

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2019.5.1.11>

Radiolabeling of antibody-mimetic scaffold protein with ^{99m}Tc tricarbonyl precursor via hexahistidine (His_6)-tag

Ha Eun Shim,^{1,2} Do Hee Kim,¹ Chang Heon Lee,¹ Dae seong Choi¹ 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

ABSTRACT

Recently, antibody-like scaffold proteins have received a great deal of interest in diagnosis and therapy applications because of their intrinsic features that are often required for tumor imaging and therapy. Intrinsic issues that are associated with therapeutic application of antibody-like scaffold proteins, particularly in cancer treatment, include an efficient and straightforward radiolabeling for understanding in vivo biodistribution and excretion route, and monitoring therapeutic responses. Herein, we report an efficient and straightforward method for radiolabeling of antibody-like scaffold proteins with the $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$ (^{99m}Tc -tricarbonyl) by using a site-specific direct labeling method via hexahistidine-tag, which is a widely used for general purification of recombinant proteins with His-affinity chromatography. Repebody is a new class of antibody-like scaffold protein that consists of highly diverse leucine-rich repeat (LRR) modules. Although all possible biomedical applications with repebody are ongoing, its in vivo biodistribution and excretion pathway has not yet been explored. In this study, hexahistidine (His_6)-tag bearing repebody (rEgH9) was labeled with $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ -tricarbonyl. Repebody protein was radiolabeled with high radiolabeling efficiency (>90%) and radiolabeled compound was more than 99% pure after purification. These results clearly demonstrate that the present radiolabeling method will be useful molecular imaging study.

Key Word: Radiolabeling, ^{99m}Tc , tricarbonyl precursor, repebody protein, radio-ITLC

Introduction

약물동역학 (PK) 연구, 특히 생체 분포는 생물학적 활성 분자 투여 후에 모든 주요 조직에서 중요한 정량 및 추적 정보를 제공한다. 또한 의약품의 전임상 안전성 평가 및 개선된 치료 전략의 개발을 위해서도 필요하다(1). 다양한 방사성 동위원소 중 technetium- 99m (^{99m}Tc)은 핵의학 분야에서 영상 진단 및 신약 후보 단백질의 생체 분포를 평가하는 데 가장 일반적으로 사용되는 방사성 핵종이다. 짧은 반감기 (6시

간), 140keV의 유리한 γ 광자 방출 (SPECT 이미징에 사용 가능), 환자에게 낮은 피폭량, 저렴한 가격 및 $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator의 탁월한 가용성으로 인해 초기 연구에 가장 적합한 방사성 동위원소다(2). ^{99m}Tc 을 이용한 약물동역학 데이터는 생체 분포 및 치료 전략을 개발하는 데 도움이 될 뿐만 아니라 전임상 및 임상 연구에 유용할 수 있는 중요한 체계적인 정보를 제공한다. 핵의학 분야에서 저분자 생리활성 물질, 펩타이드, 단백질 및 항체 등의 단백질 의약품 후보에 ^{99m}Tc 표지를 위한 몇 가지 방법이 개발되었다(3-4). 그 중

Received: June 17, 2019 / Revised: July 10, 2019 / Accepted: July 12, 2018

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

Waibel 등은 hexahistidine (His₆)을 함유한 single-chain Fv antibody에 [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺을 이용한 매우 안정하고 쉬운 표지방법(His₆ site-specific direct labeling method)을 보고하였다(5-7). 재조합 단백질의 N-terminus에서 태그 된 His₆를 사용한 방사성 표지는 몇 가지 이점을 제공할 수 있다. 생체 분자의 N-terminus에 위치한 peptide 기반 chelating group의 임계 분석 결과, N-terminus의 amino acid 조성이 생물학적 분배 측면, 특히 간 흡수 및 간 담즙 배설에서 핵심적인 역할을 한다는 것을 보여주었기 때문이다(8-10). N-terminus에 극성 또는 전하를 띠는 친수성 side chain을 갖는 amino acid group을 사용하면 일반적으로 간 흡수를 감소시키고 낮은 수준의 간 담즙 배설을 유발하였다. 그러나 C-terminus의 구성은 대개 그 효과와 무관하다(11-13). N-terminus에 부착된 chelator를 이용하여 ^{99m}Tc가 표지된 단백질은 상당히 낮은 간 흡수 및 생체 내 안정성을 보여준다(14).

