

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2019.5.1.61>

# Synthesis and evaluation of metal purine-type complexes for lung cancer imaging

Kyeong Jun Kang<sup>1</sup>, In Ok Ko<sup>1</sup>, Ji-Ae Park<sup>1</sup>, and Jung Young Kim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied RI, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul, Korea

## ABSTRACT

Purine type compounds has been recently reported to cause the death for lung cancer cell, related to microtubules-targeting agents (MTAs). Therefore it can be used to develop as theranostic radiopharmaceuticals in nuclear medicine or gadolinium-based MRI imaging agents by chelate chemistry. In the study, we tried to chemically bind a DOTA chelate on the end of purine compound and obtained a specific conjugate of DOTA-purine for metal coordination. In particular, radiometal like Cu-64, for the development of MRI imaging agents, can be utilized to choice good candidates before the synthesis of gadolinium complexes. By the screening of radioisotope technique, Gd-DOTA-purine type complex was successfully prepared and showed MRI imaging for lung cancer cell into the mouse model.

**Key Word:** Purine, Lung cancer, Cu-64, Gd, PET/MRI

## Introduction

폐암은 전세계 암 관련 사망의 주요 원인이며, 우리나라 국가 암 등록 통계자료(2018년)에서 폐암은 인구 10만 명당 남성이 69.7명으로 전체 남성 암 발생률 통계에서 2위이고, 반면에 여성은 인구 10만명당 31.2명으로 전체 여성 암 발생률 통계에서 5위를 차지하고 있다 (1). 지난 20년 동안 첨단 치료기술이 등장했지만, 폐암 환자의 치료율 및 예후는 크게 개선되지 않고 있고, 폐암에 관한 항암요법에서 약물 내성은 치료 실패의 주요한 원인 중에 하나가 되고 있다 (2). 그러므로 폐암 치료에서 조기 진단기술은 새로운 기전의 항암제 연구와 더불어 매우 중요한 연구 분야로 자리잡고 있다.

최근 항암제 관련 연구들 중에 non-small cell lung

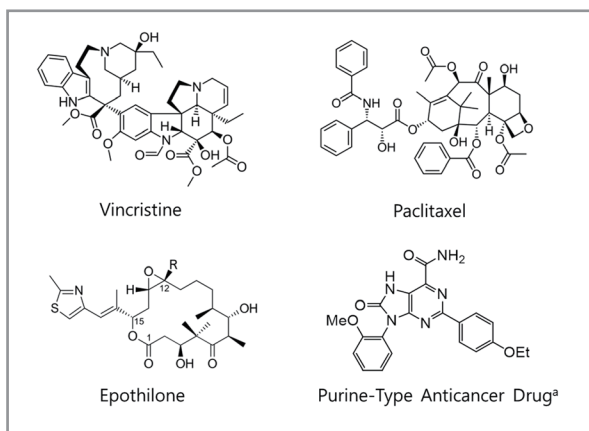
cancer (NSCLC, 비소세포 폐암) 를 효과적으로 치료할 수 있는 microtubule targeting agents (MTAs) 계열 항암제인 퓨린 (purine) 화합물 후보물질은 좋은 결과를 보여 주고 있으며(3), 그들 중 몇몇 화합물은 금속 원자를 붙이기에 매우 적합한 입체화학적 성질을 보유하고 있다 (Figure 1). 본 연구는 폐암 세포를 표적 치료하는 MTAs 계열의 퓨린 화합물의 말단에 금속성 방사성동위원소(Cu-64, Ga-68, Lu-177 등) 및 가돌리늄이 안정되게 결합할 수 있도록 DOTA를 도입하여 새로운 퓨린 착물을 위한 전구체 개발을 시도하였고, 이러한 금속 착물을 활용해 폐암을 조기 진단할 수 있는 MRI 조영제를 개발하고자 하였다.

현재 임상에서 활용되고 있는 MRI 조영제는 대부분 특정 종양 세포를 표적하지 못하는 화학적 구조를 가지고 있으며, 최근 MRI 조영제 연구에서 이러한 한계를 극복하는 연

Received: June 21, 2019 / Revised: July 5, 2019 / Accepted: July 8, 2019

**Corresponding Author :** Jung Young Kim, PhD. Division of Applied RI, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), 75 Nowon-gil, Gongneung-Dong, Nowon-Gu, Seoul, 139-706, Republic of Korea Tel: +82-2-970-1624, Fax: +82-2-970-1341, E-mail: jykim@kirams.re.kr

Copyright©2019 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes



**Figure 1.** The typically chemical structure of microtubule targeting agents (MATs).  
<sup>a</sup>ref. 3.

구들이 많이 시도되고 있다 (4, 5). 특히 가돌리늄 (Gd) 착물로 만들어진 MRI 조영제 개발은 금속성 방사성동위원소를 활용하는 방사성의약품 설계나 합성과 매우 유사하며, 심지어 가돌리늄 착물의 일부 유효성 및 안정성 시험은 금속성 방사성동위원소로 대체하여 실시하는 것이 더 유리하다. 그러므로 폐암을 표적 진단하는 가돌리늄 착물의 개발은 핵의학 및 자기공명학기술의 융합과 동시 발전을 추구하는 경제적인 연구를 하는 장점을 지닌다. 또한 새로운 가돌리늄 착물의 연구는 그 금속 착물의 배위결합이나 입체화학적 성질이 베타선을 방출하는 치료용 방사성동위원소 Lu-177, Y-90 등과 흡사하여 궁극적으로 theranotics 방사성의약품 개발에도 이바지할 것으로 보인다 (6).

