

Điều chế kháng thể kháng nhân gắn đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc -ANA: Tác nhân tiềm năng để chụp hình các khối ung thư

Preparation antinuclear antibody labeled with radioisotope ^{99m}Tc -ANA: A potent agent for solid tumor imaging

Nguyễn Thị Khánh Giang*, Nguyễn Thị Ngọc*,
Nguyễn Thanh Bình*, Đặng Hồ Hồng Quang*,
Nguyễn Thanh Nhân*, Nguyễn Lê Thu Trúc*,
Phạm Thành Minh*, Nguyễn Thị Thu*,
Nguyễn Thu Minh Châu**, Huỳnh Thị Vân Khánh***

*Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt,

**Trường Đại học Y Hà Nội,

***Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Tóm tắt

Mục tiêu: Báo cáo này mô tả quá trình nghiên cứu đánh dấu kháng thể kháng nhân (ANA) với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc để điều chế phức hợp phóng xạ ^{99m}Tc -ANA. Dựa vào đặc tính sinh học của ANA, là khả năng đi vào nhân và gắn với các kháng nguyên nhân, hợp chất ^{99m}Tc -ANA được nghiên cứu để thành thuốc phóng xạ. *Đối tượng và phương pháp:* ANA được gắn với ^{99m}Tc bằng phương pháp đánh dấu trực tiếp, dùng thiếc clorua làm chất khử. Ảnh hưởng của hàm lượng các chất tham gia phản ứng, pH và thời gian phản ứng được khảo sát. Phức hợp ^{99m}Tc -ANA được kiểm tra độ tinh khiết hoá phóng xạ, độ ổn định bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. *Kết quả:* Hiệu suất đánh dấu điều chế ^{99m}Tc -ANA đạt hơn 98% với hàm lượng kháng thể là 100 μg và hoạt độ phóng xạ của ^{99m}Tc là 5,0mCi, pH 7,4, thời gian 15 phút ở nhiệt độ phòng. ^{99m}Tc -ANA có độ tinh khiết hóa phóng xạ trên 98% và ổn định trong 24 giờ. *Kết luận:* ^{99m}Tc -ANA thu được đạt các yêu cầu để dùng trong các nghiên cứu tiếp theo, và có tiềm năng ứng dụng trong chụp hình các khối u đặc.

Từ khóa: Kháng thể kháng nhân, dược chất phóng xạ, ^{99m}Tc -kháng thể.

Summary

Objective: This paper describes the process of radiolabeling of antinuclear antibody (ANA) with ^{99m}Tc to prepare ^{99m}Tc -ANA. Based on the biological properties of ANA, which is the ability to enter the nucleus and bind to nuclear antigens, the conjugation ^{99m}Tc -ANA was studied to be radiopharmaceutical. *Subject and method:* Antinuclear antibodies were labeled with ^{99m}Tc by direct method using stannous chloride as reductant. The labeling optimization such as reactant concentration, pH and time was conducted. ^{99m}Tc -ANA were tested for radiochemical purity and stability using instance thin layer chromatography. *Result:* The radiolabeling efficiency in the preparation of ^{99m}Tc -ANA was > 98% with 100 μg ANA and the radioactive of ^{99m}Tc was 5.0mCi under the condition of pH 7.4 and 15 minutes at room temperature. The radiochemical purity reached 98% and stability for 24 hours. *Conclusion:* The collected ^{99m}Tc -ANA meets

Ngày nhận bài: 10/10/2023, ngày chấp nhận đăng: 18/10/2023

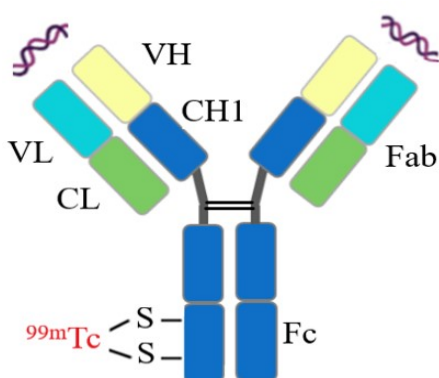
Người phản hồi: Nguyễn Thị Thu, Email: ngthithu2014@gmail.com - Viện Nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt

the initial required criteria which could be used for preclinical evaluations and which is for potential use in scintigraphy of solid tumor.

