



- (51) 국제특허분류: *C07F 1/00* (2006.01) *A61K 49/04* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/001864
- (22) 국제출원일: 2012년 3월 15일 (15.03.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2011-0024292 2011년 3월 18일 (18.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울특별시 성북구 안암동 5가 1, 136-701 Seoul (KR). **한국기초과학지원연구원 (KOREA BASIC SCIENCE INSTITUTE)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 과학로 169-148 (여은동), 305-333 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김종승 (KIM, Jong-Seung)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운 롯데아파트 130-2402, 463-728 Gyeonggi-do (KR). **브후니아산카르프라사드 (BHUNIYA, Sankarprasad)** [IN/KR]; 서울특별시 성북구 안암동 고려대학교 화학과 초분자나노유기재료 연구실, 136-701 Seoul (KR). **이**

수민 (LEE, Sumin) [KR/KR]; 서울특별시 강동구 고덕 2동 고덕주공 2단지 아파트 240-201, 134-749 Seoul (KR). **홍관수 (HONG, Kwan Soo)** [KR/KR]; 충청북도 청원군 오창읍 각리 637-1 한라비발디아파트 808동 603호, 363-885 Chungcheongbuk-do (KR). **이현승 (LEE, Hyunseung)** [KR/KR]; 충청북도 청원군 오창읍 각리 646-1 우림 2차 아파트 808동 603호, 363-885 Chungcheongbuk-do (KR). **문혜영 (MOON, Hyeyoung)** [KR/KR]; 충청북도 청원군 오창읍 각리 646-1 우림 2차 아파트 601동 1807호, 363-885 Chungcheongbuk-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM)**; 서울특별시 서초구 바우피로 225 한파음빌딩 4층, 137-130 Seoul (KR).

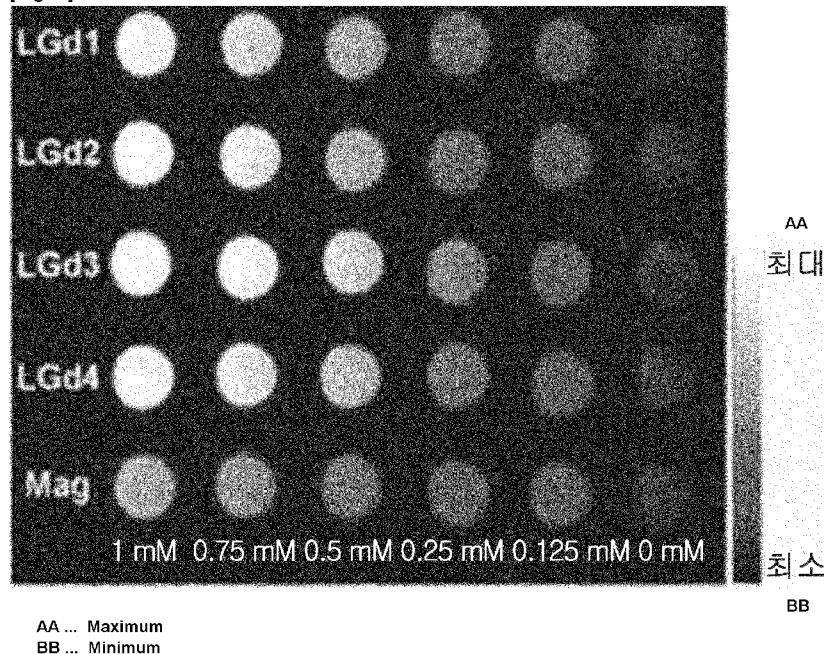
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: URIDINE-BASED GADOLINIUM COMPLEX AND MRI CONTRAST AGENT COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭 : 유리딘계 가돌리늄 착물 및 이를 포함하는 MRI 조영제

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a novel uridine nucleoside-based amphiphilic gadolinium complex and a magnetic resonance image (MRI) contrast agent comprising same, which has high laxity, superior congruity to a human serum albumin, safety, pH reactivity, and liver-specificity.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 유리딘 뉴클레오사이드 기반의 양친매성 가돌리늄 착물 및 이를 포함하는 자기공명영상(MRI) 조영제에 관한 것으로서, 이완도가 높고, 사람 혈청알부민에 대한 결합 친화성과 안정성이 우수하며, pH 반응성과 간 특이성을 갖는다.



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 유리단계 가돌리늄 착물 및 이를 포함하는 MRI 조영제

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 가돌리늄 착물 및 이를 포함하는 자기공명영상(MRI) 조영제에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 이완도가 높고, 사람 혈청알부민에 대한 결합 친화성과 안정성이 우수하며, pH 반응성과 간 특이성이 갖는 유리단계 MRI 조영제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 자기공명영상(MRI)은 생체내에서 조직의 해부학적, 기능적 정보 및 신진대사에 관한 정보를 포함하는 조직에 대한 양질의 3차원적 이미지를 제공하는 효과적인 비침투성 기법이다.
- [3] 킬레이트화된 Gd^{3+} 금속 이온은 물 양성자의 종방향 이완시간(T_1)을 증가시킴으로써 영상의 명암대비(contrast)를 향상시켜, T_1 -웨이트드 이미지에서 더 밝게 나타나게 한다. 현재 진보된 의약적 진단법은 고자기장 스캐너로 고해상도 이미지를 규정한다.
- [4] 그러나 현재 가돌리늄(Gd^{3+}) 기반의 조영제는 높은 자기장에서 최적의 이완도 값을 갖지 못하기 때문에, 조영제로서 필요한 모든 요건을 충족시킬 수 없다. 조영제가 갖추어야 할 필요 요건으로는 높은 자기장에서 더욱 향상된 조직 콘트라스트를 나타낼 수 있도록 높은 이완도(r_1)를 가지며, 사람 혈청 알부민(HSA)에 대한 비공유결합 친화성을 보유함으로써, 혈관 촬영법에 있어 생체 내 보유시간을 증대시킬 수 있어야 한다.
- [5] 최근에는 상기 요건과 함께 pH 감도가 높은 우수한 조영제 개발을 위한 연구가 진행되고 있는데, pH 감도는 살아있는 세포, 특히 병원성 세포의 생체 내 맵핑에 있어 매우 중요하다.
- [6] 이와 같은 접근 중에서, 자기조립된 나노입자 시스템으로의 가돌리늄 착물은 높은 이완도를 갖는 조영제를 개발하는데 있어 매우 흥미를 끄는 것 중 하나이다. 이 시스템에서는 자기 응집된 Gd-착물 뉴클레이의 상가 효과(additive effect)와 느린 회전 운동 때문에 높은 이완도가 달성될 수 있을 것이다.
- [7] 현재까지 보고된 가돌리늄 착물은 수중에서 25°C, 20 MHz (0.47 T)일 때 대부분의 이완도는 20-25 $mM^{-1}s^{-1}$ 사이에 놓여지며, 최근 보타(Bota) 등은 pH 7.2에서 25°C, 20 MHz (0.47 T)일 때, 최대 이완도가 34.8 $mM^{-1}s^{-1}$ 인 DOTA 기반의 양친매성물질을 발표했다.
- [8] 또한 최근 pH 반응성 조영제에 대한 요구가 증가하고 있다. 특히 조직의 생체내 pH 맵핑에 있어, 건강한 피하 조직에서보다 세포외 pH(pH_e)가 거의 0.6이나 낮은 흑색종과 같은 암을 진단하는데 있어 pH 반응성 조영제는 매우 중요하다.

그러나 아직까지 이완도가 높고, pH 감도 및 안정성이 우수한 여러 요건을 충족시키는 MRI 조영제는 개발되지 않았다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

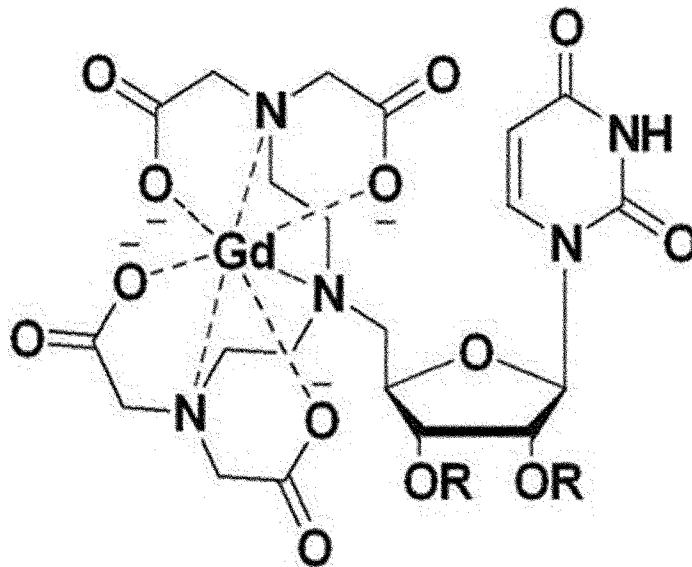
[10] 본 발명은 이완도가 높고, 사람혈청알부민(HAS) 결합친화도가 우수하며, pH 감도 및 안정성이 뛰어난 신규한 유리딘계 가돌리늄 착물 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[11] 또한 본 발명은 질병 진단, 특히 간 이상 진단에 효과적인 유리딘계 가돌리늄 착물을 포함하는 MRI 조영제를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 본 발명은 하기 화학식 (1)로 표시되는 유리딘계 가돌리늄 착물을 제공한다.

[13] ... (1)

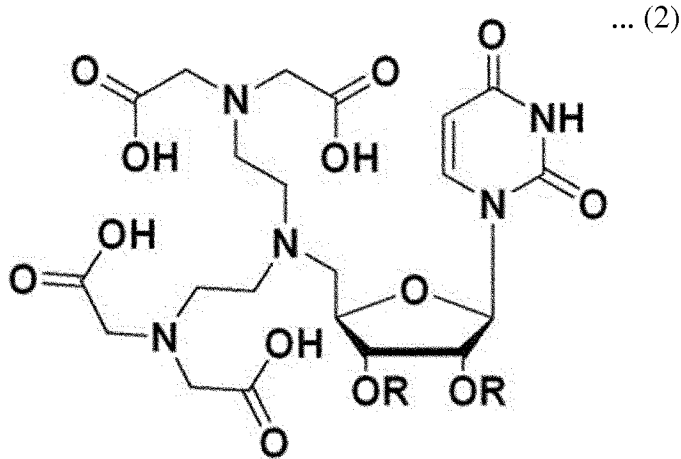


[14] 상기 식에서, R은 H 또는 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ 이며, 이때 n은 1 내지 12의 정수이다.

[15] 본 발명의 일실시예에 의하면, 상기 $\text{R}=\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ 에서 n은 6 이상인 것이 바람직하고, n은 8, 즉 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$ 인 것이 더욱 바람직하다.

[16] 또한 본 발명은 하기 화학식 (2)로 표시되는 리간드를 제공한다.

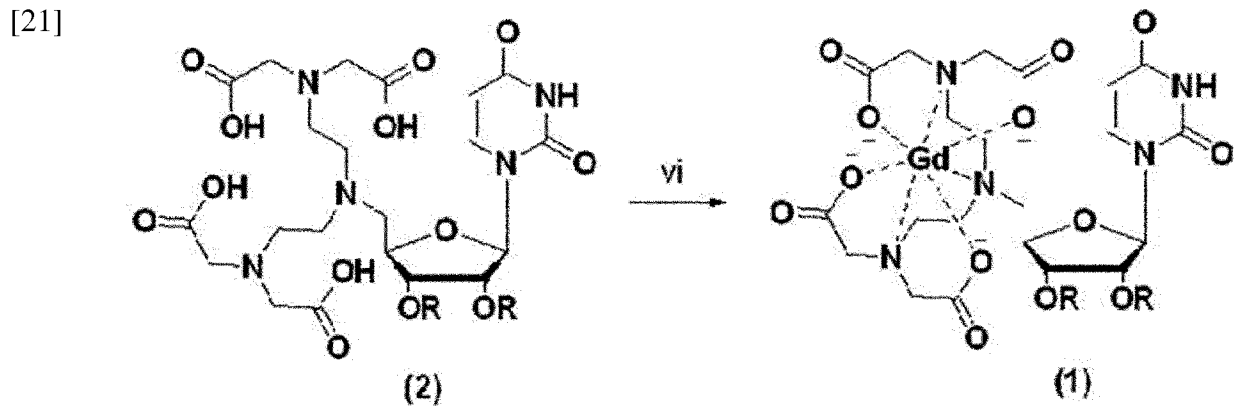
[17]



[18] 상기 식에서, R은 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ 이며, 이때 n은 1 내지 12의 정수이다.

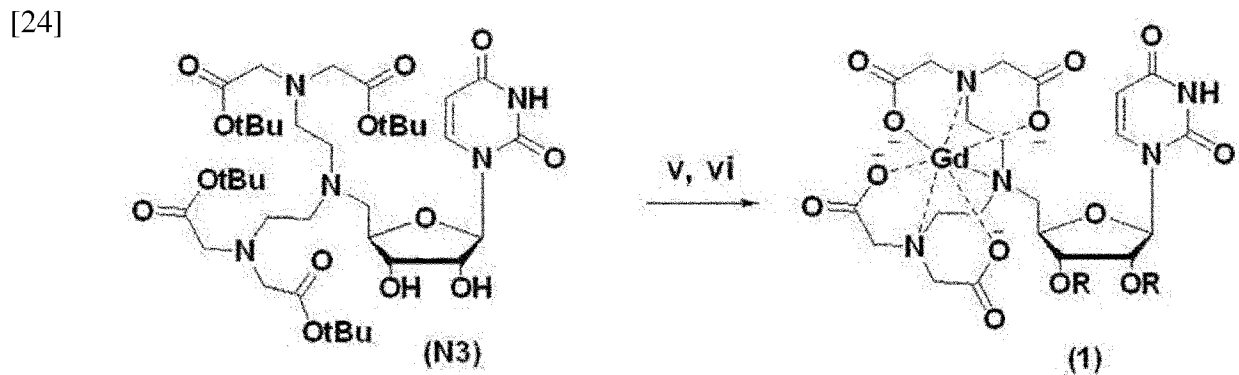
[19] 또한 본 발명은 하기 <반응식 1-1> 또는 <반응식 1-2>에 따라 화학식 (1)의 유리딘계 가돌리늄 착물을 제조하는 방법을 제공한다.

[20] <반응식 1-1>



[22] 상기 식에서, vi)는 $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_2O , Na_2CO_3 이다.

[23] <반응식 1-2>

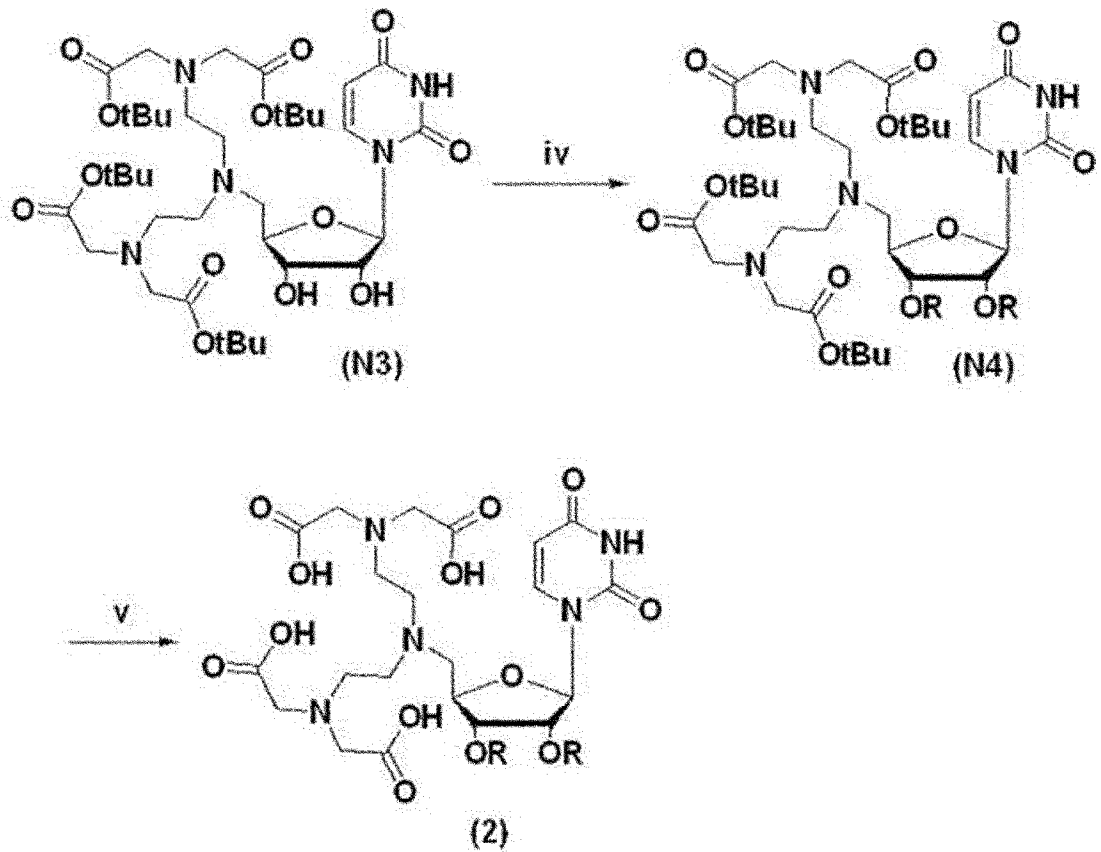


[25] 상기 식에서, v) TFA, DCM 이고, vi)는 $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_2O , Na_2CO_3 이다.

