

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2019.5.2.83>

Facile radiolabeling of antibody-mimetic protein with In-111 via an inverse-electron-demand Diels-Alder reaction

You Ree Nam^{1,†}, Ha Eun Shim^{1,2,†} and Dong-Eun Lee^{1,*}

¹ Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup, Jeonbuk 56212, Republic of Korea;

² Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu, Republic of Korea

† These authors contributed equally in this work

ABSTRACT

In order to understand the *in vivo* biodistribution of rebody protein (RB), an efficient and simple radiolabeling method for the protein is needed. We demonstrate a detailed protocol for the radiosynthesis of an ¹¹¹In radiolabeled tetrazine prosthetic group and its application to the efficient radiolabeling of trans-cyclooctene-group conjugated rebody protein using inverse-electron-demand Diels-Alder reaction. First, 1,2,4,5-tetrazine (Tz) conjugated with a DOTA chelator, was used for preparing the radiolabeled DOTA complex with ¹¹¹In. Second, the trans-cyclooctene (TCO) functionalized rebody protein was synthesized which allows for the preparation of radiolabeled proteins by copper-free click chemistry. Following incubation with the ¹¹¹In-radiolabeled DOTA complex (¹¹¹In-Tz), the TCO-functionalized RB (TCO-RB) was radiolabeled successfully with ¹¹¹In, with a high radiochemical yield (69.5%) and radiochemical purity (>99%). The radiolabeling of rebody protein by copper-free click chemistry was accomplished within 20 min, with great efficiency in aqueous conditions. These results clearly indicate that the present radiolabeling method will be useful for the efficient and convenient radiolabeling of trans-cyclooctene-group containing biomolecules.

Key Word: Radiolabeling, In-111, inverse-electron-demand Diels-Alder reaction, rebody protein, radio-ITLC

Introduction

Interleukin-6 (IL-6)는 조혈, 면역 반응, 종양 형성 과정 및 염증을 포함한 생물학적 활성을 조절하는 cytokine 계열의 활성 분자이며(1), IL-6 신호 저항에 관련된 주요 치료법은 anti-receptor monoclonal antibodies (mAb), ligand-neutralizing mAb, tyrosine kinase 억제제의 사용 등이 있다(2-3). 그 중에서 mAb를 이용한 치료법은 IL-6 생산을 무효화시키고 암세포의 증식을 억제한다. 그러나 제한된 임상 효능, 높은 생산 비용, 낮은 종양 흡수율, 큰 크기로 인한 혈장으로부터의 느린 제거율 등의 몇 가지 결점이 있

다(4). 그러므로 높은 종양 흡수율 또는 건강한 조직으로부터의 빠른 제거율과 같은 향상된 효능의 새로운 치료용 항체의 개발이 필요하다.

지난 10년 동안 작은 크기 (<30kDa)의 비 항체 scaffold protein은 면역 글로불린 항체에 대한 대안으로 상당한 관심을 끌었으며, 다양한 scaffold protein이 개발되어 광범위한 분야에서 적용 가능성을 보여주었다(5-12). 소형 scaffold protein은 항체와 비교 시 낮은 제조 비용, 쉬운 설계 및 엔지니어링 용이성, 그리고 높은 조직 침투력 등의 장점을 가지고 있다(13). 그 중에서 rebody는 쉬운 설계 및 엔지니어링, 대장균을 사용한 제조 및 대량 생산, 열, pH 및 단백질 분해에

Received: December 16, 2019 / Revised: December 26, 2019 / Accepted: December 28, 2019

Corresponding author : Dong-Eun Lee, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup, Jeonbuk 56212, Republic of Korea, Tel: +82 63 570 3373; Fax: +82 63 570 3371; e-mail: delee@kaeri.re.kr

Copyright©2019 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

대한 높은 안정성, 조직에 대한 높은 침투력 등의 생물물리학적 특징을 가지고 있다(14). 이러한 rebody는 세포 신호 전달 과정을 효과적으로 차단하여 이중 이식 마우스에서 강력한 항 종양 활성을 나타냈고(15-17), 또한 다른 비 항체 scaffold protein과 유사하게 빠른 신장 배출도 관찰되었다(18-19).

