

2-iminothiolane을 이용한 IgG의 ^{99m}Tc표지

원자력병원 핵의학과

임 상 무 · 우 광 선 · 정 위 섭

연세대학교 보건과학대학

양 세 환 · 오 옥 두

= Abstract =

Labeling IgG with ^{99m}Tc using 2-iminothiolane

SM Lim, M.D., KS Woo, M.D. and WS Chung, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

SH Yang, M.D. and OD Awh, M.D.

Yunsei University

2-iminothiolane is known to bind NH₂ group of lysine in the protein and deliver SH group, which can be used to label protein with ^{99m}Tc. In this study, we looked for the best reaction condition in which 2-iminothiolane is conjugated to human polyclonal IgG and labeling condition with ^{99m}Tc-glucoheptonate. Labeling yield was measured with TSK G4000SW column and HPLC or precipitation with 10% TCA (trichloroacetic acid) and 1% HSA. In vivo distribution was investigated with Staphylococcal abscess bearing rats. With decreasing glucoheptonate, the labeling yield decreased. Without 2-iminothiolane, ^{99m}Tc-glucoheptonate was bound to IgG, which seemed to be direct labeling. With increasing 2-iminothiolane upto 20 times higher than IgG, the labeling yield increased, and plateau was seen with higher molar excess of 2-iminothiolane. Polymer formation was not observed. The pH for the conjugation of 2-iminothiolane and IgG was best around 6.4. ^{99m}Tc-2-iminothiolane-IgG showed faster blood clearance, higher renal activity and lower hepatic and splenic activity than ^{99m}Tc-DTPA-IgG. The biodistribution of ^{99m}Tc-2-iminothiolane-IgG with higher molar excess of 2-iminothiolane was not different from that with lower molar excess. Labeling antibodies with ^{99m}Tc using 2-iminothiolane can afford a possible route to simple labeling and wide clinical use of the immunoscintigraphy.

Key Words: IgG, ^{99m}Tc, 2-iminothiolane

서 론

¹³¹I, ¹¹¹In등이 단세포균 항체의 표지에 의한 면역신티 그라피에 사용되어 왔으나, ^{99m}Tc가 쉽게 구할 수 있고 감마에너지가 우수하여 ^{99m}Tc를 이용한 항체의 표지 방

법이 꾸준히 연구되고 있고 일부 실용화 되고 있다.

^{99m}Tc의 항체 표지법은 크게 두가지로 분류되는데, 직접법은 항체의 -S-S 결합을 환원시켜 SH기를 노출시켜 직접 표지하며, 이때 사용되는 환원제로 stannous chloride, 2-mercapto-ethanol, dithiothreitol, dithioerythritol, ascorbic acid 등이 쓰인다¹⁾. 화학반응이

간단하나, 표지 항체의 정제가 필요하고, 표지후 안정도가 떨어지며, 면역 활성이 떨어지는 등의 문제가 있다^{2~4)}. 또한 ^{99m}Tc 가 항체의 원하지 않는 부위에 비특이적으로 결합하는 것이 문제가 되기도 한다. 간접법은 양기성 착화물을 항체에 부착하여 여기에 ^{99m}Tc 가 결합하는 것으로 DTPA가 오래전부터 이용되어 왔고⁵⁾, 최근 metallothionine, dithiosemicarbazone cyclams (N_4), diamidodimercaptide (N_2S_2), tetrakis (2-mercaptoethyl) ethylenediamine (N_2S_4) 등이 연구되고 있다^{6~10)}. 최근 2-iminothiolane을 항체에 부착하여 항체내의 S-S결합에 영향을 주지않고 -SH기를 ^{99m}Tc 의 표지에 이용할 수 있는 방법이 발표되어 주목을 받고 있다¹¹⁾. 그외에 미리 표지한 DADS등의 배위자(ligand)를 항체에 반응시키는 방법이 시도되고 있다. 저자들은 2-iminothiolane을 항체에 결합시키고 ^{99m}Tc 를 표지하는 최적 반응 조건을 알기 위하여 2-iminothiolane과 항체의 몰비, 결합시 pH의 영향 glucoheptonate의 양 등을 조절하였고 체내동태를 농양유발 백서모델을 이용하여 다음과 같은 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약은 $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (한국 원자력연구소), 2-iminothiolane (Sigma. Co., USA), cyclic DTPA anhydride (Sigma. Co., USA), ^{99m}Tc 표지용 Glucoheptonate cold vial (한국 원자력연구소), human polyclonal IgG (Sigma. Co., USA) 이며, 기기는 PD-10 column (Pharmacia. Co., USA), Centricon 30 (Amicon. Co., USA), HPLC (Waters-Co., USA), TSK G4000SW (Supelco. Co., Japan) 등이다.

