

Synthesis of ^{68}Ga -labeled gold nanoparticles for tumor targeted positron emission tomography imaging

Jongho Jeon* and Mi Hee Choi

Korea Atomic Energy Research Institute, Advanced Radiation Technology Institute, Jeongeup, Korea

ABSTRACT

Herein we present the synthesis of ^{68}Ga -labeled gold nanoparticles for *in vivo* PET imaging. A novel chelator DTPA-Cys was easily prepared from diethylenetriaminepentaacetic dianhydride in high yield. The $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor targeted gold nanoparticle probe was synthesized by using DTPA-Cys, polyethylene glycol and cRGD peptide. ^{68}Ga labeling of cRGD conjugated gold nanoparticle was carried out at 40°C for 30 min. Observed radiochemical yield was more than 75% as determined by radio-TLC and the probe was purified by centrifugation. In vitro stability test showed that 90% of ^{68}Ga -labeled gold nanoparticle probe was stable in FBS for 1 h. Those results demonstrated that ^{68}Ga -labeled gold nanoparticle could be used as a potentially useful probe for specific tumor imaging. **J Radiopharm Mol Probes 1(1):46-52, 2015**

Key Words: Gold nanoparticle, ^{68}Ga , Radiolabeling, Molecular imaging, Positron emission tomography

Introduction

지난 수년간 다양한 구조와 크기의 금 나노입자는 특정 물질의 초고감도 감지 및 검출, 약물전달, 질병의 진단과 치료 분야 연구에 폭넓게 연구되어 왔다(1,2). 금 나노입자는 DNA, RNA, 단백질 등 다양한 생체 물질을 Au 원자와 thiol 간의 공유결합을 활용하여 많은 양을 나노입자 표면에 쉽게 도입할 수 있을 뿐만 아니라 생체 내 독성도 다른 금속 나노입자에 비해 적은 것으로 알려져 있어 생물학 및 의학에서 응용 분야가 더욱 확대될 것으로 기대된다. 실제로 2011년 S. Gambhir group에 의해 발표된 논문에서 따르면 5종류의 금 나노입자가 유전자전달, 라만분광법을 통한 생체 내 질병진단 등의 분야에서 향후 임상에서 적용될 수 있는 후보물질로 분류되어 연구 중인 것으로 알려져 있다(3). 앞에서 언급한 것과 같이 금 나노입자는 낮은 독성과 다양한 물질을 쉽게 도입할 수 있는 특성 때문에 생체 내 분자영상 분야에서 활발하게 연구되어 왔다. 그러나 자기공명분광학(Magnetic Resonance

Imaging, MRI)에 활용되는 산화철, 산화망간 나노입자 그리고 광학영상(Optical Imaging)에 이용되는 다양한 양자점(Quantum Dot)과는 다르게 금 나노입자는 그 자체로 생체 내에서 검출하기 어려운 한계점을 가지고 있다. 금 나노입자는 최근 여러 연구자들에 의해 X-ray흡수가 좋은 금의 특성이 활용되어 컴퓨터단층촬영(computed Tomography, CT) 조영제로 개발되어 왔다(4,5). 그러나 이러한 연구에도 불구하고 원하는 생체 내 X-ray영상을 얻기 위해서는 매우 높은 농도의 금 나노입자가 요구되는 문제점을 가지고 있다. 이러한 결과는 낮은 생체 독성을 가지는 금 나노입자의 특성을 고려하더라도 생체 내에서 잠재적인 부작용을 가져 올 수 있을 것으로 예상된다.

최근 금 나노입자의 초고감도 생체영상을 위해서 다양한 방사선 동위원소를 표지하여 분자영상에 활용한 결과들이 발표되었다. 대표적으로 ^{64}Cu , ^{18}F , ^{68}Ga , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 등이 다양한 방법으로 금 나노입자에 표지되어 물질의 생체 내 동태 평가와 중앙 특이적 양전자 방출 단층 촬영(positron emission tomography, PET) 및 단일광자방출전산

Received March 10, 2015 / Revised March 26, 2015 / Accepted March 27, 2015

Corresponding Author: Jongho Jeon

Korea Atomic Energy Research Institute, Advanced Radiation Technology Institute, 29 Geumgu-gil, Jeongeup 580-185, Korea
Tel: +82-63-570-3374, Fax: +82-63-570-3379, E-mail: jeonj@kaeri.re.kr

Copyright © 2015, The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

화단층촬영(single photon emission computed tomography, SPECT) 연구에 활용되었다(6-11). 특히 이 중 ^{68}Ga 의 경우 반감기가 68분으로 임상에서의 활용에 적합하며 cyclotron 없이도 PET영상이 가능한 프로브를 킬레이션을 이용한 표지방법을 통해 쉽게 생산할 수 있기 때문에 금 나노입자의 장점과 결합한다면 다양한 분자영상연구에 효율적으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 현재까지 금 나노입자의 ^{68}Ga 표지에 관한 연구는 나노입자에 1,4,7-triazacyclononane-triacetic acid (NOTA)를 도입하여 ^{68}Ga 를 표지하여 체내 영상에 활용한 결과가 대표적으로 알려져 있다(12). 본 연구에서는 생체 내 영상연구에 활용할 수 있는 새로운 나노물질을 개발하기 위하여 킬레이트제를 포함하고 있는 안정적인 금 나노입자의 합성방법을 소개하고자 한다. 또한 종양 특이적 영상을 위해 cyclic RGD 펩타이드가 도입된 금 나노입자에 ^{68}Ga 를 높은 수율로 표지 할 수 있는 효율적인 방법을 제시하고자 한다.

