

## 흑색종에서의 I-131표지 혈관내피세포성장인자 수용체2 항체를 이용한 방사면역치료 평가

전북대학교 의학전문대학원 핵의학교실, 임상연구소, 의과학연구소  
김은미 · 정환정 · 박은혜 · 정수진 · 이창문 · 장규윤<sup>1</sup> · 김동욱 · 임석태 · 손명희

### Evaluation of the Radioimmunotherapy Using I-131 Labeled Vascular Endothelial Growth Factor Receptor2 Antibody in Melanoma Xenograft Murine Model

Eun-Mi Kim, M.S., Hwan-Jeong Jeong, M.D., Eun-Hye Park, M.S., Su-jin Cheong, M.S.,  
Chang-Moon Lee, Ph.D., Kyu-yun Jang, M.D.<sup>1</sup>, Dong Wook Kim, Ph.D.,  
Seok Tae Lim, M.D., and Myung Hee Sohn, M.D.

Departments of Nuclear Medicine and <sup>1</sup>Pathology, Research Institute of Clinical Medicine, Institute for Medical Sciences, Chonbuk National University Medical School and Hospital, Jeonju, Korea

**Purpose:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, fetal liver kinase 1 (Flk-1), play an important role in vascular permeability and tumor angiogenesis. The aim of this study is to evaluate the therapeutic efficacy of <sup>131</sup>I labeled anti-Flk-1 monoclonal antibody (DC101) on the growth of melanoma tumor, which is known to be very aggressive in vivo. **Materials and Methods:** Balb/c nude mice were injected subcutaneously with melanoma cells in the right flank. Tumors were allowed to grow up to 200-250 mm<sup>3</sup> in volume. Gamma camera imaging and biodistribution studies were performed to identify an uptake of <sup>131</sup>I-DC101 in various organs. Mice with tumor were randomly divided into five groups (10 mice per group) and injected intravenously; control PBS (group 1), <sup>131</sup>I-DC101 50 µg/mouse (group 2), non-labeled DC101 50 µg/mouse (group 3), <sup>131</sup>I-DC101 30 µg/mouse (group 4) and 15 µg/mouse (group 5) every 3 or 4 days for 20 days. Tumor volume was measured with caliper twice a week. **Results:** In gamma camera images, the uptake of <sup>131</sup>I-DC101 into tumor and thyroid was increased with time. Biodistribution results showed that the radioactivity of blood and other major organ was gradually decreased with time whereas tumor uptake was increased up to 48 hr and then decreased. After 4th injection of <sup>131</sup>I-DC101, tumor volume of group 2 and 4 was significantly smaller than that group 1. After 5th injection, the tumor volume of group 5 also significantly reduced. **Conclusion:** These results indicated that delivery of <sup>131</sup>I to tumor using Flk-1 antibody, DC101, effectively blocks tumor growth in aggressive melanoma xenograft model. (Nucl Med Mol Imaging 2008;42(4):307-313)

**Key Words:** radioimmunotherapy, vascular endothelial growth factor receptor 2, melanoma

## 서 론

원발성 고형암(primary solid tumor)이 성장하고 전이를 하기 위해서는 암세포 10-100개 마다 신생혈관이 형성

(angiogenesis)되어야 한다. 그렇지 않을 경우에 종양 형성에 필수적으로 필요한 산소, 영양분 등의 공급이 원활하게 이루어지지 않아 괴사(necrosis) 또는 고사(apoptosis)상태에 빠지게 되고, 2~3 mm<sup>3</sup> 이상의 크기를 형성하는데 실패하여 결국은 종양세포는 죽게 된다.<sup>1,2)</sup> 몇 가지 성장인자들이 혈관신생의 조절자로 알려졌는데 그 중에서도 vascular endothelial growth factor 2 (VEGF2) 와 그 수용체(Flk-1/kinase insert domain-containing receptor, KDR)가 종양 혈관신생에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> VEGF2 발현증가와 이에 의한 신생혈관형성은 많은 종양들 즉 방광, 유방, 결장, 위장관, 신경아교종, 신장, 흑색종, 신경모세포종 등 고형암에서 많이 일어나는

- Received: 2007. 12. 15. • Accepted: 2008. 4. 24.
- Address for reprints: Hwan-Jeong Jeong, M.D., Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Chonbuk National University School of Medicine, 634-18, Geumam-2 dong, Duckjin-gu, Jeonju 561-712, Korea  
Tel: 82-63-250-1674, Fax: 82-63-250-1676  
E-mail: jayjeong@chonbuk.ac.kr
- ※ 이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임. (KRF-2006-331-E00268)

것으로 알려져 있다. 이러한 종양형성에서 신생혈관형성 현상을 이용한 종양 관련 연구들 중 종양 치료와 관련해서는 antisense VEGF를<sup>4)</sup> 사용하거나 항체를 이용하여 VEGF와 VEGF 수용체의 중화(neutralization)를 유도하거나<sup>5)</sup>, Flk-1/KDR kinase inhibitor 등<sup>6)</sup>을 이용했을 때 혈관신생과 종양성장을 현저히 억제할 수 있는 것으로 보고한 연구내용들이 있다.

