(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0066927
(43) 공개일자 2011년06월17일

(51) Int. Cl.
C07D 403/12 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7007647
(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년09월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2011년04월01일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2009/002132
(87) 국제공개번호 WO 2010/026388
국제공개일자 2010년03월11일
(30) 우선권주장
0816294.3 2008년09월05일 영국(GB)
0818076.2 2008년10월02일 영국(GB)

(71) 출원인
임페리얼 이노베이션스 리미티드
영국 런던 에스더블유7 2피지 사우스 켄싱턴 엑서비션 로드 프린시즈 게이트 52
해머스미쓰 이마네트 리미티드
영국 더블유12 0엔엔 런던 듀케인 로드 해머스미쓰 호스피틀 사이클로트론 빌딩
(72) 발명자
아보아계, 에릭 오포리
영국, 미들섹스 이엔1 4엘와이, 엔필드, 89 세번 드라이브
스미스, 그라함
영국, 런던 엔더블유7 1지알, 밀 힐, 30 랭스턴 웨이, 23 파블리 코트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이철희

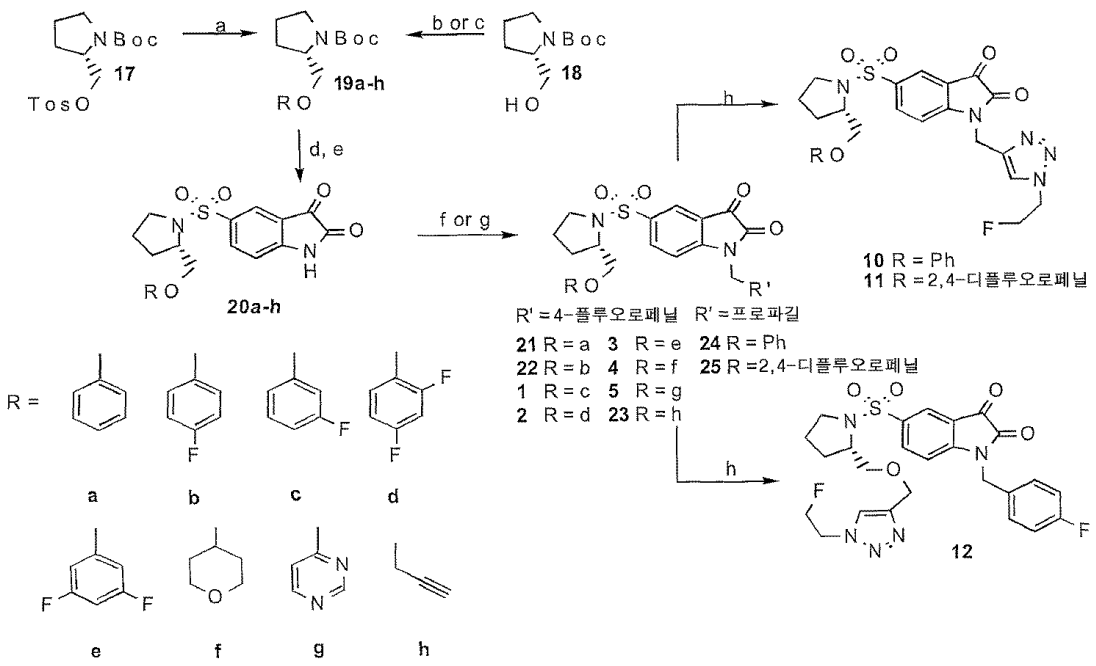
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 생체 내 영상화제로서 사용하기 위한 이사틴 유도체

(57) 요 약

본 발명은 이사틴 5-설폰아미드 유도체, 이 유도체를 포함하는 약학적 조성물, 이들의 분자 영상화제로서의 용도, 세포자멸사의 조절장애와 관련이 있는 질병 또는 장애의 진단 또는 치료를 위한 이들의 용도, 유도체를 합성하는 방법, 카스파제 활성 및 세포자멸사의 분자 영상화를 위한 방법, 및 카스파제 활성에 대한 시험 물질의 치료 효과를 평가하는 방법을 제공한다.

대 표 도



(72) 발명자

은구옌, 크앙-드

영국, 런던 더블유10 5엔에이, 158 라드브로크 그로브

아스타드, 에릭

영국, 런던 더블유10 4알피, 15 케어드 스트리트

글라저, 마티아스 에버하르트

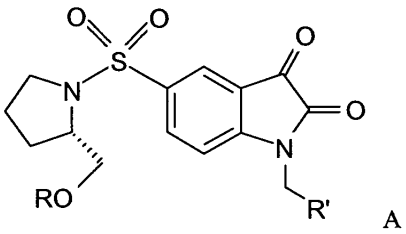
영국, 런던 엔22 5디엑스, 29 엘던 로드

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 A의 화합물 또는 이의 염, 수화물 또는 프로드러그:

(화학식 A)



A

상기 식에서, R은 페닐, 3-플루오로페닐, 2,4-디플루오로페닐, 3,5-디플루오로페닐, 임의로 치환된 테트라히드로피란, 임의로 치환된 디아진 또는 임의로 치환된 트리아졸이고,

R'은 임의로 치환된 페닐 또는 임의로 치환된 트리아졸이고,

R이 페닐인 경우, R'은 임의로 치환된 트리아졸이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 임의로 치환된 페닐, 임의로 치환된 테트라히드로피란 또는 임의로 치환된 디아진은 하나 이상의 전자 끄는 기로 임의로 치환된 것인 화합물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 전자 끄는 기는 플루오르인 화합물.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 임의로 치환된 트리아졸은 치환된 알킬기로 임의로 치환된 것인 화합물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 치환된 알킬은 C_{1-4} 플루오로알킬인 화합물.

청구항 6

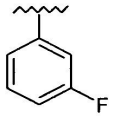
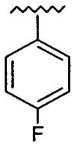
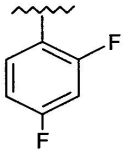
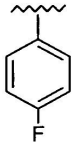
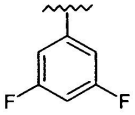
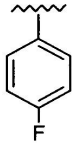
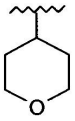
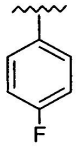
제 5 항에 있어서, 상기 C_{1-4} 플루오로알킬은 2-플루오로알킬인 화합물.

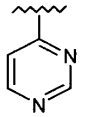
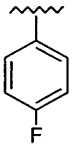
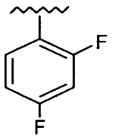
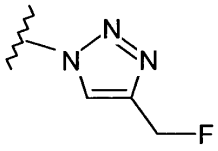
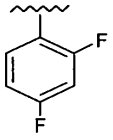
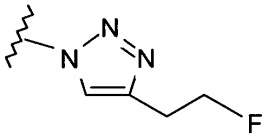
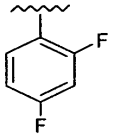
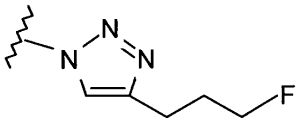
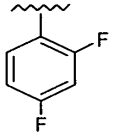
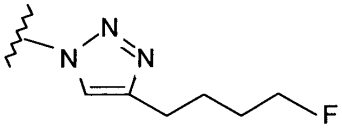
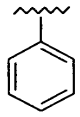
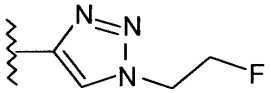
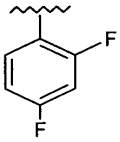
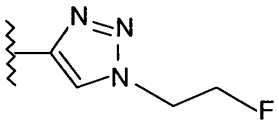
청구항 7

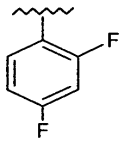
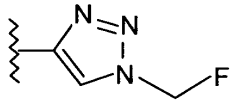
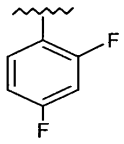
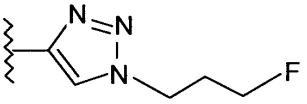
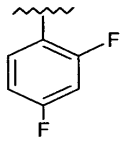
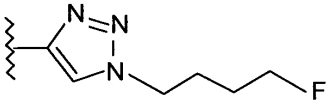
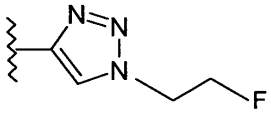
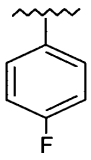
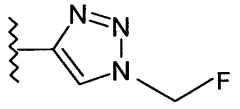
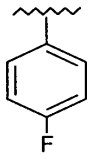
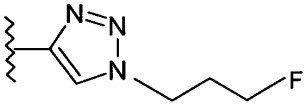
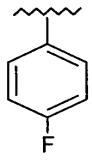
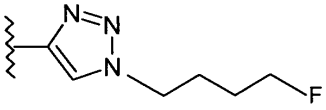
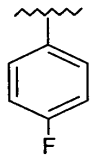
제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, R은 3-플루오로페닐, 2,4-디플루오로페닐 및 3,5-디플루오로페닐을 포함하는 군에서 선택되고, R'은 2-플루오로에틸-치환 트리아졸인 화합물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, R 및 R'가 하기와 같이 정의되는 화합물:

화합물 번호	R	R′
1		
2		
3		
4		

5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		

29		
30		
31		
12		
32		
33		
34		

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 영상화 부분을 추가로 포함하는 화합물.

청구항 10

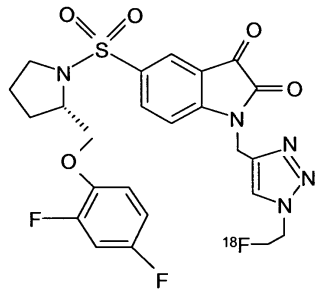
제 9 항에 있어서, 상기 영상화 부분은 방사성 표지인 화합물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 방사성 표지는 ^{18}F인 화합물.

청구항 12

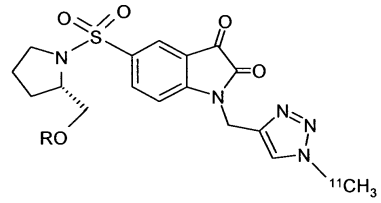
제 11 항에 있어서, 하기 화학식 [^{18}F]11를 포함하는 화합물:



[^{18}F]11

청구항 13

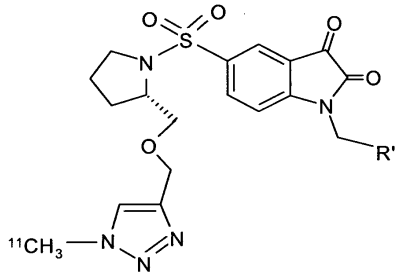
제 10 항에 있어서, 하기 화학식 35를 포함하는 화합물:



35

청구항 14

제 10 항에 있어서, 하기 화학식 36을 포함하는 화합물:



36

청구항 15

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하고 한 종 이상의 추가의 활성 성분, 약학적으로 허용가능한 부형제, 담체 또는 희석제를 임의로 포함하는 약학적 조성물.

청구항 16

제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하고 한 종 이상의 추가의 활성 성분, 약학적으로 허용가능한 부형제, 담체 또는 희석제를 임의로 포함하는 약학적 조성물.

청구항 17

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 화합물은 S 거울상 이성질체로 본질적으로 구성되는 것인 약학적 조성물.

청구항 18

분자 영상화제로서 사용하기 위한 제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제 16 항의 약학적 조성물.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 분자 영상화제는 카스파제 활성의 시각화 또는 정량화를 위한 것인 화합물 또는 약학적 조성물.

청구항 20

세포 또는 조직에서 카스파제 활성을 분자 영상화하는 방법으로서,

a) 상기 세포 또는 조직을 제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제 16 항의 약학적 조성물과 접촉시키는 단계;

b) 상기 개체를 검출 장치의 검출장 내에 위치시키는 단계; 및

c) 상기 검출 장치를 이용하여 상기 개체에서 상기 화합물을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 21

개체에서 세포자멸사를 영상화하는 생체 내 방법으로서,

a) 상기 개체에게 제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제 16 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계;

b) 상기 개체를 검출 장치의 검출장 내에 위치시키는 단계; 및

c) 상기 검출 장치를 이용하여 상기 개체에서 상기 화합물을 검출하는 단계를 포함하는 방법

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 화합물은 비침습적인 방식으로 개체에서 검출되는 생체 내 방법.

청구항 23

포유동물의 세포 또는 조직에서 카스파제 활성에 대한 시험 물질의 치료 효과를 평가하는 방법으로서,

a) 포유동물의 세포 또는 조직을 제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제 16 항의 약학적 조성물과 접촉시키는 단계;

b) 상기 포유동물의 세포 또는 조직을 검출 장치의 검출장내에 위치시키는 단계;

c) 상기 검출 장치를 이용하여 개체에서 상기 화합물을 검출하는 단계; 및

d) 상기 단계 a), b) 및 c)를 반복하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서, 상기 시험 물질은 심혈관 질환, 신경 질환 및 HIV를 치료하는 약물들을 포함하는 군에서 선택되는 방법.

청구항 25

제 23 항 또는 제 24 항에 있어서, 상기 화합물은 방사성 표지된 것이고, 상기 검출 장치는 방사선 검출 장치이고, 상기 방사성 표지된 화합물은 방사선 검출 장치를 이용하여 상기 방사성 표지 화합물로부터 방출된 방사선을 측정함으로써 검출되는 방법.

청구항 26

제 23 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물 또는 약학적 조성물은 상기 시험 물질보다 이전, 이후 또는 동시에 상기 포유동물의 세포 또는 조직과 접촉하는 방법.

청구항 27

제 23 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (a) 내지 (c)는 선택된 시간 간격으로 반복되고, 상기 반복은 시간에 따른 카스파제 활성의 변화를 추적하는데 효과적인 방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 상기 단계 (a) 내지 (c)의 첫 번째 실시는 시험 물질의 투여 전에 개체에 대하여 수행되어 카스파제 활성의 첫 번째 측정값을 제공한 다음 시험 물질이 투여되고, 상기 단계 (a) 내지 (c)의 두 번째 실시는 시험 물질의 투여 후 선택된 시간 간격으로 상기 개체에 대하여 수행되어 카스파제 활성의 두 번째 측정값을 제공하는 방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 첫 번째 실시에서 투여된 화합물은 제 13 항 또는 제 14 항에 따른 화합물인 방법.

청구항 30

제 19 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카스파제 활성은 카스파제-3 활성인 방법.

청구항 31

의약에서 사용하기 위한 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제 15 항의 조성물.

청구항 32

카스파제 활성의 억제에 사용하기 위한 제 31 항의 화합물 또는 조성물.

청구항 33

퇴행성 신경 질환, 혈액 질환, 간세포 변성, 골관절염, AIDS, 허혈 및 동종이식 거부를 포함하는 군에서 선택되는 질병 또는 상태의 치료를 위한 제 32 항의 화합물 또는 조성물.

청구항 34

과도하거나 부적당한 세포자멸사에 의해 유발되거나 그와 관련이 있는 질병 또는 장애를 진단하는 방법으로서,

a) 포유동물의 세포 또는 조직을 제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제 16 항의 조성물과 접촉시키는 단계;

b) 상기 포유동물의 세포 또는 조직을 검출 장치의 검출장 내에 위치시키는 단계; 및

c) 상기 검출 장치를 이용하여 상기 화합물을 검출하여, 상기 포유동물의 세포 또는 조직 내의 세포자멸사 수준을 표시하는 카스파제 활성의 정량적 측정값을 제공하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 35

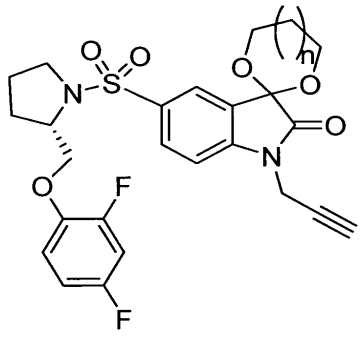
제 34 항에 있어서, 상기 질병 또는 장애는 만성 심부전, 만성 심근경색, 뇌졸중, 퇴행성 신경 질환, 자가면역 질환, 병소 혈액 질환, 병소 AIDS, 허혈(심장 허혈 포함), 및 이식 거부를 포함하는 군에서 선택되는 방법.

청구항 36

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 화합물을 합성하는 방법.

청구항 37

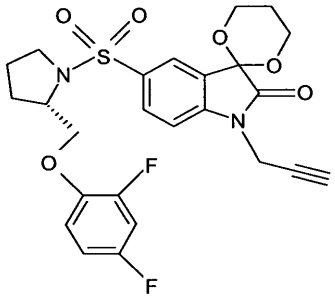
n이 0 내지 6인 하기 화학식 38을 포함하는 화합물:



38

청구항 38

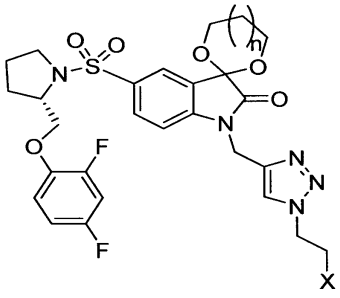
하기 화학식 39를 포함하는 화합물:



39

청구항 39

n이 0 내지 6이고 x가 이탈기인 하기 화학식 43을 포함하는 화합물:



43

청구항 40

제 12 항의 화합물의 제조에서 제 37 항, 제 38 항 또는 제 39 항의 화합물의 용도.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 이사틴 5-설폰아미드 유도체, 및 카스파제(caspase) 활성 및 카스파제-의존성 세포자멸사(apoptosis)의 시각화 및 정량화에서 분자 영상화제(molecular imaging agent)로서 및 치료용으로 상기 유도체

의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포자멸사 또는 예정 세포사멸(PCD)은 가장 일반적인 세포사멸 경로로서, 고도로 조절되고 에너지 보존적인 기작을 통해 진행된다. 건강한 상태에서, 세포자멸사는 세포성장을 조절하고, 세포수를 조절하며, 형태발생을 촉진하고, 해롭거나 비정상적인 세포를 제거하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 과정의 조절 장애는 암 및 자가면역질환과 같은, 세포사멸의 억제와 관련된 것들, 및 퇴행성 신경질환, 혈액질환, AIDS, 허혈 및 동종이식 거부와 같은, 과다활성 세포자멸사(hyperactive apoptosis)와 관련된 것들을 포함한 다수의 질병 상태에 관여하여 왔다. 따라서, 세포자멸사의 시각화 및 정량화는 이러한 세포자멸사와 관련된 이상생리(pathophysiology)의 진단에 유용하다.

[0003] 이러한 질병에 대한 치료는 세포자멸사 과정을 촉진 또는 억제함으로써 균형있는 세포자멸사를 회복함에 목적이 있다. 따라서, 세포 및 조직에서 세포자멸사의 비침습적 영상화(non-invasive imaging)는 치료적 개입(therapeutic intervention)에 대한 반응의 조기 평가를 위해 무한한 가치가 있고, 파괴적인 생리학적 과정을 새로이 통찰할 수 있다. 특히 중요한 것은 암 요법의 효능을 조기에 측정하여, 악성 성장이 말기가 되기 전에 확실히 제어하는 것이다.

[0004] 세포사멸을 영상화하기 위해 이용가능한 프로브(probe)중에서, 방사성 표지된 아넥신 V(radiolabelled Annexin V)가 가장 주목을 받아왔다[1,2]. 그러나, 아넥신 V는 세포 내측이 아니라 외측 세포 표면의 상황만을 검출할 수 있고, 음으로 대전된 인지질에만 결합하기 때문에 세포자멸사와 세포괴사(necrosis)의 사이를 구별할 수 없다. 막과 상호작용하는 프로브와 관련하여, 다수의 디-단실(di-dansyl) 시스테인 및 나프틸-에틸-플루오로알라닌 유도체가 세포자멸사를 영상화하기 위해 개발되어 왔다[3,4,5]. 그러나, 이러한 막과 상호작용하는 프로브는 세포자멸사 세포(apoptotic cell)에 대한 특이성이 낮은 단점이 있고, 별개의 테스트를 필요로 하지 않고는 세포자멸사와 세포괴사의 사이를 구별할 수 없다[6]. 더욱 최근에, 카스파제(caspase)라 불리는 효소류에 결합하는 특정 화합물의 개발에 대한 관심이 증가되어 왔다.

[0005] 카스파제는 세포자멸사의 조절에 중요한 역할을 하는 시스테인 아스파르테이트-특이 프로테아제의 류이다. 내부(intrinsic) 및 외부 신호전달 경로(extrinsic signaling network)는 '개시제' 카스파제 8(내부) 또는 9(외부)를 활성화하여 비활성 프로-카스파제(pro-caspase) 3, 6 및 7을 활성 '엑서큐서너'(executioner) 카스파제 3, 6 및 7로 분열시킨다. 엑서큐셔너 카스파제는 궁극적으로, 아스파르테이트 잔기의 오른쪽으로 아주 선택적으로 일어나는 세포 단백질의 분열을 통해 세포 사멸을 달성한다. 분열된 단백질로는 DNA 수선 효소(예, PARP), 핵심 신호전달 단백질(예, Akt, Ras), 핵골격 단백질(예, 악틴, α-포드린, 라민) 및 세포주기 조절자(예, p27Kip1)가 있다.

[0006] [^{131}I]IZ-VAD-fmk와 같은 카스파제의 펩티드계 비가역성 억제제를 분자 영상화제로 이용하는 것은 불만족스러운데, 이들 억제제는 단지 중간 정도로 선택적이고 세포 투과성이 불량하여, 세포 내로의 흡수가 생체 내 영상화에 불충분하기 때문이다.

[0007] 더욱 최근에, 이사틴으로 알려진 화학물질들의 그룹이 가능한 카스파제 억제제로서 연구되어 왔다. 이사틴의 작용 기작은 활성화된 카스파제의 효소 활성 부위에의 결합을 통해 카스파제 3 및 7과의 세포내 효소 억제제 복합체를 형성하는 것을 포함하는 것으로 믿어진다. 이사틴의 디카르보닐 작용기는 이사틴의 작용 기작에 필수적인 것으로서, 이는 이사틴의 친전자성 C-3 카르보닐 탄소 및 친핵성 시스테인 티올레이트 작용기를 통해 티오헤미케틸(thiohemiketal)을 형성하는 활성 부위의 시스테인 잔기에 결합한다[7].

[0008] 고효율 스크리닝(high through-put screen) 후, Lee 등은 카스파제-3의 억제제로서 비펩티드 이사틴 N-(1-메틸)-5-니트로이사틴을 확인했다. 구조적 최적화 결과, 설폰아미드인 (*S*)-1-벤질-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴(2.5 nM)[8] (본 명세서에서는 화합물 **13**으로 나타냄)이 개발되었다. 다른 이사틴 설폰아미드가 카스파제 3 및 7의 억제제로서 개발되었다[9-12]. Kopka[13] 및 Mach[14] 는 각각 독립적으로, 양전자 방출 단층촬영(Positron Emission Tomography: PET)용 추정적 추적자로서 ^{18}F-표지 (S)-1-(4-(2-플루오로에톡시)벤질)-5-[1-(2-페녹시메틸피롤리디닐)설포닐]이사틴을 개발했고, Kopka[13]는 방사선요오드화 동족체인 [^{125}I] ((*S*)-1-(4-아이오도벤질)-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴)(본 명세서에서는 화합물 **14**로 나타냄)의 생물학적 특성

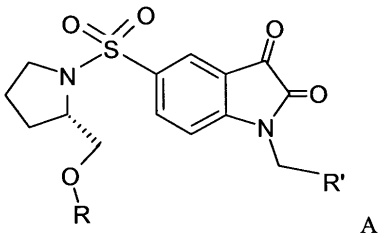
을 연구했다. WO 99/06367호 및 WO01/22966호는 다수의 이사틴 유도체 및 카스파제의 억제를 위한 유도체의 용도를 개시하고 있다. WO 06/074799호, US 2005/0250798호 및 GB 1,240,648호는 다수의 이사틴 5-설폰아미드 유도체 및 세포자멸사에 대한 영상화제로서 상기 유도체의 용도를 개시하고 있다. 그러나, 이러한 알려진 화합물들은 분자 안정성이 낮고, 카스파제-3 친화성이 비교적 낮으며 지질친화성이 높은 것 등의 단점이 있다. 낮은 분자 안정성은 빠른 대사를 초래하여, 신호대 잡음비가 낮은 불충분한 명암의 이미지를 초래한다. 낮은 카스파제-3 친화성도 불충분한 명암의 이미지를 초래할 수 있다. 높은 지질친화성은 불충분한 전신 배설(system elimination)을 초래하고, 거대분자에의 비특이적 결합을 증가시킬 수 있다.

발명의 내용

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 분자 안정성이 증가되고, 카스파제 효소에 대한 결합력(affinity)이 증가되고 지질친화성이 감소된 신규한 이사틴 유도체를 제공함에 있다.

[0010] 본 발명의 제 1 양태는 하기 화학식 A의 신규한 이사틴 5-설폰아미드 유도체, 또는 이의 염, 수화물 또는 프로드러그(prodrug)를 제공한다.

[0011] 화학식 A

[0012] 

A

[0013] 상기 식에서, R은 페닐, 3-플루오로페닐, 2,4-디플루오로페닐, 3,5-디플루오로페닐, 임의로 치환된 테트라히드로피란, 임의로 치환된 디아진 및 임의로 치환된 트리아졸이고, R'은 임의로 치환된 페닐 또는 임의로 치환된 트리아졸이고, R이 페닐인 경우, R'은 임의로 치환된 트리아졸이다.

[0014] 바람직한 구현예에서, R은 임의로 치환된 트리아졸을 포함하고, R'은 임의로 치환된 페닐을 포함한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, R은 임의로 치환된 페닐을 포함하고, R'은 임의로 치환된 트리아졸을 포함한다.

[0015] 바람직하게, 임의로 치환된 페닐, 임의로 치환된 테트라히드로피란 및 임의로 치환된 디아진은 하나 이상의 전자 끄는 기로 임의로 치환된다. 바람직하게, 상기 전자 끄는 기는 할로겐, 니트로기, 카르복시산 기, 또는 알데히드 또는 케톤과같은 다른 카르보닐 함유 작용기를 포함하는 군에서 선택된다. 가장 바람직하게, 상기 전자 끄는 기는 할로겐이다. 바람직하게, 상기 할로겐은 불소이다.

[0016] 바람직하게, 임의로 치환된 페닐은 2,4-디플루오로페닐이다.

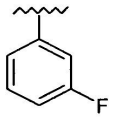
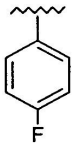
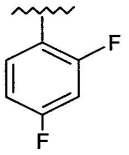
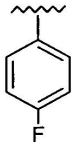
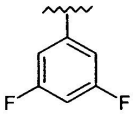
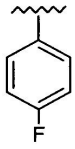
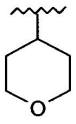
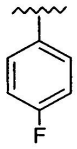
[0017] 일 구현예에서, 임의로 치환된 트리아졸은 치환 알킬로 임의로 치환된다. 바람직하게, 상기 치환 알킬은 할로겐 치환 알킬이다. 더욱 바람직하게, 상기 할로겐 치환 알킬은 C_{1-4} 플루오로알킬이다. 바람직하게, 상기 C_{1-4} 플루오로알킬은 퍼플루오로메틸, 2-플루오로에틸, 3-플루오로프로필 또는 4-플루오로부틸이다. 가장 바람직하게, 상기 C_{1-4} 플루오로알킬은 2-플루오로알킬이다.

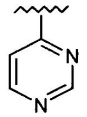
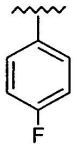
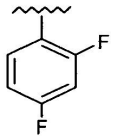
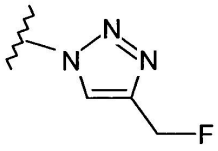
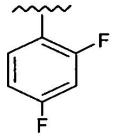
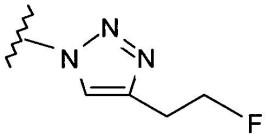
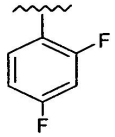
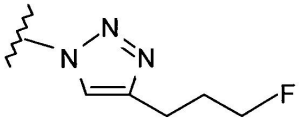
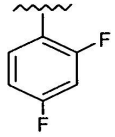
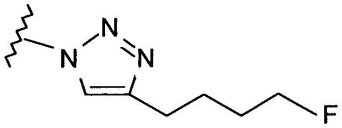
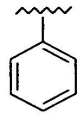
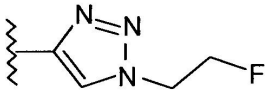
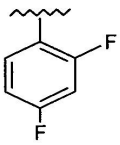
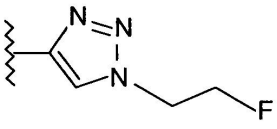
[0018] 대안의 구현예에서, 임의로 치환된 트리아졸은 알킬로 임의로 치환된 것이다. 바람직하게, 상기 알킬은 메틸이다.

[0019] 당업자는 본 발명이 거울상 이성질체 및 부분입체이성질체를 포함한, 본 발명의 화합물의 모든 입체이성질체도 포함한다는 것을 알 수 있다. 본 발명의 화합물은 특정 거울상 이성질체의 실질적으로 순수한 용액의 형태 또는 라세믹 혼합물의 형태로 존재할 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 화합물은 S 거울상 이성질체의 실질적으로 순수한 용액, 또는 S 이성질체로 본질적으로 이루어진 용액으로 존재한다. 바람직하게, S 거울상 이성질체 및 R 거울상 이성질체를 모두 포함하는 라세믹 혼합물에서, 상기 S 거울상 이성질체는 상기 라세믹 혼합물에서 본 발명의 화합물의 적어도 50%를 구성한다. 더욱 바람직하게, 상기 S 거울상 이성질체는 상기 라세믹 혼합물에서 본 발명의 화합물의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99%를 구성한다.

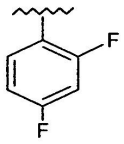
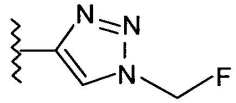
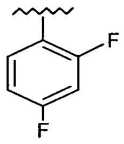
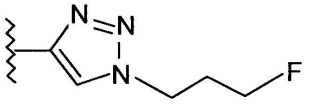
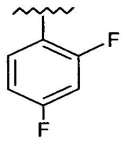
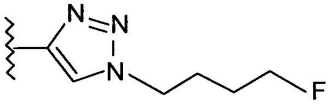
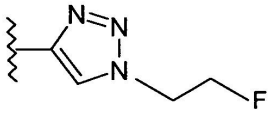
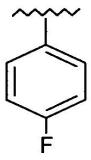
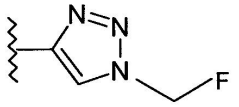
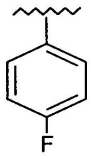
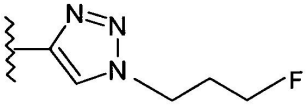
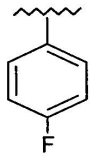
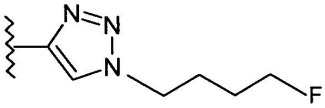
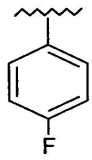
[0020] 본 발명의 특히 바람직한 화합물로는 R 및 R'가 다음과 같이 정의되는 화학식 A의 화합물이 있다:

[0021]

화합물 번호	R	R′
1		
2		
3		
4		

5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		

[0022]

29		
30		
31		
12		
32		
33		
34		

[0023]

[0024] 바람직하게, 용어 "염"은 본 발명의 화합물이 염기성 화합물을 함유하는 경우 아세트산, 프로피온산, 락트산, 시트르산, 타르타르산, 푸마르산, 말레산, 말론산, 만델산, 말산, 프탈산, 염산, 브롬산, 인산, 질산, 황산, 메탄설폰산, 나프탈렌설폰산, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산, 캄포르설폰산, 이와 유사한 알려진 허용가능한 산과 같은 유기산 및 무기산으로부터 유도한 염을 포함한다. 또한, 염은 본 발명의 화합물이 카르복시레이트 또는 페놀 부분, 또는 염기 부가 염을 형성할 수 있는 유사한 부분을 함유하는 경우, 유기 염기 및 무기 염기, 바람직하게는 알칼리금속염, 예를 들어 나트륨, 리튬 또는 칼륨으로부터 형성될 수도 있다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 용어 "수화물"은 물과 화학적으로 결합된 본 발명의 화합물의 형태를 말한다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "프로드러그"는 생체 내에서 대사 수단에 의하여 본 발명의 화합물로 전환될 수 있는 화합물을 말한다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "임의로 치환된 페닐"은 고리 위치 2, 3, 4, 5 및 6 중 하나 이상에 위치한 하나 이상의 치환체를 임의로 포함할 수 있는 페닐기를 말한다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "테트라히드로피란"은 5개 탄소 원자 및 하나의 산소 원자를 함유하는 포화된 6원환

(six-membered ring)으로 이루어진 유기화합물을 말한다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "트리아졸"은 2개의 탄소 원자 및 3개의 질소 원자로 이루어진 5원환을 갖는 분자식 C_2HN_3의 화합물을 말한다. 이러한 화합물로는 이성질체인 1,4- 및 1,5-이치환 1,2,3 트리아졸이 있다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 용어 "할로겐"은 브롬, 염소, 불소 및 요오드를 말한다.

