

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2018.4.2.85>

# Synthesis of $^{125}\text{I}$ -labeled thiol-reactive prosthetic group for site-specific radiolabeling of human serum albumin

Ha Eun Shim,<sup>1,2</sup> Lee Song,<sup>1</sup> and Jongho Jeon<sup>1,3,\*</sup>

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

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu, Republic of Korea;

<sup>3</sup>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 an  $^{125}\text{I}$ -labeled MSTP prosthetic group and its application to the efficient radiolabeling of human serum albumin (HSA). Radioiodination of the 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  $^{125}\text{I}$ -labeled MSTP ( $^{125}\text{I}]\text{1}$ ) was obtained with high radiochemical yield ( $73 \pm 5\%$ ,  $n = 3$ ) and excellent radiochemical purity ( $>99\%$ ). Site-specific reaction between ( $^{125}\text{I}]\text{1}$ ) and HSA gave the  $^{125}\text{I}$ -labeled human serum albumin ( $^{125}\text{I}]\text{3}$ ) with more than 99% of radiochemical yield as determined by radio-thin-layer chromatography (radio-TLC). These results clearly demonstrate that the present radiolabeling method will be useful for the efficient and convenient radiolabeling of thiol-bearing biomolecules.

**Key Word:** Radiolabeling, Radioactive iodine, Site-specific reaction, MSTP, Human serum albumin

## Introduction

지난 수십 년 간 방사성 요오드는 유기물질 및 생체분자의 방사성 표지(labeling)에 널리 사용되어 왔다(1, 2). 특히 생체분자에 방사성 요오드를 효율적으로 표지 하는 방법의 개발은 분자영상, 약물 동역학 연구, 암 치료와 같이 다양한 분야에서 매우 유용하게 활용될 수 있다. Tyrosine 결가지 (phenol 그룹)에 친전자성 방향족 치환 반응을 통해 방사성 요오드를 생체분자에 표지 하는 방법은 짧은 시간 내에 높은 방사화학적 수율 제공할 수 있는 장점이 있다(3). 하지만 이 과정에서 방사성 요오드 음이온을 산화하기 위해 사용되는 산화제는 생체분자의 구조에 영향을 줄 수 있는 가능성이 있고(4), tyrosine에 결합된 방사성요오드는 생체 내에서 탈 요오드화 반응이 쉽게 일어나는 단점이 있다(5, 6).

최근 우리는 다양한 생접합(bioconjugation)반응을 활용하여 생체 분자 및 나노 물질에 신속하고 효율적인 방사성 동위원소의 표지에 관한 연구를 보고하였다(7-11). 이전 연구에서 개발된 보결분자단(prosthetic group)은 효율적인 방사화학적 결과를 제공함으로써 특정 물질의 생체 분포와 영상 연구를 위한 효과적인 실험 방법으로 활용 되었다. 그러나 이러한 방법을 적용하기 위해서는 대상 생체분자에 인위적으로 새로운 반응기를 도입하기 때문에 추가적인 합성 및 정제 과정이 필요하며, 이는 표적 분자의 생물학적 활성을 감소시킬 수 있는 단점이 있다. 따라서 비변형(non-modified) 생체분자와 반응할 수 있는 새로운 보결분자단의 개발이 필요하다. 2017년 Furdai 연구팀은 thiol 선택적 반응기인 4-(5-methanesulfonyl-[1,2,3,4]tetrazol-1-yl)-phenol (MSTP)를 발표하였다(12). 따라서 방사성 동위원소가 표지

Received: December 12, 2018 / Revised: December 19, 2018 / Accepted: December 21, 2018

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

Copyright©2018 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

된 MSTP를 합성하여 활용하면 이전에 사용된 반응의 문제점을 보완할 수 있는 새로운 방사성 동위원소 표지 방법이 될 것으로 기대된다. 본 실험방법에서는 기존 발표된  $^{125}\text{I}$  표지 MSTP의 합성 방법과 이를 활용한 사람 혈청 알부민 (human serum albumin, HSA) 단백질의 표지 반응 과정을 소개하고자 한다(13).

