

Re-188이 표지된 항체의 안정성

Stability of Rhenium-188 Labeled Antibody

김보광, 정재민, 정준기, 이동수, 이명철

서울대학교병원

서울시 종로구 연건동 28

요 약

베타입자 방출 핵종을 표지한 항체를 임상적으로 이용하기 위해서는 높은 비방사능을 가지는 것이 중요하다. W-188/Re-188 발생기를 사용하여 쉽게 얻을 수 있는 무담체 Re-188은 이런 목적에 이상적인 방사성 핵종이다. 하지만 높은 비방사능의 Re-188이 표지된 항체는 높은 베타 에너지로 인한(2.1 MeV) 불안정성이 문제가 된다. 우리는 Re-188이 표지된 항체의 안정성을 확보하기 위해 몇 가지 안정제가 미치는 영향에 대해서 조사하였다. 환원시킨 단일클론항체(CEA79.4)에 stannous tartrate와 발생기에서 용출한 Re-188-perrhenate를 넣어 실온에서 2 시간 반응시켰다. 각각의 방사화학적순도는 크로마토그래피(ITLC-SG/acetone, ITLC-SG/Umezawa, Whatman No. 1/saline)를 써서 확인하였다. 표지된 항체에 사람 혈청 알부민(HSA)을 첨가(최종농도2%)하고 vitamin C, ethanol, 그리고 Tween 80 존재 하에서의 안정성을 각각 조사하였다. 표지된 항체의 비방사능은 4.29~5.11 MBq/μg, 표지 효율은 88±4%(n=12)였으며 표지된 항체를 순수 분리하였을 때 방사화학적순도는 급격히 떨어졌다. 안정제로 vitamin C, ethanol, Tween 80을 첨가하였을 때 N₂ 존재 하에서 모든 경우에 10 시간까지 안정하였으나 공기와 접촉 시 10 시간 후에 방사화학적순도는 각각 처음의 100, 45, 36%가 되었다. Perrhenate(12-47%)와 Re-188-tartrate의 증가(9-38%)가 주된 요인이었으며 콜로이드 형성은 모든 경우에 큰 영향을 끼치지 않았다. Vitamin C 첨가는 공기 중에서 perrhenate의 형성을 줄임으로서 항체의 안정성에 가장 많이 기여하였다. 높은 비방사능의 Re-188이 표지된 항체는 공기 중에 노출되었을 때 불안정하였으며, vitamin C 첨가시 안정성을 향상시킬 수 있었다.

Abstract

For clinical application of beta-emitter labeled antibody, high specific activity is important. Carrier-free Re-188 from W-188/Re-188 generator is an ideal radionuclide for this purpose. However, low stability of Re-188 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 Re-188 labeled antibody, and stabilizing effect of several nontoxic radical-quenching agents. Pre-reduced monoclonal antibody (CEA79.4) was labeled with Re-188 by incubating with generator-eluted Re-188-perrhenate in the presence of stannous tartrate for 2 hr at room temperature. Radiochemical purity of each preparation was determined by chromatography (ITLC-SG/acetone, ITLC-SG/Umezawa, Whatman No.1/saline). Human serum albumin was added to the labeled antibodies(2%). Stability of Re-188-CEA79.4 was investigated in the presence of vitamin C, ethanol, or Tween 80 as radical-quenching agents. Specific activities of 4.29~5.11 MBq/ μ g were obtained. Labeling efficiencies were $88 \pm 4\%$ (n=12). Very low stability after removal of stannous tartrate from the preparation was observed. If stored after purging with N₂, all the preparations were stable for 10 hr. However, if contacted with air, stability decreased. Perrhenate and Re-188-tartrate was major impurity in declined preparation (12~47 and 9~38% each, after 10 hr). Colloid-formation was not a significant problem in all cases. Addition of vitamin C stabilized the labeled antibodies either under N₂ or under air by reducing the formation of perrhenate. High specific activity Re-188 labeled antibody is unstable, especially, in the presence of oxygen. Addition of vitamin C increased the stability.

1. 서론

핵의학 분야에서 쓰이는 치료용 방사성 핵종으로는 I-131, P-32, Y-90 등이 있으며 최근에는 Re-186, Ho-166, Re-188 등과 같은 핵종이 많은 관심을 받고 있다^{1,2)}. 이 중 Re-188은 발생기를 이용하여 무담체로 쉽게 얻을 수 있고, 치료용으로 적합한 여러 가지 물리($E_{\beta, \text{max}}=2.1$ MeV, $t_{1/2}=16.9$ hr), 화학적 성질을 가지고 있으며, 영상화에 적합한 감마에너지(155 keV)를 방출한다³⁻⁷⁾.

