

# SINTESIS Y MARCAJE DE 6-CETO-PROSTAGLANDINA F<sub>1α</sub>-TME CON <sup>125</sup>I

J. L. Santana, C. Pérez, I. Herrera y J. A. González.\*

Instituto Superior de Ciencias y Tecnología Nucleares, Quinta de los Molinos, Avenida "Salvador Allende", Apartado Postal 6163, \*Laboratorio Técnico de Medicamentos, Avenida 26 y Calzada de Puentes Grandes, Cerro, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 23 de agosto de 1994.

**RESUMEN.** Las prostaglandinas son reguladores metabólicos de gran eficacia que pueden ser empleados en la terapia o el diagnóstico de enfermedades. En Cuba se obtienen a partir de la gorgonia *Plexaura homomalla*. En el presente trabajo se muestran dos vías de síntesis del derivado 6-ceto-prostaglandina-F<sub>1α</sub>-TME y su posterior marcaje con <sup>125</sup>I. Este reactivo puede ser empleado en la detección radioinmunológica de úlceras pépticas después de su purificación cromatográfica.

**ABSTRACTS.** Prostaglandines are high performance metabolic regulators and can be employed in a therapy or in the diagnosis of many diseases. In Cuba they are obtained from gorgonia *Plexaura homomalla*. Two methods of synthesis of 6-keto-prostaglandin-F<sub>1α</sub>-TME-<sup>125</sup>I derivative are shown. This substance must be employed in RIA kits for gastric diseases detection after their chromatographic purification.

## INTRODUCCION

El amplio espectro de actividades biológicas asociadas con las prostaglandinas, su aparición en una gran variedad de tejidos y su elevada potencia de acción en ellos, caracteriza a esta clase de sustancias como reguladores metabólicos de gran eficacia.<sup>1</sup>

En Cuba se hacen continuos esfuerzos por introducir en la práctica médica varias prostaglandinas con acción farmacológica comprobada, aprovechando la presencia de la gorgonia *Plexaura homomalla* en la plataforma insular de Cuba, fuente natural de los precursores de algunas prostaglandinas.

Junto a los fármacos para terapia, dentro del campo de aplicación de las prostaglandinas, existen fármacos para diagnóstico, tales como la 6-ceto-prostaglandina-F<sub>1α</sub> (6-ceto-PGF<sub>1α</sub>), metabolito de la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que por su semejanza estructural puede ser empleado para detectar la presencia de úlceras gástricas en pacientes, así como posibles trastornos circulatorios.<sup>2,3</sup>

La determinación indirecta de PGI<sub>2</sub>, se realiza a través de la técnica de análisis radioinmunológico, siendo muy empleado en estos casos, un trazador radioisotópico marcado con <sup>125</sup>I.

El marcaje de muchas sustancias con isótopos no constituyentes de la materia orgánica como el yodo, precisa la inclusión de un grupo prostético o molécula adicional a la estructura del metabolito fundamental, con el objetivo de que pueda ser introducido el radionúclido deseado en esta parte de la molécula, lo que se conoce como técnica de marcaje indirecto. Uno de los grupos más usados con este fin, es el éster metílico de la tirosina<sup>4</sup> que puede incorporar el yodo al anillo aromático por sustitución electrofílica sin provocar con esto, cambios en el reconocimiento inmunológico de la sustancia a determinar.

El objetivo de este trabajo fue evaluar dos procedimientos de síntesis química que permitieran acoplar la molécula del éster metílico de la tirosina a la molécula de la 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> y su posterior marcaje con <sup>125</sup>I, empleando para ello, dos derivados carbodiimídicos, uno de los cuales no ha sido reportado como agente condensante para el trabajo con prostaglandinas (diciclohexilcarbodiimida).

