

## 농양이식백서에서 $^{99m}\text{Tc}$ , $^{188}\text{Re}$ 직접표지항체의 비교

원자력병원 싸이클로트론 응용연구소실

최태현 · 임상무 · 최창운 · 우광선 · 정위섭 · 임수정

### Comparison of Direct-labeling Method of Antibody with $^{99m}\text{Tc}$ and $^{188}\text{Re}$

Tae Hyun Choi, M.S., Sang Moo Lim, M.D., Chang Woon Choi, M.D.,  
Kwang Sun Woo, M.T., Wee Sup Chung, M.T. and Soo Jeong Lim, M.T.

Laboratory of Cyclotron Application, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

#### Abstract

**Purpose:** We investigated the direct labeling method of antibody with  $^{99m}\text{Tc}$  and  $^{188}\text{Re}$  and examined the stability and function of these labeled compounds in in vitro and in vivo. **Materials and Methods:** Disulfide bond of nonspecific human IgG was reduced to -SH group by 2-mercaptoethanol. Stannous ion was used to reduce  $^{99m}\text{Tc}$  and  $^{188}\text{Re}$ . The stability of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG and  $^{188}\text{Re}$ -IgG was estimated upto 24 hrs. Biodistribution was evaluated in abscess bearing rats at 4 and 24 hr post-injection of  $^{99m}\text{Tc}$  or  $^{188}\text{Re}$  labeled IgG. **Results:** The number of -SH group per reduced IgG molecule was 2.34. The labeling yield of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG and  $^{188}\text{Re}$ -IgG were 90% and 95%, respectively. The stability of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG at 1, 4, 6 and 24 hr was 91%, 83%, 78%, 7% and that of  $^{188}\text{Re}$ -IgG at 1, 4, 16 and 24 hr was 94%, 80%, 47%, 42%, respectively. At 4 hr post-injection of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG, high uptake was found on kidney, blood, stomach and abscess ( $9.42 \pm 0.68$ ,  $1.43 \pm 0.24$ ,  $0.86 \pm 0.18$ ,  $0.72 \pm 0.10$  %ID/g, respectively). The uptakes at 24 hr were kidney, abscess, stomach, and blood in descending order. In case of  $^{188}\text{Re}$ -IgG, high uptake at 4 hr post injection appeared on kidney, blood, abscess and stomach ( $3.92 \pm 0.62$ ,  $1.32 \pm 0.08$ ,  $0.88 \pm 0.01$ ,  $0.26 \pm 0.06$ , respectively). The uptakes at 24 hr were kidney, abscess, blood and stomach in descending order. The abscess to blood uptake ratio of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG was 0.5 at 4 hr and 2.02 at 24 hr and that of  $^{188}\text{Re}$ -IgG was 0.67 and 1.29. **Conclusion:**  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG and  $^{188}\text{Re}$ -IgG can be labeled efficiently with direct labeling method. However,  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG and  $^{188}\text{Re}$ -IgG, labeled with direct method, was unstable. Further study is needed to enhance the stability of the antibody labeling. (Korean J Nucl Med 1999;33:84-93)

**Key Words:** IgG, Tc-99m, Re-188, biodistribution

Received Sep. 10th, 1998; Revision accepted Jan. 27, 1999  
Corresponding Author: Sang Moo Lim, Lab. of cyclotron application, Korea Cancer Center Hospital, 215-4 Gong-neung-dong, Nowon-Ku, Seoul 139-706, Korea  
Tel: (02) 970-1341, Fax: (02) 970-1341  
E-mail: cylab2@kcchsun.kcch.re.kr

※ 이 연구는 1998년도 과학기술부 원자력 개발사업 "방사선 이용진료기술개발; 동위원소 치료연구(E-6-1)" 연구비의 지원으로 이루어졌음.

#### 서 론

핵의학 분야에서 방사성 동위원소 표지화합물을 진단과 치료에 이용하고 있다. 진단에 이용되는 방사성 핵종은  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{210}\text{Tl}$ ,  $^{123}\text{I}$  등이며, 이들은 모두  $\gamma$  에너지 방출체들로서 전신 또는 특정 장기를 영상화하여 진단한다. 치료에 이용되는 방사성 핵종은

$^{131}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{188}\text{Re}$  등이며, 이들은 주로  $\beta$  선 방출체들로서 병소 위치에 집중적으로 입자방사선을 방출케하여 치료에 이용된다.<sup>1,2)</sup>

이들 방사성 표지화합물들이 가져야 할 중요한 조건은 선택적으로 표적장기의 병소 부위에 집적되어 집적장소 이외의 정상 조직에는 가능한 한 피폭 방사선량을 최소화시켜야 한다는 것이다.<sup>3)</sup> 병소 부위에 방사성 동위원소를 선택적으로 이동시키기 위한 대표적인 생물활성 물질로 단일클론 항체에 대한 표지화합물들이 널리 이용되고 있다.<sup>4,5)</sup> 방사면역진단용으로 사용되는  $^{99m}\text{Tc}$ 은 짧은 물리적 반감기(6시간)와 적합한  $\gamma$ 선 에너지(140 KeV)를 가진다는 장점이 있어 환자에 대한 방사선 피폭을 줄일 수 있다.

