



# <sup>99m</sup>Tc-Tocilizumab un nuevo agente de imagen molecular en Mieloma Múltiple

E. Gutiérrez<sup>a</sup>, X. Camacho<sup>a</sup>, V. Calzada<sup>a</sup>, M. Fernández<sup>a</sup>, M.F. García<sup>a</sup>,  
W. Porcal<sup>c</sup>, N. Oddone<sup>d</sup>, M. Moreno<sup>e</sup>, J. Benech<sup>d</sup>, J.A. Chabalgoity<sup>e</sup>, A. Pandiella<sup>f</sup>, E.  
Riva<sup>b</sup>, P. Cabral<sup>a</sup>.

a) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

b) Clínica Hematológica, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

c) Grupo de Química Medicinal, Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

d) Señalización celular y nanobiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

e) Biotecnología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

f) Centro de Investigación del Cáncer-Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-USAL, Salamanca, España.

## Resumen

La interleucina 6 (IL-6) es una molécula clave en la patogénesis del Mieloma Múltiple (MM). La sobre-expresión de su receptor, IL6R, en las células de MM se puede utilizar como blanco para el desarrollo de potenciales agentes moleculares para su diagnóstico. El Tocilizumab (Actemra®) es un anticuerpo monoclonal contra IL6R.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo y evaluación, a través de distintos métodos químicos y biológicos, la marcación de <sup>99m</sup>Tc-Tocilizumab utilizando dos agente quelantes, Succidinimyl-hidrazinonicotinamida (HYNIC) y tricarbonilo.

En primer lugar se derivatizó el Tocilizumab (Roche) con HYNIC y se marcó utilizando <sup>99m</sup>Tc/tricina/Sn<sub>2</sub>Cl a temperatura ambiente. La marcación del anticuerpo con [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> se llevó a cabo incubando 45 min a 37°C. La pureza radioquímica (PQR) fue evaluada por ITLC-SG y HPLC. Se realizaron estudios in-vitro de unión y competencia con células de MM U266 hasta 120 minutos. Se obtuvieron imágenes fluorescentes y por microscopía de fuerza atómica de las células U266. Se realizaron estudios in-vivo en ratones CD1 normales (n=3).

Se observó una PRQ mayor a 90% con ambos quelantes utilizados, siendo estable y sin mostrar transquelación significativa al menos durante 24 hs. La microscopía confocal mostró la capacidad del Tocilizumab-FITC para reconocer IL6R en las células U266. Los experimentos in-vitro de unión y desplazamiento confirman la especificidad de reconocimiento del <sup>99m</sup>Tc-Tocilizumab por IL6R. Los estudios de biodistribución mostraron absorción hepática y eliminación renal principalmente.

De los resultados obtenidos se concluyó que ambos marcados del Tocilizumab con <sup>99m</sup>Tco<sub>4</sub>-, vía HYNIC y vía tricarbonilo, podrían ser potenciales agentes de imagen para el diagnóstico de Mieloma Múltiple.

**Palabras claves:** MIELOMA MÚLTIPLE  
TOCILIZUMAB; IL-6 RECL; IL-6 FAMILY CYTOKINE  
TRICARBONILO  
HYNIC

## INTRODUCCIÓN

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia de la línea linfóide B que se caracteriza por la proliferación clonal de células plasmáticas malignas en la médula ósea y se asocia con presencia de componente monoclonal o proteína M en sangre y/o suero (1). Representa la segunda neoplasia hematológica en frecuencia, el 10%

de todas las neoplasias malignas hematológicas en los caucásicos y el 20% en los afroamericanos (2,3), el 1% de los tumores malignos.

Una de las principales moléculas involucradas en la patogenia del MM es la interleucina 6 (IL-6). Esta es un polipéptido perteneciente a la clase de las citocinas helicoidales, secretada por un amplio rango de células.

Posee actividad antiinflamatoria y proinflamatoria, además es capaz de estimular la producción hipofisaria de ACTH. Interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, activa linfocitos T citotóxicos, las células plasmáticas, modula la hematopoyesis y es la responsable junto con la IL-1, de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, siendo uno de los mediadores más importantes de la fiebre y de la respuesta de fase aguda (4-6). La desregulación de su producción causa diferentes situaciones patológicas, como enfermedades autoinmunes, inflamatorias, y linfoproliferativas. Se ha demostrado que la IL-6 está implicada en enfermedades tales como artritis reumatoide (RA), enfermedad de Castleman, artritis idiopática juvenil (AIJ), y enfermedad de Crohn (7). La IL-6 también se ha identificado como un factor crucial para el crecimiento, supervivencia y proliferación de las células de MM, tanto in-vivo como in-vitro. (4,8,9)

Se sabe que los anticuerpos anti-IL6 bloquean el crecimiento in-vitro de células en plasma y la proliferación tumoral, en líneas celulares de mieloma y en pacientes tratados con estos anticuerpos (10). El Tocilizumab (TCZ) es un anticuerpo monoclonal humanizado de la clase de IgG1, producido por tecnología del ADN recombinante. Esta dirigido contra el receptor tanto soluble (IL-6s), como de membrana (IL-6m), de la IL-6 bloqueando la señalización mediada por estos (11-13).

Actualmente al menos el 80% de los radiofármacos utilizados en Medicina Nuclear para diagnóstico son compuestos marcados con Tecnecio 99 metaestable (<sup>99m</sup>Tc). Su elección para su uso en Medicina se basa en las características fisicoquímicas del mismo, como su tiempo de vida media (T1/2) de 6.04 hs, su modo de decaimiento por transición isomérica y una emisión de radiación gamma de 140 keV de energías (14). El mismo es fácilmente obtenido a partir de generadores <sup>99</sup>Mo-<sup>99m</sup>Tc en una forma estéril, apirógeno y libre de portador (9,10).

