

OBTENCION DEL PEPTIDO ANTIMICROBIANO UBI 29-41 MARCADO CON ^{99m}Tc EMPLEANDO UN METODO INDIRECTO

N. Nevares*, J.L. Crudo, M.Zapata, Castiglia S.G.de

Comisión Nacional de Energía Atómica, CAE- Grupo Radiofarmacia. U.A.
Radioquímica
*nnevares@cae.cnea.gov.ar

Introducción

Los procesos infecciosos continúan siendo el mayor problema de salud y de causas de muerte a nivel mundial. El diagnóstico por imágenes en medicina nuclear, ofrece por su sensibilidad una opción atractiva para la detección de infecciones. Para ello es necesario contar con un radiofármaco que pueda concentrarse selectivamente en el sitio de infección. Hasta el momento se han desarrollado numerosos Radiofármacos, pero se continúa la búsqueda para encontrar un radiofármaco que distinga entre inflamación e infección.

Los péptidos antimicrobianos son importantes para el desarrollo de nuevos radiofármacos para localizar sitios de infección en medicina nuclear. Poseen una actividad antimicrobiana que ha sido comprobada contra una gran variedad de microorganismos. Se podrán obtener imágenes óptimas de infecciones, debido a que interactúan preferentemente con bacterias y hongos, y al ser pequeños podrán dejar la circulación rápidamente y entrar en los sitios de infección, limitando la irradiación innecesaria en el paciente. Siendo el ^{99m}Tc el radioisótopo de elección en medicina nuclear, el péptido en estudio se marcará con este radionucleído y se evaluará su potencialidad como agente de diagnóstico en infecciones.

Objetivo del proyecto

El objetivo del proyecto es obtener el UBI29-41 marcado con ^{99m}Tc , estable in vivo, que sea capaz de localizar *Staphilococcus aureus* en sitios infecciosos en ratones y tratar de discriminar infecciones de inflamaciones.

Metodología de trabajo

Se utilizará el péptido UBI29-41 (provisto por el Dr. Pauwels, Leiden University Medical Center), se marcará con ^{99m}Tc por un método indirecto utilizando un quelante derivado de la hidrazinonicotinamida NHSYNYC y se evaluará el producto marcado mediante ensayos in vitro e in vivo.

Procedimientos

- ✓ Conjugación del péptido UBI 29-41 con NHS-Hynic y purificación

Para conjugar el UBI 29-41 se utilizó la relación molar quelante/ péptido: 3/1. El péptido UBI 29-41(10mg/ml) se disolvió en PBS 0,2 M y el NHS- Hynic (20mg/ml) en DMF. Las soluciones se mezclaron y se dejaron incubar durante una hora a temperatura ambiente. El péptido conjugado se purificó a través de una columna Sephadex G-15 cuyo rango de corte se extiende de 0 a 1500 y se eluyó con una solución de NH_4AcO_4 0,25 mM (pH 5,2) previamente desgasada para evitar la formación de burbujas en su

interior. Se determinó el volumen muerto el cual resultó 3,7 ml. El eluido de la columna se recogió en fracciones de 1 ml en 10 tubos.

✓ Marcación del UBI 29-41-Hynic con ^{99m}Tc

Para la marcación del péptido conjugado purificado se utilizó la siguiente técnica; a 25 μl de UBI 29-41-Hynic, se agregaron 10 μl TcO_4^- eluido recientemente con una actividad promedio de 290 μCi , 100 μl de solución de tricina en agua (10mg/ml) y 10 μl de una solución fresca de SnCl_2 en HCl 10mM (1mg/ml) previamente nitrogenada. El tiempo de incubación a temperatura ambiente fue de 45 minutos.

✓ Controles de pureza radioquímica

La pureza radioquímica se ensayó utilizando HPLC Fase Reversa (Columna C-18 Delta Pack, Waters). El gradiente empleado fue el siguiente: Solvente A: $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ 0,1%, Solvente B: ACN puro, 0-3': 100% de A, 3-13':100-33% A, 13-18': 33% A, 18-20': 33-100% A, 20-23': 100% A.

