

다단계 표적치료를 위한 ^{188}Re -Biotin 킬레이트의 생물학적 거동

Biological Behavior of ^{188}Re -Biotin Chelate for Multistep Therapy with The Avidin-Biotin System

원자력병원

서울시 노원구 공릉동 215-4

최태현, 안순혁, 최창운, 우광선, 정위섭, 임수정, 임상무

요약

방사면역치료를 위해 바이오틴화된 항체와 streptavidin 그리고 방사표지된 바이오틴을 사용하는 암종에 대한 3단계 표적 방법에 대한 기초연구를 수행한 실험이다. 3단계 전표적법은 방사면역치료시 정상조직에 주어질 수 있는 불필요한 피폭을 최소화시킬 수 있는 방법이다. 방사치료에 적합한 핵종인 ^{188}Re 은 제네레이터에서 필요시에 간편하게 얻을 수 있는 핵종이다. 우리는 이러한 방사치료핵종과 킬레이션할 수 있는 biotin 합성물을 avidin/biotin 전 표적 방법에 사용하고자 제조하였다. ^{188}Re 을 킬레이션할 수 있는 $\text{MAG}_2\text{GABA-Biocytin}$ (MGB)은 높은 수율로 표지 되었고, 표지화합물의 생물학적 평가를 실시하였다. 체외 실험에서 표지화합물은 높은 안정성을 보였다. 정상 마우스에서 ^{188}Re -MGB은 2시간이내에 간담도를 통해 체외로 배출되었고, 암종 모델에서의 집적도는 낮게 나타났으나, 실험절차상의 개선과 더불어 전 표적 방사면역치료에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

Abstract

The purpose of this study was to test the three-step targeting of tumors in mice using biotinylated antibody, streptavidin and radiolabeled biotin for radioimmunotherapy (RAIT). Three-step pretargetting can potentially decrease harmful radiation to normal tissues in radioimmunotherapy. ^{188}Re from ^{188}W - ^{188}Re generator, is recently introduced in therapeutic nuclear medicine and made it possible to use whenever needed. We studied biotin-chelates MGB for use in the avidin/biotin pretargetting system. Chelates that hold radiometals with high stability under physiological conditions are essential to avoid excessive radiation damage to non-target cells. We synthesized $\text{MAG}_2\text{GABA-Biocytin}$ (MGB), labeled with ^{188}Re and evaluated biological behavior of ^{188}Re -MGB. biotinyl MAG_2GABA bind the therapeutic radiometal ^{188}Re with excellent in vitro stability and have the required physiological properties for pretargetted therapy. In normal mice, ^{188}Re -MGB was excreted via hepatobiliary pathway, %ID/g of GI tract was 52.1 at 120min. In Raji cells tumor bearing nude mice, liver and colon were higher than those of normal mouse. Tumor uptake at 120min was 0.05%ID/g. ^{188}Re -MGB may have a role in pretargetted radioimmunotherapy.

