

PC11: การศึกษาสถานะเหมาะสมในการเตรียม ไอโอดีน-131 ริทูซิแมบ

โดยการไอโอดีนชัน ด้วยคลอรามิน-ที

*นิภาวรรณ ปรมาศกุล¹ พุทธิพรณ์ เจริญพันธุ์² และปรานอม คงเพชร¹

¹สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ถาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ 0 2579 5230 โทรสาร 0 2562 0125 E-Mail: nipavan@tint.or.th

² คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล E-Mail: ps4436@hotmail.com

บทคัดย่อ

ริทูซิแมบเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับแอนติเจน CD20 ได้ แอนติบอดีนี้ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการเริ่มและการแบ่งตัวของเซลล์ มีการตรวจพบแอนติเจน CD20 มากกว่าร้อยละ 90 ในคนไข้ที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งน้ำเหลืองชนิด Non-Hodgkin's (NHL) จึงมีการใช้ ริทูซิแมบ เป็นเคมีบำบัดสำหรับผู้ป่วย NHL แต่ในผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อวิธีการรักษาด้วยเคมีบำบัดจำเป็นต้องใช้แอนติบอดีร่วมกับการบำบัดด้วยรังสี โดยการติดฉลากเข้ากับสารกัมมันตรังสีที่มีคุณสมบัติในการรักษา การศึกษานี้มุ่งหาสถานะที่เหมาะสม ในการทำไอโอดีนชันด้วยคลอรามิน-ที โดยนำไอโอดีน-131 ซึ่งเป็นนิวไคลด์กัมมันตรังสีที่มีคุณสมบัติในการบำบัดมะเร็งที่สามารถผลิตได้เองในประเทศไทย ติดฉลากเข้ากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการศึกษาพบว่าแอนติบอดี 7.5 มิลลิกรัมในสถานะที่มีสารละลาย 0.25 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในน้ำเกลือเป็นตัวปรับปริมาตร ในระยะเวลาทำปฏิกิริยาไอโอดีนชันด้วยคลอรามิน-ที เท่ากับ 3 นาที สามารถติดฉลากกับ Na^{131}I ความแรงรังสี 75 มิลลิวูรี โดยมีร้อยละของการติดฉลากมากกว่า 95 โดยมีความคงตัวของไอโอดีน-131 ริทูซิแมบ นานกว่า 4 ชั่วโมง

คำสำคัญ: ไอโอดีนชัน คลอรามินที ไอโอดีน-131 ริทูซิแมบ

Optimizing the Radioiodination Conditions of ^{131}I -Rituximab by Chloramine-T

*Nipavan Poramatikul¹, Puthiporn Charoenphun² and Pranom Kongpetch¹

¹Thailand Institute of Nuclear Technology (Public Organization), Chatuchak, Bangkok 10900

Phone: 0 2579 5230, Fax: 0 2562 0125, E-Mail: nipavan@tint.or.th

²Faculty of Medicine, Mahidol University, E-Mail: ps4436@hotmail.com

Abstract

Rituximab is a monoclonal antibody that has been used as chemotherapeutic agent to treat patients with Non-Hodgkin's Lymphoma. The main function of Rituximab is to control cell proliferation upon binding to CD20 on the cell surface. CD20 is found to express in more than 90 percent of Non-Hodgkin's Lymphoma patients. To extend the efficiency of Rituximab as a radioimmunotherapeutic agent for patients with low/no response, the

antibody is labeled with radionuclide. In Thailand, iodine-131 is a suitable radionuclide for this purpose. The objective of this study is to optimize the labeling conditions of the antibody by chloramine-T for preparation of ^{131}I -Rituximab. It was found that within 3 minutes of iodination by chloramine-T, more than 95% of ^{131}I -Rituximab was obtained when 7.5 milligram of the antibody was labeled with 75 millicurie of ^{131}I -NaI in 0.25 molar of phosphate buffer saline (PBS). The labeled antibody was stable for more than 4 hours.

