Nucl Med Mol Imaging
Vol. 41, No. 6, Dec 2007

Original Article

PET영상용 미토콘드리아 막전위 감지기 (4-[^{18}F]Fluorophenyl)triphenylphosphonium의 합성

전남대학교 의과대학 핵의학교실[1], 동국대학교 화학과[2]
김동연[1,2] · 유국현[2] · 범희승[1] · 민정준[1]

Synthesis of (4-[^{18}F]Fluorophenyl)triphenylphosphonium as a Mitochondrial Voltage Sensor for PET

Dong Yeon Kim, B.S.[1,2], Kook Hyun Yu, Ph.D.[2], Hee-Seung Bom, M.D., Ph.D.[1], and Jung-Joon Min, M.D., Ph.D.[1]

[1]*Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea;*
[2]*Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul, Korea*

Purpose: Lipophilic cations including tetraphenylphosphonium (TPP) salts penetrate the hydrophobic barriers of the plasma and mitochondrial membranes, resulting in accumulation in mitochondria in response to the negative inner transmembrane potentials. The development of radiolabeled phosphonium cations as a noninvasive imaging agent may serve as a new molecular "voltage sensor" probe to investigate the role of mitochondria in the pathophysiology and diagnosis of cancer. **Materials and Methods:** We have synthesized a reference compound (4-fluorophenyl)triphenylphosphonium (TPP) and a labeled compound [^{18}F]TPP via two step nucleophilic substitution of no-carrier-added [^{18}F]fluoride with the precursor, 4-iodophenyltrimethylammonium iodide, in the presence of Kryptofix-2.2.2 and K_2CO_3. **Result:** The reference compound (4-fluorophenyl)triphenylphosphonium (TPP) was synthesized in 60% yield. The radiolabeled compound [^{18}F]TPP was synthesized in 10~15% yield. The radiochemical purity of the [^{18}F]TPP was 95.57±0.51% (n=11). **Conclusion:** [^{18}F]TPP was successfully synthesized that might have a potential to be utilized as a novel myocardial or cancer imaging agent for PET. However, it is required to improve the radiochemical yield to apply [^{18}F]TPP in preclinical or clinical researches. (Nucl Med Mol Imaging 2007;41(6):561-565)

Key Words: phosphonium salts, tetraphenylphosphonium, mitochondrial membrane potential, PET, myocardial imaging, cancer imaging

서 론

미토콘드리아는 세포의 생성과 죽음에 직접적으로 관련이 있다.[1,2] 따라서 미토콘드리아의 손상은 유전적 변이 및 암, 당뇨병, 퇴행성 질환 등 광범위한 질병과 연관이 있게 된다.[3,4] 이런 미토콘드리아의 손상은 미토콘드리아 막 전위차($\Delta\Psi m$)를 측정해 봄으로써 알 수 있는데 예를 들어 정상적인 상피 세포와 암 세포와의 막 전위차($\Delta\Psi m$)는 60 mV 이상 차이가 나게 된다.[5] 만약 미토콘드리아의 막전위차에 의해 미토콘드리아 내로 확산됨으로써 막 전위차($\Delta\Psi m$)를 반영할 수 있는 방사성의약품을 합성한다면 미토콘드리아의 질병을 진단하고 치료하는데 이용할 수 있을 것이다.

Tetraphenylphosphonium (TPP)salt는 지방 친화성 양이온 물질로 세포막과 미토콘드리아 막을 손쉽게 투과할 수 있고, 미토콘드리아 막의 내부에 존재하는 음전압(-150 ~ -170 mV)에 이끌려 미토콘드리아에 직접적으로 섭취된다. 이러한 미토콘드리아에 대한 직접적 섭취는 미토콘드리아의 막전위차를 측정 할 수 있는 전극으로서의 역할을 할 수 있게 되는 것이다.