## Materials and Methods

### 1. Purine-type compound의 합성 및 표지

#### 1.1) 화합물 3, (Z)-methyl 3-(3-(2-amino-1,2-dicyanovinyl)ureido)benzoate

Ar(g) 하에서 diaminomaleonitrile (1) (400 mg, 3.70 mmol) 과 3-(Methoxycarbonyl)phenyl isocyanate (2) (695 mg, 1.06 mmol) 를 반응기에 넣고 무수 acetonitrile 10 mL 을 가해 상온에서 20시간 동안 교반 후 감압하여 용매를 제거하였다. Cold EtOH 와 diethyl ether 를 사용해 washing 한 후 filter 하여 883 mg (white solid,

84%)을 얻었다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 9.12 (s, 1 H), 8.16 (t, 1 H, *J* = 1.8 Hz), 7.67 (dd, 1 H, *J* = 1.2, 8.0 Hz), 7.63 (s, 1 H), 7.57 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz), 7.42 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz), 7.30 (s, 2 H), 3.85 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 166.2, 152.4, 140.0, 130.1, 129.2, 127.7, 123.1, 122.8, 119.0, 117.5, 114.2, 89.8, 52.2(2); *m/z* calcd for C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 286.3

#### 1.2) 화합물 4, methyl 3-(6-carbamoyl-2-(4-

methoxyphenyl)-8-oxo-7H-purin-9(8H)-yl)benzoate

화합물 3 (583 mg, 2.04 mmol)에 methanol (22 mL) 을 넣고, triethylamine (313 μL, 2.24 mmol)과 *p*-anisaldehyde (273 μL, 2.24 mmol) 을 순서대로 가하고, 상온에서 18시간 동안 교반하였다. 감압 후 DMSO (10 mL) 를 넣고, 90 °C 에서 1 시간 동안 교반 후 상온에서 식힌다. Ether를 사용하여 생성된 고체화합물을 침전시키고 filter 하여 420 mg (yellowish solid, 49%) 를 얻었다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 8.51 (s, 1 H), 8.43 (t, 1 H, *J* = 1.8 Hz), 8.41 (d, 2 H, *J* = 6.8 Hz), 8.10–8.03 (m, 2 H), 7.97 (s, 1 H), 7.77 (t, 1 H, *J* = 7.8 Hz), 7.01 (d, 2 H, *J* = 6.8 Hz), 3.92 (s, 3 H), 3.82 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 165.7, 165.6, 161.0, 154.6, 152.7, 152.6, 133.4, 133.1, 130.5, 130.3, 129.5, 129.4, 129.2, 128.1, 126.6, 119.4, 113.8, 55.3(2), 52.5(2); *m/z* calcd for C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> [M-H]<sup>-</sup> 418.5

#### 1.3) 화합물 5, 3-(6-carbamoyl-2-(4-methoxyphenyl)-8-oxo-7H-purin-9(8H)-yl)benzoic acid

화합물 4 (500 mg, 1.19 mmol)에 pyridine (50 mL) 과 NaOH (1.0 M, 5 mL)을 가해 상온에서 20 시간 동안 교반하였다. 감압하여 용매 제거 후 methanol을 첨가해 residue를 녹이고 HCl (1.0 M) 수용액을 가해 pH 1.0로 맞춘다. 생성된 solid는 원심분리를 실시 후 상층액을 걷어내고, ether로 세척 후 filter 하여 370 mg (orange

solid, 77%)을 얻었다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 13.24 (s, 1 H), 11.76 (s, 1 H), 8.50 (s, 1 H), 8.41 (d, 2 H,  $J$  = 6.8 Hz), 8.38 (t, 1 H,  $J$  = 2.0 Hz), 8.03 (dd, 2 H,  $J$  = 2.0, 8.0 Hz), 7.97 (s, 1 H), 7.74 (t, 1 H,  $J$  = 8.0 Hz), 7.00 (d, 2 H,  $J$  = 6.8 Hz), 3.81 (s, 3 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 166.7, 165.7, 161.0, 154.7, 152.7(2), 133.2, 133.1, 131.6, 130.3, 129.4, 129.3, 129.2, 128.4, 126.9, 119.4, 113.8, 55.3;  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_5$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  404.4

1.4) 화합물 6, tert-butyl 2-(3-(6-carbamoyl-2-(4-methoxyphenyl)-8-oxo-7H-purin-9(8H-yl)benzoyl)hydrazine carboxylate

