

체내 안정형 HSV1-tk (Herpes Simplex Virus Type-1 Thymidine Kinase) 영상용 IVDU 유도체의 합성

한국원자력의학원 방사성의약품연구팀¹, 분자유상연구부², 핵의학과³, 한양대학교 응용화학과⁴
김은정¹ · 최태현¹ · 안순혁¹ · 김병수¹ · 박 현¹ · 천기정^{1,2,3} · 이학준⁴ · 안광일¹

The Synthesis of the Stable IVDU Derivative for Imaging HSV-1 TK Expression

Eun jung Kim, M.S.¹, Tae Hyun Choi, Ph.D.¹, Soon Hyuk Ahn M.S.¹, Byoung Soo Kim M.S.¹, Hyun Park¹, Gi Jeong Cheon M.D. & Ph.D.^{1,2,3}, Hak June Rhee Ph.D.⁴, and Gwang Il An Ph.D.¹

¹Laboratory of Radiopharmaceutical Research, ²Molecular Imaging Research Center, ³Department of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Science (KIRAMS), Seoul, Korea; ⁴Department of Chemistry and Applied Chemistry, ⁴Hanyang University, Ansan, Korea

Purpose: 5-iododeoxyuridine analogues have been exclusively developed for the potential antiviral and antitumor therapeutic agents. In this study, we synthesized carbocyclic radioiododeoxyuridineanalogue (ddIVDU) and carbocyclic intermediate as efficient carbocyclic radiopharmaceuticals. **Materials and Methods:** The synthesis is LAH reduction, hetero Diels-Alder reaction as key reactions including Pd(0)-catalyzed coupling reaction together with organotin. MCA-RH7777 (MCA) and MCA-tk (HSV1-tk positive) cells were treated with various concentration of carbocyclic ddIVDU, and GCV. Cytotoxicity was measured by the MTS methods. For in vitro uptake study, MCA and MCA-tk cells were incubated with 1uCi of [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU. Accumulated radioactivity was measured after various incubation times. **Results:** The synthesis of ddIVDU and precursor for radioiodination were achieved from cyclopentadiene in good overall yield, respectively. The radioiododemetalation for radiolabeling gave more than 80% yield with > 95% radiochemical purity. GCV was more toxic than carbocyclic ddIVDU in MCA-tk cells. Accumulation of [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU was higher in MCA-tk cells than MCA cells. **Conclusion:** Biological data reveal that ddIVDU is stable in vitro, less toxic than ganciclovir (GCV), and selective in HSV1-tk expressed cells. Thus, this new carbocyclic nucleoside, referred to in this paper as carbocyclic 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-5-iodovinyluridine (carbocyclic ddIVDU), is a potential imaging probe for HSV1-tk. (Nucl Med Mol Imaging 2009;43(5):478-486)

Key Words: Tumor imaging, ddIVDU, carbocyclic nucleosides, Pd(0)-coupling reaction.

서 론

Gene expression을 영상화하는데 있어 HSV1-tk는 가장 유용하게 사용되는 시스템 중의 하나로, 그 동안 HSV1-tk를 이용한 유전자 영상을 위해 5번 위치에 방사요오드가 도

입된, pyrimidine과 acycloguanosine 염기를 포함하는 많은 핵산 유도체들에 대한 합성과 연구가 이루어져왔다.¹⁻⁴ 특히 이 논문에서 모델로 삼아 연구하고자 하는 IVDU의 경우, 체외 평가에서는 HSV1-tk의 발현 조직에 대하여 높은 발현율을 보여주지만, 체내 평가에서는 HSV1-tk 발현 조직에 대하여 적합하지 않은 기질로 알려져 있다. 반면에 IVDU의 2' 위치에 불소(F)를 도입한 IVFRU의 경우, 세포 섭취가 IVDU에 비해 떨어지지만, 체내에서는 오히려 IVDU에 비해 효과적인 양상을 보여준다.^{3,5} 이러한 현상은 IVDU를 비롯한 일반적인 핵산 유도체가 구조적으로 산소를 포함하는 five-membered ring인 당과 heterocyclic 염기의 C-N 글리코사이드 결합에 의해 이루어져 있다는 데서 기인한다. 일반적으로 C-N 결합과 같은 hetero atom 간의 결합은 동일한 원소 간 결합에 비하여 상대적으로 약한 결

• Received: 2009. 7. 31. • Revised: 2009. 9. 14.
• Accepted: 2009. 9. 20.
• Address for reprints: Gwang Il An Ph.D., Laboratory of Radiopharmaceuticals, Korea Institute of Radiological and Medical Science, 215-4 Gongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-706, Korea
Tel: 82-2-970-1358, Fax : 82-2-970-2409
E-mail: gwangil@krcch.re.kr
※ 본 연구는 과학기술부 원자력 연구개발 중·장기 계획사업의 난치성 질환/뇌질환 표적형 방사성의약품 선도물질 개발과제의 연구비 보조로 이루어졌음

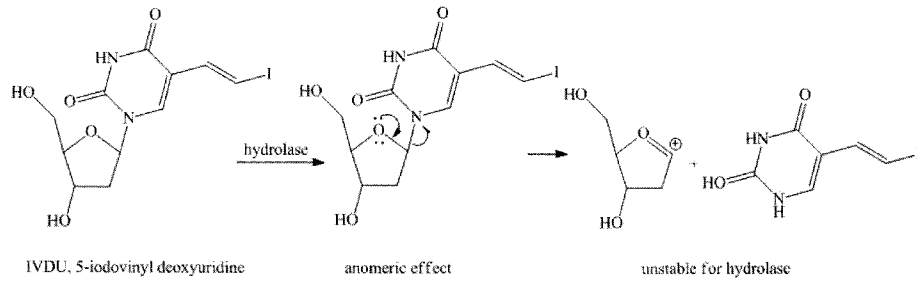


Figure 1. This shows anomeric effect of normal nucleosides in vivo study.

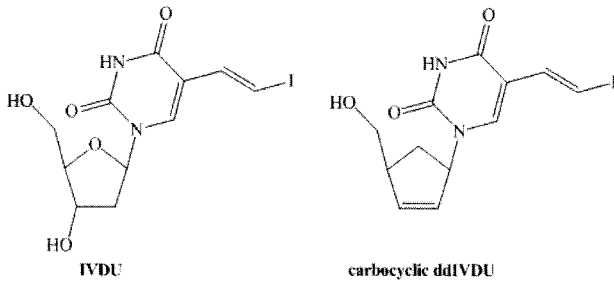


Figure 2. These show the structure of IVDU and carbocyclic ddIVDU.

