

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2017.3.2.98>

Synthesis of ^{125}I -labeled tetrazine for efficient radiolabeling of human serum albumin

Ha Eun Shim,^{1,2} and Jongho Jeon^{1,3,*}

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

³ Department of Radiation Biotechnology and Applied Radioisotope Science, University of Science and Technology, Daejeon 34113, Republic of Korea

ABSTRACT

We demonstrate a detail protocol for the radiosynthesis of a ^{125}I -labeled tetrazine prosthetic group and its application to the efficient radiolabeling of trans-cyclooctene-group conjugated human serum albumin (3) using inverse-electron-demand Diels-Alder reaction. Radioiodination of the stannylated precursor (2) was carried out by using $^{125}\text{I}]\text{NaI}$ and chloramine T as an oxidant at room temperature for 15 min. After HPLC purification of the crude product, the purified ^{125}I -labeled azide ($^{125}\text{I}]\text{1}$) was obtained with high radiochemical yield ($65 \pm 8\%$, $n = 5$) and excellent radiochemical purity ($>99\%$). Inverse-electron-demand Diels-Alder reaction between ($^{125}\text{I}]\text{1}$) and 3 gave the ^{125}I -labeled human serum albumin ($^{125}\text{I}]\text{4}$) with more than 99% of radiochemical yield as determined by radio-thin-layer chromatography (radio-TLC). 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, Radioactive iodine, Bioconjugation, Tetrazine, Albumin

Introduction

Inverse-electron-demand Diels-Alder 반응은 특이성이 높으며 반응 속도가 매우 빠르기 때문에 다양한 종류의 펩타이드, 항체와 같은 생체 물질 및 나노 물질의 체내 표지 반응에 폭넓게 활용 되고 있다(1). 또한 핵의학 영상용 방사성 동위원소(^{18}F , ^{11}C , ^{64}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 등)가 표지 된 tetrazine혹은 strained alkene을 활용하여 pre-targeted 방법을 통한 종양의 표적 영상화 연구도 활발히 진행 중이다(2). 방사성 요오드는 양전자방출단층촬영 (PET), 단일광자방출단층촬영 (SPECT)과 같은 질병의 진단영상에 활용 되고 있을 뿐만 아니라 갑상선 암을 치료하는 중요한 방사성의약품으로 전임상 연구 및 임상에서 사용되어 지고 있다.(3,4) 따라서 방사

성요오드를 효율적으로 표지 하는 방법의 개발은 임상 분야 뿐만 아니라 분자영상, 물질의 거동평가와 같은 기초연구에도 매우 유용하게 활용 될 수 있다. 친전자성 방향족 치환 반응을 활용하여 방사성요오드를 직접 단백질에 도입 하는 방법은 기존에 널리 쓰는 강력한 산화제가 단백질의 구조에 영향을 줄 수 있는 가능성이 있고 체내에서 효소에 의한 탈 요오드화 반응이 쉽게 일어난다는 단점이 있다. 따라서 방사성 요오드가 tetrazine구조에 표지 된 보결그룹을 활용하면 기존 반응의 문제점을 보완 할 수 있는 새로운 방사성요오드 표지 방법이 될 것으로 기대 된다. 본 protocol에서는 기존 발표된 ^{125}I 이 도입 된 tetrazine의 합성 방법과 이를 활용한 human serum albumin (HSA)의 표지 반응 및 절차를 소개 하고자 한다(5).

Received: December 13, 2017/ Revised: December 20, 2017/ Accepted: December 23, 2017

Corresponding Author : Jongho Jeon, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, 29 Geungu-gil, Jeongeup, Jeonbuk 56212, Republic of Korea
Tel: +82 63 570 3374; Fax: +82 63 570 3371; e-mail: jeonj@kaeri.re.kr

