

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2018.4.2.65>

Synthesis and biological evaluation of diagnostic reagent for prostate cancer using copper-64 radioisotope

Heesu Ahn,^{1,3} Mi Hyun Kim,² Sang Jin Han¹, Sang Keun Woo^{1,3}, Jung Young Kim¹, Kyu Chul Lee¹, Il Han Lim¹, and Yong Jin Lee^{1,2,*}

¹Division of Applied RI, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul, Korea,

²FutureChem Healthcare Co., Ltd., Seoul, Korea

³Korea University of Science and Technology, Daejeon, Korea

ABSTRACT

Prostate specific membrane antigen (PSMA) is a cell surface membrane protein, which is overexpressed in most prostate cancer. Recently, PET imaging with [⁶⁸Ga]PSMA-HBED-CC has been widely used for the diagnosis of recurrent prostate cancer and the studies on the diagnostic potential of ⁶⁴Cu-labeled PSMA ligands reported actively. In this study, we monitored with biological evaluation in vivo and PET imaging of ⁶⁴Cu-labeled PSMA ligand ([⁶⁴Cu]PSMA-617). The radiolabeling efficiency and stability of [⁶⁴Cu]PSMA-617 were confirmed by radio-thin layer chromatography. The radiolabeling efficiency of [⁶⁴Cu]PSMA-617 showed over 95%, and stabilities of intact remained over 98% in both human and mouse serum for 48 h. In normal male mice, in vivo uptake of [⁶⁴Cu]PSMA-617 in several organs was measured at 2, 4, 6, 24, 48 h after injection. Rapid blood clearance was observed for [⁶⁴Cu]PSMA-617. The high uptake was observed in the lung, liver, intestines and kidneys at 2 h postinjection, but was low in the other organs (1-2 %ID/g) at 4 h. The dynamic PET/CT images of 22RV1 tumor-bearing nude mice were acquired during 60 min and additionally acquired 24 h and 48 h after injection. In dynamic PET images, [⁶⁴Cu]PSMA-617 uptake ratio in tumors versus muscle was increased as time elapsed until 60 minutes and remained in tumors at 48 h. In these results, the PET/CT imaging using [⁶⁴Cu]PSMA-617 in prostate cancer is expected to be useful for the diagnosis and treatment of prostate cancer patients.

Key Word: Prostate cancer, Prostate specific membrane antigen(PSMA), PSMA-617, Cu-64

Introduction

전립선암은 전세계 남성에게 가장 많이 발생하는 암으로써, 암 특이적 사망원인 중 2위를 기록하고 있다 (1). 국소성 전립선 암 환자의 생존율은 95%를 보이지만, 전립선 암 환자의 약 80%에서 뼈 또는 전신으로 전이되며, 생존율은 약 28%까지 감소하는 것으로 보고되어 있다 (2). 가장 기본적인 전립선 암 진단법으로는 혈액검사인 전립선 특이항원검사 (Prostate Specific Antigen, PSA), 직장수지검사 (Digital

Rectal Examination, DRE), 전립선초음파 등이 있다 (3). 이 방법들은 조기 진단 및 치료 기법을 예측하기에 유용하지만, 전이가 일어난 경우를 진단하기에는 어려움이 있다. 이를 극복하기 위하여 전립선 특이적 막 항원 (Prostate specific membrane antigen, PSMA) 을 이용한 진단법에 대한 연구가 활발히 진행 중이다 (4). PSMA는 전립선 상피세포의 세포막에서 분비되는 항원으로, 정상 조직보다 전립선 암 조직에서 발현량이 증가하므로 전립선 암 진단 바이오마커로 사용할 수 있다 (5). PSMA에 선택적인 항체 7E11에 방사

Received: December 11, 2018 / Revised: December 21, 2018 / Accepted: December 23, 2018

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: +82-2-970-134, E-mail: yjlee@kirams.re.kr

Copyright©2018 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

성 동위원소를 표지한 후, 양전자 방출 단층 촬영 (positron emission tomography; PET) 기법을 이용하면 전립선 암 진단에 대한 정확성을 증가시키고, 전이 여부 및 그 위치와 범위를 파악하는 데에 유용하다는 보고가 있다 (6). 또한, 최근 임상에서 많이 사용되는 PET용 전립선 암 영상 진단제로 방사성 동위원소 Indium-111을 표지한 ProstaScint® (capromab pendetide) 도 보고되어 있다 (7). 방사성 동위원소 Lu-177, Ga-68 등을 표지할 수 있는 DOTA (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid) 킬레이트 기반의 PSMA-617 방사성추적자의 임상연구도 진행 중에 있다 (8,9). 본 연구에서는 진단용으로 사용 가능한 방사성 동위원소 Cu-64를 PSMA-617화합물에 표지하여 높은 안전성을 가지는 전립선 암 진단제로서의 효능을 종양 세포 및 동물 실험을 통하여 그 유용성을 평가하고자 하였다.

