ORIGINAL ARTICLE

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

Nourollah Sadeghzadeh[1],
Hadi Pishsaraie[2],
Yaser Ghasemi[3],
Iman Emrarian[4]

[1] Assistant Professor, Department of Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Pharmacy Student, Pardis unit Ramsar, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran
[4] PhD Student in Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 13, 2015 Accepted August 24, 2015)

Abstract

Background and purpose: Bombesin shows very high-affinity for the Gasterin releasing peptide (GRP) receptors which are over expressed in different human tumors such as breast and prostate. The aim of this study was to identify a new bombesin derivative labeled with ^{99m}Tc via HYNIC that might be used as a noninvasive tool for diagnosis of GRP receptor expressing tumors.

Materials and methods: Prepared bombein derivatives were radiolabeled with ^{99m}Tc at 100 °C for 10 min by exchange method and radiochemical analysis was performed using ITLC and HPLC methods. The stability of radiopeptide was checked in the presence of human serum at 37 °C and saline for up to 24 h.

Results: [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-(Ser)$_3$-D-Phe^{13}]BN(7-14) and [^{99m}Tc-EDDA/tricin/ HYNIC-(Gly)$_3$-D-Phe^{13}]BN (7-14) were obtained with radiochemical purities of >95%. Results of in-vitro studies demonstrated a high stability in serum and saline.

Conclusion: Radiolabeling of this novel conjugates with ^{99m}Tc were easily performed using exchange labeling. The prepared ^{99m}Tc-HYNIC-BN conjugates demonstrated some potential as site-directed diagnostic radiopharmaceuticals. Therefore, more in vivo studies are required.

Keywords: ^{99m}Tc, GRP, Bombesin, radiopeptide, tumor, HYNIC

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(129): 70-80 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۹ مهر سال ۱۳۹۴ (۸۰-۷۰)

ارزیابی رادیوشیمیایی مشتقات جدید از بومبزین نشاندار شده با تکنسیم-۹۹m با فضادهنده تری سرین و تری گلایسین برای هدف قرار دادن تومورهای دارای گیرنده GRP

نورالله صادق زاده[۱]
هادی پیش سرایی[۲]
یاسر قاسمی[۳]
ایمان امراریان[۴]

چکیده

سابقه و هدف: بومبزین تمایل بسیار زیادی به گیرنده‌های GRP نشان می‌دهد که در تومورهای انسانی مختلف از قبیل پروستات و سینه به میزان بالا بیان می‌شود. هدف از این مطالعه شناسایی مشتق جدیدی از بومبزین نشاندار با ^{99m}Tc از طریق HYNIC می‌باشد که ممکن است به عنوان ابزار غیرتهاجمی برای تشخیص تومورهای بیان کننده GRP استفاده شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، مشتقات بومبزین آماده شده با ^{99m}Tc در ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه به روش تبادلی نشان دار شد و آنالیز رادیوشیمیایی به وسیله TLC و HPLC انجام شد. پایداری رادیوپپتید در حضور سرم انسانی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سالین تا ۲۴ ساعت بررسی شد.

یافته‌ها: [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-(Ser)$_3$-D-Phe^{13}]BN (7-14) و [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-(Gly)$_3$-D-Phe^{13}]BN (7-14) با خلوص رادیوشیمیایی بالای ۹۵ درصد به دست آمد. نتایج از مطالعه برون تنی، پایداری بالا در سرم انسانی و سالین را نشان دادند.

استنتاج: نشاندارسازی کونژوگه های جدید با ^{99m}Tc به آسانی با استفاده از روش نشاندار سازی تبادلی انجام شد. کونژوگه‌های پپتیدی نشاندار با ^{99m}Tc برخی پتانسیل‌های رادیوداروهای تشخیصی را دارند و مطالعات درون تنی ضروری است.

واژه های کلیدی: ^{99m}Tc، GRP، بومبزین، رادیوپپتید، تومور، HYNIC

مقدمه

نشاندارسازی پپتیدها به دلیل کاربردشان در توسعه رادیوداروهای هدفمند مورد توجه زیادی می‌باشد. گیرنده‌های پپتیدی در انواعی از سلول‌های سرطانی انسانی با پتانسیل مولکول هدف بیان می‌شود. نشاندارسازی پپتیدها با رادیوایزوتوپ‌های مناسب می‌تواند برای تشخیص زودهنگام از طریق تصویربرداری و درمان تومورها استفاده شوند. یکی از مهم‌ترین پپتیدهای امیدبخش برای تصویربرداری و درمان تومورها، بومبزین (BN)

مولف مسئول: نورالله صادق زاده– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail:nourollahsadeghzadeh
۱. استادیار، گروه داروسازی هسته ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکتری داروسازی، واحد پردیس خودگردان رامسر، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران
۴. دانشجوی دکتری تخصصی داروسازی هسته ای، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۴/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۵/۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۶/۲

