

간세포 지향성 Galactosylated Chitosan 화합물의 표지 효율 향상 및 세포 독성에 대한 연구

원광대학교 의과대학 핵의학교실¹, 전북대학교 의과대학 핵의학교실², 전북대병원 임상연구소³
김대웅¹ · 정현정^{2,3} · 김은미^{2,3} · 김세림^{2,3} · 강윤희² · 김민우² · 김창근¹ · 손명희^{2,3}

A Study on the Labeling Efficiency and Cytotoxicity of Hepatocyte-targeting Galactosylated Chitosan Compounds

Dae-Weung Kim, M.D.¹, Hwan-Jeong Jeong, M.D.^{2,3}, Eun-Mi Kim^{2,3}, Se Lim Kim^{2,3},
Yun-Hee Kang, M.D.², Min-Woo Kim, M.D.², Chang-Guhn Kim, M.D.¹, Myung-Hee Sohn, M.D.^{2,3}

Department of Nuclear Medicine, Wonkwang University School of Medicine¹, Iksan, Department of Nuclear Medicine²,
Research Institute of Clinical Medicine³, Chonbuk National University Medical School and the Hospital, Jeonju,
Jellabuk-Do, Korea

Purpose: In prior study, we synthesized ^{99m}Tc-galactosylated chitosan (GC) and performed in vivo biodistribution study, showed specific targeting to hepatocyte. The aim of this study is to evaluate the labeling efficiency and cytotoxicity of modified galactosylated chitosan compounds, galactosyl methylated chitosan (GMC) and HYNIC-galactosylated chitosan (GCH). **Materials and Methods:** GC, GMC and GCH were synthesized and radiolabeled with ^{99m}Tc. Then, they were incubated for 6 hours at room temperature and human serum at 37°C. Labeling efficiencies were determined at 15, 30 m, 1, 2, 3 and 6 h after radiolabeling. To evaluate cytotoxicity, MTT assay was performed in HeLa and HepG2 cells. **Results:** In comparison with them of ^{99m}Tc-GC, labeling efficiencies of ^{99m}Tc-GMC were significantly improved (100, 97 and 89% in acetone and 96.3, 95.8 and 75.6% in saline at 15 m, 1 and 6 h, respectively). Moreover, ^{99m}Tc-GCH showed more improved labeling efficiencies (>95% in acetone and human serum and >90% in saline at 6 h). In MTT assay, cytotoxicity was very low and not different from that of controls. **Conclusion:** These results represent that these compounds are radiochemically compatible radiopharmaceuticals, can be used in hepatocyte specific imaging study and in vivo gene or drug delivery monitoring. (Korean J Nucl Med 39(5):278-283, 2005)

Key Words: ^{99m}Tc, galactosylated chitosan, hepatocyte, labeling efficiency, cytotoxicity.

서 론

Asialoglycoprotein은 말단 sialic acid기가 제거되어 갈락토스 말단을 가지고 있는 glycoprotein 이다. Asialoglycoprotein 수용체 (ASGP-R)는 이 glycoprotein에 대해 특이적인 수용체로서 포유류에서는 주로 간세포막에 존재한다. 이 수용체는 갈락토스나 N-acetylgalactoseamine기를 인식하고 빠르게 결합하는 성질을 가지고 있다.^{1,2)} 이미 1970년대 초반에 Marshall이 만성 간질환 환자에서 hyper-asialoglycoproteinemia가 나타남을 보고 하였고,

뒤이어 Sawamura는 이러한 현상이 경화된 간의 ASGP-R의 개수의 감소 때문에 발생한다는 것을 증명하였다.^{3,4)}

이런 특징 때문에 ASGP-R은 간으로의 유전자나 약물 운반을 위한 특이 표적자로서 많이 이용되고 있다.⁵⁻⁷⁾ 특히 핵의학 영역에서는 ^{99m}Tc-diethylenetriamine-pentaacetic acid-galactosyl neoglycoalbumin (^{99m}Tc-NGA)이나 ^{99m}Tc-diethylenetriamine-pentaacetic acid-galactosyl human serum albumin (^{99m}Tc-GSA)와 같은 방사성의약품들이 개발되어 간기능을 평가하고 영상화하는데 쓰이고 있다.^{8,9)} 또, 최근에는 ^{99m}Tc-neolactosylated human serum albumin (^{99m}Tc-LSA)이 간 특이적 영상화 방사성의약품으로 소개된 바 있다.¹⁰⁾

