

# 항체의 Cyclic DTPA를 이용한 $^{99m}\text{Tc}$ 표지시 Polymer 형성과 체내 동태 변화

원자력병원 핵의학과

임 상 무 · 우 광 선 · 정 위 섭

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과교실

오 욱 두

= Abstract =

## Polymer Formation and Altered Biodistribution of IgG Labeled with $^{99m}\text{Tc}$ and Cyclic DTPA

Sang-Moo Lim, M.D., Kwang-Sun Woo, M.T. and Wee-Sup Cung, M.T.

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

Ok-Doo Awh, M.D.

Department of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University Kangwon-Do, Korea

Technetium- $^{99m}$  labeling method using bifunctional chelating agent cyclicDTPA has been evaluated with human polyclonal nonspecific IgG. IgG was conjugated with cyclic DTPA with various molar ratio. Reduction of  $^{99m}\text{Tc}$  was done with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  with various molar excess. Labeling efficiency and identification of polymer was confirmed with HPLC using TSK4000 SW column. Polymer was purified with 100 cm Sepharose 6LB column. Cultured  $1 \times 10^9$  Staphylococcus aureus were injected into rat thigh 24 hours later labeled IgG was injected, and in vivo distribution was observed 4 and 24 hours thereafter. Reduction of  $^{99m}\text{Tc}$  was optimal with the 10000~50000 times molar excess of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ . Polymer formation increased with increasing molar excess of cyclic DTPA to IgG. Three step labeling-labeling DTPA conjugated IgG after reduction of  $^{99m}\text{Tc}$ -made more polymer than two two step labeling-simultaneous mixing DTPA conjugated IgG,  $^{99m}\text{Tc}$  and  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ .  $^{99m}\text{Tc}$  blood clearance and lower uptake in the abscess and other organs. IgG conjugated with 200 times molar excess of cyclic DTPA showed slower blood clearance with 200 times molar excess of cyclic DTPA showed slower blood clearance than that of 20 times molar excess of cyclic DTPA showed slower blood clearance than that of 20 times molar excess. In the  $^{99m}\text{Tc}$  labeling of IgG with cyclic DTPA for the immunoscintigraphy, optimal labeling condition should be chosen, and effect of the  $^{99m}\text{Tc}$  labeled IgG polymer should be considered.

**Key Words:** Biodistribution, Cyclic DTPA,  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG Polymer

서 론

면역신티그라피의 초기에는 항체의 표지에 I-131을

이용한 것이 대부분이나, 차츰  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ 등으로 전환되고 있는데, I-131이 베타선을 방출하는 점이 치료용으로는 이용 가능하나, 진단을 위한 경우 환자의 방사능 피폭선량을 증가시키며, 감마선의 에너지도 커서 현대

의 감마카메라 촬영에는 적합치 않기 때문이다. 특히 최근 단일광자방출단층촬영이 보편화되면서 <sup>99m</sup>Tc의 장점이 두드러진다. Cyclotron 생산 I-123이 반감기가 <sup>99m</sup>Tc보다 길고, 항체의 표지반응이 간단하여 면역신티그라피용으로 관심을 끌고 있으나, 시설 및 생산비용 때문에 널리 보급되기 어렵다. <sup>111</sup>In도 반감기 약 3일로 면역신티그라피에 가장 적합하나, cyclotron 생산해중으로 가격이 비싸다. 따라서 현재 핵의학 촬영에 가장 널리 이용되는 <sup>99m</sup>Tc를 이용한 항체의 표지가 면역신티그라피에 널리 이용될 가능성이 크다<sup>1,2)</sup>. <sup>99m</sup>Tc의 항체 표지법으로는 stannous chloride, 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, ascorbic acid 등의 환원제를 이용하는 직접표지법, cyclic DTPA, metallothionein, bithiosemicarbazone, cyclams, diamide dimercaptide 등의 양기능성 착화물을 이용하는 간접표지법, 미리 표지된 착화물을 항체와 결합시키는 방법들이 알려져 있다<sup>3)</sup>. 직접표지법은 간단하나, 비특이적 표지를 피할 수 없고, 생물학적 기능의 손상의 가능성이 알려져 있으며, 안정성도 떨어진다<sup>4-8)</sup>. cyclic DTPA를 이용하는 방법이 간접표지법 중 널리 이용되는데, 표지조건에 따라 생물학적 기능 및 체내 동태가 다름이 알려져 있다<sup>9-13)</sup>. 본 연구에서는 cyclic DTPA와 IgG의 결합시 물비의 변화, <sup>99m</sup>Tc의 환원시 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>의 물비의 변화, 표지방법의 변화에 따른 표지수율, 체내동태 및 농양섭취율의 변화를 농양유발백서모델을 이용하여 관찰하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 사람비특이 IgG나 Cyclic DTPA의 결합

