

방사면역치료용 ¹⁸⁸Re 표지 항체의 안정성과 안정제의 효과

서울대학교 의과대학 핵의학교실¹, 이화여자대학교 약학대학²

장영수^{1,2} · 김보광¹ · 정재민¹ · 정준기¹ · 이승진² · 이동수¹ · 이명철¹

Stability of ¹⁸⁸Re Labeled Antibody for Radioimmunotherapy and the Effect of Stabilizing Agents

Young Soo Chang, M.S.^{1,2}, Bo Kwang Kim, M.S.¹, Jae Min Jeong, Ph.D.¹, June-Key Chung, M. Seung Jin Lee, Ph.D.², Dong Soo Lee, M.D.¹ and Myung Chul Lee, M.D.¹

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine,¹
College of Pharmacy, Ewha Womans University,² Seoul, Korea

Abstract

Purpose: For clinical application of beta-emitter labeled antibody, high specific activity is important. Carrier-free ¹⁸⁸Re from ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re generator is an ideal radionuclide for this purpose. However, low stability of ¹⁸⁸Re labeled antibody, especially in high specific activity, due to radiolytic decomposition by high energy (2.1 MeV) beta ray was problem. We studied the stability of ¹⁸⁸Re labeled antibody, and stabilizing effect of several stabilizers. **Materials and Methods:** Pre-reduced monoclonal antibody (CEA79.4) was labeled with ¹⁸⁸Re by incubating with generator-eluted ¹⁸⁸Re-perrhenate in the presence of stannous tartrate for 2 hr at room temperature. Radiochemical purity of each preparation was determined by chromatography. Human serum albumin was added to the labeled antibodies (2%). Stability of ¹⁸⁸Re-CEA79.4 was investigated in the presence of ascorbic acid, ethanol, or Tween 80 as stabilizing agents. **Results:** Labeling efficiencies were 88±4% (n=12). Specific activities of 1.25~4.77 MBq/μg were obtained. If stored after purging with N₂, all the preparations were stable for 10 hr. However, stability decreased in the presence of air. Perrhenate and ¹⁸⁸Re-tartrate was major impurity in declined preparation. Colloid-formation was not a significant problem in all cases. Addition of ascorbic acid stabilized the labeled antibodies either under N₂ or under air by reducing the formation of perrhenate. **Conclusion:** High specific activity ¹⁸⁸Re labeled antibody is unstable, especially, in the presence of oxygen. Addition of ascorbic acid increased the stability. (Korean J Nucl Med 2002;36:195-202)

Key Words: Antibody, Stability, ¹⁸⁸Re, Ascorbic acid

Received Mar 19, 2002; revision accepted June 10, 2000
Corresponding author: Jae Min Jeong., M.D., Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, 28, Yongun-dong Chongno-ku, Seoul, 110-744, Korea
Tel: 02-760-3805, Fax: 02-745-7690
E-mail: jmjng@snu.ac.kr
* 이 연구는 2002년도 IMT-2000 출연금 기술개발 지원사업의 지원을 받았음.

서 론

핵의학 분야에서 방사성동위원소를 표지한 단일 클론항체를 종양의 진단이나 치료에 사용하고자하는 노력이 많이 있었다.^{1,3)} 특히 물리적 특성이 우수하고 이용이 용이한 ^{99m}Tc이 표지된 단일클론항체의

경우 임상적으로 방사면역신티그라피에 이용한 보고가 있다.^{4,5)} 치료용 방사성 핵종으로는 알파선 방출 핵종과 베타선 방출 핵종이 있는데 주로 베타선 방출 핵종을 이용한 연구가 많다.⁶⁾ 방사면역치료용으로 적당한 베타선을 방출하는 방사성 핵종으로는 ¹³¹I, ³²P, ⁹⁰Y 등이 있으며 최근에는 ¹⁶⁶Ho, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re 등과 같은 핵종이 관심을 받고 있다.^{6,9)} 이 중 ¹⁸⁸Re은 발생기를 이용하여 무담체로 쉽게 얻을 수 있고, 치료용으로 적합한 여러 가지 물리적($E_{\beta \text{max}}=2.1 \text{ MeV}$, $t_{1/2}=16.9 \text{ hr}$), 화학적 성질을 가지고 있으며, 영상화에 적합한 감마에너지(155 keV, 15%)를 방출한다.¹⁰⁻¹⁴⁾ 또한 주기율표상 ^{99m}Tc과 같은 족으로 화학적 성질이 비슷하여 항체에 표지하는데 효과적이다.