[0031] 본 발명에서 사용되는 용어 "알킬"은 지방족 탄화수소 사슬을 말하는 것으로서, 달리 나타내지 않는 경우 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 측쇄 사슬이 있다. 알킬로는 메틸, 에틸, n-프로필, iso-프로필, n-부틸, sec-부틸, iso-부틸, tert-부틸 등이 있다.

[0032] 본 발명에서 사용되는 용어 "치환 알킬"은 할로겐, 히드록시, 티올, 아미노, 대체 헤테로원자(alternative heteroatom), 방향족 또는 헤테로방향족 기, 및 폴리에테르와 같은 스페이서 기를 포함하는 군에서 선택된 하나 이상의 치환체를 추가로 포함하는 알킬을 말하는 것으로서, 폴리에틸렌 글리콜, 숙시니딜, -NH-(CH_2)n-NH- 및 폴리아미드가 있다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 용어 "디아진"은 그 탄소 원자들 중 2개가 질소로 치환되어 있는 벤젠 고리를 각각 함유하는 분자식 $C_4H_4N_2$의 유기 화합물들의 그룹을 말한다. 이러한 화합물로는 이성질체인 피라진(1,4-디아진), 피리미딘(1,3-디아진) 및 피라진(1,2-디아진)이 있다.

[0034] 본 발명의 화합물은 활성화 카스파제에 대하여 특이적이므로 결합력(affinity)이 높다. 이러한 화합물은 카스파제 3 및 7의 효능 있고 선택적인 억제제이다. 특히, 본 발명의 화합물은 카스파제-3 및 카스파제-7에 대한 결합력이 높다. 이러한 화합물은 세포자멸사 동안 활성 형태로만 발현되므로, 카스파제-3 또는 카스파제-7의 활성은 카스파제-의존성 세포자멸사의 신뢰가능한 지표(indicator)이다.

[0035] 본 발명의 화합물은 많이 알려진 이사틴 5-설폰아미드 유도체와 비교하여 지질친화성이 낮기 때문에, 전신배설(systemic elimination)이 가능하고 거대분자에 대한 비특이적 결합이 감소된다. 그러나, 카스파제는 세포 내 프로테아제가 아니므로, 본 발명의 화합물은 촉진되지 않은 확산에 의해 세포막을 투과하기에 충분한 지질친화성이 있어서, 세포의 내부 및 외부로 자유로이 통과할 수 있다. 이와 같이, 상기 화합물은 활성화된 카스파제-3 또는 카스파제-7을 갖는 세포에서만 신속한 이방향성(bi-directional) 흡수 및 체류를 나타내게 된다. 이상적인 지질친화성(Log P로 나타냄)은 상기 화합물이 통과하는데 필요한 세포 유형 및 다수의 다른 인자에 따라 변화한다. 일 구현예에서, 지질친화성은 1.0 내지 2.0의 범위인 것이 바람직하다.

[0036] 본 발명의 화합물은 대사 안정성이 증가되어, 상기 화합물이 대사되고 일부의 경우 배설되는 속도가 감소된다. 대사 안정성이 증가되면 활성화 카스파제와 결합시, 세포자멸사를 받는 세포에서 본 발명의 화합물의 축적이 가능하다. 따라서, 신호대 잡음비가 높은 잘 대조된 이미지가 제공된다. 이는 분자 영상화제에서 유리한 것인데, 세포 및 조직내에서 카스파제 활성의 정확한 시각화 및 정량화가 가능하기 때문이다.

[0037] 바람직하게, 본 발명의 화합물은 치료되지 않은 종양, 심장 및 뇌 조직에서의 흡수가 낮다. 따라서, 카스파제 활성의 변화와 관련이 있는, 포유동물 조직의 활성화 카스파제에의 상기 화합물의 결합의 변화를 탐지하는 것이 용이하게 된다.

[0038] 본 발명의 제 2 양태는 영상화 부분(imaging moiety)으로 표지되어 있는 본 발명의 제 1 양태의 화합물을 제공한다.

[0039] 상기 표지(labelling)는 작용기 내에 영상화 부분을 포함할 수 있거나, 영상화 부분이 추가의 종(species)으로 부착될 수 있다.

[0040] 상기 영상화 부분은 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 어떠한 부분을 포함할 수 있다. 이러한 부분으로는 형광 표지(fluorescent label) 및 방사성 표지(radiolabel)가 있다.

[0041] 형광 표지는 공유결합으로 부착된 형광단(fluorophore)을 포함한다. 바람직한 형광단으로는 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민 염료, 쿠마린 염료 및 시아닌 염료의 유도체, Alexa Fluors 및 DyLight Fluors 가 있다.

[0042] 바람직하게, 상기 화합물은 방사성 동위원소로 표지된다. 영상화 부분으로서 방사성 동위원소를 사용하는 것이 유리한데, 방사성 동위원소는 본 발명의 화합물의 분자량을 유의적으로 증가시키지 않고 임상적 비침습적 영상화에 이용될 수 있기 때문이다.

[0043] 바람직하게, 방사성 동위원소는 양전자 방출체(positron-emitter)이다. 방사성 동위원소는 ^{3}H, ^{14}C, ^{18}F, ^{11}C, ^{120}I, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{94m}Tc, ^{66}Ga, ^{68}Ga, ^{64}Cu, ^{61}Cu, ^{67}Cu, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{94m}Tc, ^{99m}Tc, ^{201}Tl, ^{111}In, ^{86}Y 및 ^{89}Zr을 포함하는 군에서 선택될 수 있다.

[0044] 영상화 부분이 양전자 방출 단층촬영술(PET)을 이용하여 영상화되는 경우, 방사성 동위원소는 ^{18}F, ^{11}C, ^{120}I, ^{124}I, ^{94m}Tc, ^{66}Ga, ^{68}Ga, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{86}Y, ^{75}Br 및 ^{76}Br을 포함하는 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

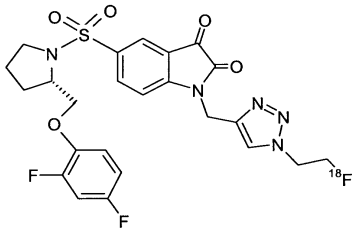
[0045] 영상화 부분이 단일 광자 방출 전산화 단층촬영(Single Photon Emission Computed Tomography: SPECT)을 이용하여 영상화되어야 하는 경우, 방사성 동위원소는 ^{123}I, ^{99m}Tc 및 ^{111}In을 포함하는 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

[0046] 바람직하게, 영상화 부분은 ^{18}F 또는 ^{11}C 이다.

[0047] 바람직하게, 화합물 **1** 내지 **12** 및 **29** 내지 **34**의 어느 화합물에서, R 또는 R'의 불소 원자의 하나 이상은 ^{18}F 이다.

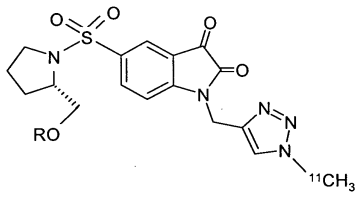
[0048] 예를 들어, 화합물 **6** 내지 **12** 및 **29** 내지 **36**의 경우와 같이 R 또는 R'에 1, 2, 3-트리아졸 기를 추가하면 화합물이 ^{18}F 또는 ^{11}C로 쉽게 표지될 수 있다는 추가의 이점이 있다.

[0049] 본 발명의 특히 바람직한 구현예는 하기 화학식을 갖는다.



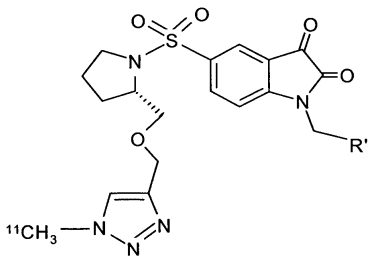
[0050] **[^{18}F]11**

[0051] 본 발명의 다른 바람직한 화합물은 하기 화학식을 갖는다.



[0052] **35**

[0053] 및



[0054] **36**

[0055] 상기 식에서, R 및 R'은 위에서 정의한 바와 같다.

[0056] 본 발명의 제 3 양태는 본 발명의 제 1 양태에 따른 화합물을 포함하고 한 종 이상의 약제학적으로 허용가능한

담체, 희석제 또는 부형제를 임의적으로 포함하는 조성물을 제공한다.

[0057] 본 발명의 제 4 양태는 본 발명의 제 2 양태에 따른 화합물을 포함하고 한 종 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 임의적으로 포함하는 조성물을 제공한다.

[0058] 이러한 조성물들은 한 종 이상의 추가의 활성 성분(active agent)을 포함할 수도 있다. 상기 추가의 활성 성분은 본 발명의 화합물에 의해 생성된 신호를 강화하는 성분(agent)을 포함할 수 있다. 바람직하게, 상기 활성 성분은 디에틸 말레에이트(DEM), L-부티오닌-(S,R)-설폭심(BSO), 및 이들의 유도체를 비롯한, 세포 글루타치온 수준을 고갈 또는 조절하는 화합물을 포함한다.

[0059] 본 발명의 제 3 또는 제 4 양태의 조성물은 어떤 통상적인 방법으로 투여될 수 있다.

[0060] 조성물은 화합물을 세포에 노출시키거나, 배양하거나, 회합하거나, 접근가능하게 함으로써 세포와 접촉할 수 있다.

[0061] 조성물은 개체(subject)에게 경구(흡입 포함), 비경구, 점막 (예, 볼, 설하, 코), 직장 또는 경피 경로로 투여되도록 제형화될 수 있다.

[0062] 경구 투여를 위해, 조성물은 액체 또는 고체, 예를 들어, 용액, 시럽, 현탁액 또는 에멀션, 정제, 캡슐 및 로젠지(lozenge)로 제형화될 수 있다.

[0063] 일반적으로, 액상 제제는 적당한 수성 또는 비수성 액상 담체(들), 예를 들어 물, 에탄올, 글리세린, 폴리에틸렌 글리콜 또는 오일에서 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염, 수화물 또는 프로드러그의 현탁액 또는 용액으로 이루어진다. 또한, 제제는 현탁제, 방부제, 풍미제 또는 착색제를 포함할 수도 있다.

[0064] 정제 형태의 조성물은 고체 제제의 제조를 위해 통상적으로 사용되는 어떤 적당한 약학적 담체(들)를 이용하여 제조할 수 있다. 이러한 담체의 예로는 스테아르산 마그네슘, 전분, 락토오스, 수크로스 및 미정질 셀룰로오스가 있다.

[0065] 캡슐 형태의 조성물은 통상적인 캡슐화 과정을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물(활성 성분)을 함유하는 분말, 그래뉼 또는 펠릿은 표준 담체를 이용하여 제조한 다음, 경질 젤라틴 캡슐에 채워질 수 있다. 택일적으로, 분산액 또는 현탁액은 어떤 적당한 담체(들), 예를 들어 수성 검, 셀룰로오스, 실리케이트 또는 오일을 이용하여 제조한 다음, 연질 젤라틴 캡슐에 채워질 수 있다.

[0066] 경구 투여용 조성물은, 예를 들어 정제 또는 캡슐상에 상기 제제의 외측 코팅을 형상함으로써, 소화관을 통과할 때 분해로부터 활성 성분을 보호하도록 디자인될 수 있다.

[0067] 경비 또는 경구 투여용 조성물은 에어로졸, 적제(drop), 겔 및 분말로 적당히 제형화 될 수 있다. 대표적으로, 에어로졸 제는 생리학적으로 허용가능한 수성 또는 비수성 용매에서 상기 활성 물질의 용액 또는 미세 현탁액을 포함하고, 분무 장치(atomising device)와 함께 사용되는 카트리지 또는 리필(refill)의 형태를 취할 수 있는 밀폐 용기내에서 멸균 형태로 단일 투여 또는 다중 투여 형태로 일반적으로 존재한다. 택일적으로, 밀폐 용기는 용기의 내용물이 모두 사용될 때 처분되는 것으로, 미터링 밸브(metering valve)를 구비한 에어로졸 디스펜서(aerosol dispenser) 또는 단일 투여 비강 흡입기(nasal inhaler)와 같은 단위 시여 장치(unitary dispensing device)일 수 있다. 투여 형태가 에어로졸 디스펜서를 포함하는 경우, 이는 약제학적으로 허용가능한 추진제를 포함할 수 있다. 에어로졸 투여 형태는 펌프-분무기(pump-atomiser)의 형태를 취할 수도 있다.

[0068] 볼 또는 설하 투여에 적당한 조성물로는 정제, 로젠지 및 파스틸(pastille)이 있는데, 이 경우 활성 성분은 설탕 및 아카시아, 트라가칸트, 또는 젤라틴 및 글리세린과 같은 담체와 함께 제형화 된다.

[0069] 직장내 및 질내 투여용 조성물은 좌약(코코아 버터와 같은 통상적인 좌약을 함유), 페서리(pessary), 질용 탭(vaginal tab), 포움(foam) 또는 관장제의 형태인 것이 바람직하다.

[0070] 경피 투여에 적당한 조성물로는 연고, 겔, 및 분말을 포함하는 주사액이 있다.

[0071] 바람직하게, 조성물은 정제, 캡슐 또는 앰풀과 같은 단위 투여 형태이다.

[0072] 바람직하게, 본 발명의 화합물 또는 조성물은 개체에 비경구 투여된다. 특히, 조성물은 정맥내, 복막내, 척수강내, 임파액내 또는 근육내로 투여될 수 있다.

[0073] 대표적인 비경구 투여용 조성물은 적당한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 살균 수성 또는 비수성 담체에서 상기 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염의 비경구투여에 허용가능한 용액 또는 현탁액으로 이루어진다.

당업자는 예를 들어 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 유산화 링거 주사액(Lactated Ringer's injection)과 같은 등장성 비히클(isotonic vehicle)을 이용하여 적당한 용액을 제조할 수 있다. 필요한 경우, 방부제, 안정화제, 완충제, 항산화제 또는 기타 첨가제가 포함될 수도 있다.

[0074] 본 발명의 제 5 양태는 분자 영상화제로서 사용하기 위한 본 발명의 제 1 또는 제 2 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 3 또는 제 4 양태의 약학적 조성물을 제공한다.

[0075] 바람직하게, 상기 분자 영상화제는 세포 및 조직에서 카스파제 활성의 시각화 및 정량화를 위한 것이다. 바람직하게, 상기 분자 영상화제는 인간 조직 및 세포를 포함한, 포유동물의 세포 및 조직에서 카스파제 활성의 시각화 및 정량화를 위한 것이다. 상기 정량화는 세포 또는 조직의 방사능 함량을 분석하거나 흡수, 해리 또는 분배(partitioning) 속도를 분석하는 것을 포함한다.

[0076] 활성 카스파제와의 복합체의 형성시, 세포 및 조직 내의 표지된 화합물의 흡수 및 축적이 영상화되어 이들 세포 및 조직 내 카스파제 활성의 수준을 지시할 수 있다. 따라서, 본 발명의 제 6 양태는 카스파제 활성의 분자 영상화 방법을 제공하는데, 이는

[0077] a) 상기 세포 또는 조직을 본 발명의 제 2 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 4 양태의 조성물과 접촉시키는 단계; 및

[0078] b) 상기 카스파제 활성을 검출하는 단계를 포함한다.

[0079] 바람직하게, 카스파제 활성을 검출하는 단계는 개체를 검출 장치의 검출장(detection field) 내에 위치시키는 단계와, 상기 검출 장치를 이용하여 개체 내에서 상기 화합물을 검출하는 단계를 포함한다.

[0080] 상기 방법은 시험관 내에서 수행될 수 있다. 세포 또는 조직을 본 발명의 화합물 또는 조성물과 접촉시키는 것은 화합물을 세포 또는 조직에 노출시키거나, 배양하거나, 접촉시키거나, 회합하거나 또는 접근가능하게 하는 것을 포함한다.

[0081] 본 발명의 화합물 또는 조성물이 방사성 표지되는 경우, 상기 카스파제 활성은 어떤 적당한 방사선 검출 장치를 이용하여 시험관 내에서 검출될 수 있다. 상기 장치는 Packard Topcount와 같은 베타 카운터(beta counter), Packard Cobra II™ 감마 카운터(Perkin Elmer, UK)와 같은 감마 카운터, 또는 라디오-TLC 스캐너(radio-TLC scanner)를 포함할 수 있다.

[0082] 본 발명의 화합물 및 조성물이 형광성 표지되는 경우, 상기 카스파제 활성은 어떤 적당한 형광 판독 기구를 이용하여 시험관 내에서 검출될 수 있다. 이러한 기구로는 형광 현미경, 형광계, 또는 Perkin Elmer Victor와 같은 형광 플레이트 판독기가 있다.

[0083] 택일적으로, 상기 방법은 생체 내에서 수행될 수도 있다. 화합물 또는 조성물은 본 발명의 제 3 및 제 4 양태에서 기재한 어떤 방법으로 개체에 투여될 수 있다. 바람직하게, 화합물은 비경구 투여된다.

[0084] 본 발명의 화합물 또는 조성물이 방사성 표지되는 경우, 상기 카스파제 활성은 방사선 검출 장치를 이용하여 검출될 수 있다. 상기 방사선 검출 장치는 양전자 방출 단층촬영(PET) 스캐너 또는 단일 광자 방출 전산화 단층촬영(SPECT) 스캐너를 포함할 수 있다. 바람직하게, 상기 방사선 검출 장치는 양전자 방출 단층촬영(PET) 스캐너이다. 상기 PET 스캐너는 ^{18}F와 같은 광전자 방출 방사성 동위원소에 의해 간접적으로 방출된 감마선의 쌍들을 검출하여 조직 내에의 방사성 동위원소 농도의 3D 영상을 생성할 수 있다. 따라서, PET를 이용하여, 포유동물 조직 내의 본 발명의 방사성 표지 화합물 또는 조성물의 편재의 3D 영상을 생성할 수 있다.

[0085] 본 발명의 화합물 또는 조성물이 형광 표지되는 경우, 상기 카스파제 활성은 어떤 적당한 형광 판독 장치를 이용하여 검출될 수 있다. 상기 형광 판독 장치는 형광 내시경을 포함할 수 있다.

[0086] 바람직하게, 카스파제 활성은 카스파제-3 활성이다.

[0087] 또한, 본 발명은 카스파제 활성의 시각화 및 정량화를 위한 약학적 또는 진단 조성물의 제조를 위한 본 발명의 제 2 양태의 화합물의 용도를 제공한다.

[0088] 상기 제 6 양태의 다른 구현예에서, 본 발명의 제 1 양태에 따른 화합물 또는 본 발명의 제 3 양태에 따른 약학적 조성물은 단계 (a)에서 투여될 수 있다. 상기 투여 후, 상기 화합물은 형광 또는 방사성 표지될 수 있다.

[0089] 전술한 바와 같이, 카스파제 효소는 세포자멸사를 달성하고, 이에 따라 카스파제 활성은 세포자멸사의 지표로서

사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 제 7 양태는 포유동물의 세포 또는 조직에서 카스파제-의존성 세포자멸사의 생체 내 영상화를 위한 본 발명의 제 2 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 4 양태의 약학적 조성물을 제공한다.

[0090] 이러한 방법은

[0091] a) 개체에 본 발명의 제 2 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 4 양태의 조성물을 투여하고;

[0092] b) 상기 개체를 검출 장치의 검출장 내에 위치시키고;

[0093] c) 상기 검출 장치를 이용하여 상기 개체에서 상기 화합물을 검출하는 것을 포함할 수 있다.

[0094] 바람직하게, 상기 화합물 또는 조성물은 주사를 통해 개체에 투여된다.

[0095] 영상화 부분은 비침습적 방법으로 외부에서 검출될 수 있거나, 혈관 내 방사선 또는 광학 검출기, 또는 수술용으로 디자인된 방사선 검출기와 같은 생체 내 용도로 디자인된 검출기를 이용하여 내부에서 검출될 수 있다. 바람직하게, 영상화 부분은 비침습적 방법으로 검출될 수 있다.

[0096] 일 구현예에서, 상기 화합물은 형광 표지되고, 상기 제 6 양태에서 기재한 바와 같은 형광 판독 장치를 이용하여 형광 표지 화합물로부터 방출된 형광을 측정함으로써 검출된다.

[0097] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 방사성 표지되고, 상기 제 6 양태에서 기재한 바와 같은 방사선 검출 장치를 이용하여 방사성 표지 화합물로부터 방출된 방사선을 측정함으로써 검출된다.

[0098] 상기 카스파제 활성은 카스파제-3 활성인 것이 바람직하다.

[0099] 상기 제 7 양태의 다른 구현예에서, 본 발명의 제 1 양태에 따른 화합물 또는 본 발명의 제 3 양태에 따른 약학적 조성물은 단계 (a)에서 투여될 수 있다. 상기 투여 후, 상기 화합물은 생체 내에서 형광 또는 형광 표지될 수 있다.

[0100] 전술한 바와 같이, 다수의 질병에 대한 치료는 세포자멸사 과정을 촉진 또는 억제함으로써 정상적이고 균형있는 세포자멸사를 회복함에 목적이 있다. 따라서, 본 발명의 제 8 양태는 포유동물의 세포 또는 조직에서 카스파제 활성에 대한 시험 물질의 치료 효과를 평가하기 위한 본 발명의 제 2 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 4 양태의 화합물을 제공한다.

[0101] 이러한 방법은

[0102] a) 포유동물의 세포 또는 조직을 본 발명의 제 2 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 4 양태에 따른 조성물과 접촉시키고;

[0103] b) 상기 포유동물의 세포 또는 조직을 검출 장치의 검출장 내에 위치시키고;

[0104] c) 상기 검출 장치를 이용하여 상기 화합물을 검출하고;

[0105] d) 상기 단계 a), b) 및 c)를 반복하는 것을 포함할 수 있다.

[0106] 일 구현예에서, 상기 화합물은 형광 표지되고, 상기 제 6 양태에서 기재한 바와 같은 형광 판독 장치를 이용하여 형광 표지 화합물로부터 방출된 형광을 측정함으로써 검출된다.

[0107] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 방사성 표지되고, 상기 제 6 양태에서 기재한 바와 같은 방사선 검출 장치를 이용하여 방사성 표지 화합물로부터 방출된 방사선을 측정함으로써 검출된다.

[0108] 상기 제 8 양태의 다른 구현예에서, 본 발명의 제 1 양태에 따른 화합물 또는 본 발명의 제 3 양태에 따른 약학적 조성물은 단계 (a)에서 투여될 수 있다. 상기 투여 후, 상기 화합물은 형광 또는 방사성 표지될 수 있다.

[0109] 바람직하게, 이러한 방법은 생체 내에서 수행될 수 있고,

[0110] a) 개체에 본 발명의 제 2 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 4 양태에 따른 조성물을 투여하고;

[0111] b) 상기 개체를 방사선 검출 장치의 검출장 내에 위치시키고;

[0112] c) 상기 방사선 검출 장치를 이용하여 상기 개체 내의 상기 방사성 표지 화합물로부터 방출된 방사선을 측정하고;

[0113] d) 상기 단계 a), b) 및 c)를 반복하는 것을 포함한다.

[0114] 상기 제 8 양태의 시험관 내 및 생체 내 방법 모두의 경우, 단계 d)는 상기 반복이 시간에 따른 카스파제 활성의 변화를 추적하는데 효과적인 선택된 시간 간격으로 수행되는 것이 바람직하다. 상기 단계 d)의 시간 간격은 개체 및 시험물질에 적절해야 한다. 인간의 경우, 적절한 시간 간격으로는 12 내지 24 시간, 48 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주 또는 6 주가 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0115] 각각의 반복시에 측정된 카스파제 활성은 카스파제 활성의 정도 및 편재(localization)의 정량적 변화를 평가하기 위해 비교될 수 있고, 따라서 시간에 따른 카스파제-의존성 세포자멸사의 정량적 또는 반정량적 변화를 평가하기 위해 비교될 수 있다. 카스파제 활성의 정도 또는 편재의 변화는 카스파제 활성의 촉진 또는 억제를 통한 카스파제-의존성 세포자멸사에 대한 시험 물질의 치료 효과를 지시할 수 있다. 이러한 방법을 이용하여, 설정된 약물을 이용한 치료에 대한 개체의 반응을 평가할 수 있고 새로운 약물의 효능을 평가할 수 있다.

[0116] 본 발명의 화합물 또는 조성물은 시험물질 이전에, 이후에 또는 동시에 투여될 수 있다. 바람직하게, 시험 물질을 투여하여 카스파제 활성의 첫 번째 측정값을 얻기 전에, 단계 (a) 내지 (c)가 개체에 대하여 수행된다. 다음에, 시험 물질이 투여되고, 전술한 바와 같이 일정 시간 후 단계 (a) 내지 (c)가 반복되어 카스파제 활성의 두 번째 측정값을 얻는다. 필요한 경우, 시험 물질을 더 투여하기 전 또는 후에, 단계 (a) 내지 (c)를 반복하여, 카스파제 활성의 측정값을 더욱더 얻을 수 있다.

[0117] 바람직하게, 상기 화합물 또는 조성물은 주사를 통해 개체에 투여된다.

[0118] 시험 물질은 질병을 치료하기 위해 사용되는 약물 또는 물질을 포함할 수 있는데, 상기 질병으로는 암, 자가면역질환, 혈액질환, HIV, AIDS, 허혈, 심혈관질환, 신경질환 및 이식 거부가 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특히, 시험 물질은 암의 치료를 위한 화학요법제, 방사선요법제 또는 면역치료제를 포함할 수 있다.

[0119] 전술한 바와 같이, 상기 단계 (a) 내지 (c)는 2회 이상 반복될 수 있다. 하나의 바람직한 구현예에서, 단계 (a)를 첫 번째 수행할 때 개체에 투여되는 화합물은 ^{11}C로 방사성 표지되는 본 발명의 화합물이다. 바람직하게, 상기 화합물은 화합물 **35** 및 **36**을 포함하는 군에서 선택된다. 다음에, 단계 (a)를 두 번째 수행할 때 개체에 투여되는 화합물은 방사능 표지된 영상화제이다. 상기 방사능 표지된 영상화제는 예를 들어, 플루오로데옥시글루코스(FDG), 3'-데옥시-3'-^{18}F-플루오로티미딘(FLT) 또는 본 발명의 화합물일 수 있다. 하나의 바람직한 구현예에서, 상기 영상화제는 ^{18}F로 표지된다. 이러한 구현예가 특히 유리하다. 탄소-11(^{11}C)은 20 분의 비교적 짧은 반감기를 갖는다. 따라서, ^{11}C이 표지된 화합물을 이용하면, 두 번째 및 후속 스캔 동안 배경 잡음이 거의 없다. 따라서, 신호대 잡음비가 더욱 높아지고, 카스파제 활성 및 카스파제-의존성 세포자멸사의 시각화 및 정량화가 더욱 정확해진다.

[0120] 마찬가지로, 본 발명의 제 6 및 제 7 양태에 따른 방법이 비교적 짧은 시간 간격 내에서 반복되어야 하는 경우, ^{11}C-표지 화합물을 사용한 다음 ^{18}F-표지 화합물과 같은 방사성 표지 영상화제를 사용하면, 두 번째 스캔 동안에 존재하는 배경 잡음이 감소될 수 있고, 신호대 잡음비가 증가될 수 있다.

[0121] 본 발명의 제 9 양태는 카스파제 활성을 억제하기 위한 본 발명의 제 1 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 3 양태의 조성물을 제공한다. 이러한 방법은 치료를 필요로 하는 개체에 본 발명의 제 1 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 3 양태의 조성물을 유효량으로 투여하는 것을 포함한다.

[0122] 또한, 이러한 양태는 카스파제 활성의 억제를 위한 의약의 제조에서 본 발명의 제 1 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 3 양태의 조성물의 용도를 제공한다.

[0123] 카스파제 효소는 세포자멸사를 달성하기 때문에, 본 발명의 제 9 양태는 세포자멸사의 억제에 사용하기 위한 본 발명의 제 1 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 3 양태의 조성물을 제공한다.

[0124] 카스파제 활성을 억제하는 것은 과도하거나 부적당한 세포자멸사에 의해 유발되거나 그와 관련이 있는 어떤 질병 또는 상태를 치료하는데 효과적일 수 있다. 이러한 질병 또는 상태의 예로는 알츠하이머병을 비롯한 퇴행성 신경질환, 혈액 질환, 간세포변성, 골관절염, AIDS, 허혈, 및 동종이식 거부가 있다.

[0125] 일반적으로, 본 발명의 제 1 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 3 양태의 조성물은 일일 투여 방법(daily dosage regimen)으로 개체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 일일 투여 방법은 개체의 체중 kg 당 약 0.001 내지 약 100 mg, 바람직하게는 약 0.001 내지 약 10 mg을 필요로 할 수 있다. 더욱 큰 포유동물의 경우, 일일 투여량은 바람직하게는 약 1mg 내지 약 1000 mg, 더욱 바람직하게는 1 mg 내지 500 mg인데, 화합물은 하루에 1 내지 4회 투여

된다. 그렇지 않으면, 본 발명의 화합물의 안정성을 고려하여, 투여는 일주일에 1, 2 또는 3회 이루어질 수 있다.

[0126] 본 발명의 화합물 및 조성물의 투여량 및 투여 방법은 질병 또는 상태에 따라 변화하게 되고, 담당 의사의 판단에 따라 변화하게 된다.

[0127] 본 발명의 제 10 양태는 이상생리(pathophysiology)를 진단하는데 사용하기 하기 본 발명의 제 2 양태의 화합물 또는 제 4 양태의 조성물을 제공한다. 특히, 본 발명의 제 2 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 4 양태의 조성물을 이용하여 과도하거나 부적당한 세포자멸사와 관련이 있는 질병 및 장애를 진단할 수 있는데, 이러한 질병 또는 장애로는 만성 심부전, 만성 심근경색, 뇌졸중, 퇴행성 신경 질환, 자가면역 질환, 병소 혈액 질환, 병소 AIDS, 허혈(심장 허혈 포함), 및 이식 거부가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0128] 이러한 방법은

[0129] a) 포유동물의 세포 또는 조직을 본 발명의 제 2 양태의 화합물 또는 본 발명의 제 4 양태의 조성물과 접촉시키고;

[0130] b) 상기 포유동물의 세포 또는 조직을 검출 장치의 검출장 내에 위치시키고;

[0131] c) 상기 검출 장치를 이용하여 상기 화합물을 검출하여, 상기 포유동물의 세포 또는 조직 내의 세포자멸사 수준을 표시하는 카스파제 활성의 정량적 측정값을 얻는 것을 포함할 수 있다.

[0132] 일 구현예에서, 상기 화합물은 형광 표지되고, 상기 제 6 양태에서 정의한 바와 같은 형광 판독 장치를 이용하여 형광 표지 화합물로부터 방출된 형광을 측정함으로써 검출된다.

