

Nghiên cứu đánh dấu kháng thể đơn dòng bevacizumab với đồng vị phóng xạ Tc-99m dùng trong chụp hình miễn dịch phóng xạ ung thư

Study on labelling of bevacizumab antibody with ^{99m}Tc in the tumor radioimmunoscintigraphy

Nguyễn Thị Khánh Giang, Nguyễn Thị Thu,
Nguyễn Thị Ngọc, Bùi Văn Cường, Nguyễn Thanh Bình,
Đặng Hồ Hồng Quang, Nguyễn Thanh Nhàn

Viện nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt

Tóm tắt

Mục tiêu: Mô tả quy trình đánh dấu đồng vị phóng xạ với kháng thể đơn dòng bevacizumab để điều chế được chất phóng xạ ^{99m}Tc -bevacizumab trong chụp hình miễn dịch phóng xạ. Bevacizumab là kháng thể đơn dòng nhân hóa tái tổ hợp kháng yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu (VEGF) và có tác dụng trong việc ngăn chặn quá trình tăng sinh mạch. **Đối tượng và phương pháp:** Kháng thể bevacizumab được gắn với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc bằng phương pháp đánh dấu trực tiếp dùng thiếc (II) clorua làm chất khử. Các khảo sát tối ưu hóa được tiến hành như pH, nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ các chất tham gia phản ứng. Phức miễn dịch phóng xạ được kiểm tra hiệu suất đánh dấu, độ tinh khiết hoá phóng xạ, độ ổn định. **Kết quả:** Kết quả nghiên cứu tối ưu cho thấy, bevacizumab đánh dấu với ^{99m}Tc trong đệm phosphat 0,5M, pH = 7,5 ở nhiệt độ phòng và thời gian 15 phút. Hiệu suất đánh dấu điều chế ^{99m}Tc -bevacizumab đạt hơn 95%, độ tinh khiết hóa phóng xạ trên 98%. Hợp chất đánh dấu đạt các chỉ tiêu về độ ổn định trong 24 giờ nghiên cứu. **Kết luận:** Phức hợp ^{99m}Tc -bevacizumab bước đầu đạt các yêu cầu được chất phóng xạ có thể dùng cho các nghiên cứu tiền lâm sàng.

Từ khóa: Kháng thể đơn dòng bevacizumab, đồng vị phóng xạ Tc-99m, chụp hình miễn dịch phóng xạ.

Summary

Objective: This paper describes a method for the radiolabeling of monoclonal antibody bevacizumab in the production of ^{99m}Tc -bevacizumab radiopharmaceutical in the radioimmunoscintigraphy (RIS). Bevacizumab is a humanized monoclonal and recombinant antibody that is an anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) and effective in blocking the process of angiogenesis. **Subject and method:** Bevacizumab was labeled with radioisotope ^{99m}Tc by direct method using stannous chloride as reductant. The labeling optimization was conducted such as pH, temperature, time, molar ratio. The radioimmunoconjugates were tested for radiolabeling yield, radiochemical purity and stability. **Result:** The results of the optimized study showed that bevacizumab was labeled with ^{99m}Tc in 0.5M phosphate buffer, pH = 7.5 at room temperature for 15 minutes. Radiolabeling yields of labelled bevacizumab were more than 95%, radiochemical purity reached 98% and stability for 24 hours. **Conclusion:** The

Ngày nhận bài: 28/9/2021, ngày chấp nhận đăng: 28/10/2021

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

conjugation of ^{99m}Tc -bevacizumab initially met the required criteria of radiopharmaceutical and could be used for preclinical evaluations.

Keywords: Monoclonal antibody bevacizumab, radioisotope ^{99m}Tc , radioimmunosintigraphy.

