



의학박사 학위논문

# 클릭 화학을 이용한 류마티스 관절염 마우스 모델의 생체 내 종양괴사인자-알파 (TNF-α) 발현 평가 SPECT/CT 항체 이미징

2022년 8월

서울대학교 대학원

의학과 핵의학 전공

유 민 영

클릭 화학을 이용한 류마티스 관절염 마우스 모델의 생체 내 종양괴사인자-알파 (TNF-α) 발현 평가 SPECT/CT 항체 이미징

## 지도 교수 천 기 정

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함 2022년 4월

> 서울대학교 대학원 의학과 핵의학 전공 유 민 영

유민영의 의학박사 학위논문을 인준함 2022년 7월

위	원 장	(인)
부우	l 원장	(인)
위	원	(인)
위	원	(인)
위	원_	(인)

초 록

목적: 본 연구에서는 관절염 부위의 tumor necrosis factor-α(TNFα)의 발현 정도 평가를 위한 anti-TNF-α 항체를 이용한 방사성 추적자 개발을 위해 각 anti-TNF-α 항체들의 결합 친화도를 비교하고, 클릭 화학을 이용한 방사성 동위원소 표지방법을 비교하였다. 또한 동위원소 및 형광 표지 된 anti-TNF-α 항체의 관절염 동물모델에서의 분포의 특성을 확인하였다.

anti-TNF- $\alpha$  항체들 중 adalimumab, infliximab, 연구방법: etanercept의 human TNF- $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ ), mouse TNF- $\alpha$  (mTNFα)에 대한 친화력을 Surface plasmon resonance(SPR)로 확인하였다. 클릭 화학을 위한 항체 변형 방법에서 NHS기 도입 및 maleimide기 도입 후의 결합 친화도의 변화를 비교하였으며, 항체 변형 전후의 결합 친화도를 SPR로 비교하였다. 변형된 항체를 클릭 화학을 이용하여 <sup>67</sup>Ga으로 표지 후 iTLC를 이용하여 순도 및 안정성 평가를 진행하였다. DBA1/J mouse를 이용하여 Collagen-induced arthritis model (CIA model)을 유도 후 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab 400 uCi±40 uCi/100 ul를 사용하여 정상 군 (n=1), CIA group (n=3), 및 CIA model with cold blocking (CB group) (n=3)에서 4시간, 24시간, 72시간, 120시간 영상을 시행하였다. 72시간까지의 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab분포를 각 그룹에서 확인하였으며, inflamed paw에서 CIA group과 CB group에서의 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab의 섭취정도를 비교하였다. Biofluorescence image (BF image) 촬영을 위하여 FNR648adalimumab을 주사 후 10일째까지 CIA group (n=2) 및 CB group (n=2)에서 BF image를 촬영하였으며, 10일 후에 조직을 채취하였다. 채취한 발목조직을 탈 석회화 후 면역형광영상 촬영을 위하여 Cy3로

i

표지 한 Cy3-adalimumab으로 염색하여 FNR648-adalimumab의 섭취부위와 비교하였다.

연구결과: SPR에서 mTNF-α에 대한 결합친화도의 K<sub>D</sub>값은 etanercept, adalimumab 각각 475 pM, 4960 pM으로 etanercept가 가장 결합친화도가 좋았으며, infliximab은 mTNF-α에 대한 친화력이 없었다. hTNF-α에 대한 결합친화도의 Kn값은 adalimumab. infliximab. etanercept가 각각 358.2 pM, 583 pM, 934 pM으로 앞의 순서대로 결합친화도가 좋았다. NHS기 및 maleimide기 도입을 통한 항체 변형 후 K<sub>D</sub>는 순서대로 1200 pM, 430 pM으로 maleimide기를 적용한 것이 결합친화도가 약 30배가량 우수하였다. Maleimide를 도입 후의 변형항체의 K<sub>D</sub> 값은 adalimumab의 K<sub>D</sub> 값인 358.2 pM와 거의 차이가 없었다. PD-10 column으로 거른 후 purity는 약 99%로 확인되었으며 1:10 human serum에서 시행된 안정성 테스트 상 2일째에 약 30%가 분해되었다. 정상 마우스에서 시행한 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab에서 간 및 소변을 통해 배출되는 방사성추적자가 관찰되었으며, 정상 관절에의 섭취 증가는 관찰되지 않았다. 골 말단 및 척추에 섭취 증가가 나타났으며, 이는 시간이 지남에 따라 증가되었다. CB group에서 관절염에 이환 된 관절이 CIA group에 비해 섭취가 유의하게 낮은 것이 확인되었다. FNR648-adalimumab을 이용한 BF image에서도 Inflamed paw: Normal paw 비율이 CIA group에서 높은 양상이 확인되었으나, 통계적유의성은 관찰되지 않았다. 형광면역염색영상에서는 마우스에 투여되었던 FNR648-adaimumab의 섭취와 ex vivo로 투여된 Cy3adalimumab는 정상 마우스에서는 뚜렷하게 증가되어 있지 않았으나, CIA group에서는 면역세포 침윤부위에서 TNF-α의 발현이 확인되었고. 서로 일치되는 모습이 확인되었다.

결론: Adalimumab에 maleimide기를 도입하여 클릭 화학을 이용하여 표

ii

지 한 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab이 가장 결합친화도의 손실이 없으며 동위 원소 표지 성적도 좋았으나, 안정성이 2일째 70%로 저조하였다. CIA group및 CB group에서 시행한 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT 영 상 및 형광 영상에서 Cold-blocking에 의한 섭취 감소를 확인하여 특 이적 섭취를 확인하였다. 향후 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT을 이 용한 치료 반응성 예측연구에 활용될 가능성이 있음을 시사하나, 안정성 등의 한계점 개선이 필요할 것으로 생각된다.

**주요어** : 류마티스 관절염, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층 촬영, 종양괴사인자-α, 생물학적 제제, immunoSPECT, adalimumab

**학 번 :** 2014-31281

# 목 차

제	1	장	서	론	<u>.</u>	•••••	•••••	•••••	••••	••••	•••••	•••••	•••••	1
제	2	장	대상	및	방법	•••••	•••••	•••••	••••	••••	•••••	•••••	• • • • • • • • •	4
제	3	장	결	괴	ŀ	•••••	•••••	•••••	••••	••••	•••••	•••••	•••••	14
제	4	장	고	칠	<u> </u>	•••••	•••••	•••••	••••	••••	•••••	•••••	•••••	37
참.	고	문학	헌				•••••	••••	••••	••••	••••	•••••	•••••	44
At	st	rac	t	••••			•••••		••••	••••		•••••		49

# 표 목차

[ $\mathbbm{H}$ 1] Kinetic analysis of human TNF- $\alpha$ with antibodies	
interaction	. 15
[ $\mathfrak{H}$ 2] Kinetic analysis of mice TNF- $\alpha$ with antibodies	
interaction	. 17
[ $\mathfrak{X}$ 3] Comparison of the modified TNF- $\alpha$ and free-form	
antibody affinity	. 20

