

KHẢ NĂNG GẮN VỚI TẾ BÀO UNG THƯ ĐẦU CÔ CỦA PHỨC HỢP ^{90}Y -DOTA-NIMOTUZUMAB IN VITRO

TS. NGUYỄN THỊ THU - Viện Nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt

PGS.TS. NGUYỄN LĨNH TOÀN - Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS.TS. NGUYỄN VĂN BA

Phó Giám đốc Trung tâm Ung bướu,

Bệnh viện Quân y 103

TÓM TẮT: Dược chất phóng xạ ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab đã được điều chế với hoạt tính miễn dịch có thể dùng trong điều trị miễn dịch phóng xạ. Dược chất phóng xạ ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab được điều chế bằng chất tạo phức trung gian hai chức năng p-NCS-benzyl-DOTA. Khả năng gắn phức hợp ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab với tế bào ung thư đầu, cổ dòng HEP-2 (ATCC) được đánh giá bằng phương pháp xác định khả năng gắn bão hòa. Hằng số cân bằng Kd và khả năng gắn cực đại Bmax đã được xác định của phức hợp ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab là 3,2 nmol/L và $2,9 \times 10^5$. Dược chất phóng xạ ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab bảo đảm hoạt tính sinh học của kháng thể sau khi đánh dấu phóng xạ.

Từ khóa: ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab, ^{131}I -nimotuzumab, immunoreactivity, antibody affinity.

ABSTRACT: The radio-immuno-conjugation of ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab was prepared and the immune-reactivities were also evaluated for radio-immuno-therapy (RIT). The Yttrium-90 was conjugated to the monoclonal antibody nimotuzumab (^{90}Y -DOTA-nimotuzumab) using the bifunctional chelated p-NCS-benzyl-DOTA. The binding of ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab with HEP-2 head-neck cancer cell line were performed base on saturation binding assay. The Kd and Bmax of ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab with HEP-2 cells were 3.2 nmol/L and 2.9×10^5 . The radio-pharmaceutical of ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab was met the requirements for antibody immune-reactivities after radiolabeling.

Keywords: ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab, ^{131}I -nimotuzumab, immunoreactivity, antibody affinity.

Chịu trách nhiệm nội dung: PGS.TS. Nguyễn Linh Toàn, Email: toannl@vmmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 04/3/2019; mời phản biện khoa học: 15/3/2019; chấp nhận đăng: 25/4/2019.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Ung thư biểu mô đầu, cổ là loại ung thư phổ biến, đứng hàng thứ sáu trong các loại ung thư. Các tế bào ung thư đầu, cổ có biểu hiện tăng thụ thể tăng trưởng biểu bì (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR) [1]. Đây chính là yếu tố đích hấp dẫn trong trị liệu nhắm đích bằng kháng thể đơn dòng nimotuzumab (kháng thể kháng EGFR người theo cơ chế cạnh tranh với các yếu tố tăng trưởng biểu bì - EGF, với cơ chế làm giảm chuyển hóa và chết tế bào bệnh) [2]. Những năm gần đây, nghiên cứu điều chế dược chất phóng xạ gắn kháng thể đơn dòng dùng trong điều trị phóng xạ nhắm đích (RIT) đang được sự quan tâm của y học (trong đó, có chế phẩm ^{90}Y -nimotuzumab - là kháng thể đơn dòng kháng EGFR đánh dấu đồng vị phóng xạ ^{90}Y). Các dược chất phóng xạ này được nghiên cứu, sử dụng trong điều trị bệnh ung thư đầu, cổ. Do vậy, nghiên cứu hoạt tính miễn dịch của kháng thể sau khi đánh dấu phóng xạ là cần thiết trong điều chế và kiểm tra chất lượng dược chất phóng xạ [3].

Đồng vị phóng xạ Yttrium-90 là nhân phóng xạ được sử dụng rộng rãi trong điều trị bệnh ung thư nhờ các tính chất vật lý của nó, như năng lượng phát tia β^- cao (2.280 KeV) với quãng chạy trong mô từ 4-11 mm (dài hơn tất cả các hạt phát tia β^-

khác), thời gian bán rã dài (64,14 giờ) [4]. Để đánh dấu kháng thể đơn dòng với đồng vị phóng xạ ^{90}Y , phân tử kháng thể nimotuzumab cần thiết phải tạo phức với tác nhân tạo phức hai chức năng (như DOTA), để từ đó, phức hợp DOTA-nimotuzumab có thể đánh dấu với đồng vị phóng xạ ^{90}Y [5]. Do trải qua nhiều xử lý nên việc kiểm tra hoạt tính miễn dịch của kháng thể là khâu quan trọng trong nghiên cứu điều chế ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab.

