

RADIOCHEMICAL AND RADIOBIOLOGICAL EVALUATION OF A NEW SERIES OF BOMBESIN DERIVATES

VLERESIMI RADIOKIMIK DHE RADIOBIOLOGJIK I NJE SERIE TE RE TE DERIVATEVE TE BOMBESINES

^aELIDA BYLYKU, ^aBRUNILDA DACI, ^aSKENDER MALJA, ^bDAMIANA OSMALLI

^aQendra e Fizikes Berthamore te Zbatuar, Universiteti i Tiranes

^bInstituti i Shendetit Publik

elidabylyku@yahoo.co.uk

AKTET V, 1: 87-91, 2012

PERMBLEDHJE

Ne vazhdim te drejtimit te pergatitjes se radiofarmaceutikateve te reja per diagnostikimin dhe terapine e kancerit te pankreasit, kemi studiuar nje seri te re derivatesh te Bombesines. Keto derivate formojne komplekse me radiometalin ^{99m}Tc, i cili eshte ideal per qellime diagnostikuese. Perpjekjet tona jane fokusuar ne vleresimin krahasues te kushteve te radioshenimit te ketyre derivateve te bombesines me ^{99m}Tc, duke percaktuar kushtet optimale te shenimit. Eshte realizuar studimi radiokimik dhe qendrueshmeria e produkteve te fituara ne temperature dhome dhe -4°C, me metoden kromatografike HPLC. Gjithashtu eshte kryer studimi i bioshpërndarjes ne minj normal dhe me tumore te injektuar. Rezultatet e ketij studimi treguan se seria e derivateve te reja te Bombesines shfaq veti kimike dhe biologjike te ngjashme me ato te Bombesines natyrore dhe keto derivate kane veti premtuese per t'u perdorur per studime te kancerit dhe ne njerez.

Fjalë kyçe: Bombesin, kromatografi, pasterti radiokimike, shenim, ^{99m}Tc.

SUMMARY

With the aim of preparing new radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy of pancreas cancer, we have studied e series of new bombesin derivatives. These derivatives form complexes with the radimetal ^{99m}Tc which is ideal for diagnosis purposes. Our efforts were focused on comparatively assessing the radiolabeling conditions of the Bombesin derivatives with ^{99m}Tc, defining optimal conditions of labeling. It is performed radiochemical study and stability of the products in room temperature and -4 °C, using HPLC chromatographic method. There are also performed biodistribution studies in normal and inducted tumor mice. The results of this study indicated that the new series of Bombesin derivatives shows chemical and biological properties similar with native Bombesin and they are promising for human cancer studies.

HYRJE

Peptidet kane cilesi te favorshme per t'u perdorur si gjurmues te radioshenuar per shkak te afinitetit receptor te larte dhe pastrimit te shpejte nga plazma. [1] Mirepo ne kushte fiziologjike ato metabolizohen shpejt ne plazem nga peptidazat endogene duke perfunduar efektin e tyre biologjik. Perqendrimi i neuropeptideve te vogla ne tumore vjen si pasoje

e aftesise se ketyre biomolekulave per te lidhur receptoret e siperfaqes se qelizave, te pranishme ne nje numer te madh indesh tumorale malinj.[2] Ne pergatitjen e radiofarmaceutikateve me baze peptidet hapi i pare eshte pergatitja e komponimeve te cilat kane afinitet dhe selektivitet per organin qe na intereson dhe qe gjithashtu kane aftesi per te lidhur radioizotopin qe na intereson. Ne botimet shkencore jane

paraqitur perpjekje te medha te bera per te sintetizuar derivate te peptideve te afta per t'u lidhur me ^{99m}Tc nepermjet ligandëve. [3,4] Strategjia me e zakonshme eshte te fiksohet nje ligand ne nje nga aminoacidet fundore, shpesh nepermjet nje grupi hapësor.

Nje peptid me interes eshte zgjedhur 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-NH₂],

Ajo eshte nje analog i "gastrin releasing peptide" njerezore (GRP), qe lidhet ne receptoret GRP (GRP-R) me afinitet dhe specificitet te larte dhe njekohesisht stimulon rritjen e tumoreve ne nje numer te konsiderueshem qelizash kanceri njerezore.[5] Bombesina e radioshenuar mund te perdoret me sukses per shintigrafine e receptoreve GRP. Akumulimi i larte i gjurmëve diagnostik ne tumoret e paoperueshme eshte kriteri me i rendesishem per terapine radioizotopike te metejshme. Duke nderhyre dhe modifikuar molekulen e Bombesines eshte zgjidhur problemi i stabilitetit te ulet in vivo te saj. Permiresim i dukshem eshte realizuar nga futja ne molekulen e Bombesines te aminoacideve jonatyrële me grupe elektron-dhenese, te afta per te kompleksuar ^{99m}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). [6] Struktura e plote e derivateve te perftuara :

Gly-Gly-Cys-Aca-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met(CONH₂)) : **Gly-Gly-Cys-Aca-BN - (BN1.1)**

MeGly-Gly-Cys-Aca-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met(CONH₂)) : **MeGly-Gly-Cys-Aca-BN - (BN1.2)**

Me₂Gly-Gly-Cys-Aca-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met(CONH₂)) : **Me₂Gly-Gly-Cys-Aca-BN - (BN1.3)**

MacGly-Cys-Aca-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met(CONH₂)) : **MacGly-Cys-Aca-BN - (BN1.4)**

ku: **MeGly** eshte metilglycine, **Me₂Gly** eshte dimetilglycine dhe **Mac** eshte acid merkuptoacetik.

