

سنتر، نشاندار کردن، فرمولاسیون و کنترل کیفی رادیوداروی پپتیدی-^{99m}Tc-Tricine-HYNIC-Tyr³-Octreotide جهت تصویربرداری از تومورهای با ریسپتور مثبت سوماتوستاتینی

مصطفی گندم کار^۱، رضا نجفی^۱، سید اسماعیل سادات ابراهیمی^۲، عباس شفیع^۲، محمد حسین بابانی^۱، محمد ربانی^۳، غلامعلی شعبانی^۱

^۱ بخش رادیوایزوتوپ، مرکز تحقیقات هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران
^۲ گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۳ گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

چکیده

آنالوگ های سوماتوستاتین نشان دار شده با رادیونوکلیدهای مختلف برای تشخیص و یا درمان تومورهای با ریسپتور مثبت سوماتوستاتینی کاربرد دارند. در این راستا ابتدا عامل بای فانکشنال ترشیو بوتوکسی کربونیل هیدرازینو پیریدین -۳- کربوکسیلیک اسید (BOC-HYNIC) سنتز شده و سپس با تیروزین اکتروتاید محافظت شده از ناحیه لیزین به عنوان آنالوگی از سوماتوستاتین کنژوگه گردید. پس از برداشتن عوامل محافظتی، خلوص سازی بوسیله Preparative-RP-HPLC انجام شد. پپتید کنژوگه شده با لیگاند کمکی ترپسین به تکنسیوم متصل گردیده و نشان دار شد. کارایی نشاندار سازی، خلوص رادیوشیمیایی، پایداری در سرم انسانی، میزان اینترنالیزه شدن رادیو دارو همراه با ریسپتور و توزیع بیولوژیکی ترکیب به عنوان یک رادیو داروی پپتیدی در موش نرمال بررسی گردید.

واژه‌های کلیدی:

سوماتوستاتین، تیروزین اکتروتاید، هیدرازینو نیکوتینیک اسید، ترپسین، تکنسیوم-^{99m}Tc

مقدمه

سوماتوستاتین یک هورمون پپتیدی ۱۴ اسید آمینه‌ای می‌باشد که نیمه عمر بیولوژیکی کوتاهی معادل ۲ دقیقه داشته و دارای طیف وسیعی در مهار فعالیت های بیولوژیکی و انکولوژیکی است (۱). بیان تعداد زیادی از ریسپتورهای سوماتوستاتینی با آفینیت بالا نسبت به آن در تومورهای خاص باعث شده که نسبت به استفاده از آن در پزشکی هسته‌ای برای تشخیص و درمان تومورها تمایل زیادی بوجود بیاید، ولیکن بخاطر نیمه عمر کوتاهش استفاده از آن امکان پذیر نیست. به این علت آنالوگهای متعددی از آن سنتز

شده اند که نسبت به سوماتوستاتین دارای اثر فوی تر و نیمه عمر طولانی تری هستند (۲). از این آنالوگ ها می‌توان اکتروتاید (Octreotide)، واپروتاید (Vaprotide)، لنیوتاید (Lanreotide) و تیروزین-۳ - اکتروتاید (Tyr³-Octreotide) را نام برد که هر کدام به زیر مجموعه‌های مختلف ریسپتورهای سوماتوستاتینی تمایل داشته و می‌توانند جهت تصویر برداری یا درمان تومورها بعد از نشاندار سازی با رادیونوکلید مناسب بکار بروند.

تیروزین اکتروتاید نشان دار شده با پد - ¹²³I-Tyr-Octreotide^(۱) اولین بار برای تشخیص

بطور گسترده‌ای در حال بررسی می‌باشد (۴ و ۳). هدف از این تحقیق تهیه و نشاندار سازی آنالوگ های سوماتوستاتین با تکنسیوم- $99m$ به روش غیر مستقیم و بررسی میزان نشاندار سازی؛ خلوص رادیوشیمیایی؛ پایداری در پلاسما؛ انسانی؛ توزیع بیولوژیکی؛ میزان اتصال به رسپتور و ایترنالیزه شدن رسپتور به داخل سلول توموری و در نهایت فرمولاسیون رادیودارویی مناسب بعنوان آلترا تیبوی برای $^{111}\text{In-DTPA-Oct}$ جهت مصرف در تمام مراکز پزشکی هسته‌ای می‌باشد.

