

양전자 방출핵종 ^{68}Ga 을 이용한 NOTA와 DOTA의 표지 및 시험관내 특성 연구

서울대학교 의과대학 핵의학교실
정재민 · 김영주 · 이윤상 · 이동수 · 정준기 · 이명철

Radiolabeling of NOTA and DOTA with Positron Emitting ^{68}Ga and Investigation of *In Vitro* Properties

Jae Min Jeong, Ph.D., Young Ju Kim, B.S., Yun-Sang Lee, Ph.D., Dong Soo Lee, M.D.,
June-Key Chung, M.D., and Myung Chul Lee, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea.

Purpose: We established radiolabeling conditions of NOTA and DOTA with a generator-produced PET radionuclide ^{68}Ga and studied *in vitro* characteristics such as stability, serum protein binding, octanol/water distribution, and interference with other metal ions. **Materials and Methods:** Various concentrations of NOTA · 3HCl and DOTA · 4HCl were labeled with 1 mL $^{68}\text{GaCl}_3$ (0.18~5.75 mCi in 0.1 M HCl) in various pH. NOTA · 3HCl (0.373 mM) was labeled with $^{68}\text{GaCl}_3$ (0.183~0.232 mCi/0.1 M HCl 1.0 mL) in the presence of CuCl_2 , FeCl_2 , InCl_3 , FeCl_3 , GaCl_3 , MgCl_2 or CaCl_2 (0~6.07 mM) at room temperature. The labeling efficiencies of ^{68}Ga -NOTA and ^{68}Ga -DOTA were checked by ITLC-SG using acetone or saline as mobile phase. Stabilities, protein bindings, and octanol distribution coefficients of the labeled compounds also were investigated. **Results:** ^{68}Ga -NOTA and ^{68}Ga -DOTA were labeled optimally at pH 6.5 and pH 3.5, respectively, and the chelates were stable for 4 hr either in the reaction mixture at room temperature or in the human serum at 37°C. NOTA was labeled at room temperature while DOTA required heating for labeling. ^{68}Ga -NOTA labeling efficiency was reduced by CuCl_2 , FeCl_2 , InCl_3 , FeCl_3 or GaCl_3 , however, was not influenced by MgCl_2 or CaCl_2 . The protein binding was low (2.04~3.32%). Log P value of ^{68}Ga -NOTA was -3.07 indicating high hydrophilicity. **Conclusion:** We found that NOTA is a better bifunctional chelating agent than DOTA for ^{68}Ga labeling. Although, ^{68}Ga -NOTA labeling is interfered by various metal ions, it shows high stability and low serum protein binding. (Nucl Med Mol Imaging 2009;43(4):330-336)

Key Words: Ga-68, gallium, protein binding, bifunctional chelating agent, generator, NOTA, DOTA

서 론

최근 임상 PET이 널리 보급됨에 따라 제너레이터에서 생산되는 양전자 방출 핵종인 ^{68}Ga 의 중요성이 증가되었다.¹⁾ ^{68}Ga 은 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 제너레이터에서 생산되는데 반감기가 67.6 분이고 화학적으로는 주기율표상에서 3A족에 속하

는 금속이다.²⁻⁴⁾ 작은 펩타이드들에 표지하면 친수성을 띠므로 신장을 통하여 체외로 빠르게 배설되어 ^{68}Ga 이 표지된 방사성의약품은 보다 선명한 표적의 영상을 획득하는데 유용하다.^{5,6)}

최근에 많이 사용되는 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 제너레이터는 TiO_2 고정상을 기본으로 0.1 N HCl을 흘려주어 $^{68}\text{Ga}^{3+}$ 의 형태로 용출된다. 용출되는 ^{68}Ge breakthrough는 0.005% 미만으로 알려져 있다. 최근에는 펩타이드 표지를 위하여 제너레이터에서 용출된 ^{68}Ga 을 편리하게 농축하는 방법이 보고된 바 있다.⁷⁾

^{68}Ga 은 사이클로트론에서 생산되는 ^{18}F , ^{11}C 등과 같은 다른 양전자 방출핵종과 달리 제너레이터에서 생산되므로 낮은 비용으로 생산할 수 있다는 장점이 있으며, 또한 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 제너레이터의 모 핵종인 ^{68}Ge 의 긴 반감기(270.8

• Received: 2009. 2. 17. • Revised: 2009. 3. 10.

• Accepted: 2009. 3. 13.

• Address for reprints: Jae Min Jeong, Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, 101 Daehangno Jongno-gu Seoul 110-744, Korea
Tel: 82-2-2072-3805, Fax: 82-2-745-7690
E-mail: jmjng@snu.ac.kr

※ 이 연구과제는 한국과학재단 국가지정연구실사업 (R0A-2008-000-20116-0) 및 원자력연구개발사업 (2007-01238)의 지원을 받았음.

