

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2021.7.1.3>

# Preliminary research on the development of boron neutron capture therapy drugs

Soyeon Kim<sup>1,2</sup>, Ji-ung Yang<sup>1,2</sup>, Kyo Chul Lee<sup>1</sup>, Jung Young Kim<sup>1</sup>, Yong Jin Lee<sup>1</sup>, Ji-Ae Park<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied RI, Korea Institute of Radiological & Medical Sciences (KIRAMS), Seoul, Korea; <sup>2</sup>Department of Medical & Biological Engineering, Kyungpook National University, Daegu, Korea

## ABSTRACT

For successful boron neutron capture therapy, it is essential to develop a boron drug with a selective accumulation capacity for tumors. In particular, in order to apply boron neutron capture therapy to brain tumors, drugs with good blood-brain barrier penetration are required. In this study, two low-molecular-weight boron compounds were introduced as brain tumor boron neutron capture therapy drugs, and their physical and biological efficacy were evaluated. Among them, **B2** showed good blood-brain barrier permeability and a high brain/blood ratio. From these results, it is expected that **B2** can be used as a useful boron drug for boron neutron capture therapy in brain tumors.

**Key Word:** Boron neutron capture therapy, Brain tumor, Blood-brain-barrier, Boron drugs

## Introduction

중성자포획치료법(Neutron Capture Therapy, NCT)은 종양세포 내에 중성자 포획(또는 흡수)약물을 축적시킨 후 일정한 용량의 열중성자를 조사하여 종양세포만 선택적으로 파괴시키는 정밀치료기술이다[1,2]. 이 기술의 장점은 낮은 에너지를 가진 열중성자가 정상세포에는 거의 손상을 주지 않으면서 열중성자와 특이적으로 반응하는 약물이 축적된 암세포에서만 선택적으로 핵분열 반응이 일어나 암세포를 사멸시키는 방법으로, 기존에 임상에서 상용화된 방사선 치료요법들에 비해 환자에 대한 낮은 방사선피폭량과 정밀표적치료를 제공하는 기술로 활용가능하다. 그러므로, 오늘날 중성자포획치료법은 현재 임상에서 쓰이는 방사선치료의 주요 문제점인 정상 조직의 손상을 효과적으로 낮출 수 있으며, 종양세포에 약물을 선택적으로 높게 섭취시키면 그 효과가 더 극대화 될 수 있다[3].

열중성자를 포획하는 원자로 붕소를 사용하는 붕소 중성자포획치료(Boron Neutron Capture Therapy, BNCT)는  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$  핵분열 반응을 그 원리로 한다. 여기서 농축  $^{10}\text{B}$  원자는 열중성자를 포획하여 핵분열 반응을 일으킨 뒤 알파입자( $\text{He}^{2+}$ ), 리튬입자( $\text{Li}^+$ ) 및 일부 감마선 등으로 붕괴된다. 이때 방출된 알파입자와 리튬입자의 비정거리는 약 5 ~ 7 마이크로미터 정도인데, 이는 약 10 마이크로미터 크기인 세포의 직경에 해당하므로, 결과적으로 붕소약물은 이 약물과 근거리에 인접한 종양세포만 파괴하게 된다[3,4].

그러므로 BNCT는 수술이 매우 어려운 악성 뇌종양(Glioblastoma Multiforme, GBM)이나 악성 피부암(melanoma), 그리고 화학요법이나 방사선요법에 효과가 없는 난치성 뇌종양 등에 주로 적용되고 있다[5-7]. 그러나 BNCT에 대한 높은 관심에 비해 현재까지 임상에 적용된 대표적인 붕소약물은 BPA (borono-L-phenylalanine)

Received: June 11, 2021 / Revised: June 25, 2021 / Accepted: June 28, 2021

Corresponding Author: Ji-Ae Park, Korea Institute of Radiological & Medical Sciences (KIRAMS), 75 Nowonro, Nowongu, Seoul 01812, Korea, Tel: +82-2-970-1660, Fax: +82-2-970-1341, E-mail: [jpark@kirams.re.kr](mailto:jpark@kirams.re.kr)

Copyright©2021 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

와 BSH (mercaptoundecahydrododecaborate) 두 가지 밖에 없다[8].

우선 타이로신 유도체인 BPA는 정상세포에 비해 성장속도가 빠른 종양세포가 아미노산 공급을 확장하기 위해 아미노산 수용체를 과다 발현시키는 체내 환경에서 유사 아미노산의 형태로 인해 능동적으로 세포 내로 들어갈 수 있다. 이와 달리, 붕소원자 12개가 polyhedral 구조로 결합된 BSH는 기존의 나노입자와 유사하게 EPR(enhanced permeability and retention) 효과로 인해 수동적으로 종양조직에 머무르게 된다[8-12]. 여기서 EPR효과는 종양 조직의 신생혈관이 정상혈관에 비해 상대적으로 느슨한 간극을 형성하여 약물의 투과가 용이하고 림프조직이 덜 형성되어 있어 약물이 오랫동안 체류하는 효과를 말한다. 그러나 앞서 언급한 두 약물(BPA, BSH)은 뇌종양에 대한 선택성이 낮으며 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB) 투과율이 낮은 단점이 존재한다[13,14].

