

^{99m}Tc-Liposomes 과 킬레이트제 표지반응의 효과

原子力病院 核醫學研究室

劉 龍 雲 · 金 長 輝 · 姜 泰 雄

延世大學校 食品工學科

柳 洲 鉉

= Abstract =

Investigation of Liposomes Labelled with Tc-99m Added EDTA, DTPA and NTA for Tumor Seeker

Yong Wun Ryu, M.S., Jang Hwi Kim, B.S. and Tae Woong Kang, M.D.

Nuclear Medicine Laboratory, Cancer Research Hospital

Ju Hyun Yu, Ph. D.

Department of Food Engineering, Yonsei University

Using chelating agents such as Nitriilotriaceticacid(NTA), Diethylenetriaminepentaaceticacid(DTPA) and Ethylenediaminenitriilotetraceticacid(EDTA), effects of liposomes labelled with Tc-99m were determined in vitro and in vivo.

Methods of separation and determination of Tc-99m-liposomes added chelating agents were practiced by thin layer chromatogram scan and gel filtration. Biodistributions of Tc-99m-liposomes in normal and sarcoma 180 cells bearing mice were observed.

The results were as follows:

- 1) Maximum amount of Sn⁺² to reduction from pertechnetium(10~20 μ ci) by adding 0, 1, 10 and 100 μ g of SnCl₂ in 0.2 ml of oxygen free water was 10 μ g.
- 2) The large amounts of SnCl₂ were not changed but the small amounts of SnCl₂ were much changed by labeling with Tc-99m to add chelating agents. EDTA in small amounts of SnCl₂ were reduced more strongly than DTPA or NTA. Using a hydrophilic chelate, DTPA, the uptake of liposomes could not accumulated in liver and spleen but a lipophilic chelate NTA were significant in vivo.
- 3) Uptake by tumor was achieved 1.14% of injected dose per gram tissue and tumor to organ ratios were measured in low with Tc-99m-NTA-liposomes(+).

서 론

최근 암의 치료성적이 향상되고 있는 중요한 요인중의 하나는 암의 보다 효과적인 약제의 개발은 물론 핵의학적 진단기술의 발전에 기인 된다고 생각되어지고

있다.

이제까지 암의 진단에 관한 연구는 1960년 Yallow와 Berson¹⁾이 고안한 방사면역측정 방법을 도입한 각종 암에 대한 특이성과 예민성이 높아진 Tumor marker 들의 미량측정(pg/ml)에 의한 조기진단과 핵의학이 목표하는 표적장기에서의 방사능 검출이 용이

하며 압조직과 친화성이 높은 방사성표지의약품의 투입으로 병소의 형태 및 크기를 영상적으로 진단하려는 Tumor seeker의 연구가 있겠다.

한편 Liposomes은 적혈구 크기의 약 1/100 밖에 안되는 작은 지방구로서 생체에 무독하고 몸속에서는 일차적으로 불용성인 인위적 약제의 보호막 구실을 하여 치료 및 진단약제의 수송도구(Drug carrier)로 많은 연구가 되고 있다. 즉 Colley 및 Ryman²⁾와 Juliano 및 Stamp³⁾ 등은 Liposomes 피막에 의한 약제의 주사 후 혈중 잔류시간이 단일 약제만 투여한 경우에 비교하여 약효 지속이 연장되었다는 실험결과가 보고된 이래 항암요법 개선을 위한 수많은 연구가 시도되었다.

Dapergolas⁴⁾ 등은 이들 Liposomes이 종양조직과 친화성이 있음을 시사 하였으며 그 후 Dapergolas 및 Richardson⁵⁾ 등에 의하여 방사핵종 표지를 이용하여 종양의 편재(Localization)가 실증되었다.

이에 저자들은 ^{99m}Tc-Liposomes의 암세포 친화성에 흥미를 갖고 실험에 착수한바 백서의 간장 및 비장과 가이식성 종양부위의 방사능 축적을 관찰하였다⁶⁾.

