



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0011727

(43) 공개일자 2016년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07F 15/00 (2006.01) *A61K 31/282* (2006.01)

A61K 31/295 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0092415

(22) 출원일자 2014년07월22일

심사청구일자 2014년07월22일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93

(72) 발명자

지기환

울산 중구 우정3길 9, 104동 903호 (우정동, 선경
아파트1차)

조재호

울산 동구 대송1길 10, 102동 1010호 (화정동, 대
송현대아파트)

(74) 대리인

특허법인 태백

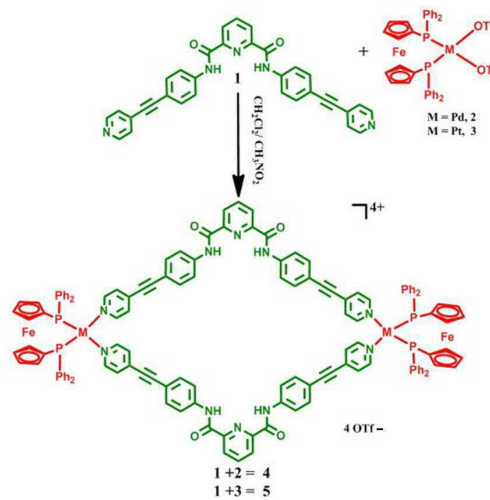
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **두가지 금속을 포함한 신규 고리화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 두가지 금속을 포함한 신규 고리화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)은 T98G (뇌종양), KB (두경부암), SNU-80(갑상선암)의 암세포 사멸을 억제하여, 암세포의 활성을 저해함으로써 뛰어난 항암활성을 나타내는바, 암질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-0498

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 자체조립을 이용한 초분자의 효과적 합성과 생화학적 응용

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.30

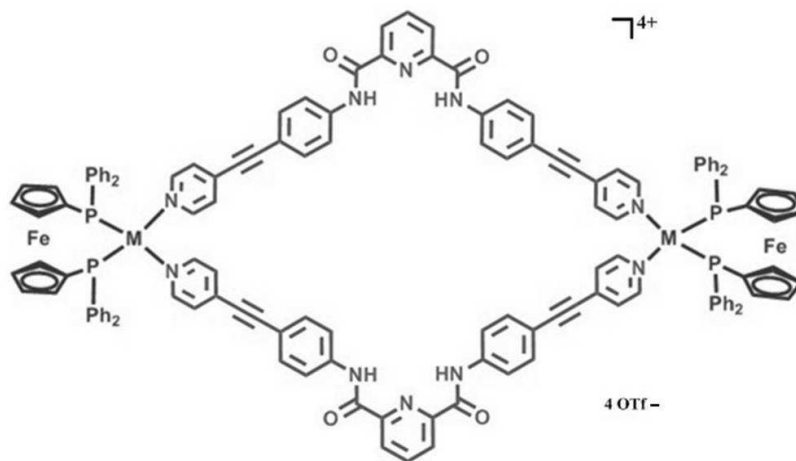
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]

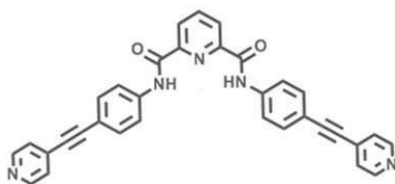


상기 화학식 1에서, M은 각각 독립적으로 Pd 또는 Pt이고, OTf는 트리플루오로메탄설포네이트(trifluoromethanesulfonate)임.

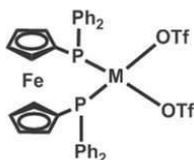
청구항 2

하기 화학식 2로 표시되는 리간드 화합물 및 하기 화학식 3으로 표시되는 헤테로 금속화합물을 혼합하는 단계를 포함하는 제1항의 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)의 제조방법.

[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식 3에서, M은 각각 독립적으로 Pd 또는 Pt이고, OTf는 트리플루오로메탄설포네이트(trifluoromethanesulfonate)임.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제조방법은 상기 화학식 2로 표시되는 리간드 화합물 및 하기 화학식 3으로 표시되는 헤테로 금속화합물을 혼합하는 단계를 포함하는 제1항의 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)의 제조방법.

테로 금속화합물을 1:1의 몰비로 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{NO}_2$ 에 녹여 반응시키는 것을 특징으로 하는 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)의 제조방법.

청구항 4

제1항의 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암세포의 세포사멸을 통하여 항암활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 암질환은 뇌종양, 두경부암 또는 갑상선암인 것을 특징으로 하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 두가지 금속을 포함한 신규 고리화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

배위결합이 원동력인 자체 조립(Coordination-driven self-assembly)은 잘 알려진 형태 및 크기를 가진 거대한 초분자적(supramolecular) 금속고리(metallacyclic) 구조의 합성에 있어서는 효과적인 접근법으로 증명되었다. 단단하고(rigid), 리간드-캡핑된 전이 금속 수용체와, O- 및 N-배위결합 위치에서 파생된 한자리(mono-) 또는 여러자리(multidentate) 도너를 결합시킨 배위결합이 원동력인 방향성 결합 연구를 이용한, 심미적으로 호감을 주는 다양한 형태, 크기 및 대칭을 가진 다수의 분자 설계가 보고되어 왔다. 피리딜(pyridyl) 또는 질소 도너 링커를 가진 사각평면 Pd(II) 및 Pt(II) 유기 금속 수용체는 상기 단단한 사각평면 배위결합 환경 때문에, 금속고리 구조의 디자인에 가장 광범위하게 사용되었다. 질소 도너 대칭적 폴리피리딜 리간드에서 파생된 유기 아미드들은 배위결합이 원동력인 자체 조립에 널리 사용되었다. 이러한 자체 조립된 초분자적(supramolecular) 설계는 주인-손님(host-guest) 반응, 촉매 반응 및 센싱(sensing) 등의 다양한 적용 분야로 확대되고 있다. 또한, 최근에 이러한 금속고리 구조의 생물학적 특성이 새롭게 떠오르기 시작했다. 금속고리 화합물 및 헬리케이트(helicate)는 DNA와 상호작용하는 것으로 밝혀진 반면, 다른 설계구조들은 암세포 및 박테리아에 세포독성이 있는 것으로 나타났다.

