

국산 항 CEA 항체의 I-131, Tc-99m 표지법 확립 및 면역학적 특성 분석

서울대학교 의과대학 내과학교실¹, 생화학교실², 암연구소³

정준기^{1,3} · 이동수¹ · 이명철¹ · 정홍근^{2,3} · 고창순¹

서울대학교병원 핵의학과

홍미경 · 최석례 · 서일택

동국대학교 의과대학 생화학교실

정 준 호

= Abstract =

Establishment of I-131, Tc-99m Labeling Methods to In-house Anti-CEA Antibodies and Evaluation of the Immunological Characteristics

June-Key Chung, M.D.,^{1,3} Dong Soo Lee, M.D.,¹ Myung Chul Lee, M.D.,¹
Hong-Keun Chung, Ph. D.^{2,3} and Chang-Soon Koh, M.D.¹

*Department of Internal Medicine¹, Biochemistry², and Cancer Research Institute³
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

Mee Kyoung Hong, Seok Rye Choi and Il Taek Seo

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Jun Ho Chung, M.D.

Department of Biochemistry, Dongguk University College of Medicine, Kyungju, Korea

Cancer cells have several tumor-associated antigens on the cell surfaces, and antibodies against these antigens have been developed by many investigators. Radiolabeled antibodies have been used as new methods to diagnose and treat malignant tumors. Especially anti-carcinoembryonic antigen (CEA) is the most popular antibody for these purposes.

In this investigation, we tried to label ¹³¹I and ^{99m}Tc to anti-CEA monoclonal antibodies which were developed in the Seoul National University College of Medicine. We found CEA-79 and CEA-92 antibodies had the better immunological characteristics among 8 anti-CEA monoclonal antibodies. And radioiodination of CEA-79 could be performed by chloramine-T method, while radioiodination of CEA-92 by iodogen method.

To label these antibodies with ^{99m}Tc, we used pretargeting transchelation as direct labeling method.

*본 연구는 과학재단 암연구소의 보조에 의하여 이루어 졌음. (연구번호 KOSEF-SRC-56-CRC-11)

At first, ^{99m}Tc was bound to glucaric acid, and monoclonal antibody was reduced by β -mercaptoethanol. When these were incubated together, ^{99m}Tc bound to glucarate was switched to monoclonal antibody because of higher affinity. We established conditions of several steps in this method.

Anti-CEA monoclonal antibodies labeled with ^{131}I and ^{99m}Tc are expected to be used valuably in the detection and treatment of malignant tumors.

서 론

대상 및 방법

종양 관련항원은 각종 악성종양에서 정상조직보다 훨씬 높은 농도로 발현되고 있어서 현재 이에 대한 항체를 방사성핵종으로 표지하여 암을 진단하고 치료하려는 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁻⁴⁾. 특히 암태아성 항원 (carcinoembryonic antigen: CEA)은 소화기계 암의 여러 다른 악성종양에서도 높게 발현되어 범암종성 (pan-carcinoma) 항원으로 알려져 있다. 이에 대한 항체는 CEA 농도를 체액에서 측정하는 방사면역계수법과 방사성동위원소 표지 항체를 인체에 주입해서 특이적으로 종양에 섭취되어 종양을 영상화하는 방사면역신티그라피 등에 많이 이용되고 있다^{1,3,5)}. 특히 최근에는 하이브리도마법의 발달로 다량의 단세포군 항체가 생산되어 사용되고 있다.

이들 항체는 여러가지 서로 다른 면역학적 특성을 보일 수 있어 적절한 항체를 선택하는 것이 중요하다. 또한 항체에 방사성동위원소를 표지할 때 항체의 구조가 변화되어 항원에 결합하는 능력을 잃게되는 수가 있다. 따라서 표지항체가 면역 반응성을 얼마나 유지하고 있는지를 측정하는 것도 중요하다.

그러나 지금까지의 항체 선택은 경험적인 방법에 의해 이루어져 비효율적이며 항체의 성질을 파악할 수 없다는 단점이 있어 왔다. 본 연구에서는 서울대학교 의과대학에서 자체 개발한 항 CEA 항체에 대한 ^{131}I , ^{99m}Tc 핵종 표지 조건을 확립하고 항 CEA 항체의 면역학적 특성을 분석하여 방사면역계수법과 방사면역신티그라피에 가장 적절한 항체를 선택하고자 한다.

본 연구의 내용은 우선 서울대학교 의과대학 생화학교실에서 만든 하이브리도마를 이용하여 항 CEA 단세포군 항체를 제조 분리하고 기존의 여러 방법을 이용해서 ^{131}I , ^{125}I 을 표지하는 것이다. 또한 본 연구진이 개발한 방법으로 ^{99m}Tc 을 표지시키고 이렇게 표지된 항 CEA 단세포군 항체를 한국인의 소화기암 세포주와 시험관내에서 반응시켜 방사성동위원소 표지 항체의 면역 반응성과 항원/항체 친화상수를 산출하였다. 산출된 면역학적 특성을 분석하여 좋은 특성을 가지면서 표지 방법이 간단한 조건을 확립하였다.