[26] 또한 본 발명은 하기 <반응식 2>에 따라 화학식 (2)의 리간드를 제조하는 방법을 제공한다.

[27] <반응식 2>

[28]

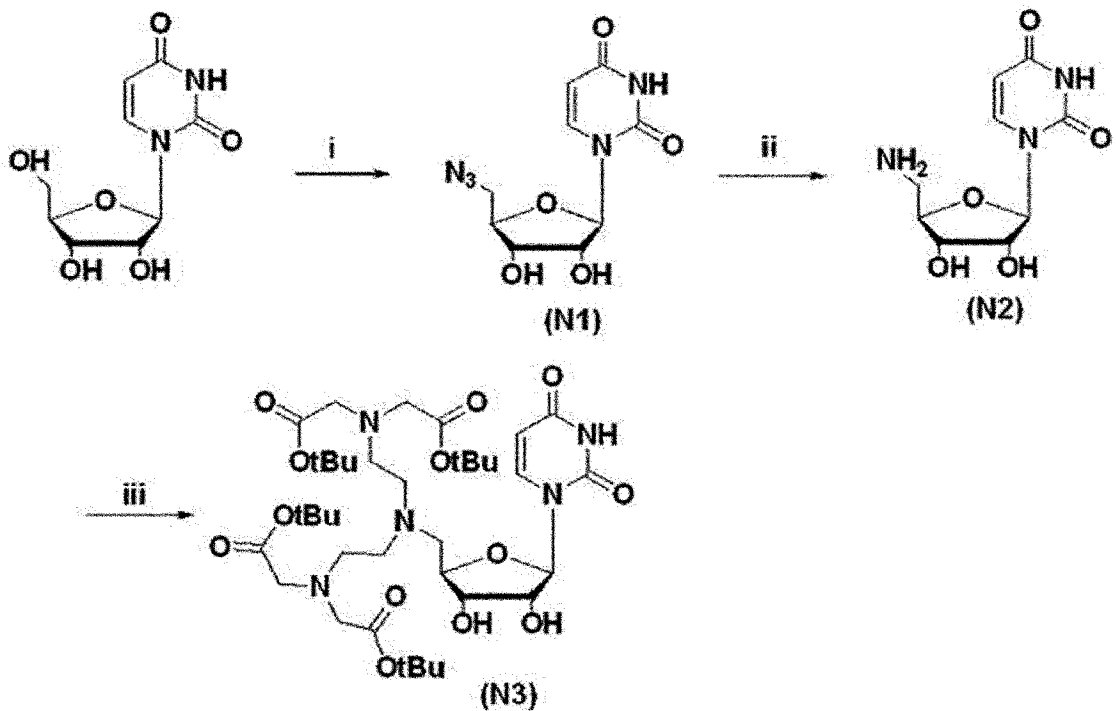


[29] 상기 식에서, iv)는 RCO_2H , EDCI, DMAP, DMF이며, v)는 TFA, DCM이다.

[30] 상기 화학식 (N3)의 화합물은 하기 <반응식 3>에 따라 제조할 수 있다.

[31] <반응식 3>

[32]



[33] 상기 식에서, i)은 PPh_3 , NaN_3 , CBr_4 , DMF이고, ii)는 PPh_3 , py, $\rightarrow \text{NH}_4\text{OH}$ 이며,

iii)은 N,N-비스[(*tert*-부톡시카르보닐)메틸]-2-브로모에틸아민, KHCO_3 , DMF이다.

- [34] 또한 본 발명은 상기 화학식 (1)의 유리딘계 가돌리늄 착물을 포함하는 MRI 조영제를 제공하며, 이때 조영제는 간(liver) 이상을 진단하는데 효과적이며, 정맥주사제로 제조 및 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [35] 본 발명에 따른 유리딘 뉴클레오시드 기반의 양친매성 가돌리늄 착물은 효과적인 MRI 조영제로 활용될 수 있다. 본 발명에 따른 유리딘계 가돌리늄 조영제는 높은 이완도, 사람혈청알부민에 대한 상당한 결합 친화성, pH 반응성 및 높은 간 특이성을 갖는 최초의 자기조립된 상자성 양친매성 조영제이다.
- [36] 또한 착물의 안정성 연구 결과, 본 발명에 따른 신규한 양친매성 착물이 상용화된 Gd-DTPA와 Gd-DTPA-BMA에 비해 상당히 안정하다는 것을 보여준다.
- [37] 한편 동물 실험에서, 신규 착물의 약리적 작용은 본 발명에 따른 착물이 간세포에 매우 특이적이며, 담도, 담낭 및 장으로 배출된다는 것을 보여준다. 따라서 간에서의 작은 병변에 대해서도 상당히 가능성이 있는 T_1 조영제가 될 수 있을 것이다. 이 새로운 유리딘계 양친매성 조영제는 MRI 분야에 중요하고 효과적인 나노시스템을 제시한다는 점에서 큰 의미가 있다.

도면의 간단한 설명

- [38] 도 1은 36°C , 63.8 MHz (1.5 T)에서 PBS 용액 중의 6가지 다른 농도(1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0 mM)를 가진 착물 LGd1 - 4 및 Mag (Magnevist®, Gd-DTPA)에 대한 T_1 -웨이티드 스핀-에코 MR (FOV = 7 cm; 매트릭스 = 256×256 ; TE/TR = 11/100 ms; 슬라이스 두께 = 2 mm; 어퀴지션수 = 50)을 보여준다.
- [39] 도 2는 36°C , 20 MHz (0.47 T)에서 사람혈청알부민(HAS)의 농도에 따른 $50\mu\text{M}$ 착물 용액의 ^1H 이완 속도의 변화를 보여준다.
- [40] 도 3은 36°C , 60 MHz (1.41 T)에서 착물 LGd3에 대한 물 ^1H -NMR 이완도의 pH 의존도를 보여준다.
- [41] 도 4는 0.1 mmol Gd/kg LGd3를 정맥 주사한 전후의 마우스의 순차적 다이내믹 2차원 MR 사진이다.
- [42] 도 5는 0.1 mmol Gd/kg 농도의 시판 중인 T_1 조영제 Gd-DTPA-BMA (Omniscan®)의 주사 후 마우스의 간(○)에서의 변화와 비교한 0.1 mmol Gd/kg의 LGd3 주사 후에 얻어진 마우스 간(●) 과 혈액(후대 정맥; ▲)에서의 CNR(Time variations of contrast-to-noise ratio) 변화 그래프이다.
- [43] 도 6은 LGd2로부터 형성된 미셀(평균 크기 6.78 nm, PDI 0.986)의 DLS 측정 결과이다.
- [44] 도 7은 LGd3로부터 형성된 미셀(평균 크기 51.16 nm, PDI 1.46)의 DLS 측정 결과이다.
- [45] 도 8은 LGd4로부터 형성된 미셀(평균 크기 50.16 nm, PDI 1.12)의 DLS 측정

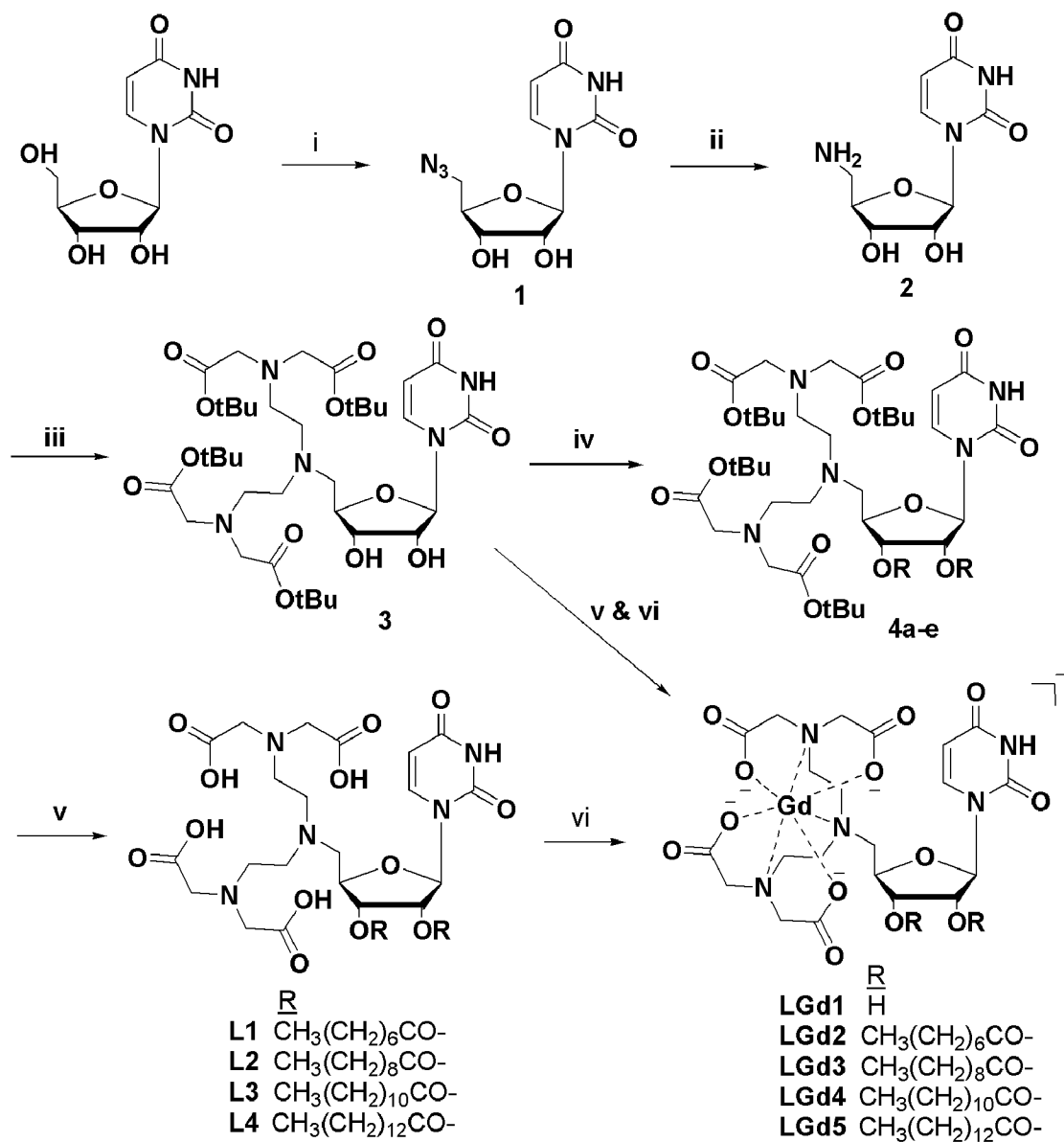
결과이다.

- [46] 도 9은 LGd5로부터 형성된 미셀(평균 크기 24.74 nm, PDI 1.14)의 DLS 측정 결과이다.
- [47] 도 10은 20 MHz, 36°C에서 LGd3의 미셀에 대한 CMC 측정결과이다. 삽입된 부분은 cmc 값이 약 ~ 0.05 mM라는 것을 보여준다.
- [48] 도 11은 60 MHz (1.41 T), 36°C에서 착물 LGd1에 대한 물 ^1H 이완도의 pH 의존도를 보여준다. 이완도는 주어진 pH 범위에 따라 $5.0 \pm 0.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 이다.
- [49] 도 12는 LGd3로부터 형성된 미셀(평균 크기 1.02 nm, PDI 2.01)의 DLS 측정 결과이다.
- [50] 도 13은 20 MHz (0.47 T), 36°C에서 PBS 용액 중의 Zn(II) 이온에 의한 착물의 트랜스메탈라이제이션 동안 양성자 이완율의 시간 변화를 보여준다. 실선은 함수 $y_0 + A \cdot \exp(-t/C_1)$ 에 대응하며, y_0 값(약 70시간 동안 상태 지속)은 화합물 LGd1, LGd2, LGd3, and LGd4에 대하여 각각 0.30, 0.50, 0.21, 0.12였다.
- [51] 도 14는 0.1 mmol Gd/kg의 LGd3가 몇 번으로 주사된 마우스의 3가지 대표적인 측면에서의 다이내믹 3D MR 이미지이다. 다음과 같은 조건을 갖는 T₁-웨이트드 FLASH(fast low angle shot gradient echo) 펄스 시퀀스를 이용하였다. (TE/TR = 2.4/7.5 ms, 수 평균 = 4, 플립각도 = 30 도, 펄드뷰 = $30 \times 30 \times 20 \text{ mm}^3$, 매트릭스 크기 = $256 \times 256 \times 128$, 및 스캔 시간 = 12분 17초.)

[52]

발명의 실시를 위한 형태

- [53] 이하 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [54] 본 발명에서는 약물이나 자기조립체와 같은 정밀한 바이오 물질로서 연구되어왔던 뉴클레오시드를 기반으로 한 조영제를 합성했다. 뉴클레오시드는 단백질과 고유하게 결합하기 때문에, 이를 기반으로 한 조영제(CA)는 사람혈청알부민(HAS)과 결합할 수 있도록 한다는데 점에서 가치가 있다.
- [55] 이러한 예상을 입증하기 위하여, 본 발명에서는 하기 반응식에 나타난 바와 같은 간단하고 저렴한 반응 경로에 따라 신규한 유리딘계 조영제(화학식 1)를 합성했다.
- [56] 먼저 본 발명에 따른 조영제 합성에 필요한 양친매성 리간드 L1-4(화학식 2)를 연속적인 4단계에 의해 얻었다. 또한 본 발명에 따른 최종 착물 형성은 약 pH 7의 수용매 중에서 수행하였으며, 이에 따라 하기 음이온성 착물 LGd1-5(화학식 1)를 얻었다.
- [57]



[58] 본 발명에서는 생체 안정성의 중요한 요소인 Gd^{3+} 착물에 대한 충분한 열역학적 안정성을 확보하기 위해서 폴리(아미노카르복실레이트)기를 선택했다. 조영제의 양친매성은 분자 진동을 상당히 감소시킬 수 있는 결정적인 역할을 하는 자기조립을 유도한다는 점에서 큰 의미가 있다.

[59] 한편 C_5 (리보스당)과 1'-우리실기의 벌키한 리간드 사이의 1,3-이축상호작용(1,3-diaxial steric-interactions)은 분자의 전체 회전에 비해 Gd^{3+} 킬레이트(상관 시간 τ_{RI} 에 의해 표현됨)의 국부적인 회전 운동을 제한할 수 있다.

[60]

[61] 이하 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명하지만, 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 예시적으로 제시된 것으로서 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다.

