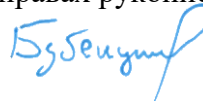


**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский
биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического
агентства России
(ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России)**

На правах рукописи



БУБЕНЩИКОВ ВИКТОР БОРИСОВИЧ

**ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОЧИСТЫХ ПРЕПАРАТОВ ^{89}Zr , ПРИГОДНЫХ ДЛЯ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РАДИОНУКЛИДНОЙ ДИАГНОСТИКЕ**

1.4.13 – Радиохимия

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

к.х.н. Ларенков А.А.

Москва 2023

Оглавление

Введение.....	4
1. Литературный обзор	12
1.1 ПЭТ радионуклиды	12
1.2 Ядерно-физические характеристики изотопов циркония	13
1.3 Методы получения ^{89}Zr	15
1.4 Состояние циркония в водных растворах	17
1.5 Ионнообменные методы выделения циркония-89	20
1.6 Экстракционные методы выделения циркония-89	23
1.7 Экстракционно-хроматографические методы выделения циркония-89	25
1.8 Эффективная молярная активность. Сравнение химических форм.....	27
1.9 Комплексообразование циркония.....	30
1.10 Биологическое воздействие циркония	39
1.11 Радиофармацевтические препараты циркония-89	40
1.12 Анализ комплексов и препаратов ^{89}Zr	43
Выводы из литературного обзора.....	44
2. Экспериментальная часть.....	45
2.1 Химикаты и реагенты.....	45
2.2 Оборудование	45
2.3 Определение коэффициентов распределения и исследования в динамических условиях ..	46
2.4 Получение растворов циркония-89.....	47
2.5 Синтез комплексов ^{89}Zr с DFO.....	48
2.6 Определение радиохимической чистоты и радиохимического выхода.....	48
3. Разработка технологии получения исходных растворов циркония-89.....	51
3.1 Получение и анализ растворов циркония-89 в форме $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата	51
3.2 Получение и анализ растворов циркония-89 в форме $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида	63
3.3 Получение циркония-89 в форме $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата	66
3.4 Сравнение методов получения растворов ^{89}Zr	69
3.6 Исследование комплексообразования с DFO	70
3.7 Автоматизация процесса	76
3.8 Определение радионуклидной чистоты	80

3.9 Анализ модельных растворов. Сравнение эффективности очистки	81
3.10 Сравнение стабильности и эффективности комплексообразования	84
Выводы	92
Сокращения и обозначения	94
Приложение 1	98
Приложение 2	95
Список литературы	99

Введение

Актуальность работы

Молекулярная визуализация является одной из наиболее быстро развивающихся междисциплинарных областей. Основу методов молекулярной визуализации составляют методы ядерной медицины – однофотонная компьютерная томография (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионная компьютерная томография (ПЭТ). Данные методы позволяют проводить неинвазивную визуализацию различных биологических процессов посредством регистрации γ -излучения от введённого радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП или упрощ. РФП). Использование меченых соединений позволяет решать широкий спектр задач по диагностике и терапии различных заболеваний. Основным преимуществом методов ядерной медицины, и, в частности, метода ПЭТ, является высокая чувствительность и специфичность, что в сочетании с другими методами, такими как компьютерная томография и магнитно-резонансная томография (ПЭТ-КТ, ПЭТ-МРТ) позволяет проводить диагностику с высокой точностью. Сегодня данные методы являются неотъемлемой частью мировой клинической практики развитых стран.

Среди многообразия позитрон-излучающих радионуклидов (РН), находящихся применение в ядерной медицине, отдельного внимания заслуживает цирконий-89. В отличие от уже активно используемых в повседневной практике циклотронных ПЭТ РН (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F) ^{89}Zr имеет более длительный период полураспада ($T_{1/2} = 78,42$ ч), что делает его крайне привлекательным для исследования биологических процессов с медленной кинетикой. Наиболее востребован цирконий-89 при разработке РФЛП на основе моноклональных антител (mAb) и их фрагментов (Fab), что в совокупности с ядерно-физическими характеристиками ^{89}Zr позволяет получать томограммы с высоким разрешением и большой клинической значимостью. Сочетание высокой специфичности mAb и высокой чувствительности ПЭТ способствовало развитию отдельного направления – иммуноПЭТ, направленного на диагностику, планирование и мониторинг терапии разнообразных заболеваний, главным образом, онкологических.

Важным преимуществом циркония-89 является возможность его наработки на стандартных медицинских циклотронах (9-18 МэВ), при этом обычно в качестве мишени используется фольга из природного моноизотопного иттрия. Для выделения циркония-89 из мишени широкое распространение получили экстракционно-хроматографические методы на гидроксаматных смолах. Однако, несмотря на все преимущества циркония-89 как диагностического радионуклида, его внедрение в клиническую практику ставит перед исследователями и разработчиками ряд нетривиальных задач, связанных со сложностью химии циркония как элемента. Используемые методы кондиционирования должны обеспечивать

высокую степень очистки от примесных металлов, которые могут негативно влиять на качество синтезируемых РФЛП. Таким образом, разработка метода получения циркония-89 в фармацевтически приемлемой и удобной химической форме является актуальной задачей в рамках разработки и развития концепции ^{89}Zr -РФЛП и иммуноПЭТ в целом.

Цели и задачи работы

С учётом вышесказанного, целью данной работы являлась разработка метода получения растворов циркония-89, фармацевтически приемлемых для синтеза меченых молекул и дальнейшего применения в технологии радиофармацевтических лекарственных препаратов.

Для достижения данной цели решались следующие **задачи**:

1. Разработка метода получения растворов ^{89}Zr в фармацевтически приемлемой форме.
2. Разработка и сравнение методов анализа радиохимической чистоты растворов и комплексов ^{89}Zr .
3. Оценка стабильности растворов ^{89}Zr , полученных различными методами, и подтверждение пригодности для синтеза РФЛП на примере комплексообразования с хелатором дефероксамином (ДФО).
4. Сравнение и выбор наиболее подходящей химической формы ^{89}Zr для применения в синтезе РФЛП.

Научная новизна работы

- Впервые разработан новый метод получения растворов ^{89}Zr , включающий комбинированную очистку ^{89}Zr на экстракционно-хроматографической смоле ZR и хелатной смоле Chelex-100, позволяющий получать ^{89}Zr в форме $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата и $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата в физиологически приемлемых растворах.
- Предложенный метод выделения циркония-89 обеспечивает высокие коэффициенты очистки от примесей металлов, высокую радионуклидную и радиохимическую чистоту, позволяет получать $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалат и $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрат в растворах с изотонической концентрацией, высоким выходом (>90%) и высокой объёмной активностью.
- Проведено сравнение различных химических форм ^{89}Zr . Впервые предложено использование $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата для разработки и синтеза ^{89}Zr -РФЛП. Растворы $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата являются стабильными, не токсичными и позволяют получать комплексы ^{89}Zr с высокой радиохимической чистотой.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых сведений о процессах сорбции на сорбентах Chelex-100 и Chromafix- HCO_3 ; хроматографическом поведении различных форм циркония-89 в процессах выделения и анализа, включая как исходные растворы, так и препараты ^{89}Zr .

Получены результаты по сорбционному поведению ^{89}Zr на различных сорбентах, имеющие большую практическую значимость для оптимизации и расширения текущих методов производства ^{89}Zr . Применение разработанного оригинального метода выделения циркония-89 с использованием смол ZR и Chelex-100 позволяет проводить эффективную очистку ^{89}Zr от всех основных примесных металлов и получать ^{89}Zr в растворах с изотонической концентрацией, значениями pH, близкими к нейтральным, высокой удельной активностью, радиохимической, химической и радионуклидной чистотой.

Показано, что наиболее популярный метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) для контроля качества препаратов ^{89}Zr (ITLC-SG/50 mM ДТПА) является необъективным. Разработаны методы анализа для идентификации различных химических форм циркония-89, позволяющие точно определять радиохимическую чистоту, как исходных растворов, так и комплексов с DFO, что улучшает текущие методологические подходы к контролю качества РФП и снижает риск получения недостоверных результатов.

Показано, что метод конверсии $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата в $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид не обеспечивает полную очистку от щавелевой кислоты, что приводит к нестабильным результатам синтезов с использованием таких растворов. Предложен альтернативный метод синтеза радиофармацевтических комплексов с использованием $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида.

Проведено сравнение различных химических форм ^{89}Zr ($[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалат, $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид, $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрат). Показано, что химическая форма ^{89}Zr оказывает значительное влияние на стабильность исходных растворов во времени и эффективность комплексообразования с целевыми молекулами.

Разработан оригинальный метод получения растворов ^{89}Zr в форме $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата и $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата. Показаны преимущества использования $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата для синтеза РФЛП.

Полученные результаты были использованы для разработки диагностического препарата « $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Циркония оксалат}$ » для ПЭТ-диагностики воспалительных процессов и метаболических поражений скелета при выполнении государственного контракта № 14. N08.11.0162 от 14.08.2017 г. в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследования сорбционного поведения ^{89}Zr на сорбентах ZR, Chelex-100, ТВР, Chromafix- HCO_3 и разработанный на их основе оригинальный метод очистки, включающая использование экстракционно-хроматографической (ZR) и хелатной смолы (Chelex-100) для получения стабильных и физиологически приемлемых растворов (осмолярность, pH) ^{89}Zr -оксалата и ^{89}Zr -цитрата с высоким выходом (>90%) и высокой объёмной активностью (>90% ^{89}Zr в 1 мл элюата).
2. Результаты исследования конверсионного метода получения ^{89}Zr -хлорида. Изменение хроматографического распределения и свойств раствора ^{89}Zr -хлорида из-за неполной очистки от щавелевой кислоты уже при концентрации в 1 мМ.
3. Методика ТСХ-анализа растворов ^{89}Zr . Предложены системы для анализа различных компонентов реакционной смеси в зависимости от используемой химической формы (стекловолокно, импрегнированное силикагелем / $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1), 4 об.% ТФУ; ITLC-SA / 50 мМ ЭДТА (pH 5); силикагель, модифицированный C18 / 0,1 М Na_3Citr (pH 5); силикагель на алюминиевой подложке с модифицированной NH_2 поверхностью / $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1), 1 М AcONH_4). Продемонстрирована недостаточная информативность широко используемого метода анализа ITLC-SG/50 мМ ДТПА_{aq}.
1. Данные по сравнению химических форм ^{89}Zr по параметрам стабильности во времени, скорости и эффективности комплексообразования с хелатором. Экспериментальное доказательство пригодности данных растворов для синтеза РФЛП на примере комплексообразования с DFO. Высокая перспективность ^{89}Zr -цитрата для дальнейших исследований по синтезу комплексов и радиофармацевтических препаратов на основе ^{89}Zr .

Личный вклад автора

Состоит в критическом обзоре литературных данных; подготовке и проведении экспериментов с ^{89}Zr ; в проведении анализов количественного содержания металлов методом атомно-абсорбционной спектроскопии; в обработке, интерпретации экспериментальных данных и подготовке материалов к публикации.

Апробация результатов

Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на следующих конференциях:

1. Школа-конференция молодых учёных и специалистов «Ильинские чтения» 22 марта 2018 года.
2. IX Научная конференция молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы» 9-13 апреля 2018 года.
3. I межрегиональная молодежная научная конференция «Достижения и перспективы молодых ученых» 25 мая 2018 года.
4. IX Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2018» 17-21 сентября 2018 года.
5. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 13-17 октября 2018 года, Дюссельдорф, Германия.
6. Школа-конференция молодых учёных и специалистов «Ильинские чтения» 10-11 октября 2019 года.
7. XVI Курчатовская междисциплинарная молодёжная научная школа 2-5 декабря 2019 года.
8. Научно-практическая конференция «Радиофарма-2019» 18-21 июня 2019 г.
9. II Межрегиональная молодежная научная конференция «Достижения и перспективы молодых ученых» 31 мая 2019 г.
10. Школа-конференция молодых ученых «Ильинские чтения 2019» 10-11 октября 2019 года.
11. VI Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа 2 - 5 декабря 2019 г.
12. Школа-конференция молодых ученых «Ильинские чтения 2020» 22-24 декабря 2020 года.
13. Научно-практическая конференция, посвященная памяти академика Анатолия Михайловича Гранова «Инновационные технологии ядерной медицины» 11 декабря 2020 года.
14. IV международная научно-практическая конференция «Радиофарма-2021». 30- сентября – 3 октября 2021 года.
15. X Российская конференция «Радиохимия-2022» 26-30 сентября 2022 года.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации:

1. Larenkov, A., **Bubenschikov**, V., Makichyan, A., Zhukova, M., Krasnoperova, A., Kodina, G. (2019). Preparation of Zirconium-89 Solutions for Radiopharmaceutical Purposes: Interrelation Between Formulation, Radiochemical Purity, Stability and Biodistribution. *Molecules*, 2019. Т. 24, N 8, С. 1534.
2. В.Б. **Бубенщиков**, А.А. Ларенков, Г. Е. Кодина. Получение растворов ^{89}Zr для синтеза радиофармпрепаратов. *Радиохимия*, 2021, Т. 63, N 3, С. 281-295.

3. В.Б. Бубенщиков, А.А. Ларенков. Хелатирующие агенты для циркония-89 в синтезе радиофармацевтических препаратов: текущее состояние и перспективы развития. Координационная химия, 2022. Т. 48, N 11. С. 647–668.
4. **Bubenshchikov**, V, Makichyan, A, Larenkov, A. The impact of zirconium-89 solution formulation on the efficiency of [⁸⁹Zr]Zr-deferoxamine synthesis. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 2022, T.65, N 13. С. 326-337.

Тезисы докладов:

1. **В.Б. Бубенщиков**, А.А. Ларенков. Разработка процедуры выделения и очистки ⁸⁹Zr для РФП. Сборник трудов школы-конференции молодых учёных с международным участием «Ильинские чтения».- М.: ГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2018. – 158 с.
2. **В.Б. Бубенщиков**, А.А. Ларенков. Технология получения препаратов циркония-89 для ядерной медицины. Материалы IX научной конференции молодых ученых "Инновации в химии: достижения и перспективы - 2018". – М.: Издательство «Перо», 2018.
3. **V.B. Bubenschikov**, M.V. Zhukova, A.S. Krasnopyorova, A.Ya. Maruk, A.A. Larenkov. Physiological ⁸⁹Zr-Oxalate Solution for PET Diagnosis: Purification, Formulation, Biological Evaluation. 19th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals (ESRR'18). EJNMMI radiopharm. chem. 3, 7 (2018). <https://doi.org/10.1186/s41181-018-0041-4>
4. **В.Б. Бубенщиков**, А.Г. Макичян, А.А. Ларенков. Разработка технологии получения высокочистых растворов ⁸⁹Zr как активной фармацевтической субстанции для ядерной медицины. IX Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2018»: Сборник тезисов, г. Санкт-Петербург, 17 – 21 сентября 2018 г. – Санкт-Петербург. 2018 – 536 с.
5. A. Larenkov, **V. Bubenschikov**, A. Makichyan, G. Kodina; Russian State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, RUSSIAN FEDERATION. Preparation of ⁸⁹Zr-Oxalate Isotonic Solution for Nuclear Medicine. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (2018) 45 (Suppl 1): S1-S844 [10.1007/s00259-018-4148-3](https://doi.org/10.1007/s00259-018-4148-3)
6. **В.Б. Бубенщиков**, А.Г. Макичян, А.А. Ларенков Ядерная медицина: разработка технологии получения АФС для синтеза РФП ⁸⁹Zr. Достижения и перспективы молодых ученых: Материалы I межрегиональной молодежной научной конференции. Сборник материалов – М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2018.
7. A. Larenkov, **V. Bubenschikov**, G. Kodina. Zirconium-89 Solutions: Preparation, Formulation, Analysis and Comparison of Applicability for Radiopharmaceutical Purposes (2019), Poster Presentations. J Label Compd Radiopharm, 62: S123-S588. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3725>
8. А.А. Ларенков, **В.Б. Бубенщиков**, А.Г. Макичян, М.В. Жукова, Г.Е. Кодина. Приготовление растворов ⁸⁹Zr для радиофармацевтических целей: Взаимосвязь между составом,

радиохимической чистотой, Стабильностью и биораспределением. Сборник тезисов докладов III Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов – РАДИОФАРМА-2019» / под ред. Г.Е. Кодиной и А.Я. Марук – М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2019. – 96 с.

9. **В.Б. Бубенщиков**, А.Г. Макичян, А.А. Ларенков. Разработка технологии получения растворов ^{89}Zr -цитрата как активной фармацевтической субстанции. Сборник тезисов докладов III Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов – РАДИОФАРМА-2019» / под ред. Г.Е. Кодиной и А.Я. Марук – М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2019. – 96 с.

10. А.Г. Макичян, **В.Б. Бубенщиков**, А.А. Ларенков. Анализ радиохимической чистоты препаратов на основе ^{89}Zr . Сборник тезисов докладов III Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов – РАДИОФАРМА-2019» / под ред. Г.Е. Кодиной и А.Я. Марук – М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2019. – 96 с.

11. **В.Б. Бубенщиков**, А.Г. Макичян, А.А. Ларенков. Разработка технологии получения АФС ^{89}Zr -цитрат. Достижения и перспективы молодых ученых: Материалы II межрегиональной молодежной научной конференции. Сборник материалов – М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2019 – 44с.

12. **В.Б. Бубенщиков**, А.Г. Макичян, А.А. Ларенков. Сравнение различных методов получения комплексов ^{89}Zr и анализ их радиохимической чистоты. Сборник трудов школы-конференции молодых учёных и специалистов «Ильинские чтения». – М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2019. – 134 с.

13. **В.Б. Бубенщиков**, А.Г. Макичян, А.А. Ларенков. Получение растворов циркония-89 для синтеза РФЛП. Сборник аннотаций докладов XVI Курчатовской междисциплинарной молодёжной научной школы. – М.: НИЦ «Курчатовский институт», 2019.

14. **В.Б. Бубенщиков**, А.Г. Макичян, А.А. Ларенков. Получение высокочистых растворов циркония-89 для синтеза РФЛП. Сборник трудов школы-конференции молодых учёных и специалистов «Ильинские чтения». – М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2020. – 131 с.

15. **В.Б. Бубенщиков**, А.Г. Макичян, А.А. Ларенков. Получение растворов циркония-89 для синтеза радиофармацевтических препаратов. Сборник тезисов докладов IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов – РАДИОФАРМА-2021»/ под ред. Г.Е.

Кодиной, А.А. Лабушкиной. – М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2021. – 84 с.

16. **В.Б. Бубенщиков**, А.Г. Макичян, А.А. Ларенков. Получение и сравнение предшественников циркония-89 для ядерной медицины. X Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2022»: Сборник тезисов, г. Санкт-Петербург, 26 – 30 сентября 2022 г. – Санкт-Петербург. 2022 – 545 с.

Структура и объём работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, двух глав, содержащих основные результаты работы и выводов. Работа изложена на 116 страницах и включает 45 рисунков, 36 таблиц и 233 источника цитируемой литературы.

1. Литературный обзор

1.1 ПЭТ радионуклиды

В настоящее время ПЭТ-радионуклиды широко используются в клинической практике. До недавнего времени большая часть научных исследований была сосредоточена на разработке ^{11}C -, ^{13}N -, ^{15}O - и ^{18}F -РФЛП. Однако из-за небольшого периода полураспада и, в ряде случаев, достаточно сложного синтеза, область использования РФЛП с данными радионуклидами ограничена визуализацией биологических процессов с быстрой кинетикой. Разработка новых рецептороспецифических РФЛП на основе таких векторов как пептиды, белки, антитела и наночастицы привела к развитию химии радионуклидов металлов. Основным преимуществом данных радионуклидов является более простой процесс введения РН в векторную молекулу через бифункциональный хелатор. Кроме того, вариативность в выборе РН для конкретной векторной молекулы позволяет проводить как диагностику, так и терапию.

Моноклональные антитела и их фрагменты являются одними из наиболее перспективных векторов для применения в рамках персонализированной медицины. Основным преимуществом mAb является высокая специфичность к определённому антигену. Применение меченных РН mAb позволяет селективно установить плотность антигена в очагах поражения, оценить фармакокинетические и дозиметрические характеристики, для назначения последующей терапии. Однако mAb и препараты на их основе имеют относительно медленную фармакокинетику, в результате чего оптимальное биораспределение соответствующих РФЛП достигается в течение нескольких суток. Поскольку одним из принципов разработки РФЛП является соответствие периода полураспада радионуклида эффективному периоду полувыведения биомолекулы, наиболее подходящими радионуклидами для исследования биологических процессов с медленной кинетикой методом ПЭТ являются ^{124}I ($T_{1/2} = 4,17$ сут), ^{64}Cu ($T_{1/2} = 12,7$ ч), ^{86}Y ($T_{1/2} = 14,7$ ч) [1,2].

Однако каждый из перечисленных выше радионуклидов имеет субоптимальные характеристики для клинического применения. Применение меди-64 в иммуноПЭТ осложнено коротким периодом полураспада и наличием β^- -линии (190,4 кэВ, $G_\gamma = 39\%$), которая приводит к увеличению дозовой нагрузки на пациента. ^{86}Y , так же, как и ^{64}Cu имеет слишком короткий период полураспада, и, кроме того, сложную процедуру получения, выделения и очистки. Несмотря на подходящий период полураспада ^{124}I ($T_{1/2} = 4,17$ сут), высокая энергия испускаемых позитронов и γ -линия с энергией, близкой к 511 кэВ (602,7 кэВ, $G_\gamma = 62,9\%$) негативно сказываются на качестве получаемых изображений [1,3].

В последнее время особый интерес представляет радионуклид ^{89}Zr ($T_{1/2} = 78,42$ ч), поскольку он может быть легко получен на низкоэнергетических (медицинских) циклотронах

облучением мишени из моноизотопного природного иттрия, имеет более подходящий период полураспада, чем ^{64}Cu и ^{86}Y , а также более безопасен в обращении и более стабилен *in vivo*, нежели ^{124}I . Ещё одним преимуществом ^{89}Zr является одна из самых низких энергий испускаемых позитронов (после ^{18}F , ^{64}Cu и ^{11}C), что позволяет получать ПЭТ-изображения с высоким разрешением (таблица 1) [3–5].

Таблица 1. Некоторые радионуклиды, применяемые в клинической практике ПЭТ

Радионуклид	$T_{1/2}$	E_{β^+} , МэВ (макс.)	Выход позитронов, %	Средний пробег позитрона в воде, мм	Ист.
^{11}C	20,36 мин	0,960	99,7	1,22	[6,7]
^{13}N	9,96 мин	1,198	99,8	1,8	[5,6]
^{15}O	2,04 мин	1,735	99,8	3,0	[5,6]
^{18}F	110 мин	0,633	96,8	0,64	[6,7]
^{44}Sc	3,97 ч	1,474	94,3	2,48	[6,8]
^{64}Cu	12,7 ч	0,653	17,5	0,7	[5,6]
^{68}Ga	67,8 мин	1,899	87,7	3,49	[6,7]
^{82}Rb	1,26 мин	3,381	81,8	5,9	[6,7]
^{86}Y	14,7 ч	3,14	31,9	2,5	[9,10]
^{89}Zr	78,4 ч	0,902	22,8	1,27	[6,7]
^{124}I	4,176 сут	2,14	22,7	3,46	[7,9]

1.2 Ядерно-физические характеристики изотопов циркония

Сегодня известно 39 изотопов Zr, пять из которых содержатся в природной смеси (^{90}Zr , ^{91}Zr , ^{92}Zr , ^{94}Zr и ^{96}Zr), ^{96}Zr слабо радиоактивен ($T_{1/2} = 2,35 \cdot 10^{19}$ лет) [11]. Наиболее изучены радиоактивные изотопы циркония — ^{93}Zr ($T_{1/2} = 1,53 \cdot 10^6$ лет), ^{95}Zr ($T_{1/2} = 64$ сут.) и ^{97}Zr ($T_{1/2} = 16,7$ ч.), которые являются продуктами деления ^{235}U . Радиоактивные изотопы ^{86}Zr ($T_{1/2} = 17$ ч., $G_{\gamma} = 100\%$, $E_{\gamma} = 241$ кэВ), ^{88}Zr ($T_{1/2} = 85$ сут., $G_{\gamma} = 100\%$, $E_{\gamma} = 390$ кэВ) и ^{89}Zr могут быть получены на циклотроне с использованием различных ядерных реакций [12,13]. ^{89}Zr ($T_{1/2} = 78,42$ ч.) распадается путем электронного захвата (77,2%) и испускания позитронов (22,8%, $E_{\beta^+} = 902$ кэВ) в метастабильный $^{89\text{m}}\text{Y}$ ($T_{1/2} = 15,84$ с), который далее распадается в стабильный ^{89}Y (ИП, $E_{\gamma} = 909$ кэВ, $G_{\gamma} = 99,0\%$) (рисунок 1) [6].

Дополнительно для ^{89}Zr , необходимо отметить наличие γ -линии высокой энергии (909 кэВ, $G_{\gamma} = 99\%$), которая, определяет радиотоксичность ^{89}Zr . Поглощённая доза при диагностике с ^{89}Zr -mAb РФЛП составляет 0,4–0,7 мЗв/МБк [14–16], а для исследования вводится примерно

37 МБк РФЛП [17–23]. Однако, достаточно высокий дозовый коэффициент не перекрывает пользу, полученную от диагностики (рисунок 2). Данные исследования используются для диагностики рака и назначаются перед иммунотерапией или радиоиммунотерапией, что позволяет более точно и качественно провести терапию.

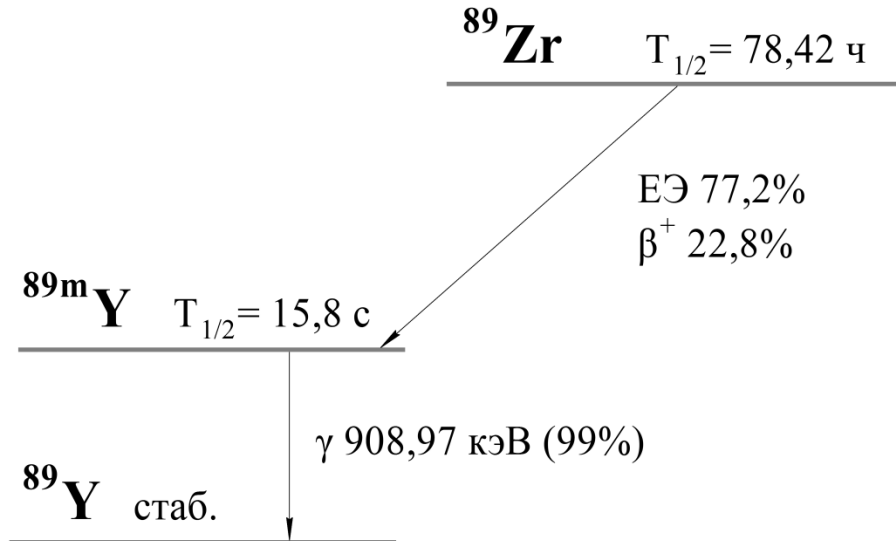


Рисунок 1. Схема распада ^{89}Zr .

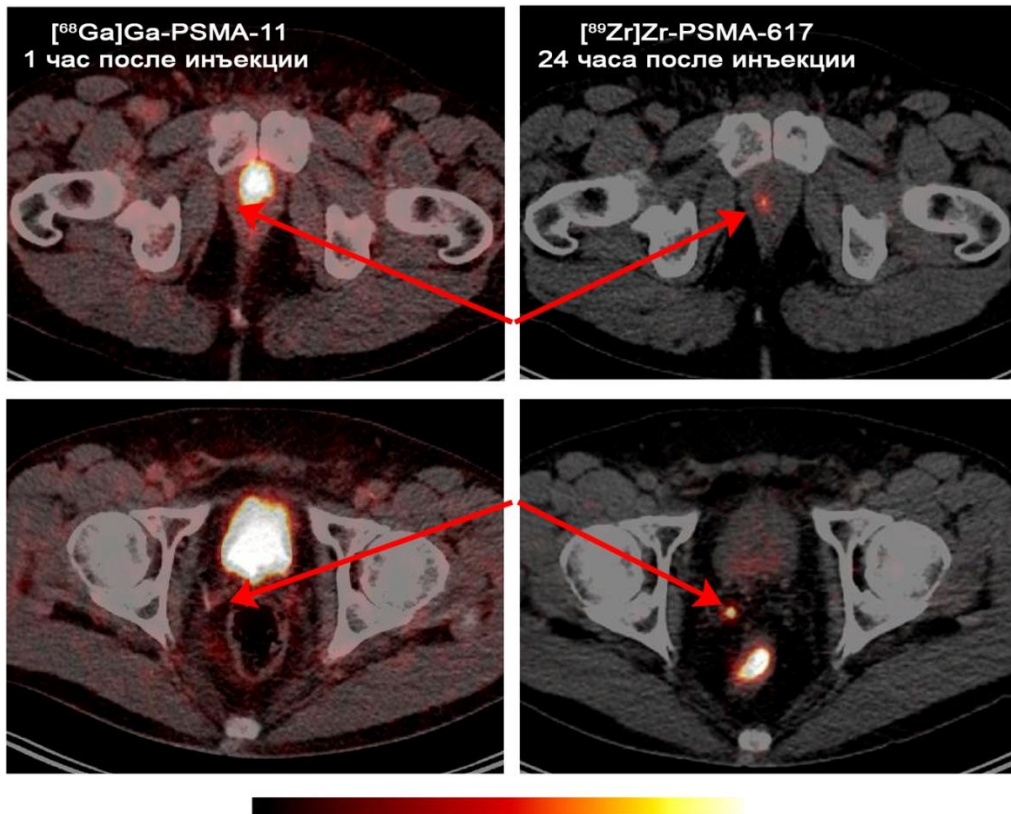


Рисунок 2. Томограммы пациентов с положительными очагами рака предстательной железы, обнаруженными с ^{89}Zr]Zr-PSMA-617, и не замеченные при скрининге с ^{68}Ga]Ga-PSMA-11 [24].

1.3 Методы получения ^{89}Zr

В настоящее время существует несколько способов получения ^{89}Zr : получение ^{89}Zr облучением ^{89}Y протонами $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ или дейтронами $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$; облучение природного стронция (смесь изотопов ^{84}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr , ^{88}Sr) альфа-частицами $^{\text{nat}}\text{Sr}(\alpha, xn)^{89}\text{Zr}$ [13]; облучение изотопно-обогащённых мишеней $^{91}\text{Zr}(p,pxn)^{89}\text{Zr}$ [25], $^{90}\text{Zr}(n,2n)^{89}\text{Zr}$ [26,27]. Несмотря на многообразие представленных методов, наиболее практичной ядерной реакцией для получения ^{89}Zr является реакция $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$, реализовать которую можно, в том числе, и на низкоэнергетических медицинских циклотронах [28–32]. Для получения ^{89}Zr разработаны различные варианты мишеней, наиболее распространёнными из которых являются иттриевая фольга [33,34], прессованные гранулы [35–37] и иттриевое напыление [38–40]. Необходимо отметить, что в результате облучения помимо ^{89}Zr могут образоваться следующие радионуклидные примеси (таблица 2).

Таблица 2. Ядерные реакции, которые могут происходить при наработке циркония-89

Радионуклид	Реакция получения	$T_{1/2}$	E_{γ} (G_{γ})* [6]
^{89}Zr	$^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$	78,4 час	511 (45,6%) 909 (99,0%)
^{88}Zr	$^{89}\text{Y}(p,2n)^{88}\text{Zr}$	83,4 сут	392,9 (97,3%)
^{88}Y	$^{89}\text{Y}(p,pn)^{88}\text{Y}$ $^{89}\text{Y}(p,d)^{88}\text{Y}$ $^{88}\text{Zr} \rightarrow ^{88}\text{Y}$	106 сут	898 (93,7%) 1836 (99,3%)
^{65}Zn	$^{65}\text{Cu}(p,n)^{65}\text{Zn}$	244 сут	511 (2,8%) 1115,5(50,2%)
^{63}Zn	$^{63}\text{Cu}(p,n)^{63}\text{Zn}$	38,3 мин	511 (185,6%) 669,9 (8,19%) 962,0 (6,5%)
^{56}Co	$^{56}\text{Fe}(p,n)^{56}\text{Co}$	77,3 сут	511 (39,2%)** 771,3 (15,4%) 846,7 (99,9%) 1037,8 (14,0%) 1238,3 (66,4%) 2598,4 (16,9%)
^{48}V	$^{48}\text{Ti}(p,n)^{48}\text{V}$	16 сут	511 (100,6%) 944,1 (7,7%) 983,5 (99,8%) 1312,1 (97,5%) 2240,4 (2,4%)

*указаны γ -линии с $G_{\gamma} > 1\%$; ** $G_{\gamma} > 10\%$.

Незначительные количества ^{65}Zn и ^{63}Zn могут образоваться в результате реакций $^{65}\text{Cu}(p,n)^{65}\text{Zn}$ и $^{63}\text{Cu}(p,n)^{63}\text{Zn}$ при использовании медной подложки во время облучения. В энергетическом диапазоне 10-15 МэВ реакция $^{65}\text{Cu}(p,n)^{65}\text{Zn}$ имеет высокое сечение захвата, близкое к 1 барн [41]. Образование изотопов ^{56}Co и ^{48}V возможно по реакциям $^{56}\text{Fe}(p,n)^{56}\text{Co}$ и $^{48}\text{Ti}(p,n)^{48}\text{V}$ из металлических примесей, находящихся в составе иттриевой мишени [42]. При облучении так же образуется $^{89\text{m}}\text{Zr}$ ($T_{1/2} = 4,2$ мин), который не является радионуклидной примесью, поскольку в течение часа полностью распадается в ^{89}Zr . Основными радионуклидными примесями являются ^{88}Zr и ^{88}Y , образование которых происходит в результате побочных ядерных реакций $^{89}\text{Y}(p,2n)^{88}\text{Zr}$, $^{89}\text{Y}(p,pn)^{88}\text{Y}$ и $^{89}\text{Y}(p,d)^{88}\text{Y}$. Однако данные реакции имеют относительно высокий энергетический порог – 13,07; 11,60 и 9,35 МэВ для $^{89}\text{Y}(p,2n)^{88}\text{Zr}$, $^{89}\text{Y}(p,pn)^{88}\text{Zr}$ и $^{89}\text{Y}(p,d)^{88}\text{Y}$ соответственно (рисунок 3) [43].

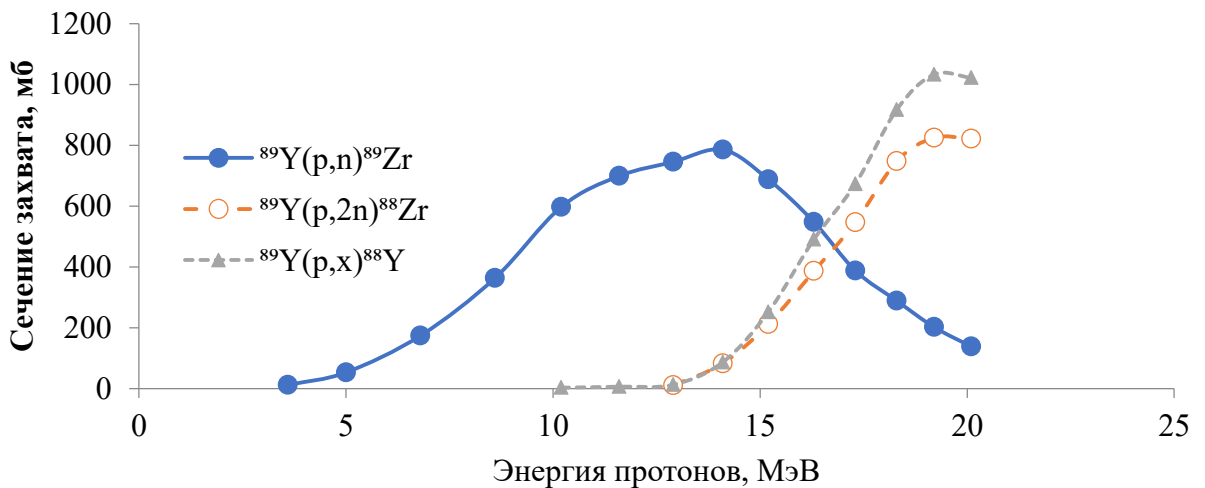


Рисунок 3. Зависимость сечения захвата от энергии протонов [43].

В настоящее время реакция $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ досконально изучена различными группами исследователей [25,44–47]. Энергетический диапазон 9–14 МэВ является оптимальным для получения ^{89}Zr . Для уменьшения количества радионуклидных примесей при энергии пучка более 14 МэВ целесообразно применение алюминиевых или ниобиевых деградеров [29,37,48]. Выход ^{89}Zr в данной реакции варьируется по разным данным от 8 до 50 МБк/μА·ч в зависимости от метода подготовки мишени.

Альтернативным методом получения ^{89}Zr из ^{89}Y является реакция $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$ [35,49–51]. Использование данного метода позволяет исключить образование радионуклидных примесей ^{88}Zr , ^{88}Y . Данная особенность связана с различием энергетических порогов для реакций $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$ и $^{89}\text{Y}(d,3n)^{88}\text{Zr}$ (рисунок 4), которые составляют 5,97 МэВ и 15,5 МэВ

соответственно [50]. Образование незначительных количеств ^{88}Y возможно по реакциям (d,t), (d,dn) и (d,p2n). Оптимальная энергия для реакции $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$ составляет 7-16 МэВ, при этом выход ^{89}Zr достигает 67 МБк/ $\mu\text{A}\cdot\text{ч}$ [35,39].

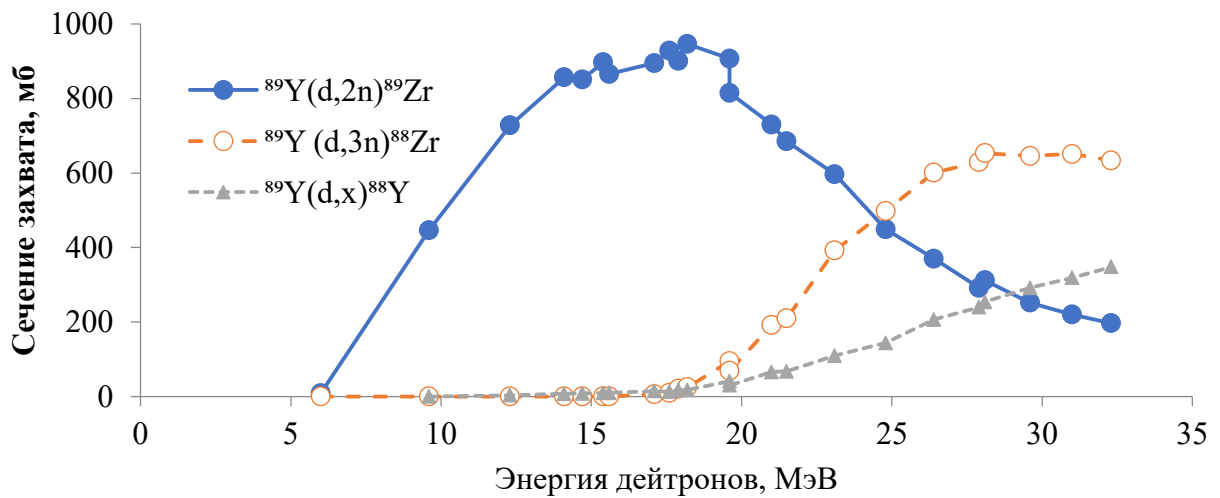


Рисунок 4. Зависимость сечения захвата от энергии дейтронов [50].

1.4 Состояние циркония в водных растворах

Цирконий впервые был выделен шведским химиком Берцелиусом в 1824 году. Значительная часть знаний о химии циркония была получена из химии гафния, поскольку данные элементы образуют соединения со схожими химическими свойствами. Подобие образуемых соединений связано с сжатием атомных ($\text{Hf} = 1,44 \text{ \AA}$ и $\text{Zr} = 1,45 \text{ \AA}$) и ионных радиусов ($\text{Hf} = 0,85 \text{ \AA}$ и $\text{Zr} = 0,86 \text{ \AA}$) при переходе от La к Lu и понижению радиуса Hf до значения Zr [52]. Цирконий существует в нескольких степенях окисления Zr (II), Zr (III), Zr (IV), образует комплексы с различной координационной геометрией и координационными числами от 4 до 12, однако наиболее предпочтительной является степень окисления Zr (IV) и комплексы с координационным числом восемь [53,54].

Цирконий имеет сложную химию в водных растворах, связанную с многообразием образующихся форм и их составом. В водных растворах с низким значением pH Zr (IV) за счёт высокого заряда и малого радиуса существует в виде множественных моно- и полиядерных соединений с окси- и гидроксидными мостиками. Длительное время одним из самых спорных моментов химии Zr явился вопрос о существовании иона цирконила и дицирконила в растворах. Считалось, что в водных растворах Zr существует именно в виде цирконил-иона (ZrO^{2+}). Однако дальнейшие исследования опровергли эту теорию [55–58]. В области микроконцентраций (10^{-9} – 10^{-11} М ^{95}Zr) при концентрации $[\text{H}^+] < 2$ М наблюдается значительный гидролиз, который протекает поэтапно с образованием гидроксокатионов $[\text{Zr}(\text{OH})_x]^{4-x}$ ($x < 3$), мономолекулярного гидроксида $\text{Zr}(\text{OH})_4$, а также смешанных комплексных катионов и

нейтральных молекул [55]. В растворах, содержащих макроколичества Zr(IV), химическое поведение осложняется протеканием реакций оляции и оксоляции. Образование оловых соединений начинается отщеплением протона от молекулы воды аква-комплекса Zr и заканчивается появлением мостиковых OH-групп, каждая из которых связана с двумя атомами Zr. Дальнейший процесс отщепления протона, называемый оксоляцией, приводит к образованию мостиковых оксогрупп, в результате чего образуются чрезвычайно устойчивые индифферентные соединения $Zr_3(OH)_4^{8+}$, $Zr_3(OH)_5^{7+}$, $Zr_4(OH)_8^{8+}$ [59]. Гидролиз циркония подавляется только в сильноокислых средах ($C(HCl, HNO_3) > 1,5$ М) или в присутствии сильных комплексообразователей [60,61]. Согласно результатам, полученным при изучении состояния ^{95}Zr в азотнокислых растворах, Zr находится в растворе виде следующих форм (таблица 3) [62].

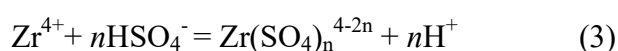
Таблица 3. Формы существования Zr в растворе в зависимости от pH

pH	Основная форма Zr
<0	Zr^{4+} ; $Zr(OH)^{3+}$ (мономер)
0-1,0	$Zr(OH)^{3+}$; $Zr(OH)_2^{2+}$; $Zr(OH)^{3+}$; $Zr(OH)_4^0$ (мономер)
1,0-1,5	$Zr(OH)_4^0$; (мономер); $[Zr(OH)_x^{4-x}]^n$ (полимер)
1,5-4,0	$[Zr(OH)]_n$ (полимеры) и коллоиды
4,0-12,0	коллоиды

Представить реакцию гидролиза и полимеризации Zr можно в виде уравнения (1). При этом константы комплексообразования для данных реакций были определены как $\log\beta_1 = 14,29$; $\log\beta_2 = 26,66$; $\log\beta_3 = 35,85$; $\log\beta_4 = 43,12$ [63,64].



