

# 벤조디아제핀 수용체 영상용 양전자 방출 핵종 표지 플루마제닐 유도체 [F-18](3-(2-Fluoro)flumazenil)의 합성과 생체 내 분포

서울대학교 의과대학 핵의학교실,<sup>1</sup> 방사선의학연구소,<sup>2</sup> 한국과학기술연구원 의약화학연구센터,<sup>3</sup> 한국외국어대학교 화학과,<sup>4</sup> 서울대학교 천연물과학연구소<sup>5</sup>

홍성현<sup>1,2</sup> · 정재민<sup>1,2</sup> · 장영수<sup>1,2</sup> · 이동수<sup>1,2</sup> · 정준기<sup>1,2</sup> · 조정혁<sup>3</sup> · 이숙자<sup>4</sup> · 강삼식<sup>5</sup> · 이명철<sup>1,2</sup>

## Synthesis and Biodistribution of Flumazenil Derivative [F-18](3-(2-Fluoro)flumazenil for Imaging Benzodiazepine Receptor

Sung Hyun Hong, M.S.,<sup>1,2</sup> Jae Min Jeong, Ph.D.,<sup>1,2</sup> Young Soo Chang, M.S.,<sup>1,2</sup>  
Dong Soo Lee, M.D.,<sup>1,2</sup> June-Key Chung, M.D.,<sup>1,2</sup> Jung-Hyuck Cho, Ph.D.,<sup>3</sup>  
Sook Ja Lee, Ph.D.,<sup>4</sup> Sam Sik Kang, Ph.D.<sup>5</sup> and Myung Chul Lee, M.D.,<sup>1,2</sup>

*Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine,<sup>1</sup> Institute of Radiation Medicine, Seoul National University, Medical Research Center,<sup>2</sup> Medicinal Chemistry Research Center, Korea Institute of Science and Technology,<sup>3</sup> Department of Chemistry, Hankuk University of Foreign Studies,<sup>4</sup> and Natural Products Research Institute, Seoul National University,<sup>5</sup> Seoul, Korea.*

### Abstract

**Purpose:** Radiotracers that bind to the central benzodiazepine receptor are useful for the investigation of various neurological and psychiatric diseases. [C-11]Flumazenil, a benzodiazepine antagonist, is the most widely used radioligand for central benzodiazepine receptor imaging by PET. We synthesized 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil, a new fluorine-18 ( $t_{1/2}=110$  min) labeled analogue of benzodiazepine receptor imaging agent, and evaluated in vivo for biodistribution in mice. **Materials and Methods:** Flumazenil (Ro 15-1788) was synthesized by a modification of the reported method. Precursor of 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil, the tosylated flumazenil derivative was prepared by the tosylation of the ethyl ester by ditosylethane. [F-18] labeling of tosyl substituted flumazenil precursor was performed by adding F-18 ion at 85 °C in the hot cell for 20 min. The reaction mixture was trapped by C18 cartridge, washed with 10% ethanol, and eluted by 40% ethanol. Biodistribution in mice was determined after intravenous injection. **Results:** The total chemical yield of tosylated flumazenil derivative was ~40%. The efficiency of labeling 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil was 66% with a total synthesis time of 50 min. Brain uptakes of 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil at 10, 30, 60 min after injection, were  $2.5 \pm 0.37$ ,  $2.2 \pm 0.26$ ,  $2.1 \pm 0.11$  and blood activities were  $3.7 \pm 0.43$ ,  $3.3 \pm 0.07$ ,  $3.3 \pm 0.09$  %ID/g, respectively. **Conclusion:** We synthesized a tosylated flumazenil derivative which was successfully labeled with no-carrier-added F-18 by nucleophilic substitution. (**Korean J Nucl Med 1999;33:527-36**)

**Key Words:** 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil, PET, Benzodiazepine receptor

Received Apr. 27, 1999; revision accepted Aug. 6, 1999

Corresponding Author: Jae Min Jeong, Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, 28 Yongon-dong Chongno-gu, Seoul 110-744, Korea

Tel: 82-2-760-3805, Fax: 82-2-745-7690, E-mail: jmjng@snu.ac.kr

※ 이 연구는 서울대학교병원 일반연구과제(04-1997-042-0)의 지원을 받았음.

## 서 론

정상 뇌에서 벤조디아제핀 수용체는 대뇌피질, 소뇌 및 시상애 높은 밀도로 존재하며, 이 밖에 미상핵에 낮은 밀도로 존재한다. 벤조디아제핀 수용체는 간질 유발 병소에서 밀도가 감소하고, 이를 이용하여 벤조디아제핀 수용체의 영상을 간질 유발 병소의 국소화 및 간질의 감별 진단에 응용할 수 있다.<sup>1)</sup> 벤조디아제핀 유도체로는 플루마제닐, 이오마제닐(iomazenil), 플루니트라제팜(flunitrazepam) 등이 있다.<sup>2)</sup>

PET로 간질 부위를 영상화하려면 간질의 대사 혹은 생화학적 변화에 대하여 알아야 한다. 현재 간질의 영상을 위하여 가장 널리 사용되는 방사성의약품은 FDG이다. FDG는 포도당 대사 정도를 영상화하므로 두뇌의 대사 활성 상태를 보여주고 두뇌의 포도당 대사 정도를 영상으로 보여준다. 이러한 FDG의 성질을 이용하여 많은 연구가 수행되었고 그 결과 발작 간기에 간질 부위의 포도당 대사가 떨어져 있다는 것이 확인되었다.<sup>3)</sup> 그렇지만 간질 부위가 주변에도 영향을 미쳐 실제 간질 초점보다 조금 더 넓은 부위에 대사가 떨어져 보이고, 또한 확실한 발작 간기에 PET 영상을 얻지 못할 경우, 또는 포도당 대사에 영향을 미칠 수 있는 다른 약물이나 신체적 조건에 영향을 받는 수가 있어서 문제가 되는 경우도 있다.