Materials and Methods

1. 장비 및 시약

Chloroauric acid, trisodium citrate, diethylenetriaminepentaacetic dianhydride (DTPADA), triethylamine (TEA), cysteine methylester hydrochloride은 Sigma-Aldrich (Korea) 제품을 사용하였다. 30 nm, 50 nm, 80 nm 크기의 금 나노입자는 Ted Pella (USA) 제품을 사용하였다. mPEG₅₀₀₀ thiol, amino PEG₅₀₀₀ thiol은 Laysan Bio (USA) 제품을 사용하였다. Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC)는 Pierce Biotechnology (USA) 제품을 사용하였다. RGD peptide (RGDfC)는 Peptides International (USA) 제품을 사용하였다. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 제너레이터는 Cyclotron co. (Obninsk, Russia) 제품을 사용하였다.

2. 13 nm 금 나노입자의 합성

13 nm 금 나노입자는 chloroauric acid 용액을 trisodium citrate로 환원하는 방법을 통하여 합성할 수 있었다. 1 mM의 chloroauric acid 용액 200 mL를 가열하여 끓인 후 38.8 mM의 trisodium citrate 용액 20 mL를 빠르게 적가한다. 약 15 분 후 가열을 멈추고 용액을 실온으로 식힌다. 0.45 μm 의 syringe filter를 사용하여 합성된 금 나노입자 용액을 여과하여 원하는 13 nm 크기의 금 나노입자를 얻을 수 있었

다. 입자의 크기는 투과전자현미경을 이용하여 확인하였으며, UV흡광스펙트럼을 이용하여 측정된 금 나노입자의 농도는 약 10 nM 이었다.

3. ^{68}Ga 킬레이트제 (DTPA-Cys)의 합성

DTPADA (715 mg, 2 mmol)를 20 mL의 DMF에 녹인다. 70°C의 온도로 가열 한 후 10 mL의 DMF에 녹아 있는 cysteine methylester hydrochloride (695 mg, 4 mmol)와 TEA (0.6 mL)를 각각 차례대로 넣어 섞는다. 12시간 반응 후 반응 용액을 0°C로 식힌다. 그 후 낮은 온도에서 침전된 흰색의 HCl/TEA 염을 glass filter로 여과하였다. 남은 DMF 용액을 감압증류기로 대부분 제거한 후 20 mL의 chloroform을 적가하여 결과물의 침전을 유도한다. 생성된 침전물을 glass filter를 이용하여 분리한 후 chloroform으로 2-3 번 세척한다. 이후 진공에서 남아 있는 용매를 제거하여 DTPA-Cys 1 (1004 mg, 1.6 mmol)을 얻을 수 있었다. HRMS calculated for $[\text{M}+\text{H}]^+$ 628.1953, Found 628.1949; Elemental analysis calculated: C, 42.10%; H, 5.94%; N, 11.16%; S 10.22%, Found C, 42.40%; H, 5.98%; N, 11.26%; S 10.19%

4. Polyethylene glycol로 표면 개질된 13 nm 금 나노입자의 합성 (2-5)

Tween 20 (1 mM, 1.5 mL) 수용액을 위의 방법으로 합성된 13 nm 금 나노입자(10 nM, 15 mL)와 섞어 주고 15 분간 교반한다. 반응용액에 DTPA-Cys (100 μM , 0.9 mL) 수용액을 적가하고 15분간 교반한다. 그 후 mPEG₅₀₀₀-thiol (100 μM , 2.7 mL)를 넣고 2시간 동안 교반한다. 반응 종료 후 원심분리(15,000 rpm \times 3 번, 20분, 4°C)를 하여 표면 개질된 금 나노입자 2를 얻을 수 있었다. UV흡광스펙트럼을 이용하여 금 나노입자 결과물을 정량하고 약 100 nM 농도로 농축하여 보관한다. 30 nm, 50 nm, 80 nm 크기의 금 나노입자도 같은 방법을 통해 mPEG₅₀₀₀-thiol 표면 개질한 결과물 (3-5)을 얻을 수 있었다.

