

$\alpha_4\beta_2$ 니코틴성 아세틸콜린 수용체 영상 방사성리간드 2-[^{18}F]fluoro-A85380의 합성 및 평가

성균관대학교 의과대학 핵의학과, 생명의공학과

류은경 · 최연성 · 김상은 · 황세환 · 백진영 · 최 용 · 이경한 · 김병태

Synthesis and Evaluation of 2-[^{18}F]Fluoro-A85380, a Radioligand for $\alpha_4\beta_2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Imaging

Eun Kyoung Ryu, B.S., Yearn Seong Choe, Ph.D., Sang Eun Kim, M.D., Sae Hwan Hwang, B.S.,
Jin Young Paik, B.S., Yong Choi, Ph.D., Kyung-Han Lee, M.D. and Byung-Tae Kim, M.D.

*Departments of Nuclear Medicine and Biomedical Engineering, Samsung Medical Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea*

Abstract

Purpose: Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), which mediate excitatory neurotransmission, are known to participate in various neurophysiological functions. Severe losses of nAChRs have been noted in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Therefore, noninvasive and quantitative imaging of nAChRs would offer a better understanding on the function of these receptors. In this study, 2-[^{18}F]fluoro-A85380 ([^{18}F]1), an $\alpha_4\beta_2$ nAChRs radioligand, was prepared using one HPLC purification and evaluated in mouse brain, and the results were compared with those in the literature. **Materials and Methods:** [^{18}F]1 was prepared by [^{18}F]fluorination of the iodo precursor followed by acidic deprotection and then purified by HPLC. Tissue distribution studies were performed in mouse brain at the indicated time points and the result was expressed as %ID/g. Inhibition studies were also carried out with pretreatment of various ligands. **Results:** One HPLC purification method gave the desired product in 15–20% radiochemical yield and with high specific activity (38–55 GBq/ μmol). Tissue distribution studies showed that [^{18}F]1 specifically labeled nAChRs in mouse brain with a high thalamus to cerebellum uptake ratio (13.8 at 90 min). Inhibition studies demonstrated selective binding of [^{18}F]1 to nAChRs, blocking the uptake of the [^{18}F]1 in nAChR-rich regions by selective ligands such as cytosine and nicotine which are well-known nAChRs agonists. **Conclusion:** This study demonstrated that the [^{18}F]1 produced by the method using one HPLC purification gave the results similar to those reported in the literature. Therefore, this synthetic method can be readily applied to the routine preparation of [^{18}F]1, a PET radioligand for $\alpha_4\beta_2$ nAChRs imaging. (Korean J Nucl Med 2002;36:261–70)

Key Words: $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptors, 2-[^{18}F]fluoro-A85380, PET

Received Aug 10, 2002; accepted Aug 13, 2002

Corresponding author: Yearn Seong Choe, Ph.D., Department
of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan
University School of Medicine, 50 Ilwon-dong, Kangnam-ku,
Seoul 135-710, Korea

Tel: 02-3410-2623, Fax: 02-3410-2639

E-mail: yschoe@samsung.co.kr

서 론

흥분성 신경전달을 중재하는 니코틴성 아세틸콜

린 수용체(nAChRs)는 다양한 뇌기능에 참여하는 것으로 알려져 있다.¹⁻³⁾ 알츠하이머병 및 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경질환 환자의 부검에서는 이 수용체가 정상인에 비하여 상당히 감소되어있어 nAChRs가 이 질병의 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있으며,^{4,5)} 통각억제를 중재할 뿐만 아니라 담배중독을 일으키는 성분인 니코틴의 작용부위이기도 하다.⁶⁻⁷⁾ 그러므로 사람의 뇌 nAChRs의 비침습적, 정량적인 영상은 이 수용체의 역할과 기능을 연구하는데 큰 기여를 할 것이다.

nAChRs 중에서 [³H]니코틴(nicotine)에 강하게 결합하는 주 수용체는 α₄β₂로 구성되어있다.⁸⁾ 따라서 사람의 α₄β₂ nAChRs에 높은 친화력과 선택성을 갖는 리간드들의 개발과 이들 리간드들을 방사성동위원소로 표지하여 nAChRs의 영상을 얻기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다(Fig. 1). 초기에는 ¹¹C으로 표지된 니코틴을 사용하여 원숭이와 사람에서 PET 영상을 얻었는데, 이 방사성리간드가 뇌로부터 빨리 배출되고 높은 비특이결합을 가지는 성질 때문에 사용이 제한되었다.⁹⁾ 우수한 nAChRs 방사성리간드를 개발하려는 노력에 힘입어 독이 있는 개구리 *Epipedobatus tricolor*의 피부에서 추출된 알칼로이드인 에피바티딘(epibatidine, (+)-exo-2-(2-chloro-5-pyridyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptane)이¹⁰⁾ 방사성리간드로 개발되었다. 에피바티딘의 Cl을 ¹²³I으로 치환한 (±)[¹²³I]IPH 및 ¹⁸F으로 치환한 (±)[¹⁸F]FPH는 우수한 수용체 영상을 보여주었지만, 이들 화합물들의 강한 독성때문에 사람에게 적용되는데 한계가 있었다.¹¹⁻¹⁴⁾ α₄β₂ 아형에 대한 선택성이 낮은 리간드는 중추 nAChRs 뿐만 아니라 말초 nAChRs에 작용하게 되고, 비방사능이 낮은 방사성리간드는 약물효과를 유도할 가능성이 있으므로 α₄β₂ 아형에 대한 선택성이 크고 독성이 낮은 리간드의 사용이 바람직하다. 따라서 에피바티딘의 구조와 유사하며 독성이 낮은 방사성리간드를 개발하고자 하는 연구가 수행되어 최근에는 독성이 낮은 3-pyridyl ethers 계열의 화합물들이 nAChRs 리간드로 개발되어 각광을 받고 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 그 대표적인 화합물이 3-(2(S)-azetidinylmethoxy) pyridine(A85380)으로 사람의 α₄β₂ 아형에 대한 친화력(K_i=0.05 nM)은 에피바티딘

