

농양 진단을 위한 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomes의 제조

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과,¹ 원자력의학원 사이클로트론응용연구실,² 핵의학과³

홍준표¹ · 오옥두¹ · 김현석¹ · 이은숙¹ · 이태섭^{1,2} · 최태현¹ · 최창운³ · 임상무³

Preparation of ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomes for Imaging of the Focal Sites of Infection

Jun Pyo Hong, M.S.¹, Ok Doo Awh, Ph.D.¹, Hyun Suk Kim, M.S.¹, Eun Sook Lee, B.S.¹,
Tae Sup Lee, M.S.^{1,2}, Tae Hyun Choi, M.S.¹, Chang Woon Choi, M.D. Ph.D.³
and Sang Moo Lim, M.D. Ph.D.³

Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University,¹ Wonju;
Laboratory of Cyclotron Application², Department of Nuclear Medicine³, Korea Institute of
Radiological and Medical Science, Seoul, Korea

Abstract

Purpose: A new linker, hydrazino nicotinamide (HYNIC), was recently introduced for labelling of liposome with ^{99m}Tc . In this study we synthesized HYNIC derivatized PEG (polyethylene glycol)-liposomes radiolabeled with ^{99m}Tc . **Materials and Methods:** In order to synthesize HYNIC-DSPE (distearoyl phosphatidyl ethanolamine) which is a crucial component for ^{99m}Tc chelation, first of all succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid was synthesized from 6-chloronicotinic acid by three sequential reactions. A DSPE derivative of succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid was transformed into HYNIC-DSPE by HCl/dioxane. HYNIC-PEG-liposomes were prepared by hydration of the dried lipid mixture of EPC (egg phosphatidyl choline) : PEG-DSPE : HYNIC-DSPE:cholesterol (1.85:0.15:0.07:1, molar ratio). The HYNIC-PEG-liposomes were labeled with ^{99m}Tc in the presence of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (a reducing agent) and tricine (a coligand). To investigate the level of in vivo transchelation of ^{99m}Tc in the liposomes, the ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposomes were incubated with a molar excess of DTPA, cysteine or glutathione solutions at 37°C for 1 hour. The radiolabeled liposomes were also incubated in the presence of human serum at 37°C for 24 hours. **Results:** 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid was synthesized with 77.3% overall yield. The HYNIC concentration in the PEG-coated liposome dispersion was 1.08 mM. In condition of considering the measured liposomal size of 106 nm, the phospholipid concentration of 77.5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ and the liposomal particle number of 5.2×10^{14} liposomes/ml, it is corresponded to approximate 1,250 nicotinyl hydrazine group per liposome in HYNIC-PEG-liposome. The removal of free ^{99m}Tc was not necessary because the labeling efficiency were above 99%. The radiolabeled liposomes maintained 98%, 96% and 99%, respectively, of radioactivity after incubation with transchelators. The radiolabeled liposomes possessed above 90% of the radioactivity in serum. **Conclusion:** These results suggest that the HYNIC can be synthesized easily and applied in labelling of PEG-liposomes with ^{99m}Tc . (Korean J Nucl Med 2002;36:333-43)

Key Words: ^{99m}Tc , HYNIC, Liposomes, Abscess imaging

Received Dec 18, 2002; revision accepted Dec 23, 2002

Corresponding author: Chang Woon Choi, M.D. & Ph.D., Laboratory of Cyclotron Application, Korea Institute of Radiological and Medical Science, 215-4 Gongleung-Dong, Nowon-Gu, Seoul, 139-706, Korea

Tel: 02-970-1341, Fax: 02-970-1341, E-mail : cwchoi@kcch.re.kr

* 본 연구는 과학기술부 원자력 연구개발 중·장기 계획사업의 RI 이용 진료기술개발과제의 연구비 보조로 이루어졌음.

서 론

다양한 생물활성물질에 방사성동위원소를 표지한 방사성표지화합물들이 여러 가지 질병진단을 위해 이용되고 있다.¹⁾ 감염진단에 사용되는 핵의학적인 방법으로는 단클론항체, 여러 종류의 혈구성분과 세균감염시 분비되는 chemotactic peptides, liposome 등이 방사성동위원소로 표지되어 감염과 염증부위를 찾는 임상진단에 이용되고 있다.^{2,3)} 이들 방사성 표지화합물들이 가져야 할 중요한 조건은 선택적으로 표적장기의 병소부위에 집적되어야 하며 유효한 시간까지 머물러 있어야 하고 비표적 장기나 조직에 집적되지 않아야 하며 배후방사능이 빠르게 제거되어야 한다. 앞의 조건들 이외에도 독성이 없어야 하고 초기 진단이 가능하고 쉽고 싸게 사용할 수 있어야 하며 준비과정에서의 피폭을 최소한으로 할 수 있어야 한다.⁴⁾ 현재까지 사용되고 연구 개발되어 왔던 감염진단제제의 특성을 나누어 보면 크게 특이적 방사성 의약품과 비특이적 방사성의약품으로 대별된다. 특이적 방사성의약품은 질병으로 인한 특이한 항원발현에 대한 항체, 비정상적인 물질대사시에 증가되는 물질 등이 선택되어 활용되는 방사성의약품이 있으며, 부분적인 혈액의 증가나, 혈관상피세포 내에 투과력이 증가하는 것을 이용한 비특이적 방사성의약품들이 있다. 지금까지는 ⁶⁷Ga-citrate, ¹¹¹In-표지백혈구, ^{99m}Tc-표지백혈구 등을 일반적으로 사용하였는데, 몇 가지 동물모델에서는 liposome에 ^{99m}Tc을 표지한 화합물이 농양중앙으로 더 우수하다는 보고가 있다.^{5,6)}

Liposome은 염증을 진단하는데 운반체로서 사용되어져 왔다.^{7,8)} 일반적인 liposome은 체내에 주사했을 때 순환계에 머무는 시간이 짧고, 대부분 간이나 비장에 있는 세망내피계에 의해 제거된다. 이 현상을 피하기 위해 liposome이 세망내피계에 의한 탐식을 최소화하여 순환계에 오래 머무를 수 있는 방법에 대한 개발이 진행되어 왔다.⁹⁾ 이러한 조건을 만족시키려면 liposome 표면에서 적당한 구조적인 방해물 유지해 혈청단백질의 흡착을 억제해야 한다. PEG (polyethylene glycol)같은 친수성 복합체와 접

