

سنتز و مقایسه دو آنالوگ ایرانی پپتید آزاد کننده گاسترین جهت تصویربرداری از تومورهای سرطانی سینه و پروستات

سید پژمان شیرمردی^۱، مصطفی عرفانی^{۲*}

۱- پژوهشکده چرخه سوخت هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، تهران- ایران

۲- پژوهشکده علوم هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، تهران- ایران

چکیده

سابقه و هدف: بومبیزین پپتیدی است که تمایل بالایی به گیرنده های پپتید آزاد کننده گاسترین (بومبیزین) دارد. تومورهایی همچون تومورهای پروستات، شش، پستان و کولون تعداد زیادی گیرنده پپتید آزاد کننده گاسترین را بیان می کنند. در این مطالعه، تولید و ارزیابی دو آنالوگ جدید نشاندار شده پپتید آزاد کننده گاسترین با تکنسیوم-^{99m}Tc و گالیوم-⁶⁷Ga انجام پذیرفته است.

مواد و روش ها: ترکیب های $\text{DOTA-GABA-Bombesin (}\gamma\text{-}^{14}\text{) NH}_2$ ، $\text{HYNIC-GABA-Bombesin (}\gamma\text{-}^{14}\text{) NH}_2$ با استفاده از استراتژی Fmoc استاندارد تهیه گردید. تحلیل رادیوشیمیایی ترکیبهای نشاندار شده توسط روش HPLC انجام شد. پایداری پپتیدهای نشاندار در حضور سرم انسانی (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) انجام و بررسی درون روی هر دو ترکیب نشاندار بر روی رده سلولی PC-۳ انجام پذیرفت.

یافته ها: نتایج پایداری نشان داد که هر دو ترکیب دارای پایداری خوبی در سرم انسانی بوده و نتایج درون روی نشان داد که ترکیب $\text{DOTA-GABA-Bombesin (}\gamma\text{-}^{14}\text{) NH}_2$ دارای درون روی بهتری نسبت به $\text{HYNIC-GABA-Bombesin (}\gamma\text{-}^{14}\text{) NH}_2$ می باشد. بررسی توزیع بیولوژیکی نیز نشان داد که ترکیب $\text{DOTA-GABA-Bombesin (}\gamma\text{-}^{14}\text{) NH}_2$ دارای نسبت تومور به کلیه و تومور به پانکراس بهتری نسبت به ترکیب دیگر است. همچنین سرعت دفع $\text{DOTA-GABA-Bombesin (}\gamma\text{-}^{14}\text{) NH}_2$ از خون بهتر از ترکیب دیگر است.

نتیجه گیری: با مقایسه شرایط دو ترکیب می توان بیان نمود که ترکیب $\text{DOTA-GABA-Bombesin (}\gamma\text{-}^{14}\text{) NH}_2$ دارای شرایط بهتری نسبت به $\text{HYNIC-GABA-Bombesin (}\gamma\text{-}^{14}\text{) NH}_2$ می باشد.

کلمات کلیدی: گالیوم-⁶⁷Ga، تکنسیوم-^{99m}Tc، پپتید، نشاندارسازی

مقدمه

(تصویربرداری و درمان) انقلاب بزرگی در این حوزه ایجاد کرد. روش های متعددی برای تهیه پپتیدها وجود دارد که از جمله می توان استخراج طبیعی و سنتز را نام برد. در روش سنتز دو روش مهم فاز جامد و فاز محلول در دنیا مرسوم است که نوع فاز جامد برای کارهای با مقیاس کوچک مورد استفاده قرار

ورود بیومولکول ها (آنتی بادپها و پپتیدها) به حوزه پزشکی

آدرس نویسنده مسئول: پژوهشکده چرخه سوخت هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته

Email: p_shirmardi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۱۰

می گیرد و نوع فاز محلول برای مقیاسهای صنعتی است. روش سنتز فاز محلول روش پیچیده، وقتگیر و به مهارت زیادی نیاز دارد. علاوه بر این، فرایند خالصسازی طولانی و پیچیده شامل کریستالیزاسیون، کروماتوگرافی، تقطیر و ... دارد. روش سنتز فاز جامد سریع و آسان بوده و دارای مزیت‌های فراوانی نسبت به روش فاز محلول میباشد که شامل کم بودن مراحل خالصسازی و حداقل شرایط لازم برای واکنش مطلوب است. روش مناسب برای سنتز پپتیدهای کوچک و متوسط بوده و راندمان آن بالاست و طی سنتز می توان عامل شلات کننده را به توالی پپتید متصل کرد. سنتز پپتید در فاز جامد بر اساس افزایش متوالی آلفا آمینو اسیدهای دارای زنجیره جانبی محافظت شده به یک پلیمر غیر قابل حل (رزین) میباشد. استفاده از پپتیدها نسبت به آنتی بادی‌های در حوزه تشخیص تومورهای سرطانی جایگاه ویژه ای پیدا نموده است. به طور کلی پپتیدها در فرایندهای بیولوژی نسبت به دیگر مولکولها از اهمیت بیشتری برخوردار هستند، تحریک، مهار یا تنظیم بسیاری از فعالیت‌های بیولوژی از طریق گیرنده مربوطه آنها انجام میپذیرد. یک پپتید قبل از اینکه در پزشکی هسته‌ای استفاده شود باید دارای خصوصیات زیر باشد:

۱- نشاندارسازی سریع و موثر، رادیواکتیویته ویژه بالا.

۲- پایداری زیستی بالا.

۳- حفظ تمایل به گیرنده و حفظ فعالیت بیولوژی در نشاندارسازی.

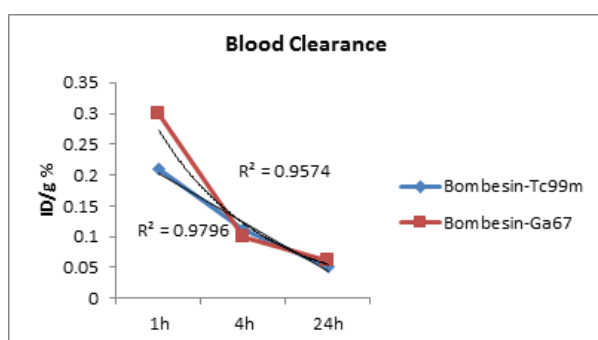
۴- خواص فارماکوکینتیک مناسب.

برای گسترش حوزه سینتیگرافی رادیوپپتیدی، طیف وسیعی از پپتیدها برای انواع سلول های توموری استفاده می شود. تعداد زیادی از سرطان های بدخیم انسانی، گیرنده های پپتیدی مختلفی را بر روی سطح سلولی خود بیان می کنند. این گیرنده ها اهداف مهم و مفیدی برای تصویر برداری مولکولی و درمان هدفمند تومورها می باشند که از جمله این گیرنده ها می توان از گیرنده های سوماتواستاتین، نوروتانسین و بومبازین نام برد که در سال های اخیر مطالعات فراوانی در این حوزه صورت پذیرفته است. از پپتید های مشابه بومبازین در پستانداران می توان Neu-