합력을 가지게 된다. 일반적인 핵산 유도체가 체내에 투여 되었을 경우, 체내 가수분해 효소인 포스포릴라아제에 의해 당과 염기로 쉽게 떨어지게 되며, 이러한 현상은 C-N 결합에 인접한 산소로부터 기인한 anomeric effect에 의해 가속화 되어질 수 있다(Fig. 1).⁶⁾

IVFRU가 IVDU에 비해 높은 체내 안정성을 보이는 이유는 바로 모든 원소 중 전자를 끌어당기는 힘인 전기음성도가 가장 강한 불소가 2' 위치에 치환되어있어 C-N 결합을 상대적으로 강화시켜주기 때문이며, 이러한 유도체들에 대한 연구가 이루어지는 이유는 체내 평가 시 안정한 화합물의 개발에 대한 관심을 반영하고 있다.⁷⁾ 그러나 이러한 구조적 변형만으로는 산소에 의한 anomeric effect를 완전히 배제할 수 없기에 근본적인 해결 방법이 아니다.

최근 들어 당 부분의 산소를 탄소로 변형한 형태의 carbocyclic 핵산 유도체에 대한 관심이 높아지고 있는데, 이는 이들 화합물들이 체내 평가에서도 매우 안정하기 때문이다. Carbocyclic 핵산 유도체는 당의 산소를 탄소로 변형하였기 때문에 체내 가수분해를 촉진시키는 anomeric effect가 전혀 존재하지 않는다.^{6,10-12)}

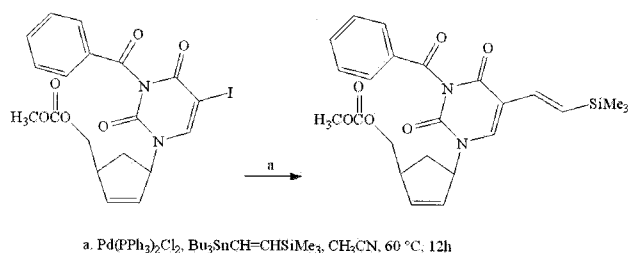
본 연구에서는 물질의 체내 안정성을 증가시키기 위하여 당의 산소를 탄소로 치환한 형태의 carbocyclic 핵산 유도체의 일환으로, IVDU의 carbocyclic 유도체의 형태인 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyiodovinyluridine (ddIVDU)를

합성하여 HSV1-tk의 항바이러스제인 ganciclovir(GCV)와 비교평가 실험을 수행하고자 하였다(Fig. 2).

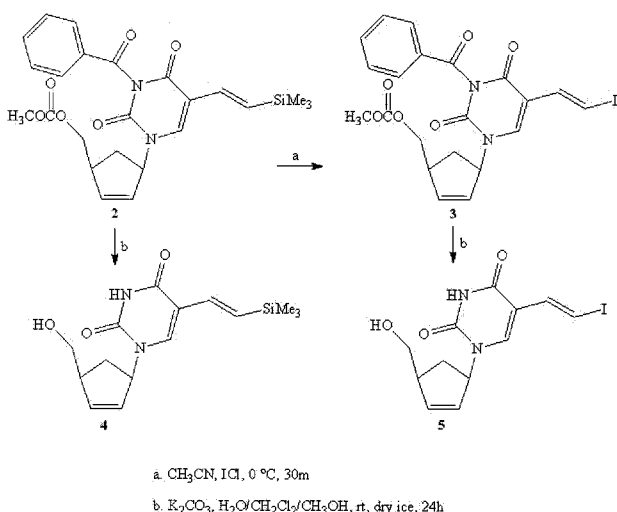
대상 및 방법

1. 기기 및 시약

반응에서 얻어진 화합물들의 구조 확인을 위하여 ¹H 및 ¹³C NMR spectra는 Bruker 300 spectrometer (300 MHz)를 사용하였으며, IR spectra는 Bio-Rad FTS 6000 FT-IR을 사용하였다. Analytical thin layer chromatography (TLC)는 E. Merck silica gel 60 F254 0.2mm precoated plate가 사용되었으며, 전개 된 판은 UV 및 요오드 흡착을 통하여 관찰하거나, 혹은 2% phosphomolybdic acid solution으로 표면을 처리하고 나서 가열하여 관찰하였다. Radio-TLC는 Bioscan AC-3000 scanner (Washington D.C)를 이용하여 측정하였으며, high performance liquid chromatography (HPLC)는 uBondapak C18 column (7.8 × 300mm, Water)을 이용하여 수행하였다. Flash column chromatography는 압축공기를 사용하여 Still의 방법에⁸⁾ 따라 Merck silica gel 60 (230-400 mesh)을 이용하여 수행하였다. 반응에 사용한 시약은 Aldrich, Merck, Junsei, 덕산 제품을 정제없이 사용하거나, 경우에 따라서는 알려진 방법에⁹⁻¹¹⁾ 의하여 정제하여 사용하였다. Tetrahydrofuran (THF)과 같은 용매는 sodium benzophenone ketyl로부터 사용하기 직전에 아르곤 하에 증류하여 사용하였고, dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 distillation하여 완전 건조된 molecular sieve와 함께 아르곤 하에 저장하여 사용하였다. 그 외 다른 용매들은 경우에 따라 증류하여 사용하였다. 간암 세포주 MCA-RH7777 (MCA)와 이 세포에 retroviral 벡터를 이용해 HSV1-tk 유전자를 이입한 MCA-tk는 한국 원자력의학원 방사선병용치료연구팀 권희충 박사로부터 제공받아 사용하였다. 세포는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Welgene), horse serum, Penicillin-



Scheme 1. This shows synthesis route of *cis*-3-N-Benzoyl-1-[4'-(methoxy-carbonyloxymethyl)-cyclopent-2'-enyl]-5-(2'-trimethylsilyl)vinyluracil, 2.



Scheme 2. This shows preparation processes of precursor(4) and reference material(5) for carbocyclic ddIVDU.

Streptomycin, G418(Gibco, USA), fetal bovine serum (Biowhittaker, USA)을 사용하여 배양하였고 세포독성 시약으로 미국의 Promega사의 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay를 사용하여 Tecan 96 well plate reader로 흡광도를 측정하였다. 세포주에 섭취된 방사능은 Perkin Elmer사의 감마카운터를 이용하여 측정하였다.