Keywords: Iodination, Chloramine-T, ^{131}I -rituximab

1. บทนำ

เทคนิคทางเวชศาสตร์นิวเคลียร์ เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง และสามารถวินิจฉัยความผิดปกติได้ก่อนที่เทคนิคอื่นๆจะสามารถตรวจพบ ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาสารชีวภาพที่มีความจำเพาะต่อเซลล์อย่างเช่น สารประกอบ เพปไทด์/ แอนติบอดี มาติดฉลากกับสารไอโซโทปรังสีโดยมุ่งหวังที่จะผนวกความไวของสารรังสี เข้ากับความแม่นยำของสารชีวภาพ เพื่อให้ได้เภสัชรังสีที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อพยาธิสภาพของร่างกายสูง ซึ่งนอกจากจะช่วยให้การวินิจฉัยถูกต้องแล้ว ถ้าเปลี่ยนสารกัมมันตรังสีที่ใช้มาเป็นชนิดที่มีความเหมาะสมกับการบำบัดโรคแล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคด้วยรังสีได้เป็นอย่างดีอีกด้วย สำหรับการรักษาโรค มะเร็งชนิด Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) ที่ผ่านมามีการนำเข้า ^{90}Y -Zevalin มาใช้บ้าง แต่มีข้อจำกัดอยู่ที่เภสัชรังสีชนิดนี้มีราคาสูงมาก ทั้งนี้เนื่องจาก ^{90}Y ซึ่งเป็นสารกัมมันตรังสีที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับเตรียมเป็นเภสัชรังสีเพื่อบำบัดเซลล์มะเร็ง มีครึ่งชีวิตประมาณสองวัน และผลิตไม่ได้ในประเทศไทย จึงมีราคาสูงมาก ประกอบกับแอนติบอดีที่ใช้เป็นตัวยาคือเป็นตัวยาคือ ^{90}Y ไปยังเป้าหมายมีราคาสูงมากเช่นกัน จึงเป็นเหตุให้ผู้ป่วย NHL ส่วนใหญ่ไม่มีโอกาสได้รับการรักษา ^{131}I เป็นสารกัมมันตรังสีสำหรับการบำบัดที่สามารถผลิตบริการในประเทศได้ โดยศูนย์ไอโซโทปรังสีสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ สลายตัวให้บีตาพลังงานต่ำกว่า ^{90}Y แต่ครึ่งชีวิตยาวกว่ามากคือ 8 วัน แม้จะมีข้อดีน้อยกว่า ^{90}Y อยู่บ้าง แต่ ^{131}I ก็เป็นสารกัมมันตรังสีที่ได้รับการยอมรับถึงผลในการรักษาเนื้องอกและมะเร็งเช่นกัน ดังนั้นหากนำ ^{131}I มาติดฉลากเข้ากับแอนติบอดีที่มีความสามารถจับตัวกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงต่อ NHL จะได้เภสัชรังสีในการรักษา NHL ที่ราคาถูก และมีประสิทธิภาพสำหรับใช้ภายในประเทศทดแทนการใช้ ^{90}Y -Zevalin ซึ่งการทำ Iodination สามารถทำได้หลายวิธี ในการศึกษาี้เลือกใช้คลอรามิน-ที ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง ที่นิยมใช้กันมากในการติดฉลากด้วยไอโซโทปรังสีของไอโอดีน เพื่อให้ได้ผลผลิตสูง

2. วัตถุประสงค์

2.1 สารเคมี

- | | |
|----------------------------|---|
| - Rituximab | Roche |
| - Chloramin-T hydrate | Sigma |
| - Sodium metabisulfite | Sigma |
| - Na ¹³¹ I | ศูนย์ไอโซโทปรังสี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ |
| - Sephadex G-10 | GE Healthcare Bio-Sciences AB |
| - Normal Saline 0.9% (NSS) | General Hospital Products Public Co.Ltd |
| - Methanol | Merck |

2.2 วัสดุอุปกรณ์

- | | |
|-----------------------------|----------|
| - Dose calibrator | Capintec |
| - Radiochromatogram scanner | Bioscan |
| - Chromatography Column | |
| - ขวดยาลีดขนาด 10 มล. | |
| - ไมโครปิเปต | |

3.วิธีการ

3.1 การเตรียมสารละลาย

1.1 สารละลาย Sodium metabisulfite

ละลาย Sodium metabisulfite 150 มิลลิกรัม ด้วย saline 5 มล.

1.2 สารละลาย Chloramin-T

ละลาย Chloramin-T hydrate 10 มิลลิกรัม ด้วย saline 5 มล.