종양 치료에 있어서 종양 혈관신생을 억제하는 방법적 접근에 있어서 Flk-1/KDR 관련 연구의 의의는 이러한 수용체를 봉쇄함으로써 종양성장과 전이를 억제할 수 있다는 것이다. 이와 관련된 연구로 1999년에 Marie 등은 마우스의 anti-Flk-1 항체인 DC101을 이용하여 여러가지 고형암에서 성장억제 결과를 보고한 바 있다.<sup>1)</sup> 2001년에는 Kozin 등이 DC101 치료와 방사선조사를 병행하였을 때 장기적인 치료효과를 상승시킨다는 연구결과를 보고한 바 있다.<sup>7)</sup>

방사면역치료란 특이성이 높은 항체에 치료목적에 적당한 물리적 특성, 즉 알파 혹은 베타입자를 방출하는 방사성핵종을 표지하여 이루어지는 치료법이다. 지금까지 단일클론항체 또는 변형된 항체를 이용한 방사면역치료에 대한 연구가 많이 진행되어 왔다.<sup>8,9)</sup> 치료에 적당한 베타입자를 방출하는 방사성핵종 중에서도 I-131은 항체 표지법이 잘 정립된 방사성핵종일 뿐 아니라 구하기도 쉽고 치료뿐 아니라 영상도 얻을 수 있는 장점이 있어 널리 사용되고 있다. 저자들은 이번 연구에서 anti-Flk-1 항체인 DC101에 I-131을 표지하여 매우 공격적인 마우스 흑색종에서 면역치료의 효능이 뚜렷하지 않는 정도의 항체양을 이용하여 방사면역치료를 시행하였을 때 흑색종의 성장억제 효과가 있는지를 알아보려고 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 재료

실험에 사용된 마우스 흑색종인 B16F10 세포주와 마우스 혈관내피세포성장인자 수용체2(Flk-1)의 단일클론항체를(DC101) 분비하는 하이브리도마를 American Type Culture Collection (HB-11534, Rockville, MA)에서 구입하여 사용하였다. RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin 등 세포 배양용 시약들은 GIBCO BRL (Grand Island, USA)에서 구입하였다. 동물실험은 생후 5주령, 체중 20 gm 암컷 누드 마우스 (Orient-Bio, Seoul, Korea)를 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포배양 및 방사성동위원소 표지

RPMI-1640에서 하이브리도마를 배양하여 rProtein G agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 분리하였다. 분리한 항체는 ultracentrifugal filter (Millipore, Billerica, MA)를 이용하여 PBS (pH 7.4, 0.1 M)로 씻어낸 후 농도는 280 nm UV spectrometer를 이용하여 측정하였고 western blotting을 이용하여 항체순도를 확인하였으며 Maldi-Tof 장비(KBSI, Jeonju, Korea)를 이용하여 분자량을 확인하였다. 96 well에 Flk-1 (recombinant mouse/Fc chimera, R&D systems)를 4℃ 에서 16시간 이상 코팅하고 3번 씻어낸 후 DC101을 농도별로 각각 처리하여 binding assay를 시행하였다. HRP가 결합된 2차 항체(Rabbit polyclonal antibody to mouse, conjugated HRP, Nobus)를 처리 후 TMB kit(Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 발색시킨 뒤 520 nm에서 측정하였다. Inhibition assay를 하기 위하여 Flk-1을 코팅하고 여기에 DC101과 VEGF<sub>165</sub>를 (PeproTech, Rocky Hill, NJ) 각각 농도별로 처리하여 결합 억제 정도를 확인하였다. DC101에 chloramine-T 법을 이용하여 방사성옥소(I-131)를 표지하였다. 표지효율은 실온에서 생리 식염수를 이용하여 24시간까지 확인하였다.