본고에서는 ^{99m}Tc-Liposomes의 Tumor seeker로서의 개발의 일환으로 표적하는 장기의 선명한 영상과 병소의 친화성을 높이기 위한 몇가지 해답을 규명코자 실험에 착수하였다. 즉 (1) ^{99m}Tc-Liposomes의 표지반응을 위한 Sn 사용의 최적조건을 구하고 (2) 표지핵종의 Liposomes외부 유출의 방지를 위한 킬레이트제의 효과를 비교하며 끝으로 (3) 적정 킬레이트제가 첨가된 ^{99m}Tc-Liposomes의 생체내 분포는 어떠한지의 상호관계를 추구하고 흥미로운 실험적 성과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

본실험에 사용한 mice는 체중이 20~25 gm 내외의 웅성 swiss webster로서 2차동위원소 표지화합물을 복강내에 주입하여 장기분포를 계속 하였다.

Na^{99m}TcO₄는 한국에너지연구소에서 구입하였다. Egg lecithin, stearylamine 및 Dicytylphosphate는 sigma chemical company(미국)에서 구입하였고 콜레스테롤은 Junsei chemical company(일본)에서 구입하여 ethanol로 재정제하여 사용하였다. 염화제일주석(SnCl₂·2H₂O)은 G.R.급 Merck을 구입하여 사용하였으며 일정농도의 SnCl₂ 수용액을 만들 때에는 Argon 기류가 충전된 증류수에서 제조하였다. 킬레이트제인 NTA

(Nitrilotriacetic acid)와 EDTA(Ethylene dinitrilotetraacetate)은 sigma chemical Co.(미국)의 제품을 사용하였으며 DTPA (Diethylenetriaminepentaacetate)은 Aldrich chemical company(미국)것을 사용했다.

흰쥐의 복수육종세포는 본연구실에서 1주일 간격으로 마우스복강내 접종으로 자라게 하면서 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

^{99m}Tc-lecithin-cholesterol(neutral charged), ^{99m}Tc-lecithin-cholesterol-Dicetylphosphate(negative charged) 및 ^{99m}Tc-lecithin-cholesterol-stearylamine(positive charged)의 제조법은 Kimelberg⁷⁾과 Richardson⁵⁾ 등의 방법을 기초로해서 만들었다⁸⁾.

Sn에 의한 pertechnetate 표지반응의 미치는 효과를 관찰하기 위하여 방사성시료중 1~2μl을 TLC-plastic sheets(silica gel 60) 위에 점적한후 전개용매인 클로로포름 : 메탄올 : 물(40 : 60 : 10)에서 약 30분간 상승전개시킨후 건조시켜 Q 가스 flow G-M 측정기인 Aloka Thin layer chromatogram scanner로 주사하였다.

또한 NTA, DTPA 및 EDTA 각각 1mM 농도가 첨가된 Sn 농도 변화에 따른 ^{99m}Tc 환원력 실험은 상기 방사성크로마토그래피를 실시하여 sheets을 1cm 간격으로 절단하여 각 절단편의 방사능을 전체방사능의 백분율로 구하였다. 실제의 ^{99m}Tc-Liposomes 표지수율의 측정에는 지방구의 입자가 크기 때문에 Radiochromatogram은 할 수 없었다. 그래서 sephadex G-100-120이 충전된 column size (0.9×25cm)상에서 앞서 제조된 ^{99m}Tc-Liposomes을 1ml 넣어놓은 다음 0.9% NaCl로 용출 각분획물의 방사능을 계속하였다.

Swiss webster mice 50 마리를 대상으로 각종 ^{99m}Tc-Liposomes 및 킬레이트가 첨가된 0.6 ml의 시료(약 10 μci의 방사능)를 복강에 주입하여 4시간 경과후 동물을 희생시켜 혈액, 신장, 간장 및 비장을 적출하여 정상동물의 체내분포를 계속하였고, 암세포 친화성 실험군은 sarcoma 180 세포를 마리당 5×10⁶cells 씩 복강접종후 9일이 경과후 5마리를 1개군으로한 시료투여군의 종양 및 특정장기를 Animal whole body counter(일본 Aloka사)로서 방사능을 계속하였다. 이때 ^{99m}Tc의 방사능 측정값은 표준시료의 방사능분포를 보정하면서 전투여량을 100%로하고 조직의 단위 gm 당 ^{99m}Tc 방사능량을 산출하였다.