2. Carbocyclic 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-5-iodovinyluridine 합성

목표 화합물의 합성을 위해 본 연구에서는 당과 염기를 각각 합성하여 Pd(0)-catalyzed coupling에 의해 결합시키는 방법을 선택하였으며, 전구물질의 합성을 위한 주요 중간체(1)는 이미 본 연구진이 발표한 논문⁹⁻¹²⁾에 의해 알려진 방법에 따라 합성하였다(Sch. 1).⁹⁻¹²⁾ 화합물 1을 이용하여 ddIVDU의 합성을 위한 전구물질 및 기준물질을 합성하였다(Sch. 2).

1) *cis*-3-N-Benzoyl-1-[4'-(methoxycarbonyloxymethyl)-cyclopent-2'-enyl]-5-iodouracil (1)의 합성

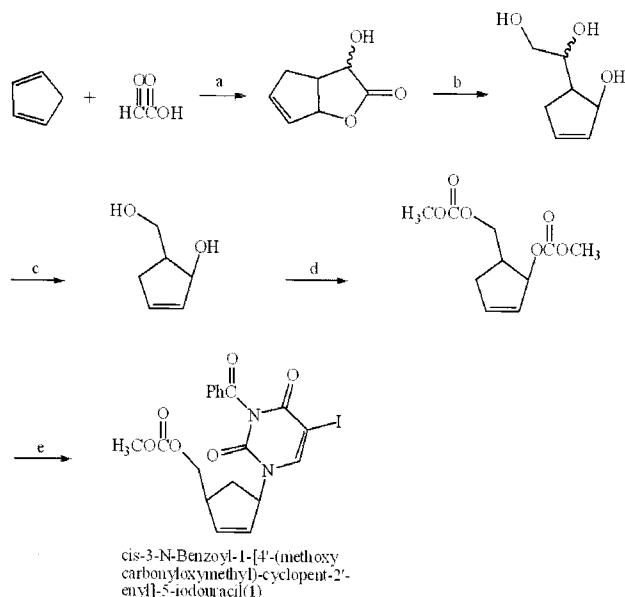
알려진 방법⁹⁻¹²⁾에 의해 합성을 수행하여 흰색 고체의 형태로 화합물 1을 얻었다(Sch 3), mp 211-213 °C; IR (KBr pellet) 1741, 1691, 1656, 1600, 1274, 1254 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.95-7.92 (m, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.70-7.65 (m, 1H), 7.54-7.49 (m, 1H), 6.21-6.18 (m, 1H), 5.79-5.76 (m, 1H), 5.72-5.70 (m, 1H), 4.66-4.60 (m, 1H), 4.39-4.14 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.15-3.14 (m, 1H), 2.89-2.78 (m, 1H), 1.59-1.53 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 167.94, 159.00, 155.68, 149.75, 145.64, 139.46, 135.18, 131.13, 130.67, 130.54, 129.93, 129.19, 68.96, 61.93, 55.00, 44.35, 33.48; HRMS: calcd for C₁₉H₁₇IN₂O₆ [(M⁺ Na)⁺, FAB] 519.0029 found 519.0026.

2) *cis*-3-N-Benzoyl-1-[4'-(methoxycarbonyloxymethyl)-cyclopent-2'-enyl]-5-(2'-trimethylsilyl)vinyluracil (2)의 합성

(E)-Bu₃SnCH=CHSiMe₃ (1.18g, 3.02 mmol)를 (Ph₃P)₂Pd(II)Cl₂ (0.11 g, 0.15 mmol)과 함께 30 mL의 무수 acetonitrile과 함께 취하였다. 화합물 1 (0.75 g, 1.51 mmol)을 첨가한 후, 아르곤 하에 60°C의 온도에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 감압 하에 용매를 제거한 후, silica gel column chromatography (ethyl acetate: hexane = 2:5, v/v)에 의해 분리하여 연한 노랑의 시럽 형태의 화합물 2 (R_f = 0.25; 0.52 g, 74 %)를 얻었다. IR (KBr pellet) 1743, 1695, 1665, 1294, 1262 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.97-7.94 (m, 2H), 7.69-7.64 (m, 1H), 7.54-7.49 (m, 3H), 6.73 and 6.58 (2H, 1H each, J_{trans} = 18.0 Hz, CH=CHSiMe₃), 6.19-6.17 (m, 1H), 5.81-5.76 (m, 2H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.22-4.17 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.17-3.14 (m, 1H), 2.86-2.81 (m, 1H), 1.62-1.55 (m, 1H), 0.12 (s, 9H); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 167.25, 159.69, 154.05, 147.45, 136.88, 136.04, 133.24, 131.98, 130.19, 129.90, 128.67, 127.42, 111.66, 75.52, 67.50, 59.73, 53.28, 42.58, 31.78, 0.08.

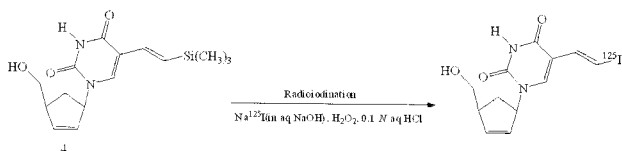
3) *cis*-3-N-Benzoyl-1-[4'-(methoxycarbonyloxymethyl)-cyclopent-2'-enyl]-5-(2'-iodovinyl)uracil (3)의 합성

화합물 2 (0.20 g, 0.426 mmol)를 5 mL의 무수 acetonitrile과 함께 취한 후, 0°C 하에 ICl (0.69 g, 0.426 mmol)을 포함하는 3 mL의 무수 acetonitrile을 첨가하여 실온에서 30분간 교반하였다. 반응 용액을 감압 하에 용매를 제거한 후, silica gel column chromatography (ethyl acetate:hexane



- a. Toluene, rt, 24h
 b. Lithium aluminum hydride (LAH), THF, 0 °C
 c. i) NaIO₄, diethyl ether:H₂O, ii) ethylene glycol, NaBH₄
 d. Methyl chloroformate, dimethylaminopyridine (DMAP), pyridine-CHCl₃
 e. i) 3-N-benzoyl-5-iodouracil, ii) Pd(OAc)₂, (*i*-PrO)₃P, *n*-BuLi, DMSO-THF

