

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
G01N 21/30

(45) 공고일자 1999년03월30일
(11) 등록번호 특0164876
(24) 등록일자 1998년09월15일

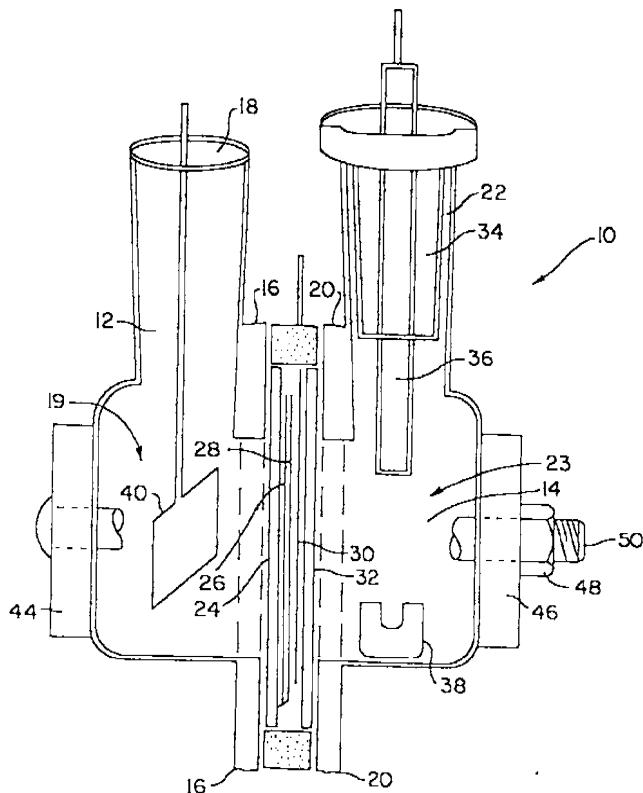
(21) 출원번호	특1993-703450	(65) 공개번호	특1994-701119
(22) 출원일자	1993년11월15일	(43) 공개일자	1994년04월22일
번역문제출일자	1993년11월15일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 92/03943	(87) 국제공개번호	WO 92/21019
(86) 국제출원일자	1992년05월12일	(87) 국제공개일자	1992년11월26일
(81) 지정국	국내특허 : 핀란드 헝가리 일본 대한민국 노르웨이		
(30) 우선권주장	701,438 1991년05월15일 미국(US)		

(73) 특허권자 더 다우 케미칼 캄파니 리차드 지. 워터맨
 미합중국 미시간 48640 미들랜드 애보트 로드 다우 센터 2030
 (72) 발명자 캐리 리 스코티치니
 미합중국 미시간 48657 샌포드 노쓰 에이트 마일 로드 1609
 제니쓰 엠. 바틀렛
 미합중국 미시간 48640 미들랜드 메도우 레인 209
 (74) 대리인 김창세, 김영, 장성구

심사관 : 김인기**(54) 단백질 및 펩티드를 표지화하기 위한 전해조 및 방법****요약**

본 발명은 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자를 표지화하기 위한 전해조 및 이를 이용하여 삼기 물질을 표지화하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 전해조(10)에는 음극 반전지(12) 및 양극 반전지(14)를 사용한다. 여기서, 다공성 사용 전극(28)은 하나의 반전지내에 위치하고, 다른 하나의 반전지에는 반대 전극(40)이 위치하며, 이들 2개의 반전지(12 및 14)는 분리기(26)에 의해 서로 격리된다. 사용전극(28)을 함유한 반전지내에 위치하고 삼기 사용전극(28)과 반대전극(40)사이의 전류 통로 외측에 놓인 참조전극(36)은 사용전극 전위를 정밀 제어하여 단백질, 펩티드 및 유기 분자에 대한 산화적 손상을 최소화하면서 최대 표지화속도가 달성되도록 해준다. 사용전극(28)을 함유하는 반전지 부피에 대한 사용 전극 표면적 비가 0.001 내지 10cm⁻¹이 되도록 사용 전극(28)을 커플링된 비-방사성 표지화제로 포화시키면 사용 전극(28)상에서의 흡착으로 인한 방사성 표지화제의 활성 손실의 문제가 최소화된다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

단백질 및 펩티드를 표지화하기 위한 전해조 및 방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 전해조와 이러한 전해조를 이용하여 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자를 표지화하는 방법에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 전해조 및 이러한 전해조를 이용하여 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자를 방사선 표지화하는 방법에 관한 것이다.

할로겐 또는 기타 다른 표지 물질로 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자를 표지화하는 현존 기술은 몇 가지 결점들을 가지고 있다. 예를 들어, 화학적 표지화 공정은 때로 정률 증가(scale-up)가 어렵고 표지화 할 단백질 및 펩티드를 손상시키는 경향이 있다. 또한, 이러한 화학적 표지화 공정은 수율이 낮을 수 있기 때문에, 미반응 표지 물질을 표지된 물질로부터 분리시켜야 한다. 이러한 정제 단계는 화학적 표지화 공정을 덜 효과적으로 만들 뿐만 아니라, 방사성 표지 물질의 경우에는 작업자들이 유해 물질에 노출된다. 이러한 방법들 중에서 단백질을 방사선 표지화하기 위한 현재 사용되고 있는 공정은 산화 기법을 이용하여 요오드화 나트륨으로부터 친전자성 요오드 종(1+)을 생성시키는 고체상 요오드화 방법이다.

할로겐 또는 다른 표지 물질, 예를 들면 태크니튬 및 레늄으로 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자를 표지화하는 현전 전기화학적 기법은 다른 결점들을 갖고 있다. 예를 들어, 전기화학적 표지화 공정에서는 보통 전해조의 양극 및 음극으로서 백금 또는 금을 사용한다. 기존의 전기화학적 기법을 이용하여 생물학적 물질에 방사성 요오드를 혼입시켜 μg 단위로 80%이하로 요오드화시킬 수 있다. 반응 시간을 짧게 하기 위하여, 많은 노동자들은 전해질 부피에 대해 비교적 고비율의 양극 표면적을 사용한다. 이와 같은 비율은 통상 양극으로서 뿐만 아니라 반응 용기로서 작용하는 백금 도나기를 사용함으로써 달성된다. 그러나, 백금 도가니는 많은 이유로 인하여 상업적인 작업에 부적당하다. 예를 들면, 백금 도가니는 그들의 형태가 특히 저전도성 용액 중에서 양극 표면을 통하여 균일한 전위가 유지되는 것을 방해하기 때문에 실용적이지 못하다. 또한, 백금 도가니의 형태는 표면적/전해질 부피비의 변형을 어렵게 만든다. 이러한 결과는 특정 형상에 대해 면적이 부피만큼 빠르게 증가하지 않는다는 사실에 기인한다. 또한, 이러한 도가니에는 사용 후 버리거나 액체 방사성 폐기물을 발생시키는 귀찮은 세정작업을 행해야 하는 백금 또는 금을 다양으로 사용한다.

현존 전기화학적 기법은 또한 화학적 기법과 유사한 결점들을 가지고 있다. 예를 들어, 방사선 표지된 단 클론성 항체(MAbs, monoclonal antibodies)의 상업적 생산에 있어서, 전해조의 양극, 음극, 막 및 다른 구성부품들은 방사성 표지화제로 오염될 수 있다. 방사성 폐기물의 처리비용 때문에, 동위원소의 사용 효율 및 효율이 100% 미만인 경우 폐기 장소에 대해 보다 더 주의할 필요가 있다.

단백질 및 펩티드를 표지화, 특히 방사성 표지화하기 위한 전해조 및 방법에 대한 이러한 많은 난점들을 극복하기 위하여, 본 발명의 전해조 및 방법을 이용할 수 있다. 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자를 표

지화하는데 사용되는 전해조는

(1) (a) 분리기(separator)에 의해 격리된 음극 반전지 및 양극 반전지 ; (b) 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 하나내에 있는 사용전극 ; (c) 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 다른 하나내에 있는 반대전극 ; 및 (d) 상기 사용 전극을 함유하는 상기 반전지내에 및 상기 사용 전극과 상기 반대 전극 사이의 전류 통로(current path) 외측에 위치한 참조전극(reference electrode)을 포함하거나; 또는

(2) (a) 개구부를 한정하는 환상 고리를 가진 제1음극 반전지 및 개구부를 한정하는 환상 고리를 가진 제2양극 반전지(이때, 상기 제1환상 고리와 상기 제2환상 고리는 서로 대향되어 있다) ; (b) 상기 제1환상 고리에 인접한 제1가스켓 ; (c) 상기 제1가스켓에 인접한 분리기 ; (d) 상기 분리기에 인접하여 있고, 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 하나내에 위치한 다공성 사용 전극 ; (e) 상기 사용 전극을 전원에 접속시키기 위하여 상기 사용 전극을 작동가능하게 결합시키는 전기 접촉수단 ; (f) 상기 제2환상 고리에 인접한 제2가스켓 ; (g) 상기 제1가스켓, 상기 분리기, 사이 다공성 사용 전극 및 상기 제2가스켓이 샌드위치식으로 사이에 삽입되도록 하는 방식으로 상기 제1환상고리를 상기 제2환상 고리에 클램핑 고정하기 위한 수단 ; (h) 상기 음극 반전지와 상기 양극 반전지중 다른 하나내에 있는 반대 전극 ; 및 (i) 상기 사용 전극을 함유하는 상기 반전지내에 및 상기 다공성 사용 전극과 상기 반대 전극 사이의 전류 통로 외측에 위치한 참조전극을 포함하거나; 또는

(3) (a) 분리기에 의해 격리된 음극 반전지 및 양극 반전지 ; (b) 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지 중 하나내에 있는 사용 전극 ; (c) 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 다른 하나 내에 있는 반대 전극 ; (d) 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지 중 어느 하나에 인접한 고정 바아 및 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 다른 하나에 인접한 가동 바아를 가진 클램프 ; 및 (e) 상기 전해조에 클램프 고정력을 가하고 상기 분리기를 상기 음극 반전지와 상기 양극 반전지 사이에서 지지시키기 위하여 상기 고정 바아와 상기 가동 바아를 함께 연결시키는 수단을 포함한다.

