



## تهیه ترکیب نشاندار $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$ و برآورد دز جذبی آن در انسان بر اساس داده‌های موش

نعیمه امرایی<sup>۱</sup>، بهروز علی‌رضاپور<sup>۲\*</sup>، محمد حسن طلب<sup>۱</sup>، اصغر حدادی<sup>۱</sup>، حسن یوسف نیا<sup>۲</sup>

۱. بخش مهندسی پر تویزشکی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵، تهران- ایران

۲. پژوهشکده کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، صندوق پستی: ۱۴۸۹۳-۸۳۶، تهران- ایران

\*Email: balirezapour@aeoi.org.ir

### مقاله‌ی پژوهشی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۸/۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۲۹

### چکیده

محاسبه دز جذبی در اندام انسان یکی از اولین گام‌ها برای توسعه رادیوداروهای جدید است. هدف از این مطالعه تخمین دز جذبی توسط انسان از ترکیب نوین نشاندار  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  است. بدین منظور ابتدا ترکیب نشاندار  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  با تغییر پارامترهای مؤثر بر نشاندارسازی در شرایط بهینه تهیه شد. پایداری پپتید هترودیمر نشاندار در بافر سالین فسفات (PBS) و در سرم خون انسانی به مدت ۱۲ ساعت ارزیابی شد. پس از آن، توزیع زیستی کمپلکس در موش‌های حامل تومور به مدت ۱۲ ساعت پس از تزریق مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، دز جذبی توسط انسان پس از تزریق ترکیب نشاندار  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  بر اساس داده‌های موش با استفاده از روش RADAR و برون‌یابی جرمی برآورد شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که ترکیب نشاندار حاصل با خلوص رادیوشیمیایی بیش از ۹۹٪ قابل تولید بوده و این ترکیب از پایداری بالایی (بالتر از ۹۶٪) برخوردار است.  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  جذب بالایی را در تومورهای بیان‌کننده گیرنده پپتیدی آزادکننده گاسترین در مقایسه با سایر اندام‌های غیرهدف نشان داد. علاوه بر این، ارزیابی دز برای این ترکیب نشان داد که بدن و سایر اندام‌ها دز قابل توجهی را پس از تزریق دریافت نمی‌کنند.

**کلیدواژه‌ها:** RGD، بمبیزین، پپتید هترودیمر، مس-۶۴، دز جذبی

## Preparation of $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$ labeled compound and its absorbed dose estimation in humans based on mouse data

N. Amraee<sup>1</sup>, B. Alirezapour<sup>\*2</sup>, M. Hosntalab<sup>1</sup>, A. Haddadi<sup>1</sup>, H. Yousefnia<sup>2</sup>

1. Medical Radiation Engineering Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O. Box: 14515-775, Tehran-Iran

2. Radiation Application Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, P.O. BOX: 14893-836, Tehran- Iran

### Research Article

Received 31.10.2022, Accepted 18.2.2023

### Abstract

Calculating the absorbed dose in the human body is one of the first steps in radiopharmaceutical development. This study estimates the dose absorbed by humans from the novel identified compound of  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$ . For this purpose,  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  labeled compound was first prepared by changing the labeling decisions in optimal conditions. The stability of labeled heterodimer peptide was evaluated in phosphate-buffered saline (PBS) and human blood serum for 12 hours. After that, the complex's bio-distribution was investigated in tumor-bearing mice for 12 hours after injection. Finally, the dose absorbed by humans after injection of the  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  labeled compound was calculated based on mouse data using RADAR and mass extrapolation methods. The results showed that the obtained labeled compound could be produced with a high radiochemical purity of more than 99% and is highly stable (higher than 96%).  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  showed high uptake in gastrin-releasing peptide receptor-expressing tumors compared to other non-target organs. Furthermore, the dose assessment for this compound indicated that the body and other organs did not absorb a significant dose after injection.

**Keywords:** RGD, Bombesin, Heterodimer peptide, Copper-64, Absorbed dose



## ۱. مقدمه

سیستم‌های شلات‌کننده واکنش دهد و به آنتی‌بادی‌ها، پروتئین‌ها، پپتیدها و سایر مولکول‌های کوچک بیولوژیکی متصل شود. بنابراین، ترکیبات نشان‌دار مختلفی با استفاده از این رادیونوکلید مانند  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM [۱۵، ۱۶]،  $^{64}\text{Cu}$ -Trastuzumab [۱۷، ۱۸]،  $^{64}\text{Cu}$ -Cetuximab [۱۹] و غیره تولید شده است که نشان‌دهنده مفید بودن این رادیویزوتوپ در تشخیص بیماری‌های مختلف می‌باشد.

ارزیابی ریسک مرتبط با تجویز رادیوداروها موضوع مهمی است که باید برای تعیین میزان بهینه اکتیویته تجویز شده در نظر گرفته شود. ارزیابی دز جذبی اندام انسان بر اساس داده‌های حیوانات یک پیش‌نیاز و اولین قدم متداول سازگار با توصیه‌های ICRP ۶۲ است. مقدار دز جذبی پرتو (انرژی بر جای گذاشته شده در واحد جرم) که برحسب  $\text{Gy (J/kg)}$  بیان می‌شود، نه تنها برای ارزیابی خطرات مربوط به تجویز رادیوداروها، بلکه برای تعیین حداکثر مقدار قابل قبول تجویز نیز باید در نظر گرفته شود [۲۰]. برای این منظور، دز تابش داخلی پزشکی ( $\text{MIRD}^4$ ) به عنوان یک روش پایه و شناخته شده، برای محاسبه دز جذبی در نظر گرفته شده است. با این حال، امروزه منابعی جدیدتر مانند منبع ارزیابی دز تابشی ( $\text{RADAR}^5$ ) برای این منظور در دسترس هستند [۲۱]. روش RADAR و MIRD از نظر اصول محاسباتی دزیمتری داخلی یک اصول را دنبال می‌کنند، لیکن در محاسبه فاکتورهای دز، روش RADAR کسر جذبی مربوط به ذرات بتا و پرتوهای گاما را با دقت بیشتری نسبت به روش MIRD در محاسبات لحاظ نموده و لذا در فرمول‌بندی RADAR عنوان فاکتور دز ( $\text{DF}$ ) به جای مقادیر S (مورد استفاده در روش MIRD) جایگزین شده است.

