大韓核醫學會誌 : 第29卷 第 1 號 1995

L-3-[^{123}I]iodo-α-methyltyrosine 합성과 9L Glioma 이식 백서 분포조사

원자력병원 싸이클로트론응용연구실

양승대 · 임상무 · 우광선 · 정위섭 · 전권수
서용섭 · 임종석 · 박 현 · 윤용기 · 이종두

= **Abstract** =

Synthesis of L-3-[^{123}I]iodo-α-methyltyrosine and Biodistribution in 9L Glioma Bearing Rats

Seung-Dae Yang, Sang-Moo Lim, M.D., **Kwang-Sun Woo, Wee Sup Chung**
Kwon-Soo Chun, Ph.D., **Yong-Sup Suh, Jong-Seok Lim,** Ph.D.
Hyon Park, Yong-Ki Yun and **Jong-Doo Lee**

Department of Cyclotron Application Laboratory, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

L-3-[^{123}I]iodo-α-methyltyrosine([^{123}I] IMT) was synthesized by electrophilic radioiodination using chloramine-T and Iodobead in phosphate buffered solution. And the biodistribution was examined in 9L glioma bearing rats. The radiosynthesis of [^{123}I]IMT with iodobead was simpler and higher in radiochemical yield(88%) than the method using chloramine-T(83%) as radioiodinating reagent. The highest yield was obtained from the reaction using 1 piece of Iodobead, 200μg α-methyltyrosine in 100μl phosphate-buffered solution(pH 5.5) and the reaction was completed in 7min.

24 hours after the injection, the biodistribution in 9L glioma transplanted rats revealed the *in vivo* deiodination, the excretion via kidney, and 3 times higher uptake in the tumor than normal brain. These results suggest the promising clinical use of [^{123}I] IMT in the various malignancies.

Key Words: Iodo-α-methyltyrosine, Na^{123}I, Chloramine-T, Iodobead, Brain Tumor

서 론

각종 악성종양에서 단백질합성및 핵산대사는 정상조직보다 훨씬 빨라 양성자방출 단층촬영술(Positron Emission Tomography)과 ^{11}C($T_{1/2}$=20min.)으로 표지된 아미노산을 이용하여 뇌종양 등에서 연구가 진행되고 있다[1]. 그러나 양전자방출 단층촬영기(PET)와 싸이클로트론이 고가이므로 국내 핵의학계에서 많이 보유하고 있는 SPECT(Single Photon Emission Tomography)를 이용한 이들 지표의 평가를 위한 새로운 방사성추적자의 개발이 필요하다.

Tyrosine은 단백질의 합성외에도 갑상선호르몬, 신경전달물질등의 합성에 이용되는 필수아미노산이다. Tyrosine의 유사체인 L-3-[^{123}I]iodo-α-methyltyrosine([^{123}I]IMT)은 췌장암, 흑색종, 뇌종양등에 섭취율이 높은 것으로 알려져 있어 이의 임상이용이 기대되고 있다[2]. 더구나 ^{123}I의 반감기가 13.2시간으로 대사속도가 비교적 느린 경우 지연영상을 얻을 수 있는 장점이 있으며, iodine의 표지반응이 간단하고, 잘 알려져 있어 각종 표지화합물 개발이 용이하고, 감마에너지가 SPECT에 적합하여 활발한 이용이 기대된

다.

L-α-methyltyrosine(AMT)의 요오드화 반응은 친전자성 치환반응이 이용되고 있으나[3] 반응용액의 pH, 반응시간, 반응에 이용되는 산화제의 양등 반응조건이 잘 알려져 있지않다.

따라서 본 연구에서는 원자력병원에 설치된 MC-50 싸이클로트론으로 생산한 ^{123}I으로 AMT를 표지하는 최적 조건을 찾고, 9L glioma 이식 백서에 정맥주사 후 체내동태를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 시약 및 기기

L-α-methyltyrosine(Sigma, St.. Louis, USA)
Chloramine-T(Sigma, St. Louis, USA)
Sodium metabisulfite(Ishizu, Japan)
Iodobead(N-chlorobenzensulfonamide coated bead, Pierce, IL., USA)
$Na^{123}I$(한국원자력연구소 부설 원자력병원, Seoul, Korea)
HPLC System(Waters, MA, USA)
Waters 510pump
Waters U6K injector
Waters 486 UV detector
Steffi 91SN01 RI detector(Raytest, Germany)
μ-Bondapak C_{18} 4×300mm column
Radial-pak C_{18} 8×200mm column
Animal whole body counter(Aloka, Japan)

