

## 항 암태아성항원에 대한 단세포군항체의 $^{99m}\text{Tc}$ 표지법개발 및 생체분포

울산대학교 의과대학 아산재단 서울중앙병원 핵의학과

문 대 혁

서울대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실\*, 일반의과학교실\*\* 및 암연구소

정준기 · 이명철 · 고창순 · 정홍근\* · 박재갑\*\*

== Abstract ==

### $^{99m}\text{Tc}$ -Labeling of Monoclonal Antibody to Carcinoembryonic Antigen and Biodistribution

Dae Hyuk Moon, M.D.

*Department of Nuclear Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan,  
College of Medicine, Seoul, Korea*

June-Key Chung, M.D.,\* Myung Chul Lee, M.D., Chang-Soon Koh, M.D.

Hong Keun Chung, Ph.D.\* and Jae Gahb Park, M.D.\*\*

*Department of Internal Medicine, Biochemistry\* and General Surgery,\*\* Cancer Research Institute  
Seoul National University, College of Medicine, Seoul, Korea*

This study was designed to evaluate a direct method of  $^{99m}\text{Tc}$  labeling using  $\beta$ -mercaptoethanol as a reducing agent, and to investigate whether  $^{99m}\text{Tc}$  labeled specific monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen (CEA-92) can be used for the scintigraphic localization of human colon cancer xenograft. Purified CEA-92 IgG was fragmented into F(ab')<sub>2</sub> and then labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  by transchelation method using glucarate as a chelator. Labeling efficiency, immunological reactivity and in vitro stability of  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab')<sub>2</sub> were measured and then injected intravenously into nude mice bearing human colon cancer (SNU-C4). Scintigrams were obtained at 24 hour after injection. Then nude mice were sacrificed and the radioactivity was measured.

Labeling efficiency of injected  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab')<sub>2</sub>, immunoreactive fraction and in vitro stability at 24 hour of injected  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab')<sub>2</sub> was 45.2%, 32.8% and 57.4%, respectively. At 24 hour after injection, % ID/g in kidney (46.77) showed high uptake, but %ID/g in tumor (1.65) was significantly higher than spleen (0.69), muscle (0.16), intestine (0.45), stomach (0.75), heart (0.48) and blood (0.45). There was no significant difference between tumor and liver (1.81). Tumor contrast as quantitated by tumor to blood ratio of  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab')<sub>2</sub> was increased significantly ( $p < 0.005$ ) until 24 hours (3.70), and there was no statistical difference from tumor to blood ratio of I-131 CEA-92 F(ab')<sub>2</sub>.

\*본 논문은 1991년 서울대학교병원 일반연구비의 보조로 이루어 졌음.

The scintigram demonstrated localization of radioactivity over transplanted tumor, but significant background radioactivity was also noted over kidney and abdomen.

It is concluded that CEA-92 F (ab')<sub>2</sub> can be labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  by a direct transchelation method using  $\beta$ -mercaptoethanol as a reducing agent and  $^{99m}\text{Tc}$  labeled CEA-92 F (ab')<sub>2</sub> can be used for the scintigraphic localization of human colon cancer xenograft in nude mice model.

## 서 론

방사면역검출법은 종양에 특이적으로 결합하는 항체와 방사성동위원소를 결합시켜서 암의 진단을 특이적으로 할 수 있다.

대부분의 초기의 방사면역검출법의 연구에서는 쉽게 구할 수 있으면서 항체의 표지가 간편한  $^{131}\text{I}$ 이 사용되었다. 이러한  $^{131}\text{I}$  표지법은 간편한 방법이지만 하나  $^{131}\text{I}$ 의  $\gamma$  에너지가 364 keV로 높아 해상력이 낮은 영상을 얻게 되고, 반감기가 8일로 길며,  $\beta$ 선도 동시에 방출하여 인체 내에 방사선 피폭량이 많다는 단점이 있다.  $^{123}\text{I}$ 은 감마 카메라 영상에 좋은 159 keV의 에너지를 내고 반감기가 13.3시간으로 짧으나 cyclotron 에서만 생산되기 때문에 보편적으로 쓰일 수 없다는 제한점이 있다.  $^{111}\text{In}$ 은 에너지는 감마카메라 영상에 좋은 172-247 keV에 속하나 가격이 비싸고 정공간에 높게 집적되기 때문에 종양의 전이가 많은 장기인 간에 전이된 종양 영상이 어렵다.  $^{99m}\text{Tc}$ 은 에너지가 140 keV 로서 감마카메라로 영상하기에 적당하며 값이 싸고 대부분의 핵의학과에서 쉽게 구할 수 있으며 반감기가 6시간으로, 짧아서 더 많은 동위원소 투여가 가능한 등 방사면역검출법의 실용화를 위하여 매우 좋은 방사성동위원소이다. 그러나  $^{99m}\text{Tc}$ 의 항체 표지가 쉽지 않고<sup>1)</sup> 아직 표지방법이 확립되어 있지 않으며 반감기가 6시간으로 충분한 항원항체결합이 이루어지는 시간에 비하여 짧다는 주장이 있다<sup>2)</sup>. 최근  $^{99m}\text{Tc}$  표지 IgG 및 Fab' 분질의 방사면역검출법으로 매우 좋은 종양 진단율이 보고되고 있으나 몇몇 센터에 국한되어 있고 아직 널리 사용되는 표준화된 방법이 없다<sup>3,4)</sup>.

본 연구에서는 국산 항 CEA 단세포군항체인 CEA-92를 transchelation 방법으로  $^{99m}\text{Tc}$  표지하는 방법을 시도하여 확립하고,  $^{99m}\text{Tc}$  표지항체의 표지효율, 면역활성, 친화성, 체외안정성등을 측정하여  $^{99m}\text{Tc}$  표지항체의 성상을 분석하였다. 동시에 인체종양과 같은 병리

학적 소견과 발현을 한다고 알려진 누드마우스 모델에서<sup>5)</sup>  $^{99m}\text{Tc}$  표지 CEA-92 F (ab')<sub>2</sub> 항체를 투여하여 체내분포를 평가하고, 종양과 기타조직 간의 상관관계, 시간에 따른 분포의 차이, 기존의 방법인  $^{131}\text{I}$  CEA-92 F (ab')<sub>2</sub>와 비교 관찰하며, 신티그라피를 실시하여  $^{99m}\text{Tc}$  표지항체로 종양의 국소화의 가능성을 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

대장암세포는 35세의 남자 황혈결장에서 얻어서 1984년부터 서울대학교 의과대학 암연구소에서 배양되고 있는 SNU-C4를 사용하였고 CEA-92 항체를 분비하는 하이브리도마와 항 사람용모성성선자극 호르몬 항체 HCG-326은 서울대학교 의과대학 암연구소에서 제공받았다. Balb/c 마우스는 서울대학교 동물사육실에서 구하였으며 누드마우스(nu/nu Balb/c)는 일본의 CLEA Inc. 에서 구한 6주된 수컷을 사용하였다.

### 2. 실험 개요

항 CEA 단세포군항체인 CEA-92를 분비하는 하이브리도마를 배양하여 단세포 군항체를 생산하고 F (ab')<sub>2</sub> 분질을 만든 다음 CEA-92 F (ab')<sub>2</sub>를  $^{99m}\text{Tc}$  으로 표지하여 표지항체의 표지효율, 면역반응성, 체외안정성을 측정하여  $^{99m}\text{Tc}$  표지항체의 성상을 확인하였다. 인체대장암 세포주인 SNU-C4를 누드마우스 피하에 접종하여 종괴를 생성한 후  $^{99m}\text{Tc}$  표지 CEA-92 F (ab')<sub>2</sub>를 주사하여 종양 및 정상조직에서의 분포를 측정하고 신티그라피를 시행하였다.