서론

방사성 동위원소를 이용한 치료방법 중에서 면역학적인 기술이 대표적으로 사용되고 있다^{1,2,3,4,5}. 종양특이항원에 대한 항체를 개발하여 치료용 방사성 동위원소를 항체에 직접 표지하거나, 간접적으로 ligands를 항체에 붙인 후 표지 하는 방법들이 임상에서 사용되고 있으나, 원하는 종양으로의 집적되는 것 이외의 다른 정상조직이나 장기로의 비특이적인 분포 때문에 불필요한 피폭이나, 목적하는 만큼의 치료효과를 얻지 못하는 경우가 많다^{6,7}. 이러한 단점들을 보완하기 위하여 in vitro에서 항원-항체 반응의 효과를 증폭시킬 수 있는 avidin-biotin system을 in vivo에서 의학적 치료법으로 적용하는 연구들이 발표되고 있다^{4,5,8,9,10}. Avidin-biotin system을 이용한 다단계 표적 방법은 대개 두 가지로 구별되어 적용된다. 하나는 2단계 처치방법으로 biotin 표지 항체와 치료용 동위원소가 부착된 avidin을 보내는 방법이고^{11,12,13,14}, 또 다른 방법은 3단계 처치방법으로 biotin 표지항체와 avidin, 그리고 치료용 동위원소가 부착된 biotin을 사용하는 것이다^{15,16,17}. 2단계 방법보다는 3단계 방법이 과정이 복잡하나, 특이적인 치료용 동위원소의 전달방법으로 알려져 있다. 기본적인 3단계 방사면역 치료의 프로토콜은 다음과 같다. 첫 번째 단계로 biotin이 붙은 MoAbs를 주입하고, 항원으로의 집적이 이루어진 만 하루가 경과한 뒤 두 번째 단계로 avidin과 streptavidin(각각 사용 또는 복합사용)을 처치한다. 24 시간 후에 혈액 내 미반응 avidin과 순환하는 avidin-MoAb 결합체가 제거되었다고 예상되는 시기에서 3번째 단계로 치료용 방사성 동위원소가 부착된 biotin을 주입한다. 이러한 방법으로 방사성 동위원소의 종양집적을 극대화시키고 정상조직의 방사능을 감소시킬 수 있다^{17,18,19}.

¹⁸⁸Re은 물리적 반감기가 약 17시간이며, 2,110KeV의 β 선과 155KeV의 γ 선을 방출하기 때문에 치료와 동시에 진단도 가능하다. 또한 ¹⁸⁸W-¹⁸⁸Re generator의 개발로 필요한 때에 즉시 사용할 수 있는 방사성 핵종이다. 이러한 rhenium을 안정하게 착화할 수 있는 NaS ligand로 MAG₂GABA-biocytin을 합성하였으며 ¹⁸⁸Re를 착화시키는 biotin-chelate로 제조 방법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

1. MAG₂GABA-Biocytin과 Monoclonal Antibody biotin conjugate 합성

S-Benzoyl mercaptoacetic acid의 N-hydroxysuccinimidyl ester를 수용액 상태의 glycylglycine과 상온에서 coupling 시켜 MAG₂를 얻었다. 이것을 0°C에서 N-hydroxy succinimide와 DCC를 넣고 반응시켜 carboxyl기를 active ester로 변환시킨 후 재결정으로 정제하여, 유용한 중간체 NHS-MAG₂를 합성하였다. 이 중간체를 γ -aminobutyric acid와 coupling 시키고 재결정으로 정제하여 순수한 MAG₂GABA를 합성하였다. 그리고 얻어진 MAG₂GABA는 또 다시 tetrafluorophenol/DCC system이나 N-hydroxysuccinimide/DCC system을 이용해 carboxy terminal을 active ester 형태로 변형시킬 수 있었다. 이 active ester 형태의 ligand를 biocytin과 합성하여 MAG₂GABA-Biocytin을 얻었다. 각 단계에서 얻어진 product들의 화학구조는 ¹H NMR 및 electron spray ionization MASS로 확인하였다. Lym-1 항체에 biotin을 붙이기 위하여 10mM phosphate buffered saline pH 7.4로 2mg/ml 1ml을 준비하였다. sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce Co, USA) 1mg을 D.W. 1ml에 녹인 뒤 75 μ l를 항체가 준비된 시험관에 넣고, 4°C에서 2시간동안 반응시켰다. 반응하지 못한 biotin을 제거하기 위하여, Centricon-30(Amicon Co, USA)을 사용하여 5,000 \times g에서 30분동안 원심 분리를 2회 반복하였다.