2. 항체와 Iminothiolane의 결합

2-iminothiolane을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 40 mM/L로 하였다. IgG 5 mg/1ml 0.01 M PBS (pH 5.4~7.4의 0.1 M citrate buffer)와 몰비 0~200배의 2-iminothiolane/50 μ l PBS 용액을 섞어 12시간 상온에서 서서히 교반하여 반응시킨후, centricon 30 membrane filter 와 0.1 M citrate buffer (pH 6.5)로 5,000 g에서 30분간 원심분리하여

2-iminothiolane 결합 IgG를 분리정제하였다. 2-iminothiolane과 IgG의 몰비 및 pH를 조절하여 표지효과를 관찰하였다.

3. 2-Iminothiolane 결합 IgG의 ^{99m}Tc 표지

8 mg, 40 mg의 glucoheptonate와 0.35 mg의 SnCl_2 가 들은 cold vial에 8 mCi의 $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 를 섞어 표지한 것을 2-iminothiolane 결합 IgG 150 μ g과 혼합하여 실온에서 90분간 반응시킨후 PD-10 column을 통과시켜 표지 IgG를 정제하였다. 40 mg의 glucoheptonate를 이용하여 반응시간을 180분으로 연장시켜 표지효과를 관찰하였다. 표지수율을 확인하기 위하여 TSK G4000SW column과 0.01 M PBS를 이용하여 HPLC, 또는 10 TCA 용액을 이용하여 표지된 항체를 침전시켜 측정하는 방법을 시행하였다. 2-iminothiolane과 IgG의 몰비와 pH를 변화시켜 결합시킨 것과 40 mg의 glucoheptonate에 8 mCi $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 표지한 것을 반응시켜 표지수율을 관찰하여 몰비와 pH의 영향을 추측하였다.

4. Cyclic anhydrous DTPA와 IgG의 결합 및 ^{99m}Tc 표지

1 ml의 0.01 M PBS에 녹인 IgG 10 mg에 50 μ g의 cyclic DTPA anhydride를 70 μ l DMSO에 녹인 것을 첨가하여 상온에서 60분간 반응시키고 DTPA 결합 IgG를 centricon 30 membrane filter 와 0.01 M PBS로 5,000 g에서 30분간 원심분리 정제하였다. $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 1.7 mCi와 정제된 DTPA결합 IgG 150 μ g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 을 함께 섞어 상온에서 45분간 반응시킨후 PD-10 column을 통과시켜 ^{99m}Tc 표지 IgG를 정제하였다. 표지수율을 확인하기 위하여 TSK G4000SW column과 0.01 M PBS를 이용하여 HPLC를 시행하였다.

5. 백서대퇴부에 포도상구균 농양의 형성 및 표지 IgG의 체내분포

포도상구균(staphylococcus aureus)을 배양하여 백서 우측대퇴부에 1×10^9 개를 피하주사하여 24시간후 농양이 촉진될때 ^{99m}Tc 표지 IgG를 두당 150 μ Ci 주사하고 주사후 4시간 및 24시간에 농양 섭취율과 장기분포를 관찰하였다.