در این مطالعه، ابتدا مس-۶۴ تولید و کنترل کیفی آن انجام شد. به منظور تخمین دز جذبی انسانی، ابتدا ترکیب نشان‌دار تصویربرداری PET، در شرایط بهینه تهیه شد. سپس پپتید هترودیمر نشان‌دار پس از انجام مراحل کنترل کیفی و بررسی پایداری ترکیب، به موش‌های سالم و حاوی تومور تزریق گردید و توزیع زیستی ترکیب نشان‌دار در موش به صورت تجربی به دست آمد. نهایتاً با استفاده از روش RADAR، دز اندام مختلف انسان بر اساس داده‌های توزیع زیستی موش تخمین زده شد.

امروزه سرطان دومین عامل مرگ و میر در جهان است و سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در مردان محسوب می‌شود [۱]. تشخیص زودهنگام و درمان به موقع سرطان از مهم‌ترین مسائل در مدیریت این بیماری است [۲]. آرژنیل-گلیسیل-اسپارتیک (RGD) و بمبیزین دو پپتیدی هستند که در بدن وجود داشته و به ترتیب از ۳ و ۱۴ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و به ترتیب گیرنده‌های اینتگرین و گاسترین موجود بر روی سلول‌های توموری در بدن را هدف‌گیری می‌کنند [۳، ۴]. پروتئین‌های اینتگرین  $\alpha v \beta 3$  یکی از مهم‌ترین عوامل برای تنظیم رگ‌زایی، به عنوان فرایند کلیدی تکثیر تومور بوده [۵، ۶] و بر روی غشای سلولی تومورهای مختلف مانند سرطان سینه [۷، ۸]، سرطان تخمدان [۹] و ملانوم [۱۰] بیان می‌شوند و بنابراین، اینتگرین‌ها را می‌توان یک هدف عالی برای ترکیبات جدید نشان‌دار شد در نظر گرفت. از سویی گیرنده‌های گاسترین نیز در یک سری از سرطان‌های انسانی مانند سینه، پروستات، گلیوما، پانکراس و غیره همراه با گیرنده‌های اینتگرین بیش از حد بیان می‌شوند [۱۱، ۱۲]. لذا در صورت استفاده از پپتید هترودیمر  $^2$  RGD-BBN می‌توان به طور هم‌زمان گیرنده‌های اینتگرین و گاسترین را مورد هدف قرار دهد.

امروزه روش توموگرافی گسیل پوزیترون ( $\text{PET}^3$ ) دارای مزایای بسیاری از جمله تشخیص فرایندهای بیوشیمیایی و همچنین بیان برخی پروتئین‌ها می‌باشد. بنابراین، PET می‌تواند اطلاعات بسیاری را در سطح مولکولی، قبل از این‌که هرگونه تغییر آناتومیک قابل تشخیص باشد، در اختیار ما قرار دهد. در بین رادیویزوتوپ‌های PET، مس-۶۴ ( $^{64}\text{Cu}$ ) با نیمه‌عمری معادل ۱۲٫۷ ساعت و گسیل نمودن ذرات  $\beta^+$  [۱۹٪] و  $\beta^-$  [۳۸٪]، به عنوان یکی از رادیویزوتوپ‌های مناسب جهت تشخیص و درمان انواع سرطان‌ها شناخته شده است. نیمه‌عمر ۱۲٫۷ ساعت مس-۶۴ انعطاف‌پذیری بالایی را برای اتصال با انواع مولکول‌های کوچک و بزرگ به منظور تصویربرداری و درمان با این ایزوتوپ فراهم می‌آورد [۱۳، ۱۴]. دلایل متعددی وجود دارد که این رادیویزوتوپ را برای تصویربرداری PET بسیار جذاب می‌کند. نیمه‌عمر نسبتاً طولانی مس باعث جذب و توزیع مناسب برای ایجاد تمایز در روشنی (Contrast) و کیفیت قابل توجهی از تصاویر می‌شود. علاوه بر این، مس می‌تواند با بسیاری از

4. Medical Internal Radiation Dose (MIRD)

5. Radiation Dose Assessment Resource

6. Dose Factor

Journal of Nuclear Science and Technology

Vol. 44 (1), Serial Number 106, 2024, P 67-75

1. Arginyl-Glycyl-Aspartic Acid

2. Heterodimer

3. Positron Emission Tomography (PET)

مجله علوم و فنون هسته‌ای

دوره ۴۴، شماره ۴، جلد ۱۰۶، زمستان ۱۴۰۲، ص ۶۷-۷۵



## ۲. روش کار

## ۱.۲ مواد و تجهیزات

پپتید هترو دایمر NODAGA-RGD-BBN با خلوص بیش از ۹۹٪ از آنالیز بین‌المللی انرژی اتمی (وین، اتریش) از طریق پروژه مشترک تحقیقاتی (CRP<sup>۱</sup>) تهیه شد. به منظور تعیین توزیع زیستی کمپلکس نشان‌دار شده رادیواکتیو، موش nude حامل تومور نیز از مؤسسه رویان (تهران، ایران) تهیه شد. تمامی مواد شیمیایی از شرکت سیگما آلدیج (آلمان) خریداری شده و مورد استفاده قرار گرفتند. خلوص رادیوشیمیایی توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (شرکت Knauer، آلمان) مجهز به ستون ODS، آشکارسازهای فرابنفش (UV) و گاما بررسی شد. خلوص و اکتیویته رادیونوکلئید توسط آشکارساز ژرمانیم با خلوص بالا <sup>۲</sup>HPGe (۴۰۲۰ NIGC، شرکت DSG، آلمان) مجهز به تحلیل‌گر چند کاناله اندازه‌گیری شد.

## ۲.۲ تولید و کنترل کیفی مس-۶۴

ابتدا هدف روی-۶۸ (<sup>۶۸</sup>Zn) بر روی یک بستر صفحه‌ای<sup>۳</sup> پوشیده شده با طلا لایه‌نشانی<sup>۴</sup> گردید. برای جلوگیری از ورود مس حامل به شیمی تولید و کاهش شدید اکتیویته ویژه، که عملاً نشان‌دارسازی با مس-۶۴ رادیواکتیو را غیرممکن می‌سازد، از هدف‌های دارای لایه طلا استفاده می‌شود. ایجاد لایه روی، به روش رسوب الکتریکی<sup>۵</sup> با تعیین زمان، غلظت و پتانسیل الکتریکی مناسب بر روی زیر لایه طلا برای رسیدن به قطر بهینه انجام شد. ابتدا اکسید روی-۶۸ در اسید کلریدریک ۰/۰۵ نرمال حل شد. سپس ۲ میلی‌لیتر هیدرازین دی‌هیدروکلراید به‌عنوان عامل احیاکننده به محلول افزوده شد و اسیدیته محلول به ۲/۵ تا ۳ رسانده شد. حجم محفظه آبکاری ۴۸۰ میلی‌لیتر بود و جریان ۳۵ میلی‌آمپر بر سانتی‌متر مربع اعمال گردید. با به کار بردن پلاتین به‌عنوان فلز آندی، یک لایه ۱۰۰ میکرونی از روی تهیه شد.