В отличие от гидроксидов циркония, соли галогенидов, перхлораты и сульфаты Zr являются растворимыми. Среди комплексов Zr с HCl, HNO₃ и H₂SO₄ наиболее стабильными являются сульфатные комплексы Zr. Сообщается, что Zr образует нейтральные и анионные комплексы даже при очень низких концентрациях H₂SO₄, нейтральные комплексы $Zr(SO_4)_2^0$ в 0,25 М H₂SO₄ и преимущественно анионные комплексы $Zr(SO_4)_3^{2-}$ при более высокой концентрации кислоты [55,65]. В HCl < 3 М и HNO₃ < 4 М цирконий существует в преимущественно в форме катионных комплексов [66]. Анионные комплексы $ZrCl_5^-$ и $ZrCl_6^{2-}$ начинают преобладать только при концентрации HCl > 7 М [55,67]. Реакцию комплексообразования Zr с анионами Cl⁻, NO₃⁻ и SO₄²⁻ можно представить в виде уравнений (2, 3).



Соответствующие константы стабильности (уравнение 4, 5) для данных реакций комплексообразования представлены в таблице 4 [67–69].

$$\beta_i = \frac{[ZrA_i^{4-i}]}{[Zr^{4+}][A^-]^i} \quad (4)$$

$$\beta_i = \frac{[Zr(SO_4)_i^{4-2i}][H^+]^i}{[Zr^{4+}][HSO_4^-]^i} \quad (5)$$

Таблица 4. Константы комплексообразования Zr с анионами Cl⁻, NO₃⁻ и SO₄²⁻

	β_1	β_2	β_3	β_4
Cl ⁻	0,95	0,12	0,07	0,08
NO ₃ ⁻	0,92	0,46	-	-
SO ₄ ²⁻	466	3,48×10 ³	3,92×10 ⁵	-

Неорганические лиганды по способности комплексообразования с Zr можно расположить в следующем порядке: OH⁻ > F⁻ > PO₄³⁻ > SO₄²⁻ > CO₃²⁻ > NO₃⁻ > Cl⁻ > ClO₄⁻ [67,70]. Оксалат анион так же является сильным комплексообразователем для Zr и в данном ряду расположен между PO₄³⁻ и SO₄²⁻. Томасом и Оуэне [71] был представлен аналогичный ряд для органических лигандов: цитрат > оксалат > малеат > тартрат > гликолят > сукцинат = малонат = малеинат = пропионат = ацетат = фумарат > формиат > сульфат > хлорид = нитрат. Однако данный ряд не в полной мере согласуется с данными, представленными Рябчиковым и соавт. [67]. Согласно опубликованным данным, наиболее стабильные комплексы с Zr (IV) образует щавелевая кислота (оксалат > триоксиглутарат > цитрат > тартрат = лактат > сукцинат). По сравнению с комплексами уксусной, малоновой, малеиновой, янтарной и глутаровой кислотой образование оксалатов циркония Zr(C₂O₄)₃²⁻, Zr(C₂O₄)₄⁴⁻ возможно даже в сильноокислых условиях (C_{HCl} > 2 М). В нейтральных средах (рН 6,8-7,2) при избытке оксалат-иона цирконий образует комплекс Zr(C₂O₄)₅⁶⁻. В диапазоне концентраций 0,125–2 М HCl цирконий образует цитратные комплексы в соотношении 1:1, лактатные и триоксиглутаратные комплексы в соотношении Zr:H_nL 1:2. Уксусная, малоновая, малеиновая, янтарная и глутаровая кислота не образуют комплексы при концентрации HCl более чем 0,125 М. Константы равновесия для комплексов Zr с некоторыми карбоновыми кислотами представлены в таблице 5 [67].

Таблица 5. Константы равновесия для комплексов Zr [67]

Кислота	β_1	β_2
Щавелевая	(3,16 ± 0,3)×10 ⁵	(4,8 ± 1,6)×10 ⁹
Триоксиглутаровая	530 ± 40	2580 ± 100
Лимонная	348 ± 43	2600 ± 432

Кислота	β_1	β_2
Молочная	108 ± 8	190 ± 10
Винная	$97,2 \pm 2,4$	$310 \pm 2,4$
Яблочная	$67,5 \pm 5,0$	$172 \pm 7,2$

Авторы отмечают, что уменьшение числа метиленовых фрагментов в гомологическом ряду, так же, как и введение –ОН группы в состав молекулы карбоновой кислоты способствует образованию более прочных комплексов. Данная теория хорошо согласуется с результатами по определению констант устойчивости для комплексов Zr со щавелевой и малоновой кислотой. *Kobayashi и соавт.* [64] сообщают о более высоких константах устойчивости для оксалатных комплексов Zr, по сравнению с малонатными (таблица 6).

Таблица 6. Константы образования комплексов Zr со щавелевой и малоновой кислотой

Оксалатные комплексы		Малонатные комплексы	
Комплекс	$\log\beta$	Комплекс	$\log\beta$
$[\text{Zr}(\text{C}_2\text{O}_4)]^{2+}$	11,5	$[\text{Zr}(\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4)]^{2+}$	10,4
$[\text{Zr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})]^0$	20,8	$[\text{Zr}(\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})]^0$	17,9
$[\text{Zr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{2-}$	27,2	$[\text{Zr}(\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4)_3]^{2-}$	22,0
$[\text{Zr}(\text{C}_2\text{O}_4)_4]^{4-}$	29,7		

1.5 Ионнообменные методы выделения циркония-89

Длительное время потенциал ^{89}Zr оставался нераскрытым из-за неэффективных технологий выделения. Для получения ^{89}Zr и использования его в синтезе РФП требовалась доступная технология выделения ^{89}Zr из облучённой мишени и последующая высокоэффективная очистка, поскольку Y, Fe и другие примесные металлы, находящиеся в составе мишени, способны конкурировать с ^{89}Zr при формировании целевых комплексов в структуре векторных конъюгатов [38]. Одни из первых исследований по получению и очистке ^{89}Zr были выполнены *J.Link* и её коллегами [30,44].

Первоначально для выделения ^{89}Zr использовались различные ионообменные смолы (например, Dowex 50W×8, Dowex 1×8), а в качестве растворов для сорбции и десорбции – минеральные кислоты. Наиболее популярными стали методы, основанные на использовании анионообменных смол (главным образом Dowex 1×8). Оптимальными растворами для сорбции в данном случае являются разбавленные H_2SO_4 , HF и смесь HCl-HF, а также концентрированные растворы HCl ($C_{\text{HCl}} > 8 \text{ M}$) [72–74]. Отмечено слабое сродство Zr (IV) к

катионообменным смолам, при этом наиболее высокие коэффициенты распределения достигаются в концентрированных растворах HClO_4 ($>6 \text{ M}$) [75].

Типичную схему переработки мишени с использованием анионообменных смол можно представить следующим образом: облученную мишень растворяют в концентрированной соляной кислоте, далее полученный раствор пропускают через колонку с ионообменной смолой. Для удаления Y и других примесных металлов, через колонку пропускают несколько колоночных объёмов $\text{HCl}_{\text{конц}}$. Десорбция ^{89}Zr осуществляется 2 М HCl или комбинированными растворами, содержащими, как правило, щавелевую кислоту. Выход ^{89}Zr при использовании данного метода очистки колеблется от 70 до 98% в зависимости от объёма и состава элюента (таблица 7).

Таблица 7. Методы ионообменной хроматографии для выделения ^{89}Zr

Исходный раствор	Ионообменная смола, размер колонки	Промывка после сорбции	Раствор десорбции	Выход	Ист.
12 М HCl + H_2O_2	Dowex 1×8 (Cl^-) 11×1∅ см	150 мл 12 М HCl 1,5 мл/мин	15 мл 2 М HCl 12 мл/мин	63%	[35]
	Dowex 2×8 (Cl^-) 11×1∅ см			80%	
3 М HCl	Dowex 1×8 (Cl^-) 11×1∅ см	40 мл 12 М HCl	40 мл 2 М HCl	80%	[38]
1 М HCl	Dowex 50W×8 (H^+) 22×1,5∅ см	1 М HCl 2 мл/мин, 200 мл 0,5 мл/мин 1 М CH_3COOH , 200 мл 0,1 М H_3Citr 2,2 мл/мин	200 мл смеси 0,5% $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ и 0,1 М H_3Citr (1:1) 1 мл/мин	75%	[36]
12 М HCl	Dowex 21K (Cl^-) 22×1,5∅ см	200 мл 12 М HCl 0,5 мл/мин, 200 мл 1 М CH_3COOH 0,5 мл/мин, 200 мл 0,1 М H_3Citr 2,2 мл/мин		21,7%	
1 М HCl	Dowex 1×8 (Cl^-) 22×1∅ см	180 мл 12 М HCl	120 мл 2 М HCl	85%	[39]
$\text{HCl}_{\text{конц}}$ + H_2O_2	Dowex-1×8 (Cl^-) 15×1∅ см	20 мл $\text{HCl}_{\text{конц}}$	40 мл 2 М HCl	98%	[76]
1 М HCl	Dowex-50×8 (H^+) 15×1∅ см	10 мл 1М HCl , 10 мл 2 М HCl	30 мл 1% $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ + 0,1 М Na_3Citr (1: 1)	70%	

Исходный раствор	Ионообменная смола, размер колонки	Промывка после сорбции	Раствор десорбции	Выход	Ист.
12 М HCl	Dowex 1×8 (Cl ⁻)	25 мл 12 М HCl	30 мл 1 М HCl + 0,01 М H ₂ C ₂ O ₄	>80%	[30]
4 М HF	Dowex 1×8 (Cl ⁻)	50 мл 4 М HF	8 мл 0,2 М HCl	100%	[44]
HCl _{конц}	1 стадия: Dowex-1×8 (Cl ⁻) 16,5×1∅ см	50 мл 12 М HCl	20 мл 6 М HCl; Сушка и растворение в 5 мл 3М HF	90%	[77]
3 М HF	2 стадия: Dowex-1×8 (F ⁻) 10×0,4∅ см	2 мл 3 М HF	1 М HNO ₃	90%	
HCl _{конц}	AG MP-1M (Cl ⁻)	5 мл HCl _{конц}	7,5 мл 6 М HCl	84%	[78]
HCl _{конц}	AG MP-1M (Cl ⁻)	5 мл HCl _{конц}	5 мл 6 М HCl + 0,33 мМ NaF	96%	

При этом полученные растворы могут значительно различаться по составу химических и радионуклидных примесей. Например, *Meijs и соавт.* [38] показали, что [⁵⁹Fe]Fe ведёт себя аналогично ⁸⁹Zr и ~65% [⁵⁹Fe]Fe элюируется совместно с [⁸⁹Zr]Zr-хлоридом. Главным недостатком данных методов является большой объём используемых растворов. При низкой скорости потока это приводило к тому, что разделение могло осуществляться более 10 часов, а конечный продукт требовал концентрирования для дальнейшего синтеза РФП.

Среди представленных ионно-обменных методов выделения ⁸⁹Zr можно выделить метод с использованием анионообменной смолы AG MP-1M (Cl⁻), что позволяет получать ⁸⁹Zr в достаточно малом объёме элюата [78]. Однако использование HCl различных концентраций (0,1–9 М) не обеспечивало полноту десорбции ⁸⁹Zr, в результате чего для повышения эффективности элюирования был использован комбинированный раствор 6 М HCl + 0,33 мМ NaF. Необходимо отметить, что присутствие ионов F⁻ в конечном растворе неприемлемо для РФП, поэтому авторы дополнили данный метод второй колонкой, заполненной гидроксаматной смолой, для получения ⁸⁹Zr в форме [⁸⁹Zr]Zr-оксалата (выход >90% в 0,3 мл 0,8 М H₂C₂O₄) [79].

Использование растворов щавелевой кислоты является одним из ключевых моментов в технологии получения растворов ⁸⁹Zr, поскольку имеет высокие константы образования комплексов с цирконием и позволяет проводить эффективное элюирование ⁸⁹Zr. Однако, в то

же время, щавелевая кислота является токсичной для использования в составе РФЛП, что является неприемлемым для использования в составе РФЛП без дополнительной очистки. Для удаления щавелевой кислоты были предложены различные методы. *Meijs и соавт.* [38] описали способы декарбоксилирования (добавление H_2O_2 в 6 М HCl при 80°C , сушка реакционной смеси при комнатной температуре в вакууме) и вакуумной сублимации (комнатная температура, 26,7 мПа). Однако следует отметить, что растворы ^{89}Zr после декарбоксилирования и сублимации показали различную эффективность комплексообразования с дефероксамином: ^{89}Zr , полученный сублимационным методом образовывал комплексы с дефероксамином даже при очень низких концентрациях (выход $> 90\%$ при 10 мкМ дефероксамина), тогда как ^{89}Zr полученный методом декарбоксилирования образовывал комплексы с низким выходом даже при высокой концентрации дефероксамина (выход $< 60\%$ при 10 мМ).

Позже *Holland и соавт.* [80] предложили более простой метод, основанный на применении анионообменного картриджа Sep-Pak QMA для получения $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$. ^{89}Zr количественно улавливается на картридже и, после промывки водой (~ 40 мл), полностью элюируется 300 ÷ 500 мкл 1,0 М HCl . Данный способ позволяет удалить более чем 99,8% $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ и широко используется для получения $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$ из $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата [80–82].

1.6 Экстракционные методы выделения циркония-89

Помимо методов хроматографии для выделения ^{89}Zr были разработаны различные экстракционные схемы, как в комбинации с хроматографией, так и отдельно (таблица 8). Несмотря на высокую эффективность выделения ^{89}Zr по сравнению с хроматографией, как правило, при меньших затратах времени и в меньшем объёме конечного раствора экстракционные методы не получили широкого распространения. Неселективная очистка от примесных металлов и содержание органических растворителей, содержание которых строго регламентируется в составе потенциального РФП, приводит к необходимости дополнительного кондиционирования полученных растворов [36,83].

Таблица 8. Экстракционные методы выделения ^{89}Zr

Исходный раствор	Экстрагент	Процесс разделения	Конечный раствор	Выход	Ист.
4 М HCl	0,5 М 4,4,4-трифтор-1-(2-тионил) - 1,3-бутандион в ксилене	Экстракция: 2 × 10 мл; реэкстракция 1:1 0,5 М HNO_3 + 0,5 М HF	0,5 М HNO_3 + 0,5 М HF , сушка и растворение в 12 М HCl	100% Общий 25%	[30]

Исходный раствор	Экстрагент	Процесс разделения	Конечный раствор	Выход	Ист.
12 М HCl		хроматография: Смола Dowex 1×8 (Cl ⁻), промывка 25 мл 12 М HCl	30 мл 1 М HCl + 0,01 М H ₂ C ₂ O ₄	>80%	
1 М HCl или H ₂ SO ₄	0,03М Дибутил фосфат в дибутиловом эфире	Экстракция 1:1, 4 промывки 1 М H ₂ SO ₄ 1:1; реэкстракция 4 М HF	4 М HF	94% Общий 84,4%	[44]
4 М HF		хроматография: Смола Dowex 1×8 (Cl ⁻), промывка 50 мл 4 М HF	8 мл 0,2 М HCl	100%	
5 × 10 ⁻⁴ М H ₂ SO ₄	10% Д2ЭГФК в циклогексане	Экстракция 1:1 (10 мин)	5 × 10 ⁻⁴ М H ₂ SO ₄	80%*	[83]
10 ⁻³ М H ₂ SO ₄	10% Д2ЭГФК в циклогексане 1:1	Экстракция 1:1	10 ⁻³ М H ₂ SO ₄	~90%*	[84]
1 Н H ₂ SO ₄	0,1 М Триэтиламин (ТОА) в циклогексане	Экстракция 1:1	0,1 М ТОА в циклогексане	~90%	[85]
9 М HCl	10% Д2ЭГФК в н-гептане 1:1	Экстракция 1:1	Д2ЭГФК+ H ₂ SO ₄	91%	[36]
9 М HCl	3% трифенилфосфиноксидом в хлороформе 1:1	Экстракция 1:1 (3 мин), промывка 10 мл 9 М HCl, реэкстракция 15 мл 0,5 % H ₂ C ₂ O ₄ (3 мин)	15 мл 0,5 % H ₂ C ₂ O ₄	98%	

*⁸⁹Zr остаётся в исходном растворе

1.7 Экстракционно-хроматографические методы выделения циркония-89

Экстракционно-хроматографические методы совмещают в себе высокую селективность экстракционных методов с удобством колоночной хроматографии, что позволяет достигать высоких коэффициентов очистки и получать растворы ^{89}Zr с высокой объёмной активностью.

Одним из наиболее широко известных способов выделения ^{89}Zr сегодня является метод с использованием гидроксаматно-модифицированных смол. В 1965 году Барончелли и Гросси обнаружили, что гидроксаматные группы обладают высокой аффинностью к цирконию и образуют с ним стабильные комплексы [86]. Позднее методом рентгеноструктурного анализа было установлено, что образуемые комплексы имеют стехиометрическое соотношение 1:4 (рисунок 5) [87].

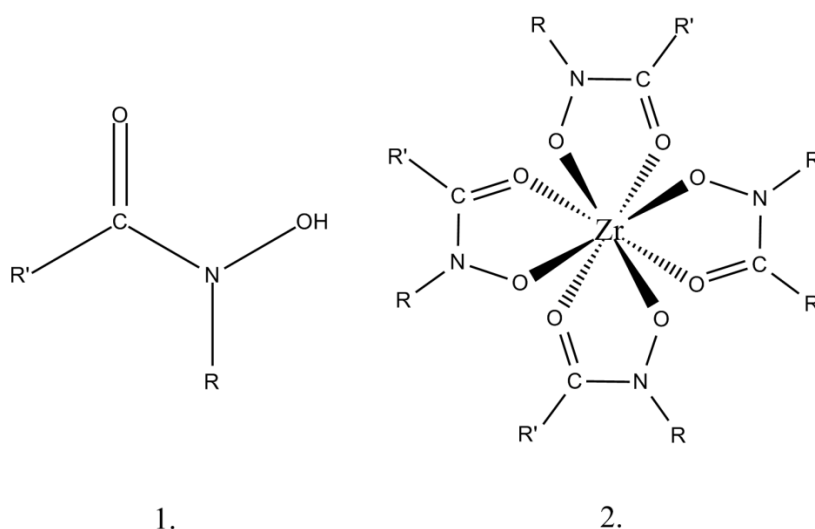


Рисунок 5. (1) Гидроксамовая кислота (2) гидроксаматный комплекс Zr (IV). R, R' – углеводородные радикалы.

Первое выделение ^{89}Zr из облучённой мишени с использованием гидроксаматных смол было описано *Meijs и соавт.* в 1994 году [38]. В качестве элюента авторы использовали растворы щавелевой, лимонной и уксусной кислот различной концентрации. Наиболее высокая эффективность десорбции была достигнута с использованием щавелевой кислоты, при этом увеличение концентрации с 0,01 до 1,0 М повысило эффективность элюирования с ~ 20 до 98% в 2 мл раствора. Позднее *Holland и соавт.* [80] показали, что ^{89}Zr -оксалат, полученный с использованием гидроксаматной смолы, обладает высокой химической и радионуклидной чистотой и подходит для получения комплексов с дефероксамином с высокой молярной активностью. Для выделения ^{89}Zr используется ~100 мг гидроксаматной смолы. Сорбция ^{89}Zr осуществляется из 2 М HCl, после чего проводится промывка HCl (4×2,5 мл) и H₂O (4×2,5 мл). В качестве элюата используется 1 мл 1 М щавелевой кислоты. В настоящее время данный

способ широко используется для лабораторного выделения ^{89}Zr из облученных мишеней [38,42,80], а также реализован в различных модулях синтеза [88–90].

Альтернативный вариант очистки ^{89}Zr с использованием гидроксаматной смолы был предложен *Pandey и соавт.* [91]. Для десорбции ^{89}Zr с гидроксаматной смолы авторы использовали фосфатный буфер (1,2 М $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$; pH 3,5). Колонку предварительно заполняли фосфатным буфером ~0,25 мл и выдерживали в течение 30 минут, после чего ^{89}Zr элюировали в 2 мл раствора с выходом $91,7 \pm 3,7\%$. По мнению авторов данный способ не уступает классическому методу получения ^{89}Zr -оксалата по химической и радионуклидной чистоте. Согласно данным ICP–MS анализа в полученных растворах ^{89}Zr -оксалата и ^{89}Zr -фосфата было обнаружено 0,4–5,38 мг/л Al, 0,6–1,2 мг/л Fe, 0,15–0,5 мг/л Y.

В ряде работ для обеспечения полного окисления Zr до Zr (IV) при растворении облученной мишени в раствор HCl дополнительно вводили H_2O_2 [35,76,79,90]. В настоящее время существует неопределённость относительно влияния H_2O_2 на полноту последующей сорбции ^{89}Zr . *Holland и соавт.* [80] сообщают об отсутствии связи между добавкой H_2O_2 и эффективностью сорбции, в то же время в [78] сообщается об увеличении извлечения ^{89}Zr из исходного раствора с 76 до 95% при растворении мишени в присутствии H_2O_2 . Авторы предполагают, что H_2O_2 способствует разрушению оксида циркония и/или цирконильных частиц, которые могут образовываться во время облучения или растворения мишени.

Важно отметить, что гидроксаматные смолы, упомянутые в подавляющем большинстве публикаций, изготовлены согласно способу, предложенному *Verel и соавт.* [42]. Смола ZR (Triskem International), вероятно, является единственной на сегодняшний день коммерчески доступной гидроксаматной смолой [92]. Согласно данным производителя, данная смола обладает высокой селективностью к ионам Zr (IV) в широком диапазоне концентраций HCl (0,01–10 М) и в растворах HNO_3 с концентрациями до 5 М [93]. В то же время смола имеет низкую аффинность к Y, а также к Fe (III) в растворах 1–6 М HCl, и, следовательно, может быть эффективно использована для выделения циркония-89 из облучённой мишени [82].

Помимо гидроксаматно-модифицированных смол для выделения ^{89}Zr описаны также и другие экстракционно-хроматографические смолы компании Triskem International. *Graves и соавт.* [82] исследовали возможность получения ^{89}Zr - ZrCl_4 на смолах UTEVA и ТВР. Смола UTEVA используется для выделения урана и четырехвалентных актиноидов, таких как Np, Th и Pu. В качестве экстрагента используется нанесённый дипентилпентилфосфонат. В смоле ТВР в качестве экстрагента используется трибутилфосфат (ТБФ), который находит широкое применение в ядерно-топливном цикле. Цирконий-89 имеет высокие в коэффициенты распределения на данных смолах в растворах $\text{HCl}_{\text{конц}}$, которые сильно уменьшаются со снижением концентрации соляной кислоты [82]. При этом смола остаётся инертной к Y во всём

диапазоне концентраций HCl. Проводя сравнение, сообщается о более медленной кинетике и более низком выходе для смолы UTEVA. В данном случае при элюировании 0,1 М HCl 29% активности ^{89}Zr оставалось на колонке, в то время как эффективность элюирования смолы ТВР составила $89 \pm 3\%$. Однако согласно данным атомно-эмиссионной спектроскопии, метод, основанный на смоле ТВР, показал более низкую эффективность очистки от примесных металлов, таких как Ni, Fe, Cr, Mn, Cu по сравнению с двухстадийным методом, основанным на гидроксаматной смоле и картридже Sep-pak QMA.

Получение растворов [^{89}Zr]Zr-хлорида возможно и на других коммерчески доступных сорбентах (LN-resin, TRU-resin, TEVA-resin, UTEVA-resin). Смола LN содержит диалкил фосфорную кислоту и применяется для определения ^{226}Ra , ^{228}Ra и разделения лантаноидов. Смола TRU применяется для извлечения и разделения четырех- и шестивалентных актиноидов и Am(III). В качестве экстрагента используется смесь карбомоилметилфосфиноксида (КМФО) и трибутилфосфата (ТБФ). Смола TEVA используется главным образом для извлечения четырехвалентных актиноидов и технеция. Экстрагентом является четвертичная аммониевая соль Aliquat®336 [92]. Для данных сорбентов была разработана одностадийная технология получения растворов ^{89}Zr [94]. Наиболее высокая эффективность разделения была достигнута на смоле TEVA (для UTEVA были получены схожие данные, но при большем объеме элюента). Необходимо отметить, что для выделения ^{89}Zr на смолах TRU и LN используются комбинированные элюенты, содержащие плавиковую кислоту (0,5 М HCl + 0,5 М HF и 3 М HNO₃ + 1 М HF соответственно), однако, ввиду токсичности фторид анионов [95], для применения в технологии РФЛП требуется дополнительное кондиционирование полученных растворов.

1.8 Эффективная молярная активность. Сравнение химических форм

Одной из важнейших характеристик целевого РФП в настоящее время является эффективная молярная активность (ЭМА), показывающая отношение активности радионуклида к общему количеству веществ, вступающих в реакцию комплексообразования с хелатором. Инъекция РФП с низкой ЭМА приводит к насыщению целевых рецепторов избытком немеченого лиганда и снижению качества диагностического исследования. Метод расчёта ЭМА для ^{89}Zr основан, как правило, на титровании бифункционального хелатора дефероксамина и поэтому учитывает наличие любого металла, способного образовывать комплексы с дефероксамином [80,90]. Стоит отметить, что данная величина является не идеальной для сравнения чистоты полученных растворов, поскольку зависит от параметров облучения. Экспериментально показано, что увеличение времени облучения, тока и энергии пучка

приводит к увеличению ЭМА, равно как и увеличение толщины и/или массы мишени снижает ЭМА [37].

ЭМА также зависит от химической формы ^{89}Zr и присутствия эксципиентов. Согласно опубликованным литературным данным эксперименты по определению ЭМА проводятся преимущественно с ^{89}Zr -Zr-оксалатом, в то время как для ^{89}Zr -Zr-хлорида получены лишь единичные данные (таблица 9). Максимально высокая ЭМА (379 ± 23 ГБк/мкмоль) в настоящее время получена при фракционном элюировании ^{89}Zr -Zr-оксалата с гидроксаматной смолы [37]. Необходимо отметить, что авторы лишь изредка публикуют данные по титрованию дефероксамина и не указывают итоговое значение ЭМА. В частности, *Holland и соавт.* [80] сообщают о достижении $C_{50\%}$ при концентрации DFO ~ 9 пмоль (ЭМА 17,39-44,215 ГБк/мкмоль), *O'Hara и соавт.* [90] $C_{50\%} \sim 10$ пмоль DFOM (44 ± 7 ГБк/мкмоль), *Wooten и соавт.* [89] $C_{50\%} = 0,4$ нмоль DFO-NCS ($4,0 \pm 0,3$ ГБк/мкмоль).

Таблица 9. Сравнение ЭМА для различных форм ^{89}Zr

Форма ^{89}Zr	Использованные сорбенты для получения ^{89}Zr	Метод измерения	ЭМА, ГБк/мкмоль*	Ист.
^{89}Zr -Zr-хлорид	ТВР	Титрование DOTA	$0,085 \pm 0,048$	[82]
	Гидроксаматная смола+ Sep-пак QMA		$0,518 \pm 0,056$	
^{89}Zr -Zr-оксалат	Гидроксаматная смола	Титрование DFO	0,2-13,1	[89]
		Титрование DFO-NCS	$4,0 \pm 0,3$	[40]
		Титрование DFO	17,4-44,2	[80]
			$36,3 \pm 2,3$	[34]
			60 ± 70	[96]
			75 ± 8	[82]
			75,5-158,4	[88]
			$105,0 \pm 70,3$	[97]
		51-379	[37]	
	Титрование DFOM	44 ± 7	[90]	
AG MP-1M (Cl-)+ Гидроксаматная смола		279 ± 61	[79]	
^{89}Zr -Zr-фосфат	Гидроксаматная смола	ICP-MS	$41,2 \pm 19,2$	[91]

*На момент окончания облучения

При обсуждении ЭМА необходимо подчеркнуть противоречивые данные, полученные для растворов [^{89}Zr]Zr-хлорида. В частности, *Graves и соавт.* [82] наблюдали различные значения ЭМА между образцами [^{89}Zr]Zr-хлорида, которые были получены различными методами: один образец был получен конверсией [^{89}Zr]Zr-оксалата в [^{89}Zr]Zr-хлорид на Sep-пак QMA картридже (518 ± 56 МБк/мкмоль), второй на смоле ТВР (85 ± 48 МБк/мкмоль). Для определения ЭМА использовался хелатор DOTA, реакция комплексообразования проводилась в достаточно жёстких условиях (рН 5,0-7,5; 90°C, 45 мин) и авторы отмечают значительный гидролиз [^{89}Zr]Zr-хлорида, однако природа различий между образцами остаётся невыясненной. Еще одним примером является работа [88], в которой сообщается о близких значениях ЭМА для [^{89}Zr]Zr-оксалата (75,5-158,4 ГБк/мкмоль) и [^{89}Zr]Zr-хлорида, полученного на картридже Sep-пак QMA (33,7-84,6 ГБк/мкмоль). Дополнительно авторы указывают, что в конечном растворе [^{89}Zr]Zr-хлорида были обнаружены оксалат ионы ($1,55 \pm 0,37$ мг/мл).

Несмотря на высокий выход и высокую химическую и радионуклидную чистоту получение ^{89}Zr в форме [^{89}Zr]Zr-оксалата также имеет отрицательную сторону. Поскольку элюирование ^{89}Zr осуществляется, как правило, щавелевой кислотой с высокой концентрацией (~1 М), нейтрализация полученного раствора осложняется низкой растворимостью оксалата натрия (0,27 М при 25°C), в результате чего для предотвращения выпадения осадка исходный раствор требуется разбавить примерно в 4 раза. Кроме того, щавелевая кислота является токсичной, поскольку может вызывать острую почечную недостаточность из-за обструкции почечных канальцев оксалатом кальция. Поэтому препараты, полученные с использованием [^{89}Zr]Zr-оксалата, нуждаются в дополнительной очистке от оксалат-анионов. Дополнительно *Pandya и соавт.* [98] сообщают, что высокая стабильность оксалата циркония влияет на эффективность комплексообразования ^{89}Zr с макроциклическими лигандами. В частности, при синтезе комплексов циркония-89 с DOTA, DOTAM и DOTP авторы считают более предпочтительным использование растворов [^{89}Zr]-хлорида, чем [^{89}Zr]Zr-оксалата. Выход реакции комплексообразования ^{89}Zr с лигандом DOTA (инкубирование 120 мин, 99 °C, рН 7,0) составил 65% и 100% для [^{89}Zr]Zr-оксалата и [^{89}Zr]-хлорида соответственно. Полученные результаты в целом согласуются с опубликованными данными по оценке влияния щавелевой кислоты на процесс комплексообразования с DFO, согласно которым образование комплексов [^{89}Zr]Zr-(ox)₃, [^{89}Zr]Zr-(ox)₄ и [^{89}Zr]Zr-DFO являются конкурирующими реакциями [99].

Однако, не смотря на очевидные минусы, в настоящее время [^{89}Zr]Zr-оксалат используется практически во всех опубликованных процедурах синтеза ^{89}Zr -РФП, а очистка полученных препаратов (^{89}Zr -mAb) проводится методом эксклюзионной хроматографии [42]. Для [^{89}Zr]Zr-хлорида необходимо отметить низкую стабильность исходных растворов и высокую склонность к гидролизу. В результате чего для работы с [^{89}Zr]-хлоридом при рН>5

требуется введение в раствор комплексонов [80–82]. В пользу данного факта свидетельствуют результаты работы [100]. Авторы использовали [^{89}Zr]Zr-хлорид, полученный на картридже Sep-рак QMA (остаточная концентрация щавелевой кислоты менее 10^{-5} М) для мечения PSMA-617. При этом высокое значение РХЧ (>70%) было получено только при добавлении в реакцию смесь органических растворителей 1:1 (наиболее эффективный – ДМСО). Добавление небольшого количества щавелевой кислоты (до 5×10^{-5} М) также приводило к увеличению РХЧ (до +20%). Данный факт свидетельствует о критической необходимости введения в раствор дополнительных солигандов для подавления гидролиза [^{89}Zr]Zr-хлорида.

Длительное время считалось, что применение [^{89}Zr]Zr-хлорида негативно влияет на стабильность радиоиммуноконъюгатов. Авторадиолиз приводит к образованию радикалов ОСГ, которые реагируют с SH-группой енолированного тиомочевинного звена [101,102]. В результате происходит разрыв метионильных пептидных связей. Однако в недавнем сравнительном исследовании [^{89}Zr]Zr-DFO-трастузумаба и [^{89}Zr]Zr-DFO-цетуксимаба, синтезированных с использованием [^{89}Zr]Zr-хлорида и [^{89}Zr]Zr-оксалата, не было обнаружено негативных эффектов при использовании растворов [^{89}Zr]Zr-хлорида [103].

1.9 Комплексообразование циркония

Первоначально для хелатирования Zr^{4+} были использованы такие известные хелаторы как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) и диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА) (рисунок 6). Исследования кристаллических структур Zr-EDTA и Zr-ДТРА показали, что в обоих случаях Zr^{4+} образует восьмикоординированные комплексы, а в формировании комплекса Zr-EDTA дополнительно участвуют две молекулы воды [104,105]. Образование полиядерных комплексов в данном случае авторами не рассматривалось. Несмотря на достаточно высокие константы термодинамической стабильности (Zr(EDTA) $\log\beta = 27,9 \pm 0,1$; Zr(ДТРА) $\log\beta = 35,3 \pm 0,3$ [106]) на практике комплекс Zr-ДТРА оказался недостаточно стабильным. При инкубации в плазме крови в течении 24 часов комплекс ^{88}Zr с ДТРА частично диссоциировал (сохранялось 80% комплекса), тогда как комплекс с DFO оставался стабильным (сохранялось 99,8% комплекса) [107]. Дефероксамин был впервые выделен *Bickel и соавт.* [108] в 1960 году из *Streptomyces pilosus*. Гексадентатный хелатор DFO является бифункциональным сидерофором, содержащим три последовательно связанные гидроксаматные группы (рисунок 6). Учитывая склонность Zr^{4+} к взаимодействию с жёсткими основаниями Льюиса, и его способность образовывать комплексы с моногидроксаматами, *Meijs и соавт.* [107] в 1992 году показали, что DFO образует стабильные комплексы с ^{89}Zr и может использоваться в качестве хелатора при синтезе радиоиммуноконъюгатов.

Согласно квантовохимическим расчётам высокая стабильность комплекса $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$ обусловлена хелатированием ${}^{89}\text{Zr}^{4+}$ тремя гидроксаматными группами молекулы DFO. В процессе комплексообразования участвуют 3 нейтральных и 3 отрицательно заряженных атома кислорода и 2 молекулы воды, которые дополняют координационную сферу (рисунок 7) [109]. В дальнейших теоретических исследованиях было показано, что при комплексообразовании Zr с DFO в водном растворе образуются комплексы $[\text{Zr}(\text{DFO})(\text{H}_2\text{O})_n]^+$ ($n = 0-2$), среди которых наиболее стабильным является комплекс $[\text{ZrDFO}(\text{H}_2\text{O})]^+$ с к.ч. 7 ($\log\beta = 41,51$) [110].

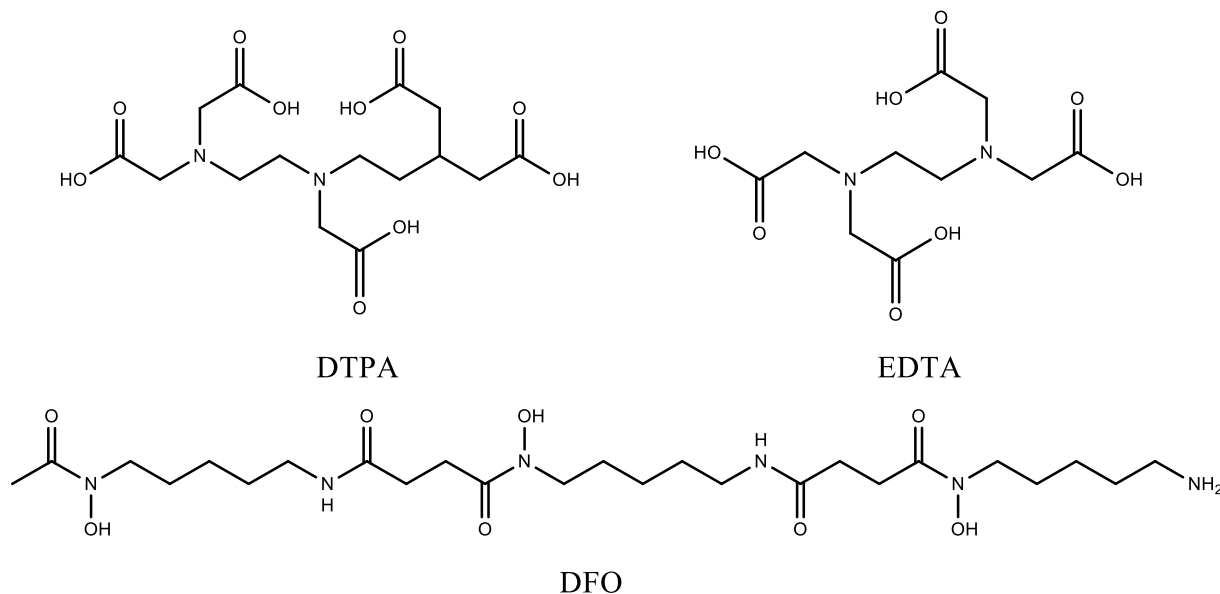


Рисунок 6. Структуры хелаторов DTPA, EDTA, DFO.

Одновременно с этим образование комплекса $[\text{ZrDFO}(\text{H}_2\text{O})]^+$ было подтверждено экспериментально [111]. В последствии было проведено еще одно исследование (квантовохимические расчёты, аппроксимация результатов EXAFS) в результате которого авторы пришли к выводу, что координационная сфера комплекса Zr-DFO, наиболее вероятно завершается двумя ионами гидроксила, а не двумя молекулами воды [112]. Таким образом, несмотря на активные исследования, в настоящее время точная структура комплекса Zr-DFO остаётся невыясненной.

В работе *Toporivska u соавт* [113] сообщается о значении константы ($\log\beta = 46,4-47,7$ и $40,4$ для $[\text{Zr}(\text{HDFO})]^{2+}$ и $[\text{Zr}(\text{DFO})]^+$ соответственно), при этом депротонированная форма становится преобладающей при значении $\text{pH} \sim 6,4$ ($C_{\text{Zr(IV)}} = 1 \text{ mM}$, $C_{\text{DFO}} = 1 \text{ mM}$). Наиболее низкие значения константы комплекса $[\text{Zr}(\text{DFO})]^+$ ($\log\beta = 36,14$), были получены в работе *Savastano u соавт.* [114]. При этом авторы отмечают, что стехиометрия комплексов $[\text{Zr}(\text{DFO})]^+$ значительно меняется в зависимости от pH и преобладающими формами в растворе при концентрациях циркония и DFO, равных 1 mM являются биядерные комплексы с мольным соотношением 2:2 и

2:3 (Zr:DFO) [114,115]. Присутствие таких форм в системах с пиколярным содержанием циркония (как в случае растворов радионуклида циркония-89 без носителя) крайне маловероятно.

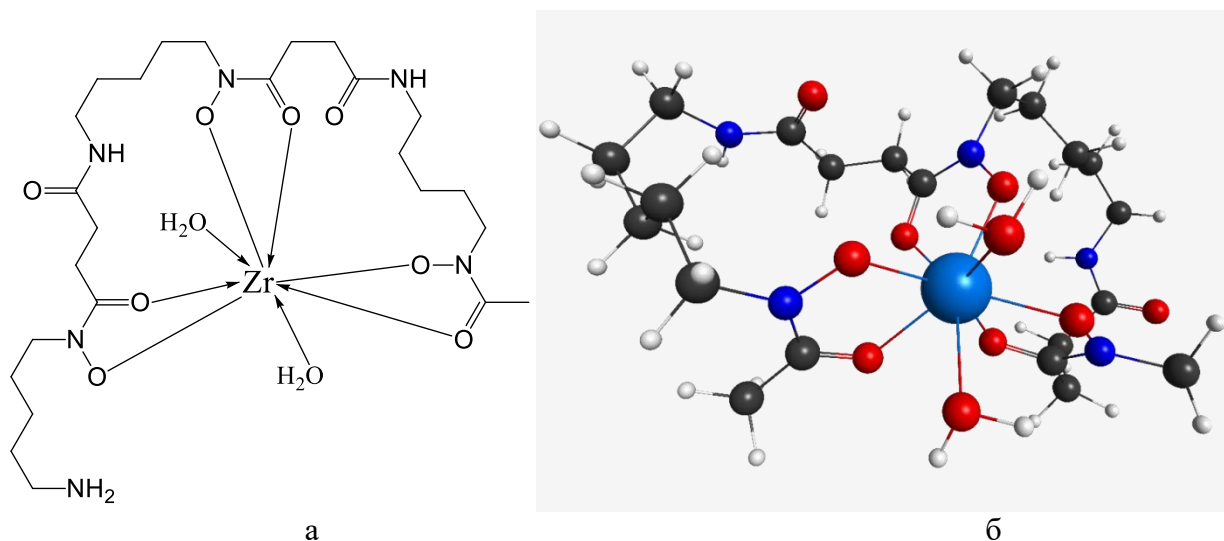


Рисунок 7. а – упрощённая структурная формула комплекса $[ZrDFO(H_2O)_2]^+$, б- Структура комплекса $[ZrDFO(H_2O)_2]^+$, вычисленная с помощью теории функционала плотности.

Построено на основании данных работы [110].

Необходимо отметить, что при выборе хелатора для РФЛП кинетическая стабильность является более важной, чем термодинамическая стабильность комплекса металл-хелат. Термодинамические константы стабильности могут быть полезны при предварительном сравнении различных хелатирующих агентов, но не отражают устойчивость комплекса *in vivo*, тогда как стабильность комплекса *in vivo* является главным критерием для применения полученных комплексов в области ядерной медицины [116]. При введении РФЛП в организм целевой комплекс подвергается ряду негативных воздействий. Присутствующие в организме ионы металлов имеют значительно большую концентрацию и могут вытеснить цирконий как микрокомпонент из его комплекса. Ещё больше усложняет ситуацию присутствие в организме сильных нативных металл-связывающих транспортных белков способных перелигандировать радионуклид [116]. Например, было показано, что Zr связывается с трансферинном, фракцией альбумина и α -, β - и γ -глобулином [117,118]. Указанные факторы, с одной стороны, вынуждают исследователей к применению разнообразных косвенных методов определения свойств комплексов циркония-89, но, в то же время, дают более практически значимую оценку приемлемости данных соединений непосредственно *in vitro* и *in vivo*.

В настоящее время дефероксамин, благодаря своей способности образовывать прочные комплексы со многими металлами, (включая Zr), а также коммерческой доступности, является «золотым стандартом» в области синтеза $[^{89}Zr]Zr$ -mAb радиофармпрепаратов. Для

присоединения DFO к mAb были предложены различные методы, главным недостатком которых остаётся сложный многоступенчатый синтез. Эти методы подробно освещены в ряде обзоров [119–121]. *Perk и соавт.* [102,122] предложили более простой одностадийный метод конъюгации p-Bn-NCS-DFO с аминогруппой лизина немодифицированного антитела (рисунок 8). Реакция конъюгации основана на образовании тиомочевинной связи и проводится в мягких условиях (37 °C, 30 мин). В качестве буферного раствора используется, как правило, карбонат натрия с pH 9. Впоследствии данный метод был усовершенствован для увеличения удельной активности готового препарата и снижения количества используемых mAb [123,124].

Однако гексадентатный DFO не является оптимальным хелатором для Zr, поскольку Zr предпочтительно образует комплексы с к.ч. 8. Данное несоответствие особенно ярко проявляется при изучении биораспределения препаратов на основе [⁸⁹Zr]Zr-DFO. В ряде работ отмечено высокое накопление ⁸⁹Zr (~10 % от введённой дозы на грамм (ID/г)) в скелете мышей после внутривенного введения (в/в) ⁸⁹Zr-DFO-mAb [109,125–128].

