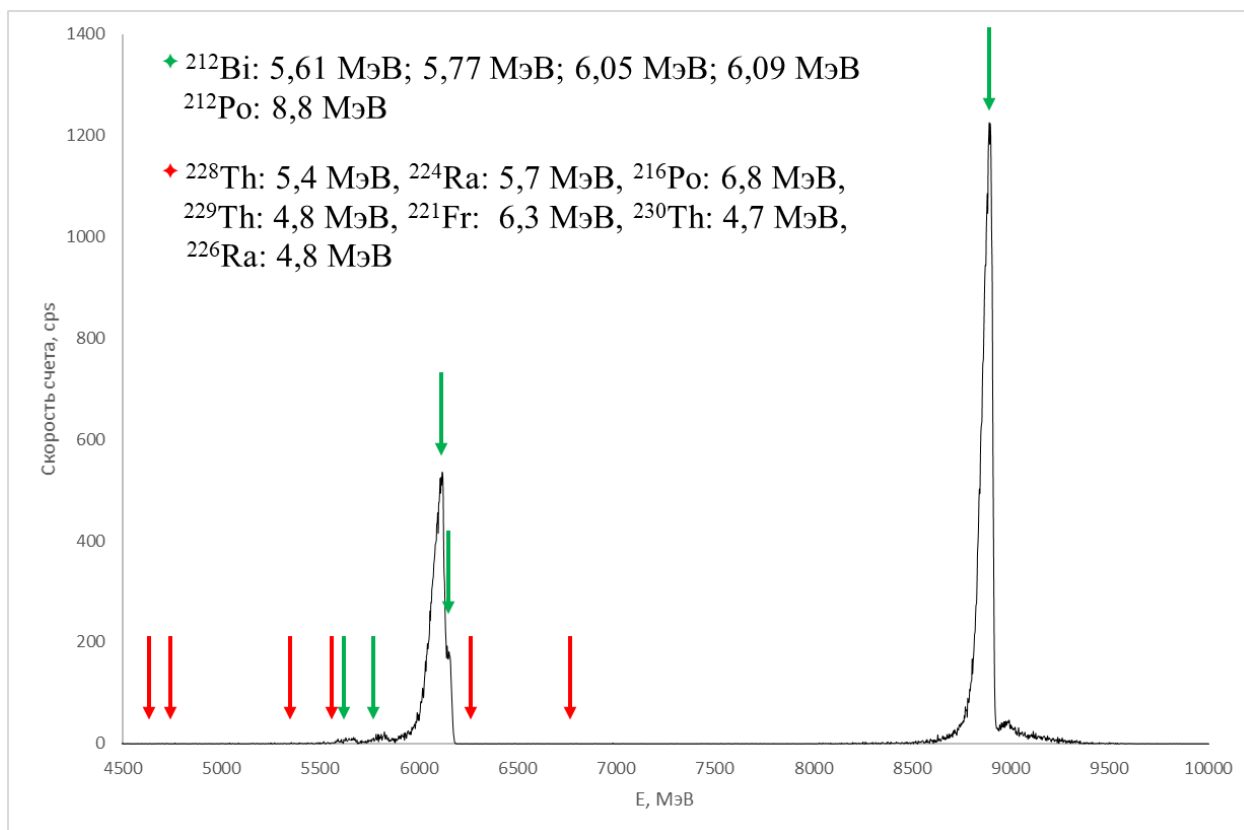


Рисунок 3.14. α -спектр образца на всём диапазоне доступных энергий

Как видно из рис. 3.14, в спектре присутствуют только пики ^{212}Bi и ^{212}Po , причём в области энергий 6000-6200 кэВ видны оба пика ^{212}Bi , более высокоэнергетический из которых является менее вероятным, и потому более низким. Можно было бы предположить, что пики ^{228}Th и ^{224}Ra перекрываются высокоактивным ^{212}Bi с гораздо более коротким периодом полураспада, однако отсутствие на спектре пиков ^{220}Rn и ^{216}Po , дочерних продуктов ^{224}Ra , чьи периоды полураспада составляют менее минуты, говорит об отсутствии всех четверых материнских радионуклидов. Данный анализ позволяет сделать вывод о чистоте выделяемого препарата, однако для надёжности заключения был проведён более длительный α -спектрометрический анализ этого же образца спустя 10 суток, когда можно с уверенностью заявлять, что весь выделенный радионуклид ^{212}Pb и его дочерние радионуклиды подверглись распаду, а присутствие ^{228}Th можно определить даже в ультрамалых количествах за счёт дочерних ^{220}Rn и ^{216}Po . Образец измеряли в течение более двух часов, за это время не было замечено присутствия α -частиц с соответствующими энергиями, количество которых превышало бы фоновые значения, из чего сделан вывод о том, что выделенный образец ^{212}Pb обладает высокой радионуклидной чистотой и не содержит примесей материнских радионуклидов.

Одним из важнейших вопросов получения радиофармпрепаратов является наличие химических примесей в растворе целевого радионуклида, то есть примесей посторонних химических соединений и элементов, источниками которых являются исходные вещества и реактивы, а также побочные продукты реакций. Присутствие химических примесей следует максимально минимизировать в виду их отрицательного вклада в удельную активность препарата и его фармакокинетические свойства. По этой причине раствор наработанного ^{212}Pb был проанализирован на наличие химических примесей на искровом масс-спектрометре JY 38 (Jobin Yvon, Франция) в лаборатории химического анализа Курчатовского комплекса физико-

химических технологий НИЦ «Курчатовский институт». Результаты анализа показаны в табл. 3.2.

Таблица 3.2. Количество химических примесей в элюате генератора ^{212}Pb

Металл	^{212}Pb -генератор, ppm
Fe	0,12
Pb	0,05
Cu	0,005
Al	0,04
As	0,13
Остальные	< 0,3

Предельное содержание каждого из металлов, конкурирующих с ^{212}Pb за образование комплексных соединений (главным образом, Fe и Cu), не превышает значения 0,1-0,2 ppm, что вдохновляет на использование генератора ввиду показанной степени химической чистоты нарабатываемого продукта. Однако для ^{212}Pb -содержащих РФП установление допустимых пределов содержания химических примесей должно проводиться в соответствии с требованиями соответствующей общей фармакопейной статьи.

3.10 Ториевый реактор из органических материалов

С целью визуального наблюдения за поведением смолы в процессе увлажнения был спроектирован и сконструирован ториевый реактор из органических материалов, а именно, полипропилена и полиметилметакрилата (см. рис. 3.15).

Корпус состоит из двух образующих частей. Верхняя часть (1) вместе с крышкой (9) изготовлены из полипропилена. Эта часть вставлялась в конструкцию из полиметилметакрилата и склеивалась с ней; на входе и выходе корпуса встраивались оливы (5,6) для дальнейшего включения в систему. Герметичность обеспечивалась уплотняющими прокладками из фтористой резины (2, 4, 8, 12). Для предотвращения уноса твердых частиц из реактора, на выходе и входе были помещены фильтрующие элементы (13), состоящие из мембранного PTFE-фильтра, скрепленного с двух сторон капроновой сеткой.

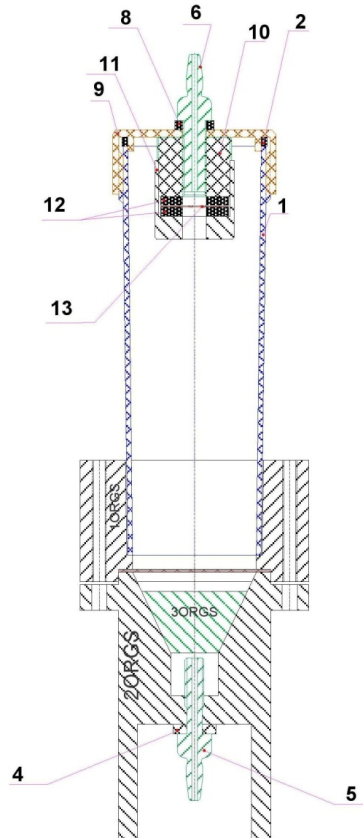


Рисунок 3.15. Органический ториевый реактор. 1 — полипропиленовая часть, 2 — прокладка, 4 — прокладка, 5, 6 — оливы, 8 — прокладка, 9 — крышка, 10 — гайка, 11 — накидная гайка, 12 — прокладки из фтористой резины, 13 — фильтрующие элементы

В сконструированный реактор была загружена неактивная смола, и проведена серия экспериментов с неактивной смолой с целью выяснения гигроскопических свойств ионообменной смолы. Эти сведения могут быть использованы для проектирования и создания последующих образцов ториевых реакторов для генераторов ^{212}Pb , основанных на принципе сбора газообразного ^{220}Rn . Цели экспериментов:

1. Определение скорости поглощения жидкости смолой, содержащейся в реакторе, а также ее осушения.
2. Определение максимального количества влаги, поглощаемого смолой используемой марки.

Для проведения исследования использовались схема, изображенная на рис. 3.16. На правом рисунке указана схема осушения смолы с помощью

Таким образом, можно видеть, что скорость поглощения влаги смолой при комнатной температуре оказалась равной примерно 0,1 г/час. В то же время скорость извлечения влаги при комнатной температуре – 0,05 г/час, что и подвигло провести цикл осушения при 60⁰С. Итого, при обозначенной температуре смола массой 20 г может быть полностью и быстро избавлена от влажности при необходимости.

Наконец, для выяснения максимального значения поглощаемой влаги в водяную баню под 60⁰С были помещены реактор и увлажнитель воздуха, заполненный до верха деионизованной водой. Спустя 2 ч после начала наработки изменение массы реактора составило около 10 г и больше не изменялось. Это говорит о том, что смола способна поглощать влагу в массовом отношении не более 1:2. Этот результат важен для предотвращения конденсации жидкости непосредственно в объеме реактора и, как следствие, вымывания долгоживущих радионуклидов из его объема.

Таким образом, оптимальным режимом работы подобных генераторов будет служить наработка с использованием увлажнения ионообменной смолы-носителя, при этом содержание жидкости для увлажнения не должно составлять более, чем половина массы носителя в реакторе, во избежание конденсации жидкости в смоле с последующим аварийным выносом родительских нуклидов. Также должны быть обеспечены минимальные значения поверхностной плотности слоя, паразитных объемов увлажнителя и реактора, а также скоростей потока газа-носителя.

3.11 Концепция проектирования генераторов ²¹²Pb

Одной из важнейших задач при проектировании и создании установки по производству терапевтического радионуклида является проектирование защиты для ограждения персонала как от излучения родительского радионуклида и его ДПР, так и от излучения производимого терапевтического радионуклида. Эта задача в случае производства ²¹²Pb имеет особую важность в связи с тем, что в цепочке распада ²²⁸Th, как уже было сказано, при распаде дочернего ²⁰⁸Tl присутствует линия жесткого γ -излучения (2,6 МэВ).