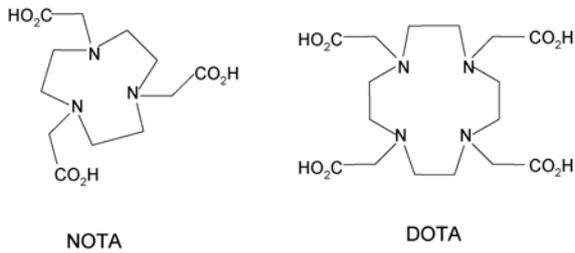


Figure 1. These are chemical structures of bifunctional chelating agents- NOTA and DOTA. NOTA and DOTA contains 3 and 4 carboxyl residues, respectively.

일)로 인하여 최소 1년 또는 그 이상 사용할 수 있다.

현재는 ^{68}Ga 을 표지한 방사성의약품으로는 주로 펩타이드를 표지한 화합물이 많다. 예를 들면 $\alpha_v\beta_3$ integrin에 특이적으로 결합하는 RGD 펩타이드를 ^{68}Ga 로 표지한 예,⁵⁾ 신경내분비종에 특이적으로 결합하는 소마토스타틴 계열 펩타이드에 ^{68}Ga 를 표지한 예,⁶⁾ 심근영상용 지용성 양이온에 표지한 예,⁸⁾ 혈액풀 영상용 인혈청알부민에 표지한 예⁹⁾이 있다.

펩타이드나 단백질에 ^{68}Ga 을 표지하려면 양기능성 킬레이트제를 사용하여야 한다. 갈륨과 결합하는 킬레이트제로는 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid (NOTA)와 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)가 가장 유명하다(Fig. 1). 이 중 특히 NOTA는 9각형 구조를 하고 있고 갈륨과 킬레이트를 만들 경우 6 N의 질산에서도 안정하다는 보고가 있다.¹⁰⁾

이 연구에서는 우선 NOTA와 DOTA에 ^{68}Ga 을 표지하는 조건을 찾아보았다. 그리고 이렇게 표지된 화합물의 안정성과 단백질 결합에 대하여 연구하고 마지막으로 표지 시에 영향을 미치는 각종 금속이온의 영향에 대하여 알아보았다.

대상 및 방법

1. 장비 및 시약

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 제너레이터는 Cyclotron Co. (Obninsk, Russia)의 1.85 GBq 제품을 사용하였다. 교반기와 배양기 (VS-8480)는 비전과학(Seoul, Korea) 제품을 사용하였다. Radio-TLC 스캐너는 P10 가스를 연결한 Bioscan사의 AR-2000 (U.S.A.)을 사용하였다. 방사능 측정기는 Packard Canberra Co.의 Cobra II 감마카운터(U.S.A.)를 사용하였다. 용량측정기는 Capintec (U.S.A.) 제품을 사용하였다. PD-10 칼럼은 GE Healthcare (U.S.A.) 제품을 그리고 ITLC-SG는 PALL Co.의 제품을 사용하였다. 기타 명기하

지 않는 시약은 Sigma-Aldrich 사(U.S.A.)의 제품을 사서 사용하였다.

2. NOTA와 DOTA의 ^{68}Ga 표지 및 안정성 시험

NOTA와 DOTA를 표지하기 위한 ^{68}Ga 은 0.1 M HCl을 1 mL씩 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -제너레이터에 흘려주고 나오는 분획을 용량측정기로 측정하여 사용하였다. NOTA · 3HCl (0.5 μg ~ 0.2 mg) 또는 DOTA · 4HCl (0.5 μg ~ 0.2 mg)에 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -제너레이터에서 용출된 $^{68}\text{GaCl}_3$ 6.66~272.8 MBq/0.1 M HCl 1.0 mL을 넣고 섞어주었다. 이 때 2 M Sodium acetate, 1 M NaOH 또는 1 M Na_2CO_3 을 사용하여 pH를 1.0~13.0으로 맞추고 교반기로 혼합 한 후 실온 또는 100°C에서 반응하였다.

^{68}Ga -NOTA 및 ^{68}Ga -DOTA의 방사 화학적 표지효율을 확인하기 위하여 고정상으로 ITLC-SG와 이동상으로 아세톤과 생리식염수를 사용하여 크로마토그래피를 시행하고 결과를 Radio-TLC 스캐너로 판독하였다.

표지된 ^{68}Ga -NOTA 및 ^{68}Ga -DOTA를 실온에 그대로 두었을 때와 37°C 사람혈청과 배양했을 때의 안정성을 확인하였다. 사람혈청 중에서의 안정성은 사람혈청 1.0 mL에 ^{68}Ga -NOTA 및 ^{68}Ga -DOTA를 각각 8.88 MBq/50 μL 씩을 넣고 섞은 후 37°C 배양기에서 10분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간동안 반응하면서 위에서 기술한 것과 같은 ITLC를 수행하였다.