مواد لازم

تیروزین اکتروتاید از کمپانی Bachem؛ کلرونیکوئینیک اسید از Fluka؛ هیدرات هیدرازین از Fluka؛ دی ترشیو بوتوکسی کربونیل از Fluka؛ آزابنوتری آزولیل ترامتیل یورونیوم هگزا فلوروفسفات (HATU) از Sigma؛ دی متیل فرمامید از Fluka؛ دی ایزو پروپیل اتیل آمین از Fluka؛ رده سلولی AR42J از کلینیک پزشکی هسته‌ای اینسبروک اتریش؛ ستون RP-C18؛ محیط کشت RPMI1640 و سرم جنین گاوی از Gibco.

روش‌ها

سنتز ترشیو بوتوکسی کربنیل هیدرازینو نیکوئینیک اسید
از این ترکیب به عنوان عامل دو منظوره برای اتصال پیشید با تکنسیوم استفاده می‌شود و سنتز آن در دو مرحله انجام می‌گردد.
۱- سنتز ۶- هیدرازینو پیریدین ۳- کربوکسیلیک اسید

به ۸ میلی گرم ۶-کلرونیکوئینیک اسید مقدار ۳۵ میلی لیتر هیدرات هیدرازین اضافه کرده و در حمام روغن ۱۰۰ درجه برای ۴ ساعت قرار دادیم. سپس رسوب سفید رنگ حاصل را صاف کرده و با اثر چندین بار شستشو داده؛ آن را جمع آوری کردیم. نقطه ذوب جسم حاصل برابر ۲۹۲ درجه و راندمان

نومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی بکار برده شد. علی رغم موفقیت در تشخیص با این رادیو دارو به علت محدودیت هایی چون عدم موجود بودن ید- ^{123}I که از نظر شیمیایی خالص باشد و اکتیویته زمینه‌ای بالا در ناحیه شکمی به خاطر دفع کبدی رادیو دارو، این روش دارای مشکل بود. بنابراین استفاده از آنالوگ نشاندار شده با ایندیوم- ^{111}In از سوماتوستاتین ($^{111}\text{In-DTPA-Oct}$) توسعه پیدا کرد. ایندیوم- ^{111}In دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید- اکتروتاید با خصوصیتی مشابه اکتروتاید به عنوان رادیودارویی خوب برای تصویربرداری از تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی تایید شد. این ترکیب اساسا از کلبه دفع شده و ۹۰٪ دوز تزریقی ۲۴ ساعت بعد از تزریق در ادرار یافت می‌شود. به خاطر طول عمر زیاد ایندیوم- ^{111}In می‌توان از نومورها بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت که اکتیویته زمینه‌ای به خاطر دفع کلیوی رادیودارو به کمترین مقدار رسیده است تصویر برداری کرد.

اگر چه در چند سال اخیر $^{111}\text{In-DTPA-Oct}$ استفاده وسیع کلینیکی پیدا کرده است با این وجود محدودیت هایی خصوصا در ارتباط با در دسترس بودن آن، خصوصیات تصویربرداری و از همه مهم تر هزینه آن همچنان باقی مانده و به عنوان عامل محرکی برای تحقیق بر روی نشان دار کردن آنالوگ های سوماتوستاتین با رادیونوکلیدهای آلترا تیبو دیگر شامل ایترنیوم- ^{90}Y و تریتیوم- ^{161}Tb برای کاربردهای درمانی؛ گالییم- ^{68}Ga ؛ مس- ^{64}Cu و فلورسور- ^{18}F برای تصویر برداری با پوزیترون (PET) و خصوصا تکنسیوم- 99m جهت سیتی گرافی (Scintigraphy) می‌باشد.