그림 목차

[그림	1]	클릭	화학의	두가지	항체	변형	방법	및	구조	5
[그림	2]	클릭	화학을	이용한	방사/	성 동	위원소	: 丑	지방법	6

[그림 3] Flow chart of affinity test for human TNF- $\alpha$ with
surface plasmon resonance16
[그림 4] Flow chart of affinity test for mice TNF- $\alpha$ with surface
plasmon resonance
[그림 5] Radio-TLC chromatogram 22
[그림 6] 1:10 human serum 에서 [ <sup>67</sup> Ga]Ga-adalimumab 의 1시간,
4 시간, 24 시간 및 48 시간 째의 안정성 검사
[그림 7] 정상 마우스에서 시행한 시간에 따른 [ <sup>67</sup> Ga]Ga-
adalimumab SPECT/CT 영상25
[그림 8] 시간에 따른 정상 마우스에서 SPECT/CT 에서 확인된
[ <sup>67</sup> Ga]Ga-adalimumab 분포 그래프26
[그림 9] 콜라겐 유도 관절염 모델에서 시간에 따른 [ <sup>67</sup> Ga]Ga-
adalimumab SPECT/CT 및 cold-blocking [ <sup>67</sup> Ga]Ga-adalimumab
SPECT/CT 영상
[그림 10] 시간에 따른 Non-blocking, Cold-blocking 콜라겐 유도
관절염 모델에서 SPECT/CT 에서 확인된 [ <sup>67</sup> Ga]Ga-adalimumab
분포 그래프
[그림 11] CIA model 에서 cold-blocking 여부에 따른 [ <sup>67</sup> Ga]Ga-
adalimumab 의 시간에 따른 섭취 비교30
[그림 12] FNR648-adalimumab 을 이용한 in vivo biofluorescence
image
[그림 13] 관절염 마우스 및 cold-blocking을 시행한 관절염
마우스에서 Inflamed paw: Normal paw ratio of FNR648-
adalimumab accumulation
[그림 14] Control mouse 에서 Immunofluorescence staining 을
이용한 TNF-a staining

[그림 ]	15] CIA mouse 에서	Immunofluorescence staining 을 이용한	
TNF-	α staining		36

## 제1장서 론

류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis)은 관절 활막의 염증을 주된 특징으로 하는 전신질환으로서, 만성경과를 거쳐 관절의 변형과 장애를 유발하게 된다. 일반적으로 인구의 1%를 침범하며, 여성의 경우 남성의 2.5배에 이르는 유병율을 보인다. 원인은 아직 정확히 알려지지 않았으나, 자가면역 기전으로 인한 염증반응으로 이해되고 있으며, 발병에는 유전적, 환경적 요인이 모두 작용할 것으로 생각되고 있다 (1, 2).

최근 류마티스 관절염의 병태생리를 기반으로 하여 많은 새로운 약들이 개발되었고, 가장 대표적인 것이 바로 생물학적 제제 (biologic agent) 중 TNF-*a* inhibitor (항 종양괴사인자-알파 억제제, Tumor necrosis factor-*a* inhibitors) 이다. TNF-*a*는 대식세포에서 생산되는 상위 사이토카인으로서, 각종 하위 사이토카인 및 단백분해효소등의 염증 매개물의 생성을 유발하여 염증을 증폭시키고, 활막세포의 증식을 항진시켜 관절의 손상을 일으킨다. TNF-*a* inhibitor는 이러한 병태생리의 과학적 근거를 배경으로 개발된, TNF*a* 표적 치료제제로 여러 연구에서 기존의 항 류마티스 제제에 반응하지 않는 심한 류마티스 관절염 환자에게서 단독 및 병행 치료에서 좋은 치료효과를 보였다 (3).

이러한 TNF-*a* inhibitor는 adalimumab, infliximab, 그리고 etanercept 가 주를 이루며, adalimumab은 사람 유래 항 TNF-*a* 

단클론항체, infliximab은 사람 IgG1의 constant region과 마우스의 사람 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체의 variable region를 결합시킨 키메라단클론 항체이다 (4-5). Recombinant DNA를 이용해 생산한 etanercept는 사람 IgG1의 Fc 부위와 TNF 수용체의 extracellular domain인 p75 단백질 두개를 융합한 수용성 수용체이다 (6). 이러한 생물학적 제제는 methotrexate를 근간으로 하는 기존의 질병 조정 항 류마티스약제 (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs)들 인 DMARDs에 저항성을 보이거나. 질병의 활성도가 높은 환자에서 증상 조절 및 병의 진행을 늦추는 데에 효과를 보여 임상적으로 활용도가 높은 제제이다. 그러나, 적응증에 해당하는 환자 중 약 30% 이상의 환자들 에서는, 생물학제제에 불완전한 반응을 보이거나 아예 반응을 보이지 않는다. 그럼에도 불구하고, 현재는 이러한 반응을 치료 전에 예측할 수 있는 뚜렷한 생물학적 지표는 없고, 류마티스 학회의 관절염 치료권고안에 제시된 몇 가지 임상 지표를 이용한 예측인자를 적용하여 치료제를 선택하도록 권고하고 있다 (7).

최근 발표된 논문에 따르면, 류마티스 관절염과 비슷한 병태생리를 보이는 자가면역 질환인 크론병 환자에서 adalimumab 의 치료 반응성 예측을 위하여 내시경을 통하여 adalimumab의 타겟인 TNF-*a* 발현 세포의 정도를 평가한 바 있다. 논문에 따르면, adalimumab에 형광 염료를 부착하여 치료 전에 위 내시경을 통해 형광염료를 붙인 adalimumab으로 병변을 염색하여 확인하였고, 거기서 확인된 TNF-*a* 발현 세포의 발현 정도와 이후 adalimumab에 대한 치료 반응성이 양의 상관관계를 갖음을 확인한 바 있다 (8).

항체 제제를 분자영상에 사용했을 때 여러가지 장점이 있다. 우선 타겟에 대한 특이도가 매우 높고, 비교적 큰 단백질이라 영상화 하기 위한 물질을 붙였을 때에도 생물학적 특징이 크게 변하지 않는다. 또한 생체 내에서의 분포 및 배출 생물학적 특징이 비교적 일정하다는 장점이 있다 (9).

이러한 항체를 이용한 분자 영상 획득 과정 중의 문제점은 항체에 형광 또는 방사성 동위원소 표지 과정에 의한 항체의 변성이다. 2000년대 초반 유기물질을 선택적으로 고효율로 표지가 가능 한 클릭 화학을 이용한 표지 방법이 도입되었다 (10). 이는 기본적으로는 azide-alkyne cycloaddition 작용을 이용하는 것으로, cyclooctyne을 사용 시에는 구리 등의 촉매를 사용하지 않아도 되는 strain-promoted alkyne-azide cycloaddition reaction (SPAAC)를 이용하여 수성환경에서 정확하게 표지 할 수 있다 (11). 또한, 비교적 간단한 방법으로 다양한 종류의 핵종에 적용하여 표지 할 수 있는 것이 큰 장점이다.

이에 이 연구에서는 anti-TNF-α 항체 제제의 클릭 화학을 이용한 방사성 동위원소 표지를 통해 in vivo로 TNF-α 발현을 확인하는 바이오마커를 개발하여, 이를 통해 관절 내 TNF-α 발현 세포의 정도평가의 가능성을 확인하려 한다.

## 제 2장 대상 및 방법

#### 1. 항체 변형 및 동위원소 표지

연구에서 분석에 사용된 anti-TNF-α 항체는 adalimumab (Humira, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA), infliximab (Remicade, Janssen Biotech, Horsham, PA), etanercept (Enbrel, Immunex, Seattle) 이다. 대조를 위하여 trastuzumab (Herceptin; Genentech; South San Francisco, CA, USA.) 이 사용되었다. 클릭 화학을 위한 1 차 항체변형과정(modification)은 adalimumab 을 이용하여 두가지 방법이 비교되었다. 항체의 Fc portion 의 disulfide bond 에 aza-dibenzocyclooctyne-maleimide(ADIBO-Maleimide)을 도입한 adalimumab-maleimide 와, 항체의 light chain 끝 부분의 NH2-terminal 에 NHS 기를 도입시켜 변형된 adalimumab-NHS 를 비교하였다[그림 1]. adalimumab-maleimide 는 2 단계인 방사성 동위원소 표지를 위하여, PEG4 (Tetraethylene glycol)와 NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid)를 사용하여 N3-PEG4-NOTA 에 적용된 <sup>67</sup>Ga 과 room temperature 에서 1 시간 혼합시켜서 방사성 동위원소 표지를 유도하였다 [그림 2] (12). 각 단계의 항체의 TNF-α에 대한 친화력을 평가하기 위하여 Surface plasmon resonance (SPR)을 시행하였다.



