

항 NCA-95 단일클론항체의 ^{99m}Tc 표지 키트 제조 및 특성 연구

서울대학교병원 핵의학과

홍미경 · 정재민 · 정준기 · 최석례 · 김채균 · 이용진 · 이동수 · 이명철 · 고창순

= Abstract =

^{99m}Tc Labeling Kit Preparation and Characteristics of Anti-NCA-95 Monoclonal Antibody

Mee Kyoung Hong, B.S., Jae Min Jeong, Ph.D., June-Key Chung, M.D.
Seok Rye Choi, M.D., Chaekyun Kim, Ph.D., Yong Jin Lee, M.S., Dong Soo Lee, M.D.
Myung Chul Lee, M.D. and Chang Soon Koh, M.D.

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

The previous monoclonal antibody labeling method for bone marrow immunoscintigraphy was complicated and laborious for clinical application. Also it showed a relatively low labeling efficiency. To improve this procedure, we compared several direct labeling methods of ^{99m}Tc .

1) The labeling efficiency in the method using gluconate as a transchelator was low (40-70%), but immunoscintigraphy using this radiotracer produced a clear image.

2) To improve labeling efficiency, β -mercaptoethanol was removed after reduction. The labeling efficiency was improved up to 70-80%, but the radioactivity of the blood pool was high.

3) The highest labeling efficiency (>90%) and best quality images could be obtained by using MDP as a transchelating agent. It did not require additional procedures for separation of labeled antibodies. The immunoreactivity of this antibody was 60%. Residual MDP which can be taken up by the bone could be removed by PD-10 column. The reduced antibodies were stable with a high labeling efficiency (>90%) for up to 47 days by deep freezing.

We concluded that the improved procedure for ^{99m}Tc labeling of anti-NCA-95 monoclonal antibody using MDP as a transchelating agent will be a simple and useful method for clinical application.

Key Words : ^{99m}Tc -anti NCA-95 monoclonal antibody, Transchelating agent, MDP, Gluconate, Bone marrow immunoscintigraphy

서 론

골수기능을 평가하기 위해 과거에는 ^{99m}Tc -sulfur colloid나 ^{59}Fe , ^{111}In -chloride 등이 사용되어왔다¹⁻³⁾.

그러나 이 방법들은 낮은 특이도로 인하여 간, 비장 등 다른 장기에 더 많이 섭취되기 때문에 적절한 골수 진단방법의 개발이 절실히 요구되었다. 최근 사람의 파립구 세포막 및 세포질에 정상적으로 발현하는 NCA-95 (nonspecific cross-reacting antigen)에 결합하는 단일클론항체를 사용한 골수진단법이 개발되어 좋은 결과를 나타내었다^{4,5)}.

이 연구는 1996년 서울대학교병원 지정연구(02-96-189)의 보조로 이루어진 것임.

항체를 표지하기 위한 영상용 방사성 핵종은 ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I 등 여러 가지가 있지만 그중 ^{99m}Tc 이 가장 가격이 싸고 물리적 특성이 좋아서 널리 사용되고 있다. ^{99m}Tc 으로 항체를 표지하는 방법은 크게 직접법과 간접법으로 나눌 수 있다. 간접법은 ^{99m}Tc 과 항체 사이에 양측성착화제 (bichelation agent)를 넣어서 표지하는 방법으로, 이때 사용되는 양측성착화제는 DTPA, hydrazinonicotinic acid, N_3S 등이 있다⁶⁻⁸⁾. 그러나 방법이 복잡하고 직접법에 비해 큰 장점이 없어 실제 사용빈도가 낮다. 직접법은 항체를 환원시켜 생긴 티올기에 ^{99m}Tc 을 표지하는 방법으로 이때 약한 착화제를 ^{99m}Tc 에 먼저 표지하고 이것을 transchelation시켜서 항체의 티올기에 결합되도록 하는 방법이다. 이때 사용되는 환원제로 β -mercaptoethanol (ME), dithiothreitol, SnCl_2 , ascorbic acid⁹⁾ 등이 사용되었고, transchelating agent로는 gluconate, glucoheptonate, glucarate, $\text{MDP}^{10)$ 등이 보고되었다.