Existen varias estrategias de marcación de péptidos y proteínas con <sup>99m</sup>Tc. Para el desarrollo de este trabajo se realizará la marcado a través de distintos agentes quelantes bifuncionales (BFC), utilizando el Succidinimyl-hidrazinonicotinamida (HYNIC) y el compuesto organometálico [(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (CO<sub>3</sub>).

El HYNIC se ha empleado para el marcado de Ac monoclonales con <sup>99m</sup>Tc así como para de proteínas, pequeñas biomoléculas, liposomas y péptidos. Entre las ventajas de utilizarlo como BFC se encuentra su alta eficiencia de marcado y las altas actividades específicas obtenidas. Debido a que el HYNIC sólo ocupa uno de los dos sitios de coordinación, es necesario para la total complejación del Tc, utilizar un coligando como la tricina. La conjugación se produce entre el HYNIC y el grupo amino épsilon de los residuos de lisina de las proteínas, dando así un conjugado HYNIC-proteína. Finalmente se obtiene un conjugado coordinado por dos moléculas de Tricina y por el átomo N-terminal del grupo hidracina del HYNIC que posteriormente es marcado con <sup>99m</sup>Tc. (14-17)

Por otro lado la síntesis de rutina de compuestos organometálicos acuosos de iones [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, se realiza directamente a partir de [<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> en solución de NaCl 0,9% bajo atmósfera de CO. La posterior sustitución de los ligandos lábiles de agua por un ligando bifuncional conectable a las biomoléculas permite la introducción del complejo carbonílico. Se ha visto que utilizando este ligando se obtiene altas actividades específicas y complejos muy estables (18,19).

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de la marcación y evaluación radioquímica y biológica del Tocilizumab con <sup>99m</sup>Tc. La posibilidad de marcar el TCZ con <sup>99m</sup>Tc permitiría determinar la topografía en donde se observa un aumento de la expresión de IL-6, con la consecuente posibilidad que esté asociado a un proceso infeccioso u neoplásico. De esta forma se podría emplear como un potencial agente imagen molecular para evaluar localización y extensión de la lesión, así como para el seguimiento de pacientes con Mieloma Múltiple.

## METODOLOGÍA

DERIVATIZACIÓN, MARCACIÓN Y CONTROLES DE CALIDAD HYNIC-TCZ CON <sup>99m</sup>Tc

Tocilizumab (Actemra®) 20 mg/mL producido por Genentech, Inc., fue proporcionado por Laboratorios Roche. La reacción de conjugación se inició por adición de 33 µL de NaHCO<sub>3</sub> 1M a 0.067 µmol de TCZ. Luego se añadió 0.33 µmol de Suc-HYNIC en 7.1 µL DMSO (J. T. Baker). La mezcla se incubó a 18 – 25 °C por 30

minutos en oscuridad, pH 8. El conjugado se purificó, para separar el HYNIC libre, por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Sephadex G-25 (SEC) (PD-10, Amersham Biosciences). Se realizó MALDI-TOF/TOF 4800 (Abi Sciex) para determinar la relación de conjugación de HYNIC con el TCZ.

Para lograr óptimas condiciones de marcado, se disolvió 44.6  $\mu\text{mol}$  de tricina (N-[Tris(hidroximetil)-metil]glicina, Sigma) en 0.8 mL de agua, se ajustó el pH a 4.5 - 5 con 0,05 mL de HCl 2.0 M (solución A). En un segundo vial se disolvió 44.3  $\mu\text{mol}$ s de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (J. T. Baker) en 0.5 mL HCl 2.0 M y 0.05 mL de esta solución se adicionó al vial de tricina. Finalmente se ajustó el volumen a 10 mL con solución NaCl 0,9 % (solución B). 25  $\mu\text{L}$  de la solución B se adicionó a 0.067  $\mu\text{mol}$  de HYNIC-tocilizumab, e inmediatamente se adicionó  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  (Generador TecnoNuclear  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), no más de 1 mL. La mezcla se incubó a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 30 minutos.

La pureza radioquímica (PRQ) fue evaluada utilizando cromatografía de exclusión molecular (SEC). Se utilizaron sistemas cromatográficos ITLC-SG (Pall Corporation) y NaCl 0,9 % ([Rf=0,  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TCZ], [Rf=1,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina y  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ]); ITLC-SG embebido en albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) y EtOH: $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (2:1:5) ([Rf=0,  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ], [Rf=1  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina,  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TCZ]), y papel Whatman N°1 (Whatman International Ltd) y MEK ([Rf=0,  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TCZ], [Rf=1,  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ]) como fases estacionarias y móviles respectivamente. Los niveles de actividad se midieron luego de la incubación en un contador de centelleo sólido Capintec CRC7 con detector de cristal "3x3" de NaI(Tl) asociado a un analizador multicanal ORTEC.

También se evaluó la PRQ por HPLC (Agilent 1200, Agilent Technologies, Italia) utilizando una columna Protein-Pak SEC, 300 Å,  $\mu\text{m}$ , 7.5mm X 300 mm, 10K-500K (Waters Corporation), modo isocrático, con buffer fosfato 0,1 M, pH 7,0, flujo 1ml/min, equipado con detectores UV y NaI (TI).

MARCACIÓN Y CONTROLES DE CALIDAD DE TCZ A TRAVÉS DE  $(\text{CO})_3$  CON  $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Se adicionó 1 ml de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  al kit de Isolink TM (Mallincrodt, USA). Se calentó en baño de agua

hirviendo durante 20 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente la solución se ajusta a pH 7,0 con HCl 0,2 N. Para el marcado se agregan 74 MBq de  $[\text{CO}_3(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^{+}$  a 1 mg de TCZ, se incubó la mezcla en solución a temperatura ambiente durante 40 minutos a 37 ° C.

