

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2019.5.2.89>

Effect of PEG chain additive on 6,8-dichloro-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridineacetamide (CB185) as a TSPO-binding ligand

Won Chang Lee^{1,2}, Sang Hee Lee^{1,2}, Nunzio Denora³, Valentino Laquintana³, Byung Chul Lee^{1,4*}, and Sang Eun Kim^{1,2,4*}

¹Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul National College of Medicine, Seongnam, 13620, Republic of Korea;

²Department of Transdisciplinary Studies, Graduate School of Convergence Science and Technology, Seoul National University, Seoul, 16229, Republic of Korea;

³Department of Pharmacy – Pharmaceutical Sciences, University of Bari “A. Moro”, Bari, 70121, Italy;

⁴Center for Nanomolecular Imaging and Innovative Drug Development, Advanced Institutes of Convergence Technology, Suwon, 16229, Republic of Korea

ABSTRACT

In our previous studies, we developed a ¹⁸F-labeled TSPO-binding ligand, named [¹⁸F]CB251, which has been proved to be a promising TSPO-binding PET radiotracer for the detection and monitoring of TSPO expression in pathological diseases. ($K_i = 0.27$ nM for TSPO, 1.96% ID/g of tumor uptake at 1h post-injection) Based on these results, we utilized 6,8-dichloro-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridineacetamide analogs, CB185 (**1**) as a targeting moiety for the selective delivery of probes and anticancer molecules to TSPO-overexpressed tissues. In this study, we designed CB185 derivatives contains different PEG chains ($n = 1, 3$ and 5) and fluorescence dye (Cy5) to identify the necessary space between a TSPO-binding ligand and an anticancer agent. Three CB185 derivatives (**11a-c**) which contains Cy5 and PEG chain, were synthesized and the effect of PEG additive on their TSPO-binding affinities were evaluated using in vitro assays. The binding affinity for compounds **11a-c** was lower than that of PK11195 ($K_i = 3.2$ nM), but still characterized by nanomolar binding affinity for TSPO ($K_i = 46.5$ nM for **11a**, 51.0 nM for **11b**, and 388.5 nM for **11c**). These results showed that the conjugates are characterized by a moderate binding affinity toward TSPO except for compound **11c**, which PEG chain consist of five PEG monomers. Our finding might add useful information to decide the appropriate PET chain length for developing new TSPO-targeting drug carriers.

Key Word: Translocator protein 18 kDa (TSPO), PEG Chain, Fluorescence dye (Cy5), Drug carrier

Introduction

전이체 단백질(the translocator protein 18 kDa, TSPO)은 다섯 개의 막관통 단백질로 이루어져 주로 미토콘드리아 외막에 존재하는 단백질로서, 스테로이드 또는 Bile salt를 합성을 위한 주요 물질인 콜레스테롤을 미토콘드리아 내부로 유입시키는 역할을 하고 있다. 이 외에 담당하는 작용으로는 membrane biogenesis

또는 세포적인 기능으로서 세포 사멸, 성장, 분화에 관여하는 단백질을 들여오거나 미토콘드리아 자체 기능을 관여한다고 알려져 있다. 이러한 TSPO는 다양한 tissue type에서 발현되며 부신, 신장, 폐, 심장, 비장과 같은 장기에서 많이 분포되어 있다. 특히 TSPO는 활성화된 미세아교세포(activated microglial)에서 높은 수준의 발현을 보이지만, 뇌의 정상세포에서는 상대적으로 낮은 분포를 보임으로 신경 염증에 대한 특

Received: December 12, 2019 / Revised: December 26, 2019 / Accepted: December 28, 2019

Corresponding Author : Prof. Dr. Byung Chul Lee, Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 82, Gumiro 173 Beongil, Bundanggu, Seongnam 13620, Republic of Korea, Tel: +82-31-787-2956, Fax: +82-31-787-4072, E-mail: leebc@snu.ac.kr

Prof. Dr. Sang Eun Kim, Department of Transdisciplinary Studies, Graduate School of Convergence Science and Technology, Seoul National University, Gwanggyo-ro 145, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do 16229, Republic of Korea, Tel: +82-31-787-7671, Fax: +82-31-787-4018, E-mail: kse@snu.ac.kr

Copyright©2019 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

이적 바이오마커(1, 2)일뿐만 아니라, 특정 종양(뇌암, 간암, 유방암, 전립선암 등)과 관련된 염증 발현 조직의 macrophage에도 발현되므로 종양 바이오마커로서 가능성을 지니고 있다. 따라서, TSPO를 표적으로 한 리간드에 다양한 진단용, 치료용 방사성동위원소와 항암제를 도입하여, 중추 신경계 신경염증과 종양의 진단 및 치료를 위한 연구가 전세계적으로 진행되고 있다. (3, 4)

양전자방출단층촬영(Positron Emission Tomography, PET)을 이용한 질환과 관련된 과발현 TSPO의 정량적 평가를 위해 양전자방출 방사성동위원소인 C-11(반감기 20.4분)이 표지된 ^{11}C PK11195가 1세대 TSPO PET 영상 방사성추적자로서 개발되었다. (5) 하지만 비특이적 결합, 그리고 ^{11}C PK11195가 제공하는 낮은 신호 대 잡음 비(signal-to-noise)의 문제로 인해 정확한 정량적 평가에 한계성이 밝혀졌다. (6) 따라서 이를 해결하고자 많은 연구그룹에서 2세대 TSPO PET 영상 방사성추적자가 개발되었으며, 대표적인 리간드로는 ^{11}C PBR28, ^{18}F PBR06, ^{18}F FEPPA, ^{11}C DAA1106, ^{11}C DPA713, 그리고 ^{18}F PBR111이 있다. (7, 8)

이러한 배경을 바탕으로 본 연구팀에서도 Central Benzodiazepine Receptor (CBR)와는 구별되어 TSPO에만 선택적으로 결합할 수 있는 ^{18}F (불소) 또는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (테크네슘)이 표지된 2-phenylimidazo[1,2-a]pyridineacetamide 기반의 TSPO 표적 방사성추적자 (^{18}F CB251, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ CB256, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ CB257)를 보고한 바 있다. (9-14) 해당 화합물은 alpidem 구조를 기반으로 구조-활성 관계(Structure-Activity Relationship, SAR) 연구를 통해 개발되었으며, 세포 수준에서의 실험 결과 10^4 배 이상으로 CBR에 비해 TSPO에 높은 선택적 결합 친화도를 가지고 있다. 신경염증 랫트 모델의 신경염증 유발부위에서 높은 섭취를 보였으며, 종양 누드마우스모델(human glioblastoma U87-MG xenograft)에서도 적절한 종양 섭취를 보여 새로운 TSPO 표적 진단용 방사성추적자로서의 가능성을 제시한 바 있다.