3. 금속이온의 공존시 ^{68}Ga -NOTA의 표지 효율 영향

금속이온 존재시 금속이온의 종류와 농도에 따른 ^{68}Ga -NOTA의 표지 효율에 미치는 영향을 관찰하였다. NOT A · 3HCl 0.2 mg에 7% NaHCO_3 0.2 mL을 넣고 CuCl_2 , FeCl_2 , InCl_3 , FeCl_3 , GaCl_3 , MgCl_2 , CaCl_2 의 전체농도가 0, 0.19, 0.38, 0.76, 1.52, 3.03, 6.07 mM가 함유된 $^{68}\text{GaCl}_3$ 6.95~8.58 MBq/0.1 M HCl 1.0 mL을 넣고 실온에서 20 분 동안 반응시켰다. ^{68}Ga -NOTA의 표지 효율을 확인하기 위하여 위에서 기술한 것과 같이 ITLC를 수행하였다.

4. 단백질 결합 분율 측정

^{68}Ga -NOTA와 ^{68}Ga -DOTA를 사람 혈청과 배양하였을 때 단백질 결합 분율을 확인하기 위하여 사람 혈청 1.0 mL에 ^{68}Ga -NOTA 또는 ^{68}Ga -DOTA 925 kBq/5 μL 을 넣고 섞은 후 37°C 배양기에서 10분과 60분 동안 반응하였다. 반응 후 PD-10 컬럼에 0.5 mL을 넣은 후 PBS (phosphate buffered saline)를 0.5 mL씩 흘려주면서 각각의 분획을 5 mL 테스트 튜브에 받은 후 감마 카운터를 사용하여 방사

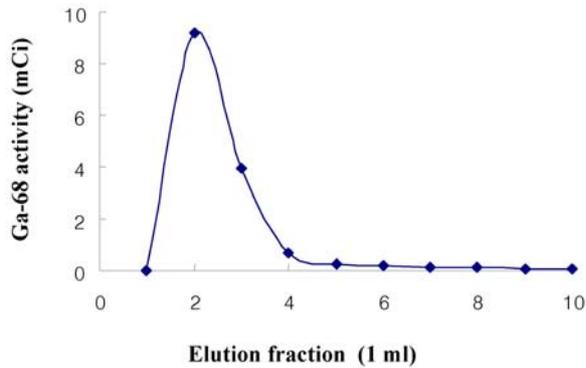


Figure 2. ⁶⁸Ga was eluted from ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga Generator using 1 mL fractions of 0.1 M HCl. Most radioactivity was eluted in the 2nd and 3rd fractions. It was possible to obtain almost 90% of radioactivity in a 1 mL aliquot by adjustment of elution volume.

능을 측정하였다. PD-10 컬럼은 사용 전에 금속이온과 단백질이 컬럼내부에 흡착되는 것을 방지하기 위하여 1% BSA (bovine serum albumin)/0.1 M DTPA 1.0 mL을 흘려준 후 PBS 100 mL을 흘려주어 충분히 세척해 주었다. 취한 각각의 분획에서의 단백질의 존재 유무를 확인하기 위하여 여과지에 반응액 2 µL씩 점적한 후 Coomassie blue 용액을 사용하여 단백질을 염색함으로써 유무를 확인하였다. 단백질 결합능(%)=(단백질이 존재하는 fraction의 방

사능)/(전체 fraction의 방사능)×100%로 계산 하였다.

5. Log P

⁶⁸Ga-NOTA의 지용성의 정도를 알아보기 위하여 Log P 값을 측정하였다. 1-Octanol 3 g과 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4., 3 g이 들어있는 유리관 튜브에 ⁶⁸Ga-NOTA 0.5 MBq/20 µL를 넣고 교반기를 사용하여 3 분 동안 강하게 혼합하였다. 3000 rpm에서 5 분 동안 원심 분리한 후 조심스럽게 octanol층과 phosphate buffer층을 취한 후 각각을 감마카운터를 이용하여 방사능을 측정하였다. Log P 값은 log (octanol층의 방사능(cpm)/0.1 M sodium phosphate buffer 층의 방사능(cpm))으로 계산 하였다.

결 과

⁶⁸Ge/⁶⁸Ga 제너레이터에 0.1 N HCl을 1 mL씩 흘려주면서 나오는 용액을 1 mL씩 연속적으로 받아서 방사능을 측정하여 본 결과 첫 1 mL에는 방사능이 거의 나오지 않았고, 2 번 분획에서 63.0% 3번 분획에서 30.0%의 방사능이 나옴을 알 수 있었다(Fig. 2).