[62]

[63] **합성 예 1: 화학식 N1 및 N2의 화합물 합성**

- [64] 5-아지도-5'-디옥시우리딘 (N1)은 이미 보고된 문헌(R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* 1987, 87, 901)에 기재된 방법에 따라 합성했으며, 수율은 90%였다.
 5-아미노-5'-디옥시우리딘 (N2)은 문헌(P. Caravan, *Chem. Soc. Rev.* 2006, 35, 512)에 기재된 방법에 따라 5-아지도-5'-디옥시우리딘으로부터 합성했으며, 수율은 84%였다. N, N-비스[(*tert*-부톡시카르보닐)메틸]-2-브로모에틸아민 (A)도 이미 공개된 문헌(E. J. Werner, A. Datta, C. J. Jocher, K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 8568)에 따라 합성했으며, 수율은 83%였다.

[65]

[66] **합성 예 2: 화학식 N3의 화합물 합성**

- [67] 무수 N,N-디메틸포름아미드(10 mL) 중의 화학식 N2의 화합물(486mg, 2mmol)과 KHCO₃ (505 mg, 5 mmol)를 0°C로 냉각시켰다. DMF (5 mL) 중의 N,N-비스[(*tert*-부톡시카르보닐)메틸]-2-브로모에틸아민 (A) (1.409g, 4 mmol) 용액을 20분에 걸쳐 적가한 후, 반응 온도를 실온으로 올리고, 60시간 동안 계속 교반했다. 반응생성물을 물로 희석한 후 에틸아세테이트(4?50 mL)로 추출했다. 유기층은 무수 황산마그네슘하에서 건조시킨 후 진공하에서 농축했다. 정제되지 않은 화합물을 용리액으로 메틸렌 클로라이드 중의 메탄올(3-5%) 을 사용하여 실리카겔 크로마토그래피를 통과시킨 후 건조시켜 화학식 N3의 화합물 660 mg (41.98%)를 얻었다.

[68]

- [69] ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ7.49 (d, 1H, *J*=8.12 Hz); 5.88 (d, 1H, *J*=2.80 Hz); 5.75 (d, 1H, *J*=8.12 Hz); 4.22 (q, 1H); 4.04 (dt, 2H, *J*=6.8 Hz); 3.50 (s, 8H); 2.98 (br, 8H); 2.55 (m, 2H); 1.47 (s, 36H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 171.10, 170.44, 163.63, 150.64, 102.71, 82.01, 81.96, 81.88, 72.01, 56.41, 56.37, 53.52, 28.33 ppm. FAB-MS *m/z* (M+H) calcd 786.44, found 786.10.

[70]

[71] **합성 예 3: 화학식 N4a-B4d의 화합물 합성**

- [72] 드라이 DMF (10 mL) 중의 화학식 N3의 화합물 (1.0 mmol), EDCI (2.5 mmol) 및 DMAP (1.0 mmol) 용액에 카르복실산(2.5 mmol)을 첨가했다. 이 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 후, 반응생성물을 물로 희석한 후 에틸아세테이트(3?50 mL)로 추출했다. 유기층은 무수 황산마그네슘하에서 건조시킨 후 진공하에서 농축했다. 잔류물은 에틸아세테이트/헥산(3:2)을 용리액으로 사용하여 실리카겔 칼럼크로마토그래피를 통과시킨 후 건조시켜 화학식 N4a-d의 화합물 660 mg (41.98%)를 얻었다.

[73]

- [74] 화합물 N4a: 수율: 780mg (83.81%) 무색 오일. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ10.24(s, 1H); 7.79(d, 1H, *J* = 8.16Hz); 6.17(d, 1H, *J* = 6.74 Hz); 5.80(d, 1H, *J*=8.12 Hz); 5.53 (m, 2H); 4.19(br, 1H); 3.44(s, 8H); 3.16(q, 1H); 2.80(br, 9H); 2.38(t, 2H, *J* =

7 Hz); 2.25(t, 2H, $J = 7.01$ Hz); 1.64(m, 2H); 1.55(m, 2H); 1.44(s, 36H); 1.33-1.22(br, 16H); 0.88(t, 3H, $J = 8.24$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): 172.46, 172.07, 171.57, 166.24, 151.33, 143.31, 102.40, 85.92, 80.88, 72.11, 71.27, 55.60, 55.46, 50.79, 50.64, 34.06, 33.82, 31.71, 29.24, 29.06, 28.96, 28.24, 24.97, 24.72, 22.69, 22.65, 14.14 ppm. FAB-MS m/z (M+1) calcd 1038.65, found 1038.54.

[75] 화합물 N4b: 수율: 800 mg (73.12%) 무색 오일. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.21 (s, 1H); 7.76 (d, 1H, $J = 8.20$ Hz); 6.09 (d, 1H, $J = 5.80$ Hz); 5.79 (d, 1H, $J = 8.08$ Hz); 5.49 (m, 2H); 4.19 (m, 1H); 3.43 (s, 8H); 3.15 (q, 1H); 2.87-2.67 (m, 8H); 2.64 (q, 1H); 2.35 (t, 2H, $J = 4.89$ Hz); 2.25 (t, 2H, $J = 4.04$ Hz); 1.62 (m, 2H), 1.52 (m, 2H); 1.44 (s, 36H); 1.34-1.25 (br, 24H); 0.88 (t, 3H, $J = 2.24$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 172.53, 172.15, 170.83, 163.63, 150.93, 140.80, 103.32, 86.14, 80.96, 71.94, 71.61, 56.00, 54.24, 52.93, 51.14, 34.12, 33.89, 31.98, 29.59, 29.38, 29.19, 25.03, 24.78, 22.79, 14.23 ppm. FAB-MS m/z (M⁺) calcd 1093.71, found 1093.70.

[76] 화합물 N4c: 수율: 900 mg (78.02%) 무색 오일. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.01 (s, 1H); 7.75 (d, 1H, $J = 8.16$ Hz); 6.10 (d, 1H, $J = 6.01$ Hz), 5.78 (d, 1H, $J = 8.12$ Hz); 5.48 (m, 2H); 4.18 (m, 1H); 3.41 (s, 8H); 3.12 (q, 1H); 2.86 (q, 1H); 2.80-2.57 (m, 8H); 2.36 (t, 2H, $J = 7.76$ Hz); 2.25 (t, 2H, $J = 6.89$ Hz); 1.63 (m, 2H); 1.54 (m, 2H); 1.43 (s, 36H); 1.33-1.23 (br, 32H); 0.86 (t, 6H, $J = 6.41$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): 172.61, 172.25, 170.88, 163.22, 150.66, 140.94, 103.31, 86.38, 81.80, 72.04, 71.64, 56.06, 53.00, 51.21, 34.19, 33.98, 32.11, 29.87, 29.83, 29.73, 29.69, 29.55, 29.47, 29.44, 29.28, 28.36, 25.11, 24.86, 22.88, 14.32 ppm. FAB-MS m/z (M+1) calcd 1149.78, found 1150.71.

[77] 화합물 N4d: 수율: 950 mg (78.77%) 무색 오일. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 10.01(s, 1H); 7.76 (d, 1H, $J = 8.16$ Hz); 6.14 (d, 1H, $J = 6.6$ Hz); 5.78 (d, 1H, $J = 8.81$ Hz); 5.52 (q, 1H); 5.47 (q, 1H); 4.17 (m, 1H); 3.42 (s, 8H); 3.14 (q, 1H); 2.87 (q, 1H); 2.78-2.58 (m, 8H); 2.35 (t, 2H, $J = 7.41$ Hz); 2.23 (t, 2H, $J = 6.44$ Hz); 1.62 (m, 2H); 1.54 (m, 2H); 1.42 (s, 36H); 1.30-1.18 (br, 40H); 0.86 (t, 6H, $J = 6.41$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): 172.17, 172.07, 170.75, 163.70, 150.99, 140.80, 103.32, 86.01, 80.90, 71.66, 71.59, 55.94, 54.09, 52.86, 51.03, 34.09, 33.87, 32.02, 29.79, 28.26, 25.01, 24.76, 22.78, 14.24 ppm. FAB-MS m/z (M+1) calcd 1206.84, found 1206.90.

[78]

[79] 합성예 4: 리간드(화학식 2) 및 가돌리늄 착물(화학식 1)의 합성

[80] 0°C에서 드라이 디클로로메탄(5.0 mL) 중의 화합물 4a-d 용액(0.50 mmol) 에 트리플루오로아세트산 (1.0 mL)을 첨가한 후 실온에서 12시간 동안 더 교반한다. 반응생성물을 디에틸에테르로 농축 및 증발시킨 다음 잔류물을 디에틸에테르로 분쇄했다. 고체생성물을 여과한 후 에탄올/클로로포름(4:1)으로 재결정화했다.

[81] 생성된 리간드(L0-4) (90 μM)를 초순수(10 mL)에 넣고, 이 용액을 소듐 바이카보네이트를 이용하여 pH를 약 7로 맞추었다. 가돌리늄 클로라이드

헥사하이드레이트(81 μ M)를 초순수 3.0 mL에 용해시키고, 3개로 나누어진 리간드(L0-4) 용액에 첨가했다. 각 용액에 첨가한 후, 0.1 M 포타슘 카보네이트 용액을 이용하여 pH 를 6.5-7.0 로 다시 맞추었다. Gd³⁺ 킬레이트화가 이루어지도록 이 용액을 30분간 교반한 후, 밤새도록 초순수에 대해 투석을 수행하고, 감압하에 동결건조하여 각각의 착물을 얻었다.

[82]

[83] 리간드 L0 및 가돌리늄 착물 LGd1의 합성

[84] 0°C에서 드라이 디클로로메탄(5.0 mL) 중의 화합물 N3의 용액(400mg, 0.50 mmol) 에 트리플루오로아세트산 (1.0 mL)을 첨가한 후 실온에서 12시간 동안 더 교반한다. 반응생성물을 디에틸에테르로 농축 및 증발시킨 다음 잔류물을 디에틸에테르로 분쇄했다. 고체생성물을 여과한 후 증류수에 재용해시켰다. 이 수용액을 건조시켜 무색의 고체 상태로 리간드 L0 270 mg (94.73%)을 얻었다.

[85] ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.41 (d, 1H, J = 8.12 Hz); 5.65 (d, 1H, J = 8.04 Hz); 5.49 (d, 1H, J = 3.56 Hz); 4.23 (q, 1H); 3.69 (s, 8H); 3.24 (br, 8H); 3.17 (m, 2H).¹³C-NMR(100 MHz, D₂O): 171.57, 166.24, 151.33, 143.31, 102.40, 93.01, 78.92, 72.11, 71.27, 55.60, 55.48, 50.79, 50.64 ppm. ESI-MS m/z (M+1) calcd 562.50, found 562.1. Gd³⁺ 착물 (C₂₁H₂₇GdN₅O₁₃)⁻¹: 수율 90%; ESI-MS: m/z (M⁻) (C₂₁H₂₇GdN₅O₁₃)⁻ calcd 715.09, found 715.00.

[86]

[87] 리간드 L1 및 가돌리늄 착물 LGd2의 합성

[88] 0°C에서 드라이 디클로로메탄(10 mL) 중의 화합물 N4a의 용액(520mg, 0.50 mmol)에 트리플루오로아세트산 (1.0 mL)을 첨가한 후 이 반응혼합물을 실온에서 12시간 동안 더 교반했다. 진공하에서 휘발 성분을 제거한 후 생성물을 디에틸에테르로 분쇄했다. 고체생성물을 디클로로메탄으로 세척한 다음 에탄올/클로로포름으로 재결정하여 무색의 고체 상태로 L1 320mg (78.62%)을 얻었다.

[89] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 11.45 (s, 1H); 7.78 (d, 1H, J = 8.04Hz); 5.84 (d, 1H, J = 5.67 Hz); 5.67 (d, 1H, J = 8.01Hz); 5.42 (dt, 1H); 5.17 (dt, 1H); 4.39 (m, 1H); 3.41 (br, 9H); 2.94 (br, 9H); 2.33 (m, 4H); 1.50 (m, 4H); 1.22 (br, 16H); 0.84 (t, 6H, J = 6.35Hz).¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 173.15, 172.94, 172.83, 164.77, 150.70, 102.22, 92.35, 81.94, 77.88, 71.68, 55.13, 52.23, 49.87, 33.47, 31.74, 29.08, 29.04, 29.00, 27.28, 24.72, 24.70, 22.54, 13.30ppm. FAB-MS m/z (M⁺) calcd 813.4, found 813.6. Gd³⁺ 착물(LGd2) (수율 87%; ESI-MS : m/z 967.30(M⁺)(C₃₇H₅₅GdN₅O₁₅)⁺ calcd 967.30, found 967.40

[90]

[91] 리간드 L2 및 가돌리늄 착물 LGd3의 합성

[92] 상기 리간드 L1 및 LGd2와 같은 방법으로 제조했으며 수율은 76.2%였다.

[93] ¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ 7.64(d, 1H, J = 8.04 Hz); 5.77(d, 1H, J = 4.28

Hz); 5.71(d, 1H, $J = 8$ Hz); 5.32(dt, 1H, $J = 5.56$ Hz); 4.61(t, 1H, $J = 7.16$ Hz); 3.86 (m, 1H); 3.76(m, 1H); 3.62 (s, 8H); 3.42 (br, 4H); 3.17(br, 4H); 2.38(m, 4H); 1.60(m, 4H); 1.28(br, 24H); 0.88(t, 6H, $J = 5.6$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 173.19, 172.92, 172.60, 164.76, 150.70, 143.44, 102.22, 92.36, 77.89, 71.88, 55.01, 52.29, 49.84, 33.46, 31.90, 29.39, 24.67, 22.55, 13.32 ppm. ESI-MS m/z (M+H) calcd 870.46, found 870.40. Gd^{3+} 착물(LGd3): 수율 85.20%; ESI-MS m/z (M^-) ($\text{C}_{41}\text{H}_{63}\text{GdN}_5\text{O}_{15}$) $^-$ calcd 1023.36, found 1023.50

[94]

[95] 리간드 L3 및 가돌리늄 착물 LGd4의 합성

[96] 상기 리간드 L1 및 LGd2와 같은 방법으로 제조했으며 수율은 82.2%였다.

[97] ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.46(s, 1H); 7.77(d, 1H, $J = 10.46$ Hz); 5.84(d, 1H, $J = 4.96$ Hz); 5.67 (d, 1H, $J = 7.88$ Hz); 5.42 (t, 1H, $J = 5.52$ Hz); 5.18(t, 1H, $J = 5.36$ Hz); 4.40 (m, 1H); 3.41 (br, 10 H); 3.03 (br, 4H); 2.81 (br, 4H); 2.34(m, 4H); 1.44(m, 4H); 1.18(m, 32H); 0.80(t, 6H, $J = 6.32$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 173.53, 172.55, 172.41, 163.77, 150.96, 142.42, 103.10, 88.89, 81.16, 77.70, 71.70, 55.58, 55.43, 52.09, 50.07, 33.78, 32.78, 29.70, 29.67, 29.47, 29.24, 29.10, 28.39, 24.98, 22.81, 14.58 ppm. FAB-MS m/z (M) calcd 926.53, found 926.00. Gd^{3+} 착물 (LGd4): 수율 89.5%; ESI-MS m/z ($\text{M}+2$) ($\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{GdN}_5\text{O}_{15}+2\text{H}$) calcd 1081.43, found 1081.4

[98]

[99] 리간드 L4 및 가돌리늄 착물 LGd5의 합성

[100] 상기 리간드 L1 및 LGd2와 같은 방법으로 제조했으며 수율은 82.2%였다.

[101] ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.34(s, 1H); 7.77(d, 1H, $J = 8.04$ Hz); 5.89(d, 1H, $J = 5.28$ Hz); 5.70(d, 1H, $J = 8$ Hz); 5.50 (t, 1H, $J = 5.81$ Hz); 5.24(t, 1H, $J = 5.48$ Hz); 4.36(m, 1H); 3.45(s, 8H); 3.32(m, 2H); 2.99(br, 4H); 2.91(br, 4H); 2.37(t, 2H, $J = 4.2$ Hz); 2.30(t, 2H, $J = 5.21$ Hz); 1.56(br, 4H); 1.26(br, 40H); 0.87(t, 6H, $J = 6.41$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 173.51, 172.53, 172.39, 163.67, 150.98, 142.38, 103.11, 88.77, 77.83, 77.57, 55.50, 52.10, 50.14, 33.80, 32.02, 30.83, 20.79, 29.47, 29.21, 29.11, 28.40, 14.58ppm. FAB-MS m/z (M+H) calcd 982.59, found 982.80. Gd^{3+} 착물 ($\text{C}_{49}\text{H}_{80}\text{GdN}_5\text{O}_{15}$): 수율 87.22%; ESI- m/z (M^-) ($\text{C}_{49}\text{H}_{80}\text{GdN}_5\text{O}_{15}$) $^-$ calcd. 1135.48, found 1134.7.