Ar(g) 하에서 화합물 5 (430 mg, 1.06 mmol), tert-Butyl carbazate (182 mg, 1.38 mmol), TBTU (511 mg, 1.59 mmol) 그리고 HOBt (215 mg, 1.59 mmol) 를 반응기에 넣고, 무수 DMF (20 mL) 을 가해 교반하였다. 무수 DIEA (554  $\mu\text{L}$ , 3.18 mmol)를 넣고, 상온에서 17 시간 동안 교반 후 감압하여 용매를 제거한다.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  와  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 를 가해 residue를 녹이고 유기층을 추출한다.  $\text{NaHCO}_3$  포화수용액을 가해 유기층을 씻어주고, brine 을 가해 한번 더 씻어준다. 모아진 유기층은  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pad 를 통과시켜 drying 후 감압 하에서 농축한 후, silica-

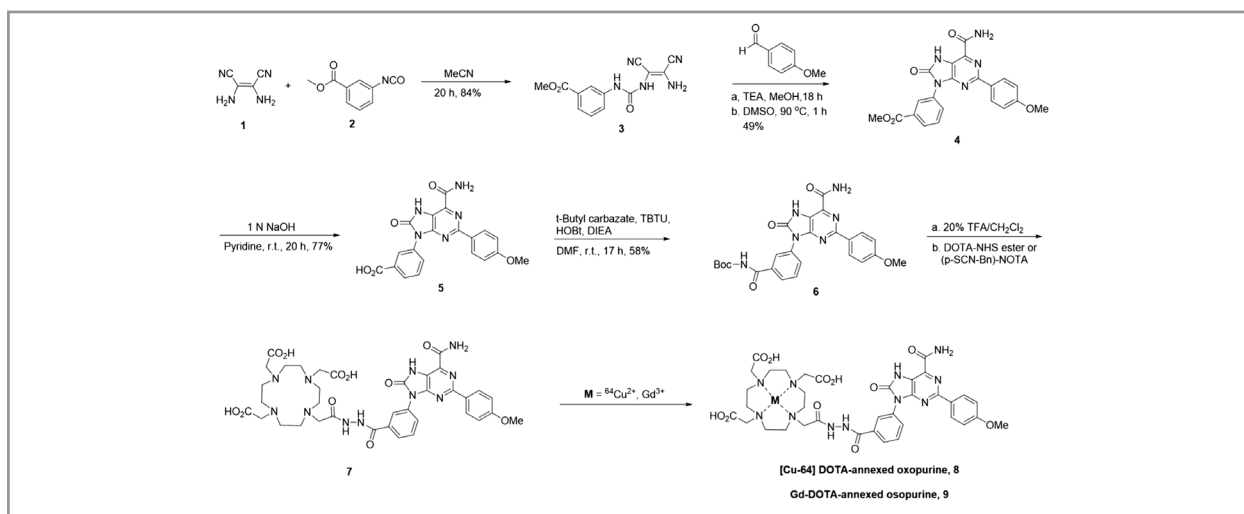
gel column chromatography (7% MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )을 수행하여 317 mg (yellow solid, 58%)을 얻었다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 11.77 (s, 1 H), 10.36 (s, 1 H), 9.00 (s, 1 H), 8.50 (s, 1 H), 8.41 (d, 2 H,  $J$  = 9.2 Hz), 8.29 (s, 1 H), 7.97–7.95 (m, 3 H), 7.73 (t, 1 H,  $J$  = 7.8 Hz), 7.00 (d, 2 H,  $J$  = 8.8 Hz), 3.81 (s, 3 H), 1.45 (s, 9 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 165.7, 165.4, 161.0, 155.5, 154.8, 152.7, 152.6, 133.4, 133.2, 133.1, 129.4, 129.3, 129.2, 126.3, 125.5, 119.3, 113.7, 79.3, 55.3, 55.2, 28.1;  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_6$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  519.0

1.5) 화합물 7, DOTA-Annexed oxopurine

화합물 6 (50 mg, 0.096 mmol) 에 20% TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) 을 넣고, 2 시간 동안 상온에서 교반하였다. 감압 하여 용매를 완전히 제거 후 Ar(g) 하에서 DOTA NHS ester (73.3 mg, 0.096 mmol), 무수 DMF (3 mL), 무수 DIEA (168  $\mu\text{L}$ , 0.962 mmol) 을 가해 상온에서 4 시간 동안 교반하였다. Prep-HPLC (YMC-pack ODS-A C18 column (20  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 0.1% TFA in water/MeCN, 25 ~ 70% MeCN linear gradient for 30 min, flow rate 1 mL/min,  $R_t$  = 12.5 min) 를 수행 하여 35 mg (white solid, 45%) 을 얻었다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 11.79 (s, 1