Sigma사의 사람 비특이 IgG 10mg/1ml 0.01M PBS와 cyclic DTPA anhydride(Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 50 μg/70 μl DMSO를 섞어 상온에서 1시간 반응시킨 후, Centricon 30 membrane filter (Amicon Co., Beverly, MA, USA)에 옮겨 2ml의 0.01 M PBS를 첨가하고 5000 g, 30분간 원심분리하여 3회 제거하였다.

DTPA: IgG의 비율을 변화시켰을 때의 표지수율 및 체내동태를 비교하기 위하여 IgG 10mg에 cyclic DTPA를 5 μg, 500 μg 섞어 반응시킨 후 같은 방법으로 정제하였다.

### 2. Khaw등의 방법에 의한 3단계 <sup>99m</sup>Tc 표지<sup>10)</sup>

555 MBq(15mCi) Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>(한국원자력연구소)에 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>를 10,000 내지 100,000배의 물 비로 섞어 상온에서 15분간 반응시켜 <sup>99m</sup>Tc를 환원시킨 후, 각 비율의 DTPA결합 IgG 150 μg/50 μl 0.01 M PBS와 섞어 실온에서 45분간 반응시켰다. 표지된 항체를 분자 크기에 따라 100 cm Sepharose 6 LB column을 통과시켜 fraction collector로 분취하였다.

### 3. 2단계 <sup>99m</sup>Tc 표지

555 MBq(15mCi) Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>에 각 반응 비율의 DTPA결합 IgG를 섞고 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>를 10,000 내지 100,000배의 물 비로 함께 섞어 상온에서 45분간 반응시킨 후 100 cm Sepharose 6 LB column을 통과시켜 분자 크기에 따라 표지된 항체를 분취하였다.

### 3. 농양 및 장기분포

각 표지 IgG당 7 마리의 체중 200 gram 전후의 Sprague Dawley 백서 대퇴부에 1×10<sup>8</sup>개의 배양된 *Staphylococcus aureus*를 주사하여 24시간 후 농양이 만져질 때, 표지된 항체를 주사전에 TSK 4000 SW column을 이용한 HPLC로 순도를 확인하고, 마리당 500 uCi 주사하여 주사 후 4시간 및 24시간에 장기분포 및 농양섭취를 관찰하였다.

## 결 과

### 1. DTPA 결합 IgG의 표지방법에 따른 변화

3단계 표지법에 의한 IgG-DTPA에 <sup>99m</sup>Tc 표지시 15분 반응시켰을 때보다 45분했을 때 표지수율이 약간 좋아졌다. 이후의 실험은 45분 반응시켰다(Fig 1).

3단계 표지법에 의한 <sup>99m</sup>Tc의 환원 후 IgG-DTPA의 표지는 IgG polymer로 보이는 것이 형성되었으며 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>를 많이 넣을수록 polymer가 많이 생겼다. 2단계 표지법에 의한 IgG-DTPA의 <sup>99m</sup>Tc 표지는 3단계 표지법보다는 훨씬 적은 polymer가 생겼으며 표지수율도 나쁘지 않았다. 2단계표지에서 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>를 10,000배 섞은 것보다는 50,000배 섞은 것이 좋았으나, 100,000배 섞어도 더 좋아지지는 않았다(Fig. 2).