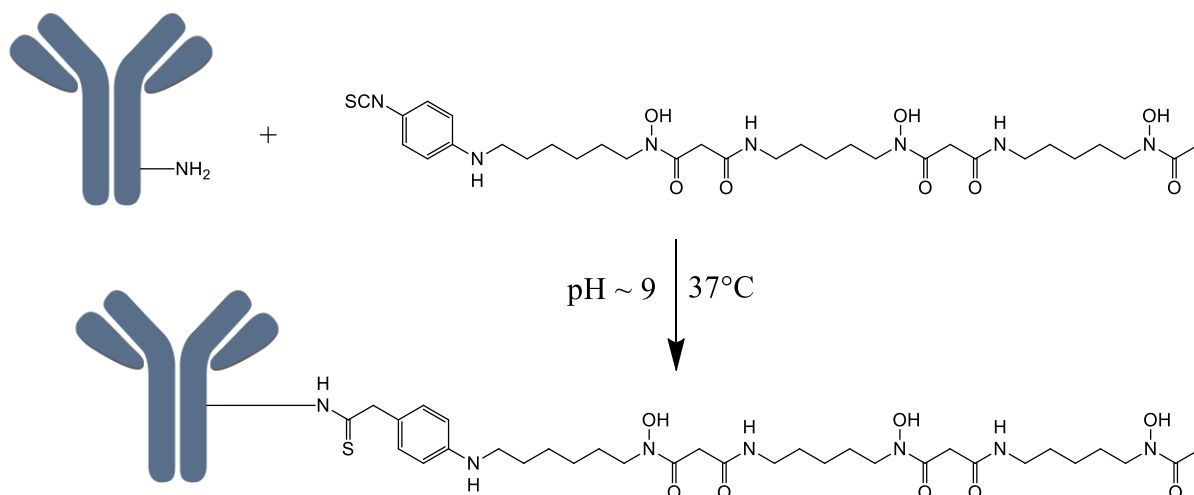


Рисунок 8. Реакция конъюгации mAb с p-Bn-NCS-DFO.

Наиболее правдоподобным объяснением данного факта является высвобождение циркония-89 из структуры комплекса с DFO. Высокая остеотропность иона циркония-89 приводит к его накоплению в костной ткани, что искажает реальное биораспределение препарата и может приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам, а также к недооценке дозы облучения, поглощённой костным мозгом [129,130]. Данные результаты стали отправной точкой для разработки более совершенных, главным образом октадентатных, хелаторов для циркония-89 [131].

Одним из наиболее перспективных хелаторов является DFO*, который содержит 4 гидроксаматные группы (рисунок 9). Комплексы и препараты, полученные на основе нового хелатора DFO*, были более стабильными *in vivo* и *in vitro* по сравнению с аналогичными на основе DFO (таблица 10). Дополнительно в ходе исследований с DFO* был синтезирован

аналог DFO* – DFOcyclo* (рисунок 9), препараты, на основе которого показали еще более высокую стабильность (таблица 10) [132]. Однако, из-за увеличения количества гидроксаматных групп, хелатор DFO* более липофилен $\log P = -0,44$ [133], поэтому для приготовления раствора используется ДМСО, что в случае синтеза mAb-РФЛП может приводить к агрегации белков [101]. Для увеличения гидрофильности молекулы был предложен синтез молекул DFO, содержащих эфирные мостики [134,135]. Молекула DFO, содержащая 3 эфирных мостика (DFO-O₃, рисунок 9), является в 45 раз более гидрофильной, по сравнению с нативным DFO. Позднее была синтезирована молекула oxoDFO* ($\log P = -1,5 \pm 0,2$), содержащая 4 эфирных мостика (рисунок 9) [133]. Оценка стабильности комплексов в 5–50 мМ избытке ДТРА (рН 6) показала более высокую устойчивость для комплексов на основе DFO*, по сравнению с DFO [136].

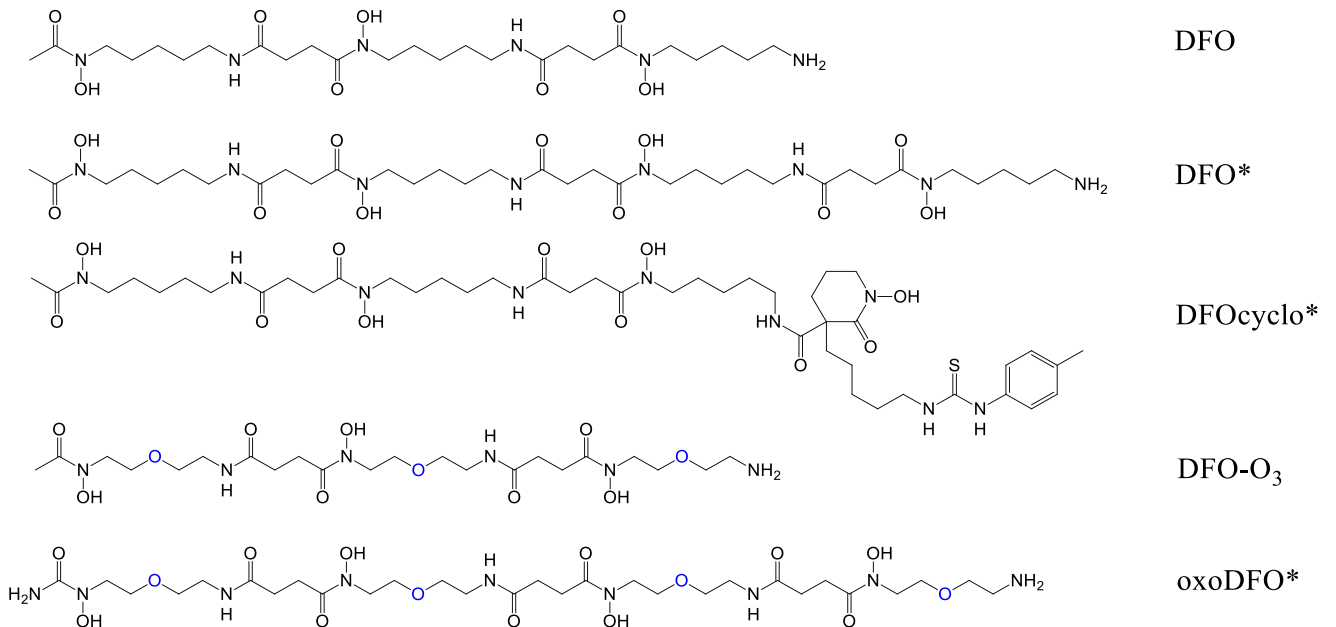


Рисунок 9. Структуры хелаторов на основе DFO

Еще одной перспективной группой являются хелаторы на основе гидроксипиридона (НОРО). Изначально они были предложены в качестве эффективного хелатора при лечении отравления плутонием-238 [137]. Среди исследованных хелаторов наиболее перспективными оказались 3,4,3-(L1-1,2-НОРО), и DFO-НОРО (рисунок 10). Дальнейшие исследования показали, что они также подходят для хелатирования ⁸⁹Zr. Для обоих хелаторов были получены многообещающие результаты. Комплексы [⁸⁹Zr]Zr-DFO-НОРО и [⁸⁹Zr]Zr-3,4,3-(L1-1,2-НОРО) были более стабильны в экспериментах *in vitro* по сравнению с [⁸⁹Zr]Zr-DFO. В экспериментах *in vivo* комплекс [⁸⁹Zr]Zr-DFO-НОРО показал более низкое накопление в скелете (таблица 10) и более быстрый клиренс. Для комплекса [⁸⁹Zr]Zr-3,4,3-(L1-1,2-НОРО) был отмечен более медленный клиренс и несколько более высокое накопление в скелете ($0,17 \pm 0,03$ %ID/г), по сравнению с [⁸⁹Zr]Zr-DFO ($0,06 \pm 0,01$ %ID/г). В дальнейших исследованиях 3,4,3-(L1-1,2-

НОРО) был модифицирован добавлением бензилизотиоцианатной группы и конъюгирован с трастузумабом [138]. Несмотря на небольшое снижение стабильности для $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -НОРО-трастузумаба относительно $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -ДФО-трастузумаба *in vitro*, исследование *in vivo* показало более низкое накопление для $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -НОРО-трастузумаба в скелете (таблица 10) и более высокое значение коэффициента дифференциального накопления (КДН) опухоль/скелет (~26) по сравнению с аналогичным препаратом на основе ДФО (КДН опухоль/скелет ~8). Исследования по синтезу и оценке препаратов на основе хелатора ДФО-НОРО на данный момент не опубликованы.

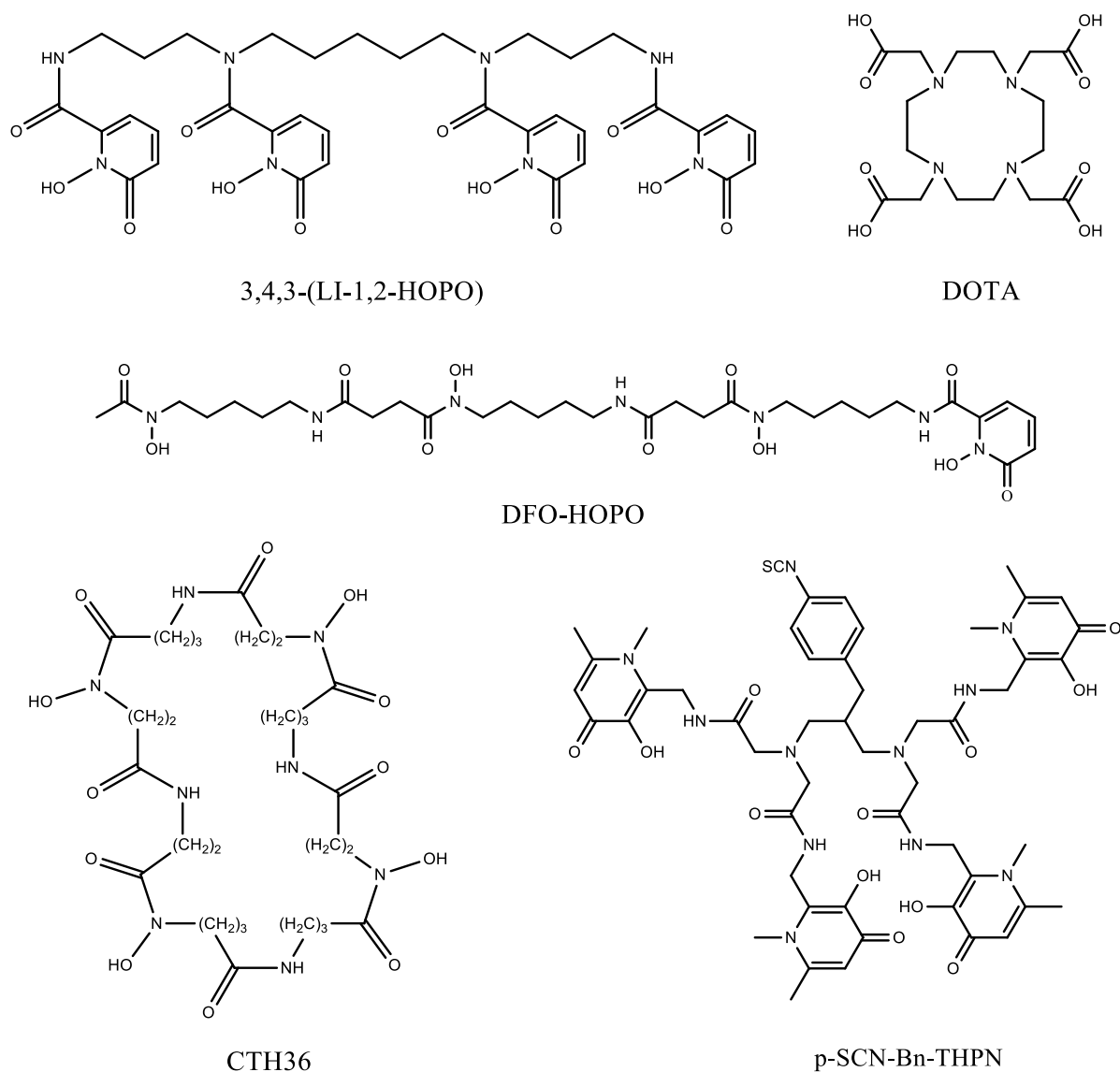


Рисунок 10. Структуры различных хелаторов

Достаточно перспективным для ^{89}Zr так же является разветвлённый хелатор на основе гидроксипиридона ТНPN (рисунок 10). Сравнительное исследование стабильности комплексов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -ТНPN и $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -ДФО *in vitro* показало одинаковую устойчивость комплексов в сыворотке крови и более высокую устойчивость комплекса $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -ТНPN в 100-кратном

избытке EDTA [139]. Исследование *in vivo* показало схожее биологическое поведение для $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-THPN}$ и $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$ через 24 ч после введения. Для дальнейших исследований THPTN был конъюгирован с 1,4-фенилендиизотиоцианатом и, далее, с высокомолекулярным (800 кДа) полимерным гиперразветвленным полиглицерином (HPG) и помечен ^{89}Zr [140]. Сравнение проводилось с препаратами на основе хелаторов DFO и DFO*. Однако несмотря на высокую термодинамическую стабильность комплекса $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-THPN}$ ($\log\beta = 50,3$) и более высокую стабильность по сравнению с $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$ *in vitro*, при проведении исследований *in vivo* препарат на основе THPTN показал более высокое накопление в скелете, по сравнению с препаратами на основе DFO и DFO* (таблица 10). В качестве одной из возможных причин неудовлетворительной стабильности указывается введение *n*-фенилендиизотиоцианатной группы, что согласно квантовохимическим расчетам приводит к небольшому нарушению координационной геометрии.

Помимо специальных хелаторов, комплексообразование ^{89}Zr так же изучалось с различными азамacroциклическими хелаторами [98,141]. Согласно последним исследованиям ^{89}Zr образует очень стабильные комплексы с хелатором DOTA (рисунок 10) [98]. Авторы отмечают, что комплекс $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DOTA}$ не подвергается перелигандированию даже в присутствии 1000-кратного избытка EDTA в течение 7 сут. В аналогичных условиях лишь 20% ^{89}Zr остается в комплексе $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$. Комплекс $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DOTA}$ так же показал наиболее низкое фоновое накопление *in vivo*. Однако необходимо учитывать, что возможность использования DOTA для синтеза ^{89}Zr -РФЛП значительно ограничена: для образования комплекса $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DOTA}$ требуется нагревание ($>70^\circ\text{C}$ в течение 30 и более минут), что делает невозможным использование предварительно конъюгированных антител. Более того, даже в случае реализации концепции предварительного мечения и последующей конъюгации область применения DOTA в качестве хелатора значительно ограничена. Комплекс $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DOTA}$ не может быть конъюгирован с векторной молекулой, поскольку не имеет свободных карбоксильных групп.

Отдельно стоит отметить специально разработанный для ^{89}Zr циклический хелатор СТН36 (рисунок 10) [142]. В *in vitro* исследованиях комплекс на основе хелатора СТН36 ($[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-СТН36-c(RGDfK)}$) был более стабилен, чем аналогичный комплекс на основе DFO. Согласно квантовохимическим расчётам (B3LYP, базис DGDZVP), хелатор СТН36 образует с Zr комплекс, характеризующийся одной из самых высоких констант термодинамической стабильности (таблица 11) [110].

Таблица 10. Результаты *in vitro* и *in vivo* исследований для различных хелаторов

Хелатор	Вектор	Стабильность <i>in vitro</i>		Стабильность <i>in vivo</i>		Ист.
		Метод	% интактного комплекса	Накопление в кости, %ID/г	Временная точка	
DFO	Трастузумаб	Сыворотка крови (7 сут)	72,0	3,86±0,8	144 ч	[101]
DFO*			96,3	0,8±0,1		
DFO	T-DM1			9,6±0,4	96 ч	[143]
DFO*				6,6±0,6		
DFO	Трастузумаб	1000-кратный избыток EDTA (7 сут)	~50%	4,5±0,6	168 ч	[132]
DFO*			>98%	2,0±0,3		
DFOcyclo*			>98%	1,5±0,3		
DFO*	Трастузумаб	375-кратный избыток EDTA (1 сут)	>90	0,8±0,3	144 ч	[144]
DFO			68	4,6±2,3		
DFO	HPG		97	3,3±0,4		
DFO*			>99	3,1±0,7		
p-Bn-NCS-НОРО	Трастузумаб	Сыворотка крови (7 сут)	89,2±0,9	2,4±0,3	366 ч	[138]
DFO			94,7±0,7	17,0±4,1		
3,4,3-(LI-1,2-НОРО)	MSLN-mAb	Сыворотка крови (4 сут)	23	15,40±2,40	144 ч	[145]
DFO	MSLN-mAb		46	6,51±1,82		
THPN	HPG	Плазма крови (5 сут)	96±1	8,4±2,2	144 ч	[140]
DFO			97±0	3,3±0,4		
DFO*			>99	3,1±0,7		

При этом наиболее высокая константа термодинамической стабильности получена для комплекса $Zr(\text{охоDFO}^*)$ (таблица 11). Такая высокая константа в данном случае объясняется более высокой гибкостью структуры охоDFO^* за счёт наличия в структуре хелатора эфирных мостиков, что приводит к снижению стерических затруднений [110]. Данный эффект так же можно наблюдать при сравнении комплексов $[ZrDFO(\text{H}_2\text{O})]^+$ и $[Zr(\text{DFO-O3})]^+$ (таблица 11). Таким образом, введение эфирных мостиков вероятно является одним из наиболее удачных

подходов к модификации хелатора, поскольку одновременно увеличивает и термодинамическую стабильность, и гидрофильность исходной молекулы.

Таблица 11. Константы термодинамической стабильности для некоторых комплексов [110]

Комплекс	Zr(охо DFO*)	Zr(DFO-НОРО)	Zr(DFO*)	Zr(СТН36)	Zr(ТНPN)	[ZrDFO (H ₂ O)] ⁺	[Zr(DFO-O3)] ⁺
log β	54,16	53,51	51,56	52,84	47,28	41,41	43,37

Непосредственное сравнение наиболее перспективных хелаторов (DFO*, СТН36, 3,4,3-(LI-1,2-НОРО) и DOTA-GA) было выполнено *Damerow и соавт.* [146]. Авторами были синтезированы тетразин-модифицированные хелаторы, которые в последствии были конъюгированы с пептидом с(RGDfK) и помечены ⁸⁹Zr. Комплексы ⁸⁹Zr с DFO-с(RGDfK), DFO*-с(RGDfK) и СТН36-с(RGDfK) были получены с высоким выходом (>96%) в течение часа инкубации при 37 °C, для синтеза [⁸⁹Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-НОРО)-с(RGDfK) потребовалось нагревание в течение 5 часов, при этом предполагается образование нескольких форм комплекса. Синтезировать комплекс с DOTA-GA-с(RGDfK) не удалось даже при инкубировании при 99 °C в течение нескольких часов. Авторы отмечают, что согласно квантовохимическим расчётам модификация молекулы хелатора тетразином оказывает незначительное влияние на геометрию комплексов, за исключением комплекса с DOTA-GA в котором происходит удлинение связей Zr-N по сравнению с комплексом Zr-DOTA. Тем не менее, данный факт не объясняет нулевой выход реакции комплексообразования. Для оценки стабильности комплексы [⁸⁹Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-НОРО)-с(RGDfK), [⁸⁹Zr]Zr-DFO-с(RGDfK), [⁸⁹Zr]Zr-DFO*-с(RGDfK) и [⁸⁹Zr]Zr-СТН36-с(RGDfK) инкубировали в 10000-кратном избытке EDTA в течение 54 часов. В данных условиях комплекс [⁸⁹Zr]Zr-DFO-с(RGDfK) быстро диссоциировал (сохраняется <10% комплекса через 24 часа). Комплексы [⁸⁹Zr]Zr-DFO*-с(RGDfK) и [⁸⁹Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-НОРО)-с(RGDfK) оставались достаточно стабильными в течение всего эксперимента (сохраняется >80% и >95% соответственно). Наиболее интересным является факт, что комплекс на основе хелатора СТН36, практически полностью диссоциировал (сохраняется ~10% комплекса через 24 часа), так же, как и комплекс на основе DFO. Данные результаты ещё раз подтверждают, что термодинамические константы являются полезными при предварительном сравнении различных хелаторов, но не могут быть использованы для оценки стабильности комплексов *in vivo*.

1.10 Биологическое воздействие циркония

В 1958 году Блюменталем был описан ряд работ, связанных с исследованием поведения циркония в организме [147]. Согласно ранним работам, цирконий оказывал слабое влияние на организмы животных: введение в организм животных различных соединений циркония (перорально, внутривенно) не оказывало существенного влияния, а имплантация металлического циркония в большие полушария собак вызывала слабые реакции на 8–97 день [148]. Добавление в пищу кошек и мышей карбоната циркония не оказывало влияние на состояние и поведение животных, кроме того низкие дозы циркония вызывали уменьшение количества кишечной флоры и оказывали благоприятное действие при стафилококковой инфекции [149–151]. Позже для растворов цитрата и лактата циркония были определены полумлетальные дозы. При введении цирконий цитрата крысам внутривенно LD_{50} составляет ~171 мг/кг [152] и 2,7 г/кг для внутрибрюшного введения мышам [153]. Кроме того, почти весь вводимый цирконий цитрат при внутрибрюшном введении выделяется через кишечный тракт в течение 5–6 час. Цитрат циркония так же рассматривался в качестве рентгенконтраста для рентгенографической диагностики опухолей мозга, однако при эксперименте на кроликах препарат задерживался только в почках и не проникал в мягкие ткани [153]. Для внутрибрюшных инъекций цирконий лактата LD_{50} составила 51 мг/кг. Большие дозы вызывали у животных судороги, конвульсии и остановку дыхания [150].

При проведении экспериментов *Hunter и соавт.* [153] отметили, что цирконий имеет высокое сродство к костной ткани, а его выведение происходит постепенно и занимает около 100 дней. *Schubert и соавт.* [152] предложили использовать цирконий для лечения отравлений плутонием и иттрием. Внутривенные инъекции цитрата циркония с цитратом натрия через 2–4 часа ускоряли выделение плутония с мочой [152]. Авторы предполагают, что это происходит в результате конкурентного замещения плутония и иттрия цирконием, однако в/в введение цитрата циркония не увеличивало выделение остреотропных металлов, таких как стронций [147].

Одно из первых исследований по изучению биораспределения ^{89}Zr у человека опубликовано в 1957 году [117]. Пациентам внутривенно вводили 1% раствор ^{89}Zr -цитрата (рН 6-7). Для изучения биораспределения проводили измерение активности образцов крови и мочи. В ходе исследования было установлено, что ^{89}Zr -цитрат имеет медленный клиренс (выведение с мочой – 7,6% в течение 7 дней) и значительном количестве остаётся связанным с фракцией альбумина, а также α -, β - и γ -глобулина (пиковая концентрация ^{89}Zr в плазме крови составила 19,3 %/л через 3 часа после введения).

В последнее десятилетие биораспределение различных химических форм циркония-89 было изучено различными группами учёных. После введения ^{89}Zr -оксалат и ^{89}Zr -цитрат

длительное время находятся в кровяном русле из-за связывания белками плазмы, что объясняет высокое накопление в сердце и лёгких на протяжении первых 8 часов после инъекции [130,154]. Данный факт необходимо учитывать при расчёте неспецифического поглощения, поскольку связанный с белками плазмы ^{89}Zr локализуется в очагах воспалительных процессов, а также ревматоидного артрита [81,155].

Различные химические формы ^{89}Zr имеют медленный клиренс (6% и 35% в течение 6 дней для ^{89}Zr]-Zr-оксалата и ^{89}Zr]-Zr-цитрата соответственно) и в значительной степени интернализуется в костной ткани (>20% ID/г) [130,154,156]. Наиболее быстрым клиренсом обладает комплекс ^{89}Zr]-Zr-DFO, который быстро выводится из кровотока через почки и удаляется с мочой в течение суток после инъекции [80,154]. Разницу в фармакокинетике авторы объясняют увеличением стабильности комплекса в ряду ^{89}Zr]-Zr-DFO >> ^{89}Zr]-Zr-цитрат > ^{89}Zr]-Zr-оксалат, что обеспечивает более высокую экскрецию почками и более низкое накопление в скелете [130]. Данные по биораспределению ^{89}Zr]-Zr-хлорида и ^{89}Zr]-Zr-фосфата являются достаточно противоречивыми. Группа *Abou и соавт.* [130] наблюдали накопление ^{89}Zr]-Zr-хлорида в мягких тканях, а затем в скелете, тогда как *Holland и соавт.* [80] отмечают высокое накопление ^{89}Zr]-Zr-хлорида в печени. Аналогичное несоответствие существует и для ^{89}Zr]-Zr-фосфата. *Abou и соавт.* [130] обнаружили высокое накопление ^{89}Zr]-Zr-фосфата в печени (~ 60 %/г) и селезенке, сохраняющееся в течение 6 дней. Однако данные представленные *Bansal и соавт.* [156] показывают, что после внутривенного введения ^{89}Zr]-Zr-фосфата накопление активности происходит главным образом в скелете. Наиболее вероятным объяснением данных фактов является недостаточный контроль вводимых образцов и присутствие ^{89}Zr в коллоидной форме, о чем свидетельствует низкое содержание активности в кровяном русле и высокое накопление в печени.

1.11 Радиофармацевтические препараты циркония-89

Основным направлением разработки в радиофармацевтической химии ^{89}Zr стало создание препаратов на основе моноклональных антител для планирования и мониторинга последующей иммунотерапии. Основным преимуществом иммунотерапии является более высокая специфичность и, следовательно, более низкая токсичность по сравнению с химиотерапией, однако данный метод требует тщательной подготовки к назначаемому лечению. В данном случае основным требованием для разрабатываемых РФЛП является специфическое накопление в целевых тканях и органах, а также соответствие биораспределения меченого антитела и терапевтического препарата.

Впервые возможность синтеза и использования ^{89}Zr -mAb была показана *Meijs и соавт.* [154] в 1996 году. После многочисленных исследований, результаты которых детально

изложены в ряде подробных обзоров [157–160] в 2009 году были опубликованы данные о первом клиническом исследовании с ^{89}Zr -РФЛП [15]. Исследование было посвящено визуализации CD44v6-позитивных опухолей головы и шеи химерным антителом ^{89}Zr -cmAb U36 [15,161]. Примерно в то же время было проведено еще одно клиническое исследование, в ходе которого *Dijkers и соавт.* [22,162] показали, что [^{89}Zr]Zr-трастузумаб может успешно применяться при диагностике метастатических поражений печени, легких, костей и головного мозга у пациентов с HER2-положительным раком молочной железы (рисунок 11).

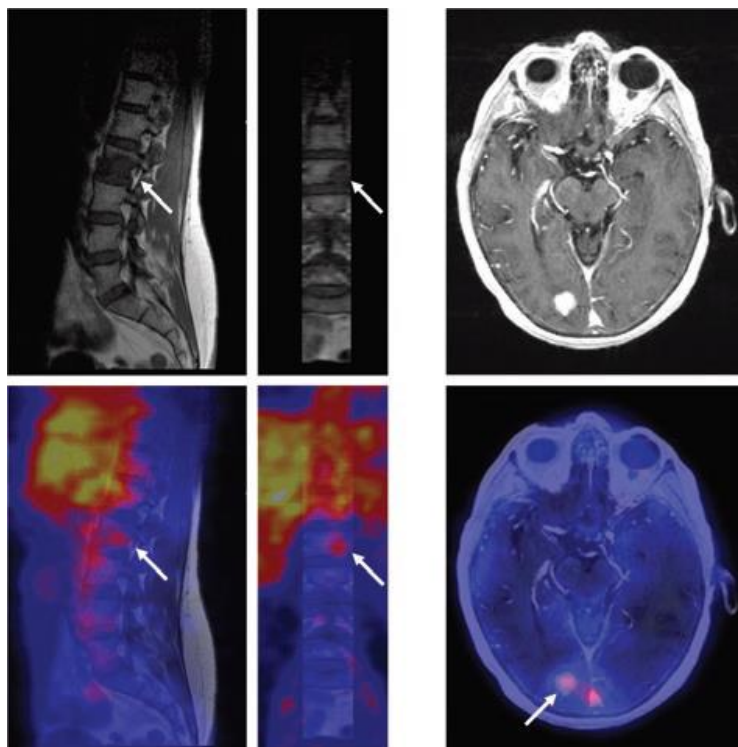


Рисунок 11. ПЭТ и МРТ томограммы метастатического поражения позвоночника и головного мозга [22].

Данные работы инициировали активные исследования и к настоящему времени клиническая практика ^{89}Zr -РФЛП насчитывает более 20 завершённых клинических исследований [163]. В таблице 12 представлены опубликованные на сегодняшний день результаты по клиническим исследованиям различных ^{89}Zr -mAb РФЛП.

Таблица 12. Клинические исследования с ^{89}Zr -mAb РФЛП

РФЛП	Диагностируемое заболевание	Ист.
^{89}Zr]Zr-cmAb U36	CD44v6-позитивные опухоли головы и шеи	[15,161]
^{89}Zr]Zr-трастузумаб	рак молочной железы	[22,162,164–167]
^{89}Zr]Zr-цетуксимаб	колоректальный рак	[168]
^{89}Zr]Zr-Hu-J591	рак предстательной железы	[169,170]
^{89}Zr] Zr-DFO-MSTP2109A		[171,172]
^{89}Zr]Zr-фрезолимумаб	гликома	[23]
^{89}Zr]Zr-ММОТ0530А	карцинома поджелудочной железы и яичников	[173]
^{89}Zr]Zr-ритуксимаб	CD20-позитивная В-клеточная лимфома	[174]
^{89}Zr]Zr-ибритумомаб		[16]
^{89}Zr]Zr-бевацизумаб	рак молочной железы	[17,164]
	рак лёгких	[174]
	карцинома почек	[19]
	нейроэндокринные опухоли	[175]
^{89}Zr]Zr-IAB22M2C	визуализация CD8 + Т-клеток	[176]
^{89}Zr]Zr-DFO-MSTP2109A	рак предстательной железы	[171,172]
^{89}Zr]Zr-GSK2849330	рецептор эпидермального фактора роста человека (HER3)	[177]
^{89}Zr]Zr-даратумумаб	множественная миелома	[178]

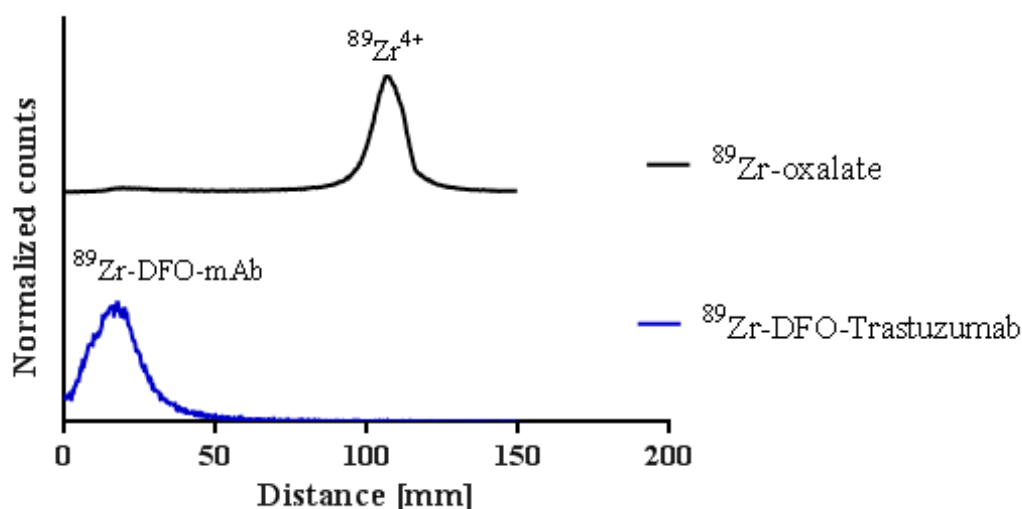
Помимо препаратов для иммуннПЭТ можно отметить ряд исследований по синтезу препаратов ^{89}Zr на основе меченых пептидов и белков [179–184], фрагментов антител [185–190], наночастиц, коллоидов и липосом [191–195]. ^{89}Zr так же востребован для исследований со стволовыми клетками и клетками крови. Лечение стволовыми клетками является весьма перспективным при многих заболеваниях. Изучение распределения и возможность трекинга клеток после трансплантации является важным критерием для получения максимального терапевтического эффекта (таблица 13). Для мечения клеток, как правило, используется липофильный комплекс ^{89}Zr с 8-оксихинолином (оксином).

Таблица 13. Исследования с [^{89}Zr]Zr-оксином

Применение	Ист.
Мониторинг клеточной терапии	[156,196,197]
Мониторинг терапии рака легких	[198,199]
Мониторинг трансплантации стволовых клеток	[200,201]
Мониторинг адаптивной иммунотерапии	[202–204]
Мониторинг терапии легочной артериальной гипертензии	[205]
Диагностика ревматоидного артрита	[206]
Диагностика атеросклеротических поражений	[207]
Диагностика воспалений и инфекций	[208]

1.12 Анализ комплексов и препаратов ^{89}Zr

Контроль качества полученных меченых соединений ^{89}Zr выполняется преимущественно методом ТСХ. Используемые в литературе радио-ТСХ системы представлены в ПРИЛОЖЕНИЕ . Система ITLC-SG / 50 мМ ДТПА (далее – *метод 1*) является одной из наиболее широко используемых систем для анализа препаратов ^{89}Zr . В данной системе комплексы и радиоиммуноконъюгаты ^{89}Zr остаются на старте $R_f = 0$, в то время как свободный ^{89}Zr имеет $R_f = 1$ (рисунок 12). Однако, основным недостатком всех ТСХ систем, в которых исследуемый комплекс имеет $R_f = 0$, является вероятность завышения РХЧ из-за возможного присутствия гидролизованной формы ^{89}Zr .

Рисунок 12. Пример определения РХЧ препарата в *системе 1* [209].

При этом для анализа комплексов, как правило, не используется дополнительная система для определения содержания гидролизованного ^{89}Zr . Так, например, в одной из популярных

современных статей по ^{89}Zr *Holland u соавт.* [80] сообщают о 100% радиохимическом выходе комплекса ^{89}Zr -DFO как при использовании ^{89}Zr -оксалата, так и ^{89}Zr -хлорида в диапазоне pH 6-9, поскольку вся активность находится на старте хроматограммы в системе ITLC-SG / 50 mM ДТПА. Однако, как известно, раствор ^{89}Zr -хлорида значительно гидролизуется и становится непригодным для мечения в отсутствие комплексов уже при pH>5 [81,82]. Недостаточный контроль РХЧ, как было показано ранее, является следствием различия в биораспределении образцов ^{89}Zr при проведении доклинических исследований. Таким образом, аналитические методики контроля качества являются важной составляющей на всём пути разработки РФЛП.

Выводы из литературного обзора

Подводя итог, можно заключить, что цирконий-89 является крайне перспективным радионуклидом для современной ядерной медицины. За последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в разработке новых РФП ^{89}Zr . Возрастающий интерес к ^{89}Zr обусловлен, главным образом, введением в клиническую практику новых рецептороспецифических РФП с характерной медленной фармакокинетикой, что, в свою очередь, накладывает более высокие требования к форме и качеству радионуклидной продукции. Сегодня практически все методы получения ^{89}Zr основаны на использовании экстракционно-хроматографических гидроксаматно-модифицированных смол, которые позволяют проводить эффективную очистку от примесей и получать растворы ^{89}Zr с высокой удельной активностью. Однако данный метод имеет существенный недостаток, поскольку основным элюентом является щавелевая кислота, которая является потенциально токсичной и должна быть удалена из фармацевтической композиции. Кроме того, считается, что высокая стабильность оксалатных комплексов ^{89}Zr негативно влияет на эффективность комплексообразования. Альтернативной химической формой ^{89}Zr является ^{89}Zr -хлорид. Однако из-за высокой склонности ^{89}Zr -хлорида к гидролизу, данная химическая форма является непрактичной при проведении синтеза ^{89}Zr -mAb РФП. В настоящее время не существует однозначного мнения о наиболее подходящей химической форме ^{89}Zr как радионуклидного предшественника. Кроме того, при разработке РФП практически не освещаются проблемы получения и контроля качества, как исходных растворов, так и синтезируемых РФП. Таким образом, одной из наиболее актуальных задач является разработка простой и эффективной технологии получения ^{89}Zr в химической форме, удобной для дальнейшего использования в синтезе (нетоксичной, и не оказывающей негативного влияния на векторную молекулу, стабильной и удобной в обращении).

2. Экспериментальная часть

2.1 Химикаты и реагенты

$[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$ в 5 М HCl (700–1000 МБк/мл) был приобретен у ЗАО Циклотрон (Россия). Согласно паспорту содержание радиоактивных примесей $< 0,1\%$; содержание неактивных химических примесей Y, Fe, Cu $< 4 \times 10^{-9}$ мкг/Бк. Все реагенты и растворители были высокочистого или фармацевтического качества и были приобретены у Sigma-Aldrich (США) или Panreac (Испания). В работе использовали деионизированную воду 18,2 МОм·см (Водолей, Водолей-М, НПП Химэлектроника, Россия). Ионообменные смолы Dowex 50W×8 (H⁺-форма, 200-400 mesh), Dowex 1×8 (Cl⁻-форма, 200-400 mesh), Chelex-100 были приобретены у Sigma-Aldrich. Экстракционно-хроматографические смолы ZR-resin и TBP-resin были приобретены у Triskem International (Франция), картриджи Chromafix 30PS-HCO₃ – у Macherey-Nagel (Германия).

DFOM – N-[5-[[4-[5-[ацетил (гидрокси) амино] пентиламино]-4-оксобутаноил] гидроксиамино] пентил]-N'-(5-аминопентил)-N'-гидроксипутандиамид; метансульфоновая кислота был приобретён у Sigma-Aldrich;

p-Bn-NCS-DFO – N-[5-[ацетил (гидрокси) амино] пентил]-N'-гидрокси-N'-[5-[[4-[гидрокси-[5-[(4-изотиоцианатофенил) карбамотиоиламино] пентил] амино]-Диамид 4-оксобутаноил] амино] пентил] бутандиамин был приобретён у Macrocyclics, Inc (США).

2.2 Оборудование

γ -радиометрию проводили с помощью дозкалибратора Atomlab 500 (Biodex, США) и радиометра RFT 20046, (Veb Robotron-Messelektronik, Dresden GmbH, Германия) или на автоматическом γ -счетчике Wizard 2480 (PerkinElmer, США).

Измерение активности остальных радионуклидов проводили с использованием спектрометра МКС-01А «МУЛЬТИРАД», ООО НТЦ Амплитуда), программное обеспечение «Прогресс».

Количественное определение содержания металлов проводилось на атомно-абсорбционном спектрометре МГА-915М (Люмэкс, Россия) согласно методике ПНД Ф 14.1.:2.253-09. Градуировочные растворы были приготовлены на основе государственного стандартного образца с концентрацией 1 г/л. Для построения калибровочной кривой использовали растворы с концентрацией 10 мкг/мл (Pb²⁺, Cu²⁺, Al³⁺, Fe³⁺) и 1000 мкг/л (Zn²⁺, Y³⁺).

Для автоматизации процесса получения растворов [^{89}Zr]Zr-оксалата и [^{89}Zr]Zr-цитрата был использован кассетный модуль Modular-Lab PharmTracer (Eckert & Ziegler Eurotop GmbH, Германия; рисунок 13).



Рисунок 13. Внешний вид модуля Modular-Lab PharmTracer

2.3 Определение коэффициентов распределения и исследования в динамических условиях

Равновесный массовый коэффициент распределения K_d был определён статическим методом. Были приготовлены рабочие растворы циркония-89 с заданной концентрацией щавелевой кислоты. Аликвоты рабочего раствора ^{89}Zr были добавлены в пробирки с точной навеской смолы 0,1 г. Исследование проводили в центрифужных пробирках типа Eppendorf объемом 5 мл. Образцы встряхивали в течение 10 минут в термошейкере Bioer Mixing block MB-102 (Bioer, Китай) при 20°C (1350 об/мин). По истечении времени контакта фаз пробирки помещали в центрифугу SM-50M (ELMI, Латвия) и центрифугировали (1 мин, 10000 об./мин). Далее пробирки извлекали, отбирали аликвоты супернатанта и проводили γ -радиометрию. Равновесный массовый коэффициент распределения рассчитывали по следующему уравнению:

$$K_d = \frac{A_0 - A}{A} \times \frac{V(\text{мл})}{m(\text{г})},$$

где A_0 — скорость счета аликвоты образца до контакта со смолой; A — скорость счета аликвоты образца супернатанта; V — объем раствора, мл; m — масса сухой смолы, г.

Ведение корректировки в уравнение, связанное с изменением объёма, не требуется из-за большого значения отношения V (мл)/ m (г). Для изучения ионообменного поведения циркония-89 в динамических условиях использовали хроматографические колонки из полиэфирэфиркетона (PEEK) 50 мм × ø2,1 мм, 100 мм × ø2,1 мм (VICI Jour, Швейцария) и полипропиленовые картриджи объемом 1 мл с полиэтиленовыми фриттами (Supelco, Германия), заполненные 30–60 мг смолы. Все используемые растворы пропускали через колонки и картриджи со скоростью 1 мл/мин.

2.4 Получение растворов циркония-89

Для получения растворов циркония-89 в различных химических формах были использованы хроматографические колонки из полиэфирэфиркетона (PEEK) 50 мм × ø2,1 мм, заполненные различными смолами (таблица 14), а так же картриджи Chromafix-30-PS-HCO₃.

Таблица 14. Исследуемые химические формы и сорбенты

Химическая форма	Смола
[⁸⁹ Zr]Zr-оксалат	ZR
	ZR + Chelex-100
[⁸⁹ Zr]Zr-хлорид	TBP Resin
	ZR + Chromafix 30-PS-HCO ₃
[⁸⁹ Zr]Zr-цитрат	TBP
	ZR + Chelex-100

Получение раствора [⁸⁹Zr]Zr-оксалата (метод «ZR»)

[⁸⁹Zr]Zr-хлорид в 2 М HCl пропускали через хроматографическую колонку, заполненную гидроксаматно-модифицированной смолой ZR (30 мг). Колонку последовательно промывали 2 М HCl (1–2 мл) и деионизованной водой (1–2 мл). Для десорбции ⁸⁹Zr через колонку пропускали 1 мл 0,5 М H₂C₂O₄.

Получение растворов [⁸⁹Zr]Zr-оксалата и [⁸⁹Zr]Zr-цитрата (метод «ZR+Chelex-100»)

[⁸⁹Zr]Zr-оксалат (предварительно полученный методом «ZR») пропускали через хроматографическую колонку, заполненную смолой Chelex-100 (30-60 мг). Колонку промывали 2 мл 0,1 М HCl. Для десорбции ⁸⁹Zr через колонку пропускали 1 мл 0,115 М Na₂C₂O₄ или 0,1 М Na₃Citr.

Получение раствора $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида (ZR+ Chromafix 30PS- HCO_3)

$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалат (предварительно полученный методом «ZR») в 0,5 М $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ пропускали через картридж Chromafix 30PS- HCO_3 . Картридж промывали 20-40 мл H_2O . Для десорбции ^{89}Zr через картридж пропускали 1 мл 1 М HCl .

Получение растворов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида и $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата (метод «ТВР»)

$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид в $\text{HCl}_{\text{конц}}$ (10 М) пропускали через хроматографическую колонку заполненную смолой ТВР (30 мг). Колонку промывали 1-2 мл 12 М HCl . Для десорбции ^{89}Zr через колонку пропускали 1 мл 0,1 М HCl или 1 мл 0,1 М Na_3Cit .

