

MARCACIÓN DE IL-2 (INTERLEUKINA 2) CON ^{99m}Tc POR UN MÉTODO INDIRECTO: ENSAYOS PRELIMINARES.

Bocco R*, Obenaus E., Rabiller G., Castiglia S.G. de

Comisión Nacional de Energía Atómica, CAE- Grupo Radiofarmacia. U.A. Radioquímica

*rbocco@cae.cnea.gov.ar

Introducción:

Las enfermedades inflamatorias crónicas, tales como las enfermedades autoinmunes específicas de determinados órganos, están caracterizadas por una continua, lenta y progresiva infiltración de células mononucleares en el órgano blanco. Pueden ser clasificadas como: Órgano específicas o Sistémicas dependiendo de si la respuesta es primariamente contra antígenos específicos del tejido o antígenos ampliamente distribuidos en el organismo.

La infiltración mononuclear libera in situ varias citoquinas diferentes (IL1, IL2, IL4, IL10, IL12, IFN γ y otras) que por procesos complejos parecen ser importantes para la evolución de la enfermedad. Las citoquinas, autoanticuerpos y linfocitos activados reaccionan contra sus propios antígenos y también se detectan en sangre periférica.

Esta infiltración puede preceder a la aparición de síntomas clínicos por varios meses o años.

El diagnóstico clínico de una enfermedad autoinmune órgano específica suele hacerse cuando los síntomas del tejido blanco demuestran hipofunción

La marcación de IL2 u otras citoquinas con ^{99m}Tc es una interesante alternativa para el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades autoinmunes, mediante imágenes realizadas en Medicina Nuclear.

Estas técnicas se basan en la inyección intravenosa de compuestos radiomarcados que se acumulan en sitios de inflamación como resultado de la extravasación no específica o la unión a componentes inflamatorios.

. La marcación de compuestos bioactivos con ^{99m}Tc requiere entonces la conjugación a un agente quelante bifuncional.

La interleukina-2 (IL-2) es una glucoproteína globular de 15.5 KD que induce la proliferación de los linfocitos T (LT) de manera autocrina y favorece la expansión clonal de las células que han sido impactadas por el antígeno.

También actúa de manera paracrina, ejerciendo su acción sobre células vecinas del sistema inmune o no.

Las principales acciones de la IL-2 se ejercen sobre los linfocitos T, ellas conducen a una expansión de la respuesta inmune cuya magnitud puede ser estimada por estimación de los niveles de interleukina 2.

Objetivo del Proyecto :

El objetivo del proyecto es obtener la interleukina-2 marcada con ^{99m}Tc, estable in vivo y que retenga su capacidad de unión a receptores una vez marcada para poder ser usada en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes.

Aportar elementos que permitan obtener una mejor comprensión del proceso inflamatorio- infeccioso y permitir el diagnóstico precoz de las enfermedades autoinmunes y posibilitar de esta manera el correcto tratamiento de las mismas.

Procedimientos:

Marcación de IL-2 Post- conjugación: El quelante utilizado para la conjugación fue el NHS- Hynic, que es un derivado de la hidrazino nicotinamida.

La técnica empleada fue la siguiente: a 30 μg de IL-2 se le agregó 1.5 μl de HCO_3^- pH = 8.5 luego se agregó la cantidad correspondiente de NHS- Hynic según la relación molar utilizada.

También se probaron conjugaciones doblando la cantidad de IL-2.

Se preparó una solución de NHS- Hynic en DMF anhidro de concentración 1 mg/ml. La conjugación se realizó con diferentes relaciones molares quelante /péptido: 10/1, 20/1, 50/1, 100/1, se dejó incubando durante 1 hora y luego se purificó en una columna Sephadex G-25 cuyo rango de corte es de $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$. Una vez medido el volumen muerto que fue de 5 ml se eluyó el conjugado con acetato de amonio.

