

# 에스트로젠 수용체 리간드로서 사이클렌을 기본 구조로 한 구리 착물의 합성

경북대학교 의과대학 분자의학교실<sup>1</sup>, 핵의학교실<sup>2</sup>  
박정찬<sup>1</sup> · 달판판다<sup>1</sup> · 전학림<sup>1</sup> · 이상우<sup>2</sup> · 안병철<sup>2</sup> · 이재태<sup>2</sup> · 유정수<sup>1,2</sup>

## Synthesis of Cyclen-Based Copper Complexes as a Potential Estrogen Receptor Ligand

Jeong Chan Park, M.S.<sup>1</sup>, Darpan N. Pandya, M.S.<sup>1</sup>, Hak Rim Jeon, Ph.D.<sup>1</sup>,  
Sang Woo Lee, M.D.<sup>2</sup>, Byeong-Cheol Ahn, M.D.<sup>2</sup>, Jaetae Lee, M.D.<sup>2</sup>, and Jeongsoo Yoo, Ph.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departments of Molecular Medicine and <sup>2</sup>Nuclear Medicine, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

**Purpose:** The estrogen receptor (ER), which is over-expressed in ER-positive breast tumors, has been imaged by positron emission tomography (PET) using [<sup>18</sup>F] labeled estrogen ligands, especially [<sup>18</sup>F]FES. However, [<sup>18</sup>F] has relatively short-lived half-life (t<sub>1/2</sub>=1.8 h) and the labeling yield of radio-fluorination is usually low compared with <sup>64</sup>Cu (t<sub>1/2</sub>=12.7 h). 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen) is used to form stable metal complexes with copper, indium, gallium, and gadolinium. With these in mind, we prepared cyclen-based Cu complexes which mimic estradiol in aspect of two hydroxyl groups. **Materials and Methods:** 1,7-Protected cyclen, 1,7-bis (benzyloxycarbonyl)-cyclen was synthesized according to the reported procedure. After introducing two 4-benzyloxybenzyl groups at 4,10-positions, the benzyloxycarbonyl and benzyl groups were removed at the same time by hydrogenation on Pd/C to give 1,7-bis(4-hydroxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1**). **Results:** The prepared ligand **1** was fully characterized by <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, and mass spectrometer. The synthesized ligand was reacted with copper chloride and copper perchlorate to give copper complexes [Cu(1)]<sup>2+</sup>·2(ClO<sub>4</sub>)<sup>-</sup> and [Cu(1)Cl]<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> which were confirmed by high-resolution mass (FAB). **Conclusion:** We successfully synthesized a cyclen derivative of which two phenol groups are located on trans position of N-atoms. And, two Cu(II) complexes of +2 and +1 overall charge, were prepared as a potential PET tracers for ER imaging. (Nucl Med Mol Imaging 2007;41(4):326-334)

**Key Words:** estrogen receptor ligand, <sup>64</sup>Cu, positron emission tomography, cyclen derivative

## 서 론

유방암은 선진국에서 암에 의한 여성 사망 요인 중 1위를 차지하고 있고, 여성 인구 10 명 중 거의 1 명은 일생 중 유방암에 걸릴 만큼 매우 높은 발생빈도를 보이고 있다.<sup>1,2)</sup> 따

라서 영상에 의한 유방암의 정확한 진단 및 병기 판정은 그 무엇보다 중요하다고 말할 수 있다. 새롭고 향상된 영상 방법은 암의 조기 진단, 보다 정확하며 비 침습적인 병기 판정 및 항암 치료의 예후 등을 예측하는데 큰 도움을 줄 수 있다. 현재 유방조영술, 초음파, CT, MRI, 전초 림프절 생검 등 다양한 방법들이 유방암의 진단과 병기 판정에 사용되고 있으나 정확한 병기 판정을 위해서는 위의 여러 방법들을 같이 사용하거나 전부 이용해야만 한다. 특히 거드랑이 림프절의 전이 여부를 정확히 알 수 있는 비 침습적인 방법은 없고 정확한 병기 판정은 전초 림프절 생검이나 액와 림프절 절제술 등 외과적이거나 조직학적 검사에 의존하는 실정이다.<sup>1,3)</sup>

다행인 점은 지난 10년간 [<sup>18</sup>F]FDG를 이용한 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET)에 의해서 유방암 진단에 크나큰 진보가 있었다는 점이다.<sup>4)</sup> PET은 해부학적이나 조직학적인 변화에 따른 암세포의 분별이 아니

• Received: 2007. 4. 10. • Accepted: 2007. 5. 23.  
• Address for reprints: Jeongsoo Yoo, Ph.D., Department of Molecular Medicine, Kyungpook National University School of Medicine, 101, Dongin-Dong 2-ga, Jung-gu, Daegu 700-422, Korea  
Tel: 82-53-420-4947, Fax: 82-53-426-4944  
E-mail: yooj@knu.ac.kr

\*이 논문은 2005년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원 (KRF-2005-003-E00198)과 2005년도 경북대학교 연구비 그리고 2006년도 두뇌한국 21 사업의 지원으로 수행되었음.

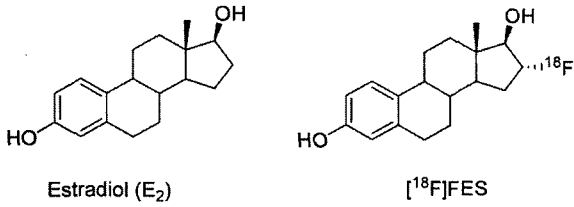


Fig. 1.  $[^{18}\text{F}]$ FES is a  $^{18}\text{F}$  analog of estradiol.

