

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG GẮN ĐỒNG VỊ PHÓNG XẠ ¹³¹I-RITUXIMAB DÙNG TRONG ĐIỀU TRỊ U LYMPHO ÁC TÍNH KHÔNG HODGKIN

MAI TRỌNG KHOA¹, NGUYỄN THỊ THU², TRẦN ĐÌNH HÀ¹,
VÕ THỊ CẨM HOA², BÙI VĂN CƯỜNG²
1. Bệnh Viện Bạch Mai, Hà Nội
2. Viện Nghiên cứu hạt nhân, Đà Lạt

TÓM TẮT

Điều trị phóng xạ miễn dịch là phương thức chữa ung thư có triển vọng cao với hiệu quả lâm sàng rõ rệt, đã được áp dụng trong thập niên qua. Kháng thể đơn dòng rituximab được đánh dấu với đồng vị phóng xạ ¹³¹I dùng trong điều trị bệnh u lympho ác tính không Hodgkin. Để điều chế hai hoạt độ riêng khác nhau dùng trong y học, trong nghiên cứu này, các điều kiện tối ưu cho quy trình đánh dấu kháng thể đã được thực hiện. Kháng thể đơn dòng được đánh dấu với đồng vị phóng xạ ¹³¹I bằng phương pháp chloramin T (chT) và iodogen. Nồng độ chT tham gia oxi hoá 740 MBq ¹³¹I và 3000 µg kháng thể là 100 µg. Thời gian phản ứng là 5 phút ở nhiệt độ phòng. Phản ứng đánh dấu kháng thể trong ống iodogen dùng 740 MBq ¹³¹I và 20 mg kháng thể trong đệm phosphat với thời gian phản ứng là 10 phút. Hiệu suất phản ứng được kiểm tra bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng TLC (Thin Layer Chromatography). Hỗn hợp phản ứng được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel. Sản phẩm ¹³¹I-rituximab được lọc qua phil lọc vô trùng 0,20 µm. Hiệu suất đánh dấu đạt hơn 95% theo phương pháp chT và hơn 85% theo phương pháp iodogen. Độ sạch hoá phóng xạ của sản phẩm hơn 99%. Đây là được chất phóng xạ đạt tiêu chuẩn chất lượng về thuốc phóng xạ như độ vô khuẩn, nội độc tố vi khuẩn, ổn định, ¹³¹I-rituximab có thể sử dụng điều trị trên lâm sàng.

Từ khóa: Radioimmunotherapy, ¹³¹I-Rituximab, Radioiodination, Radiopharmaceuticals.

STUDY ON THE PREPARATION OF LABELLED MONOCLONAL ANTIBODY ¹³¹I-RITUXIMAB FOR NON HODGKIN LYMPHOMA THERAPY

SUMMARY

Radioimmunotherapy has become a highly promising oncologic therapeutic modality with established clinical efficacy in the last decades. Monoclonal antibody rituximab was labelled with ¹³¹I used in the treatment of B cell non Hodgkin's Lymphoma (NHL). In this study, rituximab, a monoclonal antibody was labelled with ¹³¹I using chloramin T and iodogen method to prepare radioimmunoconjugated ¹³¹I-rituximab with two specific activities. The optimized conditions of radioiodination of rituximab were carried out. The optimized chloramin T concentration for the oxidation of 740 MBq of Na¹³¹I solution and 3000µg of Rituximab was 100 µg. Reaction time was 5 minutes at room temperature. The labeling reaction has

stopped using sodiummetabisulphite. Iodogen coated tubes which were used in the labelled 3000 µg antibody and 740 MBq is 80 µg. Labelling efficacy was controlled by TLC. The reaction mixtures were purified through the sephadex G-25 PD10 pharmacia column. The collected ¹³¹I-rituximab was filtered through a 0.20µm millipore sterile filter. The labeling yields was more than 95% of chT and 85% of iodogen methods. Radiochemical purity of the radiopharmaceutical after purification was more than 99%. The product has been passed the test for sterility, bacterial endotoxins, to be sufficiency invitro stable after labelling, ¹³¹I-rituximab is ready for clinical use.