따라서 TPP는 미토콘드리아의 막전위 차이가 큰 암세포 또는 심근 세포에서도 높은 섭취율을 보임이 선행 연구를 통

• **Received**: 2007. 9. 6. • **Accepted**: 2007. 10. 7.
• Address for reprints: Jung-Joon Min, M.D., Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Hwasun Hospital, 160 Ilsim-ri, Hwasun 519-809, Korea
Tel: 82-61-379-7271, Fax: 82-61-379-7280
Email: jjmin@jnu.ac.kr
※이 연구는 과학기술부 원자력연구개발사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

해서 보고 되었다.[6,7] 그러므로 TPP에 양전자를 방출할 수 있는 방사성동위원소인 [^{18}F]fluoride를 표지 할 수 있으면 양전자 단층 촬영기(Positron Emission Tomography; PET)를 이용할 수 있는 심근영상용 방사성 추적자를 개발할 수 있을 것이다. 물론 [^{18}F]fluoride가 표지된 TPP가 같은 메커니즘의 [^{99m}Tc] MIBI나 [^{99m}Tc]tetrofosmin과 비교하여 가격이 훨씬 비쌀 것으로 예상되나 조직 감쇄에 의해 야기되는 진단율의 저하를 극복하여 더 높은 수준의 영상과 진단율을 보여 줄 수 있을 것으로 기대되며 또한 반감기가 짧은 [^{13}N]NH_3보다 높은 실용성도 기대할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 TPP에 [^{18}F]fluoride를 표지함으로써 심장 및 암질환의 진단에 사용될 가능성이 있는 방사성의 약품을 합성하는 것을 목표로 하였다.

대상 및 방법

무담체 [^{18}F]fluoride는 GE PET trace 사이클로트론에서 생산하였고, 이 실험에 사용된 모든 시약들은 Sigma-Aldrich Chemical에서 구입하였다. ESI-MS는 Vincent Coates Foundation Mass Spectrometry Laboratory (Stanford University)에서 사용하였고 NMR spectra는 Varian 600MHz, 녹는 점은 Electrothermal TA 9100 digital melting point instrument를 사용하여 확인하였다. HPLC는 영린 SP930D 펌프와 UV730D 자외선 검출기를 사용하였고 방사능 검출기는 BIOSCAN FC-3200, Semi-preparative 컬럼은 Zorbax SB-C18 (9.4 mm × 250 mm)을, analytical 컬럼은 Dionex Acclaim1120 C18 (4.6 mm × 250 mm)을 사용하였다. HPLC 이동상 A는 100 mM ammonium formate (HCO_2NH_4), 이동상 B는 acetonitrile을 사용하였다. 또한 방사능을 측정하기 위해서 CAPINTEC radioisotope calibrator CRC-712MH를 이용하였다.

1. *4-Iodophenyltrimethylammonium iodide*의 합성

앞서 보고된 4-iodophenyltrimethylammonium iodide의 합성방법을 일부 수정하여 시행하였다.[8] 정제된 에탄올 50 mL에 4-iodoaniline 0.5 g (2.3 mmol)을 녹인 후, methyliodide 3.4 g (24 mmol)과 sodium acetate 0.38 g (4.6 mmol)을 첨가하였다. 환류 장치를 이용하여 48시간 동안 교반한 후 감압 여과를 하였다. 여과 후 diethyl ether를 이용하여 수 차례 세척한 후 증발 건조시켜 연 보랏빛의 분말을 얻을 수 있었다.(Fig. 1) 이를 HPLC를 이용해서 분리 및 정제 하였다 (Semi-preparative 컬럼, 유속 : 3 mL/min , 이동상 : 기울기 용리 95% A 3분, 15% A 30분, 머무름 시간 : 20.5분).

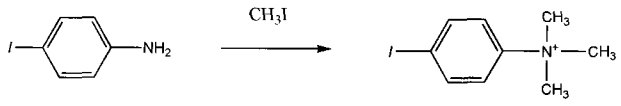

Figure 1. 4-Iodophenyltrimethylammonium iodide의 합성 경로.

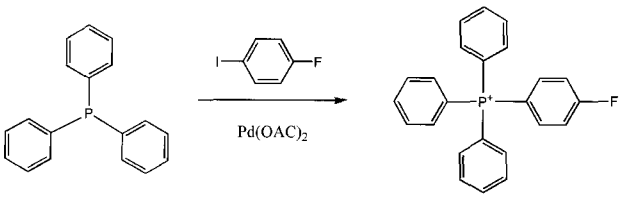

Figure 2. (4-Fluorophenyl)triphenylphosphonium formate의 합성 경로.

수율 : 90% ^{1}H-NMR (CD_3OD) 3.67 (s, 9H, $(CH_3)_3$), 7.72 (d, 2H, Ar-H), 8.02 (d, 2H, Ar-H).

