Methylenediphosphonate (MDP)-^{99m}Tc의 安定度에 關한 硏究

韓國에너지硏究所

金載祿・吳玉斗・朴敬培・具賢淑

= **Abstract** =

Studies on the Stability of Methylenediphosphonate-^{99m}Tc

Jae-Rok Kim, M.D., **Ok-Doo Awh**, M.D., **Kwung-Bae Park**, M.D. and **Hyeon-Sook Koo**, M.D.

Korea Advanced Energy Research Institute

To evaluate the *in-vivo* and *in-vitro* stability of methylene diphosphonate (MDP)-^{99m}Tc, relative ligand exchange rates in phosphate buffer between MDP-^{99m}Tc and human serum albumin(HSA), and between pyrophosphate(PYP)-^{99m} Tc and HSA have been measured. Gel permeation chromatography has also been carried out to estimate relative rates of ligand exchange between polysaccharide and the ^{99m}Tc-bone agents. The *in-vitro* stability was further correlated with its specific radioactivity.

The results indicated that the MDP-^{99m}Tc is more stable than the PYP-^{99m}Tc but less stable than MIDA-^{99m}Tc, HIDA-^{99m}Tc, and DTPA-^{99m}Tc etc. in refering to other data. In stability point of view, MDP-^{99m}Tc is considered to be a better bone agent than PYP-^{99m}Tc since MDP-^{99m}Tc can be accumulated at bone by a smooth transfer of ^{99m}Tc to hydroxyapatite, whereas in case of PYP-^{99m}Tc, most of the ^{99m}Tc is transferred to HSA before arriving to the hydroxyapatite.

Ⅰ. 序 論

Methylenediphosphonate(MDP)-^{99m}Tc의 bone imaging agent로써의 優秀性의 原因은 MDP-^{99m}Tc가 骨格에 集積될때에 hydroxyapatite와 MDP-^{99m}Tc間 리간드交換反應이 容易하기 때문이라고 한다[1].

萬若, 이 主張이 事實이라면 pyrophosphate(PYP)-^{99m}Tc나, MDP-^{99m}Tc는 이들보다 훨씬 强한 錯化劑로 생각되는 hydroxyapatite와의 交換만이 잘 일어나고 HSA와의 交換은 적게 일어나야 한다. MDP-^{99m}Tc가 PYP-^{99m}Tc보다 骨格診斷劑로써 優秀하다면 이 骨格集積理論에 立脚하여 考察할때 그 安定度定數가 큰 順序는 hydroxyapatite-^{99m}Tc>MDP-^{99m}Tc이어야 하며 HSA와의 리간드交換反應速度가 큰 順序는 위 順序의 逆이 되어야 한다. 따라서 이 骨格集積理論의 正當化를 爲하여는 PYP-^{99m}Tc, MDP-^{99m}Tc등의 HSA, polysaccharide, hydroxyapatite등과의 리간드交換反應速度의 定量的測定데이타가 必要하다. 旣報된 몇 가지 文獻[1,2]에는 使用한 ^{99m}Tc化合物의 放射化學的純度에 關한 仔細한 檢討가 없었기 때문에 交換反應速度에 對한 定量的比較를 通한 相對的安定度의 評價를 어렵게 하고 있다. 特히 比較的 不安定한 것으로 알려진 MDP-^{99m}Tc를 使用한 리간드交換反應에서는 더욱 그러하다. 더구나 文獻中의 實驗에서는 PYP-^{99m}Tc나 MDP-^{99m}Tc는 醫療用 卽席標識킷트들을 그대로 使用하였는데 實際로 그와같은 킷트들은 錯化劑와 $SnCl_2$의 量이나 몰比率이 各己 다르게 만들어질 뿐만 아니라 ascorbate等 安定劑도 상당량 含有하는 경우가 있다. 또 $Na^{99m}TcO_4$溶液을 使用하여 卽席標識할때에 그 標識收率도 킷트의 製造元이나 製造日로부터의 經過程度에 따라 큰 差異를 나타낼 수 있다.

