

## 3'-[<sup>18</sup>F]Fluoro-3'-deoxythymidine의 합성과 9L glioma 세포를 이식한 래트에서의 체내동태에 관한 연구

원자력의학원 RI 및 방사성의약품개발실<sup>1</sup>, 핵의학연구소<sup>2</sup>, 동국대학교 화학과<sup>3</sup>

심아영<sup>1</sup> · 문병석<sup>1</sup> · 이태섭<sup>2</sup> · 이교철<sup>1</sup> · 안광일<sup>1</sup> · 양승대<sup>1</sup> · 유국현<sup>3,\*</sup> · 천기정<sup>1,2</sup>

최창운<sup>2</sup> · 임상무<sup>2</sup> · 전권수<sup>1,\*</sup>

### A Study on Preparation of 3'-[<sup>18</sup>F]Fluoro-3'-deoxythymidine and Its Biodistribution in 9L Glioma Bearing Rats

Ah Young Shim, M.S.<sup>1</sup>, Byung Seok Moon, M.S.<sup>1</sup>, Tae Sup Lee, Ph.D.<sup>2</sup>, Kyo Chul Lee, Ph.D.<sup>1</sup>, Gwang Il An, Ph.D.<sup>1</sup>, Seung Dae Yang, Ph.D.<sup>1</sup>, Kook Hyun Yu, Ph.D.<sup>3,\*</sup>, Gi Jeong Cheon, M.D. & Ph.D.<sup>1,2</sup>, Chang Woon Choi, M.D. & Ph.D.<sup>2</sup>, Sang Moo Lim, M.D. & Ph.D.<sup>2</sup>, Kwon Soo Chun, Ph.D.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Radiopharmaceuticals, <sup>2</sup>Laboratory of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul, Korea; <sup>3</sup>Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul, Korea

**Purpose:** Several radioisotope-labeled thymidine derivatives such as [<sup>11</sup>C]thymidine was developed to demonstrate cell proliferation in tumor. But it is difficult to track metabolism with [<sup>11</sup>C]thymidine due to rapid *in vivo* degradation and its short physical half-life. 3'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3'-deoxythymidine ([<sup>18</sup>F]FLT) was reported to have the longer half life of fluorine-18 and the lack of metabolic degradation *in vivo*. Here, we described the synthesis of the 3'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3'-deoxythymidine ([<sup>18</sup>F]FLT) and compared with [<sup>18</sup>F]FET and [<sup>18</sup>F]FDG in cultured 9L cell and obtained the biodistribution and PET image in 9L tumor bearing rats. **Material and Methods:** For the synthesis of [<sup>18</sup>F]FLT, 3-*N-tert*-butoxycarbonyl-(5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-deoxy-3'-*O*-(4-nitrobenzenesulfonyl)-β-D-threopentofuranosyl)thymine was used as a FLT precursor, on which the *tert*-butyloxycarbonyl group was introduced to protect N3-position and nitrobenzenesulfonyl group. Radiolabeling of nosyl substituted precursor with <sup>18</sup>F was performed in acetonitrile at 120°C and deprotected with 0.5 N HCl. The cell uptake was measured in cultured 9L glioma cell. The biodistribution was evaluated in 9L tumor bearing rats after intravenous injection at 10 min, 30 min, 60 min and 120 min and obtained PET image 60 minutes after injection. **Results:** The radiochemical yield was about 20-30% and radiochemical purity was more than 95% after HPLC purification. Cellular uptake of [<sup>18</sup>F]FLT was increased as time elapsed. At 120 min post-injection, the ratios of tumor/blood, tumor/muscle and tumor/brain were 1.61±0.34, 1.70±0.30 and 9.33±2.22, respectively. The 9L tumor was well visualized at 60 min post injection in PET image. **Conclusion:** The uptake of [<sup>18</sup>F]FLT in tumor was higher than in normal brain and PET image of [<sup>18</sup>F]FLT was acceptable. These results suggest the possibility of [<sup>18</sup>F]FLT as an imaging agent for brain tumor. (Nucl Med Mol Imaging 2006;40(5):263-270)

**Key Words:** [<sup>18</sup>F]FLT, PET, brain tumor, tumor imaging

## 서 론

Thymidine은 5탄당의 3'-위치와 5'-위치에 두개의 OH기를 가진 DNA 구성 뉴클레오타이드의 한 종류이며 핵산을 구성하는 요소이다. 일반적으로 세포나 바이러스가 복제되기 위해서는 DNA의 복제가 필수적이다. 정상적인 thymidine의 경우 5'-위치가 인산화되어 뉴클레오타이드를 형성하고 3'-위치의 OH기가 인산과 결합하여 phosphodiester를 형성해 DNA 사슬이 성장하게 된다. 본 연구 대상인 3'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3'-deoxythymidine ([<sup>18</sup>F]FLT)는 thymidine

- Received: 2006. 7. 19. • Accepted: 2006. 8. 24.
  - Address for reprints: Kwon Soo Chun Ph.D., Laboratory of Radiopharmaceuticals, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, 215-4 Gongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-706, Korea  
Tel: 82-2-970-1337, Fax: 82-2-970-2409  
E-mail: kschun@kcch.re.kr
  - Address for reprints: Kook Hyun Yu Ph.D., Department of Chemistry, Dongguk University, 26 Pil-dDong, Joong-gu, Seoul 100-715, Korea  
Tel: 82-2-2260-3709, Fax: 82-2-2260-4201  
E-mail : yukook@dgu.ac.kr
- ※ 본 연구는 과학기술부 원자력 중장기 연구사업의 연구비 보조로 이루어졌음

