جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سنتز، نشاندار کردن، فرمولاسیون و کنترل کیفی رادیوداروی پپتیدی-^{99m}Tc-Tricine-HYNIC Tyr^{3}-Octreotide جهت تصویربرداری از تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی

مصطفی گندم کار [۱]، رضا نجفی [۱]، سید اسماعیل سادات ابراهیمی [۲]، عباس شفیعی [۲]، محمد حسین بابائی [۱]، محمد ربانی [۳]، غلامعلی شعبانی [۱]

[۱] بخش رادیوایزوتوپ، مرکز تحقیقات هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران
[۲] گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۳] گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

چکیده

آنالوگ های سوماتوستاتین نشان دار شده با رادیونوکلیدهای مختلف برای تشخیص و یا درمان تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی کاربرد دارند. در این راستا ابتدا عامل بای فانکشنال ترشیو بوتوکسی کربونیل هیدرازینو پیریدین -۳- کربوکسیلیک اسید (BOC- HYNIC) سنتز شده و سپس با تیروزین اکتریوتاید محافظت شده از ناحیه لیزین به عنوان آنالوگی از سوماتوستاتین کنژوگه گردید . پس از برداشتن عوامل محافظتی، خالص سازی بوسیله Preparative-RP-HPLC انجام شد . پپتید کنژوگه شده با لیگاند کمکی تریسین به تکنسیوم متصل گردیده و نشان دار شد . کارایی نشاندار سازی، خلوص رادیوشیمیایی، پایداری در سرم انسانی، میزان اینترنالیزه شدن رادیو دارو همراه با رسپتور و توزیع بیولوژیکی ترکیب به عنوان یک رادیو داروی پپتیدی در موش نرمال بررسی گردید.

واژه‌های کلیدی:

سوماتوستاتین ، تیروزین اکتریوتاید ، هیدرازینو نیکوتینیک اسید ، تریسین ، تکنسیوم-99 m

مقدمه

سوماتوستاتین یک هورمون پپتیدی ۱٤ اسید آمینه‌ای می‌باشد که نیمه عمر بیولوژیکی کوتاهی معادل ۲ دقیقه داشته و دارای طیف وسیعی در مهار فعالیت های بیولوژیکی و انکولوژیکی است (۱) . بیان تعداد زیادی از رسپتورهای سوماتوستاتینی با افینیته بالا نسبت به آن در تومورهای خاص باعث شده که نسبت به استفاده از آن در پزشکی هسته‌ای برای تشخیص و درمان تومورها تمایل زیادی بوجود بیاید، ولیکن بخاطر نیمه عمر کوتاهش استفاده از آن امکان پذیر نیست . به این علت آنالوگهای متعددی از آن سنتز شده اند که نسبت به سوماتوستاتین دارای اثر قوی تر و نیمه عمر طولانی تری هستند (۲) از این آنالوگ ها می‌توان اکتریوتاید(Octreotide)، واپروتاید (Vaprotide)، لنریوتاید (Lanreotide) و تیروزین-۳-اکتریوتاید (Tyr^{3}-Octreotide) را نام برد که هر کدام به زیر مجموعه‌های مختلف رسپتورهای سوماتوستاتینی تمایل داشته و می‌توانند جهت تصویر برداری یا درمان تومورها بعد از نشاندار سازی با رادیونوکلید مناسب بکار بروند .

تیروزین اکتریوتاید نشان دار شده با ید - ۱۲۳ (^{123}I-Tyr-Octreotide) اولین بار برای تشخیص

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی بکار برده شد . علی رغم موفقیت در تشخیص با این رادیو دارو به علت محدودیت هایی چون عدم موجود بودن ید - ۱۲۳ که از نظر شیمیایی خالص باشد و اکتیویته زمینه‌ای بالا در ناحیه شکمی به خاطر دفع کبدی رادیو دارو، این روش دارای مشکل بود . بنابراین استفاده از آنالوگ نشاندار شده با ایندیوم- ۱۱۱ از سوماتوستاتین (^{111}In-DTPA-Oct) توسعه پیدا کرد . ایندیوم- ۱۱۱- دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید - اکتریوتاید با خصوصیاتی مشابه اکتریوتاید به عنوان رادیودارویی خوب برای تصویربرداری از تومورهای با رسپتور مثبت سوماتوستاتینی تایید شد . این ترکیب اساسا از کلیه دفع شده و ۹۰٪ دوز تزریقی ۲٤ ساعت بعد از تزریق در ادرار یافت می‌شود. به خاطر طول عمر زیاد ایندیوم- ۱۱۱ می‌توان از تومورها بعد از ۲٤ و ٤۸ ساعت‌که اکتیویته زمینه‌ای به‌خاطردفع کلیوی رادیودارو به کمترین مقدار رسیده است تصویر برداری کرد .