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm kiểm tra hoạt tính miễn dịch immunoreactivity của phức hợp ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab trên tế bào ung thư biểu mô HEP-2, một trong những loại ung thư biểu mô đầu, cổ có biểu hiện mạnh EGF trên tế bào ung thư, để thấy được hoạt tính miễn dịch của kháng thể sau khi gắn phóng xạ [6].

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng, nguyên liệu, thiết bị nghiên cứu:

- Đối tượng nghiên cứu:

+ Đồng vị phóng xạ ^{90}Y dạng ^{90}Y ttrium-acetat $[(\text{CH}_3\text{COO})_3^{90}\text{Y}]$, nồng độ phóng xạ 16 mCi/ml, sản xuất tại Viện Nghiên cứu hạt nhân.

+ Kháng thể nimotuzumab 50 mg/10 ml (hãng CIMAB, Cuba sản xuất), công thức phân tử

C₆₅₆₆H₁₀₀₈₂N₁₇₄₆O₂₀₅₆S₄₀.

+ Tế bào ung thư HEP-2 (Human Epithelial Type 2), CCL-23, American Type Culture Collection (ATCC). Nuôi cấy và tăng sinh tại Labo Sinh lý bệnh, Học viện Quân Y.

- Nguyên liệu nghiên cứu: p-NCS-Benzyl-DOTA, C₂₄H₃₃N₅O₈.2,5 HCl.2,5 H₂O (hãng Macrocyclic Sephadex); G25 PD10 (hãng GE Healthcare); Millipore MultiScreen MAFBNOB50, Millipore 96 lỗ (Pháp).

- Thiết bị nghiên cứu: máy phóng xạ tự chụp Cyclone B431200, PerkinElmer; phổ kế gamma ORTEC; máy đo beta GM; máy đo beta nhấp nháy lỏng Aloka 6110.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

Đánh dấu điều chế các phức miễn dịch phóng xạ ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab để nghiên cứu khả năng gắn tế bào HEP-2 bằng các phương pháp đánh dấu kháng thể với các đồng vị phóng xạ ⁹⁰Y:

- Phương pháp đánh dấu điều chế ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab:

+ Công thức điều chế ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab: Acetate 0,5 M, pH 6, 100 µl; DOTA-nimotuzumab (1 mg), 800 µl; ⁹⁰Y (III) acetate (37 MBq), 1000 µl.

+ Xử lý: dùng NaOH 1M (pH 6,0), ủ 42°C, 60 phút.

+ Kiểm tra chất lượng: TLC/TCC trong amoniacetate 10%: methanol (V/V = 1:1).

Kiểm tra hiệu suất đánh dấu và độ tinh khiết hóa phóng xạ của phức ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab để dùng trong nghiên cứu gắn tế bào.

- Phương pháp nuôi cấy và tăng sinh, thu hoạch tế bào ung thư biểu mô HEP-2: tế bào HEP-2 sau khi rửa đông được nuôi cấy trong chai 75 cm², chứa môi trường EMEM có bổ sung thêm 10% FBS và 1% Penicillin/Streptomycin, ở 37°C, nồng độ CO₂ 5%. Khi tế bào bám đáy chai nuôi, thay môi trường mới (kiểm tra tế bào và thay môi trường 2-3 lần/tuần). Tế bào phát triển đạt mật độ khoảng 80% diện tích đáy chai nuôi thì tiến hành tách tế bào để cấy chuyển sang chai nuôi mới. Sau thời gian nuôi cấy, lượng tế bào tăng sinh đủ lớn, thu hoạch tế bào. Rửa tế bào 2 lần bằng PBS 1X và tách tế bào ra khỏi đáy chai bằng trypsin-EDTA. Trung hòa Trypsin-EDTA bằng môi trường nuôi cấy; ly tâm để loại bỏ môi trường nuôi cấy và thu tế bào; thêm đệm PBS để có nồng độ tế bào đạt 10⁷/ml [7].