本 硏究에서는 RCP 100%(卽 標識收率 100%)인 MDP-^{99m}Tc 및 旣知 RCP의 PYP-^{99m}Tc를 使用하여

몇가지 리간드交換反應을 進行시키고 速度論的으로 考察함으로써 그 結果를 文獻値와 對比하여 討議하였다.

Ⅱ. 實　　驗

1) 機器 및 材料

○우물型 감마 計測器 ; Polyspec Research Spectometer, Baird, Atomic

○Fraction Collector; Mini型, 三田村理硏.

○Sephadex G-25, fine, Pharmacia, Sweden

○MDP-^{99m}Tc; MDP(Sigma) 12.5 mg, $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (E. Merck) 0.9 mg 등을 Ar 개스雰圍氣下에 섞고 그 용액의 pH를 4.8~5.0으로 調節한 다음 凍結乾燥한 卽席標識바이알에 $Na^{99m}TcO_4$(KAERI) 1 ml(≈5 mCi)를 加해 녹인다음 1 M 食酢酸鹽 緩衝溶液과 왓트만 3 mm 종이를 쓰는 크로마토그래피[3]로 그 RCP를 檢定한 것 .

○pyrophosphate(PYP)-^{99m}Tc; PYP(E. Merc) 5 mg을 $SnCl_2 \cdot 2H_2O$(E. Merck) 0.14 mg와 Ar 개스雰圍氣下에서 섞고 그 溶液의 pH를 5.5로 調節한 다음 凍結乾燥하여 만든 ^{99m}Tc 卽席標識바이알(KAERI)에 $Na^{99m}TcO_4$(KAERI) 溶液 1 ml(≈5 mCi)를 加해 녹이고 85% MeHO와 왓트만 1호 종이 및 0.85% NaCl과 왓트만 1호 종이를 各各 주합하여 사용하는 크로마토그래피[4]로 그 RCP를 檢定한 것.

2) 方　法

(1) HSA와 MDP-^{99m}Tc間 리간드 交換反應

다음 두 方法에 따라 實驗하였다[1].

가) 方法(A)

45 mg HSA/ml의 HSA 溶液 6 ml를 燐酸鹽緩衝溶液(pH 7.4, 1,179 g/l KH_2PO_4 및 4.30 g/l $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 6 ml와 混合한 다음 여기에 RCP 100%인 MDP-^{99m}Tc 溶液 10 μl를 加하고 잘 섞은 直後부터 5분, 10분, 30분마다 3 ml씩 取해내어 1.5 g의 $(NH_4)_2SO_4$가 들어있는 試驗管에 加해 흔들어서 蛋白質이 沈澱되면 0.22 μm의 membrane을 써서 여과하고 濾液의 放射能을 測定하였다. 그 測定値와 未處理 反應液의 放射能測定値를 對比하여 리간드交換率을 求하였다(Fig. 1).

나) 方　法(B)

RCP 100%인 MDP-^{99m}Tc 溶液 10 μl를 12 ml의 燐酸鹽緩衝溶液(方法 A의 것과 같음)에 加한다음 5, 10, 30분마다 2 ml씩 取해내어 2 ml의 HSA 溶液(方法 A의 것과 같음)에 섞은 즉시 이 混合液 3 ml를 1.5 g의 $(NH_4)_2SO_4$가 들어있는 試驗管에 넣고 흔들어 蛋白質이 沈澱되면 方法(A)와 같이 放射能을 計測하여 交換率을 求하였다(Fig. 1).