갈락토스 수식 키토산(Galactosylated chitosan, GC) 역시 키토산의 갈락토스기 때문에 간세포의 ASGP-R에 결합한다고 알려져 있다.^{11,12)} 결합 후 GC는 수용체 매개 세포내이입을 통해 간세포의 용해소체로 운반되고, 유전자나 약물 역시 마찬가지로

• Received: 2005. 9. 16. • Accepted: 2005. 10. 14.
• Address for reprints: Hwan-Jeong Jeong, MD., Department of Nuclear Medicine Chonbuk National University Hospital, 634-18, Geumam-2 dong, Duckjin-gu, Jeonju City, Jellabuk-Do, Republic of Korea 561-712
TEL : 82-63-250-1674, FAX : 82-63-250-1676
E-mail : jayjeong@chonbuk.ac.kr
* 이 논문은 2005년도 전북대학교 지원 연구비에 의하여 연구되었음.

으로 운반된다. 다른 운반체들과 비교할 때 키토산은 생분해성이며, 독성이 없으며, 생체적합성이 높고, 면역반응을 일으키지 않는 등의 여러 가지 생물학적 이점을 가지고 있다. 게다가 키토산은 D-glucosamine과 N-acetylglucosamine의 두 소단위로 이루어져 있어서 음전하를 띠는 물질과 강한 상호작용을 하고, 많은 양의 금속 이온(i.e. ^{99m}Tc , Copper(II), Iron)을 킬레이트 할 수 있는 능력을 가지고 있다.¹³⁻¹⁷⁾

저자들은 이전 연구에서 GC를 합성하여 ^{99m}Tc 로 표지한 후, 그 물질의 생체 내 분포를 확인해 보았다. 그 결과 GC는 고도의 간 특이성을 보였으며, 간 특이 영상을 위한 방사성 의약품으로서의 가능성을 확인할 수 있었다.¹⁸⁾ 그러나 ^{99m}Tc -GC는 표지 수율과 안정성면에서 불만족스러운 결과를 보였고, 저자들은 이를 해결하기 위해 두 가지 방법을 고안하였다. 첫 번째는 키토산의 glucosamine 중합체 중 리간드가 결합되지 않은 다른 부위를 부분적으로 메틸화시키는 방법이고, 두 번째는 새로운 연결체(linker)로서 hydrazino nicotinamide (HYNIC)를 도입하는 방법이다. HYNIC은 양기능성 착화물(bifunctional chelating agent)로서, 한쪽 끝에는 다른 물질의 아민기와 결합하고 다른 쪽 끝에는 ^{99m}Tc 이 결합할 수 있는 능력을 가진 분자이다. 펩타이드를 표지할 때 HYNIC을 사용하면 비방사능을 높일 수 있고 독성을 줄일 수 있다. 이러한 장점 때문에 최근 HYNIC은 chemotactic 펩타이드나 somatostatin 아날로그, stealth liposome, antisense oligonucleotide 등에 대한 양기능성 착화물로서 널리 사용되고 있다.^{19,20)}

이번 연구에서는 ^{99m}Tc -GC의 안정적 표지효율확보를 위해 고안한 두 가지 방법을 이용하여 GC 유도체인 galactosyl methylated chitosan (GMC)과 HYNIC-galactosylated chitosan (GCH)을 합성하였다. 그 다음, 그 화합물들을 ^{99m}Tc 로 표지한 후 표지 수율을 측정하고 시간에 따른 표지 안정성 실험을 실시하여 상호 비교하였다. 그리고 각각의 방법이 갖는 화학적인 의의와 표지 수율 및 안정성에 대한 영향을 고찰해 보았다. 또한, 이 화합물들의 세포 독성측정 실험을 함께 실시하여 비교하였다.

대상 및 방법

1. 기기 및 시약

수용성 키토산(97% deacetylation)은 분자량이 약 5000인 것을 사용하였고, 이는 순천대에 나재운 교수님으로부터 제공받았다. Succinimidyl-HYNIC는 M.D. Anderson Cancer Center의 오창석 박사님으로부터 제공받았다. 염화 제일주석 이수화물(stannous chloride dihydrate), 락토비온산(4-O-B-D-galactopyranosyl- D-gluconic acid), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxy-

succinimide (NHS)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. ^{99m}Tc -pertechnetate는 병원에 준비된 technetium 발생기(Daiichi Radioisotope Laboratories, Ltd. Tokyo, Japan)로 부터 용출하였다. Instant thin-layer chromatography-SG (ITLC-SG)는 Gelman Sciences에서 구입하였다.

