

بررسی توزیع بیولوژیکی هرسپتین نشان‌دار در موش سوری

سمیرا رسانه¹، فریبا جوهری ده¹

¹ - پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران. Sami_rasaneh @ hotmail.com

تاریخ دریافت: 93/7/25 تاریخ پذیرش: 93/9/17

چکیده

مقدمه و هدف: آنتی بادی های مونوکلونال، پروتئین های ویژه ای هستند که در درمان هدف‌مند به‌طور چشم‌گیری مورد استفاده قرار می‌گیرند. هرسپتین یکی از معروف‌ترین آنتی بادی های مونوکلونال انسانی است که در زمینه درمان سرطان پستان مورد استفاده قرار گرفته است. در این تحقیق نشان‌داری آنتی بادی هرسپتین با تکنسیوم به عنوان اولین قدم در تولید یک رادیوداروی جدید تشخیصی مورد ارزیابی قرار گرفته شد.

روش کار: کلیه تست های کنترل کیفی شامل تعیین خلوص رادیوشیمیایی، ایمونوراکتیویته، پایداری در بافر فسفات و سرم خون انجام و نهایتاً توزیع زیستی این دارو در بدن موش سوری سالم بررسی گردید.

یافته‌ها: خلوص رادیوشیمیایی $97 \pm 2\%$ ، بعد از 24 ساعت پایداری در بافر $84 \pm 1\%$ ، سرم $75 \pm 2\%$ و ایمونوراکتیویته $86 \pm 3\%$ محاسبه شد. هیچ اکتیویته ای در بافت یا اندام خاصی از بدن موش تجمع نیافت.

نتیجه‌گیری: بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیب نشان‌دار احتمالاً به‌تواند یک کاندیدای امیدوارکننده برای کاربردهای تشخیصی در طیف وسیعی از سرطان های انسانی باشد.

واژه‌های کلیدی: هرسپتین، سرطان پستان، تکنسیوم، تشخیص.

مقدمه

در اوایل دهه 50 مطرح شد. در 1948، Pressmah و Keighley نشان دادند که اگر ایمونوگلوبین دربردارنده آنتی بادی نرمال کلیه rat با ^{131}I نشان‌دار گردد، قادر است به صورت اختصاصی کلیه ها را هدف قرار دهد (16). پیشرفت چشم‌گیر بعدی در این زمینه، در سال 1975 توسط Kohler و Milstein صورت گرفت. آن‌ها اولین مونوکلونال آنتی بادی را استخراج کردند (7). از آن پس آنتی بادی ها به عنوان سیستم ارسال رادیویزوتوپ ها برای تشخیص و درمان، نقش مهمی در زمینه انکولوژی ایفا نمودند. آنتی بادی-های مونوکلونال زیادی به بازار عرضه شده که یکی از معروف ترین و اولین آنتی بادی مونوکلونال انسانی هرسپتین با نام تجاری Trastuzumab از نوع IgG1 است که در 1998 به تایید FDA رسیده و در زمینه

سرطان پستان، شایع ترین سرطان در زنان و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه در جهان است. به دلیل مرگ آور بودن و میزان ابتلا زیاد، مبارزه علیه آن با اهمیت زیادی دنبال می‌شود (13). تشخیص و شروع به درمان سریع در مراحل اولیه این بیماری، از عوامل موثر در بهبود بیماران مبتلا به سرطان پستان است (5). در حال حاضر روش تشخیص قطعی سرطان با استفاده از بیوبسی از توده تحت سونوگرافی می باشد که روشی تهاجمی و هزینه‌بر برای بیمار محسوب می‌گردد. آنتی بادی های مونوکلونال، پروتئین هایی هستند که در درمان هدف دار به‌طور چشم‌گیری مورد استفاده قرار گرفته و گیرنده های فاکتور رشد و مسیرهای سیگنال دهی آن‌ها را هدف قرار می‌دهند (5). استفاده از آنتی بادی های نشان‌دار