단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자를 표지화하기 위한 본 발명의 방법은

(a) 분리기에 의해 격리된 음극 반전지 및 양극 반전지를 가진 전해조를 제공하고; 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중의 하나내에 다공성 사용 전극을 제공하고; 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중의 다른 하나내에 반대 전극을 제공하고; 상기 사용 전극을 함유하는 상기 반전지내에 및 상기 다공성 사용 전극과 상기 반대 전극 사이의 전류 통로 외측에 참조전극을 제공하고 ; (b) 상기 사용전극을 함유하는 상기 반전지내에 표지화할 물질을 삽입하고 ; (c) 상기 표지화할 물질을 표지화제와 접촉시키고; 이어서 (d) 상기 전해조에 전류를 통과시킴을 포함한다.

본 발명은 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자, 특히 단클론성 항체를 할로겐, 또는 테크네튬 및 레늄과 같은 다른 표지 물질로 표지화하기 위한 개선된 방법에 사용하기 위한 전기화학 전지를 제공한다. 본원에 사용된 용어 표지물질(Label)은 방사성이거나 비방사성이 수 있는 표지 물질을 포함한다. 이러한 전지는 이온 전류는 흐르게 하면서 양극액과 음극액의 전체적인 혼합은 방지해주는 분리기에 의해 격리된, 음극액을 함유하는 음극 반전지 및 양극액을 함유하는 양극 반전지를 사용한다. 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자의 표지화는 어느 하나의 반전지내의 사용 전극에서 일어날 수 있다. 표지 물질이 산화되어 표지화제로 되는 경우, 양극 반전지내에 위치한 다공성 양극은 사용전극으로서 제공하며, 음극 반전지내에 위치한 음극은 비-사용전극 또는 반대전극으로서 제공한다. 표지 물질이 환원되어 표지화제로 되는 경우, 음극 반전지내에 위치한 다공성 음극은 사용 전극으로서 제공하며, 양극 반전지내에 위치한 양극은 비-사용 전극으로서 제공한다. 사용 전극과 비-사용 전극 사이의 전류 통로 외측에 위치한 참조전극은 사용 전극 전위를 정밀하게 제어하여 단백질, 펩티드 또는 유기 분자에 대한 산화적 손상을 최소화시키면서 최대 표지화 속도의 달성을 가능하게 해준다.

본 발명의 전해조는 매우 고수율의 표지화된 생성물, 공정의 보다 쉬운 정률증가 및, 방사선 표지화의 경우에는, 감소된 부피의 액체 방사성 폐기물들과 같은 많은 잇점들을 제공한다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 본 발명에 따른 전해조의 개략도이고,

제2도는 유리 반전지의 측면도이고,

제3도는 유리 반전지의 정면도이고,

제4도는 고무 가스켓의 정면도이고,

제5도는 분리기의 정면도이고,

제6도는 다공성 양극의 정면도이고,

제7도는 금속 접촉 고리의 정면도이고,

제8도는 클램프의 평면도이고,

제9도는 제8도의 클램프의 측면도이고,

제10도는 결합된 클램프 및 열 흡입장치(heat sink)의 평면도이고,

제11도는 제10도의 결합된 클램프 및 열 흡입장치의 측면도이다.

바람직한 실시태양에서, 전해조(10)는 2개의 동일한 유리 반전지, 즉 제1유리 음극 반전지(12) 및 제2유리 양극 반전지(14)로 구성된다(제1도, 2도 및 3도). 제1유리 반전지(12)는 개구(17)(도시되지 않음), 개구 상단(18) 및 반응실(19)을 한정하는, 불투명 유리면을 가진 환상 고리(16)를 가지고 있는 반면, 제2유리 반전지(14)는 개구(21), 개구상단(22) 및 반응식(23)을 한정하는, 불투명 유리면을 가진 환상 고리(20)를 가지고 있다. 고리(16)과 고리(20) 사이의 부분에는 제1고무 가스켓(24)(제1도 및 제4도), 분리기(26)(제1도 및 제5도), 다공성 양극(28)(제1도 및 제6도), 금속 접촉 고리(30)(제1도 및 제7도) 및 제2고

무 가스켓(32)이 있다. 상기 각종 부품의 상대적인 크기가 제2도 내지 제11도에 도시되어 있다. 상기 도면으로부터 알 수 있는 바와 같이, 고무 가스켓(24) 및 (32)의 내경은 양극(28)의 작용 면적을 한정한다.

은/염화은 참조전극(36)을 유지시켜 주는 온도계 어댑터(34)는 유리 반전지(14)내에 제거가능하게 설치되어 있다(제1도). 반면에, 유리 반전지(12)는 백금박 또는 금박, 또는 스테인레스강 음극(40)과 함께 설치된다. 제1도는 내부에 자기 교반 바아(38)가 위치되어 있는 유리 반전지(14)를 나타내고 있지만, 유리 반전지(12)도 또한 이와 유사한 자기 교반 바아를 함유하기에 충분한 크기이다. 반응실(19) 및 (23)은 자기 교반 바아에 의해 보다 확실히 교반되도록 자기 교반판에 각각의 유리 반전지(12) 및 (14)의 바닥이 보다 더 밀접하게 위치되도록 설계한다.

반전지(12) 및 반전지(14)는 다양한 방법으로 함께 유지시킬 수 있지만, 고리(16) 및 고리(20) 보다는 차라리 전해조의 2개의 단부상에 설치되어 있는 클램프(42)는 특정의 밀봉제 또는 접착제의 필요 없이도 보다 균일한 압력을 제공한다(제8도 및 제9도). 제8도 및 제9도에 도시된 클램프(42)는 고정 바아(44), 및 한쌍의 나사식 봉(50)상의 밀착 또는 이완 너트(tightening or loosening nut)(48)에 의해 작동되는 가동 바아(46)으로 구성된다. 고정 바아(44) 및 가동 바아(46)은 반전지(12) 및 (14)의 후측 형상과 조화되도록 조형되어 있다. 바람직하게, 반전지의 개개의 바아 및 개개의 후측 모두는 균일한 압력 분배 및 양호한 접촉을 위해 편평하다. 클램프(42)는 또한 열 흡입장치로서 제공할 수 있는 금속 블록(52)의 일체형 부품일 수도 있다.(제10도 및 제11도). 제10도 및 제11도에 도시된 블록(52)은 가동 바아(46), 및 고정 바아(42)으로서 작용하고 고정 바아(42)를 대신할 수 있는 단부(54)로 구성된다. 블록(52)은 또한 전해조(10)를 둘러싸고 전해조(10)의 지지체로서 작용하는, 기부(56) 및 직립 벽(58)(단부(54))는 이 벽의 일부이다)을 가지고 있다. 블록(52)의 온도는 여러 가지 방법, 예를 들면 블록을 인큐베이터내에 위치시키거나 블록(52)내의 채널을 통하여 유체를 순환시켜 유지시킬 수 있다.

상술된 전해조(10)는 유리로 제작되어 있지만, 폴리프로필렌, 폴리카보네이트, 텐플론™(Teflon™) 및 루사이트™(Lucite™), 또는 이를 재료의 조합과 같은 다양한 플라스틱을 비롯한 광범위한 종류의 재료로 제작할 수도 있다. 일반적인 요건은 제작용 재료가 그들의 구조적 보전성을 유지하고 생성물에 바람직하지 못한 물질을 첨가하지 않으면서 사용조건하에 공정 화학 물질과 혼화가능해야 한다는 것이다.

방사성 및 비-방사성 할로겐은 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자, 특히 단클론성 항체를 표지화하는데 사용될 수 있다. 다른 것들중에서 본 발명에 사용이 예상되는 표지 물질은 테크네튬 및 레늄이다. 이를 표지물질도 또한 방사성이거나 비-방사성일 수 있다.

상술된 전해조(10)에서, 다공성 양극(28)은 사용 전극으로서 제공한다. 다공성 양극(28)은 금, 백금 및 90% 백금/10% 로듐의 합금으로 이루어진 그룹중에서 선택된 금속으로 제조한다. 할로겐화시킬 단백질, 펩티드 또는 기타 유기 분자가 산화반응에 매우 민감한 경우에는 금이 요오드화에 더 좋은 양극 재료일 수 있는 것으로 가정된다. 일반적으로는, 임의의 전기전도성 재료 또는 반도체 재료가 양극으로서 사용될 수 있다. 적합한 재료의 실례는 다양한 형태의 탄소, 납, 이산화납, 귀금속(원소주기율표의 VIII족 및 IB족) 및 이들의 산화물(예를 들면, 산화백금), 및 티탄과 같은 판상 금속상의 피막으로서의 귀금속 또는 이들의 산화물이다. 양극 재료는 목적하는 전환을 효과적으로 수행하는데 대한 그의 능력 및 그의 부식 저항을 고려하여 선택한다. 할로겐화 및 방사선 할로겐화와 관련하여, 귀금속이 그들의 불활성, 및 할로겐화물을 활성 할로겐화제로 효과적으로 산화시키는데 대한 그들의 능력으로 인하여 유익하다. 그러나, 귀금속 산화물은 요오드산염의 형성으로 인하여 요오드화 또는 방사선 요오드화 적합하지 않다.

다공성 음극을 사용 전극으로서 제공하는 경우, 일반적으로는 임의의 전기전도성 재료 또는 반도체 재료가 음극(40)으로서 사용될 수 있다. 적합한 재료의 예로는 다양한 형태의 탄소, 스테인레스 강, 귀금속(원소 주기율표의 VIII족 및 IB족) 및 이들의 산화물(예를 들면, 산화백금), 및 구리 및 니켈과 같은 전이금속을 들 수 있다.

금속 접촉 고리(30)는 전해조(10) 조립체의 중요한 구성 요소는 아니지만, 그것은 사용 전극과의 전기적 접촉이 유지되도록 보장해준다. 금속 접촉 고리(30)는 고가의 백금 또는 금의 매우 얇은 조각을 사용 전극내의 양극 또는 음극으로서 사용하는 경우에 특히 유용하다. 이를 박편상 백금 또는 금을 앨리게이터 클립(alligator clip)에 의해 전원에 직접 접속시킬 수 없는 상황에서는 금속 접촉 고리(30)를 접촉점으로서 제공할 수 있다.