[그림 1] 클릭 화학의 두가지 항체 변형 방법 및 구조. A; 각 변형 방법 의 공유결합 위치. B; 각 변형 후 변형된 항체의 구조.



[그림 2] 클릭 화학을 이용한 방사성 동위원소 표지방법.

# Surface Plasmon Resonance 을 이용한 변형 anti-TNF-α 항체의 결합 친화도 평가

1차 변형 전후의 항체의 친화력을 Surface plasmon resonance(SPR)을 이용하여 분석하였다. mouse TNF-α (mTNF-α; Cat# T7539-50UG, sigma-aldrich, USA) 및 human TNF-a (hTNF-α; Cat# SRP3177-50UG sigma-aldrich, USA)는 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하였다. 20mM Sodium acetate buffer pH 5.0 에 넣은 mTNF- $\alpha$  및 hTNF- $\alpha$ 를 스탠다드 아미노 커플링 방법을 이용하여 골드 슬라이드 PEG 칩(Cat#: 13206061, (Reichert Technologies, Depew, 미국 뉴욕)에 부착하였다. adalimumab, infliximab, etanercept 그리고 trastuzumab을 분석물질로 사용하여 각 TNF-α에 대한 친화도를 평가하였으며, SR7500DC를 이용한 SPR분석을 통해 mTNF- $\alpha$  및 hTNF- $\alpha$  대한 anti-TNF- $\alpha$  항체의 유리형 및 변형형의 결합력을 측정하였다. (Reichert, NY, USA).

모든 실험에서 러닝 버퍼로 PBS, pH 7.4 가 사용되었으며, 25°C에서 수행되었다. etanercept (390, 781, 1560, 3120, 6250, 12500, 25000, 50000 pM), adalimumab(390, 781, 1560, 3120, 6250, 12500, 12500, 25000, 50000 pM) infliximab (50 nM, 500 nM, 1 uM), Trastuzumab(500 nM, 1 uM, 2 uM)을 analyte으로 mTNF- a 칩에 30ul/min 5분 동안 흘렸다. adalimumab 및 etanercept의 완전한 해리는 8분 후에 달성되었다. etanercept (48.8, 97.6, 195.3, 390.6, 781.2, 1562.5, 3125, 6250, 12500, 25000, 50000 pM), adalimumab (48.8, 97.6, 195.3, 390.6, 781.2, 1562.5, 3125, 6250, 12500, 25000, 50000 pM), infliximab(48.8, 97.6, 195.3, 390.6, 781.2, 1562.5, 3125, 6250, 12500, 25000, 50000 pM), trastuzumab(1000, 10000, 100000 pM)을 hTNF-α 칩에 30 ul/min속도로 5분 동안 흘렸다. 변형형의 항체는 adalimumab-maleimide 와 adalimumab-NHS를 이용하여 동일한 조건으로 hTNF-α에서 시행하였다. 항체들과 mTNF-α 또는 hTNF-α 결합은 반응 단위(RU)로 측정된 칩 표면의 굴절률 변화로 평가되었다. K<sub>D</sub> 값은 동역학 실험을 통하여 결정된 Ka/Kd의 비율로 계산되었다. 데이터 모델은 SCRUBBER-2를 사용하여 교정되었으며, 이전에 발표된 방법에 따라 수행되었다<sup>1</sup> (13).

### 3. 순도 및 안정성 평가

<sup>67</sup>Ga 동위원소 표지 후 Purity 및 stability test를 radio thin-layer chromatography (Radio-TLC)를 통하여 수행하였다. adalimumab을 이용하여 시행되었으며 adalimumab-maleimide와 <sup>67</sup>Ga-NOTA-

<sup>1㈜</sup>우정비에스씨에서 수행함.

PEG4-azide를 room temperature에서 10분간 혼합하여 표지 후 및 PD-10 column을 이용하여 여과 후 0.1M citrate 및 Instant Thin-Layer Chromatography Silica Gel impregnated glass fiber (ITLC-SG)를 이용하여 Radio-TLC를 진행하였다. Stability test는 1:10 Human serum에서 진행하였으며, 역시 0.1M citric acid를 이용하여 Radio-TLC를 진행하였다. 여과 후 1시간, 4시간, 1일, 2일째 까지의 안정성을 확인하였다.

#### 4. 콜라젠 유도 관절염 모델

관절염 모델 중 콜라젠 유도 관절염 모델(collagen-induced arthritis model)을 동물 모델로 유도하여 사용하였다 (14). 반입된 DBA1/J 7주령 male mouse의 1주일 적응 기간 후 Bovine type II collagen을 아세트산 0.1 M에 용해시켜 Complete Freund's adjuvant와 섞어, 꼬리 기저부에 피하 주사하여 (50 µl/mouse) 1차 면역 반응을 유도하였다. 3주 후 booster injection을 위하여 Bovine type II collagen 및 Incomplete Freund's adjuvant 혼합물을 꼬리 기저부에 피하 주사(50 µl/mouse)하였다. Booster injection이 끝난 마우스는 약 2주 후 inflamed paw에 대한 임상적 심각도 점수 (clinical severity score)를 평가하였다 (14). 발적과 중창의 육안적 증거가 없을 경우를 0점, 발가락에 국한된 발적과 경미한 종창이 있는 경우를 1점,

발가락에서 발목까지 확장된 발적과 경미한 종창이 있는 경우를 2점, 발가락에서 발목까지 확장된 발적과 중등도의 종창이 있는 경우를 3점, 발 전체를 침범하는 발적과 중증의 종창, 혹은 강직이 있는 경우를 4점으로 산정하였다. 분석을 위해 0점 및 1점을 관절염에 이환 되지 않은 것으로 평가하였고, 2점-4점을 관절염에 이환 된 inflamed paw로 평가하였다.

#### 5. SPECT/CT imaging protocol 및 분석

소동물용 SPECT/CT 스캐너(Bioscan, Washington DC, WA, USA)를 사용하여 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT 영상을 획득하였으며, 360°에 32 projection으로 acquisition time은 30초로 시행되었다 (radius of rotation, ROR = 7.6 cm, 30 s/projection). Image reconstruction은 InVivoScope (Bioscan, Washington, DC)을 통해 시행되었다. 정상 마우스 (n=1), CIA group (n = 3)에서 [<sup>67</sup>Ga]Gaadalimumab SPECT/CT scan을 시행하였다. 또한, 특이적 섭취 여부를 확인하기 위하여 1mg free adalimumab을 이용하여 Cold-blocking study를 시행하였다 (CB group; n = 3). CB group은 [<sup>67</sup>Ga]Gaadalimumab 투여 1시간 전에 adalimumab 1mg을 꼬리 정맥을 통해 iv로 투여하였으며, 이 외에는 CIA group과 같은 방법으로 [<sup>67</sup>Ga]Gaadalimumab SPECT/CT scan을 시행하였다. 이미지 촬영은 1.5% isoflurane으로 최소 8시간 금식한 마우스를 마취시키고 한 마리 당 500±40 uCi/100 µL의 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab을 꼬리정맥을 통하여 주사하여 시행되었다. SPECT/CT촬영은 주사 후 4시간, 24시간, 72시간, 120시간에 시행하였다. 이미지 분석은 Syngovia (Syngo.via; Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) 및 PMOD 3.3 소프트웨어를 이용하여 관심 영역(ROI) 도구를 사용하여 정량 분석하였으며 데이터는 %ID/g으로 표기되었다.