본 연구에서는 이와 같은 선행 연구결과를 바탕으로 2-phenylimidazo[1,2-a]pyridineacetamide 기반 리간드를 이용하여 새로운 응용 분야로 TSPO 표적 의

약품 전달시스템 및 나노의학을 도입하고자 한다. 그동안 종양에 보다 효과적인 약물 전달 및 효능을 이루고자 약물 체내 안정성과 혈중 약물 농도를 증가시키는 연구가 계속해서 이루어져 왔으며, 대표적인 기술로서 약물 전달 시스템(drug delivery system, DDS)이 활발히 연구되고 개발되어왔다. 이는 주로 리포솜, 고분자, 또는 금속 원자로 이루어진 나노 입자를 개발하여 약물을 내부에 탑재한 형태를 이루는데, 최근 스마트 나노 입자로서 pH 또는 온도 감응형 입자를 개발하여 약물 전달을 극대화시키는 연구가 진행되고 있다. (15) 더불어, 나노의학이란 나노기술을 이용하여 질병을 진단, 치료하거나 약물 전달용의 나노크기의 분자수준으로 개발된 입자를 기반으로 의학에 접목한 기술을 일컫는다. 약물의 효과적인 전달, 안정성 증대, 부작용 감소를 통한 치료적 효율성의 증대 및 다양한 생체활성물질(e.g. 펩타이드, DNA, RNA)의 체내 안정성을 증가시켜 전달함으로써 새로운 치료효과를 이룰 수 있다는 기대적 측면으로 많은 연구가 활발하게 이루어지고 있다. (16) 이렇듯, DDS와 나노 의학 기술을 이용하여 TSPO 표적 약물전달체(drug carrier) 또는 나노입자(nanoparticles)를 개발하고자 TSPO-binding 기본 골격인 6,8-dichloro-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridineacetamide를 지니는 CB185(1)를 선택하였다. 이때 필요한 정보로서는 TSPO에 높은 결합친화도(nanomolar binding)를 갖는 리간드를 약물전달체 또는 나노입자에 도입하고자 할 때, 기존의 결합능을 역제를 최소화하기 위해선 TSPO 리간드와 약물 또는 나노입자 사이에 얼마만큼의 사슬 길이가 필요한지가 무척 중요시된다. 선행 연구결과를 통해, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ CB256와 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ CB257의 구조와 같이 phenylimidazo 화합물의 8번위치에 아민을 도입하여 tricarbonyl $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (트리카르보닐테크네슘)을 도입했을 때 ^{18}F CB251의 오른쪽 페닐링에 도입한 에틸플루오라이드 구조에 비해 급격히 결합친화도가 낮아졌음을 참고로 하여 출발 리간드로서 CB185를 선택하였다. 이에 본 연구에서는 일반적으로 사용되는 linker인 Polyethylene glycol (PEG)를 기본으로, CB185 오른쪽 페닐링에 도입한 PEG 사슬의 길이 ($n = 1, 3, 5$)에 따른 결합 친화도 변화를 평가하고자 한다. 이는 형광물질로 사용되는 cyanine 계열

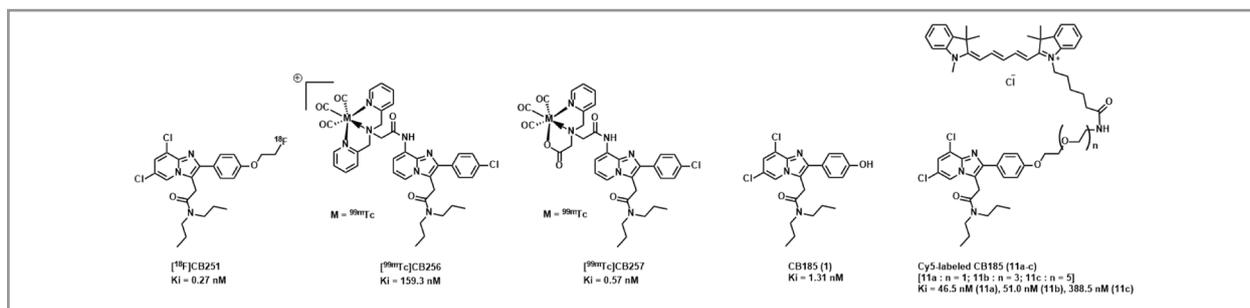


Figure 1. Structure of $[^{18}\text{F}]$ CB251, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ CB256, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ CB257, CB185(1), and Cy5-labeled CB185(11a-c)

의 Cy5를 CB185와 PEG chain을 통해 연결하였으며, 각각의 최종 화합물들(11a-c)을 비교 물질인 PK11195와 동시에 처리해 세포 수준에서 결합 친화도를 평가하였다.

Materials and Methods

1. 장비 및 시약

모든 시약은 sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)와 TCI (Tokyo, Japan) 제품을 구입하여 특별히 명시되지 않은 한 추가 정제 없이 사용하였다. 합성된 화합물의 분석에 사용된 ^1H -NMR은 Varian 400 MR (400 MHz, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용하였으며, Electrospray mass spectrometry (ESI-MS)는 Agilent 1100 LC-MSD trap system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. 고성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)용 용매(J. T. Baker, USA)를 사용하였으며 사용 전 멤브레인필터(Whatman, 0.20 μm , GE Healthcare, USA)를 이용하여 정제 후 사용하였다. Flash column chromatography는 silica-gel (Merck, 230-400 mesh, ASTM)을 이용하여 분리 정제하였으며, 모든 반응은 precoated silica-gel (Merck, silica gel 60 F₂₅₄)를 사용하여 반응 정도를 확인하였다. 최종 합성된 화합물의 형광스펙트럼(Fluorescence spectra)은 SpectraMax Gemini

(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 확인하였다.

