

## STUDIME TE PASTERTISE RADIOKIMIKE DHE RADIOFARMAKOLOGJIKE TE DERIVATEVE TE REJA TE BOMBESINES TE SHENUARA ME $^{99m}\text{Tc}$ A STUDY OF RADIOCHEMICAL AND RADIOPHARMACOLOGICAL PURITY OF NEW DERIVATIVES OF BOMBESIN MARKED WITH $^{99m}\text{Tc}$

BRUNILDA DACI, SKENDER MALJA, ELIDA BYLYKU

Qendra e Fizikes Berthamore te Zbatuar, Universiteti i Tiranes, Rruga "Qesarake", Kutia Postare 85,  
Tirane, SHQIPERI

E-mail: brunilda\_daci@yahoo.com

### PERMBLEDHJE

Me synimin e pergatitjes se radiofarmaceutikateve te reja per diagnostikimin dhe terapine e semundjeve kanceroze, kemi shenuar me  $^{99m}\text{Tc}$  derivate te reja peptidike te Bombesines dhe kemi studiuar sjelljen radiokimike dhe radiofarmakologjike te komplekseve qe ato krijojne me  $^{99m}\text{Tc}$ . Keshtu, jane percaktuar kushtet optimale te shenimit, eshte realizuar studimi radiokimik i produkteve te fituara, studimi i qendrushmerise se komplekseve ne temperature dhome. Gjithashtu eshte kryer studimi radiofarmakologjik i ketyre komplekseve peptidike si bioshpërndarja ne minj normal dhe me tumore te injektuar, eksperimente bllokimi dhe shintigrafi. Rezultatet e marra jane premtuese dhe tregojne se keto derivate te reja te Bombesines mund te perdoren me sukses per zbulimin e hershem te kancerit.

### ABSTRACT

With the prospective of preparing new radiopharmaceuticals for cancer diagnosis/therapy, we have labelled and studied a series of new Bombesin-like peptides. Bombesin (BN) is a peptide exhibiting a high affinity for the gastrin-releasing peptide (GRP) receptor, which is over expressed by a variety of tumors, including breast or prostate cancer. The aim of the present study was the investigation of the complexes formed between a series of BN-like peptides and the nuclide  $^{99m}\text{Tc}$ . The radiolabelling of the derivatives with  $^{99m}\text{Tc}$  was performed using  $^{99m}\text{Tc}$  -Gluconate as the intermediate complex. While  $^{99m}\text{Tc}$  labelled monoclonal antibodies have been widely used in diagnosis, the methods used for labelling may modify the protein structure, causing the formation of undesirable by-products. We have

studied the radiochemical species formed using two different chromatographic methods to determine radiochemical purity of the products. Also, the detailed investigations are performed to study in-vitro stability of the labelled products. The in-vivo behaviour of the  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled BN-like peptides was evaluated in normal mice. All the derivatives showed specific uptake in the pancreas, an organ rich in BN receptors. The above preliminary results indicated that the new BN-derivatives are promising for human cancer studies.

**Fjale kyce:** Pasterti radiokimike,  $^{99m}\text{Tc}$ , bioshpërndarje, bombesine, shenim, peptide.

### HYRJE

Neuropeptidet e vogla te radioshenuara jane nje klase relativisht e re e radiofarmaceutikateve, te cilat cilesohen si premtuese per zbulimin e hershem te kancerit. Shume receptore neuropeptide jane te pranishem, ne perqendrimet e larta, ne shume tumore njerezore, keshtu qe ato mund te perdoren si shenjeza potenciale per marrjen e imazhit dhe terapine me neuropeptidet e radioshenuar [2]. Perqendrimi ne tumore vjen si pasoje e aftesisë se ketyre biomolekulave per te lidhur receptoret e siperfaqes se qelizave, te pranishme ne nje numer te madh indesh tumorale malinj. Peptidet kane cilesi te favorshme per t'u perdorur si gjurmues te radioshenuar, vecanerisht, afiniteti receptor i larte dhe pastrimi i shpejte nga plazma. Megjithate ne kushte fiziologjike ato metabolizohen shpejt ne plazem nga peptidazat endogene duke perfunduar efektin e tyre biologjik. Nje peptid me interes, Bombesina eshte zgjedhur per kete studim. Bombesina (BN), nje neuropeptid i 14

