Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:31 +0430 on Friday March 23rd 2018

BRIEF REPORT

Preparation and Radiochemical Evaluation of ^{99m}Tc-HYNIC-[Lys^3,Tyr^4] bombesin (3-14) for Prostate Cancer Detection

Hassan Ghorbantabar Omrani[1],
Farzaneh Rezazadeh[2],
Nourollah 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 raiochemical 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 salin 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).

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۴ دی سال ۱۳۹۵ (۳۷۲-۳۶۷)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:31 +0430 on Friday March 23rd 2018

آماده سازی و ارزیابی رادیوشیمیایی HYNIC-[Lys^3,Tyr^4]bombesin (3-14) نشاندار شده با تکنسیوم- ۹۹m برای ردیابی سرطان پروستات

حسن قربان تبار عمرانی[۱]
فرزانه رضازاده[۲]
نورالله صادق زاده[۳و۴]

چکیده

سابقه و هدف: بیان بالایی از گیرنده‌های GRP برای بومبزین در چندین بافت بدخیم به ویژه سرطان پروستات گزارش شده است. هدف این مطالعه، ارزیابی رادیوشیمیایی و پایداری مشتقی از بومبزین نشاندارشده 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 بومبزین در محلول کولیگاند تریسین/EDDA با افزودن کلراید قلع محلول در HCl و قراردهی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد 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 ۹۷/۵، ۹۶ 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 و۲۴ به ترتیب ۱۲/۵، ۱۴ و۱۶ درصد محاسبه گردید.

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

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

مقدمه

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

مولف مسئول: نورالله صادق زاده– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی E-mail:nourollahsadeghzadeh@yahoo.com
۱. دانشجو دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجوئی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجو دکتری تخصصی داروسازی هسته ای، دانشکده داروسازی کمیته تحقیقات دانشجوئی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استاد یار، گروه داروسازی هسته ای، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. مرکز تحقیقات علوم داروئی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۶/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۶/۱۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۹/۱۳

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:31 +0430 on Friday March 23rd 2018

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 بومبزین برای اتصال اختصاصی با گیرنده GRP نقش اساسی دارد(۵،۳،۱). روش‌های گوناگونی برای نشاندار سازی مشتقات بومبزین با ^{99m}Tc به کار رفته است که مهم‌ترین آن استفاده از گروه‌های شلات‌کننده دو منظور BFCA (bifuctinalchelator agent) ازجمله HYNIC می‌باشد(۳،۱) و از طرفی شلات کننده‌ها روی خواص درون تنی و برون تنی تاثیر دارند(۶).

در این مطالعه برای افزایش حساسیت، اختصاصی بودن و پایداری بومبزین مشتق HYNIC-[Lys^3,Tyr^4]bombesin (3-14) تهیه کرده و با ^{99m}Tc نشاندار 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، کونژوگه 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 خالص‌سازی استفاده شد. سدیم پر تکنتات از ژنراتور تهیه شده توسط سازمان انرژی اتمی ایران به دست آمد. اکتیویته توسط دوز کالیبراتور مدل Capintec CRC-127R ساخت کشور آمریکا اندازه‌گیری 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.

نشاندار سازی با تکنسیم-۹۹m

به محلول حاصل از ۵۰ میکروگرم HYNIC-[Lys^3,Tyr^4]bombesin (3-14)، ۱۵ میلی‌گرم تریسین و ۵ میلی‌گرم EDDA در ۰/۵ میلی‌لیتر آب، ۴۰ میکروگرم $SnCl_2$ (۲۰ میکرولیتر از 2 mg/ml $SnCl_2$, $2H_2O$ در 0.1 M HCl) اضافه کردیم. پس از اضافه کردن ۳۷۰-۱۸۵ مگا بکرل پرتکنتات سدیم در ۰/۵ میلی لیترسالین به این محلول، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد.

ارزیابی خلوص رادیوشیمیایی

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

پایداری در سرم انسانی

به ۱ میلی‌لیتر از سرم انسانی، ۱۰۰ میکرولیتر از پپتید نشاندار اضافه شد و بعد از ۱، ۴ و ۲۴ ساعت، انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ میکرولیتر از آن برداشته و ۲۰۰ میکرولیتر اتانول برای رسوب دادن پروتئین‌های 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.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:31 +0430 on Friday March 23rd 2018

میزان اتصال به پروتئین

به ۱ میلی‌لیتر سرم انسانی، مقداری از پپتید نشان‌دار اضافه شده و بعد از زمان‌های مختلف، انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 پروتئین‌های سرم مشخص گشت.