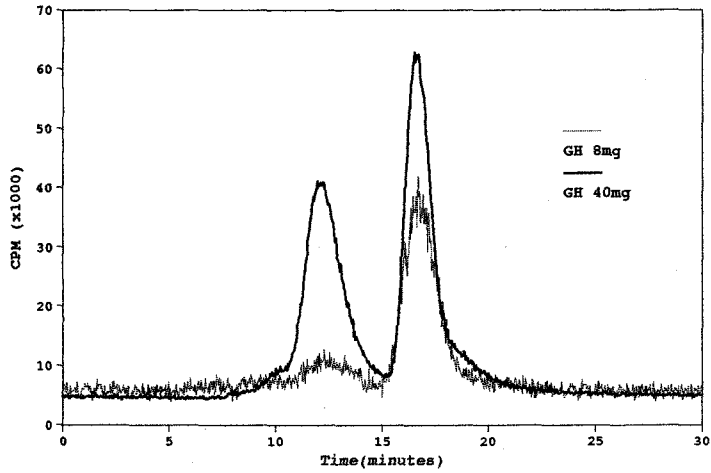


Fig. 1. HPLC radiochromatograms of ^{99m}Tc -2-iminothiolane-IgG labeled with different contents of glucoheptonate.

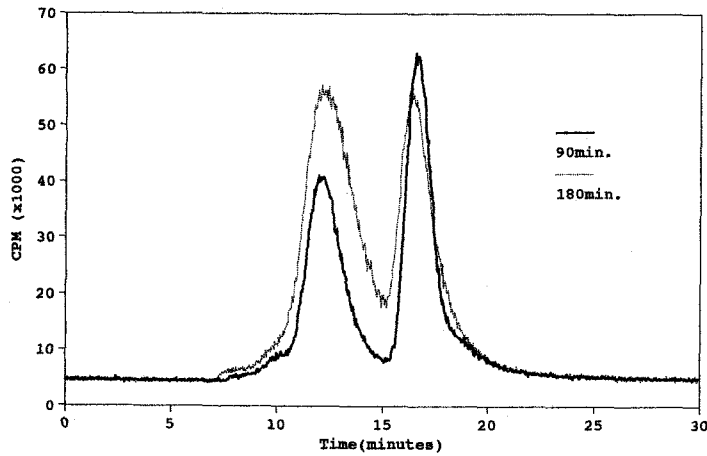


Fig. 2. HPLC radiochromatograms of IgG-2-iminothiolane ^{99m}Tc - obtained with the different reaction time.

결 과

1. 2-iminothiolane 결합 IgG의 ^{99m}Tc -glucoheptonate 표지시 glucoheptonate의 양 및 반응시간의 영향

Glucoheptonate의 양을 줄이면 표지수율이 낮아짐이 관찰되었다(Fig. 1). 90분간 반응시켰을 때 보다 180분 반응시켰을 때 표지수율이 향상되었으나(Fig. 2), 반응

시간이 길면 실제 임상이용에 문제가 있어 90분간 반응으로 고정하여 실험을 진행하였다.

2. IgG에 2-iminothiolane 결합시 몰비와 pH의 영향

IgG에 2-iminothiolane 결합시 몰비와 pH를 변화시켜 반응시킨 후 정제하여 ^{99m}Tc -glucoheptonate로 표지하였을 때 2-iminothiolane 없이도 표지됨이 관찰되었으며, 몰비 2-20배에서 2-iminothiolane의 양을 증가시켜 표지수율이 높아짐이 관찰되었으나, 몰비 100, 200배에

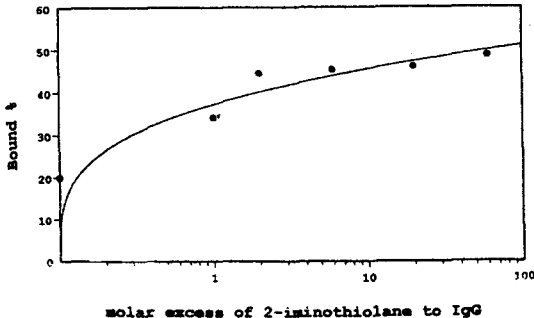


Fig. 3. Labeling yield with ^{99m}Tc-glucoheptonate of 2-iminothiolane-IgG conjugates prepared with various molar excess of 2-iminothiolane.