aminoacideve, eshte nje tetradekapeptid me kete formule te pergjithshme: [pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>]. Ajo eshte izoluar nga lekura e amfibeve "Bombina orientalis" dhe eshte nje analog i "gastrin releasing peptide" njerezore (GRP), qe lidhet ne receptoret GRP (GRP-R) me afinitet dhe specificitet te larte [1]. Gjithashtu, pervec ketij roli fiziologjik, GRP, duke bashkevepruar me GRP-R, stimulojne rritjen e tumoreve ne nje numer te konsiderueshem qelizash kanceri njerezore. Receptoret GRP jane te pranishem ne disa lloje tumoresh njerezore, duke perfshire kancerin e prostatit, te gjoksit, qeliza te vogla kanceri te mushkerive etj [5]. Ky ndikim i receptoreve te peptideve mbi tumoret njerezore ka nje interes klinik te konsiderueshem ne ditet e sotme. Keshtu, Bombesina e radioshenuar mund te perdoret me sukses per shintigrafine e receptoreve GRP. Akumulimi i larte i gjurmuesve diagnostik ne tumoret e paoperueshme eshte kriteri me i rendesishem per terapine radioizotopike te metejshme.

Mirepo eshte verejtur se Bombesina ka nje metabolizem shume te shpejte in-vivo dhe si rezultat akumulimi (uptake) ne tumore xenografts ne minj eshte i ulet [3]. Kjo ka rrezikuar perdorimin e saj si radiofarmaceutikat. Problemi i stabilitetit te ulet in vivo eshte zgjidhur duke nderhyre dhe modifikuar molekulen e Bombesines. Permirosim i dukshem eshte realizuar nga futja ne molekulen e Bombesines te amino-acideve jonatyrare me grupe elektron-dhenese, te afta per te kompleksuar <sup>99m</sup>Tc e reduktuar. Nga keto nderhyrje ne molekulen e Bombesines jane perftuar derivate qe shkurtimisht i paraqesim me X-Aca-BN, ku grupi metalik gelatues X eshte lidhur ne aminen fundore N me ane te acidit 6-amino-hekzanoik (Aca), ndersa X-eshte grupi Gly-Gly-Cys.

Gjithashtu eshte studiuar ndikimi i gjatesise se vargut (peshes molekulare) te peptidit ne sjelljen radiokimike dhe radiofarmakologjike te tyre, duke studiuar dy derivatet e meposhtme qe dallohen ndermjet tyre vetem nga gjatesia e vargut:

(BN1.1): Gly-Gly-Cys-Aca-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met(CONH<sub>2</sub>) : Gly-Gly-Cys-Aca-BN[2-14]

(BN1.1p): Gly-Gly-Cys-Aca-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met(CONH<sub>2</sub>) : Gly-Gly-Cys-Aca-BN[7-14]

## MATERIALET DHE METODAT

### I. Studimi i shenimit te derivateve te Bombesines me <sup>99m</sup>Tc

Shenimi i biomolekulave sensitive kerkon kujdes te vecante lidhur me pastertine kimike, radiokimike, radioberthamore te radioizotopit dhe te menyres se si realizohet shenimi. Ekzistojne dy menyra per shenimin

e tyre, qe dallojne nga njera tjetra nga menyra e lidhjes se peptidit me radiometalin: menyra e drejtperdrejte dhe jo e drejtperdrejte (me dy etapa) [6]. Menyra e drejtperdrejte e shenimit eshte jo e efektshme ne rastin e biomolekulave sensitive. Ajo nuk rezulton me formimin e nje komponimi te vetem radioaktiv me pasterti te larte radiokimike.

Menyra jo e drejtperdrejte (me dy faza) e shenimit perdoret per te shenuar nje biomolekule sensitive. Eshte gjetur e nevojshme prania e nje produkti te ndermjetem (precursor), i cili fillimisht lidhet me radioizotopin, dhe me pas ndodh reaksioni i shkembimit te radioizotopit nga ky produkt i ndermjetem ne biomolekulen [4]. Ne rastin e derivateve te Bombesines ne studim, glukonati i natriumit i reduktuar me SnCl<sub>2</sub> dhe i shenuar me <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> u perdor si ligandi i ndermjetem i shkembimit te <sup>99m</sup>Tc.