[0003]

반면, 금속 기반 약물의 치료 적용으로 인해, 금속약물(metallopharmaceutical)은 의약화학에 있어 중요한 영역으로 대두되고 있다. 보통, 넓은 범위의 배위결합수 및 가변 금속 중심의 접근 가능 레독스 상태에 따른 2- 또는 3-차원 공간에서의 유기 리간드 배열은 의학적 목적에 활용할 수 있는 넓은 반응성 스펙트럼을 제공한다. 시스플라틴(cisplatin)의 발견 이후, 중앙 치료에 있어 무기 화합물 용도에 대한 관심이 크게 확대되고 있다. 광범위한 암에 대해 치료제로서 이의 성공적인 적용에도 불구하고, 시스플라틴의 사용은 높은 독성 및 원하지 않는 신독성(신장 손상), 신경독성(신경계 손상) 및 골수독성(골수 억제)과 같은 부정적인 여러 부작용을 가진다. 또한, 시스플라틴의 효율은 세포 내 분해 및 내성에 의해 낮아질 수 있다. 상기 단점들은 카보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin) 및 사트라플라틴(satraplatin)과 같은 다른 백금 약물의 개발을 이끌었는데, 이는 낮은 독성을 가지며, 현재 다양한 암 치료에 사용되고 있다. 이러한 유도체들은 시스플라틴과 비교하여 개선된 치료 효과를 나타내는 반면, 상기 백금 약물들과 관련된 문제점도 있다. 따라서, 독성, 분해 및 내성과 관련된 문제점들을 완화할 수 있는 약물 전달 벡터를 개발하는데 상당한 노력을 기울이고 있다. Therrien 등은 $[\text{M}(\text{acac})_2]$ ($\text{M} = \text{Pt}^{2+}, \text{Pd}^{2+}$) 복합체로 캡슐화되고, 항종양 활성이 상승 향상된 반-샌드위치

(half-sandwich) 루테튬-기반 배위결합 케이지를 보고하였다.

[0004] 비록 많은 Pd 및 Pt 기반의 금속고리 화합물들은 주인-손님 화학(host-guest chemistry) 또는 다른 유익한 특성들을 나타내는 것으로 보고되고 있지만, 항종양 특성을 나타내는 화합물은 거의 없다. 최근에, 본 발명자들은 배위결합이 원동력인 자체 조립 연구에 의해 구성된 다양한 분자 금속고리 화합물을 보고하였는데, 이들에 대해 시험관 내 항암 활성을 측정하였다. 그 결과, 작은 금속고리 화합물보다 큰 금속고리 화합물일수록 더 높은 활성 수준을 보였는데, 이는 큰 거대분자가 암세포 내부에서 더 쉽게 유지된다는 추측을 뒷받침한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-0724586호(2007.05.28 등록)

발명의 내용

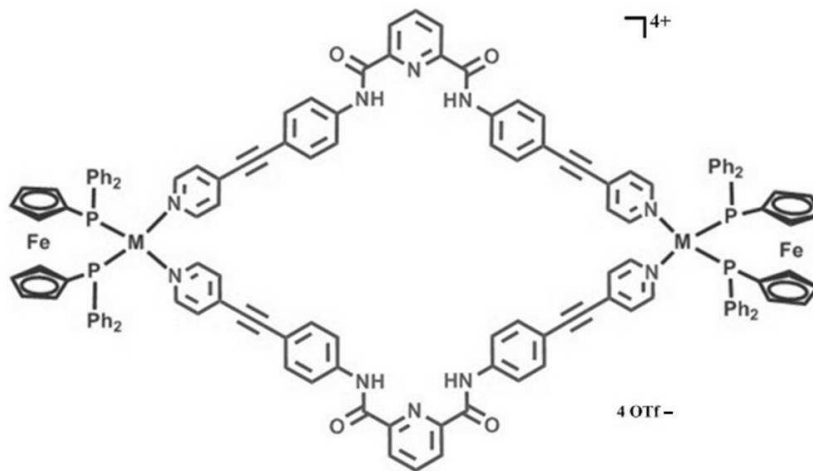
해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 신규 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0008] [화학식 1]

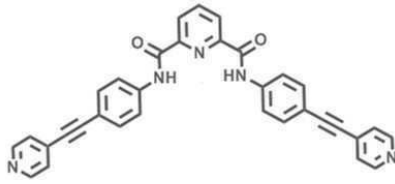


[0009] 상기 화학식 1에서, M은 각각 독립적으로 Pd 또는 Pt이고, OTf는 트리플루오로메탄설포네이트(trifluoromethanesulfonate)임.

[0010]

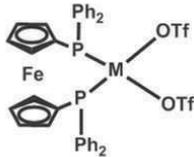
[0011] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 리간드 화합물 및 화학식 3으로 표시되는 헤테로 금속화합물을 혼합하는 단계를 포함하는 상기 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)의 제조방법을 제공한다.

[0012] [화학식 2]



[0013]

[0014] [화학식 3]



[0015]

[0016] 상기 화학식 3에서, M은 각각 독립적으로 Pd 또는 Pt이고, OTf는 트리플루오로메탄설포네이트(trifluoromethanesulfonate)임.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 두가지 금속을 포함한 신규 고리화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)은 T98G (뇌종양), KB (두경부암), SNU-80(갑상선암)의 암세포 사멸을 억제하여, 암세포의 활성을 저해함으로써 뛰어난 항암활성을 나타내며, 암질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)의 합성 과정을 나타낸다.