Ensayos in vitro

✓ Estabilidad en suero humano y unión a proteínas del suero

Para el ensayo de estabilidad en suero se utilizó suero congelado. Se realizó la incubación de 400 μl de suero junto con 50 μl de ^{99m}Tc UBI-Hynic en un baño termostático a 37°C. Se evaluó la estabilidad de la marcación a las 2 y a las 24 hs, empleando HPLC como control, con columna de permeación de geles (columna Protein Pack 60, Waters) utilizando un método isocrático, Solvente

Para el ensayo de unión a proteínas del suero, se colocaron 150 μl de la misma solución incubada, en un filtro para centrifuga (Ultrfree-MC, Milipore). El mismo se centrifugó durante 2 horas a 4500g. El filtro permite el pasaje de aquellas moléculas con un PM menor a , en cambio aquellas moléculas de mayor PM quedan retenidas en el filtro de esta manera se puede estimar el porcentaje de actividad que se une a los compuestos de alto peso molecular.

✓ Desafío con cisteína

El ensayo de estabilidad del péptido marcado frente a cantidades crecientes de cisteína. Se preparó una solución fresca de cisteína (10mg/ml ,0.083M) en buffer fosfato 0.4M (pH 7.0) y se realizaron diluciones sucesivas. A cada solución de cisteína se le agregó la misma cantidad de péptido y obteniéndose las siguientes relaciones molares cisteína/péptido; 5/1, 50/1, 500/1, 5000/1. Las soluciones se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación se calculó la cantidad de actividad transquelada a la cisteína, empleando ITLC como control.

✓ Ensayo in vitro

Para comprobar la unión del péptido marcado a los microorganismos, se ensayó la unión in vitro empleando Staphilococcus aureus ATCC 25923 como bacteria infecciosa. El ensayo se realizó colocando en un eppendorf aproximadamente 1 nmol del ^{99m}Tc -UBI- Hynic en 100 μl de PBS (pH 7,2, 0.001M), 790 μl de una solución de ácido acético 0,01M en PBS 50%(v/v), 10 μl de Tween-80, 0,01 % (v/v) y 100 μl de PBS conteniendo 2.5×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 y 3×10^7 ufc de S.a. viables. Se trabajó con las soluciones en frío, la mezcla final se incubó durante 1h a 4°C y luego los eppendorf se centrifugaron a 2000g durante 5 minutos. El pellet se resuspendió con 1ml de PBS y se centrifugó nuevamente. Finalmente se calculó el porcentaje de actividad que quedó retenida en el pellet.

Ensayos in vivo

✓ Biodistribuciones

Se realizaron biodistribuciones de ratones normales, ratones infectados con *Staphylococcus aureus* y también de ratones a los cuales se les produjo una inflamación estéril.

Los ensayos se realizaron de la siguiente manera; se tomaron ocho ratones NIH normales y se les administró, aproximadamente 2µg de ^{99m}Tc -UBI-Hynic a través de la vena de la cola. Luego de 2 horas, cuatro ratones fueron sacrificados y se aislaron los órganos y los tejidos de interés. Se realizó el mismo procedimiento con los 4 ratones restantes a las 24 hs pi.

El mismo ensayo se realizó empleando ocho ratones NIH, a los cuales se les produjo una infección, inyectándoles en una de sus patas 100 µl de una suspensión de S.a que contenía aproximadamente de 3×10^8 ufc / mL, 24 hs después se les administró el radiofármaco de igual manera que a los ratones normales y se realizaron las biodistribuciones a las 2 y a las 24hs. Finalmente para comprobar que el péptido no detecta inflamaciones, se acumula en sitios de inflamación, se realizaron biodistribuciones en ratones a los cuales se les produjo una inflamación estéril inyectándoles trementina en una de sus patas.

Resultados

✓ Conjugación y purificación

Se analizaron los tubos con el eluido de la purificación utilizando un espectrofotómetro UV (Hitachi,U-2001) y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. El perfil de absorbancia, que se muestra en la Fig.1, presenta un máximo en la fracción numero cuatro. Esta fracción se utilizó para la marcación con ^{99m}Tc .

✓ Marcación con ^{99m}Tc y control de la pureza radioquímica

La pureza radioquímica de la marcación se determinó utilizando HPLC Fase Reversa (Columna C-18 Delta Pack, Waters), en promedio el valor de la misma fue de $95.5 \pm 1,2\%$ (N=19). Los cromatogramas muestran un pico característico con un tiempo de retención de 10,50 minutos (Fig2). El rango de recuperación obtenido fue 75-92%.