[0133] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 방사성 표지되고, 상기 제 6 양태에서 정의한 바와 같은 방사선 검출 장치를 이용하여 방사성 표지 화합물로부터 방출된 방사선을 측정함으로써 검출된다.

[0134] 바람직하게, 상기 측정값은 이상생리의 진단이 가능하도록 표준값과 비교된다.

[0135] 제 10 양태의 다른 구현예에서, 본 발명의 제 1 양태에 따른 화합물 또는 본 발명의 제 3 양태에 따른 약학적 조성물은 단계 (a)에서 투여될 수 있다. 상기 투여 후, 상기 화합물은 형광 또는 방사성 표지될 수 있다.

[0136] 본 발명의 제 11 양태는 본 발명의 제 1 양태의 화합물을 합성하는 방법을 제공한다. 본 발명의 제 1 양태의 화합물은 어떤 적당한 방법으로 제조될 수 있다. 실시예 1, 3 및 10에서 설명되고, 도 1, 도 2(i), 도 2(ii), 도 12, 도 19, 도 20 및 도 21에 예시된 반응식은 본 발명의 제 1 양태의 화합물을 제조할 수 있는 방법을 예시한다.

[0137] 도 1은 화합물 **1-5**, **10-12** 및 중간체 **19a-h**, **20a-h**, **21-24**를 제조할 수 있는 방법을 예시한다. 화합물 **29** 내지 **34**는 유사한 방식으로 제조된다. 상세한 사항은 실시예 1에 기재되어 있다.

[0138] 또한, 트리아졸기를 포함하는 본 발명의 화합물은, 도 2(i), 도 12 및 도 19에 예시되어 있고, 실시예 1 및 3에서 기재된 바와 같은, '클릭 라벨링(click-labelling)'이라 명명된 방법을 통해 생성될 수도 있다. 이러한 방법을 이용하여 예를 들어 화합물 **11**, **35** 및 **36**을 제조할 수 있다. 본 발명의 제 1 양태의 화합물의 제조를 위하여, 이러한 실시예에서 기재된 방사능 표지 화합물 대신에 표지되지 않은 화합물이 사용될 수 있음은 물론이다. 예를 들어, 도 2(i)에서 예시되고 실시예 3에서 기재된 반응식에서는, 2-플루오로에틸아지드(화합물 **27**)가 2-[^{18}F]플루오로에틸아지드(화합물 [^{18}F]**27**) 대신에 사용된다.

[0139] 또한, 치환 트리아졸을 제조하기 위한 고리화첨가반응(cycloaddition)이, N-1 위치에서 작용성화된 이사틴을 말단 알킨을 포함하는 보결기(prosthetic group) 및 말단 아지드와 반응시켜서 역으로 수행될 수도 있다('역 클릭-라벨링'이라 명명된 방법). 이러한 방법을 이용하여, 예를 들어 화합물 **6**, **7**, **8** 및 **9**를 제조할 수 있다. 중간체인 ^{18}F-표지 말단 알킨(들)의 합성 방법도 포함하는 이러한 방법의 적절한 예가 도 2(ii)에 도시되어 있고 실시예 1에 기재되어 있으며, 본 명세서에 참조로 인용되는 다음 문헌[Marik, J 및 Sutcliffe, J. L.[26], Sirion, U *et al*[27] 및 Li, Z. *et al*[28]]에 기재되어 있다.

[0140] 본 발명의 제 12 양태는 본 발명의 제 2 양태의 화합물을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 제 2 양태의 화합물은 어떤 적당한 방법으로 제조할 수 있다. 실시예 1 및 3에 기재되고, 도 1, 도 2(i), 도 2(ii) 및 도 12에서 예시된 반응식은 표지된 중간체 화합물을 이용하여 본 발명의 제 2 양태의 화합물을 제조할 수 있는 방법을

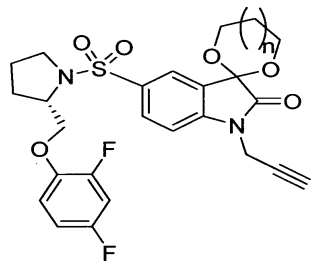
예시한다.

[0141] 실시예 1에 기재되고, 도 1에서 예시한 반응식을 이용하여, 전구체 분자 또는 중간체 화합물, 예를 들어 화합물 **19a-h**, **20a-h** 또는 **21-25**가 표지된 R 또는 R'을 포함하고 있는 본 발명의 제 2 양태의 화합물을 제조할 수 있다. 이러한 방법을 이용하여, 예를 들어 화합물 **1-5**, **10-12** 및 **29** 내지 **34**를 제조할 수 있다,

[0142] 도 2(i), 도 12 및 도 19에서 예시되고 실시예 1 및 실시예 3에서 기재된 반응식은 [^{18}F]**11**, [^{11}C]**35** 및 [^{11}C]**36**을 포함한, 본 발명의 특정 화합물을 제조할 수 있는 '클릭-라벨링' 방법을 예시한다.

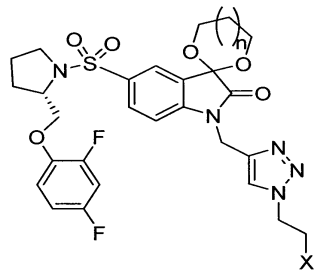
[0143] 또한, 도 2(ii)에서 예시되고 실시예 1에서 기재된 '역 클릭-라벨링' 방법을 이용하여, 화합물 **6**, **7**, **8** 및 **9**의 표지된 형태와 같은, 본 발명의 제 2 양태에 따른 특정 화합물을 제조할 수 있다. 이 경우, 하나 이상의 표지된 전구체 화합물을 이용한다. 예를 들어, 도 2(ii)에서 예시되고 실시예 1에 기재된 반응식에서는, 3-[^{18}F]플루오로프로프-1-인(화합물 [^{18}F]**28**)이 3-플루오포프로프-1-인(화합물 **28**) 대신에 사용된다.

[0144] 그러나, 실시예 3에 기재되고 도 19에서 예시된 '클릭 라벨링' 방법은 안정한 불순물이 생성되어, 이사틴 유도체 생성물의 특이 활성이 감소된다는 단점이 있다. 실시예 10에서 기재되고 도 20 및 21에서 예시한 바와 같이, 이러한 단점은, n = 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 (즉, n = 0 ~ 6)이고 x = 이탈기, 예를 들어, 메실레이트, 토실레이트, 노실레이트 또는 기타 설포네이트 에스테르 또는 할라이드인 화학식 **38** 및 **43**에서 도시한 것과 같은 보호된 전구체를 이용하여 이사틴 유도체, 예를 들어 [^{18}F]**11**을 합성함으로써 극복될 수 있다.



38

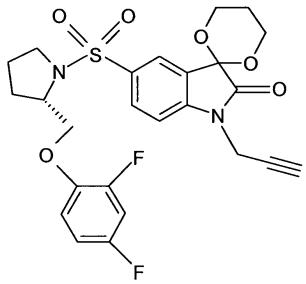
[0145]



43

[0146]

[0147] 특히 바람직한 보호된 알킨 전구체는 (*S*)-1-{[1'-[1-(2-프로피닐)]-(1'2'-디히드로-2'-옥소스피로(1,3-디옥산-2,3'[3H]인도)-5'-설포닐}-2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘(화합물 **39**)이다. 이러한 보호된 알킨 전구체를 사용하면 C-3 위치에서 원치않는 부반응이 방지된다.



39

[0148]

[0149] 이러한 방법 외에도, 본 발명의 제 2 양태에 따른 화합물은, 예를 들어 적절한 주석 전구체를 할로-탈금속화

(halo-demetallation)하고, 원하는 금속, 바람직하게는 이사틴에 부착된 적당한 리간드를 이용하여 킬레이트화하고, 적당한 아릴 또는 알킬 이탈기의 존재 하에 [^{18}F]불소로 치환하여 방사성 표지될 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0150] 도 1은 목표 화합물의 합성의 개략도이다. 시약 및 조건은 다음과 같다: (a) 페놀/플루오로-치환 페놀/4-테트라히드로피란, NaH, DMF, 80 ℃, 17 시간; (b) 4(3H)-피리미돈, PPh_3, DIAD, DCM, 실온, 48 시간; (c) 브롬화 프로파길, KOH, DMF, 실온, 18 시간; (d) TFA, DCM, 0 ℃, 1 시간; (e) 5-클로로설포닐이사틴, TEA, THF/DCM, 실온, 19 시간; (f) 4-플루오로벤질 브로마이드, K_2CO_3, DMF, 실온, 2 시간; (g) 프로파길 프로마이드, K_2CO_3, DMF, 실온, 2 시간; (h) 2-플루오로에틸 아지드, $CuSO_4$, L-아스코르브산, DMF, 실온, 2 시간.

도 2(i)는 (*S*)-1-(2-프로피닐)-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴(화합물 **25**)과 [^{18}F]플루오로에틸아지드(화합물 **27**)의 반응에 의한 화합물 [^{18}F]**11**의 합성의 개략도이다. 화합물 **26**은 2-(톨루엔-4-설포닐)에틸 아지드이다. 시약은 다음과 같다: (a) [^{18}F]KF, Kryptofix[2,2,2], 아세토니트릴; (b) $CuSO_4$, 아스코르브산나트륨, 인산염 완충액 pH 6.0, 화합물 **25**.

도 2(ii)는 (*S*)-1-(아지도메틸)-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴](화합물 **37**)과 (3-플루오로프-1-인)(화합물 **28**)의 반응에 의한 화합물 **6**인 ((*S*)-1-[4-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸1-1-일]메틸-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴의 합성의 개략도이다. 시약은 다음과 같다: (a) $CuSO_4$, L-아스코르브산, DMF.

도 3은 분석 피크 분리(우측) 및 [^{18}F]**11**(좌측)을 함유하는 반응 혼합물의 분취용 HPLC 미량분석 결과이다. 상부: 방사능 채널; 하부: 254 nm에서 UV 채널.

도 4는 2, 10, 30 및 60 분에서 RIF-1 종양 함유 마우스에서 [^{18}F]**11**의 생체분포(biodistribution)를 도시한다. 데이터는 평균 ±SEM 이고, n=시점당 3 ~ 6 마리 마우스이다.

도 5는 radio-HPLC에 의해 혈장 내에서 평가된 [^{18}F]**11**의 생체 내 대사를 도시한다. 상부 좌측: [^{18}F]**11** 표준; 상부 우측: 2 분 혈장; 하부 좌측: 15 분 혈장; 하부 우측: 60 분 혈장.

도 6은 radio-HPLC에 의해 간 및 소변에서 평가된 [^{18}F]**11**의 생체 내 대사를 도시한다. 상부열: 간 추출물; 하부열: 소변 추출물; 좌측에서 우측: 각각 2, 15 및 60 분.

도 7은 2, 10, 30 및 60 분에서 [^{125}I] 표지 (*S*)-1-(4-아이오도벤질)-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴(이하, 화합물[^{125}I]**14**로 나타냄)의 생체분포를 도시한다. 데이터는 평균 ±SEM이고; n= 시점당 3 마리 마우스이다.

도 8은 HPLC에 의해 마우스 간의 S9 분획에서 평가한 공지 화합물인 (*S*)-1-(4-아이오도벤질)-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴(화합물 **14**), (*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴(화합물 **15**) 및 1-(4-플루오로벤질)-5-(피롤리딘-1-설포닐)이사틴(화합물 **16**)의 시험관 내 대사를 도시한다. 상부열, 좌측에서 우측: 0 분에서 화합물 **14**, **15** 및 **16**; 하부 열, 좌측에서 우측: 60 분 배양 후 화합물 **14**, **15** 및 **16**.

도 9는 A) 10 ㎍/mL CDDP 또는 10 ㎍/mL CHX로 24 시간 동안 처리한 RIF-1 세포, B) 50 ㎍/mL CDDP (Cisplatin)으로 처리한 PEO1/4 세포, 및 C) 100 μM CDDP 또는 100 μM VP-16로 처리한 LNM35 세포에서 60 분간 [^{18}F]**11** 세포흡수를 도시한다. 카스파제-3 분석(C의 우측)은 실험 단락에서 기재한 바와 같이 수행한다. * Student's *t*-test, $p<0.005$.

도 10은 CDDP-처리 마우스에서 [^{18}F]**11** 분포의 전신 시상 영상(sagittal image)을 도시한다. 영상들은 약 100 μCi [^{18}F]**11**의 정맥 내 주사 후 30 분 내지 60 분에 합계되었다.

도 11은 100 mg/kg 시클로포스포라미드로 처리한 38C18 이종이식 함유 마우스에서 [^{18}F]**11** 분포의 전신 영상을

도시한다. 좌측에서 우측까지의 영상은 약 100 μCi [^{18}F]**11**의 정맥 내 주사 후 24 시간에 취한 축, 두정 및 시상 영상이다.

도 12는 화합물 **35**(상부 열) 및 화합물 **36**(하부 열)의 합성의 개략도이다.

도 13은 비히클 또는 CDDP로 처리한 RIF-1 세포에서 [^{18}F]**11**의 흡수 프로필을 도시한다. 데이터는 붕괴 보정 카운트(decay-corrected count)/평균 분/전체 세포 단백질의 mg으로 표시된다. 데이터는 평균 ±SEM으로서 삼중으로 실시했다.

도 14는 비히클(50% DMSO) 또는 CDDP (10 mg/kg 단일 투여량)로 처리한 RIF-1 종양에서 [^{18}F]**11**의 흡수를 도시한다. 방사성추적자(radiotracer)의 주사 후 60 분에서 [^{18}F]-유래 방사성 수준을 분석하여 혈액의 수준에 대한 비로 나타냈다. 데이터는 평균 ±SEM 이고, n = 그룹당 8 마리 마우스이다.

도 15는 시클로포스파미드(CPA, 100 mg/kg) 또는 비히클로서 처리한 종양에서 [^{18}F]**11**의 생체분포를 도시한 것으로서, 19 개의 시점의 각각에서 각각의 관련 영역마다 밀도가 평균되어 관련 영역에 대한 시간대 방사성 곡선(TAC)을 얻었다.

도 16은 주사 후 60 분(NUV_{60})에서 표준화 흡수값(Normalised Uptake Value (NUV))의 막대그래프, 및 시클로포스파미드(CPA, 100 mg/kg) 또는 비히클(Veh)로서 처리한 종양에서 0 내지 60분의 적분으로 계산된 NUV 곡선(AUC) 아래의 면적의 막대그래프이다.

도 17은 비히클 또는 시클로포스파미드로 처리한 두 마리의 38C13 이종이식 함유 마우스의 OSEM3D 재구성 [^{18}F]**11** PET 영상을 도시한다. 원은 종양을 나타낸다.

도 18은 카스파제-3 동족 표적 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제(PARP)에 대한 화합물 **11**('이사틴-7'로 나타냄) 및 화합물 **14**('이사틴-4'로 나타냄)의 억제 활성을 도시한다.

도 19는 (*S*)-1-(2-프러피닐)-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴(화합물 **25**)과 [^{18}F]플루오로에틸아지드(화합물 **27**)의 반응에 의한 화합물 [^{18}F]**11**의 합성의 제 2 개략도이다.

도 20은 보호된 알킨 전구체인 (*S*)-1-{[1'-[1-(2-프러피닐)]-(1'2'-디히드로-2'-옥소스피로(1,3-디옥산-2,3'-[3H]인돌)-5'-설포닐}-2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘(화합물 **39**) 및 보호된 트리아졸인 (*S*)-1-{[1'-[1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일]-(1'2'-디히드로-2'-옥소스피로(1,3-디옥산-2,3'-[3H]인**돌**)-5'-설포닐}-2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘(화합물 **40**)의 합성을 위한 일반적인 반응식을 도시한다.

도 21은 보호된 알킬 전구체인 (*S*)-1-{[1'-[1-(2-프로피닐)]-(1'2'-디히드로-2'-옥소스피로(1,3-디옥산-2,3'-3H]인돌)-5'-설포닐}-2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤릴딘(화합물 **39**)로부터 [^{18}F]**11**의 생성을 위한 대표적인 방사화학 반응의 개략도이다.

도 22는 보호기제거 전 표지 혼합물의 HPLC 분석 결과를 도시한다. 적색: 방사성 채널; 청색: 254 nm에서의 UV 채널. 잔류 [^{18}F]-플루오로에틸아지드: 1.3 분; 표지된 이사틴 아세탈: 6.8 분.

도 23은 [^{18}F]**11**의 분취용 HPLC 결과를 도시한다. 상부: 방사성 채널. 11:45 분에서의 피크는 [^{18}F]**11**에 해당한다. 하부: 254 nm에서의 UV 채널. 11:51 분에서의 신호는 안정한 불순물이다.

도 24는 제형화한 [^{18}F]**11**의 분석용 HPLC 결과를 도시한다. 상부: 254 nm에서의 UV 채널; 하부: 3.3 분에서 [^{18}F]**11**을 나타내는 방사성 신호.

도 25는 N-(2-프로피닐)이사틴(화합물 **41**)으로부터 약한 이사틴 카스파제-3 억제제인 N-[1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일]이사틴(화합물 **42**)의 합성의 개략도이다.

도 26은 치료에 의해 유도된 세포자멸사를 받는 암세포에서 [^{18}F]**11** 및 [^{18}F]**42** 결합을 도시한다. (좌측 패널) 화학적 구조 및 세포자멸사를 유도하기 위해 4-히드로퍼옥시시클로포스파미드 4-HC (4-HC; 1 μg/mL; 24 시간)로 처리한 림프종 세포에서 [^{18}F]**11** 결합. 모든 처리 시료 및 대조 시료의 경우, 방사성 데이터는 붕괴 보정 카운트

/전체 세포 단백질의 mg으로 표시했다. (우측 패널) 림프종 세포에서 저결합력 프로브 [^{18}F]**42**의 결합에 대한 4-HC의 효과. 데이터는 평균 ±s.e.m.이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0151] **실시예 1: 화합물의 합성**

[0152] ((*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴)을 선도 화합물(lead compound)로 이용하여 목표 화합물들의 라이브러리를 생성했다. 변경은 좌측 에테르 부분 및 N-1 위치에서 이루어졌다. 좌측 페닐 에테르내로 불소기를 혼입하고, 이러한 위치에서 헤테로고리 및 알킨의 내성(tolerance)을 조사했다. 또한, N-1 위치에서 1,2,3 트리아졸기에 대한 내성을 조사했다. 도 1에서 도시한 바와 같이, 작용기화된 피롤리딘을 5-클로로설포닐이사틴과 축합한 다음, 탄산칼륨/DMF를 이용하여 이사틴의 질소를 알킬화하여 목표 화합물들을 제조했다. 모든 필요한 출발 물질들은 상업적으로 입수가능한 것이거나 다음 문헌[Lee, D. 등 [8], Chu, W. 등[9] 및 Kopka, K. 등[13]]에 기재된 바와 같이 제조된다.

[0153] 상업적으로 이용가능한 페놀 및 4-히드록시테트라히드로피란을 토실레이트 **17**와 반응시켜서 피롤리딘 **19a-f**을 양호한 수율로 얻었다. Wipf 등[15]이 보고한 과정의 변형 방법을 이용하여 4(3H)-피리미돈을 (S)-1-(tert-부톡시카르보닐)-2-피롤리딘메탄올(화합물 **18**)과 결합시켜 피롤리딘 **19g**를 69% 수율로 얻었다. 프로파길 브로마이드를 이용하여 화합물 **18**을 O-알킬화시켜서, 해당하는 에테르 **19h**를 67% 수율로 얻었다. 트리플루오로아세트산을 이용하여 BOC 보호된 피롤리딘 **19a-h**의 보호기를 제거한 다음, 5-클로로설포닐이사틴과 결합시켜, 설폰아미드 **20a-h**를 보통 내지 양호한 수율로 얻었다. 다음에, 염기성 조건하에서 화합물 **20b-h**를 4-플루오로벤질 브로마이드로 처리하여 신규한 화합물 **1** 내지 **5** 및 중간체 화합물 **22** 및 **23**을 얻는 한편, 화합물 **20a** 및 **20d**를 프로파길 브로마이드로 처리하여 중간체 알킬 **24** 및 **25**를 각각 얻었다. 각각의 알킨 전구체 **23**, **24** 및 **25**를 이용하여 2-플루오로에틸아지드를 구리 촉매 고리첨가 반응시켜서 신규한 트리아졸 **10-12**를 제조했다. 다소 놀랍게도, 이사틴 스캐폴드(isatin scaffold)는 황산구리 및 아스코르브산의 존재하에 90 ℃에서 가열시 분해하여, 불충분한 수율의 신규 트리아졸 **10-12**를 생성했다. 이러한 문제는 알킨 전구체에 대한 황산구리 농도를 5%에서 50%로 증가시키고, 상온에서 반응을 수행하고, 반응 시간을 1 시간으로 단축하여 트리아졸 **10-12**를 48 ~ 57%의 수율로 얻음으로써 부분적으로 해결되었다.

[0154] **화학적 성질**

[0155] 시약 및 용매를 Sigma-Aldrich(Gillingham, United Kingdom)로부터 구입하여 더 정제하지 않고 사용했다. 수산화칼륨 및 탄산칼륨을 진공 데시케이터(vacuum dessicator)에서 오산화인 위에 보관했다. 달리 나타내지 않는 경우 모든 반응은 아르곤하에서 수행하였다. 석유 에테르는 40 ℃ 내지 60 ℃에서 증류되는 분획을 의미한다. RediSep 4 g 또는 12 g 일반상 실리카 카트리지(유속 12 mL/min 또는 26 mL/min)를 이용하여 CombiFlash Companion 장치(Companion Presearch Ltd.)에서 자동화 플래시 크로마토그래피를 수행했다. Davisil 중성 실리카(60 Å, 60 ~ 200 미크론, Fisher Scientific, Loughborough, UK)를 이용하여 매뉴얼 플래시 크로마토그래피를 수행하였으며, 용매 혼합물은 체척/체적으로 인용된다. ^{1}H NMR 스펙트럼은 Bruker Avance 600 MHz NMR 장치상에서 얻었으며, 스펙트럼은 잔류 용매를 참조하여 기재한다. 결합 상수(*J*)는 헤르츠(Hz)로 주어진다. GC-MS 데이터는 Agilent 6890N 시스템을 이용하여 전자 이온화 하에서 얻었다. 질량 스펙트럼은 WatersMicromass LCT Premier 상에서 양의 전자분무 이온화 방식(positive electrospray ionization mode)으로 얻었다. 융점은 Stuart Scientific SMP1 융점 장치에서 모세관 튜브에서 측정하였으며 보정하지 않았다. 박층 크로마토그래피(TLC)를 위한 용매 혼합물은 체적/체적으로 인용되고, 시료는 알루미늄으로 지지된 중성 실리카 플레이트(0.2 mm 두께)(Fluka, Seelze, Germany)상에 전개시켰다. 화합물 **1-5**, **10-16**, **20b-h** 및 **22-25**에 대한 순도 분석은 분석용 HPLC를 이용하여 평가했고; 화합물 **19b-h**는 GC-MS로 분석했다. 모든 화합물의 순도는 95% 이상이었다. 강화(enriched) [^{18}O]H_2O 표적의 16.4 MeV 양자 조사를 이용한 ^{18}O(p,n)^{18}F 핵반응을 이용하여 사이클로트론(GE PETrace)으로 [^{18}F]플루오라이드를 생성했다.

[0156] **HPLC 방법**

[0157] a) 비방사성 화합물의 순도 분석은 0.1 M 포름산암모늄 및 메탄올/아세토니트릴(1.8:1 v/v)의 이동상, 1분간 50 % 유기상; 14분 내 50→90% 유기상; 4분 내 90% 유기상; 4분 내 90→50 % 유기상의 구배, 1 mL/min의 유속 및

254 nm 파장에서 Laura 3 소프트웨어(Lablogic, Sheffield, UK)를 이용하여 Phenomenex Luna 50 x 4.6 mm (3 ㎛) HPLC 칼럼이 부착된 Agilent 1100 시리즈 시스템에서 수행했다.

[0158] b) Bioscan Flowcount FC-3400 PIN 다이오드 검출기(Lablogic) 및 선형 UV-200 검출기(파장 254 nm)를 구비한 Beckman System Gold에서 하기 조건에서 분취용 radio-HPLC를 수행했다. Phenomenex Onyx C_{18} 100 x 10 mm HPLC 칼럼; 물 및 메탄올/아세토니트릴(1.8:1 v/v)의 이동상; 20분 내 45→90% 유기상의 구배; 및 3 mL/min의 유속.

[0159] c) Bioscan Flowcount FC3200 요오드화나트륨/PMT 감마 검출기(Lablogic) 및 Phenomenex Luna 50 x 4.6 mm (3 ㎛) 칼럼을 이용하여 하기 조건에서 상기와 같이 분석용 radio-HPLC를 수행했다. 물 및 메탄올/아세토니트릴(1.8:1 v/v)의 이동상; 20분 내 60→ 90% 유기상의 구배; 1 mL/min의 유속.

[0160] **알려진 화합물의 제조**

[0161] 문헌에 알려진 과정에 따라 하기의 화합물을 제조하였고, ^{1}H NMR 스펙트럼 데이터는 보고된 값과 일치했다: (*S*)-1-벤질-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴(화합물 **13**), (*S*)-1-(4-아이오도벤질)-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴(화합물 **14**) 및 (*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴(화합물 **15**).

[0162] **1-(4-플루오로벤질)-5-(피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 16).** 건조 DMF((8 mL)에 용해된 5-피롤리딘-1-설포닐 이사틴[8](0.14 g, 0.5 mmol)의 얼음 냉각 및 교반된 용액에 수소화나트륨(40 mg, 1 mmol)을 첨가했다. 30분 후, 4-플루오로벤질 브로마이드(0.38 g, 2 mmol)를 첨가하고, 그 혼합물을 실온까지 가온했다. 19 시간 후, 그 오랜지색 용액을 10 % 수성 NH_4Cl (25 mL)에 첨가하고 DCM(3 x 15 mL)을 이용하여 추출했다. 진공 농축 후, 그 잔류물을 디에틸 에테르(10 mL)에 용해시키고 물(3 x 10 mL)로 세척하고 Na_2SO_4위에서 건조시켰다. 크로마토그래피(디에틸 에티르/헥산)하여 표제 화합물을 오렌지색 검 형태로 얻었다(83 mg, 43 %). HRMS (ESI) = 389.0988 (M + H)$^+$. $C_{19}H_{18}FN_2O_4S$에 대한 계산값: 389.0971. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.05 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1 H), 7.35-7.32 (m, 2 H), 7.09-7.06 (m, 2 H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 4.94 (s, 2 H), 3.25-3.23 (4 H, m), 1.84-1.79 (4 H, m). TLC (UV_{254}) R_f = 0.63 (4:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 6.83 분.

[0163] **신규 화합물 및 이의 중간체의 제조**

[0164] **(*S*)-*tert*-부틸 2-(4-플루오로페녹시메틸)피롤리딘-1-카르복시레이트 (화합물 19b).** 건조 DMF(10 mL)에 용해된 4-플루오로페닐(0.27 g, 2.4 mmol)의 교반 용액에 수소화나트륨(광물유에서 60% w/w)(0.11 g, 2.8 mmol)을 첨가했다. 30분 후, 건조 DMF(5 mL)에 용해된 ((*S*)-1-(*tert*-부톡시카르보닐)피롤리딘-2-일)톨루엔-4-설포네이트[8](화합물 **15**)(0.71 g, 2.0 mmol)를 첨가하고 그 혼합물을 80 ℃까지 17 시간 동안 가열했다. 그 반응물을 실온으로 냉각하고 1M NaOH(25 mL)에 첨가하고 DCM(3 x 15 mL)으로 추출했다. 합쳐진 유기 분획을 감압하고, 디에틸 에테르(20 mL)를 첨가한 다음, 1M NaOH(1 x 20 mL), 물 (1 x 20 mL) 및 소금물(1 x 20 mL)로 순차적으로 세척하고 Na_2SO_4 위에서 건조시켰다. 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트)하여 원하는 생성물을 무색 오일 형태로 얻었다(0.36 g, 61 %). HRMS (ESI) = 296.1654 (M + H)$^+$. $C_{16}H_{23}FNO_3$에 대한 계산값: 296.1656. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 6.97-6.93 (m, 2 H), 6.88-6.84 (m, 2 H), 4.18-4.03 (m, 2 H), 3.94-3.73 (m, 1 H), 3.46-3.32 (m, 2 H), 2.07-1.81 (m, 4 H), 1.47 (s, 9 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.51 (2:1 헥산/에틸 아세테이트).

[0165] **(*S*)-*tert*-부틸 2-(3-플루오로페녹시메틸)피롤리딘-1-카르복시레트 (화합물 19c).** 화합물 **19c**는 3-플루오로페닐을 이용한다는 것을 제외하고 화합물 **19b**의 제조 과정에 따라 제조했다. 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트)하여 표제 화합물을 무색 오일 형태로 얻었다(0.32 g, 54 %). HRMS (ESI) = 296.1657 (M + H)$^+$. $C_{16}H_{23}FNO_3$에 대한 계산값 296.1656. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 7.20-7.15 (m, 1 H), 6.73-6.69 (m, 1 H), 6.65-6.59 (m, 2 H), 4.18-4.03 (m, 2 H), 3.97-3.74 (m, 1 H), 3.48-3.29 (m, 2 H), 2.05-1.79 (m, 4 H), 1.48 (s, 9 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.40 (3:1 헥산/에틸 아세테이트).

[0166] **(*S*)-*tert*-부틸 2-(2,4-디플루오로페녹시**메틸)피롤리딘-1-카르복시레이트 (화합물 19d).** 화합물 **19d**는 2,4-디플

루오로페놀을 이용한다는 것을 제외하고 화합물 **19b**의 제조 과정에 따라 제조했다. 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트)하여 표제 화합물을 무색 오일 형태로 얻었다(1.92 g, 58 %). HRMS (ESI) = 314.1560 $(M + H)^+$. $C_{16}H_{22}F_2NO_3$에 대한 계산값: 314.1562. ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 7.08-6.76 (m, 3 H), 4.21-3.87 (m, 3 H), 3.47-3.32 (m, 2 H), 2.16-1.85 (m, 4 H), 1.48 (s, 9 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.51 (2:1 헥산/에틸 아세테이트).

[0167] **(*S*)-*tert*-부틸 2-(3,5-디플루오로페녹시메틸)피롤리딘-1-카르복시레이트 (화합물 19e).** 화합물 **19e**는 3,5-디플루오로페놀을 이용한다는 것을 제외하고 화합물 **19b**의 제조 과정에 따라 제조했다. 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트)하여 표제 화합물을 무색 오일 형태로 얻었다(0.31 g, 53 %). HRMS (ESI) = 314.1563 $(M + H)^+$. $C_{16}H_{22}F_2NO_3$에 대한 계산값: 314.1562. ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 6.44-6.29 (m, 3 H), 4.11-3.98 (m, 2 H), 3.91-3.72 (m, 1 H), 3.42-3.24 (m, 2H), 1.99-1.79 (m, 4 H), 1.42 (s, 9 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.56 (2:1 헥산/에틸 아세테이트).

[0168] **(*S*)-*tert*-부틸 2-(4-테트라히드로피라닐옥시메틸)피롤리딘-1-카르복시레이트 (화합물 19f).** 화합물 **19f**는 4-히드록시테트라히드로피란을 이용한다는 것을 제외하고 화합물 **19b**의 제조 과정에 따라 제조했다. 크로마토그래피(에틸 아세테이트)하여 표제 화합물을 무색 오일 형태로 얻었다(0.14 g, 25 %). HRMS (ESI) = 286.2012 $(M + H)^+$. $C_{15}H_{28}NO_4$ 에 대한 계산값: 286.2013. ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 3.97-3.83 (m, 2 H), 3.64-3.23 (m, 9 H), 1.97-1.72 (m, 5 H), 1.60-1.52 (m, 2 H), 1.46 (s, 9 H). TLC (I_2) R_f = 0.62 (에틸 아세테이트).