IgG-DTPA 결합시 DTPA의 량을 증가하면 표지수

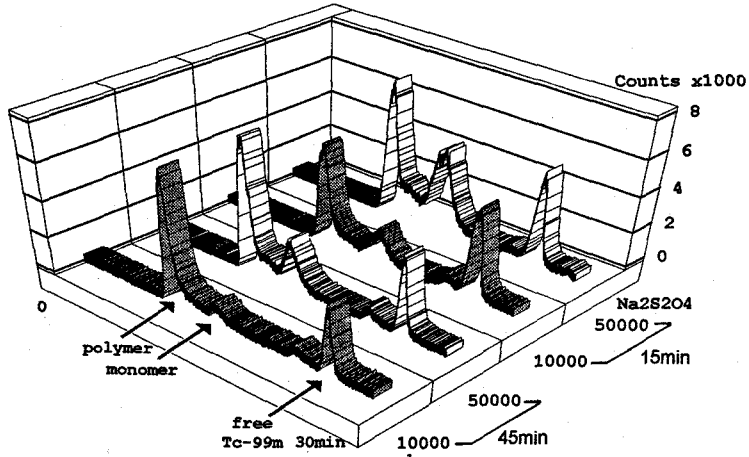


Fig. 1. HPLC chromatograms of  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-IgG reacted for 15 and 45 minutes.

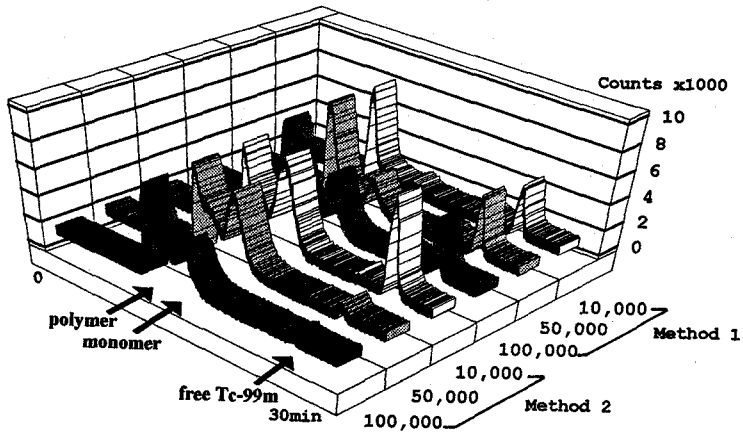


Fig. 2. HPLC chromatograms of  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-IgG.  
Method 1; Labeling DTPA-IgG after reduction of  $\text{Na}^{99m}\text{Tc-O}_4$  by  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ .  
Method 2; Simultaneous mixing  $\text{Na}^{99m}\text{Tc-O}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  and DTPA-IgG.

율은 좋아지나, polymer가 더 생겼다(Fig. 3).

(Fig. 4, Table 1).

## 2. 각 표지법에 의해 표지된 $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-IgG의 농양 및 장기분포

100 cm Sepharose 6LB column을 통과시켜 분리한 polymer, monomer의  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-IgG의 체내동태는, polymer가 주사후 대부분 간과 비장에 방사능이 집적되어 다른 장기나 농양에의 섭취율이 낮았으며, IgG에 DTPA 결합시  $\times 200$  물 비의 것이  $\times 20$ 의 것보다 혈중 제거율이 늦어, 표적 대 주변 방사능 비가 나뉘었다

## 고찰

$^{99m}\text{Tc}$ 이 핵의학에 이용된 이래 단백질의 표지에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔으며, 직접표지법과 간접표지법으로 나눌 수 있다. 단백질의 직접표지시 Stannous chloride나 2-mercaptoethanol 등을 이용하여 단백질의 -S-S 결합을 환원시키는 방법이 널리 쓰이나, 이때 -S-S결합이 필요이상으로 분리되어 여러 크기의