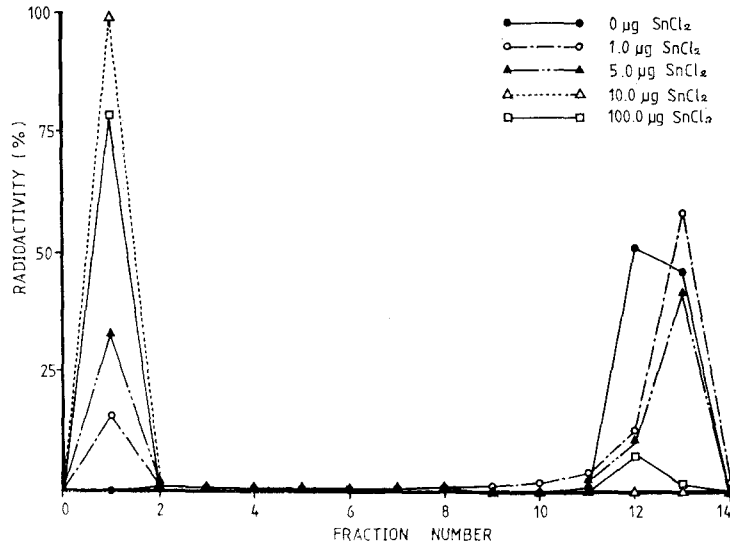


Fig. 1. Radiochromatogram of the reaction of the pertechnetate at 0, 1.0, 5.0, 10.0, 100.0 μg of SnCl_2 .

성 적

일정 비방사능($10 \mu\text{Ci}/0.1 \text{ ml}$)의 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 을 환원시키기 위하여 SnCl_2 의 양을 0, 1, 5, 10 및 $100 \mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$ 씩 첨가하여 반응액중 $1\sim 2 \mu\text{l}$ 을 점적하여 방사성크로마토그래피법으로 전개시킨후 방사능을 측정하여 추적자의 Rf를 Fig. 1에 나타내었다. 그림에 나타난 바와같이 Sn의 농도를 늘림으로써 $^{99\text{m}}\text{Tc}^{7+}$ 와 $^{99\text{m}}\text{Tc}^{4+}$ 의 두 peak가 분리되었으며 Sn free인 대조군과 비교하여 환원된 peak의 방사능 계측치는 $10 \mu\text{g}$ SnCl_2 농도에서 최고치를 관찰하였다.

일반적으로 Sn 양이 과소하면 $^{99\text{m}}\text{Tc}^{7+}$ 의 환원력은 약화되며 Sn 양이 과량이면 환원된 $^{99\text{m}}\text{Tc}^{4+}$ 가 불용화되며 여분의 Sn 양과 흡착콜로이드를 이루어 간장에 집적될때 간장을 중심으로하는 내부장기의 영상(Imaging)의 선명도가 감소될뿐 아니라⁸⁾ 미토콘드리아의 oxidative phosphorylation을 저해하는 유해성이 나타난다⁹⁾. 따라서 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 표지 화합물 생성을 위한 환원제 사용량은 $10\sim 20 \mu\text{Ci}$ 당 $10 \mu\text{g}$ 이 최적임을 확인하였다.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 과 Sn 인 두금속이온 사이에 chelating agent는 경쟁적인 친화능력이 있음이 쉽게 예상되나 이를 확인할 방안으로 여러종류의 킬레이트제를 선정하여 반응시킴으로서 그 결과를 Fig. 2에 표시하였다. 이때 과량의 Sn 양인 경우 킬레이트제의 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 환원반응에

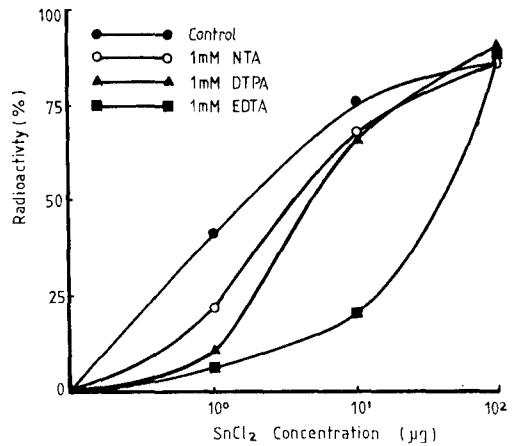


Fig. 2. Effects of chelating agents on the reduction of the pertechnetate and SnCl_2 concentration.

아무런 변동이 없었으나 $10 \mu\text{g}$ 의 Sn 양이하에서 환원력의 세기는 $\text{EDTA} > \text{DTPA} \approx \text{NTA}$ 의 순서로 나타내었다.