اگر چه در چند سال اخیر ^{111}In-DTPA-Oct استفاده وسیع کلینیکی پیدا کرده است با این وجود محدودیت هایی خصوصا در ارتباط با در دسترس بودن آن، خصوصیات تصویربرداری و از همه مهم تر هزینه آن همچنان باقی مانده و به عنوان عامل محرکی برای تحقیق بر روی نشان دار کردن آنالوگ های سوماتوستاتین با رادیونوکلیدهای آلترنائیو دیگر شامل ایتریوم-۹۰ (^{90}Y) و تربیوم-۱۶۱ (^{161}Tb) برای کاربردهای درمانی ؛ گالیم-۶۸ (^{68}Ga) ؛ مس-٦٤ (^{64}Cu) و فلوئور-۱۸ (^{18}F) برای تصویر برداری با پوزیترون (PET) و خصوصا تکنسیوم- m ۹۹ جهت سینتی گرافی (Scintigraphy) می‌باشد .

نشاندار سازی آنالوگ‌های سوماتوستاتین با تکنسیوم- m ۹۹ به روش مستقیم شامل احیاء باند دی سولفیدی با عوامل احیاء کننده و ایجاد گروههای سولفیدریل جهت پیوند با تکنسیوم و روش غیر مستقیم به کمک عوامل شلاته کننده بای فانکشنال متفاوتی شامل پروپیلن آمینو اکسیم ها ؛ ترامین ها ؛ تری آمیدو مونو تیول ها و هیدرازینو نیکوتینیک اسید بطور گسترده‌ای در حال بررسی می‌باشد (٤ و ۳).

هدف از این تحقیق تهیه و نشاندار سازی آنالوگ های سوماتوستاتین با تکنسیوم- m ۹۹ به روش غیر مستقیم و بررسی میزان نشاندار سازی ؛ خلوص رادیوشیمیایی ؛ پایداری در پلاسمای انسانی ؛ توزیع بیولوژیکی ؛ میزان اتصال به رسپتور و اینترنالیزه شدن رسپتور به داخل سلول توموری و در نهایت فرمولاسیون رادیودارویی مناسب بعنوان آلترناتیوی برای ^{111}In-DTPA-Oct جهت مصرف در تمام مراکز پزشکی هسته‌ای می‌باشد.

مواد لازم

تیروزین اکتریوتاید از کمپانی Bachem ؛ کلرونیکوتینیک اسید از Fluka ؛هیدرات هیدرازین از Fluka ؛ دی ترشیو بوتوکسی کربونیل از Fluka ؛ آزابنزوتری آزولیل ترامتیل یورونیوم هگزافلوروفسفات (HATU) از Sigma ؛ دی متیل فرمامید از Fluka ؛ دی ایزو پروپیل اتیل آمین از Fluka ؛ رده سلولی AR42J از کلینیک پزشکی هسته‌ای اینسبروک اتریش ؛ ستون RP-C18 ؛ محیط کشت RPMI1640 و سرم جنین گاوی از Gibco .

روش‌ها

سنتز ترشیو بوتوکسی کربنیل هیدرازینو نیکوتینیک اسید

از این ترکیب به عنوان عامل دو منظوره برای اتصال پپتید با تکنسیوم استفاده می‌شود و سنتز آن در دو مرحله انجام می‌گردد.

۱- سنتز ٦- هیدرازینو پیریدین ۳- کربوکسیلیک اسید

به ۸ میلی گرم ٦-کلرونیکوتینیک اسید مقدار ۳۵ میلی لیتر هیدرات هیدرازین اضافه کرده و در حمام روغن ۱۰۰ درجه برای ٤ ساعت قرار دادیم. سپس رسوب سفید رنگ حاصل را صاف کرده و با اتر چندین بار شستشو داده ؛ آن را جمع آوری کردیم . نقطه ذوب جسم حاصل برابر ۲۹۲ درجه و راندمان

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

واکنش ۷۷٪ بود .

