

固体靶 PET 核素⁸⁹Zr 的制备、质量控制和抗体标记

王风 郭晓轶 刘特立 丁立新 夏雷 丁缙 孟祥溪 蒋金泉 朱华 杨志
 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所核医学科、恶性肿瘤发病机制及转化研究
 教育部重点实验室 100036
 通信作者: 朱华, Email: zhuhuananjing@163.com

【摘要】目的 进行固体靶 PET 核素⁸⁹Zr 的制备和质量控制, 制备⁸⁹Zr 并标记产物⁸⁹Zr-去铁胺(DFO)-曲妥珠单克隆抗体(Trastuzumab)。**方法** 采用核反应⁸⁹Y(p,n)⁸⁹Zr 生产⁸⁹Zr, 设计加工⁸⁹Y 靶的固定靶托, 由医用回旋加速器 20 μA 质子束流约 12.5 MeV 轰击⁸⁹Y 靶约 1~2 h。使用羟肟酸树脂分离纯化轰击后的靶片, 用 1 mol/L 草酸溶液淋洗获得⁸⁹Zr。分析其特征峰、放射性核素纯度及放化纯等。利用⁸⁹Zr 草酸溶液和 DFO-Trastuzumab 在室温下标记制得⁸⁹Zr-DFO-Trastuzumab, 测定其放化纯。**结果** 成功进行 11 次⁸⁹Zr 的生产, 获得的⁸⁹Zr 产量为 555~1 506 MBq, 产额(34.8 ± 5.2) MBq · μA⁻¹ · h⁻¹, 获得纯化后产品 227.2~991.6 MBq(纯化率 42%~87%), 产品放射性浓度可达 1.0×10^6 MBq/L。**γ**能谱分析显示了⁸⁹Zr 的特征峰(511 和 909 keV), 未发现其他杂质峰, 放射性核素纯度与放化纯均接近 100%。合成的⁸⁹Zr-DFO-Trastuzumab 放化纯>95%, 人血清白蛋白(HSA)溶液中放置 72 h 放化纯仍超过 90%。**结论** 通过自行设计靶片, 成功制得性能优良的固体靶 PET 核素⁸⁹Zr 并行抗体标记, 为⁸⁹Zr 药物的临床应用提供保障。

【关键词】 锆; 放射性同位素; 同位素标记; 去铁胺; 抗体, 单克隆

基金项目: 北京市自然科学基金(7184195); 京津冀基础研究合作专项(H2018206600)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191018-00226

Production and purification of solid target PET nuclide ⁸⁹Zr and its antibody labeling

Wang Feng, Guo Xiaoyi, Liu Teli, Ding Lixin, Xia Lei, Ding Jin, Meng Xiangxi, Jiang Jinquan, Zhu Hua, Yang Zhi

Key laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Department of Nuclear Medicine, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100036, China

Corresponding author: Zhu Hua, Email: zhuhuananjing@163.com

【Abstract】Objective To produce the solid target nuclide ⁸⁹Zr, and prepare the probe ⁸⁹Zr-desferrioxamine (DFO)-Trastuzumab. **Methods** The ⁸⁹Y(p,n)⁸⁹Zr nuclear reaction was used for ⁸⁹Zr production. ⁸⁹Y target was irradiated by 20 μA proton in a medical cyclotron ($E = 12.5$ MeV) for about 1~2 h. ⁸⁹Zr was purified from hydroxamate resin using 1 mol/L oxalic acid solution. The characteristic peak, radionuclide purity and radiochemical purity of ⁸⁹Zr were determined by γ -ray spectroscopy. ⁸⁹Zr-DFO-Trastuzumab probe was synthesized by the reaction of ⁸⁹Zr-oxalate and DFO-Trastuzumab at room temperature, and the radiochemical purity was measured. **Results** ⁸⁹Zr was prepared successfully for 11 times, and the production of ⁸⁹Zr was 555~1 506 MBq, with production rate of (34.8 ± 5.2) MBq · μA⁻¹ · h⁻¹. After the purification (purification rate: 42%~87%), 227.2~991.6 MBq ⁸⁹Zr was obtained, with the concentration of 1.0×10^6 MBq/L. The γ spectrum showed that the characteristic peak of ⁸⁹Zr were 511 and 909 keV, and no impurities were found. The radionuclide purity and radiochemical purity were both close to 100%. ⁸⁹Zr-DFO-Trastuzumab was successfully labeled with radiochemical purity more than 95%, and it was above 90% within 72 h in human serum albumin (HSA) solution. **Conclusion** Through the self-designed target assembling, the solid target PET nuclide ⁸⁹Zr with high quality and labeling are successfully achieved, which provides guarantee for the clinical application of the ⁸⁹Zr drug.

