

# SINTESIS, MARCAJE Y PURIFICACION DE LA PROGESTERONA-11-HS-TME-<sup>125</sup>I

R. Batista Medina y J. L. Santana Romero.\*

Centro de Isótopos, Avenida Monumental, km 3, Guanabacoa, Apartado Postal 22.

\*Instituto Superior de Ciencias y Tecnología Nucleares, Quinta de los Molinos, Avenida "Salvador Allende", Apartado Postal 6163, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 18 de mayo de 1994.

**RESUMEN.** En el presente trabajo se describe la síntesis de la progesterona-11-HS-TME a partir de la progesterona-11-OH. Primeramente, se sintetizó la progesterona-11-HS y posteriormente, la progesterona-11-HS-TME que fue la empleada en el marcaje con <sup>125</sup>I. Para la purificación de la hormona marcada se utilizó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. El producto marcado se empleó en la producción de juegos de reactivos para análisis radio-inmunológico.

**ABSTRACT.** In this work the synthesis of progesterone-11-HS-TME-<sup>125</sup>I from progesterone-11-OH is described. First the synthesis of progesterone-11-HS was made and then progesterone-11-HS-TME which was labeled with <sup>125</sup>I. The labeled product was purified by High Performance Liquid Chromatography and used in the production of RIA kits.

## INTRODUCCION

La progesterona es una hormona esteroidea muy vinculada con la reproducción en animales superiores. La concentración de esta en los diferentes fluidos biológicos puede dar una valiosa información sobre el ciclo menstrual y el proceso de gestación que se desarrolle en aquellos, por lo que se hace imprescindible disponer de procedimientos analíticos que permitan realizar la determinación cuantitativa de dicha hormona según lo establecido para análisis radio-inmunológico como práctica del buen hacer.

El objetivo del trabajo fue la obtención de uno de los componentes fundamentales del juego de reactivos de análisis radio-inmunológico para la determinación de la progesterona-11-HS-TME, marcada con <sup>125</sup>I.

## MATERIALES Y METODOS

El trabajo consta de cuatro etapas fundamentales. La primera consiste en la síntesis de la progesterona-11-HS-(11-hidroxo-4-pregnen-3,20-dion-11-hemisuccinato) según recomendaciones de Allen.<sup>1</sup>

A 330 mg de progesterona-11-OH ( $1,25 \cdot 10^{-3}$  mol) se le adicionaron 500 mg de anhídrido succínico ( $4,6 \cdot 10^{-3}$  mol) en 5 mL de piridina y se refluja la mezcla a 120 °C durante 3 h

(Fig. 1). Posteriormente, se destiló la piridina. Al residuo se le adicionaron 15 mL de HCl al 5 % de concentración a 5 °C. El producto de reacción se extrajo con dos volúmenes de 30 mL de acetato de etilo. Esta fase se lavó dos veces con agua destilada.

El producto de interés se reextrajo dos veces con 30 mL de una solución de NaOH 0,5 mol/L. Esta fase acuosa se lavó con cinco pequeñas porciones de éter dietílico para eliminar restos del producto de partida. Posteriormente, se acidificó con HCl hasta pH 3-4 y se extrajo la progesterona-11-HS con fracciones de éter etílico (30 mL). La fase orgánica se lavó con agua destilada y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se adicionó carbón activado para clarificar. Se filtró y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo se diluyó en benceno y tras adicionar algunas gotas de heptano, se dejó cristalizar el producto en frío.

Los cristales obtenidos se filtraron al vacío empleando una frita No. 4. Se ejecutó la cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice 60(Me rck), empleando como referencia un patrón comercial y se determinó el punto de fusión. El R<sub>f</sub> de ambos compuestos resultó coincidente y la temperatura de fusión coincidió con la que ha sido reportada<sup>1</sup> (155-157 °C).

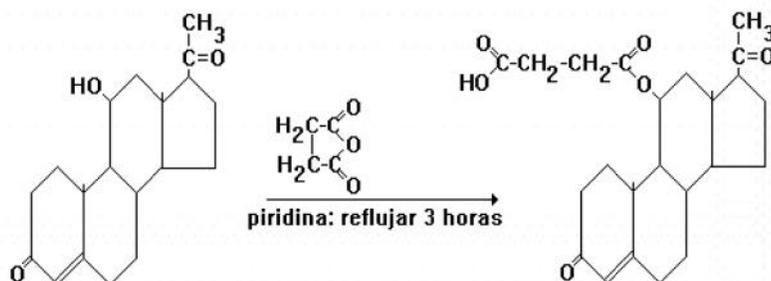


Fig. 1. Esquema de la reacción de la progesterona-11-OH y el anhídrido succínico.