라 분자 생물학적인 차이에 따라 정상 세포와 종양 세포를 분별한다는 점에서 CT나 MRI 등 기존 영상 기술과는 많은 차이가 있다. 종양 세포의 경우 정상 세포보다 포도당의 소모량이 증가하므로 포도당 유도체인 FDG의 섭취도 증가하게 되어 정상 세포로부터 구별되게 된다.<sup>5)</sup> 기존 방법에 비해 FDG-PET 영상의 가장 큰 장점은 한번의 방사능 물질의 주사 후 전신 검사에 의해서 국부적 재발, 림프절 전이 및 원격 전이 등을 높은 정확도로 한번에 검사할 수 있다는 점이다.<sup>6)</sup> 또한, FDG-PET 영상은 유방암 환자의 병기 재판정에서도 주목할 만한 결과를 보이고 있다. 하지만 FDG-PET 영상은 초기 유방암의 발견 시 민감도가 떨어지고 림프절의 병기 판정에서도 정확도가 그리 높지 않은 단점이 있다.<sup>6,7)</sup> 또 다른 FDG-PET 스캔의 가장 큰 단점은 잘못된 양성 판독이 많다는 점이다. FDG-PET의 기본 원리가 당 대사의 증가에만 의존하므로 단순 감염 등에 의한 당 대사 증가도 암 조직으로 잘못 판독될 수 있다는 점이다. FDG 섭취 정도는 원발 종양의 크기, 전이 여부 및 에스트로젠이나 프로제스테론 수용체의 발현 등과 특별한 상관관계가 없는 걸로 알려져 있다.<sup>8)</sup>

이런 FDG의 약점을 보완하기 위해서 많은 연구 그룹들이 종양 세포의 다른 생물학적/생화학적 특성에 관심을 가지기 시작했다. FDG가 종양 세포의 당 대사 증가에 초점을 맞추는 것에 비해  $[^{18}\text{F}]$ FES ( $16\alpha$ - $[^{18}\text{F}]$ fluoro- $17\beta$ -estradiol)는 암 세포의 호르몬 수용체 발현을 대상으로 하고 있다.<sup>8)</sup>  $[^{18}\text{F}]$ FES는 체내 가장 대표적인 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor, ER) 리간드인 에스트라다이올(estradiol)의  $[^{18}\text{F}]$  유도체로서 상당한 수준의 ER 결합력을 유지하고 있다 (Fig. 1). 일차 유방암 및 전이된 유방암 모두  $[^{18}\text{F}]$ FES에 의해 판독 될 수 있음이 보고 되었다.<sup>8)</sup> 또한,  $[^{18}\text{F}]$ FES의 초기 섭취 양과 호르몬 치료의 반응 정도간에 깊은 상관관계가 있다고 보고되고 있다.<sup>9)</sup> 즉,  $[^{18}\text{F}]$ FES의 초기 섭취율이 높은 유방암의 경우 타목시펜과 같은 항 에스트로젠 약제 치료에 보다 잘 반응함이 관찰되었다. 따라서  $[^{18}\text{F}]$ FES에 의한 PET 영상은 유방암 환자의 예후를 미리 예측하는데 사용될 수 있는 장점을 가지고 있다. 물론 대부분의 유방암이 ER을

가지고 있기는 하지만 ER이 많이 발현되지 않는 유방암에 대해서는  $[^{18}\text{F}]$ FES를 사용할 수 없는 단점이 있다.

$[^{18}\text{F}]$ FES의 성공적인 임상 실험 결과는 그 이후로  $[^{18}\text{F}]$ FES의 새로운 활용 가능성을 모색하는 시도와 더불어 많은 새로운 방사능을 띤 ER 리간드들의 합성을 불러 왔다.<sup>110)</sup>  $16\beta$ - $[^{18}\text{F}]$ Fluoromoxestrol의 경우 동물 실험에서는 매우 고무적인 결과를 보였으나 실제 임상 실험에서는 좋은 유방암 영상을 얻는데 실패하였다. 이유는 아마도 흰쥐(rat)에는 없지만 사람에게에는 있는 스테로이드 수송 단백질 (serum steroid transport protein)인 성 호르몬 결합 글로블린 (sex hormone binding globulin)과의 미약한 상호작용 때문이라 추측된다.<sup>11)</sup>

이상에서 살펴본 유방암 방사성의약품 (radiopharmaceutical)은  $^{18}\text{F}$ 을 이용한 것이다.  $^{18}\text{F}$ 은 붕괴 시 대부분 양전자 방출을 수반하며 (97%) 상대적으로 낮은 에너지를 가지고 있어 PET 방사성동위원소로서 아주 우수한 물리적 성질을 가지고 있다. 하지만 반감기는 110분으로써 방사성의약품을 합성하고 체내에 주사 후 상당 시간이 지난 뒤 이미지를 얻기에는 짧은 면이 없지 않다. 예를 들어 현재 암 진단시 많이 사용되고 있는  $[^{18}\text{F}]$ FDG의 경우에 줄기세포의 생체 내 분포와 관련된 연구처럼 긴 시간 동안 세포의 추적이 필요한 경우,  $^{18}\text{F}$ 의 짧은 반감기로 인하여 20시간 이상의 영상을 얻기에는 현실적으로 어려운 면이 있다.<sup>12)</sup>

$^{64}\text{Cu}$ 는 새롭게 각광 받는 PET 방사성동위원소이다. 반감기는 12.7 시간으로  $^{18}\text{F}$ 에 비해 6배 이상 길고 붕괴 시  $\beta^+$  (19%)와  $\beta^-$  (39%)를 모두 수반하므로 PET 영상을 얻을 수 있을 뿐 아니라 방사능 치료에도 이용될 수 있다.<sup>13)</sup>  $^{64}\text{Cu}$  또한  $^{18}\text{F}$ 과 마찬가지로 소형 의료용 사이클로트론을 이용해 높은 순도로 생산할 수 있다. 하지만 문헌조사 결과 우리가 알고 있는 한 아직  $^{64}\text{Cu}$ 를 기반으로 하는 어떠한 ER리간드에 대한 연구도 보고되지 않고 있다. 특히 잘 고안된 리간드를 사용할 경우  $^{64}\text{Cu}$ 는 95% 이상의 높은 수율로 표지할 수 있어 HPLC 등 복잡한 분리과정 없이 바로 주사할 수 있는 장점도 있다

본 연구는  $^{18}\text{F}$ 보다 긴 반감기를 가진  $^{64}\text{Cu}$ 를 방사성동위원소로 사용해 새로운 형태의 ER 리간드를 합성하고 이들 구리 착물의 생체 내 성질을 규명해 PET 방사능화합물로서의 가능성을 모색하는 것을 최종 연구 목표로 하고 있다. 새로운 ER 리간드는 궁극적으로 PET을 이용해 유방암의 조기 발견, 정확한 병기 판정, 그리고 항암 치료에 의한 예후 예측 및 치료 효과 평가 등에 효과적으로 사용될 수 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 기기 및 시약

Cyclen (1,4,7,10-Tetraazacyclododecane, 사이클렌)는 Strem Chemicals (Newburyport, MA, USA)에서 구입하였고, 4-benzyloxybenzyl bromide는 Biofine (Vancouver, Canada)에서 구입하였다. TLC (aluminum oxide on polyester)와 4-methoxybenzyl bromide 및 다른 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.  $^1\text{H}$ 와  $^{13}\text{C}$  NMR 분석은 경북대학교내 공동 실험 실습관에 설치되어 있는 Varian 300 MHz를 이용하였다. 질량분석 자료는 경북대학교내에 있는 기초과학지원연구소, 대구분소에서 JMS 700 (Joel, USA) 고분해능 질량분석기를 이용해 얻었다.