2. TSPO 리간드(CB185, 1) 합성

TSPO에 높은 결합 친화도를 지닌 구조를 가지고 있는 리간드인 CB185 (2-(6,8-dichloro-2-(4-hydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridine-3-yl)-N,N-dipropylacetamide)는 보고된 논문을 참고하여 아래와 같은 합성 방법을 통해 진행되었다. (17, 18)

2.1) 4-(4-Methoxyphenyl)-4-oxo-N,N-dipropylbutanamide (3)

4-(4-Methoxyphenyl)-4-oxobutanoic acid (2, 5.0 g, 24.01 mmol)가 녹아 있는 tetrahydrofuran (50 mL)에 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI, 3.47 g, 26.42 mmol)를 첨가한 후, dipropylamine (3.07 mL, 27.61 mmol), triethylamine (3.40 mL, 30.02 mmol)을 각각 첨가하였다. 상온에서 4시간동안 교반 후 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하고 농축시킨다. 이후 ethyl acetate (EtOAc)와 0.1N HCl 수용액 (30 mL, v/v = 1:1)를 첨가하고 유기층을 추출한다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (40% EtOAc/hexane)를 이용해 분리 정제하여 붉은 색의 액체 형태 (7.0 g, 71%)로 얻었다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.99 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.33-3.25 (m, 6H), 2.75 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.72-1.48 (m, 4H), 0.94 (t, J = 7.4

Hz, 3H), 0.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); MS (ESI) m/z 292.2 ($M-H^+$)

2.2) 3-Bromo-4-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-N,N-dipropylbutanamide (**4**)

화합물 **3** (0.92 g, 2.71 mmol)가 녹여져 있는 chloroform (40 mL)에 chloroform (1 mL)에 희석된 bromine (0.16 mL, 3.12 mmol)을 천천히 첨가한다. 혼합물은 상온에서 6 시간 동안 교반 후 chloroform과 sodium thiosulfate 포화수용액(30 mL, $v/v = 1:1$)을 첨가하여 유기층을 추출한다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (40% EtOAc/hexane)를 이용해 분리 정제하여 무색의 용액 형태(0.57 g, 56%)로 얻었다. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.95 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 5.69–5.65 (m, 1H), 3.57–3.50 (m, 1H), 3.32–3.14 (m, 4H), 3.06–3.01 (m, 1H), 1.72–7.64 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.54–1.47 (m, 2H), 0.98 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H), 0.84 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H); MS (ESI) m/z 370.1 ($M-H^+$)

2.3) 2-(6,8-Dichloro-2-(4-methoxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (**5**)

화합물 **4** (0.45 g, 1.21 mmol)가 녹여져 있는 dimethylformamide (15 mL)에 2-amino-3,5-dichloropyridine (0.26 g, 1.57 mmol)을 첨가한다. 혼합물은 reflux를 통해 가열하여 4시간 동안 교반 후 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거하여 농축시킨다. 이 후 dichloromethane과 증류수(15 mL, $v/v = 1:1$)를 첨가하고 유기층을 추출하였다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (40% EtOAc/hexane)를 이용해 분리 정제하여 흰색의 고체 형태(0.15 g, 28%)로 얻었다. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.31 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.06 (s,

2H), 3.86 (s, 3H), 3.30–3.26 (m, 2H), 3.09–3.05 (m, 2H), 1.57–1.45 (m, 4H), 0.85 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.71 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); MS (ESI) m/z 434.1 ($M-H^+$)

2.4) 2-(6,8-Dichloro-2-(4-hydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (CB185, **1**)

화합물 **5** (0.20 g, 0.46 mmol)가 녹여져 있는 dichloromethane (10 mL)를 얼음bath에 담그고 1M 농도로 녹여져 있는 tribromoborane (1.38 mmol)을 0 도 조건하에서 천천히 첨가하였다. 그 후에 혼합물은 상온에서 1시간 30분 동안 교반 후 증류수를 추가적으로 첨가하여 30분동안 교반한다. Dichloromethane과 sodium bicarbonate 포화수용액(10 mL, $v/v = 1:1$)을 첨가하여 유기층을 추출하고, 분리된 유기층을 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (40% EtOAc/hexane)를 이용해 분리 정제하여 옅은 노란색의 고체 형태 (0.18 g, 95%)로 얻었다. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.67 (s, 1H), 8.57 (d, $J = 1.6$ Hz), 7.63 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.30–3.16 (m, 4H), 1.63–1.48 (m, 4H), 0.88–0.80 (m, 6H); MS (ESI) m/z 420.1 ($M-H^+$)

3. 형광물질(Cy5)이 결합된 TSPO 리간드 합성

Polyethylene glycol (PEG)를 이용하여 TSPO-binding 리간드 CB185 (**1**)와 형광물질인 Cy5를 연결하였다. PEG는 diethylene glycol, tetraethylene glycol, hexaethylene glycol을 각각 사용하였으며, 아래의 합성 방법을 통해 기능화한 후 TSPO 리간드인 CB185와 Cy5를 결합 (conjugation)하여 최종 화합물 (**11a-c**)을 합성하였다.

3.1) Functionalized PEG chain 합성(8a-c)

Route A: **6a-b** (6a: Diethylene glycol, 6b: Tetraethyleneglycol)이 녹여져 있는 tetrahydrofuran (15 mL)에 4-methylbenzen-1-sulfonyl chloride (0.5 equivalent)와 4 mL의 증류수에 녹여져 있는 potassium hydroxide (0.6 equivalent)를 얼음bath를 이용하여 0도 조건 하에서 첨가하였다. 혼합물은 상온에서 12 시간 동안 교반 후 ethyl acetate와 증류수(30 mL, v/v = 1:1)를 첨가하여 유기층을 추출한다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (EtOAc/hexane)를 이용해 분리 정제하여 생성물(**7a-b**)을 얻었다. 얻어진 **7a-b**가 녹아져 있는 dichloromethane (10 mL)에 1-bromopyrrolidine-2,5-dione (NBS, 2.0 equivalent)과 triphenylphosphine (2.2 equivalent)를 얼음bath를 이용하여 0도 조건하에서 첨가하였다. 혼합물은 상온에서 5시간 교반 후 dichloromethane과 증류수(10 mL, v/v = 1:1)를 첨가하여 유기층을 추출한다. 분리된 유기층은 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (EtOAc/hexane)를 이용해 분리 정제하여 생성물(**8a-b**)을 얻었다.