항체에 방사성 핵종을 표지하는 방법으로는 항체에 결합하는 착화제를 이용하여 간접적으로 표지하는 방법과 항체에 직접 표지하는 방법이 있다⁸⁻⁹⁾. 표지된 항체는 종양을 포함한 여러 가지 질병의 추적물질로 쓰일 수 있다. 그러나 베타입자 방출 핵종이 표지된 항체는 베타

타입자가 항체에 손상을 줄 수 있으며 따라서 표지 후 단기간의 보관을 어렵게 만든다.

이 실험에서 우리는 Re-188 표지 항체의 안정성을 확립하고자 여러 가지 안정제가 Re-188이 표지된 항체(CEA79.4)의 방사능에 의한 붕괴를 억제할 수 있는지를 확인하였다.

2. 대상 및 방법

2.1 단일군 항체(CEA79.4)

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

2.2 환원된 단일군 항체 CEA79.4 바이알 제조

단일군 항체 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 30분간 반응시켰다. 환원된 항체를 PD-10 칼럼(Pharmacia Biotech)에서 acetate buffered saline (pH 5.3)을 사용하여 분리한 후, coomassie blue 염색으로 항체가 나온 튜브를 확인하였다. 분리 정제한 환원 항체를 200 μ g/100 μ l씩 바이알에 분주하고 질소로 충전시킨 후 -70°C에서 냉동 보관하였다

2.3 Re-188-CEA79.4의 표지

제조한 항체 바이알에 stannous tartrate 75 μ l(tin:tartrate=1:9, tin:항체=1720:1)와 W-188/Re-188 발생기(Oak Ridge National Laboratory)를 사용하여 얻은 Re-188 perrhenate 2 ml(278-1110 MBq)를 넣고 실온에서 2 시간 반응시켰다⁸⁾. 표지된 항체의 방사화학적순도를 측정하기 위하여 ITLC-SG/acetone, ITLC-SG/Umezawa, 그리고 Whatman No.1/saline을 사용하여 크로마토그래피를 실행하고 그 결과를 TLC 스캐너(AR2000, Bioscan)로 판독하였다.

2.4 안정성 검사

Re-188 1110, 555, 278 MBq을 사용하여 표지한 항체에 20% 사람혈청알부민(최종농도 2%)과 안정제로 20% vitamin C, 20% ethanol, 그리고 20% Tween 80(최종농도 1%)을 각각 넣은 후 방사화학적순도를 측정하였다. 공기와 질소 중에서의 안정성을 확인하기 위하여 안정제를 첨가한 Re-188-CEA79.4를 질소충진 바이알과 개봉한 바이알에 나누어 각 시간 별 (30 분, 1, 2, 3, 6, 10, 24, 48 시간)로 조사하였다. 각 반응은 표지항체에 같은 부피의 증류수를 첨가한 것을 대조군으로 사용하여 비교하였다.

3. 결과

3.1 Re-188-CEA79.4 항체의 표지

이 실험에 사용한 Re-188-CEA79.4의 표지효율은 $88 \pm 4\%$ (n=12)였다.

3.2 안정성 검사

질소충진 상태에서 Re-188-CEA79.4는 vitamin C와 ethanol을 첨가한 경우 48시간까지 안정한 것으로 나타났으며, Tween 80을 첨가하였을 때는 10시간 이후 부터는 서서히 안정성이 떨어지는 것이 관찰 되었다. 모든 경우 대조군과 유의한 차이는 없었다(Fig. 1).

