

# Development of $^{68}\text{Ga}$ -human serum albumin as a PET imaging agent for diagnosis of acute inflammation

Ji Youn Lee<sup>1,2,3,4</sup>, Hoyoung Kim<sup>2,3,4</sup>, Boeun Lee<sup>2,3,4,5</sup>, Young Ju Kim<sup>2,3,4</sup>, Yun-Sang Lee<sup>2,3,4,5</sup>, and Jae Min Jeong<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences, <sup>2</sup>Department of Nuclear Medicine, <sup>3</sup>Institute of radiation Medicine, <sup>4</sup>Institute of Cancer Research, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea; <sup>5</sup>Department of Molecular Medicine and Biopharmaceutical Sciences Graduate School of Convergence Science and Technology, and College of Medicine or College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea,

## ABSTRACT

Human serum albumin (HSA) has potential for diagnosis and therapy in clinical setting. The purpose of experiments was to develop and evaluate  $^{68}\text{Ga}$ -HSA as a PET agent for diagnosis of acute inflammation. NOTA-HSA was synthesized by conjugating 2-(p-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid to HSA in 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5) and then purified using a PD-10 size-exclusion column. NOTA-HSA was labeled with  $^{68}\text{Ga}$  at room temperature for 10 min, and 8.4% sodium hydrogen carbonate buffer was added for neutralization.  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-HSA was purified using alumina N plus light cartridge and 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter. Labeling efficiency and radiochemical purity were determined by ITLC-SG with 0.1 M citric acid. Biodistribution study was performed in a male BALB/c mice model of Carrageenan-induced acute inflammation. Animal PET study was performed in acute inflammation mice model after tail vein injection of  $^{68}\text{Ga}$ -HSA. This radiotracer showed high labeling efficiency (>99%) around pH 7. Biodistribution study showed higher inflamed footpad uptake than control footpad uptake. Animal PET study revealed 2 times higher uptake on inflamed footpad compared to control footpad. In these experiments, we developed  $^{68}\text{Ga}$ -HSA for acute inflammation PET imaging and evaluated it in a mouse disease model. The results demonstrated that  $^{68}\text{Ga}$ -HSA has potential as a PET imaging agent for diagnosis of acute inflammation.

**J Radiopharm Mol Probes 1(2):104-108, 2015**

**Key Words:**  $^{68}\text{Ga}$ , Human serum albumin (HSA), Positron emission tomography, Inflammation

## Introduction

염증은 면역학적 방어 시스템으로, 당뇨병, 심혈관 질병, 암 등의 생명을 위협하는 많은 질병과 연관되어 있다(1). 최근까지 개발된 항염증성 약품은 용량과 비례하여 부작용(dose-related side effect)이 크다는 문제가 있기 때문에 좀 더 효과적인 약물 개발이 시급한 상황이다(2-4).

사람혈청알부민(human serum albumin, HSA)은 단축이 6 nm 장축이 8 nm 크기인 럭비공 모양의 단백질로서 혈장을 구성하는 중요한 성분이다. 1991년 Thakur 등은

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 이 표지된 HSA를 이용하여 감마 카메라로 염증 영상용으로 사용할 수 있음을 보여주었다(5). 이는 염증부위에 모세혈관이 확장하여 침투성이 크기 때문에 나타난 enhanced permeability and retention (EPR) 효과로 알려져 있다. 또한 HSA는 각종 유도체로 만들어 현재 임상에서 염증질환 진단과 간경변의 치료에 사용되고 있고, 이와 관련된 연구도 많이 진행되고 있다. 그러므로 앞으로 사람혈청알부민을 이용한 진단 및 치료의 발전이 클 것으로 예상된다(6-11).

양전자단층촬영 (positron emission tomography, PET)은

Received: September 16, 2015 / Revised: November 27, 2015 / Accepted: December 2, 2015

**Corresponding Author:** Jae Min Jeong

Department of Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Institute of Cancer Research, Seoul National University College of Medicine, 101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 03080, Korea  
Tel: +82-2-2072-3805, Fax: +82-2-745-7690, E-mail: jmjng@snu.ac.kr

Copyright © 2015, The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

민감도와 특이도가 높은 분자영상의학 기술이다. 최근에는 PET용 방사성의약품 표지에  $^{68}\text{Ga}$ 의 사용이 증가되고 있다.  $^{68}\text{Ga}$ 은 양전자 방출 핵종으로서 반감기는 68분이고, 제너레이터에서 생산되기 때문에 싸이클로트론에서 생산되는  $^{18}\text{F}$ 이나  $^{11}\text{C}$  등 보다 경제적이고 사용하기 편리하다는 장점을 가지고 있다(12-14). 따라서  $^{68}\text{Ga}$ 을 표지한 각종 방사성의약품 개발 연구가 많이 진행되고 있으며(15-18), 앞으로의 발전이 기대되는 동위 원소이다.