به منظور دستیابی به بازده بالای تولید، هدف فوق با زاویه ۶ درجه تحت تابش پروتون قرار گرفت. برای تولید مس-۶۴ (<sup>۶۴</sup>Cu) انرژی بهینه پروتون به منظور انجام واکنش (p,αn) با هدف روی-۶۸ (<sup>۶۸</sup>Zn)، ۲۰-۳۵ MeV است. از آنجایی که حداکثر توان شتاب‌دهنده سیکلوترون موجود ۳۰ MeV است،

1. Cooperative Research Project
2. High-Purity Germanium (HPGe) Detector
3. Backing
4. Electroplating
5. Electrodeposition

بنابراین برای تولید بهینه مس-۶۴ ضخامت هدف ۱۰۰ μm در نظر گرفته شد. پس از بمباران، هدف در ۱۵ mL اسید کلریدریک ۱۰ نرمال حاوی ۲۰ μL آب اکسیژنه به صورت محلول در آورده شد و از میان ستون تبادل کاتیونی (۲۰۰-۴۰۰ mesh; H<sup>+</sup> form; ۵۰ W×۸ AG)، آماده‌سازی شده با ۲۵ میلی‌لیتر از اسید کلریدریک ۹ نرمال، عبور داده شد. ستون فوق برای خروج مس و روی توسط ۲۵ mL ۹ N HCl با سرعت ۱ mL/min شستشو داده شد. این مخلوط پس از رقیق‌سازی از میان ستون تبادل آنیونی (۱۰۰-۲۰۰ mesh; Cl<sup>-</sup> form; ۱×۸ Dowex)، آماده‌سازی شده با ۱۰۰ mL ۶ N HCl عبور داده شد. نهایتاً مس-۶۴ از ستون فوق توسط ۵۰ mL ۲ N HCl شستشو و جمع‌آوری شد.

جهت بررسی میزان وجود سایر رادیونوکلئیدهای ناخواسته احتمالی اسپکترومتری گامای کلرید مس-۶۴، به‌وسیله آشکارساز HPGe به مدت ۳۰۰ ثانیه انجام پذیرفت.

خلوص رادیوشیمیایی محصول به روش رادیوکروماتوگرافی لایه نازک در حضور دو حلال ۱ mM DTPA و مخلوط حلال آمونیم استات ۱۰٪: متانول (۱:۱) به عنوان فاز متحرک بر روی کاغذ واتمن شماره ۲ با ابعاد ۱۲×۱ cm و سیلیکاژل به طور جداگانه به عنوان فاز ثابت کروماتوگرافی بررسی گردید. کاغذهای کروماتوگرافی با دستگاه TLC<sup>۶</sup> اسکنر قرائت گردید. در این تحقیق غلظت کاتیون‌های مس و روی توسط دستگاه پلاروگراف مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳.۲ تهیه و کنترل کیفی <sup>۶۴</sup>Cu-NODAGA-RGD-BBN

محلول مادر از پپتید هترو دایمر NODAGA-RGD-BBN با غلظت ۱ mg/ml با حل نمودن پپتید در آب مقطر جهت استفاده در نشان‌دارسازی تهیه و نگهداری شد. جهت تعیین شرایط بهینه نشان‌دارسازی پپتید با مس-۶۴، پارامترهای مختلف مؤثر در فرایند نشان‌دارسازی مانند اسیدیته واکنش، میزان ماده، زمان واکنش و ... تغییر داده شده و در هر مورد میزان خلوص رادیوشیمیایی ترکیب نشان‌دار تعیین گردید.

خلوص رادیوشیمیایی ترکیب نشان‌دار توسط روش RTLC<sup>۷</sup> بررسی شد. از کاغذ واتمن به عنوان فاز ساکن و از مخلوط استات آمونیم ۱۰٪ و متانول (۱:۱) به عنوان فاز متحرک استفاده شد.

6. Thin Layer Chromatograph

7. Radio Thin Layer Chromatography

Journal of Nuclear Science and Technology



$\text{ID/g}$  % هر اندام با استفاده از رابطه (۳) محاسبه شد. این کمیت به عنوان اکتیویته خالص (تصحیح برای زمینه) هر اندام تقسیم بر اکتیویته تزریقی (کل) و جرم اندام (gr) تعریف می‌شود:

$$\text{ID} / \text{g} \% = \left( \frac{\text{Activity}_{\text{organ}}}{\text{Activity}_{\text{Total}}} \right) \times 100 / m_{\text{Organ}} \quad (3)$$

۶.۲ محاسبه اکتیویته انباشته برای اندام‌های حیوانات اکتیویته انباشته شده در مقابل زمان برای اندام‌های مختلف حیوانات مطابق با رابطه (۴) ترسیم شد:

$$\tilde{A} = \int_{t_1}^{\infty} A(t) dt \quad (4)$$

که در آن  $A(t)$  اکتیویته هر اندام پس از گذشت زمان  $t$  است. منحنی‌ها با برازش دنباله هر منحنی به منحنی تک‌نمایی با ضریب نمایی برابر با ثابت واپاشی فیزیکی رادیونوکلئید مس-۶۴ تا بی‌نهایت تعمیم داده شدند. در حالی که اکتیویته خون در  $t=0$  به عنوان مقدار کل اکتیویته تزریقی در نظر گرفته شد، اکتیویته سایر اندام‌ها در آن زمان صفر در نظر گرفته شد.