(romedin B (NMB) و Gastrin Releasing Peptide (GRP) را نام برد (۱۸و۷). که این دو پپتید دارای گیرنده های خاصی در بدن می باشند و در تومورهای سرطانی همچون سرطان های پستان، پروستات (۱۲)، شش (۹و۵) و کولون (۱۳) بیان این گیرنده ها در سطح سلولیشان افزایش می یابد. در مطالعات اتورادیوگرافی مشاهده شد که چگالی گیرنده های پپتید آزاد کننده گاسترین در کارسینوماهای هجومی پروستات (invasive prostate carcinomas) و آسب های پروستات اینترا اپیتلیال تکثیرشونده (proliferative intraepithelial prostate lesions) زیاد بوده در حالیکه میزان این گیرنده ها در سطح سلول های سالم و غیرتوموری پروستات بسیار ناچیز می باشد (۱۹). تا به حال سنتزهای متعددی از آنالوگ های بومبازین یا پپتید آزاد کننده گاسترین انجام شده است که هر کدام به نحوی در پی افزایش میزان پایداری ترکیب و اتصال به گیرنده مورد نظر بوده اند (۱۷و۱۶و۱۴و۱۱و۸و۶و۴). ترکیبهای متعددی از این پپتید با رادیونوکلیدهای گسیلنده گاما جهت تصویربرداری نشاندار گردید که از آن جمله می توان آنالوگ های نشاندار با تکنیسوم-۹۹m، ایندیوم-۱۱۱ و گالیوم-۶۷ توسط SPECT و آنالوگ های نشاندار با مس-۶۴ و گالیوم-۶۸ توسط PET را نام برد (۱۰و۶و۲). برای اهداف درمانی با استفاده از این پپتید، آنالوگ های متعددی توسط ایتريوم-۹۰ و لوتثیوم-۱۷۷ نشاندار گردید و بررسی های درمانی نشان از توانمندی خوب این دارو برای درمان تومورهای سرطانی سینه و پروستات دارد (۱۵). یک روش نشاندارسازی ایده‌آل، روشی است که خواص اتصال به گیرنده و فعالیت بیولوژیکی ملکولهای بیولوژی بدون تغییر باقی بماند و پپتید یا آنتی بادی نشاندار شده در طی تصویر برداری فعال باشد. تکنیکهایی برای نشاندارسازی ساده و موثر پپتیدها با رادیونوکلیدهای مختلف بر پایه نشاندارسازی پروتئینها و آنتی بادیها ایجاد شده‌اند. اثرات نشاندارسازی روی خواص بیولوژیکی معمولاً روی پپتیدهای کوچک نسبت به پروتئینها و آنتی بادیها شدیدتر است. نشاندارسازی در ناحیه ویژه‌ای از پپتیدهای کوچک جهت جلوگیری از کاهش فعالیت بیولوژی و حفظ تمایل اتصال مناسب است. برای نشاندارسازی پپتیدها دو روش مستقیم و غیر مستقیم وجود دارد. در روش نشاندار سازی مستقیم رادیونوکلید بطور مستقیم به بیومولکول

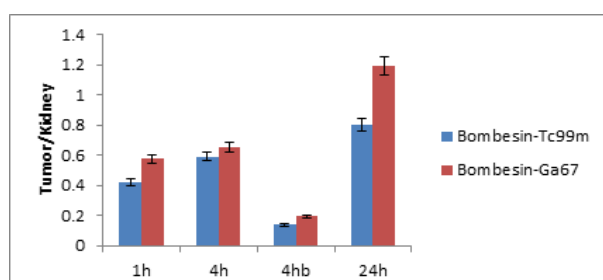
۳-۲ بررسی پایداری

می باشد (شکل ۵).

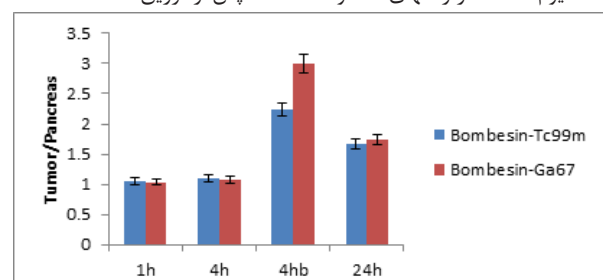


شکل ۵) توزیع بیولوژیکی در اندامهای مختلف موش یک ساعت پس از تزریق برای دو ترکیب نشاندار با گالیوم-۶۷ و تکنسیوم-۹۹م-

نتایج همچنین نشان داد که نسبت دوز تومور به کلیه و تومور به پانکراس در ترکیب $(\gamma-14) \text{NH}_2$ -Bombesin-DOTA-GABA- ^{67}Ga (۱۴) بیشتر از ترکیب دیگر است. لذا این شاخصه مهم در مورد ترکیب $(\gamma-14) \text{NH}_2$ -Bombesin-DOTA-GABA- ^{67}Ga آن را بعنوان یک عامل تصویربرداری بهتر نسبت به نوع دیگر معرفی می نماید (شکل ۶ و ۷).