다공성 음극이나 다공성 양극을 사용 전극으로서 제공하는 경우에는, 사용 전극의 모서리(edge)를 가스켓(24) 및 (32)으로 보호함으로써 모서리에서의 물질 전달을 최소화하는 것이 중요하다. 모서리에서의 물질 전달이 증가되면 사용 전극을 통하여 균일한 전위를 유지하기가 어려워져 표지화제와의 문제를 야기시킬 수 있다. 예들 들어, 전위가 충분히 높지 않으면 요오다이오드로부터 활성 표지화제가 전혀 생성되지 않을 것이며, 반면에 전위가 너무 높으면 요오다이드가 활성 표지화제가 아닌 요오드산염으로 산화될 것이다. 사용 전극의 모서리를 보호한 경우, 참조전극의 위치는 그것이 전류통로의 외측에 위치하는 한 중요하지 않은데, 그 이유는 전류가 사용전극의 모서리 주위로 퍼질 수 없기 때문이다. 그러나, 사용 전극의 모서리가 보호되지 않은 경우에는 참조전극을 전류 통로 외측에 위치시키기가 더 어렵다.

분리기(26)은 양극과 음극사이에 이온 전류가 흐르게 하면서 양극액과 음극액의 전체적인 혼합을 방지해준다. 분리기(26)은 일반적으로 전기절연성이여야 하며, 광범위한 종류의 물질, 예들들면, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 용융 유리(fritted glass), 소결 유리 분말, 텐플론™과 같은 다공성 또는 발포 플라스틱, 석면 격판, 다공성 세라믹 재료, 이온 교환막 및 한외 여과막으로 제조할 수 있다. 본 발명의 한가지 태양에서, 분리기(26)은 나피온™(Nafion™) 117 양이온 교환막이다. 양이온성인 경우, 분리기(26)은 방사성 할로겐화물이 본 발명의 양극 격실내에 잔류하도록 해준다.

본 발명은 또한 분리기(26)으로서 음이온 교환막을 사용하는 것도 예상된다. 이와 같은 실시태양에 있어서, 방사성 할로겐화물은 음극액에 첨가하며, 할로겐화물은 농도 구배에 감응하여 음이온 교환막 분리기(26)를 가로질러 확산한다. 이어서, 할로겐화물은 다공성 금속층(28)과 직면하게 되고, 상기 층이 참조전극(36)에 대해 적합한 전위에 있으면, 거기에서 할로겐화물은 활성 할로겐화제로 산화되어 다공성 양극

(28)이 충분히 다공성인 경우 단백질 물질과 반응한다. 본 실시태양에 유용한, 현재 구입가능한 음이온 교환막은 라이포어™(Raipore™) 음이온 교환막 1030, 4030 및 5030(Pall RAI, Inc.)이다.

음극액내에 방사성 할로겐화물을 넣는 경우의 잇점은 방사선 표지된 단백질로부터 미반응 방사성 물질을 분리시켜야 하는 문제가 줄어든다는 점이다. 이러한 결과는 분리기(26)에 바로 인접하게 다공성 양극(28)을 위치시킴으로써 더 향상된다. 이러한 배열을 사용하면, 방사성 요오다이드는 그것이 양극 반전지(14)내로 유입됨에 따라 다공성 양극(28)에서 단백질과 반응하며, 방사선 표지된 단백질로부터 분리되어야만 하는 미반응 방사성 요오다이드가 양극 반전지(14)내에 필수적으로 잔류하지 않을 때 상기 전지를 턴 오프(turn off)시킨다. 음극액내에 방사성 할로겐화물을 넣은 경우의 단점은 분리기(26)내에 더 많은 방사성 할로겐화물이 잔류한다는 사실이다. 그러나, 반복 사용 또는 연속 사용이 분리기(26)의 초기 포화도와 무관할 수 있는 상업적 용도에서는 이러한 사실이 단점일 수 없다.

음극액 또는 양극액에는 특정의 지지 전해질(supporting electrolyte)이 사용될 수 있다. 통상 사용되는 지지 전해질의 실례로는 염화나트륨, 인산염 완충액, 테트라알킬암모늄염 및 알칼리 금속 아세테이트를 들 수 있다. 또한, 전해조(10)는 그것이 공정 이유에서 바람직하다면 사용 전극 격실내에 특정 지지 전해질을 넣지 않고 사용할 수도 있다.

사용된 지지 전해질과는 무관하게, 몇가지 형태의 교반방법을 이용하여 사용 전극을 함유하는 반전지내에서 시약들을 적당히 혼합하고 사용전극과 접촉시켜야 한다. 상술된 전해조(10)에 있어서, 교반 바야(38)로 혼합을 행한다. 혼합을 행하기 위한 다른 방법으로는 반전지내에 개스를 스파깅(sparging)시키는 방법이 있다. 표지화제가 하나의 반전지내에 위치하고 표지화시킬 물질이 다른 하나의 반전지내에 있는 경우에는 2개의 반전지 모두에서 교반을 행하는 것이 유리한 것으로 예상된다.

양극 반전지(14)가 사용전극을 함유하는, 단백질을 할로겐화시키기 위한 본 발명의 실시태양에서는, 상이한 형태의 양극(28) 및 연장 배열의 양극(28) 및 참조전극(36)을 사용한다. 제1도에 도시된 방식에서 박편의 다공성 양극(28) 재료를 사용함으로써 고가의 귀금속 양극의 보다 경제적인 사용, 세정 절차에 있어서의 향상된 경제성 및 적응성을 제공하며, 양극 전위 및 따라서 할로겐화 반응의 효율을 정밀 제어한다. 또한, 전류 통로 외측에 참조전극(36)을 배치하면 양극 전위가 정밀 제어되어 단백질에 대한 산화적 손상을 최소화시키면서 최대 할로겐화 속도가 달성된다. 그러나, 전류 통로 외측에 참조전극(36)을 배치하면 사용 전극은 필수적으로 다공성이어야 한다. 참조전극(36)은 사용 전극 전위를 제어하거나 측정하는데 통상 사용되는 다양한 전극들중 하나일 수 있다.

본 발명의 전해조(10), 특히 다공성 양극(28)이 분리기(26)에 바로 인접하게 위치한 전해조(10)의 다른 잇점은 그의 제작의 용이성 및 사용된 용매의 전도도가 아주 낮은 경우에 조차도 효과적으로 작동하는 그의 능력이다. 예를 들어, 요오다이드, 또는 페닐 요오다이드와 같은 요오다이드 공급원을 용해시킬 수 있는 몇몇 용매는 다른 전해질은 용해시키지 않을 것이므로 전도도를 부여하지 않을 수 있다. 이러한 상황은 염 또는 물이 존재하는 경우 원치않는 반응이 일어날 수 있는 경우에 존재할 수 있다. 양극액이 약전도성일 경우, 양극(28)은 전류가 흐르고 단백질, 펩티드 또는 유기 분자의 요오드화가 아직도 일어날 수 있도록 분리기(26)에 바로 인접하게 위치시킬 수 있다. 할로겐화시킬 물질은 양극 반전지(14)내에 존재하기 때문에, 음극 반전지(12)내에 전도성 용매가 사용될 수 있다. 이러한 구성이 제1도에 도시되어 있다. 그러나, 양극 용매 전도도가 용매와 할로겐화시킬 물질사이에서의 원치않는 화학반응을 피하는 것과 관련된 인자가 아닌 경우, 전도성 용매가 사용될 수 있으며 양극(28)을 양극 반전지(14)내의 어느 곳에든 위치시킬 수 있다. 양극(28)을 분리기(26)에 바로 인접하게 위치시키는데 유용한 한가지 효과적인 수단은 양극 재료를 분리기(26)상에 화학적으로 증착시키는 것이다. 하기 실시예 16은 이러한 증착을 수행하는 한가지 방법을 예시한다.

본 발명의 양극 재료로서 귀금속을 사용하는 경우의 한가지 결점은 그들이 고용량의 요오다이드 및 기타 할로겐을 흡착한다는 사실이다. 예를 들면, 산화되어 활성 요오드화 종을 생성시키는데 사용된 양극상에서의 방사성 요오다이드의 흡착이 제어된 전위 또는 제어된 전류를 사용하는 기술이 적당히 수행된 경우 항체의 전기화학적 표지화에 동위원소를 사용할 경우의 거의 모든 비능률에 책임이 있다는 사실이 밝혀졌다. 양극액의 부피에 대한 양극의 크기는 전위-제어된 전기분해에 필요한 시간을 한정하며, 따라서 양극을 부당하게 긴 전기분해 시간을 야기시키지 않고서도 항상 더 작게만 만들 수는 없는 것으로 널리 알려져 있다. 따라서, 몇가지 다른 방법으로 양극상에서의 흡착으로 인한 활성 손실의 문제를 최소화시켜야만 하였다.

이러한 문제는 사용 전극 표면적/반전지 부피비(A/V)를 제어함으로써 최소화시킬 수 있다. 오늘에 이르러, A/V비가 너무 작으면 긴 전기분해 시간이 필요하지만, A/V비가 너무 크면 흡착으로 인하여 방사성 할로겐화물의 과도한 손실이 야기되는 것으로 밝혀졌다. 이것은 구체적으로는 방사성 할로겐화에 관계하며; 다른 전기 화학적 변형 또는 다른 유형의 방사선 표지화 반응에서도 이러한 난관에 부딪히거나 그럴지 않을 수 있다. 단백질의 방사선 할로겐화에 관여하는 A/V비에 대한 일반적인 범위는 0.001 내지 5,000cm⁻¹이며, 바람직한 범위는 0.05 내지 10cm⁻¹이다. 기하학적 면적은 전극의 전체적인 물리적 측정값으로부터 계산한다. 전기분해에 필요한 시간 및 할로겐의 흡착 용량 모두를 실질적으로 한정하는 파라메타는 실표면적(real surface area)이다. 실표면적은 전극의 형태(예를 들면, 다공도 대 평활도), 전극의 히스토리 및 다른 인자에 의해 결정되는 현미경적 조도에 따라 변한다. 실면적은 기하학적 면적보다 클수도 작을수도 있다.

상기한 문제는 또한 본 발명 전해조의 양극(28)을 비-방사성 할로겐으로 포화시킨 다음 표지화 공정도중 방사성 할로겐이 흡착된 비-방사성 할로겐으로 교환되는 것을 최소화시키는 본 발명의 바람직한 실시태양에서 최소화된다. 양극(28)을 비-방사성 할로겐으로 포화시키는 2가지 방법이 제안되어 있다. 즉, 다공성 양극(28)을 전해조(10)내에 삽입시키기 전에 비-방사성 할로겐으로 침지시키는 방법, 및 다공성 양극(28)을 비-방사성 할로겐 용액 중에서 유지시키면서 전기 분해하는 방법이다.