[0169] **(*S*)-*tert*-부틸 2-(피리딘-4-일옥시메틸)피롤리딘-1-카르복시레이트 (화합물19g).** 건조 DCM (10 mL)에 용해된 *N*-*tert*-부톡시카르보닐-L-프로리놀(0.81 g, 4 mmol) **18**의 교반 용액에 트리페닐포스핀(5.24 g, 20 mmol)을 첨가한 다음 4(3H)-피리미돈(0.77 g, 8mmol)을 첨가했다. 그 용액을 얼음 중탕에서 냉각하고, DIAD(3.24 g, 16 mmol)를 10 분에 걸쳐 적가했다. 48 시간 후 GC-MS 결과는 화합물 **18**의 완전한 전환을 나타냈으며, 그 혼합물을 물(30 mL)에 따르고, 그 유기 분획을 수집하고, 수성 상을 DCM(2 x 20 mL)으로 세척했다. 합쳐진 유기 분획을 1M NaOH (2 x 15 mL)로 세척한 다음, 소금물(1 x 15 mL)로 세척하고 Na_2SO_4 위에서 건조시켰다. 대부분의 용매를 제거하여 오렌지색 검을 얻었고, 헥산/디에틸 에테르(1:1)를 첨가하여 트리페닐포스핀 옥사이드의 침전물을 형성하여 여과로 제거했다. 크로마토그래피(에틸 아세테이트)하여 원하는 생성물을 무색 오일 형태로 얻었다(0.77 g, 69 %). HRMS (ESI) = 280.1655 $(M + H)^+$. $C_{14}H_{22}N_3O_3$에 대한 계산값: 280.1656. ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.71 (s, 1 H), 8.39 (d, J = 6 Hz, 1 H), 6,69 (d, J = 6 Hz, 1 H), 4.45-3.91 (m, 3 H), 3.40-3.33 (m, 2 H), 2.00-1.82 (m, 4 H), 1.42 (s, 9 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.49 (에틸 아세테이트).

[0170] **(*S*)-*tert*-부틸 2-(2-프로피닐옥시메틸)피롤리딘-1-카르복시레이트 (화합물 19h).** 건조 DMF(10 mL)에 용해된 화합물 **18**(0.40 g, 2 mmol)의 교반 용액에 수산화칼륨(0.56 g, 10 mmol)을 첨가한 다음, 프로파길 브로마이드(톨루엔에서 80 중량%) (0.48 g, 4 mmol)를 5 분에 걸쳐 적가했다. 18 시간 후, 그 반응 혼합물을 물(30 mL)에 따르고, DCM(3 x 15 mL)으로 세척했다. 합쳐진 유기 분획을 진공 농축하고, 남아있는 액체를 디에틸 에테르(15 mL)에 첨가하고 물(2 x 10 mL)로 세척한 다음 소금물(1 x 10 mL)로 세척하고 Na_2SO_4 위에서 건조시켰다. 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트)하여 원하는 생성물을 무색 오일 형태로 얻었다(0.32 g, 67 %). HRMS (ESI) = 240.1597 $(M + H)^+$. $C_{13}H_{22}NO_3$ 에 대한 계산값: 240.1594. ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 4.13 (s, 2 H), 3.96-3.88 (m, 1 H), 3.64 (dd, J = 9 Hz, J = 3.6 Hz, 1 H), 3.49-3.22 (m, 3 H), 2.40 (s, 1 H), 1.94-1.78 (m, 4 H), 1.46 (s, 9 H). TLC (I_2) R_f = 0.67 (1:1 헥산/에틸 아세테이트).

[0171] **(*S*)-5-(2-(4-플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 20b).** 얼음 중탕에서 냉각한 건조 DCM(4 mL)에 용해된 화합물 **19b**(0.15 g, 0.5 mmol)의 교반 용액에 TFA(0.6 mL, 10 mmol)를 첨가했다. 1 시간 후, 용매를 진공 제거하고, 그 잔류물을 건조 DCM(8 mL)에 첨가하고 얼음 중탕에서 냉각했다. 다음에, 건조 트리에틸아민(1.5 mL)을 첨가한 다음, 건조 THF(4 mL)에 용해된 5-클로로설포닐이사틴[8](0.16 g, 0.65 mmol)을 첨가하고, 그 용액을 교반했다. 19 시간 후, 용매를 진공 제거하고 그 잔류물을 DCM(10 mL)에 용해하고, 물(2 x 10 mL)로 세척한 다음 소금물(1 x 10 mL)로 세척하고 Na_2SO_4 위에서 건조시켰다. 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트)하여 원하는 생성물을 오렌지색 고체 형태로 얻었다(104 mg, 51 %). 융점: 205-207 ℃. HRMS (ESI) = 405.0941

(M + H)$^+$. $C_{19}H_{18}FN_2O_5S$에 대한 계산값: 405.0920. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.10 (s,1 H), 8.08 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz℃, 1 H), 8.00 (br, 1 H), 7.00 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.99-6.95 (m, 2 H), 6.83-6.81 (m, 2 H), 4.17 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1 H), 3.98-3.95 (m, 1 H), 3.91 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 3.54-3.50 (m, 1 H), 3.24-3.19 (m, 1 H), 2.10-1.99 (m, 2 H), 1.87-1.77 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.27 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 7.83

[0172] **(*S*)-5-(2-(3-플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이신틴 (화합물 20c).** 화합물 **20c**는 화합물 **19c**를 사용한다는 것을 제외하고 화합물 **20b**의 제조 과정에 따라 오렌지색 고체 형태로 얻었다(93 mg, 46 %). 융점: 201-203 ℃. HRMS (ESI) = 405.0933 (M + H)$^+$. $C_{19}H_{18}FN_2O_5S$에 대한 계산값: 405.0920. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.14 (br, 1 H), 8.09-8.06 (m, 2 H), 7.21 (q, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 7.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.67-6.62 (m, 2 H), 6.55 (dt, *J* = 10.8 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 4.17 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 3 Hz, 1 H), 4.01-3.97 (m, 1 H), 3.94 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 3.54-3.50 (m, 1 H), 3.27-3.25 (m, 1 H), 2.08-1.96 (m, 2 H), 1.88-1.77 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.36 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 8.27 분.

[0173] **(*S*)-5-(2-(2,4-디플루오로메녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 20d).** 화합물 **20d**는 화합물 **19d**를 이용한다는 것을 제외하고 화합물 **20b**의 제조 과정에 따라 오렌지색 고체 형태로 얻었다(0.86 g, 34 %). 융점: 185-187 ℃. HRMS (ESI) = 423.0834 (M + H)$^+$. $C_{19}H_{17}F_2N_2O_5S$에 대한 계산값: 423.0826. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.08-8.06 (m, 2 H), 7.97 (br, 1 H), 7.03 (d, *J* = 9 Hz, 1 H), 6.97-6.92 (m, 1 H), 6.87-6.77 (m, 2 H), 4.21 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 4.03-3.97 (m, 2 H), 3.56-3.52 (m, 1 H), 3.23-3.17 (m, 1 H), 2.11-2.01 (m, 2 H), 1.88-1.75 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.46 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 8.12 분.

[0174] **(*S*)-5-(2-(3,5-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 20e).** 화합물 **20e**는 화합물 **19e**를 사용한다는 것을 제외하고 화합물 **20b**의 제조 과장에 따라 오렌지색 오일 형태로 제조했다(112 mg, 53 %). 융점: 196-198 ℃. HRMS (ESI) = 423.0834 (M + H)$^+$. $C_{19}H_{17}F_2N_2O_5S$에 대한 계산값: 423.0826. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.10-8.06 (m, 2 H), 8.04 (br, 1 H), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz), 6.45-6.38 (m, 3 H), 4.18 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 3.99-3.92 (m, 2 H), 3.56-3.49 (m, 1 H), 3.24-3.17 (m, 1 H), 2.04-1.92 (m, 2 H), 1.86-1.77 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.36 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 9.18 분.

[0175] **(*S*)-5-(2-(테트라히드로-2*H*-피란-4-일옥시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 20f).** 화합물 **20f**는 화합물 **19f**를 사용하는 것을 제외하고 화합물 **20b**의 제조 과정에 따라 오렌지색 검 형태로 제조했다(63 mg, 32 %). HRMS (ESI) = 395.1282 (M + H)$^+$. $C_{18}H_{23}N_2O_6S$에 대한 계산값: 395.1277. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.17 (br, 1 H), 8.10-8.08 (m, 2 H), 7.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 3.94-3.90 (m, 2 H), 3.77-3.73 (m, 1 H), 3.70 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3 Hz, 1 H), 3.56-3.51 (septet, *J* = 4.2 Hz, 1 H), 3.48-3.44 (m, 3 H), 3.13-3.11 (m, 1 H), 2.05-1.87 (m, 4 H), 1.72-1.64 (m, 2 H), 1.60-1.52 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.26 (4:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 2.65 분.

[0176] **(*S*)-5-(2-(피리미딘-4-일옥시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 20g).** 화합물 **20g**는 화합물 **19g**를 사용하는 것을 제외하고 화합물 **20b**의 제조 과정에 따라 제조했다. 크로마토그래피(에틸 아세테이트)하여 오렌지색 검을 얻었다(51 mg, 27 %). HRMS (ESI) = 389.025 (M + H)$^+$. $C_{17}H_{17}N_4O_5S$에 대한 계산값: 389.020. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.79 (s, 1 H), 8.45 (d, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 8.12 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 8.09 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.95 (br, 1 H), 7.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.72 (d, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 4.57 (dd, *J* = 10.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1 H), 4.39 (dd, *J* = 10.8 Hz, *J* =7.2 Hz, 1 H), 4.08-4.04 (m, 1 H), 3.53-3.46 (m, 1 H), 3.27-3.22 (m, 1 H), 2.01-1.93 (m, 2 H), 1.84-1.74 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.49 (9:1 에틸 아세테이트/메탄올). HPLC t_R = 1.90 분.

[0177] **(*S*)-5-(2-(2-프로피닐옥시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 20h).** 화합물 **20h**는 화합물 **19h**를 이용한다는 것을 제외하고 화합물 **20b**의 제조과정에 따라 오렌지색 검 형태로 제조했다(92 mg, 53 %). HRMS (ESI) =

349.0867 (M + H)$^+$. $C_{16}H_{17}N_2O_5S$에 대한 계산값: 349.067. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.10-8.07 (m, 2 H), 7.84 (br, 1 H), 7.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 4.16 (s, 2 H), 3.83-3.79 (m, 1 H), 3.72 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1 H), 3.54 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1 H), 3.45-3.43 (m, 1 H), 3.19-3.15 (m, 1 H), 2.46 (t, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 1.96-1.89 (m, 2 H), 1.74-1.67 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.28 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R =2.93 분.

[0178] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-(4-플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 22).** 건조 DMF (3 mL)에 용해된 화합물 **20b**(40 mg, 0.1 mmol)의 교반 용액에 탄산칼륨(21 mg, 0.15 mmol)을 첨가한 다음, 4-플루오로벤질 브로마이드(76 mg, 0.4 mmol)를 첨가했다. 2 시간 후, TLC 결과는 화합물 **20b**의 완전한 전환을 나타내었으며, 상기 용액을 10% 수성 NH_4Cl(10 mL)에 따르고 DCM (3 x 10 mL)로 추출했다. 합쳐진 유기 분획을 진공 농축하고, 디에틸 에테르(10 mL)에 녹이고, 물(2 x 10 mL)로 세척한 다음, 소금물(1 x 10 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 위에서 건조시켰다. 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트)하여 표제 화합물을 오렌지색 검 형태로 얻었다(34 mg, 66 %). HRMS (ESI) = 513.1306 (M + H)$^+$. $C_{26}H_{23}F_2N_2O_5S$에 대한 계산값: 513.1296. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.04 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.97 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.33-7.30 (m, 2 H), 7.09-7.05 (m, 2 H), 6.96-6.92 (m, 2 H), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.81-6.77 (m, 2 H), 4.92 (d, *J* = 15.6, 1 H), 4.91 (d, *J* = 15.6, 1 H), 4.14 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1 H), 3.95-3.92 (m, 1 H), 3.88 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 3.51-3.47 (m, 1 H), 3.20-3.15 (m, 1 H), 2.06-1.93 (m, 2 H), 1.83-1.73 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.61 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 12.25 분.

[0179] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-(3-플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 1).** 화합물 **1**은 화합물 **20c**를 사용한다는 것을 제외하고 화합물 **22**의 제조 과정에 따라 오렌지색 검 형태로 제조했다(31 mg, 61 %). HRMS (ESI) = 513.1298 (M + H)$^+$. $C_{26}H_{23}F_2N_2O_5S$에 대한 계산값: 513.1296. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.02 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.98 (dd,*J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.33-7.29 (m, 2 H), 7.18 (m, 1 H), 7.09-7.04 (m, 2 H), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.66-6.62 (m, 2 H), 6.53 (dt, *J* = 10.8, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 4.88 (s, 2 H), 4.15 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1 H), 3.98-3.88 (m, 2 H), 3.51-3.47 (m, 1 H), 3.23-3.18 (m, 1 H), 2.08-1.97 (m, 2 H), 1.84-1.72 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.64 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 12.57 분.

[0180] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 2).** 화합물 **2**는 화합물 **20d**를 사용하는 것을 제외하고 화합물 **22**의 제조 과정에 따라 오렌지색 검 형태로 제조했다(32 mg, 60 %). HRMS (ESI) = 531.1204 (M + H)$^+$. $C_{26}H_{22}F_3N_2O_5S$에 대한 계산값: 531.1202. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.03 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.98 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.33-7.30 (m, 2 H), 7.09-7.06 (m, 2 H), 6.95-6.91 (m, 1 H), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.81-6.76 (m, 2 H), 4.93 (d, *J* = 16.2 Hz, 1 H), 4.92 (d, *J* = 16.2 Hz, 1 H), 4.18 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 3 Hz, 1 H), 4.00-3.95 (m, 2 H), 3.51-3.49 (m, 1 H), 3.21-3.17 (m, 1 H), 2.09-1.98 (m, 2 H), 1.85-1.74 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.67 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 12.50 분.

[0181] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-(3,5-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 3).** 화합물 **3**은 화합물 **20e**를 사용하는 것을 제외하고 화합물 **22**의 제조 과정에 따라 오렌지색 검 형태로 제조했다(31 mg, 58 %). HRMS (ESI) = 531.1213 (M + H)$^+$. $C_{26}H_{22}F_3$-N_2O_5S에 대한 계산값: 531.1202. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.04 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.99 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.34-7.29 (m, 2 H), 7.09-7.06 (m, 2 H), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.44-6.38 (m, 3 H), 4.93 (s, 2 H), 4.18-4.15 (m, 1 H), 3.94-3.89 (m, 2 H), 3.51-3.48 (m, 1 H), 3.19-3.15 (m, 1 H), 2.03-1.93 (m, 2 H), 1.83-1.73 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.64 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 13.00 분.

[0182] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-(테트라히드로-2*H*-피란-4-일옥시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 4).** 화합물 **4**는 화합물 **20f**를 사용하는 것을 제외하고 화합물 **22**의 제조 과정에 따라 오렌지색 검 형태로 제조했다(26

mg, 52 %). HRMS (ESI) = 503.1646 (M + H)$^+$. $C_{25}H_{28}FN_2O_6S$에 대한 계산값: 503.1652. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.06 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 8.01 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.34-7.31 (m, 2 H), 7.10-7.06 (m, 2 H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 4.87 (s, 2 H), 3.93-3.88 (m, 2 H), 3.73-3.70 (m, 1 H), 3.67 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 3 Hz, 1 H), 3.55-3.49 (m, 1 H), 3.47-3.41 (m, 4 H), 3.10-3.05 (m, 1 H), 1.97-1.85 (m, 4 H), 1.70-1.63 (m, 2 H), 1.59-1.54 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.55 (4:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 8.58 분.

[0183] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-(피리미딘-4-일옥시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 5).** 화합물 **5**는 화합물 **20g**를 사용하는 것을 제외하고 화합물 **22**의 제조 과정에 따라 오렌지색 검 형태로 얻었다(12 mg, 24 %). HRMS (ESI) = 497.1287 (M + H)$^+$. $C_{24}H_{22}FN_4O_5S$에 대한 계산값: 497.1295. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.77 (s, 1 H), 8.43 (d, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 8.08 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 8.01 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.34-7.32 (m, 2 H), 7.09-7.06 (m, 2 H), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.70 (d, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 4.90 (s, 2 H), 4.55 (dd, *J* = 10.8 Hz, *J* = 4.2 Hz, 1 H), 4.37 (dd, *J* = 10.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 4.05-4.01 (m, 1 H), 3.50-3.46 (m, 1 H), 3.22-3.19 (m, 1 H), 1.98-1.87 (m, 2 H), 1.81-1.72 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.32 (2:1 에틸 아세테이트). HPLC t_R = 7.45 분.

[0184] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-(2-프로피닐옥시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 23).** 화합물 **23**은 화합물 **20h**를 사용하는 것을 제외하고 화합물 **22**의 제조 과정에 따라 오렌지색 검 형태로 제조했다. 에틸 아세테이트/헥산으로부터 재결정화하여 원하는 생성물을 오렌지색 침상 결정 형태로 얻었다(93 mg, 58 %). HRMS (ESI) = 457.1236 (M + H)$^+$. $C_{23}H_{22}FN_2O_5S$에 대한 계산값: 457.1233. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.07 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 8.01 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.43-7.31 (m, 2 H), 7.09-7.04 (m, 2 H), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 4.91 (s, 2 H), 4.13 (d, *J* = 2.4 Hz, 2 H), 3.81-3.77 (m, 1 H), 3.69 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 4.2 Hz, 1 H), 3.51 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 3.43-3.40 (m, 1 H), 3.16-3.12 (m, 1 H), 2.43 (t, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 1.94-1.87 (m, 2 H), 1.75-1.66 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.62 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 8.80 분.

[0185] **(*S*)-1-(2-프로피닐)-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 24).** 건조 DMF(10 mL)에 용해된 (*S*)-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 **20a** (0.39 g, 1mmol)의 용액에 탄산칼륨(0.21 g, 1.5 mmol)을 첨가한 다음 프로파길 브로마이드(톨루엔에서 80 중량%)(0.14 g, 1.2 mmol)를 첨가했다. 2 시간 후, TLC 결과는 화합물 **20a**의 완전한 전환을 나타내었는데, 그 용액을 10% 수성 NH_4Cl(20 mL)에 따르고, DCM(3 x 10 mL)으로 세척했다. 다음에, 합쳐진 유기 분획을 진공 농축하고 그 잔류물을 디에틸 에테르(10 mL)에 녹이고 물(2 x 10 mL)로 세척한 다음, 소금물(1 x 10 mL)로 세척하고 Na_2SO_4 위에서 건조시켰다. 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트)하여 그 생성물을 오렌지색 검 형태로 얻었다. 에틸 아세테이트/헥산으로부터 재결정화하여 원하는 생성물을 오렌지색 고체로 얻었다(0.28 g, 66 %). 융점: 115-117 ℃. HRMS (ESI) = 425.1185 (M + H)$^+$. $C_{22}H_{21}N_2O_5S$에 대한 계산값: 425.1171. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.12 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 8.05 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.25-7.21 (m, 2 H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.96-6.93 (m, 1 H), 6.81 (d, *J* = 9 Hz, 2 H), 4.56 (dd, *J* = 18 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 4.53 (dd, *J* = 18 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 4.19 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3 Hz, 1 H), 4.07-4.01 (m, 1 H), 3.97 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 3.55-3.51 (m, 1 H), 3.33-3.28 (m, 1 H), 2.36 (t, *J* =2.4 Hz, 1 H), 2.09-1.99 (m, 2 H), 1.89-1.75 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.54 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 9.00 분.

[0186] **(*S*)-1-(2-프로피닐)-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 25).** 화합물 **25**는 화합물 **20d**를 사용하는 것을 제외하고 화합물 **24**의 제조 과정에 따라 오렌지색 고체로 얻었다(0.48 g, 70 %). 융점: 101-103 ℃. HRMS (ESI) = 461.0976 (M + H)$^+$. $C_{22}H_{19}F_2N_2O_5S$에 대한 계산값: 461.0983. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.13 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 8.07 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.96-6.92 (m, 1 H), 6.85-6.78 (m, 2 H), 4.59 (dd, *J* = 18 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 4.57 (dd, *J* = 18 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 4.24-4.20 (m, 1 H), 4.03-3.98 (m, 2 H), 3.55-3.52 (m, 1 H), 3.26-3.21 (m, 1 H),

2.37 (t, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 2.12-2.01 (m, 2 H), 1.88-1.76 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.63 (2:1 에틸 아세테이트/헥산). HPLC t_R = 9.60 분.

[0187] **(*S*)-1-((1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메틸)-5-(2-페녹시메틸-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 10).** 건조 DMF(3 mL)에 용해된 화합물 **24**(138 mg, 0.3 mmol)의 교반 용액에 물(0.2 mL)에 용해된 황산 구리(38 mg, 0.15 mmol)를 첨가한 다음, 물(0.2 mL)에 용해된 아스코르브산(53 mg, 0.3 mmol)을 첨가한 다음, 건조 DMF(1.5 mL)에 용해된 2-플루오로에틸아지드(33 mg, 0.36 mmol)를 첨가하고, 그 혼합물을 아르곤 하에 교반했다. 2 시간 후, TLC 결과는 완전한 전환을 나타내었고, 그 혼합물을 10% 수성 NH_4Cl(12 mL)에 따르고 DCM(3 x 10 mL)으로 추출하고 Na_2SO_4위에서 건조시켰다. 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트)하여 오렌지색 고체를 얻었다(26 mg, 51 %). 융점: 165-167 ℃. HRMS (ESI) = 514.1557 $(M + H)^+$. $C_{24}H_{25}FN_5O_5S$에 대한 계산값: 514.1560. ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.07 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 8.01 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.76 (s, 1 H), 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.23-7.19 (m, 2 H), 6.92 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 2 H), 5.03 (d, *J* = 15.6 Hz, 1 H), 5.02 (d, *J* = 15.6 Hz, 1 H), 4.79 (dt, *J* = 46.2 Hz, *J* = 4.8 Hz, 2 H), 4.66 (dt, *J* = 27 Hz, *J* = 4.8 Hz, 2 H), 4.17 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1 H), 4.00-3.97 (m, 1 H), 3.93 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 3.53-3.49 (m, 1 H), 3.27-3.24 (m, 1 H), 2.08-1.97 (m, 2 H), 1.86-1.75 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.56 (에틸 아세테이트). HPLC t_R = 7.93 분.

[0188] **(*S*)-1-((1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메틸)-5-(2(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 11).** 화합물 **11**은 화합물 **25**를 사용하는 것을 제외하고 화합물 **10**의 제조 과정에 따라 오렌지색 검 형태로 제조했다. 에틸 아세테이트/헥산으로부터 재결정화하여 오렌지색 고체를 얻었다(94 mg, 57 %). 융점: 130-131 ℃. HRMS (ESI) = 550.1381 $(M + H)^+$. $C_{24}H_{23}F_3N_5O_5S$에 대한 계산값: 550.1372. ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.08 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 8.02 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.77 (s, 1 H), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.95-6.91 (m, 1 H), 6.82-6.75 (m, 2 H), 5.05 (s, 2 H), 4.79 (dt, *J* = 46.2 Hz, *J* = 4.8 Hz, 2 H), 4.67 (dt, *J* = 26.4 Hz, *J* = 4.8 Hz, 2 H), 4.20 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3 Hz, 1 H), 4.01-3.94 (m, 2 H), 3.53-3.50 (m, 1 H), 3.22-3.17 (m, 1 H), 2.10-1.98 (m, 2 H), 1.85-1.74 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.47 (에틸 아세테이트). HPLC t_R = 8.45 분.

[0189] **(*S*)-1-((1-(플루오로메틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메틸)-5-(2(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 29).** 화합물 **29**는 2-플루오로에틸아지드 대신에 플루오로메틸아지드를 사용하였다는 것을 제외하고 화합물 **11**의 제조 과정에 따라 제조했다.

[0190] **(*S*)-1-((1-(3-플루오로프로필)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메틸)-5-(2(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 30)**은 2-플루오로에틸아지드 대신에 3-플루오로프로필아지드를 사용하였다는 것을 제외하고 화합물 **11**의 제조과정에 따라 제조했다.

[0191] **(*S*)-1-((1-(4-플루오로부틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메틸)-5-(2(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 31)**은 2-플루오로에틸아지드 대신에 4-플루오로부틸아지드를 사용하였다는 것을 제외하고 화합물 **11**의 제조과정에 따라 제조했다.

[0192] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-(1-((2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메톡시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 12).** 화합물 **12**는 화합물 **23**을 사용하는 것을 제외하고 화합물 **10**의 제조과정에 따라 오렌지색 검 형태로 제조했다(26 mg, 48 %). HRMS (ESI) = 546.1632 $(M + H)^+$. $C_{25}H_{26}F_2N_5O_5S$에 대한 계산값: 546.1623. ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 8.03 (d, *J* =1.8 Hz, 1 H), 8.00 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.67 (s, 1 H), 7.35-7.33 (m, 2 H), 7.08-7.05 (m, 2 H), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 4.95 (s, 2 H), 4.81 (dt, *J* = 46.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, 2 H), 4.67 (dt. *J* = 26.4 Hz, *J* = 4.8 Hz, 2 H), 4.62 (d, *J* = 12 Hz, 1 H), 4.60 (d, *J* = 12 Hz, 1 H), 3.81-3.78 (m, 1 H), 3.65 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 4.2 Hz, 1 H), 3.51 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 3.40-3.37 (m, 1 H), 3.19-3.15 (m, 1 H), 1.92-1.87 (m, 2 H), 1.72-1.66 (m, 2 H). TLC (UV_{254}) R_f = 0.35 (에틸 아세테이트). HPLC t_R = 6.58 분.

[0193] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-(1-((플루오로메틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메톡시메틸)-피롤리딘-1-설포**

닐)이사틴 (화합물 32)은 2-플루오로에틸아지드 대신에 플루오로메틸아지드를 사용한다는 것을 제외하고 화합물 12의 제조과정에 따라 제조한다.

[0194] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-((1-(3-플루오로프로필)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메톡시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 33)**은 2-플루오로에틸아지드 대신에 3-플루오로프로필아지드를 사용한다는 것을 제외하고 화합물 12의 제조 과정에 따라 제조한다.

[0195] **(*S*)-1-(4-플루오로벤질)-5-(2-((1-(4-플루오로부틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메톡시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 34)**은 2-플루오로에틸아지드 대신에 4-플루오로부틸아지드를 사용한다는 것을 제외하고 화합물 12의 제조 과정에 따라 제조한다.

[0196] **(*S*)-1-[4-(플루오로메틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-1-일]메틸-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴) (화합물 6)**은 도 2(ii)에서 예시한 바와 같이, (*S*)-1-(아지도메틸)-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴] (화합물 37)을 3-플루오로프로프-1-인 (화합물 28)과 반응시켜서 제조한다. 시약은 다음과 같다: (a) $CuSO_4$, L-아스코르브산 , DMF. [^{18}F]6의 제조를 위하여, 3-[^{18}F]플루오로프로프-1-인을 3-플루오로프로프-1-인 대신에 사용한다.

[0197] **(*S*)-1-[4-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-1-일]메틸-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴) (화합물 7)**은 (3-플루오로프로프-1-인) 대신에 4-플루오로부트-1-인을 사용하는 것을 제외하고 화합물 6의 제조 과정에 따라 제조한다.

[0198] **(*S*)-1-[4-(3-플루오로프로필)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-1-일]메틸-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴) (화합물 8)**은 (3-플루오로프로프-1-인) 대신에 5-플루오로펜트-1-인을 사용하는 것을 제외하고 화합물 6의 제조 과정에 따라 제조한다. [^{18}F]8의 제조를 위하여, 5-[^{18}F]플루오로펜트-1-인을 3-플루오로프로프-1-인 대신에 사용한다.

[0199] **(*S*)-1-[4-(4-플루오로부틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-1-일]메틸-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴) (화합물 9)**는 (3-플루오로프로프-1-인) 대신에 플루오로헥스-1-인을 사용한다는 것을 제외하고 화합물 6의 제조 과정에 따라 제조한다. [^{18}F]9의 제조를 위하여, 6-[^{18}F]플루오로헥스-1-인을 3-플루오로프로프-1-인 대신에 사용한다.

[0200] 화합물 35는 R이 위에서 정의되어 있는 화합물들의 그룹을 포함한다. 화합물 36은 R'이 위에서 정의되어 있는 화합물들의 그룹을 포함한다. 이러한 화합물들은 도 12에서 개략적으로 나타낸 방법을 이용하여 제조할 수 있다 (도 12에서, 상부 라인 = 화합물 35, 하부 라인 = 화합물 36). 이러한 방법은 원위치에서 또는 별개의 반응으로서 [^{11}C]메틸 아이오디드를 아지드 소오스와 반응시킨 다음, 적절한 알킨을 이용하여 고리화첨가반응시키는 것을 포함한다. 이러한 방법은 다음 문헌[Schirrmacher, R. 등[25]]에 최근에 보고된 잘 알려진 클릭 화학 방법(click-chemistry strategy)을 변형한 것이다.

[0201] **실시예 2: 목표 화합물의 지질친화성 및 카스파제에의 결합력의 측정**

[0202] **카스파제에의 표적 화합물의 결합력(affinity)**. 신규한 플루오르화 이사틴 1-5 및 10-12, 및 알려진 이사틴 유도체 및 중간체 화합물 22 및 23의 상이한 활성화 카스파제 1, 3, 6, 7 및 8에의 결합력을 Kopka[13] 등이 보고한 방법과 유사한 형광측정 시험관 내 카스파제 억제 분석법을 이용하여 측정했다. 재조합 인간 카스파제의 억제는 형광 생성물인 7-아미노-4-메틸쿠마린(7-AMC)의 축적을 평가함으로써 측정했다.

[0203] 재조합 인간 카스파제-1, -3, -6, -7, 및 -8과 이들의 펩티드 특이 기질을 Biomol International(UK)로부터 구입했다. 비방사성 이사틴에 의한 재조합 카스파제의 억제는 형광 생성물인 7-아미노-4-메틸쿠마린(7-AMC)의 축적을 측정하는 형광분석법을 이용하여 평가했다. 모든 분석은 웰(well)당 200 ml 체적의 96-웰 플레이트에서 수행했다. 상기 분석은 각 카스파제마다 아래에 기재한 바와 같이 적절한 반응 버퍼에서 37 ℃에서 수행했다. 카스파제 1의 경우, 버퍼는 0.1% CHAPS, 100mM NaCl, 5mM 2-머캅토에탄올, 100 mM HEPES (pH 7.4), 2mM EDTA, 10% 수크로스, 및 10 μM의 펩티드 기질인 Ac-YVAD-AMC로 이루어졌다. 카스파제 3의 경우, 버퍼는 20mM HEPES (pH 7.4), 10% 수크로스, 100mM NaCl, 0.1% CHAPS, 2m,mM EDTA, 및 10 μM Ac-DEVD-AMC로 이루어졌다. 카스파제 6의 경우, 버퍼는 20mM HEPES (pH 7.4), 10 % 수크로스, 100mM NaCl, 0.1% CHAPS, 2mM EDTA, 및 10 μM Ac-IEID-AMCF로 이루어졌다. 카스파제 7의 경우, 버퍼는 20mM HEPES (pH 7.4), 10% 수크로스, 5mM

2-머캅토에탄올, 100mM NaCl, 0.1% CHAPS, 2mM EDTA, 10mM Ac-DEVD-AMC로 이루어졌다. 카스파제 8의 경우, 버퍼는 20mM HEPES (pH 7.4), 10 % 수크로스, 100mM NaCl, 0.1% CHAPS, 2mM EDTA, 및 10mM Ac-IETD-AMC로 이루어졌다. 상기 버퍼들은 DMSO에서 500, 50, 5 μM; 500, 50, 및 5nM; 500, 50, 및 5pM의 최종 농도로 비방사성 이사틴을 함유했고, 모든 웰에서 DMSO의 최종 농도는 전체 체적의 5%였다. 재조합 카스파제는 분석당 0.5 units로 사용했다(약 500 pmol 기질이 시간당 전환됨). 펩티드 기질을 제외한 모든 시약은 10분간 전-배양했다. 다음에, 펩티드 기질(최종 농도 10μM)을 첨가하고, 그 플레이트를 30 분간 배양하였으며, 반응이 10, 30, 60 또는 90 분 이후에 평가되는 초기 선형성 연구 이후에 30분이 선택되었다. 30분의 시점이 선택되었다. 각각의 대조 웰은 효소 없이 모든 반응 시약을 함유했다. 생성된 7-AMC의 양은 각각 355 nm 및 460 nm 여기 및 방출 파장에서 형광 마이크로플레이트 리더(Victor2; Perkin-Elmer Life sciences)상에서 측정했다. 카스파제 활성을 50% 억제하는 이사틴의 농도(EC50)는 GraphPad Prism(Version 4.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA)을 이용하여 비선형 회귀 분석으로 평가했다. 모든 이사틴은 이중으로 분석하였고, 그 분석은 한번 반복하였다. 공지의 화합물 **13-16**은 참조 화합물로서 포함되었다. 얻어진 결과는 하기 표 1에서 나타낸다.

