

분자영상 방사성추적자의 생산에 사용되는 방사성동위원소 표지방법

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 핵의학과
최연성

Radiolabeling Methods Used for Preparation of Molecular Probes

Yeom Seong Choe, Ph.D.

Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Molecular imaging visualizes cellular processes at a molecular or genetic level in living subjects, and diverse molecular probes are used for this purpose. Radiolabeling methods as well as radioisotopes are very important in preparation of molecular probes, because they can affect the biodistribution in tissues and the excretion route. In this review, the molecular probes are divided into small organic molecules and macromolecules such as peptides and proteins, and their commonly used radiolabeling methods are described. (Korean J Nucl Med 38(2):121-130, 2004)

Key Words: Molecular probe, Radioisotope, Radiolabeling method, Small organic molecules, Proteins, Peptides, PET, SPECT

서 론

분자영상은 체내에서 분자 또는 유전자 수준에서 일어나는 세포의 과정들을 영상화하는 기술로 이 목적으로 사용되는 방사성추적자들은 매우 다양하다. 분자영상 방사성추적자를 생산하기 위하여 생체활성 화합물에 방사성동위원소를 표지하는데 영상의 목적과 영상기기에 따라 적절한 방사성동위원소와 표지방법을 사용하여야 한다.^{1,2)} 방사성동위원소와 표지방법은 방사성추적자의 체내분포, 배출경로, 대사 등을 결정하는데 매우 중요하기 때문에 방사성추적자를 디자인할 때 먼저 고려하여야 한다. 방사성동위원소로는 ^{11}C 과 ^{18}F 이 PET 방사성추적자의 생산에, 그리고 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 과 ^{123}I 이 SPECT 방사성추적자의 생산에 주로 사용된다. 이 논문에서는 분자영상 방사성추적자를 비단백질인 작은 유기 화합물과 단백질로 나누어 자주 사용되는 방사성동위원소 표지방법을 기술하였다.

작은 유기 화합물

1. ^{11}C -표지반응

^{11}C 표지 방사성추적자는 ^{12}C 를 ^{11}C 으로 단순히 동위원소 치환한 것과 같으며 생체는 이러한 중성자 하나의 차이를 인식하지 못하므로 ^{11}C 은 생체활성물질과 동일한 방사성추적자를 개발하는데 있어서 매우 이상적이다. 또한 짧은 반감기로 (20.4분) 인하여 당일에 반복하여 영상을 얻을 수 있다. ^{11}C 의 최대 비방사능 이론치는 3.4×10^8 GBq/mmol 이지만 타겟물질에 있는 ^{12}C 로 인하여 동위원소가 희석되어 실제로 얻는 비방사능은 $5-20 \times 10^5$ GBq/mmol 정도이다. $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ 핵반응에 의하여 생산되는 ^{11}C 표지에 가장 많이 사용되는 일차 전구물질이다. 심근의 산소대사 영상에 사용되는 ^{11}C acetate는 ^{11}C CO₂를 Grignard 시약과 반응한 후 가수분해하여 얻는다(Fig. 1).³⁾ 반응경로를 선택하는데 있어 제한을 줄이고 표지의 가능성을 증가시키기 위하여 ^{11}C CO₂로부터 반응성이 큰 이차 전구물질을 만들어 ^{11}C -표지반응에 사용한다. 많은 이차 전구물질 중에서 자주 사용되는 ^{11}C CH₃I는 두가지 방법에 의하여 만들어진다. 첫 번째 방법은 ^{11}C CO₂를 LiAlH₄로 환원한 다음 HI와 반응하여 얻는 방법으로 LiAlH₄가 공기로부터 담체인 CO₂를 잘 흡수하기 때문에 생성물의 비방사능을 낮출 수 있다.⁴⁾ 두 번째 방법은 ^{11}C CO₂를 Ni 촉매 하에서 수소와 반응한 후 생성된 ^{11}C CH₄

• Received: 2004. 3. 30. • Accepted: 2004. 4. 10.
• Address for reprints: Yeom Seong Choe, Ph.D. Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 50 Ilwon-dong, Kangnam-ku Seoul 135-710, Korea
Tel: 02) 3410-2623, Fax: 02) 3410-2639
E-mail: yschoe@samsung.co.kr

을 순환하는 기체상에서 요오드와 라디칼 반응을 하여 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 를 생산하는 방법으로, 생산된 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 는 더 이상 요오드화가 진행되지 않도록 계속하여 고체상에 포집된다(Fig. 2).⁵⁾ $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ 는 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 로부터 합성되는데 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 보다 온화한 조건에서 반응성이 크고 생성물의 방사화학적 수율이 높기 때문에 최근에 $[^{11}\text{C}]$ 메틸화반응에 널리 사용된다(Fig. 3).^{6,7)} $[^{11}\text{C}]$ 메틸화반응에 사용되는 전구물질은 일반적으로 비방사성 생성물로부터 메틸기를 제거하여 얻어지므로 전구물질의 정제가 완전하지 않으면 생성물의 비방사능을 낮추는 원인이 된다. $[^{11}\text{C}]$ 메틸화반응에 의하여 생산되는 대표적인 방사성추적자에는 L- $[^{11}\text{C}]\text{methionine}$ 과 $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ 가 있다(Fig. 4, 5).^{8,9)}

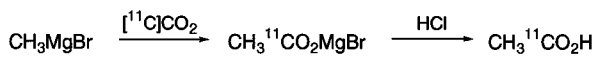


Fig. 1. (1- ^{11}C)acetate의 합성경로.

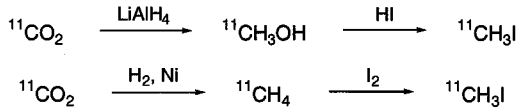


Fig. 2. (^{11}C) CH_3I 의 합성경로.

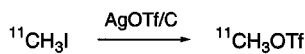


Fig. 3. (^{11}C) CH_3OTf 의 합성경로.

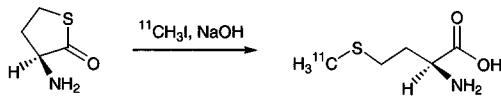


Fig. 4. L-(methyl- ^{11}C)Methionine의 합성경로.

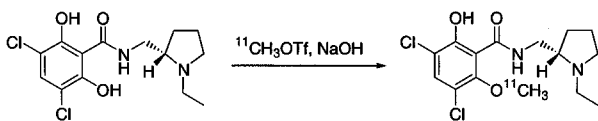


Fig. 5. (^{11}C) CH_3OTf 를 이용한 (^{11}C)raclopride의 합성경로.

2. ^{18}F -표지반응

의약품은 많은 경우에 대사의 성질을 변경하기 위하여 플루오르를 도입한다. 그러나 플루오르를 함유하지 않은 경우에는 ^{11}C 처럼 단순한 동위원소 치환이 불가능하므로 H, OH, alkyl기를 ^{18}F , $[^{18}\text{F}]$ fluoroalkyl기로 치환하는 생등입체성(bioisosteric) 치환을 시도한다. 플루오르는 크기가 작아서 화합물에 치환할 때 입체장애를 주지는 않지만 높은 전기음성도 때문에 그 화합물의 물

리화학적 성질에 영향을 주어 유도효과와 친지방성에 변화를 줄 수 있다.