[102]

[103] 실험예 1: 이완도(relaxivity) 측정

[104] 종이완도와 횡이완도 r_1 , r_2 는 NMR (mq20 and mq60, Bruker, Germany)와 animal MRI (Biospec 47/40, Bruker, Germany) 시스템을 이용하여 36°C, 20 MHz (0.47 T) 및 60 MHz (1.41 T)에서 측정했다. 이완시간 T_1 및 T_2 는 반전 회복 및 스핀-에코 펄스 시퀀스로 각각 측정했다. 착물 LGd3 의 임계미셀농도(cmc)는 착물 LGd3 농도의 함수로서 양성자 이완률 $1/T_1$ 을 측정함으로써 결정했다.

[105] 본 발명에 따라 신규 합성된 양친매성 MRI 조영제의 이완 효율은 36°C 인산염 버퍼 용액(PBS) 중에서 20(0.47 T) 및 60 MHz(1.41 T)일 때, 종이완도(r_1)와 횡이완도(r_2)를 측정함으로써 결정했다. 하기 [표 1]에 결과가 기재되어 있다. 이완도(r_1 및 r_2)는 36°C, 0.47 T, 1.41 T에서 HSA 없이, 그리고 0.65 mM HSA를 첨가하여 PBS 용액 중의 MR 조영제 mM 당 화합물 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 에 대해 측정했다.

[106] 표 1

[Table 1]

화합물	이완도(Relaxivity)						
	20MHz (0.47T)				60MHz (1.41T)		
	r_1	r_2	r_2/r_1	r_1^a	r_1	r_2	r_2/r_1
LGd1	5.10	7.20	1.41	5.62	4.17	21.50	5.15
LGd2	14.70	15.90	1.08	31.90	12.40	32.40	2.61
LGd3	30.30	31.30	1.03	41.00	23.40	55.90	2.47
LGd4	27.10	26.20	0.96	38.50	16.50	47.20	2.86
LGd5	20.10	28.71	1.40	26.40	17.20	49.80	2.89
Magnevist®	4.70	5.60	1.19	--b	3.81	18.80	4.93
Omniscan®	4.41	5.60	1.26	--b	3.68	19.60	5.32

[107] 본 발명에 따른 양친매성 착물 LGd2 내지 LGd5의 경우, 이완도는 사슬 길이와 입자 크기에 따라 다르지만, Magnevist®와 Omniscan®에 비해 약 3 ~ 6배 정도 증가했다(도 6 - 도 9).

[108] LGd3에 대한 이완도(r_1)는 0.47 및 1.41 T에서 각각 최대값 30.3와 23.4 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 에 도달했는데, 이는 Gd-DTPA 및 Gd-DTPA-BMA 보다 6배 높은 값이다. 초분자 자기조립에 대해 대응하는 양친매성 컨쥬게이트 능력은 착물의 분자 진동과 전체적인 회전운동을 느리게 할 수 있고 이에 따라 각 착물의 r_1 값을 증진시킨다. LGd3에 대한 이완도(r_1)는 PBS 완충용액에서 60 MHz (1.41T) 일 때 현재까지 보고된 양친매성 시리즈 중에서 최대값을 나타낸다.

[109] 도 6 내지 도 9에서 DLS 데이터를 보면, LGd3의 평균 입자 크기는 최대 (51.16 nm)였는데, 이에 따라 회전 운동이 감소됨으로써, 다른 화합물에 비해 이완도(r_1)가 증가된 것으로 보인다.

[110] 본 발명에 따른 양친매성 착물 LGd2 내지 LGd5의 r_2/r_1 비는 Gd-DTPA 및 Gd-DTPA-BMA에 비해 고자기장(60 MHz) (1.41 T)에서 상당히 감소했다. 이것은 본 발명에 따른 신규한 조영제가 높은 자기장에서 더 나은 T_1 조영제임을 명백히

보여준다.

[111]

[112] 실험예 2: MR 팬텀 이미지 측정

[113] LGd1 내지 LGd4의 증가된 이완도와 해상도 향상 가능성을 직접적으로 보여주기 위해서, 착물의 분자 농도를 증가시키면서 MR 팬텀을 63.8 MHz (1.5 T) (Signa EXCITE, GE, USA) clinical MR scanner를 이용하여 영상화했다(도 1).

[114] 도 1은 36°C, 63.8 MHz (1.5 T)에서 PBS 용액 중의 6가지 다른 농도(1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0 mM)를 가진 착물 LGd1 - 4 및 Mag (Magnevist® Gd-DTPA)에 대한 T₁-웨이티드 스핀-에코 MR 이미지이다(FOV = 7 cm; 매트릭스 = 256*256; TE/TR = 11/100 ms; 슬라이스 두께 = 2 mm; 어퀴지션수 = 50). 이 이미지는 본 발명에 따른 조영제 LGd1-4가 가돌리늄(Gd³⁺)이 낮은 농도로 존재할 때조차, 더 밝은 콘트라스트를 나타낸다는 것을 분명히 보여준다. 특히 Gd³⁺이 0.5 mM 이하일 때, 밝기는 60 MHz에서의 이완도 r_1 값 순서 LGd3>LGd4>LGd2>LGd1와 일치했다.

[115]

[116] 실험예 3: 사람혈청알부민(HAS)과의 상호작용

[117] 조영제와 사람혈청알부민(HAS) 사이의 비공유적 상호작용은 혈액에서의 순환 시간을 증가시키고 진동율을 감소시켜서, 혈관 이미지에 대해 콘트라스트를 더 크게 증가시킬 수 있다고 알려져 있다. 새로 합성된 조영제(CAs)와 사람 혈청 알부민(HAS) 사이의 유효 상호작용이 연구되었다.

[118] HSA(사람혈청알부민; 제품번호 A3782)은 시그마(Sigma; Bornem, Belgium)에서 구입하였고, 추가 정제 없이 사용하였다. HSA 결합 실험은 36°C, 20 MHz에서 0 부터 4 mM까지 HAS 농도를 변화시키면서 이에 따른 PBS 용액 중의 착물(LGd1-5) 50μM에 대해 수행하였다.

[119] 도 2는 36 °C, 20 MHz(0.47 T)에서 사람혈청알부민(HAS)의 농도에 따른 50 μM 착물 용액의 $1H$ 이완 속도의 변화를 보여준다. 이에 따르면 조영제의 특정 농도(50 μM)에서 R_1/R_1^0 값 (R_1 = HSA 존재하의 이완도이며, R_1^0 = HAS 부재하의 이완도)이 HSA의 농도에 따라 점진적으로 증가했음을 보여준다.

[120] 또한 이 결과는 사람혈청알부민(HAS)의 농도가 1.0 mM 일 때, 본 발명에 따른 양친매성 착물 LGd2 및 LGd3와 사람혈청알부민(HAS)의 유효 상호작용이 LGd1이나 다른 양친매성 착물 LGd4 및 LGd5 에 비해 높다는 것을 명백히 보여준다. R_1/R_1^0 의 증가는 지방족 사슬 길이의 증가와 함께 감소하는데 순서는 다음과 같다: LGd2>LGd3>LGd4>LGd5.

[121] 사람의 생리 농도(0.65 mM)를 가진 사람혈청알부민(HAS)을 포함하는 PBS 버퍼 용액에서, 20 MHz(0.47 T) 일 때, LGd3에 대해 최대 이완도 41.0 mM⁻¹s⁻¹가 얻어졌다(표 1). 이 값은 동일조건에서 현재 의학적으로 상용화된 혈관 촬영 조영제인 포스포디에스테르-Gd-DTPA(독일 바이엘 쉐링사의 상품명 Vasovist와 동일한 값이다.

[122] 또한, HSA와 착물 사이의 비공유 결합의 세기를 알기 위해서, 착물 LGd3에

대한 결합 상수(K_a)를 참고논문(D. T. Schuhle, J. Schatz, S. Laurent, L. V. Elst, R. N. Muller, M. C. A. Stuart, J. A. Peters, *Chem. Eur. J.* 2009, 15, 3290)에 기재된 이론 방정식을 사용하여 예시적으로 계산한 결과, $(3.34 \pm 0.28) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 였다.

[123] PBS 용액 중에서 36°C , 20 MHz (0.47 T)일 때 부가생성물 LGd3-HSA에 대한 (r_1^c) 값이 $41.0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 인 반면, LGd3 (r_1^f)의 비응집 상태에 대한 이완도는 $18.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (below cmc = $50 \mu\text{M}$; 도 10)로 측정되었다.

[124] 이 결합 상수는 최근 보고된 칼릭스[4]아렌-DOTA 키투게이트드 양친매성 물질에 비해 상당히 높은 것이다. 이것은 예상한 대로 뉴클레오시드가 사람혈청알부민(HAS)과 결합 친화성이 높다는 것을 보여주었다. 이는 결과적으로 본 발명에 따른 착물 LGd3는 생체 내 실험에서 장시간 동안 보유될 수 있다는 것을 입증한다.

[125]

[126] **실험 예 4: 이완도의 pH 의존성 측정**

[127] 최근 pH 반응성 조영제에 대한 요구가 증가하고 있다. 특히 조직의 생체내 pH 맵핑에 있어, 건강한 피하 조직에서보다 세포의 pH(pH_e)가 거의 0.6이나 낮은 흑색종과 같은 암을 진단하는데 있어 pH 반응성 조영제는 매우 중요하다.

[128] 비응집성 착물 LGd1과 가장 응집된 착물 LGd3(도 7, 평균 직경 51.16 nm)에 대해 60 MHz (1.41 T), 36°C 에서 여러 pH(3.5 - 11)에 대해 이완도가 조사되었다.

[129] 흥미롭게도, 이러한 넓은 pH 범위에서 어떠한 침전도 관찰되지 않았다. LGd3 착물의 이완도는 pH 증가(최대 pH 8까지)에 따라 점진적으로 증가되었다가(도 3), pH 8.0과 9.5 사이에서 급격히 감소했다. LGd1 착물에 대한 이완도는 $5.0 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 의 범위에 있었으며, 알칼리성인 pH 11에서 약 10% 정도 감소했다. (도 11)

[130] 구체적으로 LGd3에 대한 이완도는 pH 8일 때 약 $24.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 이고, pH 11일 때 $14.2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 로 점진적으로 감소했다. (approx. $\Delta r_1 = 10.3$). 이 이완도는 pH에 따라 회복된다. 가장 중요한 pH 6과 7.5 사이에서, 이완도 변화는 $\Delta r_1 = \sim 2.9$ 였다(도 3). 이러한 관찰결과는 LGd3 착물이 정상 조직(pH 7.3 - 7.6)과 암(pH 6.6 - 6.9)을 구별할 수 있다는 것을 암시한다.

[131] 도 3은 36°C , 60 MHz (1.41 T)에서 착물 LGd3에 대한 물 ^1H -NMR 이완도의 pH 의존도를 보여준다. 물 ^1H NMR 이완도 r_1 의 pH 의존성은 60 MHz, 36°C 에서 얻어졌다. 착물 LGd1와 LGd3를 미리 준비된 pH 3.5-11의 스탁용액(StockOptions pH Screen, Hampton Research, USA)에 용해시켰다.

[132] pH 의존적인 이완도 변화는 양성자 교환율 또는 분자 회전율에 기초하여 설명할 수 있다. 낮은 pH에서, 음이온성 착물에 대한 양성자화 때문에, 이완도는 낮다. pH가 증가하면, 양성자 교환율이 음이온성 착물이 많이 존재하게 됨으로 인해 증가하고, 이는 이완도가 pH 8에서 최대값에 도달하게 한다. pH 8 이상에서는 분자내 수소결합이 방해받아서 자기조립된 응집이 무너지게 되는 것 같다.

- [133] DLS 연구 결과, LGd3의 평균 직경은 pH가 7.4에서 10.5까지 변화함에 따라 51.15에서 1.2 nm까지 급격히 변화되었다(도 12). 입자 크기가 감소함에 따라, 회전 운동은 증가하여, pH 10.5에서 $17.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 정도의 낮은 이완도를 나타낸다.
- [134]
- [135] **실험예 5: 가돌리늄 착물의 안정성**
- [136] 여러 가지 생물학적 활성 금속이온에 대한 가돌리늄 착물의 안정성은 생체내 응용에서 매우 중요하다. 혈액 중의 Zn^{2+} 이온의 농도(55 - 125 $\mu\text{M/L}$)가 상대적으로 높을 때, 이 중에서 Zn^{2+} 만이 상당량의 Gd^{3+} 이온을 대체할 수 있다. 이때, Zn^{2+} 이온에 의한 트랜스메탈라이제이션에 대한 착물 LGd1-4의 안정성은 다른 방법으로 연구되었다.
- [137] PBS 용액 중에 2.5 mM ZnCl_2 을 가진 가돌리늄 착물 2.5 mM ^1H 종이완도(R_1)의 시간 변화를 측정했다. 본 발명에 따른 양친매성 착물 LGd2이 비응집성 착물 LGd1보다 안정도가 높았다. (도 13)
- [138] 70시간 후, LGd1-4 이완도는 각각 30, 50, 21 및 12%가 유지되었다. 이 값은 의학적으로 상용화된 MRI T_1CAs , Gd-DTPA 및 Gd-DTPA-BMA의 값이 각각 50과 10%인 것에 대응하는 것이다.
- [139]
- [140] **실험예 6: MRI 측정**
- [141] 실험관내 실험에서 트랜스메탈라이제이션 안정성 연구는 본 발명에 따른 착물이 매우 안정하며, 생리적 조건하에서 분해되지 않는다는 것을 보여준다. 따라서, 뉴클레오시드 기반의 Gd^{3+} -킬레이트화된 양친매성 물질의 예시로서 LGd3를 마우스에서의 MR 영상화에 대해 평가하였다. 일반적으로 소수성 부분은 점차 간에 축적되는 경향이 있는데 이는 세포외 조영제와 간세포 특이적 제제의 두 가지 특징을 제공한다.
- [142] 이러한 특성에 따라, 디페닐사이클로헥실 포스포디에스테르-Gd-DTPA (Vasovist®, Gd-BOPTA (Multihance® Bracco, Italy) 및 Gd-EOB-DTPA (Primovist® Schering AG, Germany)가 간(liver) 특이적 조영제로 사용되어 왔다.
- [143] 조영제는 신장을 통한 부분 배출과 함께 간담즙 기관을 통해 혈액으로부터 부분 배출된다(Vasovist® 91% 신장, 8% 간; Multihance® 96% 신장, 4% 간; Primovist® 50% 신장, 50% 간).
- [144] T_1 조영제의 전신 약물동태는 다이내믹 2D 또는 3D MR 영상화에 의해 측정할 수 있다. 본 발명에 따른 착물 LGd3와 현재 상용화된 조영제인 Gd-DTPA-BMA 사이의 다이내믹 특성을 비교하기 위해 간과 혈액의 MR 이미지에서의 콘트라스트 대 노이즈비 (CNRs)를 측정했다.
- [145] 5주된 Balb/C 마우스($n=3$; OrientBio, Korea)를 콘트라스트가 강화된 다이내믹 MRI로 측정했다. MRI는 시그널 전송 및 수송을 위해 quadrature birdcage RF 코일(35 mm 내부직경)을 가진 4.7 T MRI system (BioSpec 47/40; Bruker, Germany)를 사용하여 수행하였다.