$^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  핵종발생기와 같이  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  핵종발생기 형태로 이용하기가 편리한  $^{188}\text{Re}$ 은 물리적 반감기가 17시간으로 2,110 KeV의  $\beta$  선과 155 KeV의  $\gamma$  선을 방출하기 때문에 치료 및 진단에 적합하다.  $^{188}\text{Re}$ 은  $^{90}\text{Y}$ 와 달리 골침착을 하지 않으면서,  $^{90}\text{Y}$ 와 같이 큰  $\beta$  에너지를 가지고, 155 KeV의  $\gamma$  선을 동시에 방출함으로 병소 위치에 대한 집적 정도를 볼 수 있어 치료 목적에 가장 적합한 특성을 갖는다. Rhenium과 technetium은 주기율 표상에서 group VIIa에 속하며, 유사한 화학적 특성을 가진다.<sup>2)</sup>

본 연구에서는 유사한 화학적 성질을 가진  $^{99m}\text{Tc}$ 과  $^{188}\text{Re}$ 을 human IgG에 표지하기 위하여 먼저 IgG를 2-mercaptoethanol을 사용하여 -SH기를 환원시키고, Ellman's reaction을 통하여 환원된 -SH기의 개수를 결정하였다. 그리고 환원된 IgG에  $^{99m}\text{Tc}$ 과  $^{188}\text{Re}$ 을 표지하기 위하여 환원제인 stannous tartrate를 가하여 표지화합물을 제조하였다. 또한 제조된  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG와  $^{188}\text{Re}$ -IgG의 안정성을 in vitro 상에서 실험하였으며, Staphylococcus aureus로 농양을 유발한 백서에서 생체분포 실험을 통해 체내 분포 특성을 연구하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 재 료

Human polyclonal IgG, sodium acetate, stannous

tartrate, 2-mercaptoethanol 등은 Sigma사의 제품을 사용하였고, Gelman Sciences사의 ITLC-SG plate와 Whatman No. 1 paper chromatography용 paper를 사용하였다. 방사성 핵종을 얻기 위해서 Amersham사의  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  발생기와,  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  Generator (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA)를 사용하였다.

환원처리한 IgG의 분리를 위해 Pharmacia사의 PD-10 column을 사용하였고, UV 검출기 및 Steffi사의 Raytest 방사능 검출기가 장착된 Waters사의 HPLC에 Supelco사의 TSK gel column G4000 SW (30 cm×7.5 mm)를 장착하여 사용하였다. 방사능 측정을 위해 Wallac사의 gamma counter를 사용하였다. 농양 유발을 위해 S. aureus (ATCC 25923) 균주를 사용하였고, 원자력병원 동물실험실의 Sprague Dowley rat을 실험동물로 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 환원된 IgG의 제조 실험

$\text{N}_2$  purged D.W.를 사용하여 10 mM phosphate buffered saline (PBS pH 7.4)를 만들고, human IgG를 10 mg/ml의 농도가 되게 10 mM PBS에 녹여 4℃에 보관하여 24시간 경과 후에 사용하였다. IgG의 S-S 결합을 -SH기로 환원시키기 위해 환원제인 2-mercaptoethanol (2-ME)에 대한 IgG의 몰비가 2000:1, 1000:1, 100:1이 되도록 하여 4℃에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 용액을 PD-10 column을 1분획당 25방울이 되도록, 0.7 ml/min의 속도로 50 mM Acetate Buffered Saline (ABS, pH 5.3)을 사용하여 용출시켰다. 각 분획별로 UV 분광기를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하고, 흡광도가 제일 큰 분획을 선택하여 100  $\mu\text{l}$ 씩 소분하여 실험에 사용하였다.

### 2) 환원된 IgG의 농도 측정

IgG의 농도가 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml가 각각 되게 10 mM PBS로 녹여 280 nm에서의 이들 용액들의 흡광도를 UV분광기에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 환원된 IgG를 10배 희석한 후, 280 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에 적용함으로써

서 환원된 IgG의 농도를 결정하였다.

### 3) 환원된 IgG에서 -SH기 개수 결정 실험

환원된 IgG에서 IgG 한 분자당 -SH기의 개수를 결정하기 위하여 Ellman's reaction을 적용하였다.<sup>7)</sup> 표준물질로 L-cysteine을 0.0125-0.1 mM의 농도가 되게 만들고 이들 용액에서 각각 50  $\mu$ l씩 분취한 다음 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)(DTNB, 2 mg/ml) 50  $\mu$ l와 섞고 다시 0.1 M phosphate buffer 200  $\mu$ l를 가하고 실온에서 15분간 반응하였다. 반응이 끝난 각각의 용액을 UV 분광기로 412 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 작성하였다. 앞의 반응에서 L-cysteine 대신 환원된 IgG를 가하여 DTNB와 반응하게 한 용액의 412 nm에서의 UV흡광도를 측정하여 표준 곡선에 적용함으로써 -SH기의 숫자를 결정하였다.

### 4) 표지화합물의 제조 실험

방사표지에 사용할 <sup>99m</sup>Tc은 <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc 발생기를 0.9% sodium chloride 용액으로 용출시켜서 pertechnetate (Na<sup>+</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>)를 얻었고, <sup>188</sup>Re은 <sup>188</sup>W/<sup>188</sup>Re 발생기에서 perrhenate (Na<sup>+</sup>ReO<sub>4</sub><sup>-</sup>)를 얻어 준비하였다. Stannous tartrate 50 mg를 4 ml의 ABS (pH 5.3)에 녹인 후, 진한 염산(10N)을 사용하여 pH 3-4가 되게 하고 전체 부피가 5 ml되게 하였다. 이 용액을 다시 0.22  $\mu$ m filter로 여과하여 반응에 사용하였다. <sup>99m</sup>Tc 표지시에는 환원된 IgG 100  $\mu$ l에 stannous tartrate 용액 (10 mg/ml) 5  $\mu$ l를 넣고, pertechnetate 300  $\mu$ l ( $<1.85 \times 10^8$  Bq)를 넣은 다음, 4°C에서 10분간 반응시켰다. <sup>188</sup>Re 표지시에는 환원된 IgG 100  $\mu$ l에 stannous tartrate 용액 (10 mg/ml) 100  $\mu$ l을 넣고, perrhenate 300  $\mu$ l ( $<1.85 \times 10^8$  Bq)를 넣은 다음 4°C에서 30분간 반응시켰다. 반응시간 경과 후에 포화 NaHCO<sub>3</sub> 수용액 10  $\mu$ l를 가해 pH를 8-9로 올리고, 5분 동안 실온에서 방치한 다음, 표지반응용액을 PD-10 column에 넣고 0.1% bovine serum albumin (BSA) 함유 10 mM PBS (pH 7.4)로 용출시켜 동위원소 표지된 IgG을 얻었다.