Interleukin-6 (IL-6)는 조혈, 면역 반응, 종양 형성 과정 및 염증을 포함한 광범위한 생물학적 활성을 조절하는 중요한 역할을 하는 cytokine 계열의 활성 분자이다(15). IL-6 신호에 저항하는 주요 치료법은 anti-receptor monoclonal antibodies (mAb), ligand-neutralizing mAb, tyrosine kinase 억제제의 사용을 포함한다(16-17). mAb를 이용한 항IL-6 치료법은 IL-6 생산을 무효화시키고 암세포의 증식을 극적으로 억제한다. 그러나 제한된 임상 효능, 높은 생산 비용, 낮은 종양 흡수율, 큰 크기로 인한 혈장으로부터의 느린 제거율과 같은 몇 가지 결점이 있다(18). 그러므로 높은 흡수율이나 건강한 조직으로부터의 빠른 제거율 같은 향상된 효능을 지닌 새롭고 견고한 치료 항체의 개발이 필요하다. 대체 결합 scaffold protein의 개발은 작은 크기, 단순한 구조, 안정적이고 높은 가용성을 제공할 수 있으며 표적 친화성 및 특이성 외에도 다양한 분자 특징의 특정한 조절을 가능하게 할 수 있다(19-21).

방사성동위원소로 표지된 DARPins (22), affibody (23), anticalin (24), knottin (25) 그리고 fibronectin domain

(26)과 같은 antibody-mimetic protein은 전임상 연구에서 종양 영상화용 조영제로서의 가능성을 보여주었다. 그 중 repebody는 대외 항원에 대한 적응 면역 반응으로 매우 다양한 leucine-rich repeat(LRR) 모듈로 구성된 새로운 인공 결합 scaffold다(27). Repebody는 가용성 표현 수준이 높고, 라이브러리를 쉽게 만들 수 있으며, modular engineering을 이용한 결합 특성의 설계가 용이하다(27-28). Repebody 라이브러리는 phage display로 구성되어 있고, isothermal titration calorimetry를 통해 human IL-6의 선택된 repebody의 결합 친화성은 human IL-6과 수용체 사이의 상호 작용을 효율적으로 억제할 수 있다는 것을 시사했다(28).

본 연구에서는 human IL-6 표적 repebody (rEgH9)의 건강한 마우스의 주요 장기에서 생체 분포 및 혈중 농도를 연구하기 위해서 [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺를 사용하여 repebody (rEgH₉)에 태그 된 His₆를 이용하여 표지 방법을 보고하고자 한다.

Materials

실험 과정에서 사용된 sodium boranocarbonate (CORM-A1, #SML0315), sodium tetraborate decahydrate (#S9640), sodium L-tartrate dibasic dihydrate (#228729), sodium carbonate (#451614)는 Sigma-Aldrich Korea에서 구매하여 사용하였다. 표지 반응에 사용된 방사성 동위원소 [^{99m}Tc]NaTcO₄는 새한산업에서 구입하였다. 구매한 모든 시약은 정제 과정 없이 사용하였다. 실험에 사용된 단백질은 hexahistidine (His₆)-tag을 포함하는 repebody를 합성하여 정제과정을 거친 후 사용하였다. 표지 반응 후 정제과정에서 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. ^{99m}Tc 활용 reobody 단백질의 표지

1.1) Tricarbonyl 전구체 kit의 제작

1.1.1) Sodium boranocarbonate (CORM-A1) 49.5 mg을 H_2O 5.5 mL에 녹인다. (Vial 1)

1.1.2) Sodium tetraborate decahydrate 31.35 mg (0.08 mol), sodium L-tartrate dibasic tartrate dihydrate 93.5 mg (0.41 mol), sodium carbonate 78.65 mg (0.74 mol)을 5.5 mL H_2O 에 녹인다. (Vial 2)

1.1.3) Vial 1을 Vial 2에 넣어 준 후, 질소로 bubbling을 한다.

1.1.4) 세척된 kit 보관용 vial에 앞서 준비한 수용액을 1 mL씩 소분한다.