است. بومبزین تمایل بالا به گیرنده‌های GRP (Gastrin-releasing peptide) دارد. گیرنده‌های GRP در سرطان‌های انسانی هم‌چون پروستات، سینه و ریه به میزان بالا بیان می‌شود(۷-۱). بومبزین پایداری پایین در شرایط درون تنی (in vivo) و تجمع در ناحیه شکم دارد و از طرفی دفع از ناحیه کبدی- صفراوی دارد. به همین دلیل تلاش‌های زیادی برای طراحی و توسعه مشتقات بومبزین جهت افزایش پایداری با بهبود هدف قرار دادن تومور و ویژگی‌های فارماکوکنتیک مناسب انجام شده است. بهینه‌سازی با شلات‌کننده‌ها مختلف، معرفی و جایگزینی اسیدهای آمینه و استفاده از اتصال‌دهنده یا فضادهنده انجام می‌شود. همه این عوامل روی اتصال به گیرنده GRP و خواص فارماکوکنتیک موثر می‌باشند، بنابراین مشتقات جدیدی از بومبزین ممکن است نسبت به بومبزین برتری داشته باشند. تاکنون کارهای انجام شده نتوانسته مشتق جدیدی از بومبزین معرفی کند که هم اتصال به گیرنده GRP مناسب و هم دفع کلیوی مناسب داشته باشد، بنابراین مشتقات جدیدی از بومبزین ممکن است نسبت به بومبزین و مشتقات قبلی برتری داشته باشند(۵-۲،۸،۹). آزمایشات پری‌کلینکال و کلینکال برای چندین پپتید نشاندار شده با ^{99m}Tc، جهت شناسایی سرطان انجام شدند. ^{99m}Tc به دلیل انرژی (140 kev) و نیمه عمر شش ساعته، دسترسی آسان از طریق سیستم ژنراتور ^{99}MO/^{99m}Tc و ویژگی‌های رادیوشیمیایی برای نشاندارسازی مولکول‌هایی که تومور را هدف قرار می‌دهند، از جمله مشتقات بومبزین مناسب می‌باشد(۱۵-۱۰). روش‌های گوناگونی برای نشاندار سازی مشتقات بومبزین با ^{99m}Tc به کار رفته است که مهم‌ترین آن استفاده از گروه‌های شلات کننده دو منظوره BFCA (Bifuctinal chelator agent) از جمله HYNIC، DOTA و DTPA با یا بدون حضور فضادهنده یا اتصال‌دهنده می‌باشد. علاقه قابل توجهی برای تحقیق در مورد کونژوگه‌های جدید برای توسعه پایداری درون تنی رادیوداروهای پپتیدی با ^{99m}Tc وجود دارد و HYNIC به عنوان لیگاند شلات‌کننده دو منظوره در طراحی و توسعه رادیودارو مورد توجه زیاد می‌باشد(۷،۱۰،۱۱،۱۸-۱۴). از میان مشتقات بومبزین مطالعه شده می توان با توجه به ساختار، دو نوع تقسیم بندی انجام داد. اول مشتقاتی هستند که اسید آمینه موقعیت ۷ تا ۱۴را دارند(۱۴-۷) BN، دوم مشتقات بومبزین(۱۴-۱) BN هستند(۲۰-۱۷). به طور کلی استفاده از فضادهنده یکی از مهم‌ترین طرح‌های پیشنهادی برای طراحی مشتقات جدید بومبزین می‌باشد. فضادهنده از امکان اثر بخش نشاندار شده ^{99m}Tc-BFCA به ناحیه فعال بیولوژیکی جلوگیری کرده و مانع خرابی ناحیه بیولوژیکی می‌شود. علاوه بر این فضادهنده می‌تواند به عنوان اصلاح کننده خواص فارماکوکنتیک از بیومولکول شود. انواعی از فضادهنده‌ها شامل اسیدهای آمینه استفاده شده است تا بتوانند تجمع رادیواکتیو در ناحیه شکم را کاهش دهند و مسیر دفع را کلیوی کنند. تجمع اکتیویته در ناحیه شکم به خاطر عوارض جانبی برای بیمار و کاهش نسبت اکتیویته تومور به زمینه، استفاده بالینی از رادیوپپتید را دچار مشکل می کند(۹،۸،۵،۱۸-۱۴،۲۲،۲۱).

^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-(Lys^3)-bombesin برای هدف قراردادن تومورهای دارای گیرنده GRP در مدل حیوانی و انسانی مطالعه شد(۲۴،۲۳). با جایگزینی D-Phe در موقعیت سیزده به جای لوسین می‌تواند موجب بهبود تمایل و کاهش متابویسم آنزیمی گردد(۲۵) و از طرفی دو اسید آمینه سرین $(Ser)_3$ و گلایسین $(Gly)_3$ با توجه به حلالیت خوب در آب و یونی نبودن و تاثیر آن در عدم جذب توبولی به عنوان فضادهنده، می‌تواند موجب بهبود تمایل و ویژگی‌های فارماکوکنیک شود(۸،۵). هدف از این مطالعه آماده‌سازی و ارزیابی رادیوشیمیایی و پایداری مشتق جدیدی از بومبزین(۱۴-۷) کونژوگه شده با ۶- هیدارزینو پیریدین-۳- کربوکسیلیک اسید (HYNIC) نشاندار شده با تکنسیم-۹۹m: [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-$(Ser)_3$-D-Phe^{13}]BN (7-14) و [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-$(Gly)_3$-D-Phe^{13}]BN (7-14) بود.

مواد و روش ها

مواد و دستگاه

کونژوگه‌های پپتیدی با HYNIC طراحی شده، توسط شرکت Peptron در کشور کره سنتز شد و به وسیله RP-HPLC و طیف سنجی جرمی با خلوص بالای ۹۵ درصد مشخص شد. مواد شیمیایی شامل تریسین، اتیلن دی آمینو دی‌استیک اسید (EDDA)، تری‌فلوئورواستیک اسید از شرکت Fluka و ۲- بوتانون، سدیم سیترات، آمونیوم استات، متانول، استونیتریل و کلر و قلع از شرکت Merk تهیه شد. سدیم پرتکنتات از ژنراتور تهیه شده توسط سازمان انرژی اتمی ایران به‌دست 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 ۴۰ میکروگرم $[HYNIC\text{-}(Ser)_3\text{-}D\text{-}Phe^{13}]BN(7\text{-}14)$ با نام اختصاری BNFS3 و $[HYNIC\text{-}(Gly)_3\text{-}D\text{-}Phe^{13}]BN\ (7\text{-}14)$ با نام اختصاری BNFG3، ۱۵میلی‌گرم 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 میلی‌لیترسالین به این محلول، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد.

