سنتز، نشاندار کردن، فرمولاسیون و کنترل کیفی رادیوداروی پپتیدی ^{99m}Tc-Tricine-HYNIC-Tyr^3-Octreotide جهت تصویربرداری از تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی

مصطفی گندم کار [۱]، رضا نجفی [۱]، سید اسماعیل سادات ابراهیمی [۲]، عباس شفیعی [۲]، محمد حسین بابائی [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 رسپتور 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 اکتریوتاید محافظت شده از ناحیه لیزین به عنوان آنالوگی از سوماتوستاتین کنژوگه گردید . پس از برداشتن عوامل محافظتی، خالص سازی بوسیله Preparative-RP-HPLC انجام شد . پپتید کنژوگه شده با لیگاند کمکی تریسین به تکنسیوم متصل گردیده و نشان دار شد . کارایی نشاندار سازی، خلوص رادیوشیمیایی، پایداری در سرم انسانی، میزان اینترنالیزه شدن رادیو دارو همراه با رسپتور و توزیع بیولوژیکی ترکیب به عنوان یک رادیو داروی پپتیدی در موش نرمال بررسی گردید.

واژه‌های کلیدی:
سوماتوستاتین ، تیروزین اکتریوتاید ، هیدرازینو نیکوتینیک اسید ، تریسین ، تکنسیوم-۹۹ m

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 رسپتورهای سوماتوستاتینی با افینیته 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 قوی تر و نیمه عمر طولانی تری هستند (۲) از این آنالوگ ها می‌توان اکتریوتاید(Octreotide)، واپروتاید (Vaprotide)، لنریوتاید (Lanreotide) و تیروزین-۳ - اکتریوتاید (Tyr^3-Octreotide) را نام برد که هر کدام به زیر مجموعه‌های مختلف رسپتورهای سوماتوستاتینی تمایل داشته و می‌توانند جهت تصویر برداری یا درمان تومورها بعد از نشاندار سازی با رادیونوکلید مناسب بکار بروند .

تیروزین اکتریوتاید نشان دار شده با ید - ۱۲۳ (^{123}I-Tyr-Octreotide) اولین بار برای تشخیص

تومورهای 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 - ۱۲۳ که از نظرشیمیایی 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- ۱۱۱ از سوماتوستاتین (^{111}In-DTPA-Oct) توسعه پیدا کرد . ایندیوم- ۱۱۱- دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید - اکتریوتاید با خصوصیاتی مشابه اکتریوتاید به عنوان رادیودارویی خوب برای تصویربرداری از تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی تایید شد . این ترکیب اساسا از کلیه دفع شده و ۹۰٪ دوز تزریقی ۲٤ ساعت بعد از تزریق در ادرار یافت می‌شود. به خاطر طول عمر زیاد ایندیوم- ۱۱۱ می‌توان از تومورها بعد از ۲٤ و ٤۸ ساعت که اکتیویته زمینه‌ای به‌خاطردفع کلیوی رادیودارو به کمترین مقدار رسیده است تصویر برداری کرد .

اگر چه در چند سال اخیر ^{111}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 آلترناتیو دیگر شامل ایتریوم-۹۰ (^{90}Y) و تربیوم-۱٦۱ (^{161}Tb) برای کاربردهای درمانی ؛ گالیم-٦۸ (^{68}Ga) ؛ مس-٦٤ (^{64}Cu) و فلوئور-۱۸ (^{18}F) برای تصویر برداری با پوزیترون (PET) و خصوصا تکنسیوم-m ۹۹ جهت سینتی گرافی (Scintigraphy) می‌باشد .

نشاندار سازی آنالوگ‌های سوماتوستاتین با تکنسیوم-m ۹۹ 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 تیول ها و هیدرازینو نیکوتینیک اسید بطور گسترده‌ای در حال بررسی می‌باشد (٤ و ۳).

هدف از این تحقیق تهیه و نشاندار سازی آنالوگ های سوماتوستاتین با تکنسیوم- m ۹۹ به روش غیر مستقیم و بررسی میزان نشاندار سازی ؛ خلوص رادیوشیمیایی ؛ پایداری در پلاسمای انسانی ؛ توزیع بیولوژیکی ؛ میزان اتصال به رسپتور و اینترنالیزه شدن رسپتور به داخل سلول توموری و در نهایت فرمولاسیون رادیودارویی مناسب بعنوان آلترناتیوی برای ^{111}In-DTPA-Oct جهت مصرف در تمام مراکز پزشکی هسته‌ای می‌باشد.