[0204] 데이터는 두 번의 진행에 대한 평균이고, 각 진행은 5 pM 내지 500 μM 범위의 9개 농도에서 이중으로 실시되었고, 각 효소를 50% 억제하는데 필요한 약물 농도(EC_{50})는 억제 프로필의 비선형 회귀 분석으로부터 얻었다.

[0205] **결과**. 본 연구에서, 카스파제 3 및 7에 대한 공지 화합물 **14**의 결합력은 각각 59.9 및 25.3 nM 이었다. 페닐 에테르 상의 플루오르 치환체는 높은 효능이 있었고, 신규 이사틴 **1**의 경우, 카스파제 3에 대한 결합력은 잘 알려진 플루오르화되지 않은 페닐 에테르 **14**와 비교하여 2배 내지 3배 증가했다. 이플루오르화 이사틴 **2** 및 **3**은 더욱 효능이 있었는데, 카스파제 3에 대한 결합력이 각각 12.4 및 10.4 nM 이었다. 테트라히드로피란 **4**의 경우에도 유사한 결합력이 확인되었다. 알려진 벤질 유도체 **15**와 비교하여 화합물 **4**의 효능(potency)의 5배 증가는 상기 고리가 완전히 포화된다는 것을 감안할 때 놀라운 것이다. 피리미딜 유도체 **5**에서와 같이 페닐 에테르를 피리미디닐기로 치환한 결과, 효능이 더욱 증가하였는데, 카스파제 3 및 7에 대한 결합력이 각각 5.5 및 2.3 nM 이었다. 분자의 어느 한 측에 2-플루오로에틸-1,2,3-트리아졸을 도입한 결과, 효능은 급격히 증가하였는데, 카스파제 3에 대한 트리아졸 **10** 및 **12**의 결합력은 각각 16.7 및 12.6 nM 이었다. 플루오로에틸트리아졸 **12**의 효능은 화합물 **1-3**의 효능과 유사하였는데, 이는 이러한 기의 크기가 상당이 작고 극성이 높다는 것을 고려할 때 놀라운 것이다. Lee[8]는 이사틴 질소 근처에서 친수성 포켓으로서 결합 도메인을 보고하였고, 대부분의 기는 이러한 위치에서 벤질 부분을 포함했었다. 따라서, 트리아졸 **10**이 공지의 벤질 유도체 **15** 보다 4배 더 효능이 있다는 것은 아주 예상치 못한 것이다. 시험한 화합물들 중에서, 트리아졸 **11**이 가장 높은 효능이 있었는데, 카스파제 3 및 7에 대한 결합력이 각각 0.5 및 2.5 nM 이었다. 시험한 모든 화합물들은 카스파제 1, 6 및 8에 대하여 불충분한 기질이었다(EC_{50} > 5000 nM).

[0206] **Log P 계산.** 지질친화성은 ACD/Chemsketch labs 소프트웨어를 이용하여 계산했다.

[0207] **결과.** 계산 결과는 하기 표 1 및 1a에 나타낸다.

[0208] <선택된 화합물들의 카스파제 억제 프로필 및 지질친화성(P)>

표 1

[0209]

화합물	R	R'		카스파제 EC_{50} (nM)[a]		cLog P[b]
			3	7	1/6/8	
1	3-플루오로페닐	4-플루오로페닐	17.0	13.5	>5000	3.80
2	2,4-디플루오로페닐	4-플루오로페닐	12.4	13.0	>5000	3.87
3	3,5-디플루오로페닐	4-플루오로페닐	10.4	16.8	>5000	3.94
4	4-테트라히드로피라닐	4-플루오로페닐	10.7	14.4	>5000	1.87
5	피리미딘-4-일	4-플루오로페닐	5.5	2.3	>5000	2.06
10	페닐	1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일	16.7	28.2	>5000	1.38

11	2,4-디플루오로페닐	1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일	0.5	2.2	>5000	1.55[c]
12	(1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메틸	4-플루오로페닐	12.6	18.3	>5000	1.55
13	페닐	페닐	41.8	29.4	>5000	3.65
14	페닐	4-아이오도페닐	59.9	25.3	>5000	4.68
15	페닐	4-플루오로페닐	50.5	19.8	>5000	3.70
22	4-플루오로페닐	4-플루오로페닐	26.1	8.0	>5000	3.83
25	2,4-디플루오로페닐	에티닐	50.1	60.4	>5000	2.42

[0210] [표 1a]

화합물	화합물 명		카스파제 EC_{50} (nM)[a]		cLog P[b]
		3	7	1/6/8	
16	1-(4-플루오로벤질)-5-(피롤리딘-1-설포닐)이사틴	199.5	78.6	>5000	1.93

[0211]

[0212] [a] *각각의 값은 각각의 농도에서의 두 측정치들의 평균이고;*

[0213] [b] *ACD Labs 소프트웨어를 이용하여 계산된 값;*

[0214] [c] *[^{18}F]**11**= 1.61에 대하여 측정된 Log P.*

[0215] **실시예 3: [^{18}F]11의 합성**

[0216] 바람직하게, 화합물 [^{18}F]**11**은 (*S*)-1-(2-프로피닐)-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 **25**)를 [^{18}F]플루오로에틸아지드 (화합물**27**)로 클릭-표지(click-labeling)하여 제조한다.[15,16] 도 2(i) 및 도 19에서 도시한 바와 같이, 2-[^{18}F]플루오로에틸아지드 (화합물 **27**)을 알킨 전구체인 (*S*)-1-(2-프로피닐)-5-(2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 **25**)와 구리 촉매화 고리화첨가반응시켜서 트리아졸인 (*S*)-1-((1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메틸)-5-(2(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴 (화합물 **11**)을 표지했다. 동일한 방법을 이용하여, 2-[^{18}F]플루오로에틸아지드 대신에 플루오로에틸아지드가 사용되는 비방사성표지(non-radiolabelled) 화합물 **11**을 제조할 수 있다.

[0217] 질소 분위기 하에서, 아스코르브산 나트륨(50 μl, 8.7 mg, 43.2 μmol)의 완충 용액(인산나트륨 완충액, pH 6.0, 250 mM)을, 황산구리(II)의 수용액(50 μl, 1.7 mg 5수화물, 7.0 μmol)을 함유하는 Wheaton 바이알(1 mL)에 첨가했다. 1 분 후, 디메틸포름아미드(25 μl)에 용해된 알킨 **25**(3.0 mg, 6.5 μmol)의 용액을 첨가한 다음, 아세토니트릴(100 μl)에 용해된 증류된 [^{18}F]FEA (185-740 MBq)를 첨가했다. 그 혼합물을 실온에서 30 분간 정치하고 물(15 μl)을 참가한 후 분취용 radio-HPLC에 가했다. 분리된 HPLC 생성물 용액을 물(5 mL)로 희석하고, 에탄올(5 mL) 및 물(10 mL)로 조절된 SepPak C18-light 카트리지(Waters) 상에 로딩했다. 다음에, 카트리지를 물(5 mL)로 플러시(flush)하고 [^{18}F]**9**를 에탄올을 이용하여 작은 분획(0.1 mL)으로 용리시켰다. 그 생성물 분획을 PBS로 희석하여 10-15% (v/v)의 에탄올 함량을 얻었다.

[0218] **결과.** 화합물 **27**을 알킨 전구체 **25**와 결합시키기 위해 초기에 시도한 결과, 방사성 생성물들의 복합 혼합물이 형성되었다. 방사화학 수율에 대한 촉매계, 온도 및 pH의 영향을 조사한 결과, [^{18}F]**9**의 열적 안정성은 불충분하고, 실온에서 최대 수율이 얻어진 것으로 확인되었다. 반응 혼합물에 인산나트륨 버퍼(pH 6.0, 250 mM)를 첨가한 결과, 방사화학 수율이 유의적으로 개선된 반면에, 조사된 두 촉매계(구리 분말 또는 황산구리/아스코르브산염)의 경우에는 작은 차이만이 관찰되었다. 최적의 조건은 알킨 전구체 **25**에 대하여 약간 과량의 황산 구리의

존재하에 실온에서 30분의 반응시간인 것으로 확인되었다. 이는 65 ± 6% (n = 26, 화합물 **27**로부터 붕괴 보정됨(decay-corrected))의 분리된 방사화학(radiochemical) 수율로 트리아졸 [^{18}F]**11**을 제공하였는데, HPLC에 의한 정제 후 방사화학 순도는 >99%였다. 생성 혼합물에 대한 대표적인 HPLC 크로마토그램이 도 3에 도시되어 있다. 상기 과정은 낮은 방사성 수준을 이용하여 수동으로 수행하였기 때문에, 합성의 종료시 높지 않은 특히 활성(1.2 GBq/mmol)이 얻어졌다. 비방사성 기준 화합물과 함께 용리시켜 [^{18}F]**11**을 확인했다. 정제된 [^{18}F]**11을** 91 ± 6 % (n = 26, 붕괴 보정(decay-corrected))의 효율로 고상 추출하여 포뮬레이션했다. [^{18}F]**11**의 포뮬레이션(formulation)을 포함한 방사합성에는 전체 3 시간이 소요되었다.

[0219] **실시예 4: [^{18}F]11의 지질친화성**

[0220] **Log P 측정.** Barthel 등의 방법[18]을 이용하여 옥탄올-물 분배계수를 측정하여 지질친화성을 평가했다. 간략히 말해서, [^{18}F]**11** (25 μL 에탄올에서 ~180 μCi)을 물을 이용하여 100 μL의 최종 체적으로 희석하여 스톡 용액(stock solution)을 얻었다. 분취량의 스톡 용액(10 μL)을 물 (490 μL) 및 옥탄-1-올(Aldrich 무수 등급)(500 μL)에 첨가했다. 다음에, 그 용액을 10 분간 강하게 교반한 다음, 원심분리(13201 g, 20 ℃, 30 분)했다. 원심분리 후, 물 및 옥탄올 층의 부분(200 μL)을 조심스럽게 제거하고 Cobra II Auto-Gamma 카운터(Packard Instruments, Meriden, CT, USA)상에서 분석하고 비교했다. 방사능을 함유하는 옥탄올을 방사능을 함유하는 물로 나누어 옥탄올-물 분배 계수를 얻었다. 상기 표 1의 각주 c에서 나타낸 바와 같이 Log P는 1.61로 측정되었다.

[0221] **실시예 5: [^{18}F]11 및 [^{125}I]14의 조직 분포 및 대사 안전성**

[0222] 혈장 및 간에서 신규 화합물 [^{18}F]**11** 및 공지 화합물 [^{125}I]**14**의 안정성을, 마우스에 투여 후 시간에 따라 측정했다. [^{18}F]**11**은 종양 함유 마우스에게 정맥 내로 주사했고 그 조직 분포를 주사 후 2, 15 및 60 분에서 선택된 조직에서 측정했다. [^{125}I]**14**는 종양이 없는 마우스에 정맥 내로 주사하고, 그 조직 분포를 주사 후 2 내지 60 분의 선택된 시점에서 측정했다. 또한, 방사성추적자의 생체 내 대사 안정성을 혈장 및 간 시료에서 측정하였고, [^{18}F]**11**의 경우 소변 시료에서 측정했다.

[0223] **시험관 내 마우스 간의 S9 대사 연구.** Aboagye 등[19]에서 기재된 바와 같이 간의 S9 대사 연구를 수행했다. 마우스의 간을 신속하게 절제하고 실험 동안 4 ℃에서 유지했다. 조직을 칭량하고 Ultra-Thurrax 파쇄기(IKA, Staufen, Germany)를 이용하여 동일 체적의 50 mM Tris-150 mM KCl-HCl 버퍼(pH 7.4)에서 파쇄했다. S9 분획을 얻기 위하여, 균질물을 30분간 원심분리((10,000 x g)하여 핵, 미토콘드리아 및 세포 찌꺼기(cell debris)를 제거했다. S9 분획의 단백질 농도는 상업적인 BCA 단백질 분석 키트(Perbio Science, Cheshire, UK)를 이용하여 측정했다. S9 분획을 -80 ℃에서 6 주까지 보관했다. 선택된 표지되지 않은 이사틴 **14**, **15**, **16** (10 mM, 10 μL)을 S9 분획(33.26 mg/ml, 20 μL) 및 0.5 mM 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트(농축 형태)와 함께 공기중에서 60 분간 37 ℃로 0.1 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)에서 1 mL의 전체 체적으로 배양했다. 대조 배양 시료는 이사틴을 함유하지 않았다. 얼음 냉각 아세토니트릴(2 mL)을 첨가하여 반응을 종결한 다음, 그 시료를 추출 및 HPLC 분석 전에 건조한 얼음 위에 즉시 위치시켰다.

[0224] **생체 내 분포 및 대사 연구.** 방사선으로 유도한 쥐의 섬유육종(RIF-1) 종양 세포[20]를, 5% CO_2의 습기 있는 인큐베이터에서 37 ℃로, 10% 우태혈청(BioWhittaker Europe Ltd, Verviers, Belgium), 2mM L-글루타민, 100 U/mL 페니실린, 100 μg/mL 스트렙토마이신 및 0.25 μg/mL fungizone(Gibco, UK)이 첨가된 RPMI 1640 배지(Invitrogen Ltd, Paisley, UK)에서 유지했다. 모든 동물 연구는 영국의 "동물 수술(과학적 과정)의 1986년 법의 가이던스(HMSO, London, United Kingdom, 1990)"에 따라 실험 신생물에서 동물 보호에 대한 정부 법령 및 가이드라인을 완전히 준수하면서 면허 있는 연구원들에 의해 수행되었다[21]. 수컷 C3H/hej 마우스(Harlan, Bicester, Oxfordshire, UK)의 등 부위에 $5x10^5$ 세포를 피하주사하여 종양을 만들었다. 전자 캘리퍼스를 이용하여 종양 성장을 2일 간격으로 확인하였고, 다음 식 ($\pi/6$) x L x W x D (L=길이, W=폭 및 D=깊이)를 이용하여 종양 체적을 평가했다. 종양이 약 100-150 mm^3에 도달시 [^{18}F]**11**의 생체 분포 연구를 위해 동물을 선택했고, [^{125}I]**14**의 생체분포는 종양이 없는 마우스에서 실시했다.

[0225] 인산염 완충 식염수에 용해된 0.08-0.13 mL의 방사능(약 0.37 MBq의 [^{125}I]**14** 또는 3.7 MBq의 [^{18}F]**11**)을 마우스에 측정맥을 통해 정맥 내 주사했다. 주사 후 선택된 시기(2-60 분)에, 일반적인 마취(이소플루오란 흡입)하에서 심장 천자를 통해 방혈(exsanguination)시켜 마우스를 희생시켰다. 분취량의 헤파린화 혈액을 신속히 원심분리(2000 g, 5 분)하여 혈장을 얻었다. 조직에 함유된 방사능을 Cobra II Auto-Gamma 카운터(Packard Instruments, Meriden, CT, USA) 상에서 감마 카운팅으로 측정하고 조직의 g에 대한 주사량의 백분율(%ID/g)로 나타냈다. 각 시점마다 최소 3마리의 마우스를 사용했다. 모든 동물들은 처리의 경험이 없었다.

[0226] 또한, C3H/hej 마우스에서 생체 내 대사 연구를 수행했다. 종양이 없는 마우스에게 0.37 MBq 의 [^{125}I]**14** 또는 7.4 MBq의 [^{18}F]**11**를 정맥 내 주사하고 혈장을 위에서 기재한 바와 같이 얻었다. 혈장, 간 및 소변을 액체 질소에 동결시키고 분석전에 건조 얼음 상의 미리 칭량된 섬광 계수 튜브에서 유지했다.

[0227] **HPLC 분석.** 추출 바로 전에, 시료를 해동하고 얼음 위에 놓았다. 추출을 위해, 얼음 냉각 아세토니트릴(1.5 mL)을 혈장(0.2 mL)에 첨가하고; 아세토니트릴을 함유하는 S9 배양 시료(3 mL)를 분석했다. 각 혼합물을 원심분리(15493 x *g*, 4 ℃, 3 분)하고, 얻어지는 상등액을 회전증발기를 이용하여 40 ℃에서 진공 하에 건조상태까지 증발시켰다. 간을 IKA Ultra-Turrax T-25 파쇄기를 이용하여 얼음 냉각 아세토니트릴(1.5 mL)로 파쇄한 다음 원심분리했다. 그 잔류물을 HPLC 이동상(1.2 mL)에 재현탁하고 Minisart 친수성 주사기 필터(0.2 mm)(Sartorius, Goettingen, Germany)를 통해 여과했다. 소변 시료는 HPLC 이동상으로 희석하여, 위와 같이 여과했다. 다음에, 상기 시료(1 mL)를, g-RAM Model 3 감마-검출기 및 Laura 소프트웨어(IN/US Systems inc., Florida, USA)를 구비한 Agilent 1100 시리즈 HPLC 시스템(Agilent Technologies, Stockport, UK)에서 radio-HPLC로 분석했다.

[0228] 정지상은 Waters mBondapak C_{18} 역상 칼럼(300 x 7.8 mm)으로 구성하였다. [^{125}I]**14**의 분석을 위하여, 혈장 및 간 시료를 위와 같이 처리하고, 2 mL/min의 유속으로 등용매조성법(isocratic mode)으로 진행하는 물(0.1 % TFA)/프로판-1-올 (0.1 % TFA)(35:65)로 구성된 이동상을 이용하여 분석했다. 시험관 내 대사 후 비표지된 화합물 **14**, **15** 및 **16**의 분석을 위하여, 3 mL/min의 유속으로 11 분내 2→80% 유기상, 3 분내 80→5% 유기상, 다음에 6 분 동안 5% 유기상의 구배로 물(0.1 % TFA)/프로판-1-올(0.1 % TFA)로 이루어진 이동상을 이용하여 시료를 분석했다. [^{18}F]**9**의 분석을 위하여, 3 mL/min의 유속으로 1 분간 50% 유기상, 14 분간 50→90% 유기상, 2 분내 90→50% 유기상, 4 분간 50% 유기상의 구배로 0.1M 포름산암모늄/1.8:1 메탄올:아세토니트릴로 이루어진 이동상을 이용하여 혈장, 간 및 소변 시료를 분석했다. 또한, HPLC 주입물(injectate)에 남아있는 것에 대한 추출 후 혈장 및 간 펠릿과 관련 있는 [^{18}F]**9**-유래 방사능의 분율을 평가하기 위하여, HPLC 주입물의 전체 체적을 기록하고 분취량(0.1 mL)을 카운팅을 위해 제거했다. 다음에, 0.1 mL 분취량에서의 방사능 및 펠릿을 감마 카운팅(Packard Instruments)으로 분석했다.

[0229] **결과**. 도 4는 [^{18}F]**11**이 조직으로 신속히 분포하였고 신속히 배설되었음을 도시한다. [^{18}F]**11**-유래 방사능이 고도로 편재된 것이 신장, 소변 및 간에서 확인되어, 배설을 위해 신장 및 간 모두가 중요하다는 것을 알 수 있었다. 그러나, 이러한 조직에서도 방사능의 신속한 배설이 확인되었다. 중요한 것은 영상의 관점에서, 처리하지 않는 종양, 심장 및 뇌에서의 [^{18}F]**11**의 흡수가 낮았다는 것인데, 이는 이러한 조직에서 카스파제 활성화와 관련된 증가된 결합의 측정을 용이하게 한다. 골 흡수는 낮았기 때문에, 방사성추적자의 탈플루오르화가 없었고 따라서 플루오로에틸아지드 부분이 안정했다는 것을 알 수 있었다. Radio-HPLC 분석 결과, [^{18}F]**11**은 혈장 및 간에서 단일 극성 대사산물 피크를 생성하는 [^{125}I]**14** (도 5)와 비교하여 대사 분해에 대하여 비교적 더욱 안정한 것으로 확인되었다. 이러한 모화합물(parent compound)은 혈장에서 60 분에서도 존재하였고 우세한 피크였다. 이와 대조로, 대사산물은 연구된 모든 시점에서 간 시료에서 우세한 피크였다. 소변의 방사능은 주로 대사산물로 이루어졌다. 외관상 추출 효율과 함께, 선택된 시점에서 혈장 및 간에서 모 방사성추적자(parent radiotracer)의 비율이 하기 표 2에서 요약되어 있다. 급격한 감소 후, 생체 내 대사속도는 15 분 및 60 분의 사이에서 평탄역(plateau)에 도달하는 것으로 보였다. 그러나, 혈장 및 간으로부터의 추출 효율은 아마도 비특이적 결합으로 인해 시간에 따라 감소했다. 또한, 혈장 추출 후 잔류 펠릿에는 방사능의 시간 의존적인 증가가 있었기 때문에, 혈장 단백질에 대한 결합이 증가했다는 것을 알 수 있다.

[0230] <혈장 및 간 추출물에 존재하는 [^{18}F]**11**의 비율을 보여주는 선택된 시점에서의 [^{18}F]**11**의 생체내 대사[추출물들

은 radio-HPLC로 분석하였다. 시료로부터 방사성 분석물의 추출 효율이 아래에 기재되어 있다.]>

표 2

[0231]

시간 (분)	모체 (혈장)[a]	회수 (혈장)[a]	모체 (간)	회수 (간)
2	86.1 ± 3.7	92.1 ± 3.4	35.7/43.4	79.7/86.9
15	61.3 ± 5.9	76.8 ± 5.2	9.7/10.2	67.1/68.9
60	64.8 ± 7.0	50.9 ± 3.7	27.0/29.7	46.4/65.2

[0232] [a]*시점당 3개 결과의 평균. 간의 경우 두 시료로부터의 각각의 결과가 기록됨. 값들은 HPLC 분석에서 존재하는 모화합물 [^{18}F]**9**의 상대적 비율 또는 조직 시료로부터 추출한 방사능의 총량에 대한 백분율로 표시됨.*

[0233] 도 7은 [^{125}I]**14**가 주요 장기에 신속히 분포되고 신속히 배설된다는 것을 도시한다. [^{125}I]**14**는 10분 이내에 혈장으로부터 완전히 배설되었고 이러한 시점에서 간에서 검출된 방사능의 < 15% (n = 3)에 해당했다. 주사 후 30분 이내에, 모화합물 [^{125}I]**14**는 간에서 완전히 대사되었는데, 단일의 극성 대사산물이 검출된 방사능의 대부분을 구성했다. 이러한 확인과 일치하는 것으로, 본 발명자들은 조사된 모든 조직에서 신속히 배설되었으며, 10분 후부터, 주입된 방사능의 대부분이 소변으로 배설된 것을 관찰했다.

[0234] 도 8에서 도시한 바와 같이, 알려진 표지되지 않은 이사틴 **14** 및 **15**의 대사 프로필은 유사하였는데, 60분 배양 후 거의 완전한 분해가 관찰되었다.

[0235] **실시예 6: 4 개의 암세포주에서 [^{18}F]11의 흡수**

[0236] **세포주 및 종양 모델.** 인간 난소암 세포주 PEO1/4를 Wolf C.R. 등[22] 및 Langdon S.P. 등[23]에서 기재된 바와 같이 수립 및 특성화했다. 간략히 말해서, 재발성 점액성 난소암(recurrent mucinous ovarian adenocarcinoma)이 있는 환자에서 시스플라틴 화학요법에 대한 임상적 내성의 개시 전(PEO1) 및 후(PEO4)에, 상기 환자의 악성 복수로부터 PEO1/4 세포를 얻었다. 방사선에 의해 유발된 쥐의 섬유육종(RIF-1) 종양 세포주는 Twentyman P.R. 등[20]에 의해 처음으로 특성화되었다. Kozaki K. 등[24]에서 기재된 바와 같이, LNM35 종양 세포는 인간 거대 폐암 NCI-H460 세포주의 고도로 임파성의 전이성 아세포주(lymphogenous metastatic subline)이다. 모든 세포주는 5% CO2의 습기 있는 인큐베이터에서 37 ℃로 10% 우태혈청(BioWhittaker Europe Ltd, Verviers, Belgium), 2mM L-글루타민, 100U/mL 페니실린, 100㎍/mL 스트렙토마이신 및 0.25㎍/mL fungizone (Gibco, UK)이 첨가된 RPMI 1640 배지(Invitrogen Ltd, Paisley, UK)에서 통상적으로 유지했다.

[0237] 6-8 주령의 암컷 nu/nu-BALB/c 또는 수컷 C3H/hej 마우스(Harlan, Bicester, Oxfordshire, UK)의 등 부위에 PEO1/4 ($10x10^6$ 세포, v/v matrigel과 함께, BD Biosciences, Oxford, UK), RIF-1 ($5x10^5$ 세포) 및 LNM35 ($1x10^6$ 세포)를 피하주사하여 생체 내 종양 모델을 수립했다. 전자 캘리퍼스를 이용하여 종양 성장을 2일 간격으로 확인하였고, 다음 식 ($\pi/6$)x L x W x D (L=길이, W=폭 및 D=깊이)를 이용하여 종양 체적을 평가했다. 모든 동물 연구는 영국의 "동물 수술(과학적 과정)의 1986년 법의 가이던스(HMSO, London, United Kingdom, 1990)"에 따라 실험 신생물에서 동물 보호에 대한 정부 법령 및 가이드라인을 완전히 준수하면서 면허 있는 연구원들에 의해 수행되었다.

[0238] **시험관 내 [^{18}F]11 흡수 및 카스파제 3 활성화 분석.** 실험하기 2 또는 3일 전에 세포를 12-웰 플레이트에 삼중으로 도말하고, 항신생물성 백금 유래 약물인 Cisplatin, 5-FU, 단백질 합성 억제제인 시클로헥시미드(CHX) 또는 토포이소머라제 억제제인 에토포시드(VP-16)(Sigma, UK) 또는 해당하는 비히클로 지정된 농도 및 시간 동안 처리했다. 실험일에, 웰당 약 10 μCi의 of [^{18}F]**11**을 첨가하고 37 ℃에서 60 분간 세포 내로 축적시켰다. 세포를 수집하고, 세척하고 400 μL PBS에 현탁했다. 260 μL의 각 시료를 계수 튜브에 옮기고, Packard Cobra II 감마 카운터(Perkin Elmer, UK)를 이용하여 플루오르-18 방사능을 즉시 측정했다. 40 μL의 각 시료를 이용하여 제조자(Caspase-Glo 3/7 assay, Promega, UK)의 지시에 따라 비색 카스파제 3 활성화 분석을 수행했다. 간략히 말해서, 세포를 백색의 불투명한 96-웰 플레이트에 옮기고 50 μL caspase-Glo 시약과 함께 30 분 내지 3 시간 동안 배양하고, Multiskan Luminometer(Thermo Electron, UK)를 이용하여 카스파제 3의 효소 활성을 측정했다.

모든 시료에 대하여 BCA 단백질 분석(Pierce, UK)을 수행하고, 데이터를 표준화하여 단백질 mg 당 CCPMA 또는 RLU(Relative Light Unit)로 나타냈다.

[0239] **생체 내 [^{18}F]11 생체분포 및 PET 영상화.** 생체분포 연구를 위하여, 종양 함유 마우스를 10mg/kg 시스플라틴 또는 비히클로 24 시간 동안 처리하고, 이소플루오란/O_2/N_2O로 마취시키고, 약 100 μCi의 [^{18}F]11을 지정된 시간 동안 측미정맥에 정맥 내 주사했다. 상이한 조직을 제거하고, 칭량하고 계수 튜브에 위치시켜서 즉시 플루오르-18 방사능을 계수했다.

[0240] 시스플라틴(10mg/kg, 24 시간) 또는 비히클로 처리한 마우스를 헌납된 작은 동물용 PET 스캐너(quad-HIDAC; Oxford Positron Systems, Weston-on-the-Green, United Kingdom)에서 스캐닝했다. 마취된 동물을 자동온도 조절된 베드(bed)에 위치시키고 스캐너 내에 엎드리게 위치시켰다. 베드를 측정하여 약 37 ℃의 마우스 직장 온도를 얻었다. [^{18}F]11 (약 100 μCi)의 볼러스(bolus)를 꼬리정맥 캐뉼라를 통해 정맥 내 주사하고 스캐닝을 개시했다. 동적 방출 스캔을 60 분에 걸쳐서 리스트-모드 포맷(list-mode format) 방식으로 획득했다. 다음에, 획득한 데이터를 영상 재구성을 위해 0.5-mm 시노그램 빈(sinogram bin) 및 19개 프레임(0.5 x 0.5 x 0.5 mm 복셀; 4 x 15, 4 x 60, 및 11 x 300 초)에 저장하였는데, 영상 재구성은 이차원 Hamming 필터(컷오프 0.6)를 이용하여 여과 역투영(filtered back projection)으로 실시했다. 얻어진 영상 데이터 세트를 SUN 워크스테이션(Ultra 10; SUN Microsystems, Santa Clara, CA)에 옮기고 Analyze 소프트웨어(version 6.0; Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN)를 이용하여 시각화했다. 주사 후 0 내지 1 분 및 30 분 내지 60 분으로 이루어진 동적 데이터의 누적 영상을 이용하여 방사성추적자의 흡수를 시각화하고 관련 영역(ROI)을 정의했다. 19개 포인트의 각각에서 각 ROI 마다 카운트 밀도(count density)를 평균하여 ROI에 대한 시간대 방사성 곡선(TAC)을 얻었다. 각 시점에서 종양의 TAC를 심장에 대하여 표준화하여 표준화된 흡수값(NUV)을 얻었다. 근육에서 얻은 [^{18}F]9 데이터를 종양 데이터를 표준화하기 위한 내부 입력 함수로 사용했다. 주사 후 60 분에서의 NUV(NUV60), 0 내지 60 분 동안 NUV의 적분으로 계산된 NUV 곡선 아래의 면적(AUC), 2.5 분에서의 방사능에 대한 60 분에서의 방사성추적자의 분수적 체류(FRT)를 비교를 위해 사용했다. FRT는 유지되는 종양으로 전달된 방사성추적자의 비율을 나타내는 유용한 변수이다. 따라서, 전달을 위한 종양 [^{18}F]9 흡수를 표준화한다.

[0241] **결과.** 도 9에서 도시한 바와 같이, 약물로 처리한 모든 세포는 예상된 바와 같이 시스플라틴 내성 난소암 세포(PEO4)를 제외하고 대조군(비히클로 처리됨)과 비교하여 [^{18}F]11 흡수의 증가를 나타낸다. 또한, 약물로 처리한 LNM35 세포에의 [^{18}F]9 흡수의 증가는 세포에서 활성 카스파제-3의 양과 관련이 있고 CDDP 처리와 VP-16 처리 사이의 대립(antagonism)을 입증했다.