⁶⁸Ga-NOTA와 ⁶⁸Ga-DOTA는 TLC에서 거의 같은 양상을 보여주었다. 둘 다 ITLC-SG/아세톤에서 R_f=0.0이고,

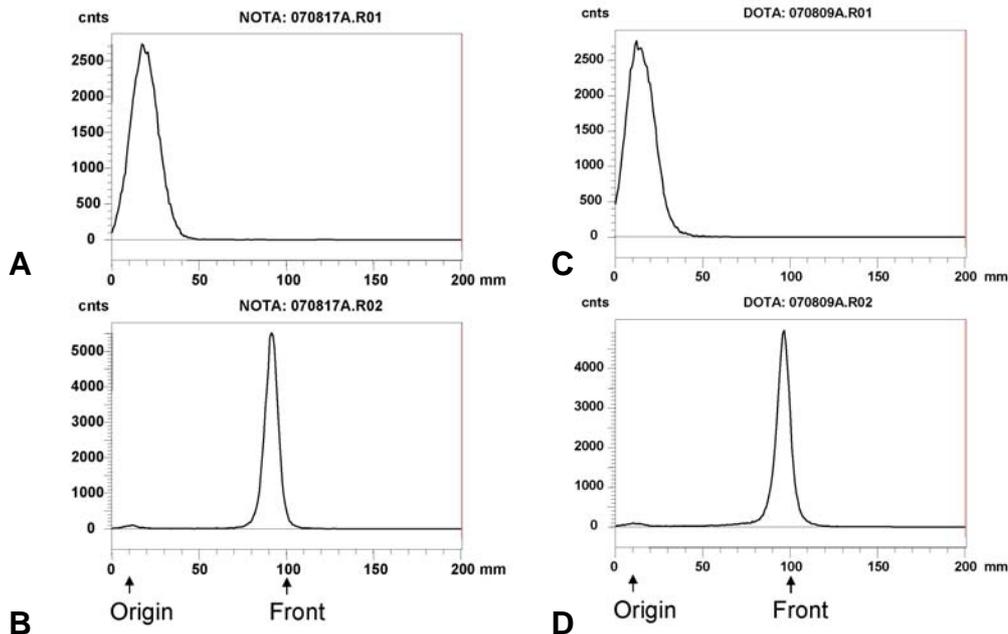


Figure 3. These are ITLC chromatograms of ⁶⁸Ga-NOTA (A and B) and ⁶⁸Ga-DOTA (C and D). Mobile phases were acetone (A, C) and normal saline (B and D). ⁶⁸Ga-NOTA was labeled at room temperature and ⁶⁸Ga-DOTA was labeled in boiling water.

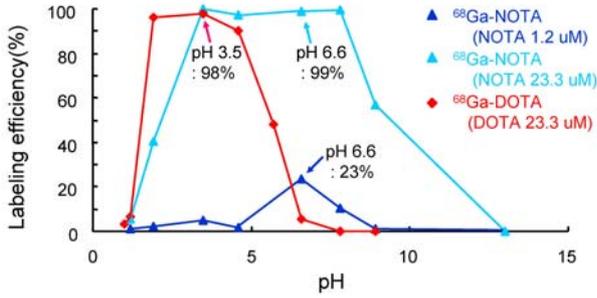


Figure 4. These are the labeling efficiency of ⁶⁸Ga-NOTA and ⁶⁸Ga-DOTA according to the change of pH. ⁶⁸Ga-NOTA was labeled at room temperature and ⁶⁸Ga-DOTA was labeled in boiling water.

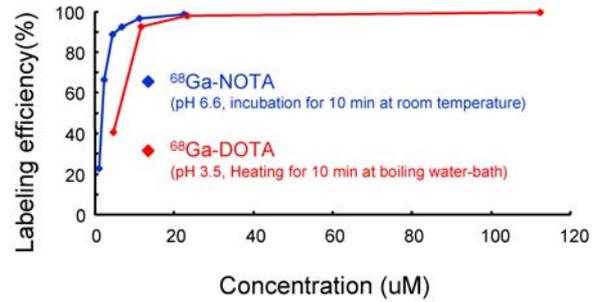


Figure 5. These are the labeling efficiency of ⁶⁸Ga-NOTA and ⁶⁸Ga-DOTA according to the concentration of chelating agents. ⁶⁸Ga-NOTA was labeled at room temperature and ⁶⁸Ga-DOTA was labeled in boiling water.