2.1. 친핵성 치환반응

$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ 핵반응에 의하여 생산된 $[^{18}\text{F}]$ fluoride ion (반감기 109.7분)은 무담체의 상태로 얻어지기 때문에 높은 비방사능(6.3×10^7 GBq/mmol)을 갖는다. 이때 $[^{18}\text{F}]$ fluoride ion은 양이온에 의하여 동반되는데 이 양이온은 아직 그 정체가 알려지지 않았지만 타겟분체 또는 타겟포일의 성분인 금속 이온일 가능성이 크다. 이 금속이온들은 $[^{18}\text{F}]$ fluoride ion과 단단한 이온결합을 하기 때문에 단지 물을 증발시킴으로써 반응성 있는 $[^{18}\text{F}]$ fluoride ion을 만들지는 못한다. 따라서 $[^{18}\text{F}]$ fluoride ion이 유기용매에서 반응성이 있도록 만들기 위하여 유기용매에 잘 녹는 양이온이 필요한데, 고리모양의 폴리에테르폴리아민과 착물 형성을 잘 할 수 있는 적당한 크기의 K^+ , Cs^+ , Rb^+ 같은 알칼리금속 이온을 사용한다. 폴리에테르폴리아민으로 Kryptofix 222를 가장 흔히 사용하는데 이것은 크기가 큰 Cs^+ , Rb^+ 보다 K^+ 와 착물을 가장 잘 형성하기 때문이다. 이렇게 양이온을 사용하려면 반응 혼합액에 음이온을 함께 넣어야 하는데 친핵성 치환반응에서 $[^{18}\text{F}]$ fluoride ion과 경쟁하지 못하는 친핵성이 없는 음이온인 OH^- 또는 CO_3^{2-} 가 주로 사용되고 염기성이 낮은 HCO_3^- 도 경우에 따라 사용된다. 친핵성 치환반응에 사용되는 극성 비양성자성 용매에 $[^{18}\text{F}]$ fluoride ion의 용해성이 충분히 높지 않으므로, Kryptofix 222 또는 tetraalkylammonium salt 같은 상이동촉매(phase transfer catalyst)를 사용하여 $[^{18}\text{F}]$ fluoride ion을 친핵성을 갖는 "naked ion"이 되도록 용해하고 활성화한다(Fig. 6).¹⁰⁾ 이 활성화된 이온에 아세토니트릴을 넣고 가열하면 공비(azeotrope)에 의하여 무수 형태의 반응성이 있는 $[^{18}\text{F}]$ fluoride ion이 얻어진다. 반응용매로는 아세토니트릴, DMF, 또는 DMSO 등이 주로 사용되고, THF 또는 dichloromethane도 용매로 사용되기도 한다. $[^{18}\text{F}]$ Fluoride ion은 강한 친핵체이면서도 강염기이기 때문에 극성 양성자성 용매에서는 반응성이 매우 떨어진다.

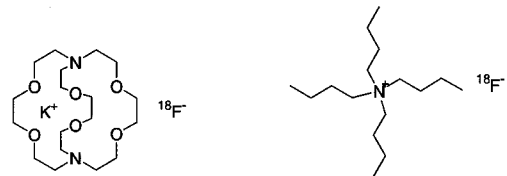


Fig. 6. Kryptofix 222와 tetrabutylammonium salt를 사용한 $[^{18}\text{F}]$ fluoride ion의 활성화.

최근에 반응매체로서 이온성 액체(ionic liquid)를 사용하는 새로운 $[^{18}\text{F}]$ 플루오르 표지방법이 개발되었다. 이온성 액체인

1-butyl-3-methylimidazolium triflate와 Cs₂CO₃를 함유하는 반응 용기에 수용액으로 얻어진 [¹⁸F]fluoride ion과 아세토니트릴에 녹인 전구물질을 넣고 반응하는 방법으로 물을 제거하는 고전적인 과정을 필요로 하지 않는 장점을 가지고 있다.¹¹⁾

2.1.1. 지방족 친핵성 치환반응

지방족 친핵성 플루오르화반응은 [¹⁸F]fluoride ion이 이탈기(leaving group)를 갖는 전구물질과 반응하여 C-F 결합을 형성하는 반응이다. 이탈기로는 할로젠, sulfonate ester (예로, trifluoromethanesulfonate ester (triflate), methanesulfonate ester (mesylate), *p*-toluenesulfonate ester (tosylate) 및 *p*-nitrobenzenesulfonate ester (nosylate)), 고리구조 (epoxide, cyclic sulfate) 등이 있으며, 이 중에서 triflate는 반응성이 크고 생성물의 방사화학적 수율이 높다. 글루코스 대사영상 방사성추적자 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG)와 유전자 영상 방사성추적자 9-[(3-[¹⁸F]-fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([¹⁸F]-FHPG)는 지방족 친핵성 치환반응에 의하여 생산되는 대표적인 예이다(Fig. 7, 8).^{12,13)} 이탈기의 선택은 전구물질의 안정성, 합성의 가능성, ¹⁸F으로 표지된 생성물과 전구물질의 분리 용이성, 부반응의 가능성 등을 고려하여 선택한다. 지방족 친핵성 플루오르화반응에서 일어날 수 있는 부반응은 제거반응으로 알켄이 생성되는 경우도 있다.

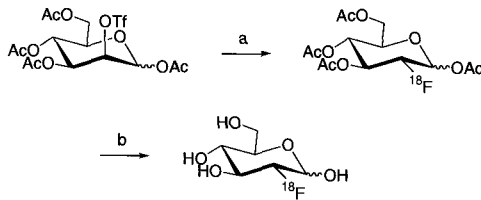


Fig. 7. 친핵성 치환반응에 의한 (¹⁸F)FDG의 합성경로. 반응시약 및 조건 (a) R₄N¹⁸F or K¹⁸F/Kryptofix 222, CH₃CN, 90 °C (b) 2 N NaOH, rt or 1 N HCl, 150 °C.

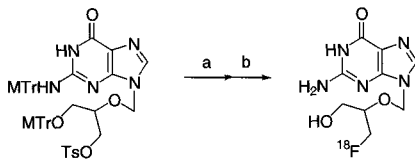


Fig. 8. (¹⁸F)FHPG의 합성경로. 반응시약 및 조건 (a) K¹⁸F/Kryptofix 222, (b) 1 N HCl.

