

Nghiên cứu điều chế phức hợp ^{131}I -ANA và phân bố sinh học trên chuột mang ung thư sarcoma-180

Studies on the preparation of ^{131}I -ANA conjugation and biodistribution in sarcoma-180 tumor bearing mice

Nguyễn Thị Thu*, Trần Anh Kiệt**,
Nguyễn Thị Khánh Giang*, Nguyễn Thu Minh Châu***
Nguyễn Thị Ngọc*, Nguyễn Lê Thư Trúc*,
Đặng Hồ Hồng Quang*, Phạm Thành Minh*

*Viện Nghiên cứu hạt nhân,
**Trường Đại học KHTN TP. Hồ Chí Minh,
***Trường Đại học Y Hà Nội

Tóm tắt

Mục tiêu: Báo cáo này mô tả quy trình đánh dấu ^{131}I với kháng thể kháng nhân (ANA) để điều chế phức hợp phóng xạ ^{131}I -ANA dùng trong nghiên cứu chẩn đoán và điều trị ung thư. Kháng thể ANA là kháng thể tự miễn, có khả năng đi vào nhân và gắn với các chất trong nhân. Kháng thể gắn phóng xạ sẽ định vị trong vùng hoại tử trong khối ung thư. **Đối tượng và phương pháp:** ANA được nghiên cứu đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{131}I bằng phương pháp chloramin T với các khảo sát về hàm lượng các chất, pH và thời gian. ^{131}I -ANA được kiểm tra độ tinh khiết hoá phóng xạ, độ ổn định bằng phương pháp điện di trên giấy. Phân bố sinh học được thực hiện trên 30 con chuột mang khối ung thư sarcoma-180. **Kết quả:** Hiệu suất điều chế ^{131}I -ANA đạt $95,51 \pm 0,94\%$ với hàm lượng kháng thể là 200mg và hoạt độ phóng xạ là 1,0mCi, pH 7,4, thời gian 5-10 phút ở nhiệt độ phòng. Độ tinh khiết hóa phóng xạ trên 98% và ổn định 16 ngày. Phức hợp tập trung cao trong mô ung thư trên chuột sau khi tiêm 24 giờ và duy trì đến 72 giờ. **Kết luận:** ^{131}I -ANA được điều chế thành công với hiệu suất cao, ổn định dài ngày, là phức hợp phóng xạ lý tưởng có tiềm năng sử dụng trong các nghiên cứu điều trị ung thư ác tính.

Từ khóa: Kháng thể kháng nhân, phức hợp phóng xạ, ung thư sarcoma-180, ^{131}I .

Summary

Objective: This report describes the radioiodination process of human antinuclear antibody (ANA) to prepare ^{131}I -ANA radiopharmaceutical used to studies in diagnose and treat cancer. The ANAs are human autoimmune antibodies that are able to enter the nucleus and bind to substances found in the nucleus. The labeled antibody will localize in necrotic regions within tumors. **Subject and method:** Antinuclear antibodies were studied on the radiolabeling with iodine-131 using chloramine T methods by the labeling optimization was conducted such as reactant concentration, pH and time. ^{131}I -ANA were tested for radiochemical purity and stability using paper electrophoresis. The biodistribution was evaluated in 30 tumor-bearing mice with sarcoma-180 cancer cell line. **Result:** The results show that the radiolabeling efficiency in the preparation of ^{131}I -ANA was $95.51 \pm 0.94\%$ with 200 μg ANA and the radioactive of ^{131}I was 1.0mCi under the condition of pH 7.4 and 5-10 minutes at room temperature. The radiochemical purity reached 98% and stability for 16 days. The labeled compound was accumulated higher into the sarcoma tumor site after 24h injection and was maintained until 72h. **Conclusion:** The ^{131}I -ANA was successfully prepared with high efficiency, long days

Ngày nhận bài: 25/8/2023, ngày chấp nhận đăng: 14/9/2023

Người phản hồi: Nguyễn Thị Thu, Email: ngthithu2014@gmail.com - Viện Nghiên cứu hạt nhân

stable and met the initial required criteria of radiopharmaceutical and which is an ideal radiopharmaceutical for potential use in studies in malignant cancer treatments.