(K_i=0.04 nM)과 유사하지만 다른 아형에 대한 친화력이 에피바티딘에 비하여 낮아 α₄β₂ 아형에 대한 선택성이 큰 반면에, 독성은 에피바티딘에 비하여 낮은 장점을 가지고 있다.¹⁸⁾ 마우스에서 보고된 독성에 의하면, 2-fluoro- A85380 (1), 6-fluoro- A85380, FPH의 LD₅₀ 값이 각각 15 μmol/kg, 1.74 μmol/kg, 40.6 nmol/kg으로, A85380 유도체들이 에피바티딘 유도체에 비하여 낮은 독성을 보였다.¹⁶⁾ 따라서 할로젠으로 치환된 여러 A85380 유도체들이 합성되었으며, 양전자를 방출하는 ¹⁸F 또는 단일광자를 방출하는 ¹²³I으로 표지되어 양전자방출단층촬영술(PET) 및 단일광자방출전산화단층촬영술(SPECT)을 이용하여 마우스 및 바분에서 연구되었다.¹⁹⁻²⁶⁾ 이 결과에서 이들 방사성리간드들이 nAChRs가 풍부한 시상(thalamus)에 높은 섭취를 보였으며 높은 비방사능과 낮은 독성으로 인하여 사람 영상을 위한 안전성이 확보되었다. 최근에는 2-[¹⁸F]fluoro- A85380의 사람에서의 선량측정 결과가 보고되어,²³⁾ 앞으로 ¹⁸F 또는 ¹²³I으로 표지된 방사성리간드들이 알츠하이머병 및 파킨슨병의 영상진단, 니코틴 중독 등의 뇌기능 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 α₄β₂ 아형에 대한 결합친화력과 선택성

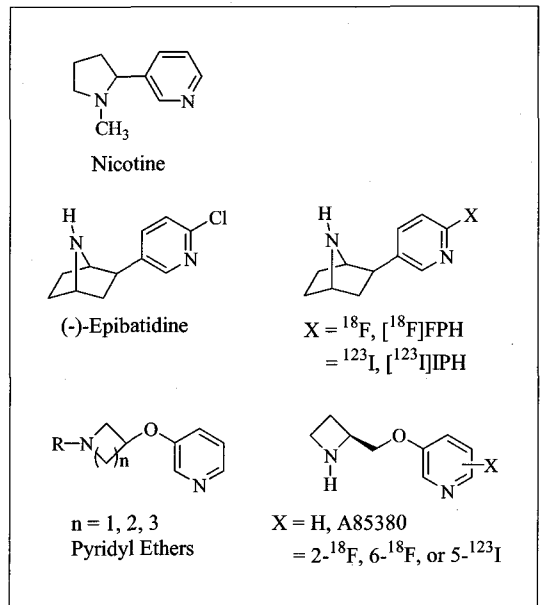


Fig. 1. Major nAChR ligands are listed.

이 5-iodo-A85380이 2-fluoro-A85380에 비하여 다소 우수하며 방사성리간드로 사용될 경우에는 방사성리간드의 합성시간이 짧고 장비의 분포도가 넓은 SPECT를 사용할 수 있는 장점이 있는 반면에, 후자가 방사성리간드로 사용될 경우에는 PET의 높은 분해능과 정량성이 장점이 될 수 있다.

이 연구에서는 2-[¹⁸F]fluoro-A85380([¹⁸F]1)의 효율적인 합성을 위하여 ¹⁸F 표지 후 얻어지는 중간물질을 분리하지 않고 한번의 HPLC 정제과정을 포함하는 합성방법을 적용하여 마우스에서 생물학적 평가를 수행하였다. 또한 이 결과들을 방사화학적 수율, 비방사능, 합성시간, 체내분포 및 억제실험의 관점에서 문헌에 알려진 결과들과 비교하여 사람에게 사용될 경우에 안전성 및 합성의 용이성을 평가하였다(Fig. 1).

대상 및 방법

¹⁸F은 싸이클로트론(GEMS, Uppsala, Sweden)에서 ¹⁸O-물을 표적으로 하여 생산되었다. HPLC 정제 및 분석은 Thermo Separation Products system 및 역상컬럼(C18, 10×250 mm, 10 μ)을 사용하였다. TLC는 실리카겔(F-254, Merck)판을 사용하였으며 UV 또는 KMnO₄에 의한 발색에 의해 화합물의 합성 유무를 확인하였다. 방사성리간드인 경우에는 실리카겔 판을 적절한 용매에서 전개한 후 Radio-TLC 스캐너를 사용하여 분석하였다. 화합물 및 방사성리간드의 합성은 문헌에 보고된 합성방법을 참고 또는 변경하여 수행하였다.^{17,21-22,24)}

1. 2-Iodo-3-(1-tert-butoxycarbonyl)-2(S)-azetidylmethoxy)pyridine(7) 및 2-fluoro-3-(2(S)-azetidylmethoxy)pyridine · trifluoroacetic acid(1)

1) 2-Iodo-3-(1-tert-butoxycarbonyl)-2(S)-azetidylmethoxy)pyridine(7)

0℃에서 2-iodo-3-pyridinol (5, 137.4 mg, 0.62 mmol)과 (1-tert-butoxycarbonyl)-2(S)-azetidyl methanol (4, 172.2 mg, 0.94 mmol)를 THF(5.5 mL)에 용해한

액에 Ph₃P (255.4 mg, 0.97 mmol)를 넣고 diethyl azodicarboxylate(0.4 mL, 0.97 mmol)를 한 방울씩 적정한 후 이 혼합액을 25℃에서 3일 동안 교반하였다. 반응 완결 후 용매를 제거하고 ethyl acetate로 희석한 후에 이 용액을 물과 NaHCO₃ 포화 수용액으로 씻고 무수 MgSO₄로 건조시켰다. 플래시 컬럼 크로마토그래피(hexane: ethyl acetate=2:1)로 정제하여 무색 oil의 7을 얻었다(49%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.40 (s, 9H), 2.38-2.49 (m, 2H), 4.07 (m, 2H), 4.15 (m, 1H), 4.54 (m, 2H), 7.06 (dd, J=1.4, 8.1 Hz, 1H), 7.17 (dd J=4.4, 8.2 Hz, 1H), 8.01 (dd, J=1.4, 4.6 Hz, 1H).

