

出國報告（出國類別：實習）

赴荷蘭阿姆斯特丹大學醫療中心學習銈-89 標誌
抗體的研製和臨床應用出國報告

服務機關：核能研究所

姓名職稱：羅瑋霖 助理研究員

派赴國家/地區：荷蘭/阿姆斯特丹

出國期間：112 年 8 月 31 日~112 年 10 月 1 日

報告日期：112 年 12 月 8 日

摘要

本次出國實習是前往荷蘭阿姆斯特丹大學醫療中心，學習有關放射性同位素銦-89 標誌抗體的研製和臨床應用。銦-89 免疫正子斷層造影 ($^{89}\text{Zr-Immuno-PET}$) 技術，利用正子斷層掃描 (PET) 來對銦-89 標誌的抗體進行成像和定量分析，這一技術的發展有助於深入理解靶向藥物的體內行為，並為精準醫學提供了強大工具。職在 *prof. Daniëlle Vugts* 帶領的實驗室中，學習兩種螯合劑接合抗體的方法，以及銦-89 標誌、品管和穩定度試驗等技術，也參觀了 GMP 產線、動物實驗室和其他相關設施。通過本次實習，不僅獲得了寶貴的知識和經驗，了解國際上 $^{89}\text{Zr-Immuno-PET}$ 領域的最新趨勢，還與阿姆斯特丹大學醫療中心的專家建立了良好的聯繫，希望未來雙方能建立合作關係來共同開發核醫藥物。

目 次

| | |
|-----------|----|
| 摘 要 | i |
| 一、目 的 | 1 |
| 二、過 程 | 1 |
| 三、心 得 | 40 |
| 四、建 議 事 項 | 41 |
| 五、附 錄 | 42 |

一、目的

本次出國實習的主要目標是前往荷蘭阿姆斯特丹大學醫療中心，學習有關放射性同位素鉛-89 標誌抗體的研製和臨床應用。在目前的正子放射診斷藥物中，氟-18 的標誌使用佔主要地位，然而，由於氟-18 的半衰期較短，且在腦部的攝取量較高，這可能導致誤判的情況。近年來，放射性金屬同位素鉛-89 用於癌症影像的研究越來越受到關注，這些示蹤劑具有高度的標靶性、較長的半衰期和快速的製備優勢。

阿姆斯特丹大學醫療中心(Amsterdam UMC)是荷蘭最大的學術醫學中心之一，同時也是歐洲最大、最先進的影像中心之一。它為臨床和研究提供先進的影像技術和服務。阿姆斯特丹大學醫療中心在癌症靶向、抗體工程、新型示蹤劑等領域有豐富的經驗，並已完成多個鉛-89 標誌抗體的臨床試驗。

這次實習計畫的學習目標主要集中在鉛-89 標誌技術、臨床鉛-89 藥物生產線以及抗體產製優化技術上。期望優化鉛-89 放射性同位素標誌的方法，以便將鉛-89 應用於相同或不同類型的抗體上，從而擴大鉛-89 放射性同位素的應用範疇。利用鉛-89 標記的單株抗體，結合本院成熟的高靈敏度和高解析度的分子影像分析技術，將有助於評估藥物在活體生物體內的動力學，這將有效地提高未來臨床試驗前的發展和應用潛力。

除了核醫藥物的研發之外，有望與相關的研究型大學和臨床醫學中心合作進行核醫學方面的研究，進一步形成核醫藥物的創新網絡，並推動藥物在臨床應用方面的發展加速。這次實習不僅提供了寶貴的知識和經驗，還為未來的合作和創新奠定了堅實的基礎。

二、過程

(一) 實習行程規劃

職實習主要地點是阿姆斯特丹大學醫療中心所屬的 Imaging Center 中的 TCA 部門(Tracer center Amsterdam)，其中生物藥物小組的負責人 *prof. Daniëlle Vugts* 提供本次實習機會(附錄 1)，並教導職相關知識、規劃學習內容與提供相關協助。操作實驗主要由技術人員 *Daniël Waagmeester* 指導實驗步驟與技巧。本次出國公差自 2023 年 8 月 31 日至 10 月 1 日止共計 32 天，本次公差行程安排如下表:

表 1、2023 荷蘭實習公差行程表

| 日期(2023 年) | 星期 | 地點 | 工作摘要 |
|------------|----|-------------|---|
| 08/31 | 四 | 臺灣 桃園 | 啟程 臺灣桃園國際機場至阿姆斯特丹史基浦機場 |
| 09/01 | 五 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 介紹實驗室人員、實驗室環境與 GMP 產線 |
| 09/04 | 一 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 登錄註冊個人資料 2. 進行輻射防護教育訓練 |
| 09/05 | 二 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 學習 TFP-N-suc-DFO-Fe 接合蛋白 |
| 09/06 | 三 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 學習 DFO-pPhe-NCS 接合蛋白 |
| 09/07 | 四 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 參加生物藥物小組工作討論會議。 2. <i>prof. Daniëlle Vugts</i> 簡介銨-89 3. 學習銨-89 標誌 |
| 09/08 | 五 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 學習 GMP 產線之最終過濾 |
| 09/11 | 一 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 進行 TFP-N-suc-DFO-Fe 接合 Rituximab |
| 09/12 | 二 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 進行銨-89 標誌 2. 進行 Lindmo assay |
| 09/13 | 三 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 進行 Lindmo assay 2. 數據計算分析 |
| 09/14 | 四 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 參加生物藥物小組工作討論會議。 2. 進行 DFO-pPhe-NCS 接合 Durvalumab 3. 進行銨-89 標誌 |
| 09/15 | 五 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 進行 plate binding assay 2. 品管分析試驗 |
| 09/18 | 一 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 品管分析試驗 2. 參加實驗室人員博士答辯 |
| 09/19 | 二 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 學習 GMP 生產銨-89 標誌抗體藥物 |
| 09/20 | 三 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 進行 titration assay |
| 09/21 | 四 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 參加生物藥物小組工作討論會議。 2. 進行穩定度試驗 |
| 09/22 | 五 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 進行 plate binding assay 2. 進行穩定度試驗 3. 參觀動物實驗室 |
| 09/25 | 一 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 進行穩定度試驗 2. 與醫療物理師討論臨床問題 |

| | | | |
|-------|---|-------------|---|
| 09/26 | 二 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 進行鉛-89 標誌 2. 進行 Lindmo assay 3. 進行 beads binding assay |
| 09/27 | 三 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 進行 TFP-N-suc-DFO-Fe 接合 Durvalumab 2. 進行 titration assay |
| 09/28 | 四 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 參加生物藥物小組工作討論會議。 2. 進行穩定度試驗 |
| 09/29 | 五 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 1. 數據分析。 2. 與 <i>prof. Daniëlle Vugts</i> 進行實習總討論 |
| 09/30 | 六 | 荷蘭 阿姆斯特丹 | 回程 阿姆斯特丹史基浦機場 |
| 10/01 | 日 | 臺灣 桃園 | 臺灣桃園國際機場 |

(二) 實習機構介紹

Amsterdam UMC 是由阿姆斯特丹醫學中心 (AMC) 和阿姆斯特丹自由大學醫學中心 (VUmc) 於 2018 年合併成立的醫療機構，代表著兩所相關大學的醫學院，即阿姆斯特丹大學和阿姆斯特丹自由大學。這一合併使得 Amsterdam UMC 成為了一個結合兩個優秀學術醫院的實體，並且擁有超過 16,000 名員工，分佈在兩個地點，致力於提供高品質且可及的醫療服務。Amsterdam UMC 的使命是建立一個能夠預防疾病並為病人提供最佳治療的醫療體系。它的主要業務包括以下三個方面。第一是照顧，提供各種專業和複雜的醫療服務，包括癌症、心血管疾病、神經科學、移植、感染、免疫、代謝等領域。此外，Amsterdam UMC 還設有多個專家中心，針對罕見或難治的疾病提供專業的診斷和治療。第二是教育，負責培養下一代的醫生、護士、科學家和其他醫療人員。它提供各種學位課程、進修課程、培訓課程和交流計劃，以促進知識的傳承和創新。第三是研究，從事高水平的醫學科學研究，旨在改善人類的健康和福祉。Amsterdam UMC 擁有多個國際知名的研究所，涵蓋基礎、轉化和臨床研究的各個領域。此外，它積極與其他國內外的學術機構、企業和社會組織進行合作，以促進跨學科和跨界別的知識交流和創新。

Tracer Center Amsterdam (TCA) 是位於阿姆斯特丹大學醫療中心成像中心三樓的一個實驗室部門，專門致力於新型示蹤劑的設計、開發和生產。示蹤劑是一種能夠與人體內分子過程產生反應的物質，通常帶有放射性或光學標記，可用於正子放射斷層掃描 (PET)、單光子放射斷層掃描 (SPECT) 或光學成像技術。示蹤劑在評估藥物是否達到目標、病人是否會從

治療中受益以及研究疾病機制方面發揮著關鍵作用。

TCA 配備了先進的設備和專業團隊，能夠專業地進行示蹤劑的開發，包含以下幾個層次：

1. 計算設計：通過電腦模擬和數據分析，尋找最有潛力的示蹤劑候選物。
2. 有機合成：在有機化學實驗室中，利用各種反應技術和分析設備（如 NMR、HRMS、LC-MS、HPLC 等），合成示蹤劑候選物。
3. 放射性標記：在放射化學實驗室中，使用不同的放射性同位素（如 ^{11}C 、 ^{18}F 或 ^{89}Zr 等），對示蹤劑候選物進行放射性標記。
4. 動物評估：在動物實驗室中，使用 Mediso nanoPET/CT 或 nanoPET/MR 或 Bruker Xtreme 等儀器，對示蹤劑在小鼠或其他動物模型中的表現進行評估。
5. GMP 生產：如果示蹤劑在動物評估中表現出色，則會在符合良好生產規範（GMP）的實驗室中進行大規模生產，以供應人體研究之需。

Tracer Center Amsterdam 不僅為 Amsterdam UMC 的臨床和臨床前研究提供示蹤劑，還為其他學術機構、企業和社會組織提供合作和服務。它是一個致力於推動醫學成像領域創新和發展的重要平台，為研究人員和醫療專業人員提供了關鍵工具，以改進診斷、治療和疾病研究。

（三） 實習單位介紹

職實習的 *prof. Daniëlle Vugts* 實驗室是屬於 Amsterdam UMC 的 TCA 部門，實驗室正在進行遷移作業，預計 2023 年底完成。目前分成 2 個地方進行作業，舊址位在 RNC (Radionuclidencentrum)，坐落在阿姆斯特丹自由大學 (Vrije Universiteit Amsterdam) 的 W&N building，其中一般辦公室在底層，而 2 個 GMP 生產線位於地下 1 層。新址位在 TCA(圖 1)，坐落在 Amsterdam UMC 的影像中心(Imaging Center)的 3 樓，其中包含有機化學實驗室跟管制區，管制區裡面有新的 GMP 設施、動物中心跟研究實驗室。地下一樓是儀器工務部門，地下二樓屬於另一家公司 BV cyclotron，具有新的迴旋加速器(KIUBE180 cyclotron、O-15 cyclotron)。

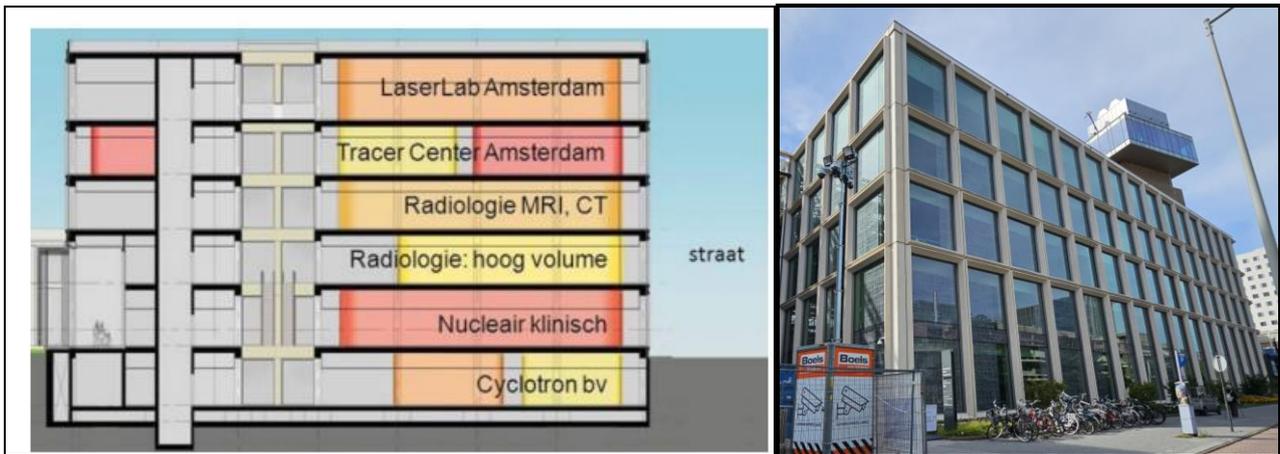


圖 1、Tracer Center Amsterdam (TCA)，左邊為配置，右圖為實際外觀。

TCA 的研發人員約有 40 人，加上實習學生(目前 6 位)，設備維護人員與輻防人員約有 9 人。主要分成 4 個部門如下：

1. 示踪劑開發小組(tracer development group):致力於開發新的正子放射斷層掃描 (PET) 示蹤劑，用於臨床前或臨床的影像學，並且開發新的放射性標誌策略。示蹤劑開發小組可細分為小分子組和生物藥物組。其中大部分所開發核種為碳-11、氟-18、鋅-89、鎰-177、碘-124 或碘-131，*prof. Daniëlle Vugts* 是生物藥物組的負責人。

2. 臨床前影像小組 (preclinical imaging group)：執行所有的動物實驗，包括動物研究設計、影像可行性和應用，並進行影像分析。儀器包含 PET-CT、PET-MRI 和光學成像儀 (冷光、螢光和 X 射線)。擁有 MLI/II 細胞培養設施、生化實驗室、動物實驗室、手術室以及適用於免疫缺陷動物、基因轉殖動物的大小鼠動物房。

3. 儀器維護小組(instrumentation service): 負責 TCA 中的所有設備，包含購買、設計和建造新設備，並進行設備的維護、驗證和維修工作，並管理設備使用和設備指導。

4. 輻防小組(radiation safety service):負責 TCA 中的常規、化學、生物安全和輻射安全事務。提供專業的指導和建議，確保職員在放射性物質操作中能夠安全工作。負責監督並檢查輻射安全規定的遵守情況，並進行相關廢棄物的管理。