### 2. 사이클렌 유도체 리간드 합성

#### 1) 1,7-Bis(benzyloxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1a**)의 합성

**1a**의 경우는 기존에 사용된 방법에 따라 합성되어졌다.<sup>14)</sup> 합성 방법을 간략하게 기술하면 다음과 같다. 5 g (29 mmol)의 사이클렌을 20 ml 물에 녹인 후 5M HCl을 조금씩 첨가하여 pH를 2~3사이로 맞추고 8.2 ml (58 mmol)의 benzyl chloroformate (ClCO<sub>2</sub>Bn)를 0.5 ml씩 몇 일에 나누어 넣었다. 반응이 진행되는 동안에 pH 2~3사이로 맞추고, 반응이 진행되면서 흰색의 침전물이 생겼는데 이를 필터에 여과하고, 반응하지 않고 남아 있는 benzyl chloroformate를 제거하기 위해 헥산으로 씻고 건조시켰다. 완전히 건조된 침전물은 에틸아세테이트에 녹여, alumina컬럼 상에서 에틸아세테이트로 씻어준 후, 메탄올로 용리하였다. 이렇게 하여 1,7-bis(benzyloxycarbonyl)-cyclen (**1a**)을 10 g (81% 수율) 얻을 수 있었다.  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) 2.76-2.99 (m, 8H), 3.4-3.53 (m, 8H), 5.13 (s, 4H), 7.27-7.36(m, 10H)

#### 2) 1,7-Bis(benzyloxycarbonyl)-4,10-bis(4-methoxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1b**)의 합성

1181 mg (2.68 mmol)의 **1a**을 20 ml의 아세트나이트릴에 녹이고, 4.67 ml (26.8 mmol)의 (*i*-Pr)<sub>2</sub>NEt을 넣고, 0.85 ml (5.9 mmol)의 4-methoxybenzyl bromide를 첨가하였다. 질소 가스하에서 70°C로 12시간 정도 반응시킨 후, 농축시키고, 다이클로로메탄으로 추출하였다. MgSO<sub>4</sub>로 수분을 제거한 후, 다시 농축시켰다. 에틸아세테이트:헥산:다이클로로메탄=9:9:2를 사용하여 alumina 컬럼으로 농축물질을 분리하여 1,7-bis(benzyloxycarbonyl)-4,10-bis(4-methoxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1b**)을 1283 mg (70% 수

율) 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) 2.63 (br d, 8H,  $J=12$  Hz), 3.43 (br s, 8H), 3.52 (br s, 4H), 3.75 (s, 6H), 4.93 (s, 4H), 6.79 (d, 4H,  $J=9$  Hz), 7.13 (br s, 4H), 7.24-7.27 (br m, 10H)

#### 3) 1,7-Bis(4-methoxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1c**)의 합성

950 mg (1.40 mmol)의 **1b**를 100 ml의 에탄올에 녹이고, 400 mg의 10% Pd/C을 넣고, 수소 가스 하에서 9시간 정도 상온에서 반응하였다. 반응이 끝났는지는 alumina TLC상에서 에틸아세테이트:헥산=1:1로 확인 후, celite로 여과하여 Pd/C를 제거하였다. 여과된 용액은 농축 후 메탄올:에틸아세테이트=1:3을 사용하여 alumina 상에서 컬럼하여 분리하였다. 이렇게 하여 1,7-bis(4-methoxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1c**)를 355 mg (62% 수율) 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) 2.59-2.64 (br m, 16H), 3.55 (s, 4H), 3.80 (s, 6H), 6.89 (d, 4H,  $J=8$  Hz), 7.25 (d, 4H,  $J=8$  Hz)

#### 4) 1,7-Bis(4-hydroxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1**) 합성 시도

##### (1) BBr<sub>3</sub>을 이용한 반응

24 mg (0.06 mmol)의 **1c**를 반응할 플라스크에 담고, 고무마개로 씌웠다. 진공펌프를 이용하여 플라스크 안의 공기를 제거하고 질소로 채웠다. 주사기를 이용하여 10 ml의 다이클로로메탄과 150  $\mu\text{l}$ 의 1M BBr<sub>3</sub>를 플라스크 안으로 순서대로 주사하였다. 상온에서 8시간 정도 반응하였다. 반응이 진행되면서 흰색의 침전물을 생겼고, 이를 여과하여 46 mg을 얻었다. NMR 분석결과 methoxy 그룹이 제거되지 않은 것으로 보였다.

##### (2) EtSNa를 이용한 반응

26 mg (0.06 mmol)의 **1c**를 5 ml의 DMF에 녹이고, 81 mg (0.32 mmol)의 EtSNa를 첨가하고 질소 가스 하에서 150~160°C로 16시간 정도 반응하였다. 진한 갈색의 반응 용액을 얻었고, 반응하지 않은 EtSNa를 제거 하기 위해 증류수를 첨가하였다. 20 ml의 다이클로로메탄을 넣고 끓인 후, 농축시키고, 한번 더 다이클로로메탄에 녹이고, 농축시키는 것을 반복하였다. 다이클로로메탄에 녹는 27 mg의 반응물을 얻었지만, 질량분석기로 분석한 결과, 시작물질인 **1c**임을 알 수 있었다.