## MATERIALES Y METODOS

La sal sódica de la prostaciclina (NaPGI<sub>2</sub>) fue obtenida por métodos sintéticos a partir de la prostaglandina A<sub>2</sub> que se extrae de la gorgonia *Plexaura homomalla*.<sup>5,6</sup>

La obtención de la prostaglandina-F<sub>1α</sub> (PGF<sub>1α</sub>) se realizó a partir de la NaPGI<sub>2</sub> por acidificación de su disolución acuosa y posterior purificación. Su obtención y posterior caracterización por temperatura de fusión, espectros IR y análisis cromatográfico, fueron llevados a cabo según recomendaciones conocidas.<sup>7</sup> Los diferentes procesos de síntesis que se desarrollaron fueron seguidos por cromatografía de capa delgada (CCD) con placas preelaboradas de gel de sílice GF-254 sobre vidrio (Merck), de dimensiones (5X10) cm y de 0,25 mm de espesor. Como relevador se empleó una disolución de ácido fosfomolibdico al 10 % en etanol, con calentamiento posterior a 105 °C. La purificación de los productos de síntesis, se llevó a cabo por cromatografía de adsorción en columnas, empleando gel de sílice 60 (Merck) como fase estacionaria.

En el análisis de la 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) sobre columna LiChrospher RP-18 (5 μm), se empleó como fase móvil una mezcla de ácido fosfórico-acetonitrilo (0,17 mol/L), en una relación de volúmenes de 67,2/32,8. La absorbancia se determinó a λ = 194 nm.

Los métodos de síntesis que se utilizaron para incorporar el éster metílico de la tirosina a la molécula de la 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>, empleando derivados carbodiimídicos, se describen a continuación.

### METODO 1

En un balón, se adicionan 0,028g (7 · 10<sup>-5</sup> mol) de 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>, 0,0025g (2,5 · 10<sup>-5</sup> mol) de trietilamina y 0,0075 g (5 · 10<sup>-5</sup> mol) de éster metílico de tirosina en 5 mL de tetrahydrofurano seco, libre de peróxido. Luego de enfriar el balón de reacción a -15 °C con mezcla de hielo y sal, se añaden 0,0020 g (5 · 10<sup>-5</sup> mol) de diciclohexilcarbodiimida, reactivo recomendado<sup>8</sup> para formar enlaces peptídicos entre aminoácidos.

La mezcla de reacción se mantiene entre -5 y -10 °C durante 2h. Después se agita durante 2h a temperatura ambiente.

Al término de la reacción, aparece un precipitado de color blanco ambarino que se separa por centrifugación. El sobrenadante se evapora al vacío y el residuo se disuelve en 5 mL de éter tilico.

Se procede a lavar el extracto con 8 mL de ácido clorhídrico 0,5 mol/L, 15 mL de agua destilada y dos porciones de 10 mL de disolución Tris 1 % (pH 8,5-8,9) y nuevamente con agua (2x10 mL). Finalmente, el éter se elimina al vacío. El producto permanece en el balón de reacción.

El primer método sintético para acoplar el éster metílico de la tirosina a la 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> se ejecutó con rendimientos del 28 al 33 %. Una vez concluida la reacción, se separó la dicitohexilurea, producto insoluble en disolventes tanto orgánicos como acuosos y después de ser evaporado al vacío el resto de éter, se obtuvo un producto grasoso de color ambarino de poca solubilidad en disolución amortiguadora de fosfato de sodio (0,5 mol/L, pH 7,5).

## METODO 2

A 0,020 g ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol) de 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> disueltos en 10 mL de acetonitrilo, se adicionan 0,025 g ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol) del hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida disueltos en 1 mL de agua destilada y 0,017 g ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol) de éster metílico de tirosina.

La reacción transcurre durante 24 h con agitación constante. Después de este tiempo, se evapora el disolvente al vacío y el sedimento que queda se disuelve en 25 mL de éter etílico.

El lavado de esta fracción, se lleva a cabo de la misma forma que el lavado en el método anterior. El rendimiento que se obtiene por este método está en el orden del 43 %.