2. GC, GMC 및 GCH 의 합성

EDC와 NHS, 그리고 락토비온산을 10 mM *N,N,N,N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED)/HCl buffer 용액(pH 4.7)에 넣어 녹인 뒤 키토산을 넣고 저으면서 72시간 반응시켰다. 반응물에 50% hydroxylamine 용액 0.6 ml를 넣고, NaOH를 넣어 최종반응물을 얻어냈다. 이것을 Spectra/Por3 membrane (MWCO = 3,500, Spectrum, Houston, TX)에 넣어서 3일 동안 투석하여 동결 건조한 후 GC를 얻었다.

GMC를 합성하기 위해서 0.1 g GC를 0.24 g sodium iodide와 4 ml *N*-methyl-2-pyrrolidone에 넣어 60°C 에서 저어서 녹였다. 녹인 후에 15% aqueous sodium hydroxide 용액 0.55 ml 과 0.6 ml methyl iodide를 넣어 1시간 동안 저어서 반응시켰다. 반응물을 에탄올에 침전시켜 원심 분리한 후 10% NaCl aqueous 용액 5 ml 에 녹여 95% 에탄올로 침전시켰다.²¹⁾ 원심분리 후 에탄올과 에테르로 반복 침전시켜 건조시킨 후 최종반응물을 D₂O에 녹여 ¹H-NMR로 확인하였다(Bruker, 600 MHz, Germany).

GCH 합성은 GC의 아민 그룹 몰수의 5 퍼센트에 해당하는 양의 succinimidyl 6-hydrazino nicotinate hydrochloride를 dimethylformamide에 용해하고, 이것을 교반중인 GC (0.2 M borate buffer, pH 8.2) 용액에 천천히 첨가하여 반응시켰다. 차광 상태로 상온에서 5시간 동안 저어주고, 그 다음 상온에서 투석하여 얻은 최종 산물을 동결 건조시켜 GCH를 얻었다. HYNIC 결합은 ¹H-NMR로 확인하였다.

3. GC, GMC 및 GCH의 ^{99m}Tc 표지

질소가스로 30분 이상 충전한 증류수로 HCl용액을 제조한 다음 SnCl₂·2H₂O 을 녹였다. GCH 또한 질소가스로 충전한 증류수에 녹였다. GCH에 tricine과 SnCl₂·2H₂O 용액을 섞고, 이 반응물에 ^{99m}Tc -pertechnetate 18 MBq을 섞어 표지하였다. 최종 용액에 PBS를 섞어 pH가 약 7.0이 되도록 하였다. 반응물은 30분 정도 실온에서 반응시킨 후, 0.22 μm filter (Millipore)로 여과하여 sterile하게 제조하였다. GCH (100 μg/μl)의 양은 고정시키고 tricine (2~15 μg), SnCl₂·2H₂O (1~6 μg), 염산농도 (0.01~0.04N)등을 변화시켜 표지수율이 가장 높은 농도를 결정하였다. GC 와 GMC도 tricine을 제

외하고 위와 동일한 방법으로 표지하였다.

4. 표지 수율의 측정과 표지 안정성 실험

실온에서의 표지 수율은 이동상으로 아세톤을 사용하고, 고정상으로 ITLC-SG를 사용하여 각각의 용액을 표지 한 후 즉시 전개시킨 후 TLC (Bioscan, USA) 스캐너를 이용하여 측정하였다. 표지 수율은 다음과 같은 식을 이용해 계산하였다.

$$\text{표지 수율} = (\text{Total count} - \text{Free pertechnetate의 count}) / \text{Total count} \times 100$$

혈청내 안정성은 각각의 화합물을 사람혈청 1 ml에 섞은 다음 37°C의 항온수조에 항온유지하면서 15분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간 간격으로 시료를 취하였고 위와 동일한 방법으로 안정성을 확인하였다.

5. 세포 독성측정 실험

동물 세포에 대한 화합물의 세포 독성을 측정하기 위하여 HepG2 (human hepatocellular cancer cell line)와 HeLa (human cervix carcinoma cell line) 세포를 96-well plates에 세포수가 각각 5×10^4 cells/ml가 되도록 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. 배양된 세포에 각각 0, 0.5, 1, 1.25, 5, 10, 25, 100 µg/ml 농도의 GC, GMC 및 GCH를 첨가한 다음 24시간 배양하였다. 배양 후에 배지를 버리고 FBS free 배지로 채운 후 MTT (Sigma, USA, 5 mg/ml)가 함유된 PBS 20 µl를 각각 첨가하고 37°C 에서 4 시간 배양시켰다. 배양 후에 배지를 버리고 건조시킨 뒤 well 에 DMSO (dimethyl sulfoxide) 100 µl를 넣어 5분간 방치시켜 MTT formazen을 용해시키고 ELISA reader를 사용하여 흡광도 570 nm에서 그 발색정도를 측정하였다. 3회 반복 측정하여 값을 구하였다.

