

pET vector를 통한 유전자 재조합 단일사슬 항 B형 림프종 항체의 생산과 면역반응성 평가

원자력의학원 핵의학연구소¹, 방사선의학연구소², 핵의학과³
정재호¹ · 최태현¹ · 우광선¹ · 정위섭¹ · 김수관² · 천기정^{1,3} · 최창운^{1,3} · 임상무^{1,3}

Production of the Recombinant Single Chain Anti-B Cell Lymphoma Antibody and Evaluation of Immunoreactivity

Jae Ho Jung, M.S.¹, Tae Hyun Choi, Ph.D.¹, Kang Sun Woo¹, Wee Sup Chung¹,
Soo Gwan Kim², Gi Jeong Cheon, M.D.^{1,3}, Chang Woon Choi, M.D.^{1,3}, and Sang Moo Lim, M.D.^{1,3}

¹Lab. of Nuclear Medicine, ²Radiological and Medical Sciences Research Center, ³Dept. of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), Seoul, Korea.

Purpose: Recombinant ScFv lym-1 was produced, using pET vector system for large scale production. **Methods:** ScFv lym-1 gene inserted pET-22b (+) vector, was expressed in E.coli BL-21 strain. ScFv lym-1 antibody extracted from periplasm, was purified with His-Taq column. To evaluate immunoreactivity with Raji cell, ScFv lym-1 was labeled with I-125 and I-125 ScFv lym-1 was purified with desalting column. Raji cell was injected into the C57BR/cdJ SCID mice. Gamma camera imaging were taken time point at 1, 8, 24, and 48 hr with 8 mm pinhole collimator. **Results:** An active scFv lym-1 could be produced in E.coli with soluble from using pET vector system. Immunoreactivity and affinity constant of IgG lym-1 were 54% and $1.83 \times 10^9 M^{-1}$, respectively, and those of scFv lym-1 were 53.7% and $1.46 \times 10^9 M^{-1}$, respectively. Biodistribution of I-125 scFv lym-1 antibody showed faster clearance in blood, spleen, kidney and than I-125 IgG lym-1 antibody. Gamma camera image of I-125 scFv lym-1 antibody showed faster clearance and tumor targeting liver than I-125 IgG lym-1 antibody. **Conclusions:** In vitro properties of scFv lym-1 were similar to those of IgG lym-1. ScFv lym-1 showed faster blood clearance than IgG lym-1. These results suggest that scFv lym-1 antibody can be useful for tumor imaging agent. (Nucl Med Mol Imaging 2006;40(4):211-217)

Key Words: pET 22b (+) vector, single chain fragment variable (scFv), lym-1 antibody, Raji cell lymphoma

서 론

항체의 유전자 재조합 기술의 등장으로, Fab와 유사한 단일 사슬 항체는 항원 결합능력을 유지하면서, 그 크기가 축소된 형태로 박테리아에서 발현이 가능하게 되었다. 유전자 재조합 단일 사슬항체는 마우스 유래 단클론 항체에 비해 많은 장점을 가지고 있다. 보다 빠른 혈중제거율, 종양 국소화의 향상, 인체 면

역내의 항 마우스 항체 반응의 감소등과 함께 분자 생물학적인 방법으로 단일 사슬항체의 기능을 변화시키고, 향상시킬 수 있다. 일반적으로 phage display 방법에 의한 단일 사슬 lym-1 항체의 제조는 그 방법이 복잡하고, 대량생산이 어려우며 생산된 단백질의 분리 및 정제가 까다로운 것으로 알려져 있다. 그러나 E.coli vector의 사용은 배양기간이 짧고, 유전자 조작이 간편하다는 장점을 가지고 있다.^{1,2)} 그 중 pET vector는 유전자의 고발현을 위한 T-7 promoter를 가지고 있으며,³⁾ 다양한 제한효소 사이트를 포함하고 있기 때문에 목적 유전자의 삽입이 용이하다는 장점을 가지고 있다. 항원인 HLA-DR에 특이적으로 결합하는 lym-1 항체는 HLA-DR이 과다 발현되어 있는 악성 림프종을 선택적으로 공격하여 치료 효과를 유도할 수 있다.

이 연구는 lym-1 hybridoma로부터 IgG lym-1 항체의 항원 인식부위만으로 구성된 단일사슬 lym-1항체를 제조하고,

• Received: 2006. 2. 23. • Accepted: 2006. 5. 30.
• Address for reprints: Gi Jeong Cheon, M.D., Dept. of Nuclear medicine Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), Seoul 139-706, Korea
Tel: 82-2-970-1273, Fax: 82-2-970-1341
E-mail: larry@kcch.re.kr
* 이 연구는 과학기술부 원자력중장기 연구사업의 연구비 보조로 이루어졌음.

그 기능을 평가하여 진단 및 치료에 이용하고자 하는 것이다.