### Menyra e shenimit

Nje perzierje e ngurte qe permban 1.0 g glukonat natriumi, 2.0 g NaHCO<sub>3</sub> dhe 15 mg SnCl<sub>2</sub> eshte homogjenizuar dhe ruajtur ne te thate. Nje sasi prej 6.0 mg e perzierjes se mesiperme eshte tretur ne 2.0 ml solucion Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> qe permban 1480 MBq (40 mCi) <sup>99m</sup>Tc te mjele ne kushte sterile nga gjeneratori <sup>99</sup>Mo - <sup>99m</sup>Tc. Nje alikuote e solucionit te mesiperme, qe permban 740 – 925MBq (20 – 25mCi) te <sup>99m</sup>Tc eshte shtuar ne 0.03 – 0.1mg te derivateve te Bombesines qe studiohen. Perzierja eshte lene ne temperature 37°C per 30 minuta, kohe kjo e mjaftueshme per perfundimin e reaksionit te shkembimit.

## II. Studimet radiokimike

### Analiza radiokimike

Analiza radiokimike u realizua me anen e ketyre dy metodave:

Metoda e kromatografise se menjehershme ne shtrese te holle (ITLC)

Per realizimin e kesaj metode u perdoren si faze stacionare shirita ITLC-SG te firmes Gelman-Science ne permasa 2 x 20cm, te aktivizuara para perdorimit. Si faze levizese u perdor 0.9%NaCl dhe MEK (Metil Etil Keton).

Metoda e kromatografise se lenget ne presion te larte (HPLC)

Rendimenti i shenimit u analizua edhe me metoden e kromatografise se lenget ne presion te larte me faze te kthyeshme, RP-HPLC, ne nje kollone te tipit 18C μ-Bondapack (3.9mm x 300mm). Alikuta prej 10μl te solucionit te derivateve te Bombesines te shenuara u perdoren per kete metode. Per eluim u zbatua nje sistem gradienti linear me shpejtesi rrjedhjeje 1ml/min, qe permban A: 0.05%TFA (acid trifluoracetik)

ne uje dhe B: 60% ACN (acetonitril) ne solventin A, per 20 minuta. Eluenti eshte kaluar permes nje detektori UV ne 220nm dhe permes nje detektori shintilues NaI, te lidhur te dy me nje kompjuter per analizen dhe ruajtjen e te dhenave.

#### **Stabiliteti in-vitro i derivateve te shenuara**

Per te percaktuar stabilitetin in-vitro te peptideve te shenuara, mostra te shenuara te tyre u ruajtten ne temperature dheme (~20°C) dhe ne frigorifer (~4°C), dhe pas cdo ore u analizuan alikuota nga 10µl me sistemet e pershkuara me siper per rendimentin e shenimit.

### **III. Studimet radiofarmakologjike**

#### **Bioshpërndarja ne minj normal**

Per studimet e bioshpërndarjes jane perdorur minj te vegjel, me peshe ~ 25g, te seksit femer, zviceriane. Per cdo pike matjeje jane perdorur grupe me nga 5 kafshë. Derivatet e Bombesines te radioshenuara me 99mTc dhe holluara deri ne aktivitetin e kerkuar me solucion fiziologjik, jane injektuar ne venen e bishtit te cdo miu ne nje vellim jo me te larte se 100µl. Kafshet jane sakrifikuar, pas anestezise me eter, ne intervale kohe te paracaktuara pas injektimit (30, 60, 120 dhe 180min). Jane vecuar organet kryesore, jane peshuar dhe matur per aktivitetin e tyre te akumuluar ne to ne nje numerues shintilues gama (Minimax 5000, Packard, USA). Rezultatet e marra nga ky studim shprehen ne % te dozës se injektuar per peshen ne gram te cdo organi.