ต้องเตรียมสารละลายเหล่านี้ใหม่ ๆ ทุกครั้งก่อนการทำปฏิกิริยา

3.2 เตรียม ¹³¹I-Rituximab

ปิเปตสารละลาย Na ¹³¹I 10 มิลลิคูรี ใส่ขวดแก้วขนาด 10 มล. แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร ด้วยสารละลาย 0.25 M PBS pH 7.4 เติมสารละลาย Rituximab 1 มก./100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Chloramin-T 15 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 3 นาที แล้วเติมสารละลาย Sodium metabisulfite 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1.5 มล. ด้วยสารละลาย 0.1M PBS

3.3 การหาร้อยละการติดฉลากด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

เฟสคงที่ : ITLC-SG
เฟสเคลื่อนที่ : สารละลาย 0.9% NaCl
: สารละลาย 85% Methanol

หยดสารตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น ITLC-SG ขนาด 1 ซม. X 12 ซม. ที่จุดเริ่มต้นห่างจากปลายด้านหนึ่งประมาณ 1 ซม. จำนวน 2 แผ่น แผ่นแรกนำไปจุ่มลงในสารละลาย 0.9% NaCl แผ่นที่ 2 จุ่มลงในสารละลาย 85% Methanol เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ได้ 10 ซม. นำกระดาษออกมาผึ่งให้แห้ง แล้ววัดการกระจายตัวของรังสีบนแผ่น ITLC-SG ด้วยเครื่อง radiochromatogram scanner คำนวณหาร้อยละของการติดฉลาก

$$\text{ร้อยละของการติดฉลาก} = \frac{\text{ผลรวมของอัตรานับรังสีที่ตำแหน่งของ } ^{131}\text{I-Rituximab} \times 100}{\text{ผลรวมของอัตรานับรังสีทั้งหมด}}$$

3.4 การแยกให้บริสุทธิ์ (Purification)

นำสารละลาย ^{131}I -Rituximab ที่เตรียมได้ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephadex G-10 ปริมาณ 10 มล. ซะคอลัมน์ด้วย 0.15 M PBS ด้วยอัตราการไหล (Flow rate) 1 มล./นาที

3.5 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบติดฉลาก ^{131}I -Rituximab

3.5.1 ศึกษาผลของ pH ที่ใช้ในการติดฉลาก

เตรียม ^{131}I -Rituximab ตามข้อ 3.1 และ 3.2 โดยปรับเปลี่ยนจากการใช้สารละลาย 0.25 M PBS pH 7.4 เป็น การใช้ Normal Saline 0.9% เพื่อปรับปริมาตรของ $\text{Na } ^{131}\text{I}$ แทน

3.5.2 ศึกษาผลของปริมาณ Chloramine-T

เตรียม ^{131}I -Rituximab ตามข้อ 3.1 และ 3.2 โดยปรับเปลี่ยนปริมาตรของ Chloramine-T เป็น 5 10 15 20 และ 30 ไมโครลิตร/ขวด (0.01 0.02 0.03 0.04 และ 0.06 มก./ขวด)

3.5.3 ศึกษาผลของปริมาณความแรงรังสีของ ^{131}I

เตรียม ^{131}I -Rituximab ตามข้อ 3.1 และ 3.2 โดยปรับเปลี่ยนปริมาณความแรงรังสีของ ^{131}I เป็น 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิคูรี/ขวด

3.5.4 ศึกษาผลของเวลาในการทำปฏิกิริยา

เตรียม ^{131}I -Rituximab ตามข้อ 3.1 และ 3.2 โดยปรับเปลี่ยนเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 1 2 3 4 5 และ 10 นาที