Keywords: Antinuclear antibodies, radiopharmaceuticals, sarcoma-180, ^{131}I .

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, kháng thể được đưa vào sử dụng chẩn đoán và điều trị lâm sàng đa phần là các kháng thể có cơ chế ngoại bào [1]. Đối với kháng thể kháng nhân ANA, kháng thể này có ở bệnh nhân lupus ban đỏ (SLE) được các nhà khoa học đề nghị như là kháng thể có tiềm năng sử dụng trong điều trị. Nhờ cơ chế nội bào như là khả năng đâm xuyên vào nhân và làm đứt gãy DNA [2]. Có nhiều loại kháng thể ANA như anti-dsDNA, anti-nucleosome, anti-histones, nhưng đa phần 60-80% là dsDNA. Vai trò sinh lý bệnh của ANA trong bệnh SLE chưa rõ ràng. Nó đôi khi còn xem như là độc tính cho tế bào lành, khi mà tế bào có tổn thương hoặc bị bệnh, nhân sẽ bộc lộ và nó sẽ tấn công [1, 3]. Các nghiên cứu gần đây với các kháng thể tự miễn cho thấy phối hợp với bức xạ ion hóa hoặc hóa chất có thể làm tăng nhạy cảm với tế bào ung thư. Việc gắn với phóng xạ của ANA tạo cơ hội thúc đẩy các nghiên cứu *invitro* và *invivo* với ANA và điều chế ra các thuốc phóng xạ mới, sử dụng trong nghiên cứu và điều trị các dạng ung thư [4].

Những năm gần đây kháng thể gắn đồng vị phóng xạ như ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ đã được sử dụng với nhiều thành công, an toàn và hiệu quả trên lâm sàng để chụp hình chẩn đoán và điều trị [5]. Để đưa ANA vào nghiên cứu ứng dụng lâm sàng, việc gắn với chất phóng xạ của ANA mở ra cơ hội cho các nghiên cứu điều chế ra các thuốc phóng xạ mới, đó là ^{131}I -ANA sử dụng trong nghiên cứu và điều trị các dạng ung thư, đặc biệt là các khối ung thư dạng đặc như ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư xương. Trong báo cáo này, ANA gắn với đồng vị phóng xạ ^{131}I tạo thành ^{131}I -ANA. Phức hợp gắn phóng xạ được kiểm tra chất lượng và nghiên cứu phân bố sinh học trên chuột mang khối ung thư Sarcoma-180.

2. Đối tượng và phương pháp

Nguyên liệu, hóa chất: Kháng thể ANA, 1,65mg/ml, Probactive Biotech, USA, ^{131}I dạng Na^{131}I ,

nồng độ phóng xạ 3,7-7,4GBq (100-200mCi)/ml, hoạt độ riêng 222GBq/mg, Viện Nghiên cứu hạt nhân. Tế bào Sarcoma 180, ATCC-TIB-66, chuột Swiss, Viện Pasteur. Các hoá chất chloramin T, natri metabisulphit, natri hydrophosphat, natri dihydrophosphat, hãng Sigma, Mỹ. Thiết bị sử dụng là máy phóng xạ tự chụp Cyclone PlusPhosphor Scanner, hãng PerkinElmer.

Phương pháp đánh dấu kháng thể ANA với đồng vị phóng xạ ^{131}I : Dùng phương pháp chloramin T (ChT), trong môi trường đệm phosphat 0,5M, pH 7,4 và nhiệt độ phòng [6, 7]. Các mẫu khảo sát được phân tích bằng điện di trên giấy Whatman No.1, dung môi phosphat 0,25M, pH 7,4. Các nghiên cứu khảo sát về hàm lượng các chất như Chloramin T được khảo sát từ 1, 5, 10, 20, 40 và 80µg cùng với 100µg kháng thể ANA, 1,0mCi ^{131}I , pH 7,4 và thời gian 15 phút ở nhiệt độ phòng. Khảo sát hàm lượng kháng thể ANA từ 10, 100, 200, 400, 800 và 1000µg với ChT là 20µg, 1,0mCi ^{131}I , pH 7,4 và thời gian đánh dấu 15 phút ở nhiệt độ phòng. Khảo sát pH từ 4, 5, 6, 7, 8 và 9 với 100µg kháng thể 20µg ChT và 15 phút ở nhiệt độ phòng. Thời gian phản ứng khảo sát từ 1, 5, 10, 20, 30 và 60 phút với 100µg kháng thể 20µg ChT ở nhiệt độ phòng. Sau đó tách ^{131}I -ANA qua cột sephadex. Để điều chế ^{131}I -ANA, 2,0mg kháng thể được đánh dấu với 10,0mCi ^{131}I , 0,2mg Chloramin T, pH 7,4, thời gian 5-10 phút, nhiệt độ phòng. Phức ^{131}I -ANA nạp qua cột sắc ký lọc gel sephadex G25. Hỗn hợp phức được tách khỏi nhau dùng chất rửa giải là NaCl 0,9% hoặc đệm phosphat 0,2M, vận tốc rửa giải là 30cm³/giờ. ^{131}I -ANA được lọc qua phin lọc vô trùng 0,2mm để sử dụng.