【Key words】 Zirconium; Radioisotopes; Isotope labeling; Deferoxamine; Antibodies, monoclonal

Fund program: Beijing Natural Science Foundation (7184195); Jing-Jin-Ji Special Projects for Basic Research Cooperation (H2018206600)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191018-00226

正电子核素⁸⁹Zr[$E_{\max(\beta^+)} = 897$ keV, $E_{(\gamma)} = 511$ keV, $E_{(\gamma)} = 909$ keV]衰变生成稳定核素⁸⁹Y, 物理半衰期

为 78.41 h, 可以匹配具有相似生物半衰期抗体的体内代谢过程, 进行抗体标记的 PET 免疫显像^[1-2], 从而在体实时监测肿瘤免疫治疗药物的体内分布, 筛选出适合进行抗体靶向治疗的肿瘤患者^[3-4]。⁸⁹Zr 还可用于标记非抗体物质, 评价或指导相关临床研究^[5-6]。国外诸多单位已在进行⁸⁹Zr 的生产^[7-10], 2009 年 Holland 等^[11]提出制备⁸⁹Zr 的标准方法, 其产额为 $56.2 \text{ MBq} \cdot \mu\text{A}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 单位靶面积产额为 $7.4 \text{ MBq} \cdot \mu\text{A}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。与之相比, 我国在放射性核素⁸⁹Zr 的制备方面还有待提高, 国内有关⁸⁹Zr 生产的文章很少^[12], 亦缺少后续相关的成功应用报道。本研究利用 20 MeV 医用回旋加速器连续 11 次成功制备固体靶核素⁸⁹Zr, 并进行质量控制分析, 以稳定提供高品质的⁸⁹Zr。

材料与方法

1. 试剂和设备。⁸⁹Y 薄片(化学纯度 99.9%, 厚度 0.064 cm)购自美国 Alfa Aesar 公司, HCl 和草酸等缓冲液和化学药品均购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 去铁胺(desferrioxamine, DFO)、曲妥珠单克隆抗体(Trastuzumab)和羟肟酸树脂分别购自美国 Macrocytomics、Genentech Inc 公司和法国 Triskem 公司。主要设备:回旋加速器包含固体靶系统(HM-20S, 日本住友公司)、薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)放射性扫描仪(美国 Bioscan 公司)、高纯锗 γ 能谱仪(美国 Canberra 公司)和活度计(CRC-25R, 美国 CAPINTEC 公司)。

2. ⁸⁹Y 靶片的制备和照射。设计制备装载⁸⁹Y 靶片的靶托(材质为 Al), 将剪裁好的⁸⁹Y 靶片装载于靶托中心预留凹槽处。将靶托安装于回旋加速器固体靶系统, 固体靶前端接入回旋加速器氦气冷却系统, 后端接入水冷系统, 检查固体靶密封性, 保证水冷和氦冷循环系统正常。调节能量衰减膜厚度, 使质子能量衰减至约 12.5 MeV, 轰击束流 20 μA , 轰击时间 1~2 h, 轰击完成后使用自动化回收系统收集靶片。

3. ⁸⁹Zr 的纯化和质量控制。通过自动回收装置将轰击后的靶片收集至热室, 放置 24 h 以去除短寿命的放射性杂质。将靶片从固体靶托中卸下, 并置于 5 ml HCl(6 mol/L)溶液中完全溶解, 溶解液通过预处理的羟肟酸树脂[树脂依次通过 2 ml 草酸(1 mol/L)、10 ml 18 MΩ H₂O 和 2 ml HCl(2 mol/L)冲洗和活化], 后分别以 10 ml HCl(2 mol/L)和 10 ml 高纯水冲洗, 最后用 1 ml 草酸(1 mol/L)溶液分为 4 次

(0.25 mL/次)从树脂中淋洗出⁸⁹Zr 产品。

采用活度计进行产品活度测量并计算放射性浓度, 采用 γ 能谱仪测定⁸⁹Zr 的放射性核素纯度, 采用 TLC 放射性扫描仪测定⁸⁹Zr 的放化纯, 表征产品的形态、外观、放射性浓度、比活度和 pH 值等质量控制指标。