약물동역학(PK) 연구는 생물학적 활성 분자 투여 후에 생체 내 주요 조직의 정량 및 추적 정보를 제공하며, 이는 의약품의 전임상 안전성 평가 및 개선된 치료 전략의 개발을 위해 필요하다(20). Tetrazine과 trans cyclooctene (TCO) 사이의 inverse-electron-demand Diels-Alder (IEDDA) 반응은 생체 직교성이 우수하며 반응 속도가 매우 빠른 것으로 알려져 있다(8-12). Tetrazine과 TCO를 활용한 생체 분자의 생체 외 방사성동위원소 표지 및 생체 내 pre-targeting에 대한 많은 연구가 보고되었다(21-26). 나노입자(27), 항체(28-29), affibody (30)와 같은 방사성인듐 표지에 IEDDA 반응 방법이 성공적으로 활용된 사례 또한 보고되어 copper free click reaction의 적용 가능성을 보여주었다. 본 연구에서는 ^{111}In 으로 표지된 tetrazine 및 human IL-6표적 rebody의 효율적인 표지 방법을 보고하고자 한다.

Materials

실험 과정에서 사용된 sodium acetate (#S2889), citric acid (#C0759), ammonium acetate (#A1542)는 Sigma-Aldrich Korea에서 구매하여 사용하였다. 표지 반응을 위한 키레이터 methyltetrazine-DOTA (DOTA-Tz, #FC-6147)은 Futurechem에서 구입하였다. 표지 반응에 사용된 방사성동위원소 ^{111}In 인 $^{111}\text{InCl}_3$ (0.1 M HCl)은 새한산업에서 구입하였다. 구매한 모든 시약은 정제과정 없이 사용하였다. 실험에 사용된 단백질은 TCO를 포함하는 rebody를 합성하여 정제 과정을 거친 후 사용하였다(TCO-RB). 표지 반응 후 정제과정에서 GE Healthcare사의 PD-10 columns (Sephadex™ G-25 M)과 Merck사의 Amicon

Ultra 0.5 mL Centrifugal Filter (10 kDa)을 사용하였다. TLC plate는 Merck사의 TLC silica gel 60 F254 (#1,05554,0001)를 구매하여 사용하였고, 이를 radio TLC scanner (Capintec, Int., #CRC®-25R)를 통해 분석하였다.

Protocol

1. ^{111}In 활용 rebody 단백질의 표지

1.1) ^{111}In 표지 DOTA-Tz의 합성(^{111}In -Tz)

1.1.1) DOTA-Tz (1 mM) 10 μL 에 sodium acetate 완충 용액 (100 mM, pH 5.5) 400 μL 를 첨가한다.

1.1.2) ^{111}In 인 $^{111}\text{InCl}_3$ (74 MBq, 400 μL in 0.1 M HCl)을 첨가한 후 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응한다.

1.1.3) 표지 반응이 종료되면 열을 식힌 후, TLC와 radio-TLC scanner를 활용하여 표지 반응을 분석한다. (용매: 0.1 M citrate, 10% NH_4Ac /Methanol (1:1) 용액)

1.2) ^{111}In -Tz 활용 rebody 단백질의 표지(^{111}In -RB)

1.2.1) TCO를 포함하는 단백질 rebody (TCO-RB)는 본 연구팀이 이전에 보고한 방법을 활용하여 합성하였다(31).

1.2.2) 단백질 rebody를 생리식염수에 녹인 용액 100 μL 에 ^{111}In -Tz (37 MBq) 400 μL 를 첨가하여, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 분 동안 반응한다.

1.2.3) TLC와 radio-TLC scanner를 활용하여 표지 반응을 분석한다. (용매: 0.1 M citrate, 10% NH_4Ac /Methanol (1:1) 용액).

1.3) ^{111}In 표지 RB의 정제

1.3.1) 표지 반응이 종료되면 반응 혼합물을 생리식염수로 희석한다(총 부피: 2.5 mL).

1.3.2) PD-10 desalting 컬럼 (Sephadex G-25 medium, bed volume: 8.3 mL)을 활용하여 정제한다.

1.3.3) 모아진 ^{111}In 표지 RB를 Amicon Ultra centrifugal filter (10 K, 0.5 mL)를 활용하여 농축한다.

1.3.4) 농축된 ^{111}In 표지 RB의 방사선량을 radioactivity dose calibrator를 활용하여 측정한다.