5. Cyclic RGD 펩타이드가 conjugation된 금 나노입자의 합성 7

Tween 20 (1 mM, 1.5 mL) 수용액을 위의 방법으로 합성된 금 나노입자(10 nM, 15 mL)와 섞어 주고 15분간 교반한다. DTPA-Cys (100 μM , 0.9 mL) 수용액을 적가하고

15분간 교반한다. 그 후 amino PEG₅₀₀₀-thiol (100 μM, 2.7 mL)를 넣고 2시간 동안 교반한다. 원심분리(15,000 rpm × 3 번, 20분, 4°C)를 통해 용액에 반응하지 않은 PEG₅₀₀₀-thiol를 제거하고 금 나노입자 pellet에 Sulfo-SMCC (300 μM, 500 μL in 10 mM PB, pH = 8.4) 수용액을 넣어 준다. 1시간 동안 강하게 교반한 후 원심분리(15,000 rpm × 2 번, 20분, 4°C)를 통해 용액에 반응하지 않은 Sulfo-SMCC를 제거한다. 그 후 cysteine이 포함 된 cyclic RGD 펩타이드 (cRGDfC, 300 μM, 500 μL in 10 mM PB, pH=7.3)를 금 나노입자에 섞어주고 2시간 동안 강하게 교반한 후 원심분리(15,000 rpm × 2 번, 20분, 4°C)를 통해 정제하여 펩타이드가 도입된 금 나노입자 7을 얻을 수 있었다. UV흡광 스펙트럼을 통해 금 나노입자 결과물을 정량하고 약 100 nM 농도로 농축하여 보관한다.

6. 금 나노입자의 ⁶⁸Ga표지

Cyclic RGD 펩타이드가 도입된 금 나노입자 7 (100 nM, 0.3 mL)에 ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga 제너레이터에서 용출된 ⁶⁸GaCl₃ 37 MBq/0.1 M HCl 0.5 mL를 넣고 섞어 준다. 1 M Na₂CO₃를

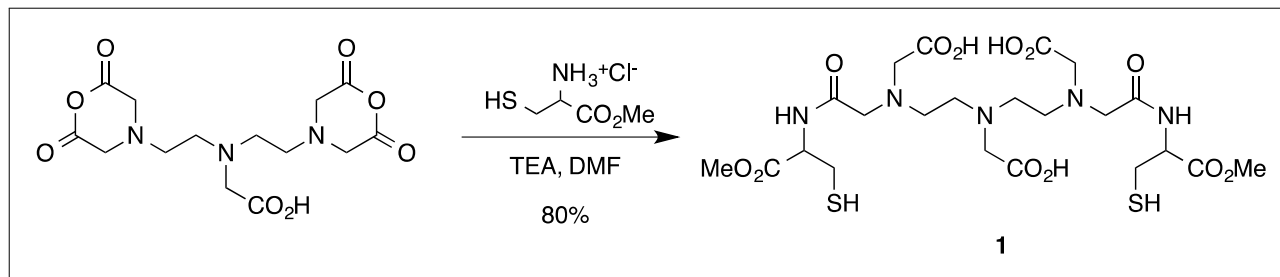
이용하여 pH를 약 4-5로 맞추고 45 °C에서 30분간 표지 반응을 진행하였다. 표지효율을 측정하기 위해서 ITLC를 정지상으로 0.1 M citric acid를 이동상으로 각각 사용하여 크로마토그래피를 시행하고 결과를 radio-TLC scanner로 분석하였다. 표지 후 원심분리를 통해 정제하여 ⁶⁸Ga가 표지된 금 나노입자 8를 75%의 radiochemical yield로 얻을 수 있었다.

7. ⁶⁸Ga표지된 금 나노입자의 시험관내 안정성 평가

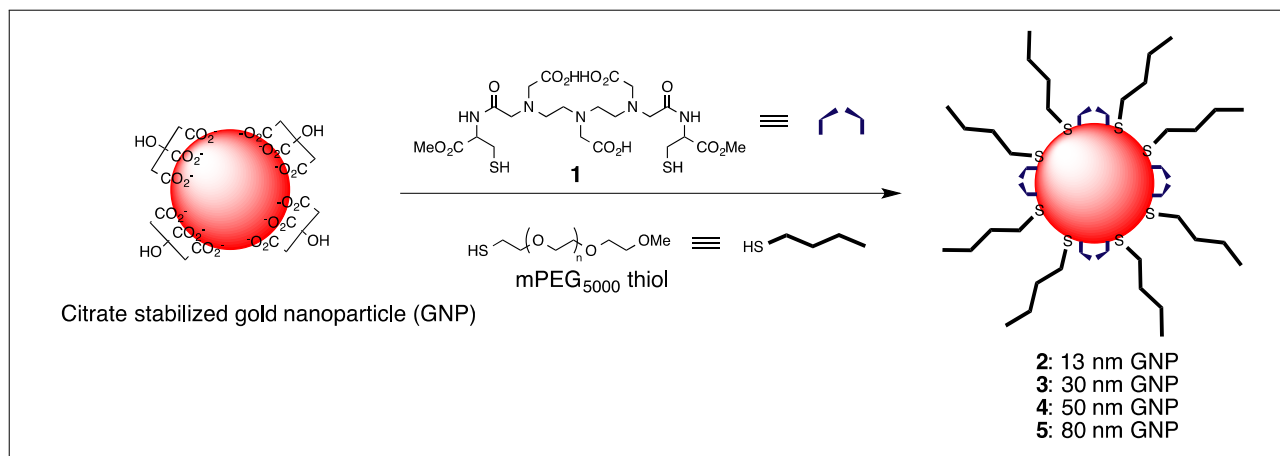
위의 방법으로 ⁶⁸Ga로 표지된 금 나노입자 8 (0.1 mL)에 fetal bovine serum (FBS, 0.9 mL)를 섞은 뒤 각각 30, 60, 120, 240분 간격으로 ITLC를 고정상으로, 0.1 M citric acid를 이동상으로 각각 사용하여 크로마토그래피를 시행하고 결과를 radio-TLC scanner로 분석하였다.