ارزیابی خلوص رادیوشیمیایی

کروماتوگرافی لایه نازک بر روی نوارهای سیلیکاژل ۶۰ ساخت کارخانه مرک و با ابعاد ۱۰× ۱/۵ سانتی‌متر مربع و با استفاده از ۳ حلال مختلف برای BNFS3 و BNFG3 نشاندار انجام شد. برای تعیین میزان پرتکنتات آزاد ($^{99m}TcO4^-$) از حلال ۲- بوتانون استفاده شد که پرتکنتات آزاد در این حلال دارای Rf برابر ۱ بوده و پپتید نشان دار، تکنسیوم کلوئید ($^{99m}TcO_2$) و تکنسیوم کولیگاند آزاد همگی دارای Rf برابر صفر هستند. جهت تعیین پرتکنتات آزاد همراه با تکنسیوم کولیگاند آزاد که به پپتید باند نشده است، از حلال ۰/۱ مولار سدیم سیترات با pH برابر ۵ استفاده گردید که پپتید نشان دار و تکنسیوم کلوئید دارای Rf برابر صفر و پرتکنتات آزاد همراه با تکنسیوم کولیگاند آزاد دارای Rf برابر ۱ می‌باشند. برای تعیین میزان تکنسیوم کلوئید ایجاد شده از حلال متانل و آمونیوم استات ۱ مولار به نسبت ۱ به ۱ استفاده شد که دراین حلال تکنسیوم کلوئید دارای Rf برابر صفر و پپتید نشاندار، پرتکنتات آزاد و تکنسیوم کولیگاند باند نشده به پپتید همگی دارای Rf برابر ۱ می‌باشند، اما در مورد BNFG3 نشاندار، برای تعیین میزان تکنسیوم کلوئید ایجاد شده از حلال استونتریل ۵۰ درصد با آب با Rf برابر صفر به جای حلال متانل و آمونیوم استات ۱ مولار استفاده شد. رادیواکتیویته توسط TLC scanner اندازه‌گیری شد. کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (RP-HPLC) برای کونژوگه‌های پپتیدی با سیستم گرادیانی شامل تری‌فلوئورو استیک اسید ۰/۱ درصد در آب (حلال A) و استونیتریل (حلال B)، سرعت حلال ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و برنامه گرادیانی صفر دقیقه ۹۵ درصد A (۵ درصد B)، ۵ دقیقه ۹۵ درصد A (۵ درصد B)، ۱۵ دقیقه ۹۵ درصد A (۵ درصد B)، ۲۰ دقیقه ۵ درصد A (۹۵ درصد B)، ۲۵ دقیقه ۵ درصد A (۹۵ درصد B) استفاده شد.

پایداری در سرم انسانی

به ۱ میلی‌لیتر از سرم انسانی، ۱۰۰ میکرولیتر از پپتید

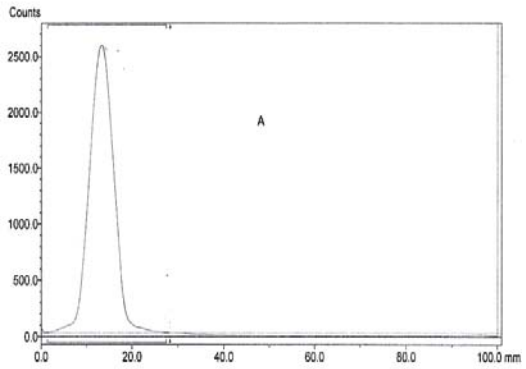
نشاندار شده با تکنسیوم اضافه شد و بعد از ۱ و ۴ و ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ میکرولیتر از آن برداشته و ۲۰۰ میکرولیتر اتانول برای رسوب دادن پروتئین‌های سرم به آن اضافه شد. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی به وسیله فیلتری با منافذ ۰/۲۰ میکرومتر فیلتر شد و با HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت(۲۶).

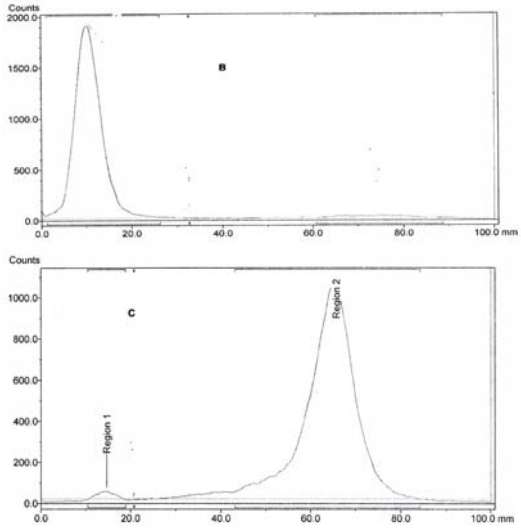
پایداری در سالین

به ۱ میلی‌لیتر نرمال سالین، ۱۰۰ میکرولیتر از پپتید نشاندار شده با تکنسیوم اضافه شده و بعد از ۱، ۴ و ۲۴ ساعت، میزان پایداری به وسیله TLC به دست آمد.

