

Estudo Farmacocinético *In Vivo* Comparativo de Diferentes Metodologias de Marcação da Anexina V

Josefina da Silva Santos, Priscilla Brunelli Pujatti, Renata Martinussi Couto, Elaine Bortoleti de Araujo

Centro de Radiofarmacia – Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares – IPEN/CNEN– Av. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitario – Butantã- CEP 05508-000 – São Paulo – Brasil.

E-mail: jssantos@usp.br

Resumo. A anexina V é uma proteína humana intracelular de 36 kDa que se liga a fosfatidilserina na presença de cálcio. A afinidade da anexina V pela fosfatidilserina é semelhante a sistemas ligante-receptor e sua interação ocorre durante a apoptose. A anexina V radiomarcada pode ser usada para a avaliação da eficácia de tratamentos terapêuticos, progressão ou regressão de doenças do tipo infarto do miocárdio e câncer. As propriedades dos radiofármacos podem ser alteradas quando há variação em seu processo de produção, resultando em diferentes distribuição, farmacocinética e lipofilicidade. Além disso, a farmacocinética e os estudos de biodistribuição são muito importantes para o uso clínico. Embora a anexina V tenha sido extensivamente radiomarcada com diferentes metodologias, os métodos estudados raramente comparavam seu padrão biológico. Neste estudo avaliamos a influência do quelante nas propriedades farmacocinéticas da anexina radiomarcada com tecnécio-99m em camundongos *Swiss* usando os quelantes HYNIC e EC. A anexina V foi radiomarcada à temperatura ambiente com alto rendimento (>95%). O produto permanece estável até 4 horas em soro humano a 4°C. Os resultados da farmacocinética mostraram que tanto a anexina radiomarcada com o HYNIC quanto a marcada com EC apresentam rápido clareamento sanguíneo. Experimentos quanto à biospecificidade da anexina V estão sendo desenvolvidos.

1.Introdução

A evolução dos exames em Medicina Nuclear deve-se, em grande parte, ao aparecimento de radiofármacos cada vez mais específicos, com menor radiação de fundo e que proporcionem imagens de melhor qualidade. Com o objetivo de atender a aplicabilidade clínica, alguns fatores devem ser considerados no desenvolvimento de um novo radiofármaco, tais como: (i) o novo radiofármaco deve demonstrar sua eficácia biológica (alta captação no alvo, alta razão alvo/BG e farmacocinética favorável); (ii) alta pureza radioquímica (> 90%), evitando processos de purificações indesejáveis e alta estabilidade em solução; (iii) preparo rápido e preferencialmente à temperatura ambiente.

O processo de produção de um radiofármaco pode originar importantes alterações de lipofilicidade e carga num substrato, podendo-se obter, assim, diferente cinética de biodistribuição para uma mesma biomolécula dependendo do radionuclídeo e da rota de marcação utilizada. Os estudos de farmacocinética e biodistribuição são muito importantes na avaliação da eficácia de um novo radiofármaco.

A anexina V (ANXA5) é uma proteína humana relativamente pequena que apresenta peso molecular de 36 kDa. É uma proteína cálcio dependente que se liga com alta afinidade à fosfatidilserina (PS) na superfície da célula em estágio inicial de apoptose. Como resultado desta propriedade a anexina V liga-se a células apoptóticas *in vitro* e *in vivo*. Esta proteína é dobrada em um arranjo cíclico planar com uma única região N-terminal seguida por quatro seqüências homólogas de aproximadamente 70 aminoácidos, cada qual composto de cinco segmentos alfa hélices. A região biospecífica à PS da ANXA5, consiste de uma cadeia de 13 aminoácidos presente na região N-terminal. Nos últimos anos foram estudadas diversas técnicas de radiomarcção da ANXA5, com diferentes radionuclídeos, em busca de um radiofármaco ideal para imagem de apoptose *in vivo*. Embora desenvolvida inicialmente como um marcador para a resposta tumoral, a anexina V tem se sobressaído na avaliação da resposta terapêutica e em imagem de infarto do miocárdio [1,2,3].