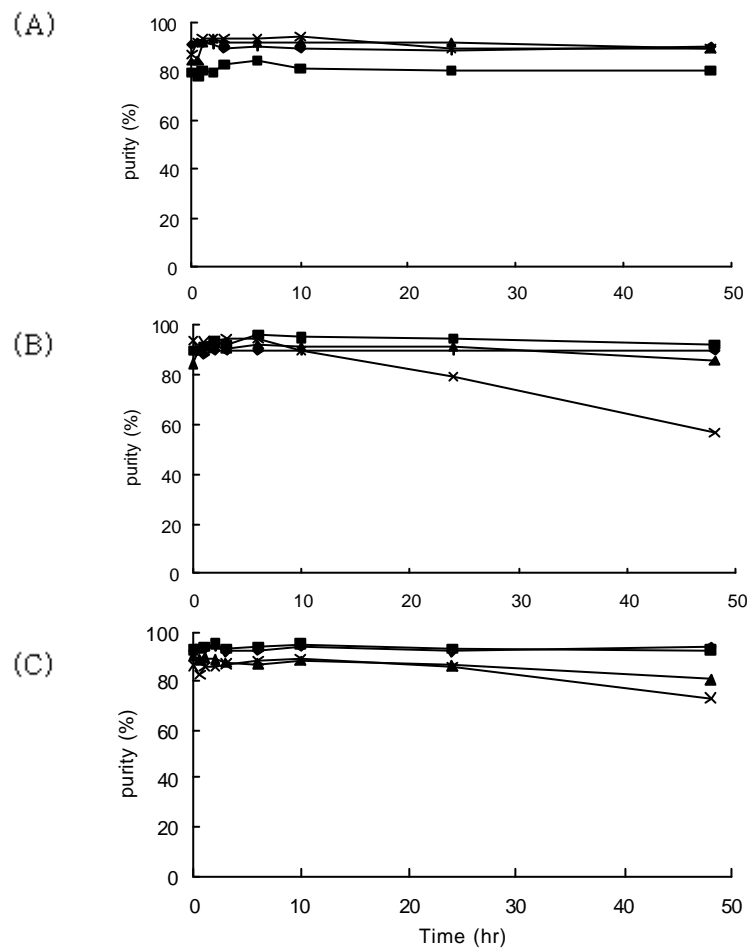


Fig. 1 질소충진 상태에서 Re-188-CEA79.4의 시간에 따른 안정성

(A) 1110 MBq (B) 555 MBq (C) 228 MBq 표지 CEA79.4

(■ : 대조군 ◆ : vitamin C 첨가 ▲ : ethanol 첨가 × : Tween 80 첨가)

Re-188-CEA79.4를 공기 중에 노출 시 방사화학적수율의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 안정제로 vitamin C를 첨가할 경우 10시간 까지 초기의 표지효율과 거의 유사한 방사화학적 수율을 나타내었다. 반면에 안정제로 ethanol과 Tween 80을 사용하였을 때는 표지 후 10시간까지는 방사화학적수율이 급격히 감소하며 이후는 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 1110 MBq의 Re-188을 사용하여 CEA79.4 항체를 표지하였을 때 ethanol과 Tween 80의 경우 10시간 후 방사화학적수율은 38%와 31%로 감소하였으나, 278 MBq의 Re-188을 표지하였을 때는 57%, 47%로 감소하여 표지 방사능의 양에 따라서도 안정성에 영향을 주는 것으로 나타났다.

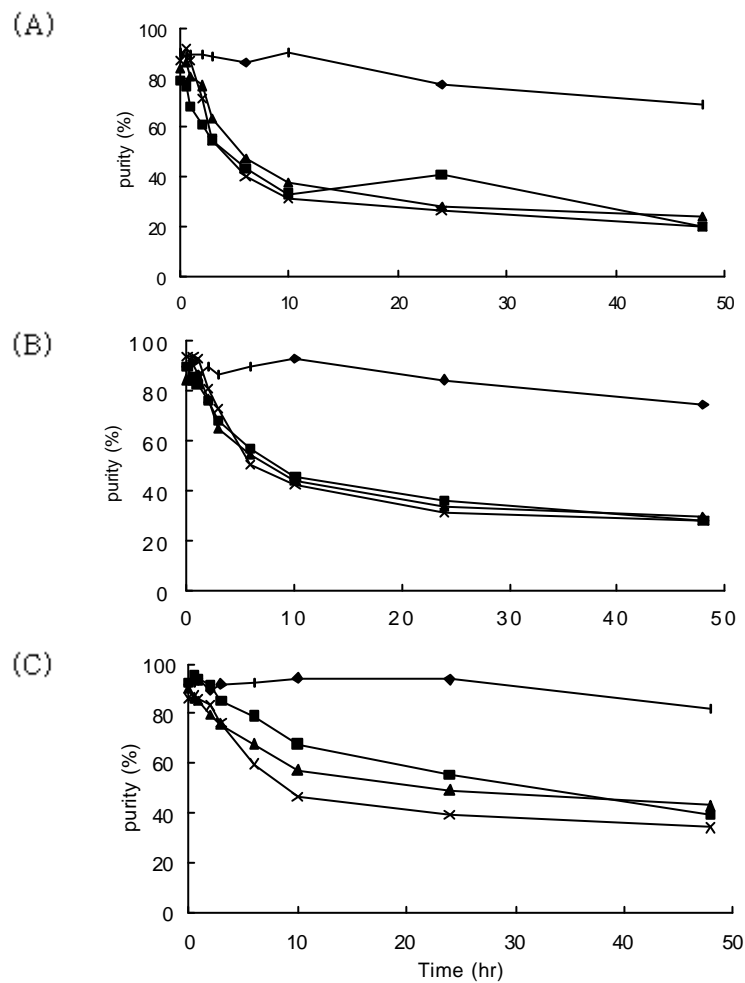


Fig. 2 공기 중에서 Re-188-CEA79.4의 시간에 따른 안정성

(A) 1110 MBq (B) 555 MBq (C) 228 MBq 표지 CEA79.4

(■ : 대조군 ◆ : vitamin C 첨가 ▲ : ethanol 첨가 × : Tween 80 첨가)