#### 6. Biofluorescence image (BF image)

Adalimumab을 Cy3 및 FNR-648로 형광표지 하였다. FNR648adalimumab을 in vivo image에 사용되었으며, Cy3-adalimumab은 in vitro 면역조직염색에 사용되었다. 정상 마우스 (n=1), CIA group (n=2), CB group (n=2)에 100 ug/100 ul±30ug의 FNR648adalimumab을 주사 후, 4시간, 25시간, 75시간, 5일째, 및 10일째 영상 후에 1.5% isoflurane으로 마취 후 IVIS Lumina II로 in vivo image를 시행하였다. 마우스는 배쪽을 아래로 하고, 등쪽에서 이미지를 촬영하였으며, excitation filter passband는 620 nm, the emission filter passband는 670nm으로 설정하였고, Acquisition time은 1s, aperture F/stop 2으로 시행하였다. 각 이미지는 Living Image® 소프트웨어 버전 4.3를 사용하여 분석하였으며, ROI를 사용하여 각 마우스의 앞발 및 뒷발의 fluorescence efficiency를 측정하였다. 이후 10일째 영상 촬영 후 장기를 추출하여, 형광영상을 시행하였다.

#### 7. 면역 조직 염색시행

정상 마우스 및 CIA group의 형광영상을 10일째까지 촬영 후 희생하여 발목 관절을 추출하였으며, 절단하여 4 ℃에서 7일 간 10% paraformaldehvde를 이용하여 고정시킨 후, pH 7.2의 14% EDTA (Sigma-Aldrich)가 함유된 용액을 이용하여 4 ℃에서 7일 간 탈 석회화를 진행하였다. 탈 석회화가 끝난 조직을 세척하여 paraffin에 심기 위해 관절의 중앙으로부터의 시상 단면으로 4 µm 두께의 절편을 얻었다. 면역 조직 염색을 위해 탈수된 절편을 0.5 % H2O2와 MeOH로 30분 동안 세척하고 투과성 단계를 위해 PBS Triton X-100를 5분 동안 흘려주었다. 이후 PBS로 3회 세척하고 1시간 동안 RT TBS에서 10% 정상 혈청, 1% BSA로 비 특이적 섭취를 차단하였다. 이후 Cv3adalimumab을 1:100 in 1% BSA으로 dilution 하여 샘플에 투여하고 4 ℃에서 밤새 인큐베이션한 후 PBS로 5분씩 3회 세척 후, DAPI staining 및 mounting을 시행하였다. 이후 Zeiss LSM 800 공초점현미경 (Carl Zeiss)을 사용하여 면역조직염색을 촬영하였다.

8. 통계 분석

데이터는 IBM SPSS ver. 27 (IBM Co., Armonk, NY, USA). 소프트웨어를 사용하여 통계 분석하였다. CIA group과 CB group 간 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab 섭취 및 형광영상의 FNR648adalimumab섭취를 비교하기 위해 Independent t-test 분석을 시행하였다. P 값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

## 제 3장 결 과

Etanercept, infliximab, adalimumab의 human
TNF-α 및 mouse TNF-α에 대한 결합 친화도

Etanercept (K<sub>D</sub> = 934 pM), infliximab (K<sub>D</sub> = 583pM), adalimumab (K<sub>D</sub> = 358.2pM)은 hTNF-α에 높은 결합력을 보였다 (Table 1, 그림 3). 특히adalimumab은 다른 제제들보다 hTNF-α 대한 K<sub>D</sub> 가 낮아 결합 친화도가 3배 이상 높았다. mTNF-α의 경우 etanercept와 adalimumab은 mTNF-α에 높은 결합 친화도를 보였지만, infliximab은 mTNF-α에 대한 결합 친화도를 전혀 보이지 않았다 (Table 2, 그림 4). etanercept는 adalimumab에 비해 mTNF-α에 대해 10배 높은 결 합 친화도를 보였다.

Target: human TNF-α						
Analyte	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$\mathrm{Kd}~(\mathrm{s}^{-1})$	$K_D$ (pM)			
Etanercept	$5.97E^5$	$5.58\mathrm{E}^{-4}$	934			
Adalimumab	$3.92E^5$	$1.40E^{-4}$	358.2			
Infliximab	$4.30E^{5}$	$2.50E^{-4}$	583			
Trastuzumab	*					

Table 1. Kinetic analysis of human TNF-  $\alpha$  with antibodies interaction

\* Association was not observed



[그림 3] Flow chart of affinity test for human TNF- a with Surface Plasmon Resonance. Human TNF- a 를 PEG chip에 고정 후, adalimumab (A), etanercept (B), infliximab (C), 및 trastzumab (D)를 용량을 증량하며 투과하였다. Adalimumab, etanercept, infilximab에서 K<sub>D</sub>를 구할 수 있었으며, trastzumab에서는 결합이 관찰되지 않았다.

Target: mouse TNF-α							
Analyte	Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Kd (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (pM)				
Etanercept	$1.19E^{6}$	$5.67 \mathrm{E}^{-4}$	474				
Adalimumab	$3.39E^5$	$0.0014E^{-4}$	4350				
Infliximab	*						
Trastuzumab	*						

Table 2. Kinetic analysis of mice TNF-  $\alpha$  with antibodies interaction

\* Association was not observed



[그림 4] Flow chart of affinity test for mouse TNF- a with surface Plasmon Resonance. Mouse TNF-a를 PEG chip 에 고정 후, adalimumab (A), etanercept (B), infliximab (C), 및 trastzumab (D)를 용량을 증량하며 투과하였다. Adalimumab, etanercept 에서 K<sub>D</sub>를 구할 수 있었으며, infliximab 및 trastzumab 에서는 결합이 관찰되지 않았다.

### 2. 변형된 항체의 TNF-α에 대한 결합 친화도 비교

hTNF-α에 대한 adalimumab-maleimide의 K<sub>D</sub> (430 pM)는 변 형 전의 adalimumab의 K<sub>D</sub> (358.2 pM)와 유사했다. adalimumab-NHS 의 K<sub>D</sub>는 1200 pM으로 adalimumab-maleimide의 결합 친화도가 30배 가량 우수하였다(Table 3). Mouse TNF-α에 대한 etanerceptmaleimide의 K<sub>D</sub> 도 변형전의 etanercept의 K<sub>D</sub>와 (462.3 pM)와 유사 하여, 항체 변형 후에도 결합 친화도가 크게 변하지 않았다.

Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$\mathrm{Kd}~(\mathrm{s}^{-1})$	$K_D$ (pM)	Target
$2.02E^{5}$	$1.40F^{-4}$	258.0	*hTNF-
0.9215	1.4012	000.2	α
1 15F <sup>5</sup>	$4.06F^{-5}$	130	hTNF-
1.13E	4.90E	400	α
$6.26F^4$	7 59F <sup>-5</sup>	1200	hTNF-
0.2012	1.02E	1200	α
	Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) 3.92E <sup>5</sup> 1.15E <sup>5</sup> 6.26E <sup>4</sup>	Ka ( $M^{-1}s^{-1}$ )Kd ( $s^{-1}$ ) $3.92E^5$ $1.40E^{-4}$ $1.15E^5$ $4.96E^{-5}$ $6.26E^4$ $7.52E^{-5}$	Ka ( $M^{-1}s^{-1}$ )Kd ( $s^{-1}$ )K_D ( $pM$ ) $3.92E^5$ $1.40E^{-4}$ $358.2$ $1.15E^5$ $4.96E^{-5}$ $430$ $6.26E^4$ $7.52E^{-5}$ $1200$

Table 3. Comparison of the modified  $\mathrm{TNF-}\,\alpha$  and free-form antibody affinity

\*hTNF- $\alpha$ , human TNF- $\alpha$ 

### 3. 순도 및 안정성 평가

Adalimumab-maleimide와 <sup>67</sup>Ga-azide-PEG4-NOTA의 방사성 동위원소 표지 후 PD-10 Column으로 거른 후 Radio-TLC로 시행한 분석에서 99%이상의 순도를 보였다[그림 5]. 혈청에서 1시간 까지는 높은 안정성을 보였으나, 2일째까지 시행한 안정성평가에서 70%정도의 안정성을 확인하였다[그림 6].



