تهیه، فرمولاسیون و کنترل کیفی کیت یک مرحله ای ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC به عنوان رادیوداروی پپتیدی جدید جهت تصویربرداری از تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی

دکتر مصطفی گندم کار [۱]، دکتر رضا نجفی [۱]، دکتر سید اسماعیل سادات ابراهیمی [۲]، دکتر محمدحسین بابائی [۱]

۱- بخش رادیوایزوتوپ ، مرکز تحقیقات هسته ای ، سازمان انرژی اتمی ایران

۲- گروه شیمی دارویی ، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

استفاده از ^{111}In-DTPA-Octreotide به عنوان روش تشخیص کلینیکی در انکولوژی جهت تصویربرداری از تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی به طور گسترده ای کاربرد پیدا کرده است. با این وجود ^{111}In دارای جنبه های منفی متعددی از جمله دسترسی محدود به آن، انرژی گامای غیر ایده‌ال و تشعشع بالا به مریض می باشد. ^{99m}Tc-EDDA-HYNIC-D-Phe^{1}-Tyr^{3}-Octreotide به عنوان عاملی جدید و بالقوه برای جایگزینی با Octreoscan در تصویربرداری رسپتورهای سوماتوستاتینی مورد بررسی قرار گرفت. این کمپلکس مشتق آنالوگ سوماتوستاتین با هیدرازینو نیکوتینیک اسید می باشد که دارای اتیلن دی آمینو دی استیک اسید (EDDA) به عنوان لیگاند همراه با پایداری بالای in vivo و in vitro می باشد. بازده نشاندارسازی بیش از ۹۰٪ در اکتیویته ویژه بالا به دست آمد. خصوصیات HPLC، توزیع بیولوژیکی و اتصال به رسپتور بررسی شد. فرمولاسیون بدست آمده به سرعت با تکنسیوم نشاندار شده و پایدار می باشد که آن را برای استفاده بالینی مناسب کرده است.

واژه‌های کلیدی: *سوماتوستاتین، هیدرازینونیکوتینیک اسید، تیروزین اکتریوتاید، اتیلن دی آمینو دی استیک اسید، تکنسیوم-99m*

مقدمه

امروزه استفاده از آنالوگ های سوماتوستاتین جهت تصویربرداری از تومورها بعنوان ابزار بالینی در انکولوژی پذیرفته شده است. ^{123}I تیروزین اکتریوتاید و ^{111}In -DTPA اکتریوتاید دارای تجمع خوبی در تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی می باشند ولیکن دفع کبدی صفراوی اکتریوتاید نشان دار شده با ^{123}I و در نتیجه اکتیویته زمینه ای بالا در ناحیه شکمی مانع از شناسایی تومورهای این نواحی می شود و همچنین عدم دسترسی به ^{123}I با خلوص بالا در تمام مراکز موجب گردیده تا ^{111}In-DTPA-Octreotide به عنوان رادیوداروی انتخابی برای این نوع تشخیص ها شناخته شود (۱). با توجه به این که تکنسیوم-99m به عنوان رادیونوکلیدی با انرژی مناسب و ایده ال جهت تصویربرداری SPECT به شمار می رود. ما اخیرا در مورد تهیه آنالوگ سوماتوستاتین با نام تیروزین-۳- اکتریوتاید (TOC) به عنوان قسمت پپتیدی باند شونده به رسپتور و هیدرازینونیکوتینیک اسید به عنوان لیگاند دو منظوره برای اتصال به تکنسیوم-99m گزارش کردیم (۲). نشاندارسازی با تکنسیوم-99m نیاز به لیگاند همراه جهت پایدار کردن پیوند تکنسیوم و دنباله هیدرازینی باند شده به پپتید دارد. دربررسی قبلی ما از تریسین به عنوان لیگاند همراه استفاده کردیم، که دارای بازده نشان دارسازی بالا و پایداری *in vitro* نسبتا خوب بود ولی در *in vivo* از پایداری مطلوب برخوردار نبود که استفاده بالینی آن را دشوار می سازد؛ لذا جهت افزایش پایداری از لیگاند همراه EDDA (اتیلن دی آمینو دی استیک اسید) استفاده شده است.EDDA به عنوان لیگاند همراه انتخابی می باشد از آنجایی که لیپوفیلیسیته و در نتیجه