En este caso la PRQ fue evaluada igualmente por SEC y HPLC. Se utilizó el sistemas cromatográfico ITLC-SG y NaCl 0,9 % (Rf=0,  $[\text{CO}_3(\text{CO})_3\text{-TCZ}]$ , Rf=1,  $[\text{CO}_3(\text{CO})_3]$ ) como fases estacionarias y móviles respectivamente. Las condiciones de medida y de HPLC utilizadas fueron las mismas que para el marcado vía HYNIC.

#### ESTUDIOS DE ESTABILIDAD IN-VITRO

Para estudiar la estabilidad de los radiomarcados se realizaron estudios in-vitro desafiando la transquelación del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  a distintas condiciones. Para ambos casos los estudios fueron analizados por HPLC, con las condiciones mencionadas anteriormente, a 1, 4 y 24 H.

Para el conjugado  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TCZ se estudió la estabilidad en solución de NaCl 0.9 %, suero fetal bovino (SFB), PBS y L-Cisteína a dos concentraciones diferentes, 0.1 y 1 mM a 37 °C. Para el radiomarcado  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-TCZ}$  se realizó una comparación de la estabilidad en solución NaCl 0.9 % a 25 y 37°C. También se analizó la estabilidad en SFB a 37°C.

#### CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA EN RATONES NORMALES BALB/C.

Todos los protocolos de trabajo utilizados con ratones fueron sometidos previamente a aprobación por el Comité Nacional de Experimentación Nacional (CHEA, Uruguay). Se utilizaron ratones Balb/C normales de seis semanas (n = 3 por grupo), los cuales fueron inyectados por la vena de la cola con aproximadamente 1,8 MBq de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TCZ, para ambos agentes quelantes. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical después de las 4, 16 y 24 h de inyección para el radiomarcado  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TCZ y a 1, 4 y 24 hs para el radiomarcado  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - $(\text{CO})_3\text{-TCZ}$ . Se seleccionaron los tejidos: corazón, hígado, pulmones, bazo, tiroides, riñones, músculos, huesos, estómago, tracto intestinal (TI) y vejiga). Se enjuagó la sangre residual y se midió su actividad en un detector de NaI (TI). La orina y la sangre, también se recogieron y se midió su actividad. Se expresó la

captación como porcentaje de dosis inyectada (% DI) y dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g).

#### IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL

Esta técnica se utilizó para observar la unión del TCZ a los antígenos de la membrana plasmática de células U266. Para obtener imágenes de fluorescencia se realizó primero la conjugación FITC-Tocilizumab y luego se analiza en el microscopio de fluorescencia.

#### ESTUDIOS IN-VITRO DE UNIÓN CELULAR

Los estudios de unión se llevaron a cabo utilizando la línea celular de MM U266 (ATCC) que sobre-expresan el receptor de IL-6. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo PBS (7.4) durante dos semanas. El número de células se determinó por citometría de flujo,  $1 \times 10^6$  células/ml de medio de cultivo se fraccionaron de a 1 ml. Luego se adicionan 20  $\mu$ l de radiomarcado (1  $\mu$ Ci/tubo) y se incubaron a 37 °C durante 30, 60 y 120.

Paralelamente se realizó un ensayo de desplazamiento para poder determinar la unión específica del TCZ a los antígenos, IL-6R, expresados en la membrana de las células. Dicho ensayo se llevó a cabo incubando conjuntamente durante 120 minutos  $1 \times 10^6$  células/ml con 1 ml (20  $\mu$ g/ml) de TCZ no marcado y con 20  $\mu$ l de radiomarcado a una concentración final de 55 nM.

Una vez transcurridos los tiempos de incubación, las células fueron centrifugadas tres veces por 3 minutos

a 3000g, el sobrenadante es aspirado y el pellet conteniendo las células es lavado dos veces con PBS 0,5 M. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado. Finalmente se midieron todas las muestras juntas por detección gamma al finalizar el ensayo en el contador PICKER COMPAC 120 CPM.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no apareada t. Fue considerado significativo un valor de  $p \leq 0,05$ .

### RESULTADOS

#### DERIVATIZACIÓN, MARCACIÓN Y CONTROLES DE CALIDAD HYNIC-TCZ CON <sup>99m</sup>Tc

Suc-HYNIC fue conjugado con TCZ a temperatura ambiente por 30 min. Se utilizó una columna PD10 para separar el HYNIC-TCZ conjugado del HYNIC libre. Más del 90% de la cantidad inicial de anticuerpo fue recuperado según lo que se monitoreo por absorbancia UV a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de 1.4.

La relación m/z para el HYNIC-TCZ (MH+)<sup>2+</sup> fue de 148.590 y para el TCZ (M+) fue de 147.626. Con las masas obtenidas por MALDI-TOF y usando como referencia la masa de HYNIC, se determinó que están unidos, un promedio de cuatro moléculas HYNIC por molécula de anticuerpo (Figura 1A y 1B).

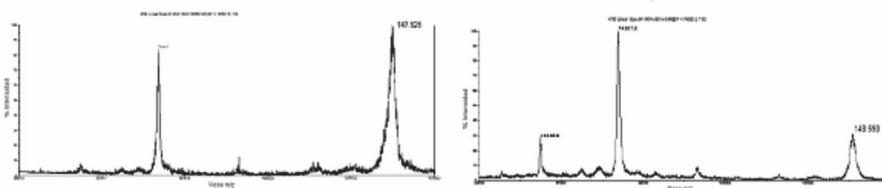


Figura 1. A. Espectrometría de masa MALDI-TOF de Tocilizumab, se observa el pico correspondiente al anticuerpo a los 147.626 Da. B. MALDI-TOF de HYNIC-Tocilizumab, se observa el pico correspondiente al conjugado a los 148.590 Da.