2. Chloramine-T를 이용한 표지

200μg의 AMT를 pH 7.5 phosphate buffer 100μL에 녹이고, $Na^{123}I$ 10mCi(0.01N NaOH 100μL)와 섞은 후 chloramine-T 500μg을 가하여 상온에서 반응시켰다[4,5]. 15분간 반응시킨 후 10% sodium metabisulfite 50μL를 가하여 반응을 정지시켰다. 적정한 chloramine-T의 양을 결정하기 위하여, chloramine-T의 양을 50μL에서 200μL까지 변화시키며 표지수율의 변화를 관찰하였다. 반응이 끝난 후 반응용액을 HPLC에 주입하고 수율을 결정하였다. 용매는 MeOH:H_2O:AcOH=40:60:1의 혼합용액을 사용하였고, 유속은 1mL/min.로 하였다[3].

3. Iodobead를 이용한 표지

$Na^{123}I$ 10mCi(in 0.01N NaOH 100μL)에 Iodobead 1개를 넣어 iodide를 산화시키고, AMT 200μg을 녹인 pH 5.5 phosphate buffer 100μL를 가하여 상온에서 반응시켰다. 7분 후 Iodobead를 제거하여 반응을 정지시켰다.

Iodobead의 갯수, AMT의 양, pH, 반응시간의 변화에 따른 표지수율을 검정하였다. 검정방법은 HPLC를 사용하였으며 그 조건은 chloramine-T 표지법에 사용한 조건과 같았다.

4. 9L Glioma 이식 백서 장기분포

9L glioma cell을 10% FBS를 첨가한 RPMI1640 배양액에 넣어 37℃ 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양한 9L glioma cell 1×10^6개를 Sprague Dawley rat의 우측 전두엽에 Stereotaxic inoculator를 이용하여 주사하였다. 암세포 이식 8일 후 500μCi IMT를 꼬리정맥에 주사하여 4시간 및 24시간 후에 장기분포와 이식 뇌종양 섭취를 관찰하였다.

결 과

1. Chloramine-T 표지법

Chloramine-T의 양에 따른 표지수율의 변화는 Fig. 1과 같다. IMT의 방사화학적 수율은 chloramine-T가 50μg일 때 84%로 가장 좋았고 chloramine-T의 양이 많아짐에 따라 방사화학적 수율은 낮아지고 부생성물의 양이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 요오드화반응과 염소화반응이 동시에 일어난 결

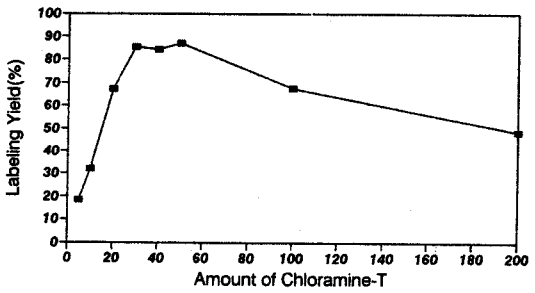

Fig. 1. The variation of the labeling yield of L-3-[I -123]iodo-alpha-methyl tyrosine depending on the amount of Chloramine-T.

과로 추측된다.

2. Iodobead 표지법

Iodobead는 N-chlorobenzenesulfonamide로 coating된 polystyrene bead로써 단백질의 요오드화반응을 위하여 M.A.K. Markwell에 의하여 개발되었다. Iodobead는 하나당 0.55μmole을 산화시킬 수 있으며, 이는 gentle한 요오드화반응 시약으로 민감한 분자의 요오드화반응시 산화에 의한 손상을 줄일 수 있는 장점이 있다. 또한 반응이 끝난 후 bead를 tweezer로 제거하면 반응을 정지시킬 수 있어 매우 편리하다.