Keywords: Radioimmunotherapy, ¹³¹I-Rituximab, Radioiodination, Radiopharmaceuticals,.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, kháng thể đơn dòng đánh dấu phóng xạ đã được nghiên cứu điều chế và ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị lâm sàng. Trong số đó, chế phẩm ¹³¹I-rituximab gồm kháng thể đơn dòng kháng CD20 rituximab [1] đánh dấu đồng vị phóng xạ ¹³¹I là một trong những được chất phóng xạ được sử dụng có hiệu quả trong điều trị bệnh u lympho ác tính không Hodgkin (Non Hodgkin's Lymphoma, NHL) [2].

U lympho ác tính là nhóm bệnh ung thư phát sinh từ tế bào lympho trong các tổ chức khác nhau của cơ thể. Kháng nguyên CD20 biểu hiện mức độ cao trên các tế bào lympho ung thư [3]. Việc điều trị bệnh NHL bằng phương pháp điều trị phóng xạ nhắm đích dùng ¹³¹I-rituximab trong những năm qua đã ngày càng chứng minh tình hiệu quả [4], [5]. Kháng thể đơn dòng rituximab thực hiện chức năng nhắm đích của mình bằng cách gắn đặc hiệu lên kháng nguyên CD20 trên tế bào ung thư lympho B [6]. Sau khi đánh dấu phóng xạ, kháng thể gắn phóng xạ ¹³¹I - rituximab tìm đến và diệt tế bào ung thư theo cơ chế bức xạ ion hóa, cơ chế gây độc tế bào ung thư qua kháng thể, gây độc tế bào ung thư qua bổ thể và kết quả dẫn đến sự chết có chương trình của tế bào [2], [7]. Với thời gian bán rã 8 ngày, phát tia gamma với năng lượng 364 keV và tia beta với năng lượng trung bình là 192 keV, ¹³¹I [8] là đồng vị phóng xạ lý tưởng cho việc chụp hình và điều trị bệnh khi gắn với phân tử kháng thể. Trong báo cáo này chúng tôi trình bày phương pháp nghiên cứu điều chế ¹³¹I - rituximab bằng các phương pháp chloramin T và phương pháp iodogen để thu được được chất phóng xạ đạt các tiêu chuẩn chất lượng về thuốc phóng xạ dùng điều

trị trong y học.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu, hoá chất: Đồng vị phóng xạ ^{131}I dạng Na^{131}I sản xuất tại Viện Nghiên cứu hạt nhân, nồng độ phóng xạ 100-200 mCi/ml. Kháng thể đơn dòng kháng CD20 rituximab, mua từ hãng Roche. Cột sắc ký lọc gel Sephadex G25 (pharmacia) mua từ hãng Amersham Bioscences. Hoá chất chloramin T, Iodogen (1,3,4,6 - tetrachloro - 3alpha, 6alpha - diphenylglucoluril), natri metabisulphite mua từ hãng Sigma Aldrich. Thiết bị sử dụng là máy điện di, máy sắc ký FPLC 6850A, Perkin Elmer, máy phóng xạ tự chụp radioautography B431201, máy quét Bioscan, máy đo phóng xạ Capintec, máy đo phóng xạ Caprat.

Phương pháp đánh dấu kháng thể rituximab với đồng vị phóng xạ dùng chất oxy hóa chloramin T: Đây là phương pháp được giới thiệu bởi Hunter và Greenwood (1962) [9] để đánh dấu các hợp chất sinh học với chất phóng xạ iod. Đồng vị phóng xạ ^{131}I được chọn làm chất đánh dấu vì sự có mặt của nó không gây ảnh hưởng đến hoạt tính của phân tử kháng thể. Kháng thể đơn dòng rituximab được đánh dấu với ^{131}I trong môi trường đệm phosphat 0.5 M, pH 7.5. Các nghiên cứu khảo sát thực hiện với hàm lượng chT từ 1 μg đến 60 μg , pH 5, 6, 7, 8, 9, hàm lượng kháng thể từ 1 đến 1000 mg; thời gian phản ứng đánh dấu kháng thể với phóng xạ từ 1 đến 30 phút. Các mẫu kháng thể đánh dấu phóng xạ trong nghiên cứu được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng TLC trong dung môi methanol và NaCl 0,9% theo tỉ lệ thể tích là 85:15. Số liệu được đo đếm trên các máy đo chuyên dụng.