간질의 동물모델에서 흥분성 뉴런과 억제성 뉴런 모두에서 글루타메이트 수용체와 GABA 수용체의 양에 변화가 있음이 밝혀졌다.<sup>4)</sup> 이는 간질환자에서 벤조디아제핀 수용체 양의 변화를 강하게 시사하므로 억제성 뉴런인 GABA<sub>A</sub>/벤조디아제핀 수용체를 영상화하기 위한 PET가 시도되었다. 벤조디아제핀 수용체의 차단제로 가장 널리 사용되는 플루마제닐에 C-11을 표지하여 PET 영상을 얻은 결과 간질병소의 국소화를 FDG와 비교하여 더 정확하게 알 수 있다는 보고가 있다. 그러나 [C-11]flumazenil은 체내에서 빨리 대사 되어 벤조디아제핀 수용체가 아닌 다른 부분에 갈 가능성이 커지게 된다. 따라서 분자내의 다른 부분에 표지를 하는 방법이 연구되었다.

플루마제닐의 demethylated 유도체인 Ro 15-5528에 methylation을 시키는 방법과 deethylated 유도체인 Ro 15-3890에 에스테르화로 에틸기를 도입하는 방법이 있다.<sup>5,6)</sup> 이러한 용도로 사용할 [C-11]methyl iodide와 [C-11]ethyl iodide는 [C-11]carbon dioxide로부터 one-pot 반응으로 합성이 가능하다.<sup>7)</sup> 또한 이렇게 표지된 방사성 의약품을 정상인에 투여하여 PET를 시행하였고, 그 이후 많은 임상연구가 있었다.<sup>8)</sup> F-18이 표지된 플루마제닐 유도체로는 N-demethylated 플루마제닐 화합물에 [F-18]fluoroethyl기를 질소 위치에 치환시킨 5-(2-[F-18]fluoroethyl)flumazenil이 보고되어 있고,<sup>9)</sup> 이를 이용한 체내 및 체외 동물실험 결과가 나와 있는 정도이다.<sup>10)</sup>

C-11은 양전자 방출 핵종으로 유기물을 구성하는 원소의 동위원소로 생체의 필요 성분이나 생리 활성 물질의 표지에 의해 종래의 해부학적 화상뿐만 아니라 생화학적 방법을 응용한 생체 기능의 해석에 의한 진단용 동위원소로 사용되어 왔으나, C-11으로 표지된 플루마제닐은 플루마제닐의 원래의 화학적 성질이 전혀 변하지 않는다는 장점이 있지만, 반감기가 20분으로 너무 짧아 표지 작업을 할 때 방사선 피폭이 심하고 표지 후에도 빨리 사용하지 않으면 안 된다는 단점이 있다. 따라서 이는 연구용으로 소수의 환자에 적용할 수가 있고 많은 환자의 영상을 얻는데는 부적당하다. 반면, F-18은 C-11과 같은 양전자 방출 핵종으로 반감기는 109.7분으로 시간이 소요되는 방사성 의약품의 합성과 느리게 진행되는 생리 대사의 연구에도 이용할 수 있다.

이 연구에서는 벤조디아제핀 수용체 영상용 방사성 의약품으로 F-18이 표지된 플루마제닐 유도체인 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil을 합성하기 위해 2-amino-5-fluorobenzoic acid를 출발물질로 THF 용매에서 triphosgene과 반응하여 5-fluoroisatoic acid anhydride (a)를 합성하고, 이를 DMSO 용매에서 sarcosine과 100℃에서 교반하여 벤조디아제핀 유도체(b)를 합성한 후, DMF 용매에서 postassium t-butylate를 염기로 사용하여 -10~20℃에서 ethyl isocynoacetate를 적가하여 플루마제닐(c)을 합성하였다(Fig. 1).

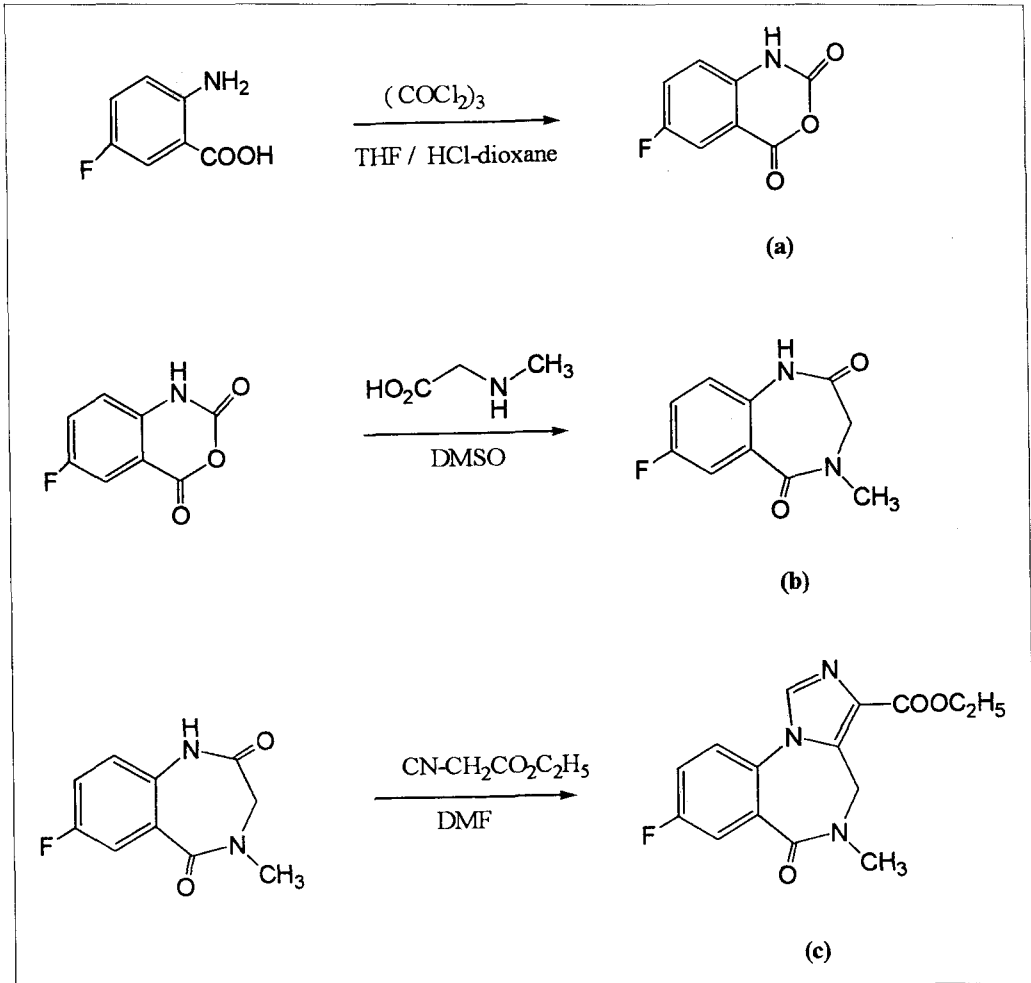


Fig. 1. Synthesis of flumazenil (Ro 15-1788).