Results and Discussion

방사성동위원소가 표지된 나노입자를 동물실험에 활용하기 위해서는 ⁶⁸Ga을 표지할 수 있는 킬레이터제가 나노



Scheme 1. Synthesis of DTPA-Cys 1



Scheme 2. Synthesis of DTPA-Cys and PEG conjugated gold nanoparticles

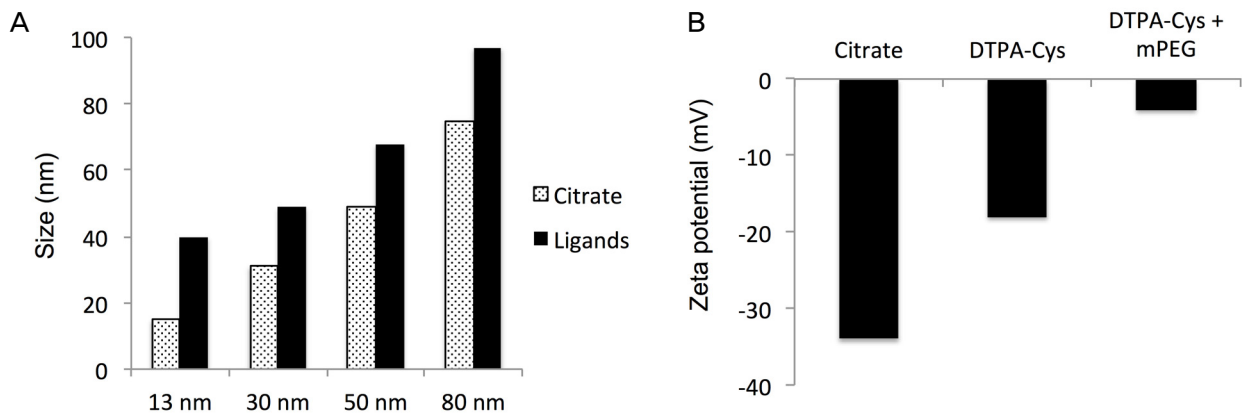


Figure 1. (A) ELS analysis of gold nanoparticle probes (13 nm, 30 nm, 50 nm and 80 nm). (B) Zeta potential analysis of 13 nm gold nanoparticle 2.