۷.۲ برآورد دز جذبی و دز مؤثر برای اندام‌های انسان چندین روش برای برون‌یابی داده‌های جذب در اندام حیوانات به جذب معادل در انسان پیشنهاد شده است. اسپارک و همکارانش چهار روش برای برون‌یابی داده‌های حیوانی به انسان توضیح داده است [۲۳]. در روش اول هیچ‌گونه برون‌یابی انجام نشده و میزان اکتیویته تجمع یافته در اندام حیوان و انسان یکسان در نظر گرفته می‌شود. در روش دوم از برون‌یابی جرمی نسبی اندام برای تبدیل داده‌های توزیع زیستی حیوان به انسان استفاده می‌شود که در این مطالعه از این روش استفاده شده است. سومین روش مربوط به برون‌یابی زمان فیزیولوژیکی است که بر اساس آن، زمان تجمع در اندام حیوان متناسب با زمان دیگری از تجمع در انسان در نظر گرفته می‌شود. در روش چهارم، هم‌زمان برون‌یابی جرمی و زمان فیزیولوژیکی را برای تبدیل داده‌های حیوان به انسان در نظر می‌گیرد. هرچند استفاده از برون‌یابی زمان فیزیولوژیکی مناسب‌تر است، نقاط زمانی زیادی را برای استفاده بهینه لازم دارد که می‌تواند تعداد موش‌های

## ۴.۲ بررسی پایداری

اکتیویته  $18.5$  مگابکرل از پپتید نشان‌دار شده نهایی به بافر فسفات سالین (PBS) و سرم انسانی تازه آماده شده در حالی که به ترتیب در دمای  $4$  درجه سانتی‌گراد و  $37$  درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد، اضافه شد. خلوص رادیوشیمیایی ترکیب نشان‌دار  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  با استفاده از روش RTLC، حداقل به مدت  $12$  ساعت تعیین شد.

## ۵.۲ فرایند محاسبه توزیع بیولوژیکی در موش

اکتیویته  $1.85$  مگابکرل از ترکیب نشان‌دار به صورت داخل ورید دمی به موش‌های حامل تومور  $\text{PC}^3$  تزریق شد. موش‌های حامل تومور (با استفاده از گاز  $\text{CO}_2$ ) در  $1$ ،  $2$ ،  $3$  و  $12$  ساعت پس از تزریق قربانی و برای در نظر گرفتن تجزیه و تحلیل آماری، سه موش در هر بازه زمانی قربانی شدند. سپس اندام‌های موش شامل: خون، کبد، طحال، کلیه‌ها، معده، روده، قلب، ریه، ماهیچه، پوست، استخوان و هم‌چنین تومور خارج، با نرمال سالین شستشو، وزن شده و اکتیویته آن‌ها با آشکارساز  $\text{HPGe}$  اندازه‌گیری شد. اکتیویته بافت ( $A$ ) مطابق با رابطه (۱) محاسبه می‌شود [۲۲]:

$$A = \frac{N}{\epsilon \gamma t_s k_1 k_2 k_3 k_4 k_5} \quad (1)$$

که در آن  $\epsilon$  بازده آشکارساز در انرژی فوتوپیک،  $\gamma$  احتمال انتشار فوتوپیک،  $t_s$  زمان زنده جمع‌آوری طیف نمونه برحسب ثانیه،  $k_1$ ،  $k_2$ ،  $k_3$ ،  $k_4$  و  $k_5$  فاکتورهای اصلاحی به ترتیب برای واپاشی هسته از زمان جمع‌آوری نمونه برای شروع اندازه‌گیری، واپاشی هسته در طول دوره شمارش، خود تضعیفی در نمونه اندازه‌گیری‌شده، از دست دادن پالس‌ها به دلیل جمع‌بندی تصادفی و هم‌رویدادی هستند. پارامتر  $N$  سطح زیر پیک خالص تصحیح شده فوتوپیک مربوطه بوده که با رابطه (۲) محاسبه می‌گردد:

$$N = N_s - (t_s / t_b) N_b \quad (2)$$

جایی که  $N_s$  و  $N_b$  به ترتیب سطح پیک خالص در طیف نمونه و زمینه است. به همین ترتیب  $t_s$  و  $t_b$  نیز زمان واقعی<sup>۱</sup> جمع‌آوری طیف نمونه و زمینه (برحسب ثانیه) است.

1. Live Time



### ۳. نتایج و بحث

#### ۱.۳ کنترل کیفی کلراید مس-۶۴

##### ۱.۱.۳ بررسی خلوص رادیونوکلئیدی کلراید مس-۶۴

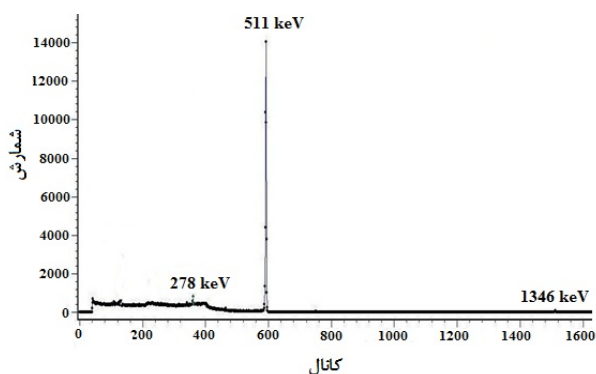
جهت بررسی میزان وجود سایر رادیونوکلئیدها، طیف گامای کلراید مس-۶۴ تولید شده با بهره‌گیری از دستگاه Canberra™ multi-channel analyzer مجهز به آشکارساز HPGe به مدت ۳۰۰ ثانیه ثبت گردید.

شکل ۲ نمودار حاصل از طیف گامای مس-۶۴ را نشان می‌دهد، نتایج بیان‌گر آن است که هر سه پیک انرژی مشاهده شده مربوط به مس-۶۴ شامل (۱٪) ۱۳۴۶ keV، (۳۵٪) ۵۱۱ keV و (۹٪) ۲۷۸ keV بوده که تأییدکننده تولید این رادیونوکلئید است. از سوی دیگر عدم وجود پیک‌هایی به غیر از پیک‌های انرژی مربوط به مس-۶۴ نشان‌دهنده خلوص رادیونوکلئیدی بسیار بالای محصول نهایی (بیش از ۹۹٫۹٪) است.

#### ۲.۱.۳ بررسی خلوص رادیوشیمیایی کلراید مس-۶۴

خلوص رادیوشیمیایی مس-۶۴ به روش کروماتوگرافی لایه نازک توسط دو حلال mM DTPA ۱ و مخلوط آمونیم استات ۱۰٪: متانول با نسبت (۱:۱) به عنوان فاز متحرک به ترتیب بر روی کاغذ واتمن شماره ۲ و سیلیکاژل به طور جداگانه به عنوان فاز ثابت کروماتوگرافی بررسی گردید (شکل ۲).

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است مس-۶۴ آزاد در فاز متحرک mM DTPA ۱ و فاز ثابت کاغذ واتمن به سمت بالای کاغذ مهاجرت می‌کند. در این شرایط کاتیون  $Cu^{2+}$  با DTPA تشکیل کمپلکس Cu-DTPA داده و کمپلکس حاصل به  $R_f=0.8$  صعود می‌کند. هم‌چنین مس-۶۴ آزاد در فاز متحرک مخلوط آمونیم استات ۱۰٪: متانول با نسبت (۱:۱) بر روی سیلیکاژل، در ابتدای کاغذ باقی می‌ماند. نتایج نشان می‌دهد که خلوص رادیوشیمیایی کاتیون  $Cu^{2+}$  بیش از ۹۹ درصد است.