## Materials

실험 과정에서 사용된 chloramine-T (#402829), sodium metabisulfite (#S9000), human serum albumin (#A8763), dimethyl sulfoxide (DMSO, #D2650), acetone (#650501)은 Sigma-Aldrich Korea에서 구매하여 사용하였다. 표지 반응에 사용된 방사성 동위원소  $^{125}\text{I}$ NaI (0.1 M NaOH) 수용액은 새한산업에서 구입하였다. 구매한 모든 시약은 정제 과정 없이 사용하였다. 표지 반응 후 C18 cartridge는 Water사의 Sep-Pak plus tC18 cartridge (#WAT020315)를 사용하였다. 크기 배제 크로마토그래피 (Size-exclusion chromatography)는 PD-10 desalting column (GE healthcare, #17085101, Sephadex G-25 medium, bed volume: 8.3 mL)를 사용하였다. TLC plate는 Merck사의 TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> (#1,05554.0001)를 구매하여 사용하였고, 이를 radio-TLC scanner (Capintec, Inc., CRC®-25R)를 통해 분석하였다. 분석 및 정제과정에서 사용된 HPLC는 Agilent사의 제품을 사용하였으며, 모든 HPLC 실험에서 0.1%의 formic acid가 포함된 물(용액 A)과 0.1%의 formic acid가 포함된 acetonitrile (용액 B)를 사용하였다. Analytical HPLC (column: Eclipse XDB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm)의 유속은 1 mL/분, preparative HPLC (column: Eclipse XDB-C18, 21.2 × 150 mm, 7 μm)는 10 mL/분의 유속으로 활용하였다.

## Protocol

### 1. $^{125}\text{I}$ 표지 MSTP의 합성

#### 1.1) 전구체 2의 $^{125}\text{I}$ 표지 반응 (Figure 1)

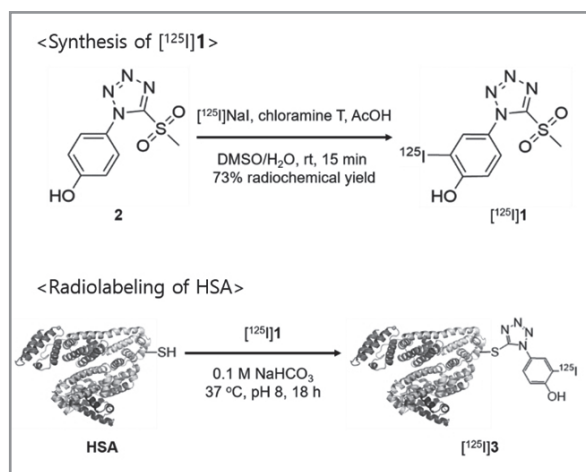


Figure 1. Synthetic scheme for  $^{125}\text{I}$ 1 and  $^{125}\text{I}$ 3.

1.1.1) 방사성 요오드를 표지 하기 위한 전구체 2는 본 연구팀이 이전에 보고한 방법을 활용하여 합성하였다(13).

1.1.2) 전구체2 (1 mg)를 DMSO (100 μL)에 녹인 용액에 Chloramine T 수용액(1 mg in 10 μL of pure water), 초산 (acetic acid, 2 μL)을 차례로 첨가한다.

1.1.3)  $^{125}\text{I}$ NaI (38.9 MBq, 10 μL in 0.1 M NaOH)를 첨가한 후 상온에서 15분간 반응시킨다.

1.1.4)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  수용액 (Sodium metabisulfite, 3 mg in 30 μL)을 첨가하여 반응을 종료한다.

1.1.5) 반응이 종료된 용액을 analytical radio-HPLC를 활용하여 표지 반응을 분석한다. 조건: analytical C18 column; 유속: 1 mL/min; 이동상: 0.1% formic acid H<sub>2</sub>O (solvent A)와 0.1% formic acid CH<sub>3</sub>CN (solvent B); gradient: 20% solvent B 0-2 분; 20-60% solvent B 2-25 분, retention time for  $^{125}\text{I}$ 1: 14.6 min)

### 1.2) HPLC 활용 $^{125}\text{I}$ 표지 MSTP ( $^{125}\text{I}$ 1)의 정제

1.2.1) Preparative HPLC (preparative C18 column; 유속: 10 mL/min; gradient: 20% solvent B 0-2 min; 20-60% solvent B 2-25 min, retention time for  $^{125}\text{I}$ 1: 21.6 min)으로 정제하여  $^{125}\text{I}$  표지 화합물 MSTP  $^{125}\text{I}$ 1을 얻는다.

1.2.2) Analytical radio-HPLC를 활용하여 product의 방사화학적 순도를 확인한다.

### 1.3) $^{125}\text{I}$ 표지 MSTP ( $^{125}\text{I}$ 1)의 고체상 추출 과정

1.3.1) Preparative HPLC collection vial에 받아들인 표지 결과물  $^{125}\text{I}$ 1 (10 mL)을 물 40 mL에 희석한다.