2.1.2. 방향족 친핵성 치환반응

방향족 친핵성 플루오르화반응에서 가장 널리 사용되는 이탈기는 nitro와 trimethylammonium기이며, [¹⁸F]플루오르 생성물의 수율은 서로 유사하다. Nitro기를 가지는 전구물질은 trimethyl-

ammonium기를 가지는 전구물질에 비하여 합성하기가 용이한데 비하여, 전자는 반응생성물과 잘 분리가 되지 않고 후자는 전하를 가지고 있으므로 쉽게 분리가 된다. 이탈기의 ortho 또는 para 위치에 하나이상의 전자 끄는기가 있으면 방향족 고리가 활성화되어 플루오르화반응이 잘 일어난다(Fig. 9, 10).^{14,15)} 전자 끄는기는 생성물의 일부가 되거나 필요한 다른 기로 쉽게 전환이 되기도 하며 어떤 경우에는 플루오르화반응 후에 완전히 제거되기도 한다. 최근에는 [¹⁸F]플루오르화반응에 microwave cavity를 사용하여 반응수율을 증가시키고 반응시간을 단축하는데 기여하였다.^{16,17)}

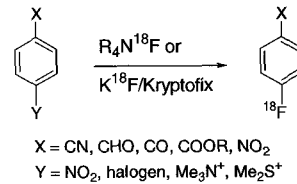


Fig. 9. 방향족 친핵성 플루오르화반응.

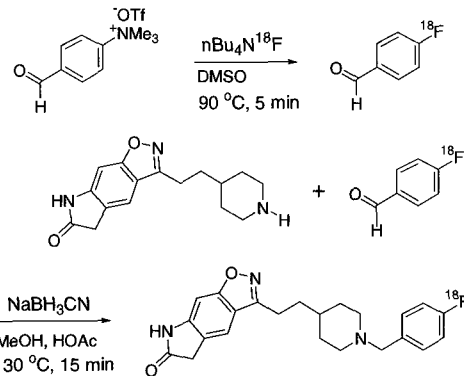


Fig. 10. 아세틸콜린에스테라제 영상 방사성추적자인 4-(¹⁸F)fluoro-CP-118,954의 합성경로.

2.2. 친전자성 치환반응

초기에는 친전자성 플루오르화반응에 [¹⁸F]F₂가 사용되었으나 높은 반응성 때문에 이차 플루오르화시약들이 개발되었다. 이 중에서 가장 널리 사용되는 시약은 acetyl hypofluorite (CH₃COO [¹⁸F]F)이며 [¹⁸F]F₂에서 만들어진다. 따라서 모든 친전자성 플루오르화반응은 [¹⁸F]F₂ 생산을 위하여 사용되는 ²⁰Ne(d,α)¹⁸F 핵반응의 타겟물질에 들어있는 소량의 담체 F₂ 때문에 비방사능이 낮은 단점이 있다. 이 반응은 그러므로 높은 비방사능이 필요하지 않고 존재하는 비방사성 화합물이 독성이 없는 경우에 사용된다.

2.2.1. 지방족 친전자성 치환반응

초기에는 알켄의 플루오르화반응에 사용되었으나 최근에는 친

핵성 플루오르화반응으로 대체되어 잘 사용되지 않는다. 이 반응은 친핵성 플루오르화반응이 잘 일어나지 않는 저산소 증감제 (hypoxic sensitizer) EF5와 같은 ^{18}F 으로 표지된 perfluoroalkyl기의 합성에 사용된다. ^{18}F FDG가 처음 개발되었을 때 3,4,6-tri-*O*-acetyl-D-glucal을 ^{18}F F₂와 반응하여 얻었고,¹⁸⁾ 그 후에 acetyl ^{18}F hypofluorite를 사용하여 부산물로 생성되는 2- ^{18}F fluoro-2-deoxy-D-mannose의 양을 줄이고 수율을 증가시킬 수 있었다(Fig. 11). 그러나 ^{18}F FDG는 친핵성 치환반응에 의하여 고수율로 쉽게 얻어지므로 친전자성 치환반응은 더 이상 사용되지 않는다. 5- ^{18}F Fluorouracil은 uracil과 ^{18}F F₂ 또는 acetyl ^{18}F hypofluorite를 반응하여 얻는다(Fig. 12).^{19,20)}

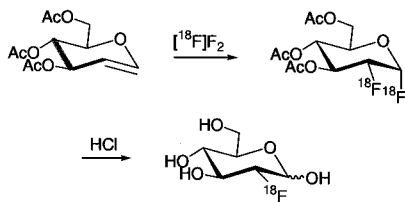


Fig. 11. 친전자성 치환반응에 의한 ^{18}F FDG의 합성경로.

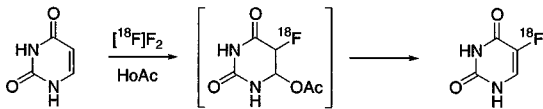


Fig. 12. 5- ^{18}F Fluorouracil의 합성경로.

2.2.2. 방향족 친전자성 치환반응

친전자성 플루오르화반응은 반응성이 매우 크기 때문에 첨가제 반응에 의하여 방향족 화합물에 플루오르를 표지한다. 이 반응은 위치 선택성이 결여되어 여러 위치 이성체를 생성시킨다. 위치 선택적인 플루오르화반응은 trialkyltin, mercury halide 등과 같은 금속 치환기를 갖는 방향족 화합물의 탈금속 플루오르화반응(radiofluorodemetalation)에 의하여 얻어진다(Fig. 13).²¹⁾

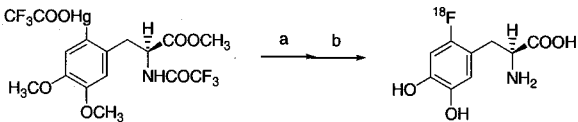


Fig. 13. L-6- ^{18}F FluoroDOPA의 합성경로. 반응시약 및 조건 (a) $\text{CH}_3\text{COO}^{18}\text{F}$ (b) HBr.

3. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -표지반응

^{99}Mo 이 붕괴되면서 생성되는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 은 에너지가 140 keV이어서 감마카메라에 의하여 효율적으로 검출되며, 반감기가 비교적 짧기 때문에(6시간) 핵의학 영상진단에 이상적인 방사성동위원

소이다. 또 다른 동위원소인 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 은 반감기가 52분이며 양전자를 방출하기 때문에 PET 방사성추적자의 생산에 사용된다. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 은 ^{99}Tc 으로 붕괴되기 때문에 ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 발생기로부터 용리된 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 는 ^{99}Tc 을 함유하며 이 농도는 용리시간에 의존하지만 일반적으로 10^{-7} - 10^{-10} M이다. 따라서 이 착물들은 완전한 무담체 상태는 아니다. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 으로 표지된 방사성추적자의 동정에는 Tc과 같은 족, 세 번째 주기의 전이금속인 Re이 유사한 화학적 성질을 가지기 때문에 자주 사용되나, β 방출체인 ^{99}Tc (반감기 2.1×10^5 년)이 분석에 필요한 양으로 얻어지기 때문에 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 방사성추적자의 화학, 구조, 물리화학적 성질을 규명하는데 사용된다.