Phương pháp kiểm tra chất lượng:

Độ tinh khiết hóa phóng xạ: Chấm 5µl ^{131}I -ANA lên băng điện di, dung môi phosphat 0,025M, thời gian 60 phút, lấy ra để khô và quét trên máy phóng xạ tự chụp Cyclone, tính kết quả bằng phần mềm OptiQuant 5.0.

Độ ổn định: Mẫu ^{131}I -ANA sau khi đánh dấu và tinh chế, bảo quản trong các dung dịch phosphat 0,05M, pH 7,4, NaCl 0,9%, có thêm acid ascorbic 0,6% và albumin 0,05%. Sau các khoảng thời gian từ 2 đến 16 ngày, ^{131}I -ANA được phân tích bằng phương pháp điện di.

Nghiên cứu phân bố sinh học:

Tế bào Sarcoma 180 được nuôi cấy trong môi trường RPMI, sau 9-10 ngày, tế bào thu được có nồng độ 10^7 tế bào/ml. Tiêm vào đùi phải mỗi con chuột 1×10^6 tế bào. Chuột được nuôi 10 ngày cho đến khi khối u đạt kích thước u từ 15-20mm, chia chuột mỗi nhóm 5 con, Tiêm ^{131}I -ANA vào tĩnh mạch đuôi chuột, số lượng 30 con, liều tiêm một con là $100\mu\text{Ci}/100\mu\text{l}$. Sau khi tiêm 1, 6, 24, 48, 72 và 168 giờ, chuột được gây mê và mẫu máu được thu bằng cách hút qua tim. Mổ chuột, thu lấy các mô như máu, gan, thận, lách, dạ dày, phổi, tuyến giáp, khối u và đuôi, đo trên phổ kế gamma Canberra.

Xử lý số liệu: Các số liệu được 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 $p < 0,05$.

3. Kết quả

Kết quả khảo sát hàm lượng các chất tham gia phản ứng: Các kết quả khảo sát cho thấy, với hàm lượng ChT là 1, 2, 5, 10, 20, $50\mu\text{g}$ hiệu suất gắn đạt lần lượt là $89,43 \pm 1,15$, $92,61 \pm 1,13$, $96,52 \pm 1,32$, $96,74 \pm 2,84$, $95,67 \pm 2,56$ và $94,42 \pm 2,32$. Vì vậy, hàm lượng ChT để điều chế ^{131}I -ANA được chọn là 5- $20\mu\text{g}$ để có hiệu suất gắn đạt tối đa $>95\%$. Kết quả khảo sát hàm lượng ANA cho thấy với $2\mu\text{g}$ ANA, hiệu suất gắn đạt $61,34 \pm 3,23\%$ và hiệu suất gắn là $95,13 \pm 1,11\%$ khi ANA là $200\mu\text{g}$. Khi hàm lượng ANA đạt từ $10\mu\text{g}$ trở lên $200\mu\text{g}$, hiệu suất gắn đạt hơn 95% (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả khảo sát điều chế ^{131}I -ANA (n = 3)

