

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2017.3.2.59>

Development of bombesin peptide kit for prostate cancer diagnosis and treatment using $^{64}\text{Cu}/^{177}\text{Lu}$.

Mi Hyun Kim, Min Hwan Kim, Kwang Il Kim, Jung Young Kim, Tae Sup Lee, Joo Hyun Kang, Kyo Chul Lee, Yong Jin Lee*

RI-Convergence Research, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul, Korea

ABSTRACT

It has been reported that ^{64}Cu was radiolabeled with bombesin (BBN) peptide binding to the gastrin releasing peptide receptor expressed in human prostate cancer cells (PC3), confirming tumor target efficacy in mouse model. In this study, we developed the kit for the diagnosis and treatment of prostate cancer that can be used clinically using bombesin peptide available of ^{64}Cu and ^{177}Lu radioisotope labeling. The NODAGA-galacto-BBN peptide containing the NODAGA chelator and galactose was dispensed into a sterilized glass vial and lyophilized to prepare a kit. The stability of the kit after long-term storage in the 4°C cold chamber and the radiolabeling efficiency after ^{64}Cu or ^{177}Lu labeling were confirmed by thin layer chromatography. When labeling with ^{64}Cu at the initial stage of storage, labeling efficiency of NODAGA-galacto-BBN peptide kit was over 96%, labeling efficiency was over 90% when ^{177}Lu was labeled. At 11 months after storage, the radiolabeling efficiency of kit against ^{64}Cu and ^{177}Lu was each over 95% and 90%. The cell viability was significantly reduced in the ^{177}Lu -NODAGA-galacto-BBN treated group compared with the control and ^{177}Lu alone treated group in clonogenic assay. In conclusion, the NODAGA-galacto-BBN kit prepared by the lyophilization showed high stability over time and high yield of radioisotope labeling. Also ^{177}Lu -NODAGA-galacto-BBN confirmed high cytotoxicity to prostate cancer cells. Therefore, the NODAGA-galacto-bombesin kit is expected to be useful for the diagnosis and treatment of prostate cancer patients.

Key Word: ^{64}Cu , ^{177}Lu , bombesin, NODAGA, PC3, prostate cancer

Introduction

전립선 암의 경우 가장 빈번하게 진단되는 암종 하나이며, 미국의 경우 암 특이적인 사망원인 중 2위를 기록하고 있다 (1). 국소성 전립선 암의 경우 5년 생존율이 100%에 달하지만, 다른 부위로 전이가 일어난 경우에는 5년 생존율이 29% 까지 감소하는 것으로 보고되어 있다 (2). 전립선 암의 진행 정도에 따라 진단 및 치료 기법이 크게 달라질 수 있으며, 조기에 발견하는 경우 국소 방사선 치료 또는 근치적 회음부 전립선 절제술을 통해 치료가 가능하다. 그러나 전이가 일어난 경우에는 위와 같은 방법을 통한 치료는 불가능하며 주

로 방사선 치료 또는 호르몬 요법에 의존하여 왔다 (2). 따라서 암 초기 진단 및 암 진행 단계를 정확히 진단하는 것이 중요하다. 가스트린 유리 펩타이드 수용체(gastrin releasing peptide receptor; GRPR) 의 경우 전립선 암 (3, 4) 과 유방암 (5) 에서 많이 발현되는 것으로 알려져 있으며, 가스트린 유리 펩타이드 (gastrin releasing peptide; GRP) 유사체인 봄베신 (bombesin; BBN) 펩타이드에 ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu 등의 방사성 동위원소를 표지 후, 양전자 방출 단층 촬영(positron emission tomography; PET) 기법을 이용하여 전립선 암을 진단하는 연구가 활발히 진행되어 왔다. 뿐만 아니라, 치료 및 영상이 가능한 ^{177}Lu 을 사용하여 전립선암을 진단하

Received: November 08, 2017 / Revised: November 30, 2017 / Accepted: December 08, 2017

Corresponding Author : Yong Jin Lee, PhD. RI-Convergence Research, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), 75 Nowon-gil, Gongneung-Dong, Nowon-Gu, Seoul, 139-706, Republic of Korea
Tel: +82-2-970-1364, Fax: +82-2-970-1341, E-mail: yjlee@kirams.re.kr