발생기로부터 용리된 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 는 산화상태가 +7로 킬레이트와 쉽게 착물을 형성하지 못한다. 간, 비장, 골수의 세망내피계 영상에 사용되는 콜로이드 $^{99\text{m}}\text{Tc}_2\text{S}_7$ 를 제외하고는 더 낮은 산화상태로 환원되어야 반응성이 있으며 환원제로는 SnCl_2 가 주로 사용된다. 배위하는 리간드 또는 킬레이트의 존재 하에서 환원이 되면 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 은 배위 리간드의 전자주기 능력에 따라 산화상태가 +1부터 +6이 된다. 배위수가 +4부터 +7일 때 얻을 수 있는 구조의 다양성과 산화상태에서의 변화는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 화학에 풍부한 다양성을 주어 넓은 영역의 착물을 형성할 수 있도록 하였다. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 착물은 두가지 반응에 의하여 얻어지는데 첫 번째는 배위 리간드와 환원제를 함유하는 무균 바이알(키트)에 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 를 넣고 적절한 온도에서 표지하는 한 단계 반응(직접표지방법)이 있고, 두 번째는 적절한 산화상태에 있는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 을 안정화하는 결합력이 약한 리간드의 존재 하에서 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 를 환원하고 이것을 열역학적으로 더 안정하고 더 강하게 전자를 줄 수 있는 타겟 리간드를 함유하는 바이알(키트)에 넣고 표지하는 두 단계 반응(교환표지방법)이 있다.

배위리간드로는 N_2S_2 , N_3S , diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dioxime의 boronic acid adducts (BATO) 등이 주로 사용되고 있으며,^{22,23)} 최근에는 $^{99\text{m}}\text{TcCp}(\text{CO})_3$ (Cp: cyclopentadienyl), *fac*- $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3$ ⁺ 등이 개발되어 다양한 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 착물의 개발에 기여하고 있다.^{24,25)} 도파민운반체 영상 방사성추적자인 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ TRODAT-1은 diaminedithiol 리간드의 대표적인 예이다(Fig. 14).²⁶⁾

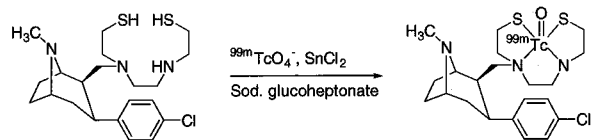


Fig. 14. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ TRODAT-1의 합성경로.

4. 방사성요오드 표지반응

영상진단에 사용되는 방사성요오드에는 ^{123}I (반감기 13.2시간, 에너지 159 keV)과 ^{124}I (4.18일, 511 keV)가 있다.

4.1. 동위원소 교환방법

이 방법은 요오드를 방사성요오드로 교환하는 방법으로 방사성추적자의 상용생산에 사용된다. 방사성요오드가 교환되는 정도는 전구물질과 방사성요오드의 몰비에 직접 비례하기 때문에 전구물질 양이 증가할수록 방사화학적 수율이 증가한다. 따라서 이 방법은 높은 비방사능이 필요하지 않은 방사성추적자를 생산할 때 사용한다.

4.2. 친핵성 치환반응

브로민을 이탈기로 가지는 지방족 및 방향족 화합물을 요오드로 치환하는 반응은 동위원소 교환반응처럼 용이하지는 않지만 생성물을 높은 수율과 높은 비방사능으로 얻는다.²⁷⁾ 그러나 이 반응은 경우에 따라서 생성물과 전구물질의 분리가 용이하지 않다.

4.3. 친전자성 치환반응

전자가 풍부한 방향족 화합물의 수소를 방사성요오드로 치환하는 경우에 주로 사용한다. 방향족 고리에 전자를 제공하는 치환기(OH, NH₂)가 있는 경우에 이 치환기의 ortho 또는 para 위치에 방사성요오드가 쉽게 도입된다.

4.3.1. 직접표지법

방사성요오드는 온화한 산화제 존재 하에서 친전자성 치환반응에 의하여 수소를 치환한다. 산화제로는 chloramine-T, *N*-chlorosuccinimide와 같은 *N*-chloro 화합물이 주로 사용되는데 (Fig. 15), 산화제의 염소는 요오드 보다 전기음성도가 크기 때문에 요오드를 I⁺에 대등한 친전자성 형태로 전환시킨다. 또한 산화제는 생성물과 잘 분리되고 최소한의 산화적 손상과 부산물을 동반하지 않는 것을 선택하여야 한다. 이 방법은 요오드 담체 없이도 재현성, 신속성, 효율성이 큰 장점이 있다.

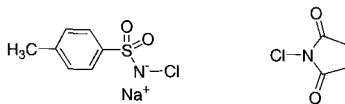


Fig. 15. Chloramine-T와 *N*-chlorosuccinimide의 구조.

4.3.2. 탈금속 방사성요오드화 반응

위치특이적으로 방사성요오드를 도입하고 방사성추적자에서 요오드가 이탈되는 단점을 보완하기 위하여 탈금속 방사성요

드화반응(radioiododemetalation)이 주로 사용된다. 탄소-금속 결합의 비교적 높은 극성과 낮은 강도로 인하여 이 결합을 탄소-요오드 결합으로 치환하는 반응은 빠르며 위치특이성이 높다. 유기금속 기질 중에서 borane, mercurial, thallate, silane, germane 및 stannane이 가장 널리 사용된다. 직접표지법은 이성체 혼합물을 생성하거나 원하지 않는 위치에 방사성요오드를 표지할 수 있는 반면에, 이 반응은 방향족 화합물을 표지하는데 유용하고 표지위치를 정확히 결정할 수 있다는 장점이 있다. 이 표지방법을 사용하는 대표적인 방사성추적자에는 [^{123}I]β-CIT와 [^{123}I]β-IPT가 있다(Fig. 16, 17).²⁸⁻²⁹⁾

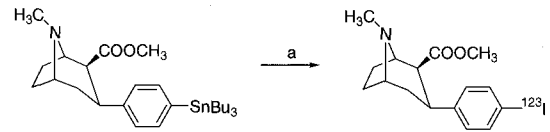


Fig. 16. (^{123}I)β-CIT의 합성경로. 반응시약 및 조건: (α) ^{123}I , CH₃CO₃H, 상온, 30분.

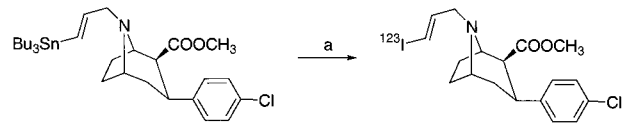


Fig. 17. (^{123}I)β-IPT의 합성경로. 반응시약 및 조건: (α) ^{123}I , 3% H₂O₂, 상온, 30분.

