



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0064117
(43) 공개일자 2018년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 33/24 (2006.01) A23L 33/16 (2016.01)

A61K 31/69 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 33/24 (2013.01)

A23L 33/16 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0164342

(22) 출원일자 2016년12월05일

심사청구일자 2016년12월05일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

이창연

인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 55 더샵
마스터뷰 2102동 1704호

가젠드라 굽타

인천광역시 연수구 아카데미로 119 인천대학교 공
과대학

(74) 대리인

차준용

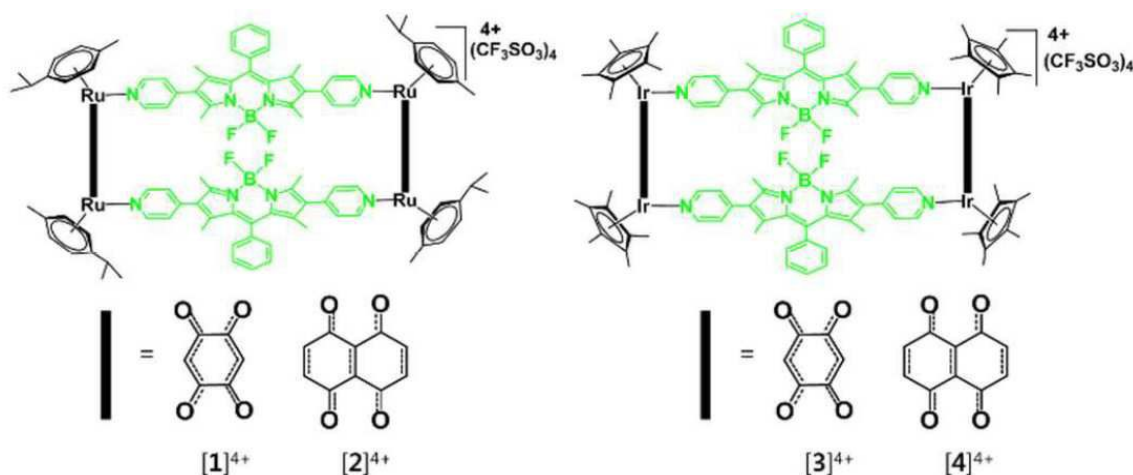
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 보디피를 기반으로 하는 루테튬 및 이리듐 금속 고리화합물 항암제

(57) 요약

본 발명은 보디피-기반 루테튬 및 이리듐 금속 고리화합물 항암제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 형광 물질인 보디피(BODIPY)를 루테튬(Ru(II)) 및 이리듐(Ir(III)) 금속 고리화합물에 도입하여 신규한 구조의 초분자 복합체를 합성하고 이를 항암제의 용도로 사용함으로써, 암 세포에 대해 선택적인 우수한 항증식 활성을 보여 상용화된 시스플라틴(기존 백금 기반의 항암제) 대비 뛰어난 항암 효과를 나타내고, 형광표지 물질인 보디피를 함유함에 따라 암 세포 내 어느 부위에 약물이 작용하는지를 눈으로 직접 관찰할 수 있어 세포 내 위치를 매우 용이하게 파악할 수 있는, 새로운 구조의 보디피-기반 루테튬 및 이리듐 금속 고리화합물, 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/69 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

명세서

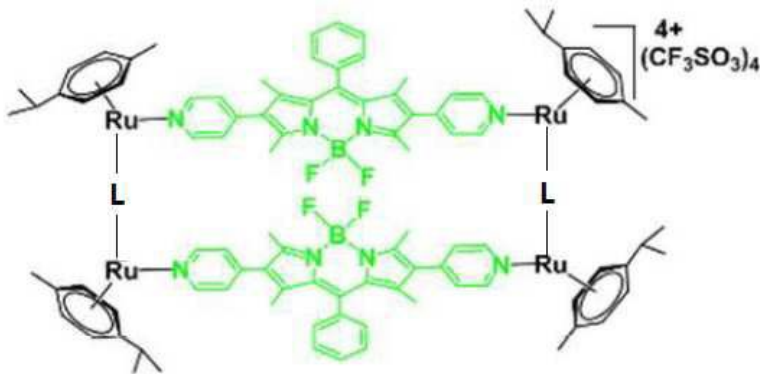
청구범위

청구항 1

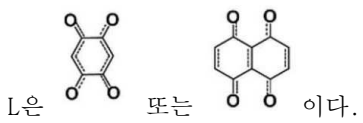
하기 화학식 A로 표시되는 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는,

암의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 A]



상기 화학식 A에서,

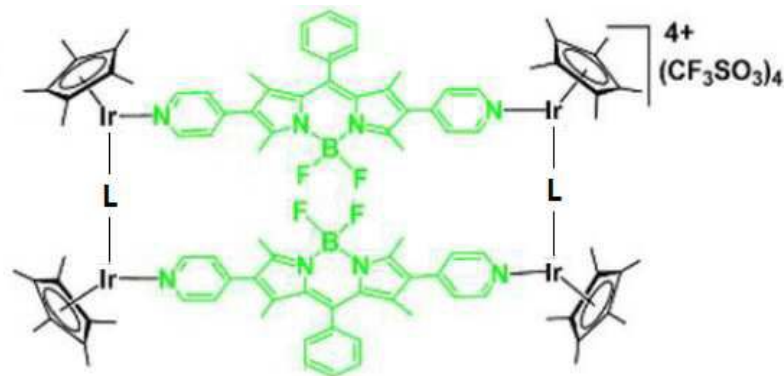


청구항 2

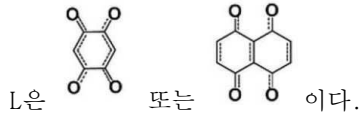
하기 화학식 B로 표시되는 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는,

암의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 B]



상기 화학식 B에서,



청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 암 세포의 증식을 억제하여 항암 활성을 나타내는 것임을 특징으로 하는,

암의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 형광표지 물질인 보디피(BODIPY)를 함유함에 따라, 암 세포 내에서의 약물 작용 부위 및 위치를 가시적으로 파악할 수 있는 것임을 특징으로 하는,

암의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

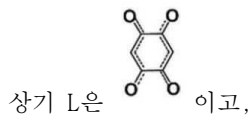
제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 폐암, 유방암, 자궁경부암, 뇌암, 대장암, 전립선암, 간암, 난소암, 직장암 및 골육종으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 암에 대해 항암 활성을 나타내는 것임을 특징으로 하는,

암의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

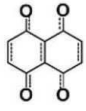


상기 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 유방암 세포(MCF-7)를 선택적으로 사멸시키는 것을 특징으로 하는,

암의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,



상기 L은 이고,

상기 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 뇌암 세포(U87)를 선택적으로 사멸시키는 것을 특징으로 하는,

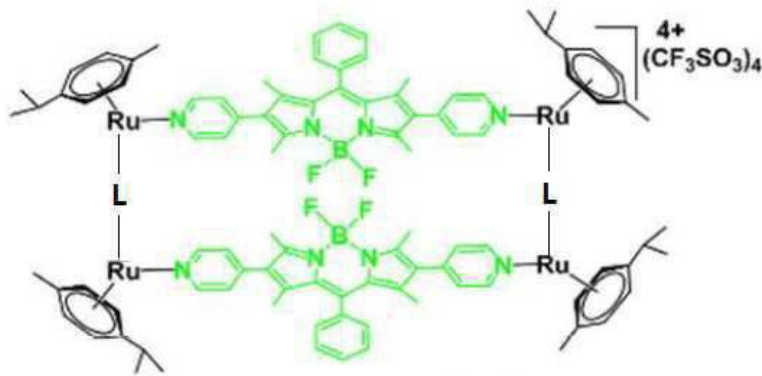
암의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

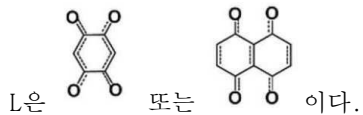
하기 화학식 A로 표시되는 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는,

암의 예방 및 개선용 건강기능식품:

[화학식 A]



상기 화학식 A에서,

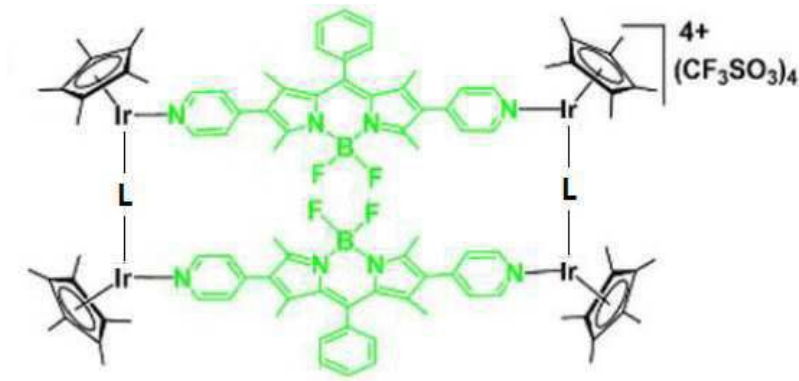


청구항 9

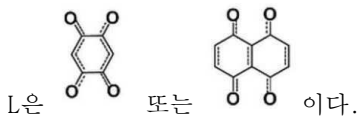
하기 화학식 B로 표시되는 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는,

암의 예방 및 개선용 건강기능식품:

[화학식 B]



상기 화학식 B에서,



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 보디피-기반 루테튬 및 이리듐 금속 고리화합물 항암제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 형광 물질인 보디피(BODIPY)를 루테튬(Ru(II)) 및 이리듐(Ir(III)) 금속 고리화합물에 도입하여 신규한 구조의 초분자 복합체를 합성하고 이를 항암제의 용도로 사용함으로써, 암 세포에 대해 선택적인 우수한 항증식 활성을 보여 상용화된 시스플라틴(기존 백금 기반의 항암제) 대비 뛰어난 항암 효과를 나타내고, 형광표지 물질인 보디피를 함유함에 따라 암 세포 내 어느 부위에 약물이 작용하는지를 눈으로 직접 관찰할 수 있어 세포 내 위치를 매우 용이하게 파악할 수 있는, 새로운 구조의 보디피-기반 루테튬 및 이리듐 금속 고리화합물, 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 기 설계된 금속 클립 및 도너 리간드와 관련하여 자기-조립 초분자 복합체를 합성하는 것은 호스트-게스트 화학, 약물 전달, 센싱, 촉매작용 및 항암 치료 등 다양한 분야에서 그 잠재적 적용성이 높아 뜨거운 연구 화제가 되고 있다. 이러한 금속-기반 화합물은 생물학적 시스템에서 산화환원 상태를 조절하는 능력 등 다양한 물리화학적 특성을 지니고 있어, 다양한 질병의 치료에 활용될 가능성이 크다.