#### **Eksperimenti i bllokimit**

Ky eksperiment kryhet per te provuar nese Bombesina natyrore (native), e pashenuar, pengon akumulimin e derivateve te Bombesines se shenuar ne pankreas (Bombesina natyrore dhe derivatet e Bombesines te shenuara do te konkurojne per te arritur receptoret GRP-R). Keshtu, ne nje grup tjeter kafshesh eshte bashkeinjektuar vellim i njejte (100µl) i Bombesines native (natyrore) dhe peptideve te shenuar. Keto kafshë jane sakrifikuar 60 minuta pas injektimit. Te dhenat e bioshpërndarjes jane llogaritur si perqindje e dozës se llogaritur per peshen (ne gram) te cdo organi.

#### **Bioshpërndarja ne minj me tumor te injektuar**

Nepermjet ketij eksperimenti percaktohet shkalla e akumulimit te derivateve te shenuara ne tumore dhe raporti tumor / jo tumor. Per te realizuar kete eksperiment jane perdorur minj te seksit femer, nude, me peshe afersisht 20g. Tumore eksperimentale jane inokuluar (vaksinuar), ne kofshen e djathte te cdo miu me anen e transplantit te qelizave kanceroze prostati PC3 (107 qeliza / mi). Tumoret jane lene te rriten per tre jave. Studimet e bioshpërndarjes te derivatit te Bombesines te shenuar me 99mTc jane realizuar pas injektimit intravenoz ne venen e bishtit te cdo miu. Kafshet jane sakrifikuar 1 ore pas anestezise me eter. Tumori eshte ndare vecmas, peshuar dhe matur per aktivitetin e akumuluar ne te. Po ashtu eshte vepruar me pjesen tjeter te trupit. Rezultatet e bioshpërndarjes jane llogaritur ne %ID/g (perqindje e dozës se injektuar per g organ te trupit te miut).

#### **Studimet shintigrafike**

Nga minjte nude, qe mbartin qeliza te kancerit te prostatit PC3 (sic pershkuam me lart), jane marre imazhe, 1 ore pas injektimit intravenoz te derivateve te Bombesines te shenuar me 99mTc. Studimi eshte realizuar ne nje gama-kamera me fushe te vogel pamjeje, bazuar mbi nje kristal CsI.

### **REZULTATE DHE DISKUTIME**

#### **I. Studimet radiokimike**

##### **Analiza radiokimike**

*Metoda e kromatografise se menjehershme ne shtrese te holle (ITLC)*

Kjo metode u zbatua per solucionet e derivateve te Bombesines te shenuara direkt me 99mTc, pa perdorur si ndermjetes glukonatin. Rezultatet per te gjitha derivatet ishin te njejta. Nga keto radiokromatograma shihet qarte se asnje lloj kompleksi nuk eshte krijuar gjate shenimit direkt te derivateve te Bombesines me 99mTc.

E njejta procedure u ndoq per solucionin e marre pas shenimit te glukonatis, te pergatitur si me siper dhe te ruajtur ne te thate, me 99mTc. Kromatogramat per dy sistemet respektive jepen ne Fig. 7 dhe Fig. 8.

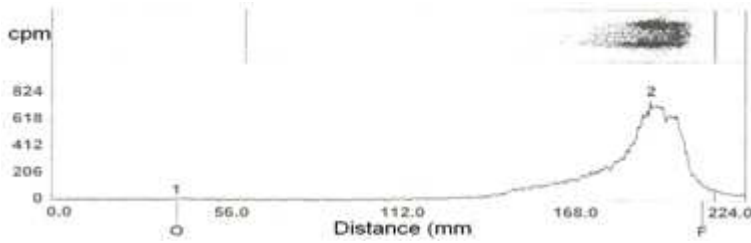


Fig. 7 Glukonat i shenuar (ITLC-SG / 0.9%NaCl)