Materials and Methods

1. [Cu-64]PSMA-617 합성 및 표지

1.1) PSMA 617 합성

1.1.1) *tert*-Butyl *N*^ε-((*S*)-2-amino-3-(naphthalen-2-yl)propanoyl)-*N*^ε-(((*S*)-1-(*tert*-butoxy)-5-(*tert*-butylperoxy)-1,5-dioxopentan-2-yl)carbamoyl)-*L*-lysinate (1).

PSMA-617 전구체는 Scheme 1 과 같은 방법으로 진행하였다. Ar (g)하에서 2-{3-[1-*tert*-butyl-carboxylate-(5-aminopentyl)]ureido}di-*tert*-butyl pentanedioate (1.41 g, 2.89 mmol), Fmoc-3-(2-naphthyl)-*L*-alanine (1.39 g, 3.18 mmol), 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium tetrafluoroborate (TBTU, 1.39 g, 4.34 mmol) 그리고 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt, 586 mg, 4.34 mmol)를 round flask에 넣고 무수 N,N-dimethylformamide (DMF, 16 mL)과 N,N-diisopropylethylamine (DIEA, 1.51 mL, 8.68 mmol)을 가해 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. Ethyl acetate/NH₄Cl

포화수용액으로 추출 하여 유기층을 분리하고 NaHCO₃ 포화수용액으로 씻어준 후 무수 Na₂SO₄로, 남은 수분을 제거한 후, 감압하여 용매를 제거하였다. Crude mixture에 20% piperidine/DMF(10 mL)을 가해 상온에서 30분간 교반 후 감압하여 용매를 제거하였다. Silica gel flash column chromatography (3% MeOH/CH₂Cl₂)로 분리, 정제하여 1.16 g (pale yellow foamy solid, 59%)을 얻었다: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81-7.76 (m, 3H), 7.64 (s, 1H), 7.47-7.41 (m, 2H), 7.36 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 5.40 (brs, 2H), 4.34-4.24 (m, 2H), 3.69 (dd, 1H, J = 9.0, 3.4 Hz), 3.39 (dd, 1H, J = 13.6, 3.6 Hz), 3.30-3.15 (m, 2H), 2.87 (dd, 1H, J = 13.4, 9.4 Hz), 2.35-2.22 (m, 2H), 2.09-1.97 (m, 2H), 1.86-1.68 (m, 4H), 1.61-1.52 (m, 4H), 1.50-1.34 (m, 27H), 1.33-1.24 (m, 3H); LR-MS (ESI) m/z Calcd: 685.41 [M+H]⁺; Found: 685.50 [M+H]⁺.

1.1.2) *tert*-Butyl *N*^ε-((*S*)-2-(((1*S*,4*R*)-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxamido)-3-(naphthalen-2-yl)propanoyl)-*N*^ε-(((*S*)-1-(*tert*-butoxy)-5-(*tert*-butylperoxy)-1,5-dioxopentan-2-yl)carbamoyl)-*L*-lysinate (2).

Ar (g) 하에서 화합물 1 (1.15 g, 1.68 mmol), Fmoc-tranexamic acid (702 mg, 1.85 mmol), TBTU (809 mg, 2.52 mmol) 그리고 HOBt (341 mg, 2.52 mmol)를 round flask에 넣고 무수 DMF (12 mL)과 DIEA (0.88 mL, 5.04 mmol)을 가해 상온에서 2 시간 동안 교반하였다. Ethyl acetate/NH₄Cl 포화수용액으로 추출 하여 유기층을 얻고 NaHCO₃ 포화수용액으로 씻어준 후 무수 Na₂SO₄로 남은 수분을 제거한 후, 감압하여 용매를 제거하였다. Crude mixture에 20% piperidine/DMF(10 mL)을 가해 상온에서 30분간 교반 후 감압하여 용매를 제거하였다. Silica gel flash column chromatography (15% MeOH/CH₂Cl₂)로 분리, 정제하여 1.16 g (pale yellow foamy solid, 84%)을 얻었다: ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.82-7.77 (m, 3H), 7.68 (s, 1H), 7.47-7.42 (m, 2H), 7.39 (dd, 1H, J = 8.4, 2.0 Hz), 4.04-4.07 (m, 1H), 4.18-4.21 (m, 1H), 4.65-4.69 (m, 1H) 4.68

(d, 0.5H, J = 6.4 Hz), 4.66 (d, 0.5H, J = 6.8 Hz), 4.21 (d, 0.5H, J = 4.8 Hz), 4.19 (d, 0.5H, J = 5.2 Hz), 4.07 (d, 0.5H, J = 4.8 Hz), 4.04 (d, 0.5 H, J = 4.8 Hz), 3.27–3.22 (m, 1H), 3.14–3.04 (m, 3H), 2.74 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 2.36–2.26 (m, 2H), 2.24–2.16 (m, 1H), 2.08–1.99 (m, 1H), 1.88–1.74 (m, 4H), 1.67–1.58 (m, 2H), 1.56–1.49 (m, 2H), 1.49–1.42 (m, 27H), 1.42–1.32 (m, 3H), 1.31–1.22 (m, 3H), 1.07–0.96 (m, 2H); LR-MS (ESI) m/z Calcd: 824.51 [M+H]⁺; Found: 827.65.70 [M+H]⁺.