본 연구에서 사용되는 목적 유전자인 단일 사슬 lym-1 유전자는 pCANTAB 5E에서 획득하였다. 이는 promoter의 구조 및 codon 사용 빈도 등이 일반적인 미생물의 유전자 구조와는 상이하기 때문에, 대장균계나 bacillus와 같은 숙주계를 직접 사용하여, 고발현이 불가능하므로 유전자를 PCR 방법으로 대장균용 발현 벡터 pET-22b(+)에 도입하여, *E. coli* BL21 (F omp T hsdSb (rb-mb-))[gal dcm (DE3)]에서 IPTG 발현을 유도하였다.³⁾ 이렇게 생산된 단백질을 정제하여 방사성 요오드를 표지 하였으며, 표지된 항체의 Human Burkitt's Lymphoma 세포주인(Raji cell)에 대한 면역반응성을 평가하였다.

대상 및 방법

1. Cloning procedure

pCANTAB 5E 및 pET 22b(+) DNA의 분리에는 Accuprep Plasmid Extract Kit (Bioneer CO.)를 사용하였고, 분리된 DNA의 정제, 농축 및 용출에는 동일사의 PCR 및 Gel Purification Kit를 사용하였다. pET 22b(+) DNA는 Not I과 BamH I으로 절단하였으며, pCANTAB 5E DNA는 Sfi I과 Not I으로 절단하여, 750 b.p의 lym-1 유전자 단편을 agarose electro elution 방법으로 회수하였다. 이를 pET 22b(+) vector에 삽입하기 위하여 PCR을 통해 유전자를 증폭시켰으며, 동시에 BamH I restriction enzyme site를 합성하였다. 각각의 digestion된 vector와 insert를 0.5 ug과 1.0 ug의 비율로 혼합하였고, Tris-HCl 500 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 200 mM, ATP 10 mM 조성의 ligation 완충 용액에서 T4 DNA ligase를 사용하여, 4°C에서 16-18시간 동안 반응시켰다. 재 조합된 DNA 용액을 *E. coli* DH5a에 형질 전환시키고, LB+Ap+IPTG 고체배지에 도말하여 형질전환체를 선별하였다.⁴⁾

2. ScFv Lym-1 유전자의 발현

IPTG 농도에 따른 scfv Lym-1 유전자의 발현은 Smith 등의 방법을 변형하여 실시하였다.⁵⁾ *E. coli* BL21(DE3)를 LB배지에 ampicillin (50ug/mL)과 함께 접종하여, 하룻밤 동안 배양한 후 원심분리한 뒤, 2×YT 배지에 균체만을 회수하였다. 2×YT 배지에 현탁된 균체를 다시 원심분리하여, ampicillin (50ug/mL) 100 ul 가 포함된 2×YT 배지 100 mL에 1% 접종 하고, 2 시간 동안 37°C, 250 rpm 에서 배양하였다. 여기에 농도별로 IPTG를 첨가하였고, 시간대별로 관찰하여 항체 생산을 위한 최적 IPTG 농도와 시간 조건을 확인하였다. 발현 단백질의 농도 확인은

Bradford6) 분석법을 이용하였다. 이 때 standard curve는 BSA (bovine serum albumin)를 사용하였다.

3. 발현 단백질의 추출 및 정제

재조합 *E. coli* 균주가 생산하는 Lym-1 항체를 배양액으로부터 회수하기 위하여 고농도의 sucrose 용액을 사용하는 osmotic shock 방법을 사용하였다. Lym-1 항체의 정제는 Ni-NTA column (His TrapTM HP Kit, Amersham Biosciences Co.)을 사용하였다.

4. 방사성 요오드 scFv Lym-1 항체의 제조

Ni-NTA column을 통해 정제된 scFv Lym-1 항체의 Raji cell 결합능평가를 위한 I-125의 표지는 Iodo bead를 사용하였다. scFv Lym-1 항체(100ug)과 항체의 1/2 부피에 해당하는 0.2 M phosphate buffer (pH 6.5)를 혼합하여 pH를 조절 한 후, Iodo bead 한 개를 넣고, 상온에서 20 분 동안 반응 시켰다. 여기에 I-125 (3.7 MBq)를 첨가하여 상온에서 30분간 반응하였다. 10분 간격으로 반응액을 혼합하였으며, 반응액의 부피는 bead가 잡기는 범위에서 최대한 작게 하였다. 반응 후 표지수율을 확인하기 위해 박층 크로마토그래피를 수행하였고, TLC 스캐너를 이용하여 측정하였다. 이때 고정상으로 ITLC-SG를 이동상으로는 아세톤 전개용매를 사용하였고, 반응하지 않은 I-125와 항체와 결합한 I-125의 각 피크 면적으로부터 표지수율을 결정하였다.⁷⁾ I-131의 표지도 위와 동일한 방법으로 시행하였다.

