

Nghiên cứu điều chế và kiểm tra chất lượng ^{166}Ho -DOTMP - tác nhân tiềm năng điều trị giảm đau do ung thư di căn xương

Study on the preparation and quality control of ^{166}Ho -DOTMP - a potential agent in painful treatment of bone metastases

Nguyễn Thị Thu*, Nguyễn Thị Khánh Giang*,
Phạm Thành Minh*, Nguyễn Thanh Bình*,
Đinh Ngọc Bảo Nam*, Nguyễn Đình Lâm*,
Lê Văn Tiến**, Đặng Hồ Hồng Quang*

*Viện Nghiên cứu hạt nhân,
**Bệnh viện Đa khoa Lâm Đồng

Tóm tắt

Mục tiêu: ^{166}Ho -DOTMP là các phân tử gắn phóng xạ được dùng để cung cấp liều xạ cao đến tủy xương để điều trị các ung thư ác tính di căn xương và tủy xương. Báo cáo này trình bày quy trình điều chế và kiểm tra chất lượng ^{166}Ho -DOTMP. **Đối tượng và phương pháp:** DOTMP được gắn với đồng vị phóng xạ ^{166}Ho bằng phương pháp đánh dấu trực tiếp tạo liên kết phối trí với ion Ho^{3+} trong môi trường trung tính. Các khảo sát điều kiện tối ưu cho quá trình đánh dấu gồm pH, thời gian, nhiệt độ và tỷ lệ mol các chất tham gia phản ứng. Phức ^{166}Ho -DOTMP được kiểm tra hiệu suất đánh dấu, độ tinh khiết hoá phóng xạ, độ ổn định bằng phương pháp sắc ký giấy. **Kết quả:** Hiệu suất đánh dấu điều chế ^{166}Ho -DOTMP > 98% với tỷ lệ mol $^{166}\text{Ho}^{3+}$ và DOTMP là 1:30 1:40 và 1:50. Hoạt độ phóng xạ của ^{166}Ho là 10-40mCi, pH 6-8, thời gian 15 phút và nhiệt độ 25°C. Hiệu suất đánh dấu và độ tinh khiết hóa phóng xạ đạt hơn 98% và ổn định trong 3 ngày bảo quản. **Kết luận:** Phức hợp ^{166}Ho -DOTMP bước đầu đạt các yêu cầu được chất phóng xạ có thể dùng cho các nghiên cứu tiền lâm sàng.

Từ khóa: ^{166}Ho -DOTMP, đồng vị phóng xạ ^{166}Ho , giảm đau ung thư di căn xương.

Summary

Objective: ^{166}Ho -DOTMP are radiolabeled molecules which are used to deliver sufficient doses of ionizing radiation to bone marrow in the therapy of bone metastases and bone marrow malignancies. In this paper, the production and quality control of ^{166}Ho -DOTMP have been presented. **Subject and method:** DOTMP was labeled with ^{166}Ho by direct radiolabeled method which created coordination bonds with the Ho^{3+} ion in a neutral medium. The optimization conditions of radiolabeling procedure such as pH, time, temperature and reactants molar ratio was carried out. Thereafter, radiolabeling yield, radiochemical purity and stability of ^{166}Ho -DOTMP complexes were investigated using paper chromatography. **Result:** The results show that the radiolabeling efficiency in the preparation of ^{166}Ho -DOTMP was more than 98% with the reactants molar ratio of 1:30, 1:40 and 1:50. The radioactivity of ^{166}Ho was measured about 10-40mCi. The reaction conditions were gained at the pH 6-8 for 15 minutes and under the condition of the 25°C temperature. The radiolabeling yields and radiochemical purity were above 98% and stability for 3 days storage. **Conclusion:** The ^{166}Ho -DOTMP complexes initially reach the required criteria of radiopharmaceutical for continuing preclinical evaluations.