이때 표지반응 수율을 결정하기 위하여, Gelman Science사의 instant thin layer chromatogram-silica

gel (ITLC-SG)에 표지반응시료를 점적하고 acetone으로 전개하는 방사크로마토그래피를 실시하였다. 방사표지반응물의 반응액에서 미반응의 pertechnetate, 또는 perrhenate의 양을 radioscanner를 사용하여 백분율로 결정하였다. 또한 표지반응 생성물에서 콜로이드의 양을 확인하기 위하여 2.5% BSA를 미리 떨어뜨린 paper를 생리식염수로 전개시켜 콜로이드의 백분율 양을 결정하고, 앞에서 결정된 pertechnetate, 또는 perrhenate의 양과 합하여 방사표지화합물의 표지반응수율을 결정하였다.

### 5) 표지화합물의 체외 안정성 실험

방사표지된 IgG 용액 1 ml에 사람 혈청 4 ml를 섞은 다음, 37°C 항온수조에 항온유지하면서 <sup>99m</sup>Tc 표지된 화합물은 1시간, 4시간, 6시간, 24시간 간격으로, <sup>188</sup>Re 표지된 화합물은 1시간, 4시간, 16시간, 24시간 간격으로 시료를 취하여 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 실시하였다. 이때 size exclusion TSK-GEL 4000 column을 사용하였으며, 10 mM PBS (pH 7.4)를 용출액으로 사용하여 용출 속도 0.7 ml/min으로 용출시켰다. 방사능검출기는 Raytest를 사용하였으며, UV검출기를 사용하였다. 이들 두 검출기를 동시에 적용하여 chromatogram을 얻어 방사 화학적 순도를 결정하였으며, UV분광기에서 적용된 파장은 280 nm이었다. 이와 같이 얻은 방사 화학적 순도를 비교하여 방사 표지화합물의 체외 안정도를 확인하였다.

### 6) 표지화합물의 농양이식 백서에서의 생체분포 실험

포도상구균을 약  $2 \times 10^{10}$  개/200  $\mu$ l 생리식염수액이 되게 만들고, 이 용액을 Sprague Dowley Rat 왼쪽 대퇴부 근육에 주사한 다음 24시간 경과한 뒤 농양발생을 확인하여 실험에 사용하였다. 농양 발생이 확인된 실험동물에 <sup>99m</sup>Tc-IgG 이나 <sup>188</sup>Re-IgG액  $7.4 \times 10^6$  Bq/200  $\mu$ l씩을 꼬리정맥에 주사하였다. 주사 후 4시간과 24시간 후에 농양이식백서(n=4)를 도살하여 각 장기들을 적출하여 장기들의 무게를 재고, 이들의 방사능을 gamma counter로 측정하여 percentage of injected dose per gram of tissue (%)

ID/g)를 환산하였다. Perrhenate와 <sup>188</sup>Re-IgG을 농양이 이식되지 않은 정상백서(n=3)에 3.7×10<sup>6</sup> Bq/100 μl씩 주사 후 24시간에서의 생체분포실험을 수행하여 방사성 동위원소와 방사표지화합물 자체만의 거동을 비교하였다.

## 결 과

### 1. 환원된 IgG의 제조

IgG의 -SH기를 유발하기 위하여 환원제로 2-mercaptoethanol을 사용하였다. 2-mercaptoethanol 대 IgG의 몰 비를 2000:1, 1000:1, 100:1로 각각 처리하였다. 환원 처리한 IgG 용액을 PD-10 column으로 2-mercaptoethanol을 제거하고 흡광도가 제일 높은 분획을 UV분광기를 이용하여 환원된 IgG의 농도를 측정할 실험에서는 2000:1, 1000:1, 100:1의 몰비별 처리에서 각각 6.7, 6.63, 6.8 mg/ml의 농도를 나타내었다. 또한 환원된 IgG에서 -SH의 개수를 측정한 결과 2-mercaptoethanol 몰 비별 환원 처리한 IgG 한 분자당 -SH기의 개수는 2000:1, 1000:1, 100:1 처리별로 2.75, 2.34, 0.245개가 생성된 것으로 나타났다(Table 1).

**Table 1.** Effect of Reduction Conditions on the Number of thiol Groups per Antibody Molecule

ME:Ab*	Protein (mg/ml)	Thiol group/Ab
2000:1	6.7	2.75
1000:1	6.63	2.34
100:1	6.8	0.245

\*, Molar ratio of mercaptoethanol to antibody.

### 2. 방사표지항체의 제조 실험

반응혼합물을 반응시간별로, ITLC와 paper chromatography를 실시하여 <sup>99m</sup>Tc-IgG이나 <sup>188</sup>Re-IgG의 표지반응수율을 확인한 뒤 반응 조건을 결정하였다. 그 결과 <sup>99m</sup>Tc-IgG의 경우 반응시간 10분에 최적의 표지수율(>90%)과 5% 미만의 콜로이드 발생을 확인하였다(Fig. 1A, B). <sup>188</sup>Re-IgG의 경우는 반응시

간 30분이 경과하여야 최고의 수율(>95%)을 나타냈으며, 콜로이드 형성은 관찰되지 않았다(Fig. 2C, D). 반응시간 2시간에서는 perrhenate가 14%, 콜로이드가 24%로 관찰되어 표지반응수율이 62% 정도임을 확인하였다(Fig. 3E, F).