1.1.5) 나누어진 kit vial을 각각 질소로 충분히 bubbling을 해준다.

1.1.6) 각각 고무마개로 막은 후 급속냉각을 시킨다.

1.1.7) 냉각시킨 kit vial의 고무마개를 살짝 열고, 하루 동안 동결 건조시킨다.

1.1.8) 질소로 bubbling한 후에 냉동실에 보관하여 사용한다.

1.2) ^{99m}Tc -tricarbonyl ($^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$)의 합성

1.2.1) [^{99m}Tc]NaTcO₄ 1 mL를 tricarbonyl kit에 넣고 잘 녹을 수 있도록 살짝 흔들어 준다.

1.2.2) 반응물을 100 °C, water bath에서 30 분간 반응시킨다.

1.2.3) 반응이 종료되면 약 5~10분간 실온에서 열을 식힌다.

1.2.4) 1 N HCl을 사용하여 pH 7.4로 맞춘다.

1.2.5) TLC와 radio-TLC scanner를 활용하

여 표지 반응을 분석한다. (용매: 생리식염수, Methanol/HCl (99:1) 용액).

1.3) ^{99m}Tc -tricarbonyl 활용 reobody 단백질의 표지

1.3.1) His₆-tag를 포함하는 단백질 reobody는 본 연구팀이 이전에 보고한 방법을 활용하여 합성하였다(28).

1.3.2) 단백질 reobody를 생리식염수에 녹인 용액 (1 mg/mL) 100 μL 에 ^{99m}Tc -tricarbonyl (120 MBq) 100 μL 를 첨가하여, 37 °C에서 1 시간 동안 반응한다.

1.3.3) 표지 반응이 종료되면 Amicon Ultra Centrifugal Filter (10 kDa)을 활용하여 정제한다(12,000 rpm, 10분).

1.3.4) TLC와 radio-TLC scanner를 활용하여 순도를 분석한다. (용매: 생리식염수, Methanol/HCl (99:1) 용액).

2. ^{99m}Tc 표지 된 reobody 단백질의 안정성 검사 및 histidine challenge

2.1) 마우스 혈청 내 안정성 검사

2.1.1) ^{99m}Tc -reobody (1.85 MBq/100 μL)에 마우스 혈청 (900 μL)를 첨가하여, 37 °C에서 24 시간 동안 반응한다.

2.1.2) TLC와 radio-TLC scanner를 활용하여 반응물의 안정성을 분석한다. (용매: 생리식염수, Methanol/HCl (99:1) 용액).

2.2) Histidine challenge

2.2.1) ^{99m}Tc -reobody에 과량의 histidine (1000 당량)을 첨가하여, 37 °C에서 24 시간 동안 반응한다.

2.2.2) TLC와 radio-TLC scanner를 활용하여 반응물의 안정성을 분석한다. (용매: 생리식염수, Methanol/HCl (99:1) 용액).

Results & Discussion

본 연구의 전체 반응 과정을 Figure 1과 같이 요약할 수 있다. Tricarbonyl 전구체의 ^{99m}Tc 표지 반응의 TLC 분석 결과는 Figure 2와 같으며, 확립된 프로토콜을 통해 약 95% 이상의 방사화학적 수율로 ^{99m}Tc -tricarbonyl을 얻을 수 있었다. 정제 과정 없이 reebody 단백질과 1 시간 동안 반응하여 radio-TLC로 분석하였을 때, 90%의 높은 방사화학적 수율로

^{99m}Tc -tricarbonyl 이 단백질과 반응하였음을 알 수 있었다. 반응하지 않은 ^{99m}Tc -tricarbonyl은 10 kDa cut-off filter를 활용 원심분리 정제하여 specific activity가 925 MBq/mg이며, 방사화학적 순도는 99% 이상의 ^{99m}Tc 표지 reebody를 얻을 수 있었다. ^{99m}Tc 표지된 reebody 단백질의 생체 내 안정성을 알아보기 위해 진행한 안정성 검사에서 마우스 혈청 내에서 24 시간 후 98% 이상의 안정성을 나타냈다 (Figure 3). 또한 ^{99m}Tc 표지 복합체의 결합강도를 평가하기 위하여