단백질 및 펩타이드

분자생물학의 발달과 함께 핵의학 분야에서도 방사성동위원소로 표지된 단백질 및 펩타이드를 수용체 및 중앙 영상에 적용하려는 연구가 활발히 전개되고 있으며 최근에는 단일항체 및 항체의 단편에 대한 관심도 증가하고 있다.³⁰⁻³²⁾ 펩타이드는 약 50개의 아미노산, 분자량 10 kDa 이하인 화합물을, 단백질은 크기에 있어서 이 보다 큰 아미노산으로 이루어진 화합물을 일컫는다. 많은 펩타이드들은 세포 표면에 있는 수용체와 높은 친화력을 가지고 결합되어 있으며 이들 수용체들은 자주 정상세포 보다는 암세포에서 더 높은 밀도로 발견된다. 따라서 방사성동위원소로 표지된 펩타이드들은 암세포 영상을 얻는데 사용될 수 있다. 이들은 혈액에서 빨리 제거되고 신장으로 배출되어 배설조직에 축적이 낮기 때문에 높은 표적대 배경 섭취비를 가진다. 펩타이드는 또한 표지를 위한 작용기를 도입하기가 용이하여 펩타이드 유사체의 화학적 합성이 가능하다. 단점으로는 효소에 의한 펩타이드의 빠른 분해 때문에 불안정할 수 있고 대부분 직선구조를 갖기 때문에 변성화되어 생체활성을 잃게 될 가능성도 있다. 방사성동

위원소로 표지된 단백질들은 크기가 커 혈액안에 오래 머무르고 간으로 배출되는 경우가 많다. 따라서 항체의 경우에 크기가 작은 단백을 사용하여 혈액으로부터 배출이 빠르도록 하고 간 보다 는 신장을 통하여 배출되도록 한다.

1. ¹⁸F-표지반응

분자량이 작은 펩타이드들은 표적 대 배경 섭취비가 높고 혈액 제거가 빠르기 때문에 ¹⁸F와 같은 반감기가 짧은 방사성동위원소가 흥미를 끈다. 고분해능의 PET를 사용하여 작은 표적을 감지할 수 있는 장점이 있으나 표지방법이 오랜 시간과 노력을 요하는 경우가 많다. 작은 펩타이드에 비교적 큰 ¹⁸F-표지 보결그룹이 붙으면 큰 단백질에서는 존재하지 않는 구조변형이 일어날 수도 있다. ¹⁸F-표지를 위한 보결그룹으로는 여러 가지가 알려져 있고(Fig. 18-21),³³⁾ 사용하는 펩타이드와 단백질에 따라 차이가 있지만 수율과 체내안정성 등을 고려할 때 *N*-succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate가 유용한 것으로 알려져 있다. 반면에 methyl 2-[¹⁸F]fluoropropionate는 크기가 작기 때문에 ¹⁸F을 도입하려는 펩타이드에 입체적 장애를 일으키지 않으며 타이로신과 히스티딘 잔기의 양이 적은 펩타이드에 ¹⁸F을 도입하기 위하여 사용된다.

1.1. [¹⁸F]Fluoroacylation

펩타이드 및 단백질들의 [¹⁸F]fluoroacylation을 위한 보결그룹에는 2-[¹⁸F]fluoroacetic acid (2 단계반응, 방사화학적 수율 50%), methyl 2-[¹⁸F]fluoropropionate (1 단계반응, 90%), 4-nitrophenyl 2-[¹⁸F]fluoropropionate (3 단계반응, 60%), *N*-succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate (3 단계반응, 55%), *N*-succinimidyl 4-([¹⁸F]fluoromethyl)benzoate (1 단계반응, 18%), *N*-succinimidyl 8-[(4'-[¹⁸F]fluorobenzyl)amino]suberate (3 단계반응,

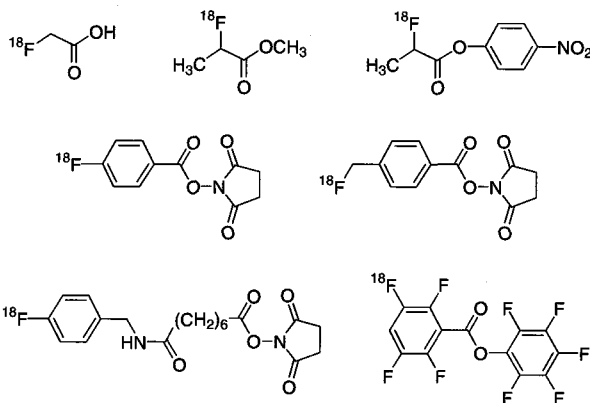


Fig. 18. (¹⁸F)Fluoroacylation을 위한 보결그룹.

25-40%), [¹⁸F]-2,3,5,6-tetrafluorophenyl pentafluorobenzoate (1 단계반응, 32%) (Fig. 18) 등이 있다.

1.2. [¹⁸F]Fluoroamidation

[¹⁸F]Fluoroamidation을 위한 대표적인 보결그룹은 1-[4-([¹⁸F]fluoromethyl)benzoyl]aminobutane-4-amine으로 (Fig. 19), 2 단계반응을 거쳐 얻어지며 방사화학적 수율은 52%이다.

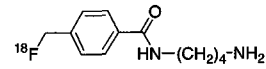


Fig. 19. (¹⁸F)Fluoroamidation을 위한 보결그룹.

1.3. [¹⁸F]Fluoroimidation

[¹⁸F]Fluoroimidation을 위한 대표적인 보결그룹은 methyl 3-[¹⁸F]fluoro-5-nitrobenzimidate로 (Fig. 20), 3 단계반응을 거쳐 얻어지며 방사화학적 수율은 20-33%이다.

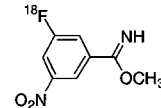


Fig. 20. (¹⁸F)Fluoroimidation을 위한 보결그룹.

1.4. [¹⁸F]Fluoroalkylation

[¹⁸F]Fluoroalkylation을 위한 보결그룹에는 *N*-(*p*-[¹⁸F]fluorophenyl)maleimide (4 단계반응, 15%), 4-[¹⁸F]fluorophenacyl bromide (3 단계반응, 28-40%), *m*-maleimido-*N*-(*p*-[¹⁸F]fluorobenzyl)benzamide (3 단계반응, 10%), [¹⁸F]pentafluorobenzaldehyde (1 단계반응, 60%) (Fig. 21) 등이 있다.

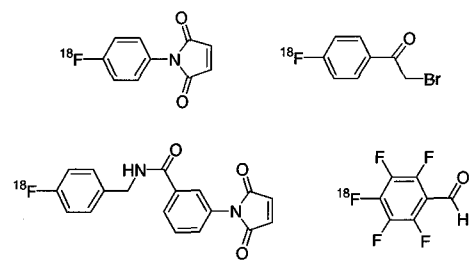


Fig. 21. (¹⁸F)Fluoroalkylation을 위한 보결그룹.