##### (3) Pyridine hydrochloride을 이용한 반응

60 mg (0.15 mmol)의 **1c**에 8 g (69.23 mmol)의 pyridine

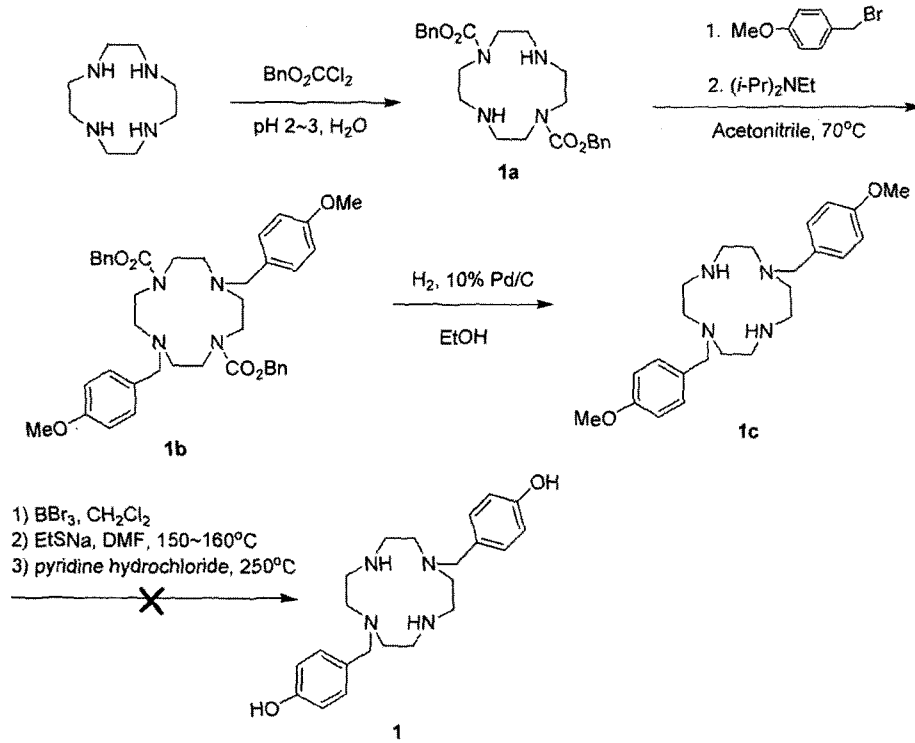


Fig. 2. 4-Methoxybenzyl bromide was used to prepare 1,7-bis(4-hydroxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (1)

hydrochloride를 넣고, 250°C에서 8시간 반응시켰다. 용액은 진한 갈색으로 되었고, 흰색 고체가 생겼다. 50 ml의 증류수를 첨가하니 흰색의 고체가 모두 녹았고, 이를 여과하여 진한 갈색의 용액을 얻었다. 이 용액을 농축시킨 후, 다이클로로메탄에 녹여 물에서 추출하였는데, 우리가 원하는 반응물인 **1**를 얻는다는 실패하였다.

5) 1,7-Bis(benzyloxycarbonyl)-4,10-bis(4-benzyloxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1d**)의 합성

1000 mg (2.27 mmol)의 **1a**를 20 ml의 아세트나이트릴에 녹이고, 2.3 ml (13.6 mmol)의  $(i\text{-Pr})_2\text{NEt}$ 을 넣고, 1384 mg (5.00 mmol)의 4-benzyloxybenzyl bromide를 첨가하였다. 질소 가스 하에서 70°C로 14시간 반응하였다. 반응이 끝나면 농축시키고, 다이클로로메탄으로 추출하였다. 추출물은  $\text{MgSO}_4$ 로 수분을 제거한 후, 다시 농축시켰다. 에틸아세테이트:헥산:다이클로로메탄=1:1:1을 사용하여 alumina컬럼에서 순수한 화합물을 분리하였다. 이렇게 하여 1,7-bis(benzyloxycarbonyl)-4,10-bis(4-benzyloxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1d**)을 1440 mg (76% 수율) 얻었다.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) 2.63 (br d, 8H,  $J=15$  Hz), 3.41 (br t, 8H,  $J=12$  Hz), 4.93 (s, 4H), 5.02 (s, 4H), 6.88 (d, 4H,

$J=3$  Hz), 7.14 (br s, 4H), 7.25-7.42 (m, 20H)

6) 1,7-Bis(4-hydroxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1**)의 합성

1440 mg (1.73 mmol)의 **1d**를 에틸아세테이트에 녹이고, 700 mg의 10% Pd/C을 넣고, 수소 가스 하에서 2시간 정도 상온에서 반응하였다. 반응 종료 후 Pd/C를 Celite로 제거후 500 ml의 메탄올을 이용하여 Celite를 씻어주었다. 여과한 용액은 회전식 감압농축기를 이용해 20 ml로 농축시켜 흰색의 침전물인 1,7-bis(4-hydroxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1**)을 345 mg (52% 수율) 얻었다.  $^1\text{H NMR}$  (methanol- $d_4$ , 300 MHz) 2.59 (br s, 16H), 3.45 (s, 4H), 6.81 (d, 4H,  $J=9$  Hz), 7.15 (d, 4H,  $J=9$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (methanol- $d_4$ , 300 MHz) 45.3, 52.2, 60.0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 116.4 (Ph ring CH), 131.1 (Ph ring C), 131.5 (Ph ring CH), 158.1 (Ph ring C); HRMS (FAB)  $m/z$  385.2602 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{O}_2\text{N}_4$ , calcd 385.2604).

3. 사이클렌 유도체의 구리 착물 합성

1)  $[\text{Cu}(\text{1})]^{2+}2(\text{ClO}_4)^-$ 의 합성

150 mg (0.39 mmol)의 **1**을 30 ml 메탄올에 가열하며 녹이고, 여기에 173 mg (0.47 mmol)의 copper (II) perchlorate

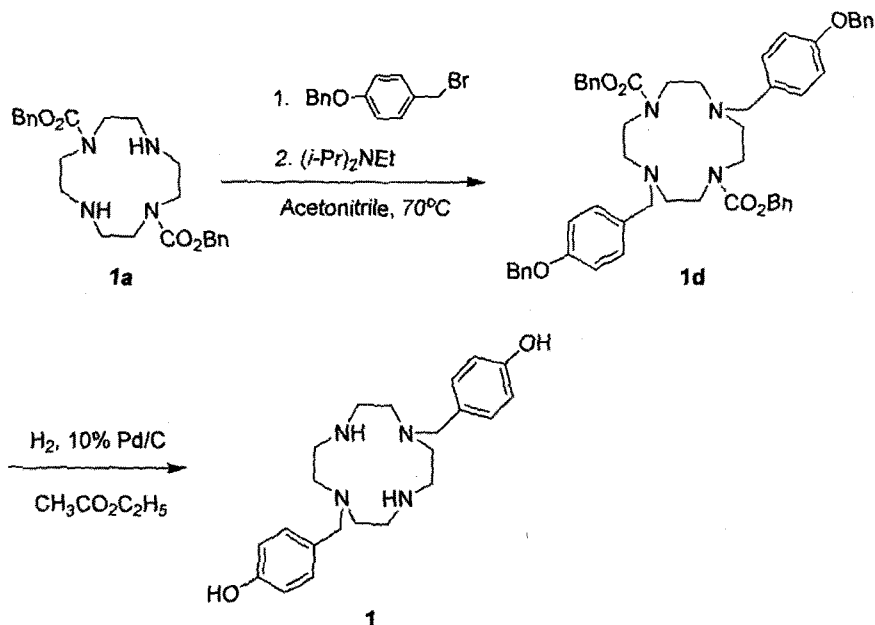


Fig. 3. 4-Benzyloxybenzyl bromide was chosen as starting compound to synthesize 1,7-bis(4-hydroxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (1)