کربونیل نشان‌دار کرد. این گروه کار خود را محدود به شرایط *in vitro* کرده و نتایج خوبی به دست آوردند، اما آن‌ها در شرایط *in vivo* بررسی انجام ندادند(6). در این پژوهش سعی شده تا با نشان‌دارسازی این آنتی بادی با یک رادیویزوتوپ تشخیصی متداول مثل ^{99m}Tc روشی برای تشخیص سریع تر و غیر تهاجمی تر این آنتی ژن در سطح سلول‌های سرطانی ارائه شود. بعد از نشان‌دارسازی و انجام کلیه مراحل کنترل کیفی، توزیع زیستی رادیودارو در بدن موش سالم سوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آنتی بادی هرستین محصول شرکت Gentech آلمان است که در ویال 140 میلی گرم از داروخانه 13 آبان تهیه شد. ^{99m}Tc از ژنراتور مولیدن/تکنسیم، سازمان انرژی اتمی ایران به دست آمد. شلاتور Succinimidyl Hydra zinonicotin (SHYNIC) amide محصول شرکت ABX به میزان 50 میلی گرم خریداری شد. سایر مواد آزمایشگاهی از شرکت Fluka تهیه گردید.

کشت سلولی

برای تهیه محیط کشت 10/4 گرم پودر محیط کشت RPMI با 2 گرم بی کربنات سدیم در 1000 سی سی آب مقطر حل کرده و برای استریل سازی از فیلتر 0/22 میکرون عبور داده شد. 900 سی سی از این محیط با 100 سی سی سرم جنین گاوی، 15 سی سی L-گلوتامین و یک سی سی آنتی بیوتیک جنتامایسین مخلوط گردیدند. سلول‌های سرطان پستان SKBR3 که به صورت Overexpress HER2 هستند از انستیتو پاستور تهیه شد. با کمک محلول تریپسین-EDTA سلول‌ها از کف ظرف جدا شده و بعد از شستشو به داخل فلاسک بزرگ تر منتقل گردیدند،

درمان و تشخیص سرطان پستان مورد استفاده قرار گرفته است. این آنتی بادی به پروتئین خارج سلولی گیرنده HER2 متصل می شوند. HER2 در 20-25% سرطان‌های پستان انسانی دارای بیان بیش از حد نرمال است(15). این پروتئین با سیگنال دهی، مسیرهای مرتبط با سرطان از جمله تکثیر، حرکت، تهاجم استرومال و نوواسکولاروزاسیون را افزایش می دهد. این حالت در پاتوزن سرطان پستان که مشخص شده یک فاکتور کلیدی در تشخیص است. بزرگی بیان ژن 50-100 برابر حالت نرمال است باشد که در نتیجه فعالیت مستقل از لیگاند گیرنده را می تواند در پی داشته باشد(3). تا به حال ترکیبات نشان‌دار درمانی بسیاری با هرستین مورد بررسی قرار گرفته است(14، 12، 11، 9، 8، 4، 2). به عنوان مثال در سال 2004، هرستین با عنصر آلفا زا ^{213}Bi نشان‌دار شده و اثر کشندگی آن بر روی سلول‌های CaP که رده سلولی سرطان پروستات است آزمایش شد. این تحقیق نشان داد که ^{213}Bi -Trastuzumab توانایی از بین بردن این رده سلولی را دارد و قدرت کشندگی آن با افزایش بیان HER2 در سطح سلول‌ها بیشتر می شود(9). برای کاربرد تشخیصی هرستین با روش‌های مختلفی با تکنسیم و ایندیم نشان‌دار شده است(20، 19، 12، 6). در سال 2009، McLarty و همکارانش هرستین را با کمک DTPA با ایندیم نشان‌دار کرده و آزمون‌های کنترل کیفی درون‌تنی و برون‌تنی برای آن انجام دادند. نتایج مثبت این تحقیق، آن‌ها را به استفاده بالینی از این ترکیب امیدوار ساخت(12). در مطالعه ای که تانگ در سال 2005 انجام داد، فراگمنت Fab هرستین را جدا کرده و با کمک hynic با تکنسیم نشان‌دار کرد. آن‌ها ترکیب خود را بر روی موش حامل سرطان انسانی با موفقیت آزمایش کردند(19). در سال 2008، Chen و همکارانش هرستین را به روش مستقیم و با تکنیک

