

뇌혈류 평가용 ^{99m}Tc -HMPAO 합성 및 분포에 관한 연구*

서울대학교 의과대학 내과학교실

이명철 · 이범우 · 정준기 · 조보연 · 고창순

서울대학병원 핵의학과

정재민 · 염미경 · 홍미경

중앙연구소

최석례

= Abstract =

A Study on Synthesis of ^{99m}Tc -HMPAO as A Brain Perfusion Agent and Its Distribution

Myung Chul Lee, M.D., Bum Woo Lee, M.D., June-Key Chung, M.D.

Bo Youn Cho, M.D. and Chang-Soon Koh, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Jae Min Jeong, Ph.D., Mi Kyung Yeom and Mee Kyoung Hong

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Seok Rye Choi

Central Laboratory

HM-PAO was synthesized by two step reaction. d, l-HM-PAO was separated from the racemic product by fractional recrystallization in ethylacetate, and the chemical structure and purity was confirmed by proton NMR spectroscopy. The synthesized d, l-HM-PAO was labeled with ^{99m}Tc and studied the biodistribution in mice. From the results we could find that liver uptake of synthesized ^{99m}Tc d, l-HM-PAO was higher than that of Amersham kit, but no conspicuous difference was found in brain and other tissues (blood, lung, stomach, intestine, muscle, spleen and kidney).

서론

국소 뇌혈류의 측정을 위한 방사성의약품은 SPECT

의 개발에 따라 그 필요성이 절실하게 되었다. ^{123}I -p-iodo-N-isopropylamphetamine (IMP)¹⁾과 N,N-dimethyl-N'-(2-hydroxy-5-iodo-3-methylbenzyl)-1, 3-propanediamine (HIPDM)²⁾과 같은 주로 I-123으로 표지된 방사성 의약품들이 개발되었다. 이들 중 특히 ^{123}I -IMP는 많은 주목을 끌었^{3,4)} 국소 뇌혈류 측정을 위한

*본 논문은 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구 되었음.

SPECT에 가장 좋은 방사성 의약품으로 선택되었다⁵⁾. 그러나 이는 ¹²³I을 사용하기 때문에 가격이 비싼 단점이 있어서 사용에 많은 제약이 있고 특히 국내에서는 사용이 더욱 힘들었다.

다른 방사성 의약품들과 마찬가지로 국소 뇌혈류 측정용 방사성 의약품도 ^{99m}Tc을 표지할 수 있는 화합물을 합성하기 위하여 많은 노력이 경주되었다. 국소 뇌혈류 측정을 위한 방사성의약품은 혈액 뇌간문을 잘 통과하고 뇌 혈류량에 비례하여 뇌에 분포하여야 하며 또한 한 번 뇌속에 들어가면 다시 혈류로 빠져 나오기가 힘들어야 한다. 이러한 조건을 만족시키기 위한 많은 화합물이 합성되었는데 대부분 혈액 뇌관문 통과는 잘 하나 뇌 속에 남아 있는 능력이 부족하여 다시 혈류로 빠져 나오는 것들이 많았다⁶⁻⁹⁾. 그러다가 diamine dithiol(DADT)계 열로서 amine 측쇄를 가진 화합물들이 뇌 속에 비교적 잘 남아 있는 것이 발견되었다¹⁰⁾.

DADT와는 다른 계열로서 propyleneamine oxime (PnAo)의 Tc-99m 복합체가 중성이면서 지용성이라는 사실¹¹⁾과 쥐¹²⁾, 개¹²⁾, 사람등¹³⁾에서 혈류와 비례적으로 뇌에 흡수된다는 사실에 착안하여 PnAO 계열의 많은 유도체들이 합성되었다¹⁴⁾. 이중 hexamethyl propyleneamineoxime(HM-PAO)이 개발되어 국소 뇌혈류에 따른 뇌의 흡수와 저류가 뛰어나다는 실험 동물에서의 결과¹⁵⁾와 임상 실험 결과^{16,17)}가 보고되었다.