[0005] 루테튬(Ru) 화합물은 잠재적인 생물학적 활성을 지닌 것으로 잘 알려져 있다. NAMI-A, KP1339 및 RAPTA-C가 현재 임상시험 중인 항암제 분야에서 유망한 미래를 제시할 것으로 기대된다. 또한 하프-샌드위치 Ir(III) 복합체가 대장암, 유방암 및 전립선암 등 다양한 암 세포에 대해 시스플라틴(Cisplatin)보다 훨씬 더 큰 항증식 효과를 나타낸다는 일부 증거들이 존재한다.

[0007] 효과적인 항암 약물이 되려면, 정상 세포에는 피해를 주지 않으면서 암 세포만을 선택적으로 죽일 수 있어야 한다.

[0008] 이와 관련하여, Ru(II) 및 Ir(III) 초분자 복합체의 항암 특성 및 기타 물리적 특성을 연구하기 위해, 서로 다른 도너 링커를 이용한 몇몇 고리(직사각형)화합물 및 프리즘을 설계하여 더 우수하거나 동등한 수준의 특성을 규명하려 한 시도가 있었다.

[0010] 그러나, 현재까지 보론-디피로메텐(BODIPY)-기반 링커로부터 유도된 초분자 화합물에 대한 연구는 진행된 사례가 없다.

[0011] BODIPY 염료-기반 화합물은 생물학적 세포에서 저산소 조건 중에 형광을 나타내는 경향이 있다. 이러한 발광체는 단량체 및 응집체 중의 공존으로 인해 청색 또는 녹색 여기 하에서 상당한 형광성을 보이고, 응집체 형성에 따라 유발된 증가된 장애로 인해 용액의 극성이 증가함에 따라 감소된 흡광도를 나타내는 특성이 있다.

[0013] 이에, 암 세포에 대해 선택적인 우수한 항증식 효능을 나타냄과 더불어, 보디피(BODIPY)의 형광표지 능력을 이용해 암 세포 내에서 해당 약물의 작용 부위 내지 위치를 쉽게 파악할 수 있는, 새로운 구조의 루테튬 및 이리듐 금속 고리화합물 항암제에 대한 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0015] (비특허문헌 0001) (a) T. R. Cook, V. Vajpayee, M. H. Lee, P. J. Stang and K.-W. Chi, Acc. Chem. Res., 2013, 46, 2464; (b) Y.-F. Han, H. Li and G.-X. Jin, Chem. Commun., 2010, 46, 6879.

발명의 내용

해결하려는 과제

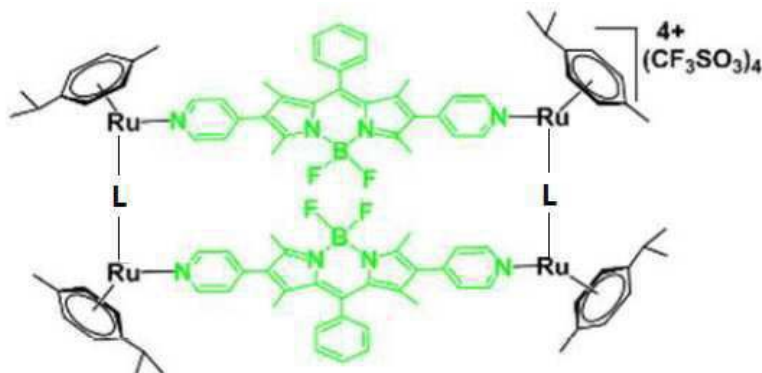
[0016] 본 발명은 상기와 같은 종래의 요구를 충족시키기 위한 것으로, 피리딘으로 관능화된 BODIPY 리간드에 기반한 4 가지 구조의 금속 고리화합물과 이의 항암제로서의 용도를 제공함을 기술적 과제로 한다.

[0017] 구체적으로, 본 발명자들은 암 세포주들에 대한 상기 금속 고리화합물의 항암 활성을 실험을 통해 확인하였으며, BODIPY 코어를 통해 공초점 현미경 하에서의 관찰시 상기 금속 고리화합물을 암 세포 내에서 매우 간단한 방법으로 가시화할 수 있었다.

과제의 해결 수단

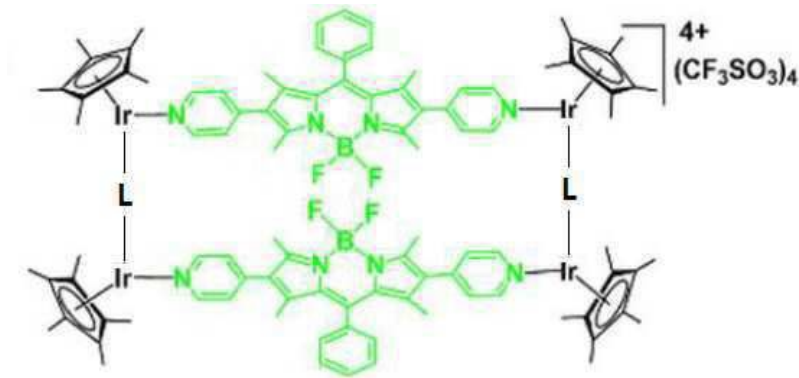
[0019] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 하기 화학식 A 및 B로 표시되는 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] [화학식 A]



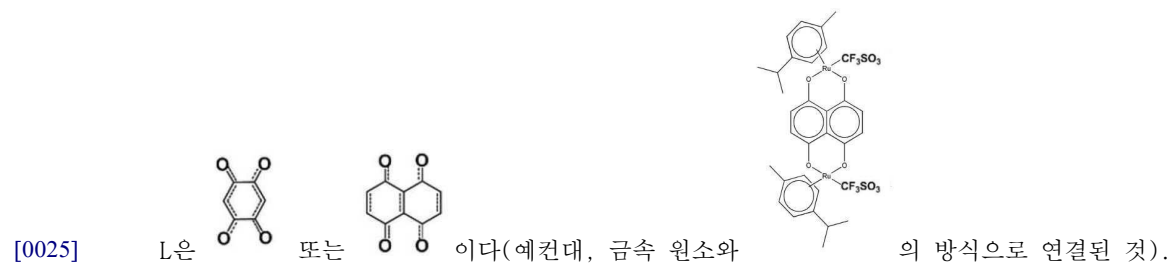
[0021]

[0022] [화학식 B]



[0023]

[0024] 상기 화학식 A 및 B에서,



[0025]

[0027] 현재 널리 사용되고 있는 항암제는 시스플라틴과 같은 백금 기반의 화합물인데, 이 경우 신장 독성과 같은 부작용이 발생하거나, 계속 사용시 복용 의존증이 발생하거나, 약의 저항력이 높아지는 문제가 있었다.

[0028] 이에, 본 발명은 백금이 아닌 루테튬(Ru)과 이리듐(Ir) 금속을 사용한 보디피(BODIPY) 기반의 금속 고리화합물 (Metalla-rectangles) 4종([1]⁴⁺-[4]⁴⁺)(도 1 참조)을 새롭게 합성하고 이의 항암 효능을 입증하였다. 또한 이러한 금속 고리화합물 내에 존재하는 BODIPY 코어를 통해 공초점 현미경(Confocal microscopy) 관찰시 상기 금속 고리화합물의 암 세포 내에서 위치를 가시적으로 매우 간단하게 파악할 수 있었다. 즉 본 발명에 따라 합성된 초분자 화합물은 암 세포의 증식을 억제하여 상용화된 시스플라틴보다 우수한 항암 활성을 나타내고, 형광표지 물질인 보디피를 포함하고 있어 암 세포 내에서 항암 약물의 작용 부위 및 위치를 정확하게 확인할 수 있음은 물론 항암제의 작용 과정을 눈으로 직접 볼 수 있는 장점이 있다.

[0030] 본 발명에서, 상기 약제학적으로 허용되는 염은 의약품계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미하며, 예를 들어 칼슘, 칼륨, 나트륨 및 마그네슘 등으로 제조된 무기이온염; 염산, 질산, 인산, 브롬산, 요오드산, 과염소산, 타르타르산 및 황산 등으로 제조된 무기산염; 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레산, 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만델산, 프로피온산, 시트르산, 젖산, 글리콜산, 글루콘산, 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산, 글루쿠론산, 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 하이드로아이오딕산 등으로 제조된 유기산염; 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, *p*-톨루엔설폰산 및 나프탈렌설폰산 등으로 제조된 설폰산염; 글리신, 아르기닌, 라이신 등으로 제조된 아미노산염; 및 트리메틸아민, 트리에틸아민, 암모니아, 피리딘, 피콜린 등으로 제조된 아민염; 등을 들 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에 따른 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물(또는 이의 약제학적으로 허용되는 염)은 폐암, 유방암, 자궁경부암, 뇌암, 대장암, 전립선암, 간암, 난소암, 직장암 및 골육종으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 암에 대해 항암 활성을 나타내는 것일 수 있으나, 치료 가능한 암의 종류가 반드시 이에 한정되는 것을 아니다.

[0033] 일 구체예에서, 본 발명에 따른 금속 고리화합물 [1]⁴⁺ 및 [3]⁴⁺는 유방암 세포(MCF-7)를 선택적으로 사멸시키는 데, [2]⁴⁺ 및 [4]⁴⁺는 뇌암 세포(U87)를 선택적으로 사멸시키는 데 적절하게 사용될 수 있다.

- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 90 중량%의 함량으로 포함할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화분녹말, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 첨가제는 약학적 조성물 100 중량부에 대해 1 ~ 50 중량부 정도 포함될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물은 실제 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러가지 제형으로 투여될 수 있는바, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 들 수 있으며, 이러한 고형 제제는 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등을 들 수 있으며, 이러한 액상 제제에는 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 및 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함될 수 있으며, 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 한편 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시에는 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사와 같은 주입 방식을 선택할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 대상 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등을 고려하여 적절하게 결정할 수 있으며, 예를 들어 일일 투여량은 본 발명의 조성물의 양을 기준으로 0.01 ~ 1000 mg/kg, 하루 투여 횟수는 1 ~ 6회 정도가 될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 화학식 A 및 B로 표시되는 보디피(BODIPY) 기반의 초분자 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 및 개선용 건강기능식품이 제공된다.
- [0044] 본 발명의 유효성분이 첨가되는 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 예를 들어 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0045] 본 발명의 유효성분 외에 상기 건강기능식품은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 상기 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있으며, 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합되어 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0047] 본 발명에 따른 일련의 금속 고리화합물은 암 세포에 대해 우수한 항증식 활성을 보이며, 상용화된 시스플라틴보다도 우수한 항암 효과를 나타낸다.
- [0048] 또한, 암 세포 내 어느 부위에 약물이 작용하는지를 눈으로 직접 관찰할 수 있어 세포 내 위치 파악이 용이한

차별화된 장점이 있으며, 이를 통해 항암작용 기전을 연구하는 데에도 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050]

도 1은 복합체 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 의 분자 구조이다.

도 2는 복합체 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 및 자유 BODIPY의 ^1H NMR 스펙트럼이다. (* CD_2Cl_2)

도 3은 금속 고리화합물 (a) $[2]^{4+}$ 및 (b) $[4]^{4+}$ 의 X-선 구조이다.