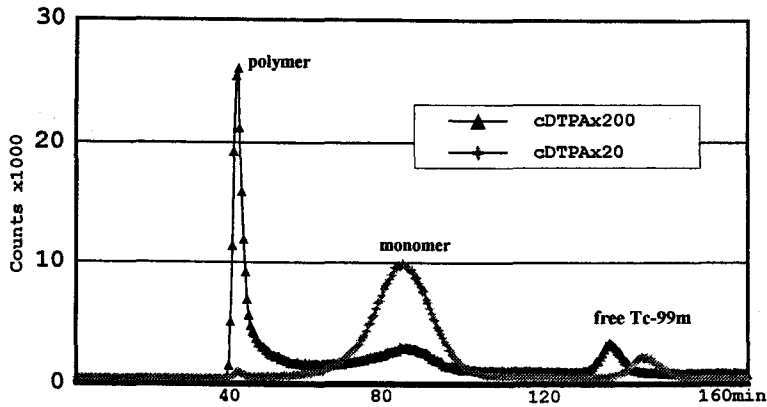


Fig 3. 100 cm Sepharose 6 LB column chromatograms of  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-IgG conjugated with DTPA of 2- and 200 times molar excess.

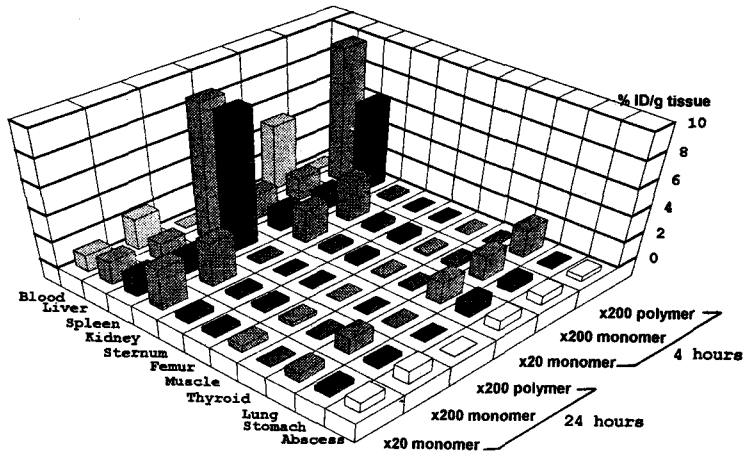


Fig. 4. Distribution of radioactivity at 4 and 24 hours after injection of monomer and polymer of  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-IgG.

작은 분자량의 단백질로 분해됨과,  $^{99m}\text{Tc}$ 의 비특이적 결합 때문에 불안정함이 알려져 있다<sup>14,23,24</sup>. 표지반응시간이 짧으면 IgG의 low affinity-high capacity의 결합 부위에  $^{99m}\text{Tc}$ 이 결합하고, 반응시간을 길게하면 이러한 비특이적 결합을 줄일 수 있다는 보고도 있다<sup>13</sup>. Gluconate, glucarate, glucoheptonate등을 이용하여 환원된  $^{99m}\text{Tc}$ 을 약하게 결합시켰다가, -S-S-결합이 환원된 항체에  $^{99m}\text{Tc}$ 을 넘겨주는 방법들이 이용되는데, 이 때 사용하는 buffer system과 pH가 영향을 미침이 알려져 있다<sup>6</sup>. 양기능성착화물은 항체의 방사성핵종표지에 널리 이용되는데, 가장 흔히는 항체에 양기능성착화물을 결합시키고 그 다음 방사성 핵종을 첨가하여 표

지하는 것으로, cyclic DTPA를 이용하는 것이 많이 연구되었다. cyclic DTPA이용시  $^{99m}\text{Tc}$ 의 항체에의 비특이적 결합이 알려져 있고, DTPA와 IgG의 몰비의 변화에 따라 면역활성과 체내동태가 다름이 보고되어 있다<sup>15</sup>. 비특이적 결합을 방지하기 위하여 방사성핵종을 양기능성 항체에 결합시키는 방법들도 보고되었으나, 표지수율이 낮거나 표지후 정제과정이 필요한 점등의 문제점들이 있다<sup>16-19</sup>. Metallothionein은 자연계에 존재하는 분자량 6000정도의 단백질로 중금속에 대한 친화력이 강한 착화물로 잘 알려져 있어, 이것을 항체에 결합시켜  $^{99m}\text{Tc}$ 을 표지하는 방법도 있다<sup>20</sup>. 최근 2-iminothiolane을 항체에 결합시켜 항체내의 -S-S-