Route B: **6c** (hexaethylene glycol)이 녹아져 있는 tetrahydrofuran (15 mL)에 4-methylbenzen-1-sulfonyl chloride (0.5 equivalent)와 4 mL의 증류수에 녹여져 있는 potassium hydroxide (0.6 equivalent)를 얼음bath를 이용하여 0도 조건 하에서 첨가하였다. 혼합물은 상온에서 12 시간 동안 교반 후 ethyl acetate와 증류수(10 mL, v/v = 1:1)를 첨가하여 유기층을 추출한다. 분리된 유기층을 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (EtOAc/hexane)를 이용해 분리 정제하여 생성물(**7c**)을 얻었다. 얻어진 **7c**가 녹아져 있는 acetone (10 mL)에 lithium bromide(4 equivalent)를 첨가하였다. 혼합물은 reflux를 통해 가열하여 3시간 동안 교반 후 감압증발기를 통해 반응 용매를 제거

하고 dichloromethane과 증류수(10 mL, v/v = 1:1)를 첨가하여 유기층을 추출한다. 분리된 유기층은 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 추가 정제 없이 농축하여 다음 반응에 바로 사용하였다. 생성물이 포함된 혼합물이 녹아져 있는 dichloromethane (10 mL)에 4-methylbenzen-1-sulfonyl chloride (1.0 equivalent)와 trimethylamine (1.0 equivalent)을 얼음bath를 이용하여 0도 조건하에서 첨가하였다. 혼합물은 상온에서 12 시간 교반 후 dichloromethane과 증류수(10 mL, v/v = 1:1)를 첨가하여 유기층을 추출한다. 분리된 유기층은 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (EtOAc/hexane)를 이용해 분리 정제하여 생성물(**8c**)을 얻었다.

3.1.1) 2-(2-Hydroxyethoxyethyl)

4-methylbenzenesulfonate (**7a**)

화합물 **6a** (5.0 g, 47.1 mmol)로부터 route A를 이용해 반응 후, flash column chromatography (40% EtOAc/hexane)를 이용해 분리 정제하여 무색의 용액 형태(2.7 g, 22%)로 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.20-4.18 (m, 2H), 3.70-3.66 (m, 4H), 3.54-3.52 (m, 2H), 2.44 (s, 3H); MS (ESI) m/z 261.1 (M-H⁺)

3.1.2) 2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl)

4-methylbenzenesulfonate (**7b**)

화합물 **6b** (5.0 g, 25.7 mmol)로부터 route A를 이용해 반응 후, flash column chromatography (40% EtOAc/hexane)를 이용하여 무색의 용액 형태(1.9 g, 21%)로 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.16 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.70-3.58 (m, 14H), 2.44 (s, 3H); MS (ESI) m/z 349.1 (M-H⁺)

3.1.3) 17-Hydroxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl 4-methylbenzenesulfonate (**7c**)

화합물 **6c** (5g, 17.7 mmol)로부터 route B를 이용해 반응 후, flash column chromatography (70% EtOAc/hexane)를 이용하여 무색의 용액 형태(1.7 g, 22%)로 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.18–4.14 (m, 2H), 3.80 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.71–3.59 (m, 18H), 3.46 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.44 (s, 3H); MS (ESI) m/z 437.2 (M-H^+)

3.1.4) 2-(2-Bromoethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**8a**)

화합물 **7a** (0.7 g, 2.8 mmol)로부터 route A를 이용해 반응 후, flash column chromatography (40% EtOAc/hexane)를 이용해 무색의 용액 형태(0.6 g, 69%)로 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.18 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.75–3.70 (m, 4H), 3.38 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.45 (s, 3H); MS (ESI) m/z 323.0 (M-H^+)

3.1.5) 2-(2-(2-(2-Bromoethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**8b**)

화합물 **7b** (0.5 g, 1.5 mmol)로부터 route A를 이용해 반응 후, flash column chromatography (40% EtOAc/hexane)를 이용해 무색의 용액 형태(0.4 g, 74%)로 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.16 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.80 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.70–3.60 (m, 10H), 3.46 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.45 (s, 3H); MS (ESI) m/z 413.0 (M-H^+)

3.1.6) 17-Bromo-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl 4-methylbenzenesulfonate (**8c**)

화합물 **7c** (0.8 g, 1.7 mmol)로부터 route B를 이용해 반응 후, flash column chromatography (70% EtOAc/hexane)를 이용해 무색의 용액 형태(0.6 g, 71%)로 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78

(d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.17–4.14 (m, 2H), 3.80 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.70–3.58 (m, 18H), 3.47 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.45 (s, 3H); MS (ESI) m/z 501.1 (M-H^+)

3.2) TSPO 리간드와 형광물질 (Cy5) 및 PEG chain의 결합(**11a-c**)

화합물 **1** (CB185)이 녹아져 있는 tetrahydrofuran (10 mL)에 화합물들 **8a-c**와 sodium hydride (1.5 equivalent)를 첨가하였다. 혼합물은 상온에서 24 시간 동안 교반 후 dichloromethane과 증류수(10 mL, $v/v = 1:1$)를 첨가하여 유기층을 추출한다. 분리된 유기층은 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (EtOAc/hexane)를 이용하여 생성물을 분리 정제한 후 농축시켜 바로 다음 반응에 사용한다. 혼합물이 녹아져 있는 dimethylformamide (10 mL)에 sodium azide (3 equivalent)를 첨가하여 상온에서 24시간 동안 교반 후 감압 증발기를 통해 반응용매를 제거한 후 농축시킨다. 이 후 dichloromethane과 증류수(10 mL, $v/v = 1:1$)를 첨가하여 유기층을 추출하고, 분리된 유기층은 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (EtOAc/hexane)를 이용해 분리 정제하여 생성물(**9a-c**)을 얻었다. 얻어진 화합물들 **9a-c**가 녹아 있는 tetrahydrofuran (5 mL)에 triphenylphosphine (1.1 equivalent)을 첨가하였다. 혼합물은 상온에서 48 시간 동안 교반 후 dichloromethane과 sodium bicarbonate 포화수용액(5 mL, $v/v = 1:1$)을 첨가하여 유기층을 추출한다. 분리된 유기층은 소량의 무수 황산나트륨으로 물을 제거한 후 flash column chromatography (methanol/dichloromethane (1% TEA))를 이용해 분리 정제하여 생성물들(**10a-c**)을 얻었다. 얻어진 화합물들 **10a-c**가 녹아져 있는 dimethylformamide (0.3 mL)에 형광물질인 Cy5-NHS ester (0.9 equivalent)와 diisopropylethylamine (10.0 equivalent)을 빛이 차단된 조건하에서 첨가하였다. 혼합물은 상온에서 24 시간 동안 교반 후 감압 증발기를 통해 반응 용매를 제거한 후 flash column chromatography (methanol/

dichloromethane)를 이용해 분리 정제하여 생성물들 (11a-c)을 얻었다.

