

^{125}I -붕소페닐알라닌 Fructose의 세포내 섭취능

Intracellular Uptake of ^{125}I -Boronophenylalanine-Fructose

원자력병원

서울시 노원구 공릉동 215-4

우광선, 최태현, 최창운, 정위섭, 임수정, 이수진, 임상무

abstract

Boronophenylalanine (BPA) has been used in malignant glioma or melanoma uptake for BNCT. We labeled BPA with ^{125}I for in vivo quantitation of BPA in BNCT, and tumor imaging with gamma camera. We investigated the amino acid BPA as a boron delivery agent for BNCT. As the free amino acid, BPA has a limited solubility at physiological pH, which makes it unsuitable for IV or IP injection. Recent studies of the chemistry of BPA have yielded a method of solubilizing BPA at neutral pH using fructose, a common fruit sugar. The use of BPA-fructose has significantly improved high uptake compared to BPA alone in melanoma.

요약

붕소화합물 중 붕소페닐알라닌(BPA)은 흑색종이나 신경교종과 같은 악성종양의 붕소중성자포획치료에 사용되는 아미노산 유도체이다. 아모노산으로서의 BPA는 생리적 pH에서 용해도가 좋지 않아 체내 투여시 많은 제약이 따른다. 그래서 fructose를 사용하여 정맥이나 복강 내로 투여시 중성 pH에서도 좋은 용해성을 보이도록 하였다. 이러한 BPA-fructose를 사용하여 흑색 종에서 BPA를 사용하였을 때와 비교하여 섭취 율의 증가를 확인하였다.

서론

붕소중성자포획치료(Boron Neutron Capture Therapy)는 종래의 저 LET 방사선 치료법이 뇌암에는 큰 효과가 없는 것으로 판명되어, 중성자선 등을 이용한 고LET의 방사선 치료법의 요구에 의해 시작되었다^{1,2)}. 그 원리는 ^{10}B 은 중성자 흡수 단면적이 매우 크고, 알파 등의 원자핵은 전리작용이 매우 강하면서 비정기 세포 반지름 정도이기 때문에 중성자 흡수반응이 일어난 세포만을 죽게 만드는 것을 이용하는 것이다³⁾. 종양친화성 붕소화합물을 환자에게 주사한 후 암조직에 열중성자선을 조사하면 이때 발생하는 알파 및 Li 입자와 같은 중입자에 의한 고LET의 선택적 암 방사선 치료를 할 수 있다⁴⁾.

페닐알라닌은 아미노 산중에서 소수성이 강한 방향족으로 단백질 구성 물질이다. 페닐알라

년의 붕소 유도체인 붕소페닐알라닌은 단백질 대사가 활발한 흑색종, 신경교종 등의 종양세포로의 높은 집적이 보고 되었다^{5, 6, 7)}. 이러한 붕소페닐알라닌을 붕소중성자포획치료용으로 미국에서 1994년 9월부터 미국 FDA 공인 하에 뇌암과 피부암에 대해서 붕소페닐알라닌과 열외 중성자를 이용하여 치료를 시행하고 있다. 주된 대상은 악성 뇌신경교종과 피부암인 흑색종이고, 그밖에 간암, 폐암 등에서의 가능성도 연구중이다. 그러나 임상 적용시 BPA의 낮은 용해성은 인체 내 투여에 많은 장애를 동반하여, 그에 따르는 연구가 요구되어 수용성 증가 실험이 시도되고 있다^{3,9)}. BPA와 fructose의 결합체는 BPA의 용해성을 증가시키고 생체 내 투여를 용이하게 하는 것으로 알려져 있다^{3,8)}. ¹²³I-BPA는 BPA의 체내동태를 파악할 수 있는 추적자를 이용할 수 있으며, 각종 악성종양에서 아미노산의 세포내 섭취를 영상화할 수 있을 것이다. ¹²³I-BPA의 실험결과와 비교하여 ¹²³I-BPA-fructose 복합체를 제조하고, 각기 다른 신경교종과 흑색종에서의 세포내 섭취를 비교해 보았다.