[그림 5] Radio-TLC chromatogram. azide-PEG4-NOTA-<sup>67</sup>Ga, adalimumab-maleimide, iTLC-SG, 0.1M citric acid. <sup>67</sup>Ga peak (A)가 click chemistry를 이용하여 adalimumab과 성공적으로 표지 후 왼쪽으 로 이동하는 것이 관찰된다. PD-10 column로 여과 후 99%의 순도가 확인되었다.



[그림 6] 1:10 human serum에서 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab의 1시간, 4시 간, 24시간 및 48시간 째의 안정성 검사. 48시간 후에 약 35%의 감소 가 관찰되었다.

## 4. 정상 마우스의 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT

소견 및 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab 분포

이미지 촬영은 모든 군에서 120시간까지 시행되었으며, 비특이적 섭취의 영향을 배제하기 위해 72시간 영상까지 이미지가 분석되었다. 정상 마우스 에서는 4시간에 방사능이 간에서 장을 통하여 배출되는 것이 관찰되었으며, 신장을 통한 방광으로의 배설 또한 관찰되었다. brain에서는 뚜렷한 섭취증가가 관찰되지 않았으며, heart및 lung의 섭취는 시간이 감에 따라 감소하는 것이 관찰되었다. anterior paw 및 hind paw의 관절에 섭취증가는 뚜렷하지 않았으나 시간이 지남에 따라 특징적으로 humeral head, distal femur, proximal tibia 그리고 spine에 섭취증가가 관찰되었다. 염증이 없는 anterior paw, hind paw에 뚜렷한 섭취증가는 관찰되지 않았으며, wrist, ankle joint에는 약간의 증가가 관찰되었으나 장골의 말단의 섭취 증가로 생각되었다 [그림 7, 8].



[그림 7] 정상 마우스에서 시행한 시간에 따른 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT 영상. 4시간 영상에서 소변 및 장으로 배출되는 방사능이 관찰된다. 72시간까지 골말단의 섭취증가가 뚜렷이 관찰되며, 척추섭취도 관찰되나, paw의 섭취증가는 뚜렷하지 않다. 120시간에는 전반적으로 방사능이 감소되어 관찰된다. (L, liver; H, heart; B, bowel; K, kidney; G, growth plate)



[그림 8] 시간에 따른 정상 마우스에서 SPECT/CT 에서 확인된 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab 분포 그래프.

# 5. CIA group 및 CB group의 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT 소견 및 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab 분포

CIA group 에서도 역시 간을 통한 배설 및 신장을 통한 배설이 관찰되었다[그림 9, 10]. 정상 마우스 서 장골의 말단 섭취가 시간이 감에 따라 증가하는 것과 대조적으로, CIA group에서는 장골 말단의 섭취는 정상 마우스에 비해 낮고, 관절 주변 및 inflamed paw의 관절을 따라 증가하는 소견이 관찰되었다. 장골 말단 및 spine의 섭취는 24h에서 최고치를 보이고 감소하는 양상을 보였으며, inflamed paw 와 Non-inflamed paw의 섭취는 유의한 차이가 관찰되었다.

CB group의 섭취 pattern은 CIA group과 비슷한 양상을 보였으나, 대체적으로 낮은 섭취를 보였다. CIA group에 비해 장골말단 및 spine의 섭취증가가 두드러졌다[그림 9, 10]. CIA group에서 inflamed paw의 섭취는 CB group에 비해 anterior paw에서는 4시간, 24시간째에 유의하게 높았으며, hind paw에서는 24시간째에 유의하게 높았다[그림 11]. 24시간에 anterior paw는 3.04배, hind paw는 2.47배의 섭취 차이를 보였다. 두 부위 모두 72시간에는 유의한 차이를 보이지 않았다.



[그림 9] 관절염 모델에서 시간에 따른 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT (CIA group) 및 cold-blocking [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT (CB group)영상. 상단, CIA group; 하단, CB group. 4시간 영상에서 CIA group은 소변 및 장으로 배출되는 방사능이 관찰되나, CB group에서는 소변으로 배출되는 방사능만 관찰됨. 두 그룹 모두 24 시간영상에서 inflamed paw의 최고 섭취증가가 관찰됨. 전반적으로 CB group의 방사능이 낮게 관찰된다. (H, heart; K, kidney; L, liver; B, bowel)



[그림 10] 시간에 따른 관절염 모델 (A), 및 cold-blocking 시행 관절염 모델 (B) SPECT/CT 에서 확인된 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab 분포 그래프 (Growth plate\_K, growth plate of knee joint; Growth plate\_S, growth plate of shoulder joint; HP, hind paw; AP, anterior paw)



[그림 11] 관절염 모델에서 cold-blocking 여부에 따른 anterior paw (A) 및 hind paw (B)의 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab 의 시간에 따른 섭취 비교. (AP, anterior paw; HP, hind paw; CIA, collagen-induced arthritis group, CB, Cold-blocking collagen-induced arthritis group)

# 6. FNR648-adalimumab을 이용한 in vivo biofluorescence image

CB group 및 CIA group에서 모두 관절염에 이환 된 관절에서 섭취 증가가 나타났다. 섭취정도의 비교를 위하여 normal paw섭취에 대한 inflamed paw의 형광정도의 비를 비교하였다 [그림 12]. CB group에서 CIA group에 비해 섭취가 낮은 양상이 관찰되었으나, 통계적으로 유의하지는 않았다 [그림 13]. 10일까지 촬영 후 검체를 추출하였고, 추출된 검체에서 역시 CIA group 과 CB group의 섭취차이가 관찰되었다.



[그림 12] FNR648-adalimumab을 이용한 *in vivo* biofluorescence image (BF image) (10 days after p.i.). (A), (C) 관절염 마우스의 BF image 및 FNR648-adalimumab 분포, (B), (D) Cold-blocking을 시 행한 마우스의 BF image 및 FNR648-adalimumab 분포. Normal paw 및 inflamed paw에 Region of interest (blue box)를 그려 inflamed paw: normal paw ratio를 구하였다. (L, lung; H, heart; Li, liver; S, spleen; K, kidney; B, bowel)



[그림 13] 관절염 마우스 및 cold-blocking 을 시행한 관절염 마우스에서 inflamed paw: normal paw ratio of FNR648-adalimumab accumulation. 5 일 이후에 점차 차이가 나는 것을 관찰할 수 있으나, 통계적 유의성은 확인되지 않았다. (CIA, collagen-induced arthritis model)

# 7. Immunofluorescence staining을 이용한 TNF-*a* staining in control and CIA mouse

Control 및 CIA model에서 DAPI, 1:1000 Cy3-adalimumab을 이 용하여 confocal image를 촬영하였다. 정상 마우스 이미지에서는 in vivo staining 및 ex vivo staining 모두에서 TNF-a 검출이 비교적 적 었으나[그림 14], CIA model에서는 혈관 및 관절주변에 침투한 면역 세 포에서 TNF-α 발현이 관찰되었고, Fusion 영상에서 발현된 부위가 일 치되는 소견이 관찰되었다[그림 15].



[그림 14] Control mouse에서 Immunofluorescence staining을 이용한 TNF- *a* staining. (A) DAPI nucleus staining, (B) in vitro로 시행한 Cy3-adalimumab staining, (C) FNR648-adalimumab 주사 후 시행된 ex vivo image (p.i. 10 days) (D) fusion image. (B, Bone; Syv, Synovium; JC, Joint space)



[그림 15] CIA mouse에서 Immunofluorescence staining을 이용한 TNF-α staining. In vitro 및 ex vivo image에서 TNF-α 발현을 확 인할 수 있으며, fusion 영상에서 연관성을 확인할 수 있다. (A) DAPI nucleus staining, (B) in vitro로 시행한 Cy3-adalimumab staining, (C) FNR648-adalimumab 주사 후 시행된 ex vivo image (p.i. 10 days) (D) fusion image. (B, Bone; Syv, Synovium; JC, Joint space)

### 제 4장 고찰

본 연구에서는 TNF-α 표적 항체 방사성 추적자 개발을 위하여 etanercept, infliximab, adalimumab의 human 및 mouse의 TNF-α에 대한 결합 친화도를 SPR을 통하여 직접적으로 비교하였으며, mouse TNF-α에 대한 결합친화도는 etanercept가, human TNF-α 대해서는 adalimumab이 가장 결합친화도가 높음을 확인하였다.

