

Marcación de un péptido antimicrobiano con tecnecio-99m: ^{99m}Tc -HYNIC-UBI 29-41 para la localización de focos infecciosos*

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

Comisión Nacional de Energía Atómica
Avenida del Libertador 8250
(1419BNP) Buenos Aires, República Argentina
e-mail: nnevares@cae.cnea.gov.ar

Recibido el 4 de diciembre de 2007; aceptado el 15 de febrero de 2008

Resumen

Los procesos infecciosos continúan siendo un problema importante y la causa de numerosas muertes a nivel mundial. La Medicina Nuclear es una alternativa atractiva para la detección de focos infecciosos debido a su alta sensibilidad. Los péptidos antimicrobianos son un desarrollo importante de nuevos radiofármacos, ya que ha sido probada su actividad antimicrobiana hacia una gran variedad de microorganismos. El objetivo de este trabajo fue obtener el péptido antimicrobiano UBI 29-41 marcado con tecnecio-99m, a través de un método indirecto y evaluar su estabilidad tanto in-vitro como in-vivo y la habilidad para discriminar entre procesos infecciosos e inflamatorios.

PALABRAS CLAVE: PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS - UBI 29-41 - INFECCIÓN - INFLAMACIÓN

Abstract

The infection processes are a major problem in human health, causing high number of human deaths all around the world. Due to its sensitivity, Nuclear Medicine is an attractive option in the detection of infection process. 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, by an indirect method, and evaluate its stability in-vitro and in-vivo and its ability to discriminate between infection and inflammation sites.

KEYWORDS: ANTIMICROBIAL PEPTIDES - UBI 29-41 - INFECTION - INFLAMMATION

* Trabajo realizado sobre la base de la tesis presentada por N. Nevares para optar al grado de Magíster en Radioquímica, bajo la dirección de S.G. Castiglia.

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 y que sea capaz de distinguir entre inflamación e infección.

Los péptidos antimicrobianos son importantes para el desarrollo de nuevos radiofármacos destinados a localizar sitios de infección en medicina nuclear ya que 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.

El péptido antimicrobiano UBI 29-41 es el fragmento 29-41 (6,7 kDa), de una pequeña proteína catiónica llamada ubiquicidina (1463 kDa). Ya que el tecnecio-99m es el radioisótopo de elección en medicina nuclear, el péptido en estudio se marcó con este radionucleído y se evaluó su potencialidad como agente de diagnóstico en infecciones.

Originariamente, la ubiquicidina se aisló de los macrófagos murinos; luego se aisló una proteína idéntica de las células epiteliales humanas de las vías aéreas, lo que permitió extrapolar los resultados de los ratones a los humanos.

Está demostrado que la presencia de la ubiquicidina en el citosol de los macrófagos sirve para restringir el crecimiento intracelular de los microorganismos ya que la desintegración de estos macrófagos produce la eliminación de la ubiquicidina dentro del ambiente extracelular, lo cual puede contribuir a la defensa del huésped luego de la muerte de los macrófagos (Welling y colaboradores, 2000). La ubiquicidina fue purificada de la fracción citosólica de las células activadas del IFN γ de los macrófagos murinos de la línea celular RAW264.7. En este trabajo se encontró que la ubiquicidina purificada era igualmente activa contra L monocitogenes, como una de las defensas más potentes del conejo WP-1.

Estos resultados demostraron que la ubiquicidina es idéntica o altamente homóloga a S30, una proteína que fue purificada de la pequeña subunidad ribosomal del hígado de rata, cuya presencia se demostró en varios tejidos humanos y murinos.

Welling estudió diferentes péptidos sintéticos cuyas secuencias de aminoácidos se basan en la secuencia

del péptido humano ubiquicidina. Estos fragmentos se marcaron empleando una técnica directa y se realizaron ensayos de unión a bacterias, tanto *in-vitro* como *in-vivo*. Las investigaciones demostraron que los fragmentos 29-41 y 18-35 son los compuestos óptimos para distinguir infecciones bacterianas e inflamaciones estériles, ya que tanto los ensayos *in-vitro* como *in-vivo* revelaron que estos péptidos se unían de manera preferencial a bacterias y no así a los leucocitos (Welling y colaboradores, 2000).