1. 항체의 방사성옥소 표지

10~20 mg/ml의 농도로 농축시킨 항체를 Greenwood 등의 chloramine-T법⁷⁾과 Fraker와 Speck이 고안한 iodogen법⁸⁾에 따라 방사성옥소 표지를 하였다. Sephadex G-25 column으로 방사성옥소 표지 항체를 분리하였다.

2. 항체의 ^{99m}Tc 표지

직접 표지법중의 하나인 pretargeting transchelation 법으로 ^{99m}Tc 을 표지하였다(Fig. 1). 여러 착화제(chelator) 중 ^{99m}Tc 이 잘 표지되고 비교적 약한 착화제인 glucarate를 본 실험에서는 사용하였다(Table 1). 단세포군 항체에 대한 ^{99m}Tc 의 표지효율은 완충액, pH, 반응시간, 환원제인 주석이온의 농도 등에 따라 좌우된다. 본 실험에서는 CEA-79 항체를 대상으로 다음과 같

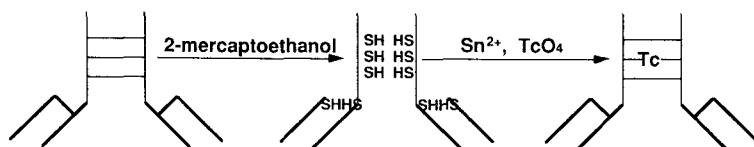


Fig. 1. General scheme showing outline of ^{99m}Tc labeling procedure to antibody.

이 표지조건들을 변화시켜 보았다.

- 1) 적정 Sn²⁺의 농도를 결정하기 위해 glucarate에 대한 Sn²⁺의 몰비를 변화시켜 표지하였다.
- 2) 적정 pH(5~7)를 결정하기 위해 sodium bicarbonate로 pH를 변화시켜 표지하였다.
- 3) 항체 환원에 필요한 β-mercaptoethanol의 양을 변화시켜 보았다.
- 4) ^{99m}Tc와 glucarate가 표지되는데 소요되는 시간을 결정하기 위해 ^{99m}Tc와 glucarate의 반응시간을 변화시켰다.
- 5) ^{99m}Tc-glucarate와 환원된 항체의 반응에 필요한

적정 pH를 결정하기 위해 pH를 변화시켜 표지하였다.

3. 표지효율 확인

표지효율은 종이 크로마토그래피(Whatmann, 3 MM), 즉석박층크로마토그래피(Instant Thin Layer Chromatography: ITLC)로 구하였다. 생리식염수(종이)와 Umezawa(10% 초산 암모늄염 : 메탄올=1:1)와 아세톤(즉석박층)에 전개시켜 종이크로마토그래피로는 ^{99m}Tc 표지 항체의 양을, 즉석박층크로마토그래피로는 유리 과산화테크네슘(free pertechnetate)과 ^{99m}Tc 교질의 양을 각각 구하였다.

4. 방사성동위원소 표지 항체의 면역반응성 (immunoreactivity) 측정

CEA를 발현하는 SNU-C4 대장암 세포주를 시험관에 100 μl당 0.25×10⁶, 0.5×10⁶, 1×10⁶, 2×10⁶, 4×10⁶, 8×10⁶의 농도로 준비하였다. 방사성동위원소 표지 항체를 5 ng/75 μl씩 가하여 세포와의 총 결합도(total binding)를 측정하고 방사성동위원소를 표지시키지 않은 항체를 25 μg/25 μl 가하여 세포와의 비특이 결합(nonspecific binding : NSB)을 보았다.

각 세포의 항 CEA항체에 관한 특이결합(specific binding)은 다음과 같다.

Specific binding (B%)

$$= \frac{\text{Total binding} - \text{NSB}}{\text{Total count}} \times 100$$

위의 B%를 각 시험관의 세포농도에 관하여 도시하고 IBM computer의 lotus program에서 곡선을 fitting시

Table 1. Labeling Yields of Several Chelating Agents with ^{99m}Tc

Chelating agent	TcO ₄ ⁻	HR-Tc	Labeling yield
Barbituric acid	79.2	9.6	11.2
Citric acid	4.1	12.2	83.7
DTPA	2.2	1.9	95.9
Edetic acid	44.9	1.1	54.0
Glucaric acid	2.4	12.9	84.7
Gluconic acid	1.4	12.0	86.6
Iminodiacetic acid	22.6	26.1	51.3
Mannitol	4.1	93.9	2.0
Maleic acid	57.2	34.4	8.4
Oxalic acid	67.7	1.4	30.9
Pyrophosphate	14.8	0.7	84.5
Tartaric acid	7.5	34.8	57.7

* HR-Tc : Hydrolyzed Reduced Tc.