Para la marcación del conjugado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se utilizó tricina como coligando y se empleó la siguiente técnica: a 500 μl de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se le agregaron 200 μl de IL-2 conjugada luego 500 μl de una solución de tricina en ácido succínico 0.025 M pH = 5.5 (1mg/ml) y 13 μl de una solución (2 mg/ml) de SnCl_2 en HCl 0.1N.

Se utilizó el mismo método de conjugación y marcación pero empleando Albúmina, proteína que se usó como modelo dado el costo de la interleukina-2.

Se controló el avance de la reacción desde la conjugación hasta la marcación, utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa para la interleukina-2 y HPLC con una columna de permeación de geles (GPC) para la Albúmina.

Marcación Pre- conjugación: Previo a la conjugación se marcó el quelante s-benzoil MAG_3 (Mercaptoacetiltriglicina) con 100 μl de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ con un rango de actividad de 1-3 mCi, luego se agregó 200 μl de Buffer tartrato de Sodio pH = 6 y 15 μl de una solución (2 mg/ml) de SnCl_2 en HCL 0.1 N, se calentó durante 30 minutos a 90 °C. Para la marcación se utilizaron diferentes relaciones molares s-benzoil MAG_3 / $^{99\text{m}}\text{Tc}$: 4/1, 3/1, 2/1 para encontrar una relación molar óptima.

También se probaron diferentes cantidades de SnCl_2 , entre 5-20 μl para obtener un mayor porcentaje de benzoil MAG_3 marcado sin impurezas.

La marcación de IL-2 con s- benzoil MAG_3 requiere la formación de un éster activo el cual se obtuvo agregando TFP (tetrafluorfenol) y 50 mg de (1- etil - 3- (3 dimetilamoni- propil) carbodiimida) EDC y una relación molar s- benzoil MAG_3 / TFP: 1/10, 1/15, 1/20. Luego se incubó durante 40 minutos.

Finalmente, el éster activo se purificó por Sep- Pack el cual se activó con metanol y agua.

Una vez sembrada la muestra, la primera elución se realizó con agua para eliminar la amina formada, luego se secó bien y se eluyó el éster con acetonitrilo, se colectó en diferentes eppendorf una cantidad de 300 μl y el colectado de mayor actividad se controló por HPLC en fase reversa.

Luego de llevar a sequedad el éster activo purificado en atmósfera de N_2 , se conjugó con la Albúmina al 20 % en una relación molar 150/1, se dejó incubando durante 30 minutos y el conjugado se controló en HPLC, usando una columna GPC.

El mismo método se empleó para la marcación de la IL-2 usando diferentes relaciones molares IL-2/ éster activo marcado: 150/1 y 300/1, 100/1, 16/1, 1/1.

Resultados:

Marcación Post- conjugación: no se pudo obtener IL-2 marcada por este método a pesar de modificar diferentes parámetros. Sin embargo, el método dio resultado

cuando se empleo la albúmina, obteniéndose un rendimiento de marcación del 80 % (fig. 1).

Marcación Pre- conjugación: Se obtuvieron resultados satisfactorios tanto en la marcación del s- benzoil MAG₃ (Fig. 2) como en la formación del éster activo (Fig.3) y en la posterior conjugación con la albúmina (Fig.4). Se probaron diferentes cantidades de SnCl₂ para obtener una menor cantidad de ^{99m}Tc libre y se buscó una relación molar óptima de s- benzoil MAG₃/^{99m}Tc para lograr mayor porcentaje de s- benzoil MAG₃ marcado.

Cuando se aplicó dicho modelo a la IL-2 se observa en la figura 5 que la misma pudo ser marcada, siendo el tiempo de retención de 12 minutos, aunque el rendimiento de marcación es menor que en el caso de la Albúmina pero que estaría de acuerdo a los datos bibliográficos que dan un rendimiento de marcación no mayor al 20 %.

Se encararán ensayos para purificar el producto por el método mas conveniente y una vez purificada se realizarán los ensayos in vivo e in vitro.