1.3.5) 정제 과정 후 TLC와 radio-TLC scanner를 활용하여 ^{111}In 표지 RB의 방사화학적 순도를 측정한다 (용매: 0.1 M citrate, 10% NH_4Ac /Methanol (1:1) 용액).

2. ^{111}In 표지된 RB의 약물동태학 (PK) 평가

2.1) 미정맥 투여를 위한 ^{111}In -RB의 주사제 제작 및 투여

2.1.1) 정제된 ^{111}In 표지 RB 단백질을 생리식염수에 녹인다($5\ \mu\text{Ci}/100\ \mu\text{L}$).

2.1.2) 실험동물 마우스에 ^{111}In -RB 주사제를 미정맥 투여하여, 정해진 시간마다 채혈한다.

2.2) 감마카운터 활용 혈액 내 방사선량 측정

2.2.1) 채혈한 혈액 시료의 무게를 측정한다.

2.2.2) 혈액 시료를 감마카운터를 통해 방사선량을 측정하여 분석한다.

2.2.3) 혈액 무게 대비 방사선량을 계산한다.

Results & Discussion

본 연구의 전체 반응 과정을 Figure 1과 같이 요약할 수 있다. DTOA-tetrazine 전구체의 ^{111}In 표지 반응의 TLC 분석 결과는 Figure 2와 같으며, 확립된 프로토콜을 통해 높은 방사화학적 효율로 ^{111}In -Tz를 얻을 수 있었다. 정제 과정 없이 rebody 단백질과 20 분 동안 반응하여 radio-TLC로 분석하였을 때, 95%의 높은 방사화학적 효율로 ^{111}In -Tz이 단백질과 반응하였음을 알 수 있었다. 반응하지 않은 ^{111}In -Tz을 10 kDa cut-off filter를 활용 원심분리 정제하여 specific activity가 $18.1\ \text{MBq}/\text{mg}$ 이며, 방사화학적 순도는 99%이상의 ^{111}In 표지 rebody를 얻을 수 있었다. ^{111}In 표지 rebody 단백질의 혈액 내 동태를 알아보기 위해 수행한 마우스 PK 시험(pharmacokinetic profile)에서도 24 시간 후 98% 이상의 안정성을 나타냈다 (Figure 3). 따라서 본 프로토콜은 다양한 방사성동위원소 표지 화합물 합성 및 분자영상 연구에 유용하게 활용될 것으로 기대 된다.