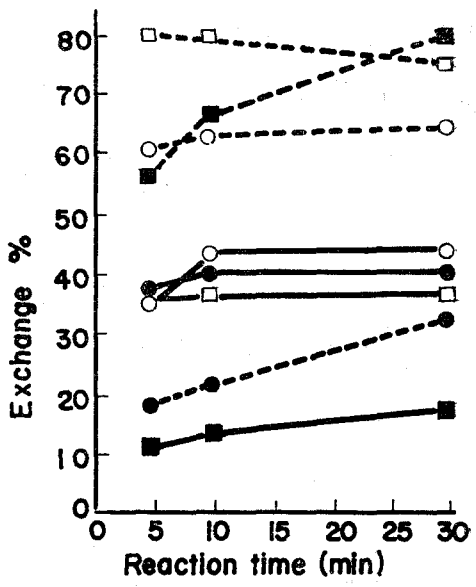

Fig. 1. Relative Rates of Ligand Exchanges
●, ■ : Mode A, ○, □ Mode B,
○, ● : MDP-^{99m}Tc⟷HSA, □, ■ : PYP-^{99m}Tc ⟷HSA, —— : Present study, ····· : in ref.[1]

Table 1. Gel Permeation Chromatography of Some ^{99m}Tc Chelates

Compounds	% in Chelate	% in $^{99m}TcO_4$	% Bound to Gel
MDP-^{99m}Tc#	53	0.2	47
MDP-^{99m}Tc##	35	30.4	65
PYP-^{99m}Tc*	20	0.04	80
PYP-^{99m}Tc**	9.7	0.3	90
MIDA-^{99m}Tc**	94	1	6±4
HIDA-^{99m}Tc**	98	1	2±2
DTPA-^{99m}Tc**	97	0.95	2±2

RCP; 100%, ## RCP; 70%, * RCP; 50%, ** Data in ref[6].

(2) 젤 浸透 크로마토그래피에 依한 流出率 測定[5]

Sephadex 젤(G-25) 5 g을 증류수 40 ml에 懸濁시켜 1×25 cm의 유리대롱에 넣어 그 높이가 25 cm되

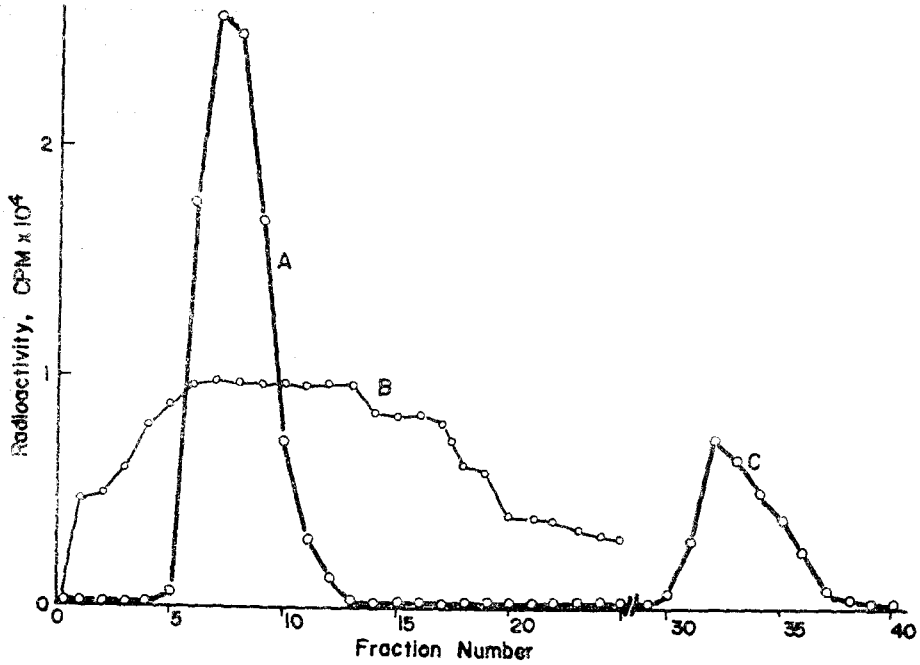

Fig. 2. Separation Pattern in Sephadex (G-25) Gel Permeation Chromatography of MDP-^{99m}Tc
A; MDP-^{99m}Tc eluted B; Radioactivity distribution in column (adsorbed) C; $^{99m}TcO_4^-$ eluted