شکل ۲. طیف گامای کلراید مس-۶۴.

مورد مطالعه در هر زمان را محدود کند. در این مطالعه، نویسندگان ترجیح دادند که نقاط زمانی کم‌تر اما آمار بهتری در هر زمان را داشته باشند. لذا از روش برون‌یابی جرمی جهت تبدیل اکتیویته انباشت اندام‌های حیوانی به اکتیویته انباشت اندام‌های انسان و با بهره‌گیری از رابطه (۵) استفاده شد:

$$\bar{A}_{Human\ organ} = \bar{A}_{Animal\ organ} \times \frac{Organ\ mass_{Human} / Body\ mass_{Human}}{Organ\ mass_{Animal} / Body\ mass_{Animal}} \quad (5)$$

برای برون‌یابی از میانگین وزن استاندارد برای هر اندام انسانی استفاده شد [۲۴].

فورمول‌بندی RADAR (رابطه ۶) جهت برآورد دز جذبی در اندام‌های انسان بر اساس داده‌های توزیع زیستی در موش استفاده شد [۲۵]:

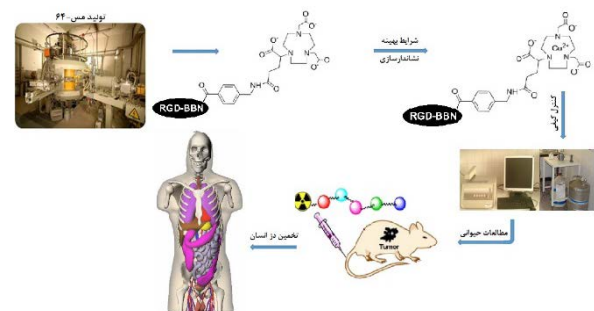
$$D = \bar{A} \times DF \quad (6)$$

که در آن،  $\bar{A}$  اکتیویته انباشت برای هر اندام انسان است، و  $DF$  فاکتور پاسخ دز است که به صورت معادله ۷ تعریف می‌گردد:

$$DF = \frac{k \sum_i n_i E_i \phi_i}{m_t} \quad (7)$$

در این معادله،  $n_i$  احتمال تابش با انرژی  $E_i$  (MeV) ساطع شده در هر گذار هسته‌ای،  $\phi_i$  کسری از انرژی ساطع شده است که در اندام هدف جذب می‌شود،  $m_t$  جرم اندام هدف (برحسب کیلوگرم) و  $k$  ضریب برازش است.

در این تحقیق، از DFهای ارائه شده در نرم‌افزار OLINDA/EXM [۲۶] برای محاسبه دز جذبی در اندام‌های انسانی استفاده شد. جهت محاسبه دز مؤثر (E) از فاکتورهای وزنی استاندارد بافت استفاده شد [۲۷]. شکل ۱ طرح‌واره‌ای از روند انجام این مطالعه را به صورت شماتیک نشان می‌دهد.

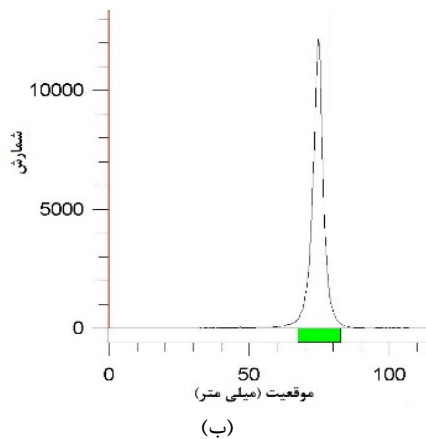
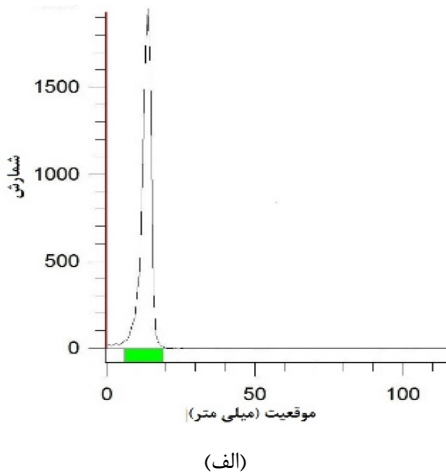


شکل ۱. طرح‌واره روند انجام مطالعه.

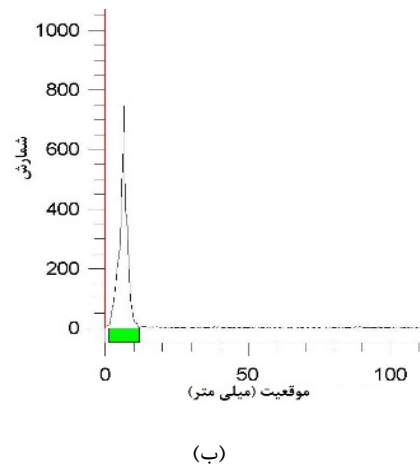
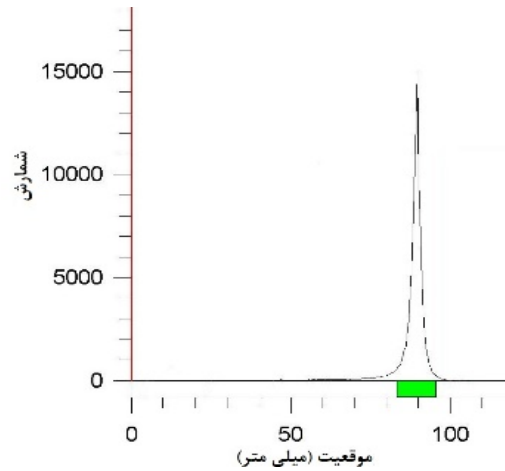


میزان ۷۴ مگابکرل (۲ میلی کوری) از مس-۶۴ درون ویال ریخته شده و تحت دما و گاز نیتروژن خشک شد. به ویال حاوی مس-۶۴، ۵۰۰ میکرولیتر بافر سدیم استات (pH=۵.۵) اضافه گردید. ویال را بر روی آلولاک با دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده و میزان ۱۰ میکروگرم از پپتید هترودایمر به آن اضافه شده و واکنش برای مدت ۱۰ دقیقه ادامه پیدا کرد. در نهایت ۸ میلی لیتر آب به محلول آزمایش اضافه گردید و از ستون C<sub>18</sub> Sep-Pak عبور داده شد (ستون از قبل به ترتیب با ۵ میلی لیتر اتانول، ۱۰ میلی لیتر آب و ۱۰ میلی لیتر هوا شسته شده بود). در مرحله آخر ستون با ۱ میلی لیتر اتانول و ۹ میلی لیتر نرمال سالین ۰.۹٪ شستشو داده شد.