본 저자들은 환원제로 β -mercaptoethanol을, transchelating agent로 gluconate를 사용하여 골수면역영상을 성공적으로 실시하여 발표한바 있으나^{5, 11)}, 낮은 표지효율로 인하여 표지후 PD-10 컬럼으로 분리하여야 하는 번거로움이 있었고 비방사능이 낮아 한 사람당 투여하는 항체의 양이 많아서 비경제적이고 부작용이 발생할 가능성이 높은 문제가 있었다.

본 실험에서는 transchelating agent를 MDP 로 교환하고, 환원시킨 항체를 분주하여 -70°C 에 냉동보관하여 사용함으로써 ^{99m}Tc 표지 단일클론항체의 표지과정을 개선하고 시간을 단축하여 표지효율을 높이고자 여러 가지 조건에서 실험을 실시하였다.

대상 및 방법

서울대학교 의과대학 생화학교실에서 만든 하이브리도마를 이용하여 항 NCA-95 단일클론 항체를 생산 분리하여 사용하였다¹²⁾. 항체의 ^{99m}Tc 표지는 3가지 방법을 사용하여 표지하였고 박층크로마토그래피를 이용하여 표지효율을 측정하였다. 표지항체의 면역반응성과 항원/항체 친화 상수를 구하였다.

1. ^{99m}Tc -gluconate 표지

300 μl 의 0.4 M gluconate (pH 5.6)를 reacti-vial에 담고 1.5mg/ml $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 150 μl 가하여 공기를 제거하고 실온에서 10분간 반응시켰다.

2. ^{99m}Tc -항체 표지

1) 방법 1

① 항체의 환원

5-10mg/ml의 항체를 사용하여 β -ME을 3000:1 (β -ME:항체)로 넣고 37°C 에서 30분간 환원시켰다.

② ^{99m}Tc -gluconate 제조: 1.의 ^{99m}Tc -gluconate 표지법 이용

③ ^{99m}Tc -항체의 표지

환원시킨 항체 (환원제 존재)를 ^{99m}Tc -gluconate vial에 넣고 37°C 에서 1시간 반응시켰다. PD-10 컬럼을 이용하여 ^{99m}Tc 표지 항체를 분리하였다.

2) 방법 2

① 항체의 환원

5-10mg/ml의 항체를 사용하여 β -ME을 3000:1 (β -ME:항체)로 넣고 37°C 에서 30분간 환원시켰다.

환원시킨 항체는 PD-10 컬럼을 이용하여 β -ME을 제거하였다.

② ^{99m}Tc -gluconate 제조: 1.의 ^{99m}Tc -gluconate 표지법 이용

③ ^{99m}Tc -항체의 표지

환원시킨 항체를 ^{99m}Tc -gluconate vial에 넣고 37°C 에서 1시간 반응시켰다. PD-10 컬럼을 이용하여 ^{99m}Tc 표지 항체를 분리하였다.

3) 방법 3

① 항체의 환원

5-10mg/ml의 항체를 사용하여 β -ME을 3000:1 (β -ME:항체)로 넣고 37°C 에서 30분간 환원시켰다.

환원시킨 항체를 PD-10 컬럼을 이용하여 β -ME을 제거하였다.

항체를 0.5mg씩 reacti-vial에 분주하여 -70°C 에서 냉동보관하였다.

② MDP - 뼈스캔 방사성의약품 (5mg medronate, 0.34 mg stannous fluoride, 2 mg p-aminobenzoic acid, Amersham)을 생리식염수 5ml로 재구성하였다.