운전시, 전해조(10)는 사용 전극 전위, 전지 전류 또는 총괄 전지 전압, 즉, 양극과 음극을 통한 전위를 제어함으로써 작동시킬 수 있다. 관심있는 공정의 요건에 따라, 인가 전류가 직류 또는 교류일 수

있거나, 또는 인가 전위가 소정의 파형에 따라 일정하거나 변할 수 있다. 전위를 제어하는 경우, 전류 통로 외측에 참조전극을 위치시켜 보다 정밀하게 제어한다. 이와 같은 제어에 대해 제안된 이유는 이러한 기하학이 참조전극과 사용 전극 사이의 전위에 대한 IR 강하(전지전류 × 용액 저항의 생성값)의 기여도를 최소화한다는 것이다. 전지 전류 또는 전위를 제어할 때, 이러한 기하학은 사용 전극 전위의 보다 정밀한 측정값을 제공한다. 수성 매질내에서의 요오드화 및 방사선 요오드화의 경우, 몇몇 기재에 대하여 높은 재생 수율을 달성하기 위해서는 양극의 정밀한 전위 제어가 필수적인 것으로 밝혀졌다.

하기 실시예에 의해 본 발명을 더 설명할 것이며, 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하려는 것이다.

[실시예 1 내지 13]

단클론성 항체의 요오드화

표 1은 I-125를 사용하여 단클론성 항체를 전해 방사선 요오드화시킨 실시예 1 내지 13의 결과를 요약한 것이다. 본 실험은 본 발명의 전해조(10)를 사용하여 수행하였으며, 표지된 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자의 수율에 대한 변화량의 방사선 표지된 할로겐 및 할로겐으로 전처리된 양극의 효과를 측정하였다. 본 실험에 사용된 I-125의 양은 양극(28)의 흡착 용량에 비해 매우 작았기 때문에, 용액상 캐리어 요오다이드(비-방사성 요오다이드)를 사용하여 하기 표의 결과들을 얻었다. 비-방사성 표지화제, 특히 비-방사성 할로겐은 미합중국 핵 관리위원회(U.S. Nuclear Regulatory Commission)의 기준을 만족시키는 것 중 하나이다.

[표 1]

표 1

실시예 번호	μCi	nM 캐리어	E ^a (mV)	pH	시간(분)	양극 ^b %	MAb ^b %	미반응 ^b %	각주 ^c
1	200	100	600	7.0	45	7.5	77.2	15.3	1,4,9
2	202	0	600	7.0	325	95.0	0	5.0	1,4,9
3	232	100	600	7.0	192	18.4	81.6	0	1,4,9,11
4	231	0	600	7.0	32	26.8	62.2	11.0	1,5
5	115	0	650	7.0	194	50.3	41.6	8.0	1,5
6	8710	0	650	7.0	121	30.8	61.1	8.2	1,5,10,12
7	332	3.5	650	7.0	220	23.5	-73.8	2.8	1,5
8	272	0	650	8.0	90	32.4	58.4	9.3	1,5
9	306	0	650	7.0	180	13.7	82.9	3.4	1,6,13
10	240	0	650	7.3	106	72.9	8.4	18.7	1,7
11	397	0	650	7.3	240	57.9	24.0	18.1	2,8
12	287	7	650	7.3	90	18.5	72.9	8.6	2,8
13	310	0	600	7.0	30	4.5	0	95.5	3

a = E 는 Ag/AgCl 에 대한 전기분해 전위(mV)이다.

b = 양극%, MAb% 및 미반응%는 전시원-전기분해 시간의 종결시 각각 양극에 결합된 초기 I-125, 항체에 결합된 초기 I-125 및 용액 중에 잔류하는 초기 I-125에 대한 백분율이다.

c = 다음 페이지의 각주 참조.

각주:

1. 양극이 Au 전기주조 메쉬(electroformed mesh)(1000line/in)이다.
2. 양극이 Au 전기주조 메쉬(670line/in)이다.
3. 양극이 Pt 메쉬상 Pt 산화물이다.
4. 양극 전처리 : 방사선 요오드화 전지 외측의 개방 회로에서 요오다이드 용액 중에 침지시킴.
5. 양극 전처리 : 방사선 요오드화 전지내에서 40 또는 50 μM 의 요오다이드를 사용하여 650mV에서 전기분해시킴.
6. 양극 전처리 : 방사선 요오드화 전지내에서 1mM의 요오다이드를 사용하여 650mV에서 전기분해시킴.
7. 양극 전처리 : 방사선 요오드화 전지 외측의 개방회로에서 1mM 요오드에 노출시킴.
8. 양극 전처리 : 방사선 요오드화 전지의 외측에서 1mM 요오드를 사용하여 650mV에서 전기분해시킴.
9. 응집에 대한 HPLC 징후.
10. 면역 반응성=78.4%
11. I-125가 이미 양극상에 흡착된 후에 캐리어 요오다이드를 첨가하였다.
12. 9mg MAb.
13. 6mg MAb.

전해조(10)를 조립하기 전에, 불순물을 제거하기 위하여 분리기(26), 즉, 양이온-교환막을 2M 질산종에서 2시간동안 비점근처에서 가열하였다. 이어서, 막(26)을 인산염 완충 식염수(PBS, phosphate buffered saline) 중에 침지시켜 염 형태로 전환시켰다. 막(26)은 항체가 양극액에서 음극액으로 통과하지 못하게 하였다. 막(26)은 또한 방사성 요오다이드가 양극 격실내에 잔류하도록 하였다.

표 1의 각주에 기술된 방법들중 한가지 방법을 사용하여 전처리한 양극(28)을 사용하여 전해조(10)를 조립하였다. 음극(12) 격실 및 양극(14) 격실 모두를 PBS로 충진시켰다. 캐리어 요오다이드가 사용된 경우에는, 그것을 먼저 양극액에 첨가한 다음 새로 녹인 Mab를 첨가하고 마지막으로 방사성 화합물 I-125를 첨가하였다. 간단히 교반한후, 전체 양극액을 10mL로서 사기를 사용하여 인출(withdraw)한 다음 카핀텍(Capintec)CRC7 방사성 동위원소 검정장치를 사용하여 계수하였다. 양극액을 다시 전해조내에 채우고 교반을 시작한 다음 제어된 전위에서 전기분해를 수행하였다. 포텐시오스태트(potentiostat)는 바이오어널리티컬 시스템즈, 인코포레이티드(Bioanalytical Systems, Inc)(BAS-West Lafayette, IN)에서 공급된 모델 CV1B 사이클릭 볼타모그라프(mode CV1B cyclic voltammograph)였다. 전류는 디지털 전압계를 사용하여 모니터하였다.

양극액을 계수하고 HPLC 분석용의 50μL 샘플을 인출하기 위하여 전기분해를 주기적으로 중단하였다. 샘플을 용출제(400mM PBS를 함유하는 나트륨 아지드) 200μL로 희석시킨 다음 걸 투과 칼럼상에 주입시켰다. UV(280nm) 검출기 및 방사선 검출기를 일렬로 설치하여 미결합 및 MAb-결합 I-125의 상대적인 양을 정량분석하였다.

전기분해 종결후, 때로는 양극(28)을 전해조(10)로부터 회수하여 계수하였다. 계수하였을 경우, 이 측정값을 이용하여 양극(28)상에 흡착된 초기 I-125의 백분율을 직접 얻었다(양극(28)은 단지 일찍이 전기분해후에 상당히 방사성으로 되는 것으로 밝혀진 전지 구성 요소이다). 양극액은 항상 계수하였으며, 양극(28)을 계수하지 않은 경우에는 양극(28)상에 흡착된 양을 초기 계수값과 최종 양극액 계수값 사이의 차이로써 취하였다. 주사기를 사용하여 양극액을 정량적으로 회수하기가 어렵기 때문에, 계수되지 않은 특정 방사능은 잔류 용액내에 존재하는 것으로 가정하였으며, 없어진 양을 양극액 계수값에 부가하였다.

표 1에서 처음 3가지의 실험은 전해조 외측에서 요오다이드에 침지시킨 Au양극을 사용하여 수행하였으며, 거기에서 방사선 요오드화가 일어났다. 가정하건데, 이러한 처리로 인하여 포화 범위의 흡착된 I가 생성되지 않고 개방 부위상에 흡착된 I-125가 이미 흡착된 I와 교환되지 않고 잔류할 수 있었을 것이다. 캐리어 요오다이드를 전혀 사용하지 않은 경우에는 I-125가 양극에 의해 거의 정량적으로 흡수되는 것으로 가정된다. 캐리어 요오다이드를 대량(100nM 요오다이드 대 33.3nM MAb)으로 사용하면 요오드화 수율이 매우 양호하였지만, MAb가 응집되는 징후가 나타났다. 이러한 응집은 일반적으로 그것이 생물학적 분포 및 약리 활성을 변화시킨다는 점에서 생성물에 해로운 것으로 본 기술분야의 전문가들에게 알려져 있다. 실시예 3은 실시예 2와 유사한 방법으로 시작하였으며, I-125가 양극에 의해 흡수되고, 캐리어 요오다이드를 지시된 수준에서 첨가하고 전기분해를 계속 진행시킨 후에 표에 나타난 수율이 얻어지는 것으로 입증되었다.

다음 그룹의 실험(실시예 4 내지 9)에서는, 전해조내에서 요오다이드(MAb가 전혀 존재하지 않음)을 산화시킨 다음(여기서, 방사선 요오드화가 일어난다), 전해조를 광범위하게 세정하여 양극을 전처리하였다(표 1의 각주 5,6). 이러한 전처리와 관련하여, 양호한 수율을 얻기 위해서는 캐리어 요오다이드가 전혀 필요치 않은 것으로 나타났다. 그러나, 별개의 실험에서는 전처리 과정에서 모든 요오다이드 및/또는 요오드를 세척하여 완전히 제거하기가 어려웠으며, 따라서 이들 실험에서 결국에는 미측정 수준의 캐리어를 가질 수 있는 것으로 지적되었다. 어떠한 경우에도 MAb 응집의 징후는 전혀 없었다.