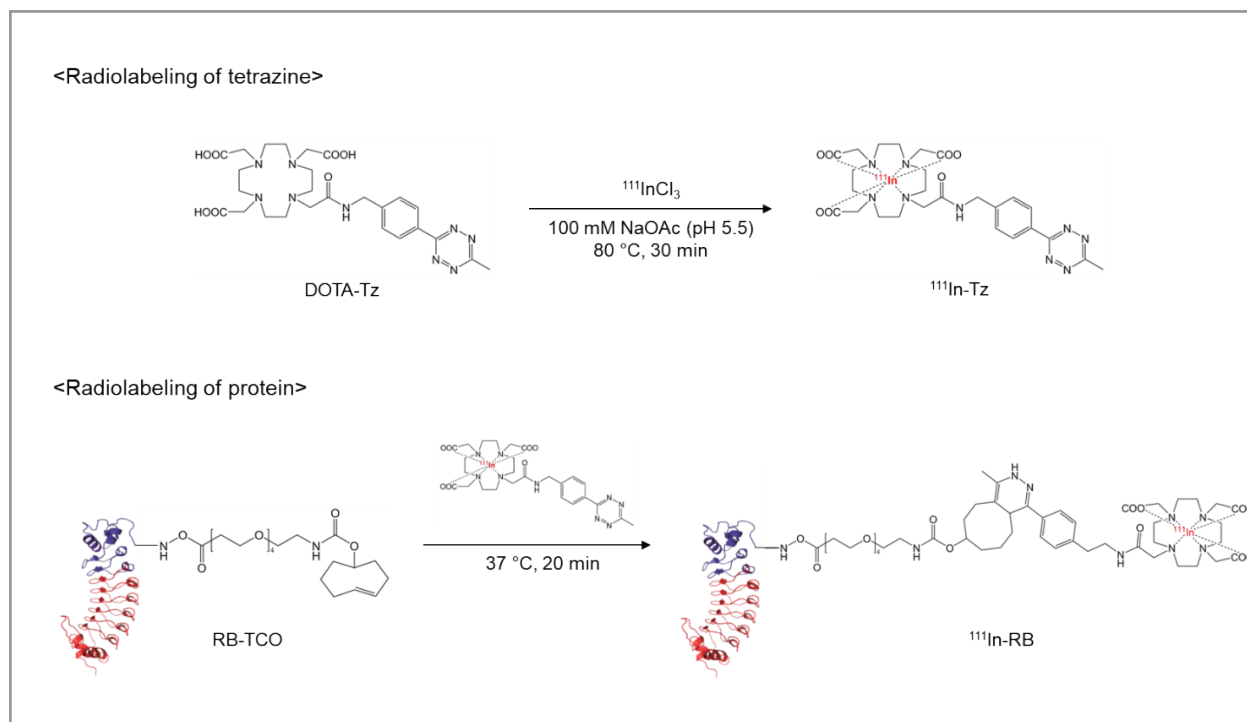


Figure 1. Synthetic procedure of ^{111}In -rebody protein.

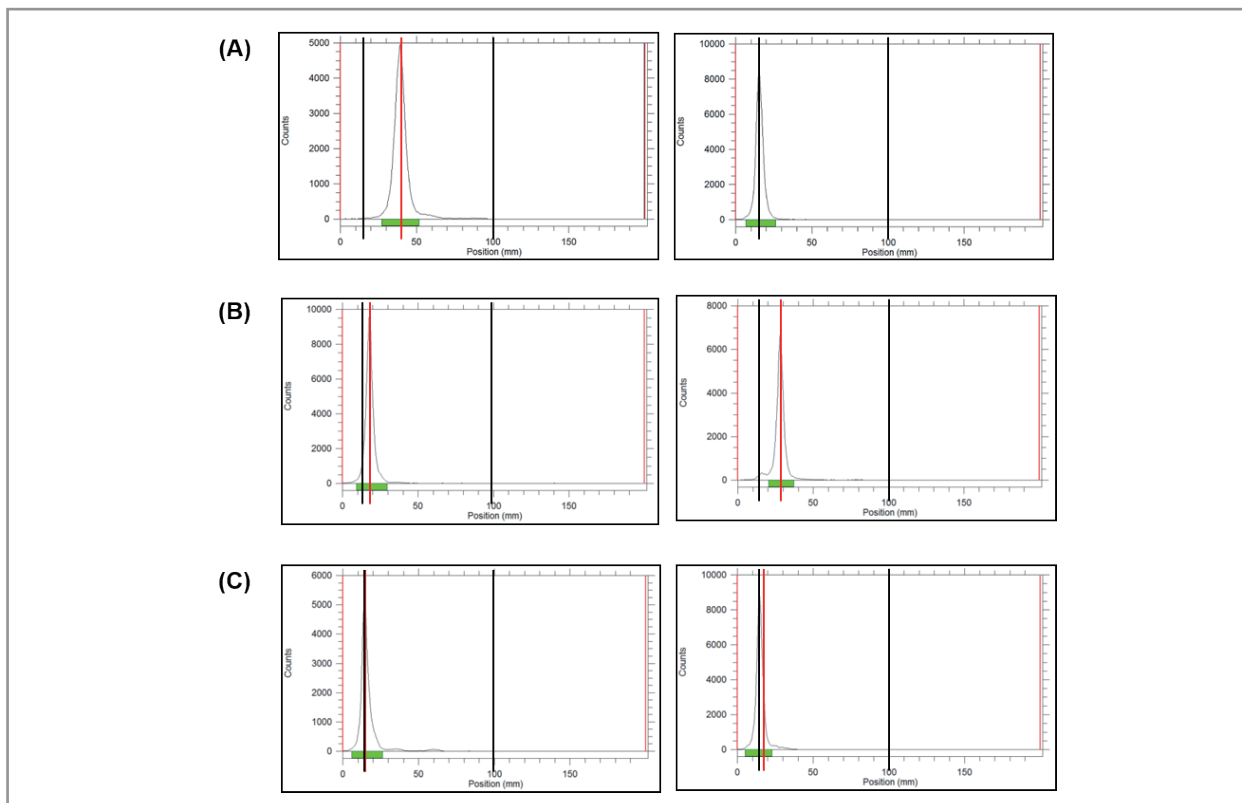


Figure 2. Radio TLC chromatogram in 0.1 M citric acid (left) and 10% NH₄Ac/Methanol (1:1) (right). (A) ¹¹¹InCl₃ free; (B) ¹¹¹In-Tz (C) After purification of ¹¹¹In-repebody protein.