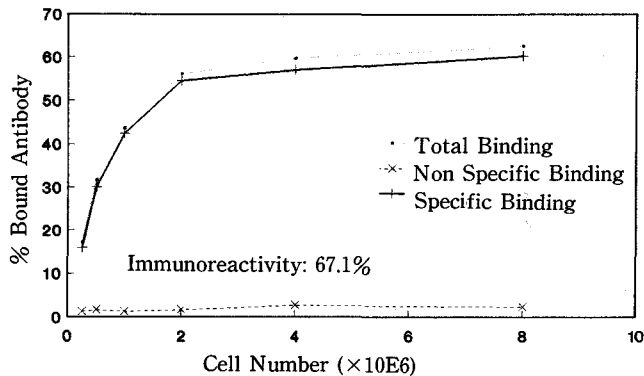


Fig. 2. Cell binding assay of ¹²⁵I CEA-79 monoclonal antibody with SNU-C4 colon cancer cells.

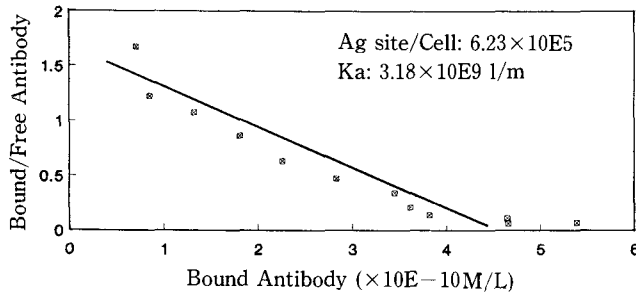


Fig. 3. Scatchard plot of ¹²⁵I CEA-79 monoclonal antibody with SNU-C4 colon cancer cells.

켜 세포와 결합하는 최대의 B%, 즉 면역반응성을 산출하였다(Fig. 2).

5. Scatchard 분석

¹²⁵I 표지 항 CEA항체를 300 ng/100 μl부터 0.5 ng/100 μl까지 단계적으로 희석시켜 1×10⁶개의 SNU-C4 세포와 반응시켜 결합 방사능치를 측정하였다. 면역반응성 측정과 같은 방법으로 비특이결합을 구하여 표지항체와 세포간의 특이결합도를 산출하였다.

세포와 결합된 항체의 농도를 가로축에, 결합항체와 유리 항체의 비를 세로축으로 하여 도시하였다. 이 점들을 연결시킬 수 있는 직선을 구하면 X절편이 SNU-C4 세포막의 CEA 농도이고 기울기가 친화상수가 된다(Fig. 3).

결 과

1. 방사성숙소표지

8종류의 항 CEA항체는 Table 2와 같이 거의 비슷한 표지효율을 보이고 있으나 다른 항체에 비해 CEA-79항체와 CEA-92항체가 면역반응성과 친화상수의 수치가 가장 높게 나타났다. 위 결과를 바탕으로 CEA-79와 92항체를 선택하여 각각에 대하여 chloramin-T법과 iodogen 법에서의 표지효율과 면역반응성을 비교해 보았다.

Table 3과 같이 CEA-79항체는 표지효율이 둘 다 좋았으나 면역반응성은 chloramine-T법으로 표지한 것이 더 우수하였다. CEA-92항체는 표지효율과 면역반응성이 iodogen 법에서 우수하게 나타났다.

방사성 표지물의 비방사능이 높은 것이 바람직하지만

Table 2. Immunologic Characteristics of Various CEA Monoclonal Antibodies

Antibody	Labeling efficiency (%)	Immunore-activity (%)	Affinity constant (l/m)
CEA-173	78.9	16.5	15.5×10 ⁷
144	74.7	0.7	—
142	75.6	—	—
92	78.7	60.8	111.0×10 ⁷
55	79.2	27.5	21.4×10 ⁷
129	78.1	32.8	13.4×10 ⁷
165	85.4	15.6	15.6×10 ⁷
79	80.8	67.1	193.0×10 ⁷

Table 3. Comparison of Radioiodine Labeling Methods Between CEA-79 and CEA-92 Antibodies

Antibody	Labeling method	Labeling efficiency (%)	Immunore-activity (%)
CEA-79	Chloramine-T	96.1	51.6
	Iodogen	99.1	19.5
CEA-92	Chloramine-T	59.7	—
	Iodogen	91.7	53.0

비방사능이 너무 높아도 면역반응성이 상실될 수가 있다. CEA-79항체에 대해 비방사능을 100 mCi/mg까지 변화시켜 본 결과 표지효율도 별 차이가 없었으며 면역반응성도 근본적인 차이가 없었다(Table 4).