방법

1. 붕소페닐알라닌의 ¹²³I 표지

반응용기에 Iodo-bead (Pierce Co.) 1개와 붕소페닐알라닌 200 μ l (1mg)를 넣었다. KI 15 μ g/5 μ l를 캐리어로 첨가한다. Na¹²³I 약 2mCi/20 μ l를 넣는다. 교반하면서 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 표지수율은 고성능 액체크로마토그래피를 C18 μ Bondapak 컬럼을 사용하여, 전개용매는 증류수:에틸알코올:아세트 산(87.5:10:2.5)을 제조하여 1ml/min로 용출하였다.

2. ¹²³I-붕소페닐알라닌의 혈청내 안정성 HPLC 분석

표지된 ¹²³I-BPA를 혈청과 1:9로 섞어 37°C에서 보관하면서 24시간까지 경과시간별로 20% TCA를 사용하여 혈청단백질을 침전 제거하고 안정도를 확인해 보았다. 방사능 검출기가 장착된 waters HPLC를 사용하였다. 컬럼은 C18 μ Bonda-pak을 사용하였고, 용출액은 water:ethanol:acetic acid=87.5:10:2.5 (용출속도 1ml/min)의 등속도로 실시하였다.

3. ¹²³I-붕소페닐알라닌 fructose 복합체의 종양세포 내 섭취 비교

I-BPA의 종양세포에서의 섭취와 세포소기관에서의 분포를 측정하기 위하여 9L glioma와 B16 melanoma 두 가지의 종양세포를 각 조마다 3개씩 준비하여, 시간을 30분, 60분, 120분, 240분, 24시간마다 세포 내로의 섭취가 I-BPA만을 주었을 때와 fructose 복합체를 주었을 때 각기 측정하였다. Glioma는 $1.7 \times 10^6/0.2$ ml 씩 melanoma는 $2.1 \times 10^6/0.2$ ml씩 준비하였다. 각각의 시험관마다, I-BPA 21 μ g(1.1 MBq) 100 μ l과 I-BPA 21 μ g(1.1 MBq) 100 μ l에 fructose 21 μ g을 넣어 복합체를 만든 것을 각각 투여 후 배양 시간마다, 원심 분리하여 saline으로 세척한 후 방사능을 측정하였다. 측정된 방사능은 최초 투여 방사능으로 %계산되어 명시하였다.

결과

Iodo-bead법을 이용하여 I-BPA를 표지하고 고성능 액체크로마토그래피를 수행한 결과, 표지수율이 80-90%인 것을 확인하였다.

표지된 ¹²⁵I-BPA를 혈청에서의 안정도를 24시간까지 보관하며 HPLC를 사용하여 관찰, 24시간 이내에서는 표지수율의 변화가 없음을 확인하였다(fig 1).

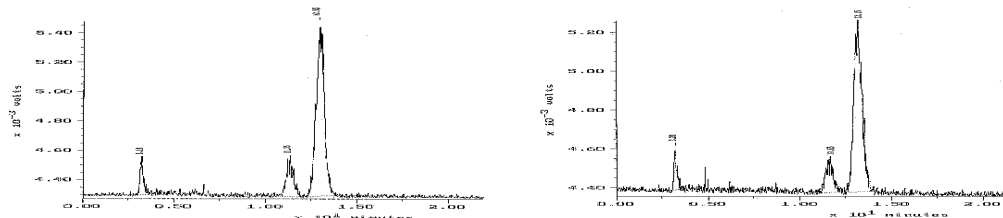


Fig 1 Radiochromatogram after 1hr(left) and 24hr(right) in serum

시험관에서 종양세포로의 섭취율을 비교하여 table 1에 나타내었다. 종양세포의 종류와는 상관없이 약물을 투여 후 세포 배양시간 중에서 60분 경과 후 가장 높은 섭취를 나타내는 경향을 보였으며, glioma보다는 melanoma에서 보다 높은 섭취를 보였고, melanoma에서 I-BPA-fructose복합체를 투여한 경우 I-BPA만을 주었을 때 보다 I-BPA-fructose/I-BPA의 비가 2.57로 현격한 섭취의 증가를 보였다.