합된 liposome은 혈청단백질의 흡착을 저해하여 세망내피계에 의한 인지를 최소화하고 순환계에 머무르는 시간을 증가시킨다. 특히 PEG의 분자량에 따라 순환계에 머무르는 시간이 달라지는데, PEG-1900의 경우가 머무름 시간이 가장 긴 것으로 보고되었다.¹⁰⁾ 세망내피계에 의한 탐식을 최소화하는 다른 방법은 liposome의 크기를 조절하는 것인데, 90 nm 정도의 liposome은 순환계에 머무르는 시간이 다른 크기의 liposome에 비해 긴 것으로 알려져 있다.¹¹⁾

방사성동위원소를 표지하는 방법은 생물활성물질에 손상을 적게 주는 방법을 사용하여야 하며, 우수한 BFCA (bifunctional chelating agent)는 낮은 산화상태의 ^{99m}Tc을 안정화 시켜서 표지 후에는 산화·환원 반응이 일어나지 않아야 한다. 생물활성물질에 ^{99m}Tc을 표지하는 방법으로는 첫째로 직접 표지 방법, 둘째로 동위원소와 킬레이트를 먼저 표지한후 생물 활성물질과 반응시키는 방법, 셋째로 간접 표지 방법 등이 있다.¹²⁾ 직접 표지 방법의 경우는 단백질이나 펩타이드 등에만 국한되어 있는 단점이 있다. 동위원소와 킬레이트를 먼저 표지하는 방법은 킬레이트와 표지 과정이 명확하고, 표지 중에 생물활성물질이 노출되지 않아서 생물활성손상이 적다는 장점이 있지만 비방사능이 낮고 과정이 너무 복잡해 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다.¹³⁾ ^{99m}Tc과 여러 생물활성물질을 표지하는데 사용되었던 BFCA로는 triamide thiols, diamidedithiols, monoamide mono aminedithiols, diamidedithiols, PnAO (propyleneamine oxime, tetraamines, BATOs, HYNIC (hydrazino nicotinamide) 등이 있다.^{14,15)} 본 연구에 이용되는 HYNIC (Fig. 1)은 간접 표지 방법으로 실

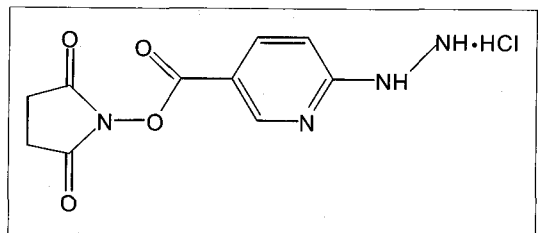


Fig. 1. The chemical structure of hydrazino nicotinamide (HYNIC).

온에서 30분 정도의 시간으로 표지를 할 수 있는 간편한 방법이다. HYNIC은 ^{99m}Tc과 결합할 때 쉽고 빠르게 표지되며 높은 표지 수율을 보인다. HYNIC은 ^{99m}Tc에 하나 또는 두 개의 배위결합부위를 갖고, tricine과 같은 coligand와 함께 피라미드 형태나 정사면체의 배위결합구조를 형성해 안정한 구조를 가지는 것으로 보고 되었다.¹⁶⁾

Liposome과 ^{99m}Tc을 표지하는 방법에는 여러 가지가 있다.¹⁷⁾ DTPA를 이용해 ^{99m}Tc를 liposome에 포획하는 방법이 있는데, 이는 생체 내에서 불안정하다는 단점이 있다.¹⁸⁾ 최근에는 소수성 킬레이트인 HMPAO (hexamethyl propyleneamine oxime)를 이용한 ^{99m}Tc 표지방법이 사용되었다. 그러나 일반적으로 표지 수율이 60~80% 정도로 낮아서 표지 후 분리정제를 해야하는 단점이 있다.¹⁹⁾ HYNIC을 사용하면 liposome에 ^{99m}Tc을 쉽게 표지 가능하고 높은 수율을 나타내기 때문에 표지 후 분리정제과정이 필요 없다는 장점이 있다.^{20,21)}

본 연구는 BFCA 중 하나인 HYNIC을 제조하고, 염증부위에 선택적으로 국소화되어 진단할 수 있는 PEG-liposome과 결합시켜 HYNIC-PEG-liposome을 제조하고자 하였으며, 제조된 HYNIC-PEG-liposome에 방사성동위원소인 ^{99m}Tc의 표지 방법을 확립하고자 하였다. 표지된 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome의 시험관내 안정성을 실험하여 생체적용 가능 여부를 확인함으로써 염증진단 시약으로서의 가능성 여부를 연구하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid의 합성

6-Chloronicotinic acid 8.0 g (50.8 mmol)과 85% hydrazine hydrate 수용액 35 ml (930.0 mmol, 18.3 equiv.)을 teflon coated magnetic stirrer와 함께 500 ml 등근 플라스크에 넣고 저어주면서 100℃ oil bath에서 4시간동안 반응시켰다. 반응 종료 후 실온에서 10시간 방치하고 rotary evaporator로 2시간동안 감압건조를 시켰다. 여기에 200 ml의 증류수를 가해 녹이고, 농염산을 이용해 pH 5.5로 조정하여 침전물

을 얻었다. 생성된 침전물은 Whatman filter paper (No.1)로 여과하였다. 95% Ethanol 수용액과 ethyl ether로 각각 2회씩 반복 세척하였고 감압 건조기에서 12시간 감압건조 후 6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid를 얻었다. 생성물에 2 N NH₄OH 수용액을 적당량 가해 녹인 후 TLC (C18-silica gel, reverse phase, Aldrich)에 점적하여 혼합전개액 (n-hexane:2 N NH₄OH:chloroform=1:2:1)로 전개시킨 후 UV 분광기 254 nm에서 그 순도를 확인하였다. 순수하게 얻은 생성물을 DMSO-d₆에 녹인 후 ¹H-NMR (Bruker AC/100F, 100 MHz)로 그 구조를 확인하였다.

