

에스트라디올 유도체의 합성 및 체내분포

Synthesis of estradiol derivatives and their biodistribution.

김상욱, 양승대, 서용섭, 안순혁, 전권수, 최창운, 임상무,
원자력병원

유국현
동국대학교

요 약

최근 수년간 다양한 에스트로겐 수용체에 근거한 방사성의약품들 중에서 estradiol의 17α -iodovinyl 유도체와 11β -methoxy유도체가 유방암의 영상화를 통한 진단 시약으로서 가장 좋은 가능성을 나타냄이 보고되어오고 있다. 유방암의 영상에 관한 연구는 곧 에스트로겐 수용체 농도의 측정과 직접적으로 연관을 맺고 있으며, 실제로 에스트로겐 수용체의 농도가 높은 유방암 환자의 경우 이러한 호르몬 therapy를 이용하기도 한다. 본 연구에서는 estradiol 유도체인($17\alpha,20E$)-and($17\alpha,20Z$)- 21 -[odo- 19 norpregna- $1,3,5(10),20$ -tetraene- $3,17$ -diol과($17\alpha,20E$)-and($17\alpha,20Z$)- 21 -[odo- 19 norpregna- $1,3,5(10),20$ -tetraene- $3,17$ -diol 3- (methylether)를 합성하여 이 물질들의 분광학적 특성을 연구하였고, 이를 바탕으로 하여($17\alpha,20E$)- 21 -[odo- 19 norpregna- $1,3,5(10),20$ -tetraene- $3,17$ -diol에 ^{125}I 를 표지하였고 표지된 에스트라디올 유도체를 Rat에 주사하여 체내 분포에 관해 연구하였다. 가장높은 자궁섭취율은 $3.12\%ID/g$ 이었고, 자궁 대 혈액의 섭취비율은 14.2 였다.

Abstracts

Among the various estrogen receptor based radiopharmaceuticals that have been developed over the past years as possible imaging agents for breast cancer, 17α -iodovinyl derivatives of estradiol and 11β -methoxy estradiol showed the most promising properties. The study for the imaging of breast cancer status is directly related with the measurement of the estrogen receptor concentration. Estrogen receptor measurement also give benefits to the patients who may be treated with hormonal therapy. In this study, we synthesized ($17\alpha,20E$)-and($17\alpha,20Z$)- 21 -[odo- 19 norpregna- $1,3,5(10),20$ -tetraene- $3,17$ -diol and ($17\alpha,20E$)-and($17\alpha,20Z$)- 21 -[odo- 19 norpregna- $1,3,5(10),20$ -tetraene- $3,17$ -diol 3- (methylether), characterized their spectroscopic properties and labelled ($17\alpha,20E$)- 21 - ^{125}I [odo- 19 norpregna- $1,3,5(10),20$ -tetraene- $3,17$ -diol. The labelled estradiol derivative was injected to the rats in order to measure its biodistribution. The highest uterus uptake was $3.12\%ID/g$ at 2h post-injection and uterus to blood ratio was 14.2 .