Table 1 Intracellular uptake of I-BPA and I-BPA-Fructose in the culture medium unit : % Injected Dose(%ID)

Incubation time	9L glioma			B16 melanoma		
	I-BPA	I-BPA-Fructose	F/I ratio	I-BPA	I-BPA-Fructose	F/I ratio
30min	2.3	2.0	0.87	2.17	5.41	2.5
60min	2.05	2.6	1.27	2.57	6.62	2.57
120min	1.92	2.4	1.25	2.46	6.11	2.48
6hr	1.82	2.3	1.26	2.44	6.04	2.47
24hr	2.3	2.5	1.08	2.54	5.22	2.05

F/I ratio is I-BPA-Fructose/I-BPA %ID ratio

결론

혈청에서 I-BPA의 안정도는 24시간까지 일정하게 유지되었다. 기존의 ¹²⁵I 표지 methyltyrosine 등의 표지화합물이 혈청내에서 빠르게 탈요드화 반응이 일어나는 단점이 있어, ¹²⁵I-BPA의 혈청내 안정도는 BPA 체내동태 tracer 및 종양 영상용 화합물로서 이용이 기대된다. I-BPA와 I-BPA-fructose를 glioma에 넣은 것은 30분에서는 fructose 복합체가 오히려 낮은 섭취를 나타냈고, 24시간까지는 약 1.2배정도 복합체의 섭취가 높았다. melanoma의 경우 평균적으로 I-BPA-fructose의 섭취율이 2.5배정도 높게 나타났다. 수용성이 낮은 I-BPA의 보다 I-BPA-fructose의 투여가 화합물의 제조, 정도관리등이 용이하고, 종양대 배경 방사능비가 높은 영상을 얻을 수 있을 것이다. 효과적일 것이다.

참고문헌

1. G. Morris, J. Coderre, P. Micca, C. Fisher, J. Capala, J. Hopewell, Central nervous system tolerance to boron neutron capture therapy with p-boronophenylalanine, *Br. J. Cancer* 76: 1623-1629, 1997
2. D. Smith, S. Chandra, J. Coderre, G. Morrison, Ion microscopy imaging of ^{10}B from p-boronophenylalanine in a brain tumor model for boron neutron capture therapy, *Cancer Research* 56: 4302-4306, 1996
3. J. Coderre, T. Button, P. Micca, C. Fisher, M. Nawrocky, H. Liu, Neutron capture therapy of the 9L gliosarcoma using the p-boronophenylalanine-fructose complex, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 30: 643-652, 1994
4. J. Capala, M. Makar, J. Coderre, Accumulation of boron in malignant and normal cells incubated in vitro with boronophenylalanine, mercaptoborane or boric acid, *Radiation Research* 146: 554-560, 1996
5. Y. Setiawan, G. Halliday, A. Harding, D. Moore, B. Allen, Effect of L-10B-p-boronophenylalanine-fructose and the boron neutron capture reaction on mouse brain dopaminergic neurons, *Cancer Research* 55: 874-877, 1995
6. R. Kubota, S. Yamada, K. Ishiwata, M. Tada, T. Ido, K. Kubota, Cellular accumulation of ^{18}F -labelled boronophenylalanine depending on DNA synthesis and melanin incorporation: a double-tracer microautoradiographic study of B16 melanomas in vivo, *Br. J. Cancer* 67: 701-705, 1993
7. J. Coderre, J. Glass, R. Fairchild, U. Roy, S. Cohen, I. Fand, Selective targeting of boronophenylalanine to melanoma in BALB/c mice for neutron capture therapy, *Cancer Research* 47: 6377-6383, 1987
8. G. Kabalka, G. Smith, J. Dyke, W. Reid, C. Longford, T. Roberts, et al, Evaluation of fluorine-18-BPA-fructose for boron neutron capture treatment planning, *J Nucl Med* 38:1762-1767, 1997.
9. M. Takagaki, K. Ono, Y. Oda, H. Kikuchi, H. Nemoto, S. Iwamoto, et al, Hydroxyforms of p-Boronophenylalanine as Potential Boron Carriers on Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Brain Tumors, *Cancer Res* 56:2017-2020, 1996.