



The use of a new analogue ${}_{\text{D}}$ Glu-Octagastrin in scintigraphy of medullary thyroid carcinoma

Jerzy Kosowicz, Rafał Czepczyński, Katarzyna Ziemnicka, Maria Gryczyńska, Jerzy Sowiński

Department of Endocrinology, Metabolism and Internal Diseases, University of Medical Sciences, Poznań

Abstract

Introduction: Medullary thyroid carcinomas (MTC) reveal overexpression of several peptide receptors particularly of gastrin and cholecystokinin 2 (CCK2). Experimental studies of various CCK-2/gastrin analogues found that a C-terminal, 8-aminoacid peptide, ${}_{\text{D}}$ Glu-octagastrin, has optimal properties. Thus, the aim of our studies was to prepare ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled HYNIC-octagastrin, to evaluate its biologic tolerance in animals and introduce for scintigraphy in patients with MTC. **Material and methods:** HYNIC- ${}_{\text{D}}$ Glu-octagastrin was from piCHEM (Graz, Austria), ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ generator from Amersham (Health), other reagents were purchased from Sigma. Labeling of the peptide was performed in phosphate buffer of pH 6.0 for 10 minutes at 100°C using EDDA and tricine as coligands. **Results:** The labeling yields were high (above 95%); the specific activity amounted to 1200 to 1430 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Radiochemical purity on SepPak cartridge and ITLC ranged from 94 to 98%. No adverse effects were observed in mice after administration of 10 to 50 times greater doses than those used in patients. Clinical studies comprised 20 patients with MTC and high serum calcitonin. ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC- ${}_{\text{D}}$ Glu-octa-

gastrin, 500 to 700 MBq, was administered iv and whole body scintigraphy was performed using a double head gamma-camera (Varicam, Elscint) 2 and 4 hours later. Increased accumulation of the tracer in foci of MTC and its metastases was found in 8 patients.

Conclusions: Scintigraphy with a new gastrin analogue (${}_{\text{D}}$ Glu-octagastrin) makes it possible to detect MTC with overexpression of CCK-2/gastrin receptors and to select patients for receptor-mediated radiolabeled therapy using DOTA-gastrin analogues labelled with ${}^{177}\text{Lu}$ and ${}^{90}\text{Y}$.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 4 (57): 427–430)

Key words: medullary carcinoma, gastrin analogues, radiolabeled scintigraphy, ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Octagastrin



Jerzy Kosowicz, M.D., Ph.D.
Department of Endocrinology
University of Medical Sciences, Poznań
Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań
e-mail: jkosowicz@poczta.fm



Zastosowanie nowego analogu D Glu-Oktagastryny w scyntygrafii raka rdzeniastego tarczycy*

Jerzy Kosowicz, Rafał Czepczyński, Katarzyna Ziemnicka, Maria Gryczyńska, Jerzy Sowiński

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Streszczenie

Wstęp: Rak rdzeniasty tarczycy (MTC, *medullary thyroid cancers*) wykazuje nadekspresję receptorów kilku peptydów, zwłaszcza receptorów gastryny i cholecystokininy 2 (CCK2). W badaniach eksperymentalnych różnych analogów CCK2 i gastryny wykazano, że najlepsze właściwości posiada C-końcowy 8-aminokwasowy peptyd D Glu-Oktagastryna. Dotychczas brakuje doniesień na temat klinicznego zastosowania tego analogu. Celem pracy było opracowanie zestawu do uzyskania znakowanej ${}^{99m}\text{Tc}$ -Oktagastryny, sprawdzenie tolerancji biologicznej preparatu i określenie przydatności tego peptydu w scyntygrafii.

Materiał i metoda: HYNIC- D Glu-minigastryna (piCHEM, Austria), ${}^{99m}\text{Tc}$ (Amersham), trycyna, EDDA, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma). Znakowanie wykonano w buforze fosforanowym o pH 6,0 w temp. 100°C przez 10 minut z koligandami EDDA i trycyną.

Wyniki: Wydajność znakowania była wysoka; aktywność wynosiła 1200–1430 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Czystość radiochemiczna określana metodą chromatografii odwrotnej fazy na minikolumnach SepPaku i chromatografii cienkowarstwowej wynosiła 94–98%. W badaniu biologicznym u myszek szczepu Balb/c wykazano brak działań niepożądanych po zastosowaniu preparatu w dawkach 10- i 50-krotnie wyższych niż stosowanych u ludzi. Badania kliniczne objęły 20 chorych z MTC z wysokim stężeniem kalcytoniny; rozpoznanie było

potwierdzone badaniem histopatologicznym i immunohistochemicznym usuniętego guza. Chorem podano 500–700 MBq ${}^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC- D Glu-oktagastryny i po 2 oraz 4 godzinach wykonano scyntyografię całego ciała z użyciem gammakamery dwugłowicowej Varicam (Elscont). U 8 chorych scyntygrafia wykazała gromadzenie znacznika w ognisku raka rdzeniastego i jego przerzutach.