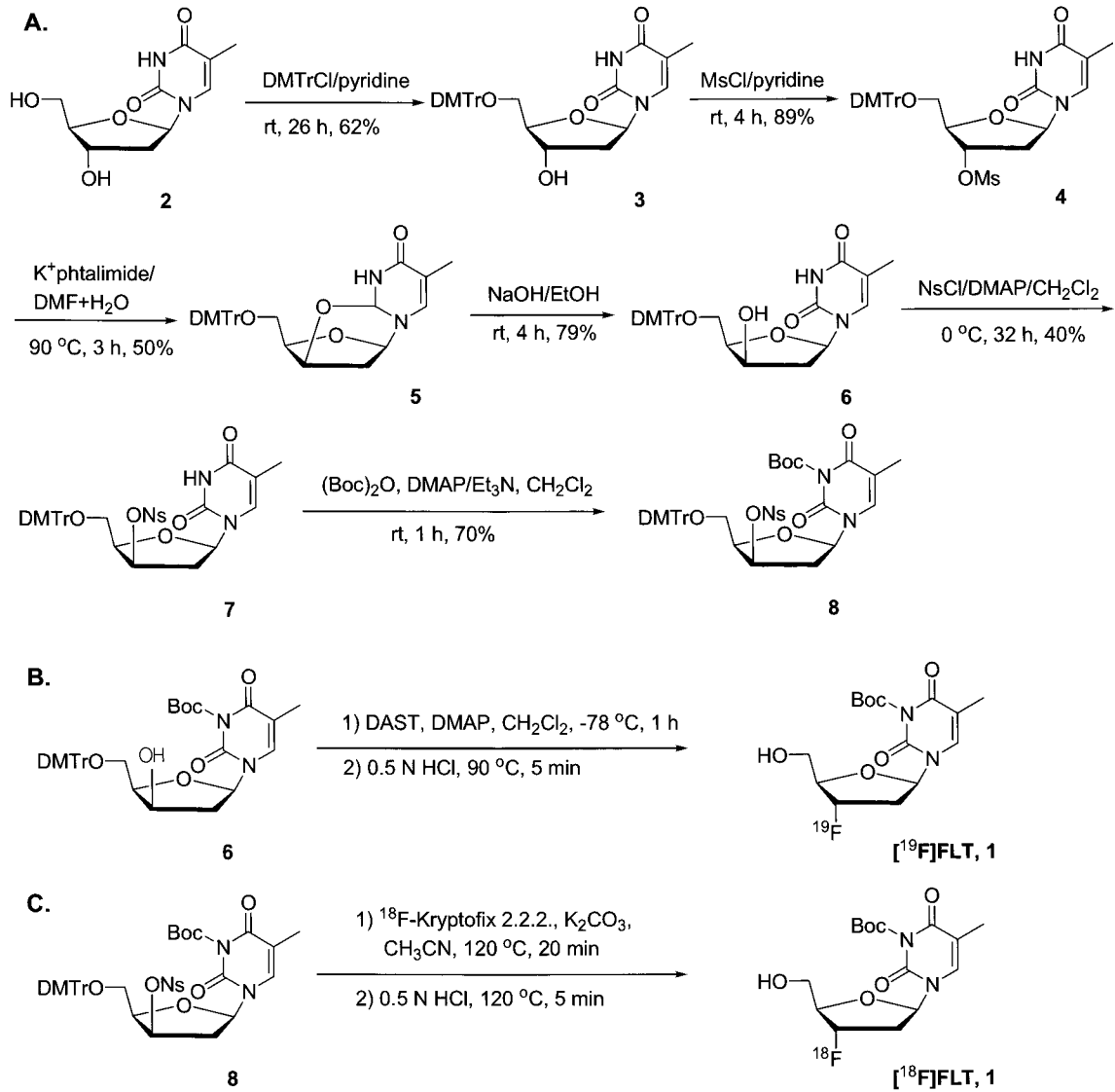
의 3'-위치에 방사성동위원소인 <sup>18</sup>F이 치환된 구조를 가지고 있다. Thymidine의 3'-말단이 OH기가 아닌 다른 치환기인 플루오르로 치환되면 더이상 nucleotide의 5'-인산과 phosphodiester 결합의 형성이 일어날 수 없어 사슬의 형성이 종결되어진다.<sup>1-3)</sup> 암이나 바이러스는 비정상적으로 핵산의 합성이 활발히 일어나게 되므로 3'-위치가 다른 치환기로 된 [<sup>18</sup>F]FLT는 DNA의 복제를 방해하고 대사경로를 따라 대사되지 않고 이상 증식이 일어나는 부위에 축적하게 된다. 따라서 방사성동위원소 <sup>18</sup>F로 표지한 [<sup>18</sup>F]FLT를 이용하면 외부에서 측정된 부위를 알아내어 질병의 진단이 가능한 양전자방출단층촬영(PET)의 방사성의약품으로 사용할 수 있다. 현재 C-11이 표지된 [<sup>11</sup>C]thymidine<sup>4-6)</sup>과 방사성요오드가 표지된 5-iododeoxyuridine<sup>7,8)</sup> 등이 양전자방출단층촬영용 및 감마카메라를 이용한 세포증식 방사성의약품으로 개발되어 뇌종양이나 유방암의 진단에 사용되고 있다. 그러나 C-11의 반감기가 20분 정도로 짧아서 표지반응의 어려움이 있고 정상적인 thymidine과 화학적, 생화학적 특성이 비슷하여 정상 thymidine과 같은 대사과정을 거치므로 이상 세포에 축적되지 않아 물질대사를 확인하는데 어려운 단점을 가지고 있다. 또한 방사성동위원소가 표지된 대사물질의 분포가 복잡하여 영상의 질을 저하시키는 경향도 있다.<sup>9)</sup> 하지만, <sup>18</sup>F이 표지된 thymidine은 반감기가 110분으로 비교적 길기 때문에 표지반응에 이용하기가 적당하고 또한 C-11이 표지된 thymidine처럼 양전자방출단층촬영에도 사용이 가능하다. 이에 thymidine을 모체로 하여 thymidine의 3'-위치에 생체에서 보다 안정한 방사성동위원소인 <sup>18</sup>F이 치환된 3'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3'-deoxythymidine ([<sup>18</sup>F]FLT)가 개발되었지만 <sup>18</sup>F이 표지된 [<sup>18</sup>F]FLT의 합성 및 생체 내 특성에 관한 연구는 아직 많은 연구를 필요로 하는 단계이다.<sup>3,10)</sup> 본 연구에서는 [<sup>18</sup>F]FLT의 유용성을 검증하기 위해 [<sup>18</sup>F]FLT의 전구체와 표준물질을 합성하고 표지된 [<sup>18</sup>F]FLT를 [<sup>18</sup>F]FET, [<sup>18</sup>F]FDG와 세포 섭취율을 비교하였다. 또한 9L 종양세포를 이식한 쥐에서 체내동태를 확인하였으며, 양전자방출단층촬영 영상을 획득하여 [<sup>18</sup>F]FLT의 유용성을 확인하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 전구체 및 표준물질([<sup>19</sup>F]FLT)의 합성