1. Đặt vấn đề

Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (vascular endothelial growth factor - VEGF) là protein được sản sinh từ các tế bào, đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành các mạch máu mới. Khi VEGF biểu hiện quá mức được xem là bước đầu trong quá trình di căn liên quan đến việc chuyển đổi "tạo mạch" [1], hình thành khối u có kích thước lớn hơn 2mm. Vì vậy, ngăn chặn tăng sinh mạch cũng là mục tiêu của quá trình điều trị ung thư. Một trong những thuốc kháng sự tăng sinh mạch được FDA cấp phép và sử dụng cho lâm sàng là kháng thể đơn dòng bevacizumab. Bevacizumab có tác dụng ngăn chặn sự phát triển khối u trong các bệnh ung thư như ung thư thận, ung thư cổ tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư đại tràng [2]. Bevacizumab hoạt động bằng cách gắn với yếu tố VEGF, ức chế sự kết hợp của VEGF với thụ thể Flt-1 và KDR, ngăn chặn quá trình tăng sinh tế bào nội mô và ức chế sự di căn của khối u [3]. Ngoài tác dụng điều trị ung thư, kháng thể đơn dòng kháng VEGF còn được nghiên cứu và có nhiều ứng dụng trong sinh, y học, nổi bật là đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc , đồng vị phát năng lượng gamma 140keV và thời gian bán rã 6,01 giờ rất thích hợp dùng trong xạ hình chẩn đoán. Kháng thể kháng yếu tố tăng trưởng mạch máu này tập trung tại các mô ung thư theo cơ chế có sự gia tăng hình thành mạch tại các khối u. Khi các khối u cần dinh dưỡng để phát triển, yếu tố tăng trưởng nội mô xuất hiện nhiều, tập trung tại các vị trí khối u. Do vậy, khi đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc , kháng thể đơn dòng này có thể sử dụng và phát huy hiệu quả trong chụp hình miễn dịch phóng xạ RIS.

2. Đối tượng và phương pháp

Nguyên liệu, hóa chất: Bevacizumab nồng độ 100mg/4ml, hãng Roche. Đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc chiết từ máy phát $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, dạng $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$, nồng độ phóng xạ 150 - 200mCi/ml, Polatom. Các hoá chất $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ hãng

Merck. Sắc ký bản mỏng (Silicagel 60 F254, Merck). Máy phóng xạ tự chụp Cyclone hãng PerkinElmer.

Phương pháp đánh dấu kháng thể bevacizumab với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc : Kháng thể được đánh dấu với ^{99m}Tc bằng phương pháp đánh dấu trực tiếp, dùng thiếc (II) clorua làm chất khử, khử cầu disulfide (S-S) trên phân tử kháng thể về dạng sulfhydryl (SH), để dễ dàng tạo phức với ^{99m}Tc trong môi trường đệm phosphat 0,5M, pH 7,4. Để tối ưu hoá qui trình đánh dấu, các nghiên cứu khảo sát được tiến hành như sau:

Khảo sát hàm lượng clorua thiếc: Cho vào các ống đánh dấu 100 μg kháng thể bevacizumab, hoạt độ ^{99m}Tc là 5mCi, pH 7, thời gian đánh dấu 15 phút, riêng hàm lượng clorua thiếc thay đổi từ 11, 10, 20, 30, 40 và 50 μg . Dung dịch phản ứng được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng (TLC).

Hàm lượng kháng thể bevacizumab: Cố định hàm lượng clorua thiếc là 40 μg , hoạt độ ^{99m}Tc là 5mCi, pH 7, thời gian đánh dấu 15 phút, riêng hàm lượng kháng thể thay đổi từ 1, 10, 100, 400, 600 và 1000 μg . Dung dịch phản ứng được phân tích bằng TLC.

Hoạt độ phóng xạ ^{99m}Tc : Cho vào các ống đánh dấu 100 μg kháng thể bevacizumab, 40 μg thiếc (II) clorua, thay đổi hoạt độ phóng xạ khác nhau ở mỗi ống, từ 0,2mCi, 1mCi, 5mCi, 10mCi, 20mCi, 40mCi. Phức đánh dấu để yên 15 phút ở nhiệt độ phòng. Phân tích các mẫu bằng TLC.

