creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

공 학 석 사 학 위 논 문

종양세포에 발현하는 TSPO를 표적으로 하는 새로운 테라노스틱 리간드 개발

Development of a new TSPO targeting ligand for tumor theranosis

2021 년 8 월

서울대학교 융합과학기술대학원

응용바이오공학

김 정 민

종양세포에 발현하는 TSPO를 표적으로 하는 새로운 테라노스틱 리간드 개발

지도 교수 김 상 은

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2021 년 **7** 월

서울대학교 융합과학기술대학원

응용바이오공학

김 정 민

김정민의 공학석사 학위논문을 인준함

2021 년 **7** 월

위 원 장 _____ 박 원 철 _____

부위원장 _____ 김 상 은 _____

위 원 _____ 임 형 준 _____

초 록

종양세포에 발현하는 TSPO를 표적으로 하는 새로운 테라노스틱 리간드 개발

전이체 단백질(the translocator protein 18 kDa, TSPO)의 과발현은 퇴행성 뇌질환과 관련된 신경염증뿐만 아니라 뇌, 간, 유방, 그리고 전립선 암 등에서도 관찰되고 있다. 본 연구에서는 TSPO를 표적 한 종양의 핵의학적 진단과 치료가 가능한 테라노시스 물질로서 2-(4-chloro)phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine 유사체(CB259)에 대한 합성 연구와 방사성동위원소 표지 연구를 수행하였다.

전구체 CB259는 4-((N,N-hydroxycarbonyl-2-picolylamino)methyl) aniline 화합물과 CB86 화합물을 thiourea결합으로 연결하여 합성하였다. 최종 방사성동위원소가 표지 된 테라노시스의 기준 물질로서, 비방사성동위원소 레늄이 도입된 Re-CB259는 $(Net_4)_2[ReBr_3(CO)_3]$와 CB259를 dimethylformamide에 녹여 70 ºC에서 1시간 동안 교반 후 HPLC 분리 정제를 통해 59.5% 수율로 합성하였다. 얻어진 Re-CB259의 TSPO에 대한 결합친화도 평가는 C6 교모세포에서 분리된 membrane

단백질에서 [^{3}H]PK11195와 경쟁결합을 통해 측정하여, 결합친화도(K_i) = 32.1±9.9 nM 값임을 확인하였다. 단일광자방출단층촬영 영상을 제공하는 테크네슘-99m의 CB259 표지는 [^{99m}Tc(CO)$_3$(H$_2$O)$_3$]$^+$와 CB259를 dimethylformamide에 녹인 후, 70도에서 30분 동안 교반 시켜 수행하였다. 목적한 ^{99m}Tc-CB259는 표지 화합물에서 tC18 Sep-Pak 카트리지로 간단하게 정제한 후에 HPLC 정제를 통해 분리 할 수 있었으며 이때 얻어진 방사화학적 수율은 21.6% (non-decay corrected)이고 방사화학적 순도는 99% 이상이었다. 기준 물질로 합성한 Re-CB259과 ^{99m}Tc-CB259을 HPLC에 동시 주입한 후 분석함으로써, 동위원소만이 다른 최종 목적 화합물 ^{99m}Tc-CB259임을 확인 하였으며, 이때 관찰된 Re-CB259과 ^{99m}Tc-CB259의 HPLC 컬럼 머무름 시간은 각각 17분과 19분이었다. ^{99m}Tc-CB259의 지방친화도(Distribution-coefficient, Log D) 측정은 n-옥탄올과 인산 완충액(pH 7.4) 용매 간 용해도 차이를 이용해 측정되었으며 그 값은 1.47±0.12 (n=3)이다. 시험관 내의 안정성 실험은 사람혈청에서 37 ^{o}C 4시간동안 수행되었으며 결과적으로 높은 안정성(99% 이상)을 나타내었다.

본 연구에서는 종양의 TSPO에 결합 가능한 테라노시스로서, TSPO에 높은 결합친화도를 가지면서 matched pair 방사성동위원소 (^{99m}Tc & ^{188}Re)를 표지 할 수 있는 새로운 TSPO 결합 리간드인 CB259를 개발하였다.

주 요 어 : 전이체 단백질 18 kDa, 테라노스틱, 트리카보닐 테크네슘-

99m, $^{99m}Tc(CO)_3$, TSPO 과발현 종양, SPECT

학 번 : 2019-25467

목 차

초 록 ····· **1**

목 차 ····· **4**

표 목차 ····· **6**

그림 목차 ····· **7**

SCHEME 목차 ····· **8**

제 1 장 서 론 ····· **9**

제 1 절 전이체 단백질 18 kDa (TSPO) ····· 9

제 2 절 테라노스틱 특징과 장점 ····· 12

제 3 절 기존 화합물의 특징과 한계점 ····· 13

제 4 절 연구의 목적 ····· 14

제 2 장 실험 재료와 방법 ····· **16**

제 1 절 Synthesis of CB259 ····· 18

제 2 절 Synthesis of CB258 ····· 24

제 3 절 Synthesis of NCS-CB86 ····· 30

제 4 절 Synthesis of Re-CB259, ^{99m}Tc-CB259 ····· 35

제 5 절 Log D Determination ····· 37

제 6 절 In Vitro Cell-Binding Assays ····· 37

제 3 장 결 론 39

제 1 절 CB258 39

제 2 절 CB259 43

제 4 장 맺 음 말 56

제 5 장 부 록 57

제 1 절 ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR data 57

제 2 절 HRMS data of CB259 and Re-CB259 73

참고문헌 74

Abstract 78

표 목차

[표 1] Re-CB259 (Re-1) 반응 테스트 45

[표 2] Partition coefficient (LogD value) 53

[표 3] Affinities (K_i, nM) for TSPO on Membrane Extracts of C6 Glioma 55

그림 목차

[그림 1] Translocator protein (TSPO) and the hallmarks of cancer 11

[그림 2] Structure CB256, CB258 (1'), CB259 (1) 15

[그림 3] Reaction test of CB258 40

[그림 4] Stability test of Re-CB258 42

[그림 5] Calibration curve of CB259, Re-CB259 45

[그림 6] Optimization of HPLC condition of CB259 and Re-CB259 47

[그림 7] $[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ 합성 Radio-TLC Profile 48

[그림 8] ^{99m}Tc-CB259 합성 Radio-TLC 49

[그림 9] HPLC profile of ^{99m}Tc-CB259 (^{99m}Tc-1) and Re-CB259 (Re-1) 51

[그림 10] Re-CB259 (Re-1)의 PBS buffer에서의 안정성 실험 53

[그림 11] 사람 혈청에서 ^{99m}Tc-CB259(^{99m}Tc-1)의 안정성 실험 54

Scheme 목차

[Scheme 1] Synthesis of CB259 23

[Scheme 2] Synthesis of CB258 29

[Scheme 3] Synthesis of NCS-CB86 34

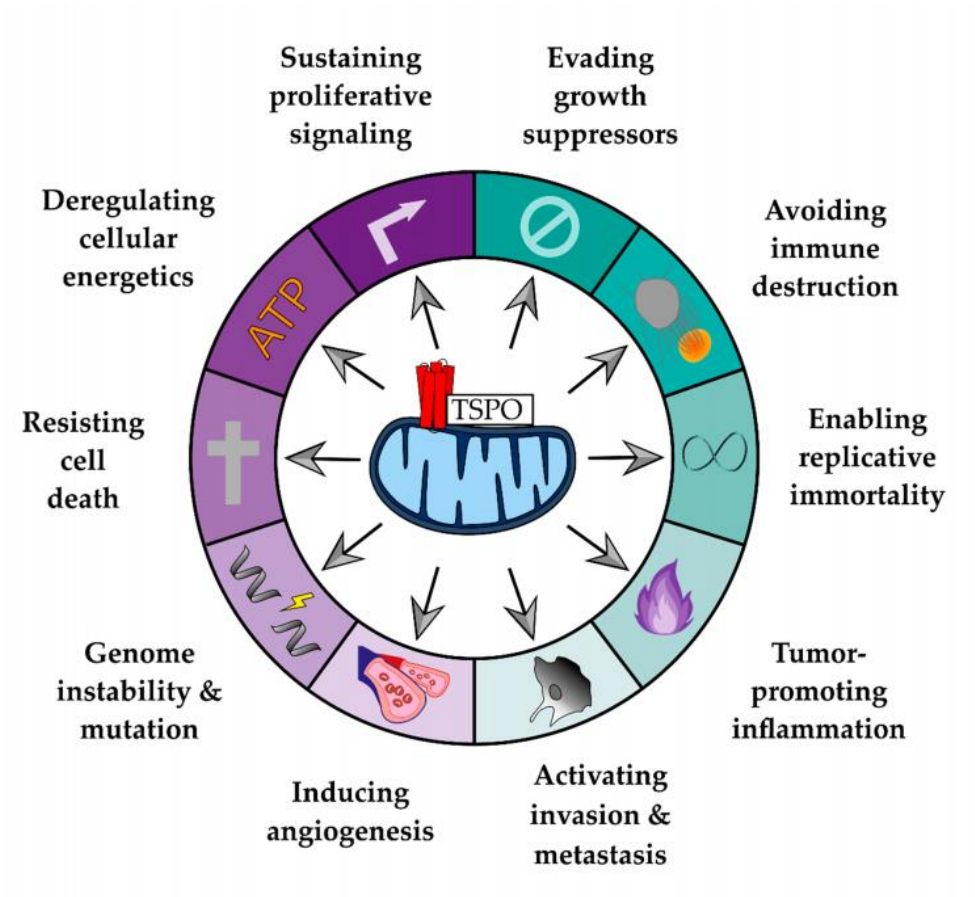
제 1 장 서 론

제 1 절 전이체 단백질 18 kDa (TSPO)

전이체 단백질 18 kDa (TSPO) [1-7]은 미토콘드리아의 외막에 위치하는 막 단백질로 169개의 아미노산으로 이루어져 있으며 5개의 transmembrane helix 로 이루어져 있다[16]. 미토콘드리아 단백질인 TSPO는 다양한 리간드들과 결합하여 다양한 분자 생물학적 기작에 관여한다. 초기에 TSPO는 콜레스테롤, protoporphyrin IX 그리고 다른 tetrapyrrole 등의 수송체로 알려져 있었다 [17-19]. TSPO는 Ca^{2+}, ATP 그리고 cytochrome c 등을 조절하는 역할을 수행한다. TSPO는 respiration, photosynthesis, tetrapyrrole metabolism, 그리고 programmed cell death 등 생명에 필요한 기능들을 담당한다. 계속적인 연구로 현재 TSPO는 apoptosis, gene expression, reactive oxygen species (ROS) generation, ATP 생산, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$) 조절, heme synthesis, mitochondrial cholesterol 수송, neuro steroid synthesis, glutamate metabolism, cell proliferation, cell adhesion, cell migration 그리고 cell differentiation 과 같은 다양한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 [17,18,20-23].

즉, TSPO는 핵과 미토콘드리아 signaling pathway에 관여하여 nuclear gene expression을 조절함으로써 세포 증식, 세포 생존성, 스테로이드성 형성, 면역 반응 등과 관련이 있다 [그림 1]. 특히

TSPO는 뇌, 유방, 대장, 전립선, 난소암 등 다양한 암세포나 astrocytomas, hepatocellular에 과다 발현되는 것으로 보고되었으며 proliferation, tumorigenicity 등 암 세포의 생장과 연관이 깊다고 보고가 되었다 [10]. 따라서 TSPO는 TSPO가 풍부한 암의 영상 및 치료에 매력적인 대상이 될 수 있다.



[그림 1] Translocator protein (TSPO) and the hallmarks of cancer [3].

제 2 절 테라노스틱 특징과 장점

Theranostic 은 치료의 의미인 'Therapy'와 진단의 의미인 'Diagnostic'이 합쳐진 용어로 하나의 리간드로 진단 및 치료가 가능하다는 의미를 가진다. 즉 기본적으로 동일한 특정 분자 표적에 관련된 진단 및 치료 도구의 결합으로, 보다 정확한 환자 선택, 치료 반응 및 조직 독성 예측, 반응 평가를 더 나은 결과를 목표로 한다. 동일한 세포 구조와 생물학적 과정에 접근하는 진단 및 치료용 방사선 의약품(즉, 동일한 타겟을 공유하는 의약품)을 theranostic pair라고 한다.

핵의학, 특히 종양학에서의 적용과 관련하여, 테라노시스는 현재 임상 및 연구 시나리오에서 가장 큰 이론 개념의 구성 요소 중 하나이다. 핵의학과 핵테라노스틱스(nuclearanostics)는 세포표면수용체나 막전달체 등의 특정 질병대상의 발현을 통해 생물학적 현상을 영상화하고, 이러한 정보를 발현하는 조직에 전리방사선을 전달하기 위해 특별히 설계된 물질을 사용하는 것을 말한다

Matched pair isotopes 인 테크네슘-99m 과 레늄-188 은 그 물리화학적 성질이 유사하기 때문에 하나의 리간드에 필요에 따라 진단을 위한 동위원소인 테크네슘-99m 과 치료를 위한 동위원소인 레늄-188이 사용될 수 있어 Theranostic 전략을 위해 널리 사용되고 있다.

제 3 절 기존 화합물의 특징과 한계점

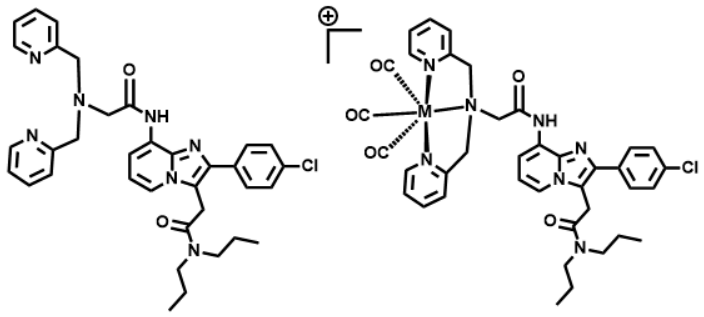
이러한 Theranostic 전략을 바탕으로 테크네슘-99m 과 레늄-188이 표지 가능한 TSPO 리간드인 CB256이 보고되었다 [8]. [그림 2-(a)]에서 알 수 있듯이, CB256은 positive net charge로 이루어진 포켓 부분 (metal chelation part)이 TSPO 리간드와 amide bond로 연결 되어있다. 기존 연구에서 CB256의 기준 화합물인 Re-CB256은 rat의 C6 glioma cell에 대하여 150nM 수준의 결합친화도를 가지는 것을 확인하였으며, 테크네슘-99m 이 표지 된 ^{99m}Tc-CB256의 경우에도 세포 섭취능 평가에서 유의미한 결과를 나타내었다 [9]. 그 후 in vivo 종양 마우스 모델에서 영상을 얻고자 하였으나 in vivo에서는 유감스럽게도 유의미한 데이터는 얻지 못하였다.

제 4 절 연구의 목적

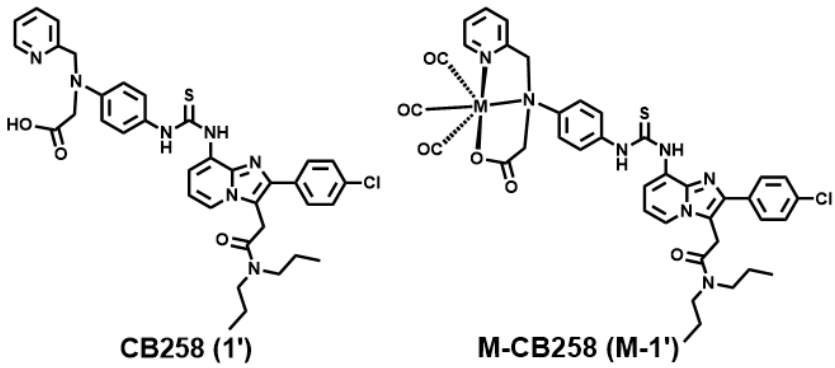
영상을 획득하지 못한 첫 번째 원인으로 고려된 것은 non-specific binding 이 가능한 포켓 부분의 positive net charge 때문이라 사료되었고, 두 번째는 free rotation이 가능한 amide bond의 linker 부분으로 인한 TSPO binding site와의 steric hinderance 때문이라 사료되었다.

따라서 본 연구에서는 1) [그림 2-(b), (c)]에서처럼 neutral net charge를 통한 non-specific binding을 줄이고 passive diffusion으로 인한 세포 섭취능을 증가시키고자 하였으며, 2) linker 부분에 rigid한 aryl thio-urea conjugation을 도입함으로써 화합물의 안정성을 높이는 동시에 TSPO의 binding site인 imidazopyridine과 포켓 부분의 steric hinderance를 줄이고 화합물의 결합 친화도를 높이고자 한다.

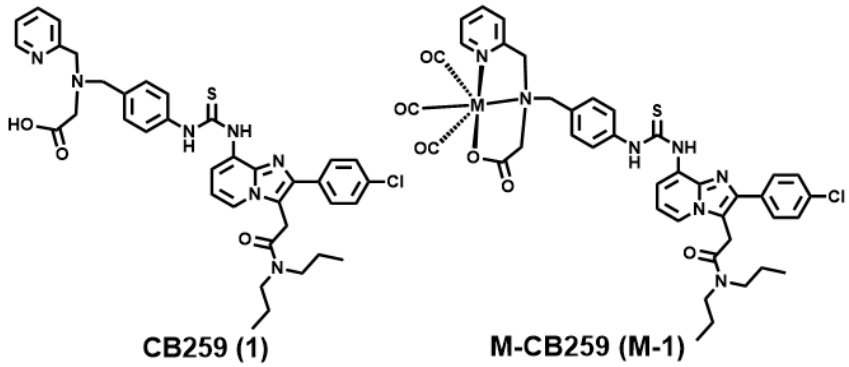
최종적으로 본 연구에서 제시된 화합물 구조는 [그림 2-(b)]처럼 포켓 부분과 linker 사이에 탄소 결합이 없는 구조 (CB258, 1')와 [그림 2-(c)]처럼 포켓 부분과 linker 사이에 탄소결합이 하나인 구조 (CB259, 1)로 디자인되었다.



(a)



(b)



(c)

[그림 2] Structure of CB256, CB258 (1'), CB259 (1); M = Re or ^{99m}Tc: (a) CB256, M-CB256, ref 8; (b) CB258, M-CB258; (c) CB259, M-CB259.

제 2 장 실험 재료와 방법

Commercial reagents와 solvents는 추가적인 정제과정을 거치지 않고 실험에 사용되었다. 모든 reagents와 solvents는 Sigma-aldrich와 TCI에서 구매하였다. ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra는 ambient temperature에서 Varian 400-MR (400 MHz) spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 통해 측정되었다. Chemical shifts는 parts per million (ppm, δ units)으로 기술되었다. Electrospray mass spectrometry (ESI-MS)는 LC/MS spectrometer (Agilent 6130 Series, Agilent Technologies)를 사용하여 측정되었다. HPLC는 Thermo Separation Products System (Fremont, CA, USA)을 사용하였으며 semi-preparative column (Waters, Xterra RP-C18, 10 μm, 10 ˆ 250 mm)과 UV detector (wavelength set at 254 nm), γ-ray detector (Bioscan, Poway, CA, USA)을 이용하여 측정된 데이터를 기술하였다. HPLC 정제에 사용된 용매는 HPLC-grade solvents (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)를 membrane filtering (Whatman, Maidstone, UK, 0.22 μm) 후 사용되었고, TLC는 Merck F254 silica plates를 사용하였으며 radio-TLC는 Bioscan radio-TLC scanner (Washington, DC, USA)를 이용하여 분석되었다. 모든 radio activities는 Veenstra Instruments (Joure, The Netherlands)사의 VDC-505 activity calibrator를 사용하여 측정되었다. In vitro incubation는 block heater (Digi-Block Laboratory Device Inc. Holliston, MA, USA)를 사용하여 37 ºC에서 수행되었다. $Na^{99m}TcO_4$는 ^{99}Mo/^{99m}Tc generators (Samyoung Unitech, Seoul, Korea)로부터

당일 용출하여 사용하였으며, organometallic precursor인 $(NEt_4)_2[ReBr_3(CO)_3]$와 radioactive precursor $[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ 는 기존에 보고된 방식으로 합성되었다 [11-13].