항체에 방사성 핵종을 표지하는 방법으로는 항체에 결합하는 착화제를 이용하여 간접적으로 표지하는 방법과 항체에 직접 표지하는 방법이 있다. 직접법을 이용할 경우 간접법에 비하여 표지방법이 간단하고 표지효율이 높아 비교적 비방사능이 높은 방사성 핵종표지 항체를 얻을 수 있다.^{9,15-18)} 예를 들면 골수성 백혈구 세포에 존재하는 NCA-95에 대한 단일클론항체 CEA79.4에 ^{99m}Tc과 ¹⁸⁸Re을 직접법으로 표지하여 그 특성이 보고된 바 있다.^{19,20)}

표지된 항체는 종양을 포함한 여러 가지 질병의 추적물질로 쓰일 수 있다. 방사면역신티그라피에는 비교적 낮은 방사능의 방사성 핵종 표지 항체를 이용하기 때문에 방사능으로 인한 항체의 손상은 큰 문제가 되지 않는다. 그러나 방사면역치료를 위한 높은 방사능의 베타입자 방출 핵종 표지 항체의 경우 방출된 베타입자가 표지과정 또는 보관중에 항체에 치명적인 손상을 줄 수 있다.²¹⁻²³⁾

이 실험에서 우리는 비교적 높은 방사능의 ¹⁸⁸Re 표지 항체의 안정성을 확립하고자 하였다. 또 안정제를 사용할 경우 ¹⁸⁸Re이 표지된 항체(¹⁸⁸Re-CEA79.4)의 방사능에 의한 손상을 억제할 수 있는지를 시간별로 방사화학적순도를 측정하여 확인하였다.

대상 및 방법

1. 단일클론항체(CEA79.4)

단일클론항체 CEA79.4는 암태아성항원(carcinoembryonic antigen, CEA)에 특이적인 항체(IgG_{2a})로 CEA를 이용하여 서울대학교 의과대학 생화학고실에서 제조하였다.

2. 단일클론항체 CEA79.4의 환원

단일클론항체 CEA79.4를 환원시키기 위하여 항체 5 mg에 0.3 M EDTA 30 μ l, 1.0 M sodium bicarbonate 30 μ l와 1.5 M β -mercaptoethanol 45 μ l를 넣고 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 환원된 항체를 PD-10 칼럼(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)으로 50 mM acetate buffered saline (pH 5.3)을 사용하여 분리하였다. 분리 정제한 환원 항체를 200 μ g/100 μ l씩 바이알에 분주하고 질소가스를 충전하여 -70°C에서 냉동 보관하여 두고 사용하였다.

3. ¹⁸⁸Re-CEA79.4의 표지²⁰⁾

2에서 제조한 항체를 stannous tartrate 75 μ l (tin:tartrate=1:9, tin:항체=1720:1(몰비))와 ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re 발생기(Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA)로부터 얻은 ¹⁸⁸Re-perrhenate 2 ml (278, 555, 1,110 MBq)를 넣고 실온에서 2시간동안 반응시켜 표지하였다. 표지된 항체의 방사화학적순도를 측정하기 위하여 ITLC-SG (Gelman Science, Michigan, USA)/acetone, ITLC-SG/ Umezawa (10% ammonium acetate:methanol= 1:1), 그리고 Whatman No. 1 (Whatman International Ltd, Maidstone, England)/saline을 사용하여 크로마토그래피를 실행하고 그 결과를 TLC 스캐너(AR2000, Bioscan, Washington, USA)를 이용하여 판독하였다.

4. 안정성 검사

¹⁸⁸Re (278, 555, 1110 MBq/2 ml)을 사용하여 표지한 항체에 20% 사람혈청알부민(최종농도 2%)을 첨가하고 안정제로 20% ascorbic acid, 20% ethanol, 20% Tween 80을 최종농도가 1%가 되게 각각 넣은

후 방사화학적순도를 측정하였다. 공기와 질소 중에서의 안정성을 비교하기 위하여 안정제를 첨가한 $^{188}\text{Re-CEA79.4}$ 를 질소충진 바이알과 개봉한 바이알에 나누어 후 방사화학적순도를 시간별(30 분, 1, 2, 3, 6, 10, 24, 48 시간)로 조사하였다. 각 반응은 표지항체에 안정제와 같은 부피의 증류수를 첨가한 것을 대조군으로 사용하여 비교하였다.