دفع کبدی کاهش داده شده و پایداری *in vivo* به علت عدم داشتن فرم های رزونانسی افزایش می یابد و همچنین جذب بالا به رسپتورهای سوماتوستاتینی گزارش شده است (۳).

در این مقاله روشی برای نشاندارسازی مشتقی از سوماتوستاتین با ^{99m}Tc بررسی شده است که با لیگاند همراه EDDA بازده نشاندارسازی بالایی بدست می آید و مناسب جهت استفاده بالینی به عنوان آلترناتیوی برای Octreoscan می باشد.

مواد و روش‌ها

BOC تیروزین اکتریوتاید از کمپانی Bachem، کلرونیکوتینیک اسید از Fluka، هیدرات هیدرازین از Fluka ، تریسین از Fluka، اتیلن دی آمینو دی استیک اسید از Fluka، آزوبنزوتری آزولیل تترامتیل یورونیوم هگزافلوروفسفات (HATU) از Sigma، دی متیل فرمامید از Fluka، دی ایزوپروپیل اتیل آمین از Fluka، رده سلولی AR42J از کلینیک پزشکی هسته ای اینسبروگ اتریش (این رده سلولی که از سلولهای توموری پانکراس موش صحرائی (rat) بدست آمده است. رسپتورهای سوماتوستاتینی نوع دوم را بیان می کنند)، محیط کشت RPMI1640 همراه با ۱۰درصد سرم جنین گاوی و ۲ میلی مولار ال-گلوتامین و جنتامایسین (جهت رشد رده سلولی) از Gibco ؛ SEPPAK-C18 .

الف- سنتز HYNIC-Tyr^3-Octreotide

این کمپلکس بر طبق روشی که قبلا گزارش کرده ایم تهیه شد (٤) . بطور خلاصه به مخلوطی از ۱/۵ میلی گرم HYNIC و ٤/٦ میلی گرم HATU در نیم میلی لیتر دی متیل فرمامید ؛ ۲/۹ میکرولیتر دی ایزوپروپیل اتیل آمین اضافه کرده و بعد از انکوباسیون ۱۵ دقیقه ای ۵/۵ میلی گرم پپتید به آن اضافه گردید و بعد از گذشت ۲ ساعت به آن نیم میلی لیتر اتیل استات اضافه کرده و با کربنات هیدروژن سدیم ۵٪ ؛ بافر سدیم استات ۵/. مولار pH=5.2 و NaCl اشباع فاز اتیل استات را شستشو داده و خشک کردیم. به جسم خشک شده به دست آمده ۵۰۰ میکرولیتر تری فلورواستیک اسید (۹۲٪) ؛ تیوآنیزول (٤٪) و آب مقطر (٤٪) اضافه شده و بعد از ۱۵ دقیقه کنژوگه پپتید با اضافه کردن دی اتیل اتر رسوب داده شد و سپس با استفاده از HPLC خالص سازی گردید.

ب- نشاندارکردن HYNIC-Tyr^3-Octreotide با ^{99m}Tc

ما قبلا نشاندار کردن پپتید با لیگاند همراه تریسین و نتایج بررسی‌های in vivo و in vitro در کنترل کیفی آن را گزارش کردیم (۲). در این بررسی از لیگاند همراه EDDA جهت نشان دار سازی استفاده گردید و روش های مختلف نشاندارسازی بررسی شد.