Khảo sát pH: Cố định các ống phản ứng gồm kháng thể 100 μg , hoạt độ ^{99m}Tc là 5mCi, 40 μg thiếc clorua. Thay đổi pH ở các ống đánh dấu là 3, 4, 5, 6, 7 và 8. Phản ứng đánh dấu trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Phương pháp kiểm tra chất lượng:

Độ tinh khiết hóa phóng xạ: Chấm 5 μl ^{99m}Tc -bevacizumab lên băng sắc ký lớp mỏng, triển khai trong dung môi acetone, thời gian 15 phút. Băng sắc ký được chụp trên máy phóng xạ tự chụp Cyclone, tính độ tinh khiết hóa phóng xạ bằng phần mềm OptiQuant 5.0.

Độ bền ^{99m}Tc -bevacizumab theo thời gian: Mẫu ^{99m}Tc -bevacizumab sau khi đánh dấu được bảo quản trong các loại dung dịch đệm như phosphat 0,5M, pH 7,4 có thêm acid ascorbic hoặc albumin, đệm acetate 0,5M, pH 6, NaCl 0,9%. Sau các khoảng thời gian 1, 3, 6, 24 giờ, ^{99m}Tc -bevacizumab được phân tích bằng TLC, triển khai trong dung môi aceton. Thống kê hiệu suất đánh dấu điều chế ^{99m}Tc -bevacizumab tiến hành trên 10 mẻ nghiên cứu.

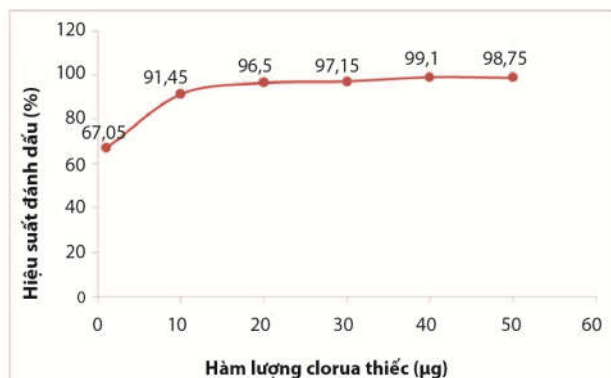
2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu được phân tích dùng phần mềm Prism 8.4.3 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

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

Thiếc (II) clorua: Quá trình đánh dấu kháng thể bevacizumab với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc đạt hiệu suất hơn 98% (Hình 1).

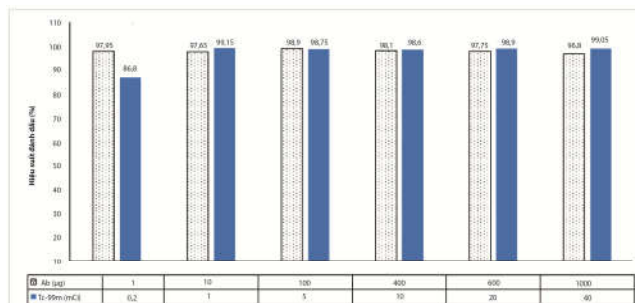


Hình 1. Hàm lượng thiếc clorua và hiệu suất đánh dấu

Đồ thị cho thấy với hàm lượng thiếc clorua 10μg trở lên, hiệu suất đánh dấu đạt hơn 91%, và hiệu suất đánh dấu đạt cao nhất là 99% khi hàm lượng thiếc clorua đạt 40μg.

Hàm lượng kháng thể và hoạt độ phóng xạ: Kết quả khảo sát hàm lượng kháng thể bevacizumab tham gia trong phản ứng đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc cho thấy hiệu suất đánh dấu đạt hơn 95% với hàm lượng kháng thể từ 1μg đến 1000μg. Hoạt độ phóng xạ của ^{99m}Tc từ 1mCi trở lên tham gia

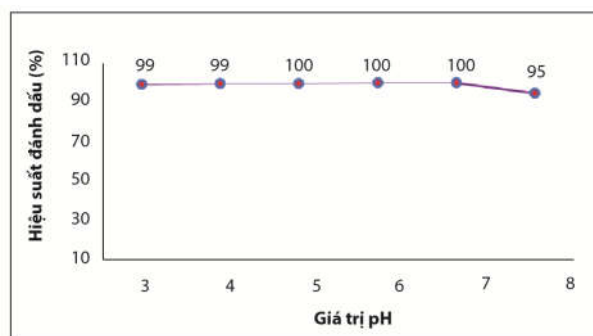
trong phản ứng đánh dấu 100μg kháng thể cho hiệu suất đạt hơn 98%. Trong miền < 1mCi, hiệu suất gắn chỉ đạt 86,8% (Hình 2).