#### 2) 종양모델 및 치료방법

B16F10 흑색종 세포주를 누드마우스의 오른쪽 앞다리에  $2 \times 10^5$ 로 피하주사하고 평균 7일을 키워 종양크기를 대략 200-250 mm<sup>3</sup>가 되게 키웠다. 우선 <sup>131</sup>I-DC101의 생체내 분포를 확인하기 위하여 주사 후 1시간, 6시간, 24시간, 48시간, 72시간에 5마리씩 희생시켜 전체 조직의 %ID/g을 구하였다. 또한 <sup>131</sup>I-DC101의 종양섭취를 확인하기 위하여 감마카메라 영상을 78시간까지 획득하였다. 항체에 표지하여 주사할 I-131의 방사능량을 결정하기 위해 생체내 분포의 종양 섭취 정도를 참고하였다. Residence time은 반감기/ln 2, <sup>131</sup>I-DC101의 종양에 대한 S-value는 MIRDOSE 3.1 소프트웨어(Oak Ridge Associated University)의 Nodule Module을 이용하여 얻었다.<sup>10)</sup> 종양 마우스 모델에서 계산된 S-value와 residence time으로부터 종양에 방사능이 30 Gy조사되기 위한 <sup>131</sup>I-DC101의 I-131의 양을 계산하고 항체의 양에 따른 치료효과를 알아보려고 하였다.

치료효과를 평가하기 위하여 200-250 mm<sup>3</sup> 크기의 종양 마우스를 5개 군으로 나누어 1군은 PBS를, 2군은 <sup>131</sup>I-DC101 50 µg (200 µCi), 3군은 DC101 50 µg, 4군은 <sup>131</sup>I-DC101 30 µg (200 µCi), 5군은 <sup>131</sup>I-DC101 15 µg (200

$\mu\text{Ci}$ ) 을 각각 꼬리정맥으로 투여하였다. 3일 간격으로 5회 걸쳐 투여를 하였고, 각각당 마우스는 10마리를 시행하였다. 종양의 크기는 calipers를 이용하여 한 주에 2번씩 확인하였고, 종양 볼륨은  $\pi/6 \times (\text{large diameter})^2 \times (\text{small diameter})$ 의 식을 이용하여 계산하였다.

3) 면역조직화학 염색

파라핀 고정 조직을 4  $\mu\text{m}$  두께의 절편으로 박절하여 슬라이드에 부착하고 크실렌으로 파라핀을 제거한 후에 알코올로 함수과정을 거쳤다. 그런 다음 citrate 완충용액 (10 mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담근 후 전자레인지리를 이용하여 98°C에서 10분간 끓였다. 실온에서 20분간 식힌 후 Tris 완충 용액에 세척하고 조직 절편에 있는 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 3% 과산화수소를 이용하여 10분간 처리하였다. Tris 완충용액에 세척하고, 비특이 항원을 제거하기 위해 차단 항체를 실온에서 10분간 반응시킨 후 여분의 용액을 제거하였다. 일차 항체로 VEGFR2 (rabbit polyclonal, abcam, Cambridge, UK)를 1:100으로 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 일차 항체 반응 후 Tris 완충용액에 5분간 3회 세척한 다음 비오틴이 결합된 이차 항체를 실온에서 30분간 반응시켰다. 그런 다음 Tris 완충용액으로 씻어내고 streptavidin-biotin conjugate 용액에 10분간 반응시켰다. Tris 완충용액으로 씻어내고 chromogen substrate를 이용하여 발색하였고, 헤마톡실린으로 대조염색하고 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

4) 통계분석

SPSS 11.0의 One-way ANOVA 방법을 이용하여 각 실험군 간에 유의한 차이가 있는지 검정하였다. 통계값은  $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 표시하였다.  $p$  값 0.05이하일 때 유의한 차이가 있다고 나타내었다.

결 과

1) 항체 분리 및 종양조직에서 Flk-1 발현 분석

항체를 분리하여 분자량분석을 시행한 결과 147,650 Da 이었고, ELISA binding affinity 분석결과  $K_d$  값은 3.05  $\mu\text{M}$  이었다(Fig. 1A). 억제 실험(Inhibition study)을 시행한 결과 VEGF 농도에 따라 DC101이 Flk-1에 결합되는 정도가 감소되는 것을 확인할 수 있었다.  $\text{IC}_{50}$  값은 9.27 nM 이었다. 누드 마우스에 키운 흑색종 종양조직과 흑색종 세포를 각각 western blot 분석을 한 결과 약 170 kDa