2. ^{99m}Tc 표지

Sodium bicarbonate buffer로 반응액의 pH를 4-7

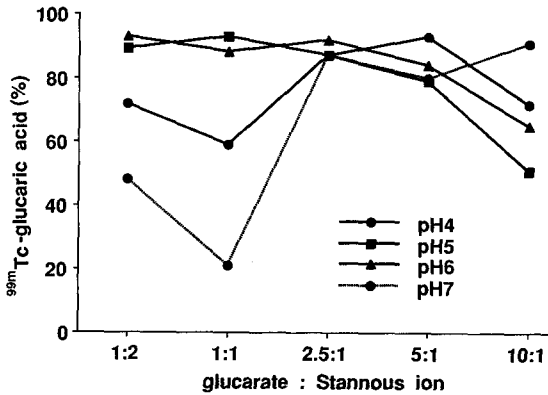


Fig. 4. Effect of glucarate: Sn²⁺ molar ratio upon glucuric acid labeling efficiency in sodium bicarbonate buffer.

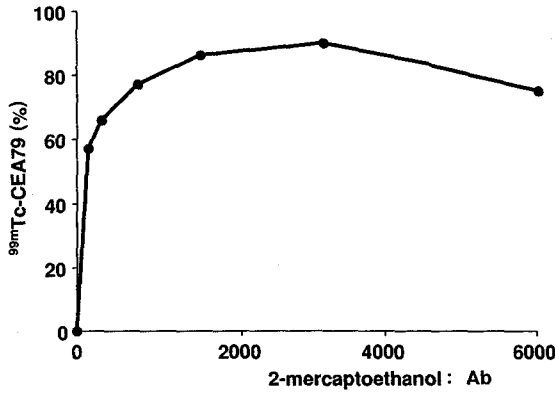


Fig. 5. Effect of antibody reduction conditions upon 99mTc antibody labeling efficiency.

Table 4. Change of Labeling Efficiency and Immunoreactivity According to the Change of Specific Activity in CEA-79 Radioiodine Labeling

Specific activity (mCi/mg)	Labeling efficiency (%)	Immunoreactivity (%)
0.5	88.1	59.3
1	85.9	53.7
2	97.9	51.9
5	95.1	52.1
10	97.6	55.7
20	92.7	55.9
25	90.4	54.0
50	98.6	56.9
100	92.5	53.4

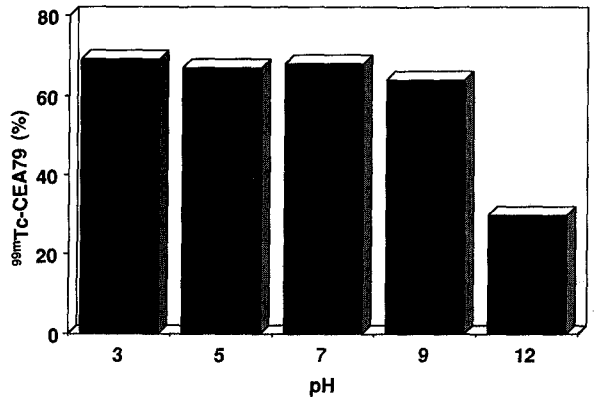


Fig. 6. Effect of pH upon antibody labeling efficiency.

로 변화시키고 glucarate : Sn²⁺의 농도를 변화시킨 결과 pH 5나 6에서 glucarate : Sn²⁺의 농도비가 1 : 2~2.5 : 1일 때가 좋은 표지효율을 보이는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4).

항체에 99mTc를 표지하려면 우선 환원제를 사용하여 항체의 disulfide bond를 환원시켜 유리-SH기를 만들어 주어야 99mTc이 표지된다. 이때 환원제의 양이 너무 작으면 disulfide bond의 환원이 불완전하게 되며 과량의 환원제를 처리하면 항체의 면역반응성의 저하를 초래하게 된다. 항체에 대한 β-mercaptoethanol의 물비를 변화시켜 반응시킨 결과 항체 : β-mercaptoethanol의 물비가 1 : 1000~1 : 3000에서 표지효율이 좋은 것으로 나타났다 (Fig. 5).

Glucarate에 99mTc를 반응시키면서 5, 10, 20, 40, 60분마다의 표지효율을 조사한 결과 5~10분이면 glucarate의 99mTc 표지가 이루어지는 것을 알 수 있었다. 99mTc의 glucarate 표지 반응은 빠른 반응으로 시험관내에서 60분까지 표지효율의 큰 저하는 일어나지 않았으나 시간이 지남에 따라 다소 표지효율이 저하되는 것으로 나타났다. 즉 99mTc와 glucarate의 표지후 5~10분 이내에 항체표지에 사용하는 것이 바람직한 것으로 보인다.