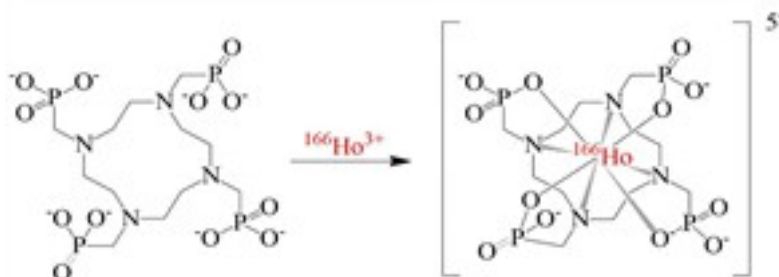
Keywords: ^{166}Ho -DOTMP, radioisotope ^{166}Ho , palliative for metastatic bone pain.

Ngày nhận bài: 25/8/2023, ngày chấp nhận đăng: 19/9/2023

Người phản hồi: Đặng Hồ Hồng Quang, Email: hongquank24@gmail.com - Viện Nghiên cứu hạt nhân

1. Đặt vấn đề

Để điều trị giảm đau các di căn xương, liệu pháp sử dụng thuốc phóng xạ nhắm trực tiếp vào các vùng tổn thương xương do di căn là hiệu quả và đã có nhiều ứng dụng lâm sàng. Để đi vào vùng tổn thương đó, các nhân phóng xạ cần được gắn với các chất phosphonat [1]. Trong số đó, DOTMP (1, 4, 7, 10 - tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetramethylene phosphonate) là phối tử vừa có ưu điểm tạo liên kết phối trí với các đồng vị phóng xạ kim loại, vừa khu trú trên bề mặt xương và hấp thụ trong tủy xương.



Hình 1. Cấu trúc DOTMP và ^{166}Ho -DOTMP

Các đồng vị phóng xạ gắn với các chất phosphonat gồm ^{32}P , ^{89}Sr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{166}Ho , ^{153}Sm , ^{177}Lu và ^{223}Ra và trong thập niên qua, nhiều loại thuốc phóng xạ ra đời như ^{32}P , ^{89}Sr , ^{153}Sm -EDTMP (ethylenediamine-tetramethylene phosphonic acid), ^{153}Sm -DOTMP, ^{177}Lu -EDTMP, $^{186/188}\text{Re}$ /HEDP (Hydroxyethylidene diphosphonic acid), ^{166}Ho -DOTMP [1, 4]. ^{166}Ho là đồng vị phóng xạ với nhiều ưu điểm nhờ phát tia bê ta với các năng lượng 1,85MeV (51%), 1,77MeV (48%). Ngoài ra ^{166}Ho phát tia gamma với năng lượng là 80keV (6,2%) và chu kỳ bán rã là 26,8 giờ, thích hợp để xạ hình theo dõi điều trị [4, 5]. Trong báo cáo này, chúng tôi khảo sát quá trình đánh dấu DOTMP với ^{166}Ho để điều chế ^{166}Ho -DOTMP và kiểm tra chất lượng và định hướng ứng dụng điều trị giảm đau ung thư di căn xương.

2. Đối tượng và phương pháp

Nguyên liệu, hóa chất: DOTMP công thức phân tử $\text{C}_{12}\text{H}_{32}\text{O}_{12}\text{N}_4\text{P}_4$, khối lượng phân tử là 548,3g/mol, CAS 91987-74-5, hãng BLD Pharmatech; Đồng vị phóng xạ ^{166}Ho dạng dung dịch $^{166}\text{HoCl}_3$, nồng độ phóng xạ 20,72GBq/ml (560mCi)/ml, hoạt độ riêng

DOTMP khi đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{166}Ho tạo thành ^{166}Ho -DOTMP và phức này được ưu tiên chỉ định trong điều trị các ung thư có liên quan đến tủy xương [2, 3]. ^{166}Ho tạo phức bền với DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid), DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), EDTA (ethylen-diaminetetraacetic acid), DOTMP, do vậy ^{166}Ho -DOTMP bền và ổn định cao trong các nghiên cứu invitro và invivo [3]. Cấu trúc phân tử của DOTMP và ^{166}Ho -DOTMP như sau (Hình 1).