Scheme 3. This shows preparation processes of cis-3-N-Benzoyl-1-(4'-(methoxycarbonyloxymethyl)-cyclopent-2'-enyl)-5-iodouracil (1)



Scheme 4. This shows preparation processes of cis-1-(4'-(Hydroxymethyl)-cyclopent-2'-enyl)-5-(2'-[¹²⁵I]iodovinyl)uracil

= 1:2, v/v)에 의해 분리하여 흰색 시럽 형태의 화합물 3 ($R_f = 0.28$; 0.16 g, 73%)을 얻었다. ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.94-7.91 (m, 2H), 7.63-7.60 (m, 1H), 7.57-7.47 (m, 3H), 7.26 and 7.07 (2H, 1H each, J_{trans} = 14.61 Hz, CH=CHI), 6.14-6.11 (m, 1H), 5.81-5.75 (m, 2H), 4.45-4.40 (m, 1H), 4.18-4.13 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.15-3.13 (m, 1H), 2.87-2.82 (m, 1H), 1.64-1.60 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 168.66, 160.75, 155.56, 148.86, 139.43, 139.09, 135.76, 135.19, 131.42, 130.46, 129.24, 113.00, 80.84, 76.60, 69.04, 61.14, 55.40, 44.30, 32.84.

4) cis-1-[4'-(Hydroxymethyl)-cyclopent-2'-enyl]-5-(2'-trimethylsilyl)vinyluracil (4)의 합성

화합물 2 (0.5 g, 1.067 mmol)를 potassium carbonate

(0.972 g, 7.032 mmol)과 함께 20 mL의 (H₂O:CH₂Cl₂:CH₃OH = 1:2:3, v/v/v) 혼합용액과 함께 취하였다. 실온에서 24시간 교반 후, 0.1 N NaOH 용액을 이용하여 pH = 7-8로 중화하였다. 감압 하에 모든 용매를 제거한 후, silica gel column chromatography (CH₃OH:CH₂Cl₂ = 1:30 → 1:20, v/v)에 의해 분리하여 흰색의 시럽 형태의 화합물 4 ($R_f = 0.30$; 0.24 g, 72%)를 얻었다. ¹H NMR (DMSO): δ 11.35 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 6.54-6.53 (m, 2H), 6.10-6.08 (m, 1H), 5.71-5.69 (m, 1H), 5.59-5.57 (m, 1H), 4.80 (t, 1H), 3.53-3.40 (m, 2H), 2.83-2.79 (m, 1H), 2.52-2.46 (m, 1H), 1.44-1.39 (m, 1H), 0.07 (s, 9H); ¹³C NMR (DMSO): δ 162.79, 150.54, 140.32, 140.22, 136.05, 130.15, 127.95, 111.67, 63.66, 61.16, 47.70, 33.27.

5) cis-1-[4'-(Hydroxymethyl)-cyclopent-2'-enyl]-5-(2'-iodovinyl)uracil (5)의 합성

화합물 3 (0.1 g, 0.191 mmol)를 potassium carbonate (0.132 g, 0.957 mmol)과 함께 10 mL의 (H₂O:CH₂Cl₂:CH₃OH = 1:2:3, v/v/v) 혼합용액과 함께 취하였다. 실온에서 24시간 교반 후, 0.1 N NaOH 용액을 이용하여 pH = 7-8로 중화하였다. 감압 하에 모든 용매를 제거한 후, silica gel column chromatography (CH₃OH:CH₂Cl₂ = 1:30 → 1:20, v/v)에 의해 분리하여 흰색의 고체 화합물 5 ($R_f = 0.24$; 0.054 g, 79%)를 얻었다. ¹H NMR (DMSO): δ 11.48 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.13-7.11 (m, 2H), 6.10-6.08 (m, 1H), 5.68-5.66 (m, 1H), 5.49-5.47 (m, 1H), 4.76-4.73 (m, 1H), 3.47-3.38 (m, 2H), 2.80-2.77 (m, 1H), 2.51-2.48 (m, 1H), 1.38-1.34 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO): δ 162.34, 150.29, 141.48, 140.22, 137.50, 129.86, 111.66, 78.15, 63.95, 61.36, 47.80, 33.54.

3. 방사성요오드의 표지정제

cis-1-[4'-(Hydroxymethyl)-cyclopent-2'-enyl]-5-(2'-[¹²⁵I]iodovinyl)uracil의 합성 (Sch 4)

약 4.0 mg의 trimethylsilyl 전구체인 화합물 4를 5.0 mL의 methanol에 취하여 완전히 용해시켜주었다. KIRAMS MC-50 cyclotron에 의해 생성된 Na¹²⁵I 1.0 mCi를 0.1 mL의 전구체 용액과 함께 취한 후, 1.0 N HCl 용액을 이용하여 반응 용액의 pH = 4.0으로 보정하여주었다. 30% H₂O₂ 용액 0.05 mL를 첨가하여 실온에서 10분간 교반한 후, 포화 NaHSO₃용액으로 반응을 종료하였으며, radio-TLC (acetonitrile:water = 19:1, $R_f = 0.65$)를 이용하여 반응의 종결을 확인하였다. 반응용액을 방사선검측기(Bioscan,tk,

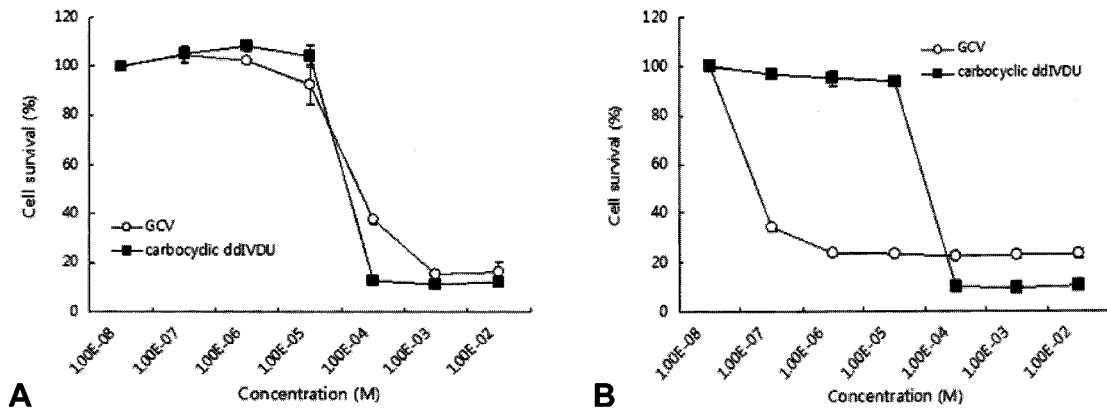


Figure 3. Two graphs show the in vitro cytotoxicity of carbocyclic ddIVDU and GCV in MCA-RH7777 (MCA) and MCA-tk (HSV1-tk positive) cells. Cytotoxicity of carbocyclic ddIVDU and GCV in MCA (A) and MCA-tk cells (B) were examined by the MTS assay. These cytotoxicity data were matched up to ganciclovir (GCV).