결 과

1. $^{188}\text{Re-CEA79.4}$ 의 표지

표지효율은 크로마토그래피로 측정하였다(Fig. 1). ITLC-SG/acetone에서는 $^{188}\text{Re-perrhenate}$ 가 용매전단까지 올라갔고, ITLC-SG/Umezawa에서는 $^{188}\text{Re-perrhenate}$ 와 $^{188}\text{Re-tartrate}$ 가 용매전단까지 올

라갔으며, Whatman No.1/saline에서는 콜로이드를 제외한 모든 성분이 용매전단까지 올라갔다. 이 실험에 사용한 $^{188}\text{Re-CEA79.4}$ 의 표지효율은 278 MBq의 ^{188}Re 을 사용하였을 때는 $90\pm 3\%$ (n=4, 비방사능 1.25 MBq/ μg), 555 MBq의 ^{188}Re 을 사용하였을 때는 $89\pm 4\%$ (n=4, 비방사능 2.47 MBq/ μg), 1110 MBq의 ^{188}Re 을 사용하였을 때는 $86\pm 5\%$ (n=4, 비방사능 4.77 MBq/ μg)였다.

2. 안정성 검사

질소충진 상태에서 $^{188}\text{Re-CEA79.4}$ 는 ascorbic acid와 ethanol을 첨가한 경우 표지 방사능 양과 상관없이 48시간까지 안정한 것으로 나타났으며, Tween 80을 첨가하였을 때는 10시간 이후부터 서서히 안정성이 떨어지는 것이 관찰 되었다. 모든 경

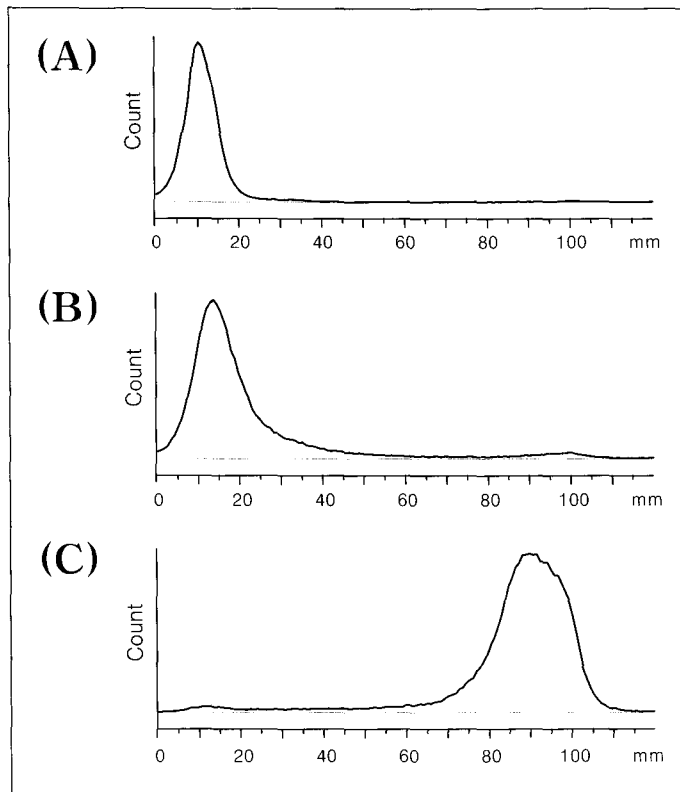


Fig. 1. Chromatograms of $^{188}\text{Re-CEA79.4}$. The radiolabeled antibody was subjected to ascending chromatography on (A) ITLC-SG/acetone, (B) ITLC-SG/Umezawa and (C) Whatman No. 1 /saline as stationary phase/mobile phase.