2. ^{99m}Tc-표지반응

^{99m}Tc은 구입이 용이하고, 가격이 저렴하며 물리적 성질이 우수하여 단백질 표지에 이상적인 방사성동위원소이다. 펩타이드 및 단백질의 수용체에 대한 결합친화력은 그 분자의 화학변화에

의하여 영향을 받을 수 있는데, 금속 방사성동위원소와의 표지를 위한 킬레이터의 선택은 펩타이드 및 단백질의 친지방성과 전체 전하에 상당한 영향을 줄 수 있어 그들의 결합성질을 바꿀 수 있다. 표지방법에는 직접방법과 간접방법(이작용기성 방법)이 있다. 가장 흔하게 사용되는 직접방법은 단백질의 -S-S- 결합의 환원에 의하여 생성되는 -SH와 ^{99m}Tc 의 결합에 의한 것인데 불안정한 결합을 형성하고 표지위치를 조절하기가 어렵다. 이 방법은 항체를 ^{99m}Tc 으로 표지하는데는 유용하게 사용되어져 왔지만 작은 펩타이드들을 표지하는데는 사용되지 않는다. 작은 펩타이드들은 대부분 disulfide들을 함유하지 않으며 다수의 비공유적 작용에 의하여 안정화되지 않기 때문에 직접 표지법이 사용되지 않는다.³²⁾ 간접표지법은 결합하는 ^{99m}Tc 에 높은 친화력을 가지는 킬레이터를 사용하는데 후표지접합(postlabeling conjugation: PLC)과 후접합표지(postconjugation labeling: PCL)의 두 방법이 있다. 전자는 이작용기 화합물을 ^{99m}Tc 과 표지한 후에 단백질에 접합하는 방법이며 후자는 킬레이터를 단백질에 접합한 후에 표지하는 방법인데, 두 방법 모두 단백질 및 펩타이드를 표지하는데 유용하다. 킬레이션을 위하여 N_2S_2 , N_3S , *N*-succinimidyl 6-hydrazinonicotinate (S-HYNIC) 등이 주로 사용된다. 최근에 $^{99m}\text{TcCp}(\text{CO})_3$, *fac*-[$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$]⁺ 등을 사용한 단백질의 표지가 보고되었다.^{24,25)}

2.1. S-HYNIC

S-HYNIC (Fig. 22)이 단백질과 결합한 후에 도입된 HYNIC의 수는 이 단백질과 *p*-nitrobenzaldehyde와 반응한 후에 340 nm에서 흡광도 변화로부터 측정할 수 있다. 이 원리는 반응 후 생성된 *p*-nitrobenzaldehyde의 hydrazone이 340-386 nm에서 흡광도가 증가하기 때문이다.³⁴⁻³⁷⁾

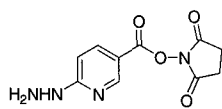


Fig. 22. S-HYNIC의 구조.

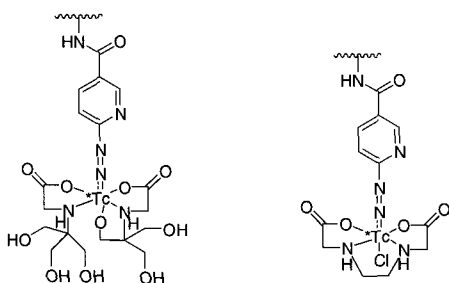


Fig. 23. (^{99m}Tc)-HYNIC-colligand (fricine, EDDA)의 구조.

공동 리간드(co-ligand)는 방사능 표지의 안정성, 친지방성 및 단백질 결합능에 중요한 역할을 하는데, tricine과 ethylenediamine diacetic acid (EDDA)가 주로 사용된다(Fig. 23).

3. 방사성요오드 표지반응

방사성요오드 표지반응은 매우 다양하며 단백질의 아미노산 잔기를 직접 표지하는 방법과 두단계반응을 통한 간접표지방법이 있다. 전자는 단백질 하나당 한개 이하의 요오드를 도입하는데 유용하고 후자는 단백질 손상을 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다. 단백질 및 펩타이드의 방사성요오드 표지반응은 산화제와 방사성동위원소 존재 하에서 친전자성 치환반응에 의하여 일어난다. 산화제로는 chloramine-T, *N*-chlorosuccinimide, Iodobead, Iodogen 및 lactoperoxidase가 주로 사용된다.³⁰⁾

3.1. 직접표지법

방향족 고리에 OH 또는 NH_2 기와 같은 활성화기가 있으면 방향족 고리의 전하분포에 영향을 주기 때문에 주로 이 활성화기의 ortho-위치에 표지가 된다. 이 방법은 경우에 따라서 체내에서 탈요오드화를 일으킨다.

3.1.1. 화학 산화제

Chloramine-T를 산화제로 사용하는 요오드화 반응은 단백질 변성을 일으킬 수 있는 극단적인 pH 또는 유기용매를 사용하지 않아도 되는 장점이 있다. 단점으로는 경우에 따라서 단백질 변성을 일으킬 수 있는데 이것은 전기이동성 변경, 응집 또는 활성의 손실로 측정할 수 있다.³⁷⁾ 따라서 chloramine-T에 노출되는 단백질의 농도와 시간을 최소화하여 chloramine-T에 의한 비특이적 단백질 변성을 방지하여야 한다. 주로 단백질의 타이로신 잔기에 표지된다.

N-Chlorosuccinimide는 비수용액 조건(용매의 물 함량이 10% 이내)에서 방사성요오드를 표지하는데 유용하다.

Iodobead (*N*-chlorobenzenesulfonamide)는 chloramine-T를 polystyrene 구슬에 고정된 산화제인데(Fig. 24), 이 산화제의 장점은 표지 후에 구슬을 용액으로부터 쉽게 제거할 수 있기 때문에 환원제를 넣어 반응을 종료시킬 필요가 없다.

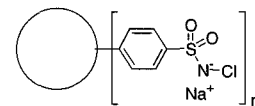


Fig. 24. Iodobead의 구조.

Iodogen (1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril)은 물에 녹지 않는 chloramine으로, 반응용기에 얇은 막으로 입혀 사용한다(Fig. 25). 요오드화 효율로 볼 때 chloramine-T 보다 우수하며 Iodogen이 용기의 벽에 입혀있기 때문에 산화제에 대한 단백질의 직접적인 노출을 최소화할 수 있다.

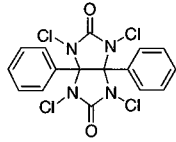


Fig. 25. Iodogen의 구조.

3.1.2. 효소 산화제

산화효소인 lactoperoxidase는 H₂O₂ 존재 하에서 단백질을 방사성요오드로 표지하는데 사용된다. 효소를 이용한 요오드 치환 반응은 화학적인 방법보다는 덜 임의적이며, 주로 입체적으로 접근이 가능한 타이로신 잔기를 가진 단백질의 표지에 유용하다. 이 방법의 장점은 표지할 물질이 효소의 활성부위에서 생성되고 이어 이 효소는 표지할 단백질에 비공유적으로 결합하기 때문에 산화로 인한 단백질 손상을 최소화할 수 있다. 따라서 이 방법은 화학적인 방법보다 표지가 더 균일하며 chloramine-T에 의하여 손상되는 단백질을 사용하는 경우 또는 히스티딘 잔기를 표지할 경우에 유용하다.