도 2는 니트로메탄-d₃(nitromethane-d₃)에서 HBMC 복합체 4 및 Pd 수용체 화합물 2의 비교 ³¹P NMR 스펙트럼이다.

도 3은 니트로메탄-d₃(nitromethane-d₃)에서 HBMC 복합체 5 및 Pd 수용체 화합물 3의 비교 ³¹P NMR 스펙트럼이다.

도 4는 HBMC 복합체 4(a) 및 복합체 5(b)의 계산(상단) 및 실험(하단) ESI-MS 스펙트럼이다.

도 5는 리간드 1, Pd 수용체 화합물 2 및 HBMC 복합체 4의 비교 UV-Vis 스펙트럼이다.

도 6은 리간드 1, Pd 수용체 화합물 3 및 HBMC 복합체 5의 비교 UV-Vis 스펙트럼이다.

도 7은 복합체 4의 분자 역학(molecular mechanics) 역장(force field) 계산을 통해 얻은 구조-최적화된(Geometry-optimized) 화학구조를 나타낸다.

도 8은 T98G 고형 뇌종양 세포에 대한 복합체 4 및 5의 억제효과를 나타낸다. 생존 T98G 세포의 백분율은 복합체 4(A) 및 복합체 5(B)를 24, 48 및 72 h 처리 후에 계산되었다. 성장 동역학 분석(A 및 B) 결과, 복합체 4 및 5는 배양 시간 의존적으로 T98G 세포에 억제 효과를 갖는 것으로 나타났다. 배양된 세포는 0.5 내지 16 μM 농도의 복합체들로 처리되었다. (C) 복합체 4 및 복합체 5로 처리된 T98G 세포의 집락형성 능력을 나타낸다. (D) 배양 배지에서 전-반응된 복합체들의 성장-억제 활성의 감소를 나타낸다. T98G 세포의 배양물을 첨가하기 전에, 6μM 농도의 복합체 4 및 5는 DMSO 및 10% FBS가 첨가된 세포 배양 배지(DMEM)에서 표시된 시간 동안 37°C에서 전-반응되었다.

도 9는 세포 내 ATP 및 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 검출 결과를 나타낸다. (A) DMEM 배지에서 T98G 세포의 상대적 세포 내 ATP 수치를 나타낸다. 복합체 4 및 5에 노출된 T98G 세포는 처리 24 시간 후, ATP 수준 및 대사 활성이 더 감소된 것으로 나타났다. (B) 복합체 4 및 5로 처리된 T98G 세포에서의 ROS 생성 결과를 나타낸다. 데이터는 H2DCFDA 프로브를 사용한 DCF의 평균 형광 세기로 표시하였다.

도 10은 인간 T98G 뇌종양 세포에서의 세포자멸사 검출 결과를 나타낸다. 여러 농도(0.05-2 μ M)의 복합체 4 및 5로 처리된 세포들을 결합 완충액에 현탁하였다. 아넥신(Annexin) V-FITC 및 프로피디움 이오다이드(propidium iodide) 용액을 첨가하였고, 세포 용액을 15분 동안 상온 및 암소에서 배양하였다. 1시간 내에 유세포분석을 수행하였다. 각 사분면에 있어 각각의 숫자는 세포의 백분율을 나타낸다.

도 11은 T98G 뇌종양 세포에 있어서, 복합체 4 및 5의 미토콘드리아 막 전위에 대한 효과를 나타낸다. 그래프는 복합체 처리 후 세포에 대한 JC-1 시약의 적색 형광도 세기 곡선을 나타낸다. 가로축은 적색 형광 세기(PE-A)를, 세로축은 세포수를 나타낸다. 남색 곡선은 미처리 음성 대조군을 나타내고, 검정 곡선은 양성자 이온운반체(ionophore)인 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐하이드라존(Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; cccp)으로 처리한 양성 대조군 세포군을 나타낸다. 음성 대조군 곡선으로부터 cccp 처리된 곡선으로의 곡선이동은 미토콘드리아 막 전위의 감소를 나타낸다.

도 12는 T98G 뇌종양 세포군에서 24시간 처리 후, 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential; MMP) 및 카스파제 활성화에 대한 복합체 4 및 5의 효과에 대해 나타낸다. (A) T98G 세포에서 MMP 변화를 검출하기 위해서, 음성 대조군에 대한 JC-1 적색 형광도의 상대적 수치를 JC-1 시약으로 유세포 분석에 의해 정량화하였다. 세포자멸사 세포 사멸의 유도는 Promega Caspase-3/7Glo assay kit을 이용하여 카스파제-3/7 활성을 측정함으로써 확인할 수 있고, 발광도의 검출은 세포 내부의 카스파제 수준과 정비례한다.

도 13은 처리 24시간 후, T98G 뇌종양 세포에서 검출된 복합체 4 및 5의 형광도를 나타낸다. 2 μ M의 복합체 4 및 5를 이용하여 T98G 세포의 형광현미경(40 $\times$ 배율) 분석을 수행하였다: (A) 복합체 4의 명시야상(bright field image), (B) 복합체 4의 형광이미지, (C) 복합체 5의 명시야상 및 (D) 복합체 5의 형광이미지. (E) T98G 세포에서 여러 농도로 검출된 복합체 4 및 5의 형광 세기를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