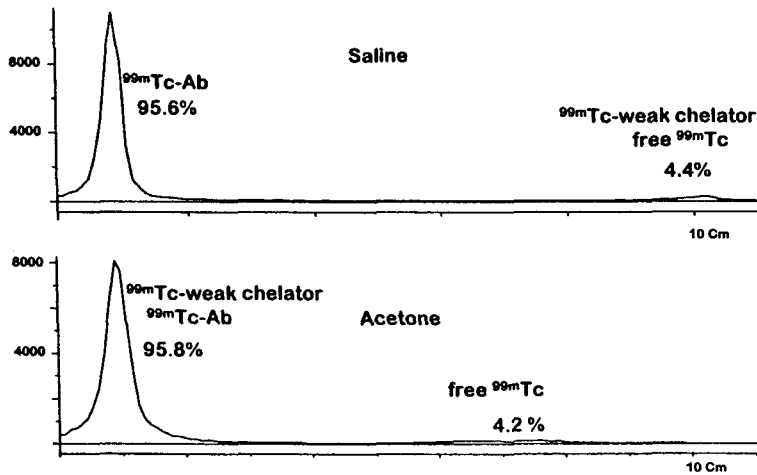


Fig. 1. Chromatogram of ^{99m}Tc labeled antibody by ITLC.

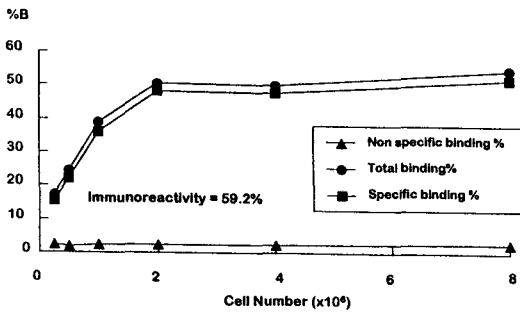


Fig. 2. Cell binding assay of ^{99m}Tc Anti-NCA 95 MoAb with SNU-C4 colon cancer cells.

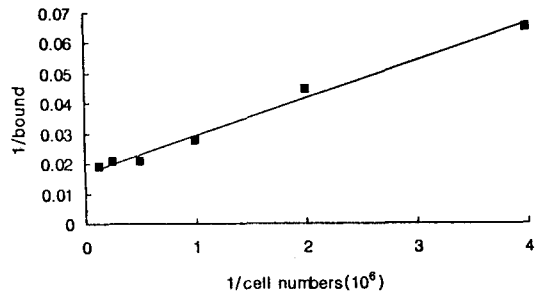


Fig. 3. Cell Binding Assay. The value of Y-intercept is the inverse value of the immunoreactivity.

③ MDP용액을 300 μl 취해 환원시킨 항체에 넣고 30mCi/1ml의 ^{99m}Tc 을 넣어 실온에서 30분간 반응시켜 표지하였다.

3. 표지효율 측정

표지효율의 측정은 박층크로마토그래피 (thin layer chromatography)를 이용하였다. 고정상으로는 ITLC-SG를, 이동상으로는 생리식염수와 아세톤을 사용하였고 TLC scanner (Bioscan)를 이용하여 측정하였다. 생리식염수에서 선단으로 올라가는 것은 ^{99m}Tc -착화제와 유리형 ^{99m}Tc 이었고 원점에 남는 것이 ^{99m}Tc 표지항체였다. 아세톤에서는 선단으로 올라가는 것은 유리형 ^{99m}Tc 이고 원점에 남는 것은 ^{99m}Tc -착화제와 ^{99m}Tc 표지항체였다 (Fig. 1).

4. 세포결합반응

대장암 세포주 SNU-C4를 시험관에 100 μl 당 0.25 $\times 10^6$, 0.5 $\times 10^6$, 1 $\times 10^6$, 2 $\times 10^6$, 4 $\times 10^6$, 8 $\times 10^6$ 농도로 준비하였다. ^{99m}Tc 표지 항체를 5ng/75 μl 씩 가하여 세포와의 총 결합%를 측정하고 표지하지 않은 항체를 25 μg /25 μl 를 가하여 세포와의 비특이결합%를 측정하여 특이결합%를 얻었다. 면역반응성은 항체가 항원과 결합하는 최고결합력으로 특이결합%에서 산출하였다 (Fig. 2, 3). 세포와 결합한 항체의 농도와 결합항체/유리항체의 비를 산출하여 결합항체의 농도를 가로축으로 결합항체/유리항체의 비를 세로축으로 표시한 그래프에서 (Fig. 4) 점들을 연결하는 직선의 기울기인 친화상수를 구하였다.