1. 서론

에스트라디올은 에스트로겐(여성 난포 홀몬)의 일종으로서 여성의 난소에서 생성되며 자궁 및 난소에 높은 분포를 나타낸다. 또한 gonadotropin의 생성을 유발하여 배란을 촉진시키는 역할을 하기도 한다. 유방암에는 에스트로겐 수용체가 발현된 경우와 에스트로겐 수용체가 발현되지 않은 경우가 있는데 에스트로겐 수용체가 발현된 경우에는 홀몬 치료법으로 유방암을 치료할 수 있다. 여성과 관계된 이런 특성을 바탕으로 에스트라디올 유도체에 방사성 동위원소인 ^{123}I 를 표지함으로써 유방암을 진단하여 에스트로겐 수용체가 발현된 경우인지 아닌지를 판단 함으로써 홀몬 치료법 사용여부를 결정할 수 있다. 지난 여러해동안 다양한 에스트로겐 수용체에 근거한 방사성의약품들 중에서 estradiol의 17α -iodovinyl 유도체와 11β -methoxy유도체가 유방암의 영상화를 통한 진단 시약으로서 가장 좋은 가능성을 나타냄이 보고 되어오고 있다. 유방암의 영상에 관한 연구는 곧 에스트로겐 수용체 농도의 측정과 직접적으로 연관을 맺고 있으며, 실제로 에스트로겐 수용체의 농도가 높은 유방암 환자의 경우 이러한 호르몬 therapy를 이용하기도 한다. 과거에는 수용체를 영상화시키기 위해 16α - ^{125}I -iodo-oestradiol과 같은 ^{125}I 이 표지된 ligand가 합성되어 사용되었으나 이 compound는 빠른 체내 metabolism으로 인하여 수용체에 관한 충분한 데이터를 얻기에는 많은 어려움이 있었다. 그런 이유로 16α - ^{125}I -iodo-oestradiol를 기본물질로하여 metabolism속도를 줄이고 검출율을 향상시키기 위하여 수많은 compounds들이 합성되었으나, 아주 좋은 검출율을 나타내는 compound는 얻지 못했다. 연구된 여러 compound중에서 화학적 데이터와 동물실험 그리고 clinical studies를 통해 처음에 언급된 estradiol의 11번째 methoxy가 치환된 11β -methoxy- 17α - ^{125}I -iodovinylestradiol이 가장 가능성 있는 compound로 연구되었다. 본 연구에서는 estradiol 유도체인 ($17\alpha,20\text{E}$)-and($17\alpha,20\text{Z}$)-21-[iodo-19norpregna-1,3,5(10),20-tetraene-3,17-diol과($17\alpha,20\text{E}$)-and($17\alpha,20\text{Z}$)-21-[iodo-19norpregna-1,3,5(10),20-tetraene-3,17-diol 3- (methyl ether)를 합성하여 이 물질들의 분광학적 특성과 성질을 연구하였고, ^{123}I 를 표지하였으며 동물실험을 하였다.

2. 실험

1) 시약 및 기기

17α -ethynylestradiol과 17α -ethynylestradiol 3-(Methyl ether)는 Aldrich사 제품을 사용하였고, azobisisobutyronitrile(AIBN)은 Junsei사 제품을 사용하였으며, Tri-n-butyltin hydride는 Aldrich사 제품을 사용하였다. Thin-Layer chromatography(TLC)는 형광물질이 도포된(UV 254) Merck사 제품을 사용하였고, 모든 유기용매는 사용하기 전에 알려진 정제법에 의해 정제하여 사용하였으며, 그 외의 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다. $^1\text{H-NMR}$ 은 Varian사의 Gemini-200를 사용하여 얻었으며, 방사능 TLC-detector는 Bioscan사의 AC-3000를 이용하여 기록하였다.

2) 합성

2)-1 ($17\alpha,20\text{E}$)-21-(Tributylstannyl)-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol (2a)의 합성

질소 기체 하에서 azobisisobutyronitrile(16.6mg, 1mmol)과 17α -ethynylestradiol (1a)(100mg, 0.337mmol), toluene 5ml 그리고 tri-n-butyltin hydride (0.3ml, 1.1mmol)의 혼합물을 90°C 에서 3시간 동안 가열한다. 용매를 감압증류하고 남은 부분을 5% ethyl acetate(in hexane)용액으로 컬럼하여 분리하였다.

2)-2 (17 α ,20E)-21-iodo-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol (3a)의 합성

2a(116.8mg,0.2mmol)를 3ml의 chloroform에 녹인다. 이 용액에 0.1M 요오드 용액(in chloroform)을 요오드의 색이 유지될 때까지 가한다. 이후 0.2ml(1M in methanol)의 KF용액과 0.2ml(5% in water) sodiumbisulfite 용액을 순차적으로 가한다. 이 혼합용액을 10ml의 ethyl acetate로 2회 추출한다. 추출한 용액을 magnesium sulfate로 건조시킨 후 여과하고 증발건조 시켰다.