2. 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid의 합성

6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid 1.4 g (9.2 mmol)을 triethylamine 1.2 ml (11.8 mmol, 1.3 equiv..)과 함께 DMF 10 ml에 녹이고 di-tert-butylidicarbonate 2.13 g (9.8 mmol, 1.1 equiv..)을 stirrer로 저어 주면서 16시간동안 실온에서 반응시켰다. 반응 종료 즉시 rotary evaporator로 10시간 감압건조 시켰다. 최소량의 ethyl acetate로 녹인 후 silica gel 60 (230-400 mesh)을 이용해 column chromatography를 실시한 후 rotary evaporator로 12시간동안 감압건조 시켰다. 이렇게 얻어진 반응 결과물에 ethyl acetate를 적당량 가해 녹인 후 위와 동일한 고정상과 이동상을 이용하여 전개시킨 후 UV 분광기 254 nm에서 화합물을 확인하였다. 생성물을 DMSO-d₆에 녹인 후 ¹H-NMR로 최종 그 구조를 확인하였다.

3. Succinimidyl 6-BOC-hydrazino pyridine-3-carboxylic acid의 합성

15 ml의 DMF에 6-BOC-hydrazino-pyridine-3-carboxylic acid 1.45 g (5.8 mmol)과 N-hydroxy-succinimide 0.66 g (5.8 mmol, 1 equiv.)을 넣고, 5 ml의 DMF에 녹인 dicyclohexylcarbodiimide 1.18 g (5.8 mmol, 1 equiv.)을 첨가한 후 실온에서 16시간동안 반응시켰다. 반응종료 후 혼합물은 Whatman filter paper (No. 1)으로 여과한 후에 최소량의 ethyl

acetate로 녹이고 silica gel 60 (230-400 mesh)을 이용해 column chromatography를 실시한 후에 rotary evaporator로 12시간동안 감압건조 시켰다. 이렇게 얻어진 반응 결과물에 ethyl acetate를 적당량가해 녹인 후 고정상을 TLC (Kieselgel 60 F254, Merck)로 하고 이동상은 혼합전개액(methanol:dichloromethane=1:9)을 사용하여 전개시킨 후, 생성물을 DMSO-d₆에 녹인 후 UV 분광기 254 nm에서 화합물을 확인하였고, ¹H-NMR로 그 구조를 확인하였다.

4. HYNIC-PEG-liposome의 제조

반응용기에 질소가스를 충전시킨 상태에서 DSPE (distearoyl phosphatidyl ethanolamine) 20 mg (26.7 μmol)과 500 μl의 chloroform으로 55°C에서 녹였다. Succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid 37 mg (106.8 μmol, 4 equiv.)을 혼합용액(chloroform: methanol=2:1)으로 녹이고 앞에서 제조한 DSPE용액과 섞고, triethylamine 14.8 μl (106.8 μmol, 4 equiv.)를 첨가한 후 1시간동안 반응시켰다. 반응물 혼합물을 TLC에 점적한 후 혼합 전개액(methanol:dichloromethane=1:9)을 사용하여 전개시킨 후 UV 램프로 반응정도를 확인하였으며, 또한 1.3%의 molybdenum blue가 포함된 4.2 M 황산수용액으로 염색하여서도 반응을 확인하였다. t-BOC을 제거하기 위하여 4 M HCl의 dioxane용액 3 ml를 첨가한 후 실온에서 4시간 동안 반응 후 형성된 침전물을 ethyl ether로 5회 반복 세척하였고, 감압 건조하여 생성물을 얻었다. 생성물을 Chloroform에 녹여 TLC에 점적한 후 혼합 전개액(methanol:dichloromethane=1:9)을 사용하여 전개시킨 후 UV lamp로 반응을 확인하였으며, 1.3%의 molybdenum blue가 포함된 4.2 M 황산수용액 발색시약으로 염색하여서도 확인하였다. PEG의 분자량이 1900인 PEG-DSPE를 사용하여 120 mM의 EPC:PEG-DSPE:HYNIC-DSPE:cholesterol을 1.85:0.15:0.07:1의 비율로 혼합하여 chloroform/methanol (1:2)에 녹인 다음 유기용매를 질소가스를 이용하여 증발시켜 제거한 후, 1시간 이상 감압건조하여 미량의 유기용매까지 완전히 제거하였다. 여기에 50 mM PBS (pH 7.4) 1 ml를 넣어 수화시킨 후, β-octylglucoside를 적당량 넣고

vortexer를 이용하여 multilamellar vesicle을 만들었다. 상온의 liposome 용액을 extruder와 polycarbonate filter pore size를 450 nm, 220 nm, 110 nm로 하여 순차적으로 여러 번 반복하여 통과시켜 일정한 크기의 liposome을 만들었다. 반응 용액을 투석막(slide-A-Lyzer 10K, cut-off 10,000)에 넣고 5시간 간격으로 4°C에서 네 번 PBS를 교체해주었다. Particle analyzer (ELS-8000, Photal OSTUTA Electronics, JAPAN)를 이용하여 liposome의 직경을 측정하였다. HYNIC-PEG-liposome에서 HYNIC의 농도는 p-nitrobenzaldehyde 0.5 mM을 2.5% acetonitrile 수용액에 녹인 뒤 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.73)를 넣어준 용액 1 ml과 이미 알고 있는 HYNIC 농도 100, 50, 25, 12.5 μg/ml을 섞어 차광상태로 5시간동안 방치하여 UV 분광기 385 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.²²⁾ 표준곡선을 작성후 시료의 흡광도를 측정해 liposome에 접합된 HYNIC의 농도를 측정하였다. 이를 토대로 PEG-liposome의 개수와 PEG-liposome당 접합된 HYNIC의 개수를 결정하였다.²³⁾

5. 전자 현미경을 이용한 liposome 형성 확인

제조된 10 mg/ml HYNIC-PEG-liposome solution 10 μl에 5% uranyl acetate 10 μl를 섞어주어 negative stain을 한 후, 200 mesh copper grid (TED PELLA INC, USA) 위에 올려놓았다. Filter paper로 물기를 제거한 후 electron microscope (Joel 299EX-II, JAPAN)상에서 60,000배 (80 kV)로 HYNIC-PEG-liposome의 형성을 확인하였다.