خلوص رادیوشیمیایی محصول نهایی با استفاده روش RTLC مورد ارزیابی قرار گرفت. از مخلوط استات آمونیم ۱۰٪ و متانول (۱:۱) به عنوان فاز متحرک و کاغذ واتمن به عنوان فاز ثابت انجام شد (شکل ۴). در این فاز نیز در حالی که مس-۶۴ آزاد در ابتدای کاغذ باقی می‌ماند، رادیودارو به سمت بالای کاغذ مهاجرت می‌نماید. خلوص رادیوشیمیایی بالاتر از ۹۹ درصد پس از خلص‌سازی به‌دست آمد.



شکل ۴. کروماتوگرام مس-۶۴ آزاد (الف) و  $^{64}\text{Cu}$ -NODAGA-RGD-BBN (ب) در فاز متحرک در استات آمونیم ۱۰٪: متانول (۱:۱) به عنوان فاز متحرک و کاغذ واتمن.



شکل ۳. کروماتوگرام مس-۶۴ آزاد در حلال ۱ mM DTPA به عنوان فاز متحرک و کاغذ واتمن شماره ۲ (سمت الف) و کروماتوگرام مس-۶۴ آزاد در فاز متحرک مخلوط آمونیم استات ۱۰٪: متانول با نسبت (۱:۱) بر روی سیلیکاژل (سمت ب).

### ۲.۱.۳ کنترل شیمیایی کلرید مس-۶۴

نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت مس و روی در محصول نهایی با استفاده از دستگاه پلاروگراف نشان داد که غلظت مس و روی در محصول نهایی کمتر از ۱ ppm بوده که علاوه بر آن که در حد مجاز است، مشکل جدی را برای نشان‌دارسازی پپتیدها ایجاد نمی‌کند.

### ۲.۳ تهیه و کنترل کیفی $^{64}\text{Cu}$ -NODAGA-RGD-BBN

به منظور تعیین بهترین بازده نشان‌دارسازی پپتید با مس-۶۴، فرایند نشان‌دارسازی در شرایط گوناگون تکرار شد. پارامترهای تأثیرگذار شامل غلظت پپتید، دمای واکنش، pH واکنش و مدت زمان واکنش تغییر داده شد تا شرایط بهینه نشان‌دارسازی حاصل گردد. شرایط بهینه نشان‌دارسازی بدین صورت تعیین گردید:



۳.۳ بررسی پایداری

بررسی پایداری ترکیب نشان‌دار نشان داد که این ترکیب حداقل تا ۱۲ ساعت پس از تهیه در بافر فسفات سالین (۴°C) و سرم خون انسانی (۳۷°C) پایدار می‌ماند و خلوص رادیوشیمیایی تنها کم‌تر از ۴ درصد کاهش می‌یابد.

۴.۳ بررسی توزیع زیستی <sup>۶۴</sup>Cu-NODAGA-RGD-BBN در موش

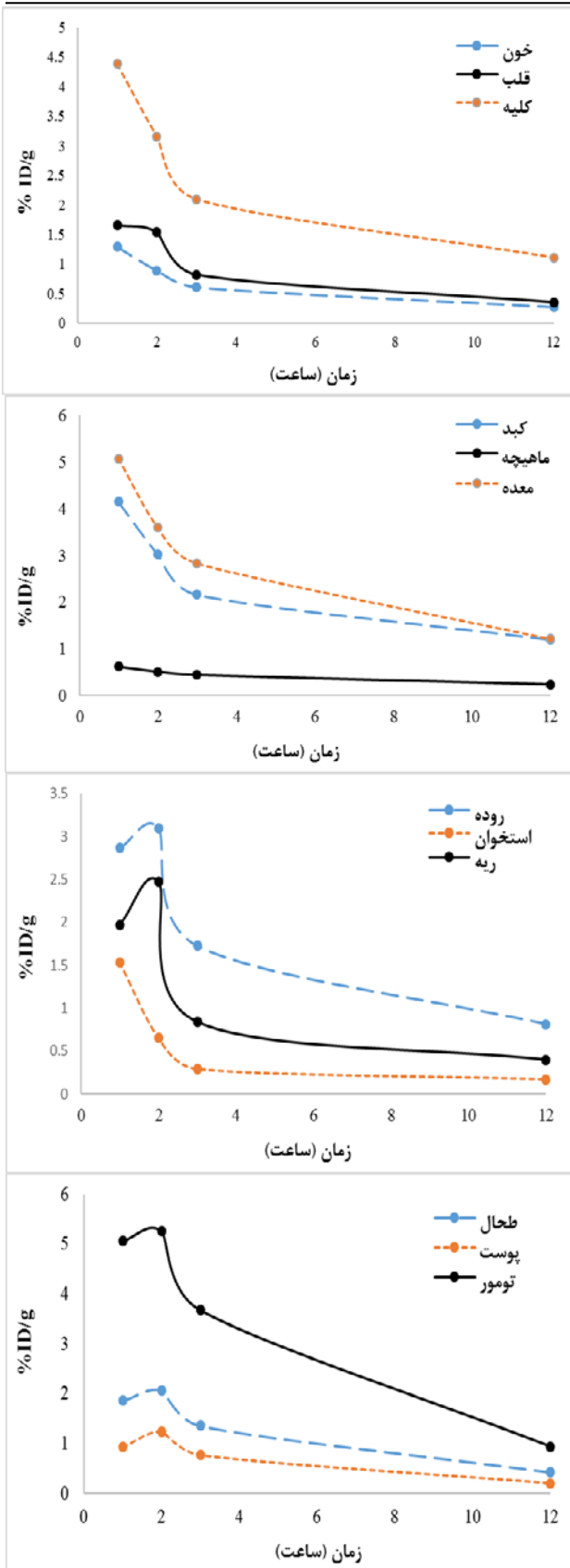
جهت بررسی توزیع زیستی ۱/۸۵ مگابکرل از ترکیب نشان‌دار به صورت داخل ورید دمی به موش‌های حامل تومور PC<sub>۳</sub> تزریق شد. درصد دز تزریقی در هر گرم از اندام موش پس از تزریق کمپلکس تعیین شد. %ID/g با استفاده از رابطه ۳ برای هر اندام تعیین شد. شکل ۵ منحنی‌های تصحیح نشده به واپاشی را برای اندام‌های بدن موش پس از تزریق پپتید نشان‌دار شده نشان می‌دهد.

