

두뇌혈류영상용 방사성의약품인 Ethylcystein Dimer(ECD)의 합성과 ^{99m}Tc 표지 및 뇌단일광자단층영상 구성

서울대학교병원 핵의학과, 한국과학기술연구원 응용과학부*

정재민 · 이명철 · 정수욱 · 이경한 · 조정혁*
곽 철 은 · 이 동 수 · 정 준 기 · 고 창 순

= Abstract =

Synthesis and ^{99m}Tc labeling of Ethylcystein Dimer and Its Brain SPECT Image

Jae Min Jeong, Ph.D., Myung Chul Lee, M.D., Soo Wook Chung, B.S., Kyung Han Lee, M.D.
Jung-Hyuck Cho, Ph.D.*, Cheoleun Kwark, Ph.D. Dong Soo Lee, M.D.
June-Key Chung, MD. and Chang-Soon Koh, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea
Division of Applied Science, Korea Institute of Science and Technology*

Ethylcystein dimer(ECD) was synthesized by dimerization of L-thiazolidine-4-carboxylic acid in liquid ammonia with sodium metal and successive esterification in ethanolic solution of hydrogen chloride. The purified product was labeled with ^{99m}Tc in the presence of sodium gluconate(pH=5.6) and stannous chloride. Best result was obtained from the preparation consisting of 0.1mg ECD, 40 μl of 0.4M sodium gluconate (pH=5.6), and 20 μg of stannous chloride. The labeling efficiency was 90% with previous condition. The labeled ^{99m}Tc-ECD was stable at least for 3 hours in PBS(pH=7.4) at room temperature. About 10mCi of ^{99m}Tc-ECD was injected to normal volunteer, and SPECT image of brain was obtained by triple head camera 10 minutes after injection. The image showed similar distribution of radioactivity in brain with that of HMPAO image.

Key Words: Ethylcystein dimer, Brain SPECT,

서 론

여러가지 국소뇌혈류 영상용 방사성의약품과 단일광자단층촬영술의 개발은 각종 두뇌 질환의 진단에 큰 기여를 하게 되었고 더 나아가 핵의학의 발전에도 중요한 역할을 하였다. 국소뇌혈류측정용으로 가장 먼저 사용되기 시작한 방사성의약품으로는 불활성기체인 ¹³³Xe으로서 뇌혈류장벽을 쉽게 통과하여 뇌세포에 들어간다^{1,2)}. 그러나 다시 혈류로 쉽게 빠져 나오므로 촬영에 장시간이 소요되는 단일광자단층촬영에는 적합하지 않다. 따라서 두뇌세포 속에 들어간 후 오랫동안

빠져나오지 못하는 방사성의약품들에 대한 연구가 활발히 진행되었다.

이러한 연구의 결과 ¹²³I으로 표지된 아민 계통의 화합물인 IMP(isopropyl iodoamphetamine)와 ¹²³I-N, N, N'-trimethyl-N'-(2-hydroxyl-3-methyl-5-iodobenzyl)-1, 3-propanediamine 등이 먼저 개발되고³⁾ 뒤이어 ^{99m}Tc로 표지된 HMPAO(hexamethyl propylene amine oxime)^{4,5)} 및 ECD(ethyl cystein dimer)^{6,7)} (Fig. 1)등이 개발되었다. ¹²³I으로 표지된 방사성의약품들은 방사선의 에너지가 영상을 얻기에 적당하고 두뇌에의 축적이 좋아 널리 사용되고 있지만 국내에서는 ¹²³I의 가격 및 공급상의 문제로 거의 쓰이지 않고 있다.

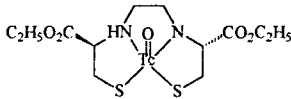


Fig. 1. Chemical structure of L, L-Tc-ECD.

국내에 단일광자단층촬영용 방사성의약품이 널리 쓰이게 된 것은 HMPAO가 소개되면서부터이다. 테크네슘은 물리적 성질이 뛰어난 특성 외에도 가격이 저렴하고 쉽게 구할수 있다는 장점이 있다. 또한 HMPAO는 상품화되어 있어 사용이 편리하고 뛰어난 영상을 보여 준다. 그러나 테크네슘 표지 효율이 문제가 되어 정도관리를 철저히 하여야하고 또한 불안정하여 표지후 30분 이내에 투여를 하여야 하는 등 여러 가지 문제점이 있다.