이 녹아 있는 1 ml 메탄올 용액을 한 방울씩 떨어뜨리며 상온에서 반응시켰다. 반응이 진행되면서 보라색의 침전물이 서서히 생겼다. 이를 펌프라인 필터로 여과한 후 용액은 비커에서 재결정을 시도하였고, 걸러진 침전물은 적은 양의 메탄올:에테르=1:1로 씻어준 후 건조시켜 보라색의 침전물인  $[Cu(1)]^{2+}2(ClO_4)^-$ 을 172 mg (97% 수율) 얻었다. HRMS (FAB)  $m/z$  447.1826 ( $[M-(2ClO_4)]^{2+}$ ,  $C_{22}H_{32}CuN_4O_2$ , calcd 447.1821.

2)  $[Cu(1)Cl]^+Cl^-$ 의 합성

154 mg (0.40 mmol)의 1을 30 ml 메탄올에 가열하며 녹이고, 여기에 82 mg (0.48 mmol)의 copper (II) chloride dihydrate가 녹아 있는 1 ml 메탄올 용액을 한 방울씩 떨어뜨리며 상온에서 반응시켰다. 반응이 진행되면서 침전물이 생겼다. 이를 여과한 후 용액은 비커에 옮겨 재결정을 시도하였고, 걸러진 침전물들은 적은 양의 메탄올:에테르=1:1로 씻어준 후, 건조시켜 파란색의 침전물인  $[Cu(1)Cl]^+Cl^-$ 을 93 mg (48% 수율) 얻었다. HRMS (FAB)  $m/z$  482.1508  $[M-Cl]^+$ ,  $C_{22}H_{32}ClCuN_4O_2$ , calcd 482.1510.

결 과

1. 사이클렌 유도체 리간드 합성

우리는 먼저 4-methoxybenzyl bromide를 electrophile로

사용하여 원하는 리간드인 1,7-bis(4-hydroxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (1)을 합성하고자 시도하였다.(Fig. 2) Benzyl chloroformate를 이용하여 대각선 방향에 있는 사이클렌의 1,7-위치의 아민을 선택적으로 보호한 후, 반응할 수 있는 나머지 두개의 아민에 4-methoxybenzyl bromide를 도입하여 성공적으로 1,7-bis(benzyloxycarbonyl)-4,10-bis(4-methoxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (1b)을 합성하였다. 10% Pd/C을 이용한 수소반응으로 사이클렌의 1,7에 위치한 두개의 아민을 보호하고 있던 Chz그룹을 제거하여 1,7-bis(4-methoxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (1c)을 얻었다. 1c에서 최종생성물인 1을 얻기 위하여  $BBr_3$ 를 첨가하여 methoxy그룹을 제거하고자 하였다.  $-70^\circ C$  또는 상온에서  $BBr_3$ 를 이용하여 반응해 보았지만, methoxy그룹이 제거되지 않고 남아 있었다. 그래서 이 외에도 1c를 유기용매인 DMF에 녹인 후, EtSNa만 첨가하기도 하고 LiBr와 EtSNa를 같이 첨가하는 반응도 진행하였다. 또한 DMF에 녹아 있는 1c에 EtSNa를 첨가하고 microwave에서 반응시키기도 하였지만, 모두 시작물질만을 회수할 수 있었다. 다른 시약인 pyridine hydrochloride을 이용하여 methoxy그룹을 제거하는 반응을 하였다. 용액이 갈색으로 바뀌고, 흰색 고체도 생기면서 반응이 진행되는 것처럼 보였지만, 반응 종료 후, 회수해 본 결과, 시작물질임을 알 수 있었다. 그리하여 4-methoxybenzyl bromide 대신 4-benzyloxybenzyl bromide를 electrophile로 사용하여 새롭게 합성을 시작하였다.(Fig. 3)

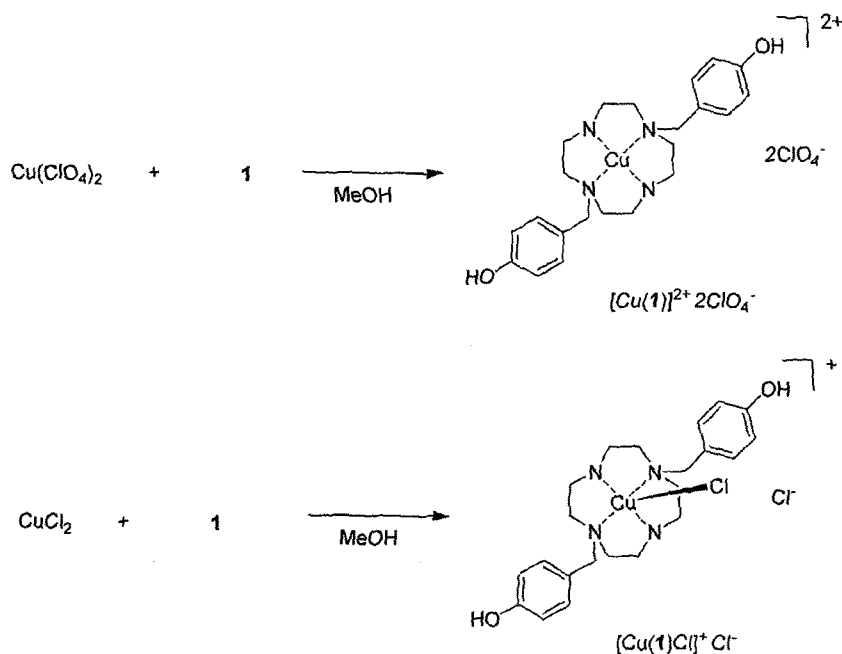


Fig. 4. 1,7-Bis(4-hydroxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1**) was reacted with copper (II) perchlorate and copper (II) chloride to give  $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^{2+} 2(\text{ClO}_4)^-$  and  $[\text{Cu}(\mathbf{1})\text{Cl}]^+ \text{Cl}^-$ , respectively

Cbz로 두개의 아민이 방해된 **1a**와 4-benzyloxybenzyl bromide를 반응시켜 **1d**를 합성하였다. 최종 합성 목표물인 **1**은 4-benzyloxybenzyl 그룹이 도입된 중간체 **1d**를 수소화 반응을 통해 2개의 아민을 보호하고 있던 Cbz 그룹과 benzyloxybenzyl 그룹의 benzyl 그룹을 동시에 제거함으로써 한번의 반응으로 합성할 수 있었다. 합성한 모든 반응물은  $^1\text{H}$  NMR로 확인하였으며, 마지막 최종 생성물인 **1**의 경우,  $^1\text{H}$ 와  $^{13}\text{C}$ -NMR, 그리고 고분해능 질량분석기 (HRMS)를 통하여 합성 여부를 확인하였다.