Как было сказано, изотопный состав раствора составлял: ^{229}Th – 6,81%; $^{230}\text{Th} \cong 0,08\%$; ^{228}Th – следы; ^{232}Th – 93,11%. Согласно расчетным данным, при времени выдержки 50 лет на 1 г ^{233}U образуется радионуклида ^{229}Th в количестве 45,49 мкКи (214,56 мкг), а также радионуклида ^{228}Th активностью 0,417 мКи. Таким образом, отношение активности $^{228}\text{Th}/^{229}\text{Th}$ составляет 9,2. Для вычисления мощности дозы от источника в табл. 3.4 и табл. 3.5 представлены значения γ -постоянных для ^{229}Th и ^{228}Th вместе с ДПР каждого. Вклад излучения при распаде ^{232}Th и ^{230}Th незначителен и далее не рассматривается, как и для изотопов полония и радионуклидов ^{217}At и ^{220}Rn .

Таблица 3.4. γ -постоянные цепочки ^{229}Th

Радионуклид	$T_{1/2}$	% ветвления предшественника	γ -постоянная, мкЗв·м ² /ч·мКи
^{229}Th	$7,34 \cdot 10^3$ лет	100	7,359
^{225}Ac	10 сут	100	1,914
^{225}Ra	14,9 сут	100	1,541
^{221}Fr	4,9 мин	100	0,441
^{213}Bi	45,59 мин	99,99	1,162
^{209}Tl	2,16 мин	2,2	12,935
Суммарная γ-постоянная			12,701

Таблица 3.5. γ -постоянные цепочки ^{228}Th

Радионуклид	$T_{1/2}$	% ветвления предшественника	γ -постоянная, мкЗв·м ² /ч·мКи
^{228}Th	1,91 года	100	0,793
^{224}Ra	3,63 сут	100	0,11
^{212}Pb	10,64 ч	100	2,734
^{212}Bi	60,55 мин	100	1,948
^{208}Tl	3 мин	36	17,039
Суммарная γ-постоянная			11,719

Тогда мощность эквивалентной дозы D на расстоянии R от такого источника точечной геометрии составит:

$$D = D_1 + D_2 = \frac{1}{R^2} \sum_{i=1}^n A_i K_i^1 BR_i + \frac{1}{R^2} \sum_{j=1}^m A_j K_j^2 BR_j$$

где D_1 – мощность дозы от цепочки ^{229}Th ,

D_2 – мощность дозы от цепочки ^{228}Th ,

A – активность каждого радионуклида в цепочке распада ^{229}Th и ^{228}Th , соответственно,

K – γ -постоянная каждого радионуклида в цепочке распада ^{229}Th и ^{228}Th , соответственно,

BR – коэффициент ветвления каждого радионуклида в цепочке распада ^{229}Th и ^{228}Th , соответственно.

Приведем развернутую таблицу (табл. 3.6) рассчитанной мощности эквивалентной дозы в зависимости от расстояния для активностей 1-3 мКи.

Таблица 3.6. Зависимость рассчитанной мощности эквивалентной дозы от расстояния

Расстояние, см	Мощность дозы, мкЗв/ч (1 мКи)	Мощность дозы, мкЗв/ч (2 мКи)	Мощность дозы, мкЗв/ч (3 мКи)
1	129892	259784	389676
5	5196	10391	15587
10	1299	2598	3897
20	325	649	974
30	144	289	433
40	81	162	244
50	52	104	156

В соответствии с нормами радиационной безопасности, регламентированными НРБ-99/2009, для персонала группы А (персонал, работающий с источниками ионизирующего излучения) при 250 рабочих днях в году предельно допустимая доза для наиболее критического органа (гонады) составит 200 мкЗв/день, что соответствует работе на месте оператора (50 см от установки) в течение 1,5-4 ч, достаточных для исполнения всей работы с генератором (1-3 мКи) по смыву ^{212}Pb . Однако для работы на медицинской площадке требуются более высокие активности в ториевом реакторе. Как было сказано выше, минимально необходимая активность составляет ~ 10 мКи. В этой связи однозначно встает вопрос о проектировании и установке защитных материалов для снижения уровня облучения персонала. В случае большой активности смыв радионуклида должен проводиться автоматизированным способом, иными словами, непрерывно во время работы должно соблюдаться достаточное расстояние от установки до рабочего места оператора.

Для самой энергетической линии γ -излучения источника (линия ^{208}Tl 2,6 МэВ) слой половинного ослабления свинца составляет 21 мм. В рамках проектирования защиты генератора, основанного на принципе принудительного удаления ^{220}Rn , могут иметь место два подхода: 1) защита всей установки и 2) защита отдельных узлов: ториевого реактора и накопителя. В первом случае, при наличии защиты целой установки, но без отдельной защиты ториевого реактора, оператор при проведении ремонтно-профилактических и экспериментальных работ, требующих доступ к спиральному накопителю или иным элементам установки, попадет в поле γ -излучения от источника, мощность дозы которого может достигать 13 мЗв/ч на расстоянии 10 см. С другой стороны, если установить отдельные защиты от излучения ториевого реактора и от излучения накопителя, то при необходимости доступа к накопителю или другим элементам остаточное излучение может не позволить проводить работы до распада остатков ^{212}Pb , могущих производить облучение оператора выше допустимых пределов. По этой причине генератор с высокой активностью источника должен в

обязательном порядке быть оборудован индивидуальной защитой ториевого реактора. В то же время, защита накопителя и побочных элементов в отдельных ситуациях может быть демонтирована, например, в случае простоя установки или постоянного нахождения данного узла на большом расстоянии от оператора.

Помимо рассмотренного выше вопроса, особую важность представляет рассмотрение проблемы радиолиза полимерных материалов, используемых в узлах генератора. Полимеры из-за своего молекулярного строения под действием радиации подвергаются деструкции, сопровождаемой уменьшением молекулярной массы, прочности, повышением растворимости. Существует предел поглощенной дозы, после которой химические и физические свойства полимеров претерпевают существенные изменения. Оценочные расчеты показывают, что при активности ^{228}Th в 37-74 МБк (1-2 мКи), находящегося в равновесии с дочерними радионуклидами, и при величине критической дозы, оцениваемой, в частности, для политетрафторэтилена в 10 кГр, а для полипропилена в 1 МГр, срок службы таких материалов для указанной активности будет измеряться от нескольких суток до нескольких месяцев. В этой связи при проектировании генератора ^{212}Pb высокой активности необходимо учитывать радиолиз полимерных материалов для предотвращения попадания продуктов их радиолиза в конечный препарат.

В этой же связи, используемый в работе ^{228}Th -содержащий сильноосновный анионит наиболее подвержен воздействию ионизирующего излучения непрерывно распадающихся радионуклидов, содержащихся в его объеме. Поскольку ионообменные смолы изначально широко использовались в атомной промышленности, уже достаточно давно изучено влияние ионизирующего излучения на свойства различных смол в зависимости от поглощенной дозы. В частности, значительное изменение обменной емкости, селективности и кинетики ионного обмена, происходящее по причине разрушения функциональных групп, а также других характеристик

происходит с органическими ионообменными смолами уже при поглощенной дозе 10^5 Гр [126].

В этой связи, при создании генератора ^{212}Pb высокой активности, необходимо с достаточной точностью определять величину поглощенной дозы в сорбенте материнского радионуклида с течением времени. А именно, представляется необходимым подсчет точного значения мощности дозы, поглощенной в результате α -, β -, и γ -излучения материнского радионуклида и его дочерних продуктов распада, для оценки безопасного срока службы органических сорбентов такого типа.

Глава 4. Получение прототипов РФП

4.1 Методика мечения адресных молекул радионуклидом ^{212}Pb

Как было сказано выше, целевой радионуклид ^{212}Pb после смыва с генератора содержался в растворе 0,1 М HCl (pH 1,0). Такая среда нежелательна для проведения реакции комплексообразования с БФХА-содержащими молекулами, поскольку при низких значениях pH хелатор DOTA запротонирован, что приводит к меньшей доступности хелатирующих групп для иона металла, т.е. в среде с низким pH при избытке протонов возникает конкуренция катиона (в данном случае Pb^{2+}) с протонами за связывание с молекулой. В этой связи раствор с ^{212}Pb перед добавлением DOTATATE необходимо довести до значений pH в диапазоне 4,5-5,5, являющихся благоприятными для протекания реакции включения катионов в хелатор.

В элюат, полученный с генератора, производилось добавление раствора Na_2CO_3 концентрации 2 М в количествах, обеспечивающих доведение pH раствора. В водном растворе Na_2CO_3 гидролизуется, что обеспечивает щелочную реакцию среды. После этого в образовавшуюся реакционную смесь добавляли водный раствор DOTATATE концентрацией 1 мг/мл или 0,01 мг/мл. После этого вновь при необходимости следовало добавление раствора 2 М Na_2CO_3 для доведения pH до значений $\sim 5,5$.

После смешивания всех компонентов для синтеза реакционную смесь помещали в термостат для проведения синтеза. Конечный объем смеси составлял $1 \pm 0,1$ мл. При повышении температуры среды увеличивается скорость протекания реакции, что играет ключевую роль ввиду периода полураспада ^{212}Pb в 10,64 ч. Вместе с этим, разрушение пептидов происходит при температуре, близкой к 100°C . По этой причине температура синтеза контролировалась на оптимальном значении 90°C .

Активность образца, содержащего ^{212}Pb , измерялась непосредственно перед добавлением DOTATATE, поскольку одним из ключевых параметров мечения адресных молекул является молярная активность, представляющая

собой отношение активности радионуклида к количеству вещества адресных молекул. Поскольку количество доступных на клеточной мембране рецепторов ограничено, при повышении молярной активности на поверхность одной целевой клетки будет приходиться большее количество молекул, содержащих терапевтический радионуклид, что влечет за собой увеличение биологического эффекта и эффективность всего препарата в целом. Итак, после измерения активности следовало добавление DOTATATE в количествах, необходимых для получения требуемой молярной активности. Кроме того, после инкубации в термостате проводились γ -спектрометрические измерения реакционной смеси, поскольку объемная активность изменялась после добавления растворов Na_2CO_3 и DOTATATE. Как было сказано выше, после смыва ^{212}Pb объемная активность наработанного на генераторе ^{212}Pb составляла от 450 до 800 кБк/мл.

Реакция комплексообразования прерывалась охлаждением сосуда со смесью воздействием холодной воды при 15°C . После завершения реакции синтеза и измерения активности приготовленного прототипа РФП следовал отбор части смеси для анализа методом тонкослойной хроматографии для определения радиохимической чистоты препарата, процедура проведения которого описана ниже.