5. 세포결합능 측정(Cell binding assay and Scatchard analysis)

Human Burkitt's lymphoma 세포주인 Raji cell을 이용하여, 시험관 내에서 I-125 scFv Lym-1 항체의 세포결합실험과 Scatchard 분석을 총 5회에 걸쳐서 실시하였고, 각각의 면역 반응성과 친화상수를 구하였다.⁸⁾ 세포결합 실험은 세포를 시험관 에 100 ul 당 0.25, 0.5, 1, 2, 4×10⁶개로 준비하여 시행하였다. 각각의 시험관에 I-125 항체를 5 ng/75 ul씩 가하여 세포와의 총 결합 %를 측정하고, 표지하지 않은 항체 25 ug/ul를 가하여 세포와의 비특이적 결합 %를 측정 하여, 특이 결합 %를 얻었다. 면역반응성은 항체가 항원과 결합하는 최고 결합력으로 특이결합 %를 산출하였다. Scatchard 분석은 1.0×10⁶/100 ul 세포와 3.6-300 ng/75 ul의 동위원소 결합항체를 사용하였다. 항원에 결합한 항체의 농도와 결합항체/유리 항체의 비를 산출하여 결합 항체의 농도를 가로축으로 결합항체/유리 항체의 비를 세로축으로 도시한 그래프에서 점들을 연결하는 직선의 기울기인 친화 상수를 구하였다.⁷⁾

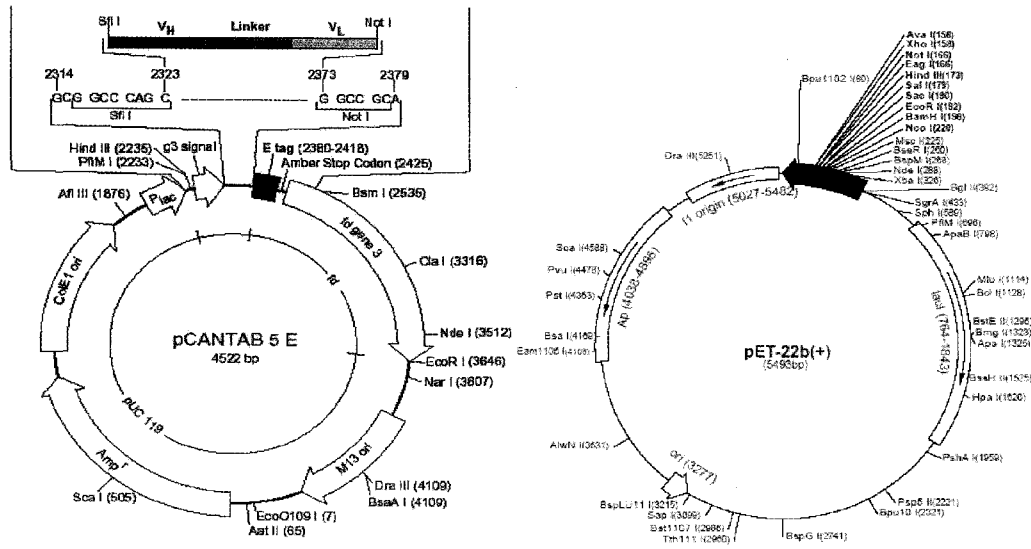


Fig. 1. The maps of pCANTAB 5 E and *E. coli* pET-22b(+) shows the control regions and restriction enzyme site.

6. Flow cytometry 분석

Raji cell 1×10^6 /mL를 준비하여 100 ul씩 polystyrene tube에 넣고, 재조합 된 scFv lym-1 항체 2 ug (1 ug/mL)을 첨가하였다. 상온에서 30 분 동안 반응시킨 후, anti-his tag mouse antibody (1 ug/mL)를 처리하여 상온에서 30 분간 반응시켰다. 반응시킨 세포를 PBS로 세척한 뒤 10배 희석한 FITC 결합 anti-mouse IgG anti body 20 ug을 첨가하여, 실온의 암소에서 10 분간 반응하였다. 최종 적으로 FACSsort cytofluorimeter (Becton Dickin son, USA)를 사용하여 분석하였다.⁹⁾

7. 생체 분포(Organ biodistribution)

체중 20 g의 정상 Balb/c 마우스(n=5)에 I-125 표지 항체를 각각 370 kBq씩 꼬리 정맥에 주사하였으며, 마리 당 0.5 ng의 표지항체를 투여하였다. 주사 후 1, 4, 24 시간에 마우스의 혈액, 간, 폐, 비장, 그리고 신장을 적출하였고, 무게

를 측정 한 후 감마 카운터로 각 장기의 방사능을 측정하였다. 그 측정량에 대한 각각의 장기 무게 당 섭취율(%ID/g) 즉, percent injected dose per tissue weight (%ID/g = 장기의 cpm/총 주입량/장기의 중량)을 계산하여 비교 분석 하였다.¹⁰⁾

8. 감마 카메라 영상(Gamma camera)

