

Preparation and Radiochemical Evaluation of ^{99m}Tc -HYNIC-[Lys³, Tyr⁴] bombesin (3-14) for Prostate Cancer Detection

Hassan Ghorbantabar Omrani¹,
Farzaneh Rezazadeh²,
Nouroollah Sadeghzadeh^{3,4}

¹ Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² PhD Student in Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 31, 2016 ; Accepted December 3, 2016)

Abstract

Background and purpose: Over-expression of GRP receptors for Bombesin has been reported to be found in malignant tissues, especially in prostate cancer. Here, we aimed at radiochemical and stability evaluation of a new bombesin derivative labeled with ^{99m}Tc via HYNIC as a chelating agent and Tricine/EDDA as coligands that might be used for diagnosis of prostate cancer.

Materials and methods: In this experimental study (performed in 2016), the prepared bombesin was added to aqueous solution of Tricine/EDDA, then we added SnCl_2 , which was dissolved in HCl-containing solution. Finally the prepared bombesin was treated in 95 °C for 10 minutes. We investigated radiochemical purity using TLC and HPLC methods. Also, its stability in normal saline and human serum and percentage of protein-binding were studied.

Results: Radiochemical purity was more than 98%. Stability in normal saline was 97.5, 96, and 95.5% after 1, 4, and 24 hours, respectively. Stability in human serum after 1 hour was more than 98% and after 4 hours was more than 92%. Percentage of protein-binding was 12.5, 14, and 16%, after 1, 4, and 24 hours, respectively.

Conclusion: This new bombesin derivative was easily labeled with ^{99m}Tc using exchange labeling and has some promising characteristics for prostate cancer detection.

Keywords: bombesin, prostate cancer, ^{99m}Tc , gastrin releasing peptide

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(144): 367-372 (Persian).

آماده سازی و ارزیابی رادیوشیمیایی HYNIC-[Lys³, Tyr⁴]bombesin (3-14) نشاندار شده با تکنسیوم-۹۹m برای ردیابی سرطان پروستات

حسن قربان تبار عمرانی^۱فرزانه رضازاده^۲نورالله صادق زاده^{۳و۴}

چکیده

سابقه و هدف: بیان بالایی از گیرنده‌های GRP برای بومیزین در چندین بافت بدخیم به ویژه سرطان پروستات گزارش شده است. هدف این مطالعه، ارزیابی رادیوشیمیایی و پایداری مشتقی از بومیزین نشاندار شده با ^{99m}Tc است که می‌تواند برای تشخیص سرطان پروستات مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که در سال ۹۵ در دانشکده داروسازی ساری انجام شد، مشتق بومیزین در محلول کولیگاند ترپسین/EDDA با افزودن کلراید قلع محلول در HCl و قراردادی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، نشان‌دار شد. خلوص رادیوشیمیایی با استفاده از روش‌های TLC و HPLC و پایداری در نرمال سالین، سرم انسانی و میزان اتصال به پروتئین، بررسی گردید.

یافته‌ها: خلوص رادیوشیمیایی بیش از ۹۸ درصد و میزان پایداری در سالین در ساعات ۱، ۴ و ۲۴ به ترتیب ۹۶/۵، ۹۷/۵ و ۹۵/۵ درصد محاسبه شد. میزان پایداری در سرم انسانی پس از ۱ ساعت بیش‌تر از ۹۸ درصد و پس از ۴ ساعت بیش‌تر از ۹۲ درصد به دست آمد. میزان اکتیویته متصل به پروتئین در ساعات ۱، ۴ و ۲۴ به ترتیب ۱۲/۵، ۱۴ و ۱۶ درصد محاسبه گردید.

استنتاج: مشتق جدید بومیزین به آسانی به روش تبدیلی با تکنسیوم-۹۹m نشاندارسازی شد که در نتیجه، بعضی مشخصات نوید بخش برای ردیابی سرطان پروستات را دارد.

واژه های کلیدی: بومیزین، سرطان پروستات، تکنسیوم-۹۹m، گیرنده GRP

مقدمه

سرطان‌های پروستات اولیه و متاستاتیک به میزان بالا بیان می‌شود. در حالی که در بافت پروستات نرمال و در هیپرپلازی پروستات خوش خیم عمدتاً منفی است (۴-۲). تلاش برای طراحی مشتقات بومیزین برای انتخاب

سرطان پروستات شایع‌ترین علت مرگ در بین مردان است. ردیابی زود هنگام سرطان پروستات با رادیوپپتیدها ممکن است میزان درمان را بهبود دهد (۱). بومیزین تمایل بالا به گیرنده‌های GRP دارد. گیرنده‌های GRP در

E-mail: nourollahsadeghzadeh@yahoo.com

مؤلف مسئول: نورالله صادق زاده - ساری: ۱۸ کیلومتر جاده خزرآباد، مجتمع پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی

۱. دانشجوی دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی دکتری تخصصی داروسازی هسته‌ای، دانشکده داروسازی کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استاد یار، گروه داروسازی هسته‌ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۱۳

نشانداز سازی با تکنسیم-^{99m}

به محلول حاصل از ۵۰ میکروگرم HYNIC-[Lys³,Tyr⁴]bombesin (3-14)، ۱۵ میلی گرم تریسین و ۵ میلی گرم EDDA در ۰/۵ میلی لیتر آب، ۴۰ میکروگرم SnCl₂ (۲۰ میکرولیتر از ۲ mg/ml SnCl₂, 2H₂O در 0.1 M HCl) اضافه کردیم. پس از اضافه کردن ۳۷۰-۱۸۵ مگا بکرل پرتکتات سدیم در ۰/۵ میلی لیتر سالین به این محلول، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد.

ارزیابی خلوص رادیوشیمیایی

کروماتوگرافی لایه نازک بر روی نوارهای سیلیکاژل ۶۰ ساخت کارخانه مرک با استفاده از ۳ حلال مختلف: ۲-بوتانول، ۰/۱ مولار سدیم سیترات با pH برابر ۵ و ۵-۲ حلال استونتریل ۵۰ درصد انجام شد. RP-HPLC برای کوئوگه های پپتیدی با سیستم گرادیانی شامل تری فلونورو استیک اسید ۰/۱ درصد در آب (حلال A) و استونتریل (حلال B) سرعت حلال ۱ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد (۷).

پایداری در سرم انسانی

به ۱ میلی لیتر از سرم انسانی، ۱۰۰ میکرولیتر از پپتید نشانداز اضافه شد و بعد از ۱، ۴ و ۲۴ ساعت، انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۱۰۰ میکرولیتر از آن برداشته و ۲۰۰ میکرولیتر اتانول برای رسوب دادن پروتئین های سرم به آن اضافه شد. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی به وسیله فیلتری با منافذ ۰/۲۰ میکرومتر فیلتر شد و با HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت (۷).

پایداری در سالین

به ۱ میلی لیتر نرمال سالین، ۱۰۰ میکرولیتر از پپتید نشان دار اضافه شده و بعد از ۱، ۴ و ۲۴ ساعت، میزان پایداری به وسیله TLC به دست آمد.

بهترین مشتق از جهت حساسیت، اختصاصی بودن و پایداری داخل بدن و کاهش تجمع شکمی در حال انجام و توسعه است. توالی ۷ تا ۱۴ بومیزین برای اتصال اختصاصی با گیرنده GRP نقش اساسی دارد (۵،۳،۱). روش های گوناگونی برای نشانداز سازی مشتقات بومیزین با ^{99m}Tc به کار رفته است که مهم ترین آن استفاده از گروه های شلات کننده دو منظور BFCA (bifunctional chelator agent) از جمله HYNIC می باشد (۳،۱) و از طرفی شلات کننده ها روی خواص درون تنی و برون تنی تاثیر دارند (۶).

در این مطالعه برای افزایش حساسیت، اختصاصی بودن و پایداری بومیزین مشتق HYNIC-[Lys³,Tyr⁴]bombesin (3-14) تهیه کرده و با ^{99m}Tc نشانداز شده است و مورد ارزیابی رادیوشیمیایی و پایداری به عنوان عامل بالقوه جهت ردیابی سرطان پروستات قرار گرفته است.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی که در سال ۹۵ در دانشکده داروسازی ساری انجام شده است، کوئوگه پپتیدی با HYNIC توسط شرکت Peptron در کشور کره سنتز شد و به وسیله RP-HPLC و طیف سنجی جرمی با خلوص بالای ۹۵ درصد مشخص شد. کلیه مواد از شرکن سیگما-آلدریچ و مرک خریداری شده و بدون خالص سازی استفاده شد. سدیم پرتکتات از ژنراتور تهیه شده توسط سازمان انرژی اتمی ایران به دست آمد. اکتیویته توسط دوز کالیبراتور مدل Capintec CRC-127R ساخت کشور آمریکا اندازه گیری شد. ارزیابی رادیوشیمیایی با استفاده از TLC توسط دستگاه Lablogic mini-scan TLC scanner ساخت کشور انگلستان و RP-HPLC مدل Knauer ساخت کشور آلمان مجهز به دتکتور Bioscan, INC مدل B-FC-3200 ساخت کشور آمریکا انجام شد. ستون 250/4.6 Knauer Earospher100 5C18 استفاده شد.