Keywords: Antinuclear antibodies, radiopharmaceuticals, ^{99m}Tc-antibodies.

1. Đặt vấn đề

Kháng thể kháng nhân là các immunoglobulin phản ứng với các thành phần khác nhau của nhân tế bào, được tách từ máu của bệnh nhân lupus ban đỏ (SLE). Có nhiều loại kháng thể ANA như anti-dsDNA, anti-nucleosome, anti-histones, nhưng đa phần 60-80% là dsDNA. Khi tế bào có tổn thương hoặc ung thư, nhân sẽ bộc lộ và ANA sẽ đi vào nhân để gắn với kháng nguyên nhân [1, 2]. Vì vậy, ý tưởng sử dụng kháng thể kháng nhân trong nghiên cứu phát hiện các tổn thương và điều trị ung thư đã được một số tác giả đề xuất trong hơn hai thập kỷ gần đây [2, 3]. Ví dụ như kháng thể kháng nhân đơn dòng 3E10, 3D8, 5C6, 2C10, H241 và G2-6, trong đó, 3E10 đã thử nghiệm trên bệnh nhân với kết quả an toàn và hiệu quả [1, 3]. Khi kháng thể kết hợp với bức xạ ion hóa hoặc hóa chất có thể làm tăng nhạy cảm với tế bào ung thư [1]. Khi gắn với phóng xạ tạo thành ^{99m}Tc-ANA, phức hợp tạo cơ hội thúc đẩy các nghiên cứu *invitro* và *invivo* để điều chế ra các thuốc phóng xạ mới, vì vậy mà ANA gắn phóng xạ sẽ được sử dụng trong nghiên cứu và điều trị các dạng ung thư [3, 4]. Các đồng vị phóng xạ như ^{99m}Tc, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu gắn kháng thể đã được sử dụng an toàn và hiệu quả trên lâm sàng để chụp hình chẩn đoán và điều trị. Đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc phát năng lượng gamma 140 keV và thời gian bán rã 6,01 giờ [5], khi đánh dấu với ANA tạo thành ^{99m}Tc-ANA thích hợp dùng trong xạ hình chẩn đoán (Hình 1).



Hình 1. Cấu trúc phân tử ^{99m}Tc-ANA

Báo cáo này trình bày nghiên cứu đánh dấu kháng thể kháng nhân ANA với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc để điều chế ^{99m}Tc-ANA theo tiêu chí thuốc phóng xạ. Nghiên cứu này thành công có thể áp dụng để chụp hình các khối ung thư đặc (solid tumor) như ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư xương bằng kỹ thuật SPECT.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Nguyên liệu, hóa chất

Kháng thể ANA, 1,87mg/mL được cung cấp bởi Công ty Proactive Biotech, Mỹ. Đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc chiết từ máy phát ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, dạng Na^{99m}TcO₄⁻ có nồng độ phóng xạ 150-200mCi/mL, Viện Nghiên cứu hạt nhân cung cấp. Các loại hóa chất như NaH₂PO₄.2H₂O, SnCl₂.2H₂O, NaOH 2M, HCl 2M, acid ascorbic mua từ hãng Sigma hoặc Merck. Sắc ký lớp mỏng ITLC (Instant Thin Layer Chromatography), Iglan, Mỹ. Máy phóng xạ tự chụp cyclone của hãng PerkinElmer.