Pra ne molekulen e Bombesines natyrore eshte zevendesuar acidi piroglutamik (pGlu) me X-Aca qe mbart aminoacide te afta per t'u lidhur me radiometalin.

MATERIALET DHE METODAT

I. Studimi i shenimit te derivateve te Bombesines me ^{99m}Tc

Shenimi i nje biomolekule sensitive kryhet nepermjet nje produkti te ndermjetem (precursor), i cili fillimisht lidhet me radioizotopin duke qene mbartesi i tij, dhe me pas ndodh reaksioni i shkembimit te radioizotopit nga ky produkt i ndermjetem ne biomolekulen.

Ne rastin e derivateve te Bombesines ne studim, glukonati i natriumit i reduktuar me SnCl₂ dhe i shenuar me $^{99m}\text{TcO}_4^-$ eshte perdor si ligandi i ndermjetem i shkembimit te ^{99m}Tc .

Menyra e shenimit

Eshte homogjenizuar dhe ruajtur ne te thate nje perzierje e ngurte qe permban 1.0g glukonat natriumi, 2.0g NaHCO₃ dhe 15 mg SnCl₂. Nje sasi prej 6.0mg e perzierjes se mesiperme eshte tretur ne 2.0ml solucion Na $^{99m}\text{TcO}_4^-$ qe permban 1480MBq (40mCi) ^{99m}Tc te mjele ne kushte sterile nga gjeneratori $^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$. Nje alikuote e solucionit te mesiperme, qe permban 740 – 925MBq (20 – 25mCi) te ^{99m}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 metoden e kromatografise se lenget ne presion te larte (HPLC), me faze te kthyeshme, RP-HPLC, ne nje kollone te tipit ^{18}C μ -Bondapack (3.9mm x 300mm). Alikuta prej 10 μ l 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 lane ne temperature dhome (~20°C) dhe ne frigorifer (~4°C), dhe pas cdo ore u analizuan alikuota nga 10µl me sistemet e pershkruara 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 kafshe. Derivatet e Bombesines te radioshenuara me ^{99m}Tc 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, dhe 120min). 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).

Eksperimenti i bllokimit

Ky eksperiment kryhet per te provuar nese Derivatet e bombesines se shenuar jane analoge te Bombesines natyrore (native), te pashenuar, pra nese sillen njelloj ne organizem. Injektimi i njekohshem i tyre do te tregojte nese Bombesina natyrore pengon akumulimin e derivateve te Bombesines se shenuar ne pankreas (Bombesina natyrore dhe derivatet e Bombesines te shenuara do te konkurojne njelloj per te arritur receptoret GRP-R).(22)

Keshtu, ne nje grup tjetër kafshesh eshte bashkeinjektuar vellim i njejte (100µl) i Bombesines native (natyrore) dhe peptideve te

shenuar. Keto kafshe 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 ^{99m}Tc 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 tjetër te trupit.

REZULTATE DHE DISKUTIME

I. Studimi i shenimit te derivateve te Bombesines me ^{99m}Tc

Ne Tabelen 1 jepen strukturat e komplekseve te formuara me radiometalin (^{99m}Tc).

Derivati i Bombesines	Derivate te pastra Rt (min)	^{99m} Tc-komplekse Rt (min)
BN 1.1	8.71	10.36
BN 1.2	8.33	11.13
BN 1.3	8.99	11.38
BN 1.4	9.35	11.58

Tab. 1. Kohet e mbajtjes ne kollonen HPLC te derivateve ne studim

II. Studimet radiokimike

Analiza radiokimike

Ne Tabelen 1 jepen kohet e mbajtjes ne kollone (Rt) te derivateve te pastra dhe te shenuara.

Sic shihet nga rezultatet e marra nga kjo metode radioshenimi i derivateve te Bombesines me

^{99m}Tc con, ne secilin rast, ne formimin e nje komponimi te vetem radioaktiv.