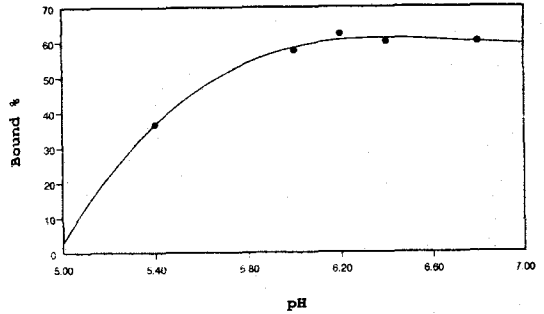


Fig. 4. Labeling yield with ^{99m}Tc-glucoheptonate of 2-iminothiolane-IgG conjugates prepared with various pH.

Table 1. Biodistribution of ^{99m}Tc-2-iminothiolane-IgG and ^{99m}Tc-DTPA-IgG in Staphylococcal abscess bearing rats.

Organs	IgG-2-Iminothiolane- ^{99m} Tc								IgG-DTPA- ^{99m} Tc			
	×6				×60				4hrs		24hrs	
	4hrs		24hrs		4hrs		24hrs		4hrs		24hrs	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Blood	2.10	0.36	0.78	0.07	1.69	0.38	0.67	0.11	2.37	0.27	1.23	0.29
Liver	0.78	0.16	0.68	0.06	0.74	0.18	0.58	0.06	1.87	0.26	1.72	0.38
Spleen	0.60	0.10	0.64	0.10	0.57	0.15	0.52	0.10	1.50	0.14	1.53	0.24
Kidney	5.89	0.57	12.76	1.02	6.78	1.37	11.77	1.46	2.45	0.41	3.10	0.65
Sternum	0.16	0.03	0.12	0.02	0.14	0.04	0.09	0.00	0.29	0.05	0.42	0.27
Femur	0.22	0.03	0.18	0.02	0.21	0.06	0.16	0.02	0.35	0.08	0.33	0.04
Muscle	0.10	0.01	0.07	0.01	0.07	0.01	0.07	0.01	0.13	0.02	0.05	0.20
Thyroid	0.12	0.04	0.06	0.04	0.11	0.02	0.04	0.01	0.12	0.03	0.08	0.02
Lung	0.78	0.16	0.43	0.11	0.68	0.31	0.28	0.03	1.64	0.38	0.68	0.08
Stomach	0.39	0.09	0.15	0.02	0.31	0.03	0.12	0.01	0.99	0.25	0.38	0.08
Abscess	1.13	0.32	0.80	0.25	0.94	0.28	0.83	0.24	0.75	0.26	0.77	0.20

×6: 6times molar excess of 2-iminothiolane to IgG

×60: 60times molar excess of 2-iminothiolane to IgG

6 head for each group

서 더 증가하지는 않았다(Fig. 3). 또 polymer의 형성은 관찰되지 않았다. 2-iminothiolane과 IgG의 결합시 pH의 변화에 따른 수율의 변화는 pH 6.5 부근에서 가장 좋은 결과를 얻었다(Fig. 4).

3. 농양유발 백서 체내동태

^{99m}Tc-DTPA-IgG 보다 ^{99m}Tc-2-iminothiolane IgG가 신장을 통한 배설이 훨씬 높고 간 및 비장의 방사능이 낮았으며 농양의 섭취는 비슷하였다. 2-iminothiolane

과 IgG의 몰비의 변화에 따른 체내분포의 차이는 관찰되지 않았다(Table 1).

고 찰

^{99m}Tc의 항체 표지에 널리 이용된 anhydrous DTPA는 표지후 중합체(polymer)가 생기는 단점이 있어 ^{99m}Tc의 표지에 여러가지 2기능성 착화물의 이용이 시도되고 있다¹¹⁾.

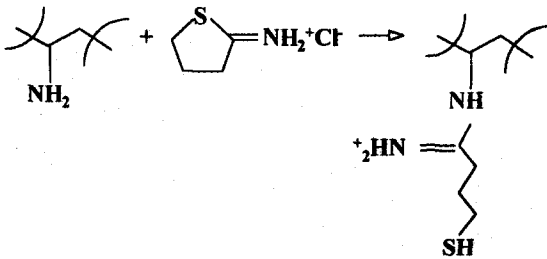
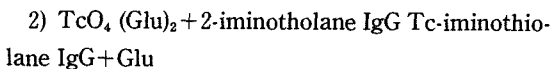
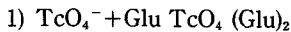


Fig. 5. Reaction of proteins with 2-iminothiolane.