Etanercept, adalimumab, infliximab의 결합친화도를 직접적으로 비 교한연구는 많지 않다. 이전 연구에 따르면, 직접적인 비교는 아니지만 etanercept와 adalimumab이 mTNF-α에 결합 친화도가 있음이 보고 된 바 있으며, adalimumab의 mTNF-α에 대한 결합 친화도는 hTNFα에 비해 낮음이 보고되었다 (15-16). 같은 연구에서 infliximab은 mTNF-α에 작용하지 않음이 확인되었다 (15). 이러한 연구를 바탕으 로 현재 마우스를 대상으로 하는 동물 실험에서는 TNF-α inhibitor로 etanercept가 쓰이고 있다 (17-18). 그러나, Etanercept는 membrane-bound TNF-α (memTNF-α) 에는 효과적인 치료효과 가 없음이 확인되어 memTNF-α 가 중요 치료 타겟이 될 수 있는 크 론 병이나, 건선 등에서는 adalimumab이 TNF-α inhibitor로 우선적 으로 투여되고 있다. 마우스 대상의 TNF-α 발현 확인에도, 치료 타겟 인 TNF-α의 형태에 따라, etanercept 및 adalimumab의 사용을 유동 적으로 고려할 수 있을 것으로 생각된다.

클릭 화학을 이용한 방사성 동위원소 표지 단계 중 항체변형과정 전 후의 결합친화도를 확인하였으며, adalimumab을 사용하여 진행된 분석 에서, maleimide 기를 도입한 변형 과정에서 결합 친화도가 보존되는 것 을 확인하였다. 또한 변형 방법 중, adalimumab-maleimide는 430pM 로 결합친화도가 함께 비교하였던 NHS기를 이용한 항체변형 방법이 maleimide를 이용한 항체 변형 방법에 비해 변형 후 30배가량 결합친 화도가 낮아지는 것이 확인되었다. (Adalimumab-maleimide K<sub>D</sub> :430pM vs Adalimumab-NHS K<sub>D</sub>:1200 pM) 이는 binding site에 기인한 것으로 생각되며, NHS기를 도입하여 표지 할 때에는 NH<sub>2</sub> site가 항체 전반에 랜덤하게 발생하여 antigen binding site에도 결합이 생길 수 있는 반면에, maleimide기를 도입할 때에는 Fc portion의 disulfide bond에 site-specific binding이 가능하여 이에 따라 결합친화도에 영향 을 미치는 것으로 생각된다 (9).

[<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT에서 inflamed paw의 섭취는 24시간째에 가장 증가하고 72시간에는 감소하는 양상이 관찰되었다. 이 는 cold form의 adalimumab으로 blocking을 시행했을 시 그 섭취가 유 의하게 감소하는 것으로 특이적 섭취임을 확인할 수 있었다. BF image 에서 inflamed paw에 normal paw 대비 섭취가 증가됨이 관찰되었고, 통계적 유의성을 확인하진 못하였으나, 역시 cold-blocking을 통하여

감소되는 양상을 확인하였다.

이러한 통계적유의성의 차이의 원인은, 추적자의 특성 및 이미지 분 석 방법의 차이에 의한 것으로 추측해 볼 수 있다. [67Ga]Gaadalimumab SPECT/CT에서는 5일째에 확연히 병변 및 전신 섭취가 감 소함에 비해 BF image 에서는 10일까지도 전신에 비교적 뚜렷한 형광 이 확인되었다. 이는 표지의 안정성 및 형광제제의 체내 배출시간차이에 따른 영향이 있을 것으로 생각된다. 이 연구에서 수행된 in vitro 안정성 평가에서 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab는 2일째 70%정도까지만 안정성이 유 지됨이 확인되었다. SPECT/CT 이미징에서도 5일이후에는 방사능이 거 의 검출이 되지 않아, 체내에서도 안정성이 높지 않음을 확인할 수 있었 다. 또한, 이미지 분석 방법이, SPECT/CT는 각 병변의 %ID/g을 직접 재는 방식으로 이루어 졌으나, BF imaging에서는 Inflamed: Normal paw ratio를 이용하여 비교하여, 상대적으로 높은 background activity 가 그 차이를 좁히는 데에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 연구 결과에서. 유의하지는 않았으나 5일이후 점점 더 벌어지는 차를 고려하면, 향후 10일 이후의 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

정상 마우스에서 시행된 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT에서 장골의 말단 및 척추에 시간이 갈수록 방사능 섭취가 증가하는 소견이 관찰되었다. Adalimumab 은 골에 축적되지 않기 때문에, 이 섭취는 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab이 아닌 unbound form의 <sup>67</sup>Ga의 영향으로 해석

할 수 있다. Robert G et al. 이 발표한 논문에 의하면, bone metabolism 이 활발한 어린 마우스에서는 골 말단의 <sup>67</sup>Ga 섭취가 높음이 보고된 바 있고, 이는 염증 부위가 있을 때 그 정도가 감소 한다고 보고하였다 (19). 이 연구에 사용된 마우스는 대부분 약 3-4개월령으로 비교적 젊 은 쥐에 속하며, CIA group 및 CB group의 경우 염증이 동반된 상태로 장골 말단 및 척추의 방사능 섭취 증가가 정상마우스에 비해 낮으며, 시 간에 따라 증가하지 않고 24시간까지 증가하다 감소하는 소견이 관찰되 어 정상 마우스에서 관찰되는 골섭취의 단독의 영향은 적은 것으로 관찰 된다. 이러한 방사선 동위원소의 뼈 섭취증가 소견은 PET/CT에서 항체 표지에 많이 사용되는 <sup>89</sup>Zr에서도 비슷한 소견이 보고된 바 있다 (20-21). 보고에 따르면, 골단의 인산염 성분인 수산화인회석은 강력한 킬레 이트 물질로 방사성 추적자에서 유리된 <sup>89</sup>Zr는 킬레이트화 될 가능성이 매우 높아, bone metabolism이 높은 골단의 성장점 등에서 축적이 될 수 있다. 이러한 소견은 킬레이팅 제제에 따라 마우스에서 선택적으로 빨리 제거되는 화합물에서는 잘 일어나지 않는다 (21).

그러나, 이 연구에서 킬레이터로 쓰인 NOTA는 <sup>67</sup>Ga과 log stability constant value 가 30.98인 매우 안정적인 팔면체 복합물을 생 성하며 (22), Ca2+, Mg2+ 및 Zn2+ 등이 존재하는 혈액 내에서도 매 우 안정적인 특성을 지닌다 (23). 또한 Ga과 NOTA 화합물은 소변으로 매우 빠르게 제거되는 약동학적 특성이 있어 (23), bone에 흡수된 free

<sup>67</sup>Ga이 <sup>67</sup>Ga-NOTA 화합물에서 혈액내로 분리되어 나왔기는 매우 어 렵다. <sup>67</sup>Ga-adalimumab이 마우스 체내에서 빠르게 분리되어, free <sup>67</sup>Ga 이 혈액으로 방출되거나 (21), 초기 PD-10 column 여과를 통과한 소 량의 free <sup>67</sup>Ga 이 집적되어 골단에 섭취증가가 일어났을 가능성을 추측 할 수 있겠으나, 이 부분은 향후 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

면역형광영상에서는 정상 마우스에서는 TNF-α가 거의 검출되지 않았으며, CIA group마우스 에서는 염증이 있는 관절에 침윤한 면역세포 주변으로 주사한 FNR648-adalimumab의 분포와 in vitro로 투여한 Cy3-adalimumab에서 낸 TNF-a가 연관성을 보였다. 다만, 그 강도는 높지 않아, ex vivo 영상 및 in vitro 영상 모두에서 Non-specific activity 와 비교하였을 때 섭취의 강도가 다소 증가되어 소견이 관찰되 었다. 이는 여러가지 가능성이 있는 데, 첫째로 실제로 발현정도가 저 조하여 형광의 강도가 약해 보이거나, 둘째로 염색의 강도가 강해서 Non-specific binding이 증가한 이유 등이 있을 수 있다 (24). 이 연구 에서는 ex vivo 영상을 위해 투여된 FNR648-adalimumab의 세척 과 정이 충분히 이루어지지 못하는 한계점이 있어, 두번째 이유의 가능성이 있을 것으로 생각되나, 추가 연구가 필요 할 것으로 생각된다.