1.1.3) (((S)-1-Carboxy-5-((S)-3-(naphthalen-2-yl)-2-((1s,4R)-4-((2-(4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)acetamido)methyl)cyclohexane-1-carboxamido)propanamido)pentyl)carbamoyl)-L-glutamic acid (3).

화합물 2 (109 mg, 0.13 mmol)에 40% trifluoroacetic acid/CH₂Cl₂ (3 mL)을 가해 2.5 시간 동안 상온에서 교반 후 감압하여 용매를 제거하였다. Crude mixture에 0.4 M NaHCO₃ 수용액(3 mL)을 가해 녹이고 DOTA-NHS ester (165 mg, 0.22 mmol)를 물(3 mL)에 녹여 천천히 5분간 적 가하였다. 상온에서 1 시간 동안 교반 후 0.5 N HCl 수용액을 가해 중화 후 prep-HPLC (High performance liquid chromatography)을 수행하여 분리한 후 동결건조하여 95 mg (white solid, 70%)을 얻었다: LR-MS (ESI) m/z Calcd: 1042.50 [M+H]⁺; Found: 1043.0 [M+H]⁺.

1.2) Cu-64를 이용한 표지

가속기로부터 ⁶⁴Ni(p,n)⁶⁴Cu 핵반응을 통해 얻어진 ⁶⁴CuCl₂ 용액을 용이한 표지반응을 위하여 가열(100 °C) 하면서 질소 (N₂ gas)를 불어넣어 건조시켰다. PSMA-617 전구체 1 mg 을 0.1 M ammonium citrate (pH 5.5) 버퍼용액 1 mL로 녹인 다음, 100 μL를 취하여 건조된 ⁶⁴CuCl₂ 바이알에 첨가하여 90 °C에서 5분 동안 반응하였다. 표지가 끝난 후, [⁶⁴Cu] PSMA-617의 방사화학적 순도는 radio-TLC (Thin layer chromatography)로 확인하였다. 이동상(mobile phase)은 0.1 M citrate 버퍼를 사용하였다. 최종생산물인 [⁶⁴Cu]

PSMA-617은 생리식염수(saline)를 섞어 0.22 μm 멸균 필터를 통과시켜 멸균 용기로 옮겨 준비하였다.

1.3) 혈청 내 안정성 실험

[⁶⁴Cu]PSMA-617을 phosphate buffered saline (PBS, pH = 7.4, 100 mM) 를 이용하여 100 μCi/50–100 μL의 용량으로 희석한 후 마우스 혈청 또는 사람 혈청, 생리식염수를 각각 500 μL와 동량으로 섞어준 후 37 °C에서 배양하였다. 배양하면서 0, 4, 24, 48 시간에 정량을 취하여 radio-TLC로 혈청 내 안정성을 분석하였다.

2. 세포 배양 및 PSMA 발현 측정

2.1) 세포 배양

사람 전립선 암 세포주 중에서 PSMA 음성인 PC3, PC3-M 세포주와 PSMA 양성인 22RV1, LNCap 세포주는 각각 10% 소태아혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 Ham's F-12K 배지, RPMI 1640 배지에 단층배양 하였다. 세포는 5% CO₂, 37 °C 가 유지되는 습윤항온 배양기에서 배양하였다.

2.2) PSMA mRNA 발현 측정

RNA 샘플은 트라이졸을 이용하여 추출하고, Nanodrop (Nanodrop™ 2000c, Thermo fisher, Massachusetts, USA)으로 정량하였다. SuperScript III First-strand Synthesis System Kit (Invitrogen, California, USA) 를 사용하여 cDNA를 합성하고 10 pmol의 PSMA primer, GAPDH primer를 이용하여 증폭하였다. 증폭조건은 94 °C, 5 min, (94 °C 30 sec - 58 °C 30 sec - 72 °C 30 sec) x 35 cycle, 72 °C 10 min으로 진행하였다. 각 유전자의 발현 정도는 2% 아가로즈 겔에서 전기영동 후 밴드로 확인하였다. PSMA 프라이머 정보는 다음과 같다. Forward primer: 5'-ACAGATATGTCATTCIGGGAGGTC-3', Reverse primer: 5'-ACTGTGATACAGTGGATAGCCGCT-3'

2.3) PSMA 단백질 발현 측정

단백질 샘플은 RIPA 완충액(프로테아제 억제제 + 포스파타제 억제제)을 이용하여 추출하고 정량하였다. 단백질 샘플

플을 동량 준비하고 샘플 버퍼를 넣은 후, 이를 10% SDS PAGE gel에서 전기영동하였다. PVDF 막으로 전기영동을 통해 이동시킨 후 5% 탈지우유로 블로킹하고, 항-PSMA 항체, 항-GAPDH 항체를 처리한다. 이어 2차 항체를 결합시킨 후, ECL (enhanced chemiluminescence) 용액으로 반응시킨 후 단백질 발현을 확인하였다.