3- تعیین ایمونوراکتیویته: ایمونوراکتیویته، توانایی آنتی بادی را در اتصال به آنتی ژن موردنظر پس از انجام پروسه نشان دارسازی بررسی می کند و مطابق با روش Lindmo انجام شد (10). به طور خلاصه بعد از جداسازی سلول ها از کف ظرف با محلول تریپسین - EDTA تعداد 6×10^7 از سلول های مورد نظر شمرده و داخل 1 سی سی محیط کشت شناور گردید. در 6 ظرف دیگر تعداد سلول ها را به ترتیب نصف تعداد سلول ها در ظرف قبل ریخته، کمپلکس بر روی سلول ها اثر داده شد. بعد از گذشت 2 ساعت سلول ها سانتریفیوژ و چند بار شسته شدند تا فقط اکتیویته متصل به سلول ها باقی بماند. منحنی اکتیویته متصل به سلول ها نسبت به تعداد سلول ها رسم گردید و شیب این منحنی درصد آنتی بادی های نشان دار فعال پس از نشان دارسازی نشان داد. هر اندازه گیری 3 بار انجام و نهایتاً میانگین گرفته شد.

توزیع بیولوژیکی در موش

جهت بررسی توزیع بیولوژیکی از 36 موش سالم سوری با سن 6-8 هفته و وزن 25-35 گرم استفاده و به هر کدام تقریباً $250 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$ از هرسپتین-تکنسیوم از طریق دم تزریق گردید (17). موش ها در ساعت های 4، 24 ساعت بعد تزریق کشته و بافت های مختلف آن ها جداسازی و درصد اکتیویته به ازای هر گرم بافت (%ID/g) در سیستم شمارنده گاما (EG & G / ORTEC / Model 4001 M) اندازه گیری شد.

نتایج

خلوص رادیوشیمیایی کمپلکس در 1 ساعت پس از انکوباسیون بیشتر از $97 \pm 2\%$ به دست آمد که در نمودار 1 مشخص است بالاترین اکتیویته در قسمت پایین کاغذ دیده می شود. نتایج بررسی پایداری در نمودار 2 نمایش داده شده است. بعد از یک شبانه روز هرسپتین - تکنسیوم در بافر تا $84 \pm 1\%$ و در سرم خون

30 - 40 سی سی محیط کشت به آن اضافه و داخل انکوباتور سلولی قرار گرفت.

نشان دار سازی

نشان دارسازی با کمک شلاتور SHYNIC طبق روش Abrams و همکارانش (1) انجام شد. به طور خلاصه 10 میلی گرم هرسپتین در بافر سترات (pH: 8) با 1 میلی گرم SHYNIC به مدت 24 ساعت در تاریکی به آرامی مخلوط شده، سپس با عبور از ستون PD-10 خالص سازی و با بافر استات (pH: 5) شستشو گردید. به جای استفاده از تریسین به عنوان کولیگاند از glico heptonate برای نشان دارسازی هرسپتین - SHYNIC با تکنسیوم استفاده شد (1). ترکیب نهایی با عبور از ستون سفادکس G25 و شستشو با بافر فسفات (pH: 7) خالص سازی گردید.

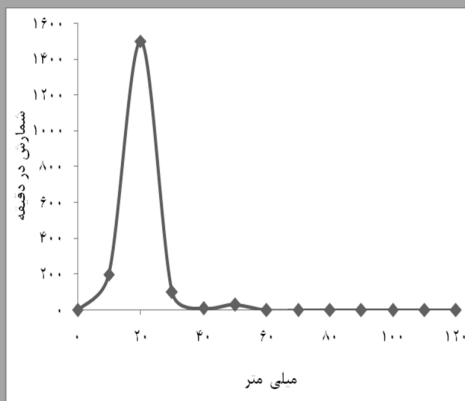
کنترل کیفی

1- تعیین خلوص رادیوشیمیایی: خلوص رادیوشیمیایی توسط روش TLC با استفاده از نوار های واتمن شماره 1 به عنوان فاز ثابت، در بافر سالین به عنوان حلال، بریدن یک سانتی متری نوار ها و شمارش اکتیویته آن ها با دستگاه شمارنده گاما (EG & G / ORTEC / Model 4001 M) بررسی شد.