그러므로, 임상에서 보다 성공적인 BNCT를 위해 붕소 약물은 1) 낮은 독성, 2) 종양 조직의 높은 선택성 및 축적률 ( $20\sim 35 \mu\text{g }^{10}\text{B/g tumor}$ ), 3) 정상 조직의 낮은 축적률 ( $<5 \mu\text{g }^{10}\text{B/g tissue}$ ) 등의 조건을 갖추는 것이 매우 중요하다[9,15]. 이러한 관점에서 알츠하이머 및 뇌종양 진단을 위한 방사성의약품에 많이 응용되고 있는 벤조사이아졸 유도체는 종양에서 많이 발현되는 아릴 하이드로카본 수용체 통해 종양세포에 섭취될 뿐만 아니라 BBB 투과력이 높아 좋은 BNCT 약물의 후보물질로 언급될 수 있다[16-18]. 따라서 본 연구팀은 상기 BBB 투과력을 유지하면서 뇌종양 세포의 선택성을 높일 수 있는 BNCT를 위한 붕소약물을 개발하기 위하여 벤조사이아졸을 도입한 신규 화합물을 설계 및 합성하였고, 또한 이들 화합물의 유효성 평가를 위해 독성 시험과 함께 체내의 실험을 수행하였다.

## Materials and Methods

### 1. General remarks

모든 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 추가 정제 없이 사용하였다. 합성 화

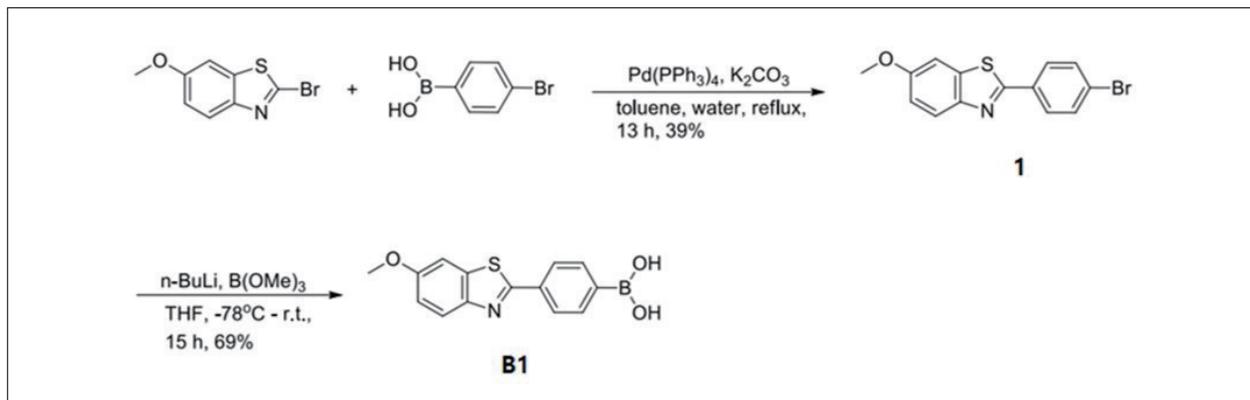
합물 **B1**, **B2**의 순도 분석은 고성능 액체 크로마토그래피 (high-performance liquid chromatography, HPLC, Agilent, 1200 Infinity series)를 이용하여 이루어졌고, C18 칼럼(Merck, LiChroCART, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle size)을 사용하였으며, 이동상은 solvent A : solvent B = 6 : 4 (solvent A : 0.1 % TFA in water, solvent B : acetonitrile) 비율로 20분 동안 1 mL/min 유속으로 흘러주었다. 각 화합물 (1 mg)은 MeOH (1 mL)에 녹여 20  $\mu\text{L}$  주입하여 254 nm의 파장에서 신호를 측정 후, 각 피크의 면적으로 순도를 분석하였다. 질량 분석은 전기분무 이온화 질량 분광계(electrospray ionization mass spectrometer, ESI-MS, Thermo Scientific, ISQ EM)을 이용하여 이루어졌고, 모든 동물실험은 한국원자력의 학원 동물윤리위원회에서 승인(KIRAMS 2020-0067)한 지침에 따라 수행하였다.