Phương pháp đánh dấu kháng thể rituximab với đồng vị phóng xạ dùng chất oxy hóa iodogen: Kháng thể đơn dòng rituximab được khảo sát đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{131}I theo phương pháp iodogen [10]. Nghiên cứu tỉ lệ mol từ 0,005 đến 100 mole iodogen/mole rituximab, khảo sát pH miền đo từ 2, 3, 5, 6, 7, 8, 5. Hàm lượng kháng thể tham gia tạo phức hợp từ 1 đến 1000 mg, thời gian phản ứng đánh dấu kháng thể với phóng xạ từ 1 đến 240 phút. Các mẫu kháng thể đánh dấu phóng xạ được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng TLC trong dung môi methanol và salin 0,9% theo tỉ lệ thể tích là 85:15. Số liệu được đo đếm trên các máy đo chuyên dụng.

Kiểm tra chất lượng ^{131}I -rituximab: Phức hợp ^{131}I -rituximab được kiểm tra chất lượng bằng các phương pháp sắc lý lớp mỏng, sắc ký lọc gel, các phương pháp sinh học như độ vô khuẩn, nội độc tố vi khuẩn [12].

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

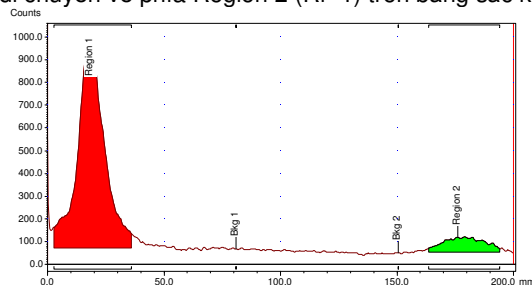
1. Kết quả đánh dấu kháng thể rituximab với đồng vị phóng xạ ^{131}I dùng chloramin T [13]: Kết quả khảo sát quy trình đánh dấu phóng xạ cho thấy hàm lượng chT tham gia trong phản ứng đánh dấu là trong khoảng 20 μg để oxy hóa từ 5 mCi ^{131}I . Hàm lượng kháng thể có mặt trong sự oxy hóa của chloramin T là khoảng 100 μg để có thể gắn với mức tối thiểu hoạt độ phóng xạ là 5 mCi. Phản ứng đánh

dấu đạt hiệu suất cao nhất ở pH 7 - 8, đây là miền pH có thể bảo vệ kháng thể ổn định trong quá trình bảo quản và điều trị trên con người. Thời gian phản ứng đánh dấu là khoảng từ 1 đến 5 phút, thời gian này đủ nhanh để có thể các phân tử tiếp xúc nhau, phản ứng nhanh và người thực hiện có thể kết thúc phản ứng. Kết quả cho phản ứng đánh dấu đạt hiệu suất cao 96 - 98 % và phương pháp đánh dấu ổn định, bằng 1.

Bảng 1: Kết quả khảo sát quá đánh dấu rituximab với ^{131}I bằng phương pháp chloramin T

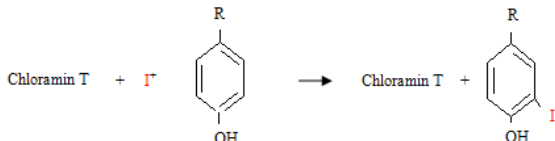
Hàm lượng chloramin T (μg) Hiệu suất đánh dấu (%)	1	10	20	30	60
Hàm lượng kháng thể (μg) Hiệu suất đánh dấu (%)	0,1	1	10	100	1000
Thời gian phản ứng (phút) Hiệu suất đánh dấu (%)	1	5	10	20	30
pH Hiệu suất đánh dấu (%)	5	6	7	8	9