[0242] 하기 표 3은 PEO1 이종이식을 갖는 CDDP 처리 마우스의 종양 내로 [^{18}F]11 흡수가 유의적으로 증가한 것을 나타내는 반면에, CDDP-내성 PEO4 종양은 대조군과 처리군 사이에 흡수의 차이를 나타내지 않는다. 다른 조직에서의 [^{18}F]11 흡수는 PEO1 종양을 갖는 마우스의 비장 및 근육을 제외하고 대조군과 처리군 사이에 유의적인 차이가 없다.

[0243] <PEO1, PEO4 또는 RIF-1 이종 이식을 갖는 대조군 및 CDDP 처리 마우스에서 [^{18}F]11의 60 분 생체분포. * Student's *t*-test, $p<0.005$.>

표 3

[0244]

		PEO1	PEO4	RIF-1
폐	대조군	4.25 ± 0.57	3.31 ± 0.83	4.47 ± 1.00
	CDDP	4.90 ± 1.05	4.73 ± 1.78	3.23 ± 0.43
간	대조군	9.98 ± 2.51	6.71 ± 1.56	11.36 ± 2.39
	DDP	8.20 ± 2.09	8.22 ± 2.89	10.58 ± 4.64
비장	대조군	1.19 ± 0.26	1.26 ± 0.45	1.85 ± 0.19
	DDP	1.65 ± 0.22 *	1.81 ± 0.80	1.85 ± 0.76
소장	대조군	4.27 ± 0.78	10.37 ± 10.58	14.93 ± 12.68
	DDP	9.09 ± 5.82	10.43 ± 14.36	11.08 ± 6.00
대장	대조군	1.81 ± 0.37	2.40 ± 1.88	2.66 ± 0.67
	DDP	3.24 ± 1.81	2.89 ± 0.93	2.88 ± 1.52

신장	대조군	6.59 ± 1.94	8.04 ± 4.24	8.49 ± 2.00
	DDP	8.53 ± 3.64	7.96.± 3.34	5.50 ± 2.59
근육	대조군	0.98 ± 0.14	0.88 ± 0.36	1.76 ± 1.33
	DDP	1.34 ± 0.28 *	1.13 ± 0.22	1.09 ± 0.54
뼈	대조군	0.64 ± 0.09	1.12 ± 0.47	1.06 ± 0.49
	DDP	1.51 ± 1.02	1.44 ± 0.66	1.78 ± 1.72
종양	대조군	1.37 ± 0.25	1.66 ± 0.41	0.96 ± 0.10
	DDP	2.96 ± 1.25 *	2.15 ± 0.79	1.31 ± 1.04

[0245] PEO1, PEO4 및 RIF-1 이종이식을 갖는 세 마리의 CDDP-처리 마우스의 PET 영상(도 10)은 종양에서의 [^{18}F]**11**의 유의적인 흡수를 나타냈다.

[0246] 하기의 문헌들은 모두 본원에 참조로 인용된다.

[0247] **실시예 7: 세포자멸사 세포 내로 [^{18}F]11의 흡수**

[0248] RIF-1 세포를 비히클(0.1% DMSO) 또는 시스-디아민디클로로플래티넘(ii) (시스플라틴)(CDDP)(100 μM)로 48 시간동안 처리했다. 다음에, 그 세포를 [^{18}F]**11**과 함께 1 사간 동안 배양하고, 세척하고 방사능에 대해 분석했다. 도 13에 도시한 바와 같이, 세포 분석 결과는 세포자멸사 세포에서의 [^{18}F]**11**의 흡수가 약 1.5 배 증가하였음을 나타냈다. 데이터는 붕괴-보정 카운트(decay-corrected count)/평균 분/전체 세포 단백질의 mg으로 나타낸다. 데이터는 삼중으로 작성된 평균 ± SEM 이다.

[0249] RIF-1 종양을 비히클(50% DMSO) 또는 CDDP(10 mg/kg 단일 투여량)로 처리했다. 방사성추적자 주사 후 60분에서의 [^{18}F]-유래 방사능을 분석하여 혈액의 방사능에 대한 비로서 나타냈다. 도 14에 도시한 바와 같이, RIF-1 종양을 갖는 마우스의 생체 내 흡수 연구 결과, 약물 처리 마우스가 비히클 처리 마우스와 비교하여 [^{18}F]**11**의 흡수에서 약 1.5배 증가를 나타냈다. 데이터는 평균 ±SEM 이고, n = 그룹당 8 마리 마우스이다.

[0250] **실시예 8: 세포자멸사 영상 추적자로서 [^{18}F]11의 기능성**

[0251] 6-8 주령의 수컷 C3H/hej 마우스(Harlan, Bicester, Oxfordshire, UK)의 등부위에 38C13 쥐 임파종 세포(5000개 세포)를 피하 주사하여 종양 세포자멸사의 생체 내 실험 모델을 수립했다. 이종이식이 약 100mm^{3}에 도달할 때, 마우스를 시클로포스파미드(CPA, 100mg/kg) 또는 비히클로 24 시간 동안 처리한 다음, 헌납 작은 동물용 PET 스캐너(Siemens Inveon PET module)에서 스캐닝했다. 마취된 동물을 자동온도 조절된 베드에 위치시키고 스캐너 내에 엎드리게 위치시켰다. [^{18}F]**11** (약 100 μCi)의 볼러스를 꼬리 정맥 캐뉼라를 통해 정맥 내 주사하고 스캐닝을 개시했다.

[0252] 동적 방출 스캔을 60 분에 걸쳐서 리스트-모드 포맷(list-mode format) 방식으로 획득했다. 다음에, 획득한 데이터를 영상 재구성을 위해 0.5-mm 시노그램 빈(sinogram bin) 및 19개 프레임에 저장하였는데, 영상 재구성은 여과 역투영(filtered back projection)으로 실시했다. 얻어진 영상 데이터 세트를 Siemens Inveon Research Workplace를 이용하여 시각화했다. 동적 데이터의 누적 영상을 이용하여 방사성추적자의 흡수를 시각화하고 관련 영역(ROI)을 정의했다. 19개 포인트의 각각에서 각 ROI마다 카운트 밀도(count density)를 평균하여 ROI에 대한 시간대 방사성 곡선(TAC)을 얻었다(도 15 참조).

[0253] 각 시점에서 종양의 TAC를 전신(whole body)에 대하여 표준화하여 표준화된 흡수값(NUV)을 얻었다. 주사 후 60분에서의 NUV(NUV60), 및 0 내지 60 분 동안 NUV의 적분으로 계산된 NUV 곡선 아래의 면적(AUC)을 비교를 위해 사용했다(도 16 참조).

[0254] 스캐닝 후, 상이한 조직을 제거하고, 칭량하고 튜브에 위치시켜서 즉시 플루오르-18 방사능을 계수하여 [^{18}F]**11** 생체분포를 평가했다(하기 표 4 참조).

[0255] 비히클 또는 시클로포스포라미드로 처리한 두 마리의 38C13 이종이식-함유 마우스의 대표적인 OSEM3D 재구성 [^{18}F]**11** PET 영상이 도 17에서 도시되어 있는데, 도 17에서의 원은 종양을 나타낸다.

[0256] 하기 표 4의 생체분포 결과는, PET 영상 파라미터, 종양의 TAC, NUV_{60} 및 AUC로부터 발생된 반정량적인 데이터로 확인한 바와 같이(도 15 및 도 16 참조), 비히클과 비교하여 CPA-처리 마우스의 종양에서의 [^{18}F]**11**의 흡수가 유의적으로 2배 증가하였음을 나타낸다. 따라서, 도 15 내지 도 17 및 표 4에서 나타낸 생체분포 및 PET 스캔 데이터는 생체 내에서 종양 세포자멸사를 검출하기 위한 [^{18}F]**11**의 효능을 입증하고 종양에 대한 카스파제-3 특이적 PET 영상화제의 유용성을 최초로 설명하는 것이다.

[0257] <비히클과 비교한 CPA-처리 마우스의 종양에서 [^{18}F]**11**의 생체분포>

표 4

[0258]

a.	%ID 종양/혈액 비	
	비히클	CPA
혈장	1.98 ± 0.23	1.90 ± 0.09
혈액	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
심장	1.31 ± 0.10	1.43 ± 0.16
폐	4.27 ± 0.13	5.49 ± 0.66
간	10.60 ± 0.75	14.17 ± 1.55
비장	2.30 ± 0.38	1.81 ± 0.37
위	1.95 ± 0.00	1.62 ± 0.19
소장	291.61 ± 28.68	83.12 ± 70.19
대장	6.07 ± 0.62	2.78 ± 0.64
배설물	13.28 ± 2.37	8.46 ± 0.91
신장	7.21 ± 0.33	7.23 ± 0.47
근육	1.22 ± 0.07	1.20 ± 0.07
뼈	0.87 ± 0.10	0.93 ± 0.07
종양	0.83 ± 0.10	1.24 ± 0.11
뇌	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.03
소변	116.71 ± 19.47	43.64 ± 12.24

[0259] **실시예 9: 화합물 11의 세포 활성**

[0260] 효소 분석을 이용하여 화합물 **11**의 세포 활성을 평가하고 화합물 **14**와 비교했다.

[0261] 방사선에 의해 유도된 쥐의 섬유육종 RIF-1 세포를 카스파제 억제제인 z-VAD-fmk (100 μM), 화합물 **11** 및 화합물 **14**로 15 분간 처리한 다음, 시스플라틴(100 μM)을 이용하여 48 시간 동안 세포자멸사를 유도했다. △-PARP 면역 블럿 밴드는 카스파제 3의 분열로부터 얻어지는 PARP의 내인성 89kDa 거대 단편에 해당한다. α-튜블린을 로딩 대조군으로 사용했다.

[0262] 도 18에 도시한 바와 같이, RIF-1 세포를 화합물 **14**가 아닌 화합물 **11**과 함께 전-배양한 결과, 시스플라틴-유도 세포자멸사에 의한 카스파제-3 동족 표적 PARP의 유도가 중단되어, 화합물 **11**에 의한 카스파제-3의 세포 불활성화가 입증되었다.

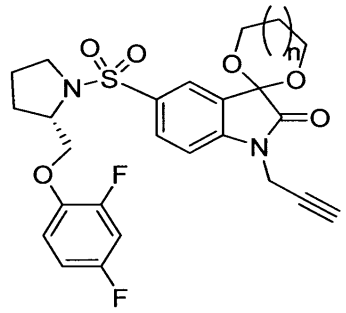
[0263] 약물-유도 세포자멸사의 조건하에서 화합물 **11**의 결합을 더욱 확인하기 위하여, 본 발명자들은 상기 실시예 6에 기재되고 도 9에서 도시된 바와 같이, LNM35, RIF-1 및 PEO1/4 암세포에의 방사성 표지 [^{18}F]**11**의 흡수를 평가했다. 모든 약물-처리 세포는 예상한 바와 같이 시스플라틴-내성 암세포(PEO4)를 제외하고, 대조군과 비교하여 [^{18}F]**11** 흡수의 유의적인 증가를 나타냈다. 또한, 약물 처리 LNM35 세포에서의 [^{18}F]**11** 흡수의 증가는 Caspase-Glo 분석을 이용한 세포 활성 카스파제-3의 양과 관련이 있었다.

[0264] **실시예 10: 보호된 전구체를 이용한 [^{18}F]11의 합성**

[0265] 이사틴 방사리간드인 [^{18}F]**11**은 도 2(i), 도 19 및 실시예 3에서 기재한 바와 같이 2-단계 과정을 이용하여 합성할 수 있다. 이러한 방사합성의 단점은 안정한 불순물이 존재하여, 얻어진 생성물(1-4 Ci/μmol)의 특히 활성을 감소시킨다는 것이다. 더욱 구체적으로, 안정한 불순물이 임상적용에는 너무 큰 값인 실질적인 질량(5-10 μg/mL)으로 존재한다. 불순물을 특성화하여 독성 시험을 수행하기 위한 시도는 차가운 플루오르-19 트리아졸 화합

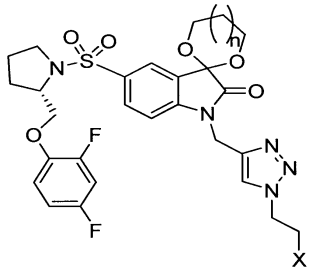
물이 아닌 안정한 불순물이 이사틴에 근거한다는 것을 확인시키기보다는 설득력이 없는 것으로 입증되었다.

[0266] HPLC 분석 결과, 불순물은 방사합성 동안의 부분의 결과이고, 알킨 전구체에 존재하는 물질이 아닌 것으로 확인되었다. 이사틴의 분자 구조를 조사한 결과, 높은 화학적 반응성의 두 개의 부위, 즉 전술한 클릭 고리화참가반응에서 사용된 말단 알킨, 및 카스파제-3 활성 부위에의 결합에 필요한 C-3 카르보닐 위치가 확인되었다. C-3 카르보닐 위치에 대한 보호기 방법이 조사되었는데, 특히 n = 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고 x = 이탈기, 예를 들어 메실레이트, 토실레이트, 노실레이트 또는 다른 설포네이트 에스테르 또는 할라이드인 하기 화학식 38 및 43에서 도시한 바와 같이, 아세탈 디옥솔란으로서 상기 C-3 카르보닐 위치의 보호를 조사했다.



38

[0267]



43

[0268]

[0269] 보호된 알킨인 (*S*)-1-{[1'-[1-(2-프로피닐)]-(1'2'-디히드로-2'-옥소스피로(1,3-디옥산-2,3'-[3H]인돌)-5'-설포닐}-2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘 (화합물 **39**), 및 보호된 트리아졸 (화합물 **40**)을 도 20에서 도시한 바와 같이 합성했다.

[0270] 일반적인 실험 사항은 상기 실시예의 시작부 및 Smith 등[29]에서 기재되었다. 모든 반응은 아르곤의 분위기 하에서 수행하였다.

[0271] (*S*)-1-{[1'-[1-(2-프로피닐)]-(1'2'-디히드로-2'-옥소스피로(1,3-디옥산-2,3'-[3H]인돌)-5'-설포닐}-2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘 (화합물 **39**)은 하기의 방법에 따라 제조했다. 무수 톨루엔(6 mL)에 용해된 화합물 **25**(92 mg, 0.2 mmol)의 용액에 1,3-프로판디올(0.3 mL) 및 4-톨루엔설폰산(10 mg, 0.005 mmol)를 첨가했다. 다음에, 그 용액을 24 시간 동안 환류시키면서 형성되는 물을 공비증류로 제거했다. 다음에, 그 반응 혼합물을 상온까지 냉각시키고, 대부분의 용매를 감압하에 제거했다. 다음에, 그 시료를 DCM(10 mL)에 다시 용해시키고, 포화 Na_2CO_3(1 x 10 mL), 물(1 x 10 mL) 및 소금물(1 x 10 mL)로 세척한 다음, Na_2SO_4 위에서 건조시켰다. 컬럼 크로마토그래피(2:1 에틸 아세테이트/헥산)하여 원하는 생성물을 제 1 분획으로서 얻었다(무색 오일, 46 mg, 44 %). HRMS (ESI) = 519.1393 $(M + H)^+$. $C_{25}H_{25}F_2N_2O_6S$에 대한 계산값: 519.1401. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) d 7.90 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.87 (dd, *J* = 8.2 Hz, 1.8 Hz, 1 H), 7.09 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.04-6.98 (m, 1 H), 6.88-6.78 (m, 1 H), 4.93 (t, *J* = 12.1 Hz, 2 H), 4.45 (d, *J* = 2.4 Hz, 2 H), 4.32-4.27 (m, 1 H), 3.99-3.93 (m, 4 H), 3.56-3.49 (m, 1 H), 3.14-3.08 (m, 1 H), 2.43-2.37 (m, 1 H), 2.30 (t, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 2.09-1.93 (m, 2 H), 1.78-1.64 (m, 3 H).

[0272] (*S*)-1-{[1'-[1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일]-(1'2'-디히드로-2'-옥소스피로(1,3-디옥산-2,3'-[3H]인돌)-5'-설포닐}-2-(2,4-디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘 (화합물 **40**)은 하기의 방법에 따라 제조했다. 무

수 톨루엔(4 mL)에 용해된 (S)-1-((1-(2-플루오로에틸)-1H-[1,2,3]-트리아졸-4-일)메틸)-5-(2(2,4- 디플루오로페녹시메틸)-피롤리딘-1-설포닐)이사틴) (화합물 **11**)(12 mg, 0.02 mmol)에 1,3-프로판디올(0.15 mL) 및 4-톨루엔설폰산(1 mg, 0.005 mmol)을 첨가했다. 다음에, 그 용액을 24 시간 동안 환류시키면서 형성되는 물을 공비증류로 제거했다. 다음에, 그 반응 혼합물을 상온까지 냉각하고, 대부분의 용매를 감압하에 제거했다. 다음에, 그 시료를 DCM(10 mL)에 용해하고 포화 Na_2CO_3 (1 x 10 mL), 물(1 x 10 mL) 및 소금물(1 x 10 mL)로 세척한 다음, Na_2SO_4 위에서 건조시켰다. 크로마토그래피(4:1 에틸 아세테이트/헥산)하여, 원하는 생성물을 제 1 분획으로 얻었다(무색 오일, 7 mg, 58 %). HRMS (ESI) = 519.1393 $(M + H)^+$; $C_{25}H_{25}F_2N_2O_6S$에 대한 계산값: 519.1401. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) d.7.84 (s, 1 H), 7.81 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H), 7.67 (s, 1 H), 7.43 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1.6 Hz, 1 H), 7.04-6.98 (m, 1 H), 6.88-6.79 (m, 1 H), 4.96 (s, 1 H), 4.92 (t, *J* = 2.8 Hz, 2 H), 4.79 (dt, *J* = 46.6 Hz, 4.8 Hz, 2 H), 4.64 (dt, *J* = 27 Hz, 4.8 Hz, 2 H), 4.29 (dd, *J* = 8.4 Hz, 2.6 Hz, 1 H), 4.00-3.89 (m, 4 H), 3.53-3.48 (m, 1 H), 3.10-3.07 (m, 1 H), 2.43-2.37 (m, 1 H), 2.05-1.92 (m, 2 H), 1.75-1.65 (m, 3 H).

[0273] 다음에, 이러한 보호된 전구체들 중 하나 이상을 이용하여 [^{18}F]**11**을 합성할 수 있다. 보호된 알킨 전구체 **39**를 이용한 대표적인 방사화학 반응이 도 21에서 도시되어 있다. 이러한 보호된 알킨 전구체를 이용하면, C-3 위치에서의 바람직하지 않은 부반응이 방지된다.

[0274] 인산나트륨 버퍼(pH 6.0, 250 mM, 25 μL)에서 아스코르브산나트륨 질소(2.53 mg, 12.79 μmol)하에 육수화황산구리(II)(0.51 mg, 2.06 μmol, 25 μL)의 수용액에, DMF (25 μl)에 용해된 알킨아세탈 전구체(1.0 mg, 1.93 μmol) (화합물 **39**) 및 아세토니트릴(100 μL)에 용해된 [^{18}F]-플루오로에틸아지드(1.27 mCi) (화합물 **27**)을 첨가했다. 그 반응 혼합물을 30 분간 80 ℃까지 가열했다(도 22 참조). 염산(6 N, 100 μL)을 첨가한 후, 그 교반 혼합물을 마이크로파 캐비티(2s, 50 W, 80 ℃ 온도로 세팅)를 이용하여 가열했다. HPLC 이동상(50 μL, 50% MeOH 및 35 % MeCN을 함유하는 물)을 첨가한 후, 그 혼합물을 분취용 HPLC로 정제했다(도 23 참조). [^{18}F]**11**을 24% 붕괴-보정 방사화학 수율(출발물질인 [^{18}F]-플루오로에틸아지드를 기준으로)로 분리하고, PBS/10 % EtOH에서 C18-SepPak SPS를 이용하여 포뮬레이션했다. [^{18}F]**11**과 함께 용리되는 안정한 불순물의 수준은 0.84 μg/mL 이었다. 특히 방사성은 0.05 Ci/μmol(2 GBq/μmol)이었다(도 24 참조).

[0275] 유사한 보호된 전구체를 이용하여 본 발명의 다른 화합물을 합성할 수 있음은 물론이다.

[0276] **실시예 11: 세포자멸사 세포에의 [^{18}F]11 및 [^{18}F]42의 흡수의 비교**

[0277] 본 발명의 또 다른 양태는 약한 이사틴 카스파제-3 억제제인 N-[1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일]이사틴 (화합물 **42**)의 분석을 포함한다. 이러한 화합물은 도 25에서 도시된 바와 같이 N-(2-프로피닐)이사틴 (화합물 **41**)을 이용하여 합성했다. 화합물 [^{18}F]**42**는 중심 이사틴 골격을 가져서, 통상적인 이사틴 결합 방식으로 활성화 카스파제-3에 결합할 수 있고 방사성 표지 트리아졸 작용기에 결합할 수 있다. 그러나, [^{18}F]**42**는 카스파제-3에 대한 높은 결합력 및 선택성을 부여하는 피롤리딘 설폰아미드 작용기가 없다. [^{18}F]**42**를 [^{18}F]**11**과 직접 비교하여 세포 흡수 분석에서 조사했다. 이의 목적은 흡수가 세포자멸사 세포의 특징인 세포 투과성의 증가의 결과 또는 카스파제-3 결합의 결과인 지를 확인하기 위하여 상기 화합물의 흡수 프로필을 조사하기 위한 것이다. [^{18}F]**11**과 다르게, 약물 처리 후 [^{18}F]**42** 결합의 증가는 없었기 때문에(도 26 참조), [^{18}F]**11** 결합은 카스파제 3 활성화에 기인한다는 판단이 지지된다.

[0278] N-(2-프로피닐)이사틴 (화합물 **41**)은 Smith 등[29]에서 기재된 바와 같이 합성했다(일킨 12 및 13). ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 7.65-7.61 (m, 2 H), 7.19-7.12 (m, 2 H), 4.61 (s, 2 H), 2.30 (s, 1 H).

[0279] N-[1-(2-플루오로에틸)-1*H*-[1,2,3]-트리아졸-4-일]이사틴 (화합물 **42**)는 Smith 등[29]에서 기재된 바와 같이 합성했다(트리아졸 14 및 15). ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) d 7.76 (s, 1 H), 7.63-7.57 (m, 2 H), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.13 (t, *J* = 3.6 Hz, 1 H), 5.03 (s, 2 H), 4.81 (dt, *J* = 46.8 Hz, 4.8 Hz, 2 H), 4.68 (dt, *J* = 27 Hz, 4.8 Hz, 2 H).

[0280] 번호 매기기의 실수로 인해, 화합물 **15** 및 **21**은 실제로 동일한 화합물이다.

[0281] **참조문헌**

[0282] 1. Lahorte *et al.* (2004) *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. **31**. 887-919.

[0283] 2. Boersma *et al.* (2005) *Journal of Nuclear Medicine*. **46**, 2035-2050.

[0284] 3. Aloya, R. *et al.* (2006) *Apoptosis*. **11**, 2089-2101.

[0285] 4. Damianovich, M. *et al. (2006) European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*.. **33**, 281-291.

[0286] 5. WO 2005/067388

[0287] 6. Neuss, M. *et al.* (2001*). Cardiovascular Drugs and Therapy*. **15**, 507-523.

[0288] 7. Lee, D. *et al* (2000) *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 16007-16014.

[0289] 8. Lee, D. *et al*. (2001) *Journal of Medicinal Chemistry*.**44**, 2015-2026

[0290] 9. Chu, W. et al (2005) *Journal of Medicinal Chemistry*. **48**. 7637-7647

[0291] 10. Chu, W. et al (2007) *Journal of Medicinal Chemistry*. **50**. 3751-3755.

[0292] 11. WO 2005/053752

[0293] 12. Faust, A. et al (2007) *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. **51**. 67-71

[0294] 13. Kopka, K. *et al* (2006) *Journal of Medicinal Chemistry*. **49**, 6704-6715.

[0295] 14. Zhou, D. *et al* (2006) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **16**, 5041-5046.

[0296] 15. WO 2006/067376

[0297] 16. Glaser *et al* (2007) *Bioconjugate Chemistry*. **18**. 989-993

[0298] 17. Wipf, P. *et al* (2001) *Tetrahedron*. **57**, 283-296.

[0299] 18. Barthel, H. *et al* (2004) *British Journal of Cancer*. **90**, 2232-2242.

[0300] 19. Aboagye, E.O. *et al,* (1997) *Biochemical Pharmacology*. **54**, 1217-1224.

[0301] 20. Twentyman, P.R. *et al.*(1980) *J Natl. Cancer Inst*. **64**, 595-604

[0302] 21. Workman, P., *et al* (1998) *British Journal of Cancer*. **77**, 1-10.

[0303] 22. Wolf, C.R. *et al.* (1987) Int. J. Cancer. **39**, 695-702

[0304] 23. Langdon, S.P. *et al* (1988) *Cancer Research*. **48**, 6166-6172

[0305] 24. Kozaki, K *et al* (2000) *Cancer Research*. **60**, 2535-40

[0306] 25. Schirrmacher, R. *et al* (2008) Tet. Lett. **49**, 4824-4827.

[0307] 26. Marik, J. and Sutcliffe, J. L. (2006) Click for PET: Rapid preparation of [^{18}F]fluoropeptides using Cu^{I} catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition. *Tet. Lett.* **47**, 6681-6684

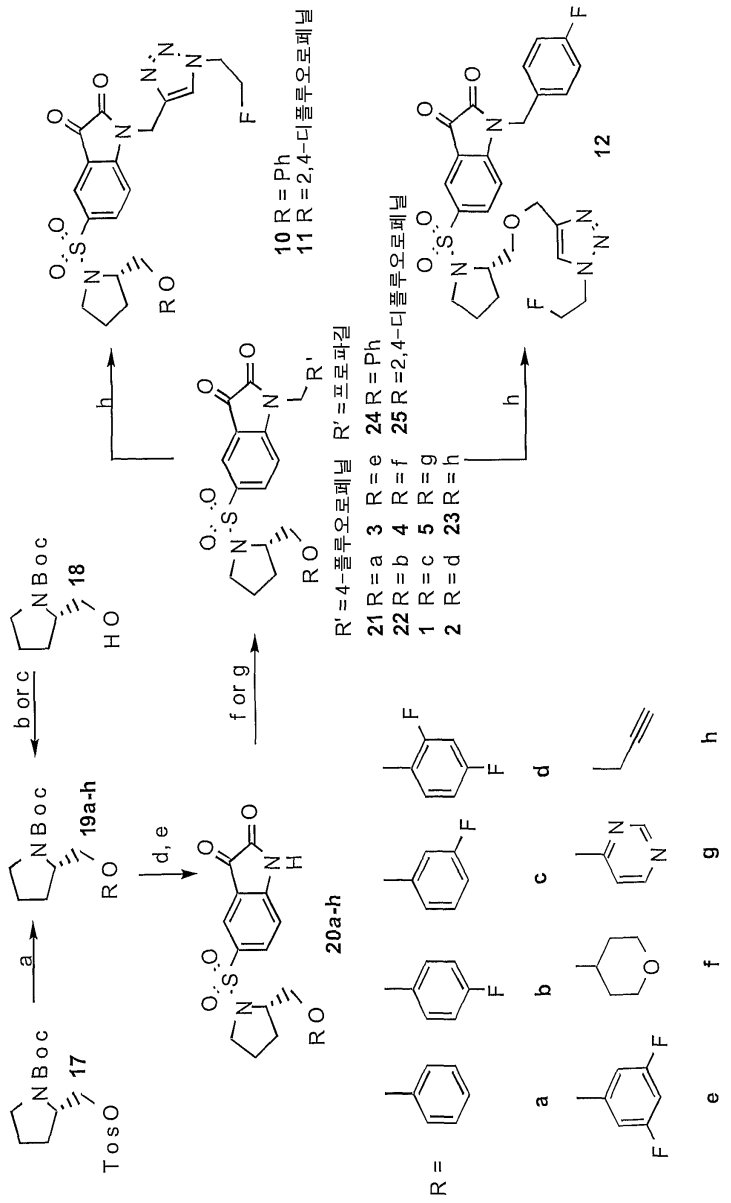
[0308] 27. Sirion, U. *et al*, (2007) An efficient F-18 labeling method for PET study: Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of bioactive substances and F-18-labeled compounds. *Tet. Lett.*, **48**, 3953-3957

[0309] 28. Li, Z, *et al*. (2007) Click Chemistry for ^{18}F-Labeling of RGD Peptides and microPET Imaging of Tumor Integrin a_vb_3 expression. *Bioconjugate Chem.*, **18**, 1987-1994.