제 1 절 Synthesis of CB259

CB259의 합성 과정은 아래 [Scheme 1]의 과정을 따라 이루어 졌으며 자세한 합성 과정 및 내용은 아래에 기술하였다.

tert-butyl 2-((pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (3)

2-picolylamine **2** (1.0 g. 9.3 mmol)와 K_2CO_3 (3.8 g, 27.3 mmol)가 녹아 있는 N,N-dimethylformamide (DMF, 40 mL) 용매를 상온에서 30 분 동안 교반 시켜준다. DMF (5 ml)에 녹여 진 tert-butyl 2-bromoacetate (1.8 g, 9.3 mmol) 를 천천히 반응 용매에 떨어뜨려 주고 상온에서 4 시간 동안 교반 시킨다. 4 시간 후, 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. 이 후, dichloromethane (20 mL) 과 water (20 mL)를 사용하여 유기층을 3번 추출해 준다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산 나트륨으로 물을 제거 한 후 silica gel column chromatography [ethyl acetate : hexane = 1 : 1 (v/v), contains 1% of triethylamine, as eluent] 를 통해 분리 정제하여 연한 노랑색의 고체 형태 (1.5 g, 70%) 인 tert-butyl 2-((pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (**3**)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 1.40 (s, 9H), 3.25 (s, 2H), 3.79 (s, 2H), 7.23 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.73 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 8.48 (d, J = 7.2 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 171.2, 159.7, 148.7, 136.4, 121.8, 121.7, 80.0, 53.7, 50.5, 27.7; MS (ESI) *m/z* 222.14 $(M-H)^+$

tert-butyl 2-((4-nitrobenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (4)

3번 화합물 (1.0 g. 4.5 mmol)와 K_2CO_3 (1.8 g, 13.5 mmol)가 녹아 있는 N,N-dimethylformamide (DMF, 40 mL) 용매를 상온에서 30 분 동안 교반 시켜준다. DMF (5 ml)에 녹여 진 4-nitrobenzylbromide (1.4 g, 6.7 mmol) 를 천천히 반응 용매에 떨어뜨려 주고 상온에서 24 시간 동안 교반 시킨다. 24 시간 후, 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. 이 후, dichloromethane (20 mL) 과 water (20 mL) 를 사용하여 유기층을 3번 추출해준다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산 나트륨으로 물을 제거 한 후 silica gel column chromatography [ethyl acetate : dichloromethane = 1: 10 (v/v) as eluent]를 통해 분리 정제하여 흰색의 고체 형태 (1.2 g, 72%) 인 tert-butyl 2-((4-nitrobenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (**4**)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 1.41 (s, 9H), 3.27 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 7.25 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.76 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.48 (d, J = 7.6 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 169.8, 158.6, 148.8, 147.3, 146.6, 136.6, 129.5, 123.3, 122.7, 122.2, 80.4, 59.0, 56.6, 54.9, 27.8; MS (ESI) *m/z* 357.17 $(M-H)^+$

tert-butyl 2-((4-aminobenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (5)

4번 화합물(1 g, 0.7 mmol) 이 녹아져 있는 10% water/methanol (10 mL)에 ammonium chloride (338 mg, 1.6 mmol)와 activated zinc (7.34 g, 28 mmol) 를 함께 넣어준 뒤 온도 40 ºC에서 4 시간 동안 교반 시켜준다. 반응 후 용매는 dichloromethane을 사용하여 celite 필터를 진행하고 필터 후 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. 이 후, dichloromethane (20

mL) 과 water (20 mL) 를 사용하여 유기층을 3번 추출해준다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산 나트륨으로 물을 제거 한 후, silica gel column chromatography [ethyl acetate : dichloromethane = 1 : 4 (v/v) as eluent]를 통해 분리 정제하여 흰색 고체 형태 (890 mg, 97%)인 tert-butyl 2-((4-aminobenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (**5**) 를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 1.41 (s, 9H), 3.14 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.82 (s, 2H), 4.96 (s, 2H), 6.50 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.24 (t, *J* = 6 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.77 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.47 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 170.1, 159.4, 148.6, 147.7, 136.6, 129.6, 129.5, 128.1, 124.9, 122.4, 122.0, 113.7, 113.6, 80.1, 58.6, 56.7, 54.1, 27.8; MS (ESI) *m/z* 327.19 $(M-H)^{+}$

tert-butyl2-((4-(3-(2-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)thioureido)benzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (6)

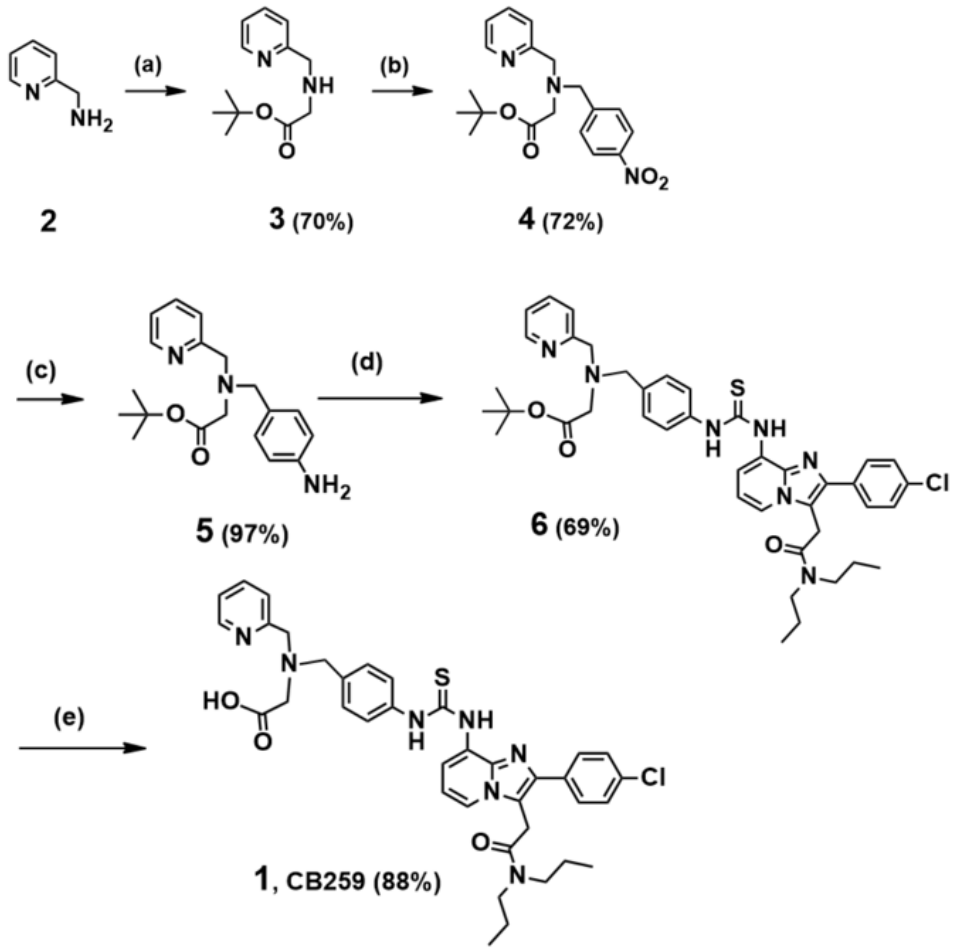
5번 화합물(92 mg, 0.3 mmol) 이 녹여져 있는 N,N-dimethylformamide (DMF, 10 mL)에 **8번 화합물**(80 mg, 0.2 mmol)을 첨가하여, 65 °C에서 TLC로 반응물이 전부 사라져 반응이 완결 될 때 까지 교반 시켜준다. indicated the reaction was complete. 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축시킨다. 이 후, dichloromethane (20 mL) 과 0.1 N HCl (20 mL)를 사용하여 유기층을 3번 추출해준다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산 나트륨으로 물을 제거 한 후 silica gel column chromatography [ethyl acetate : dichloromethane = 1: 3 (v/v) as eluent] 를 통해 분리 정제하여 흰색의 고체 형태(100 mg, 69%)인 tert-butyl 2-((4-(3-(2-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dipropylamino)-2-

oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-8yl)thioureido)benzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (**6**)을 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 0.81 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.49 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.59 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.22 (s, 2H), 3.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.76 (s, 2H), 3.88 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 6.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.51-7.57 (m, 5H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.78 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 9.8 (s, 1H), 10.7 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 178.3, 169.9, 167.3, 159.1, 148.7, 140.1, 139.0, 137.7, 136.5, 135.4, 133.0, 132.3, 129.4, 128.8, 128.5, 127.6, 123.7, 122.5, 122.1, 119.9, 117.8, 112.7, 111.7, 80.3, 58.9, 56.5, 54.4, 48.9, 47.0, 28.9, 27.8, 21.6, 20.4, 11.1, 10.9; MS (ESI) *m/z* 753.32 $(M-H)^{+}$

2-((4-(3-(2-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)thioureido)benzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetic acid (1, CB259)

6번 화합물(50 mg, 0.07 mmol)을 2 mL의 trifluoroacetic acid (TFA) : dichloromethane =1 : 1 (v/v) 용매 하에서 상온에서 1.5 시간동안 교반 시켜 준다. TLC로 반응의 완결을 확인 한 후, dichloromethane을 추가로 더 넣고 반응을 완결 시킨다. 감압 증발기를 사용하여 유기용매를 제거하고 dichloromethane과 ether를 사용하여 재결정화한다. 고체 층은 HPLC system (Waters, Xterra Semi-preparative C18 column, 10 x 250 mm, 10 μm; 50% water/acetonitrile with 0.1% formic acid, 254 nm, flow rate: 3.0 mL min^{-1})을 사용하여 정제한다. **1번 화합물**은 머무름 시간 12분에서 분리되었으며 동결 건조 후, 흰색 고체로 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 0.81 (t, *J* = 7.2 Hz,

3H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.49 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.59 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.93 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 6.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.28 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.80 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 9.90 (s, 1H), 10.79 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 178.3, 172.0, 167.3, 158.7, 148.5, 140.0, 139.0, 137.8, 136.9, 135.1, 133.0, 132.3, 129.4, 128.9, 128.5, 127.6, 123.7, 122.7, 122.3, 119.9, 117.8, 112.9, 111.7, 104.5, 58.5, 56.6, 53.5, 48.9, 47.0, 28.9, 21.6, 20.4, 11.1, 10.9; HRMS (ESI) m/z ;Re calcd: 698.26; found: 698.2675.



Scheme 1. Synthesis of CB259; Reagent and conditions: (a) tert-butyl 2-bromoacetate, K_2CO_3, DMF, r.t., 4 h. (b) 4-nitrobenzylbromide, K_2CO_3, DMF, r.t., 24 h. (c) zinc, ammonium chloride, 10% water/methanol, 40 °C, 4 h. (d) **12**, DMF, 65 °C, 2 h. (e) TFA : dichloromethane = 1 : 1, r.t., 1.5 h.

제 2 절 Synthesis of CB258

CB258의 합성과정은 아래 [Scheme 2]의 과정을 따라 이루어졌으며 자세한 과정 및 결과는 아래에 기술하였다.

4-nitro-N-(pyridin-2-ylmethyl)aniline (3')

2'번 화합물(1.0 g. 5.8 mmol)와 K_2CO_3 (3.2 g, 23.3 mmol)가 녹아 있는 N,N-dimethylformamide (DMF, 30 mL) 용매를 상온에서 30 분 동안 교반 시켜준다. DMF (5 ml)에 녹여 진 4-nitroaniline (0.8 g, 5.8 mmol)를 천천히 반응 용매에 떨어뜨려 주고 상온에서 6 시간 동안 교반 시킨다. 6 시간 후, 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. 이 후, dichloromethane (20 mL) 과 water (20 mL)를 사용하여 유기층을 3번 추출해준다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산 나트륨으로 물을 제거 한 후 silica gel column chromatography [ethyl acetate : dichloromethane = 1 : 7 (v/v), as eluent] 를 통해 분리 정제하여 연한 노랑색의 고체 형태 (770 mg, 58%) 인 4-nitro-N-(pyridin-2-ylmethyl)aniline (**3'**)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 4.51 (d, *J* = 6 Hz, 2H), 6.69 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.29 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.77 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.88 (t, *J* = 6 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.54 (d, *J* = 4 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.9, 154.3, 149.1, 136.9, 136.0, 126.1, 122.4, 121.3, 47.8; MS (ESI) *m/z* 229.09 $(M-H)^+$

tert-butyl N-(4-nitrophenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycinate (4')

3'번 화합물 (600 mg. 2.6 mmol)와 K_2CO_3 (1.1 g, 7.9 mmol)가 녹아 있는 N,N-dimethylformamide (DMF, 15 mL) 용매를 상온에서 30 분 동안 교반 시켜준다. DMF (5 ml)에 녹여 진 tert-butyl 2-bromoacetate (554 mg, 5.3 mmol)를 천천히 반응 용매에 떨어뜨려 주고 60 °C에서 16 시간 동안 교반 시킨다. 16시간 후, 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. 이 후, dichloromethane (20 mL) 과 water (20 mL)를 사용하여 유기층을 3번 추출해준다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산 나트륨으로 물을 제거 한 후 silica gel column chromatography [ethyl acetate : hexane = 1: 8 (v/v) as eluent]를 통해 분리 정제하여 황색의 고체 형태 (710 mg, 78%) 인 tert-butyl N-(4-nitrophenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycinate (**4'**)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.18 (s, 2H), 4.79 (s, 2H), 6.62 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 7.22 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.65 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 8.60 (d, J = 7.6 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 168.4, 156.8, 153.1, 149.9, 138.5, 137.0, 126.0, 122.6, 120.9, 111.3, 82.7, 58.6, 54.4, 28.0; MS (ESI) *m/z* 343.15 $(M-H)^+$

tert-butyl N-(4-aminophenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycinate (5')

4'번 화합물(300 mg, 0.9 mmol) 이 녹아져 있는 10% water/methanol (10 mL)에 ammonium chloride (105 mg, 1.9 mmol)와 activated zinc (2.3 g, 34.9 mmol)를 함께 넣어준 뒤 온도 40 °C에서 4 시간 동안 교반 시켜준다. 반응 후 용매는 dichloromethane을 사용하여 celite 필터를 진행하고 필터 후 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. 이 후, dichloromethane

(20 mL) 과 water (20 mL) 를 사용하여 유기층을 3번 추출해준다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산 나트륨으로 물을 제거 한 후, silica gel column chromatography [ethyl acetate : dichloromethane = 1 : 3 (v/v) as eluent]를 통해 분리 정제하여 흰색 고체 형태 (300 mg, 91%)인 tert-butyl N-(4-aminophenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycinate (**5'**) 를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 1.38 (s, 9H), 4.04 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 6.34 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.42 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.21 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.69 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 170.5, 159.9, 148.9, 139.7, 139.5, 136.5, 121.8, 121.2, 115.2, 113.9, 80.3, 58.2, 54.8, 27.7; MS (ESI) *m/z* 313.18 $(M-H)^{+}$

tert-butylN-(4-(3-(2-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-8yl)thioureido)phenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycinate (6')

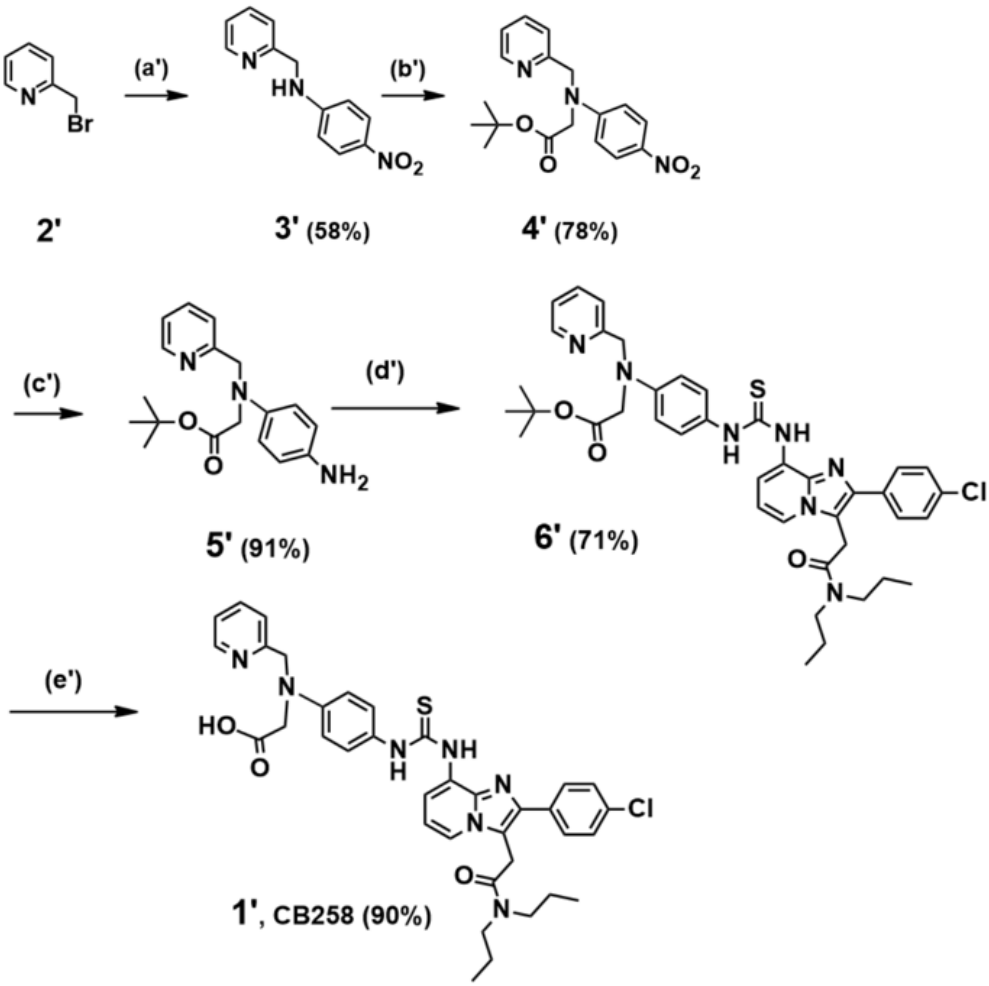
5'번 화합물(88 mg, 0.3 mmol) 이 녹여져 있는 N,N-dimethylformamide (DMF, 10 mL)에 **8번 화합물**(80 mg, 0.2 mmol)을 첨가하여, 65 °C에서 TLC로 반응물이 전부 사라져 반응이 완결 될 때 까지 교반 시켜준다. indicated the reaction was complete. 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. 이 후, dichloromethane (20 mL) 과 0.1 N HCl (20 mL)를 사용하여 유기층을 3번 추출해준다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산 나트륨으로 물을 제거 한 후 silica gel column chromatography [ethyl acetate : dichloromethane = 1: 6 (v/v) as eluent] 를 통해 분리 정제하여 흰색의 고체 형태(98 mg, 71%)인 tert-butyl N-(4-(3-(2-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dipropylamino)-2-

oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)thioureido)phenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycinate (**6'**)을 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 0.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.85 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.49 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.59 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.34 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.23 (s, 2H), 4.26 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 6.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.24-7.26 (m, 3H), 7.40 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.65-7.71 (m, 3H), 7.94 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.54 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 9.65 (s, 1H), 10.47 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 169.9, 167.3, 158.9, 149.1, 139.9, 138.8, 136.7, 133.0, 132.2, 129.3, 128.5, 127.8, 125.9, 122.1, 121.1, 119.4, 117.8, 111.9, 111.7, 80.8, 57.6, 54.0, 48.9, 47.0, 28.9, 27.7, 21.6, 20.4, 11.1, 10.9; MS (ESI) *m/z* 739.31 $(M-H)^{+}$

N-(4-(3-(2-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)thioureido)phenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycine (1', CB258)

6'번 화합물(50 mg, 0.07 mmol)을 2 mL의 trifluoroacetic acid (TFA) : dichloromethane =1 : 1 (v/v) 용매 하에서 상온에서 1.5 시간동안 교반 시켜 준다. TLC로 반응의 완결을 확인 한 후, dichloromethane을 추가로 더 넣고 반응을 완결 시킨다. 감압 증발기를 사용하여 유기용매를 제거하고 dichloromethane과 ether를 사용하여 재결정화한다. 고체 층은 HPLC system (Waters, Xterra Semi-preparative C18 column, 10 x 250 mm, 10 μm; 45% water/acetonitrile with 0.1% formic acid, 254 nm, flow rate: 3.0 mL min-1)을 사용하여 정제한다. **1번 화합물**은 머무름 시간 10 분에서 분리되었으며 동결 건조 후, 황색 고체로 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 0.81 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.49 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.59 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.24

(t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.37 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 4.02 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 6.96 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.35 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.87 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.41 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.54 (d, J = 4 Hz, 1H), 9.91 (s, 1H), 10.8 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 178.8, 172.0, 167.7, 158.0, 148.4, 140.3, 139.4, 138.5, 138.2, 133.3, 129.9, 129.7, 129.0, 128.0, 123.9, 123.7, 123.2, 120.5, 118.3, 112.3, 58.5, 56.4, 54.3, 49.1, 47.4, 27.9, 22.1, 20.9, 11.6, 11.4; MS (ESI) *m/z* 683.24 $(M-H)^+$



Scheme 2. Synthesis of CB258; Reagent and conditions: (a') 4-nitroaniline, K_2CO_3, DMF, r.t., 6 h. (b') tert-butyl 2-bromoacetate, K_2CO_3, DMF, 60 °C, 16 h. (c') zinc, ammonium chloride, 10% water/methanol, 40 °C, 4 h. (d') **12**, DMF, 65 °C, 3 h. (e') TFA : dichloromethane = 1 : 1, r.t., 1.5 h.