Además los fragmentos 29-41 y 18-35 fueron capaces de detectar sitios infecciosos tanto en ratones como en conejos y no se observó acumulación de los mismos en las patas de los animales con inflamaciones estériles.

Por otra parte, el fragmento 18-45 presentó una actividad antimicrobiana superior, lo cual representa que no es tan útil para el diagnóstico como el fragmento 29-41.

Estos trabajos llevaron a la elección del fragmento 29-41 para estudiarlo como posible agente en la discriminación de los procesos infecciosos de los inflamatorios.

El péptido UBI 29-41 posee en su estructura 13 aminoácidos, de los cuales 5 son residuos de arginina y 1 de lisina, lo que le confiere una carga neta positiva, y no posee residuos de cisteína.

Parte experimental

Se utilizó el péptido UBI 29-41 (provisto por el Dr. E. K. J. Pauwels, University Medical Center, Leiden, Holanda), que se marcó con $^{99m}\text{TcO}_4^-$ por un método indirecto utilizando un quelante derivado de la hidrazinonicotinamida NHS-Hynic. Se evaluó el producto marcado mediante ensayos *in-vitro* e *in-vivo*.

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

Para conjugarse 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 acetato de amonio 0,25 mM (pH 5,2), en la cual se eliminaron los gases previamente para evitar la formación de burbujas en su interior. Se determinó el volumen muerto, el cual resultó igual a 3,7 ml. El eluido de la columna se recogió en fracciones de 1 ml en 10 tubos.

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

Para la marcación del péptido conjugado purificado se utilizó la siguiente técnica: a 25 μ l de Hynic-UBI

29-41, se agregaron 10 μ l $^{99m}\text{TcO}_4^-$ eluido recientemente con una actividad promedio de 290 μCi , 100 μ l de solución de tricina en agua (10 mg/ml) y 10 μ l de una solución fresca de SnCl_2 en HCl 10 mM (1mg/ml) en la cual se hizo burbujear nitrógeno previamente. El tiempo de incubación a temperatura ambiente fue de 45 minutos.

Controles de pureza radioquímica

La pureza radioquímica se determinó utilizando HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 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 μ l de suero junto con 50 μ l de ^{99m}Tc -Hynic-UBI 29-41, 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.

Para el ensayo de unión a proteínas del suero, se colocaron 150 μ l de la misma solución incubada en un filtro para centrifuga (Ultrafree-MC, Milipore), que se centrifugó durante 2 horas a 4500 g. El filtro permite el pasaje de aquellas moléculas con PM menor a 5000; en cambio, las 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.

• Estabilidad frente a la cisteína

El ensayo de estabilidad frente a la cisteína fue desarrollado por Hnatowich y colaboradores (1993) cuando determinaron que la transquelación a la cisteína es la manera principal de inestabilidad de los anticuerpos marcados con ^{99m}Tc . En sus investigaciones utilizó este ensayo para medir la inestabilidad de dos anticuerpos de IgG (B 72,3 y C110) marcados con ^{99m}Tc por método directo, empleando mercaptoetanol y ion estannoso.

En este caso, el ensayo de estabilidad se realizó sometiendo el péptido marcado a la presencia de cantidades crecientes de cisteína.

Se preparó una solución fresca de cisteína (10 mg/ml, 0,083M) en buffer fosfato 0,4 M (pH 7,0) y se realizaron diluciones sucesivas. Se agregó la misma

cantidad de péptido a cada solución de cisteína, 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 (Instant Thin Layer Chromatography) como control.

• Ensayo de unión a Staphilococcus aureus in-vitro

Para comprobar la unión del péptido marcado a los microorganismos, se ensayó la unión *in-vitro* empleando Staphilococcus aureus (S.a) ATCC 25923 como bacteria infecciosa. El ensayo se realizó colocando en tubos eppendorf aproximadamente 1 nmol del ^{99m}Tc - Hynic-UBI 29-41 en 100 μ l de PBS (pH 7,2, 0,001M), 790 μ l de una solución de ácido acético 0,01 M en PBS 50 % (v/v), 10 μ l de Tween-80, 0,01 % (v/v) y 100 μ l 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 1 h a 4 °C y luego los tubos eppendorf se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos. Los pellets se resuspendieron con 1ml de PBS y se centrifugaron nuevamente. Finalmente se calculó el porcentaje de actividad que quedó retenida en cada pellet.