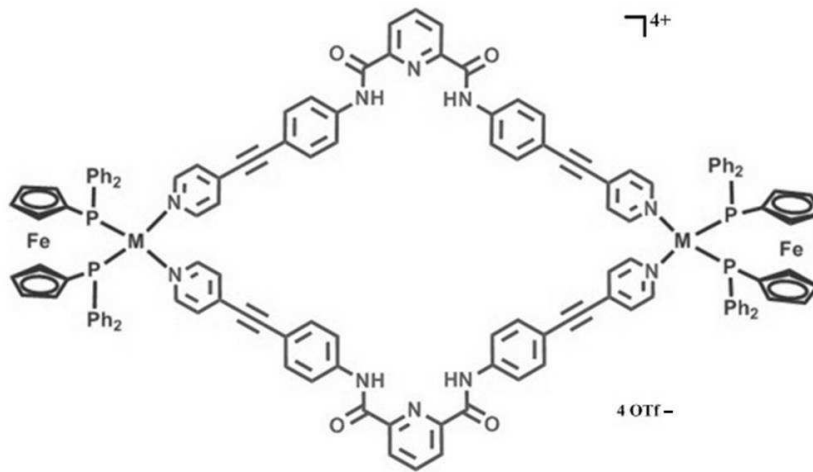
[0020]

금속초분자적(metallosupramolecular) 구조에 대한 전문지식을 구축하고자, 본 발명자들은 두 개의 다른 금속(Pd 및 Pt) 수용체를 가진 아미드-기반 디피리딜(dipyridyl) 리간드에 의해, 2개의 새로운 헤테로-바이메탈 고리 화합물(hetero-bimetallicacycles; HBMCs)을 디자인하고 합성하였다. 생체분자를 가진 이러한 시스템의 상호작용에 대한 잠재 생물학적 효과를 확인하기 위해서, 본 발명자들은 개시 수용체 및 도너 리간드와 함께 다양한 인간 암세포주에 대한 HBMCs의 항암 효과를 측정하였다. 이에 본 발명자들은 최초로 아미드-기반 디피리딜(dipyridyl) 리간드 및 Pd와 Pt 수용체로부터 제작된 금속고리 시스템 및 이들의 다양한 암세포주에 대한 세포 독성 활성을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0021]

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0022] [화학식 1]



[0023]

[0024] 상기 화학식 1에서, M은 각각 독립적으로 Pd 또는 Pt이고, OTf는 트리플루오로메탄설포네이트(trifluoromethanesulfonate)임.

[0025]

본 발명의 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가 염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설포산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설포산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 무기산으로는 염산, 유기산으로는 메탄설포산을 사용할 수 있다.

[0026]

또한, 본 발명의 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0027]

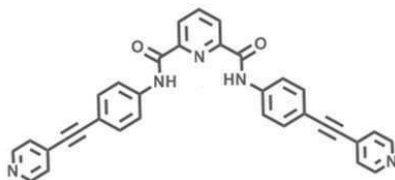
본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 화합물을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0028]

또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 리간드 화합물 및 하기 화학식 3으로 표시되는 헤테로 금속화합물을 혼합하는 단계를 포함하는 상기 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)의 제조방법을 제공한다.

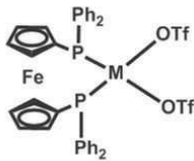
[0029]

[화학식 2]



[0030]

[0031] [화학식 3]



[0032]

[0033] 상기 화학식 3에서, M은 각각 독립적으로 Pd 또는 Pt이고, OTf는 트리플루오로메탄설포네이트(trifluoromethanesulfonate)임.

[0034] 본 발명에 따른 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)은 화학식 2로 표시되는 리간드 화합물 및 화학식 3으로 표시되는 헤테로 금속화합물을 1:1 몰비로 반응시킴으로써 용이하게 제조될 수 있으며, 상기 반응은 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{NO}_2$ 에서 이루어질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 상기와 같이 본 발명에 따라 제조된 화학식 1의 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)은 제조 후, 적외선 분광법, 핵자기 공명 스펙트럼, 질량 분광법, 액체크로마토그래피법, X-선 구조결정법, 선광도 측정법 및 대표적인 화합물의 원소분석 계산치와 실측치의 비교에 의해 분자구조를 확인할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0037] 상세하게는, 상기 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암세포의 세포사멸을 통하여 항암활성을 나타낼 수 있다.

[0038] 바람직하게는, 상기 암질환은 뇌종양, 두경부암 또는 갑상선암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 약학조성물은 약학조성물 100 중량부에 대하여 화학식 1의 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)을 0.01 내지 90 중량부, 0.1 내지 90 중량부, 1 내지 90 중량부, 또는 10 내지 90 중량부로 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 달라질 수 있다.

[0040] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학조성물은 담체, 부형제, 봉해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 운환제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 운환제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 운환제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 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 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 약학조성물의 제형은 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 죽, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

- [0043] 본 발명의 실시시에 따르면, 상기 약학조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0044] 상기 약학조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 실시시에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 1,000 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 1,000 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0047] <실험예>
- [0048] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0049] 본 발명에 사용된 모든 화합물은 상업적 판매처에서 구입하였고, 추가적 정제 없이 사용하였다. *cis*-[(dppf)M(OTf)₂] (M = Pd, Pt) 개시 수용체 및 리간드는 이전에 보고하였다(Dalton Trans, 2014, 43, 6032). ¹H, ¹³C, and ³¹P {H} NMR 스펙트럼은 Bruker 300 MHz NMR spectrometer로 기록하였다. ³¹P {H}의 화학적 이동은 외부의 열린 샘플인 H₃PO₄ (δ = 0.0 ppm)과 비교하여 보고하였다. 질량 스펙트럼은 MassLynx operating system를 가진 전자분무이온화(electrospray ionization; ESI)를 이용한 Micromass Quattro II triple-quadrupole mass spectrometer로 기록하였다. Elemental GmbH Vario EL-3 analyzer를 이용하여 원소분석을 수행하였다. 흡수 스펙트럼은 Cary 100 Conc UV-Visible spectrophotometer를 이용하여 기록하였다.
- [0050] 1. 시약
- [0051] 트립판 블루(Trypan blue), 크리스탈 바이올렛(crystal violet), MTT 및 Hoechst-33342는 Sigma Chemical Co., Korea로부터 구입하였다. 인산완충생리식염수(Phosphate buffered saline; PBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 트립신-EDTA는 Hyclone, Korea로부터 구입하였다. H₂DCFDA는 Invitrogen, Molecular Probes, Korea으로부터 구입하였다. 본 발명에 사용된 다른 모든 화합물들은 분석용 등급이고, Sigma-Aldrich, Korea로부터 구입하였다.
- [0052] 2. 인간세포 배양
- [0053] 본 발명에서 사용된 T98G, KB, SNU-80 및 HEK-293 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB), Seoul로부터 구입하였다. 본 발명자들은 10% 우태아혈청(fetal bovine serum), 1% 비필수 아미노산, 1% 글루타민, 페니실린(100 IU/mL) 및 스트렙토마이신((100 ug/mL)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)를 이용하여, 75-cm² 배양 플라스크(SPL, Korea)에서 판매자의 지시에 따라 상기 세포주를 배양하였다. 모든 배양은 37℃, 95% 상대습도 및 5% CO₂를 유지하였다.
- [0054] 3. 시험관 내 세포 성장 억제 분석(MTT 분석)
- [0055] 세포는 완전배지 100uL에 1×10⁵ cells/well 농도로 96-웰 플레이트에 접종시켰고, 세포 부착을 위해 24시간 동