2.2. Phương pháp đánh dấu ANA với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc

Kháng thể ANA được đánh dấu với ^{99m}Tc bằng phương pháp đánh dấu trực tiếp, dùng thiếc (II) clorua làm chất khử. Liên kết disulfide (S-S) trên phân tử kháng thể khử về dạng sulfhidryl (SH), để tạo phức với ^{99m}Tc trong môi trường đệm phosphat 0,5M, pH 7,4. Để tối ưu hoá quy trình đánh dấu, các nghiên cứu khảo sát được tiến hành như sau: Cố định 100µg ANA, hoạt độ ^{99m}Tc là 5mCi, pH 7,4, thời gian đánh dấu 15 phút, hàm lượng clorua thiếc thay đổi từ 2, 10, 20, 30 và 40µg. Cố định 20 µg clorua thiếc, hoạt độ ^{99m}Tc là 5mCi, pH 7,4, thời gian đánh dấu 15 phút, hàm lượng ANA thay đổi từ 1, 10, 50, 100 và 200µg. Sử dụng công thức 100µg ANA, 20µg thiếc clorua và ủ ở nhiệt độ phòng, khảo sát hiệu suất phản ứng khi thay đổi pH từ 3, 4, 5, 6, 7, 8 và 9 với thời gian phản ứng 15 phút và khi thay đổi thời gian phản ứng 1, 5, 10, 15, 20, 25 và 30 phút với pH

7,4. Các mẫu khảo sát được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng ITLC, dung môi acetone. Để điều chế ^{99m}Tc -ANA, cho vào chai phản ứng theo thứ tự là 200 μL phosphat 0,5M (pH 7,4), 1,0mg (534 μL) kháng thể ANA, 200 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 1850MBq (50mCi) ^{99m}Tc . Trộn nhẹ và ủ 15 phút nhiệt độ phòng, thêm nước cất để thể tích 5,0mL, điều chỉnh pH về 7,4. Sản phẩm ^{99m}Tc -ANA được lọc qua phin lọc vô trùng 0,2 μm , xác định nồng độ phóng xạ và kiểm tra độ tinh khiết hoá phóng xạ.

2.3. Phương pháp kiểm tra chất lượng

Độ tinh khiết hóa phóng xạ và độ ổn định: Chấm 5 μL ^{99m}Tc -ANA lên 3 băng sắc ký lớp mỏng, triển khai trong dung môi acetone thời gian 15 phút. Các băng sắc ký được chụp trên máy phóng xạ tự chụp cyclone. ^{99m}Tc -ANA được nghiên cứu bảo quản trong các dung dịch đệm như phosphat 0,2M, pH 7,4 hoặc nước muối sinh lý có thêm acid ascorbic, ủ ở nhiệt độ 24°C và 4°C. Để nghiên cứu độ ổn định trong serum, cho HSA vào dung dịch ^{99m}Tc -ANA

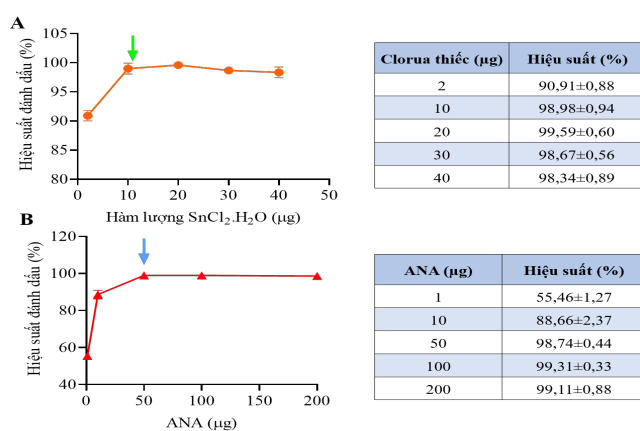
(0,5mg/ml) ủ ở nhiệt độ 4°C đến 24 giờ. Thời gian theo dõi ổn định là 1, 3, 6 và 24 giờ, phương pháp sử dụng là sắc ký lớp mỏng.

Xử lý số liệu: Số liệu khảo sát được phân tích bằng phần mềm Prism 8.4.3. Độ tinh khiết hóa phóng xạ được tính bằng phần mềm OptiQuant 5.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Kết quả khảo sát hàm lượng các chất tham gia phản ứng

Các kết quả khảo sát cho thấy, với hàm lượng clorua thiếc 10 μg trở lên, hiệu suất đánh dấu đạt hơn 98%, và hiệu suất đánh dấu đạt cao nhất là 99% khi hàm lượng clorua thiếc đạt 20 μg (Hình 1A). Vì vậy, hàm lượng clorua thiếc được chọn là 20 μg để có hiệu suất gắn đạt tối đa > 95%, theo Chuyên khảo về thuốc phóng xạ đánh dấu với ^{99m}Tc (Dược điển Mỹ, USP 35).