۱- استفاده از EDDA به تنهایی:

به محلولی از ۱۰ میکروگرم پپتید در بافر سدیم استات ۰/۵ مولار با pH=5.2 ؛ ۲۵ میکرولیتر محلول $SnCl_2.2H_2O$, 10mg/10ml در 0.1N HCl ؛ نیم میلی لیتر آب مقطر حاوی ۱۰ میلی گرم EDDA ؛ یک میلی لیتر محلول سدیم پرتکنتات حاوی ۱۵ میلی کوری اکتیویته اضافه گردید و بعد از یک ساعت انکوبه کردن در دمای اتاق میزان نشاندارسازی و خلوص رادیوشیمیایی با استفاده از HPLC ؛ ITLC و Seppak-C18 مشخص شد.

۲- استفاده از تریسین و EDDA بصورت جداگانه:

به محلولی از ۱۰ میکروگرم پپتید در بافر سدیم استات ۰/۵ مولار با pH=5.2 مقدار یک میلی لیتر محلولی حاوی ۱۰۸ میلی گرم تریسین ؛ ۲ میلی لیتر سدیم استات ۰/۵ مولار با pH=5.2 ؛ 40mCi/ml سدیم پرتکنتات و ۷۵ میکرولیتر $SnCl_2.2H_2O$,10mg/10ml in 0.1N HCl اضافه کرده ؛ به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه کرده و سپس به ویالی حاوی ۱۰ میلی گرم EDDA در نیم میلی لیتر آب مقطر pH=8 اضافه گردید و ۲۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. میزان نشاندارسازی و خلوص رادیوشیمیایی اندازه گیری و مشخص گردید.

۳- استفاده از تریسین و EDDA بطور همزمان:

در این روش ابتدا مقدار ۲۰ میلی گرم تریسین به صورت جداگانه در ویالی وزن شده و به آن نیم میلی لیتر فسفات بافر ۰/۲ مولار pH=6 اضافه و حل گردید. سپس ۱۰ میلی گرم EDDA در ویال جداگانه ای وزن

گردیده و به آن ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر قلیایی شده با NaOH اضافه گردید و حل شد . محلول ویال اول به ویال دوم اضافه گردید و سپس به محلول به دست آمده ۲۰ میکروگرم پپتید HYNIC-Tyr^3-Octreotide اضافه گردید. با اضافه کردن 36 mCi/ml سدیم پرتکنتات و ۲۵ میکرولیتر از محلول $SnCl_2.2H_2O$,10mg/10ml,0.1NHcl و ۱۰ دقیقه حرارت دادن در ۱۰۰ درجه نشاندار سازی انجام شد. میزان خلوص رادیوشیمیایی و بازده نشان دار سازی بررسی گردید.