2.4) [⁶⁴Cu]PSMA-617 세포내 섭취

사람 전립선 암 세포주인 PC3, 22RV1, LNCap 세포주를 6 well 플레이트에 5x10⁵개씩 깔고, 5% CO₂, 37 °C가 유지되는 습윤항온 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 무혈청 배지로 [⁶⁴Cu]PSMA-617을 4 μCi/mL가 되도록 준비한 후, 이를 세포가 배양된 6 well 플레이트 5 mL (6 μCi)씩 처리하였다. 0.5, 1, 2, 24시간동안 5% CO₂, 37 °C 습윤항온 배양기에서 배양 후, 각 시간 대에 맞춰 세포주를 배양기에서 꺼낸다. 2% SDS 버퍼를 처리하여 6 well 플레이트에 부착되어 있는 세포주를 떼어 5 mL 플라스틱 테스트 튜브에 담아 방사능을 측정하였고, 단위 중량당의 방사능인 집적량(%ID/mg)으로 산출하였다. 방사능측정은 감마카운터(WIZARD 1480, Perkin-Elmer, Massachusetts, USA)를 사용하였다.

3. [⁶⁴Cu]PSMA-617 생체내 분포 및 PET영상

3.1) 실험 동물 및 전립선 암 모델 제작

6주령의 Balb/c Nude (nu/nu) 수컷 마우스와 Balb/c 수컷 마우스 두 종류를 (주)나라바이오테크로부터 공급받았으며, 일주일간 순화시킨 뒤 실험에 사용하였다. 전립선 암 종양모델은 22RV1 세포주를 1×10⁷ cells/100 μL/head가 되게 준비한 후 수컷 누드마우스의 오른쪽 뒷다리 부분에 피하 주사로 이식하고 3주간 지속적으로 관찰하였다.

3.2) 정상 수컷 마우스에서 [⁶⁴Cu]PSMA-617 생체내 분포실험

[⁶⁴Cu]PSMA-617의 방사능량을 0.5 mCi/mL의 용량으로 희석한 후 0.1 mL를 꼬리 정맥으로 주사하였다.(10) 본 연구에서는 체중이 21-24 g 범위의 BALB/C 마우스를 사용하

였으며, 마우스당 0.05 mCi의 [⁶⁴Cu]PSMA-617을 주사하였다. 시험군은 주사 후 2, 4, 6, 24, 48 시간에 네 마리씩의 동물군을 사용하였다. 주사 후 각 시간대에 동물을 희생하고 blood, muscle, fat, heart, lung, liver, spleen, stomach, intestine, kidney, bone, brain을 적출하여 무게를 측정하고, 5 mL 플라스틱 test tube에 담아서 방사능을 측정하여 단위 중량당의 방사능에서 집적량(%ID/g)을 산출하였다. 방사능의 측정은 감마카운터를 사용하여 측정하였다.

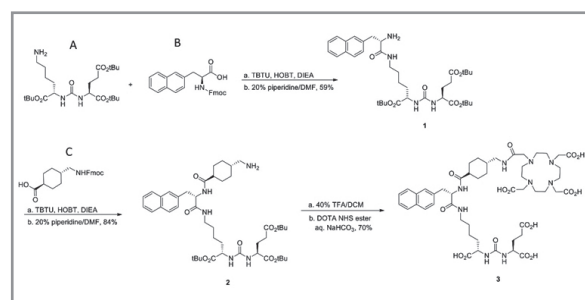
3.3) 전립선 암 모델 마우스에서 [⁶⁴Cu]PSMA-617 PET영상 촬영

22RV1 세포주를 이식한 후 종양이 형성된 수컷 누드마우스를 사용하였다. 2%의 이소플루란 흡입마취를 한 종양 모델을 소동물 영상장비(Siemens Inveon PET/CT, München, Germany)에 고정시켰다. 먼저, CT 영상을 획득한 후, PET 촬영을 시작하면서 [⁶⁴Cu]PSMA-617 (400 μCi)을 마우스 꼬리정맥에 1분 동안 주사하며 소동물 영상장비를 이용하여 60분간 Dynamic PET영상을 획득하였다. 영상 재구성은 OSEM 방법을 이용하였다.

Results

1. PSMA-617 합성

Fmoc으로 protection된 펩타이드 화합물 B의 carboxylic acid를 TBTU/HOBT로 활성화 시킨 후 tert-butyl group 으로 protection된 화합물 A와 coupling 반응을 하였다. 이어서 piperidine으로 Fmoc을 deprotection하여 화합물 1을 59%의 수율로 얻었다(Scheme 1). 얻어진 화합물 1을 Fmoc



Scheme 1. Synthetic route of precursor for [⁶⁴Cu]PSMA-617.