2.5 Синтез комплексов ^{89}Zr с DFO

Для синтеза комплексов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFOM, $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -p-NCS-Bn-DFO к раствору $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата или $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата (10-100 МБк/мл) добавляли 0,1–1 М раствор NaOH до pH 5-7. К полученному раствору добавляли аликвоту раствора хелатора (до 10 мкг/мл). Синтез комплексов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFOM и $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -p-NCS-Bn-DFO с использованием $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида был выполнен в двух вариантах (далее а, б). В первом варианте (а) к раствору $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида добавляли буфер HEPES (конечная концентрация 0,1 М) и 0,1–1 М раствор NaOH до pH 5-7, после чего добавляли аликвоту раствора хелатора (до 10 мкг/мл). Во втором варианте (б) к исходному раствору $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида добавляли аликвоту раствора хелатора, после чего в реакционную смесь добавляли буферный раствор HEPES (итоговая концентрация 0,1 М) и 0,1-1 М NaOH до pH 5-7. Образцы инкубировали 15-60 мин при 25 °С.

2.6 Определение радиохимической чистоты и радиохимического выхода

Определение РХЧ проводили методом тонкослойной хроматографии восходящим потоком элюента в предварительно насыщенных хроматографических камерах. Расстояние от линии старта до линии фронта для всех хроматограмм составляло 75 мм. Распределение активности по хроматограмме устанавливали с помощью радио-ТСХ-сканера MiniGita Star (Raytest, Германия). Для определения компонентов реакционной смеси использовали различные ТСХ системы:

Метод 1: неподвижная фаза – стекловолокно, импрегнированное силикагелем (ITLC-SG, Agilent Technologies, США), элюент – 50 мМ раствор ДТПА (pH 7) для определения РХЧ исходных растворов и препаратов ^{89}Zr .

Метод 2: неподвижная фаза – ITLC-SG, элюент – 4 об.% ТФУ в смеси $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1), для определения содержания гидролизованного ^{89}Zr в растворах $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата.

Метод 3: неподвижная фаза – силикагель, модифицированный С18 (обращённая фаза), на алюминиевой подложке (105559 Merck KGaA, Германия, далее – 5559), элюент — 0,1 М

цитратный буфер (pH 5) для определения несвязанных форм ^{89}Zr в растворах ^{89}Zr -хлорида и ^{89}Zr -цитрата.

Метод 4: неподвижная фаза – силикагель на алюминиевой подложке с модифицированной NH_2 поверхностью (105533 Merck KGaA, Германия, далее – 5533), элюент – 1 М AcONH_4 в смеси $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1), для определения содержания комплексов ^{89}Zr -DFOM.

Метод 5: неподвижная фаза – стекловолокно, импрегнированное кремниевой кислотой (ITLC-SA, Agilent Technologies, США), элюент – 50 мМ ЭДТА (pH 5) для определения несвязанных форм ^{89}Zr в растворах ^{89}Zr -оксалата.

Факторы удерживания компонентов реакционной смеси при ТСХ-анализе методами 1–5 представлено в таблице 15. Примеры хроматограмм представлены в приложении 2.

Таблица 15. Значение R_f для различных компонентов реакционной смеси

№	ТСХ система		Значение R_f				
	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	^{89}Zr -хлорид	^{89}Zr -оксалат	^{89}Zr -цитрат	^{89}Zr -DFOM	^{89}Zr -p-NCS-Bn-DFO
1	ITLC-SG	50 мМ ДТПА (pH 7)	—	1,0	—	0	0
2	ITLC-SG	4 об.% ТФУ в смеси $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1),	0	0,8-1,0	—	1,0	1,0
3	5559	0,1 М цитратный буфер (pH 5)	1,0	—	1,0	0	0
4	5533	1 М AcONH_4 в смеси $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1),	0	0	0	1	0,5
5	ITLC-SA	50 мМ ЭДТА (pH 5)	—	1,0	0,5	0	0

Эксперименты были выполнены троекратно. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($n = 3$). Статистическая значимость (величина вероятности p) была рассчитана с использованием непарного двухвыборочного t-теста для средних с неравными дисперсиями.

Для определения радиохимического выхода (РХВ) определяли объёмную активность раствора до проведения синтеза. После проведения синтеза раствор переносили в новую пробирку и повторно изменяли активность. После чего аликвота раствора отбиралась для определения РХЧ методом ТСХ. Радиохимический выход рассчитывался по формуле:

$$\text{РХВ} = \text{РХЧ} \times \frac{A_1}{A_0},$$

где A_0 — начальная объёмная активность реакционной смеси, МБк/мл; A_1 — объёмная активность раствора после окончания синтеза. Коррекция на распад не проводилась из-за значительно более длительного периода полураспада циркония-89 по сравнению с продолжительностью синтеза (10-60 мин).

3. Результаты и обсуждение

3.1 Получение и анализ растворов циркония-89 в форме [⁸⁹Zr]Zr-оксалата

В настоящее время для получения исходных растворов ⁸⁹Zr широко используется метод, с использованием гидроксаматных смол. Гидроксаматные смолы высокоселективны по отношению к ⁸⁹Zr и, в отличие от ионообменных смол, позволяют получать ⁸⁹Zr в оксалатной форме с высоким выходом и высокой объёмной активностью. Кроме того, данный метод позволяет проводить эффективную очистку ⁸⁹Zr от различных примесей, содержащихся в мишени после облучения. Полученные растворы ⁸⁹Zr могут использоваться для синтеза без предварительного концентрирования. Однако необходимо отметить, что гидроксаматные смолы, используемые в большинстве работ, изготавливаются непосредственно в лаборатории («*in house*»).

В данной работе была использована коммерчески доступная смола ZR-resin (Triskem International). Согласно данным производителя, смола ZR обладает высокой селективностью к Zr в средах HCl (0,01–10 М) и HNO₃ (0–5 М). В качестве исходного раствора для сорбции был выбран 2 М раствор HCl (рисунок 14), так как при высоких концентрациях HCl (от 6 М) сообщается о низкой эффективности очистки от ионов железа. Масса навески смолы для данных экспериментов была выбрана из расчёта наименьшего значения суммы потерь активности на этапе сорбции и остаточной активности на колонке после десорбции и составила 30 мг.

Для моделирования процедуры выделения и очистки ⁸⁹Zr исходный раствор [⁸⁹Zr]Zr-хлорида разбавляли деионизованной водой до концентрации 2 М (по HCl). Процедура очистки включала следующие стадии:

1. подготовка колонки 50 мм × ø2,1 с 30-60 мг смолы ZR, промывка водой;
2. пропускание 1 мл сорбционного раствора [⁸⁹Zr]Zr-хлорида в 2 М HCl;
3. промывка 1 мл 2 М HCl;
4. промывка 1 мл H₂O;
5. десорбция ⁸⁹Zr 1-2 мл 0,1-1 М H₂C₂O₄.

Необходимо отметить различие между методами подготовки смолы ZR и гидроксаматными смолами, изготавливаемыми «*in house*». *In house* смолы перед сорбцией ⁸⁹Zr последовательно промывают MeCN, H₂O, 2 М HCl. Присутствие в растворе даже следов MeOH, MeCN, EtOH приводит к полному снижению селективности смолы ZR. Аналогичный результат получен при предварительной промывке смолы раствором HCl с концентрацией 6 М: эффективность сорбции снижалась более чем на 50% по сравнению с сорбцией на смоле без промывки.

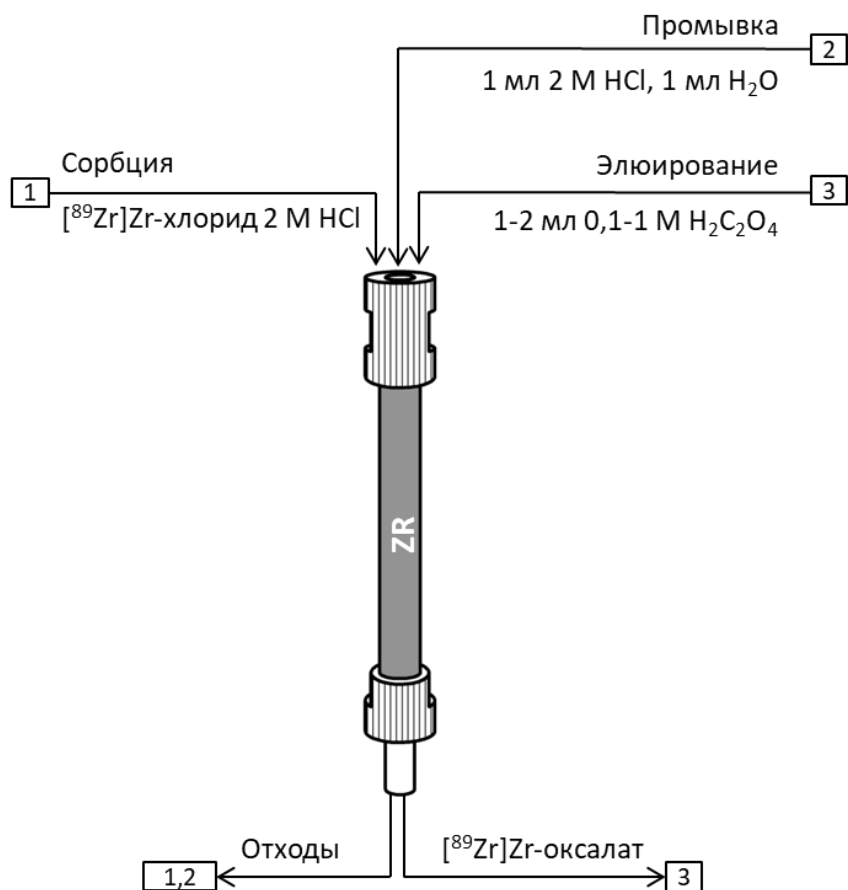


Рисунок 14. Схема получения ^{89}Zr Zr-оксалата методом «ZR»

Согласно опубликованным данным, для десорбции ^{89}Zr с гидроксаматных смол используется 1 М раствор H₂C₂O₄ [80]. Использование более разбавленных растворов щавелевой кислоты значительно снижает выход ^{89}Zr (рисунок 15).

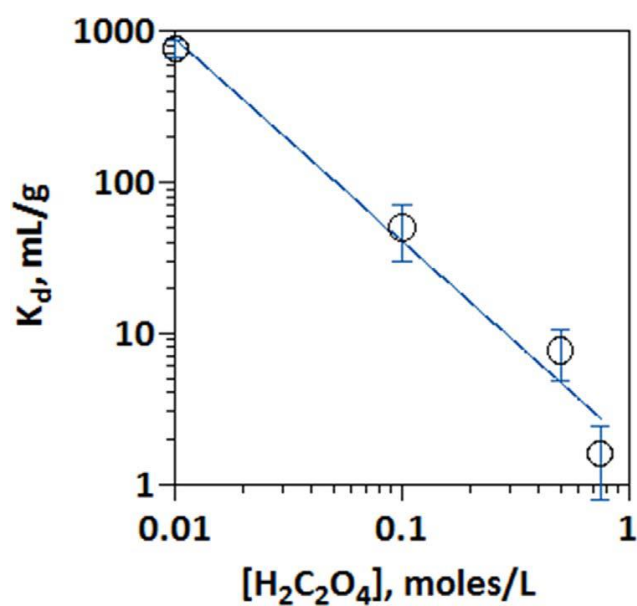


Рисунок 15. Коэффициенты распределения ^{89}Zr на гидроксаматной смоле в зависимости от концентрации щавелевой кислоты [90].

Щавелевая кислота является токсичной и не подходит для использования в составе готовой лекарственной формы (ГЛФ) РФЛП, поэтому для десорбции ^{89}Zr со смолы ZR были рассмотрены другие элюенты (таблица 16). Однако среди исследованных растворов только щавелевая кислота позволяет эффективно десорбировать ^{89}Zr .

Таблица 16. Эффективность десорбции ^{89}Zr со смолы ZR различными элюентами

Элюент	Эффективность десорбции, %
Щавелевая кислота 0,1 М	> 90
Оксалат натрия 0,1 М	~ 40
Лимонная кислота 0,1 М	< 1
Цитрат натрия 0,1 М	< 1
Малоновая кислота 0,1 М	< 1
Янтарная кислота 0,1 М	< 1

В отличие от гидроксаматных смол (рисунок 15), эффективная десорбция ^{89}Zr (>90% в 1 мл элюата) со смолы ZR возможна даже разбавленными растворами щавелевой кислоты (0,1 М, таблица 17), что является особенно важным при дальнейшей нейтрализации для использования полученных растворов в технологии РФЛП. С целью определения оптимальной концентрации щавелевой кислоты, обеспечивающей полноту десорбции ^{89}Zr со смолы ZR, был проведен эксперимент при различных концентрациях (0,1 М; 0,5 М; 1 М). Результаты распределения активности в процессе очистки представлены в таблице 17.

Таблица 17. Распределение активности по фракциям (%) на смоле ZR в зависимости от концентрации щавелевой кислоты.

Этап очистки	Концентрация $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$, М		
	0,1	0,5	1
Промывка 1 мл 2 М HCl	$0,5 \pm 0,15$		
Промывка 1 мл H_2O	$0,1 \pm 0,1$		
Элюирование 0,5 мл $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$	$86,4 \pm 2,2$	$95,8 \pm 1,5$	$98,0 \pm 0,4$
Элюирование 0,5 мл $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$	$5,5 \pm 3,0$	$1,5 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,2$
Элюирование 0,5 мл $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$	$1,4 \pm 0,9$	$0,4 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,1$
Активность на колонке	$6,0 \pm 3,3$	$1,8 \pm 1,1$	$0,8 \pm 0,3$
Общая эффективность элюирования	93,3	97,6	98,8

Как видно из представленных данных, с повышением концентрации щавелевой кислоты в элюенте уменьшается минимальный объём элюата. При использовании 1 М раствора щавелевой кислоты практически весь ^{89}Zr (98,8 %) элюируется в первых 0,5 мл. Использование 0,1 М раствора $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ является допустимым, но недостаточным для полной десорбции ^{89}Zr – после пропускания 1,5 мл элюента 6% ^{89}Zr остаётся на колонке. На рисунке 16 показано влияние концентрации щавелевой кислоты в составе элюента на распределение ^{89}Zr по фракциям элюата (кривые элюирования). Исходя из полученных данных, для десорбции ^{89}Zr со смолы ZR была выбран раствор щавелевой кислоты с концентрацией 0,5 М, так как такой раствор с одной стороны обеспечивает достаточно высокую эффективность элюирования (>97% в 1 мл элюата), а с другой — заметно упрощает нейтрализацию и разбавление полученных растворов для проведения дальнейшего синтеза, поскольку предельная растворимость оксалата натрия составляет 0,27 М (20°C) [210], и, для предотвращения выпадения осадка при нейтрализации, раствор требуется разбавить примерно в 2 раза.

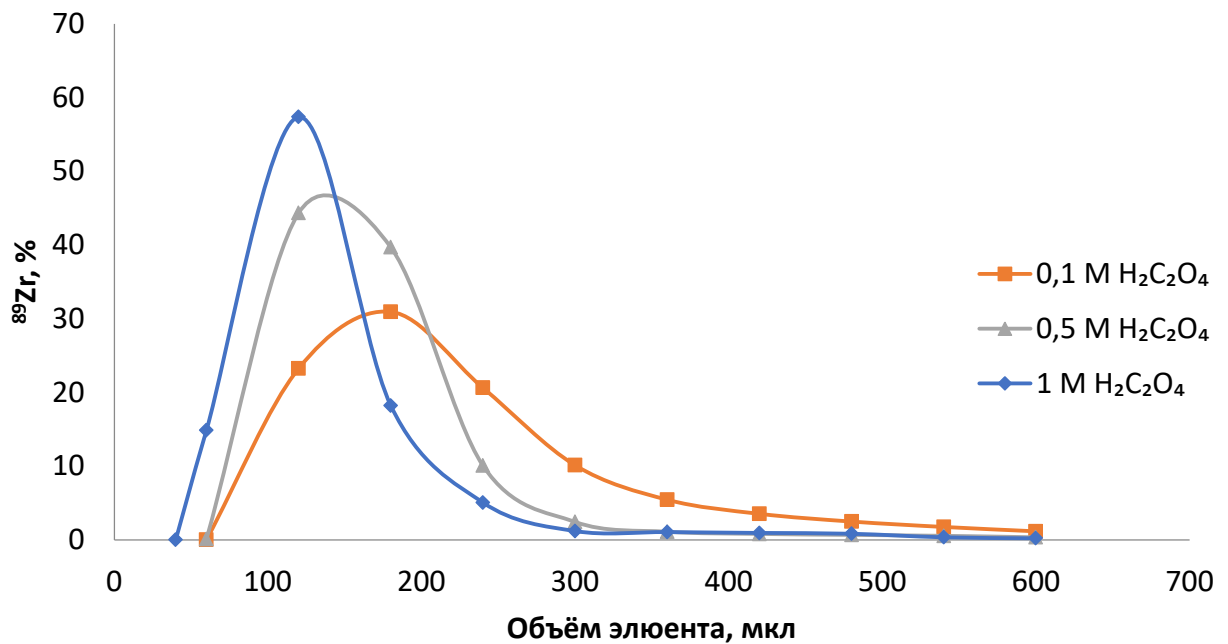


Рисунок 16. Кривые элюирования смолы ZR для различных концентраций $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

В ходе работы обнаружено, что при выделении ^{89}Zr методом «ZR» растворы соляной кислоты приобретали слабую желтую окраску, что отмечено на УФ-спектрах всех растворов до и после контакта со смолой ZR. Предположительно данный факт связан с нарушением структуры смолы и попаданием в раствор примесей органической фазы. Кроме того, полученные образцы ^{89}Zr -оксалата проявляли различное хроматографическое поведение (метод 1): для ^{89}Zr -оксалата в 0,1 М растворе щавелевой кислоты (метод получения «ZR») отмечено значительное количество «гидролизованного» ^{89}Zr ($R_f = 0$, рисунок 17). Тогда как для аналогичного модельного раствора ^{89}Zr -оксалата, приготовленного путём добавления

аликвоты исходного раствора $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида (выделенного с помощью смолы Dowex 1×8) в раствор 0,1 М оксалата натрия пик с $R_f = 0$ практически отсутствовал.

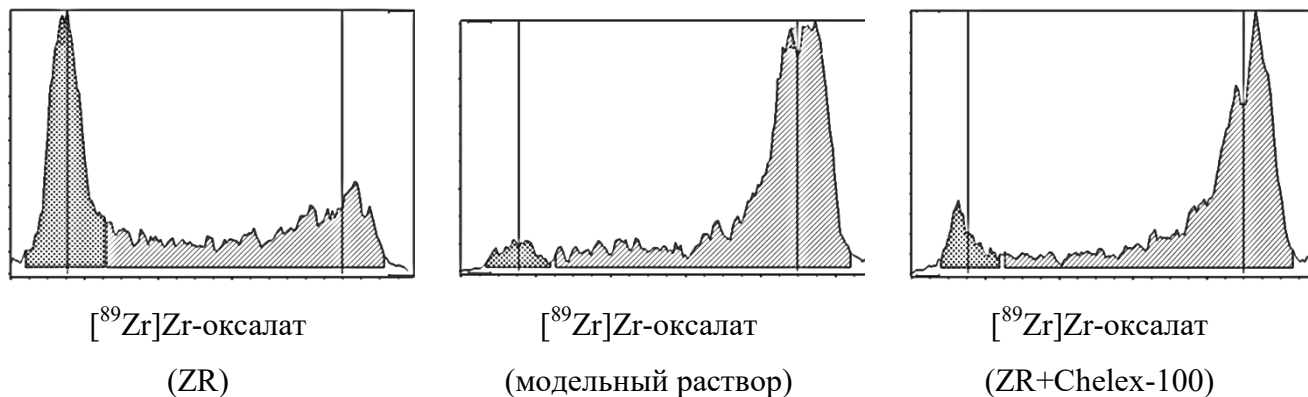


Рисунок 17. Хроматограммы образцов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата (метод 1).

В результате было решено провести дополнительную очистку. На данном этапе исследований метод получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата с использованием только смолы ZR оставлен исключительно для сравнения.

Для выделения ^{89}Zr были рассмотрены различные ионообменные сорбенты (например, Chromalite CGC50×2; Chromalite CGA 50×2; Dowex 1×8; Dowex 50×8), однако представленные методы характеризуются «классическими» недостатками ионообменных методов: низкая селективность и эффективность десорбции (или большой объём элюата) и, как следствие, низкая объёмная активность. Кроме того, для большинства ионообменных и экстракционно-хроматографических смол необходимо отметить, что Zr (IV) и Fe (III) имеют схожее сорбционное поведение, в результате чего очистка от Fe (III) является наиболее затруднительной среди рассматриваемых примесей.

Для проведения второй стадии очистки была выбрана хелатная смола Chelex-100, которая при различных уровнях кислотности среды способна выступать в качестве анионита, катионита или хелатора [211]. Согласно литературным данным, Zr имеет сравнительно низкие коэффициенты распределения (<30 мл/г) на смоле Chelex-100 (NH_4^+ форма) при сорбции из разбавленных растворов серной, соляной, лимонной, винной кислот и высокий коэффициент распределения (>100 мл/г) в 0,1 М растворе щавелевой кислоты при $\text{pH} < 1$. При повышении значения pH коэффициенты распределения уменьшаются и достигают нуля при $\text{pH} > 4$ [212,213].

На основании представленных данных было сделано предположение, что ^{89}Zr можно эффективно сорбировать на смоле Chelex-100 из растворов щавелевой кислоты ($\text{pH} \leq 1$), а затем эффективно десорбировать растворами оксалата натрия ($\text{pH} \geq 4$). Экспериментальные данные подтвердили эту гипотезу: $98 \pm 1\%$ радиоактивности оставалось на колонке, заполненной смолой Chelex-100, при пропускании растворов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата в 0,1 М щавелевой кислоте

(полученного по методу «ZR»). Масса навески смолы Chelex-100 составляла 50 мг. При сорбции из солянокислых растворов наблюдался большой пропуск ^{89}Zr (до 25%), поэтому данная смола не подходит для переработки облучённой мишени на первой стадии очистки. Для выбора оптимальной концентрации сорбционного раствора щавелевой кислоты были определены коэффициенты распределения (рисунок 18). Результаты исследования кинетики сорбции циркония-89 на смоле Chelex-100 в статических условиях показали, что сорбционное равновесие достигается за 20 минут. Поэтому в экспериментах по определению коэффициентов распределения продолжительность контакта фаз составляла 30 минут.

Эксперименты по исследованию сорбции ^{89}Zr на смоле Chelex-100 при различной концентрации щавелевой кислоты (рисунок 18) показали, что зависимость имеет максимум при концентрации щавелевой кислоты 0,5 М ($K_d \sim 100$). 0,5 М щавелевая кислота является наиболее предпочтительным раствором для переноса ^{89}Zr с колонки со смолой ZR на колонку со смолой Chelex-100.

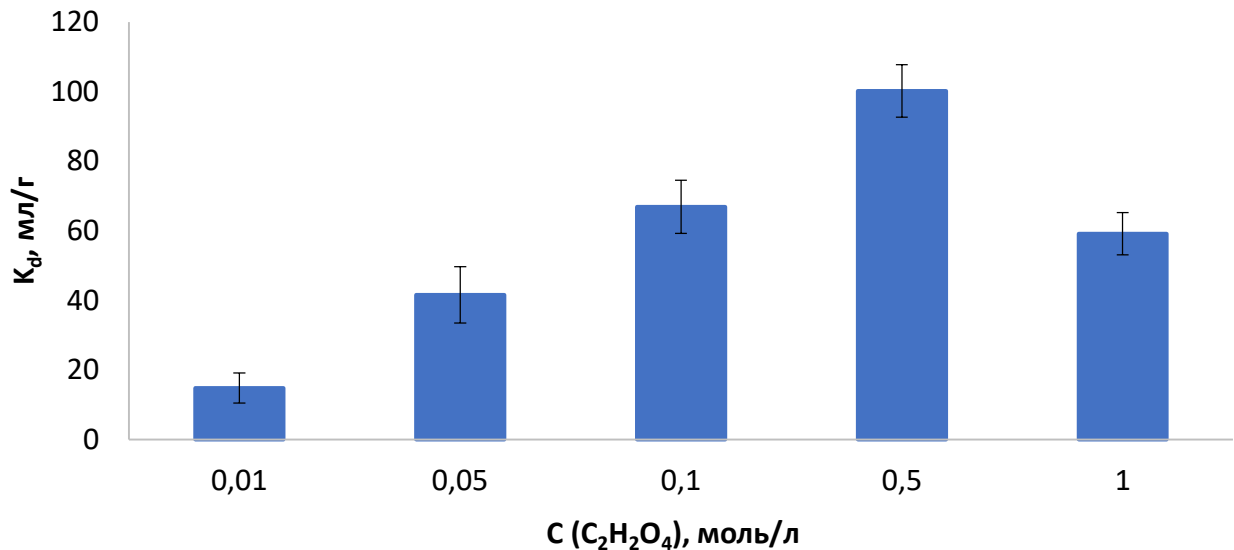


Рисунок 18. Коэффициенты распределения ^{89}Zr на смоле Chelex-100 в зависимости от концентрации щавелевой кислоты.

Для промывки колонки после сорбции использовали 0,1 М растворы HCl и H₂C₂O₄. Использование промывочных растворов со значениями pH >1 приводило к частичной десорбции ^{89}Zr (более подробно о выборе промывочного раствора в п 3.4). Для десорбции циркония-89 с колонки использовали растворы оксалата натрия с различной концентрацией. Наиболее высокая эффективность десорбции ^{89}Zr была достигнута при использовании насыщенного раствора оксалата натрия (0,27 М, таблица 18).

Таблица 18. Влияние концентрации оксалата натрия на эффективность элюирования ^{89}Zr со смолы Chelex-100

Концентрация оксалата натрия	Распределение активности ^{89}Zr по фракциям		
	Сорбционный* и промывочный растворы, %	Содержание ^{89}Zr в элюате (1 мл), %	Остаточная активность ^{89}Zr на колонке, %
0,05 М	0,3 ± 0,2	88,2 ± 4,1	11,5 ± 4,6
0,1 М		94,5 ± 1,9	5,1 ± 2,2
0,2 М		97,0 ± 0,8	2,9 ± 0,8
0,27 М		97,6 ± 0,4	2,2 ± 0,5

*Активность сорбционного раствора после пропускания через колонку со смолой

Для смолы Chelex-100 необходимо отметить незначительное изменение эффективности десорбции ^{89}Zr при концентрации оксалата натрия в диапазоне 0,1–0,27 М. Таким образом, для десорбции ^{89}Zr можно использовать оксалат натрия с изотонической концентрацией (1,55%, ~0,116 М) [214,215]. После второй стадии очистки получен раствор [^{89}Zr]Zr-оксалата, с тем же хроматографическим поведением (*метод 1*), что и у модельного раствора [^{89}Zr]Zr-оксалата — рисунок 17.

Несмотря на потенциальную токсичность оксалат-анионов, раствор оксалата циркония-89 может применяться в качестве самостоятельного РФЛП (например, для визуализации воспаления и ревматоидного артрита [155]). Полученная доза оксалат-анионов при предполагаемом введении 1 мл изотонического [^{89}Zr]Zr-оксалата человеку почти в 90 раз меньше, чем LD₁₀ (17 мг/кг) [216]. При этом в литературе отмечается, что использование раствора оксалата натрия с концентрацией, даже меньшей, чем изотоническая (1,1%), не вызывает видимых деформаций клеток крови [217].

По результатам проведённых доклинических исследований в рамках разработки диагностического препарата «[^{89}Zr]Циркония оксалат» в ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России не было выявлено каких-либо токсических эффектов для изотонического раствора [^{89}Zr]Zr-оксалата [218]. Полулетальная доза (LD₅₀) для мышей BALB/c составила 149,9 мг/кг, что превышает концентрацию оксалат-ионов во вводимой дозе РФЛП в 26,2 раза. Изучение биораспределения показало увеличенное накопление препарата в очагах воспалительных процессов и метаболических поражений скелета (КДН патология/интактная костная ткань достигает 2,8 спустя 6 суток после в/в введения, рисунок 19)

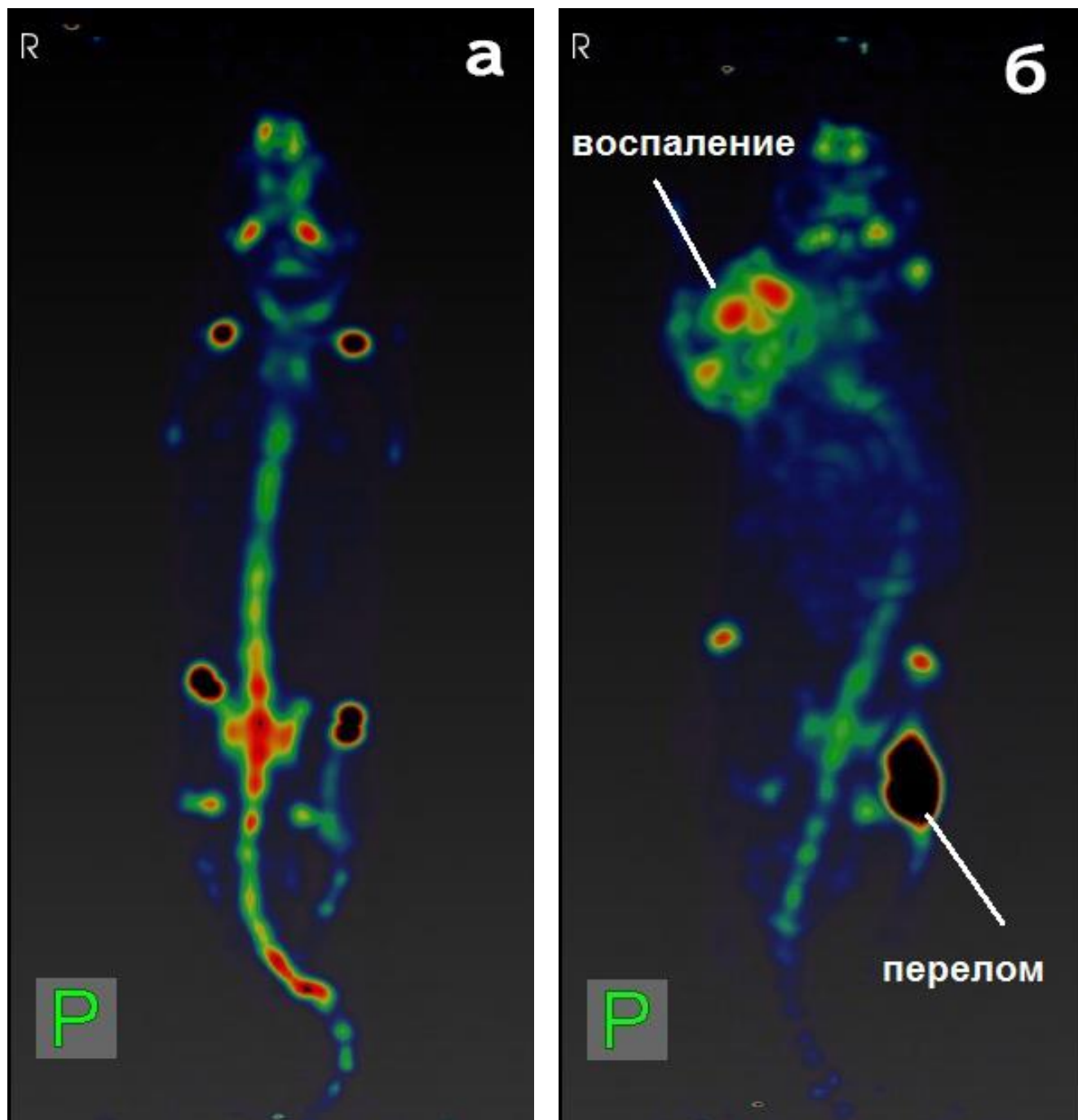


Рисунок 19. ПЭТ-визуализация нормального распределения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата (а) и увеличенное накопление $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата в очаге воспаления и перелома (б).

Таким образом, полученные растворы $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата могут использоваться как в качестве активной фармацевтической субстанции так и в качестве самостоятельного РФЛП для ПЭТ-диагностики воспалительных процессов и метаболических поражений скелета [219]. Общая схема получения изотонического раствора $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата представлена на рисунке 20.

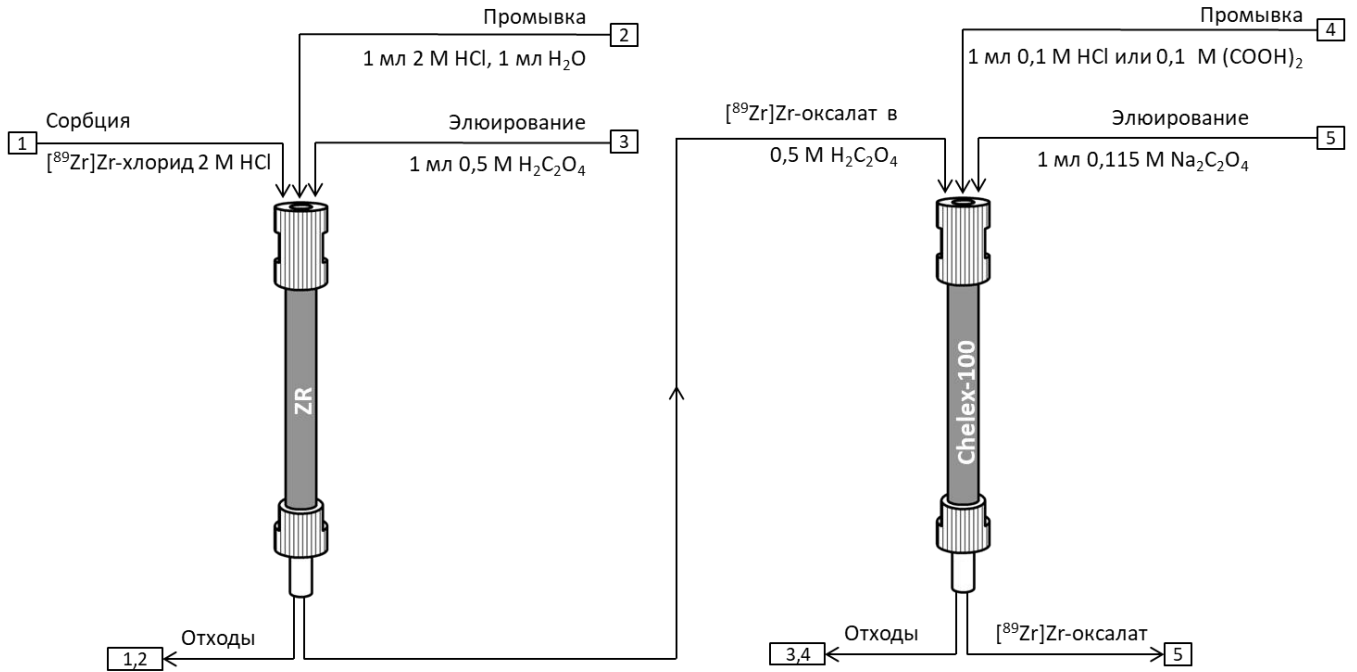


Рисунок 20. Схема получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата методом «ZR+Chelex-100».

Анализ растворов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата

На сегодняшний день в литературе для определения радиохимической чистоты комплексов и радиоиммуноконъюгатов ^{89}Zr используются различные системы для тонкослойной хроматографии — приложение 2. При этом в большинстве систем определяется именно содержание несвязанного ^{89}Zr .

Наиболее широко используется система ITLC-SG / 50 мМ ДТПА (pH 7) (метод 1, таблица 15). В данной системе несвязанный ^{89}Zr движется с фронтом растворителя, а комплексы и радиоиммуноконъюгаты остаются на старте хроматограмме. Пример хроматограмм ^{89}Zr представлен на рисунке 21.

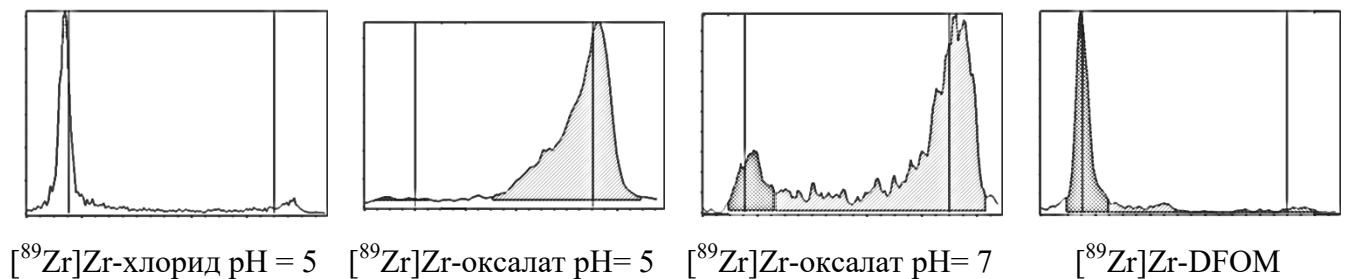


Рисунок 21. Типичные хроматограммы для различных химических форм ^{89}Zr (метод 1).

Дополнительно для анализа образцов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата была выбрана система ITLC-SG / 4 об.% ТФУ в смеси MeOH-H₂O (1:1) (метод 2, R_f гидролизованного ^{89}Zr — 0, $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида — 0, $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата — 0,8–1,0). Данная система может использоваться для определения

содержания гидролизованного ^{89}Zr при синтезе комплексов ^{89}Zr (например, $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFOM}$), поскольку комплексы и свободный ^{89}Zr движутся с фронтом растворителя (рисунок 22).

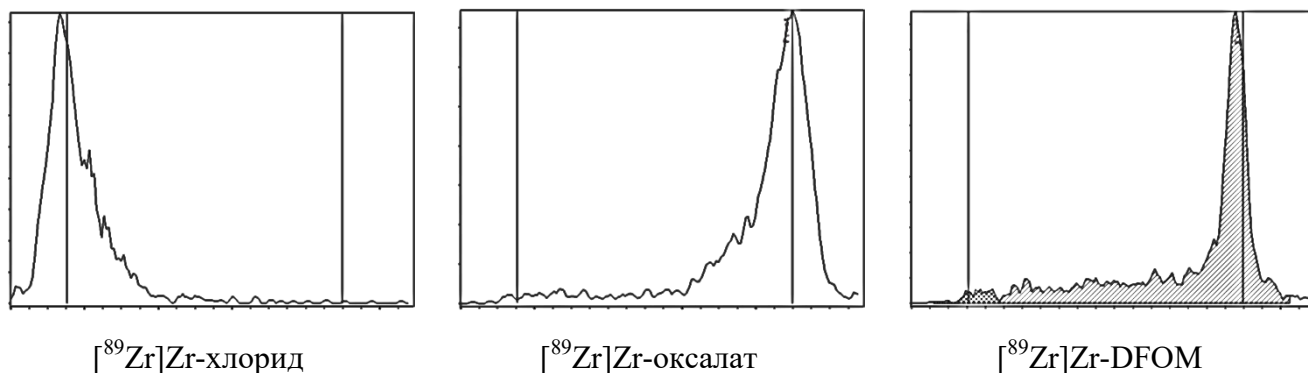


Рисунок 22. Примеры хроматограмм для различных химических форм ^{89}Zr (метод 2).

При анализе образцов $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-оксалата}$ методом 2 была отмечена интересная особенность: в зависимости от pH и концентрации щавелевой кислоты наблюдается 2 пика с R_f 0,8 и 1,0. При повышении pH и/или увеличении концентрации щавелевой кислоты наблюдалось изменение соотношения площадей пиков в сторону увеличения площади пика с $R_f = 1$ (рисунок 23). Наиболее вероятным объяснением данного факта является существование ^{89}Zr в форме двух различных оксалатных комплексов. На основании опубликованных данных можно предположить, что, вероятно, этими формами являются $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}(\text{C}_2\text{O}_4)_4^{4-}$ и $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3^{2-}$ [64].

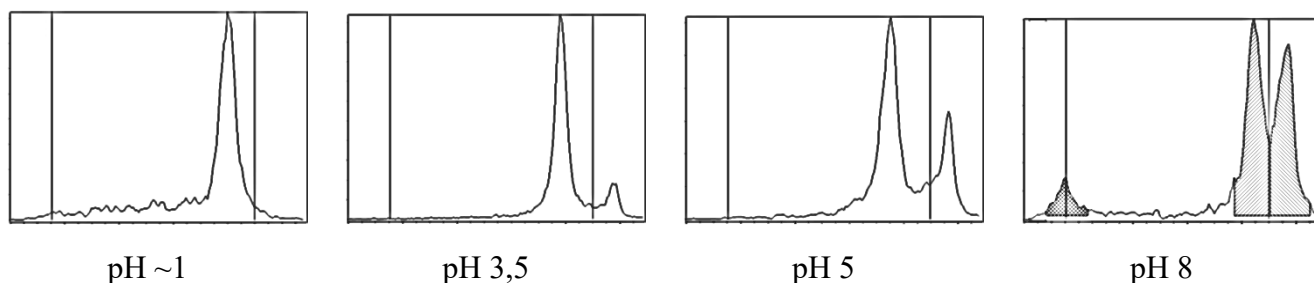


Рисунок 23. Хроматограммы образцов $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-оксалата}$ в 0,1 М щавелевой кислоты при различных значениях pH (метод 2).

В ходе анализа исходных образцов $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-оксалата}$ отмечена чувствительность метода 1 к значению pH исследуемого раствора: в холостых образцах при переходе от pH 5 к pH 7 наблюдается увеличение пика с $R_f = 0$ (рисунок 21). Тогда как при анализе данных растворов методами 2 и 5 количество гидролизованного ^{89}Zr составляло менее 1%. Кроме того, для метода 1 площадь пика с $R_f = 0$ (гидролизированный ^{89}Zr), равно как и его наличие, зависит от концентрации оксалат-ионов: уменьшение концентрации щавелевой кислоты приводит к росту площади пика с $R_f = 0$, что не соответствует результатам, полученным методом 2, согласно которым при концентрациях 0,1 и 0,2 М гидролизированный ^{89}Zr отсутствует (рисунок 24).