플루마제닐 유도체의 합성은 플루마제닐을 tetra-butylammonium hydroxide로 가수분해(hydrolysis)하고, 여기에 ditosylethane으로 tosyl 기를 치환시킨 플루마제닐 유도체(d)를 합성하여 radioactive isotope F-18을 표지하기 위한 전구체를 만들었다(Fig. 2).<sup>11)</sup> 그리고 합성된 전구체를 사이클로트론으로 제조한 [F-18]fluoride과 친핵성치환반응(nucleophilic substitution)으로 표지(scheme 2)를 하여 실험동물 체내에서의 분포를 확인하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 기기 및 시약

<sup>1</sup>H Nuclear magnetic resonance spectra (<sup>1</sup>H-NMR)와 <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectra (<sup>13</sup>C-NMR)은 Varian사의 Gemini-300 (<sup>1</sup>H NMR-300 MHz, <sup>13</sup>C NMR-50 MHz)를 사용하여 얻었으며, chemical shift는 내부 표준 물질로 tetramethylsilane을 기준으로  $\delta$  (ppm) 단위로 표시하였다. Mass spectra는 Hewlett Packard Model 598513 Spectrometer을 사용하여 얻었다. TLC scanner는 Bio-Scan system 200 imaging scanner를 사용하였다.

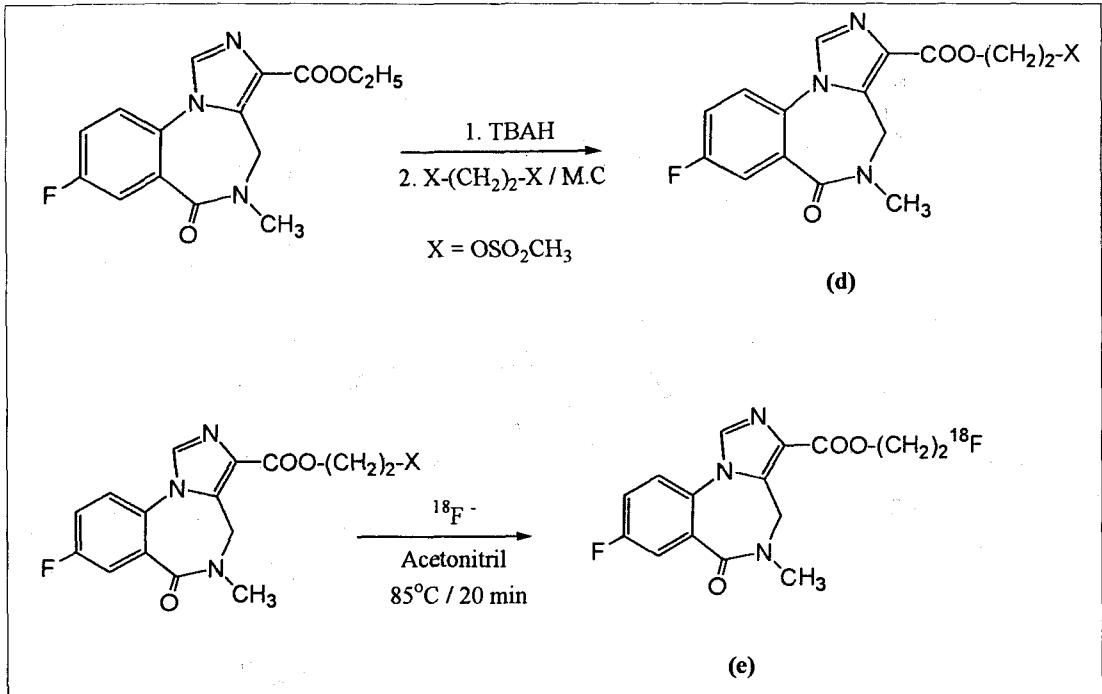


Fig. 2. Synthesis of flumazenil derivative and labeling with F-18.

반응에 사용된 시약은 Aldrich와 Lancaster사에서 구입한 시약을 사용하였으며, tetrahydrofuran, methylalcohol, dichloromethane, diethylether 등 반응 용매는 CaH<sub>2</sub>를 이용하여 정제하여 사용하였다. 기타 표시되지 않은 시약은 1급 시약 그대로 사용하였다. Thin Layer Chromatography는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (No.5715, Merck)를 사용하였으며, 검출은 254 nm UV Lamp를 사용하거나 발색제인 PMA (phosphomolybdic acid)와 p-anisaldehyde를 사용하였다. Column chromatography는 silica gel (Merck, 200~300 mesh)를 사용하였다.

## 2. Flumazenil derivative의 합성

먼저 플루마제닐을 합성하고 이를 가수 분해하여 에틸기를 제거한 다음 sulfonyl ethyl기를 에스테르화 반응으로 결합시켰다. 이렇게 합성한 전구체를 F-18로 표지하였다. 플루마제닐 합성은 Gerecke 등<sup>14)</sup>의 방법을 조금 변형하여 실시하였다.

### 1) 5-fluoroisatoic acid anhydride (a)의 합성

아르곤 하에서 100 mL 2-neck 둥근바닥플라스크에 4.0 g (26 mmol)의 2-amino-5-fluorobenzoic acid을 가하고 52 mL THF와 26 mL 4N HCl in 1,4-dioxane의 혼합용액을 더 가하여 녹였다. 여기에 THF에 녹인 triphosgene (2.8 g, 9.4 mmol)을 35~40°C에서 천천히 적가하고 약 3시간 동안 교반하였다. TLC상 출발물질의 spot이 없어지면 반응 혼합물에 증류수를 가하여 phosgene을 제거하고 생성되는 침전을 여과하여 생성물을 얻었다.