5. 무균시험 및 발열성 (pyrogen) 물질 검사

^{99m}Tc 표지 항체는 LAL (Limulus amoebocyte lysate, Associate of cape cod, INC.) 검사와 무균 시험을 실시하였다. LAL 검사는 양성, 음성, 검체용의 시험관에 생리식염수 0.1ml과 검체 0.1ml을 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 실온에서 5분간 방치

후 겔 (gel)화 정도를 보고 판정하였다. 무균시험은 혈액한천배지 (blood agar plate), 맥콘키 한천배지 (Mc Conkey agar plate), 티오글리코레이트 액체배지 (Thioglycolate broth media)에 접종후 35°C 항온 배양기에서 배양하여 일반세균과 장내세균 및 호기성, 혐기성 세균의 유무를 알아보았다.

6. 골수면역신티그래피

골수질환 환자에게 실험의 내용과 의의를 설명하고 동의서를 받은 후 7-10mCi의 ^{99m}Tc 표지 항체를 정맥주사하여 4시간 후에 전신스캔하였다.

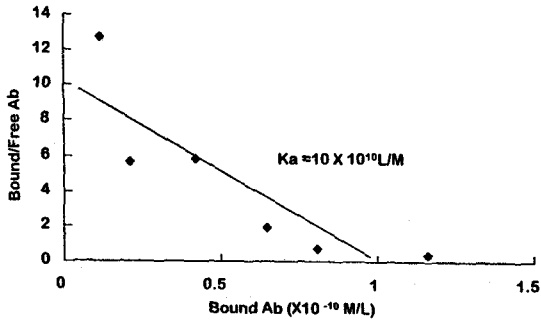


Fig. 4. Scatchard plot of ^{99m}Tc anti-NCA-95 MoAb with SNU-C4 colon cancer cells.

결 과

Transchelating agent로 gluconate를 이용한 방법에서 항체의 환원제를 제거하여 표지한 방법 2는 환원제의 존재하에 표지한 방법 1에 비해 표지효율이 48.7±11.1% (n=9)에서 77.5±11.2% (n=7)로 개선