4.2 Условия, влияющие на выход меченя

Для поиска оптимальных условий меченя соединений низкой молярной активности варьировались такие параметры, как количество пептида, а также время инкубации при температуре 90°C . Для синтеза использовались 18, 35, 70 нмоль (25, 50, 100 мкл) водного раствора DOTATATE (1 мг/мл). Для исследования зависимости выхода меченя от времени инкубации сразу после образования реакционной смеси ее разделяли на 4 аликвоты, которые помещались в термостат. Каждая аликвота вынималась из термостата для прерывания реакции синтеза спустя промежутки времени в 5, 15, 30, 60 минут, после чего проводилось определение радиохимической чистоты. Во избежание искажения результатов остановку реакции в каждой аликвоте

проводили добавлением раствора ДТРА концентрации 0,84 мМ, поскольку данное соединение связывает свободные ионы ^{212}Pb , исключая продолжение реакции синтеза ^{212}Pb]DOTATATE при комнатной температуре: $\lg K = 18.9$ для $\text{Pb} + \text{ДТРА}$; $\lg K = 24.3$ для $\text{Pb} + \text{ДОТА}$. В случае высокой молярной активности с целью исследования зависимости радиохимического выхода реакции меченя от молярной активности препарата также варьировалась концентрация пептида при реакции комплексообразования.

4.3 Определение радиохимической чистоты

Разработка методики определения радиохимической чистоты с помощью тонкослойной хроматографии проводилась с более «удобным» радионуклидом ^{210}Pb ($T_{1/2}$ 22,3 г), химически эквивалентным ^{212}Pb , с пиком энергии γ -излучения 46,5 кэВ. После выделения ^{210}Pb согласно процедуре, описанной в Главе 2, следовало проведение синтеза соединения ^{210}Pb]DOTATATE. Синтез проводился при двух температурах, 60°C и 90°C , для сравнения кинетики комплексообразования, при этом использовалось ~ 5 кБк ^{210}Pb в 100 мкл раствора 0,1 М HCl, конечный объем реакционной смеси ~ 400 мкл.

После синтеза комплекса ^{210}Pb]DOTATATE на пластины ТСХ добавлялись независимо друг от друга комплекс и «свободный» ^{210}Pb (в аналогичной среде), после чего следовало проведение тонкослойной хроматографии. Распределение радиоактивности на пластинах было проанализировано методом цифровой автордиографии (рис. 4.1). Изображение, полученное после синтеза комплекса ^{210}Pb]DOTATATE спустя 5, 15 и 30 мин после помещения в термостат (см. рис. 4.1), говорит об успешном разделении фракций в присутствии указанной подвижной фазы ТСХ. В верхней части пластин видно пятно от продвижения «свободного» ^{210}Pb вместе с подвижной фазой, в нижней части – пятно связанного с пептидом радионуклида. Таким образом, разрезая пластину по указанной на рис. 4.1 разделительной линии, становится возможным измерение активности

«свободного» и связанного радионуклида и определение радиохимической чистоты препарата.

Следует отметить случай, при котором радиохимическая чистота может быть некорректно определена ввиду возможного присутствия соединения $[^{210}\text{Pb}]\text{DOTA}$ на старте пластины, что может иметь место при диссоциации комплекса на БФХА и адресную часть. Однако, как было описано выше, реакцию синтеза останавливали добавлением раствора 0,84 мМ ДТРА в реакционную смесь, так что под «свободным» свинцом в данном случае имеется в виду $[^{210}\text{Pb}]\text{ДТРА}$. Поэтому, ввиду схожего поведения ДТРА и DOTA в среде указанной подвижной фазы [115], можно сделать вывод о том, что значение радиохимической чистоты в данном случае определено корректно, т.к. соединение $[^{210}\text{Pb}]\text{DOTA}$ тоже продвигается с фронтом элюента.



Рисунок 4.1. Разделение свободной и связанной фракции ^{210}Pb (пластины с образцами по временам инкубирования – 5, 15 и 30 мин)

После разрезания пластины на фрагменты, последние оборачивались в прозрачную клейкую ленту для предотвращения просыпки радиоактивного

силикагеля с поверхности фрагмента пластины. Затем следовало измерение активности на фрагменте на расстоянии 10 см от поверхности детектора γ -спектрометра и параллельно ей. Как было сказано в методической части, поскольку калибровочная точка находилась на расстоянии в два раза большем, для вычисления РХЧ использовались значения импульсов в секунду (cps).

Использование γ -спектрометра, в отличие от одноканальных γ -детекторов, позволяет определить степень связывания с адресными молекулами не только ^{212}Pb , но и дочернего ^{212}Bi , содержащегося в образце. В частности, измерения активности пика энергии γ -излучения ^{212}Bi позволили сделать вывод о связывании этого радионуклида с молекулой DOTATATE в той же степени, что и ^{212}Pb . Данный результат важен ввиду того, что ^{212}Bi является непосредственно дочерним для ^{212}Pb , и в случае худшего относительно ^{212}Pb связывания этот радионуклид вносил бы отрицательный вклад в радиохимическую чистоту препарата относительно ^{212}Bi . На рис. 4.2 представлен фрагмент спектра γ -излучения образца (фрагмент пластины с $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$) в интервале энергии от 205 до 819 кэВ, представленный в программе ORTEC GammaVision.

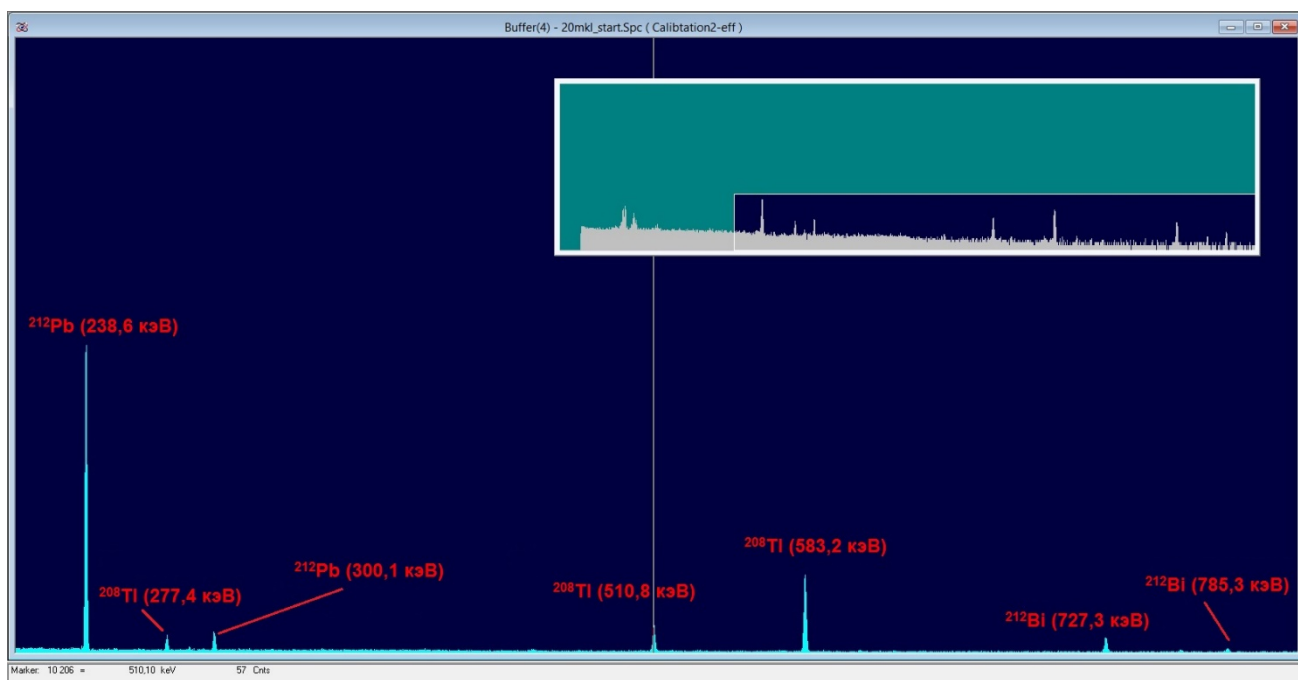


Рисунок 4.2. Фрагмент гамма-спектра в диапазоне энергий 205-820 кэВ

4.4 Синтез [$^{210}\text{Pb}/^{212}\text{Pb}$]DOTATATE

После отработки методики определения радиохимической чистоты радионуклид ^{210}Pb использовался непосредственно для мечения DOTATATE. На рис. 4.3 изображена зависимость радиохимической чистоты меченого комплекса от времени и температуры синтеза при концентрации 10^{-4} М DOTATATE в реакционной смеси с ^{210}Pb .

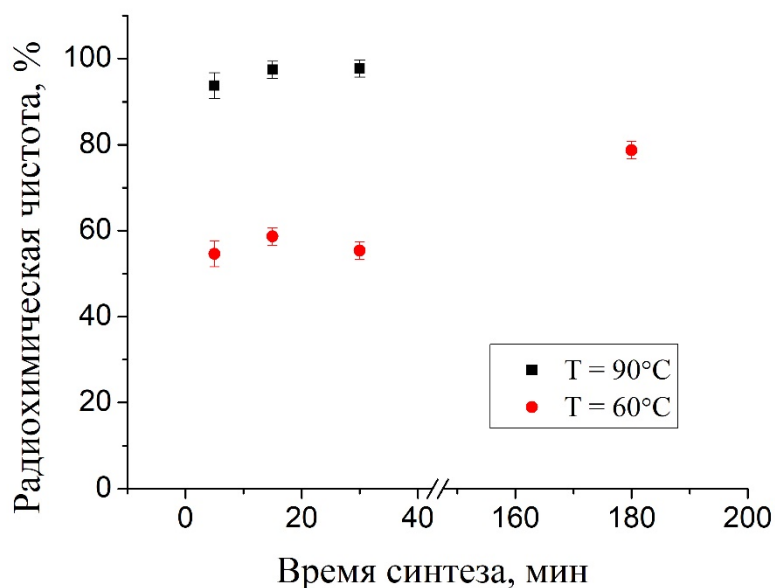


Рисунок 4.3. Зависимость радиохимической чистоты [^{210}Pb]DOTATATE от времени и температуры синтеза

Видно, что РХЧ комплекса [^{210}Pb]DOTATATE после остановки синтеза, проведенного по описанной выше процедуре, при 60°C даже спустя 3 ч составила не более 80%, что, разумеется, очевидно с точки зрения кинетики комплексообразования циклического БФХА ДОТА. В этой связи далее для проведения комплексообразования производили инкубирование при 90°C , при этом РХЧ достигала значений более 90% спустя небольшие промежутки времени синтеза (см. рис. 4.3)

Синтез комплекса [^{212}Pb]DOTATATE показал высокий выход мечения ($> 90\%$) для всех указанных выше концентраций пептида (см. рис. 4.4) уже через 5 мин после начала инкубации при 90°C . На рис. 4.4 также изображена зависимость радиохимической чистоты от времени синтеза при рассматриваемых концентрациях пептида в реакционной смеси. Однако,

несмотря на эффективное комплексообразование БФХА и Pb^{2+} уже спустя 5 мин, далее синтез проводился на протяжении 60 мин, поскольку концентрацию DOTATATE уменьшали на два порядка, что подробно описано далее.