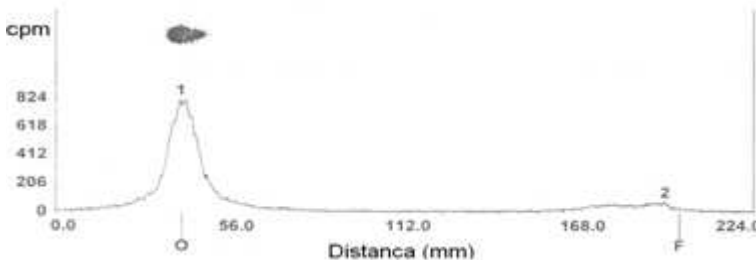
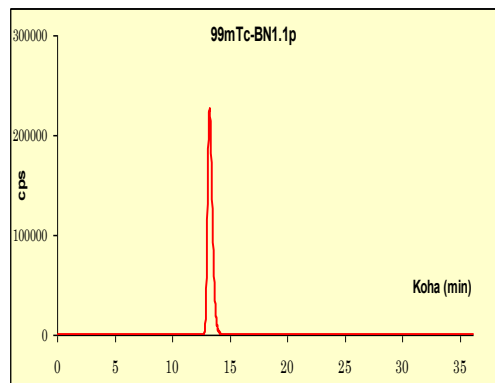
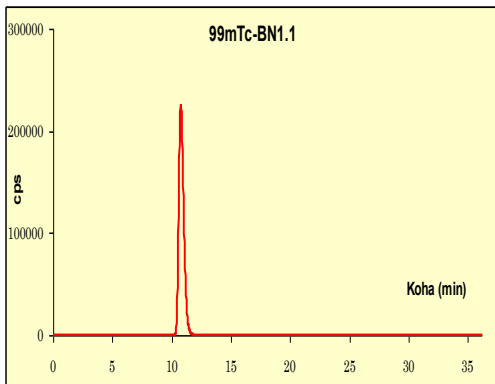


Fig. 8 Glukonat i shenuar (ITLC-SG /MEK)



Fi

g. 9 Profili i eluimit te BN 1.1 dhe BN 1.1p (HPLC)

Me sistemin ITLC-SG / 0.9%NaCl percaktohet 99mTc i lire dhe me sistemin ITLC-SG / MEK percaktohet 99mTc koloidal.

Nga keto radiokromatograma shihet qarte se kompleksi 99mTc-Glukonat eshte shenuar me pasterti 85.3%.

**Metoda e kromatografise se lenget ne presion te larte (HPLC)**

Rezultatet e marra nga kjo metode treguan se radioshenimi i derivateve te Bombesines me 99mTc con, ne secilin rast, ne formimin e nje komponimi te vetem radioaktiv. Ne Fig. 9 jepen profilet e eluimit te dy prej derivateve ne studim me metoden HPLC. BN 1.1.

**Stabiliteti in-vitro i derivateve te shenuara**

Stabiliteti in-vitro shprehet me kohen qe kalon nga momenti i shenimit te derivatit deri ne kohen kur rendimenti i shenimit te tij rezulton mbi 90%. Matjet treguan se komplekset ishin stabel deri 6 ore, kur ato ruhen ne temperature dheme, dhe deri ne 8 ore kur ruhen ne frigorifer. Rendimenti i shenimit u percaktua me metoden ITLC te pershkruar me lart.

**II. Studimet radiofarmakologjike**  
**Bioshpenderja ne minj normal**

Ne Fig. 10 jepen grafiksht rezultatet e marra nga studimet e bioshpenderjes ne minj normal per dy derivatet BN.1.1 dhe BN 1.1p te Bombesines.

Duke analizuar keto rezultate arrijme ne perfundimin se kemi perqendrim me te larte ne pankreas per BN1.1p, sidomos ne 30 minuteshin e pare dhe largimi nga organizmi i derivateve te shenuara realizohet nga veshkat ne traktin urinar per BN1.1 dhe nga zorret ne traktin urinar per BN1.1p, pa ndonje mbetje te

theksuar ne veshka. Pra derivati BN1.1p sjell krahasim me derivatin tjetër të Bombesines. përmirësim në sjelljen radiofarmakologjike në .