### 3. 방사표지항체의 체외 안정성 실험

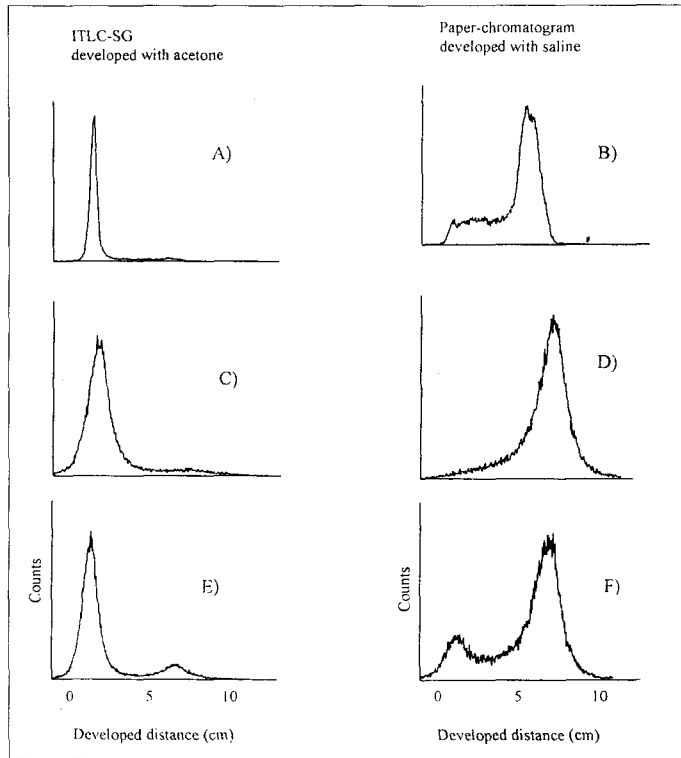
<sup>99m</sup>Tc-IgG이나 <sup>188</sup>Re-IgG의 체외 안정성을 확인하기 위하여 HPLC를 사용하여 방사 화학적 순도를 결정하였다. 그 결과, <sup>99m</sup>Tc-IgG 용액을 37℃ 항온 수조에서 방치하고, 1시간, 4시간, 6시간, 24시간마다 측정된 <sup>99m</sup>Tc-IgG의 peak area가 각각 91, 83, 78, 7%이었고, <sup>188</sup>Re-IgG 용액은 1시간, 4시간, 16시간, 24시간에서 각각 94, 80, 47, 42%를 나타냈다.

### 4. 방사표지항체의 농양이식백서에서의 생체 분포실험

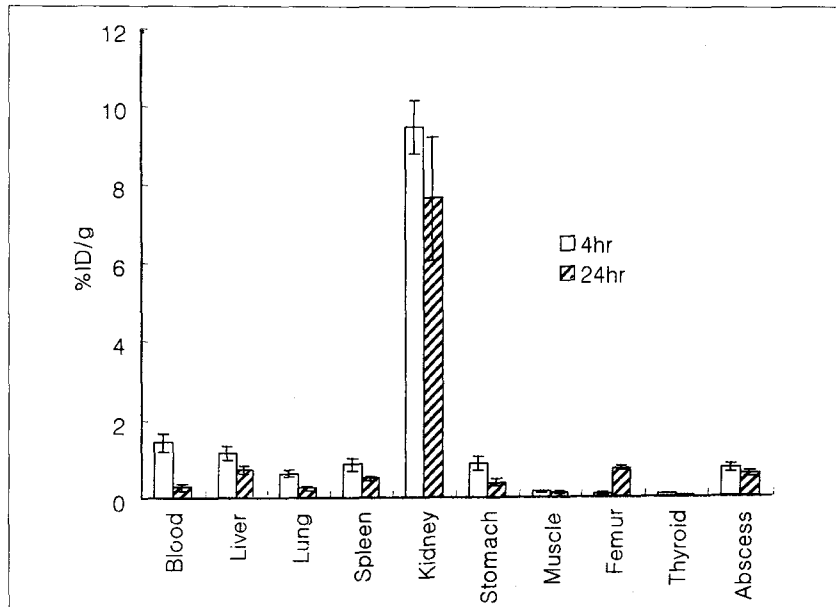
포도상구균을 이식한 백서에 <sup>99m</sup>Tc-IgG이나 <sup>188</sup>Re-IgG를 주사하고 각 장기를 적출하여 방사능을 계측하였다. 그 계측 값을 % ID/g값으로 환산하여 나타내었다(Fig. 2, 3). 24시간이 지난 후, 장기 중에서는 신장에서 가장 높은 섭취를 나타냈고, 다음으로 농양에서 높게 나타났다. 또한 control로 포도상구균을 이식하지 않은 정상백서에 perrhenate와 <sup>188</sup>Re-IgG을 주사하고 24시간 경과 후 장기별 분포를 나타내었다(Table 2). perrhenate에서 24시간 경과 후, 위에서 제일 높은 섭취를 나타내어, 방사성 동위원소 자체로는 별다른 표적장기 없이 소화기관을 통해서 배출되어지고 있는 것을 확인하였다.