항체에 대한 99mTc 표지시 pH의 영향을 조사한 결과 산성, 중성, 약알칼리성에서는 비교적 고른 표지 효율을 보인 반면 pH 12의 알칼리성에서는 표지효율이 크게 저하되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 6). pH가 높으면 교질의 생성이 증가할 수 있고 낮은 pH에서는 항체의 변성이 일어날 수 있으므로 pH 5나 pH 7에서 항체의 99mTc

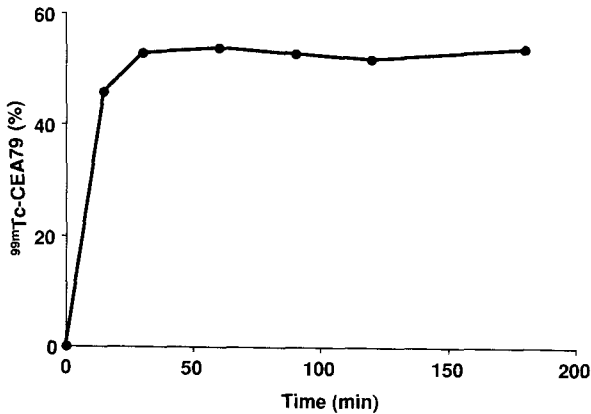


Fig. 7. The labeling of antibody with ^{99m}Tc as a function of time.

60~70%의 효율로 ^{99m}Tc을 표지할 수 있었고, ^{99m}Tc 표지 CEA-79항체의 면역반응성은 60% 정도로 방사성 옥스포지 항체와 큰 차이가 없었다.

고 안

악성종양의 진단은 기존의 X-선 영상법외에도 초음파 영상법, 단층촬영술(Computerized Tomography; CT), Magnetic Resonance Image (MRI) 등의 등장으로 진일보 하였으나 아직도 조기 진단은 해결하여야 할 과제로 되어 있다. 특히 지금까지의 영상법으로는 1 cm 이하의 종양은 영상화에 한계점이 되어 있고 이 1 cm의 종양에도 10억개의 암 세포가 존재하고 있어 이론상 암을 초기에 영상진단하기는 불가능하다.

이에 새로운 악성종양의 진단법이 요구되고, 방사성 동위원소를 이용한 핵의학적 방법이 그 가능성으로 제시 연구되고 있다. 악성종양에는 정상세포와는 달리 종양 관련 항원(tumor associated antigen)이 다량 존재하는 경우가 많고 이에 대한 항체를 만들어 동위원소로 표지하여, 이 방사성동위원소 표지 항체를 인체에 주입하여 악성종양을 영상화(방사면역신티그라피)하고 치료(방사면역치료법)하는 방법이 연구 시도되고 있다^{1,3,9}. 특히 1975년 하이브리도마 기법의 개발로 단세포군 항체를 손쉽게 다량 생산하게 됨으로써 이 분야의 발전에 큰 기여를 하여 대장암, 위암, 췌장암, 폐암, 유방암, 흑색종, 난소암, 림프종 등 각종 악성종양에 대한 단세포군 항체를 만들 수 있게 되어 방사면역신티그라피는 현대 선진국에서 활발히 연구되어 CEA, CA-125 등에 대한 kit가 상품화까지 되어 있는 단계이다.

이중 의학계에서 현재까지 가장 많이 연구되어온 종양 항원이 CEA이고 1970년부터 이에 대한 단세포군 항체가 개발되어 방사면역신티그라피가 시도되어 왔다⁹. CEA는 종양태아 단백질(oncofetal protein)의 일종으로 태아의 대장에서는 존재하나 성인이 되면서 소실되는 항원으로 소화기계의 암에서 다시 그 세포질과 세포막에서 농도가 급격히 증가된다. 우리나라에서 많은 위암, 대장암, 췌장암 등에서 모두 높은 빈도로 증가되며 소화기계 암 이외에도 폐암, 유방암 등에서도 증가되는 소위 “범암종성 항원(pan-carcinoma antigen)”으로 여겨지고 있다¹⁰. 이러한 단세포군 항체에 표지시키는 방사성동

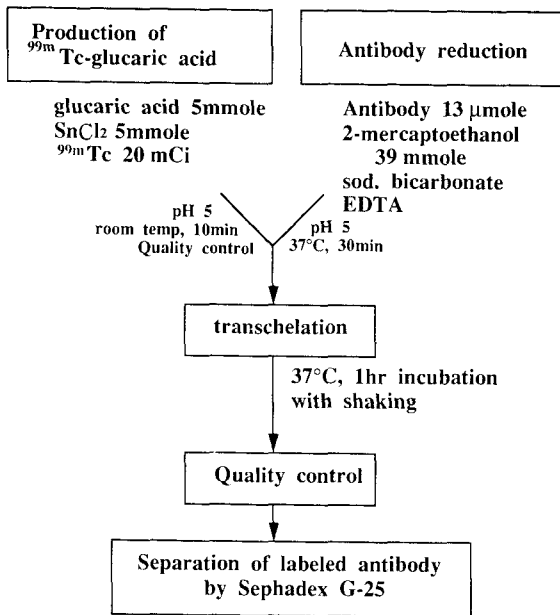


Fig. 8. Summary of antibody labeling procedure with ^{99m}Tc.