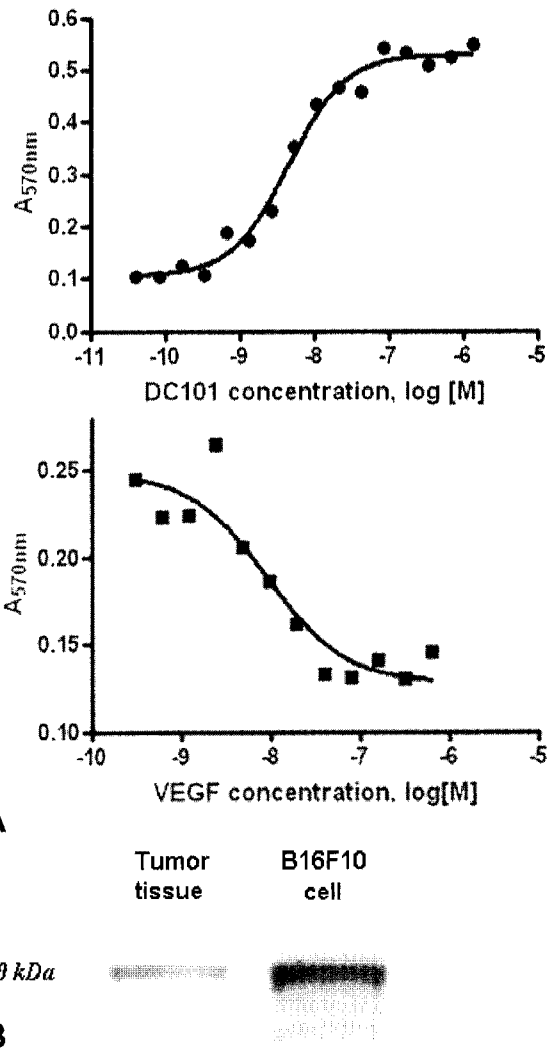


Figure 1. Binding of anti-Flk-1 antibody (DC101) to Flk-1 and blocking the interaction of Flk-1 with DC101 by VEGF (A), and expression of Flk-1 in melanoma tumor tissue and B16 cells (B).

에 해당된 부위에서 밴드가 관찰되어 종양조직과 세포에 Flk-1가 발현되어 있음을 확인하였다(Fig. 1B). 조직에서 발현이 좀더 낮아 보이는 이유는 종양세포 외에 종양조직을 구성하는 다른 단백질들의 존재로 세포에서 보여지는 발현정도 보다는 낮게 관찰된 것으로 해석된다.

2) 형태학적 소견 및 면역조직화학염색 결과

조직학적 소견상 피하에 형성된 종양은 멜라닌 색소를 형성하는 악성 흑색종의 형태학적 소견을 보였다(Fig. 6A). 면역조직화학 염색에서 Flk-1은 종양세포의 세포질에서 균일하게 발현하였고 종양 주변의 혈관이나 버팀질에서는 발현되지 않았다(Fig. 6B).

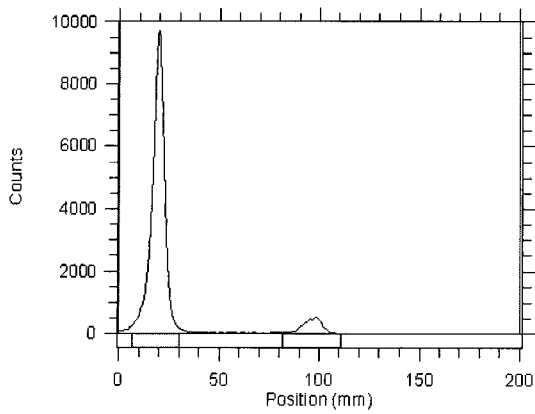


Figure 2. Labeling efficiency of  $^{131}\text{I}$ -DC101.

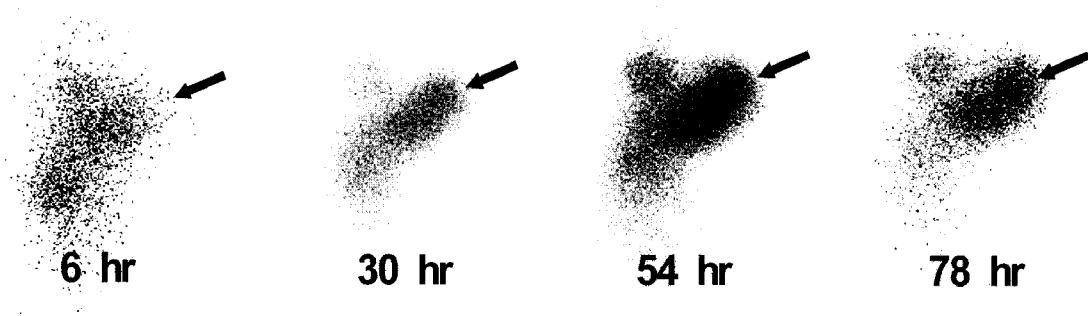
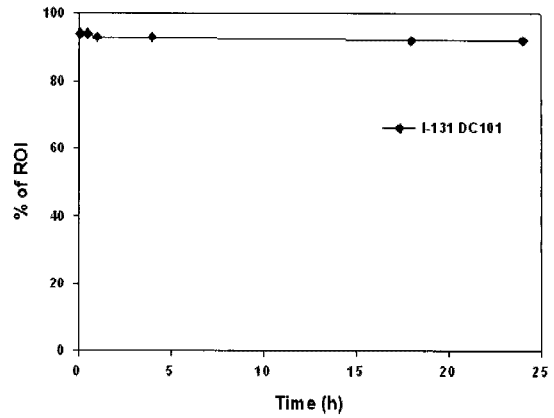


Figure 3. Gamma camera images of  $^{131}\text{I}$ -DC101 tumor accumulation in melanoma tumor bearing mouse. Arrows indicate tumor location.