(四) 實驗室環境與設施介紹

TCA 主要從事放射性示蹤劑開發，所以實驗室主要都在管制區域中，大致可以分為研究

實驗室跟 GMP 設施，以下以圖片輔助說明實驗室環境與設施。

1. 研究實驗室

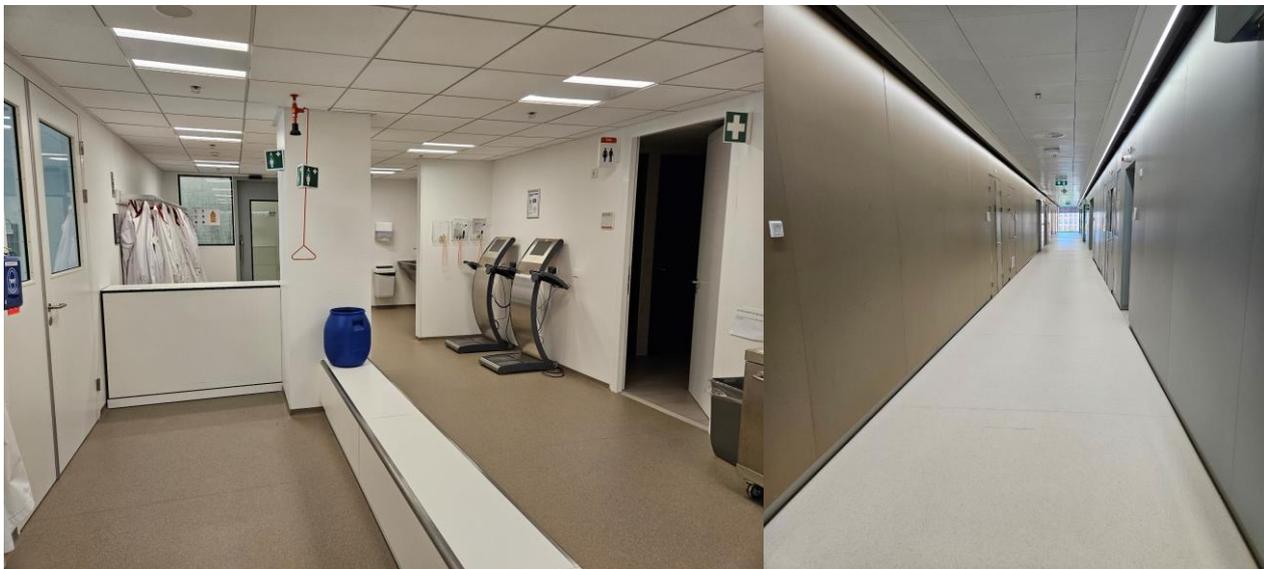


圖 2、實驗室入口處，需要更換工作鞋，再穿上實驗衣，才可進去實驗室。右圖為實驗室走廊，兩側依據實驗需求分隔成不同實驗室。



圖 3、輻射操作實驗室，職實習主要在此實驗室進行實驗。

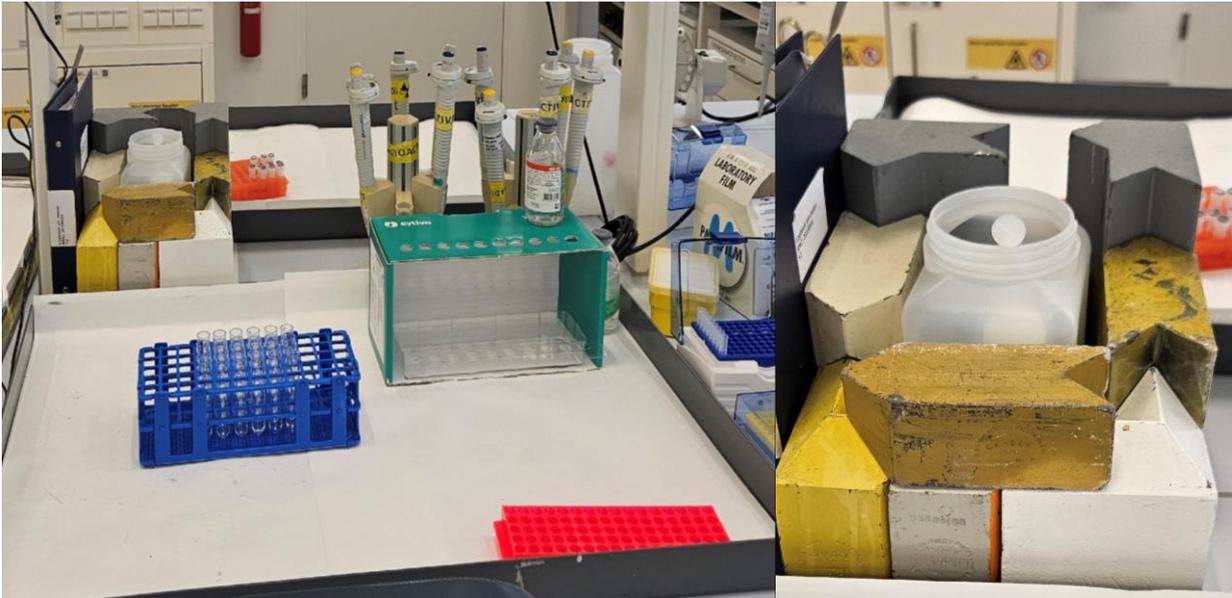


圖 4、放射性物質操作必須在托盤中進行，並有放射性專用移液器與一般移液器不能混用。
右圖為放射性廢棄物暫存桶，具有鉛屏蔽防護。



圖 5、實驗操作櫃，裡面已設置好鉛屏蔽，一般標誌實驗皆在裡面進行。實驗前後皆要用偵檢器確認有無污染。



圖 6、左圖為離心機、震盪機與加熱混合器。右圖為品管分析用 HPLC。



圖 7、熱室(Hot cell)外觀與內部，主要用於操作 45 mci 以上的放射性活度。



圖 8、左圖為耗存儲存室，儲放實驗會使用到的相關耗材。右圖為計讀室，放置數台加碼計數儀進行樣品分析。



圖 9、左圖為手足偵檢器，需要確認沒有汙染才能離開實驗室。右圖為個人劑量計，來賓或短期人員須隨身佩帶以記錄輻射劑量。

2. GMP 廠房

TCA 一年約會進行 600 批次 GMP 生產，已提供 40 次以上的臨床試驗供藥，屬於 GMP 產線的有研究技術人員 28 名、3 名化學家及藥師 2 名，可惜的是筆者實習期間剛好正在進行產線搬遷，並未有任何正式銩-89 抗體藥物生產，但有見習了一次預生產作業，了解 GMP 生產流程與環境，以下同樣以圖片輔助說明設施與流程。

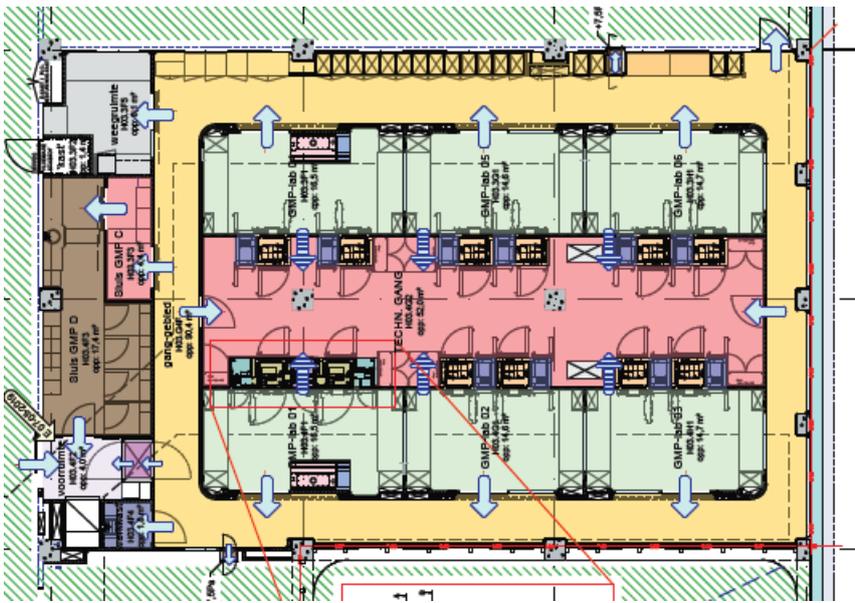


圖 10、GMP 廠房平面配置圖。

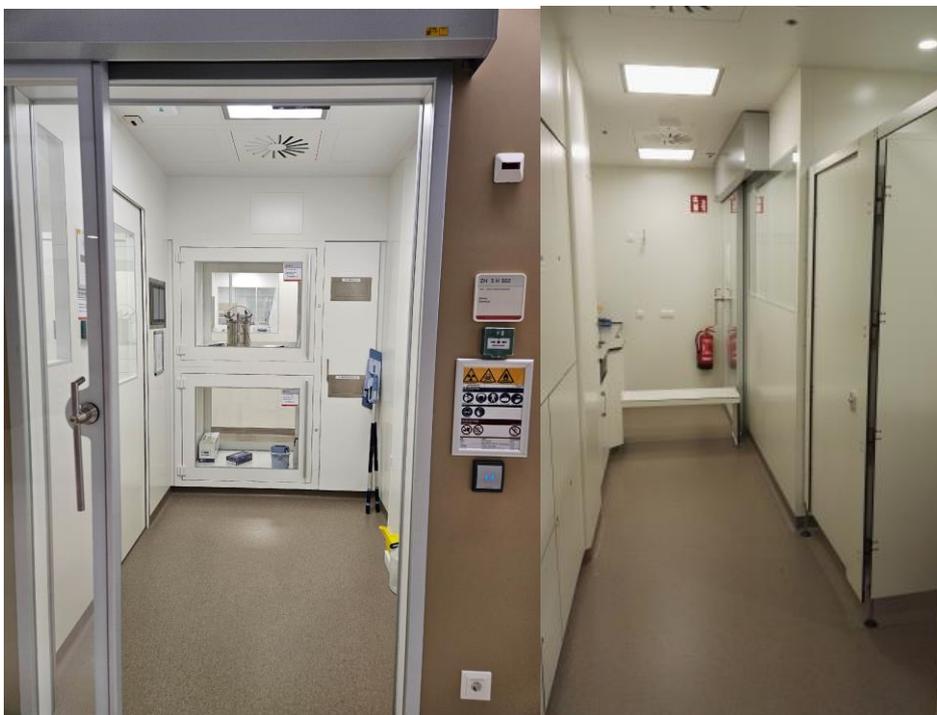


圖 11、左圖為 GMP 廠房入口，欲攜入或攜出之物品須經由傳遞箱遞送。右圖為更衣間，需換成無塵衣才能進去 GMP 廠房。



圖 12、藥品材料暫存區，包含常溫暫存區及冰箱暫存區。



圖 13、 稱重室，進行藥品稱量，完成後需使用打印機將結果印出保存。



圖 14、熱室，在此進行鉛-89 標誌與純化步驟，手套箱中已放置所有必需儀器或器具，包含分注器、開瓶器、鉛罐、天枰及活度量測儀等。



圖 15、最終過濾室，在此進行鉛-89 標誌抗體的最終過濾步驟，所有物品須經由中間手套箱傳遞至兩旁手套箱中。



圖 16、左圖為最終過濾示意圖，鉛-89 標誌抗體會經由氦氣控制，自動化進行過濾，經過 2 道傳遞瓶，最後移至成品瓶。右圖為成品瓶，會放置在鉛罐中，移送至醫院進行給藥。

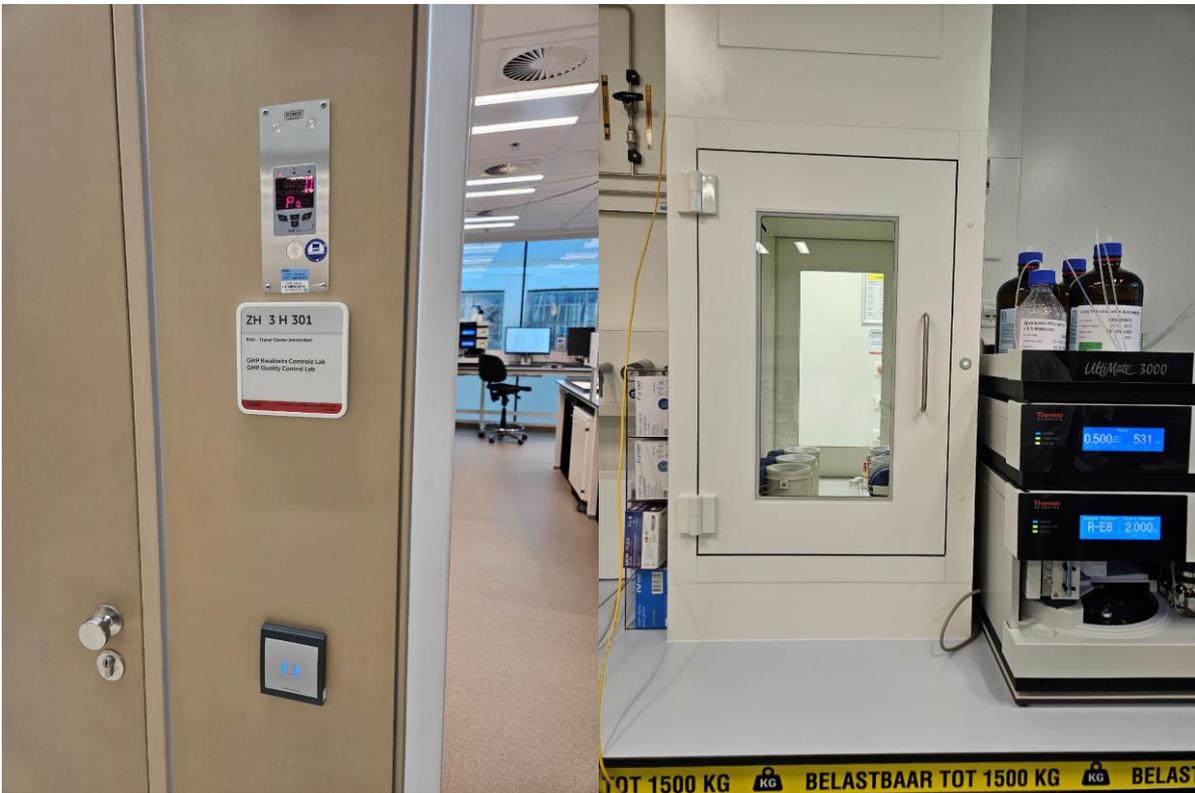


圖 17、GMP 品管室，樣品會經由傳遞箱移入進行品管，通過後產品才可以出貨至醫院。

(三) ⁸⁹Zr-Immuno-PET 介紹

單株抗體藥物 (mAbs) 目前是標靶藥物開發的主流，其全球治療性 mAbs 銷售額自 2001 年的 40 億美元增長到 2013 年的超過 570 億美元。大多數已經獲得批准的 mAbs 屬於傳統免疫球蛋白 G (IgG)，主要作為拮抗劑 (antagonists)，用於抑制受體酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinases) 或調節阻斷疾病中訊息傳遞路徑的關鍵節點。這些傳統 mAbs 的安全性和治療效果已經激發了對新一代 mAbs 的開發，以提高其效力。新一代 mAbs 可以分為以下幾個類別：

1. 糖基工程 mAbs：通過調整抗體的糖基化，增強其與免疫細胞受體的結合，從而增加抗體依賴的細胞介導的細胞毒性 (ADCC) 和補體依賴性細胞毒性 (CDC)。
2. 抗體藥物共軛物 (ADCs)：這些藥物被設計成在體內穩定循環，但一旦到達腫瘤部位，便可釋放出治療藥物。
3. 抑制免疫檢查點的 mAbs：這類抗體能夠調節免疫反應，增強對腫瘤的免疫反應。
4. 多標靶性 mAbs：這些抗體能同時識別 2 個以上的抗原，提供更全面的治療效果。
5. 融合 mAbs：將抗體免疫球蛋白與其他功能性蛋白融合在一起，提供多重治療效應。
6. mAb 片段或類架構的蛋白治療藥物，如單域抗體 (single domain antibodies)、擬抗體 (affibodies)、奈米抗體 (nanobodies) 等，這些藥物通常具有較小的分子量，但仍具有高度的特異性和效力。

表 2、新一代 mAbs 的開發

| Product | Companies | Tech platform | Target; indications | Phase |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|---|----------------------------------|
| Gazyva (obinituzumab) | Roche | Glycoengineering | CD20; CLL, NHL | Registered (CLL; USA); III (NHL) |
| MEDI-563/KHK4563 (benralizumab) | MedImmune/Kyowa Hakko Kirin | Glycoengineering | IL-5R α ; asthma | III |
| AME133v/LY2469298 (ocaratuzumab) | Mentriq/Eli Lilly | Glycoengineering | CD20; follicular lymphoma | III |
| CDX 011 (glembatumumab vedotin) | Celldex/Seattle Genetics | ADC | GPNMB; breast cancer | III |
| RG7593/DCD'T2980S (pinatuzumab vedotin) | Roche | ADC | CD22; lymphoma | II |
| RG7596/DCDS4501A (polatuzumab vedotin) | Roche | ADC | CD79b; NHL and DLBCL | II |
| SAR3419 | Sanofi | ADC | CD19; NHL | II |
| MT103 (blinatumumab) | Amgen | BiTE | CD19 and CD3; ALL | II |
| CT-322 (pegdinetanib, angicept) | Adnexus (now Bristol-Myers Squibb) | Adnectin (non-immunoglobulin ligand) | VEGF; glioblastoma multiforme, colorectal cancer, NSCLC | II |
| AGN150998/MP0112 | Allergan | DARPin (non immunoglobulin ligand) | VEGF and PDGFB; wet AMD | IIb |
| MEDI-551 | MedImmune/Kyowa Hakko Kirin | Glycoengineering | CD19; CLL, DLBCL | II |
| GA201 (RG1760/RO5083945) | Roche | Glycoengineering | EGFR; Solid tumours | II |
| KW-2871 (ecromeximab) | Life Science Pharm/Kyowa Hakko Kirin | Glycoengineering | GD3; metastatic melanoma | II |
| LFB-R593 (roledumab) | LFB | Glycoengineering | RhD; RhD allo-immunization | II |
| MOR208/Xmab 5574 | MorphoSys/Xencor | Fc amino acid mutation | C19, CLL, ALL, NHL | II |

ADC: antibody-drug conjugate; ALL: acute lymphoblastic leukaemia; AMD: age-related macular degeneration; BiTE: bispecific T cell engager; CLL: chronic lymphocytic leukaemia; DARPin: designated ankyrin repeat protein; DLBCL: diffuse large B cell lymphoma; EGFR: epidermal growth factor receptor; GPNMB: glycoprotein non-metastatic melanoma protein B; IL-5R α : interleukin-5 receptor- α ; NHL: non-Hodgkin's lymphoma; NSCLC: non-small-cell lung carcinoma; PDGFB: platelet-derived growth factor B; RhD: rhesus D antigen; VEGF: vascular endothelial growth factor.
Modified from Evans J *et al.*¹

為了研究靶向藥物在人體內的分佈和作用模式這一核心問題，發展了鋯-89 免疫正子斷層造影 ($^{89}\text{Zr-Immuno-PET}$) 技術。這種技術利用正子斷層掃描 (PET) 來對鋯-89 標誌的抗體進行成像和定量分析，而 Immuno-PET 這個術語也擴大應用到其他類型的靶向藥物，包括胜肽、蛋白質、奈米粒子和細胞等。要實現靶向藥物的 PET 追蹤，藥物需要標記上帶正電子的同位素。這種同位素的物理半衰期應該與靶向藥物在體內的停留時間相匹配。由於單株抗體通常具有較長的生物半衰期(幾天)，因此長半衰期的同位素如鋯-89 ($t_{1/2} = 78.4$ 小時)和碘-124 ($t_{1/2} = 100.3$ 小時)成為 Immuno-PET 的最佳選擇。鋯-89 需要透過螯合劑(DFO)與抗體結合，而碘-124 可以直接與抗體中的酪氨酸殘基結合。鋯-89 是一種殘留性同位素，因此當抗體被細胞內吞後，它會被困在細胞內。相對地，碘-124 則會從細胞中釋放，重新進入血液循環。此外，鋯-89 的能量較低，這可能導致劑量校正時的誤差。因此，對於 Immuno-PET 應用而言，使用鋯-89 是一個更為優越的選擇。這一技術的發展有助於深入理解靶向藥物的體內行為，並為精準醫學的實現提供了強大工具。

另外在製備 GMP 製備鋯-89 標誌的抗體的過程中，需要注意以下品管項目：

1. 螯合劑與抗體的比例：建議平均比例約為 1，以確保不影響結合和藥物動力學。
2. 放射化學純度：游離的鋯-89 和鋯-89-DFO 的含量應該小於 5%。游離的鋯-89 可能增加骨髓的輻射劑量。
3. 完整性：單株抗體或其他靶向藥物在放射性標誌後應保持完整，其聚合物和碎片物應小於 5%。而當 ADCs 被放射性標記時，應確認藥物未從單株抗體釋放。
4. 外觀：產品應為清澈無色的溶液。
5. 結合活性：單株抗體的免疫反應性不應受到抗體修飾和放射性標誌的影響。特別在多特異性抗體應確保每個特異性結合活性。
6. 無發熱原性：產品應不含內毒素。
7. 無菌性：產品在製備後應通過最終過濾以確保無菌性。
8. 穩定性：在儲存和運輸過程中，鋯-89 標誌抗體應保持穩定性。