Ensayos in-vivo

• Biodistribuciones en ratones

Se realizaron biodistribuciones de ratones normales, de ratones infectados con Staphilococcus 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 a los que se administraron aproximadamente 2 μg de ^{99m}Tc -Hynic-UBI 29-41, 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 horas 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 μ l de una suspensión de S.a que contenía aproximadamente de 3×10^8 ufc/ml; 24 horas 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 24 horas.

Finalmente, para comprobar que el péptido no detecta inflamaciones, es decir que no 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 Figura 1, presenta un máximo en la fracción número 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 (Figura 2). El rango de recuperación obtenido fue 75-92 %.

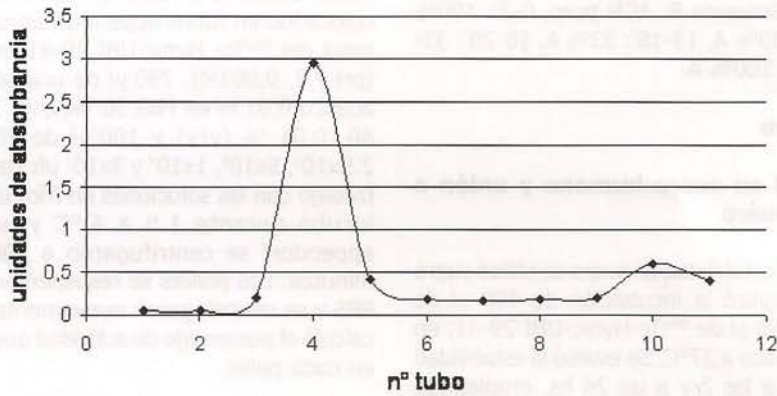


Figura 1. Perfil de absorbancia de la elución de Hynic-UBI en una columna Sephadex G-15

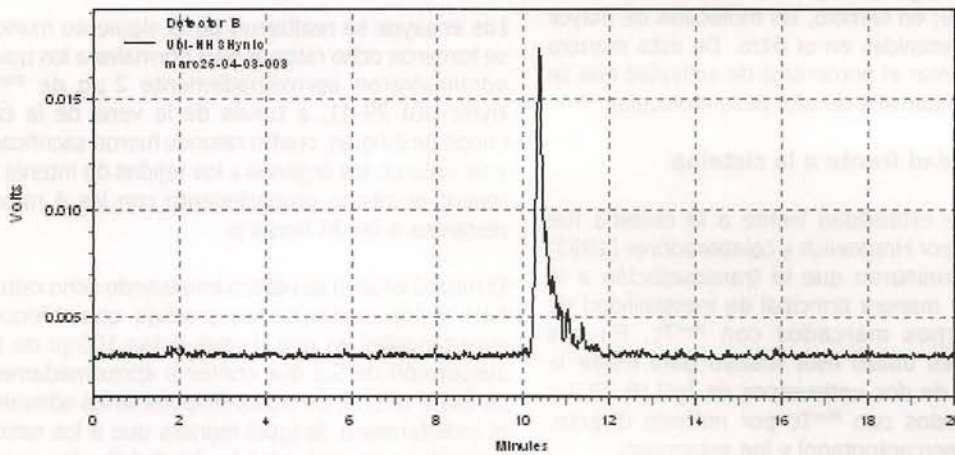


Figura 2. Radiocromatograma en HPLC-RF de ^{99m}Tc -HYNIC-UBI 29-41

Ensayos in-vitro

• Estabilidad en suero y unión a proteínas

Se utilizó HPLC, con columna de permeación de geles (GPC), para estimar la estabilidad del ^{99m}Tc -Hynic-UBI 29-41 en suero humano. En el perfil del cromatograma se observó la aparición de nuevos picos hacia menores tiempos de retención, lo que muestra una unión del compuesto marcado a moléculas de mayor peso molecular. La Figura 3 representa la estabilidad en suero en función del tiempo.