도 4는 평면 $[2]^{4+}$ 의 X-선 구조 (a), 평면 $[2]^{4+}$ (b), 꼬인 $[2]^{4+}$ (c) 및 $[4]^{4+}$ (d)의 공간-충전 모형이다. (* 명확화를 위해 카운터 음이온, 수소 원자 및 용매 분자는 생략함)

도 5는 (a) 아세토니트릴, (b) 아세톤, (c) 클로로포름, (d) 에탄올, (e) 헥산 및 (f) 물에서, 금속 고리화합물 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 및 BODIPY의 UV-vis 흡수 스펙트럼이다. (* 1×10^{-5} M 용액)

도 6은 (a) 아세토니트릴, (b) 아세톤, (c) 클로로포름, (d) 에탄올, (e) 헥산 및 (f) 물에서, 금속 고리화합물 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 및 BODIPY의 포토루미네선스 스펙트럼이다. (* 1×10^{-7} M 용액)

도 7은 $\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$ 에서 24시간 후, 복합체 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 의 ^1H NMR 스펙트럼이다. (* 복합체 $[1]^{4+}$ 및 $[2]^{4+}$ 의 경우 사용된 $\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$ 의 비율 = 1:1; 복합체 $[3]^{4+}$ 및 $[4]^{4+}$ 의 경우 사용된 $\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$ 의 비율 = 1:4)

도 8은 (A) $[1]^{4+}$, (B) $[2]^{4+}$, (C) $[3]^{4+}$, (D) $[4]^{4+}$, (E) BODIPY 및 (F) 시스플라틴이 암(A549, MCF-7, HeLa 및 U87) 및 정상(WI-38) 세포의 세포 증식 및 생존율에 미치는 효과를 보여주는 그래프이다. (* 세포는 화합물의 농도를 증가시키면서 48시간 동안 처리함; 세포 증식 및 생존율은 WST-1 세포 증식 시약을 이용해 결정함; 결과는 세포 생존율(% of 대조구)로서 표현함)

도 9는 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 의 DPPH 라디칼 소거 활성을 아스코르브산(표준 항산화 기준 화합물)과 비교하여 나타낸 그래프이다. (* 모든 데이터는 평균 $\pm$ SD(n=6)로 표현함; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.001$ vs. 0 $\mu\text{g/ml}$)

도 10은 세포 주기 분석 결과를 그래프로 표현한 것이다. (* [A] MCF-7, [B] HeLa 및 [C] U87는 용량을 증가시키면서 $[1]^{4+}$ 로 처리한 것; [D] U87, [E] MCF-7 및 [F] U87는 각각 $[2]^{4+}$, $[3]^{4+}$ 및 $[4]^{4+}$ 로 처리한 것)

도 11은 $[1]^{4+}$ 로 처리한 세포의 세포 주기를 유세포 분석을 이용해 분석한 결과(* $[1]^{4+}$ 의 용량을 증가시키면서 48시간 동안 처리한 경우 (A) MCF-7, (C) HeLa 및 [E] U87 세포의 Sub-G1, G1, S 및 G2/M 상)와 서로 다른 상에서의 % 세포 집단을 그래프로 표현한 것이다(* MCF-7 (B), HeLa (D) 및 U87 (F) 세포; 각 세포 주기 상에 존재하는 세포의 각 백분율은 막대 그래프에 기입되어 있음).

도 12는 $[2]^{4+}$, $[3]^{4+}$ 및 $[4]^{4+}$ 로 처리한 세포의 세포 주기를 유세포 분석을 이용해 분석한 결과(* 용량을 증가시키면서 각각 $[2]^{4+}$, $[3]^{4+}$ 및 $[4]^{4+}$ 로 48시간 동안 처리한 경우 (A) U87, (C) MCF-7 및 (E) U87 세포의 Sub-G1, G1, S 및 G2/M 상)와 서로 다른 상에서의 % 세포 집단을 그래프로 표현한 것이다(* (B), (D) 및 (F)는 각각 (A), (C) 및 (E)에 관한 그래프; 각 세포 주기 상에 존재하는 세포의 각 백분율은 막대 그래프에 기입되어 있음).

도 13은 세포 내 화합물 위치 파악을 보여주는 도면이다. (* 화합물 처리를 하거나 하지 않은 경우 DAPI로 염색된 핵을 공초점 현미경(488 nm에서 여기) 하에서 관찰; (A) 3 μM $[1]^{4+}$ 및 1 μM $[3]^{4+}$ 로 처리된 MCF-7 세포; (B) 3 μM $[1]^{4+}$ 로 처리된 HeLa 세포; (C) 3 μM $[1]^{4+}$, 3 μM $[2]^{4+}$ 및 0.75 μM $[4]^{4+}$ 로 처리된 U87 세포; 흰색 화살표는 세포질(A 및 C) 및 핵(B)에 존재하는 미세한 형광성 화합물 응집체를 나타냄)

도 14는 금속 고리화합물 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 및 BODIPY 리간드의 농도 증가에 따라 정자 DNA와의 상호작용 관계에서 얻

은 UV-visible 스펙트럼이다. (* 본래 조건(25℃)에서, (A-D) dsDNA + 복합체 및 (E) dsDNA + BODIPY 리간드; 변성 조건(95℃)에서 (F-I) ssDNA + 복합체 및 (J) ssDNA + BODIPY 리간드)

도 15는 금속 고리화합물 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 및 BODIPY 리간드의 농도 증가에 따라 BSA 단백질과의 상호작용 관계에서 얻은 UV-visible 스펙트럼이다. (* 25℃ 조건; (A-D) BSA + 복합체; (E) BSA + BODIPY 리간드; (F) BSA가 없는 경우 개별 복합체의 스펙트럼)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0053] 실시예

[0054] (1) 일반 사항

[0055] 디피리딘으로 관능화된 보디피 리간드 및 출발 물질(η^6 -*p*-cymRu)₂(dbq)Cl₂, (η^6 -*p*-cymRu)₂(dhq)Cl₂, (η^6 -Cp^{*}Ir)₂(dbq)Cl₂ 및 (η^6 -Cp^{*}Ir)₂(dhq)Cl₂를 "(a) J. Mattsson, P. Govindaswamy, A. K. Renfrew, P. J. Dyson, P. Stepnicka, G. Suss-Fink and B. Therrien, *Organometallics* 2009, **28**, 4350; (b) G. Gupta, J. M. Murray, P. J. Dyson and B. Therrien, *Materials*, 2013, **6**, 5352."에 보고된 방법에 따라 제조하였다.

[0056] 다른 모든 시약들은 상업적으로 입수하여 추가적인 정제없이 사용하였다.

[0058] 2핵 *p*-시멘 복합체(*p*-cymRu)₂(L)Cl₂ 또는 2핵 펜타메틸사이클로펜타디에닐 복합체(Cp^{*}Ir)₂(L)Cl₂(L = dbq(2,5-디하이드록시-1,4-벤조퀴논); dhq(5,8-디하이드록시-1,4-나프토퀴논))와 AgCF₃SO₃를 반응시킨 후, 메탄올에서 BODIPY 리간드를 첨가하여 4종의 양이온성 4핵 금속 고리화합물 (*p*-cymRu)₄(BODIPY)₂(L)₂⁴⁺(L = dbq [1]⁴⁺; dhq [2]⁴⁺) 및 (Cp^{*}Ir)₄(BODIPY)₂(L)₂⁴⁺(L = dbq [3]⁴⁺; dhq [4]⁴⁺)를 수득하였다(도 1 참조).

[0060] (2) [1]⁴⁺의 합성

[0061] (η^6 -*p*-cymRu)₂Ru₂(μ₄-dbq)Cl₂(43 mg, 0.06 mmol) 및 AgCF₃SO₃(33 mg, 0.13 mmol)의 혼합물을 메탄올(25 mL)에서 실온으로 4시간 동안 교반한 다음, 여과하여 AgCl을 제거하였다.

[0062] 얻어진 질은 녹색 여과액에 보디피 리간드(30 mg, 0.06 mmol)를 첨가하고, 용액을 15시간 동안 환류시킨 다음, 진공 하에서 용매를 제거하였다.

[0063] 잔류물을 디클로로메탄(3 mL)에 녹이고, 헥산을 천천히 첨가하여 질은 고체를 침전시켰다.

[0064] 여과하여 고체를 분리하고 진공 하에서 건조시켰다.

Yield 75 mg (85%). ESI MS (CH₃CN): *m/z* = 544.84 [M - 4CF₃SO₃]⁴⁺. IR (KBr pellets): ν = 3489 (b, C-H_{ar}), 1616 (s, C=N), 1523 (s, C=O), 1255 (s, CF₃). ¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ = 8.27 (d, 8H, *J* = 8, H_a), 7.62 (m, 6H, H_{ph}), 7.42 (d, 4H, *J* = 8, H_{ph}), 7.23 (d, 8H, *J* = 8, H_β), 5.85 (d, 8H, *J* = 4, H_{*p*-cym}), 5.84 (s, 4H, H_{dbq}), 5.71 (d, 8H, *J* = 8, H_{*p*-cym}), 2.84 (sept, 4H, *J* = 8, CH(CH₃)₂), 2.40 (s, 12H, CH₃), 2.18 (s, 12H, CH₃C_{*p*-cym}), 1.38 (s, 12H, CH₃), 1.34 (d, 24H, *J* = 8, CH(CH₃)₂). ¹³C {¹H}-NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ = 184.37, 165.46, 152.08, 132.22, 126.93, 112.83, 109.99, 31.43, 29.60, 21.98, 12.55.

[0065]

[0067] (3) [2]⁴⁺의 합성

[0068] (η^6 -*p*-cymRu)₂(μ_4 -dhnq)Cl₂(46 mg, 0.06 mmol) 및 AgCF₃SO₃(33 mg, 0.13 mmol)의 혼합물을 메탄올(25 mL)에서 실온으로 4시간 동안 교반한 다음, 여과하여 AgCl을 제거하였다.

[0069] 얻어진 질은 녹색 여과액에 보디피 리간드(30 mg, 0.06 mmol)를 첨가하고, 용액을 15시간 동안 환류시킨 다음, 진공 하에서 용매를 제거하였다.

[0070] 잔류물을 디클로로메탄(3 mL)에 녹이고, 헥산을 천천히 첨가하여 질은 고체를 침전시켰다.

[0071] 여과하여 고체를 분리하고 진공 하에서 건조시켰다.