그러나 lactoperoxidase 자체도 표지가 일어날 수 있기 때문에 방사성동위원소 표지 후에 바로 정제를 하여 lactoperoxidase를 제거하여야 하는데 이는 효소의 표지가 표적 단백질의 표지 보다 훨씬 느리게 일어나기 때문이다.

3.2. 간접표지법

직접표지법이 체내에서 탈요오드화를 쉽게 일으키기 때문에 Bolton-Hunter 시약(*N*-succinimidyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate)을 사용한 간접표지법을 사용하여 탈요오드화를 어느정도 방지할 수 있다(Fig. 26).^{38,39} Bolton-Hunter 시약은 방사성요오드가 쉽게 도입될 수 있는 페놀기와 온화한 조건 하에서 단백질의 NH₂기(주로 라이신 잔기)와 반응할 수 있는 *N*-hydroxysuccinimide ester를 가지는 이작용기 화합물이다. 따라서 이 반응은 타이로신 잔기가 부족한 단백질의 표지에도 사용이 가능하다. 그러나 페닐 고리의 OH기는 친전자 치환반응을 용이하게 하지만 deiodinase로 중재된 탈요오드화 뿐만 아니라 가수분해도 활성화시킨다. 이 문제를 극복하기 위하여 OH기 없이 페닐 고리에 방사성요오드화 반응을 수행하는 방법으로 [¹²³I]SIB (*N*-succinimidyl 3-iodobenzoate)가 합성되었고 체내에서 탈요오드화를 현저하게

감소시키는 것이 보고되었다(Fig. 27).⁴⁰

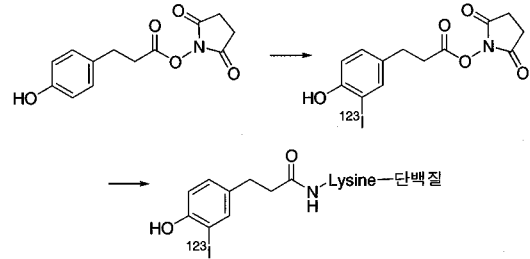


Fig. 26. Bolton-Hunter 방사성요오드 표지방법.

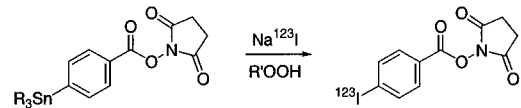


Fig. 27. (¹²³I)SIB의 합성경로.

4. 정제

4.1. 반응종료

방사성동위원소 표지 후 반응혼합액을 10-20배의 차가운 buffer로 희석하여 반응을 현저히 늦춤으로써 반응을 종료하거나 또는 산화제의 1.2-1.5배에 해당하는 환원제를 사용한다. 주로 sodium metabisulfite와 같은 환원제가 사용되며 방사성요오드로 표지하는 경우에는 반응액으로부터 휘발성이 큰 요오드의 방출을 최소화할 수 있다.

4.2. 정제

반응종료 후에 방사성동위원소로 표지된 단백질 또는 펩타이드는 반응하지 않고 남아있는 방사성동위원소, 보결그룹, 산화제들을 제거하기 위하여 정제된다. 일반적으로 사용되는 방법은 gel filtration으로 분자량 차이에 의하여 단백질과 시약들을 분리하는 방법인데 신속하고 간편하여 주로 사용된다. 단백질은 비특이결합이 크기 때문에 정제할 때 serum albumin 또는 gelatin 등을 사용하여 비특이결합을 피할 수 있다. 이 방법은 표지된 단백질과 표지되지 않은 단백질의 크기가 서로 유사하기 때문에 분리할 수 없으므로, 방사성단백질의 비방사능을 높이기 위하여는 fast protein liquid chromatography (FPLC)가 유용하다. 펩타이드의 경우에는 일반적으로 3차원 구조가 명확히 정해지지 않아 high performance liquid chromatography (HPLC)를 사용하여 비방사능이 높은 방사성 펩타이드를 얻을 수 있다. HPLC 용매로는 이온쌍(ion pairing) 시약인 0.1% trifluoroacetic acid를 포함하는 물

-아세트나이트릴이 주로 사용된다. 이외에도 단백질의 정제를 위하여 affinity chromatography, ion exchange chromatography, electrophoresis, dialysis 등이 사용된다.

결론

분자영상 방사성추적자를 개발하기 위하여 고려하여야 할 인자는 여러 가지가 있지만 영상의 목적에 따라 적절한 타겟화합물, 전구물질, 방사성동위원소, 표지방법을 선정하여야 한다. 방사성동위원소 표지방법은 방사성동위원소에 따라 다르나, 반응이 간단하고 반응시간이 짧으며 반응의 마지막단계에 표지가 되도록 하며 높은 반응수율을 줄 수 있는 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 새로운 표지방법을 개발하고 기존의 표지방법을 적절히 적용하는 것은 다양한 방사성추적자를 개발하는데 있어 필요하다.