۲- سنتز ٦- BOC - هیدرازینو پیریدین -۳- کربوکسیلیک اسید

به ۱/٤ گرم ٦- هیدرازینو پیریدین-۳- کربوکسیلیک اسید در ۱/۲ میلی لیتر تری اتیل آمین و ۱۰ میلی لیتر دی متیل فرمامید ۲/۱۳ گرم دی ترشیو بوتوکسی کربونیل اضافه کرده و ١٦ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد، جسم جامد به دست آمده را توسط ستون سیلیکاژل واتیل استات خالص سازی و سپس خشک کرده که مقدار ۲/۳ گرم جسم مورد نظر با بازده ۹٤٪ به دست آمد. (۵)

سنتز BOC-HYNIC-BOC-Lys⁵-Tyr³ Octreotide

به مخلوطی از ۳ میلی گرم BOC-HYNIC و ٤/٦ میلی گرم HATU در ۱ میلی لیتر دی متیل فرمامید مقدار ٥/٩ میکرولیتر دی ایزوپروپیل اتیل آمین اضافه کرده و بعد از ۱۵ دقیقه به آن ۱۱/۳ میلی گرم BOC-Lys⁵-Tyr³-Oct اضافه شد . بعد از گذشت ۱ ساعت به آن ۵۰۰ میکرولیتر کربنات ئیدروژن سدیم ۵٪ همراه با ۵۰۰ میکرولیتر اتیل استات اضافه کرده و اتیل استات را ۳ بار با کربنات ئیدروژن سدیم ؛ بافر سدیم استات pH =5.2 و محلول اشباع NaCl شستشو دادیم و اتیل استات تبخیر گردید تا جسم خشک به دست آمد .

سنتز HYNIC- Tyr³-Octreotide

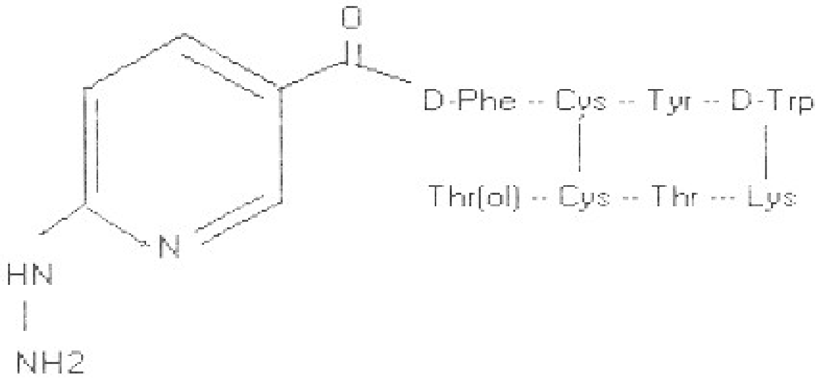
به جسم خشک شده بالا ۵۰۰ میکرولیتر محلولی حاوی ۹۲٪ تری فلوروواستیک اسید ؛ ٤٪ تیوآنیزول ؛ ٤٪ آب مقطر اضافه کرده ؛ بعد از ۱۵ دقیقه با اضافه کردن ۱/۵ میلی لیتر دی اتیل اتر جسم رسوب داده شده و با HPLC خالص سازی شد (شکل ۱).