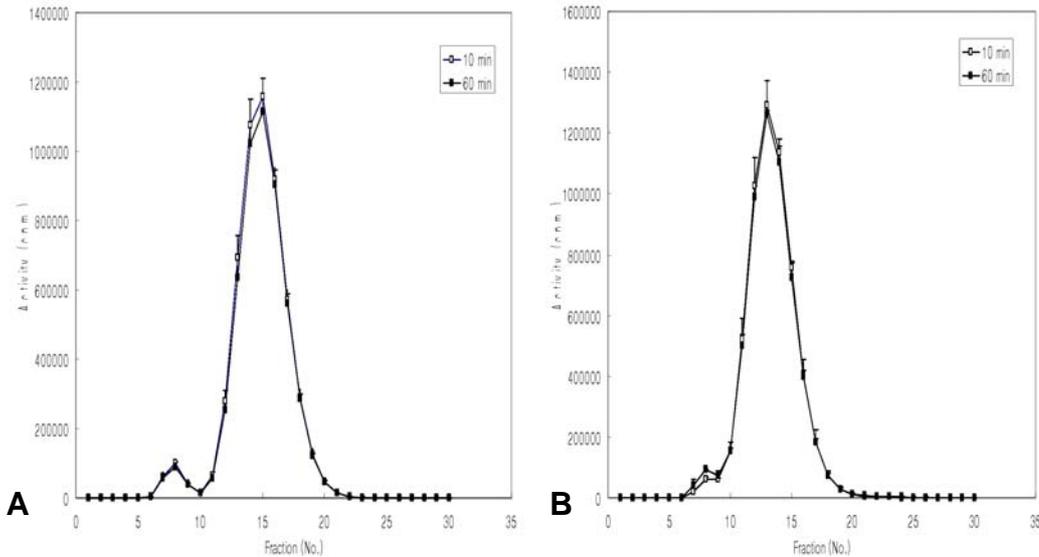


Figure 6. The elution profiles of ⁶⁸Ga-NOTA (A) and ⁶⁸Ga-DOTA (B) from PD-10 column after incubation with human serum 0.5 mL fractions were collected. Protein-containing fractions were detected by Coomassie blue staining after dotting onto a filter paper and found to be fraction number 6~11.

TLC-SG/생리식염수에서는 $R_f=1.0$ 이었다(Fig. 3). ⁶⁸GaCl₃는 ITLC-SG/아세톤과 생리식염수 모두에서 $R_f=0.0$ 으로 움직이지 않았다. ⁶⁸Ga-NOTA와 ⁶⁸Ga-DOTA는 실온에 그대로 두었을 때와 사람혈청과 혼합하여 37°C에서 배양하였을 때 모두 4 시간 동안 99% 이상의 안정성을 보여주었다.

pH를 변화시켜 가면서 NOTA와 DOTA를 표지하였을 때 최적 pH 범위는 NOTA의 경우 3.5~7.5였고 DOTA의 경우 2.0~3.5였다(Fig. 4). NOTA의 농도를 낮게 하였을 경우 최적 pH는 6.5 정도가 되었다(Fig. 4).

NOTA와 DOTA가 각각 가장 표지가 잘되는 pH인 pH6.6과 pH3.5에서 농도를 변화시키면서 표지하였을 때 NOTA가 DOTA에 비하여 더 낮은 농도에서도 표지가 잘

되었고, 또한 DOTA는 풀어야 표지가 잘 되었지만 NOTA는 실온에서도 표지가 잘 되었다(Fig. 5).

표지시에 공존하는 다른 금속이온이 ⁶⁸Ga-NOTA의 방사 화학적 표지효율에 미치는 영향을 관찰한 결과, Mg²⁺과 Ca²⁺은 거의 영향을 미치지 않는다는 것을 알았다(Table 1). Cu²⁺이 존재할 경우 가장 표지가 되지 않았고 그 다음으로 In³⁺, Ga³⁺, Fe³⁺, Fe²⁺의 순서였다. Fe의 경우 +3가 이온이 +2가 이온에 비하여 더 표지에 영향을 미치지 않지만 같은 +2가 이온이라도 Mg²⁺와 Ca²⁺는 전혀 영향을 미치지 않는데 Cu²⁺는 매우 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다(Table 1).

⁶⁸Ga-NOTA와 ⁶⁸Ga-DOTA의 사람 혈청 단백질과의 결

Table 1. Labeling Efficiency Change of ⁶⁸Ga-NOTA in the Presence of Various Metal Ions

Concentration (mM)	FeCl ₂	CuCl ₂	InCl ₃	FeCl ₃	GaCl ₃	MgCl ₂	CaCl ₂
0.000	99.7±0.1*	99.6±0.1	99.4±0.2	99.4±0.2	99.5±0.1	99.6±0.1	99.6±0.1
0.190	99.6±0.1	99.4±0.4	99.4±0.1	99.0±0.5	98.8±0.8	99.5±0.1	99.5±0.1
0.380	99.5±0.1	94.5±6.4	98.6±0.5	98.5±0.8	96.7±1.0	99.6±0.1	99.7±0.1
0.760	96.4±2.4	31.5±12.9	67.3±1.5	87.7±2.6	68.2±6.8	99.6±0.1	99.4±0.3
1.519	92.5±0.8	6.0±1.7	27.8±0.5	59.0±7.1	34.0±5.2	99.5±0.2	99.5±0.1
3.038	67.9±1.4	0.8±0.3	10.0±2.8	38.8±0.6	14.8±1.1	99.6±0.1	99.6±0.1
6.076	46.7±6.4	0.1±0.1	4.4±0.1	18.9±4.5	9.2±2.0	99.7±0.1	99.6±0.1

Values represent mean±SD (n=3)