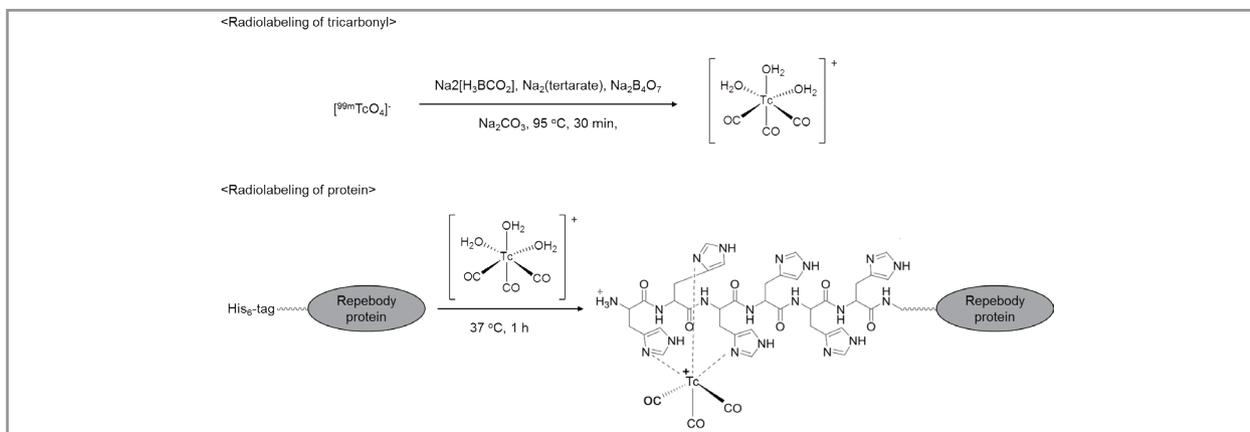


Figure 1. Synthetic procedure of ^{99m}Tc -reebody protein.

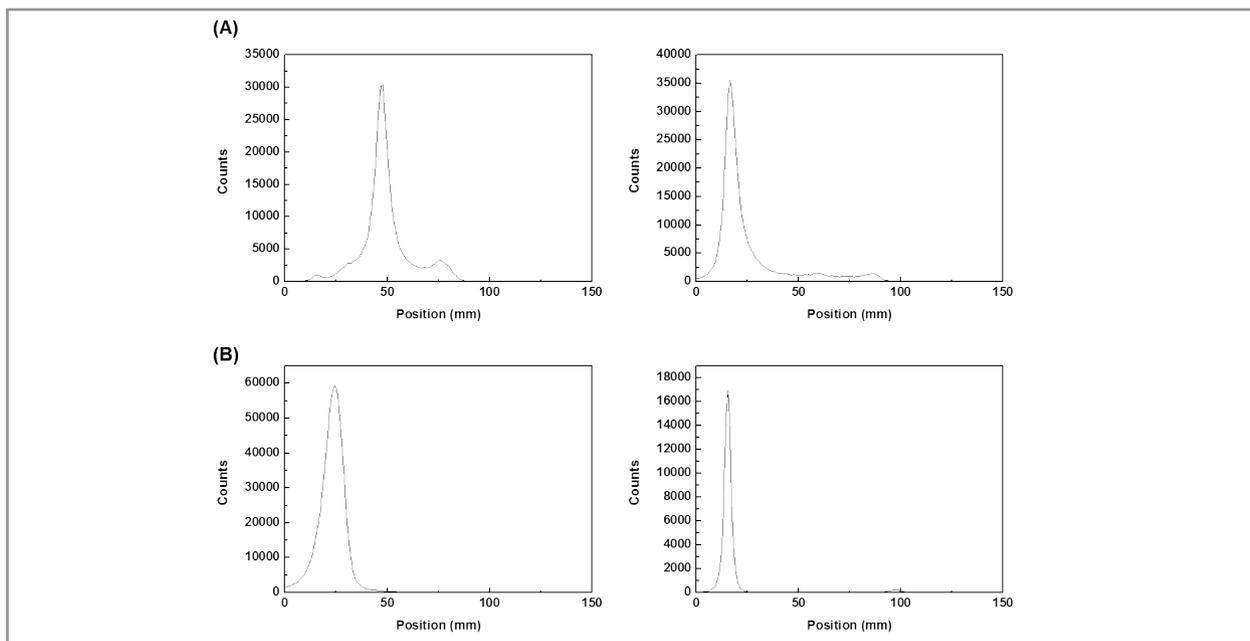


Figure 2. Radio TLC chromatogram in methanol/HCl (99:1) (left) and saline (right). (A) $^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3^+$; (B) After purification of ^{99m}Tc -reebody protein.