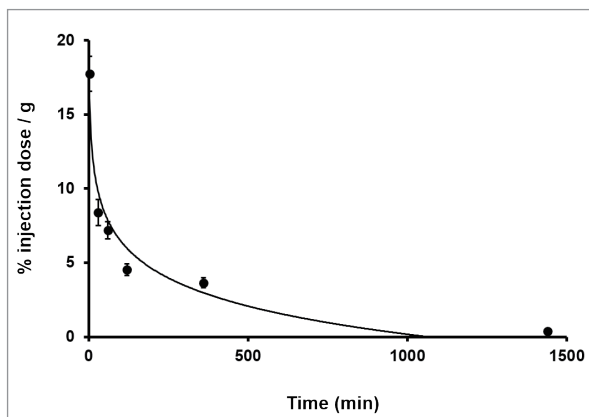


Figure 3. Pharmacokinetic results of ¹¹¹In-repebody protein in male ICR mouse (n = 5).

Conclusion

본 프로토콜에서는 TCO를 포함하는 단백질에 방사성 동위원소 인듐을 표지 하는 방법을 소개하였다. 이 방법을 사용하여 ¹¹¹In표지 DOTA-Tz를 95% 이상의 방

사화학적 효율로 얻을 수 있었다. 표지 된 ¹¹¹In-Tz을 repebody 단백질과 반응하였을 때 높은 방사화학적 수율로 반응하는 것을 관찰할 수 있었으며, 마우스 혈액 내에서 24시간 안에 빠르게 배출되는 것을 보여주었다. 따라서 본 연구의 합성 프로토콜은 방사성동위원소 인듐을 활용하기 위하여 copper free click반응전구체 DOTA-Tz 및 단백질 표지 방법을 제공함으로써 향후 분자영상 연구에 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

References

1. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005;23:1-21.
2. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and

- its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* 2007;110:1911-1928.
3. Nagasaki T, Hara M, Shiga K, Takeyama H. Relationship between inflammation and cancer progression: review of the recent advances in interleukin-6 signaling and its blockage in cancer therapy. *Receptors Clin Investig* 2014;1:e202.
 4. Chames P, Regenmortel MV, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* 2009;157:220-233.
 5. Skrlec K, Strukelj B, Berlec A. Non-immunoglobulin scaffolds: a focus on their targets. *Trends Biotechnol* 2015;33:408-418.
 6. Gronwall C, Stahl S. Engineered affinity proteins—generation and applications. *J Biotechnol* 2009;140:254-269.
 7. Skerra A. Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:295-304.
 8. Simeon R, Chen Z. In vitro-engineered non-antibody protein therapeutics. *Protein Cell* 2017;9:3-14.
 9. Nuttall SD, Walsh RB. Display scaffolds: protein engineering for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:609-615.
 10. Binz HK, Amstutz P, Plückthun A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* 2005;23:1257-1268.
 11. Nygren PA, Skerra A. Binding proteins from alternative scaffolds. *J Immunol Methods* 2004;290:3-28.
 12. Banta S, Dooley K, Shur O. Replacing antibodies: engineering new binding proteins. *Annu Rev Biomed Eng* 2013;15:93-113.
 13. Hey T, Fiedler E, Rudolph R, Fiedler M. Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. *Trends Biotechnol* 2005;23:514-522.
 14. Kim TY, Seo HD, Lee JJ, Kang JA, Kim WS, Kim HM, Song HY, Park JM, Lee DE, Kim HS. A dimeric form of a small-sized protein binder exhibits enhanced anti-tumor activity through prolonged blood circulation. *J Control Release* 2018;279:282-291.
 15. Lee JJ, Kim HJ, Yang CS, Kyeong HH, Choi JM, Hwang DE, Yuk JM, Park K, Kim YJ, Lee SG, Kim D, Jo EK, Cheong HK, Kim HS. A high-affinity protein binder that blocks the IL-6/STAT3 signaling pathway effectively suppresses non-small cell lung cancer. *Mol Ther* 2014;22:1254-1265.
 16. Hwang DE, Ryou JH, Oh JR, Han JW, Park TK, Kim HS. Anti-human VEGF reobody effectively suppresses choroidal neovascularization and vascular leakage. *PLoS One* 2016;11:e0152522.
 17. Hwang DE, Choi JM, Yang CS, Lee JJ, Heu W, Jo EK, Kim HS. Effective suppression of C5a-induced proinflammatory response using anti-human C5a reobody. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;477:1072-1077.
 18. Mushtaq S, Rho JK, Kang JA, Lee JJ, Kim JY, Nam YR, Yun SJ, Lee GH, Park SH, Lee DE, Kim HS. Radiolabeling and preliminary biodistribution study of ^{99m}Tc-labeled antibody-mimetic scaffold protein reobody for initial clearance properties. *Bioorg Med Chem Lett* 2017;27:5060-5064.
 19. Zahnd C, Kawe M, Stumpp MT, de Pasquale C, Tamaskovic R, Nagy-Davidescu G, Dreier B, Schibli R, Binz HK, Waibel R, Plückthun A. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size. *Cancer Res* 2010;70:1595-1605.
 20. Tolmachev V, Orlova A. Influence of labelling methods on biodistribution and imaging properties of radiolabelled peptides for visualisation of molecular therapeutic targets. *Curr Med Chem* 2010;17:2636-2655.
 21. Keinänen, O, Li X, Chenna NK, Lumen D, Ott J, Molthoff CFM, Sarparanta M, Helariutta K, Vuorinen T,