Scheme. Synthesis of metal purine-type complex

H), 10.72 (s, 1 H), 8.51 (s, 1 H), 8.40 (d, 2 H,  $J = 8.8$  Hz), 8.26 (s, 1 H), 8.04–7.92 (m, 3 H), 7.75 (t, 1 H,  $J = 8.0$  Hz), 6.99 (d, 2 H,  $J = 8.8$  Hz), 3.89–3.67 (m, 11 H), 3.36–2.96 (m, 16 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 170.6, 165.7, 164.9, 161.0, 154.8, 152.7(2), 133.2, 133.1, 133.0, 129.8, 129.4, 129.3(2), 126.7, 125.7, 119.3, 118.6, 115.6, 113.8, 55.3(2), 53.5, 49.8$ ;  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{N}_{11}\text{O}_{11}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  806.9

## 2. $^{64}\text{Cu}$ purine-type complex의 합성 및 안정성 시험

### 2.1) $^{64}\text{Cu}$ 를 이용한 표지

사이클로트론 (50 MeV, Scanditronix사, 1985년, 한국원자력의학원)으로부터  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$  핵반응을 통하여 얻어지는  $^{64}\text{Cu}$ 용액을 용이한 표지반응을 위하여 가열 (100°C) 하면서 질소 ( $\text{N}_2$  gas)를 불어넣어서 건조시켰다. 화합물 7 (1.0 mg)을 sodium acetate (1.0 M, pH 5.5, 1 mL)에 녹인 다음, 100  $\mu\text{l}$ 를 취하여 건조된  $^{64}\text{Cu}$  바이알에 첨가하여 80°C에서 5분 동안 반응하였다. 방사 표지가 끝난 후, 별도의 정제과정 없이  $[\text{Cu}-64]\text{DOTA}$ -annexed oxopurine (8)의 방사화학적 순도를 알아보기 위해 radio-TLC (Thin Layer Chromatography)를 시행하였다. 이때 이동상 (mobile phase)은 citrate 버퍼 (0.1 M)를 사용하였다.

### 2.2) $[\text{Cu}-64]\text{DOTA}$ -annexed oxopurine (8)의 혈청 내 안정성 실험

화합물 8을 PBS를 이용하여 100  $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$ 의 용량으로 희석한 후 마우스 혈청 또는 사람 혈청, PBS를 각각 500  $\mu\text{l}$ 와 동량으로 섞어준 후 37°C에서 배양하였다. 1, 3, 24 시간에 radio-TLC로 혈청 내 안정성을 분석하였다.

### 2.3) $[\text{Cu}-64]\text{DOTA}$ -annexed oxopurine (8)의 logP 측정

PBS (500  $\mu\text{l}$ )와 octanol (500  $\mu\text{l}$ )를 섞은 용액에 화합물 8 (300  $\mu\text{Ci}$ )을 첨가한 후 5분동안 vortexing 기를

이용하여 섞는다. 원심분리기를 이용하여 12,500 rpm에서 5분 원심분리 후 분리된 PBS와 octanol 층에서 각각 200  $\mu\text{l}$ 를 취하여 방사선량을 감마카운터 (WIZARD 1480, Perkin-Elmer, Massachusetts, USA)로 측정하였다.

## 3. Gd purine-type complex (9)의 합성 및 체외평가

### 3.1) Gd-DOTA-annexed oxopurine (9) 합성

화합물 7 (94 mg, 0.117 mmol)에 tris-borate EDTA buffer (pH 8.3, 3 mL)을 넣고,  $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (60.7 mg, 0.140 mmol)을 3차 증류수 (1 mL)에 녹여 넣은 후 50°C에서 4 시간 동안 교반하였다. 상온에서 식힌 반응용액을 C18 column 하여 화합물 9 70 mg (white solid, 63%)을 얻었다. 최종 화합물은 HPLC (X-bridge C-18 column (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 0.1% TFA in Water/MeCN, 20 ~ 60% MeCN linear gradient for 20 min, flow rate 1 mL/min,  $R_t = 9.35$  min)로 확인하였다.  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{GdN}_{11}\text{O}_{11}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  961.1

### 3.2) Gd-DOTA-annexed oxopurine (9)의 이완율 (relaxivity) 측정

화합물 9의 T1 이완시간 및 T2 이완시간을 측정하기 위해서, 화합물 9을 0.75, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mM 농도의 팬텀을 제작하였다. 이완시간은 임상용 3 T MRI (Magnetom Trio A Tim, Simens, Germany)에서 측정하였다. T1 이완시간 측정을 위해서 inversion recovery 펄스시퀀스를 이용하였고 50 ~ 1750 msec 범위에서 35개의 다른 inversion time (TI)을 사용하였다. T2이완시간 측정을 위해서 CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 펄스시퀀스를 이용하였고 10 ~ 1900 msec 범위에서 34개의 다른 echo time (TE)를 사용하였다. 이완율  $r_1$ 과  $r_2$ 는 mM 당 이완시간의 역수로 계산되었다. 임상에서 사용되고 있는 조영제와 이완시간을 비교하기 위해서 옴니스캔 (Omniscan<sup>TM</sup> (gadodiamide))과 도타렘 (Dotarem<sup>TM</sup> (gadoterate meglumine))의 이완시간도 같은 방법으로 측정하였다.