Yield 91 mg (77 %). ESI MS (CH₃CN): m/z = 572.88 [M - 4CF₃SO₃]⁴⁺. IR (KBr pellets): ν = 3504 (b, C-H_{ar}), 1616 (s, C=N), 1539 (s, C=O), 1272 (s, CF₃). ¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ = 8.39 (d, 8H, J = 4, H_a), 7.62 (m, 6H, H_{ph}), 7.38 (d, 4H, J = 8, H_{ph}), 7.23 (s, 8H, H_{dhnq}), 7.19 (d, 8H, J = 8, H_β), 5.66 (d, 8H, J = 4, H_{*p*-cym}), 5.50 (d, 8H, J = 4, H_{*p*-cym}), 2.78 (sept, 4H, J = 8, CH(CH₃)₂), 2.37 (s, 12H, CH₃), 2.08 (s, 12H, CH₃C_{cym}), 1.35 (s, 12H, CH₃), 1.31 (d, 24H, J = 8, CH(CH₃)₂). ¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ = 171.03, 154.22, 151.41, 145.11, 141.16, 137.36, 134.09, 129.74, 127.54, 126.95, 111.75, 110.06, 103.68, 99.36, 30.68, 21.89, 17.04, 13.08, 12.49.

[0072]

[0074] (4) [3]⁴⁺의 합성

[0075] (η^6 -Cp^{*}Ir)₂(μ_4 -dbq)Cl₂(54 mg, 0.06 mmol) 및 AgCF₃SO₃(33 mg, 0.12 mmol)의 혼합물을 메탄올(25 mL)에서 실온으로 4시간 동안 교반한 다음, 여과하여 AgCl을 제거하였다.

[0076] 얻어진 질은 갈색 여과액에 보디피 리간드(30 mg, 0.04 mmol)를 첨가하고, 용액을 15시간 동안 환류시킨 다음, 진공 하에서 용매를 제거하였다.

[0077] 잔류물을 디클로로메탄(3 mL)에 녹이고, 헥산을 천천히 첨가하여 질은 고체를 침전시켰다.

[0078] 여과하여 고체를 분리하고 진공 하에서 건조시켰다.

Yield 90 mg (92%). ESI MS (CH₃CN): m/z = 637.30 [M - 4CF₃SO₃]⁴⁺. IR (KBr pellets): ν = 3498 (b, C-H_{ar}), 1616 (s, C=N), 1531 (s, C=O), 1261 (s, CF₃). ¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ = 8.31 (d, 8H, J = 8, H_a), 7.61 (m, 6H, H_{ph}), 7.43 (d, 4H, J = 8, H_{ph}), 7.37 (d, 8H, J = 8, H_β), 5.99 (s, 4H, H_{dbq}), 2.48 (s, 12H, CH₃), 1.60 (s, 60H, Cp^{*}), 1.40 (s, 12H, CH₃). ¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ = 185.44, 154.18, 151.29, 145.97, 141.21, 133.94, 131.80, 129.77, 128.09, 127.57, 109.99, 101.95, 13.13, 12.68, 8.58.

[0079]

[0081] (5) [4]⁴⁺의 합성

[0082] (η^6 -Cp^{*}Ir)₂(μ_4 -dhnq)Cl₂(57 mg, 0.06 mmol) 및 AgCF₃SO₃(33 mg, 0.13 mmol)의 혼합물을 메탄올(25 mL)에서 실온으로 4시간 동안 교반한 다음, 여과하여 AgCl을 제거하였다.

[0083] 얻어진 질은 갈색 여과액에 보디피 리간드(30 mg, 0.06 mmol)를 첨가하고, 용액을 15시간 동안 환류시킨 다음, 진공 하에서 용매를 제거하였다.

[0084] 잔류물을 디클로로메탄(3 mL)에 녹이고, 핵산을 천천히 첨가하여 짙은 고체를 침전시켰다.

[0085] 여과하여 고체를 분리하고 진공 하에서 건조시켰다.

[0086]

Yield 90 mg (89%). ESI MS (CH_3CN): $m/z = 661.19$ [$\text{M} - 4\text{CF}_3\text{SO}_3$] $^{4+}$. IR (KBr pellets): $\nu = 3506$ (b, C-H_{ar}), 1616 (s, C=N), 1537 (s, C=O), 1269 (s, CF₃). ^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): $\delta = 8.39$ (d, 8H, $J = 4$, H_a), 7.61 (m, 6H, H_{ph}), 7.40 (d, 4H, $J = 8$, H_{ph}), 7.36 (s, 8H, H_{dhmq}), 7.32 (d, 8H, $J = 8$, H_p), 2.43 (s, 12H, CH₃), 1.48 (s, 60H, Cp*), 1.37 (s, 12H, CH₃). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): $\delta = 168.18, 154.17, 149.69, 145.83, 140.95, 138.79, 133.91, 129.77, 127.82, 127.53, 113.64, 110.00, 13.12, 12.56, 8.08$.

[0088] 실험 조건 및 방법

[0089] (1) 일반 사항

[0090] ^1H 및 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR 스펙트럼은 내부 표준으로 잔류 양성자화 용매를 이용하여 Agilent 400-MR 분광계 상에 기록하였다.

[0091] 적외선 스펙트럼은 KBr 펠릿을 이용하여 Bruker/Hyperion 2000 FTIR 분광계 상에 기록하였다.

[0092] 순환전압전류법 실험은 WonATech WBCS3000 퍼텐쇼스탯으로 3-전극 구성을 이용하여 0.1 M Bu₄NPF₆ 용액에서 수행하였다.

[0093] 화합물들은 건조 디클로로메탄에 용해시켜 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 5×10^{-4} M을 함유하는 용액을 얻었다.

[0094] UV-visible 흡수 스펙트럼은 Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis 분광계 상에 기록하였다.

[0095] 형광 스펙트럼은 Scinco FluoroMate FS-2 형광 분광계 상에 기록하였다.

[0096] HRESI-MS는 한국의 KBSI에서 Waters SynaptG2Si 분광계 상에 기록하였다.

[0098] (2) WST-1 세포 증식 평가

[0099] 세포 배양 실험을 위해, 복합체 및 표준 약물 시스플라틴(Sigma Aldrich, St. Louis, USA)의 저장 용액을 DMSO:물에서 제조하되, 가장 높은 처리 농도에서 세포에 노출되는 DMSO의 최종량이 세포에 대해 비-독성으로 남도록 제조하였다.

[0100] 세포 증식 및 세포 생존율은 WST-1 세포 증식 시약(Roche diagnostics, Mannheim, Germany)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 정량하였다.

[0101] 이러한 평가 원리는 세포 효소, 특히 미토콘드리아 탈수소효소(Mosmann 1983)에 의한 WST-1(Water soluble tetrazolium) 염의 포르마잔으로의 분열에 기반하며, 대사 활성 세포의 수는 생성된 포르마잔의 양과 직접 관련된다.

[0102] 모든 세포주는 96-웰 배양 플레이트에 1×10^4 세포/웰의 밀도로 시딩하고, 16시간 동안 자리잡게 하였다.

[0103] 이어서, 세포를 화합물의 용량을 증가시키면서 48시간 동안 처리하였다.

[0104] 처리 후, WST-1 세포 증식 시약 10 μl 를 각 웰에 첨가하고, 37°C에서 3 ~ 4시간 동안 인큐베이션하였다.

[0105] 세포 증식 및 생존율은 마이크로플레이트 ELISA 리더 MULTISKAN EX(Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA)를 이용하여 460 nm에서 포르마잔의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

[0107] (3) 세포 주기 분석

- [0108] 세포 주기 분석은 "A. Das, D. Chaudhuri, N. Mandal and A. Chatterjee, *Asian J Pharm Clin Res*, 2012, **5**, 74."에 기술된 방법에 따라 유세포 분석을 하여 수행하였다.
- [0109] 모든 세포는 12-웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰의 밀도로 시딩하고, 37°C에서 5% CO₂로 12시간 동안 인큐베이트 한 다음, 화합물로 48시간 동안 처리하였다.
- [0110] 세포를 수확하고 적당량의 차가운 메탄올로 고정시킨 후, PBS(Phosphate-buffered saline)로 재수화시켰다.
- [0111] 이어서, 세포를 RNase A로 37°C에서 1시간 동안 처리하여 세포 RNA를 Digest시켰다.
- [0112] 핵 DNA를 요오드화 프로피디움으로 염색하고, 세포 상(Cell phase) 분포를 FACS ARIA(Becton-Dickinson, New Jersey, USA)(488 nm 아르곤(청색) 및 633 nm 헬륨-네온(적색) 레이저; 623 nm 밴드 패스 필터; FACS DIVA 소프트웨어(Version 6.0))를 이용하여 결정하였다.
- [0113] DNA 함량(x-축, 적색 형광) vs. 총수(y-축)의 히스토그램을 도시하였다.
- [0115] (4) 공초점 현미경을 이용한 복합체의 세포 내 위치 파악
- [0116] DAPI(4', 6-디아미디노-2-페닐인돌) 대조 염색을 "N. B. Ghate, B. Hazra, R. Sarkar and N. Mandal, *Cytotechnology*, 2014, **66**, 209."에 기술된 방법에 따라 수행하였다.
- [0117] 모든 세포는 22 mm 글래스 커버슬립을 포함하는 6-웰 배양 플레이트에 2.5×10^5 세포/웰의 밀도로 시딩하고, 16시간 동안 고착시켰다.
- [0118] 세포를 아래 농도의 화합물로 48시간 동안 인큐베이트하였다:
- [0119] MCF-7 = 3 μ M [1]⁴⁺ 및 1 μ M [3]⁴⁺
- [0120] HeLa = 3 μ M [1]⁴⁺
- [0121] U87 = 3 μ M [1]⁴⁺, 3 μ M [2]⁴⁺ 및 0.75 μ M [4]⁴⁺.
- [0122] 처리 후, 샘플을 4% 파라포름알데히드로 고정한 다음, 0.1% Triton X-100으로 침투화(Permeabilization)시켰다.
- [0123] 세포를 10 μ g/ml DAPI로 실온에서 40분 동안 염색한 다음, 세척하여 결합되지 않은 염료를 제거하였다.
- [0124] 대조구 및 처리된 세포를 63X 배율에서 10 시야로부터 관찰 및 이미지화(Leica TCSP8 레이저 스캐닝 공초점 현미경(Leica Microsystems, Illinois, USA) 하; DAPI 및 BODIPY 특이적 파장 관찰)하고, Leica Application Suite X 소프트웨어를 이용하여 데이터를 분석하였다.
- [0126] **실험 결과**
- [0127] (1) 분광 분석
- [0128] 분광 분석을 통한 특성화 결과, 4핵 금속 고리화합물이 형성되었음이 확인되었다.
- [0129] 복합체의 ¹H NMR 스펙트럼은 금속 고리화합물에 대한 예측된 공명을 보여주는 뚜렷한 피크를 나타내었다.
- [0130] 자유 BODIPY 리간드의 양성자와 비교할 때, BODIPY 리간드에서 유래한 피리딜 그룹의 α -양성자는 약간 업필드 이동한 반면, β -양성자는 다운필드 이동하였다(도 2).
- [0131] HR-ESI-MS도 이러한 금속 고리화합물의 형성을 확인시켜주었는바, 복합체 [1]⁴⁺-[4]⁴⁺에 대해 각각 544.84, 572.88, 637.30 및 661.19를 중심으로 4개 트리플레이트(Triflate) 음이온 [M-4CF₃SO₃]⁴⁺의 손실에 상응하는 4-양이온성 피크를 나타내었다.