0,41GBq/mg, Viện Nghiên cứu hạt nhân, Đà Lạt; Giấy sắc ký Whatman No.1, 51B, hãng Advantec, Nhật; Các hoá chất DTPA, natri hydrophosphat, natri dihydrophosphat, hãng Sigma, Mỹ; Thiết bị sử dụng là máy đo dose calibrator 127 Capintec, Mỹ. Thiết bị phóng xạ tự chụp Cyclone Plus, hãng PerkinElmer.

Phương pháp điều chế và kiểm tra chất lượng ^{166}Ho : Chiếu xạ 200mg $^{165}\text{Ho}_2\text{O}_3$, có độ giàu đồng vị 100% trong lò phản ứng hạt nhân với thông lượng neutron là $2,3 \times 10^{13} \text{ n/cm}^2/\text{giây}$. Thời gian chiếu xạ 300 giờ, phản ứng hạt nhân $^{165}\text{Ho}(n,\gamma)^{166}\text{Ho}$. Bia đã chiếu xạ được hòa tan trong 4,0ml dung dịch HCl 0,05N thành $^{166}\text{HoCl}_3$, Hoạt độ phóng xạ 2240mCi, hoạt độ riêng là $\sim 0,41\text{GBq/mg}$, nồng độ mol 0,264mM/ml, lọc qua phin lọc vô trùng 0,2 μm . Kiểm tra độ tinh khiết hạt nhân $^{166}\text{HoCl}_3$ đo trên phổ kế gamma Canberra và độ tinh khiết hóa phóng xạ xác định bằng phương pháp sắc ký giấy, dung môi là DTPA 10mM, pH 4 và amoniacetat 10%:methanol tỷ lệ 1:1.

Nghiên cứu tối ưu quy trình đánh dấu DOTMP với ^{166}Ho : Để tối ưu hoá quá trình đánh dấu, các khảo sát được thực hiện là tỷ lệ mol các chất là 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:30, 1:40 và 1:50, pH (3, 4, 5, 6, 7, 8 và 9), thời gian phản ứng (5, 15, 30, 60, 90 và 120 phút), nhiệt độ

phản ứng (4°C, 24°C, 37°C, 50°C, 60°C và 80°C). Sử dụng dung dịch 0,264mM Ho^{3+} và 0,264mM DOTMP. Các mẫu được phân tích bằng sắc ký giấy.

Điều chế ^{166}Ho -DOTMP: Cân 292mg (0,53mM) DOTMP, hòa tan trong 1,0ml nước cất pha tiêm, thêm vào đó 0,9ml NaOH 2M, thêm 0,27ml nước cất, kiểm tra pH dung dịch là 7,5-8,0, nồng độ 144,7mg/ml (0,264mM/ml). Thêm vào đó 67 μl ^{166}Ho , ~2,92mg Ho^{3+} (~0,0175mM), tỷ lệ 1:30, có hoạt độ phóng xạ 37,6mCi, ủ 15 phút ở nhiệt độ 24°C. Kiểm tra độ tinh khiết hóa phóng xạ bằng sắc ký giấy, dung môi amoni:methanol:H₂O tỷ lệ 1:10:20. ^{166}Ho -DOTMP được lọc qua phin lọc vô trùng 0,2 μm .

Phương pháp kiểm tra độ tinh khiết hóa phóng xạ: Dùng giấy sắc ký Whatman 01, kích thước 20 × 200cm, triển khai sắc ký trong dung môi NH₄OH:CH₃OH:H₂O tỷ lệ 1:10:20.