Ensayos in vitro

✓ Estabilidad en suero y unión a proteínas

Se utilizó el HPLC, con columna de permeación de geles (GPC), para estimar la estabilidad del ^{99m}Tc -UBI29-41-Hynic en suero humano. En el perfil del cromatograma se observó la aparición de nuevos picos hacia menores tiempo de retención lo que muestra una unión del compuesto marcado a moléculas de mayor peso molecular. El Gráfico 1 representa la estabilidad en suero en función del tiempo.

El ensayo de unión a proteínas muestra una retención cercana al 50% que se mantiene luego de 24hs.

✓ Desafío con cisteína

El ^{99m}Tc -UBI-Hynic mostró una baja tendencia a la transquelación del ^{99m}Tc hacia la cisteína. Se pueden observar los datos en la Tabla 1 y el gráfico correspondiente Gráfico 2.

✓ Ensayo in vitro

En los datos obtenidos se observa que a medida que se aumentó la cantidad de ufc aumenta la cantidad de actividad retenida en el pellet. El Gráfico 3 muestra que la tendencia puede ajustarse a una curva que alcanza la saturación. Este número de ufc se empleará para los ensayos in vivo.

✓ Biodistribuciones

El patrón de distribución es en general similar para los ratones normales, los infectados y los inflamados (Gráfico 4). La eliminación es principalmente a través de riñón, mostrando también una captación mayor en hígado y en bazo para los ratones inflamados. Las relaciones target/non target en los ratones inflamados y en los ratones infectados (Gráfico 5) muestran un valor aproximado a 1 para los primeros y un valor cercano a 2 para los segundos. Esto indica que el ^{99m}Tc UBI-Hynic no es captado por la zona de inflamación y que tiene una captación del doble para la pata infectada en relación a la pata normal.

Conclusiones:

De acuerdo a los resultados se puede concluir que se obtuvo el UBI 29-41 marcado con ^{99m}Tc , empleando un método indirecto usando NHS-HYNIC como quelante con una pureza radioquímica mayor al 95%, lo cual haría innecesaria la purificación posterior. Además el producto marcado es estable in vitro, dentro de los parámetros normales para este tipo de biomoléculas, siendo excretado principalmente a través del riñón y obteniéndose una relación T/NT de 1,76 a las 2 horas, siendo un valor muy próximo al que se considera óptimo (2) para este tipo de relaciones.

REFERENCIAS

- [1] Rusckowski M, Qu T, Pullman J, Marcel R, Ley AC, Lander RC, Hnatowich DJ. Inflammation and infection imaging with a ^{99m}Tc -neutrophil elastase inhibitor in monkeys. J Nucl Med 2000; 41: 363-374
- [2] Welling MM, Paulusma-Annema A., Balter HS, Pauwels EK, Nibbering PH. Technetium-99m labelled antimicrobial peptides discriminate between bacterial infections and sterile inflammations. Eur J Nucl Med 2000; 27:292-301
- [3] Welling MM, Nibbering PH, Paulusma-Annema A, Hiemstra PS, Pauwels EK, Calame W. Imaging of bacterial infections with ^{99m}Tc -labeled human neutrophil peptide-1. J Nucl Med 1999; 40: 2073-2080.

Fig.1

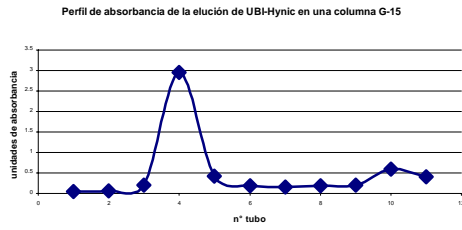


Gráfico 1

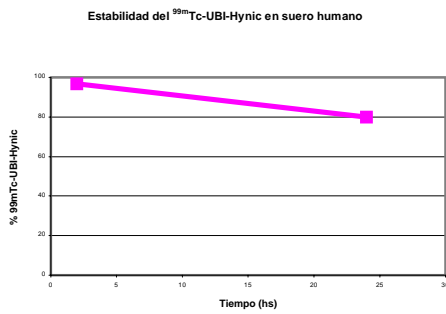


Tabla 1. Desafío con cisteína

Relación Molar (cisteína/ péptido)	^{99m} Tc-UBI-Hynic			
	5	50	500	5000
% de ^{99m} Tc transquelado a la cisteína	1.93	3.54	4.23	5.62