- [0133] (2) XRD 연구
- [0134] 또한, 단결정 XRD 연구에 의해 복합체 $[2]^{4+}$ 및 $[4]^{4+}$ 의 분자 구조를 확인하였다(도 3).
- [0135] 디에틸에테르(DEE)를 복합체 $[2]^{4+}$ 메탄올 용액 및 복합체 $[4]^{4+}$ 아세톤 용액으로 각각 느리게 확산시켜, X-선에 적합한 단결정을 성장시켰다.
- [0136] X-선 결정 구조는 4핵 직사각형 구조의 형성을 명백하게 확인시켜주었다.
- [0137] 금속 고리화합물 $[2]^{4+}$ 의 분자 구조는 Ir 유사체 $[4]^{4+}$ 와 비교했을 때 약 99° 꼬여있었는바, 이는 아렌 루테튬 금속 고리화합물에 있어서 특이적인 현상이다.
- [0138] 2개 BODIPY 단위 사이의 거리는 약 4.2 Å으로, 이들간의 $\pi-\pi$ 상호작용을 고려했을 때 상대적으로 긴 거리였다.
- [0139] 이러한 거동은 결정화 과정에서 사용된 용매의 영향인 것으로 여겨진다.
- [0140] 결정화 과정에서 용매의 효과를 확인하기 위해, 서로 다른 조합의 용매($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DEE}$)를 사용하여 금속 고리화합물 $[2]^{4+}$ 에 대한 결정을 성장시켰다.
- [0141] 흥미롭게도, 이 경우 금속 고리화합물 $[4]^{4+}$ 의 그것과 유사한 선형 구조가 얻어졌다. 그러나 결정의 품질은 좋지 않았다(도 4).
- [0142] 이러한 특이한 거동은 $[4]^{4+}$ 와 비교시 $[2]^{4+}$ 에서 2개 보론 분자 사이의 거리를 1.72 Å까지 감소시켰다.
- [0143] 두 가지 구조 모두에서, BODIPY 리간드의 페닐 그룹은 서로 멀어졌는바, 이는 페닐 그룹으로부터 생성된 입체적 벌크성(Steric bulkiness) 때문인 것으로 여겨진다.
- [0145] (3) UV 흡수 스펙트럼 및 형광 특성
- [0146] 서로 다른 극성을 지닌 용매에서 금속 고리화합물 및 BODIPY의 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 기록하였다(도 5).
- [0147] CH_3CN 에서 기록된 스펙트럼(도 5(a))은 약 520 nm에서 거의 비슷한 강한 밴드를 나타내었는바, 이는 BODIPY의 $n-\pi^*$ 전이에 기인한 것일 수 있다.
- [0148] 아울러, 228 및 397 nm 사이의 피크는 금속-대-리간드 전하-수송 전이와 결부된 분자 내/분자 간 $\pi-\pi^*$ 전이의 조합에 따른 결과일 수 있다.
- [0150] 또한, 서로 다른 극성을 지닌 용매에서 금속 고리화합물 및 BODIPY 리간드의 형광성 특성을 기록하였다(도 6).
- [0151] CH_3CN 에서 기록된 스펙트럼은 도 6(a)에 나타내었다.
- [0152] 금속 고리화합물은 고도의 형광성을 보였고, BODIPY 부분에 상응하는 ~537 nm에서 방출 피크를 나타내었다.
- [0153] 대체로, 용매의 극성 변화에 따라 흡수 및 방출 스펙트럼의 큰 변화는 관찰되지 않았다.
- [0155] (4) 생물학적 매질에서의 안정성
- [0156] 생물학적 매질에서 금속-기반 복합체의 안정성은 이들의 생물학적 활성을 평가하는 중요한 요소이다.
- [0157] 이와 관련하여, $\text{D}_2\text{O}-\text{DMSO}-d_6$ 에서 용해 직후 및 24시간 이후의 금속 고리화합물 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 의 안정성을 ^1H NMR 분광에 의해 평가하였다.
- [0158] 상기 시간 동안 스펙트럼 변화는 관찰되지 않았는바, 이는 이러한 금속 고리화합물이 생리학적 조건 하에서 안

정함을 증명해 주는 것이며(도 7), 이러한 안정성은 보고된 다른 금속 복합체들의 경우와 동등한 수준이다.

[0160] (5) 항암 효능

[0161] 금속 고리화합물 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 및 BODIPY가 폐암(A549), 유방암(MCF-7), 자궁경부암(HeLa) 및 뇌암(U87) 세포의 생존율에 미치는 효과를 평가하고, 처리(치료) 후 48시간 동안 측정된 용량-의존적 반응 연구로부터 IC_{50} 값을 계산하였다.

[0162] 화합물이 성공적인 항암 약물이 되려면, 암 세포의 증식을 효율적으로 억제하고 아포토시스(Apoptosis)를 유발 하되, 동시에 정상 세포에는 피해를 주지 않아 그 부작용이 작거나 무시할만한 수준이어야 한다.

[0163] 이러한 이유로, 화합물이 정상 섬유아세포(WI-38)에 미치는 영향을 동시에 연구하고, 암 세포에 대한 영향과 비교하였다.

[0165] 용량-의존적 반응의 경향 및 각 금속 고리화합물의 IC_{50} 값을 비교하기 위해 시스플라틴을 표준 약물로 삼았다.

[0166] $[1]^{4+}$ 는 MCF-7, HeLa 및 U87 세포를 효율적으로 사멸시켰는바, WI-38 세포의 경우보다 훨씬 더 큰 사멸률을 나타내었다(도 8A).

[0167] Ru-고리화합물 중에서, $[2]^{4+}$ 는 모든 암 세포주에 대해 더욱 큰 독성을 보였는바, 특히 높은 용량($\geq 5 \mu M$)에서 그러하였다. 낮은 농도에서는, U87의 경우에만 정상 세포 대비 현저하게 높은 세포 사멸률을 유도하였다(도 8B).

[0168] 비슷하게, $[3]^{4+}$ 는 정상 세포 대비 MCF-7 세포의 증식을 더욱 억제하였다(도 8C).

[0169] 모든 복합체 중에서 가장 높은 세포 독성은 $[4]^{4+}$ 에서 나타났으며, 모든 세포주에 있어 IC_{50} 값이 가장 낮았다(표 1). 그러나 U87 세포의 경우에만 WI-38 대비 현저하게 높은 사멸률을 나타내었다(도 8D).

[0170] 한편, BODIPY 리간드 그 자체로는 어떠한 세포주에 대해서도 활성을 나타내지 못했는바(도 8E), 복합체의 항증식 활성에 있어 그 역할은 없는 것으로 확인된다.

[0171] [표 1] 다양한 세포주에서 $[1]^{4+}$ - $[4]^{4+}$, BODIPY 및 시스플라틴의 $IC_{50}(\mu M)$

Compounds	A549	MCF-7	HeLa	U87	WI 38
$[1]^{4+}$	83.63±4.91	4.24±0.11	34.97±2.39	13.24±1.15	72.25±8.50
$[2]^{4+}$	3.09±0.17	2.72±0.21	4.31±0.22	0.24±0.06	3.62±0.06
$[3]^{4+}$	59.88±2.69	3.79±0.12	42.39±3.34	61.45±3.64	11.67±0.11
$[4]^{4+}$	3.30±0.14	1.82±0.06	2.22±0.07	0.54±0.07	2.10±0.17
BODIPY	374.65±55.85	148.39±9.34	378.86±65.42	225.53±18.16	428.48±18.82
CISPLATIN	106.55±21.78	16.13±0.87	8.44±0.98	6.06±0.12	77.25±7.28

[0172]

[0174] 시스플라틴은 MCF-7, HeLa 및 U87에 대해 우수한 선택적인 활성을 보였다.

[0175] 금속 고리화합물의 암 세포에 대한 선택적 사멸과 관련하여, $[1]^{4+}$ 및 $[3]^{4+}$ 는 MCF-7에 대해, $[2]^{4+}$ 및 $[4]^{4+}$ 는 U87에 대해, 시스플라틴보다 더욱 우수한 IC_{50} 을 나타내었다(표 1).

[0177] (6) DPPH 라디칼 소거능

[0178] 또한, 복합체는 DPPH 라디칼에 대해 용량-의존적 소거능을 나타내었는바(도 9), 이는 이들의 항산화 잠재성과

관련되어 안전한 약물에 대한 우수한 척도가 된다.

- [0179] 대체로, 금속 고리화합물 [2]⁴⁺ 및 [4]⁴⁺는 연구된 모든 세포주에 걸쳐 더욱 높은 효능을 나타내었다.
- [0180] 이러한 결과는 증가된 핵성(Nuclearity) 및 상기 금속 고리화합물에 존재하는 나프타퀴논 리간드의 광범위한 컨쥬게이션 때문인 것으로 여겨진다.
- [0182] (7) 세포 주기 분석
- [0183] 요오드화 프로피디움(PI) 염색을 이용한 세포 주기 분석은 다양한 모델에서 아포토시스를 평가하기 위한 효율적인 기술이다.
- [0184] DNA와 결합하여 이를 표지할 수 있는 PI(형광단)는 세포 집단에서 G1, S 및 G2/M 상에 존재하는 DNA의 양과 단편화된 핵 DNA(아포토시스의 특징)를 정확하게 나타낸다.
- [0185] (괴사성 세포의 가능성을 완전히 배제할 수는 없지만) 아포토시스 세포 사멸의 백분율은 sub-G1 집단으로부터 계산될 수 있다.
- [0186] 더욱 우수하고 안전한 항암 약물을 선별하기 위해, 각 복합체가 정상 세포 대비 더욱 우수한 항증식 활성을 나타내는 악성 세포의 세포 주기 분포를 분석하였다.
- [0187] 세포 독성 실험으로부터 얻어진 경향이 기초하여 각 금속 고리화합물 대한 용량 범위를 선택하였고, 각각의 IC₅₀ 값은 세포 사멸에 대한 이들의 용량-의존적 활성을 평가할 수 있는 범위 내로 유지하였다.
- [0188] [1]⁴⁺는 MCF-7, HeLa 및 U87 세포의 sub G1 집단 증가를 나타내었는바, 이는 아포토시스의 용량-의존적 증가를 의미한다(도 10A-C, 도 11).
- [0189] 3 μ M [2]⁴⁺로 처리한 경우, U87 세포에서 23%의 사멸물을 유도하였다(도 10D 및 도 12A, B).
- [0190] 반면, [3]⁴⁺ 및 [4]⁴⁺는 각각 MCF-7(5.1% ~ 51.6%) 및 U87 세포(0.5% ~ 44.1%)에 대해 용량-의존적 아포토시스를 유도하였다(도 10E, F 및 도 12C-F).
- [0191] 각 경우에서 가장 높은 용량은 당해 조건에서 세포 주기 상 분포가 효과적으로 훼손되는지를 고려하여 설정하였다.
- [0192] 복합체의 활성은 금속 코어에서의 증가된 전자 밀도, 이에 따른 리간드의 교환 촉진, 더욱 높은 산화 상태의 안정화 및 개선된 산화능에 기인한 것일 수 있다.
- [0193] 암 세포의 미토콘드리아가 비정상적으로 기능하여 불규칙한 속도로 반응성 산소 종을 생성하고, 그 결과 정상 세포의 경우 대비 더욱 높은 산화 스트레스가 생김에 따라, 복합체가 암 세포에 대해 선택성을 지니게 된 것으로 파악된다.
- [0195] (8) 화합물이 위치할 수 있는 세포 내 영역 결정
- [0196] 화합물이 존재할 수 있는 세포 내 영역을 결정하기 위해, 공초점 현미경 하에서 BODIPY의 특징적인 녹색 형광을 추적 도구로 이용하였다.
- [0197] 세포를 DAPI로 대조 염색하여 핵 영역을 나머지와 구별되도록 하였다.
- [0198] BODIPY 특이적 파장(488 nm에서 여기)에서 관찰했을 때, 처리된 모든 세포는 보통 내지 빛나는 녹색 형광을 나타내었다.
- [0199] 어떠한 화합물 처리도 없는 세포(대조구)의 경우, 무시할만한 정도의 녹색 형광을 나타내었으나, DAPI에 의해 핵 영역은 명확하게 구분되었다(도 13).
- [0200] [1]⁴⁺ 및 [3]⁴⁺로 처리된 MCF-7 세포는 각 경우에 있어서 세포질을 따라 화합물이 추적되었다.
- [0201] 또한, 도 13A는 화합물 처리에 따라 세포 구조가 초기 파괴됨을 보여준다.