[<sup>18</sup>F]FLT의 전구체(8)와 표준물질([<sup>19</sup>F]FLT)을 합성하기 위해 보고된 방법<sup>10-12)</sup>과 유사하게 Scheme 1A에 따라 합성하였다. Thymidine(2)의 5'-위치의 OH기를 보호하기 위해 아르곤 기체 하에서 무수 피리딘에 녹인 후 0°C에서

4,4'-dimethoxytrityl chloride (DMTrCl)를 서서히 가한 후 실온에서 26시간 동안 교반하여 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)thymidine(3)을 합성하였다. 화합물 3의 3'-위치에 미질(mesyl)기를 도입하기 위한 반응으로 아르곤 기체하에서 무수 피리딘 용매에 녹인 후 0°C에서 methanesulfonyl chloride를 서서히 가한 후 실온에서 4시간 동안 교반하여 1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-mesyl-β-D-pentofuranosyl]thymine(4)을 합성하였다. Thymidine 3' 위치의 OH의 위치를 β형으로 바꾸기 위해 아르곤 기체 하에서 화합물 4를 N,N-dimethylformamide에 녹인 후 이 용액에 photassium phthalimide을 증류수에 녹여 가하고 90°C에서 3시간 동안 교반하여 O<sup>2</sup>,O<sup>3</sup>-anhydro-1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-pentofuranosyl]thymine(5)을 합성하였다. 얻어진 화합물 5를 아르곤 기체 하에서 에탄올에 녹인 다음 1 N NaOH 수용액 0.5 mL를 가하고 4시간 동안 실온에서 교반함으로써 OH가 β형으로 바뀐 화합물 6을 얻을 수 있었다. 합성된 화합물 6에 친핵성 치환반응에서 좋은 이탈기가 도입된 전구체를 합성하기 위해 아르곤 기체 하에서 1-[2'-deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-lyxofuranosyl]thymine(6)을 무수 피리딘 용매에 녹인 후 0°C를 유지하면서 4-nitrobenzenesulfonyl chloride을 피리딘 용매에 녹인 후 서서히 가하면서 32시간 동안 교반함으로써 노질 이탈기가 도입된 1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(4-nitrobenzenesulfonyl)-β-D-lyxofuranosyl]thymine(7)을 합성하였다. 최종적으로 keto-enol tautomerization 현상을 방지하고 N3 위치에 보호기(Boc)를 도입함으로써 안정한 전구체를 합성하기 위해 아르곤 기체하에서 1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(4-nitrobenzenesulfonyl)-β-D-lyxofuranosyl]thymine(7)을 무수 methylene chloride 용액에 녹인 후 triethylamine과 촉매량의 4-(dimethylamino)pyridine(DMAP)을 가한 다음 di-tert-butyl dicarbonate를 넣고 실온에서 1시간 동안 교반하여 [<sup>18</sup>F and <sup>19</sup>F]FLT(1)를 합성하기 위한 최종 전구체(8)를 합성하였다. 표준물질([<sup>19</sup>F]1)의 합성은 화합물 6-78°C, methylene chloride 용매하에서 (diethylamino)sulfurtrifluoride (DAST)와 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP)을 서서히 가하고 1시간을 교반하여 합성하였으며, 0.5 N HCl로 보호기를 제거하였다. 표준물질 3'-fluoro-3'-deoxythymidine([<sup>19</sup>F]1)은 역상 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography)를 사용하여 분리하였다(Scheme 1B).



**Scheme 1.** The preparation of (<sup>18</sup>F)FLT and authentic (<sup>19</sup>F)FLT. (A) The procedure of (<sup>18</sup>F)FLT precursor synthesis. (B) The synthesis of authentic FLT. (C) The synthesis of radiofluorinated (<sup>18</sup>F)FLT.

## 2. [<sup>18</sup>F]FLT의 합성

합성된 [<sup>18</sup>F]FLT 전구체에 방사성동위원소 <sup>18</sup>F를 도입시키기 위한 반응 과정을 Scheme 1C에 나타내었다. 빔 조사 후 생성된 <sup>18</sup>F(>37.0 GBq)을 QMA에 흡착시킨 다음 kryptofix 2.2.2. (10 mg)을 acetonitrile에 녹인 용액과 0.25 M의 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 mL) 혼합용액으로 회수하였다. <sup>18</sup>F 표지용 반응로에서 회수된 용액과 acetonitrile 용액을 사용하여 90°C에서 세 번 azeotropic distillation에 의해 물을 완전히 제거함으로써 kryptofix-fluoride 착물을 만들었다. 20 mg의 전구체 (N3-Boc-1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(4-nitrobenzenesulfonyl)-β-D-lyxofuranosyl]thymine, 8)를 0.5 mL의 acetonitrile에 녹이고 kryptofix-fluoride 착물

용액에 가한 후 120°C에서 15분간 반응하였다. 실온으로 식힌 후 0.5 N HCl 0.5 mL를 가하고 120°C에서 5분 정도 가열하여 보호기를 제거하였다. 반응조에 0.5 N NaOH를 이용하여 pH를 6.0 정도로 중화한 후 alumina N sep-pak으로 [<sup>18</sup>F]FLT를 분리하였다. 최종 목적물인 [<sup>18</sup>F]FLT는 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography)를 이용하여 분리하였다(분리조건: Alltech, Econosil C18, 250×7.9 mm, mobile phase: 13% EtOH/H<sub>2</sub>O, flow rate: 2.0 mL/min).