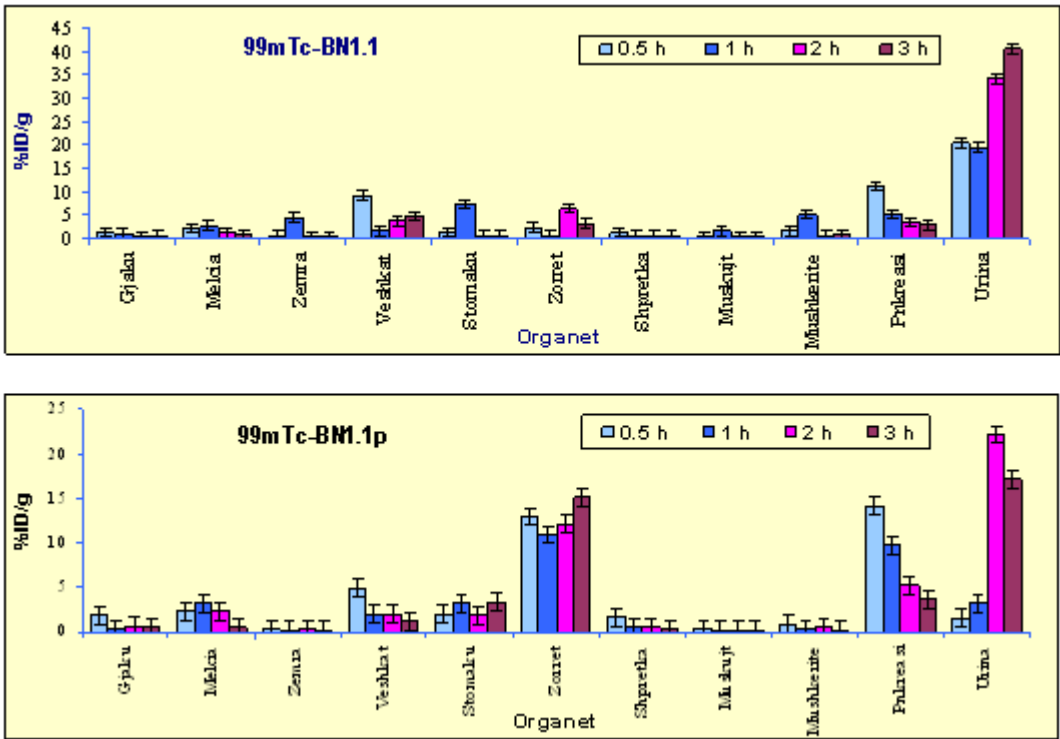


Fig. 10 Rezultatet e bioshpërdarjes në minj normal për BN1.1 dhe BN1.1p

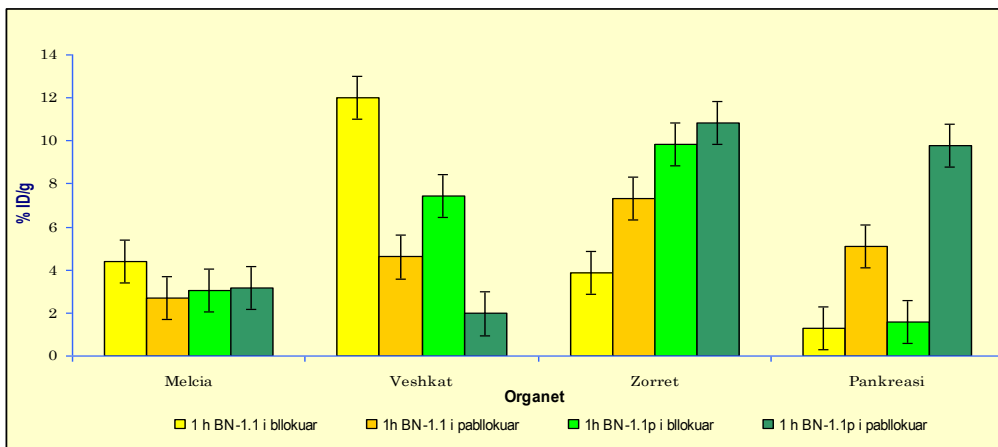


Fig. 11 Eksperimenti i bllokimit për BN1.1 dhe BN1.1p

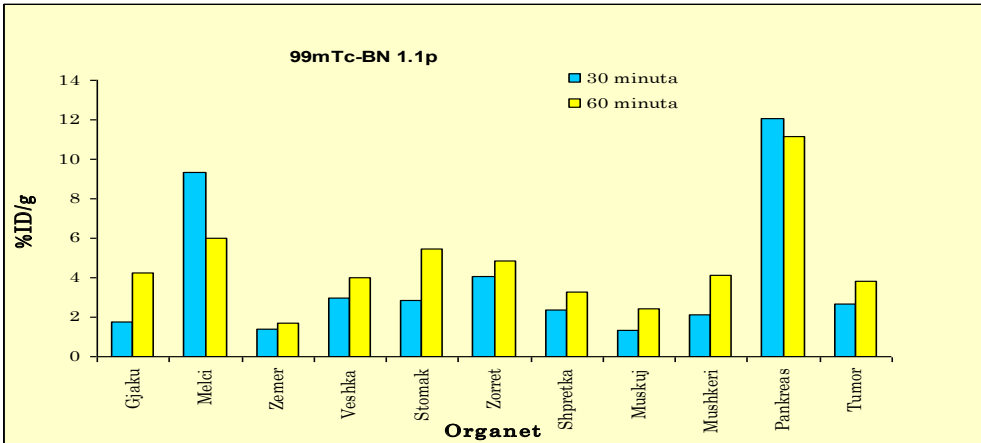


Fig. 12 Bioshpërndarja në minj me tumore të injektuar për BN1.1p

**Eksperimenti i bllokimit**

Në Fig. 11 jepen grafikisht rezultatet e marra nga ky studim.

Analiza e rezultateve të marra tregon se injektimi i njëkohshëm i Bombesines natyrore dhe asaj të shënuar con në bllokimin (uljen e përqendrimit) e derivateve të shënuara në pankreas, krahasuar me melcine dhe sidomos me veshkat. Kjo vertetohet edhe një herë faktin se ato konkurojnë njëllë për receptoret GRP, pra janë analoge të njëri-tjetrit. Ky bllokim është me i theksuar për derivatin BN1.1p.

**Bioshpërndarja në minj me tumor të injektuar**

Në Fig. 12 janë paraqitur rezultatet e marra për derivatin BN.1.1p, i përcaktuar si më i miri për sjelljen e tij radiofarmakologjike deri në këto faze të