1×10^6 /100 ul의 Raji cell을 5-6주령 C57BR/cdJ SCID 마우스 우측 대퇴부 피하지방에 주사하였다. SPF 시설에서 25-28일간 사용하여, 0.4-0.5 g 이상의 종양을 획득하고, 꼬리정맥에 I-131 표지항체 3.7 MBq을 주사한 후, 1, 8, 24, 48 시간의 감마카메라(SIMENSE, ZLC 3700S) 영상을 확인하였다.^{11,12)} 보다 우수한 감마 카메라 영상을 얻기 위하여 8 mm 바늘구멍 조준기(pinhole colimeter)를 사용하였고, C57BR/cdJ SCID 마우스와의 거리는 90 mm에서 500,000 counts를 수집하였다.¹⁴⁾

9. 자가방사 영상(Autoradiography)

자가방사 영상은 I-131 표지항체 3.7 MBq를 꼬리 정맥에 주입하고, 48 시간 후 C57BR/cdJ SCID 마우스를 희생시켜서 4% carboxymethyl cellulose로 블록을 만든 뒤 드라이아이스로 얼려서 동결 미세 절편기(Auto cryotome NA-200F, Nakaga wa Seisaku-sho co., Japan)를 사용하여, 30 m 두께의 관상절편을 얻어서 동결 건조시킨 후, X-선 필름(X-Omart AR, Kodak)에 7 일 동안 노출시켰다.^{15, 16)}

Table 1. Radiolabeling Yields of IgG Lym-1 and ScFv Lym-1 with I-131 by Iodobead

Radioisotope	Radiolabeling yield (%)	
	IgG Lym-1	scFvLym-1
I-131	>99	>99



Fig. 2. Gene structure of recombinant scFv Lym-1 antibody.

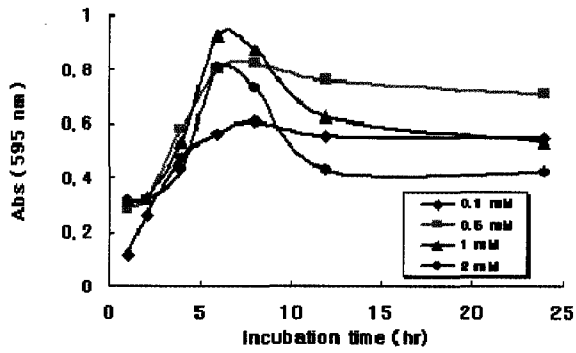


Fig. 3. Optimal expression conditions by IPTG concentration and incubation time (1 mM IPTG, 6hr, 37°C).

결 과

1. ScFv Lym-1 유전자의 재조합

ScFv Lym-1 유전자의 재조합에 사용된 Insert와 Vector DNA를 Fig. 1에 나타내었다. pCANTAB 5E의 plasmid

DNA를 분리하여, PCR로 증폭한 결과 약 750 b.p의 Lym-1 유전자를 획득하였다. 이 유전자를 Not I 제한효소로 절단하였고, PCR 증폭 시 새로 만들어진 BamH I 사이트 또한 37°C에서 1시간 동안 절단하였다. pET 22b(+) vector의 plasmid DNA를 분리하였고, Not I과 BamH I 제한 효소를 이용해 양 말단을 절단하였다. Ligation 효율을 높이기 위해 5' 말단의 인산기를 제거하였으며, 16°C에서 하룻밤 동안 반응하여, scFv Lym-1 유전자를 재조합하였다.(Fig. 2) 재조합 scFv lym-1 유전자의 위치는 His Taq 사이트 바로 앞이었으며, T7 프로모터와 T7 터미네이터를 가지고 있는 전형적인 pET vector의 구조를 갖고 있었다.

2. ScFv Lym-1 유전자의 발현

IPTG induction을 통한 유전자의 발현 결과 1 mM 농도의 IPTG를 첨가했을 때, 가장 우수한 conversion율을 확인할 수 있었으며, 이때의 온도는 37°C, 최고 발현 시간은 6 시간임을 알 수 있었다. 0.5 mM IPTG 농도에서도 일정수준

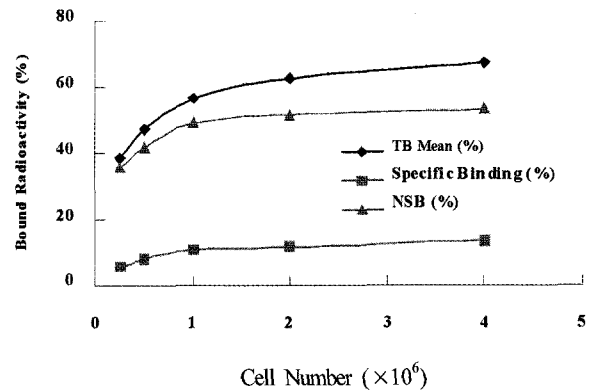
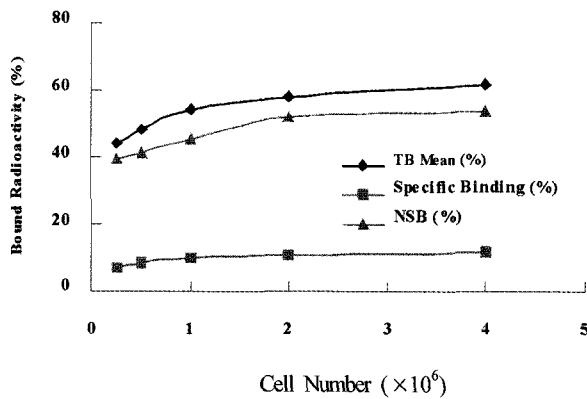


Fig. 4. Immunoreactivity of I-125 IgG lym-1 and ScFv lym-1 was confirmed with HLA-DR antigen expressed Raji cell line (A : I-125 IgG lym-1, B : I-125 scFv lym-1).