## 3. 시험관에서 [<sup>18</sup>F]FLT, [<sup>18</sup>F]FET, [<sup>18</sup>F]FDG의 세포섭취율 연구

[<sup>18</sup>F]FLT의 세포섭취는 9L (glioma) 세포주를 사용하여 측정하고, 이미 임상에서 사용되고 있는 2-[<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose ([<sup>18</sup>F]FDG)와 2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyltyrosine ([<sup>18</sup>F]FET)의 세포섭취율과 비교하였다. [<sup>18</sup>F]FDG는 GE FDG 모듈에서 합성하여 사용하였으며, [<sup>18</sup>F]FET는 보고된 2-[<sup>18</sup>F]fluoropropyltyrosine ([<sup>18</sup>F]FPT)의 합성방법<sup>13)</sup>과 유사하게 합성하여 사용하였다. 9L 세포주를 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 이틀에 한번씩 배양액을 교환하면서 culture flask 배양면의 80% 정도를 덮을 정도로 세포가 배양되었을 때 계대 배양하였다. 0.25%의 trypsin-EDTA를 사용하여 culture flask에 있는 세포주를 떼어낸 후 배양액을 이용하여 2회 세척하고 1.0×10<sup>6</sup>개씩의 세포주를 6 well plate에 동일하게 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후에 [<sup>18</sup>F]FLT, [<sup>18</sup>F]FDG와 [<sup>18</sup>F]FET를 각각 740 KBq/0.1 ml을 각각의 well에 직접 넣어준 후 10분, 20분, 30분, 60분, 120분 후에 각각의 flask에 세포주를 수확하고 PBS로 2회 세척한 후 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 cell pellet을 v-counter로 측정하였다. 실험은 각 시간 군에 3개씩 시행하였고 결과는 주사량의 백분율(percentage of injected dose: %ID)로 표시하였다.

### 3. [<sup>18</sup>F]FLT의 9L 종양 형성 모델에서의 체내동태 연구

체내동태 연구는 Fisher 344 rat를 이용하였다. 9L 종양모델은 Fisher rat의 우측 대퇴부에 1X10<sup>6</sup> 개의 9L 세포를 피하에 접종하고 종양의 크기가 약 1 cm가 되었을 때 생체분포에 사용하였다. [<sup>18</sup>F]FLT 3.7 MBq/0.1 ml을 꼬리정맥에 주사한 후 10분, 30분, 60분, 120분 후 희생하여 혈액 및 장기를 적출하여 무게와 방사능을 측정하였다. 실험은 각 시간 군에 네 마리씩 시행하였다. 결과는 조직 그램 당 주사량의 백분율(percentage of injected dose per gram of tissue: %ID/g)로 표시하여 나타내었다.

### 4. [<sup>18</sup>F]FLT의 9L 종양 형성 모델에서의 PET 영상

9L 종양세포를 이식한 쥐에서 종양의 크기가 약 1 cm가 되었을 때 생체영상 실험에 사용하였다. [<sup>18</sup>F]FLT 37.0 MBq를 쥐의 꼬리정맥에 주사한 후 60분이 지난 후, 임상용 PET 스캐너(ECAT EXACT HR+ Scanner, Siemens/CTIMI, Knoxville, TN)를 이용하여 2차원 영상획득 방법으로 방출데이터를 얻었다. 방출데이터 획득 전에 Ge-68 선 선원을 이용한 투과 스캔을 5분간 시행하여 감쇠보정을 위한 투과데이터를 획득하였고, 이어서 방출 스캔을 15분간 시행하였다. 획득한 방출데이터는 반복적 재구성 방법과 분할합

최보정방법을 이용하여 단면영상으로 재구성되었다.

## 결 과

### 1. 전구체 및 표준물질의 합성

전구체 및 표준물질의 각각의 단계를 Varian 200 MHz NMR을 통해 확인하였다. 표준물질 [<sup>19</sup>F]FLT의 전구체인 N<sup>3</sup>-Boc-1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(4-nitrobenzenesulfonyl)-β-D-lyxofuranosyl]thymine의 제조과정에서 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)thymidine(**3**)는 62%의 수율로 합성하였으며, 1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-mesylyl-β-D-pentofuranosyl]thymine(**4**)은 89%의 수율로 합성하였다. O<sup>2</sup>,O<sup>3</sup>-anhydro-1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-pentofuranosyl]thymine(**5**)은 50%의 수율로 합성하였으며, OH가 β 위치인 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)thymidine(**6**)은 79%의 수율로 합성하였다. 1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(4-nitrobenzenesulfonyl)-β-D-lyxofuranosyl]thymine(**7**)은 40%의 수율로 합성하였으며, Boc 기가 도입된 최종 전구체(**8**)는 70%의 수율로 합성하였다. 표준물질([<sup>19</sup>F]**1**)은 DAST를 사용하여 <sup>19</sup>F를 도입 후 0.5 N HCl로 보호기를 제거하고 HPLC로 분리 정제하였다.