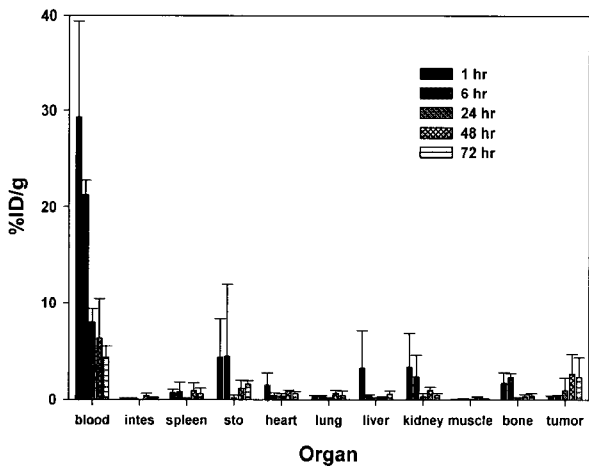


Figure 4. Biodistribution of  $^{131}\text{I}$ -DC101 in athymic nude mice bearing melanoma tumor after injection of  $^{131}\text{I}$ -DC101 (n=5). (sto=stomach, intes=intestine)

### 3) 표지효율

DC101 항체 15  $\mu\text{g}$ , 30  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$ 에  $\text{Na}^{131}\text{I}$  200  $\mu\text{Ci}$ 를 표지하고 실온에서 생리식염수를 이동상으로 사용하여 표지 안정성을 평가하였다. 24시간까지 확인한 결과 90% 이상

의 표지 효율을 보였다(Fig. 2).

### 4) 감마카메라영상 및 생체내분포

$^{131}\text{I}$ -DC101을 중앙 누드 마우스에 정맥주사하고 영상을 얻은 결과 초기 6시간째에서는 갑상선, 위, 간, 종양 등에 섭취를 보였다가 그 이후 시간이 지남에 따라 위와 간의 섭취는 감소하고 종양에 강하게 섭취되는 양상을 보였다 (Fig. 3). 생체내 분포를 확인한 결과 혈액내 방사능치는 시간에 따라 점점 감소하였고 다른 장기들도 비슷한 양상을 보였다. 종양 섭취는 48시간째에는 2.79%였고, 72시간째는 2.37%였다(Fig. 4).

### 5) 치료

전체 5번에 걸쳐 항체를 투여하고 종양 체적을 측정 한 결과 4번째 주사한 후에는 1군(PBS를 주사한 군)과 비교하여 2군( $^{131}\text{I}$ -DC101 50  $\mu\text{g}$ /마리 주사한 군), 4군( $^{131}\text{I}$ -DC101 30  $\mu\text{g}$ /마리 주사한 군) 이 각각 유의한 차이를 보이기 시작하였으며,  $P$  값은 각각 0.007, 0.011 이었다. 5번째 주사한 후 종양체적증가 억제는 PBS를 주사한 군

Table 1. Tissue Uptake of <sup>131</sup>I-DC101

	% ID/organ weight (g)				
	1 hr	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Blood	29.323±10.118	21.235±1.465	7.973±1.411	6.420±4.048	4.362±1.127
Intestine	0.105±0.056	0.046±0.077	0.018±0.016	0.400±0.247	0.111±0.072
Spleen	0.732±0.367	0.888±0.940	0.113±0.045	0.995±0.766	0.622±0.638
Stomach	4.370±3.986	4.492±7.444	0.217±0.222	1.258±0.755	1.659±0.333
Heart	1.549±1.300	0.423±0.304	0.354±0.281	0.907±0.126	0.661±0.196
Lung	0.279±0.103	0.303±0.083	0.116±0.066	0.684±0.339	0.432±0.515
Liver	3.312±3.804	0.383±0.091	0.199±0.036	0.201±0.064	0.566±0.373
Kidney	3.439±3.403	2.468±2.125	0.332±0.323	1.035±0.345	0.445±0.226
Muscle	0.057±0.044	0.080±0.082	0.025±0.046	0.209±0.084	0.077±0.039
Bone	1.773±1.162	2.368±0.474	0.127±0.108	0.287±0.252	0.393±0.257
Tumor	0.259±0.146	0.327±0.133	1.031±1.275	2.785±1.941	2.374±1.979