표 1의 다음 그룹의 3가지 실험(실시예 10, 11 및 12)에서는, 캐리어 수준이 정확히 알려지도록 전해조의 외측에서 양극을 전처리하였다(각주 7 및 8). 캐리어를 전혀 첨가하지 않으면 표지된 물질의 수율이 불량하였으며, 결국에는 양극상에서 대부분의 활성이 소실되었다. 그러나, 적당량의 캐리어를 첨가하면 MAb의 응집없이 수율이 상당히 향상되었다. 이상의 결과로부터 캐리어를 적어도 총 요오다이드 대 MAb의 물비가 항체에 대한 손상이 없는 대략 0.2가 되도록 하는 수준이하로 첨가할 수 있음을 알았다.

실시예 1 내지 13은, 사용된 I-125의 양이 양극(28)의 흡착 용량에 비해 매우 적을 경우, 양극의 전처리 방법 및 캐리어 요오다이드의 수준이 표지된 MAb의 수율을 측정하는데 있어서 매우 중요한 인자였음을 예시한다. 비-방사성 요오다이드를 사용한 양극 전처리 방법이 양극을 미리 침지시키는 방법이기 보다는 전기 분해 방법인 경우에 캐리어를 거의 또는 전혀 사용하지 않고서 70 내지 80% 범위의 표지된 MAb의 수율(초기 I-125 기준)이 달성되었다.

[실시예 14]

용액상 캐리어를 사용하지 않은 단클론성 항체의 요오드화

실시예 14는 생산 등급 활성 수준의 I-125를 사용하는 경우 용액상 캐리어를 사용하지 않고서도 유사하거나 보다 우수한 수율이 얻어짐을 예시한다.

I-125로 종양-특이 MAb를 방사선 요오드화하는 개선된 방법에 본 발명의 전해조를 사용하였다. 이러한 물질은 예를 들면 작은 종양, 또는 달리 말하면 외과적 절제를 요하는 검출되지 않을 수 있는 종양의 검출에 유용하다.

5mL의 양극액 부피 및 2.9cm²(일족)의 기하학적 양극 표면적을 제공하도록 전해조를 구성하였다. 양극 및 음극 격실을 격리시키는데 사용된 막은 나피온(Nafion) 117 강양이온 교환막이었다. 양극 재료는 요오드 흡착 부위를 포화시키기 위하여 비-방사성 요오다이드의 1mM 용액을 전기분해하여 전처리시킨 금 전기 주조 메쉬(670Line/in)였다. 본 실험에 사용된 양극을, 요오다이드 전기분해를 반복하지는 않았지만 실험들 사이에서 1M NaOH로 침지시킨 다음 인산염-완충 식염수(PBS)로 조심스럽게 세정한 2가지의 선행 실험에도 사용하였다.

방사선 요오드화에 하기 절차를 이용하였다 : 60mg의 항체를 함유하는 PBS 2mL, I-125 용액(105mCi) 1mL 및 총 부피를 5mL로 만들기에 충분한 양의 pH7의 PBS를 양극 격실에 첨가하였다. 음극 격실은 PBS로 충진

시켰다. 양극액을 자기적으로 교반하면서 +0.650V(은/염화은 참조전극에 대해)에서 전기 분해를 개시시켰다. 90분후에 전기분해를 정지시키고 양극액을 제거하였다. 양극액 및 전해조를 계수하여 양극에서의 흡착에 대한 방사성 요오다이드의 손실을 측정하였다. 전기분해후, 양극액중에는 96.4mCi가 존재한 반면 전해조내에는 8.6mCi가 잔류하였다.

트리클로로아세트산으로 침전시킨 결과 양극액 방사능의 5.0%가 항체에 공유결합되지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 총 양극액 계수값과 함께 초기 I-125를 기준한 방사선 요오드화 생성물의 총 수율이 87%임을 보여주었다. 양극액을 HPLC 분석한 결과 방사선 표지된 항체의 97%(97%)이 단량체 형태로 존재하였으며, 방사선 표지된 항체의 82.7%가 면역 반응성인 것으로 나타났다.

MAb의 방사선 할로겐화를 달성할 수 있다는 것외에도, 본 발명의 전해조 및 그의 사용방법을 이용하여 다른 단백질, 펩티드 및 유기 분자를 방사선 할로겐화시킬 수도 있다.

하기의 특정 실시예들은 본 발명의 몇가지 실시태양에 관한 것이며, 이들이 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.

[실시예 15]

pH 9.0에서 티로신의 요오드화

Pt금속망 음극, 금 전기주조 메쉬 양극(670 Line/in, 기하학적 면적 3.5cm²) 및 나피온 117 양이온 교환막 분리기로 전해조를 구성하였다. 촉매는 pH 9.0의 완충액(0.2M 인산 칼륨, 0.10M 염화나트륨, NaOH로써 pH 9.0 으로 조정함)이다. 양극액은 pH 9.0 완충액 중의 3.0mM의 1.07mM L-티로신(3.07 마이크로몰)과 2.0mM의 pH 9.0 완충액으로 구성되었다. 150μM의 10.0mM NaI 용액(1.53 마이크로몰 요오드)을 주사기를 통해 양극액에 첨가하고 전기분해를 Ag/AgCl(3M KCl)에 대해 +600mV로 수행하였다. 양극액을 자기적으로 교반시켰다. 90분 후에, 전기분해를 종결시키고 고압 액체 크로마토그래피를 사용하여 양극액을 분석하였다. 요오다이드 전환율이 84%일 때, 초기 요오다이드를 기준으로 3-요오도-L-티로신의 수득율은 72%였다.

[실시예 16]

티로신의 요오드화전의 음이온 교환막상에서의 금 양극의 화학증착

다음과 같은 방법으로 금을 라이포어 4030 음이온 교환막상에 화학적으로 증착시켰다: 막 자체를 분리기로서 가진 2개의 격실 반응기를 사용하여 0.02M AuCl(pH 1) 용액을 일측에 넣고 다른 측에는 0.1M 히드라진 용액(pH 13)을 넣었다. 45분후, 금속화된 막을 반응기로부터 제거하여 탈이온수로 세정한 다음 70% 메탄올, 30% 물중의 요오드(1mM) 용액 중에 10분간 침지시켰다. 이어서, 금속화된 막을 70% 메탄올로 수회 세척한 다음 몇가지의 변형된 pH 9.0 완충액에 침지시켰다. 동일한 전해조내에서 상기 금속화된 막을 양극 및 분리기로 사용하여 전기분해를 행한 다음 실시예 15에서와 동일한 절차에 따랐다. 88% 요오다이드 전환율에서, 3-요오도-L-티로신의 수율은 초기 요오다이드를 기준으로 40%였다(양극액은 단지 표본이었다).

[실시예 17]

티로신의 요오드화전의 음극액에 대한 요오다이드의 부가

화합물을 방사성 요오드로 표지화하는 경우, 몇몇 경우에는 과도하게 긴 전기분해 시간에 의존하지 않고서도 전기분해 후 생성물 용액 중에 잔류하는 미반응 방사성 요오다이드를 최소화시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 내용은 비-방사성 요오다이드와 함께 하기 방법으로 본 발명을 사용함으로써 입증될 수 있다: 실시예 16에 기술된 금속화된 막을 사용하여 전해조를 조립하였다. 요오다이드를 음극액에 첨가하고 양극액 및 음극액 모두를 자기적으로 교반하였다는 것을 제외하고는 실시예 15에서와 같이 전기분해를 행하였다. 3-요오도-L-티로신의 수율은 음극액에 첨가된 초기 요오다이드를 기준으로 45%였으며, 양극액 내의 요오다이드의 농도를 사실상 0이었다.

[실시예 18]

pH 7.0에서의 티로신의 요오드화

양극액 및 음극액의 pH가 7.0이었다는 것을 제외하고는 실시예 15에서와 동일한 전해조, 양극, 막 및 절차를 이용하여 전기 분해를 수행하였다. 85% 요오다이드 전환율에서, 3-요오도-L-티로신의 수율은 초기 요오다이드를 기준으로 58%였다.

[실시예 19]

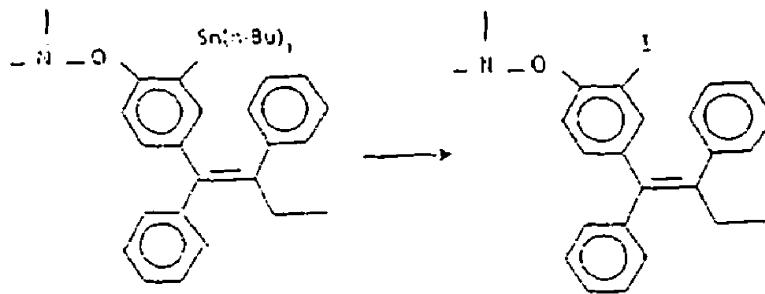
티로신의 요오드화전의 한외여과막상에서의 금 양극의 증착

폴리실론 한외여과막(분자량 약 100,000) 상에 금을 150 Å 두께로 증착시켰다. 실시예 18에서와 동일한 절차에 따라 상기 금속화된 막 조립체를 사용하여 L-티로신을 요오드화시켰다. 45% 요오다이드 전환율에서, 3-요오도-L-티로신의 수율은 초기 요오다이드를 기준으로 54%였다(실험 오차내에서의 100% 요오드화 선택도).

[실시예 20]

비-스테로이드계 에스트로겐의 요오드화

전해조를 사용하여 하기의 요오도데스테닐화 반응(iododes-tannylation reaction)을 수행하였다:

반응식 1트리- α -부틸스테닐 에스트라디올

요오도 타목시펜

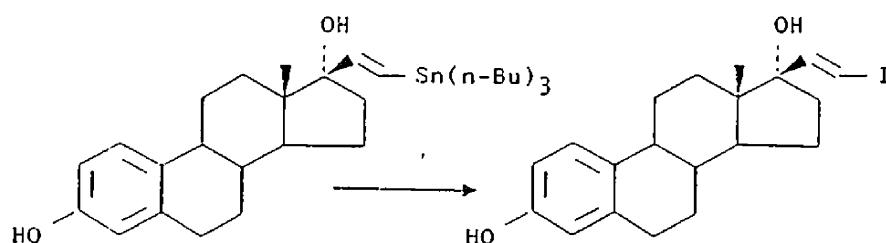
타목시펜(tamoxiphen)은 생체내에서 에스트로겐 수용체에 대한 친화도 및 항에스트로겐 활성을 갖는 비-스테로이드계 에스트로겐 유사물이다. 방사선 표지된 요오도 유도체는 수용체에 대한 감마선 방출 트레이서(tracer)로서 상당히 유용하다. 본 실시예에서, 요오도 타목시펜은 본 발명의 적용성을 입증하기 위하여 비-방사성 요오다이드를 이용하여 제조한다.