HM-PAO는 d, 1-형과 meso-형의 두가지 입체 이성체가 존재한다(Fig. 1). 이들 중 d, 1-형의 입체 이성체가 meso형의 입체이성체보다 뇌에 흡수가 더 잘되므로^{18,19)} 일반적으로 HM-PAO를 합성하였을 경우 d, 1-형을 분리해내어 사용한다.

저자들은 2 단계 반응으로 HM-PAO를 합성하여 에틸 초산에 녹여 분별 재결정에 의하여 d, 1-형을 분리한

뒤 양성자 핵자가 분광법으로 그 순도를 확인하고 ^{99m}Tc을 표지한 뒤 마우스에 투여하여 각 시간별로 각 장기에 의 분포를 알아 보고 동시에 시판되고 있는 키트와도 동일 실험을 하여 비교하여 보았다.

재료 및 방법

1. 재 료

핵자기공명 분광기는 럭키연구소에 부탁하여 270 MHz 짜리를 사용하여 용매를 CD₃OD로 하여 사용하였다. 2, 3-Butanedione monooxime과 2, 2-dimethyl-1, 3-propanediamine은 Aldrich사 제품을 사용하였고 각종 유기용매는 Merck사 제품을, 그리고 sodium borohydride는 Junsei제품을 사용하였다. 마우스는 한 군당 6마리씩 웅성 ICR(18~20 g)을 사용하였다. 랫트는 250 g의 웅성 Wistar를 사용하였다. 합성한 HM-PAO와 대조용으로 Amersham에서 판매하는 키트를 사용하였다.

2. d, 1-HM-PAO의 합성

Neirinckx등이 보고한 방법²⁰⁾을 수정하여 합성하였다. 간략하면 2, 3-butanedione monooxime (115.4 mmol)을 benzene (50 ml)에 녹이고 Dean and Starke 장치를 설치한 환류 장치에 넣은 다음 질소를 충전시켜 주었다. 여기에 benzene(100 ml)에 녹인 2, 2-dimethyl-1, 3-propanediamine (49 mmol)을 2시간에 걸쳐 점적하면서 환류를 시켰다. 첨가가 끝난 후 2시간 더 환류 시킨다음 benzene을 회전 감압 증류기로 증발시키고 침전을 0°C에서 95% 에탄올에 녹였다. Sodium borohydride (120 mmol)를 30분에 걸쳐서 가해주고 2시간 더 섞어 준 다음 물을 첨가하여 2시간 더 섞어 주었다. 에탄

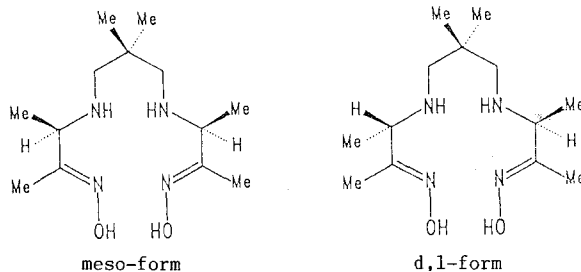


Fig. 1. Chemical structure of HM-PAO. Two diastereoisomers exist.

을 날려 보내고 물을 더 가해 준 다음 여과하여서 침전을 얻었다. 침전을 에틸 초산에 녹여서 분별 재결정을 d, 1-형이 얻어질 때까지 계속하였다: ¹H-NMR (CD₃OD) δ 3.25(2H, q, CH), 2.27(4H, q, CH₂), 1.77(6H, s, Me), 1.18(6H, d, Me), 0.88(6H, s, Me).