Iodobead 반응시 반응용액의 pH에 따른 방사화학적 수율의 변화는 Fig. 2와 같다. [^{123}I]IMT의 방사화학적 수율은 pH 5.5에서 가장 좋았으며 pH가 증가함에 따라 감소하였으나 pH 6.5 이상이되면 다시 증가하는 양상을 보여주고 있다.

Fig. 3은 AMT의 양에 따른 표지수율의 변화를 보

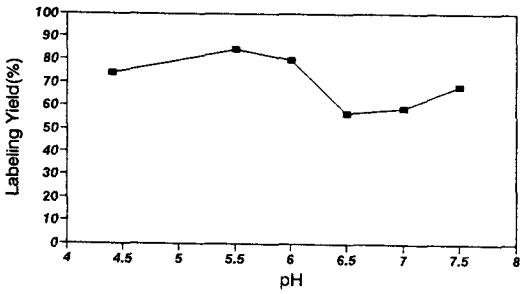

Fig. 2. The variation of the labeling yield of L-3-[I -123]iodo-alpha-methyl tyrosine depending on the pH of phosphate buffer.

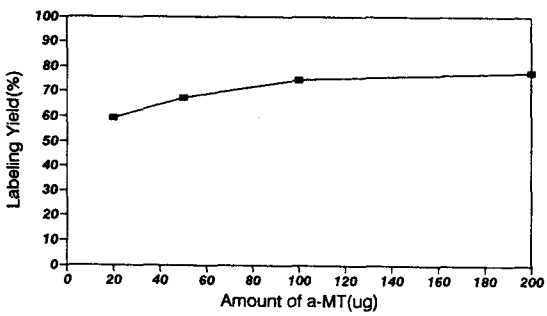

Fig. 3. The variation of the labeling yield of L-3-[I -123]iodo-alpha-methyltyrosine depending on the amounts of L-alpha-methyltyrosine.

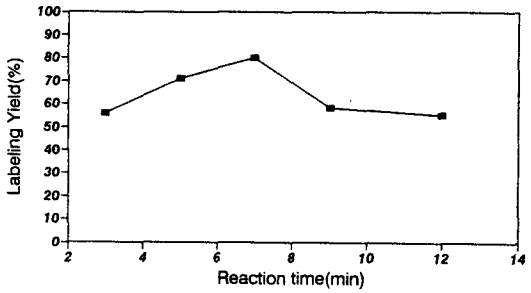

Fig. 4. The variation of the labeling yield of L-3-[I -123]iodo-alpha-methyltyrosine depending on the reaction time.

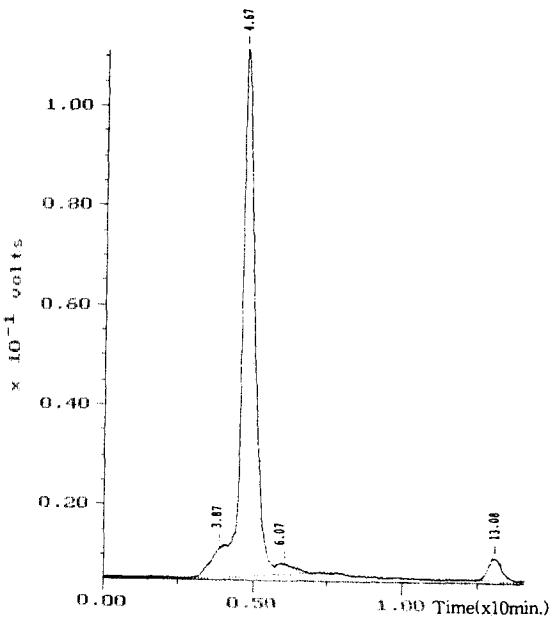

Fig. 5. The HPLC chromatogram of the reaction mixture of L-3-[^{123} I]iodo-α-methyltyrosine using Iodobead as iodinating reagents.

여주고 있다. 즉 AMT의 양이 증가함에 따라 표지수율이 증가하는 양상을 보여주고 있다. 그러나 200μg 이상의 AMT는 phosphate buffer 용액 100μL에 녹지 않아 더 이상 증가시킬 수 없었다. 반응시간에 따른 수율의 변화를 측정한 결과 반응시간이 길어짐에 따라 수율이 증가하였으나 약 7분후 수율이 점점 감소하였다. 반응 시간에 따른 수율의 변화는 Fig. 4와 같다.