Copyright©2017 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

고 치료하고자 하는 연구 또한 진행되고 있다 (6–8). 이전 연구에서 사람 전립선암 세포 (PC3 cells) 에서 발견되는 가스 트린 유리 펩타이드 수용체에 결합하는 봄베신 펩타이드에 NODAGA (1,4,7-triazacyclononane,1-glutaric acid-4,7 acetic acid) 킬레이터를 통해 ⁶⁴Cu를 표지하고, 갈락토오스를 도입하여 간에서의 과도한 ⁶⁴Cu 섭취를 줄이고, 마우스 전립선암 모델에서 효과적인 종양 표적 효능을 확인하였다 (9). 본 연구에서는 무균적인 동결건조 기법을 활용한 ⁶⁴Cu 및 ¹⁷⁷Lu 방사성 동위원소 표지가 가능한 봄베신 펩타이드 (NODAGA-galacto-BBN)를 이용하여 임상에서 간편하고, 신속하게 활용 가능한 전립선암 진단 및 치료용 키트를 개발하고자 하였다.

Materials and Methods

NODAGA-galacto-BBN kit의 제작

NODAGA-galacto-BBN은 애니젠회사 (AnyGen Co., Ltd., Korea)에 제작 의뢰하여 다음 실험에 사용하였다. NODAGA-galacto-BBN을 1 M sodium acetate에 1 mg/mL 농도로 녹인 다음, 24 µL의 NODAGA-galacto-BBN 용액을 pH 5의 sodium acetate buffer solution 1mL 용액과 혼합하여 섞어준다. pH 5의 sodium acetate buffer solution의 제조는 먼저 stock solution A [glacial acetic acid (CH₃COOH) 11.55 mL을 증류수에 희석하여 0.2 M

1 L 용액으로 만든다.]와 stock solution B [16.41 g 의 anhydrous sodium acetate (CH₃COONa) 또는 7.22 g 의 CH₃COONa·3H₂O를 증류수에 희석하여 0.2 M 1 L 용액으로 만든다.]를 제조한 후 각각 296 µL (stock solution A), 704 µL (stock solution B)를 혼합하여 제조하였다. 멸균한 유리 바이알 (glass vial)에 500 µL 또는 1 mL씩 분주하여 동결건조과정을 거쳐 12 µg 또는 24 µg 용량의 NODAGA-galacto-BBN kit를 제작하였다 (Figure 1).

⁶⁴Cu 를 이용한 NODAGA-galacto-BBN kit 표지실험

12 µg과 24µg의 두 가지 농도의 NODAGA-galacto-BBN kit를 사용하여 ⁶⁴Cu (Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), Korea)를 표지하고 radio-TLC를 통하여 표지수율을 확인하는 실험을 진행하였다.

먼저 ⁶⁴Cu용액의 유기물질을 110 °C에서 아르곤 가스 퍼징(argon gas purging)을 통해 제거하고 주사용수로 재희석하였다. 총 37 MBq, 1 mL의 ⁶⁴Cu용액을 1 mL 주사기를 이용하여 펩타이드가 포함된 유리 바이알 에 주입하였다. 70 °C에서 30분간 반응한 뒤에 radio-TLC를 통하여 표지수율을 확인하고 pH를 확인하였다. 최종적으로 제조된 ⁶⁴Cu-NODAGA-galacto-BBN의 구조는 Figure 2에 표기하였다.

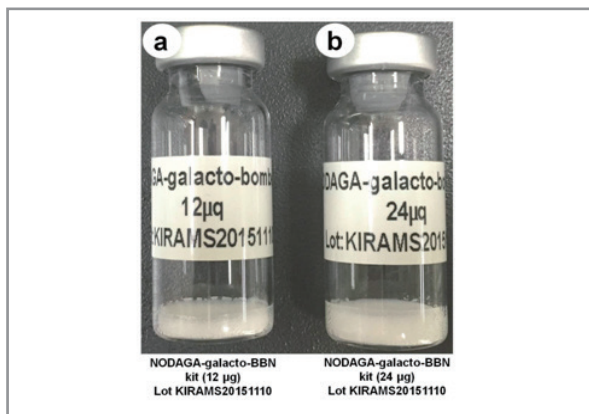


Figure 1. Photographic image of NODAGA-galacto-BBN kit. (a) NODAGA-galacto-BBN kit (12 µg). (b) NODAGA-galacto-BBN kit (24 µg).