نشان دار کردن HYNIC-Tyr³-Octreotide با ^{99m}Tc

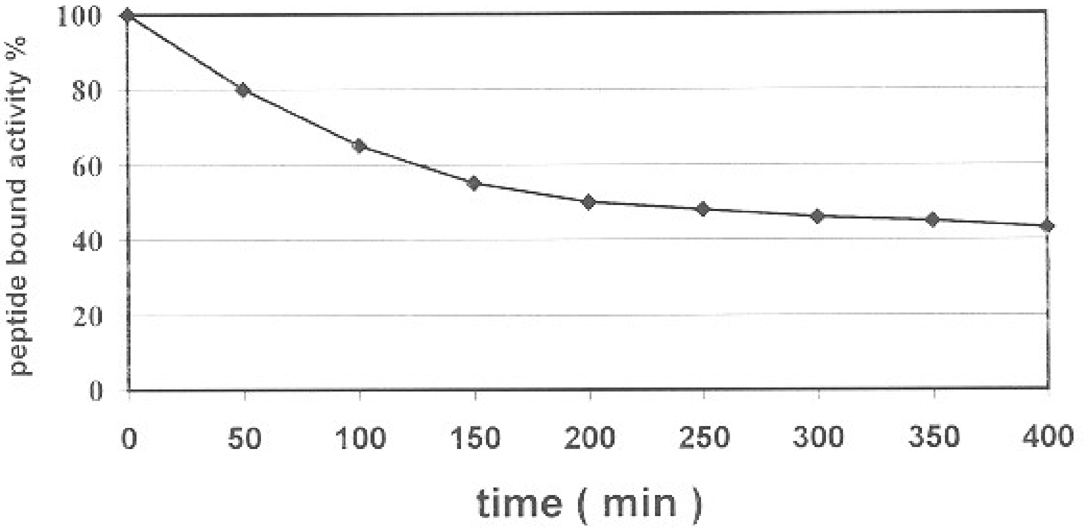
به ۱۰ میکرو گرم HYNIC-Tyr-Oct مقدار ۱ میلی لیتر محلولی حاوی ۱۰۸ میلی گرم تریسین ؛ ۲ میلی لیتر سدیم استات (pH = 5.2 ، 0.5 M) ؛ 40 mCi / ml سدیم پرتکنتات ؛ ۷۵ میکرولیتر محلول $SnCl_2$ (HCl ، 0.1 N ، 20 mg / 10 ml) اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه کردیم. میزان نشاندارسازی و خلوص رادیوشیمیائی با استفاده از HPLC، ITLC و SEPPAK-C18 مشخص شد.

پایداری در سرم انسانی

به ۲ میلی لیتر سرم انسانی ۵ میکرولیتر پپتید نشان دار شده حاوی اکتیویته ٦٠ میکرو کوری اضافه شد و بعد از ۱۵ دقیقه، ۱، ۲، ۳ و ٤ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه مقدار ۵۰ میکرولیتر از آن به ستون PD_{10} اضافه گردید . پس از شستشوی ستون با PBS هر ۱۳ قطره جداگانه جمع آوری گشت . شمارش لوله‌های ۵ و ٦ جهت اکتیویته متصل شده به پروتئین پلاسما و لوله‌های ۱٠-١٤ جهت اکتیویته متصل به پپتید انجام شده و میزان پروتئین بایندینگ مشخص گردید. (نمودار ۱)



شکل ۱- شمای ساختاری HYNIC-Tyr³-Octreotide سنتز شده



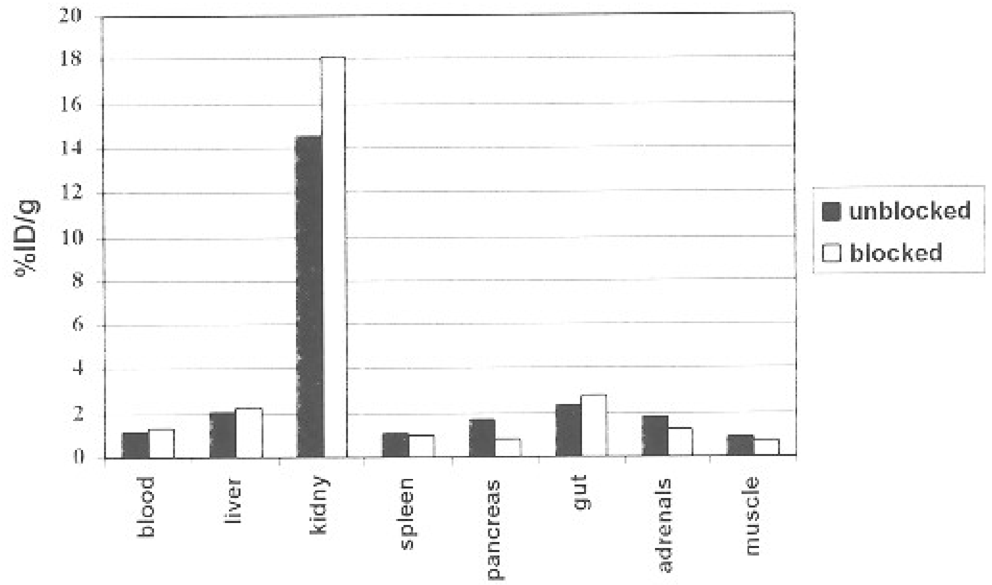
نمودار ۱ – پایداری ^{99m}Tc –Tricine-HYNIC-Toc در سرم انسانی بعد از گذشت زمانهای مختلف