HMPAO에 뒤이어 개발된 ECD는 두뇌의 흡수 및 축적이 HMPAO와 유사하고 또한 표지효율이 높을 뿐만 아니라 표지후 장시간 동안 안정한 성질을 보여 주었다. 본 연구에서는 ECD를 합성하고 이를 glucarate와 stannous chloride 존재하에 ^{99m}Tc.으로 표지하는 조건을 확립하였으며 또한 정상인 지원자에 투여하여 단일광자단층촬영영상을 얻었다.

대상 및 방법

1. ECD의 합성

ECD는 L-thiazolidine-4-carboxylic acid를 Fig. 2에서와 같이 금속 소듐의 존재하에 액체 암모니아 속에서 환원하여 radical dianion의 이중함체화에 의하여 제조하였다⁸⁾. L-thiazolidine-4-carboxylic acid, 액체 암모니아, 금속 소듐은 Aldrich에서 구입하였고 기타 시약은 Sigma에서 구입하였다. 11g의 L-thiazolidine-4-carboxylic acid를 100ml의 환류중인 액체암모니아에 녹이고 지속적인 푸른색이 나타날때까지 금속 소듐을 가하여 주었다. 염화암모늄을 가해준 금속소듐과 같은 당량을 가하여 준 다음 액체 암모니아가 상온에서 완전히 건조되도록 하였다. 증발잔사에 100ml의 물을 가해준 다음 진한 염산을 가하여 pH가 2가 되도록 하였다. 이때 생성된 침전을 여과하여 모은 다음 0.1N의 염산으로 세척하였다. 이렇게 얻어진 N, N'-ethylene-di-L-cysteinate를 염화수소

가스로 포화된 에탄올에 녹이고 3시간 동안 가열 환류시켜 에스테르화한 다음 4°C에 밤새도록 방치하여 생성된 침전을 여과하여 회수함으로써 ECD를 얻었다. ¹H-NMR in D₂O : 1.40t(CH₃), 3.35d(CH₂S), 3.75S(CH₂-CH₂), 4.45q(COOCH₂) 4.55t(CH)

2. 테크네슘 표지

테크네슘 표지를 하는 조건은 다음과 같이 구하였다. 우선 0.1mg씩의 ECD를 vial에 분주한 다음 40μl씩의 0.4M glucarate(pH 5.6)를 가하여 주고 여기에 20μg의 stannous chloride를 0.01M의 염산 용액에 녹인 상태로 가하여 준 다음 잘 섞어 주었다. 이 혼합물에 ^{99m}Mo/^{99m}Tc발생기로부터 얻은 400μl의 ^{99m}Tc(약 20mCi)를 가하고 잘 혼합한 다음 10분씩 방치함으로써 표지를 하였다. 표지 효율을 알아 보기 위하여 역상박층크로마토그래피(reverse phase thin layer chromatography : RP-TLC; Analtech)를 60%아세톤과 40%초산암모늄(0.5M, pH 4.0)혼합 용액으로 전개함으로써 시행하였다. 이때 콜로이드, ^{99m}Tc-ECD, pertechnetate들의 Rf치는 각각 0, 0.7, 0.95였다. TLC 시행 후에는 CRT 필름에 자가방사기록(autoradiography)을 하고 나타난 영상을 디지털영상분석기(digital image analyzer, RAS system)로 정량하였다.

3. 안정성 시험

^{99m}Tc-ECD의 PBS 용액(pH=7.4)을 실온에서 3시간 동안 방치하면서 각 시간 별로 시료를 취해 2에서와 같은 조건으로 TLC를 하여 안정성 시험을 실시하

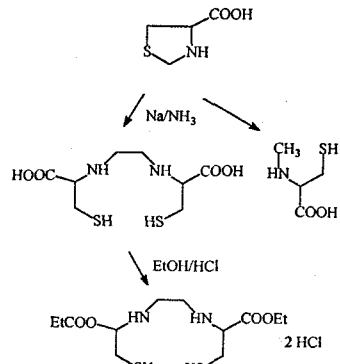


Fig. 2. Synthetic pathway of ECD.

였다.

4. 정상인에서의 두뇌혈류 영상

ECD를 테크네슘으로 표지후 Limulus Amebocyte Lysate(LAL)테스트를 하여 발열성물질이 존재하지 않는 것을 확인 후 정상인 지원자(38세 남자)에 약 10mCi를 무균필터(0.2 μ m)를 통과시켜 투여하고 10분후 삼중검출기카메라(triple head SPECT camera; picka)로 두뇌 영상을 얻었다.