#### 4. 세포 배양 및 세포 uptake 실험

##### 4.1) 세포 배양

사람 폐 암 세포주 인H460, H1299, A549와 정상 폐 세포인 IMR90을 각각 10% 소태아혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 Ham's F-12K 배지, RPMI 1640 배지에 단층배양 하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub>, 37°C가 유지되는 습윤항온 배양기에서 배양하였다.

##### 4.2) [Cu-64] DOTA-annexed oxopurine (8)의 세포 uptake 측정

사람 폐 암 세포주 인H460, H1299, A549와 정상 폐 세포인 IMR90을 6 well 플레이트에 1 X 10<sup>6</sup>개씩 깔고, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C가 유지되는 배양기에서 24시간 동안 배양 하였다. 무혈청 배지로 화합물 8을 4 µCi/ml의 방사성농도가 되도록 준비한 후, 이를 각 세포에 6 µCi씩 넣어 주었다. 1, 4, 24시간동안 배양기에서 배양 후, 각 시간 대에 맞춰 세포주를 떼어내어 방사능섭취량 (%ID)을 감마카운터 (WIZARD 1480, Perkin-Elmer, Massachusetts, USA)로 측정하였다.

#### 5. Gd-DOTA-annexed oxopurine (9)의 MRI 획득

##### 5.1) 폐 암 모델 제작

6주령의 Balb/c Nude (nu/nu) 마우스 오른쪽 폐에 H460세포주 2×10<sup>6</sup> cells/25µl와 matrigel (25µl)을 섞어 27G 주사기를 사용하여 5분간 주사하고 3주간 종양의 성장을 관찰한다.

##### 5.2) 폐 암 마우스에서 Gd-DOTA-annexed oxopurine (9)의 MRI

MR영상 촬영은 임상용 3 T MRI (Magnetom Trio A Tim, Simens, Germany) 에서 시행하였다. 화합물 9 (0.1 mmol/kg)를 폐암 모델 마우스의 꼬리정맥에 주사하고, 주사 전과 후 2시간까지 T1강조영상 획득하였다. 임상에서 사용하고 있는 조영제와 조영 효과를 비교하기 위하여 옴니스캔을 주입하고 T1강조영상을 획득하였다. MR 시퀀스는 다음과 같다; repetition time (TR) 9.91 ms, echo time (TE) 3.76 ms, number of averaging 5, flip angle 10, slice thickness 1 mm, matrix size 288 × 288, field-of-view (FOV) 59 × 59 mm<sup>2</sup>,

scan time 2 min 49 s, 폐암 부위의 신호를 contrast-to-noise ratio (CNR;  $\frac{[Signal]_{after} - [Signal]_{before}}{[Noise]}$ ) 로 나타내었다.

## Results

Cu-64을 이용한 방사성표지 실험이 끝난 후, radio-TLC로 확인한 화합물 8 의 방사화학적 순도는 평균 95% 이상이었으며, 별도의 정제 없이 최종화합물은 혈액 내 안정성을 확인하기 위해서 마우스 혈청, 사람 혈청, PBS 버퍼용액에 일정량을 섞고 각각 관찰하였다. 1, 3, 24시간동안 radio-TLC에서는 화합물 8의 초기 방사화학적 순도를 유지하였으며, 이것은 동물에 주사하였을 때 표지된 금속성 방사성동위원소 Cu-64가 킬레이트 DOTA로부터 화학적으로 분리되지 않고 안정하게 유지되고 있음을 보여주었다 (Figure 2). 또한 화합물 8의 옥탄올-물 분배계수 (Octanol-water partition coefficient, log P)는 약 -1.09의 수용성 착물로 분석되었다.

화합물 9 의 T1이완시간 (r1)은 6.8 ± 0.2 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>이고, T2이완시간 (r2)은 9.0 ± 0.1 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (25 °C, 64 MHz) 로 나타났다. 이 값은 임상에서 사용되는 조영제인 옴니스캔 (r1; 5.2 ± 0.1, r2; 6.1 ± 0.2), 도타렘 (r1; 5.0 ± 0.1, r2; 5.9 ± 0.1)에 비해 약 1.5배 높은 값이며, 이는 자기공명영상에서 더 큰 조영 증강 효과를 보여 줄 수 있다 (Table 1).

폐암 세포주 인H460, H1299, A549와 정상 폐 세포주 IMR90에 대한 화합물 8 의 섭취율은 Figure 3과 같이 나타났다. 이것은 화합물 8이 가 정상 세포에 비해 폐암 세포에 대해 높은 섭취율을 보여주었고, 특히 H460 폐암 세포주에 높은 섭취율을 나타냈다. 그러므로 본 연구에서는 H460 폐암 세포주를 in vivo MR영상 실험에 사용하였다.