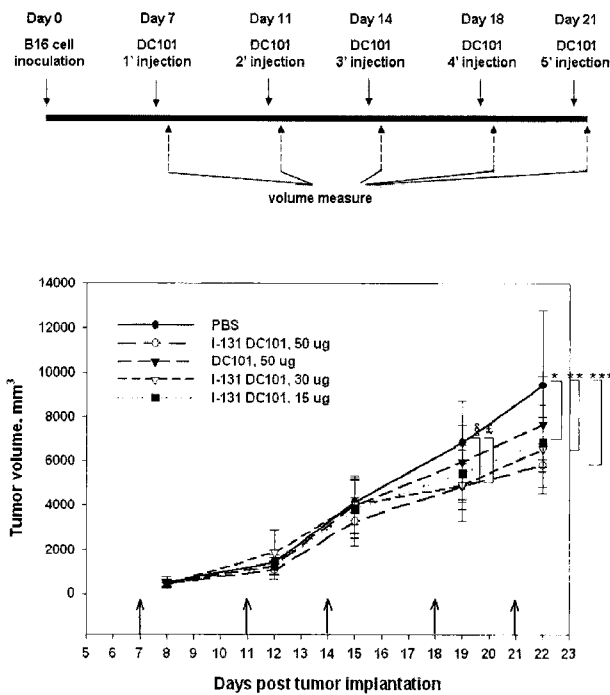


Figure 5. Treatment with <sup>131</sup>I-DC101 inhibits growth of melanoma. Groups of nude mice bearing B16 tumors were treated intravenously with PBS, DC101 50 µg, or <sup>131</sup>I-DC101 (15 µg, 30 µg, and 50 µg) every 3 or 4 days for 20 days. Administration of DC101 50 µg did not affect tumor growth. Treatment with <sup>131</sup>I-DC101 at a dose of 15, 30, 50 µg/ mouse significantly suppressed tumor growth after 5' injection (<sup>§</sup>*p*=0.007, <sup>‡</sup>*p*=0.011, <sup>\*</sup>*p*=0.001, <sup>\*\*</sup>*p*=0.01, <sup>\*\*\*</sup>*p*=0.015).

과 비교하여 2군과 4군, 5군에서 유의 있는 억제효과를 보였다. 5번째 주사 후 대조군에 비해 2군과 4군, 5군에서 각각 0.001, 0.01, 0.015의 *P* 값을 보였다.

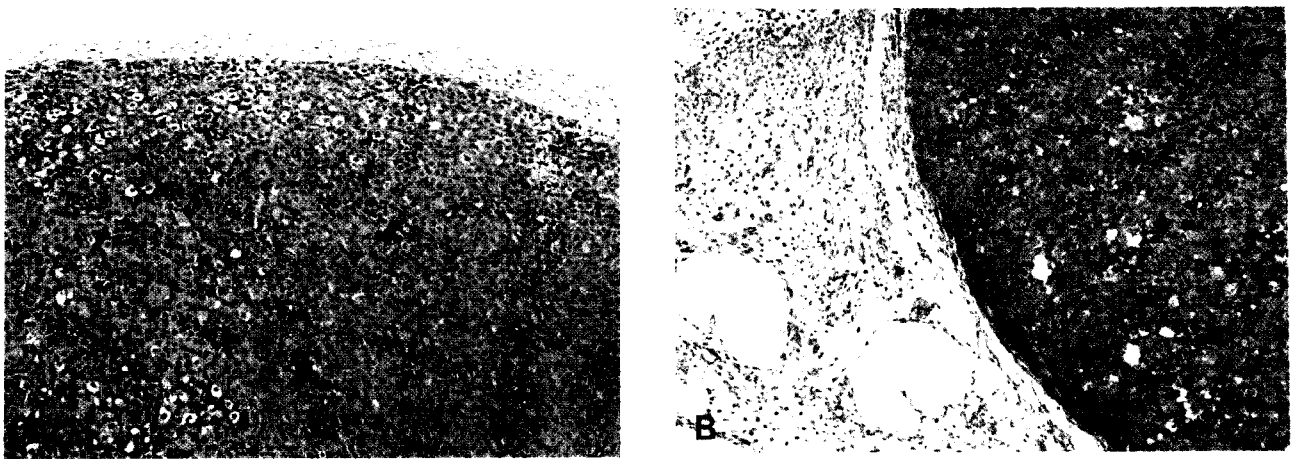
## 고 찰

이번 연구에서는 Flk-1의 항체인 DC101에 I-131을 표지하여 항체의 표적성, 표지된 방사성핵종의 베타입자의

치료능 그리고 주변세포에 대한 방관자효과(bystander effect)에 의해 흑색종의 성장이 억제되는지를 확인하고자 하였다.