- [0202] 흰색 화살표는 세포질에 작은 응집체 화합물 입자가 갇혀있음을 의미한다.
- [0203] U87 세포의 경우, $[1]^{4+}$, $[2]^{4+}$ 및 $[4]^{4+}$ 로 처리했을 때 비슷한 녹색 형광이 관찰되었다.
- [0204] 도 13C는 세포질을 따라 복합체가 분포함을 보여주며, $[1]^{4+}$ 처리의 경우 명확하게 나타남을 알 수 있다.
- [0205] $[1]^{4+}$ 의 경우 흰색 화살표는 응집된 작은 그레눌에 기인한 응집-유도 방출(AIE)의 예를 보여준다.
- [0206] $[1]^{4+}$ 와 달리, $[2]^{4+}$ 및 $[4]^{4+}$ 로 처리한 경우 U87 세포에서 스트레스를 유도하여, 세포 온전성을 더욱 크게 손상시켰다.
- [0207] 이러한 결과는 유방암 및 뇌암에 있어서 각 복합체의 항증식 활성 작용의 핵외 경로/메커니즘을 제시한다.
- [0208] 한편, HeLa 세포의 경우는 그 결과가 완전히 반대였다.
- [0209] 0.75 μM 용량의 $[1]^{4+}$ 는 핵 장벽을 끊임없이 깨고 세포질보다는 핵 내부에 더욱 가깝게 위치하는 능력을 지닌 것으로 보여진다(도 13B의 흰색 화살표).
- [0210] $[1]^{4+}$ 가 HeLa의 유전 물질과 상호작용을 하고, 그 결과 전사적 또는 번역적 항증식 작용이 이루어져 용량-의존적 아포토시스를 유발했을 가능성이 크다.
- [0211] 처리된 세포는 수축 및 핵축축되었는데, 이는 프로그램화된 세포 사멸이 시작되었음을 의미하고, 전술한 세포 주기 분석 결과를 뒷받침해주는 것이다.
- [0213] (9) DNA와의 결합 정도
- [0214] UV 분광법은 약물-DNA 및 약물-단백질 상호작용을 연구하기 위해 널리 사용된다.
- [0215] 분자는 인터칼레이션(Intercalation), 그루브 바인딩(Groove binding) 또는 외부 정전기적 효과에 의해 DNA와 비공유결합적으로 상호작용할 수 있다.
- [0216] DNA-약물 상호작용의 정도를 예측할 수 있는 농색 변화(Hyperchromic shift)는 외부 정전기적 결합, 또는 DNA 나선의 부분적인 풀림을 통해 나타날 수 있고, 그 결과 더욱 많은 질소 염기가 노출되게 된다.
- [0217] 연어 정자 DNA는 260 nm 근처에서 두드러진 피크를 나타내었는데, 이는 게놈 DNA에 있어 전형적인 현상이다.
- [0218] 4가지의 복합체 모두 이중 가닥 DNA(dsDNA)와 상호작용함에 따라, 농도-의존적 농색 변화를 나타내었다(도 14).
- [0219] 25 μM 농도에서, $[1]^{4+}$ 가 가장 높은 활성을 보였고, 그 다음으로 $[4]^{4+}$ 가 높은 활성을 보였다.
- [0220] 가장 낮은 분자량을 지닌 $[1]^{4+}$ 가 주로 암 세포의 핵 내부에 위치할 수 있는 유일한 화합물로 확인된 점은 흥미로운 결과이다(도 13).
- [0221] 한편, $[2]^{4+}$ - $[4]^{4+}$ 는 주로 세포질에 위치하는 거동을 보였으나(도 13), 게놈 DNA와 현저하게 상호작용을 하였다(도 14).
- [0222] 이러한 흡광증가(Hyperchromicity)는 배위된 그룹의 인터 리간드 $\pi-\pi^*$ 전이에 기인한 것일 수 있다.
- [0223] 복합체와 변성된 DNA의 상호작용을 이해하기 위해, DNA-화합물 혼합물을 95°C에서 15분 동안 가열하였다.
- [0224] 그 결과, 스펙트럼(도 14)은 본래 조건보다 낮은 농색 변화를 보였다.
- [0225] 변성된 조건 하에서, DNA 이중 나선이 풀리고 더욱 많은 수의 질소 염기가 매질에 노출되어 복합체와의 정전기적 상호작용을 촉진하지만, 동시에 그 안에 삽입되는 화합물을 방출하는 경향을 보인다.
- [0227] (10) 단백질과의 결합 정도
- [0228] 소 혈청 알부민(BSA)은 인간 혈청 알부민과의 구조적 상동성으로 인해 약물-단백질 상호작용을 이해하기 위한

중요한 타겟으로 사용되고 있다.

[0229] BSA의 흡수 강도는 화합물(5-25 μM)을 첨가함에 따라 농도 의존적 방식으로 증가하였고, $[1]^{4+}$ 가 가장 강한 상호작용을 나타내었다(도 15A-E).

[0230] 이러한 결과는 동적 퀀칭(Dynamic quenching)과 달리 정적 퀀칭(Static quenching)이 흡광도 증가를 유발하는 하나의 메커니즘이 됨을 제시해주며, 이는 통상적으로 단백질-화합물 복합체를 교란시켜 바닥 상태에서 BSA 단백질의 정상 스펙트럼 변화를 유발한다.

[0231] 개별 화합물의 UV 스펙트럼을 도 15F에 표현하였다.

[0232] BODIPY 리간드는 연어 정자 DNA 또는 BSA 단백질과 아무런 상호작용을 하지 않음을 알 수 있다.

[0234] 결과 검토

[0235] 본 발명에서는 4가지의 새로운 BODIPY-기반 Ru(II) 및 Ir(III) 금속 고리화합물을 성공적으로 설계하였다.

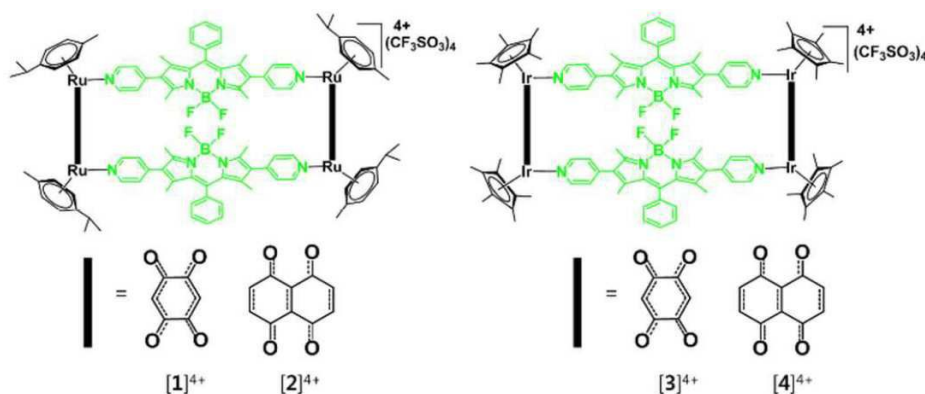
[0236] 초기 생물학적 스크리닝 결과, $[1]^{4+}$ 및 $[3]^{4+}$ 는 MCF-7 대해, $[1]^{4+}$ 는 HeLa에 대해, $[2]^{4+}$ 및 $[4]^{4+}$ 는 U87 세포에 대해 선택적인 독성을 지니는 것으로 확인되었다.

[0237] 흥미롭게도, 이러한 복합체들 중 일부는 MCF-7 및 U87 세포주에 대해 시스플라틴보다도 더욱 우수한 세포 독성을 나타내었다.

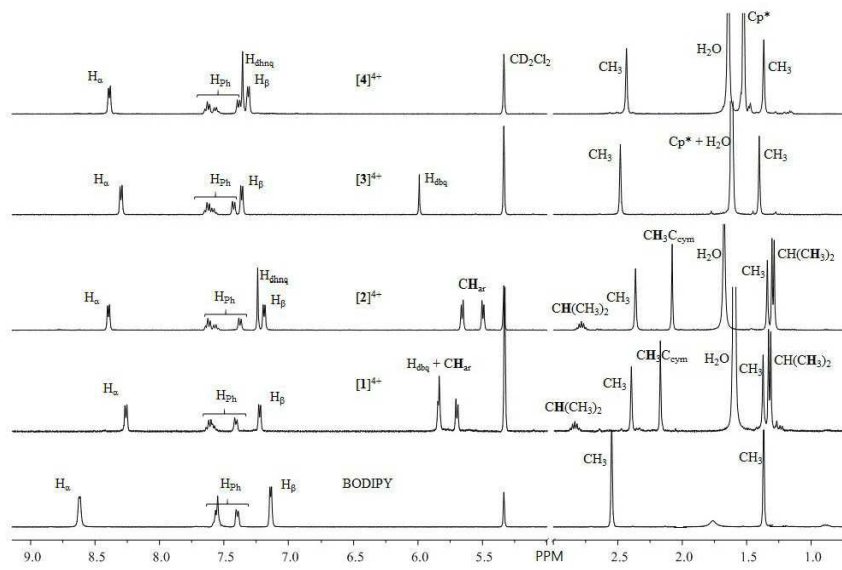
[0238] 이러한 결과는 본 발명에 따른 신규 복합체의 각 세포주에 대한 활성이 다양한 세포 내 분자 타겟과 관련이 있음을 강하게 의미하는 것으로서, 단백질 및 mRNA 발현과도 밀접한 연관이 있음을 시사해준다.