Wnioski: Scyntygrafia z użyciem nowego analogu D Glu-Oktagastryny pozwala na wykrycie guzów z nadekspresją receptorów CCK2/gastrynowych i wskazuje na możliwość zastosowania terapii radioizotopowej z użyciem DOTA-oktagastryny znakowanej ${}^{177}\text{Lu}$ i ${}^{90}\text{Y}$.

(*Endokrynol Pol* 2006; 4 (57): 427–430)

Słowa kluczowe: rak rdzeniasty, analogi gastryny, scyntygrafia radiopeptydowa, ${}^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-oktagastryna

prof. dr hab. med. Jerzy Kosowicz
Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii
i Chorób Wewnętrznych Akademia Medyczna
im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań
e-mail: jkosowicz@poczta.fm

*Praca finansowana w ramach projektu MNiI nr 3 PO5B 097 25

Wstęp

Diagnostyka i terapia raka rdzeniastego tarczycy (MTC, *medullary thyroid cancers*) nadal sprawia poważne trudności, ponieważ nowotwór ten nie gromadzi jodu i stąd nie poddaje się terapii izotopem jodu 131. Leczenie MTC polega na totalnej tyreoidektomii i usunięciu węzłów chłonnych, jednak aż w połowie przypadków dochodzi do nawrotów i przerzutów, na co wskazuje wysokie stężenie kalcytoniny w surowicy chorych. Radioterapia zewnętrzna i leki cytostatyczne są mało skuteczne, dlatego istotnym problemem jest wczesne wykrycie i lokalizacja ognisk nowotworowych.

Guzy neuroendokrynne, do których zalicza się MTC, wykazują zwiększoną ekspresję receptorów aktywnych peptydów. W badaniach Reubiego i wsp. [1, 2], wyko-

nanych metodą autoradiografii z użyciem peptydów znakowanych 125-jodem w MTC, ujawniono znaczną nadekspresję receptorów cholecystokininowych typu 2 (CCK2) i gastrynowych, wspólnych dla obu peptydów, która przewyższała ekspresję receptorów somatostatyny, wapnia i kalcytoniny, również obecnych w komórkach tego raka. Stało się to podstawą do diagnostycznego i terapeutycznego stosowania radiopeptydów celowanych na odpowiednie receptory.

W badaniach klinicznych jako pierwsze zastosowano analogi somatostatyny — oktrottyd znakowany 111-jodem (Octreoscan firmy Mallinckrodt), a w ostatnich latach — łatwiejszy i tańszy znakowany ${}^{99m}\text{Tc}$ Tektrottyd (EDDA-HYNIC-Tyr³-octreotide), produkowany przez OBRI, Polatom (Świerk).

Behr, Behe i wsp. [3–6] do scyntygrafii guzów neuroendokrynych wprowadzili początkowo ^{131}I -gastrynę, potem znakowaną ^{111}In $_{\text{D}}\text{Glu}^1$ -minigastrynę, i uzyskali pozytywne wyniki w scyntygrafii w większości przypadków MTC i guzów neuroendokrynych.

Jednak wysokie wchłanianie zwrotne $_{\text{D}}\text{Glu}^1$ -minigastryny i przedłużona retencja tego peptydu w nerkach stanowiły istotną przeszkodę w zastosowaniach terapeutycznych. W badaniach eksperymentalnych różnych analogów gastryny stwierdzono, że 8-aminokwasowy peptyd — $_{\text{D}}\text{Glu}$ -oktagastryna — wykazał dobre wiązanie z komórkami rakowymi i znacznie niższą retencję w nerkach [7, 8].

Celem niniejszej pracy było opracowanie zestawu do uzyskania znakowanej $^{99\text{m}}\text{Tc}$ HYNIC- $_{\text{D}}\text{Glu}$ -oktagastryny ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -oktagastryny), sprawdzenie tolerancji biologicznej tego peptydu i zastosowanie w badaniach klinicznych w scyntygrafii u chorych na raka rdzenia-ścieg tarczycy.

Materiały i metody

Badanie scyntygraficzne z zastosowaniem nowego analogu HYNIC-oktagastryny wykonano u 20 chorych, w tym u 14 kobiet i 6 mężczyzn z wysokim stężeniem kalcytoniny w surowicy. Wszystkich chorych poddano totalnej tyreoidotomii i usunięciu węzłów chłonnych. Wyniki histopatologiczne i badania immunohistochemiczne usuniętych guzów (dodatnie reakcje na kalcytoninę i chromograninę) potwierdziły rozpoznanie raka rdzeniastego tarczycy.

