

OBTENÇÃO DE UM GRUPAMENTO PROSTÉTICO PARA MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS COM RADIOIODO

Josefina da S. Santos*, Maria Tereza Colturato*, Elaine B. de Araújo*

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IPEN/CNEN-SP
Caixa postal 11049
05422-970, São Paulo/SP, Brasil.

RESUMO

O uso de anticorpos e peptídeos radiomarcados em radioimunodeteção e radioimunoterapia, tem sido extensivamente estudado nas últimas décadas. O principal problema associado ao uso de proteínas radioiodadas é a deiodação observada “in vivo”. Diversas metodologias de marcação indireta de proteínas, têm sido estudadas a fim de minimizar esta dehalogenação. O objetivo deste trabalho foi a obtenção do grupamento prostético iodado N-succinimidil 4-radioiodo benzoato (SIB), a partir de iodação do ácido p-bromo-benzóico e posterior reação com TSTU. Os resultados mostram que a obtenção deste grupamento prostético apresenta um bom rendimento.

I. INTRODUÇÃO

O uso de anticorpos e peptídeos radiomarcados em radioimunodeteção e radioimunoterapia, tem sido extensivamente estudado nas últimas décadas.

Diversos nuclídeos metálicos como Índio-111, Tecnécio-99m, Rênio-166, Cobre-67, Tritium-90 e os radioisótopos do Iodo têm sido utilizados na marcação destas biomoléculas. Destes, os isótopos do iodo apresentam uma série de vantagens para estudos pré-clínicos e clínicos na marcação de proteínas para diagnóstico e terapia de tumores, sendo o ^{131}I utilizado para tratamento de massas tumorais sólidas, o ^{125}I em diagnósticos “in vitro” e o ^{123}I utilizado em diagnósticos “in vivo” [1,2].

O principal problema associado ao uso de proteínas radioiodadas é a deiodação observada “in vivo”. Esta dehalogenação está relacionada com a degradação enzimática do resíduo iodotiroisina produzido na iodação eletrofílica de proteínas, como resultado da semelhança estrutural com hormônios da tireóide [3].

Diversas metodologias de marcação de proteínas, baseadas no uso de intermediários bifuncionais, que após serem radiomarcados são acoplados à proteína, têm sido descritas na literatura [4,5,6]. Estes métodos indiretos de marcação visam minimizar os danos causados à proteína durante o processo de marcação e a dehalogenação da molécula biologicamente ativa “in vivo”. Outra vantagem desta radioiodação por via indireta é a possibilidade de

iodação de peptídeos que não possuam resíduos de tiroisina ou histidina livres.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção do grupamento prostético iodado N-succinimidil 4-radioiodo benzoato (SIB), para marcação de proteínas por via indireta. Para tal utilizamos uma rota alternativa descrita por Stocklin e colaboradores [7]. Este grupamento foi originalmente obtido por Zalutsky e col. [4] e Wilbur e col. [5], a partir da radioiodação do derivado estânico N-succinimidil-(tri-n-butilestanoil)benzoato (ATE).

Este estudo faz parte de um projeto coordenado pela IAEA para o desenvolvimento de metodologia de marcação e controle de qualidade de proteínas com ^{123}I e ^{18}F .

II. MATERIAL E MÉTODOS

Material

O Na^{131}I utilizado foi produzido no Centro de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP. O ácido p-bromobenzóico foi obtido junto a Sigma-Aldrich e o 0-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronium tetrafluoroborate (TSTU) junto a Fluka Chemika. Os solventes usados foram de alto grau de pureza (Sigma-Aldrich). Colunas do tipo Sep-Pack de sílica e C-18 foram obtidas da Waters e as colunas de sílica e as de C-18 para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram obtidas na Whatman.