Copyright©2017 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

Materials

Name of Reagent/Equipment	Company	Catalog Number/Model Number
Chloramine T trihydrate	Sigma	402869
[¹²⁵ I]NaI in aq. NaOH	Perkin-Elmer	NEZ033A010MC
Sodium metabisulfite	Sigma	S9000
Formic acid	Sigma	251364
Sep-Pak tC18 plus cartridge	Waters	WAT036800
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma	D2650
Acetone	Sigma	650501
Ethanol (EtOH)	Sigma	459844
TLC silica gel 60 F ₂₅₄	Merck	1.05554.0001
Analytical HPLC	Agilent	1290 Infinity
Preparative HPLC	Agilent	1260 Infinity
Analytical C18 reverse-phase column	Agilent	Eclipse XDB-C18 (size: 4.6 x 250 mm)
Preparative C18 reverse-phase column	Agilent	Eclipse PrepHT XDB-C18 (size: 21.2 x 150 mm)
Radio TLC scanner	Bioscan	AR-2000
Radioisotope dose calibrator	Capintec, Inc.	CRC® -25R

Protocol

1. ¹²⁵I 표지 된 tetrazine의 합성

1.1) 전구체 2의 radioiodination 반응 (그림 1)

1.1.1) Tributyl tin을 포함하고 있는 전구체 2는 본 연구팀이 기존 보고한 방법을 활용하여 합성 하였다(5). 전구체 2 용액(1 mg in 100 μ L DMSO)에 chloramine-T 용액(2 mg in 20 μ L of phosphate buffered saline, pH = 7.4)과 초산(acetic acid, 5 μ L)을 차례로 첨가한다.

1.1.2) 150 MBq의 [¹²⁵I]NaI (15 μ L in aqueous NaOH)를 첨가 한 후 상온(25 °C)에서 15 분간 반응 시킨다.

1.1.3) Sodium metabisulfite 수용액 (1.0 M, 20 μ L)를 첨가하여 반응을 종료시킨다.

1.1.4) 표지 반응 결과를 HPLC로 분석 하기 위하여반응 혼합물 중 0.2 μ L를 취하여 100 μ L의 용액 (H₂O/CH₃CN, 1:1)에 희석 시킨다.

Note: 모든 HPLC실험은 0.1% formic acid H₂O (solvent A)와 0.1% formic acid CH₃CN (solvent B)를 이동상으로 사용하였다.

1.1.5) 희석한 용액을 analytical radio-HPLC를 활용하여 반응을 분석 한다 (그림 2). 조건: analytical C18 reverse-phase column; flow rate: 1 mL/min; gradient: 50% solvent B in solvent A for 0–2 min; 50–100% solvent B in solvent A for 2–17 min; retention time of [¹²⁵I]1: 8.7 min.

1.2) HPLC활용 ¹²⁵I표지 tetrazine ([¹²⁵I]1)의 정제과정

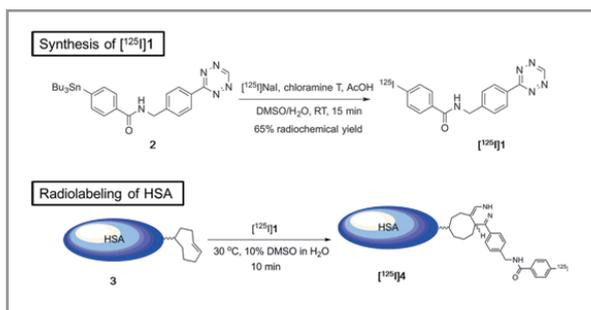


Figure 1. Synthetic procedure of $[^{125}\text{I}]1$ and $[^{125}\text{I}]4$

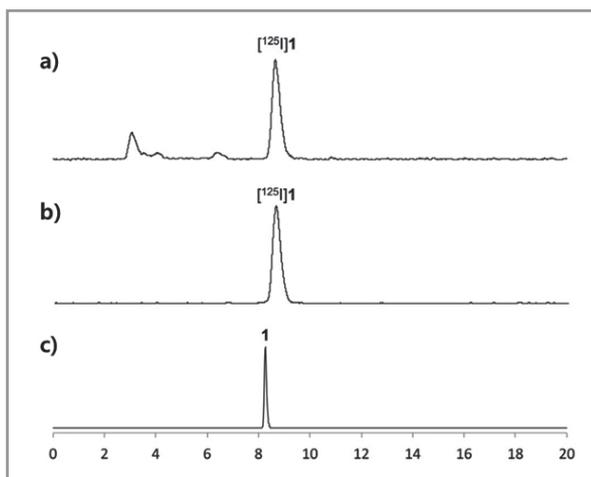


Figure 2. Radio-HPLC chromatogram (a) Before purification of $[^{125}\text{I}]1$ (Crude mixture), (b) After purification of $[^{125}\text{I}]1$, (c) UV-HPLC chromatogram for 1