안 37℃, 5% CO₂ 대기에서 배양하였다. 복합체의 스타크 용액(2M)은 DMSO:물(1:3)의 용액으로 만들었고, 그 후 세포주 처리를 위해 불완전 배지에 0.125 μM까지 희석하였다. 계산된 농도의 각 복합체를 100μL의 새로운 배지 용액에 첨가하였고, 최종농도 300-0.06 μM이 되도록 하여 웰에 분주하였다. 모든 분석은 3번의 독립적인 세트로 반복 시험을 수행하였다. 또한 약물을 적용하지 않은 음성대조군 및 시스플라틴으로 처리한 양성대조군을 각 분석에 포함시켰다. 약물에 24시간 동안 세포 노출 후, 각 웰을 200μL PBS 완충액으로 조심스럽게 헹구었다. 100μL의 새로운 완전 배지와 함께 20μL MTT 용액(5 mg/ml)을 각 웰에 첨가하여 세포독성을 측정하였고, 플레이트는 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 배지를 제거하고, 각 웰의 보라색 포르마잔 침전물을 100μL DMSO로 소독하였다. 흡광도는 Biotek Synergy HT microplate reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였고, 생존 백분율(%)을 계산하였는데, 이는 대사적으로 활성화된 세포 수에 정비례한다.

[0056]

[0057] % 생존율 = 샘플 웰에서의 OD / 대조군 웰에서의 OD × 100

[0058] 억제 농도 50(inhibitory concentration 50; IC₅₀)으로 표시되는 결과는 Microsoft Excel에서 제공되는 식을 이용하여 용량 반응 곡선 경향에 따라 수치를 적용함으로써 얻어냈다.

[0059] 4. 성장 동역학(kinetics)

[0060] T98G 세포는 세포 배양 플레이트 상에 10000 cells/cm²로 접종하였고, 이의 증식 동역학을 합성된 복합체 처리 후, 배양 시간을 달리하여(24, 48 및 72 h) 조사하였다. 세포들은 트립신처리하였고, 플레이트 당 전체 세포를 트립판 블루 배제 방법에 의해 현미경으로 계수하였다.

[0061] 5. 집락형성 분석(Clonogenic assay)

[0062] 콜로니 형성 분석은 "무제한" 분열을 할 수 있는 능력을 가진 개체군에서 기본적으로 모든 세포를 시험하였다. DMEM에서 37℃로 처리되기 전, (처리에 따라) 150-400 세포가 10-12 시간 동안 배양되었다. 또한, 배양된 세포들은 1 내지 16μM의 합성된 복합체 용량에 따라 처리되었다. 처리 후, 콜로니 형성을 위해 세포들은 암소에서 습윤상태로, 5% CO₂ 대기환경에서 37℃로 8-10일 동안 배양되었다. 콜로니들은 메탄올로 고정되었고, 1% 크리스탈 바이올렛으로 염색되었다. 50 세포 이상의 콜로니들은 계수되었고, 각 콜로니의 생존 분획(surviving fraction; SF)을 계산하였다. 집락형성 생존 곡선은 평균 생존율 수준을 적용한 최종제곱회귀분석(east-squares regression)에 의한 3번의 독립적인 실험을 통해 작성하였다.

[0063] 6. 복합체의 안정성 평가

[0064] 복합체 4 및 복합체 5의 합성된 복합체의 안정성을 평가하기 위해서, 0 h에서 50 h까지 두 용액에서 안정성을 확인하였다. 복합체의 안정성을 시험하기 위해, DMSO (6 μM) 또는 DMEM 배지 (6 μM) 둘 중 하나의 수용액을 사용하였다. T98G 종양세포에서 대사 성장 억제를 확인하기 위해서, MTT 분석을 통해 복합체의 안정성을 평가하였다.

[0065] 7. ATP 측정

[0066] 모든 다세포 미생물은 대사 에너지 저장 수단으로 ATP를 사용한다. 따라서, ATP 정량은 대사적으로 활성화된 세포를 검출하기 위한 특징적 신호가 된다. 이러한 이유로, 본 발명자들은 복합체 4 및 복합체 5를 처리한 세포에서의 세포 내 ATP 수준을 확인하였다. 상기 실험을 수행하기 위해서 다양한 농도의 복합체를 사용하였다. ATP는 상업적 키트(CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Korea)를 사용하여 측정하였고, 모든 검출 단계는 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0067]

8. 세포 내 ROS 검출

[0068]

T98G 세포에서 복합체 4 및 복합체 5에 의해 유도된 세포 내 ROS를 확인하기 위해서, 2', 7'-디클로로플루오레신 디아세테이트(H₂DCFDA; Molecular Probes, USA) 형광 색소 프로브를 사용하였다. 산화에 따라, 비-형광 화합물 DCFH-DA는 형광 화합물 디클로로플루오레신(dichlorofluorescein; DCF)으로 바뀌었다. 따라서, DCF 형광도를 비율 및 생산된 ROS 양으로 표시하였다. 간단히 설명하면, 복합체들로 처리한 후, T98G 세포들은 10uM H₂DCFDA가 포함된 새로운 배지에서 37℃, 30분 동안 배양되었고, PBS로 2번 씻어낸 후, 485 nm에서 여기(excitation) 및 528 nm에서 방출(emission) 파장으로, 플레이트 리더(Biotek, Techan, USA)를 사용하여 형광도를 측정하였다.