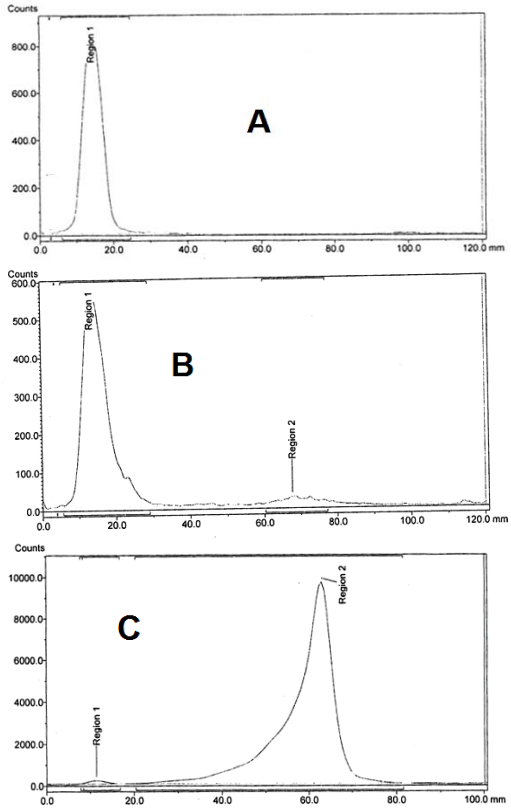
یافته ها

راندمان رادیوشیمیایی کونژوگه‌های پپتیدی BNFS3 و BNFG3 با تکنسیم-۹۹m تحت شرایط توصیف شده، بالای ۹۵ درصد به دست آمد. حضور تکنسیوم کولیگاند آزاد، تکنسیوم کلوئید و پرتکنتات آزاد به وسیله TLC ارزیابی شد و در تصویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است و نتایج در جدول شماره ۱ قابل مشاهده است. تفاوت خیلی کمی در مقدار تکنسیوم کولیگاندآزاد، تکنسیوم کلوئید، پرتکنتات آزاد و کونژوگه‌های نشاندار شده با لیگاند کمکی تریسین/ EDDA مشاهده شد. اما در مورد BNFS3 تکنسیوم کولیگاندآزاد کم‌تر ولی تکنسیوم کلوئید بیش‌تر مشاهده شد.





تصویر شماره ۱: نمایش TLC از[^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-(Ser)$_3$-D-Phe^{13}]BN(7-14) برای تعیین پرتکنتات آزاد با ۲-بوتانون (A)، تکنسیوم کولیکاندآزاد با سدیم سیترات ۰/۱ مولار با pH برابر ۵ (B) و تکنسیوم کلوئید با متانول و آمونیوم استات ۱ مولار به نسبت ۱ به ۱(C)



تصویر شماره ۲: نمایش TLC [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-(Gly)$_3$-D-Phe^{13}]BN (7-14) برای تعیین پرتکنتات آزاد با ۲-بوتانون (A)، تکنسیوم کولیکاندآزاد با سدیم سیترات ۰/۱ مولار با pH برابر ۵ (B) و تکنسیوم کلوئید با استونتیریل ۵۰ درصد (C)

جدول شماره ۱: ارزیابی خلوص رادیوشیمیایی کونژوگه های پپتیدی با تکنسیم-۹۹m با لیگاند کمکی تریسین/EDDA

پپتید نشاندار	تکنسیوم کولیکاند آزاد	تکنسیوم کلوئید	پرتکنتات آزاد	نام کونژوگه پپتیدی
۹۶/۳۴ +۰/۴	۲/۳۷ +۰/۳	۱/۲۹ +۰/۱	دیده نشد	BNFS3
۹۵/۰۲ +۰/۲۶	۴/۲۵ +۰/۲	۰/۷۳ +۰/۰۶	دیده نشد	BNFG3

به منظور بهینه‌سازی راندمان رادیوشیمیایی لیگاند، غلظت مختلف در محدوده ۱۰ تا ۵۰ میکروگرم و ۱۲۰ میکروگرم و کلرید قلع در محدوده ۲۰ تا ۸۰ میکروگرم و تریسین EDDA با نسبت ۳ به ۱ و ۴ به ۱ با غلظت تریسین در محدود ۰/۱ تا ۲۰ میلی‌گرم، طبق پروتکل نشاندارسازی استفاده شد و نتایج در جدول شماره ۲، ۳ و ۴ قابل مشاهده است. در این تحقیق راندمان نشاندارسازی، زمانی که کونژوگه به میزان ۴۰ و ۵۰ میکروگرم استفاده شد، تفاوتی وجود نداشت. علاوه بر این غلظت بالای ۴۰ میکروگرم راندمان نشاندارسازی، کاهش نشان داد.

جدول شماره ۲: اثر کونژوگه پپتیدی روی راندامان نشاندارسازی

خلوص رادیوشیمیایی	کونژوگه پپتیدی(میکرو گرم)
۹۰ درصد<	۱۰
۹۰ درصد<	۲۰
۹۵ درصد<	۴۰
۹۲ درصد<	۵۰
۹۰ درصد <	۱۲۰

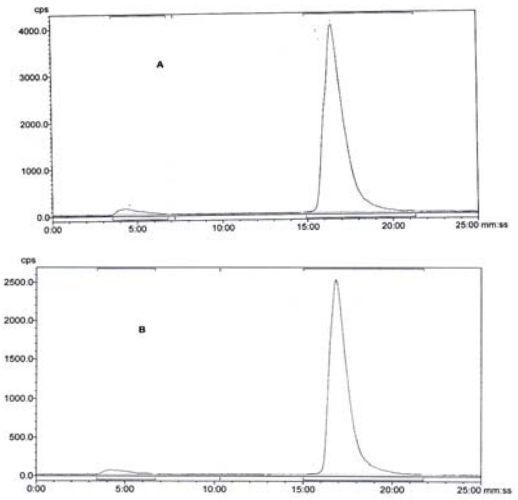
جدول شماره ۳: اثر کولیگاند EDDA/تریسین روی راندامان نشاندار سازی