2. MAG₂GABA-Biocytin의 ¹⁸⁸Re 표지

MAG₂GABA-Biocytin(50 μ g)을 sodium potassium tartrate (56mg)와 stannous tartrate를 2mg에서 0.12mg으로 사용농도를 변화시키며, ¹⁸⁸Re perrhenate (370 MBq)를 넣어 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켜 표지 하였다. 표지된 ¹⁸⁸Re-MAG₂GABA-Biocytin을 37 $^{\circ}$ C 혈청에서 안정성을 HPLC를 사용하여 확인하였다. Reverse phase C18컬럼에 용출액으로 20% methanol의 10mM PBS에서 50% methanol까지의 구배농도 (1ml/min)를 사용하였다. 반응이 끝난 후 방사 화학적 순도를 확인하기 위하여 Sep-Pak C18 cartridge를 ethanol을 사용하여 활성화시킨 후, 0.001N HCl로 씻어내었다. 반응 액을 컬럼에 점적한 후 다시 0.001N HCl로 용출하며 시험관에 받아내어, 반응하지 않은 ¹⁸⁸Re의 방사능을 측정하였다. 50%ethanol로 용출한 것을 시험관으로 받아 방사능을 측정한 후, 용출을 다 마친 Sep-Pak cartridge의 방사능을 측정하여 방사콜로이드의 방사능을 측정하였다. ¹⁸⁸Re-MAG₂GABA-Biocytin을 avidin과 실온에서 10분간 반응시킨 후, HPLC TSK size exclusion column으로 결합능력을 관찰하였다.

3. Biodistribution

정상 마우스에서의 ¹⁸⁸Re-MAG₂GABA-Biocytin의 거동을 관찰하기 위하여, ICR 마우스 4마리를 한 그룹으로 ¹⁸⁸Re-MAG₂GABA-Biocytin을 한 마리당 3.7 MBq/100 μ l 씩 꼬리정맥에 주사한 후 5분, 15분, 30분, 1시간, 2시간에 장기를 적출 하여 감마카운터로 방사능을 측정하여 단위 조직당의 방사능을 측정하였다. 다단계 표적 방법의 생체내 적용을 위해 Lym-1 항체의 항원을 가지고 있는 human lymphoma인 Raji cell을 Balb/c nude mice(n=3)의 왼쪽 허벅지에 1×10^7 개를 주입하여, 2주 뒤에 종양크기가 1cm정도 성장한 것을 확인하였다. Biotin이 붙은 Lym-1 (40 μ g)을 정맥주사하고, 약 48시간 경과 후 streptavidin (50 μ g)을 주입하였다. 약 24시간 후에 ¹⁸⁸Re-MAG₂GABA-Biocytin (0.5 μ g)을 주입하고, 2시간 후에 각 장기를 적출 하여 방사능을 측정하였다.

결 과

S-benzoylmercaptoacetyl NHS ester로 시작하여 합성된 최종 산물인 MAG₂GABA-Biocytin이 약 41.5%의 수율로 합성되었다. m.p.=194-196 $^{\circ}$ C 1H-NMR (DMSO-d₆), δ 8.49 (t, 1H), 8.12(t,1H), 8.0(d, J=7.73Hz, 1H), 7.95-7.56(m, 5H), 6.38, 6.33(s, 2H), 4.29(m, 1H), 4.13(m, 1H), 3.89(s, 2H), 3.77(d, J=5.63Hz, 2H), 3.67(d, J=5.86Hzs, 2H), 3.10(m, 1H), 3.05(q, J=6.7Hz, 2H), 3.00(q, J=6.6Hz), 2.83(dd, J=12.4, 5.11Hz, 1H), 2.57(d, J=12.4Hz, 1H), 2.12(t, J=7.50Hz, 2H), 2.04(t, J=7.4Hz,2H), 1.2-1.6(m, 14H). MASS (ESI) m/z 750.57(M++1). Lym-1을 NHS-LC-biotin을 사용하여 1.6mg/ml의 biotin 표지항체를 얻었다. Rhenium 표지시 stannous ion의 사용 정도에 따라 수율의 변화가 나타나는 것은 0.25mg 이하를 사용시 현격하게 나타나며(table 1) 1mg이상의 양을 사용하여 안정된 표지수율을 얻

Table 1 Radiochemical purity of ¹⁸⁸Re-MAG₂GABA-Biocytin

Concentration of stannous ion	0.5mg	0.25mg	0.12mg
Purity (%)	95%	90%	50%

수 있게 사용하였다. C18 Sep-Pak cartridge를 이용한 방사화합물 실험에서는 98%를 보였다. Sep-Pak을 이용하여 표지 수율을 확인하는 방법은 정제과정도 함께 이루어 질 수 있어 효과적일 것으로 기대된다.