## 고 찰

항체의 방사성 동위원소 표지과정에서 항체에 손상을 적게 주는 것이 중요하다.<sup>19,20</sup> <sup>99m</sup>Tc이나 <sup>188</sup>Re 등과 같은 방사성 동위원소를 표지하는 표지 방법으로는 직접표지, bifunctional chelate의 사용, prelabelled ligand법 등이 있다.<sup>8,9,17,18</sup> 직접표지는 그 과정이 간단하나 면역활성과 안정성에서 불규칙성의 단점을 가지고, bifunctional group을 단백질과 반응시켜 방사성 동위원소로 표지 하는 방법은 실험과정



**Fig. 1.** Radiochromatogram of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG and  $^{188}\text{Re}$ -IgG. The radioactivity peak of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG in (A), (B) represents 10 min incubation. Peak of  $^{188}\text{Re}$ -IgG in (C), (D) was 30 min incubation, (E), (F) was 120 min incubation.



**Fig. 2.** Biodistribution of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG in abscess bearing rats.

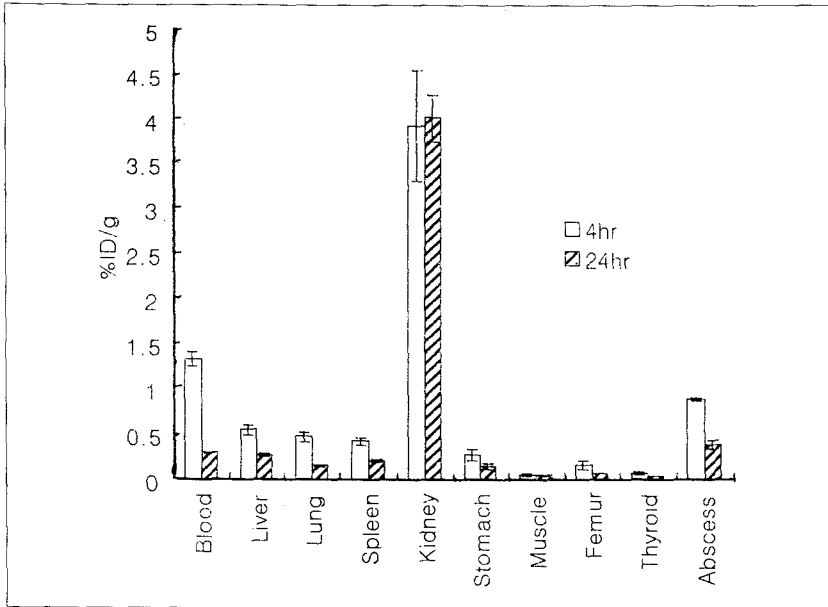


Fig. 3. Biodistribution of  $^{188}\text{Re}$ -IgG in abscess bearing rats.

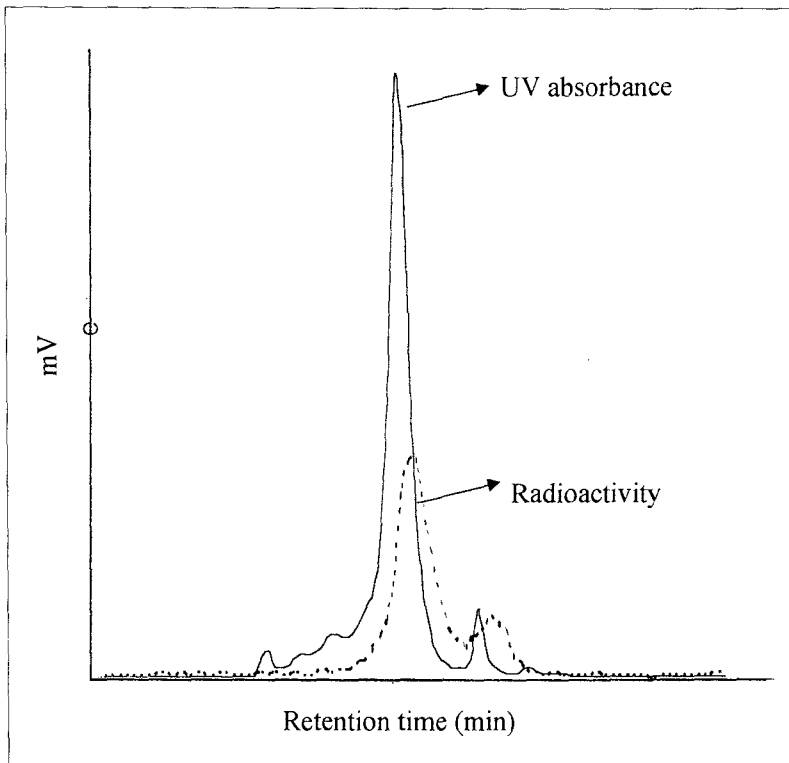


Fig. 4. Typical HPLC chromatogram of  $^{188}\text{Re}$ -IgG (TSK-GEL 4000 SW column eluted with 10 mM phosphate buffered saline pH 7.4, flow rate 0.7 ml/min).