- Kiểm tra phản ứng miễn dịch của ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab (áp dụng phương pháp định lượng khả năng gắn bão hòa (saturation binding assay): cho vào các ống thủy tinh 100 µl đệm phosphat 0,15 mM, pH 7,2, lượng tế bào trong mỗi ống SA (specific binding) là 0,5 x 10⁶. Dược chất phóng

xạ ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab hoạt độ riêng 0,37 GBq/mg được cho vào các ống SA với nồng độ 1980, 1320, 660, 330, 150, 100, 50, 10, 5 nmol/L. Các ống NSB (non specific binding) được thêm vào một lượng 50 µl (250 µg) nimotuzumab và ủ trước ở 37°C, 60 phút. Sau khi cho tế bào vào các ống, tổng thể tích trong mỗi ống là 0,3 ml, ủ tất cả các ống ở 37°C, 180 phút. Sau khi ủ, đo hoạt độ của các ống, hút tế bào cho vào các lỗ trên khay milipore 96 lỗ, lấp trên hệ lọc milipore, bật bơm hút hết phần dung dịch, các tế bào được rửa bằng PBS 1X 3 lần. Thu màng lọc bằng máy milipore, đo hoạt độ phóng xạ trên máy đo gamma và máy đếm beta cùng với ống tổng. Tính đặc hiệu của kháng thể được xác định dựa trên hằng số Bmax và Kd bằng phương pháp phân tích Schatchard dùng phần mềm Graphpad Prism 6. Kết quả tính theo phương trình sau [8]:

$$\frac{B}{[Ab]} = \frac{-1}{Kd} \times B + \frac{Bmax}{Kd}$$

+ B (Bound): là phức kháng thể gắn với receptor tế bào.

+ Ab: nồng độ của antibody.

+ Kd là hằng số cân bằng - phân li.

+ Bmax là giá trị cực đại gắn trên mỗi tế bào.

- Xử lý số liệu: bằng phương pháp thống kê y học. Nhập và quản lý số liệu bằng Excel 2010 và phân tích bằng phần mềm SPSS v.19. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị p < 0,05.

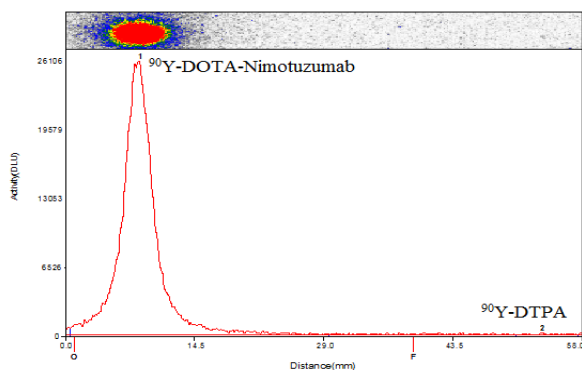
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN.

3.1. Kết quả điều chế ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab:

Phức hợp p-NCS-Benzyl-DOTA-nimotuzumab được tạo thành và tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel. Kết quả tạo phức kháng thể nimotuzumab với DOTA được giải thích như sau: NCS-Benzyl-DOTA là tác nhân tạo phức đôi, liên kết cộng hóa trị với kháng thể qua nhóm isothiocyanate (NCS) của DOTA và nhóm amin của lysine trên phân tử kháng thể. Phức hợp DOTA-nimotuzumab sau khi tinh sạch được đánh dấu với ⁹⁰Y để điều chế dược chất phóng xạ ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab, có hoạt độ riêng 0,37 GBq/mg. Hiệu suất đánh dấu đạt 97,2%, độ tinh khiết hóa phóng xạ đạt 99,0% (hình 1).

Độ tinh khiết hóa phóng xạ của dược chất phóng xạ ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab đạt được là 99,4%. Đồ thị cho thấy vị trí của phức ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab lưu tại điểm gốc của băng sắc ký TCC, Rf = 0,0-0,1 và Rf của ⁹⁰Y-DTPA là 0,9-1,0.

Độ tinh khiết hóa phóng xạ của dược chất phóng xạ ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab đạt được là 99,4%. Đồ thị cho thấy vị trí của phức ⁹⁰Y-DOTA-nimotuzumab lưu tại điểm gốc của băng sắc ký TCC, Rf = 0,0-0,1 và Rf của ⁹⁰Y-DTPA là 0,9-1,0.



Hình 1: Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab, TecControl Chromatography (TCC), autoradiography, Cyclone.

3.2. Kết quả nuôi cấy, thu hoạch tế bào ung thư biểu mô HEP-2:

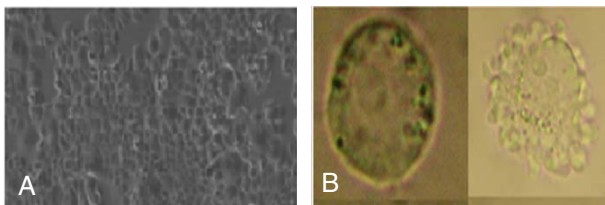
Sau khi tế bào tăng sinh với số lượng nhanh trong vòng 8-10 ngày, loại bỏ môi trường nuôi cấy và chuyển vào chai nuôi tế bào trong môi trường có bổ sung 10% DMSO. Số lượng tế bào được đếm trên máy buồng đếm hồng cầu và xác định bằng công thức:

$$N = 5a \cdot 10^4 \text{ (tế bào/ml)}$$

Trong đó, a là tổng số tế bào trong 5 ô vuông lớn; N là số tế bào trong 1 ml.