1.3.2) 에탄올과 물로 세척된 Sep-Pak tC18 plus cartridge에 1.3.1)에서 희석된 용액을 주사기로 천천히 주입한 후 물 10 mL로 씻어준다.

1.3.3) 아세톤 (3 mL)을 이용하여 tC18 cartridge에 있는 결과물  $^{125}\text{I}$ 1을 용출한다.

1.3.4) 아세톤은 질소 또는 아르곤 가스를 불어넣어 제거한 후 다음 실험을 위하여 DMSO로  $^{125}\text{I}$ 1를 다시 녹인다.

## 2. $^{125}\text{I}$ -MSTP ( $^{125}\text{I}$ 1) 활용 HSA의 표지

### 2.1) $^{125}\text{I}$ 표지 HSA의 합성( $^{125}\text{I}$ 3)

2.1.1) HSA를 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8.0)에 녹인 용액 (0.1 mM, 1.0 mM) 1 mL에  $^{125}\text{I}$ 1 (17.6 MBq in DMSO) 80  $\mu\text{L}$ 를 각각 첨가하여, 37 °C에서 18 시간 동안 반응한다.

2.1.2) TLC와 radio-TLC scanner를 활용하여 표지 반응을 분석한다. (용매: 아세톤).

### 2.2) $^{125}\text{I}$ 표지 HSA의 정제

2.2.1) 표지 반응이 종료되면 반응 혼합물을 saline (총 부피: 2.5 mL)으로 희석한다.

2.2.2) PD-10 desalting column을 활용하여 정제한다 (용매: saline, eluent volume: 2.5 mL, eluate volume: 3.5 mL).

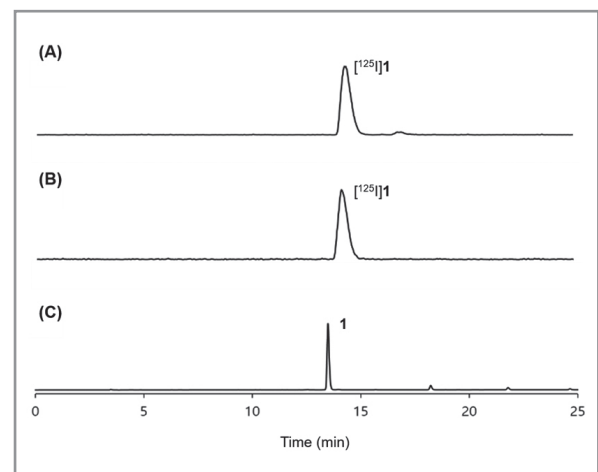
2.2.3) 정제된  $^{125}\text{I}$  표지 HSA ( $^{125}\text{I}$ 3)을 Amicon Ultra centrifugal filter (30 KDa, 2 mL)를 활용하여 농축한다.

2.2.4) 농축된  $^{125}\text{I}$  표지 HSA ( $^{125}\text{I}$ 3)의 방사선량을 radioactivity dose calibrator를 활용하여 측정한다.

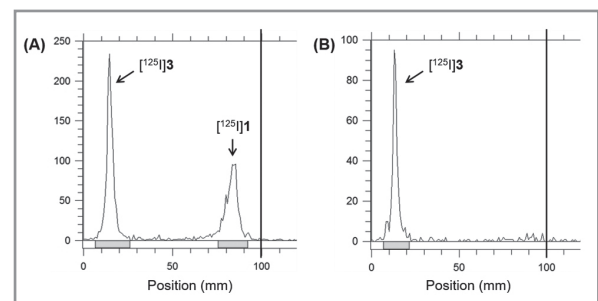
2.2.5) 정제 과정 후 TLC와 radio-TLC scanner를 활용하여  $^{125}\text{I}$  표지 HSA ( $^{125}\text{I}$ 3)의 방사화학적 순도를 측정한다(용매: 아세톤).

## Representative Results

본 연구의 전체 반응 과정은 Figure 1과 같이 요약할 수 있다. MSTP 전구체 2의  $^{125}\text{I}$  표지 반응의 HPLC 분석 결과는 Figure 2와 같으며, preparative HPLC로 정제 후 약 99% 이상의 방사화학적 순도로  $^{125}\text{I}$ 1을 분리할 수 있었다. 이러한 과정으로 얻어진  $^{125}\text{I}$  표지 MSTP ( $^{125}\text{I}$ 1)의 방사화학적 수율은  $73 \pm 5\%$  ( $n = 3$ )이다. 100 nmol의 HSA 단



**Figure 2.** Radio-HPLC results for synthesis of  $^{125}\text{I}$ 1. (A) Before purification of  $^{125}\text{I}$ 1 (crude mixture); (B) After purification of  $^{125}\text{I}$ 1; (C) UV HPLC chromatogram of 1.