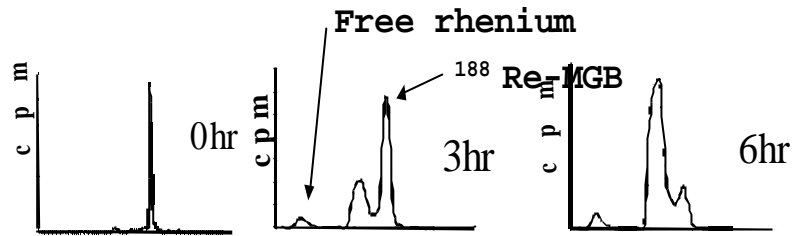


Fig 1 Reverse phase C18 HPLC radiochromatogram of ^{188}Re -MGB in serum

Peptide 분석방법의 대표적인 HPLC 이동상인 methanol 구배농도를 사용하여 혈청에서 ^{188}Re -MAG₂GABA-Biocytin의 안정성을 확인하였다 (Fig 1). 주 피크와 다르게 시간 경과에 따라 나타나는 피크는 혈청 상에 존재하는 biotinidase에 의해 표지화합물의 구조상 변화가

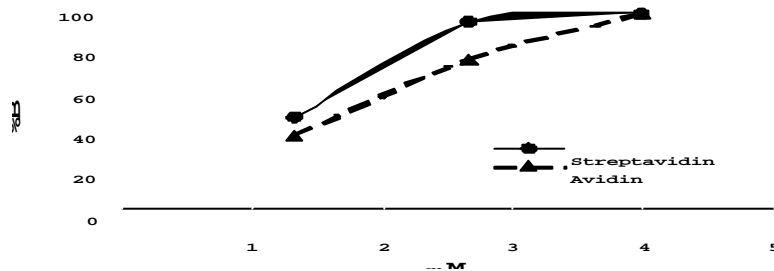


Fig 2 Binding capacity of ^{188}Re -MGB to avidin, streptavidin

이루어진 것으로 생각된다.

표지 반응 후 ^{188}Re -MAG₂GABA-Biocytin 0.2mg과 avidin 2mg을 반응시켜 90% 이상의 결합능력이 있음을 확인하였다(fig 2).

정상 마우스에서 ^{188}Re -MAG₂GABA-Biocytin의 장기별 분포(%ID/g)는 신장의 경우 5분, 15분, 30분에 각각 5.14, 1.52, 0.72이었다. 간에서는 5분, 15분, 30분, 60분, 120분에 7.97, 7.49, 3, 3.6, 0.28이었다. 소장은 15분은 8.6, 30분은 10.3으로 증가하여, 간 담도와 소장을 통해서 많은 양이 배설되는 것을 확인하였다(fig 3).

Avidin-biotin 3단계법을 실험동물에 적용시키는 초기 실험에서 바이오틴 부착항체와 avidin 그리고 ^{188}Re -MAG₂GABA-Biocytin의 세 가지 단계를 수행한 결과, Raji cell 종양으로의 집적도가 긴 시간을 필요로 하는 직접표지에 의한 종양집적도와 동일시간을 놓고 보았을 때와 유사하게 나타났으나(fig 4), liver, lung, spleen, kidney 등의 주요장기에서의 %ID/g은 직접표지 24시간에서의 %ID/g보다 훨씬 낮아²⁰ 정상 조직에 대한 피폭 감소 효과는 클 것으로 기대되었다. 대부분의 방사능이 간담도 및 소장에서 검출되어 정상 마우스의 체내 분포와 유사하게 나타내었다.