رسپتور بایندینگ و اینترنالیزه شدن رادیو دارو با رسپتور

ابتدا سلولهای AR42J در ظروف کشت سلولی چاهک دار مخصوص رشد داده شدند تا مقدار آنها معادل ۰/۵ میلی گرم پروتئین در هر چاهک گردید، سپس آزمایشات بصورت دوتایی در ٤ ردیف A, B, C, D انجام شد . به هر یک از چاهک ها ۱ میلی لیتر محیط کشت اضافه گردید و سپس به سری B و D هر کدام ۵ میکرو لیتر اکتریوتاید سرد حاوی 10^{-6} مول اکتریوتاید اضافه کرده ولی به سری A و C پپتید سرد اضافه نشد . به تمام چاهک ها ۱۰ میکرولیتر از تیروزین اکتریوتاید نشان دار شده اضافه کرده و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار دادیم. بعد از خارج کردن سلولها از انکوباتور محیط کشت آنها را خالی کرده و به ترتیب سری A و B را سه مرتبه با ۱ سی سی PBS و سری C و D را یک مرتبه با ۱ سی‌سی بافر سدیم استات (0.1M,pH=3.5) بعد از ۲ دقیقه انکوباسیون و سپس دو مرتبه هر بار با ۱ سی سی PBS شستشو دادیم. نهایتا هر چهار سری سلول را با ۱ سی سی سود ۱ مولار بعد از نیم ساعت انکوبه کردن شستشو داده تا تمامی سلولها از سطح جدا شوند و اکتیویته هر یک را شمارش کردیم. مقدار بایندینگ اختصاصی کل از رابطه A - B = E و اینترنالیزه شدن پپتید با رسپتور از رابطه C - D = F محاسبه گردید .

بررسی توزیع بیولوژیکی در موش

تعداد ۸ موش انتخاب شده به دو گروه تقسیم شدند که به یک گروه ۵۰ میکرو گرم اکتریوتاید سرد و به گروه دیگر ۵۰ میکروگرم نرمال سالین تزریق شد . بعد از گذشت ۰/۵ ساعت به هر دو گروه ۱۲ میکرو کوری پپتید نشاندار شده با تکنسیوم تزریق شد . به ترتیب ۰/۵ ؛ ۱ ؛ ۲ ؛ ۳ ؛ ٤ و ۲٤ ساعت بعد از تزریق پپتید نشاندار موشها کشته شده و قسمتهای مختلف شامل خون ؛ کبد ؛ پانکراس ؛ طحال ؛ کلیه ؛ معده ؛ روده کوچک ؛ روده بزرگ و ماهیچه جدا گردیده، وزن و اکتیویته آنها بدست آمد . درصد دوز تزریقی به ازای گرم بافت (%ID/ g) برای هر عضو حساب شده و با استفاده از آزمون Paired - t - test مقایسه بین زمانهای مختلف و بین دو گروه انجام گردید . (نمودار ۲ و جدول ۱)



نمودار ۲- توزیع بیولوژیکی ^{99m}Tc-Tricine-HYNIC-Toc در موش نرمال ۴ ساعت پس از تزریق پپتید

جدول ۱- توزیع بیولوژیکی ^{99m}Tc-Tricine-HYNIC-Toc در موش نرمال ۴ ساعت پس از تزریق پپتید

Tissue	Unblocked	Blocked
Blood	1.14 ± 0.10	1.31 ± 0.09
Liver	2.08 ± 0.40	2.20 ± 0.39
Kidny	14.57 ± 3.42	18.15 ± 5.34
Spleen	1.07 ± 0.16	0.98 ± 0.04
Pancreas	1.66 ± 0.08	0.80 ± 0.13
Gut	2.32 ± 0.42	2.82 ± 0.86
Adrenals	1.80 ± 0.20	1.24 ± 0.14
Muscle	0.92 ± 0.14	0.73 ± 0.15

فرمولاسیون کیت

۱۰ میکروگرم پپتید کنژوگه شده ؛ ۵۰ میکروگرم کلروراستانو؛ ۱۵ میلی‌گرم تریسین را در ۱ سی‌سی‌آب مقطر حل کرده و پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون آن را در خلاء خشک می‌کنیم . کیت تهیه شده با اضافه کردن ۲۰ میلی کوری سدیم پرتکنتات در دمای اتاق بعد از گذشت زمان ۱ ساعت نشان دار می‌گردد .