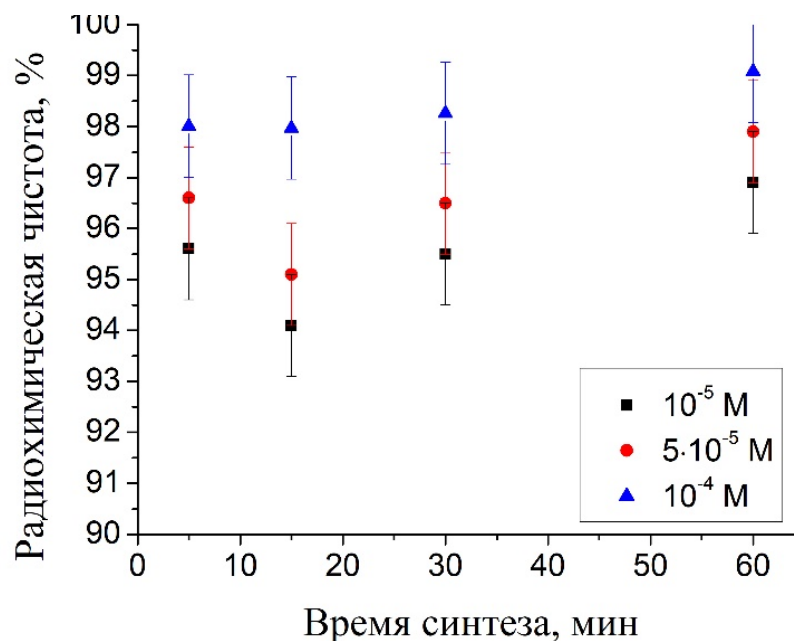


Рисунок 4.4. Зависимость радиохимической чистоты $[^{212}Pb]DOTATATE$ от времени синтеза при различных концентрациях лиганда

Из рис. 4.4 видно, что высокий уровень выхода реакции мечения достигается при всех обозначенных количествах DOTATATE и ^{212}Pb . Значения pH реакционной смеси при этом согласуются с аналогичными исследованиями по мечению радионуклидами синтетических пептидов [127]. В связи с достигнутыми результатами дальнейший интерес начал представлять синтез и исследование препарата более высокой молярной активности. Здесь заранее нужно отметить, что имеет место зависимость между стабильностью синтезированного комплекса и его удельной активностью по причине радиолитического разрушения препарата [128]. Один из подходов к решению проблемы радиолитического разрушения предусматривает использование поглотителей свободных радикалов (антиоксидантов), таких как аскорбиновая кислота, гентизиновая кислота, некоторые спирты [128]. Отдельный интерес, за рамками данной работы, могут представлять исследования с добавлением в

реакционную смесь также соединений, содержащих стабильный изотоп Pb^{2+} , что позволит изучить выход реакции мечения с нужным соотношением металл/лиганд без риска диссоциации комплекса.

Итак, далее следовало добавление различных количеств раствора DOTATATE низкой концентрации (0,01 мг/мл) для повышения молярной активности. На рис. 4.5 изображена зависимость радиохимического выхода реакции мечения от концентрации лиганда, включая рассмотренный случай низкой молярной активности. Из рис. 4.5 видно, что стабильные результаты по радиомечению были достигнуты вплоть до концентрации 10^{-7} М. Несмотря на то, что достигнутые значения используются в исследованиях [71], представляется, что стабильные результаты выхода реакции мечения препаратов более высокой молярной активности могут быть достигнуты путем очищения раствора, содержащего ^{212}Pb , например, с помощью методов ионообменной хроматографии.

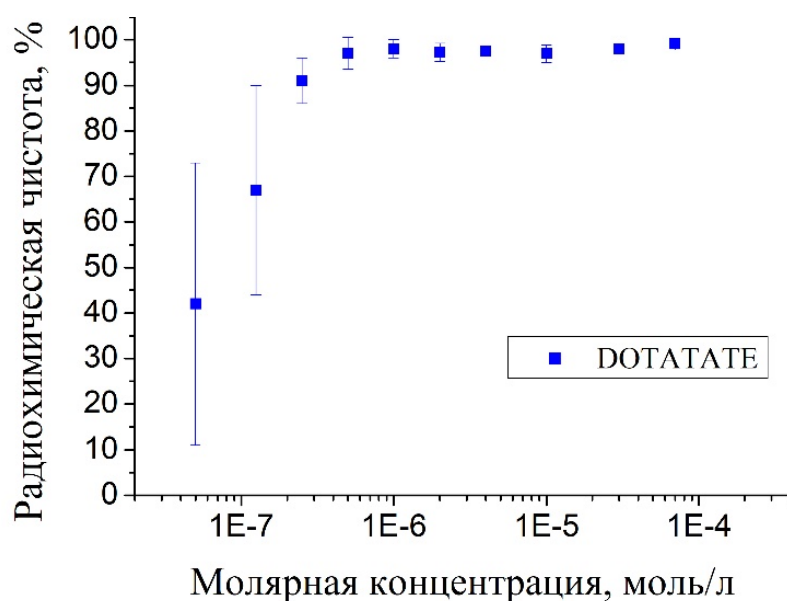


Рисунок 4.5. Зависимость радиохимической чистоты $[^{212}Pb]DOTATATE$ от концентрации лиганда

Поскольку количество доступных на клеточной мембране рецепторов ограничено, достижение высокой удельной активности меченых пептидов является важным аспектом производства терапевтических радиофармпрепаратов, в связи с чем проблема диссоциации комплексов

высокой удельной активности является одной из важнейших при их разработке. По этой причине отдельный интерес могут представлять исследования по кинетической стабильности комплекса в физиологических средах в случае высокой молярной активности.

Также необходимо отметить, что достигнутые результаты мечения позволяют в перспективе разработать автоматизированный модуль синтеза комплексов на основе пептидов. Данная задача становится необходимой при наличии активностей ^{212}Pb на уровне терапевтических доз для пациентов (от 10 мКи), что было показано ранее. Разработка такого автоматизированного модуля возможна после определения условий проведения эффективного мечения: температуры инкубации, количества добавляемых компонентов в реакционную смесь, их концентраций и др.

4.5 Синтез ^{212}Pb]DOTA-HSA-ZHER2

Достижение максимального отношения количества радионуклида к количеству комплексообразователя в случае молекулы DOTATATE, для которой химия комплексообразования хорошо изучена [71], позволило перейти к мечению нового комплекса DOTA-HSA-ZHER2, синтезированного для таргетной терапии опухолей, клетки которых обладают гиперэкспрессией антигена HER2/neu.

К полученному раствору радионуклида ^{212}Pb добавляли раствор фосфатного буфера 1 М KH_2PO_4 в 1/10 части от общего объема реакционной смеси для предотвращения гидролиза радионуклида, сохранения его ионной формы при одновременном повышении pH. Также во избежание денатурации белкового носителя DOTA-HSA-ZHER2 в процессе мечения доводили pH смеси концентрированным раствором NaOH до значения 4,5-5,5. Затем для реакции комплексообразования ^{212}Pb в полученный раствор добавляли 100-125 мкл раствора биоконъюгата DOTA-HSA-ZHER2 в концентрации 1 мг/мл и инкубировали в течение 60 мин при температуре 60°C с кратковременным перемешиванием каждые ~15 мин. Температура 60°C является максимальной

для человеческого сывороточного альбумина, выше которой он подвергается необратимой денатурации.

Радиохимическую чистоту (РХЧ) меченого соединения определяли методом эксклюзионной хроматографии на гель-фильтрационной колонке (ГФК) Illustra NAP-5 Column (GE HealthCare, порог фракционирования 5 кДа), уравновешенной 0,1 М MES. Радиоактивно меченые конъюгаты элюировали тем же буфером, а несвязавшиеся с конъюгатом радионуклиды смывали раствором 0,1 М лимонной кислоты. РХЧ определяли как процентное отношение суммарной активности всех фракций, содержащих радиоконъюгат, к суммарной активности во всех фракциях смывочных растворов. ГФК колонку калибровали путем пропускания через колонку свободных радионуклидов с отбором 0,1 мл элюатов, что позволило построить кривые элюирования свободного ^{212}Pb (рис. 4.6, черные линии). Видно, что в случае очистки [^{212}Pb] DOTA-HSA-ZHER2 белковая фракция полностью отделяется от фракции со свободным ^{212}Pb , которая в свою очередь смывается с колонки раствором 0,1 М лимонной кислоты (рис. 4.6, красная линия).

Для подтверждения наличия белка в аликвоты добавляли реагент Кумасси, в результате чего образцы, содержащие белок, окрашивались (синяя область на рис. 4.6). Было обнаружено, что фракции, следующие за нулевой, за исключением фракций смыва раствором лимонной кислоты, содержат в себе белковую компоненту, что подтвердило корректность указанной схемы разделения.

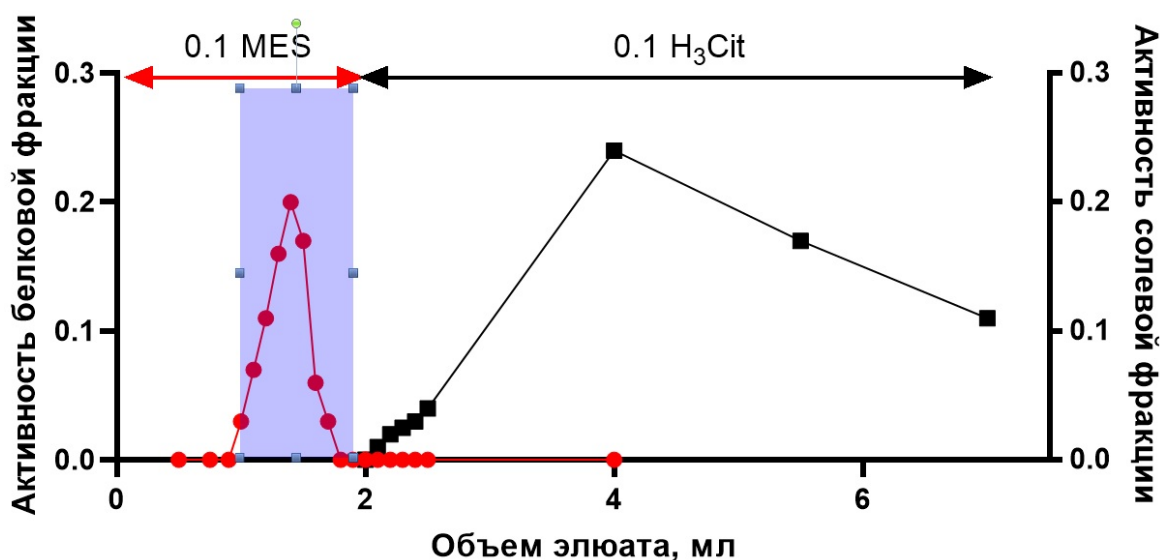


Рисунок 4.6. Диаграмма элюирования $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$ (красная линия) и свободного ^{212}Pb (черная линия)

В этих условиях РХЧ комплекса $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$ составила $(82\pm 5)\%$, соответственно. Причина такого уровня РХЧ состоит в отношении количества свободных катионов к количеству хелаторов на поверхности молекул ЧСА. Широко известно, что на РХЧ препарата влияет не только концентрация ионов целевого радионуклида, но и концентрация примесных металлов. Меньшего содержания примесных ионов (железа, меди, цинка и др.) можно добиться очищением раствора, в частности, методами ионообменной хроматографии.