Table 1. Distribution of Radioactivity at 4 and 24 Hours after Injection of Monomer and Polymer of <sup>99m</sup>Tc-DTPA-IgG

Organ	x200 monomer				x200 polymer							
	4 hours		24 hours		4 hours		24 hours					
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.				
Blood	2.37	0.27	1.23	0.29	4.90	0.72	2.30	0.25	0.02	0.01	0.01	0.00
Liver	1.87	0.26	1.72	0.38	1.66	0.29	1.36	0.14	9.97	2.43	11.14	1.44
Spleen	1.50	0.14	1.53	0.24	1.25	0.39	1.34	0.17	6.48	2.47	14.54	3.56
Kidney	2.45	0.41	3.10	0.65	3.02	0.42	3.29	0.38	0.17	0.03	0.12	0.01
Sternum	0.29	0.05	0.42	0.27	0.44	0.12	0.26	0.03	0.04	0.01	0.05	0.01
Femur	0.35	0.08	0.33	0.04	0.49	0.07	0.32	0.03	0.07	0.02	0.09	0.01
Muscle	0.13	0.02	0.50	0.20	0.17	0.08	0.30	0.19	0.01	0.00	0.00	0.00
Thyroid	0.12	0.03	0.08	0.02	0.25	0.13	0.13	0.04	0.02	0.01	0.02	0.01
Lung	1.64	0.38	0.68	0.08	1.83	0.26	1.19	0.29	2.12	1.01	0.06	0.02
Stomach	0.99	0.25	0.38	0.08	0.53	0.11	0.32	0.04	0.10	0.03	0.03	0.02
Abscess	0.75	0.26	0.77	0.20	0.70	0.47	0.97	0.56	0.38	0.42	0.03	0.03

결합을 환원시키지 않고서도 -SH기에 <sup>99m</sup>Tc를 표지하는 방법이 보고되어 이용이 기대된다<sup>21)</sup>.

cyclic DTPA는 <sup>99m</sup>Tc 뿐 아니라 In-111, Re-186, Sm-153등의 방사성핵종표지에도 이용될 수 있어, 항체를 이용한 진단 및 치료에 중요한 착화물이다<sup>22)</sup>. 표지조건에 따른 표지수율을 HPLC로 확인하는 과정에서 <sup>99m</sup>Tc 표지 IgG polymer가 생김이 관찰되었고, 표지방법의 변화로 이 polymer의 형성을 줄일 수 있음과 polymer가 체내분포에 변동을 초래함을 발견하였다. DTPA가 항체에 여러개 결합할 수록 체내에서 방사능의 집적이 커짐이 <sup>111</sup>In의 경우 알려져 있으나, <sup>99m</sup>Tc의 경우 monomer는 큰 차이가 없다. 그러나 표지도중 polymer가 생기면 간 및 비장의 방사능이 증가하고, 상대적으로 표적에의 섭취가 감소한다. 또 DATA가 여러개 항체에 결합할 수록 <sup>99m</sup>Tc 표지항체의 혈중제거율이 느려지는 것도 표적 대 주변 방사능비를 나쁘게 하는 요인이 된다. 면역신티그라피를 위한 <sup>99m</sup>Tc의 항체표지법으로는 polymer를 형성하지 않는 방법을 모색하는 것이 중요하다.

본 연구에 사용된 농양유발백서모델은 포도상구균의 표면에 protein A가 있고, 농양에 침습한 백혈구 표면에 IgG의 Fc receptor가 있어, 방사성핵종표지항체의 체내동태 및 대사연구에 쉽게 이용할 수 있는 모델로, 추후 다른 핵종의 항체표지연구에도 이용이 기대된다.