ChT (μg)	Hiệu suất (%)	ANA (μg)	Hiệu suất (%)	pH	Hiệu suất (%)	Thời gian (phút)	Hiệu suất (%)
1	$89,43 \pm 1,15$	2	$61,34 \pm 3,23$	4	$90,34 \pm 2,56$	1	$95,18 \pm 2,22$
2	$92,61 \pm 1,13$	10	$95,21 \pm 2,45$	5	$91,22 \pm 2,32$	5	$95,23 \pm 2,81$
5	$96,52 \pm 1,32$	20	$95,22 \pm 1,34$	6	$95,15 \pm 1,28$	10	$95,54 \pm 1,34$
10	$96,74 \pm 2,84$	50	$95,42 \pm 1,83$	7	$95,32 \pm 1,12$	20	$95,23 \pm 1,18$
20	$95,67 \pm 2,56$	100	$95,18 \pm 1,12$	8	$94,89 \pm 1,65$	30	$94,93 \pm 1,54$
50	$94,42 \pm 2,32$	200	$95,13 \pm 1,11$	9	$93,24 \pm 2,23$	60	$90,43 \pm 3,29$

Hoạt độ ^{131}I và hàm lượng ANA trong thí nghiệm được chọn là 1mCi và $200\mu\text{g}$, tương đương $1,31$ và $1,32\text{nmol/L}$. Do vậy, tỷ lệ mol giữa ^{131}I và kháng thể là 0,99. Hiệu suất đánh dấu đạt trung bình là $95,51\%$, do đó số nhóm gắn ^{131}I trên phân tử kháng thể là 0,94, có ý nghĩa ~ 1 nguyên tử ^{131}I gắn trên 1 phân tử kháng thể [6].

Kết quả khảo sát pH và thời gian: Hiệu suất gắn đạt cao $> 95\%$ trong miền pH từ 6-7 và thời gian 1-20 phút ở điều kiện cố định $100\mu\text{g}$ kháng thể $20\mu\text{g}$ ChT và nhiệt độ phòng. Thời gian lâu hơn có thể do phân tử oxy hóa làm thay đổi nhẹ hoạt tính của kháng thể

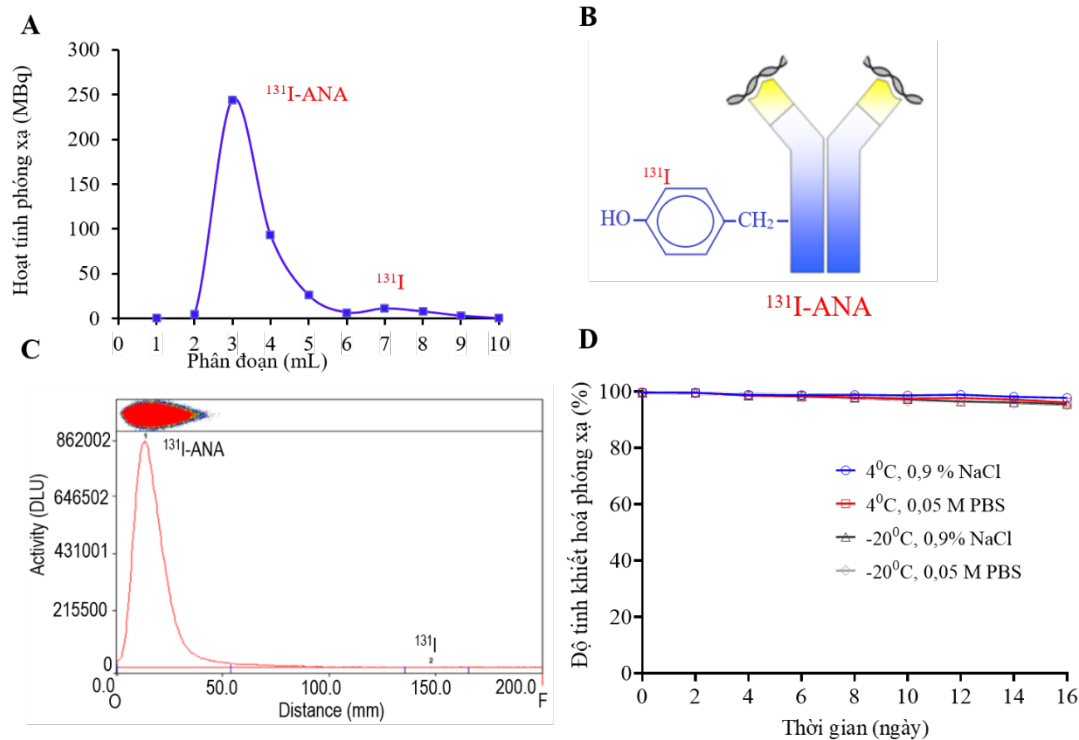
hoặc làm hỏng một số cấu trúc của kháng thể, vì vậy thời gian phản ứng được chọn là 5-10 phút.