- 수득률: 94%, 전개용매: ethyl acetate: hexane = 1:2, R<sub>f</sub>=0.5
- <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz ; DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.2 (s, <sup>1</sup>H, Ar-H), 7.6 (m, <sup>2</sup>H, Ar-H), 11.7 (s, <sup>1</sup>H, -NH)

## 2) 7-Fluoro-3,4-dihydro-4-methyl-<sup>2</sup>H-1,4-benzodiazepine-2,5(<sup>1</sup>H)-dione

### (b)의 합성

100 mL 둥근바닥플라스크에 4.38 g (24 mmol)의 5-fluoroisatoic acid anhydride (a)를 가하고 24 mL DMSO를 더 가하여 녹이고 2.37 g (26 mmol)의 sarcosine을 가한 다음 교반하면서 100℃에서 기체가 발생하지 않을 때까지 반응하였다(약 3시간). 기체 발생 유무를 확인 후 반응물에 100 mL의 물을 붓고 약 10분간 저어 주면 흰색 결정이 석출된다. 이를 여과하여 증류수로 여러 번 세척하고 건조하였다.

- 수득률: 96%, 전개용매: ethyl acetate: hexane=2:1, R<sub>f</sub>=0.5
- <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.1 (s, <sup>3</sup>H, -N-CH<sub>3</sub>), 3.8 (s, <sup>2</sup>H, -COCH<sub>2</sub>), 7.1 (s, <sup>1</sup>H, Ar-H), 7.4 (m, <sup>2</sup>H, Ar-H), 10.4 (s, <sup>1</sup>H, -NH)

## 3) Ethyl 8-fluoro-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-<sup>4</sup>H-imidazo-[1,5-a][1,4]-benzodiazepine-3-carboxylate (Flumazenil)(c)의 합성

100 mL 2-neck 둥근바닥플라스크에 아르곤 기체 하에 출발물질(b) 2.0 g (9.6 mmol)을 건조한 DMF 9 mL에 녹이고 postassium t-butylate 1.3 g (11 mmol)을 첨가한 후 35℃에서 약 10분간 처리한 다음 -30℃로 냉각하고 diethylchlorophosphate 1.65 g (9.6 mmol)를 적가하고 -20℃에서 10분간 교반하였다. 다른 둥근바닥플라스크에 potassium t-butylate를 3 mL의 건조한 DMF에 녹이고 -40℃에서 ethyl isocyanacetate 1.78 g (15.7 mmol)를 녹인 다음 처음 100 mL 2-neck 둥근바닥플라스크에 -10℃에서 -20℃를 유지하면서 천천히 적가하였다. 냉각을 중단하고 약 1시간 동안 교반시킨 다음 1 mL의 빙초산액을 가해주었다. 반응액을 100 mL의 증류수에 들어 붓고 ethyl acetate로 3회 세척한 다음 유기층을 50 mL의 증류수로 5회 세척하였다. 유기층을 magnesium sulfate로 건조시킨 다음 감압 하에서 용매를 제거하였다. Column chromatography로 분리 정

제 한 다음 ethyl acetate/diethyl ether로 재결정하여 생성물을 얻었다.

- 수득률: 72%, 전개용매: ethyl acetate: ethyl alcohol:hexane=1:1:3, R<sub>f</sub>=0.5, <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.3 (t, <sup>3</sup>H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.1 (s, <sup>3</sup>H, -N-CH<sub>3</sub>), 4.3 (q, <sup>2</sup>H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.6 (d, <sup>2</sup>H, -N-CH<sub>2</sub>), 7.6 (m, <sup>1</sup>H, Ar-H), 7.8 (m, <sup>2</sup>H, Ar-H), 8.3 (s, <sup>1</sup>H, -N-CH)

## 4) 2-[(4-Toluenesulfonyl)oxy]ethyl 8-fluoro-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-<sup>4</sup>H-imidazo-[1,5-a][1,4]-benzodiazepine-3-carboxylate (d)의 합성

100 mL 둥근바닥플라스크에 출발물질(c) 0.1 g (0.33 mmol)을 methanol 5 mL에 녹이고 tetra-butylammonium hydroxide 0.69 g (2.63 mmol)을 첨가한 후 실온에서 약 5시간 동안 교반하였다. TLC상에서 모든 출발물질이 없어지면 감압 하에서 용매를 완전히 제거하였다. 다른 플라스크에 ditosylethane 0.25 g (0.66 mmol)을 15 mL의 건조한 dichloromethane에 녹이고 처음 반응 플라스크의 생성물을 10 mL의 건조한 dichloromethane에 녹이고 아르곤 하에서 실온에서 약 5시간 동안 교반하였다. TLC상에서 모든 출발물질이 없어지면 감압하에서 용매를 완전히 제거하고 생성물을 다시 20 mL ethyl acetate에 녹이고 20 mL 증류수로 추출하였다. 유기층을 magnesium sulfate로 건조시킨 다음 감압 하에서 용매를 제거하고 column chromatography로 분리 정제 한 다음 ethyl acetate/diethyl ether로 재결정하여 생성물을 얻었다.

- 수득률: 63%, 전개용매: ethyl acetate: ethyl alcohol: hexane=1:1:3, R<sub>f</sub>=0.4, <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.2 (t, <sup>2</sup>H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.4 (s, <sup>3</sup>H, Ar-CH<sub>3</sub>), 3.2 (s, <sup>3</sup>H, -N-CH<sub>3</sub>), 4.2 (t, <sup>2</sup>H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-), 4.4 (t, <sup>2</sup>H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.2 (s, <sup>2</sup>H, -N-CH<sub>2</sub>-), 7.3 (m, <sup>4</sup>H, SO<sub>2</sub>-Ar), 7.5 (m, <sup>1</sup>H, Ar-H), 7.7 (m, <sup>2</sup>H, Ar-H), 7.8 (s, <sup>1</sup>H, -N-CH)

3. Flumazenil derivative의 [F-18]표지

1) [F-18]Tetrabutylammonium fluoride의 제조

[F-18]fluoride는 TR-13 사이클로트론에 장착된 티타늄 타겟 내에서 [O-18]water에 [O-18(p,n)F-18] 반응을 시켜 제조한다. 핵반응에 의해 제조된 [F-18]fluoride는 이온교환수지에 흡착시키고 이를 다시 tetrabutylammonium bicarbonate 용액으로 회수하고 80℃에서 헬륨 가스를 불어 주어 건조하였다. 여기에 acetonitrile을 1 mL 더 가하여 주고 azeotropic distillation을 하여 물을 완전히 제거하였다.