نشاندار سازی آنالوگ‌های سوماتوستاتین با تکنسیوم- 99m به روش مستقیم شامل احیاء باند دی سولفیدی با عوامل احیاء کننده و ایجاد گروههای سولفیدریل جهت پیوند با تکنسیوم و روش غیر مستقیم به کمک عوامل شلاته کننده بای فانکشنال متفاوتی شامل پروپیلن آمینو اکسیم ها؛ ترامین ها؛ تری آمیدو مونو نیول ها و هیدرازینو نیکوئینیک اسید

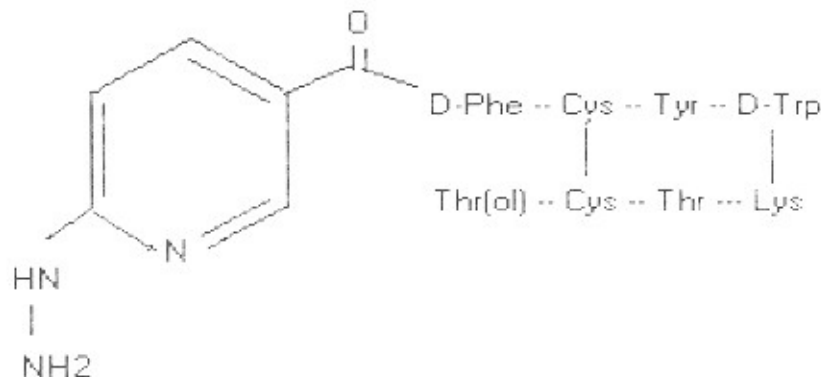
حاوی ۹۲٪ تری فلورواستیک اسید ؛ ۴٪ تیوانیزول ؛ ۴٪ آب مقطر اضافه کرده ؛ بعد از ۱۵ دقیقه با اضافه کردن ۱/۵ میلی لیتر دی اتیل اتر جسم رسوب داده شده و با HPLC خالص سازی شد (شکل ۱).

نشان دار کردن ^{99m}Tc HYNIC-Tyr³-Octreotide با

به ۱۰ میکرو گرم HYNIC-Tyr-Oct مقدار ۱ میلی لیتر محلولی حاوی ۱۰۸ میلی گرم تریسین ؛ ۲ میلی لیتر سدیم استات (pH = 5.2 , 0.5 M) ؛ 40 mCi ؛ ۷۵ میکرو لیتر محلول SnCl₂ / ml / سدیم پرتکتات ؛ ۷۵ میکرو لیتر محلول SnCl₂ (HCl , 0.1 N , 20 mg / 10 ml) اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه کردیم. میزان نشاندار سازی و خلوص رادیوشیمیایی با استفاده از HPLC , ITLC و SEPPAK-C18 مشخص شد.

پایداری در سرم انسانی

به ۲ میلی لیتر سرم انسانی ۵ میکرو لیتر پیپت نشان دار شده حاوی اکتیوینه ۶۰ میکرو کوری اضافه شد و بعد از ۱۵ دقیقه، ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه مقدار ۵۰ میکرو لیتر از آن به ستون PD₁₀ اضافه گردید. پس از شستشوی ستون با PBS هر ۱۳ قطره جداگانه جمع آوری گشت. شمارش لوله‌های ۵ و ۶ جهت اکتیوینه متصل شده به پروتئین پلاسما و لوله‌های ۱۰-۱۴ جهت اکتیوینه متصل به پیپت انجام شده و میزان پروتئین بایندینگ مشخص گردید. (نمودار ۱)



شکل ۱- شمای ساختاری HYNIC-Tyr³-Octreotide سنتز شده

واکنش ۷۷٪ بود .