A maior parte dos estudos de radiomarcção da ANXA5 foram desenvolvidos com o tecnécio-99m, isto se deve principalmente às suas características físicas extremamente favoráveis, disponibilidade e custo. O tecnécio-99m pode ser acoplado à anexina V tanto diretamente, utilizando estanho como agente redutor após modificação da proteína, com introdução de uma seqüência de aminoácido

quelante (anexina V mutante), quanto indiretamente, utilizando-se quelantes bifuncionais tais como 4,5-bis(tioacetamido)pentanoil (^{99m}Tc -Apomate), n-1-imino-4-mercaptobutil (^{99m}Tc -i-anexina-V), hidrazinonicotinamida (^{99m}Tc -HYNIC-anexina-V), etilenodicisteína (^{99m}Tc -EC-anexina-V), hidrazina succínica (^{99m}Tc -SDH-anexina-V) [4,5,6,7].

O uso de diferentes quelantes pode proporcionar um impacto significativo na lipofilicidade, na estabilidade da solução, na farmacocinética e na biodistribuição do complexo anexina V tecnécio-99m. O HYNIC é usado para radiomarcas proteínas com ^{99m}Tc e sua metodologia de marcação está bem estabelecida. O ^{99m}Tc -HYNIC-ANXA5 mostrou-se o traçador mais promissor, sendo que seu estudo encontra-se em fase clínica II/III. O EC é o exemplo de sucesso mais recente de quelante do tipo N_2S_2 , e tem sido amplamente estudado [7,8].

Embora esteja comprovada que a reação entre anexina V, quelante e Tecnécio-99m seja quimicamente factível e experimentalmente implementável, diversos estudos ainda são necessários. Neste trabalho estamos mostrando resultados preliminares da avaliação da influência do quelante na farmacocinética da ANXA5 radiomarcada com tecnécio-99m em *Swiss* usando o HYNIC e o EC como quelantes bifuncionais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Síntese e Radiomarcção da EC-ANXA5

À uma solução de EC (0,05mmol) pH 10, adiciona-se tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TSTU) (0,1 mmol). Após uma suave agitação adiciona-se anexina V, a mistura permanece sob agitação por 24 horas a 4 °C. Após este período a mistura é dialisada por 48 horas a 4 °C e aliqotada. Para obter a ^{99m}Tc -EC-ANXA5, adiciona-se ao frasco contendo o EC-anexina V o ^{99m}Tc -pertechnetato (185 – 259 MBq) e o cloreto de estanho (100µg), agita-se suavemente e incuba-se por 30 minutos. A pureza radioquímica foi determinada em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando como suporte fitas de sílica gel (ITLC) e como fase móvel acetato de amônia 1M: metanol (4:1).

2.2. Radiomarcção da HYNIC-ANXA5

A anexina derivatizada com o HYNIC foi realizado na formulação de “kit” por doação do National Cancer Institute-Frederick. O procedimento de radiomarcção é obtido adicionando-se 0,5mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (1,11 a 1,85 GBq) ao frasco do HYNIC-anexina V e agitando-se suavemente. Reconstitui-se o frasco de tricina/estanho com 3,0 mL de salina para injeção e imediatamente retirou-se 30 µL do frasco da tricina/estanho e adiciona-se ao tubo do pertechnetato/HYNIC-anexina V. Agitou-se suavemente e incubou-se por 15 minutos. A pureza radioquímica foi determinada em CCD utilizando como suporte o ITLC e como fase móvel tampão ACD.

2.3. Farmacocinética

Para este estudo, após a administração da anexina V radiomarcada na veia caudal de camundongos *Swiss* machos (4 semanas, 25-30 g), a veia do sinus orbital foi puncionada em intervalos de tempos pré-fixados (t = 1, 5, 10, 30, 60 e 120 minutos), com capilar de vidro heparinizado de 60 µL de volume. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados utilizando-se o programa BIEXP. Este programa ajusta os dados segundo um modelo bicompartimental, sendo um compartimento central ou vascular (compartimento 1) e um extravascular (compartimento 2), através da decomposição da curva sangüínea em duas componentes (rápida e lenta). Esta decomposição fornece uma série de dados que traduzem a cinética do radiofármaco, como as constantes de transferência entre compartimentos ($k_{1,2}$ e $k_{2,1}$), a constante de eliminação (k_{ss}), e a de meia vida nas fases rápida e lenta ($T_{1/2}$ rap. $T_{1/2}$ lento).