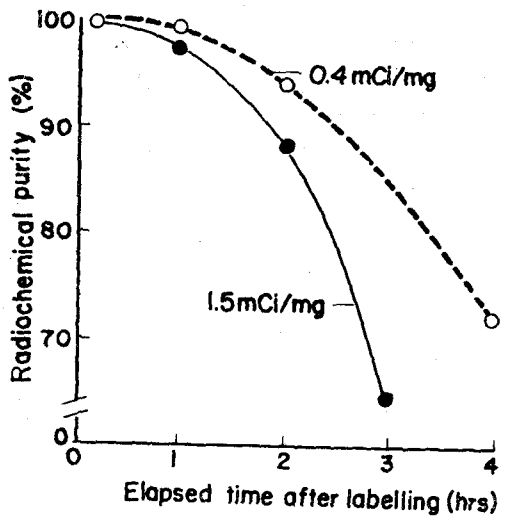

Fig. 3. Decrease of radiochemical purity of MDP-^{99m}Tc with its specific activity

게 맞추었다. 0.85% NaCl 水溶液을 充分히 흘려내리고 나서 RCP 100%인 MDP-^{99m}Tc 溶液 0.2 ml를 넣고 다시 0.85% NaCl 溶液으로 0.45 ml/min의 용출速度로 흘려내렸다. 0.7 ml씩 받은 各試驗管의 放射能을 計測하여 그 測定値와 原來의 MDP-^{99m}Tc의 放射能을 關聯시켜 流出率을 求하였다(Fig. 2 및 Table1).

(3) 比放射能에 따르는 體外 安子度

比放射能이 다르게 標識한 MDP-^{99m}-Tc를 20~25°C의 室溫下에 保管하면서 一定時間 間隔마다 그 放射化學的純度를 測定하여 安定度를 보았다(Fig. 3).

Ⅲ. 結果 및 討議

1) HSA와의 리간드 交換反應

Fig. 1에서 보는 바와같이 方法(A)에 依한 交換率은 文獻値[1]보다 높은反面, 方法(B)의 結果는 文獻値[1]보다 낮아서 結局, 方法間의 交換率差異가 적었지만 方法(B)에 依한 交換率이 方法(A)의 그것보다 큰 경향만은 文獻內容과 一致하였다.

方法間差異가 크지 않은 原因은 確實하지 않으나, Schümichen等[1]도 그들이 얻은 큰 隔差에 對해 자세한 討議를 하지 않았다는 사실을 고려할때 本實驗에서 얻은 結果가 더 合理的이라고 생각된다.

PYP-^{99m}Tc와 HSA間 交換反應에서도 方法(B)에서의 交換率이 方法(A)의 그것에 比해 컸으나 一般的으로 MDP-^{99m}Tc 때에 比해 交換率이 작다. 그러나 文獻[1]의 結果에 依하면 PYP-^{99m}Tc 때가 MDP-^{99m}Tc 때

보다 오히려 交換速度가 훨씬 커서 反應開始 30分後에의 交換率을 보였다. 이와 같이 相反된 結果가 얻어진 原因은 本硏究에서 使用한 PYP-^{99m}Tc의 RCP가 50%에 不過했던 事實에 연유하는 것으로 본다. MDP-^{99m}Tc 때의 例로보아 RCP가 작을 때에는 交換速度가 減少되었다. 따라서 PYP-^{99m}Tc때도 RCP 100%인 것을 使用할 경우 文獻値와 같은 結果가 얻어질 것으로 보인다. 그렇다면 MDP-^{99m}Tc보다 PYP-^{99m}Tc가 HSA와의 交換速度는 커져서 PYP^{99m}Tc가 MDP-^{99m}Tc보다 不安定하다고 할 수 있다.

2) 젤 浸透 크로마토그래피

Fig. 2가 보이는 바와 같이 MDP-^{99m}Tc(또는 PYP-^{99m}Tc)에 비해 $^{99m}TcO_4^-$는 훨씬 늦게 流出되므로 分離效果는 매우 좋다.