Phương pháp kiểm tra độ ổn định: ^{166}Ho -DOTMP sau khi điều chế được bảo quản trong các dung dịch NaCl 0,9%, phosphat 0,2M, pH 7,4 và human serum albumin 0,05%. Ủ các mẫu ở nhiệt độ 4°C, 24°C và 37°C theo thời gian 1, 2 và 3 ngày và kiểm tra độ tinh khiết hóa phóng xạ. Tất cả các băng sắc ký được chụp trên thiết bị phóng xạ tự chụp Cyclone, tính kết quả bằng phần mềm OptiQuant 5.0.

Xử lý số liệu

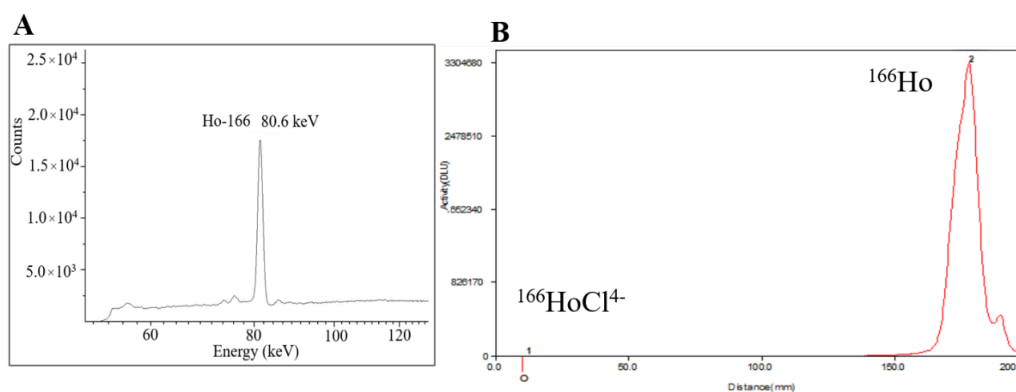
Các số liệu phân tích dùng phần mềm Prism 8. và tính độ tinh khiết hóa phóng xạ bằng phần mềm OptiQuant 5.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Sơ đồ nghiên cứu:



3. Kết quả

Kết quả điều chế đồng vị phóng xạ ^{166}Ho : $^{166}\text{HoCl}_3$ dùng trong nghiên cứu này có nồng độ phóng xạ đo được là 20,72GBq/ml (560mCi)/ml, hoạt độ riêng 0,41GBq/mg đo tại thời điểm sau khi dùng lò và làm nguội 24 giờ. Hạt nhân ^{166}Ho được nhận diện trên hệ phổ kế gamma, kết quả đo phổ gamma của hạt nhân ^{166}Ho chỉ có 1 đỉnh duy nhất đặc trưng của ^{166}Ho là 80,6keV (Hình 1A). Kiểm tra độ tinh khiết hóa phóng xạ trong dung môi amoniacetat 10%:methanol tỷ lệ 1:1, phức đạt > 99% tại vị trí gốc. Trong DTPA 10mM, tại vị trí gốc $R_f = 0,1-0,2$ là $^{166}\text{HoCl}_4^-$, $^{166}\text{Ho}^{3+}$ tạo phức với DTPA thành ^{166}Ho -DTPA, $R_f = 0,8-1,0$ (Hình 1B).



Hình 2. Đồ thị kiểm tra chất lượng đồng vị phóng xạ ^{166}Ho .

A. Phổ gamma của ^{166}Ho với đỉnh năng lượng đặc trưng là 80,6keV, đo trên phổ kế gamma ORTEC, phần mềm Canberra.

B. Độ tinh khiết hoá phóng xạ của ^{166}Ho trong hệ dung môi DTPA 10mM.

Kết quả phân tích cho thấy dung dịch $^{166}\text{HoCl}_3$ không chứa các đồng vị khác hoặc ion bản nào. độ tinh khiết hạt nhân của ^{166}Ho đạt hơn 99,9%.