도면

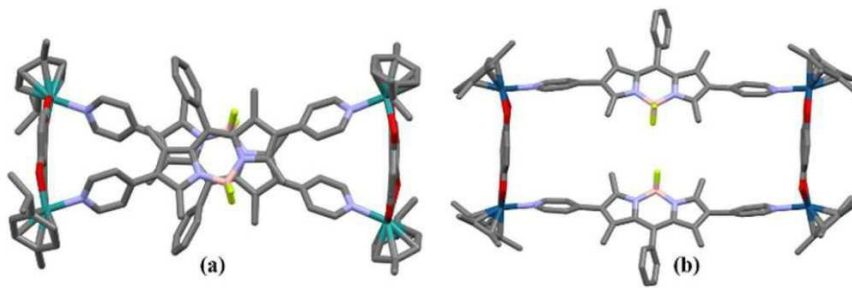
도면1



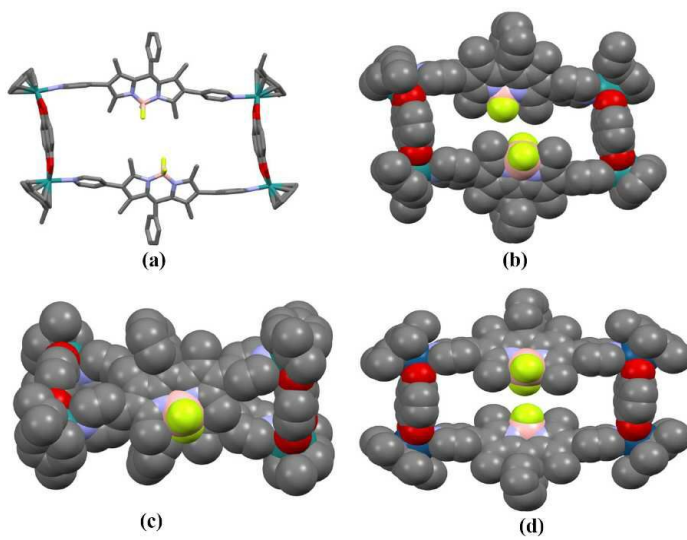
도면2



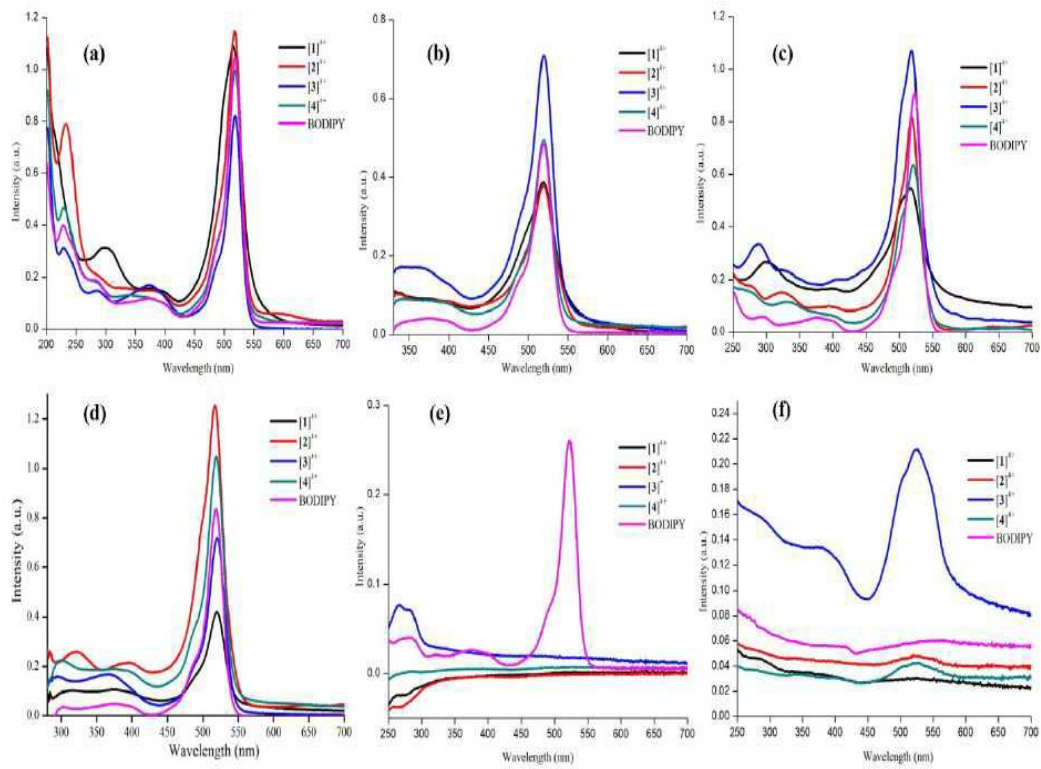
도면3



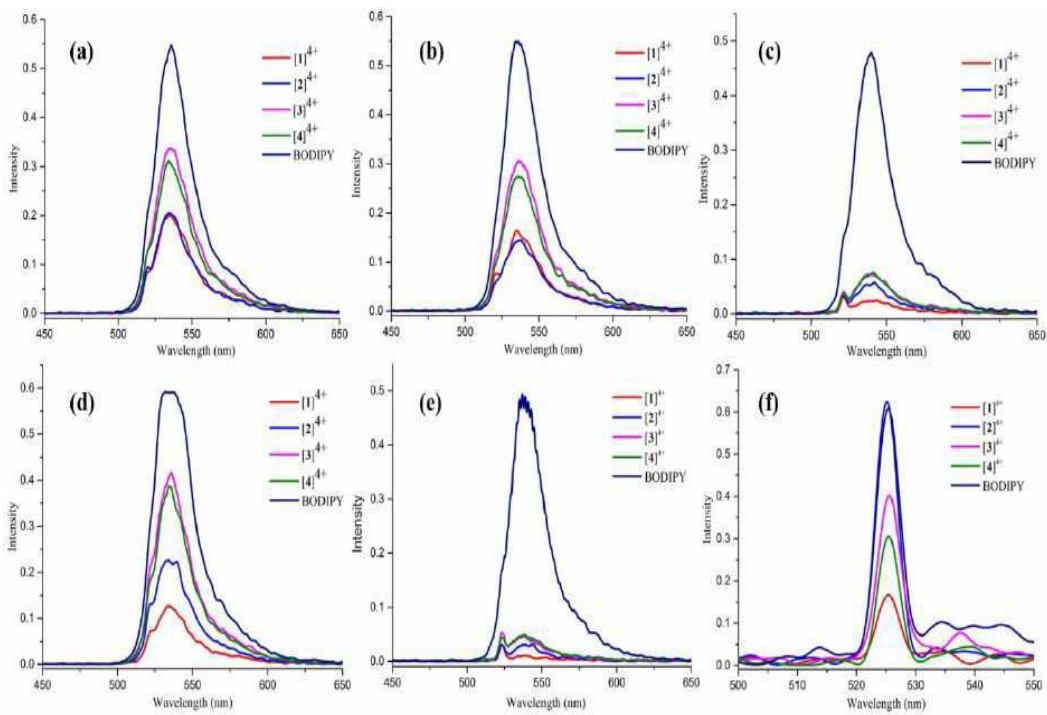
도면4



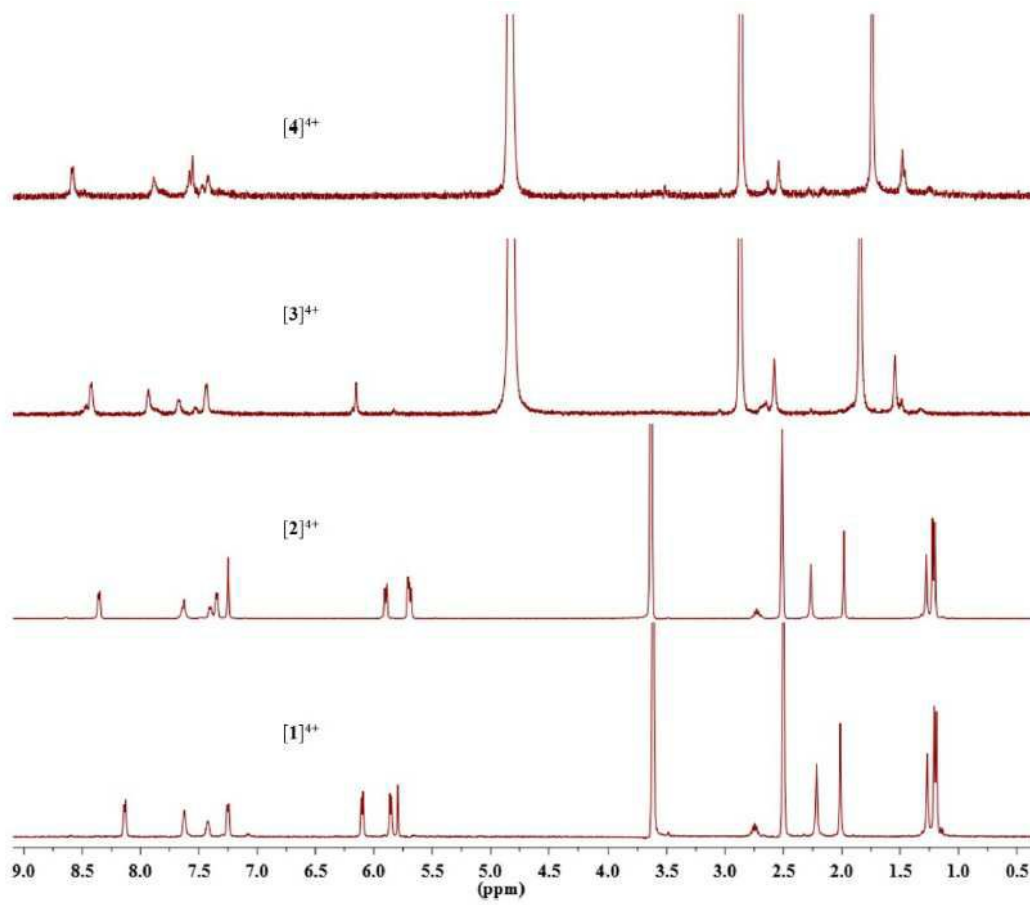
도면5



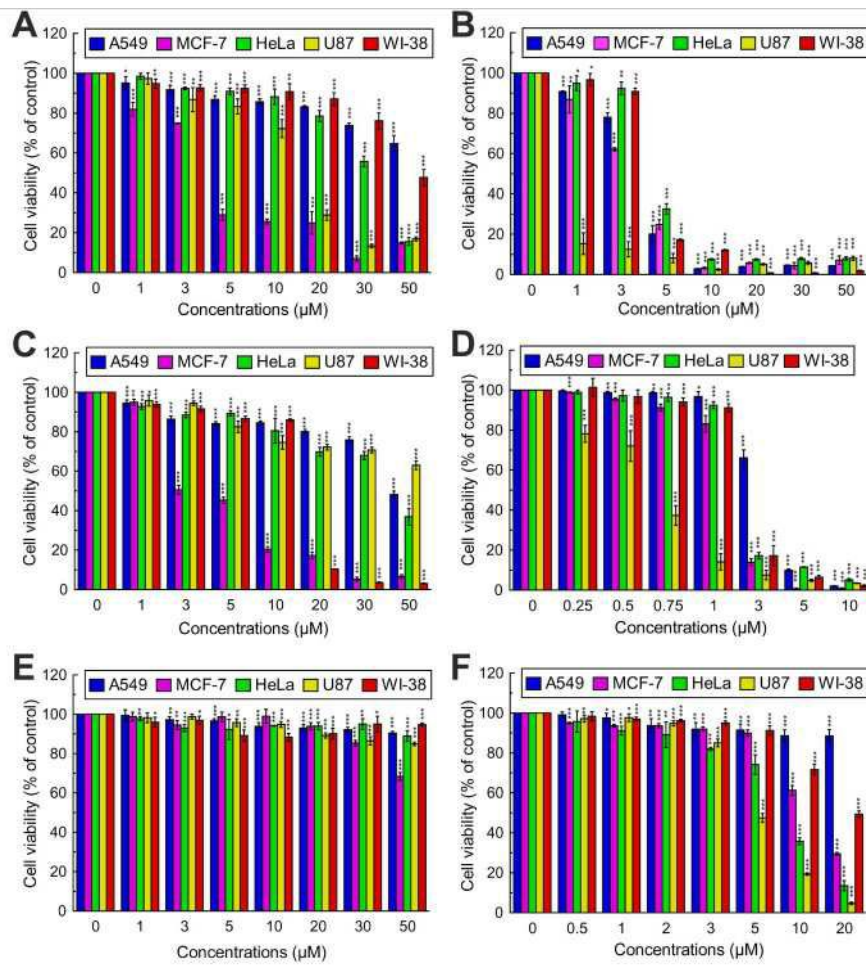
도면6