Table 1. IC₅₀ of Carbocyclic ddIVDU and GCV in MCA and MCA-tk Cells

Cell Lines	Nucleoside Analogues Concentration (M)	
	GCV ^{a)}	Carbocyclic ddIVDU
MCA ^{b)}	7.0×10 ⁻⁵	6.97×10 ⁻⁵
MCA-tk ^{c)}	1.17×10 ⁻⁷	5.14×10 ⁻⁵

^{a)}GCV; standard analogue of cytotoxicity of HSV1-tk gene expression cells, ^{b)}MCA; MCA-RH7777 rat hepatoma cell line, ^{c)}MCA-tk; thymidine kinase transduced MCA-RH7777 cell line

Flow-count PMT detector)와 HPLC (Gilson 321 pump, Gastorr BG-14 in-line degasser, UV/VIS-151 detector; 295nm)에 uBondapak C18 column (7.8×300mm, Water)을 사용하여 정제하였다. HPLC 용매조건은 구배조건으로 초기에는 acetonitrile/water/TFA=18:72:0.1로 1.0 mL/min의 유속으로 흘러주었으며, 15분 경과 후에 20 분까지 5분 동안 acetonitrile을 80%까지 증가시켰다.

4. 생물학적 평가

1) 대상 세포주 및 세포 배양

MCA와 MCA-tk 세포주는 20% horse serum과 5% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium에서 37°C 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. 세포 내에 이입된 유전자에selectable marker로서 neo 유전자가 삽입되어있기 때문에 HSV1-tk 유전자가 이입된 세포만 선택적으로 배양이 가능하도록 G418을 800 µg/mL 농도로 첨가하여 배양하였다. 계대 시 flask 바닥에 붙어있는 세포를 떼어내기 위해서 D-PBS를 사용하여 가볍게 한번 헹구어 낸 후 1×trypsin-EDTA 3 mL를 첨가하여 37°C세포 배

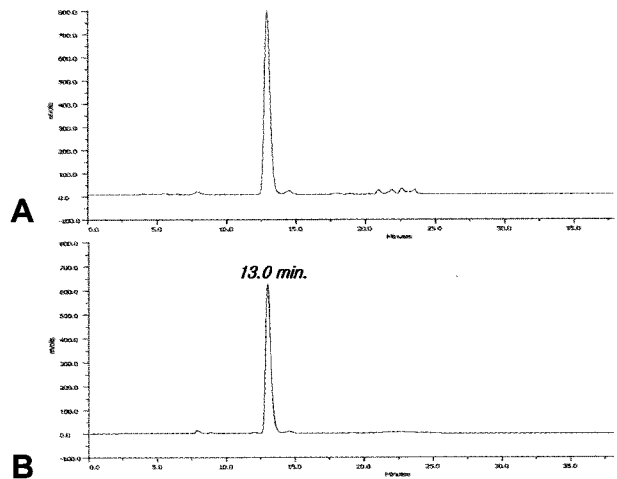


Figure 4. HPLC chromatograms of [¹²⁵I]ddIVDU (A, radioactivity detection) and cold ddIVDU (B, UV absorbance detection). A, The radiolabeling yield and retention time of [¹²⁵I]ddIVDU were 89.4% and 12.9 minutes, respectively. B, The retention time of cold ddIVDU standard was 13.0 minutes. The retention times of two chromatograms were identical so that we can confirm the successful radiolabeling reaction.

양기에 1~5 분 방치한 후 세포손상을 막기 위해 10 mL의 세포배양액으로 중화시켜 1,500 rpm에 3 분 원심 분리하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포는 1 mL의 세포배양액으로 재 부유한 후 세포 수 확인과 생존을 확인을 위해 trypan blue로 염색하여 Neubauer chamber에서 계측하였다.

2) carbocyclic ddIVDU의 MCA와 MCA-tk 세포에서 독성능 실험

동물 세포에 대한 carbocyclic ddIVDU의 세포 독성을 측정하기 위하여 MCA와 MCA-tk 세포를 96-well plates에

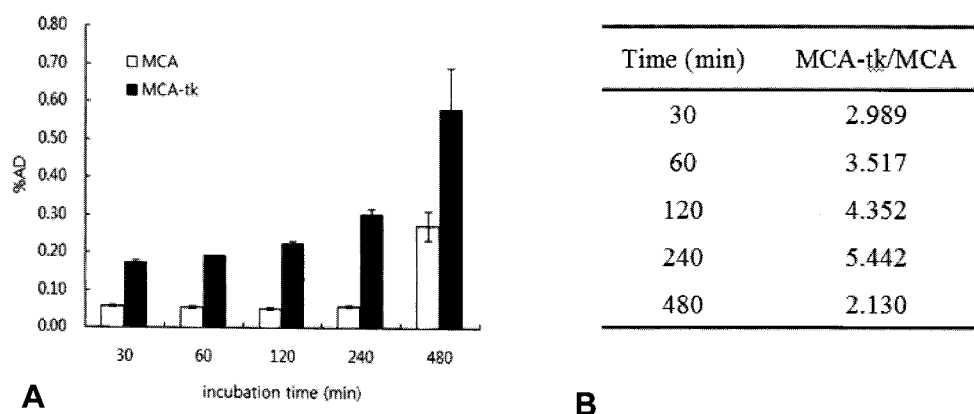


Figure 5. (A) Cell uptake of [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU by MCA-RH7777 (MCA) and MCA-tk (HSV1-tk positive) cells shows the results of selective uptake and retention. Cell uptake of [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU measured after 30, 60, 120, 240, 480 min incubation. Cellular uptake of [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU was continuously increased according to the length of incubation time in both MCA and MCA-TK cells. %AD; percentage of added dose (B) The table shows ratio of [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU uptake in MCA-tk and MCA cells.