خلوص رادیوشیمیایی	EDDA/تریسین(میلی گرم)
۹۰ درصد<	۰/۰۳ به ۰/۱
۹۰ درصد<	۰/۱۷ به ۰/۵
۹۰ درصد<	۰/۳۳ به ۱
۹۰ درصد<	۱/۳۳ به ۴
۹۵ درصد<	۵ به ۱۵

جدول شماره ۴: اثر کلرید قلع روی راندامان نشاندار سازی

خلوص رادیوشیمیایی	کلرید قلع (میکروگرم)
۹۰ درصد<	۲۰
۹۰ درصد<	۳۰
۹۵ درصد<	۴۰
۹۲ درصد<	۶۰
۹۰ درصد <	۸۰

خلوص رادیوشیمیایی کونژوگه‌های جدید، هم چنین به وسیله RP-HPLC ارزیابی شد. کروماتوگراف برای کونژوگه‌های پپتیدی تولید شده از طریق جایگزینی EDDA به جای تریسین در تصویر شماره ۳ نشان داده شد.



تصویر شماره۳: نمایش کروماتوگراف RP-HPLC کونژوگه پپتیدی نشاندار A و B: [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNI C-(Ser)$_3$-D-Phe^{13}]BN (7-14)B: [^{99m}Tc-EDDA/tricin/HYNIC-(Gly)$_3$-D-Phe^{13}]BN (7-14)

کروماتوگرام‌ها یک پیک اصلی برای ^{99m}Tc-BNFS3 و ^{99m}Tc-BNFG3 به ترتیب با زمان بازداری ۱۶/۲۸ و ۱۶/۴۸ دقیقه نشان می‌دهد. کونژوگه‌های پپتیدی نشاندار، پایداری برون تنی خیلی خوبی داشتند. برای مثال راندمان پایداری در سالین برای هر دو کونژوگه پپتیدی نشاندار در ۲۴ ساعت بالای ۹۰ درصد بود. کونژوگه‌های ^{99m}Tc-BNFS3 و ^{99m}Tc-BNFG3 در سرم انسانی بعد از ۴ ساعت پایدار بودند که راندمان کمپلکس دست نخورده به ترتیب ۹۲/۳۰ و ۹۶/۴۲ درصد بود. میزان اکتیویته متصل مانده به پپتید در زمان‌های ۱، ۴ و ۲۴ ساعت در سرم انسانی برای ^{99m}Tc-BNFS3 به ترتیب ۶۲، ۶۰ و ۵۵/۴ و برای ^{99m}Tc-BNFG3 به ترتیب ۶۷، ۶۱ و ۵۲ درصد به دست آمد.

بحث

طراحی و توسعه رادیوداروهای پپتیدی برای

تشخیص زودهنگام سرطان انسانی چندین دهه است که تحقیق می‌شود. گیرنده‌های GRP، هدف امیدوارکننده‌ای برای مشتقات نشاندار شده بومبزین هستند. طراحی و توسعه سیستم لیگاند اختصاصی که به آسانی به یک عامل هدفمند کونژوگه گردد و در راندمان بالا و زمان کوتاه با ^{99m}Tc نشاندار شود، در حال تحقیق می‌باشد. علاوه بر این ضروری است که رادیونوکلئید در کمپلکس نشاندار تحت شرایط درون تنی در حضور پروتئین خون مانند ترانسفرین پایدار باشد(۲۷). پپتیدهای کوچک با توجه به خصوصیات ذاتی از قبیل وزن مولکولی کم، حذف خونی سریع و نسبت تومور به زمینه بالا در زمان‌های کوتاه دارند اما مشکل اصلی در استفاده از آن‌ها به عنوان رادیوداروهای پپتیدی، در متابولیزه شدن سریع آن‌ها در پلاسما توسط پپتیداز طبیعی بدن و مسیر دفع می‌باشد. توالی پپتیدها روی جذب تومور، پایداری درون تنی، ویژگی‌های فارماکوکنتیک، قابل اتصال به گیرنده‌ها و کئوردیناس از ^{99m}Tc به وسیله کونژوگه پپتیدها با لیگاند خاص تاثیر دارد(۲۸،۲۵،۱۳،۱۱). HYNIC (هیدرازینونیکوتنیک اسید) برای نشاندار سازی پپتیدها با ^{99m}Tc از جمله بومبزین به کار رفته است. از آن‌جایی که HYNIC به عنوان عامل شلات کننده دو منظوره (BFCA)، فقط یک یا دو ظرفیت کوردینانسی ^{99m}Tc را اشغال می‌کند، به همین دلیل استفاد از لیگاندهای کمکی ضروری است و استفاده از لیگاندهای کمکی اجازه تغییر در هیدروفیلیسیته و فارماکنتیک کونژوگه‌های پپتیدی نشاندار شده با ^{99m}Tc را می‌دهد. اگر کونژوگه پپتیدی با HYNIC نشاندار شده با ^{99m}Tc بیش‌تر پایدار باشد، پس ممکن است منجر به بهبود هدف‌گیری تومور و ماندگاری در بدن شود. از طرفی تغییر در کونفیگارسیون، احتمالاً کارائی رادیوداروها را در شرایط درون تنی کاهش می‌دهد. بیش‌ترین لیگاندهای کمکی استفاده شده، تریسین و تریسین/EDDA به عنوان لیگاند تبادلی می‌باشد(۲۸،۲۷،۲۵،۲۲،۶). در این تحقیق کونژوگه پپتیدی BNFS3 و BNFG3 با استفاده از لیگاند کمکی تریسین/ EDDA به عنوان (لیگاند تبادلی) برای به دست آوردن راندمان نشاندار سازی در زمان کوتاه را بررسی کردیم تا کونژوگه ^{99m}Tc-BNFS3 و ^{99m}Tc-BNFG3 پایدار در محیط آزمایشگاهی و طبیعی را به دست آوریم. تریسین در سیستم بافری بهترین راندمان نشاندارسازی در دمای اتاق را می‌دهد، اما گزارش شده است که تریسین به عنوان لیگاند کمکی، کمپلکس نشاندار با ^{99m}Tc ناپایداری ایجاد می‌کند. به ویژه در محیط‌های رقیق که به دلیل روش‌های پیوند مختلف بخش هیدرازین از HYNIC باتریسین می‌باشد و باعث کارائی ضعیف در محیط درون تنی می‌شود. برای بیش‌تر این مطالعات، غلظت تریسین‌مسئله مهم و تاثیرگذاری روی‌خلوص رادیوشیمیایی محصول نهایی می‌باشد. در این مطالعات غلظت تریسین متنوع بوده است، برای مثال از ۱۵ تا ۵۰mg تریسین جهت نشاندارسازی استفاده شده است(۲۸،۲۷،۲۵،۶).