میزان اتصال به پروتئین

به ۱ میلی لیتر سرم انسانی، مقداری از پپتید نشان دار اضافه شده و بعد از زمان های مختلف، انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد و بعد از برداشتن مقداری از سرم و اضافه کردن میزان مناسب اتانول و بعد از سانتریفوژ محلول رویی و رسوب، با استفاده از گاما کانتر، میزان تابش پرتو کانت شد و درصد رادیوپپتید و درصد رادیوایزوتوپ پیوند یافته به آلبومین یا دیگر پروتئین های سرم مشخص گشت.

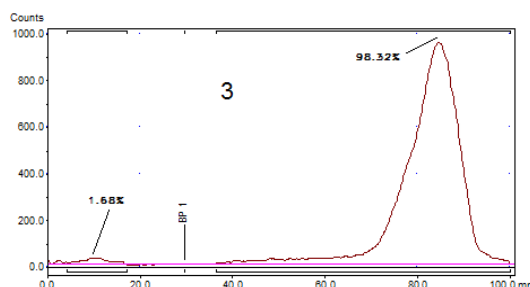
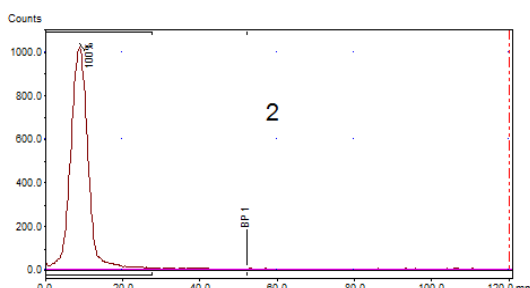
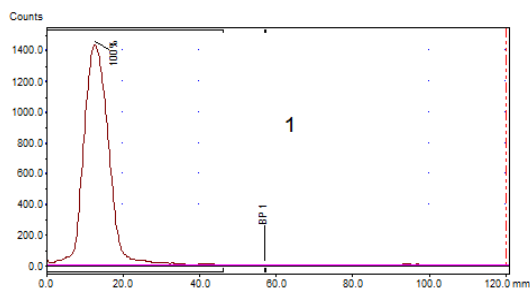
یافته ها و بحث

راندمان رادیو شیمیایی بالای ۹۸ درصد به دست آمد. نتایج در تصویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. راندمان پایداری در سالیان در ۱، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از سه بار تکرار به ترتیب 97.5 ± 0.07 درصد، 96 ± 0.05 درصد و 95 ± 0.07 درصد محاسبه گردید. میزان پایداری در سرم انسانی پس از سه بار تکرار و گرفتن میانگین بعد از ۱ ساعت بالای ۹۸ درصد و در ۴ ساعت بالای ۹۲ درصد گردید. نتایج تعیین میزان درصد اکتیویته متصل شده به پروتئین در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در مطالعه Ferro-Flores که مشتق bombesin نشان دار شده با ^{99m}Tc استفاده شد، خلوص رادیوشیمیایی ۹۵ درصد و پایداری خلوص رادیوشیمیایی در سرم انسانی بعد از ۲۴ ساعت بالای ۹۰ درصد مشاهده شد و اتصال به پروتئین ۲۹ درصد و ۳۴ درصد در ۱ و ۲۴ ساعت به ترتیب گزارش گردید که مورد استفاده بالینی قرار گرفته است (۸). Liolios و همکارانش، مشتقات بومبیزین نشاندار شده با ^{99m}Tc را مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که تصویربرداری سرطان پروستات با مشتقات هیدروفیل بومبیزین با حداقل جذب در بافت کلیه به مشتقات لیپوفیل آن با حفظ جذب اختصاصی و تمایل بالا ترجیح داده می شوند. ضمناً نشان دادند که مشتقات پایدار در سرم انسانی بعد از یک ساعت، بالای ۶۰ درصد بوده که می تواند به علت شکسته شدن در بین ناحیه $\text{His}^{12}\text{-Leu}^3$

باشد (۹). در مطالعه حاضر، خلوص رادیوشیمیایی بالای ۹۸ درصد و پایداری خلوص رادیوشیمیایی در سرم انسانی بعد از ۴ ساعت بالای ۹۲ درصد مشاهده شد؛ هم چنین اتصال به پروتئین به ترتیب ۱۲/۵ درصد و ۱۶ درصد در ۱ و ۲۴ ساعت مشاهده شد که می تواند به دلیل بهینه سازی روش نشاندارسازی و توالی پپتید باشد.