یافته ها و بحث

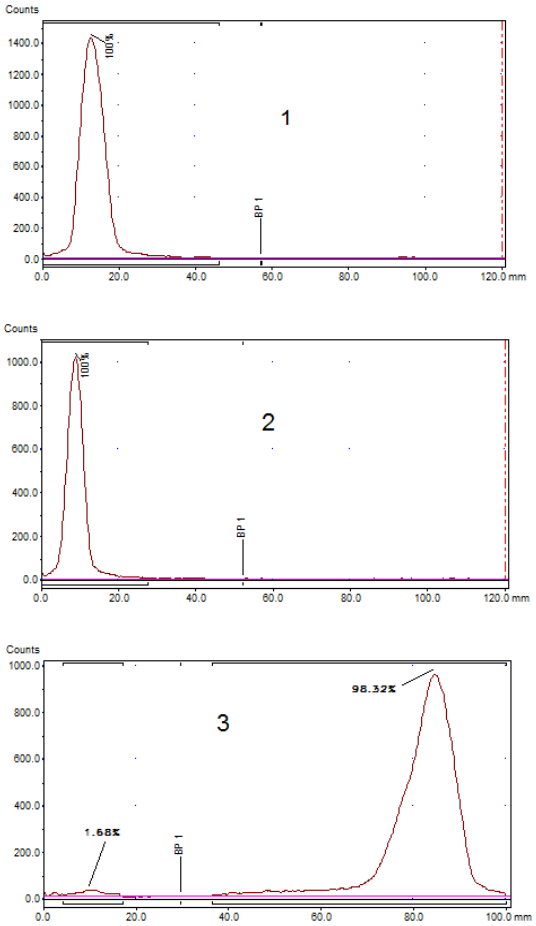
راندمان رادیو شیمیایی بالای ۹۸ درصد به دست آمد. نتایج در تصویر شماره ۱ و۲ نشان داده شده است. راندمان پایداری در سالین در ۱، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از سه بار تکرار به ترتیب ۰/۰۰۷ ± ۹۷/۵ درصد، ۰/۰۰۵ ± ۹۶ درصد و ۰/۰۰۷± ۹۵ درصد محاسبه گردید. میزان پایداری در سرم انسانی پس از سه بار تکرار و گرفتن میانگین بعد از 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 نشان‌دار 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 به‌پروتئین ۲۹ درصد و۳۴ درصد در ۱ و۲۴ ساعت به ترتیب گزارش گردید که مورد استفاده بالینی قرار گرفته است(۸).

Liolios و همکارانش، مشتقات بومبزین نشاندار شده با ^{99m}Tc را مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که تصویربرداری سرطان پروستات با مشتقات هیدروفیل بومبزین با حداقل جذب در بافت کلیه به مشتقات لیپوفیل آن با حفظ جذب اختصاصی و تمایل بالا ترجیح داده می‌شوند. ضمناً نشان دادند که مشتقات پایدار در سرم انسانی بعد از یک ساعت، بالای ۶۰ درصد بوده که می‌تواند به علت شکسته شدن در بین ناحیه His^{12}-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؛ هم‌چنین اتصال به پروتئین به ترتیب ۱۲/۵ درصد و ۱۶ درصد در ۱ و ۲۴ ساعت مشاهده شد که می‌تواند به دلیل بهینه‌سازی روش نشاندارسازی و توالی پپتید باشد.

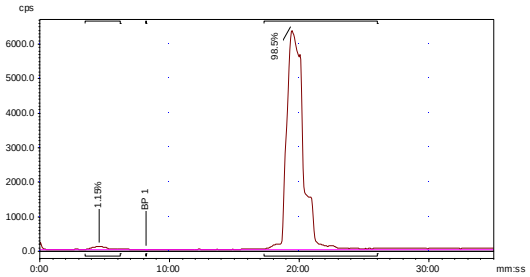
جدول شماره ۱: میزان اتصال اکتیویته جدا شده از [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-[Lys^{3}-Tyr^{4}]BB (3-14) به پروتئین

اتصال به پروتئین (درصد)	زمان (ساعت)
۱۲/۵± ۱/۵	۱
۱۴±۰/۷	۴
۱۶± ۱/۱	۲۴



تصویر شماره ۱: نمایش TLC از [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-[Lys^{3}-Tyr^{4}]BB (3-14) برای تعیین پرتکنتات آزاد با ۲-بوتانون (۱)، تکنسیوم کولیکاند آزاد با سدیم سیترات ۰/۱ مولار با pH برابر ۵ (۲) و تکنسیوم کلوئید با استونیتریل ۵۰ درصد(۳)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:31 +0430 on Friday March 23rd 2018



تصویر شماره ۲: نمایش کروماتوگراف RP-HPLC کونژوگه پپتیدی نشاندار [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-[Lys^3-Tyr^4]BB (3-14)

در مطالعه قبلی نشان داده شد که دو مشتق جدید بومبزین نشان‌دار شده، پایداری بالا در سالین بالای ۹۰ درصد بعد از ۲۴ ساعت و در سرم انسانی بالای ۹۲ درصد بعد از ۴ ساعت داشته‌اند(۷). در این مطالعه هم پایداری بالا در سالین 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، کم‌تر از ۵۶ درصد گزارش شد(۷) که دلیل آن می‌تواند جایگزینی دو EDDA به جای دو تریسین باشد(۱۰).

نتیجه گیری این که HYNIC-[Lys^3,Tyr^4]bombesin (3-14) 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 می‌باشد.

References

1. 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.
2. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. Endocr Rev 2003; 24(4): 389-427.
3. 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.
4. Okarvi SM. Peptide-Based Radiopharmaceuticals: FutureTools for Diagnostic Imaging of Cancers and Other Diseases. Med Res Rev 2004; 24(3): 357-397.
5. 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.
6. 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.
7. Sadeghzadeh N, Pishsaraie H, Ghasemi Y, Emranian I. Radiochemical Evaluation of New 99mTc-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.
8. Ferro-Flores G, Arteaga de Murphy C, Rodrguez-Cortes J, Pedraza-Lopez M, Ramrez-Iglesias MT. Preparation and evaluation of 99mTc-EDDA/HYNIC-[Lys3]-bombesin for imaging gastrin-releasing peptide receptor-positive tumours. Nucl Med Commun 2006; 27(4): 371-376.
9. Liolios CC, Fragogeorgi E a, Zikos C, Loudos G, Xanthopoulos S, Bouziotis P, et al. Structural modifications of ^{99}mTc-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.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:31 +0430 on Friday March 23rd 2018