

## MARCAÇÃO DO PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO (VIP) COM IODO-131 POR MÉTODO DIRETO

Colturato, M.T.; da Silva, C.P.G. e Araújo, E.B.

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP  
Centro de Radiofarmácia - Av. Lineu Prestes, 2242.  
05508-900, Butantã, São Paulo, SP, Brasil.

## RESUMO

O Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) é um polipeptídeo contendo 28 resíduos de aminoácidos e possui um grande número de receptores em células tumorais incluindo, adenocarcinomas, carcinomas pancreáticos e de cólon. A molécula de VIP contém dois resíduos tirosina, nas posições 10 e 22 que são, teoricamente, igualmente susceptíveis a radioiodação. O VIP foi marcado com iodo-131 por método direto utilizando como agente oxidante Iodogen: 15,03 mmol VIP + 0,10 nmol KI + [<sup>131</sup>I] NaI + 13,9 mmol Iodogen; o volume final de reação foi levado a 100 µL com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,5 e a reação foi mantida sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. A pureza radioquímica da marcação foi avaliada por eletroforese (papel Whatman 1MM; tampão barbital 0,05M, pH 8,6; 150V; 40 minutos) que indicou baixa porcentagem de iodo-131 livre na marcação. O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna de fase reversa C<sub>18</sub>, 10 µm, 4x250 mm foi efetivo para separação das diferentes espécies radioativas formadas, somente quando se utilizou o sistema isocrático com a mistura acetoneitrila:ácido trifluoroacético 0,1% (27:73) com fluxo de 0,5 mL/min.

Keywords: vasoactive intestinal peptide, [<sup>131</sup>I]-VIP, radiolabelling, receptor scintigraphy

## I. INTRODUÇÃO

O principal atrativo da Medicina Nuclear tem sido a aplicação potencial de traçadores radioativos para monitorar a função e parâmetros metabólicos dos diversos órgãos, sob condições fisiológicas e patológicas. O advento da biologia molecular levou ao desenvolvimento de uma nova abordagem para imagem, denominada medicina nuclear molecular. O primeiro impulso nesta direção ocorreu com o uso de anticorpos monoclonais marcados (AcMo), que foram considerados agentes potencialmente ideais por ligarem-se a antígenos específicos. Entretanto, apesar das vantagens potenciais dos AcMo radiomarcados, inúmeras desvantagens limitaram seu uso, tais como alto peso molecular com baixo acúmulo nos tecidos, clearance lento, com visualização desfavorável do sítio alvo, produção de anticorpos murínicos que ocasionavam reações imunológicas nos pacientes. Além disso, o desenvolvimento subsequente de fragmentos de AcMo (Fab' e F(ab)'<sub>2</sub>) e de anticorpos quiméricos ou humanizados não preencheram completamente as expectativas.

A racionalização para o uso de peptídeos radiomarcados derivou da observação de que uma variedade de receptores expressos na superfície das células liga-se a pequenos peptídeos com alta afinidade.

Desta forma, o estudo dos sistemas peptídeo/receptor tem oferecido uma nova maneira pela qual estruturas celulares e teciduais podem ser caracterizadas utilizando-se a medicina nuclear. Em muitos cânceres observa-se um

aumento da expressão de receptores, tornando-os alvos atrativos para imagem de tumores. Uma das primeiras aplicações clínicas de importância relatou a localização de tumores endócrino-relacionados utilizando um análogo da somatostatina marcado com iodo radioativo. Atualmente, um análogo da somatostatina marcado com indio-111 (octreotide) apresenta utilização rotineira em medicina nuclear, permitindo a imagem de tecidos com suficiente densidade de receptores para somatostatina, possibilitando, desta forma, o diagnóstico e estadiamento de tumores neuroendócrinos [1].