6. 통계분석

자료의 분석은 SPSS 11.0 version (standard version, SPSS Inc. Chicago, USA)을 이용하였다. 세포 독성측정을 하기 위해 시행한 각 농도별 비교는 ANOVA를 시행하였으며, p값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의 있는 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

1. GC, GMC 및 GCH 의 합성

GC, GMC 및 GCH의 합성 모식도를 Fig. 1에 나타내었다. GC의 갈락토스 결합 비율은 갈락토스 그룹의 특징적인 정점

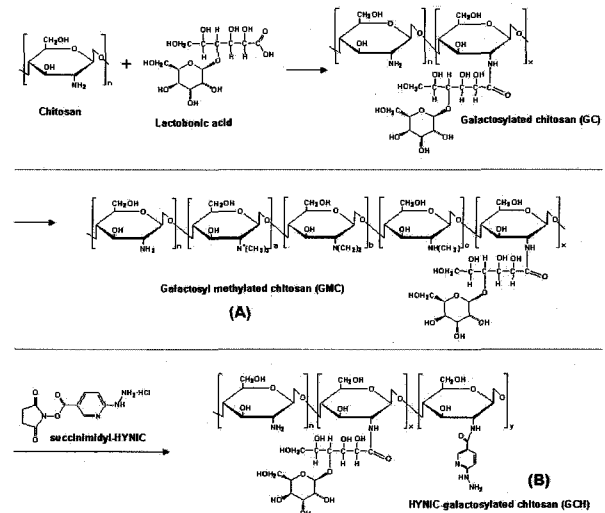


Fig. 1. Synthesis scheme of GC, GMC (A) and GCH (B).

(4.1 ppm)을 키토산의 원래 acetamide군이 나타내는 정점 (2.0 ppm)과 비교하여 계산하였다. GC에서 키토산에 결합된 락토비온산의 결합 비율은 GC의 아민 그룹 몰수의 7.42% 정도로 측정되었다. GC에 메틸화한 결과는 tri, di, mono가 각각 8.8, 46, 35.2%인 것을 확인하였다. HYNIC 결합여부는 HYNIC의 pyridine 고리의 3개의 수소위치에서 보이는 NMR 피크를 통해 확인하였다(8.6, 8.1, 6.9 ppm).

2. ^{99m}Tc 표지 수율의 측정과 표지 안정성 실험

^{99m}Tc-GC의 표지율은 이동상이 아세톤인 경우 15분에 96%, 1시간에 88%였고, 생리식염수인 경우 15분에 73.9%, 1시간에 72%에 그쳤다. ^{99m}Tc-GMC의 경우, methyl 그룹의 혼합으로 인해 이동상이 아세톤인 경우 15분과 1시간, 6시간 간격으로 시료를 취하여 안정성을 확인한 결과 각각 100%와 97%, 89%의 향상된 표지율을 보였고, 생리식염수인 경우 각각 96.3%와 95.8%, 75.6%의 표지율을 보였다. 이와 비교할 때, ^{99m}Tc-GCH는 6시간까지 95% 이상, 90% 이상의 표지율을 보여 6시간까지 안정성을 보였다. 특히 GCH는 사람 혈청에서 시행한 표지 안정성 실험에서도 6시간까지 95.7%의 표지율을 보여 안정성을 확인할 수 있었다. GMC와 GCH의 시간에 따른 표지율의 변화를 Fig. 2에 나타내었다.