2) 2-Fluoro-3-(2(S)-azetidylmethoxy)pyridine · trifluoroacetic acid(1)

0℃에서 2-fluoro-3-hydroxypyridine (6, 9.2 mg, 0.70 mmol)과 4 (161.9 mg, 0.88 mmol)를 THF (6 mL)에 용해한 액에, Ph₃P(399.5 mg, 1.52 mmol)를 넣고 diethylazodicarboxylate(0.25 mL, 1.59 mmol)를 한 방울씩 천천히 넣었다. 이 혼합액을 25℃에서 3일 동안 교반한 후, 용매를 제거하고 ethyl acetate로 추출하여 유기층을 물 및 NaHCO₃ 포화 수용액으로 차례로 씻어준 후 무수 MgSO₄로 건조시켰다. 플래시 컬럼 크로마토그래피(hexane: ethyl acetate=2:1)로 정제하여 무색 oil 형태의 8을 얻었다(41%). 8(41.5 mg, 0.15 mmol)을 CH₂Cl₂(2 mL)에 용해한 액에 trifluoroacetic acid (1 mL)를 가하고 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 염 형태의 최종생성물은 HPLC로 정제하여 무색 시럽 형태의 1을 얻었다(90%). HPLC 용매는 (H₂O:CF₃COOH:CH₃CN:CH₃OH-90:0.2:6:4, 유출속도는 분당 4 mL이었으며 최종생성물은 13-14분에서 유출되었다. ¹H NMR (acetone-d₆) δ 2.5 (m, 2H), 4.08 (m, 2H), 4.36 (dd, J=3.4, 10.9 Hz, 2H), 4.82 (m, 2H), 7.12 (dd, J=4.2, 8.0 Hz, 1H), 7.5 (ddd, J=1.3, 7.9, 10 Hz), 1H, 7.63 (ddd, J=1.3, 1.8, 4.8 Hz, 1H).

2. 2-[¹⁸F]Fluoro-3-(2(S)-azetidylmethoxy)pyridine · trifluoroacetic acid ([¹⁸F]1)

¹⁸F 적당량을 nBu₄NOH(40% 수용액, 2.9 μL, 4.42

μmol)에 가한 후에 CH_3CN 을 이용하여 물을 제거하였다(90°C, 질소). 생성된 $n\text{Bu}_4\text{N}^{18}\text{F}$ 를 무수 DMSO (200 μL)를 이용하여 전구물질 7 (1.9 mg, 4.90 μmol)이 담겨있는 바이알에 옮긴 후, 190°C에서 20분 동안 가열 교반하였다. 반응이 끝나면 반응액의 온도를 실온으로 낮추고 물과 CH_2Cl_2 로 추출한 유기층을 물로 한번 씻어내었다. 이 용액에 trifluoroacetic acid (1 mL)를 넣고 상온에서 10분 동안 반응하였다. 반응 후에 용액을 제거하고 HPLC 용매(1 mL)에 용해한 후 HPLC로 정제하였다. HPLC 용매로는 ($\text{H}_2\text{O}:\text{CF}_3\text{COOH}-90:0.2$):($\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}-3:2$)=92:8 혼합액을 사용하였고, 용매는 분당 4 mL의 속도로 유출하였으며, UV 검출기(254 nm)와 방사능 검출기를 동시에 사용하여 방사성리간드의 유출을 확인하였다. 총 반응시간은 100분이 소요되었으며 22-23분 사이에서 ^{18}F 이 유출되었다. 이 유출액의 용매는 60°C 이하에서 감압증류기를 사용하여 제거하였다. 최종생성물의 확인은 비방사성 표준물질(1)과 HPLC에서 동일한 시간에 유출되는 것으로 확인하였다. 비방사능은 아는 농도의 비방사성 표준물질(1)을 이용하여 HPLC로 분석하여 얻었다. 마우스의 체내분포 및 억제실험을 위하여 생리식염수에 용해한 ^{18}F 의 pH는 5이었다.

또 다른 방법으로는 ^{18}F 표지 후 반응혼합액을 곧바로 HPLC($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}-60:40$)로 분리하고 용매는 감압증류기를 사용하여 제거하였다.²²⁾ 이 화합물에 trifluoroacetic acid(1 mL)와 CH_2Cl_2 (1 mL)를 넣고 상온에서 10분 동안 교반하였다. 반응 후에 반응액을 HPLC로 정제하였다. HPLC 용매로는($\text{H}_2\text{O}:\text{CF}_3\text{COOH}-90:0.2$):($\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}-3:2$)=90:10 혼합액을 사용하였으며 ^{18}F 은 13-14분에서 유출되었다. 총 반응시간은 120분이 소요되었다.

3. 체내분포 실험

HPLC에 의해 정제된 방사성리간드(^{18}F)를 생리식염수에 용해한 후에, 1.11 MBq (200 μL)씩을 취하여 마우스(ICR, 25 g)의 꼬리정맥에 주사한 후 5, 15, 30, 60, 90, 120분에 마우스를 경추탈구하여 소뇌(cerebellum), 해마(hippocampus), 선조체(striatum), 피질(parietal cortex), 시상(thalamus), 상구(superior

colliculus)의 6개 뇌조직을 분리해 무게를 측정 한 후, 감마계수기를 이용하여 방사능을 측정하였다. 각 시간 당 마우스는 4마리를 사용하였으며 섭취된 양은 평균을 내었다. 주사용량은 마우스 주사액으로 만들어진 표준액으로부터 계산하였으며 각 조직의 무게 당 감쇠보정된 방사능양을 %ID/g으로 나타내었다.

조직대 소뇌의 방사능 섭취비는 각 시간별 각 조직에 해당하는 %ID/g을 소뇌의 %ID/g으로 나누어 얻었다.