1999년 Prewett 등<sup>1)</sup>이 발표한 연구결과는 B16은 매우 빠른 성장을 보이는 종양으로 DC101의 치료효과를 평가하기 위하여 종양을 실험동물에 주사하고 3일 후부터 항체를 1회 주사에 복강으로 800 µg을 3일 간격으로 계속해서 투여하였다. 치료 27일째 결과에서 대조군으로 IgG를 준 것과 비교했을 때 종양성장의 75%를 억제하였다고 보고하고 있다. DC101을 포함한 대부분의 동물모델에서의 항체실험은 복강주사법을 사용하고 있다. 복강주사법은 흡수가 지속적으로 이루어진다는 장점은 있으나 사용되는 항체량이 매우 많이 요구되고 임상적 상황에서 복강주사법을 많이 사용하고 있지 않다는 점 등은 이러한 실험법의 실제적 사용에 있어서 제한점이라 하겠다.

저자들은 이번 실험에서 Figure 3에서와 같이 항체에 I-131을 표지하여 종양 표적성 여부 및 표적 지속시간대를 먼저 파악하였는데 3일 이상 지속적으로 표적성이 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 I-131 표지 항체에 의해 충분한 양의 방사능이 전달되면 방사능치료 효과가 예상되는 결과라고 생각할 수 있다. 정확한 종양 표적성은 생체내분포 실험을 진행하여 Table 1과 Figure 4에 정리된 결과와 같이 DC101을 정맥주사하였을 때 흑색종 종양 모델에서 약 3%ID/g의 종양 표적성이 있음을 파악하였다. 그러나 아직까지 항체의 복강주사량에 의한 효과를 보고한 예는 많지만 이와 정맥주사량의 관계에 대한 연구를 찾아보기는 힘들었다. 본 연구자들은 흑색종 종양세포에서 주사한 항체가 복강을 통해 혈액내로 모두 흡수된다는 것을 전제로 IC<sub>50</sub>값이 9.27 nM임과 3%ID/g의 종양표적성을 갖는 결과를 가지고 추정하였을 때 복강내에 800 µg정도를 주사하여야 함을 계산을 통해 알 수 있었고, 이는 기존



**Figure 6.** Malignant melanoma forms solid mass and dark-brown colored melanin pigments are present (H&E, ×100) (A). Expression of Flk-1 is found in tumor cells but stroma, vessels, and inflammatory cells are negative for Flk-1 (×100) (B).

의 생체적용 연구결과들에서 실제 효과를 나타낸 항체량과 비슷한 정도였다. 그러나 이러한 양은 앞에서도 언급하였듯이 많은 양의 항체이고 주사경로에도 제한점이 있었기 때문에 흑색종에서의 복강주사량과 정맥주사량과의 관계를 정립하기 위해 예비실험으로 흑색종을 4개 군으로 나누어서 각각 PBS, DC101 50 µg, DC101 100 µg, DC101 150 µg을 정맥 주사하여 치료효과를 확인하였다. 사전실험방법을 간단히 언급하면, 전체 5회 항체를 주사하였고, 9회 걸쳐 종양체적을 측정하였으며 각 군의 개체수는 5마리씩이었다. 전체 치료 일수는 17일 이었다. 4회 주사 후 2일째 측정된 결과 식염수를 주사한 군과 100 µg, 150 µg 주사한 군에서 각각 유의한 차이를 보였으나(\**P*=0.036, \*\**P*=0.032), 5회 주사 후에는 어느군에서도 유의한 차이를 보이지 않았다. 치료효과가 있는 정맥주사량의 결정을 위해 시행한 예비실험결과에서는 흑색종에서 DC101 50 µg의 정맥주사로는 치료효과를 유도할 수 없을 것으로 판단하였다. 이러한 예비실험결과를 바탕으로 본 연구에서는 정맥 내 주사량을 DC101 50 µg 이하로 결정하여 I-131에 의한 치료효과 여부를 확인하여 보기로 하였다. 본 연구에서도 예비실험결과와 마찬가지로 I-131이 표지되지 않은 DC101 50 µg의 농도로는 역시 유의한 치료효과를 보이지 않았다(Fig. 5). 그러나 DC101 30 µg과 50 µg에 I-131을 표지한 군에서는 4회 투여부터는 유의한 차이를 보이기 시작했다. 이는 I-131 DC101을 이용하여 흑색종 종양 모델에서 방사면역치료를 시도하였을 때 유의한 치료효과가 없는 항체 양임에도 불구하고 I-131을 이용한 방사면역치료의 경우 종양성장이 대조군에 비해 유의미하게 억제됨을 알 수 있었다. 또한 5회 투여 후에는 DC101 15 µg에 I-131을 표지한 군에서도 유의한 차이를 보이기 시작해서

I-131에 의한 효과가 확실해 짐을 확인할 수 있다.