으로 protection된 전구체 C와 TBTU/HOBT coupling 반응을 보낸 후 Fmoc을 deprotection하여 화합물 2를 84%의 수율로 얻었다. 합성물 2의 tert-butyl group을 TFA로 제거하고, 이어서 DOTA-NHS ester와 반응시켜 화합물 3을 70%의 수율로 합성하였다.

2. $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617 표지

PSMA-617 전구체와 $^{64}\text{CuCl}_2$ 를 90 °C에서 5분 동안 반응하였으며, $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617의 방사화학적 순도는 radio-TLC로 확인하였다. 전구체와 반응하지 않는 $^{64}\text{CuCl}_2$ 는 Rf 값 1.0에서 확인되었으며, $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA 617의 radio-TLC 결과는 Rf 값 0.5에서 하나의 피크만 나오는 것을 확인하였다. 이를 통해 방사성동위원소 표지 수율은 >99%로 진행되었음을 알 수 있었으며, 방사화학적 순도가 높은 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617를 얻어 실험에 사용하였다(Figure 1).

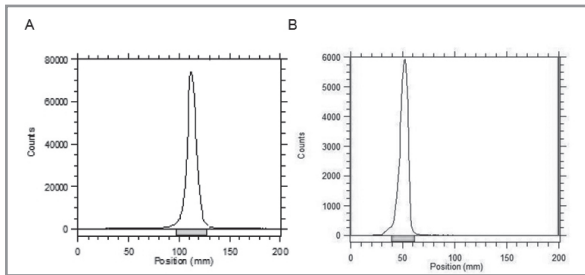


Figure 1. Chromatogram of $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617. (A) It is a radio-TLC peak image of free Cu-64: Rf=1.0 (B) It is a radio-TLC peak image of $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617: Rf=0.5

3. 시험관내 안정성 평가

$[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617 (100 $\mu\text{Ci}/50\text{--}100\ \mu\text{L}$)과 마우스 혈청 또는 사람 혈청, 생리식염수를 각각 500 μL 를 섞어준 후 37 °C에서 배양하였다. 혈청 안정성 테스트를 통하여, 동물에 투여하였을 때 표지된 방사성동위원소가 혈액 내에서 화합물로부터 떨어지지 않고, 안정하게 유지되고 있는 지를 확인할 수 있다. 0, 4, 24, 48 시간에 정량을 취하여 radio-TLC로 확인하였을 때, Radioactivity peak가 1개로 나타나는데, 이를 통해 방사성동위원소가 떨어지지 않고 안정하게 유지되고 있음을 확인하였다(Figure 2A). 따라서 마우스 혈청 또는 사람 혈청, 생리식염수는 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617의 안정성에 영향을 주지 않는 것을 알 수 있다.

4. 세포내 PSMA 발현 확인

PSMA 양성인 22RV1, LNCap 세포주와 PSMA 음성인 PC3,

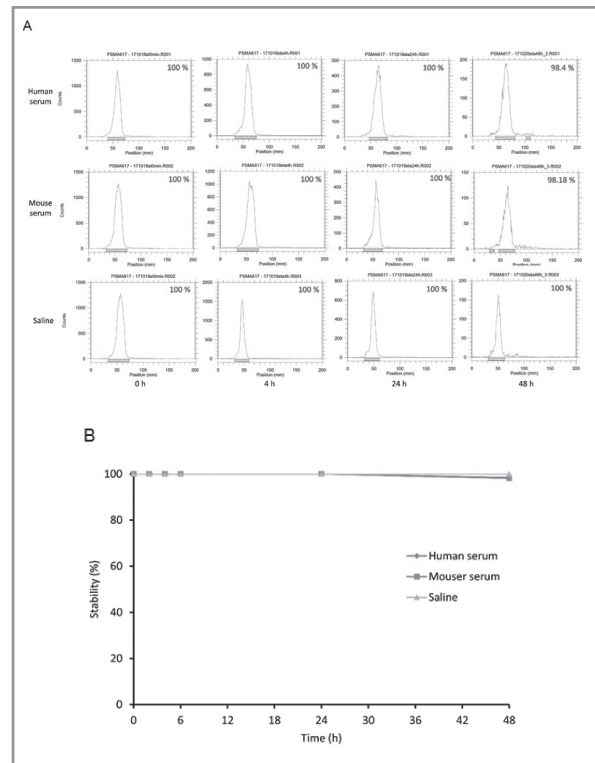


Figure 2. In vitro serum stability assay. (A) It is radio-TLC peak images of $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617 after incubation in human serum, mouse serum and saline during 0, 4, 24, 48 h. (B) It is a graph of stability (%) of $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617 after incubation in human serum, mouse serum and saline during 0, 4, 24, 48h.