제 3 절 Synthesis of NCS-CB86

TSPO binding ligand 인 NCS-CB86은 [Scheme 3]의 과정을 통하여 합성 및 분리 정제 되었다.

4-(4-chlorophenyl)-4-oxo-*N,N*-dipropylbutanamide (8)

1,1'-carbonyldimidazole (CDI, 7.0 g, 42.9 mmol)과 3-(4-chlorobenzoyl)propionic acid (8.3 g, 38.9 mmol)가 녹아있는 *N,N*-dimethylformamide (40 mL)을 상온에서 30분 동안 교반 시켜준다. 그 후 반응 용매에 *N,N*-dipropylamine (6.2 mL, 44.7 mmol)과 triethylamine (6.8 mL, 48.9 mmol)을 넣어주고 상온에서 8시간 동안 교반 한다. 반응 후 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. 이 후 ethyl acetate (EtOAc)와 0.5 N HCl 수용액 (30 mL, v/v = 1:1)를 첨가하고 유기층을 추출한다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 silica gel column chromatography (5% ethyl acetate-dichloromethane)를 이용해 분리 정제하여 갈색의 액체 형태 (9.7 g, 85%)로 4-(4-chlorophenyl)-4-oxo-*N,N*-dipropylbutanamide (**8**)을 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 0.88 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.99 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 1.55 (sx, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.72 (sx, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.24-3.42 (m, 4H), 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 11.5, 21.1, 22.3, 27.3, 34.0, 48.0, 49.8, 129.0, 129.7, 135.4, 139.6, 171.3, 198.4; MS (ESI) *m/z* 296.1 $(M+H)^+$.

3-bromo-4-(4-chlorophenyl)-4-oxo-*N,N*-dipropylbutanamide (9)

8번 화합물 (3.7 g, 12.5 mmol)가 녹여져 있는 chloroform (30 mL)에 chloroform (1 mL)에 희석된 bromine (0.8 mL, 15 mmol)을 천천히 첨가한다. 혼합물은 50 °C 에서 1.5 시간 동안 교반 후 상온으로 식힌다. chloroform 과 sodium thiosulfate 포화수용액 (30 mL, v/v = 1:1)을 첨가하여 유기층을 추출한다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 silica gel column chromatography (5% ethyl acetate-dichloromethane)를 이용해 분리 정제하여 갈색의 용액 형태(4 g, 83%)인 3-bromo-4-(4-chlorophenyl)-4-oxo-*N,N*-dipropylbutanamide (**9**)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 0.83 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.99 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 1.44-1.78 (m, 4H), 3.04 (dd, J = 4.8, 16.0 Hz, 1H), 3.10-3.34 (m, 4H), 3.57 (dd, J = 10.0, 16.0 Hz, 1H), 5.60 (dd, J = 3.6, 10.0 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 11.4, 21.0, 22.2, 38.5, 40.7, 47.6, 49.7, 129.2, 130.5, 132.8, 140.2, 169.3, 192.2; MS (ESI) *m/z* 374.1 $(M+H)^+$.

2-(2-(4-chlorophenyl)-8-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N,N*-dipropylacetamide (10)

9번 화합물 (4.0 g, 10.7 mmol)이 녹여져 있는 *N,N*-dimethylformamide (30 mL)에 2-amino-3-nitro-pyridine (1.9 g, 13.9 mmol)을 첨가하여 150 °C에서 16 시간 동안 교반 시킨다. 반응 용매는 감압 증발기를 통해 제거하여 농축 시킨 후, silica gel column chromatography (20% ethyl acetate-dichloromethane)를 이용해 분리정제하여 황색 고체(0.5 g, 12 %)인 2-(2-(4-chlorophenyl)-8-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N,N*-dipropylacetamide (**10**)를 얻었다. M.p., 20

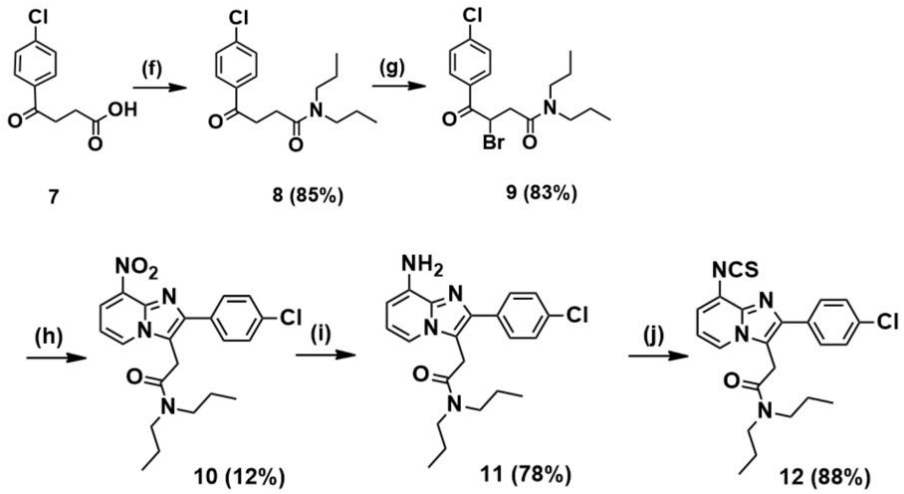
4-206 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 0.81 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.89 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 1.50 (sx, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.62 (sx, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.25 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.34 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.17 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.32 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.69 (d, J = 6.8 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 11.0, 11.2, 20.5, 21.7, 28.8, 47.1, 49.0, 110.0, 118.9, 123.8, 128.8, 129.7, 131.6, 132.4, 133.0, 136.3, 136.4, 143.1, 167.1; MS (ESI) *m/z* 415.2 $(M+H)^+$.

2-(8-amino-2-(4-chlorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N,N*-dipropylacetamide (11, CB86)

10번 화합물(110 mg, 0.27 mmol) 이 녹아져 있는 10% water/methanol (10 mL)에 ammonium chloride (32 mg, 0.60 mmol)와 activated zinc (706 mg, 10.8 mmol)를 함께 넣어준 뒤 온도 40 ºC에서 5 시간 동안 교반 시켜준다. 반응 후 상온으로 식혀주고 용매는 dichloromethane (10 mL)을 사용하여 celite 필터를 진행하고 필터 후 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. Silica gel column chromatography (40% ethyl acetate-dichloromethane)를 통해 분리 정제하여 흰색 고체 형태 (81 mg, 78 %)인 2-(8-amino-2-(4-chlorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N,N*-dipropylacetamid (**11**) 를 얻었다. M.p., 95-97 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 0.80 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.83 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 1.48 (sx, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.56 (sx, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.23 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.32 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 4.13 (s, 2H), 5.63 (s, 2H), 6.29 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.67 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 8.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 11.0, 11.2, 20.5, 21.7, 29.3, 47.0, 48.9, 100.2, 112.5, 113.4, 116.7, 128.4, 129.3, 131.8, 133.9, 137.0, 138.2, 139.6, 167.5; MS (ESI) *m/z* 385.2 $(M+H)^+$.

2-(2-(4-chlorophenyl)-8-isothiocyanatoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (12)

11번 화합물 (CB86) (200 mg, 0.5 mmol)을 무수 CH_2Cl_2 (10 mL)에 녹여준 후, O,O-Di(pyridin-2-yl) carbonothioate (151 mg, 0.65 mmol)를 첨가하여 상온에서 교반 시켜준다. 20 시간 동안 교반 시켜준 후 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. Silica gel column chromatography [ethyl acetate : dichloromethane = 1: 6 (v/v) as eluent]을 사용하여 분리 정제 후 흰색 고체 형태(195 mg, 78%)인 2-(2-(4-chlorophenyl)-8-isothiocyanatoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (**12**)을 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 0.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.49 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.60 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.23 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.27 (s, 2H), 6.95 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.25 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ 167.6, 141.9, 141.7, 140.8, 133.2, 133.0, 129.8, 129.1, 125.2, 119.8, 119.7, 119.4, 111.8, 49.4, 47.4, 29.4, 22.1, 20.9, 11.6, 11.4; MS (ESI) *m/z* 426.13 $(M-H)^+$



Scheme 3. Synthesis of NCS-CB86; Reagent and condition: (f) N,N'-dipropylamine, CDI, Et3N, DMF, 25 °C, 8 h. (g) Br_2, $CHCl_3$, 50 °C, 1.5 h. (h) 2-amino-3-nitro-pyridine, DMF, 150 °C, 18 h. (i) zinc, ammonium chloride, 10% water/methanol, 40 °C, 5 h. (j) Di-2-pyridyl thionocarbonate, dichloromethane, r.t., 16 h.

제 4 절 Synthesis of Re-CB259, ^{99m}Tc-CB259

Re-CB259 (Re-1)

1번 화합물 (10 mg, 14.3 μmol)을 N,N-dimethylformamide (DMF, 300 μL) 에 녹여주고 $(NEt_4)_2[ReBr_3(CO)_3]$ (10.5 mg, 14.3 μmol)을 넣고 65 °C에서 1 시간 동안 교반 시켜준다. 반응 후 상온으로 식혀준 후, 감압 증발기를 사용하여 반응 용매를 제거하고 농축 시킨다. 유기물은 HPLC system (Waters, Xterra Semi-preparative C18 column, 10 x 250 mm, 10 μm; 60% acetonitrile-water, 254 nm, flow rate: 3.0 mL min^{-1})을 사용하여 정제한다. **Re-1 화합물**은 머무름 시간 20 분에서 분리되었으며 동결 건조 후, 흰색 고체로 얻었다. 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 0.81 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.86 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.50 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.60 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 2.92 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 3.24 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 4.20-4.30 (m, 2H, 1H), 4.56 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.75 (d, J = 12 Hz, 1H), 4.87 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 6.98 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.55-7.58 (m, 2H, 1H), 7.68-7.71 (m, 2H, 1H), 7.73 – 7.76 (m, 2H, 1H), 8.02 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.10 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.78 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 10.0 (s, 1H), 10.9 (s, 1H); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ 198.5, 179.3, 168.2, 160.2, 152.8, 141.3, 138.3, 136.8, 133.2, 131.8, 130.5, 129.5, 128.4, 126.7, 125.0, 123.7, 119.0, 114.0, 111.2, 72.0, 68.3, 61.5, 49.8, 47.9, 29.8, 22.6, 21.4, 11.9; HRMS (ESI) m/z ;Re calcd: 968.19; found: 968

^{99m}Tc-CB259 (^{99m}Tc-1)

전구체에 표지하기 위해 우선 제너레이터에서 용출된 pertechnetate를 reduction하는 과정을 진행하였다. 우선 capping 된 바이알에 borane-ammonia complex (5 mg, 0.16 mmol)을 넣어준 후, CO gas를 상온에서 10분 동안 charging 시켜준다. 식염수에 녹아져 있는 $Na^{99m}TcO_4$에 phosphoric acid (6 μL, 31 μmol)을 첨가해준 후 charging 시킨 바이알에 넣어준다. 80 °C에서 20 분동안 반응을 진행시키고 상온으로 식혀준 후, PBS buffer(x10) 20 μL로 pH를 중성으로 적정 해준다.

식염수에 녹여져 있는 합성 된 $[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ (150 μL, approximately 37 MBq) 을 **1번 화합물** (0.5 mg, 0.7 μmol)이 녹여져 있는 N,N-dimethylformamide (DMF, 300 μL)에 넣어준 후, 70 °C에서 30 분 동안 교반 시킨다. 반응 후 상온으로 식혀준 후, 20 mL 증류수로 dilution 시켜준다. 이를 tC18 Sep-Pak cartridge에 로딩 시키고, 8 mL 증류수로 washing 해준다. 최종적으로는 1 mL의 acetonitrile로 용출 시킨다. 1차 정제 후 용출액은 semi-preparative HPLC system을 사용하여 정제한다. Radiochemically pure한 **^{99m}Tc-1**는 머무름 시간 17 분에서 분리되었으며, homemade 된 $[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$으로부터 방사화학적 수율을 계산해본 결과, 27.5% (non-decay-corrected)의 수율을 가지고 합성이 확인 되었다. 얻어진 **^{99m}Tc-1**은 충분한 양의 증류수를 사용하여 tC18 Sep-Pak cartridge에 로딩되었으며 증류수 (5 mL)로 washing 되었다. 그 후 ethanol (1.5 mL)을 사용하여 용출되었으며 10% ethanol-saline의 용매를 사용하여 추후 in vitro실험에 사용되었다.

제 5 절 Log D Determination

Log D value는 시험관에 **^{99m}Tc-1** 과 5% ethanol-saline (10 μL, approximately 0.74 MBq), sodium phosphate buffer (0.15 M, pH 7.4, 5 mL) 와 n-octanol (5 mL) 을 혼합시킨 용액으로 측정되었다. 혼합물을 1 분동안 vortexing 한 후, 각각의 시험관을 상온에서 3분 정도 두어 phase를 분리한다. 각각 phase (100 μL)에서 얻은 샘플로 radioactivity를 측정한다. Log D는 n-octanol의 계수 대 sodium phosphate buffer의 계수 비율의 로그로 표현된다.

제 6 절 In Vitro Cell-Binding Assays

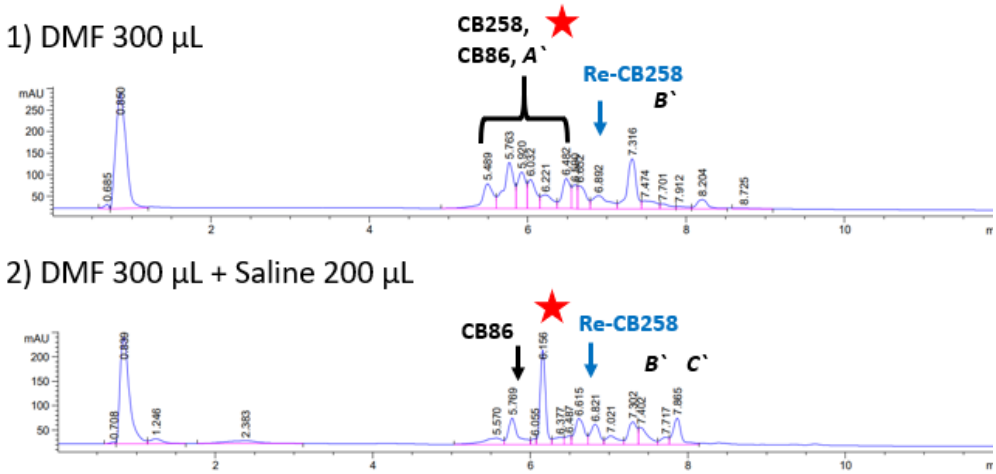
TSPO 결합친화도를 평가하기 위하여 TSPO의 발현도가 높으며 specific binding이 가능한 rat C6 glioma cell (Interlab Cell Line Collection (ICLC) (Genova, Italy))을 선택하여 실험을 진행하였다. 해당 세포는 HAM'S F-12 medium에서 열처리된 Fetal Bovine Serum (FBS)와 100 U/mL의 penicillin, 100 μg/mL의 streptomycin 그리고 2 mM의 L-glutamine을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였다. Membrane 추출을 위해 80% confluency가 될 때까지 세포를 배양한 후, medium을 제거하고 Phosphate Buffer Saline (PBS) (pH = 7.2)로 세포를 탈착 시킨다 [14]. 탈착된 세포는 PBS에 현탁시켜 Brinkman Polytron (setting 5 for 3 x 15 s)을 이용하여 균질화 하였다.

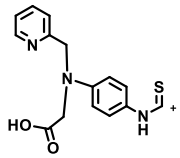
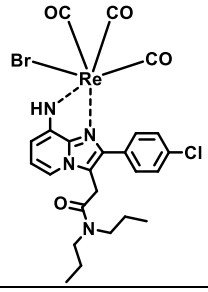
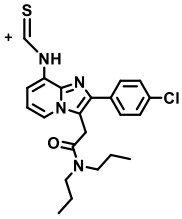
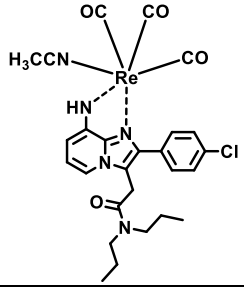
이후 현탁액은 4 ℃에서 30 분간 37000 g로 원심 분리한 후 상층액을 제거하였다. 최종 펠렛은 차가운 10 mM PBS (pH = 7.2)로 재현탁 시킨 후에 −80℃에서 보관하여 사용하였다. TSPO 결합 친화도 평가 실험은 다음과 같이 진행되었다. 100 μg의 C6 membrane을 0.5 mL의 PBS (pH = 7.2)에 현탁 시킨 후, 0.7 nM의 [^{3}H]PK11195와 약물과 **Re-1** (six to nine different concentrations)를 첨가하여 25℃에서 90 분간 반응하였다 [16]. 반응이 종료된 후 Whatman GF/C glass microfiber filters를 통해 여과하였다. 해당 필터는 1 mL의 차가운 PBS (pH = 7.2)로 3번 세척해준 후 결합친화도를 평가하였다.

제 3 장 결 론

제 1 절 CB258 (1’)

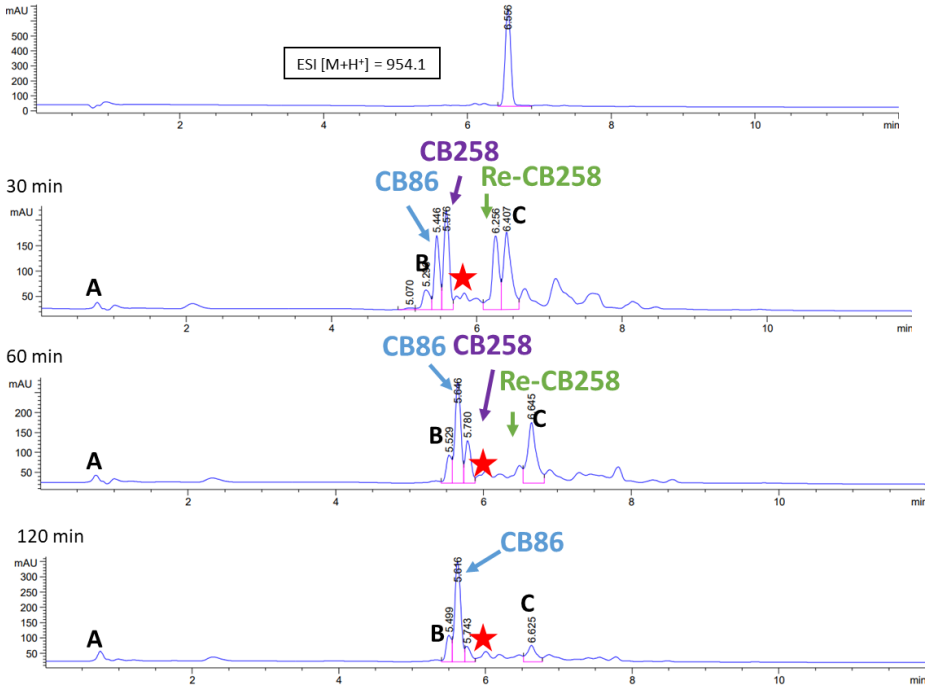
CB258 (1’) 화합물의 구조는 [그림 2-(b)]에서와 같으며 합성 과정은 앞서 기술한 **Scheme 2** 의 과정을 통하여 합성되었다. 기준물질인 **Re-CB258 (Re-1’)**을 합성함과 동시에 반응 중 화합물의 안정성을 확인하고자 다음과 같은 합성 과정을 수행하며 반응을 모니터링 하였다. 반응은 1 당량의 $Re(CO)_3(H_2O)_3Br$ 와 **1’번 화합물**을 다음 두 가지의 용매 조건 1) DMF 300 μL, 2) DMF 300 μL + Saline 200 μL 을 사용하여 70 ºC 에서 1 시간동안 교반 시켰다. 반응의 모니터링은 LC/MS 를 사용하여 수행되었다. HPLC profile 과 mass 결과 값에 근거하여 우리는 CB258 (the precursor, **1’**) 그리고 포켓 부분 (**5'**), TSPO binding ligand 인 CB86 (**11**)을 반응 용매에서 확인 할 수 있었으며 또한 mass 값들로 예상되는 추가적인 화합물의 구조 또한 확인되어 아래에 기술하였다 [그림 3]. 최종적인 **Re-1’** 의 합성 수율은 HPLC profile 로 계산한 결과 약 10%로 확인되었다.