2)-3 (17 α ,20Z)-21-(Tributylstannyl)-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol (4a)의 합성

5ml의 hexamethylphosphoric triamide(HMPA)를 용매로 하여 17 α -ethynylestradiol (1a)(1g, 3.37mmol)과 2.5ml(9.66mmol)의 tri-n-butyltin hydride 혼합물을 70 $^{\circ}$ C에서 45시간동안 반응시킨다. 이 용액을 20ml의 ethylacetate로 희석시킨 후 물로 세척하고 magnesium sulfate로 건조시킨 후 여과하고 용액을 증발건조 시킨다. 5% ethyl acetate(in hexane)용액으로 컬럼하여 분리하였다.

2)-4 (17 α ,20Z)-21-iodo-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol (4a)의 합성

4a(116.8mg,0.2mmol)를 3ml의 chloroform에 녹인다. 이 용액에 0.1M 요오드 용액(in chloroform)을 요오드의 색이 유지될 때까지 가한다. 이후 0.2ml(1M in methanol)의 KF용액과 0.2ml(5% in water) sodiumbisulfite 용액을 순차적으로 가한다. 이 혼합용액을 10ml의 ethyl acetate로 2회 추출한다. 추출한 용액을 magnesium sulfate로 건조시킨 후 여과하고 증발건조 시켰다.

2)-5 (17 α ,20E)-21-(Tributylstannyl)-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol 3-(Methyl ether) (2b)의 합성

질소 기체 하에서 azobisisobutyronitrile(50mg, 0.13mmol)과 17 α -ethynylestradiol 3-(methyl ether) (1b)(310mg, 1mmol), toluene 8ml 그리고 tri-n-butyltin hydride (1ml, 3.7mmol)의 혼합물을 90 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 가열한다. 용매를 감압증류하고 남은 부분을 3% ethyl acetate(in hexane)용액으로 컬럼하여 분리하였다.

2)-6 (17 α ,20E)-21-iodo-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol 3-(Methyl ether) (3b)의 합성

2b(240mg,0.4mmol)를 5ml의 chloroform에 녹인다. 이 용액에 0.1M 요오드 용액(in chloroform)을 요오드의 색이 유지될 때까지 가한다. 이후 0.4ml(1M in methanol)의 KF용액과 0.4ml(5% in water) sodiumbisulfite 용액을 순차적으로 가한다. 이 혼합용액을 10ml의 ethyl acetate로 2회 추출한다. 추출한 용액을 magnesium sulfate로 건조시킨 후 여과하고 증발건조 시켰다.

2)-7 (17 α ,20Z)-21-(Tributylstannyl)-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol 3-(Methyl ether) (4b)의 합성

5ml의 hexamethylphosphoric triamide(HMPA)를 용매로 하여 17 α -ethynylestradiol 1b(1g, 3.23mmol)과 2.5ml(9.2mmol)의 tri-n-butyltin hydride 혼합물을 70 $^{\circ}$ C에서 45시간동안 반응시킨다. 이 용액을 20ml의 ethylacetate로 희석시킨 후 물로 세척하고 magnesium sulfate로 건조시킨 후 여과하고 용액을 증발건조 시킨다. 5% ethyl acetate(in hexane)용액으로 컬럼하여 분리하였다.

2)-B (17 α ,20 β)-21-iodo-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol 3-(Methyl ether) (6b)의 합성

4b(100mg,0.167mmol)를 3ml의 chloroform에 녹인다. 이 용액에 0.1M 요오드 용액(in chloroform)을 요오드의 색이 유지될 때까지 가한다. 이후 0.2ml(1M in methanol)의 KF용액과 0.2ml(5% in water) sodiumbisulfite 용액을 순차적으로 가한다. 이 혼합용액을 10ml의 ethyl acetate로 2회 추출한다. 추출한 용액을 magnesium sulfate로 건조시킨 후 여과하고 증발건조 시켰다.