### 3. 단세포군항체의 생산, 정제, 친화산수 측정 및 F (ab')<sub>2</sub>의 생산

저자들이 발표하였던 신등의 방법을 사용하였다<sup>6)</sup>.

#### 4. CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>의 <sup>99m</sup>Tc 표지

##### 1) <sup>99m</sup>Tc-glucarate 제조

300 μl의 0.4 M glucarate (pH 5.6)를 Reacti-Vial에 담고 여기에 150 μl의 1.5 mg/ml SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(N<sub>2</sub>)를 통과시킨 물 8 ml에 1 N HCl 2 ml를 가한 다음 15 mg의 SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O를 녹여 제조를 가했다. <sup>99m</sup>Tc를 30 mCi 가하여 섞어주고 vial 뚜껑을 닫은 다음 진공상태로 만들었다. <sup>99m</sup>Tc-glucarate 표지효율을 보기 위해 10분 후에 instant thin layer chromatography(이하 ITLC라 함)를 시행하였다. ITLC의 방법은 다음 항에서 기술하는 바와 같다.

##### 2) CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>의 환원 조건 결정

항체용액 6 mg/ml 300 μl에 100 μl의 0.03 M EDTA (pH 7)와 100 μl의 0.1 M sodium bicarbonate (pH 8.3)를 섞은 다음 질소를 통과시킨 물로 제조된 β-mercaptoethanol(이하 βME라 함)을 βME: F (ab)<sub>2</sub>의 molar ratio가 각각 125 : 1, 250 : 1, 500 : 1, 1000 : 1, 2000 : 1, 3000 : 1, 6000 : 1, 15000 : 1이 되도록 가하여 섞고 37°C에서 30분간 배양하였다. 1) 항에서 표지된 <sup>99m</sup>Tc glucarate를 각각 넣어준 다음 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. ITLC를 시행하여 <sup>99m</sup>Tc F (ab)<sub>2</sub>의 표지효율을 측정하고 7에 기술된 표지항체의 면역반응성을 각각 측정하였다.

##### 3) <sup>99m</sup>Tc 표지

1) 항에서 표지된 <sup>99m</sup>Tc glucarate와, 2) 항에서 결정된 조건에서 환원된 CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>(100 μl의 0.3 M βME; βME: Ab=3000:1)를 섞고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 미리 γ-globulin 용액으로 포화시키고 PBS를 흘려준 Sephadex G-25 column에 부하하여 1 ml씩 모은 다음 dose calibrator로 각 시험관의 방사능을 측정하였다.

##### 4) 표지효율의 측정

Whatman 3 MM paper의 원점에 5% BSA 생리식염수 용액을 20~40 μl 떨어뜨리고 10~15분 말린 다음, 마이크로 피펫으로 약 2 μl의 용액을 떨어뜨린 후 즉시 paper의 끝을 생리식염수 용매에 담그고 용매가 표지된 선까지 올라가도록 전개시켰다. 약 30~45초후 전개가 끝나면 strip을 꺼내어 중앙을 절단했다. 원점부위의 strip(이하 sect 1이라 함)과 상단부의 strip(이하 sect 2이라 함)의 방사능을 감마카운터로 측정하였다. ITLC-

SG strip을 용매 acetone에 전개시킨 후 꺼내어 중앙부를 절단하고 원점부위의 strip(이하 sect 3이라 함)과 상단부의 strip(이하 sect 4라 함)의 방사능을 감마카운터로 측정하였다. ITLC-SGstrip과 Umezawa(10% ammonium acetate: methanol=1:1)을 용매로 하여 같은 방법으로 원점부위의 strip sect 5와 상단부의 strip sect 6의 방사능을 감마카운터로 측정하였다. Hydrolyzed reduced <sup>99m</sup>Tc, 유리 <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>, <sup>99m</sup>Tc glucarate, <sup>99m</sup>Tc CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>의 표지효율을 다음과 같이 측정하였다.

Hydrolyzed reduced <sup>99m</sup>Tc %

$$= \frac{\text{sect 1의 방사능}}{\text{sect 1의 방사능} + \text{sect 2의 방사능}} \times 100$$

유리 <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> %

$$= \frac{\text{sect 4의 방사능}}{\text{sect 3의 방사능} + \text{sect 4의 방사능}} \times 100$$

<sup>99m</sup>Tc glucarate 표지 효율 % (4, 2)의

<sup>99m</sup>Tc glucarate 제조시)

$$= 100 - (\text{<sup>99m</sup>TcO}_4\% + \text{hydrolyzed reduced <sup>99m</sup>Tc \%})$$

<sup>99m</sup>Tc CEA-92 F (ab)<sub>2</sub> 표지효율

$$= 100 - (\text{hydrolyzed reduced <sup>99m</sup>Tc \%}$$

$$+ \frac{\text{sect 5}}{\text{sect 5} + \text{sect 6}} \times 100)$$

#### 5. CEA-92 F (ab)<sub>2</sub> 및 비특이 항체

##### HCG326 F (ab)<sub>2</sub>의 Iodine 표지

Chloramine T 방법을 사용하였다. 0.5 M PBS 15 μl와 300 μg의 F (ab)<sub>2</sub>, <sup>131</sup>I 400 μCi (CEA-92), <sup>125</sup>I 300 μCi (HCG326)를 섞은 다음 chloramine T 용액 10 μg/10 μl을 가하였다. 2분후에 sodium thiosulfate 30 μg/30 μl를 가하여 반응을 정지시키고 Sephadex G-25 column에 통과시켰다. 300 μl씩 시험관에 받은 후 각 시험관의 방사능을 감마카운터로 측정하였다.

#### 6. 면역반응성 측정

인체대장암 세포주인 SNU-C4를 100 μl에 0.25 × 10<sup>6</sup>, 0.5 × 10<sup>6</sup>, 1 × 10<sup>6</sup>, 2 × 10<sup>6</sup>, 4 × 10<sup>6</sup>, 8 × 10<sup>6</sup> 개씩 넣어 각각 4개의 시험관에 분주하였다. 각 세포농도의 시험관 2개에는 방사성동위원소표지를 하지 않은 25 μg/25 μl의 CEA-92 F (ab)<sub>2</sub> 항체를 가하였고(비특이적 결

합방사능시험관) 나머지 2개에는 가하지 않았다(총 결합방사능시험관). 모든 시험관에 방사성동위원소 표지 항체를 5 ng/75 μl씩 가하고 총방사능치측정을 위하여 별도의 3 시험관에 방사성동위원소 표지항체 만을 넣었다(총방사능 측정용 시험관). 22°C에서 1시간 동안 흔들면서 반응시키고 총방사능치 측정시험관을 제외한 나머지 시험관에 3ml의 PBS 용액을 가하고 800 g에서 5분간 원심분리시킨 다음 상층액을 버렸다. 남아있는 세포침전물과 총방사능치 측정시험관의 방사능을 감마카운터로 측정하였다. 각기 다른 농도의 시험관 별로 다음과 같은 공식에 의하여 특이적 결합 %를 구하였다.

비특이적 결합 방사능 = 25 μg/25 μl의 <sup>99m</sup>Tc 표지 안  
한 항체시험관의 방사능치

특이적 결합 %

$$= \frac{\text{총결합 방사능} - \text{비특이적 결합 방사능}}{\text{총방사능}} \times 100$$

각 세포농도에서의 특이적 결합 %를 세포수에 대하여 plot 하였으며 Lindmo et al.의 방법에 따라 세포수의 역수에 대한 특이적 결합 %의 역수를 도표에 그린 다음 회귀곡선을 구하고 세포수의 역수가 0인 즉 무한대 수의 세포수에서의 특이적 결합 %를 구하여 면역반응성을 측정하였다<sup>7)</sup>.