همان‌طور که داده‌های توزیع زیستی نشان می‌دهد بیش‌ترین تجمع اکتیویته باقی مانده در بدن موش در تومور می‌باشد که با گذشت زمان از تجمع اکتیویته در تومور کاهش می‌یابد. هم‌چنین جذب بالای کلیه‌ها در ساعت‌های مختلف پس از تزریق ترکیب نشان‌دار نشان می‌دهد که مجاری ادراری مسیر اصلی پپتید هترودایمر نشان‌دار شده است.

۵.۳ محاسبه دز معادل و مؤثر

دز جذبی به ازای MBq تزریقی از رادیوداروی نشان‌دار <sup>۶۴</sup>Cu-NODAGA-RGD-BBN در اندام مختلف انسان و با استفاده از فرمول‌بندی RADAR بر اساس داده‌های توزیع زیستی موش برآورد شد (جدول ۱).

نتایج ارزیابی دز نشان می‌دهد که اکثر اندام‌ها دز نسبتاً بالایی را دریافت ننموده و دز معادل و مؤثر در انسان پس از تزریق <sup>۶۴</sup>Cu-NODAGA-RGD-BBN به ترتیب ۰/۱۰۰۶۸ mGy/MBq و ۰/۱۰۰۷۱ mSv/MBq برآورد شد.



شکل ۵. منحنی‌های تصحیح نشده به واپاشی برای اندام اصلی موش پس از تزریق <sup>۶۴</sup>Cu-NODAGA-RGD-BBN.



ناشی از عوامل مختلف از جمله نیمه عمر بالاتر مس-۶۴ نسبت به گالیم-۶۸ و وجود ذرات بتای مثبت و بتای منفی در واپاشی مس-۶۴ است.

$^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  یک ترکیب نشان دار نوین است که می تواند به طور هم زمان گیرنده های اینتگرین و گاسترین را هدف قرار دهد و آن را عامل بالقوه بالایی برای تصویربرداری PET از سرطان پروستات می کند. در این مطالعه  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  با خلوص رادیوشیمیایی بیش از ۹۹ درصد تهیه شد. نتایج توزیع زیستی نشان داد که ترکیب نشان دار تجمع بالایی در بافت های تومور و در کلیه دارد. جذب بالای پپتید هترو دیم نشان دار در تومور در مقایسه با سایر اندام های غیرهدف نشان می دهد که پپتید نشان دار شده یک عامل کاملاً مناسب در اهداف تصویربرداری PET از سرطان پروستات است. دز مؤثر انسان نیز بر اساس داده های موش و با استفاده از روش RADAR تخمین زده شد. نتایج این کار تحقیقاتی نشان داد که این ترکیب نشان دار از نظر پرتوی ایمن بوده و دز قابل توجهی را در بدن و اندام های مختلف بر جای نمی گذارد.

مراجع

1. [www.euro.who.int- World health organization, regional office for Europe](http://www.euro.who.int- World health organization, regional office for Europe).
2. J. Ferlay, et al, *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, Int J Cancer*, **127**, 2893-2917 (2010).
3. R. Fischer, et al, *Effects of psychodysleptic drug psilocybin on visual perception: Changes in brightness perference, Experientia*, **25**, 166-169 (1969).
4. S.R. Nagalla, et al, *There Are Three Distinct Forms of Bombesin: Identification of [Leu13] Bombesin, [Phe13] Bombesin, and [Ser3, Arg10, Phe13] Bombesin in the Frog Bombina Orientalis, J. Biol. Chem.*, **271**, 7731-7737 (1996).
5. T. Tonini, R. Francesca, P.C. Pier, *Molecular basis of angiogenesis and cancer, Oncogene*, **22**, 6549-6556 (2003).
6. D. Hanahan, A.W. Robert, *Hallmarks of cancer: the next generation, Cell*, **144**, 646-674 (2011).
7. R. Axelsson, et al, *An open-label, multicenter, phase 2a study to assess the feasibility of imaging metastases in late-stage cancer patients with the  $\alpha\beta$  3-selective angiogenesis imaging agent 99mTc-NC100692, Acta Radiologica*, **51**, 40-46 (2010).
8. L. Liu, et al, *99mTc-3PRGD2 scintimammography in palpable and nonpalpable breast lesions, Mol Imaging*, **13**, 7290-2014 (2014).

جدول ۱. دز مؤثر اندام های مختلف انسان پس از تزریق  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  به ازای MBq تزریقی

اندام هدف	دز جذبی (mGy)	$W_t$	دز مؤثر (mSv)
آدرنال	$0.2E-7.74$	۰.۰۰۸	$0.5E-6.19$
مغز	$0.2E-1.22$	۰.۰۱	$0.5E-1.22$
کیسه صفرا	$0.2E-7.75$	۰.۰۰۸	$0.5E-6.2$
روده بزرگ	$0.2E-5.33$	۰.۱۲	$0.4E-6.39$
روده کوچک	$0.2E-1.78$	۰.۰۰۸	$0.4E-1.42$
قلب	$0.2E-1.06$	۰.۰۰۸	$0.5E-8.48$
معدة	$0.2E-1.22$	۰.۱۲	$0.3E-1.46$
کلیه	$0.2E-2.41$	۰.۰۰۸	$0.4E-1.92$
کبد	$0.2E-5.03$	۰.۰۴	$0.3E-2.01$
ریه	$0.3E-9.32$	۰.۱۲	$0.3E-1.11$
مغز استخوان	$0.3E-7.79$	۰.۱۲	$0.4E-9.34$
استخوان	$0.2E-1.25$	۰.۰۱	$0.4E-1.25$
طحال	$0.2E-1.15$	۰.۰۰۸	$0.5E-9.2$
تیروئید	$0.3E-4.81$	۰.۰۴	$0.4E-1.93$
کل بدن	$0.3E-6.83$		$0.3E-7.1$