這些品管項目有助於確保鋯-89 標誌抗體的品質和安全性，以確保產品符合相關法規標準。

(四) 螯合劑接合抗體 (chelator conjugation)

為了與放射性金屬離子 $Zr-89$ 結合，需要先為抗體加上螯合劑，目前去鐵胺 B (Desferrioxamine B, DFO) 是臨床上唯一一種用於 $Zr-89$ 標誌的螯合劑。而目前臨床上常使用的螯合劑接合抗體方法有 2 種(圖 18)，使用具有鐵離子保護的四氟苯酚-N-琥珀酸酯脫鐵素 (TFP-N-suc-DFO-Fe) 或是對異硫氰基苄基-DFO (DFO-pPhe-NCS) 與抗體中離胺酸結合，得到 DFO 接合抗體的複合物(mAb-DFO)。使用 TFP-N-suc-DFO-Fe 好處是 mAb-N-suc-DFO 較穩定、可以使用鐵離子訊號計算螯合劑對抗體的比例(chelator to antibody ratio, CAR)，但缺點是過程中多一個去鐵步驟，會造成耗時長、酸鹼值變化較劇烈，可能會影響抗體結構而沉澱。相反的，使用 DFO-pPhe-NCS 好處是步驟簡單快速、酸鹼值只在弱鹼跟中性環境，但 mAb-NCS-DFO 較不穩定，在不易得知 CAR 資訊。實務上，若針對新的抗體或蛋白進行螯合劑接合，會優先選用 TFP-N-suc-DFO-Fe 進行接合，因為較穩定且可以知道 CAR。

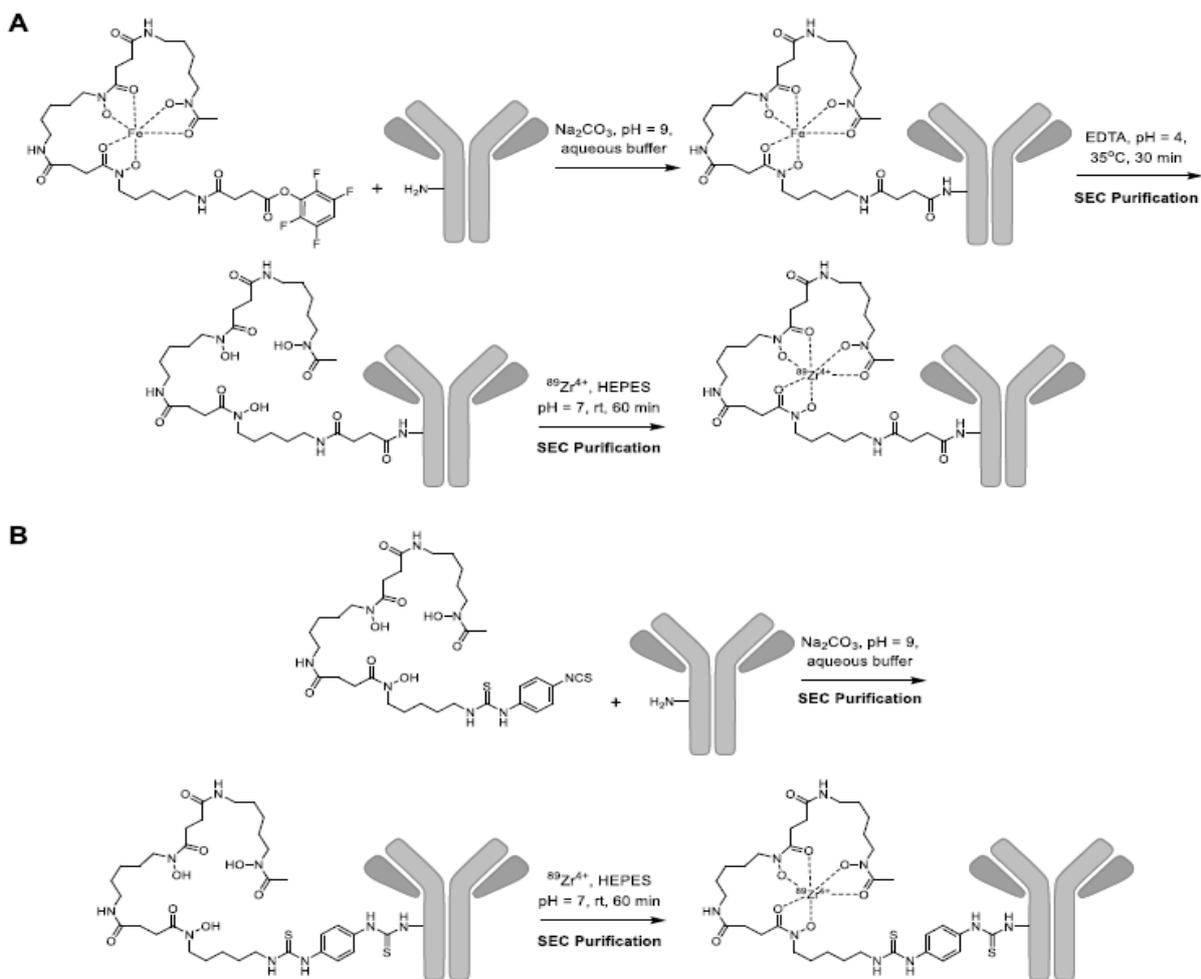


圖 18、臨床上 2 種 $Zr-89$ 標誌抗體方法

1. TFP-N-suc-DFO-Fe 接合抗體方法

接合流程如圖 19，詳細步驟如附錄 2。其中 100 mg/mL gentisic acid 溶液需要新鮮配置，且調整酸鹼時會有較劇烈反應，可將蓋子鬆開一些。酸鹼值調整為關鍵步驟且會花費較多時間，過程中溶液需混勻並確認不超過範圍。mAb-N-suc-DFO-Fe 為淺褐色，在去鐵反應完成後會呈現透明無色，所以可以也用目視顏色來初步判斷去鐵反應是否完成。mAb-N-suc-DFO 可以先保存在 4 度冰箱幾天，等到有射源後再進行標誌。

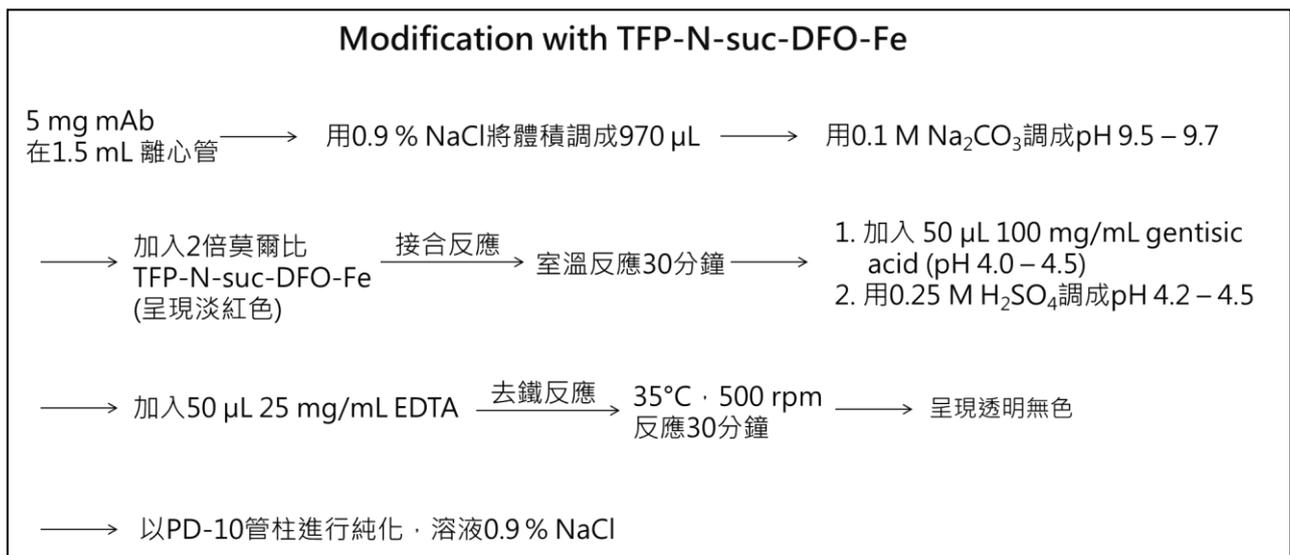


圖 19、TFP-N-suc-DFO-Fe 接合流程

(1) N-suc-DFO-Fe 接合 Rituximab 抗體

本次使用抗體為 Rituximab，是一種作用於人類 CD20 的人鼠嵌合單株抗體。由於 CD20 主要表現於 B 淋巴球細胞表面，Rituximab 可用來治療因 B 淋巴球過多所造成的疾病，包括淋巴瘤、慢性淋巴細胞白血病、移殖排斥和某些自體免疫疾病。在接合反應後，取出一些 Rituximab-N-suc-DFO-Fe 進行 HPLC 分析如圖 20，由 280 波長得知蛋白訊號，滯留時間為 15.49 分鐘，純度達 98.47%。由 430 nm 波長得知鐵離子訊號，15.39 分鐘是抗體上的鐵，比例佔了 59.58%，而 25.70 分鐘是未接合上抗體的鐵。已知接合反應中 TFP-N-suc-DFO-Fe 是 Rituximab 的 2 倍莫爾量，所以本次接合反應的 CAR 約為 1.2。圖 21 為 PD-10 純化結果，可以發現抗體濃度最高在第 6

管與第 7 管，所以混合這 2 管作為 Rituximab-N-suc-DFO 樣品。

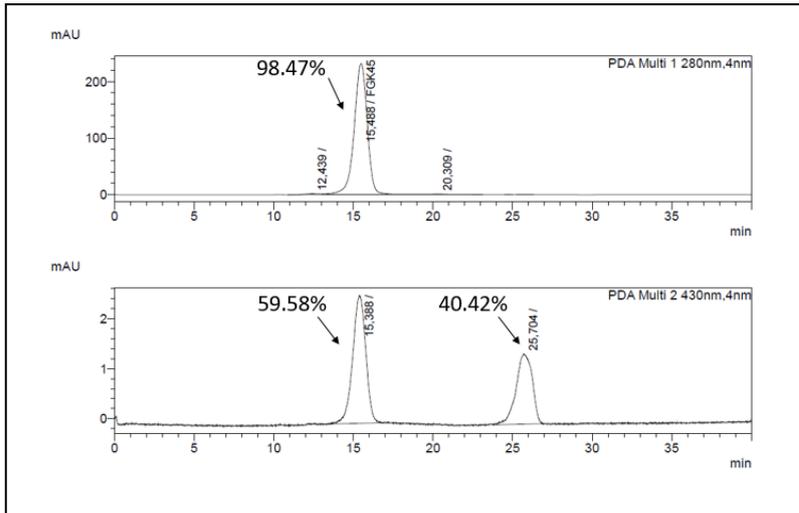


圖 20、Rituximab-N-suc-DFO-Fe 之 HPLC 分析結果，上方為 280 nm 波長吸收，下方為 430 nm 波長吸收

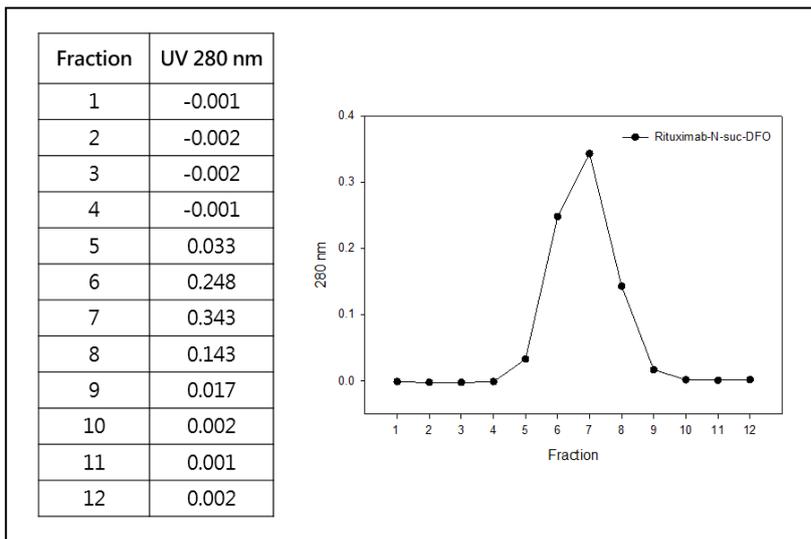


圖 21、Rituximab-N-suc-DFO-Fe 之 PD-10 純化結果。

(2) N-suc-DFO-Fe 接合 Durvalumab 抗體

本次使用抗體為 Durvalumab，是一種用於治療癌症的完全人源化抗 PD-L1 單株抗體，屬免疫檢查點抑制劑 (immune checkpoint inhibitor, ICI)，作用標的在 PD-1 (programmed death 1) /PD-L1 (programmed death-ligand 1) 途徑。檢查點 PD-L1 會與 T 細胞的 PD-1 受體結合，抑制 T 細胞增生及細胞激素生成進而抑制體內免疫

反應之平衡調節。某些腫瘤中會增加 PD-L1 之表現並與 PD-1 受體結合，透過此路徑傳遞抑制 T 細胞免疫反應的訊息。Durvalumab 藉由抑制此作用，幫助體內免疫系統辨識及攻擊癌細胞。

本次進行 2 個不同 TFP-N-suc-DFO-Fe 用量的反應，分別是 2 倍莫爾量跟 6 倍莫爾量，在接合反應後，取出一些 Durvalumab-N-suc-DFO-Fe 進行 HPLC 分析如圖 22-23，由 280 nm 的抗體滯留時間皆為 15 分鐘左右，純度都達 98% 以上。由 430 nm 波長計算 2 倍莫爾量跟 6 倍莫爾量的 CAR 分別約為 0.73 跟 2.1，所以增加 TFP-N-suc-DFO-Fe 反應量，可以提升 CAR。圖 24 為 2 倍莫爾量的 PD-10 純化結果，可以發現抗體濃度最高在第 6~8 管，所以混合這 3 管作為 Durvalumab-N-suc-DFO 樣品。這次在 PD-10 純化後，再進行一次 HPLC 分析如圖 25-26，可以發現 CAR 高的樣品明顯較不穩定，出現較多大分子量訊號，而且鐵訊號較強，可能要增加去鐵反應時間或 DTPA 用量。

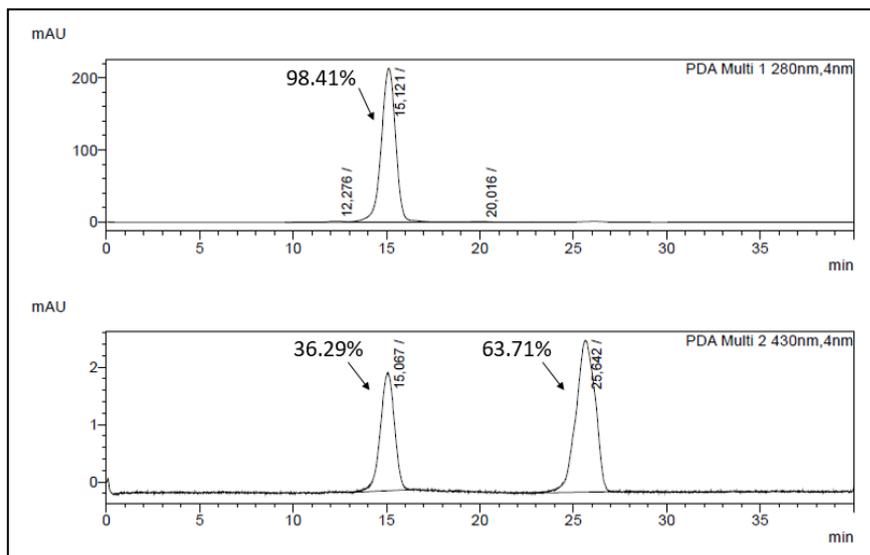


圖 22、Durvalumab-TFP-N-suc-DFO-Fe (2 倍莫爾量)之 HPLC 分析結果，上方為 280 nm 波長吸收，下方為 430 nm 波長吸收

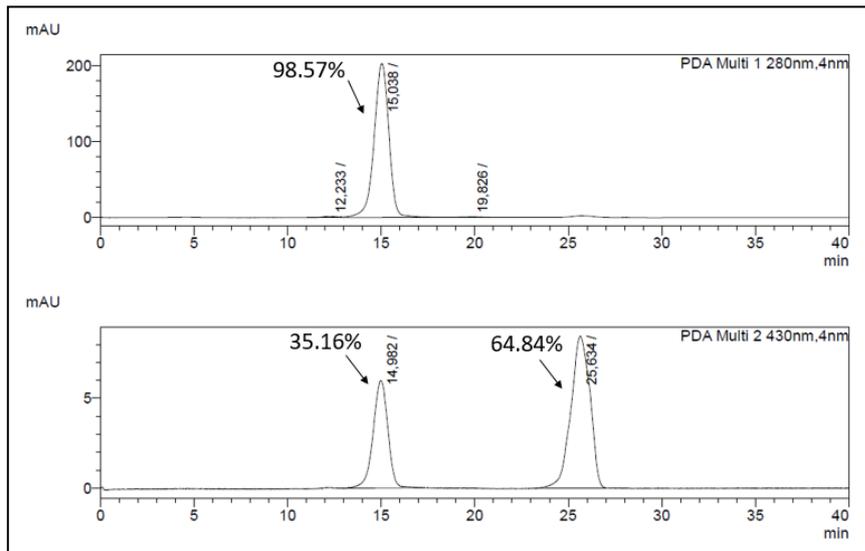


圖 23、Durvalumab-TFP-N-suc-DFO-Fe (6 倍莫爾量)之 HPLC 分析結果，上方為 280 nm 波長吸收，下方為 430 nm 波長吸收