### 7. 체외안정성 측정

<sup>99m</sup>Tc CEA-92 F (ab')<sub>2</sub>를 40 μl 취하여 15개의 시험관에 넣고 960 μl의 신선한 사람혈청을 가한다음 37°C에서 배양시켰다. 1시간, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간에 3개의 시험관을 꺼내서 30 μl의 용액을 취하고 2070 μl의 생리식염수와 함께 Centricon 30에 넣어 섞은 다음 4000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 300 μl 정도의 상층부(결합방사능)와 1.8 ml 정도의 하층부(분리방사능)를 각각 시험관에 넣어서 감마카운터로 방사능을

측정하였다. 체외안정성은 다음과 같은 공식으로 구하였다.

$$\text{체외안정성 (\%)} = \frac{\text{결합방사능}}{\text{결합방사능} + \text{분리방사능}} \times 100$$

### 8. 인체대장암세포주 SNU-C4 배양과 누드마우스 접종

저자들이 발표하였던 신등의 방법을 사용하였다<sup>6)</sup>.

### 9. CEA-92 F (ab')<sub>2</sub> 항체의 체내분포

#### 1) 실험동물군의 분류

Sephadex G-25 column을 통하여 분리된 Tc-99m CEA-92 F (ab')<sub>2</sub>, <sup>131</sup>I CEA-92 F (ab')<sub>2</sub>, <sup>125</sup>I HCG-326 F (ab')<sub>2</sub> 항체의 시간에 따른 체내분포를 보기위하여 누드마우스를 6군으로 나누었다(Table 1). <sup>99m</sup>Tc CEA-92 F (ab')<sub>2</sub> 항체는 Sephadex G-25 column으로 분리 후 측정된 방사능치가 최고치를 보이는 시험관을 모아서 연구방법 5에서 기술한 방법대로 표지효율을 측정한 다음 누드마우스 제 1군 7마리에는 100 μCi/100 μl, 제 2군 7마리에는 200 μCi/100 μl, 제 3군 6마리에는 750 μCi/200 μl, 제 4군 4마리에는 945 μCi/150 μl를 정맥으로 투여하였다. 항체투여 후 6시간 후에 제 1군, 12시간 후에 제 2군, 24시간 후에 제 3군을 희생시켰으며 제 4군은 24시간에 감마카메라 영상을 얻은 직후 희생시켰다. <sup>131</sup>I CEA-92 F (ab')<sub>2</sub> 항체는 Sephadex G-25 column으로 분리 후 방사능치가 최고치가 되는 시험관을 모아서 누드마우스 제 5군 5마리에는 정맥으로, 제 6군 8마리에는 복강 내로 45 μCi/100 μl씩 투여하였으며 제 5군은 24시간 후 제 6군은 4일 이후에 희생시켰다. <sup>125</sup>I HCG-326 F (ab')<sub>2</sub> 항체는 같은 방법으로 제 3군 누드마우스에 20 μCi/50 μl씩 정맥으로 투여하였다. 항체를 주사한 주사기의 주사 전, 후의 무게를 재고 그차이를 주

Table 1. Schedule for the Biodistribution Study of Radiolabeled CEA-92 F (ab')<sub>2</sub> in Nude Mice Bearing Human Colon Carcinoma

Radiolabeled antibody	Time after injection			
	6 hr	12 hr	24 hr	4 day
<sup>99m</sup> Tc CEA-92 F (ab') <sub>2</sub>	group 1	group 2	group 3, 4	
<sup>131</sup> I CEA-92 F (ab') <sub>2</sub>			group 5	group 6
<sup>125</sup> I HCG-326 F (ab') <sub>2</sub>			group 3	

사된 항체용액의 무게로 계산하였다.

**2) 항체의 체내분포 평가**

희생된 누드마우스에서 중앙, 간장, 비장, 신장, 근육, 소장, 위, 심장 및 혈액을 적출한 후 무게를 재고 감마카운터로 1분간의 방사능치를 측정하였다. 이때 투여된 항체용액과 같은 부피 용액의 무게를 재고 1 : 10으로 연속적으로 희석한 후 같이 측정하였다.  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  각각의 방사성동위원소에 대하여 140, 365, 35 keV의 에너지에 20%의 식별영역을 정하여 방사능을 측정하였다. 각 장기의 무게와 방사능치로부터  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{131}\text{I}$ 에 대하여 투여한 총방사능치에 대한 각 장기에서의 g당 회수된 방사능치의 %값(이하 % ID/g 이라함)을 구하였다.  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab)<sub>2</sub>의 특이적인 중앙분포를 측정하기 위하여 항체 특이적 분포비(antibody specific localization ratio)를 다음과 같이 구하였다.

항체특이적분포비 =

$$\frac{\text{중앙의 } ^{99m}\text{Tc CEA-92 F(ab)}_2}{\frac{^{125}\text{I HCG-326 F(ab)}_2 \text{ 방사능계수}}{\text{조직의 } ^{99m}\text{Tc CEA-92 F(ab)}_2}} \div \frac{\text{조직의 } ^{99m}\text{Tc CEA-92 F(ab)}_2}{^{125}\text{I HCG-326 F(ab)}_2 \text{ 방사능계수}}$$

**10. 중앙의 신티그라피**

$^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab)<sub>2</sub>를 투여한 후 24시간에 제 4군의 누드마우스를 촬영하였다. 바늘구멍조준기가 장착된 Pho/Gamma 감마카메라를 이용하여 누드마우스를 고정 한 다음 전신상을 촬영하였다. 바늘구멍과 누드마우스의 거리는 4cm로 하였고 20,000 계수치에 고정하여 영상을 얻었다.

**결 과**

**1. 단세포균항체의 생산 및 정제**

복수가 생긴 Balb/c 마우스에서 한 마리당 3~5 ml의 복수를 얻었으며 복수의 ml당 2~5mg의 CEA-92 IgG를 얻었다. Excellulose column에서 PBS로 용출된 CEA-92 F(ab)<sub>2</sub> 6 mg/ml를 실험에 사용하였다.

**2. 친화상수 측정**

Scatchard plot에서 구한 CEA-92 F(ab)<sub>2</sub>의 친화상수는  $K_a = 3.35 \times 10^8 \text{ l/mol}$ 였다.

**3. ITLC로 측정된  $^{99m}\text{Tc}$  Glucarate의 표지효율**

Hydrolyzed reduced  $^{99m}\text{Tc}$  3.0%, free  $^{99m}\text{TcO}_4$  2.3%로  $^{99m}\text{Tc}$  glucarate의 표지효율은 94.7%였다.

**4. CEA-92 F(ab)<sub>2</sub>의 환원 조건 결정**

$\beta\text{ME} : \text{F(ab)}_2$ 의 molar ratio를 변화시켜 얻은  $^{99m}\text{Tc}$  F(ab)<sub>2</sub>의 표지효율은 Fig. 1과 같았다.  $\beta\text{ME} : \text{F(ab)}_2$ 의 molar ratio가 3000 : 1에서 45.2%의 가장 높은 표지효율을 보였다. 면역반응성은 Fig. 2에서와 같이 3000 : 1에서 27.4%로 가장 높았다.

**5. CEA-92 F(ab)<sub>2</sub>, HCG-326 F(ab)<sub>2</sub>의 Iodine 표지**

Sephadex G-25 column으로 300  $\mu\text{l}$ 씩 용출된 용액의 방사능치로 부터 구한 CEA-92 F(ab)<sub>2</sub>의  $^{131}\text{I}$  및 HCG-326 F(ab)<sub>2</sub>의  $^{125}\text{I}$  표지효율은 각각 91.2%, 93.7%였다.