Stabiliteti in-vitro i derivateve te shenuara

Matjet treguan se komplekset ishin stabel deri 6 ore, kur ato ruhen ne temperature dhome, dhe deri ne 8 ore kur ruhen ne frigorifer. Rendimenti i shenimit rezultoi mbi 98%, per secilin rast.in-vitro i derivateve te shenuara

	BN 1.1	BN 1.2	BN 1.3	BN 1.4
Gjaku				
30min	1.2	0.7	1.4	0.6
60min	1.1	2.0	1.8	3.2
120min	0.4	0.4	1.0	0.1
Melci				
30min	2.3	4.1	3.0	3.8
60min	2.7	4.2	1.8	9.6
120min	1.1	1.2	1.9	3.1
Zorret				
30min	2.4	8.7	5.6	9.3
60min	7.3	10.5	3.4	3.3
120min	6.4	9.8	6.4	15.7
Veshkat				
30min	9.2	4.3	11.0	3.7
60min	4.6	5.8	7.2	14.7
120min	3.7	1.6	6.4	0.6
Pankreas				
30min	11.3	7.7	12.8	10.3
60min	5.1	7.3	3.0	6.7
120min	3.6	3.0	6.7	0.6
Urine				
30min	20.4	6.5	26.6	3.9
60min	19.5	20.5	21.8	12.3
120min	33.8	46.0	34.3	23.3

Tab. 2. Bioshpërndarja ne minj normal

III. Studimet radiofarmakologjike

Bioshpërndarja ne minj normal

Rezultatet e marra nga ky studim paraqiten ne Tabelen 2. Ato shprehen ne % te dozës se injektuar per peshen ne gram te cdo organi.

Nga rezultatet e marra shihet qarte akumulimi i larte i derivateve te peptideve ne pankreas ne 30 minuteshin e pare, krahasuar me organet e tjera. Gjithashtu konstatohet pastrim shume i shpejte

nga gjaku i tyre, permes veshkave ne traktin urinar, pa ndonje mbetje te theksuar ne veshka.

60min	BN 1.1	BN 1.2	BN 1.3	BN 1.4
Gjaku	3.0	2.1	2.7	3.5
Melci	4.4	9.5	3.5	10.0
Zorret	3.8	9.9	2.2	3.3
Veshkat	12.0	20.7	11.8	16.0
Pankreas	1.3	1.8	1.3	1.3
Urine	33.5	1.0	0.6	0.5

Tab. 3. Eksperimenti i bllokimit

Eksperimenti i bllokimit

Ne Tabelen 3 paraqiten rezultatet e marra nga ky studim.

Duke krahasuar keto rezultate me ato te Tabele 2, per kohen 60 minuta, arrijme ne perfundimin se prania e Bombesines natyrore (ne vellim te larte) krahas asaj te shenuar realizon bllokimin e akumulimit te derivateve te shenuara ne pankreas. Kjo verteton edhe nje here faktin se ato konkurojne njelloj per receptoret GRP, pra jane analoge te njeri-tjetrit.

Derivati i Bombesines	Akumulimi ne tumor (%ID/g)	Raporti tumor / jo tumor
BN 1.1	15.2	29.1
BN 1.2	14.9	28.3
BN 1.3	15.7	30.0
BN 1.4	15.6	29.5

Tab. 4. Bioshpërndarja ne minj me tumore te injektuar

Bioshpërndarja ne minj me tumor te injektuar

Rezultatet e bioshpërndarjes jane llogaritur ne %ID/g (perqindje e dozës se injektuar per g organ te trupit te miut). Rezultatet e marra jepen ne Tabelen 4.

Sic shihet nga keto rezultate akumulimi i derivateve te Bombesines ne tumore eshte i kenaqshem dhe po ashtu raporti tumor / jo tumor. Nuk verehet ndonje diference e dukshme midis derivateve me njeri tjetrin. Ato sillen pothuajse njesoj biologjikisht.

PERFUNDIME

Rezultatet e ketij studimi tregojne se seria e derivateve te Bombesines e analizuar me ane te metodave analitike, shfaq veti kimike dhe biologjike te ngjashme me ato te Bombesines natyrore dhe keto derivate kane veti premtuese per t'u perdorur si nje radiofarmaceutikat specifik, i ri, per zbulimin e tumoreve te pankreasit:

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

2. 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, kohe kjo e mjaftueshme per studime shintigrafike.

3. Bioshpërndarja ne kafshe tregon per nje pastrim (largim) te shpejte nga gjaku, kryesisht permes veshkes, per ne traktin urinar.

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

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

6. Krahasimet midis 4 derivateve nuk tregojne ndonje diference te dukshme midis tyre, gje qe i jep atyre mundesine per t'u perdorur me sukses si radiofarmaceutikate te 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. (1999) Evaluation of radiolabeled bombesin analogues for receptor-targeted scintigraphy and radioteraphy. *Int J Cancer*, 81(4), 658-665

2. Costopoulos B., Varvarigou A. D., Sivolapenko G., Potamianos S., Scopinaro F. And Archimandritis S.C. (1997) Radiochemical and radiobiological evaluation of a synthetic peptide labelled with ^{99m}Tc . *Nucl. Med. Commun.* 18, 474-481

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

4. Mantey S., Frucht H., Coy D.H., and Jensen R.T. (1993) Characterization of Bombesin Receptors Using a Novel, Potent, Radiolabeled Antagonist That Distinguishes Bombesin Receptor Subtypes. *Molecular Pharmacology*. 43, 762-774

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

6. Van de Wiele C., Dumont F., Vanden Broecke R., Oosterlinck W., Cocquyt V., (2002) A GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. *Eur J Nucl Med*, 27, 1694-1699.