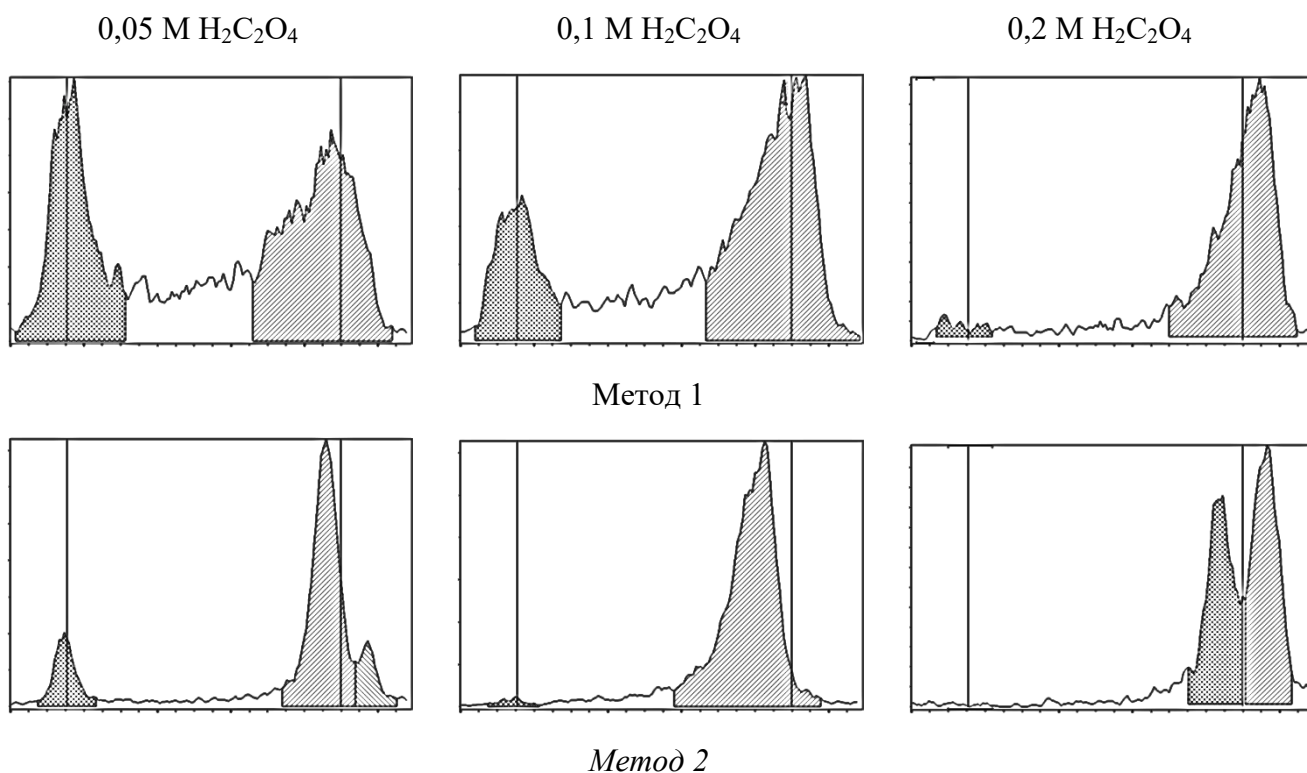


Рисунок 24. Хроматограммы образцов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата (рН 7) при различной концентрации $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$

Несоответствие между результатами определения РХЧ растворов *методом 1* и *методом 2* имели систематический характер, при этом расхождение в результатах увеличивалось с повышением значения рН образцов. В диапазоне рН 5–8 и для низких концентраций оксалатионов ($\leq 0,5$ М) при анализе образцов *методом 1* большая часть активности оставалась на старте хроматограммы (до 100%). Данный факт предполагает наличие в растворе гидролизованного ^{89}Zr , который не способен к комплексообразованию с хелаторами. В то же время, при анализе данных образцов *методом 2* практически вся активность движется с фронтом растворителя (пик с $R_f = 1$), что противоречит результатам, полученным *методом 1*. Известно, что если радионуклид металла гидролизуется, то он остаётся на старте при анализе методом ТСХ, и при введении препарата (без очистки от радиоколлоида) радиоактивность накапливается в тканях печени и, реже, в легких.

Для установления корреляции между содержанием гидролизованных форм ^{89}Zr в препаратах $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата и их хроматографическим распределением при использовании *метода 1* и *метода 2*, был проведён эксперимент с биологическими моделями: препараты с различным значением РХЧ были введены лабораторным животным (рисунок 25).

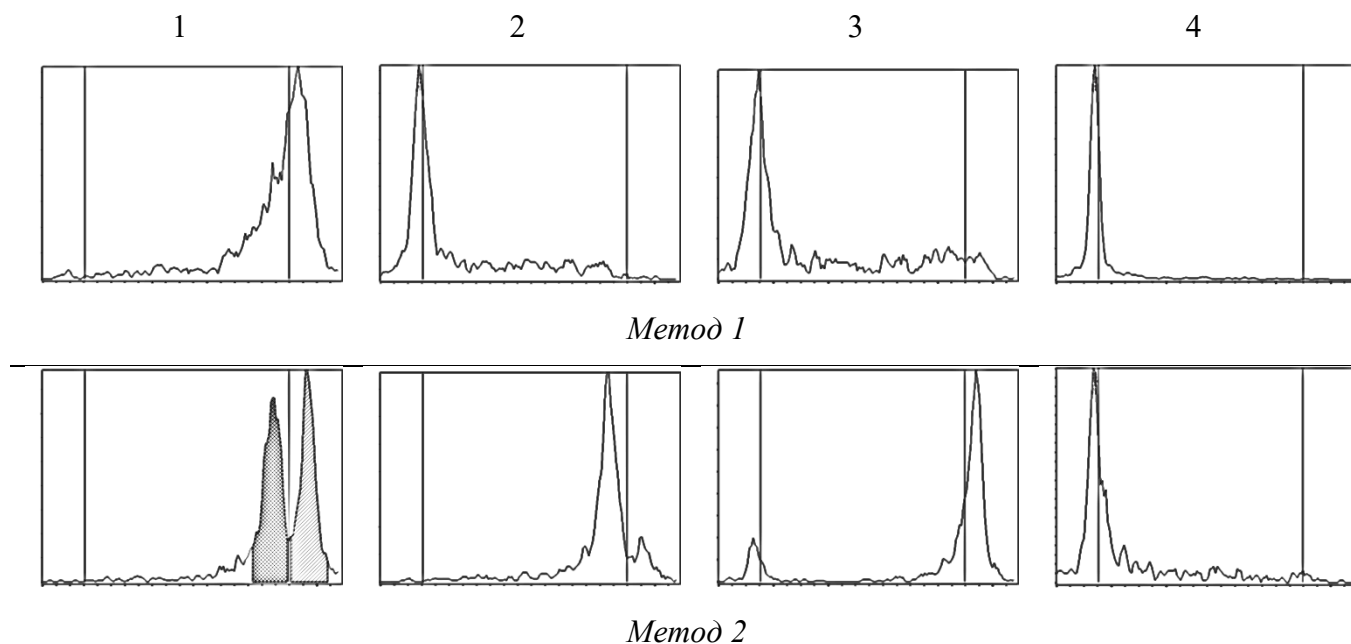


Рисунок 25. Хроматограммы образцов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата с различными значениями РХЧ (образцы 1-4) для *метода 1* и *метода 2*.

Согласно результатам ПЭТ, для образцов 1 и 2 (рисунок 25) большая часть накопленной активности связана с костной тканью животного (РХЧ согласно *методу 2* — 100%), накопление увеличивается в зонах активного метаболизма костной ткани. Для образца 3, который имеет РХЧ = 90% (по *методу 2*) отмечается накопление в скелете, а также чёткая визуализация печени, что противоречит данным *метода 1* (если считать, что в методе 1 на старте хроматограммы представлен только гидролизованный ^{89}Zr). Введение образца 4, который имеет РХЧ = 0 согласно *методу 2*, приводит к накоплению препарата исключительно в печени, что подтверждает корректность *метода 2* [220]. Таким образом, *метод 1* в ряде случаев не отражает истинного значения РХЧ и его использование для контроля качества препаратов циркония-89 становится сомнительным. В данном случае разработанный *метод 2* дает более полную и адекватную оценку содержания различных форм ^{89}Zr .

Тем не менее, несмотря на очевидные преимущества (такие как высокая стабильность растворов и простота получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата с использованием гидроксаматных смол), потенциальная токсичность оксалат-ионов требует проведения дополнительной стадии очистки полученного препарата. Кроме того, согласно данным [98,99] высокая стабильность комплексов оксалата циркония влияет на эффективность комплексообразования (подробнее в п. 3.3 Получение циркония-89 в форме $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата). Альтернативной, нетоксичной, химической формой ^{89}Zr является $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид.

3.2 Получение и анализ растворов циркония-89 в форме $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида

Для получения растворов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида из $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата возможно применение различных методов декарбоксилирования [38], однако следует отметить, что данные методы являются технически сложными и приводят к более высоким потерям ^{89}Zr , чем ионообменные. Для проведения декарбоксилирования возможно упаривание исходного раствора $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата с добавлением H_2O_2 , однако данный этап занимает более 1 часа с выходом около 80%.

Сегодня наиболее популярным методом получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида является конверсия $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата на анионообменном картридже Sep-pak QMA [80]. По аналогии с данной методикой для получения т.н. «конверсионного» $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида был использован картридж Chromafix 30PS- HCO_3 , который хорошо зарекомендовал себя при получении и очистке препаратов с другими РН (например, ^{68}Ga). Процедура очистки включала следующие стадии:

1. предварительная промывка картриджа Chromafix 30PS- HCO_3 водой;
2. пропускание 1 мл сорбционного раствора — $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалат в 0,5 М $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$;
3. промывка 20-40 мл H_2O ;
4. десорбция ^{89}Zr 1 мл 1 М HCl .

Выход для данного метода составляет более 90% в 1 мл раствора. Схема процесса очистки представлена на рисунке 26.

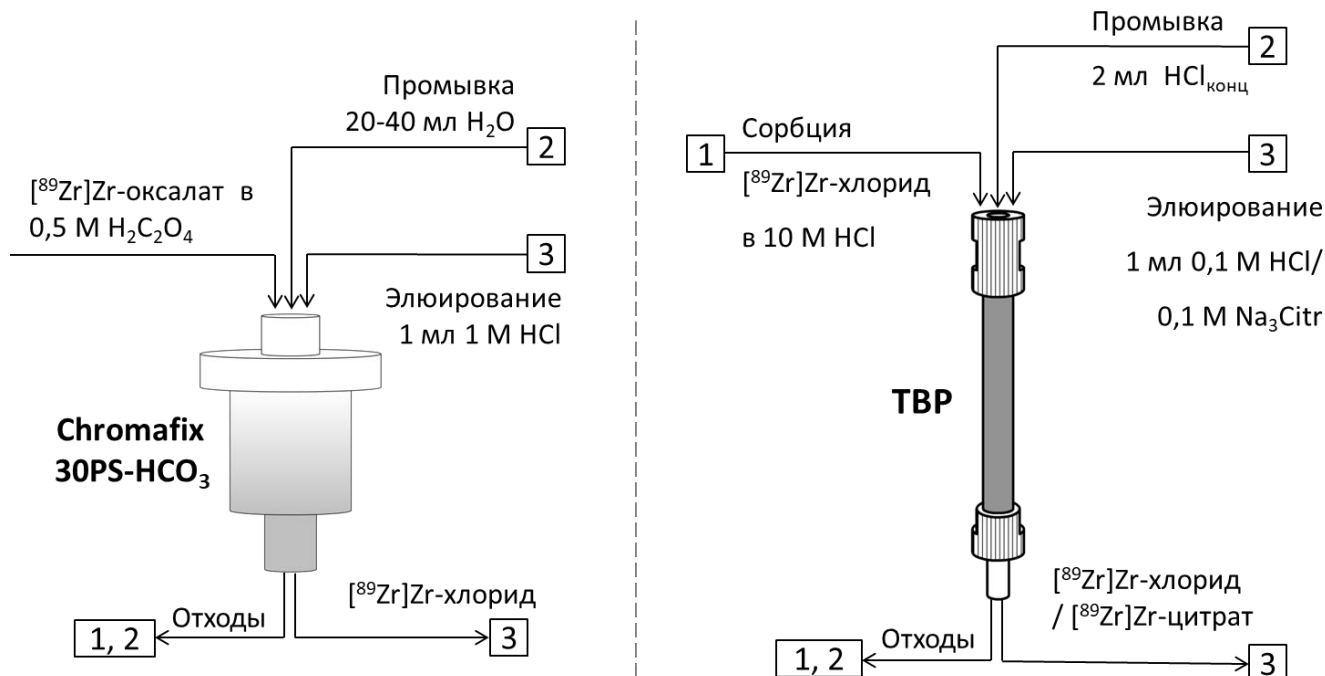


Рисунок 26. Схема получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида на смоле Chromafix 30PS- HCO_3 и ТВР.

Еще одним методом получения растворов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида являются экстракционно-хроматографические методы, которые имеют более высокую селективность и позволяют

получать ^{89}Zr с более высокой объёмной активностью, чем методы ионного обмена. Для одностадийного получения $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида была выбрана экстракционно-хроматографическая смола ТВР (экстрагент — трибутилфосфат), на которой, согласно литературным данным, ^{89}Zr имеет высокие коэффициенты распределения при высоких концентрациях HCl (рисунок 27) и может быть выделен в форме $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида при элюировании разбавленной HCl с высоким выходом ($89 \pm 3\%$) и высокой объёмной активностью (< 1 мл $0,1$ М HCl) [82].

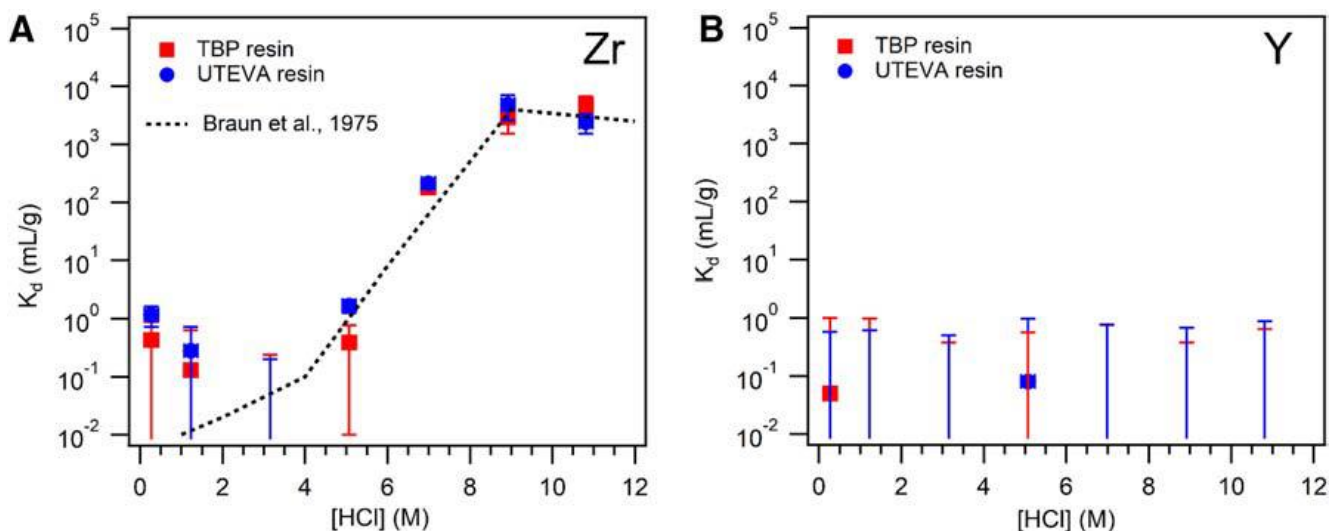


Рисунок 27. Коэффициенты распределения Zr (A) и Y (B) на смолах ТВР и UTEVA [82].

В дальнейших экспериментах данная смола так же использовалась для одностадийного получения растворов $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата. Выход для $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида составляет более 95% в 1 мл раствора. Схема процедуры очистки представлена на рисунке 26 и состоит из следующих стадий:

1. подготовка колонки $50 \text{ мм} \times \varnothing 2,1$ с 30-60 мг смолы ТВР;
2. предварительная промывка 12 М HCl ;
3. пропускание 1 мл сорбционного раствора — $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид в 10 М HCl ;
4. промывка 2 мл 12М HCl ;
5. десорбция ^{89}Zr 1 мл $0,1$ М раствора HCl .

Оба метода, «ТВР» и «ZR+Chromafix 30PS- HCO_3 », позволяют получать растворы $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида с высоким выходом и высокой объёмной активностью, однако при анализе образцов, было отмечено различие в хроматографическом поведении при использовании метода 2 ТСХ (рисунок 28). $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид, полученный на смоле ТВР, также как и исходный раствор $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида, полученный от производителя (ЗАО «Циклотрон») характеризуется пиком $R_f = 0$, тогда как $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид, полученный конверсионным методом (ZR+Chromafix 30PS- HCO_3) характеризуется пиком с $R_f = 1$. Кроме того, данный раствор $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -

хлорида был более устойчив к гидролизу как при хранении в среде 0,1 М HCl (pH ~1), так и при мечении DFO (pH 6).

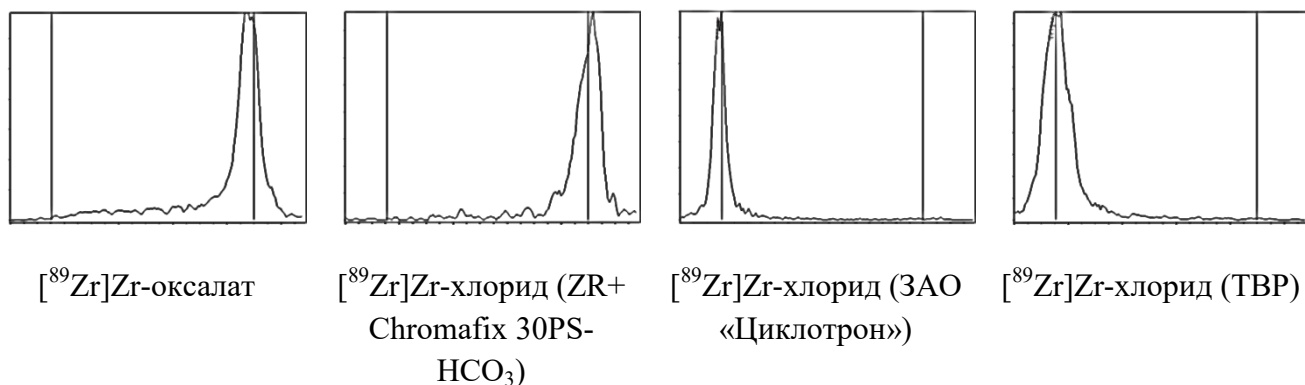


Рисунок 28. Различие в хроматографическом поведении образцов ^{89}Zr в ТСХ (метод 2).

Аналогичное явление описано в работах [82,88] (подробнее в п. 1.8). Согласно [80] конверсионный метод позволяет удалить более 99,8% щавелевой кислоты, но наблюдаемые различия между образцами $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида предположительно связаны с остаточным содержанием щавелевой кислоты в конечном растворе. Это подтверждается различием в хроматографическом поведении $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида (метод 2), поскольку $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид, полученный без использования растворов оксалата, в данной системе характеризуется пиком $R_f = 0$.

При анализе методом 2 образцов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида с добавлением щавелевой кислоты (0–1 М) было обнаружено, что заметное изменение в хроматографическом поведении $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида наблюдается уже при концентрации щавелевой кислоты 1 мМ (рисунок 29). Это соответствует проскоку 0,1% щавелевой кислоты при использовании в качестве исходного раствора $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата в 1 М $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

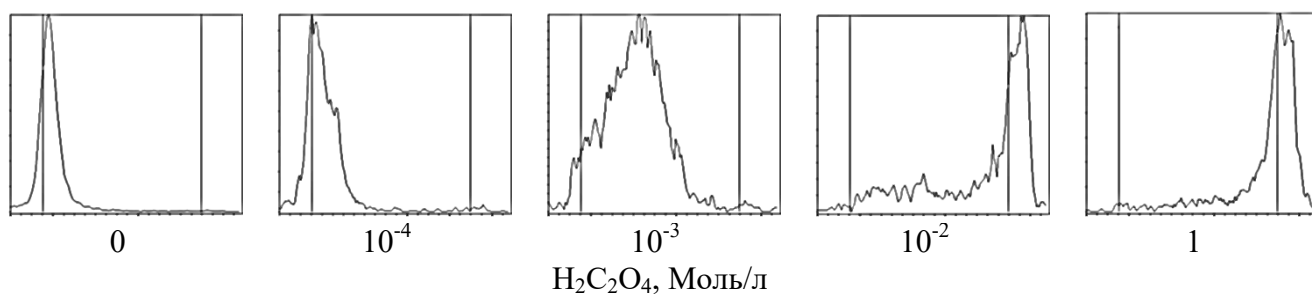


Рисунок 29. Хроматограммы образцов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида с различным содержанием щавелевой кислоты (метод 2).

Таким образом, в растворах $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида, полученных конверсионным методом необходимо контролировать остаточное содержание щавелевой кислоты, поскольку в

зависимости от концентрации изменяются свойства раствора, что приводит к невоспроизводимым результатам дальнейших синтезов комплексов и препаратов ^{89}Zr . Для получения раствора $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида, не отличающегося от аналогичного образца, полученного по безоксалатной технологии, был увеличен объём промывки до 40 мл H_2O и снижена концентрация исходного раствора щавелевой кислоты до 0,1 М.

3.3 Получение циркония-89 в форме $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата

Как было сказано выше, для выделения ^{89}Zr с использованием гидроксаматно-модифицированных смол эффективная десорбция возможна ^{89}Zr только растворами щавелевой кислоты (как правило, 1 М $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$), которая считается токсичной для применения в составе РФЛП. Кроме того, высокая стабильность оксалатного комплекса циркония-89 негативно влияет на эффективность комплексообразования. Поэтому при разработке метода получения ^{89}Zr на смолах ZR и Chelex-100 была рассмотрена возможность десорбции ^{89}Zr со смолы Chelex-100 в другими карбоновыми кислотами (таблица 19).

Таблица 19. Эффективность элюирования ^{89}Zr со смолы Chelex-100 солями различных карбоновых кислот

Элюент	Распределение активности ^{89}Zr по фракциям		
	Сорбционный* и промывочный растворы, %	Содержание ^{89}Zr в элюате (1 мл), %	Остаточная активность ^{89}Zr на колонке, %
0,1 М Оксалат натрия	0,9 ± 0,7	95,9 ± 0,2	2,7 ± 0,4
0,1 М Цитрат натрия		95,0 ± 0,3	4,1 ± 0,7
0,1 М Тартрат натрия		87,0 ± 3,0	12,6 ± 3,1
0,1 М Сукцинат натрия		79,9 ± 2,9	19,6 ± 2,3
0,1 М Малонат натрия		78,7 ± 2,3	20,8 ± 2,9

* Сорбционный раствор после пропускания через колонку со смолой

Как видно из представленных данных, десорбция ^{89}Zr со смолы Chelex-100 возможна солями различных карбоновых кислот. Цитрат натрия незначительно уступает оксалату натрия по эффективности десорбции и является перспективной химической формой. ^{89}Zr образует достаточно стабильные цитратные комплексы, что предотвращает его гидролиз. Кроме того, растворы цитрата не являются токсичными и разрешены для в/в введения. В качестве промывочного раствора при получении $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата использовали 1 М HCl . Наиболее высокая эффективность элюирования ^{89}Zr была достигнута при использовании 1 М раствора Na_3Cit (таблица 20), однако дальнейшие эксперименты показали (подробнее в п. 3.6), что увеличение концентрации цитрата натрия в растворе снижает эффективность

комплексообразования. В связи с этим в качестве раствора десорбции был выбран 0,1 М Na₃Citr (изотоническая концентрация).

Таблица 20. Влияние концентрации цитрата натрия на эффективность элюирования ⁸⁹Zr со смолы Chelex-100

Концентрация цитрата натрия	Распределение активности ⁸⁹ Zr по фракциям		
	Сорбционный* и промывочный растворы, %	Содержание ⁸⁹ Zr в элюате (1 мл), %	Остаточная активность ⁸⁹ Zr на колонке, %
0,05 М	0,2 ± 0,1	88,2 ± 1,3	11,5 ± 0,3
0,1 М		94,5 ± 0,9	5,1 ± 1,5
0,2 М		97,0 ± 0,7	2,9 ± 0,5
1,0 М		98,2 ± 0,7	1,7 ± 0,5

* Сорбционный раствор после пропускания через колонку со смолой

Таким образом, общая схема получения ⁸⁹Zr в форме [⁸⁹Zr]Zr-цитрата представлена на рисунке 30 и включает следующие стадии:

1. подготовка колонки 50 мм × Ø 2,1 с ~50 мг смолы Chelex-100, промывка водой;
2. пропускание 1 мл сорбционного раствора [⁸⁹Zr]Zr-оксалата в 0,5 М H₂C₂O₄;
3. промывка 2 мл 0,1 М HCl;
4. десорбция ⁸⁹Zr 1 мл 0,1 М Na₃Citr.

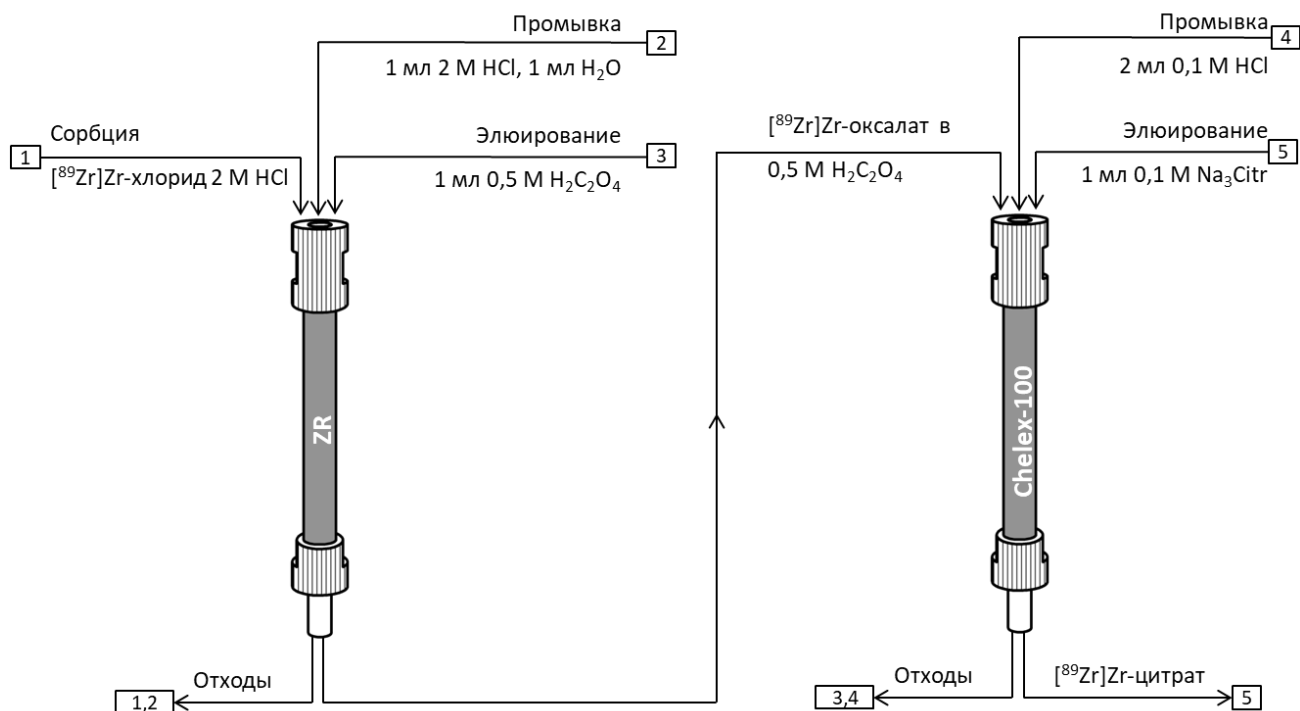


Рисунок 30. Схема получения [⁸⁹Zr]Zr-цитрата на смолах ZR и Chelex-100

Для получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата с более высокой объемной активностью возможно снижение объема элюата до 300 мкл. В таком случае выход ^{89}Zr составит $\sim 93\%$ (рисунок 31).

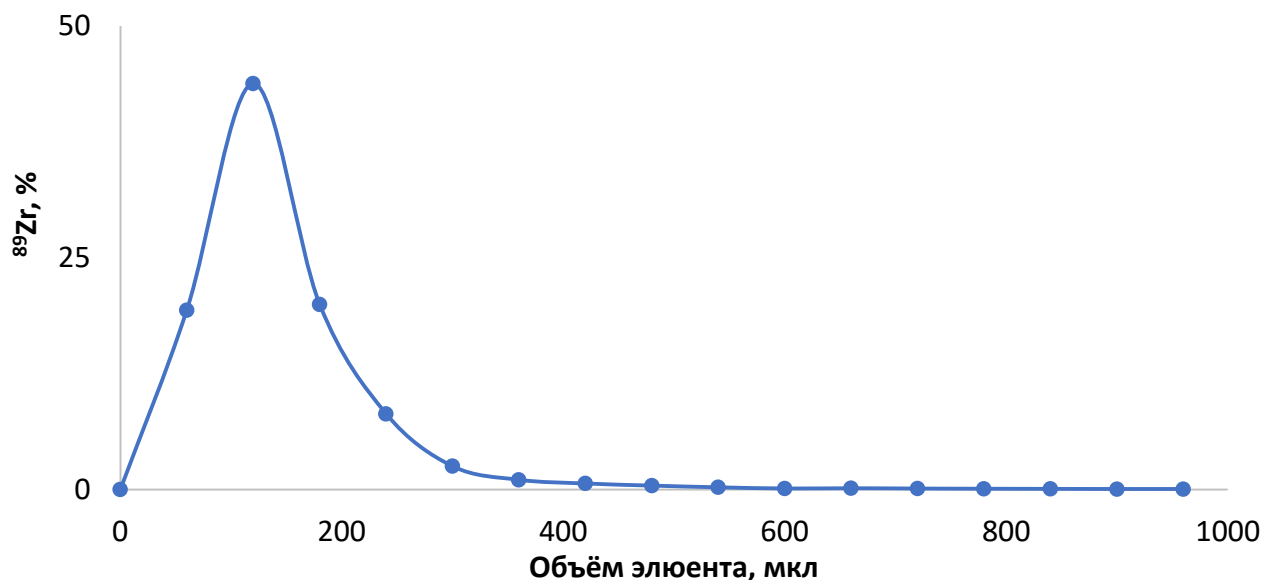


Рисунок 31. Кривая элюирования ^{89}Zr со смолы Chelex-100 при использовании 0,1 М Na_3Citr в качестве элюента (скорость потока 1 мл/мин).

Дополнительно для получения ^{89}Zr в форме $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата были рассмотрены экстракционно-хроматографические смолы ТВР и UTEVA (таблица 21), которые используются для получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида. На данных смолах ^{89}Zr имеет высокие коэффициенты распределения только при высоких концентрациях HCl (рисунок 27), что позволяет провести десорбцию ^{89}Zr разбавленными растворами лимонной кислоты.

Таблица 21. Эффективность десорбции ^{89}Zr со смолы UTEVA и ТВР различными элюентами

Сорбент / элюент	Распределение активности ^{89}Zr по фракциям		
	Сорбционный* и промывочный растворы, %	Содержание ^{89}Zr в элюате (1 мл), %	Остаточная активность ^{89}Zr на колонке, %
ТВР/ H_3Citr 0,1М	$0,6 \pm 0,1$	$92,3 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,6$
ТВР/ Na_3Citr 0,1М		$91,6 \pm 2,0$	$7,8 \pm 1,5$
UTEVA/ H_3Citr 0,1М	$4,4 \pm 1,5$	$90,6 \pm 2,5$	$5,1 \pm 2,3$

* Сорбционный раствор после пропускания через колонку со смолой

Для смолы UTEVA можно отметить более высокие потери ^{89}Zr на стадии сорбции, что наиболее вероятно связано с более низкой кинетикой взаимодействия ^{89}Zr со смолой [82]. Для смолы ТВР оба исследованных элюента (Na_3Citr и H_3Citr) позволяют получать ^{89}Zr в форме $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата с высоким выходом ($>90\%$). Однако в данном случае необходимо отметить, что

итоговые растворы [^{89}Zr]Zr-цитрата имеют $\text{pH} \leq 1$ из-за использования в качестве промывочного раствора концентрированной HCl . Использование более разбавленных растворов приводит к частичной десорбции ^{89}Zr . Схема процедуры очистки состояла из следующих стадий:

6. подготовка колонки 50 мм \times \varnothing 2,1 с 30-60 мг смолы ТВР;
7. предварительная промывка 12 М раствором HCl ;
8. пропускание 1 мл сорбционного раствора [^{89}Zr]Zr-хлорида в 10 М HCl ;
9. промывка 2 мл 12 М раствора HCl ;
10. элюирование ^{89}Zr 1 мл 0,1 М Na_3Citr .

3.4 Сравнение методов получения растворов ^{89}Zr

В работе были использованы различные методы получения циркония-89 в форме [^{89}Zr]Zr-оксалата, [^{89}Zr]Zr-цитрата и [^{89}Zr]Zr-хлорида (таблица 22).

Таблица 22. Методы получения растворов ^{89}Zr

Химическая форма	Элюент	Сорбент	Выход в 1 мл р-ра, %	pH
[^{89}Zr]Zr-оксалат	0,1 М $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$	ZR	90 ± 2	$1,0 \pm 0,5$
	0,115 М $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	ZR + Chelex-100	93 ± 2	$4,0 \pm 0,5$
[^{89}Zr]Zr-хлорид	0,1 М HCl	ТВР	95 ± 1	≤ 1
	1 М HCl	ZR + Chromafix- HCO_3	91 ± 1	≤ 1
[^{89}Zr]Zr-цитрат	0,1 М Na_3Citr	ТВР	91 ± 1	$1,0 \pm 0,5$
		ZR + Chelex-100	91 ± 1	$5,0 \pm 0,5$

Все представленные методы позволяют получать растворы циркония-89 с выходом более 90%. Одностадийный метод получения [^{89}Zr]Zr-оксалата на смоле ZR не обеспечивает надлежащего качества получаемых растворов (различное хроматографическое поведение образцов, пожелтение растворов и различие в УФ-спектрах растворов до и после контакта со смолой). Метод с использованием смол ZR и Chelex-100 является наиболее технологичным. Кроме того, в отличие от «классического» метода очистки на гидроксаматной смоле, в котором для элюирования ^{89}Zr используют 1 М раствор $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ получаемые растворы [^{89}Zr]Zr-оксалата и [^{89}Zr]Zr-цитрата на смолах ZR + Chelex-100 характеризуются значением pH, близким к нейтральному и изотонической концентрацией, что позволяет использовать полученные растворы для синтеза комплексов и препаратов ^{89}Zr без дополнительной стадии нейтрализации. При использовании смолы ТВР полученные растворы являются сильнокислыми ввиду использования концентрированной HCl на стадии сорбции и промывки, что в случае растворов

$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата требует дополнительной корректировки pH. Суммируя вышесказанное для дальнейшего получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата и $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата наиболее перспективным является метод с использованием смол ZR и Chelex-100.

Для получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида конверсионный метод (ZR + Chromafix 30PS- HCO_3) имеет существенный недостаток, связанный с попаданием щавелевой кислоты в конечный раствор ^{89}Zr и изменению свойств раствора, что в конечном счёте приводит к невоспроизводимым результатам. Поэтому для получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида более предпочтительным является метод с использованием смолы ТВР.

3.6 Исследование комплексообразования с DFO

Применение ^{89}Zr для синтеза препаратов на основе mAb накладывает дополнительные требования к свойствам хелатора: требуется высокая эффективность комплексообразования без нагревания реакционной смеси при значениях pH, близких к нейтральному. Однако основной сложностью для оценки полученных комплексов является сложная координационная химия циркония, выраженная в образовании полиядерных форм с различной степенью полимеризации, состав которых меняется в зависимости от pH и времени, из-за чего классические методы, такие как EXAFS, рентгеноструктурный анализ и потенциометрическое титрование в водных средах являются зачастую малоинформативными.

В настоящее время DFO благодаря своей способности образовывать прочные комплексы со многими металлами, в том числе с Zr, а также коммерческой доступности широко используется при синтезе РФЛП на основе $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -mAb. Как правило, реакция комплексообразования проводится при pH 6,8–7,2 и комнатной температуре, что связано с использованием mAb, предварительно конъюгированных с DFO [102,158]. Соблюдение данных условий необходимо для предотвращения инактивации mAb (потеря рецепторспецифичности, агрегация, денатурация).

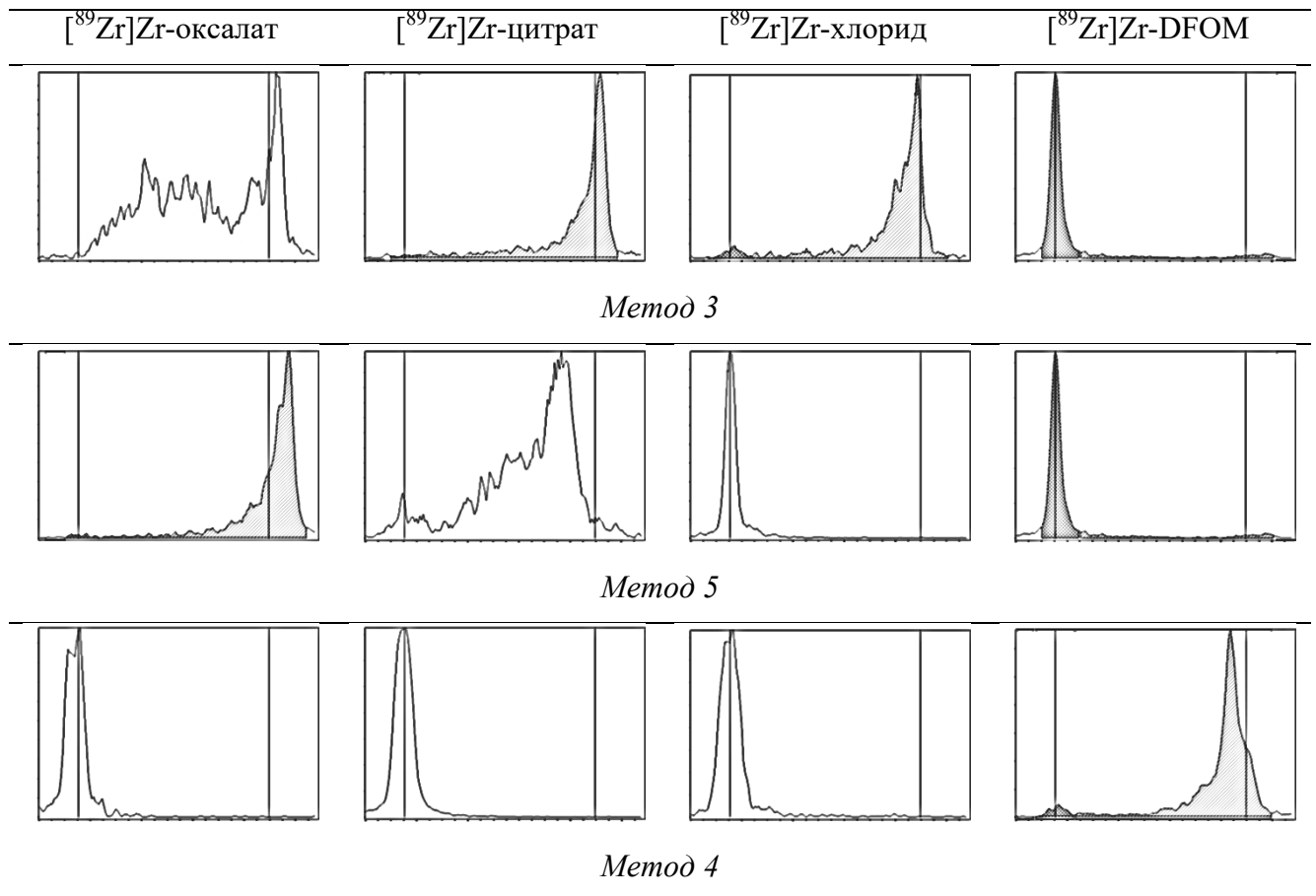
С учётом ранее разработанных систем для анализа исходных растворов ^{89}Zr (таблица 23) для определения РХЧ меченых комплексов были выбраны следующие системы:

- *Метод 3* — для анализа образцов, приготовленных с использованием $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида и $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата (R_f $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFO — 0, свободного ^{89}Zr — 1). Среди всех рассмотренных систем, именно данный метод характеризуется наилучшим разрешением при работе с препаратами $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида, даже при повышении pH > 5. Однако данная система не подходит для анализа препаратов на основе $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата, поскольку свободный $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалат в данной системе характеризуется пиком с $R_f \sim 0,5$.

- *метод 5* — для анализа образцов, приготовленных с использованием $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата (R_f $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFO — 0, свободного ^{89}Zr — 1).
- *Метод 4* использовался параллельно с *методом 3* или *5* в зависимости от исходной химической формы ^{89}Zr . *Метод 4* позволяет хроматографически разделить комплекс $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFO и гидролизованный ^{89}Zr (R_f несвязанного/гидролизованного ^{89}Zr — 0, комплекса $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFOM — 1). Данная система наиболее актуальна при работе с $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлоридом из-за необходимости контроля количества гидролизованного ^{89}Zr . В обычных хроматографических системах гидролизованный ^{89}Zr и исследуемый комплекс характеризуются одинаковым пиком с $R_f = 0$, что может приводить к неверной интерпретации полученных результатов и завышению РХЧ комплексов и препаратов ^{89}Zr за счёт наличия гидролизованного ^{89}Zr .

Необходимо отметить, что *метод 4* оказался неподходящим для анализа комплексов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -p-Bn-NCS-DFO, из-за их высокой липофильности. Для анализа образцов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -p-Bn-NCS-DFO, полученных с использованием $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида использовали системы ITLC-SG / 1 об.% ТФУ в смеси MeOH—H₂O (3:1), и/или ITLC-SG / 1 об.% ТФУ в смеси ацетон-H₂O (7:3), (приложение 2).

Таблица 23. Хроматограммы образцов в различных ТСХ системах



Как уже было сказано ранее, для введения ^{89}Zr в структуру препаратов на основе mAb в подавляющем большинстве случаев используется хелатор DFO. Для изучения влияния метода получения исходных растворов на эффективность комплексообразования был использован хелатор дефероксамин (DFOM, рисунок 32) и его производное (p-Bn-NCS-DFO, рисунок 32), которое используется для предварительной конъюгации с mAb.

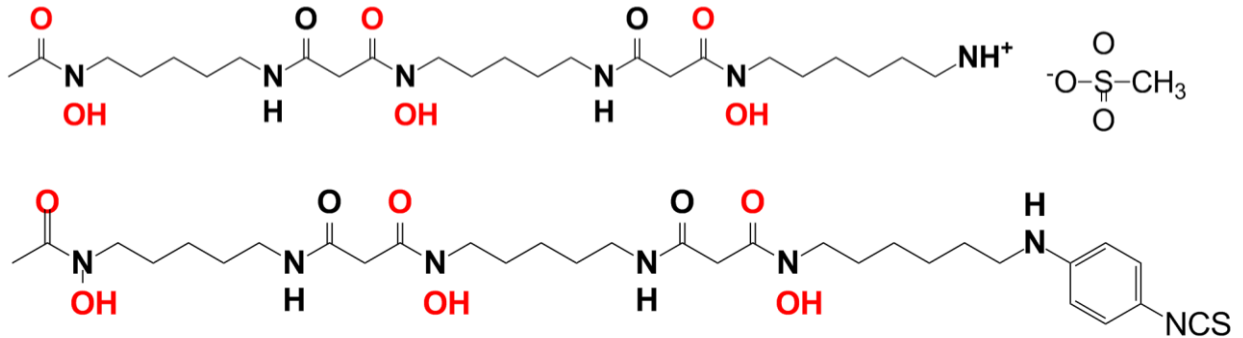


Рисунок 32. Структурные формулы DFOM и p-Bn-NCS-DFO.

Поскольку для мечения хелаторов, неконъюгированных с mAb, не требуется соблюдения строгих условий синтеза, оценка эффективности комплексообразования с использованием ^{89}Zr -оксалата была проведена в более широком диапазоне pH (3–8).

Наиболее высокие значения РХЧ для комплексов ^{89}Zr -DFOM и ^{89}Zr -p-Bn-NCS-DFO были получены при pH 6 (таблица 24). Дополнительно при проведении мечения определялся радиохимический выход (РХВ), учитывающий изменение активности образца до и после окончания синтеза. Это связано с тем, что высокое значение РХЧ согласно результатам ТСХ анализа в ряде случаев не отражает реальных радиохимических параметров качества анализируемых образцов.