3) 표지반응

100 μ g(166nmol)의 2a와 5%(w/v in glacial acetic acid)의 sodium acetate용액 50 μ l의 혼합물에 [¹²⁵I]NaI(50mCi, in 500 μ l of ethanol)를 첨가한 후 50 μ l의 산화제 용액(H₂O₂(30%)/acetic acid,2/1,v/v)를 첨가한다. 이 용액을 상온에서 20분간 반응시킨후 25 μ l의 5% sodium bisulfite(w/v in water)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. Dichloromethane를 이용하여 추출하고 추출액을 질소가스를 이용하여 증발건조하였다.

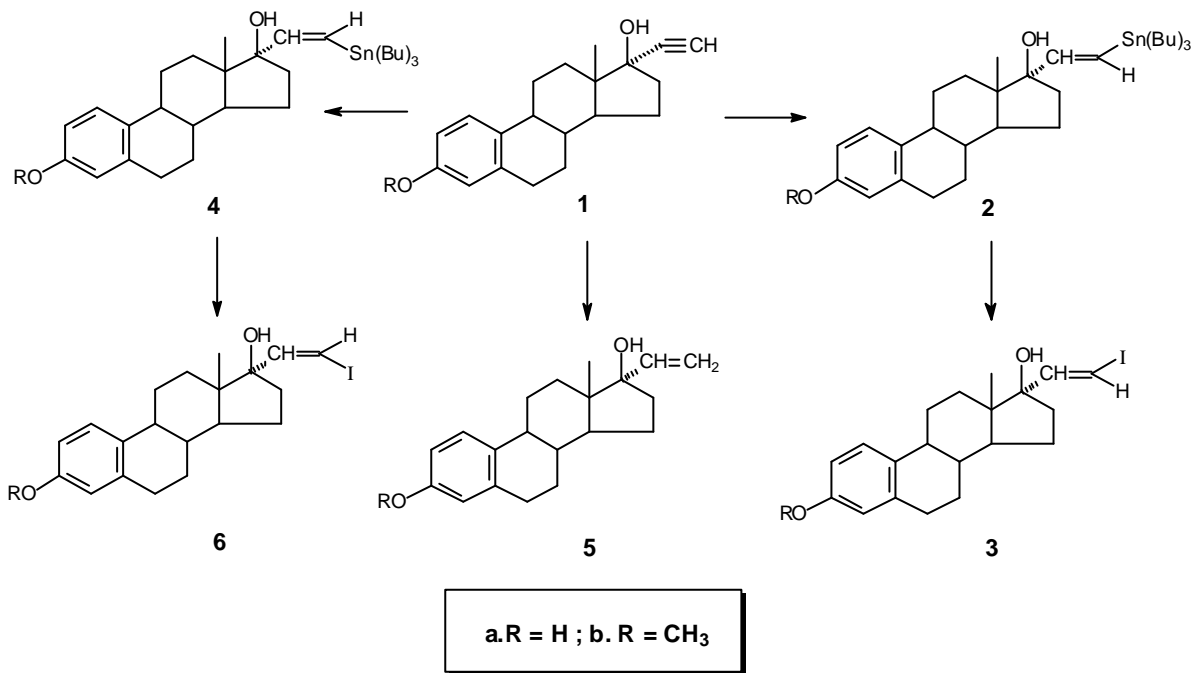


Figure 1. Procedure of the synthesis of (17 α ,20 β)-and(17 α ,20 β)-21-[¹²⁵I]iodo-19-norpregna-1,3,5(10),20-tetraene-3,17-diol and 3-O-methyl ether

4) 동물실험

실험에 사용한 동물은 immature female Fischer rats(24 days old, 55-60g)이었고, 주사용 용액은 9%의 에탄올이 포함된 주사용수에 표지된 에스트라디올을 녹여 제조하였으며 마리당 150 μ Ci씩을 투입하였다. 체내 분포는 주사후 1시간, 2시간, 5시간 후에 rat의 장기를 떼어내고 혈액을 채취하여 γ -counter로 측정하였다.