### 결 론

면역 신티그라피에 널리 이용되는 cyclic DTPA를 이용하는 <sup>99m</sup>Tc 표지방법에서 표지조건에 따라 면역반응능과 체내동태가 다름이 알려져 있다. IgG 대 DTPA의 물 비의 변화와 <sup>99m</sup>Tc와 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>의 물 비의 변화 및 반응순서의 변화에 따른 표지수율, polymer 형성 및 체내동태변화를 포도상구균을 이용한 백서 농양모델에서 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) <sup>99m</sup>Tc보다 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>를 10,000배 섞은 것 보다는 50,000배 섞은 것이 표지수율이 좋았으나 100,000배 섞어도 표지수율이 크게 향상되지는 않았다.
- 2) IgG와 DTPA 결합시 DTPA를 IgG의 20배 사용했을 때 보다 200배 사용했을 때 polymer가 잘 생겼고, 표지수율이 좋았다.
- 3) 3단계 표지법이 polymer가 더 많이 생겼으나 2단

제 표지법에서도 polymer가 생겼다.

4) <sup>99m</sup>Tc-IgG polymer를 농양 유발 백서에 주사하면 monomer보다 간과 비장에 방사능 집적이 유의하게 높고, 혈중 제거율이 빠르며, 농양 및 기타 장기의 섭취율이 유의하게 낮았다.

5) IgG에 DTPA 결합시 DTPA를 20배 사용하여 <sup>99m</sup>Tc 표지한 monomer는 200배 사용한 것 보다 혈중 제거율이 빨랐고, 농양섭취는 비슷하여 표적 대 주변 방사능비가 좋았다.

이상에서 cyclic DTPA를 이용한 IgG의 <sup>99m</sup>Tc 표지시 반응조건 및 순서의 변화에 따라 polymer가 생기는 비율이 다르고, IgG 결합된 DTPA의 수에 따라서도 체내동태가 다름이 관찰되어 면역 신틸로그래피에 이용시 좋은 반응 조건의 선택이 중요함을 알 수 있었다.