При дальнейшем повышении pH происходило снижение РХЧ и РХВ за счёт увеличения количества гидролизованного ^{89}Zr . При этом необходимо отметить резкое снижение РХВ для комплекса ^{89}Zr -p-Bn-NCS-DFO при переходе от pH 6 к pH 8. Данное снижение предположительно связано с наличием в структуре p-Bn-NCS-DFO бензил-изотиоцианатной группы и более высокой липофильностью образуемого комплекса, что в нейтральных растворах приводит к сорбции полученных комплексов на стенках пробирки.

Таблица 24. РХЧ и РХВ для комплексов ^{89}Zr -DFOM и ^{89}Zr -p-Bn-NCS-DFO в зависимости от pH

pH	^{89}Zr -DFOM		^{89}Zr -p-Bn-NCS-DFO	
	РХЧ	РХВ	РХЧ	РХВ
3	0	0	0	0

рН	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFOM}$		$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-p-Bn-NCS-DFO}$	
	РХЧ	РХВ	РХЧ	РХВ
4	0	0	0	0
5	46 ± 5	46 ± 5	15 ± 4	15 ± 5
6	93 ± 1	92 ± 3	95 ± 2	91 ± 2
7	93 ± 2	91 ± 3	86 ± 2	63 ± 3
8	89 ± 2	86 ± 3	77 ± 3	48 ± 3

Таким образом, в данном случае РХВ является важным критерием для оценки эффективности комплексообразования. Несмотря на высокие значения РХЧ, например при рН = 8 для комплекса $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-p-Bn-NCS-DFO}$ более 50% ^{89}Zr будет потеряно из-за осаждения и сорбции гидролизованных форм или комплексов ^{89}Zr .

Для уменьшения потерь ^{89}Zr , связанных с сорбцией липофильного комплекса $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-p-Bn-NCS-DFO}$ были проведены эксперименты с использованием стеклянных и пластиковых пробирок (таблица 25). Дополнительно были приготовлены образцы с добавлением в раствор 10 об.% этилового спирта (EtOH, допустимое фармакопейное содержание этанола), что увеличивает растворимость для липофильных комплексов.

Таблица 25. РХЧ и РХВ комплекса $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-p-Bn-NCS-DFO}$

Материал реакционного сосуда	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-хлорид (ZR+ Chromafix 30PS-HCO}_3)$		$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-хлорид (ТВР)}$		$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-цитрат (ZR+Chelex-100)}$	
	без спирта	+10% спирт	без спирта	+10% спирт	без спирта	+10% спирт
РХЧ						
Пластик	91	92	86	93	91	94
стекло	92	85	85	93	88	86
РХВ						
Пластик	78,7	87,5	56,1	73,7	76,9	89,2
стекло	58,5	63,8	53,8	60,0	39,6	49,4

Для всех приготовленных образцов можно отметить незначительные различия в РХЧ в зависимости от материала реакционного сосуда или добавления в раствор этанола, однако при этом добавление 10 об. % спирта приводит к увеличению РХВ на 5–15 %. Для подтверждения влияния этанола на РХВ был проведен еще один эксперимент при различной концентрации хелатора (таблица 26).

Таблица 26. РХВ комплекса $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-p-Bn-NCS-DFO}$ при различной концентрации p-Bn-NCS-DFO

Состав образца		Концентрация p-Bn-NCS-DFO, мкг/мл		
		0,1	1	10
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид (ТВР)	без спирта	6,6	45,1	19,8
	+10% спирт	6,8	55,4	27,2
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрат (ZR+Chelex-100)	без спирта	5,9	45,4	65,4
	+10% спирт	6,1	48,5	73,9

Представленные данные, подтверждают гипотезу: увеличение концентрации p-Bn-NCS-DFO сопровождается снижением РХВ из-за сорбции полученных комплексов, при этом различие в РХВ между образцами с добавлением и без добавления спирта возрастает пропорционально увеличению концентрации хелатора.

Для подавления гидролиза Zr в исходных растворах одним из решений является увеличение концентрации солигандов (цитрат/оксалат ионов), что приводит к образованию достаточно стабильных комплексов ^{89}Zr (подробнее в п. 1.4). Для оценки влияния концентрации оксалат- и цитрат- анионов на выход реакции комплексообразования был проведен эксперимент в диапазоне концентраций 0,05–0,27 М и 0,1–1,0 М для оксалата и цитрата соответственно (рисунок 33). В данных условиях наблюдалось более резкое снижение РХЧ в присутствии оксалат анионов, предположительно связанное, с более высокой стабильностью оксалатных комплексов.

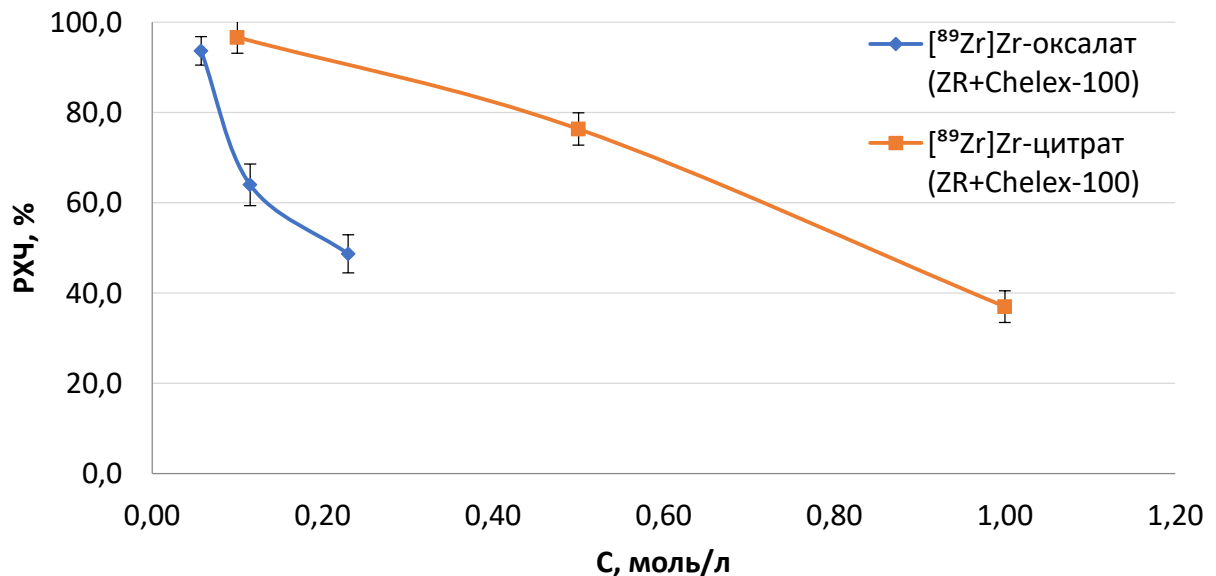


Рисунок 33. Влияние концентрации оксалат- и цитрат- ионов на РХЧ комплекса $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFOM}$.

Более высокая стабильность оксалатных комплексов ^{89}Zr также оказывает влияние на скорость реакции комплексообразования (рисунок 34). При исследовании комплексообразования ^{89}Zr с DFOM (0,156 мг/мл, pH 6) наблюдалось быстрое образование комплексов для растворов ^{89}Zr -хлорида (порядок смешения – а (п. 2.5.), РХЧ перестает расти спустя 15 минут инкубирования), и более медленное образование комплексов для ^{89}Zr -цитрата (~ 30 мин) и ^{89}Zr -оксалата (~ 60 мин).

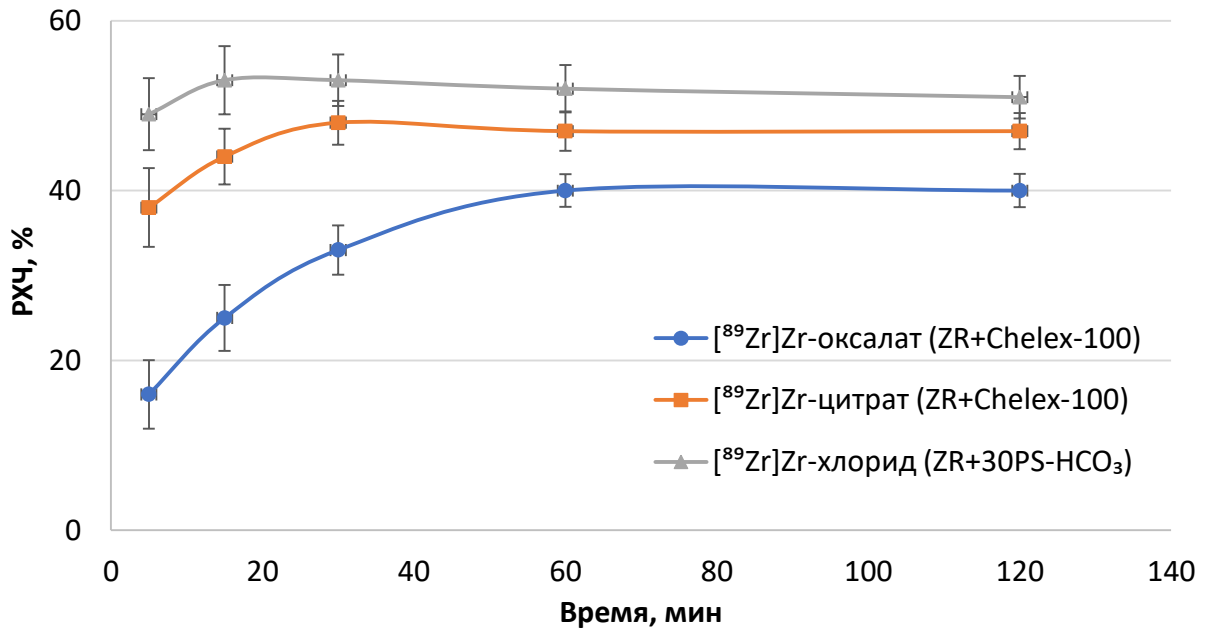


Рисунок 34. Зависимость РХЧ от продолжительности инкубирования для различных химических форм ^{89}Zr .

Таким образом, высокая стабильность исходных растворов, с одной стороны приводит к подавлению гидролиза, а с другой, является конкурирующей реакцией для комплексообразования с хелаторами. В растворах ^{89}Zr -хлорида, который не содержит каких либо солигандов реакции комплексообразования с хелатором и гидролиза протекают наиболее быстро.

При проведении реакции комплексообразования с использованием ^{89}Zr -хлорида было обнаружено большое количество гидролизованного ^{89}Zr ($\geq 30\%$) сразу после добавления раствора хелатора в свежеприготовленный раствор ^{89}Zr -хлорида с pH 6 (в качестве буферного раствора использовался 0,1 М HEPES). Для снижения количества гидролизованного ^{89}Zr был изменён порядок добавления реагентов (порядок смешения — б). Во всех последующих экспериментах раствор хелатора (DFOM, p-Bn-NCS-DFO) добавлялся в кислый раствор ^{89}Zr -хлорида, а затем строго рассчитанный объём буферного раствора. В результате изменения порядка смешения реагентов удалось значительно повысить как РХЧ (~40%), так и в целом РХВ (таблица 27).

Таблица 27. влияние порядка добавления реагентов на РХЧ $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFOM}$ при использовании $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-хлорида}$. $p < 0,05$.

Показатель	Порядок добавления реагентов:	
	a^*	b^{**}
РХЧ, %	$61,3 \pm 0,8$	$98,9 \pm 0,1$
Объёмная активность, %	$68,7 \pm 3,8$	$92,8 \pm 0,7$
РХВ, %	$42,1 \pm 2,7$	$91,7 \pm 0,6$

* a - $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-хлорид}$ + буферный раствор + DFOM;

** b - $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-хлорид}$ + DFOM + буферный раствор

3.7 Автоматизация процесса

Для автоматизации процесса получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-оксалата}$ и $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-цитрата}$ была разработана программа и схема на модуле Modular-Lab PharmTracer (Eckert & Ziegler Eurotop GmbH, Германия). В Modular-Lab PharmTracer используется модульная система и стерильные одноразовые кассеты, исключающие возможность перекрёстного загрязнения. Процесс синтеза полностью автоматизирован с возможностью дистанционного контроля посредством датчиков температуры, активности и давления.

Программирование модуля осуществляется через графический интерфейс. Для каждого этапа работы программы используется блок схема из различных действий. Получение раствора ^{89}Zr в форме $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-оксалата}$ или $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-цитрата}$ включает 6 стадий (таблица 28). Пример программы для стадии №4 представлен на рисунке 35.

Таблица 28. Стадии получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-оксалата}$ и $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-цитрата}$ на модуле синтеза

№	Стадии очистки	$V_{\text{раствора}}$
1	Подача исходного раствора $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-хлорида}$ на колонку со смолой ZR	2 мл
2	Промывка коммуникаций и колонки с ZR 2 М раствором HCl	3 мл
3	Промывка коммуникаций и колонки с ZR H ₂ O	4 мл
4	Элюирование ^{89}Zr с колонки со смолой ZR, сорбция ^{89}Zr на колонке со смолой Chelex-100 – 0,5 М H ₂ C ₂ O ₄	2 мл
5	Промывка коммуникаций и колонки с Chelex-100 0,1 М раствором HCl	3 мл
6	Элюирование ^{89}Zr раствором цитрата (0,1 М) или оксалата натрия (0,115 М)	2 мл

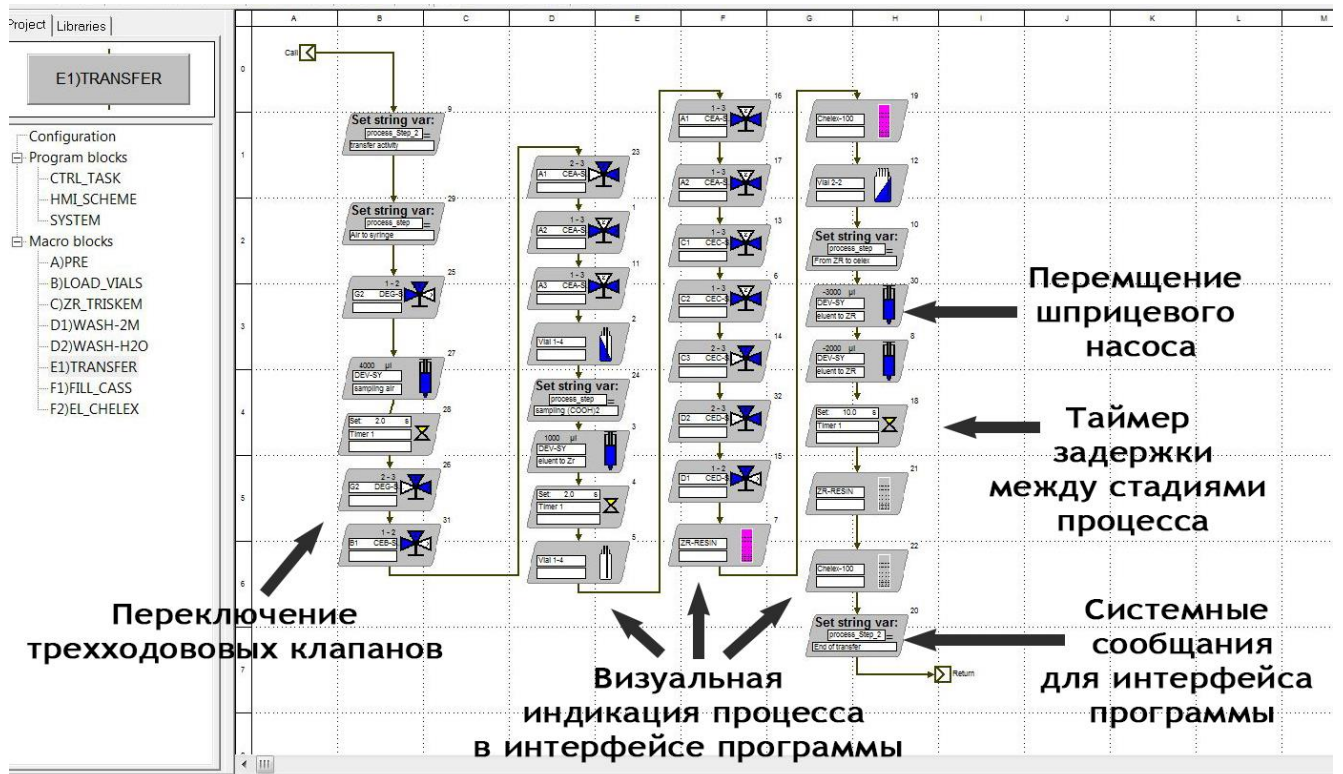


Рисунок 35. Блок программы по переносу активности ^{89}Zr (десорбция ^{89}Zr со смолы ZR, сорбция на смоле Chelex-100)

Для проведения полного цикла очистки использовалась одноразовая кассета, на которой расположено 4 блока с тремя трёхходовыми поворотными клапанами типа stop-cock, которые были соединены полипропиленовыми коммуникациями через разъёмы luer-lock в необходимой последовательности. Схема соединения коммуникаций была выбрана таким образом, чтобы максимально ограничить соприкосновение потоков на разных стадиях очистки: подача исходного и промывочных растворов для смолы ZR осуществляется через левую часть кассеты, а очистка на смоле Chelex-100 и получение готового продукта – через правую. Внешний вид кассеты и интерфейс программы представлены на рисунке 36 и рисунке 37.

Все используемые в цикле очистки растворы были предварительно расфасованы в стеклянные флаконы (5 мл) и присоединены к кассете посредством мини-спайков. В качестве колонок использовали полипропиленовые картриджи с полиэтиленовыми фриттами, заполненные 50 мг соответствующей смолы.

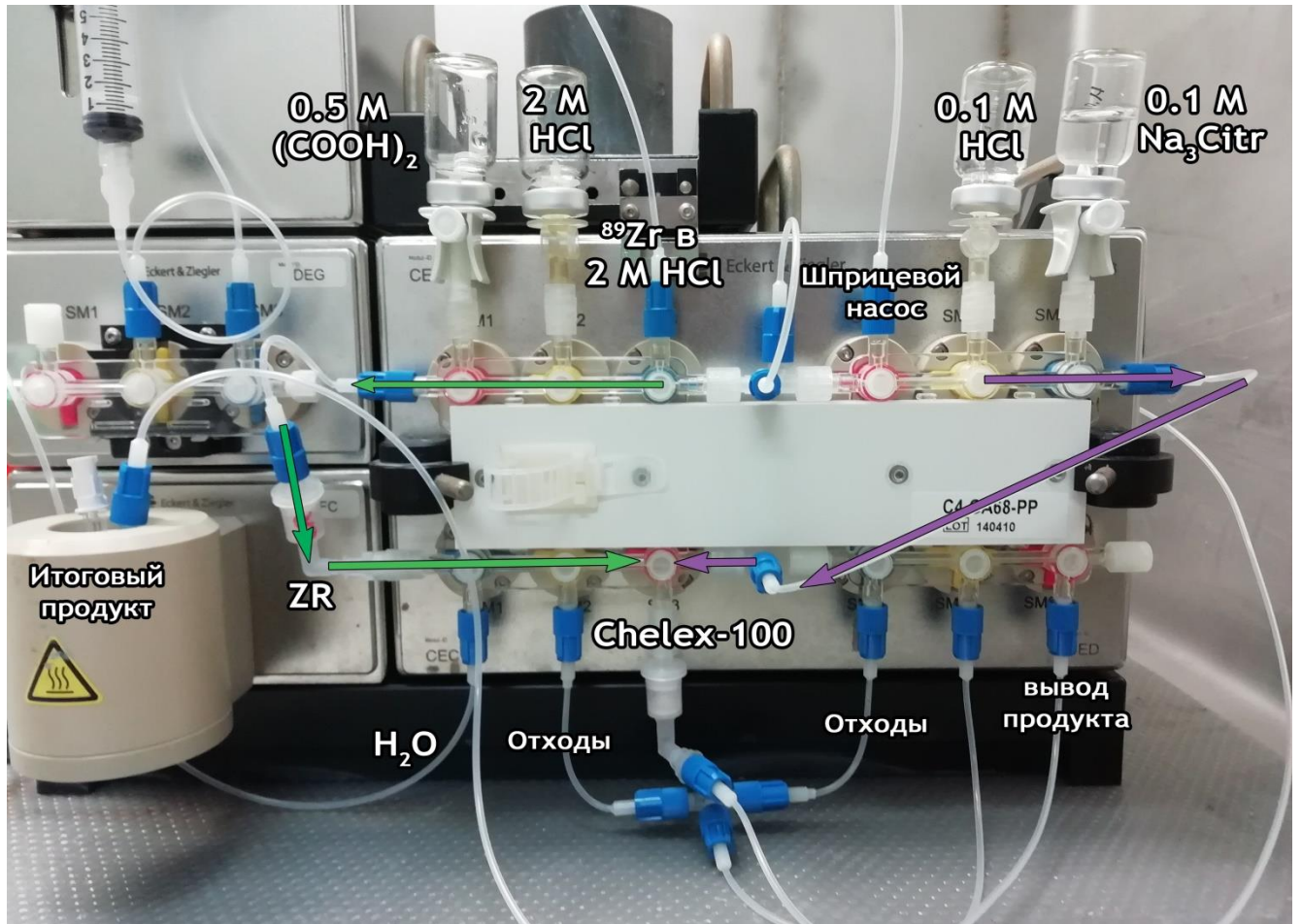


Рисунок 36. Внешний вид кассеты и направление потоков.

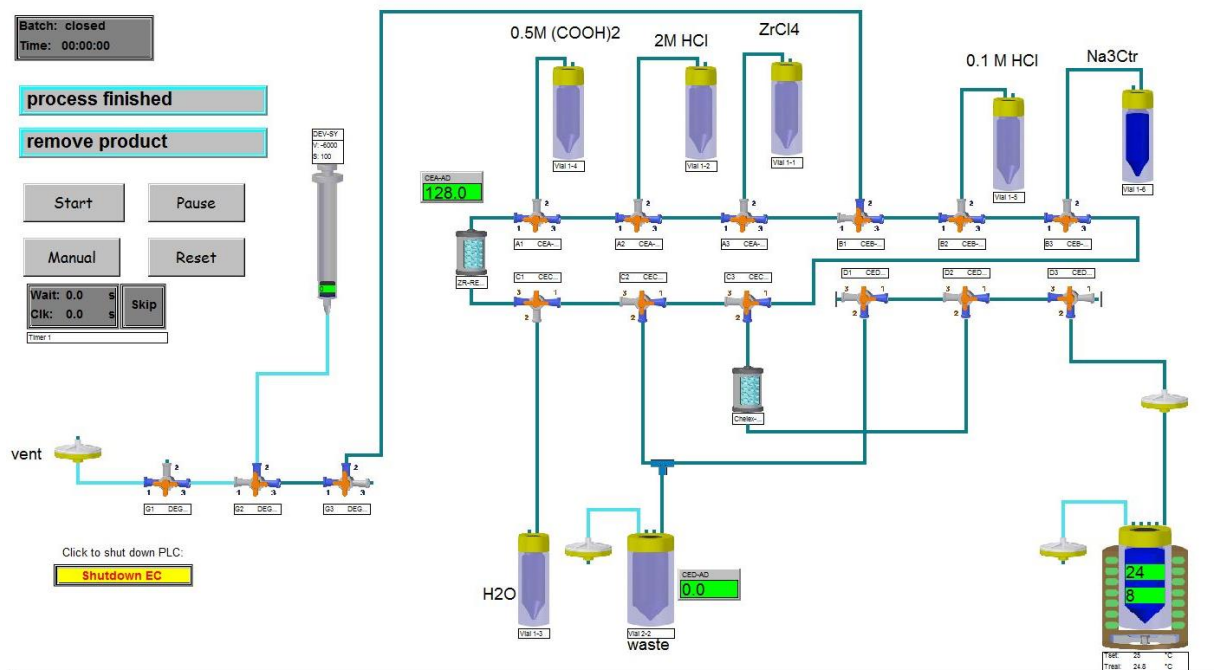


Рисунок 37. Интерфейс программы и схема получения [⁸⁹Zr]Zr-оксалата и [⁸⁹Zr]Zr-цитрата.

Общий цикл выполнения программы очистки занимает около 30 минут. Выход продукта при этом составляет >75% без поправки на распад. Потери связаны с автоматизацией процесса и потерями активности при переносе растворов между сосудами и в коммуникациях кассеты. Для снижения потерь объём рабочих растворов был увеличен с 1 до 2-4 мл. Распределение активности ^{89}Zr при получении $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата представлено в таблице 29.

Таблица 29. Потери активности ^{89}Zr при получении $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата

Распределение ^{89}Zr	Активность, %
Остаток в исходном флаконе	$0,3 \pm 0,1$
Колонка ZR	$6,9 \pm 1,8$
Колонка Chelex-100	$5,0 \pm 0,3$
Отходы	$1,6 \pm 0,6$
Другие потери (кассета)	$11,2 \pm 4,4$
Продукт	$75,8 \pm 4,1$

Далее было проведено сравнение полученных растворов $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата и $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата для различных методов получения (вручную / на модуле) для синтеза комплексов с DFO. При сравнении методов получения исходного раствора на эффективность комплексообразования была выбрана концентрация хелатора, заведомо недостаточная для достижения РХЧ более 95%. Результаты эксперимента показали (таблица 30), что автоматизация процесса практически не оказывает влияния на свойства растворов и эффективность комплексообразования с DFOM ($p > 0,05$).

Таблица 30. Эффективность комплексообразования для растворов ^{89}Zr , полученных различными методами

Метод получения исходных растворов	РХЧ комплекса $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFOM, %	
	0,1 М $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрат	0,115 М $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалат
Вручную	$81,7 \pm 2,1$	$86,1 \pm 1,0$
Модуль синтеза	$84,0 \pm 1,7$	$85,2 \pm 1,3$

3.8 Определение радионуклидной чистоты

Для проведения синтезов и дальнейшего применения полученных препаратов исходные растворы ^{89}Zr должны иметь высокую радионуклидную чистоту (РНЧ). При получении ^{89}Zr облучением иттриевой мишени, в зависимости от энергии и вида бомбардирующих частиц ($^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ или $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$) образуются радионуклидные примеси ^{88}Y и ^{88}Zr . Кроме того, возможно образование незначительных количеств ^{57}Co , ^{56}Co , ^{65}Zn из металлических примесей, находящихся в составе иттриевой мишени (подробнее в п. 1.3).

Для определения радионуклидной чистоты была проведена γ -спектроскопия серии растворов ^{89}Zr , полученных различными методами. Обнаружено, что метод получения ^{89}Zr в различных химических формах (при использовании одной выбранной комбинации сорбентов) не оказывает влияния на РНЧ. Более того, не было выявлено каких-либо существенных различий между методами, основанными на смолах ZR+Chelex-100 и смоле ТВР (РНЧ для обоих методов >99,99%) вне зависимости от получаемой химической формы. В исходном растворе [^{89}Zr]Zr-хлорида (ЗАО «Циклотрон», для выделения использовался метод ионного обмена) были обнаружены радионуклидные примеси (РНП) ^{56}Co , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{88}Y и ^{88}Zr (таблица 31). ^{88}Y является продуктом распада ^{88}Zr , поэтому содержится даже в очищенных растворах.

Спектры образцов, нормированные по активности ^{88}Zr и результаты измерений активности с коррекцией на дату поставки представлены на рисунке 38 и в таблице 31 соответственно. Активность ^{89}Zr для данных образцов была измерена с помощью дозкалибратора Atomlab 500.

Таблица 31. Результаты измерения активности образцов (МКС-01А «Мультирад»)

РН	$T_{1/2}$ (сут)	Активность, Бк/мл		
		Исходный раствор [^{89}Zr]ZrCl ₄ (ЗАО «Циклотрон»)	Метод очистки	
			ТВР	Zr+Chelex-100
^{56}Co	77,23	499,6 ± 64,2	13,8 ± 5,1	<0,1
^{57}Co	271,8	9,5 ± 2,7	<0,1	<0,1
^{65}Zn	244,0	2051,2 ± 229,4	4,1 ± 4,5	<0,1
^{88}Y	106,6	402,4 ± 48,1	115,0 ± 14,0	97,1 ± 11,5
^{88}Zr	83,0	605,0 ± 70,9	177,4 ± 21,0	148,2 ± 18,0
^{89}Zr	3,26	100×10 ⁶	30×10 ⁶	25×10 ⁶
Суммарное содержание РНП, %		0,0036	0,0010	0,0010

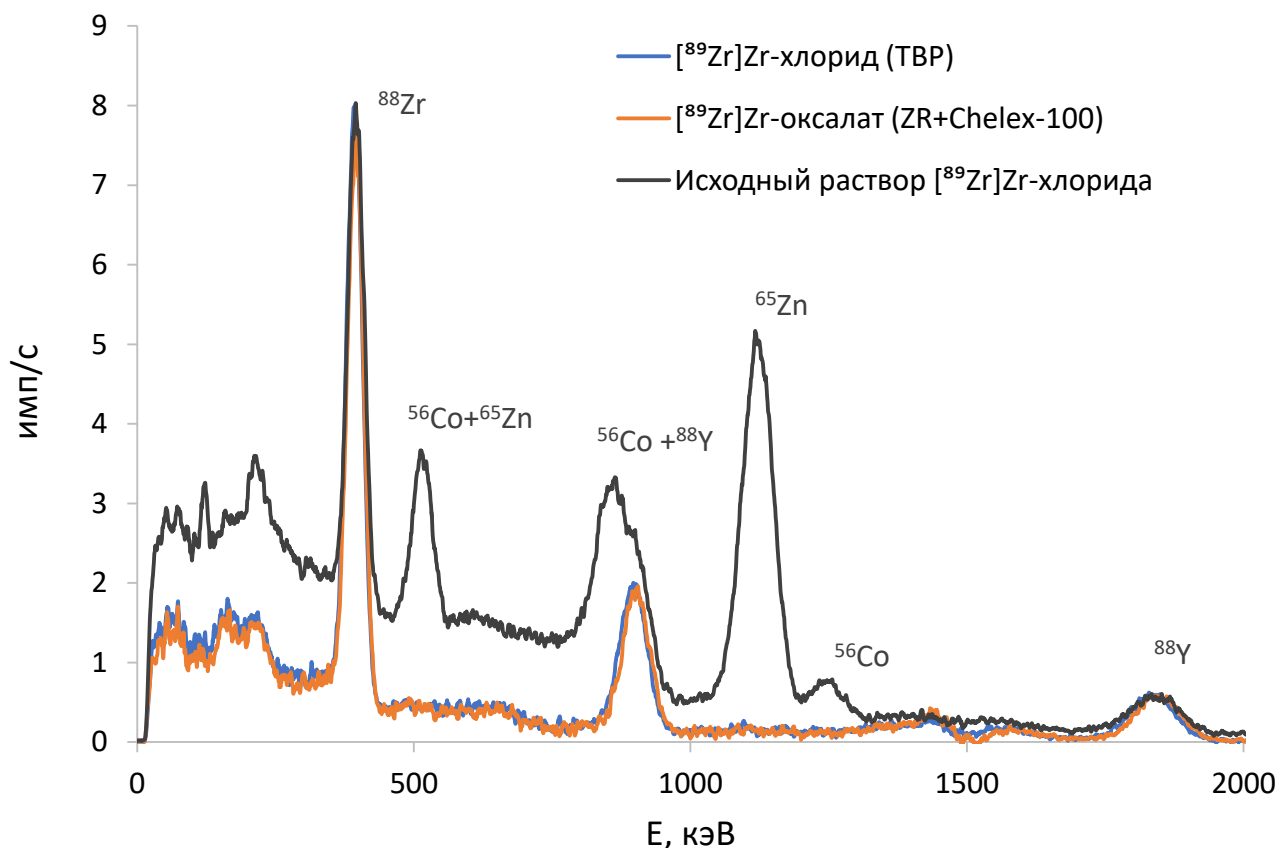


Рисунок 38. Спектры образцов, нормированные по активности ^{88}Zr .

По результатам исследований, оба метода, основанные на использовании сорбентов ZR+Chelex-100 и TBP, позволяют получать растворы ^{89}Zr с высоким значением РНЧ, поэтому определяющим критерием для выбора технологии является химическая чистота и апробация полученных растворов для синтеза комплексов и препаратов ^{89}Zr .

3.9 Анализ модельных растворов. Сравнение эффективности очистки

Для применения в технологии РФЛП исследуемые методы помимо высокой РНЧ должны обеспечивать эффективную очистку от примесных металлов, содержание которых зависит от массы и химической чистоты исходной мишени. При этом исходный раствор после растворения мишени содержит достаточно высокую концентрацию иттрия, очистка от которого является первостепенной задачей.

Для определения эффективности очистки различных методов был проведён эксперимент с модельными растворами, содержащими примеси различных катионов металлов. Метод очистки для модельных растворов полностью эквивалентен методу получения ^{89}Zr (п. 2.4). Объём всех фракций составлял 1 мл. Первоначально была оценена эффективность очистки для экстракционно-хроматографической гидроксаматно-модифицированной смолы ZR (таблица

32). Данный метод в настоящее время является основным при получении ^{89}Zr из облучённой иттриевой мишени.

Таблица 32. Распределение металлов по фракциям на смоле ZR

Металл	Содержание во фракциях, мкг/л				
	До очистки (2 М HCl)	Раствор после сорбции (2 М HCl)	Промывка (2 М HCl)	Промывка (H ₂ O)	Элюент (0,5 М H ₂ C ₂ O ₄)
Fe	16340 ± 270	13030 ± 1600	1240 ± 100	12 ± 3	107 ± 25
Cu	19397 ± 440	17340 ± 1700	750 ± 50	8,9 ± 5,2	2,6 ± 0,3
Y	416200 ± 5900	340000 ± 6500	8220 ± 6500	81 ± 37	50 ± 18
Al	9620 ± 130	8910 ± 160	140 ± 160	11 ± 4	52 ± 46
Pb	10730 ± 380	10290 ± 120	580 ± 120	14 ± 12	6,4 ± 6,0
Zn	19340 ± 280	16260 ± 570	910 ± 130	28 ± 22	62 ± 2

Как видно из представленных данных, смола ZR обеспечивает высокую степень очистки от потенциальных примесей. Металлы практически не задерживаются на колонке. Особо важно в данном случае отметить высокую степень очистки от ионов железа, которые частично удерживаются на колонке, однако после промывки 1 мл 2 М раствора HCl практически полностью десорбируются (в элюате остаётся ≤0,7% от исходного количества Fe (III)).

Таблица 33. Распределение металлов по фракциям на смоле ТВР

Металл	Содержание во фракциях, мкг/л				
	До очистки (10 М HCl)	Раствор после сорбции (10 М HCl)	Промывка (12 М HCl)	Промывка (12 М HCl)	Элюент (0,1 М HCl)
Fe	14580 ± 900	750 ± 55	1080 ± 450	810 ± 330	12780 ± 750
Cu	16550 ± 570	15270 ± 970	640 ± 100	<1	23 ± 21
Y	179510 ± 2100	173000 ± 18000	3860 ± 110	<100	260 ± 250
Al	13960 ± 900	12800 ± 370	1120 ± 70	610 ± 40	93 ± 14
Pb	10830 ± 490	9850 ± 410	740 ± 50	380 ± 20	70 ± 20
Zn	18790 ± 230	15190 ± 1200	2020 ± 210	<100	320 ± 130

Для смолы ТВР можно отметить на порядок более высокие концентрации металлов в растворе элюата (таблица 33). Увеличение объёма промывочного раствора (12 М HCl) незначительно влияет на степень очистки. На стадии промывки происходит удаление остатков

иттрия и алюминия, тогда как железо сорбируется на колонке вместе с Zr (IV). В целом, полученные результаты согласуются с опубликованными данными, согласно которым метод на основе гидроксаматной смолы позволяет проводить более эффективную очистку от всех металлов, включая Fe (III) [82].

Для хелатной смолы Chelex-100 (вторая ступень очистки) в качестве исходного раствора был использован 0,5 М раствор $H_2C_2O_4$. В данном случае модельный раствор был приготовлен без добавления ионов иттрия из-за нерастворимости и выпадения в осадок оксалата иттрия. Для смолы Chelex-100 можно отметить, что Al (III) и Fe (III) так же как и Zr (IV) сорбируются на смоле (таблица 34). При этом замена промывочного раствора с 0,1 М щавелевой кислоты на 0,1 М HCl позволяет удалить более 80% алюминия (таблица 35).

Таблица 34. Распределение металлов по фракциям на смоле Chelex-100, элюент – оксалат натрия

Металл	Содержание во фракциях, мкг/л				
	До очистки (0,5 М $H_2C_2O_4$)	Раствор после сорбции (0,5 М $H_2C_2O_4$)	Промывка (0,1М $H_2C_2O_4$)	Промывка (0,1М $H_2C_2O_4$)	Элюент (0,115 М $Na_2C_2O_4$)
Fe	13520 ± 1200	470 ± 19	67 ± 14	90 ± 31	10686 ± 1200
Cu	19880 ± 240	10140 ± 410	5230 ± 480	1860 ± 220	170 ± 22
Al	10690 ± 140	1240 ± 100	1450 ± 74	1090 ± 90	6910 ± 440
Pb	6690 ± 430	5380 ± 110	730 ± 75	41 ± 13	6,6 ± 2,3
Zn	23810 ± 660	16020 ± 280	1850 ± 140	89 ± 7	27 ± 4

Таблица 35. Распределение металлов по фракциям на смоле Chelex-100, элюент – цитрат натрия

Металл	Содержание во фракциях, мкг/л				
	До очистки (0,5 М $H_2C_2O_4$)	Раствор после сорбции (0,5 М $H_2C_2O_4$)	Промывка (0,1М HCl)	Промывка (0,1М HCl)	Элюент (0,1 М Na_3Citr)
Fe	11300 ± 100	670 ± 190	140 ± 97	76 ± 12	6690 ± 300
Cu	18220 ± 1100	9050 ± 760	5500 ± 310	1070 ± 50	110 ± 8
Al	8760 ± 330	910 ± 410	5050 ± 560	2060 ± 410	6,5 ± 4,2
Pb	7450 ± 250	4750 ± 280	1090 ± 30	81 ± 4	11 ± 1
Zn	18579 ± 210	15950 ± 750	440 ± 50	60 ± 3	12 ± 5

При использовании щавелевой кислоты в качестве промывочного раствора на смоле Chelex-100 алюминий десорбируется совместно с циркониевыми растворами оксалата или цитрата натрия. Ионы железа ведут себя аналогично Zr (IV) и практически количественно переходят в элюат. При этом, по сравнению со смолой ТВР, высокая эффективность очистки на смоле Chelex-100 не требуется, поскольку удаление основных примесей, в случае реализации метода двухступенчатой очистки, осуществляется на смоле ZR, а Chelex-100 используется для получения растворов в необходимой химической форме.

На рисунке 39 представлено сравнение содержания различных примесей в элюате для исследованных сорбентов. Наиболее эффективная очистка от различных металлических примесей может быть достигнута при использовании гидроксаматно-модифицированной смолы ZR. Необходимо отметить, что только метод с использованием смолы ZR позволяет проводить эффективную очистку от ионов Fe (III), которые являются критической примесью при дальнейшем синтезе радиоиммуноконъюгатов с использованием DFO в качестве хелатора. Это связано с тем, что DFO является сидерофором и образует очень прочные комплексы с ионами Fe (III). Метод двухступенчатой очистки на смолах ZR и Chelex-100 обеспечивает наиболее высокую химическую чистоту получаемых растворов ^{89}Zr .

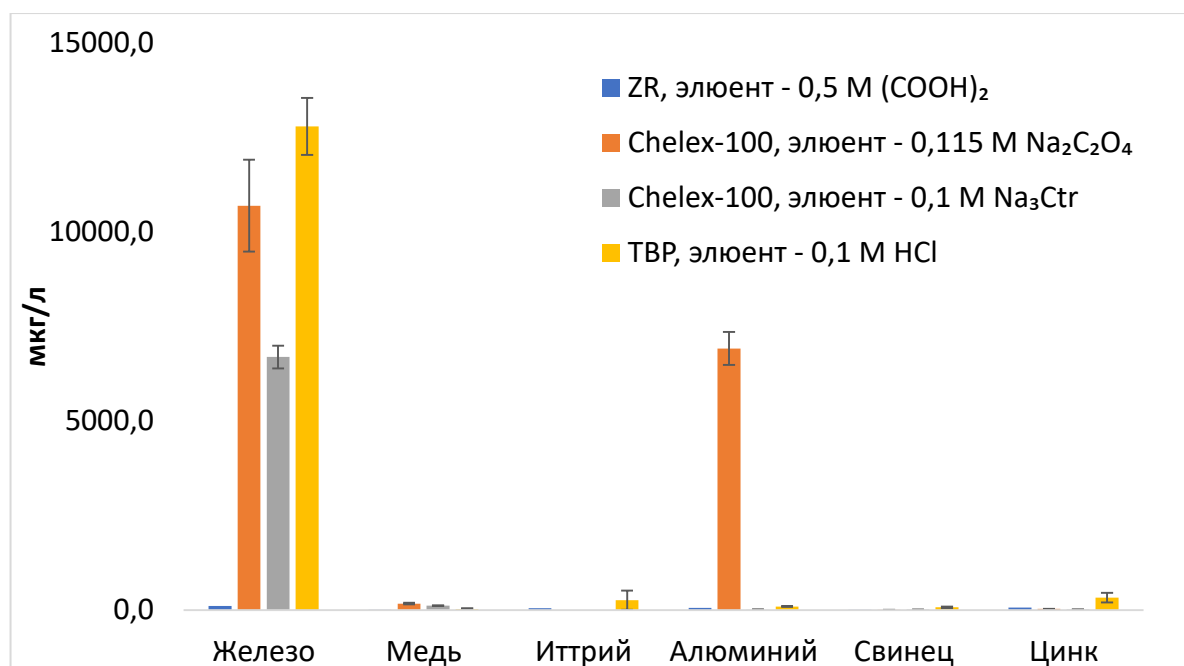


Рисунок 39. Содержание металлов в элюате после очистки для исследованных сорбентов.

3.10 Сравнение стабильности и эффективности комплексообразования

Благодаря своему длительному периоду полураспада цирконий-89, является идеальным кандидатом для доставки в центры, не имеющие своего циклотронно-радиохимического комплекса. Полученные растворы [^{89}Zr]Zr-оксалата, [^{89}Zr]Zr-хлорида и [^{89}Zr]Zr-цитрата могут

использоваться в качестве активной фармацевтической субстанции и поставляться непосредственно в радиохимические лаборатории для синтеза РФЛП.

Для полученных растворов была проведена оценка стабильности при $\text{pH} = 6$ (рисунок 40). Значение $\text{pH} 6$ было выбрано исходя из более высокого радиохимического выхода при синтезе комплексов с DFO. Для мечения mAb, предварительно конъюгированных с DFO, более предпочтительными будут растворы ^{89}Zr с $\text{pH} = 7$.

Растворы $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата ($0,115 \text{ M Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) и $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата ($0,1 \text{ M Na}_3\text{Citr}$) оставались стабильными в течение 14 дней (небольшое снижение стабильности связано с образованием 1–6% коллоидного ^{89}Zr , рисунок 42). Для сравнения представлены данные для $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида, который является стабильным только в сильноокислых средах. При повышении pH до 6 образцы $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида значительно гидролизировались в течение нескольких минут (рисунок 41, рисунок 42). Необходимо отметить различие в стабильности образцов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида, полученных различными методами. Образцы $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида, полученные конверсионным методом были более стабильными, что связано с неполной очисткой от щавелевой кислоты и образованием в растворе оксалатных комплексов ^{89}Zr .