### 2. [<sup>18</sup>F]FLT의 표지와 분리

[<sup>18</sup>F]FLT 전구체로부터 표지반응을 수행하는데 걸리는 시간은 HPLC 분리 정제(Fig. 1) 시간을 포함하여 약 120분 정도 소요되었다. 머무름 시간은 약 10-13분에서 분리하였으며, 방사화학적 수율은 붕괴시간 보정 후 20-30% 정도이었다. 방사화학적 순도는 95% 이상이었으며 비방사능은 37.0 GBq/μmol 이상이었다. 표지 후 정제된 용액은 표준물질과 동일주입함으로써 동일한 물질임을 확인하였다.

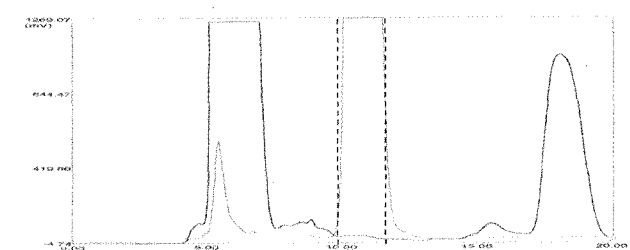


Fig. 1. HPLC profile of [<sup>18</sup>F]FLT. The chromatogram was monitored by a UV detector (254 nm) and radioactivity detector (column: Alltech Econosil C18, 250×7.9 mm; mobile phase: 13% EtOH/H<sub>2</sub>O; flow rate: 2.0 mL/min) [<sup>18</sup>F]FLT was collected at around 10-13 min.

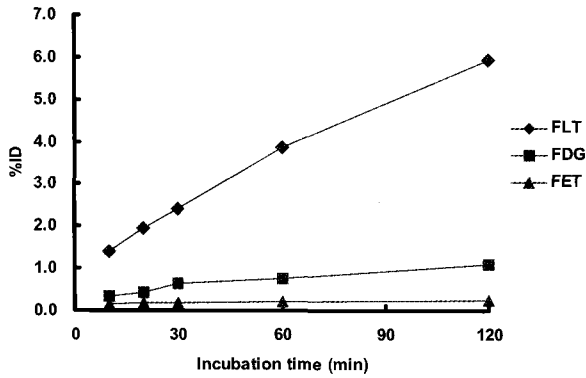


Fig. 2. Cellular uptake of [<sup>18</sup>F]FLT, [<sup>18</sup>F]FDG and [<sup>18</sup>F]FET in 9L glioma cells.

### 3. 시험관에서 [<sup>18</sup>F]FLT, [<sup>18</sup>F]FDG, [<sup>18</sup>F]FET의 세포 섭취율 비교

[<sup>18</sup>F]FLT와 [<sup>18</sup>F]FDG, [<sup>18</sup>F]FET의 섭취는 시간이 경과함에 따라 증가하는 양상을 보였다. 방사성의약품 처리 후 120분에서 [<sup>18</sup>F]FLT의 9L 세포주에서 섭취량은 5.94 %ID/g였고, [<sup>18</sup>F]FDG는 1.10 %ID/g, [<sup>18</sup>F]FET는 0.23 %ID/g를 나타내었다. 10분에서 120분으로 시간이 증가함에 따라 [<sup>18</sup>F]FLT는 4.26배, [<sup>18</sup>F]FDG는 3.29배, [<sup>18</sup>F]FET는 1.60배 증가하는 양상을 나타내었으며, Figure 2에서 그 양상을 도식화하였다.

### 4. [<sup>18</sup>F]FLT의 9L 종양 형성 모델에서의 체내동태 연구

9L 세포를 이식한 쥐에서 [<sup>18</sup>F]FLT 주사 후 10분, 30분, 60분, 120분에 따라 체내 동태 결과를 Table 1에 나타내었다. [<sup>18</sup>F]FLT는 비장, 신장에 많이 분포됨을 확인하였다. 방사능 섭취는 비장에서는 시간이 경과할수록 증가하고, 혈액과

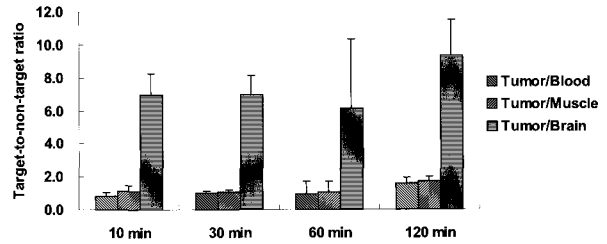


Fig. 3. The target-to-nontarget ratio of [<sup>18</sup>F]FLT in Fisher rats bearing 9L tumor.

간, 폐, 위, 근육에서는 시간이 경과될수록 감소되었으며, 주로 신장을 통해서 배출되는 것으로 나타났다. Figure 3은 [<sup>18</sup>F]FLT의 종양의 집적율을 평가하고자 종양 대 혈액 (Tumor/Blood, T/B) 비, 종양 대 근육 (Tumor/Muscle, T/M) 비, 종양 대 뇌 (Tumor/Brain, T/Br) 비를 나타내었다. T/B비는 60분과 120분에서 1.28±0.51, 1.61±0.34, T/M 비는 1.38±0.19, 1.70±0.30 그리고 T/Br비는 8.21±1.01, 9.33±2.22으로 나타났다. Figure 3에서 보듯이 종양 대 뇌의 비가 높은 것을 확인할 수 있었다.

### 5. 9L 종양 형성 모델에서 [<sup>18</sup>F]FLT의 양전자방출 단층촬영 영상

코리정맥에 주사 후 60분 [<sup>18</sup>F]FLT의 PET 영상은 Figure 4와 같다. [<sup>18</sup>F]FLT는 신장과 방광에 많이 분포되는 것이 관찰되었고, 대퇴부에 심어진 9L 종양에 집적되는 것이 관찰되었다. 또한, 대퇴골에서의 [<sup>18</sup>F]FLT의 섭취가 높은 것을 확인할 수 있었다.