Table 2. Protein Binding Percentages in Human Serum at 37°C

	10 min	1 hr
⁶⁸ Ga-NOTA	2.08±0.01	2.67±0.04
⁶⁸ Ga-DOTA	2.04±0.15	3.32±0.24

Values represent mean%±SD (n=3)

합을 측정하기 위하여 사람 혈청과 혼합한 다음 PD-10 칼럼에 걸어서 0.5 mL씩 30 개의 분획을 취하였다(Fig. 6). 각 분획을 Coomassie blue로 염색하여 본 결과 6~11번째 분획에서 염색이 된 것으로 보아 이 분획들에 단백질이 포함되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 단백질 결합 분획과 결합하지 않은 분획의 방사능을 측정하여 단백질 결합률을 계산한 결과 ⁶⁸Ga-NOTA와 ⁶⁸Ga-DOTA의 사람 혈청에서의 단백질 결합률은 10 분 후에 각각 2.08%와 2.04%, 1 시간 후에 각각 2.67%와 3.32%로 낮음을 알 수 있었다(Table 2).

⁶⁸Ga-NOTA의 지용성의 정도를 관찰하기 위하여 octanol distribution 실험을 실시한 결과 log P 값은 -3.07로서 수용성이 높음을 알 수 있었다.

고 찰

⁶⁸Ga은 PET용으로 매우 훌륭한 양전자 방출 핵종으로서 특히 제너레이터에서 생산할 수 있어서 경제성이 뛰어나고, 표지가 매우 간편하여 앞으로 급성장할 잠재력을 가지고 있는 핵종이다. 그러나 아직 연구가 많이 이루어지지 않아 적당한 방사성의약품이 별로 많이 개발되어 있지 않은 상태이다.

⁶⁸Ge/⁶⁸Ga 제너레이터를 0.1 N HCl로 용출할 경우 거의 대부분의 방사능이 2~3 mL 분획에서 나타난다(Fig. 2). 따라서 초기 방사능이 나타나지 않는 분획을 버리고 그 다음 분획을 얻는 방법을 사용할 경우, 여러 번 시행착오를 거치면 약 1 mL 정도의 부피 안에 거의 90%에 해당하는 방사능을 용출해 낼 수 있어 각종 방사성의약품을 농축할

필요 없이 편리하게 표지할 수 있다.

결합하지 않은 Ga³⁺ 이온은 TLC를 할 때 아세톤이나 생리식염수로 전개를 하면 원점에서 움직이지 않는다. 이는 콜로이드를 형성하든지 아니면 TLC 매질과 결합하기 때문으로 추정된다. 그러나 NOTA와 DOTA와는 수용성 킬레이트를 형성하므로 아세톤에서는 움직이지 않지만 생리식염수에 의하여는 매우 쉽게 움직여 용매 선단까지 올라간다. 따라서 이러한 성질을 이용하면 ⁶⁸Ga로 표지된 방사성의약품의 방사화학적 순도를 쉽게 측정할 수 있다.

갈륨은 3A 족에 속하는 금속이므로 각종 킬레이트를 잘 형성한다. 따라서 ⁶⁸Ga을 펩타이드나 단백질에 표지할 때는 양기능성 킬레이트제를 먼저 결합하여 놓고 여기에 표지하는 방법을 사용하는 것이 가장 간편하다. ⁶⁸Ga을 표지하기 위한 양기능성 킬레이트제로서 가장 먼저 고려해 볼 수 있는 것들로 NOTA와 DOTA가 있다. 이중 DOTA는 ¹¹¹In, ⁹⁰Y 등의 표지에 널리 사용되는 양기능성 킬레이트제로서 매우 유명하지만¹¹⁾ ⁶⁷Ga의 경우는 NOTA가 더 유리하다는 보고가 있다.¹²⁾ ⁶⁸Ga은 ⁶⁷Ga과 화학적으로는 동일하므로 ⁶⁸Ga을 표지하기 위한 양기능성 킬레이트제로는 NOTA를 사용하는 것이 DOTA를 사용하는 것보다 더 나을 것이라는 추정이 가능하다. Ga³⁺ 이온은 크기가 In³⁺ 또는 Y³⁺ 같이 핵의학에 사용하는 다른 금속이온보다 작기 때문에 DOTA에 비하여 크기가 작은 NOTA가 더 적당할 것이라는 유추도 할 수 있다. 이 연구에서는 이 두가지 양기능성 킬레이트제 중 실제로 NOTA가 더 유리한지를 보고자하는 목적이 있었다.