이 연구는  $^{68}\text{Ga}$ 이 표지된 HSA를 이용하여 급성 염증의 영상화가 가능한지 확인하는 것을 목적으로 하였다.  $^{68}\text{Ga}$ 이 표지된 HSA의 개발은 경제적인 측면과 피폭량 감소, 정확한 진단에 도움이 될 것으로 예상된다.

## Materials and Methods

### 1. 장비 및 시약

사람혈청알부민은 녹십자에서 구입하였고, SCN-NOTA는 Macrocyclics (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. 그 외 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. PD-10 컬럼은 GE Healthcare (Buckinghamshire, U.K.) 제품을 사용하였다. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF MS)는 MALDI TOF-TOF 5800 system (AB SCIEX, CA, USA)을 사용하였다.  $\lambda$ -Carrageenan은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.  $^{68}\text{Ga}$ 은  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  제너레이터 (ITG GmbH, Munich, Germany)에서 용출하여 사용하였다. 알루미늄 N 카트리지는 Waters (Massachusetts, USA)에서 구입했고, 일회용 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter는 Pall Corp (East Hills, NY, USA)에서 구입했다. 표지효율은 instant thin-layer chromatography-silica gel (ITLC-SG) plate (Pall Corp., USA)를 이용하여 측정하였으며, 이 때 방사성크로마토그램은 Bioscan AR 2000 (AR-2000, Poway, CA, USA)을 이용하여 판독하였다. 동물 조직의 방사능 측정에는 감마카운터 Cobra II (Packard Canberra Co.Kamsey, MN, USA)를 사용하였다. PET 영상 촬영은 animal PET/CT scanner (GE Healthcare, USA)를 사용해 진행하였다. 이미지 분석은 ASIPro software (Concorde Microsystems, Inc., USA)를 사용하였다.

### 2. NOTA-HSA 합성

HSA (54 mg)와 SCN-NOTA (6 mg)을 0.1 M 탄산나트륨 완충액 (sodium carbonate buffer, pH 9.5)에 녹이고, 23 시간 동안 상온에서 차광하여 반응하였다. 만들어진 NOTA-HSA는 PD-10 size-exclusion column을 이용하여 정제하였다. MALDI-TOF/TOF MS로 질량 분석한 결과 HSA 한 분자에 몇 분자의 NOTA가 결합하였는지 확인하였다.

### 3. 급성 염증 모델

모든 동물실험은 Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal care(AAALAC) International의 승인을 받은 서울대학교병원에서 수행하였다.

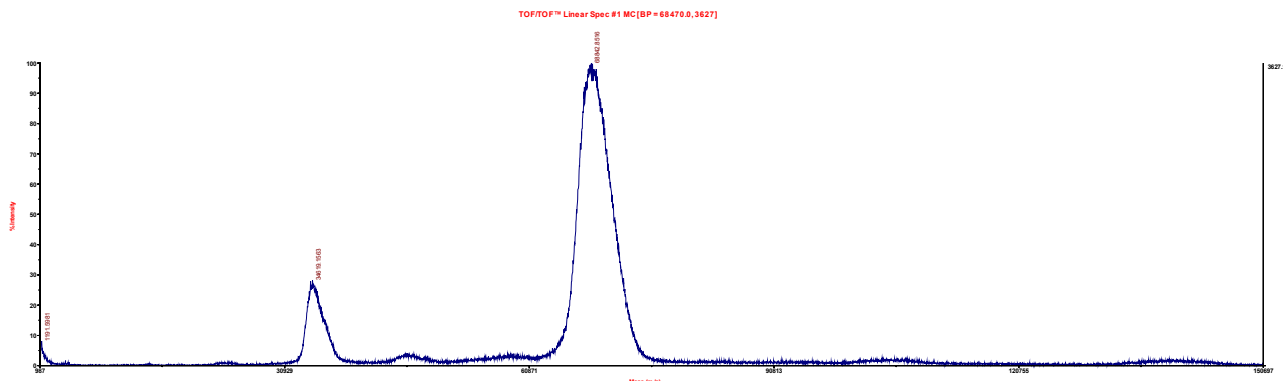
$\lambda$ -Carrageenan를 생리식염수에 녹여 1%  $\lambda$ -Carrageenan을 준비했다. 각각의 BALB/c 마우스 (8주령) 왼쪽 뒷발바닥에 생리식염수 30  $\mu\text{L}$ 를, 오른쪽 뒷발바닥에 1%  $\lambda$ -Carrageenan 30  $\mu\text{L}$ 를 주사했다. 약품 주입 4시간 후 동물 실험을 진행하였다.