2) 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil (e)의 합성

전구체(d) 2 mg (4.1 μ mol)을 3 mL의 acetonitrile에 녹이고 3.(1)에서 제조한 [F-18]tetrabutylammonium fluoride에 가하여 잘 섞어 주었다. 온도를 80℃에서 90℃ 정도로 올리고 20분간 반응하였다. 이때 표지된 플루마제닐 유도체는 TLC로 표지 효율 (Fig. 3A), acetonitrile:H<sub>2</sub>O=19:1)을 측정하고, 헬륨 가스를 불어주어 용매를 건조한 후, acetonitrile (1 mL)과 증류수(4 mL) 혼합용액을 반응용기에 첨가하여 C<sub>18</sub> Sep-pak과 alumina-N을 통과하였다. 혼합용액이 통과한 C<sub>18</sub> Sep-pak을 증류수(2 mL)와 10% ethanol (3 mL)로 씻어준 후, 40% ethanol (0.5 mL)로 용출하여 생성물(e)을 얻었다. 정제된 생성물은

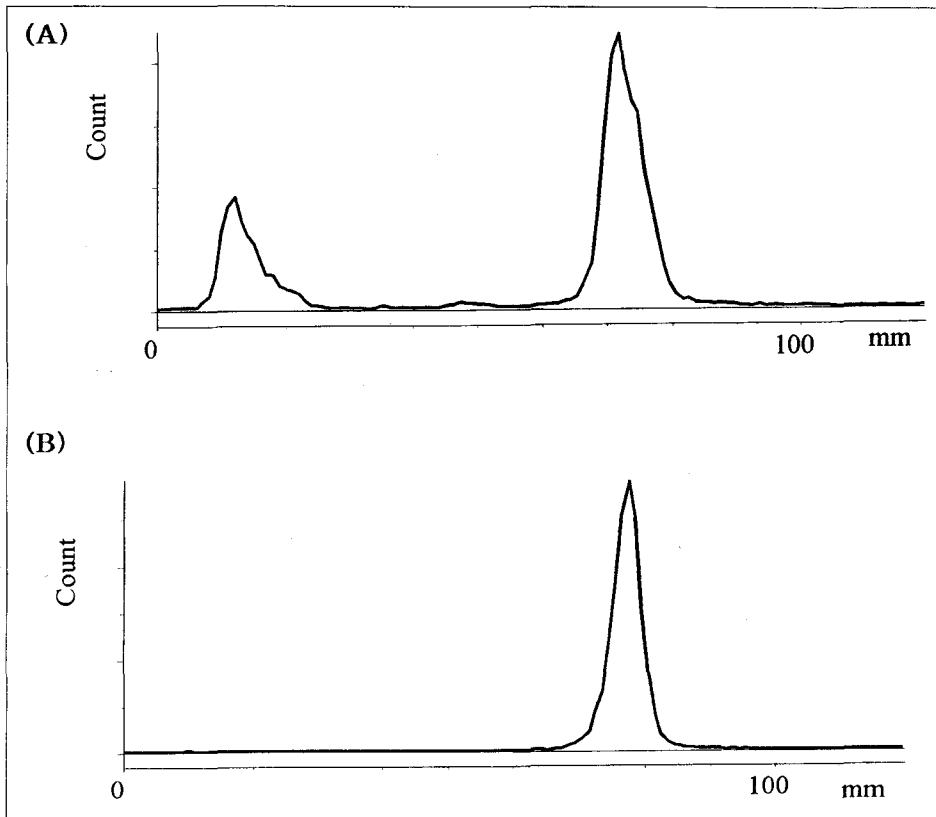


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil. The purification was achieved using C<sub>18</sub> Sep-pak cartridge and the purity was checked by TLC (acetonitrile: H<sub>2</sub>O=19:1). The efficiency of labeling tosylflumazenil with F-18 was 66% (A), and it showed no radioactive impurities after purification (B).

TLC (Fig. 3B, acetonitrile:H<sub>2</sub>O=19:1)로 순도를 측정하였다.

#### 4. 마우스를 이용한 생체분포 조사

3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil의 체내동태를 조사하기 위해 마우스(ICR, 숫컷, n=9)의 꼬리정맥을 통하여 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil 0.37 MBq/0.1 mL을 주사하였다. 10분, 30분, 60분 후 심장강으로부터 약 0.1~0.2 mL의 혈액을 채취하고 경추탈골시켰다. 각 장기를 적출하여 무게를 측정 후, 감마카운터로 장기에 남아 있는 방사능을 계수하였다. 투여한 방사능량과 장기 내 방사능치를 구하여 각 장기의 단위 무게당 섭취율(% ID/g)을 구하였다.

### 결 과

뇌 기능 영상화에 사용되는 방사성 의약품 중 벤조디아제핀계 유도체인 F-18이 표지된 플루마제닐 유도체는 2-amino-5-fluorobenzoic acid를 출발물질로 phosgene과 반응하여 5-fluoroisatoic acid anhy-

dride(a)를 만들고 이를 sarcosine과 반응하여 7-fluoro-3,4-dihydro-4-methyl-<sup>2</sup>H-1,4-benzodiazepine-2,5-(<sup>1</sup>H)-dione (b)을 합성한 다음 diethylchlorophosphate를 촉매로 potassium t-butylate를 염기로 사용하여 ethylisocynoacetate와 반응 시켜 플루마제닐(c)을 전체 수득률 64%로 합성할 수 있었다.

플루마제닐 유도체(d)의 합성은 플루마제닐(c)을 출발물질로 tetrabutylammonium hydroxide와 반응하여 가수분해 후, 이를 methylene chloride 용매 조건에서 ditosylethane과 반응하여 63%의 수득률로 합성하였다.