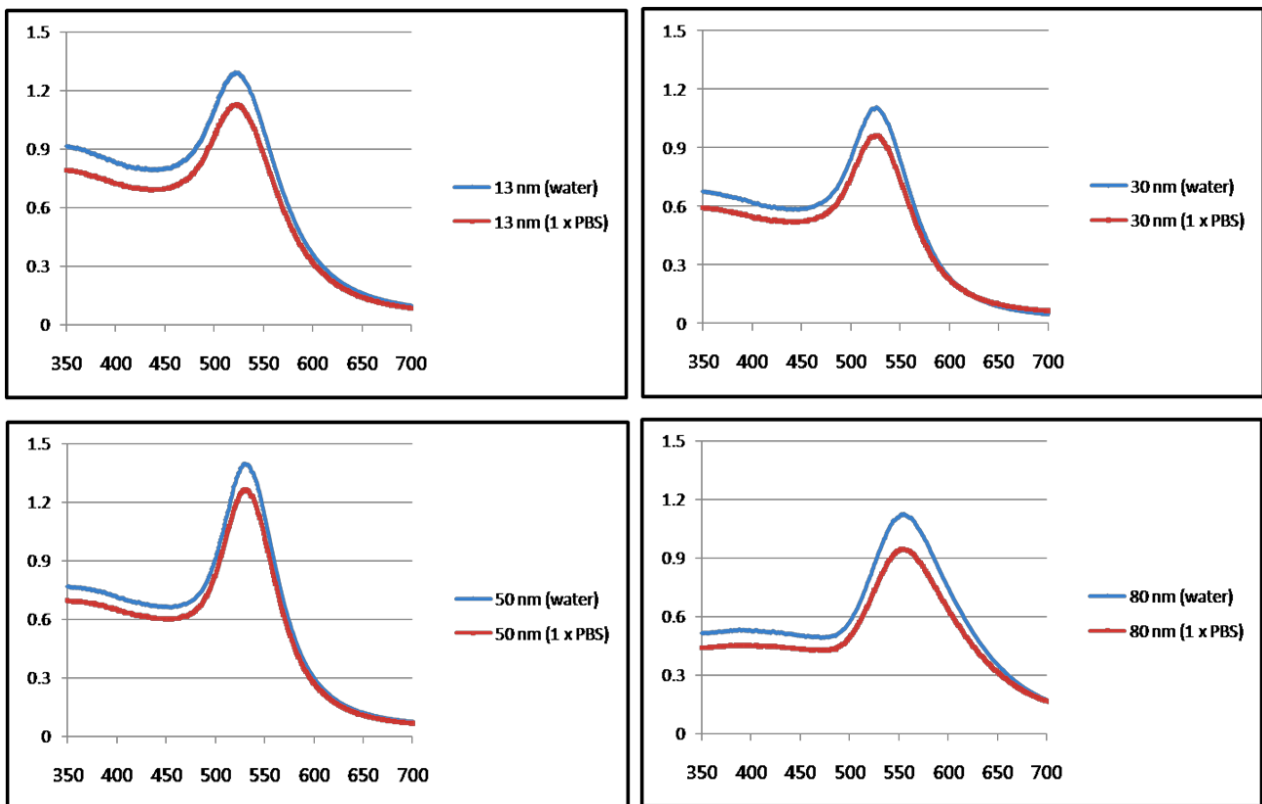
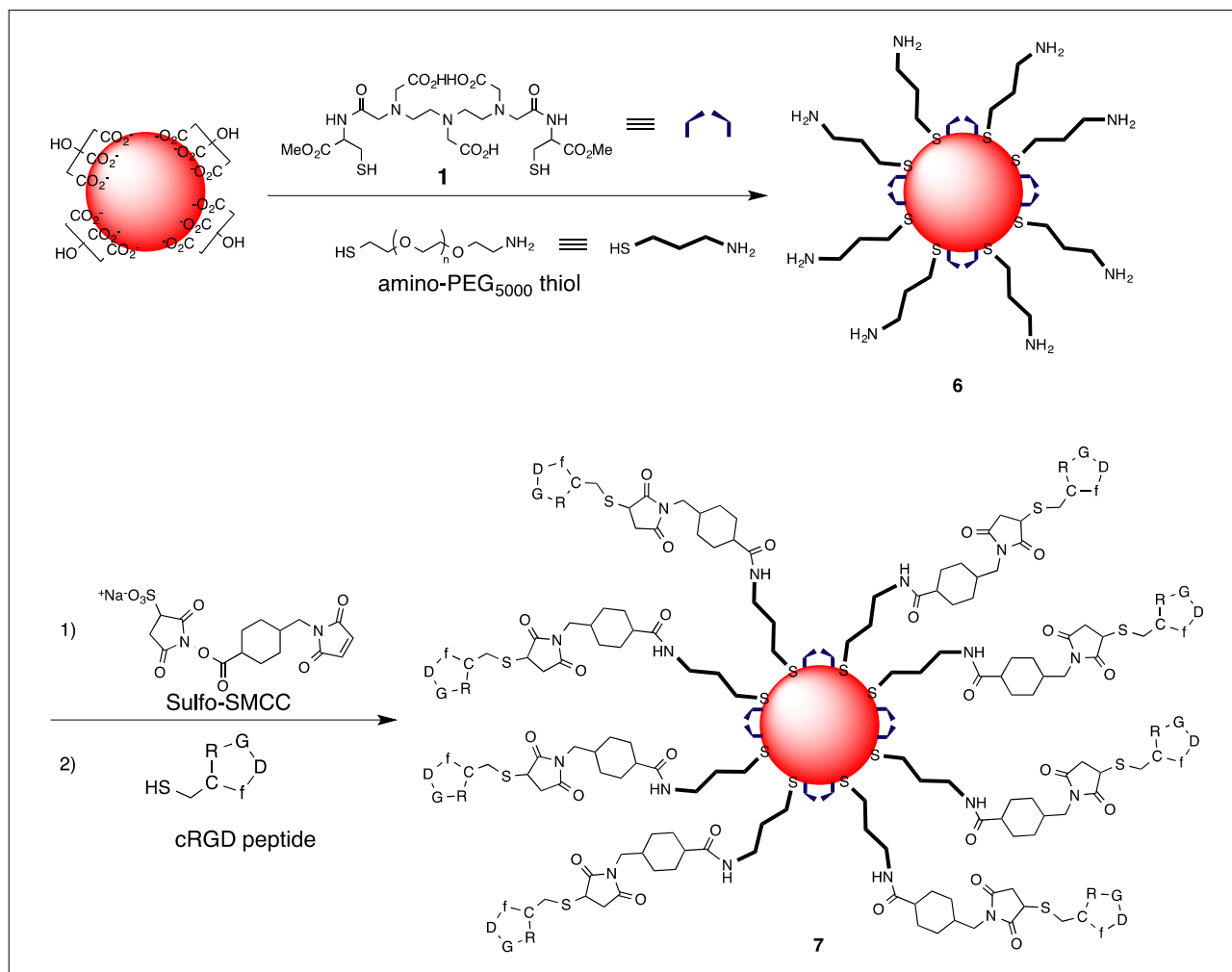