3.2.1) 2-(2-(4-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)-6,8-dichloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (**9a**)

위의 3.2)의 합성 방법을 이용해 반응 후, flash column chromatography (40% EtOAc/hexane)를 이용해 얻은 노란색의 용액 형태(50.9 mg, 43%)로 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.21-4.18 (m, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.91-3.89 (m, 2H), 3.78-3.76 (m, 2H), 3.45-3.42 (m, 2H), 3.30-3.27 (m, 2H), 3.10-3.06 (m, 2H), 1.56-1.44 (m, 4H), 0.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.72 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); MS (ESI) m/z 532.2 (M-H^+)

3.2.2) 2-(2-(4-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)-6,8-dichloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (**9b**)

위의 3.2)의 합성 방법을 이용해 반응 후, flash column chromatography (40% EtOAc/hexane)를 이용해 얻은 노란색의 용액 형태(49.3 mg, 33%)로 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.19-4.17 (m, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.90-3.88 (m, 2H), 3.75-3.66 (m, 12H), 3.40-3.37 (m, 2H), 3.30-3.26 (m, 2H), 3.10-3.06 (m, 2H), 1.56-1.44 (m, 4H), 0.85 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.72 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); MS (ESI) m/z 621.2 (M-H^+)

3.2.3) 2-(2-(4-((17-Azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)oxy)phenyl)-6,8-dichloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (**9c**)

위의 3.2)의 합성 방법을 이용해 반응 후, flash column chromatography (70% EtOAc/hexane)를

이용해 얻은 노란색의 용액 형태(105.7 mg, 61%)로 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.18-4.16 (m, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.89-3.87 (m, 2H), 3.74-3.73 (m, 2H), 3.71-3.64 (m, 20H), 3.30-3.26 (m, 2H), 3.10-3.06 (m, 2H), 1.56-1.44 (m, 4H), 0.85 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.72 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); MS (ESI) m/z 709.3 (M-H^+)

3.2.4) 2-(2-(4-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)-6,8-dichloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (**10a**)

화합물 **9a** (40mg, 75 μmol)로부터 위의 3.2)의 합성 방법을 이용해 반응 후, flash column chromatography (4% methanol/dichloromethane containing 1% TEA)를 이용해 얻은 노란색의 용액 형태(26.7 mg, 70%)로 얻었다. MS (ESI) m/z 507.2 (M-H^+)

3.2.5) 2-(2-(4-(2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)-6,8-dichloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (**10b**)

화합물 **9b** (50mg, 80 μmol)로부터 위의 3.2)의 합성 방법을 이용해 반응 후, flash column chromatography (5% methanol/dichloromethane containing 1% TEA)를 이용해 얻은 노란색의 용액 형태(26 mg, 54%)로 얻었다. MS (ESI) m/z 595.2 (M-H^+)

3.2.6) 2-(2-(4-((17-Amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)oxy)phenyl)-6,8-dichloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dipropylacetamide (**10c**)

화합물 **9c** (50mg, 70.4 μmol)로부터 위의 3.2)의 합성 방법을 이용해 반응 후, flash column chromatography (10% methanol/dichloromethane containing 1% TEA)를 이용해 얻은 노란색의 용액 형태(12.5 mg, 26%)로 얻었다. MS (ESI) m/z 683.3 (M-H^+)

3.2.7) 1-(6-((2-(2-(4-(6,8-Dichloro-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)phenoxy)ethoxy)ethyl)amino)-6-oxohexyl)-3,3-dimethyl-2-((1E,3E,5E)-5-(1,3,3-trimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3H-indol-1-ium chloride (**11a**)

화합물 **10a** (4.3mg, 8.4 μ mol)로부터 위의 3.2)의 합성 방법을 이용해 반응 후, flash column chromatography (4% methanol/dichloromethane)를 이용해 진한 푸른색의 고체 형태(6.4mg, 78%)로 얻었다. MS (ESI) m/z 971.4 (M^+)

3.2.8) 1-(1-(4-(6,8-Dichloro-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)phenoxy)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-yl)-3,3-dimethyl-2-((1E,3E,5E)-5-(1,3,3-trimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3H-indol-1-ium chloride (**11b**)

화합물 **10b** (5.0 mg, 8.4 μ mol)로부터 위의 3.2)의 합성 방법을 이용해 반응 후, flash column chromatography (5% methanol/dichloromethane)를 이용해 진한 푸른색의 고체 형태(6.6 mg, 74%)로 얻었다. MS (ESI) m/z 1059.5 (M^+)

3.2.9) 1-(1-(4-(6,8-Dichloro-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)phenoxy)-19-oxo-3,6,9,12,15-pentaoxa-18-azatetracosan-24-yl)-3,3-dimethyl-2-((1E,3E,5E)-5-(1,3,3-trimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3H-indol-1-ium chloride (**11c**)

화합물 **10c** (5.7mg, 8.4 μ mol)로부터 위의 3.2)의 합성 방법을 이용해 반응 후, flash column chromatography (10% methanol/dichloromethane)를 이용해 진한 푸른색의 고체 형태(7.3 mg, 76%)로 얻었다. MS (ESI) m/z 1147.6 (M^+)

4. TSPO 결합친화도 평가

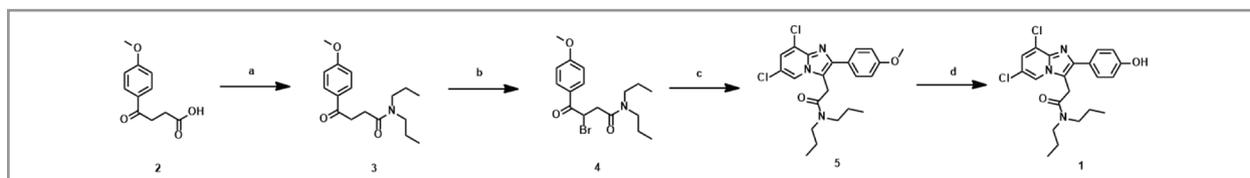
선행 연구를 바탕으로 TSPO 결합친화도를 평가하기 위하여 TSPO의 발현도가 높으며 specific binding