**Table 2.** Biodistribution of Perrhenate and <sup>188</sup>Re-IgG in Normal Rat 24hrs after Injection

Organ	Perrhenate	<sup>188</sup> Re-IgG
Blood	0.017±0.004	0.317±0.012
Liver	0.037±0.001	0.294±0.031
Lung	0.022±0.007	0.164±0.016
Spleen	0.013±0.004	0.188±0.024
Kidney	0.025±0.007	3.998±0.198
Stomach	0.215±0.109	0.149±0.055
Muscle	0.007±0.002	0.032±0.009
Femur	0.014±0.004	0.057±0.008
Thyroid	0.002±0.006	0.025±0.014

\*, Three animals were used at each time point

에 항체의 활성손상이 되는 단점이 있다.<sup>22)</sup> 방사성 동위원소를 ligand에 표지를 한 후 이 ligand를 IgG와 반응시켜 표지화합물을 만드는 prelabelled ligand법은 활성손상이 적으며 높은 비방사능의 표지화합물을 얻을 수 있다는 장점이 있으나, 실험과정에서 많은 단계를 거쳐야 하는 번거로움이 있다.<sup>1,10)</sup> 그러나 이 방법들은 단백질의 방사성 표지화합물을 제조하는 데 널리 이용되고 있다. 이러한 방법중에서 직접표지법은 빠른 표지시간과 편리성때문에 면역활성 손상의 단점에도 불구하고 임상적으로 널리 사용되고 있다. 환원제를 사용하여 -SH가 유도된 IgG의 면역활성을 최대한 유지하기 위해서는 IgG 한 분자당 가질 수 있는 -SH기 32개 중에서 개수가 2개 정도이어야 한다는 보고가 있어,<sup>6)</sup> 환원제의 양을 조절함으로써 IgG 한 분자당 약 2개의 -SH가 유도된 IgG를 얻어 <sup>99m</sup>Tc과 <sup>188</sup>Re과 표지반응에 사용하였다.

Technetium과 rhenium은 amine, amide, thiol, phosphine, oxime, isonitrile 등의 기능기를 갖는 화합물과 작물을 잘 형성하는 특성을 갖는다.<sup>2,11)</sup> 두 동위원소의 산화상태는 0~+7까지 가능하나 수용액에서 가장 안정한 형태는 Tc(Re)O4-(+7)과 불용성의 Tc(Re)O2(+4)이다. 표지화합물을 형성하기 위해서는, 산화상태를 낮추어야 한다. 산화상태를 낮추는 방법으로 화학적 환원제를 사용한다. Tc(Re)O4-를 환원하기 위하여 여러 가지 환원제들 즉, sodium

borohydride, sodium dithionite, sodium bisulphite, formamidinesulphinic acid, hydrazine, hydrochloric acid, tin foil, zinc metal, ferric ion, ascorbic acid, antimony (III), molybdenum (III), tungsten (III) salts 등이 이용된다.<sup>12)</sup>

항체(IgG)에 표지하기 위해서는 +3~+5의 산화상태가 되게 환원이 필요하며 이 때 환원제로서 stannous ion이 주로 이용된다. Stannous ion은 우수한 수용성과 안정성을 가지며 인체투여시 낮은 독성을 나타내는 장점이 있다.<sup>4,12)</sup> IgG에 존재하는 -S-S-결합을 -SH로 환원하기 위하여 2-mercaptoethanol이 사용된다. 이렇게 만들어진 -SH기는 technetium이나 rhenium이 결합할 수 있는 결합 부위로 알려져 있다.<sup>6,7)</sup> Technetium은 hydroxycarboxylic acids상에서 산화상태를 보면, pH6 이하에서 Tc (III)와 Tc (V), pH 6~10에서 Tc (IV)와 Tc (V), pH10 이상에서 Tc (III), Tc (IV), Tc (V)이며, Sn (II)에 의한 환원은 pH3~9에서 Tc (V)를 만든다. 결국 안정한 산화상태는 pH의 적용에 의한 것으로 알려져 있다.<sup>12)</sup> 단백질표지법에서 pH는 pH 범위가 3~5 정도가 가장 효과적인 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 일반적으로 stannous ion을 환원제로 사용할 경우 pH 1~2의 조건에서는 콜로이드의 형성이 작아 안정된 표지수율을 보이지만, IgG의 활성손상이 예상된다. 따라서 본 실험에서는 pH 3~4의 액성에서 IgG의 <sup>99m</sup>Tc이나 <sup>188</sup>Re 표지반응을 수행하여 각각 90%, 95%의 높은 표지수율을 얻을 수 있었다. <sup>188</sup>Re은 <sup>99m</sup>Tc에 비해 반응성이 낮은 원소이기 때문에 stannous ion의 양이 <sup>99m</sup>Tc에 비해 20배 이상이 사용되었으며, <sup>99m</sup>Tc에서 콜로이드가 발생한 것은 반응성이 강한 특징 외에도 pH와 stannous ion의 양이 <sup>188</sup>Re과는 다른 반응조건 때문인 것으로 보였다.

사람 혈청을 IgG-<sup>99m</sup>Tc과 IgG-<sup>188</sup>Re 용액에 첨가함으로써 체내에서의 안정도를 예상해 보았다. <sup>99m</sup>Tc-IgG의 경우 반감기인 6시간에서의 안정도는 78%였으며 24시간 경과 후에는 7%로 급격한 안정도의 감소가 관찰되었으며 <sup>188</sup>Re-IgG의 경우, 반감기에 가까운 16시간에서 47%이었고 24시간 경과 후에는 42%였다. 이것은 <sup>188</sup>Re의 낮은 반응성에 의해 초기에는 불안정한 표지를 보였으나 경과시간이

진행될수록 물리적 반감기가 긴 특성때문에 <sup>99m</sup>Tc과 비교하여 안정성이 높게 나타난 것으로 보인다.<sup>21,23)</sup>