۲- سنتز ۶-BOC - هیدرازینو پیریدین ۳-
کربوکسیلیک اسید

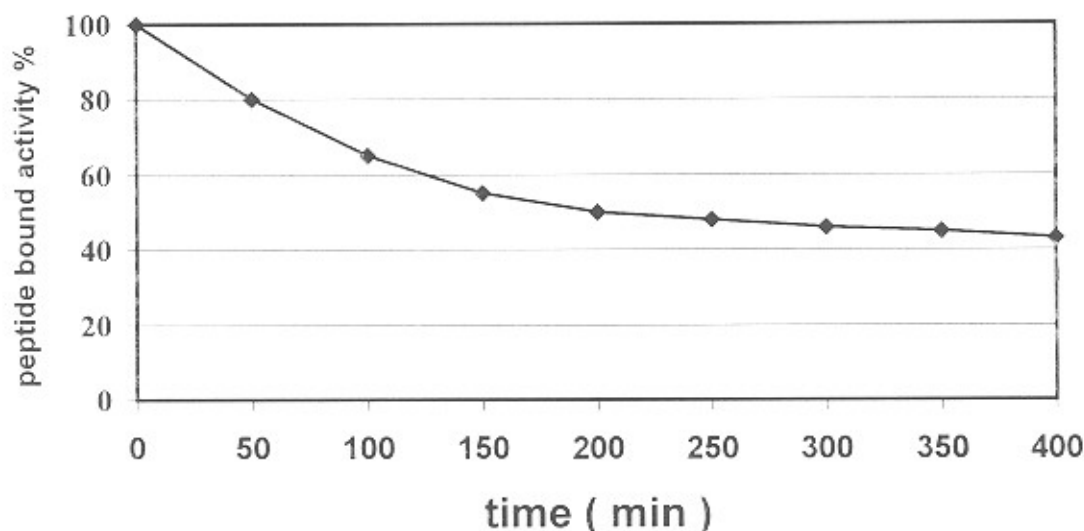
به ۱/۴ گرم ۶- هیدرازینو پیریدین ۳- کربوکسیلیک اسید در ۱/۲ میلی لیتر تری اتیل آمین و ۱۰ میلی لیتر دی متیل فرمامید ۲/۱۳ گرم دی ترشیو بوتوکسی کربونیل اضافه کرده و ۱۶ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد، جسم جامد به دست آمده را توسط ستون سیدیکازل و اتیل استات خالص سازی و سپس خشک کرده که مقدار ۲/۳ گرم جسم مورد نظر با بازده ۹۴٪ به دست آمد. (۵)

سنتز ۵-BOC-HYNIC-BOC-Lys³-Tyr³-
Octreotide

به مخلوطی از ۳ میلی گرم BOC-HYNIC و ۴/۶ میلی گرم HATU در ۱ میلی لیتر دی متیل فرمامید مقدار ۵/۹ میکرو لیتر دی ایزوپروپیل اتیل آمین اضافه کرده و بعد از ۱۵ دقیقه به آن ۱۱/۳ میلی گرم BOC-Lys³-Tyr³-Oct اضافه شد. بعد از گذشت ۱ ساعت به آن ۵۰۰ میکرو لیتر کربنات نیدروژن سدیم ۵٪ همراه با ۵۰۰ میکرو لیتر اتیل استات اضافه کرده و اتیل استات را ۳ بار با کربنات نیدروژن سدیم ؛ بافر سدیم استات pH = 5.2 و محلول اشباع NaCl شستشو دادیم و اتیل استات تبخیر گردید تا جسم خشک به دست آمد .

سنتز HYNIC-Tyr³-Octreotide

به جسم خشک شده بالا ۵۰۰ میکرو لیتر محلولی



نمودار ۱ - پایداری ^{99m}Tc -Tricine-HYNIC-Tox در سرم انسانی بعد از گذشت زمانهای مختلف

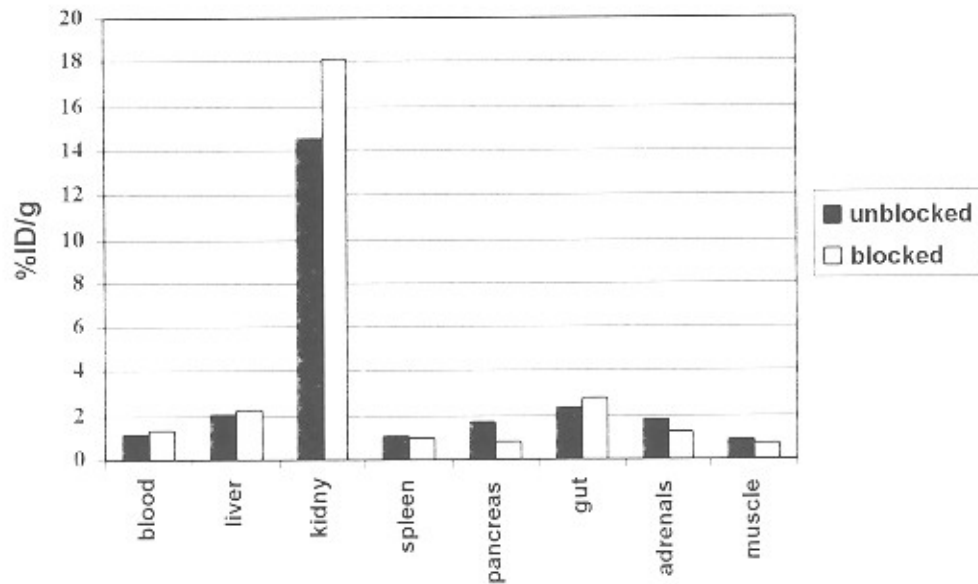
جدا شوند و اکتیویته هر یک را شمارش کردیم. مقدار بایندینگ اختصاصی کل از رابطه $A - B = E$ و ایترنالایزه شدن پپتید با رسپتور از رابطه $C - D = F$ محاسبه گردید.