3. 결과

1) 합성확인

합성된 compounds는 각각 TLC와 NMR 그리고 기타 분광기기를 통해 확인하였다. E isomer와 Z isomer의 가장 두드러진 차이는 NMR상에서 vinylic proton의 coupling constant로 구별하였다. E form의 경우 coupling constant J 값이 14Hz이고 Z form의 경우는 8.5Hz로서 두 화합물이 큰 차이를 보이는 것을 확인하였다. E form과 Z form의 NMR스펙트럼을 그림2와 그림3에 나타내었다.

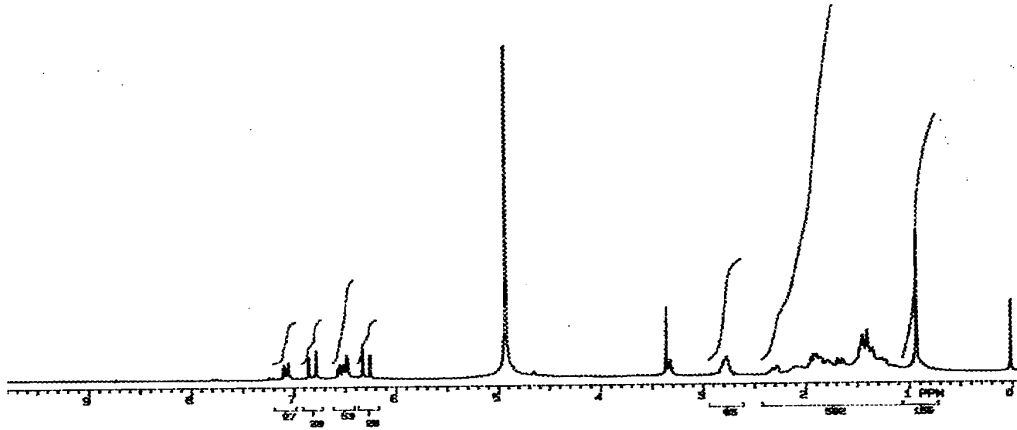


Figure 2. NMR Spectrum of (17 α ,20E)-21-iodo-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol

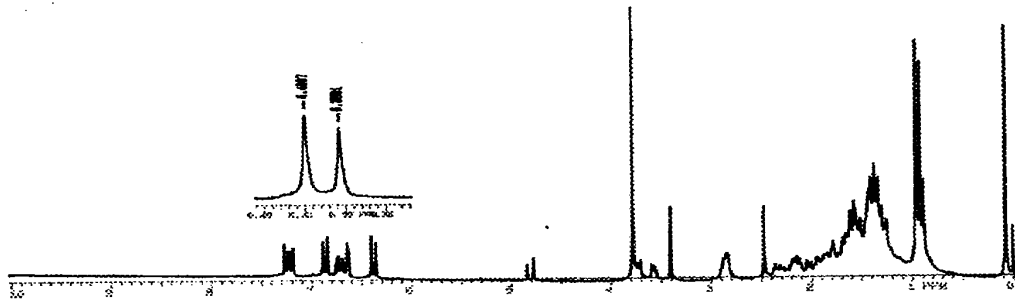


Figure 3. NMR Spectrum of (17 α ,20Z)-21-iodo-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol

2) 표지확인 및 방사화학적 순도 확인

^{123}I 이 표지된 (17 α ,20E)-21- ^{123}I iodo-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol 반응혼합물은 hexan과 에틸아세테이트 혼합 유기용매(hexane : ethyl acetate, 3 : 1, v/v)를 이용하여 Silica Sep-Pak cartridge를 통과시켜 정제하였으며, 그때의 Rf값은 0.53이었고 free iodine은 출발선상에 그대로 있는 것이 확인 되었다(Silica TLC). 각각 다른 전개 용매를 사용한 TLC chromatogram을 그림 4와 그림 5에 나타내었으며 정제된 I-123 에스트라디올의 chromatogram을 그림 6에 나타내었다. 정제 후의 방사화학적 순도는 95%로 확인되었다.