Hình 1 là đồ thị điển hình trong quá trình khảo sát. Phức ^{131}I -rituximab nằm tại miền Region 1 ($R_f=0$), ^{131}I di chuyển về phía Region 2 ($R_f=1$) trên băng sắc ký

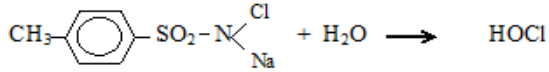


Hình 1: Đồ thị kiểm tra hiệu suất đánh dấu phóng xạ bằng phương pháp chloramin T

Quy trình đánh dấu kháng thể rituximab với đồng vị phóng xạ dùng chất oxy hóa chloramin T để điều chế phức hợp có hoạt độ riêng 6,6 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ [11]. Kháng thể được đánh dấu với ^{131}I trong môi trường đệm phosphat 0,5 M, pH 7,4. Cho vào chai phản ứng theo thứ tự 100 μl đệm phosphat, 300 μl rituximab (10 mg/ml), 100 μl dung dịch phóng xạ Na^{131}I có hoạt độ 740 MBq, tiếp theo đó thêm 50 μl ChT (2 mg/ml). Lắc trộn nhẹ cho phản ứng xảy ra trong 5 phút. Sau đó, cho 100 μl SMB (4 mg/ml) vào, trộn nhẹ 30 giây. Hỗn hợp phản ứng được nạp cột sephadex PD10 và tách, thu phân đoạn sản phẩm, đo hoạt độ phóng xạ, lọc qua pin lọc vô trùng 0,2 μm và bảo quản thuốc ở điều kiện lạnh. Phản ứng oxy hóa kháng thể bằng phương pháp chloramin T như sau:

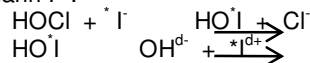


Ở dạng Na^{131}I phân tử ^{131}I ở trạng thái bền, không phản ứng thế vào các phân tử thyroxin. Khi cho thêm chất oxy hóa nhẹ là chloramin T, trong dung dịch, chT để tạo thành acid hypochlorous theo phản ứng:



(N-Chloro-4-methylbenzen sulfonamide natri)

Acid hypochlorous là chất oxy hóa thực hiện phản ứng chuyển I^- thành I^+ :

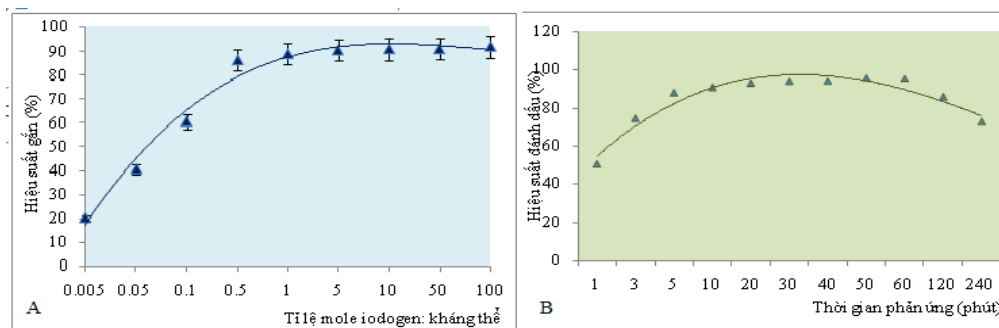


I^+ là chất oxy hóa mạnh, phản ứng thuận và nhanh tại pH trung tính, I^+ thay vào vị trí ortho của hydro trên vòng phenol. Phản ứng oxy hóa xảy ra nhanh, hơn 90% kháng thể đánh dấu phóng xạ được

tạo thành, một nguyên tử iod phóng xạ (^{131}I) được gắn vào vòng phenol tại vị trí 3' đồng thời cũng có một số ít nguyên tử ^{131}I gắn vào cả vị trí 5' [12].