세포수가 각각 2×10^3 cells/ml가 되도록 분주한 다음 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM, 10 mM 농도의 GCV와 carbocyclic ddIVDU를 첨가한 다음 37°C 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양하였다. 배양 후에 MTS(Promega, USA, 317 ug/ml)를 20 μ l씩 각각 첨가하고 37°C에서 2시간 배양시켰다. 배양 후에 96 well plate reader(GENios, Tecan Co., USA)를 사용하여 흡광도 492 nm에서 그 발색 정도를 측정하였다. 3회 반복 측정하여 값을 구하였다.

3) [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU의 MCA와 MCA-tk 세포에서 섭취 실험

간암 세포주 MCA와 HSV1-tk 유전자를 이입한 MCA-tk에서 [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU의 시간경과에 따른 uptake를 비교하였다. Culture flask 배양면의 80% 정도를 덮을 정도로 세포가 배양되었을 때 떼어내어 6 well plate에 각 세포주를 well당 1×10^6 cell(n=3)이 되도록 분주하고 각각의 배지 상에서 24 시간 배양한 후 각 well 당 1 μ Ci의 [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU를 첨가하고 30분, 60분, 120분, 240분, 480분 동안 추가로 배양한 뒤 배지를 흡입하여 제거하고 D-PBS로 세척한 후 각각의 세포를 trypsin-EDTA 400 μ L로 처리하여 떼어내어 세포를 수집하였다. 최종적으로 각 세포에 uptake된 방사능을 감마카운터를 이용하여 측정하여 평가하였다. 세포 내 uptake는 독립된 3회 이상의 실험결과를 평균으로 하여 첨가된 방사능의 백분율(% AD: percentage of added dose)로 나타내었다.

결 과

1. [¹²⁵I]ddIVDU의 방사표지 및 정제

생성물인 [¹²⁵I]ddIVDU의 머무름 시간은 12.9분이었다. 방사화학적 수율과 순도는 각각 80% 이상 그리고 95% 이상으로 확인하였다(Fig. 4).

2. MCA와 MCA-tk 세포에서 carbocyclic ddIVDU의 세포독성 실험

96-well plates에 분주한 MCA와 MCA-tk 세포주에 HSV-TK 항바이러스제 치료효과의 기준물질로 사용되고 있는 ganciclovir(GCV)와 본 연구에서 합성되어진 carbocyclic ddIVDU를 농도에 따라 처리하여 MTS 분석을 시행한 세포독성 (IC₅₀) 결과, MCA에서 GCV의 경우 7.0×10^{-5} M 이었고, carbocyclic ddIVDU는 6.97×10^{-5} M 이었다. MCA-tk에서는 GCV의 경우 1.17×10^{-7} M 이었고, carbocyclic ddIVDU는 5.14×10^{-5} M 이었다. Carbocyclic ddIVDU의 세포독성실험 결과를 보면, MCA와 MCA-tk 세포에서 HSV1-tk 유전자 발현여부에 따라 세포독성의 차이를 보이지 않았고, GCV 결과와 비교하여 보다 낮은 세포독성을 보였다(Fig. 3, Table 1).

3. MCA와 MCA-tk 세포에서 [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU의 섭취 실험

MCA와 MCA-tk 세포에서의 [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU의 섭취율은 시간이 경과함에 따라 증가하는 양상을 보였다. MCA 세포에서 uptake는 30분, 60분, 120분, 240분, 480

분에서 각각 0.06% AD, 0.05% AD, 0.05% AD, 0.06% AD, 0.27% AD로 4시간째까지 일정하게 유지되다가 8시간째 급격히 증가하였으며, MCA-tk 세포의 경우는 30분, 60분, 120분, 240분, 480분에서 각각 0.17% AD, 0.19% AD, 0.22% AD, 0.30% AD, 0.58% AD로 8시간째까지 계속 증가하는 양상을 보였다. MCA-tk 세포에서의 uptake는 시간이 증가함에 따라 MCA 세포보다 약 3 배, 3.5 배, 4.4 배, 5.4 배, 2 배 증가되는 양상을 보였다(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서는 carbocyclic 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-5-iodovinyluridine (carbocyclic ddIVDU)를 합성하고 간암 세포주 MCA-RH7777 (MCA)와 이 세포에 HSV1-tk 보고 유전자를 이입한 MCA-tk 세포를 이용하여 세포독성과 세포내의 섭취율 실험을 진행하여 보고 유전자 기질로서의 carbocyclic ddIVDU의 유용성을 평가하고자 하였다.

본 연구에 사용된 보고유전자 발현 영상기법은 HSV1-tk 유전자가 보고 유전자 또는 자살 치료 유전자로 사용되었을 때 이것이 생성하는 viral tk 효소가 동물세포의 tk와는 달리 기질 다양성을 보여 dT이 아닌 인산화시키는 특징이 있다.¹³⁾ 방사성동위원소를 표지한 HSV1-tk 유전자 영상용 핵산유도체들은 비전하성 극성 분자로 운반단백질과 수송 단백질을 통해 세포막을 능동, 수동 운반기전에 의해 세포 내로 유입되고 HSV1-tk의 기질로 사용되면, 인산화과정을 거쳐 세포 내에 축적되게 되는데, 축적된 방사능의 정도와 HSV1-tk유전자 발현의 비례관계로 유전자발현을 영상화한다는 원리이다.¹⁴⁻¹⁷⁾

In vitro 상에서 HSV1-tk의 억제 약물로 개발되었던 여러 uracil nucleosides 유도체들 중에는 HSV1-tk와의 높은 친화성에도 불구하고, 생체 내에서의 대사 과정 중에 약물로서 효용이 떨어지기 때문에 약제화 되지 않은 것들이 많다.¹⁸⁻²⁰⁾ 여러 바이러스 중에서도 herpes virus의 약물로 BVDU가 HSV1-tk에 한해서 적은 양으로도 높은 억제를 나타내는 것을 확인하였다.¹⁸⁾ 이와 비슷한 시기에 Wiebe등에 의해 BVDU 합성과정에서 유도된 IVDU에 방사성 동위원소 표지를 이용하여 바이러스에 감염된 세포에서의 영상화를 시도하였다.^{3,21,22)} IVDU는 방사옥소의 사용이 가능하고, 방사표지가 용이하여 지속적인 연구가 이루어졌으나 개에서의 생체 내 대사 실험에서 IVDU의 생체 내 안정성이 떨어진다고 보고되어서 다양한 형태로의 변화를 주어 생체 내 안정성을 높이고자 하였다.^{19,20,23)}