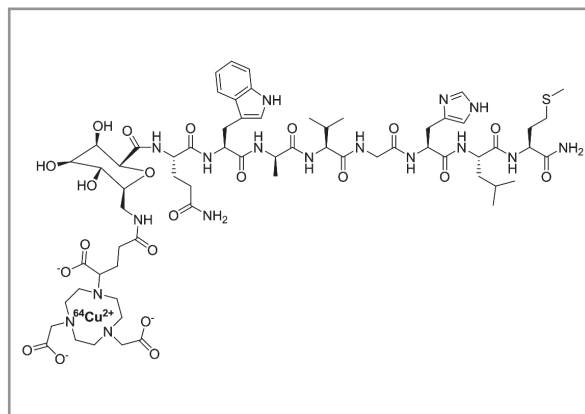


Figure 2. Chemical structure of ⁶⁴Cu-NODAGA-galacto-BBN

^{177}Lu 을 이용한 NODAGA-galacto-BBN kit 표지실험
12 μg 과 24 μg 두 가지 농도의 NODAGA-galacto-BBN
Kit를 사용하여 ^{177}Lu 을 표지하고 radio-TLC를 통하여 표지
수율을 확인하는 실험을 진행하였다.

먼저 ^{177}Lu 용액의 유기물질을 110 $^{\circ}\text{C}$ 에서 아르곤 가스 퍼
징을 통해 제거하고 주사용수로 재희석하였다. 총 37 MBq,
1 mL의 ^{177}Lu 용액을 1 mL 주사기를 이용하여 펩타이드가 포
함된 유리 바이알에 주입하였다. 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40분간 반응한
뒤에 radio-TLC를 통하여 표지수율을 확인하고 pH를 확인
하였다.

무균 시험 및 엔도톡신 (endotoxin) 시험

무균시험법은 식약청 식품의약품안전평가원에 고지된 무
균시험법에 의거하여 측정하였다. 무균시험은 무균 및 진균
을 대상으로 시행하였으며, 무균용은 액상티오글리콜산배지
(BBL™ Fluid Thioglycollate Medium, Becton, Dickinson
and company Sparks, Franklin Lakes, NJ)에 검체를 0.2
- 0.4 mL를 접종하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 14일간 배양하였으며, 진
균용은 대두카제인소화배지 (BBL™ Tryptic Soy Broth,
Becton, Dickinson and company Sparks, NJ)에 검체를
0.2 - 0.4 mL씩 접종하고 24 $^{\circ}\text{C}$ 에서 14일간 배양 후 육
안으로 확인하여 투명하면 오염되지 않았다고 판단하였다.
엔도톡신 시험은 Charles River 사의 Endo safe®-PTS™
system 을 이용하여 사용자 매뉴얼에 따라서 측정하였다. 샘
플을 50배 또는 100배로 희석하여 테스트 카트리지에 주입하
여 측정 장비를 통해 결과를 확인하였다.

세포배양

사람 전립선암 세포주인 PC3 세포주는 10% fetal bovine
serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 Ham's
F-12K 배지(WelGENE, Inc., Korea)에 단층배양 하였다.
세포는 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 조건의 세포 배양기 (Sanyo, Co.,
Ltd., Tokyo, Japan)에서 배양하였다.

군집 형성 분석 (Clonogenic assay)

1×10^6 의 PC3 세포를 100 mm dish에 깔아주고 24시간 배
양한 후 2% FBS가 첨가된 Ham's F-12K 배지로 교환하였
다. ^{177}Lu -NODAGA-galacto-BBN 5.5 MBq을 새로 교환
한 배지에 처리한 후 4시간 배양하였다. PBS로 washing 후
세포를 떼어 계수한 후 세포들을 각각 2×10^2 , 5×10^2 , $1 \times$
 10^3 개씩 깔아주고 14일간 배양하였다. 형성된 군집을 크리
스탈 바이올렛 (crystal violet, 0.05 w/v%) 용액으로 염색
후 계수하였다.

Results and Discussion

NODAGA-galacto-BBN kit를 이용한

^{64}Cu 표지 수율 및 표지 안정성 확인.

NODAGA-galacto-BBN kit를 사용하여 ^{64}Cu 를 표지하
고 radio-TLC를 통하여 표지수율을 확인하는 실험을 진행
하였다. NODAGA-galacto-BBN 펩타이드 kit의 농도를
12 μg , 24 μg 두 가지로, 농도를 달리하여 ^{64}Cu 를 표지하였
다. radio-TLC로 ^{64}Cu 에 대한 표지수율 확인결과 12 μg , 24
 μg 두 가지 농도에서 각각 $96.58 \pm 2.98\%$, $97.02 \pm 0.51\%$ 표
지 수율을 보여주었다 (Figure 3A-a and b). 최종 화합물
의 pH는 6-7로 확인되어 중성에 가까운 pH를 보여주었다.