6. HYNIC-PEG-liposome에 ^{99m}Tc의 표지

25 μl의 HYNIC-PEG-liposome (775 μmol phospholipids/ml)에 ^{99m}Tc을 표지하기 위하여, 환원제인 SnCl₂ · 2H₂O와 coligand인 tricine의 농도를 결정하였다. 반응기질용액의 제조에 사용되는 증류수는 아르곤가스로 충전하여 사용하였다. 반응혼합물에 74 MBq (2 mCi)의 Na^{99m}TcO₄을 사용하고, tricine 농도를 고정시켜주고 SnCl₂ · 2H₂O의 농도를 5~300 μg까지 변화시키면서 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome의 표지수율이 가장 높은 SnCl₂ · 2H₂O의

농도를 결정하였다. 결정된 SnCl₂ · 2H₂O 농도 10 µg으로 고정시키고 tricine의 농도를 10~200 µg까지 변화시키면서 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome의 표지수율이 가장 높은 tricine의 농도를 결정하였다. 결정된 SnCl₂ · 2H₂O과 tricine의 농도를 각각 10 µg씩 사용하여 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome의 표지수율을 고정상으로 Instant Thin Layer Chromatography-silica gel (ITLC-SG, Gelman Science INC.)을 사용하고, 이동상으로 0.15 M sodium citrate buffer (pH 5.0)을 이용하여 전개시켰고 이를 thin-layer chromatogram scanner (Aloka, Japan)을 사용하여 확인하였다. ^{99m}Tc의 방사능의 증가에 따른 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome의 표지수율의 변화를 확인하기 위하여 ^{99m}Tc의 방사능을 185 MBq~2.96 GBq (5~80 mCi)까지 증가시키면서 표지수율의 변화를 확인하였다.

7. ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome의 trans-chelation과 시험관내 안정성 실험

^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome 1 ml과 섞은 후에 각각 0, 1, 10, 100, 300, 500, 700, 1000배의 물 비가 되도록 만든 DTPA, cysteine, glutathione을 각각 1 ml씩 섞은 다음, 37℃ 항온수조에 1시간동안 항온 유지하였다.⁴⁶⁾ ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome의 안정성은 고정상으로 Instant Thin Layer Chromatography-silica gel (ITLC-SG, Gelman Science INC.)을 사용하고, 이동상으로 0.15 M sodium citrate (pH 5.0)을 이용하여 전개시켰고 이를 Thin-layer chromatogram scanner (Aloka, Japan)를 사용하여 확인하였다.

^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome 1 ml과 사람혈청 1 ml를 섞은 다음, 37℃ 항온수조에 항온유지하면서 5분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간 간격으로 시료를 취하였고 위와 동일한 방법으로 안정성을 확인하였다.

결 과

1. 6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid의 합성

6-Chloronicotinic acid(8.0 g; 50.8 mmol)과 85%

hydrazine hydrate (35 ml; 930.0 mmol, 18.3 equiv.)를 반응시켜 6-Hydrazino-pyridine-3-carboxylic acid를 6.88 g (45.0 mmol)을 얻어 88.5%의 수율을 나타냈다. Rf값이 약 0.75 근처에서 화합물을 확인하였고, 반응물을 ¹H-NMR을 이용해 약 6.6 ppm에서 amino기의 peak를 확인하였다.

2. 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid의 합성

6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid 1.4 g (9.2 mmol)으로부터 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid를 2.17 g (8.6 mmol)을 얻어 93.7%의 수율을 나타냈다. 이렇게 얻어진 반응 결과물에 ethyl acetate를 적당량 가해 녹인 후 전개하여 Rf값이 약 0.42 근처에서 반점을 확인하였고, 반응물을 DMSO-d₆에 녹인 후 ¹H-NMR을 이용하여 약 1.4 ppm에서 t-BOC peak를 확인하였다.

3. Succinimidyl 6-BOC-hydrazino pyridine-3-carboxylic acid의 합성

6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid 1.45 g (5.8 mmol)으로부터 succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid를 1.87 mg (5.3 mmol)을 얻어 93.2%의 수율을 나타냈다. 이렇게 얻어진 반응 결과물의 Rf값이 약 0.42 근처에서 반점을 확인하였고, 반응물을 DMSO-d₆에 녹인 후 ¹H-NMR을 이용해 약 2.7 ppm에서 NHS의 peak를 확인하였다.

6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid를 출발물질로 해서 얻어진 succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid의 최종수율은 77.3%였다(Fig. 2).

4. HYNIC-PEG-liposome의 제조

DSPE 20 mg (28.0 µ mol)과 succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid 37 mg (106.8 µ mol, 4 equiv.)을 반응시켜 0.29의 Rf 값을 가지는 Succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid-DSPE를 제조하였다. DSPE의 Rf 값은 0.17이었다. 이 혼합물에 4 M의 HCl이 첨가된 dioxane 3 ml을 가해서 HYNIC-DSPE를 제조하였다