- [146] 조영제 LGd3 및 Gd-DTPA-BMA의 주입 전후에, 다이내믹 T₁-웨이티드 MR 조영화가 수행되었다. 조영제(0.1 mmol Gd/kg) 정맥 볼루스(Bolus)는 꼬리 정맥을 통해 주사되었다. MRI를 하는 동안, O₂:N₂O (3:7) 혼합물과 1~1.25 % 흡입마취제를 사용하여 동물을 마취했다.
- [147] 콘트라스트 대 노이즈 비율(CNR)로서 ROI(region-of-interest)에서의 시그널 강도를 정량적으로 측정하기 위하여, 우리는 실린더형 튜브(직경 5 mm)에 들어 있는 물 샘플(1 g/l CuSO₄ in 8:2 of D₂O:H₂O)을 레퍼런스로 사용했다.
- [148] 다음과 같은 수치를 갖는 스핀-에코(SE) 펄스 시퀀스를 이용하여 다이내믹 2D T₁-웨이티드 이미지를 얻었다(TE/TR = 10/400 ms, 수평균 = 4, 매트릭스 크기 = 256 × 256, 슬라이스 두께 = 1 mm, 필드 뷰 = 30 × 30mm² (축상 슬라이스) 또는 50 × 30mm² (관상 슬라이스), 스캔 시간 = 6분 50초).
- [149] 다음과 같은 수치를 갖는 FLASH를 이용하여 다이내믹 3D T₁-웨이티드 이미지를 얻었다. TE/TR = 2.4/7.5 ms, 수평균 = 4, 플립 각도 = 30 도, 필드뷰 = 30 × 30 × 20mm³, 매트릭스 크기 = 256 × 256 × 128, 및 스캔 시간 = 12 min 17 s.
- [150] 도 4는 0.1 mmol Gd/kg LGd3를 정맥 주사한 전후의 마우스의 순차적 다이내믹 2차원 MR 사진이다. 스핀-에코(SE) 펄스 시퀀스를 다음 조건하에서 사용했다. TE/TR = 10/400 ms, 평균수 = 4, 매트릭스 크기 = 256 × 256 및 슬라이스 두께 = 1 mm, 필드뷰 = 50 × 30mm².
- [151] LGd3를 주사한 지 30분 후에 얻어진 T₁-콘트라스티드 이미지에서, 간 유조직(L), 후대정맥(CVC) 및 신장(K)에서의 간 콘트라스티드 강화현상은 현저히 증가했다. 그러나 담낭(GB)에서의 시그널 강도(SI)는 큰 변화가 없었다. 주사한지 2시간 후에 CVC에서의 SI가 거의 회복되어 낮아진 반면 담낭에서의 밝은 콘트라스트의 증가는 주사한지 2-4시간 내에 관찰되었다. 주사한지 9시간 후에, 간에서의 SI는 주사전 수치와 비교했을 때 상대적으로 높았다.
- [152]
- [153] 실시예 7: 간(liver) 특이성 평가
- [154] 도 5는 0.1 mmol Gd/kg 농도의 시판 중인 T1 조영제 Gd-DTPA-BMA (Omniscan®)의 주사 후 마우스의 간(○)에서의 변화와 비교한 0.1 mmol Gd/kg의 LGd3 주사 후에 얻어진 마우스 간(●)과 혈액(후대 정맥; ▲)에서의 CNR(Time variations of contrast-to-noise ratio) 변화 그래프이다. LGd3의 주사 후 CNR 값은 점차 증가되었고, 2-4시간 후에 거의 최고치에 이르렀으며, 11시간까지 점차적으로 감소하였으나 주사 전의 값의 약 60% 정도는 유지했다. LGd3 주사 후 혈액에서의 CNR은 거의 초기 값으로 회복되었으며, 상대적으로 긴 보유 시간을 제외하면 Gd-DTPA-BMA의 경우와 유사한 경향을 보였다. (*: P<0.01, 간과 혈액에서의 LGd3와 주사 전 간에서의 값)
- [155] 3차원 다이내믹 이미지(도 14)에서 얻어진 마우스의 CNR(time-course contrast-to-noise ratio) 변화의 정량 분석 결과는 0.1 mmol Gd/kg의 LGd3를 주사한 경우가 동일한 양으로 Gd-DTPA-BMA를 주사한 경우보다 간실질(liver

parenchyma)에서 더욱 강하고 지속력 있는 증가 현상이 나타났다는 것을 보여준다. (도 5) 간실질에서의 피크(peak)와 플라토(plateau)의 증가는 조영제 LGd3를 주사한 후 1.5과 4 시간 사이에서 관찰되었으며 약 240%였다. (간에서의 CNR 1.67 내지 4.0).

- [156] 이 시그널 증가는 이미 보고된 양친매성 하이드록시피리도네이트-테레프탈아미드 기반의 조영제로서 수화수가 2인 헤테로트리포달하이드록시피리도네이트-테레프탈아미드(HOPO-TAM)의 경우 주사 후 5분 이내에는 시그널이 165% 증가하지만 곧 바로 낮아지는 것과 비교해서도 매우 높은 값이다.
- [157] DTPA 기반의 양친매성 물질의 경우, 이러한 증가는 단 102%였다. 본 발명에 따른 조영제의 간에서의 증가는 상용화된 간 특이적 조영제인 Gd-EOB-DTPA (Primovist® chering AG, Germany)와 비슷하다는 것을 확인할 수 있다.
- [158] 또한 Gd-DTPA-BMA 의 피크 CNR 값은 LGd3 보다 작았으며, 0.2 내지 0.6 시간 사이에서 약 2.8이었다. 또한 Gd-DTPA-BMA (Omniscan®의 CNR 값은 LGd3 보다 훨씬 빠르게 감소되었다. LGd3를 주사한 지 2시간 이내에 혈액의 CNR은 그 전의 CNR과 비교할 때 상당히 높아졌음이 관찰되었으며, 관류 파아지(perfusion phage)는 이때까지 지속되었다. LGd3를 주사한 지 약 3시간 후에는 혈중 CNT이 거의 초기값으로 회복되었으며, 이는 이 시간 내에 신장을 통해 혈액 중의 LGd3가 배출되기 때문인 것 같다. 간에서의 시그널 강도는 간세포에 LGd3가 축적되기 때문인 것으로 추정된다.
- [159] 간에서의 최대 증가값은 주사한지 2시간이 되었을 때 관류 파아지에서 관찰되었으며, 그 후에는 플라토와 유사한 일정한 정도의 증가된 CNR이 2시간 동안 유지되었다.
- [160] 지연된 간담즙성 조직 특이적 파아지, 간실질에서의 CNR은 혈액 보다 상당히 높았으며, 혈중 CNR은 LGd3를 주사한 지 2시간 후에 이내에 이전 값으로 거의 회복되었다. 지연된 간담즙성 파아지 동안, 2시간 후에 간에서 매우 강한 CNR이 얻어졌으며 11시간 이상 지속되었다.
- [161] LGd3의 약리적 작용(pharmacokinetic)은 담도와 장을 통해 조영제가 배출된다는 관점에서, 시판되고 있는 간담즙성 MR 조영제인 Gd-BOPTA, Gd-EOB-DTPA 또는 MS-325와 유사하다. LGd3의 담도 배출 성질은 간암 전이, 특히 더 작은 병변에 대해 고감도의 선택성 높은 검출이 가능하도록 한다.
- [162]
- [163] 종합하면, 본 발명에서는 MRI 조영제로서 유리딘 뉴클레오시드 기반의 양친매성 가돌리늄 착물을 합성했다. 본 발명에 따른 착물 중 하나인 LGd3의 최대 이완도는 0.47 와 1.41 T 일 때 인산염 버퍼 용액(pH 7.4)에서 각각 30.3와 23.4 mM⁻¹s⁻¹였다. 또한 본 발명에 따른 신규 착물은 증가된 이완도와 함께 사람혈청알부민에 대한 결합 친화성을 나타냈으며, 양친매성 조영제 LGd3의 이완도는 용액의 pH에 따라 달라졌다. 아연 이온(Zn²⁺)과의

트랜스메탈라이제이션에 대한 착물의 안정성 연구 결과는 본 발명에 따른 신규한 양친매성 착물이 상용화된 Gd-DTPA와 Gd-DTPA-BMA에 비해 상당히 안정화하는 것을 보여준다. 동물 실험에서, 신규 착물의 약리적 작용은 본 발명에 따른 착물이 간세포에 매우 특이적이며, 담도, 담낭 및 장으로 배출된다는 것을 보여준다. 따라서 간에서의 작은 병변에 대해서도 상당히 가능성이 있는 T₁ 조영제가 될 수 있을 것이다.

[164]

산업상 이용가능성

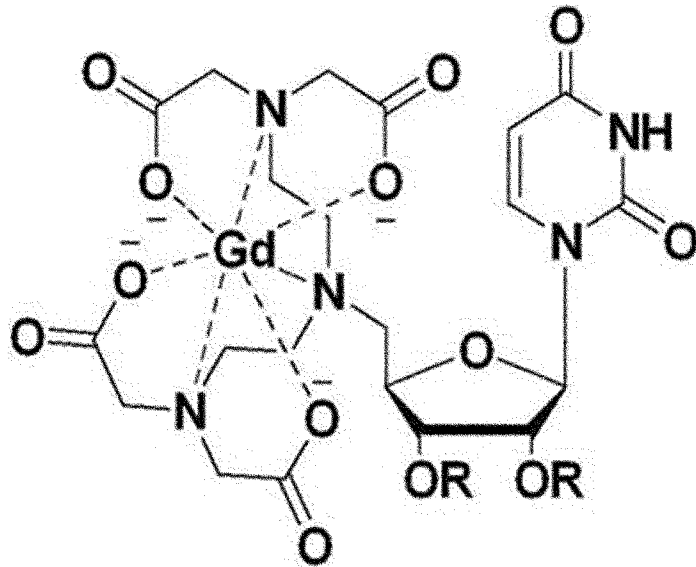
[165] 본 발명에 따른 유리딘계 가돌리늄 착물은 높은 이완도, 사람혈청알부민에 대한 상당한 결합 친화성, pH 반응성 및 높은 간 특이성을 갖는 최초의 자기조립된 상자성 양친매성 물질로서, 이를 포함하는 조영제는 MRI 분야에 중요하고 효과적인 나노시스템을 제시한다는 점에서 큰 의미가 있다.

청구범위

[청구항 1]

하기 화학식 (1)로 표시되는 유리던계 가돌리늄 착물:

... (1)



상기 식에서, R은 H 또는 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ 이며, 이때 n은 1 내지 12의 정수이다.

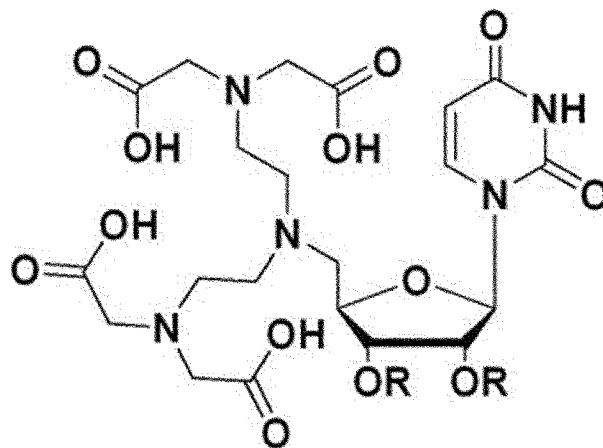
[청구항 2]

제1항에 있어서, 상기 n은 6 이상인 것을 특징으로 하는 유리던계 가돌리늄 착물.

[청구항 3]

하기 화학식 (2)로 표시되는 리간드:

... (2)

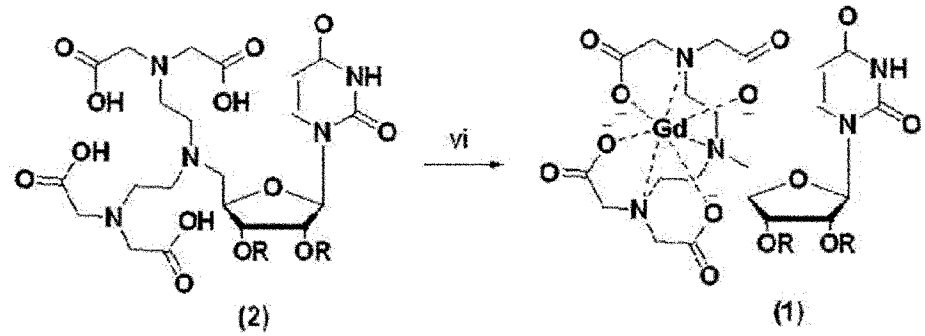


상기 식에서, R은 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ 이며, 이때 n은 1 내지 12의 정수이다.

[청구항 4]

하기 <반응식 1-1>에 따라 화학식 (1)의 유리던계 가돌리늄 착물을 제조하는 방법:

<반응식 1-1>

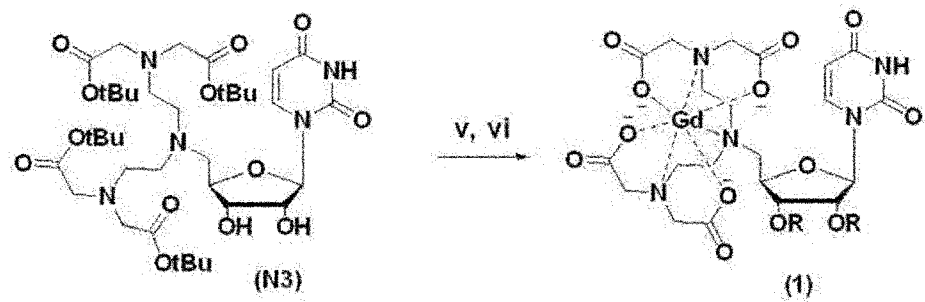


상기 식에서, vi)는 $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_2O , Na_2CO_3 이다.

[청구항 5]

하기 <반응식 1-2>에 따라 화학식 (1)의 유리단계 가돌리늄 착물을 제조하는 방법:

<반응식 1-2>

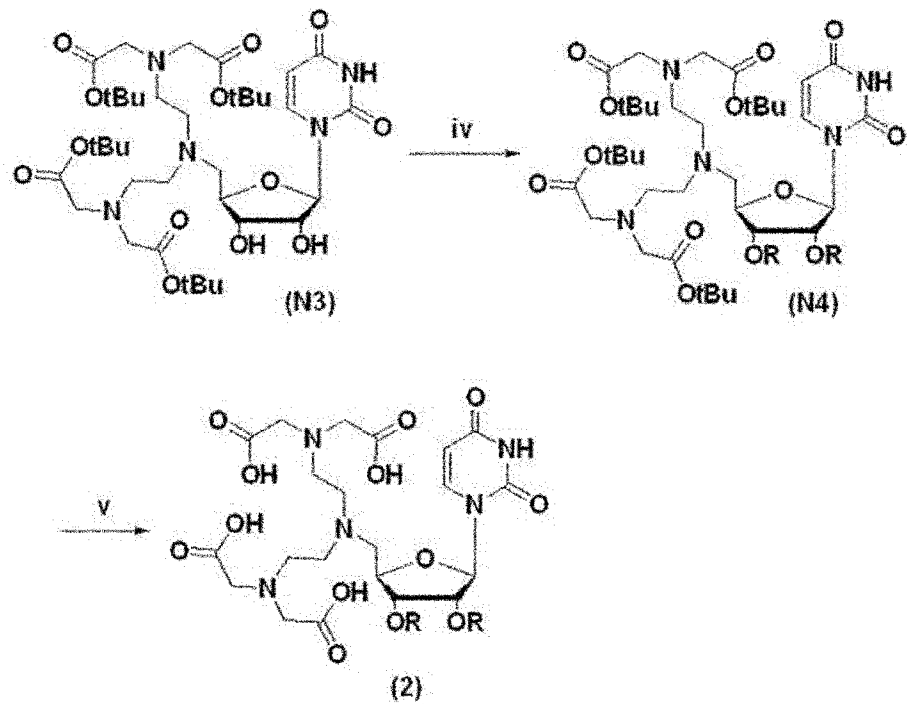


상기 식에서, v) TFA, DCM 이고, vi)는 $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_2O , Na_2CO_3 이다.