4. 억제실험

방사성리간드(^{18}F)를 생리식염수에 용해한 후에 마우스(ICR, 25 g) 한 마리당 1.48 MBq (200 μL)을 사용하였으며 각 실험군 당 마우스 4마리를 사용하였다. 억제실험에 사용한 스코폴라민(scopolamine) 및 메카밀아민(mecamylamine)은 방사성리간드의 꼬리정맥 주사 전 30분에 마우스에 피하주사하였으며, 생리식염수, 사이티신(cytisine), (-)니코틴 그리고 비방사성 표준물질(1)은 방사성리간드 주사 5분 전에 같은 방법으로 주사하였다. 사용된 약물은 200 μL 의 생리식염수에 용해하여 사용하였으며 용량은 1(0.17 $\mu\text{mol}/\text{kg}$)을 제외하고는 모두 5 mg/kg을 주사하였다.^{21,25)} 방사성리간드의 주사 후 90분에 마우스를 경추탈구하여 6개의 뇌조직(소뇌, 해마, 선조체, 피질, 시상, 상구)을 분리해 무게를 측정 한 후, 감마계수기를 이용하여 방사능을 측정하였다. 조직 무게 당 감쇠보정된 방사능의 양을 %ID/g으로 나타내었다.

결 과

1. 전구물질(7) 및 비방사성 표준물질(1)의 합성

전구물질(7) 및 비방사성 표준물질(1)은 Fig. 2에서 처럼 2-halo-3-pyridinol(5, 6)과 (1-tert-butoxycarbonyl-2(S)-azetidiny) methanol(4)의 Mitsunobu 커플링에 의하여 각각 49% 및 41%로 합성되었다. 중간물질인 3, 4, 6은 문헌에 있는 방법과 같이 합성되었다.^{17,21,24)} 즉 6은 2-amino-3-hydroxypyridine과 tetrafluoroboric acid로부터 61%의 수율로 얻었으며,

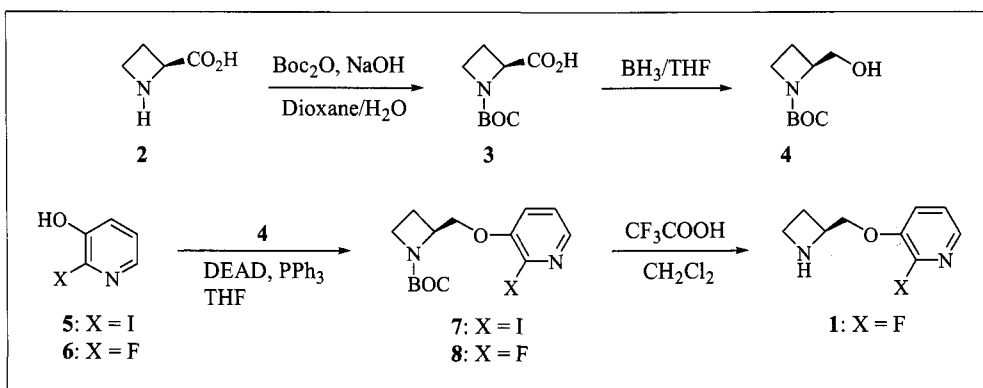


Fig. 2. Synthetic route of nonradioactive standard ligand 1 and the precursor 7 is shown.

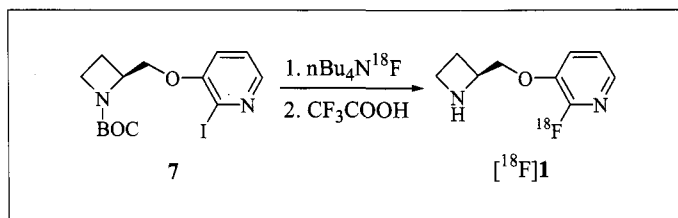


Fig. 3. Synthetic route of the [¹⁸F]1. The desired radioligand was prepared in 2 steps from the precursor, 7.

azetidylmethanol 4는 azetidylcarboxylic acid(2)의 아민에 보호기인 tert-butoxycarbonyl(BOC)기를 99%의 수율로 도입한 후, 3의 carboxyl기를 68%의 수율로 환원하여 얻었다(Fig. 2).

비방사성 표준물질은 4와 6을 커플링하고 trifluoroacetic acid를 사용하여 azetidine의 N에 있는 보호기를 제거한 후 trifluoroacetic acid 염의 형태로 얻어졌다. 얻어진 화합물을 HPLC로 정제하였으며 화합물의 분석 결과 문헌의 결과와 일치하였다.^{21,24)}

2. [¹⁸F]1의 합성

전구물질(7)을 무담체 상태에서 친핵반응에 의하여 50-65%의 방사화학적 수율로 I을 ¹⁸F으로 치환하였으며, 용매인 DMSO를 제거하기 위하여 CH₂Cl₂로 생성물을 추출하고, 보호기인 BOC를 trifluoroacetic acid를 사용하여 95% 이상의 수율로 제거하였다(Fig. 3). 이 반응액을 HPLC로 정제하여 [¹⁸F]1을 비교적 높은 수율 (15-20%)로 얻었다. 이때, HPLC 용매의 비율에 따라 원하는 방사성리간

드와 비방사성 불순물의 분리에 차이가 있었으며 (Fig. 4A 및 4B), 마우스의 체내연구에서는 비방사능이 높은 방사성리간드를 사용하기 위하여 비극성 비율의 혼합액을 사용하였다(Fig. 4B). 최종 방사성 리간드는 비방사성 표준물질과 HPLC에 동시에 주입하여 같은 시간에 유출되는 것으로 확인하였다. 두 번의 HPLC를 사용한 방법은 ¹⁸F 표지 후에 중간 물질을 역상 HPLC로 분리하였으며 나머지 과정은 한 번의 HPLC를 사용하는 방법과 동일하였다. 한 번의 HPLC를 사용한 방법의 총 합성시간은 100분이 소요되었고, 감쇠보정된 방사화학적 수율이 15-20%, 비방사능은 38-55 GBq/μmol, 방사화학적 순도는 99% 이상이었다. 반면에, 두 번의 HPLC를 사용한 방법은 총 합성시간이 120분이었고, 수율이 12-16%, 비방사능이 60 GBq/μmol이었다(Fig. 3, 4).