Lambert 등이 ribosome의 단백질에 2-iminothiolane을 결합시킨 후¹²⁾, 단백질의 lysine 잔기에 2-iminothiolane이 결합하면서 S-S 결합을 깨지 않고도 SH기를 노출시켜 핵종의 표지후에도 면역 활성이 잘 유지되고, 응집(aggregation)이 거의 일어나지 않음이 보고되어 있다¹³⁾. 저자들의 결과에서 2-iminothiolane을 결합시키지 않은 IgG와 ^{99m}Tc-glucoheptonate로 반응시켜도 비특이적 결합을 보임은 ^{99m}Tc 표지용 glucoheptonate cold vial에 첨가되어 있는 SnCl₂가 IgG의 S-S 결합을 환원시켜 직접표지 되었을 가능성을 제시한다¹⁴⁾. 직접표지법에 사용되는 환원제들은 항체내의 -S-S 결합을 환원시킬 것으로 생각되는데 Na₂S₂O₄의 경우, IgG한 분자당 70 -S-S 결합이 있을 경우 8 이하의 -S-S 결합이 환원될 것으로 추정되어 항체의 파쇄(fragmentation)가 일어날 가능성은 거의 없을 것으로 생각된다. 표지된 ^{99m}Tc의 20 정도가 cysteine에 결합되어 불안정한 상태로 있는 점이 문제가 됨이 알려져 있다. 환원된 ^{99m}Tc을 안정화하기 위하여 glucoheptonate나 gluconate, MDP 등의 약한 착화물을 사용하기도 하며, 본 연구에 사용된 것과 비슷한 glucoheptonate와 barbiturate buffer를 이용한 직접 표지법이 알려져 있다.

2-iminothiolane 결합 IgG의 ^{99m}Tc 표지 반응은 다음과 같다(Fig. 5).



이때 glucoheptonate의 양이 적으면 IgG의 표지수율이 떨어지고, SnCl₂ 양이 많으면 IgG에 대한 ^{99m}Tc의 비특이적 결합이 증가함이 예상된다. 본 실험에서도 이와같은 결과가 관찰되어 작은 양의 glucoheptonate를 사용하고 표지 반응시간을 길게 하여 그 표지수율을 증

가시키고자 하였다. 그러나 90분 이상 반응시간을 연장할 경우 ^{99m}Tc의 반감기를 고려할 때 환자에 사용하기에는 어려움이 있다. 따라서 90분의 반응시간으로 가능한 작은 양의 glucoheptonate를 사용하여 ^{99m}Tc 표지 IgG를 얻는 것이 양호한 표지방법이라 생각된다.

실험동물을 통한 생체분포 실험을 한 결과 ^{99m}Tc-2-iminothiolane IgG가 ^{99m}Tc-DTPA IgG 보다 신장 방사능이 높아 대사산물이 신장을 통해 배출됨을 알 수 있었고 표지 반응시 2-iminothiolane을 과량 사용하여도 중합체(polymer)가 형성되지 않으며, 혈중제거율이 빨라 표적대 배후 방사능의 비가 높아 우수함을 확인하였다.

결 론

2-iminothiolane을 이용한 항체의 ^{99m}Tc 표지시 최적 반응조건을 알기 위하여 2-iminothiolane과 IgG의 결합시 몰비, pH의 변화등에 의한 ^{99m}Tc-glucoheptonate 표지수율의 변화와 농양 유발 백서 체내 동태를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) ^{99m}Tc-glucoheptonate의 양이 적으면 2-iminothiolane 결합 IgG의 표지 수율이 낮아졌다.

2) 2-iminothiolane 결합 IgG와 ^{99m}Tc-glucoheptonate의 반응시간이 길수록 표지수율이 높았다.