**6. 면역반응성 측정**

$^{99m}\text{Tc}$  F(ab)<sub>2</sub>분질의 면역반응성은 32.8%였다(Fig. 3).  $^{131}\text{I}$  CEA-92 F(ab)<sub>2</sub>와  $^{125}\text{I}$  HCG-326 F(ab)<sub>2</sub>의 면역반응성은 각각 36.4%, 0.3%였다.

**7.  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab)<sub>2</sub>의 체외 안정성 측정**

신선한 사람혈청과 체외배양하여 측정된 시간에 따른

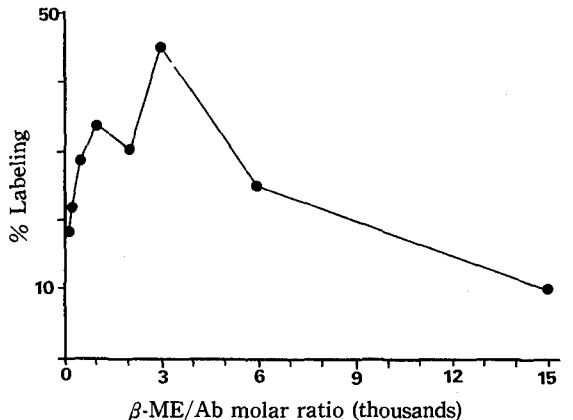


Fig. 1. Effect of reduction conditions upon  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab)<sub>2</sub> labeling efficiency. ( $\beta\text{-ME}$ :  $\beta$ -mercaptoethanol)

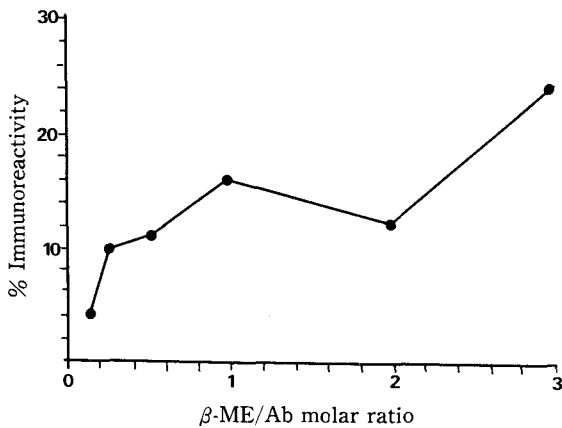


Fig. 2. Effect of reduction conditions upon  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab) $_2$  immunoreactivity. ( $\beta$ -ME:  $\beta$ -mercaptoethanol)

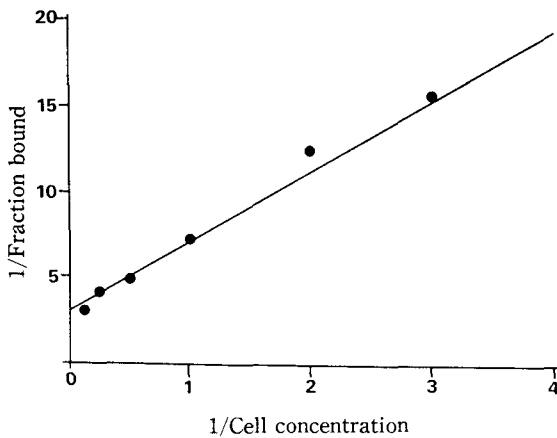


Fig. 3. Determination of the immunoreactivity of  $^{99m}\text{Tc}$  labeled F(ab) $_2$  by double inverse plotting of cell number and bound fraction. Extrapolation to the ordinate where 1/cell concentration=0, i.e. a theoretical infinite number of cells, gives 1/fraction bound as 3.05, that is an immunoreactivity of 0.328, or 32.8%.

체의 안정성은 1시간 89.9%, 2시간 85.6%, 6시간 74.4%, 15시간 67.2%, 24시간 57.4%였다.

### 8. CEA-92 F(ab) $_2$ 의 체내분포

$^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab) $_2$ 의 투여 후 6시간에서의 체내 분포는 Table 2와 같았다. 각 장기별 분포는 유의한 차이가 있었다( $p < 0.001$  by Friedman test). 신장

Table 2. Distribution of  $^{99m}\text{Tc}$  Labeled F(ab) $_2$  Fragment of CEA-92 at 6 Hour Expressed in Percent Antibody Dose

Tissue	Mean	Range	p-value#
Tumor	2.08	1.78-2.73	
Liver	4.69	3.77-5.82	$p < 0.05$
Spleen	1.62	1.10-1.99	NS
Kidney	90.52	73.61-112.76	$p < 0.05$
Muscle	0.35	0.18-0.54	$p < 0.05$
Intestine	1.80	0.69-3.61	NS
Stomach	1.22	0.62-3.13	NS
Heart	1.06	0.80-1.48	$p < 0.05$
Blood	1.92	1.36-2.55	NS

Note : # ; statistical difference between tumor and other tissue by Wilcoxon signed rank test. (NS ; not significant)

Table 3. Distribution of  $^{99m}\text{Tc}$  Labeled F(ab) $_2$  Fragment of CEA-92 at 12 Hour Expressed in Percent Antibody Dose

Tissue	Mean	Range	p-value#
Tumor	1.81	0.92-2.99	
Liver	1.90	1.41-3.11	NS
Spleen	1.15	0.61-1.80	NS
Kidney	59.89	48.60-78.01	$p < 0.05$
Muscle	0.28	0.15-0.60	$p < 0.05$
Intestine	0.40	0.30-0.56	$p < 0.05$
Stomach	0.44	0.26-0.92	$p < 0.05$
Heart	0.45	0.40-0.49	$p < 0.05$
Blood	0.79	0.47-1.03	$p < 0.05$

Note : # ; statistical difference between tumor and other tissue by Wilcoxon signed rank test. (NS ; not significant)

(90.52), 간장(4.69)의 %ID/g은 종양(2.08)에 비하여 유의하게 높았으며( $p < 0.05$  by Wilcoxon signed rank test), 비장(1.62), 소장(1.80), 위(1.22), 혈액(1.92)과 비교하여 차이를 보이지 않았으나 근육(0.35), 심장(1.06)보다는 유의하게 높았다( $p < 0.05$  by Wilcoxon signed rank test). 12시간에서의 체내분포는 Table 3과 같았다. 각 장기별 분포는 유의한 차이가 있었으며( $p < 0.001$  by Friedman test), 신장의 %ID/g(59.89)이 종양(1.81)과 유의한 차이가 있었고( $p < 0.05$  by Wilcoxon signed rank test) 간(1.90),

비장(1.15)은 차이를 보이지 않았으며, 근육(0.28), 소장(0.40), 위(0.44), 심장(0.45), 혈액(0.78)과 비교하여는 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ).

24시간에서의 체내분포는 Table 4와 같았다. 각 장기별분포는 유의한 차이가 있었으며( $p < 0.001$  by Friedman test) 신장의 % ID/g(46.80)이 종양(1.65)에 비하여 유의하게 증가하였고( $p < 0.01$  by Wilcoxon signed rank test), 간(1.81)은 차이를 보이지 않았으며 비장(0.69), 근육(0.16), 소장(0.45), 심장(0.48), 혈액(0.45) ( $p < 0.01$ ) 및 위(0.75) ( $p < 0.05$ )와 비교하

여서는 유의하게 높았다.