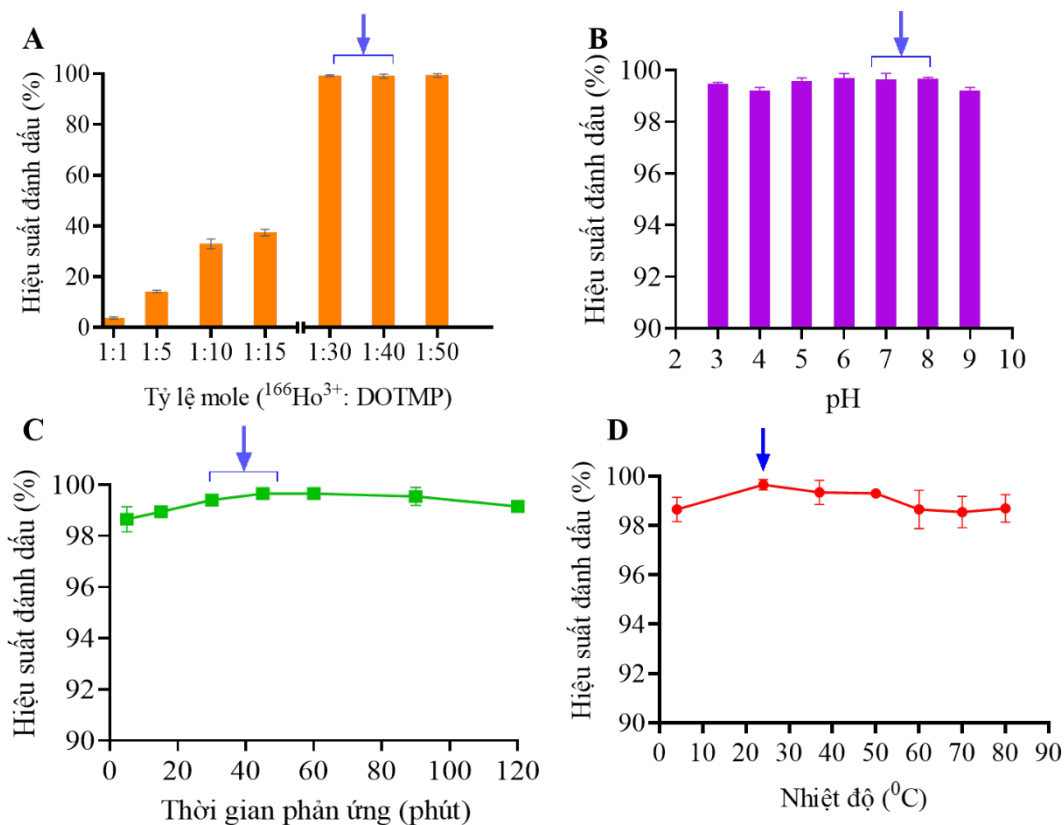
Nhận xét các kết quả khảo sát: Tỷ lệ mol các chất $^{166}\text{Ho}^{3+}$: DOTMP là 1:1, 1:5, 1:10 và 1:15 hiệu suất gắn đạt lần lượt là $93,75 \pm 1,62$, $99,55 \pm 0,49$, $99,60 \pm$

0,42 và $99,70 \pm 0,22\%$. Kết quả cho thấy hiệu suất gắn đạt hơn 99% tại các tỷ lệ 1:30, 1:40 và 1:50. Tỷ lệ

mol 1:30 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo (Bảng 1, Hình 3A).

Bảng 1. Kết quả khảo sát điều chế ^{166}Ho -DOTMP (n = 3)