HYNIC- $_{\text{D}}\text{Glu}$ -oktagastryna pochodziła z piCHEM (Graz, Austria) generator $^{99\text{m}}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ z Amersham (Heath). EDDA i trycynę oraz pozostałe odczynniki zakupiono w firmie Sigma, a minikolumny C18 SepPak w Waters Corp.

Preparatu HYNIC-oktagastryny nie stosowano u ludzi, dlatego przed badaniami klinicznymi w Zakładzie Toksykologii AM wykonano badanie biologiczne na myszkach, podając dootrzewnowo dawki 10–50 razy przekraczające dawki stosowane u ludzi. Obserwacje wykazały całkowity brak działań niepożądanych u zwierząt doświadczalnych, co pozwoliło uzyskać zgodę Komisji Etycznej na zastosowanie tego analogu u chorych.

HYNIC-oktagastrynę znakowano $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -technetem (26–30 mCi) w buforze fosforanowym (pH 6,0), stosując jako koligandy EDDA (10 mg), trycynę (20 mg) oraz $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20 μg) w łaźni wodnej o temperaturze 100°C przez 10 minut, na podstawie metody znakowania HYNIC-okreotydu opracowanej przez von Guggenberga i Mikołajczak [9].

Scyntyografię całego ciała wykonano gammakamerą Varicam (Elsint) po podaniu chorym dożylnie 12–14 mCi

znakowanej oktagastryny. Scyntyografię wykonano w różnych odstępach czasu: u 15 chorych po 2 i 4 godzinach, a u pozostałych po: 1, 2, 3, 4 i 8 godzinach po podaniu znacznika u różnych chorych dla określenia optymalnego okresu akwizycji.

Wyniki

Zastosowana metoda znakowania $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -technetem HYNIC-oktagastryny pozwoliła na uzyskanie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-oktagastryny o wysokiej aktywności właściwej 1200–1430 uCi/ μg . Czystość radiochemiczna na minikolumnach SepPak wynosiła 94,8–98,1%. W badaniach biologicznych u myszy ściśle kontrolowanych przez 3 dni wykazano duże bezpieczeństwo podawania HYNIC-oktagastryny, ponieważ megadawki tego peptydu nie wywołały działań niepożądanych, a stężenie kreatyniny i mocznika u myszy nie uległo żadnej zmianie.

Zastosowanie znakowanej HYNIC-oktagastryny u chorych na MTC było dobrze tolerowane, u nikogo nie wystąpiły działania niepożądane, nawet w przypadkach, w których podanie innego analogu gastryny-pentagastryny wywołało chwilowe mdłości lub ból w nadbrzuszu. Różnice w odpowiedzi na te analogi gastryny zależały zapewne od tego, że dawka pentagastryny była znacznie wyższa (30–40 μg) niż dawka oktagastryny (7–9 μg).

U wszystkich chorych już w 1. i 2. godzinie po dożylnym podaniu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Oktagastryny scyntygrafia wykazała fizjologiczne gromadzenie znacznika w żołądku i dwunastnicy. W 2. i 3. godzinie znacznik zanikał w żołądku, natomiast widoczny był w dalszych odcinkach jelita cienkiego. W 4. i 8. godzinie znacznik gromadził się także w jelicie grubym, a po 24 godzinach tylko jelito grube uwidaczniało się na scyntygramach.

Ponadto mniejsze gromadzenie znacznika, wcześniej, bo już w 1. i 2. godzinie, było widoczne w obu nerkach i pęcherzu moczowym oraz u kobiet w wieku rozrodczym w obu gruczołach piersiowych. Znacznik gromadził się także w stawach barkowych, w postaci łukowatych linii, oraz w śródpiersiu. Natomiast nie było akumulacji $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -oktagastryny w śledzionie i wątrobie, a więc w miejscach, gdzie inne znaczniki izotopowe, zwłaszcza $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC, ulegają znacznej akumulacji i retencji.

Ogniska patologicznej akumulacji $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -oktagastryny stwierdzono u 8 chorych, a u 6 z nich w węzłach chłonnych szyi, nadobojczykowych lub śródpiersiowych. Odległe przerzuty raka uwidoczniły się w płucach u jednego chorego, w kościach u innej chorej, a u 2 chorych znacznik gromadził się w śródpiersiu.