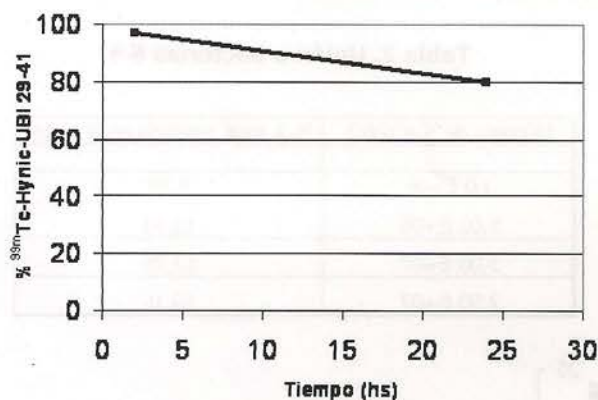


Figura 3. Estabilidad del ^{99m}Tc - Hynic-UBI 29-41 en suero humano

Tabla 1. Estabilidad frente a la cisteína

^{99m}Tc - Hynic-UBI 29-41				
Relación Molar (cisteína/ péptido)	5	50	500	5000
% de ^{99m}Tc transquelado a la cisteína	1.93	3.54	4.23	5.62

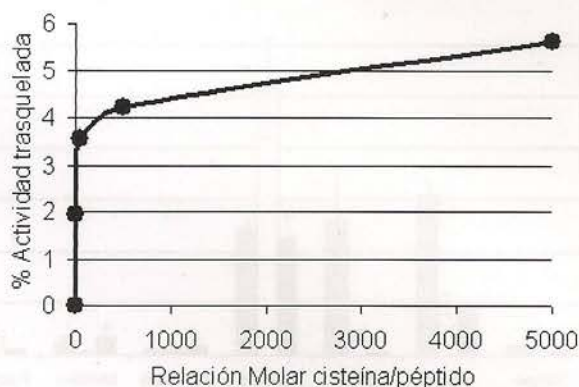


Figura 4. Estabilidad frente a la cisteína de ^{99m}Tc -Hynic-UBI 29-41

• **Ensayo de unión a *Staphilococcus aureus* in-vitro.**

En los datos obtenidos se observa que, a medida que se aumenta la cantidad de ufc, aumenta la cantidad de actividad retenida en el pellet (Tabla 2). La Figura 5 muestra que la tendencia puede ajustarse a una curva que alcanza la saturación.

Biodistribuciones en ratones

El patrón de distribución es en general similar para los ratones normales, los infectados y los inflamados (Figura 6). La eliminación es principalmente a través

de riñón, mostrando también una captación mayor en hígado y en bazo para los ratones inflamados. Cuando se desea determinar la eficiencia de un radiofármaco en la detección de un sitio de infección/inflamación, es necesario conocer la relación entre el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g de tejido) en el sitio de infección (o inflamación) y el sitio normal. Esta relación se identifica como T/TN (Tejido blanco: pata infectada o inflamada y Tejido No blanco: pata normal).

Las relaciones T/TN en los ratones inflamados y en los ratones infectados (Figura 7) muestran un valor

Tabla 2. Unión a bacterias S.a

Número de <i>S.a.</i> (ufc)	% A total retenida en el pellet
1,0 E+06	9,73
5,00 E+06	11,91
3,00 E+07	17,78
3,50 E+07	19,16