Table 1에서 보는 바와같이 流出率은 MDP-^{99m}Tc가 PYP-^{99m}Tc보다 크므로 MDP-^{99m}Tc가 더 安定하다고 보며 HSA와의 리간드 交換에서의 安定度와 一致한다. P.E. Valk 等[5]에 의하면 ^{99m}Tc 錯物은 polysaccharide와도 리간드交換을 이르킨다고 하며 一部 流出되지 않는 部分은 리간드交換에 의한 것으로 본다.

PYP-^{99m}Tc의 경우 文獻中[6] 流出率이 9.7%인데 比해 本硏究結果에서는 20%이다. 10% 가량 더 높은 理由는 PYP-^{99m}Tc의 RCP와 關係된다고 본다. MDP-^{99m}Tc의 경우 RCP가 낮은것을 쓰면 流出率의 減少가 일어나는 것으로 보아 文獻値 9.7%는 PYP-^{99m}Tc의 RCP가 本 硏究에서 使用한 PYP-^{99m}Tc의 RCP(50%)보다 더 낮았던 事實에 기인한다고 생각된다.

RCP 100%인 MDP-^{99m}Tc의 流出率이 53%인데 比해 MIDA-^{99m}Tc, HIDA-^{99m}Tc, DTPA-^{99m}Tc 等의 流出率은 各各 94%, 98%, 97%임으로[6] MDP-^{99m}Tc는 이들 3종의 化合物보다는 不安定하나 PYP-^{99m}Tc보다는 安定하여 그 利用에 있어서도 有利하다고 생각된다.

3) 체외 안정도와 比放射能

Fig. 3에 나타낸 바와 같이 MDP-^{99m}Tc의 比放射能이 높을수록 또 保管時間이 길어질수록 그 RCP 減少가 심하였다. Self radiolysis는 放射性 標識化合物에서 一般的으로 觀察되는 현상인바 實際로 MDP-^{99m}Tc의 경우 比放射能은 2 mCi/mg에서 20 mCi/mg의 것을 使用하므로 可能한 限 標識反應한 直後에 使用해야 좋을 結果를 얻게 된다는 事實을 確認하였다.

Ⅳ. 結　　論

HSA와의 리간드交換反應速度 및 젤 浸透크로마토그래피에서의 polysaccharide와의 리간드交換率等으로 보아 MDP-^{99m}Tc는 PYP-^{99m}Tc보다 安定하였다.

따라서 PYP-^{99m}Tc는 HSA와의 리간드交換이 너무 심하여 bone agent로는 MDP-^{99m}Tc보다 不適하며 MDP-^{99m}Tc는 適當히 安定하여 hydroxyapatite까지 到達된 後에 그것과 리간드交換하여 骨格에 集積된다는 理論을 뒷받침해 준다.

比放射能이 높을 경우 MDP-^{99m}Tc는 室溫下에서도 不安定하므로 標識卽時 使用해야 한다.

參 考 文 獻

1) C. Schümichen, T. Körgen and G. Hoffman: *Relationship between Complex stability and Biokinetics of ^{99m}Tc-Phosphate Compounds, Nucl. Med., 19(1), 7—10, 1980.*

2) C.H. Paik, F. Vieras, W.C. Eckelman and R.C. Reba: *Exchange Labelling of ^{99m}Tc-Labelled Transferrin, J. Radioanal. Chem., 60(1), 281-289, 1980.*

3) J.R. Kim et al.: *A Study cn Effetive Applications of Methyenediphosphonate-^{99m}Tc, Korean J. Nucl. Med., 16:55, 1982.*

4) J.R. Kim et al.: *Studies on the Formation of Pyrophosphate-^{99m}Tc Complex, J. Koroan Nucl. Soc., 12(1), 19-28, 1980.*

5) P.E. Valk, C.A. Dilts and J. McRae: *A Possible Artifact in Gel Chromatography of Some ^{99m}Tc Chelates, J. Nucl. Med., 14(4), 235-237, 1973.*

6) N.D. Heindel, H.D. Burns, T. Honda and L.W. Brady: *Chem. Radiopharm., p. 194, Masson Publishers, New York, 1977.*