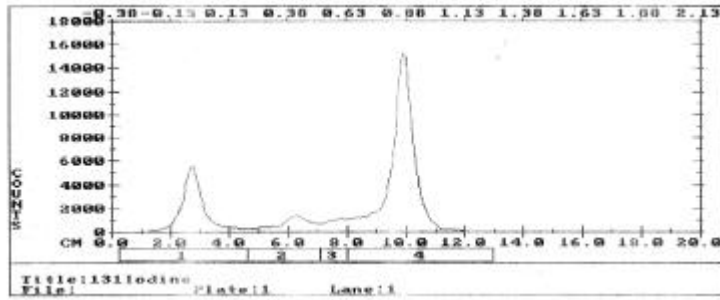


Figure 4. TLC chromatogram of [-123 estradiol (hexane : ethyl acetate, 1:1, v/v)

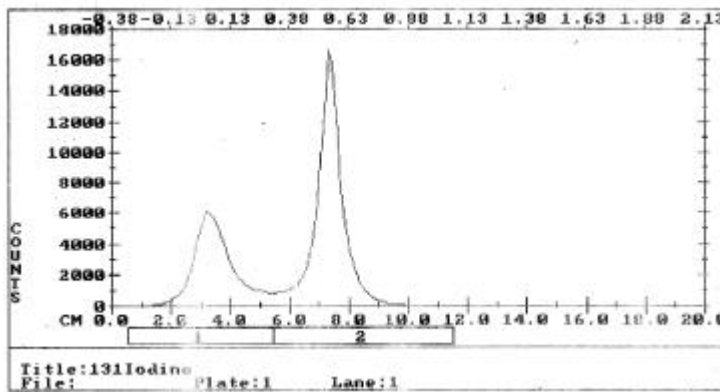


Figure 5. TLC chromatogram of [-123 estradiol (hexane : ethyl acetate, 3:1, v/v)

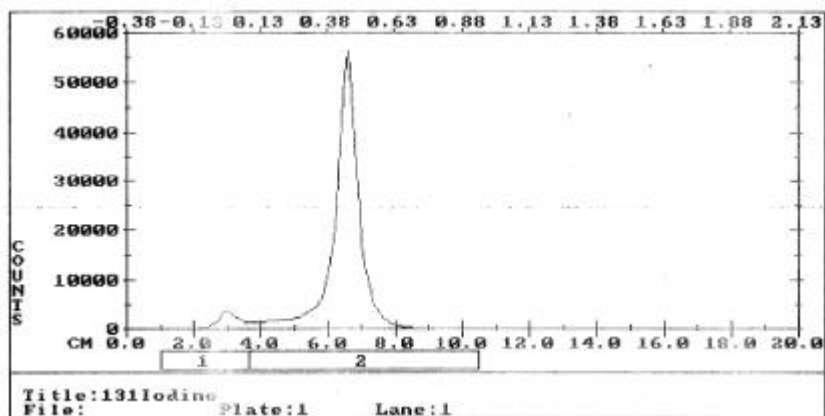


Figure 6. TLC chromatogram of [-123 estradiol (After purification by silica Sep-Pak cartridge)

3) Rat 체내분포

체내분포를 조사해본 결과 ^{123}I 표지된 에스트라디올은 본 실험에서 의도된 바와 같이 uterus와 ovaries에 큰 섭취를 나타내었다. 가장 큰 섭취를 보인 장기는 uterus로서 주사 2시간 후 3.11%ID/g이었다. 또한 ovaries도 주사 2시간 후에 2.28%ID/g으로 비교적 큰 섭취를 보였다. 시간에 따른 분포는 대개의 장기가 주사 1시간 후 큰 섭취를 보인 반면 adrenal, uterus, ovaries는 주사 2시간 후 큰 섭취를 보였다. 위에 설명된 결과를 표 1에 나타내었고, 그림 7에 그래프로 표시하였다.