Tabla 2. Unión a bacterias S.a

Número de S.a. (ufc)	% A total retenida en el pellet
1,0E+06	9.73
5,00E+06	11.91
3,00E+07	17.78
3,50E+07	19.16

Gráfico 5

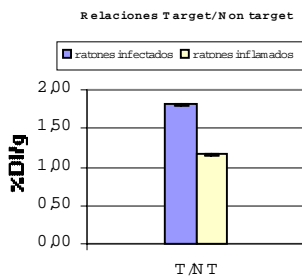


Fig.2 Cromatograma de ^{99m}TcUBI-HYNIC en columna C18

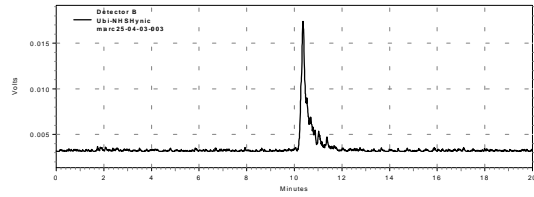


Gráfico 2

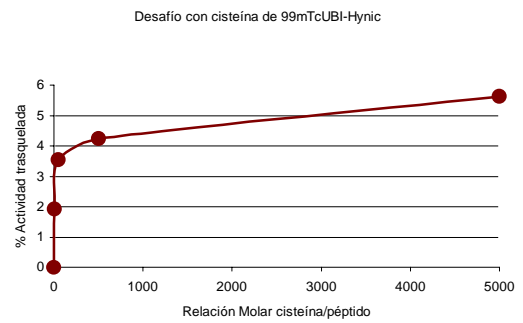


Gráfico 3

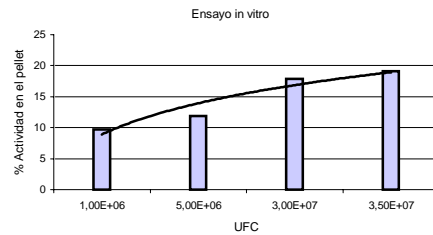
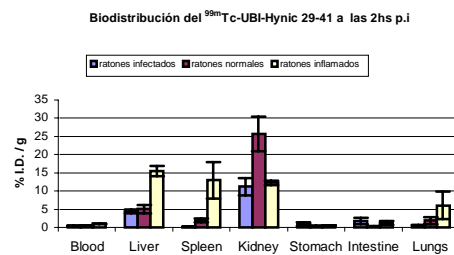


Gráfico 4



PRODUCTION OF THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE UBI 29-41 LABELLED WITH ^{99m}Tc BY AN INDIRECT METHOD

Nevares N.*, Crudo J.L., Zapata M., Castiglia S.G.de

Comisión Nacional de Energía Atómica, CAE- Grupo Radiofarmacia. U.A. Radioquímica
*nnevares@cae.cnea.gov.ar

The infection processes are the major problem in human health causing a high number of human deaths all around the world.

Diagnostic imaging in Nuclear medicine is an attractive option in the detection of infection process due to its sensitivity.

The antimicrobial peptides are very important in the development of new radiopharmaceuticals, since their antimicrobial activity towards a great variety of microorganism have been proven.

The aim of this work was to obtain the antimicrobial peptide UBI 29-41 labelled with technetium ^{99m}Tc , by an indirect method via NHS-Hynic and tricine as a coligand, and evaluate its stability and its ability to discriminate between infection and inflammation sites.

The radiochemical purity of the labeling process was $95.5 \pm 1,2$ %. The cysteine challenge showed a great stability of the $^{99m}\text{TcUBI-Hynic}$, and the stability in human serum showed that the 81% of the radioactivity remained bounded to UBI-Hynic at 48 hs of incubation.

The biodistributions studies showed main elimination via kidney of $^{99m}\text{TcUBI-Hynic}$ and the target/non target ratio was 1,81 for infected mice and 1,16 for inflamated mice