Las condiciones óptimas de marcado de HYNIC-TCZ fueron determinados examinando diferentes concentraciones de tricina y SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O en la reacción de marcado. La eficiencia de marcado de anticuerpo obtenido fue de  $92.0 \pm 4$  % con una relación de radio molar de tricina/SnCl<sub>2</sub> 9:10. El rendimiento de marcado fue confirmado por SEC y HPLC. El <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-TCZ se eluyó a 3 – 4 mL y el <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> y <sup>99m</sup>Tc-Tricine libre a 7 – 8 mL en una columna PD-10 con solución salina.

La caracterización por HPLC mostrada como tiempo de retención (Rt) para el Tocilizumab sin marcar fue de 7.73 min determinado por detección UV (Figura 2). A su vez se determinó el Rt para  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TCZ, el cual fue de 7,83 min, tanto por detección UV como gamma (Figura 3A y 3B). Se observaron además, en el espectro gamma, pequeños picos con Rt 11,85 y 13,18 min. A fin de determinar las identidades de estos picos se realizaron controles de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , TCZ-

HYNIC y tricina libre mostrando Rt de 13,15, 7,17 y 12,38 min, respectivamente. Por tanto los picos observados corresponden a tricina y  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . La PRQ determinada por el área del pico correspondiente al conjugado marcado fue de 92%, repitiéndose el porcentaje de PRQ obtenido mediante SEC.

Posteriormente el marcado se purificó y se obtuvo un único pico con un Rt de 7,85.

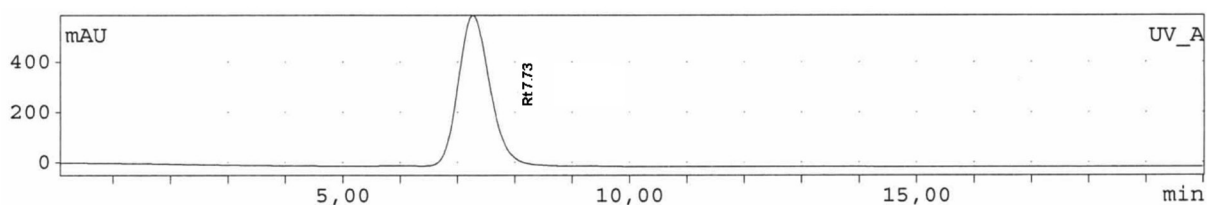


Figura 2. Espectro UV obtenido por HPLC para el Tocilizumab sin marcar, Rt = 7.73 min.

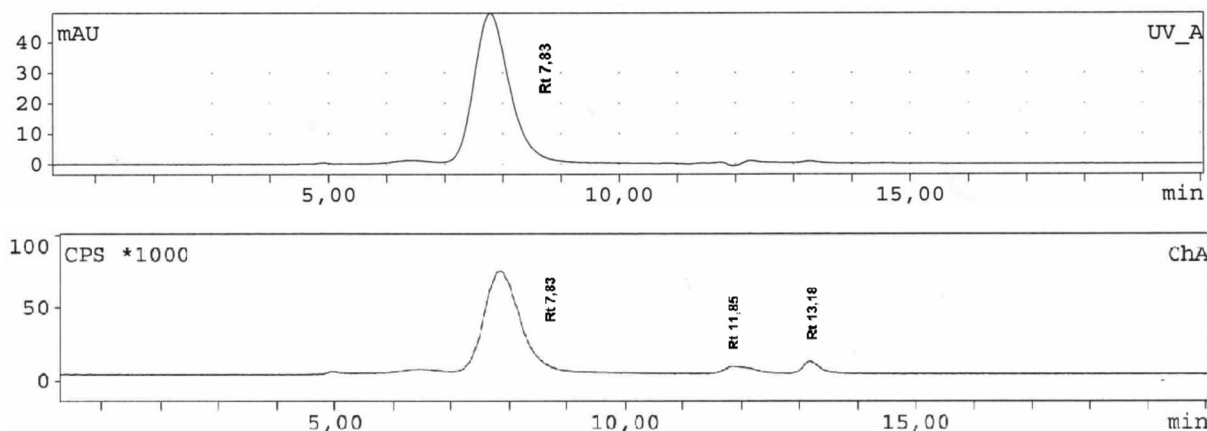


Figura 3A y 3B. En la fig 3A - Espectro UV obtenido por HPLC de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TCZ Rt = 7.83 min. En la fig 3B - Espectro gamma obtenido por HPLC de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TCZ, Rt = 7.83 min. También se observan pequeños picos con Rt = 11.85 y 13.18 min, correspondientes a tricina y de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  sin conjugar

#### MARCACIÓN Y CONTROLES DE CALIDAD DE TCZ CON $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$

La eficiencia de marcado del anticuerpo fue determinada por SEC y HPLC. La PRQ obtenido por SEC fue de  $95 \pm 5$  %. La caracterización por HPLC mostrada como tiempo de retención para el  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -TCZ fue de 7,93 min, en el espectro UV y gamma (Figura 4A y 4B). Para este marcado se realizó control de  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  mostrando un Rt de 12,38. (Figura 5)