После разделения на ГФК наиболее активные фракции были объединены для дальнейшего использования в экспериментах по кинетической стабильности и цитотоксичности. Во всех случаях перед добавлением меченого конъюгата к среде доводили рН до биологически совместимых значений (рН 5,5-6,5). Объемная активность $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$ перед применением на клеточных культурах составила 80 кБк/мл.

Итого, можно сказать, что достижение стабильных результатов комплексообразования ^{212}Pb и комплекса DOTATATE, содержащего БФХА DOTA, позволило перейти к синтезу нуклид-содержащего комплекса на основе адресного полипептида и человеческого сывороточного альбумина, в результате чего был получен комплекс $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$.

Глава 5. Исследование свойств меченых радиоконъюгатов

5.1 Исследование кинетической стабильности $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$

Стабильность комплекса $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$ была исследована при комнатной температуре в изотоническом растворе. Анализ вещества на ТСХ показал, что спустя все обозначенные промежутки времени нахождения в среде стабильность комплекса составляет не менее 95%.

Доля диссоциировавших молекул $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$, ионы Pb^{2+} которых связались с белками сыворотки, с течением всего времени наблюдения сохраняется на уровне 15-20%, что говорит о сохраняющемся терапевтическом потенциале препарата. Целостность молекул комплекса $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$ в присутствии сыворотки остается на уровне 80-85% на протяжении всего периода полураспада ^{212}Pb (см. рис. 5.1).

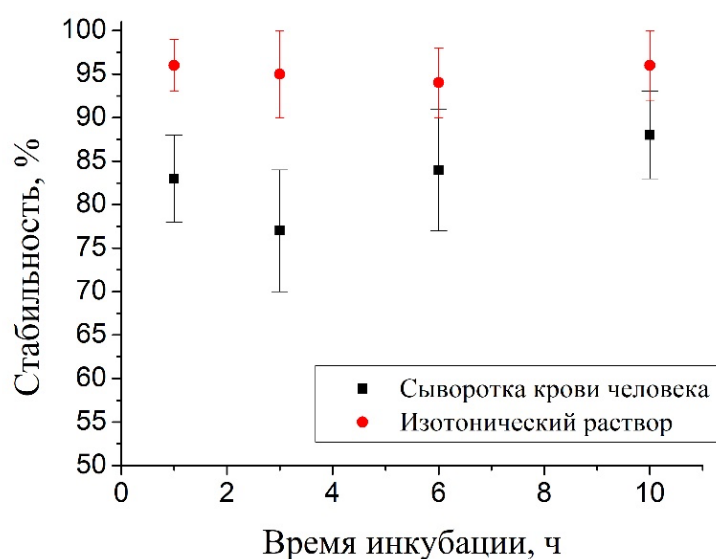


Рисунок 5.1. Кинетическая стабильность $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$

Следует отметить, что стабильность может быть преувеличена в случае, если часть ионов Pb^{2+} покинула комплекс и затем связалась с небольшими лигандами сыворотки, такими как фосфаты или цитраты, которые не подверглись осаждению. Разложение комплекса в сыворотке крови может возникать в результате ряда причин, например, из-за кинетической нестабильности комплекса, за которой может следовать

комплексообразование с другими протеинами и лигандами. Поэтому методы анализа стабильности меченого пептида в сыворотке должны быть способны определять все возможные продукты диссоциации комплекса.

В этой связи для верификации результатов по стабильности препарата следует проводить анализ с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии [129]. Идеальным случаем может служить использование препаративной ВЭЖХ для производства препарата высокой химической чистоты [71]. Представляет интерес переход к изучению кинетической стабильности методами ВЭЖХ, электрофореза, эксклюзионной хроматографии на предмет наличия простых несвязанных ионов, меченых аминокислот, пептидных фрагментов и белков, за рамками данной работы.

5.2 Исследование стабильности [^{212}Pb]DOTA-HSA-ZHER2

Исследуемый образец [^{212}Pb]DOTA-HSA-ZHER2 (40 кБк, 0,5 мл) добавляли к среде эмбриональной телячьей сыворотки при температуре 37⁰С в отношении 1:1. Вместе с этим, в раствор, содержащий ^{212}Pb (56 кБк, 1 мл) добавляли 110 мкл раствора 1,5 М NaCl, так что итоговая концентрация NaCl в смеси составляла значение изотонического раствора.

Через 1 ч, 2 ч, 3 ч из каждой из образованных смесей отбирали аликвоту с последующим элюированием на ГФК и расчетом стабильности. На протяжении 3 ч соединение [^{212}Pb]DOTA-HSA-ZHER2 сохраняет стабильность более 90%. Как уже было сказано, стабильность соединения может быть переоценена в случае, если часть катионов покинула комплекс и связалась с лигандами сыворотки, такими как альбумин или трансферрин, которые не подверглись разделению на гель-фильтрационной колонке с комплексом. Для верификации результатов по стабильности следует проводить анализ с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии. Приведенные результаты представлены на рис. 5.2.

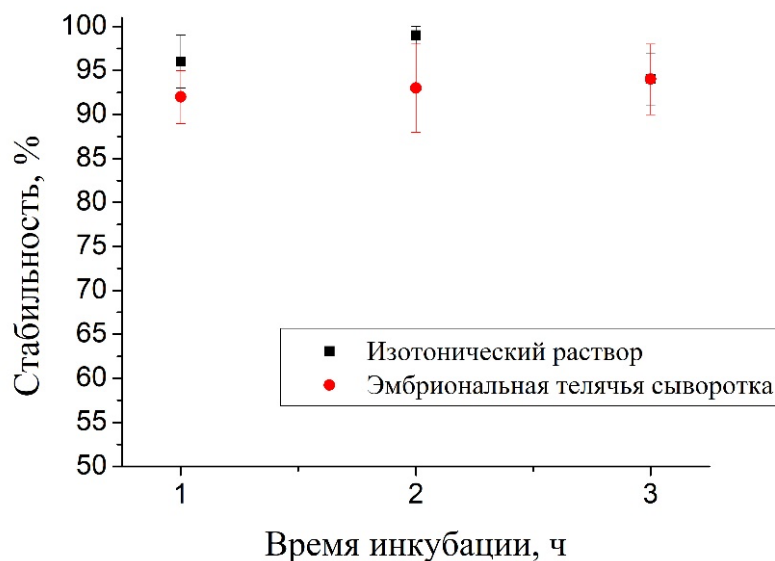


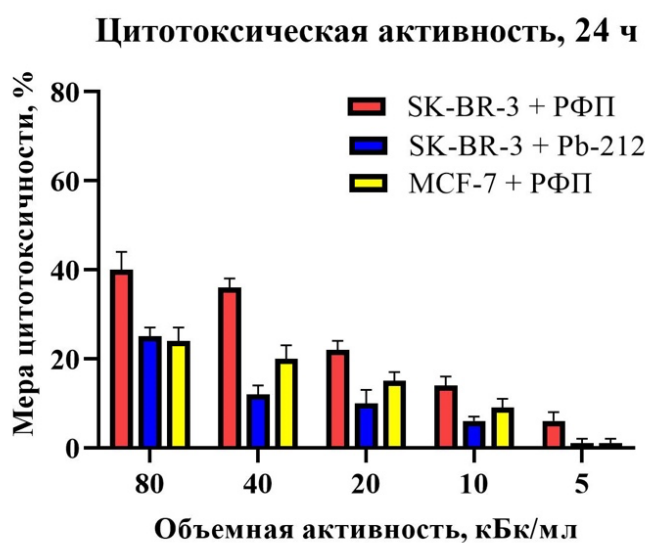
Рисунок 5.2. Кинетическая стабильность $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$

5.3 Исследование цитотоксичности $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$

Полученный комплекс был исследован на предмет цитотоксичности. Исследования проводились за рамками данной работы по стандартным методикам сотрудниками Национального медицинского исследовательского центра радиологии Московского научного исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена, однако, в них использовались препараты, приготовленные непосредственно в рамках данной работы автором. Для оценки цитотоксической активности РФП использовали линии клеток рака молочной железы человека SK-BR-3 с гиперэкспрессией онкомаркера HER2/neu. Линию клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 с низким уровнем экспрессии HER2/neu использовали в качестве отрицательного контроля. Мерой цитотоксичности служила процентная доля погибших клеток. Все тесты проводили в триплетах, величины оптической плотности, полученные в трех независимых лунках, усредняли. Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica v. 10.0. Достоверность различий между группами данных оценивали с применением t-критерия Стьюдента. Различия

считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты исследований представлены на рис. 5.3. При инкубации клеток линии SK-BR-3 в течение 24 ч при объемных активностях ^{212}Pb в диапазоне 5-80 кБк/мл, было зафиксировано снижение числа живых клеток относительно контрольной группы (MES-буфер). Ингибирование пролиферации для опухолевых клеток культуры SK-BR-3 при объемной активности радионуклида в составе РФП 80 кБк/мл составляло 40%, в то время как для контрольной линии MCF-7 при той же активности данная величина оказалась ниже примерно в 2 раза.