Outro peptídeo utilizado para localização de tumores do tipo neuroendócrino é o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) marcado com iodo-123 [2]. Muitos outros peptídeos e sistemas receptores têm sido investigados, com potencial para o diagnóstico e terapia de tumores utilizando radiofármacos, tais como peptídeos gastrina relacionados (gastrina, bombesina, colecistoquininas), para carcinoma de pequena célula pulmonar, hormônio alfa-melanócito estimulante para melanoma, endotelina para tumores epiteliais, gonadotrofinas para cânceres de mama e próstata. Outras classes de peptídeos, como os que se ligam a receptores da glicoproteína IIb/IIIa para detecção de trombos e de peptídeos quimiotáticos e antimicrobianos para delinear sítios focais de infecção também estão sendo estudadas [3].

O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) é um neuropeptídeo com grande abrangência de atividade biológica. Foi primeiramente isolado de células de intestino

e seqüenciado em 1970. VIP é uma substância vasodilatadora responsável pela síndrome diarréica aquosa em pacientes com tumores que secretam o peptídeo. Promove também o crescimento e proliferação de células normais e malignas [4,5] (Fig. 1).

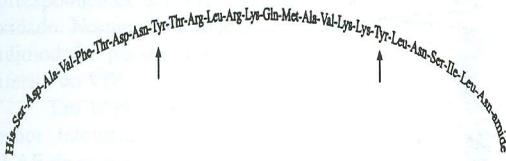


Figura 1. Seqüência de Aminoácidos do Peptídeo VIP

Os efeitos do VIP são intermediados por receptores superficiais de membrana das células (VIPR). Um grande número destes receptores é expresso em uma variedade de células tumorais, incluindo adenocarcinomas, câncer mamário, carcinomas pancreáticos, tumores endócrinos, câncer de pequena célula pulmonar e carcinoma de cólon [6,7,8,9,10,11].

O VIP marcado com radioiodo tem sido utilizado com sucesso na obtenção de imagens e localização de adenocarcinomas intestinais e tumores endócrinos [2,5,8,9,12].

A molécula de VIP contém dois resíduos de tirosina, nas posições 10 e 22, que são, teoricamente, igualmente susceptíveis à radioiodação por método direto. Neste método, o iodo radioativo é incorporado ao resíduo de tirosina por meio de substituição eletrofílica aromática, tendo como espécie ativa o iodo oxidado, obtido com a utilização de agentes oxidantes clorados como Iodogen ou Cloramina T.

O objetivo deste trabalho é estudar a marcação do peptídeo VIP com radioiodo, utilizando-se como agente oxidante o Iodogen e avaliar metodologias para determinação da pureza radioquímica e purificação da marcação, visando a obtenção do peptídeo marcado com alta atividade específica.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

O agente oxidante 1,3,4,6-tetracloro-3 $\alpha$ -6 $\alpha$ -difetilglicouiril (Iodogen) e o peptídeo VIP humano foram adquiridos de Sigma-Aldrich. Os solventes empregados na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são de grau de pureza compatível. O [<sup>131</sup>I]NaI proveniente da Nordion (Canadá) foi processado no IPEN-CNEN/SP em solução de hidróxido de sódio 0,001 M.

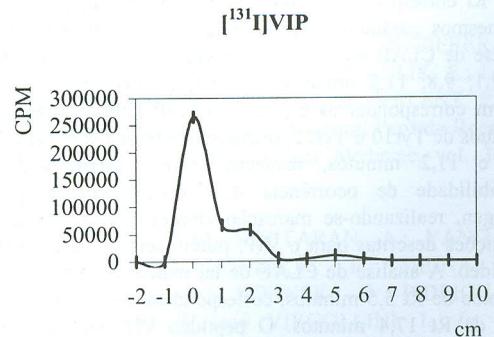
**Marcação do VIP.** O VIP foi marcado com iodo-131 por método direto utilizando-se como agente oxidante Iodogen [2]. A reação foi conduzida em um tubo cônico de marcação (tipo eppendorf). Foram adicionados 15,03 mmol

VIP/20  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,5, seguido de 0,10 nmol KI/5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L da solução de [<sup>131</sup>I]NaI (3,7-7,4 MBq) e 13,9 mmol Iodogen/5 $\mu$ L, na forma de suspensão recém preparada (6mg de Iodogen adicionados a 100  $\mu$ L de acetona e 4,9 mL de água). O volume final da marcação foi elevado a 100  $\mu$ L com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,5. A reação foi conduzida sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente.