이 연구의 결과 똑같이 23.3 μM 농도로 ⁶⁸Ga을 표지하였을 때 NOTA가 훨씬 더 표지가 잘 되고, 또한 DOTA는 끓여야 표지가 잘 되는데 비하여 NOTA는 실온에서도 표지가 잘 된다는 것을 알았다. 따라서 ⁶⁸Ga의 표지에는 NOTA를 양기능성 킬레이트제로 사용하는 것이 DOTA에 비하여 유리하다는 결론을 내릴 수 있었다. 이는 NOTA를 기반으로 한 양기능성 킬레이트제를 펩타이드나 단백질에 결합하

여 ⁶⁸Ga를 표지하면 지금까지 ¹⁸F 또는 ^{99m}Tc과 같은 핵종으로 표지하던 각종 펩타이드나 단백질 들을 훨씬 편리하게 PET에 도입할 수 있다는 결론을 내릴 수 있다. 그러한 펩타이드나 단백질로 유망한 것으로 ¹⁸F-LSA,¹³⁾ ^{99m}Tc-MSA,¹⁴⁾ ¹⁸F-RGD 등¹⁵⁾을 들 수 있다.

양기능성 킬레이트제를 결합한 단백질이나 펩타이드를 표지할 때 중요한 점은 표지시에 다른 금속 이온의 존재이다. 비록 NOTA나 DOTA가 ⁶⁸Ga과 잘 결합한다고 하나 그 농도가 매우 낮기 때문에 다른 금속이온이 조금이라고 존재하면 표지 효율을 떨어뜨릴 수가 있기 때문이다. 특히 실험에 사용하는 증류수에 금속 이온이 미량 존재할 경우가 많고, 또한 각종 완충용액으로 사용하는 시약에도 미량의 금속이온이 오염되어 있을 수 있으며, 각종 실험기구에서도 용출될 수 있으므로 금속 이온의 오염에는 매우 주의를 기울여야 한다. 이 실험의 결과 알칼리토류에 속하는 Mg²⁺와 Ca²⁺는 ⁶⁸Ga의 표지에 전혀 영향을 미치지 않으나 Cu²⁺는 매우 큰 영향을 미치는 것을 알았다. 따라서 Cu의 동위원소 핵종(⁶⁰Cu, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu 등)의 표지에도 NOTA가 적당할 것이 틀림없다. 그리고 증류수나 시약 중에 가장 오염의 염려가 큰 Fe³⁺ 이온도 상당히 영향을 미치므로 실험을 할 때 금속 이온의 오염에 많은 주의를 기울여야 하는 것을 알았다.

방사성의약품의 체내동태에 매우 중요한 영향을 미치는 인자 중 하나가 혈장 단백질과의 결합이다. 혈장 단백질 결합률을 측정하는 방법은 투석법, 침전법, 추출법 등 여러 가지가 있을 수 있지만 대부분 시간이 오래 걸리거나 측정 오차가 매우 크다. 여기서는 겔 여과법을 사용하였는데 다른 방법에 비하여 시간이 짧게 걸리므로 측정 중에 단백질과 떨어질 확률이 낮아 비교적 정확한 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 이 연구의 결과 ⁶⁸Ga-NOTA와 ⁶⁸Ga-DOTA 둘 다 혈장 단백질의 결합은 매우 낮은 것으로 밝혀졌다.

결론적으로 NOTA와 DOTA 모두 ⁶⁸Ga 표지에 사용이 가능한 양기능성 킬레이트제이지만 NOTA가 더 바람직하다고 볼 수 있다. 그러나 NOTA의 경우 3개의 카르복실기 중 하나를 단백질이나 펩타이드에 결합하면 킬레이트 형성이 약화될 수가 있으므로 벤질이소치오시아니드 기와 같은 잔기를 도입하여 카르복실기를 직접 단백질이나 펩타이드에 결합하지 않는 방법을 사용하는 것이 바람직하다.

요 약

목적: ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-제너레이터에서 생산되는 PET용 방사성동위원소인 ⁶⁸Ga를 NOTA와 DOTA에 표지하는 조건을