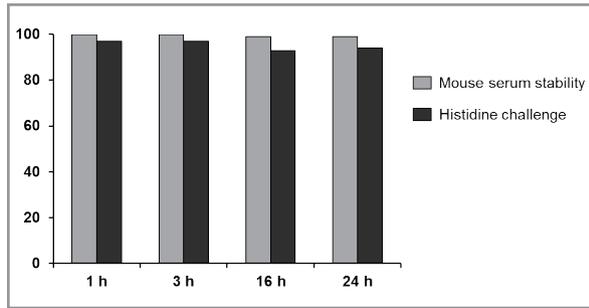


Figure 3. Stability test of ^{99m}Tc -repebody protein in mouse serum and histidine challenge.

histidine challenge를 수행하였다. ^{99m}Tc -repebody에 과량의 histidine (1000 당량)을 넣어 24시간 동안 확인하였고 95% 이상의 방사화학적 순도를 확인하였다 (Figure 3). 따라서 본 프로토콜을 통해 합성된 물질 (^{99m}Tc -repebody)이 체내 분포 평가 및 단일 광자 단층 촬영을 통한 거동 연구가 가능함을 보여준다.

Conclusion

본 프로토콜에서는 His₆-tag을 포함하는 단백질을 방사성 테크네튬을 사용하여 표지 하는 방법을 소개하였다. 이 방법을 사용하여 ^{99m}Tc 표지 tricarbonyl을 95% 이상의 방사화학적 수율로 얻을 수 있었다. 표지된 ^{99m}Tc -tricarbonyl을 repebody 단백질과 반응하였을 때 높은 방사화학적 수율로 반응하는 것을 관찰할 수 있었으며, histidine challenge에서 높은 안정성을 보여주었다. 따라서 본 연구의 합성 프로토콜은 방사성 동위원소 테크네튬을 활용하기 위한 전구체 tricarbonyl의 제작 및 단백질 표지 방법을 제공함으로써 향후 분자영상 연구에 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

References

1. 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.
2. Núñez R, Erwin WD, Wendt RE 3rd, Stachowiak A, Mar M, Stevens D, Madewell JE, Yeung HW, Macapinlac HA. Acquisition parameters for oncologic imaging with a new SPECT/multislice CT scanner. *Mol Imaging Biol* 2010;12:110-138.
3. Tait JF, Smith C, Gibson DF. Development of annexin V mutants suitable for labeling with Tc(I)-carbonyl complex. *Bioconjugate Chem* 2002;13:1119-1123.
4. Badar A, Williams J, de Rosales RT, Tavaré R, Kampmeier F, Blower PJ, Mullen GE. Optimising the radiolabelling properties of technetium tricarbonyl and His-tagged proteins. *EJNMMI Res* 2014;4:14-21.
5. Waibel R, Alberto R, Willuda J, Finnern R, Schibli R, Stichelberger A, Egli A, Abram U, Mach JP, Plückerthun A, Schubiger PA. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. *Nat Biotechnol* 1999;17:897-901.
6. Egli A, Alberto R, Tannahill L, Schibli R, Abram U, Schaffland A, Waibel R, Tourwé D, Jeannin L, Iterbeke K, Schubiger PA. Organometallic ^{99m}Tc -aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. *J Nucl Med* 1999;40:1913-1917.
7. Schibli R, Schubiger PA. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:1529-1542.
8. Engfeldt T, Tran T, Orlova A, Widström C, Feldwisch J, Abrahmsen L, Wennborg A, Karlström AE, Tolmachev V. ^{99m}Tc -chelator engineering to improve