포도상구균으로 농양을 유발시킨 뒤 주입 후 4시간 경과한 장기 분포에서는 신장, 혈액, 농양 순으로 높았으며 24시간 경과에서는 신장 다음으로 농양에서 높은 섭취를 나타냈다. <sup>99m</sup>Tc-IgG와 <sup>188</sup>Re-IgG의 농양 대 혈액의 방사능비는 4시간에서는 0.5, 0.66 이고, 24시간에서 2.02, 1.29로 나타났다(Table 3). 사람의 비특이 IgG과 albumin을 <sup>99m</sup>Tc와 같은 방사성 동위원소로 표지하여 농양 부위에 대한 집적을 보았을 때, IgG의 표지화합물이 알부민의 표지화합물보다 높은 집적률을 보이는 것은 IgG의 경우 혈류의 증가나 모세혈관의 투과성 증가 외에, IgG가 병원균과 염증세포의 Fc 수용체에 결합하는 기전에 의한 것으로 보는 견해도 있다.<sup>13)</sup> 본 연구에 사용된 농양유발백서 모델은 포도상구균의 표면에 protein A가 있고 농양 백혈구 표면에 IgG의 Fc receptor가 있어 방사성 표지항체의 체내동태 및 대사연구에 쉽게 이용할 수 있는 모델로 추후 다른 핵종의 항체표지연구에도 이용이 가능할 것으로 기대되었다.<sup>14,15,24)</sup> 또한 perrhenate에 비해 <sup>188</sup>Re-IgG의 신장 집적율이 높게 나타나는 것은 IgG의 생물학적 반감기가 20~22시간으로 <sup>188</sup>Re과 표지 되었다 하더라도 22시간까지는 약 절반밖에 체외로 배설되지 않아 상당량이 체내에 잔류하게 되어 나타나는 현상일 것이다. 백서의 면역체계는 사람 IgG를 외부 항원으로 인식하여 효소와 면역세포 등에 의해 분해되고, 방사성 동위원소가 표지된 IgG의 대사산물이나, IgG에 표지되지 않은 chelate는 요로 느리게 배설되는 현상 등이 신장 방사능이 높게 집적되는 원인으로 보인다.

신장의 섭취가 4시간, 24시간에서 높게 나타나는 것이 방사면역진단에 <sup>99m</sup>Tc-IgG에서는 큰 문제가 되지 않는다고 한다. 하지만 방사면역치료를 위한 <sup>188</sup>Re-IgG의 경우는 높은 에너지의β 선을 방출을 하여 신장조직에 손상을 줄 것이다.

## 요 약

**목적:** 주기율표상에서 7족에 위치하며, 유사한 화학적 특성을 지닌 <sup>99m</sup>Tc와 <sup>188</sup>Re의 항체에 표지하는 조건의 차이점과 앞서 표지된 항체의 핵종에 따른 거동의 차이를 비교 실험해 보고자 하였다. **대상 및 방법:** mercaptoethanol을 사용하여 non-specific human IgG의 disulfide 결합을 환원시켜, -SH 기의 발생을 유도하였다. 앞서 처리된 IgG을 stannous ion을 사용하여 <sup>99m</sup>Tc과 <sup>188</sup>Re을 환원하여 <sup>99m</sup>Tc-IgG과 <sup>188</sup>Re-IgG를 제작하였다. HPLC를 사용하여 <sup>99m</sup>Tc-IgG은 1시간, 4시간, 6시간, 24시간마다 <sup>188</sup>Re-IgG은 1시간, 4시간, 16시간, 24시간마다 시간경과에 따른 안정도 변화를 확인하였다. **결과:** 한 분자당 약 2개의 -SH기를 유도 면역 활성이 최대한 유지되는 환원된 IgG를 얻을 수 있었다. 각각 90%와 95% 이상의 높은 표지반응수율로 <sup>99m</sup>Tc-IgG과 <sup>188</sup>Re-IgG을 얻었다. <sup>99m</sup>Tc-IgG의 %peak area를 1시간, 4시간, 6시간, 24시간마다 측정된 값은 각각 91%, 83%, 78%, 7%이었다. <sup>188</sup>Re-IgG의 경우 1시간, 4시간, 16시간, 24시간에서 94%, 80%, 47%, 42%이었다. <sup>99m</sup>Tc-IgG을 정맥주사 후 4시간 후의 %ID/g는 장기 별로 신장, 혈액, 위, 농양(9.42±0.68, 1.43±0.24, 0.86±0.18, 0.72±0.1)순이었고, 24시간에서는 신

Table 3. Tissue/Blood Ratios of <sup>99m</sup>Tc-IgG and <sup>188</sup>Re-IgG in Abscess Bearing Rats (mean±SD)

Tissue	<sup>99m</sup> Tc-IgG		<sup>188</sup> Re-IgG	
	4hr	24hr	4hr	24hr
Blood	1.00	1.00	1.00	1.00
Kidney	6.59±0.73	2.71±1.58	2.96±0.62	13.75±0.26
Muscle	0.09±0.24	0.34±0.09	0.035±0.08	0.154±0.0001
Abscess	0.5±0.26	2.02±0.11	0.66±0.08	0.288±0.04

\*, Three animals were used at each time point.



장, 농양, 위, 혈액( $7.61 \pm 1.58$ ,  $0.57 \pm 0.07$ ,  $0.37 \pm 0.09$ ,  $0.281 \pm 0.09$ )의 순이었다.  $^{188}\text{Re}$ -IgG의 경우 4시간에서 신장, 혈액, 농양, 위( $3.92 \pm 0.62$ ,  $1.32 \pm 0.08$ ,  $0.88 \pm 0.01$ ,  $0.26 \pm 0.06$ )의 순이었고, 24시간에서 신장, 농양, 혈액, 위( $4 \pm 0.26$ ,  $0.37 \pm 0.04$ ,  $0.29 \pm 0.01$ ,  $0.13 \pm 0.03$ )의 순이었다. 결론:  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG과  $^{188}\text{Re}$ -IgG의 표지항체는 직접표지법을 사용하여 효과적으로 제조되었다. 그러나, 직접표지법을 사용한  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG과  $^{188}\text{Re}$ -IgG의 안정도는 시간경과에 따라 불안정함을 보여 안정성을 증가시키기 위한 항체표지 방법들에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