$^{131}\text{I}$  CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>의 투여 후 24시간에서의 체내분포는 Table 5와 같았다. 각 장기별 분포는 유의한 차이가 있었으며( $p < 0.001$  by Friedman test) 종양에서의 %ID/g이 평균 5.83으로 다른 장기에 비하여 유의하게 높았으나( $p < 0.05$  by Wilcoxon signed rank test) 신장(3.50)과는 차이가 없었다.

$^{131}\text{I}$  CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>의 투여후 4일째의 체내분포는 Table 6과 같았다. 각 장기별분포는 유의한 차이가 있었으며( $p < 0.01$  by Friedman test) 종양에서 %ID/g (0.45)은 다른 모든 장기에서 보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$  by Wilcoxon signed rank test). 투여 후 24시간에서의  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>와  $^{131}\text{I}$  CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>의 %ID/g은 종양, 간장, 신장, 혈액에서 유의한 차이를 보여서( $p < 0.05$  by Wilcoxon rank sum test)  $^{99m}\text{TcO}_4$  CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>가 간장, 신장에서 높았으며 종양, 혈액에서는 낮았다. 비장, 근육, 소장, 위, 심장에서는 차이를 보이지 않았다.  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F (ab)<sub>2</sub> 종양대 혈액비는 6시간에 1.10, 12시간 2.31, 24시간 3.70,  $^{131}\text{I}$  24시간이 3.76, 4일이 4.59로 각 군간에 유의한 차이가 있어서( $p < 0.005$  by Kruskal-Wallis test),  $^{99m}\text{Tc}$ 이 6, 12, 24시간 까지 증가하였으나( $p < 0.005$  by Wilcoxon rank sum test)  $^{131}\text{I}$ 의 종양대 혈액 비와는 차이가 없었다(Fig. 4). 24시간에서  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>의 항체특이적 분포비는 Fig. 5와 같았다. 비장, 근육, 소장, 위, 심장, 혈액 등에서 높은 분포를

**Table 4. Distribution of  $^{99m}\text{Tc}$  Labeled F (ab)<sub>2</sub> Fragment of CEA-92 at 24 Hour Expressed in Percent Antibody Dose**

Tissue	Mean	Range	p-value#
Tumor	1.65	1.22-2.64	
Liver	1.81	1.53-2.29	NS
Spleen	0.69	0.33-1.08	$p < 0.01$
Kidney	46.77	29.81-59.77	$p < 0.01$
Muscle	0.16	0.10-0.25	$p < 0.01$
Intestine	0.45	0.26-0.96	$p < 0.01$
Stomach	0.75	0.34-2.45	$p < 0.05$
Heart	0.48	0.27-0.61	$p < 0.01$
Blood	0.45	0.35-0.63	$p < 0.01$

Note : # ; statistical difference between tumor and other tissue by Wilcoxon signed rank test. (NS ; not significant)

**Table 5. Distribution of  $^{131}\text{I}$  Labeled F (ab)<sub>2</sub> Fragment of CEA-92 at 24 Hour Expressed in Percent Antibody Dose**

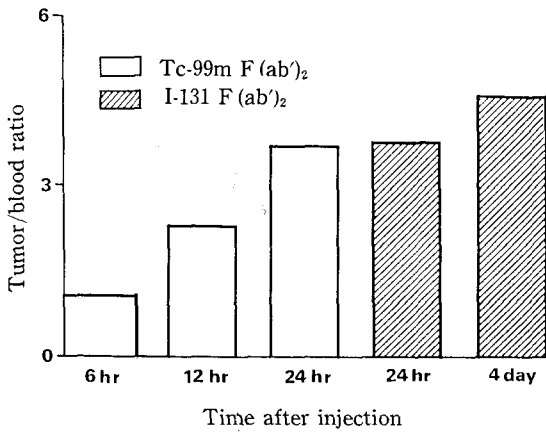
Tissue	Mean	Range	p-value#
Tumor	5.83	4.08-7.61	
Liver	0.59	0.32-1.33	$p < 0.05$
Spleen	0.78	0.32-2.12	$p < 0.05$
Kidney	3.50	2.17-8.26	NS
Muscle	0.23	0.11-0.44	$p < 0.05$
Intestine	0.61	0.18-1.85	$p < 0.05$
Stomach	1.84	0.79-2.60	$p < 0.05$
Heart	0.56	0.28-1.18	$p < 0.05$
Blood	1.85	0.83-4.04	$p < 0.05$

Note : # ; statistical difference between tumor and other tissue by Wilcoxon signed rank test. (NS ; not significant)

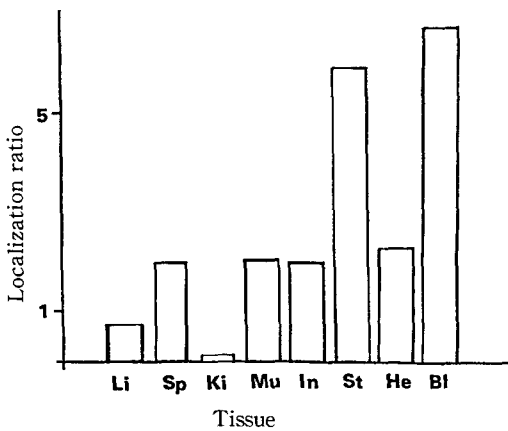
**Table 6. Distribution of  $^{131}\text{I}$  Labeled F (ab)<sub>2</sub> Fragment of CEA-92 at 4th Day Expressed in Percent Antibody Dose**

Tissue	Mean	Range	p-value#
Tumor	0.45	0.28-0.57	
Liver	0.03	0.03-0.04	$p < 0.05$
Spleen	0.04	0.02-0.07	$p < 0.05$
Kidney	0.13	0.09-0.18	$p < 0.05$
Muscle	0.02	0.01-0.04	$p < 0.05$
Intestine	0.02	0.01-0.03	$p < 0.05$
Stomach	0.05	0.01-0.14	$p < 0.05$
Heart	0.03	0.02-0.04	$p < 0.05$
Blood	0.10	0.08-0.13	$p < 0.05$

Note : # ; statistical difference between tumor and other tissue by Wilcoxon signed rank test. (NS ; not significant)

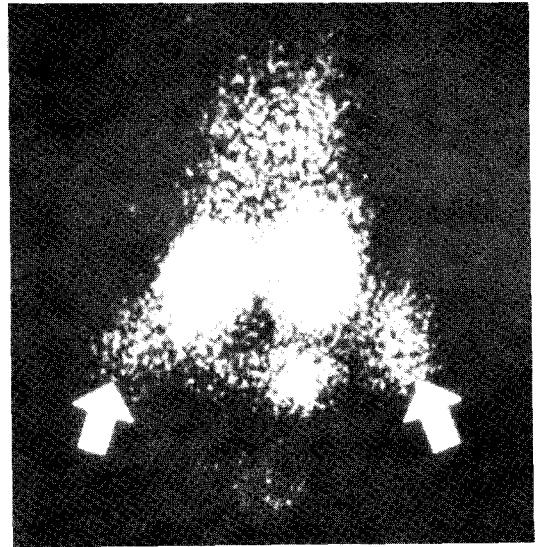


**Fig. 4.** Tumor to blood ratio of  $^{99m}\text{Tc}$  and  $^{131}\text{I}$  labeled F(ab')<sub>2</sub> fragment of CEA-92. Tumor to blood ratio of  $^{99m}\text{Tc}$  F(ab')<sub>2</sub> at 24 hr was significantly higher than those at 6 & 12 hr, but there was no significant difference from those of  $^{131}\text{I}$  F(ab')<sub>2</sub>.