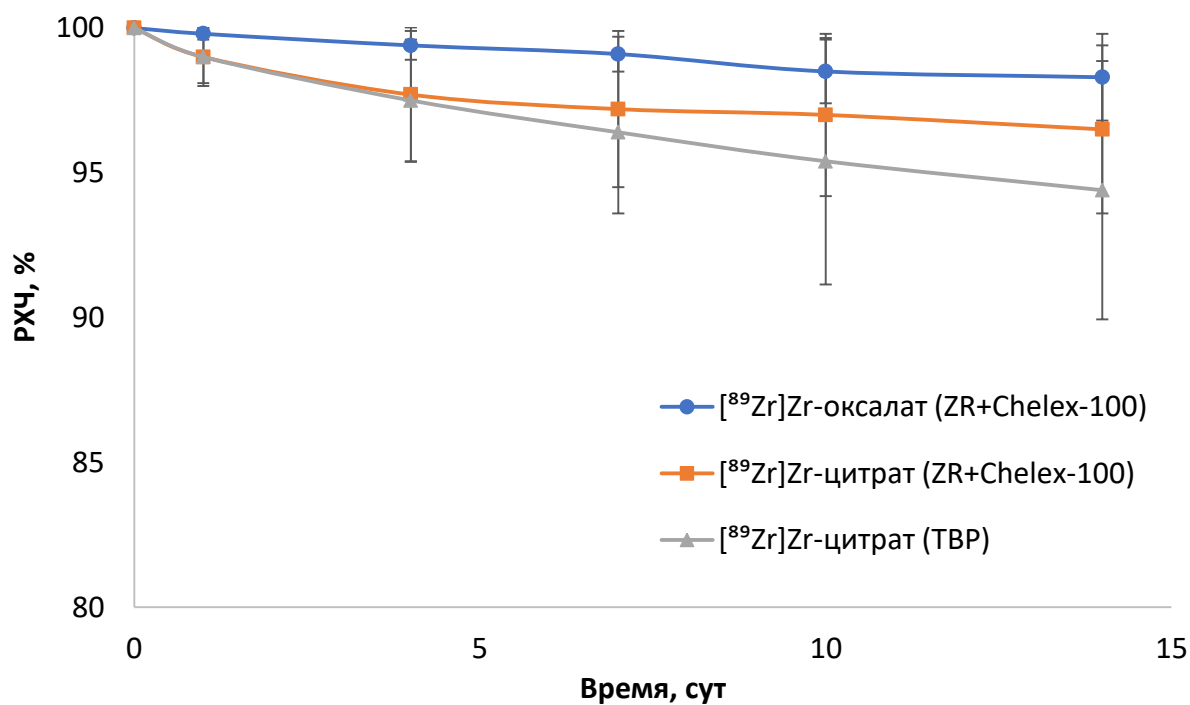


Рисунок 40. Стабильность образцов ^{89}Zr при $\text{pH} 6$.

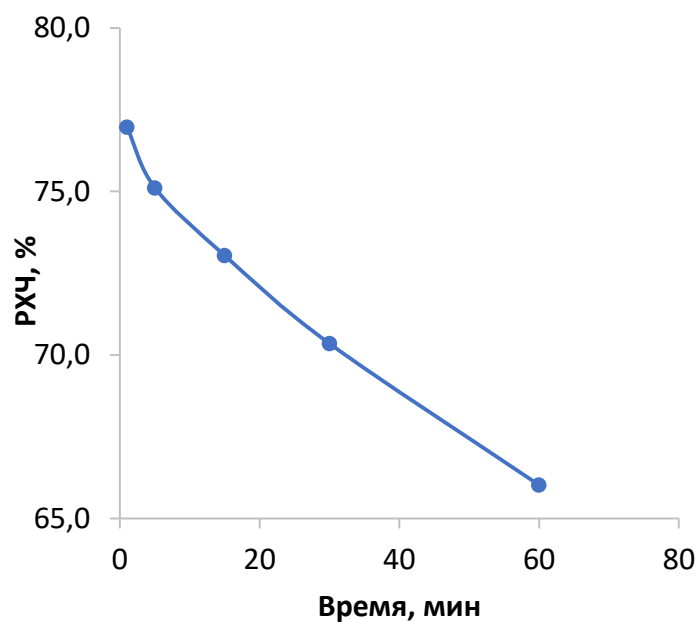


Рисунок 41. Стабильность $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида при pH 6.

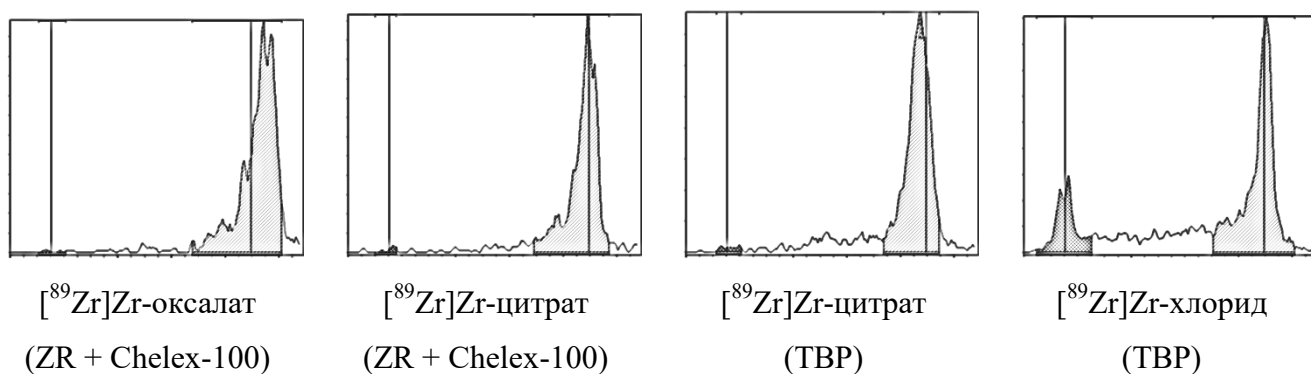


Рисунок 42. Оценка стабильности растворов ^{89}Zr . Хроматограммы образцов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата (метод 5), $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата (метод 3) через 14 суток и хроматограмма $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида (метод 3) непосредственно после приготовления раствора.

Более высокая стабильность образцов конверсионного $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида (ZR + Chromafix- HCO_3) также отражается на РХВ при проведении реакции комплексообразования с DFO. При проведении мечения DFOM с использованием растворов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида, полученных различными методами (TBP и ZR + Chelex-100) были получены близкие значения РХЧ и более высокое значение РХВ для конверсионного $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида из-за его более высокой стабильности (таблица 36).

Таблица 36. РХЧ и РХВ комплексов [⁸⁹Zr]Zr-DFOM.

Метод получения [⁸⁹ Zr]Zr-хлорида	ZR + Chromafix- HCO ₃	ТВР
РХЧ	92,0 ± 2,0	89,0 ± 2,8
РХВ	87,9	78,3

При синтезе любого таргетного РФЛП важным моментом является возможность получения целевой субстанции с высокой молярной активностью. Эффективная молярная активность является важной характеристикой (ЭМА), показывающей отношение активности радионуклида к общему количеству веществ, вступающих в реакцию комплексообразования с хелатором. Для определения ЭМА и сравнения различных химических форм были приготовлены серии образцов с последовательным уменьшением концентрации хелатора (рисунок 43). После чего были построены зависимости РХЧ от концентрации хелатора, и определена концентрация DFO, обеспечивающая 50% эффективность комплексообразования с ⁸⁹Zr.

На основе полученных данных был выполнен расчёт эффективной молярной активности (таблица 37), согласно методу, использованному в работе [79].

$$\text{ЭМА} = \frac{Y \cdot IC}{2 \cdot C_{50\%}}$$

где Y – выход изотопа МБк/μА·ч; IC – интегральный ток пучка μА·ч; $C_{50\%}$ – концентрация хелатора, необходимая для достижения 50% выхода комплексообразования.

Наиболее высокая эффективность комплексообразования была достигнута при использовании [⁸⁹Zr]Zr-хлорида (порядок смешения – б), полученного по безоксалатной технологии (ТВР). При сравнении образцов [⁸⁹Zr]Zr-оксалата и [⁸⁹Zr]Zr-цитрата, можно отметить более высокое значение ЭМА для образцов, полученных двухступенчатым методом (смолы ZR + Chelex-100). Таким образом, двухступенчатый метод очистки в данном случае является более предпочтительным методом получения растворов ⁸⁹Zr, поскольку обеспечивает высокие коэффициенты очистки, а полученные растворы могут использоваться для синтеза комплексов и препаратов ⁸⁹Zr с высокой молярной активностью.

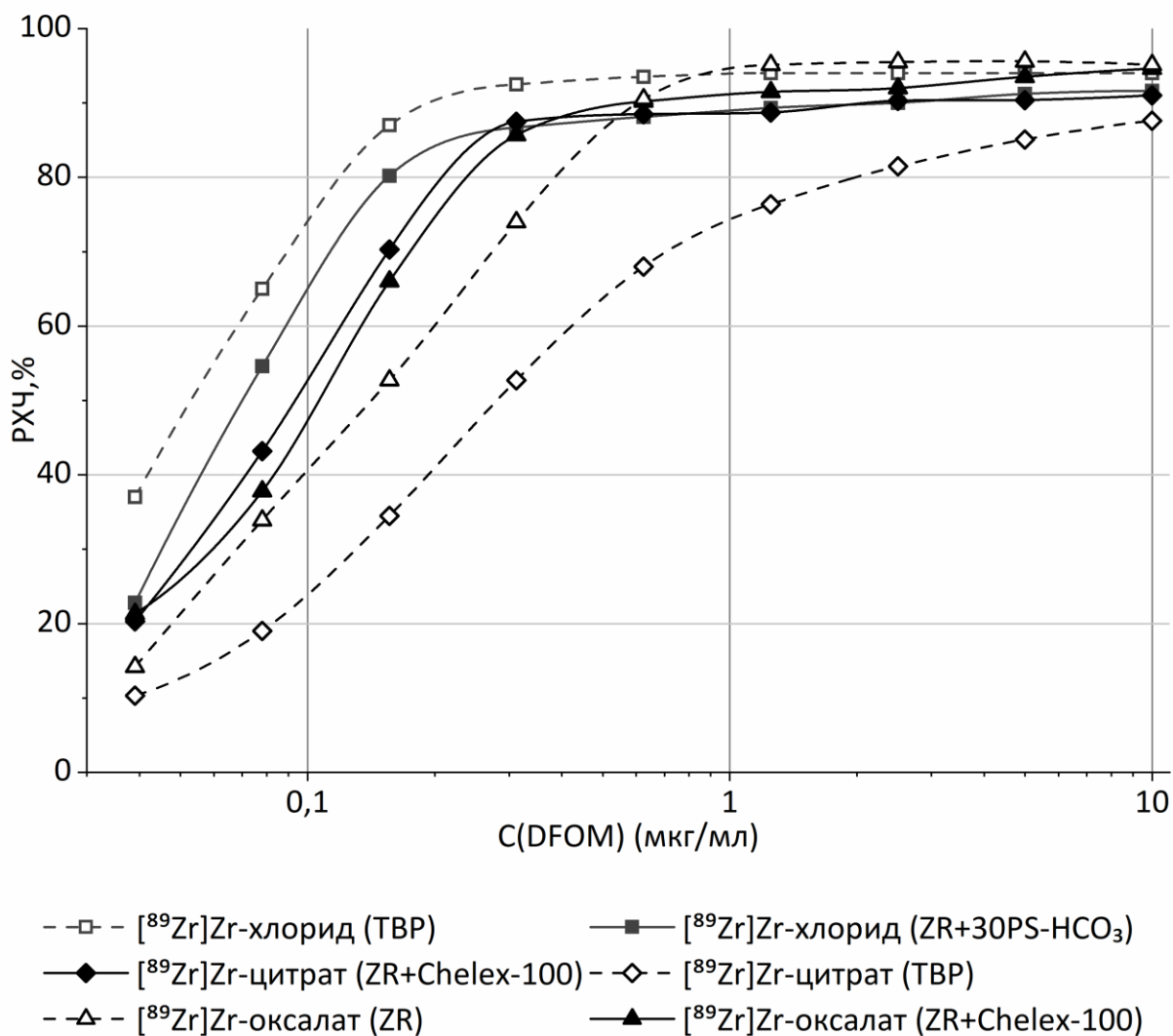


Рисунок 43. Зависимость РХЧ комплекса $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFO от концентрации хелатора для различных химических форм ^{89}Zr , планки погрешностей опущены для ясности.

Таблица 37. ЭМА для различных химических форм ^{89}Zr

Химическая форма	Метод получения	ЭМА, ГБк/мкмоль
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалат	ZR+Chelex-100	2,070
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалат	ZR	2,027
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрат	ZR+Chelex-100	2,236
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрат	TBP	0,964
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид	ZR+Chromafix HCO_3	2,860
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид	TBP	3,858

Аналогичная тенденция была получена при мечении p-Bn-NCS-DFO. Однако необходимо отметить, что для комплексов с p-Bn-NCS-DFO происходило снижение объемной активности раствора с увеличением концентрации хелатора. После проведения синтеза

реакционный раствор переносили в новую пробирку и измеряли распределение активности. С увеличением концентрации хелатора в реакционном растворе пропорционально уменьшалась активность ^{89}Zr в растворе после синтеза. Предположительно, данный факт связан с более высокой липофильностью хелатора p-Bn-NCS-DFO и осаждением/сорбцией полученных комплексов. Данная тенденция наблюдалась для всех химических форм, при этом наиболее значительное снижение происходило при использовании растворов ^{89}Zr -хлорида и ^{89}Zr -цитрата. Данные для ^{89}Zr -цитрата представлены на рисунке 44.

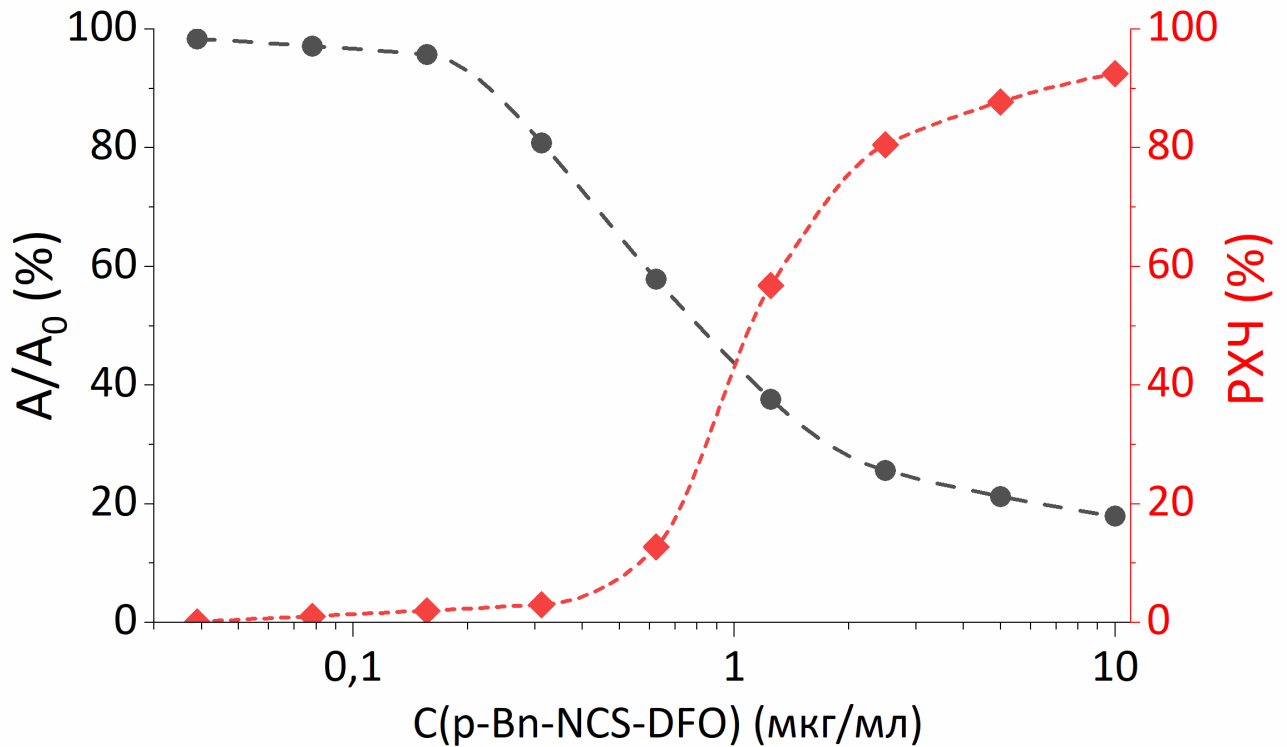


Рисунок 44. Зависимость РХЧ и объёмной активности (A) ^{89}Zr -p-Bn-NCS-DFO от начальной концентрации p-Bn-NCS-DFO.

Необходимо отметить, что хелатор p-Bn-NCS-DFO при синтезе радиофармпрепаратов используется не в чистом виде, а в составе mAb, после предварительной конъюгации и очистки. В связи с этим, можно предположить, что полученная зависимость (рисунок 44) не окажет существенного влияния на синтез радиоиммуноконъюгатов.

Несмотря на высокие значения ЭМА, использование ^{89}Zr -хлорида в технологии синтеза радиофармпрепаратов является неоднозначным. В настоящее время ^{89}Zr -хлорид является востребованным для синтеза РФП на основе небольших векторных молекул, нечувствительных к нагреву, таких как PSMA [100,221–223]. Так, например, отмечаются более высокие выходы при использовании ^{89}Zr -хлорида по сравнению с ^{89}Zr -оксалатом при комплексообразовании с хелаторами DOTA и DOTAGA, входящими в состав молекул PSMA-

617 и PSMA I&T. В данном случае предложенный протокол мечения для $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида позволит снизить количество гидролизованного ^{89}Zr и повысить РХВ.

Тем не менее, необходимо отметить ряд проблем, связанных с использованием $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида в синтезе ^{89}Zr -mAb РФП. Во-первых, при конверсионном методе получения $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида в большинстве случаев не контролируется содержание щавелевой кислоты, в результате чего результаты синтезов с использованием таких растворов значительно отличаются. Даже небольшие количества щавелевой кислоты приводят к образованию в растворе оксалатных комплексов ^{89}Zr и изменениям характеристик раствора, и, соответственно, невоспроизводимым результатам. Во-вторых, при использовании растворов $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида в отсутствие даже небольших количеств солигандов (например, оксалат ионов), фактически невозможно проведение реакции мечения прекоњуигированных антител (рисунок 45, 1).

Высокие выходы реакции комплексообразования достигаются только при добавлении хелатора в кислый раствор $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида, что приведет к инаktivации предварительно коњуигированных mAb. Использование «стандартного» протокола мечения для $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида (добавление mAb в раствор с pH 6,8-7,2) будет сопровождаться большим количеством гидролизованного ^{89}Zr , оценить содержание которого в растворе с меченым антителом методом ТСХ невозможно. Использование другого пути синтеза (рисунок 45, 2) также затруднительно. Предварительное мечение p-Bn-NCS-DFO и последующая коњуигация с mAb является менее эффективной. Кроме того, как было показано выше, прямое мечение p-Bn-NCS-DFO осложняется низким РХВ из-за высокой липофильности исходной молекулы.

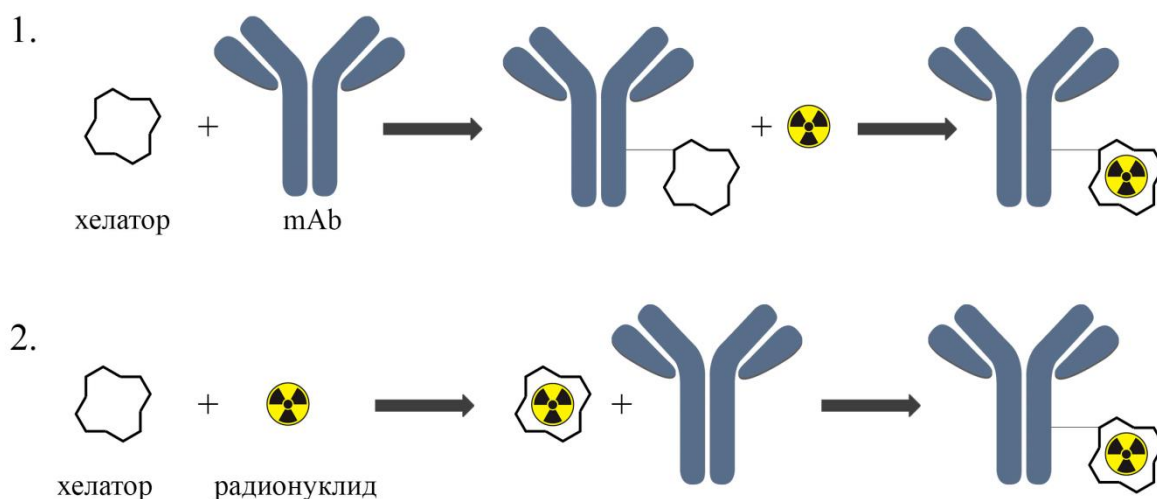


Рисунок 45. Пути синтеза радиоиммуноконъюгатов. 1 – мечение с прекоњуигированием антител (*post-labelling*); 2 – мечение с посткоњуигированием антител (*pre-labeling*)

При сравнении трёх исследованных химических форм можно отметить высокую перспективность $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата для применения в технологии РФЛП. $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрат может

быть получен методом с использованием смол ZR и Chelex-100, который обеспечивает высокий выход и высокие коэффициенты очистки. Основным отличием от широко используемых растворов оксалата натрия является физиологическая приемлемость растворов цитрата натрия, что делает необязательной стадию очистки конечного продукта. При этом растворы [^{89}Zr]Zr-цитрата являются более стабильными и удобными в обращении, чем растворы [^{89}Zr]Zr-хлорида, и могут использоваться для синтеза комплексов и препаратов ^{89}Zr с высокой молярной активностью.

Выводы

- Разработан оригинальный метод двухступенчатой очистки ^{89}Zr на сорбентах ZR и Chelex-100 для получения физиологически приемлемых растворов $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата и $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата с высоким выходом ($>90\%$), высокой объёмной активностью ($>90\%$ ^{89}Zr в 1 мл элюата), высокой радиохимической, химической и радионуклидной чистотой.
- Разработаны системы, позволяющие более достоверно определять РХЧ растворов и комплексов ^{89}Zr , по сравнению с литературным методом ТСХ анализа ^{89}Zr (ITLC-SG / 50 мМ ДТПА).
- Экспериментально показана пригодность полученных растворов для синтеза РФЛП на примере синтеза комплексов с DFO. Выбор химической формы ^{89}Zr оказывает значительное влияние на эффективность комплексообразования. Растворы $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорида являются стабильными только в сильноокислых средах, что существенно ограничивает их применение. Растворы $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата и $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата остаются стабильными как минимум в течение 14 суток при pH 6 и являются более универсальными для синтеза широкого спектра соединений на основе циркония-89.
- Впервые предложено использование ^{89}Zr в форме $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата для синтеза комплексов и препаратов ^{89}Zr . Растворы $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрата являются стабильными, а протокол мечения более прост в реализации. Кроме того, растворы цитрата натрия, в отличие от растворов оксалата, являются физиологически приемлемыми и разрешены для внутривенного введения, что снимает дополнительные токсикологические ограничения для парентерального использования полученных препаратов в процедурах ПЭТ.

Благодарность

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю – Ларенкову Антону Алексеевичу за неоценимую помощь, терпение и поддержку при написании данной работы и Кодиной Галине Евгеньевне за ценные научные консультации и поддержку.

Отдельную благодарность автор выражает всему коллективу отдела радиационных технологий медицинского назначения ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, особенно А.Г. Макичяну за помощь в подготовке и проведении исследований, Ю.А. Митрофанову за всестороннюю помощь и консультации, А.Б. Брускину и А.Я. Марук за ценные советы и помощь в первых шагах на просторах радиохимии.

Автор очень признателен друзьям и коллегам за разностороннюю помощь, поддержку и оптимизм.

Сокращения и обозначения

%ID/г – % от введённой дозы на грамм;

DFO (ДФО) – дефероксамин;

K_d – равновесный массовый коэффициент распределения;

ДТРА (ДТПА) – диэтилентриаминпентауксусная кислота;

EDTA (ЭДТА) – этилендиаминтетрауксусная кислота;

Fab – фрагменты антител;

mAb – моноклональные антитела;

ITLC-SG – полоски для тонкослойной хроматографии (стекловолокно, импрегнированное силикагелем);

ITLC-SA – полоски для тонкослойной хроматографии (стекловолокно, импрегнированное кремниевой кислотой);

RP-18 (5559) – полоски для тонкослойной хроматографии (силикагель, модифицированный C18 (обращённая фаза), на алюминиевой подложке);

5533 – полоски для тонкослойной хроматографии (силикагель, модифицированный NH_2 на алюминиевой подложке);

ГЛФ – готовая лекарственная форма;

КДН – коэффициент дифференциального накопления;

ОФЭКТ – однофотонная компьютерная томография;

ПЭТ – позитронно-эмиссионная компьютерная томография;

РН – радионуклид;

РНЧ – Радионуклидная чистота;

РФ(Л)П – радиофармацевтические (лекарственные) препараты;

РХВ – радиохимический выход;

РХЧ – радиохимическая чистота;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

ЭМА – эффективная молярная активность.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Используемые ТСХ системы для определения комплексов ^{89}Zr

Хроматографическая система		Определяемые компоненты	R_f	Ист.
Неподвижная фаза	Подвижная фаза			
iTLC-SG (Pall Corp.)	50 мМ ДТПА (рН 7)	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$	0	[80]
		Свободный ^{89}Zr	1	
iTLC-SG (Agilent Technologies)	MeOH-H ₂ O (1:1), 4% ТФУ (об/об)	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$	1	[220]
		Свободный ^{89}Zr	1	
RP-18 (Merck)	0,1 М рН=5 цитратный буфер (рН 5)	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-DUPA-Pep}$	1	[224]
		Свободный ^{89}Zr	0	
RP-18 (Merck)	H ₂ O – MeOH (30:70) 0,1% ТФУ (об/об)	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-DUPA-Pep}$	0	
		Свободный ^{89}Zr	1	
iTLC-SG (Agilent Technologies)	50 мМ ЭДТА (рН 5)	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-mAb}$	0	[225]
iTLC-SA (Varian)		$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$	0	
		Свободный ^{89}Zr	1	
iTLC-SA (Varian)	0,5 М H ₃ Citr	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$	0	
		Свободный ^{89}Zr	1*	
iTLC-SG (Pall Corp.)	0,02 М цитратный буфер (рН 5,5)	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-mAb (Trastuzumab)}$	0	[226]
		Свободный ^{89}Zr	1	
		Свободный ^{89}Zr	1	
Silica gel 60 (Merck)	50 мМ ДТПА (рН 7)	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$	0	[227]
		$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-(8-Гидоксихинолин)}_4$	0,6	
		Свободный ^{89}Zr	1	
iTLC-SG (Varian)		$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-BFCs}$	0	[228]
			Свободный ^{89}Zr	
iTLC-SG (Varian)		$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-BPDETLysH22-3,2-НОРО}$	0	[229]
	Свободный ^{89}Zr		1	
iTLC-SG (Agilent Technologies)	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DBN}$	0	[156]	
		Свободный ^{89}Zr $[^{89}\text{Zr}(\text{HPO}_4)_2]$		0,9

Хроматографическая система		Определяемые компоненты	R _f	Ист.		
Неподвижная фаза	Подвижная фаза					
iTLC-SG (Agilent Technologies)	50 мМ ДТПА (pH 7)	[⁸⁹ Zr]Zr -DFO-mAb (Trastuzumab)	0	[209]		
		Свободный ⁸⁹ Zr	1			
iTLC-SG (Pall Corp.)		[⁸⁹ Zr]Zr-5A10	0	[230]		
		Свободный ⁸⁹ Zr	1			
iTLC-SG (Agilent Technologies)		[⁸⁹ Zr]Zr -DFO*-pPhe-NCS	0-0,25	[101]		
		[⁸⁹ Zr]Zr -DFO-pPhe-NCS	0			
		Свободный ⁸⁹ Zr	1			
iTLC-SG		[⁸⁹ Zr]Zr -DFO-mAb (Trastuzumab)	0	[40]		
		Свободный ⁸⁹ Zr	1			
iTLC-SG (Biodex Tec-Control)		0,1М цитратный буфер (pH 5,5)	[⁸⁹ Zr]Zr -3-Hydroxy-4-Pyridinone	0	[139]	
	Свободный ⁸⁹ Zr		1			
iTLC-SG (Biodex Tec-Control)	[⁸⁹ Zr]Zr -3-Hydroxy-4-Pyridinone		0	[139]		
	Свободный ⁸⁹ Zr		1			
Silica Gel 60 (Millipore Sigma Inc.)	50 мМ ДТПА (pH 7)		[⁸⁹ Zr]Zr-DFO	0		[82]
			Свободный ⁸⁹ Zr	1		
Silica Gel 60 (Millipore Sigma Inc.)	10% (масс/об) NH ₄ OAc в H ₂ O- MeOH (1:1)		⁸⁹ Zr]Zr -DOTA	0,3		
			Свободный ⁸⁹ Zr	0		
iTLC-SG (Varian)	50 мМ ЭДТА (pH 5)	[⁸⁹ Zr]Zr-phospa-mAb (Trastuzumab)	0	[231]		
		Свободный ⁸⁹ Zr	1			
Silica Gel 60 (Sigma-Aldrich)	50 мМ ЭДТА (pH 5)	[⁸⁹ Zr]Zr -L5-mAb (Trastuzumab)	0	[232]		
		[⁸⁹ Zr]Zr -DFO-mAb (Trastuzumab)	0			
		Свободный ⁸⁹ Zr	1			
iTLC-SA (Varian)	0,1 М ЭДТА (pH 5)	[⁸⁹ Zr]Zr-DOTA	0,35-0,40	[98]		
		[⁸⁹ Zr]Zr-DOTP	0,15-0,20			
		Свободный ⁸⁹ Zr – R _f	1			

Хроматографическая система		Определяемые компоненты	R _f	Ист.
Неподвижная фаза	Подвижная фаза			
iTLC-SA (Varian)	0,1 М Н ₂ С ₂ О ₄ (рН 5)	[⁸⁹ Zr]Zr-DOTAM	0	[98]
		Свободный ⁸⁹ Zr	1	
RP-18 (Merck)	MeOH:10% NH ₄ Cl	[⁸⁹ Zr]Zr-DOTA	0,85- 0,90	
		[⁸⁹ Zr]Zr-DOTP	0,75- 0,85	
		Свободный ⁸⁹ Zr	0	
iTLC-SA (Varian)	0,5 М Na ₃ Citr (рН 4-5)	[⁸⁹ Zr]Zr-DFO	0	
		[⁸⁹ Zr]Zr-DFO- mAb (Trastuzumab)	0	
		Свободный ⁸⁹ Zr	1	
iTLC-SG (Pall Corp.)	20 mM цитратный буфер(рН 5)	⁸⁹ Zr-N-sucDf-mAb (Cetuximab)	0	[126]
		Свободный ⁸⁹ Zr	1	
iTLC-SA (Agilent Technologies)	20 mM цитратный буфер	[⁸⁹ Zr]Zr-DFO	0	[88]
		[⁸⁹ Zr]Zr -DFO-mAb (IgG)	0	
		Свободный ⁸⁹ Zr	1	
iTLC-SG (Pall Corp.)	0.9% NaCl	[⁸⁹ Zr]Zr -DFO-mAb (Panitumumab)	0	[233]
		Свободный ⁸⁹ Zr	1	
целлюлоза	н-бутанолвода- уксусная кислота (2:1:1)	[⁸⁹ Zr]Zr-DFO	0,81	[107]
		Свободный ⁸⁹ Zr	1	
		Свободный ⁸⁹ Zr	1	
Silica gel 60 (Merck)	H ₂ O:MeOH (1:1), 5% CH ₃ COONH ₄	[⁸⁹ Zr]Zr -ДТПА	0,7	[81]
		Свободный ⁸⁹ Zr	0	

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Хроматограммы образцов в различных ТСХ системах

ТСХ система	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалат	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -цитрат	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -хлорид	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFOM	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -p-Bn-NCS-DFO
50 мМ ДТПА (рН 7) ITLC-SG Метод 1					
	$R_{f \text{ свободного}} = 1$	-	-	$R_{f \text{ комплекса}} = 0$	
MeOH-H ₂ O (1:1), 4% TFA ITLC-SG Метод 2					
	$R_{f \text{ свободного}} = 1$	-	-	$R_{f \text{ комплекса}} = 1$	
0,1 М Na ₃ Сtr (рН 5) RP-18 Метод 3					
	-	$R_{f \text{ свободного}} = 1$		$R_{f \text{ комплекса}} = 0$	
MeOH-H ₂ O (1:1), 1М AcNH ₄ 5533 Метод 4					
	$R_{f \text{ свободного}} = 0$		$R_{f \text{ комплекса}} = 1^*$		-
50 мМ ЭДТА (рН 5) ITLC-SA Метод 5					
	$R_{f \text{ свободного}} = 1$	-	-	$R_{f \text{ комплекса}} = 0$	
MeOH-H ₂ O (3:1), 1% TFA ITLC-SG					
	-	-	$R_{f \text{ свободного}} = 0$	$R_{f \text{ комплекса}} = 0,8$	$R_{f \text{ комплекса}} = 1$
Ацетон-H ₂ O (7:3), 1% TFA ITLC-SG					
	-	-	$R_{f \text{ свободного}} = 0$	-	$R_{f \text{ комплекса}} = 1$

* Прим. При синтезе комплекса с использованием $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -оксалата пик характеризуется $R_f < 1$

Список литературы

1. Holland J.P., Williamson M.J., Lewis J.S. Unconventional Nuclides for Radiopharmaceuticals // *Mol. Imaging*. 2010. Vol. 9, № 1. P. 7290.2010.00008.
2. Zeglis B.M., Lewis J.S. A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography // *Dalt. Trans. Dalton Trans*, 2011. Vol. 40, № 23. P. 6168.
3. Sánchez-Crespo A., Andreo P., Larsson S.A. Positron flight in human tissues and its influence on PET image spatial resolution // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2004. Vol. 31, № 1. P. 44–51.
4. Disselhorst J.A. et al. Image-quality assessment for several positron emitters using the NEMA NU 4-2008 standards in the siemens inveon small-animal PET scanner // *J. Nucl. Med.* 2010. Vol. 51, № 4. P. 610–617.
5. Conti M., Eriksson L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: A review and a discussion // *EJNMMI Phys. EJNMMI Physics*, 2016. Vol. 3, № 1.
6. Laboratoire National Henri Becquerel [Electronic resource]. URL: <http://www.lnhb.fr/en/>.
7. Therese Soderlund A. et al. Beyond 18F-FDG: Characterization of PET/CT and PET/MR scanners for a comprehensive set of positron emitters of growing application-18F, 11C, 89Zr, 124I, 68Ga, and 90Y // *J. Nucl. Med.* 2015. Vol. 56, № 8. P. 1285–1291.
8. García A.D. et al. Pet-Compton system. Comparative evaluation with PET system using Monte Carlo simulation // *Nucleus*. 2012. № 51. P. 6–13.
9. Nuclear Structure and Decay Data Searchable Database. Nuclear Structure and Decay Data Searchable Database, National Nuclear Data Center, Brookhaven National Laboratory, USA [Electronic resource]. URL: <https://www.nndc.bnl.gov>.
10. Rösch F. et al. Radiation doses of yttrium-90 citrate and yttrium-90 EDTMP as determined via analogous yttrium-86 complexes and positron emission tomography // *Eur. J. Nucl. Med. Eur J Nucl Med*, 1996. Vol. 23, № 8. P. 958–966.
11. Audi G., Wapstra A.H., Thibault C. The Ame2003 atomic mass evaluation - (II). Tables, graphs and references // *Nucl. Phys. A. North-Holland*, 2003. Vol. 729, № 1. P. 337–676.
12. Saha G.B., Porile N.T., Yaffe L. $(p, \alpha xn)$ and $(p, \alpha pxn)$ reactions of yttrium-89 with 5-85-meV protons // *Phys. Rev. American Physical Society*, 1966. Vol. 144, № 3. P. 962–971.
13. Kandil S.A. et al. Excitation functions of (α, xn) reactions on natRb and natSr from threshold up to 26 MeV: Possibility of production of 87Y, 88Y and 89Zr // *Appl. Radiat. Isot.* 2007. Vol. 65, № 5. P. 561–568.
14. Laforest R. et al. [89Zr]Trastuzumab: Evaluation of Radiation Dosimetry, Safety, and Optimal Imaging Parameters in Women with HER2-Positive Breast Cancer // *Mol. Imaging Biol.* Springer New York LLC, 2016. Vol. 18, № 6. P. 952–959.

15. Börjesson P.K.E. et al. Radiation Dosimetry of ^{89}Zr -Labeled Chimeric Monoclonal Antibody U36 as Used for Immuno-PET in Head and Neck Cancer Patients // *J. Nucl. Med.* 2009. Vol. 50, № 11. P. 1828–1836.
16. Rizvi S.N.F. et al. Biodistribution, radiation dosimetry and scouting of ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan therapy in patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma using ^{89}Zr -ibritumomab tiuxetan and PET // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2012. Vol. 39, № 3. P. 512–520.
17. Gaykema S.B.M. et al. ^{89}Zr -bevacizumab PET imaging in primary breast cancer // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine*, 2013. Vol. 54, № 7. P. 1014–1018.
18. Gebhart G. et al. Molecular imaging as a tool to investigate heterogeneity of advanced HER2-positive breast cancer and to predict patient outcome under trastuzumab emtansine (T-DM1): the ZEPHIR trial // *Ann. Oncol. Elsevier*, 2016. Vol. 27, № 4. P. 619–624.
19. Oosting S.F. et al. ^{89}Zr -Bevacizumab PET visualizes heterogeneous tracer accumulation in tumor lesions of renal cell carcinoma patients and differential effects of antiangiogenic treatment // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine Inc.*, 2015. Vol. 56, № 1. P. 63–69.
20. Bahce I. et al. Pilot study of ^{89}Zr -bevacizumab positron emission tomography in patients with advanced non-small cell lung cancer // *EJNMMI Res. Springer Verlag*, 2014. Vol. 4, № 1. P. 1–7.
21. Nagengast W.B. et al. VEGF-PET imaging is a noninvasive biomarker showing differential changes in the tumor during sunitinib treatment // *Cancer Res.* 2011. Vol. 71, № 1. P. 143–153.
22. Dijkers E.C. et al. Biodistribution of ^{89}Zr -trastuzumab and PET Imaging of HER2-Positive Lesions in Patients with Metastatic Breast Cancer // *Clin. Pharmacol. Ther. Nature Publishing Group*, 2010. Vol. 87, № 5. P. 586–592.
23. Den Hollander M.W. et al. TGF- β antibody uptake in recurrent high-grade glioma imaged with ^{89}Zr -fresolimumab PET // *Journal of Nuclear Medicine. Society of Nuclear Medicine Inc.*, 2015. Vol. 56, № 9. P. 1310–1314.
24. Rosar F. et al. [^{89}Zr]Zr-PSMA-617 PET/CT in biochemical recurrence of prostate cancer: first clinical experience from a pilot study including biodistribution and dose estimates // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2022.
25. Uddin M.S. et al. Excitation functions of the proton induced nuclear reactions on natural zirconium // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* North-Holland, 2008. Vol. 266, № 1. P. 13–20.
26. Semkova V. et al. Neutron activation cross sections for zirconium isotopes // *Nucl. Phys. A.* North-Holland, 2010. Vol. 832, № 3–4. P. 149–169.
27. Lewis V.E., Zieba K.J. A transfer standard for d + t neutron fluence and energy // *Nucl.*

- Instruments Methods. Elsevier BV, 1980. Vol. 174, № 1–2. P. 141–144.
28. Omara H.M. et al. Proton induced reactions on ^{89}Y with particular reference to the production of the medically interesting radionuclide ^{89}Zr // *Radiochim. Acta*. 2009. Vol. 97, № 9. P. 467–471.
 29. Dabkowski A.M., Probst K., Marshall C. Cyclotron production for the radiometal Zirconium-89 with an IBA cyclone 18/9 and COSTIS solid target system (STS) // *AIP Conference Proceedings*. 2012. Vol. 1509. P. 108–113.
 30. Link J.M. et al. ^{89}Zr for antibody labeling and positron emission tomography // *J. Label. Compd. Radiopharm.* 1986. Vol. 23, № 10–1. P. 1297–1298.
 31. Link J.M., Krohn K.A., O'Hara M.J. A simple thick target for production of ^{89}Zr using an 11 MeV cyclotron // *Appl. Radiat. Isot. Elsevier*, 2017. Vol. 122. P. 211–214.
 32. Kasbollah A. et al. Review on Production of ^{89}Zr in a Medical Cyclotron for PET Radiopharmaceuticals // *J. Nucl. Med. Technol.* 2013. Vol. 41, № 1. P. 35–41.
 33. Ciarmatori A. et al. Some experimental studies on ^{89}Zr production // *Radiochim. Acta*. 2011. Vol. 99, № 10. P. 631–634.
 34. Scharli R.K. et al. Establishing reliable production of the PET isotope ^{89}Zr for research use: From target fabrication to preclinical imaging // *AIP Conf. Proc.* 2012. Vol. 1509. P. 101–107.
 35. Zweit J., Downey S., Sharma H.L. Production of no-carrier-added zirconium-89 for positron emission tomography // *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A. Appl. Radiat. Isot.* 1991. Vol. 42, № 2. P. 199–201.
 36. Kandil S.A. et al. A comparative study on the separation of radiozirconium via ion-exchange and solvent extraction techniques, with particular reference to the production of ^{88}Zr and ^{89}Zr in proton induced reactions on yttrium // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2007. Vol. 274, № 1. P. 45–52.
 37. Alnahwi A.H., Tremblay S., Guérin B. Comparative study with ^{89}Y -foil and ^{89}Y -pressed targets for the production of ^{89}Zr // *Appl. Sci.* 2018. Vol. 8, № 9. P. 1–13.
 38. Meijs W.E. et al. Production of highly pure no-carrier added ^{89}Zr for the labelling of antibodies with a positron emitter // *Appl. Radiat. Isot.* 1994. Vol. 45, № 12. P. 1143–1147.
 39. Tang Y. et al. A simple and convenient method for production of ^{89}Zr with high purity // *Appl. Radiat. Isot. Elsevier*, 2016. Vol. 118, № 29. P. 326–330.
 40. Queern S.L. et al. Production of Zr-89 using sputtered yttrium coin targets // *Nucl. Med. Biol. Elsevier Inc.*, 2017. Vol. 50. P. 11–16.
 41. Rowshanfarzad P., Jalilian A.R., Sabet M. Production and quality control of ^{65}Zn radionuclide // *Nukleonika*. 2005. Vol. 50, № 3. P. 97–103.
 42. Verel I. et al. ^{89}Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of ^{89}Zr -labeled

- monoclonal antibodies. // *J. Nucl. Med.* 2003. Vol. 44, № 8. P. 1271–1281.
43. Khandaker M.U. et al. Investigations of $^{89}\text{Y}(p,x)$ $^{86,88,89}\text{Zr}$, $^{86m+g,87g,87m,88g}\text{Y}$, ^{85g}Sr , and ^{84g}Rb nuclear processes up to 42 MeV // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* Elsevier B.V., 2012. Vol. 271. P. 72–81.
 44. Dejesus O.T., Nickles R.J. Production and purification of ^{89}Zr , a potential PET antibody label // *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A. Appl. Radiat. Isot.* 1990. Vol. 41, № 8. P. 789–790.
 45. Sharifian M., Sadeghi M., Alirezapour B. Utilization of GEANT to calculation of production yield for ^{89}Zr by charge particles interaction on ^{89}Y , natZr and natSr // *Appl. Radiat. Isot.* 2017. Vol. 127, № May. P. 161–165.
 46. M. Taghilo. Cyclotron production of ^{89}Zr : A potent radionuclide for positron emission tomography // *Int. J. Phys. Sci.* 2012. Vol. 7, № 14. P. 2156–2160.
 47. Levkovski V.N. Cross Sections of Medium Mass Nuclide Activation ($A=40\text{--}100$) by Medium Energy Protons and Alpha Particles ($E=10\text{--}50$ MeV) // *Inter-Vesi, Moscow, USSR.* 1991.
 48. Infantino A. et al. Prediction of ^{89}Zr production using the Monte Carlo code FLUKA // *Appl. Radiat. Isot.* Elsevier, 2011. Vol. 69, № 8. P. 1134–1137.
 49. Uddin M.S. et al. Experimental determination of deuteron-induced activation cross sections of yttrium // *Radiochim. Acta.* 2007. Vol. 95, № 4. P. 187–192.
 50. Manenti S., Haddad F., Groppi F. New excitation functions measurement of nuclear reactions induced by deuteron beams on yttrium with particular reference to the production of ^{89}Zr // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* Elsevier, 2019. Vol. 458, № January. P. 57–60.
 51. Lebeda O., Štursa J., Ráliš J. Experimental cross-sections of deuteron-induced reaction on ^{89}Y up to 20 MeV; comparison of $\text{natTi}(d,x)^{48}\text{V}$ and $^{27}\text{Al}(d,x)^{24}\text{Na}$ monitor reactions // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* 2015. Vol. 360. P. 118–128.
 52. Shannon R.D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides // *Acta Crystallogr. Sect. A. International Union of Crystallography,* 1976. Vol. 32, № 5. P. 751–767.
 53. Intorre B.J., Martell A.E. Aqueous Zirconium Complexes. II. Mixed Chelates // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society,* 1961. Vol. 83, № 17. P. 3618–3623.
 54. Intorre B.I., Martell A.E. Zirconium Complexes in Aqueous Solution. I. Reaction with Multidentate Ligands // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society,* 1960. Vol. 82, № 2. P. 358–364.
 55. Solovkin A.S., Tsvetkova Z.N. the Chemistry of Aqueous Solutions of Zirconium Salts (Does the Zirconyl Ion Exist?) // *Russ. Chem. Rev. Turpion-Moscow Limited,* 1962. Vol. 31, № 11. P.