3. 체내분포실험

생리식염수에 용해된 [¹⁸F]1을 마우스의 꼬리정맥에 주사 후 6개의 뇌조직에 섭취된 정도를 %ID/g으

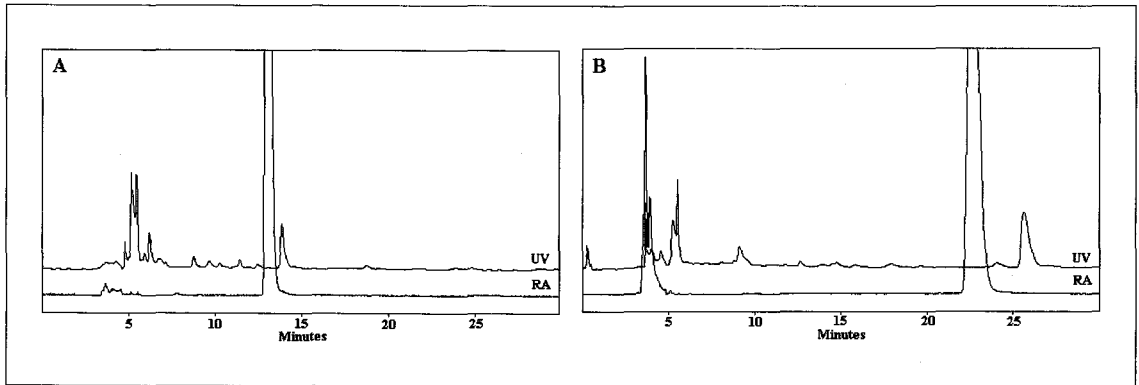


Fig. 4. HPLC traces of the $[^{18}\text{F}]1$. The ratio of HPLC solvents differs in the traces A and B. ($\text{H}_2\text{O}:\text{CF}_3\text{COOH}-90:0.2$):($\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}-3:2$)= $90:10$ for trace A and $92:8$ for B. The product was eluted at 13–14 min (A) and 22–23 min (B). The eluants were simultaneously monitored by a UV detector (UV) and a NaI(Tl) radioactivity detector (RA).

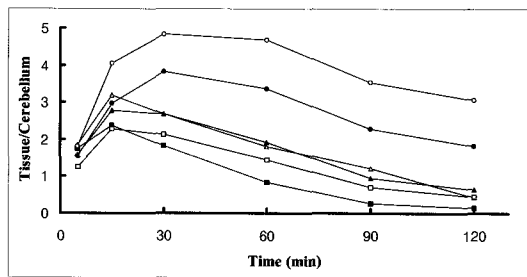


Fig. 5. Tissue distribution of $[^{18}\text{F}]1$ in mouse brain ($n=4$). The injected dose was calculated from standards prepared from the injection solution and the data were expressed as %ID/g. Tissue: thalamus \circ ; superior colliculus \bullet ; cortex \triangle ; striatum \blacktriangle ; hippocampus \square ; cerebellum \blacksquare .

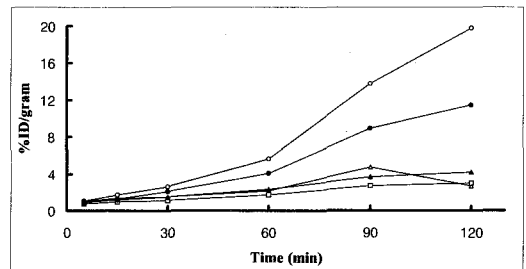


Fig. 6. Tissue/cerebellar uptake ratios of $[^{18}\text{F}]1$ in mouse brain are shown as a function of time. Tissue: thalamus \circ ; superior colliculus \bullet ; cortex \triangle ; striatum \blacktriangle ; hippocampus \square .

로 나타내었다(Fig. 5). 가장 높은 방사능 섭취를 보인 조직은 시상으로 주사 후 30분에 4.8%ID/g을 보였다. 시상과 상구의 방사능 섭취는 주사 후 90분에 각각 3.5%ID/g, 2.3%ID/g이었고, 120분에는 3.1%ID/g, 1.8%ID/g로 시간이 경과함에 따라 감소되는 것이 관측되었다(Fig. 5). 그에 반해 피질, 선조체, 해마에서의 섭취는 비교적 낮았고 소뇌에는 거의 섭취되지 않았다. 조직/소뇌의 섭취비는 시간이 지날수록 증가하여 시상/소뇌의 섭취비는 주사후 90분에 13.8, 120분에 19.7에 도달하였다(Fig. 6).

4. 억제실험

리간드를 용해하는데 사용된 생리식염수를 리간드 대신에 주사하여 대조군으로 하고 조직의 g 당 방사능양을 100%로 나타내었을 때, 방사성리간드 주사 전에 투여한 스코폴라민과 메카밀아민은 실험에 사용된 모든 조직에서 대조군에서 얻은 방사능 섭취와 유사한 값을 보였다(Fig. 7). 반면에 사이티신, (-)니코틴 및 비방사성 표준물질 (1)의 투여는 생리식염수를 주사한 각각의 대조군에 비하여 방사능 섭취가 시상에서 각각 89.3%, 68.3%, 79.5%, 상구에서 89.9%, 66.9%, 78.8% 만큼 감소되었으며, 해마, 선조체, 피질에서는 방사능 섭취가 약 30-50% 감소되었고 소뇌에서는 대조군과 유사하였다(Fig. 7). 사

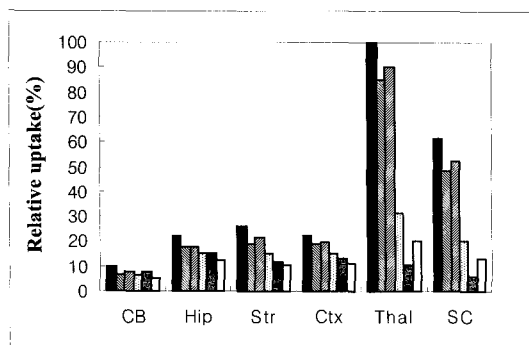


Fig. 7. Effect of various ligand pretreatment on the uptake of [¹⁸F]1 in mouse brain tissues at 90 min after the administration of the radioligand (n=4). Mecamylamine (▨) and scopolamine (▧) were injected subcutaneously 30 min prior to injection of the radioligand, and saline (■), (-)nicotine (□), cytosine (▤) and 1 (▩) were pretreated 5 min before the radioligand. Dose was 5 mg/kg except 1 (0.17 μmol/kg). Cerebellum (CB); hippocampus (Hip); striatum (Str); parietal cortex (Ctx); thalamus (Thal); superior colliculus (SC).