بررسی توزیع بیولوژیکی در موش

تعداد ۸ موش انتخاب شده به دو گروه تقسیم شدند که به یک گروه ۵۰ میکرو گرم اکتیویته سرد و به گروه دیگر ۵۰ میکرو گرم نرمال سالتین تزریق شد. بعد از گذشت ۱/۵ ساعت به هر دو گروه ۱۲ میکرو کوری پپتید نشاندار شده با تکنسیم تزریق شد. به ترتیب ۱/۵؛ ۱؛ ۲؛ ۳؛ ۴ و ۲۴ ساعت بعد از تزریق پپتید نشاندار موشها کشته شده و قسمت‌های مختلف شامل خون؛ کبد؛ پانکراس؛ طحال؛ کلیه؛ معده؛ روده کوچک؛ روده بزرگ و ماهیچه جدا گردیده، وزن و اکتیویته آنها بدست آمد. درصد دوز تزریقی به ازای گرم بافت (%ID/g) برای هر عضو حساب شده و با استفاده از آزمون Paired-t-test مقایسه بین زمانهای مختلف و بین دو گروه انجام گردید. (نمودار ۲ و جدول ۱)

رسپتور بایندینگ و ایترنالایزه شدن رادیو دارو با رسپتور

ابتدا سلولهای AR42J در ظروف کشت سلولی چاهک دار مخصوص رشد داده شدند تا مقدار آنها معادل ۰/۵ میلی گرم پروتئین در هر چاهک گردید، سپس آزمایشات بصورت دوتایی در ۴ ردیف A, B, C, D انجام شد. به هر یک از چاهک ها ۱ میلی لیتر محیط کشت اضافه گردید و سپس به سری B و D هر کدام ۵ میکرو لیتر اکتیویته سرد حاوی 10^{-7} مول اکتیویته اضافه کرده ولی به سری A و C پپتید سرد اضافه نشد. به تمام چاهک ها ۱۰ میکرو لیتر از تیروزین اکتیویته نشان دار شده اضافه کرده و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار دادیم. بعد از خارج کردن سلولها از انکوباتور محیط کشت آنها را خالی کرده و به ترتیب سری A و B را سه مرتبه با ۱ سی سی PBS و سری C و D را یک مرتبه با ۱ سی سی بافر سدیم استات (0.1M, pH=3.5) بعد از ۲ دقیقه انکوباسیون و سپس دو مرتبه هر بار با ۱ سی سی PBS شستشو دادیم. نهایتاً هر چهار سری سلول را با ۱ سی سی سود ۱ مولار بعد از نیم ساعت انکوبه کردن شستشو داده تا تمامی سلولها از سطح



نمودار ۲- توزیع بیولوژیکی ^{99m}Tc -Tricine-HYNIC-Tox در موش نرمال ۴ ساعت پس از تزریق پپتید

جدول ۱- توزیع بیولوژیکی ^{99m}Tc -Tricine-HYNIC-Tox در موش نرمال ۴ ساعت پس از تزریق پپتید

Tissue	Unblocked	Blocked
Blood	1.14 ± 0.10	1.31 ± 0.09
Liver	2.08 ± 0.40	2.20 ± 0.39
Kidney	14.57 ± 3.42	18.15 ± 5.34
Spleen	1.07 ± 0.16	0.98 ± 0.04
Pancreas	1.66 ± 0.08	0.80 ± 0.13
Gut	2.32 ± 0.42	2.82 ± 0.86
Adrenals	1.80 ± 0.20	1.24 ± 0.14
Muscle	0.92 ± 0.14	0.73 ± 0.15