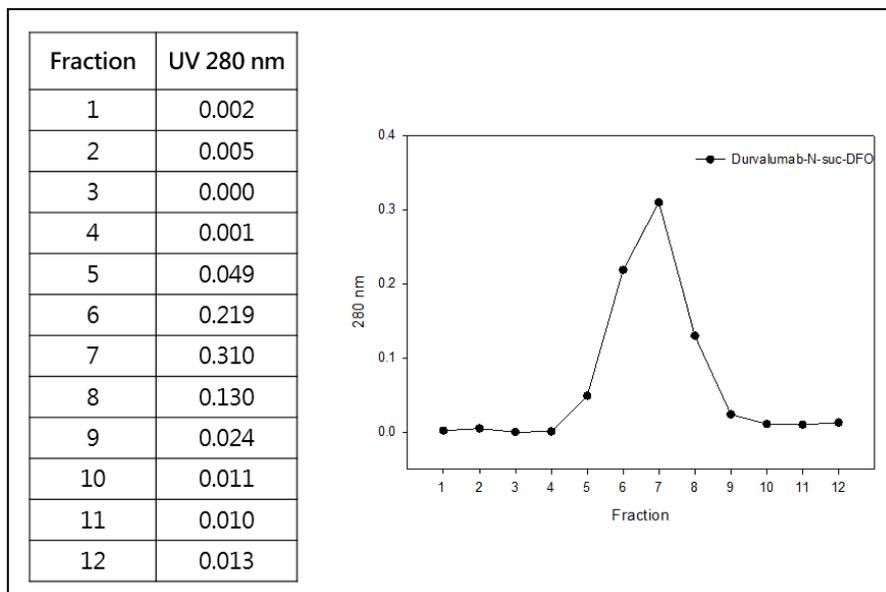


圖 24、Durvalumab -N-suc-DFO-Fe 之 PD-10 純化結果。

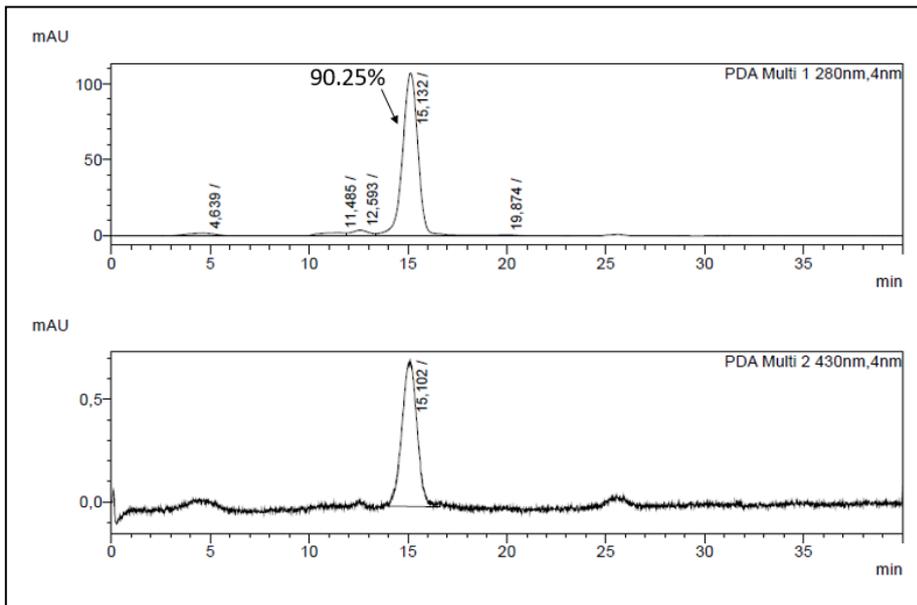


圖 25、Durvalumab-TFP-N-suc-DFO-Fe (2 倍莫爾量)經純化後 HPLC 分析結果，上方為 280 nm 波長吸收，下方為 430 nm 波長吸收

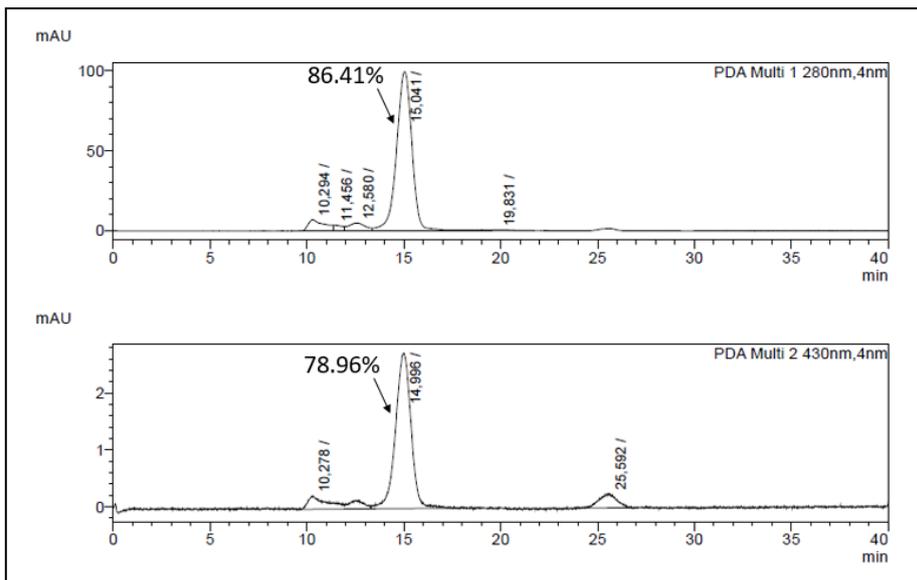


圖 26、Durvalumab-TFP-N-suc-DFO-Fe (6 倍莫爾量)經純化後 HPLC 分析結果，上方為 280 nm 波長吸收，下方為 430 nm 波長吸收

2. DFO-pPhe-NCS 接合抗體方法

接合流程如圖 28，詳細步驟如附錄 3。因為氯離子會造成 mAb-NCS-DFO 不穩定，建議使用 50 mM sodium acetate + 200 mM sucrose 溶液保存，可以先配好放在 4 度冰箱。接合反應中若抗體濃度低於 2 mg/mL 會降低接合效率。DFO-pPhe-NCS 配置在 DMSO 中，須注意 DMSO

含量在反應溶液中需低於 2%。mAb-NCS-DFO 可以保存在-20 度冰箱中 2 個星期。

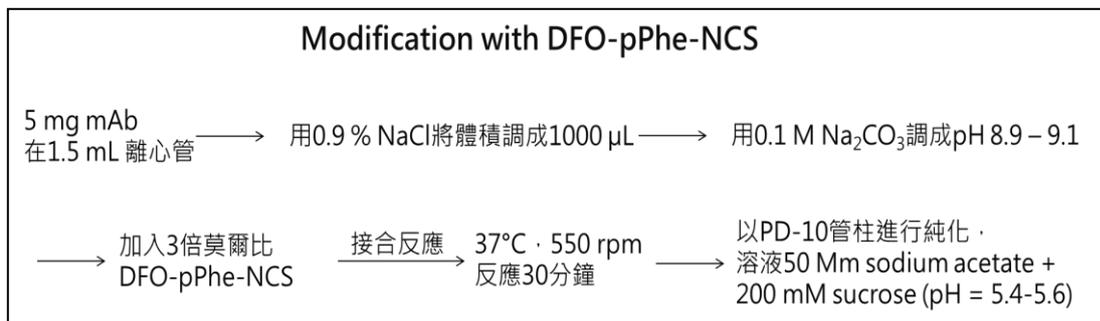


圖 28、DFO-pPhe-NCS 接合流程

(1) DFO-pPhe-NCS 接合 Durvalumab 抗體 (第一次)

使用抗體為 Durvalumab，圖 29 為 PD-10 純化結果，可以發現抗體濃度最高在第 6~8 管，所以混合這 3 管作為 Durvalumab-NCS-DFO 樣品。

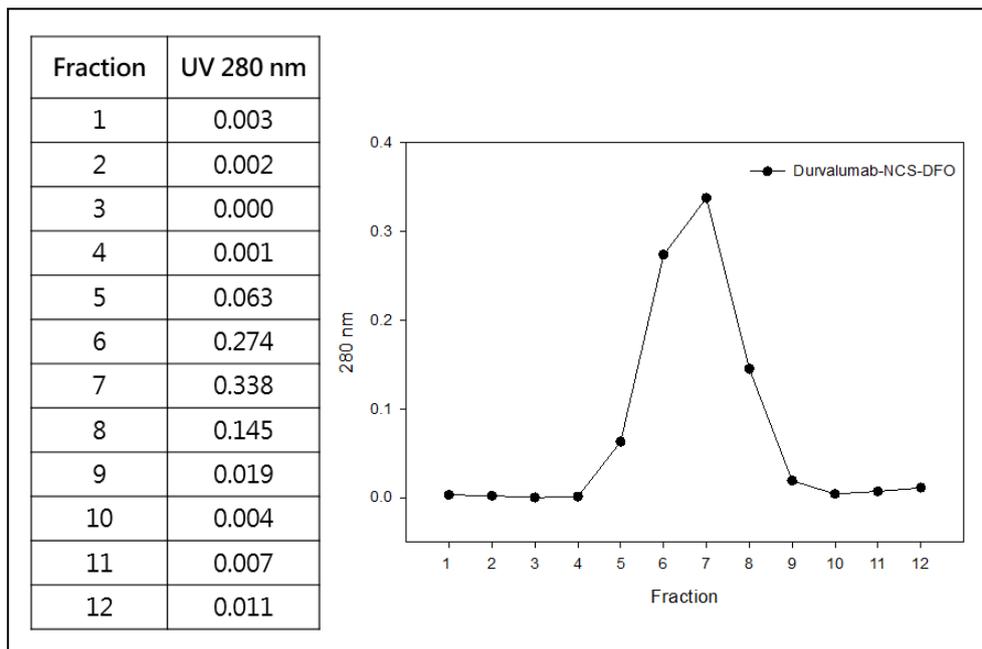


圖 29、Durvalumab-NCS-DFO 之 PD-10 純化結果。

(2) DFO-pPhe-NCS 接合 Durvalumab 抗體 (第二次)

使用抗體為 Durvalumab，圖 30 為 PD-10 純化結果，可以發現抗體濃度最高在

第 6~7 管，所以混合這 2 管作為 Durvalumab-NCS-DFO 樣品。

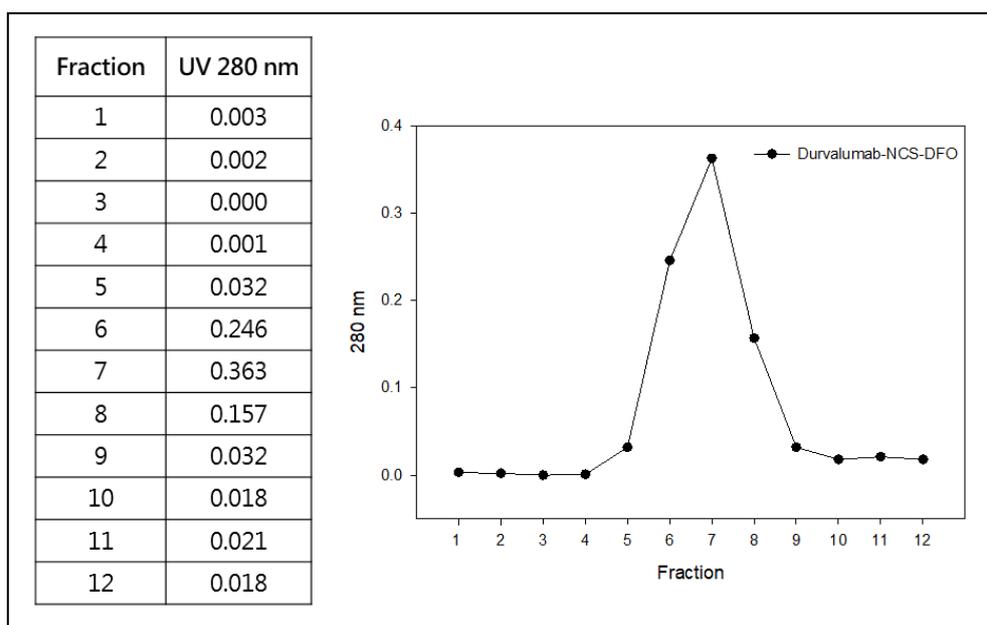


圖 30、Durvalumab-NCS-DFO 之 PD-10 純化結果。

(五) 銻-89 放射性同位素標誌

TCA 所使用的銻-89 射源來自 BV cyclotron，與本院以往使用的銻-89 是相同來源，因為就坐落在相同大樓，所以使用上相當方便，也可以拿到較高活度。TCA 在銻-89 標誌時，都直接使用臨床用量的抗體進行反應，而本院還在前期測試階段，使用少量的抗體進行反應。另外，TCA 會把銻-89 射源以草酸補足到固定體積，這樣就不用每次標誌都量測酸鹼值，減少人員劑量曝露。銻-89 標誌流程如圖 31，詳細步驟如附錄 4。基本上 mAb-N-suc-DFO 跟 mAb-NCS-DFO 的標誌流程相同，差別在於使用的保存溶液不同，另外品管分析方法也不太一樣，因為 TCA 在以往測試數據發現，mAb-NCS-DFO 的 iTLC 結果會失真，無法真實反映標誌結果，所以改用離心過濾法(Spinfilter)來檢測放射化學純度。iTLC 跟 Spinfilter 的詳細實驗步驟如附錄 5-6。

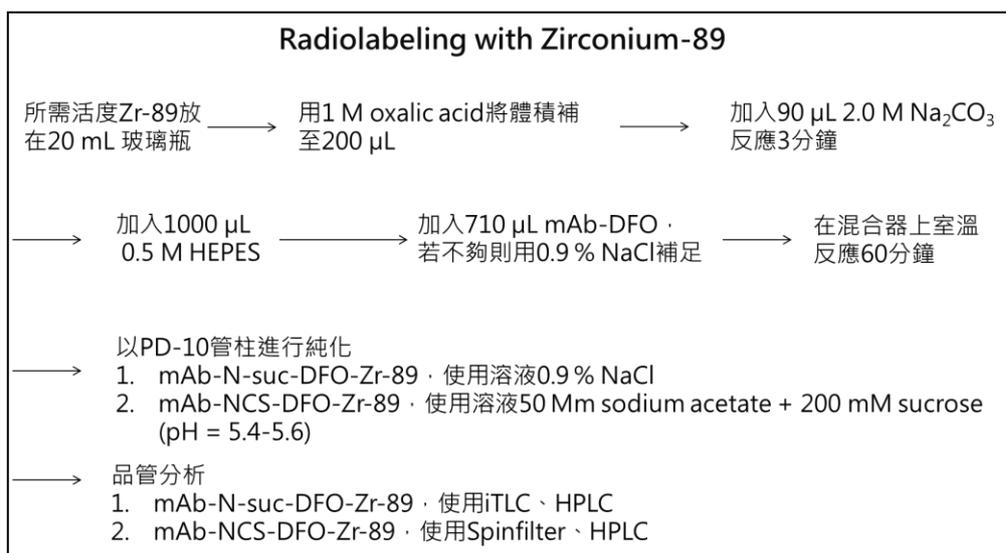


圖 31、銻-89 標誌流程

1. 銻-89 標誌 Rituximab-N-suc-DFO 抗體

使用 Rituximab-N-suc-DFO 進行銻-89 標誌，取 10 μL/9.4 Mbq 銻-89 進行反應，進行 PD-10 純化結果如圖 32，可以發現銻-89 活度主要在第 4~8 管，所以混合這 5 管約 8.611 Mbq/2.5 mL 作為 Rituximab-N-suc-DFO-Zr-89 樣品，標誌效率約 92%。經過 HPLC 分析結果如圖 33，由 280 nm 波長分析抗體純度有 95%以上，但有一些大分子量聚合物，可能是二聚體或多聚體，導致由 Radio 訊號得出的純度較低為 86.53%，另由 iTLC 分析所得到的放射化學純度有 99.77%。