2. *(4-Fluorophenyl)triphenylphosphonium formate*의 합성

(4-Fluorophenyl)triphenylphosphonium의 합성 방법은 (4-bromophenyl)triphenylphosphonium의 합성 방법을 일부 수정하여 시행하였다.[9] 정제된 p-xylene 50 mL에 triphenylphosphine 0.176 g (0.672 mmol)과 4-fluoro-iodobenzene 0.149 g (0.672 mmol), $Pd(OAC)_2$ 7.5 mg (0.033 mmol, 5 mol%)를 첨가하여 150-160℃에서 12시간 동안 가열하였다. 가열 하면 노란색의 액체에서 갈색 빛을 띄는 침전이 생기고 증발 건조 하여 갈색의 분말을 얻을 수 있었다.(Fig. 2) 이것을 메탄올에 녹여 HPLC를 이용하여 분리, 정제 한 후 과량의 NaI를 이용하여 흰색의 침전으로 만들었다(Semi-preparative 컬럼, 유속 : 3 mL/min , 이동상 95% A 3분, 15% A 30분 머무름 시간 : 25.18분). 순도 확인은 analytical 컬럼을 이용하였으며 95%이상의 순도를 확인하였다(analytical 컬럼, 유속 : 1 mL/min, 이동상 : 기울기 용리 95% A 3분, 15% A 30분, 머무름 시간 : 25.2분). 녹는 점 : >200℃ ^{1}H-NMR (CD_3OD) 7.40-7.51(m, 2H), 7.65-7.74(m, 2H), 7.59-7.69(m, 6H), 7.74-7.81(m, 6H), 7.87-7.96(t, 3H)

ESI-MS (high-resolution): m/z 이론값: 357.1208 ($C_{24}H_{19}FP$), 실제값: 357.1219.

3. *(4-[^{18}F]Fluorophenyl)triphenylphosphonium cation*의 표지와 정제

무담체 [^{18}F]fluoride는 GE PET trace 사이클로트론의 16.4 MeV의 양성자 빔을 이용해 [^{18}O]water를 표적으로 하

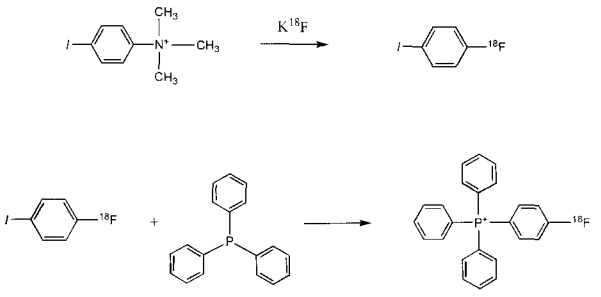

Figure 3. (4-[^{18}F]Fluorophenyl)triphenylphosphonium cation의 합성 경로.

는 $^{18}O(p,n)^{18}F$ 핵반응을 통해 생산하였다.

무담체 [^{18}F]fluoride를 reaction vessel에 취한 후, 25 mM potassium carbonate 200 μL을 넣고 Kryptofix 2.2.2. 4.0 mg가 녹아 있는 acetonitrile 300 μL를 넣었다. 이를 질소 분위기 하에서 100℃로 수 차례 가열하여 공비(azeotrope)에 의하여 무수 형태의 반응성이 있는 [^{18}F]fluoride를 얻었다. 이 무수의 [^{18}F]fluoride에 DMSO (0.5 mL)에 3.0 mg 4-iodophenyltrimethylammonium iodide를 녹인 용액을 첨가하여 130℃에서 15분간 반응 시켰다.(Fig. 3)[10] 이 반응물을 solid phase cartridge (Sep-Pak® Plus Silica cartridge, Waters)를 통해 분리 하고 용출된 화합물에 triphenylphosphonium 6.0 mg과 $Pd(OAC)_2$ 2.0 mg을 넣고 140℃에서 40분간 가열하였다. 합성한 ^{18}FTPP를 실온에서 식힌 후 semi-preparative 컬럼을 이용하여 분리 정제하였다(유속 : 3 mL/min, 이동상 : 기울기 용리 72% A 3분, 52% A 30분, 15% A 36분, 72% A 39분 머무름 시간 : 25.18분).