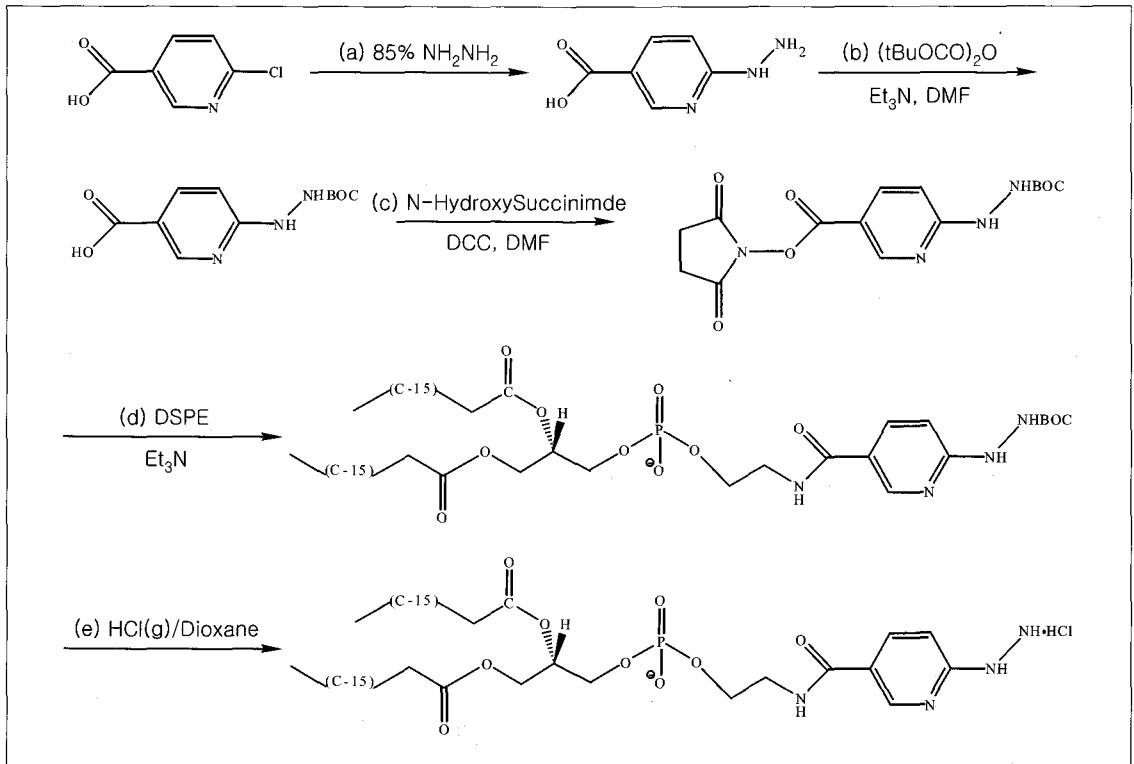


Fig. 2. Reaction scheme for the preparation of HYNIC-DSPE. (a) 6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid. (b) 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid. (c) Succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid. (d) Succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid-DSPE. (e) HYNIC-DSPE.

(Fig. 3).

제조된 HYNIC-DSPE의 Rf 값은 0이었다.

제조된 HYNIC-PEG-liposome은 particle analyzer를 사용하여 직경을 확인한 결과 106 nm였다. p-Nitrobenzaldehyde를 사용하여 UV 분광기 385 nm에서 HYNIC의 흡광도를 측정된 결과 PEG-liposome에 접합된 HYNIC의 농도는 38.6 μg (1.08 mM)이었다. 이는 Fig. 3에 나타난 HYNIC농도의 표준곡선을 작성하여 계산하였다. PEG-liposome의 개수는 1 ml에 5.2×10^{14} 개가 존재하였고, 이를 토대로 계산한 결과 PEG-liposome 한 개당 HYNIC은 약 1,250개였다.

5. 전자 현미경을 이용한 liposome 형성 확인

5% uranyl acetate 10 μl 를 섞어주어 negative staining하여 얻은 전자현미경 사진에서 PEG-liposome이 형성되었음을 확인할 수 있었다. Poly-

carbonate filters (110 nm)를 최종적으로 통과시켜 사진에 보이는 PEG-liposome의 크기는 비교적 크게 나타났다(Fig. 4).

6. HYNIC-PEG-liposome에 ^{99m}Tc 의 표지

반응혼합물에 74 MBq (2 mCi)의 $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 를 사용하고, tricine농도를 고정시켜주고 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 5~300 μg 까지 변화시킨 결과 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposome의 표지 수율은 10 μg 에서 약 59%를 나타내었다. 결정된 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 농도 10 μg 으로 고정시키고 tricine의 농도를 10~200 μg 까지 변화시킨 결과 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposome의 표지 수율은 10 μg 에서 99%이상을 나타내었다(Fig. 5). ^{99m}Tc 의 방사능의 증가에 따른 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG-liposome의 표지 수율의 변화를 확인하기 위하여 ^{99m}Tc 의 방사능을 185 MBq~2.96 GBq (5~80 mCi)까지 증가시킨 결과 370 MBq (10 mCi)에서 99%이

상을 나타내어 가장 좋은 표지 수율을 보였으며, 2.96 GBq (80 mCi)에서도 90%이상의 표지 수율을 확인하였다(Fig. 6).

7. ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome의 trans-chelation과 시험관 내 안정성

^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome 1 ml과 섞은 후에 각각 0, 1, 10, 100, 300, 500, 700, 1000배의 물 비로 만든 DTPA, cysteine, glutathione을 각각 1 ml을 섞어 반응시켜본 결과 모두 93%이상의 안정성을 나타내었다(Fig. 7). ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome 1 ml과 사람혈청 1 ml를 섞은 다음, 37℃ 항온수조에 항온 유지하면서 5분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간 간격으로 시료를 취하여 안정성을 확인한 결과 매 시간 93%이상으로 안정하였다(Fig. 8).

고찰

의학분야에서 진단은 질병치료의 기초가 된다.

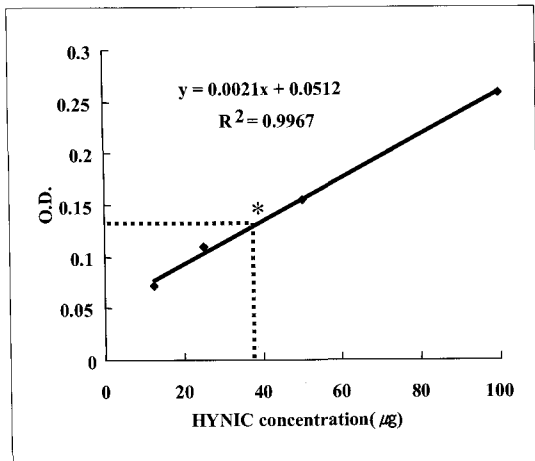


Fig. 3. A standard curve of HYNIC concentration for HYNIC-PEG-liposomes analysis. The concentration of liposome-associated HYNIC in the PEG-coated liposomes dispersion after dialysis was 38.6 µg (1.08 mM). This corresponds to approximate 1250 nicotinyl hydrazine groups per liposome, assuming an average liposome size of 106 nm, a phospholipid concentration of 77.5 µmol/ml and a liposomes concentration of 5.2 × 10¹⁴ liposomes/ml.

진단을 위한 방법 중에서 방사성 동위원소를 이용한 핵의학적인 진단은 영상처리를 통해 육안적으로 확인할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 장점은 실제

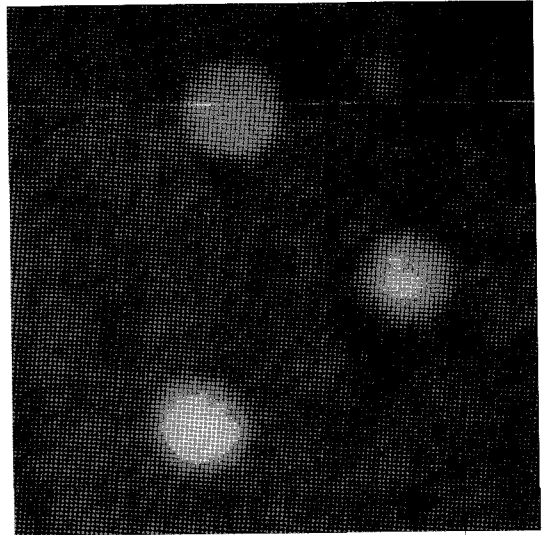


Fig. 4. Electron microscope photograph of HYNIC-PEG-liposomes. An average HYNIC-PEG-liposomes size is approximately 106 nm by particle analyzer. liposome formulation was EPC:PEG-DSPE:HYNIC-DSPE:cholesterol (1.85:0.15:0.07:1).