Table 1. The biodistribution of [<sup>18</sup>F]FLT in Fisher rats Bearing 9L Tumor

Organ	10 min	30 min	60 min	120 min
Blood	0.60±0.05	0.45±0.03	0.31±0.08	0.12±0.02
Liver	0.78±0.02	0.50±0.04	0.33±0.06	0.13±0.03
Lung	0.64±0.07	0.47±0.04	0.28±0.09	0.13±0.02
Spleen	1.01±0.24	1.18±0.31	1.42±0.26	1.64±0.64
Kidney	1.44±0.14	0.91±0.21	0.59±0.13	0.24±0.04
Stomach	0.33±0.11	0.27±0.06	0.18±0.05	0.11±0.03
Small Intestine	0.61±0.15	0.58±0.06	0.46±0.08	0.23±0.10
Large Intestine	0.34±0.06	0.42±0.11	0.46±0.06	0.43±0.07
Femur	0.37±0.10	0.39±0.16	0.49±0.03	0.48±0.08
Muscle	0.45±0.04	0.42±0.03	0.29±0.04	0.11±0.01
Brain	0.07±0.00	0.06±0.00	0.05±0.01	0.02±0.00
Tumor	0.51±0.13	0.45±0.08	0.41±0.13	0.19±0.03

\*Four animals were used at each time point.  
Data represent as mean±S.D



Fig. 4. PET image of [<sup>18</sup>F]FLT at 60 min post injection in Fisher rat bearing 9L tumor (right thigh, blue circle).

## 고 찰

[<sup>18</sup>F]FLT는 DNA로 통합되기 전에는 DNA 복제 시 세포의 증식에 사용되는 thymidine과 비슷한 과정을 보여주지만, DNA와 통합되면 세포 증식을 중단시키고 세포 안에 축적된다. 특히 암이나 종양과 같이 핵산의 합성이 비이상적으로 활발히 일어나는 부위에 축적이 된다. 이러한 특징을 이용하여 방사성동위원소를 도입하고 PET 종양 영상용 진단시약으로 사용하기 위하여 연구되어 왔다. 본 실험은 [<sup>18</sup>F]FLT 방사성의약품을 제조하고 9L(glioma) 세포주를 배양하여 [<sup>18</sup>F]FLT의 종양에 따른 세포섭취를 비교하였으며 종양세포를 이식한 쥐에서 체내분포를 확인하였다.

[<sup>18</sup>F]FLT의 전구체 합성과정에서 N3-위치에 Boc 보호기를 도입한 후, 3' 위치에 이탈기로 mesyl-, tosyl-, nosyl-기로 변화를 주면서 방사화학적 수율을 측정할 결과 nosyl기를 도입한 전구체가 다른 이탈기에 비해 표지수율이 높은 것을 확인하여 N3-Boc-1-[2',3'-dideoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(4-nitrobenzenesulfonyl)-β-D-lyxofuranosyl]thymine을 전구체로 사용하였다. 또한 빔 조사 후 생성된 <sup>18</sup>F 용액을 QMA를 사용하여 물 속에 존재하는 양이온을 제거한 후 표지반응을 수행하였을 경우, 기존의 QMA를 사용하지 않은 방법과 비교하면 방사화학적 수율이 붕괴시간 보정 후 약 10% 정도에서 20-30% 정도로 증가하는 것을 확인하였으며 이는 <sup>18</sup>F 용액에 존재하는 양이온의 제거가 [<sup>18</sup>F]FLT의 합성수율 변화에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

[<sup>18</sup>F]FLT는 thymidine 3'-위치에 불소가 치환되어

thymidine phosphorylase에 의한 C-N glycosidic bond의 분해를 억제하는 효과가 있다. [<sup>18</sup>F]FLT는 5'-위치의 수산화기가 인산화되어 DNA 합성에 들어가지만 3'-위치의 수산화기가 불소로 치환되어 DNA 가닥을 합성하는데 이용되지는 않는다. 즉, 다른 nucleoside 유도체들과는 달리 [<sup>18</sup>F]FLT는 거의 DNA 합성에 쓰이지 않고 그 섭취는 단지 표유류의 티미딘 키나아제(Thymidine kinase type-1, TK1)의 활성도에 비례할 뿐이다. TK1은 G0/G1에서 낮고 S에서 높다. 일부 세포에서는 유사분열동안 높은 상태로 유지된다가 세포분열 후 G1기로 들어가면 다시 낮아진다. TK1의 활성도와 세포증식도, 세포주기와의 상관관계가 있음이 비종양세포와 종양세포 모두에서 밝혀져 있다.<sup>14)</sup> 세포주기와 연관된 FLT 섭취를 확인하기 위하여 세포주기를 동조화시킨 비소세포성 폐암 세포주에서 [<sup>18</sup>F]FLT 섭취와 deoxyglucose 섭취를 S기의 분율과 비교하여 [<sup>18</sup>F]FLT가 세포주기와 연관되어 섭취가 나타남을 증명하였으며, deoxyglucose보다 세포증식도를 더 잘 반영함을 보였다.<sup>15)</sup> 또한 [<sup>18</sup>F]FLT는 DNA 합성자체를 나타내지는 않아 [<sup>18</sup>F]FLT를 세포 증식 영상으로 쓰는데 문제점이 있다고 제시하는 보고도 있다. Jeffrey 등은 세포분열에 있어서 TK1 의존 정도가 nucleoside를 이용한 세포증식도 측정에 매우 중요한 역할을 함을 밝혔다.<sup>16)</sup> 본 연구의 시험관 섭취율 실험에서 [<sup>18</sup>F]FLT의 세포섭취되는 비율이 [<sup>18</sup>F]FDG나 [<sup>18</sup>F]FET보다 월등히 높은 것을 확인하였으며 이에 대한 보충 연구가 필요한 것으로 생각된다.