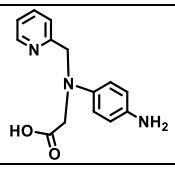
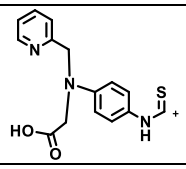
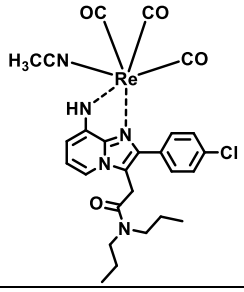


A’	B’
	
ESI [M+H$^+$] = 300.0	**ESI [M+H$^+$] = 734.0**
C’	**★**
	
ESI [M+H$^+$] = 427.1	**ESI [M+H$^+$] = 696.1**

[그림 3] Reaction Test of Re-CB258. The reaction of CB258 (1’). The solvent was tested 1) only DMF 300 µL and 2) DMF 300 µL + Saline 200 µL. A’(ESI [M+H$^+$] = 300.0), B’(ESI [M+H$^+$] = 734.0), C’(ESI [M+H$^+$] = 734.0) and ★(ESI [M+H$^+$] = 696.1) are structures which derived from mass data.

또한 **Re-1'**의 안정성 실험을 수행하였다. 안정성 실험은 37 ºC, PBS buffer 상에서 2 시간동안 모니터링하며 LC/MS 로 관찰되었다. 타임포인트는 각각 30 분, 60 분, 120 분으로 설정하여 확인하였으며, 반응 시작 후 30 분부터 화합물의 decompose 가 확인되었다. 역시 mass 값으로 확인한 결과 **1'**, **11**, **5'** 그리고 아래 [그림 4]에 기술한 구조로 예상되는 값들이 관찰되었으며, 2 시간 후에는 거의 99% 이상의 화합물이 decompose 되는 것을 확인할 수 있었다.



A	B
	
ESI [M+H+] = 258.1	**ESI [M+H+] = 300.0**
C	★
ESI [M+H+] = 787.3	
	ESI [M+H+] = 696.1

[그림 4] Stability Test of Re-CB258. The stability was tested under PBS buffer at 37 °C for 2 h. A(ESI [M+H+] = 258.1), B(ESI [M+H+] = 300.0), C(ESI [M+H+] = 787.3) and ★(ESI [M+H+] = 696.1) are structures which derived from mass data.

제 2 절 CB259 (1)

1'번 화합물의 HPLC profile 들과 mass 데이터를 통한 안정성 테스트로 비추어 보았을 때, 화합물의 안정성이 떨어지는 이유는 포켓부분과 링커부분 사이의 강한 resonance effect 일것이라 사료되었다.

이러한 결과를 바탕으로 1'번 화합물은 추후의 in vivo 실험에 부적합하다고 판단이 되었으며 따라서 우리는 포켓부분과 링커부분 사이에 탄소결합을 하나 더 늘린 **1 번 화합물**과 같은 구조로 화합물을 새롭게 디자인하여 합성을 수행하였다.

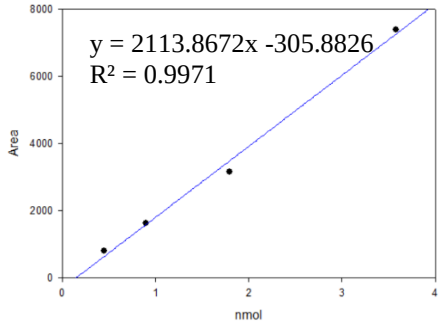
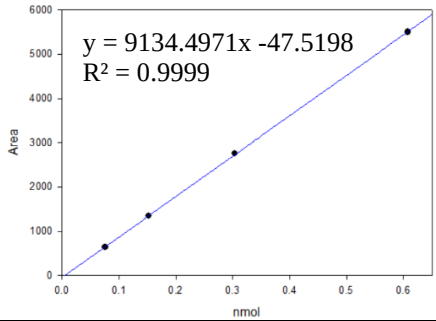
*Synthesis of Re-CB259 (**Re-1**) and ^{99m}Tc-CB259 (^{99m}**Tc-1**)*

기준물질인 **Re-1** 을 합성하는 동시에 technetium-99m 의 표지 조건을 확립하고자 본 연구에서는 4 가지 용매와 2 가지 온도에서 화합물의 합성 수율을 비교하였다 [표 1]. 온도는 70 ºC 와 80 ºC 두가지 온도를 설정하였으며 용매는 methanol, DMF, acetonitrile, 그리고 DMSO 용매를 선정하여 실험을 진행하였다. 각각의 온도와 용매 조건에서 전구체

1 당량 대비 $[NEt_4]_2[Re(CO)_3Br_3]$를 0.3 당량 넣어준 후 1 시간 동안 교반시킨 후 LC/MS 로 반응의 수율을 측정하였다.

수율 측정을 위해 전구체와 기준물질의 calibration curve 를 각각 그려주었다 [그림 5]. CB259 의 injection 된 몰농도는 3.4 nmol, 1.7 nmol, 0.85 nmol 0.42 nmol 의 4 포인트로 측정되었고 Re-CB259 의 injection 된 몰농도는 0.6 nmol, 0.3 nmol, 0.15 nmol, 0.07 nmol 의 4 포인트로 측정되었다.

기준물질 합성 수율 측정 결과 4 가지 용매 모두 각각의 용매에 대하여 70 ºC 에서가 80 ºC 보다 높은 수율을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며 용매는 methanol 과 DMF 에서가 나머지 두 용매보다 높은 합성 수율을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 최종적으로 DMF 용매에서 70 ºC 의 온도조건을 반응 최적조건으로 설정하여 테크네슘 표지실험을 수행하였다.

CB259	Re-CB259
	

[그림 5] Calibration curve of CB259, Re-CB259

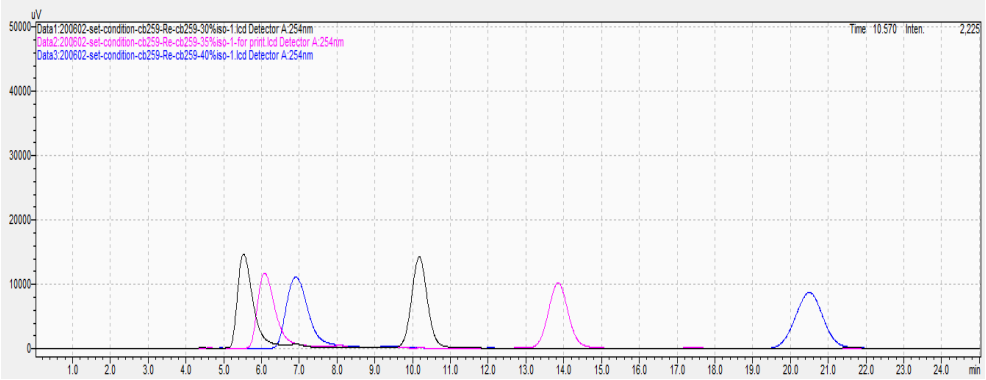
[표 1] Re-CB259 (**Re-1**) 반응 테스트

Entry	Temp (ºC)	Solvent	Re-CB259 (%)
1	**70**	**MeOH**	57.4 ± 1.7
2		**DMF**	59.5 ± 3.2
3		**MeCN**	25.1 ± 4.3
4		**DMSO**	29.8 ± 3.7
5	**80**	**MeOH**	43.5 ± 2.2
6		**DMF**	48.2 ± 4.8
7		**MeCN**	18.7 ± 6.4
8		**DMSO**	23.4 ± 3.1

Reaction condition: The reaction was carried out with 0.3 equivalent of $[NEt_4]_2[Re(CO)_3Br_3]$ (0.17 mg, 0.2 μmol) relative to the CB259 (0.5 mg, 0.7 μmol) in solvent (350 μL) at different temperature, 1 h. The reaction yield was measured by HPLC, n=3.

기준물질과 표지물질의 최적의 HPLC 분리 조건을 찾는 실험 또한 수행되었다. HPLC system (Waters, Xterra Semi-preparative C18 column, 10 x 250 mm, 10 μm; 254 nm, flow rate: 3.0 mL min^{-1})을 이용하여 다음의 세 가지 분리조건인 1) 70% acetonitrile-water, 2) 65% acetonitrile-water, 3) 60% acetonitrile-water 의 조건으로 진행되었다.

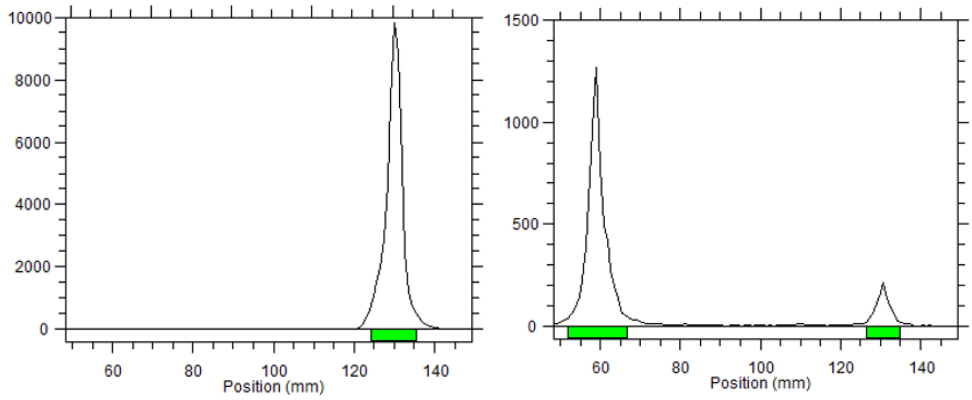
각각 분리 조건 결과 1) 70% acetonitrile-water 의 조건에서는 전구체와 기준물질을 각각 5.5 분과 10.2 분에서 확인할 수 있었으며, 2) 65% acetonitrile-water 의 조건에서는 각각 6.2 분과 13.8 분, 마지막으로 3) 60% acetonitrile-water 조건에서는 각각 6.8 분과 20.5 분의 머무름 시간을 가지는 것으로 확인할 수 있었다. 최종적으로 3) 60% acetonitrile-water 의 조건을 분리 조건으로 선택하여 실험을 진행하였다 [그림 6].



	CB259 (min)	Re-CB259 (min)
30 % water, 70 %acetonitrile	5.5	10.2
35 % water, 65 %acetonitrile	6.2	13.8
40 % water, 60 %acetonitrile	6.8	20.5

[그림 6] Optimization of HPLC condition of CB259 and Re-CB259 : Condition : Waters, Xterra Semi-preparative C18 column, 10 x 250 mm, 10 µm; 254 nm, flow rate: 3.0 mL min^{-1}

^{99m}Tc-1 를 합성하기 위해 우선 제너레이터에서 용출 된 pertechnetate 를 reduction 하는 반응을 진행하였다. 반응 전 pertechnetate 의 Radio-TLC 를 확인한 결과 acetone 을 전개 용매로 사용하였을 때 rf 값은 1 에서 activity 를 확인할 수 있었다 [그림 7-(a)]. 앞서 기술하였던 조건으로 반응 진행 후 확인한 Radio-TLC 결과에서는 같은 전개용매 조건하에서 rf 값 약 0 에서 tricarbonyl technetium-99m 의 activity 를 확인할 수 있었으며 약 94%의 높은 수율로 합성 됨을 확인할 수 있었다 [그림 7-(b)].



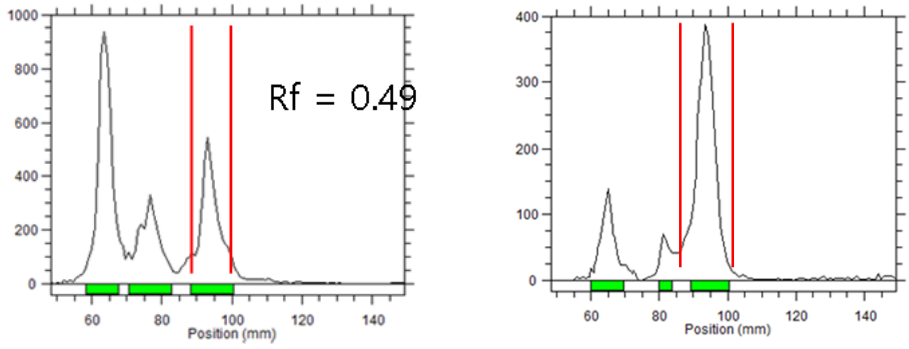
(a) Before reaction (b) After reaction

[그림 7] [$^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ 합성 Radio-TLC Profile

합성 된 tricarbonyl technetium-99m 과 전구체인 **1 번 화합물**을 DMF 용매하에서 70 ºC 의 온도로 30 분 동안 교반시켰다. 반응 후 충분히

식혀주고 radio-TLC 를 확인한 결과, 10% methanol/dichloromethane 을 전개 용매로 사용하였을때, rf 값 약 0.49 에서 **^{99m}Tc-1** 의 activity 를 확인할 수 있었으며 radio-TLC 상의 표지수율은 약 32%로 확인되었다 [그림 8-(a)].

미리 activation 시켜놓은 tC18 Sep-Pak 으로 1 차 정제과정을 수행해 준 후, HPLC 정제과정을 진행하였다. tC18 Sep-Pak 정제 후 radio-TLC 를 확인한 결과 rf 값 0 에서 확인 된 activity 가 상당량 분리 된 것을 profile 상으로 확인 할 수 있었다 [그림 8-(b)].

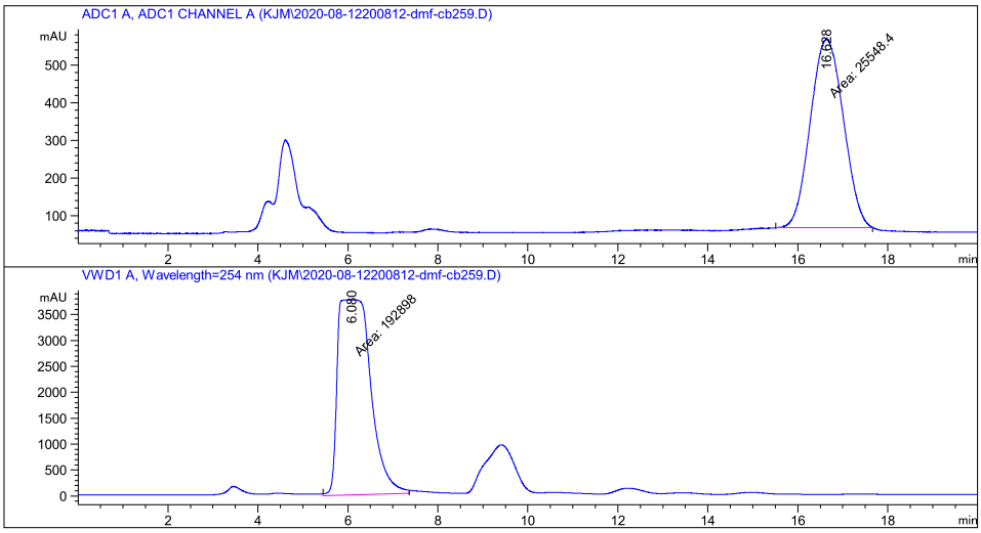


(a) After reaction (b) After tC18 Sep-Pak

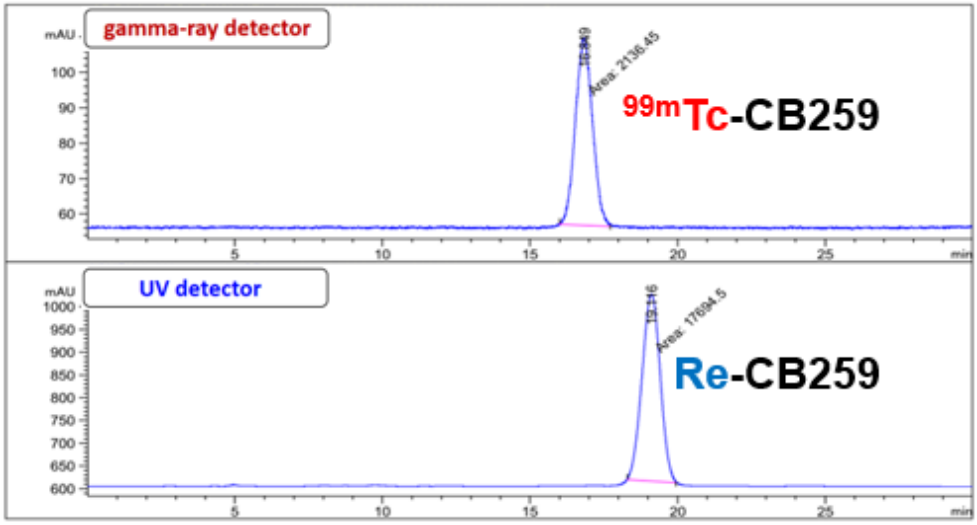
[그림 8] ^{99m}Tc-CB259 합성 Radio-TLC

tC18 Sep-Pak 정제 HPLC 정제를 수행한 결과 목적 화합물을 머무름 시간 17 분에서 약 27%의 방사화학적 수율로 얻을 수 있었다. [그림 9-(a)]는 정제 과정에서 얻은 HPLC profile 이다. 얻어진 **^{99m}Tc-1** 은

사전에 합성 된 기준 물질인 **Re-1** 와 함께 co-injection 을 통해 화합물의 identification 을 다시 한번 확인 하였다 [그림 9-(b)]



(a) HPLC profile of after tC18 Sep-Pak purification



(b) HPLC co-injection profile

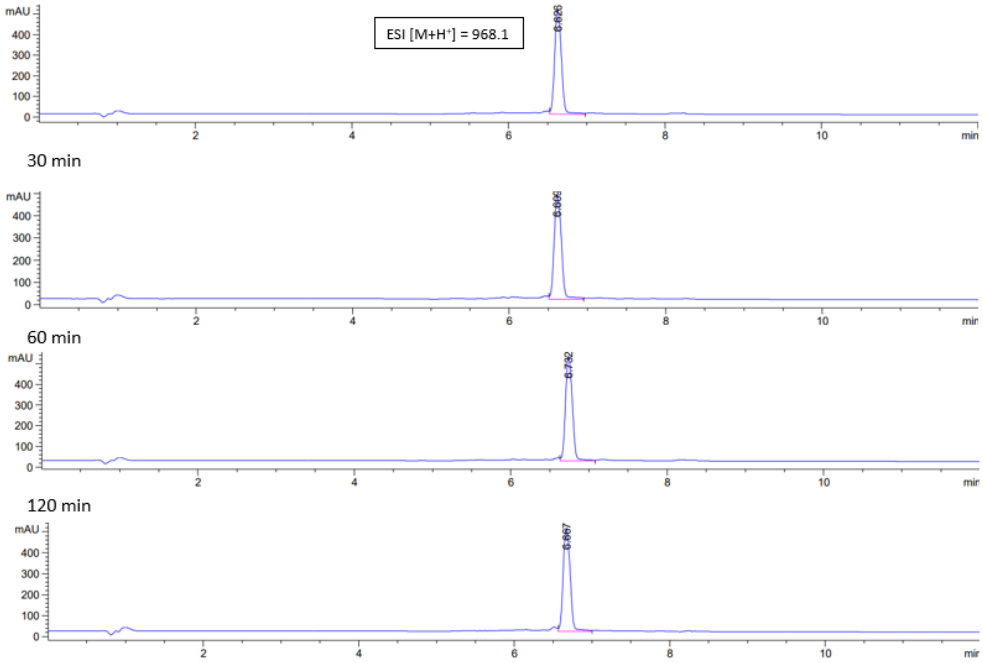
[그림 9] HPLC profile of ^{99m}Tc-CB259 (**^{99m}Tc-1**) and Re-CB259 (**Re-1**). Waters, Xterra Semi-preparative C18 column, 10 x 250 mm, 10 µm; 40% water/acetonitrile, 254 nm, flow rate: 3.0 mL min^{-1}.