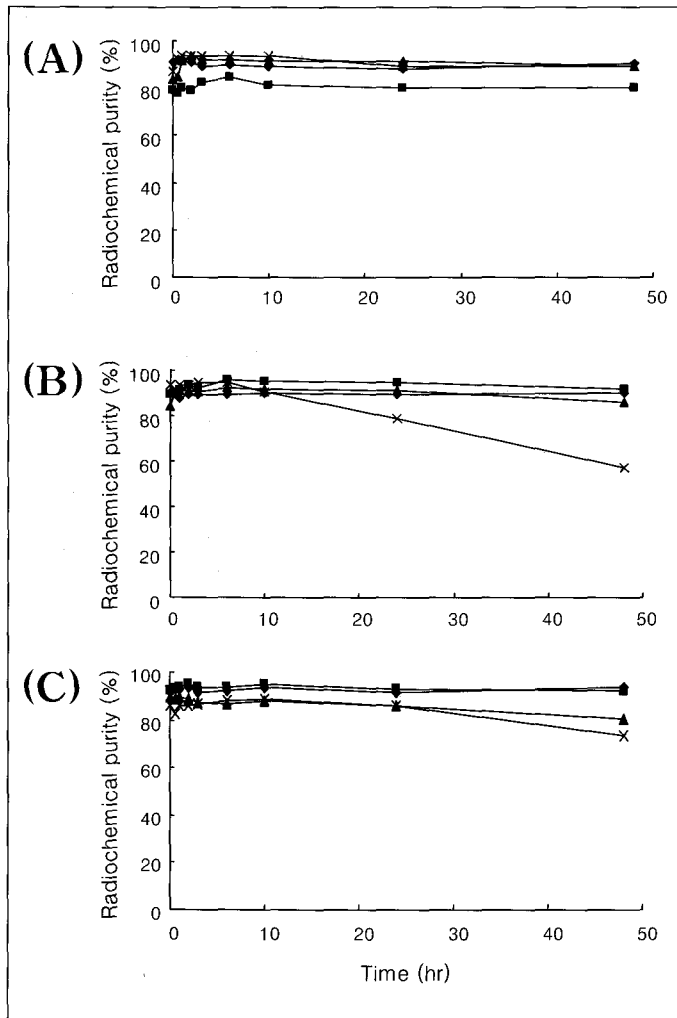


Fig. 2. Stability of ^{188}Re -CEA79.4 under nitrogen environment. Radioactivities of ^{188}Re for labeling $200\ \mu\text{g}$ CEA79.4 were (A) 1110 MBq, (B) 555 MBq and (C) 278 MBq. (■ : Control, ◆ : Ascorbic acid, ▲ : Ethanol, × : Tween 80)

우 대조군과 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

^{188}Re -CEA79.4를 공기 중에 노출 시 방사화학적 순도의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 안정제로 ascorbic acid를 첨가할 경우 10시간까지 초기의 표지효율과 거의 유사한 방사화학적순도를 나타내었다. 반면에 안정제로 ethanol과 Tween 80을 사용하였을 때는 표지 후 10시간까지는 방사화학적순도가 급격히 감소하며 이후는 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 방사화학적순도의 감소는 과산화레늄(perrhenate)의 생성(12~47%)과 ^{188}Re -tartrate의 증가

(9~38%)의 증가가 주된 요인이었으며 콜로이드의 형성은 모든 경우에 큰 영향을 미치지 않았다. 1110 MBq의 ^{188}Re 을 사용하여 CEA79.4 항체를 표지하였을 때 ethanol과 Tween 80의 경우 10 시간 후 방사화학적순도는 38%와 31%로 감소하였으나, 278 MBq의 ^{188}Re 을 표지하였을 때는 57%, 47%로 감소하여 표지 방사능의 양에 따라서도 안정성에 영향을 주는 것으로 나타났다.