а)



б)

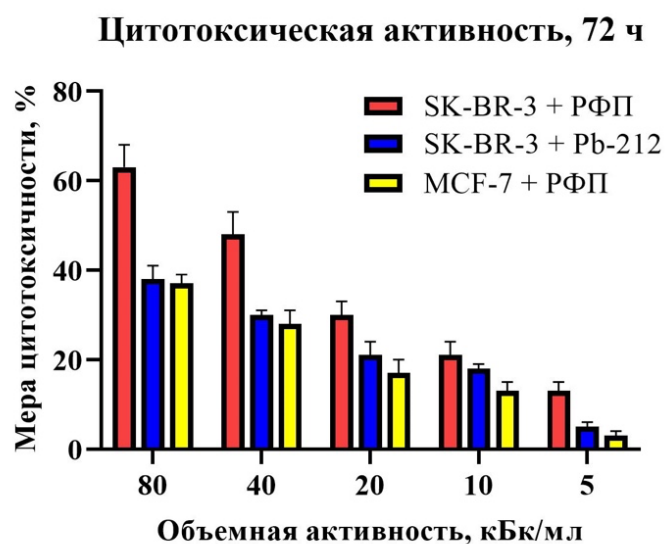


Рисунок 5.3. Цитотоксическая активность $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$ а) спустя 24 ч, б) спустя 72 ч

С увеличением времени инкубации до 72 ч на клетках, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu (SK-BR-3), отмечено значительное увеличение цитотоксического эффекта: максимальное ингибирование пролиферации опухолевых клеток в культуре составило 63% при объемной активности 80 кБк/мл. Следует отметить, что количество жизнеспособных клеток увеличивалось со снижением концентрации экспериментального образца препарата, то есть выявлен дозозависимый цитотоксический эффект исследуемого РФП. Ингибирование пролиферации при использовании ^{212}Pb в виде соли не превысило 48%. Таким образом, показано, что $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-HSA-ZHER2}$ обладает специфической цитотоксической активностью только в отношении линии SK-BR-3, гиперэкспрессирующей онкомаркер HER2/neu.

Заключение

1. Разработанный лабораторный генератор позволяет непрерывно получать ^{212}Pb с эффективностью по материнскому радионуклиду до 40%. Генератор обладает удобными эксплуатационными характеристиками, позволяет получать радионуклид автономно при нормальных условиях, без необходимости использования концентрированных растворов кислот. Нарботанный ^{212}Pb находится в растворе 0.1 М HCl, пригодном для использования в реакциях комплексообразования.
2. Содержание долгоживущих материнских радионуклидов в растворе ^{212}Pb не превышает пределов обнаружения, что позволяет исключить операции по его очистке. Содержание в продукте генератора химических примесей, конкурирующих с ^{212}Pb за образование комплексных соединений, составляет не более 0,1-0,2 ppm, что не препятствует использованию продукта генератора для синтеза меченых соединений.
3. Комплексообразование ^{212}Pb и адресной молекулы DOTATATE происходит эффективно (РХЧ >99%) при температуре синтеза 90°C в широком диапазоне концентраций DOTATATE. Отработанная методика синтеза модельного комплекса $[\text{}^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$ пригодна для разработки технологии получения радиофармацевтических препаратов на основе ^{212}Pb .
4. Присоединение ^{212}Pb к молекуле DOTA-HSA-ZHER2 происходит эффективно (РХЧ макс. ~85%) при температуре синтеза 60°C . Использование гель-фильтрационной хроматографии позволяет эффективно отделить меченый комплекс от несвязанного ^{212}Pb , что позволяет рекомендовать этот вид хроматографии в качестве препаративного для данной адресной молекулы.

5. Стабильность синтезированных комплексов сохраняется на уровне не менее 95% в изотоническом растворе, а в сыворотке крови – не менее 80-85%, что свидетельствует о сохранении терапевтического потенциала синтезированных соединений.
6. Синтезированные комплексные соединения [^{212}Pb]DOTA-HSA-ZHER2 в экспериментах по определению цитотоксичности показали присутствие дозозависимого цитотоксического эффекта на клеточных культурах целевого рака молочной железы, что говорит о перспективности как радионуклида ^{212}Pb , так и в целом полученного соединения для дальнейших исследований в области таргетной терапии онкологических заболеваний.

Список условных обозначений и сокращений

ДОТА – 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусная кислота;

ДТРА – Диэтилентриамин-N,N,N,N,N-пентауксусная кислота;

Да – дальтон, единица измерения молекулярной массы, равная 1 г/моль;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

pH – водородный показатель;

БФХА – бифункциональный хелатирующий агент;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДПР – дочерние продукты распада;

РХЧ – радиохимическая чистота;

РНТ – радионуклидная терапия;

РФП – радиофармацевтический препарат;

ЛПЭ – линейная передача энергии;

ОБЭ – относительная биологическая эффективность;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

ИИ – ионизирующее излучение.

Список литературы

1. Cancer // World Health Organization. [Official site]. URL: <http://www.who.int/cancer/en/> (дата обращения: 01.03.2021).
2. Klenov G.I., Khoroshkov V.S. Hadron therapy: history, status, prospects // Uspekhi Fizicheskikh Nauk. Uspekhi Fizicheskikh Nauk (UFN) Journal, 2016. Vol. 186, № 8. P. 891–911.
3. Волшебная пуля Пауля Эрлиха // Практик Ф. [Электронный ресурс]. URL: <http://fp.com.ua/articles/volshebnaaya-pulya-paulya-erliha/> (дата обращения: 01.03.2021).
4. Кодина Г.Е. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины [Электронный ресурс] // Издательский дом МЭИ. 2019. URL: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785383012413.html> (дата обращения: 07.11.2019).
5. Yong K., Brechbiel M.W. Towards translation of ^{212}Pb as a clinical therapeutic; Getting the lead in! // Dalton Transactions. 2011. Vol. 40, № 23. P. 6068–6076.
6. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. 1975. Vol. 256, № 5517. P. 495–497.
7. Barbieri F. et al. Peptide receptor targeting in cancer: The somatostatin paradigm // International Journal of Peptides. 2013. Vol. 2013. ID 926295.
8. Xu C., Zhang H. Somatostatin receptor based imaging and radionuclide therapy // BioMed Research International. Hindawi Publishing Corporation, 2015. Vol. 2015. ID 917968.
9. Sharkey R.M., Burton J., Goldenberg D.M. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma: a critical appraisal // Expert Review of Clinical Immunology. 2005. Vol. 1, № 1. P. 47–62.
10. Жизнь, рак и радиация / С. П. Ярмоненко. - М. : Фирма коммерч. рекламы и науч.-техн. пропаганды "ИздАТ". - 1993. - 159 с.
11. Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis // Environmental and Molecular Mutagenesis. 2017. Vol. 58, № 5. P. 235–263.

12. Ward J.F. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 1988. Vol. 35, № С. P. 95–125.
13. Изотопы: свойства, получение, применение. В 2-т. Т. 1 / под ред. Баранова В.Ю. Москва: ФИЗМАТЛИТ. - 2005. - 600 с.
14. Солодкий В.А., Иванова В.В., Панынин Г.А., Ставицкий Р.В. Возможности применения радиофармацевтического препарата «Октреотида-¹¹¹In» в онкологической практике // *Радиология – практика*. – 2010. – № 4. – С. 42–48.
15. Lamberts S.W.J. et al. Drug therapy: Octreotide // *New England Journal of Medicine*. 1996. Vol. 334, № 4. P. 255–260.
16. Öberg K. et al. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system // *Annals of Oncology*. 2004. Vol. 15, № 6. P. 966–973.
17. Симоненко В.Б., Дулин П.А., Маканин М.А. Возможности таргетной терапии нейроэндокринных опухолей // *Клиническая медицина*. 2014. Vol. 8. P. 5–14.
18. Pandey U. et al. A systematic study on the utility of CHX-A''-DTPA-NCS and NOTA-NCS as bifunctional chelators for ¹⁷⁷Lu radiopharmaceuticals // *Applied Radiation and Isotopes*. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 127. P. 1–6.
19. Das T. et al. On the preparation of a therapeutic dose of ¹⁷⁷Lu-labeled DOTA-TATE using indigenously produced ¹⁷⁷Lu in medium flux reactor // *Applied Radiation and Isotopes*. 2007. Vol. 65, № 3. P. 301–308.
20. Chakraborty S. et al. Prospects of medium specific activity ¹⁷⁷Lu in targeted therapy of prostate cancer using ¹⁷⁷Lu-labeled PSMA inhibitor // *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. John Wiley and Sons Ltd, 2016. P. 364–371.
21. Michel R.B. et al. ¹⁷⁷Lu-antibody conjugates for single-cell kill of B-lymphoma cells in vitro and for therapy of micrometastases in vivo // *Nuclear Medicine and Biology*. Elsevier Inc., 2005. Vol. 32, № 3. P. 269–278.
22. Cremonesi M. et al. Dosimetry in peptide radionuclide receptor therapy: A review // *Journal of Nuclear Medicine*. 2006. Vol. 47, № 9. P. 1467–1475.

23. Cutler C.S. et al. Radiometals for combined imaging and therapy // *Chemical Reviews*. 2013. Vol. 113, № 2. P. 858–883.
24. Ray G.L. et al. Pre-clinical assessment of ^{177}Lu -labeled trastuzumab targeting HER2 for treatment and management of cancer patients with disseminated intraperitoneal disease // *Pharmaceuticals*. 2011. Vol. 5, № 1. P. 1–15.
25. Larsson M. Therapy with ^{177}Lu -octerotate pharmacokinetics dosimetry and kidney toxicity: Doctoral thesis. – Gothenburg, 2014. – 69 P.
26. Khan S. et al. Quality of life in 265 patients with gastroenteropancreatic or bronchial neuroendocrine tumors treated with [^{177}Lu -DOTA 0,Tyr 3]octreotate // *Journal of Nuclear Medicine*. *J Nucl Med*, 2011. Vol. 52, № 9. P. 1361–1368.
27. Forrer F. et al. Treatment with ^{177}Lu -DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with ^{90}Y -DOTATOC // *Journal of Nuclear Medicine*. 2005. Vol. 46, № 8. P. 1310–1316.
28. Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008. Vol. 60, № 12. P. 1347–1370.
29. Price E.W., Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals // *Chemical Society Reviews*. 2014. Vol. 43, № 1. P. 260–290.
30. Kam B.L.R. et al. Lutetium-labelled peptides for therapy of neuroendocrine tumours // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2012. Vol. 39, № SUPPL.1.
31. Elgqvist J. et al. The potential and hurdles of targeted alpha therapy - clinical trials and beyond // *Frontiers in Oncology*. Frontiers Research Foundation. – 2014. – Vol. 3. – ID 324.
32. Soyland C., Hassfjell S.P. Survival of human lung epithelial cells following in vitro α -particle irradiation with absolute determination of the number of α -particle traversals of individual cells // *International Journal of Radiation Biology*. 2000. Vol. 76, № 10. P. 1315–1322.