이 가능한 rat C6 glioma cell을 선택하여 실험을 진행하였다. 해당 세포는 HAM'S F-12 medium에서 열처리된 Fetal Bovine Serum (FBS)와 100 U/mL의 penicillin, 100 μ g/mL의 streptomycin 그리고 2 mM의 L-glutamine을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. Membrane 추출을 위해 80% confluency가 될 때까지 세포를 배양한 후, medium을 제거하고 Phosphate Buffer Saline (PBS) (pH = 7.2)로 세포를 탈착시킨다. 탈착된 세포는 PBS에 현탁시켜 Brinkman Polytron (setting 5 for 3 x 15 s)을 이용하여 균질화하였다. 이후 현탁액은 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 37000 g로 원심 분리한 후 상층액을 제거하였다. 최종 펠렛은 차가운 10 mM PBS (pH = 7.2)로 재현탁시킨 후에 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하여 사용하였다. TSPO 결합친화도 평가 실험은 다음과 같이 진행되었다. 100 μ g의 C6 membrane을 0.5 mL의 PBS (pH = 7.2)에 현탁시킨 후, 0.7 nM의 [³H]PK11195와 약물과 11a-c (10^{-5} - 10^{-11} M)를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 90분간 반응하였다. 반응이 종료된 후 Whatman GF/C glass microfiber filters를 통해 여과하였다. 해당 필터는 1 mL의 차가운 PBS (pH = 7.2)로 3번 세척해준 후 결합친화도를 평가하였다.

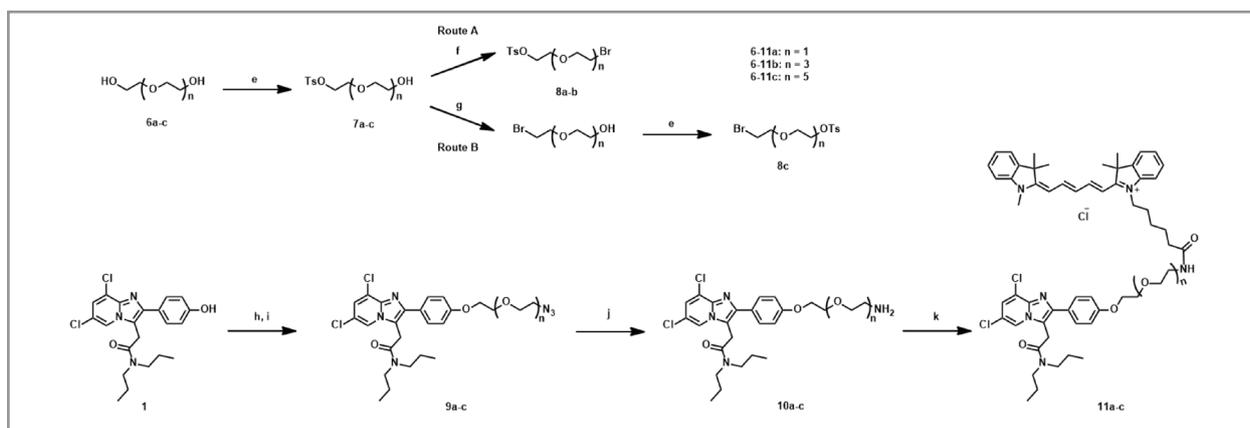
Results and discussion

TSPO에 결합하는 6,8-dichloro-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridineacetamide 기반의 리간드인 CB185 (**1**)를 합성하기 위해 시작 물질인 화합물 2의 carboxylic acid에 coupling agent인 CDI를 이용해 dipropylamine과 amide coupling 반응을 하였다. 합성된 화합물 3을 브롬화한 후, 2-amino-3,5-dichloropyridine을 이용하여 고리화 반응을 진행하여 6,8-dichloro-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridineacetamide 골격을 형성하였다. 이후 boron tribromide를 이용하여 디메틸화를 진행하여 총괄 수득율 10%로 최종 화합물인 CB185(**1**)를 합성하였다.

본 연구의 목적인 polyethylene glycol (PEG) chain



Scheme 1. Synthesis of CB185. Reagents and conditions: (a) 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), dipropylamine, triethylamine (TEA), THF, r.t., 4 h; (b) Br_2 , CHCl_3 , r.t., 6 h; (c) 2-amino-3,5-dichloropyridine, DMF, reflux, 4 h; (d) BBr_3 , CH_2Cl_2 , H_2O , r.t., 2 h.



Scheme 2. Functionalization of PEG and Conjugation CB185 with Fluorescence Dye (Cy5). Reagents and conditions: (e) 4-methylbenzen-1-sulfonyl chloride, TEA, CH_2Cl_2 , from 0 °C to r.t., 12 h; (f) 1-bromopyrrolidine-2,5-dione (NBS), triphenylphosphine, CH_2Cl_2 , from 0 °C to r.t., 5 h; (g) LiBr, acetone, reflux, 3 h; (h) **8a-c**, NaH, THF, r.t., 24 h; (i) NaN_3 , DMF, r.t., 24 h; (j) triphenylphosphine, THF, r.t., 48 h; (k) Cy5-NHS ester, DIPEA, DMF, r.t., 24 h

의 길이에 따른 TSPO 리간드의 결합 친화도 변화를 평가하기 위하여, 미리 준비한 서로 다른 길이의 PEG인 **6a-c**를 기능화하여 TSPO 리간드인 CB185 (**1**)을 연결 후 셀 실험을 위해 PEG 말단에 형광물질인 Cy5를 도입하였다. 시작 물질인 화합물 **6a-c**를 기능화하기 위해 4-methylbenzen-1-sulfonyl chloride를 염기 조건하에서 양쪽의 끝 단 중 한 개의 하이드록시기를 설포닐화한다. 이후, 생성물에서 남은 한 개의 하이드록시기는 NBS를 이용해 브롬화하는 합성 방법 (Route A)으로 화합물들 **8a-b**를 얻었다. 화합물 **6c**의 경우, 위의 반응을 통해 합성 도중 분리 정제의 문제로 인해 변경된 합성 방법(Route B)을 사용하였다. 동일하게 4-methylbenzen-1-sulfonyl chloride를 염기 조건하에서 양쪽의 끝 단 중 한 개의 하이드록시기를 설포닐화 후 동일한 위치에 lithium bromide를 이용해 브롬화하였다. 이후, 생성물에서 남은 한 개의 하이드록시기는 위와 동일하게 설포닐화 하였다. 따라서 양 쪽 모두 기능화된 PEG인 화합물들 **8a-c**를 성공적으로 합성하였으며, 이를 사용하여 *O*-alkylation