Tỷ lệ mol	Hiệu suất (%)	pH	Hiệu suất (%)	Thời gian (phút)	Hiệu suất (%)	Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	Hiệu suất (%)
1:1	$3,66 \pm 0,49$	3	$99,45 \pm 0,07$	5	$98,65 \pm 0,49$	4	$98,65 \pm 0,49$
1:5	$14,23 \pm 0,51$	4	$99,20 \pm 0,14$	15	$98,95 \pm 0,21$	24	$99,65 \pm 0,21$
1:10	$32,93 \pm 1,91$	5	$99,59 \pm 0,11$	30	$99,4 \pm 0,14$	37	$99,35 \pm 0,49$
1:15	$37,40 \pm 1,30$	6	$99,69 \pm 0,18$	45	$99,65 \pm 0,07$	50	$99,30 \pm 0,14$
1:30	$99,20 \pm 0,30$	7	$99,63 \pm 0,25$	60	$99,65 \pm 0,21$	60	$98,65 \pm 0,78$
1:40	$99,10 \pm 0,85$	8	$99,65 \pm 0,07$	90	$99,55 \pm 0,35$	70	$98,55 \pm 0,64$
1:50	$99,26 \pm 0,68$	9	$99,20 \pm 0,14$	120	$99,15 \pm 0,07$	80	$98,70 \pm 0,57$



Hình 3. Đồ thị kết quả khảo sát điều chế ^{166}Ho -DOTMP, A. Tỷ lệ mol $^{166}\text{Ho}^{3+}$ và DOTMP, B. Khảo sát pH, thời gian phản ứng, C. Khảo sát thời gian phản ứng, D. Khảo sát nhiệt độ.

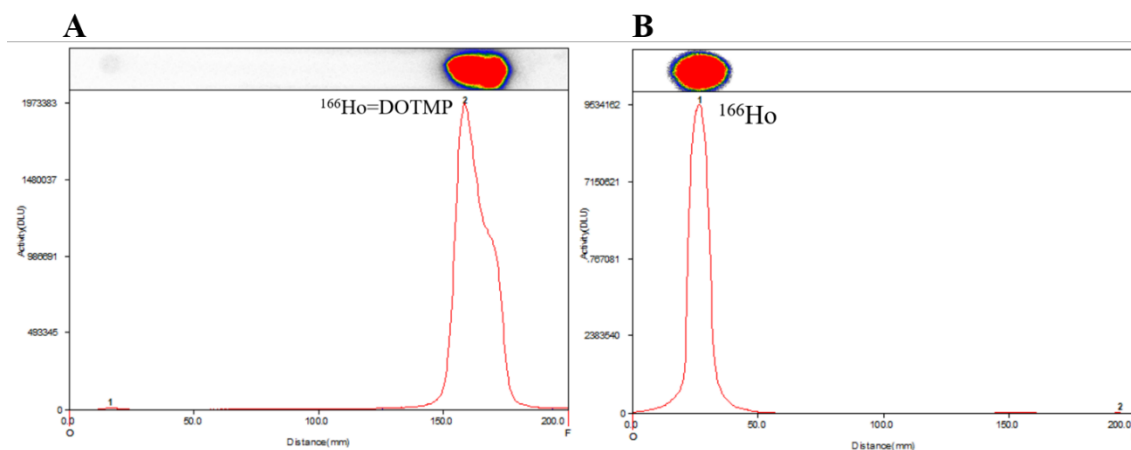
Với tỷ lệ mol các chất $^{166}\text{Ho}^{3+}$: DOTMP là 1:30 (cụ thể là 20 μl 0,264mM/ml ^{166}Ho và 600 μl 0,264mM/ml DOTMP), hiệu suất gắn đạt hơn 99% tại các pH từ 3 đến 9 (Bảng 1, Hình 3B) và pH 7-8 được chọn. Kết

quả khảo sát thời gian cho thấy cố định pH 7, nhiệt độ 24 $^{\circ}\text{C}$, hiệu suất gắn đạt hơn 99% trong thời gian từ 5-120 phút (Bảng 1, Hình 3C). Cuối cùng là, số liệu khảo sát nhiệt độ trên Bảng 3, Hình 3D, cố định tỷ lệ

mol 1:30, pH 7, thời gian 15 phút, nhiệt độ phản ứng 4°C, 24°C, 37°C, 50°C, 60°C và 80°C có hiệu suất gần hơn 98%, (Bảng 1, Hình 3D).