^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN kit의 안정성 확인.

^{64}Cu 를 이용하여 표지한 NODAGA-galacto-BBN kit (12
 μg , 24 μg) 두 가지에 대하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 안정성 시험을 시행
하였다. Kit 제작 후 2시간, 15시간 뒤에 ^{64}Cu -NODAGA-
galacto-BBN (12 μg , 24 μg) 에서 radio-TLC로 ^{64}Cu 에
대한 표지수율 확인결과 ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN
(12 μg) 의 경우 2시간, 15시간째 각각 $96.90 \pm 2.02\%$,
 $96.75 \pm 5.62\%$ 로 나타났다. ^{64}Cu -NODAGA-galacto-
BBN (24 μg) 의 경우 2시간, 15시간째 각각 $97.21 \pm 2.63\%$,
 $97.64 \pm 4.09\%$ 로 나타났다 (Figure 3A-c and d, Figure

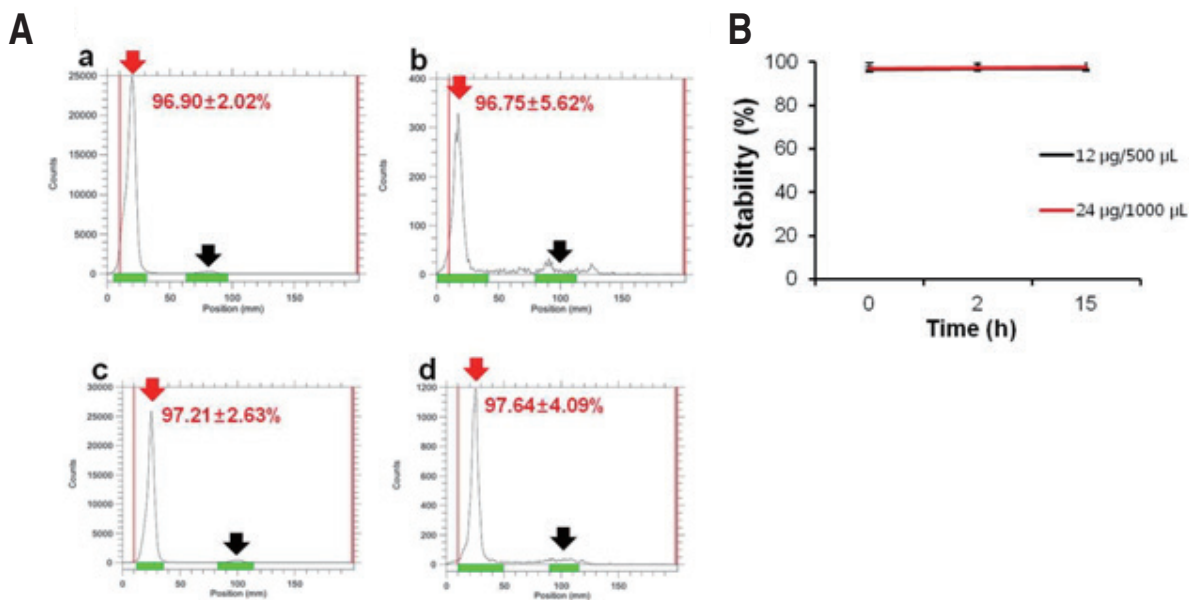


Figure 3. Stability test of ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN kit at 4°C . (A) Radio-TLC of ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN kit (a-d). (a) Radio-TLC of ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN ($12\mu\text{g}$) at 2 h after radiolabeling. (b) Radio-TLC of ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN ($12\mu\text{g}$) at 15 h after radiolabeling. (c) Radio-TLC of ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN ($24\mu\text{g}$) at 2 h after radiolabeling. (d) Radio-TLC of ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN ($24\mu\text{g}$) at 15 h after radiolabeling. Black arrows indicate the radioactivity of ^{64}Cu . Red arrows indicate the radioactive peak of ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN. (B) Stability of ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN ($12\mu\text{g}$, black line) and ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN ($24\mu\text{g}$, red line) for 15 h at 4°C .

B). 이로써 표지 후 15시간 후에도 안정적으로 96% 이상의 ^{64}Cu 가 결합되어 있음이 확인되었다. 제작한 NODAGA-galacto-BBN kit는 무균시험 및 엔도톡신 시험결과에서 음성 결과를 보여 안전성을 확인하였다.