HYNIC- با بازده ۴۰٪ و خلوص بیش از ۹۵٪ به دست آمد. کنژوگه پپتید سنتز شده با لیگاند کمکی تریسین با خلوص رادیوشیمیایی بالای ۹۵٪ نشاندار شد. پایداری در سرم انسانی بعد از ۱۵ دقیقه ۹۰٪ و نهایتاً بعد از ۴ ساعت به ۴۵٪ رسید. اتصال به رسپتور و در نتیجه اینترنالیزه شدن برابر ۴٪ به ازای هر میلی گرم پروتئین بعد از گذشت زمان ۱ ساعت بود. در توزیع بیولوژیکی ترکیب، اختلاف معناداری (t-Test, P<0.05) در جذب ترکیب بین حیوانات بلاک شده با

فرمولاسیون کیت

۱۰ میکروگرم پپتید کنژوگه شده ۵۰ میکروگرم کلروراستانو؛ ۱۵ میلی گرم تریسین را در ۱ سی سی آب مقطر حل کرده و پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون آن را در محلول خشک می کنیم. کیت تهیه شده با اضافه کردن ۲۰ میلی کوری سدیم یرتکتات در دمای اتاق بعد از گذشت زمان ۱ ساعت نشان دار می گردد.

یافته‌ها

در سنتز کنژوگه پپتید با HYNIC نهایتاً Tyr³-Oct

دسترس و استفاده باشد ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا $\text{HYNIC-Tyr}^3\text{-Octreotide}$ با درصد بالایی در حضور تریسین با تکنسیوم نشان دار گردیده و دارای رسپتور باین‌دینگ و توزیع بیولوژیکی مناسبی می‌باشد و می‌توان کیت مناسبی از آن که به راحتی در تمام مراکز پزشکی هسته‌ای قابل استفاده باشد تهیه کرد، بنابراین از این ترکیب می‌توان به عنوان آلترناتیو $^{111}\text{In-DTPA-Octreotide}$ در تمام مراکز پزشکی هسته‌ای استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای حسین حمزه و خانم ذوقی در بخش رادیوایزوتوپ به خاطر همکاری تشکر و قدردانی می‌گردد.

بلاک نشده در بافت های آدرنال و پانکراس که سرشار از رسپتورهای سوماتوستاتینی هستند دیده می‌شود که نشان دهنده جذب اختصاصی ترکیب در این بافت ها است. در بقیه بافت ها عدم وجود اختلاف معنادار بین حیوانات بلاک شده و بلاک نشده نشان دهنده جذب غیر اختصاصی ترکیب در آن بافت ها می‌باشد. جذب بالا در کلیه نسبت به کبد نشان دهنده دفع کلیوی ترکیب می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

از آنجایی که $^{111}\text{In-DTPA-Octreotide}$ به علت داشتن محدودیت هایی چون عدم دسترسی آسان و هزینه بالای تهیه آن قابل استفاده در تمام مراکز پزشکی هسته‌ای نمی‌باشد، تهیه آلترناتیوی که به راحتی قابل

منابع

- Schally AV; Oncological applications of somatostatin analogues. *Cancer Res* 1988; 48: 6977-6985
- Vigrolin I, Angelberger P, Li S, Yang Q, Kurtaran A, Aderer M, Neuhold N, Kaserer K, Leimer M, Peck M, Scheithauer W, Niederle B, Eichler H and Valent P; In vitro and in vivo studies of three radiolabelled somatostatin analogues: $^{123}\text{I-Octreotide}$, $^{123}\text{I-Tyr}^3\text{-Oct}$ and $^{111}\text{In-DTPA-Phe-1-Oct}$. *Eur J Nucl Med* 1996; 23: 1388-1399
- Thakur M, Kolan H, Rifat S, Li J, Rux A, John E, Halmos G and Schilly A; Vaprotide labelled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ for imaging tumors: preparation and preliminary evaluation. *International Journal of Oncology* 1996; 9: 445-451
- Maecke HR and Behe M; New octrotide derivatives labelled with technetium-99m [abstract]. *J Nucl Med* 1996; 37: suppl 29 P
- Abrams Mj, Juweid M, Tenkate C, Schwartz DA, et al; $^{99\text{m}}\text{Tc}$ human polyclonal IgG radiolabelled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med* 1990; 31: 2022-2028