**Table 1.** Relaxivities of Omniscan, Dotarem and 9 (25°C, 64 MHz)

	r <sub>1</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	r <sub>2</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Omniscan	5.2 ± 0.1	6.1 ± 0.2
Dotarem	5.2 ± 0.1	5.9 ± 0.1
9	6.8 ± 0.2	9.0 ± 0.1

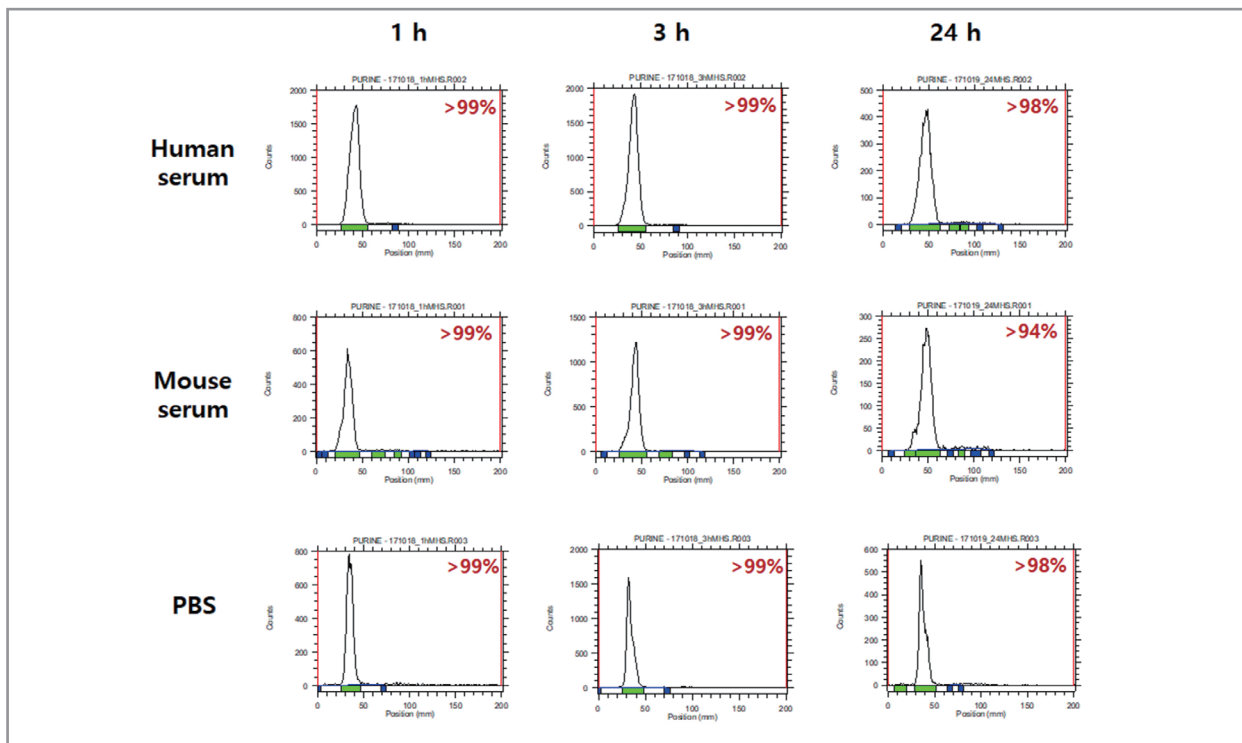


Figure 2. Stability after incubation human serum, mouse serum and PBS with 8 for 1 h, 3 h, 24 h. Stability is presented as % intact compounds as determined by TLC.