### 2. Synthesis and Characterization

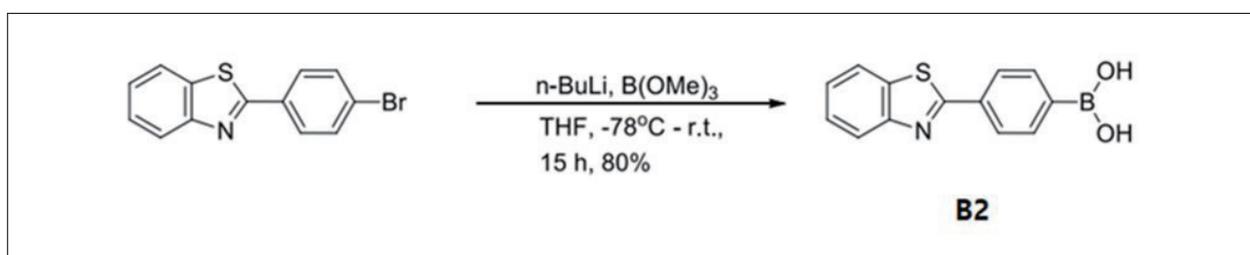
**2-(4-bromophenyl)-6-methoxybenzothiazole**  
(1). Round-bottom flask에 2-Bromo-6-methoxy-1,3-benzothiazole (30.0 g, 122.9 mmol), 4-bromophenylboronic acid (24.7 g, 122.9 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (5.7 g, 4.9 mmol), 그리고 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (34.0 g, 245.8 mmol)을 넣어주고 toluene (522.0 g)과 증류수 (600.0 g)를 가해 13 시간 동안 reflux하였다. 상기 반응 혼합물을 상온까지 식히고, celite filter 한 후, EtOAc로 닦아냈다. 추출(extraction)하여 유기층을 얻고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pad를 통과시켜 수분을 감압 제거하였다. Silica-gel flash column chromatography(50% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexane)를 수행하여 1, 15.20 g (white solid, 39%)을 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  7.94 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 7.90 (dt, J = 8.5, 2.5 Hz, 2 H), 7.61 (d, J = 8.5 Hz, 2 H), 7.35 (d, J = 2.5 Hz, 1 H), 7.10 (dd, J = 9.0, 3.0 Hz, 1 H), 3.90 (s, 3 H). ESI-MS (m/z): calculated for C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>BNOS = 320.0 [M+H]<sup>+</sup>; found, 320.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**B1**. Ar(g)하에서 2-(4-bromophenyl)-6-methoxybenzothiazole (10.0 g, 31.2 mmol)을 무수 THF (124.5 g)에 녹이고 -78°C에서 5 분간 교반한다. Cyclohexane (2.0 M)에 녹인 n-BuLi (13.3 g, 34.4

Scheme 1. Synthesis of B1



Scheme 2. Synthesis of B2



mmol)을 10 분간 넣어주고  $-78^\circ\text{C}$  에서 2 시간 동안 교반하였다. Trimethyl borate (4.9 g, 46.9 mmol)를 10 분간 넣어 준 후 상온에서 15 시간 동안 교반하였다. 그 뒤에 HCl 수용액(1.0 M)을 적정하여 용액의 pH를 4-5 정도로 맞추고 30 분간 추가적으로 교반하였다. 반응을 종료한 이후, 용액을 separatory funnel로 옮기고, EtOAc 을 넣어 추출하여 모은 유기층을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  패드에 통과시킨 후 감압 건조하였다. EtOAc로 씻어주며 필터하여 **B1** (pale yellow solid, 6.1 g (69.0%))를 98.7% 순도로 얻었다.  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.28 (s, 2 H), 8.00 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2 H), 7.96-7.94 (m, 3 H), 7.72 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1 H), 7.14 (dd,  $J = 9.0, 2.5$  Hz, 1 H), 3.85 (s, 3 H). ESI-MS ( $m/z$ ): calculated for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{BNO}_3\text{S} = 286.1$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ; found, 286.2 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

B2. Ar(g)하에서 2-(4-Bromophenyl)benzothiazole (10.0 g, 34.5 mmol)을 무수 THF (80.0 g)에 녹이고  $-78^\circ\text{C}$  에서 5 분간 교반하였다. Cyclohexane (2.0 M)에 녹인 n-BuLi (14.69 g, 37.9 mmol)을 10 분간 넣어주고  $-78^\circ\text{C}$ 에서 2 시간 동안 반응하였다. Trimethyl borate (5.4 g, 51.7 mmol)를 10 분간 넣어 준 후 상온에서 15

시간 동안 추가적으로 교반하였다. HCl 수용액(1.0 M)을 적정하여 용액의 pH를 4-5 정도로 맞추고 30 분간 추가적으로 교반하였다. 반응 종료 후 용액을 separatory funnel에 옮겨 담고, EtOAc을 넣어 추출하여 유기층을 모아  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  패드를 통과시킨 후 감압 건조하였다. 이후, EtOAc로 씻어주며 필터하여 **B2** (beige solid, 7.1 g (80.0%))를 99.5% 순도로 얻었다.  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.30 (br s, 2 H), 8.16 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H), 8.07 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H), 8.07 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2 H), 7.97 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2 H), 7.56 (td,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1 H), 7.47 (td,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1 H). ESI-MS ( $m/z$ ): calculated for  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BNO}_2\text{S} = 256.1$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ; found, 256.2 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

### 3. Cell viability

96 well plate에 1 well 당  $1 \times 10^4$  개수로 쥐 유래 신경교종 세포(C6)를 10% FBS(Fetal bovine serum)와 1% 항생제가 들어있는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 배양하였다. 세포를 24시간 동안 부

작 및 안정화 시킨 후, 각 well당 무 혈청 배지 100  $\mu$ l에 **B1** 또는 **B2**를 0, 1, 5, 10, 50, 100, 200  $\mu$ M의 농도로 희석하여 처리하고 22시간 동안 배양하였다. 이후 각 well에 CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) 용액을 10  $\mu$ l씩 첨가하여 2시간 추가 배양하였다. 배양이 완료된 plate는 microplate reader기를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도에서의 흡광도 값을 계산하여 세포 생존율 (cell viability)을 구하고 GraphPad Prism 프로그램을 이용하여 그래프를 그렸다.