In Vitro Stability Studies and Partition Coefficient of Re-CB259 (**Re-1**) and ^{99m}Tc-CB259 (**^{99m}Tc-1**)

앞선 **Re-1'**의 안정성 실험과 마찬가지로 PBS buffer, 37 °C 에서 2 시간 동안 **Re-1** 을 incubation 하는 과정을 수행하였다. 반응의 모니터링은 LC/MS 로 수행하였으며 30 분, 60 분, 120 분마다 LC profile 과 mass 값을 확인하였다. 2 시간동안 **Re-1** 은 decompose 되지 않고 99% 이상 안정성을 가짐을 확인할 수 있었다 [그림 10].

또한 사람 혈청 (Human Serum)에서 **^{99m}Tc-1** 의 안정성 실험 또한 진행되었다. 실험은 온도 37 °C 에서 4 시간동안 관찰되었으며 0 분, 10 분, 30 분, 60 분, 120 분, 240 분의 시간 간격을 두고 radio-TLC profile 을 확인하였다. 10% methanol/dichloromethane 을 전개 용매로 사용하였을 때, 240 분동안 다른 activity 는 관찰되지 않았으며 99% 이상 안정한 것을 확인할 수 있었다 [그림 11].

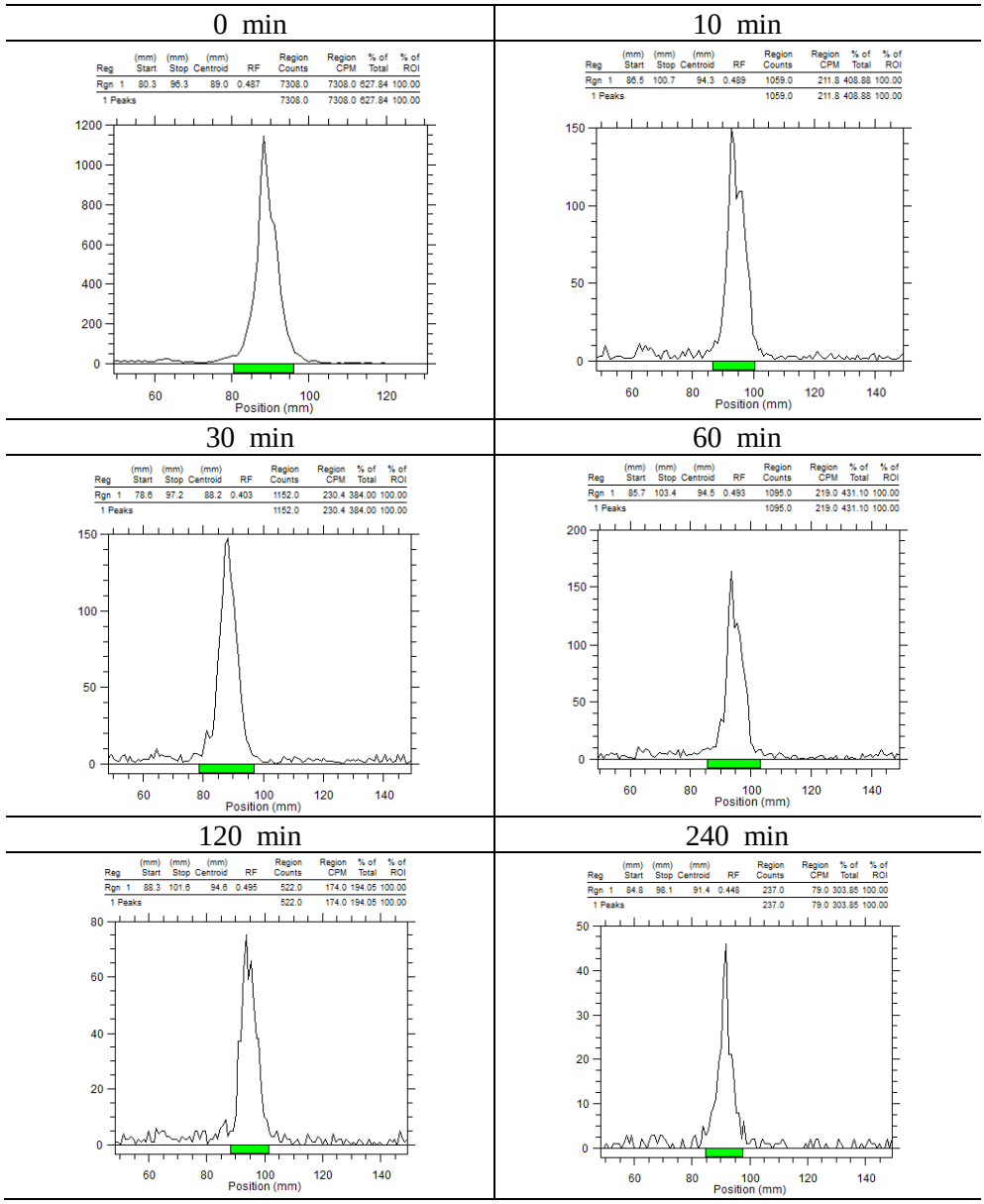
^{99m}Tc-1 의 Partition coefficient (LogD value) 값을 측정한 결과 1.47 ± 0.12 (n = 3)로 확인 되었다 [표 2].



[그림 10] Re-CB259 (**Re-1**)의 PBS buffer 에서의 안정성 실험

[표 2] Partition coefficient (LogD value)

No.	**1**	**2**	**3**
n-octanol	1263921.7	1197724.6	1172615.5
PBS	30854.4	50504.6	42966.6
n-octanol/PBS	40.96	23.72	27.29
Log D	1.61	1.38	1.44



[그림 11] 사람 혈청에서 ^{99m}Tc-CB259(**^{99m}Tc-1**)의 안정성 실험

In Vitro Cell Binding Affinity of Re-CB259 (**Re-1**)

Re-1 의 TSPO 에 대한 결합친화도를 측정하였다. 결합친화도는 rat 의 C6 glioma cell 에서 막 단백질을 추출하여 측정되었다. 경쟁물질로는 [^{3}H]PK11195 를 사용하였으며 화합물들의 결합친화도는 [표 3]에 요약하였다. **Re-1** 의 경우 기존에 보고되었던 +1 의 양전하를 가진 Re-CB256 에비해 약 5 배 우수한 결합친화도를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[표 3] Affinities (K_i, nM) for TSPO on Membrane Extracts of C6 Glioma Cells

Compound	K_i (nM)[a]
PK11195	4.99 ± 2.71
Re-CB256	159.3 ± 8.70
Re-CB259	32.1 ± 9.90

[a] Data represent mean values of n ≥ 4 separate experiments in duplicate (± SEM).

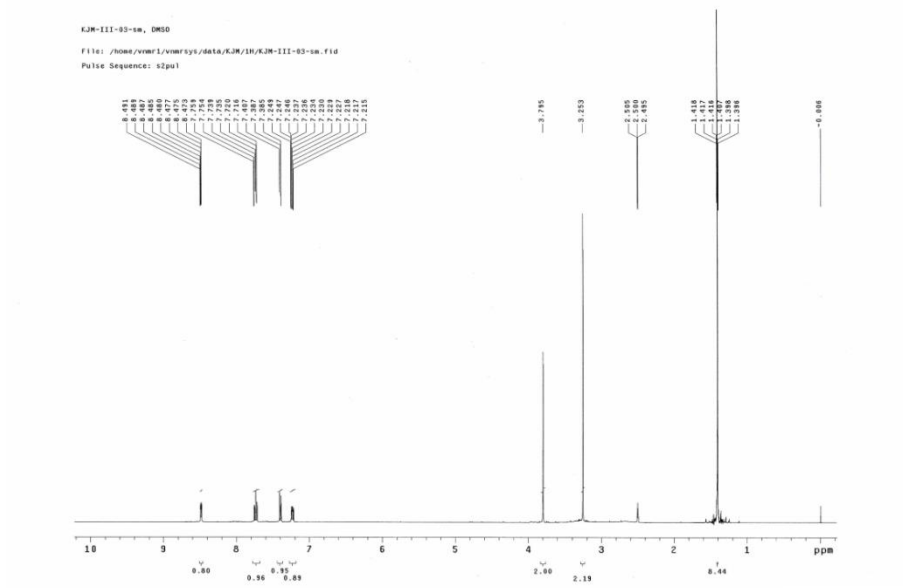
제 4 장 맺 음 말

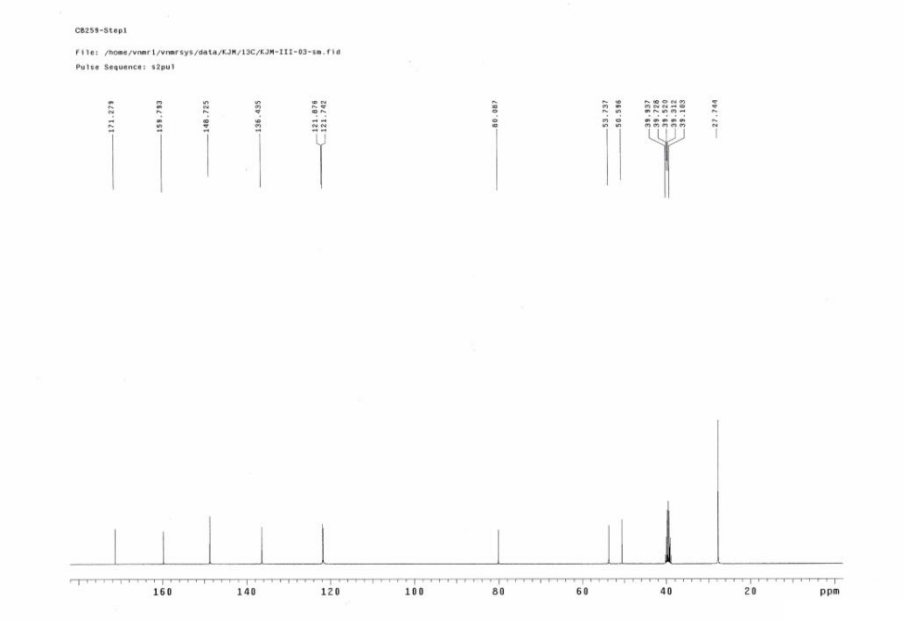
본 연구에서는 전하를 달리한 Tc-99m 표지 TSPO 방사성추적자(^{99m}Tc-CB259, **^{99m}Tc-1**)를 높은 방사화학적 순도로 합성하였다. 이를 기준물질인 PK11195를 사용해 결합 친화도를 평가 및 비교하였다. 트리카보닐 레늄이 표지된 CB259은 기존 양전하를 가진 Re-CB256 보다 약 5배 높은 TSPO 결합친화도를 보여주었다. 이러한 in vitro 결과는 기존 CB256의 구조를 최적화한 CB259가 TSPO 표적 방사성추적자로서 보다 우수할 것으로 예측되며, TSPO 과다 발현 세포에서의 섭취능 평가 및 TSPO 과다 발현 질환모델에서 SPECT 영상 결과가 기대된다.

제 5 장 부 록

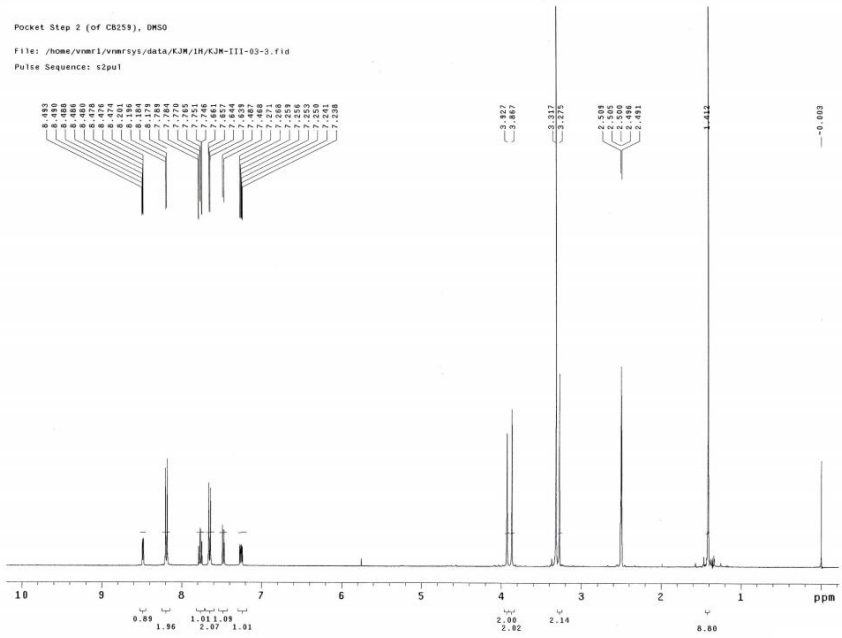
제 1 절 ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR data

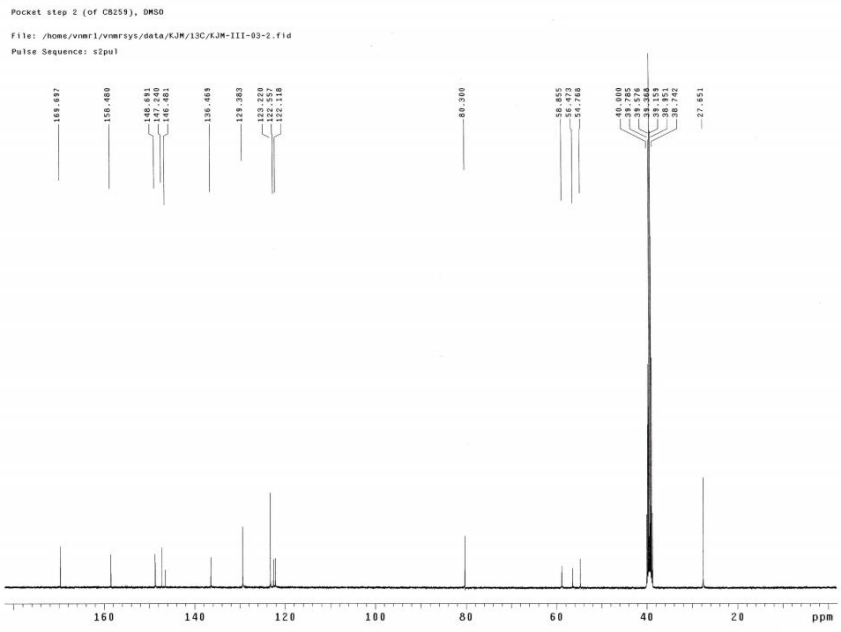
• tert-butyl 2-((pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (3)



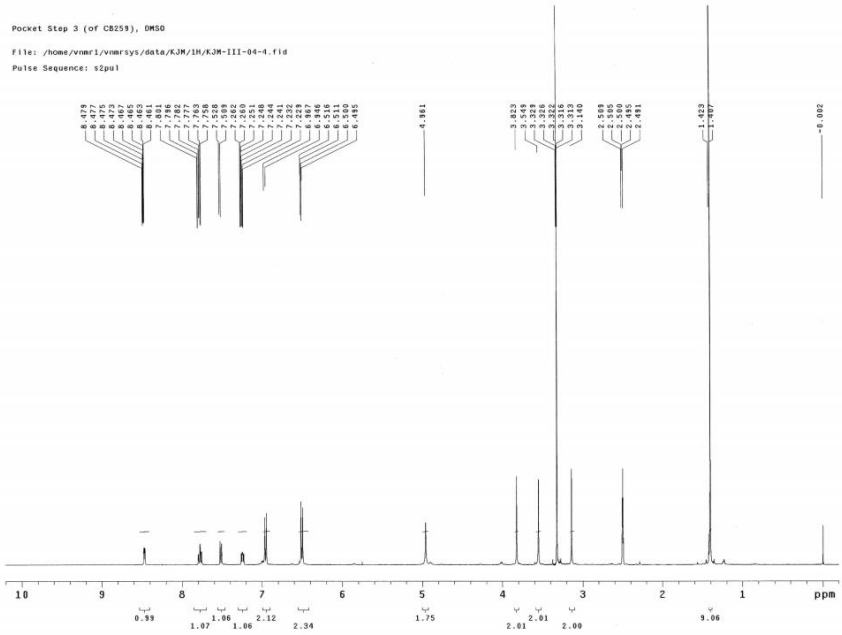


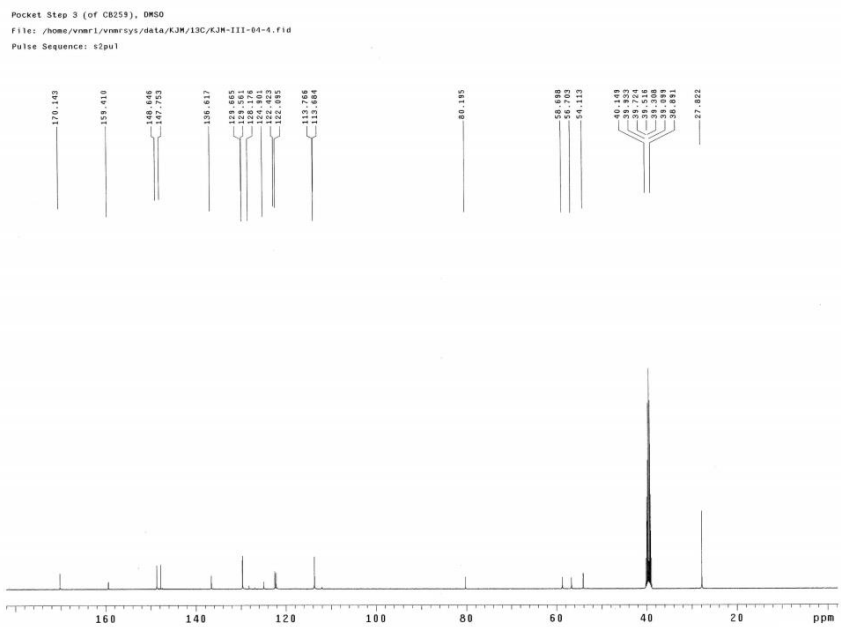
• **tert-butyl 2-((4-nitrobenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (4)**