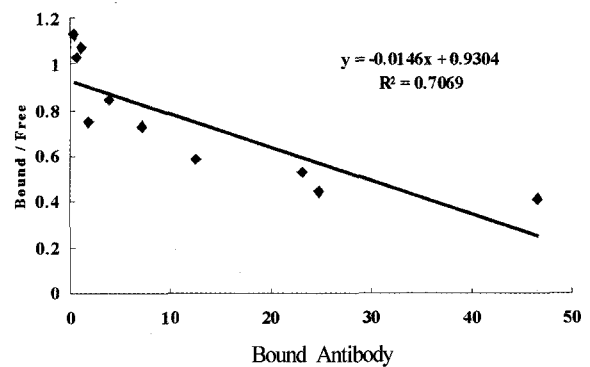
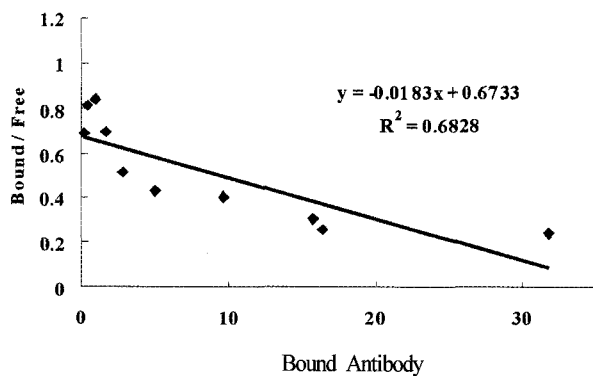


Fig. 5. Scatchard plot of I-125 IgG lym-1 and ScFv lym-1 was confirmed with HLA-DR antigen expressed Raji cell line (A : I-125 IgG lym-1, B : I-125 scFv lym-1).

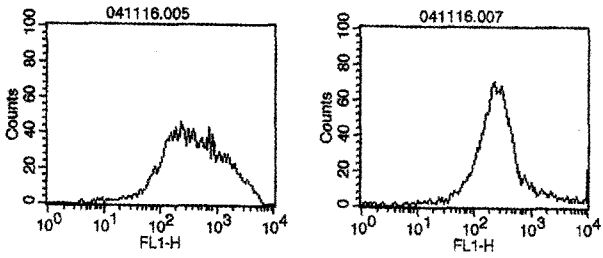


Fig. 6. Flow cytometry analysis of IgG lym-1 (A) and ScFv lym-1 (B). Primary antibody (Anti - His tag mouse antibody) ; Secondary antibody (FITC conjugated - Anti - mouseIgG, Rabbit antibody)

이상의 conversion율을 보였으나, 1 mM IPTG 첨가 시 보다 낮은 수준이었다.(Fig. 3) 본 실험의 발현과정에서 inclusion body는 발견되지 않았다.

3. 표지 효율

기존의 IgG lym-1과 재조합 된 scFv lym-1 항체에 I-131

을 표지한 결과를 Table 1에 나타내었다. 각각의 항체 모두 Iodo bead를 사용해 상온에서 표지하였으며, I-131의 표지수율은 99% 이상이었다. 재조합 된 scFv lym 항체는 기존의 IgG lym-1과 비교했을 때, 1/5 사이즈의 분자량을 갖고 있음에도 불구하고, 역시 99% 이상의 표지수율을 보여 IgG lym-1에 비해 그반응성이 전혀 떨어지지 않은 것을 확인할 수 있었다.

4. 세포결합능 측정

포화결합 실험에서 림프종 세포주 Raji cell에 대한 I-125 IgG lym-1과 I-125 scFv lym-1 항체의 결합율은 Fig. 4와 같았다. I-125 IgG lym-1 항체의 세포에 대한 최고 특이 결합율인 면역반응성은 54.0%였으며, I-125 scFv lym-1 항체의 면역반응성은 53.7%였다. Scatchard plot (Fig. 5.)에서 회귀직선의 기울기인 친화상수는 각각 $1.83 \times 10^9 M^{-1}$, $1.46 \times 10^9 M^{-1}$ 이었다.