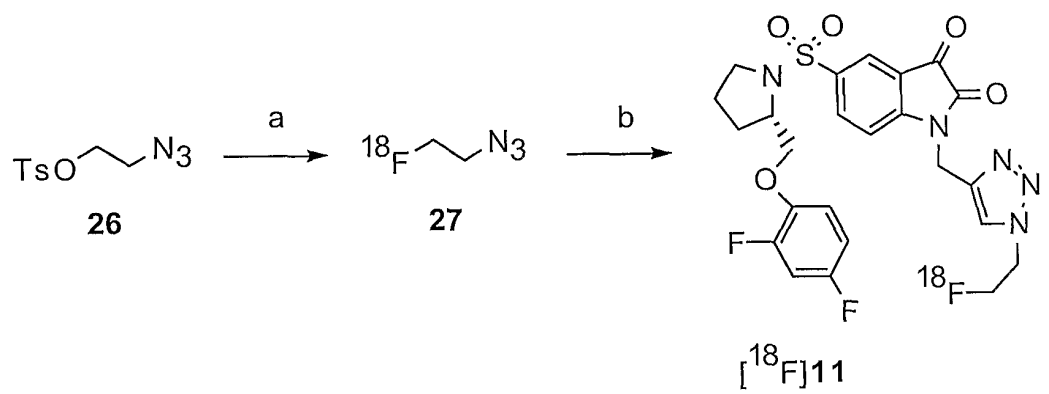
[0310] 29. Smith G. *et al*, (2008) Design, Synthesis and Biological Characterization of a Caspase 3/7 Selective Isatin Labeled with 2-[^{18}F]fluoroethylazide. *Journal of Medicinal Chemistry*. **51**. 8057-8067

도면

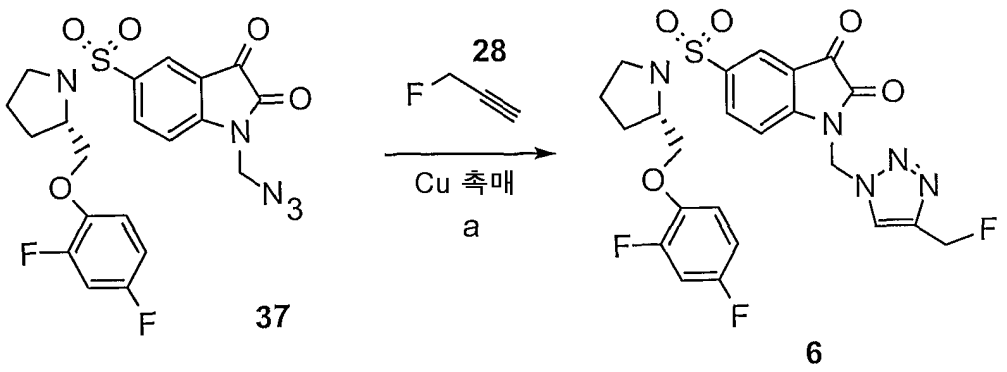
도면1


10 R = Ph
11 R = 2,4-디플루오로페닐
12
R' = 4-플루오로페닐 R' = 프로파길
21 R = a 3 R = e 24 R = Ph
22 R = b 4 R = f 25 R = 2,4-디플루오로페닐
1 R = c 5 R = g
2 R = d 23 R = h
R =
a
b
c
d
e
f
g
h
17
18
19a-h
20a-h
a
b or c
d, e
f or g
h

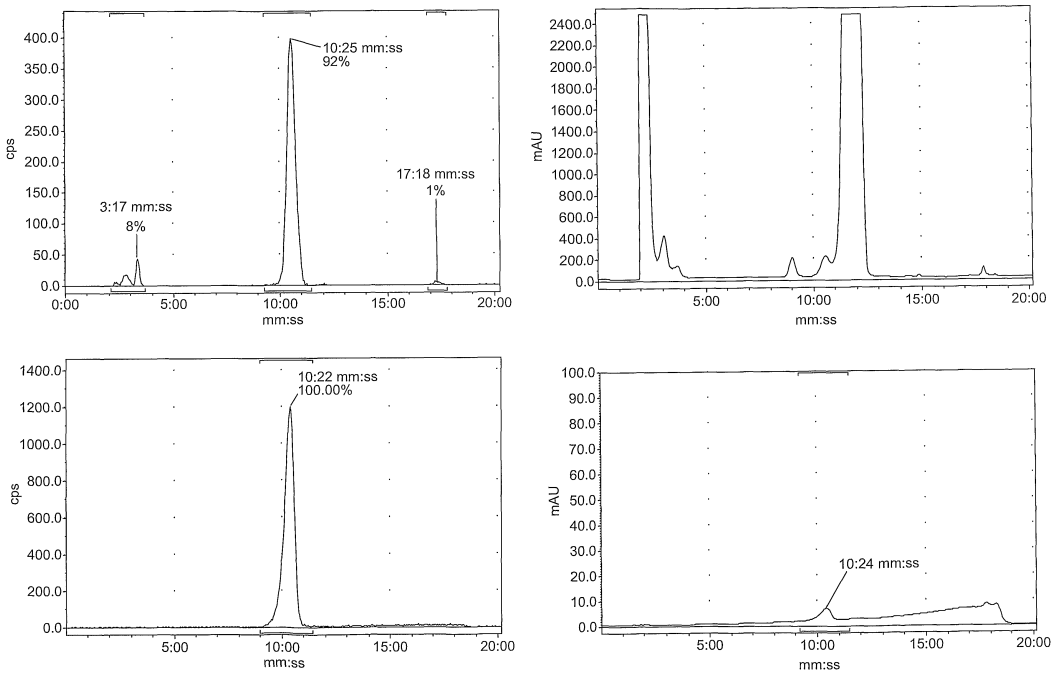
도면2i


TsO
N3
26
a
18F
N3
27
b
[18F]11

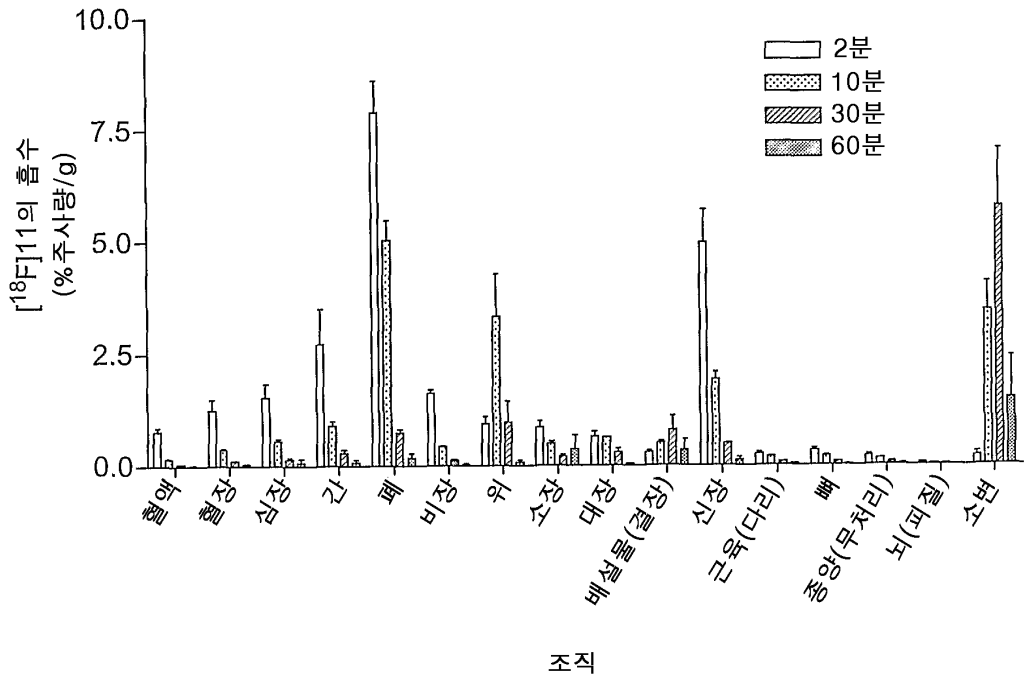
도면2ii


28
Cu 촉매
a
37
6

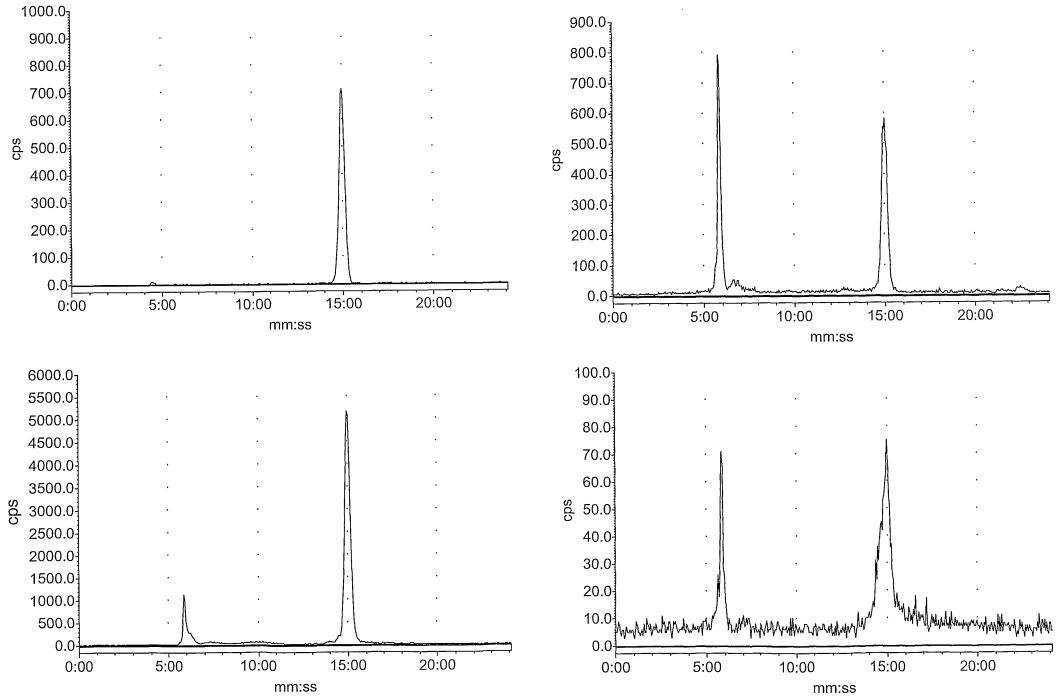
도면3


10:25 mm:ss
92%
3:17 mm:ss
8%
17:18 mm:ss
1%
cps
mm:ss
mAU
10:22 mm:ss
100.00%
10:24 mm:ss

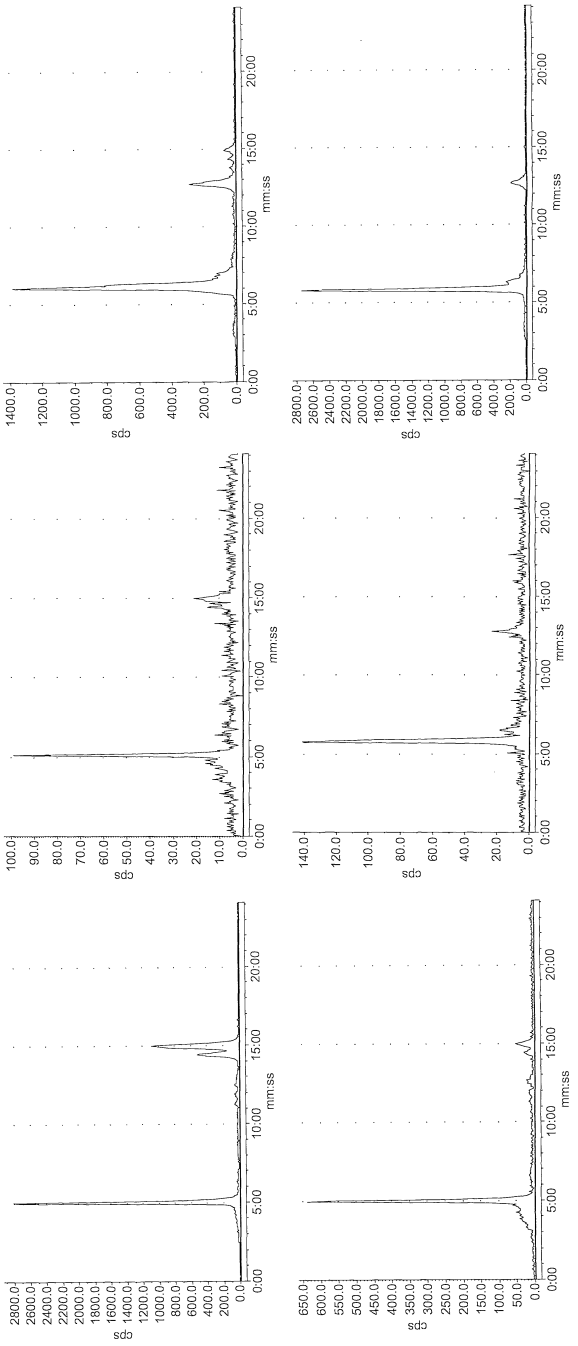
도면4


10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
[18F]11의 흡수
(%주사량/g)
2분
10분
30분
60분
혈액
혈장
심장
간
폐
비장
위
소장
대장
배설물(결장)
신장
근육(다리)
뼈
중앙(무처리)
뇌(피질)
소변
조직

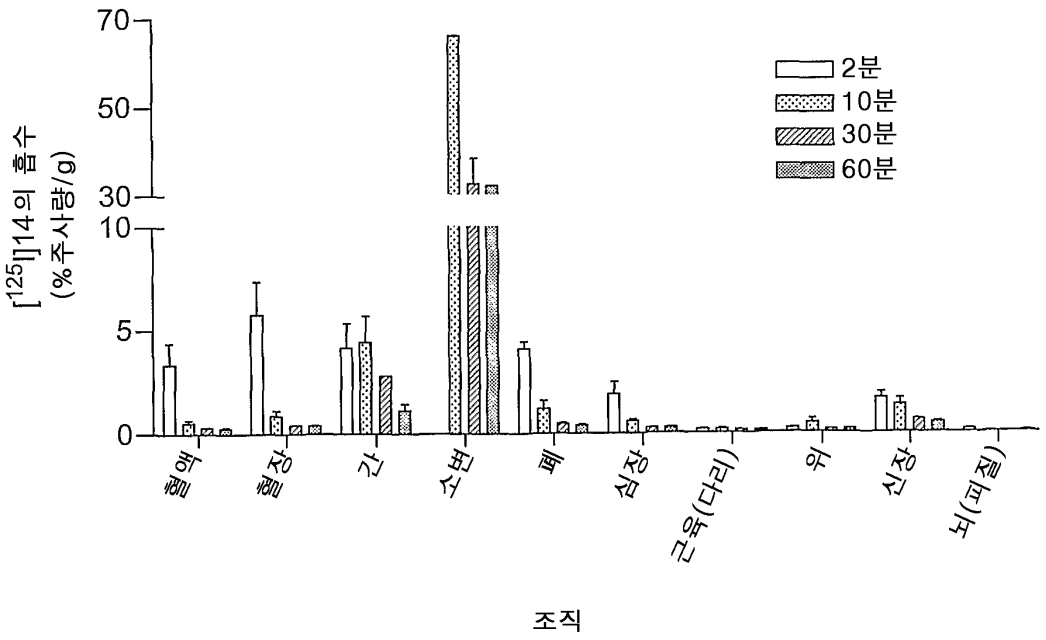
도면5


cps
mm:ss
0:00
5:00
10:00
15:00
20:00

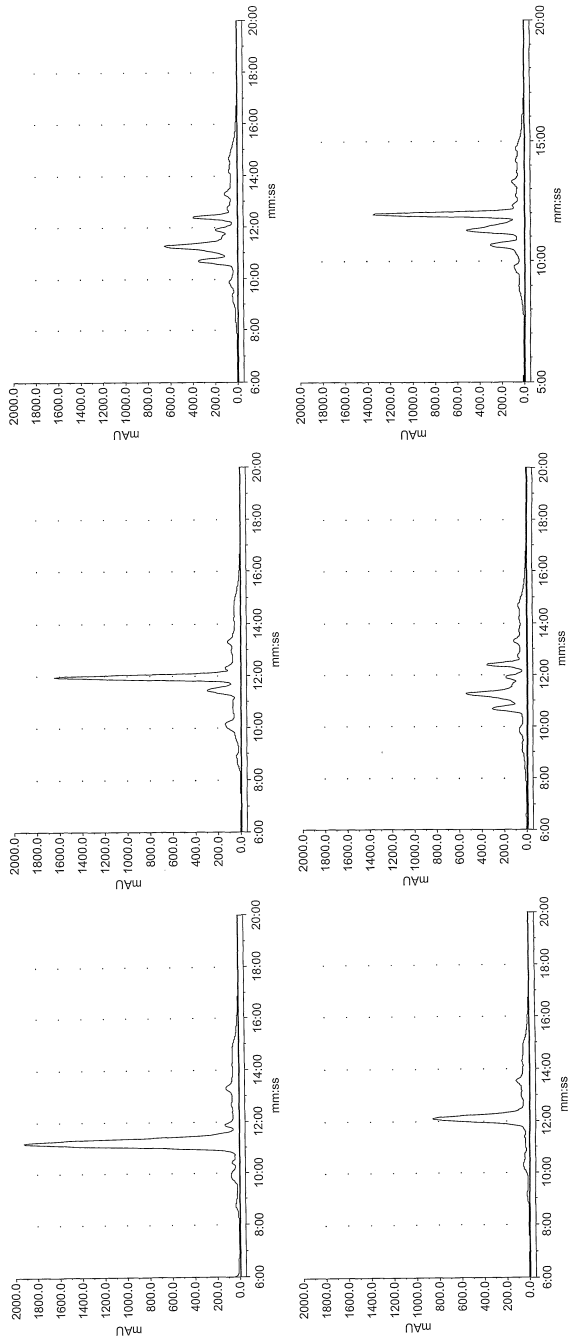
도면6



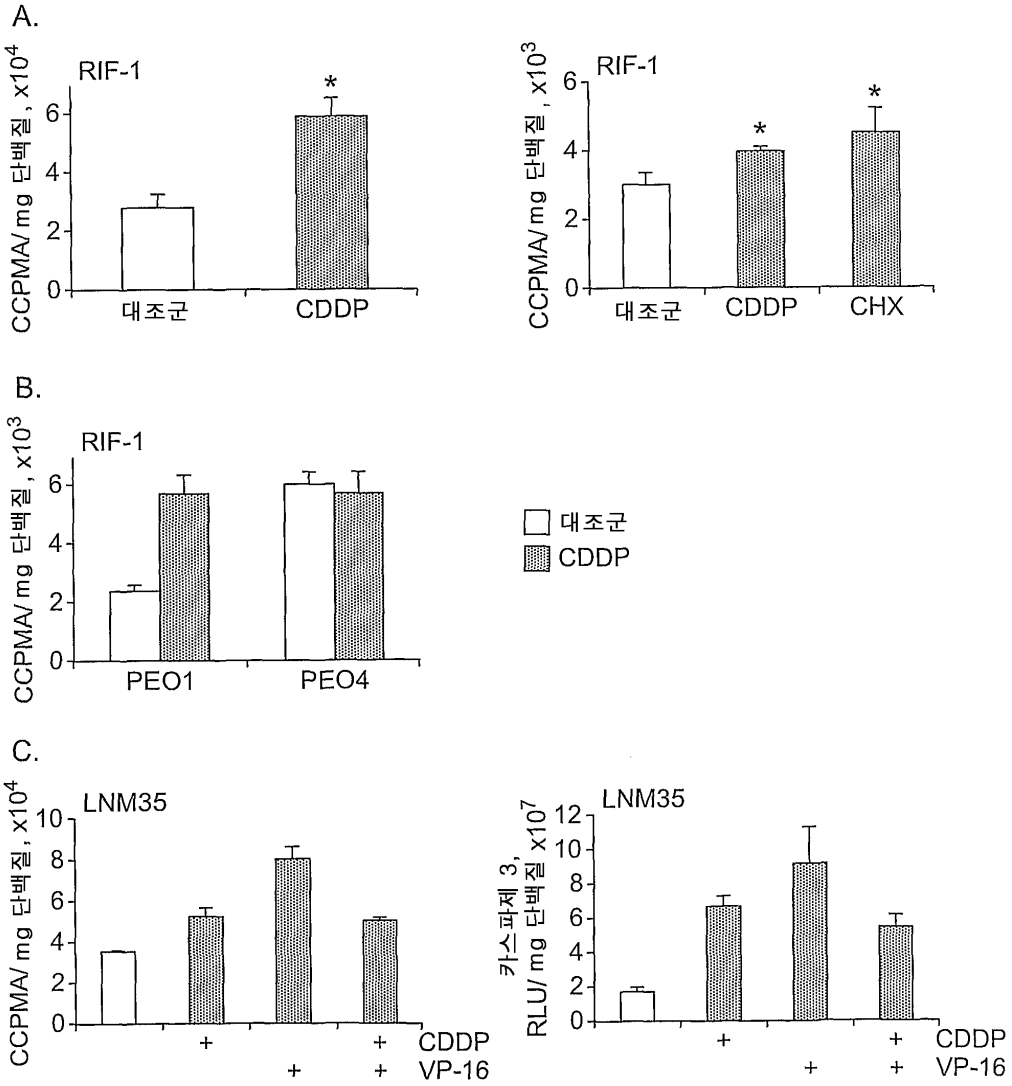
도면7


70
50
30
10
5
0
[125I]I4 의 흡수
(%주사량/g)
2분
10분
30분
60분
혈액
혈장
간
소변
폐
심장
근육(다리)
위
신장
뇌(피질)
조직

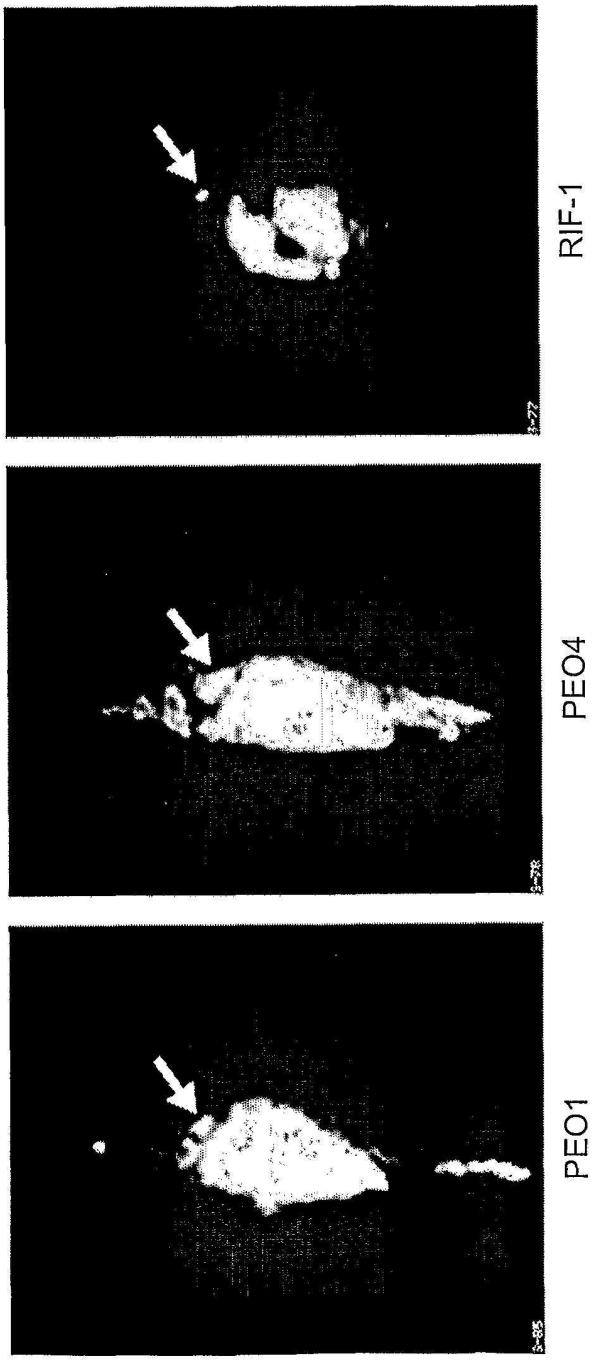
도면8



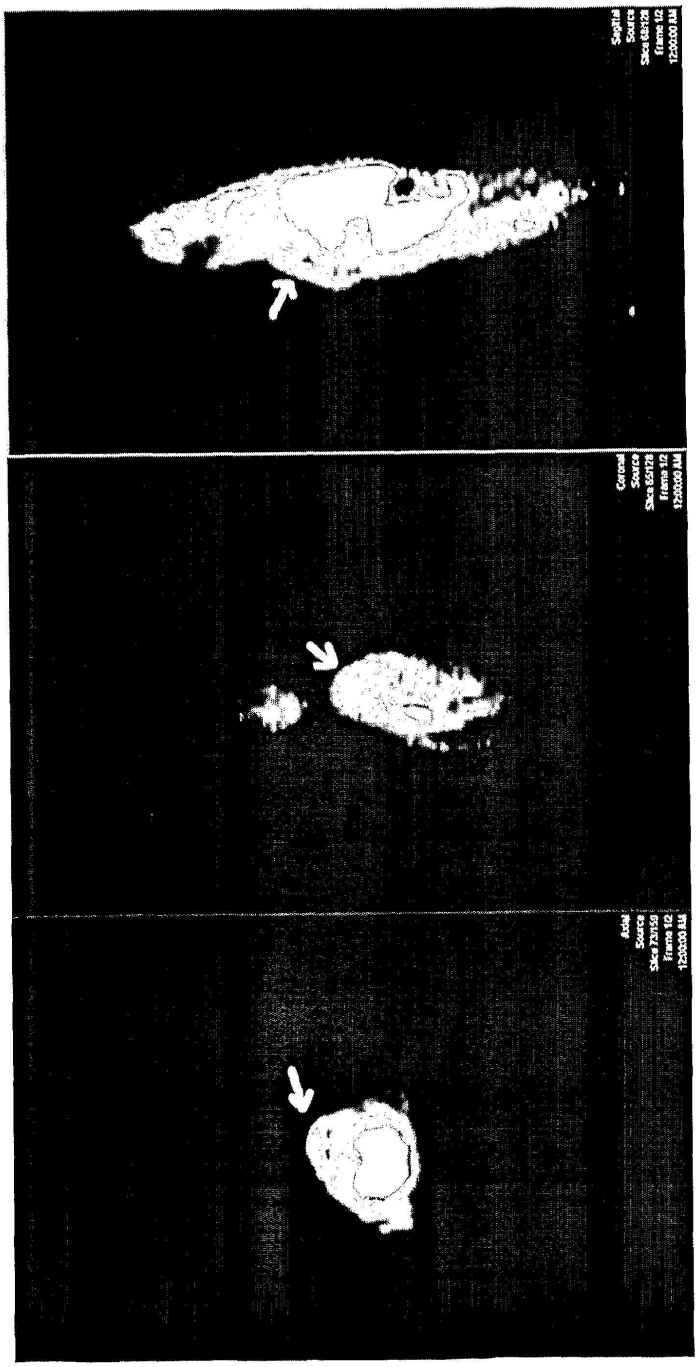
도면9


A.
RIF-1
CCPMA/mg 단백질, x10^4
대조군
CDDP
RIF-1
CCPMA/mg 단백질, x10^3
대조군
CDDP
CHX
B.
RIF-1
CCPMA/mg 단백질, x10^3
PEO1
PEO4
대조군
CDDP
C.
LNM35
CCPMA/mg 단백질, x10^4
CDDP
VP-16
LNM35
카스파제 3, RLU/mg 단백질 x10^7
CDDP
VP-16

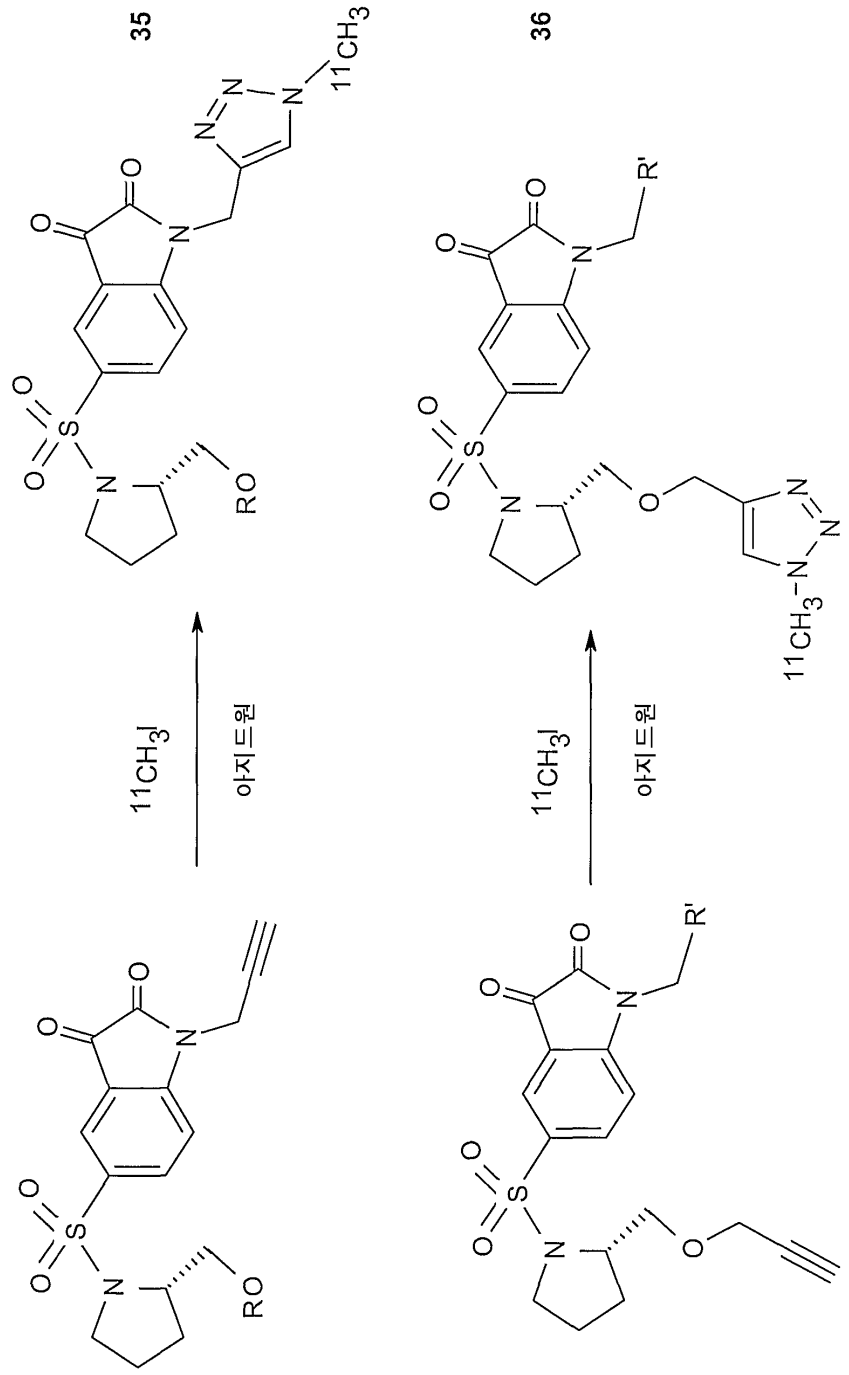
도면10



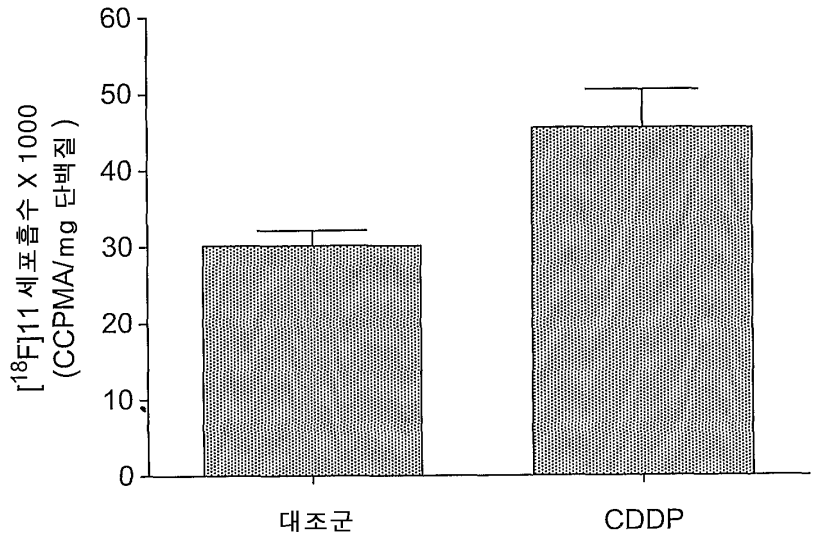
도면11


Sagittal
Source
Slice 68/128
Frame 1/2
12:00:00 AM
Coronal
Source
Slice 85/128
Frame 1/2
12:00:00 AM
Axial
Source
Slice 73/159
Frame 1/2
12:00:00 AM