## 2. 사이클렌 유도체 리간드를 이용한 구리 착물 합성

메탄올에 대한 사이클렌 유도체 **1**의 용해도가 좋지 않아 다소 많은 양의 메탄올에 가열을 하여 녹일 수 있었다. 소량의 메탄올에 녹아 있는 copper (II) perchlorate을 한 방울씩 떨어뜨리며 반응시켜 보라색의 구리 착물 침전물인  $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^{2+} 2(\text{ClO}_4)^-$ 을 얻을 수 있었다. 이와 같은 방법으로 메탄올에 녹아 있는 **1**에 copper(II) chloride dihydrate가 녹아 있는 메탄올 용액을 한 방울씩 떨어뜨리며 반응시켜 파란색의 구리 착물인  $[\text{Cu}(\mathbf{1})\text{Cl}]^+ \text{Cl}^-$ 을 얻을 수 있었다(Fig. 4).

합성한  $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^{2+} 2(\text{ClO}_4)^-$ 와  $[\text{Cu}(\mathbf{1})\text{Cl}]^+ \text{Cl}^-$ 는 모두 고분해능 질량분석기로 분자량을 측정하여 잘 합성되었음을 확인하였다.

## 고찰

새로운 방사성 핵종으로 표지한 ER 리간드 개발은 유방암의 조기 발견 및 기존 항암 치료의 예후 예측과 밀접한 관계가 있으므로 미국 및 서유럽의 경우 활발히 연구가 진행되고 있는 상황이다.<sup>15-17)</sup>  $^{18}\text{F}$ ,  $^{76}\text{Br}$  그리고  $^{124}\text{I}$ 등으로 표지된 에스트로젠과 프로제스틴 유도체를 이용해 새로운 유방암 추적자를 개발하려는 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되어 왔으며 실제로  $^{18}\text{F}$ FES의 경우 유방암의 호르몬 치료 여부 및 항암 치료의 예후를 예측하는데 임상적으로 유용하게 사용되고 있다.<sup>18,19)</sup> ER 리간드 개발에 선두 그룹 중 한 곳인 Katzenellenbogen 등은 주로 테크니슘을 이용한 무기 착물 및 유기금속 (organometallic) 화합물로 ER 리간드를 개발하려는 연구를 진행하고 있다.<sup>20-22)</sup> 하지만 유기금속 화합물의 경우 아직 낮은 ER 결합력을 보여주고 있으며, 무기 화합물의 경우 모든 화합물이 체내에서 불안정해 어떠한 선택적인 ER 결합력도 보이지 못하고 있다.<sup>23)</sup> 최근 Welch 등은 cyclofenil과 그 유도체들을 이용한 ER리간드 합성에 관해 보고하였다. Cyclofenil 유도체를 rhenium과 반응시켜 착물을 합성한 후, ER 결합력을 측정하였는데, 역시 매우 낮은 값을 보여 주었다.<sup>1)</sup>

우리 연구는  $^{64}\text{Cu}$ 를 기반으로 하는 새로운 ER 리간드를 개발하여 PET용 유방암 조영제로 활용하는데 최종 목표를

두고 있으며, 이번 연구에서는 실제로 사이클렌을 기반으로 하여 에스트로젠과 구조적으로 유사하면서 구리와 쉽게 결합할 수 있는 선도 화합물의 합성 가능성을 보여 주었다.

우리는 컴퓨터 모델링 연구를 통해 우리가 디자인한 구리 착물이 ER 리간드로 작용해 리셉터에 결합할 수 있는지 검토하였다.<sup>24)</sup> 디자인한 구리 착물과 ER의 서브타입 중 하나인 ER $\alpha$ 와의 도킹(docking)을 모델링 프로그램인 GOLD를 이용해 예측해 보면 구리착물의 사이클렌에 대각선 방향으로 위치한 두 페놀 그룹 중 하나의 hydroxy 그룹이 ER 리셉터의 결합 자리(binding site)에 있는 Glu353과 강한 수소결합을 하는 것을 알 수 있었다. 이 수소 결합은 ER 리간드의 결합친화도(binding affinity)를 결정짓는 중요한 요소 중 하나이다. 또한 결합 자리에 충분한 공간적 여유가 있어 구리 착물이 어떤 공간적 상충(steric hindrance)도 없이 수용체에 자리잡고 있음을 알 수 있었다. 이상의 두 우호적인 예비 연구 결과는 우리가 디자인한 구리 착물이 새로운 ER 리간드로서의 작용하리라는 기대감을 높여주었다.

이번 합성의 가장 큰 문제점은 어떻게 동일한 조건에 있는 사이클렌의 4개의 아민 중 대각선 방향으로 놓여 있는 1,7-위치의 두개의 아민에만 치환체를 도입하는 것이었다. 우리는 이미 이전 연구에서 적절한 protection group을 활용한 protection/substitution/de-protection 전략을 사용할 경우 사이클렌의 4개의 아민에 두개의 서로 다른 치환기를 원하는 비율로 원하는 위치에 정확히 도입이 가능함을 보고하였다.<sup>25,26)</sup> 이번에 우리가 사용한 protection 방법은 사이클렌을 pH 조절 하에서(pH 2-3) benzyl carbamate (Cbz) 그룹을 1,7-위치에 선택적으로 도입하여 대각선 방향의 2 개의 아민을 보호한 후 나머지 2개의 아민에만 원래 치환하려고 하던 그룹을 도입하는 방법이었다.