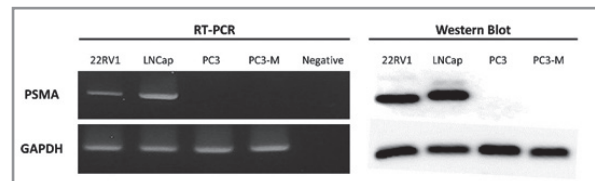


Figure 3. PSMA mRNA or protein expression level of human prostate cancer cell line 22RV1, LNCap, PC3 and PC3-M. (A) It is a RT-PCR band for PSMA mRNA expression. (B) It is a western blot band for PSMA protein expression. The GAPDH expression is used for control.

PC3-M 세포주의 유전자 발현과 단백질의 발현을 RT-PCR과 western blot을 통하여 확인하였다. PSMA 양성 세포주로 알려진 22RV1과 LNCap에서는 PSMA mRNA의 발현을 확인할 수 있었으나, 음성세포주인 PC3와 PC3-M 세포주에서는 유전자의 발현이 확인되지 않았다. 또한 PSMA의 발현을 western blot으로 확인하였을 때, 22RV1과 LNCap에서는 선명한 밴드를 확인할 수 있었으나, PC3와 PC3-M에서는 밴드가 나타나지 않는 것이 확인되었다. 따라서 PSMA 양성세포주인 22RV1을 다음 실험에 사용하였다(Figure 3).

5. 세포내 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617 섭취 연구

사람 전립선 암 세포주로 알려진 PC3, 22RV1, LNCaP 세포주와 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617을 반응시켰을 때, 0.5, 1, 2시간 때에 섭취율이 대략 8 %ID/mg까지 증가하는 것을 확인할 수 있다. 반응 후 24시간 때의 방사능 집적량은 LNCaP 세포주의 경우 30 %ID/mg까지 증가하는 것으로 보아 시간이 지날수록 세포 섭취율이 점점 증가하는 것을 예상할 수 있다. PSMA 양성 세포주로 확인된 LNCaP, 22RV1에서 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617의 섭취율은 PSMA 음성 세포주인 PC3보다 약 3배 가량 높은 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617이 PSMA에 선택적으로 결합하고 있음을 보여준다(Figure 4).

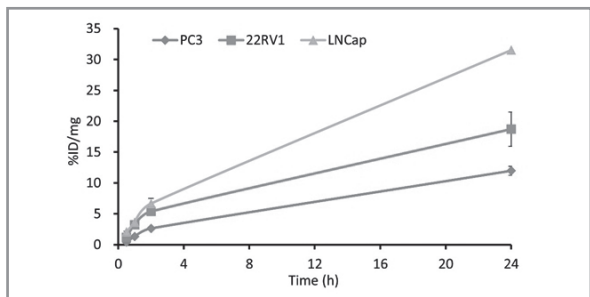


Figure 4. In vitro cell uptake assay. It is a time-dependent graph of $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617 in human prostate cancer cell line PC3, 22RV1 and LNCaP.

6. 정상마우스에서 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617의 분포

본 실험에서 사용한 투여용량 0.05 mCi/mouse에서 시험 기간 동안 동물의 사망사나 일반적인 특이 증상을 보이지 않았으며, 실험완료 후 실시한 부검에서도 어떠한 이상 증상을 보이지 않았다. 따라서 본 시험에서 사용한 용량에서의 흡수 및 분포는 정상적인 조건에서 나타난 결과라고 할 수 있다. 정상 수컷 마우스에서 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617은 대부분의 장기에서 주사 후 2시간에서 가장 높은 %ID/g을 보여주었다. 그러나 이러한 분포는 해당 장기에 선택적으로 이행되기 보다는 혈류에 의한 단순 확산에 의해 각각의 장기에 분포된 것으로 볼 수 있다. 따라서 4시간에서는 대부분의 장기에서 배출되어 대략 1-2 %ID/g만 잔류하였다. Lung, liver, intestine, kidney 등에서는 주사 초기에 높은 농도로 관찰되었지만 주사 후 시간이 경과하면서 점차 배출되는 결과를 보였다(Figure 5). Blood에서 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617은 주사 후 2시간에서도 1 %ID/g 이하의 낮은 섭취를 보여주어 빠르게 배출되는 경향을 보였다. 상기의 결과를 Figure 5와 Table 1에 요약하였다.

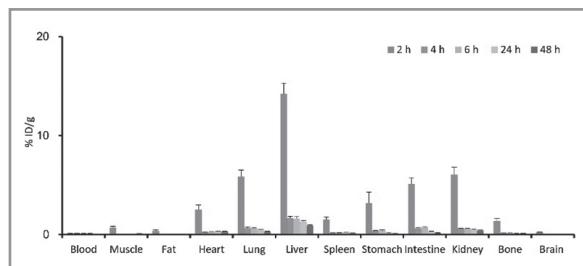


Figure 5. The biodistribution (%ID/g) of radioactivity in Balb/c (nu/nu) mice (n=4) after the injection of $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617 at 2, 4, 6, 24, 48h. The tissue uptake at 2 h is highest and decreased via liver and kidney during 48 h.