3. ^{99m}Tc 표지

d, 1-HM-PAO 0.5 mg에 SnCl₂ · 2H₂O를 여러가지 농도로 변화시켜 실험해 본 결과 1 μg/vial이 가장 좋은 표지 효율을 나타내어서 이러한 조건을 사용하여 계속 실험하였다. 표지 효율은 보고된 바와 같이 ITLC/SG를 전개 용매를 각각 2-butanone과 0.9% 생리 식염수를 사용하고 paper chromatography는 전개 용매를 50% acetonitrile 수용액을 사용하여 전개하여 구하였다²⁰⁾.

4. 마우스에 대한 생체내 분포 실험

^{99m}Tc-d, 1-HM-PAO 약 10 μCi 씩을 마우스에 정맥 주사한 다음 15분, 30분, 1시간, 2시간 후에 혈액 및 각종 장기(간, 비장, 신장, 폐, 위장, 소장, 근육, 뇌)들의 무게와 방사능을 측정하여 percent injected dose/

gram tissue값을 구하고 또한 근육에 대한 각종 장기에의 방사능 분포비를 구하였다. 주사가 끝난 뒤 ^{99m}Tc-d, 1-HM-PAO의 표지 효율은 약 86%(TcO₄⁻: 1.6%, 2차 물질: 4.6%, 환원형 콜로이드: 7.9%)였다. 똑같은 실험을 Amersham 제품 HM-PAO를 사용하여 반복 시행하였다.

5. 랫트 뇌에 Tc-^{99m}-HM-PAO분포의 자가방사 촬영

랫트에 약 3mCi의 ^{99m}Tc-HM-PAO를 정맥 주사하고 5분 후에 희생시켜 뇌를 적출하여 20 μm두께로 냉동 절편을 구한 다음 X-ray 필름과 24시간 접촉시켜 자가 방사촬영을 하였다.

결 과

1. 합성 및 표지결과

합성된 HM-PAO를 에틸 초산에 녹여 재결정시 나타나는 초기의 결정은 meso-형이었고(Fig. 2)나중에 나타나는 결정은 d, 1-형이었다(Fig. 3). ^{99m}Tc-d, 1-HM-PAO의 시간별 표지 효율 변화는 Table 1과 같다.

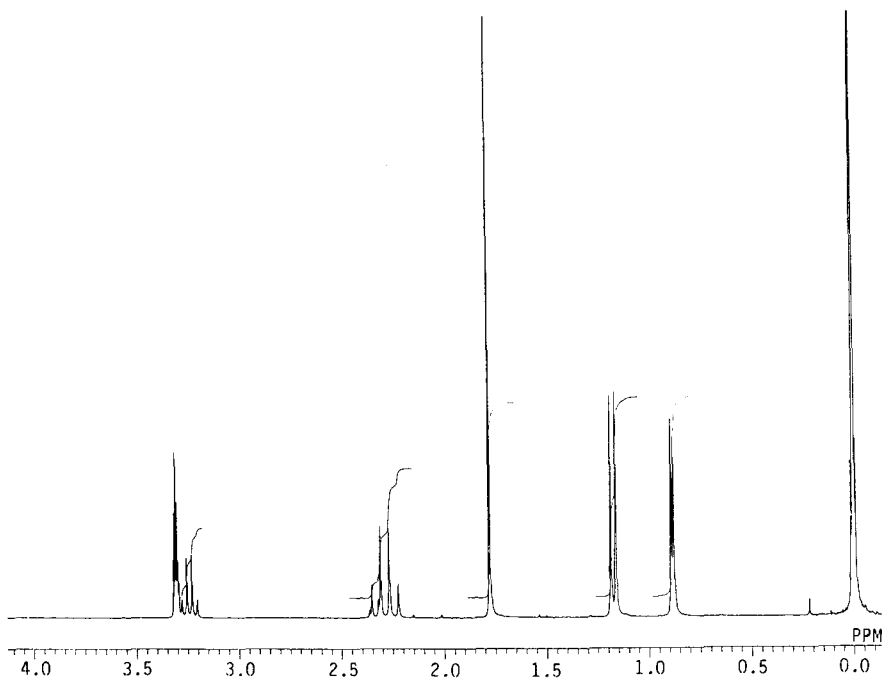


Fig. 2. Proton NMR spectrum of meso-HM-PAO. Doulet can be found at 0.88ppm.