Liu و Edwards در سال ۱۹۹۹گزارش کردند که استفاده از تریسین به عنوان لیگاند کمکی موجب ناپایداری کمپلکس‌های تکنسیم و حضور از ایزومرهای مختلف کمپلکس در محلول می‌باشد. به علاوه گزارش کردند که استفاده از غلظت پایین تریسین (کم‌تر ۱۰mg در میلی‌لیتر) منجر به تشکیل مقدار قابل توجهی کلوئید- ^{99}Tc می‌شود(۲۹). این مشاهدات هم‌چنین در سال ۲۰۰۳ توسط SU و همکارانش گزارش شد. در این مطالعه آن‌ها گزارش کردند که کاهش مقدار تریسین در تولید ^{99m}Tc-HYNIC-RGD منجر به تشکیل ۱۵-۱۰ درصد $^{99m}Tco_2$ شده است. $^{99m}Tco_4$ در این مطالعه ۵-۳ درصد بود(۳۰) و در سال ۲۰۰۵، Faintuch و همکارانش با غلظت ۴۰ میلی‌گرم تریسین در میلی لیتر در PH=۷ در یک سیستم بافری برای دو مشتق بومبزین کونژوگه شده با HYNIC راندمان نشاندار سازی بالای ۹۰ درصد به وسیله ITLC به دست آورند.کنترل کیفی به وسیله ITLC راه موثر برای تعیین حضور پرتکنتات– 99m و $^{99m}Tco_2$ در این مطالعه بود، اما این روش اگر فرم ایزومری از کونژوگه پپتیدی نشاندار با ^{99m}Tc وجود

داشته باشد، به روشنی نشان نمی‌دهد. در این مطالعه گزارش کردند که گونه‌های کوچکی از ایزومرها را مشاهده کردند اما در مقاله شان نشان ندادند(۲۷). Liu و همکارانش در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که آنالیز HPLC از کونژوگه با HYNIC نشاندار با ^{99m}Tc با استونیتریل به عنوان حلال شستشو ممکن است کمپلکس در لیگاند تریسین/ استونیتریل در روی ستون تولید کند(۳۱).

در این مطالعه جهت فائق شدن بر مشکل عدم پایداری، لیگاند همراه دیگری هم‌چون EDDA مورد بررسی قرار گرفت. در سال ۲۰۰۰، Decristoforo و همکاران از تریسین و از EDDA به عنوان لیگاندها کمکی در نشاندارسازی Tco(Tyr^3-octreotide) استفاده کردند(۳۲). گزارش‌های بالینی توسط Plachcinska و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Gabriel و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که استفاده از هر دو لیگاند با هم، برای تولید (99mTc-Hynic-Toc) نتایج خوبی می‌دهد. Plachcinska درسال ۲۰۰۳ و Gabriel در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند سیستم لیگاند تبادلی در استفاده هم زمان از تریسین و EDDA در نشاندارسازی کونژوگه پپتیدی با HYNIC بسیار سودبخش می‌باشد(۳۴،۳۳). از مشتقات بومبزین و دیگر پپتیدها که با HYINC کونژوگه شده و مورد استفاده بالینی قرار گرفته اند، از سیستم لیگاند تبادلی تریسین/ EDDA استفاده شده است(۲۵). در روش نشاندار سازی در مطالعه ما برای هر دو کونژوگه راندمان نشاندارسازی در فرمولاسیون ساده سالین و آب بالای ۹۵ درصد به دست آمد که نتایج نشان داده اند EDDA به خاطر این که 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. مسطح بودن مولکول EDDA باعث می‌گردد که به راحتی وارد واکنش با تکنسیوم نگردد و به تنهایی از درصد نشاندارسازی بالایی برخوردار نیست و با استفاده از تکنیک تعویض لیگاند می‌توانیم EDDA را با حرارت جایگزین تریسین کرده و به نشان دار سازی بالای ۹۵ درصد دسترسی پیدا کنیم(۳۵). با استفاده از فرمولاسیون ساده مطابق روش اجرای استفاده همزمان از تریسین و EDDA و حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، می‌توانیم در یک مرحله هم نشاندار سازی با تریسین و هم‌جانشینی با EDDA را داشته باشیم که نهایتاً باعث به دست آمدن فرمولاسیون ساده یک مرحله‌ای، پایدار و بدون اشکال ایزومری^{99m}Tc کونژوگه BNFS3 و BNFG3 می‌گردد. نظر به این که نشان داده شد که مشتقات بومبزین HYNIC-)BB(5-14) (D-Tyr^5-D-Tyr^6-D-Phe^{13} و HYNIC-D-Tyr^6-D-Trp^{8}BB(6-14) پتانسیل تصویربرداری هدفمند از تومور را دارند(۳۶)، بنابراین مطالعات قبل را با یک مشتق جدید بومبزین نشاندار شده با توالی ۱۴-۷ بومبزین، D-phe^{13} را به جای Leu^{13}، (Ser)$_3$ و (Gly)$_3$ را به عنوان فضادهنده برای بهبود الگوی دفع از طریق کلیه، بهبود تمایل به اتصال و کاهش متابولیسم آنزیمی ادامه داده شد. با توجه به زمان بازداری کونژوگه ^{99m}Tc-BNFS3 و ^{99m}Tc-BNFG3 هر دو تقریباً به یک اندازه هیدروفیل هستند. ترکیبات نشاندار شده با لیگاندی تبادلی تریسین/EDDA شبیه مطالعات قبلی پایداری بالا در سالین و سرم انسانی داشته‌اند. دلیل پایداری آن در سرم انسانی می‌تواند جایگزینی D-Phe در موقعیت سیزده به جای لوسین باشد که می‌تواند موجب بهبود تمایل و کاهش متابویسم آنزیمی گردد(۲۵). اما میزان اکتیویته متصل مانده به پپتیدها در سرم انسانی بعد از ۲۴ ساعت کم‌تر از ۶۰ درصد به دست آمد که در مطالعات قبلی میزان اکتیویته متصل مانده به پپتید کم‌تر از۶۶ درصدگزارش شد(۲۳) که دلیل آن می‌تواند جایگزینی یک EDDA به جای یک تریسین باشد که در کمپلکس به شکل تریسین/EDDA ظاهر می‌شود(۳۷).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به این که کونژوگه‌های پپتیدی در مطالعه ما در زمان کوتاه و با راندمان بالا به آسانی نشاندار شد، می‌تواند در