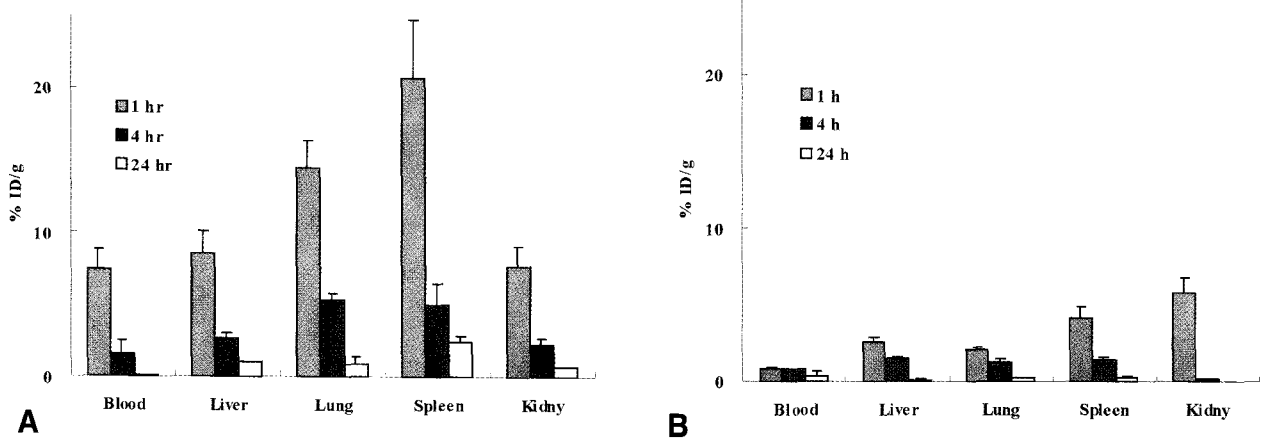


Fig. 7. Biodistribution of I-125 IgG lym-1 (A) and I-125 ScFv lym-1 (B) in normal Balb/c mice.

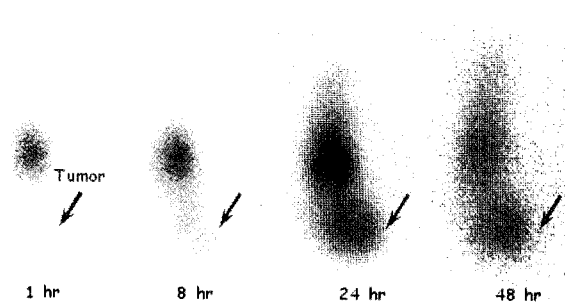


Fig. 8. Gamma camera image of I-131 IgG lym-1 antibody in C57BR/cdJ SCID mice.

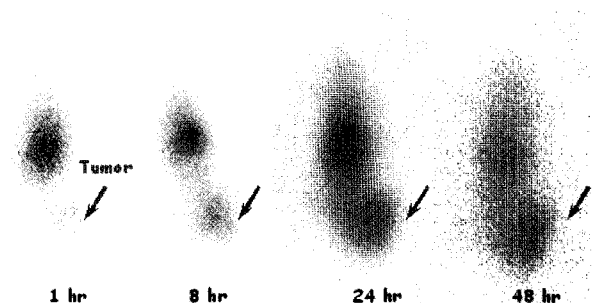


Fig. 9. Gamma camera image of I-131 scFv lym-1 antibody in C57BR/cdJ SCID mice.

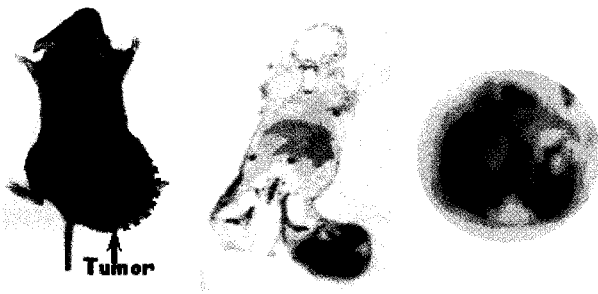


Fig. 10. Autoradiography of I-131 IgG lym-1 antibody in C57BR/cdJ SCID mice.

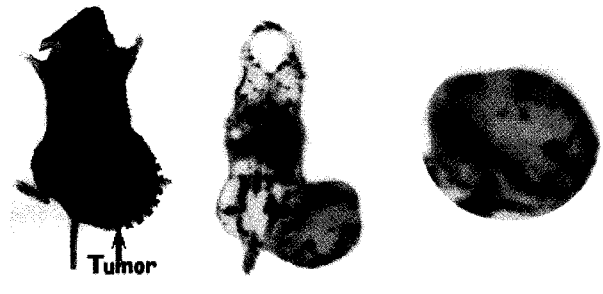


Fig. 11. Autoradiography of I-131 scFv lym-1 antibody in C57BR/cdJ SCID mice.