2. Kết quả đánh dấu kháng thể rituximab với đồng vị phóng xạ ^{131}I dùng iodogen:

Kết quả đánh dấu kháng thể rituximab với đồng vị phóng xạ ^{131}I theo tỉ lệ mol từ 0,005 đến 100 mole iodogen/mole rituximab cho thấy tỉ lệ mol iodogen và kháng thể tham gia trong phản ứng đánh dấu trong khoảng 0,5:1 để oxy hóa và đánh dấu với 5 mCi của ^{131}I (hình 2A). Hoạt độ phóng xạ tham gia phản ứng đánh dấu kháng thể trong ống iodogen 20 μg là 5 mCi. Thời gian phản ứng kháng thể gắn phóng xạ từ 1 đến 240 phút, kết quả cho thấy thời gian phản ứng đánh dấu là khoảng từ 5 đến 10 phút (hình 2B). Thời gian này đủ nhanh để có thể các phân tử tiếp xúc nhau, phản ứng nhanh và người thực hiện có thể kết thúc phản ứng. Khảo sát pH miền đo từ 2, 3, 5, 6, 7, 8,5 cho thấy phản ứng đánh dấu đạt hiệu suất cao nhất ở pH 7,2 - 7,5 (bảng 1), đây là miền pH có thể bảo vệ kháng thể ổn định trong quá trình bảo quản và điều trị trên con người.



Hình 2: Khảo sát tỉ lệ mole iodogen và kháng thể và khảo sát thời gian phản ứng

Đánh dấu kháng thể với đồng vị phóng xạ ^{131}I bằng phương pháp iodogen cho kết quả hiệu suất gắn cao trong khoảng 85 - 95 % và sản phẩm thu được ổn định.

Bảng 1: Kết quả khảo sát quá đánh dấu rituximab với ^{131}I bằng phương pháp iodogen

pH	2	3	5	6	7	8,5
Hiệu suất đánh dấu (%)	30,5	32,5	53,3	70,8	89,5	88,9
Hoạt độ phóng xạ (mCi)	1	5	10	20	50	100
Hiệu suất đánh dấu (%)	92,1	91,9	90,2	89,9	89,5	75,0

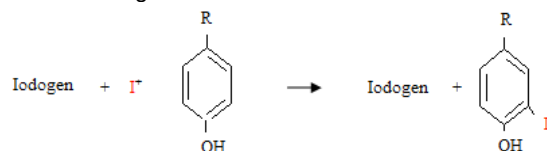
Trong miền pH tối ưu pH 7,0 - 8,5 có sự oxy hóa của ^{131}I tạo thành I^+ dễ dàng, phản ứng gắn ^{131}I vào phân tử kháng thể hiệu quả hơn. Khi pH lớn hơn 8,5 hiệu suất đánh dấu giảm, có thể do phản ứng không thuận nghịch tạo thành IO_3^- :



Trong miền pH nhỏ hơn 6,5 hiệu suất phản ứng ít hiệu quả hơn do sự phân ly của HOCl trong môi trường axit.

Hoạt độ phóng xạ càng cao hàm lượng iodogen tương ứng càng nhiều để đáp ứng vai trò làm chất oxy hóa ^{131}I thành I^+ . Trong bảng khảo sát hiệu suất đánh dấu thấp có thể do hàm lượng iodogen không đủ để oxy hóa hết hoạt độ phóng xạ 150 mCi của ^{131}I .

Phản ứng đánh dấu phân tử ^{131}I vào thyroxin trên phân tử kháng thể như sau:



I^+ thay vào vị trí ortho của hydro trên vòng phenol của thyroxin, tạo thành phức hợp kháng thể gắn phóng xạ bền.