4. 고찰

방사성 동위원소가 표지된 단일클론항체는 종양을 포함한 여러 가지 질병의 진단과 치료에 유용하게 이용된다¹⁾. 감마선 방출 핵종을 항체에 표지하여 방사면역 신틸로그라피에 사용하며, 알파 혹은 베타입자 방출 핵종을 표지하여 방사면역 치료에 사용한다. 현재 영상진단에 사용되는 방사성 핵종으로는 Tc-99m이 가장 우수하며, 여러 가지 단일클론항체에 표지하여 종양 등의 진단에 임상적으로 이용되고 있다. 또한 방사면역 치료에 단일클론 항체를 적용하고자 많은 연구가 진행되고 있다. Re-188은 방사면역치료에 응용할 수 있는 방사성 핵종으로 주목받고 있으며, 항체에 직접법과 MAG3등을 이용한 간접법으로 표지하는 방법 및 Re-188 표지 항체의 체외·체내 특성에 관한 연구가 발표되고 있다. Re-188이 표지된 항체의 성공적인 치료에는 표지된 항체의 안정성이 가장 중요하다고 할 수 있다. Re-188이 표지된 항체는 적은 양의 항체를 사용하고 또한 높은 비방사능을 가질 때 더 유용하게 사용할 수 있다. 그러나 높은 비방사능에서는 표지된 항체가 높은 에너지의 베타입자 때문에 방사선분해가 되기 쉽다. 사람혈청알부민의 첨가는 용액 속의 전체 단백질의 함량을 늘려주기 때문에 Re-188에서 방출되는 베타입자의 공격으로부터 항체를 효과적으로 방어할 수 있다¹⁰⁾. 질소와 공기 중에서 Re-188-CEA79.4의 안정성을 비교하여 보면, 질소 상태에서는 vitamin C, ethanol, Tween 80을 넣은 것이 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 공기 중에서는 vitamin C를 넣은 경우는 상당히 안정하였으나, ethanol을 넣은 것은 대조군과 차이가 없었고 Tween 80을 넣은 것은 오히려 대조군 보다 안정성을 감소시켰다. 따라서 안정성을 높이기 위해서는 산소와 차단하는 일이 가장 중요하다고 생각된다. 이상의 실험결과로 Re-188이 표지된 항체를 가장 안정하게 보관하기 위해서는 먼저 질소상태에서 보관해야하며 안정제로 vitamin C를 사용해야한다는 것을 알 수 있었다.

5. 참고문헌

1. V. J. Lewington ; Cancer therapy bone-seeking isotopes ; Phys Med Biol 41 (1996) 2027-2042
2. V. J. Lewington ; Targeted radionuclide therapy for bone metastases ; Eur J Nucl Med (1993) 20:66-74
3. 이 진, 이동수, 김영주, 장영수, 정재민, 신승애, 정준기, 이명철, 고창순 ; Re-188-DTPA (Diethylene-triaminepentaaceticacid)의 표지와 생체내 분포 ; 대한핵의학회지 (1997) 31(4); 427-432

4. 김영주, 정재민, 장영수, 이동수, 정준기, 이명철, 고창순 ; 암 치료를 위한 $^{188}\text{Re}(\text{V})\text{-DMSA}$ 에 관한 연구 ; 방사성동위원소 표지와 생체내 분포 ; 대한핵의학회지 (1998) 32(1):81-88
5. 김영주, 정재민, 장영수, 이용진, 이동수, 정준기, 이명철, 송영욱 ; Re-188이 표지된 항 교질(Sulfur Colloid) 제조와 생체내 분포 ; 대한핵의학회지 (1998) 32(3):298-304
6. 장영수, 정재민, 이동수, 정준기, 이명철 ; Tungsten-188/Rhenium-188 발생기의 정도관리 ; 대한핵의학회지 (1998) 32(5):425-432
7. 홍미경, 정재민, 여정석, 김경민, 장영수, 이용진, 이동수, 정준기, 이명철 이승진 ; Re-188 과 Tc-99m 표지 단일클론항체 CEA79.4의 생체외 특성과 생체내 분포 ; 대한핵의학회지 (1998) 32(6):516-524
8. G. L. Griffiths, D. M. Goldenberg, H. Diril, H. J. Hansen ; Technetium-99m, rhenium-186, and rhenium-188 direct-labeled antibodies ; Cancer (1994) 73:761-8
9. B. A. Rhodes, C. R. Lambert, M. J. Mared, F. F. Knapp jr. ; Re-188 labeled antibodies ; Appl Radiat Isot (1996) 47(1):7-14
10. Q. A. Salako, R. T. O'Donnell, S. J. DeNardo ; Effects of radiolysis on yttrium-90-labeled Lym-1 antibody preparations ; J Nucl Med (1993) 39:667-670