표지를 하는 것이 바람직하다고 여겨진다.

항체에 대한 ^{99m}Tc의 표지에 필요한 시간은 30~60분 이면 충분한 것으로 생각되며(Fig. 7) 표지된 항체는 생체의(in vitro)에서 시간의 경과에 따른 표지효율의 큰 저하는 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 그림 8과 같은 표지과정을 확립할 수 있었다. 이러한 방법으로 CEA-79 항체를

위원소로는 지금까지 ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I 등이 많이 사용되어 왔고, 특히 최근에는 손쉽게 구할 수 있고 선명한 영상을 얻을 수 있는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 의 표지법에 관한 연구가 활발히 연구되고 있다.

우리나라에서도 1988년 서울대학교 의과대학 생화학 교실에서 이, 정 등이 사람 대장암 세포주인 LS174T에서 CEA 항원을 분리하고 이를 balb/c 마우스에 감작시켜 항 CEA 항체들을 생산하는 하이브리도마를 만드는 데 성공하였다⁸⁾. 이들 항 CEA 단세포군 항체는 CEA에 대해 면역반응성이 있고 다른 정상 혈청 성분과는 반응하지 않음을 보고하였다.

항 CEA 항체를 이용한 임상적인 방사면역신티그라피의 시도는 1978년부터 다세포군 항체 (polyclonal antibody)를 이용하여 시작되었다⁹⁾. 단세포군 항체가 개발되면서 더욱 활발하게 많은 시도가 있어 왔고 소화기암에서의 진단적 예민도는 50~90%로 다양한 결과를 보고하고 있다^{11,12)}. 특히 처음의 시도에서 쓰이던 ^{131}I 표지법에서는 진단적 예민도가 낮았으나 ^{111}In , ^{123}I 표지법이 개발되면서 진단적 예민도도 점차 증가하고 있다. 1989년 본 연구팀에서도 누드마우스에 한국인 대장암 세포주인 SNU-C4를 이식시키고 국산 항 CEA 항체인 CEA-92에 ^{131}I 을 표지하고 주입하여 정상조직에 비하여 종양내에 CEA 항체가 3배정도 더 많이 집적됨을 증명하였고¹³⁾, 또한 CEA-79 항체가 종양조직내에 14.0% ID/g (종양 1g당 주입 항체량의 14%) 정도 집적됨을 보고한 바 있다¹⁴⁾.

그러나 이러한 ^{131}I 표지법은 간편한 방법이지만 하나 ^{131}I 의 감마에너지가 364 keV로 높아 해상력이 낮은 영상을 얻게 되고, 반감기가 8일로 길고 베타선도 동시에 방출하여 인체내에 방사선 피폭량이 많아진다는 단점을 가지고 있었다. ^{123}I 은 감마카메라 영상에 좋은 159 keV의 에너지를 내고 반감기가 13.3시간으로 짧으나 cyclotron에서만 생산되기 때문에 보편적으로 쓰일 수 없다는 제한점이 있다. 이에 대체하는 방사성동위원소로 개발된 ^{111}In 은 에너지는 감마카메라 영상에 해상력이 좋은 172~247 keV에 속하나 가격이 비싸고 특히 우리나라에서는 전량을 수입에 의존해야 한다는 문제점을 가지고 있었다¹⁰⁾. 또한 ^{111}In 은 세말내피계 세포에 비특이적으로 (예를 들면 Fc 수용체) 결합되기 때문에 종양 부위 영상에 어려운 경우도 있다. 이에 값싸고 해상력이 좋으면서 다른 핵의학적 검사법에서 많이 쓰이고 있는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 표

지법에 관한 연구가 방사면역신티그라피 연구의 초창기부터 꾸준히 시도되어 있다^{15,16)}.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 은 물리적인 성상이 극히 우수하기 때문에 감마 카메라영상에 좋은 방사성동위원소로 흔히 쓰이고 있다. 또한 $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ 발생기에서 부터 쉽게 구할 수 있기 때문에 현재 우리나라의 핵의학과에서도 널리 사용되고 있다. 그러나 이러한 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 의 복잡한 화학적인 성질 때문에 어려움을 겪게 된다. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 를 방사성의약품에 표지시킬 경우 반응물에 산소가 있을 때에는 환원된 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 을 다시 산화시켜 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 과산화테크네튬을 형성하게 된다. 또한 환원된 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 이 가수분해되면 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 교질을 형성하게 된다.