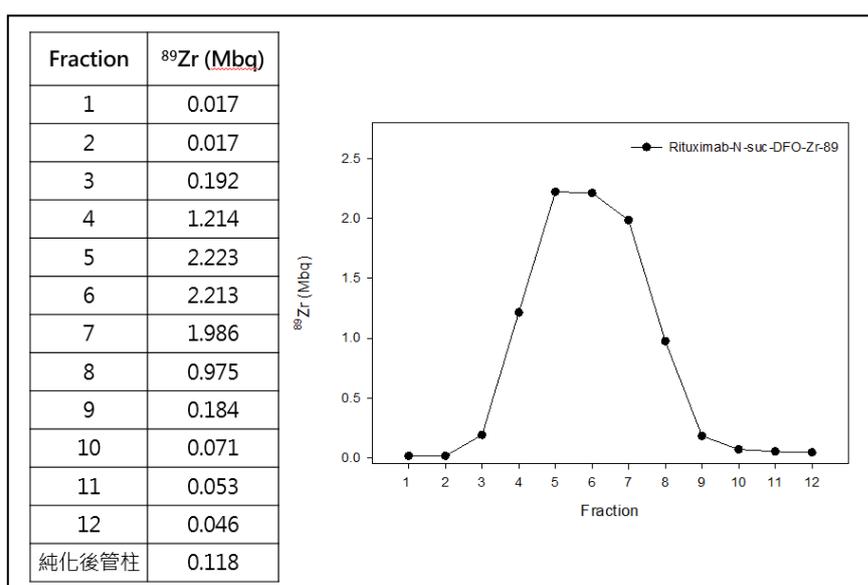


圖 32、Rituximab-N-suc-DFO-Zr-89 標誌後 PD-10 純化結果。

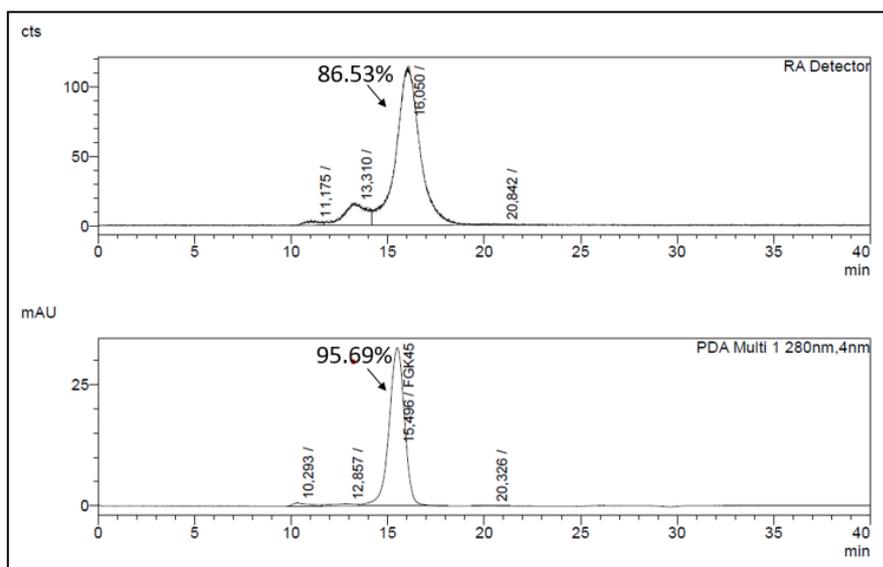


圖 33、Rituximab-N-suc-DFO-Zr-89 純化後 HPLC 分析結果，上方為 280 nm 波長吸收，下方為放射性訊號

2. 銻-89 標誌 Durvalumab-NCS-DFO 抗體

使用 Durvalumab-NCS-DFO 進行銻-89 標誌，取 18 μ L/11.5 Mbq 銻-89 進行反應，進行 PD-10 純化結果如圖 34，可以發現銻-89 活度主要在第 4~8 管，所以混合這 5 管約 10.3 Mbq/2.5 mL 作為 Durvalumab-NCS-DFO-Zr-89 樣品，標誌效率約 90%。經過 HPLC 分析結果如圖 35，由 280 nm 波長得知抗體純度有 95% 以上，但有一些大分子量聚合物，可能是二聚體或多聚體，導致由 Radio 訊號得出的純度較低為 86.53%。本次同時進行 iTLC 與 Spinfilter 分析，其放射化學純度分別為 99.84% 與 99.79%。

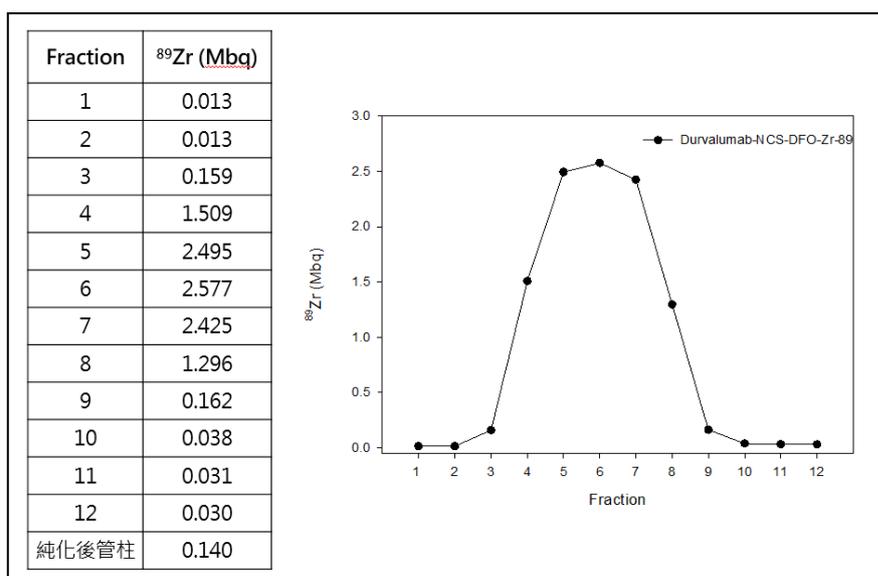


圖 34、Durvalumab-NCS-DFO-Zr-89 標誌後 PD-10 純化結果。

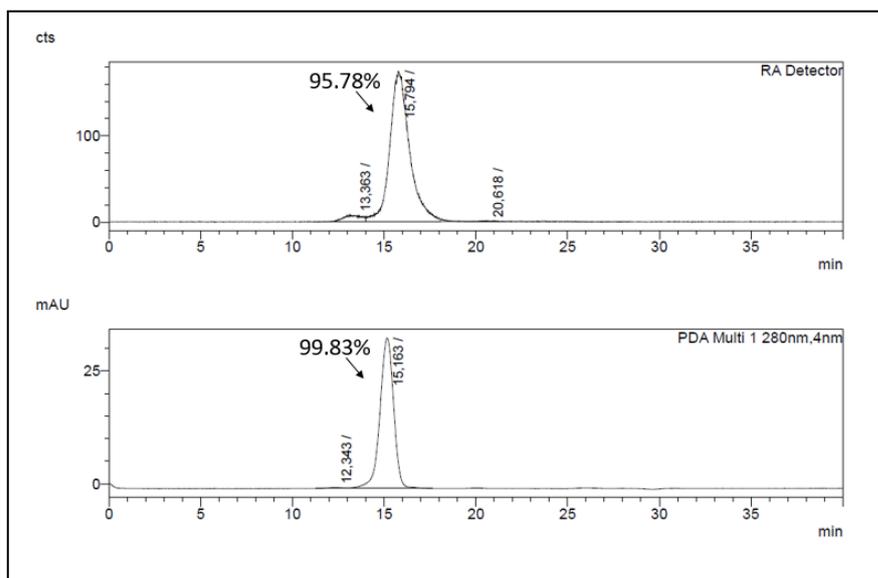


圖 35、Durvalumab-NCS-DFO-Zr-89 純化後 HPLC 分析結果，上方為 280 nm 波長吸收，下方為放射性訊號

3. 銻-89 標誌 Trastuzumab-N-suc-DFO 抗體

使用 Trastuzumab-N-suc-DFO 進行銻-89 標誌，Trastuzumab 或稱 Herceptin 是一種作用於人類表皮生長因子受體 II (HER-2) 的單株抗體，主要用於治療 HER-2 陽性乳癌的標靶藥物。HER-2 是細胞膜上的一種接受器，與人類表皮生長因子 EGF 有高度專一性。當 EGF 與 HER-2 結合後，會造成 HER-2 的雙聚體化，進而引發自體磷酸化而傳遞細胞內訊息傳遞，最後維持正常的細胞生長與分裂。當 HER-2 過度表現，細胞會因過度刺激而造成不正常的快速生長，最終造成癌症發生。Trastuzumab 為人源化的單株抗體，能以高專一性與 HER-2 接受器結合，阻止 EGF 與 HER-2 再結合，進而延緩癌細胞生長，也有抑制腫瘤血管新生的作用。

取 15 μ L/11.6 Mbq 銻-89 與 Trastuzumab-N-suc-DFO 進行標誌反應，進行 PD-10 純化結果如圖 36，可以發現銻-89 活度主要在第 4~7 管，混合這 4 管約 8.79 Mbq/2 mL 作為 Trastuzumab-NCS-DFO-Zr-89 樣品，標誌效率約 84%。本次僅進行 iTLC 分析，其放射化學純度為 99.47%。

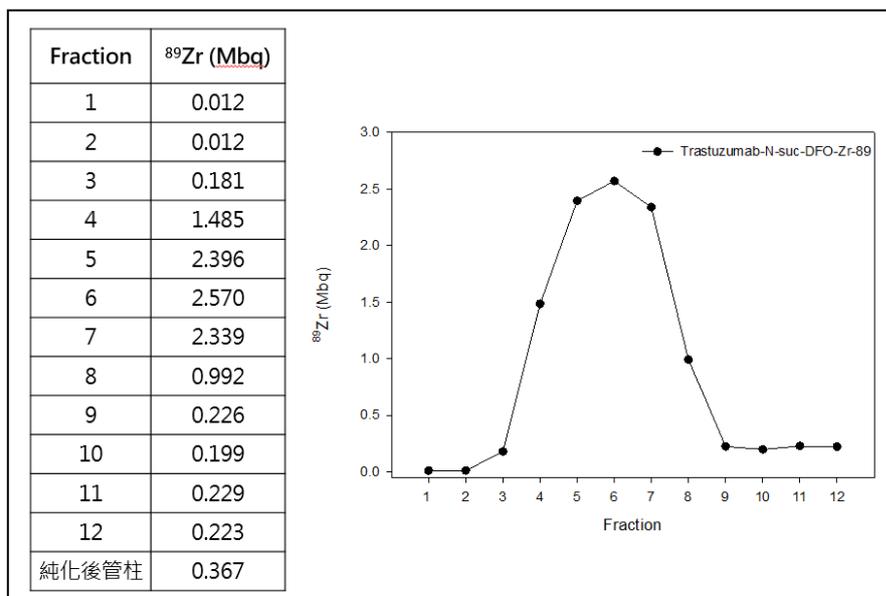


圖 36、Trastuzumab-NCS-DFO-Zr-89 標誌後 PD-10 純化結果。

(六) 免疫活性分析 (Immunoactivity)

抗體經過螯合劑接合、放射性標誌後，其品管分析部分通常會進行免疫活性分析，為了確認在經過一連串化學反應與酸鹼變化，抗體仍保有對目標抗原的結合活性。確保放射性標誌後抗體的 **Immuno-PET** 影像，能夠用來推斷原始抗體藥物的生物體分布的結果。免疫活性分析依據使用的抗原類型不同，有 3 種方法進行。第 1 種是 **Lindmo assay**，使用會表現抗原的細胞株，為傳統分析方法，需要事先培養大量細胞，與放射性標誌抗體進行整夜的結合反應，隔天計算出免疫活性。此法需要較長時間，且使用細胞進行分析，會受到不同批號或細胞狀況不同等因素影響分析結果，在 **GMP** 產線上已逐漸淘汰此法。第 2 種是 **Plate binding assay**，將抗原蛋白固定在分析盤上，再與放射性標誌抗體進行整夜的結合反應，隔天計算出免疫活性。此法同樣需要較長時間固定蛋白與結合反應，但使用之抗原蛋白可以直接購買同一批商業化產品，其品質較為穩定，也可省下細胞培養時間。目前 **GMP** 產線主要使用此種方法進行免疫活性分析。第 3 種是 **Bead binding assay**，使用帶有抗原蛋白的磁珠，與放射性標誌抗體進行結合反應。利用磁力進行分離較為省力省事，且部分磁珠可以 1-2 小時就完成結合反應，無須等到第二天才能拿到分析結果。另外優點為在室溫下進行結合反應，無需準備冷房。有些抗原蛋白的磁珠已有商業化產品，可以直接購買使用，也可自行進行固化反應。未來 **GMP** 產線的免疫活性分析都會逐漸採用此種方法進行。

1. Lindmo assay

依據抗體專一性結合之抗原，選擇會表現該抗原的細胞株進行培養。依據細胞株類型，大概需培養 25 個 T175 培養皿，將細胞以福馬林固定後，可在 4 度冰箱儲存 3 個月，之後若結合測試通過可延長儲存期限。Lindmo assay 詳細步驟如附錄 7，將細胞株進行序列稀釋成 5 個濃度，最低濃度準備 2 組，其中 1 組加入過量原始抗體，作為非專一結合率的計算。所有組別加入銨-89 標誌抗體進行結合反應，每組進行 3 重複，在 4°C 下反應整夜，經過離心後，以加馬射線計數分析儀量測上清液跟細胞沉澱的活度。細胞沉澱的活度就是有結合銨-89 標誌抗體，可以計算出結合比例，最高的結合比例就是免疫活性，但其 CV 值需小於 20% 且非專一結合要低於 5%。

(1) Rituximab-N-suc-DFO-Zr-89 進行 Lindmo assay

使用銨-89 標誌之抗體為 Rituximab-N-suc-DFO-Zr-89，細胞株為 SU-DHL4。將序列稀釋之各組別經過量測活度，並扣除非專一性結合後，算出其結合率，以抗原-抗體比例跟結合率進行作圖(圖 37)，可發現隨抗原增加，其結合率也隨之上升，最後進入飽和狀態，最終計算出之免疫活性為 94.2%。

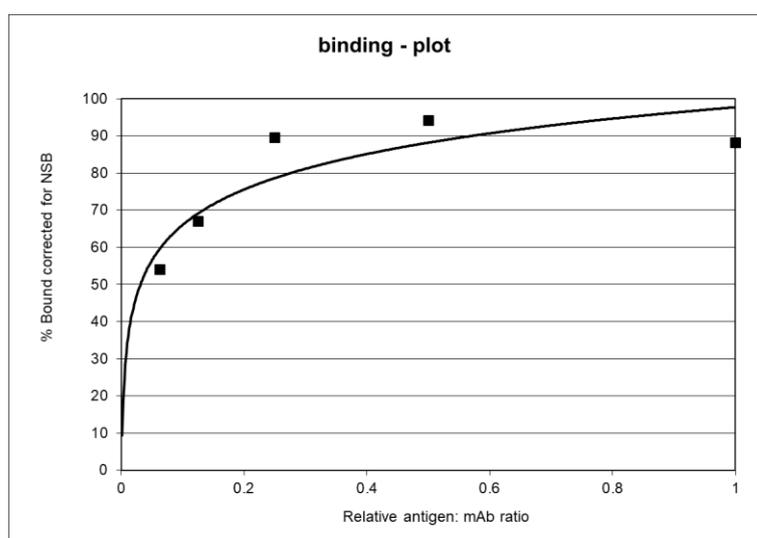


圖 37、Rituximab-N-suc-DFO-Zr-89 進行 Lindmo assay 之數據結果

(2) Trastuzumab-N-suc-DFO-Zr-89 進行 Lindmo assay

使用銻-89 標誌之抗體為 Trastuzumab-N-suc-DFO，細胞株為 SKOV-3。將序列稀釋之各組別經過量測活度，並扣除非專一性結合後，算出其結合率，以抗原-抗體比例跟結合率進行作圖(圖 38)，可發現結合率最高只有 4%，且並未呈現濃度相關曲線，各組別之 CV 值皆大於 20%。檢視各組別的銻-89 的總活度一致，且實驗中肉眼觀察到不同細胞沉澱量，代表實驗操作應無問題，可能原因是本批細胞已放置超過一年，已變質導致無法量測免疫活性。

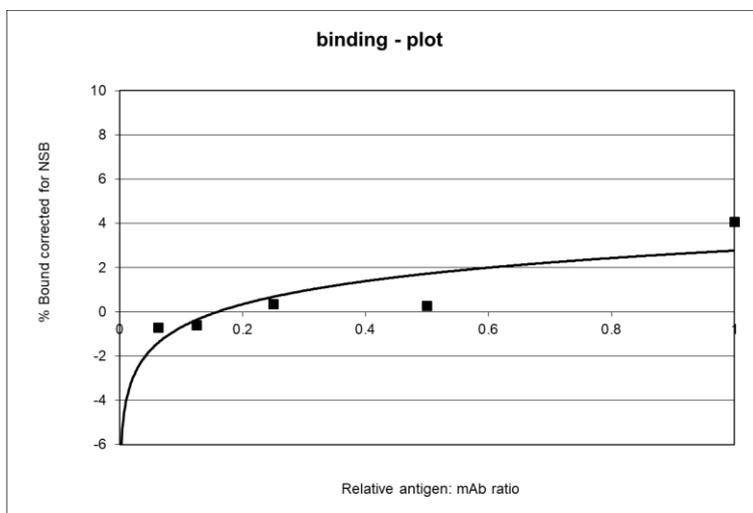


圖 38、Trastuzumab-N-suc-DFO-Zr-89 進行 Lindmo assay 之數據結果

2. Plate binding assay

選擇抗體專一性結合之抗原，大多數常見抗原市面上都可買到商品化產品，減少自行合成時間。先將抗原固定在 Plate 上，再用 BSA 進行 Blocking，一般來說建議當天新鮮配置。Lindmo assay 詳細步驟如附錄 8，將銻-89 標誌抗體進行序列稀釋成 7 個濃度，最低濃度準備 2 組，其中 1 組加入過量原始抗體，作為非專一結合率的計算。每組進行 3 重複，在 4°C 下結合反應整夜後，經過離心與清洗 3 次後，以加馬射線計數分析儀量測上清液跟含抗原小管的活度。含抗原小管的活度就是有結合銻-89 標誌抗體，可以計算出結合比例，最高的結合比例就是免疫活性，但其 CV 值需小於 20% 且非專一結合要低於 5%。

(1) Durvalumab-NCS-DFO-Zr-89 進行 Plate binding assay (第一次)

使用銦-89 標誌之抗體為 Durvalumab-NCS-DFO-Zr-89，抗原為 PD-L1 蛋白。將序列稀釋之各組別經過量測活度，並扣除非專一性結合後，算出其結合率，以抗原-抗體比例跟結合率進行作圖(圖 39)，可發現隨抗原增加，其結合率也隨之上升，最後進入飽和狀態，最終計算出之免疫活性為 92.74%。