류마티스 관절염에서 여러 생물학적 제제를 이용하여 in vivo 로 타 겟을 영상화 하는 연구는 다양하게 진행 되어 왔다 (25-28). 그 중 TNF-α 타겟팅 이미징 연구는 infliximab 및 adalimumab을 이용하여

진행되었다(25, 29-31). 앞선 연구들은 대부분 <sup>99m</sup>Tc를 이용하여 방사 선 표지를 하였다. 그러나, 실제로 infliximab 및 adalimumab은 intact IgG로 생체내에서 반감기가 약 2주가량 되어 반감기가 6시간인 <sup>99m</sup>Tc 로는 background activity 가 쉽게 제거되지 않아 이미징에 한계가 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 antibody fragment를 이용한 이미징 방 법들이 시도되고 있지만, antibody fragment를 생산해내려면 고도의 기 술이 필요하고 이러한 fragment를 일정하게 대량으로 생산하는 것 또한 현재의 기술로는 어려운 실정이다 (32). 본 연구는 클릭 화학을 이용하 여 반감기가 78.3 시간인 <sup>67</sup>Ga을 adalimumab에 표지 하였으며, 결합친 화도 변화를 모니터링 하여 항체의 큰 변성 없이 <sup>67</sup>Ga-adalimuab표지 를 확인하였다는데 그 의의가 있다.

이 연구에는 몇 가지 한계점이 있다. 첫째로 SPECT/CT scan을 통한 이미징 연구가 각 그룹 3마리의 적은 수의 동물에서 진행되었으며, 병리 조직을 통한 TNF- *a* 검출을 모든 동물에서 확인하여 검출하지 않았다. 그러나, 이미징 타겟인 inflamed paw 기준으로 각 group당 12개씩 paw가 있었고 통계적인 유의성을 확인하였다. 차후에 좀 더 대규모의 실험을 진행한다면 좀 더 신뢰성이 있는 결과가 될 것으로 생각된다.

두번째로 실험에 사용된 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab의 2일째까지 안정성 이 70%으로 낮아서 방사성추적자로서 한계가 있는 것으로 생각된다. 또 한 염증에 섭취가 증가하는 free <sup>67</sup>Ga특성상 병변의 섭취에 영향이 있을

것으로 생각되며, 장골 말단에 <sup>67</sup>Ga의 섭취 증가로 장골에 맞닿아 있는 무릎관절의 섭취 증가 평가에는 한계가 있었다. 이 연구에서는 무릎관절 은 분석에서 제한하여 그 영향을 최소화하였으나, 마우스 모델의 관절염 평가에서 <sup>67</sup>Ga는 그 한계가 분명히 존재하는 것으로 확인된다. 비록 cold blocking test로 특이적섭취 여부를 확인하였으나, 향후 염증에 대 한 영향을 덜 받는 <sup>111</sup>In 등으로 표지 된 항체를 이용 시 결과 해석에 좀 더 효과적일 것으로 생각된다.

결론적으로 이 연구에서는 adalimumab에 클릭 화학을 이용하여 maleimide기를 도입하여 표지 한 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab은 결합친화도 의 손실이 없이 표지가 되었다. CIA group및 CB group에서 시행한 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT 영상 및 in vivo 형광 영상에서 Cold-blocking에 의한 섭취 감소를 확인하여 특이적 섭취를 확인하여 [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT을 이용한 TNF-α 발현 평가연구 에 활용될 가능성이 있음을 시사하였다. 그러나, in vitro 안정성이 2일째 70%로 저조하며 이에 따른 free <sup>67</sup>Ga의 골 말단 및 염증에의 섭취로 인 한 영상해석의 한계 등이 존재하여 향후 개선이 필요할 것으로 생각된다.

# 참고문헌

- 1. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. New England Journal of Medicine. 2011;365(23):2205-19.
- Croia C, Bursi R, Sutera D, Petrelli F, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2019;37(3):347-57.
- 3. Gibbons LJ, Hyrich KL. Biologic therapy for rheumatoid arthritis. BioDrugs. 2009;23(2):111-24.
- Bang LM, Keating GM. Adalimumab. BioDrugs. 2004;18(2):121-39.
- 5. Markham A, Lamb HM. Infliximab. Drugs. 2000;59(6):1341-59.
- 6. Goffe B, Cather JC. Etanercept: an overview. Journal of the American Academy of Dermatology. 2003;49(2):105-11.
- Smolen JS, Landewé RB, Bijlsma JW, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. Annals of the rheumatic diseases. 2020;79(6):685-99.
- Atreya R, Neumann H, Neufert C, Waldner MJ, Billmeier U, Zopf Y, et al. In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. Nature medicine. 2014;20(3):313-8.

- 9. Wu AM. Engineered antibodies for molecular imaging of cancer. Methods. 2014;65(1):139-47.
- Kolb HC, Finn M, Sharpless KB. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. Angewandte Chemie International Edition. 2001;40(11):2004-21.
- Ornelas C, Broichhagen J, Weck M. Strain-promoted alkyne azide cycloaddition for the functionalization of poly (amide)-based dendrons and dendrimers. Journal of the American Chemical Society. 2010;132(11):3923-31.
- 12. Jeong S, Park JY, Cha MG, Chang H, Kim Y-i, Kim H-M, et al. Highly robust and optimized conjugation of antibodies to nanoparticles using quantitatively validated protocols. Nanoscale. 2017;9(7):2548-55.
- 13. Mun CH, Kim J-O, Ahn SS, Yoon T, Kim SJ, Ko E, et al. Atializumab, a humanized anti-aminoacyl-tRNA synthetaseinteracting multifunctional protein-1 (AIMP1) antibody significantly improves nephritis in (NZB/NZW) F1 mice. Biomaterials. 2019;220:119408.
- 14. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. Nature protocols. 2007;2(5):1269-75.
- 15. Arnoult C, Brachet G, Castaneda DC, Azzopardi N, Passot C, Desvignes C, et al. Crucial Role for Immune Complexes but Not FcRn in Immunization against Anti-TNF-α Antibodies after a Single Injection in Mice. The Journal of Immunology. 2017;199(2):418-24.

- 16. Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song X-Y, Shealy D, et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2002;301(2):418-26.
- Hutchison S, Choo-Kang B, Bundick R, Leishman A, Brewer J, McInnes I, et al. Tumour necrosis factor- a blockade suppresses murine allergic airways inflammation. Clinical & Experimental Immunology. 2008;151(1):114-22.
- 18. Shi X, Semkova I, Müther PS, Dell S, Kociok N, Joussen AM. Inhibition of  $TNF-\alpha$  reduces laser-induced choroidal neovascularization. Experimental eye research. 2006;83(6):1325-34.
- Sephton RG, Hodgson GS, De Abrew S, Harris AW. Ga-67 and Fe-59 distributions in mice. Journal of Nuclear Medicine. 1978;19(8):930-5.
- 20. Laverman P, van der Geest T, Terry SY, Gerrits D, Walgreen B, Helsen MM, et al. Immuno-PET and immuno-SPECT of rheumatoid arthritis with radiolabeled anti-fibroblast activation protein antibody correlates with severity of arthritis. Journal of Nuclear Medicine. 2015;56(5):778-83.
- Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. In vivo biodistribution and accumulation of 89Zr in mice. Nuclear medicine and biology. 2011;38(5):675-81.