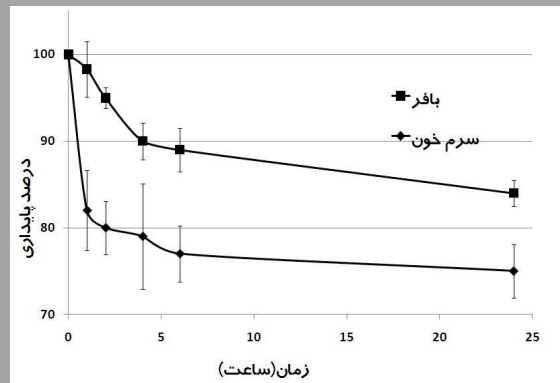
2- پایداری کمپلکس: پایداری در بافر سالین و سرم خون سنجیده شد، به این ترتیب که نمونه های 1 میلی لیتری سرم خون تازه انسانی، تهیه و کمپلکس هرسپتین-تکنسیوم ($250 \mu\text{Ci}$) به هر نمونه اضافه گردید، سپس در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. نمونه ها در ساعت های 1، 2، 4، 6 و 24 ساعت پس از انکوباسیون توسط TLC ارزیابی گردیدند. روش مشابه برای بررسی پایداری کمپلکس در شرایط 4 درجه سانتی گراد، دمای اتاق و بافر فسفات نیز انجام شد.

توزیع بیولوژیکی کمپلکس در بدن موش سوری در نمودار 3 نمایش داده شده است. هیچ تجمع خاصی در اندامی مشاهده نگردید و تا 24 ساعت اکتیویته کبد و خون بالا بود که نشان دهنده پایداری بالای این کمپلکس در شرایط *in vivo* است. جذب در کبد به علت این است که کبد محل هضم و شکسته شدن آنتی بادی می باشد.

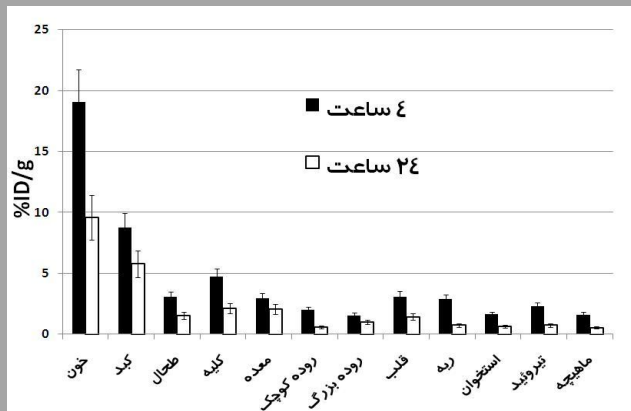
تا $2 \pm 75\%$ پایدار بود که این نتایج پایداری قابل قبولی را نشان می دهد. پایین بودن درصد پایداری در سرم نسبت به بافر به علت وجود آنزیم های موجود در خون است که توانایی تاثیرگذاری در پیوند را دارد. ایمونوراکتیویته کمپلکس که با کمک سلول های SKBR3 تعیین شده بود 86 درصد به دست آمد که نشان دهنده توانایی بالای کمپلکس در اتصال اختصاصی به آنتی ژن مورد نظر است. نتایج مربوط به



نمودار 1- خلوص رادیوشیمیایی نشان دارسازی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک. شمارش ها از قطعات مختلف کاغذ ثبت شده است و بیشترین شمارش مربوط به هرستین-تکنسیوم در محل لکه گذاری می باشد.



نمودار 2- پایداری *in vitro* هرستین-تکنسیوم در بافر فسفات و سرم خون



نمودار 3- توزیع بیولوژیکی هرستین-تکنسیوم در بدن موش سوری در زمان 4 و 24 ساعت بعد تزریق