3.6 ศึกษาความคงตัวของสารประกอบติดฉลาก ^{131}I -Rituximab

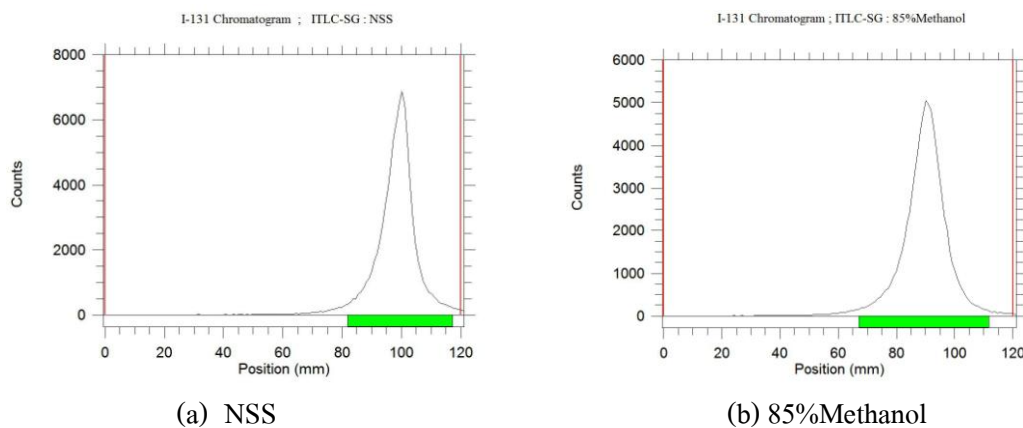
เตรียมสารประกอบติดฉลาก ^{131}I -Rituximab ตามวิธีข้อ 3.1 3.2 และ 3.4 โดยให้มีค่าความแรงรังสีจำเพาะ 10 มิลลิคูรี/มิลลิกรัม ความเข้มข้น 5 15 และ 30 มิลลิคูรี/มิลลิลิตร หาร้อยละของความ

บริสุทธิ์ทางเคมีรังสี บันทึกไว้เป็นค่าเริ่มต้น หลังจากนั้นนำมาหาร้อยละของความบริสุทธิ์ทางเคมี
รังสี ที่เวลาต่างๆ ดังนี้ 1, 2, 3,..., 6 ชม

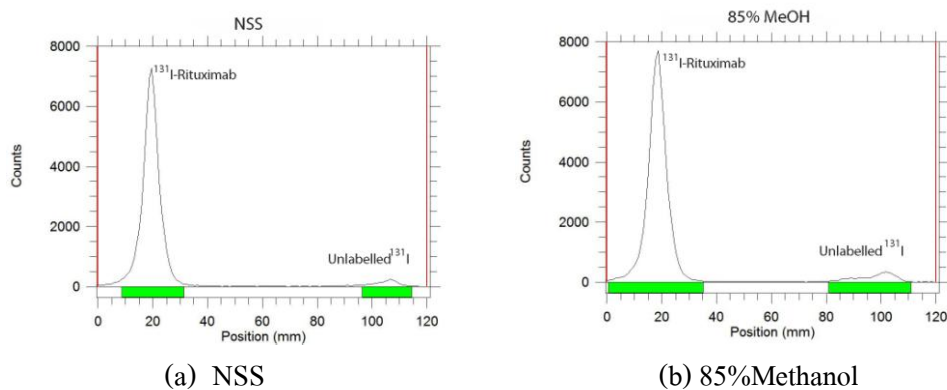
4. ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การหาร้อยละการติดฉลากด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

การหาร้อยละของการติดฉลากด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีโดยมี ITLC-SG เป็นเฟสคงที่ และสารละลาย 0.9% NaCl และ/หรือ สารละลาย 85% Methanol เป็นเฟสเคลื่อนที่พบว่า Na^{131}I จะเคลื่อนที่ไปได้ดีในสารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ทั้งสองชนิด ($R_f = 1$) ดัง Chromatogram ที่แสดงในรูปที่ 1 ส่วน ^{131}I -Rituximab ถูกยึดจับไว้กับเฟสคงที่ ($R_f = 0$) ดัง Chromatogram ที่แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 Radio-chromatogram ของ Na^{131}I ที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง Bioscan

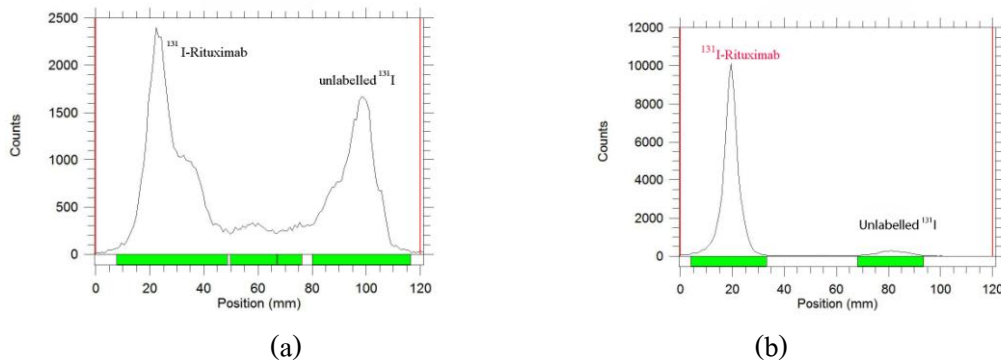


รูปที่ 2 Radio-chromatogram ของ ^{131}I -Rituximab ที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง Bioscan