مواد لازم

تیروزین اکتریوتاید از کمپانی Bachem ؛ کلرونیکوتینیک اسید از Fluka ؛هیدرات هیدرازین از Fluka ؛ دی ترشیو بوتوکسی کربونیل از Fluka ؛ آزابنزوتری آزولیل تترامتیل یورونیوم هگزافلوروفسفات (HATU) از Sigma ؛ دی مثیل 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 نیکوتینیک اسید

از این ترکیب به عنوان عامل دو منظوره برای اتصال پیشبد با تکنسیوم استفاده می‌شود و سنتز آن در دو مرحله انجام می‌گردد.

۱- سنتز ٦- هیدرازینو پیریدین ۳- کربوکسیلیک اسید

به ۸ میلی گرم ٦-کلرونیکوتینیک اسید مقدار ۳۵ میلی لیتر هیدرات هیدرازین اضافه کرده و در حمام روغن ۱۰۰ درجه برای ٤ ساعت قرار دادیم. سپس رسوب سفید رنگ حاصل را صاف کرده و با اتر چندین بار شستشو داده ؛ آن را جمع آوری کردیم . نقطه ذوب جسم حاصل برابر ۲۹۲ درجه و راندمان

واکنش ۷۷٪ بود .

۲- سنتز ٦- BOC - هیدرازینو پیریدین ۳- کربوکسیلیک اسید

به ۱/٤ گرم ٦- هیدرازینو پیریدین۳- 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 ۱٦ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد، جسم جامد به دست آمده را توسط ستون سیلیکاژل واتیل استات خالص سازی و سپس خشک کرده که مقدار ۲/۳ گرم جسم مورد نظر با بازده ۹٤٪ به دست آمد. (۵)

سنتز BOC-HYNIC-BOC-Lys^5-Tyr^3 Octreotide

به مخلوطی از ۳ میلی گرم BOC-HYNIC و ٤/٦ میلی گرم HATU در ۱ میلی لیتر دی متیل فرمامید مقدار ۵/۹ میکرولیتر دی ایزوپروپیل اتیل آمین اضافه کرده و بعد از ۱۵ دقیقه به آن ۱۱/۳ میلی گرم BOC-Lys^5-Tyr^3-Oct اضافه شد . بعد از گذشت ۱ ساعت به آن ۵۰۰ میکرولیتر کربنات ئیدروژن سدیم ۵٪ همراه با ۵۰۰ میکرولیتر اتیل استات اضافه کرده و اتیل استات را ۳ بار با کربنات ئیدروژن 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- Tyr^3-Octreotide

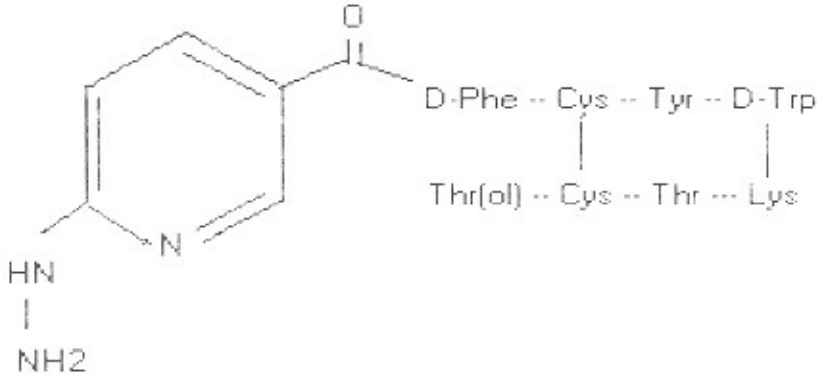
به جسم خشک شده بالا ۵۰۰ میکرولیتر محلولی حاوی ۹۲٪ تری فلوروستیک اسید ؛ ٤٪ تیوآنیزول ؛ ٤ ٪ آب مقطر اضافه کرده ؛ بعد از ۱۵ دقیقه با اضافه کردن ۱/۵ میلی لیتر دی اتیل اتر جسم رسوب داده شده و با HPLC خالص سازی شد (شکل ۱).