**Fig. 5.** Antibody specific localization ratios for  $^{99m}\text{Tc}$  F(ab')<sub>2</sub> fragment of CEA-92 at 24 hour after intravenous injection. Antibody specific localization ratios were calculated from CEA-92 F(ab')<sub>2</sub> tumor to nontumor ratios divided by nonspecific antibody F(ab')<sub>2</sub> tumor to nontumor ratios. Li=liver, Sp=spleen, Ki=kidney, Mu=muscle, In=intestine, St=stomach, He=heart, Bl=blood.

보였으나 간 및 신장에서 각각 0.73, 0.06으로 낮은 값을 나타냈다.



**Fig. 6.** Scintigram of a nude mouse bearing human colon carcinoma xenograft. Mice with femoral subcutaneous xenografts (arrows) were injected intravenously with  $^{99m}\text{Tc}$  labeled F(ab')<sub>2</sub> of CEA-92 and imaged at 24 hour using gamma camera.  $^{99m}\text{Tc}$  labeled fragment clearly distinguished the tumor, but the radioactivity has been retained in the kidneys.

### 9. $^{99m}\text{Tc}$ CEA-92 F(ab')<sub>2</sub>를 이용한 면역신티그라피

항체 투여 24시간 후의 종양영상은 Fig. 6과 같았다. 신장의 방사능치가 매우 높은 것을 알 수 있으며 상당한 복부의 배후방사능이 있으나 양대퇴부의 종양영상이 뚜렷이 관찰되었다.

### 고 안

$^{99m}\text{Tc}$ 을 방사성의약품에 표지시킬 때에는  $^{99m}\text{Tc}$  pertechnetate( $^{99m}\text{TcO}_4$ )를 환원제에 의해서 환원시키고, 환원된  $^{99m}\text{Tc}$ 이 ligand와 결합하여 방사성의약품이 만들어진다. 이때 원하는  $^{99m}\text{Tc}$  방사성의약품 복합체 이외에 유리  $^{99m}\text{TcO}_4$ 와 hydrolyzed reduced  $^{99m}\text{Tc}$  등의 불순물이 생기는데, 유리  $^{99m}\text{TcO}_4$ 는 환원제 농도를 높이거나 vitamin C, gentisic acid 등의 안정제를 사용하여 줄일 수 있으며 reduced hydrolyzed  $^{99m}\text{Tc}$ 은 ligand의 농도를 높이거나 pH를 낮추어서 생성을 줄일



수 있다. 그러나 ligand로서의 항체는 농도를 어느정도 이상 높이거나 pH를 낮추기 어렵기 때문에 문제가 된다.

$^{99m}\text{Tc}$  단세포균항체의  $^{99m}\text{Tc}$  표지법은 크게 나누어 직접표지법과 간접표지법이 있다. 직접표지법은 항체와 환원된  $^{99m}\text{Tc}$ 을 직접 반응시키는 것으로 항체에 있는 아미노산기에  $^{99m}\text{Tc}$ 이 결합하게 된다. 이 방법의 장점은 표지방법이 단순하다는 것이지만, 단점으로  $^{99m}\text{Tc}$ -항체 결합이 불안정하기 때문에 표지 항체를 분리하기 위한 특수한 분리법을 사용해야 되었고 간, 갑상선, 위 등에  $^{99m}\text{Tc}$  표지 불순물에 의한 집적이 많았다. 간접표지법은 강력한 착화물을 사용하여 항체와  $^{99m}\text{Tc}$ 을 착화시키는 것이다. 간접적인 방법의 문제점은  $^{99m}\text{Tc}$  표지 속도를 빠르게 하기 위하여 많은 착화물을 항체에 붙일 경우 항체의 성질이 변화되어 표지된 항체가 항원과 결합할 수 있는 면역반응성이 감소하게 되는 것이다. 또한 이 방법은  $^{99m}\text{Tc}$ 이 착화물에 붙지 않고 항체에 직접 결합되는 것을 막기 어려우며, 항체에 직접 결합된  $^{99m}\text{Tc}$ 은 안정성이 낮아 생체 내에 주입시 항체와 분리되어 배후방사능을 높이는 결과를 초래하게 되어 아직  $^{99m}\text{Tc}$  표지법은 연구의 여지가 있다<sup>8)</sup>.

단세포균항체에  $^{99m}\text{Tc}$ 이 결합되는 부위가 2가지 종류 있다는 것이 밝혀져 있다<sup>9)</sup>. High capacity low affinity site와 low capacity high affinity site가 그것이다. Low capacity high affinity site는 항체의  $^{99m}\text{Tc}$  직접 표지점에서 유용하게 사용되는데 항체에서 두개의 heavy chain이 환원제에 의해서 disulfide bridge가 환원되어 -SH 기가 생기고, 여기에  $^{99m}\text{Tc}$ 이 결합하는 것으로 여겨지고 있다. 따라서 이 low capacity high affinity site는 IgG2, IgG3 isotype 같은 disulfide bridge가 많은 항체에  $^{99m}\text{Tc}$ 을 잘 결합시킬 수 있다.

Rhodes et al.은 stannous ion을 매우 높은 농도로 사용하여 disulfides를 환원시킨 다음, 후에 넣어준  $^{99m}\text{TcO}_4$ 가 이미 존재하는 다량의 stannous ion에 의하여 환원되어 항체에 표지되는 방법을 보고하였다 (pretinning method)<sup>10)</sup>. 표지 후 정제과정이 필요하지만 표지방법이 비교적 단순하며 악성흑색종 항체에 표지되어 임상에 사용되었다<sup>11)</sup>. 최근에는 보다 약한 환원제를 낮은 농도로 사용하여 항체가 분절로 분리되지 않으며  $^{99m}\text{TcO}_4$ 를 직접 가하지 않고 환원되어 약한 chelator에 결합시킨 상태로 항체용액에 가하는 방법이

보고되고 있다. 즉 항체내의 low capacity high affinity site인 disulfide 결합을 미리 환원시켜 thiol로 만들어 놓고, 2단계로  $^{99m}\text{Tc}$ 을  $\text{SnCl}_2$ 를 사용하여 미리 착화물에 표지시킨 다음 이렇게 표지된  $^{99m}\text{Tc}$  chelator 복합체를 미리 환원시켜 둔 항체용액에 가하여 약한 착화물에 결합되어 있던  $^{99m}\text{Tc}$ 이 강한 착화물을 형성할 수 있는 항체의 thiol기로 교환되어 결합하게 되는 방법이다 (transchelation). Schwarz et al.은  $^{99m}\text{Tc}$  methylene diphosphonate와 환원제로  $\beta$ -mercaptoethanol을 이용하여 transchelation 법을 처음 시도하였다<sup>12)</sup>. 또한 Paik et al.은 dithiothreitol을 환원제로, glucarate를 약한 착화물로 사용하는 방법을 보고하였다<sup>13)</sup>. 이같은 새로운 직접표지방법은 표지 후 정제과정이 불필요하며 수분내에 좋은 비방사능을 가지는 kit를 만들수 있으며  $^{99m}\text{Tc}$  표지가 안정하다는 장점이 있다. 그러나 아직 이같은 직접표지 방법의 경험이 제한되어 서로 비교가 어려우며 여러 종류의 항체에 아직 널리 응용되지 않았다.

본 연구에 쓰인 CEA-92 항체는 Chung et al. (1989)에 의하여  $^{125}\text{I}$ 로 표지하여 CEA의 방사면역측정에 쓰였을 때 측정감도가 높고 CEA의 양과 방사능사이에 좋은 상관관계를 보이는 단세포균항체로서 정상혈청성분과 교차반응을 하지 않음이 증명되었다<sup>14)</sup>. Scatchard plot으로 구한  $^{125}\text{I}$  표지 CEA-92 IgG의 친화상수  $K_a$ 는  $3.35 \times 10^8 \text{ l/mol}$ 로서 보통 방사면역검출법에 사용되는 표지항체의 친화상수  $10^8 \sim 10^{11} \text{ l/mol}$ 의 범주내에 속하였다.