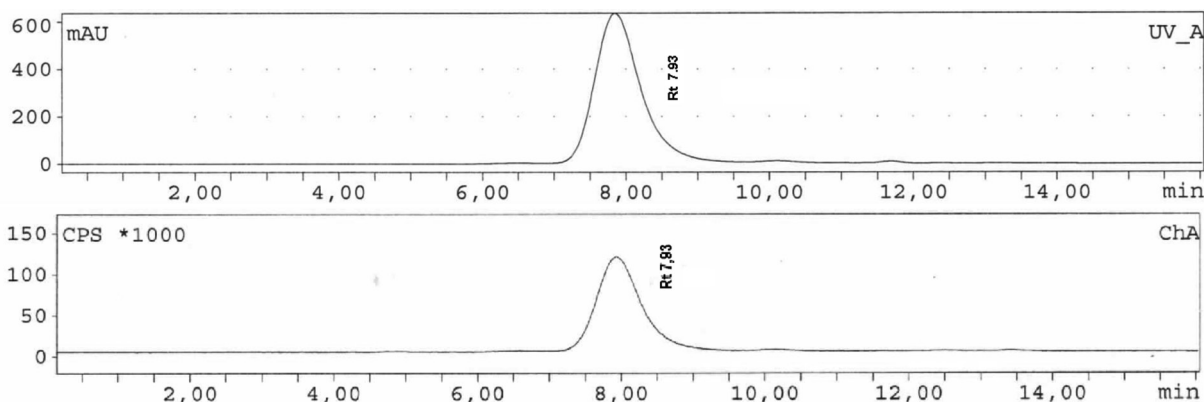


Figura 4A y 4B. Espectro UV y gamma respectivamente obtenido por HPLC de <sup>99m</sup>Tc-(CO)<sub>3</sub>-TCZ, Rt = 7,93 min

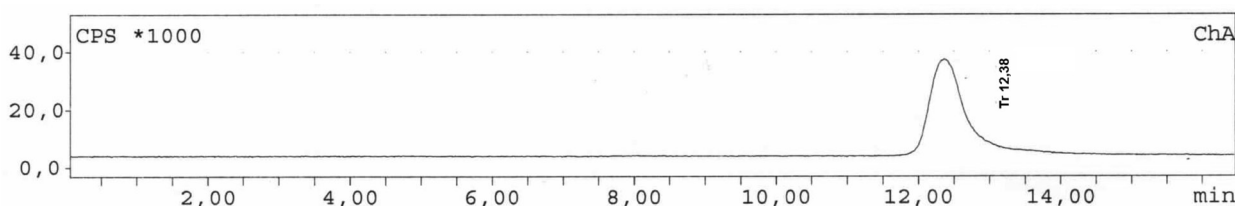


Figura 5. Espectro gamma obtenido por HPLC de [<sup>99m</sup>Tc-(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, Rt = 12.38 min.

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD IN-VITRO

Los estudio de estabilidad in-vitro para el sistema <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-TCZ en solución de NaCl 0.9% a 37 °C muestran que un 96 % del <sup>99m</sup>Tc permanece unido al anticuerpo hasta 24 hs post incubación. Respecto a la transquelación del <sup>99m</sup>Tc con concentraciones de L-cisteína de 0.1 mM y 1 mM los resultados muestran que hasta 94% y 83% respectivamente del <sup>99m</sup>Tc permanece unido al anticuerpo. Los resultados para la incubación con SFB y PBS no revelaron niveles de transquelación significativos, en este caso un 96% del radionucleido permanece unido (Tabla 1).

Estudio por HPLC de estabilidad <i>in-vitro</i> de <sup>99m</sup> Tc-HYNIC-Tocilizumab					
Tiempo (hs)	NaCl 0.9 % 37°	PBS	L-Cisteína 0,1 mM	L-Cisteína 1 mM	SFB
1	100	97	90	91	100
4	96	96	94	89	100
24	98	--	--	83	96

Tabla 1

En la tabla 2 se muestran los resultados del estudio de estabilidad para el marcado vía tricarbonilo. De esto se observó que la reacción de marcado es dependiente

de la temperatura, siendo mayormente favorecido cuando el marcado se realiza a 37°C, comparada a la marcación realizada a temperatura ambiente (25°C), especialmente a cortos períodos de incubación. Para una hora de incubación la PRQ fue de 94% a 37°C y 49% a 25°C. Sin embargo al transcurrir 24 hs las PRQ son equiparables, siendo de 97 y 93 % para 37 y 25°C respectivamente.

Los resultados en suero a 37°C muestran una disminución de la PRQ conforme avanza el tiempo, reduciéndose la misma en un 18%, al compararla con las condiciones ideales de NaCl 0.9% a 37°C.

Estudio de estabilidad de [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ]-TCZ en solución salina a 37°C y 25°C y en suero (SFB) a 37°C			
Tiempo (hs)	NaCl 0.9 % 37°	NaCl 0.9 % 25°	SFB
1	94	49	91
2	94	34	85
3	95	79	84
24	97	93	71

Tabla 2

CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA EN RATONES NORMALES BALB/C.

Los resultados de la caracterización farmacológica se muestran en la tabla 3 y 4 para <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-TCZ, <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>-TCZ respectivamente.

En primer lugar para <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-TCZ se observó captación hepática y una lenta depuración sanguínea, con eliminación renal y hepática. La retención de conjugado se observó tanto en hígado como en riñón, lo que sugiere un metabolismo mixto hepatobiliar/renal de este radiotrazador. La actividad en el riñón fue de 5,16 ± 0,36, 3,24 ± 0,66, y 3,62 ± 0,59 % DI/g a 4, 16 y 24 h, respectivamente. Estos datos fueron acompañados por un alto porcentaje de dosis inyectada en intestino y orina. A las 24 h, 32,80 ± 2,41 %DI de <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-TCZ fue eliminado en la orina, que incluye orina recogida y vejiga, y el 7,70 ± 0,90 %DI fue detectado en los intestinos. Los niveles de radiactividad en sangre fueron 8,65 ± 0,64, 6,59 ± 2,53, y 7,31 ± 0,57 % DI/g a 4, 16 y 24 horas seguidas, lo que indica una depuración de la sangre 24 horas después de la inyección del anticuerpo marcado.