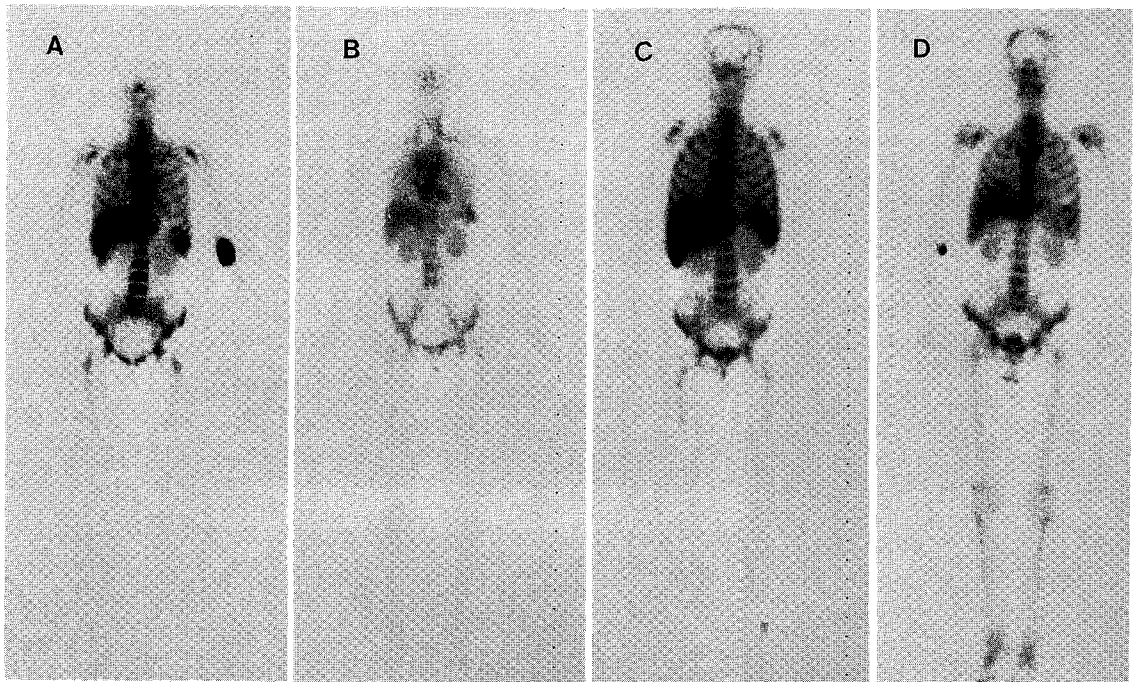


Fig. 5. Bone marrow images with various methods
 A : method 1, Labeling efficiency 57.6%, good image
 B : method 2, Labeling efficiency 61.9%, high blood pool activity
 C : method 3, Labeling efficiency 95.0%, good image
 D : method 3, Labeling efficiency 86.0%, high bone activity

Table 1. Comparison of Various Labeling Methods of ^{99m}Tc-anti-NCA Ab

	Method 1	Method 2	Method 3
Labeling efficiency(%)	48.7±11.1(n=9)	77.5±11.2(n=7)	92.4±5.9(n=15)
Immunoreactivity(%)	47.8	45.4	59.2
Affinity constant(L/M)	9.58×10 ¹⁰	11.43×10 ¹⁰	10.0×10 ¹⁰

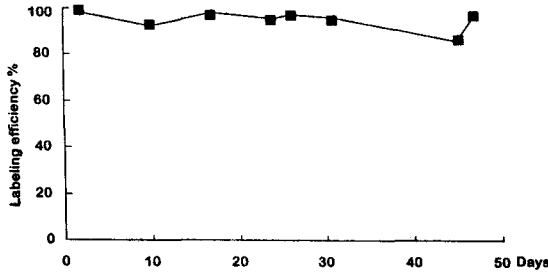


Fig. 6. Variation of the labeling efficiency of reduced antibody (79.4) stored at -70°C

되었고, MDP를 사용한 방법 3은 92.4±5.9% (n=15)으로 가장 높은 표지효율을 얻었다 (Table 1). 대장암 세포주인 SNU-C4를 이용한 세포결합반응에서 표지항체의 면역반응성과 친화상수를 구하였다. 면역반응성과 친화상수는 방법마다 유사하였다.

모든 표지항체에 대한 무균시험과 발열성물질시험 결과는 음성으로 나타났다.

이들 방법으로 표지한 항체를 정맥주사한 환자에서 4시간후에 전신스캔하였다. 방법 1로 표지한 항체를 이용한 것은 영상은 좋았지만 표지효율이 좋지 않았으며 (Fig. 5A), 방법 2로 표지한 것은 표지효율은 조금 개선되었지만 혈액풀의 방사능이 높아 전체적으로 깨끗한 영상을 얻을 수 없었다 (Fig 5B).

방법 3은 표지효율도 좋았으며 좋은 영상을 얻을 수 있었다 (Fig. 5C). 그러나 ^{99m}Tc-MDP의 방사능 양이 높을 경우에는 뼈에 방사능이 섭취된 영상이 얻어진 경우가 있었다 (Fig. 5D). 그러나 이 경우에도 PD-10 컬럼을 이용하여 MDP의 제거가 가능하였다.

방법 3의 경우 환원제를 제거한 항체를 0.5-1mg 씩 reacti-vial에 분주하고 질소 개스를 충전하여 -70°C에서 보관하여 안정성을 보였다. 47일 까지 90% 이상 표지효율을 보여 안정함을 알 수 있었다 (Fig. 6).