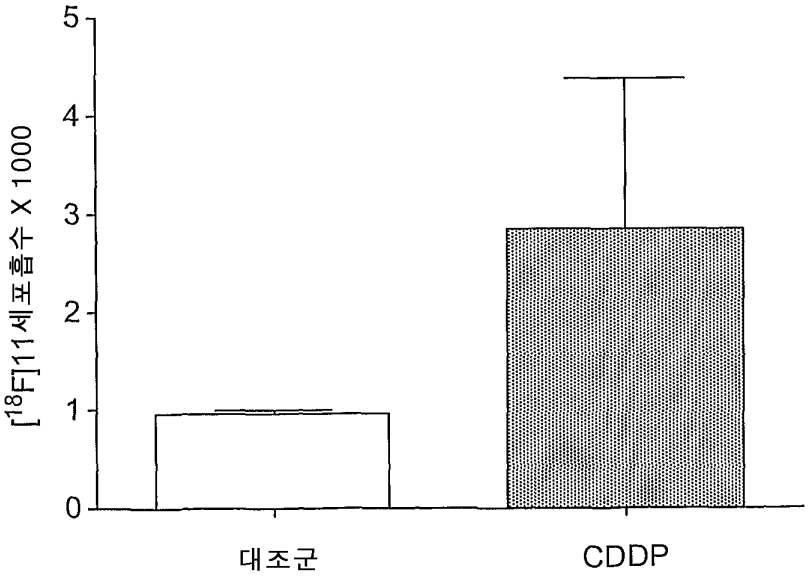
도면12



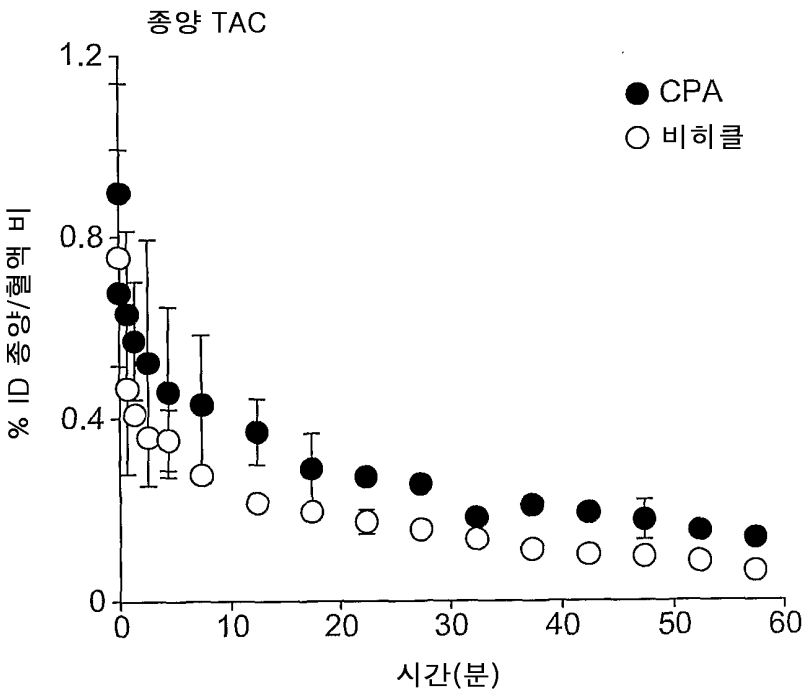
도면13


60
50
40
30
20
10
0
[18F]11 세포흡수 X 1000
(CCPMA/mg 단백질)
대조군
CDDP

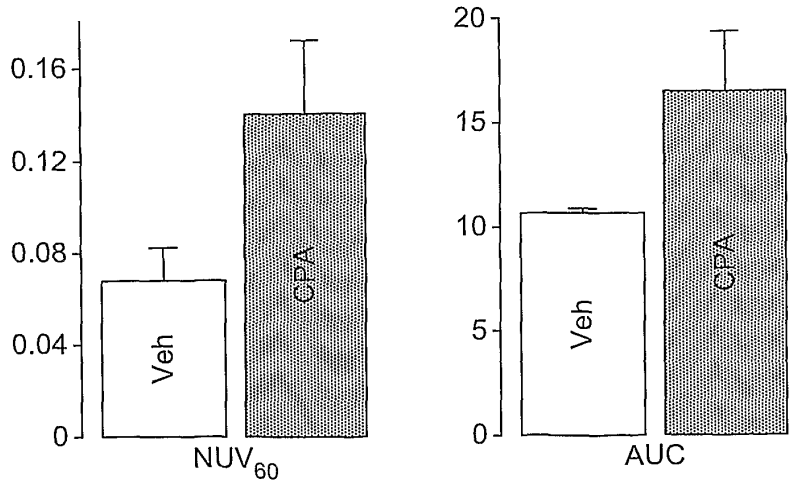
도면14


5
4
3
2
1
0
[18F]11세포흡수 X 1000
대조군
CDDP

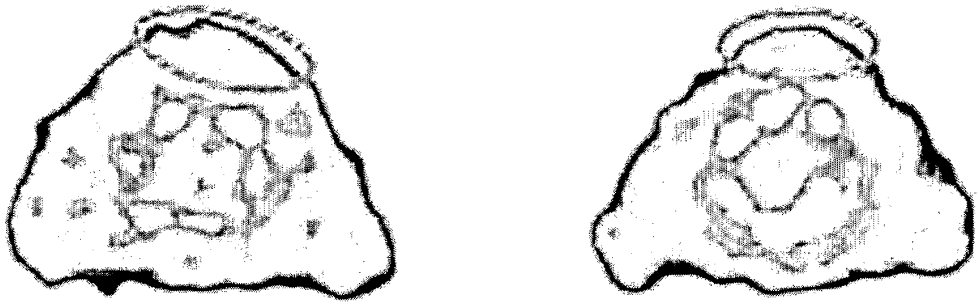
도면15


종양 TAC
CPA
비히클
% ID 종양/혈액 비
1.2
0.8
0.4
0
0
10
20
30
40
50
60
시간(분)

도면16

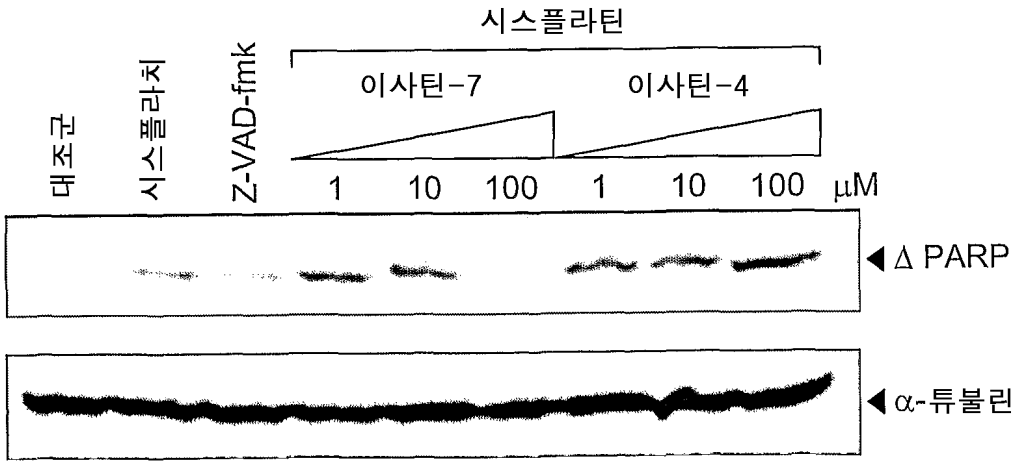

0.16
0.12
0.08
0.04
0
Veh
CPA
NUV60
20
15
10
5
0
Veh
CPA
AUC

도면17

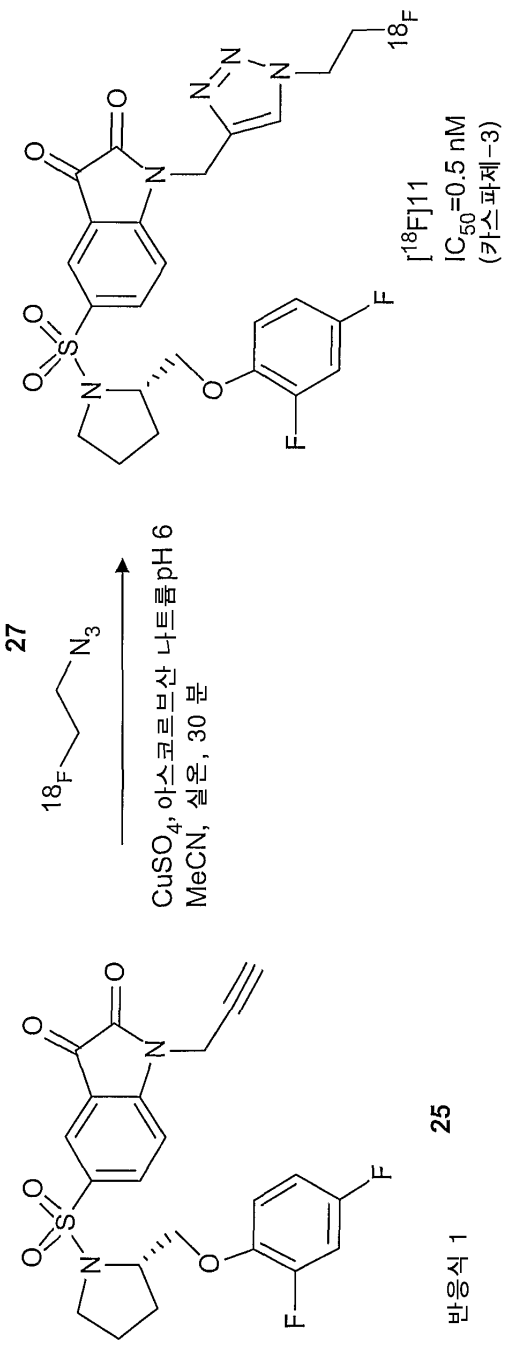


비히클 CPA

도면18

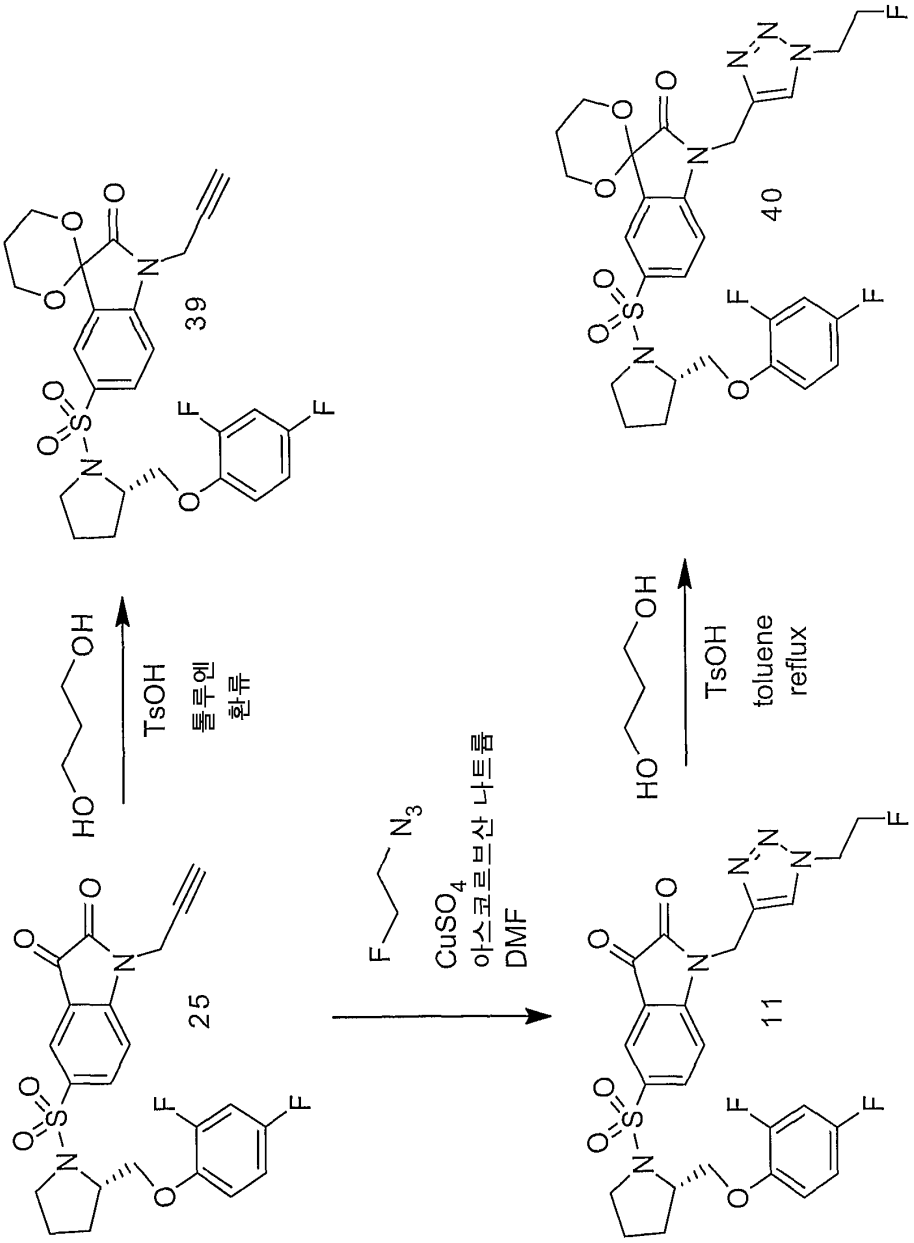


도면19

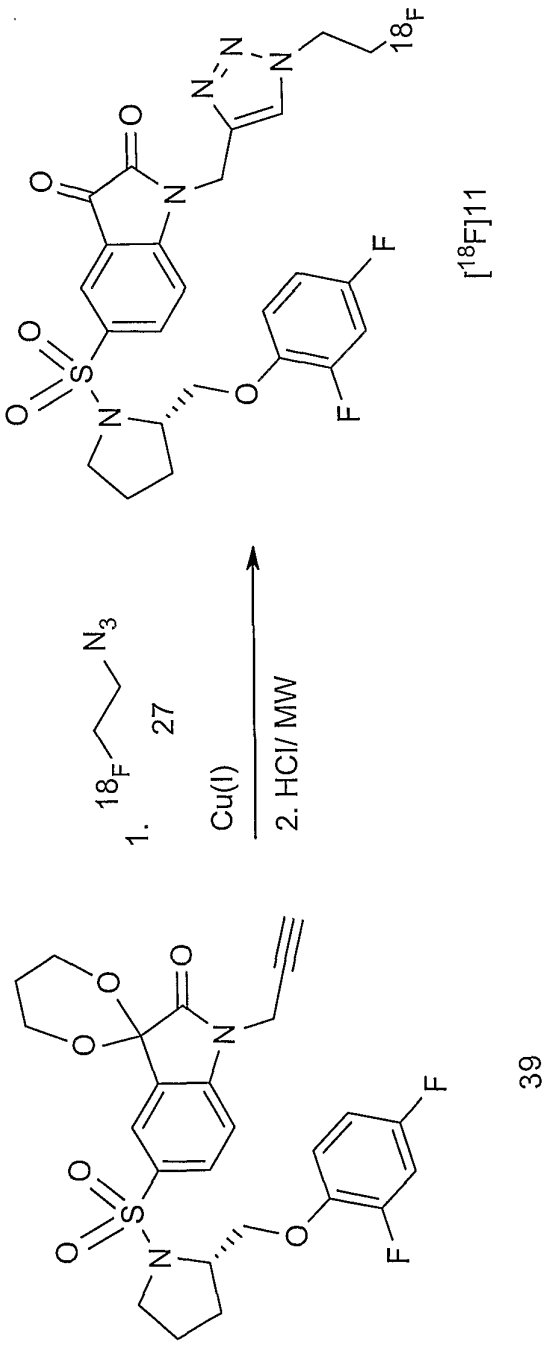

25
27
N_3
^{18}F
$CuSO_4$, 아스코르브산 나트륨 pH 6
MeCN, 실온, 30 분
$[^{18}F]11$
IC_{50}=0.5 nM
(카스파제-3)

반응식 1

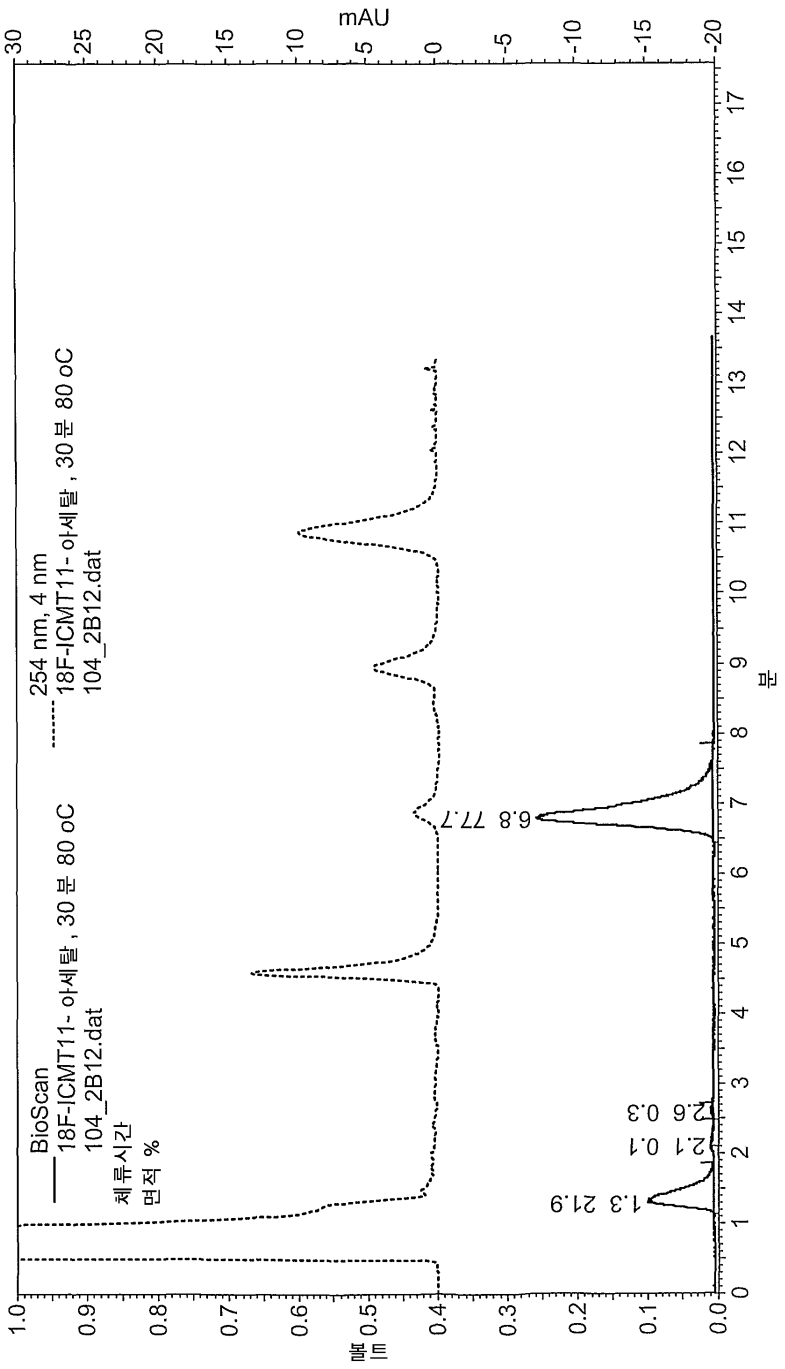
도면20


25
39
40
11
TsOH
톨루엔
환류
CuSO4
아스코르브산 나트륨
DMF
TsOH
toluene
reflux

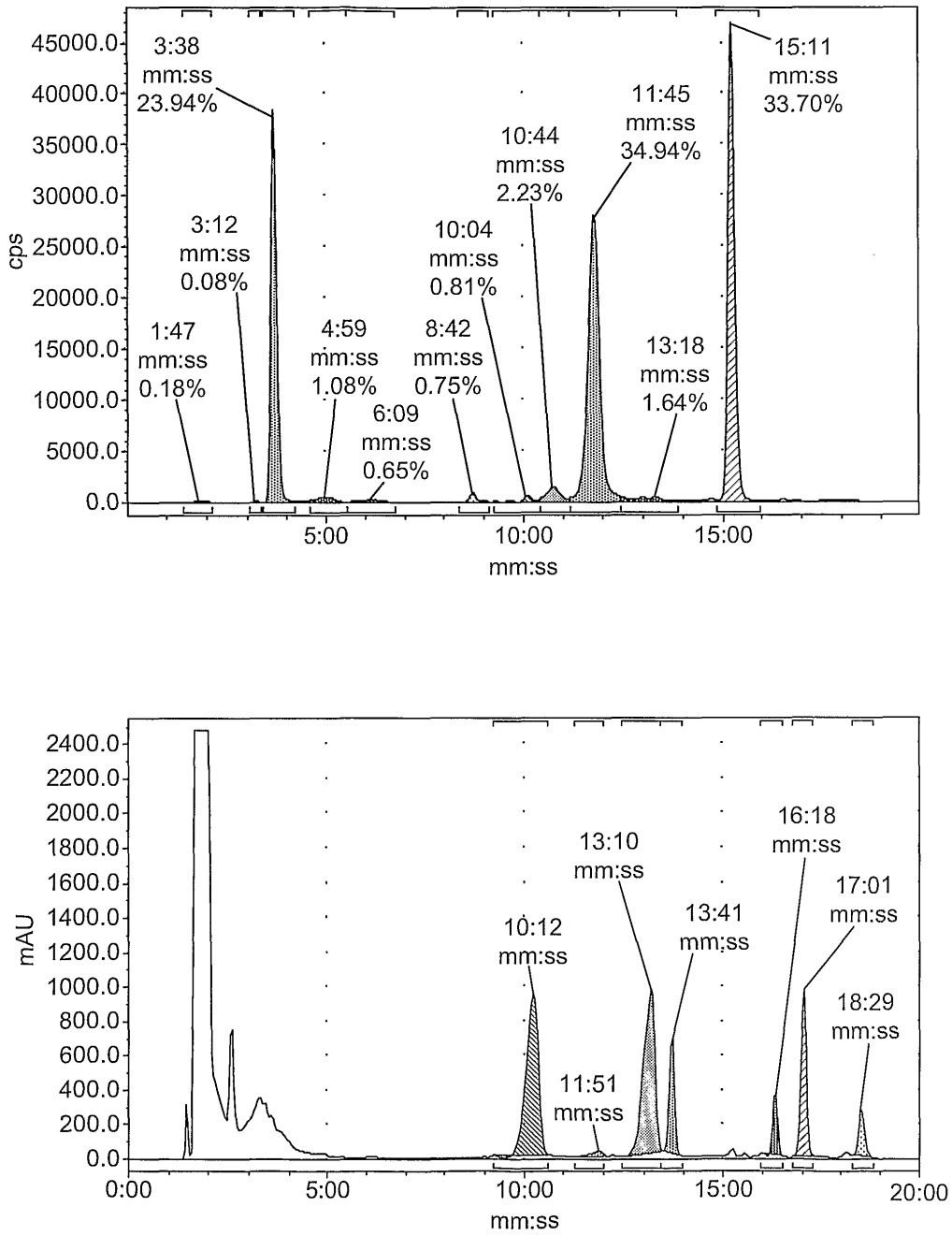
도면21



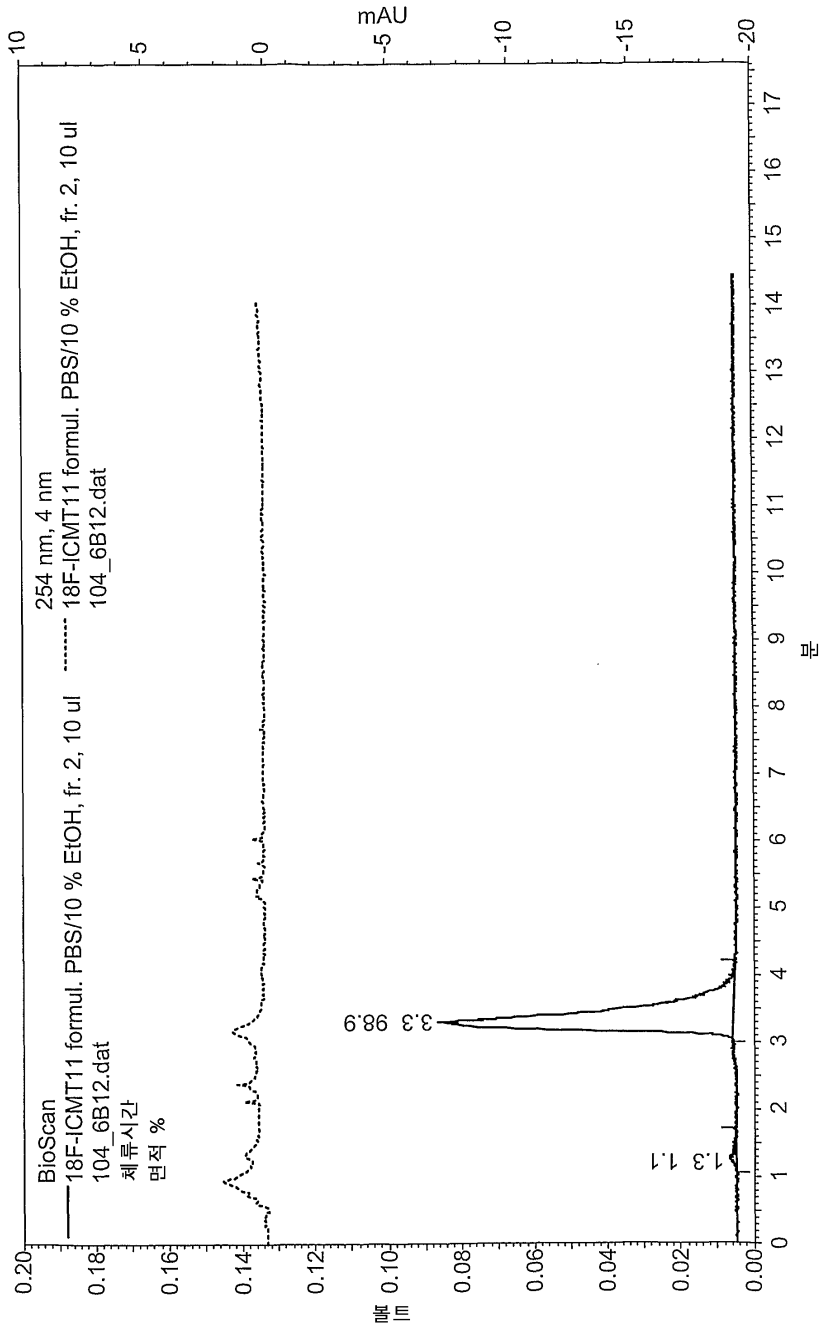
도면22


mAU
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
BioScan
18F-ICMT11- 아세탈 , 30 분 80 oC
104_2B12.dat
체류시간
면적 %
254 nm, 4 nm
18F-ICMT11- 아세탈 , 30 분 80 oC
104_2B12.dat
6.8 77.7
2.6 0.3
2.1 0.1
1.3 21.9
볼트
분
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

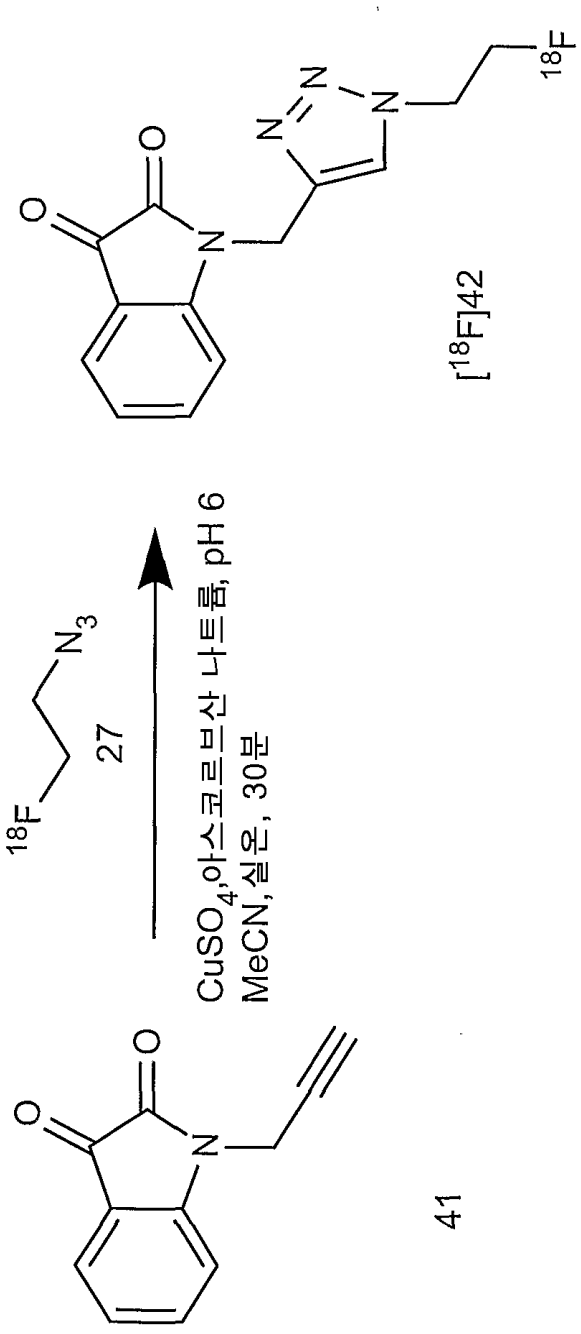
도면23


cps
45000.0
40000.0
35000.0
30000.0
25000.0
20000.0
15000.0
10000.0
5000.0
0.0
3:38
mm:ss
23.94%
3:12
mm:ss
0.08%
1:47
mm:ss
0.18%
4:59
mm:ss
1.08%
6:09
mm:ss
0.65%
8:42
mm:ss
0.75%
10:04
mm:ss
0.81%
10:44
mm:ss
2.23%
11:45
mm:ss
34.94%
13:18
mm:ss
1.64%
15:11
mm:ss
33.70%
5:00
10:00
15:00
mm:ss
mAU
2400.0
2200.0
2000.0
1800.0
1600.0
1400.0
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
10:12
mm:ss
11:51
mm:ss
13:10
mm:ss
13:41
mm:ss
16:18
mm:ss
17:01
mm:ss
18:29
mm:ss
0:00
5:00
10:00
15:00
20:00
mm:ss

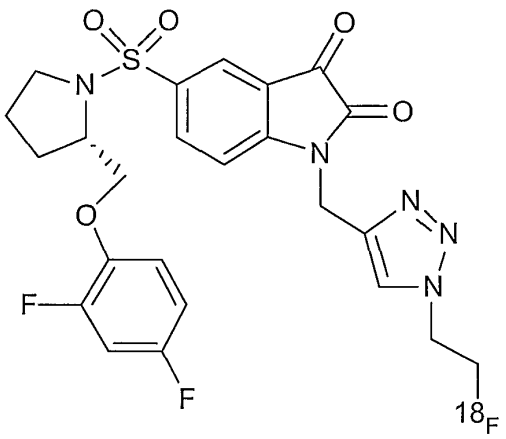
도면24

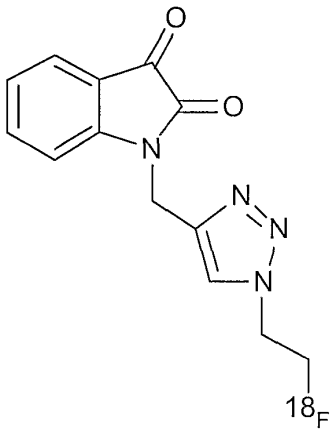

BioScan
18F-ICMT11 formul. PBS/10 % EtOH, fr. 2, 10 ul
104_6B12.dat
체류시간
면적 %
254 nm, 4 nm
18F-ICMT11 formul. PBS/10 % EtOH, fr. 2, 10 ul
104_6B12.dat
mAU
볼트
분
1.3 1.1
3.3 98.9

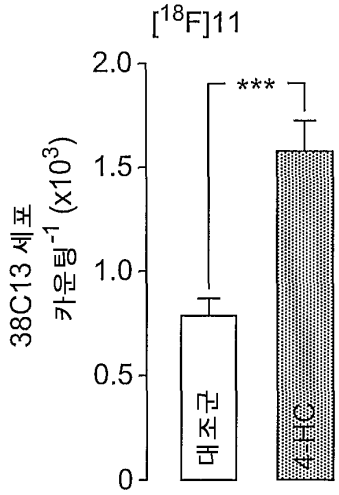
도면25

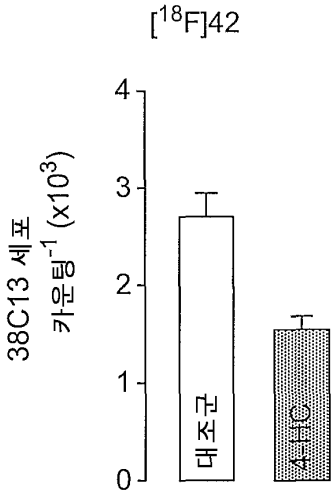


도면26


O
O
S
N
O
O
N
N
N
F
F
18F


O
O
N
N
N
18F


[18F]11
38C13 세포
카운팅-1 (x103)
2.0
1.5
1.0
0.5
0
***
대조군
4-HC


[18F]42
38C13 세포
카운팅-1 (x103)
4
3
2
1
0
대조군
4-HC