En el caso del conjugado <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>-TCZ los tiempos evaluados fueron de 1, 4 y 24 horas. Los resultados muestran un comportamiento similar al derivatizado vía HYNIC. La actividad en el riñón fue de 10,51 ± 4,04, 3,78 ± 1,43 y 2,72 ± 0,66 % DI/g a 1, 4 y 24 h, respectivamente. A las 24 h, 59,95 ± 6,48 %DI de radiotrazador fue eliminado en la orina y el 4,73 ± 0,63 %DI se detectó en los intestinos. Los niveles de radiactividad sanguínea fueron 28,23 ± 4,10, 5,63 ± 1,23 y 4,49 ± 0,48 % DI/g a 1, 4 y 24 horas, lo que confirma una adecuada depuración sanguínea después de 24 horas.

A pesar de las altas actividades en sangre detectadas para ambos radiomarcados, se verificó la baja acumulación en varios tejidos no específicos. Menos del 4 % DI/g se ha detectado en bazo, tiroides, músculos, huesos, estómago y tracto intestinal en todos los tiempos analizados para ambos conjugados marcados.

Estudios farmacocinéticos de <sup>99m</sup> Tc-HYNIC-Tocilizumab en ratones Balb/C normales.			
	4 h	16 h	24 h
Porcentaje de dosis inyectada/gramo (%ID/g)*			
SANGRE	8,65 ± 0,64	6,59 ± 2,53	7,31 ± 0,57
HÍGADO	3,02 ± 0,12	5,31 ± 0,39	7,13 ± 1,50
CORAZÓN	2,65 ± 0,07	1,50 ± 0,31	2,45 ± 0,50
PULMON	2,54 ± 0,39	3,08 ± 0,81	3,52 ± 1,44
BAZO	2,49 ± 0,03	1,26 ± 0,18	2,75 ± 0,64
RIÑONES	5,16 ± 0,36	3,24 ± 0,66	3,62 ± 0,59
TIROIDES	2,23 ± 0,11	1,42 ± 0,38	2,36 ± 0,28
MUSCULO	0,51 ± 0,07	0,32 ± 0,10	0,57 ± 0,16
HUESO	0,69 ± 0,15	0,87 ± 0,16	0,81 ± 0,37
ESTOMAGO	1,43 ± 0,37	2,53 ± 1,08	2,13 ± 1,21
TI	2,15 ± 0,25	2,73 ± 0,65	3,38 ± 0,69
Porcentaje de dosis inyectada (%ID)*			
INTESTINO	3,08 ± 1,42	2,87 ± 0,50	7,70 ± 0,90
ORINA + VEJIGA	10,93 ± 5,93	26,72 ± 7,49	32,80 ± 2,41

Tabla 3 (\* Los datos se presentan como %ID/g (o %ID) desviación estándar (n=3)

TI=Tracto Intestinal)

Estudios farmacocinéticos de [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> (OH) <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> -Tocilizumab en ratones Balb/C normales.			
	1 h	4 h	24 h
Porcentaje de dosis inyectada/gramo (%ID/g)*			
SANGRE	28,23 ± 4,10	5,63 ± 1,23	4,49 ± 0,48
HÍGADO	9,03 ± 2,44	2,80 ± 0,92	3,41 ± 0,37
CORAZÓN	10,10 ± 3,46	1,59 ± 0,58	1,53 ± 0,24
PULMON	10,28 ± 2,98	1,90 ± 0,31	1,88 ± 0,45
BAZO	0,85 ± 0,51	1,21 ± 0,41	1,29 ± 0,24
RIÑONES	10,51 ± 4,04	3,78 ± 1,43	2,72 ± 0,66
TIROIDES	2,12 ± 1,58	1,17 ± 0,47	1,77 ± 0,45
MUSCULO	0,78 ± 0,16	0,57 ± 0,70	0,46 ± 0,18
HUESO	1,71 ± 0,29	1,02 ± 1,26	0,65 ± 0,23
ESTOMAGO	1,75 ± 0,74	1,40 ± 0,76	0,73 ± 0,14
TI	2,21 ± 0,47	0,98 ± 0,41	1,77 ± 0,17
Porcentaje de dosis inyectada (%ID)*			
INTESTINO	4,59 ± 1,11	2,08 ± 0,79	4,73 ± 0,63
ORINA + VEJIGA	10,85 ± 3,38	13,88 ± 3,82	59,95 ± 6,48

Tabla 4 (\* Los datos se presentan como %ID/g (o %ID) desviación estándar (n=3)

TI=Tracto Intestinal)

IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL

En la Figura 6 se muestran las imágenes del ensayo de unión de FITC-TCZ a los antígenos de membrana de las células U266. Se puede observar la unión eficaz del anticuerpo a los mL-6R y también se observa anticuerpo internalizado.

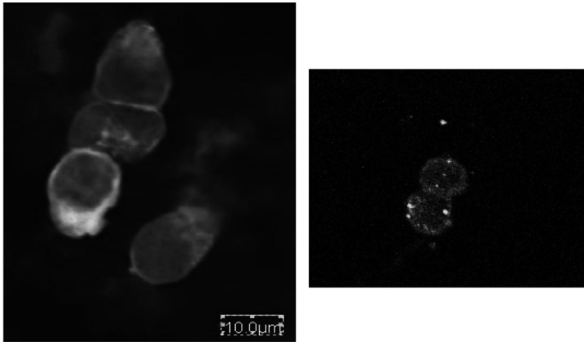


Figura 6. Imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia confocal, se observa la unión de FITC-Tocilizumab a las membranas de las células U266, las cuales expresan el mL-6R.

ESTUDIOS IN-VITRO DE UNIÓN CELULAR.

Los resultados in-vitro realizados muestran la unión de ambos marcados a las células U266 a 60 y 120 min para <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-TCZ y 30, 60 y 120 min para <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>-TCZ.