Pt/Rh 금속망 양극(10% Rh, 80 메쉬), Pt 금속망 음극 및 Nafion™ 117 양이온 교환막 분리기를 사용하여 전해조를 조립하였다. 음극액은 pH 7.0의 수성 완충액이었다. 양극액은 트리- n -부틸스테닐 타목시펜 0.086g(0.00013mol) 및 NaI 0.042g(0.00028mol)을 함유하는 대략 5mL의 메탄올로 구성하였다. 양극액에 다른지지 전해질은 전혀 첨가하지 않았다. 양극액을 대략 2.5시간동안 자기적으로 교반하면서 Ag/AgCl(3M KCl)에 대해 +500mV에서 전기분해를 행하였다. 이때, 양극액을 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용출제: 클로로포름 중 5% 메탄올)한 결과 트리- n -부틸스테닐 타목시펜이 완전히 전환된 것으로 나타났다. 양극액을 전해조로부터 회수하여 디에틸 에테르 30mL로 희석시킨 다음 10% 나트륨 메타비설파이트 10mL 및 10mL 분량의 1M NaOH로 2회 세척하였다. 유기상을 분리하여 무수 황산마그네슘상에서 건조시킨 다음 여과하였다. 무수 질소의 부드러운 스트림하여 용매를 증발시킨 결과 무색 오일 0.051g(0.00010mol)을 수득하였다. 수득된 생성물의 1 H 및 13 C NMR 스펙트럼은 목적 화합물인 요오도타목시펜과 일치하였다.

[실시예 21]

17- α -(트리부틸스테닐)-비닐에스트라디올의 요오드화

17- α -요오도비닐에스트라디올의 방사선 표지된 유도체도 또한 에스트로겐 수용체 부위에 선택적으로 결합하는 감마선 방출약제로서 유용하다. 본 실시예는 17- α -(트리부틸스테닐)-비닐에스트라디올의 요오도 스태닐화를 통한 17- α -요오도비닐에스트라디올의 합성을 위한 전해조의 효용을 설명한다:

반응식 217- α -(트리부틸스테닐)비닐
에스트라디올17- α -요오도비닐에스트라디올

금 전기주조 메쉬 양극(기하 표면적 3.9cm²), 304 스테인레스강 금속망 음극(40 메쉬) 및 Nafion™ 117 양이온 교환막 분리기를 사용하여 전해조를 조립하였다. 음극액은 pH 7.0의 완충액으로 구성하였다. 양극액은 17- α -(트리부틸스테닐)-비닐에스트라디올 0.060g(0.00010mol) 및 NaI 0.031g(0.00010mol)이 첨가된 메탄올 중 10% 물 5mL로 구성하였다. 박층 크로마토그래피(실리카겔, 용출제: 헥산중 10% 에틸아세테이트)가 17- α -(트리부틸스테닐)-비닐에스트라디올의 완전 전환을 나타낼 때까지 자기적으로 교반하면서 +600mV(Ag/AgCl에 대해, 3M KCl)에서 전기분해를 행하였다. 양극액을 클로로포름 20mL로 희석시킨 다음, 10% 수성 나트륨 메타비설파이트/1% 불화칼륨으로 1회 추출하였다. 수성상을 새로운 클로로포름 10mL로 1회 추출하였다. 클로로포름 추출물을 합하여 무수 황산마그네슘상에서 건조시킨 다음

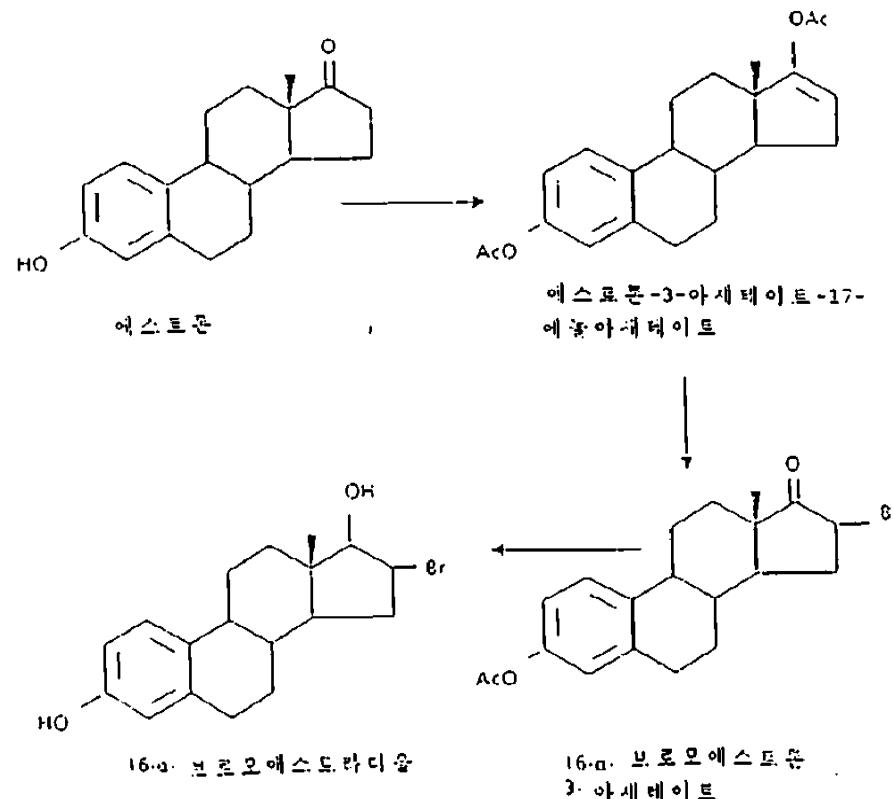
여과하였다. 무수 질소 스트립하에 용매를 증발시킨 결과 백색 고체 0.056g을 수득하였다. 수득된 물질을 용매중에 용해시키고, 12g의 40 μ 실리카겔 및 25% 에틸 아세테이트/헥산 용출제를 사용하여 플래쉬 크로마토그라피하였다. 균질 분획을 합한 다음 용매를 증발시켜 백색 고체 0.030g(0.000071mol)을 수득하였다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼, 고속 원자 충격 질량 스펙트럼 및 화학적 요오드화 질량 스펙트럼은 모두 목적 생성물인 17- α -요오도비닐에스트라디올의 구조와 일치하였다.

[실시예 22]

에스트론 에놀디아세테이트의 브롬화

16- α -[^{77}Br] 브로모에스트라디올은 에스트로겐 수용체를 함유하는 인간의 유방 종양(breast tumor)을 영상화하는데 대해 상당한 효용을 가지고 있다. 전해조를 중간체 에스트론 에놀디아세테이트의 브롬화에 적용시킨 본 실시예는 에스트론으로부터 본 화합물의 비-방사성 유사물을 합성하는 방법을 예시한다.

반응식 3



이소프로펜일 아세테이트 15mL, 에스트론 2.0g(0.0074mol) 및 촉매 용액(5mL 이소프로펜일 아세테이트중의 0.1mL의 진한 황산) 0.6mL를 2.5시간 동안 환류시켰다. 이어서 1.5시간에 걸쳐 대략 4mL의 용매를 증류하였다. 촉매 용액 0.5mL를 함유하는 이소프로펜일 아세테이트 10mL를 첨가하고, 혼합물을 서서히 증류시켜 전체 부피의 약 1/2을 제거하였다. 잔류 혼합물을 빙욕에서 냉각시키고 무수 디에틸에테르 50mL로 희석시킨 다음 포화 수성 중탄산나트륨 10mL로 세척하였다. 유기상을 무수 황산 마그네슘상에서 건조시켜 여과한 다음 증발 건조시켰다. 잔사를 헥산중 20% 에틸 아세테이트 1L에 용해시킨 다음 80 내지 200 메쉬 중성 알루미나의 짧은 칼럼(5cm 길이 × 2cm 직경)에 통과시켰다. 이어서, 용액을 감압하에 약 50mL 부피로 증발시키고, 생성물을 재결정시켜 백색 결정(융점: 149-150°C, 문현치 149-150°C)을 1.56g 수득하였다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 목적하는 에놀디아세테이트(에스트론-3-아세테이트-17-에놀아세테이트)와 일치하였다.

Pt/Rh 금속망 양극(80 메쉬, 기하 표면적 3.9cm²), 304 스테인레스강 음극(40 메쉬) 및 Nafion™ 117 양이온 교환막 분리기를 사용하여 전해조를 조립하였다. 양극액 및 음극액에 대하여 각각 테트라하이드로푸란 10mL, 디에틸에테르 7mL 및 완충액(85% 아세트산, 15% 물의 혼합용액 50mL 중의 칼륨 아세테이트 2.18g) 33mL로 구성된 전해액을 사용하였다. 양극액은 에스트론-3-아세테이트-17-에놀아세테이트 0.039g(0.00011mol) 및 브롬화나트륨 0.013g(0.00013mol)을 함유하는 전해질 5mL이었다. 박층 크로마토그라피(실리카겔, 용출제: 헥산중 20% 에틸 아세테이트)가 에스트론-3-아세테이트-17-에놀아세테이트의 완전 전환을 나타낼 때까지 양극액을 자기적으로 교반하면서 +1200mV(Ag/AgCl, 3M KCl)에서 전기분해를 행하였다. 양극액을 물 25mL에 첨가하고, 혼합물을 10mL 분량의 디에틸 에테르로 3회 추출하였다. 에테르 추출물을 합하여 무수 황산마그네슘상에서 건조시킨 다음 여과하였다. 무수 질소의 스트립하에 용매를 제거한 결과 백색 고체 0.032g(0.000082mol)이 남았다. 생성물의 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 16- α -브로모에스트론-3-아세테이트와 일치하였다.