이티신에 의한 억제효과가 니코틴에 의한 억제효과보다 다소 컸다. 체내분포에서 [¹⁸F]1을 주사 후 그리고 억제실험에서 0.17 μmol/kg 용량의 1을 피하주사로 투여한 후에도 마우스에서 독성의 흔적은 관측되지 않았다(Fig. 7).

고 찰

¹⁸F으로 표지된 A85380의 전구물질로서 I이 치환된 7 및 I 대신 trimethylammonium 염이 치환된 화합물이 사용되었으며,^{16,21,24,26} 이 연구에서는 I이 치환된 화합물을 사용하여 비교적 높은 수율로 ¹⁸F이 표지된 화합물을 얻었다. 전구물질(7)의 합성은 2-iodo-3-pyridinol과 BOC 보호기를 가진 azetidyl-methanol(4)을 Mitsunobu 커플링을 통하여 합성하였으며 비방사성 표준물질(1)은 2-fluoro-3-pyridinol을 사용하여 7의 합성과 같은 방법으로 합성하였다(Fig. 2). 비방사성 표준물질(1) 및 [¹⁸F]1을 합성할 때 azetidine의 N이 자유 N 형태로 존재하면 열에 불안정하여 쉽게 N의 고립전자쌍이 pyridine 고리를 공격하여 6각형의 고리가 형성되므로 화합물의 N이

염의 형태로 존재하는 것이 안정하다.²⁴ 따라서 N의 보호기인 BOC을 제거한 후에 화합물이 trifluoroacetic acid 염 형태로 존재하도록 하였으며 최종생성물은 모두 HPLC로 정제하였다.

이 연구에서는 ¹⁸F 표지반응 후에 중간물질을 분리하지 않고 보호기 제거반응을 수행하였다(Fig. 3). 생성된 [¹⁸F]1을 HPLC로 정제할 때, H₂O:CF₃COOH (90:0.2)와 CH₃CN:CH₃OH(3:2)의 혼합비율을 90:10으로 하면 최종생성물이 13-14분에서 유출되고 92:8로 하면 22-23분에서 유출된다(Fig. 4). 두 경우 모두에서, 방사성리간드가 비방사성화합물과 동시에 유출되지는 않았으나 비방사능을 높이기 위하여 후자의 조건을 사용하였다(Fig. 4B). 두 번의 HPLC를 사용할 경우에는 1번의 HPLC를 사용하는 방법에 비하여 비방사능은 다소 높았으나 합성시간이 20분 정도 더 소요되었으며 방사화학적 수율도 낮았다. 이 방법은 문헌에서 사용된 방법으로,²¹⁻²² ¹⁸F 표지 후에 중간물질을 HPLC로 정제하고 보호기를 제거한 후에 다시 HPLC로 정제하는 방법이다. 이 방법은 모두 역상컬럼을 사용하였으며 중간물질을 다른 처리없이 곧바로 HPLC로 정제할 수 있으며 두 번의 정제로 인하여 비방사능이 높은(60 GBq/μmol) 방사성리간드를 생산하는 장점이 있는 반면에, 두 번의 HPLC와 감압증류기의 사용으로 번거로움이 있고 HPLC 용매의 대부분이 물을 포함하므로 용매 제거에 많은 시간이 소요될 수 있다. 다른 방법으로는 ¹⁸F 표지 중간물질을 정상 HPLC로 정제하고 보호기를 제거한 후에 다시 역상 HPLC로 정제하는 방법이다.^{24,26} 이 방법은 첫 번째 방법과 마찬가지로 높은 비방사능의 방사성리간드를 생산하는 장점이 있으나 정제할 때 서로 다른 상의 컬럼을 사용하는 번거로움이 있다.

이 연구에서는 ¹⁸F의 비교적 짧은 반감기(109.8 분)를 고려하여 ¹⁸F 표지 후 중간물질을 분리하지 않고 바로 보호기를 제거하는 과정을 거친 다음, HPLC로 한번 정제하는 방법을 적용하였다. 이 연구에서 얻어진 결과와 문헌에 보고된 결과를 비교하면 [¹⁸F]1의 방사화학적 수율은 각각 15-20%, 10%, 비방사능은 38-55 GBq/μmol, 37-39 GBq/μmol(최근에 같은 연구팀에서 사람의 선량평가에 사

용된 [^{18}F]1의 비방사능은 185-740 GBq/ μmol 로 보고되어 있다), 반응시간은 100분, 120분으로 한 번의 HPLC를 사용하는 방법은 문헌의 결과와 유사하였다.²¹⁻²³⁾

마우스 뇌에서 [^{18}F]1의 체내분포 실험 결과, 방사능 섭취는 주사후 30분에 nAChRs가 풍부한 시상(4.8%ID/g) 및 상구(3.8%ID/g)에서 가장 높았으며 시간이 경과함에 따라 감소하였다. 피질, 선조체, 해마에는 15분에 약간의 섭취만 관측되었고 이 수용체가 부족하다고 알려진 소뇌에는 방사능 섭취가 거의 일어나지 않았다. 따라서 Fig. 5에서 보여진 것처럼 [^{18}F]1은 nAChRs에 특이적 결합을 하는 방사성리간드임이 증명되었다. 이 결과를 조직 대 소뇌의 섭취비로 표현하면, 시상/소뇌와 상구/소뇌의 섭취비가 각각 주사 후 90분에 13.8, 8.9 그리고 120분에 19.7, 11.5로 nAChRs가 풍부한 조직에 특이적으로 결합하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