### 4. $^{68}\text{Ga}$ 표지

NOTA-HSA 1 mg과 초산나트륨 32.8 mg에  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  제너레이터에서 0.1 N HCl로용출한  $^{68}\text{GaCl}_3$  용액 1.6 mL를 넣고 섞은 후 실온에서 10 분 동안 반응하였다. 8.4% 탄산수소나트륨 용액 0.2 mL를 넣어 중화시켰다. 알루미늄 N 카트리지와 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter를 차례로 통과시켜 정제하였다.  $^{68}\text{Ga}$ -HSA의 표지효율과 방사화학적 순도를 측정하기 위해 고정상으로 ITLC-SG, 이동상으로 0.1 M citric acid를 사용하였다. 크로마토그래피 결과는 Radio-TLC 스캐너로 확인하였다.

### 5. $^{68}\text{Ga}$ -HSA의 생체내분포

급성 염증이 유발된 BALB/c 마우스 (수컷, 8주령, N=4)의 꼬리정맥에  $^{68}\text{Ga}$ -HSA를 0.37 MBq/0.1 mL씩 주사하였다. 방사성추적자 투여 1시간 후 마우스를 희생하고 혈액, 근육, 심장, 폐, 간, 비장, 위, 소장, 대장, 신장, 뼈, 1% Carrageenan을 투여한 발, 생리식염수를 투여한 발을 각각 적출하여 각각의 무게를 측정하였다. 감마카운터를 이용하여 적출된 각각의 장기의 방사능을 측정하였다. 결과는 조직 단위무게당 섭취된 방사능의 백분율 (percent injected dose/g)로 나타내었다.



**Figure 1.** MALDI TOF/TOF MS spectrum of NOTA-HSA. Molecular weight of NOTA-HSA was found to be 67690. HSA molecular weight is 66400. Then the increase of molecular weight is 1290. Molecular weight of NOTA is 559,90. The number of NOTA per one molecule of NOTA-HSA is 2.3.

### 6. Animal PET

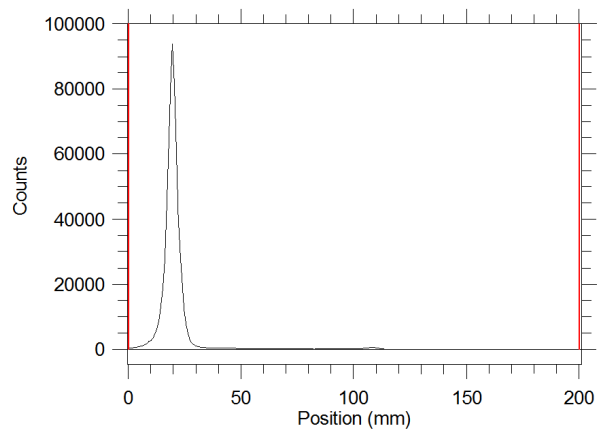
급성 염증이 유발된 BALB/c 마우스(수컷, 8주령)의 꼬리정맥에 <sup>68</sup>Ga-HSA 37 MBq/0.1 mL을 주사하였다. 방사성추적자 투여 70분 후 2% isoflurane을 사용하여 급성 염증이 유발된 BALB/c 마우스를 호흡마취시켜 20분 동안 PET 영상을 얻었다. 이미지 분석은 ASIPro software를 사용하였다. 표준섭취계수 (Standard uptake value, SUV)는  $SUV = CCF / (\text{injected dose} / \text{body weight})$  공식을 사용하여 계산하였다. CCF (decay corrected activity concentration)는  $CCF (\text{MBq/mL}) = \text{radioactivity} (\text{mCi/mL}) \times \text{branching ratio} (0.891 \text{ for } ^{68}\text{Ga}) \times \text{ROI} (\text{value/pixel})$  공식을 사용하여 계산하였다.