확립하고 이의 안정성 및 단백질 결합 특성을 연구하였고, 여러 가지의 금속이온 공존시 표지효율에 미치는 영향도 관찰하였다. **대상 및 방법:** 여러 가지 농도의 NOTA · 3HCl과 DOTA · 4HCl에 ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-제너레이터에서 0.1 M HCl로 용출한 ⁶⁸GaCl₃ 6.66~272.8 MBq 1.0 mL와 합치고 초산나트륨 또는 탄산나트륨 완충액을 사용하여 다양한 pH 조건에서 반응하였다. 다양한 금속이온(CuCl₂, FeCl₂, InCl₃, FeCl₃, GaCl₃, MgCl₂, CaCl₂)과 0.373 mM NOTA를 ⁶⁸Ga (6.77~8.58 MBq)으로 표지할 때 표지효율을 관찰하였다. ⁶⁸Ga의 표지효율은 ITLC-SG고정상으로 하고 아세톤과 생리식염수를 이동상으로 하여 측정하였다. 최적의 pH 조건에서 ⁶⁸Ga-NOTA와 ⁶⁸Ga-DOTA를 표지한 후 4 시간 동안 안정성을 확인하고, 사람 혈청에서의 단백질 결합능을 평가하였으며, 지용성 정도를 측정하기 위하여 octhanol distribution 실험을 실시하여 log P값을 구하였다. **결과:** ⁶⁸Ga-NOTA와 ⁶⁸Ga-DOTA의 최적 표지 pH 조건은 각각 pH 6.5와 3.5였고, NOTA는 실온에서 표지가 잘 되었으나 DOTA는 가열이 필요하였다. MgCl₂와 CaCl₂의 존재는 ⁶⁸Ga-NOTA의 표지 효율에 영향을 미치지 않았으나 CuCl₂, FeCl₂, InCl₃, FeCl₃, GaCl₃이 존재할 경우에는 표지효율이 감소하였다. ⁶⁸Ga-NOTA와 ⁶⁸Ga-DOTA는 실온에 그대로 두거나 사람혈청과 37°C에 두었을 때 4 시간 이상 안정하였고, 사람 혈청 단백질 결합능은 2.04~3.32%로 낮았으며, log P 값은 -3.07로 수용성을 보였다. **결론:** ⁶⁸Ga의 표지에는 NOTA가 DOTA에 비하여 이상적인 양기능성 킬레이트제로 쓰일수 있음을 알았다. 또한 ⁶⁸Ga-NOTA는 금속이온 존재시 표지효율이 떨어질 수 있지만 안정하고 낮은 단백질 결합을 보였다.

References

1. Breeman WA, Verbruggen AM. The ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator has high potential, but when can we use ⁶⁸Ga-labelled tracers in clinical routine? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:978-81.
2. Ehrhardt GJ, Welch MJ. A new germanium-68/gallium-68 generator. *J Nucl Med* 1978;19:925-9.
3. Schuhmacher J, Maier-Borst W. A new ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga radioisotope generator system for production of ⁶⁸Ga in dilute HCl. *Int J Appl Radiat Isot* 1981;32:31-6.
4. Zhemosekkov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, et al. Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application. *J Nucl Med* 2007;48:1741-8.
5. Jeong JM, Hong MK, Chang YS, Lee Y-S, Kim YJ, Cheon GJ, et al. Preparation of a promising angiogenesis PET imaging agent: ⁶⁸Ga-labeled c(RGDyK)-isothiocyanatobenzyl-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid and feasibility studies in mice. *J Nucl Med* 2008;49:830-6.
6. Rufini V, Calcagni ML, Baum RP. Imaging of neuroendocrine

- tumors. *Semi Nucl Med* 2006;36:228-47.
7. Meyer G-J, Mäcke H, Schuhmacher J, Knapp WH, Hofmann M. ^{68}Ga -labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:1097-104.
 8. Hsiao Y-U, Mathias CJ, Wey S-P, Fanwick PE, Green MA. Synthesis and biodistribution of lipophilic and monocationic gallium radiopharmaceuticals derived from *N,N'*-bis(3-amino-propyl)- *N,N'*-dimethylethylenediamine: potential agents for PET myocardial imaging with ^{68}Ga . *Nucl Med Biol* 2009;36:39-45.
 9. Hoffend J, Mier W, Schuhmacher J, Schmidt K, Dimitrakopoulou-Strauss A, Strauss LG, et al. Gallium-68-DOTA-albumin as a PET blood-pool marker: experimental evaluation in vivo. *Nucl Med Biol* 2005;32:287-92.
 10. Parker D. Tumor targeting with radiolabeled macrocycle-antibody conjugates. *Chem Soc Rev* 1990;19:271-91.
 11. Jeong HJ. Review of radionuclide treatment for neuroendocrine tumors. *Nucl Med Mol Imaging* 2006;40:90-5.
 12. Lee J, Garmestani K, Wu C, Brechbiel MW, Chang HK, Choi CW, et al. In vitro and in vivo evaluation of structure-stability relationship of ^{111}In - and ^{67}Ga -labeled antibody via IB4M or C-NOTA chelates. *Nucl Med Biol* 1997;24:225-30.
 13. Chang YS, Jeong JM, Lee Y-S, Kim Hw, Rai GB, Lee SJ, et al. Preparation of ^{18}F -Human Serum Albumin: A Simple and Efficient Protein Labeling Method with ^{18}F Using a Hydrazone-Formation Method. *Bioconjugate Chem* 2005;16:1329-33.
 14. Jeong JM, Hong MK, Kim YJ, Lee J, Kang JH, Lee DS, et al. Development of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -neomannosyl human serum albumin ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MSA) as a novel receptor binding agent for sentinel lymph node imaging. *Nucl Med Commun* 2004;25:1211-7.
 15. Lee Y-S, Jeong JM, Kim HW, Chang YS, Kim YJ, Hong MK et al. An improved method of ^{18}F peptide labeling: hydrazone formation with HYNIC-conjugated c(RGDyK). *Nucl Med Biol* 2006;33:677-83.