고 찰

영상용 방사성 핵종중 ^{99m}Tc은 유리한 가격과 물리적 성질로 인하여 항체를 표지하는데 유용하게 쓰이고 있다. 항체를 표지하는데 있어 중요한 것은 항체의 면역반응성을 유지시키며 최소한의 과정으로 안정한 화합물을 만드는 것이다. ^{99m}Tc은 반감기가 6시간으로 짧기 때문에 인체에 주는 방사능 피폭이 적다는 장점도 있지만 표지시에 걸리는 시간이 길면 방사능의 붕괴로 인하여 표지항체의 비방사능이 낮아진다. 그러므로 임상에 적용하기 위해선 짧은 시간 내에 표지하는 것이 중요하다.

직접법을 이용하여 항체에 ^{99m}Tc을 표지하였다. 착화제로 gluconate를 사용하고 항체 환원제로 β-ME을 사용하여 60-70%의 표지효율을 보고 하였으나¹¹⁾, 낮은 표지효율로 인하여 분리하는 과정이 요구되었다. 또한 과정이 복잡하고 시간이 오래걸리는 단점이 있어 임상적용에 어려움이 있었다. Mather (1990) 등은 항체에 ^{99m}Tc을 표지하는데 여러 착화제 중에서 상업화된 MDP kit를 사용하여 95% 이상의 표지효율을 보고하였다¹⁰⁾.

Guconate를 착화제로 사용한 방법으로 항체 환원제인 β-ME의 존재하에 표지한 방법은 표지효율이 40-70%로 낮았으나, 좋은 골수영상을 얻었다. 그러나 항체의 환원 후 환원제를 미리 제거하고 표지한 방법의 경우에는 표지효율이 70-80%로 개선되었으나 혈액풀의 방사능이 높아 깨끗한 영상을 얻을 수 없었다. 이는 β-ME의 존재가 free thiol group의 재산화를 억제하고 ^{99m}Tc의 재결합을 돕기 때문이라고 생각된다.

MDP를 착화제로 이용한 방법은 90% 이상의 표지효율로 Mather 등의 보고와 같은 결과를 얻어 표지항체를 분리하는 과정이 필요치 않았다. 면역반응성

은 약 60%이었으며 골수면역신티그래피에서도 좋은 영상을 얻을 수 있었다. 그러나 골영상제제인 MDP를 착화제로 사용하기 때문에 ^{99m}Tc -MDP 방사능이 높은 경우에는 뼈에 흡수되는 방사능이 높아 골영상과 비슷하게 나타났다. 이 경우에도 PD-10 컬럼을 이용하여 정제가 가능하였다.

환원된 항체를 냉동보관하여 사용하였을 때 47일간 안정하였고 항체를 냉동건조하여 키트화하였을 경우에도 같은 결과를 보였다. 그러므로 매번 항체를 환원시켜야 하는 번거로움을 없애고 항체를 미리 환원시켜 보관하여 필요할 때 수시로 사용할 수 있었다.

본 연구 결과 단일클론항체에 ^{99m}Tc 을 표지하는데 있어 MDP를 transchelating agent로 사용한 표지환경은 표지효율을 높이고 과정을 단순화하여 표지시에 걸리는 시간을 단축하였고 표지항체의 비방사능을 높여 임상적용에 용이하게 하였다. 이러한 표지법의 개선은 골수면역신티그래피 뿐만 아니라 항체를 사용하는 여러 의학적 분야의 발전에 크게 도움이 되리라 생각된다.

요 약

우리는 국내에서 개발한 항 NCA-95 단일클론항체의 면역학적 특성을 규명하고 ^{99m}Tc 표지법을 연구하여 골수면역신티그래피법을 개발한 바 있다. 그러나 ^{99m}Tc 단일클론항체의 표지효율이 낮고, 과정이 복잡하여 시간이 오래 걸리는 단점이 있어 임상적용에 어려움이 있었다. 본 연구에서는 ^{99m}Tc 표지 단일클론항체의 표지과정을 개선하여 시간을 단축하고 표지효율을 높이는 연구를 실시하였다.

티올기와 아민 및 하이드록시 그룹을 가진 착화제(chelator)와 ^{99m}Tc 은 안정한 복합체를 형성하므로, 이러한 화학적 성질을 이용하여 항체를 환원시켜 티올기를 생성하고 여기에 약한 착화제와 결합한 ^{99m}Tc 을 가하는 transchelation법을 연구하였다.