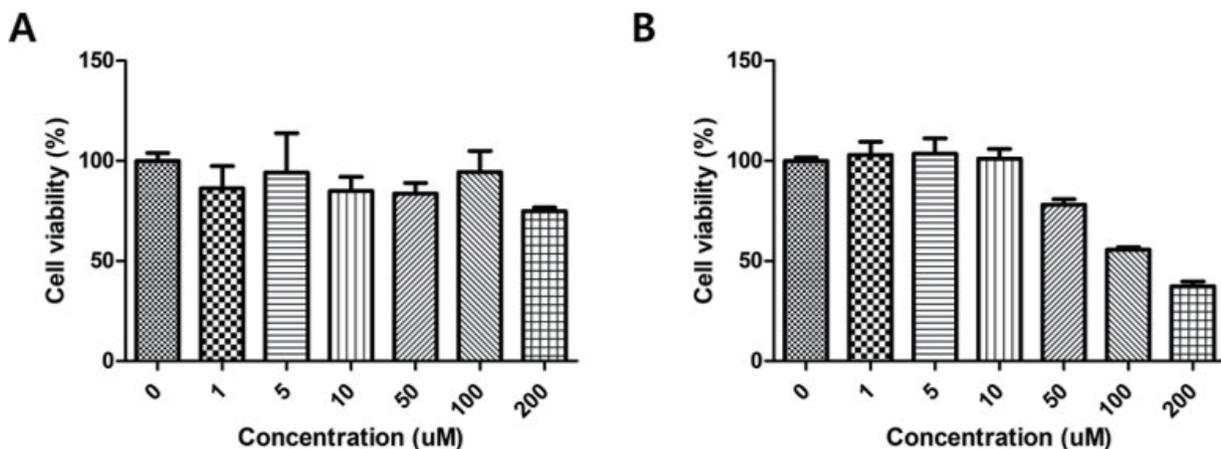
#### 4. *In vivo* biodistribution of BNCT drugs

**B1**과 **B2** 각각을 1 mg당 용매(DMSO 0.03  $\mu$ l, Tween80 0.045  $\mu$ l, saline 0.225  $\mu$ l)에 녹여 용량별로 BALB/c 마우스(male, 6W, 25 g BW)에 복강주사(i.p.) 혹은 정맥주사(i.v.) 하였다. 주사 후, 1시간째에 심장 채혈을 하고 생리식염수를 이용한 관류 후, 뇌, 신장, 간을 적출하여 유도 결합 플라즈마 질량 분석(Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)을 통해 피와 각 장기에 존재하는 붕소의 양을 측정하였다. 검량선은 3, 5, 10, 20, 40, 60 ppb B를 이용하여 그렸고, 샘플과 모든 표준 용액에 10 ppb Y (Yttrium)의 내부 표준용액을 넣어 분석하였으며 장비는 ICP-MS (NexION 350D, Perkin Elmer)를 사용하였다.

## Results and Discussion

뇌종양은 BBB에 의해 약물의 낮은 투과성 및 표적화로 다른 장기에서 발생하는 종양에 비해서 진단 및 치료가 어려운 질병들 중에 하나이다. 그럼에도 불구하고, 약물을 뇌까지 전달하기 위해서 BBB의 통과는 필수적이며, 이를 위한 전략으로 다음의 조건 등이 요구된다; 1) 이온화 되지 않는 화합물이어야 한다, 2) log P 값은 2에 가까워야 한다, 3) 분자량은 400 Da 미만이어야 한다, 4) 화합물 내 수소결합은 8~10 개를 넘지 않아야 한다(19). 본 연구에서 개발된 화합물들은(Scheme 1, 2) 모두 분자량이 300 Da 미만의 저분자이고, 이들의 CLogP 값은 각각 **B1**, 3.92 와 **B2**, 3.6로 소수성을 보여주었다. 이러한 결과는 **B1** 화합물에 붙어있는 methoxy(CH<sub>3</sub>O-) 그룹의 전자에 의해 유도효과(inductive effect)가 발생하면서 **B1** 이 **B2** 보다 이온화가 일어나지 않는 것으로 이해된다(20). 이러한 결과를 토대로, 상기 화합물은 높은 BBB 투과력에 예상되어 세포독성 및 소동물실험을 각각 진행하였다.

**Figure 1**은 붕소약물의 세포독성 실험 결과를 보여준다. **B1**은 1 ~ 200  $\mu$ M의 약물농도에서 70% 이상의 세포 생존력을 보였다. **B2**는 1 ~ 50  $\mu$ M의 약물농도에서 70% 이상의 세포 생존력을 보인 반면에, 100 ~ 200  $\mu$ M의 약물 농도에서는 세포 생존력이 65~45% 로 감소하는 경향을 보였다.