사이클렌에 phenol 그룹을 도입하기 위해 우리가 electrophile로 첫번째로 선택한 것은 4-methoxybenzyl 그룹으로 demethylation 반응을 통해 methyl 기를 제거하면 phenol을 얻을 수 있기 때문이다.<sup>27-29)</sup> 처음 예상한 반응 스킴대로 protection/substitution/de-protection 전략을 통해 원하는 1,7-위치에 두개의 4-methoxybenzyl 그룹이 도입된 **1c**까지 특별한 어려움 없이 합성할 수 있었다(Fig. 2). 이 이후에 demethylation 시키기 위해 맨 먼저 BBr<sub>3</sub>을 이용하여 deprotection 시켜보았지만, methoxy그룹이 제거되지 않았다. 그리하여 EtSNa와 pyridine hydrochloride 등 다양한 deprotection 방법을 시도해 보았지만 **1c**에서 methyl 그룹을 제거할 수는 없었다. 반응이 진행되면서 용매색깔이 변하거나 흰색 고체가 생기는 등 반응이 되는 것처럼 보이기도 했지만, 회수하여 NMR이나 TLC 상에서 분석해 본 결과, 시

작물질임을 알 수 있었다.

그래서 methyl 기에 비해 좀더 약한 조건에서 쉽게 제거할 수 있는 phenol 방해기를 찾게 되었고 수소화 반응에 의해서 선택적으로 제거할 수 있는 benzyl 그룹으로 phenol을 protection한 4-benzyloxybenzyl 그룹을 이용하여 최종 목표물인 1,7-bis(4-hydroxybenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**1**)를 합성할 수 있었다(Fig. 3). **1b**를 합성한 동일한 방법에 의해 **1d**를 합성하였고 **1d**의 경우 네개의 아민에 치환기가 도입된 삼차 아민으로 두개의 이차 아민이 있는 **1a**와는 달리 컬럼에서 끌리는 것 없이 쉽게 분리할 수 있었다. **1d**의 Cbz와 phenol의 protection 그룹인 benzyl 기는 전형적인 수소화 반응에 의해서 동시에 제거한 후 최종 화합물인 **1**를 합성할 수 있었다.

합성한 **1**를 이용하여 두 개의 구리 착물을 합성하였다. Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>를 이용할 경우 구리 착물의 전체 전하가 +2인 [Cu(**1**)]<sup>2+</sup>2(ClO<sub>4</sub>)<sup>-</sup>를 얻을 수 있는 반면 CuCl<sub>2</sub>를 이용할 경우 Cl<sup>-</sup> 이온 하나가 구리에 배위하여 전체 전하가 +1인 [Cu(**1**)Cl]<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>를 얻을 수 있었다. 두 화합물 모두 1,7-위치에 놓인 두개의 phenol 그룹이 서로 반대 방향을 향하게 되어 전체적인 구리 착물의 구조는 비슷하리라 예상된다. 단지 [Cu(**1**)Cl]<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>의 경우 구리 이온에 배위한 염소 이온이 square pyramidal 구조의 꼭지점에 놓이게 되어 square planar 구조를 가지는 [Cu(**1**)]<sup>2+</sup>2(ClO<sub>4</sub>)<sup>-</sup> 보다 좀더 bulky하리라 예상된다. 하지만 [Cu(**1**)Cl]<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>의 염소 이온이 수용액 상태에서 쉽게 해리되므로 결국 체내에서 두 구리 착물의 구조는 같게 되고 ER 과의 결합력도 비슷하리라 예상된다.

결론적으로 본 저자들은 에스트라다이올처럼 전체적으로 평평한 구조를 가지면서 ER와의 결합에 중요한 역할을 하는 두개의 알코올 기를 화합물의 서로 반대 방향에 가지고 있는 구리 착물을 사이클렌 유도체를 이용해서 성공적으로 합성하였다. 앞으로 합성한 두 구리 착물은 ER과의 결합력 정도를 측정하여 실제로 ER 리간드로 작용하는지 살펴볼 예정이다. 또한, 구리 착물 **1**의 비어있는 두개의 아민에 acetate 그룹을 도입하여 구리 착물의 체내 안정성을 높이는 등 구리 착물의 구조 최적화를 통해 ER과의 결합력을 높이는 연구도 필요할 것이다.

## 요 약

**목적:** 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서 과발현되는 에스트로젠 수용체는 [<sup>18</sup>F]FES와 같은 <sup>18</sup>F이 표지된 스테로이드계 에스트로젠 수용체 리간드를 사용하여 양전자방출단층촬영기로 영상을 얻을 수 있다. 반감기가 12.7시간인 <sup>64</sup>Cu

에 비해 1.8시간인  $^{18}\text{F}$ 은 반감기가 짧고,  $^{64}\text{Cu}$ 로 표지 하는 경우보다 수율이 낮은 단점이 있다. 사이클렌은 구리, 인듐, 갈륨, 가돌리움 등과 같은 금속과 안정한 착물을 형성한다. 이를 근거로 2개의 페놀 하이드록시 그룹을 가지고 있는 사이클렌을 기본구조로 한 구리 착물을 합성하였다. **재료 및 방법:** 1,7 위치에 보호기를 가지고 있는 1,7-bis(benzyloxy-carbonyl)-cyclen은 기존에 알려진 방법에 따라 합성 되었다. 여기에 4,10 위치에 2개의 4-benzyloxybenzyl groups을 도입한 후, Pd/C상에서의 수소화 반응으로 benzyloxy-carbonyl과 benzyl groups이 모두 제거됨으로써 1,7-bis(4-hydroxybenzyl)-cyclen (**1**)을 성공적으로 합성할 수 있었다. **결과:** 우리가 합성한 물질 **1**은  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 그리고 질량분석기로 만들어졌는지 여부를 확인하였다. 이 물질들은 구리 이온과 반응하여  $[\text{Cu}(\text{I})]^{2+}2(\text{ClO}_4)^-$ 와  $[\text{Cu}(\text{I})\text{Cl}]^+\text{Cl}^-$ 를 형성하였고, 고분해능 FAB 질량분석기로 확인하였다. **결론:** 우리는 질소원자에 trans 방향으로 2개의 페놀 그룹을 가지고 있는 cyclen 유도체를 합성하는데 성공하였고, 구리 이온과 반응하여 각각 전체 전하가 +2 그리고 +1인 구리 착물을 합성하였으며, 이들은 에스트로젠 수용체의 영상화를 위한 PET 추적자로 쓰일 수 있는 가능성이 있다.