بحث و نتیجه گیری

به-توان گفت کمپلکس مربوطه جهت کارهای درون-تنی از پایداری قابل قبولی برخوردار است. Chen در بررسی خود، پایداری 24 ساعته بالای 98٪ در سرم برای هرستین- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ به روش مستقیم به دست آورد(6). با توجه به این که پروسه نشان دارسازی روی ایمونوراکتیویته ی آنتی بادی اثر می گذارد، بررسی ایمونوراکتیویته یکی از تست های کنترل کیفی لازم-الاجرا است. بررسی های ایمونوراکتیویته که به روش Lindmo صورت گرفت نشان داد که کمپلکس هرستین-تکنسیوم در حدود 65٪ توانایی اتصال سلولی خود را حفظ کرده است که نتیجه قابل قبولی برای ترکیب نشان دار می باشد. نتایج مشابهی توسط صلوتی در 2010 برای اجزای Fab آنتی بادی PR81 نشان دار با ^{99m}Tc ایمونوراکتیویته با توانایی اتصال 65٪ به دست آمد(18). در بررسی دیگری Chen و همکاران توانایی اتصال 70٪ برای سلول های BT-474 گزارش نمودند در این تحقیق هرستین به روش مستقیم با تکنسیوم نشان دار شده بود(6). توزیع درون تنی فرآورده در بدن موش و عدم تجمع در ارگان هایی مثل معده، تیروئید و کلیه نشان داد که کمپلکس خلوص رادیوشیمیایی خود را به خوبی حفظ کرده و ایزوتوپ آزاد وجود ندارد. برداشت بالای کبد به خاطر

در تحقیق حاضر، آنتی بادی هرستین که به طور رایج در درمان سرطان پستان مورد استفاده است به-صورت غیرمستقیم و با استفاده از SHynic به عنوان چلاتور با رادیویزوتوپ ^{99m}Tc نشان دار و آزمایش-های کنترل کیفی روی کمپلکس صورت گرفت. بررسی خلوص رادیوشیمیایی نشان داد 97 درصد تکنسیوم ها به آنتی بادی اتصال پیدا کرده و میزان اکتیویته آزاد کمپلکس بسیار پایین است. خلوص رادیوشیمیایی نشان دارسازی تکنسیوم با فراگمنت IgG توسط Abrams و همکارانش 96٪ محاسبه شده است(1). Chen هرستین را به روش مستقیم و با تکنیک کربونیل با تکنسیوم نشان دار کرد و به خلوص رادیوشیمیایی بالای 90٪ دست یافت(6). هم چنین نشان دارسازی فراگمنت Fab هرستین که توسط تانگ با تکنسیوم و HYNIC انجام شد، خلوص رادیوشیمیایی برابر با 94٪ داشت(19). نتایج آزمون پایداری در بافر در فاصله ی 6 ساعت، فقط 11٪ جدایی آنتی بادی از تکنسیوم را نشان دادند(89٪). هم چنین پایداری در سرم بعد از 24 ساعت، 75٪ به دست آمد که نسبتاً مشابه نتایج صلوتی برای پایداری 24 ساعت کمپلکس ^{99m}Tc -PR81 در دمای محیط و سرم خون است که به ترتیب 3/88٪ و 8/79٪ بود(17). بر این اساس شاید

مطالعات تشخیصی درطیف وسیعی از سرطان های بیان کننده آنتی ژن HER2 می باشد که نیاز به مطالعات بیشتری از جمله مطالعات سلولی در آینده را دارد.

مسیر هضم و دفعی آنتی بادی است که این یک نتیجه بدیهی است. این پایداری، نگهداری و به کارگیری فرآورده در مطالعات بالینی را امیدوار ساخت. این تحقیق نشان داد که ترکیب نشان دار هرستین-تکنسیوم احتمالاً می تواند یک کاندیدای امیدوار کننده جهت