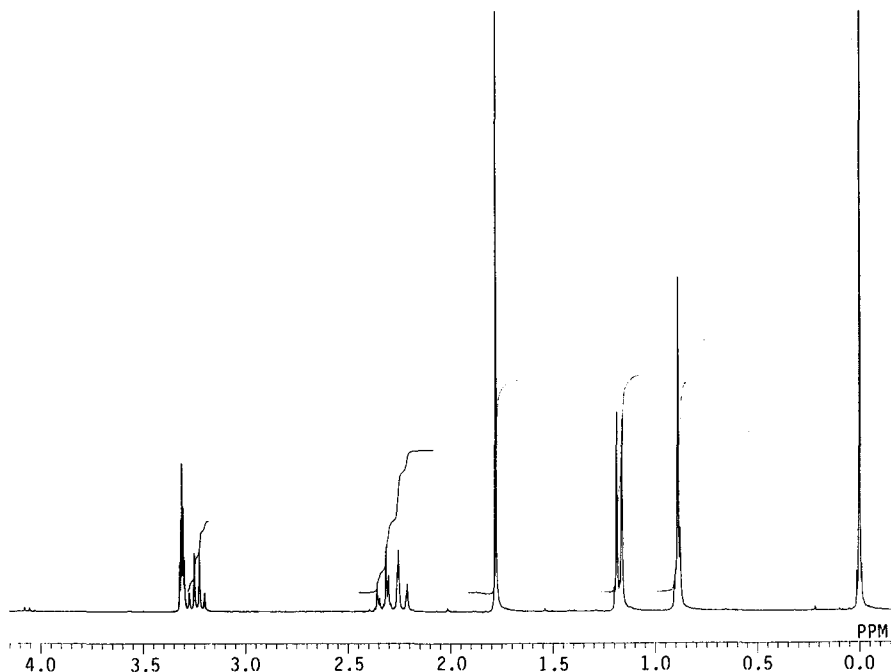


Fig. 3. Proton NMR spectrum of d, 1-HM-PAO. Singlet can be found at 0.88ppm.

Table 1. Change of Labeling Efficiency of ^{99m}Tc-HM-PAO

Time (min)	Reduced Tc (%)	TcO ₄ ⁻ (%)	Secondary (%)	Efficiency (%)
0	2.1	28.9	1.8	67.2
10	1.3	1.7	5.5	91.5
20	2.0	1.0	8.6	88.4
30	2.2	0.5	6.4	90.8
40	1.8	1.2	8.0	89.0
60	3.0	1.6	8.7	86.7
120	3.1	2.4	11.9	82.7
180	1.5	2.4	17.0	79.1
240	2.0	2.3	16.8	78.9
360	4.8	4.0	15.5	75.7

The values were obtained by three strip method.

2. 마우스에 대한 생체 내 분포 실험

혈액 및 각종 장기에의 ^{99m}Tc-d, 1-HM-PAO의 각 시간별 분포는 Table 2, 3에서의 같이 저자들이 합성한 HM-PAO가 간에 집적도가 높은(p<0.05)것으로 나타났다. 그리고 근육에 대한 각종 장기에의 집적 비율은

Table 2. Biodistribution of ^{99m}Tc-HM-PAO Synthesized in Our Laboratory

Organ	Time			
	15min mean SD	30min mean SD	60min mean SD	120min mean SD
blood	7.1	6.2	4.6	2.7
	0.6	1.1	1.4	1.1
liver	27.8	23.6	24.8	17.3
	4.1	3.7	3.8	3.2
spleen	6.4	7.5	4.6	4.1
	1.6	3.4	1.4	0.6
stomach	6.1	5.4	5.5	3.5
	1.1	1.2	1.0	0.4
intestine	22.0	15.1	10.8	5.5
	4.4	5.7	2.3	0.9
kidney	21.6	17.1	15.8	10.7
	5.8	3.6	3.0	1.7
muscle	5.0	3.3	3.1	2.7
	0.4	0.5	0.6	0.6
brain	6.1	5.3	5.4	4.8
	0.7	0.8	0.6	0.4
lung	30.0	26.4	26.6	17.0
	6.1	3.8	6.7	1.1

The values are percent injected dose/gram tissue. n=6

Fig. 4와 같다.