## References

- Bigott HM, Parent E, Luyt LG, Katzenellenbogen JA, Welch MJ. Design and synthesis of functionalized cyclopentadienyl tricarbonylmethyl complexes for technetium-94m pet imaging of estrogen receptors. *Bioconjugate Chem* 2005;16:255-64.
- Eubank WB, Mankoff DA, Takasugi J, Vesselle H, Eary JF, Shanley TJ et al. 18fluorodeoxyglucose positron emission tomography to detect mediastinal or internal mammary metastases in breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3516-23.
- Greco M, Crippa F, Agresti R, Seregni E, Gerali A, Giovanazzi R et al. Axillary lymph node staging in breast cancer by 2-fluoro-2-deoxy-d-glucose-positron emission tomography: Clinical evaluation and alternative management. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:630-5.
- Danforth DN, Jr., Aloj L, Carrasquillo JA, Bacharach SL, Chow C, Zujewski J et al. The role of 18F-FDG-PET in the local/regional evaluation of women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002;75:135-46.
- Kerik Nora E, Alexanderson-Rosas E, Fermon-Schwaycer S, Ruiz-Ramirez OL, Alonso-Lopez F. Usefulness of positron tomography (PET) in lung cancer. *Gac Med Mex* 2004;140:525-9.
- Nishiyama Y, Yamamoto Y, Yokoe K, Monden T, Sasakawa Y, Tsutsui K et al. Contribution of whole body FDG-PET to the detection of distant metastasis in pancreatic cancer. *Ann Nucl Med* 2005;19:491-7.
- Isasi CR, Moadel RM, Blafox MD. A meta-analysis of FDG-PET for the evaluation of breast cancer recurrence and metastases. *Breast Cancer Res Treat* 2005;90:105-12.
- Mortimer JE, Dehdashti F, Siegel BA, Katzenellenbogen JA, Fracasso P, Welch MJ. Positron emission tomography with 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-2-deoxy-d-glucose and 16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-17 $\beta$ -estradiol in breast cancer: Correlation with estrogen receptor status and response to systemic therapy. *Clin Cancer Res* 1996;2:933-9.
- Dehdashti F, Flanagan FL, Mortimer JE, Katzenellenbogen JA, Welch MJ, Siegel BA. Positron emission tomographic assessment of "Metabolic flare" To predict response of metastatic breast cancer to antiestrogen therapy. *Eur J Nucl Med* 1999;26:51-6.
- Yoshida Y, Kurokawa T, Sawamura Y, Shinagawa A, Okazawa H, Fujibayashi Y et al. The positron emission tomography with F18 17 $\beta$ -estradiol has the potential to benefit diagnosis and treatment of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2007;104:764-6.
- Jonson SD, Bonasera TA, Dehdashti F, Cristel ME, Katzenellenbogen JA, Welch MJ. Comparative breast tumor imaging and comparative in vitro metabolism of 16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ] fluoroestradiol-17 $\beta$  and 16 $\beta$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoromoxestrol in isolated hepatocytes. *Nucl Med Biol* 1998;26:123-30.
- Kang WJ, Kang H-J, Kim H-S, Chung J-K, Lee MC, Lee DS. Tissue distribution of  $^{18}\text{F}$ -FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med* 2006;47:1295-301.
- Smith SV. Molecular imaging with copper-64. *J Inorg Biochem* 2004;98:1874-901.
- Kovacs ZS, A.D. A general synthesis of 1,7-disubstituted 1,4,7,10-tetraazacyclododecanes. *J Chem Soc Chem Commun* 1995:185-6.
- Minutolo F, Antonello M, Bertini S, Ortore G, Placanica G, Rapposelli S et al. Novel estrogen receptor ligands based on an anthranilyldoxime structure: Role of the phenol-type pseudocycle in the binding process. *J Med Chem* 2003;46:4032-42.
- Muthyala RS, Sheng S, Carlson KE, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Bridged bicyclic cores containing a 1,1-diarylethylene motif are high-affinity subtype-selective ligands for the estrogen receptor. *J Med Chem* 2003;46:1589-602.
- Muthyala RS, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. Exploration of the bicyclo[3.3.1]nonane system as a template for the development of new ligands for the estrogen receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:4485-8.
- Jonson SD, Welch MJ. Pet imaging of breast cancer with fluorine-18 radiolabeled estrogens and progestins. *Q J Nucl Med* 1998;42:8-17.
- Linden HM, Stekhova SA, Link JM, Gralow JR, Livingston RB, Ellis GK et al. Quantitative fluoroestradiol positron emission tomography imaging predicts response to endocrine treatment in breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:2793-9.
- Arterburn JB, Corona C, Rao KV, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. Synthesis of 17- $\alpha$ -substituted estradiol-pyridin-2-yl hydrazine conjugates as effective ligands for labeling with alberto's complex fac-[re(oh2)3(co)3] $^{+}$  in water. *J Org Chem* 2003;68:7063-70.
- Luyt LG, Bigott HM, Welch MJ, Katzenellenbogen JA. 7 $\alpha$ - and 17 $\alpha$ -substituted estrogens containing tridentate tricarbonyl rhenium/technetium complexes: Synthesis of estrogen receptor imaging agents and evaluation using micropet with technetium-94m. *Bioorg Med Chem* 2003;11:4977-89.
- Vijaykumar D, Al-Qahtani MH, Welch MJ, Katzenellenbogen JA. Synthesis and biological evaluation of a fluorine-18 labeled estrogen receptor- $\alpha$  selective ligand: [ $^{18}\text{F}$ ] propyl pyrazole triol. *Nucl Med Biol* 2003;30:397-404.
- Endo Y, Iijima T, Yamakoshi Y, Yamaguchi M, Fukasawa H, Shudo K. Potent estrogenic agonists bearing dicarba-closo-dodecaborane as a hydrophobic pharmacophore. *J Med Chem* 1999;42:1501-4.



24. Reichert DE, Yoo J. unreported results.
25. Yoo J, Reichert DE, Welch, MJ. Comparative in vivo behavior studies of cyclen-based copper-64 complexes: Regioselective synthesis, x-ray structure, radiochemistry, log p, and biodistribution. *J Med Chem* 2004;47:6625-37.
26. Yoo J, Reichert DE, Welch, MJ. Regioselective n-substitution of cyclen with two different alkyl groups: Synthesis of all possible isomers. *Chem Commun* 2003:766-7.
27. Fredriksson A, Stone-Elander S. Rapid microwave-assisted cleavage of methyl phenyl ethers: New method for synthesizing desmethyl precursors and for removing protecting groups. *J Label Compd Radiopharm* 2002;45:529-38.
28. Gates M, Tschudi G. Synthesis of morphine. *J Am Chem Soc* 1956;78:1380-93.
29. Kulkarni PP, Kadam AJ, Mane RB, Desai UV, Wadgaonkar PP. Demethylation of methyl aryl ethers using pyridine hydrochloride in solvent-free conditions under microwave irradiation. *J Chem Res* 1999:394-5.