۴. نتیجه گیری

امروزه توسعه پپتیدهای هترو دیم نشان دار شده با رادیوایزوتوپ های تشخیصی و درمانی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند [۲۸]. مطالعات انجام شده بر روی ترکیب نشان دار  $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD-BBN}$  خلوص رادیوشیمیایی بالاتر از ۹۸ درصد را برای این ترکیب نشان داده است. رادیولیگاند  $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD-BBN}$  جذب تومور PC۳ برابر با  $5.26 \pm 0.32$  را در زمان ۶۰ دقیقه پس از نشان داده که با نتایج به دست آمده از این مقاله قابل مقایسه است [۲۹]. هم چنین جذب تومور ۶۰ دقیقه پس از تزریق  $^{18}\text{F-FB-PEG3-RGD-BBN}$  مقدار  $4.41 \pm 0.71$  گزارش شده است [۳۰]. مطالعه ای دیگر بر روی ترکیب نشان دار  $^{68}\text{Ga-NODAGA-RGD-BBN}$  دز جذبی و دز مؤثر کل بدن انسان بر اساس داده های موش را به ترتیب mGy/MBq  $0.1019$  و  $0.1011$  mSv/MBq برآورد نموده است [۳۱]. دز جذبی و دز مؤثر کل بدن انسان بر اساس داده های موش برای ترکیب نشان دار  $^{64}\text{Cu-NODAGA-RGD-BBN}$  به ترتیب  $0.1068$  mGy/MBq و  $0.1071$  mSv/MBq برآورد شده که

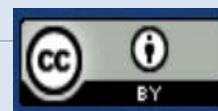




9. M.E. Shinderman, et al, *The thyroid hormone- $\alpha\beta 3$  integrin axis in ovarian cancer: regulation of gene transcription and MAPK-dependent proliferation*, *Oncogene*, **35**, 1977-1987 (2016).
10. R. Huang, K.R. Einar, *Integrins as therapeutic targets in the organ-specific metastasis of human malignant melanoma*, *J. Exper. Clin. Cancer Res*, **37**, 1-14 (2018).
11. T.W. Moody, et al, *Bombesin Receptor Family Activation and CNS/Neural Tumors: Review of Evidence Supporting Possible Role for Novel Targeted Therapy*, *Frontiers in Endocrinology*, **12**, (2021).
12. P. Moreno, et al, *Bombesin related peptides/receptors and their promising therapeutic roles in cancer imaging, targeting and treatment*, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **20**, 1055-1073 (2016).
13. M.L. Thakur, et al., *Radiolabeled somatostatin analogs in prostate cancer*, *Nucl. Med. Biol.*, **24**, 105-113 (1997).
14. H. Yang, et al., *Synthesis of DOTA-pyridine chelates for  $^{64}\text{Cu}$  coordination and radiolabeling of  $\alpha\text{MSH}$  peptide*, *EJNMMI Radiopharm Chem.*, **6**, 1-16 (2021).
15. E. Lopci, et al., *Prognostic evaluation of disease outcome in solid tumors investigated with  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM PET/CT*, *Clin. Nucl. Med.*, **41**, e87-e92 (2016).
16. I. Grassi, et al., *Usefulness of  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM in head and neck cancer: a preliminary prospective study*, *Clin. Nucl. Med.*, **39**, e59-e63 (2014).
17. S. Sasada, et al.,  *$^{64}\text{Cu}$ -DOTA-Trastuzumab PET imaging for HER2-specific primary lesions of breast cancer*, *Ann. Oncol.*, **28**, 2028-2029 (2017).
18. J.E. Mortimer, et al., *Functional imaging of human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer using ( $^{64}\text{Cu}$ ) Cu-DOTA-trastuzumab PET*, *J. Nucl. Med.*, **55**, 23-29 (2014).
19. A. Niccoli Asabella, et al., *The copper radioisotopes: a systematic review with special interest to  $^{64}\text{Cu}$* , *Biomed Res Int.*, **2014**, 786463 (2014).
20. M.G. Stabin, et al., *Radiation dosimetry in nuclear medicine*, *Appl Radiat Isot*, **50**, 73-87 (1999).
21. M.G. Stabin, et al., *Physical models and dose factors for use in internal dose assessment*, *Health Phys.*, **85**, 294-310 (2003).
22. H. Yousefnia, et al., *Preliminary dosimetric evaluation of  $^{166}\text{Ho}$ -TTHMP for human based on biodistribution data in rats*, *Appl Rad Iso*, **94**, 260-265 (2014).
23. R. Sparks, et al., *Comparison of the Effectiveness of Some Common Animal Data Scaling Techniques In Estimating Human Radiation Dose*, *TN (United States): Oak Ridge Associated Universities*. (1999).
24. H. Yousefnia, et al, *Preliminary dosimetric evaluation of ( $^{166}\text{Ho}$ ) -TTHMP for human based on biodistribution data in rats*, *Appl Radiat Isot.*, **94**, 260-265 (2014).
25. S. Shanehsazzadeh, et al., *Estimated human absorbed dose for ( $^{68}\text{Ga}$ ) -ECC based on mice data: Comparison with ( $^{67}\text{Ga}$ ) -ECC*, *Ann Nucl Med.*, **29**, 475-481 (2015).
26. M.G. Stabin, et al., *OLINDA/EXM: The second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine*, *J. Nucl. Med.*, **46**, 1023-1027 (2005).
27. D.J. Brenner, et al., *Effective dose: A flawed concept that could and should be replaced*, *Br. J. Radiol.*, **81**, 521-523 (2008).
28. Z. Liu, et al.,  *$^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ , and  $^{68}\text{Ga}$  Labeled RGD-Bombesin Heterodimeric Peptides for PET Imaging of Breast Cancer*, *Bioconjugate Chem.*, **20**, 1016-1025 (2009).
29. Z. Liu, et al.,  *$^{68}\text{Ga}$ -labeled NOTA-RGD-BBN peptide for dual integrin and GRPR-targeted tumor imaging*, *Europ. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **36**, 1483-1494 (2009).
30. Z. Liu, et al., *Dual integrin and gastrin-releasing peptide receptor targeted tumor imaging using  $^{18}\text{F}$ -labeled PEGylated RGD-bombesin heterodimer  $^{18}\text{F}$ -FBPEG3-Glu-RGD-BBN*, *J. Med. Chem.*, **52**, 425-432 (2009).
31. N. Amraee, et al., *Human dose assessment of  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-RGD-BBN heterodimer peptide based on animal data*, *J. Med. Phys*, **47**, 287-293 (2022).

**COPYRIGHTS**

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.



استناد به این مقاله

نعیمه امرایی، بهروز علیرضاپور، محمد حسن طلب، اصغر حدادی، حسن یوسف نیا (۱۴۰۲)، تهیه ترکیب نشاندار  $^{64}\text{Cu}$ -NODAGA-RGD-BBN و برآورد دز جذبی آن در انسان بر اساس داده‌های موش، ۱۰۶، ۶۷-۷۵

DOI: 10.24200/nst.2023.1225.1800

Url: [https://jonsat.nstri.ir/article\\_1549.html](https://jonsat.nstri.ir/article_1549.html)