آماده‌سازی فرمولاسیون کیت برای اقدامات روتین در پزشکی هسته‌ای مطرح باشد. این ویژگی‌ها نشان می‌دهد که کونژوگه‌های پپتیدی، برخی پتانسیل‌های رادیوداروهای تشخیصی را دارند و مطالعات درون تنی در مدل‌های سرطان انسان ضروری است.این مطالعات درحال انجام هستند.

References

1. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N,Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Ann Oncol 2009; 20(3): 556-563.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J clin 2011; 61(2): 69-90.
3. Dykes PW, Bradwell AR, Fairweather DS. Scanning for tumours with radiolabelled antibodies: a review. J R Soc Med 1983; 76(11): 957-960.
4. Goldenberg DM. Advancing role of radiolabeled antibodies in the therapy of cancer. Cancer Immunol, Immun 2003; 52(5): 281-296.
5. Smith CJ, Volkert WA, Hoffman TJ. Radiolabeled peptide conjugates for targeting of the bombesin receptor superfamily subtypes. Nucl Med Boil 2005; 32(7): 733-740.
6. Okarvi SM. Peptidebased radiopharmaceuticals: Future tools fordiagnostic imaging of cancers and other diseases. Med Res Rev 2004; 24(3): 357-397.
7. Okarvi SM. Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxicconjugates: potential tools against cancer. Cancer Treat Rev 2008; 34(1): 13-26.
8. Smith CJ, Volkert W, Hoffman T. Gastrin releasing peptide (GRP) receptor targeted radiopharmaceuticals: a concise update. Nucl Med Biol 2003; 30(8): 861-868.
9. Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer JC, Gugger M. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125) I-[D-TYR (6), beta-ALA (11), PHE (13),NLE (14)] bombesin (6-14). Clin Cancer Res 2002; 8(4): 1139-1146.
10. Mantey SA, Weber HC, Sainz E, Akeson M, Ryan R, Pradhan TK, et al. Discovery of a high affinity radioligand for the human orphan receptor,bombesinreseptor subtype 3,which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors. J Biol Chem 1997; 272(4): 26062-26071.
11. Pradhan TK, Katsuno T, Taylor JE, Kim SH, Ryan RR, Mantey SA, et al. Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes. Euro J Pharmacol 1998; 343(2): 275-287.
12. Zhang H, Chen J, Waldherr C, Hinni K, Waser B, Reubi JC, et al. Synthesis and evaluation of bombesin derivatives on the basis of pan-bombesin peptides labeled with indium-111, lutetium-177, and yttrium-90 for targeting bombesin receptor-expressing tumors. Cancer Res 2004; 64(18): 6707-6715.
13. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. Endocr Rev 2003; 24(4):389-427.
14. Baidoo KE, Lin KS, Zhan Y, Finley P, Scheffel U, Wagner HN Jr. Design, synthesis, and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues. Bioconjug Chem 1998; 9(2): 218-225.