4. ⁸⁹Zr-DFO-Trastuzumab 的标记和质量控制。将 DFO 加入到 Trastuzumab 溶液(pH 值 9.0)中, 37 °C 反应 60 min, 获得 DFO-Trastuzumab, 后将⁸⁹Zr 草酸溶液和 DFO-Trastuzumab 在 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸{(2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid, HEPES}缓冲液(pH 值 7.0)中室温反应 60 min, 获得⁸⁹Zr-DFO-Trastuzumab 探针。以丙酮溶液作为展开剂, 使用 TLC 放射性扫描仪分析产品放化纯及其在含质量分数 5% 柠檬酸的人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)溶液中的稳定性。

5. 统计学处理。采用 Excel (Microsoft Office 2016)软件处理数据, 符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1. ⁸⁹Y 靶片的制备和照射。成功设计并制备⁸⁹Y 的固定靶托(直径 3.0 cm, 厚度 0.2 cm), 中心凹槽(直径 1.0 cm, 深度 0.1 cm)用于嵌入⁸⁹Y 靶片(图 1A, 1B)。剪裁合适的⁸⁹Y 靶片[质量(216 ± 4) mg; 直径(1.0 ± 0.1) cm; 厚度 0.064 cm]成功嵌入靶托中心, 固定牢靠且表面均匀平整(图 1C)。靶片照射期间, 质子束流稳定, 冷却系统正常, 轰击结束后⁸⁹Y 靶片的颜色从深灰色变为浅灰色(图 1D)。

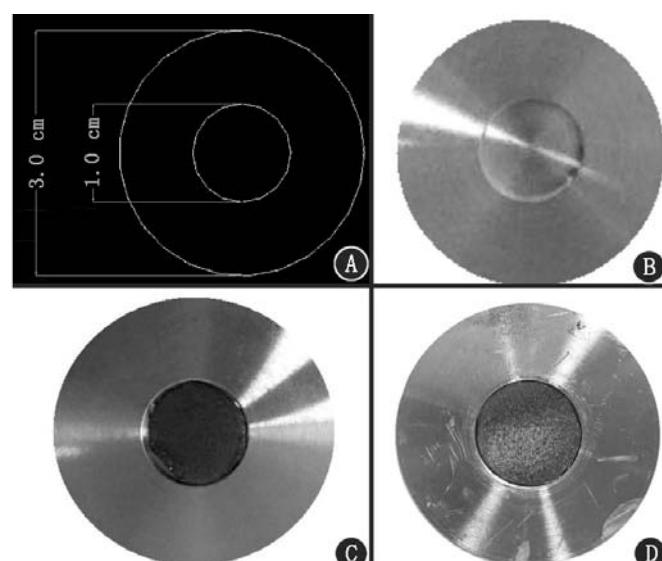


图 1 ⁸⁹Y 靶片和靶托设计图及实物图。A. ⁸⁹Y 靶托设计图; B. ⁸⁹Y 靶托; C. 靶片装载于靶托(照射前); D. 靶片装载于靶托(照射后)

2. ^{89}Zr 的纯化和质量控制。共成功进行 11 次靶片轰击和纯化, 轰击束流 $20 \mu\text{A}$, 轰击时间 $50\sim129 \text{ min}$, 获得的 ^{89}Zr 产量为 $555\sim1506 \text{ MBq}$, 产额为 $(34.8\pm5.2) \text{ MBq} \cdot \mu\text{A}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 单位靶面积产额为 $44.4 \text{ MBq} \cdot \mu\text{A}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。纯化产品为无色透明液体(pH 值 $1\sim2$), 纯化率 $42\%\sim87\%$ ($227.2\sim991.6 \text{ MBq}$), 放射性浓度可达 $1.0\times10^6 \text{ MBq/L}$, 比活度为 $1.7\times10^7 \text{ GBq/g}$ 。 γ 能谱图显示 ^{89}Zr 的特征能峰为 511 和 909 keV, 未观察到其他放射性核素杂质能峰, ^{89}Zr 产品的放射性核素纯度接近 100%, 其放化纯亦接近 100%。