studimit. Sic shihet nga këto rezultate, vërehet dhe një herë akumulim shumë i lartë në pankreas dhe akumulim i kënaqshëm në tumore, në masën 2.8% dhe 3.7%, respektivisht, 30 dhe 60 minuta pas injektimit. Pra, akumulimi i derivateve të Bombesines në tumore është i kënaqshëm dhe po ashtu raporti tumor / jo tumor.

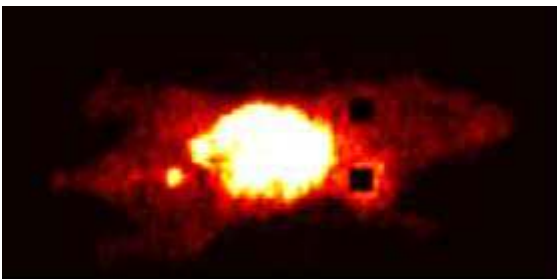


Fig. 13 Shintigrafi në mi me tumor të injektuar

**Studimet shintigrafike**

Në Fig. 13 është paraqitur shintigrafi e miut me tumor, 1 orë pas injektimit të derivatit të Bombesines BN.1.1p

Në Fig. 14 jepen profilet e radioaktivitetit për dy zona që na interesojnë (zona normale dhe ajo me tumor të injektuar).

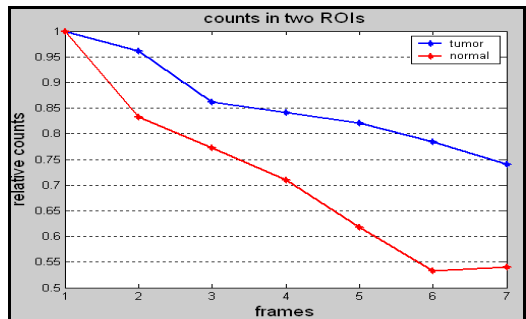
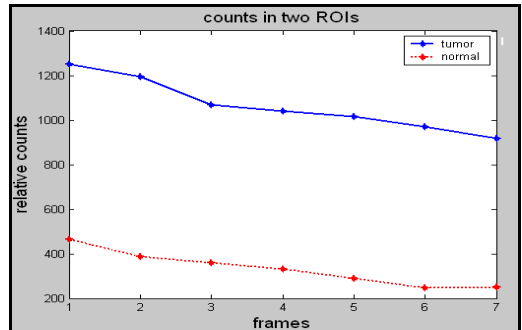


Fig. 14 Profilet e radioaktivitetit për zonat në interes

Grafiku i parë jep të dhënat e marra për dy zona (normale dhe me tumor), duke filluar nga minuta e 15

deri ne te 27. Sic shihet kemi akumulim te larte te radioaktivitetit ne zonen me tumor te injektuar.