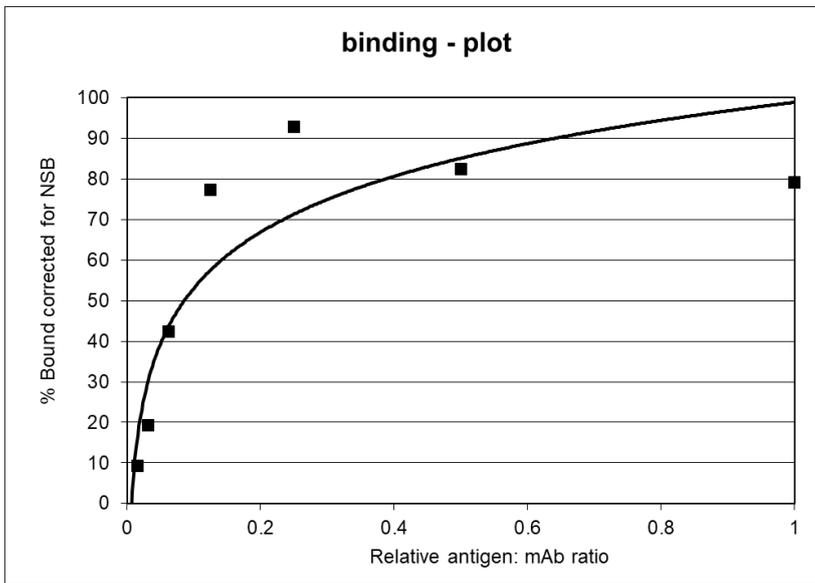


圖 39、Durvalumab-NCS-DFO-Zr-89 進行 Plate binding assay 之數據結果

(2) Durvalumab-NCS-DFO-Zr-89 進行 Plate binding assay (第二次)

使用銦-89 標誌之抗體為 Durvalumab-NCS-DFO-Zr-89，抗原為 PD-L1 蛋白。將序列稀釋之各組別經過量測活度，並扣除非專一性結合後，算出其結合率，以抗原-抗體比例跟結合率進行作圖(圖 40)，可發現隨抗原增加，其結合率也隨之上升，最後進入飽和狀態，最終計算出之免疫活性為 89.17%。

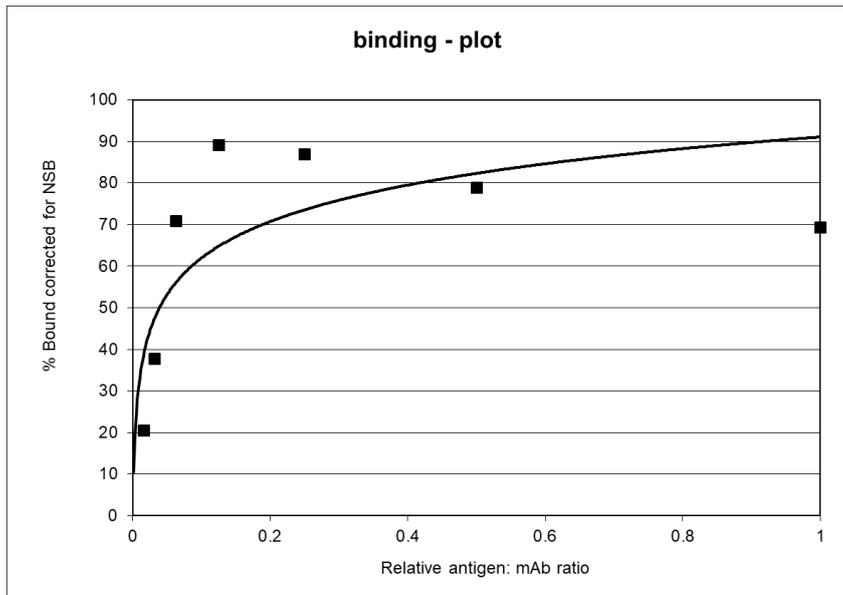


圖 40、Durvalumab-NCS-DFO-Zr-89 進行 Plate binding assay 之數據結果

3. Bead binding assay

確定抗體專一性結合之抗原，先確認市面上是否有接好磁珠的產品，減少自行合成時間。若沒有則購買商品化抗原，再自行接合磁珠。詳細步驟如附錄 9，先將磁珠-抗原清洗與置換溶液，搭配磁座可以方便分離磁珠與溶液。將磁珠-抗原進行序列稀釋成 5 個濃度，最低濃度準備 2 組，其中 1 組加入過量原始抗體，作為非專一結合率的計算。每組進行 3 重複，在室溫下結合反應整夜後，經過離心，以加馬射線計數分析儀量測上清液跟磁珠的活度。磁珠的活度就是有結合銦-89 標誌抗體，可以計算出結合比例，最高的結合比例就是免疫活性，但其 CV 值需小於 20% 且非專一結合要低於 5%。

(1) Trastuzumab-N-suc-DFO-Zr-89 進行 Bead binding assay

使用銦-89 標誌抗體為 Trastuzumab-N-suc-DFO-Zr-89，抗原為 HER2 蛋白接合之磁珠。將序列稀釋之各組別經過量測活度，並扣除非專一性結合後，算出其結合率，以抗原-抗體比例跟結合率進行作圖(圖 41)，可發現隨抗原增加，其結合率也隨之上升，最後進入飽和狀態，最終計算出之免疫活性為 84.1%。

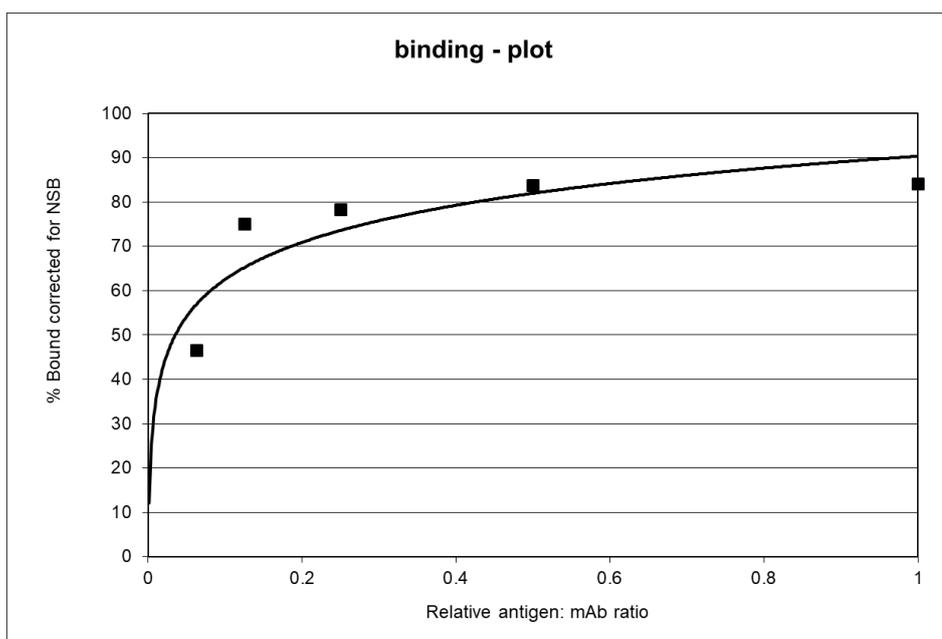


圖 41、Trastuzumab-N-suc-DFO-Zr-89 進行 Bead binding assay 之數據結果

(七) 分析螯合劑與抗體接合比例 (Chelator to mAb Ratio, CAR)

螯合劑與抗體接合比例是在放射性免疫療法和分子影像學中的一個重要參數，確保螯合劑和抗體的適當結合比例對於實現所需的治療效果或影像結果至關重要。CAR 取決於所使用的螯合劑、抗體以及標記物質的性質。影響螯合劑與抗體接合比例的因素包括螯合劑的親和性、抗體的特性、標記物質的性質，以及反應條件。過多的螯合劑可能會影響抗體的生物分佈和清除，並增加副作用的風險，而太少的螯合劑可能會影響放射性標記效率與分子影像結果。

常用分析 CAR 的方法為液相層析質譜儀(LC-MS)，但需要使用昂貴儀器進行分析，有些實驗室需要送到外部單位進行。另外 LC-MS 分析時使用的溶劑通常與抗體保存的溶劑不相同，會導致抗體不穩定，而出現不相符之分析結果。在 TCA 有 2 種常用的來分析銻-89 標記抗體的 CAR 方法，第一個是使用 TFP-N-suc-DFO-Fe 螯合劑。可以使用鐵離子在 430 nm 波長有吸收訊號，可以計算螯合劑對抗體的比例，已在前面章節有提到。第二種方法是草酸銻滴定法，將已知數量的修飾抗體與放射性銻-89，與不同數量的正常銻-90 進行標記反應，利用標記效率的降低比例可以分析出本批修飾抗體的 CAR 數值。詳細步驟如附錄 10，將 1 mg 的修飾抗體、2 MBq 銻-89 與不同摩爾當量的草酸銻進行標記反應。對未純化產物進行

Spinfilter 來確定標誌效率。也可以透過 PD-10 管柱分離，來分析標誌效率。透過已知的草酸鋯當量與標誌效率，可以計算出螯合劑與 mAb 的比率。

1. 分析 Trastuzumab-N-suc-DFO 之 CAR

使用的抗體為 Trastuzumab-N-suc-DFO，分成 5 個組別(草酸鋯對抗體的當量 0 倍、1 倍、2 倍、3 倍及 4 倍)，皆與約 2 MBq 鋯-89 進行標誌反應。反應後以 iTLC 跟 PD10 純化來分析標誌效率，以 PD10 結果計算得知平均 CAR 為 0.79 (表 3)，以 iTLC 結果計算得知平均 CAR 為 1.02 (表 4)。本批抗體理論 CAR 為 1，與 iTLC 結果相符合，而 PD10 結果會略低，因為 PD10 是使用較高活度的收集管作為標誌成功抗體，解析度較低，無法得知精確的標誌效率百分比。

表 3、以 PD10 結果分析 Trastuzumab-N-suc-DFO 之 CAR

| Group | Labeling yield (PD10, %) | Normalized yield | nmol mAb | nmol Zr-90 | nmol DFO | CAR (DFO/mAb) |
|-------------|--------------------------|------------------|----------|------------|----------|---------------|
| 0 equiv | 89.8 | 100.0 | 6.67 | - | - | - |
| 1 equiv | 68.4 | 76.2 | 6.67 | 6.67 | 5.08 | 0.76 |
| 2 equiv | 35.8 | 39.9 | 6.67 | 13.34 | 5.32 | 0.80 |
| 3 equiv | 24.2 | 26.9 | 6.67 | 20.01 | 5.39 | 0.81 |
| 4 equiv | 17.8 | 19.8 | 6.67 | 26.68 | 5.28 | 0.79 |
| Average CAR | | | | | | 0.79 |

表 4、以 iTLC 結果分析 Trastuzumab-N-suc-DFO 之 CAR

| Group | Labeling yield (iTLC, %) | Normalized yield | nmol mAb | nmol Zr-90 | nmol DFO | CAR (DFO/mAb) |
|-------------|--------------------------|------------------|----------|------------|----------|---------------|
| 0 equiv | 91.4 | 100.0 | 6.67 | - | - | - |
| 1 equiv | 87.4 | 95.6 | 6.67 | 6.67 | 6.38 | 0.96 |
| 2 equiv | 39.0 | 42.7 | 6.67 | 13.34 | 5.69 | 0.85 |
| 3 equiv | 31.0 | 33.9 | 6.67 | 20.01 | 6.79 | 1.02 |
| 4 equiv | 28.8 | 31.5 | 6.67 | 26.68 | 8.41 | 1.26 |
| Average CAR | | | | | | 1.02 |

2. 分析 Durvalumab-N-suc-DFO 之 CAR

使用的抗體為 Durvalumab-N-suc-DFO，因抗體量較少分成 3 個組別(草酸鋯對抗體

的當量 0 倍、2 倍及 4 倍)，皆與約 2 MBq 銻-89 進行標誌反應。反應後以 iTLC 跟 PD10 純化來分析標誌效率，以 PD10 結果計算得知平均 CAR 為 0.54 (表 5)，以 iTLC 結果計算得知平均 CAR 為 0.70 (表 6)。同樣因為 PD10 解析度較低，其 CAR 計算較低。而本次在接合螯合劑時，由 430 nm 波長計算的 CAR 約為 0.73，與 iTLC 結果相符合。此方法為正常同位素滴定法，所以不限制於銻-89，可以應用在任何接合螯合劑的抗體上。

表 5、以 PD10 結果分析 Durvalumab-N-suc-DFO 之 CAR

| Group | Labeling yield (PD10, %) | Normalized yield | nmol mAb | nmol Zr-90 | nmol DFO | CAR (DFO/mAb) |
|-------------|--------------------------|------------------|----------|------------|----------|---------------|
| 0 equiv | 80.4 | 100.0 | 6.67 | - | - | - |
| 2 equiv | 22.3 | 27.7 | 6.67 | 13.34 | 3.57 | 0.53 |
| 4 equiv | 11.6 | 14.4 | 6.67 | 26.68 | 3.58 | 0.54 |
| Average CAR | | | | | | 0.54 |

表 6、以 iTLC 結果分析 Durvalumab-N-suc-DFO 之 CAR

| Group | Labeling yield (iTLC, %) | Normalized yield | nmol mAb | nmol Zr-90 | nmol DFO | CAR (DFO/mAb) |
|-------------|--------------------------|------------------|----------|------------|----------|---------------|
| 0 equiv | 91.5 | 100.0 | 6.67 | - | - | - |
| 2 equiv | 33.4 | 36.5 | 6.67 | 13.34 | 4.87 | 0.73 |
| 4 equiv | 15.4 | 16.8 | 6.67 | 26.68 | 4.49 | 0.67 |
| Average CAR | | | | | | 0.70 |

(八) 不同溶液的穩定度試驗

在實習的過程中，*prof. Daniëlle Vugts* 強調抗體最終成品的溶液非常重要，不同的溶液會影響最終臨床試驗的成品的穩定性。溶液會影響抗體本身的穩定度，也會影響螯合劑與放射性同位素的穩定度。在 TCA 的經驗中，NCS-DFO 雖步驟簡單但較不穩定，尤其溶液中不能含有氯離子，所以 PBS 跟 saline 皆不適合保存 mAb-NCS-DFO 成品。而穩定度的分析方法有很多種，有 Spinfilter、iTLC、HPLC、Binding assay 等等，每一種都有其優點與侷限性，單獨看一種可能會誤判。在 TCA 的經驗中，iTLC 解析度最低容易高估成品穩定度。*prof. Daniëlle Vugts* 指導進行不同溶液及不同分析方法影響成品穩定度的實驗，測試標誌後抗體

在 4 種不同的溶液中，以 4 種不同分析方法進行 7 天的穩定度試驗。透過此實驗可以將這幾周學到的東西做個統整與練習，實驗得到的數據對於往後鉛-89 標誌抗體有很大的助益，可作為溶液資料庫。

使用的測試抗體為 Durvalumab-NCS-DFO，標誌鉛-89 後產物分成 4 等份，以 PD10 管柱進行純化與置換成不同種溶液，分別為 0.9% NaCl、PBS、20 mM Histidine + 240 mM sucrose + 0.05% Tween 20 (簡稱 Histidine 溶液)以及 20 mM Sodium Citrate + 240 mM sucrose (簡稱 Citrate 溶液)。其中 0.9% NaCl 與 PBS 是很常見的反應溶液，Histidine 溶液是 TCA 歷年測試中抗體保存效果的溶液，而 Citrate 溶液較少使用，測試其抗體保存效果。將不同組別溶液都配置成 1 mL，包含 0.185 mg/ 9 MBq 的 Durvalumab-NCS-DFO-Zr-89，放置於 37 度培養箱中，在 0、24、96、168 小時進行 iTLC、Spinfilter、HPLC、plate binding assay 等 4 種分析方法，觀察其穩定度變化。試驗數據彙整如表 7-10，每組溶液隨時間的 HPLC 分析圖譜如圖 42-45。

由不同溶液組別比較，在 0 小時所有溶液品管分析皆在 95% 以上，免疫活性皆在 90% 左右，只有 Citrate 溶液組別較其他溶液低了 10% 左右，經檢視 HPLC 280 波長訊號，抗體本身仍很完整，但 Radio 訊號可以發現有 free Zr-89 訊號，代表 Citrate 溶液會導致部分 Zr-89 從標誌後抗體掉下來。隨著培養時間增加，標誌後抗體在 PBS 溶液組別中的穩定度是最差的，24 小時後穩定度只剩 70% 左右，到了 168 小時免疫活性只剩 10%。檢視 HPLC 280 波長訊號，96 小時之後抗體在 PBS 溶液中不穩定產生小分子量片段，而 Radio 訊號可以發現在 0 小時，PBS 溶液中就有高分子量聚合物產生。Citrate 溶液組別穩定度在 168 小時後只剩 15% 左右，免疫活性剩下 8%，表示此種溶液也不適合做為成品溶液，主要原因是 Zr-89 容易從抗體上分離出來，不過檢視 HPLC 訊號可以發現，對於抗體本身穩定度不錯，沒有產生小分子量片段或聚合物。0.9% NaCl 組別經由品管分析數據到了 168 小時還有 50% 以上，免疫活性也有 40% 以上，但檢視 HPLC 280 波長訊號，96 小時之後產生小分子量片段，Radio 訊號可以發現在 0 小時，就有高分子量聚合物產生。所有組別中，Histidine 溶液保存標誌後抗體效果最好，由品管分析數據與 0.9% NaCl 組別類似，到了 168 小時還有 50% 以上，免疫活性也有 40% 以上。而且檢視 HPLC 訊號，小分子量片段或聚合物比例很少。

由不同分析方法比較，若以 Immuno-PET 原理來看，直接計算抗原結合比例的免疫活性，

應該是最適合的作為分析標誌抗體的穩定度的方法，但需要耗費時間較多，無法立即得到結果。iTLC 方法除了 PBS 溶液組別部分時間點，所得到的穩定度皆遠高於免疫活性數據，顯示出有高估穩定度的情形。而 Spinfilter 方法相較下比較接近免疫活性數據，適合作為快速分析的方法。HPLC 的 Radio 訊號與免疫活性數據最為一致，而且可以同時看 280 波長訊號來檢視抗體本身穩定度，綜合來說最適合作為穩定度分析方法。

表 7、鋅-89 標誌抗體在 0.9% NaCl 溶液中穩定度結果

| 0.9% NaCl | | | | |
|----------------|--------|--------|--------|--------|
| | 0 h | 24 h | 96 h | 168 h |
| iTLC | 99.86% | 96.41% | 75.75% | 72.01% |
| Spin filter | 99.86% | 96.12% | 57.42% | 56.53% |
| HPLC (280 nm) | 96.51% | 95.69% | 79.00% | 70.30% |
| HPLC (radio) | 97.28% | 91.52% | 48.62% | 53.86% |
| Immunoactivity | 90.72% | - | 48.08% | 41.11% |