인체대장암세포주로 SNU-C4를 선택하였는데 SNU-C4는 Park et al.에 의하여 확립된 CEA를 생성하는 대장암 세포로서<sup>15)</sup> 누드마우스에 이식시 종괴를 형성하고 상품화된 항 CEA 항체와 결합하며<sup>16)</sup>, 본 연구에서도 CEA-92와 in vitro에서 특이적으로 결합하는 것으로 보아 CEA-92가 SNU-C4에 발현된 CEA 항원과 결합하는 것으로 유추할 수 있다.

$^{99m}\text{Tc}$  표지 단세포균항체가 실제 종양 CEA 항원과 결합할 수 있는 능력을 면역반응성이라고 한다. 면역반응성이 100%가 되지 않고 감소되는 이유는 항체의 분리, 분절의 생산, 동위원소표지과정에서 구조적인 변화가 일어나 항원과 결합할 수 있는 능력이 감소하기 때문이다<sup>17)</sup>. 면역반응성을 측정하는 방법으로는 종양항원을 순수분리하고 항원에 결합정도를 측정하는 것이 원칙적

인 방법이지만 본 실험에서는 Fawwaz et al.이 제시한 종양항원 발현 세포와 동위원소 표지항체의 결합정도로 측정하는 간편한 방법을 선택하였다<sup>18)</sup>. 이 방법으로 Lindmo et al.이 제시한 세포수와 결합항체의 double inverse plot을 사용하면 거의 이론치에 접근하는 수치를 얻을 수가 있다<sup>7)</sup>. 이 방법으로 구하는 면역반응성은 y축으로 선형의삼을 하여 세포수의 역수가 결합비율로 계산된다. 이렇게 계산된 면역반응성은 세포수의 농도나 배양기간, 항체의 농도, 반응에 사용된 항원항체의 비 등에 무관하다. 종양형상에 사용된 방사성동위원소 표지항체의 면역반응성은 작게는 10%에서 100%까지 보고되어 있다<sup>19)</sup>. 본 연구에서  $^{99m}\text{Tc}$  표지 CEA-92 F(ab)<sub>2</sub>의 면역반응성은 32.8%로 비교적 낮은 값을 나타내었다. 이는 신동이 보고한  $^{131}\text{I}$  표지 CEA-92 IgG의 면역활성 27.9%와 유사하였다<sup>6)</sup>. 좋은 면역활성을 얻지 못한 이유로 단세포균항체를 Balb/c 마우스 복수에서 얻은 것이 한가지 이유로 추측된다. 마우스 체내배양은 손쉽게 단세포균항체를 얻을 수 있지만 오랜기간 항체가 마우스 체내에서 머물기 때문에 항원 항체 반응활성의 감소를 가져 올 수 있고 정제과정에서 마우스의 정상항체가 같이 분리될 수 있으며 이외에 바이러스등 미생물의 오염이 있을 수 있다<sup>19)</sup>. 최근에는 체외배양시에 필요한 우태아혈청대신에 값싼 단백질 첨가물이 사용되어 저렴한 가격으로 대규모 체외배양이 가능하여졌으므로 앞으로의 연구과제이다<sup>19)</sup>. 이외에 CEA-92 항체 자체가 면역반응성이 낮을 수 있고, 항체의 정제, 분절과정,  $^{99m}\text{Tc}$  표지과정에서의 항체의 구조적 손상 등의 이유를 들 수 있다.

표지된 항체는 in vitro 에서 안정성을 유지하여야 한다. 생체내에 주입한  $^{99m}\text{Tc}$  표지 단세포균항체는 혈액내에서 순환되면서 종양조직에 소량씩 축적되기 때문에 최소한 24시간 이상 혈액내에서 안정성을 유지하여야 한다. 안정성의 측정을 위해서  $^{99m}\text{Tc}$  표지항체를 사람의 혈청과 37°C 에서 반응시켰으며 이후 원심분리하여  $^{99m}\text{Tc}$  표지항체의 안정성을 측정하였는데 2시간까지는 85.6%로 높은 안정성을 유지하였으나 24시간까지 57.4%로 감소하여 유리  $^{99m}\text{Tc}$ 의 생성이 시간이 지남에 따라 증가하는 것을 알 수 있었다.

누드마우스는 돌연변이에 의하여 흉선이 없어 면역결핍상태에 있어서 인체종양의 이종이식모델로 많이 사용된다. 그러나 누드마우스에 이종이식된 인체종양 모델

에서 방사면역검출법을 시행함에 있어 몇가지 인체와 다를 수 있는 점이 있는데 주사된 마우스 항체는 사람에서 보다 빨리 소실되며, 누드마우스에서는 HAMA가 생기지 않고, 누드마우스에서의 종양내 항원의 발현이 사람에서보다 좋을 수 있으며, 작은 크기의 피하종양이라 하더라도 누드마우스에서는 매우 큰 종양으로서 혈류나 혈관분포가 인체종양과 다를 수 있으며 사람에서의 정상조직과의 교차반응을 예견할 수 없기 때문이다. 이같은 차이점이 있을 수 있음에도 불구하고 누드마우스에 이종이식된 인체종양모델은 단세포균항체의 선정 및 방사성동위원소표지법등을 평가하는데 매우 좋은 방법이다. 누드마우스를 이용한 생체내 분포측정은 주사된 방사성동위원소 표지항체에 대한 종양이나 정상조직의 g당 집적률 즉 %ID/g 으로 측정하며 종양내항체집적의 특성을 보기위하여 종양항원과 관계없이 항체를 표지하여 주사하여 특이적 항체의 비특이항체에 대한 집적비를 항체특이적 분포비로서 측정한다. 또한 신티그라피에서는 표지항체집적의 절대량 뿐아니라 정상과 종양조직간의 집적비가 중요하므로 본 연구에서는 이들 세가지 정량지표로  $^{99m}\text{Tc}$  표지항체의 체내분포항상을 연구하였다.  $^{131}\text{I}$  표지항체의 집적률과 종양내 혈액의 항체집적비는 투여 후 24시간과 4일에 측정하였다. 그 이유는 신동의 연구에서  $^{131}\text{I}$  표지항체 F(ab)<sub>2</sub>의 종양내 비종양 항체집적비가 투여 후 4일에 최고치를 보임이 증명되었으며<sup>6)</sup>, 또한  $^{99m}\text{Tc}$  표지항체는 반감기가 짧아 24시간 이후의 항체집적을 구하기 어렵기 때문에 투여 후 24시간과 4일에  $^{131}\text{I}$  표지항체의 집적을 구하여 비교하였다.