[0069]

9. 아넥신 V(annexin V) 및 PI 염색의 FACS 분석

[0070]

복합체 4 및 복합체 5를 처리한 T98G 세포 내에서 세포자멸사(apoptosis)의 수준을 확인하기 위해서, 유세포 분석기를 사용하였다. 처리-유도된 세포 사멸을 분석하기 위해, 아넥신 V-FITC/PI 염색을 수행한 후 FACS 분석하였다. 세포들을 집중하였고, 0.05, 1 및 2 uM 농도의 복합체로 처리하였다. 미처리 세포 및 (세포자멸사를 촉발시키는) 시스플라틴으로 처리된 세포는 각각 음성대조군 및 양성대조군으로 사용하였다. 간단히 설명하면, 처리 24시간 후, 세포들을 모았고, EzWay Annexin V-FITC apoptosis detection kit을 이용하여 아넥신 V-FITC/PI 염색에 적용하였고, 모든 단계는 제조사에 의해 제공되는 프로토콜에 따랐다.

[0071]

10. 미토콘드리아 막 전위 검출

[0072]

미토콘드리아는 많은 요인에 의해 유도되는 세포자멸사에 결정적인 역할을 하고, 미토콘드리아 막 전위($\Delta\psi_m$)의 감소는 이른 세포자멸사의 특징/사건이다. JC-1은 세포사멸 세포에서 미토콘드리아 막 전위 검출을 위한 선택 마커이다. JC-1는 친지방성의 양이온성 염료이다. 이는 세포 내에서 단량체로 존재하고, 낮은 농도에서 (미토콘드리아 막을 탈분극시켜) 녹색 형광을 나타낸다. 하지만, 고농도에서 염료는 J-응집체를 형성하는데, 넓은 여기 스펙트럼을 나타내고, ~590 nm에서 방출 최대치를 나타내며, 세포는 (정상 분극된 미토콘드리아) 붉은색 형광을 나타낸다. 미토콘드리아 막 상에서 복합체 4 및 복합체 5의 효과를 관측하기 위해서, MitoProbe JC-1 Assay Kit (Invitrogen, molecular probes)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 복합체 처리된 T98G 세포 상에 JC-1 염색을 수행하였다. 양성 MMP 탈분극을 위해, 본 발명자들은 양성자 이온운반체(ionophore)인 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐하이드라존(Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine; cccp)를 사용하였는데, 이는 막 전위를 빠르게 분해시킨다.

[0073]

11. 카스파제(Caspase) 3/7 활성 측정

[0074]

시스테인 프로테아제(cysteine proteases) 패밀리인, 카스파제들은 세포자멸사의 중심 조절자이다. 상기 시스테인 프로테아제 패밀리 중 가장 잘 연구된 것 중 하나가 작용 카스파제-3(executioner caspase-3) 및 카스파제-7(caspase-7)인데, 이는 세포자멸사(apoptosis) 및 분화에 중요한 역할을 한다. 세포자멸사를 측정하기 위해서, Caspase-Glo® 3/7 Assay Kit (Promega, Korea)을 사용하였다. 100 uL Caspase-Glo® 3/7 reagent은 100 uL 복합체 처리된 세포 및 대조군 세포 각각에 첨가되었고, 상온에서 반응시켰다. 플레이트 내 각 샘플의 발광도는 luminometer (Biotek, Techan, USA)로 기록되었다.

[0075]

12. 세포 흡수 및 복합체의 현미경 분석

[0076]

세포들을 96-웰 플레이트 (SPL, Korea)에 집중하였고, 세포 부착을 위해 12시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포들은 1-4 uM 농도의 복합체 4 및 복합체 5에 37℃, 48시간 동안 완전 배양 배지에서 노출시켰다. PBS로 씻어낸 후, 상등액을 새로운 배지로 교체하고, 복합체 처리된 세포 개체군은 각각 330 및 485 nm의 여기 및 방출 필터를 가진 fluorescence microplate reader (Biotek, Techan, USA)로 측정하였다. 현미경 분석을 위해, 세포들은 완전 배양 배지에 유리 슬라이드 상에서 배양하였고, 2uM 농도의 복합체 4 및 복합체 5에 밤새도록 노출시켰다. 슬라이드는 PBS로 씻어냈고, 여기 필터 Ex340-380 및 차단 필터 BA435-485로 구성된 MBE41300 C-FL 필터가 장

착된 형광 현미경(Ti-U, Nikon) 하에서 관찰하였다.