3. Resultados e Discussão

A conjugação do EC ao grupo N-terminal da anexina V foi realizado via ativação do ácido carboxílico por reação com TSTU em meio básico. A anexina V radiomarcada por este método foi obtida com alta pureza radioquímica (Tabela I). A anexina V radiomarcada utilizando o “kit” HYNIC foi obtida em um curto intervalo de tempo de marcação (15 minutos) e com alta pureza radioquímica (Tabela I).

Tabela I. Porcentagem da pureza radioquímica da anexina V radiomarcada.

Pureza Radioquímica (%)	
$^{99m}\text{Tc-HYNIC-ANXA5}$	$^{99m}\text{Tc-EC-ANXA5}$
$92,30 \pm 0,97$	$97,87 \pm 0,75$

n=3

O processo de marcação para ambos os métodos foi desenvolvido a temperatura ambiente. A anexina V radiomarcada por ambas metodologias apresenta um rápido clareamento sanguíneo (FIG 1).

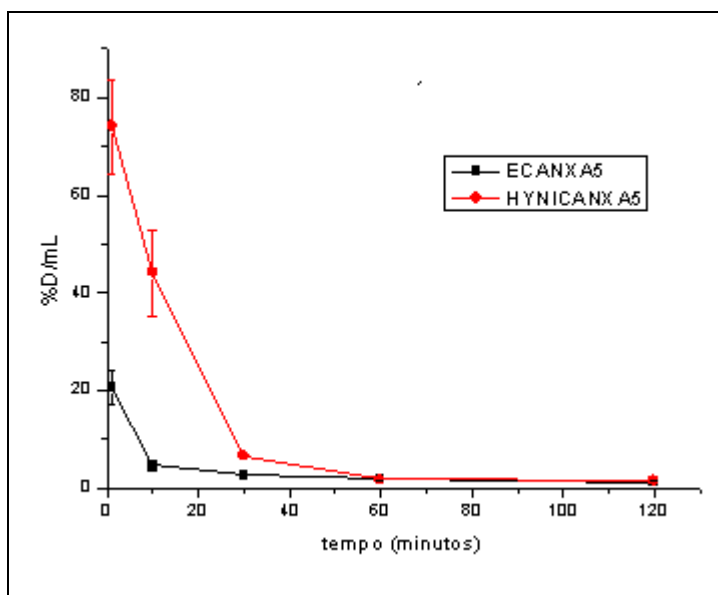


FIG. 1. Cinética do clareamento sanguíneo da $^{99m}\text{Tc-HYNIC-ANXA5}$ e $^{99m}\text{Tc-EC-ANXA5}$.

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir das equações 1 e 2, as quais representam o comportamento sanguíneo da $^{99m}\text{Tc-HYNIC-ANXA5}$ e $^{99m}\text{Tc-EC-ANXA5}$ respectivamente, podem ser observados na tabela II. O tempo de residência médio para a $^{99m}\text{Tc-HYNIC-ANXA5}$ foi superior ao da $^{99m}\text{Tc-EC-ANXA5}$. O mesmo efeito foi observado quando o parâmetro analisado é o volume de distribuição em equilíbrio para $^{99m}\text{Tc-HYNIC-ANXA5}$ e o $^{99m}\text{Tc-EC-ANXA5}$.

$$C(t) = 1109455,75e^{-13,34t} + 22923,70e^{-0,14t} \quad (1),$$

$$C(t) = 549211e^{-14,68t} + 78128,30e^{-0,484t} \quad (2),$$

onde $C(t)$ é a concentração sanguínea do radiofármaco em estudo no tempo t .

Tabela II. Parâmetros farmacocinéticos da anexina V radiomarcada com EC e HYNIC.