- 655–669.
56. Larsen E.M. Zirconium and hafnium chemistry // *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* Academic Press, 1970. Vol. 13, № C. P. 1–133.
 57. Baglin F.G., Breger D. Identification of the zirconium sulfate species in highly acidic aqueous solutions by Raman spectroscopy // *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* Pergamon, 1976. Vol. 12, № 2. P. 173–177.
 58. Зайцев Л.М., Бочкарев Г.С. Об особенностях поведения циркониила в растворах // *Ж. неорган. химии.* 1962. Vol. 7, № 4-С. P. 795–802.
 59. Ekberg C. et al. Studies on the hydrolytic behavior of zirconium(IV) // *J. Solution Chem.* 2004. Vol. 33, № 1. P. 47–79.
 60. Benedict J.T., Schumb W.C., Coryell C.D. Distribution of Zirconium and Hafnium between Cation-exchange Resin and Acid Solutions. The Column Separation with Nitric Acid-Citric Acid Mixture // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 1954. Vol. 76, № 8. P. 2036–2040.
 61. Mayer A., Bradshaw G. The absorptiometric determination of zirconium by means of alizarin-S with special reference to magnesium alloys // *Analyst.* The Royal Society of Chemistry, 1952. Vol. 77, № 918. P. 476–483.
 62. Старик И.Е., Скульский И.А., Юртов Л.И. Состояние микроколичеств радиоэлементов в растворах. VI. Состояние № в водных растворах // *Радиохимия.* 1959. Vol. 1. P. 379–386.
 63. Sasaki T. et al. Hydrolysis constant and coordination geometry of Zirconium(IV) // *J. Nucl. Sci. Technol.* 2008. Vol. 45, № 8. P. 735–739.
 64. Kobayashi T. et al. Zirconium solubility in ternary aqueous system of Zr(IV)-OH-carboxylates // *J. Nucl. Sci. Technol.* 2009. Vol. 46, № 2. P. 142–148.
 65. Nekovár P., Schrötterová D., Mrnka M. Extraction of metal ions with a primary amine // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* Kluwer Academic Publishers, 1997. Vol. 223, № 1–2. P. 17–22.
 66. Lee M.-S., Lee H.-Y. Distribution of Zr(IV) Ion Species in Aqueous Solution // *J. Korean Inst. Resour. Recycl.* The Korean Institute of Resources Recycling, 2011. Vol. 20, № 6. P. 56–62.
 67. Ryabchikov D.I. et al. Stability of some inorganic and organic complex compounds of zirconium and hafnium // *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1964. Vol. 26, № 6. P. 965–980.
 68. Deshpande R.G. et al. The aqueous chemistry of hafnium (IV) solvent extraction and ion exchange studies // *J. Inorg. Nucl. Chem.* Pergamon, 1965. Vol. 27, № 10. P. 2171–2181.
 69. Hála J., Phanková D. Solvent extraction of hafnium(IV)-V stability of hafnium(IV) halogenocomplexes at 3·0 M ionic strength // *J. Inorg. Nucl. Chem.* Pergamon, 1967. Vol. 29, № 12. P. 2983–2995.
 70. Aja S.U., Wood S.A., Williams-Jones A.E. The aqueous geochemistry of Zr and the solubility

- of some Zr-bearing minerals // *Appl. Geochemistry*. 1995. Vol. 10, № 6. P. 603–620.
71. Thomas A.W., Owens H.S. Basic Zirconium Chloride Hydrosols // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society*, 1935. Vol. 57, № 10. P. 1825–1828.
 72. Bunney L.R. et al. Quantitative Radiochemical Analysis by Ion Exchange. Anion Exchange Behavior of Several Metal Ions in Hydrochloric, Nitric, and Sulfuric Acid Solutions // *Anal. Chem.* 1959. Vol. 31, № 3. P. 324–326.
 73. Wish L. Quantitative Radiochemical Analysis by Ion Exchange: Anion Exchange Behavior in Mixed Acid Solutions and Development of a Sequential Separation Scheme // *Anal. Chem. American Chemical Society*, 1959. Vol. 31, № 3. P. 326–330.
 74. Coleman G.H. The Radiochemistry of Plutonium // *The Radiochemistry of Plutonium*. National Academy of Sciences, 1965. Vol. 3058.
 75. Nelson F., Murase T., Kraus K.A. Ion exchange procedures. I. Cation exchange in concentration HCl and HClO₄ solutions // *J. Chromatogr. A*. 1964. Vol. 13, № C. P. 503–535.
 76. Das S.S. et al. Production and radiochemical separation of a potential immuno-PET imaging agent ⁸⁹Zr from proton irradiated natY target // *J. Radioanal. Nucl. Chem. Springer Netherlands*, 2017. Vol. 313, № 3. P. 641–645.
 77. Ivanov P.I. et al. Cyclotron production and radiochemical purification of ^{88,89}Zr via α -particle induced reactions on natural strontium // *Appl. Radiat. Isot. Elsevier*, 2014. Vol. 90. P. 261–264.
 78. O'Hara M.J. et al. Optimized anion exchange column isolation of zirconium-89 (⁸⁹Zr) from yttrium cyclotron target: Method development and implementation on an automated fluidic platform // *J. Chromatogr. A. Elsevier B.V.*, 2018. Vol. 1545. P. 48–58.
 79. O'Hara M.J. et al. Tandem column isolation of zirconium-89 from cyclotron bombarded yttrium targets using an automated fluidic platform: Anion exchange to hydroxamate resin columns // *J. Chromatogr. A. Elsevier B.V.*, 2018. Vol. 1567. P. 37–46.
 80. Holland J.P., Sheh Y., Lewis J.S. Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89 // *Nucl. Med. Biol. Elsevier Inc.*, 2009. Vol. 36, № 7. P. 729–739.
 81. Severin G.W. et al. The impact of weakly bound ⁸⁹Zr on preclinical studies: Non-specific accumulation in solid tumors and aspergillus infection // *Nucl. Med. Biol. Elsevier Inc.*, 2015. Vol. 42, № 4. P. 360–368.
 82. Graves S.A. et al. Evaluation of a chloride-based ⁸⁹Zr isolation strategy using a tributyl phosphate (TBP)-functionalized extraction resin // *Nucl. Med. Biol. Elsevier Inc.*, 2018. Vol. 64–65. P. 1–7.
 83. Dutta B., Maiti M., Lahiri S. Production of ^{88,89}Zr by proton induced activation of natY and separation by SLX and LLX // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2009. Vol. 281, № 3. P. 663–667.
 84. Lahiri S., Mukhopadhyay B., Das N.R. Simultaneous production of ⁸⁹Zr and ^{90,91m,92m}Nb in

- α -particle activated yttrium and their subsequent separation by HDEHP // *Appl. Radiat. Isot.* 1997. Vol. 48, № 7. P. 883–886.
85. Lahiri S., Mukhopadhyay B., Das N.R. Simultaneous production of ^{89}Zr and $^{90,91\text{m}}\text{Zr}$ in α -particle activated yttrium and their subsequent separation by TOA // *J. Radioanal. Nucl. Chem. Akadémiai Kiadó*, co-published with Springer Science+ Business Media BV..., 1997. Vol. 218, № 2. P. 229–231.
 86. Baroncelli F., Grossi G. The complexing power of hydroxamic acids and its effect on the behaviour of organic extractants in the reprocessing of irradiated fuels-I the complexes between benzohydroxamic acid and zirconium, iron (III) and uranium (VI) // *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1965. Vol. 27, № 5. P. 1085–1092.
 87. Guérard F. et al. Investigation of Zr(IV) and ^{89}Zr (IV) complexation with hydroxamates: Progress towards designing a better chelator than desferrioxamine B for immuno-PET imaging // *Chem. Commun.* 2013. Vol. 49, № 10. P. 1002–1004.
 88. Lin M. et al. Semi-automated production of ^{89}Zr -oxalate/ ^{89}Zr -chloride and the potential of ^{89}Zr -chloride in radiopharmaceutical compounding // *Appl. Radiat. Isot.* Elsevier, 2016. Vol. 107. P. 317–322.
 89. Wooten A. et al. Routine Production of ^{89}Zr Using an Automated Module // *Appl. Sci.* 2013. Vol. 3, № 3. P. 593–613.
 90. O'Hara M.J. et al. Hydroxamate column-based purification of zirconium-89 (^{89}Zr) using an automated fluidic platform // *Appl. Radiat. Isot.* 2018. Vol. 132, № April 2017. P. 85–94.
 91. Pandey M.K. et al. Improved production and processing of ^{89}Zr using a solution target // *Nucl. Med. Biol.* Elsevier Inc., 2016. Vol. 43, № 1. P. 97–100.
 92. Interational T. Product sheet [Electronic resource]. URL: <https://www.triskem-international.com>.
 93. Dirks C. et al. on the Characterisation of an Hydroxamate Based Extraction Chromatographic Resin // Presented at the 61st RRMC. 2015. P. 35170.
 94. Kazakov A.G. et al. Separation of ^{89}Zr from irradiated yttrium targets by extraction chromatography // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* Springer International Publishing, 2018. Vol. 317, № 1. P. 605–611.
 95. Guth S. et al. Toxicity of fluoride: critical evaluation of evidence for human developmental neurotoxicity in epidemiological studies, animal experiments and in vitro analyses // *Arch. Toxicol.* 2020. Vol. 94, № 5. P. 1375–1415.
 96. Ellison P.A. et al. Spot-welding solid targets for high current cyclotron irradiation // *Appl. Radiat. Isot.* Elsevier, 2016. Vol. 118, № September. P. 350–353.
 97. Pandey M.K. et al. Production of ^{89}Zr via the $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ reaction in aqueous solution: Effect

- of solution composition on in-target chemistry // *Nucl. Med. Biol.* Elsevier Inc., 2014. Vol. 41, № 4. P. 309–316.
98. Pandya D.N. et al. Zirconium tetraazamacrocyclic complexes display extraordinary stability and provide a new strategy for zirconium-89-based radiopharmaceutical development // *Chem. Sci.* Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 8, № 3. P. 2309–2314.
99. Imura R. et al. Re-Evaluations of Zr-DFO complex coordination chemistry for the estimation of radiochemical yields and chelator-to-antibody ratios of ⁸⁹Zr Immune-PET tracers // *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 16. P. 4977.
100. Imura R. et al. Radiolabeling of PSMA-617 with ⁸⁹Zr: A novel use of DMSO to improve radiochemical yield and preliminary small-animal PET results // *Nucl. Med. Biol.* Elsevier, 2022. Vol. 106–107. P. 21–28.
101. Vugts D.J. et al. Comparison of the octadentate bifunctional chelator DFO*-pPhe-NCS and the clinically used hexadentate bifunctional chelator DFO-pPhe-NCS for ⁸⁹Zr-immuno-PET // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2017. Vol. 44, № 2. P. 286–295.
102. Vosjan M.J.W.D. et al. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine // *Nat. Protoc.* Nature Publishing Group, 2010. Vol. 5, № 4. P. 739–743.
103. Pandya D.N. et al. ⁸⁹Zr-Chloride Can Be Used for Immuno-PET Radiochemistry Without Loss of Antigen Reactivity In Vivo // *J. Nucl. Med.* 2019. Vol. 60, № 5. P. 696–701.
104. Pozhidaev A.I., Porai-Koshits M.A., Polynova T.N. Crystal structure of zirconium ethylenediaminetetraacetate tetrahydrate // *J. Struct. Chem.* Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 1974. Vol. 15, № 4. P. 548–553.
105. Ilyukhin A.B. et al. Eightfold-coordinated diethylenetriaminepentaacetates: Crystal structures of $K[M(Dtpa)] \cdot 3H_2O$ ($M = Zr$ or Hf) and $NH_4[Sn(Dtpa)] \cdot H_2O$ // *Crystallogr. Reports*. Maik Nauka-Interperiodica Publishing, 2000. Vol. 45, № 1. P. 39–43.
106. Friend M.T., Wall N.A. Stability constants for Zirconium(IV) complexes with EDTA, CDTA, and DTPA in perchloric acid solutions // *Inorganica Chim. Acta.* Elsevier, 2019. Vol. 484. P. 357–367.
107. Meijs W.E. et al. Evaluation of desferal as a bifunctional chelating agent for labeling antibodies with Zr-89 // *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A. Appl. Radiat. Isot.* 1992. Vol. 43, № 12. P. 1443–1447.
108. Bickel H. et al. Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine, und ihre Antagonisten, die eisenhaltigen Antibiotika Sideromycine // *Experientia*. 1960. Vol. 16, № 4. P. 129–133.
109. Holland J.P. et al. ⁸⁹Zr-DFO-J591 for ImmunoPET of Prostate-Specific Membrane Antigen Expression In Vivo // *J. Nucl. Med.* 2010. Vol. 51, № 8. P. 1293–1300.

110. Holland J.P. Predicting the Thermodynamic Stability of Zirconium Radiotracers // *Inorg. Chem.* 2020. Vol. 59, № 3. P. 2070–2082.
111. Racow E.E. et al. General Approach to Direct Measurement of the Hydration State of Coordination Complexes in the Gas Phase: Variable Temperature Mass Spectrometry // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society*, 2019. Vol. 141, № 37. P. 14650–14660.
112. Summers K.L. et al. Structural Characterization of the Solution Chemistry of Zirconium(IV) Desferrioxamine: A Coordination Sphere Completed by Hydroxides // *Inorg. Chem.* 2020. Vol. 59, № 23. P. 17443–17452.
113. Toporivska Y., Gumienna-Kontecka E. The solution thermodynamic stability of desferrioxamine B (DFO) with Zr(IV) // *J. Inorg. Biochem. Elsevier*, 2019. Vol. 198. P. 110753.
114. Savastano M. et al. Tales of the Unexpected: The Case of Zirconium(IV) Complexes with Desferrioxamine // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 11. P. 2098.
115. Savastano M., Boscaro F., Bianchi A. Metal Coordination Properties of a Chromophoric Desferrioxamine (DFO) Derivative: Insight on the Coordination Stoichiometry and Thermodynamic Stability of Zr⁴⁺ Complexes // *Molecules*. 2021. Vol. 27, № 1. P. 184.
116. Price E.W., Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals // *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43, № 1. P. 260–290.
117. Mealey J. Turn-over of carrier-free zirconium-89 in man // *Nature. Nature Publishing Group*, 1957. Vol. 179, № 4561. P. 673–674.
118. Zhong W. et al. Unusual features for zirconium(IV) binding to human serum transferrin // *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 2002. Vol. 7, № 6. P. 589–599.
119. Deri M.A. et al. PET imaging with ⁸⁹Zr: From radiochemistry to the clinic // *Nucl. Med. Biol. Elsevier Inc.*, 2013. Vol. 40, № 1. P. 3–14.
120. Bhatt N., Pandya D., Wadas T. Recent Advances in Zirconium-89 Chelator Development // *Molecules*. 2018. Vol. 23, № 3. P. 638.
121. Marquez-Nostra B. V., Viola N. The Radiopharmaceutical Chemistry of Zirconium-89 // *Radiopharmaceutical Chemistry / ed. Lewis J.S., Windhorst A.D., Zeglis B.M. Springer, Cham*, 2019. P. 371–390.
122. Perk L.R. et al. p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2010. Vol. 37, № 2. P. 250–259.
123. Knight J.C. et al. Scaling-down antibody radiolabeling reactions with zirconium-89 // *Dalt. Trans.* 2016. Vol. 45, № 15. P. 6343–6347.
124. Bhatt N.B. et al. A comprehensively revised strategy that improves the specific activity and long-term stability of clinically relevant ⁸⁹Zr-immuno-PET agents // *Dalt. Trans.* 2018. Vol.

- 47, № 37. P. 13214–13221.
125. Viola-Villegas N.T. et al. Applying PET to Broaden the Diagnostic Utility of the Clinically Validated CA19.9 Serum Biomarker for Oncology // *J. Nucl. Med.* 2013. Vol. 54, № 11. P. 1876–1882.
126. Perk L.R. et al. ⁸⁹Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab // *J. Nucl. Med.* 2005. Vol. 46, № 11. P. 1898–1906.
127. Oude Munnink T.H. et al. ⁸⁹Zr-trastuzumab PET visualises HER2 downregulation by the HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in a human tumour xenograft // *Eur. J. Cancer.* 2010. Vol. 46, № 3. P. 678–684.
128. Nayak T.K. et al. PET and MRI of metastatic peritoneal and pulmonary colorectal cancer in mice with human epidermal growth factor receptor 1-targeted ⁸⁹Zr- labeled panitumumab // *J. Nucl. Med.* 2012. Vol. 53, № 1. P. 113–120.
129. Meijs W.E. et al. Zirconium-labeled monoclonal antibodies and their distribution in tumor-bearing nude mice. // *J. Nucl. Med.* 1997. Vol. 38, № 1. P. 112–118.
130. Abou D.S., Ku T., Smith-Jones P.M. In vivo biodistribution and accumulation of ⁸⁹Zr in mice // *Nucl. Med. Biol. Elsevier Inc.*, 2011. Vol. 38, № 5. P. 675–681.
131. Бубенщиков В., Ларенков А. Хелатирующие агенты для циркония-89 в синтезе радиофармацевтических препаратов: текущее состояние и перспективы развития // *Координационная химия.* 2022. Vol. 48, № 11. P. 647–668.
132. Raavé R. et al. Additional information on “Direct comparison of the in vitro and in vivo stability of DFO, DFO* and DFOcyclo* for ⁸⁹Zr-immunoPET” // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2020. Vol. 47, № 2. P. 505–506.
133. Briand M. et al. A solid phase-assisted approach for the facile synthesis of a highly water-soluble zirconium-89 chelator for radiopharmaceutical development // *Dalt. Trans.* 2017. Vol. 46, № 47. P. 16387–16389.
134. Richardson-Sanchez T. et al. Exploiting the biosynthetic machinery of: *Streptomyces pilosus* to engineer a water-soluble zirconium(IV) chelator // *Org. Biomol. Chem. Royal Society of Chemistry*, 2017. Vol. 15, № 27. P. 5719–5730.
135. Brown C.J.M., Gotsbacher M.P., Codd R. Improved Access to Linear Tetrameric Hydroxamic Acids with Potential as Radiochemical Ligands for Zirconium(iv)-89 PET Imaging // *Aust. J. Chem.* 2020. Vol. 73, № 10. P. 969–978.
136. Brandt M. et al. Radiolabelling of the octadentate chelators DFO* and oxoDFO* with zirconium-89 and gallium-68 // *JBIC J. Biol. Inorg. Chem. Springer Berlin Heidelberg*, 2020.

- Vol. 25, № 5. P. 789–796.
137. White D.L. et al. Specific sequestering agents for the actinides. 16. synthesis and initial biological testing of polydentate oxohydroxypyridinecarboxylate ligands // *J. Med. Chem. American Chemical Society*, 1988. Vol. 31, № 1. P. 11–18.
 138. Deri M.A. et al. P-SCN-Bn-HOPO: A Superior Bifunctional Chelator for ⁸⁹Zr ImmunoPET // *Bioconjug. Chem. American Chemical Society*, 2015. Vol. 26, № 12. P. 2579–2591.
 139. Buchwalder C. et al. A new tetrapodal 3-hydroxy-4-pyridinone ligand for complexation of ⁸⁹zirconium for positron emission tomography (PET) imaging // *Dalt. Trans.* 2017. Vol. 46, № 29. P. 9654–9663.
 140. Buchwalder C. et al. Evaluation of the Tetrakis(3-Hydroxy-4-Pyridinone) Ligand THPN with Zirconium(IV): Thermodynamic Solution Studies, Bifunctionalization, and in Vivo Assessment of Macromolecular ⁸⁹ Zr-THPN-Conjugates // *Inorg. Chem.* 2019. Vol. 58, № 21. P. 14667–14681.
 141. Pandya D.N. et al. Polyazamacrocyclic Ligands Facilitate ⁸⁹Zr Radiochemistry and Yield ⁸⁹Zr Complexes with Remarkable Stability // *Inorg. Chem.* 2020. Vol. 59, № 23. P. 17473–17487.
 142. Seibold U., Wängler B., Wängler C. Rational Design, Development, and Stability Assessment of a Macrocyclic Four-Hydroxamate-Bearing Bifunctional Chelating Agent for ⁸⁹Zr // *ChemMedChem. John Wiley and Sons Ltd*, 2017. Vol. 12, № 18. P. 1555–1571.
 143. Cho H. et al. A comparison of DFO and DFO* conjugated to trastuzumab-DM1 for complexing ⁸⁹Zr – In vitro stability and in vivo microPET/CT imaging studies in NOD/SCID mice with HER2-positive SK-OV-3 human ovarian cancer xenografts // *Nucl. Med. Biol.* 2020. Vol. 84–85. P. 11–19.
 144. Chomet M. et al. Head-to-head comparison of DFO* and DFO chelators: selection of the best candidate for clinical ⁸⁹Zr-immuno-PET // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2021. Vol. 48, № 3. P. 694–707.
 145. Roy J. et al. In Vitro and in Vivo Comparison of 3,2-HOPO Versus Deferoxamine-Based Chelation of Zirconium-89 to the Antimesothelin Antibody Anetumab // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2021. Vol. 36, № 4. P. 316–325.
 146. Damerow H. et al. Side-by-Side Comparison of Five Chelators for ⁸⁹Zr-Labeling of Biomolecules: Investigation of Chemical/Radiochemical Properties and Complex Stability // *Cancers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 24. P. 6349.
 147. Блюменталь У.Б. Химия циркония / ed. под ред. Комиссаровой ЛН С.В. Москва: Издательство иностранной литературы, 1963. 345 p.
 148. Bates J.I., Lewey F.H., Reiners C.R. The reaction of cerebral tissue to silver, tantalum, and zirconium: a discussion of the use of these metals for hemostatic brain clips // *J. Neurosurg.*

- Journal of Neurosurgery Publishing Group, 1948. Vol. 5, № 4. P. 349–353.
149. Richet C., Gardner G. No Title // *Compt. rend.* 1925. Vol. 181. P. 1105–1106.
 150. Blumenthal W.B., Leonard C.S. An Investigation of the Physiological and Therapeutic Properties of Zirconium Compounds // Report to the 12th International Congress of Pure and Applied Chemistry. 1951.
 151. E. W.L. No Title // *Wiener Arch. inn. Med.* 1931. Vol. 21. P. 169—189.
 152. Schubert J. (1947). T. of plutonium poisoning by metal displacement (Vol. 595). U.A.E.C. Treatment of plutonium poisoning by metal displacement // *Science*. 1947. Vol. 105. P. 389–390.
 153. Hunter S.W., Miree J., Bloch H. Compounds of zirconium for x-ray media // *Surgery*. Elsevier, 1949. Vol. 26, № 4. P. 682–684.
 154. Meijs W.E. et al. A facile method for the labeling of proteins with zirconium isotopes // *Nucl. Med. Biol.* 1996. Vol. 23, № 4. P. 439–448.
 155. Park J.A. et al. Evaluation of [^{89}Zr]-oxalate as a PET tracer in inflammation, tumor, and rheumatoid arthritis models // *Mol. Pharm.* American Chemical Society, 2016. Vol. 13, № 7. P. 2571–2577.
 156. Bansal A. et al. Novel ^{89}Zr cell labeling approach for PET-based cell trafficking studies // *EJNMMI Res.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 1–11.
 157. Jauw Y.W.S. et al. Immuno-positron emission tomography with zirconium-89-labeled monoclonal antibodies in oncology: What can we learn from initial clinical trials? // *Front. Pharmacol.* 2016. Vol. 7. P. 131.
 158. Zeglis B.M., Lewis J.S. The Bioconjugation and Radiosynthesis of ^{89}Zr -DFO-labeled Antibodies // *J. Vis. Exp.* 2015. № 96. P. 1–8.
 159. van de Watering F.C.J. et al. Zirconium-89 Labeled Antibodies: A New Tool for Molecular Imaging in Cancer Patients // *Biomed Res. Int.* 2014. Vol. 2014. P. 1–13.
 160. Lamberts L.E. et al. Antibody Positron Emission Tomography Imaging in Anticancer Drug Development // *J. Clin. Oncol.* 2015. Vol. 33, № 13. P. 1491–1504.
 161. Börjesson P.K.E. et al. Performance of Immuno–Positron Emission Tomography with Zirconium-89-Labeled Chimeric Monoclonal Antibody U36 in the Detection of Lymph Node Metastases in Head and Neck Cancer Patients // *Clin. Cancer Res.* American Association for Cancer Research, 2006. Vol. 12, № 7. P. 2133–2140.
 162. Dijkers E.C.F. et al. Development and characterization of clinical-grade ^{89}Zr - trastuzumab for HER2/neu immunoPET imaging // *J. Nucl. Med.* 2009. Vol. 50, № 6. P. 974–981.
 163. ClinicalTrials.gov [Electronic resource]. URL: <http://www.clinicaltrials.gov>.
 164. Gaykema S.B.M. et al. ^{89}Zr -trastuzumab and ^{89}Zr -bevacizumab PET to evaluate the effect of the HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in metastatic breast cancer patients // *Clin. Cancer Res.*

2014. Vol. 20, № 15. P. 3945–3954.
165. Ulaner G.A. et al. Detection of HER2-positive metastases in patients with HER2-negative primary breast cancer using ^{89}Zr -trastuzumab PET/CT // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine Inc.*, 2016. Vol. 57, № 10. P. 1523–1528.
 166. Dehdashti F. et al. Evaluation of [^{89}Zr]trastuzumab-PET/CT in differentiating HER2-positive from HER2-negative breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat. Springer New York LLC*, 2018. Vol. 169, № 3. P. 523–530.
 167. Ulaner G.A. et al. ^{89}Zr -Trastuzumab PET/CT for Detection of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Metastases in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Primary Breast Cancer // *Clin. Nucl. Med. Lippincott Williams and Wilkins*, 2017. Vol. 42, № 12. P. 912–917.
 168. Menke-van der Houven van Oordt C.W. et al. ^{89}Zr -cetuximab PET imaging in patients with advanced colorectal cancer // *Oncotarget. Impact Journals LLC*, 2015. Vol. 6, № 30. P. 30384–30393.
 169. Pandit-Taskar N. et al. ^{89}Zr -huJ591 immuno-PET imaging in patients with advanced metastatic prostate cancer // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. springer berlin*, 2014. Vol. 41, № 11. P. 2093–2105.
 170. Pandit-Taskar N. et al. A Phase I/II Study for Analytic Validation of ^{89}Zr -J591 ImmunoPET as a Molecular Imaging Agent for Metastatic Prostate Cancer // *Clin. Cancer Res. American Association for Cancer Research Inc.*, 2015. Vol. 21, № 23. P. 5277–5285.
 171. Carrasquillo J.A. et al. Imaging patients with metastatic castration-resistant prostate cancer using ^{89}Zr -DFO-MSTP2109A anti-STEAP1 antibody // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine Inc.*, 2019. Vol. 60, № 11. P. 1517–1523.
 172. O’Donoghue J.A. et al. Pharmacokinetics and biodistribution of a [^{89}Zr]Zr-DFO-MSTP2109A Anti-STEAP1 antibody in metastatic castration-resistant prostate cancer patients // *Mol. Pharm. American Chemical Society*, 2019. Vol. 16, № 7. P. 3083–3090.
 173. Lamberts L.E. et al. ImmunoPET with Anti-Mesothelin Antibody in Patients with Pancreatic and Ovarian Cancer before Anti-Mesothelin Antibody–Drug Conjugate Treatment // *Clin. Cancer Res. American Association for Cancer Research Inc.*, 2016. Vol. 22, № 7. P. 1642–1652.
 174. Muylle K. et al. Tumour targeting and radiation dose of radioimmunotherapy with ^{90}Y -rituximab in CD20+ B-cell lymphoma as predicted by ^{89}Zr -rituximab immuno-PET: impact of preloading with unlabelled rituximab // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. Springer Berlin Heidelberg*, 2015. Vol. 42, № 8. P. 1304–1314.
 175. Van Asselt S.J. et al. Everolimus reduces ^{89}Zr -bevacizumab tumor uptake in patients with

- neuroendocrine tumors // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine Inc.*, 2014. Vol. 55, № 7. P. 1087–1092.
176. Pandit-Taskar N. et al. First-in-Humans Imaging with ^{89}Zr -Df-IAB22M2C Anti-CD8 Minibody in Patients with Solid Malignancies: Preliminary Pharmacokinetics, Biodistribution, and Lesion Targeting // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine*, 2020. Vol. 61, № 4. P. 512–519.
177. Willemien Menke-Van Der Houven Van Oordt C. et al. Immuno-PET imaging to assess target engagement: Experience from ^{89}Zr -anti-HER3 mAb (GSK2849330) in patients with solid tumors // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine Inc.*, 2019. Vol. 60, № 7. P. 902–909.
178. Ulaner G.A. et al. CD38-targeted Immuno-PET of Multiple Myeloma: From Xenograft Models to First-in-Human Imaging // *Radiology*. 2020. Vol. 295, № 3. P. 606–615.
179. Bauman A. et al. Development of ^{68}Ga - and ^{89}Zr -Labeled Exendin-4 as Potential Radiotracers for the Imaging of Insulinomas by PET // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine Inc.*, 2015. Vol. 56, № 10. P. 1569–1574.
180. Kuda-Wedagedara A.N.W. et al. ^{89}Zr -Cobalamin PET Tracer: Synthesis, Cellular Uptake, and Use for Tumor Imaging // *ACS Omega*. American Chemical Society, 2017. Vol. 2, № 10. P. 6314–6320.
181. Heneweer C. et al. Magnitude of enhanced permeability and retention effect in tumors with different phenotypes: ^{89}Zr -albumin as a model system // *J. Nucl. Med.* 2011. Vol. 52, № 4. P. 625–633.
182. Zeglis B.M. et al. Underscoring the influence of inorganic chemistry on nuclear imaging with radiometals // *Inorg. Chem.* 2014. Vol. 53, № 4. P. 1880–1899.
183. Holland J.P. et al. Annotating MYC status with ^{89}Zr -transferrin imaging // *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 18, № 10. P. 1586–1591.
184. Jacobson O. et al. MicroPET imaging of integrin $\alpha v\beta 3$ expressing tumors using ^{89}Zr -RGD peptides // *Mol. Imaging Biol.* Springer, 2011. Vol. 13, № 6. P. 1224–1233.
185. Vosjan M.J.W.D. et al. Nanobodies Targeting the Hepatocyte Growth Factor: Potential New Drugs for Molecular Cancer Therapy // *Mol. Cancer Ther.* 2012. Vol. 11, № 4. P. 1017–1025.
186. Hoeben B.A.W. et al. PET of hypoxia with ^{89}Zr -labeled cG250-F(ab')₂ in head and neck tumors // *J. Nucl. Med.* 2010. Vol. 51, № 7. P. 1076–1083.
187. Sham J.G. et al. Glypican-3-Targeting F(ab')₂ for ^{89}Zr PET of Hepatocellular Carcinoma // *J. Nucl. Med.* 2014. Vol. 55, № 12. P. 2032–2037.
188. Viola-Villegas N.T. et al. Noninvasive imaging of PSMA in prostate tumors with ^{89}Zr -Labeled huJ591 engineered antibody fragments: The faster alternatives // *Mol. Pharm.* 2014. Vol. 11, № 11. P. 3965–3973.

189. Richter A. et al. First In-Human Medical Imaging with a PASylated ^{89}Zr -Labeled Anti-HER2 Fab-Fragment in a Patient with Metastatic Breast Cancer // *Nucl. Med. Mol. Imaging* (2010). *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2020. Vol. 54, № 2. P. 114–119.
190. Mendler C.T. et al. ^{89}Zr -Labeled Versus ^{124}I -Labeled αHER2 Fab with Optimized Plasma Half-Life for High-Contrast Tumor Imaging In Vivo // *J. Nucl. Med.* 2015. Vol. 56, № 7. P. 1112–1118.
191. Heuveling D.A. et al. ^{89}Zr -nanocolloidal albumin-based PET/CT lymphoscintigraphy for sentinel node detection in head and neck cancer: Preclinical results // *J. Nucl. Med.* 2011. Vol. 52, № 10. P. 1580–1584.
192. Heuveling D.A. et al. Pilot study on the feasibility of PET/CT lymphoscintigraphy with ^{89}Zr -nanocolloidal albumin for sentinel node identification in oral cancer patients // *J. Nucl. Med.* 2013. Vol. 54, № 4. P. 585–589.
193. Avila-Rodriguez M.A. et al. Positron-emitting resin microspheres as surrogates of ^{90}Y SIR-Spheres: a radiolabeling and stability study // *Nucl. Med. Biol.* 2007. Vol. 34, № 5. P. 585–590.
194. McDevitt M. et al. Imaging and treating tumor vasculature with targeted radiolabeled carbon nanotubes // *Int. J. Nanomedicine*. 2010. Vol. 5, № 1. P. 783.
195. Abou D.S. et al. ^{89}Zr -Labeled Paramagnetic Octreotide-Liposomes for PET-MR Imaging of Cancer // *Pharm. Res.* 2013. Vol. 30, № 3. P. 878–888.
196. Sato N. et al. ^{89}Zr -Oxine Complex PET Cell // *Radiology*. 2015. Vol. 275, № 2. P. 490–500.
197. Charoenphun P. et al. [^{89}Zr]Oxinate4 for long-term in vivo cell tracking by positron emission tomography // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2015. Vol. 42, № 2. P. 278–287.
198. Patrick P.S. et al. ^{89}Zr -oxine labelling and PET imaging shows lung delivery of a cell/gene cancer therapy // *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2019. P. 736967.
199. Patrick P.S. et al. Lung delivery of MSCs expressing anti-cancer protein TRAIL visualised with ^{89}Zr -oxine PET-CT // *Stem Cell Res. Ther. Stem Cell Research & Therapy*, 2020. Vol. 11, № 1. P. 256.
200. Asiedu K.O. et al. Bone marrow cell trafficking analyzed by ^{89}Zr -oxine positron emission tomography in a murine transplantation model // *Clin. Cancer Res.* 2017. Vol. 23, № 11. P. 2759–2768.
201. Asiedu K.O. et al. Bone marrow cell homing to sites of acute tibial fracture: ^{89}Zr -oxine cell labeling with positron emission tomographic imaging in a mouse model // *EJNMMI Res. EJNMMI Research*, 2018. Vol. 8.
202. Weist M.R. et al. PET of adoptively transferred chimeric antigen receptor T Cells with ^{89}Zr -Oxine // *J. Nucl. Med.* 2018. Vol. 59, № 10. P. 1531–1537.
203. Man F. et al. In Vivo PET Tracking of ^{89}Zr -Labeled $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ T Cells to Mouse Xenograft

- Breast Tumors Activated with Liposomal Alendronate // *Mol. Ther.* 2019. Vol. 27, № 1. P. 219–229.
204. Sato N. et al. In Vivo Tracking of Adoptively Transferred Natural Killer Cells in Rhesus Macaques Using ^{89}Zr -Oxine Cell Labeling and PET Imaging // *Clin. Cancer Res.* 2020.
205. Liu Y. et al. Evidence of Accumulated Endothelial Progenitor Cells in the Lungs of Rats with Pulmonary Arterial Hypertension by ^{89}Zr -oxine PET Imaging // *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* Elsevier Ltd., 2020. Vol. 17, № June. P. 1108–1117.
206. Gawne P.J. et al. PET imaging of liposomal glucocorticoids using ^{89}Zr -oxine: Theranostic applications in inflammatory arthritis // *Theranostics*. Ivyspring International Publisher, 2020. Vol. 10, № 9. P. 3867–3879.
207. Lobatto M.E. et al. Multimodal Positron Emission Tomography Imaging to Quantify Uptake of ^{89}Zr -Labeled Liposomes in the Atherosclerotic Vessel Wall // *Bioconjug. Chem.* American Chemical Society, 2020. Vol. 31, № 2. P. 360–368.
208. Socan A. et al. On-cartridge preparation and evaluation of ^{68}Ga -, ^{89}Zr - and ^{64}Cu -precursors for cell radiolabelling // *Nucl. Med. Biol.* 2019. Vol. 71. P. 23–31.
209. Dias G.M. Evaluation of cyclotron produced radiometals for radiolabeling of immuno- and bio-conjugates for nuclear imaging. University of British Columbia, 2017.
210. Lurie J. Handbook of analytical chemistry. M.: Chemistry, 1965. 390 p.
211. Schmuckler G. Chelating resins-their analytical properties and applications // *Talanta*. 1965. Vol. 12, № 3. P. 281–290.
212. El-Sweify F.H. Sorption and separation of some elements of nuclear importance using Chelex-100 // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 1997. Vol. 222, № 1–2. P. 55–59.
213. El-Sweify F.H. et al. Distribution of some actinides and fission products between the chelating ion exchanger chelex-100 and certain carboxylic acid solutions // *Radiochim. Acta*. 1985. Vol. 38, № 4. P. 211–214.
214. Hitchcock D.I., Dougan R.B. Freezing points of anti-coagulant salt solutions // *J. Gen. Physiol.* The Rockefeller University Press, 1935. Vol. 18, № 4. P. 485–490.
215. Leendertz G., Gromelski B. Zwei neue Methoden zur Fibrinogenbestimmung. Eiweißbestimmungen in Salzplasma. Zugleich ein Beitrag zur Frage der Brauchbarkeit von Serum zu quantitativen Blutuntersuchungen // *Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie*. Springer-Verlag, 1922. Vol. 94, № 1–2. P. 114–123.
216. Von Burg R. Oxalic acid and sodium oxalate // *J. Appl. Toxicol.* 1994. Vol. 14, № 3. P. 233–237.
217. Sasano K.T., Ordway W.H., Medlar E.M. A Study of Certain Factors which Influence the

- Sedimentation Rates of Erythrocytes with Especial Emphasis Upon the Effect of Temperature // *Am. J. Clin. Pathol.* 1936. Vol. 6, № 5. P. 432–443.
218. Клементьева О.Е. et al. Доклинические исследования лекарственного средства, предназначенного для долгосрочного мониторинга патологических изменений опорно-двигательного аппарата методом позитронно-эмиссионной томографии на основе циркония-89. Москва, 2019. 30 p.
219. Larenkov A. et al. Evaluation of ^{89}Zr Complexes With Dicarboxylic Acids for PET-Diagnosis of Inflammatory Processes and Metabolic Skeletal Disorders // *European journal of nuclear medicine and molecular imaging.* 2017. Vol. 44. P. S554--S555.
220. Larenkov A. et al. Preparation of Zirconium-89 Solutions for Radiopharmaceutical Purposes: Interrelation Between Formulation, Radiochemical Purity, Stability and Biodistribution // *Molecules.* 2019. Vol. 24, № 8. P. 1534.
221. Vázquez S.M. et al. Translational Development of a Zr-89-Labeled Inhibitor of Prostate-specific Membrane Antigen for PET Imaging in Prostate Cancer // *Mol. Imaging Biol. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH,* 2022. Vol. 24, № 1. P. 115–125.
222. Dietlein F. et al. An ^{89}Zr -Labeled PSMA Tracer for PET/CT Imaging of Prostate Cancer Patients // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine,* 2022. Vol. 63, № 4. P. 573–583.
223. Privé B.M. et al. ^{89}Zr -labeled PSMA ligands for pharmacokinetic PET imaging and dosimetry of PSMA-617 and PSMA-I&T: a preclinical evaluation and first in man // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH,* 2022. Vol. 49, № 6. P. 2064–2076.
224. Baur B. et al. Synthesis and labelling of Df-DUPA-Pep with gallium-68 and zirconium-89 as new PSMA ligands // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2014. Vol. 299, № 3. P. 1715–1721.
225. Deri M.A. Zirconium-89: Radiochemistry and Ligand Development toward Improved PET Applications. 2015.
226. Kasbollah A. Zirconium-89 for positron emission tomography and hydroxamate resin column for gallium-68 generator. 2013. № July.
227. Li N. et al. A generic ^{89}Zr labeling method to quantify the in vivo pharmacokinetics of liposomal nanoparticles with positron emission tomography // *Int. J. Nanomedicine. Dove Medical Press Ltd.,* 2017. Vol. Volume 12. P. 3281–3294.
228. Bhatt N.B. et al. Evaluation of macrocyclic hydroxyisophthalamide ligands as chelators for zirconium-89 // *PLoS One.* 2017. Vol. 12, № 6. P. e0178767.
229. Tinianow J.N. et al. Evaluation of a 3-hydroxypyridin-2-one (2,3-HOPO) based macrocyclic chelator for $^{89}\text{Zr}^{4+}$ and its use for immunoPET imaging of HER2 positive model of ovarian carcinoma in mice // *Theranostics. Ivyspring International Publisher,* 2016. Vol. 6, № 4. P. 511–

- 521.
230. Ulmert D. et al. Imaging Androgen Receptor Signaling with a Radiotracer Targeting Free Prostate-Specific Antigen // *Cancer Discov.* 2012. Vol. 2, № 4. P. 320–327.
231. Price E.W. et al. H 6 phospha-trastuzumab: bifunctional methylenephosphonate-based chelator with ^{89}Zr , ^{111}In and ^{177}Lu // *Dalt. Trans. The Royal Society of Chemistry*, 2014. Vol. 43, № 1. P. 119–131.
232. Boros E. et al. Macrocyclic-Based Hydroxamate Ligands for Complexation and Immunoconjugation of $^{89}\text{Zirconium}$ for Positron Emission Tomography (PET) Imaging // *Chempluschem*. 2016. Vol. 81, № 3. P. 274–281.
233. Bhattacharyya S. et al. Zirconium-89 labeled panitumumab: a potential immuno-PET probe for HER1-expressing carcinomas // *Nucl. Med. Biol. Nucl Med Biol*, 2013. Vol. 40, № 4. P. 451–457.