16- α -브로모에스트론-3-아세테이트 0.064g(0.00016mol)을 테트라하이드로푸란(THF) 5mL에 용해시키고, 이소프로판올/무수 빙욕중에서 질소하에 -78°C로 냉각시켰다. THF중의 1.0M 수소화 리튬 알루미늄 2mL를 신속하게 자기적으로 교반하면서 서서히 첨가하였다. 10분간 교반한 후, (-78°C로 예비 냉각시킨) THF 중의 1:1 에틸 아세테이트 4mL를 첨가하여 혼합물을 급냉시켰다. 혼합물을 5분 동안 교반한 다음, 이소프로판올/무수 빙욕을 빙욕으로 대체하였다. 냉각된 3M 수성 HCl 10mL를 서서히 첨가하여 급냉을 완결하였다. 3M HCl 10mL를 첨가하고, 혼합물을 실온으로 가온시켰다. 10mL 분량의 디에틸 에테르로 혼합물을 3회 추출하였다. 에테르 추출물을 합하여 무수 황산마그네슘상에서 건조시킨 다음 여과하였다. 무수 질소 스트림하에 용매를 증발시켜 담록색 잔사 0.075g을 수득하였다. 본 잔사를 박층 크로마토그라피(실리카겔, 용출제: 헥산중 25% 에틸 아세테이트)한 결과는 적어도 5개의 성분을 나타내었다. 혼합물을 플래쉬 크로마토그라피(15g 40메쉬 실리카겔, 용출제: 헥산중 25% 에틸 아세테이트)하였다. 균질 분획을 합한 다음 용매를 증발시켜 백색 고체(주성분, $R_f=0.31$) 0.024g을 수득하였다. 이 생성물의 1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 16- α -브로모에스트라디올과 일치하였다. ^{13}C NMR 데이터는 17-위치에서의 입체화학이 알파임을 시사한다.

[실시예 23]

단클론성 항체 B72.3의 방사선 요오드화

금 전기주조 메쉬 양극(670line/in, 1mM 비-방사성 요오드에 침지시켜 전처리), 304 스테인레스강 메쉬 음극, 및 NafionTM 117 양이온 교환막 분리기를 사용하여 전해조를 조립하였다. 음극실내에 pH7의 PBS 3mL를 넣었다. 양극실에는 항체 15mg, 1.44mCi의 I-125 및 22nM의 캐리어 요오다이드(40mCi I-125에 상당하는 총 요오다이드)를 함유하는 pH 8.1의 PBS 3mL를 첨가하였다. 자기적으로 교반하면서, +800mV(Ag/AgCl, 3M Cl⁻)에서 전기분해를 행하였다. 30분 경과후에 취한 중간 샘플은 71.8%의 요오드화 수율을 나타내었다. 90분후, 초기 I-125의 9.5%가 양극상에 흡착된 반면, 4.5%는 항체에 결합하지 않은채로 용액 중에 잔류하였으며, 요오드화 수율은 86.0%였다.

[실시예 24]

단클론성 항체 B72.3의 방사선 요오드화

양극 전위를 +850mV로 정치시킨 반면 동일한 참조전극을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 23에서 수행한 방사선 요오드화를 반복하였다 30분 경과후에 취한 샘플은 단지 31.8%의 요오드화 수율을 나타내었다.

실시예 15 내지 24는 본 발명 전해조의 추가 용도를 예시한 것이다. 실시예 15 및 18은 L-티로신의 요오드화에 대한 pH의 효과를 예시한 것이다. 반면에, 실시예 16 및 17은 각 실험에서 음이온 교환막을 가진 전해조를 사용하여 양극액에 요오다이드를 첨가한 경우와 음극액에 첨가한 경우를 비교한 것이다. 요오다이드를 음극액에 첨가한 경우의 잇점은 생성물 용액내에서 미반응 요오다이드가 최소화된다는 것이다. 실시예 16, 17 및 19는 또한 분리기(26)를 양극 재료 증착용의 고체 지지체로서 제공하여 양극(28)이 분리기(26)에 인접되도록 한 경우의 실례이다. 마지막으로, 실시예 20, 21, 22, 23 및 24는 다른 유기 분자의 할로겐화를 예시한 것이다.

상기 실시예에서, 편리하게는 주위온도를 선택하지만, 표지화할 물질의 안정성과 관련하여 더 낮거나 더 높은 온도를 사용할 수도 있다. pH, 및 완충제 성분의 농도 및 특성도 또한 표지화할 물질의 안정성을 고려하여 광범위하게 변할 수 있다. 사용 전극의 전위, 사용 전극 면적 대 사용 전지 부피의 비 및 참조전극의 존재는 단백질에 대한 산화적 손상을 최소화하면서 최대의 표지화 속도를 달성할 수 있는 수단들이다.

상기 상세한 설명은 단지 이해를 돋기 위한 것이고, 본 발명이 이들로 제한되는 것으로 이해되어서는 안 되며, 본 발명 범주내에서의 변경은 본 기술분야의 전문가들에게 자명할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

(a) 분리기(separator)에 의해 격리된 음극 반전지 및 양극 반전지; (b) 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 하나내에 있는 사용전극; (c) 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 다른 하나내에 있는 반대전극; 및 (d) 상기 사용 전극을 함유하는 상기 반전지내에 및 상기 사용 전극과 상기 반대 전극 사이의 전류 통로 외측에 위치한 참조전극을 포함하는, 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자를 표지화하기 위한 전해조.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사용 전극이 금, 백금 및 90% 백금/10% 로듐의 합금중에서 선택된 금속으로 제조된 전해조.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 반대 전극이 스테인레스강 및 백금중에서 선택된 금속으로 제조된 전해조.

청구항 4

제1항에 있어서, 사용 전극 재료가 상기 분리기상에 증착된 전해조.

청구항 5

제1항, 제2항 또는 제4항에 있어서, 상기 사용 전극이 다공성 전극인 전해조.

청구항 6

제1항, 제2항 또는 제4항에 있어서, 상기 사용 전극이 다공성 전극이고 상기 분리기에 바로 인접하여 위치되어 있는 전해조.

청구항 7

제1항, 제2항 또는 제4항에 있어서, 상기 사용 전극이 다공성 전극이고 상기 분리기에 바로 인접하여 위치되어 있으며 비-방사성 표지화제로 전처리된 전해조.

청구항 8

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 분리기가 음이온 교환막 또는 양이온 교환막인 전해조.

청구항 9

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 분리기가 음이온 교환막 또는 양이온 교환막이고, 상기 사용 전극이 다공성 전극인 전해조.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 사용 전극이 비-방사성 할로겐으로 전처리된 전해조.

청구항 11

(a) 개구부를 한정하는 환상 고리를 가진 제1음극 반전지 및 개구부를 한정하는 환상 고리를 가진 제2양극 반전지(이때, 상기 제1환상 고리와 상기 제2환상 고리는 서로 대향되어 있다); (b) 상기 제1환상 고리에 인접한 제1가스켓; (c) 상기 제1가스켓에 인접한 분리기; (d) 상기 분리기에 인접하여 있고, 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 하나내에 위치한 다공성 사용 전극; (e) 상기 사용 전극을 전원에 접속시키기 위하여 상기 사용 전극을 작동가능하게 결합시키는 전기 접촉수단; (f) 상기 제2환상 고리에 인접한 제2가스켓; (g) 상기 제1가스켓, 상기 분리기, 사이 다공성 사용 전극 및 상기 제2가스켓이 샌드위치식으로 사이에 삽입되도록 하는 방식으로 상기 제1환상 고리를 상기 제2환상 고리에 클램핑 고정하기 위한 수단; (h) 상기 음극 반전지와 상기 양극 반전지중 다른 하나내에 있는 반대 전극; 및 (i) 상기 사용 전극을 함유하는 상기 반전지내에 및 상기 다공성 사용 전극과 상기 반대 전극 사이의 전류 통로 외측에 위치한 참조전극을 포함하는, 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자를 표지화하기 위한 전해조.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 다공성 사용 전극이 금, 백금 및 90% 백금/10% 로듐의 합금중에서 선택된 금속으로 제조된 전해조.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 반대 전극이 스테인레스강 및 백금중에서 선택된 금속으로 제조된 전해조.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 다공성 사용 전극이 비-방사성 할로겐으로 전처리된 전해조.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 전기 접촉 수단이 금속 접촉 고리인 전해조.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 사용 전극 재료가 상기 분리기상에 증착된 전해조.

청구항 17

제11항에 있어서, 상기 다공성 사용 전극이 상기 분리기에 바로 인접하여 위치된 전해조.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 다공성 사용 전극이 비-방사성 할로겐으로 전처리된 전해조.

청구항 19

제11항, 제16항 또는 제18항에 있어서, 상기 분리기가 음이온 교환막 또는 양이온 교환막인 전해조.

청구항 20

제11항, 제16항 또는 제18항에 있어서, 상기 분리기가 음이온 교환막 또는 양이온 교환막이고, 상기 다공성 사용 전극이 상기 분리기에 바로 인접하여 위치된 전해조.

청구항 21

(a) 분리기에 의해 격리된 음극 반전지 및 양극 반전지; (b) 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 하나내에 있는 사용 전극; (c) 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 다른 하나내에 있는 반대 전극; (d) 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지 중 어느 하나에 인접한 고정 바아 및 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중 다른 하나에 인접한 가동 바아를 가진 클램프; 및 (e) 상기 전해조에 클램프 고정력을 가하고 상기 분리기를 상기 음극 반전지와 상기 양극 반전지 사이에서 지지시키기 위하여 상기 고정 바아

와 상기 가동 바아를 함께 연결시키는 수단을 포함하는 전해조.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 고정 바아가 열 흡입장치(heat sink)인 전해조.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 열 흡입장치가 기부 및 전해조를 둘러싼 직립 벽으로 구성되어 있는 전해조.

청구항 24

제21항 또는 제23항에 있어서, 상기 고정 바아 및 상기 가동 바아가 전해조 후측의 형상에 맞게 형성된 전해조.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 고정 바아 및 상기 가동 바아가 전해조 후측의 형상에 맞게 형성되고, 상기 고정 바아, 상기 가동 바아 및 전해조의 후측이 편평한 전해조.

청구항 26

제21항 또는 제25항에 있어서, 상기 사용 전극을 함유하는 상기 반전지내에 놓인 참조전극을 추가로 포함하는 전해조.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 사용 전극이 금, 백금 및 90%백금/10% 로듐의 합금중에서 선택된 금속으로 제조된 전해조.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 반대 전극이 스테인레스강 및 백금중에서 선택된 금속으로 제조된 전해조.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 사용 전극이 비-방사성 할로겐으로 전처리된 전해조.

청구항 30

제21항에 있어서, 상기 분리기가 음이온 교환막 또는 양이온 교환막인 전해조.