## Marcaje radioisotópico de 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>-TME con <sup>125</sup>I

Se prepararon disoluciones de 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>-TME a concentraciones de 100 y 145 µg/mL en una disolución compuesta por ocho partes de disolución amortiguadora de fosfato sódico 0,5 mol/L, pH 7,5, una parte de etanol y otra de glicerina.

En un vial de polietileno con capacidad para 3 mL de volumen se depositaron 100 µL de disolución amortiguadora de fosfato sódico 0,5 mol/L, 100 µL de disolución de 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>, preparada como se indicó con anterioridad, 10 µL de Na<sup>125</sup>I, (100 µCi/mL), 100 µL de disolución de cloramina T (50 mg/mL) en disolución amortiguadora de fosfato de sodio 0,05 mol/L. Se homogeneizó el contenido de la reacción y se detuvo con 100 µL de disolución de metabisulfito de sodio (30 mg/mL) en disolución amortiguadora de fosfato sódico de concentración 0,5 mol/L, pH 7,5.

La purificación del producto final de la síntesis y el marcaje, se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, sobre columna Supelco C-8 (250X4,6) mm, dp = 5 µm, empleando como fase móvil la mezcla agua-etanol (50/50). Se estudió el efecto de la concentración de cloramina T y del tiempo sobre el marcaje. Las mediciones radiométricas de las fracciones cromatográficas (0,5 mL), se efectuaron en un detector de centelleo sólido de NaI con geometría de pozo acoplado a un radiómetro RFT-20046.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El esquema general de la síntesis de la 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>-TME-<sup>125</sup>I se muestra en la figura 1.

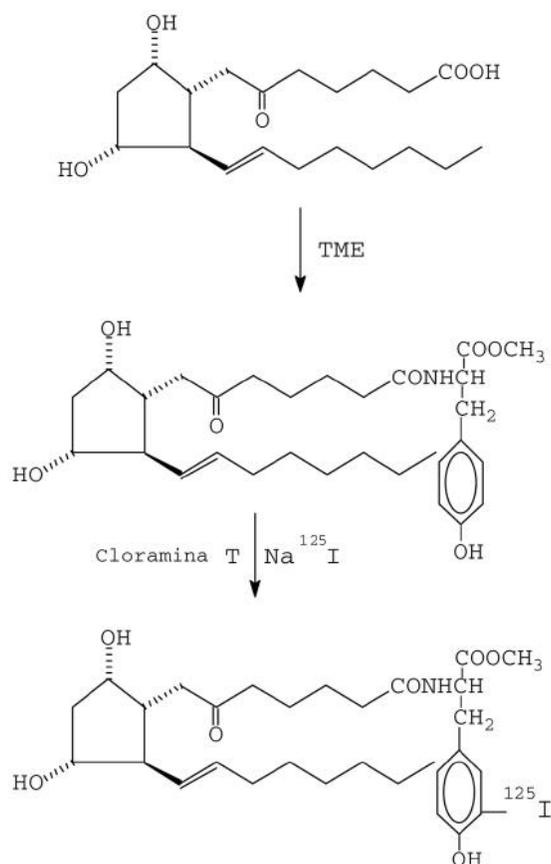


Fig. 1. Esquema de obtención de la 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>-TME-<sup>125</sup>I.

La 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> obtenida por transformación de la sal sódica de la prostaciclina presentó un alto nivel de pureza y los resultados de su análisis físico-químico se correspondieron con los reportados por Whittaker<sup>6</sup> y Johnson.<sup>7</sup>

Se comprobó la ausencia total de impurezas en el producto sintetizado. Se empleó como patrón la 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> de la firma Chinoín.

El valor del R<sub>f</sub> (0,26) en la CCD, empleando el sistema de fase móvil formado por acetato de etilo-ácido acético-isooctano-agua: 90-20-50-100 (fase orgánica), correspondiente a la 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> sintetizada coincidió con el del patrón empleado.

En el segundo método de reacción, los rendimientos se situaron entre un 3 y un 8 % . No se obtuvieron productos colaterales insolubles con el empleo de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.