장기간 냉장보관 NODAGA-galacto-BBN kit의 $^{64}\text{Cu}/^{177}\text{Lu}$ 표지를 통한 안정성 확인

NODAGA-galacto-BBN kit ($24\mu\text{g}$)의 장기 냉장 보관 (4°C) 안정성을 확인하기 위하여 kit 제작 후 11개월째 $^{64}\text{Cu}/^{177}\text{Lu}$ 에 대한 표지수율을 확인하였다.

NODAGA-galacto-BBN 펩타이드 키트의 ^{64}Cu 에 대한 표지 효율은 96.14%, ^{177}Lu 에 대한 표지효율은 90.01%로 확인되었다. 이러한 결과를 통하여 장기 냉장 보관한 kit에 대해서도 방사성동위원소가 안정적으로 표지가 이루어져, 장기간 냉장 보관에 대한 kit의 안정성이 확인되었다 (Figure 4).

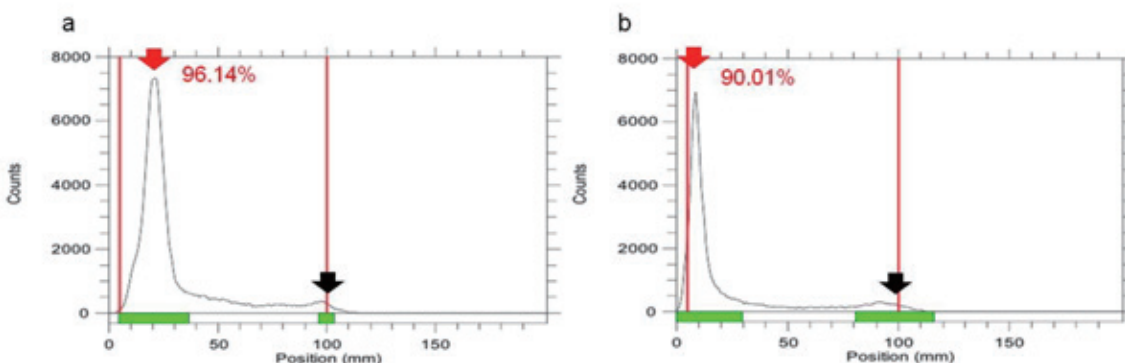


Figure 4. Radiolabeling efficiency of NODAGA-galacto-BBN kit stored for 11 months. (a) Radio-TLC of ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN ($12\mu\text{g}$). (b) Radio-TLC of ^{177}Lu -NODAGA-galacto-BBN ($12\mu\text{g}$). Black arrows indicate the radioactivity peak of ^{64}Cu (a), ^{177}Lu (b). Red arrows indicate the radioactivity peak of ^{64}Cu -NODAGA-galacto-BBN (a), ^{177}Lu -NODAGA-galacto-BBN (b).

군집형성 분석을 통한 ^{177}Lu -NODAGA-galacto-BBN의 치료효과 확인.

군집형성 분석을 통하여 PC3-Luc 세포에 대한 ^{177}Lu -NODAGA-galacto-BBN의 치료 효과를 확인하였다. 5.5 MBq의 ^{177}Lu -NODAGA-galacto-BBN을 처리 ($76.64 \pm 13.39\%$)한 경우 Control group에 비하여 통계적으로 유의하게 세포 수가 감소 하는 것이 확인되었으며, ^{177}Lu 을 단독 처리한 군 ($95.93 \pm 7.56\%$)에 비해서도 통계적으로 유의하게 세포수가 감소하였다. 11.1 MBq의 ^{177}Lu -NODAGA-galacto-BBN을 처리한 경우에는 Control group 대비하여 통계적으로 유의한 세포수 감소를 보여(Figure 5), ^{177}Lu -NODAGA-galacto-BBN처리가 전립선암 세포 사멸에 효과적임을 확인하였다.