En la segunda etapa, se realizó la síntesis de la progesterona-11-HS-TME (11-hidroxo-4-pregnen-3,20-dion-11-suc-

ciniltirosilmetil éster) (Fig. 2). Se disolvieron 15 mg de progesterona-11-HS ( $4 \cdot 10^{-5}$  mol) en 1 mL de dioxano seco. Se

adicionaron 12 mL de tri-n-butilamina y se enfrió hasta 8-10 °C. Esta mezcla se hizo reaccionar con 5 µL de isobutilcloroformiato durante 30 min. Paralelamente, se tomaron 7,8 mg ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol) de éster metílico de tirosina (TME) y se disolvieron en 0,35 mL de agua, a los cuales se les había adicionado previamente dos gotas de NaOH 20%. Se enfrió a 4 °C. A esta segunda disolución, se le adicionó la disolución en la que previamente se había activado la progesterona y se dejó en reposo a 4 °C durante 12 h.

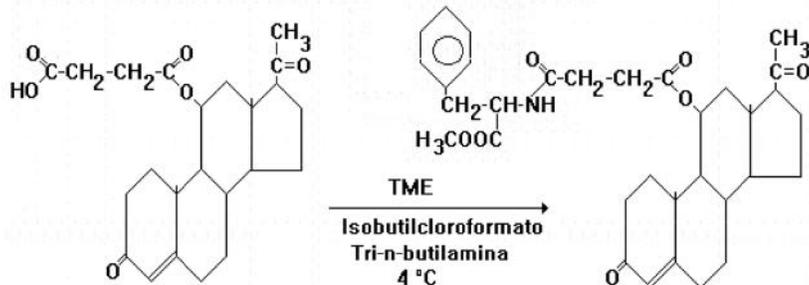


Fig. 2. Esquema de la reacción de la progesterona-11-HS y el éster metílico de tirosina.

En la tercera etapa de trabajo se realizó el marcaje radioisotópico del producto sintetizado con  $^{125}\text{I}$ , según el procedimiento de Sánchez y colaboradores.<sup>2</sup> La reacción se realizó en un tubo Eppendorf con capacidad para 3 mL. Se adicionaron sucesivamente los reactivos siguientes: 1 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (10 µL), solución amortiguadora de fosfato de sodio 0,25 mol/L (10 µL), progesterona-11-HS-TME disuelta en dioxano 20 µL (0,2 mg/mL), cloramina T disuelta en solución amortiguadora 20 µL (2 mg/mL). Se agitó vigorosamente con un vibrador durante 45 s. Posteriormente, la reacción se detuvo por la adición de 20 µL de metabisulfito de sodio (2 mg/mL) disuelto en la disolución amortiguadora de fosfato de sodio.

La cuarta y última etapa del trabajo, fue la purificación radiocromatográfica de la progesterona marcada. Para ello, se empleó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Se utilizó una columna Supelco C-8 (250X4,6) mm,  $\text{dp} = 5 \mu\text{m}$ . Como fase móvil se empleó la mezcla metanol:agua al 50%. La velocidad de flujo durante la separación fue de 1 mL/min. El equipo empleado fue de la firma JASCO. Se colectaron fracciones de 0,5 mL en tubos de vidrio. Para las mediciones se empleó un detector de centelleo sólido de NaI (Robotron).

Como método de validación de la hormona marcada se empleó la técnica de análisis radio-inmunológico. Se utilizaron los anticuerpos antiprogesteroa producidos en el Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de San José de Las Lajas, La Habana.

Para comprobar la identidad biológica del producto obtenido, este se hizo reaccionar con anticuerpos antiprogesteroa. El título de trabajo del antisuero para un 50% de enlazamiento del antígeno marcado fue de 1/70 000. La unión no específica se mantuvo por debajo del 3%. El desplazamiento de la hormona marcada, se probó en una curva de calibración de progesterona en presencia de antígeno marcado y sin marcar para evaluar la calidad del enlace antígeno-anticuerpo.

Se prepararon disoluciones de antígeno a diferentes concentraciones (0,25; 0,5; 1; 4; 8; 16 ng/mL)<sup>4</sup> en disolución amortiguadora de fosfato sódico 0,05 mol/L, pH 7,4. En cada tubo de ensayos empleado, se añadieron 10 µL de disolución

El producto de la reacción se extrajo con 10 mL de diclorometano, se lavó con agua destilada y se llevó a sequedad en evaporador rotatorio. Los residuos se aplicaron a una placa cromatográfica preparativa de gel de sílice 60F 254 de 2 mm de espesor preparada en el laboratorio y se desarrolló la separación, empleando el sistema de solventes cloroformo:metanol (6:1). La mancha en la placa se observó bajo una lámpara de luz UV a 254 nm, la zona se raspó y el producto se extrajo con cloroformo. Después de evaporar a sequedad, se obtuvieron 20 mg de un producto amorfo de color carmelita claro.

de hormona marcada (20 000 cpm), 100 µL de disolución de anticuerpo y 25 µL de disolución de antígeno en las disoluciones antes preparadas.