### Results and Discussion

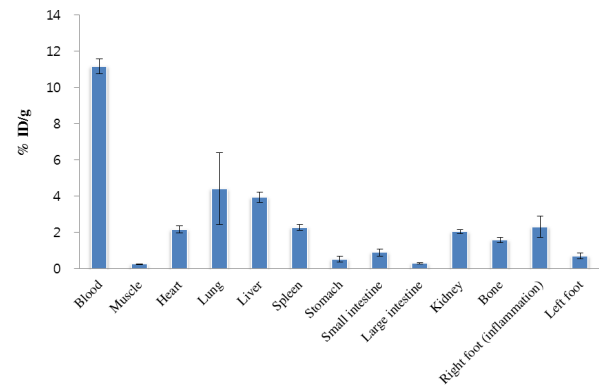
MALDI-TOF/TOF MS data로부터 NOTA-HSA의 HSA에 평균 2.3개의 NOTA가 붙었음을 확인하였다(Figure 1).

NOTA-HSA를 <sup>68</sup>Ga로 표지한 후 ITLC-SG로 크로마토그래피를 하였다. 이때 0.1 M citric acid로 전개하였을 때 <sup>68</sup>Ga-NOTA-HSA는  $R_f=0.0$ 이었고 표지되지 않은 <sup>68</sup>Ga<sup>+++</sup>는  $R_f=1.0$ 이었다(Figure 2). 이 크로마토그램으로부터 표지효율이 99.9% 이상임을 확인하였다.

1% λ-Carrageenan을 투여하여 만든 급성 염증 마우스 모델 꼬리 정맥으로 <sup>68</sup>Ga-HSA 0.37 MBq/0.1 mL을 투여하고 60분 후 생체내분포를 확인하였다(Figure 3). <sup>68</sup>Ga-HSA이 간 ( $3.93 \pm 0.28\%$  ID/g), 비장 ( $2.28 \pm 0.17\%$  ID/g), 골수 ( $1.58 \pm 0.13\%$  ID/g)에서 각각 낮은 섭취를 보였다. 이는 1991년 Thakur의 <sup>99m</sup>Tc-HSA 투여 4시간 후 tissue distribution (turpentine induced inflammation)에서의 간( $12 \pm 5.1\%$

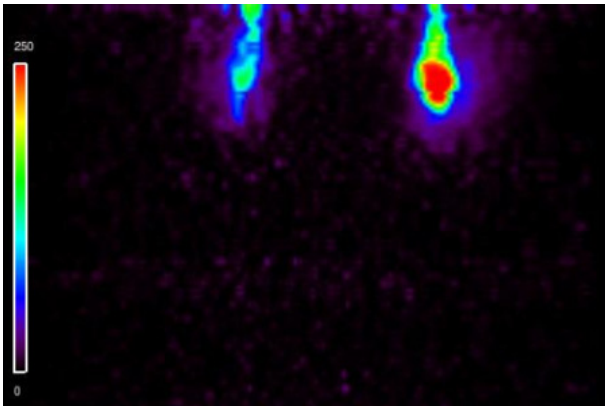


**Figure 2.** Labeling efficiency of <sup>68</sup>Ga-HSA.



**Figure 3.** Biodistribution of <sup>68</sup>Ga-HSA in acute inflammation mouse model at 60 min after intravenous injection through the tail vein. The values represent the mean±standard deviation % ID/g.

ID/g), 비장( $6.7 \pm 3.4\%$  ID/g)의 결과보다 낮은 수치였다. 반면, 여전히 혈액( $11.16 \pm 0.43\%$  ID/g)에 많이 남아있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 1% λ-Carrageenan이 투여된 오른쪽 뒷발이  $2.32 \pm 0.6\%$  ID/g, 생리식염수가 투여된 왼



**Figure 4.** Animal PET image of a mouse having an acute inflammation on the right foot. Image was obtained at 70 min after intravenous injection of  $^{68}\text{Ga}$ -HSA (Left; control foot, Right; inflamed foot).

쪽 뒷발이  $0.70 \pm 0.16\%$  ID/g으로 약 3배 정도 높은 섭취를 보였다(Figure 3).

$^{68}\text{Ga}$ -HSA을 급성 염증 마우스 모델의 꼬리 정맥으로 주사하고 70분 후 20분동안 소동물 PET 이미지를 얻었다. 급성 염증 마우스 모델에서의 생체내분포 결과와 마찬가지로, 1%  $\lambda$ -Carrageenan이 투여된 오른쪽 뒷발의 SUV가 0.23으로, 생리식염수가 투여된 왼쪽 뒷발의 0.1보다 약 2.3배 정도 높은 섭취를 보였다(Figure 4).