Table 1. The biodistribution (%ID/g) of radioactivity in Balb/c (nu/nu) mice (n=4) after the injection of $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617 at 2, 4, 6, 24, 48h.

Time (h)	2	4	6	24	48
Blood	0.11±0.02	0.11±0.00	0.10±0.01	0.09±0.01	0.06±0.00
Muscle	0.70±0.13	0.07±0.01	0.07±0.00	0.06±0.01	0.08±0.01
Fat	0.37±0.13	0.04±0.02	0.04±0.01	0.03±0.00	0.03±0.01
Heart	2.53±0.48	0.26±0.02	0.27±0.03	0.28±0.02	0.29±0.03
Lung	5.85±0.65	0.67±0.08	0.63±0.08	0.47±0.05	0.28±0.04
Liver	14.21±1.09	1.65±0.19	1.62±0.18	1.29±0.10	0.91±0.07
Spleen	1.52±0.27	0.18±0.03	0.17±0.03	0.20±0.02	0.13±0.02
Stomach	3.18±1.12	0.36±0.05	0.40±0.09	0.17±0.04	0.12±0.02
Intestine	5.13±0.62	0.62±0.08	0.75±0.05	0.30±0.03	0.17±0.02
Kidney	6.08±0.70	0.60±0.04	0.57±0.04	0.51±0.06	0.41±0.05
Bone	1.39±0.22	0.14±0.02	0.15±0.01	0.10±0.02	0.10±0.02
Brain	0.21±0.03	0.03±0.00	0.03±0.00	0.04±0.00	0.04±0.01

7. PET 영상 평가

22RV1 전립선 암 종양모델에 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617를 정맥주사한 후 30-60분의 PET/CT 영상을 확인하였다. 종양을 이식한 부위(T)에서 개체간의 차이는 있으나 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617의 종양 내 섭취 양상을 확인할 수 있었다(Figure 6A). 종양 대 근육 비율은 초기10분에서 60분까지 지속적으로 증가하는 것을 알 수 있다(Figure 6B). 또한, 22RV1 전립선 암 종양모델에 $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617를 정맥주사한 후 24시간과 48시간 때의 PET/CT 영상을 확인한 결과, $[^{64}\text{Cu}]$ PSMA-617이 전립선 암 종양 내에 48시간까지 머물러 있음을 확인할 수 있었다(Figure 6C).

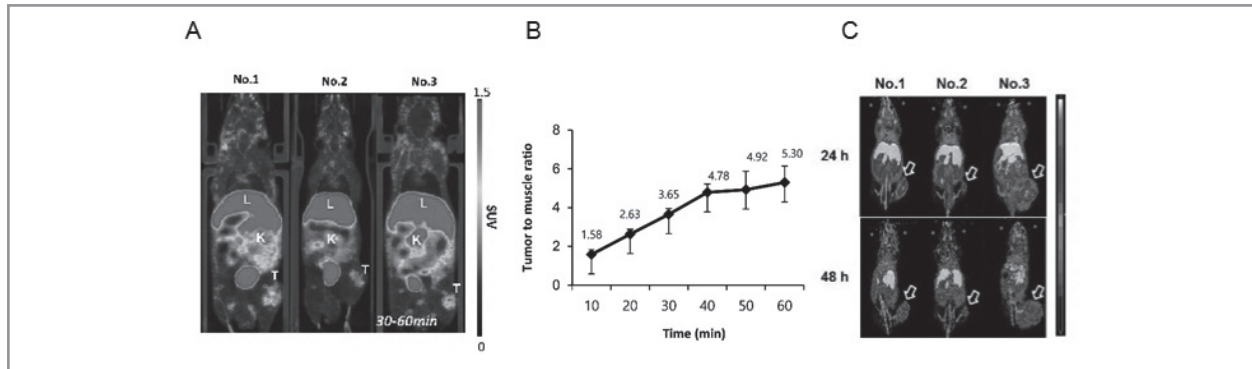


Figure 6. The PET/CT imaging of 22RV1 prostate xenograft tumor model after injection [^{64}Cu]PSMA-617. (A) It is a dynamic PET/CT image after 30-60 min of [^{64}Cu]PSMA-617 injection in 22RV1 prostate xenograft tumor model. (B) It is a time-dependent graph of tumor to muscle uptake ratio. (C) It is a static PET/CT image of [^{64}Cu]PSMA-617 injection in 22RV1 prostate xenograft tumor model at 24 h, 48 h.