ج- روش های آنالیز

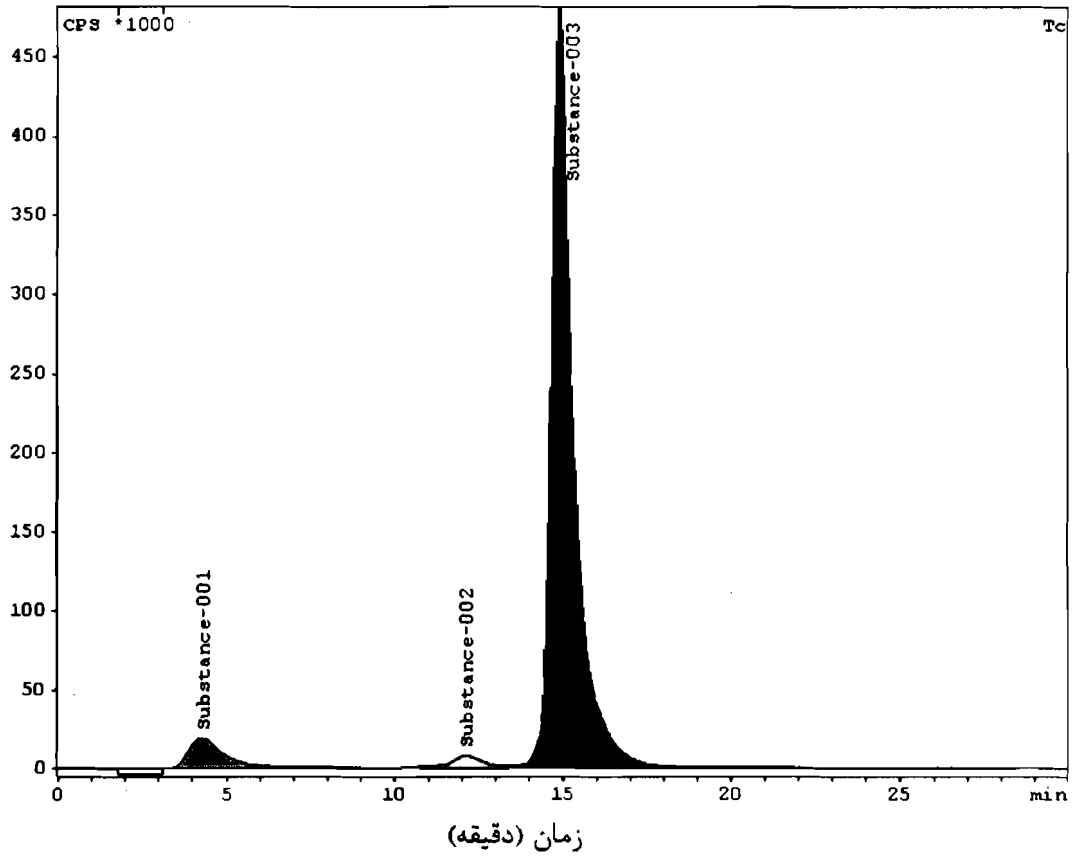
۱- کروماتوگرافی لایه نازک TLC:

برای کروماتوگرافی از ورقه های سیلیکاژل ITLC-SG کمپانی سیگما همراه با فازهای متحرک مختلف استفاده شد. جهت تعیین مقدار پرتکنتات آزاد از فاز متحرک متیل اتیل کتون استفاده گردید (TcO_4^- Rf =1)

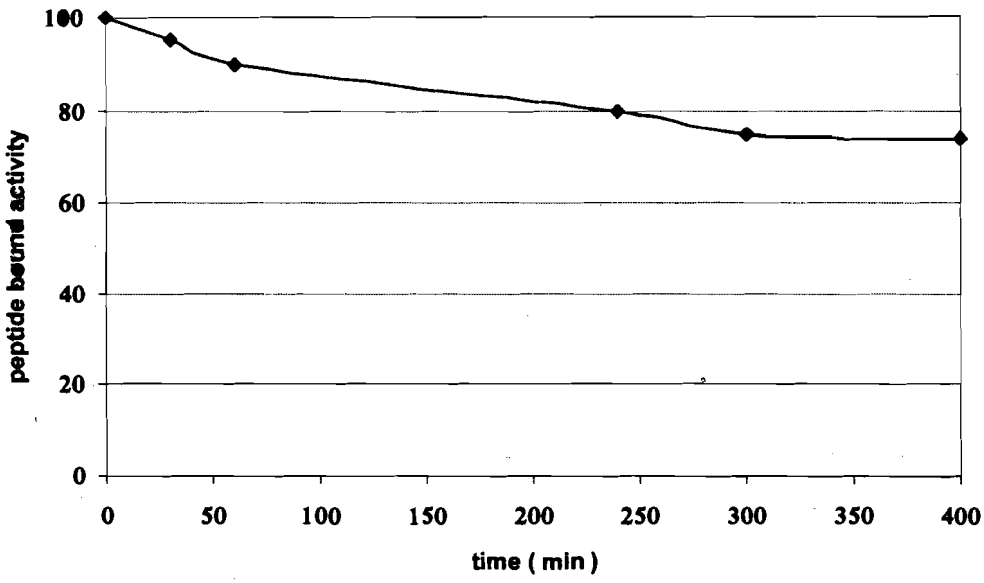
فاز متحرک ۰/۱ نرمال سیترات بافر با pH=5 جهت تعیین میزان Tc-Coligand متصل نشده به پپتید و TcO_4^- آزاد با Rf =1 استفاده گردید . فاز متحرک ۵۰ ٪ استونیتریل / آب جهت تعیین میزان کلوئید تکنسیم (TcO_2) با Rf =0 استفاده شد.