1.2.1) 반응 결과물을 HPLC injection vial에 모두 옮긴 후 preparative radio-HPLC를 이용하여 정제 한다. 조건: preparative C18 reverse-phase column; flow rate: 10 mL/min; gradient: 50% solvent B in solvent A for 0–2 min; 50–100% solvent B in solvent A for 2–17 min; retention time of $[^{125}\text{I}]1$: 10.4 min.

1.2.2) Preparative HPLC에서 표지 결과물을 반영하는 peak를 collection tube에 모으고 radioactivity dose calibrator를 활용하여 합성 된 $[^{125}\text{I}]1$ 의 방사선량을 측정한다.

1.2.3) 정제 된 $[^{125}\text{I}]1$ 을 1.1.5)와 같은 조건으로 analytical radio-HPLC를 활용하여 방사화학적 순도를 측정한다 (그림 2).

1.3) ^{125}I 표지 tetrazine ($[^{125}\text{I}]1$)의 고체상 추출 과정

1.2.4) Preparative HPLC collection tube에 있는 표지 결

과물 $[^{125}\text{I}]1$ (10 mL)을 물(40 mL)로 희석 시킨다.

1.2.5) EtOH과 물로 pre-conditioning 된 Sep-Pak tC18 plus cartridge에 1.2.4)에서 희석 된 용액을 천천히 주입한 후 추가적으로 40 mL의 물로 씻어준다.

1.2.6) Acetone 혹은 DMSO (2 mL)를 이용하여 tC18 cartridge에 있는 $[^{125}\text{I}]1$ 을 용출시킨다.

Note: 이 과정에서 일부 radioactivity는 여전히 카트리 지 내부에 남아 있음 (DMSO 사용시 20%, acetone사용시 30%). Acetone을 사용하여 용출 하면 결과물의 부피를 쉽게 줄일 수 있음.

2. ^{125}I -tetrazine 활용HSA 표지 과정

2.1) Inverse-electron-demand Diels-Alder 반응을 통한 ^{125}I 표지 HSA의 합성

2.1.1) 기존에 보고 한 방법을 활용하여 trans-cyclooctene(TCO)이 도입 된 HSA(TCO-HSA, 3)를 합성 한다 (HSA 하나 당 평균 2.4개의 TCO 그룹 포함) (5).

2.1.2) TCO-HSA (10 μM , 100 μL in phosphate buffer, pH = 8.0)에 ^{125}I 가 표지 된 tetrazine ($[^{125}\text{I}]1$, 7.4 MBq, 10 μL)를 첨가 하고 30 °C에서 10 분간 반응한다.

2.1.3) TLC와 radio-TLC scanner를 활용하여 표지 반응을 분석한다 (용매: acetone). (그림 3)

2.2) 크기 배제 크로마토그래피(size exclusive

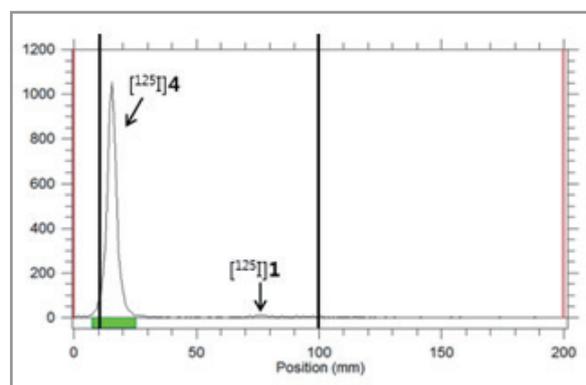


Figure 3. Radio TLC result for synthesis of $[^{125}\text{I}]4$ using $[^{125}\text{I}]1$ (30 °C, reaction time: 10 min, eluent: acetone)

chromatography) 활용 ^{125}I 표지 HSA의 정제

2.2.1) 표지 반응 종료 후 반응 혼합물을 saline으로 희석한 후 (2.5 mL) PD-10 desalting 컬럼 (Sephadex G-25 medium, bed volume: 8.3 mL) 을 활용하여 정제 한다.