[<sup>18</sup>F]FLT의 생체분포 및 생체 영상 결과 [<sup>18</sup>F]FLT는 세포의 DNA 합성의 기질로서 사용되지 않는으나 thymidine의 섭취와는 유사한 생체분포 및 영상을 나타내는 것으로 확인되었다. [<sup>18</sup>F]FLT의 섭취는 DNA 합성이 활발하게 일어나는 조직인 비장과 골수에서의 섭취가 시간 경과에 따라서 증가하는 경향을 보였으며 이는 기존의 연구결과와 일치하는 경향을 보였다.<sup>3,17)</sup>

현재 사용 중인 PET용 방사성의약품 중 [<sup>18</sup>F]FDG의 경우 뇌종양에서 당 대사정도에 따라 정상세포보다 높고 낮음이 결정지어지게 되므로 종양의 정확한 경계를 그려낼 수 없을 뿐만 아니라 종양과 염증의 구별이 어려운 단점을 가지고 있다. 반면에 [<sup>18</sup>F]FLT는 일반 뇌세포에서 축적되는 양이 적고 Figure 3에서 보여주듯이 120분에서 tumor/brain의 비율은 9.15로 tumor/blood와 tumor/muscle에 비해 월등히 높은 것으로 나타나 [<sup>18</sup>F]FDG에 비해 종양의 발견과 예후에 측에 도움이 될 것으로 기대된다.

Chen 등<sup>18)</sup>의 임상 연구에서는 [<sup>18</sup>F]FLT 영상이 [<sup>18</sup>F]FDG 영상보다 재발된 high-grade 뇌 종양의 진단에 좀 더 민감하며, 세포 증식도에 대한 평가 인자인 Ki-67 지

표와 높은 상관관계를 보이는 것을 보고 하였다. 또한 Choi 등<sup>19)</sup>의 임상 연구에서는 [<sup>18</sup>F]FLT 영상에 뇌 종양의 grade의 평가와 세포 증식도와 좋은 상관관계를 보였으나 비종양 부위와 종양 부위간의 감별에는 유용성이 적은 것으로 보고 하였다.

[<sup>18</sup>F]FLT는 항암 치료 후 조기치료효과 판정에 도움이 될 것으로 기대되나 항암제의 작용기전에 따라 섭취변화가 다를 수 있어 치료효과 판정에 있어서는 아직 연구가 필요한 것으로 생각된다. [<sup>18</sup>F]FLT 이외에 thymidine의 fluoro-arabinofuranosyl 유도체인 FMAU, FBAU, FIAU등이 DNA 합성에 사용된다는 것이 밝혀져 있어 향후 지속적인 연구가 필요한 것으로 알려져 있다.<sup>20)</sup>

본 연구 결과로 볼 때 [<sup>18</sup>F]FLT는 뇌에서 종양의 존재를 평가하는 진단용 방사성의약품으로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대되며, 치료효과 판정등에서도 유용한 것으로 생각된다.

## 요 약

**목적:** 종양 내 양전자방출단층촬영으로 세포증식을 영상화하기 위해 [<sup>11</sup>C]thymidine과 같은 다양한 방사성의약품이 개발되었다. 그러나 [<sup>11</sup>C]thymidine은 C-11의 짧은 반감기와 대사과정의 추적에 문제점을 가지고 있어 문제점을 해결하기 위해 [<sup>11</sup>C]thymidine을 대신하여 3'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3'-deoxythymidine([<sup>18</sup>F]FLT)이 개발이 보고되었다. 본 연구에서는 thymidine을 출발물질로 하여 총 6 단계에 걸쳐 3'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3'-deoxythymidine ([<sup>18</sup>F]FLT)의 합성하였다. 또한 합성된 [<sup>18</sup>F]FLT를 이용하여 FET, FDG의 9L 세포에서 세포섭취율을 비교하였으며 생체 분포 및 양전자방출단층촬영 영상을 얻어 유용성을 검증하고자 하였다. **대상 및 방법:** [<sup>18</sup>F]FLT 전구체(3-*N-tert*-butoxycarbonyl-(5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-deoxy-3'-*O*-(4-nitrobenzenesulfonyl)-β-D-threopentofuranosyl)thymine)는 N3-위치에 *tert*-butyloxycarbonyl (*t*-Boc)기를 도입하고, 3'-위치에 친핵성 치환반응을 유도하기 위한 이탈기로 nitrobenzenesulfonyl기를 도입하였다. 방사성동위원소 <sup>18</sup>F의 표지는 전구체를 120°C, acetonitrile 용매하에서 수행하였고 0.5 N HCl로 보호기를 제거하였다. 표지된 [<sup>18</sup>F]FLT를 alumina N sep-pak과 고성능액체크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. [<sup>18</sup>F]FLT의 세포섭취율은 [<sup>18</sup>F]FET, [<sup>18</sup>F]FDG와 9L 세포에서 비교하였고, 체내동태는 종양세포를 이식한 쥐를 이용하여 10분, 30분, 60분, 120분에 측정하였으며, 양전자방출단층촬영 영상을 얻었다. **결과:** HPLC

분리 후 [<sup>18</sup>F]FLT의 방사화학적 수율은 약 20-30% 정도였고 방사화학적 순도는 95% 이상이였다. 시험관 섭취율에서 [<sup>18</sup>F]FLT는 시간이 지남에 따라 증가하는 양상을 보였고 생체분포 실험에서 주사 후 120분에서 tumor/blood, tumor/muscle, tumor/brain의 비율은 1.61±0.34, 1.70±0.30, 9.33±2.22를 나타내었다. 또한, 양전자방출단층촬영 결과 종양에 국소화된 영상을 얻었다. **결론:** [<sup>18</sup>F]FLT의 종양세포 섭취는 정상 뇌에 비해 월등히 높게 나타났으며, 양전자방출단층촬영 결과는 뇌종양 진단을 위한 방사성의약품으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