Figure 2. UV absorption spectrum of ligands (DTPA-Cys and mPEG) modified 13 nm, 30 nm, 50 nm and 80 nm gold nanoparticle probes.

입자에 도입되어야 하고, 다양한 범위에서의 pH 및 높은 농도의 염 등 여러 조건에서 안정한 나노입자가 요구된다. 이 연구에서는 ^{68}Ga 을 표지할 수 있으면서 동시에 금 나노입자에 안정성을 줄 수 있는 킬레이터제를 우선적으로 합성하고자 하였다.

^{68}Ga 을 표지하기 위한 킬레이터제(DTPA-Cys, 1)는 DTPADA와 cysteine methylester를 염기 조건에서 반응시켜

쉽게 합성할 수 있었다(Scheme 1). 합성된 DTPA-Cys는 thiol기가 두 개 포함되어 있으므로 13 nm 크기의 금 나노입자와 섞어 주었을 때 실온에서도 쉽게 나노입자 표면에 도입할 수 있었다. DTPA-Cys를 도입한 후 생체 내 실험을 위해 평균 분자량 5000의 polyethylene glycol (mPEG₅₀₀₀-SH)를 금 나노입자에 도입해 주었다(Scheme 2). 이렇게 합성된 금 나노입자는 강산 및 강염기 조건

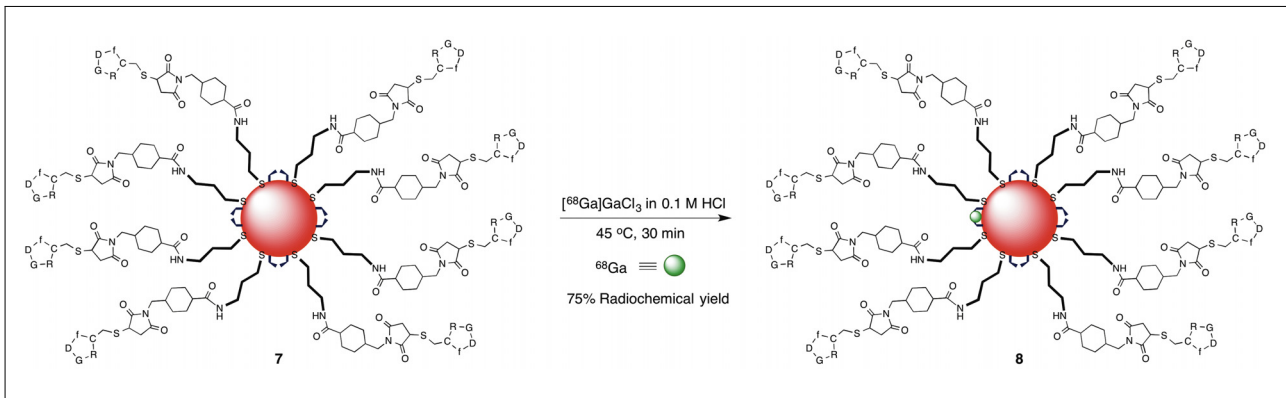


Scheme 3. Synthesis of cRGD conjugated 13 nm gold nanoparticle 7

(pH=1-13) 그리고 높은 농도의 GaCl_3 (10 mM), NaCl (200 mM)에서 나노입자의 안정성이 잘 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 표면개질방법으로 30, 50, 80 nm의 금 나노입자 표면에도 두 가지 종류의 리간드 (DTPA-Cys, mPEG₅₀₀₀-SH)를 간단하게 도입할 수 있었다. Electron light scattering (ELS)분석 결과 mPEG₅₀₀₀-SH가 도입된 금 나노입자는 원래 크기보다 약 20 nm 정도로 큰 size로 각각 관찰되었다. 또한 zeta potential측정을 통한 분석을 통해서도 리간드가 도입된 13 nm 크기의 금 나노입자를 분석할 수 있었다(Figure 1). Zeta potential분석결과 음이온을 가지는 citrate로 안정화된 금 나노입자는 -34 mV이지만 DTPA-Cys 리간드가 도입되었을 경우 약 -18 mV 그리고 DTPA-Cys와 mPEG₅₀₀₀가 동시에 도입된 경우 -4 mV 값을 보였다. 이러한 방법으로 합성된 30, 50, 80 nm 크기의 금 나노입자는 모두 1 × PBS에서 특별한 aggregation 현상 없이 입

자의 안정성이 24시간 이상 잘 유지되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2).