3. 세포 독성측정 실험

96-well plates에 분주한 HepG2와 HeLa 세포주에 각각 화합물을 농도에 따라 처리하여 MTT 분석을 시행한 결과, GCH의 경우 세포 생존능은 각각 농도별로 HepG2에서 100.5 ± 3.5 , 99.9 ± 3.4 , 100.7 ± 2.9 , 100.5 ± 2.5 , 100.2 ± 3.5 , 96.2 ± 10.1 , 97.6 ± 1.9 이었고, HeLa에서는 101.4 ± 3.4 , 97.8 ± 6.7 , $99.9 \pm$

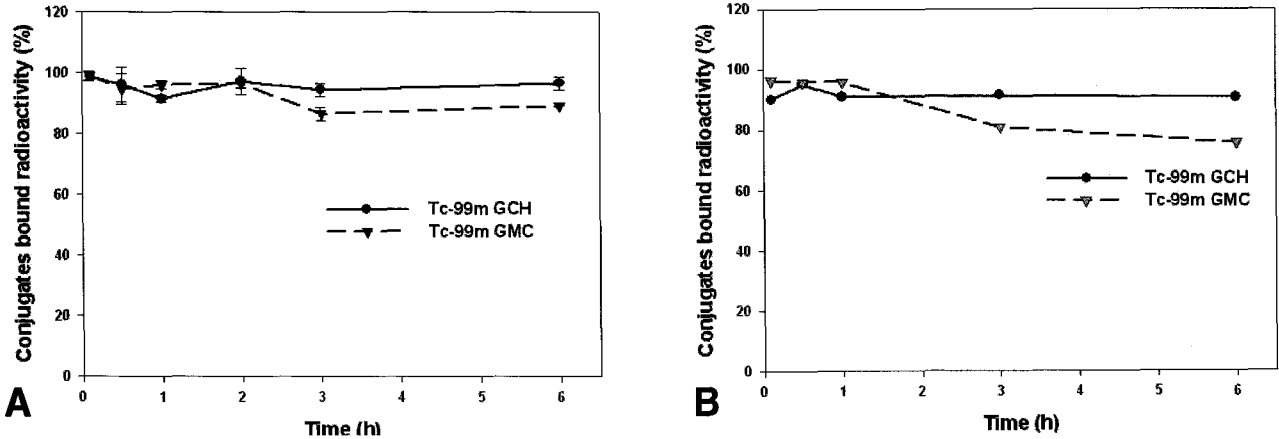


Fig. 2. Labeling efficiency of ^{99m}Tc-GMC and ^{99m}Tc-GCH in acetone (A) and saline (B).

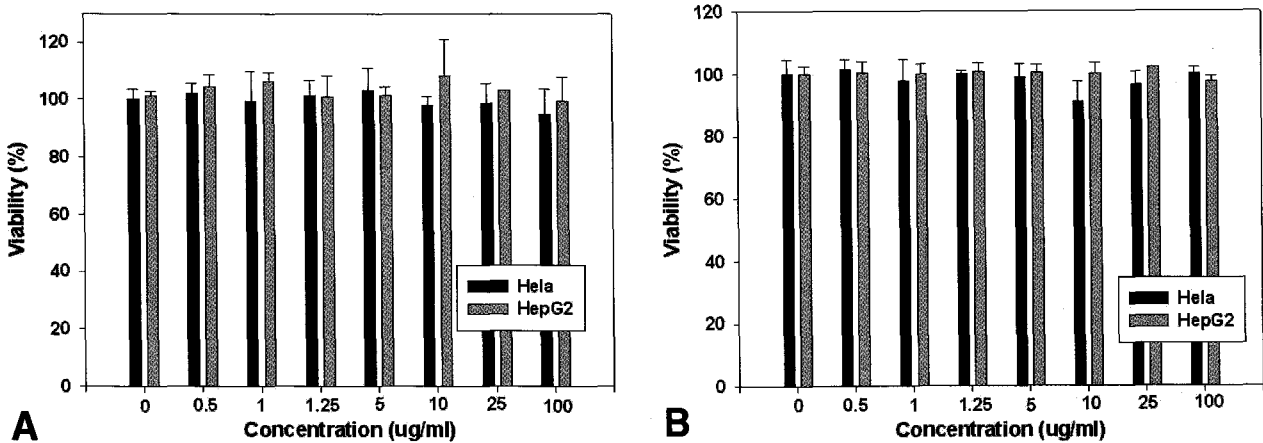


Fig. 3. MTT assay of GC (A) and GCH (B).