5. Flow cytometry 측정

분리 정제된 IgG lym-1과 scFv lym-1 항체의 HLA-DR 항원에 대한 반응성을 평가하고자 하였다.(Fig. 6) Raji cell의 경우 FITC 접합항체를 반응시킨 결과 IgG Lym-1 항체와 scFv lym-1 항체가 유사한 shifting 수준을 보여 대등한 면역반응성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

6. 정상 마우스에서의 생체 내 분포

정상 Balb/c 마우스에서 I-125 IgG lym-1과 scFv lym-1 표지 항체를 주사한 후 1, 4, 24 시간에 생체 내 분포를 Fig. 7에 나타내었다. 투여 1 시간 후, IgG lym-1 모델의 경우 혈액이 8% ID/g, 간섭취 9% ID/g, 폐와 비장의 섭취율이 각각 15, 21% ID/g으로 다소 높았으며, 신장 섭취는 8% ID/g 수준으로 혈액이나 간과 비슷한 초기 섭취율을 보였다. 표지항체 투여 4시간 후 부터 체외로 배출되어 대부분의 장기에서 5% ID/g 미만의 섭취율을 보이다, 24 시간 경과 후에는 비장을 제외한 모든 장기에서 1% ID/g 내외에 낮은 섭취율을 나타내었다. 반면에 분자량이 작은 scFv 모델의 경우는 항체 투여와 동시에 빠른 체내 대사율을 보이며, 모든 장기에서 IgG Lym-1 모델에 비해 빠른 장기 배출을 보여, 결과적으로 매우 낮은 장기 섭취율을 나타내었다.

7. 감마 카메라 영상

C57BR/cdJ SCID 마우스에 이식한 Riji cell 종양모델의 감마 카메라 영상을 획득하기 위하여 I-131 IgG lym-1과 I-131 scFv lym-1 항체를 각각 주사하고, 1, 8, 24, 48 시간의 영상을 비교 하여 Fig. 8, 9에 나타내었다. 생체 내 분포 결과와 비교하여 볼 때, IgG 모델의 경우 분자량이 큰 만큼 더딘 체내 대사율을 보임을 알 수 있었고, 이로 인해 초기 1시간에는 종양에 특이적으로 결합한 항체의 영상을 얻지 못하였다. 투여 8 시간째부터 희미한 영상 이 보이기 시작했으며, 24 시간이 되어서야 뚜렷한 영상을 얻을 수 있었다. 반면에 항체 크기가 작은 scFv 모델의 경우는 빠른 체내 대사율과

우수한 종양 특이적 결합력은 갖고 있어, 투여 1시간 후부터 영상을 얻을 수 있었으며, 8 시간에는 뚜렷한 종양 영상을 획득 할 수 있었다.

8. 자가 방사선 영상

C57BR/cdJ SCID 마우스에 이식한 Riji cell 종양모델의 감마 카메라 영상을 얻은 후, 자가 방사선 영상을 획득하였다. IgG 와 scFv 모델 두 그룹 모두 주사 후, 48 시간 에 얻은 자가 방사선영상에서 종양의 일부 괴사로 인하여, 중심부에 항체가 불균일하게 섭취되었으나, 종양은 잘 관찰할 수 있었으며, 장기를 포함한 종양의 섭취부위는 감마 카메라 영상에서 고신호 강도를 보이는 부위와 일치하였다.(Fig. 10, 11) 두 그룹 모두 매우 유사한 종양섭취를 보임을 알 수 있었다.

고찰

재조합 scFv lym-1 유전자의 위치는 His Taq 사이트 바로 앞이었으며 전형적인 pET vector의 구조를 갖고 있었다. 일반적으로 *E.coli*를 숙주로 하여 외래 유전자를 대량으로 발현시킬 경우 phase contrast microscope로 볼 수 있는 cytoplasmic 입자를 형성하게 된다. 이와 같은 입자는 다량의 외래단백질의 형성으로 단백질의 folding이 제대로 일어나지 않아 발생하는 것으로 추정되며, 이들은 과발현될 때 insoluble mass로 형성되는 것으로 활성이 없는 형태이며, inclusion body라고 부르고 있다²⁾. 본 연구에서 과발현 될 때 형성되는 것으로 활성이 없는 inclusion body는 발견되지 않았고 정상적으로 발현되어 항체 단백질의 생산이 가능함을 확인하였다.²⁾ 재 조합된 scFv lym 항체는 IgG lym-1항체에 비해 1/5 사이즈의 분자량을 갖고 있으며, 바인딩 사이트가 절반임에도 불구하고, 기존의 것과 매우 유사한 동위원소 표지수율 과 면역반응성을 갖고 있음을 확인하였다. 방사성 요오드의 표지수율은 99% 이상 이었으며, 면역반응성은 95% 이상, 회귀직선 의 친화상수는 80%의 활성을 보인다는 것은

scFv lym-1 항체를 이용한 동물 실험에서도 기대이상의 종양 특이적 결합력을 갖고 있을 것이라고 사료된다. 이런 결과는 종래의 단편항체 재조합 과정에서 발생하는 항체 사이의 감소로 인한 동위 원소와의 반응성 저하에서 오는 활성의 상실이란 문제점을 전혀 갖고 있지 않는 것으로 확인되었으며, scFv Lym-1 항체의 면역반응성 또한 활성화되어 있을 것이라는 기대를 갖게 하는 결과물이었다. 결과적으로 결합부위가 절반인 scFv lym-1 항체가 기존의 IgG Lym-1 항체에 상응하는 결합력을 갖고 있음을 의미한다. 동시에 작아진 분자량으로 인하여 생체 내에서 매우 빠른 혈중 제거율은 보였으며, 이는 동위원소 결합 시 정상세포에 미치는 피해를 최소화 할 수 있을 것으로 생각된다. 재 조합 항체의 빠른 대사속도는 궁극적으로 종양 표적화의 시간을 단축시켰으며, 항체 투여 후 초기에 영상을 확인할 수 있음을 의미한다. 이 영상은 48 시간까지 지속적인 확인이 가능하여, 기존의 IgG Lym-1 항체의 문제점을 보완할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