**Figure 3.** Radio-TLC results for synthesis of  $^{125}\text{I}$ 3 using  $^{125}\text{I}$ 1 (eluent: acetone). (A) Before purification of  $^{125}\text{I}$ 3 (crude mixture); (B) After purification of  $^{125}\text{I}$ 3.

백질과 반응한 후 radio-TLC로 분석하였을 때, 1시간 후에 13%, 18 시간 후에 65%의  $[^{125}\text{I}]1$ 이 HSA와 반응하였음을 관찰할 수 있었다. 크기 배제 크로마토그래피(Size-exclusion chromatography)를 활용하여 정제 한 후 55%의 방사화학적 수율(isolated yield)로  $^{125}\text{I}$  표지 HSA( $[^{125}\text{I}]3$ )를 얻을 수 있으며 결과물의 방사화학적 순도는 99% 이상임을 확인 할 수 있었다 (Figure 3).

## Discussion

본 연구에 활용된 전구체 2는 소수성(hydrophobicity)이 강하므로 방사성 요오드 표지 과정에서 반드시 충분한 양의 DMSO에 녹여 사용해야 한다 (1 mg/100  $\mu\text{L}$  in DMSO). 그렇지 않을 경우 chloramine T 수용액 혹은  $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$ 의 첨가 과정에서 일부 전구체 2가 침전되어 표지 반응의 수율을 감소시킬 수 있다. 높은 순도의  $[^{125}\text{I}]1$ 을 정제하기 위하여 HPLC 사용 전 column을 충분히 washing 하여 column에 남아 있을 수 있는 불순물을 제거해주어야 한다. 또한  $[^{125}\text{I}]1$ 을 HPLC 상에서 일정한 retention time에서 얻기 위하여 정제 과정 전 20분 이상 용매 A(80%)와 B(20%)를 column에 흘려주는 것이 바람직하다. Sep-Pak tC18 plus cartridge를 활용하여  $[^{125}\text{I}]1$ 을 용출하는 과정에서 acetone으로 표지 결과물을 용출하였다. 이 경우 용매 acetone을 질소 혹은 아르곤 가스를 활용하여 제거할 수 있어  $[^{125}\text{I}]1$ 을 쉽게 농축할 수 있다. 본 연구에서 사용한 HSA는 하나의 free cysteine을 포함하고 있는 단백질이므로 site-specific하게 MSTP와 반응할 수 있다. MSTP와 thiol 그룹과의 반응은 약 염기성 조건에서 잘 진행되므로, 반응 용매는 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8.0)을 사용하여 pH를 조절하였다. 100 nmol의 HSA를  $[^{125}\text{I}]1$ 과 반응하여 65%의 수율(conversion yield)로 표지 결과물을 얻을 수 있다 (Figure 3). 정제 과정을 거치면 55%의 수율(isolated yield)을 얻을 수 있는데, 이것은 크기 배제 크로마토그래피 과정에서 일부  $[^{125}\text{I}]3$ 이 PD-10 desalting column에 남아 있기 때문으로 추측된다. 본 연구에서 사용된 단백질 HSA는 다양한 방사성 동위원소로 표지하여 분자영상제, 치료제, 약물 전달체 개발 등의 의학 분야 연구에 널리 활용되어왔다 (14, 15).  $^{125}\text{I}$  또는  $^{131}\text{I}$ 가 표지된 HSA는 임상에서 환자의 혈액과 혈장의 부피를 측정하는데 효과적인 방사성의약품으로

잘 알려져 있다(16, 17). 이 연구에서는  $^{125}\text{I}$ 을 표지 반응에서 사용되었으나 유사한 실험 과정을 통해 다른 종류의 방사성 요오드( $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ) 표지에 도입 가능할 것으로 예상되며 이를 다양한 분야(분자영상 및 치료 연구)에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

## Conclusion

본 연구의 합성 방법을 이용하여  $^{125}\text{I}$  표지 MSTP( $[^{125}\text{I}]1$ )를 73%의 방사화학적 수율과 99% 이상의 방사화학적 순도로 얻을 수 있었다. 정제된  $[^{125}\text{I}]1$ 을 100 nmol의 HSA와 반응하였을 때 약 65%의 전환 수율(conversion yield)로 반응하는 것을 관찰할 수 있었다. 본 protocol은 방사성 동위원소를 단백질에 site-specific하게 도입할 수 있는 새로운 표지 방법을 제공함으로써 향후 방사성의약품 및 방사성 동위원소 표지 물질의 합성에 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

## Acknowledgments

This study was funded by the National Research Foundation of Korea (Grant number 2017M2A2A6A01070858).