شکل ۶) نسبت دوز تومور به کلیه برای دو ترکیب نشاندار با گالیوم-۶۷ و تکنسیوم-۹۹م در زمانهای ۴، ۱ و ۲۴ ساعت پس از تزریق



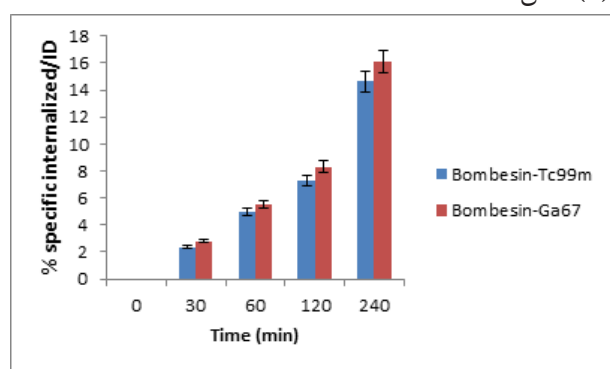
شکل ۷) نسبت دوز تومور به پانکراس برای دو ترکیب نشاندار با گالیوم-۶۷ و تکنسیوم-۹۹م در زمانهای ۴، ۱ و ۲۴ ساعت پس از تزریق

در ضمن سرعت دفع آن از اندام های با گیرنده منفی (بجز کلیه ها) قابل قبول می باشد. ترکیب نشاندار میزان جذب مناسبی

نتایج بررسی پایداری برای ترکیب ^{99m}Tc -HYNIC-GA- $(\gamma-14) \text{NH}_2$ -Bombesin-BA نشان داد که ترکیب پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در سرم انسانی، دارای پایداری بیشتر از ۹۰ درصد بوده و هیچگونه اثر متابولیکی جدی مشاهده نشد. و برای $(\gamma-14) \text{NH}_2$ -Bombesin-GABA-DOTA- ^{67}Ga این پایداری در ۱۶ ساعت به دست آمد.

۳-۳ بررسی درون روی (Internalization)

نتایج درون روی هر دو ترکیب نشان داد که گیرنده های سطح سلولی را شناسایی و بخوبی وارد سلول شده اند ولی میزان درون روی برای ترکیب نشاندار با گالیوم-۶۷ پس از ۴ ساعت نشان از بهتر بودن این ترکیب نسبت به ترکیب نشاندار با تکنسیوم می باشد. برای ترکیب ^{99m}Tc -HYNIC-GA- $(\gamma-14) \text{NH}_2$ -Bombesin-BA پس از ۴ ساعت میزان درون روی $41.0 \pm 6.3\%$ و برای ^{67}Ga -Bombesin-GABA-DOTA- ^{67}Ga $71.0 \pm 13.1\%$ می باشد. میزان درون روی در زمانهای های مختلف برای دو ترکیب نشاندار در شکل (۴) نشان داده شده است.



شکل ۴) میزان درون روی در زمانهای ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه برای دو ترکیب نشاندار با گالیوم-۶۷ و تکنسیوم-۹۹م-

۳-۴ توزیع بیولوژیکی

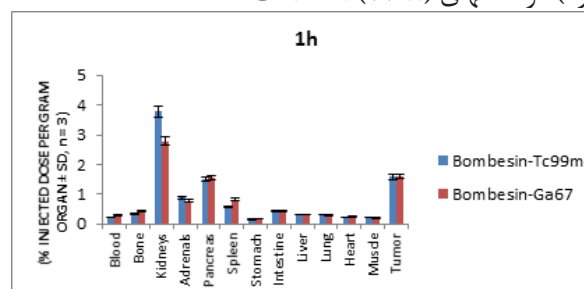
نتایج توزیع بیولوژیکی در موش نشان می دهد که ترکیبهای مورد نظر در بافت های با گیرنده مثبت بومبیزین مانند پانکراس و تومور تمرکز قابل توجهی داشته و سرعت دفع آنها از خون قابل قبول است. ولی شیب سرعت دفع ترکیب ^{67}Ga -DO- $(\gamma-14) \text{NH}_2$ -Bombesin-TA بیشتر از ترکیب دیگر