Hình 1. Kết quả khảo sát hàm lượng các chất tham gia phản ứng, A. Khảo sát hàm lượng $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, B. Khảo sát hàm lượng kháng thể ANA.

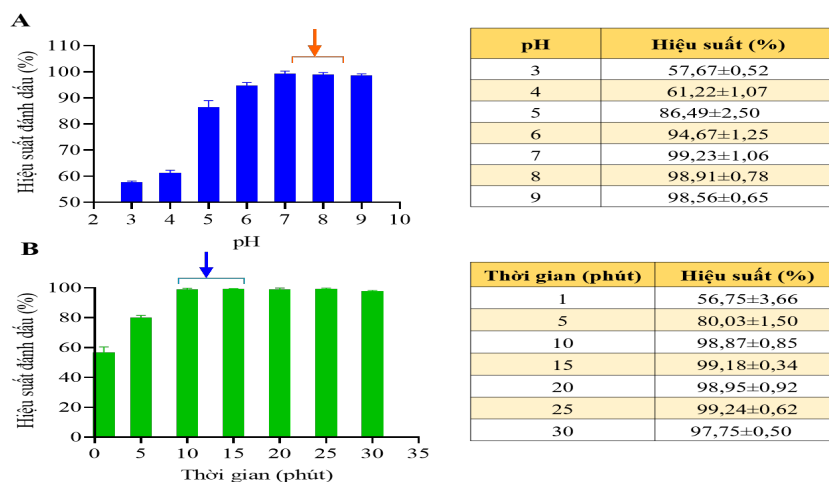
Trên (Hình 1B) cho thấy với hàm lượng ANA từ 50 μg trở lên, hiệu suất gắn đạt hơn 98% tại pH 7,4, hàm lượng clorua thiếc là 20 μg , hoạt độ ^{99m}Tc là 5mCi và thời gian đánh dấu 15 phút.

3.2. Kết quả khảo sát pH và thời gian phản ứng

Với hàm lượng kháng thể là 100 μg , clorua thiếc là 20 μg , hoạt độ ^{99m}Tc là 5mCi và thời gian đánh dấu

15 phút, hiệu suất gắn đạt hơn 99% ở pH 7-8 (Hình 2A). Các chai phản ứng ở pH 3-6 có màu trắng đục, có thể bị tủa nhẹ do có sự tạo thành Sn^{4+} . Chất khử dùng trong nghiên cứu này là chlorua thiếc làm nhiệm vụ khử $^{99m}\text{Tc}^{7+}$ về $^{99m}\text{Tc}^{4+}$ do vậy hiệu suất gắn không cao ở pH miền acid. Kết quả khảo sát thời gian (Hình 2B) với hàm lượng kháng thể là 100 μg , clorua thiếc là 20 μg , hoạt độ ^{99m}Tc là 5mCi và thời

gian đánh dấu từ 10 phút trở lên, hiệu suất gắn đạt hơn 98%.

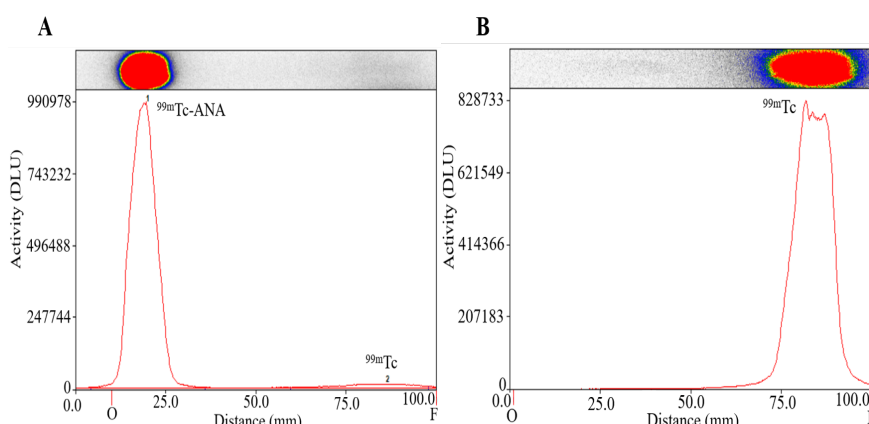


Hình 2. Kết quả khảo sát pH và thời gian phản ứng, A. Khảo sát pH, B. Khảo sát thời gian phản ứng.