Hình 2. Khảo sát hàm lượng kháng thể, hoạt độ ^{99m}Tc và hiệu suất đánh dấu

Hoạt độ riêng của ^{99m}Tc không chất mang là $5,27 \times 10^6$ mCi/mg [4]. Đánh dấu 5mCi ^{99m}Tc tương đương 0,945ng (0,0095nmol/L) và 100μg kháng thể tương đương 0,66nmol/L. Tỷ lệ mol giữa Tc- 99m và kháng thể là 0,0143. Hiệu suất đánh dấu đạt 98%, số nhóm gắn của ^{99m}Tc trên phân tử kháng thể là 0,014, tỷ lệ này thích hợp đối với các hợp chất đánh dấu dùng trong chụp hình chẩn đoán.

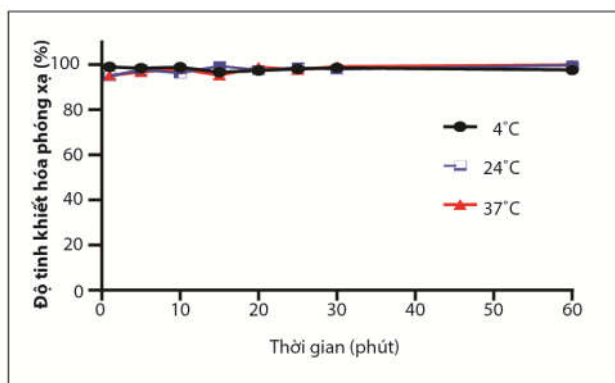
Kết quả khảo sát pH đánh dấu kháng thể: Quá trình đánh dấu kháng thể với ^{99m}Tc đạt hiệu suất cao hơn 98% trong miền pH từ pH = 3 đến pH = 7 (Hình 3). Trong miền này khả năng ổn định của các gốc -RS rõ hơn. Chất khử dùng trong nghiên cứu này là thiếc chlorua làm nhiệm vụ khử $^{99m}\text{Tc}^{7+}$ về $^{99m}\text{Tc}^{4+}$ trong môi trường acid. Khi pH= 8 hiệu suất đánh dấu giảm còn 94,55%, và vì môi trường kiềm không bảo quản được các hợp chất đánh dấu phóng xạ, nên chọn pH đánh dấu tối ưu là pH trung tính.



Hình 3. Đồ thị khảo sát pH và hiệu suất đánh dấu

Kết quả khảo sát thời gian và nhiệt độ phản ứng: Kết quả Hình 5 cho thấy, thời gian tối ưu để phản ứng đạt hiệu suất cao hơn 98% là khoảng 5

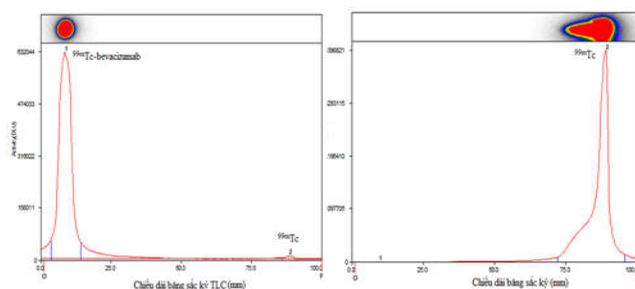
đến 20 phút, nếu thời gian ít hơn có thể không đủ cho phản ứng xảy ra hoàn toàn. Thời gian lâu hơn có thể do phân tử oxy hóa làm thay đổi nhẹ hoạt tính của kháng thể hoặc làm hỏng một số cấu trúc của kháng thể. Do vậy, chọn thời gian phản ứng tối ưu cho phản ứng đánh dấu kháng thể là cần thiết.