[청구항 6]

하기 <반응식 2>에 따라 화학식 (2)의 리간드를 제조하는 방법:

<반응식 2>

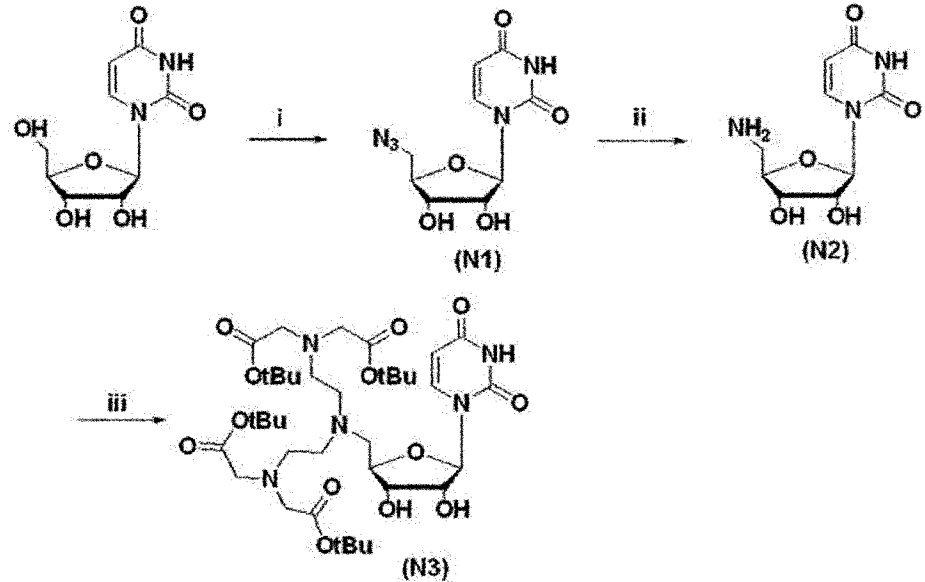


상기 식에서, iv)는 RCO_2H , EDCI, DMAP, DMF이며, v)는 TFA, DCM이다.

[청구항 7]

제6항에 있어서, 상기 화학식 (N3)의 화합물은 하기 <반응식 3>에 따라 제조하는 것을 특징으로 하는 화학식 (2)의 리간드를 제조하는 방법:

<반응식 3>



상기 식에서, i)은 PPh_3 , NaN_3 , CBr_4 , DMF이고, ii)는 PPh_3 , py, $\rightarrow \text{NH}_4\text{OH}$ 이며, iii)은 N,N-비스[(tert-부톡시카르보닐)메틸]-2-브로모에틸아민, KHCO_3 , DMF이다.

[청구항 8]

제1항에 따른 화학식 (1)의 유리딘계 가돌리늄 착물을 포함하는 MRI 조영제.

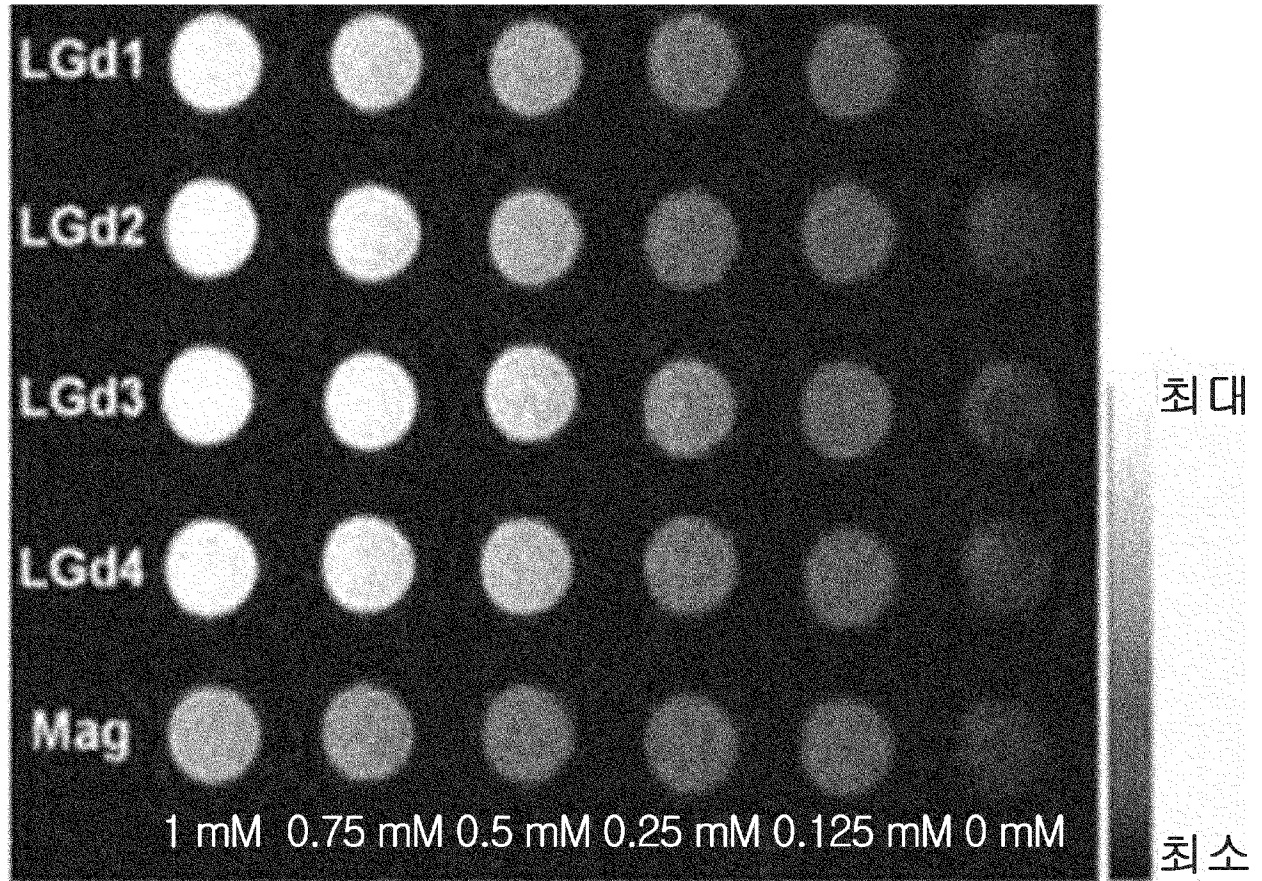
[청구항 9]

제8항에 있어서, 간(liver) 이상을 진단하기 위한 것을 특징으로 하는 MRI 조영제.

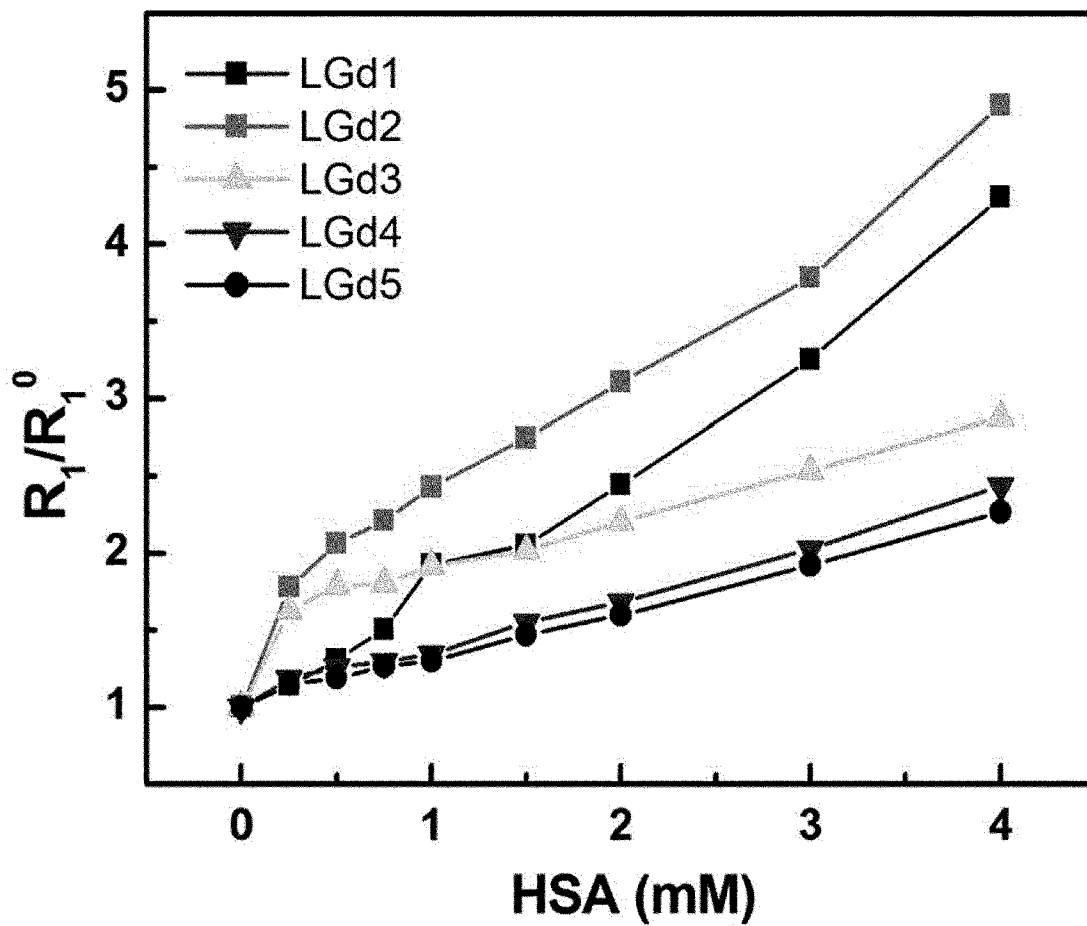
[청구항 10]

제8항에 있어서, 정맥주사제인 것을 특징으로 하는 MRI 조영제.

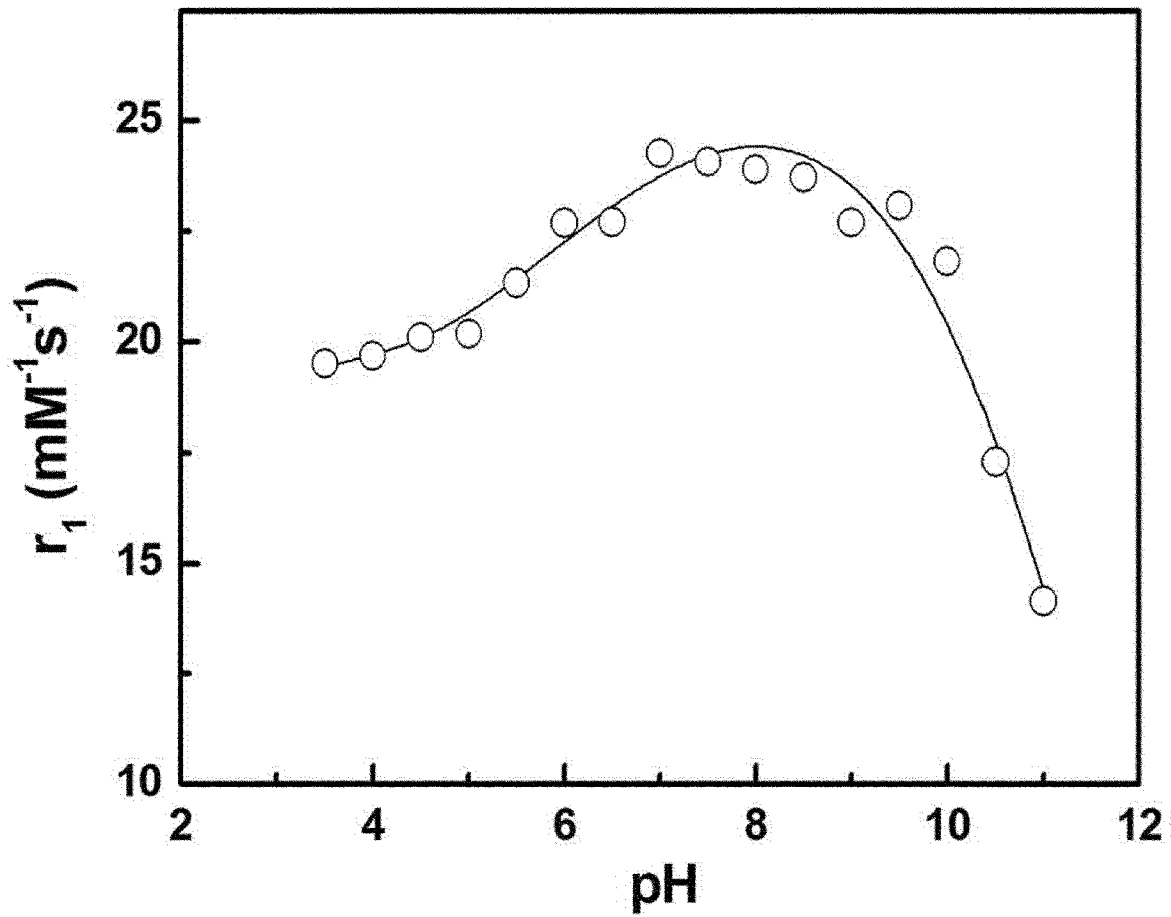
[Fig. 1]



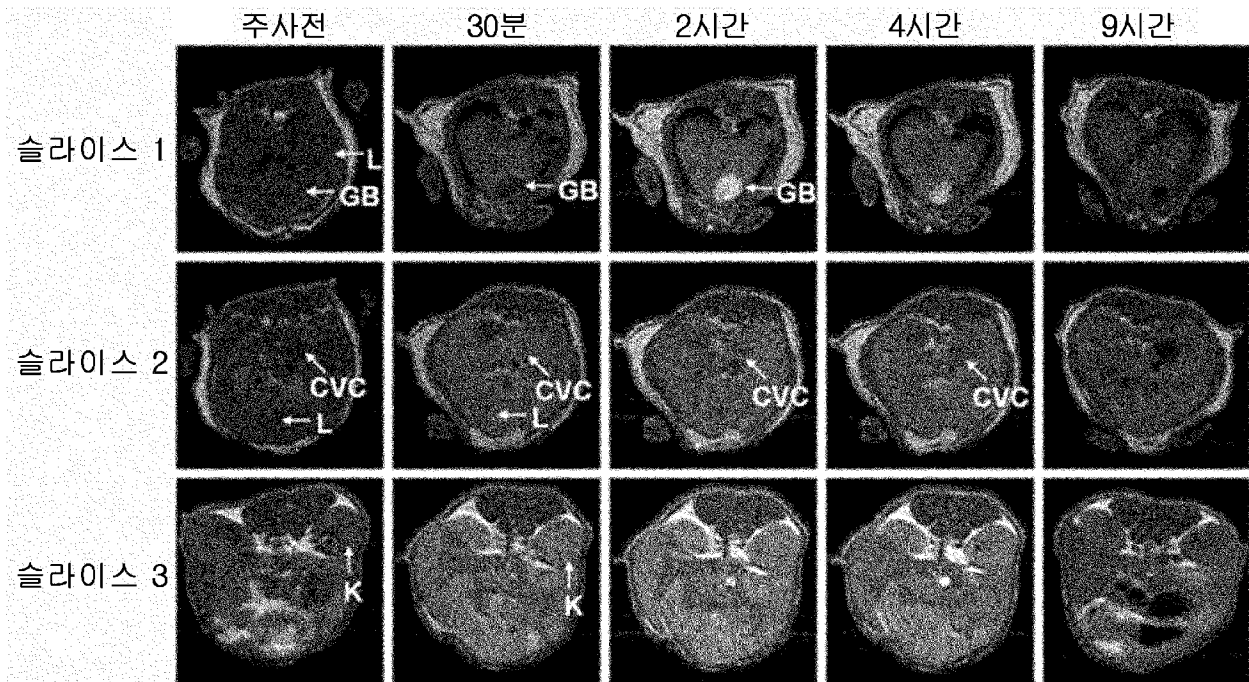
[Fig. 2]