۲- کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC):

دستگاه HPLC مدل JASCO 880-PU و دتکتور 875-UV-Vis جهت تعیین جذب UV و دتکتور Raytest جهت اندازه گیری طیف رادیواکتیو و ستون تجزیه ای RP-C_{18}, 5 µm, polygosil 250.40 mm^2 و سیستم حلال استونیتریل و آب در تری فلورواستیک اسید ۰/۱٪ بصورت گرادیانتی از ۱۰۰ ٪ آب در تری فلورواستیک اسید به ۱۰۰٪ استونیتریل در زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱ - رادیوکروماتوگرام ^{99m}Tc-EDDA-HYNIC-Tyr^3-Octreotide یک ساعت بعد از نشاندار سازی با استفاده از تریسین و EDDA بطور همزمان و ده دقیقه حرارت دادن در صد درجه سانتی گراد. محور افقی زمان بر حسب دقیقه و محور عمودی میزان شمارش (در پنجاه هزار) را نشان می دهد . RT (زمان بازداری) برای پرتکنتات آزاد برابر ۴ دقیقه و برای پپتید نشان دار برابر ۱۵ دقیقه می باشد.



نمودار ۲- پایداری ^{99m}Tc-EDDA-HYNIC-Tyr^3-Octreotide در سرم انسانی با گذشت زمان.

۳- پایداری in vitro :

جهت تعیین پایداری از سرم انسانی استفاده گردید. پپتید نشاندار شده حاوی ۵۰ میکروکوری اکتیویته به ۲ میلی لیتر سرم انسانی اضافه گردید و پس از عبور از ستون PD10 توسط شستن با PBS میزان اکتیویته متصل شده به پروتئین های پلاسما و اکتیویته متصل مانده به پپتید در زمان های مختلف انکوباسیون اندازه گیری شد و نهایتا میزان اتصال به پروتئین های پلاسما با گذشت زمان به دست آمد . (نمودار ۲)

۴- اینترنالیزه شدن رادیودارو:

برای مطالعات اینترنالیزه شدن از رده سلولی تومورهای پانکراس موش AR42J حاوی رسپتورهای سوماتوستاتینی نوع دوم استفاده شد. سلولها مطابق با روشی که قبلا ذکر شد (۲) در پلیت های مخصوص در ٤ ردیف دو تایی رشد داده شدند و بعد از انکوبه کردن در زمان های مختلف با پپتید سرد و پپتید نشاندار ؛ رسپتورهای سطحی با استفاده از سدیم استات ۰/۱ مولار با pH=3.5 برداشته شدند. میزان اینترنالیزه شدن رادیو دارو به داخل سلولها به روش بالا اندازه گیری شد.

۵- توزیع بیولوژیکی :