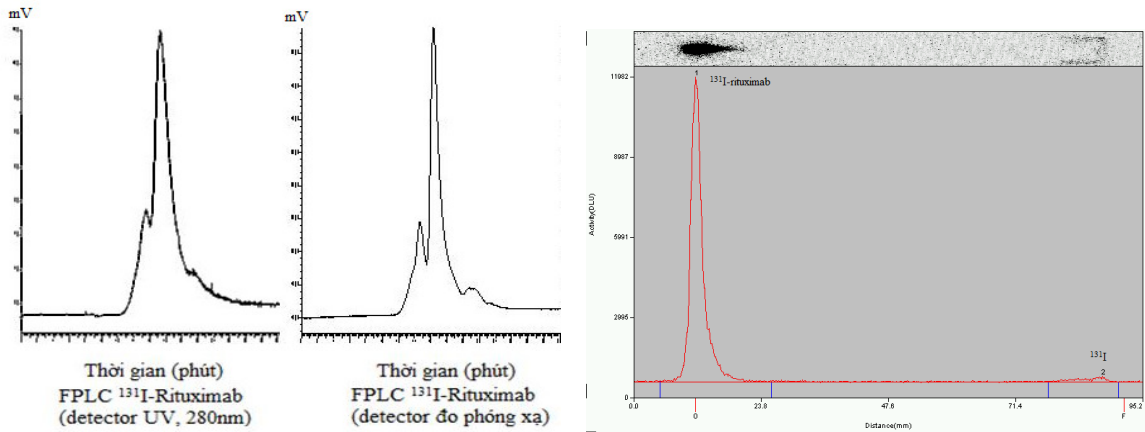
Kết quả đánh dấu kháng thể với ^{131}I : Để điều chế phức hợp miễn dịch phóng xạ ^{131}I -rituximab có hoạt độ riêng 1 $\square\text{Ci}/\square\text{g}$, lượng kháng thể được đánh dấu với ^{131}I là 2 mg và hoạt độ phóng xạ là 740 MBq. Phản ứng xảy ra trong môi trường đệm phosphat 0,5 M, pH 7,4. Cho vào ống phản ứng đã có phủ sẵn 80 $\square\text{g}$ iodogen, thể tích đệm phosphat là 100 μl , thêm

vào đó 2000 μ l rituximab và 100 μ l dung dịch phóng xạ $Na^{131}I$ có hoạt độ 740 MBq. Lắc trộn nhẹ cho phản ứng xảy ra trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được nạp cột sephadex và tách phần phức hợp ^{131}I -rituximab và phần ^{131}I tự do, đo hoạt độ phóng xạ và bảo quản thuốc ở điều kiện lạnh.

Tinh sạch ^{131}I -Rituximab: Phức hợp ^{131}I -rituximab được tách ra khỏi ^{131}I tự do bằng phương pháp sắc ký lọc gel dùng sephadex G-25. Hỗn hợp phản ứng có chứa phức hợp miễn dịch phóng xạ ^{131}I -rituximab được tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel sephadex G25,

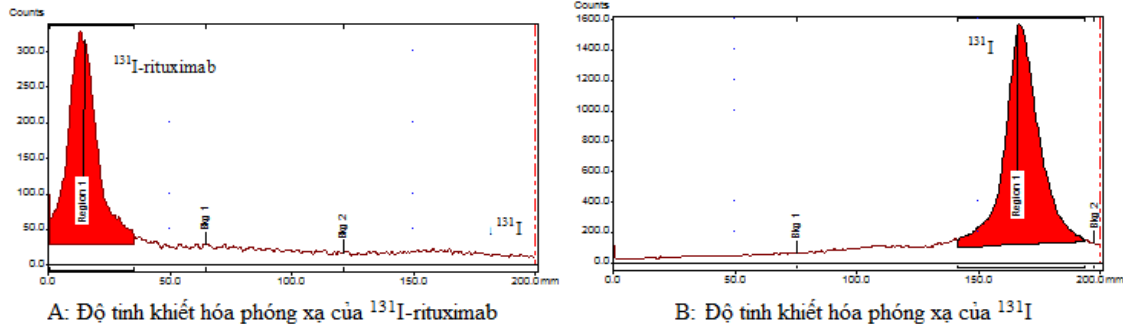
PD10. Quá trình tách ly qua cột được nghiên cứu trên các dung dịch rửa giải, tốc độ rửa giải và phân đoạn thu sản phẩm. Chất rửa giải thích hợp cho ^{131}I -rituximab là đệm phosphat 0,2 M, pH 7,2 hoặc dung dịch NaCl 0,9%.

Kết quả kiểm tra độ tinh khiết hóa phóng xạ ^{131}I -rituximab: Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{131}I -rituximab đạt hơn 99%, được kiểm tra theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp, sắc ký lớp mỏng, sắc ký điện di (hình 3,4).