단세포군 항체에 대한 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 의 표지법은 크게 나누어 직접표지법 (direct labeling)과 간접표지법 (indirect labeling)이 있다. 직접표지법은 항체와 환원된 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 을 직접 반응시키는 것으로 항체에 있는 아미노산기에 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 이 결합하게 된다. 연구자에 따라 buffer system, pH, 반응시간 등이 다양하지만 공통점은 환원제로서 주석이온을 사용하는 것이다^{15,18)}. 이 방법의 장점은 표지 조건이 강력하지 않고 단순하다는 것이지만, 단점으로 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 과 항체의 결합이 불안정하기 때문에 표지 항체를 분리하기 위한 특수한 분리법을 사용해야 한다는 것이다. 간접표지법은 강력한 착화제를 사용하여 항체와 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 을 착화시키는 것이다. 지금까지 사용되고 있는 착화제로는 DTPA, cyclic tetraamine, diamide dithiol, thiosemicarbazone 등이 있다^{19~21)}. 이들 중 DTPA가 가장 많이 사용되고 있으며 항체당 8개 또는 14개의 DTPA가 필요하다고 연구되어 있다. 그러나 이 간접적인 방법의 큰 문제점은 항체의 성질이 변화되어 표지된 항체가 항원과 결합할 수 있는 면역반응성이 감소하게 되는 것이다. 또한 이 방법은 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 이 착화제에 붙지 않고 항체에 직접 붙는율이 높으며, 항체에 직접 결합된 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 은 안정성이 낮아 있어 생체내에 주입시 항체와 분리되어 배후방사능을 높이는 결과를 초래하게 된다. 직접표지법이 현재 활발히 연구되고 있고, 특히 최근에는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 을 약한 착화제에 표지시키고 여기에 환원된 항체를 반응시키면 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 이 더 강한 친화성을 가지는 항체내 disulfide bond에 결합하는 방법이 사용되고 있다. Pretargeting transchelation이라고 하는 이 방법은 항체표지에 사용되는 착화제 (chelating agent)로 glucarate, tartrate, methylene diphosphonate

(MDP), pyrophosphate, gluconic acid을 사용하는데 이중 glucarate가 주석이온이 교질로 되지 못하게 하는 능력이 가장 큰 것으로 여겨지고 있다. Glucaric acid를 ^{99m}Tc 로 표지하고자 할 때 Sn^{2+} 의 농도가 높거나 pH가 높으면 교질의 생성이 많아지며 Sn^{2+} 의 농도가 낮거나 산소와의 접촉이 일어나면 유리 TcO_4^- 의 양이 증가한다. 따라서 glucaric acid에 ^{99m}Tc 표지의 적정조건을 확립하기 위해서는 Sn^{2+} 의 농도와 pH의 결정이 필수적이다. 현재까지의 ^{99m}Tc 표지효율은 60~70%이지만 이들의 조건을 점차 개선하고 실험기법을 향상시켜 더 높은 효율을 얻게 노력하여야 한다. ^{99m}Tc 교질은 환원된 ^{99m}Tc 이 stannous hydroxide와 결합될 때에도 또한 생성된다. 따라서 이러한 여러가지 반응물은 항체의 양, 착화제의 양, 환원제의 양에 따라 변화하게 되고 또한 반응물의 pH, 산소량, 반응시간, 완충액 등에 따라 변화하게 된다.

본 실험에서 여러 항 CEA단세포군 항체들 중에서 면역학적인 특성을 비교하였을 때 CEA-79, 92항체가 가장 좋은 결과를 보여 이들 항체를 선택할 수 있었다. CEA-79항체는 chloramine-T법으로, CEA-92항체는 iodogen법으로 가장 우수한 면역학적 성질을 보이고 있다. 이 두 항체의 구조상의 차이 때문에 이와같이 서로 다른 표지법이 필요한 것으로 추측된다. 이 두 항체를 면역반응성이 60% 전후로 또 친화상수가 10^9 l/m로 비교적 우수한 면역학적 특성을 가지고 있다. 이처럼 CEA 발현 세포주를 이용하여 항체의 면역학적 특성을 측정하는 세포결합검사법 (cell binding assay)이나 Scatchard 분석방법은 다른 단세포군 항체에서도 방사면역계수법이나 방사면역신티그라피 등에 사용될 적절한 항체를 선택하는 기준으로 사용될 수 있을 것이다.

요 약

서울대학교 의과대학에서 개발한 항 CEA항체에 대한 방사성옥소 및 ^{99m}Tc 의 표지법을 개발하고 이런 표지항체의 면역학적 특성을 분석하였다.

1) 8가지의 항 CEA의 단세포군 항체중 CEA-79항체와 CEA-92항체가 가장 좋은 면역학적 특성을 보였다. 표지항체의 면역반응성은 60% 정도이었고, 항원/항체 친화상수는 $1\sim 2 \times 10^9$ l/m 이었다.

2) CEA-79항체는 chloramine-T법으로, CEA-92항

체는 iodogen 법으로 방사성옥소를 표지하는 것이 가장 좋은 표지효율 및 면역반응성을 보였다.

3) CEA-79항체는 0.5 mCi/mg에서부터 100 mCi/mg까지 비방사능을 변화시켰을 때 표지효율이나 면역반응성에 유의한 차이는 발견할 수 없었다.