**Controle de pureza radioquímica e purificação da marcação.** A pureza radioquímica da marcação foi avaliada por eletroforese, utilizando-se tampão barbital 0,05 M, pH 8,6, 150V, por 40 minutos e papel Whatman 1MM. A eletroforese possibilita a determinação da porcentagem de iodo livre na marcação. Uma análise mais refinada foi obtida utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>), 10  $\mu$ m, 4x250 mm. Diversos solventes e condições de corrida foram testados. Inicialmente, utilizou-se como solvente a mistura de 27% acetonitrila (A):73% solução aquosa de ácido acético 1% (B) (v/v) para os primeiros 10 minutos de corrida e de 10 a 30 minutos a mistura de 73% A:27% B, com fluxo de 1 mL/minuto. Posteriormente, manteve-se uma única mistura durante todo o tempo de corrida, composta de acetonitrila:ácido acético 1% (27:73) ou acetonitrila:ácido trifluoracético 0,1%, tendo sido utilizados fluxos de 1 mL/minuto no primeiro caso e 0,5 e 1,0 mL/minuto no segundo caso.

## III. RESULTADOS

Foram realizadas diversas marcações do peptídeo VIP nas condições descritas. A análise de eletroforese das marcações indicou uma porcentagem de iodo livre média de 4,69  $\pm$  1,96 % (N=6). Após 24 horas de armazenamento em condições de refrigeração, tal porcentagem aumentou para 18,27  $\pm$  7,45 %. A Figura 2 ilustra a análise eletroforética obtida para a espécie [<sup>131</sup>I]NaI (iodeto) bem como para uma das marcações do VIP. A análise de CLAE confirma a baixa porcentagem de iodo livre nas marcações para todos os sistemas avaliados.



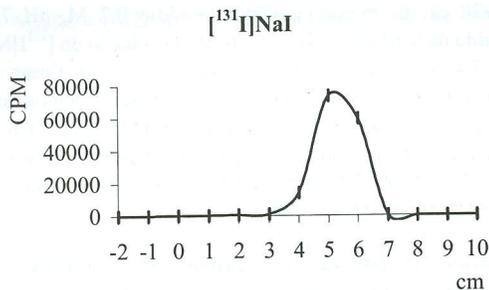


Figura 2. Perfil Eletroforético do  $[^{131}\text{I}]\text{VIP}$  e  $[^{131}\text{I}]\text{NaI}$

Utilizando-se uma coluna de fase reversa ( $\text{C}_{18}$ ) e tendo como solvente a mistura acetonitril:ácido trifluoracético 0,1%, com fluxo de 0,5 mL/min., o radioiodo apresenta tempo de retenção ( $R_t$ ) de 5,5 minutos (Fig. 3).