## References

- Eriksson S, Kierdaszuk B, Munch-Peterson B, Oberg B, Johnsson NG. Comparison of the substrate specificities of human thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase toward antiviral and cytostatic nucleoside analogs. *Biophys Res Commun* 1991;176:586-92.
- Kong XB, Zhu QY, Vidal PM, Watanabe KA, Polsky B, Armstrong D, et al. Comparison of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3-fluoro-3-deoxythymidine and 3-azido-3-deoxythymidine. *Antimicrob Agent Chemother Biochem* 1992; 36:808-18.
- Shields AF, Grierson JR, Dohmen BR, Machulla H-J, Stayanoff JC, Lawhorn-Crews JM, et al. Imaging proliferation in vivo with [<sup>18</sup>F]FLT and positron emission tomography. *Nat Med* 1998;4:1334-6.
- Eary JF, Mankoff DA, Spence AM, Berger MS, Olshen A, Link JM, et al. 2-[<sup>11</sup>C]thymidine imaging of malignant brain tumors. *Cancer Res* 1999;59:615-21.
- Martiat P, Ferrant A, Labar D, Cogneau A, Boc C, Michel JL, et al. In vivo measurement of carbon-11 thymidine uptake in non-Hodgkin's lymphoma using positron emission tomography. *J Nucl Med* 1998;29:1633-7.
- Shields AF, Mankoff DA, Link JM, Graham MM, Eary JF, Kozawa SM, et al. Carbon-11-thymidine and FDG to measure therapy response. *J Nucl Med* 1998;39:1757-62.
- Tjuvajev JG, Macapinlac HA, Daghighian F, Scott AM, Ginos JZ, Finn RD, et al. Imaging of the brain tumor proliferative activity with [<sup>131</sup>I]iododeoxyuridine. *J Nucl Med* 1994;35:1407-17.
- Tjuvajev J, Muraki A, Ginos J, Berk J, Koutcher D, Ballon B. Iododeoxyuridine (IUDR) uptake and retention as a measure of tumor growth. *J Nucl Med* 1993;34:1152-61.
- Toyohara J, Wakib A, Takamatsub S, Yonekurab Y, Magatac Y, Fujibayashib Y. Basis of FLT as a cell proliferation marker: comparative uptake studies with [<sup>3</sup>H]thymidine and [<sup>3</sup>H]arabinothymidine, and cell-analysis in 22 asynchronously growing tumor cell lines. *Nucl Med Biol* 2001;29:281-7.
- Grierson JR, Shields AF. Radiosynthesis of 3-deoxy-3-[<sup>18</sup>F]fluorothymidine: [<sup>18</sup>F]FLT for imaging of cellular proliferation in vivo. *Nucl Med Biol* 2000;27:143-56.
- Martin SJ, Eisenbarth JA, Wagner-Utermann U, Mier W, Henze M, Pritzkow H, et al. A new precursor for the radiosynthesis of [<sup>18</sup>F]FLT. *Nucl Med Biol* 2002;29:263-73.
- Wodarski C, Eisenbarth J, Weber K, Henze M, Haberkorn U,

- Eisenhut M. Synthesis of 3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F]fluorothymidine with 2,3'-anhydro-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) thymidine. *J Labelled Cpd Radiopharm* 2000;43:1211-8.
13. Moon BS, Kim SW, Lee TS, Ahn SH, Lee KC, An GI, et al. Synthesis of O-(3-[<sup>18</sup>F]fluoropropyl)-L-tyrosine (L-[<sup>18</sup>F]FPT) and its biological evaluation in 9L tumor bearing rat. *Bull Korean Chem Soc* 2005;26:91-6.
  14. Higashi K, Clavo AC, Wahl RL. Does FDG uptake measure proliferative activity of human cancer cells? In vitro comparison with DNA flow cytometry and tritiated thymidine uptake. *J Nucl Med* 1993;34:414-9.
  15. Rasey JS, Grierson JR, Wiens LW, Kolb PD, Schwartz JL. Validation of FLT uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in A549 carcinoma cells. *J Nucl Med* 2002;43:1210-7.
  16. Schwartz JL, Tamura Y, Jordan R, Grierson JR, Krohn KA. Monitoring tumor cell proliferation by targeting DNA synthetic processes with thymidine and thymidine analogs. *J Nucl Med* 2003;44:2027-32.
  17. Lu L, Samuelsson L, Bergstrom M, Sato K, Fasth KJ, Langstrom B. Rat studies comparing <sup>11</sup>C-FMAU, <sup>18</sup>F-FLT, and <sup>76</sup>Br-BFU as proliferation markers. *J Nucl Med* 2002;43:1688-98.
  18. Chen W, Cloughesy T, Kamdar N, Satyamurthy N, Bergsneider M, Liau L, et al. Imaging proliferation in brain tumors with <sup>18</sup>F-FLT PET: comparison with <sup>18</sup>F-FDG. *J Nucl Med* 2005;46:945-52.
  19. Choi SJ, Kim JS, Kim JH, Oh SJ, Lee JG, Kim CJ, et al. 3'-deoxy-3-[<sup>18</sup>F]fluorothymidine PET for the diagnosis and grading of brain tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:653-9.
  20. Mangner TJ, Klecker RW, Anderson L, Shields AF. Synthesis of 2'-deoxy-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-beta-D-arabinofuranosyl nucleosides, [<sup>18</sup>F]FAU, [<sup>18</sup>F]FMAU, [<sup>18</sup>F]FBAU and [<sup>18</sup>F]FIAU, as potential PET agents for imaging cellular proliferation. Synthesis of [<sup>18</sup>F]labelled FAU, FMAU, FBAU, FIAU. *Nucl Med Biol* 2003;30:215-24.