3. 랫트 뇌에 대한 ^{99m}Tc -HM-PAO의 분포

랫트에 ^{99m}Tc -HM-PAO를 투여시 두뇌에는 Fig. 5와

같이 분포하는 것을 관찰할 수 있었다.

고찰

d, 1-HM-PAO의 합성시 부딪히는 난관 중의 하나는 d, 1-형을 meso-형으로부터 분리하는 일이다. 왜냐하면 일반적으로 에틸 초산 용액 중에서 분별 재결정을 계속하는 방법을 사용하는데 그렇게 할 경우 순도를 높이기 위해서는 분별 재결정의 회수를 늘여야 하므로 수득율이 매우 떨어지기 때문이다. 저자들도 동일 방법으로 분별 재결정을 계속하여 d, 1-HM-PAO를 분리하여 사용하였지만 미량의 meso형이 섞여 있었다. d, 1-형과 meso-형을 대량으로 경제적으로 분리하려면 silica gel column chromatography나 preparative HPLC의 조건을 잡아서 실험하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

HM-PAO를 ^{99m}Tc 으로 표지할 때는 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 양 및 기타 여러가지 조건 때문에 free Tc- $^{99m}\text{O}_4$, 환원형 콜로이드, 2차 물질 등이 생기게 되는데 이들이 가능한 한 적게 생기는 조건을 구하여서 사용하여야 한다. 저자들은 Amersham 제품의 매뉴얼이나 다른 여러가지 문헌에서 처럼 HM-PAO를 0.5 mg, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 7.5 μg , NaCl을 4.5 mg씩 넣은 vial을 제조하여 표지하여 보았으나 2차 물질과 콜로이드의 생성이 너무 많아서 사용이 불가능하였고 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 1 μg 넣은 경우는 적절한 표지 효율이 얻어 졌다.

마우스에서 저자들이 합성한 ^{99m}Tc -HM-PAO의 간

Table 3. Biodistribution of Commercial ^{99m}Tc -HM-PAO

Organ	Time			
	15min mean SD	30min mean SD	60min mean SD	120min mean SD
blood	5.5	8.7	3.3	1.7
	1.6	5.7	1.5	1.8
liver	18.2	10.8	8.9	8.2
	1.7	2.0	1.4	2.4
spleen	7.3	2.7	3.7	6.6
	1.6	0.7	1.0	2.6
stomach	9.1	8.1	4.8	3.8
	0.8	2.2	1.0	0.7
intestine	16.8	11.7	5.4	3.9
	4.1	4.7	1.2	0.9
kidney	23.7	14.0	13.6	11.8
	2.3	1.7	2.1	1.8
muscle	4.2	3.2	3.0	2.5
	1.2	1.7	0.7	0.4
brain	5.8	4.4	5.4	4.1
	0.4	0.9	1.1	1.1
lung	35.7	17.9	18.9	19.0
	4.1	3.4	4.2	3.9

The values are percent injectal dose/gram tissue. n=6.