El mismo procedimiento con fines comparativos, se realizó con una hormona comercial (progesterona-11 $\alpha$ -HS-histamina- $^{125}\text{I}$ , Amersham).

## RESULTADOS Y DISCUSION

La eficiencia de marcaje se determinó como el valor porcentual de la radiactividad contenida en el producto deseado, previamente purificado por CLAR. Esta resultó del 91% para las condiciones óptimas del marcaje, constituyendo un valor muy adecuado para el trabajo.

La separación cromatográfica distinguió claramente la presencia de tres picos (Fig. 3).

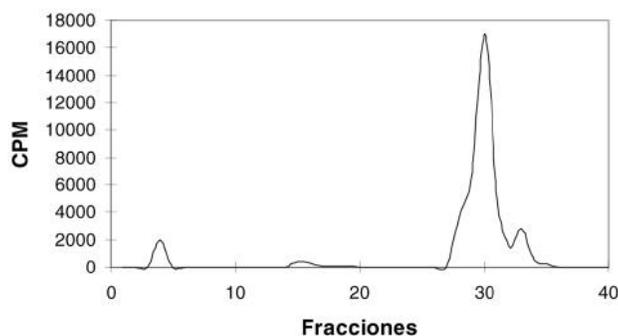


Fig. 3. Perfil de purificación de la progesterona-11-HS-TME- $^{125}\text{I}$ .  
Columna Supelco C-8 [(250X4,6) mm, 5 µm].  
Fase móvil: metanol-agua (1:1).

El primero correspondió al yoduro libre, como resultado de la reducción realizada con el metabisulfito de sodio y que por sus características tan polares eluye de la columna en primer lugar con un tiempo de retención de 2 min. El segundo pico correspondió a la hormona marcada con un tiempo de retención igual a 15 min y por último, a los 16,5 min eluyó la hormona diyodada.

El producto purificado por CLAR mostró excelentes condiciones como componente del juego de reactivos para análisis radioinmunológico (Fig. 4). El intervalo de trabajo resultó

comparable al de productos comerciales similares, destacándose la sensibilidad de detección que posee el método para el metabolito analizado.

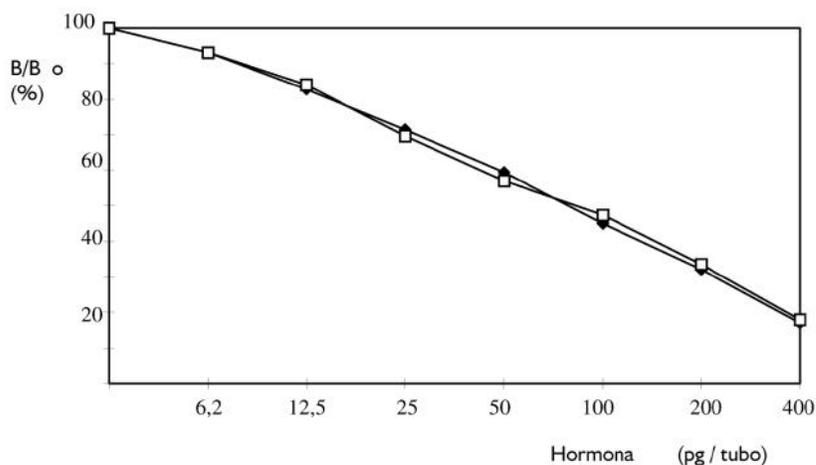


Fig. 4. Curva de desplazamiento de la hormona progesterona-11 $\alpha$ -HS-TME-125I y del patrón comercial escogido (Amersham).

### CONCLUSIONES

El método de síntesis, marcaje y purificación empleado es válido para la obtención de progesterona-11 $\alpha$ -HS-TME-<sup>125</sup>I apta para ser empleada satisfactorialmente como componente de un juego de reactivos para el análisis radio-inmunológico.

### BIBLIOGRAFIA

1. Allen R.M. and Redshaw M.R. **Steroids**, **32**, No.4, 1978.
2. Gómez C. and Milewich L. **J. Lab. Clin. Med.**, **80**, No.4, April, 1990.
3. Ria and related procedures in medicine. Proceeding of International Symposium. OIEA. OIEA publications, Vienna, 147-160, 1982.
4. Hukman F. and Beriming R. **J. Agric. Sci. Camb.**, **81**, 151, 1973.