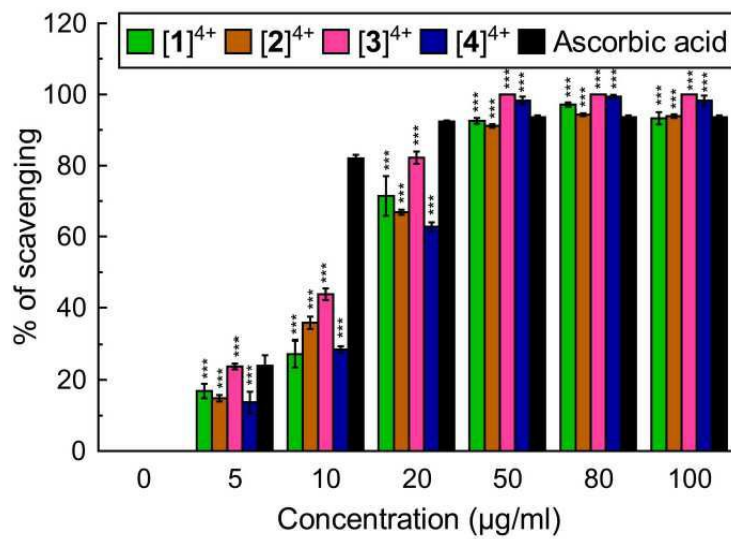
도면7



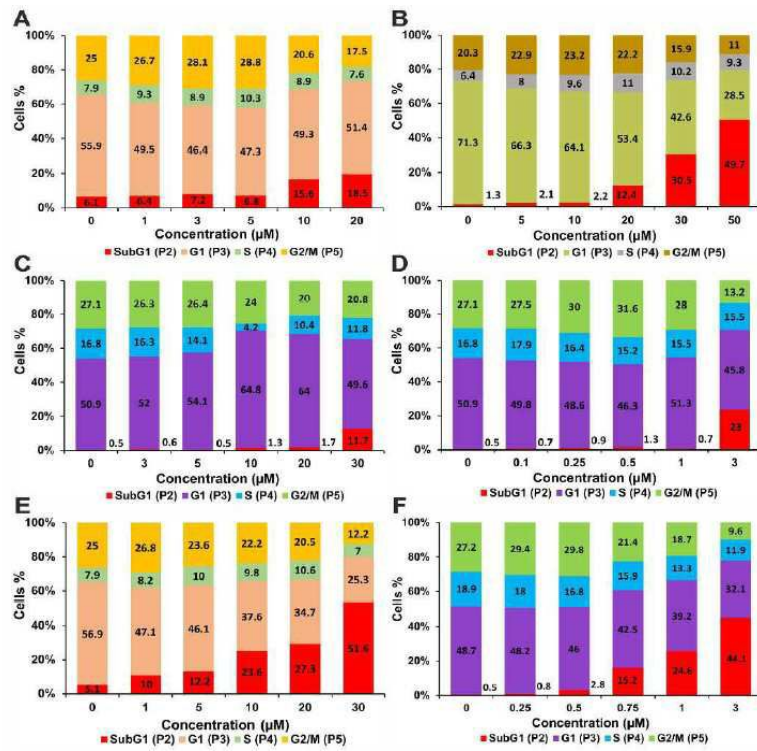
도면8



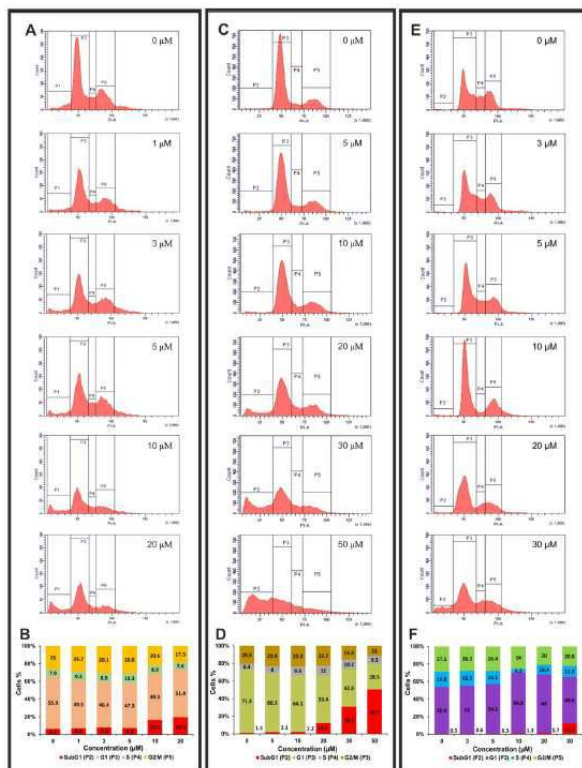
도면9



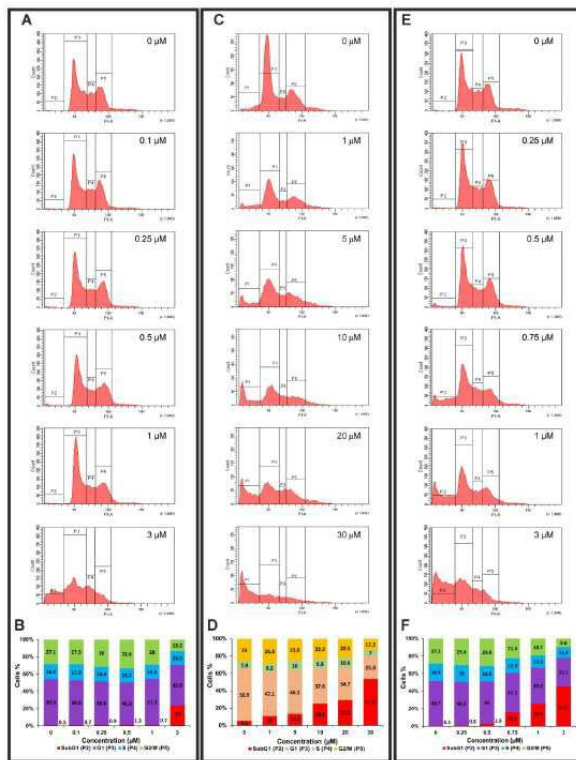
도면10



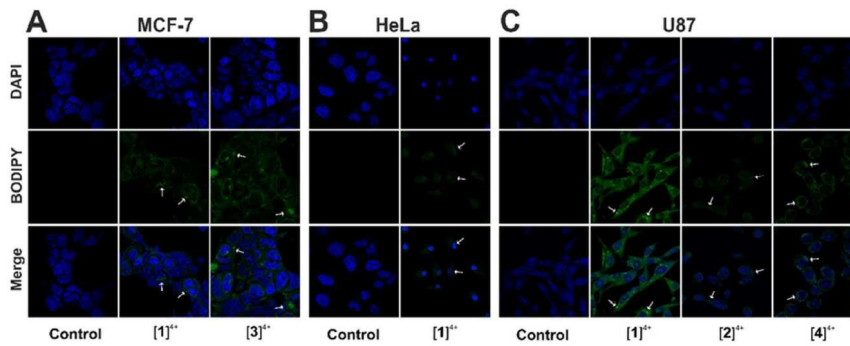
도면11



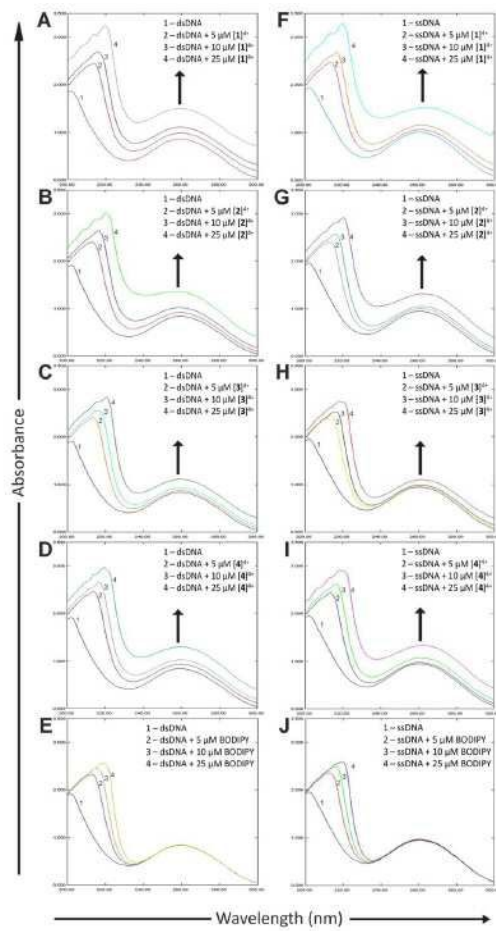
도면12



도면13



도면14



도면15