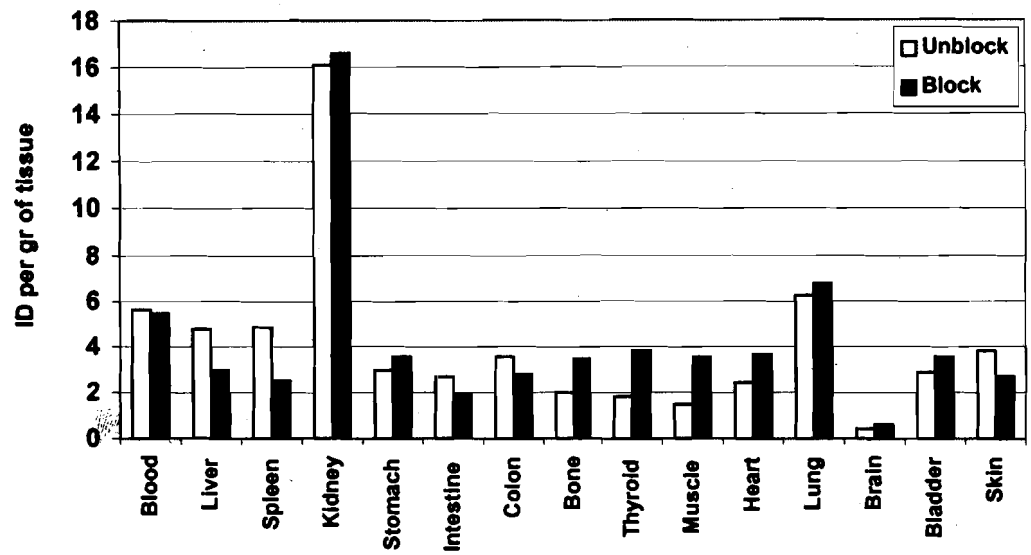
چهار گروه سه تایی از موش سوری انتخاب شدند و یک گروه با تزریق ۵۰ میکروگرم پپتید سرد اکتریوتاید رسپتورهای‌سوماتوستاتینی آنها اشباع گردید. به همه گروه ها ۱ میکروگرم پپتید نشان دار تزریق شده و توزیع بیولوژیکی در زمان های مختلف ۰/۵ ؛ ۱ و ٤ ساعت بررسی گردید (نمودار ۳ و جدول ۱).

نتایج

۱- نشاندارسازی:

سنتز HYNIC-Tyr^3-Octreotide بازده ای برابر ۵۰٪ داشت و خلوص شیمیایی آن بالای ۹۵٪ بوسیله HPLC تعیین گردید. در نشاندارسازی کنژوگه سنتز شده با تکنسیوم با استفاده از لیگاند همراه EDDA بدون حرارت بعد از یک ساعت انکوباسیون نهایتا نشاندارسازی با بازده ۷۰٪ به دست آمد. در روش تهیه کمپلکس با تریسین و سپس اضافه کردن EDDA و حرارت به صورت جداگانه بازده نشاندارسازی بالای ۹۰٪ به دست آمد که نشان دهنده جایگزینی EDDA با تریسین بوسیله حرارت می باشد.

درروش‌استفاده‌ازمحلولی‌از‌تریسین‌وEDDAبصورت همزمان‌وحرارت‌دادن برای ۱۰دقیقه بازده نشاندارسازی بالای ۹۵٪ بود یعنی همزمان با تشکیل کمپلکس ^{99m}Tc(Tricine)$_2$ باکمک‌حرارت EDDA جایگزین تریسین گشته و نهایتا کمپلکس پایدار به‌دست می‌آید و نشاندار کردن در یک مرحله و در زمان کوتاه انجام می‌گیرد.



نمودار۳- مقایسه درصد دوز تزریق شده در بافت های مختلف در موش های نرمال بلاک نشده (سفید) و بلاک شده (سیاه) نیم ساعت پس از تزریق داخل وریدی کمپلکس ^{99m}Tc-EDDA-HYNIC-Tyr^3-Octreotide. رسپتورهای داخل بدن موش با تزریق ۱۰۰ میکروگرم اکتریوتاید سرد نیم ساعت قبل از تزریق کمپلکس نشان دار بلاک شدند.

جدول ۱- توزیع حیاتی کمپلکس ^{99m}Tc-EDDA-HYNIC-Tyr^3-Octreotide در موش های طبیعی سوری در ساعات مختلف (۰/۵، ۱ و ۴ ساعت) پس از تزریق وریدی. اعداد بصورت درصد دوز تزریق شده در هر گرم بافت (%ID/g tissue) همراه با انحراف استاندارد (n=3) بیان شده اند(Mean ± SD).