4.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบติดฉลาก ^{131}I -Rituximab

4.2.1 ศึกษาผลของ pH ที่ใช้ในการติดฉลาก

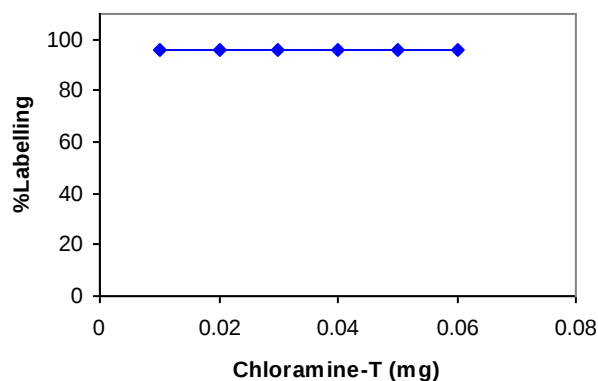
การศึกษาสภาพของ pH ที่ใช้ในขั้นตอนของการติดฉลากต่อผลของการติดฉลากพบว่า เมื่อใช้ NSS (pH 5) เป็นสารละลายในการเจือจาง ^{131}I ให้มีปริมาตรตามที่ต้องการ ผลของการติดฉลากจะอยู่ที่ร้อยละ 50.90 ขณะที่เมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 7.4 เป็นตัวช่วยปรับปริมาตรร้อยละของการติดฉลากเพิ่มขึ้นเป็น 94.81 แสดงว่า pH เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากต่อการติดฉลาก Radiochromatogram ของผลผลิตที่ได้จากการติดฉลากในสภาวะดังกล่าวได้แสดงไว้ในรูปที่ 3



รูปที่ 3 Radio-chromatogram ของ ^{131}I -Rituximab (a) ที่ไม่ได้ปรับ pH (b) ปรับ pH 0.25 M PBS pH 7.4

4.2.2 ศึกษาผลของปริมาณ Chloramine-T

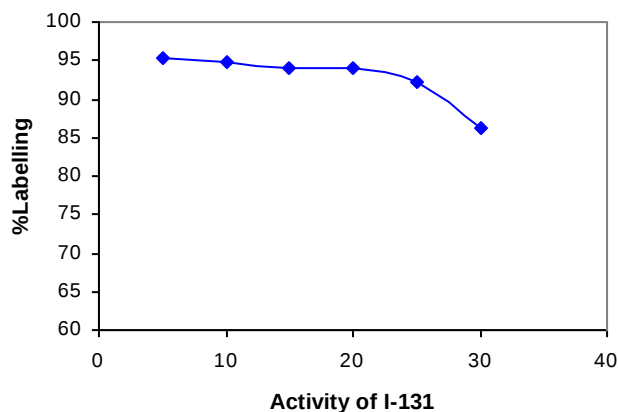
เมื่อทำการปรับเปลี่ยนปริมาณ Chloramine-T ในการทำปฏิกิริยาเป็น 0.01 0.02 0.03 0.04 และ 0.06 มก/ขวด พบว่าการเกิดไอโอดีนชันของ I-131 เป็น ^{131}I -Rituximab มีความคงที่เท่ากัน ดังกราฟผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 4 แสดงว่า แม้จะมีปริมาณของตัวออกซิไดซ์คือคลอรามินที่สูงอยู่ในสถานะที่กำลังทำปฏิกิริยา ก็ไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อผลผลิตของ ^{131}I -Rituximab