3. ^{89}Zr -DFO-Trastuzumab 的标记和质量控制。成功标记人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 特异性分子探针 ^{89}Zr -DFO-Trastuzumab, 产物具有良好的放化纯(>95%)。在含质量分数 5% 柠檬酸的 HSA 溶液中, ^{89}Zr -DFO-Trastuzumab 放置 72 h 后的放化纯仍超过 90%, 表明 ^{89}Zr -DFO-Trastuzumab 有良好的体外稳定性。

讨 论

新的治疗靶点和新的联合用药方案都是当下研究的热点, 许多研究机构使用 ^{89}Zr 标记抗体进行 PET 免疫显像, 分析抗体药物在体内的代谢生理过程, 评估肿瘤治疗效果^[13-15]。本单位在成功生产固体靶核素 ^{64}Cu 和 ^{124}I 后^[16-18], 又设计并制备 ^{89}Y 靶片, 并解决了轰击过程中靶片装载、水冷散热等问题, 进行了 11 次成功的生产, 生产工艺和参数如下: $20 \mu\text{A}$ 质子轰击, 轰击时间约 60 min, 使用羟肟酸树脂分离快速纯化 ^{89}Zr (约 30 min)。本研究利用回旋加速器成功制备高纯度的 ^{89}Zr 产品, 其平均产额可达 $34.8 \text{ MBq} \cdot \mu\text{A}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 单位靶面积产额为 $44.4 \text{ MBq} \cdot \mu\text{A}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, 产额略高于其他研究的报道数据^[19-21]。相较于国外的生产工艺, 本法的优势在于能够简捷、快速地获得高纯度产品, 快速响应临床药物制备需求, 满足临床诊断。与国内 Tang 等^[12] 的 ^{89}Zr 生产报道数据相比, 本研究分离提纯的 HCl 溶液浓度更低、体积需求更少, 产品比活度更高, 并成功制备了探针 ^{89}Zr -DFO-Trastuzumab, 生产的 ^{89}Zr 核素纯度通过质量控制分析验证, 这为 ^{89}Zr 标记药物在临床研究中的应用提供了保障。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] McKnight BN, Viola-Villegas NT. ^{89}Zr -ImmunoPET companion diagnostics and their impact in clinical drug development [J]. J Labelled

- Comp Radiopharm, 2018, 61(9): 727-738. DOI: 10.1002/jlcr.3605.
- [2] van de Watering FC, Rijpkema M, Perk L, et al. Zirconium-89 labeled antibodies: a new tool for molecular imaging in cancer patients [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 203601. DOI: 10.1155/2014/203601.
- [3] Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future [J]. J Clin Invest, 2015, 125(9): 3384-3391. DOI: 10.1172/JCI80011.
- [4] Perk LR, Visser OJ, Stigter-van Walsum M, et al. Preparation and evaluation of ^{89}Zr -Zevalin for monitoring of ^{90}Y -Zevalin biodistribution with positron emission tomography [J]. Eur J Nucl Med Imaging, 2006, 33(11): 1337-1345. DOI: 10.1007/s00259-006-0160-0.
- [5] Keliher EJ, Yoo J, Nahrendorf M, et al. ^{89}Zr -labeled dextran nanoparticles allow in vivo macrophage imaging [J]. Bioconjug Chem, 2011, 22(12): 2383-2389. DOI: 10.1021/bc200405d.
- [6] Pérez-Medina C, Tang J, Abdel-Attí D, et al. PET imaging of tumor-associated macrophages with ^{89}Zr -labeled high-density lipoprotein nanoparticles [J]. J Nucl Med, 2015, 56(8): 1272-1277. DOI: 10.2967/jnumed.115.158956.
- [7] Dias GM, Ramogida CF, Rousseau J, et al. ^{89}Zr for antibody labeling and *in vivo* studies—a comparison between liquid and solid target production [J]. Nucl Med Biol, 2018, 58: 1-7. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2017.11.005.
- [8] Queern SL, Aweda TA, Massicano A, et al. Production of Zr-89 using sputtered yttrium coin targets ^{89}Zr using sputtered yttrium coin targets [J]. Nucl Med Biol, 2017, 50: 11-16. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2017.03.004.
- [9] Synowiecki MA, Perk LR, Nijssen J. Production of novel diagnostic radionuclides in small medical cyclotrons [J]. EJNMMI Radiopharm Chem, 2018, 3(1): 3. DOI: 10.1186/s41181-018-0038-z.
- [10] Link JM, Krohn KA, O'Hara MJ. A simple thick target for production of ^{89}Zr using an 11 MeV cyclotron [J]. Appl Radiat Isot, 2017, 122: 211-214. DOI: 10.1016/j.apradiso.2017.01.037.
- [11] Holland JP, Sheh Y, Lewis JS. Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89 [J]. Nucl Med Biol, 2009, 36(7): 729-739. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2009.05.007.
- [12] Tang Y, Li S, Yang Y, et al. A simple and convenient method for production of ^{89}Zr with high purity [J]. Appl Radiat Isot, 2016, 118: 326-330. DOI: 10.1016/j.apradiso.2016.09.024.
- [13] Deri MA, Zeglis BM, Francesconi LC, et al. PET imaging with ^{89}Zr : from radiochemistry to the clinic [J]. Nucl Med Biol, 2013, 40(1): 3-14. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2012.08.004.
- [14] 程思源, 洪浩, 朱小华. ^{89}Zr 正电子显像剂的制备及进展 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2017, 37(11): 733-737. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.11.016.
- Cheng SY, Hong H, Zhu XH. Recent progress of ^{89}Zr tracers for PET imaging [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2017, 37(11): 733-737. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.11.016.
- [15] 曾永龙, 邓启民, 刘媛媛, 等. 用于放射免疫显像和治疗的抗体药物研究现状 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2016, 36(2): 196-200. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2016.02.024.
- Zeng YL, Deng QM, Liu YY, et al. Current status of radioimmunoimaging and radioimmunotherapy drugs [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2016, 36(2): 196-200. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2016.02.024.