1.3, 99.1±4.1, 91.2±6.2, 96.4±4.6, 100.0±2.3 이었다. 이 결과는 대조군(GCH를 배지에 처리하지 않은 군, HepG2: 100±2.5, HeLa: 100±4.8)과 비교할 때 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. GMC의 세포독성 실험은 이전 실험에서 독성이 없음을 이미 보고하였으며,¹⁶⁾ GC를 처리한 세포의 생존능도 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

고찰

간 영상화를 위한 방사성의약품의 표적은 비특이적인 세포외공간, 세망내피계(reticuloendothelial system), 그리고 간세포 등 세 가지로 분류할 수 있다. 세포외공간을 표적으로 하는 방사성의약품은 비특이적이나 혈관신생(vascularization)과 관류(perfusion)에 대한 정보를 제공한다. 이에 비해, 세망내피계와 간세포를 표적하는 방사성의약품은 간 조직에 대해 특이적일 뿐 아니라, 직접 '기능'과 관련된 정보를 제공

해 조직의 성격을 결정하는데 더 많은 도움을 줄 수 있다. 따라서, 뛰어난 간세포 특이성을 가지는 방사성 의약품의 개발은 임상적으로 매우 중요한 문제로 대두되고 있다.

우리는 이전 연구에서 갈락토스 수식 키토산이 키토산의 갈락토스기를 통해 간세포의 표면에 위치하는 ASGP-R에 결합한다는 것에 착안하여, GC를 합성하여 ^{99m}Tc로 표지한 후 생체 내 분포를 확인해 보았다. 그 결과 GC은 고도의 간 특이성을 보였으며, 간 특이 영상을 위한 방사성 의약품으로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 그러나 이번 실험결과를 통하여 알 수 있듯이, ^{99m}Tc-GC은 표지 수율과 안정성면에서 불만족스러운 결과를 보였고, 이 문제점을 해결하기 위해 저자들은 연구에서 두 가지 방법을 이용했다.

첫 번째는 키토산의 glucosamine 중합체 중 리간드 그룹을 수식하기 위해 사용되는 부위 외에 리간드가 결합되지 않은 다른 부위를 부분적으로 메틸화시키는 방법이다. 표지 수율을 높이기 위해서 일반적으로 ethylenediaminetetraacetic

acid (EDTA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), DTPA-Ca, DTPA-Na, sodium tetramethylene diamine-tetraacetate 등의 화학적 착화제가 널리 쓰이고 있으나, 이 물질들은 대부분 다소간의 세포독성을 띄고 있다고 알려져 있으며, 이러한 착화제를 사용할 경우 원래 키토산의 생체내 분포에 영향을 미칠 수도 있기 때문에 저자들은 GC를 메틸화시키는 방법을 우선 사용하였다.

^{99m}Tc 은 $-\text{COO}^-$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ 같은 비공유 전자쌍을 가진 물질과 배위공유결합을 형성할 수 있기 때문에,^{22,23)} 키토산의 subunit인 glucosamine이 ^{99m}Tc 과 배위공유결합을 할 수 있을 것으로 생각하였다. 그러나 GC에 ^{99m}Tc 을 표지할 경우 표지 수율이 낮았는데, 그 이유는 키토산의 subunit인 glucosamine이 산성 조건에서 양이온을 띄면서 ^{99m}Tc 과의 배위결합 부위가 줄어들게 되는데 있다고 사료되었다. 이를 피하기 위해 원래 키토산의 1차 아민 구조를 2차, 3차 아민으로 바꾸면 배위 결합 부위가 늘어나 ^{99m}Tc 표지 수율을 높일 수 있을 것으로 사료되었다.²⁴⁾ 그 결과, GMC는 95% 이상의 표지 수율을 보여 GC에 비해 표지 수율이 매우 향상되었다. 그러나 GMC 역시 6시간째에 90% 이하의 표지율을 나타내 표지 안정성을 향상시킬 필요가 있었다.

이를 해결하기 위해 두 번째 방법으로 succinimidyl-HYNIC을 도입하였다. Succinimidyl말단은 반응 물질의 amine 말단과 결합하고, 또 hydrazine 말단은 ^{99m}Tc 과 결합할 수 있어서 양기능성 착화제로 알려져 있다. succinimidyl-HYNIC은 실온에서 수 시간 정도의 반응으로 간편하게 결합시킬 수 있고, ^{99m}Tc 과는 높은 표지 수율을 보인다. HYNIC을 도입한 결과 ^{99m}Tc -GCH는 95%이상의 높은 표지 수율을 보였고, 표지 후 6시간 후에도 약 10% 이하의 양만이 free ^{99m}Tc 으로 분리되고 나머지는 매우 뛰어난 안정적 표지화합물로 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 사람 혈청에서 시행한 표지 안정성 실험에서도 6시간째에 95.7%의 표지율을 보여 매우 안정적임을 확인할 수 있었다.