[0077]

13. 헤테로-바이메탈 고리 화합물(hetero-bimetalliccycle) 4의 합성

[0078]

리간드 1 (0.010g, 0.020 mmol) 및 $\text{Pd}(\text{dppt})_2(\text{OTf})_2$ (0.020 g, 0.020 mmol) 수용체 2는 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{NO}_2$ (1:1, 2.0 mL)에 부유시켰고, 최종 혼합물은 상온에서 5-6시간 동안 섞었다. 반응 혼합물을 여과하였고, 용매를 감압하여 제거하였으며, 산물은 디에틸 에테르(diethyl ether)로 씻어냈다. 얻어진 미가공 산물은 니트로메탄(nitromethane)에 재용해하였고, 디에틸 에테르로 증기 확산시켰다. 하루 내에 붉은 결정 산물을 얻었다(93%, 0.028 mg). $\text{C}_{138}\text{H}_{97}\text{F}_{12}\text{Fe}_2\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_4\text{Pd}_2\text{S}_4$ 의 원소 분석을 수행하였다: C, 56.07, H, 3.31, N, 4.74; found: C, 56.88, H, 3.42, N, 4.60; MS (ESI) calculated for $[\text{M}-30\text{Tf}]^{3+}$ m/z 836.5, found 836.4; calculated for $[\text{M}-40\text{Tf}]^{4+}$ m/z 590.1, found 590.1; ^1H NMR (300 MHz, nitromethane- d_3 , d, ppm): 10.17 (s, 4H, CONH), 8.46 (d, 8H, H_a), 8.43-8.24 (m, 10H, $\text{H}_{e/f}$), 8.03-7.94(m, 32H, Ph), 7.78(m, 8H, H_b), 7.71-7.67(m, 8H, Ph) 7.55 (d, 8H, H_d), 7.20 (d, 8H, H_d), 4.83 (m, 8H, cp), 4.76 (m, 8H, cp); ^{13}C NMR (300 MHz, nitromethane- d_3 , d, ppm): 164.13 (C=O), 151.01, 149.36, 141.39, 135.50, 134.60, 131.26, 129.14, 128.38, 127.66, 124.29, 120.05, 78.40, 77.42, 70.30, 69.40, 30.78.

[0079]

14. 헤테로-바이메탈 고리 화합물(hetero-bimetalliccycle) 5의 합성

[0080]

$\text{Pd}(\text{dppt})_2(\text{OTf})_2$ 수용체 3이 사용된 것을 제외하고는, HBMC 4와 유사한 방법으로 합성을 수행하였고, 그 산물은 91% 수율의 노란색 고체 결정으로 분리되었다. $\text{C}_{138}\text{H}_{97}\text{F}_{12}\text{Fe}_2\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_4\text{Pt}_2\text{S}_4$ 의 원소 분석을 수행하였다: C, 56.07, H, 3.31, N, 4.74; found: C, 57.01, H, 3.39, N, 4.81; MS (ESI) calculated for $[\text{M}-30\text{Tf}]^{3+}$ m/z 895.5, found 895.4; calculated for $[\text{M}-40\text{Tf}]^{4+}$ m/z 634.4, found 634.4; ^1H NMR (nitromethane- d_3 , 300 MHz, d, ppm): 10.48 (s, 4H, CONH), 8.29 (m, 8H, H_a), 7.67 (m, 8H, H_b), 7.77 (m, 8H, H_c), 8.15 (m, 2H, H_d), 8.03-7.98 (m, 40H, Ph), 5.81 (m, 8H, cp), 5.79 (m, 8H, cp); ^{13}C NMR (nitromethane- d_3 , 300 MHz, d, ppm): 165.11 (C=O), 152.02, 148.36, 141.38, 135.57, 133.78, 130.92, 129.14, 128.48, 127.67, 124.54, 120.11, 77.41, 78.49, 70.34, 69.77, 31.18.

[0081]

<실시예 1> 헤테로-바이메탈 금속고리 화합물(Hetero-Bimetallic Metallacycles; HBMCs)의 합성 및 특성 분석

[0082]

도 1에 나타난 바와 같이, 비스(4-(피리딘-4-일에티닐)페닐)피리딘-2,6-디카복사마이드)) 도너 리간드 1[bis(4-(pyridin-4-ylethynyl)phenyl)pyridine-2,6-dicarboxamide)) donor ligand 1] 및 헤테로메탈(heterometallic) $\text{cis-M}[(\text{dppf})(\text{OTf})_2]$ [M = Pd (2), Pt (3); dppf = 1,1'-bis (diphenylphosphino) ferrocene; OTf = trifluoromethanesulfonate] 수용체 사이의 반응을 통해 [2+2] 방법으로 HBMCs 복합체 4 및 복합체 5를 제조하였다.

[0083]

금속 고리 화합물의 특성을 확인하기 위하여, 먼저 NMR 분광법을 사용하였다. 복합체 4 및 복합체 5의 ^1H NMR 스펙트럼은 금속 착물화(complexation)로 인한 전형적인 공진 이동(resonance shifts)에 의한 대칭종(symmetrical species)이 형성된다는 것을 명백하게 나타냈다. 도너 리간드 1에서 양성자 신호를 비교하여, 본 발명자들은 배위결합에 따라 금속 고리 복합체 4 및 5에서의 모든 신호가 상당히 이동한다는 것을 밝혀냈다. 복합체 4의 ^{31}P NMR 스펙트럼은 34.74 ppm에서 하나의 급격한 피크를 나타냈는데, 이는 개시 수용체의 신호와 비교할 때 피리딘(pyridines)과의 금속 배위결합으로 인해 ~16.5 ppm 업필드(upfield)로 이동한 것이다(도 2). 단일 ^{31}P 신호의 출현은 대칭되는 인 핵(phosphorus nuclei)이 존재한다는 것을 나타낸다. 하지만, 복합체 5의 ^{31}P NMR 스펙트럼은 ^{195}Pt satellites와 함께 12.80 ppm에서 급격한 단일항(singlet)을 나타냈는데, 이는 단일 산물

의 형성을 의미한다(도 3).

[0084] 전기분무 이온화 질량 분석(Electrospray ionization mass spectrometry; ESI-MS) 결과, 금속 고리 화합물이 형성된다는 증거가 추가로 제공되었다. $m/z = 836.4$ ($[M-30Tf]^{3+}$) 및 590.1 ($[M-40Tf]^{4+}$)에서 조립 복합체 4(도 4a)와, $m/z = 895.4$ ($[M-30Tf]^{3+}$) 및 634.4 ($[M-40Tf]^{4+}$)에서 조립 복합체 5(도 4b)의 전하 상태가 명백하게 관찰되었고, 동위원소를 통해 분석되었다. 상기 피크들은 이론적 분포와 잘 맞아떨어졌다.