- [16] Xie Q, Zhu H, Wang F, et al. Establishing reliable Cu-64 production process: from target plating to molecular specific tumor micro-PET imaging[J]. Molecules, 2017, 22(4): 641. DOI:10.3390/molecules22040641.
- [17] 朱华,王风,刘特立,等.新型固体靶核素⁶⁴Cu 的生产、质控及 microPET 显像[J].中华核医学与分子影像杂志, 2018, 38(12): 797-800. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.12.006.
- Zhu H, Wang F, Liu TL, et al. Production, quality control and microPET analysis of novel solid-target based radionuclide ⁶⁴Cu [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 38(12): 797-800. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.12.006.
- [18] Wang F, Liu T, Li L, et al. Production, quality control of next-generation PET radioisotope iodine-124 and its thyroid imaging[J]. J Radioanal Nucl Chem, 2018, 318(3): 1999-2006. DOI:10.1007/s10967-018-6277-3.
- [19] Tang L. Radionuclide production and yields at Washington University School of Medicine[J]. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2008, 52(2): 121-133. DOI:10.1016/j.ejmp.2008.01.007.
- [20] Meijs WE, Herscheid J DM, Haisma HJ, et al. Production of highly pure no-carrier added ⁸⁹Zr for the labeling of antibodies with a positron emitter[J]. Appl Radiat Isot, 1994, 45(12): 1143-1147. DOI:10.1016/0969-8043(94)90029-9.
- [21] Ciarmatori A, Cicoria G, Pancaldi D, et al. Some experimental studies on ⁸⁹Zr production [J]. Radiochimica Acta, 2011, 99(10): 631-634. DOI:10.1524/ract.2011.1822.

(收稿日期:2019-10-18)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

中华医学会杂志社对一稿两投问题处理的声明

为维护中华医学会系列杂志的声誉和广大读者的利益,现将中华医学会系列杂志对一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下:

1.本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管 2 篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处,但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿,应向有关期刊编辑部做出说明。

2.如 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表,除非文种不同,否则不可再将该文投寄给他刊。

3.请作者所在单位在来稿介绍信中注明该文稿有无一稿两投问题。

4.凡来稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿,则表明稿件仍在处理中,作者欲投他刊,应事先与该刊编辑部联系并申述理由。

5.编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时,应认真收集有关资料并仔细核实后再通知作者,同时立即进行退稿处理,在做出处理决定前请作者就此问题做出解释。期刊编辑部与作者双方意见发生分歧时,应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

6.一稿两用一经证实,期刊编辑部将择期在杂志中刊出其作者姓名和单位及撤销该论文的通告;对该作者作为第一作者所撰写的一切文稿,中华医学会系列杂志 2 年内将拒绝其发表;并就此事件向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

中华医学会杂志社