Métodos

Obtenção do ácido p-iodobenzóico – Utilizou-se

metodologia descrita por Moerlin e col. [8] para radioiodação do ácido p-bromo-benzóico em meio de dimetilsulfoxido e em presença de catalisador de Cu(I). Avaliou-se a influencia do tempo de reação (20, 40 e 60 minutos), temperatura (155, 165 e 175°C) e concentração de CuCl (0,005, 0,01, 0,1 e 0,2M) no rendimento de marcação. O ácido p-[¹³¹I]iodobenzóico obtido foi purificado para separação do radioiodo livre. A purificação foi realizada conforme descrito por Stocklin e col. [7] utilizando-se coluna Sep-Pack C-18 pré saturada com água e posteriormente eluída com água (5mL) e acetonitrila (10mL). Alternativamente introduzimos a purificação por processo de precipitação do composto com água, seguida de centrifugação, lavagem e separação das fases com subsequente ressuspensão do produto purificado em acetonitrila (300-400µL). O controle radioquímico desta fase foi realizado em CLAE usando-se coluna C-18 (5µm, 4,6×250mm) e um gradiente de metanol/água e em cromatografia de papel W3MM utilizando-se uma solução de clorofórmio:ácido acético (9:1) como fase móvel.

Obtenção do SIB – Após alcalinização do meio de reação adiciona-se ao ácido p- [¹³¹I]iodobenzóico purificado 100µL de TSTU (0,2M), e deixa-se reagir por 15 min. à 60°C. A purificação do SIB é realizada em coluna Sepack de sílica eluída com hexano (40mL) e hexano:acetato de etila 30% (30mL). Nesta fase a pureza radioquímica do produto foi determinada por CLAE com uma coluna de sílica (Partisil 10µm, 4,6×250mm) e uma mistura de hexano:acetato de etila:ácido acético (70:30:0,2) como solvente e em cromatografia de camada delgada (TLC-SG) com uma solução de hexano:acetato de etila(70:30) como fase móvel.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 podemos observar o efeito de diferentes intervalos de tempo sobre a substituição do Br do ácido bromobenzóico pelo radioiodo. Estes resultados foram obtidos utilizando-se cromatografia em papel como descrito anteriormente. Os Rf obtidos neste sistema foram: do iodo livre = 0,0 e do ácido p-radioiodobenzóico = 1,0.

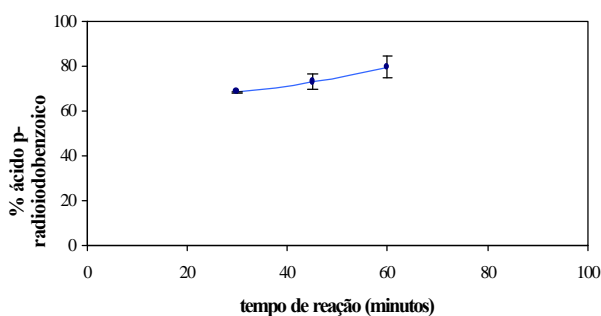


Figura 1 - Efeito do tempo na produção do ácido -[¹³¹I]iodobenzóico

A análise do estudo da concentração de CuCl a ser usada foi realizada em CLAE onde o ácido

[¹³¹I]iodobenzóico apresentou um Rt=3,2 min. e o radioiodo livre um Rt de 3,8 min. Utilizando-se concentrações ≥ 0,1M de CuCl, observou-se também um pico de Rt= 2,7 min., que está relacionado com excesso de cobre (figura 2).

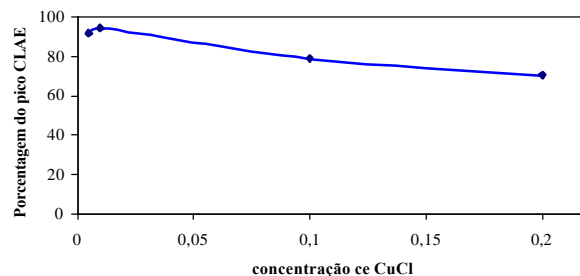


Figura 2 – Efeito das concentrações de CuCl no rendimento do ácido p-iodobenzóico

A temperatura escolhida para reação foi de 165°C uma vez que temperaturas maiores não contribuem para melhora do rendimento de marcação, conforme observado na figura 3. Apesar da temperatura de 155°C promover resultados semelhantes, sua utilização foi excluída uma vez que promove formação de outra espécie radioquímica além do ácido-p-radioiodobenzóico e o iodeto livre observada no controle radioquímico da marcação.