물질의 안정성을 증가시키기 위하여 당의 산소를 탄소로

치환한 IVDU의 carbocyclic 유도체의 형태인 ddIVDU를 합성하였고, MCA 세포주에서의 [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU 섭취율은 MCA-tk 세포주에 비해 낮았으며 시간대별 섭취율은 30분, 60분, 120분, 240분, 480분에서 각각 0.17% AD, 0.19% AD, 0.22% AD, 0.30% AD, 0.58% AD로 나타나 HSV1-tk 유전자가 이입되어 viral TK가 생성된 MCA-tk 세포 주에서만 [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU가 인산화되어 세포 내에 특이적으로 집적되는 것으로 확인되었다. [¹²⁵I]carbocyclic DDIU의 선행 연구를 통한 섭취 결과는 [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU와 유사하게 MCA 세포주에서 MCA-tk 세포주에 비해 낮은 세포섭취율을 보였다. MCA-tk 세포주에서 [¹²⁵I]carbocyclic DDIU의 8 시간째 세포섭취율은 0.08 % AD로 [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU가 0.60% AD로 DDIU에 vinyl group을 도입하여 viral TK에 의한 섭취율이 증가되는 양상을 보였다. MCA와 MCA-tk 세포주를 이용한 [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU의 섭취율 비교 실험에서 4 시간 섭취 후의 결과에서 MCA-tk가 MCA 세포에 비해 5 배 높은 섭취율을 보였다.

본 연구를 통하여 합성한 목표 화합물에 대한 대사 안정성 평가는 아직 수행하지 않았지만, 이미 수행한 연구를 통하여 본 연구진이 합성한 carbocyclic 핵산 유도체의 경우, 같은 염기 구조를 포함하는 일반적인 핵산 유도체에 비하여 체내 평가 시 10배 이상 안정한 것을 확인하였다.¹¹⁾ 이들 화합물은 일반적인 핵산 유도체에 비해 C-N 글리코사이드 결합을 분해하는 포스포릴라아제 효소에 대하여 매우 강한 저항력을 가지기 때문에, 항바이러스 화학요법의 분야에서도 광범위하게 응용되고 있다.²⁴⁻³⁰⁾

본 연구 결과로부터 carbocyclic ddIVDU를 효율적으로 합성하였으며, 생물학적 연구 결과로부터 이미 물질의 안정성을 확인하였으며, 아울러 화합물의 유전자 영상용 방사성 추적자로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 화합물 구조의 당의 이중결합을 포화시켜 알콜기를 도입하여줌으로써, 일반적인 핵산 유도체와 같은 구조로 변환시켜준다면 더욱 더 향상된 생물학적 결과를 보여줄 것으로 기대하며, 이러한 경향에 맞추어 향후 연구 방향을 설정 하고자 한다.

요 약

목적: 화합물이 가지는 항바이러스 및 항암 작용으로 인하여 5-iododeoxyuridine 유도체들에 관한 연구는 매우 광범위하게 이루어져왔다. 방사 요오드가 치환된 이들 화합물에 대한 연구의 주요 목표는 체내 및 체외 평가 시 효과적인 일뿐만 아니라, 보다 안정한 화합물을 개발하는 것이다. 본

연구를 통해, 다양한 방사성의약품의 중간체로도 이용되어 질 수 있는 carbocyclic radioiododeoxyuridineanalogue (ddIVDU)를 합성하여 생물학적 평가를 수행하고자 하였다. **대상 및 방법:** 목표 화합물의 합성은 Pd(0)-촉매 결합 반응, LAH 환원반응, hetero Diels-Alder 반응을 주요 반응으로 하여 수행하였다(Sch 3)¹⁰⁻¹². 합성된 화합물의 생물학적 평가를 위해 MCA와 MCA-tk 세포에 다양한 농도의 GCV와 carbocyclic ddIVDU를 처리하여 MTS 법을 이용해 세포독성을 보았고, [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU를 이용해 MCA와 MCA-tk 세포에서 HSV1-tk에 의한 선택적 섭취를 비교 평가 하였다. **결과:** Carbocyclic ddIVDU 및 오오드 도입을 위한 전구물질의 합성을 cyclopentadiene을 출발 물질로 하여 높은 수율에 의해 수행하였다. 방사요오드를 이용한 동위원소 도입 반응은 각각, 80% 이상의 방사표지 수율 및 95% 이상의 방사 화학적 순도를 나타내었다. 세포독성 결과 MCA-tk 세포에서 carbocyclic ddIVDU는 GCV에 비해 세포독성이 작았고, MCA에서는 유사한 세포독성을 보였다. [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU는 MCA-tk 세포에서 uptake는 8시간째까지 계속 증가하는 양상을 보였으며, MCA 세포에서 uptake는 4시간째까지 일정하게 유지되다가 8시간째 급격히 증가하였다. [¹²⁵I]carbocyclic ddIVDU의 uptake는 MCA보다 MCA-tk에서 약 2-5배 정도 높은 결과를 보였다. **결론:** 진행되어진 생물학적 결과로부터 이 유도체는 체내 평가 시 매우 안정할 뿐만 아니라, GCV에 비해 독성이 덜하고, HSV1-tk cell에 선택적임을 보여준다. 따라서 신규 화합물인 carbocyclic ddIVDU는 HSV1-tk를 영상화하는데 유용하게 이용되어질 수 있을 것이다.