키토산은 키토신을 탈아세틸화한 것으로 glucosamine이 β -1,4 결합으로 길게 중합되어 있고 전이금속과 착화합물을 잘 형성하며,²⁵⁾ 독성이 매우 적고 생분해성과 생체적합성이 뛰어난 뿐만 아니라 다양한 생체유용성이 알려져 있다. 이번 연구의 세포 독성측정 실험에서도 GC, GMC 및 GCH가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 높은 농도에서도 대조군과 비교해 통계적으로 유의 있는 차이를 보이지 않아 키토산의 생체적합성을 확인할 수 있었다.

요약하면, 저자들은 GC를 메틸화하는 방법과 HYNIC의 도입을 통해 새로운 간세포 특이적 지향성을 갖는 키토산 화합물을 합성하였고, 이 화합물들은 ^{99m}Tc 으로 표지할 때 향상된 표지 수율과 뛰어난 표지 안정성을 보였다. 그리고 각 화

합물들의 세포 독성 역시 원래 키토산과 유의 있는 차이가 없이 매우 낮은 정도임을 증명하였다. 이러한 결과는 간특이 영상화 연구에 이 키토산 화합물을 이용할 수 있는 방사화학적 적합성을 제시하였다고 할 수 있다. 더 나아가서는 GC화합물을 이용한 간세포 지향 유전자 전달 및 약물전달 구조체의 생체내 모니터링에 핵의학적인 방법을 이용할 수 있음을 보여주는 기초 실험으로서의 의의가 있다 하겠다.

요 약

목적 : 저자들은 이전 연구에서 ^{99m}Tc -GC을 합성해 생체내 분포를 확인했다. 그 결과 GC는 고도의 간 특이성을 보였으며, 간 특이 영상을 위한 방사성 의약품으로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 그러나 ^{99m}Tc -GC는 표지 수율과 안정성 면에서 불만족스러운 결과를 보였다. 이번 연구는 GC를 메틸화하는 방법과 HYNIC의 도입을 통해 표지수율과 안정성을 향상시킬 수 있는지 알아보고, 그와 함께 이 화합물들의 세포 독성에 대해 연구해 보고자 하였다. **대상 및 방법 :** 합성한 GC, GMC, GCH를 ^{99m}Tc 로 표지하고 상온과 사람 혈청에서 표지 안정성을 측정하였으며, 6시간까지 시행하였다. 각 화합물을 0, 0.5, 1, 1.25, 5, 10, 25, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가한 HeLa와 HepG2 세포를 18시간동안 배양한 뒤 세포 생존능을 MTT를 이용해 측정하였다. **결과 :** 표지 후 실온에서의 안정성 실험을 한 결과 이동상으로 아세톤을 사용한 경우 ^{99m}Tc -GC는 15분에 96%, 1시간에 88%였고, ^{99m}Tc -GMC는 15분, 1시간, 6시간에서 각각 100%, 97%, 89%의 향상된 표지율을 보였고 ^{99m}Tc -GCH는 6시간까지 95% 이상을 보여 안정성이 보다 더 향상됨을 확인하였다. 또한 이동상으로 생리 식염수를 사용한 경우 ^{99m}Tc -GC는 15분, 1시간에 73.9%, 72%를 보였고, ^{99m}Tc -GMC의 경우 15분, 1시간, 6시간에서 96.3%, 95.8%, 75.6%의 표지율을 보였다. ^{99m}Tc -GCH는 90% 이상의 표지 안정성을 보였고, 사람 혈청에서 6시간까지 95.7%의 표지율을 보였다. MTT를 시행한 결과, 각 화합물을 처리한 세포주의 생존능은 대조군과 비교할 때 통계적으로 유의한 차이가 없었다. **결론 :** 저자들은 GC를 메틸화하는 방법과 HYNIC의 도입을 통해 새로운 간세포 특이적 지향성을 갖는 키토산 화합물을 합성하였고, 이 화합물들은 ^{99m}Tc 으로 표지할 때 향상된 표지 수율과 뛰어난 표지 안정성을 보였다. 그리고 각 화합물들의 세포 독성 역시 원래 키토산과 유의 있는 차이가 없이 매우 낮은 정도임을 증명하였다.