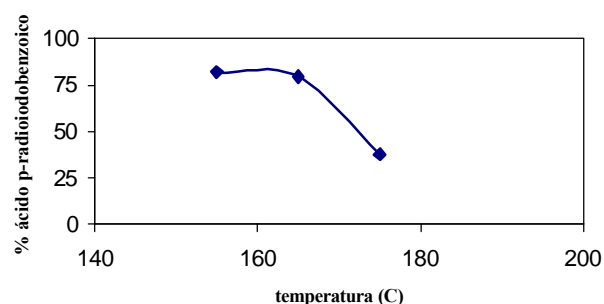


Figura 3 - Efeito do temperatura na produção do ácido -[¹³¹I]iodobenzóico

Na reação do ácido p -[¹³¹I]iodobenzóico com TSTU, observou-se que, após purificação em coluna de Sepack, aproximadamente 6,5% da atividade do ácido p-[¹³¹I]iodobenzóico inicial encontra-se na fração de hexano, 51,4% na fração de hexano:acetato de etila 30% e o restante permaneceu retido na coluna. Ou seja, o SIB foi obtido na fração de purificação de hexano-acetato de etila com rendimento de 51,4% da atividade inicial do ácido p-[¹³¹I]iodobenzóico.

Esta fração deverá ser evaporada à secura em um frasco cônico para reação com IgG humano. Os estudos de acoplamento deste composto à proteína encontram-se em fase preliminar.

AGRADECIMENTOS: A IAEA pelo financiamento parcial deste projeto e a FAPESP pela concessão de bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

[1] Larson SM **Improved tumor targeting with radiolabeled, recombinant single-chain, antigen binding protein.** J Natl. Cancer Inst. 1990, 82: 1173-1174.

[2] Lindegren S, Skarnemark G, Jacobsson L, Karlsson B **Chloramine-T in High-Specific-Activity Radioiodination of Antibodies Using N-succinimidyl-3-(trimethylstannyl) benzoate as na Intermediate** Nucl. Med. Biol. 1998, 25: 659-665.

[3] Eary J.F., Krohn K.A, Kishore R. and Nelp W. **Radiochemistry of halogenated antibodies. In Antibodies in Radiodiagnosis and Therapy**, ed. Zalutsky M.R., p.83, CRC Press, Boca Raton, FL.

[4] Zalutsky, M.R. and Narula, A.S. **A method for the radiohalogenation of proteins resulting in decreased thyroid uptake of radioiodine**, Appl Radiat Isot (Int J Radit Appl Instrum Part A) vol. 38 (12), p. 1051-1055, 1987.

[5] Wilbur, D.S.; Hadley, S.W.; Hylarides, M.D.; Abrams, P.G.; Beaumier, P.A.; Morgan, A.C.; Reno, J.M. and Fritzberg, A.R, **Development of a stable radioiodinating reagent to label monoclonal antibodies for radiotherapy of cancer**, J.Nucl.Med., vol. 30, p. 216-226, 1989.

[6] Bolton, A.E. and Hunter, W.M. **The labeling of proteins to a I-125 containing acylating agent**, Biochem. J. vol 133, p. 529-539, 1973.

[7] Stocklin G, Wester, HJ, **Strategies for radioligand development I: peptides for tumor targeting**. Kluwer academic publishers, in press.

[8] Moerlin SM **Regioespecific aromatic radioiodination via n.c.a. copper (I) assisted iododebromination**. Radiochimica Acta 1990, 50: 55-61.

ABSTRACT

Antibodies and peptides labeled with radionuclides has been extensively used in radioimmunotherapy and radioimmunodetection. The principal problem with the use of radioiodinated proteins is the in vivo dehalogenation. The use of prosthetic groups for indirect labeling of proteins with radioiodine has showed to be useful on labeling proteins with greater in vivo stability. A procedure is described for the preparation of an radioidinated prosthetic group (N-succinimidy 4-radioidine-benzoate-SIB), using procedure described by Stocklin et al, with the iodination of p-bromo-benzoic acid and subsequent reaction with TSTU.

Preliminary labeling results showed that the prosthetic group can be obtained in a good yield. The coupling of the SIB to the protein will be studied using human IgG as protein model.