References

- Tjuvajev JG, Doubrovin M, Akhurst T, Cai S, Balatoni J, Alauddin MM, et al. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of HSV1-tk gene expression. *J Nucl Med* 2002;43:1072-83.
- Manger TJ, Klecker RW, Anderson L, Shields AF. Synthesis of 2'-deoxy-2'-[¹⁸F]fluoro-β-D-arabinofuranosyl nucleosides, [¹⁸F]-FAU, [¹⁸F]FMAU, [¹⁸F]FBAU and [¹⁸F]FIAU, as potential PET agents for imaging cellular proliferation. *Nucl Med Biol* 2003; 30:215-24.
- Morin KW, Atrazheva ED, Knaus EE, Weibe LI. Synthesis and cellular uptake of 2'-substituted analogues of (E)-5-(2-[¹²⁵I]-Iodovinyl)-2'-deoxyuridine in tumor cells transduced with the herpes simplex type-1 thymidine kinase gene. Evaluation as probes for monitoring gene therapy. *J Med Chem* 1997;40:2184-90.
- Alauddin MM, Shahinian A, Park R, Tohme M, Fissekis JD, Conti PS. Synthesis and evaluation of 2'-deoxy-2'-[¹⁸F]fluoro-5-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyluracil as a potential PET imaging agent for suicide gene expression. *J Nucl Med* 2004;45:2063-9.
- Samuel J, Gill MJ, Iwashina T, Tovell DR, Tyrrel DJ, Knaus EE, et al. Pharmacokinetics and metabolism of (E)-5-(2-[¹³¹I]iodovinyl)-2'-deoxyuridine in dogs. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29: 320-4.
- Michael TC. New developments in the enantioselective synthesis of cyclopentyl carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* 1998;54:9229-72.
- Toyohara J, Hayashi A, Mikiko S, Akie G, Hiromichi T, Fujibayashi Y, et al. Development of radioiodinated nucleoside analogs for imaging tissue proliferation. *Nucl Med Biol* 2003; 30:687-96.
- Armarego WLF, Chai CLL. *Purification of Laboratory Chemicals*, 5th ed. Amsterdam: Elsevier Butterworth-Heinemann; 2003.
- Morin KW, Duan W, Xu L, Zhou A, Moharram S, Knaus EE, et al. Cytotoxicity and cellular uptake of pyrimidine nucleosides for imaging herpes simplex type-1 thymidine kinase (HSV-1 TK) expression in mammalian cells. *Nucl Med Biol* 2004;31:623-30.
- An GI, Rhee HJ. A facile synthesis of cis-4-amino-2-cyclopentene-1-methanol, a key intermediate for the synthesis of carbocyclic nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2002;21:65-72.
- An GI, Rhee HJ. A Facile Synthesis of cis-9-[4-(1,2-dihydroxyethyl)-cyclopent-2-enyl]guanine and its derivatives. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2000;19:1111-22.
- An GI, Choi TH, Kim BS, Hong SH, Ahn HS, Rhee HJ, et al. Synthesis and evaluation of cis-1-[4-(hydroxymethyl)-2-cyclopent-1-yl]-5-[¹²⁴I]iodouracil: a new potential PET imaging agent for HSV1-tk expression. *J Med Chem* 2007;50:6032-8.
- Bogdanov A Jr, Weissleder R. The development of in vivo imaging systems to study gene expression. *Trends Biotechnol* 1998;16:5-10.
- Miyagawa M, Anton M, Haubner R, Simoes MV, Stadele C, Erhardt W, et al. PET of cardiac transgene expression: comparison of 2 approaches based on herpesviral thymidine kinase reporter gene. *J Nucl Med* 2004;45:1917-23.
- Martin JA, Thomas GJ, Merrett JH, Lambert RW, Bushnell DJ, Dunsdon SJ, et al. The design, synthesis and properties of highly potent and selective inhibitors of herpes simplex virus types 1 and 2 thymidine kinase. *Antivir Chem Chemother* 1998;9:1-8.
- Hsieh CH, Liu RS, Wang HE, Hwang JJ, Deng WP, Chen JC, et al. In vitro evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter system in dynamic studies of transcriptional gene regulation. *Nucl Med Biol* 2006;33:653-60.
- Oh SJ. Radiopharmaceuticals for imaging of cellular proliferation. *Korean J Nucl Med* 2002;36:209-23.
- Clercq ED. Biochemical aspects of the selective antihherpes activity of nucleoside analogues. *Biochem Pharmacol* 1984;33: 2159-69.
- Kelvin O, Danny M, Suzanne B, Gholam H, Zbigniew D. The preparation of protected arabinonucleosides. *Can J Chem* 1983;61: 1204-12.
- Kelvin O, Gholam H, Zbigniew P, Danny M. Silylated derivatives of arabinonucleosides. *Tetrahedron Lett* 1982;23:1997-2000.
- Tjuvajev JG, Finn R, Watanabe K, Joshi R, Oku T, Kennedy J, et al. Noninvasive imaging of herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression: a potential method for monitoring clinical gene therapy. *Cancer Res* 1996;56:4087-95.
- Tjuvajev JG, Stockhammer G, Desai R, Uehara H, Watanabe K, Gansbacher B, et al. Imaging the expression of transfected genes in vivo. *Cancer Res* 1995;55:6126-32.

23. Dougan H, Rennie BA, Lyster DM, Sacks SL. No-carrier-added [¹²⁵I]1-(beta-D-arabinofuranosyl)-5(E)-(2-iodovinyl)uracil (IVaraU): high yield radiolabeling via organotin and exchange reactions. *Appl Radiat Isot* 1994;45:795-801.
24. Borthwick AD, Biggadike K. Synthesis of chiral carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* 1992;48:571-623.
25. Herdewijn P, DeClercq E, Balzarini J, Vanderhaeghe H. Synthesis and antiviral activity of the carbocyclic analogues of (E)-5-(2-halovinyl)-2'-deoxyuridines and (E)-5-(2-halovinyl)-2'-deoxycytidines. *J Med Chem* 1985;28:550-5.
26. Shi J, McAtee JJ, Wirtz SS, Tharnish P, Juodawlkis A, Liotta DC, et al. Synthesis and biological evaluation of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-5-fluorocytidine (D4FC) analogues: discovery of carbocyclic nucleoside triphosphates with potent inhibitory activity against HIV-1 reverse transcriptase. *J Med Chem* 1999;42:859-67.
27. Wang J, Jin Y, Rapp KL, Benneth M, Schinazi RF, Chu CK. Synthesis, antiviral activity, and mechanism of drug resistance of D- and L-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-2'-fluorocarbocyclic nucleosides. *J Med Chem* 2005;48:3736-48.
28. Agrofolio L, Suhas E, Farese A, Condom R, Challand SR, Earl RA, et al. Synthesis of carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* 1994;50:10611-70.
29. Ko OH, Hong JH. Synthesis and biological evaluation of novel 2', 3', 4'-triple branched carbocyclic nucleosides as potential antiviral agents. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 2004;337:579-86.
30. Still WC, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J Org Chem* 1978;43:2923-5.