을 통해 각기 다른 길이의 PEG를 CB185 (**1**)에 연결하였다. NHS-ester로 활성화된 형광물질인 Cy5를 *N*-alkylation을 통해 PEG chain이 포함된 CB185 (**1**)와 연결하고자 sodium azide를 사용하여 azidation한 후 triphenylphosphine을 이용한 환원 반응으로 PEG chain의 끝 단이 아민기로 치환된 화합물들 **10a-c**를 합성하였다. 마지막으로 화합물들 **10a-c**와 NHS-ester로 활성화된 Cy5를 염기조건하에서 *N*-alkylation을 통하여 성공적으로 화합물들 **11a-c**를 합성하였다. 각 반응은 TLC를 통하여 반응 진행 정도를 모니터링 하였으며, 생성물은 NMR과 LC-MS로 화합물의 구조 및 분자량을 확인하였다.

최종 화합물들인 **11a-c**의 TSPO에 대한 결합 친화도 평가를 위해 TSPO가 과발현되며 특이적 결합이 가능한 rat C6 glioma cell을 선택하여 평가를 진행하였다. 경쟁물질로는 [^3H]PK11195를 사용하였으며, 화합물들 **11a-c**의 결합 친화도 평가 결과는 Figure 2와 Table 1에 표시하였다. 화합물들 **11a-c**의 TSPO에 대한 결합 친화도는 각각 46.5, 51.0, 그리고 388.5 nM로 선행

연구에서 보고된 [^{18}F]CB251 (0.27 nM)과 기본 골격인 CB185 (1, 1.31 nM)에 비해 결합 친화도가 약 35배 감소한 것을 볼 수 있다. 이전 세대의 TSPO 표적 방사성 추적자인 PK11195 (3.2 nM)와 PBR28 (6.1 nM)보다 약 8배 이상 낮은 결합 친화도를 보였지만, TSPO를 표적으로 하면서 항암물질을 운반할 수 있는 물질로서는 충분한 결합친화도(nanomolar binding)를 갖을 거라 기대된다. 특히 1개 또는 3개의 PEG chain을 포함하는 화합물들 11a–b의 경우 약 50 nM 수준에서 결합친화도가 떨어진 상태로 유지되는 것을 볼 수 있지만, 상대적으로 증가된 5개의 PEG chain을 포함하는 화합물

11c의 경우 388.5 nM로 급격하게 결합친화도가 낮아지는 것을 볼 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 TSPO 리간드인 CB185가 PEG chain의 길이 영향으로 인해 결합친화도가 변화함을 알 수 있고, 상대적으로 길어진 PEG chain에 의한 방해로 TSPO 자체에 대한 결합 친화도가 떨어지는 경향성을 확인할 수 있었다. 이는 TSPO 표적 약물전달체 또는 나노입자를 개발하는 단계에서 자체 결합능 억제를 최소화할 수 있는 사슬 길이를 검증할 수 있었으며, 추후 최적화 단계에서 결합친화도와 체내 분포에 영향을 줄 수 있는 중요한 요소로서 고려될 필요가 있다.

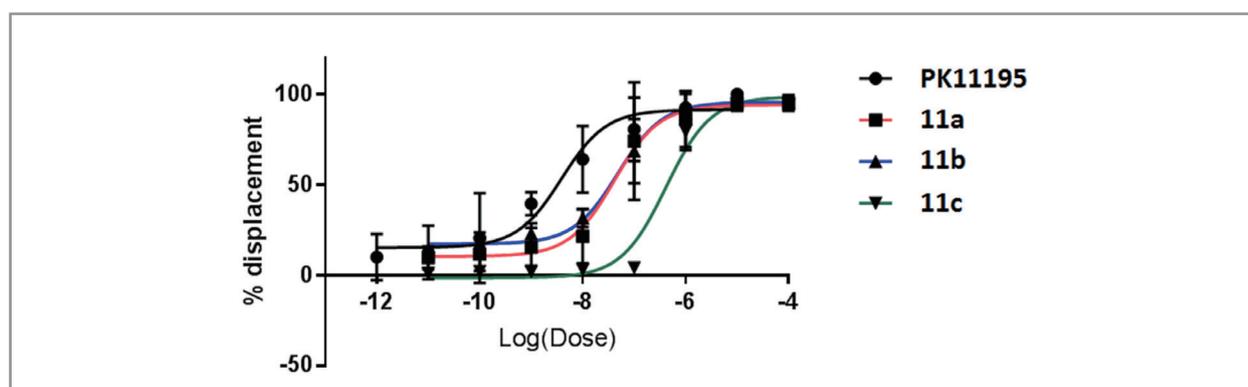


Figure 2. Competition binding affinity curves of the three tested compounds and a reference compound PK11195 in rat C6 glioma cells.

Table 1. Affinity value (K_i /nM) of reported TSPO-binding compounds and 11a-c

Compound	K_i value (nM) for TSPO
PK11195	3.2
PBR28	6.1 ^a
CB251	0.27 ^a
CB185 (1)	1.31 ^b
11a	46.5
11b	51.0
11c	388.5

^a Corresponding values for PBR28 and CB251 are also reported in reference 9; ^bCorresponding value for CB185 (1) is also reported for comparing with other ligands in reference 18.