Tế bào được rửa sạch với PBS 1X, ly tâm và được dùng trong thí nghiệm gắn phức hợp ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab với số lượng tế bào trong mỗi giếng gắn là $0,5 \times 10^7$ tế bào.

- Hình ảnh tế bào HEP-2 khi thu hoạch:



Hình 2: Hình ảnh tế bào ung thư biểu mô HEP-2 (A: khi thu hoạch; B: chụp trên kính hiển vi Nikon 80i).

3.3. Hoạt tính miễn dịch của dược chất phóng xạ lên tế bào:

Dược chất phóng xạ ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab được pha loãng với PBS 1X thành các nồng độ từ 5 nmol/L đến 1980 nmol/L và gắn với tế bào ung thư HEP-2. Hoạt độ phóng xạ cho mỗi ống đánh dấu từ 0,37 kBq đến 740 kBq, ủ ở nhiệt độ 37°C , 3 giờ, trong một thể tích giống nhau (đều 300 μl). Phần gắn không đặc hiệu NSB nhỏ hơn 3%, được tính toán bởi sự cạnh tranh với 250 μg kháng thể nimotuzumab không phóng xạ. Kết quả thực nghiệm bằng phương pháp gắn bão hòa tế bào ung thư biểu mô HEP-2 với ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab cho thấy.

Nồng độ tăng dần của ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab, phần gắn đặc hiệu fmol/cell là kết

quả số vị trí gắn trên mỗi tế bào. Kết quả được phân tích bởi phương pháp làm khớp với hàm phi tuyến tính (dùng phần mềm Graphpad Prism 6). Đồ thị đạt đến giá trị cực đại cho thấy bão hòa với giá trị K_d là 3,2 nmol/L, B_{max} là $2,9 \times 10^5$ vị trí gắn trên tế bào; phù hợp với kết quả trong các nghiên cứu công bố trước đây [7]. Các kết quả nghiên cứu cho thấy ái lực của kháng thể sau khi đánh dấu phóng xạ đối với thụ thể EGFR bảo đảm hoạt tính miễn dịch và số vị trí gắn trên mỗi tế bào đạt $\approx 10^5$.

4. KẾT LUẬN.

Dược chất phóng xạ ^{90}Y -DOTA-nimotuzumab được kiểm tra gắn đặc hiệu trên tế bào ung thư biểu mô đầu cổ (thanh quản) với hằng số K_d là 3,2 nmol/L, B_{max} là $2,9 \times 10^5$ vị trí gắn trên mỗi tế bào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

- Herbst R.S (2004), "Review of epidermal growth factor receptor biology", *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59.
- Talavera A, Friemann R, Gómez-Puerta S, Martinez-Fleites C, Garrido G, Rabasa A, López-Requena A, Pupo A, Johansen R.F, Sánchez O, Krengel U, Moreno E (2009), *Nimotuzumab, an Antitumor Antibody that Targets the Epidermal Growth Factor Receptor, Blocks Ligand Binding while Permitting the Active Receptor Conformation*, *Cancer Res*, Jul 15, 69(14): 5851-9.
- Denis Rolando Beckford Vera, Sebastian Eigner, Milos Beran, Katherina Eigner Henke, Alice Laznickova, Milan Laznicez, Frantisek Melichar, and Marco Chinol (2011), "Preclinical evaluation of ^{177}Lu -nimotuzumab: a potential tool for radioimmunotherapy of Epidermal Growth Factor Receptor overexpressing tumors", *Cancer Biotherapy and radiopharmaceuticals*, vol 26, No3.
- I.A.E.A (2009), *Therapeutic Radionuclide Generators: $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ and $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Generators*, Technical Series Number 470.
- Gopal B Saha (2012), *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Sixth Edition, Springer.
- Lindmo T, Boven E and Cuttita E (1984), "Determination of the immunoreactive fraction of radiolabelled monoclonal antibody by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess", *J. Immunol Methods*, 27, 77-89.
- Hua D, Qin F, Li Shen, Jiang Z, Zou ST et al (2012), " $\beta 3\text{GnT8}$ Regulates Laryngeal Carcinoma Cell Proliferation Via Targeting MMPs/TIMPs and TGF- $\beta 1$ ", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, pp. 2087-2093.
- http://www.graphpad.com/guides/prism/6/curve/fitting/index.htm?reg_one_site_specific.htm. □