이와 같은 결과를 바탕으로 $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor를 targeting 할 수 있는 cyclic RGD 펩타이드를 금 나노입자에 도입하여 종양을 특이적으로 영상화할 수 있는 나노입자 프로브를 합성하고자 하였다(Scheme 3). 이 경우 하나의 금 나노입자에 많은 양의 cyclic RGD와 킬레이트제가 도입되어 종양 표적 특이성이 크게 증가할 수 있을 뿐만 아니라 ⁶⁸Ga의 표지효율도 증가하는 효과를 보일 수 있을 것으로 기대된다. Cyclic RGD 펩타이드의 도입은 아민그룹이 있는 PEG₅₀₀₀을 이용하여 진행할 수 있었다. Sulfo-SMCC와 반응하여 금 나노입자에 maleimide를 도입하고 다음 반응으로 cysteine이 있는 cyclic RGDyC과 반응하여 펩타이드와 polyethylene glycol 그리고, 킬레이트제가 도입된 프로브 7를 얻을 수 있었다. 이렇게 합성된 금 나노입



Scheme 4. ^{68}Ga labeling of cRGD conjugated gold nanoparticle 7.

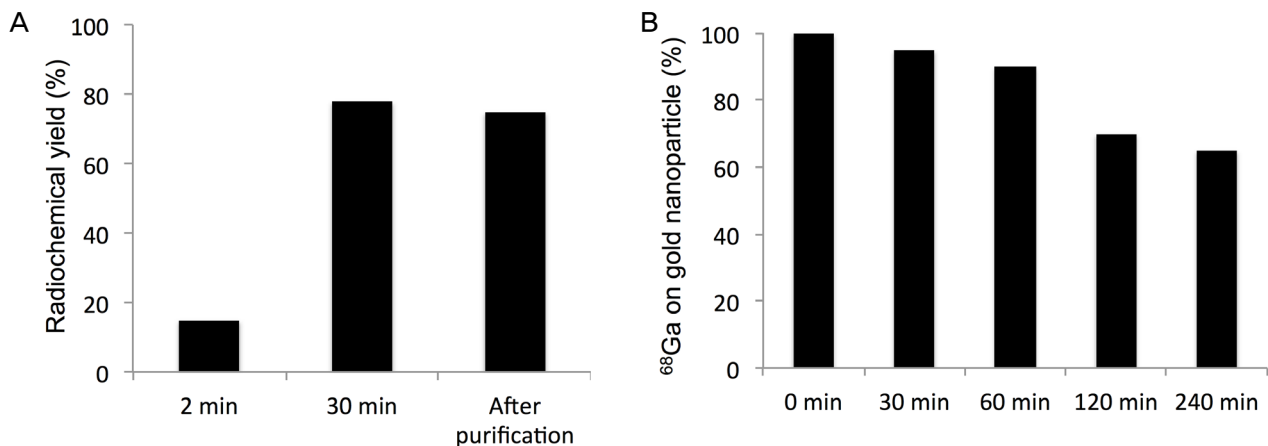


Figure 3. (A) ^{68}Ga -labeling of gold nanoparticle probe 7. (B) In vitro stability test of ^{68}Ga -labeled gold nanoparticle probe 8 in FBS.

자는 0.5 M NaOH, 0.5 M HCl 그리고 1 M NaCl 조건에서 24시간 동안 안정하였다.

^{68}Ga 을 표지하는 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 제너레이터에서 용출된 $^{68}\text{GaCl}_3$ (37 MBq in 0.1 M HCl) 와 cRGD펩타이드가 붙은 금 나노입자를 이용하여 진행되었다(Scheme 4). 1 M Na_2CO_3 를 이용하여 pH를 약 4로 맞추고 45°C에서 30분간 반응하였다. 표지 반응 결과는 radio-TLC를 통해 확인할 수 있었다. 표지반응을 시작하고 2분 후에는 많은 양의 ^{68}Ga 이 표지되지 않은 상태로 남아있는 것을 확인할 수 있으나 30분 후에는 대부분의 ^{68}Ga 이 금 나노입자에 표지된 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3A). 이후 원심분리를 하여 반응하지 않은 소량의 ^{68}Ga 를 제거하여 ^{68}Ga 이 표지된 금 나노입자 프로브를 75%의 수율로 합성할 수 있었다.