**Figure 1.** Cell viability of C6 glioma cell for (A) **B1** and (B) **B2** at various concentrations.

Figure 2는 마우스 장기 별 B1과 B2의 붕소 농도를 보여준다. 또한, 약물을 주입하지 않은 마우스 장기의 붕소 농도도 나타내었는데, 정상 마우스의 장기에도 소량의 붕소(Blood,  $0.16 \pm 0.01$ ; Brain,  $0.12 \pm 0.01$ ; Kidney,  $0.53 \pm 0.01$ ; Liver,  $0.14 \pm 0.01$   $\mu\text{g/g}$  tissue)가 있었다. B1를 500 mg/kg 복강주사(i.p.)한 후 1시간의 붕소농도는 Blood,  $2.00 \pm 0.14$ ; Brain,  $1.46 \pm 0.01$ ; Kidney,  $4.01 \pm 0.66$ ; Liver,  $4.28 \pm 0.42$   $\mu\text{g/g}$  tissue 였고, B2를 500 mg/kg 복강주사(i.p.)한 후 1시간의 붕

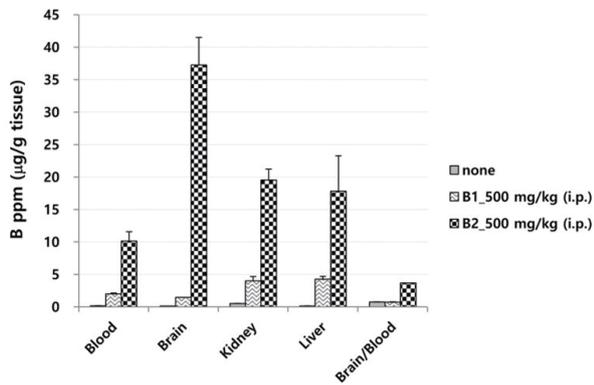


Figure 2. Boron concentrations in organs of Balb/C mice (n = 3, mean  $\pm$  SD) after i.p. injection of 500 mg/kg dose of B1 or B2.

소농도는 Blood,  $10.12 \pm 1.45$ ; Brain,  $37.24 \pm 4.26$ ; Kidney,  $19.54 \pm 1.65$ ; Liver,  $17.82 \pm 5.45$   $\mu\text{g/g}$  tissue 였다. B2는 B1에 비해서 전체적으로 높은 장기 분포를 보였고 brain의 붕소농도는 B2가 B1에 비해서 약 25배 높았다.

BNCT 약물로 사용되기 위해서 관심장기의 약물 농도는  $20 \sim 35$   $\mu\text{g}^{10}\text{B/g}$  이상이 요구되는데 B2의 관심장기 (brain)의 붕소농도는  $37.24 \pm 4.26$   $\mu\text{g/g}$ 로 BNCT 약물로 치료효과를 기대할 수 있다. 또한, BNCT 약물로 사용되기 위해서는 배경장기의 약물농도는  $5$   $\mu\text{g}^{10}\text{B/g}$  이하가 요구되는데, B2의 배경장기(blood)의 붕소농도는  $10.12 \pm 1.45$   $\mu\text{g/g}$ 로 기대농도보다는 2배 정도 높았다. 약물 주입 후 배경장기의 약물농도가 기대 값 이하로 낮아 지는 시간에 대한 추후 연구가 필요하다.

B1과 B2의 brain/blood 비는 B1,  $0.73 \pm 0.57$ ; B2,  $3.68 \pm 0.12$  로 B2가 B1에 비해 약 5 배 높았다. BNCT에 효과적인 붕소약물은 관심장기에 대한 높은 선택성과 배경장기에 대한 낮은 선택성이 요구된다. 특히 뇌종양에 대한 BNCT의 치료적인 이득을 위해서는 관심장기에 대한 배경장기의 약물 농도비(e.g. tumor to normal tissue ratio, T/N)가 중요하며 그 값이 3 보다 큰 것이 보다 효과적이다[21,22]. 그런 의미에서 B2는 brain/blood 비가 3 이상임으로 BNCT치료 약물로서의 가능성을 가진

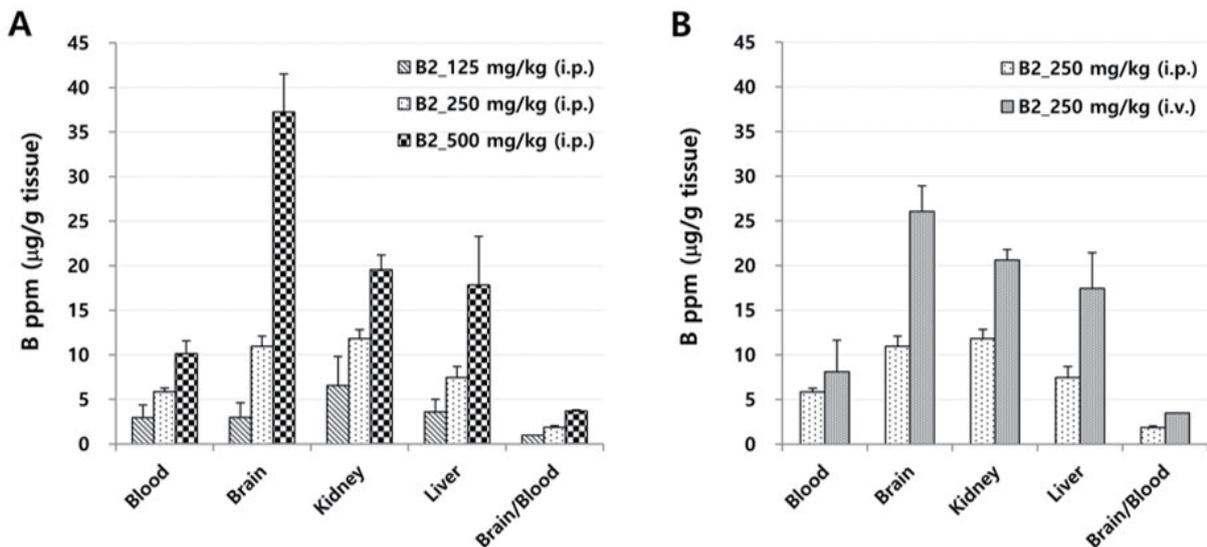


Figure 3. Boron concentrations in organs of Balb/C mice (n = 3, mean  $\pm$  SD) (A) after i.p. injection of 125 or 250 or 500 mg/kg dose of B2 (B) after i.p. or i.v. injection of 250 mg/kg dose of B2.