플루마제닐 유도체의 F-18표지 반응은 tosyl 치환기가 도입된 플루마제닐 유도체(d)를 사이클로트론에서 [O-18]water에 의해 [O-18(p,n)F-18] 핵반응으로 제조한 [F-18]tetrabutylammonium fluoride와 친핵성 치환반응으로 2-([F-18]fluoro)ethyl-8-fluoro-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-<sup>4</sup>H-imidazo-[1, 5-a][1, 4]-benzodiazepine-3-carboxylate(e)을 합성하였다. 플루마제닐 유도체의 F-18 표지 반응에서 총 합성시간은 50분, 표지 효율은 ~66%, 정제 후 순도는 ~

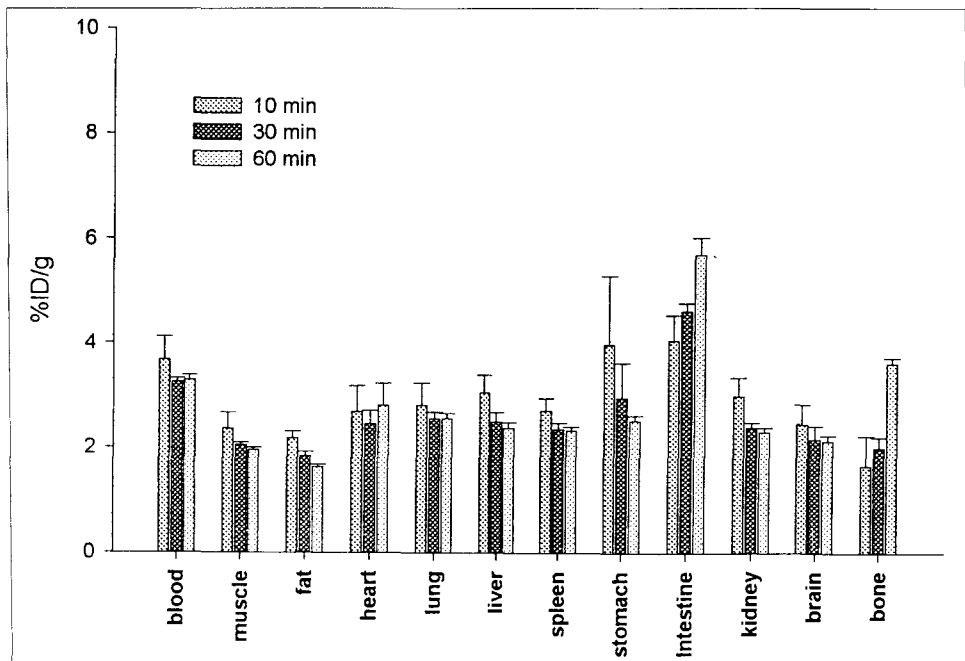


Fig. 4. Biodistribution of 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil was investigated in normal ICR mice (n=3/group).

99% 이었다(Fig. 3). 마우스를 이용한 생체분포 실험에서 뇌의 섭취율은 10, 30, 60분에서  $2.5 \pm 0.4$ ,  $2.2 \pm 0.3$ ,  $2.1 \pm 0.1$  ID/g 이었고, 혈액은  $3.7 \pm 0.4$ ,  $3.3 \pm 0.1$ ,  $3.3 \pm 0.09$  ID/g 이었다(Fig. 4).

## 고 찰

벤조디아제핀 수용체 영상용 방사성의약품으로 [C-11]flumazenil은 여러 가지 신경정신 질환에서 PET 영상용으로 연구되어 왔다. 플루마제닐의 구조에는 3번 위치의 ethylester기와 5번 위치의 methyl기, 그리고 8번 위치의 fluoro기의 결가지가 있다. 적절히 변형시킨 플루마제닐의 분자구조는 이미 보고된 바가 있다. C-3 결가지의 ethylester기는 sodium hydroxide나 potassium hydroxide 등으로 간단히 가수분해 반응이 이루어지나, 5번 위치에 있는 methyl기의 경우 질소과 탄소의 강한 결합으로 인해 demethylation 반응이 거의 진행되지 않는 것으로 알려져 있다.

이 연구에서는 플루마제닐 유도체인 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil을 합성하기 위하여 플루마제닐의 C-3 결가지의 ethylester기를 tetrabutylammonium hydroxide와 반응하여 가수분해하고, ditosylethane을 사용하여 tosyl기를 도입한 전구체를 합성한 후 사이클로트론에서 제조한 F-18과 친핵성치환 반응으로 표지하였다.

플루마제닐 유도체의 합성에 있어서 문제점들은 다음과 같다. 첫 번째 step인 5-fluoroisatoic acid anhydride(a)의 합성은 HCl 산 촉매를 사용하여 phosgene 반응을 하는데 문제점은 염산 수용액에서 phosgene이 분해되어 수득률이 떨어진다는 점에 있다. 이를 보완하고자 염산 수용액 대신 1,4-dioxane 유기용매에 녹아있는 염산을 사용함으로써 94%의 높은 수득률로 생성물(a)을 합성할 수 있었고, monomer인 phosgene은 매우 유독성 기체이므로 trimer인 고체 phosgene을 사용하였다. 7-fluoro-3,4-dihydro-4-m-ethyl- $^2\text{H}$ -1,4-benzodiazepine-2,5( $^1\text{H}$ )-d ion(b)을 합성하는 데 있어서 TLC에서 반응 종결점을 찾는 데 어려움이 있었다. 그러나 반응 메카니즘에서 이산화탄소 기체가 발생하는 점을 고려하여 기

체 유출을 확인할 수 있는 버블러(bubbler)를 장치함으로써 반응 종결점을 찾을 수 있었고, 수득률 또한 96% 이상으로 생성물(b)을 합성할 수 있었다. 세 번째 step인 플루마제닐(c) 합성에서는 습기에 민감한 시약들의 취급과 적절한 염기의 선택, 출발물질의 건조 상태, 반응 온도에 따른 부반응의 발생 여부가 수득률에 결정적인 요인이 되었으며, 적절한 반응 조건에서 수득률 72%로 합성할 수 있었다. Tosyl기를 도입하는 플루마제닐 유도체(d)의 합성에서 문제점은 C-3 결가지의 가수분해 반응이었다. Lithium hydroxide나 sodium hydroxide로 반응 후 염산으로 acidify하면 수득률은 거의 100%로 높으나 생성물이 염산 염(HCl salt)으로 존재하며 이로 인해 다음 반응에서 tosyl기가 치환되지 않아 원하는 생성물을 얻을 수 없었다. 이를 보완하고자 cesium carbonate로 염을 만든 후 이를 동결 건조 후 ditosylethane으로 반응을 시도하였으나 수득률이 매우 좋지 않았다. 같은 방법으로 tetrabutylammonium 염으로 만든 후 반응한 결과 63%의 수득률로 생성물(d)을 얻었다.