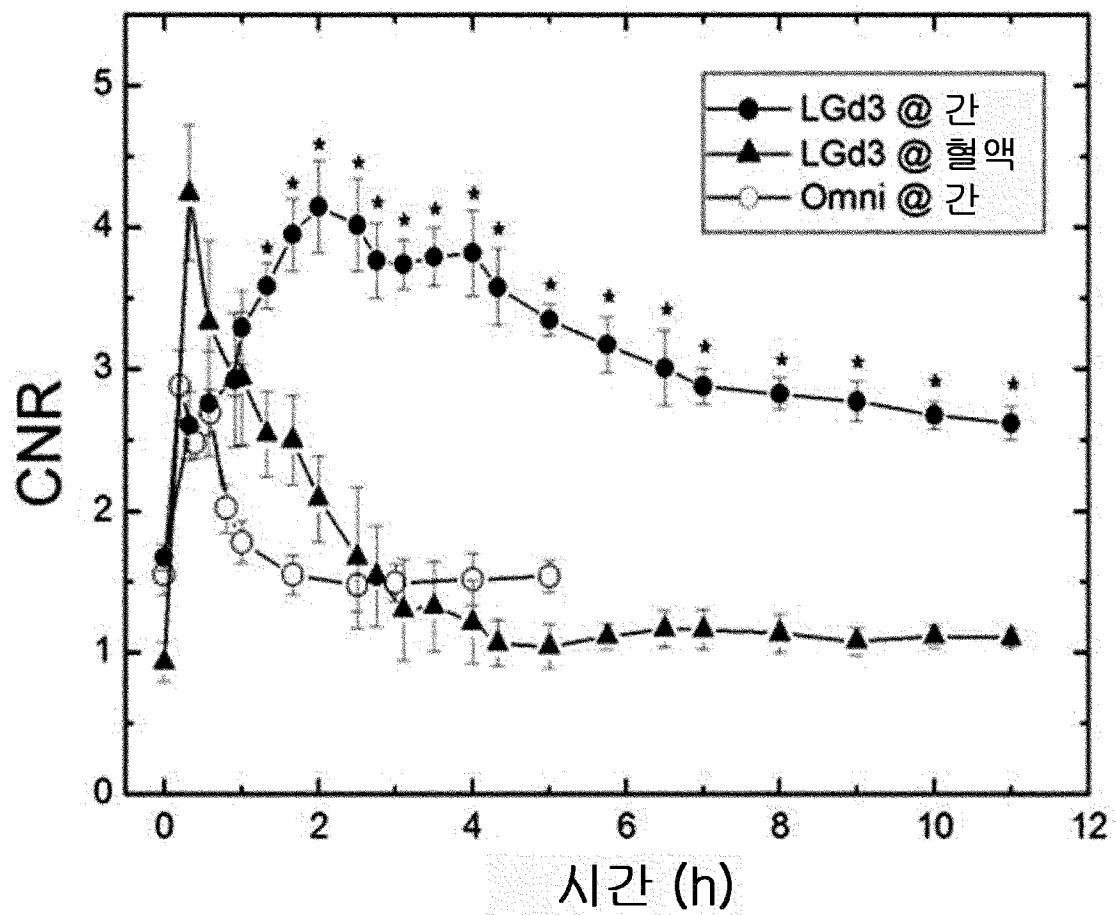
[Fig. 3]



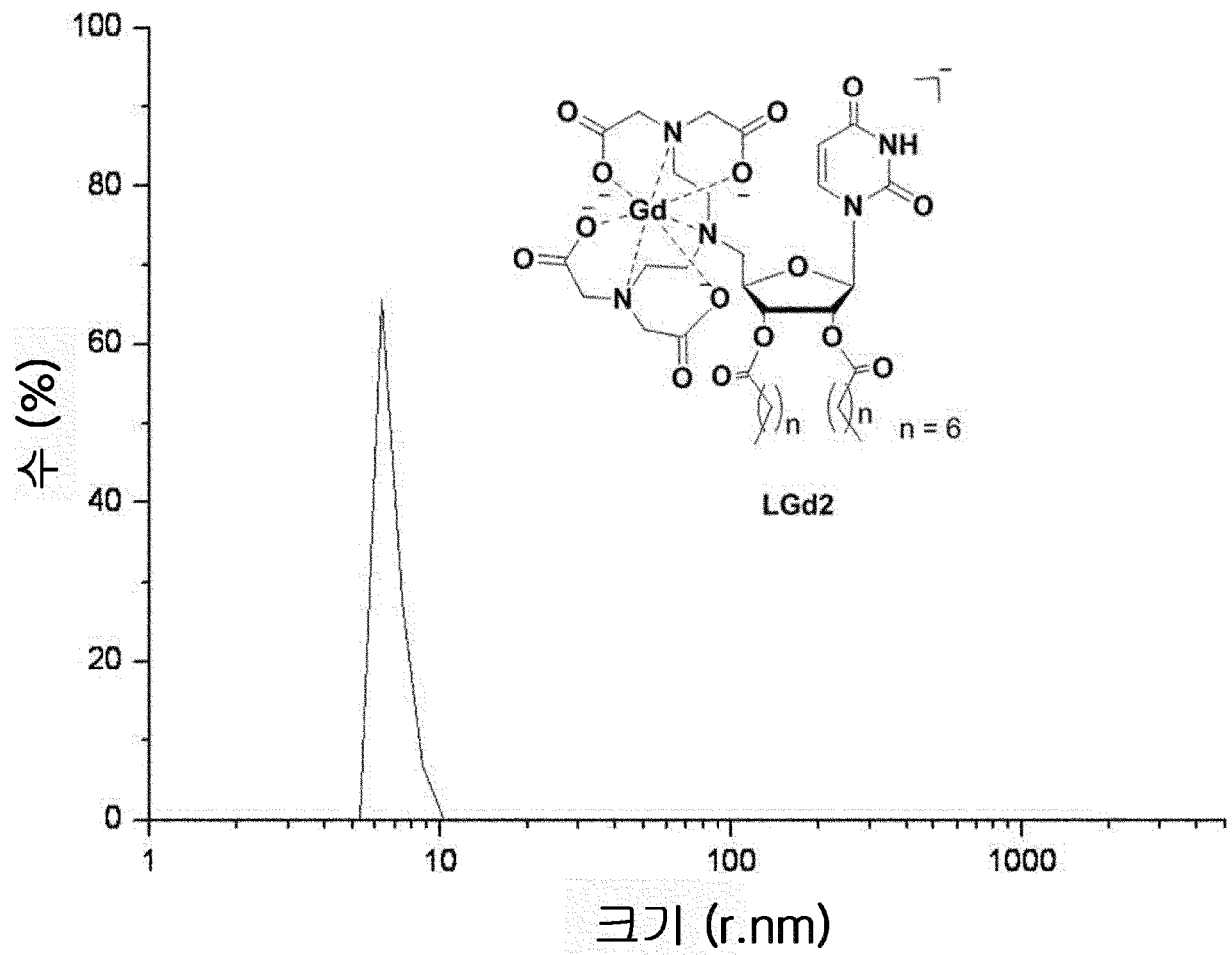
[Fig. 4]



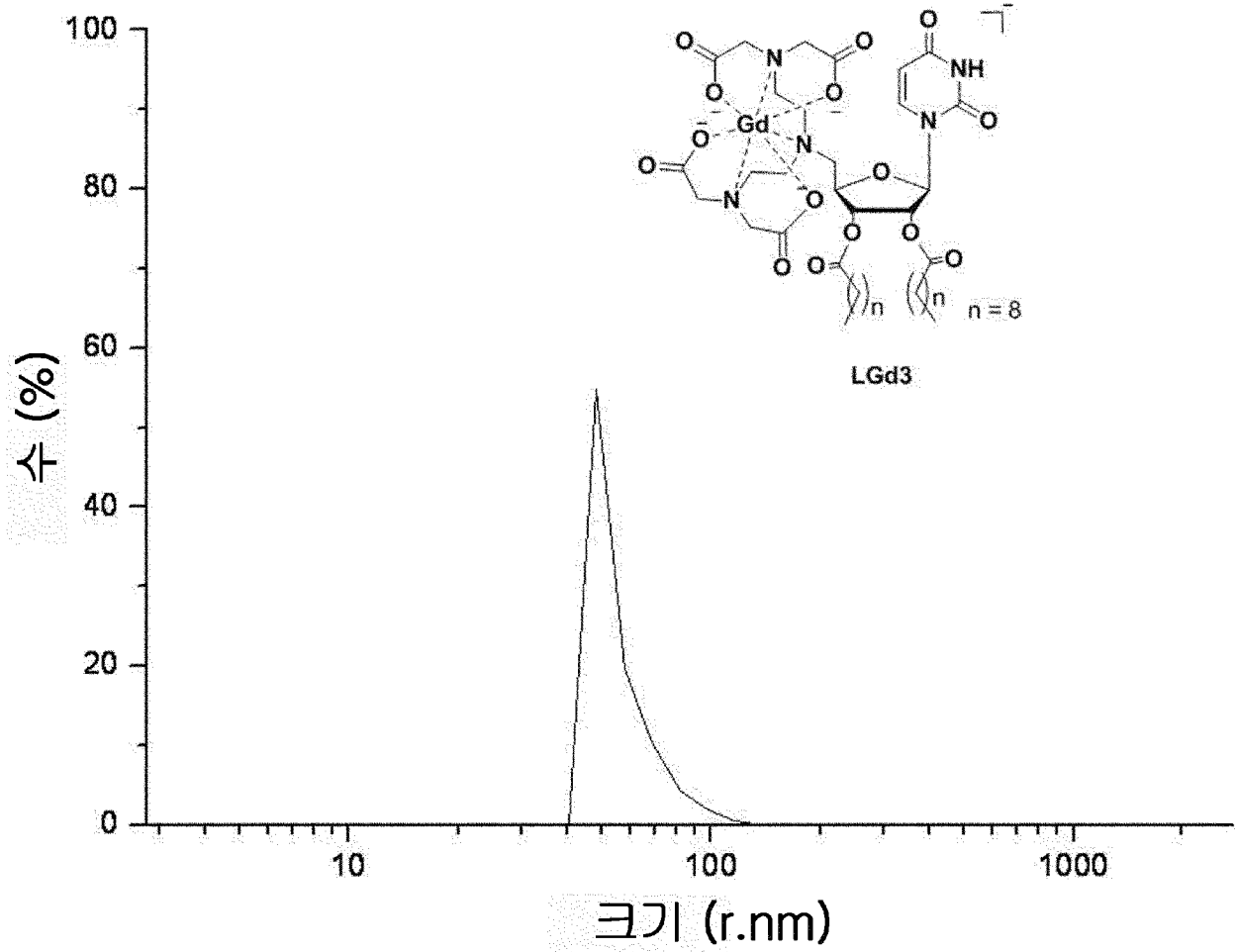
[Fig. 5]



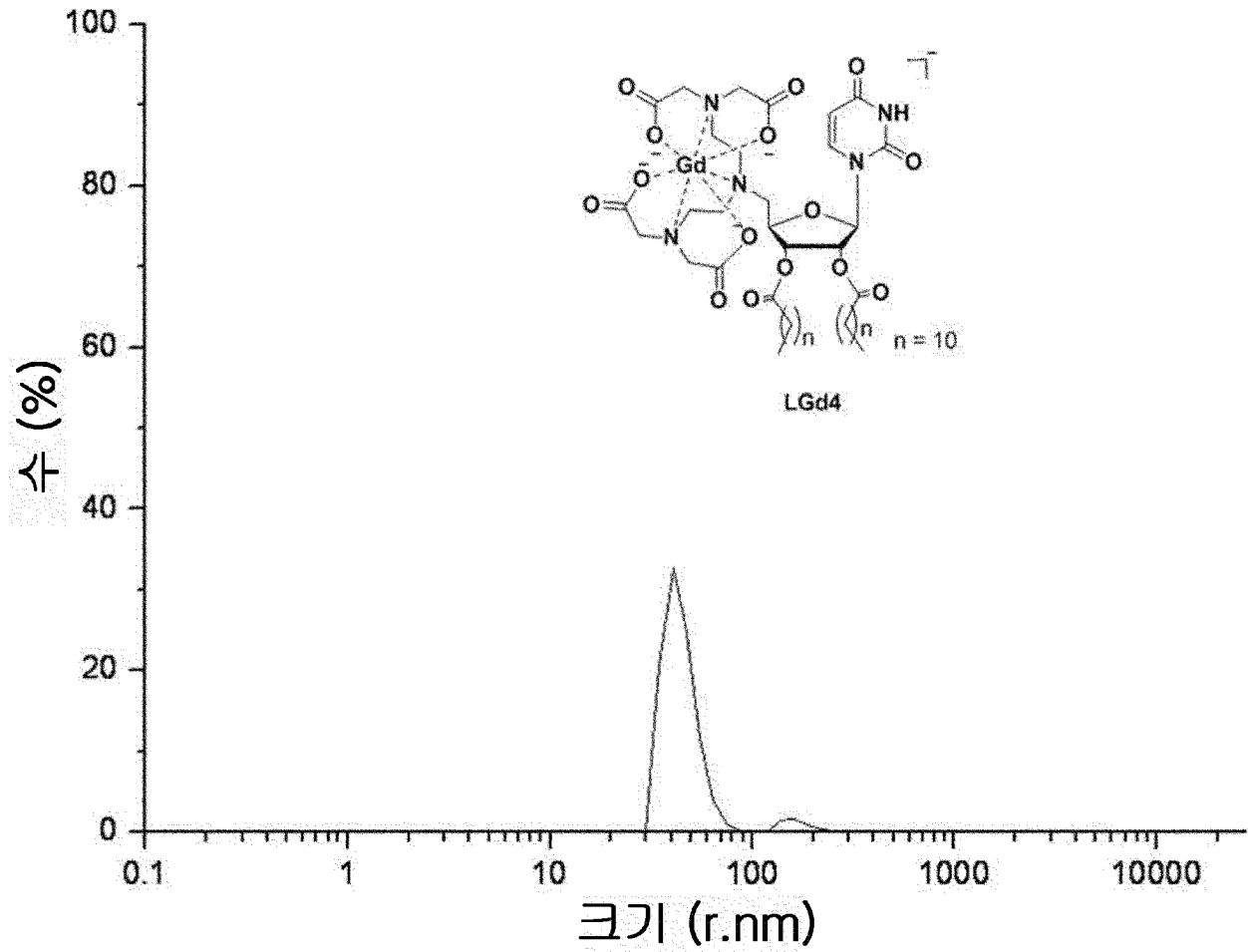
[Fig. 6]



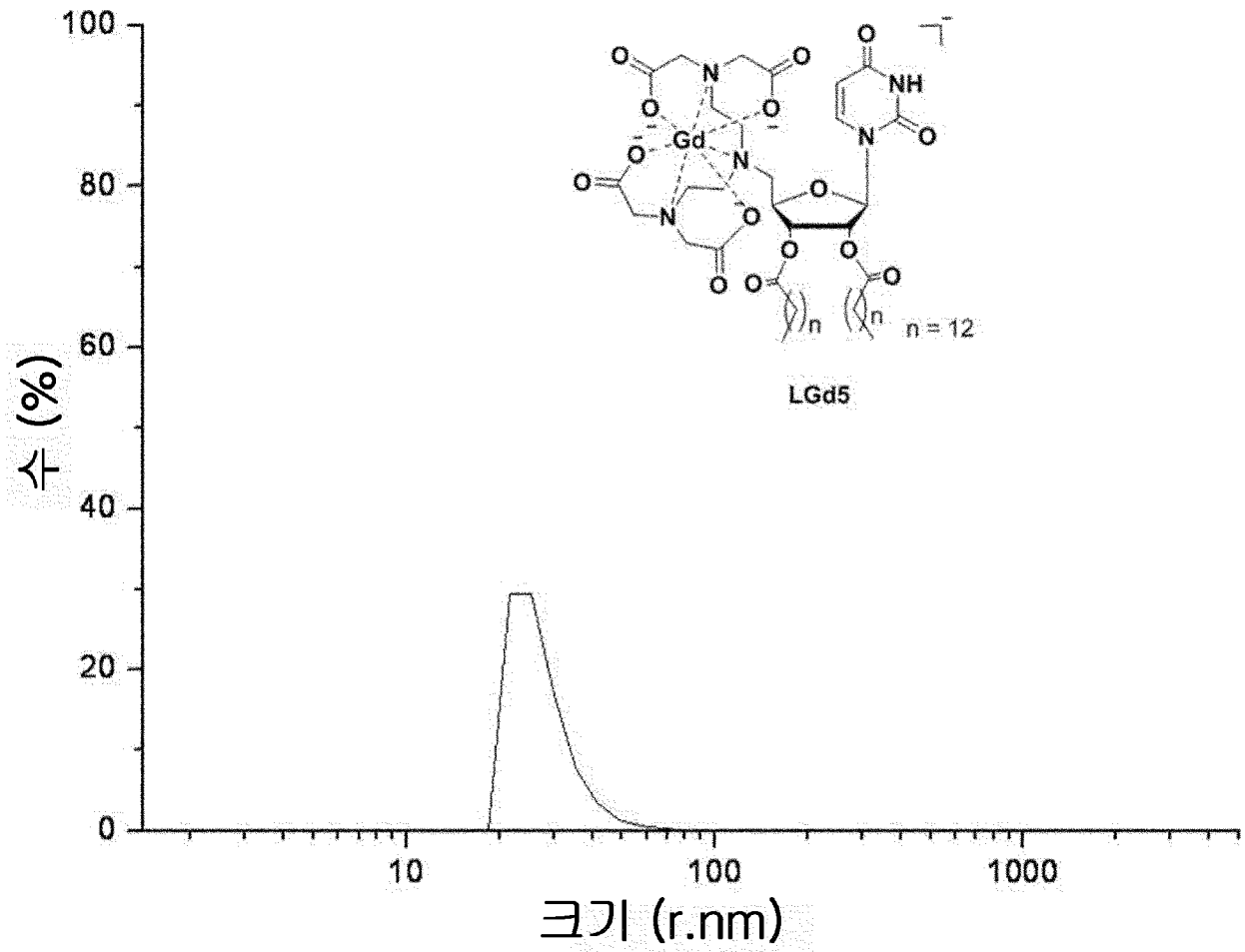
[Fig. 7]