Kết quả tách ^{131}I -ANA qua cột sắc ký sephadex: Phức ^{131}I -ANA thu qua cột sắc ký lọc gel sephadex tại phân đoạn 4-6ml và ^{131}I tự do thu được tại 8-10ml trong điều kiện các chất rửa giải là NaCl 0,9% hoặc phosphat 0,2M. Hiệu suất tách đạt $> 95\%$ (Hình 1A). Cấu trúc phân tử ^{131}I -ANA minh họa trong hình 1B.

Kết quả kiểm tra chất lượng: Độ tinh khiết hóa phóng xạ của phức đánh dấu đạt hơn 98% đạt chỉ tiêu chất lượng theo Dược điển Mỹ USP 35, chuyên khảo 3524-3525. Đồ thị cho thấy phức ^{131}I -ANA nằm

ở vị trí gốc của băng sắc ký $R_f = 0,1$, còn ^{131}I tự do sẽ đi về ngọn $R_f = 0,9$ (Hình 1C). ^{131}I -ANA ổn định trong đệm phosphat 0,05M hoặc trong NaCl 0,9% chứa thêm acid ascorbic cho đến 16 ngày, bảo quản ở 4°C hoặc -20°C, độ tinh khiết hoá phóng xạ đạt hơn 98%

(Hình 1D). Acid ascorbic có thể sử dụng để ổn định phức kháng thể gắn phóng xạ ^{131}I -ANA. Quá trình đánh dấu kháng thể ANA với đồng vị phóng xạ ^{131}I đạt hiệu suất $95,51 \pm 0,94\%$.