- Kubicek V, Havlickova J, Kotek J, Tircsó G, Hermann P, Tóth É, et al. Gallium (III) Complexes of DOTA and DOTA- Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies. Inorganic chemistry. 2010;49(23):10960-9.
- 23. Zhang Y, Kundu B, Zhong M, Huang T, Li J, Chordia MD, et al. PET imaging detection of macrophages with a formyl peptide receptor antagonist. Nuclear medicine and biology. 2015;42(4):381-6.
- 24. Haugland R. Optical microscopy for biology/Eds B. Herman, K. Jacobson. 1990.
- 25. Conti F, Malviya G, Ceccarelli F, Priori R, Iagnocco A, Valesini G, et al. Role of scintigraphy with 99mTc-infliximab in predicting the response of intraarticular infliximab treatment in patients with refractory monoarthritis. European journal of nuclear medicine and molecular imaging. 2012;39(8):1339-47.
- 26. Paiva Proença Lobo Lopes F, Newton Leitão de Azevedo M, Marchiori E, Barbosa da Fonseca LM, Augusto Lopes de Souza S, Gutfilen B. Use of 99mTc-anti-CD3 scintigraphy in the differential diagnosis of rheumatic diseases. Rheumatology. 2010;49(5):933-9.
- 27. Kinne R, Becker W, Schwab J, Horneff G, Schwarz A, Kalden J, et al. Comparison of 99Tcm-labelled specific murine anti-CD4 monoclonal antibodies and nonspecific human immunoglobulin for imaging inflamed joints in rheumatoid arthritis. Nuclear medicine communications. 1993;14(8):667-75.

- 28. Tran L, Huitema AD, van Rijswijk MH, Dinant HJ, Baars JW, Beijnen JH, et al. CD20 antigen imaging with 124I-rituximab PET/CT in patients with rheumatoid arthritis. Human antibodies. 2011;20(1-2):29-35.
- 29. Conti F, Priori R, Chimenti MS, Coari G, Annovazzi A, Valesini G, et al. Successful treatment with intraarticular infliximab for resistant knee monarthritis in a patient with spondylarthropathy: a role for scintigraphy with 99mTc-infliximab. Arthritis & Rheumatism. 2005;52(4):1224-6.
- Barrera P, Oyen W, Boerman O, Van Riel P. Scintigraphic detection of tumour necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis. Annals of the rheumatic diseases. 2003;62(9):825-8.
- 31. Roimicher L, Lopes FP, de Souza SA, Mendes LF, Domingues RC, da Fonseca LM, et al. 99mTc-anti-TNF-α scintigraphy in RA: a comparison pilot study with MRI and clinical examination. Rheumatology. 2011;50(11):2044-50.
- 32. Fu R, Carroll L, Yahioglu G, Aboagye EO, Miller PW. Antibody fragment and affibody immunoPET imaging agents: radiolabelling strategies and applications. ChemMedChem. 2018;13(23):2466-78.

## Abstract

# In vivo Assessment of TNF-*a* Expression by SPECT/CT Antibody Imaging Using Click Chemistry in Mice Models of Rheumatoid Arthritis

Min Young Yoo

College of Medicine, Department of Nuclear Medicine The Graduate School

Seoul National University

**Purpose:** Molecular imaging of the tumor necrosis factor  $-\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) has the potential to predict therapeutic response to biologic treatment in rheumatoid arthritis. In order to develop radio-immuno-tracer for TNF- $\alpha$ , we investigated radiolabeling methods, and distribution of radiolabeled anti-TNF- $\alpha$  antibodies in collagen induced mouse model.

**Methods:** Affinity of adalimumab, infliximab, and etanercept to human  $TNF-\alpha$  (hTNF- $\alpha$ ) and mouse  $TNF-\alpha$  (mTNF- $\alpha$ ) were investigated by surface plasmon resonance (SPR). The changes in binding affinity during the antibody modification in methods of click chemistry were investigated. After the modified antibody was labeled with <sup>67</sup>Ga, purity and stability tests in 1:10 human serum were

performed using radio thin-layer chromatography. After induction of collagen-induced arthritis model (CIA model) using DBA1/J mouse, [67Ga]Ga-adalimumab SPECT/CT was performed in normal mouse (n = 1), CIA group (n = 3), and CIA model with cold blocking group (CB group, n = 3) after 4 hours, 24 hours, 72 hours, and 120 hours of 400 uCi±40 uCi/100 ul [67Ga]Ga-adalimumab injection. The distribution of [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab up to 72 hours was investigated in each group, and the intakes of [67Ga]Ga-adalimumab in the CIA group and the CB group in the inflamed paw were compared. For in FNR648-adalimumab fluorescence imaging, and Cv3vivo adalimumab were created using click chemistry. In vivo fluorescence images were taken in the CIA group (n=2) and CB group (n=2) until the 10 days after injection of FNR648-adalimumab, and tissues were harvested on day 10. After decalcification, the harvested inflamed paw was stained with Cy3-adalimumab and compared with in vivo FNR648-adalimumab staining by confocal microscopy

**Results:** The  $K_D$  values of binding affinity of etanercept and adalimumab for mTNF- $\alpha$  were 475 pM and 4960 pM, respectively. Etanercept showed the highest binding affinity for mTNF- $\alpha$ , while infliximab showed no affinity for mTNF- $\alpha$ . The  $K_D$  values of the binding affinity for hTNF- $\alpha$  were 358.2pM, 583pM, and 934pM for adalimumab, infliximab, and etanercept, respectively. In modified antibodies, adalimumab-maleimide was 30 times superior in binding affinity than adalimumab-NHS ( $K_D = 430$  pM and  $K_D = 1200$  pM, respectively). The  $K_D$  value of the adalimumab-maleimide was not difference as the  $K_D$  value of adalimumab of 358.2pM. After PD-10 column filtration, the result of purity test was 99%. In stability test, bout 30% was degraded on the second day.

In normal mouse, [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab was excreted through the liver and urine. Increased [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab in normal paw was not observed. But there were increased radioactivity in the end of long bones and vertebrae, which increased over time. Inflamed paws of CB group showed significantly lower [<sup>67</sup>Ga]Ga-adalimumab uptake than in that of the CIA group.

In biofluorescence imaging using FNR648-adalimumab, the ratio of inflamed paw: normal paw was higher in the CIA group than CB group, but no statistical significance was observed. In normal mouse, there was no accumulation of FNR648-adalimumab and Cy3-adalimumab in paws. In inflamed joint of CIA group, accumulations of FNR648-adalimumab and Cy3-adalimumab with consistency were observed with infiltration of immune cells

**Conclusion:**  $[^{67}Ga]Ga$ -adalimumab radiolabeled by click chemistry using maleimide-ADIBO showed excellent performance in binding affinity and purity test, but the result of stability test was 70% on the second day.  $[^{67}Ga]Ga$ -adalimumab SPECT/CT scan and biofluorescence image showed specific uptakes to TNF- $\alpha$  and were blocked by co-injection of the cold antibodies. These results suggest that  $[^{67}Ga]Ga$ -adalimumab SPECT/CT has the potential to be used for molecular imaging of the tumor necrosis factor- $\alpha$ , but it is necessary to improve limitations such as stability.

Keywords: Rheumatoid arthritis, SPECT/CT, tumor necrosis factor-

 $\alpha$ , biologic drug, immuno<br/>SPECT, adalimumab

**Student Number :** 2014-31281