جدول شماره ۱: میزان اتصال اکتیویته جدا شده از ^{99m}Tc -EDDA/tricin/HYNIC-[Lys³-Tyr⁴]BB (3-14) به پروتئین

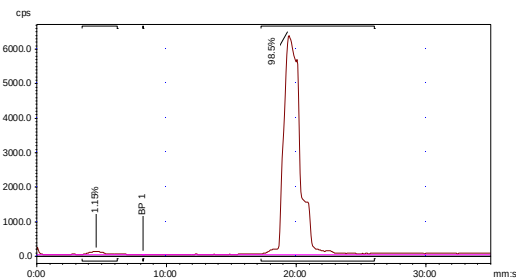
اتصال به پروتئین (درصد)	زمان (ساعت)
12.5 ± 1.5	۱
14 ± 0.7	۴
16 ± 1.1	۲۴



تصویر شماره ۱: نمایش TLC از ^{99m}Tc -EDDA/tricin/HYNIC-[Lys³-Tyr⁴]BB (3-14) برای تعیین پرتکنتات آزاد با ۲-بوتانول (۱)، تکنسیوم کولیکاند آزاد با سدیم سیرتات ۰/۱ مولار با pH برابر ۵ (۲) و تکنسیوم کلونید با استونتریل ۵۰ درصد (۳)

بالا در سالیان بالای ۹۵ درصد و در سرم انسانی بعد از ۴ ساعت بالای ۹۲ درصد به دست آمد. اکتیویته متصل مانده به پپتید در سرم انسانی بعد از ۲۴ ساعت ۸۶ درصد به دست آمد که در مطالعه قبلی میزان اکتیویته متصل مانده به پپتیدها در سرم انسانی بعد از ۲۴ ساعت، کم تر از ۵۶ درصد گزارش شد (۷) که دلیل آن می تواند جایگزینی دو EDDA به جای دو تریسین باشد (۱۰).

نتیجه گیری این که HYNIC-^{99m}Tc bombesin (3-14) [Lys³, Tyr⁴] نشاندار شده با ^{99m}Tc، بعضی مشخصات نویدبخش برای ردیابی سرطان پروستات را دارد و جهت تکمیل مطالعه، ارزیابی سلولی و درون تنی ضروری است که در حال انجام می باشد.



تصویر شماره ۲: نمایش کروماتوگراف RP-HPLC کونژوگه پپتیدی نشاندار [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-[Lys³-Tyr⁴]BB (3-14)]

در مطالعه قبلی نشان داده شد که دو مشتق جدید بومبیزین نشان دار شده، پایداری بالا در سالیان بالای ۹۰ درصد بعد از ۲۴ ساعت و در سرم انسانی بالای ۹۲ درصد بعد از ۴ ساعت داشته اند (۷). در این مطالعه هم پایداری

References

- Schroeder RP, van Weerden WM, Bangma C, Krenning EP, de Jong M. Peptide receptor imaging of prostate cancer with radiolabelled bombesin analogues (Review). *Methods* 2009; 48(2): 200-204.
- Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 2003; 24(4): 389-427.
- Faintuch BL, Teodoro R, Duatti A, Muramoto E, Faintuch S, Smith CJ. Radiolabeled bombesin analogs for prostate cancer diagnosis: preclinical studies. *Nucl Med Biol*. 2008; 35(4): 401-411.
- Okarvi SM. Peptide-Based Radiopharmaceuticals: FutureTools for Diagnostic Imaging of Cancers and Other Diseases. *Med Res Rev* 2004; 24(3): 357-397.
- Nanda PK, Pandey U, Bottenus BN, Rold TL, Sieckman GL, Szczodroski AF. Bombesin analogues for gastrin-releasing peptide receptor imaging. *Nucl Med Biol* 2012; 39(4): 461-471.
- Decristoforo C, Mather SJ. The influence of chelator on the pharmacokinetics of ^{99m}Tc-labelled peptides (Review). *Q J Nucl Med* 2002; 46(3): 195-205.
- Sadeghzadeh N, Pishsaraie H, Ghasemi Y, Emranian I. Radiochemical Evaluation of New ^{99m}Tc-labelled Bombesin Derivatives with Tripeptidic (Ser-Ser-Ser) and (Gly-Gly-Gly) Spacer for Targeting GRP Receptor Positive-tumors. *J Mazaran Univ Med Sci* 2015; 25(129): 70-80.
- Ferro-Flores G, Arteaga de Murphy C, Rodriguez-Cortes J, Pedraza-Lopez M, Ramirez-Iglesias MT. Preparation and evaluation of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-[Lys3]-bombesin for imaging gastrin-releasing peptide receptor-positive tumours. *Nucl Med Commun* 2006; 27(4): 371-376.
- Liolios CC, Fragogeorgi E a, Zikos C, Loudos G, Xanthopoulos S, Bouziotis P, et al. Structural modifications of ^{99m}Tc-labelled bombesin-like peptides for optimizing

- pharmacokinetics in prostate tumor targeting. Int J Pharm 2012; 430(1-2): 1-17.
10. King R, Surfraz MB, Finucane C, Biagini SC, Blower PJ, Mather SJ. 99mTc-HYNIC-gastrin peptides: Assisted coordination of 99mTc by amino acid side chains results in improved performance both in vitro and invivo. J Nucle Med 2009; 50(4): 591-598.