2.2.2) 모아진 ^{125}I 표지 HSA (^{125}I 4)의 방사선량을 radioactivity dose calibrator를 활용하여 측정한다.

2.2.3) 정제 과정 후 TLC와 radio-TLC scanner를 활용하여 ^{125}I 표지 HSA(^{125}I 4)의 방사화학적 순도를 측정한다 (용매: 아세톤).

Representative Results

본 연구의 전체 반응 과정을 그림 1과 같이 요약 할 수 있다. Tetrazine 전구체 2의 ^{125}I 표지 반응의 HPLC 분석 결과는 그림 2a와 같으며, preparative HPLC로 정제 후 약 99% 이상의 방사화학적 순도로 ^{125}I 1 를 분리 할 수 있었다 (그림 2b). 이러한 과정으로 얻어진 ^{125}I 표지 tetrazine (^{125}I 1)의 방사화학적 수율은 $65 \pm 8\%$ ($n = 5$)이다. $10 \mu\text{M}$ 농도의 HSA 을 사용 하여 진행 한 단백질 표지 반응을 radio-TLC로 분석 하였을 때, 10 분 안에 거의 대부분의 ^{125}I 1이 TCO-HSA 와 반응 하였음을 알 수 있었다 (그림 3). 크기 배제 크로마토 그래피로 ^{125}I 표지 HSA를 정제 하여 ^{125}I 4을 93%의 방사화학적 수율(isolated yield)로 얻을 수 있으며 방사화학적 순도는 99%이상임을 확인 할 수 있었다.

Discussion

본 연구에 활용 된 tributyl tin 전구체 2는 소수성이 강하므로 ^{125}I 1 를 합성 하는 과정에서 반드시 충분한 양의 DMSO 에 녹여서 사용해야 한다 (1 mg of 2 in 100 μL of DMSO). 그렇지 않을 경우 chloramine T 수용액 혹은 ^{125}I NaI가 첨가 되는 과정에서 일부 2 가 침전되어 전체 표지 반응의 수율을 감소 시킬 수 있다. 높은 순도의 ^{125}I 1 를 합성 하기 위하여 정제 과정 전 preparative HPLC 컬럼에 이동상 용매를 충분히 흘려주어 컬럼에 남아 있을 수 있는 불순물을 제거 해주어야 한다. 또한 ^{125}I 1가 HPLC상에서 일정한 retention

time에서 얻어 지게 하기 위하여 정제 과정 전 20분 이상 20% solvent B in 80% solvent A를 컬럼에 흘려주는 것이 바람직하다. Sep-Pak tC18 plus cartridge를 활용하여 ^{125}I 1를 용출하는 과정에서 DMSO외에 acetone을 활용 할 수도 있다. 이 경우 acetone을 질소 혹은 아르곤 가스를 활용 하여 제거 가능하므로, ^{125}I 1이 포함 된 용액의 부피를 간단한 과정을 통해 줄일 수 있다. TCO-HSA를 ^{125}I 1 로 반응 하여 표지 할 때, $10 \mu\text{M}$ 의 단백질 농도에서는 99% 이상의 수율 (conversion yield)을 보이며 (radio-TLC 결과), $5 \mu\text{M}$ 농도에서는 95% 로 수율이 약간 감소 하는 결과를 관찰 할 수 있었다. $10 \mu\text{M}$ 의 HSA를 ^{125}I 1 로 반응 후 정제 과정을 거치면 93%의 수율(isolated yield)을 얻을 수 있는데, 이것은 크기 배제 크로마토그래피 과정에서 일부 ^{125}I 4 이 desalting 컬럼에 남아 있기 때문으로 추측 된다.