합성된 프로브의 시험관 내 안정성을 확인하기 위해 0.1 mL의 금 나노입자를 0.9 mL의 FBS와 혼합하여 37 °C에 보관하였다. 각 시간 별로 radio-TLC로 측정된 금 나노입자 프로브의 안정성 결과는 다음과 같다(Figure 3B). 60

분 후 약 90%의 ^{68}Ga 이 금 나노입자와 결합하고 있음을 확인할 수 있고 120분 후에는 67%로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. ^{68}Ga 의 반감기가 68분임을 고려하였을 때 본 연구에서 합성된 금 나노입자 프로브는 동물영상 연구용으로 활용 가능할 것으로 기대된다. 향후 본 연구에서 만들어진 금 나노입자 프로브를 활용하여 동물에서 종양 특이적 PET영상 실험이 수행될 예정이다. 또한 금 나노입자에 표지된 ^{68}Ga 의 안정성을 본 연구에서 얻은 결과보다 더 증가시키기 위해 새로운 구조의 킬레이트제 합성이 진행되고 있다.

Conclusion

본 연구를 통해 ^{68}Ga 표지를 위한 새로운 금 나노입자 프로브의 합성과 표지 방법을 제공할 수 있었다. 실제 ^{68}Ga 표지를 진행하였을 때 약 75% 이상의 높은 표지 효율을 얻을 수 있었다. 금 나노입자에 표지된 ^{68}Ga 의 시험관

내 안정성은 FBS에서 시간이 지나면서 감소하는 결과를 관찰할 수 있었으나 향후 새로운 구조의 킬레이트제의 개발을 통해 이러한 문제점은 개선될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 연구에서 사용된 cyclic RGD peptide뿐만 아니라 다른 종류의 targeting 물질을 활용한다면 다양한 분자영상 나노 프로브의 개발로 이어질 것으로 예상된다.

Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation of Korea grant funded by the Korea government (Grant no. 2012M2B2B1055245 and 2012M2A2A6011335) and Korea Atomic Energy Research Institute.

References

- Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem Rev* 2012;112:2739-2779.
- Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspective. *Chem Soc Rev* 2012;41:2256-2282.
- Thakor AS, Jokerst J, Zavaleta C, Massoud TF, Gambhir SS. Gold nanoparticles: a revival in precious metal administration to patients. *Nano Lett* 2011;11:4029-4036.
- Xi D, Dong S, Meng X, Lu Q, Meng L, Ye J. Gold nanoparticles as computerized tomography (CT) contrast agents. *RSC Adv* 2012;2:12515-12524.
- Curry T, Kopelman R, Shilo M, Popovtzer R. Multifunctional theranostic gold nanoparticles for targeted CT imaging and photothermal therapy. *Contrast Media Mol Imaging* 2014;9:53-61.
- Zhao Y, Sultan D, Detering L, Cho S, Sun G, Pierce R, Wooley KL, Liu Y. Copper-64-Alloyed Gold Nanoparticles for Cancer Imaging: Improved Radiolabel Stability and Diagnostic Accuracy. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53:156-159.
- Zhu J, Chin J, Wängler C, Wängler B, Lennox RB, Schirrmacher R. Rapid ^{18}F -labeling and loading of PEGylated gold nanoparticles for in vivo applications. *Bioconjugate Chem* 2014;25:1143-1150.
- Guerrero S, Herance JR, Rojas S, Mena JF, Gispert JD, Acosta GA, Albericio F, Kogan MJ. Synthesis and in vivo evaluation of the biodistribution of a ^{18}F -labeled conjugate gold-nanoparticle-peptide with potential biomedical application. *Bioconjugate Chem* 2012;23:399-408.
- Kim YH, Jeon J, Hong SH, Rhim WK, Lee YS, Youn H, Chung JK, Lee MC, Lee DS, Kang KW, Nam JM. Tumor targeting and imaging using cyclic RGD-PEGylated gold nanoparticle probes with directly conjugated iodine-125. *Small* 2011;7:2052-2060.
- Morales-Avila E, Ferro-Flores G, Ocampo-García BE, De León-Rodríguez LM, Santos-Cuevas CL, García-Becerra R, Medina, LA, Gómez-Oliván L. Multimeric system of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled gold nanoparticles conjugated to c[RGDfK(C)] for molecular imaging of tumor $\alpha(v)\beta(3)$ expression. *Bioconjug Chem* 2011;22:913-922.
- Jiménez-Mancilla N, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, Ocampo-García B, Luna-Gutiérrez M, Azorín-Vega E, Isaac-Olivé K, Camacho-López M, Torres-García E. Multifunctional targeted therapy system based on $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{177}\text{Lu}$ -labeled gold nanoparticles-Tat(49-57)-Lys³-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells. *J Label Compd Radiopharm* 2013;56:663-671.
- Frigell J, García I, Gómez-Vallejo V, Llop J, Penadés S. ^{68}Ga -labeled gold glyconanoparticles for exploring blood-brain barrier permeability: preparation, biodistribution studies, and improved brain uptake via neuropeptide conjugation. *J Am Chem Soc* 2014;136:449-457.