Hình 4. Kết quả khảo sát thời gian và nhiệt độ phản ứng

Phản ứng đánh dấu kháng thể với ^{99m}Tc được khảo sát ở 4°C, 24°C và 37°C cho thấy phức phóng xạ đạt hiệu suất cao dù thực hiện đánh dấu ở các nhiệt độ khác nhau, hiệu suất gần vẫn duy trì ở mức trên 98%.

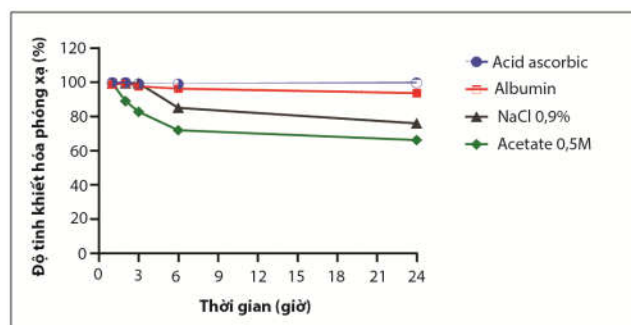
Kết quả kiểm tra chất lượng: Kết quả phân tích và đo đếm cho thấy, độ tinh khiết hóa phóng xạ của phức đánh dấu đạt hơn 98% (Hình 5). Đồ thị cho thấy phức ^{99m}Tc -bevacizumab nằm ở gốc của băng sắc ký $R_f = 0,1$, còn ^{99m}Tc tự do sẽ đi về ngọn $R_f = 0,9$. Kết quả cho thấy ^{99m}Tc -bevacizumab đạt chỉ tiêu chất lượng của dược chất phóng xạ dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 5. Độ tinh khiết hoá phóng xạ ^{99m}Tc -bevacizumab, TLC 10 × 100mm, dung môi acetone, chụp bằng sắc ký trên máy phóng xạ tự chụp Cyclone.

Độ bền ^{99m}Tc -bevacizumab theo thời gian: Kết quả phân tích cho thấy dung dịch sản phẩm ổn định

trong đệm phosphate chứa thêm acid ascorbic cho đến 24 giờ, kiểm tra độ tinh khiết hoá phóng xạ sau 24 giờ đánh dấu vẫn đạt hơn 98% (Hình 6). Acid ascorbic là chất thường được dùng làm tá dược trong các loại thuốc nên có thể sử dụng để ổn định phức kháng thể đánh dấu với phóng xạ như phức ^{99m}Tc -bevacizumab.



Hình 6. Theo dõi độ ổn định phức ^{99m}Tc -bevacizumab theo thời gian

Tóm lại, quá trình đánh dấu kháng thể đơn dòng bevacizumab với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc được thực hiện trong môi trường đệm phosphate 0,5M, pH = 7,4, trong đó 100μg kháng thể, 40μg chất khử thioclorua và 5mCi ^{99m}Tc , thời gian đánh dấu là 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Kết quả thống kê trên 10 lô đánh dấu cho thấy hiệu suất đánh dấu điều chế ^{99m}Tc -bevacizumab là $98,96 \pm 0,49\%$ ($n = 10$). Vì vậy, không cần thiết phải tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel như thường thấy khi dùng chất khử như 2-mercapto ethanol hoặc dithiothreitol hoặc dùng phương pháp gián tiếp với các chất tạo phức trung gian như MAG_3 [3].

4. Bàn luận

Quá trình đánh dấu kháng thể bevacizumab với ^{99m}Tc dùng thioclorua làm chất khử, liên kết disulphite (S-S) được khử thành nhóm thiol (-SH) và đánh dấu dễ dàng với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc (thường là ở trạng thái ion $^{99m}\text{Tc}^{4+}$). Chúng tôi chọn chất khử là ion thioclorua dựa trên nhiều nghiên cứu trước đây, các thuốc phóng xạ đánh dấu với ^{99m}Tc đã thương mại và đã sử dụng an toàn trên lâm sàng [4]. Hơn ba thập kỷ qua, kỹ thuật đánh dấu kháng thể với các đồng vị phóng xạ như ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{124}I , ^{18}F dùng trong chụp hình chẩn đoán đã được phát triển và sử dụng trên lâm sàng để chụp hình các ung thư như ung thư trực

tràng (satumomab pendetic, arcitumomab), ung thư tuyến tiền liệt (capromab pendetide), u lympho không Hodgkin, ung thư gan, nhồi máu cơ tim (imciromab penlefate) nhiễm trùng và viêm (sulesomab, fanolesomab) [5].