منابع

1. Abrams, M.J., Juweid, M., Tenkate, C.I. (1990). Technetium-99m human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med*, 31(2); 2022-2028.
2. Akabani, G., Carlin, S., Welsh, P., Zalutsky, M.R. (2006). In vitro cytotoxicity of ^{211}At -labeled trastuzumab in human breast cancer cell lines: effect of specific activity and HER2 receptor heterogeneity on survival fraction. *Nucl Med Biol*, 33 (3); 333-347.
3. Albanell, J., Codony, J., Rovira, A., Mellado, B., Gascon, P. (2003). Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Bio*, 532; 253-268.
4. Ballangrud, A.M., Yang, W.H., Palm, S., Enmon, R., Borchardt, P.E., Pellegrini, V.A. (2004). Alpha-particle emitting atomic generator (Actinium-225)-labeled trastuzumab (herceptin) targeting of breast cancer spheroids: efficacy versus HER2/neu expression. *Clin Cancer Res*, 10 (13); 4489-4497.
5. Bange, J., Zwick, E., Ullrich, A. (2001). Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med*, 7(5); 548-552.
6. Chen, W.J., Lo, S.T., Chen, K.T., Lo J.M. (2008). Direct $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labeling of Herceptin (trastuzumab) by $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ tricarbonyl ion. *Appl Radiat Isot*, 66(3); 340-345.
7. Kohler, G., Milstein, C. (1975). Cotinuous cultures of fused cells secreting antibod of predefined specificity. *Nature*, 256; 495 - 497.
8. Li, G., Wang, Y., Huang, K., Zhang, H., Peng, W., Zhang, C. (2005). The experimental study on the radioimmuno therapy of the nasopharyngeal carcinoma over expressing HER2/neu in nude mice model with intratumoral injection of ^{188}Re -herceptin. *Nucl Med Biol*, 32 (1); 59-65.
9. Li, Y., Cozzi, P.J., Qu, C.F., Zhang, D.Y., Rizvi, S.M.A., Raja, C. (2004). Cytotoxicity of human prostate cancer cell lines in vitro and induction of apoptosis using ^{213}Bi -Herceptin α -conjugate. *Cancer Lett*, 205(2); 161-71.
10. Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedorko, J., Bunn, P.J. (1984). Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods*, 3(72);77-89.
11. Luo, T.Y., Tang, I.C., Wu, Y.L., Hsu, K.L., Liu, S.W., Kung, H.C. (2009). Evaluating the potential of ^{188}Re -SOCTA-trastuzumab as a new radioimmuno agent for breast cancer treatment. *Nucl Med Biol*, 36 (1); 81-88.
12. McLarty, K., Cornelissen, B., Scollard, D.A., Done, S.J., Chun, K., Reilly, R.M. (2009). Associations between the uptake of ^{111}In -DTPA-trastuzumab, HER2 density and response to trastuzumab(Herceptin) in athymic mice bearing subcutaneous human tumour xenografts. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 36; 81-93.
13. Metro, G., Mottolose, M., Fabi, A. (2008). HER-2-positive metastatic breast cancer: trastuzumab and beyond. *Expert Opin Pharmacother*, 9(15); 2583-2601.
14. Milenic, D.E., Garmestani, K., Brady, E.D., Albert, P.S., Abdulla, A., Flynn, J. (2007). Potentiation of high-let radiation by gemcitabine: targeting HER2 with trastuzumab to treat disseminated peritoneal disease. *Clin Cancer Res*, 13(6); 145-150.
15. Nahta, R., Esteva, F. (2003). HER-2-targeted therapy – lessons learned and future directions. *Clin Cancer Res*, 9(14); 5078-5084.
16. Pressman, D., Keighley, G. (1948). The zone activity of antibodies as determined by the use of radioactive tracers, the zone of activity of nephritoxic antkidney serum. *J. Immunol*, 59; 141 - 146.

17. Salouti, M., Rajabi, H., Babaei, M.H., Rasae, M.J. (2008). Breast tumor targeting with ^{99m}Tc -HYNIC-PR81 complex as a new biologic radiopharmaceutical. *Nucl Med Biol*, 35; 763–768.

18. Salouti, M., Babaei, M.H., Rajabi, H., Forootan, H., Rasae, M.J., Bitarafan Rajabi, A. (2010). Production, quality control and biodistribution study of f(ab')₂ fragment of antibody PR81 labeled with ^{99m}Tc for diagnosis of breast carcinoma bearing mice. *Nucl Sien Tech*, 53; 1-9.

19. Tang, Y., Scollar, D., Chen, P., Wang, J., Holloway, C., Reilly, R.M. (2005). Imaging of

HER2/neu expression in BT-474 human breast cancer xenografts in athymic mice using [^{99m}Tc] – HYNIC trastuzumab(Herceptin) Fab fragments. *Nucl Med Commun*, 26(5); 427-432.

20. Tang, Y., Wang, J., Scollard, D.A., Mondal, H., Holloway, C., Kahn, H.J. (2005). Imaging of HER2/neu-positive BT-474 human breast cancer xenografts in athymic mice using ^{111}In - trastuzumab(Herceptin) Fab fragments. *Nucl Med Biol*, 32; 51-58.



Archive of SID