表 8、鋅-89 標誌抗體在 PBS 溶液中穩定度結果

| PBS | | | | |
|----------------|--------|--------|--------|--------|
| | 0 h | 24 h | 96 h | 168 h |
| iTLC | 99.48% | 78.28% | 29.66% | 19.64% |
| Spin filter | 99.69% | 75.22% | 43.67% | 45.97% |
| HPLC (280 nm) | 97.61% | 97.97% | 78.01% | 73.29% |
| HPLC (radio) | 95.28% | 61.56% | 20.75% | 11.74% |
| Immunoactivity | 89.17% | - | 17.31% | 11.05% |

表 9、銻-89 標誌抗體在 Histidine 溶液中穩定度結果

| 20 mM Histidine + 240 mM sucrose + 0.05% Tween 20 (pH5.6) | | | | |
|---|--------|--------|--------|--------|
| | 0 h | 24 h | 96 h | 168 h |
| iTLC | 99.85% | 98.72% | 77.68% | 66.68% |
| Spin filter | 99.92% | 98.54% | 66.65% | 50.20% |
| HPLC (280 nm) | 99.15% | 98.98% | 98.43% | 98.40% |
| HPLC (radio) | 95.72% | 92.54% | 52.86% | 43.86% |
| Immunoactivity | 90.55% | - | 53.33% | 40.62% |

表 10、銻-89 標誌抗體在 Citrate 溶液中穩定度結果

| 20 mM Sodium Citrate + 240 mM sucrose (pH5.3) | | | | |
|---|--------|--------|--------|--------|
| | 0 h | 24 h | 96 h | 168 h |
| iTLC | 91.91% | 81.15% | 35.93% | 21.81% |
| Spin filter | 92.36% | 82.70% | 26.95% | 14.51% |
| HPLC (280 nm) | 97.41% | 98.33% | 98.87% | 97.61% |
| HPLC (radio) | 84.34% | 77.10% | 25.88% | 14.66% |
| Immunoactivity | 81.96% | - | 18.19% | 8.13% |

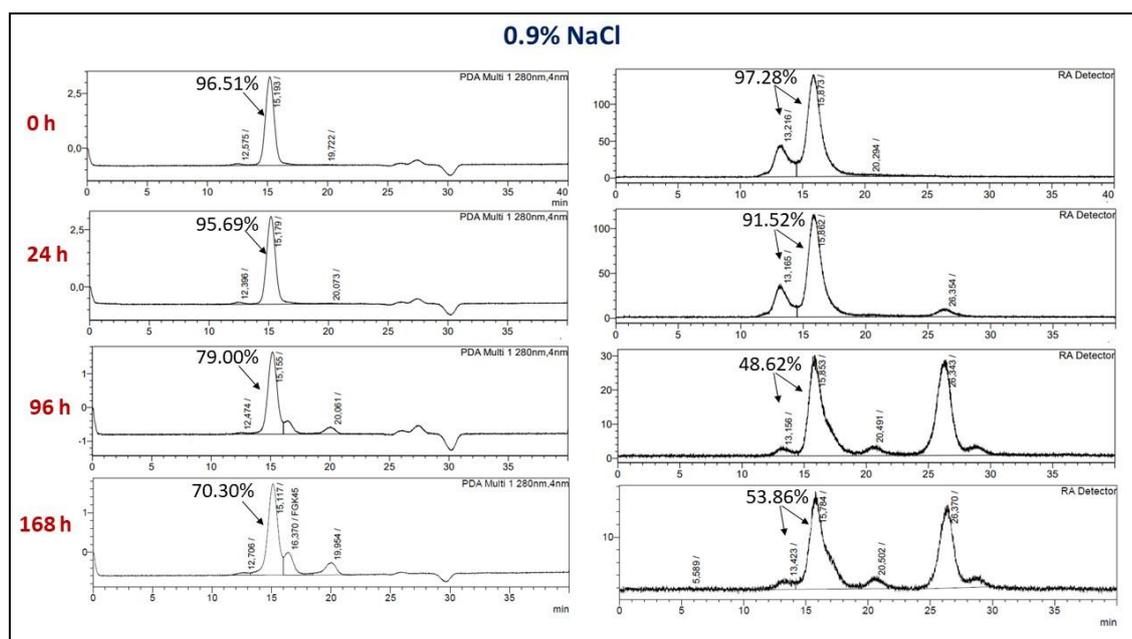


圖 42、銻-89 標誌抗體在 0.9% NaCl 溶液中 HPLC 分析結果，左邊是 280 nm 波長吸收，右邊

是放射性訊號

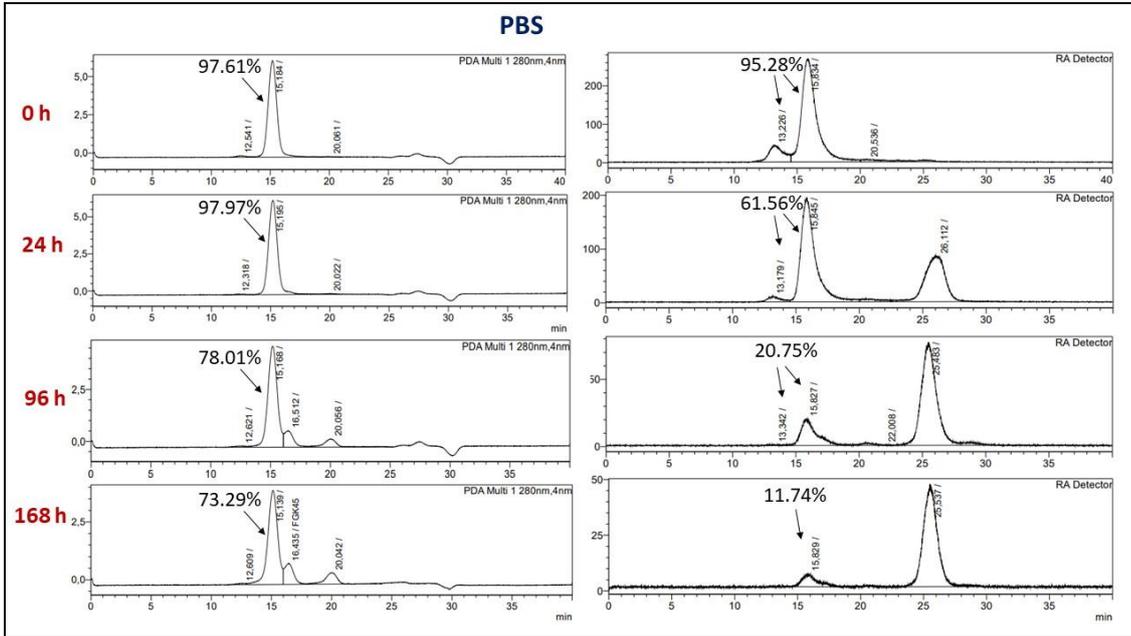


圖 43、銨-89 標誌抗體在 PBS 溶液中 HPLC 分析結果，左邊是 280 nm 波長吸收，右邊是放射性訊號

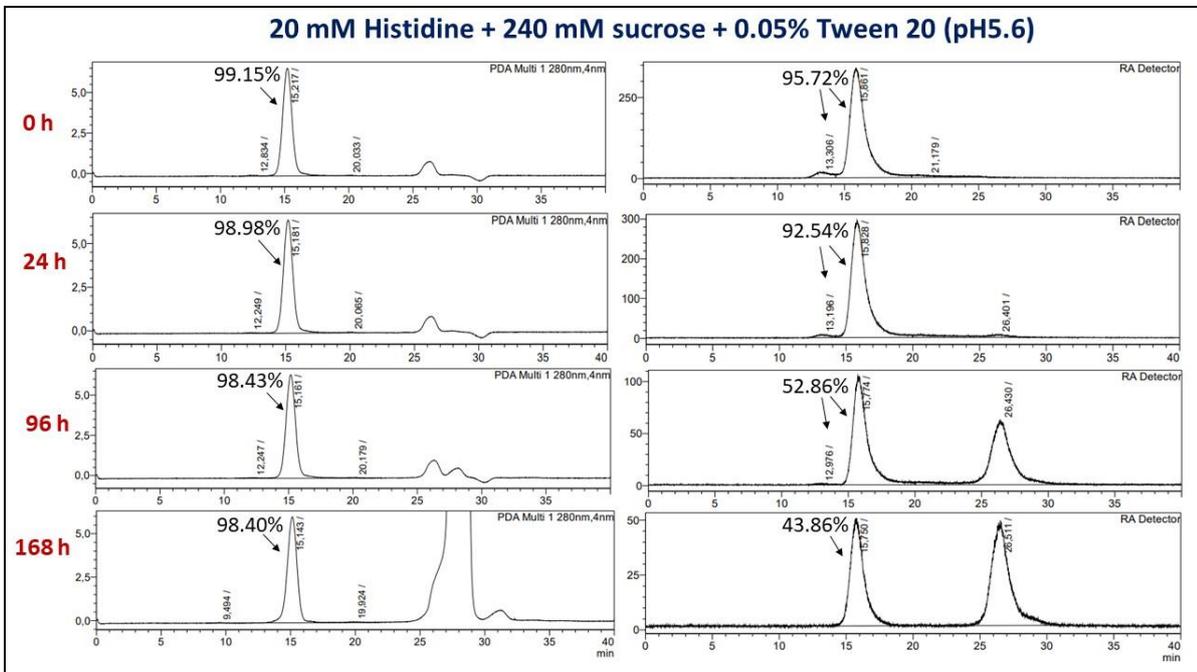


圖 44、銨-89 標誌抗體在 Histidine 溶液中 HPLC 分析結果，左邊是 280 nm 波長吸收，右邊是放射性訊號

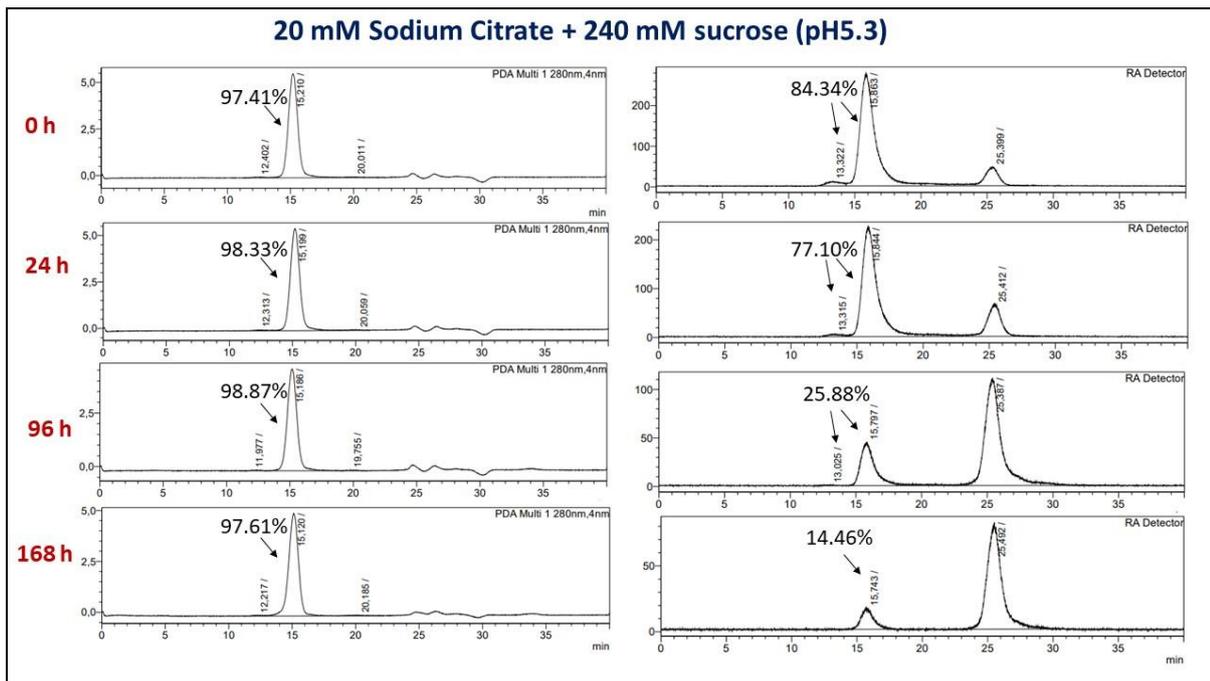


圖 45、銨-89 標誌抗體在 Citrate 溶液中 HPLC 分析結果，左邊是 280 nm 波長吸收，右邊是放射性訊號

(九) 參考文獻

1. The official website of Amsterdam UMC <https://www.amc.nl/web/home.htm>.
2. Poot AJ, Adamzek KWA, Windhorst AD, Vosjan MJWD, Kropf S, Wester HJ, van Dongen GAMS, Vugts DJ. Fully Automated ⁸⁹Zr Labeling and Purification of Antibodies. J Nucl Med. 2019 May;60(5):691-695. doi: 10.2967/jnumed.118.217158. Epub 2018 Dec 7. PMID: 30530830.
3. Van Dongen GA, Huisman MC, Boellaard R, Harry Hendrikse N, Windhorst AD, Visser GW, Molthoff CF, Vugts DJ. ⁸⁹Zr-immuno-PET for imaging of long circulating drugs and disease targets: why, how and when to be applied? Q J Nucl Med Mol Imaging. 2015 Mar;59(1):18-38. Epub 2014 Dec 17. PMID: 25517081.
4. Evans JB, Syed BA. From the analyst's couch: Next-generation antibodies. Nat Rev Drug Discov. 2014 Jun;13(6):413-4. doi: 10.1038/nrd4255. Epub 2014 Apr 11. PMID: 24722461.
5. Nayak TK, Brechbiel MW. Radioimmunoimaging with longer-lived positron-emitting radionuclides: potentials and challenges. Bioconjug Chem. 2009 May 20;20(5):825-41. doi: 10.1021/bc800299f. PMID: 19125647; PMCID: PMC3397469.
6. Chomet M, Schreurs M, Bolijn MJ, Verlaan M, Beaino W, Brown K, Poot AJ, Windhorst AD, Gill H, Marik J, Williams S, Cowell J, Gasser G, Mindt TL, van Dongen GAMS, Vugts DJ.

Head-to-head comparison of DFO* and DFO chelators: selection of the best candidate for clinical ^{89}Zr -immuno-PET. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2021 Mar;48(3):694-707. doi: 10.1007/s00259-020-05002-7. Epub 2020 Sep 5. PMID: 32889615; PMCID: PMC8036225.

三、心得

儘管我在荷蘭阿姆斯特丹大學醫療中心的實習只持續了一個月，但這段時間為我帶來了豐富的收穫。它拓寬了我對核醫藥物研究領域的國際視野和前瞻性思維，同時也加強了我的外語溝通能力。此外，我有幸認識了眾多在放射化學、生物學、醫學等專業的學者專家，進行抗體藥物、銦-89 放射性同位素與 GMP 生產等領域的學習與交流，增加未來國際合作的可能性。本次實習可惜點是沒遇到臨床試驗進行，沒有接觸到臨床端的部分，包含病人給藥、臨床數據分析等，希望有機會能學習相關技術。

在發展核醫相關藥物或技術時，穩定的同位素供應是重點之一，TCA 雖然本身沒有生產同位素，都是跟 BV cyclotron 購買，但 BV cyclotron 就住在同一個大樓中，雙方合作十分密切，所以 TCA 易於取得同位素，而運送時間短還可以取得更高活度射源。BV cyclotron 原本的加速器已經生產超過 35 年，已經蓋好新的加速器廠房，預計今年底可以正式生產供應。TCA 在儀器管理上也是值得借鏡，採取專業管理方法，一般技術人員可以正常使用，但是內建的參數、方法設定、儀器維護由專人負責，避免儀器因為人為因素損壞。另外貴重儀器會有定期汰換時程，為了避免突然巨額支出，會分成數年攤提費用，固定提撥一定比例經費，以用於貴重儀器汰換。

實習單位的先前研究中已證實新型螯合劑 DFO* 結合銦-89 的能力優於現行的 DFO，雖然目前臨床試驗供藥仍是 DFO，但未來的研發方向會逐進改成 DFO*，相關的臨床試驗預計明年會開始進行，但缺點是目前購買 DFO* 的成本較高。所以本所在發展 ^{89}Zr -Immuno-PET 相關技術時，應朝向使用 DFO*，與國際趨勢接軌。另外，職針對專一性接合法詢問 *prof. Daniëlle Vugts*，她表示若是一般的抗體藥物，其實隨機法就符合需求，因為抗體本身分子量高，隨機接合影響靶向能力機率不高，而且 CAR 建議 1 左右即可，太高會影響穩定度，另外專一性接合法成本較高也是考量點之一。專一性接合法比較適合 ADC 藥物，因為可以避免螯合劑接合到活性藥物成分上，進而影響藥物治療作用。在銦-89 標誌之自動合成盒方面，*prof. Daniëlle*

Vugts 原先發表的設計，在 PD10 管柱遇到困難，因為屬於封閉式管路系統，PD10 管柱流洗則需要重力進行分離純化，所以此設計已被放棄不用，但明年開始 TCA 與跟新的廠商有合作計畫，來開發新一代自動合成盒。

四、建議事項

(一) 持續派員出國實習訓練。

透過派員前往國際頂尖的實驗室和研究機構，可以獲得寶貴的經驗，了解國際上核醫藥物研發領域的最新趨勢，能帶回最新的技術和方法，提高本院的技術量能。核醫藥物的設計、開發、分析和臨床生產一直在不斷進步，緊密關注國際研究動態十分重要，派員到國際上也有助於人員的專業訓練。最重要的是，這種國際交流也為我們建立了重要的聯繫管道。通過展示我們的研究能力和執行成果，我們可以吸引國際專家的注意，促進未來的合作機會。這種合作不僅有助於我們的研究項目，還有助於推動核醫藥物領域的不斷發展和創新。

(二) 建立穩定鉛-89 生產技術。

本院已經擁有成熟的臨床前分子影像分析技術，在本次實習中，學習了鉛-89 放射性同位素的標誌和應用技術。然而目前我們主要依賴於國外供應商進口鉛-89 射源，這導致了高昂的成本以及供應的不穩定性。要持續發展和精進 ^{89}Zr -Immuno-PET 應用技術，穩定的鉛-89 供應至關重要。因此，我們認為建立本院的鉛-89 自行生產技術，將有助於降低成本、確保供應的穩定性，為本院的分子影像領域帶來更多的機會和突破。

(三) 維持阿姆斯特丹大學醫療中心的聯繫。

這次的實習專注於鉛-89 放射性同位素的標誌和應用技術，而阿姆斯特丹大學醫療中心作為歐洲頂尖的醫療機構之一，提供了一個廣泛的學習和合作機會。該中心在分子影像領域涵蓋了多個不同的放射性同位素，包括 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{124}I 、 ^{177}Lu 以及 ^{131}I ，並致力於多個研究領域，包括腦神經、腫瘤和發炎等。此外，與阿姆斯特丹大學醫療中心的合作也為長期合作提供了潛在的機會。這次短期的實習可以作為未來更深入的合作的起點，持續建立專業聯繫，參與更多合作項目，共同推動分子影像領域的發展。

五、附 錄

附錄 1



Amsterdam April 28, 2023

Dear Wei-Lin,

Thank you very much for your letter and thanks for your interest in our research. I would like to invite you, Mr. Wei-Lin Lo, to come over to Amsterdam University Medical Center, location VUmc to receive an approximately one month training course (about 1st Sep 2023 to 30st Sep 2023). I would be glad to supervise you during the training period in our research group. I hope you will be able to learn the modification and radiolabeling of Zr-89 antibody. We look forward to your visit and a fruitful outcome from this collaboration.