Kết quả kiểm tra độ tinh khiết hoá phóng xạ ^{166}Ho -DOTMP: Trên băng sắc ký lớp mỏng, phức ^{166}Ho -

DOTMP di chuyển về ngọn $R_f = 0,8-1,0$ (Hình 4A), ^{166}Ho nằm tại vị trí gốc, $R_f = 0,1-0,2$ (Hình 4B). Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{166}Ho -DOTMP đạt hơn 98%.



Hình 4. Độ tinh khiết hoá phóng xạ của ^{166}Ho -DOTMP (A) và ^{166}Ho (B).

Sắc ký giấy, 20 × 200mm, dung môi $\text{NH}_4\text{OH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:10:20), chụp trên máy phóng xạ tự chụp Cyclone.

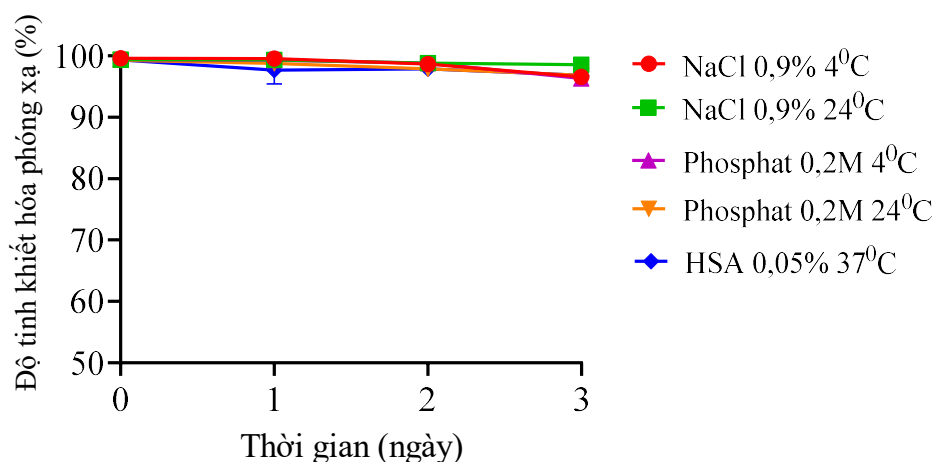
Kết quả cho thấy ^{166}Ho -DOTMP đạt chỉ tiêu chất lượng về độ tinh khiết hoá phóng xạ (>95%), có thể dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả kiểm tra độ ổn định ^{166}Ho -DOTMP: Theo dõi ổn định các mẫu theo thời gian từ khi điều chế đến 03 ngày, tổng hợp các kết quả phân tích các băng sắc ký cho thấy ^{166}Ho -DOTMP ổn định trong môi trường NaCl 0,9% ở điều kiện 4°C và 24°C đạt chất lượng tương ứng cho đến ngày thứ 3 là $96,55 \pm 1,06$, $98,55 \pm 0,49\%$ và trong đệm phosphat 0,2M là

$96,30 \pm 0,14$ và $96,80 \pm 0,42\%$. Đặc biệt là, ^{166}Ho -DOTMP ổn định *invitro* trong HSA ở nhiệt độ 37°C đến ngày thứ 3 là $96,85 \pm 0,63$ (Hình 5).

Hiệu suất đánh dấu: Thống kê hiệu suất đánh dấu dựa trên 03 mẻ ^{166}Ho -DOTMP điều chế, kết quả trong bình là $98,28 \pm 0,55\%$.

Độ bền của phức ^{166}Ho -DOTMP trong đệm phosphat không khác nhau đáng kể so với trong NaCl 0,9% ($p > 0,05$) (Hình 5).



Hình 5. Độ ổn định của ^{166}Ho -DOTMP

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chứng minh DOTMP có thể đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{166}Ho để điều chế ^{166}Ho -DOTMP với độ tinh khiết hóa phóng xạ và ổn định cao, có tiềm năng ứng dụng cho nghiên cứu lâm sàng. DOTMP có ái lực cao với các muối vô cơ trong xương như canxi photphat và hydroxyapatite, đặc hiệu trên mô xương tuỷ xương và phát huy hiệu quả khi gắn với ^{166}Ho [2, 3].