- Windhorst AD, Airaksinen AJ. A new highly reactive and low lipophilicity fluorine-18 labeled tetrazine derivative for pretargeted PET Imaging. *ACS Med Chem Lett* 2016;7:62-66.
22. Choi JY, Lee BC. Click reaction: an applicable radiolabeling method for molecular imaging. *Nucl Med Mol Imaging* 2015;49:258-267.
23. Zeglis BM, Sevak KK, Reiner T, Mohindra P, Carlin SD, Zanzonico P, Weissleder R, Lewis JS. A pretargeted PET imaging strategy based on bioorthogonal Diels-Alder click chemistry. *J Nucl Med* 2013;54:1389-1396.
24. Selvaraj R, Fox JM. trans-Cyclooctene - a stable, voracious dienophile for bioorthogonal labeling. *Curr Opin Chem Biol* 2013;17:753-760.
25. Herth MM, Andersen VL, Lehel S, Madsen J, Knudsen GM, Kristensen JL. Development of a ¹¹C-labeled tetrazine for rapid tetrazine-trans-cyclooctene ligation. *Chem Commun* 2013;49:3805-3807.
26. Li Z, Cai H, Hassink M, Blackman ML, Brown RC, Conti PS, Fox JM. Tetrazine-trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of ¹⁸F labeled probes. *Chem Commun* 2010;46:8043-8045.
27. van Onzen AHAM, Rossin R, Schenning APHJ, Nicolay K, Milroy LG, Robillard MS, Brunsveld L. Tetrazine-trans-cyclooctene chemistry applied to fabricate self-assembled fluorescent and radioactive nanoparticles for in vivo dual mode imaging. *Bioconjugate Chem* 2019;30:547-551.
28. Rossin R, van den Bosch SM, ten Hoeve W, Carvelli M, Versteegen RM, Lub J, Robillard MS. Highly Reactive trans-cyclooctene tags with improved stability for Diels-Alder chemistry in living systems. *Bioconjugate Chem* 2013;24:1210-1217.
29. Rossin R, Verkerk PR, van den Bosch SM, Vulderson RC, Verel I, Lub J, Robillard MS. In vivo chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. *Angew Chem Int Ed* 2010;49:3375-3378.
30. Rossin R, Lappchen T, van den Bosch SM, Laforest R, Robillard MS. Diels-Alder reaction for tumor pretargeting: In vivo chemistry can boost tumor radiation dose compared with directly antibody. *J Nucl Med* 2013;54:1989-1995.
31. Kim TY, Park JH, Shim HE, Choi DS, Lee DE, Song JJ, Kim HS. Prolonged half-life of small-sized therapeutic protein using serum albumin specific protein binder. *J Control Release* 2019;315:31-39.