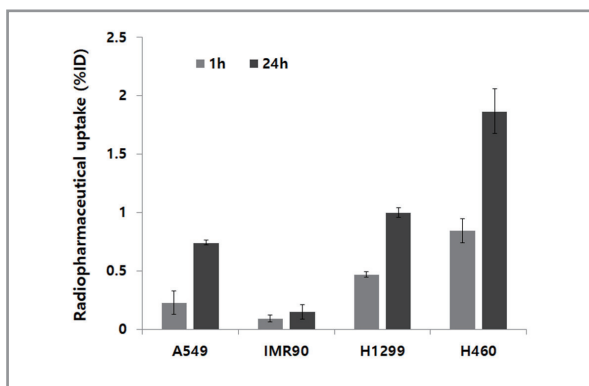


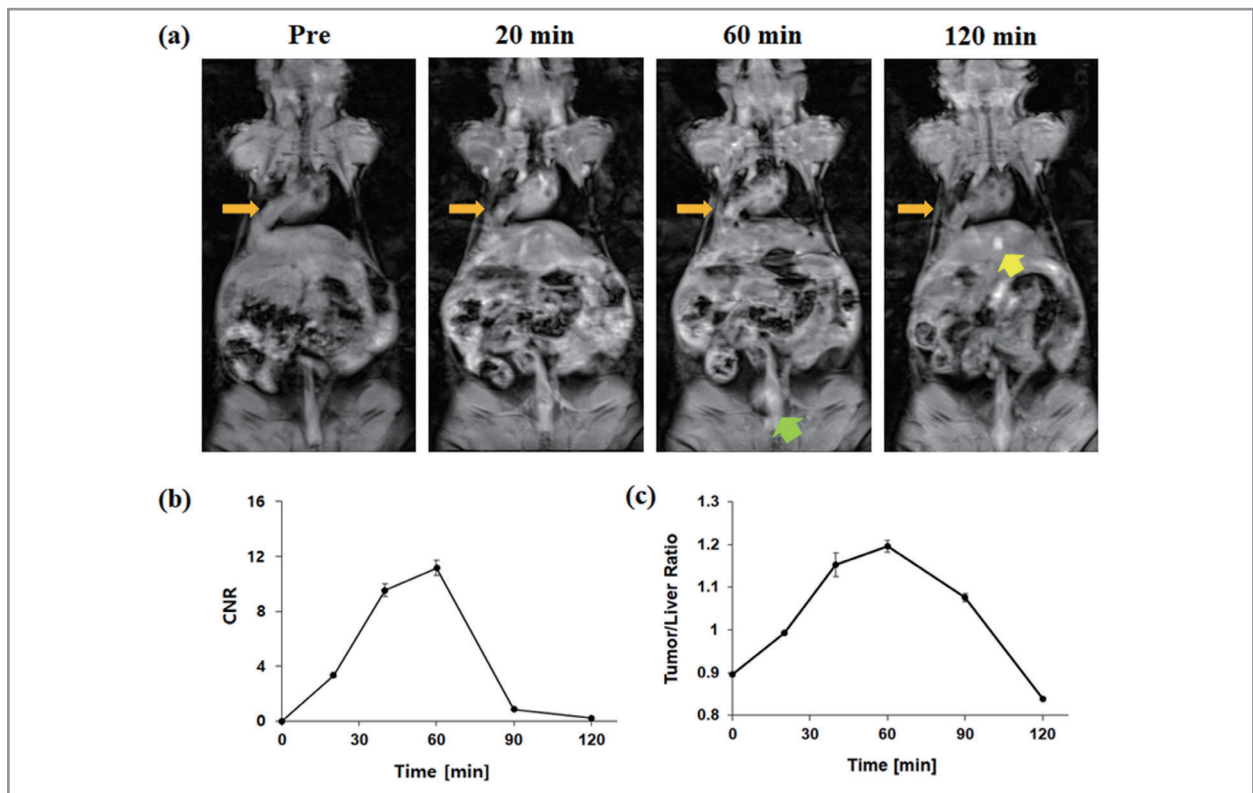
Figure 3. In vitro cellular uptake study of 8 using A549, IMR90, H1299 and H460 cells (n = 3, mean ± SD).

사람 폐 암 세포주인 H460 폐암 모델 쥐에 화합물 9 (0.1 mmol/kg)을 주입하고 MR 영상을 획득하였다. 조영제를 주입하기 전과 후 (20분, 60분, 120분)를 비교한 T1강조영상을 Figure 4a에 나타내었다. 조영제 주입 전에 비해 주입 후 20분 영상에서 폐암 부위(orange arrow)의 조영 증강 효과가 관찰되었고, 주입 후 60분까지 신호가 지속이 되었으며 주입 후 120분에는 신호가 감소 했음을 알 수 있다. 조영제는 신장을 통해 방광으로 배

설 되는 것을 60분 영상 (green arrow)에서 알 수 있고, 일부는 담관을 통해 배설 되는 것을 120 분 영상 (yellow arrow)에서 확인 할 수 있다. T1 강조영상에서 조영제 주입 후 60분에 최대 조영 증강 효과가 관찰되었고 (Figure 4b) 조영 후 60분의 Tumor/Liver Ratio 는 약 1.2로 나타났다 (Figure 4c).

## Discussion

공기로 차 있는 폐 조직을 진단하는 MRI 조영제 개발 단계에서 다양한 분자영상기술과 융합연구는 필수적이며 (7), 특히 금속성 방사성동위원소를 활용한 의약품 스크리닝 기술은 가돌리늄 기반 금속착물 MRI 조영제 개발의 기간 및 비용을 절감하는데 매우 유용하게 적용될 수 있다. 본 연구에서 금속성 방사성동위원소 Cu-64는 상기 퓨린 화합물 (Scheme, 7)에서 가돌리늄이 위치할 DOTA 킬레이트 위치에 안정적으로 결합되어 체외에서 금속 착물의 화학적 유효성 및 안정성(표지수율 및 24시간 동안 방사화학적 순도가 95% 이상 유지)과 체내 지용성 수치



**Figure 4.** Coronal T1-weighted MR images of H460 xenograft mice (a) before and after injection of 9 (0.1 mmol/kg). Orange arrows indicate lung tumor lesions, green and yellow arrows indicate bladder and gallbladder, respectively. CNR profiles of tumor (b) and tumor to liver ratio (c) as a function of time. CNR was measured in T1-weighted images.