청구항 31

제21항에 있어서, 상기 사용 전극이 다공성 전극인 전해조.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 상기 사용 전극이 상기 분리기에 바로 인접하여 위치된 전해조.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 사용 전극이 비-방사성 표지화제로 전처리된 전해조.

청구항 34

제32항에 있어서, 상기 양극 반전지의 부피에 대한 상기 사용 전극의 표면적 비가 0.001 내지 5000cm^{-1} 인 전해조.

청구항 35

제32항에 있어서, 상기 양극 반전지의 부피에 대한 상기 사용 전극의 표면적 비가 0.05 내지 10cm^{-1} 인 전해조.

청구항 36

(a) 분리기에 의해 격리된 음극 방전지 및 양극 반전지를 가진 전해조를 제공하고; 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중의 하나내에 다공성 사용 전극을 제공하고; 상기 음극 반전지 및 상기 양극 반전지중의 다른 하나내에 반대 전극을 제공하고; 상기 사용 전극을 함유하는 상기 반전지내에 및 상기 다공성 사용 전극과 상기 반대 전극 사이의 전류 통로 외측에 참조전극을 제공하고; (b) 상기 사용전극을 함유하는 상기 반전지내에 표지화할 물질을 삽입하고; (c) 상기 표지화할 물질을 표지화제와 접촉시키고; 이어서 (d) 상기 전해조에 전류를 통과시킴을 포함하는, 단백질, 펩티드 및 기타 유기 분자를 표지화하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 다공성 사용 전극을 상기 분리기에 바로 인접하여 위치시킴을 포함하는 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 분리기로서 음이온 교환막 또는 양이온 교환막을 제공함을 포함하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 막이 음이온 교환막이고, 상기 접촉단계가, 상기 표지화제를 상기 반대 전극을 함유하는 상기 반전지에 첨가하여 상기 표지화제가 상기 음이온 교환막을 통하여 표지화할 물질과의 반응을 위한 상기 다공성 사용 전극으로 이동되도록 하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 40

제37항에 있어서, 상기 다공성 사용 전극을 제공하는 단계가 상기 분리기상에 사용 전극재료를 중착시킴을 포함하는 방법.

청구항 41

제38항에 있어서, 상기 다공성 사용 전극을 금, 백금 및 90% 백금/10% 로듐의 합금중에서 선택된 금속으로 제조함을 포함하는 방법.

청구항 42

제38항 또는 제41항에 있어서, 상기 반대 전극을 스테인레스강 및 백금중에서 선택된 금속으로 제조함을 포함하는 방법.

청구항 43

제38항에 있어서, 상기 전류를 통과시키는 단계가 상기 참조전극을 사용하여 사용 전극 전위를 제어하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 접촉단계가 상기 사용 전극을 함유하는 상기 반전지에 상기 표지화제를 첨가하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 상기 접촉단계가, 상기 표지화제를 상기 반대 전극을 함유하는 상기 반전지에 첨가하여 상기 표지화제가 상기 분리기를 통하여 표지화할 물질과의 반응을 위한 상기 다공성 사용 전극으로 이동되도록 하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 46

제37항에 있어서, 상기 표지화제가 방사성 표지화제인 방법.

청구항 47

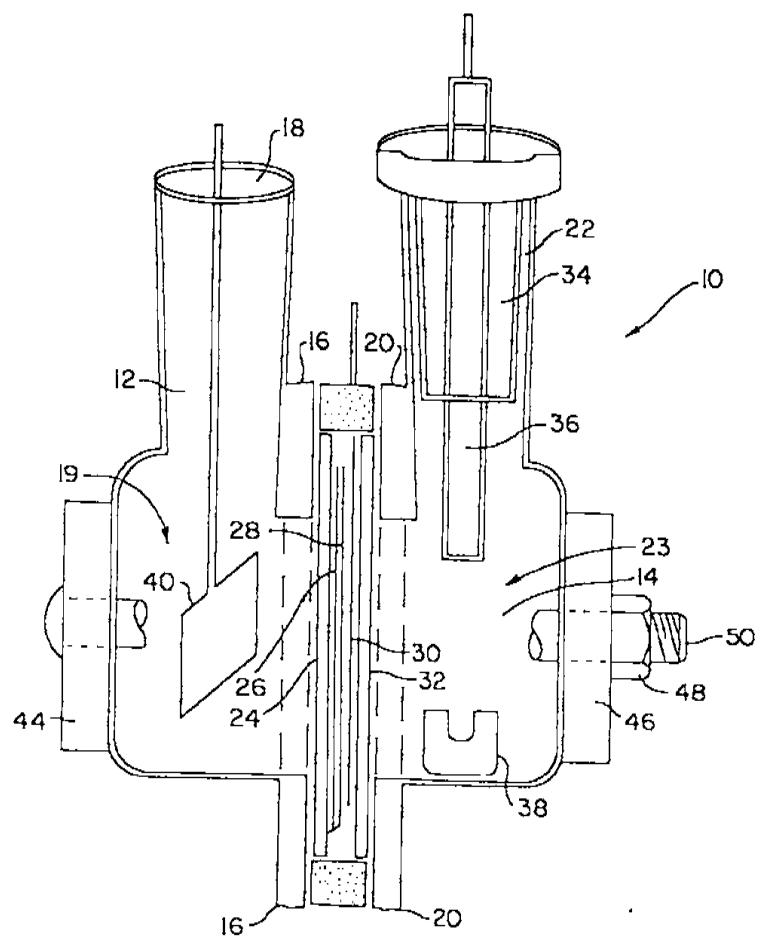
제46항에 있어서, 상기 방사성 표지화제가 방사성 할로겐화물인 방법.

청구항 48

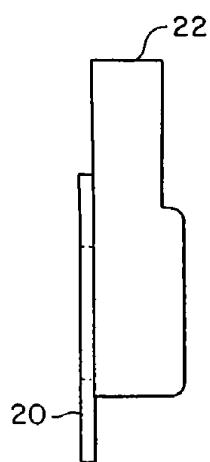
제47항에 있어서, 상기 방사성 할로겐화물이 I-125인 방법.

도면

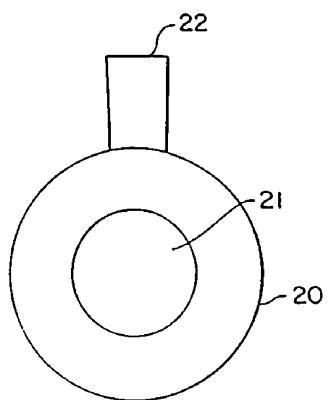
도면1



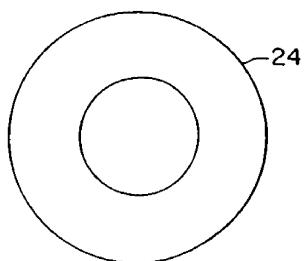
도면2



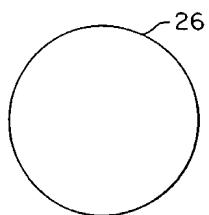
도면3



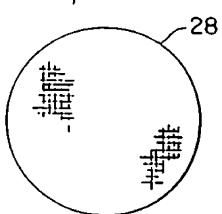
도면4



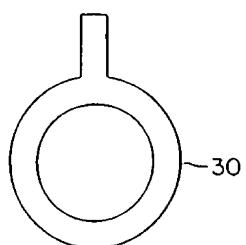
도면5



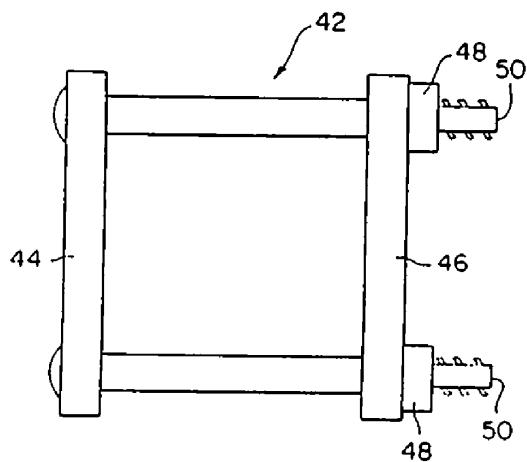
도면6



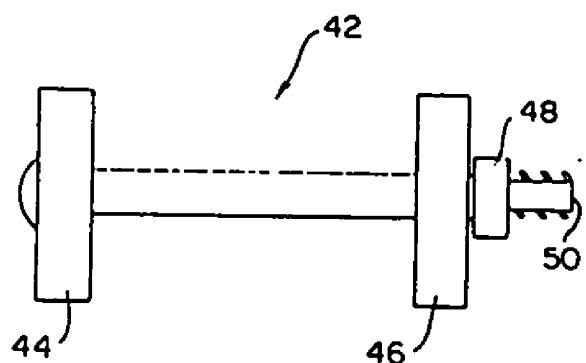
도면7



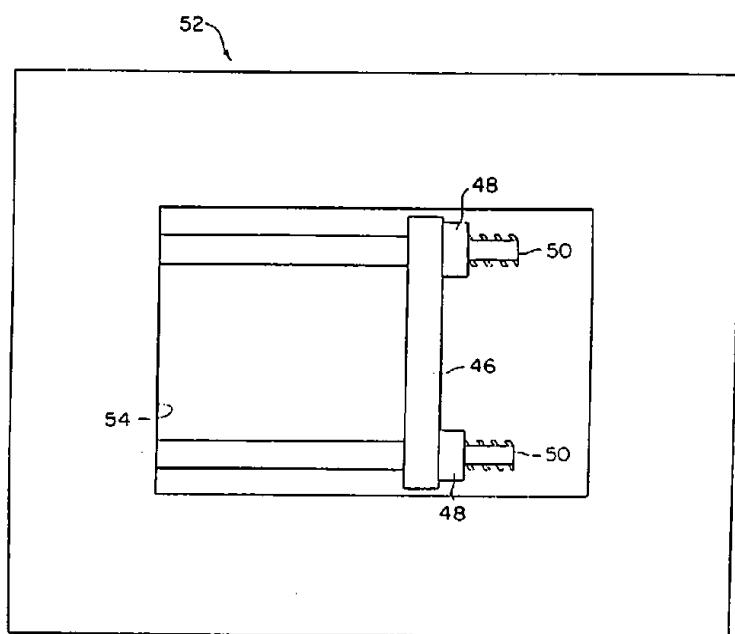
도면8



도면9



도면10



도면11