결 과

테크네슘 표지 결과 0.1mg의 ECD에 대하여 가해진 stannous chloride의 양이 15 μ g일때 85%, 20 μ g일때 90%의 표지효율을 얻었다(Fig. 3). 따라서 계속된 실험에서는 0.1mg의 ECD에 대해 가해진 stannous chloride의 양이 항상 20 μ g이 되도록 하여 테크네슘을 표지하였다.

테크네슘으로 표지된 ECD는 PBS 용액(pH=7.4)중에서 적어도 3시간 동안 실온에서 안정한 것을 RP-TLC에 의해 알 수 있었다(Fig. 4).

정상 성인 남자에 위의 방법으로 합성 및 표지된 ECD 10mCi를 투여하고 삼중검출기카메라로 영상

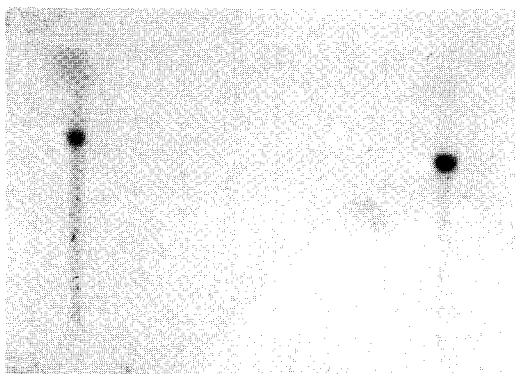


Fig. 3. RP-TLC of ^{99m}Tc labeled ECD. ECD dissolved in DMSO(0.1mg) was incubated with ^{99m}Tc-pertechnetate in the presence of 0.4M glucarate buffer (pH 5.6) and stannous chloride. The condition of chromatography will be found in the text. A, 15 μ g of SnCl₂·2H₂O and B, 20 μ g of SnCl₂·2H₂O.

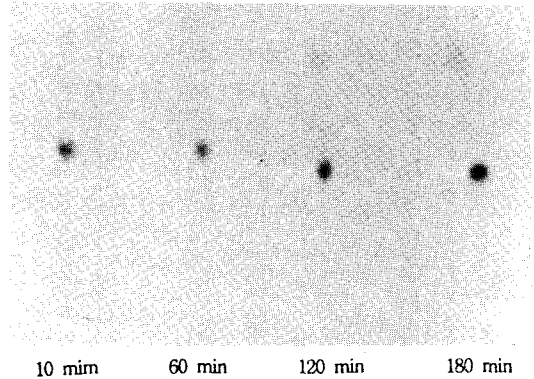


Fig. 4. Stability test of ^{99m}Tc labeled ECD. ^{99m}Tc-ECD was incubated in PBS upto 3 hours. Samples were taken at 10, 60, 120 and 180 minutes and RP-TLC was performed. The condition of chromatography will be found in the text.

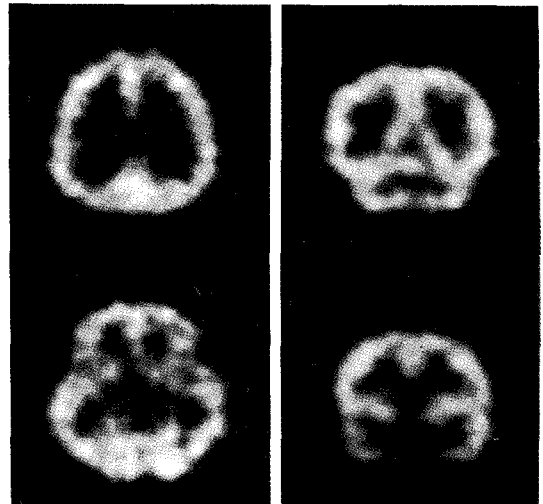


Fig. 5. Brain SPECT image of ECD in normal volunteer(male, 38 years). Image was taken by triple head SPECT instrument.

을 얻을수가 있었고(Fig. 5), 이때 회백질 대 백질의 방사능 분포 비율은 일반적으로 HMPAO에서 관찰되는 값과 유사한 2 : 1이었다.