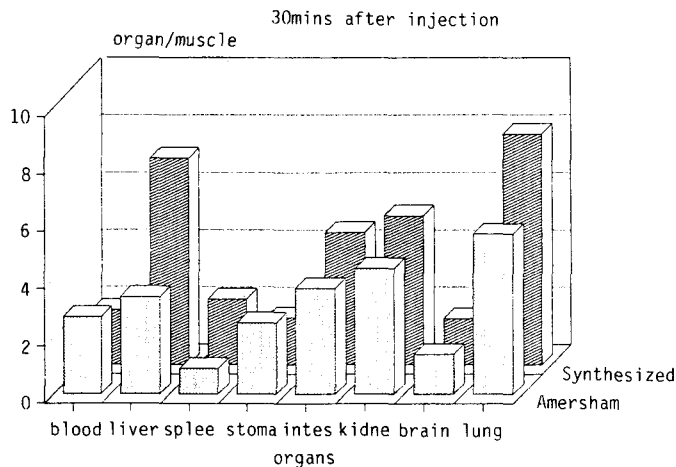
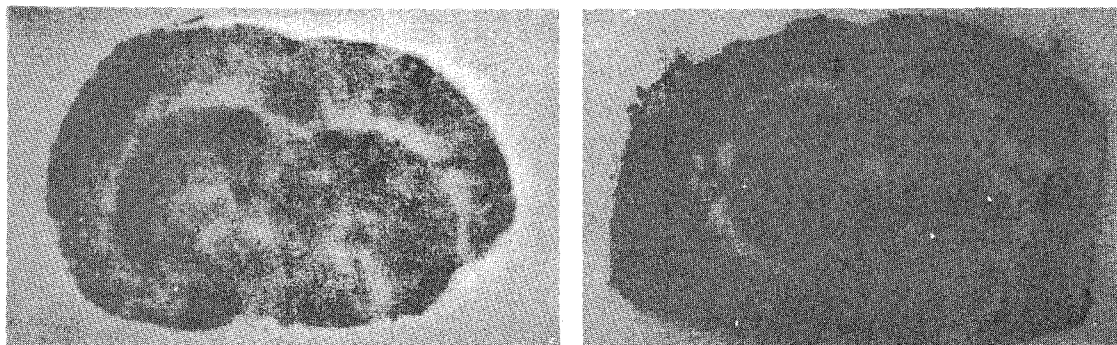


Fig. 4. Organ to muscle radioactivities of mice injected with ^{99m}Tc -HM-PAO. The organs were obtained 30 mins after injection.



Amersham

Synthesized

Fig. 5. Autoradiogram of cryosectioned rat brain. A male Wistar rat (250 g) was injected with 3mCi of ^{99m}Tc -d, 1-HM-PAO through tail vein and the brain was obtained 5 mins after injection.

Amersham Synthesized

에 대한 집적도가 Amersham 제품에 비하여 높게 나왔는데 이는 HM-PAO 자체의 문제로는 볼 수가 없고 표지 시 약 7.9%가 생긴 콜로이드의 문제일 가능성이 크다. 그리고 뇌에 이행하는 율이나 뇌에 머무르는 기간 또는 다른 조직에의 분포는 저자들의 합성품이나 Amersham 제품이나 별 차이가 없었으므로 이대로도 백혈구 표지용으로 사용될 수 있지만 ^{99m}Tc 표지 조건을 개선하여 표지 효율을 조금 더 높이면 뇌 SPECT에 사용하여도 무방하리라 사료된다.

결 론

d, 1-HM-PAO를 합성, 분리, 정제한 다음 ^{99m}Tc 을 표지하여 마우스에 투여하여 체내 분포를 본 결과 간에의 집적도가 Amersham 제품에 비하여 높은 결과를 나타냈고 ($p < 0.05$) 다른 장기에의 분포는 별로 차이가 없었다.