33. Pugliese M. et al. Inactivation of individual mammalian cells by single α -particles // *International Journal of Radiation Biology*. 1997. Vol. 72, № 4. P. 397–407.
34. Hei T.K. et al. Mutagenic effects of a single and an exact number of α -particles in mammalian cells // *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences*, 1997. Vol. 94, № 8. P. 3765–3770.
35. Allen B.J. et al. Targeted alpha therapy for cancer // *Physics in Medicine and Biology*. 2004. Vol. 49, № 16. P. 3703–3712.
36. Blakely E.A., Kronenberg A. Heavy-Ion Radiobiology: New Approaches to Delineate Mechanisms Underlying Enhanced Biological Effectiveness // *Radiation Research. JSTOR*, 1998. Vol. 150, № 5. P. S126.
37. Howell R.W. et al. Radiotoxicity of Gadolinium-148 and Radium-223 in Mouse Testes: Relative Biological Effectiveness of Alpha-Particle Emitters In Vivo // *Radiation Research. JSTOR*, 1997. Vol. 147, № 3. P. 342.
38. Azure M.T. et al. Biological Effect of Lead-212 Localized in the Nucleus of Mammalian Cells: Role of Recoil Energy in the Radiotoxicity of Internal Alpha-Particle Emitters // *Radiation Research. JSTOR*, 1994. Vol. 140, № 2. P. 276.
39. Goodhead D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: Clustered damage in DNA // *International Journal of Radiation Biology*. 1994. Vol. 65, № 1. P. 7–17.
40. Graf F. et al. DNA double strand breaks as predictor of efficacy of the alpha-particle emitter Ac-225 and the electron emitter Lu-177 for somatostatin receptor targeted radiotherapy // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, № 2.
41. Dadachova E. Cancer Therapy with Alpha-Emitters Labeled Peptides // *Seminars in Nuclear Medicine. Elsevier Inc.*, 2010. Vol. 40, № 3. P. 204–208.
42. Rizvi S.M.A. et al. In vitro and preclinical studies of targeted alpha therapy (TAT) for colorectal cancer // *Colorectal Disease*. 2001. Vol. 3, № 5. P. 345–353.
43. Aurlien E. et al. Radiation doses to non-Hodgkin's lymphoma cells and normal bone marrow exposed in vitro. Comparison of an α -emitting

- radioimmunoconjugate and external γ -irradiation // International Journal of Radiation Biology. 2002. Vol. 78, № 2. P. 133–142.
44. Behr T.M. et al. Studies on the Red Marrow Dosimetry in Radioimmunotherapy: An Experimental Investigation of Factors Influencing the Radiation-induced Myelotoxicity in Therapy with β -, Auger/Conversion Electron-, or α -Emitters // Clinical Cancer Research. 1999. Vol. 5, № 10.
 45. Nayak T.K. et al. Somatostatin-receptor-targeted α -emitting ^{213}Bi is therapeutically more effective than β -emitting ^{177}Lu in human pancreatic adenocarcinoma cells // Nuclear Medicine and Biology. Elsevier, 2007. Vol. 34, № 2. P. 185–193.
 46. Miederer M. et al. Preclinical evaluation of the α -particle generator nuclide ^{225}Ac for somatostatin receptor radiotherapy of neuroendocrine tumors // Clinical Cancer Research. 2008. Vol. 14, № 11. P. 3555–3561.
 47. Norenberg J.P. et al. ^{213}Bi -[DOTA $_0$,Tyr $_3$]octreotide peptide receptor radionuclide therapy of pancreatic tumors in a preclinical animal model // Clinical Cancer Research. 2006. Vol. 12, № 3 I. P. 897–903.
 48. Kratochwil C. et al. ^{213}Bi -DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. Springer Berlin Heidelberg, 2014. Vol. 41, № 11. P. 2106–2119.
 49. Goodhead D.T. Mechanisms for the Biological Effectiveness of High-LET Radiations // Journal of Radiation Research. J Radiat Res, 1999. Vol. 40. P. 1–13.
 50. Leichner P.K. Radiation dosimetry of monoclonal antibodies: practical considerations // Nuclear Medicine / ed. Henkin R.E. et al. St. Louis, 1996. P. 558–562.
 51. Rotmensch J. et al. Comparison of short-lived high-LET α -emitting radionuclides lead-212 and bismuth-212 to low-LET X-rays on ovarian carcinoma // Gynecologic Oncology. 1989. Vol. 35, № 3. P. 297–300.
 52. Rotmensch J. et al. The development of α -emitting radionuclide lead 212 for the potential treatment of ovarian carcinoma // American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1989. Vol. 160, № 4. P. 789–797.

53. Rotmensch J. et al. The effect of the α -emitting radionuclide ^{212}Pb on human ovarian carcinoma: A potential new form of therapy // *Gynecologic Oncology*. 1989. Vol. 32, № 2. P. 236–239.
54. Rosenow M.K. et al. Properties of Liposomes Containing ^{212}Pb // *International Journal of Nuclear Medicine and Biology*. 1983. Vol. 10, № 4.
55. Saidi A. et al. Targeted Alpha Therapy with ^{212}Pb -NNV003 for the Treatment of CD37 Positive B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) // *Blood*. American Society of Hematology. – 2018. – Vol. 132. – № Supplement 1. – ID 4422.
56. Horak E. et al. Radioimmunotherapy targeting of HER2/neu oncoprotein on ovarian tumor using lead-212-DOTA-AE1. // *J Nucl Med*. 1997. Vol. 38, № 12. P. 1944–1950.
57. Ruble G. et al. The use of ^{212}Pb -labeled monoclonal antibody in the treatment of murine erythroleukemia // *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. Elsevier Inc., 1996. Vol. 34, № 3. P. 609–616.
58. Repetto-Llamazares A.H. v. et al. Targeted Cancer Therapy with a Novel Anti-CD37 Beta-Particle Emitting Radioimmunoconjugate for Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – № 6. – ID e0128816.
59. Kratochwil C. et al. ^{213}Bi -DOTATOC receptor-targeted α -radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumors refractory to beta radiation: a first-in-human experience // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2014. Vol. 41, № 11. P. 2106–2119.
60. Schneider N.R. et al. Biodistribution of ^{212}Pb conjugated trastuzumab in mice // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2013. Vol. 296, № 1. P. 75–81.
61. Tan Z. et al. Significant systemic therapeutic effects of high-LET immunoradiation by ^{212}Pb -trastuzumab against prostatic tumors of androgen-independent human prostate cancer in mice // *International Journal of Oncology*. 2012. Vol. 40, № 6. P. 1881–1888.
62. Milenic D.E. et al. α -Particle Radioimmunotherapy of Disseminated Peritoneal Disease Using a ^{212}Pb -Labeled Radioimmunoconjugate Targeting HER2 // *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2005. Vol. 20, № 5. P. 557–568.

63. Milenic D.E. et al. Potentiation of High-LET Radiation by Gemcitabine: Targeting HER2 with Trastuzumab to Treat Disseminated Peritoneal Disease // *Clinical Cancer Research*. 2007. Vol. 13, № 6. P. 1926–1935.
64. Milenic D.E. et al. Multimodality Therapy: Potentiation of High Linear Energy Transfer Radiation with Paclitaxel for the Treatment of Disseminated Peritoneal Disease // *Clinical Cancer Research*. 2008. Vol. 14, № 16. P. 5108–5115.
65. Boudousq V. et al. Comparison between Internalizing Anti-HER2 mAbs and Non-Internalizing Anti-CEA mAbs in Alpha-Radioimmunotherapy of Small Volume Peritoneal Carcinomatosis Using ^{212}Pb // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – ID e69613.
66. Chappell L.L. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of a novel bifunctional chelating agent for the lead isotopes ^{203}Pb and ^{212}Pb // *Nuclear Medicine and Biology*. 2000. Vol. 27, № 1. P. 93–100.
67. Milenic D.E. et al. Multimodality therapy: Potentiation of high linear energy transfer radiation with paclitaxel for the treatment of disseminated peritoneal disease // *Clinical Cancer Research*. 2008. Vol. 14, № 16. P. 5108–5115.
68. Yong K.J. et al. Sensitization of tumor to ^{212}Pb radioimmunotherapy by gemcitabine involves initial abrogation of G2 arrest and blocked DNA damage repair by interference with Rad51 // *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2013. Vol. 85, № 4. P. 1119–1126.
69. Yong K.J. et al. Cell killing mechanisms and impact on gene expression by gemcitabine and ^{212}Pb -trastuzumab treatment in a disseminated i.p. tumor model // *PLoS ONE*. Public Library of Science. – 2016. – Vol. 11. – № 7. – ID 0159904.
70. Stallons T.A.R. et al. Preclinical investigation of ^{212}Pb -DOTAMTATE for peptide receptor radionuclide therapy in a neuroendocrine tumor model // *Molecular Cancer Therapeutics*. American Association for Cancer Research Inc., 2019. Vol. 18, № 5. P. 1012–1021.
71. Li M. et al. Automated cassette-based production of high specific activity [$^{203}/^{212}\text{Pb}$]peptide-based theranostic radiopharmaceuticals for image-guided radionuclide therapy for cancer // *Applied Radiation and Isotopes*. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 127. P. 52–60.

72. Delpassand E. et al. First clinical experience using targeted alpha-emitter therapy with ^{212}Pb -DOTAMTATE (AlphaMedix TM) in patients with SSTR(+) neuroendocrine tumors. // *The Journal of Nuclear Medicine*. 2019. Vol. 60. P. 559.
73. Meredith R.F. et al. Pharmacokinetics and imaging of ^{212}Pb -TCMC-trastuzumab after intraperitoneal administration in ovarian cancer patients // *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. Mary Ann Liebert, Inc., 2014. Vol. 29, № 1. P. 12–17.
74. Meredith R. et al. Dose escalation and dosimetry of first-in-human α radioimmunotherapy with ^{212}Pb -TCMC-trastuzumab // *Journal of Nuclear Medicine*. Society of Nuclear Medicine Inc., 2014. Vol. 55, № 10. P. 1636–1642.
75. Meredith R.F. et al. Safety and outcome measures of first-in-human intraperitoneal α radioimmunotherapy with ^{212}Pb -TCMC-Trastuzumab // *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*. Lippincott Williams and Wilkins, 2018. Vol. 41, № 7. P. 716–721.
76. Edem P.E. et al. In vivo radionuclide generators for diagnostics and therapy // *Bioinorganic Chemistry and Applications*. Hindawi Publishing Corporation. – 2016. – Vol. 2016. – ID 6148357.
77. Feinendegen L.E., McClure J.J. Alpha-Emitters for Medical Therapy: Workshop of the United States Department of Energy: Denver, Colorado, 1996 // *Radiation Research*. 1997. Vol. 148, № 2. P. 195–201.
78. McClure J.J., Feinendegen L.E. Alpha emitter for medical therapy. Second bi-annual work-shop. Toronto, Canada, 1998. Germantown, Md., USA, 1998.
79. Vaidyanathan G., Zalutsky M.R. Targeted therapy using alpha emitters // *Physics in Medicine and Biology*. Institute of Physics Publishing, 1996. Vol. 41, № 10. P. 1915–1931.
80. McDevitt M.R. et al. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides // *European Journal of Nuclear Medicine*. 1998. Vol. 25, № 9. P. 1341–1351.
81. Gregory J.N., Moorbath S. The diffusion of thoron in solids. Part II—the emanating power of barium salts of the fatty acids // *Trans. Faraday Soc*. 1951. Vol. 47, № 0. P. 1064–1072.