Reference

1. Pricer WE, Ashwell G. The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of liver. *J Biol Chem* 1971;246:4825-33.
2. Morell AG, Irvine RA, Sternlieb I, Scheinberg IH, Ashwell G. Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo. *J Biol Chem* 1968;243:155-9.
3. Marshall JS, Green AM, Pensky J, Williams S, Zinn A, Carlson DM. Measurement of circulating desialylated glycoproteins and correlation with hepatocellular damage. *J Clin Invest* 1974;54:555-62.
4. Sawamura T, Nakada H, Hazama H, Shiozaki Y, Sameshima Y, Tashiro Y. Hyperasialoglycoproteinemia in patients with chronic liver diseases and/or liver cell carcinoma. Asialoglycoprotein receptor in cirrhosis and liver cell carcinoma. *Gastroenterology* 1984;87:1217-21.
5. Spiess M. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry* 1990;29:10009-18.
6. Bettinger T, Remy JS, Erbacher P. Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes. *Bioconjug Chem* 1999;10:558-61.
7. Niidome T, Urakawa M, Sato H, Takahara Y, Anai T, Hatakayama T, et al. Gene transfer into hepatoma cells mediated by galactose-modified alpha-helical peptides. *Biomaterials* 2000;21:1811-19.
8. Stadalnik RC, Vera DR, Woodle ES, Trudeau WL, Porter BA, Ward RE, et al. Technetium-99m NGA functional hepatic imaging: preliminary clinical experience. *J Nucl Med* 1985;26:1233-42.
9. Sasaki N, Shiomi S, Iwata Y, Nishiguchi S, Kuroki T, Kawabe J, et al. Clinical usefulness of scintigraphy with ^{99m}Tc-galactosyl-human serum albumin for prognosis of cirrhosis of the liver. *J Nucl Med* 1999;40:1652-6.
10. Jeong JM, Hong MK, Lee J, Son M, So Y, Lee DS, et al. ^{99m}Tc-neolactosylated human serum albumin for imaging the hepatic asialoglycoprotein receptor. *Bioconjug Chem* 2004;15:850-5.
11. Park IK, Kim TH, Park YH, Shin BA, Choi ES, Chowdhury EH, et al. Galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol) as hepatocyte-targeting DNA carrier. *J Control Release* 2001;76:349-62.
12. Park IK, Yang J, Jeong HJ, Bom HS, Harada I, Akaike T, et al. Galactosylated chitosan as a synthetic extracellular matrix for hepatocytes attachment. *Biomaterials* 2003;24:2331-7.
13. Sandford P. Chitosan: commercial uses and potential applications. In: Skjakbrack G, Anthonsen T, Sandford P, editors. *Chitin and Chitosan*. London, UK:Elsevier Applied Science; 1989. p. 51-69.
14. Muzzarelli RAA, Rocchetti R. Enhanced capacity of chitosan for transition-metal ions in sulphate-sulphuric acid solutions. *Talanta* 1974;21:1137-43.
15. Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res* 1997; 34:21-8.
16. Ngah WS, Ab Ghani S, Kamari A. Adsorption behaviour of Fe(II) and Fe(III) ions in aqueous solution on chitosan and cross-linked chitosan beads. *Bioresour Technol* 2005;96:443-50.
17. Skorik YA, Gomes CA, Podbereskaya NV, Romanenko GV, Pinto LF, Yatluk YG. Complexation models of N-(2-carboxyethyl) chitosans with copper(II) ions. *Biomacromolecules* 2005;6:189-95.
18. Kim EM, Jeong HJ, Park IK, Cho CS, Kim CG, Bom HS. Hepatocyte-targeted nuclear imaging using ^{99m}Tc-galactosylated chitosan: conjugation, targeting, and biodistribution. *J Nucl Med* 2005;46:141-5.
19. Edwards DS, Liu S, Ziegler MC, Harris AR, Crocker AC, Heminway SJ, et al. RP463: a stabilized technetium-99m complex of a hydrazino nicotinamide derivatized chemotactic peptide for infection imaging. *Bioconjug Chem* 1999;10:884-91.
20. Decristoforo C, Mather SJ. Technetium-99m somatostatin analogues: effect of labelling methods and peptide sequence. *Eur J Nucl Med* 1999;26(8):869-76.
21. Siecal AB, Thanou M, Kortze AF, Verhoel JC, Brussee J, Junginger HE. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers* 1998;36:157-65.
22. Saha GB. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 4th ed. New York: Springer-Verlag; 1998. p. 98-9.
23. Arano Y. Delivery of diagnostic agents for gamma-imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;37:103-20.
24. Domingo JL. Developmental toxicity of metal chelating agents. *Reprod Toxicol* 1998;12:499-510.
25. Rhazi M, Desbrieres J, Tolaimate A, Rinaudo M, Vottero P, Alagui A. Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomer. *Polymer* 2002;43:1267-76.