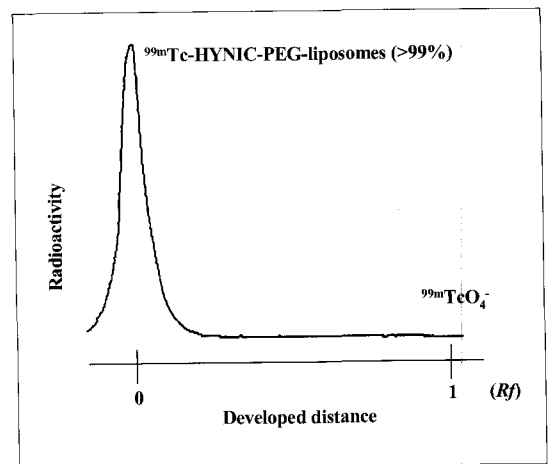


Fig. 5. Radiochromatogram of ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposomes reaction mixture. ITLC condition: mobile phase is 0.15 M sodium citrate buffer (pH 5.0) and solid phase is ITLC-SG (Gelman Science, INC.).

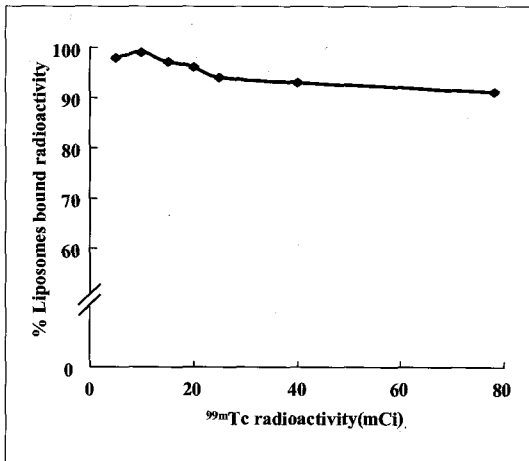


Fig. 6. Radiolabeling yield of ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposomes according to ^{99m}TcO₄-radioactivity. When radioactivity of ^{99m}Tc was 10 mCi (370 MBq), radiolabeling yield of ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposomes was 99%. radiolabeling yield was decreased as increasing radioactivity of ^{99m}TcO₄⁻, but When radioactivity of ^{99m}Tc was 80 mCi (2.96 GBq), radiolabeling yield of ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposomes was above 90%.

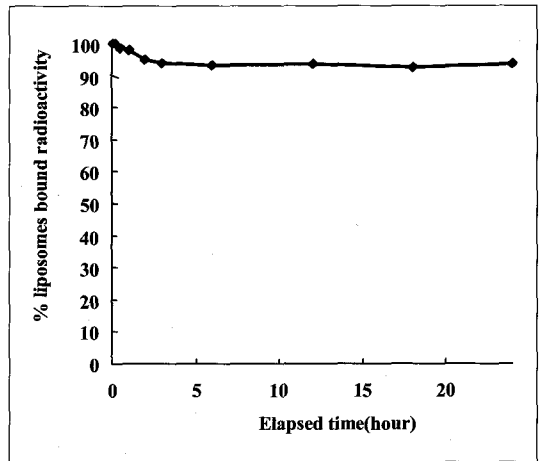


Fig. 8. In vitro stability of ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposomes contained with human serum. Radiolabeled liposomes 100 μl were incubated with 400 μl human serum at 37°C. Samples were taken after 5, 10, 30 min, 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24 hour of incubation.

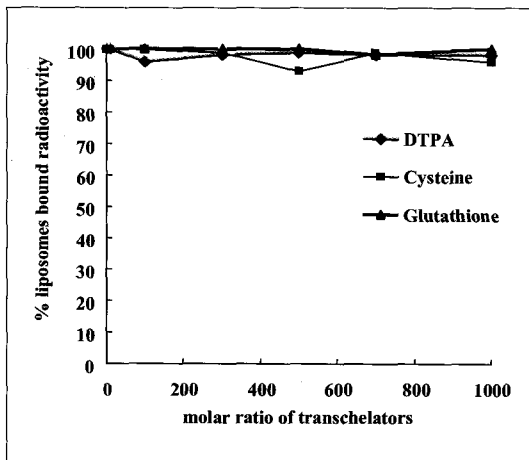


Fig. 7. Transchelation of ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposomes with DTPA, cysteine and glutathione. ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposomes showed above 93% stability in 1,000 fold molar ratio of DTPA, cysteine and glutathione. Each sample was duplicated (represented by mean value).

로 임상에 적용되고 있다. 농양과 종양 진단을 위한 방사성의약품으로서 여러 가지의 생물활성물질이 연구 개발되어, 임상진단에 사용되고 있다.³⁾

생물활성물질인 liposome은 염증을 진단하는데 운반체로서 사용되어져 왔는데 일반적인 liposome은 체내에 주사했을 때 순환계에 머무는 시간이 짧고, 대부분 간이나 비장에 있는 세망내피계에 의해 제거된다고 알려졌다.²⁴⁾ 이 현상을 피하기 위해 liposome이 세망내피계에 의한 인식을 최소화하여 순환계에 오래 머무를 수 있는 방법에 대한 개발이 진행되었다.⁹⁾ 아직은 liposome이 농양부위에 섭취되는 경로는 정확히 밝혀지지는 않았으나 liposome이 농양부위에 우선적으로 섭취된다는 보고가 있다.^{25,26)}

Succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid은 6-chloronicotinic acid를 시작 물질로 하여 3 단계를 거쳐 합성하였다.²¹⁾ 최종 합성수율은 77.3%로서 우수한 편이었다. HYNIC-PEG-liposome을 제작하기 위해서는 질소가스를 충전한 상태에서 succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid과 DSPE 그리고 triethylamine을 첨가 후 55~65에서 1시간을 반응 시켰다. 반응물에 4 M의 HCl이 첨가된 dioxane 3 ml을 첨가해 protecting group인 t-BOC를 제거하여 HYNIC-DSPE를 합성하였다. 질소가스를 충전하지 않은 상태에서는 HYNIC과 DSPE가 거의 반응하지 않았다.