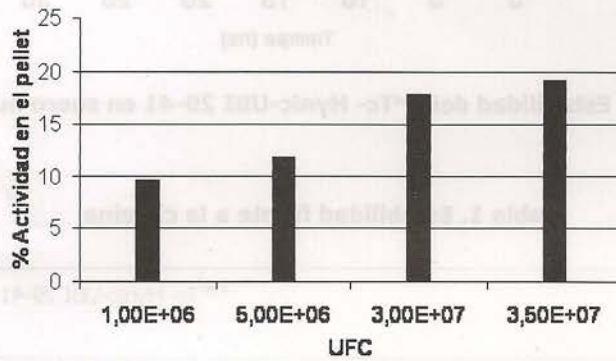


Figura 5 . Ensayo de unión a *Staphilococcus aureus* in-vitro

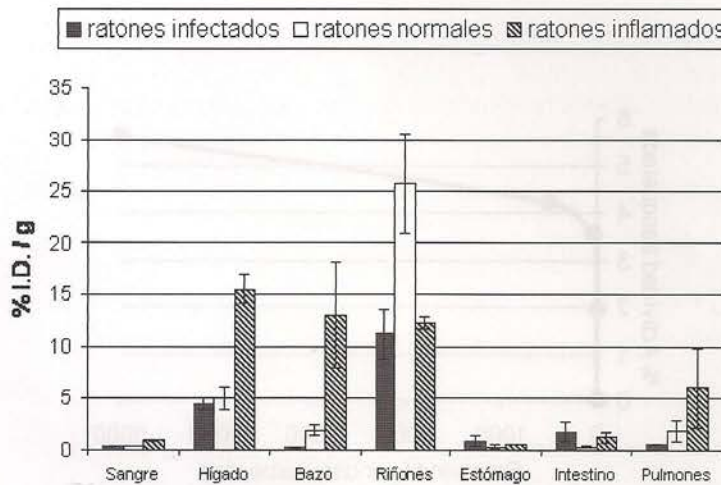


Figura 6. Biodistribuciones del ^{99m}Tc-Hynic-UBI 29-41 a las 2hs p.i

aproximado a 1 para los primeros y un valor cercano a 2 para los segundos. Esto indica que el ^{99m}Tc -Hynic-UBI 29-41 no es captado por la zona de inflamación y que tiene una captación del doble para la pata infectada con relación a la pata normal.

utilizó el esquema de conjugación previa a la marcación empleando NHS-Hynic como ligando.

Los controles de pureza radioquímica de la marcación mostraron un elevado rendimiento (95 %, n=22).

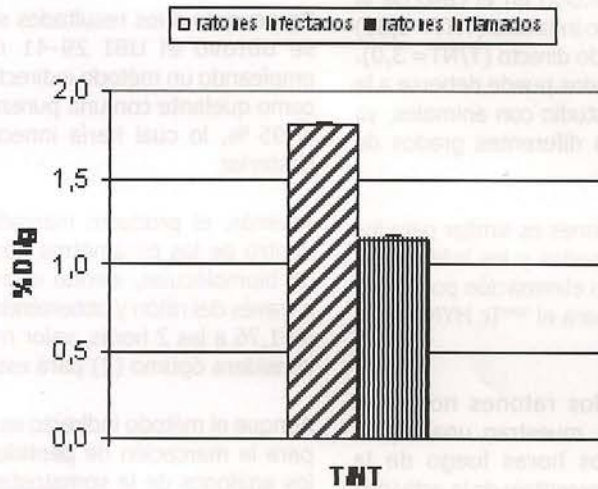


Figura 7. Relaciones Target/Non target

Discusión

Un paso crítico en el tratamiento de paciente con procesos inflamatorios e infecciosos es su detección temprana. Para ello se utilizan técnicas radiológicas que incluyen la tomografía computada, la resonancia y la ultrasonografía.

La información que se obtiene a partir de estos estudios es parcial, ya que estas técnicas se basan en cambios anatómicos. Por el contrario, la centellografía, al ser una técnica que se basa en los cambios funcionales (fisiológicos o bioquímicos) de los tejidos, es un excelente método no invasivo que permite la localización de los focos infecciosos e inflamatorios.

Desde la aparición del ^{67}Ga se desarrolló un gran número de radiofármacos, que incluyen leucocitos y anticuerpos antigranulocitos, ambos marcados con ^{111}In y ^{99m}Tc .

Una nueva clase de radiofármacos muy promisorios son las pequeñas proteínas y los péptidos marcados. Hasta el momento, la distinción entre inflamación e infección sigue siendo un problema a solucionar. En esta área de investigación, reciben especial atención los péptidos antimicrobianos, por su potencial como agentes antimicrobianos en la lucha contra la infecciones.