Sincerely yours,



On behalf of dr Vugts, Prof. dr. Guus van Dongen.

Prof. dr. Guus van Dongen,
managing director Amsterdam UMC Imaging Center Amsterdam
Radiology & Nuclear Medicine
New Location Office VUmc | ZH 1A020 | De Boelelaan 1117, 1081HV Amsterdam
T: +31 20 4442869 | E: gams.vandongen@amsterdamumc.nl

Dr. Danielle J. Vugts
Associate professor
VU University Medical Center Amsterdam – Radiology & Nuclear Medicine
E: d.vugts@amsterdamumc.nl
P: +31 20 4445699
De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam

Modification of proteins with N-suc-DFO-Fe

1. Before starting be sure that all equipment and solutions have been prepared and are ready for use.
2. Pipette the needed volume of mAb (~5 mg) in an eppendorf tube.
3. Adjust the total volume to 970 μ L with 0.9 % NaCl.
4. Adjust the pH to pH 9.5 – 9.7 with 0.1 M Na₂CO₃.
5. Take the TFP-N-suc-Df-Fe ester from the -70 °C. Dilute the TFP-ester with MeCN to 3.3 nmol/ μ L.
6. Needed amount of ester for a final 1:1 ratio (mAb:TFP-ester) is 66 nmol (reacting with 5 mg = 33 nmol mAb; theoretical maximum ratio = 2).
7. Add 20 μ L diluted TFP-ester to the conjugation tube. Incubate at RT for 30 minutes.
8. After 20 minutes of conjugation, take a 60 μ L HPLC-sample and inject 20 μ L on the HPLC-system.
9. Turn on the thermomixer and set it to 35 °C. Make sure it is heating up!
10. In the meantime, wash a PD-10 column four times with ~5 mL 0.9 % NaCl.
11. After 30 minutes conjugation, add 2 times 25 μ L 100 mg/mL gentisic pH 4.0 – 4.5 and adjust the pH to pH 4.2 – 4.5 with 0.25 M H₂SO₄ (max. 6 μ L 0.25 M H₂SO₄ per step). Make sure to homogenize the solution after each addition step before measuring the pH!
12. Add 50 μ L 25 mg/mL EDTA and mix gently by petting up and down or inverting the vial.
13. Place the reaction tube in the thermomixer for 30 minutes at 35 at 500 rpm.
14. After 30 minutes, apply the reaction mixture on the 0.9 % NaCl prewashed PD-10 column.
Note: if it is not known when the modified mAb elutes from the PD-10 column; pipette 11x 0.5 mL 0.9 % NaCl on the column, collect each fraction separately and measure by NanoDrop at 280 nm to determine the antibody-containing fractions.
15. Collect the flow-through in a waste tube, pipette 1.5 mL 0.9 % NaCl on the column and again collect the flow-through in the waste tube.
16. Pipette 2 mL 0.9 % NaCl on the column and collect the flow-through in a 15 mL tube.

Modification of proteins with DFO-pPhe-NCS chelate

1. Pipette the required amount of mAb solution into an eppendorf tube.
2. Adjust the reaction mixture to a total volume of 1 ml by adding a sufficient amount of normal saline into the tube.
3. Adjust pH of the mAb solution to pH = 8.9 – 9.1 with 0.1 M Na₂CO₃.
4. Add to the protein solution 3-fold molar excess of the Df-Bz-NCS-chelator.
5. 20 μL 5 mM Df-Bz-NCS in DMSO is added to intact antibody
6. Incubate the reaction for 30 min at 37°C using a Thermomixer at 550 rpm.
7. In the mean time rinse a PD-10 column four times with 50 Mm sodium acetate + 200 mM sucrose (pH = 5.4-5.6)
8. Pipette the conjugation reaction mixture onto the PD-10 column and discard the flow-through.
9. Pipette 1.5 ml 50 Mm sodium acetate + 200 mM sucrose (pH = 5.4-5.6) onto the PD-10 column and discard the flow-through.
10. Pipette 2 ml 50 Mm sodium acetate + 200 mM sucrose (pH = 5.4-5.6) onto the PD-10 column and collect the Df-protein.
11. The Df-protein can be stored at -20 °C until the day of radiolabeling. The NCS-Bz-Df-mAb is stable in storage for at least two weeks.

Radiolabeling with ⁸⁹-zirconium

1. Pipette a maximum of 200 μ L ⁸⁹-zirconium to a 20 mL β -scintillation glass vial and measure the activity by using a dose calibrator.
2. Adjust the volume to 200 μ L with 1 M oxalic acid and place the vial in the wobbler.
3. Add 90 μ L 2.0 M Na₂CO₃, cap the vial, turn on the wobbler for 3 minutes.
4. After 3 minutes, pipette 1000 μ L 0.5 M HEPES buffer to the reaction vial.
5. Finally, add up to 710 μ L of the modified antibody and adjust the total volume to 2 mL with 0.9 % NaCl.
6. Incubate for 60 minutes at RT.
7. In the meantime, wash a PD-10 column with four times 5 mL of the formulation buffer; For mAb-N-suc-DFO, generally use 5 mg/mL gentisic acid or 0.9 % NaCl. For mAb-NCS-DFO, generally use 50 Mm sodium acetate + 200 mM sucrose (pH = 5.4-5.6).
8. After 60 minutes, measure the activity in the reaction vial by using a dose calibrator.
9. Apply the reaction mixture to the pre-washed PD-10 column. Note: if it is not known when the radiolabeled conjugate elutes from the PD-10 column; pipette 11x 0.5 mL formulation buffer on the column, collect each fraction separately and measure for activity by using a dose calibrator.
10. Collect the flow-through in a waste tube, pipette 1.5 mL formulation buffer on the column and again collect the flow-through in the waste tube.
11. Pipette 2.0 mL formulation buffer on the column and collect the flow-through in a separate tube.
12. Measure the waste tube, radiolabeled mAb, PD-10 column, empty reaction vial + pipette-tip and an empty tube for activity by using a dose calibrator.
13. For mAb-N-suc-DFO, QC-analysis by HPLC and iTLC.
14. For mAb-NCS-DFO, QC-analysis by HPLC and Spinfilter analysis.

iTLC analysis

1. Take a tube and fill this tube with 450 μL 20 mM citric acid iTLC eluent and 50 μL acetonitrile.
2. Take another two tubes and mark them.
3. Take a iTLC strip and pipette 1-2 μL (approximately 50,000-1,000,000 cpm) from the conjugate on the silica impregnated side of the iTLC strip, at the middle of the base line, which is the line under the '1' on the iTLC strip.
4. Place the iTLC strip in vertical position with bottom down into the tube with 500 μL iTLC buffer.
5. When the iTLC eluent reaches the green part at the top of the iTLC strip, take the strip out of the tube.
6. Cut with scissors the 2 marked sections of and transfer each of the sections in their respective marked tubes.
7. Place the two tubes in the Gamma counter.
8. The radiochemical purity can calculate from the raw counts.

Spinfilter analysis

1. Prepare the wash buffer: add 50 μL DMSO to 950 μL of 50 mM sodium acetate + 200 mM sucrose.
2. Add 4 μL of the sample to 96 μL of wash buffer.
3. Assemble the filter in the supplied Eppendorf and pipette the buffer with the product onto the filter.
4. Spin down at 14000 rcf for 7 min.
5. Wash the filter with 100 μL wash buffer and spin down at 14000 rcf for 7 min.
6. Wash the filter again with 100 μL wash buffer and spin down at 14000 rcf for 7 min.
7. Remove the filter from the Eppendorf and put it into a tube.
8. Cut the lid of the Eppendorf tube and put the tube into a tube.
9. Cap both filter and supernatant tubes.
10. The tubes are counted in the Gamma-counter.
11. The radiochemical purity can calculate from the raw counts.

Lindmo assay

1. Take the cells out of the refrigerator and resuspend them gently.
2. Pipette the needed volume of cell-suspension (depending on cells and mAb) in a 15 mL tube.
3. Wash the cells two times with 15 mL 1% BSA/PBS solution, by centrifuging the cells for 5 minutes by 1500 rpm.
4. Reconstitute the washed cells to a total volume of 3.5 mL in the 15 mL tube.
5. The binding assay will be performed in triplicate, with five cell concentrations (0.5×10^7 , 0.25×10^7 , 1.3×10^6 , 6.3×10^5 , 3.13×10^5 /mL) and one control, in triplicate, for non-specific binding with a cell-concentration of 3.13×10^5 /mL.
6. Put in a Lindmo-box with 18 Lindmo-tubes (for 5 dilutions and a non-specific binding, all in triplicate).
7. Pipette 0.5 mL 1% BSA/PBS solution into the Lindmo-tubes 2, 3, 4 and 5. (Tube 1 is the tube with the highest cell concentration; tube 6 is the tube for the non-specific binding control.
8. Pipette 0.5 mL cells in tubes 1 and 2.
9. Subsequently take 0.5 mL from the tubes 2 and add it to the tubes 3,
10. subsequently take 0.5 mL from the tubes 3 and add it to the tubes 4,
11. subsequently take 0.5 mL from the tubes 4 and add it to the tubes 5,
12. subsequently take 0.5 mL from the tubes 5 and add it to the tubes 6.
13. Add 2 μ l of unlabeled ("cold") antibody (>5 mg/mL) to the tubes 6 (control for non-specific binding).
14. Make 10 ml labelled antibody solution (usual concentration is 10-15 ng/mL).
15. Add 0.5 ml of the labelled antibody to all the Lindmo-tubes.
16. Put the caps on the tubes; ensure that they are well closed.
17. Put the box in the head over head rotator in the cold room (4 °C) for an overnight period.
18. After an overnight period the Lindmo-box is put in the centrifuge. The tubes are spun down at 1500 rpm for 5 minutes.
19. The Lindmo-tubes are taken out from the Lindmo-box and the 500 μ L of each supernatant is pipetted in a plastic tube. The tube with the pellet and the remaining 500 μ L supernatant is placed in another plastic tube.
20. After pipetting all the supernatants the tubes are capped.
21. The tubes are counted in the Gamma-counter.
22. The radioactivity in the pellet (bound) and in the supernatant (unbound) is counted. The ratio between the bound and the unbound antibody gives the immune reactive fraction of the antibody.

Plate binding assay

1. Prepare antigen in coating buffer, the concentration will be 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 4.00 mL.
2. Take sufficient amount of strips of maxisorp break apart wells and put them in a white frame (3 strips of 8 wells per assay).
3. Add 100 μL of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antigen coating solution to each of the wells with a multichannel pipette.
4. Cover the strips with a plate sealer and incubate at room temperature for 4 hours.
5. Remove the excess antigen and wash the wells 3x with 150 μL Phosphate Buffered Saline (PBS).
6. Add 150 μL 1% BSA/PBS to each well and incubate by shaking at room temperature for 45 - 60 min.
7. Prepare 10 mL of ^{89}Zr -antibody of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 1% BSA/PBS.
8. Put in a tube rack 24 tubes (for 7 dilutions and a non-specific binding).
9. Pipette 1 mL 1% BSA/PBS into the 8.5 mL tubes 2, 3, 4, 5, 6 and 7. (Tube 1 is the tube with the highest antibody concentration; tube 8 is the tube for the non-specific binding control)
10. Pipette 1 mL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antibody solution in tubes 1 and 2 and mix well.
11. Take 1 mL from the tubes 2 and add it to the tubes 3, and repeat subsequently dilute step to tubes 8.
12. Add 200 μg of unlabelled antibody to the tubes 8
13. Discard the blocking solution from the wells and wash the wells three times with 200 μL 0.05% Tween20/PBS.
14. Add 100 μL of ^{89}Zr -antibody to each well.
15. Seal the wells with sealer and incubate by shaking at 2 – 8°C overnight on the shaker at 200 rpm.
16. The next day, 48 tubes are placed in a rack.
17. Pipette the supernatant (sup) of each well in each tubes.
18. Wash the wells 3 times with 150 μL 0.05% Tween20/PBS and add the washing step to the tubes with supernatant.
19. Put the individual wells into different tubes and cap all tubes.
20. The tubes are counting by gamma counter.
21. The radioactivity in the well (bound) and in the supernatant (unbound) is counted. The ratio between the bound and the unbound antibody gives the immune reactive fraction of the antibody.

Bead binding assay

1. Prepare 150 μL antigen coupled magnetic beads and resuspend the beads in the eppendorf tube by pipetting for 30 seconds.
2. Wash the beads three times with 1.0 mL 0.1 % PBS/BSA, by placing the eppendorf tubes in the DynaMag™-2 Magnet. After 30 seconds, carefully remove the supernatant by pipetting.
3. Reconstitute the washed magnetic beads in 1 % PBS/BSA to a total volume of 0.5 mL and transfer into a sterile 15 mL tube.
4. Add 1.25 mL 1 % PBS/BSA and store in the refrigerator until use.
5. The binding assay will be performed in triplicate with five concentrations (8.57×10^6 , 4.28×10^6 , 2.14×10^6 , 1.07×10^6 , 5.35×10^5 beads/mL) and one control for non-specific binding with a bead concentration of 5.35×10^5 .
6. Put in a Lindmo-box 18 Lindmo-tubes (for 5 dilutions and a non-specific binding, all in triplicate).
7. Pipette 0.25 mL 1 % BSA/PBS into the Lindmo tubes 2, 3, 4, and 5. (Tube 1 is the tube with the highest beads concentration; tube 6 is the tube for the non-specific binding control)
8. Pipette 0.25 mL beads in tubes 1 and 2 and mix well.
9. Take 0.25 mL from the tubes 2 and add it to the tubes 3, and repeat subsequently dilute step to tubes 6.
10. Add 100 μg of unlabelled antibody to the tubes 6.
11. Prepare a stock solution of ^{89}Zr -antibody of 15 ng/mL in 1 % BSA/PBST.
12. Add 0.35 mL ^{89}Zr -antibody to all the Lindmo-tubes and caps the tubes.
13. Put the box in the rotator at room temperature overnight.
14. The next day, 36 tubes are placed in a rack.
15. The Lindmo-box is put in the centrifuge. The tubes are spun down at 4000 rpm for 10 minutes.
16. The Lindmo-tubes are taken out from the Lindmo-box and the 300 μL of the supernatant (sup) is pipette in a tube. The tube with the pellet and the remaining 300 μL supernatant is placed in another tube.
17. The tubes are counting by gamma counter.
18. The radioactivity in the well (bound) and in the supernatant (unbound) is counted. The ratio between the bound and the unbound antibody gives the immune reactive fraction of the antibody.

Zirconium oxalate Titration method

1. Prepare the cold Zr stock in the fridge.
2. Pipette 2 MBq into 1.5 mL Eppendorf tubes.
3. Pipette the calculated amount of 1 M oxalic acid into the reaction vial.
4. Pipette the calculated amount of cold zirconium (0 eq, 1 eq, 2 eq, 3 eq and 4 eq to antibody amount) into the reaction vial.
5. Pipette the calculated amount of 0,9%NaCl.
6. Pipette 45 μ L 2 M Na₂CO₃ and wait for 3 minutes.
7. Pipette 500 μ L 0.5 M HEPES pH = 7.1 – 7.3 into the reaction vial.
8. Pipette the calculated volume of modified mAb solution into the reaction vial.
9. React for 60 minutes at RT, 550 rpm.
10. After 60 minutes take a 4 μ L sample of each labeling reaction and perform a spin filter test or iTLC test.
11. Measure the labeling efficiency of each group.
12. The chelator to mAb ratio is calculated by labeling efficiency and cold zirconium amount.

Optional:

13. Rinse the PD-10 a fourth time with formulation buffer or 0,9%Nacl .
14. Measure the activity in the reaction vial.
15. Pipette the reaction mixture onto the PD-10 column, elute the column with 0.9% NaCl, and collect twelve 0.5 mL fractions.
16. Measure the activity in the empty reaction vial
17. Measure the fractions and calculate the labeling efficiency.
18. The chelator to mAb ratio is calculated by labeling efficiency and cold zirconium amount.