다. 반면 **B1**의 brain/blood 비는 붕소 약물을 주입하지 않은 마우스의 brain/blood 비( $0.74 \pm 0.01$ )와 거의 동일한 값을 보였다.

성공적인 BNCT를 위해서는 관심장기와 배경장기의 적절한 약물의 농도를 유지하는 것이 매우 중요하다. 그러므로 적절한 약물의 농도를 유지하기 위해서는 약물의 주입량과 주입 방법도 적절히 선택되어야 한다. 이를 위해서 **B2**를 주입량(125 mg/kg ~ 500 mg/kg)과 주입방법(복강주사, 혹은 정맥주사)을 달리하여 주입하고 주입 후 1시간의 장기 별 붕소 농도를 관찰하였다(**Figure 3**).

**B2** 125 mg/kg을 복강으로 주사 한 경우 장기 별 붕소의 농도는 Blood,  $2.96 \pm 1.40$ ; Brain,  $2.97 \pm 1.63$ ; Kidney,  $6.56 \pm 3.26$ ; Liver,  $3.58 \pm 1.42$   $\mu\text{g/g}$  tissue

이고, **B2** 250 mg/kg 을 복강으로 주사 한 경우 장기 별 붕소의 농도는 Blood,  $5.85 \pm 0.41$ ; Brain,  $10.93 \pm 1.15$ ; Kidney,  $11.82 \pm 1.01$ ; Liver,  $7.46 \pm 1.21$   $\mu\text{g/g}$  tissue 이며, **B2** 500 mg/kg 을 복강으로 주사 한 경우 장기 별 붕소의 농도는 Blood,  $10.12 \pm 1.45$ ; Brain,  $37.24 \pm 4.26$ ; Kidney,  $19.54 \pm 1.65$ ; Liver,  $17.82 \pm 5.45$   $\mu\text{g/g}$  tissue 이다. 약물을 125 mg/kg에서 500 mg/kg으로 4배 증가하였을 때, brain 외 장기(blood, 3.41; kidney, 2.98; liver, 4.97)는 약 3~5배 증가한 반면에 brain의 붕소농도는 약 12배 증가하였다. Brain/Blood 비는 125 mg/kg,  $0.97 \pm 0.14$ ; 250 mg/kg,  $1.87 \pm 0.18$ ; 500 mg/kg,  $3.68 \pm 0.12$  으로 약물 용량을 증가시키면 Brain/Blood는 거의 비슷한 비율로 높아졌다.

**Table 1.** Brain and tumor  $^{10}\text{B}$  concentrations in various BNCT drugs

		Injection route	Injection amount	$^{10}\text{B}$ mg/g (tissue)	ICP time	tissue/blood ratio	Reference
<b>B1</b>	Balb/c mouse	i.p.	500 mg/kg	$1.46 \pm 0.01$ $\mu\text{g/g}^{\text{a}}$ (brain)	1 h	0.73	-
<b>B2</b>	Balb/c mouse	i.p.	125 mg/kg	$2.97 \pm 1.63$ $\mu\text{g/g}^{\text{a}}$ (brain)	1 h	0.97	-
		i.p.	250 mg/kg	$10.93 \pm 1.15$ $\mu\text{g/g}^{\text{a}}$ (brain)	1 h	1.87	-
		i.p.	500 mg/kg	$37.24 \pm 4.26$ $\mu\text{g/g}^{\text{a}}$ (brain)	1 h	3.68	-
		i.v.	250 mg/kg	$26.04 \pm 2.88$ $\mu\text{g/g}^{\text{a}}$ (brain)	1 h	3.47	-
BPA	Wistar rat	i.p.	300 mg/kg	$3 \pm 2$ $\mu\text{g/g}$ (brain <sup>b</sup> )	6 h	3	[23]
			600 mg/kg	$5 \pm 3$ $\mu\text{g/g}$ (brain <sup>b</sup> )	6 h	2.5	
			1200 mg/kg	$21 \pm 4$ $\mu\text{g/g}$ (brain <sup>b</sup> )	6 h	1.16	
BSH	Wistar rat	i.p.	100 mg/kg	$13.9 \pm 2.5$ $\mu\text{g/g}$ (brain tumor)	2.5 h	0.39	[24]
			100 mg/kg	$5.4 \pm 0.9$ $\mu\text{g/g}$ (brain tumor)	6 h	1.47	
			300 mg/kg	$17.3 \pm 2.2$ $\mu\text{g/g}$ (brain tumor)	6 h	0.53	
BSH	NMRI nude mouse	i.p.	200 mg/kg	$1.0 \pm 0.8$ $\mu\text{g/g}$ (brain)	2.5 h	0.06	[25]
BPA-F <sup>c</sup>	NMRI nude mouse	i.p.	700 mg/kg	$5.4 \pm 2.6$ $\mu\text{g/g}$ (brain)	1.5 h	0.47	[25]
BPA-F <sup>c</sup>	GS-9L rat	i.v. infusion for 2 h	$125$ mg/kg/h <sup>d</sup>	-	1 h <sup>e</sup>	3.7	[26]
			$250$ mg/kg/h <sup>d</sup>	-	1 h <sup>e</sup>	3.7	
			$500$ mg/kg/h <sup>d</sup>	-	1 h <sup>e</sup>	3.6	