تزریق برای دو ترکیب نشاندار با گالیوم-۶۷ و تکنسیوم-۹۹م

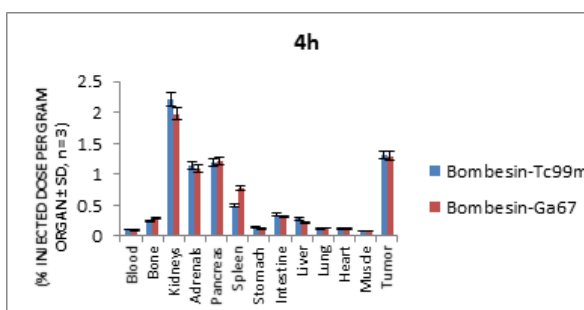
بحث

امروزه تصویربرداری از تومورهای سرطانی و تشخیص متاستازهای ناشی از آنها امری مهم در طراحی درمان مناسب برای سرطان است. یکی از روشهای انتخابی و مهم در تشخیص سرطانها و متاستازهای ناشی از آنها، روش استفاده از بیومولکولهای همچون پپتیدهاست. پپتیدها پس از نشاندارسازی با رادیونوکلیدهای گسیلنده گاما و انجام فرایندهای کنترل کیفی به بیمار تزریق شده تا فرایند تشخیص تومورهای سرطانی و مکانهای متاستازی شناسایی گردند. در این مطالعه، پپتید پایه توسط روش فاز جامد و استراتژی FMOC سنتز و سپس با استفاده از HPLC خالص سازی گردید و ساختارهای ناقص از آن جدا شدند، ارزش تحقیقاتی و مهم این کار تکنیک استفاده از فضا دهنده گابا است که با افزودن آن به توالی پپتیدی افزایش میزان درون روی و پایداری ترکیب نسبت به نمونه های قبلی افزایش یافت. پپتید تهیه شده با استفاده از روش غیر مستقیم و با رادیونوکلیدهای ^{67}Ga و $^{99\text{m}}\text{Tc}$ توسط شلاتورهای مختلفی همچون DOTA و Hynic نشاندار گردید. با توجه به بررسی پایداری دو ترکیب، نتایج نشان می دهد که این ساختار پایه پپتیدی دارای پایداری خوبی در سرم انسانی است و این نتیجه اتصال فضا دهنده به توالی پپتیدی است. بررسی میزان درون روی نشان از نتایج بهت ترکیب نشاندار شده با گالیوم-۶۷ دارد که می توان این درون روی بهتر را به نوع رادیونوکلید نسبت داد. بررسی توزیع بیولوژیکی در واقع تعیین میزان دفع رادیوپپتید از خون، میزان و مسیر دفع رادیوپپتید، پایداری درون تنی رادیوپپتید، میزان جذب و نگهداری در بافت های با گیرنده مثبت می باشد، پپتیدها در خون متابولیزه شده و متابولیت های نشاندار شده ممکن است سریع از خون دفع نشوند و همچنین اتصال به پروتئین از عواملی می باشد که باعث بالا رفتن پس زمینه خونی می شوند. اتصال به پروتئین سبب می شود تا زمان استخراج پپتید از خون از چند دقیقه به چندین ساعت افزایش یابد. علاوه بر خون، بررسی بافت های مهم دیگری همچون کلیه و کبد که بافت های دفع پپتید هستند مهم و اساسی است، در ضمن سرعت دفع آن از اندام های با گیرنده منفی (بجز کلیه

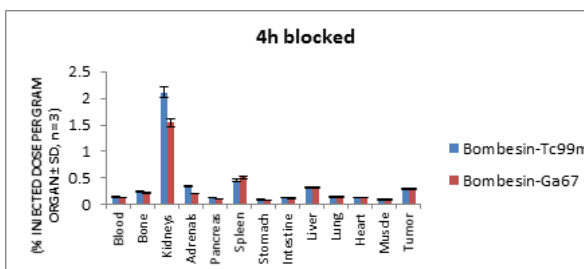
را در تومور و پانکراس دارد. نتایج جدول توزیع بیولوژیکی در ساعت های ۱، ۴ و ۲۴ ساعت پس از تزریق به همراه نتایج مربوط به توزیع بیولوژیکی ۴ ساعت بلاک (ترکیب حاوی پپتید سرد) در شکل های (۸-۱۱) آمده است.