결 과

(4-[^{18}F]Fluorophenyl)triphenylphosphonium는 두 단계의 표지 반응을 통해 합성되었다. 전구체의 합성은 4-iodoaniline에 methyliodide를 첨가하여 가열 및 교반하여 수행하였다. 합성된 생성물은 HPLC를 이용해 분리 및 정제 하였으며, 합성의 확인은 ESI-MS 및 NMR을 이용하여 확인하였다. 표지 반응은 무담체 [^{18}F]fluoride를 K_2CO_3와 상 이동 촉매인 Kryptofix 2.2.2.와 함께 사용하여 친핵성의 반응성이 있는 [^{18}F]fluoride가 되도록 용해하고 활성화 하였다. 이렇게 활성화한 [^{18}F]fluoride에 전구체를 첨가하여 130 ℃에서 15분간 반응시킨 다음 Sep-Pak cartridge를 이용해 분리 하였다. 마지막으로, [^{18}F]fluoride로 치환된 1-fluoro-4- iodobenzene에 triphenylphosphonium을 첨가하여 140℃, 40분간 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 실온에서 식히고 semi-

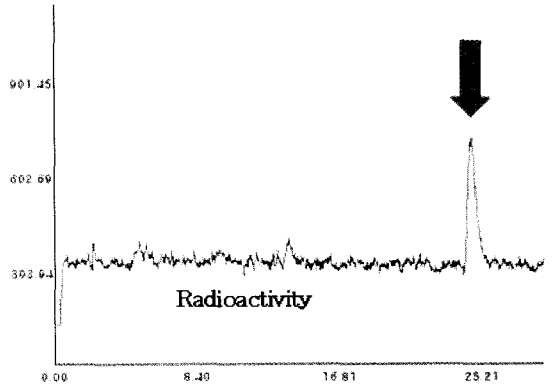

Figure 4. (4-[^{18}F]Fluorophenyl)triphenylphosphonium cation의 Prep-HPLC radiochromatogram.

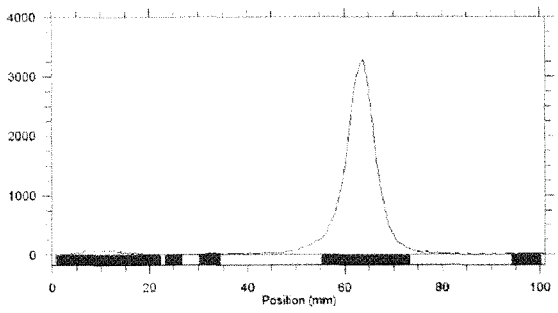

Figure 5. (4-[^{18}F]Fluorophenyl)triphenylphosphonium cation의 radio TLC.

preparative 컬럼을 이용해 [^{18}F]fluoride가 표지된 표지 화합물을 분리하였다.(Fig. 4) 머무름 시간은 25.18분이었고, 분리한 화합물을 analytical 컬럼을 이용해 (4-fluorophenyl) triphenylphosphonium과 비교하였다. 방사 화학적 수율은 10-15% (EOS : corrected for decay)였으며 방사 화학적 순도는 95.57±0.51% (n=11)임을 radio TLC로 확인하였다. (Fig. 5)

고 찰

핵의학적 심장기능 검사는 1971년에 시작된 이래 많은 발전이 이루어졌으며, 최근에는 단일 광자 단층 촬영기(SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography)와 양전자 단층 촬영기(Positron Emission Tomography; PET)를 이용한 핵의학 검사에 많은 관심이 집중 되고 있다. SPECT는 체내 방사성동위원소의 분포를 단층영상으로 관찰 할 수 있게 하여 평면영상에서 얻을 수 없는 깊이 정보를 살려내는

기술이다. SPECT를 이용하여 심장 영상을 보기 위한 기존의 방사선 의약품으로는 ^{201}Tl이나 ^{99m}Tc를 이용한 ^{99m}Tc-methoxyisobutylisonitrile ([^{99m}Tc]-MIBI), tetrofosmin 또는 [^{13}N]NH_3 을 사용하였지만 ^{201}Tl 보다 감마카메라 영상에 적절한 에너지 영역을 가지고 있고 반감기가 적절한 ^{99m}Tc 표지 화합물을 대부분 사용한다. 하지만 ^{99m}Tc 표지 화합물을 사용했을 경우 간에 섭취된 ^{99m}Tc에 의한 광자의 산란으로 심장에 섭취된 정확한 ^{99m}Tc의 양을 정량하기 어려웠다.[1-17] 또 다른 방사성동위원소인 [^{13}N]NH_3 는 반감기가 10분이기 때문에 임상에서 많은 환자를 대상으로 사용하기에 한계점이 있다. 따라서 이러한 단점을 보안할 수 있는 양전자 단층촬영에 사용 할 수 있는 새로운 방사성 의약품의 개발이 요구된다.