실험에 사용된 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Liposomes의 표지수율은 종류별로 음성하전 Liposome이 91.2%, 양성하전 Liposomes은 84.9%, 중성하전 Liposomes의 54.1%의 순서로 나타냈으며 기초물질인 Egg lecithin liposomes은 86.9%의 표지수율을 얻었다(Fig. 3).

한편 각각의 chelating agents을 1 mM 농도로 첨가한 lecithin liposomes의 실험성적이 Fig. 4에 표시하였다. 즉 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-lecithin과 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDTA-leci-

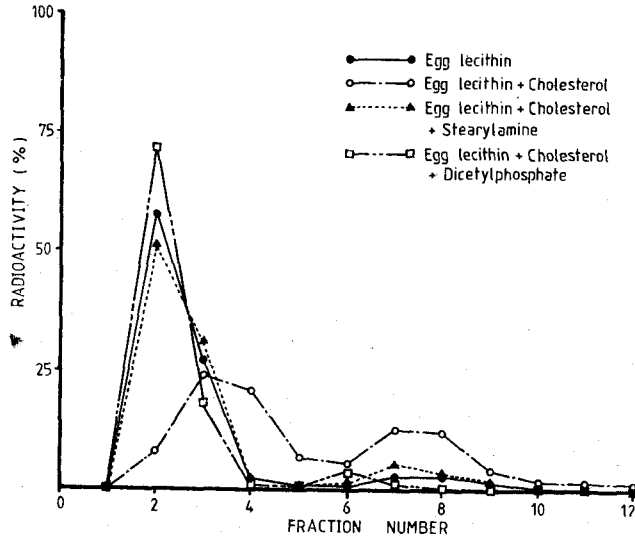


Fig. 3. Column chromatogram of ^{99m}Tc -labeled liposomes on Sephadex G-100-120. Column size: $0.9 \times 25\text{cm}$. Solvent: 0.9% NaCl. ^{99m}Tc -liposome: $10\mu\text{Ci}/2\text{mg}$.

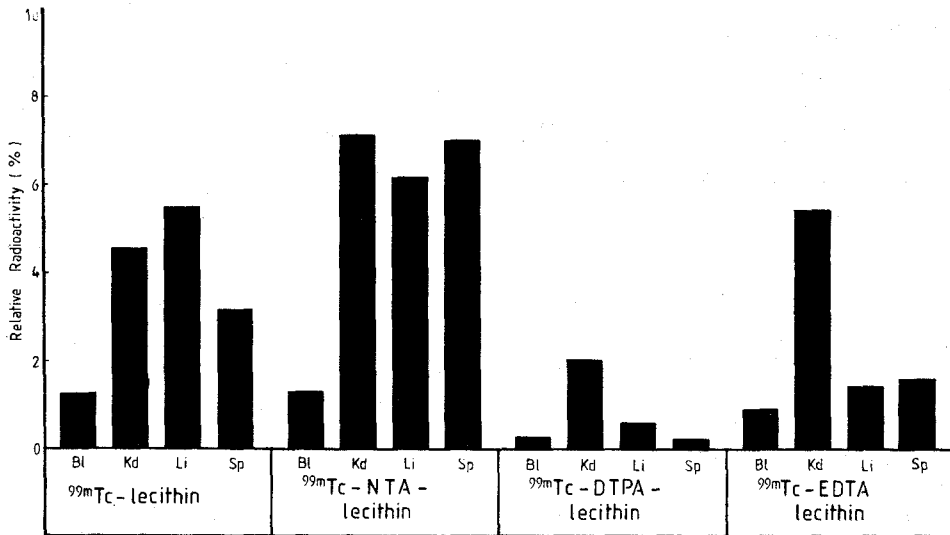


Fig. 4. Biodistribution of vortexed ^{99m}Tc -lecithin added chelating agents in normal mice. *Abbreviation: Bl; blood, Kd; kidney, Li; liver, Sp; spleen.

thin의 장기친화성은 대조군에 비교하여 생물학적특성을 상실하는 결과를 나타내었다. 그러나 ^{99m}Tc -NTA-lecithin의 장기집적 효과는 유의있는 증가를 나타내었다. Fig. 5은 cholesterol 첨가에 의한 lecithin의 체내 유통성을 높여줄때 이들 Liposomes의 각종 킬레이트제의 효과를 확인하는 실험 결과이다. Fig. 4의 성적에 비하여 전체적으로 낮았으나 NTA의 효과가 EDTA 혹은 DTPA의 장기분포에 미치는 영향이보다

우세함을 입증하고 있다.