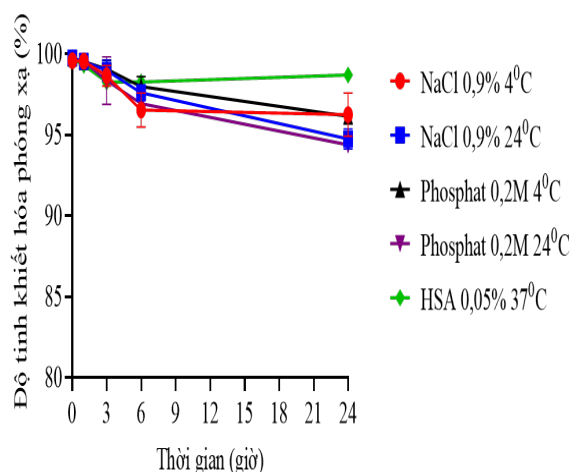
3.3. Kết quả kiểm tra độ tinh khiết hóa phóng xạ và độ ổn định của ^{99m}Tc-ANA

Độ tinh khiết hóa phóng xạ của phức kháng thể ANA đánh dấu ^{99m}Tc đạt hơn 98% (Hình 3A). Đồ thị cho thấy ^{99m}Tc-ANA nằm ở vị trí gốc của băng sắc ký $R_f = 0,1$, ^{99m}Tc di chuyển tới vị trí $R_f = 0,9$. Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{99m}Tc-ANA là $99,25 \pm 0,21\%$ (n = 6). Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{99m}Tc là 99,9% (Hình 3B). Kết quả nghiên cứu độ ổn định cho thấy ^{99m}Tc-ANA ổn định trong đệm phosphat hoặc NaCl 0,9%. Bảo quản trong NaCl 0,9% ở 4°C, độ tinh khiết hoá phóng xạ của phức là $96,26 \pm 1,33\%$, trong khi bảo quản ở 24°C kết quả là $94,76 \pm 0,62\%$. Tương

tự, bảo quản ^{99m}Tc-ANA trong phosphat 0,2M tại 4°C và 24°C, sau 24 giờ là $96,15 \pm 0,07$ và $94,39 \pm 0,39\%$. Độ ổn định của ^{99m}Tc-ANA trong HSA sau 24 giờ ở 37°C là $98,70 \pm 0,02\%$ (Hình 4). Phức đạt chỉ tiêu ổn định có thể dùng trong các nghiên cứu tiếp theo. Quá trình đánh dấu ANA với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc được thực hiện trong môi trường đệm phosphat 0,5M, pH 7,4, trong đó 100µg kháng thể, 20µg chất khử thiếc clorua và 5mCi ^{99m}Tc, thời gian đánh dấu là 15 phút ở nhiệt độ phòng cho hiệu suất đánh dấu cao nhất. Kết quả thống kê trên 6 lô đánh dấu cho thấy hiệu suất đánh dấu điều chế ^{99m}Tc-ANA là $99,25 \pm 0,21\%$.