Hình 3: Đồ thị sắc ký lỏng cao áp HPLC và sắc ký lớp mỏng kiểm tra độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{131}I -rituximab

Đồ thị trên hình 3 cho thấy thời gian lưu của ^{131}I -rituximab trên hệ HPLC là 14,0 phút đo trên hai detector phóng xạ và detector UV. Trên ảnh phóng xạ tự chụp radioautography, phức ^{131}I -rituximab nằm tại điểm gốc của băng sắc ký với độ tinh khiết hơn 99%. Đồng vị phóng xạ ^{131}I tự do di chuyển về tuyến trên của dung môi.



A: Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{131}I -rituximab

B: Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{131}I

Hình 4: Kiểm tra độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{131}I -rituximab và ^{131}I

Trên hình 4, băng sắc ký được quét trên máy Bioscan, kết quả là phức ^{131}I -rituximab tại nằm tại vị trí $R_f = 0,0 - 0,1$.

KẾT LUẬN

Với nhiều ưu điểm về tính chất dễ sử dụng, phản ứng nhanh, tạo sản phẩm đặc hiệu ^{131}I -rituximab dùng trong điều trị u lympho bào B không Hodgkin, hai hợp chất oxy hóa nhẹ chloramin T và iodogen đã được nghiên cứu ứng dụng trong điều chế phức hợp miễn dịch phóng xạ. Hàm lượng chloramin T và iodogen tham gia trong phản ứng đánh dấu rất bé, trong khoảng 20 - 200 μ g chloramin T để oxy hóa từ

185 - 1850 MBq ^{131}I . Tỷ lệ mol iodogen và kháng thể tham gia trong phản ứng đánh dấu là trong khoảng 0,5:1 để oxy hóa và đánh dấu với 740 - 1850 MBq ^{131}I . Thời gian phản ứng đánh dấu nhanh, dễ thực hiện. Phản ứng đánh dấu đạt hiệu suất cao 95 - 98 % và phương pháp đánh dấu ổn định. Phức hợp miễn dịch thu được đạt độ tinh khiết hoá phóng xạ và các chỉ tiêu kiểm tra chất lượng thuốc phóng xạ như độ vô khuẩn, nội độc tố vi khuẩn, ổn định trong bảo

quản, đạt các chỉ tiêu đánh giá tiền lâm sàng, ¹³¹I-rituximab đạt tiêu chuẩn chất lượng thuốc phóng xạ dùng trong lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mark S. Karminski, Kenneth R. Zasadny, Isaac R. Francis, Adam W. Milik. Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with [¹³¹I]Anti B1 (anti-CD20) Antibody. The new England Journal of Medicine Volume 329:459-465, 1993.
2. Richard, L. Wahl, MD. (2005). Tositumomab and ¹³¹I Therapy in Non Hodgkin's Lymphoma. The Journal of Nuclear Medicine. Vol 46. No.1.
3. Pescovitz, M. D. (2006). Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant.* 6:859-866.
4. John P. Leonard. Targeting CD20 in Follicular NHL. Novel anti-CD20 Therapies, Antibody Engineering, and the Use of Radioimmunoconjugates. The American Society of Hematology, 2005.
5. Fisher, R. I. 2003. Overview of non-Hodgkin's

lymphoma: biology, staging, and treatment. *Seminars in oncology.* 30:3-9.

6 Maloney, D. G. (2001). Mechanism of action of rituximab. *Anti-cancer drugs.* 12 Suppl 2:S1-4

7 Knox, S. J., Goris, M. L., Trisler, K., Negrin, R., Davis, T., *et al.* (1996). Yttrium-90-labeled anti-CD20 monoclonal antibody therapy of recurrent B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2:457-470

8 Azuwuikwe Owunwanne, Mohan Patel and Samy Sadek. (1995). The handbook of Radiopharmaceuticals. Chapman and Hall Medical. New York

9 Bolton, A. E., and Hunter, W. M. (1973). The labelling of proteins to high specific activities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent. *Biochem. J.* 133, 529-538.

10 Fraker, P. J., and Speck, J. C. (1978). Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro 3a.6a diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849.