본 연구에서는 방법 1. β -mercaptoethanol로 항체를 환원하고 환원제의 존재하에 ^{99m}Tc -gluconate를 이용한 표지법, 방법 2. 항체의 환원후 β -mercaptoethanol을 제거하고 ^{99m}Tc -gluconate를 사용한 표지법, 방법 3. 환원제를 제거한 항체에 MDP를 먼저 가하고 여기에 ^{99m}Tc 을 가하는 표지법을 시도하여

보았다. 고정상으로는 ITLC-SG를, 이동상으로는 생리식염수와 아세톤을 사용하여 표지효율을 구하였다.

방법 1은 표지효율이 40-70%이나 좋은 골수영상을 얻었고, 방법 2의 경우 표지효율은 70-80%로 개선되었으나 혈액분의 방사능이 높았다. MDP를 착화제로 이용한 방법 3은 표지효율이 $92.4 \pm 5.9\%$ ($n=15$)이고 면역반응성은 약 60%였으며 골수면역신티그래피에서도 좋은 영상을 얻을 수 있었다. 때로는 ^{99m}Tc -MDP 방사능이 높아 뼈에 흡수되는 방사능이 증가하는 단점이 있지만 PD-10 컬럼을 이용하여 분리가 가능하였다. 환원된 항체를 냉동보관하여 사용하였을 경우에도 안정하여 냉동보관 47일 까지 90%이상의 표지효율을 보였다.

본 연구 결과 ^{99m}Tc 표지 항 NCA-95 단일클론항체의 표지법의 개선으로 더 쉽게 임상에 이용할 수 있게 될 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Staub RF, Gorston E: Indium-111-chloride distribution kinetics in hematologic disease. *J Nucl Med* 1973;14:456-457
- 2) Fordham EW, Ali A: Radionuclide imaging of bone marrow. *Semin Hematol* 1981;18:222-239
- 3) Datz FL, Tayer A Jr: The clinical use of radionuclide bone marrow imaging. *Sem Nucl Med* 1985;15:239-259
- 4) Chung JK, Yeo JS, Lee DS, et al.: Bone Marrow Scintigraphy Using ^{99m}Tc -Anti-granulocyte Antibody in Hematologic Disorders. *J Nucl Med* 1996;37(6):978-982
- 5) 최창운, 정준기, 이명철, 김병국, 고창순, 정홍근: ^{99m}Tc 표지 항 과립구단일 클론 항체를 이용한 골수신티그래피법의 개발. *대한내과학회지* 1994;46:100-109
- 6) Child RL, Hnatowich DJ: Optimum conditions for labeling of DTPA-coupled antibodies with ^{99m}Tc . *J Nucl Med* 1985;26:293
- 7) Paik CH, Ebbert MA, Murphy PR, et al.: Factors influencing DTPA conjugation with antibodies by cyclic DTPA anhydride. *J Nucl Med* 1983;24:1158-1163
- 8) Ram S, Buchsbaum DJ: Apeptide-based bifunctional chelating agent for ^{99m}Tc - and ^{186}Re -labeling of monoclonal antibodies. *Cancer* 1994 Feb 1;73(3 suppl):769-773
- 9) Thakur ML, DeFulvio J, Richard MD, Park CH:

- ^{99m}Tc labeled Monoclonal Antibodies: Evaluation of Reducing Agent. *Nucl Med Biol* 1991;18:227-233
- 10) Mather SJ, Ellison D: Reduction-Mediated ^{99m}Tc labeling of Monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1990;31:692-697
- 11) 정준기, 이동수, 이명철 등: 국산 항 CEA 항체의 ^{131}I , ^{99m}Tc 표지법 확립 및 면역학적 특성 분석. 대한 핵의학학회지 1992;26:346-354
- 12) Lee JM, Chung HK, Kim SW, et al.: Purification of carcinoembryonic antigen from culture supernatant of human colon cancer cell line, LS 174 T using monoclonal immunaffinity chromatography. *Korean J Biochem* 1988;20:12-32