یافته‌ها

در سنتز کنژوگه پپتید با HYNIC نهایتا Tyr^3-Oct HYNIC– با بازده ۴۰ ٪ و خلوص بیش از ۹۵٪ به دست آمد . کنژوگه پپتید سنتز شده با لیگاند کمکی تریسین با خلوص رادیوشیمیایی بالای ۹۵٪ نشاندار شد . پایداری در سرم انسانی بعد از ۱۵ دقیقه ۹۰٪ و نهایتا بعد از ٤ ساعت به ٤۵٪ رسید . اتصال به رسپتور و در نتیجه اینترنالیزه شدن برابر ٤٪ به ازای هر میلی گرم پروتیین بعد از گذشت زمان ۱ ساعت بود . در توزیع بیولوژیکی ترکیب، اختلاف معنا داری (t-Test، $P<0.05$) در جذب ترکیب بین حیوانات بلاک شده با

بلاک نشده در بافت های آدرنال و پانکراس که سرشار از رسپتورهای سوماتوستاتینی هستند دیده می‌شود که نشان دهنده جذب اختصاصی ترکیب در این بافت ها است . در بقیه بافت ها عدم وجود اختلاف معنادار بین حیوانات بلاک شده و بلاک نشده نشان دهنده جذب غیر اختصاصی ترکیب در آن بافت ها می‌باشد . جذب بالا در کلیه نسبت به کبد نشان دهنده دفع کلیوی ترکیب می‌باشد .

نتیجه‌گیری کلی

از آنجایی که [111]In-DTPA-Octreotide به علت داشتن محدودیت هایی چون عدم دسترسی آسان و هزینه بالای تهیه آن قابل استفاده در تمام مراکز پزشکی هسته‌ای نمی باشد، تهیه آلترناتیوی که به راحتی قابل دسترس و استفاده باشد ضروری به نظر می‌رسد . در این راستا HYNIC-Tyr^3-Octreotide با درصد بالایی در حضور تریسین با تکنسیوم نشان دار گردیده و دارای رسپتور بایندینگ و توزیع بیولوژیکی مناسبی می‌باشد و می‌توان کیت مناسبی از آن که به راحتی در تمام مراکز پزشکی هسته‌ای قابل استفاده باشد تهیه کرد، بنابراین از این ترکیب می‌توان به عنوان آلترناتیو [111]In-DTPA-Octreotide در تمام مراکز پزشکی هسته‌ای استفاده کرد .

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای حسین حمزه و خانم ذوقی در بخش رادیوایزوتوپ به خاطر همکاری تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1) Schally AV; Oncological applications of somatostatin analogues. Cancer Res 1988; 48: 6977-6985
2) Vigrolin I, Angelberger P, Li S, Yang Q, Kurtaran A, Aderer M, Neuhold N, Kaserer K, Leimer M, Peck M, Scheithauer W, Niederle B, Eichler H and Valent P; In vitro and in vivo studies of three radiolabelled somatostatin analogues: [123]I-Octreotide, [123]I-Tyr^3-Oct and [111]In- DTPA-Phe-1-Oct. Eur J Nucl Med 1996; 23: 1388-1399
3) Thakur M, Kolan H, Rifat S, Li J, Rux A, John E, Halmos G and Schlly A; Vaprotide labelled with [99m]Tc for imaging tumors: preparation and preliminary evaluation. International Journal of Oncology 1996; 9: 445-451
4) Maecke HR and Behe M; New octrotide derivatives labelled with technetium-99m [abstract]. J Nucl Med 1996; 37: suppl 29 P
5) Abrams Mj, Juweid M, Tenkate C, Schwartz DA, et al; [99m]Tc human polyclonal IgG radiolabelled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. J Nucl Med 1990; 31: 2022-2028