- tumour targeting properties of a HER2-specific Affibody molecule. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:1843-1853.
9. Tran T, Engfeldt T, Orlova A, Widström C, Bruskin A, Tolmachev V, Karlström AE. In vivo evaluation of cysteine-based chelators for attachment of ^{99m}Tc to tumor-targeting Affibody molecules. *Bioconjugate Chem* 2007;18:549-558.
 10. Tran T, Engfeldt T, Orlova A, Sandström M, Feldwisch J, Abrahmsén L, Wennborg A, Tolmachev V, Karlström AE. ^{99m}Tc -maEEE-ZHER2:342, an Affibody molecule-based tracer for the detection of HER2 expression in malignant tumors. *Bioconjugate Chem* 2007;18:1956-1964.
 11. Ekblad T, Tran T, Orlova A, Widström C, Feldwisch J, Abrahmsén L, Wennborg A, Karlström AE, Tolmachev V. Development and preclinical characterisation of ^{99m}Tc -labelled Affibody molecules with reduced renal uptake. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35:2245-2255.
 12. Tran TA, Ekblad T, Orlova A, Sandström M, Feldwisch J, Wennborg A, Abrahmsén L, Tolmachev V, Eriksson Karlström A. Effects of lysine-containing mercaptoacetyl-based chelators on the biodistribution of ^{99m}Tc -labeled anti-HER2 Affibody molecules. *Bioconjugate Chem* 2008;19:2568-2576.
 13. Ahlgren S, Wållberg H, Tran TA, Widström C, Hjertman M, Abrahmsén L, Berndorf D, Dinkelborg LM, Cyr JE, Feldwisch J, Orlova A, Tolmachev V. Targeting of HER2-expressing tumors with a site-specifically ^{99m}Tc -labeled recombinant affibody molecule, ZHER2:2395, with C-terminally engineered cysteine. *J Nucl Med* 2009;50:781-789.
 14. Ekblad T, Orlova A, Feldwisch J, Wennborg A, Karlström AE, Tolmachev V. Positioning of ^{99m}Tc -chelators influences radiolabeling, stability and biodistribution of Affibody molecules. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:3912-3914.
 15. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005;23:1-21.
 16. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* 2007;110:1911-1928.
 17. 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.
 18. Chames P, Regenmortel MV, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* 2009;157:220-233.
 19. Sawyer N, Speltz EB, Regan L. NextGen protein design. *Biochem Soc Trans* 2013;41:1131-1136.
 20. Banta S, Dooley K, Shur O. Replacing antibodies: engineering new binding proteins. *Annu Rev Biomed Eng* 2013;15:93-113.
 21. Lindbo S, Garousi J, Åstrand M, Honarvar H, Orlova A, Hober S, Tolmachev V. Influence of histidine-containing tags on the biodistribution of ADAPT scaffold proteins. *Bioconjugate Chem* 2016;27:716-726.
 22. Goldstein R, Sosabowski J, Livanos M, Leyton J, Vigor K, Bhavsar G, Nagy-Davidescu G, Rashid M, Miranda E, Yeung J, Tolner B, Plückthun A, Mather S, Meyer T, Chester K. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015;42:288-301.
 23. Ahlgren S, Tolmachev V. Radionuclide molecular imaging using Affibody molecules. *Curr Pharm Biotechnol* 2010;11:581-589.
 24. Terwisscha van Scheltinga AG, Lub-de Hooge MN, Hinner MJ, Verheijen RB, Allersdorfer A, Hülsmeier M, Nagengast WB, Schröder CP, Kosterink JG, de Vries EG, Audoly L, Olwill SA. In vivo visualization of MET tumor expression and anticalin

- biodistribution with the MET-specific anticalin ^{89}Zr -PRS-110 PET tracer. *J Nucl Med* 2014;55:665-671.
25. Ackerman SE, Currier NV, Bergen JM, Cochran JR. Cystine-knot peptides: emerging tools for cancer imaging and therapy. *Expert Rev Proteomics* 2014;11:561-572.
26. Hackel BJ, Kimura RH, Gambhir SS. Use of ^{64}Cu -labeled fibronectin domain with EGFR-overexpressing tumor xenograft: molecular imaging. *Radiology* 2012;263:179-188.
27. Lee SC, Park K, Han J, Lee JJ, Kim HJ, Hong S, Heu W, Kim YJ, Ha JS, Lee SG, Cheong HK, Jeon YH, Kim D, Kim HS. Design of a binding scaffold based on variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates by module engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:3299-3304.
28. 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.