[^{18}F]1의 nAChRs에 대한 선택성을 연구하기 위하여 여러 가지 리간드를 사용하여 방사성리간드의 섭취에 대한 영향을 조사하였다(Fig. 7). 시상 대 소뇌의 방사성리간드 섭취비가 시간이 경과함에 따라 증가하나, 시상에 섭취된 선량을 고려하여 방사성리간드 주사 후 90분에 마우스의 뇌조직을 얻었다. mAChRs (muscarinic AChRs) 길항제인 스코폴라민과 nAChRs 채널 차단제인 메카밀아민은 nAChRs에 대한 [^{18}F]1의 섭취에는 아무런 영향을 끼치지 않으므로 리간드 대신에 용매로 사용한 생리식염수를 주사한 대조군에 비하여 6개의 뇌조직 모두에서 방사능 섭취의 억제가 거의 일어나지 않았다. 반면에 nAChRs 작용제인 사이티신 및 (-)니코틴은 [^{18}F]1과 서로 경쟁적으로 결합하므로 이 리간드들의 전처리 는 이 수용체가 풍부한 시상 및 상구에서 방사능의 섭취를 70-90% 감소시켰으며, 피질, 선조체, 해마에서는 30-50%의 억제를 보였고 소뇌에서는 방사능 섭취의 억제효과가 거의 관측되지 않았다. 또한 nAChRs를 1의 전처리로 포화시킨 경우에도 [^{18}F]1의 섭취가 시상 및 상구에서 억제되었다. 따라서 이 결과로부터 [^{18}F]1이 nAChRs에 특이적, 선택적으로 결합한다는 것을 알 수 있었다.

[^{18}F]1의 뇌에서의 체내분포와 여러 리간드에 의

한 억제효과는 문헌에 보고된 결과와 유사하였다.²²⁾ 이 연구에서 사용된 방법으로 얻어진 방사성리간드는 문헌에 알려진 방사성리간드와 비방사능이 유사하였으며 사람의 PET 영상에 사용된다고 할 때 비방사능 37-74 GBq/ μmol 의 방사성리간드 370 MBq을 주사하면 약 0.08-0.16 nmol/kg의 담체가 사람에게 주사되므로 15 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 인 1의 LD₅₀ 값을 고려할 때 이 방사성리간드의 사용은 안전하다고 할 수 있다. 또한 한번의 HPLC를 사용하는 방법은 FDG 자동화장치를 사용하여 합성이 가능할 것으로 보이며 HPLC 정제 후에 영상에 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

목적: nAChRs의 $\alpha_4\beta_2$ 아형에 높은 친화력과 선택성을 갖는 리간드인 2-[^{18}F]fluoro-A85,380([^{18}F]1)의 효율적인 합성과정을 연구하여 방사화학적 수율, 비방사능, 합성시간, 마우스에서 생물학적 평가의 측면에서 문헌에 보고된 결과들과 비교 평가하였다. **대상 및 방법:** 전구물질의 I을 ^{18}F 으로 치환한 다음 중간물질을 분리하지 않고 trifluoroacetic acid를 가하여 보호기를 제거하였다. 반응혼합액을 HPLC로 정제하여 얻은 방사성리간드([^{18}F]1)를 마우스의 꼬리 정맥에 주사한 후에 정해진 시간별로 6개의 뇌조직(소뇌, 해마, 선조체, 피질, 시상, 상구)을 분리하여 무게를 측정하고 감마계수기를 이용하여 방사능을 측정하였다. 또한 스코폴라민, 메카밀아민, 사이티신, (-)니코틴, 비방사성 표준물질(1)을 마우스에 피하주사로 투여하고 방사성리간드 주사 후 90분에 6개의 뇌조직을 분리하여 무게 및 방사능을 측정하여 %ID/g으로 나타내었다. 이 결과를 대조군과 비교하였다. **결과:** ^{18}F 표지 후 중간물질을 분리하지 않고 한 번의 HPLC 정제를 통하여 [^{18}F]1을 15-20%의 방사화학적 수율로 합성하였으며 비방사능은 38-55 GBq/ μmol 이었다. 이 방사성리간드의 마우스 뇌에서의 분포결과, 주사 후 30분에 nAChRs가 풍부하게 분포되어 있는 시상과 상구에서 가장 많은 섭취를 보였고 이 수용체가 부족한 소뇌에는 거의 섭취되지 않았다. 여러 리간드를 사용하여 [^{18}F]1 섭취

의 억제효과를 본 실험에서는 nAChRs 작용제인 사 이티신 및 (-)니코틴의 전처리가 시상 및 상구에서 [¹⁸F]1의 섭취를 70-90% 감소시켰으며, 소뇌에서는 억제효과가 관측되지 않았다. 결론: 이 연구에서 사용된 방법으로 얻어진 [¹⁸F]1의 방사화학적 수율, 비 방사능, 뇌에서의 분포 그리고 여러 리간드에 의한 억제효과는 문헌에 보고된 결과와 유사하였다. 따라서 중간물질을 분리하지 않고 한번의 HPLC를 사용하는 방법이 [¹⁸F]1의 상용생산에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

이 연구는 원자력중·장기연구개발사업(M2-0204-00-0026-02-A05-00-001-1-3) 및 삼성생명과학 연구소(C-A0-006)의 연구비 보조로 이루어졌음.