Czas akwizycji (scyntygrafii) nie miał istotnego wpływu na wykrycie ognisk patologicznego gromadzenia znacznika, ponieważ scyntygramy wykonane po

2 i po 4 godzinach nie różniły się istotnie między sobą. Zbyt mała liczba badań po 1 godzinie nie pozwala ocenić, czy ten okres jest wystarczający. Natomiast scyntygramy wykonane po 8 i po 24 godzinach nie ujawniały ognisk nowotworowych; znacznik widoczny był tylko w jelicie grubym i śladowo w nerkach.

Dyskusja

U chorych na raka rdzeniastego tarczycy w toku testu z pentagastryną już w pierwszych minutach dochodzi z reguły do znacznego zwiększenia stężenia kalcytoniny w surowicy. Pośrednio wskazuje to na obecność receptorów gastrynowych na powierzchni komórek MTC. Stąd można było oczekiwać, że podanie oktagastryny, 8-aminokwasowego analogu gastryny, zawierającego tę samą aktywną grupę 4 aminokwasów C-końcowego odcinka gastryny, pozwoli uzyskać pozytywne wyniki u wszystkich chorych. W odróżnieniu od oczekiwań, badania scyntygraficzne z zastosowaniem ${}^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-oktagastryny dały pozytywne wyniki w mniej niż połowie przypadków MTC. U tych samych chorych wykonanie scyntygrafii analogiem somatostatyny (${}^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC) pozwoliło wykryć ogniska patologiczne u 16 chorych, a więc prawie 2-krotnie częściej. Przypuszczalnie dołączenie do oktagastryny substancji chelatującej, amidu hydrazyno-nikotynowego (HYNIC) oraz ${}^{99m}\text{Tc}$ utrudnia wiązanie tego kompleksu przez receptory gastrynowe MTC.

Wykrycie obecności receptorów CCK-2/gastrynowych u chorych na MTC daje istotne wskazania do wyboru terapii chorych. Gromadzenie znacznika w węzłach chłonnych szyi i nadobojczykowych wskazuje na potrzebę ponownej operacji, natomiast chorzy niekwalifikujący się do reoperacji są kandydatami do receptorowej radiopeptydowej terapii, peptydami znakowanymi ${}^{177}\text{Lu}$ -lutetem i ${}^{90}\text{Y}$ -itrem. U chorych na MTC z obecnością 2 typów receptorów gastrynowych i somatostatynowych przewidywać można kombinowaną terapię DOTA-oktagastryną i DOTA-TATE, znakowa-

nymi emiterami promieniowania β , co powinno przyczynić się do uzyskania lepszych niż dotąd wyników terapeutycznych.

Wnioski

Scyntygrafia z użyciem nowego analogu D Glu-oktagastryny pozwala wykryć guzy z nadekspresją receptorów CCK-2/gastrynowych i wskazuje na możliwość zastosowania terapii radioizotopowej z użyciem DOTA-oktagastryny znakowanej ${}^{177}\text{Lu}$ lub ${}^{90}\text{Y}$.

Piśmiennictwo

1. Reubi JC, Schaer JC, Waser B. Cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 1377–1386.
2. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *End Rev* 2003; 24: 389–427.
3. Behr TM, Jenner N, Radetzky S i wsp. Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur J Nucl Med* 1998; 25 (4): 424–430.
4. Behe M, Becker W, Gotthardt M i wsp. Improved kinetic stability of DTPA- D Glu as compared with conventional monofunctional DTPA in chelating indium and yttrium: preclinical and initial clinical evaluation of radiometal labelled minigastrin derivatives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30 (8): 1140–1146.
5. Behe M, Behr TM. Cholecystokinin-B (CCK-B)/gastrin receptor targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other CCK-B receptor expressing malignancies. *Biopolymers* 2002; 66: 399–418.
6. Behr TM, Jenner N, Radetzky S i wsp. Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur J Nucl Med* 1998; 25 (4): 424–430.
7. Bernard BF, Behe MP, Breeman AP i wsp. Preclinical evaluation of minigastrin analogues for CCK-B receptor targeting. *Cancer Biother Radiopharm* 2003; 18: 281.
8. von Guggenberg E, Behe M, Skvortsova I i wsp. ${}^{99m}\text{Tc}$ -labelled minigastrin: comparison of two HYNIC-conjugates In vitro and In vivo. *Nucl Med Rev* 2005; 8: 20–21.
9. von Guggenberg E, Mikołajczak R, Janota B i wsp. Radiopharmaceutical development of a freeze-dried kit formulation of (${}^{99m}\text{Tc}$ -EDDA-HYNIC-D-Phe¹, Tyr³) — octreotide, a somatostatin analog for tumor diagnosis. *J Pharm Sci* 2004; 93: 2497–2506.