들에 대한 정보를 주었다. 이때 사용된 상기 퓨린 화합물은 100  $\mu\text{g}$  정도를 사용하였으며, 동일 용량으로도 소동물에서 체내 약물의 분포도 실험도 수행할 수 있다. 그러므로 상기 화학적 결과를 기반으로 퓨린 화합물의 합성 용량을 늘려 가돌리늄과 착물 합성을 수행하여 최종화합물 70 mg을 확보하였다.

일반적으로 가돌리늄 기반 조영제는 소동물 실험에서 0.1 mmol/kg이 사용되며, 마우스 한 마리당 약 2~3 mg 정도가 주사되어야 MRI 영상을 획득할 수 있다 (8). 반면에 화합물 7에 Cu-64 표지하여 체내의 실험을 할 때 높은 방사성동위원소의 방사선 민감도 때문에 금속 착물은 나노그램 이하로 실험이 가능하다 (9). 이러한 방사성동위원소 기술의 장점은 MRI 조영제를 개발하는 과정에서 소동물이나 임상후보물질을 선정하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.

따라서 Cu-64로 스크리닝한 후 가돌리늄 퓨린 착물을 합성하여 체내에서 폐암 세포를 표적하여 영상을 획득할

수 있었고, T1 강조영상에서 60분 이후 종양 대 간 비율이 약 1.2로 나타나 영상으로 충분히 폐암 세포를 확인할 수 있었다. 향후 본 MRI 영상의 우수성을 입증하기 위해 기존 가돌리늄 기반 MRI 조영제들과의 비교 실험이 수행될 예정이다. 또한 상기 가돌리늄 착물은 외과적 수술의 한계가 있는 폐암 환자를 대상으로 치료할 수 있는 중성자포획치료 (neutron capture therapy, NCT) 기술의 의약품으로 활용이 가능하다 (10).

## Conclusion

금속성 방사성동위원소들 중에 가돌리늄과 화학적 유사한 금속은 MRI 조영제 개발에서 가돌리늄 착물의 체내 유효성 및 안전성 등을 평가하는 실험에서 분자영상 기술과 함께 유용하게 활용될 수 있으며, 또한 본 연구를 통해 폐암 세포를 표적하는 진단 및 치료제 개발에서 퓨

린계 화합물이 유용한 효능이 있다는 것을 확인하였다.

## Acknowledgments

이 논문은 2019년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 원자력연구개발사업(No.2017M2A2A6A02019904) 을 통하여 수행된 연구임.

## References

1. 국가암등록 통계사업, 2018년, 보건복지부
2. Lopez-Ayllon BD, Moncho-Amor V, Abarrategi A, Ibañez de Cáceres I, Castro-Carpeño J, Belda-Iniesta C, Perona R, Sastre L. Cancer stem cells and cisplatin-resistant cells isolated from non-small-lung cancer cell lines constitute related cell populations. *Cancer Med* 2014;3:1099-1111.
3. Kuo TC, Li LW, Pan SH, Fang JM, Liu JH, Cheng TJ, Wang CJ, Hung PF, Chen HY, Hong TM, Hsu YL, Wong CH, Yang PC. Purine-Type Compounds Induce Microtubule Fragmentation and Lung Cancer Cell Death through Interaction with Katanin. *J Med Chem* 2016;59:8521-8534.
4. Wahsner J, Gale EM, Rodríguez-Rodríguez A. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem Rev* 2019;119:957-1057.
5. Jeong Y, Hwang HS, Na K. Theranostics and contrast agents for magnetic resonance imaging. *Biomater Res* 2018;22:20.
6. Park JA, Kim JY. Recent advances in radiopharmaceutical application of matched-pair radiometals. *Curr Top Med Chem* 2013;13:458-469.
7. Romei C, Turturici L, Tavanti L, Miedema J, Fiorini S, Marletta M, Wielopolski P, Tiddens H, Falaschi F, Ciet P. The use of chest magnetic resonance imaging in interstitial lung disease: a systematic review. *Eur Respir Rev* 2018;27:180062.
8. Kim HK, Lee GH, Chang Y. Gadolinium as an MRI contrast agent. *Future Med Chem* 2018;10:639-661.
9. Park JA, Kim JY, Kim HK, Lee W, Lim SM, Chang Y, Kim TJ, Kim KM. Heteronuclear Gd-(<sup>99m</sup>Tc) Complex of DTPA-Bis(histidylamide) Conjugate as a Bimodal MR/SPECT Imaging Probe. *ACS Med Chem Lett* 2012;3:299-302.
10. Jung KH, Park JA, Kim JY, Kim MH, Oh S, Kim HK, Choi EJ, Kim HJ, Do SH, Lee KC, Kim KM, Lee YJ, Chang Y. Image-Guided Neutron Capture Therapy Using the Gd-DO3A-BTA Complex as a New Combinatorial Treatment Approach. *Contrast Media Mol Imaging* 2018: 3727109.