합성된 HYNIC-DSPE를 이용해 HYNIC-PEG-liposome을 제작하였다. 본 연구에서 PEG분자량이 2000을 사용한 이유는 PEG의 분자량에 따라 순환계에 머무르는 시간이 달라지는데, PEG-1900의 경우가 가장 긴 것으로 보고되었기 때문이고, PEG-liposome의 크기를 조절한 이유는 90 nm 정도의 liposome은 순환계에 머무르는 시간이 다른 크기의 liposome에 비해 긴 것으로 보고되었기 때문이다.^{11,27)} 순수한 HYNIC-PEG-liposome을 만들기 위하여 투석을 실시하여 접합되지 않은 HYNIC을 제거하였는데, HYNIC-DSPE를 순수 분리 정제를 하면 투석의 과정이 불필요할 것으로 토의 되었다.

HYNIC을 직접 DSPE와 접합시키지 않고 t-BOC이 존재하는 상태의 succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid를 사용해 DSPE와 접합시킨 이유는 HYNIC상태에서는 서로 amide bond를 형성할 가능성이 있기 때문이었다. Laverman 등은 HYNIC을 DSPE와 직접 접합하였는데 그 반응수율이 낮아 한 개의 liposome당 약 230개의 HYNIC만이 접합되었다고 보고했다.²⁸⁾

HYNIC과 ^{99m}Tc이 높은 표지수율을 보이며 안정하게 결합기 위해서는 환원제인 SnCl₂·2H₂O와 coligand인 tricine의 양을 조절하여 사용하여야 한다. Coligand로서의 tricine은 일반적으로 사용하던 gluco heptonate보다 높은 표지수율과 특이성을 가지기 때문에 tricine을 사용하였다.¹¹⁾

^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome의 표지 수율은 약 99% 이상으로 반응하지 않은 ^{99m}TcO₄는 거의 없을 정도로 높은 표지수율을 보였다. 실제 임상적용 가능성을 확인하기 위해 사람에게 일반적으로 주사되는 ^{99m}TcO₄의 방사능(0.74~1.11 GBq, 20~30 mCi)도 표지해 본 결과 370 MBq (10 mCi)에서 99% 이상을 나타내어 가장 좋은 표지 수율을 보였으며, 2.96 GBq (80 mCi)에서도 90% 이상의 표지 수율을 확인하였다. 환원제인 SnCl₂·2H₂O를 사용하지 않고 표지 하였을때는 산화상태인 ^{99m}TcO₄를 환원시킬 수 있는 물질이 없으므로 표지가 안되었다. 본 연구결과로 볼 때 BFCA 중 하나인 HYNIC은 쉽게 제조할 수 있어 염증 부위에 선택적으로 국소화되어 진단할 수 있는 PEG-liposome을 제조하는데 유용하게

사용될수 있으며, 제조된 HYNIC-PEG-liposome에 방사성동위원소인 ^{99m}Tc의 표지은 매우 쉽고, 높은 표지수율을 나타내며 사람의 혈청과 다른 transchelator들에도 높은 안정성을 나타내는 유용한 방법으로 농양영상제제로의 사용가능성을 확인할수 있었다.

요 약

목적: BFCA 중 하나인 HYNIC을 제조하고, 염증부위에 선택적으로 국소화 되어 진단할 수 있는 PEG-liposome과 결합시켜 HYNIC-PEG-liposome을 제조하며, 제조된 HYNIC-PEG-liposome에 방사성동위원소인 ^{99m}Tc의 표지 방법을 확립하고자 하였다. **대상 및 방법:** 6-Chloronicotinic acid를 출발물질로 하여 succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid를 순차적으로 합성하였다. Triethylamine을 이용해 합성된 succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid와 DSPE를 접합하였다. HYNIC-DSPE를 제조한 후에 EPC:PEG-DSPE:HYNIC-DSPE:cholesterol을 1.85:0.15:0.07:1의 몰 비로 혼합하여 HYNIC-PEG-liposome을 제조하였다. 제조된 HYNIC-PEG-liposome에 SnCl₂·2H₂O와 tricine을 이용하여 ^{99m}Tc를 표지하였다. ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome과 혈청을 섞어서 실온과 37°C에서 24시간까지 안정성을 확인하였다. ^{99m}Tc-HYNIC-PEG-liposome에 DTPA, cysteine, glutathione을 각각 과량의 몰 비로 섞고 37°C에서 1시간 반응 후에 trans-chelation을 통해 안정성을 확인하였다. **결과:** 6-Chloronicotinic acid를 출발물질로 하여 6-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid, 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid, succinimidyl-6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid를 합성하였으며 각각의 합성수율은 88.5%, 93.7%, 93.2%였고 최종수율은 77.3%였다. 제조된 HYNIC-PEG-liposome의 직경은 106 nm였고, PEG-liposome에 접합된 HYNIC의 농도는 1.08 mM이었다. HYNIC-PEG-liposome의 개수는 1 ml에 5.2×10¹⁴개가 존재하였고, PEG-liposome 한 개당 HYNIC은 약 1250개가 접합되었다. 제조된 HYNIC-PEG-