플루마제닐 유도체(d)의 F-18 표지 반응에서는 전구체의 농도를 10 mg (20.5  $\mu\text{mol}$ ), 5 mg (10.3  $\mu\text{mol}$ ), 2 mg (4.1  $\mu\text{mol}$ )으로 변화를 주면서 표지 실험을 하였으며, 좋은 이탈기(leaving group)로 작용하는 tosyl 치환체를 도입한 전구물질들을 사용함으로써 친핵체인 [F-18]fluoride ion과의 친핵성 치환 반응에 의해 66%의 높은 표지 효율을 보였다. 그리고 전구체의 농도(10 mg, 5 mg, 2 mg)에 따른 방사화학적 수율은 큰 변화가 없었으며, 친핵성치환반응을 위한 전구체의 이탈기로 tosyl 치환기 대신 mesyl 치환된 플루마제닐 유도체를 전구체로 사용할 경우는 수득률과 반응성은 좋으나, 반응하고 남은 dimesylethane이 생성물과 극성이 유사하여 제거가 어려우며, 이로 인해 최종 생성물인 F-18이 표지된 플루마제닐 유도체에는 많은 양의 mesyl 치환된 플루마제닐 유도체인 전구체가 포함되어 있으며, 결과적으로 최종 생성물의 비방사능(specific activity)을 낮추는 원인이 될 것으로 생각하여 tosyl 치환된 플루마제닐 유도체를 전구체로 사용하였다. 표지된 플루마제닐 유도체인 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil은



C<sub>18</sub> Sep-pak과 alumina-N을 사용하여 99% 이상의 순도로 간단히 정제할 수 있었으며, 고성능 액체 크로마토그래피법(HPLC)에 의한 분리 정제는 하지 않았다. 합성된 최종 생성물을 HPLC로 정제는 하지 않았지만, 표지된 fluoroflumazenil과 tosyl 치환된 플루마제닐과 플루마제닐을 TLC한 결과 여러 조건의 ethyl acetate:hexane 전개용매와 acetonitrile:H<sub>2</sub>O 등의 전개용매에서는 tosyl 치환된 플루마제닐과 cold 플루마제닐의 R<sub>f</sub> 값이 큰 변화가 없었으나 (spot이 겹쳐서 나타남), ethyl acetate:EtOH:hexane=1:1:3에서 R<sub>f</sub>가 각각 0.5, 0.4, 0.3으로 나타났으며, TLC Autoradiography와 UV-lamp를 이용하여 반응하지 않은 tosyl 치환된 플루마제닐이 거의 없음을 확인하였다. 이는 SepPak-C<sub>18</sub>에 표지 혼합물을 흡착하고 10% EtOH로 세척한 후 40% EtOH로 용출하면 표지된 fluoroflumazenil 만을 얻을 수가 있음을 뜻한다.

마우스를 이용한 생체 내 분포 실험에서 각 장기들은 비슷한 단위무게당 섭취율을 보였으며, 간과 신장에서의 단위무게당 섭취율은 10, 30, 60분에서 점차적으로 감소하였으며, 장의 단위무게당 섭취율은 시간이 지남에 따라 점차적으로 증가하였다. 뼈의 경우 주사 후 30분이 지나 단위무게당 섭취율이 증가하였으며, 혈액에서의 단위무게당 섭취율은 시간이 지남에 따라 큰 변화가 없었다. 이러한 섭취율의 변화는 F-18이 표지된 플루마제닐이 장을 통해서 배설이 되며, 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil이 대사되어 유리된 F-18은 빠르게 섭취되는 것으로 생각된다. 뇌의 단위무게당 섭취율은 10, 30, 60분에서 각각  $2.5 \pm 0.4$ ,  $2.2 \pm 0.3$ ,  $2.1 \pm 0.1$  % ID/g으로 거의 일정한 값으로 나타났다. 이상의 결과는 합성한 F-18 표지 플루마제닐을 사용하여 영상을 얻고자 할 때 주사 후 30분 전후에 영상을 얻는 것이 좋을 것으로 생각되며, 이것은 C-11 표지된 플루마제닐을 이용한 실험에서의 결과와 유사하다.<sup>12)</sup> 또한 fluoroflumazenil의 경우 30분에 두뇌 섭취와 뼈 섭취가 유사하여 영상에서 두개골의 영상도 동시에 볼 수가 있다는 장점이 있다. 이오마제닐의 경우 주사 후 10분 안에 뇌의 섭취율이 최고 값을 나타내었으며, 뇌에서의 섭취율 감소보다 혈액에서의 감소가 더 빨리

일어났고 1시간 후에는 혈액에서의 섭취율이 거의 모두 감소하였다고 보고되었다.<sup>13)</sup>

벤조디아제핀 수용체 영상용으로 현재 가장 널리 보고된 방사성 의약품은 [C-11]methyl iodide를 이용하여 C-11으로 표지한 플루마제닐이며, C-11으로 표지된 플루마제닐은 체내에서 빨리 대사<sup>6)</sup> 되는 반면, 플루마제닐에 F-18을 표지하면 F-18이 도입된 작은 group이 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil에서 떨어져 나올 가능성은 있으나, 불소(fluorine)의 전기 음성도와 C-F 결합에너지가 커서 불소로 치환된 분자의 화학적, 생물학적 성질은 크게 변화되고, F-18이 표지된 플루마제닐은 이러한 불소의 물리, 화학적 결합의 변화가 생리대사에 관한 정보를 얻는데 결정적 역할을 할 것으로 기대한다.