ND; not determined, i.p.; intraperitoneal, i.v.; intravenous. <sup>a</sup>Assuming that  $^{10}\text{B}$  enriched was used. <sup>b</sup>Brain gray matter. <sup>c</sup>(BPA-F) p-boronophenylalanine-fructose complex. <sup>d</sup>(mg/kg/h) injection amount per bodyweight per hour. <sup>e</sup>1 h after the end of intravenous infusion of drug.

**B2** 250 mg/kg을 정맥으로 주입 한 경우 장기 별 붕소의 농도는 Blood,  $8.09 \pm 3.55$ ; Brain,  $26.04 \pm 2.88$ ; Kidney,  $20.60 \pm 1.18$ ; Liver,  $17.44 \pm 4.00$   $\mu\text{g/g}$  tissue로 동량을 복강으로 주입했을 때와 비교하면 brain의 붕소농도가 약 1.4배 정도 증가하였다(**Figure 3B**). 이것은 복강주입으로 인한 **B2**의 체내 순환이 정맥주입보다 느리고, 정맥주입의 경우 체내 여러 단백질들과 붕산(boric acid)이 화학적으로 결합할 기회가 낮기 때문으로 보여진다.

**Table 1**은 다양한 종류의 BNCT 약물에 대한 붕소 함량을 보여준다[23-26]. 약물의 형태에 따라서 약물의 주입량 및 주입 방법이 다르고, 이에 따라서 약물의 체내 분포 양상이 달라진다. 따라서 관심장기에 붕소 약물의 농도가 최적으로 유지 될 수 있는 방법을 찾아야 하고, 그 목적에 맞는 약물의 설계가 필요하다. BNCT를 위한 붕소약물의 개발이 진행되고 있지만, 임상에 적용된 약물은 여전히 BPA (BPA-F 포함)와 BSH가 유일하다[8]. 그러므로 광범위하게 사용할 수 있는 약을 개발하는 것 보다는 특정 질병 및 관심장기에 효율적으로 집적이 될 수 있는 붕소약물을 개발하는 것에 초점을 맞추어야 할 것이다. 그런 의미에서 본 연구의 **B2**는 BPA 혹은 BSH 와 비교했을 때 이들보다 더 높은 관심장기의 축적률과 관심장기 및 배경장기 비율을 보여주었다. 다만, 본 연구의 붕소약물은 농축 붕소( $^{10}\text{B}$ )를 사용하지 않고 천연 붕소를 이용한 것이므로, 향후 열중성자에 의한 체내 치료효과를 실질적으로 검증하기 위해서 농축 붕소( $^{10}\text{B}$ ) 사용이 요구되고, 또한 신규 약물에 대한 체내 약물 동태를 관찰 가능한 영상제제(및 기법)에 대한 연구가 반드시 동반되어야 한다.

## Conclusion

임상에서 성공적인 BNCT를 위해 종양세포에 대한 선택적 축적능을 가진 새로운 붕소약물의 개발이 필수적이며, 본 연구에서는 벤조사이아졸 유도체를 기반으로 저분자량 붕소화합물 2종을 합성하였고, 그와 동시에 생물학적 유효성을 평가하였다. 특히 이들 중에서 **B2**는 높은 BBB 투과성과 함께 비교적 높은 Brain/Blood 비율을 나타내었다. 이러한 결과로부터 본 연구팀이 개발한 **B2**는 뇌

종양치료를 위한 BNCT 약물로 활용성을 기대하고 있다.

## Acknowledgments

이 논문은 한국연구재단 중견연구자지원사업(2020R1A2C200790611)과 과학기술정보통신부 한국원자력의학원 연구운영비지원사업(50532-2021)의 지원에 의하여 이루어졌으며 다른 이해관계는 없음을 밝힙니다.