Discussion

전립선 암은 조기 진단 및 전이성 여부를 확인하는 것이 매우 중요하다. 왜냐하면, 국소성 전립선 암 환자의 생존율은 95%이지만, 전립선 암 환자 중 80%에서 뼈 또는 전신으로 전이가 일어나고 그때의 생존율은 28%까지 감소하기 때문이다. 따라서, 전 세계적으로 전립선 암 진단제 개발 연구가 활발히 진행 중이다. 최근에는 전립선 암 조직에서 과발현 한다고 알려진 전립선 특이적 막 항원(PSMA)이 선택적 바이오마커로 주목받고 있다. 그 중, PSMA를 선택적으로 타겟팅하는 PSMA-617에 Ga-68, Lu-177, Sc-44과 같은 방사성 동위원소를 표지한 후, 진단 방사성의약품으로 이용 가능성을 확인하는 것이 연구추세이다. 본 논문에서는 가속기의 $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ 핵반응을 통하여 얻어지는 방사성동위원소 Cu-64를 PSMA-617에 표지하고 이에 대한 체내·외 안정성과 전립선 암 동물모델에서 PET/CT 영상실험으로 진단 유용성을 확인하였다. 그 결과, [^{64}Cu]PSMA-617은 높은 방사화학적 순도로 제조할 수 있었으며, 혈청 및 생체 내에서 높은 안정성이 확인되었으며, 전립선 암 동물모델에서 선택적으로 전립선 암을 영상화 하는 것을 확인할 수 있었다. 본 논문에서 사용한 방사성동위원소 Cu-64의 반감기는 12.7시간이며 PET 영상에 필요한 베타 플러스(β^+) 에너지를 약 61% 방출하는 동시에 비정거리가 짧은 베타 마이너스(β^-) 에너지를 39% 방출하기 때문에 진단 및 치료용 방사성동위원소로 사용될 수 있다. 또한, 동일한 화학적 특징을 가지는 방사성 동위원소 Cu-67의 반감기는 61.8시간으로 베타 마이너스 에너지만을 방출한다. 그러므로 방사성 동위원소 Cu-64 뿐만

아니라 치료용 핵종Cu-67을 PSMA-617에 표지 한다면 더 높은 치료효과를 기대할 수 있을 것이다. 나아가, 전립선 암 등의 동물모델과 전이성 전립선 암 동물모델을 이용한 연구를 진행하여 전이성 전립선 동물모델에서의 치료율과 생존율에 대한 평가 연구를 진행하고자 한다.

Conclusion

본 연구를 통하여 PSMA-617의 Cu-64에 대한 높은 표지 효율 및 혈청 내에서 높은 안정성을 확인하였다. 이를 바탕으로 PSMA 양성 세포주인 22RV1 전립선 암 동물모델에 주사하였을 때 타 장기에 영향을 크게 미치지 않고, 전립선 암을 선택적으로 영상화하는 것을 보여주었다. 본 연구결과를 바탕으로, [^{64}Cu]PSMA-617이 전립선 암 환자의 진단 및 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

Acknowledgments

이 논문은 2017년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 원자력연구개발사업((No.20172A2A6A02019904) 과 국책연구사업 (No. 50461-2018, 50462-2018)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. Richard MH. Screening for Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 2011;2013-2019
4. Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, Roche P, Murphy GP. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *Cancer* 1998;82:2256–2261.
5. Perner S, Hofer MD, Kim R, Shah RB, Li H, Möller P, Hautmann RE, Gschwend JE, Kuefer R, Rubin MA. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol* 2007;38:696–701.
6. Maurer T, Eiber M, Schwaiger M, Gschwend JE. Current use of PSMA-PET in prostate cancer management. *Nat Rev Urol* 2016;13:226–235
7. Kahn D, Williams RD, Manyak MJ, Haseman MK, Seldin DW, Libertino JA, Maguire RT. 111Indium-capromab pendetide in the evaluation of patients with residual or recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 1998;159:2041–2047.
8. Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C, Haberkorn U, Schäfers M, Essler M, Baum RP, Kulkarni HR, Schmidt M, Drzezga A, Bartenstein P, Pfestroff A, Luster M, Lützen U, Marx M, Prasad V, Brenner W, Heinzel A, Mottaghy FM, Ruf J, Meyer PT, Heuschkel M, Eveslage M, Bögemann M, Fendler WP, Krause BJ. German Multicenter Study Investigating ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J Nucl Med* 2017;58:85–90.
9. Afshar-Oromieh A, Malcher A, Eder M, Eisenhut M, Linhart HG, Hadaschik BA, Holland-Letz T, Giesel FL, Kratochwil C, Haufe S, Haberkorn U, Zechmann CM. PET imaging with a [⁶⁸Ga] gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013;40:486–495.
10. Cui C, Hanyu M, Hatori A, Zhang Y, Xie L, Ohya T, Fukada M, Suzuki H, Nagatsu K, Jiang C, Luo R, Shao G, Zhang M, Wang F. Synthesis and evaluation of [⁶⁴Cu]PSMA-617 targeted for prostate-specific membrane antigen in prostate cancer. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2017;15:40-52.