Table 1은 양성하전 ^{99m}Tc -NTA-liposomes의 장기 및 중앙조직의 친화정도를 비교한 결과이다. Liposomes이 암세포와의 편계기전은 아직도 불분명하다. 그러나 Liposomes의 화학적조성, 전기적하전, 입자의 크기 및 지방유통성은 암조직내 섭취율의 변동을 나타내었으며¹⁰⁾ 또한 추적자 표지시 동위원소의 방사화학적 상호작용도 복잡한 요인들이 되고 있다.

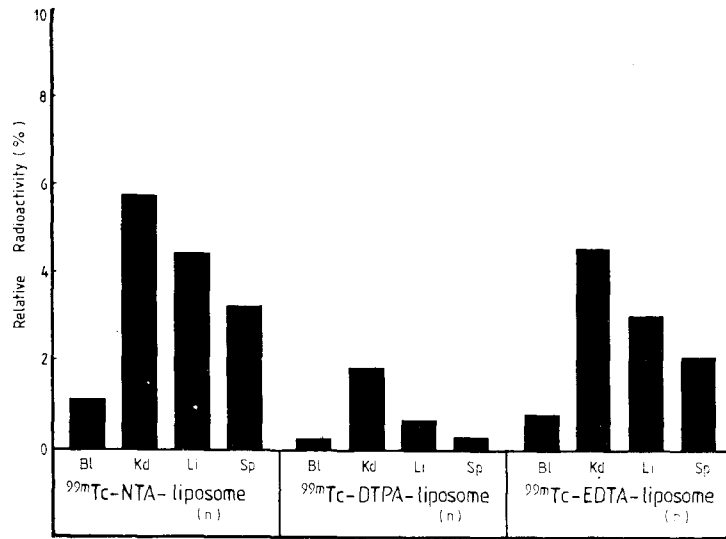


Fig. 5. Biodistribution of vortexed ^{99m}Tc -lecithin-cholesterol added chelating agent in normal mice.
*Abbreviation: Bl; blood, Kd; kidney, Li; liver, Sp; spleen, n; neutral charged.

Table 1. Biodistribution of Tc- 99m -NTA-liposomes at 4hr in Swiss Webster Mice with Sarcoma 180 Cells

Organ	Vortexed 1 mM Tc- 99m -NTA-liposomes (n=5)		Vortexed 0.1 mM Tc- 99m -NTA-liposomes (n=5)		Sonicated 0.1 mM Tc- 99m -NTA-liposomes (n=5)	
	I	II	I	II	I	II
Blood	1.32±0.3	0.62	1.02±0.2	0.61	2.02±0.6	0.56
Liver	2.91±1.2	0.28	8.13±4.1	0.08	8.98±2.9	0.12
Spleen	2.04±1.2	0.40	5.02±2.1	0.12	3.96±2.0	0.28
Kidney	7.18±1.3	0.11	4.84±0.9	0.13	4.53±1.1	0.25
Tumor	0.82±0.3	—	0.62±0.1	—	1.14±0.2	—

I : % Dose gram organ(Mean±S.D.)

II : Tum or to organ ratios

n: number of mice per group

Liposomes molar ratio compositions were eg. le: chol: stearyl=7:2:1

EDTA 와 DTPA 는 hydrophilic chelate 로서 강력한 착화능력이 있다. 이들은 Liposomes 표면에 결합된 $^{99m}\text{Tc}^{4+}$ 이온과 쉽게 전기적으로 결합한다. 반면에 NTA 는 친지용성(liphophilic) 약한 chelate 이기 때문에 Liposomes 내부에서 쉽게 친화되면서 ^{99m}Tc 의 환원상태를 보호하는 역할을 담당한다. 그리하여 Liposomes 의 장기친화성의 방사능 검출이 용이하도록 한다. 그러나 NTA 량이 과량이 첨가되었을때 비장의 육안적인 독성이 관찰됨으로써 NTA 사용량의 연구는 더욱 추후 되어야 한다고 사료되었다.