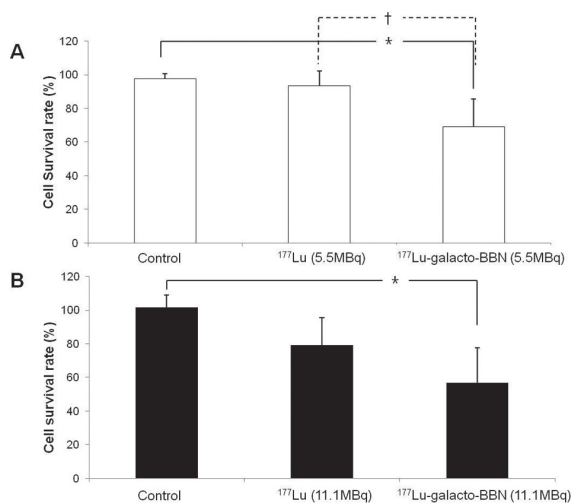


Figure 5. Effect of ^{177}Lu -NODAGA-Galacto-BBN and ^{177}Lu treated to PC3 cells. (A) Cell survival ratio after 5.5MBq of ^{177}Lu -NODAGA-Galacto-BBN and ^{177}Lu treated for 4 h. (B) Cell survival ratio after 11.1MBq of ^{177}Lu -NODAGA-Galacto-BBN and ^{177}Lu treated for 4 h. (* $p < 0.05$).

Conclusion

본 연구를 통하여 NODAGA-galacto-BBN kit의 ^{64}Cu 및 ^{177}Lu 에 대한 높은 표지 효율 및 장기간 냉장 보관 시에도 안정성 유지함을 확인할 수 있었으며, ^{177}Lu 표지 붐베신 처리에 의한 전립선암 세포의 생존율 감소를 통해 치료효과를 확

인할 수 있었다. 본 연구결과를 토대로, 전립선암 환자의 진단 및 치료에 NODAGA-galacto-BBN kit가 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

Acknowledgments

이 논문은 2017년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 원자력연구개발사업 (No. 20172A2A6A02019904) 과 국책연구사업 (No. 1711045539;1711045541/50461-2017)을 통하여 수행된 연구임.

References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10-29.
2. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:220-241.
3. Zhang H, Desai P, Koike Y, Houghton J, Carlin S, Tandon N, Touijer K, Weber WA. Dual-Modality Imaging of Prostate Cancer with a Fluorescent and Radiogallium-Labeled Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist. *J Nucl Med* 2017;58:29-35.
4. Accardo A, Galli F, Mansi R, Del Pozzo L, Aurilio M, Morisco A, Ringhieri P, Signore A, Morelli G, Aloj L. Pre-clinical evaluation of eight DOTA coupled gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) ligands for in vivo targeting of receptor-expressing tumors. *EJNMMI Res* 2016;6:17
5. Dalm SU, Martens JW, Sieuwerts AM, van Deurzen CH, Koelewijn SJ, de Blois E, Maina T, Nock BA, Brunel L, Fehrentz JA, Martinez J, de Jong M, Melis M. In vitro and in vivo application of radiolabeled gastrin-releasing peptide receptor ligands in breast cancer. *J Nucl Med* 2015;56:752-757.
6. Roivainen A, Kähkönen E, Luoto P, Borkowski S, Hofmann B, Jambor I, Lehtiö K, Rantala T, Rottmann A, Sipilä H, Sparks R, Suilamo S, Tolvanen T, Valencia R, Minn H. Plasma pharmacokinetics, whole-body distribution, metabolism, and radiation dosimetry of ^{68}Ga -bombesin antagonist BAY 86-7548 in healthy men. *J Nucl Med* 2013;54:867-872.
7. Kähkönen E, Jambor I, Kempainen J, Lehtiö K, Grönroos TJ, Kuisma A, Luoto P, Sipilä HJ, Tolvanen T, Alanen K, Silén

- J, Kallajoki M, Roivainen A, Schäfer N, Schibli R, Dragic M, Johayem A, Valencia R, Borkowski S, Minn H. In vivo imaging of prostate cancer using [68Ga]-labeled bombesin analog BAY86-7548. *Clin Cancer Res* 2013;19:5434-5443.
8. Stott Reynolds TJ, Schehr R, Liu D, Xu J, Miao Y, Hoffman TJ, Rold TL, Lewis MR, Smith CJ. Characterization and evaluation of DOTA-conjugated Bombesin/RGD-antagonists for prostate cancer tumor imaging and therapy. *Nucl Med Biol* 2015;42:99-108.
9. Kim MH, Park JA, Woo SK, Lee KC, An GI, Kim BS, Kim KI, Lee TS, Kim CW, Kim KM, Kang JH, Lee YJ. Evaluation of a ⁶⁴Cu-labeled 1,4,7-triazacyclononane, 1-glutaric acid-4,7 acetic acid (NODAGA)-galactose-bombesin analogue as a PET imaging probe in a gastrin-releasing peptide receptor-expressing prostate cancer xenograft model. *Int J Oncol* 2015;46:1159-1168.