고 찰

ECD는 테크네슘으로 표지하면 테크네슘의 산화 상태가 +5인 oxotechnetium의 사면체 형태의 킬레

이트를 만들고 이때 전체화전은 중성이 되며 양쪽 옆으로 부착된 에틸 그룹 때문에 지용성이 강한 물질이 된다⁶⁾. 따라서 인체에 투여시 혈뇌장벽을 쉽게 통과하여 두뇌 세포로 들어 간다. 두뇌 세포로 들어간 ECD는 세포내의 가수분해 효소들의 작용을 받아 에틸 그룹이 떨어져 나가게 되고 그 결과 생성된 화합물은 카르복실기를 두 개씩 가지게 된다. 따라서 등전점(pI, isoelectric point)이 낮아져서 생리적인 조건에서는 항상 음전하를 띠게 되어 혈뇌장벽을 거꾸로 통과하여 나올 수가 없게 된다. 그 결과 한번 두뇌 속으로 들어 간 ECD는 다시 빠져나오지 못하고 축적 되는데 그 결과 HMPAO와 거의 동일한 두뇌 영상을 만들 수 있다.

HMPAO는 수용액상에서 불안정하여 pertechnetate와 이차생성물로 변화하게 되는데¹²⁾ 그 결과 정도판리는 3 strip method를 사용하므로 시간이 오래 걸린다. 또한 테크네슘 표지 후 실험실조건(in vitro)에서 불안정하여 적절한 영상을 얻으려면 표지 한지 30분 이내에 인체에 투여하여야 한다. 이와 달리 이 실험의 결과에서 보인 것과 같이 ECD는 테크네슘 표지 후 실온에서 오랫동안 안정하다는 장점이 있다.

HMPAO도 역시 산화수가 +5인 oxotechnetium의 중성 킬레이트를 만들고⁶⁾ 혈뇌장벽을 잘 통과하며 두뇌 세포에 축적이 된다. 그러나 세포내에 포집되는 기전은 ECD와는 달리 가수분해효소의 작용과는 관계가 없고 세포내의 글루타치온과 같은 sulfhydryl기와 결합하여 세포막을 통과할 수 없는 물질을 만들것으로 추측하고 있다. 따라서 백혈구와 같은 세포를 표지하여 염증부위의 영상에도 사용할 수가 있으나^{10,11)} ECD는 이러한 목적으로는 사용할 수가 없다.

ECD는 화학적으로는 N₂S₂ 계열의 킬레이트화제인데 이러한 계열의 화합물들은 옥소테크네슘(V)과 안정한 킬레이트를 만들고 그 결과 생성된 킬레이트는 지용성이 크다는 점에 착안하여 일찍부터 두뇌혈류 영상용 방사성의약품으로 개발하기 위하여 활발히 연구되어 왔다. 특히 그 이전에 개발된 방사성 요드로 표지된 IMP와 같은 방사성의약품들이 pH이동(pH shift)에 의하여 두뇌에 축적될 것이라는 가정에 의거하여 이를 흉내낸 테크네슘표지 화합물이 연구되었는데 그 화학구조는 대부분 N₂S₂ 계열 화합물의 주변에 3차 아민 그룹을 가진 측쇄를 결합시킨 형태를 하고

있다^{13,14)}. 그러나 이러한 화합물들은 테크네슘표지 후 반드시 두 가지 이상의 이성체가 생긴다. 특히 일반적으로 질소 원자는 비대칭중심(asymmetrical center)이 될 수 없기 때문에 3,6-diaza-1,8-octanedithiol의 3번 질소에 아민그룹을 가진 측쇄를 연결하여 이성체가 존재하지 않는 새로운 화합물을 합성하였으나, 테크네슘으로 표지하면 질소 원자가 또다시 비대칭 중심으로 되어 결국 syn-과 anti-의 두 가지 이성체를 만드는 것이 밝혀져 단일 성분의 방사성의약품은 합성이 되지 않았다. 다행히도 이러한 화합물들은 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC)로는 분리가 되므로 이들 각각의 방사화합물의 분리는 가능하다. 따라서 각각의 화합물에 대한 동물 실험 결과 두 가지 이성체들은 서로 다른 생체내분포를 보여준다고 보고되었다^{15,16)}.

결 론

단일광자단층촬영영상에 의한 뇌혈류 영상용 방사성의약품인 ECD를 합성하고 이를 테크네슘으로 표지하여 안정한 표지화합물을 만드는 조건을 확립하였고 이를 정상인 지원자에 투여한 결과 HMPAO의 두뇌 단일광자단층촬영영상과 유사한 결과를 얻었다.