즉 초음파처리로 Liposomes 의 입자크기를 달리 하

였으며 NTA 의 농도를 10배로 줄여서 0.1 mM 농도의 NTA 가 첨가된 양성화전 Liposomes 의 장기분포 상황은 간장이 8.98±2.9%의 집적율로서 비교군인 vortexed ^{99m}Tc -NTA-liposomes 인 8.13±4.1%와 비교하여 유의 있는 차이는 없었으나 최고축적율을 보였다. 그러나 NTA 가 과량인 대조군은 간장 및 비장이 2.91±1.2%와 2.04±1.2%로서 저조 하였다. 한편 sarcoma 180 암세포이식 종양조직의 단위 gm 당 방사능량은 0.62±0.1%인 비교군에 비하여 1.14±0.2%로서 유의한 차이를 볼 수 있었다. 이는 핵종표지 Liposomes 을 주사후 ^{99m}Tc 의 친화장기내 축적시간을 연

장시키며, Liposomes 밖으로 유출을 방지하는 효과를 얻을 수 있는 것이라 시사되었다. 그러나 Tumor to nontumor의 organ ratio는 저조하여 오히려 간장의 질병진단을 위한 Imaging에 효과가 기대되었다.

고 안

방사성핵종표지 Liposomes 투여에 의한 중앙조직의 섭취율 측정실험은 여러 사람에게 의하여 보고되었다. (Dapergolas⁹⁾, Neerunjun¹¹⁾ Richardson¹²⁾) 특히 tumor seeker로서 Liposomes 연구는 Gregoriadis¹³⁾ Segal¹⁴⁾ 및 Richardson¹⁰⁾ 등에 의해 동물 및 인체를 대상으로 기보되었다. 이들의 연구 결과를 미루어볼 때 Liposomes의 중앙조직내 친화성은 투여전량의 방사능비가 단위중앙조직 gm 당 1~7%의 진폭이 있었다.

그러나 본실험에서는 초음파처리된 양성하전 ^{99m}Tc 표지 Liposomes의 투여후 4시간이 경과된후 Sarcoma 180 암조직의 집적율은 1.14%의 값을 나타내었다.

Liposomes을 특정장기의 Imaging을 판독하려는데 기존의 약제와 비교하여 여러가지점에서 장점을 갖추고 있다. 즉 체내에서 무독, 안전성이 높음, 인지질혼합물로서 장기조직에 들어가면 쉽게 분해된다. 또한 ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga 및 ¹¹¹In과 신속히 표지방사성화합물을 이룬다.

한편 이제까지 Liposomes이 개발이 안되고 있는 이유는 동물의 암조직의 실험에서는 효과가 좋으나 인체 암은 그 양이 다르게 나타나고 있다. 동물의 암세포의 Liposomes 섭취를 높여주는 endocytosis 활성화에 관한 많은 보고들이 있다.^{15~17)}

인간의 암세포증식은 동물의 암세포증식에 비교하여 매우 느리며, Liposomes의 대사과정도 상이한 것으로 생각된다. 본 연구의 개발목적은 Liposomes이 표적장기내 방사능집적이 용이하도록 표지관제를 개선하고자 chelating agents를 첨가하여 ^{99m}Tc-Liposome의 실험관내 표지반응에 어떠한 영향을 나타내는지를 관찰하였고, 이들 표지 혼합물의 생체실험을 통해서 EDTA 및 DTPA는 생물학적 변성을 일으켰으나 NTA는 생물체내 기능을 상실함이 없이 표적장기인 간장내 수송이 되는 현상을 실험적으로 밝혔다. 그러나 비장에서 유해함과 암조직과의 친화성의 연구는 낮은 성과를 얻었다. 이는 Richardson이 walker 256 암세포이식 백서¹²⁾와 sarcoma 180암세포 이식마우스의 특성차이 및 표지사용시 핵종의 물리적 반감기가 다소긴 ⁶⁷Ga 또는 ¹¹¹In과 NTA의 실험을 수행함으로써 보다 효

과적인 결과를 기대할 것으로 사료되었다.

결 론

^{99m}Tc-Liposomes의 표적장기내 방사능집적이 용이하며, 체내의 표지반응의 안정화를 위한 고안으로 킬레이트제를 반응 시킨결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) SnCl₂의 농도를 크게 할수록 ^{99m}Tc⁷⁺와 ^{99m}Tc⁴⁺의 두 peak가 분리되었으며 10 μg의 SnCl₂ 농도에서 최고치를 얻었다.

2) SnCl₂량이 과량인 경우 킬레이트제의 ^{99m}Tc과의 표지방사능에 변동이 없었으나 SnCl₂량이 소량인 경우 EDTA>DTPA≈NTA의 순서로 환원력의 세기를 나타내었다.