양전자 단층 촬영은 최근 핵의학에서 급속히 발전하고 있는 영상기술로서, 단일 광자를 이용한 SPECT보다 영상의 해상도가 뛰어나며, 양전자를 방출하는 방사성의약품을 이용해 해당 물질의 분포 및 인체 내 각 장기의 기능과 생화학적, 생리적 반응을 정량화 할 수 있다. 즉, 심근에 직접적으로 섭취되는 화합물에 양전자를 방출하는 [^{18}F]fluoride를 표지 할 수 있다면 PET을 이용한 새로운 심근 영상 제재로 사용이 가능 할 뿐 아니라 적절한 반감기를 지니고 있기 때문에 임상에서의 사용도 용의 할 것이다.

게다가(4-[^{18}F]fluorophenyl)triphenylphosphonium 표지 화합물은 영상을 위한 방사성 의약품의 가장 큰 문제점인 선택성의 측면에서도 기존의 제재들 보다 훨씬 높은 장점을 가지고 있다. 암 세포에 대한 선택성의 경우 [^{3}H]TPP는 폐암 세포에 대해 아무 처리도 하지 않은 대조군에 비해 500% 이상의 높은 섭취율을 보일 뿐 아니라 ^{99m}Tc-methoxyisobutylisonitrile ([^{99m}Tc]-MIBI)에 비해서는 6배 이상의 높은 섭취율을 보였으며 시간 경과 후에도 이러한 현상은 지속되었다.[6]

또한 미토콘드리아의 활동이 활발한 심근에 대해서도 높은 섭취율을 나타내었는데, 심근에 대한 높은 섭취율을 보인 반면에, 다른 장기에 대한 섭취율은 현저히 떨어졌으며, 특히 혈액 내에는 방사능이 거의 나타나지 않았다.[7] 즉 (4-[^{18}F]fluorophenyl)triphenylphosphonium cation 은 지금까지의 심장 영상을 확인하기 위한 방사성 의약품들이 가지고 있던 반감기의 문제나 선택성 및 섭취율에 따른 단점을 보안할 수 있는 새로운 방사성의약품으로서의 기대치가 높다고 할 수 있다.

하지만 benzene 고리에 음전하를 띄고 있는 [^{18}F]fluoride 이온을 이용하여 친핵성 치환 반응으로 표지 하였기 때문에 [^{18}F]fluoride 이온이 표지된 다른 방사성 의약품에 비해 상대적으로 방사화학적 수율이 낮으며, 이는 실용적인 측면에서 표지 방법의 개선이 필요하다고 생각된다. 본 실험실에서는 알킬 사슬을 이용한 유도체 합성을 통하여 방사화학적 수율의 개선을 꾀하고 있다.

본 논문에서는 (4-[^{18}F]fluorophenyl)triphenylphosphonium 이 두 단계의 표지 반응을 거쳐 합성되었다. 이는 미토콘드리아의 활동이 활발한 심근 세포 내에 직접 섭취되어 심장 질환의 진단 및 치료에 사용될 잠재력을 가진 방사성 의약품 합성의 첫 결과이며 앞으로 방사화학적 수율의 개선을 통한 전임상 연구가 있어야 할 것이라 생각된다.

요 약

목적 : Tetraphenylphosphonium (TPP) salts를 비롯한 지용성 양이온들은 혈장 및 미토콘드리아막을 쉽게 통과할 수 있을 뿐 아니라 미토콘드리아 내의 음 전압에 이끌려 미토콘드리아의 내부에 직접적으로 섭취된다. 또한 tetraphenylphosphonium (TPP) salts는 암세포에 직접적으로 섭취될 뿐 아니라 미토콘드리아의 활동이 활발한 심근에서도 직접적 섭취가 일어나는 것으로 보고되어 있다. 따라서 이러한 특징을 가지는 tetraphenylphosphonium (TPP) salts에 [^{18}F]fluoride를 표지 할 수 있다면 암의 진단 및 미토콘드리아의 기능에 대해 연구 할 수 있는 새로운 분자 영상 추적자로써 사용할 수 있을 것이다. **대상 및 방법** : 기준 물질인 (4-fluorophenyl)triphenylphosphonium (TPP)을 단일 반응으로 합성 하였으며, [^{18}F]이 표지된 [^{18}F]TPP는 무담체 [^{18}F]fluoride와 전구체인 4-iodophenyltrimethylammonium iodide를 이용하여 Kryptofix- 2.2.2와 K_2CO_3존재 하에 두 단계의 반응으로 합성하였다. **결과** : 기준물질인 (4-fluorophenyl) triphenylphosphonium (TPP)은 60%의 수율로 합성 되었으며, 표지 화합물인 [^{18}F]TPP의 방사 화학적 수율은 10-15%였다. 또한 radio TLC로 확인한 방사 화학적 순도는 95.57±0.51% (n=11)이었다. **결론**: 미토콘드리아의 막전위 차를 이용한 암 또는 심근 영상제제인 (4-[^{18}F]fluorophenyl) triphenylphosphonium의 합성에 성공하였다. 하지만 전임상, 임상에의 응용을 위해서는 방사화학적 수율을 더 개선시켜야 할 것이다.