주사 후 6시간, 12시간, 24시간까지 조직내  $^{99m}\text{Tc}$  CEA-92 F(ab)<sub>2</sub>의 집적률은 신장, 종양, 간에서 높은 값을 나타내었으며  $^{131}\text{I}$  표지항체는 종양에서 다른 장기에 비하여 높았다. F(ab)<sub>2</sub> 항체분절은 분자량이 작아 신장으로의 소실이 빨리 이루어져 빠른시간내 종양의 영상화가 가능하다고 알려져 있으나<sup>20)</sup>  $^{131}\text{I}$  F(ab)<sub>2</sub>의 24시간 항체집적률이  $^{99m}\text{Tc}$ 에 비해 낮아서  $^{99m}\text{Tc}$  표지항체의 신장내 소실이외에 항체의 체내대사나 표지항체의 안정성의 변화등으로 생긴 유리  $^{99m}\text{Tc}$  이나 Fab'등 항체의 환원과정에서 생길수 있는 항체 분절이 신장내에 집적한 가능성을 시사하였다. 간에서의 항체집적률은 6시간에서는 오히려 종양보다 높았으며 12시간, 24시간에서 종양과의 차이를 보이지 않았다. 간에서의 항체집적은  $^{111}\text{In}$ 에서의 경우와 같이 항체를 통하여 간내에 운

반된 후 아직 알려져있지 않은 대사과정을 거쳐 간내에 남아있거나 표지과정에서 손상되어 면역활성을 상실한 항체 중합체들이 간내에 집적하는 등의 원인을 생각할 수 있겠다. 그러나 24시간에서의 항체집적률은 이외의 모든 장기에 비하여 종양조직에서 높은 값을 보였다.

24시간 <sup>131</sup>I 표지항체와의 비교에서는 신장 및, 간에서 <sup>99m</sup>Tc 표지항체보다 낮았으며 기타 장기는 차이가 없었으나 혈액에서는 유의하게 높아서 <sup>99m</sup>Tc 표지항체가 <sup>131</sup>I 표지항체에 비하여 종양의 집적률이 떨어지나, 반면 신장과 간으로의 집적률이 높아 혈액의 방사능치가 낮음을 알 수 있었다. 종양내 혈액의 <sup>99m</sup>Tc 표지 항체의 집적비는 6시간부터 24시간까지 증가하여 24시간 영상에서 더욱 좋은 종양의 대조도를 얻을 수 있었으며, <sup>131</sup>I 표지항체의 종양내혈액의 항체집적비에 비하여 차이가 없어서 24시간에 종양을 신티그라피로 확인할 수 있었다. 그러나 신장과 간에서의 항체집적에 의한 복부의 배후방사능이 높아서 체내분포에서 예견되었던 소견이 함께 관찰되었다.

본 연구에서의 β-mercaptoethanol의 환원에 의한 <sup>99m</sup>Tc 표지효율은 45.2%로 비교적 낮았으며 정제 과정이 필요하였다. 또한 24시간 체의 안정성이 57.4%이며, 체내 항체집적이 신장과 간에서 높은 등 임상에서 사용되기 까지는 몇가지 보완될 점이 있다. 신등이 보고한 <sup>131</sup>I 표지 CEA-92 F (ab)<sub>2</sub>의 면역활성(27.9%)과 유사하게<sup>6)</sup> 본 연구에서의 <sup>99m</sup>Tc 표지 항체의 면역활성도가 32.8%로 낮은 것은 표지효율이나 항체의 체내분포에 영향을 미칠 수 있는 한가지 이유로 생각할 수 있으며 항체의 체외배양 등으로 면역활성을 높이는 향후 연구가 필요할 것이다. 한편 <sup>99m</sup>Tc 표지 후 환원과정에서 Fab'등 원하지 않는 항체분절이나 항체응집을 분리측정함으로써 β-mercaptoethanol의 적절한 환원조건을 찾아내는 것이 필요하며 향후 연구과제이다.

### 감사의 글

본 논문이 만들어지기까지 서울대학교병원 핵의학과 최석례, 홍미경씨의 노고에 깊은 감사드립니다.

### REFERENCES

1) Pettit WA, DeLand FH, Bennett SJ, et al: *Improved*

*protein labeling by stannous tartrate reduction of pertechnetate. J Nucl Med 21:59-62, 1980*

- 2) Delaloye B, Bischof-Delaloye A, Buchegger F, et al: *Detection of colorectal carcinoma by emission-computerized tomography after injection of I-123-labelled Fab or (Fab')<sub>2</sub> fragments from monoclonal anticarcinoembryonic antigen antibodies. J Clin Invest 77:301-11, 1986*
- 3) Goldenberg DM, Goldenberg H: *Clinical studies of cancer radioimmunodetection with carcinoembryonic antigen monoclonal antibody fragments labelled with I-123 or <sup>99m</sup>Tc. Cancer Res. 50:909-21, 1990*
- 4) Baum RP, Hertel A, Lowenz M, et al: *<sup>99m</sup>Tc labelled anti-CEA monoclonal antibody for tumor immunoscintigraphy: First clinical results. Nucl Med Commun 10:345-50, 1989*
- 5) Mach JP, Carrel S, Merenda C, et al: *In vivo localization of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice. Nature 248:704-6, 1974*
- 6) 신성해, 문대혁, 이명혜, 외 4인: 이종이식된 인체대장암에서 항 태아성 암항원 단세포군 항체 IgG 및 F(ab')<sub>2</sub> 분절을 이용한 방사면역검출법. 대한내과학회잡지 40:188-97, 1991
- 7) Lindomo T, Boven E, Cuttitta F, et al: *Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J Immunol Method 72:77-89, 1984*
- 8) Paik CH, Ebbert MA, Murphy PR, et al: *Factors influencing DTPA conjugation with antibodies by cyclic DTPA anhydride. J Nucl Med 24:1158-63, 1983*
- 9) Paik CH, Phan LNB, Hong JJ, et al: *The labeling of high affinity sites of antibodies with <sup>99m</sup>Tc. Int J Nucl Med Biol 12:3-8, 1985*
- 10) Rhodes BA, Zamora PO, Newell KD, et al: *<sup>99m</sup>Tc labeling of murine monoclonal antibody fragments. J Nucl Med 27:685-93, 1986*
- 11) Siccardi AG, Buraggi GL, Callegaro L, et al: *Multicenter study of immunoscintigraphy with radiolabeled monoclonal antibodies in patients with melanoma. Cancer Res 46:4817-22, 1986*
- 12) Schwarz A, Steinstrasser A: *A novel approach to <sup>99m</sup>Tc labelled monoclonal antibodies. J Nucl Med 28:721, 1987*
- 13) Paik CH, Eckelman WC, Reba RC: *Radiolabeled monoclonal antibodies for imaging and therapy,*

- important chemical variables for labeling antibodies with indium-111 and technetium-99m. p 253-60, Plenum Press, New York, 1988*
- 14) Chung HK, Lee JH, Kim SR, et al: *Radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen employing monoclonal antibodies. Korean J Biochem 21:21-6, 1989*
- 15) Park JG, Oie HK, Sugasbakes PH, et al: *Characteristics of cell lines established from human colorectal carcinoma. Cancer Res 47:6710-8, 1987*
- 16) Lee JM, Chung HK, Kim SW, et al: *Purification of carcinoembryonic antigen from culture supernatant of human colon cancer cell line, LS174T using monoclonal immunoaffinity chromatography. Korean J Biochem 20:23-32, 1988*
- 17) Matzku S, Kirchgessner M, Dipplid WG, et al: *Immunoreactivity of monoclonal anti-melanoma antibodies in relation to the amount of radioactive iodine substituted to the antibody molecule. Eur J Nucl Med 11:260-4, 1985*
- 18) Fawwaz RA, Wang TST, Estabrook A, et al: *Immunoreactivity and biodistribution of Indium-111-labeled monoclonal antibody to a human high molecular weight melanoma associated antigen. J Nucl Med 26:488-92, 1985*
- 19) Perkins AC, Pimm MV: *Immunoscintigraphy, practical aspects and clinical applications. 1st ed. p 17-38, Wiley-Liss, New York, 1991*
- 20) Covell DG, Barbet J, Holton OD, et al: *Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G<sub>1</sub>, F(ab')<sub>2</sub> and Fab' in mice. Cancer Res 46:3969-78, 1986*