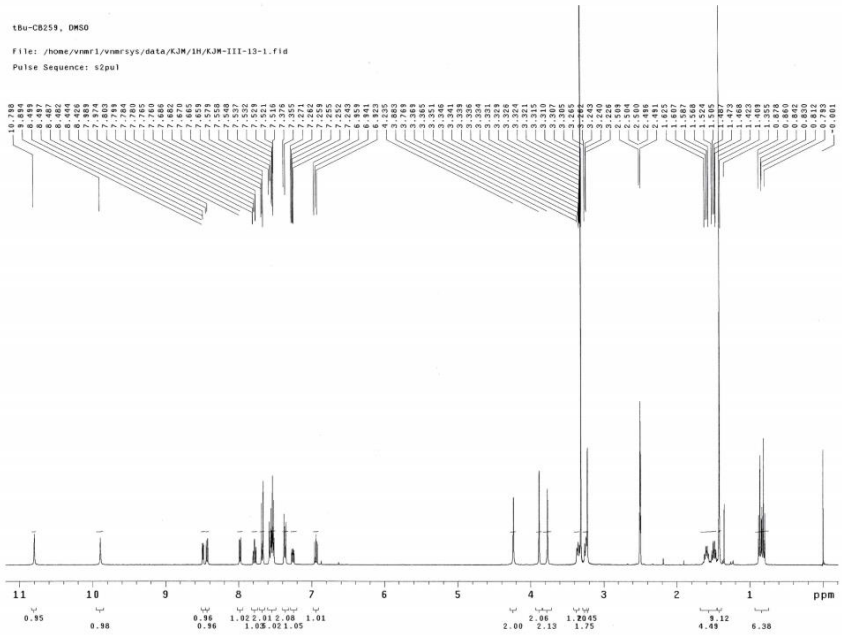


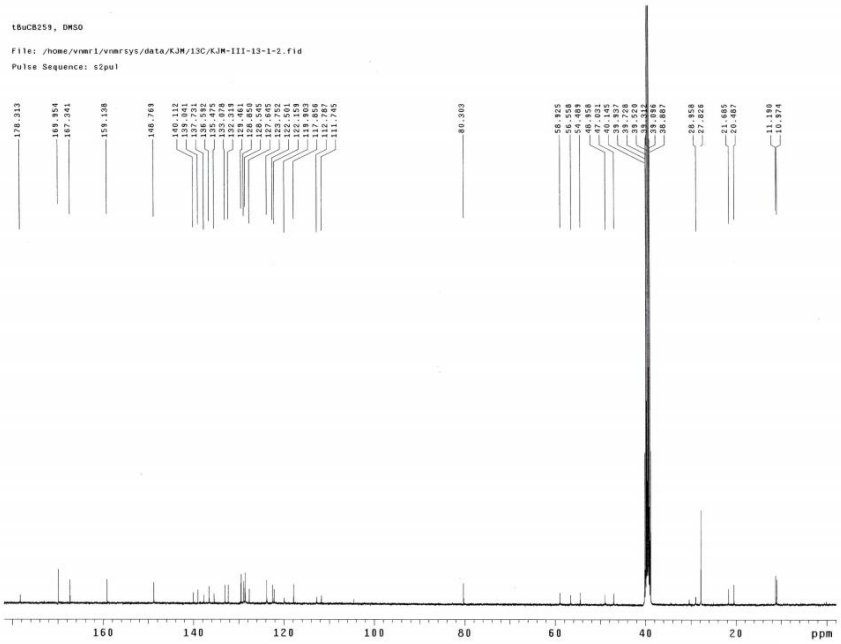
• **tert-butyl 2-((4-aminobenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetate (5)**



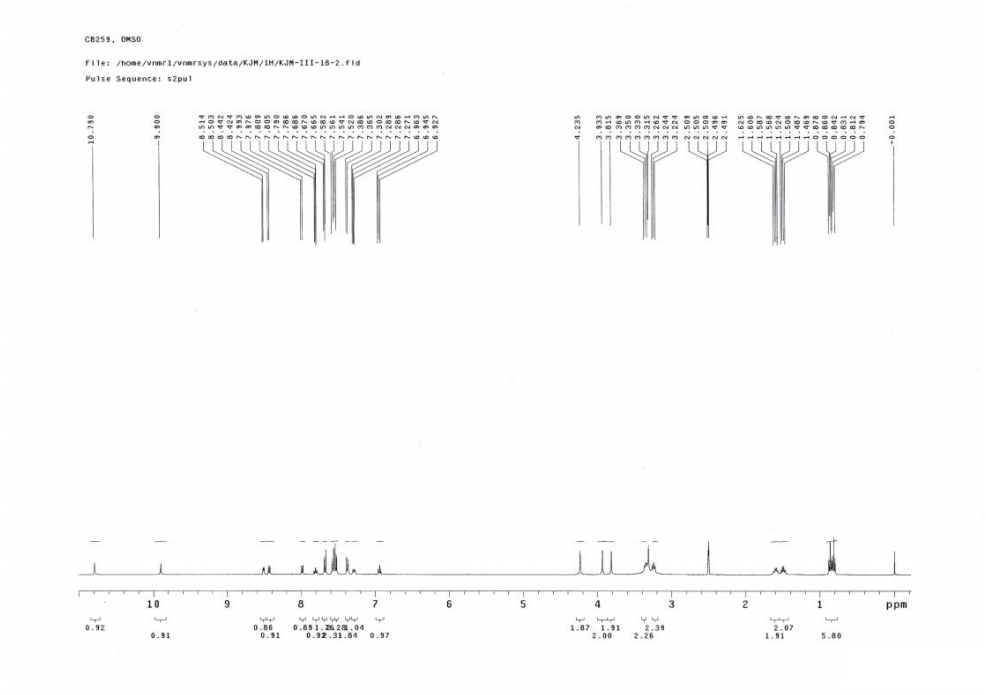


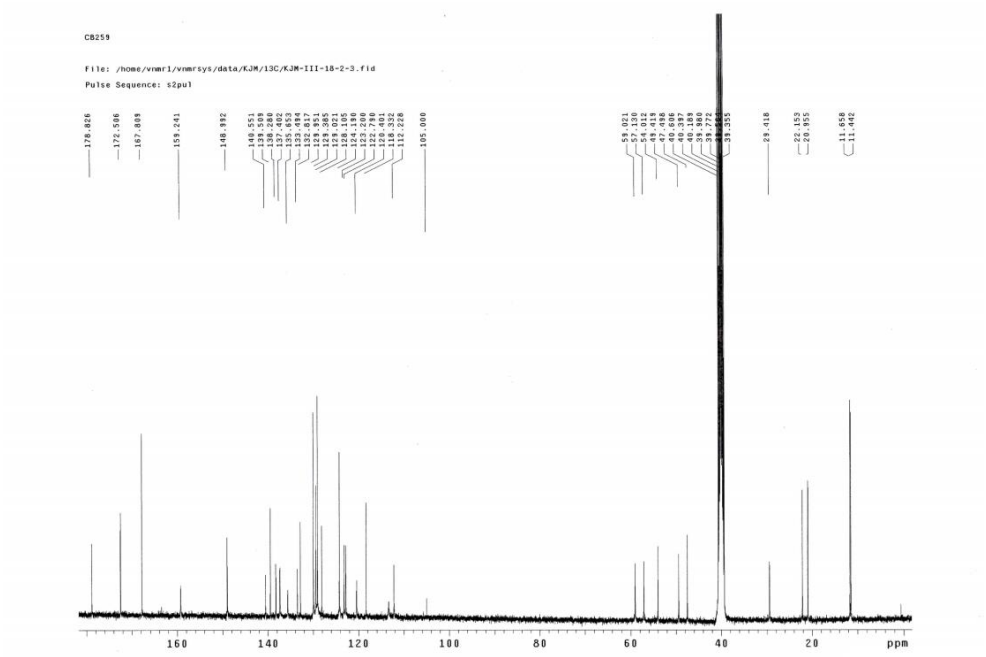
• tert-butyl2-((4-(3-(2-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl) imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)thioureido)benzyl)(pyridin-2-ylmethyl) amino) acetate (6)



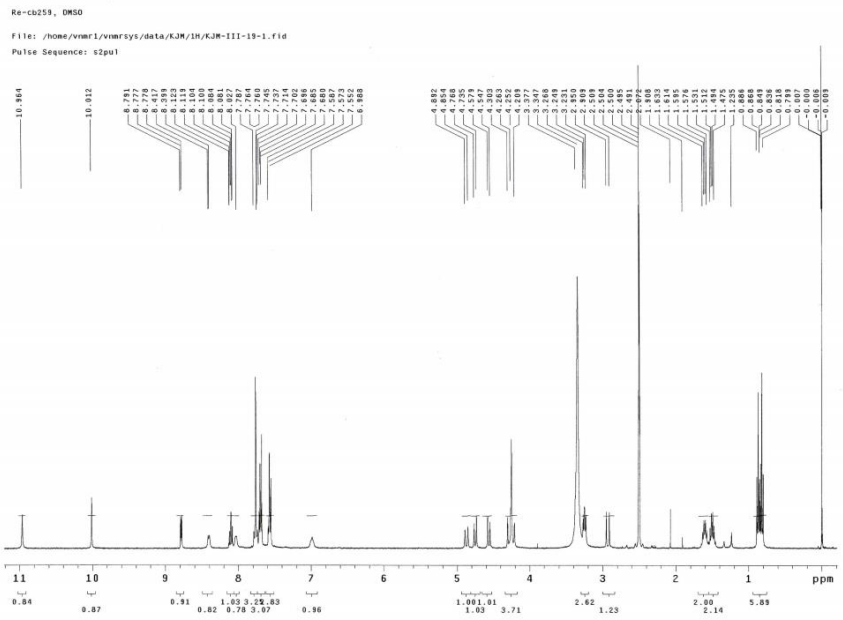


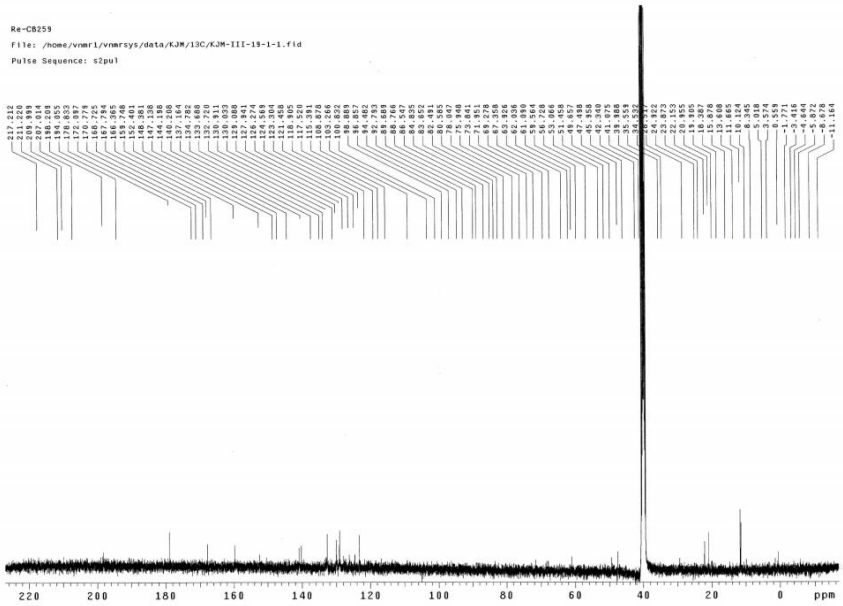
- **2-((4-(3-(2-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)thioureido)benzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetic acid (1, CB259)**



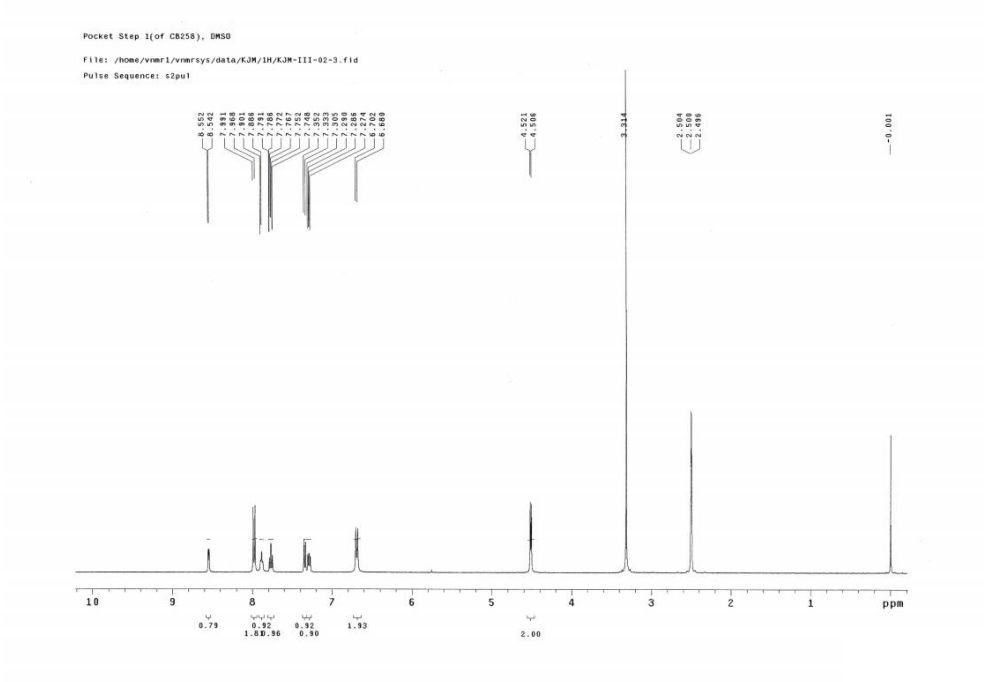


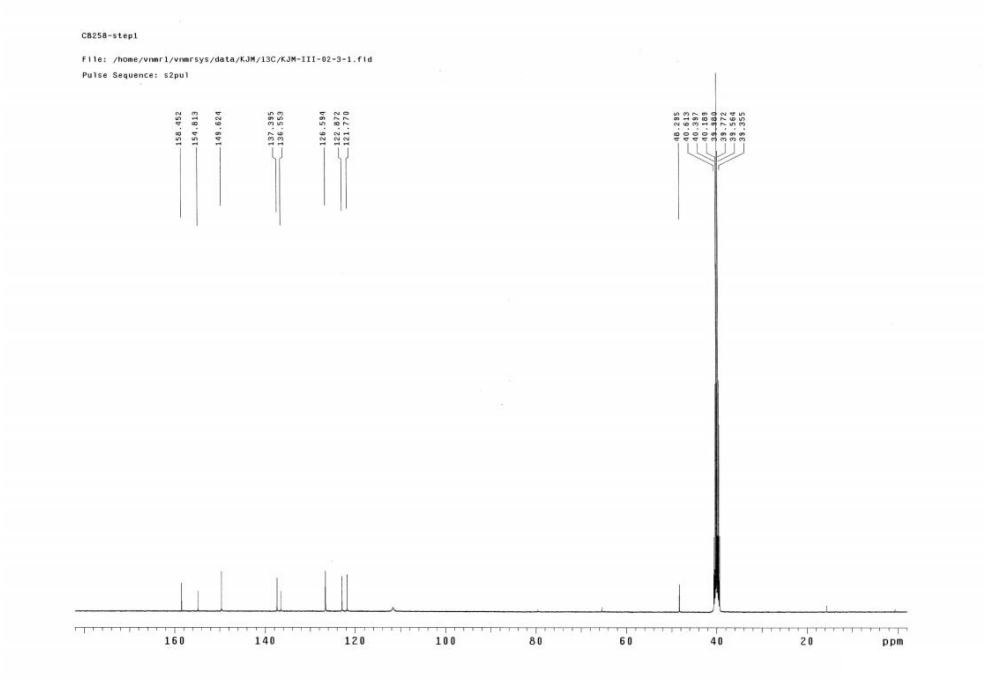
• **Re-CB259 (Re-1)**


Re-cb259, DMSO
File: /home/vnmrl/vnmrsys/data/KJM/1H/KJM-III-19-1.fid
Pulse Sequence: s2pul
ppm

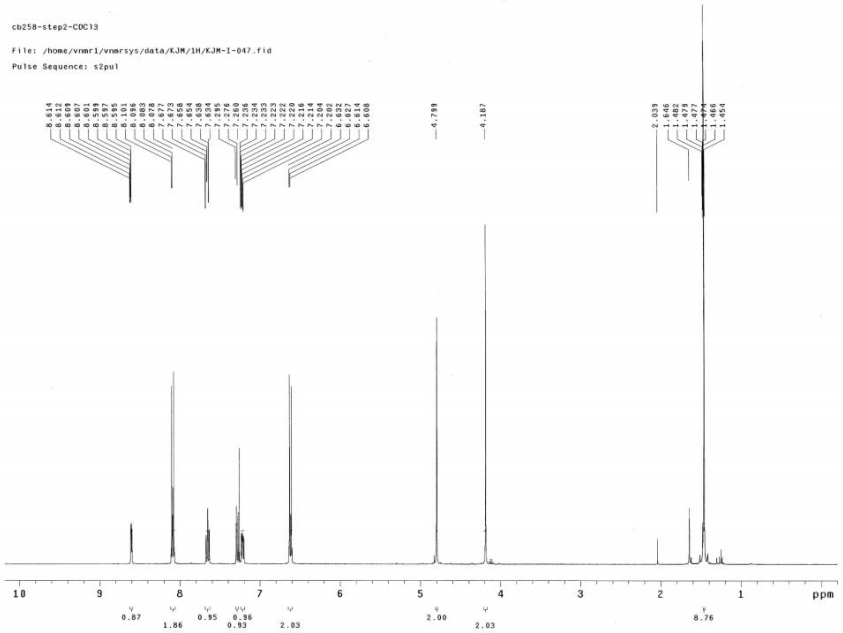

Re-CB259
File: /home/vnmrl/vnmrsys/data/KJM/13C/KJM-III-19-1-1.fid
Pulse Sequence: s2pul
ppm

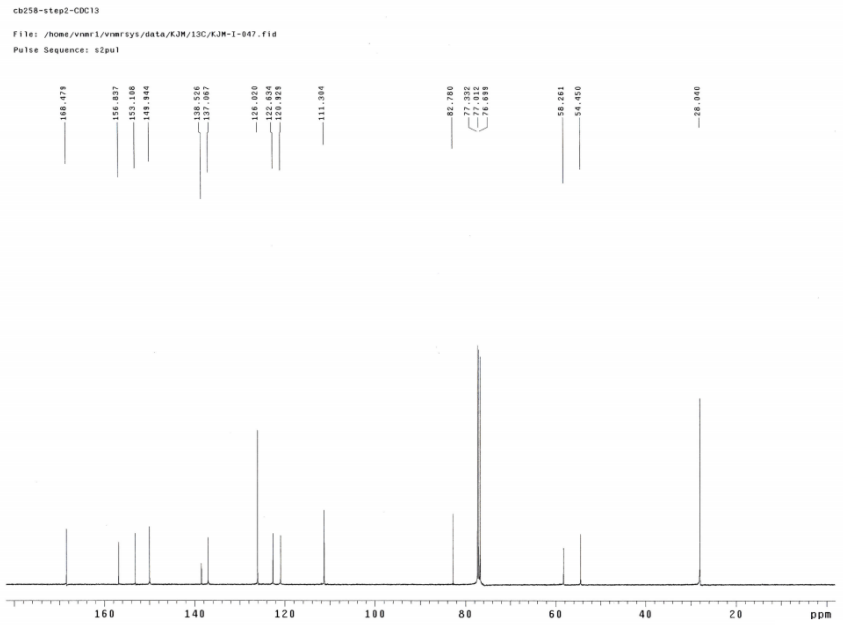
• **4-nitro-N-(pyridin-2-ylmethyl)aniline (3')**



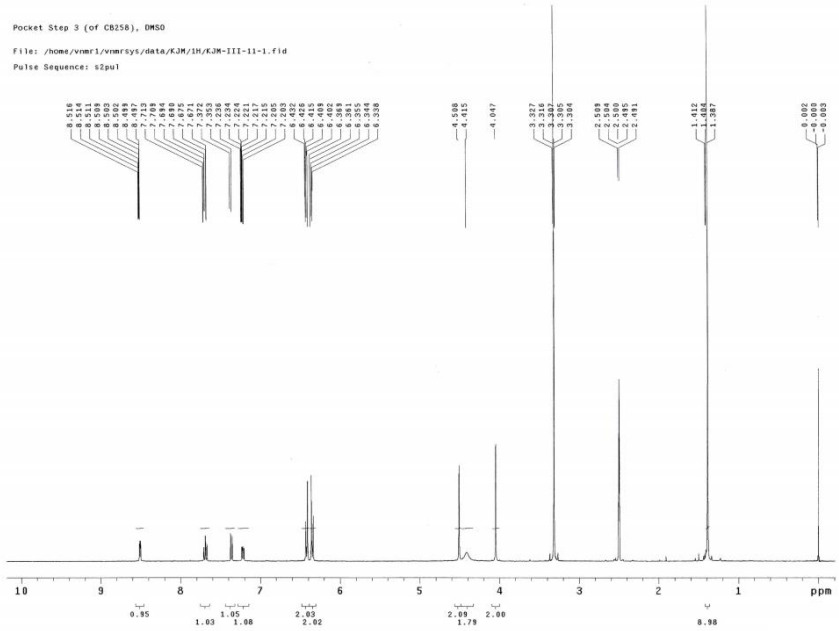


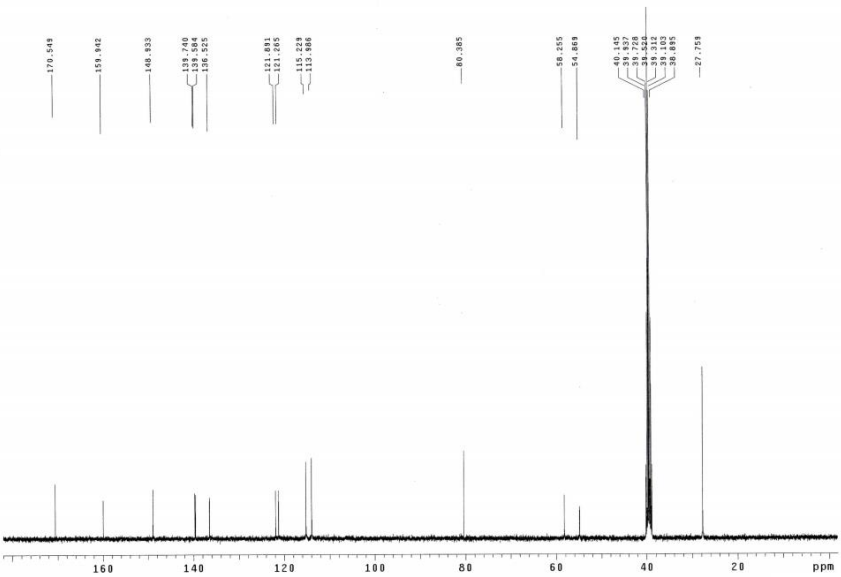
• **tert-butyl N-(4-nitrophenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycinate (4')**