동물실험을 위한 [^{123}I]IMT의 합성은 Iodobead 1개, AMT 200μg/100mL phosphate buffer, Na^{123}I

Table 1. Biodistribution of L-3-[^{123}I]iodo-α-methyltyrosine in 9L Glioma Bearing Rats

Organs	4hours		24hours	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Blood	0.33	0.15	0.18	0.01
Liver	0.17	0.07	0.10	0.05
Spleen	0.12	0.04	0.08	0.00
Kidney	0.84	0.24	0.35	0.05
Sternum	0.07	0.03	0.05	0.01
Femur	0.08	0.02	0.06	0.00
Muscle	0.07	0.03	0.03	0.02
Thyroid	1.13	0.21	2.53	0.27
Lung	0.18	0.04	0.12	0.02
Stomach	0.52	0.15	0.70	0.06
Brain	0.03	0.01	0.02	0.00
Brain tumor	0.07	0.01	0.06	0.01

10mCi를 pH 5.5에서 7분간 반응시켜 사용하였다. 반응이 끝난 후[^{123}I]IMT는 HPLC를 이용하여 분리하였으며 사용한 컬럼과 용매는 Waters radial-pak C_{18} 8×300mm, MeOH:H_2O:AcOH=40:60:1의 혼합용매를 사용하였다. HPLC를 이용하여 반응용액을 분석한 결과는 Fig. 5와 같다. 분취한 [^{123}I]IMT는 용매를 완전히 증발시키고 생리식염수에 녹인 후 0.22μm filter로 여과하여 사용하였다.

3. 9L Glioma 이식 백서 체내 동태

9L glioma 이식백서에서의 [^{123}I]IMT 주사후 4시간 및 24시간의 체내분포는 Table 1과 같다. 주사후 4시간에 신장의 방사능이 높았으며 24시간에 갑상선 및 위의 방사능이 높았다. 주사 후 24시간에 이식 뇌종양에 정상 뇌조직의 3배 섭취가 관찰되었다.

고 찰

[^{123}I]IMT는 췌장암 촬영에 이용된 이래[2], 뇌종양에도 섭취가 증가됨이 보고되었으며[6], 나아가 중성 아미노산 세포막 수송체계의 표식자로도 이용되고 있다[4]. 뇌조직에서 [^{123}I]IMT는 methylation되지 않은 3-iodotyrosine보다 4배 정도 높은 섭취를 보이며[7], 혈뇌장벽을 쉽게 통과하여 정상 뇌조직과 뇌종양의 세포막 수송체를 통하여 섭취된다. [^{123}I]IMT의 대사산물은 혈뇌장벽을 통과하지 못하기 때문에 뇌에 섭취된 [^{123}I]IMT는 대사되지 않는 것이다. [^{123}I]IMT는 특이적인 t-RNA가 발견되지 않아서 일반적으로 단백질합성에는 이용되지 않는 것으로 인식되고 있으나, 아미노산의 세포내 섭취율이 종양에서 정상보다 높은 점이 임상적으로 이용 가능한 면이다. 또한 세포내 섭취후 단백질 합성에 이용되는 것은 상대적으로 느린 반응이어서 초기의 세포내 섭취율이 더 중요한 인자인 PET나 SPECT 촬영시에는 그 의미가 적다고 할 수 있다.

[^{123}I]IMT의 뇌종양 섭취가 혈뇌장벽의 파괴에 의한 결과일 수도 있으나, 혈뇌장벽의 파괴에 의한 섭취는 시간의 경과에 따른 종양대 정상뇌 방사능 비가 계속 증가하는데 비하여, [^{123}I]IMT에서의 종양대 정상뇌 방사능 비는 거의 일정하며 [^{123}I]IMT의 섭취가 포화가능함이 보고되어 있다[5,6,8]. 따라서 공복시에 [^{123}I]IMT를 주사하고 촬영할 것이 권고되고 있다. [^{123}I]IMT의 PET에서의 약역학 실험 결과를 보면 주사 후 15~60분에 촬영하는 것이 좋은 시점일 것으로 제시되고 있다[8]. 시간의 경과에 따른 종양대 정상 뇌 조직의 방사능 비가 큰 차이가 없는 것으로 보고되어 있어 종양 및 정상 뇌조직에서의 제거율은 비슷할 것으로 추측되나, 저자들의 측정치는 24시간에 더 좋은 비율을 보여 24시간 지연영상도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. [^{123}I]IMT의 lipophilicity를 증가시키면 뇌 및 종양 조직에의 섭취가 증가된다는 보고도 있어[9,10], 이러한 유도체들의 ^{123}I표지화합물을 이용한 연구가 활발히 진행될 것으로 기대된다.