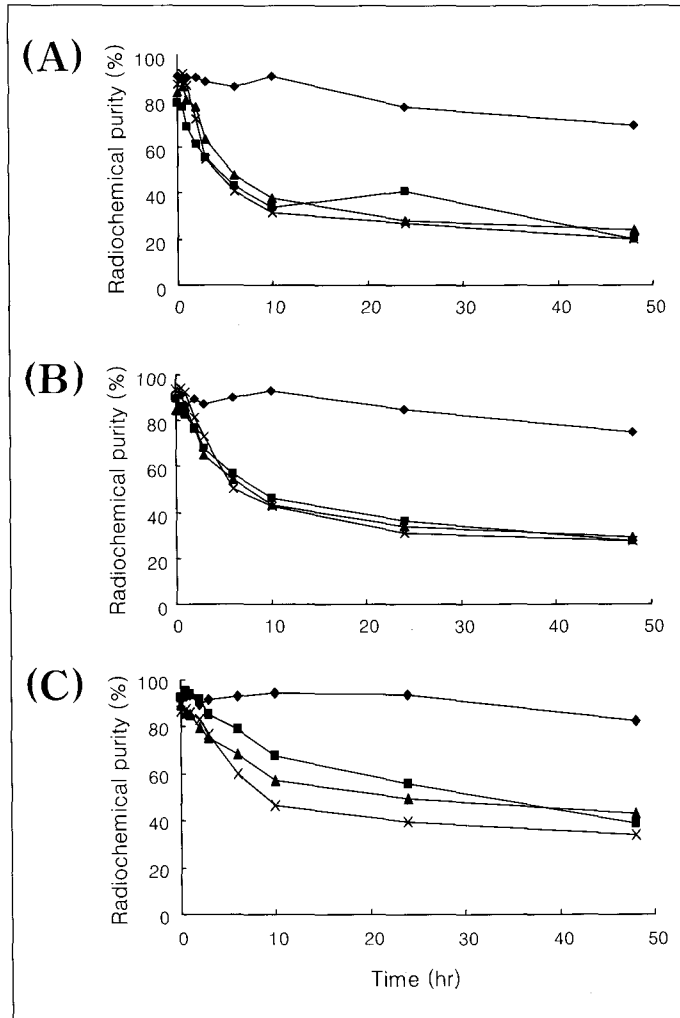


Fig. 3. Stability of ^{188}Re -CEA79.4 under air environment. Radioactivities of ^{188}Re for labeling 200 μg CEA79.4 were (A) 1110 MBq, (B) 555 MBq and (C) 278 MBq. (■ : Control, ◆ : Ascorbic acid, ▲ : Ethanol, × : Tween 80).

고찰

^{188}Re 발생기($^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generator) 개발로 인한 ^{188}Re 의 사용 편의성의 증대는 치료용 방사성핵종으로서의 관심의 증가로 이어졌다.¹⁰⁻¹⁴⁾ 또한 단일클론 항체에 ^{188}Re 을 표지하여 방사면역치료에 이용하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다.^{8,9)}

레늄은 테크네슘과 비슷한 화학적 성질을 갖고 있기 때문에 이미 개발된 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 의 항체표지법을 이

용하여 항체에 ^{188}Re 을 직접 표지하거나 양기능성 착화제를 항체에 붙인 후 표지하는 간접법으로 표지할 수 있다.^{17,18)} 직접법을 이용하여 비교적 높은 효율의 ^{188}Re 표지항체를 얻을 수 있으나 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 을 이용하여 표지할 때보다 반응성이 떨어지고 환원제의 양이 많이 필요하다.²⁰⁾

성공적인 방사면역치료에는 방사성핵종이 표지된 항체의 안정성이 필수적이다. 비방사능이 높아야 적은양의 항체를 사용할 수 있게 되어 경제적이고 적은 양의 항원에도 높은 방사능이 결합할 수 있어

표적대 비표적 비율이 높아진다. 그러나 높은 비방사능에서는 표지된 항체가 높은 에너지의 베타입자 때문에 방사선분해가 되기 쉽다.²¹⁻²³⁾ 손상된 표지항체는 선택적으로 종양에 결합하는 능력이 떨어지고 결과적으로 종양이외의 장기에 방사능으로 인한 독성을 일으킬 수 있다. 방사선분해를 억제할 수 있는 것으로 사람혈청알부민, cysteamine, glycerol 등이 알려져 있다.²⁴⁾ 사람혈청알부민의 첨가는 용액 속의 전체 단백질의 함량을 늘려주기 때문에 ¹⁸⁸Re에서 방출되는 베타입자의 공격으로부터 항체를 효과적으로 방어할 수 있다.²¹⁾ 또한 ascorbic acid는 항산화제로서 항체표지과정중 방사선방어제로서 작용함이 알려져있고,²³⁾ ethanol은 라디칼스카벤저로 작용하며,²⁵⁾ 계면활성제인 tween 80은 단백질안정제로 작용하여 방사선방어작용을 한다. 이 외에도 항체를 표지한 후에 투여하기 전까지 표지항체를 냉동저장하면 방사선분해로 인한 면역반응성이 떨어지는 것을 유의하게 억제할 수 있다는 보고가 있다.²²⁾

질소와 공기 중에서 ¹⁸⁸Re-CEA79.4의 안정성을 비교하여 보면 Fig. 2와 3에서 보듯이 질소를 치환한 상태에서는 ascorbic acid, ethanol, Tween 80을 넣은 것이 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 공기 중에서는 ascorbic acid를 넣은 경우는 상당히 안정하였으며, ethanol을 넣은 것은 대조군과 차이가 없었고, Tween 80을 넣은 것은 오히려 대조군보다 안정성을 감소시켰다. 따라서 안정성을 높이기 위해서는 산소와 차단하는 일이 가장 중요하다고 생각된다.