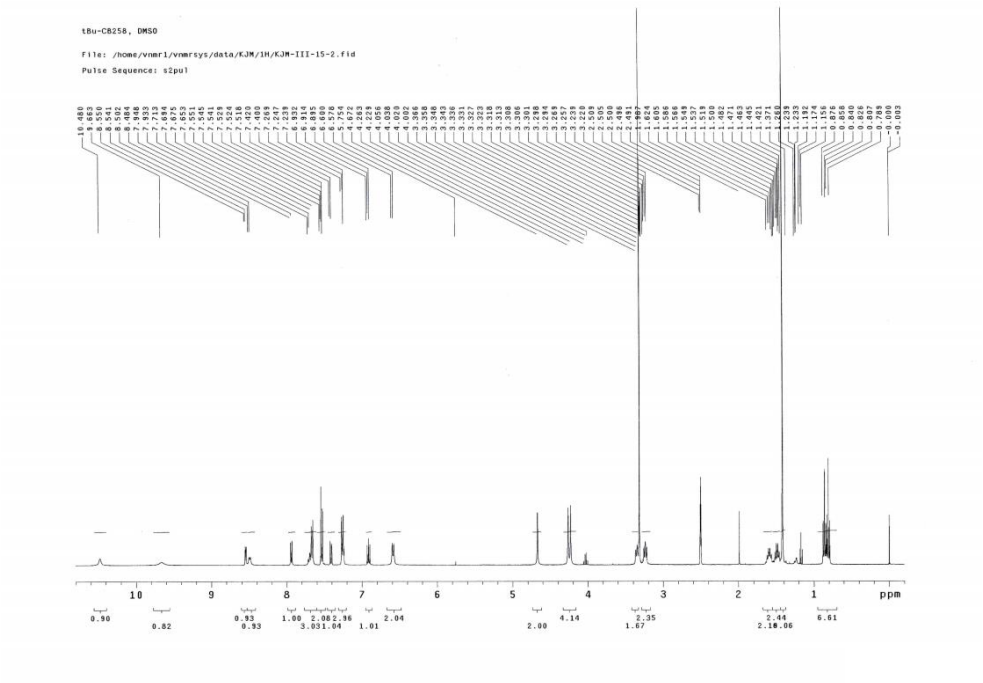


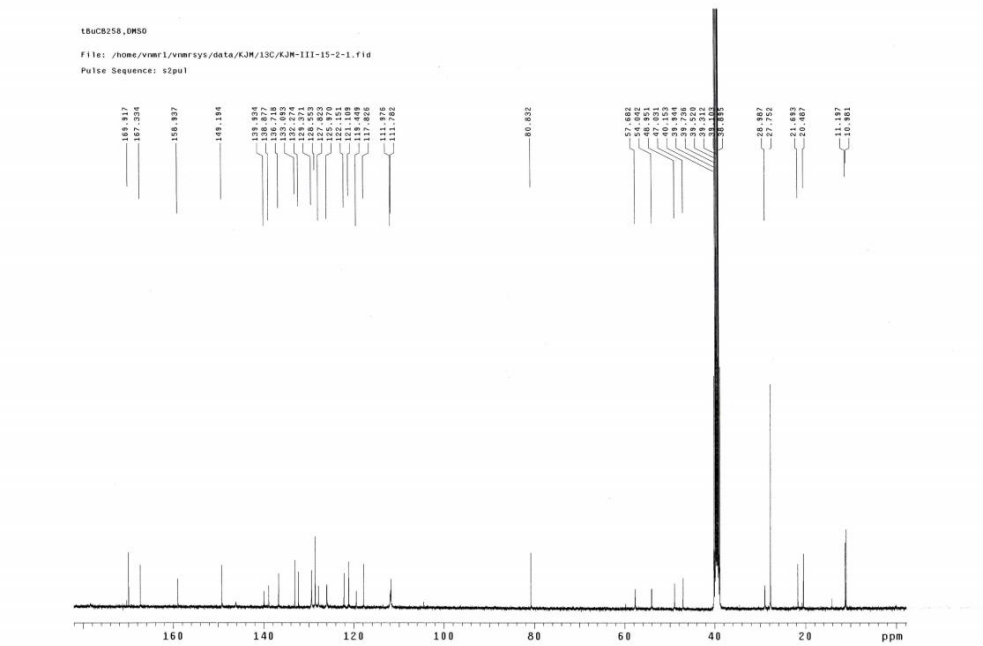
• **tert-butyl N-(4-aminophenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycinate (5')**



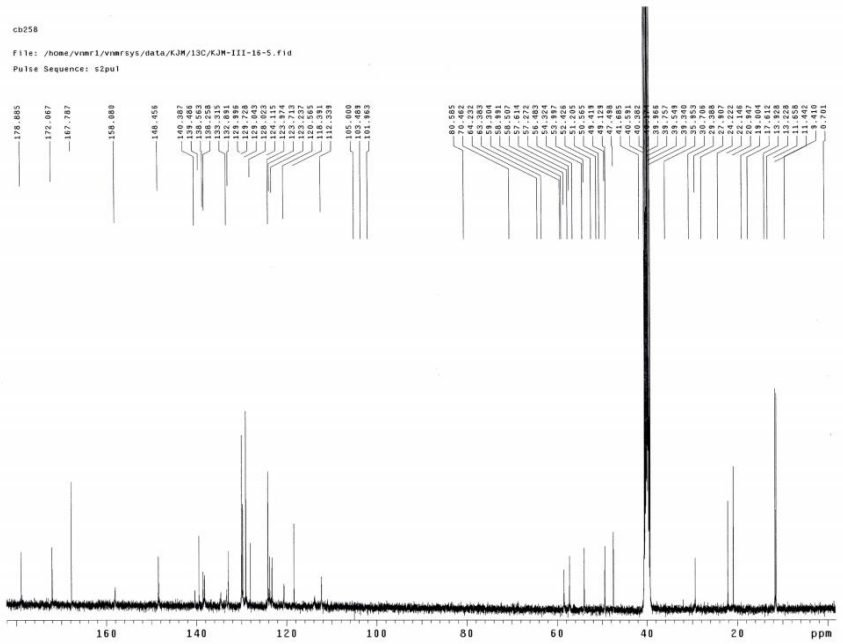


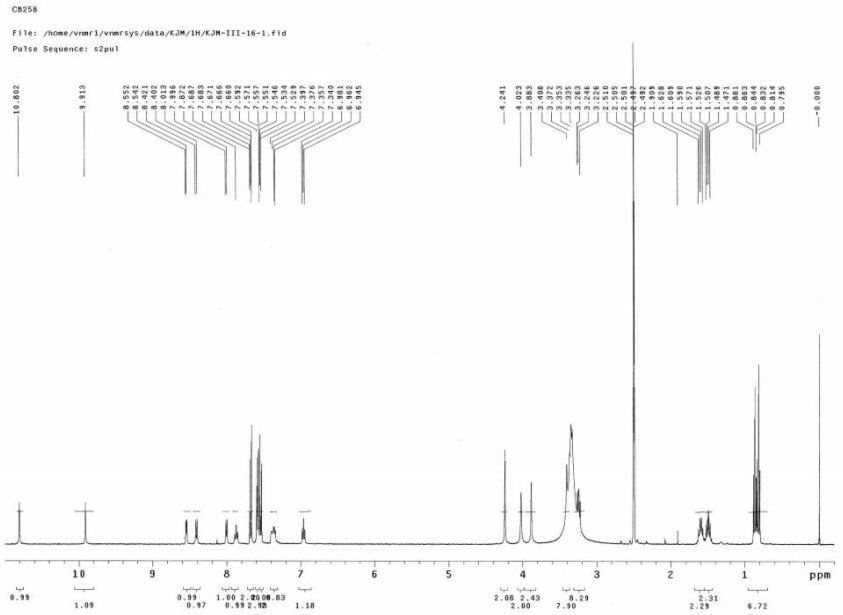
• tert-butylN-(4-(3-(2-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl) imidazo[1,2-a]pyridin-8yl)thioureido)phenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl) glycinate(6')



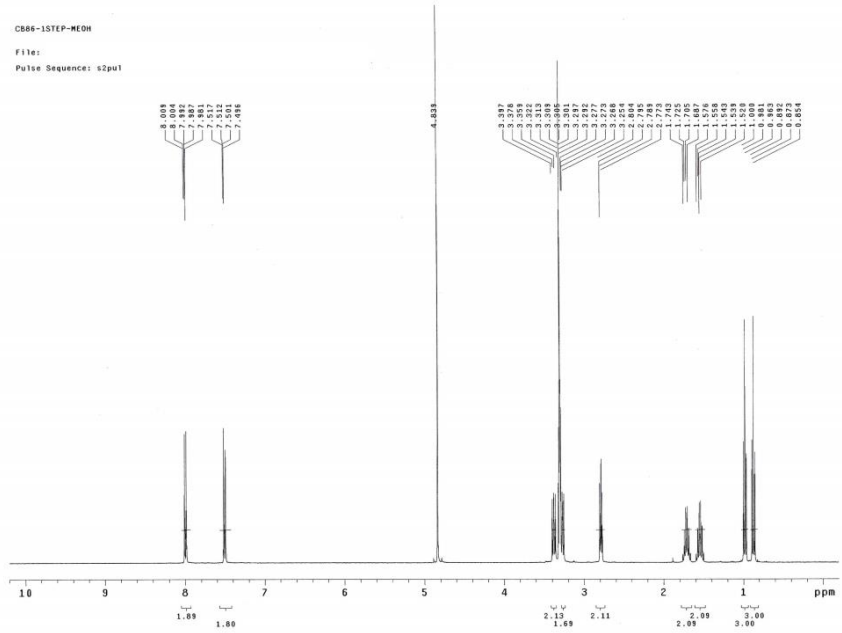


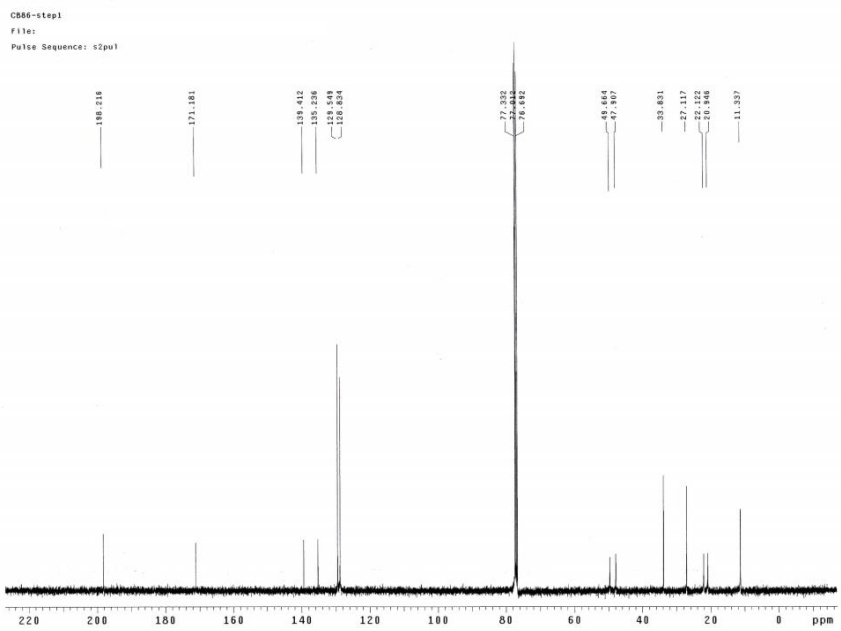
- **N-(4-(3-(2-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)thioureido)phenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycine (1', CB258)**



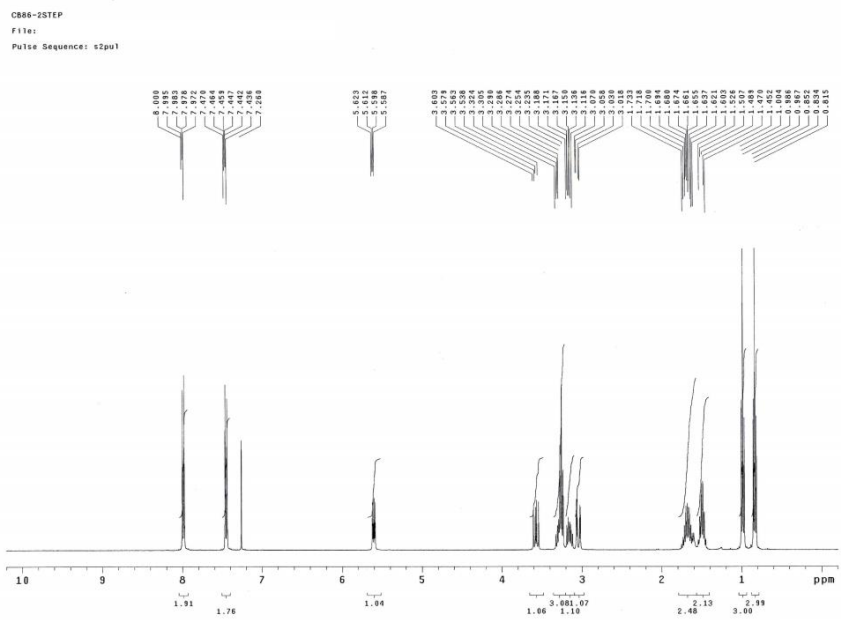


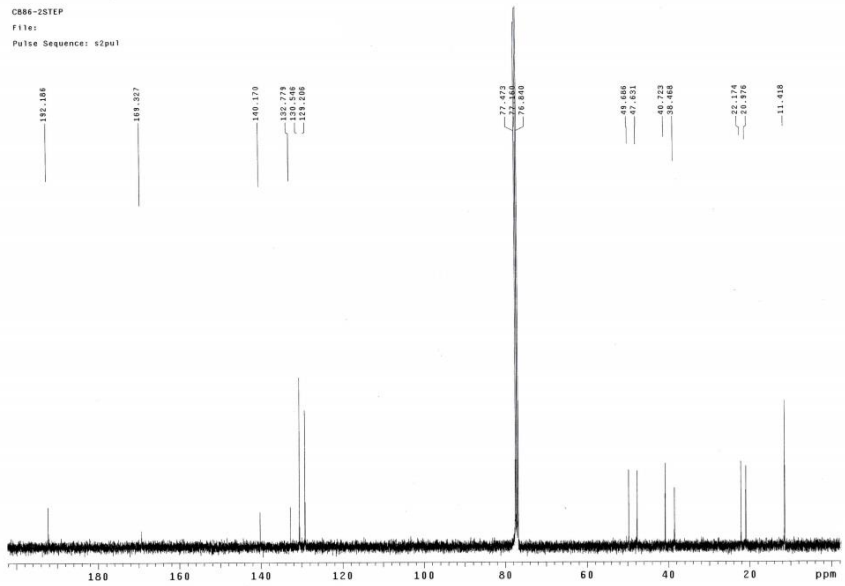
• **4-(4-chlorophenyl)-4-oxo-*N,N*-dipropylbutanamide (8)**



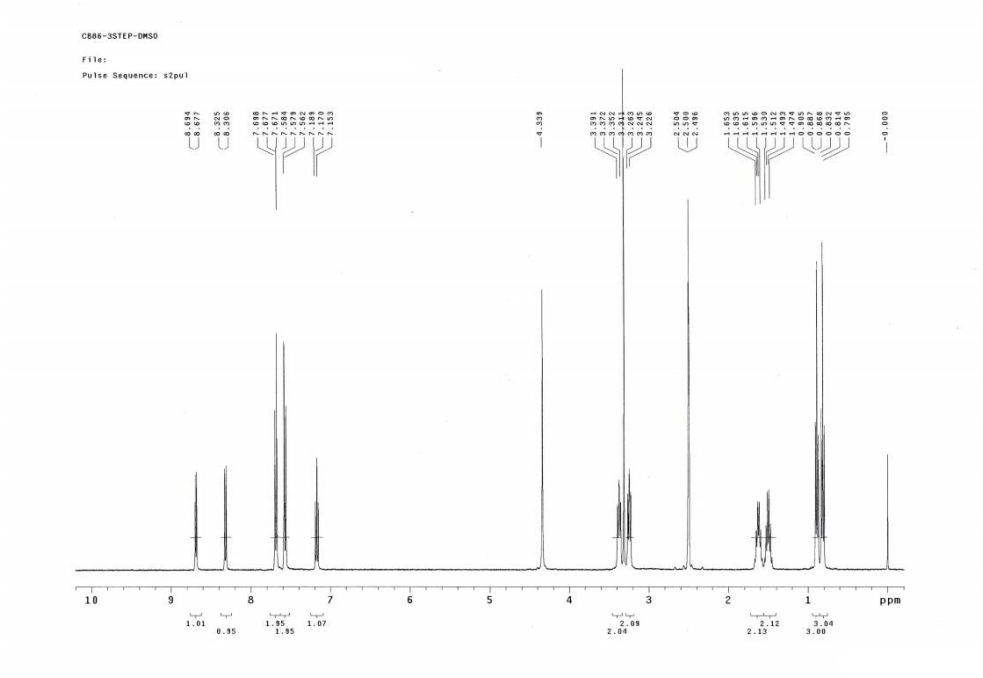


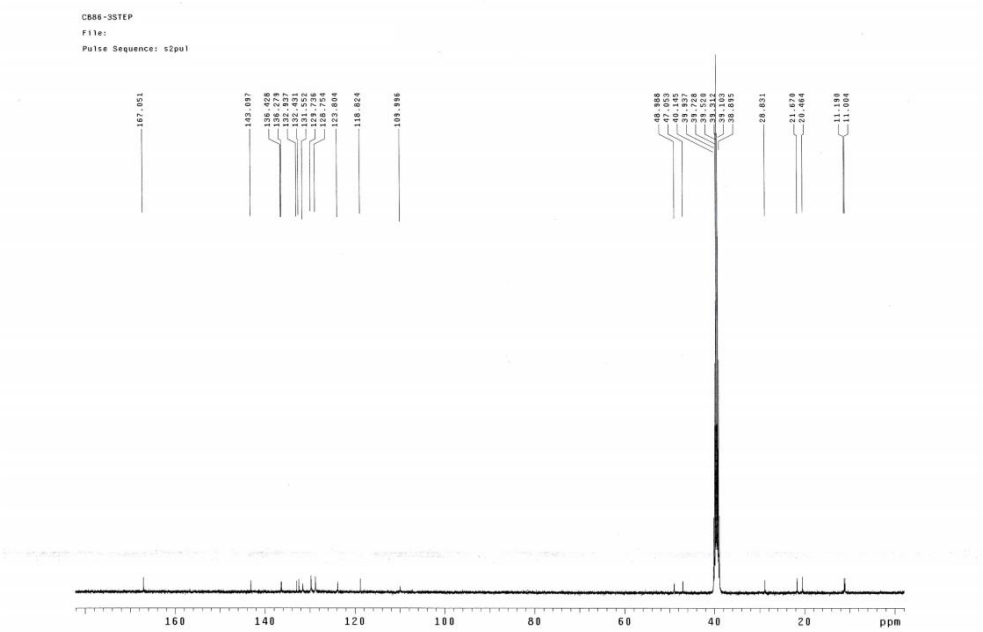
• **3-bromo-4-(4-chlorophenyl)-4-oxo-*N,N*-dipropylbutanamide (9)**