참고 문헌

- 1) Decker MW, Brioni JD, Bannon AW, Armeric SP. Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptor: Lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. *Life Sci* 1995;56:545-70.
- 2) Flicker KRL, Watkins KL, Fisher SK, Bartus RT. Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to cerebral cortex in rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;18:973- 81.
- 3) Levine ED, Ross JE. Acute and chronic nicotinic imteractions with dopamine systems and working memory performance. *Ann N Y Acad Sci* 1995;757:245-52.
- 4) London ED, Waller SB, Wamsley JK. Autoradiographic localization of [³H]nicotine binding sites in the rat brain. *Neurosci Lett* 1985;53: 179-84.
- 5) Whitehouse PJ, Martino AM, Antuono PG, Lowenstein PR, Coyle JT, Price DL, et. al. Nicotinic acetylcholine binding sites in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1986;371:146-51.
- 6) Pert A. Cholinergic and catecholaminergic modulation of nociceptive reactions: Interactions with opiates. In: Akil A, Lewis JW, editors. *Pain and Headache, Neurotransmitters and Pain Control*. Basel: Karger; 1987. p. 1-63.
- 7) Henningfield JE, Woodson PP. Dose-related actions of nicotine on behavior and physiology: Review and implications for replacement therapy for nicotine dependence. *J Subst Abuse* 1989;1: 301-17.
- 8) Holladay MW, Dart MJ, Lynch JK. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as targets for drug discovery. *J Med Chem* 1997;40:4169-94.
- 9) Nyback H, Nordberg A, Langstrom B, Halldin C, Ahlin A, Swahn CG, et al. Attempts to visualize nicotinic receptors in the brain of monkey and man by positron emission tomography. *Prog Brain Res* 1989;79:313-9.
- 10) Spande TF, Garraffo HM, Edwards MW, Yeh HJC, Panell L, Daly JW. Epibatidine: A novel (chloropyridyl)azabicycloheptane with potent analgesic activity from an Ecuadorian poison frog. *J Am Chem Soc* 1992;114: 3475-8.
- 11) Musachio JL, Horti AG, London ED, Dannals RF. Synthesis of a radioiodinated analog of epibatidine: (±)-Exo-2-(2-iodo-5-pyridyl)-7-azabicyclo [2.2.1]heptane for in vitro and in vivo studies of nicotinic acetylcholine receptors. *J Labelled Cpd Radiopharm* 1997;39:39-48.10.
- 12) Horti AG, Ravert HT, London ED, Dannals RF. Synthesis of a radiotracer for studying nicotinic acetylcholine receptors: (±)-Exo-2-(2-[¹⁸F]fluoro-5-pyridyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptane. *J Labelled Cpd Radiopharm* 1996;38:355-66.
- 13) Horti AG, Scheffel U, Stathis M, Finley P, Ravert HT, London ED et al. [¹⁸F]FPH for PET imaging of nicotinic acetylcholine receptors. *J Nucl Med* 1997;38:1260-5.
- 14) Molina P, Ding YS, Carrol FI, Liang F, Volkow N, Kuhar M, et al. [¹⁸F]Norchlorofluoroepi-

- batidine (NEEP): Preclinical toxicological studies. *J Nucl Med* 1997;38:287P (Abstract).
- 15) Abreo MA, Lin NH, Garvey DS, Gunn DE, Hettinger AM, Wasicak JT, et al. Novel 3-pyridyl ethers with subnanomolar affinity for central neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* 1996;39:817-25.14.
 - 16) Horti AG, Scheffel U, Kims AS, Musachio JL, Ravert HT, Mathews WB, et al. Synthesis and evaluation of [¹¹C]-N-methylated analogs of epibatidine as tracers for PET studies of nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* 1998;41:199-206.
 - 17) Koren AO, Horti AG, Mukhin AG, Gündisch D, Kimes AS, Dannals RF, et al. 2-, 5-, and 6-Halo-3-(2(S)-azetidylmethoxy) pyridines: Synthesis, affinity for nicotinic acetylcholine receptors, and molecular modeling. *J Med Chem* 1998;41:3690-8.
 - 18) Sullivan JP, Donnelly-Roberts D, Briggs CA, Anderson DJ, Gopalakrishnan M, Plattoni-Kaplan M, et al. A-85380 [3-(2(S)-azetidylmethoxy)pyridine]: *In vitro* pharmacological properties of a novel, high affinity $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptor ligand. *Neuropharmacology* 1996;35:725-34.
 - 19) Horti AG, Koren AO, Lee KS, Mukhin AG, Vaupel DB, Kimes AS, et al. Radiosynthesis and preliminary evaluation of 5-[¹²³/¹²⁵I]iodo-3-(2(S)-azetidylmethoxy)pyridine: A radioligand for nicotinic acetylcholine receptors. *Nucl Med Biol* 1999;26:175-82.
 - 20) Musachio, JL, Villemagne VL, Scheffel UA, Dannals RF, Dogan AS, Yokoi F, et al. Synthesis of an I-123 analog of A-85380 and preliminary SPECT imaging of nicotinic receptors in baboon. *Nucl Med Biol* 1999;26:201-7.
 - 21) Horti AG, Koren AO, Ravert HT, Musachio, JL, Mathews WB, London ED, et al. Synthesis of a radiotracer for studying nicotinic acetylcholine receptors: 2-[¹⁸F]fluoro-3-(2(S)-azetidylmethoxy)pyridine(2-[¹⁸F] A-85380). *J Labelled Cpd Radiopharm* 1998;41:309-18.
 - 22) Horti AG, Scheffel U, Koren AO, Ravert HT, Mathews WB, Musachio JL, et al. 2-[¹⁸F]Fluoro-A-85380, an *in vivo* tracer for the nicotinic acetylcholine receptors. *Nucl Med Biol* 1998;25:599-603.
 - 23) Kimes AS, Horti AG, Contoreggi C, Chefer SI, Kurian V, Friello P, et al. Imaging human $\alpha_4\beta_2$ nicotinic receptors with PET. *J Nucl Med* 2002;43S:356.
 - 24) Dolle F, Valette H, Bottlaender M, Hinnen F, Vaufrey F, Guenther I, et al. Synthesis of 2-[¹⁸F]fluoro-3-[2(S)-azetidylmethoxy]pyridine, a highly potent radioligand for *in vivo* imaging central nicotinic acetylcholine receptors. *J Labelled Cpd Radiopharm* 1998;41:451-63.
 - 25) Scheffel U, Horti AG, Koren AO, Ravert HT, Banta JP, Finliy PA. 6-[¹⁸F]Fluoro- A-85380: An *in vivo* tracer for the nicotinic acetylcholine receptor. *Nucl Med Biol* 2000; 27:51-6.
 - 26) Ding Y-S, Liu N, Wang T, Marecek J, Garza V, Ojima I, Fowler JS. Synthesis and evaluation of 6-[¹⁸F]fluoro-3-(2(S)-azetidylmethoxy) pyridine as a PET tracer for nicotinic acetylcholine receptors. *Nucl Med Biol* 2000;27:381-9.