Conclusion

본 연구에서는 TSPO 리간드인 CB185 (1)에 각기 다른 길이의 PEG chain을 도입하였으며 형광물질인 Cy5를 통해 TSPO 결합친화도의 변동성을 보고자 하였다. 최종 화합물들(11a-c)을 성공적으로 합성할 수 있었으며, 이를 기준물질인 PK11195를 사용해 결합 친화도를 평가 및 비교하였다. 그 결과 5개의 PEG chain이 도입된 경우 급격히 결합친화도가 떨어지는 성향을 보였으며, 이는 상대적으로 긴 PEG chain으로 인해 기존의 결합능을 억제하여 결합 친화도가 감소한 것으로 분석하였다. 따라서 본 연구는 나노의학 분야에서 사용될 수 있는 TSPO 표적 약물전달체 또는 나노입자를 개발하기 위해 TSPO 리간드 CB185 (1)를 도입 시 결합능 억제를 최소화할 수 있는 적절한 사슬 길이에 대한 결합친화도 경향성을 파악할 수 있었다. 준비한 형광 물질 Cy5가 말단에 있고 PEG 사슬을 갖춘 TSPO-binding 리간드를 이용한 체외 셀 실험에서의 미토콘드리아 영상 특이성 실험은 준비중에 있으며, 추후 본 실험 결과를 고려하여 약물을 탑재하거나 진단 또는 치료용 방사성동위원소를 표지하여 높은 결합 친화도를 지닌 TSPO 표적 약물전달체 또는 나노입자를 개발 및 최적화하고자 한다.

Acknowledgments

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 질환극복기술개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: H16C0947). 이권에 대한 문제(conflict of interest)는 해당사항 없습니다.

References

- Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, Akula N, Groyer G, Adams D, Schumacher M. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:971-988.
- Ching A, Kuhnast B, Damont A, Roeda D, Tavitian B, Dolle F. Current paradigm of the 18-kDa translocator protein (TSPO) as a molecular target for PET imaging in neuroinflammation and neuro degenerative diseases. *Insights Imaging* 2012;3:111-119.
- Zheng J, Boisgard R, Siquier-Pernet K, Decaudin D, Dollé F, Tavitian B. Differential expression of the 18 kDa translocator protein (TSPO) by neoplastic and inflammatory cells in mouse tumors of breast cancer. *Mol Pharm* 2011;8:823-832.
- Austin CJD, Kahlert J, Kassiou M, Rendina LM. The translocator protein (TSPO): A novel target for cancer chemotherapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:1212-1216.
- Camsonne R, Crouzel C, Comar D, Mazière M, Prenant C, Sastre J, Moulin MA, Syrota A. Synthesis of N-[¹¹C]methyl, N-(methyl-1-propyl)(chloro-2-phenyl)-1-isoquinolinecarboxamide-3 (PK11195): a new ligand for peripheral benzodiazepine receptors. *J Labelled Comp Radiopharm* 1984;21:985-991.
- Banati R, Newcombe J, Gunn R, Cagnin A, Turkheimer F, Heppner F, Price G, Wegner F, Giovannoni G, Miller D, Perkin D, Smith T, Hewson A, Bydder G, Kreutzberg G, Jones T, Cuzner M, Myers R. The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis. *Brain* 2000;123:2321-2337.
- Chauveau F, Boutin H, Camp NV, Dolle F, Tavitian B. Nuclear imaging of Neuroinflammation: a comprehensive review of [¹¹C]PK11195 challengers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35:2304-2319.
- Owen D, Yeo A, Gunn R, Song KJ, Wadsworth G, Lewis A, Rhodes C, Pulford D, Bennacef I, Parker C, StJean P, Cardon L, Mooser V, Matthews P, Rabiner E, Rubio J. An 18-kDa Translocator Protein (TSPO) polymorphism explains differences in binding affinity of the PET radioligand PBR28. *J Cerebr Blood F Met* 2012;32:1-5.
- Perrone M, Moon BS, Park HS, Laquintana V, Jung JH,

- Cutrignelli A, Lopedota A, Franco M, Kim SE, Lee BC, Denora N. A novel PET imaging probe for the detection and monitoring of translocator protein 18 kDa expression in pathological disorders. *Sci Rep* 2016;6:20422.
10. Lopalco A, Cutrignelli A, Denora N, Perrone M, Lacobazzi RM, Fanizza E, Lopedota A, Depalo N, de Candia M, Franco M, Laquintana V. Delivery of proapoptotic agents in glioma cell lines by TSPO ligand-dextran nanogels. *Int J Mol Sci* 2018;19:1155.
11. Kim GR, Paeng JC, Jung JH, Moon BS, Lopalco A, Denora N, Lee BC, Kim SE. Assessment of TSPO in a rat experimental autoimmune myocarditis model: A comparison study between [¹⁸F]fluoromethyl-PBR28 and [¹⁸F]CB251. *Int J Mol Sci* 2018;19:276.
12. Choi JY, Iacobazzi RM, Perrone M, Margiotta N, Cutrignelli A, Jung JH, Park DD, Moon BS, Denora N, Kim SE, Lee BC. Synthesis and evaluation of tricarbonyl ^{99m}Tc-labeled 2-(4-chloro)phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine analogs as novel SPECT imaging radiotracer for TSPO-rich cancer. *Int J Mol Sci* 2016;17:1085.
13. Choi JY, Jung JH, Song IH, Moon BS, Lee BC, Kim SE. Synthesis and biological evaluation of tricarbonyl technetium labeled 2-(4-chloro)phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine analog (^{99m}Tc-CB257) as a TSPO-binding ligand. *J Radiopharm Mol Probes* 2018;4:73-79.
14. Denora N, Lee C, Lacobazzi RM, Choi JY, Song IH, Yoo JS, Piao Y, Lopalco A, Leonetti F, Lee BC, Kim SE. TSPO-targeted NIR-fluorescent ultra-small iron oxide nanoparticles for glioblastoma imaging. *Eur J Pharm Sci* 2019;139:105047.
15. Torchilin V. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2014;13:813-827.
16. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2017;17:20-37.
17. Trapani G, Franco M, Latrofa A, Ricciardi L, Carotti A, Serra M, Sanna E, Biggio G, Liso G. Novel 2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine derivatives as potent and selective ligands for peripheral benzodiazepine receptors: synthesis, binding affinity, and in vivo studies. *J Med Chem* 1999;42:3934-3941.
18. Denora N, Laquintana V, Pisu M, Dore R, Murru L, Latrofa A, Trapani G, Sanna E. 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine compounds containing hydrophilic groups as potent and selective ligands for peripheral benzodiazepine receptors: synthesis, binding affinity and electrophysiological studies. *J Med Chem* 2008;51:6876-6888.