82. Hursh J.B., Lovaas A.I. Preparation of a dry ^{228}Th source of thoron // *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. 1967. Vol. 29, № 3. P. 599–600.
83. Wahl A.C., Daniels W.R. Emanating power of barium stearate for 3·9-second actinon (^{219}Rn) // *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. 1958. Vol. 6, № 4. P. 278–287.
84. Porstendorfer J., Röbig G., Ahmed A. Experimental determination of the attachment coefficients of atoms and ions on monodisperse aerosols // *Journal of Aerosol Science*. 1979. Vol. 10, № 1. P. 21–28.
85. Porstendorfer J., Mercer T.T. Influence of electric charge and humidity upon the diffusion coefficient of radon decay products // *Health Physics*. 1979. Vol. 37, № 2. P. 191–199.
86. Kotrappa P., Bhanti D.P., Raghunath B. Diffusion coefficients for unattached decay products of thoron--dependence on ventilation and relative humidity. // *Health Phys.* 1976. Vol. 31, № 4. P. 378–380.
87. Hassfjell S.P., Hoff P. A generator for production of ^{212}Pb and ^{212}Bi // *Applied Radiation and Isotopes*. 1994. Vol. 45, № 10. P. 1021–1025.
88. Hassfjell S. A ^{212}Pb generator based on a ^{228}Th source. // *Appl Radiat Isot.* 2001. Vol. 55, № 4. P. 433–439.
89. Morimoto E.M., Kahn M. Preparation of carrier-free lead-212 (Thorium B) // *Journal of Chemical Education*. Division of Chemical Education, 1959. Vol. 36, № 6. P. 296.
90. Hashimoto T. et al. Elution behaviour of alpha-recoil atoms into etchant and observation of their tracks on the mica surface // *Nuclear Instruments and Methods*. 1980. Vol. 178, № 2–3. P. 437–442.
91. Arazi L. et al. Treatment of solid tumors by interstitial release of recoiling short-lived alpha emitters. // *Phys Med Biol*. 2007. Vol. 52, № 16. P. 5025–5042.
92. Lang R.F. et al. A ^{220}Rn source for the calibration of low-background experiments // *Journal of Instrumentation*. – 2016. – Vol. 11. – № 4. – ID P04004.
93. Manfredi J. et al. On determining dead layer and detector thicknesses for a position-sensitive silicon detector // *Nuclear Instruments and Methods in*

- Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. Elsevier B.V., 2018. Vol. 888. P. 177–183.
94. Dougherty T.F. et al. Studies of the Biological Effects of ^{226}Ra , ^{239}Pu , ^{228}Ra , ^{228}Th and ^{90}Sr in Adult Beagles // Radiation Research. JSTOR, 1962. Vol. 17, № 4. P. 625.
 95. Šebesta F., Starý J. A generator for preparation of carrier-free ^{224}Ra // Journal of Radioanalytical Chemistry. Kluwer Academic Publishers, 1974. Vol. 21, № 1. P. 151–155.
 96. Zucchini G.L., Friedman A.M. Isotopic generator for ^{212}Pb and ^{212}Bi // International Journal of Nuclear Medicine and Biology. 1982. Vol. 9, № 1. P. 83–84.
 97. Atcher R.W., Friedman A.M., Hines J.J. An improved generator for the production of ^{212}Pb and ^{212}Bi from ^{224}Ra // International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part. 1988. Vol. 39, № 4. P. 283–286.
 98. Yong K.J. et al. ^{212}Pb -radioimmunotherapy potentiates paclitaxel-induced cell killing efficacy by perturbing the mitotic spindle checkpoint // British Journal of Cancer. 2013. Vol. 108, № 10. P. 2013–2020.
 99. Kasten B.B. et al. Imaging, biodistribution, and toxicology evaluation of ^{212}Pb -TCMC-trastuzumab in nonhuman primates // Nuclear Medicine and Biology. Elsevier Inc., 2016. Vol. 43, № 7. P. 391–396.
 100. Steinkopff T., Frank G., Salvamoser J. Measurement of radionuclides within the Global Atmosphere Watch Programme of WMO // Kerntechnik. Carl Hanser Verlag, 2012. Vol. 77, № 3. P. 193–196.
 101. Lloyd R.D. et al. ^{228}Th Retention and Dosimetry in Beagles // Radiation Research. JSTOR, 1984. Vol. 98, № 3. P. 614.
 102. Miao Y. et al. Melanoma therapy via peptide-targeted α -radiation // Clinical Cancer Research. 2005. Vol. 11, № 15. P. 5616–5621.
 103. Makvandi M. et al. Alpha-Emitters and Targeted Alpha Therapy in Oncology: from Basic Science to Clinical Investigations // Targeted Oncology. Springer-Verlag France, 2018. Vol. 13, № 2. P. 189–203.

104. Shah M.A. et al. Metal-Free Cycloaddition Chemistry Driven Pretargeted Radioimmunotherapy Using α -Particle Radiation // *Bioconjugate Chemistry*. American Chemical Society, 2017. Vol. 28, № 12. P. 3007–3015.
105. Maaland A.F. et al. Targeted alpha therapy for chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma with the anti-CD37 radioimmunoconjugate 212Pb-NNV003. // *PLoS One*. – 2020. – Vol. 15. – № 3. – ID e0230526.
106. Howell R.W. et al. Relative Biological Effectiveness of Alpha-Particle Emitters In Vivo at Low Doses // *Radiation Research*. JSTOR, 1994. Vol. 137, № 3. P. 352.
107. Horwitz E.P., Bond A.H. Purification of radionuclides for nuclear medicine: The multicolumn selectivity inversion generator concept // *Czechoslovak Journal of Physics*. Springer Science and Business Media LLC, 2003. Vol. 53, № S1. P. A713–A716.
108. McAlister D.R., Horwitz E.P. Chromatographic generator systems for the actinides and natural decay series elements // *Radiochimica Acta*. 2011. Vol. 99, № 3. P. 151–159.
109. Bartoś B. et al. Search of ligands suitable for 212Pb/212Bi in vivo generators // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2013. Vol. 295, № 1. P. 205–209.
110. Guseva L.I. A 228Ra-212Pb tandem generator for potential application in biomedical studies // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2007. Vol. 272, № 1. P. 153–159.
111. Corroyer-Dulmont A. et al. VCAM-1 Targeted Alpha-Particle Therapy for Early Brain Metastases // *Neuro-Oncology*. 2019. – № 3. – P. 357-369.
112. Hermes W.H. et al. Thorium Nitrate Stockpile--From Here to Eternity // *Waste Management 2003 Symposium, Tucson, AZ (US), 02/23/2003--02/27/2003*. WM Symposia, Inc., 2003.
113. Coenen H.H. et al. Consensus nomenclature rules for radiopharmaceutical chemistry — Setting the record straight // *Nuclear Medicine and Biology*. Elsevier Inc., 2017. Vol. 55. P. v–xi.

114. Чувилин Д.Ю., Болдырев П.П., Прошин М.А., Захаров А.С., Николаев В.И. Способ получения радионуклида висмут-212: Пат. RU 2 498 434 С1 USA. Россия, 2012.
115. Brom M., Joosten L., Oyen W.J., Gotthardt M., Boerman O.C. Improved labelling of DTPA- and DOTA-conjugated peptides and antibodies with ^{111}In in HEPES and MES buffer // *EJNMMI Res.* – 2012. – №27(2). – P. 1-11.
116. Philip Horwitz E. et al. A lead-selective extraction chromatographic resin and its application to the isolation of lead from geological samples // *Analytica Chimica Acta.* 1994. Vol. 292, № 3. P. 263–273.
117. Mather S.J. Preclinical Development of Therapeutic Radiopharmaceuticals // *Comparative Evaluation of Therapeutic Radiopharmaceuticals.* 2007. P. 257–268.
118. Torres S. et al. Radiolabeled ^{153}Sm -chelates of glycoconjugates: Multivalence and topology effects on the targeting of the asialoglycoprotein receptor // *Radiochimica Acta.* 2007. Vol. 95, № 6. P. 343–349.
119. Болдырев П.П. et al. Исследование мечения α -излучающими радионуклидами ^{212}Bi и ^{212}Pb биоконъюгата, специфичного к онкомаркеру HER-2/NEU // *Медицинская физика.* 2015. Vol. 1. P. 64–70.
120. Danon J. Determination of the stability constants of thorium nitrate complexes with anion-exchange resins // *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry.* 1960. Vol. 13, № 1–2. P. 112–118.
121. Luo Y., Millero F.J. Stability constants for the formation of lead chloride complexes as a function of temperature and ionic strength // *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 2007. Vol. 71, № 2. P. 326–334.
122. Kasten B. et al. ^{212}Pb -Labeled Antibody 225.28 Targeted to Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 for Triple-Negative Breast Cancer Therapy in Mouse Models // *International Journal of Molecular Sciences.* 2018. Vol. 19, № 4. P. 925.
123. Kasten B.B. et al. ^{212}Pb -labeled B7-H3-targeting antibody for pancreatic cancer therapy in mouse models // *Nuclear Medicine and Biology.* Elsevier Inc., 2018. Vol. 58. P. 67–73.

124. Tang F. et al. Preparation and emanation properties of an ion-exchanged solid thoron source // *Radiation Protection Dosimetry*. 2012. Vol. 152, № 1–3. P. 66–70.
125. Zhuo W., Iida T., Furukawa M. Modeling radon flux density from the earth's surface // *Journal of Nuclear Science and Technology*. 2006. Vol. 43, № 4. P. 479–482.
126. Marsh S.F., Pillay K.K.S. Effects of ionizing radiation on modern ion exchange materials // *Los Alamos National Lab., NM (United States)*. – 1993. – P. 1–25.
127. Breeman W.A.P. et al. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{90}Y , ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Springer Verlag, 2003. Vol. 30, № 6. P. 917–920.
128. Pimentel G.J. et al. Biological Evaluation of Radiotracers for Radionuclide Therapy // *Comparative Evaluation of Therapeutic Radiopharmaceuticals*. 2007. P. 53–72.
129. Chan H.S. et al. Optimizing labelling conditions of ^{213}Bi -DOTATATE for preclinical applications of peptide receptor targeted alpha therapy // *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*. Springer Science and Business Media LLC, 2017. Vol. 1, № 1.