liposome에 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 tricine을 이용하여 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 를 표지하였으며 그 표지수율은 99% 이상이었다. 혈청 내에서 24시간까지 93.5% 이상의 안정성을 나타내었다. DTPA, cysteine, glutathione을 각각 1000배의 몰 비를 첨가한 경우 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-PEG-liposome의 방사화학적순도가 각각 98%, 96%, 99%으로서 안정하였다. 결론: BFCA중 하나인 HYNIC을 이용한 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-PEG-liposome의 제조는 손쉬운 표지방법과 높은 표지수율 그리고 안정성을 나타낼 수 있는 방법으로서, 이를 염증부위에 선택적으로 국소화되어 염증의 진단에 유용하게 사용될 수 있을것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- 1) Kubota R, Yamada S, Ishiwata K, Tada M, Ido T, Kubota K. Cellular accumulation of ^{18}F -labelled boronophenyl alanine depending on DNA synthesis and melanin incorporation: a double-tracer microautoradiographic study of B16 melanomas in vivo. *Br J Cancer* 1993; 67(4):701-5.
- 2) Babich JW, Tompkins RG, Graham W, Barrow SA, Fischman AJ. Localization of radiolabeled chemotactic peptide at focal sites of Escherichia coli infection in rabbits: evidence for a receptor-specific mechanism. *J Nucl Med* 1997; 38(8):1316-22.
- 3) van der Lake CJ, Boerman OC, Oyen WJ, van de ven MT, Edwards DS. Technetium-99m-labeled chemotactic peptides in acute infection and sterile inflammation. *J Nucl Med*. 1997; 38(8):1310-5.
- 4) Rennen HJ, Boerman OC, Oyen WJ, Corstens FH. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *Eur J Nucl Med*. 2001;28(2):241-52.
- 5) Oyen WJ, Boerman OC, Storm G, van Bloois L, Koenders EB, Crommelin DJ, et al Labelled Stealth liposomes in experimental infection: an alternative to leukocyte scintigraphy? *Nucl Med Commun*. 1996;17(9):742-8.
- 6) Boerman OC, Oyen WJ, Storm G, Corvo ML, van Bloois L, van der Meer JW., et al Technetium-99m-labeled liposomes to image experimental colitis in rabbits: comparison with technetium-99m-HMPAO-granulocytes and technetium-99m-HYNIC-IgG, *J Nucl Med*. 1997; 39(12):2172-8.
- 7) Woodle MC, Lasic DD. Sterically stabilized liposomes. *Biochi Biophys Acta*. 1992;1113(2): 171-99.
- 8) Woodle MC, Matthey KK, Newman MS, Hidayat JE, Collins LR, Redemann C, et al Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochi Biophys Acta*. 1992;1105(2): 193-200.
- 9) Treat J, Greenspan A, Forst D, Sanchez JA, Ferrans VJ, Potkul LA, et al. Antitumor activity of liposomes-encapsulated doxorubicin in advanced breast cancer: phase II study. *J Nat Cancer Inst* 1990;82(21):1706-10.
- 10) Russell CD, Speiser AG. Complexes of technetium with hydroxy carboxylic acids: gluconic, glucoheptonic, tartaric, and citric. *J Nucl Med* 1980;21(11):1086-90.
- 11) Boerman OC, Oyen WJ, van Bloois L, Koenders EB, van der Meer JW, Corstens FH, et al. Optimization of technetium-99m-labeled PEG liposomes to image focal infection: effects of particle size and circulation time, *J Nucl Med* 1997;38(3):489-93.
- 12) Liu S, Edwards DS, Barrett JA. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labeling of highly potent small peptides. *Bioconj Chem* 1997;8(5):621-36.
- 13) Jeong JM, Kinuya S, Paik CH, Saga T, Sood VK, Carrasquillo JA, Neumann RD., et al. Application of high affinity binding concept to radiolabel avidin with Tc-99m labeled biotin and the effect of pI on biodistribution. *Nucl Med*

- Biol* 1994;21(7):935-40.
- 14) Jones GS, Elmaleh Jr DR, Strauss HW, Fischman AJ. 7,10-bis (2-mercapto-2-methyl) propyl-7,10-diazapalmitic acid: a novel, N2S2 ligand for technetium-99m. *Bioorg Med Chem* 1996 Lett. 6(20):2399-404.
 - 15) Milind Rajopadhye D, Scott Edwards Jeffrey P, Bourque, Timothy R. Carroll, Synthesis and technetium-99M labeling of cyclic GP IIB/IIIA receptor antagonists conjugated to 4,5-bis (mercapto acetamido)-pentanoic acid (MAPT). *Bioorg Med Chem Lett.* 1996;6(15):1737-40.
 - 16) Edwards DS, Liu S, Barrett JA, Harris AR, Looby RJ, Ziegler MC., et al. New and versatile ternary ligand system for technetium radiopharmaceuticals: water soluble phosphines and tricine as coligands in labeling a hydrazinonicotinamide-modified cyclic glycoprotein IIB/IIIA receptor antagonist with ^{99m}Tc *Bioconj Chem* 1997;8(2):146-54.
 - 17) Goins BA, Phillips WT. The use of scintigraphic imaging as a tool in the development of liposomes formulations. *Prog Lipid Res* 2001;40: 95-123.
 - 18) Oku N, Namba Y, Takeda A, Okada S. Tumor imaging with technetium-99m-DTPA encapsulated in RES-avoiding liposomes. *Nucl Med Biol* 1993;20(4):407-12.
 - 19) Awasthi V, Goins B, Klipper R, Loreda R, Korvick D, Phillips WT. Imaging experimental osteomyelitis using radiolabeled liposomes. *J Nucl Med* 1998;39(6):1089-94.
 - 20) Babich JW, Graham W, Barrow SA, Dragotakes SC, Tompkins RG, Rubin RH, et al. Technetium-99m-labeled chemotactic peptides: comparison with indium-111-labeled white blood cells for localizing acute bacterial infection in the rabbit. *J Nucl Med* 1993;34(12):2176-81.
 - 21) Abrams MJ, Juweid M. tenKate CI., Schwartz DA, Hauser MM., Gaul FE, et al. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med* 1990;31(12):2022-8.
 - 22) King TP, Zhao SW, Lam T. Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage. *Biochemistry* 1986;25(19):5774-9.
 - 23) Enoch HG, Strittmatter P. Formation and properties of 1000-A-diameter, single-bilayer phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76(1):145-9.
 - 24) Allen TM, Hansen C, Rutledge J. liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochi Biophys Acta* 1989;981(1):27-35.
 - 25) Gabizon AA. Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Res* 1992;52(4):891-6.
 - 26) Bakker-Woudenberg IA, Lokerse AF, ten Kate MT, Mouton JW, Woodle MC, Storm G. liposomes with prolonged blood circulation and selective localization in Klebsiella pneumoniae-infected lung tissue. *J Infect Dis* 1993;168(1): 164-71.
 - 27) Goins B, Phillips WT, Klipper R. Blood-pool imaging using technetium-99m-labeled liposomes. *J Nucl Med* 1996;37(8):1374-9.
 - 28) Laverman P, Dams ET, Oyen WJ, Storm G, Koenders EB, Prevost R, et al A novel method to label liposomes with ^{99m}Tc by the hydrazino nicotinyl derivative. *J Nucl Med* 1999;40(1): 192-7.