Conclusiones

Se ensayaron dos métodos indirectos de marcación de biomoléculas con ^{99m}Tc: post- conjugación y pre- conjugación. En el primero de los casos no se pudo obtener IL 2 marcada. Dado que es una molécula muy costosa y con la intención de comprobar que el método funciona, se tomó la molécula de albúmina como modelo y se realizaron marcaciones con ^{99m}Tc, conjugando con NHS- Hynic y utilizando tricina como coligando. Por este método se obtuvo un rendimiento del 80%, lo cual requirió una purificación posterior. Una vez comprobada la factibilidad de esta metodología en otras biomoléculas y asumiendo que no se obtenían resultados positivos con la interleukina, se continuó con la utilización del método de pre- conjugación empleando s- benzoil MAG₃ como quelante. De esta manera se pudo obtener albúmina marcada con un rendimiento de marcación de 75%. Dados estos resultados satisfactorios, se utilizó la misma metodología para marcar interleukina 2. Los resultados mostraron que la IL-2 puede ser marcada por este método, quedando por realizar su purificación y los estudios preclínicos para comprobar su factibilidad en el estudio de enfermedades autoinmunes.

Referencias:

- “ Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: A review” M. Chianelli, S.J Mather, Martin Comin and Signore. M. Nucl. Medicine Communications, vol. 18, 437-455 (1997)
- “Imaging of autoimmune diseases” E.Procaccini, M Chianelli, P. Pantano, A. Signore..The Quarterly Journal of Nucl. Med., Vol 43 - N° 1 pp. 100 - 112 (Marzo 1999)
- “ A Simple method for the evaluation of receptor binding capacity of modified cytokines”. Marco Chianelli, Alberto Signore, Ray Hicks, Roberto Testi, Marcello Negri Peter Beverley . Journal of Immunological Methods, 166: 177-82, (1993)
- “The Development of Technetium-99-Labelled Interleukin-2: A new Radiopharmaceutical for the In Vivo Detection of Mononuclear Cell Infiltrates in Immune-Mediated Diseases.” Marco Chianelli, Alberto Signore, Alan Fritzberg and Stephen Mather. Nuclear Medicine and Biology, Vol. 24, pp 579-586, (1997)

- “ Specific and Rapid Scintigraphic Detection of Infection with ^{99m}Tc -Labeled Interleukin-8” Huub Rennen, Otto Boerman, Wim Oyen, Jos van der Mer and Frans Corstens. Journal of Nuclear Medicine , Vol 42 N°1 117-123 (2001) by Society of Nuclear Medicine.
- Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) Cátedra de Inmunología. Temas de Actualización “Las citoquinas y sus receptores” Prof: Dra. Elida Alvarez
- “Three- Dimensional structure of IL-2”. Barbara J. Brandhuber, Tom Boone, Willian C. Kenney, David Mckay. Science, Vol. 238, pag. 1707-1709 (1987)
- “ Diagnostic Use of Radiolabelled Cytokines and Chemokines” A. Signore, M. Chianelli, C. Alessandria, G DE Toma, F Scopinaro. Technetium, Rhenium and other Metals in Chemistry and Nuclear Medicine 6. Marino Nicolini Ulderico Mazzi. SGE Editoriali – Italy pag. 637-645 (2002)
- “ Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix” Barbara Carnemolla, Laura Borsi, Enrica Balza, Patricia Castellani, Raffaella Meazza, Alexander berndt, and Silvano Ferrini Blood, vol. 99 N° 5 pag 1659-1664 (2002)
- “Reversed-Phase Chromatography of Interleukin-2 Muteins”. Michael Kunitani. Pamela Hirtzer, Robert Halenbeck, Albert Boosman. Journal of Chromatography, 359 391-402 (1986)
- “Interleukin-2-Self-Association” J.D. Fleischman, D.Wentworth, F. Valencic, K.A. Koehler. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol.152, N°2, pags 879-885 (1988)
- “Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications”. Kendall A. Smith. Science Vol 240 Pags 1169-1176 (1988)

Gráficos:

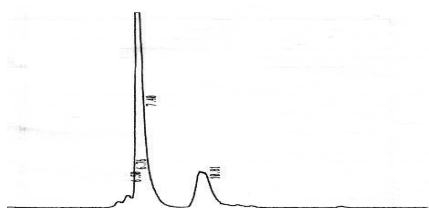


Fig. 1: Cromatograma de ^{99m}Tc – NHS-Hynic- Albúmina en HPLC con columna GPC.