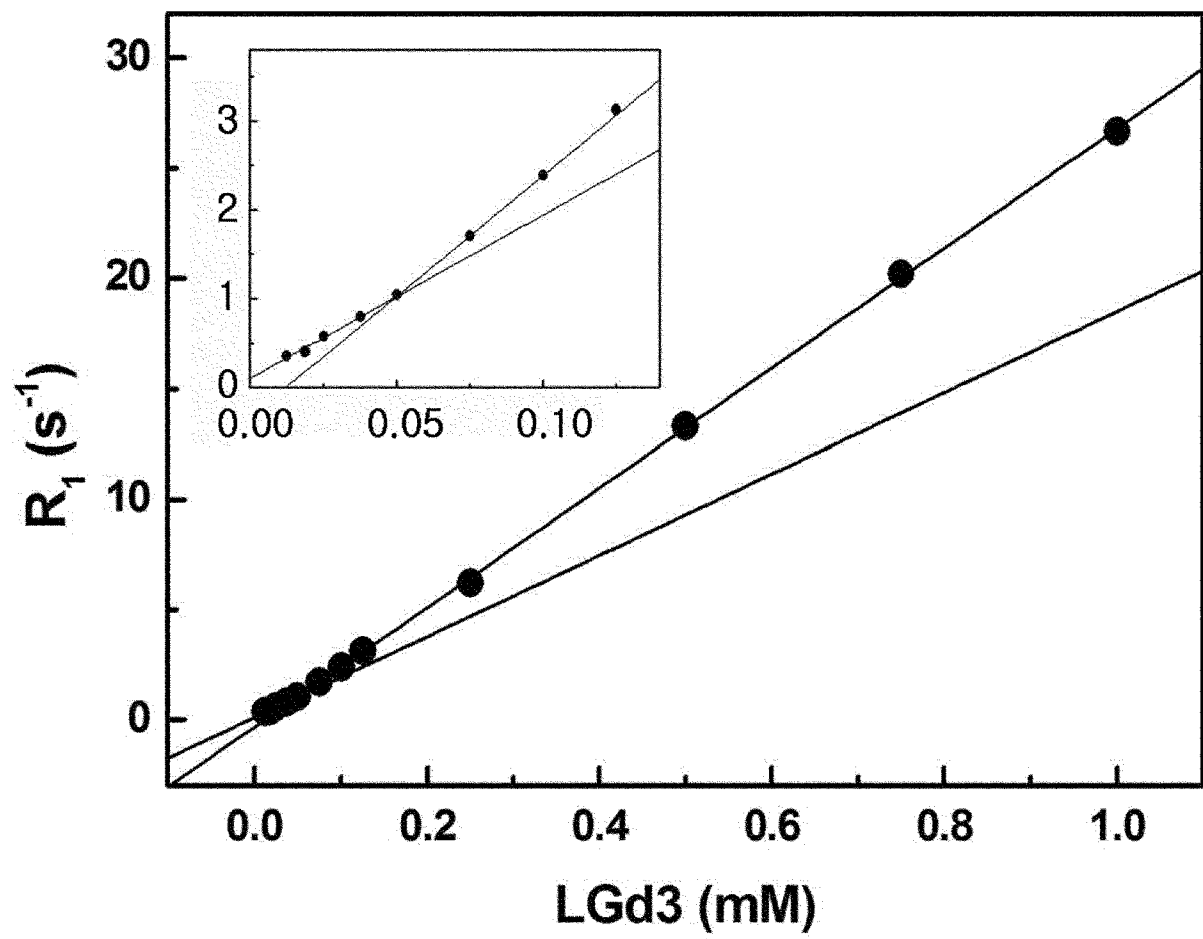
[Fig. 8]



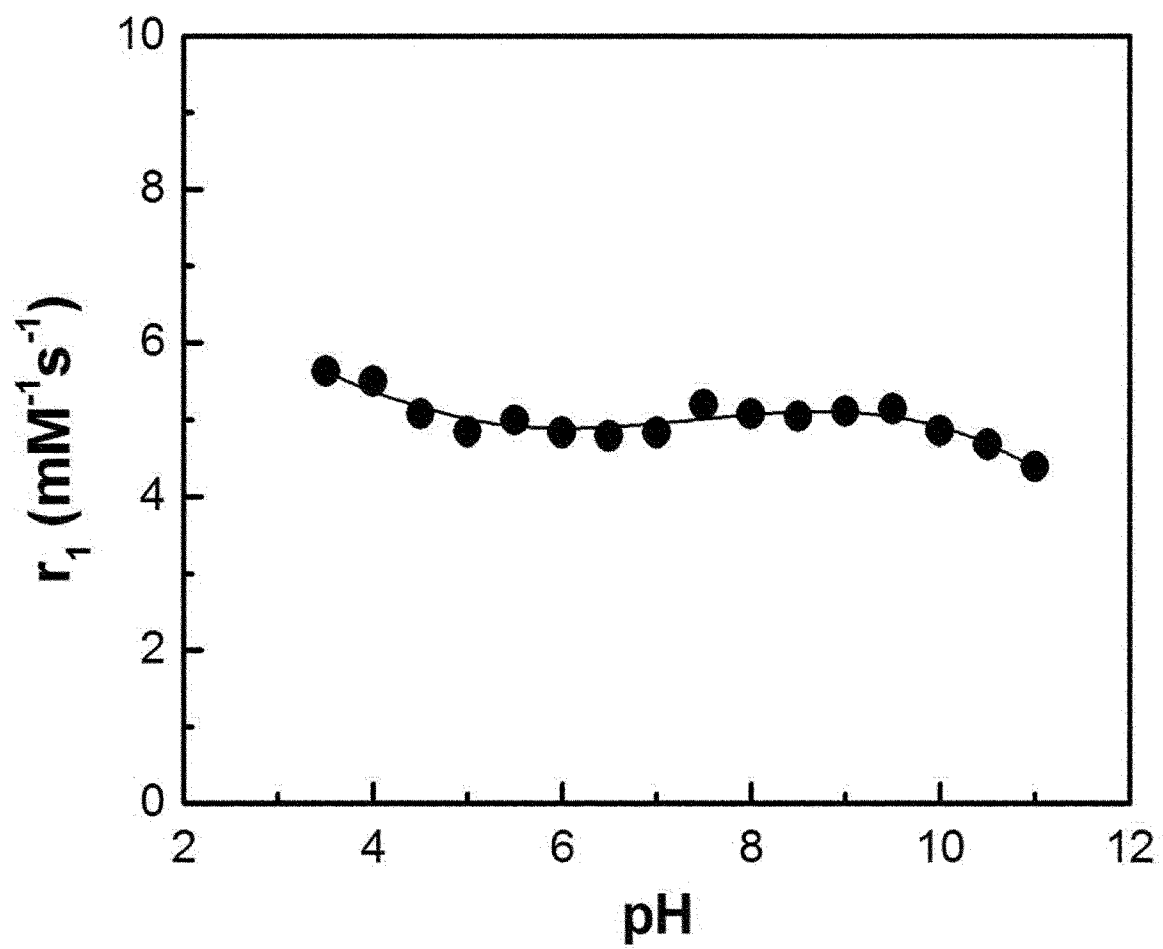
[Fig. 9]



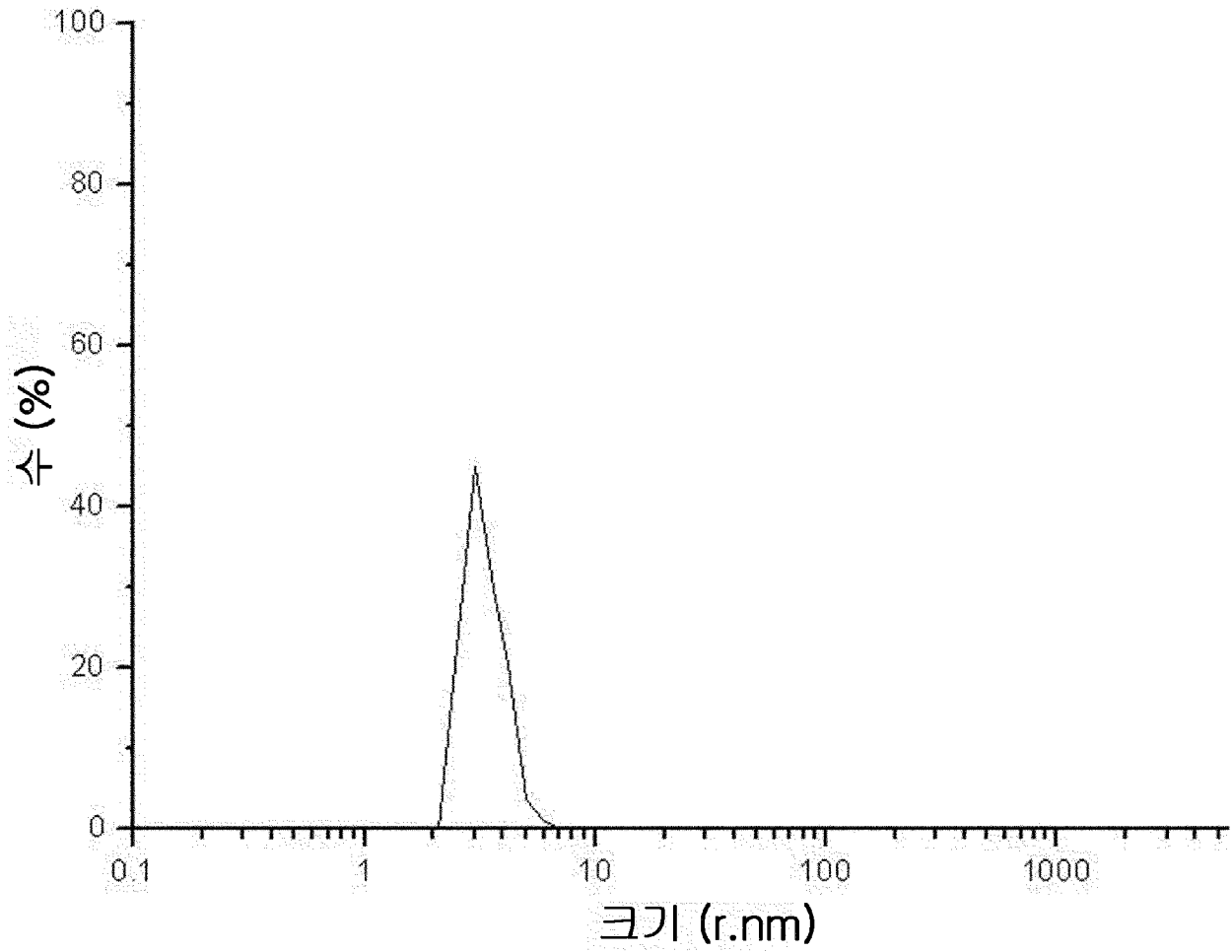
[Fig. 10]



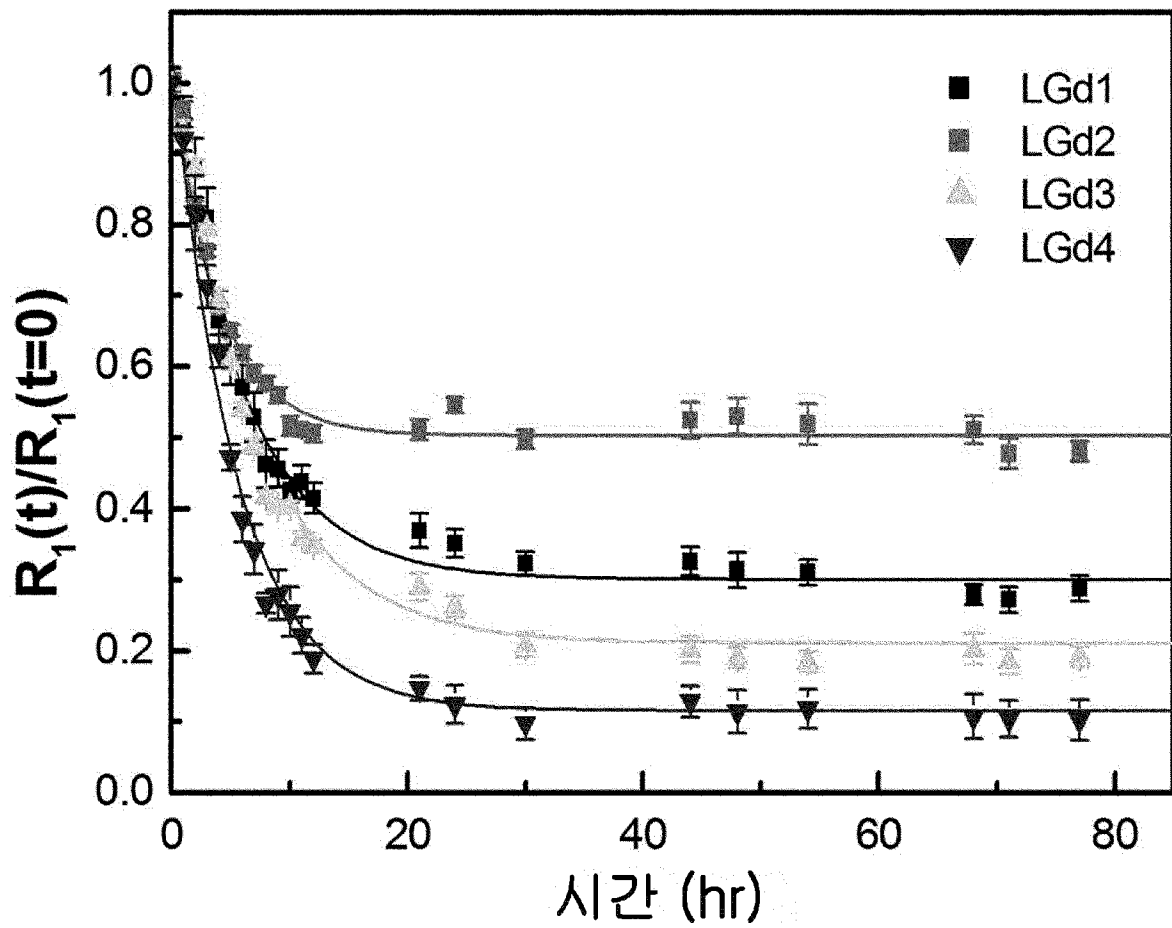
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]