3) IgG와 ^{99m}Tc-glucoheptonate를 반응시킬 때 2-iminothiolane 없이도 표지됨이 관찰되었다.

4) 2-iminothiolane과 IgG의 분자수 비는 2-6 : 1에서 ^{99m}Tc 표지수율이 높았으며, 60 : 1에서도 중합체(polymer)는 관찰되지 않았다.

5) 2-iminothiolane과 IgG의 결합시 pH 6.4-6.6에서 가장 좋은 표지수율을 얻었다.

6) 실험적백서농양에서 ^{99m}Tc-DTPA-IgG보다 ^{99m}Tc-2-iminothiolane IgG가 혈중제거율이 빠르며, 신장을 통한 배설이 훨씬 높고, 간 및 비장의 방사능이 낮았으며, 농양 섭취는 비슷하였다. 결과적으로 ^{99m}Tc-2-iminothiolane IgG가 ^{99m}Tc-DTPA-IgG보다 농양대 주변 방사능의 비가 우수하였다.

2-iminothiolane을 IgG 및 단세포균 항체에 결합시켜 ^{99m}Tc 표지하는 방법은 농양 및 각종 악성종양의 면역 스티그라피에 유용할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Pak Ky, Nedelman MA, et al: *An instant kit method for labeling antimyosin fab' with ^{99m}Tc : Evaluation in an experimental myocardial infarct model.* *J Nucl Med* 33:144-149, 1992
- 2) Hnatowich DJ: *Recent developments in the radiolabeling of antibodies with iodine, indium, and technetium.* *Semi Nucl Med* 20:80-91, 1990
- 3) Hnatowich DJ: *Antibody radiolabeling, Problems and promises.* *Nucl Med Biol* 17:49-55, 1990
- 4) Eckelman WC, Paik CH, Steigman J: *Three approaches to radiolabeling antibodies with ^{99m}Tc .* *Nucl Med Biol* 2:171-176, 1989
- 5) Khaw BA, Strauss HW, et al: *^{99m}Tc labeling of antibodies to cardiac myosin fab and to human fibrinogen.* *J Nucl Med* 1011-1019, 1982
- 6) Arano Y, Yokoyama A, et al: *^{99m}Tc labeled monoclonal antibody with preserved immunoreactivity and high in vivo stability.* *J Nucl Med* 28:1027-1033, 1987
- 7) Fritzberg AR, Abrams PG, et al: *Specific and stable labeling of antibodies with ^{99m}Tc with a diamide dithiolate chelating agent.* *Proc Natl Acad Sci* 85: 4025-4029, 1988
- 8) Alauddin MM, Khawli LA, Epstein AL: *An Improved method of direct labeling monoclonal antibodies with ^{99m}Tc .* *Nucl Med Biol* 19:445-454, 1992
- 9) Franz J, Volkert WA, et al: *The production of ^{99m}Tc -labeled conjugated antibodies using a cyclam-based bifunctional chelating agent.* *Nucl Med Biol* 14:569-572, 1987
- 10) Fritzberg AR: *Advances in ^{99m}Tc -labeling of antibodies.* *Nucl Med* 26:7-12, 1987
- 11) 임상무, 우광선, 정위섭, 오옥두: 항체의 cyclic-DTPA를 이용한 ^{99m}Tc 표지시 polymer 형성과 체내 동태 변화. 대한 핵의학회지 27(2):270-276, 1993
- 12) Lambert JM, Jue R, Traut RR: *Disulfide cross-linking of escherichia coli ribosomal proteins with 2-iminothiolane (methyl 4-mercaptobutymidate): Evidence that the cross linked protein pairs are formed in the intact ribosomal subunit.* *Biochemistry* 17: 5406-5416, 1978
- 13) Joiris E, Bastin B, et al: *A new method for labeling of monoclonal antibodies and their fragment with ^{99m}Tc .* *Nucl Med Biol* 18:353-356, 1991
- 14) Hnatowich DJ, Virzi F, Winnard P: *Investigation of Ascorbate for direct labeling of antibodies with ^{99m}Tc .* *J Nucl Med* 35:127-134, 1994