3) ^{99m}Tc-EDTA-Liposomes과 ^{99m}Tc-DTPA-Liposomes의 장기친화성은 Liposomes의 생물학적특성을 상실하였으나 ^{99m}Tc-NTA-Liposomes는 의의있는 장기친화성을 나타내었다.

4) ^{99m}Tc-NTA-Liposomes(+)의 암세포 집적효과는 sarcoma 180 암세포점종 중앙조직의 단위 gm 당 방사능량은 1.14±0.2%이었다. 그러나 각장기에 대한 암조직의 집적비율은 의미가 없었다.

이상의 실험성적으로 미루어보아 NTA이 ^{99m}Tc⁴⁺의 Liposomes과의 결합을 보조하는 킬레이트제임을 실험적으로 규명하였다.

REFERENCES

- 1) Yallow, R.S. and Berson, S.A.: *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Inv.*, 39:1157, 1960.
- 2) Colley, C.M. and Ryman, B.E.: *Liposomes as carrier in vivo for methotrexate. Biochim. Soc. Trans.*, 3:157-159, 1975.
- 3) Juliano, R.L. and Stamp, D.: *Pharmacokinetics of liposome-encapsulated anti-tumour drugs. Studies with Vinblastine, actinomycin D, cytosine arabinoside and daunomycin. Biochem. Pharmacol.*, 27:21, 1978.
- 4) Dapergolas, G., Neerunjun, E.D. & Gregoriadis, G.: *Penetration of target areas in the rat by liposome-entrapped bleomycine, glucose oxidase and inuline. FEBS Lett.*, 63:235-239, 1976.

- 5) Richardson, V.J., Jeyasigh, K., Jewkes, R.F., Ryman, B.E. & Tattersall, M.H.N.: *Properties of ^{99m}Tc-labelled liposomes in normal and tumour bearing rats. Biochem. Soc. Trans., 5:290, 1977.*
- 6) Ryu, Y.W.: *Studies on the tumor chemotherapy of Tc-99m-labeled liposomes and their uses. KAERI/RP-284/81.*
- 7) Kimelberg, H.K. & Papahadjopoulos, D.: *J. Biol. Chem. 246:1142-1148, 1971.*
- 8) Benjamin, P.P.: *Reduced pertechnetate-metal ion complex. Int'l. J. Appl. Radiat. Isotopes, 20:187, 1969.*
- 9) Moore, K.E. and Brody, T.M.: *Effect of triethyltin on mitochondrial swelling. Bioch. Pharmacol., 6:134-42, 1961.*
- 10) Richardson, V.J. Ryman, B.E., Jewkes, R.F., Jeyasingh, K., Tattersall, M.N.H., et al.: *Tissue distribution and tumor localization of ^{99m}Tc-labeled liposomes in cancer patients.: Br. J. Cancer, 40:35, 1979.*
- 11) Neerunjun, E.D., Hunter, R., Gregoriadis, G.: *Fate of a liposome-associated agent injected into normal and tumour bearing rodents: Attempts to improve localization in tumor tissue. Biochem Soc. Trans., 5:1380-1383, 1977.*
- 12) Richardson, V.J., Jeyasingh, K., Jewkes, R.F., et al.: *Possible tumor localization of Tc-99m-labelled liposomes: Effect of lipid composition, charge and liposome size. J.Nucl. Med., 19:1049-1054, 1978a.*
- 13) Gregoriadis, G., Swain, P., Wills, E.J. & Tavile, A.S.: *Drug carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. Lancet, i, 1313, 1974.*
- 14) Segal, A.W., Gregoriadis, G., Lavender, J.P., Tarin, D. & Peters, T.J.: *Tissue and hepatic subcellular distribution of liposomes containing bleomycin after intravenous administration to patients with neoplasms. Clin. Sci. Mol. Med., 51:421, 1976.*
- 15) Busch, H., Fujiwara, E. & Firszt, D.C.: *Studies on the metabolism of radioactive albumin in tumor bearing rats. Cancer Res., 21:371, 1961.*
- 16) Ghose, T., Nairn, R.C. & Fothergill, J.E.: *Uptake of proteins by malignant cells. Nature, 196:1109, 1962.*
- 17) Mego, J.L. & McQueen, J.D.: *The uptake of labelled proteins by particulate fractions of tumor and normal tissues after injection into mice. Cancer Res. 25:865, 1965.*