نشان دار کردن HYNIC-Tyr^3-Octreotide با ^{99m}Tc

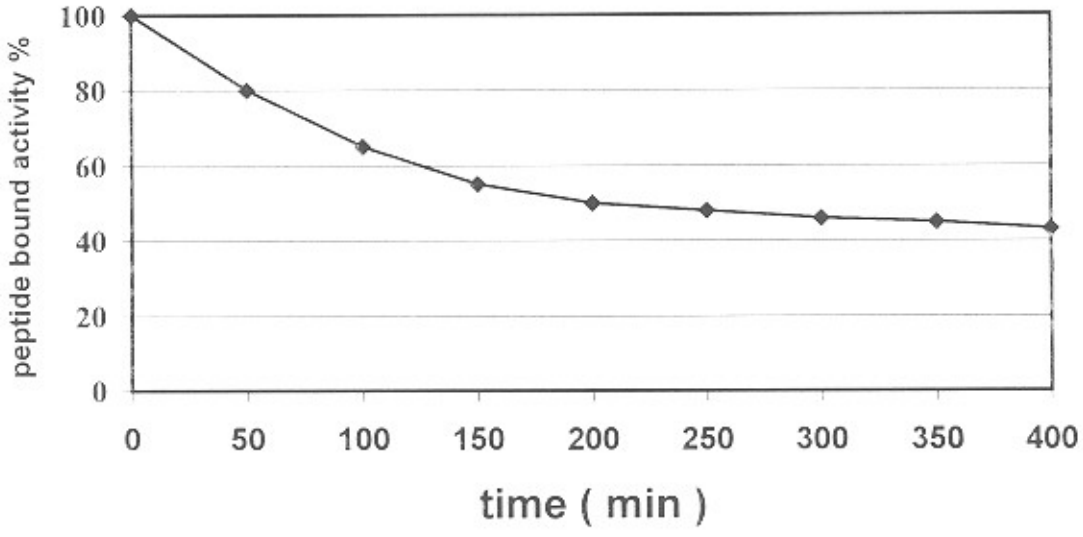
به ۱۰ میکرو گرم HYNIC-Tyr-Oct مقدار ۱ میلی لیتر محلولی حاوی ۱۰۸ میلی گرم تریسین ؛ ۲ میلی لیتر سدیم استات (0.5 M , pH = 5.2) ؛ 40 mCi / ml سدیم پرتکنتات ؛ ۷۵ میکرولیتر محلول $SnCl_2$ (20 mg / 10 ml , 0.1 N , HCl) اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه کردیم. میزان نشاندارسازی و خلوص رادیوشیمیائی با استفاده از HPLC, ITLC و SEPPAK-C18 مشخص شد.

پایداری در سرم انسانی

به ۲ میلی لیتر سرم انسانی ۵ میکرولیتر پپتید نشان دار شده حاوی اکتیوته ٦۰ میکرو کوری اضافه شد و بعد از ۱۵ دقیقه، ۱، ۲، ۳ و ٤ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه مقدار ۵۰ میکرولیتر از آن به ستون PD_{10} اضافه گردید . پس از شستشوی ستون با PBS هر ۱۳ قطره جداگانه جمع آوری گشت . شمارش لوله‌های ۵ و ٦ جهت اکتیوته متصل شده به پروتئین پلاسما و لوله‌های ۱۰-۱٤ جهت اکتیوته متصل به پپتید انجام شده و میزان پروتئین بایندینگ مشخص گردید. (نمودار ۱)



شکل ۱- شمای ساختاری HYNIC-Tyr^3-Octreotide سنتز شده



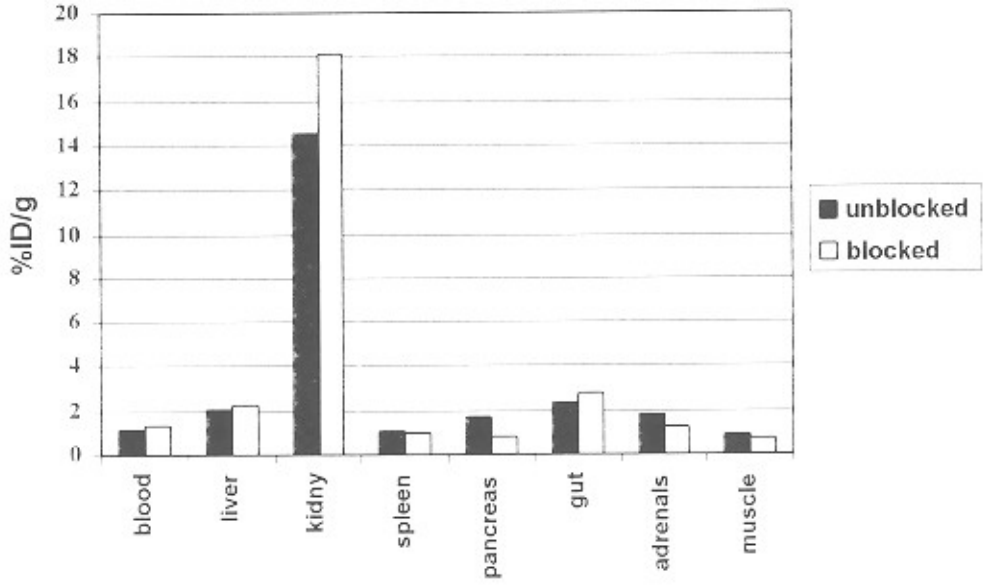
نمودار ۱ - پایداری ^{99m}Tc –Tricine-HYNIC-Toc در سرم انسانی بعد از گذشت زمانهای مختلف