## References

1. Sauerwein WA. Principles and roots of neutron capture therapy. In: Sauerwein WA, Wittig A, Moss R, Nakagawa Y, editors. Neutron Capture Therapy. New York : Springer-Verlag; 2012. p. 1-3.
2. Brugger RM, Shih JA. Evaluation of gadolinium-157 as a neutron capture therapy agent. *Strahlenther Onkol* 1989;165:153-6.
3. Barth RF, Coderre JA, Vicente MG, Blue TE. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin Cancer Res* 2005;11(11):3987-4002.
4. Barth RF, Mi P, Yang W. Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer. *Cancer Commun* 2018;38(1):35.
5. Capala J, Stenstam BH, Sköld K, Rosenschold PM, Giusti V, Persson C, Wallin E, Brun A, Franzen L, Carlsson J, Salford L, Ceberg C, Persson B, Pellettieri L, Henriksson R. Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: clinical studies in Sweden. *J Neuro-Oncol* 2003;62(1-2):135-44.
6. Barth RF, Soloway AH, Fairchild RG, Brugger RM. Boron neutron capture therapy for cancer. Realities and prospects. *Cancer* 1992;70(12):2995-3007.
7. Mishima Y, Honda C, Ichihashi M, Obara H, Hiratsuka J, Fukuda H, Karashima H, Kobayashi T, Kanda K, Yoshino K. Treatment of malignant melanoma by single thermal neutron capture therapy with melanoma-seeking  $^{10}\text{B}$ -compound. *Lancet* 1989;2(8659):388-9.
8. Sauerwein WA, Bet PM, Wittig A. Drugs for BNCT: BSH and BPA. In: Sauerwein WA, Wittig A, Moss R, Nakagawa Y, editors. Neutron Capture Therapy. Berlin : Springer-Verlag; 2012. p. 117-160.
9. Soloway AH, Tjarks W, Barnum BA, Rong FG, Barth RF, Codogni IM, Wilson JG. The Chemistry of Neutron Capture Therapy. *Chem Rev* 1998;98(4):1515-62.
10. Salt C, Lennox AJ, Takagaki M, Maguire JA, Hosmane

- NS. Boron and gadolinium neutron capture therapy. *Russ Chem Bull* 2004;53(9):1871-88.
11. Yanagië H, Ogata A, Sugiyama H, Eriguchi M, Takamoto S, Takahashi H. Application of drug delivery system to boron neutron capture therapy for cancer. *Expert Opin Drug Deliv* 2008;5(4):427-43.
  12. Hawthorne MF. The role of chemistry in the development of boron neutron capture therapy of cancer. *Angew Chem Int Ed* 1993;32(7):950-84.
  13. Futamura G, Kawabata S, Nonoguchi N, Hiramatsu R, Toho T, Tanaka H, Masunaga SI, Hattori Y, Kirihata M, Ono K, Kuroiwa T, Miyatake SI. Evaluation of a novel sodium borocaptate-containing unnatural amino acid as a boron delivery agent for neutron capture therapy of the F98 rat glioma. *Radiat Oncol* 2017;12(1):26.
  14. Cerecetto H, Couto M. Medicinal chemistry of boron-bearing compounds for BNCT-glioma treatment: Current challenges and perspectives. In: Omerhodzic I, Arnautovic K, editors. *Glioma: Contemporary Diagnostic and Therapeutic Approaches*. London : Intech Open; 2018. p. 205-230.
  15. Ishiwata K. 4-Borono-2-<sup>18</sup>F-fluoro-l-phenylalanine PET for boron neutron capture therapy-oriented diagnosis: Overview of a quarter century of research. *Ann nucl med* 2019;33(4):223-36.
  16. Uzuegbunam BC, Librizzi D, Yousefi BH. PET radiopharmaceuticals for Alzheimer's disease and Parkinson's disease diagnosis, the current and future landscape. *Molecules*. 2020;25(4):977.
  17. Bradshaw TD, Westwell AD. The development of the antitumour benzothiazole prodrug, phortress, as a clinical candidate. *Curr Med Chem*. 2004;11(8):1009-21.
  18. Perepechaeva ML, Grishanova. The role of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in brain tumors. *Int J Mol Sci* 2020;21(8):2863.
  19. Pathan SA, Iqbal Z, Zaidi SMA, Talegaonkar S, Vohra D, Jain GK, Azeem A, Jain N, Lalani JR, Khar RK, Ahmad FJ. CNS drug delivery systems: novel approaches. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2009;3(1):71-89.
  20. Hall DG. Boronic acid catalysis. *Chem Soc Rev* 2019;48(13):3475-96.
  21. Kato I, Ono K, Sakurai Y, Ohmae M, Maruhashi A, Imahori Y, Kirihata M, Nakazawa M, Yura Y. Effectiveness of BNCT for recurrent head and neck malignancies. *Appl Radiat Isot* 2004;61(5):1069-73.
  22. Balcerzyk M, De-Miguel M, Guerrero C, Fernandez B. Quantification of Boron Compound Concentration for BNCT Using Positron Emission Tomography. *Cells* 2020;9(9):2084.
  23. Pignol JP, Oudart H, Chauvel P, Sauerwein W, Gabel D, Prevot G. Selective delivery of <sup>10</sup>B to soft tissue sarcoma using <sup>10</sup>B-L-borophenylalanine for boron neutron capture therapy. *Brit J Radiol* 1998;71(843):320-3.
  24. Yokoyama K, Miyatake SI, Kajimoto Y, Kawabata S, Doi A, Yoshida T, Asano T, Kirihata M, Ono K, Kuroiwa T. Pharmacokinetic study of BSH and BPA in simultaneous use for BNCT. *J Neuro-Oncol* 2006;78(3):227-32.
  25. Wittig A, Huiskamp R, Moss RL, Bet P, Kriegeskotte C, Scherag A, Hilken G, Sauerwein WAG. Biodistribution of <sup>10</sup>B for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in a Mouse Model after Injection of Sodium Mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate and l-para-Boronophenylalanine. *Radiat Res* 2009;172(4):493-9.
  26. Joel DD, Coderre JA, Micca PL, Nawrocky MM. Effect of dose and infusion time on the delivery of p-boronophenylalanine for neutron capture therapy. *J Neuro-Oncol* 1999;41(3):213-21.