## REFERENCES

- 1) Hnatowich DJ: *Antibody radiolabeling, problems and promises. Nucl Med Biol* 17:49-55, 1990
- 2) Hnatowich DJ: *Recent developments in the radiolabeling of antibodies with Iodine, Indium and Technetium. Semin Nucl Med* 20:80-91, 1990
- 3) Eckelman WC, Paik CH, Steigman J: *Three approaches to radiolabeling antibodies with <sup>99m</sup>Tc. Nucl Med Biol* 16:171-176, 1989
- 4) Schwarz A, Steinstrasser A: *A novel approach to <sup>99m</sup>Tc labelled monoclonal antibodies. J Nucl Med* 28:721, 1987
- 5) Pettit WA, Deland FH, Bennett SJ, Golderg DM: *Improved protein labeling by stannous tartrate reduction of pertechnetate. J Nucl Med* 21:59-62, 1980
- 6) Allauddin MM, Khawli LA, Epstein A: *An improved method of direct labeling monoclonal antibodies with <sup>99m</sup>Tc. Nucl Med Biol* 19:445-454, 1992
- 7) Pimm MV, Rajput RS, Frir M, Gribben SJ: *Anomalies in reduction-mediated <sup>99m</sup>Tc labeling of monoclonal antibodies. Eur J Nucl Med* 18:973-976, 1991
- 8) Pak KY, Nedelman MA, Kante M, Khaw BA, Mattis JA, Strauss HW, Dean RT, Berger HJ: *An instant kit method for labeling antimyosin Fab' with <sup>99m</sup>Tc: Evaluation in an experimental myocardial infarct model. J Nucl Med* 33:144-149, 1992
- 9) Krejkarek GE, Tucker KL: *Covalent attachment of chelating group to macromolecules. Biochem Biophys Res Com* 77:581-585, 1977
- 10) Khaw BA, Strauss W, Carvalho A, Locke E, Gold HK, Haber E: *<sup>99m</sup>Tc labeling of antibodies to cardiac myosin Fab and to human fibrinogen. J Nucl Med* 23:1011-1019, 1982
- 11) Hnatowich DJ, Layne WW, Childs RL: *The preparation and labeling of DTPA-coupled albumin. Int J Appl Radiat Isot* 33:327-332, 1982
- 12) Paik CH, Ebbert MA, Murphy PR, Lassman CR, Reba RC, Eckelman WC, Pak KY, Powe J, Stelewski Z, Koprowski H: *Factors influencing DTPA conjugation with antibodies by cyclic DTPA anhydride. J Nucl Med* 24:1158-1163, 1983
- 13) Paik CH, Phan LNB, Hong JJ, et al: *The labeling of high affinity sites of antibodies with <sup>99m</sup>Tc. Int J Nucl Med Biol* 12:3-8, 1985
- 14) Eckelman WC, Steigman J: *Direct labeling with <sup>99m</sup>Tc. Nucl Med Biol* 18:3-7, 1991
- 15) Sakahara H, Endo K, Nakashima T, Koizumi M, Ohta H, Torizuka K, Furukawa T, Ohmomo Y, Yokoyama A, Okada K, Yoshida O, Nishi S: *Effect of DTPA conjugation on the antigen binding activity and biodistribution of monoclonal antibodies against  $\alpha$ -Fetoprotein. J Nucl Med* 26:750-755, 1985
- 16) Franz J, Volkert WA, Barefield EK, Holmes RA: *The production of <sup>99m</sup>Tc-labeled conjugated antibodies using a cyclam-based bifunctional chelating agent. Nucl Med Biol* 14:569-572, 1987
- 17) Fritzberg AR, Anrams PG, Beaumier PL, Kasina S, Morgan AC, Rao TN, Reno JM, Sanderson JA, Srinivasan A, Wilbur DS, Vanderheyden JL: *Specific and stable labeling of antibodies with <sup>99m</sup>Tc with a diamide dithiolate chelating agent. Proc Natl Acad Sci USA* 85:4025-4029, 1988
- 18) Fritzberg AR: *Advances in <sup>99m</sup>Tc-labeling of antibodies. Nuclearmedizin* 26:7-12, 1987
- 19) Arano Y, Yokoyama A, Furukawa T, Horiuchi K, Yanata T, Saji H, Sakahara H, Nakashima T, Koinumi M, Endo K, Torizuka K: *<sup>99m</sup>Tc labeled monoclonal antibody with preserved immunoreactivity and high in vivo stability. J Nucl Med* 28:1027-1033, 1987
- 20) Burchiel SW, Hadjian RA, Hladik WB, Drozynski CA, Tolman GL, Haber SB, Gallagher BM: *Pharmacokinetic evaluation of <sup>99m</sup>Tc metallothionein-conjugated mouse monoclonal antibodies B72.3 in Rhesus monkeys. J Nucl Med* 30:1351-1357, 1989
- 21) Joiris E, Bastin B, Thorenback JR: *A new method*

- for labeling of monoclonal antibodies and their fragments with  $^{99m}\text{Tc}$ . Int J Radiat Appl Instrum B 18:353-356, 1991*
- 22) Hnatowich DJ, Virzi F, Doherty PW: *DTPA-coupled antibodies labeled with Yttrium-90. J Nucl Med 26: 503-509, 1985*
- 23) Lim SM, Woo KS, Chung WS, Awh OD, Seo YS, Lee JD: *Distribution of I-123,  $^{99m}\text{Tc}$ -human polyclonal nonspecific IgG and  $^{67}\text{Ga}$ -citrate in abscess bearing mice. Kor J Nucl Med 26:116-123, 1992*
- 24) Takur ML, DeFulvio J, Richard MD, Park CH:  *$^{99m}\text{Tc}$  labeled monoclonal antibodies: Evaluation of reducing agents. Int J Rad Appl Instrum B 18:227-233, 1991*
-