PARÂMETRO	^{99m} Tc-HYNIC-ANXA5	^{99m} Tc-EC-ANXA5
T _{1/2 rap.} (h)	0,05	0,05
T _{1/2 lento} (h)	4,79	1,45
k _{1,2}	8,73	9,78
k _{2,1}	0,42	2,25
k _{ss}	0,22	0,58
Tempo de residência médio	4,61	1,7
Volume de distribuição no equilíbrio	470,58	381,60

T_{1/2 rap} = meia vida da componente rápida, T_{1/2 lento} = meia vida da componente lenta, k_{1,2} = constante de transferência entre 1 e 2, k_{2,1} = constante de transferência entre 2 e 1, k_{ss} = constante de eliminação

4. Conclusão

A ^{99m}Tc-ANXA5 foi obtida com alto grau de pureza radioquímica à temperatura ambiente em ambos os métodos de radiomarcagem analisados. A farmacocinética da ^{99m}Tc-Ec-ANXA5 sugere que este radiofármaco pode ser uma alternativa atrativa para o uso da ^{99m}Tc-HYNIC-ANXA5 *in vivo*. Outros estudos estão em desenvolvimento a fim de avaliar a efetividade destes dois compostos na detecção da da apoptose por imagem cintilográfica.

5. Referências Bibliográficas

- [1] Belhocine, T.Z.; Tait, J.F.; Vanderheyden, Jean-Luc; Li, C. And Blankenberg, F.G. Nuclear Medicine in the era of genomics and proteomics: lessons from Annexin V. J. Proteome Res. v. 3, p. 345-349, 2004.
- [2] Boersma, H.H.; Kietselaar, B.L.J.H.; Stolk, L.M.L.; bennaghmouch, A. ofstra, L. Narula, J. Heidendal, G.A.K. Reutelingsperger, C.P.M. Past, present, and future of annexin A5: from proetin discovery to clinical applications. J. Nucl. Med. v. 46, n. 12, pp. 2035-2050, 2005.
- [3] Mukherjee, A.; Kothari, K.; Tóth, G.; Szemenyei, E.; Sarma, H.D.; Környei, J.; Venkatesh, M. ^{99m}Tc-labeled annexin V fragments; a potential SPECT radiopharmaceutical for imaging cell death. Nuclear medicine and biology. v. 33, p. 635-643, 2006.
- [4] Blankenberg, F.G.; Katsikis, P.D.; Tait, J.F.; Davis, R.E.; Naumovski, L.; Ohtsuki, K.; Kapiwoda, S.; Abrams, M.J.; Darkes, M.; Robbins, R.C.; Maecker, H.T. And Strauss, H.W. "in vivo" detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. Proc. Natl. Sci. USA, v. 95, pp. 6349-6354, 1998.
- [5] Stratton, J.R.; Dewhurst, T.A.; Kasina, S.; Reno, J.; Cerqueira, M. Baskin, D.; Tait, J.F. Selective uptake of radiolabeled Annexin V on acute porcine left atrial thrombi. Circulation, v. 92, n. 10, pp. 3113-3121, 1995.
- [6] Kemerink, G.J.; Boersma, H.H.; Thimister, P.W.L.; Hofstra, L. Liem, I.H.; Pakbiers, Marie-Thérèse W., Janssen, D.; Reutelingsperger, C.P.M.; Heidendal, G.A.K. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc-BTAP-annexin-V in humans. Eur. J. Nucl. Med, v. 28, n. 9, pp. 1373-1378, 2001.
- [7] Yang, D.J.; Azhdarinia, A.; Wu, P.; Yu, Dong-Fang; Tansey, W.; Kalimi, S.K.; Kim, E.E.; Podolof, D.A. *In vivo* and *in vitro* measurement of apoptosis in breast cancer cells using ^{99m}Tc-EC-Annexin V. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, v. 16, n. 1, pp. 73-83, 2001.
- [8] Vanderheyden, Jean-Luc.; Liu, G.; He, J.; Patel, B.; Tait, J.F. Hnatowich, D.J. Evaluation of ^{99m}Tc-MAG₃-annexin V: influence of the chelate on *in vitro* and *in vivo* properties in mice. Nuclear Medicine and Biology, v. 33, pp. 135-144, 2006.