De los experimentos realizados para marcar la molécula de 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>-TME, las mejores condiciones reportaron un 55 % de incorporación de iodo. La concentración de prostaglandina correspondió a 145 µg/mL, la de cloramina T a 50 µg/mL y el tiempo de marcaje se limitó a 30 s. Mayores tiempos de iodación se acompañan de una disminución del rendimiento de la reacción y una mayor degradación del producto deseado.

Después de efectuado el marcaje, el compuesto fue purificado por CLAR tomando como patrón el producto comercial (Amersham). Los tiempos de retención correspondientes a ambos compuestos resultaron idénticos y se manifestó una gran diferencia de movilidad del producto analizado con respecto a otras posibles impurezas del sistema. En ningún caso se detectó la presencia de algún derivado diiodado (Fig. 2).

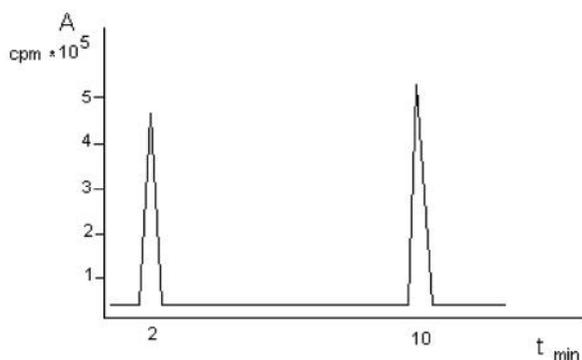


Fig. 2. Radiocromatograma de la 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>-TME-<sup>125</sup>I.  
Fase estacionaria: Supelco C-8 (5 μm).  
Fase móvil: etanol-agua (50 %).

El producto de elución cromatográfica en etanol al 50% fue colectado en frascos hasta una actividad aproximada de 70k Bq para su posterior examen de inmuno-competencia. En todos los casos, las muestras analizadas (correspondientes a ambas vías de síntesis) fueron confrontadas contra el juego de reactivos de la Amersham.

Dos réplicas de cada muestra sintética fueron incubadas con muestras de diferente concentración de 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> manteniendo la metodología de trabajo recomendada por el fabricante del juego comercial de reactivos empleado. Se demostró la inmuno-competencia del producto, lo cual permite

asegurar que el proceso de síntesis y marcaje no afecta en la molécula del derivado de prostaglandina aquellas partes en su estructura química encargadas del reconocimiento inmune.

## CONCLUSIONES

Se determinó que el método de síntesis óptimo es aquel que emplea al hidrocloreto de 1-etil-3-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida como agente condensante por ofrecer mejores rendimientos y ser más cómodo y sencillo en su ejecución.

El procedimiento de marcaje radioisotópico empleado, permite la inclusión adecuada del radionúclido escogido para marcar el producto de síntesis.

La purificación cromatográfica realizada permite obtener un producto inmuno-competente de elevada pureza.

## BIBLIOGRAFIA

1. Varfolomeiev S.D. i Mievj. A. T. Prostaglandini-molekuliarniie bioregulatori. Moskva. Izd. Moskovskogo Universitieta, 1985.
2. Moncada S. J. **Pharmacol.**, **16**, 71, 1985.
3. Sanders K. **Amer. Phys. Soc.**, **193**, 1857, 1984.
4. Toth. G, Mucha. I and Tanacs B. **J. of Chromatography**, **189**, 433, 1980.
5. Schneider W., Bundy G. **J. Amer Chem. Soc.**, **99**, 1222, 1977.
6. Whittaker N. **Tetrahedron letters**, **30**, 2627, 1977.
7. Johnson B., Lincoln F., Nidy E., Schneider W., Thompson J. and Axen V. **J. Amer. Chem. Soc.**, **100**, 7690, 1978.
8. Guershovich A.A. i Kibirev B.K. Sintez Peptidov. Reaguenti i metodi. Kiev, Naukoba Dumka, 1987.