4) Glucarate를 이용한 pretargeting transchelation 법으로 CEA-79 항체를 ^{99m}Tc 로 표지하는 조건을 확립하였다. 표지효율은 60~70%이었다.

본 실험을 통하여 얻은 적절한 조건의 ^{131}I 과 ^{99m}Tc 표지방법의 확립은 앞으로 방사면역신티그라피와 방사면역치료법에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 실험의 ^{99m}Tc 표지법에 크게 도움을 주신 미국 NIH의 백창흠, 정재민 선생님께 깊이 감사드립니다.

REFERENCES

- 1) Goldenberg DM, DeL and F, Kim E, et al: *Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers photoscanning. N Engl J Med* 298:1384, 1978
- 2) Larson SM, Brown JP, Wright PW, et al: *Imaging of melanoma with I-131-labeled monoclonal antibodies. J Nucl Med* 24:123, 1983
- 3) Larson SM, Carrasquillo JA, Reynolds JC: *Radioimmunodetection and radioimmunotherapy. Cancer Invest* 2:364, 1984
- 4) Bernhard MI, Hwang KW, Foon KA: *Localization of ^{111}In - and ^{125}I -labeled monoclonal antibody in guinea pigs bearing line 10 hepatocarcinoma tumors. Cancer Res* 43:4429, 1983
- 5) Chung HK, Lee JH, Kim SR, et al: *Radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen employing monoclonal antibodies. Korean J Biochem* 21:21, 1989
- 6) Lee JM, Chung HK, Kim SW: *Purification of carcinoembryonic antigen from culture supernatant of human colon cancer cell line, LS174T using monoclonal immunoaffinity chromatography. Korean J Biochem* 20:23, 1988
- 7) Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: *The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem J* 89:114, 1963
- 8) Fraker PJ, Speck JC: *Protein and cell membrane*

- iodinations with a sparingly soluble chloramine, Biochem. Biophys Res Commun* 80:849, 1978
- 9) Carrasquillo JA, Krohn KA, Beaumier P, et al: *Diagnosis of and therapy for solid tumors with radiolabeled antibodies and immune fragments. Cancer Treat Rep* 68:317, 1984
 - 10) 고창순 : 핵의학, p 720, 서울, 고려의학사, 1992
 - 11) Beierwaltes WH: *Radioimmunotherapy of cancer: Historical perspectives and prospects for the future. In: Srivastava SC, ed. Radiolabeled monoclonal antibodies for imaging and therapy. p 739, New York, Plenum Press, 1988*
 - 12) Colcher D, Esteban JM, Carrasquillo JA, et al.: *Quantitative analysis of selective radiolabeled monoclonal antibody localization in metastatic lesions of colorectal cancer patients. Cancer Res* 47:1185, 1987
 - 13) 신성해, 문대혁, 이명혜, 이동수, 정준기, 이명철, 고창순, 염미경, 정재민, 박재갑, 정홍근 : 이중이식된 인체 대장암에서 항 태아성 암 항원 단세포군 항체 IgG 및 F(ab')₂ 분절을 이용한 방사면역검출법, 대한내과학회지 40:188, 1991
 - 14) 궁성수, 김승택, 정준기, 이명철, 고창순 : 누드마우스에 이식된 인체 대장암 모델에서 주입된 항 CEA 단세포군 항체의 종양내 집적에 관한 인자, 대한내과학회지 38:240, 1990 (초록)
 - 15) Pettit Wa, DeLand FH, Bennett SJ, et al: *Improved protein labeling by stannous tartrate reduction of pertechnetate. J Nucl Med* 21:59, 1980
 - 16) Arano Y, Yokoyama A, Fukukawa T, et al: *Technetium-99m-labeled monoclonal antibody with preserved immunoreactivity and high in vivo stability. J Nucl Med* 28:1027, 1981
 - 17) Paik CH, Eckelman WC, Reba RC: *Important chemical variables for labeling antibodies with Indium-111 and Technetium-99m. In: Srivastava SC, ed. Radiolabeled monoclonal antibodies for imaging and therapy. p 253-260, New York, Plenum Press, 1988*
 - 18) Rhodes BA, Zamora PO, Newell KD, et al: *Tc-99m labeling of murine monoclonal antibody fragments. J Nucl Med* 27:685, 1986
 - 19) Khaw BA, Strauss HW, Carvalho A, et al: *Tc-99m labeling of antibodies to cardiac myosin Fab and to human fibrinogen. J Nucl Med* 23:1011, 1982
 - 20) Childs RL, Hnatowich DJ: *Optimum conditions for labeling of DTPA-coupled antibodies with Technetium-99m. J Nucl Med* 26:293, 1985
 - 21) Paik CH, Ebbert MA, Murphy PR et al: *Factors influencing DTPA conjugation with antibodies by cyclic DTPA anhydride. J Nucl Med* 24:1158-1163, 1983