## References

1. Adam MJ, Wilbur DS. Radiohalogens for imaging and therapy. *Chem Soc Rev* 2005;34:153-163.
2. Gupta S, Batra S, Jain M. Antibody labeling with radioiodine and radiometals *Methods Mol Biol* 2014;1141:147-157.
3. Mushtaq S, Jeon J, Shaheen A, Jang BS, Park SH. Critical analysis of radioiodination techniques for micro and macro organic molecules. *J Radioanal Nucl Chem* 2016;309:859-889.
4. Hussain AA, Awad R, Crooks PA, Dittert LW. Chloramine-T in radiolabeling techniques. I. Kinetics and mechanism of the reaction between chloramine-T

- and amino acids. *Anal Biochem* 1993;214:495-499.
- Albu SA, Al-Karmi SA, Vito A, Dzandzi JP, Zlitni A, Beckford-Vera D, Blacker M, Janzen N, Patel RM, Capretta A, Valliant JF. <sup>125</sup>I-Tetrazines and Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Chemistry: A Convenient Radioiodination Strategy for Biomolecule Labeling, Screening, and Biodistribution Studies. *Bioconjug Chem* 2016;27:207-216.
  - Kornasiewicz O, Dębski M, Grat M, Lenartowicz B, Stępnowska M, Szalas A, Bar-Andziak E, Krawczyk M. Enzymatic activity of type 1 iodothyronine deiodinase in selected liver tumors. *Arch Med Sci* 2014;10:801-805.
  - Jeon J, Kang JA, Shim HE, Nam YR, Yoon S, Kim HR, Lee DE, Park SH. Efficient method for iodine radioisotope labeling of cyclooctyne-containing molecules using strain-promoted copper-free click reaction. *Bioorg Med Chem* 2015;23:3303-3308.
  - Choi MH, Shim HE, Nam YR, Kim HR, Kang JA, Lee DE, Park SH, Choi DS, Jang BS, Jeon J. Synthesis and evaluation of an <sup>125</sup>I-labeled azide prosthetic group for efficient and bioorthogonal radiolabeling of cyclooctyne-group containing molecules using copper-free click reaction. *Bioorg Med Chem Lett* 2016;26:875-878.
  - Jeon J, Shim HE, Mushtaq S, Choi MH, Park SH, Choi DS, Jang BS. An Optimized Protocol for the Efficient Radiolabeling of Gold Nanoparticles by Using a <sup>125</sup>I-labeled Azide Prosthetic Group. *J Vis Exp* 2016;116:e54759.
  - 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 <sup>125</sup>I-radiolabeling of biomolecules using inverse-electron-demand Diels-Alder reaction. *Bioorg Med Chem* 2016;24:2589-2594.
  - Mushtaq S, Choi DS, Jeon J. Radiosynthesis of <sup>125</sup>I-labeled 2-cyanobenzothiazole: A new prosthetic group for efficient radioiodination reaction. *J Radiopharm Mol Prob* 2017;3:44-51.
  - Chen X, Wu H, Park CM, Poole TH, Keceli G, Devarie-Baez NO, Tsang AW, Lowther WT, Poole LB, King SB, Xian M, Furdai CM. Discovery of heteroaromatic sulfones as a new class of biologically compatible thiol-selective reagents. *ACS Chem Biol* 2017;12:2201-2208.
  - Shim HE, Mushtaq S, Song L, Lee CH, Lee H, Jeon J. Development of a new thiol-reactive prosthetic group for site-specific labeling of biomolecules with radioactive iodine. *Bioorg Med Chem Lett* 2018;28:2875-2878.
  - Yang M, Hoppmann S, Chen L, Cheng Z. Human serum albumin conjugated biomolecules for cancer molecular imaging. *Curr Pharm Des* 2012;18:1023-1031.
  - 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.
  - Henriksen UL, Henriksen JH, Bendtsen F, Møller S. <sup>99m</sup>Tc-labelled human serum albumin cannot replace <sup>125</sup>I-labelled human serum albumin to determine plasma volume in patients with liver disease. *Clin Physiol Funct Imaging* 2013;33:211-217.
  - 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.