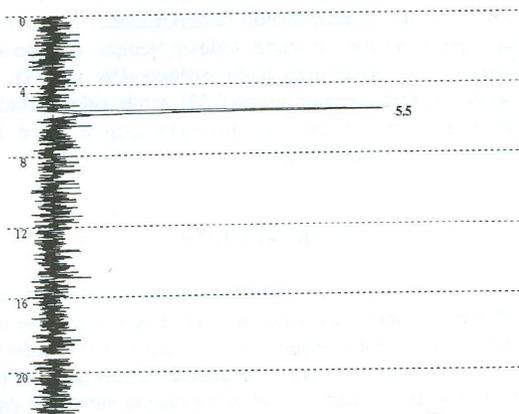


Figura 3. Espectro da CLAE do  $[^{131}\text{I}]\text{NaI}$

Na análise de CLAE da marcação do VIP um pico com  $R_t$  correspondente pode ser observado, utilizando-se os mesmos parâmetros cromatográficos (Fig. 4). A mesma análise de CLAE mostra outros picos radioativos, com  $R_t$  de 7,1; 9,8; 11,2 minutos, sendo que dois destes picos devem corresponder às espécies de VIP radioiodadas nos resíduos de Tyr10 e Tyr22, provavelmente os picos com  $R_t$  7,1 e 11,2 minutos, respectivamente. Verificou-se a possibilidade de ocorrência de iodinação do próprio Iodogen, realizando-se marcação empregando as mesmas condições descritas para o VIP, porém sem a presença do peptídeo. A análise de CLAE de tal marcação demonstrou um pico de  $R_t$  5,5 minutos, correspondente ao iodeto e um pico de  $R_t$  17,4 minutos. O peptídeo VIP analisado no mesmo sistema de CLAE com detector UV (230 nm), apresentou um  $R_t$  de 6,4 minutos (Fig. 5).

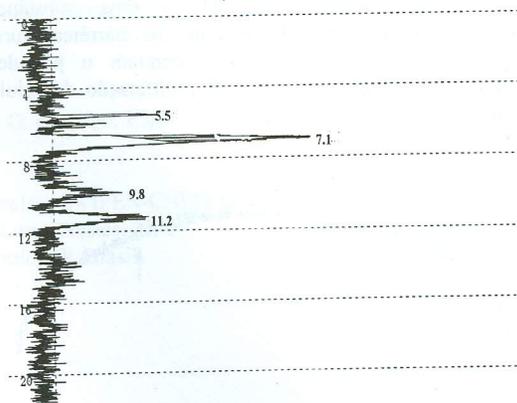


Figura 4. Espectro da CLAE do  $[^{131}\text{I}]\text{VIP}$

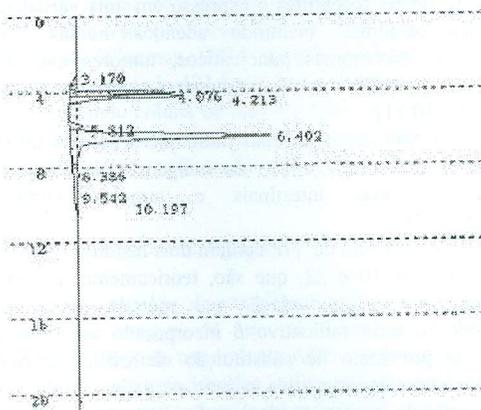


Figura 5. Espectro da CLAE do VIP em UV (230 nm)

Ao utilizar-se qualquer outro sistema de CLAE, descrito, a separação das espécies ficou prejudicada.

#### IV. DISCUSSÃO

De acordo com Virgolini e col. [2] a radioiodação do peptídeo VIP produz as espécies iodadas nos resíduos de Tyr10 e Tyr22, além da possibilidade de formação da espécie diiodada, ou seja, introdução de mais de um átomo de iodo em um mesmo resíduo de tirosina. Esta última possibilidade deve ser evitada já que tal molécula apresenta deficiência de interação com o receptor específico. Ainda de acordo com os autores, o excesso de agente oxidante no meio de reação promove a formação da espécie diiodada e a metodologia proposta por Virgolini e col. [2] utiliza massa reduzida do agente redutor em suspensão, evitando a formação desta espécie.

Martin e col. [13], ao descrever a marcação do peptídeo VIP empregando Cloramina T também utiliza massa bastante reduzida do agente oxidante. No mesmo trabalho, os autores descrevem a possibilidade de formação de uma espécie oxidada de VIP, denominada VIPox, originada da oxidação do resíduo metionina da molécula de proteína. Muito provavelmente, os dois picos radioativos correspondentes ao VIP iodado representam o peptídeo oxidado. No mesmo estudo o autor determina que, o VIPox radioiodado possui afinidade pelo receptor ligeiramente inferior ao VIP.