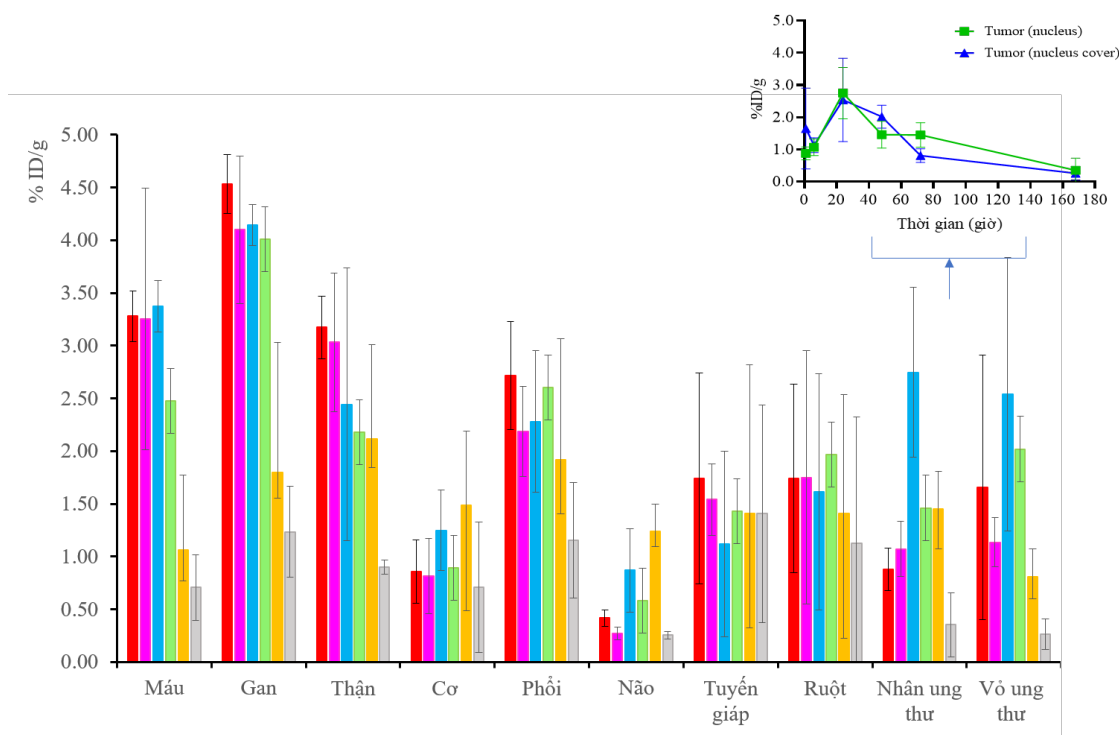


Hình 1. Điều chế và kiểm tra chất lượng ^{131}I -ANA, A. Đồ thị tách phân đoạn ^{131}I -ANA qua cột lọc gel sephadex, B. Cấu trúc phân tử ^{131}I -ANA, C. Độ tinh khiết hoá phóng xạ ^{131}I -ANA, D. Độ ổn định ^{131}I -ANA theo thời gian.

Tóm lại, quá trình khảo sát đánh dấu kháng thể ANA với đồng vị phóng xạ ^{131}I được thực hiện bằng cách cố định các yếu tố, chỉ thay đổi 1 yếu tố cần khảo sát, mục đích là để chọn lượng tối ưu. Kết quả tối ưu được chọn là 200μg kháng thể, 10μg CHT và 1,0mCi ^{131}I , thời gian đánh dấu là 5-10 phút ở nhiệt độ phòng. Kết quả thống kê 6 lô đánh dấu cho thấy hiệu suất đánh dấu điều chế ^{131}I -ANA là $95,5 \pm 0,49\%$, tỷ lệ mol ^{131}I /ANA là 0,99.

Kết quả phân bố sinh học ^{131}I -ANA: Một giờ sau khi tiêm ^{131}I -ANA trên chuột mang khối u sarcoma 180, phức hợp phóng xạ tập trung nhiều trong máu và trong các mô. Sau khi tiêm 6 giờ và 24 giờ, có sự tập trung của kháng thể gắn phóng xạ trong mô ung thư, chứng tỏ rằng ^{131}I -ANA đi dẫn vào trong

khối u. Kháng thể gắn phóng xạ tuần hoàn trong máu, trong mô và trong khối u. Sau 24 và 48 giờ, ^{131}I -ANA tập trung nhiều trong mô ung thư, cao hơn các mô khác, nhưng phân bố còn cao trong mô gan. Vào thời điểm 7 ngày, phân bố phóng xạ trong các mô ít hơn, vì có sự phân rã vật lý của chất phóng xạ và đào thải sinh học của ^{131}I -ANA ra khỏi cơ thể. Phân bố trong khối ung thư được chia 2 phần, phần nhân ung thư và phần vỏ ung thư. Phần vỏ có sự tập trung phóng xạ cao hơn sau khi tiêm và sau đó có sự phân bố trong nhân ung thư cao đến 3 ngày (Hình 2). Tuy nhiên, tổn động trong gan vẫn còn. Đào thải ^{131}I -ANA ra khỏi máu sau 72 giờ, được tính bằng động học bậc 1, một ngăn, dùng phần mềm GraphPad Prism 8.



Hình 2. Phân bố ^{131}I -ANA trên chuột mang khối ung thư Sarcoma-180

4. Bàn luận

Kháng thể ANA được chứng minh là có thể đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{131}I để điều chế ^{131}I -ANA. Hiệu suất gắn đạt trung bình là $95,51 \pm 0,94\%$. So sánh với các nghiên cứu tương tự, hiệu suất gắn là $96,21 \pm 23\%$ [4] hoặc $91,8 \pm 3,6\%$ [5] hoặc $> 95\%$ [6] với hàm lượng chloramin T là $20\text{-}50\mu\text{g}$ để oxy hóa ^{131}I là $185\text{-}370\text{MBq } ^{131}\text{I}$ [5], lượng chất oxy hoá phù hợp và không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của kháng thể. Phức ^{131}I -ANA được tinh chế qua cột lọc gel để loại bỏ lượng thừa iodine và chloramin T trong sản phẩm. Tại pH 7,4 và thời gian từ 5 phút đánh dấu trở đi chứng tỏ quá trình tạo phức của đồng vị phóng xạ ^{131}I với kháng thể xảy ra nhanh. Số nhóm gắn của ^{131}I trên phân tử kháng thể tính được là 0,94, tỷ lệ này thích hợp và tránh được sự xạ phân xảy ra, bảo vệ được phân tử kháng thể. Các nghiên cứu tương tự là 0,95 [6] và 0,90 [7] với ^{131}I -nimotuzumab. Kết quả phức ^{131}I -ANA thu được có độ tinh khiết hóa phóng xạ hơn 98%, và phức bền đến 16 ngày, tương đương với các nghiên cứu đã công bố [6, 7]. Phân bố sinh học trên mô hình chuột mang khối ung thư sarcoma 180 cho thấy sự tập trung ^{131}I -ANA cao