REFERENCES

- 1) Buell U, Moser EA, Schmiedek P: *Dynamic SPECT with Xe-133: Regional cerebral blood flow in patients with unilateral cerebrovascular disease: Concise communication. J Nucl Med* 25:441-446, 1984
- 2) Kushner MJ, Chawluk J, Fazekas F: *Cerebral blood flow in systemic lupus erythematosus with or without cerebral complications. Neurol* 37:1596-1598, 1987
- 3) Holman BL, Lee RGL, Hill TC: *A comparison of two cerebral blood flow tracers, N-isopropylI-123 P-iodoamphetamine and I-123 HIPDM. J Nucl Med* 25:25-30, 1984
- 4) Neirinckx RD, Canning LR, Piper IM, Nowotnik DP, Pickett RD, Holmes RD, Volkert WA, Forster AM, Weisner JPS, Marriott JA, Chaplin SB: *Technetium-99m d, l-HM-PAO: A new radiophar-*

- maceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. J Nucl Med 28:191-202, 1987*
- 5) Leonard J-P, Nowotnik DP, Neirinckx RD: *Technetium-99m-d, l-HM-PAO: A radiopharmaceutical for imaging regional brain perfusion using SPECT-a comparison with iodine-123HIPDM. J Nucl Med 27:1819-1823, 1986*
 - 6) Walovich RC, Hill TC, Garrity ST, heesman EH, Burgess BA, O'Leary DH, Watson AD, Ganey MV, Morgan RA, Williams SJ: *Characterization of technetium-99m-L, L-ECD for brain perfusion imaging, part 1: Pharmacology of technetium-99m ECD in nonhuman primates. J Nucl Med 30:1892-1901, 1989*
 - 7) Vallabhajosula S, Zimmerman RE, Picard M, Stritzke P, Mena I, Hellman RS, Tikofsky RS, Stabin MG, Morgan RA, Goldsmith SJ: *Technetium-99m ECD: a new brain imaging agent: In vivo kinetics and biodistribution studies in normal human subjects. J Nucl Med 30:599-604, 1989*
 - 8) Blondeau P, Berse C, Gravel D: *Dimerization of an intermediate during the sodium in liquid ammonia reduction of L-thiazolidine-4-carboxylic acid. Canadian J Chem 45:49-52, 1966*
 - 9) Jurisson S, Schlemper EO, Troutner DE: *Synthesis, characterization, and x-ray structural determinations of technetium(V)-oxo-tetradentate amine oxime complexes. Inorg Chem 25:543-549, 1986*
 - 10) Peters AM, Danpure HJ, Osman S: *Clinical experience with 99mTc-hexamethylpropyleneamineoxime for labelling leucocytes and imaging inflammation. Lancet II:946-949, 1986*
 - 11) Schumichen C, Scholmerich J: *Tc-99m HM-PAO labelling of leukocytes for detection of inflammatory disease. NucCompact 17:274-276, 1986*
 - 12) Hung JC, Corlija M, Volkert WA, Holmes RA: *Kinetic analysis of technetium-99m d, l-HM-PAO decomposition in aqueous media. J Nucl Med 29:1568-1576, 1988*
 - 13) Kung HF, Molnar M, Billings J, Wicks R, Blau M: *Synthesis and biodistribution of neutral lipid-soluble Tc-99m complexes that cross the blood-brain-brain. J Nucl Med 25:326-332, 1984*
 - 14) Kung HF, Efang CC, Yu CC, Billings J, Blau M: *Synthesis and biodistribution of Tc-99m bis-aminoethanethiol(BAT) complexes with amine side chains. J Nucl Med 26:P18, 1985*
 - 15) Yamaguchi H, Takahashi J, Seri S, Kawashima H, Koike H, Kato Azuma M: *In vitro and in vivo characterization of a new series of Tc-99m complexes with N₂S₂ ligands. In: Nicholini M, Bandoli G, Mazzi U, eds. Technetium and rhenium in chemistry and nuclear medicine. pp 475-502 Publ Cortina International. 1990*
 - 16) Kung HF, Guo YZ, Yu CC, Billings J, Subramanizn V, Calabrese JC: *New brain perfusion imaging agents based on Tc-99m-bis(aminoethanethiol)complexes: Stereoisomers and biodistribution, J Med Chem 32:433, 1989*