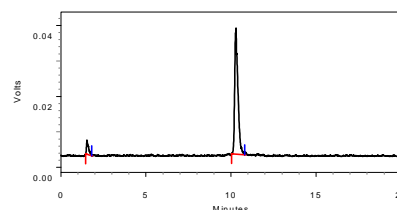


Fig 2: Cromatograma de ^{99m}Tc -s- benzoil Mag3 en HPLC en FR

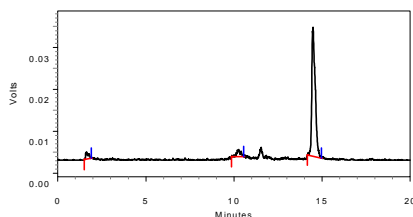


Fig. 3: Cromatograma de ^{99m}Tc s- benzoil Mag₃- TFP en HPLC en FR

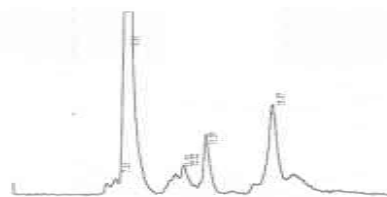


Fig. 4: Cromatograma de (^{99m}Tc - s- benzoil Mag₃)- Albúmina en HPLC con columna GPC

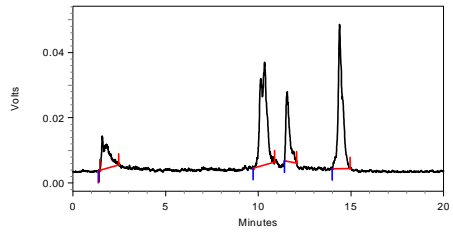


Fig. 5: Cromatograma de ^{99m}Tc (s-benzoil MAG_3) IL 2 en HPLC en FR

IL-2 LABELED WITH TECHNETIUM 99m BY AN INDIRECT METHOD.

Bocco R*, Obenaus E., Rabiller G., Castiglia S.G. de

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

IL-2 and the other cytokines labeled with ^{99m}Tc are an interesting option to early diagnosis of autoimmune diseases and monitoring with nuclear medicine images.

The aim of this study was to obtain by indirect method IL-2 labeled with technetium-99m using Benzoil MAG3 chelating agent, for in vivo diagnosis of lymphocytic infiltration. IL-2 is a small, relatively fragile protein, and it is essential to retain its receptor binding capacity after labeling.

Two different methods of labeling have been proven:

Pre-conjugation labeling method: we used NHS- Hynic as a chelator agent and labeled this conjugated protein with ^{99m}Tc using tricina as coligand.

Albumin was used as a model for the conjugation and labeling steps

The albumin was labeled by this method with a good labeling efficiency but the IL-2 protein couldn't be labeled with this approach.

Post-conjugation labeling method: We used the bifunctional chelating agent, benzoil MAG3, this ligand is first labeled with ^{99m}Tc and then is conjugated to the protein.

The N_3S ligand complex was incubated for 30 minutes and then measured by RP- HPLC.

An active ester of the labeled ligand was formed and was incubated with IL-2 at room temperature and basic pH to promote the conjugation between the active ester and the protein

The labeling efficiency was determined by RP-HPLC using a C18 column.

The albumin protein was also labeled by this method and the radiochemical purity was measured by RP- HPLC using a GPC column and the labeling efficiency was 80 %.

The next objectives are to explore different strategies for purifying the ^{99m}Tc -IL-2 and to evaluate the capacity of IL-2 to bind to its receptor after labeling.