بافت	۰/۵ ساعت پس از تزریق	۱ ساعت پس از تزریق	٤ ساعت پس از تزریق
خون	5.63 ± 2.24	3.15 ± 2.51	1.52 ± 0.37
کبد	4.77 ± 1.08	5.59 ± 3.32	8.77 ± 0.07
طحال	4.81 ± 1.98	2.25 ± 2.53	3.00 ± 0.48
کلیه	16.10 ± 4.12	13.80 ± 9.48	19.89 ± 0.3
معده	2.97 ± 0.62	3.29 ± 2.01	3.99 ± 0.05
روده	2.71 ± 0.54	1.44 ± 0.73	9.44 ± 7.22
کولون	3.55 ± 0.53	4.73 ± 4.13	10.03 ± 10.50
مثانه	2.84 ± 1.96	35.80 ± 40.80	2.64 ± 0.30
قلب	2.46 ± 0.60	3.02 ± 0.29	3.69 ± 0.10
عضله	1.46 ± 0.31	1.13 ± 0.01	1.67 ± 0.70
ریه	6.22 ± 1.49	6.56 ± 3.60	7.62 ± 1.20
پوست	3.81 ± 1.44	1.40 ± 0.83	2.72 ± 1.13
تیروئید	1.80 ± 0.61	1.93 ± 1.09	2.76 ± 0.30
مغز	0.39 ± 0.24	0.97 ± 0.48	1.33 ± 0.05
استخوان	1.96 ± 0.47	1.54 ± 0.51	2.62 ± 0.51

۲- پایداری در سرم انسانی:

پایداری کمپلکس ^{99m}Tc-EDDA-HYNIC-Tyr^3-Octreotide بعد از ٤ ساعت بالای ۷۰٪ بود که نشان دهنده مزیت آن نسبت به تریسین است. از آنجایی که تریسین دارای فرم های ایزومری مختلفی می باشد ناپایدار بوده و تکنسیم سریعا توسط عوامل SH در سرم جایگزین شده و کمپلکس آزاد می شود در حالی که EDDA به علت مسطح بودن کمپلکس محکم و پایداری را با تکنسیوم ایجاد کرده و در سرم انسانی پایداری خود را حفظ می کند.

۳- اینترنالیزه شدن:

پدیده اینترنالیزه شدن در مورد EDDA شبیه تریسین بوده و برابر ٤٪ به ازای هر میلی گرم پروتئین بعد از گذشت زمان یک ساعت بود.

۴- توزیع بیولوژیکی:

در توزیع بیولوژیکی اختلاف معنی داری t-Test, $P<0.05$ در جذب ترکیب بین حیوانات بلاک شده با بلاک نشده در بافت های طحال ، پانکراس ، کبد و پوست که سرشار از رسپتورهای سوماتوستاتینی هستند دیده می شود که نشان دهنده جذب اختصاصی ترکیب در این بافت ها است (۵). در بقیه بافت ها عدم وجود اختلاف معنی دار بین حیوانات بلاک شده و بلاک نشده نشان دهنده جذب غیر اختصاصی ترکیب در آن بافت ها می باشد. جذب بالا در کلیه نشان دهنده دفع خوب کلیوی ترکیب می باشد.