15. Chen X, Park R, Hou Y, Tohme M, Shahinian AH, Bading JR, et al. microPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with 64Cu-DOTA-[Lys3] bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. J Nucl Med 2004; 45(8): 1390-1397.
16. Breeman WA, Hofland LJ, de Jong M, Bernard BF, Sinivasan A,Kwekkeboom DJ, et al. Evaluation of radiolabelled bombesin scintigraphy and radiotherapy. Int J cancer 1999; 81(4): 658-665.
17. Zhang X, Cai W, Cao F, Schreibmann E, Wu Y, Wu JC, et al. 18F-labeled bombesin analogs for targeting GRP receptor-expressing prostate cancer. J Nucl Med 2006; 47(3): 492-501.
18. Parry JJ, Andrews R, Rogers BE. MicroPET imaging of breastcancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor. Breast cancer Res Treat 2007; 101(2): 175-183.
19. Smith CJ, Sieckman GL, Owen NK, Hayes DL, Mazuru DG, Kannan R, et al. Radiochemical investigations of gastrin-releasing peptide receptor-specific [99mTc (X)(CO) 3-Dpr-Ser-Ser-Ser-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-(NH2)] in PC-3, tumor-bearing, rodent models:syntheses,radiolabeling, and in vitro/in vivo studies where Dpr=2, 3-diaminopropionic acid and X= H2O or P (CH2OH) 3. Cancer Res 2003; 63(14): 4082-4088.
20. Hoffman TJ, Gali H, Smith CJ, Sieckman GL, Hayes DL, Owen NK, et al. Novel series of 111In-labeled bombesin analogs as potential radiopharmaceuticals for specific targeting of gastrin-releasing peptide receptors expressed on human prostate cancer cells. J Nucl Med 2003; 44(5): 823-831.
21. Guard S, Watling KJ, Howson W. Structure-activity requirements of bombesin for gastrin-releasing peptide-and neuromedin B-preferring bombesin receptors in rat brain. Eur J Pharmacol 1993; 240(2-3): 177-184.
22. Gali H, Hoffman TJ, Sieckman GL, Owen NK, Katti KV, Volkert WA. Synthesis, characterization, and labeling with99mTc/ 188Re of peptide conjugates containing a dithia-bisphosphine chelating agent. Bioconjug Chem 2001; 12(3): 354-363.
23. Ferro-Flores G, Arteaga de Murphy C, Rodriguez-Cortes J, Pedraza-Lopez M, Ramirez-Iglesias MT. Preparation and evaluation of99mTc-EDDA/HYNIC-[Lys 3]-bombesin for imaging gastrin-releasingpeptide receptor-positive tumours. Nucl Med Commun 2006; 27(4): 371-376.
24. Santos-Cuevas CL, Ferro-Flores G, de Murphy CA, Pichardo-Romero PA. Targeted imaging of gastrin-releasingpeptide receptor With 99mTc-EDDA/HYNIC-[Lys 3]-bombesin: biokinetics and dosimetry in women. Nucl Med Commun 2008; 29(8): 741-747.
25. Sadeghzadeh N, Erfani M, Omidi M. Evaluation of a new bombesin analogue labeled with 99mTc as potential targeted tumor scintigraphic agent. Res Mol Med 2013; 1(3): 13-17.
26. Liolios C, Fragogeorgi E, Zikos C, Loudos G, Xanthopoulos S, Bouziotis P, et al. Structural modifications of 99mTc-labelled bombesin-like peptides for optimizing pharmacokinetics in prostate tumor targeting. Int J pharmaceutics 2012; 430(1-2): 1-17.
27. Faintuch BL, Santos RLSR, Souza ALFM, Hoffman TJ, Greeley M, Smith CJ. 99mTc-HYNIC-bombesin (7-14) NH2: Radiochemical evaluation with co-ligands EDDA (EDDA= ethylenediamine-N, N′- diacetic acid), tricine,

and nicotinic acid. Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry 2005; 35: 43-51.

28. Thomas R, Chen J, Roudier MM, Vessella RL, Lantry LE, Nunn AD.In vitro binding evaluation of 177Lu-AMBA, a novel 177Lulabeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy in human tissues. Clin Expl Metastasis 2009; 26(2): 105-119.
29. Liu S, Edwards D S. 99mTc-Labeled Small Peptides as DiagnosticRadiopharmaceuticals. Chem Rev 1999; 99(9): 2235-2268.
30. Su ZF, He J, Ruskowski M, Hnatowich DJ. In Vitro Cell Studies of Technetium-99m Labeled RGD-HYNIC Peptide, a Comparison of Tricine and EDDA as Co-ligands. Nucl Med Biol 2003; 30(2): 141-149.
31. Liu G, Wescott C, Sato A, Wang Y, Liu N, Zhang YM, et al. Nitriles form Mixed-Coligand Complexes with 99mTc-HYNIC-Peptide. Nucl Med Biol 2002; 29(1): 107-113.
32. Decristoforo C, Melendez-Alafort L, Sosabowski JK, Mather SJ. 99mTc-HYNIC-Tyr3-Octreotide for Imaging Somatostatin-Receptor-Rositive Tumors: Preclinical Evaluation and Comparison with 111In-Octreotide. J Nucl Med 2000; 41(6): 1114-1119.
33. Plachcinska A, Mikolajczak R, Maecke HR, Miodkowska E, Kunert-Radek J, Michalski A, et al. Clinical Usefulness of 99mTc-EDDA/ HYNICTOC Scintigraphy in Oncological Diagnostics: a Preliminary Communication. Eur J Nucl Med 2003; 30(10): 1402-1406.
34. Gabriel M, Froehlich F, Decristoforo C, Ensinger C, Donnemiller E, von Guggenberg E, et al. R. 99mTc-EDDA/HYNIC-TOC and 18F-FDG in Thyroid Cancer Patients with Negative 131I Whole-Body Scans. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2004; 31(3): 330-341.
35. Gandomkar M, Najafi R, Sadatebrahimi SE, Babaei MH. Preparation, formulation and quality control of one step kit ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-Tyr^{3}-Octreotide as a peptide radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor positive tumors. Iranian J Nucl Med 2004; 12(2): 21-27 (Persian).
36. Sadeghzadeh N, Ahmadzadeh M, Erfani M. Evaluation of a new radiolabeled bombesin derivative with 99mTc as potential targeted tumor imaging agent. J Radioanal Nucl Chem 2012; 298(1): 287-293.
37. King R, Surfraz MBU, Finucane C, Biagini SCG, Blower PJ, Mater 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.