รูปที่ 4 ผลของปริมาณ Chloramine-T ต่อร้อยละของการติดฉลาก

4.2.3 ศึกษาผลของปริมาณความแรงรังสีของ ^{131}I

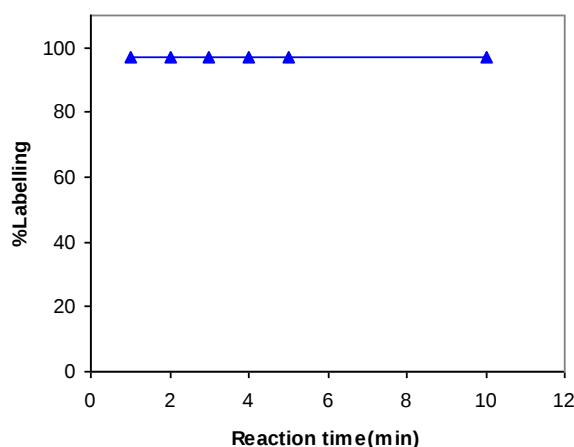
การเตรียม ^{131}I -Rituximab โดยปรับเปลี่ยนปริมาณความแรงรังสีของ ^{131}I เป็น 5 10 15 20 25 และ 30 มิลลิคูรี/ขวด แสดงให้เห็นถึงผลของความแรงรังสีต่อการติดฉลาก ซึ่งค่อยๆ ลดลงเมื่อปริมาณกัมมันตรังสีของ ^{131}I เพิ่มขึ้น ในช่วงความแรงรังสี 5-20 มิลลิคูรี และลดลงอย่างมากช่วงความแรงรังสี 25-30 มิลลิคูรี (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลของปริมาณความแรงรังสีของ ^{131}I ต่อร้อยละของการติดฉลาก

4.2.4 ศึกษาผลของเวลาในการทำปฏิกิริยา

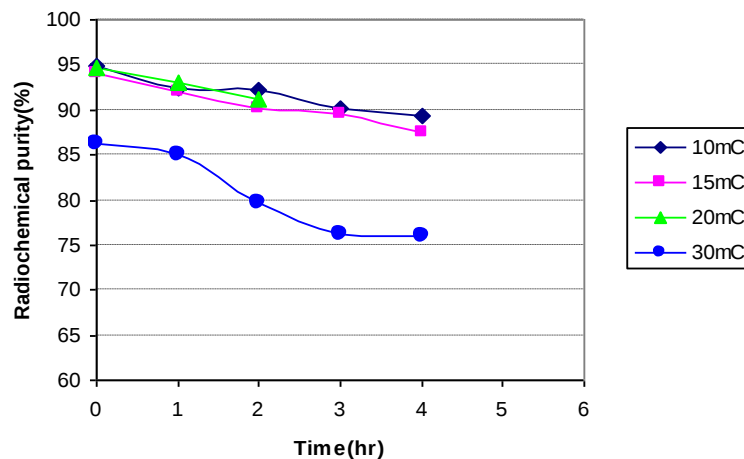
จากการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในช่วง 1-10 นาที แสดงให้เห็นว่า ในสภาวะการเตรียมที่ใช้ระยะเวลาของการถูกออกซิไดซ์โดยคลอรามินที ไม่มีผลต่อการติดฉลาก ^{131}I -Rituximab



รูปที่ 5 ผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อร้อยละของการติดฉลาก

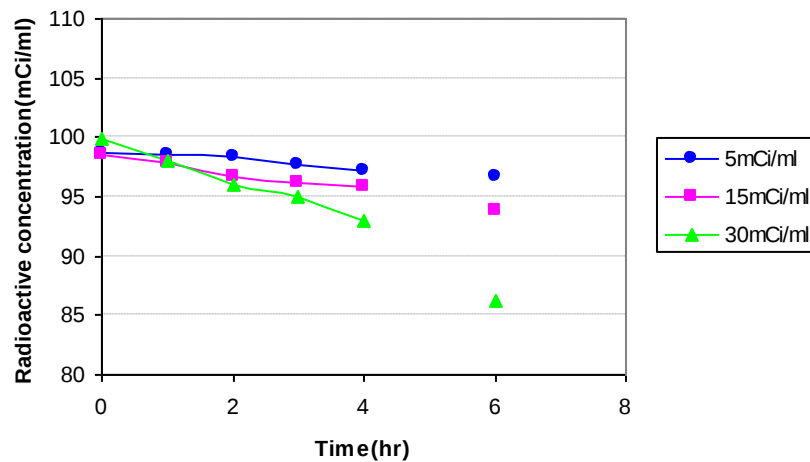
4.3 ศึกษาความคงตัวของสารประกอบติดฉลาก ^{131}I -Rituximab