## Conclusion

이 실험에서는  $^{68}\text{Ga}$ -HSA가 급성 염증 영상을 위한 방사성의약품으로 사용할 수 있는지를 알아 보았다. 이를 위하여 1%  $\lambda$ -Carrageenan을 발바닥에 투여한 급성 염증 마우스 모델을 만들어 생체내분포와 소동물 PET 영상 촬영을 시행하였다. 그 결과 급성 염증이 유발된 오른쪽 발이 생리식염수를 투여한 왼발(control)보다 2-3배 정도 높은 섭취를 보였다. 결과적으로,  $^{68}\text{Ga}$ -HSA가 급성 염증 PET 이미지를 위한 방사성의약품으로서 사용될 수 있음을 확인하였다.

## Acknowledgments

이 연구는 한국연구재단 도약연구과제(2013RIA2A1A05006227)와 방사선연구개발과제(NRF-2012M2A2A7035853)의 지원을 받았으며, 다른 이해관계는 없음을 밝힙니다.

## References

- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2002;2:787-795.
- Dinarello CA. Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell* 2010;140:935-950.
- Hahm TS, Ahn HJ, Rye S, Gwak MS, Choi SJ, Kim JK, Yu JM. Combined carbamazepine and pregabalin therapy in a rat model of neuropathic pain. *Br J Anaesthe* 2012;109:968-974.
- Raffa RB, Clark-Vetri R, Tallarida RJ, Wertheimer Al. Combination strategies for pain management. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4:1697-708.
- Thakur ML, DeFulvio J, Park CH, Damjanov A, Yaghseizian H, Jungkind D, Epstein A, McAfee JG. Technetium-99m-labeled proteins for imaging inflammatory foci. *Nucl Med Biol* 1991;18:605-612.
- Jeong JM, Hong MK, Kim YJ, Lee JT, Kang JH, Lee DS, Chung JK, Lee MC. Development of  $^{99m}\text{Tc}$ -neomannosyl human serum albumin ( $^{99m}\text{Tc}$ -MSA) as a novel receptor binding agent for sentinel lymph node imaging. *Nucl Med Commun* 2004;25:1211-1217.
- Choi JY, Jeong JM, Yoo BC, Kim K, Kim Y, Yang BY, Lee YS, Lee DS, Chung JK, Lee MC. Development of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled mannosylated human serum albumin (MSA) as a lymph node imaging agent for positron emission tomography. *Nucl Med Biol* 2011;38:371-379.
- Choi JY, Jeong JM, Yoo BC, Hong MK, Kim YJ, Lee YS, Lee DS, Chung JK. Ga-68-labeled neolactosylated human serum albumin (LSA) for PET imaging of hepatic asialoglycoprotein receptor. *Nucl Med Biol* 2015;42:53-58.
- Owunwanne A, Weber DA, Spar IL, Wilson GA, O'Mara RE. Technetium Tc 99m plasmin in the diagnosis of inflammatory disease. *Eur J Nucl Med* 1987;12:496-499.
- Arroyo V, Garcia-Martinez R, Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *J Hepatol* 2014;61:396-407.
- Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: Biochemical Properties and Therapeutic Potential. *Hepatology* 2005;41:vol 6
- Zhemosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihi H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M, Rosch F. Processing of generator-produced Ga-68 for medical application. *J Nucl Med* 2007;48:1741-1748.
- Roesch F. Maturation of a key resource-the germanium-68/gallium-68 generator: development and new insights. *Curr Radiopharm* 2012;5:202-211.
- Greene MW, Tucker WD. An improved gallium-68 cow. *Int J Appl Radiat Isot* 1961;12:62-63.
- Jeon JM, Hong MK, Chang YS, Lee YS, Kim YJ, Cheon GJ, Lee DS, Chung JK, Lee MC. Preparation of a promising angiogenesis PET imaging agent: Ga-68-labeled c(RGDyK)-isothiocyanatobenzyl-1,4,7-triazacyclo-nonane-1,4,7-triacetic acid and feasibility studies in mice. *J Nucl Med* 2008;49:830-836

16. Shetty D, Lee YS, Jeong JM.  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography. *Nucl Med Mol Imaging* 2010;44:233-240.
17. Hoigebazar L, Jeong JM, Hong MK, Kim YJ, Lee JY, Shetty D, Lee YS, Lee DS, Chung JK, Lee MC. Synthesis of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled DOTA-nitroimidazole derivatives and their feasibilities as hypoxia imaging PET tracers. *Bioorg Med Chem* 2011;19:2176-2181.
18. Lee JY, Jeong JM, Kim YJ, Jeong HJ, Lee YS, Lee DS, Chung JK. Preparation of Ga-68-NOTA as a renal PET agent and feasibility tests in mice. *Nucl Med Biol* 2014;41:210-215.