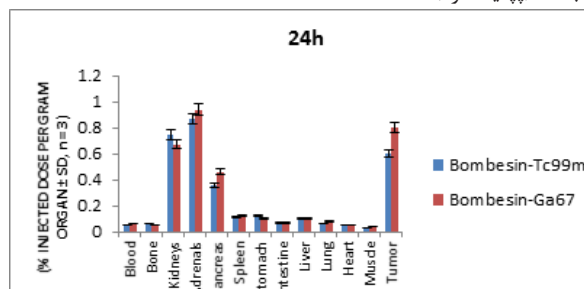
شکل ۸) توزیع بیولوژیکی در اندامهای مختلف موش ۱ ساعت پس از تزریق برای دو ترکیب نشاندار با گالیوم-۶۷ و تکنسیوم-۹۹م



شکل ۹) توزیع بیولوژیکی در اندامهای مختلف موش ۴ ساعت پس از تزریق برای دو ترکیب نشاندار با گالیوم-۶۷ و تکنسیوم-۹۹م



شکل ۱۰) توزیع بیولوژیکی در اندامهای مختلف موش ۴ ساعت پس از تزریق برای دو ترکیب نشاندار با گالیوم-۶۷ و تکنسیوم-۹۹م برای بررسی اثر بلاک (پپتید سرد)



شکل ۱۱) توزیع بیولوژیکی در اندامهای مختلف موش ۲۴ ساعت پس از

ها) قابل قبول می باشد. ترکیب نشاندار میزان جذب مناسبی را در تومور و پانکراس دارد. مقایسه دو ترکیب نشاندهنده نسبت جذب مناسب تومور به کلیه و تومور به پانکراس ترکیب نشاندار شده با گالیوم-۶۷ نسبت به نمونه نشاندار با ^{99m}Tc است.

در این مطالعه ترکیب‌های (۷- DOTA-GABA-Bombesin) NH_2 ، (۱۴- HYNIC-GABA-Bombesin) NH_2 با استفاده از استراتژی Fmoc استاندارد تهیه گردید. نتایج پایداری نشان داد که هر دو ترکیب دارای پایداری خوبی در سرم انسانی بوده و همچنین ترکیب ^{67}Ga -DOTA-GABA-Bombesin ^{99m}Tc -HYN- (۷-۱۴) NH_2 دارای درون روی بهتری نسبت به ^{99m}Tc -HYN- (۷-۱۴) NH_2 می باشد. نسبت دوز تومور به کلیه و تومور به پانکراس و همچنین سرعت دفع از خون برای ترکیب (۷-۱۴) ^{67}Ga -DOTA-GABA-Bombesin NH_2 بهتر از ترکیب دیگر است. با مقایسه شرایط دو ترکیب می توان بیان نمود که ترکیب ^{67}Ga -DOTA-GABA-Bombesin ^{99m}Tc -HYN- (۷-۱۴) NH_2 دارای شرایط بهتری نسبت به ^{99m}Tc -HYN- (۷-۱۴) NH_2 می باشد.