Hình 3. A. Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{99m}Tc-ANA, B. Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{99m}Tc, ITLC, đo trên thiết bị phóng xạ tự chụp cyclone



Hình 4. Độ ổn định ^{99m}Tc-ANA theo thời gian, (n = 3, ±SD), p>0,05

4. Bàn luận

Hàm lượng kháng thể 100µg, 5mCi ^{99m}Tc, clorua thiếc 20µg, pH 7,4, thời gian từ 15 phút đánh dấu trở lên cho hiệu suất tổng hợp hơn 95%, chứng tỏ quá trình tạo phức của kháng thể với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc dễ dàng xảy ra. Việc dùng clorua thiếc dựa trên nhiều nghiên cứu trước đây, liên kết disulphite (S-S) sẽ được khử thành nhóm thiol (-SH) và gắn dễ dàng với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc. Các nghiên cứu tương tự của Hui Tan và cộng sự với ^{99m}Tc-bevacizumab có độ tinh khiết hoá phóng xạ là 98,22% [6], hoặc ^{99m}Tc-leukoscan độ tinh khiết hoá phóng xạ > 99% [7]. ^{99m}Tc-ANA sau khi đánh dấu bền vững trong 24 giờ, do đó có thể sử dụng được đến khi ^{99m}Tc phân rã hoàn toàn (4 chu kỳ phân rã của ^{99m}Tc) tương đương với các nghiên cứu đã công bố [6]. Phức ^{99m}Tc-ANA tạo thành với hiệu suất cao trong miền pH trung tính do khả năng ổn định của các gốc -SH. Thời gian gắn cho thấy phân tử ANA cũng như các kháng thể có thời gian phản ứng từ 5 đến 15 phút [6, 7]. ^{99m}Tc-ANA ổn định trong đệm phosphat chứa thêm acid ascorbic. Sau 24 giờ độ tinh khiết hoá phóng xạ vẫn đạt hơn 95%. Để có thể sử dụng ^{99m}Tc-ANA, cần có những nghiên cứu tiếp theo về các đánh giá tiền lâm sàng như đánh giá *in vitro* trên vài dòng tế bào ung thư, phân bố và đào thải sinh học trên chuột, cũng như các đánh giá liều lượng phóng xạ.

5. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc đánh dấu kháng thể kháng nhân ANA với ^{99m}Tc tạo ra phức hợp ^{99m}Tc-ANA. Nghiên cứu bước đầu đạt được các kết quả tối ưu về qui trình đánh dấu. Phức hợp có độ tinh khiết hoá phóng xạ cao, ổn định trong các điều kiện bảo quản là đệm phosphat hoặc nước muối sinh lý ở 4°C, đáp ứng chỉ tiêu cơ bản của một thuốc phóng xạ về độ tinh khiết hoá phóng xạ và độ ổn định. ^{99m}Tc-ANA có tiềm năng ứng dụng trong chụp hình các ung thư như ung thư xương, phổi, vú, tuyến tiền liệt. Tuy nhiên, cần phải có các nghiên cứu sâu thêm về tiêu chuẩn chất lượng cũng như các thí nghiệm trên động vật.

Tài liệu tham khảo

- Gordon RE, Jennifer FN, Sanjaya S et al (2020) *Harnessing SLE autoantibodies for intracellular delivery of biologic therapeutics*. Trends Biotechnol 39: 298-231. <http://doi:10.1016/j.tibtech.2020.07.003>.
- 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>.
- Noble PW, Chan G, Hansen JE et al (2015) *Optimizing a lupus autoantibody for targeted cancer therapy*. Cancer research 75: 2285-2291, <http://doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2278>.
- Hansen JE, Chan G, Liu Y (2012) *Targeting cancer with a lupus autoantibody*. Sci. Transl. Med 4(57): 142.
- Larson SM, Carrasquillo JA, Cheung NKV, Press O (2015) *Radioimmunotherapy of human tumours*. Nature Rev. Cancer 15: 347-360 <http://doi:10.1038/nrc3925>.
- Tan H, Zhou J, Yang X, Abudupataer M, Li X, Hu Y, Xiao J, Shi H, Cheng D (2017) *^{99m}Tc-labeled bevacizumab for detecting atherosclerotic plaque linked to plaque neovascularization and monitoring antiangiogenic effects of atorvastatin treatment in ApoE^{-/-} mic*. Nature Scientific Reports 7: 3504.
- SARCAN ET, & ÖZER Y (2023) *Monoclonal antibodies and immuno-PET imaging: An overview*. J. Pharm. Sci. 48(1): 165-182, [Doi:10.55262/fabadecczacakil.117202](https://doi.org/10.55262/fabadecczacakil.117202).