بحث

ما در مقاله قبلی خود از ^{99m}Tc-Tricine-HYNIC-Tyr^3-Octreotide به عنوان آلترناتیو و جایگزینی برای ^{111}In-DTPA-Octreotide نام بردیم (۲) . تریسین به خوبی و با میزان بالای ۹۵ ٪ با تکنسیوم کمپلکس داده و سریعا با HYNIC کنژوگه می گردد. توزیع بیولوژیکی و پایداری کمپلکس تا ٤ ساعت بسیار خوب بوده و پایدار می باشد همچنین دفع سریع کلیوی داشته و خصوصیات ایده ال یک رادیو دارو را دارا می باشد ولیکن تریسین به علت داشتن فرم های ایزومری مختلف دائما در بین اشکال مختلف ایزومری جابجا شده و همین امر موجب سست بودن پیوند تشکیل شده با تکنسیوم می شود که می تواند با گروههای دارای الکترون آزاد همچون اکسیژن و گوگرد جایگزین شده و پیوند بین تکنسیوم و تریسین شکسته شود ، لذا در سرم انسانی پایداری خوبی نداشته و باعث می گردد اکتیویته زمینه ای حاصل از تکنسیوم آزاد زیاد گردیده و تصویر برداری به خوبی صورت نگیرد. لذا اگرچه تریسین به تنهایی جهت نشان دارسازی کافی بوده و قابل استفاده می باشد ولیکن جهت فائق شدن بر مشکل عدم پایداری درسرم انسانی لیگاند های همراه دیگری چون EDDA مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که EDDA به خاطر اینکه مولکولی مسطح بوده و کمپلکس آن با تکنسیوم هم حالت مسطح داشته و اشکال ایزومری دیده نمی شود، بسیار پایدار بوده و قابل جایگزین شدن با عوامل اکسیژن و گوگرد و دارای الکترون آزاد در سرم خون نیست و همچنین دارای توزیع بیولوژیکی خوبی بوده و دفع کلیوی دارد. مسطح بودن مولکول EDDA باعث می گردد که به راحتی وارد واکنش با تکنسیوم نگردد و به تنهایی از درصد نشان دارسازی بالایی برخوردار نیست و نهایتا به بازده ای برابر ۷۰ درصد می توان دست یافت. با استفاده از تکنیک تعویض لیگاند می توانیم EDDA را با حرارت جایگزین تریسین کرده و به نشان دارسازی بالای ۹۵ درصد دسترسی پیدا کنیم . در صورتیکه بطور هم زمان از تریسین و EDDA و حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد استفاده کنیم می توانیم در یک مرحله هم نشان دارسازی با تریسین و هم جانشینی با EDDA را داشته باشیم که نهایتا باعث به دست آمدن فرمولاسیون کیت یک مرحله ای ، پایدار و بدون اشکال ایزومری ^{99m}Tc-EDDA-HYNIC-Tyr^3-Octreotide می گردد که با پایداری بالا در سرم انسانی و توزیع بیولوژیکی مناسب می تواند جایگزین بسیار مناسبی برای Octreoscan به شمار رود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری آقایان حسین حمزه، محمد مزیدی، حسن میرفلاح و خانمها محمودخان و ذوقی در بخش رادیوایزوتوپ تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1) Kwekkeboom D, Krenning EP and De Jong M; Peptide receptor imaging and therapy. J Nucl Med 2000; 41: 1704-1713

۲) گندم کار، مصطفی . نجفی، رضا . سادات ابراهیمی، سیداسماعیل . شفیعی، عباس . بابائی، محمد حسین . سنتز، نشان دار کردن ، فرمولاسیون و کنترل کیفی رادیوداروی پپتیدی ^{99m}Tc-Tricine-HYNIC-Tyr^3-Octreotide جهت تصویربرداری از تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی. مجله پزشکی هسته ای ایران : شماره ۱۹ ؛ زمستان ۸۱ ؛ صفحه ۲۸-۲۳

3) Decristoforo C and Mather SJ; ^{99m}Tc-somatostatin analogues effect of labeling methods and peptide sequence. Eur J Nucl Med 1999; 26: 869-879

4) Abrams MJ, Juweid M, Tenkate C, Schwartz DA, ^{99m}Tc human polyclonal IgG radiolabelled via the hydrazine nicotinamide derivative for imging focal sites of infection in rats. J Nucl Med 1990; 31: 2022-2028

5) Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H and Srikant CB; the somatostatin receptor family. Life Sci 1995; 57: 1249-1265