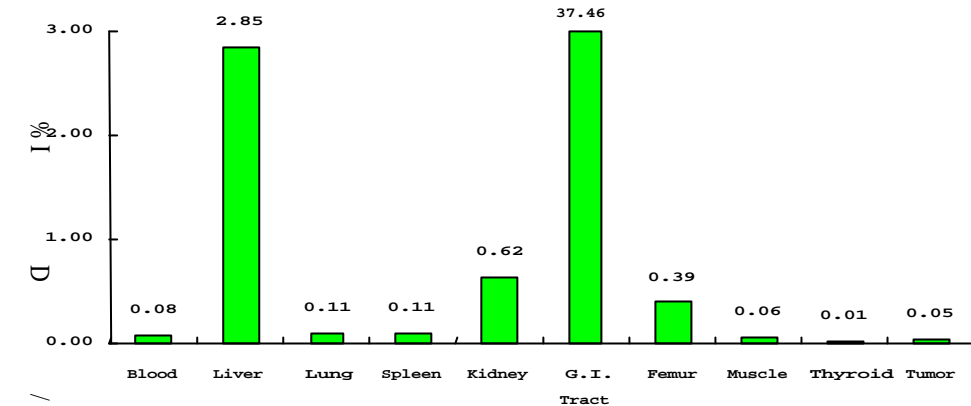


Fig 4 Biodistribution of ¹⁸⁸Re-MGB, pretargetting with biotinylated Lym-1 and streptavidin in Raji cell bearing nude mice at 120 min

결론

MAG₂GABA-Biocytin을 합성하여 치료용 방사성 동위원소인 ¹⁸⁸Re과 안정적으로 착화물을 제조하였고, 방사면역치료에 필요한 avidin-biotin의 affinity를 최대한 유지하였다. 실험동물 모델에서는 짧은 시간 내에 간담도를 통해 배출되어, avidin에 의해 표적되지 않은 불필요한 표지화합물에 의한 피폭을 줄일 수 있을 것으로 생각된다. 하지만, 3단계 표적의 실험동물모델에서 종양으로의 집적도가 높지 않았으나 동일 항원-항체 모델을 사용한 직접표지법의 실험동물 자료에서의 정상조직의 %ID/g을 비교해 볼 때 짧은 시간에서의 빠른 제거율을 보여 불필요한 피폭감소에 우수한 효과를 나타내었다. 실제 적용에 있어서 종양으로의 낮은 집적을 나타내는 문제점은 Avidin-Biotin 체계를 이용한 각 단계마다의 포화정도의 차이와 항원-항체 반응 모델의 개선을 통해 나아질 것이다.

참고문헌

1. H. Sakahara, K. Endo, M. Koizumi, T. Nakashima, M. Kunimatsu, Y. watanabe, et al. Relationship Between In Vitro Binding Activity and In Vivo Tumor Accumulation of Radiolabeled Monoclonal Antibodies, J Nucl Med 29:235-240, 1988.
2. S. Halpern, P. Hagan, P. Garver, J. Koziol, A. Chen, J. Frincke, et al. Stability, characterization, and Kinetics of ¹¹¹In-labeled Monoclonal Antitumor Antibodies in Normal Animals and Nude Mouse-Human Tumor Models, Cancer Res 43:5347-5355, 1983.
3. G. Rowlinson, D. Snook, A. Busza, A. Epenetos. Antibody-guided Localization of Intraperitoneal Tumors following Intraperitoneal or Intravenous Antibody Administration, Cancer Res 47:6528-6531, 1987.
4. T. Lindmo, E. Boven, F. Cuttitta, J. Fedorko, P. Bunn Jr. Determination of the Immunoreactive Fraction of Radiolabeled Monoclonal Antibodies by Linear Extrapolation to Binding at Infinite Antigen Excess, J Immunol Metho 72:77-89, 1984.