방사성핵종의 항체표지과정에서 ascorbic acid를 환원제로 시도하여 보았지만 그 작용은 특별히 강하지 않으며, 표지효율에도 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다.²⁴⁾ 또한 ascorbic acid는 천연 비타민 성분으로 환자에게 투여시 독성이 없어 의약품으로 사용이 가능하다. 따라서 질소충진 상태에서 ¹⁸⁸Re을 항체에 표지하더라도 안정제로 ascorbic acid를 사용하는 것이 안정성을 높일 수 있다.

이상의 실험결과를 ¹⁸⁸Re 표지 항체를 가장 안정하게 보관하기 위해서는 먼저 질소충진 상태에서 반응 및 보관을 하는 것이 좋으며, 안정제로 ascorbic acid를 사용하면 보다 확실하게 방사선분해

를 억제할 수 있다는 것을 보여주었다.

요 약

목적: 베타입자 방출 핵종을 표지한 항체를 임상적으로 이용하기 위해서는 높은 비방사능을 가지는 것이 중요하다. ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re 발생기를 사용하여 쉽게 얻을 수 있는 무담체 ¹⁸⁸Re은 이런 목적에 이상적인 방사성 핵종이다. 하지만 높은 비방사능의 ¹⁸⁸Re이 표지된 항체는 높은 베타 에너지(2.1 MeV)로 인한 불안정성이 문제가 된다. 우리는 ¹⁸⁸Re이 표지된 항체의 안정성을 확보하기 위해 몇 가지 안정제가 미치는 영향에 대해서 조사하였다. **대상 및 방법:** 환원시킨 단일클론항체(CEA79.4)에 stannous tartrate와 발생기에서 용출한 ¹⁸⁸Re-perrhenate를 넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. 각각의 방사화학적순도는 크로마토그래피를 써서 확인하였다. 표지된 항체에 사람 혈청 알부민(HSA)을 첨가(최종농도 2%)하고 ascorbic acid, ethanol, Tween 80 존재 하에서의 안정성을 각각 조사하였다. **결과:** 표지된 항체의 비방사능은 1.25~4.77 MBq/ μ g, 표지 효율은 88 \pm 4% (n=12)였다. 안정제로 ascorbic acid, ethanol, Tween 80을 첨가하였을 때 N₂ 존재 하에서 모든 경우에 10시간까지 안정하였으나, 공기와 접촉 시 10시간 후에 방사화학적순도는 각각 처음의 100, 45, 36%가 되었다. 과산화레늄(perrhenate)과 ¹⁸⁸Re-tartrate의 증가가 주된 요인이었으며 콜로이드 형성은 모든 경우에 큰 영향을 끼치지 않았다. Ascorbic acid 첨가는 공기 중에서 perrhenate의 형성을 줄임으로서 항체의 안정성에 가장 많이 기여하였다. **결론:** 높은 비방사능의 ¹⁸⁸Re이 표지된 항체는 공기 중에 노출되었을 때 불안정하였으며, ascorbic acid 첨가시 안정성을 향상시킬 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Eckelman WC, Paik CH, Reba RC. Radio-labeling of antibodies. *Cancer Res* 1980;40: 3036-42.
- 2) Griffiths GL, Goldenberg DM, Diril H, Hansen