재조합된 scFv lym-1의 세포결합 실험에서 높은 면역반응성을 보였으며, 비특이 반응에서 모항체인 IgG lym-1에 의해 결합이 억제됨을 확인하였고, 동물 영상을 통해 IgG보다 분자량이 작은 scFv lym-1 항체가 빠른 체내대사율과 종양섭취율을 보여 방사면역진단에 유용할 것으로 보여진다.

References

1. Kim YH, Lee JJ, Hong SK, Hong YS, Hwang CK, Lee HS, et al. A survey for the microbial metabolism and its application to the microbial transformation. *Report for the Korean Ministry of Sciences and Technology* 1994;175-209.
2. Min WK, Hong YS, Choe Y.K, Lee JK, Hong SK. Condition optimization for overexpression of the aklavinone 11-hydroxylase gene from streptomyces peucetius sub sp. Caesius ATCC 27952 in *Escherichiacoli*. *Kor J Appl Microbiol Bio technol* 1998;15-22.
3. Moran CP Jr, Lang N, LeGrice SF, Lee G, Stephens M, Sonenshein

- AL, et al. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* 1982;186:339-46.
4. Seu JH, Kim YH, Jun DY, Jo, YL. Cloning of *Bacillus amyloliquefaciens* amylase gene using YRp7 as a vector. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 1986;14:161-8.
5. Smith DB, and Johnson KS. Single step purification of polypeptides expressed in *Escherchia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988;67:31-20.
6. Shen B, Hutchinson CR. Deciphering the mechanism for the assembly of aromatic polyketides by a bacterial poly ketide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;93:6600-4.
7. Hong MK, Jeong JM, Yeo JS, Kim K M, Chang YS, Lee YJ, et al. In vitro properties and Biodistribution of ^{99m}Tc and Re-188 labeled monoclonal antibody CEA 79.2. *Korean J Nucl Med* 1988;32: 516-24.
8. Hong MK, Jeong JM, Choung JK, Choi SR, Kim CK, Lee YJ, et al. ^{99m}Tc labeling kit preparation and characteristics of anti-NCA-95 monoclonal antibody. *Korean J Nucl Med* 1966;30: 541-7.
9. Mather SJ, Ellison D. Reduction-mediated ^{99m}Tc labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1990;31:692-7.
10. Kim HW, Kim CG, Yoon KH, Kim H J, Juhng SK, Roh BS, et al. Biodistribution of Iodine-131-Iodomisonidazole and Imaging of Tumor Hypoxia in Mice bearing CT-26 Adenocarcinoma. *J Nucl Med* 1999;33:289-97.
11. Hansen HJ, Ong GL, Diril H, Roche PA, Griffiths GL, Goldenberg DM, et al. Internalization and catabolism of radiolabeled antibodies to the MHC class II invariant chain by B-cell lymphomas. *Biochem J* 1996;320:293-300.
12. Patel S, Stein R, Ong GL, Golden berg DM, Mattes MJ. Enhancement of tumor-to-non-tumor localization ratios by hepatocyte-directed blood clearance of antibodies labeled with certain residualizing radiolabels. *J Nucl Med* 1999;40:1392-1401.
13. Reddy N, Ong GL, Behr T, Sharkey RM, Goldenberg DM, Mattes MJ. Rapid blood clearance of mouse IgG^{2a} and human IgG¹ in nude and nu/mice is due to low IgG^{2a} serum concentrations. *Cancer Immunol Immunother* 1988;46:25-33.
14. Chung JK, Yeo JS, Lee DS, Park SY, Lee MC, Kim BK, et al. Bone marrow Scintigraphy using ^{99m}Tc-anti granulocyte antibody in hematologic disorder. *J Nucl Med* 1996;30:978-82.
15. Koh WJ, Rasey JS, Evans ML, Grierson JR, Lewellen TK, Graham MM, et al. Imaging of hypoxia in human tumors with [F-18]Fluoromisonidazole. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991;22:199-212.
16. Mannan RH, Somayaji VV, Lee J, Mercer JR, Chapman JD, Wiebe LI. Radioiodinated 1-(5-iodo-5-deoxy--D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazole (iodoazomycin arabinoside:IAZA): A novel marker of tissue hypoxia. *J Nucl Med* 1991;32:1764-70.