En los ensayos de desplazamiento, de ambos radiomarcados, se registró una disminución de más del 50% de la actividad como resultado del bloqueo eficaz de del anticuerpo (Figura 7A y 7B).

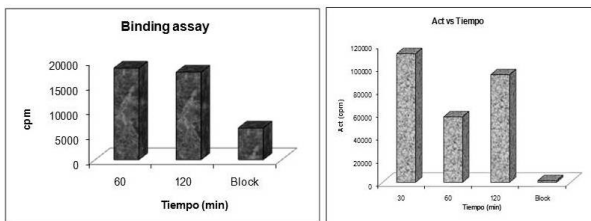


Figura 7A y 7B. Ensayo en células de unión y desplazamiento para <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Tocilizumab y <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>-Tocilizumab respectivamente

DISCUSIÓN

El Tocilizumab es un anticuerpo monoclonal que se une a los receptores de IL-6. La IL-6 es una de las principales moléculas involucradas en la patogenia del MM. se han encontrado que niveles elevados de IL-6 están directamente relacionados con el crecimiento, supervivencia y proliferación de células de MM. De esta forma la marcación del Tocilizumab con un emisor gamma, como el <sup>99m</sup>Tc, se podría emplear como método diagnóstico para evaluar localización de la lesión y extensión, así como para el seguimiento de pacientes con MM.

El objetivo del presente trabajo fue la marcación de Tocilizumab con <sup>99m</sup>Tc mediante dos vías; agente bifuncional HYNIC y el organometálico (CO<sub>3</sub>). Posteriormente se realizó la evaluación radioquímica y biológica a través de diferentes ensayos.

Es muy importante en la marcación de moléculas blanco con radionucleidos metálicos que retengan la actividad biológica de la biomolécula. El grupo 6-hidrazinonicotinil, conocido como HYNIC, es uno de los agente quelantes bifuncionales más utilizados (19). A su vez el <sup>99m</sup>Tc(CO<sub>3</sub>) representa un excelente precursor para el marcado de biomoléculas, como los anticuerpos, resultando en un complejo muy estable y compacto que no causa impedimento estérico con los sitios de unión del anticuerpo (20).

Como se mencionó la mayoría de los radiofármacos que están clínicamente disponibles en Medicina Nuclear son complejos de <sup>99m</sup>Tc debido a las favorables características fisicoquímicas de este radionucleido para la realización de imágenes centellográficas. Además, el <sup>99m</sup>Tc es fácilmente disponible y a bajos costos a partir de generadores de <sup>99</sup>Mo-<sup>99m</sup>Tc.

Inicialmente los resultados obtenidos por espectrometría de masa MALDI-TOF, confirman la derivatización del anticuerpo y nos permiten estimar el número de moléculas de BFC por anticuerpo. Al evaluarse los pesos moleculares (M+) para el Tocilizumab y HYNIC-Tocilizumab, se obtuvo una relación anticuerpo:HYNIC de aproximadamente 1:4. Estos resultados significan una alta conjugación por parte del anticuerpo al quelante bifuncional, lo que posibilitaría obtener altas actividades

específicas.

Ambas marcaciones con  $^{99m}\text{Tc}$  se desarrollaron de forma rápida y sencilla, presentando altas puridades radioquímicas, según se pudo evaluar por distintos sistemas cromatográficos. Complementariamente los resultados obtenidos por HPLC muestran un marcado estable que no parece afectar la integridad del anticuerpo y sin presencia de agregados proteicos.

La estabilidad *in-vitro* de los radiomarcados, evaluadas como porcentaje de PRQ, mostraron altos niveles de pureza en todas las condiciones estudiadas. Para el marcado vía HYNIC, el estudio realizado con el agente de competencia L-Cisteína mostró una disminución de la estabilidad en un 15% para concentraciones de 1mM, mientras que a 0,1mM no se observó cambio en la PRQ. Estos resultados son esperados dado que la L-Cisteína es un agente de competencia que a concentraciones altas resulta un competidor muy potente por el radionucleido  $^{99m}\text{Tc}$  formando complejos muy estables con el mismo. Por otro lado se pudo apreciar, comparando la PRQ obtenida a 25 y 37°C, como se ve favorecida la marcación para el agente organometálico, con el aumento de temperatura. Finalmente se estudió la estabilidad de ambos marcados en suero; para el marcado vía HYNIC se observó que se mantiene una alta estabilidad hasta 24 hs, mientras que vía tricarbonilo la estabilidad disminuye en un 18% transcurrido el mismo tiempo de incubación.

Por otro lado, se realizaron estudios para determinar el perfil farmacocinético del Tocilizumab marcado mediante la realización de biodistribución con ratones Balb/C normales. Para el  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TCZ se realizaron a 4, 16 y 24 H y para  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -TCZ a 1, 4 y 24 hs. Ambos radioconjugados presentaron el mismo perfil farmacocinético, se observó una lenta depuración sanguínea, con eliminación hepática principalmente y en menor medida renal, y ausencia de captación apreciable en otros órganos. La eliminación renal, se sabe que es debido a productos de metabolización del anticuerpo los que pueden ser filtrados por el glomérulo renal unidos a radionucleido.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía láser confocal muestran la efectiva unión entre el FITC-TCZ

a los antígenos de membrana de las células U266, las cuales expresan mL-6R. Además se observa que FITC-TCZ internalizado por lo que probablemente el mL-6R es un receptor de membrana internalizable una vez se une al anticuerpo.

Finalmente en los ensayos de unión en células U266, para ambos radiomarcados, se observó la efectiva unión de los radiomarcados a la línea celular de MM. Adicionalmente en el ensayo de desplazamiento se observó más del 50 % del marcado desplazado por el anticuerpo frío (bloqueo). Estos resultados nos indican la alta especificidad de unión que existe de los marcados y nos permiten concluir que luego de derivatizado y marcado el anticuerpo por ambas vías, sigue manteniendo su actividad biológica y no se ve afectada la capacidad de unión al antígeno de membrana en las células ensayadas.