Table 1. Biodistribution of ^{123}I labelled $(17\alpha,20\text{E})-21-[^{123}\text{I}]\text{iodo}$
 $^{19}\text{-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol}$ (%ID/g)

장기	주사후시간		
	1시간	2시간	3시간
Blood	0.294	0.225	0.190
Liver	2.757	2.098	1.199
Lung	0.993	0.610	0.219
Spleen	0.565	0.349	0.149
Kidney	1.219	0.759	0.303
Adrenals	1.645	1.994	0.635
Uterus	2.851	3.117	1.135
Ovaries	2.271	2.288	1.019
Muscle	0.522	0.322	0.139
Thyroid	0.080	0.049	0.092
Brain	0.628	0.333	0.083

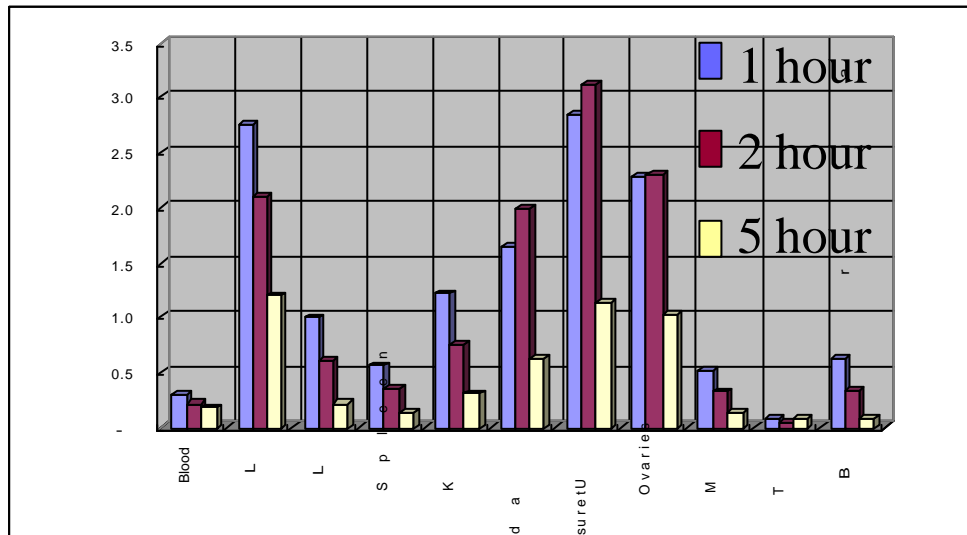


Figure 7. Biodistribution of ^{123}I labelled $(17\alpha,20\text{E})-21-[^{123}\text{I}]\text{iodo}$
 $^{19}\text{-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol}$ (%ID/g)

4. 결론

- 1) Sn(Bu)₄HCl를 이용하여(17 α ,20E)-and-(17 α ,20Z)-21-iodo-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol 와 (17 α ,20E)-and-(17 α ,20Z)-21-iodo-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol 3-methyl ether를 합성하였다.
- 2) H₂O₂를 이용하여 (17 α ,20E)-21-[¹²⁵I]iodo-19-norpregna-1,3,5-(10),20-tetraene-3,17-diol를 표지하였고, 표지수율은 75%였으며, 정제후 순도는 95%였다.
- 3) 가장 큰 섭취율을 보인 장기는 uterus로서 주사 2시간 후 3.11%ID/g이었고, ovaries는 주사 2시간 후에 2.28%ID/g으로 비교적 큰 섭취율을 보였다. 주사 2시간 후 uterus와 blood의 비는 14.2였다.

5. 참고문헌

- 1) H. Ali, J. Rousseau, M. A. Ghaffari, J. E. van Lier, J. Med. Chem., Vol. 31, 1988, pp.1946-1950
- 2) C. Foulon, D. Guilloteau, J. L. Baulieu, M. J. Ribeiro-Barras, G. Desplanches, Y. Frangin, J. C. Besnard, Nucl. Med. Biol., Vol. 19, 1992, pp.257-261
- 3) M. J. Ribeiro-Barras, C. Foulon, J. L. Baulieu, D. Guilloteau, P. Bougnoux, J. Lansac, J. C. Besnard, Nucl. Med. Biol., Vol. 19, 1992, pp.263-267
- 4) R. Hanson, L. A. Franke, J. Nucl. Med., Vol. 25, 1984, p.998