Các kết quả cho thấy nghiên cứu đạt tối ưu các điều kiện trong điều chế ^{166}Ho -DOTMP tại tỷ lệ 1:30, pH 7, thời gian 30 phút, nhiệt độ 24°C là phù hợp như các nghiên cứu đã công bố, và được chọn. Ví dụ như nhóm tác giả Samani và cộng sự đã nghiên cứu đánh dấu ^{166}Ho với DOTMP có hiệu suất gắn đạt trung bình > 99% ở tỷ lệ mol 1:30 đến 1:50 [3]. So với các nghiên cứu điều chế ^{153}Sm -DOTMP [2], hiệu suất gắn đạt cao > 99% tại pH 7,0-8,5 là phù hợp với bản chất của DOTMP, một phosphonate dễ tạo phức ổn định với các đồng vị phóng xạ ion 3+. Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{166}Ho -DOTMP đạt hơn 98% tương đương với các nghiên cứu đã công bố và phức bền cho đến 3 ngày trong môi trường thích hợp là nước muối sinh lý và đệm phosphat có ở nhiệt độ 4°C , 24°C [3]. Độ ổn định có ý nghĩa ^{166}Ho -DOTMP bền sau 2 chu kỳ phân rã của ^{166}Ho . Với hy vọng thay thế ^{153}Sm -EDTMP, một sản phẩm đã được FDA phê duyệt sử dụng lâm sàng dưới tên thương mại là Lexidronam [2], khó nhập ngoại vì thời gian bán rã 1,9 ngày, giá thành đắt.

Việc điều chế ^{166}Ho -DOTMP trong nước thuận lợi và phù hợp vì có sẵn lò phản ứng hạt nhân trong nước và có ý nghĩa cho bệnh nhân. Tuy nhiên, để có thể sử dụng ^{166}Ho -DOTMP trong lâm sàng, cần có những nghiên cứu sâu hơn về các đánh giá tiền lâm

sàng như phân bố trên động vật cũng như các đánh giá an toàn trên mô và tủy xương.

5. Kết luận

Hợp chất DOTMP đã được đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{166}Ho tạo ra phức ^{166}Ho -DOTMP. Nghiên cứu bước đầu đạt được các kết quả tối ưu về qui trình điều chế, hiệu suất gắn cao. Phức ^{166}Ho -DOTMP đạt độ tinh khiết hóa phóng xạ, ổn định trong các điều kiện bảo quản, đáp ứng các tiêu chí về dược chất phóng xạ, có tiềm năng ứng dụng trong điều trị giảm đau các ung thư di căn xương.

Tài liệu tham khảo

1. Yang Z, Yue Z, Ma X, Xu Z (2020) *Calcium homeostasis: A potential vicious cycle of bone metastasis in breast cancers*. Front Oncol 10: 293. doi: 10.3389/fonc.2020.00293.
2. Anderson P, Nuñez R (2007) *Samarium Lexidronam (^{153}Sm -EDTMP): Skeletal radiation for osteoblastic bone metastases and osteosarcoma*. Expert Rev. Anticancer Ther 7(11): 1517-1527.
3. Bagheri R, Jalilian AR, Bahrami-Samani A et al (2011) *Production of Holmium-166 DOTMP: A promising agent for bone marrow ablation in hematologic malignancies*. Iran J Nucl Med, 19(1): 12-20.
4. Manafi-Farid R, Masoumi F, Divband G, Saidi B, Ataeinia B, Hertel F, Schweighofer-Zwink G, Morgenroth A, Beheshti M (2020) *Targeted palliative radionuclide therapy for metastatic bone pain*. J. Clin. Med 9(8): 2622.
5. Garnuszek P, Pawlak D, Licińska I, Kamińska A (2003) *Evaluation of a freeze-dried kit for DOTMP-based bone-seeking radiopharmaceuticals*. Appl Rad and Isot 58: 481-488.