Em nossos estudos, um terceiro pico radioativo, de menor intensidade, pode ser observado no espectro de CLAE da mistura de marcação do VIP, com Rt 9,8 minutos. Martin e col. [13] relatam a observação de uma espécie radioativa com Rt intermediário entre os dois picos representativos do VIP que, segundo os autores, trata-se de uma espécie instável que se converte, com o tempo, na primeira espécie de VIP eluída. Em nossos estudos, entretanto, não observamos esta conversão.

Para verificar a possibilidade de tal espécie intermediária estar relacionada à iodinação do próprio Iodogen, realizou-se marcação excluindo o peptídeo do meio reacional. Um pico radioativo em CLAE correspondente, provavelmente, à espécie iodada do Iodogen foi observado, porém com Rt de 17,4 minutos. Este mesmo pico pode ser observado, em porcentagem mínima, no espectro representativo da marcação do VIP (Figura 4). Um estudo mais aprofundado da variação das condições de marcação do VIP, promovendo-se a variação da massa de Iodogen e do tempo de reação deverá ser conduzido de modo a eliminar a formação desta espécie radioativa indesejada.

Das condições de CLAE analisadas, a utilização de coluna C<sub>18</sub>, empregando-se sistema isocrático de mistura 27% acetonitrila e 73% solução aquosa de ácido trifluoroacético 0,1% com fluxo de 0,5 mL/minuto foi a que apresentou melhor resolução para separação das espécies radioativas produzidas no meio reacional. Além disso, tal condição possibilita a perfeita separação da espécie não radioativa de VIP, de Rt de 6,4 minutos (Fig. 5), acenando com a possibilidade de obtenção de um radiofármaco com alta atividade específica. Tal condição é essencial para radiofármacos que interagem com receptores específicos. Estudos adicionais serão realizados nas frações de eluição de CLAE de modo a caracterizar cada um dos picos radioativos da análise e confirmar a presença das espécies VIP-Tyr10 e VIP-Tyr22.

## REFERENCES

[1] BEHR, T.M.; GOTTHARDT, M.; BARTH, A. and BÉHÉ, M., **Imaging Tumors with Peptide-based Radioligands**, The Quarterly Journal of Nuclear Medicine, vol. 45 (2), p. 189-200, 2001.

[2] VIRGOLINI, I.; YANG, Q.; LI, S.; ANGELBERGER, P.; NEUHOLD, N.; NIEDERLE, B.; SCHEITHAUER, W. and VALENT, P., **Cross-Competition between**

**Vasoactive Intestinal Peptide and Somastotatin for binding to Tumor Cell Membrane Receptors**, Cancer Research, vol. 54, p. 690-700, 1994.

[3] BLOCK, D. FEITSMA, R.I.J.; VERMEIJ, P. and PAWELS, E.J.K., **Peptide radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine**, European Journal of Nuclear Medicine, vol. 26, p. 1511-1519, 1999.

[4] MUTT, V., **Vasoactive Intestinal Polypeptide and related Peptides. Isolation and Chemistry**, Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 527, p. 1-19, 1988.

[5] VIRGOLINI, I.; RADERER, M.; KURTARAN, A.; ANGELBERGER, P.; YANG, Q.; RADOSAVLJEVIC, M.; LEIMER, M.; KASERER, K.; LI, S.; KORNEK, G.; HÜBUSCH, P.; NIEDERLE, B.; PIDDLICK, J.; SCHEITHAUER, W. and VALENT, P., **<sup>123</sup>I-Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Receptor scanning: update of Imaging results in Patients with Adenocarcinomas and Endocrine Tumors of the Gastrointestinal Tract**, Nuclear Medicine and Biology, vol. 23, p. 685-692, 1996.

[6] SVOBOVA, M.; DENEFF, P. TASTENAY, M. and CHRISTOPHE, J., **Molecular characteristics and evidence for Internalization of VIP Receptors in the Tumoral Rat Pancreatic Acinar Cell Line AR 4-2J**, European Journal of Biochemistry, vol. 176, p. 707-713, 1988.