trong khối u sau khi tiêm 24 giờ và duy trì đến 3 ngày. Ngoài ra, sự tập trung trong mô gan, thận, trong máu cao trong thời gian đầu sau khi tiêm. Sau đó có sự đào thải ra khỏi máu và hợp chất đánh dấu được bài tiết qua thận. Để có thể sử dụng ^{131}I -ANA, cần có những nghiên cứu sâu hơn về các đánh giá tiền lâm sàng như đánh giá trên vài dòng tế bào ung thư, cũng như các đánh giá liều lượng phóng xạ.

5. Kết luận

Kháng thể ANA đã được nghiên cứu thành công tại Viện Nghiên cứu hạt nhân, đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{131}I tạo ra phức hợp ^{131}I -ANA và kiểm tra chất lượng. Các kết quả bước đầu là quy trình đánh dấu tối ưu, hàm lượng ANA là $200\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$ ChT và $1,0\text{mCi } ^{131}\text{I}$, thời gian đánh dấu 5-10 phút ở nhiệt độ phòng, hiệu suất gắn đạt hơn 95%. Phức hợp miễn dịch phóng xạ có độ tinh khiết hóa phóng xạ cao $> 98\%$, ổn định, đáp ứng các tiêu chí về dược chất phóng xạ. ^{131}I -ANA phân bố trong mô ung thư cao hơn các mô khác. Phức hợp ^{131}I -ANA có tiềm năng ứng dụng trong điều trị các ung thư dạng đặc như ung thư xương, phổi, vú, tuyến tiền liệt. Tuy nhiên,

cần khắc phục nhược điểm tập trung trong gan và phân bố trên mô hình các ung thư khác.

Tài liệu tham khảo

1. Gordon RE, Jennifer FN, Sanjaya S, Russell BL, and Iqbal SG (2020) *Harnessing SLE autoantibodies for intracellular delivery of biologic therapeutics*. Trends Biotechnol 39: 298-310. <http://doi:10.1016/j.tibtech.2020.07.003>.
2. Juan IV, Marcos LH (2022) *Disease criteria of systemic lupus erythematosus (SLE); the potential role of non-criteria autoantibodies*. Journal of Translational Autoimmunity 5: 100143 <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2022.100143>.
3. Li H, Zheng Y, Chen L & Lin S (2022) *High titers of antinuclear antibody and the presence of multiple autoantibodies are highly suggestive of systemic lupus erythematosus*. Nature Scientific Reports 12: 1687. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05807-6>.
4. Dimitrov JD (2020) *Harnessing therapeutic potential of "rogue" antibodies*. Trends Pharmacol. Sci 41: 411–417 <http://doi:10.1016/j.tips.2020.03.005>.
5. Larson SM, Carrasquillo JA, Cheung NKV, Press O (2015) *Radioimmunotherapy of human tumours*. Nature Rev. Cancer 15: 347-360 <http://doi:10.1038/nrc3925>.
6. Thi-Thu N, Khanh-Giang N, Thi-Ngoc N et al (2021) *Efficacy of nimotuzumab (hR3) conjugated with ¹³¹I or ⁹⁰Y in laryngeal carcinoma xenograft mouse model*. Intern J of Rad. Biol 97(5): 704-713 <http://doi:10.1080/09553002.2021.1889703>.
7. Mythili K, Grace S, Haladhar DS et al (2015) *¹³¹I-Nimotuzumab A potential radioimmunotherapeutic agent in treatment of tumors expressing EGFR*. Appl Rad and Isotop 102: 98-102.