การเตรียมสารประกอบติดฉลาก ^{131}I -Rituximab โดยให้มีค่าความแรงรังสีจำเพาะ 10 มิลลิคูรี/มิลลิกรัม แต่ปรับความเข้มข้นของสารติดฉลากเป็น 10 15 20 และ 30 มิลลิคูรี/มิลลิลิตร ให้ค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีที่แตกต่างกัน เมื่อทอดระยะเวลาหลังการติดฉลากนานมากขึ้น ดังได้แสดงไว้ในรูปที่ 6 โดยที่ ความเข้มข้นในช่วง 10-20 มิลลิคูรี/มิลลิลิตรจะให้ผลใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิคูรี/มิลลิลิตร ความคงตัวของ ^{131}I -Rituximab ลดต่ำกว่ามาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลัง 1 ชั่วโมง



รูปที่ 6 ความคงตัวของสารประกอบติดฉลาก ^{131}I -Rituximab (ไม่ purify)

เมื่อนำ ^{131}I -Rituximab ที่เตรียมได้ มาผ่าน Sephadex เพื่อกำจัดสารเจือปนที่ไม่ต้องการออกไปแล้วจะออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่าความเข้มข้นของกัมมันตรังสีต่อปริมาตรมีผลต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่ได้ รูปที่ 7 แสดงให้เห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลาย ^{131}I -Rituximab ต่ำ แม้ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีจะค่อยๆ ลดลง เมื่อเวลาผ่านไป แต่ที่ 6 ชั่วโมงต่อมา ก็ยังมีความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีมากกว่าร้อยละ 95 แต่เมื่อความเข้มข้นเป็น 15 และ 30 มิลลิคูรี/มิลลิลิตร ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี จะลดลงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 95



รูปที่ 7 ความคงตัวของสารประกอบติดฉลาก ^{131}I -Rituximab (purify)

หากเปรียบเทียบความคงตัวของ ^{131}I -Rituximab ที่ความเข้มข้นเดียวกันของสารที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการ purify กับที่ผ่านแล้ว (รูปที่ 6 และ 7) จะเห็นว่าสารที่ได้ทำการ purify จะมีความคงตัวที่ดีกว่า

5. สรุป

ในการเตรียม ^{131}I -Rituximab โดยการไอโอดิเนชัน ด้วยคลอรามิน-ที pH เป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อปฏิกิริยา ปริมาณของตัวออกซิไดซ์คือคลอรามิน-ทีที่ใช้ในการศึกษาและระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาไม่มีผลต่อการติดฉลาก แต่ความแรงรังสีที่ใช้ต่อปริมาณแอนติบอดีมีผลอย่างมาก ซึ่งความแรงรังสี 5-10 มิลลิคูรีต่อ 1 มิลลิกรัมของรีทูซิแมบจะให้ผลการติดฉลากมากที่สุด นอกจากนี้ปริมาณของสารเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์ สารละลาย ^{131}I -Rituximab ที่มีความเข้มข้น 10-20 มิลลิคูรี/มิลลิลิตรจะมีความคงตัวดีกว่า 30 มิลลิคูรี/มิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณที่น้อยจะทำให้โอกาสของการเกิด radiolysis โดยอนุภาคบีตาที่ได้จากการสลายตัวของไอโอดีน-131 มากขึ้น และแม้ว่าการติดฉลากโดยการไอโอดิเนชันด้วยคลอรามิน-ที จะทำให้ปริมาณการติดฉลาก (ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี) มากกว่าร้อยละ 95 ซึ่งเป็นค่าที่ระบุในเอกสารระบุว่าเหมาะสมที่จะใช้เป็นเภสัชรังสี แต่การกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่มีอยู่ อันได้แก่ สารกัมมันตรังสีอิสระ (^{131}I) สารออกซิไดซ์ (Chloramine-T) และ สารหยุดปฏิกิริยา (Sodium metabisulfite) ยังเป็นสิ่งจำเป็นทั้งนี้เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความคงตัวดี ซึ่งการกำจัดสิ่งปนเปื้อนสามารถทำได้โดยการจับด้วย Sephadex G10