REFERENCES

- Winchell HS, Baldwin RM, Lin TH: *Development of I-123-labeled amines for brain studies. Localization of I-123-iodophenyl-alkylamines in rat brain.* *J Nucl Med* 21:940-946, 1980
- Tramposch KM, Kung HF, Blau M: *Radioiodine-labeled N, N-dimethyl-N'-(2-hydroxy-3-alkyl-5-iodobenzyl)-1-3-propanediamines for brain perfusion imaging.* *J Nucl Med* 26:121-125, 1983
- Holman BL, Lee RGL, Hill TC, et al: *A comparison of two cerebral perfusion tracers, N-isopropyl-I-123-p-iodoamphetamine and I-123 HIPDM in the human.* *J Nucl Med* 25:25-30, 1984
- Hill TC, Holman BL: *SPECT imaging: Finding a niche in neurologic diagnosis.* *Diagnostic Imaging* 7: 64-68, 1985
- Holman BL, Hill TC: *Functional imaging of the brain with SPECT.* *Appl Radiol* 13(6):21-27, 1984
- Kung HF, Molnal M, Billings J, et al: *Synthesis and biodistribution of neutral lipid soluble Tc-99m complexes which can cross the blood-brain-barrier [abstract].* *J Nucl Med* 25:P23-P24, 1983
- Kung HF, Molnal M, Billings J, et al: *Synthesis and biodistribution of neutral lipid soluble Tc-99m complexes.* *J Nucl Med* 25:326-332, 1984
- Kung HF, Efange S, Yu CC, et al: *Synthesis and biodistribution of Tc-99m bis-aminothiol (BAT) complexes with amine side chains [abstract].* *J Nucl Med* 26:P18, 1985
- Troutner De, Volkert WA, Hoffman TJ, et al: *A neutral lipophilic complex of Tc-99m with a multidentate amine oxime.* *Int J Appl Radiat Isotop* 35:467-470, 1984
- Lever SZ, Burns HD, Kervitsky, et al: *The behavior of neutral amine oxime chelate labeled with Tc at tracer level.* *Int J Nucl Med* 26:1287-1294, 1985
- Volkert WA, McKenzie EH, Hoffman TJ, et al: *The behavior of neutral amine oxime chelate labeled with Tc at tracer level.* *Int J Nucl Med Biol* 11:243-246, 1984
- Volkert WA, Hoffman TJ, Seger RM, et al: *Tc-99m*

- propyleneamine oxime (Tc-99m-pnAO). A potential brain radiopharmaceutical. Eur J Nucl Med 9:511-516, 1984*
- 13) Holm S, Andersen AR, Vorstrup S, et al: *Dynamic SPECT of the brain using a lipophilic technetium-99m complex, PnAO. J Nucl Med 26:1129-1134, 1985*
 - 14) Cummming SA, Nechvatal G, Canning LR, et al: *Development of technetium-99m regional cerebral blood flow agents based upon the propyleneamine oxime ligand (PnAO). Eur J Nucl Med 11:A107, 1985*
 - 15) Holms RA, Chaplin SB, Royston KG, et al: *Cerebral uptake and retention of Tc-99m examethyl propyleneamine oxime (Tc-99m HM-PAO). Nucl Med Commun 6:443-447, 1985*
 - 16) Ell PJ, Clullum I, Costa DC, et al: *Regional cerebral blood flow mapping with a new Tc-99m labeled compound. The Lancet July 6:50-51, 1985*
 - 17) Ell PJ, Hocknell JML, Jarritt PH, et al: *A Tc-99m-labeled radiotracer for the investigation of cerebral vascular disease. Nucl Med Commun 6:437-441, 1985*
 - 18) Nowotnik DP, Canning LR, Cumming SA, et al: *Development of a TC-99m-labelled radiopharmaceutical for cerebral blood flow imaging. Nucl Med Commun 6:499-506, 1985*
 - 19) Sharp PF, Smith FW, Gemmell HG, et al: *Technetium-99m HM-PAO stereoisomers as potential agents for imaging regional cerebral blood flow. J Nucl Med 27:171-177, 1986*
 - 20) Neirinckx RD, Canning LR, Piper IM, et al: *Tc-99m d, 1-HM-PAO: A new radiopharmaceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. J Nucl Med 28:191-202, 1987*
-