Con el fin de aportar datos que permitan una mejor comprensión del proceso inflamatorio-infeccioso, se trabajó con un péptido sintético para el cual se desarrolló un método de marcación indirecto y se evaluó la detección de focos infecciosos de S.a. Se

Esto resulta importante a los fines prácticos, ya que un rendimiento elevado de la marcación hace innecesaria la purificación posterior antes de ser utilizado en los ensayos *in-vitro* o antes de ser administrado a los animales para realizar los ensayos de biodistribuciones. De esta manera se ahorra tiempo y se disminuye la exposición a la radiación del personal afectado al trabajo.

El péptido marcado ^{99m}Tc -HYNIC-UBI 29-41 se sometió a los ensayos de estabilidad *in-vitro*. Los resultados mostraron una buena estabilidad de la marcación tanto en suero como en presencia de cisteína. Con estos ensayos se comprobó que la marcación es estable luego de las 2 horas de incubación.

En el ensayo *in-vitro* de unión a bacterias se obtuvo un 20 % de unión del péptido cuando se incubó junto con 3×10^7 UFC de S.a. Este valor resulta menor al que se obtiene cuando se somete a las mismas condiciones el UBI 29-41 marcado por el método directo (40%); (Crudo y colaboradores, 2005). Sin embargo, la estabilidad de los dos productos y los rendimientos de ambos métodos son similares.

Cuando se realizaron las biodistribuciones de los ratones inflamados se pudo observar que no hay diferencia de captación entre la pata normal y la pata inflamada si se les inyecta ^{99m}Tc HYNIC-UBI 29-41 (T/NT= 1,21) o ^{99m}Tc -UBI 29-41(T/NT=0,83), lo que demuestra que el péptido UBI 29-41 no se acumula en los sitios de inflamación, independientemente del método de marcación; ambos resultados son menores que el que se obtiene

cuando se utiliza un radiofármaco útil para detectar inflamaciones ^{99m}Tc -IgG (T/NT= 2,30).

Con respecto a las biodistribuciones de los animales infectados con S.a, se observó que existe una menor captación en el sitio de infección en el caso de la molécula marcada por método indirecto (TNT= 1,81) en comparación con el método directo (T/NT= 3,0). Esta diferencia en los resultados puede deberse a la dificultad que presenta el estudio con animales, ya que los ratones desarrollan diferentes grados de infección e inflamación.

El patrón de las biodistribuciones es similar para los ratones normales, los inflamados y los infectados, donde se observó una rápida eliminación por riñón. Esta eliminación es mayor para el ^{99m}Tc HYNIC-UBI 29-41.

Las biodistribuciones en los ratones normales empleando ^{99m}Tc -UBI 29-41 muestran una rápida eliminación por riñón. Dos horas luego de la administración un pequeño porcentaje de la actividad inyectada es removida a través del hígado (2,5 en comparación con el riñón, 27,6; luego de 24 horas la actividad en el hígado y en los riñones disminuye respectivamente a 0,19 y 3,5 (Crudo y colaboradores, 2005).

Debido a la más rápida eliminación por riñón el complejo obtenido por método directo muestra una

mejor biodistribución que el complejo con NHS-Hynic, donde se observó una excreción hepatobiliar mayor.

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, valor muy próximo al que se considera óptimo (2) para este tipo de relaciones.

Aunque el método indirecto es el método de elección para la marcación de péptidos, como por ejemplo los análogos de la somatostatina, en este caso no resultó superior al método directo utilizado para este mismo péptido.

Empleando el método directo se obtienen mejores resultados en la detección de los focos infecciosos. Por lo tanto, no resultaría beneficioso el reemplazo de la técnica directa, ya que ésta permite el desarrollo de un kit diagnóstico.

Referencias

CRUDO, J. L.; NEVARES, N. N.; ZAPATA, A. M; PEREZ, J. H; OBENAU, E. R; CASTIGLIA, S. G. (2005) Alasbimn Journal 7(28): Article N° AJ28-4.

HNATOWICH, D. J.; MARDIROSIAN, G.; RUSCKOWSKI, M.; FOGARASI, M.; VIRSI, F.; WINNARD, P. (1993) J. Nucl. Med 34: 109-19.

WELLING, M. M.; PAULUSMA-ANNEMA, A.; BALTER, H. S.; PAUWELS, E. K.; NIBBERING, P. H. (2000) Eur. J. Nucl. Med. 27:292-301.