Reference

1. Radiotracer production. In: Wagner HN, Szabo Z, Buchanan JW, editors. *Principles of Nuclear Medicine* Philadelphia: W.B. Saunders; 1995.
2. Snyder SE, Kilbourn MR. Chemistry of fluorine-18 radiopharmaceuticals. In: Welch MJ, Redvanly CS, editors. *Handbook of Radiopharmaceuticals* Chichester: Wiley; 2003. p 195-227.
3. Pike VW, Eakins MN, Allan RM, Selwyn AP. Preparation of [^{11}C]acetate - an agent for the study of myocardial metabolism by positron emission tomography. *Int J Appl Radiat Isot* 1982; 33:505-12.
4. Crouzel C, Långström B, Pike VW, Coenen HH. Recommendations for a practical production of [^{11}C]methyl iodide. *Appl Radiat Isot* 1987;38:601-3.
5. Larsen P, Ulin J, Dahlström K, Jensen M. Synthesis of [^{11}C]iodomethane by iodination of [^{11}C]methane. *Appl Radiat Isot* 1997;48:153-7.
6. Jewett DM. A simple synthesis of [^{11}C]methyl triflate. *Appl Radiat Isot* 1992;43:1383-5.
7. Nägren K, Muller L, Halldin C, Swahn CG, Leuhkoinen P. Improved synthesis of some commonly used PET radioligands by the use of [^{11}C]methyl triflate. *Nucl Med Biol* 1995;22:235-9.
8. Comar D, Carton JC, Maziere M, Marazano C. Labelling and metabolism of methionine-methyl- ^{11}C . *Eur J Nucl Med* 1976; 1:11-4.
9. Iwata R, Pascali C, Bogna A, Miyake Y, Yanai K, Ido T. A simple loop method for the automated preparation of [^{11}C]raclopride from [^{11}C]methyl triflate. *Appl Radiat Isot* 2001;55:17-22.
10. Coenen HH. New radiohalogenation methods: An overview. In: Cox PH, Mather SJ, Sampson CB, Lazarus CR, editors. *Progress in Radiopharmacy*. Boston: Martinus Nijhoff; 1986. p 196-220.
11. Kim DW, Choe YS, Chi DY. A new nucleophilic fluorine-18 labeling method for aliphatic mesylates: reaction in ionic liquids shows tolerance for water. *Nucl Med Biol* 2003;30:345-50.
12. Hamacher K, Coenen HH, Stöcklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[^{18}F]fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med* 1986;27:235-8.
13. Alauddin MM, Conti PS, Mazza SM, Hamzeh FM, Lever JR. 9-[(3-[^{18}F]-Fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([^{18}F]-FHPG): a potential imaging agent of viral infection and gene therapy using PET. *Nucl Med Biol* 1996;23:787-92.
14. Haka MS, Kilbourn MR, Watkins GL, Toorongian SA. Aryltrimethylammonium trifluoromethanesulfonates as precursors to aryl [^{18}F]fluoride: Improved synthesis of [^{18}F]GBR-13119. *J Labelled Cpd Radiopharm* 1989;27:823-33.
15. Lee SY, Choe YS, Kim YR, Choi BW, Kim SE, Choi Y, Lee KH, Lee J, Kim BT. Synthesis and evaluation of ^{18}F -labeled N-benzylpiperidine benzisoxazole for acetylcholinesterase mapping. *J Nucl Med* 2002;43S:358P.
16. Le Bars D, Lemaire C, Ginovart N, Plenevaux A, Aerts J, Brihaye C, et al. High-yield radiosynthesis and preliminary in vivo evaluation of p-[^{18}F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635. *Nucl Med Biol* 1998;25:343-50.
17. Jonson SD, Welch MJ. Synthesis, biological evaluation, and baboon PET imaging of the potential adrenal agent cholesteryl-p-[^{18}F]fluorobenzoate. *Nucl Med Biol* 1999;26:131-8.
18. Ido T, Wan CN, Casella V, Fowler JS, Wolf AP, Reivich M, et al. Labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose analogs. ^{18}F -Labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and ^{14}C -2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J Labelled Cpd Radiopharm* 1978;14:171-83.
19. Fowler JS, Finn RD, Lambrecht RM, Wolf AP. The synthesis of ^{18}F -5-fluorouracil. *J Nucl Med* 1973;14:63-4.
20. Diksic M, Farrokhzad S, Yamamoto YL, Feindel W. A simple synthesis of ^{18}F -labelled 5-fluorouracil using acetylhyposulfurite. *Int J Nucl Med Biol* 1984;11:141-2.
21. Adam MJ, Jivan S. Synthesis and purification of L-6-[^{18}F]fluorodopa. *Appl Radiat Isot* 1988;39:1203-10.
22. Hom RK, Katzenellenbogen JA. Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: recent developments and encouraging results. *Nucl Med Biol* 1997;24:485-98.
23. Jurisson SS, Lydon JD. Potential technetium small molecule radiopharmaceuticals. *Chem Rev* 1999;99:2205-18.
24. Spradau TW, Katzenellenbogen JA. Preparation of cyclopentadienyltricarbonylrhenium complexes using a double ligand transfer reaction. *Organometallics* 1998;17:2009-17.
25. Alberto R, Schibli R, Egli A, Schubiger AP. A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$] $^+$ from [$^{99\text{m}}\text{TcO}_4$] in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *J Am Chem Soc* 1998;120:7987-8.
26. Kung MP, Stevenson DA, Plössel K, Meegalla SK, Beckwith A, Essman WD, Mu M, Lucki I, Kung HF. [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]TRODAT-1: A novel technetium-99m complex as a dopamine transporter imaging agent. *Eur J Nucl Med* 1997;24:372-80.
27. Moerlein SM. Regiospecific aromatic radioiodination via n.c.a. copper (I) assisted iododebromination. *Radiochim Acta* 1990; 50:55-61.
28. Neumeyer JL, Wang S, Milius RA, Baldwin RM, Zea-Ponce Y, Hofer PB, et al. [^{125}I]-2 β -Carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl)tropane: high-affinity SPECT radiotracer of monoamine reuptake sites in brain. *J Med Chem* 1991;34:3144-6.
29. Goodman MM, Kung M-P, Kabalka GW, Kung HF, Switzer R. Synthesis and characterization of radioiodinated N-(3-iodopropen-1-yl)2 β -carbomethoxy-3 β -(4-chlorophenyl)tropanes: potential dopamine reuptake site imaging agents. *J Med Chem* 1994;37:1535-42.
30. Parker CW. Radiolabeling of proteins. *Methods Enzymol* 1990; 182:721-31.
31. Blok D, Feitsma RIJ, Vermeij P, Pauwels EJK. Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Eur J Nucl Med* 1999; 26:1511-1519.
32. Fischman AJ, Babich JW. Radiolabeled peptides: a new class of imaging agents. In: Freeman LM, editor. *Nuclear Medicine Annual*.

- New York: Raven Press; 1997. p. 103.
33. Wester H-J, Hamacher K, Stöcklin G. A comparative study of N.C.A. fluorine-18 labeling of proteins via acylation and photochemical conjugation. *Nucl Med Biol* 1996;23:365-72.
 34. King TP, Zhao SW, Lam T. Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage. *Biochemistry* 1986;25:5774-9.
 35. Rennen HJ, Boerman OC, Koenders EB, Oyen WJ, Corstens FH. Labeling proteins with Tc-99m via hydrazinonicotinamide (HYNIC): optimization of the conjugation reaction. *Nucl Med Biol* 2000; 27:599-604.
 36. Rennen HJ, Boerman OC, Oyen WJ, van der Meer JW, Corstens FH. Specific and rapid scintigraphic detection of infection with ^{99m}Tc-labeled interleukin-8. *J Nucl Med* 2001;42:117-23.
 37. Su Z-F, He J, Rusckowski M, Hnatowich. In vitro cell studies of technetium-99m labeled RGD-HYNIC peptide, a comparison of tricine and EDDA as co-ligands. *Nucl Med Biol* 2003;30:141-9.
 38. Russell J, O'Donoghue JA, Finn R, Kozirowski J, Ruan S, Humm JL, et al. Iodination of annexin V for imaging apoptosis. *J Nucl Med* 2002;43:671-7.
 39. Bolton AM, Hunter RM. The labeling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to I-125 containing acylating agent. *Biochem J* 1973;133:529-39.
 40. Zalutsky MR, Narula AS. A method for the radiohalogenation of proteins resulting in decreased thyroid uptake of radioiodine. *Appl Radiat Isot* 1987;38:1051-5.