## CONCLUSIONES

Tocilizumab fue marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  a través de ambas estrategias obteniéndose buena estabilidad, PQR y especificidad *in-vitro* e *in-vivo*. Tanto  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Tocilizumab como  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Tocilizumab pueden ser potenciales agentes de imagen molecular en MM.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores quisieran agradecer a G. Arroyo y a Roche® por proporcionarnos el Tocilizumab (Actemra®). Este trabajo fue apoyado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay) por una beca a E. Gutiérrez. No existen conflictos de intereses.

## SUMMARY

IL6 is a key molecule in the pathogenesis of MM. Tocilizumab is a monoclonal antibody against IL6R. In our work we conjugate  $^{99m}\text{Tc}$ -Tocilizumab using two different chelators (HYNIC and tricarbonyl). Tocilizumab was derivatized with HYNIC and labeled using  $^{99m}\text{Tc}$ /tricarbonyl/ $\text{SnCl}_2$  at room temperature, incubated during 45 min. PQR was assessed by ITLC-SG and HPLC. *In vitro* studies were carried out up to 120 min. Fluorescent and atomic force microscopy images were obtained with U266 MM cells. *In vivo* studies were carried out in

normal Cd1 mice (N=3).

Radiochemical purity was >90% using both chelators, remaining stable with no significant transchelation during 24 h. Confocal microscopy showed the ability of TCZ-FITC to recognize IL6R in U266 cells. Specificity of union of <sup>99m</sup>Tc-Tocilizumab to IL6R was demonstrated by in vitro competitive experiments. Biodistribution studies showed liver uptake and renal elimination. We conclude that labeling <sup>99m</sup>Tc-TCZ is performed by both strategies with high RQP and specificity of binding, so the could become potential imaging agents for diagnosis of MM.

**Key Words:** MULTIPLE MYELOMA

TOCILIZUMAB; IL-6 RECL;

IL-6 FAMILY CYTOKINE

TRICARBONILO

HYNIC

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, et al. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature Publishing Group* 2007; 7: 585-598.
- (2) Katzel J A, Hari P, Vesole D H. Multiple Myeloma: Charging Toward a Bright Future. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 301-318.
- (3) Conte G, Figueroa G, Lois V, et al. Mieloma múltiple en Chile. Características clínicas y sobrevida. *Rev Méd Chile* 2007; 135: 1111-1117.
- (4) Kishimoto T, Hibi M, Murakami M, et al. The molecular biology of interleukin 6 and its receptor, discusión 16. En: *Polyfunctional citokines: IL-6 and LIF*. Ciba Foundation Symposium 167. England, 1992. p.5-23
- (5) Gennaro C, Rocco S, inventors. Instituto di Ricerche di Biologia Molecolare P. Angeletti S.P.A., assignee. Interleucina 6 mutante de actividad biológica mejorada

con relación a la de la interleucina 6 salvaje. IT patent 2,145,819. 2000 Abr 19.

- (6) Samuel J M, Kelberman D, Smith A J P, et al. Identification of a novel regulatory region in the interleukin-6 gene promoter. *Cytokine* 2008; 42 (2): 256–264.
- (7) Nishimoto N, Terao K, Mima T, et al. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 2008; 112(10 ):3959-3964.
- (8) Dacha LR. Mieloma múltiple quiescente: Historia Natural y caracterización clínica y citogenética del tipo progresivo. Tesina de Doctorado en Medicina, Universitat de Barcelona, 2006.
- (9) Chatterjee M, Honemann S, Lentzsch S, et al. In the presence of the bone marrow stromal cells human multiple myeloma cells become independent of the IL-6/gp130/STAT3 pathway. *Blood* 2002; 100(9): 3311-3318.
- (10) Sans-Sebrafen J, Besses C, Vives J. Hematología Clínica. 5a ed. España: Elsevier, 2006.
- (11) Mihara M, Kasutani K, Okazaki M, et al. Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mIL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family. *International Immunopharmacology* 2005; 5(12):1731–1740.
- (12) Blanco Alonso R, Agudo Bilbao M. La inhibición de la interleucina-6, una nueva opción terapéutica en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin* 2009; 5(3): 121–127.
- (13) Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, et al. Interleukin-6 Receptor Inhibition With Tocilizumab Reduces Disease Activity in Rheumatoid Arthritis With Inadequate Response to Disease-Modifying Antirheumatic Drugs. *Arthritis & Rheumatism* 2008; 58(10): 2968–2980.
- (14) Liu S. The role of coordination chemistry in the development of targetspecific radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev* 2004; 33(7): 445-461.

(15) Verdera ES, Gomez de Castiglia S, editores. Radiofármacos terapéuticos. Comité de Radiofarmacia, Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear; 2007.

(16) Kenji Yoshihara. Recent Studies on the Nuclear Chemistry of Technetium. Topics in Current Chemistry 1996; 176, Technetium and Rhenium Thei Chemistry and Its Application, p.1-16

(17) Wynn A, Voikert, Jurisson S. Technetium-99m Chelates as Radiopharmaceuticais. Topics in Current Chemistry 1996; 176: 124-145.

(18) Alberto R, Schibili R, Egli A, et al. A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of  $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  from  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$  in aqueous solution and its reaction with bifunctional ligand. J Am Chem Soc 1998; 120: 7987–7988.

(19) Alberto R, Schibili R, Waibel R, et al. Basic aqueous chemistry of  $[\text{M}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  (M=Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. Coord Chem Rev 1999; 190–192: 901–919.