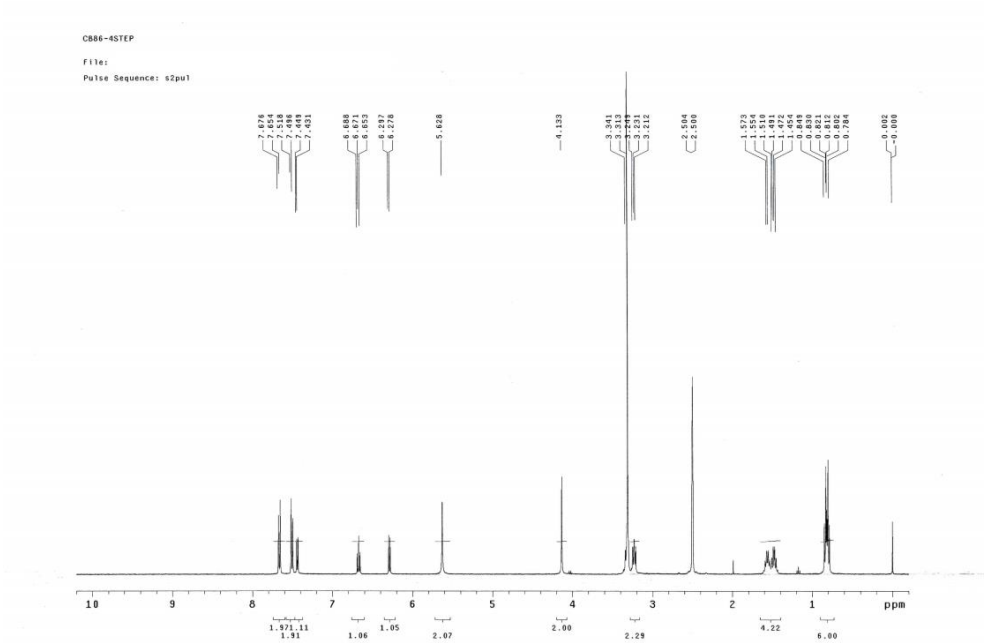


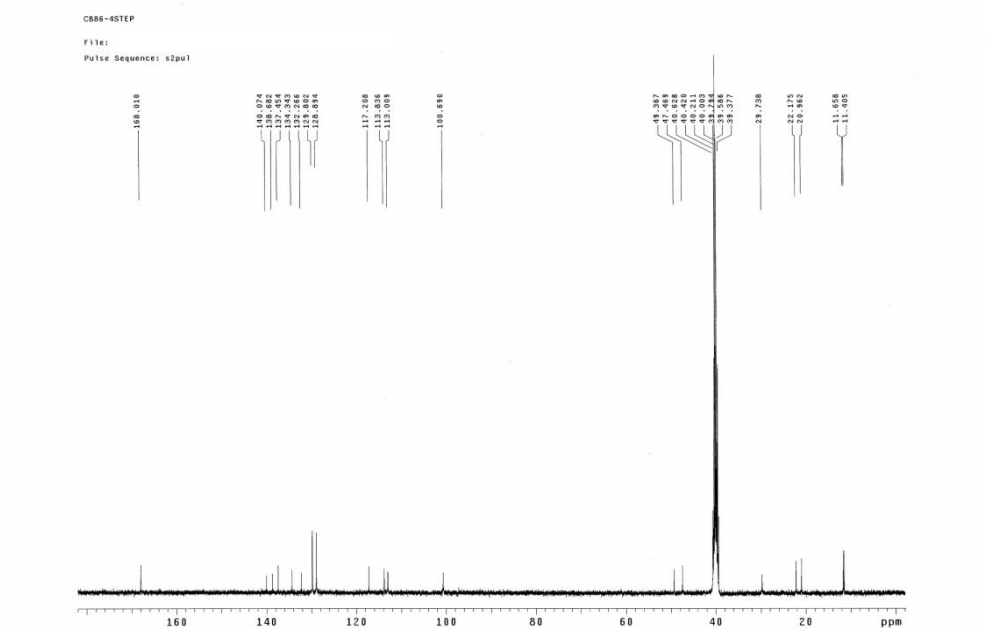
• **2-(2-(4-chlorophenyl)-8-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N,N* dipropylacetamide (10)**



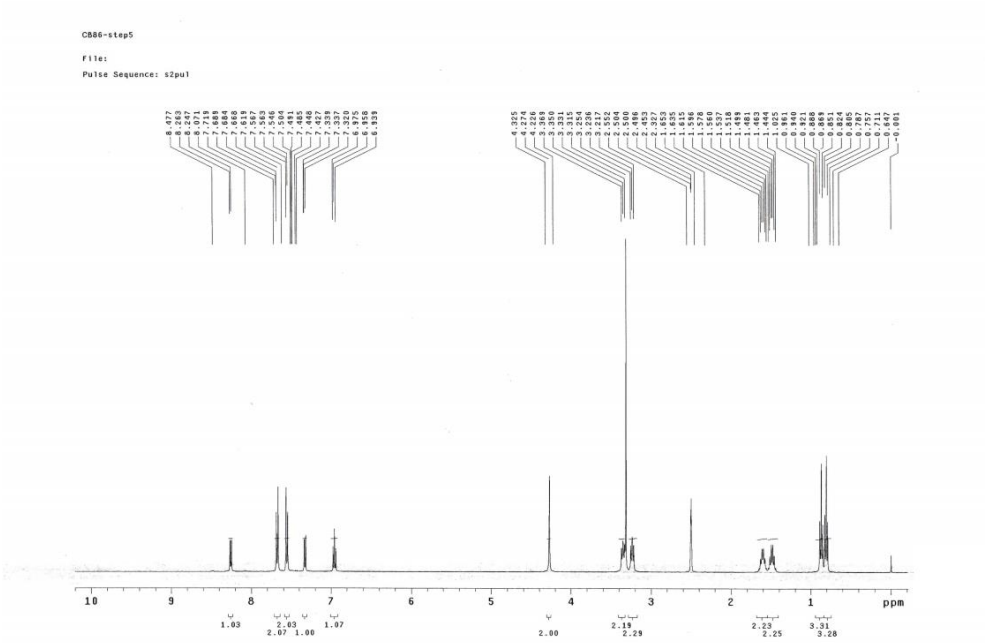


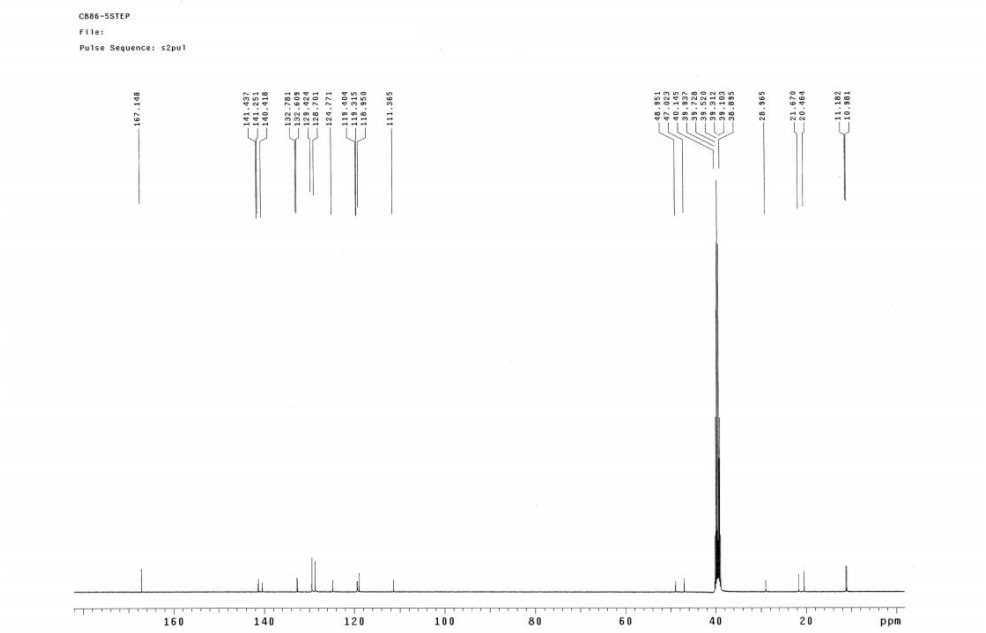
• **2-(8-amino-2-(4-chlorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N*,*N*-dipropylacetamide (11, CB86)**





• **2-(2-(4-chlorophenyl)-8-isothiocyanatoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (12)**

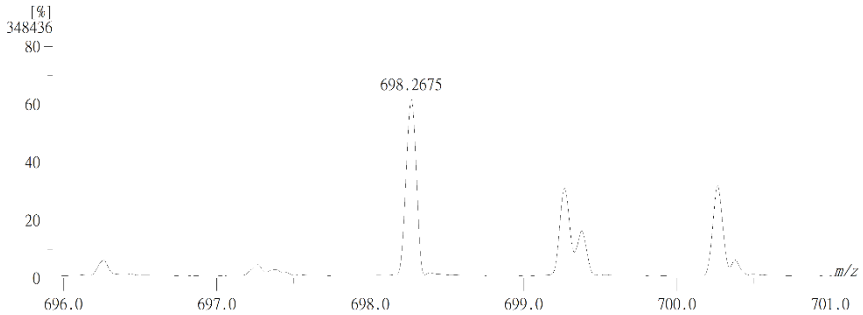




제 2 절 HRMS data of CB259 and Re-CB259

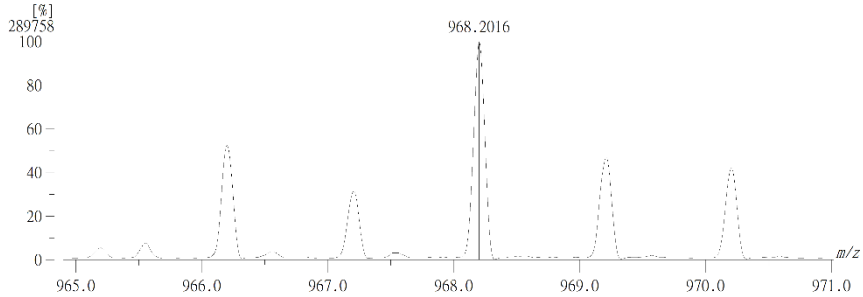
• CB259

[Mass Spectrum]
Data : FAB-A550 Date : 22-Jun-2020 15:26
RT : 0.07 min Scan# : (4,18)
Elements : C 100/0, H 100/0, 35Cl 1/0, 37Cl 1/0, N 10/5, O 5/0, S 2/0
Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 10mmu if m/z > 10
Unsaturation (U.S.) : 15.0 – 25.0



• Re-CB259

[Mass Spectrum]
Data : FAB-A551 Date : 22-Jun-2020 15:36
RT : 0.13 min Scan# : (8,17)
Elements : C 100/0, H 100/0, 35Cl 1/0, 37Cl 1/0, N 10/5, O 7/3, S 1/0, 185Re 1/0,
187Re 1/0
Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 10mmu if m/z > 10
Unsaturation (U.S.) : 20.0 – 30.0



참고 문헌

1. Murphy, M.; Hartley, R. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, 17, 865 –886.
2. Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol* **2018**, 18, 165–173.
3. Ammer, L.-M.; Vollmann-Zwerenz, A.; Ruf, V.; Wetzel, C.H.; Riemenschneider, M.J.; Albert, N.L.; Beckhove, P.; Hau, P. The Role of Translocator Protein TSPO in Hallmarks of Glioblastoma. *Cancers* **2020**, 12, 2973.
4. Papadopoulos, V.; Baraldi, M.; Guilarte, T.R.; Knudsen, T.B.; Lacapère, J.J.; Limdermann, P.; Norenberg, M.D.; Nutt, D.; Weizman, A.; Zhang, M.R.; et al. Translocator protein (18 kDa): New nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* **2006**, 27, 402–409.
5. Varshosaz, J. Dextran conjugates in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **2012**, 9, 509–523.
6. Zheng, J.; Boisgard, R.; Siquier-Pernet, K.; Decaudin, D.; Dolle, F.; Tavitian, B. Differential expression of the 18 kDa translocator protein (TSPO) by neoplastic and inflammatory cells in mouse tumors of breast cancer. *Mol Pharm* **2011,** 8, 823–832.
7. Corsi, L.; Geminiani, E.; Baraldi, M. Peripheral benzodiazepine receptor (PBR) new insight in cell proliferation and cell differentiation review. *Curr Clin Pharmacol* **2008,** 3, 38–45.

8. Denora, N.; Margiotta, N.; Laquintana, V.; Lopedota, A.; Cutrignelli, A.; Losacco, M.; Franco, M.; Natile, G. Synthesis, Characterization, and in Vitro Evaluation of a New TSPO-Selective Bifunctional Chelate Ligand. *ACS Med Chem Lett* **2014**, 5, 685-689.
9. Choi, J.Y.; Iacobazzi, R.M.; Perrone, M.; Margiotta, N.; Cutrignelli, A.; Jung, J.H.; Park, D.; Moon, B.S.; Denora, N.; Kim, S.E.; Lee, B.C. Synthesis and Evaluation of Tricarbonyl (99m)Tc-Labeled 2-(4-Chloro)phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine Analogs as Novel SPECT Imaging Radiotracer for TSPO-Rich Cancer. *Int J Mol Sci* **2016**, 17, 1085.
10. Bhoola, N.H.; Mbita, Z.; Hull, R.; Dlamini, Z. Translocator Protein (TSPO) as a Potential Biomarker in Human Cancers. *Int J Mol Sci* **2018**, 19, 2176.
11. Denora, N.; Margiotta, N.; Laquintana, V.; Lopedota, A.; Cutrignelli, A.; Losacco, M.; Franco, M.; Natile, G. Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of a new TSPO selective bifunctional chelate ligand. *ACS Med Chem Lett* **2014**, 5, 685–689.
12. Margiotta, N.; Denora, N.; Piccinonna, S.; Laquintana, V.; Lasorsa, F.M.; Franco, M.; Natile, G. Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of new coordination complexes of platinum(II) and rhenium(I) with a ligand targeting the translocator protein (TSPO). *Dalton Trans* **2014**, 43, 16252–16264.
13. Alberto, R.; Schibli, R.; Egli, A.; Schubiger, A.P. A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of [99mTc(OH2)3(CO)3]+from [99mTcO4]′ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand. *J Am Chem Soc* **1998**, 120, 7987–7988.

14. Veenman, L.; Levin, E.; Weisinger, G.; Leschiner, S.; Spanier, I.; Snyder, S.H.; Weizman, A.; Gavish, M. Peripheral-type benzodiazepine receptor density and in vitro tumorigenicity of glioma cell lines. *Biochem Pharmacol* **2004**, 68, 689-698.
15. Denora, N.; Laquintana, V.; Pisu, M.G.; Dore, R.; Murru, L.; Latrofa, A.; Trapani, G.; Sanna, E. 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine compounds containing hydrophilic groups as potent and selective ligands for peripheral benzodiazepine receptors: synthesis, binding affinity and electrophysiological studies. *J Med Chem* **2008**, 51, 6876-6888.
16. Jaremko, M.; Jaremko, Ł.; Jaipuria, G.; Becker, S.; Zweckstetter, M. Structure of the mammalian TSPO/PBR protein. *Biochem Soc Trans* **2015**, 43, 566–571.
17. Papadopoulos, V.; Baraldi, M.; Guilarte, T.R.; Knudsen, T.B.; Lacapere, J.J.; Lindemann, P.; Norenberg, M.D.;Nutt, D.; Weizman, A.; Zhang, M.R.; et al. Translocator protein (18 kDa): New nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* **2006**, 27, 402–409.
18. Zeno, S.; Veenman, L.; Katz, Y.; Bode, J.; Gavish, M.; Zaaroor, M. The 18 kDa mitochondrial translocatorprotein (TSPO) prevents accumulation of protoporphyrin IX. Involvement of reactive oxygen species (ROS). *Curr Mol Med* **2012**, 12, 494–501.
19. Veenman, L.; Vainshtein, A.; Yasin, N.; Azrad, M.; Gavish, M. Tetrapyrroles as endogenous TSPO ligands in eukaryotes and prokaryotes: Comparisons with synthetic ligands. *Int J Mol Sci* **2016**, 17, 880.

20. Veenman, L.; Gavish, M. The role of 18 kDa mitochondrial translocator protein (TSPO) in programmed cell death, and effects of steroids on TSPO expression. *Curr Mol Med* **2012**, 12, 398–412.
21. Kugler, W.; Veenman, L.; Shandalov, Y.; Leschiner, S.; Spanier, I.; Lakomek, M.; Gavish, M. Ligands of the mitochondrial 18 kDa translocator protein attenuate apoptosis of human glioblastoma cells exposed to erucylphosphohomocholine. *Cell Oncol* **2008**, 30, 435–450.
22. Veenman, L.; Bode, J.; Gaitner, M.; Caballero, B.; Pe'er, Y.; Zeno, S.; Kietz, S.; Kugler, W.; Lakomek, M.;Gavish, M. Effects of 18-kDa translocator protein knockdown on gene expression of glutamate receptors, transporters, and metabolism, and on cell viability affected by glutamate. *Pharmacogenet Genom* **2012**, 22, 606–619.
23. Vainshtein, A.; Veenman, L.; Shterenberg, A.; Singh, S.; Masarwa, A.; Dutta, B.; Island, B.; Tsoglin, E.;Levin, E.; Leschiner, S.; et al. Quinazoline based tricyclic compounds that regulate programmed cell death, induce neuronal differentiation, and are curative in animal models for excitotoxicity and hereditary brain disease. *Cell Death Discov* **2015**, 1, 15027.

Abstract

Development of a new TSPO targeting ligand for tumor theranosis

Jungmin Kim

Department of Applied Bioengineering

Graduate School of Convergence Science and Technology

Seoul National University

Introduction: Translocator protein 18 kDa (TSPO), which is located on the outer membrane of mitochondria, has been reported to overexpress in various cancer cells, including brain, breast, colon, prostate and ovarian cancers, as well as in astrocytomas and hepatocellular. Therefore, TSPO could be an attractive target for imaging and therapy of TSPO-rich cancer. In this work, we designed and synthesized an imidazo[1,2-a]pyridine analog (CB259) for radiolabeling. The ^{99m}Tc-labeled form can be a diagnostic tool and, on the other hand, the ^{188}Re-labeled form can be a therapeutic agent for TSPO-rich cancer diagnosis and treatment, respectively.

Methods: The TSPO ligand CB259 was prepared by thiourea ligation of the 4-((*N,N*-hydroxycarbonyl-2-picolylamino)methyl)aniline moiety to CB86. Compound Re-CB259 was prepared by a coordination of CB259 with $(NEt_4)_2[^{185/187}ReBr_3(CO)_3]$ in dimethylformamide at 70 ^{o}C for 1 h, followed by HPLC purification. Binding affinity of Re-CB259 for TSPO was measured by displacement of [^{3}H]PK 11195 in the

isolated membrane protein from C6 glioma cells. The radiosynthesis of ^{99m}Tc-CB259 was conducted in dimethylformamide (350 μL) contains CB259 (0.5 mg, 0.7 μmol) and $[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ at 70 °C for 30 min. ^{99m}Tc-CB259 was isolated from the obtained mixture by HPLC purification. Log D of ^{99m}Tc-CB259 was determined in the mixture of *n*-octanol and phosphate buffer (pH 7.4) by shaking vial method. *In vitro* stability test of ^{99m}Tc-CB259 performed in human serum at 37 °C for 4 h.

Results: Re-CB259 was prepared with 59.5% yield and its binding affinity (K_i) was 32.1±9.9 nM for TSPO. The radiolabeled form, ^{99m}Tc-CB259 was successfully synthesized with 27.6 % radiochemical yield (non-decay corrected) in high radiochemical purity (>99%). The identification of ^{99m}Tc-CB259 was confirmed by HPLC co-injection with Re-CB259 as followed the observed HPLC retention time was 17 min for ^{99m}Tc-CB259 and 19 min for Re-CB259. ^{99m}Tc-CB259 showed high in vitro stability (>99%), and 1.47±0.12 Log D value (n=3).

Conclusion: We successfully synthesized and characterized a new TSPO-binding ligand, CB259 for radiolabeling with the matched pair ^{99m}Tc/^{188}Re.

Keywords: Translocator protein 18 kDa, TSPO, theranostic, Tricarbonyltechnetium-99m, $^{99m}Tc(CO)^3$, TSPO-rich cancer, SPECT

Student number: 2019-25467