이상의 결과로 새로운 벤조디아제핀 수용체 영상용 방사성의약품으로서 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil을 높은 표지 효율로 합성하였다. 그러나 PET 영상에 응용하기에는 더 많은 유도체 합성에 관한 연구가 뒤따라야 함을 시사하였다.

## 요 약

**목적:** [C-11]flumazenil (RO 15-1788)은 벤조디아제핀 수용체 영상용 방사성 의약품으로 여러 가지 신경, 정신 질환에서 양전자방출촬영(PET)용으로 연구되고 있다. 이 연구에서는 2-amino 5-fluorobenzoic acid를 출발물질로 사용하여 5단계에 걸쳐 플루마제닐 유도체를 합성한 후 F-18으로 표지하여 실험 동물에서의 생체 내 분포를 보았다. **대상 및 방법:** 플루마제닐(c)의 합성은 F. Hoffmann-La-Roche (Basle/CH)에서 보고된 방법에 의해 수정하여 합성하였다. 플루마제닐 유도체(d)는 플루마제닐(c)의 C-3 결가지의 ethylester기를 tetrabutylammonium hydroxide와 반응하여 가수분해한 후 di-tosylethane을 사용하여 tosyl기를 도입하여 합성하였다. 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil(e)의 합성은 TR-13 사이클로트론에서 제조한 [F-18]fluoride를 acetonitrile 용매하에서 플루마제닐 유도체(d)와 친핵성 치환반응으로 표지하였다. 표지된 플루마제닐 유도체는 TLC로 표지 효율을 측정하고, alumina-N과

C<sub>18</sub> Sep-pak으로 정제하였다. 3-(2-[F-18]fluoro) flumazenil의 생체 내 분포를 보기 위해 마우스(n=9)의 꼬리정맥으로 3-(2-[F-18]fluoro)flumazenil (0.37 MBq/0.1 mL)을 주사한 후 10, 30, 60분 후에 희생시켰다. 각 장기별 무게를 측정 후 감마카운터로 방사능을 계수하였다. 투여한 방사능 양과 장기 내 방사능치를 구하여 시간에 따른 장기의 단위 무게별 주사량 대비 백분율(% ID/g)을 계산하였다. **결과:** 플루마제닐 유도체 합성(d)의 전체 수득률은 40%였고, 플루마제닐 유도체의 F-18 표지효율은 66% 이상이었다. 마우스를 이용한 생체분포 실험에서 뇌의 섭취율은 10, 30, 60분에서 2.5±0.4, 2.2±0.3, 2.1±0.1 % ID/g이었고, 혈액은 3.7±0.4, 3.3±0.1, 3.3±0.09% ID/g이었다. **결론:** 새로운 벤조디아제핀 수용체 영상용 방사성 의약품으로서 3-(2-[F-18]fluoro) flumazenil을 높은 표지 효율로 합성함으로써 PET와 SPECT 영상의 비교 연구에 이용될 수 있으며, F-18을 플루마제닐 유도체의 제각기 다른 위치에 치환함으로써 체내동태에 대한 연구에도 이용될 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) Baldwin RM, Horti AG, Bremner JD. Synthesis and PET imaging of the benzodiazepine receptor tracer [N-Methyl-<sup>11</sup>C] iomazenil. *Nucl Med Biol* 1995;22:659-65.
- 2) Foged C, Hallidin C, Hiltunen J. Development of <sup>123</sup>I-labeled NNC 13-8241 as a radioligand for SPECT visualization of benzodiazepine receptor binding. *Nucl Med* 1996;23:201-9.
- 3) Abou-Khalil BW, Siegel GJ, Sackellares JC. Positron emission tomography studies of cerebral glucose metabolism in chronic partial epilepsy. *Ann neurol* 1989;22:480-6.
- 4) Johnson EW, de Lanerolle NC, Kim JH. "Central" and "Peripheral" benzodiazepine receptors: opposite changes in human epileptogenic tissue. *Neurology* 1992;42:811-5.
- 5) Hantraye P, Kajjima M, Prenant C. Central type

benzodiazepine binding sites: a positron emission tomography study in the baboon's brain. *Neurosci Lett* 1984;48:115-9.

- 6) Hallidin C, Stone-Elander S, Thorell J-O, Persson A, Sedvall G. C-11-Labeling of Ro 15-1788 in two different positions, and also C-11-labeling its main metabolite Ro 15-3890, for PET studies of benzodiazepine receptor. *Appl Radiat Isot* 1988; 39:993-7.
- 7) Langstrom B, Antoni G, Gullberg P. The synthesis of [C-11]-labelled ethyl, propyl, butyl and isobutyl iodides and examples of alkylation reactions, *Appl Radiat Isot* 1986;37:1141.
- 8) Henry TR, Frey KA, Sackellares JC. In vivo cerebral metabolism and central benzodiazepine receptor binding in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 1993;43:1998-2006.
- 9) Moerlein SM, Permuter JS. Binding of 5-(2'-[F-18]fluoroethyl) flumazenil to central benzodiazepine receptors measured in living baboon by positron emission tomography. *Eur J Pharmacol* 1992;218:109-15.
- 10) Moerlein SM, Perlmutter JS, Parkerson D. valuation of N-omega [F-18]fluoroethyl flumazenil for in vivo measurement of central benzodiazepine receptor binding with PET. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1991;11(suppl 2):S613.
- 11) Jeong JM, Lee DS, Chung J-K, Lee MC, Koh C-S, Kang SS. Synthesis of No-Carrier-Added [<sup>18</sup>F]Fluoroacetate. *J Labeled Compd Radiopharm* 1997;1119:395-9.
- 12) Koeppel RA, Holthoff VA, Frey KA, Kilbourn MR, Kuhl DE. Compartmental Analysis of [<sup>11</sup>C] Flumazenil Kinetics for the Estimation of Ligand Transport Rate and Receptor Distribution Using Positron Emission Tomography. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1991;11:735-44.
- 13) Beer H-F, Blauenstein PA, Hasler PH. In Vitro and In Vivo Evaluation of Iodine-123-Ro 16-0154: A New Imaging Agent for SPECT Investigations of Benzodiazepine Receptors. *J Nucl Med* 1990;31:1007-14.
- 14) Gereke M, Haefely W, Hunkeler W, Kyburz E, Moehler H, Pieri L. US patent 4,316,839. 1982.