종양에 대한 항체 치료에 있어서 항체에 의한 충분한 양이 개체에 전달되었는지는 생리현상 및 대사과정이 개체마다 상이하기 때문에 동일한 양의 항체를 주더라도 치료효과는 다르게 나타날 수 있다. 본 연구결과는 경우에 따라서 개체별로 충분한 양의 항체가 전달되지 않더라도 방사면역치료를 시행하는 경우에는 치료효과를 충분히 볼 수 있다고 증명하였다는데 그 의의가 있을 것이라 사료된다. 결론적으로, anti-Flk-1 항체에 I-131을 이용한 방사면역치료는 신생혈관형성을 억제하는 항체 자체 효과가 나타나지 않는 정도의 항체 양에서도 항체에 의해 신생혈관 및 종양세포에 I-131이 축적되게 됨으로써 방사능에 의한 치료효과가 발생하게 됨을 확인할 수 있었다.

## 요 약

**목적:** 혈관내피성장인자(VEGF)와 그 수용체는 종양의 성장과 전이에 매우 중요한 역할을 한다. 3개의 수용체가 알려져 있는데 그 중에서도 VEGFR2 (Flk-1/KDR)가 종양 angiogenesis에 매우 밀접하게 관련된 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 마우스 Flk-1 항체로 알려진 DC101에 I-131을 표지하여 매우 공격적인 종양으로 알려진 흑색종의 치료 정도를 확인해 보고자 하였다. **방법:** 하이브리도마 세포에서 Flk-1 항체인 DC101을 분리하여 western blot, ELISA, maldi-tof 방법을 이용하여 순도를 확인하고 항체에 chloramin T를 이용하여 I-131을 표지하였다. 누드 마우스에 B16F10 세포를 주사하여 흑색종 모델을 만들고 평균 200-250 mm<sup>3</sup>으로 키워 <sup>131</sup>I-DC101을 주사하여 영상과 시간별 장기섭취율(%ID/g)을 비교하고, 종양내 Flk-1

발현을 확인하기 위하여 면역염색 등을 시행하였다. 흑색종 동물모델을 5개 군으로 나누어 각각 치료를 시행하였다. 1군은 PBS만을, 2군은 <sup>131</sup>I-DC101 50 µg(200 µCi)을, 3군은 DC101 50 µg을, 4군은 <sup>131</sup>I-DC101 30 µg(200 µCi)을, 5군은 <sup>131</sup>I-DC101 15 µg(200 µCi)을 각각 매 3일 ~ 4일마다 주사하고 전체 5회를 주사하였고 종양볼륨을 측정하였다. **결과:** <sup>131</sup>I-DC101을 흑색종 모델에 정맥주사하고 78시간까지 영상을 얻은 결과 시간에 따라 종양섭취가 증가하는 영상을 보였다. 시간대별 장기섭취를 정확히 확인하기 위하여 1시간, 6시간, 24시간, 48시간, 72시간 장기섭취율을 비교한 결과 시간에 따라 혈액내 방사능치가 서서히 감소하였고 다른 장기의 섭취도 시간에 따라 감소하였고 종양의 섭취는 48시간까지 증가하였다가 그 이후는 감소하였다. 흑색종 동물모델에 <sup>131</sup>I-DC101 치료를 시행한 결과 3번째 주사까지는 각군간의 유의한 차이를 보이지 않다가 4번째 주사를 시행한 때부터 1군과 2군, 또는 1군과 4군간의 유의한 차이를 보이기 시작했다. 또한 5번째 주사 이후에는 5군에서도 유의한 차이를 보여 I-131에 의한 효과가 뚜렷해 짐을 확인하였다. **결론:** 마우스 Flk-1 항체로 알려진 DC101을 흑색종 모델에 정맥내 주사 하였을 때, 종양 성장억제 효과를 보이지 않는 항체양에서도 I-131을 표지하여 치료를 시행했을 경우에는 효율적인 종양성장억제 효과를 보였다.

## References

1. Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, et al. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver

- kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 1999; 59:5209-18.
2. Lee KH. Molecular nuclear imaging of angiogenesis. *Korean J Nucl Med* 2004;38:171-4.
3. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
4. Im SA, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Ke LD, Kim JS, et al. Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth *in vivo*. *Cancer Res* 1999;59:895-900.
5. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature* 1993; 362:841-4.
6. Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, et al. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999;59:99-106.
7. Kozin SV, Boucher Y, Hicklin DJ, Bohlen P, Jain RK, Suit HD. Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts. *Cancer Res* 2001;61:39-44.
8. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005;23:1126-36.
9. Schrama D, Reisfeld RA, Becker JC. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:147-59.
10. Stabin MG. MIRDOSE: Personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *J Nucl Med* 1996;37: 538-46.