Các kết quả trong nghiên cứu cho thấy rằng, hiệu suất đánh dấu đạt cao > 95%, thậm chí với hàm lượng thiếc clorua < 20µg, pH từ pH = 3 đến pH = 7, thời gian từ 5 phút đánh dấu trở đi và ngay cả khi hàm lượng kháng thể chỉ từ 1µg, chứng tỏ quá trình tạo phức của đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc với kháng thể dễ dàng xảy ra. Với hàm lượng kháng thể 100µg, hiệu suất đánh dấu đạt trên 98%, cho thấy càng nhiều phân tử kháng thể, càng có nhiều vị trí gắn. So sánh với các nghiên cứu tương tự như Faiza và cộng sự gần đây, khi gắn bevacizumab qua phối tử p-SCN-Bz-TCMC [1] hoặc Camacho và cộng sự với $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab và ^{99m}Tc -HYNIC-bevacizumab đều tạo ra sản phẩm có độ tinh khiết hóa phóng xạ cao và bền trong nước muối sinh lý cũng như đệm phosphat đến 6 giờ sau khi đánh dấu [6, 7]. Cuối cùng là pH trung tính cũng như thời gian đánh dấu 15 phút được chọn để phù hợp khi sử dụng lâm sàng. Sau 24 giờ, phức bền trong nước muối sinh lý hoặc đệm phosphat có thêm acid ascorbic và albumin, thuận lợi cho việc bảo quản và sử dụng.

5. Kết luận

Nghiên cứu đánh dấu kháng thể đơn dòng bevacizumab với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc đạt hiệu suất cao. Phức đánh dấu đạt các chỉ tiêu về độ tinh khiết hóa phóng xạ và độ ổn định theo yêu cầu của dược chất phóng xạ dùng trong chụp hình chẩn đoán các khối ung thư. Để có thể sử dụng ^{99m}Tc -bevacizumab trên lâm sàng, cần có những nghiên cứu sâu hơn về các đánh giá tiền lâm sàng như hoạt tính miễn dịch, phân bố trên động vật,

đánh giá liều lượng cũng như hiệu quả chụp hình phóng xạ miễn dịch.

Tài liệu tham khảo

1. Faiza B, Shah SQ (2020) *Synthesis of ^{99m}Tc -p-SCN-Bz-TCMC-bevacizumab for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor imaging using ovarian cancer model*. J Radioanal and Nucl Chem 325: 147–154.
2. Masłowska K, Halik PK, Tymecka D, Misicka A, Gniazdowska E (2021) *The Role of VEGF receptors as molecular target in nuclear medicine for cancer diagnosis and combination therapy*. Cancers (Basel) 13(5): 1072.
3. Rahmathulla G, Hovey EJ, Hashemi-Sadraei N, Ahluwalia MS (2013) *Bevacizumab in high-grade gliomas: A review of its uses, toxicity assessment, and future treatment challenges*. Onco Targets Ther 6: 371–389.
4. Muhammad UA, Muhammad RA, Aqeela S, Sajid M (2016) *A review on evaluation of technetium-99m labeled radiopharmaceuticals*. J Radioanal and Nucl Chem 310(2).
5. David MG, Robert MS, Jacques B, Jean FC (2007) *Radioactive antibodies: Selective targeting and treatment of cancer and other diseases*. Appl Rad 6(4): 10–29.
6. Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Chabalgoity JA, Moreno M, de Aguiar RB, Alonso O, Gambini JP, Chammas R et al (2013) *$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -radiolabeled bevacizumab: In vitro and in vivo evaluation in a melanoma model*. Oncology 84: 200–209.
7. 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*. Sci Rep 7: 3504.