References

1. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. ***GENES & DEVELOPMENT*** 2003;17:545-80.
2. Cavalli LR, Liang BC. Mutagenesis, tumorigenicity, and apoptosis: are the mitochondria involved? ***Mutat Res*** 1998;398:1926.

3. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. ***Science*** 1999;283:1482-8.
4. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. ***Ann Rev Physiol*** 1998;60:619-42.
5. Labajova A, Vojtiskova A, Krivakova P, Kofranek J, Drahota Z, Houstek J. Evaluation of mitochondrial membrane potential using a computerized device with a tetraphenylphosphoniumselective electrode. ***Anal. Biochem*** 2006;353:37-42.
6. Madar I, Weiss L, Izbicki G. Preferential Accumulation of ^{3}H-Tetraphenylphosphonium in NonSmall Cell Lung Carcinoma in Mice: Comparison with 99mTc-MIBI. ***J Nucl Med*** 2002;43:234-8.
7. Min JJ, Biswal S, Deroose C, Gambhir SS. Tetraphenylphosphonium as a Novel Molecular Probe for Imaging Tumors. ***J Nucl Med*** 2004;45:4 636-43.
8. Burns HD, Marzilli LG, Dannals RF, Dannals TE, Trageser TC, Conti P et al. 4-[^{125}I] Iodophenyltrimethylammonium Ion, an Iodinated Acetylcholinesterase Inhibitor with Potential as a Myocardial Imaging Agent. ***J Nucl Med*** 1980;21:875-9.
9. Lambert C, Gaschler W, Noll G, Weber M, Schmalzlin E, Brauchle C, Meerholz K. Cationic π-electron systems with high quadratic hyperpolarisability. ***J Chem Soc Perkin Trans*** *2* 2001;6:964-74.
10. Cheng Z, Subbarayan M, Chen X, Gambhir SS. Synthesis of (4-[^{18}F]fluorophenyl) Triphenylphosphonium as a potential imaging agent for mitochondrial dysfunction. ***J Label Compd Radiopharm*** 2005;48:131-7.
11. Higley B, Smith FW, Smith T, et al. Technetium-99m-1,2-bis [bis(2-ethoxyethyl)phosphino] ethan: biodistribution, dosimetry and safety of a new myocardial perfusion imaging agent. ***J Nucl Med*** 1993;34:30-8.
12. Chua T, Kiat H, Germano G, et al. Rapid back to back adenosine stress/rest technetium-99m teboroxime myocardial perfusion SPECT using a triple-detector camera. ***J Nucl Med*** 1993;34:1485-93.
13. Germano G, Chua T, Kiat H, Areeda JS, Berman DS. A quantitative phantom analysis of artifacts due to hepatic activity in technetium-99m myocardial perfusion SPECT studies. ***J Nucl Med*** 1994;35:356-9.
14. Nuyts J, Dupont P, Van den Maegdenbergh V, Vleugels S, Suetens P, Mortelmans L. A study of the liver-heart artifact in emission tomography. ***J Nucl Med*** 1995;36:133-9.
15. Matsunari I, Tanishima Y, Taki J, et al. Early and delayed technetium-99m-tetrofosmin myocardial SPECT compared in normal volunteers. ***J Nucl Med*** 1996;37:1622-26.
16. Kailasnath P, Sinusas AJ. Comparison of Tl-201 with Tc-99m-labeled myocardial perfusion agents: technical, physiologic, and clinical issues. ***J Nucl Cardiol*** 2001;8:482-98.
17. Hatada K, Riou LM, Ruiz M, Yamamichi Y, Duatti A, Lima RL et al. ^{99m}Tc-N-DBODC5, a New Myocardial Perfusion Imaging Agent with Rapid Liver Clearance: Comparison with ^{99m}Tc-Sestamibi and ^{99m}Tc-Tetrofosmin in Rats. ***J Nucl Med*** 2004;45:2095-101.