### 참 고 문 헌

- 1) Goldrosen MH, Biddle WC, Pancook J, Bakshi S, Vanderheyden JL, Fritzbeg AR, et al. Biodistribution, pharmacokinetic, and imaging studies with  $^{186}\text{Re}$ -labeled NR-LU-10 whole antibody in LS174T colonic tumor-bearing mice. *Cancer Res* 1990;50:7973-78.
- 2) Yoshihara K, Omori T. *Technetium and Rhenium*. Berlin: Springer-Verlag; 1996. p. 275-291.
- 3) Leichner PK, Akabani G, Colcher D, Harrison KA, Hawkins WG, Eckblade M. et al. Patient-specific dosimetry of indium-111-and yttrium-90-labeled monoclonal antibody CC49. *J Nucl Med* 1997;38:512-16.
- 4) Pettit WA, Deland FH, Bennett SJ, Goldenberg DM. Improved protein labeling by stannous tartrate reduction of pertechnetate. *J Nucl Med* 1980;21:59-62.
- 5) Kanellos J, Pietersz GA, McKenzie IF, Bonnyman J, Baldas J. Coupling of the  $^{99m}\text{Tc}$ -nitrido group to monoclonal antibody and use of the complexes for the detection of tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 1986;77:431-39.
- 6) Griffiths GL, Goldenberg DM, Diril H, Hansen HJ. Technetium-99m, Rhenium-186, and Rhenium-188 direct-labeled antibodies. *Cancer* 1994;73:761-68.
- 7) Mater SJ, Ellison D. Reduction-mediated Technetium-99m labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1990;31:692-97.
- 8) Lim SM, Woo KS, Chung WS, Awh OD. Polymer formation and altered biodistribution of IgG labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  and cyclic DTPA. *Korean J Nucl Med* 1993;27:270-76.
- 9) Lim SM, Woo KS, Chung WS, Yang SH, Awh OD. Labeling IgG with  $^{99m}\text{Tc}$  using 2-iminothiolane. *Korean J Nucl Med* 1994;28:106-11.
- 10) Jeong JM, Kinuya S, Paik CH, Saga T, Sood VK, Carrasquillo JA, et al. Application of high affinity binding concept to radiolabel avidin with Tc-99m labeled biotin and the effect of pI on biodistribution. *Nucl Med Biol* 1994;21:935-40.
- 11) Sampson CB. *Text book of Radiopharmacy Theory and Practice*. Gordon and Breach Science Publishers; 1994. p. 29-49.
- 12) Russell CD, Speisor AG. Complexes of technetium with hydroxycarboxylic acids: gluconic, glucoheptonic, tartaric, and citric. *J Nucl Med* 1980;21:1086-90.
- 13) Lim SM, Woo KS, Chung WS, Awh OD, Seo YS, Lee JD. Distribution of  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ -Human polyclonal nonspecific IgG and  $^{67}\text{Ga}$ -Citrate in abscess bearing mice. *Korean J Nucl Med* 1992;26:116-23.
- 14) Babich JW, Tompkins RG, Graham W, Barrow SA, Fischman AJ. Localization of radiolabeled chemotactic peptide at focal sites of Escherichia coli infection in rabbits: evidence for a receptor-specific mechanism. *J Nucl Med* 1997;38:1316-22.
- 15) Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJ, Ven MT, Edwards DS, Barrett JA, et al. Technetium-99m-labeled chemotactic peptides in acute infection and sterile inflammation. *J Nucl Med* 1997;38:1310-15.
- 16) Pettit WA, Deland FH, Bennett SJ, Goldenberg DM. Radiolabeling of affinity-purified goat anti-carcinoembryonic antigen immunoglobulin G with Technetium-99m. *Cancer Res* 1990;40:3043-45.
- 17) Abrams MJ, Juweid M, Kate CI, Schwartz DA, Hauser MM, Gaul FE, et al. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med* 1990;31:2022-28.
- 18) Alauddin MM, Khawli KA, Epstein AL. An improved method of direct labeling monoclonal antibodies with  $^{99m}\text{Tc}$ . *Nucl Med Biol* 1992;19:445-54.
- 19) Yoo TM, Chang HK, Choi CW, Webber KO, Le N, Kim IS, et al. Technetium-99m labeling and

- biodistribution of anti-TAC disulfide-stabilized Fv fragment. *J Nucl Med* 1997;38:294-300.
- 20) Thakur ML, Marcus CS, Henneman P, Butler J, Sinow R, Diggles L, et al. Imaging inflammatory diseases with neutrophil-specific Technetium-99m-labeled monoclonal Antibody Anti-SSEA-1. *J Nucl Med* 1996;37:1789-95.
- 21) Hnatowich DJ, Virzi F, Winnard P, Fogarasi M, Rusclowski M. Investigations of ascorbate for direct labeling of antibodies with Technetium-99m. *J Nucl Med* 1994;35:127-34.
- 22) Joiris E, Bastin B, Thornback JR. A new method for labeling of monoclonal antibodies and their fragments with Technetium-99m. *Nucl Med Biol* 1991;18:353-56.
- 23) Griffiths GL, Goldenberg DM, Knapp FF, Callahan AP, Chang CH, Hansen HJ. Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with generator-produced Rhenium-188 for radioimmunotherapy: Labeling and animal biodistribution Studies. *Cancer Res* 1991;51:4594-602.
- 24) Lim SM, Chun KS, Woo KS, Chung WS, Lee JD. Comparison polyclonal IgG labeled with  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  and  $^{111}\text{In}$  oxine leukocytes in the Staphylococcal abscess bearing rats. *Korean J Nucl Med* 1995;29:92-97.
-