본 연구에서 모델 단백질로 사용 된 HSA는 그동안 다양한 방사성 동위원소로 표지하여 분자영상 프로브, 치료제, 약물 전달체 개발 등에 적용 되었다(6-8). 특히, ^{125}I 혹은 ^{131}I 가 표지 된 HSA는 임상에서 환자의 혈액 부피를 측정하는데 활용 되고 있다(9,10). 이 연구에서는 ^{125}I 만 표지 반응에서 사용 되었으나 동일한 실험 과정을 통해 다른 종류의 방사성요오드도 tetrazine에 도입 가능 할 것으로 예상되며 이를 다양한 분야 (123I: SPECT 영상; 124I: PET영상; 131I: 치료 연구)에 응용 할 수 있을 것이다.

Conclusion

본 protocol의 방법을 이용하여 ^{125}I 표지 tetrazine을 65%의 방사화학적 수율과 99%이상의 방사화학적 순도로 합성 할 수 있었다. 또한 ^{125}I 1 를 활용하여 HSA을 짧은 시간에 높은 수율로 표지 할 수 있었다. ^{125}I 1 과 TCO-HSA를 반응시켜 ^{125}I 4을 합성 하는데 필요한 시간은 정제 과정을 포함 하여 약 30분이다. 그 동안 다양한 종류의 방사성동위원소가 표지 된 tetrazine혹은 TCO가 합성 되어 표적 영상 연구에 활용 되어왔으나 방사성요오드의 경우는 inverse-electron-demand Diels-Alder 반응에 적용 된 예가 많지 않았다. 따라서 향후 본 protocol은 방사성요오드를 활용하

는 표지 화합물 합성 및 분자영상 연구에 유용하게 활용 될 것으로 기대 된다.

Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation (NRF) of Korea (Grant number: 2017M2A2A6A01070858).

References

1. Selvaraj R, Fox JM. trans-cyclooctene – a stable, voracious dienophile for bioorthogonal labeling. *Curr Opin Chem Biol* 2013;17: 753-760.
2. Mushtaq S, Jeon J: Synthesis of PET and SPECT radiotracers using inverse electron-demand Diels-Alder reaction. *Appl Chem Eng* 2017;28:141-152.
3. Adam MJ, Wilbur DS. Radiohalogens for imaging and therapy. *Chem Soc Rev* 2005;34:153-163.
4. Loveland W: Radioiodination reactions for pharmaceuticals. *J Am Chem Soc* 2006;128:15548-15548.
5. Choi MH, Shim HE, Yun SJ, Kim HR, Mushtaq S, Lee CH, Park SH, Choi DS, Lee DE, Byun EB, Jang BS, Jeon J. Highly efficient method for ¹²⁵I-radiolabeling of biomolecules using inverse-electron-demand Diels–Alder reaction. *Bioorg Med Chem* 2016;24: 2589-2594.
6. Haubner R, Vera DR, Farshchi-Heydary S, Helbok A, Rangger C, Putzer D, Virgolini IJ. Development of ⁶⁸Ga-labelled DTPA galactosyl human serum albumin for liver function imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013;40:1245-1255.
7. Cao W, Lu X, Cheng Z. The advancement of human serum albumin-based molecular probes for molecular imaging. *Curr Pharm Des* 2015;21:1908-1915.
8. Yang M, Hoppmann S, Chen L, Cheng Z. Human serum albumin conjugated biomolecules for cancer molecular imaging. *Curr Pharm Des* 2012;18:1023-1031.
9. Henriksen UL, Henriksen JH, Bendtsen F, Møller S. (99m) Tc-labelled human serum albumin cannot replace (125) I-labelled human serum albumin to determine plasma volume in patients with liver disease. *Clin Physiol Funct Imaging* 2013;33: 211-217.
10. Yasumoto K, Takata M, Ueno H, Tomoda F, Inoue H. Relation of circulating blood volume to left ventricular geometry in essential hypertension. *Hypertens. Res.* 2002;25: 703-710.