5. W. Bloomer, R. Lipsztein, J. Dalton, Antibody-Mediated Radiotherapy, *Cancer* 55:2229-2233, 1985.
6. R. Begent, P. Keep, A Green, F. Searle, K. Bagshawe, R. Jewres, et al. Liposomally Entrapped Second Antibody Improves Tumour Imaging with Radiolabelled Antitumour antibody, *The Lancet* 739-741, 1982.
7. D. Hnatowich, W. Layne, R. Childs, D. Lanteigne, M. Davis, Radioactive Labeling of Antibody: A Simple and Efficient Method, *Science* 220:613-615, 1983.
8. Z. Yao, M. Zhang, H. Sakahara, T. Saga, H. Kobayashi, Y. Nakamoto, et al. Increased Streptavidin Uptake in Tumors Pretargeted with Biotinylated Antibody Using a Conjugate of Streptavidin-Fab Fragment, *Nucl Med Biol* 25:6:557-560, 1998.
9. D. Hnatowich, F. Virzi, M. Rusckowski, Investigations of Avidin and Biotin for Imaging Applications, *J Nucl Med* 28:1294-1302, 1987.
10. A. Kassis, P. Jones, K. Mataka, S. Adelstein, Antibody-Dependent Signal Amplification in Tumor Xenografts after Pretreatment with Biotinylated Monoclonal Antibody and Avidin or Streptavidin, *J Nucl Med* 37:343-352, 1996.
11. G. Paganelli, C. Belloni, P. Magnani, F. Zito, A. Pasini, I. Sassi, et al. Two-step tumour targeting in ovarian cancer patients using biotinylated monoclonal antibodies and radioactive streptavidin, *Eur J Nucl Med* 19:322-329, 1992.
12. C. Sung, W. Osdol, T. Saga, R. Neumann, R. Dedrick, J. Weinstein, Streptavidin Distribution in Metastatic Tumors Pretargeted with a Biotinylated Monoclonal Antibody: Theoretical and Experimental Pharmacokinetics, *Cancer Res* 54:2166-2175, 1994.
13. E. Bos, W. Kujipers, M. Meesters-Winters, d. Pham, A. Haan, A. Doornmalen, et al. In Vitro Evaluation of DNA-DNA Hybridization as a Two-Step Approach in Radioimmunotherapy of Cancer, *Cancer Res* 34:79-3486, 1994.
14. T. Saga, J. Weinstein, J. Jeong, T. Heya, J. Lee, N. Le, et al. Two-Step Targeting of Experimental Lung Metastases with Biotinylated Antibody and Radiolabeled Streptavidin, *Cancer Res* 54:2160-2165, 1994.
15. D. Goodwin, C. Meares, M. Osen, Biological Properties of Biotin-Chelate Conjugates for Pretargeted Diagnosis and Therapy with the Avidin/Biotin System, *J Nucl Med* 39:1813-1818, 1998.
16. M. Cremonesi, M. Ferrari, M. Chinol, M. Stabin, C. Grana, G. Prisco, et al. Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin: dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients, *Eur J Nucl Med* 26:110-120, 1999.

17. G. Paganelli, P. Magnai, F. Zito, E. Villa, F. Sudati, L. Lopako, et al. Three-step Monoclonal Antibody Tumor Targeting in Carcinoembryonic Antigen positive Patients. *Cancer Res* 51:5960-5966, 1991.
18. Y. Nakamoto, T. Saga, H. Sakahara, Z. Yao, M. Zhang, N. Sato, et al. Three-step Tumor Imaging with Biotinylated Monoclonal Antibody, Streptavidin and ¹¹¹In-DTPA-Biotin. *Nucl Med Biol* 25:2:95-99, 1998.
19. M. Zhang, Z. Yao, H. Sakahara, T. Saga, Y. Nakamoto, N. Sato, et al. Effect of Administration Route and Dose of Streptavidin or Biotin on the Tumor uptake of Radioactivity in Intraperitoneal Tumor with Multistep Targeting. *Nucl Med Biol* 25:2:101-105, 1998.
20. D. Kukis, G. DeNardo, S. DeNardo, G. Miricks, L. Miers, D. Greiner, et al. Effect of the Extern of Chelate Substitution on the Immunoreactivity and Biodistribution of ZIT-BAT-Lym-1 Immunoconjugates. *Cancer Res* 55:878-884, 1995.