Ne grafikun e dyte jepen kurbat e eliminimit (largimit) te radioaktivitetit nga keto zona. Shihet se aktiviteti i perqendruar ne zonen me tumor te injektuar nuk eliminohet me te njejten shpejtesi si ne zonen normale. Ne minuten e 25 eshte eliminuar 75% e aktivitetit total nga zona me tumor dhe 55% nga zona normale.

#### PERFUNDIME

Rezultatet e arritura ne kete studim mund t'i përbledhim ne:

Shenimi i derivateve te Bombesines me  $^{99m}\text{Tc}$  con ne formimin e nje komponimi radioaktiv te vetem, qe shfaqet si nje pik i vetem gjate kontrollit me sistemin HPLC.

Keto komponime mbeten stabel deri ne 6 ore pas shenimit kur ruhen ne temperature dhome dhe deri ne 8 ore pas shenimit kur ruhen ne frigorifer.

Bioshpërndarja ne kafshe tregon per nje pastrim (largim) te shpejte nga gjaku, kryesisht permes veshkes, per BN1.1, dhe zorreve, per BN1.1p, ne traktin urinar.

Bioshpërndarja ne minj normale tregon se akumulimi ne pankreas eshte i larte dhe specifik.

Studimet shintigrafike te derivateve te Bombesines ne minj me tumore te injektuar tregojne per mundesine e dedektimit shintigrafik te ketyre tumoreve.

Eksperimentet e bllokimit tregojne edhe nje here se derivatet e Bombesines ne studim jane analoge te Bombesines natyrore. Ato konkurojne njelloj per te kapur receptoret GRP-R.

Krahasimet midis derivateve BN1.1 dhe BN1.1p tregojne per permiresim te sjelljes radiofarmakologjike te derivatit BN1.1p, gje qe i jep atij mundesine per t'u perdorur me sukses si radiofarmaceutikati me i

pershtatshem ne diagnostikimin e kancerit te hershem ne pankreas.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Breemen W.A.P., Hofland L.J., de Jong M., Bernard B.F., Sinivasan A., Kwekkeboom D.J., Visser T.J. and Krenning E.P. Evaluation of radiolabeled bombesin analogues for receptor-targeted scintigraphy and radioteraphy. *Int J Cancer*, 81(4), 658-665, (1999).

2. Karra S. R., Schibli R., Gali H., Katti K.V. and Hoffman T.J., Higginbotham Sieckman GL, and Volkert WA.  $^{99m}\text{Tc}$ -labeling and in vivo studies of a bombesin analogue with novel water-soluble dithiadiphosphine-based bifunctional chelating agent. *Bioconjug Chem*, 10, 254-260, (1999).

3. La Bella R., Garcia-Garayoa E., Bahler M., Blauenstein P., Schibli R., Conrath P., Tourwe D. And Schubiger P.A. A  $^{99m}\text{Tc}$  (I)-Postlabeled High Affinity Bombesin Analogue as a Potential Tumor Imaging Agent. *Bioconjugate Chem.*, 13, 599-604 (2002).

4. La Bella R., Garcia-Garayoa E., Langer M., Blauenstein P., Beck-Sickinger A.G. and Schubiger PA. In vitro and in vivo evaluation of a  $^{99m}\text{Tc}$ (I)-labeled bombesin analogue for imaging gastrin releasing peptide receptor-positive tumors. *Nucl Med Biol*, 29, 553-560, (2002).

5. Nock B., Nikolopoulou A., Chiotellis E., Loudos G., Maintas D., Reubi J.C. and Maina T. [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumor imaging. *Eur J Nucl Med*. 30, 247-258, (2003).

6. Van de Wiele C., Dumont F., Vanden Broecke R., Oosterlinck W., Cocquyt V., Serreyn R., A GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. *Eur J Nucl Med*, 27, 1694-1699, (2000).