[7] HASSAN, M. REFAI, E.; ANDERSON, M.; SCHENELL, P. and JACOBSSON, H., **In Vivo dynamical distribution of <sup>131</sup>I-VIP in the Rat studies by Gamma-camera**, Nuclear Medicine and Biology, vol. 21(6), p. 865-872, 1994.

[8] VIRGOLINI, I.; RADERER, M.; KURTARAN, A.; ANGELBERGER, P.; BANYAI, S.; YANG, Q.; LI, S.; BANYAI, M.; PIDDLICK, J.; NIEDERLE, B.; SCHEITHAUER, W. and VALENT, P., **Vasoactive Intestinal Peptide-Receptor Imaging for the localization of Intestinal Adenocarcinomas and Endocrine Tumors**, The New England Journal of Medicine, vol. 331(17), p. 1116-1121, 1994.

[9] VIRGOLINI, I.; KURTARAN, A.; RADERER, M.; LEIMER, M.; ANGELBERGER, P.; HAULIK, E.; LI, S.; SCHEITHAUER, W.; NIEDERLE, B.; VALENT, P. and EICHLER, H.-G., **Vasoactive Intestinal Peptide Receptor Scintigraphy**, Journal of Nuclear Medicine, vol. 36, p. 1732-1739, 1995.

[10] RADERER, M. KURTARAN, A.; YANG, Q.; MEGHDADI, S.; VORBECK, F.; HEJNA, M.; ANGELBERGER, P.; KORNEK, G. PIDDLICH, J.; SCHEITHAUER, W. and VIRGOLINI, I., **In Vitro identification of Vasoactive Intestinal Peptide Receptors in Human Tumors: implications for Tumor Imaging**, Journal of Nuclear Medicine, vol. 36, p. 1846-1853, 1995.

[11] RADERER, M.; KURTARAN, A.; YANG, Q.; MEGHDADI, S.; VORBECK, F.; HEJNA, M.; ANGELBERGER, P.; KORNEK, G.; PIDLICK, J.; SCHEITHAUER, W.; and VIRGOLINI, I., **Iodine-123-Vasoactive Intestinal Peptide Receptor Scanning in Patients with Pancreatic Cancer**, Journal of Nuclear Medicine, vol. 39, p. 1570-1575, 1998.

[12] BATTARI, A., **Solubilization of the Vasoactive Intestinal Peptide Receptor from Human Colonic Adenocarcinoma Cells**, Journal of Biochemical Research, vol. 263, p. 17895-17899, 1999.

[13] MARTIN, J.-L.; ROSE, K. HUGLES, G.J. and MAGISTRETTI, P.J., **[mono<sup>125</sup>Iodo]-Tyr<sup>10</sup>,MetO<sup>17</sup>]-Vasoactive Intestinal Polypeptide. Preparation, Characterization and use for Radioimmunoassay and Receptor binding**, Journal of Biological Chemistry., vol. 261 (12), p. 5320-5327, 1986.

#### ABSTRACT

The Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) is a 28-amino acid polypeptide with a great numbers of receptors in tumoral cells, including adenocarcinomas and pancreatic and colon carcinomas. The VIP molecule contains two tyrosine residues, in positions 10 and 22, that are theoretically equally susceptible to iodination, The VIP was labeled with 131-iodine by direct method using Iodogen as oxidant agent: 15.03 mmol VIP + 0.10 nmol KI + [<sup>131</sup>I]NaI + 13.9 mmol Iodogen; the final volume was adjust to 100  $\mu$ L using 0.2M phosphate buffer, pH 7.5 and the reaction proceed with stirring for 30 minutes at room temperature. The radiochemical purity was determined by electrophoresis (Whatman 1MM paper; 0.05M barbital buffer; pH 8.6; 150V; 40 minutes) that indicates low percent of free 131-iodine. The high performance liquid chromatography (HPLC) system using RPC<sub>18</sub>, 10  $\mu$ m, 4x250mm column, was able to separate the different radiochemical species, only when an isocratic mixture of acetonitrile:0.1% trifluoroacetic acid (27:73) was used, with 0.5 mL/min. flux.