رسپتور بایندینگ و اینترنالیزه 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 ٤ 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 اکتریوتاید سرد حاوی 10^{-6} مول اکتریوتاید اضافه کرده ولی به سری A و C پپتید سرد اضافه نشد . به تمام چاهک ها ۱۰ میکرولیتر از تیروزین اکتریوتاید 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 سی‌سی 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. نهایتا 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 جدا شوند و اکتیویته هر یک را شمارش کردیم. مقدار بایندینگ اختصاصی کل از رابطه E = A - B و اینترنالیزه شدن پپتید با رسپتور از رابطه F = C - D محاسبه گردید .

بررسی توزیع بیولوژیکی در موش

تعداد ۸ موش انتخاب شده به دو گروه تقسیم شدند که به یک گروه ۵۰ میکرو گرم اکتریوتاید سرد و به گروه دیگر ۵۰ میکروگرم نرمال سالین تزریق شد . بعد از گذشت ۱/۵ ساعت به هر دو گروه ۱۲ میکرو کوری پپتید نشاندار شده با تکنسیوم تزریق شد . به ترتیب ۰/۵ ؛ ۱ ؛ ۲ ؛ ۳ ؛ ٤ و ۲٤ 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)



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

جدول ۱- توزیع بیولوژیکی ^{99m}Tc-Tricine-HYNIC-Toc 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
Kidny	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

فرمولاسیون کیت

۱۰ میکروگرم پپتید کنژوگه شده با ۵۰ میکروگرم کلروراستانو، ۱۵ میلی‌گرم تریسین را در ۱ سی‌سی آب مقطر حل کرده و پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون آن را در خلاء خشک می‌کنیم. کیت تهیه شده با اضافه کردن ۲۰ میلی کوری سدیم پرتکنتات در دمای اتاق بعد از گذشت زمان ۱ ساعت نشان دار می‌گردد.

یافته‌ها

در سنتز کنژوگه پپتید با HYNIC نهایتا Tyr^3-Oct-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 نهایتا بعد از ٤ ساعت به ٤٥٪ رسید. اتصال به رسپتور و در نتیجه اینترنالیزه شدن برابر ٤٪ به ازای هر میلی گرم پروتئین بعد از گذشت زمان ۱ ساعت بود. در توزیع بیولوژیکی ترکیب، اختلاف معنا داری (1-Test، $P<0.05$) در جذب ترکیب بین حیوانات بلاک شده با

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}In-DTPA-Octreotide به علت داشتن محدودیت هایی چون عدم دسترسی آسان و هزینه بالای تهیه آن قابل استفاده در تمام مراکز پزشکی هسته‌ای نمی باشد، تهیه آلترناتیوی که به راحتی قابل دسترس و استفاده باشد ضروری به نظر می‌رسد . در این راستا HYNIC-Tyr^3-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}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.

منابع

1) Schally AV; Oncological applications of somatostatin analogues. Cancer Res 1988; 48: 6977-6985

2) 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}I-Octreotide, ^{123}I-Tyr^3-Oct and ^{111}In- DTPA-Phe-1-Oct. Eur J Nucl Med 1996; 23: 1388-1399

3) Thakur M, Kolan H, Rifat S, Li J, Rux A, John E, Halmos G and Schlly A; Vaprotide labelled with ^{99m}Tc for imaging tumors: preparation and preliminary evaluation. International Journal of Oncology 1996; 9: 445-451

4) Maecke HR and Behe M; New octrotide derivatives labelled with technetium-99m [abstract]. J Nucl Med 1996; 37: suppl 29 P

5) Abrams Mj, Juweid M, Tenkate C, Schwartz DA, et al; ^{99m}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