요 약

Tyrosine의 유도체인 [^{123}I]IMT를 각종 악성종양의 SPECT에 이용하기 위하여 표지시 반응조건과 뇌종양 이식 백서에서의 체내 동태를 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

AMT의 ^{123}I 표지에 chloramine-T 보다 Iodobead를 이용하는 것이 훨씬 간편하고 수율이 높았으며, Iodobead 1개, AMT 200μg/100μL phosphate buffer, pH 5.5, 상온에서 7분간 반응시키는 것이 최적 반응조건이었다.

9L glioma 이식 백서 체내동태는 [^{123}I]IMT가 신장으로 배설됨과 체내에서 탈요오드 반응이 일어남이 추측되었고, 정상조직의 3배 방사능 섭취가 관찰되어, 각종 뇌종양의 진단 및 치료 후 경과 관찰에 이용 가능성이 보여 임상연구의 진행이 기대된다.

REFERENCES

1) Bergström M, Collind VP, Ehrin E, et al.: *Discrepancies in brain tumor extent as shown by computed tomography and positron tomography using ^{68}Ga-EDTA, ^{11}C-glucose, and ^{11}C-methionine. J Comput Assit Tomogr 7:1062-1066, 1983*

2) Tisljar U, Kloster G, Ritzl F, Stocklin G: *Accumulation of radioiodinated L-α-methyltyrosine in pancreas of mice: Concise communication. J Nucl Med 20:973-976, 1979*

3) Knust EJ, Dutschka K, Machulla HJ: *Radiopharmaceutical preparation of 3-^{123}I-α-methyltyrosine for nuclear medical application. J Radioanal Nucl Chem Letter 144:107-113, 1990*

4) Kawai K, Fujibayasi Y, Saji H, Konishi J, Kubodera A, Yokoyama A: *Monoiodo-D-tyrosine, an artificial amino acid radiopharmaceutical for selective measurement of membrane amino acid transport in the pancreas. Med Biol 17:369-376, 1990*

5) Biersack HJ, Coenen HH, Stocklin G, Reichmann K, Bockisch A, Oehr P, Kashab M, Rollmann O: *Imaging of brain tumors with L-3-[^{123}I]iodo-α-methyl tyrosine and SPECT. J Nucl Med 30:110-112, 1989*

6) Langen KJ, Roonsen N, Coenen HH, Kuikka JT, Kuwert T, Herzog H, Stocklin G, Feinendegen LE: *Brain and brain tumor uptake of L-3-[^{123}I]iodo-α-methyltyrosine: Competition with natural L-amino acids. J Nucl Med 32:1225-1228, 1991*

7) Kawai K, Fujibayashi Y, Saji H, Yonekura Y, Konishi J, Kubodera A, Yokoyama A: *A strategy for the study of cerebral amino acid transport using I-123 labelled amino acid radiopharmaceutical: 3-Iodo-alpha-methyl-L-tyrosine. J Nucl Med 32:819-824, 1991*

8) Langen KJ, Coenen HH, Roosen N, Kling P, Muzik O, Herzog H, Kuwert T, Stocklin G, Feinendegen LE: *SPECT studies of brain tumors with L-3-[^{123}I]iodo-α-methyltyrosine: Comparison with PET, ^{124}IMT and first clinical results. J Nucl Med 31:281-286, 1990*

9) Winchell HS, Baldwin RM, Lin TH: *Development of I-123 labelled amines for brain studies: Localization of I-123 iodophenylalkyl amines in rat brain. J Nucl Med 21:940-946, 1980*

10) Krummeich C, Holschabch M, Stöcklin G: *Direct n.c.a. electrophilic radioiodination of tyrosine analogues; their in vivo stability and brain-uptake in mice. Appl Radiat Isot 45(9): 929-35, 1994*