- HJ. Technetium-99m, rhenium-186, and rhenium-188 direct-labeled antibodies. *Cancer* 1994;73: 761-8.
- 3) Wilder RB, DeNardo GL, DeNardo SJ. Radioimmunotherapy: recent results and future directions. *J Clin Oncol* 1996;14: 1383-400.
 - 4) Chung JK, Yeo J, Lee DS, Park S, Lee MC, Kim BK, et al. Bone marrow scintigraphy using technetium-99m-antigranulocyte antibody in hematologic disorders. *J Nucl Med* 1996;37:978-82.
 - 5) Higuchi T, Inoue T, Sarwar M, Oriuchi N, Karasawa M, Naruse T, et al. Tc-99m- labelled chimeric human/mouse antigranulocyte antibody bone marrow scintigraphy: a preliminary clinical study. *Nucl Med Comm* 1998;19:463-74.
 - 6) Mausner LF, Srivastava SC. Selection of radionuclides for radioimmunotherapy. *Med Phys* 1993;20:503-9.
 - 7) John E, Thakur TJ, DeFulvio J, McDevitt MR, Damjanov I. Rhenium-186-labeled monoclonal antibodies for radioimmunotherapy: preparation and evaluation. *J Nucl Med* 1993;34:260-7.
 - 8) Rhodes BA, Lambert CR, Marek MJ Knapp FF, Harvey EB. Re-188 labelled antibodies. *Appl Radiat Isot* 1996;47:7-14.
 - 9) Iznaga-Escobar N. Re-188 direct labeling of monoclonal antibodies for radioimmunotherapy of solid tumors: biodistribution, normal organ dosimetry, and toxicology. *Nucl Med Biol* 1998;25:441-7.
 - 10) Lee J, Lee DS, Kim YJ, Chang YS, Jeong JM, Shin SA, et al. Labeling and biodistribution of Re-188-DTPA. *Korean J Nucl Med* 1997;31:427-32.
 - 11) Kim YJ, Jeong JM, Chang YS, Lee DS, Chung JK, Lee MC, et al. Study of Re-188(V)-DMSA for treatment of cancer: radiolabeling and biodistribution. *Korean J Nucl Med* 1998;32:81-8.
 - 12) Kim YJ, Jeong JM, Chang YS, Lee YJ, Lee DS, Chung JK, et al. Preparation and biodistribution of Re-188 sulfur colloid. *Korean J Nucl Med* 1998;32:298-304.
 - 13) Chang YS, Jeong JM, Lee DS, Chung JK, Lee MC. Quality control of tungsten-188/rhenium-188 generator. *Korean J Nucl Med* 1998;32:425-32.
 - 14) Chang YS, Jeong JM, Kim BK, Cho JH, Lee DS, Chung J-K, et al. Effect of carrier on labeling and biodistribution of Re-188-hydroxyethylene diphosphonate. *Korean J Nucl Med* 2000;34:344-52.
 - 15) Mather SJ, Ellison D. Reduction-mediated technetium-99m labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1990;31:692-7.
 - 16) John E, Thakur ML, Wilder S, Alauddin MM, Epstein AL. Technetium-99m-labeled monoclonal antibodies: influence of technetium-99m binding sites. *J Nucl Med* 1994;35:876-81.
 - 17) 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.
 - 18) Normando IE. Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with rhenium-188 for radioimmunotherapy of solid tumors-a review of radiolabeling characteristics, quality control and in vitro stability studies. *Appl Rad Isotope* 2001;54: 399-406.
 - 19) Hong MK, Jeong JM, Chung J-K, Choi SR, Kim CK, Lee YJ, et al. ^{99m}Tc labelling kit preparation and characteristics of anti- NCA-95 monoclonal antibody. *Korean J Nucl Med* 1996;30:541-7.
 - 20) Hong MK, Jeong JM, Yeo JS, Kim KM, Chang YS, Lee YJ, et al. In vitro properties and biodistribution of Tc-99m and Re-188 labeled monoclonal antibody CEA 79.4. *Korean J Nucl Med* 1998;32:516-24.

- 21) Salako QA, O'Donnell RT, DeNardo SJ. Effects of radiolysis on yttrium-90-labeled Lym-1 antibody preparations. *J Nucl Med* 1998;39:667-70.
 - 22) Wahl RL, Wissing J, Rosario RD, Zasadny KR. Inhibition of autoradiolysis of radiolabeled monoclonal antibodies by cryopreservation. *J Nucl Med* 1990;31:84-9.
 - 23) Chakrabarti MC, Le N, Paik CH, De Graff WG, Carrasquillo JA. Prevention of radiolysis of monoclonal antibody during labeling. *J Nucl Med* 1996;37:1384-8.
 - 24) Hnatowich DJ, Virzi F, Winnard P, Fogarasi M, Rusckowski M. Investigations of ascorbate for direct labeling of antibodies with technetium-99m. *J Nucl Med* 1994;35:127-34.
 - 25) Seymour CB, Mothersill C, Moriarty MJ, Tipton KF. The effect of ethanol on the radiation response of CHO-K1 cells. *Br J Radiol* 1987; 60(714):577-81.
-