منابع

- (1) Baidoo KE, Lin KS, Zhan Y, Finley P, Scheffel U, Jr Wagner and HN. Design, synthesis, and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues. *Bioconj Chem*, 1998; 9:218–225.
- (2) Breeman WA, Hofland LJ, de Jong M, Bernard BF, Srinivasan A, Kwekkeboom DJ. Evaluation of radiolabelled bombesin analogues for receptor-targeted scintigraphy and radiotherapy. *Int J Cancer*, 1999;81:658–665.
- (3) Chen J, Nguyen H, Metcalfe E, Eaton S, Arunachalam T, Raju. Formulation and in vitro metabolism studies with ¹⁷⁷Lu-AMBA; a radiotherapeutic compound that targets gastrin releasing peptide receptors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004; 31 Suppl 2:S281.
- (4) Chen X, Park R, Hou Y, Tohme M, Shahinian AH, Bading TR. microPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with ⁶⁴Cu-DOTA-[Lys3] bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. *J Nucl Med*, 2004; 45:1390–1397.
- (5) Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A. Bombesin-like peptides as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*, 1985;316:823-826.
- (6) Hoffman TJ, Gali H, Smith CJ, Sieckman GL, Hayes DL, Owen NK. Novel series of ¹¹¹In-labeled bombesin analogs as potential radiopharmaceuticals for specific targeting of gastrinreleasing peptide receptors expressed on human prostate cancer cells. *J Nucl Med*, 2003;44:823–831.
- (7) Karra SR, Schibli R, Gali H, Katti KV, Hoffman TJ, Higginbotham C. ^{99m}Tc labeling and In Vivo Studies of a Bombesin Analogue with a Novel Water-soluble Dithiadiphosphine-based Bifunctional Chelating Agent. *Bioconj Chem*, 1999;10(2):254-260.
- (8) La Bella R, Garcia-Garayoa E, Langer M, Blauenstein P, Beck- Sickinger AG, Schubiger PA. In vitro and in vivo evaluation of a ^{99m}Tc (I)-labeled bombesin analogue for imaging of gastrin releasing peptide receptor-positive tumors. *Nucl Med Biol*, 2002;29:553–560.
- (9) Mahmoud S, Staley J, Taylor J, Bogden A, Moreau JP, Coy D. Bombesin analogues inhibit growth of small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 1991;51:1798-1802.
- (10) Nock B, Nikolopoulou A, Chiotellis E, Loudos G, Maintas D, Reubi JC. [^{99m}Tc] Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2003;30:247–258.
- (11) Nock BA, Nikolopoulou A, Galanis A, Cordopatis P, Waser B, Reubi JC. Potent bombesin-like peptides for GRP-receptor targeting of tumors with ^{99m}Tc: a preclinical study. *J Med Chem*, 2005;48:100–110.
- (12) Plonowski A, Nagy A, Schally AV, Sun B, Groot K. In vivo inhibition of PC-3 human androgen-independent prostate cancer by a targeted cytotoxic bombesin analogue, AN-215. *Int. J. Cancer*, 2000;88:652–657.
- (13) Preston SR, Woodhouse LF, Jones-Blackett Miller GV, Primrose JN. High-affinity binding sites for gastrin-releasing peptide on human colorectal cancer tissue but not uninvolved mucosa. *Br J Cancer*, 1995;71:1097-1089.
- (14) Scopinaro F, De Vincentis G, Varvarigou AD, Laurenti C, Iori F, Remediani S. ^{99m}Tc-bombesin detects prostate cancer and invasion of pelvic lymph nodes. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2003;30:1378–1382.
- (15) Smith CJ, Gali H, Sieckman GL, Hayes DL, Owen NK, Mazuru DG. Radiochemical investigations of ¹⁷⁷Lu-DOTA-8-Aoc-BBN[7–14]NH₂: an in vitro/in vivo assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells. *Nucl Med Biol*, 2003;30:101–119.
- (16) Smith CJ, Sieckman GL, Owen NK, Hayes DL, Mazuru DG, Kannan R. Radiochemical investigations of gastrin-releasing peptide receptor-specific [^{99m}Tc (X)(CO)₂-Dpr-Ser-Ser-Ser-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-(NH₂)₃] 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;63:4082–4088.
- (17) Smith CJ, Volkert WA, Hoffman TJ. Gastrin releasing peptide (GRP) receptor targeted radiopharmaceuticals: a concise update. *Nucl Med Biol*, 2003;30:861–868.
- (18) Van de Wiele C, Dumont F, van Belle S, Slegers G, Peers SH, Dierckx RA. Is There a Role for Agonist Gastrin-releasing Peptide Receptor Radioligands in Tumour Imaging. *Nucl Med Commun*, 2001;22:5-15.
- (19) Zhang H, Chen J, Waldherr C, Hinni K, Waser B, Reubi JC. 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;64:6707–6715.