[0085] 금속 고리 화합물 4 및 5 뿐만 아니라 이들 수용체의 전자 흡수 스펙트럼을 1×10^{-5} M로 메탄올 용액에서 얻었다(도 5 및 도 6). 금속 고리 화합물 4에 있어서는 초기 Pd-수용체와 비교시 d-d 밴드의 상당한 청색-편이와 함께, 320 nm에서 강한 흡수 파장이 관측되었다(도 5). 금속 고리 화합물 4 및 Pd-수용체 2에 대한 λ_{max} 위치에 대한 차이는 금속 중심에 있는 피리딘 고리 상 질소 고립 전자쌍의 강한장(strong-field) 배위결합으로 인해 명백히 나타났다. 유사하게도, 금속 고리 화합물 5에서도 개시 Pt 수용체와 비교시 상당한 청색-편이와 함께, 325 nm에서 강한 흡수 파장이 관측되었다(도 6).

[0086] 최종적으로, 분자 역학(molecular mechanics) 역장(force field) 계산을 이용하여, [2 + 2] 자체 조립된 HBMC 복합체 4의 구조를 결정하였다(도 7). UFF 역장(force field)을 이용하여 구조 최적화(geometry optimization)를 수행하였는데, Gaussian 09 computational software suite를 사용하였다. 초기에는 Ru 중심의 배위권(coordination sphere)을 완성하면서, 염소화합물(chloride)로 개별적인 단편을 최적화하였다. 그 후, 상기 단편들을 전체 장사방형(rhomboids)으로 결합시켰고, 도 1에 나타난 구조로 완성시키면서 최적화하였다. 사이클로펜타디에닐(cyclopentadienyl) 고리의 수소 원자들을 그들의 계산된 최적 위치에 추가하였다. 루테튬 중심들은 23.8Å의 위치에 분포되었고, 다리 리간드(bridging ligands) 중심 고리의 피리딘-질소 원자는 19.5Å의 위치에 분포되었다. 비록, 상기 구조가 매우 평면적이지만, 중심 피리딘 고리들은 Pd 중심의 배위권에 의해 경계된 평면으로부터 24.2° 및 10.2°의 비틀림 각도로 기울어져 있는데, 이는 장사방형(rhomboids)의 얇은 불-유사 특성에 기여한다.

[0087] <실시예 2> 암세포 및 정상세포에서의 리간드 및 HBMCs의 억제 효과

[0088] 금속 기반 약물은 임상분야에 널리 사용되고 있다. 이러한 시스템과 생물분자 간의 상호작용에 대한 생물학적 잠재 효과를 연구하기 위해서, 본 발명자들은 T98G (뇌종양), KB (두경부암), SNU-80 (갑상선암) 및 HEK-293 비악성 세포주에 대한 리간드 화합물 1, 수용체 화합물 2와 3, 및 신규 HBMCs 4와 5의 세포독성을 측정하였다. 증식 마커인, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카복시메톡시페닐)-2-(4-설포페닐)-2H-테트라졸리움[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTT)]은 살아있는 세포에서 감소되는데, 이는 대사성 디하이드로게나제(dehydrogenase) 효소 활성을 통해 색깔을 띤 포르마잔(formazan) 산물로 전환된다. 세포자멸사(apoptosis) 또는 괴사(necrosis)와 같은 대사작용에 있어, MTT 세포 증식 분석은 역으로 세포 증식율을 측정하기 위한 신뢰성 있는 방법으로 널리 사용되고 있다. 이런 이유로, MTT 분석은 항암제민감성 및 방사선 감수성 시험을 위해 사용되었다. MTT 분석에 의해 얻은 데이터는 모든 복합체가 암세포의 성장에 용량 의존적으로 억제 효과를 가진 것으로 나타났다. 복합체 4 및 5는 T98G, KB 및 SNU-80의 성장을 4.5 - 36.2 μ M의 IC₅₀ 수치 범위에서 효과적으로 억제하였다(표 1). 암-치료 약물인 시스플라틴을 대조군으로 사용하였다. 복합체 4 및 5 둘 다, 처리 24시간 후에 4.5 내지 5.2 μ M 범위에서 T98G 뇌암 세포 성장을 50% 억제하는 것으로 밝혀졌다. 실험 결과는 상기 복합체들이 비악성 HEK-293 세포에 대해서는 중간 농도(0.32-20.82 μ M)에서 더 낮은 세포독성을 가지는 것으로 나타났다(표 1). HEK-293 세포에 대한 복합체들의 IC₅₀ 수치는 20.6 - 36.2 μ M 범위였다. 상기 결과는 복합체 4 및 5가 T98G 뇌종양 세포 성장을 억제하는 것으로 나타났는데, 이는 성장 정지 또는 세포 사멸 중 하나 때문일 수 있다. 종합하면, 상기 결과는 복합체 4 및 5가 용량-의존적으로 T98G 세포에 효과적으로 민감성을 가진다는 것을 명백하게 나타내는데, 이는 (세포유전학적 손상과 관련된) 유사분열 또는 간기 (세포자멸사) 사멸의 증가 때문일 수 있다. 또한, 본 발명자들은 성장 동력학 분석, 생존 분석, 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 발생 분석, 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential; MMP) 검출, 총 세포내 ATP 검출, 성장 억제 확인을 위해 처리된 T98G 암세포에서의 세포자멸사 검출을 위한 카스파제(caspase) 3/7 활성 및 아넥신(annexin) V/PI 염색 분석, 집락형성(clonogenic) 억제, 산화스트레스 및 새롭게 합성된 복합체에 의해 유도되는 세포자멸사(apoptosis) 분석을 각각 수행하였다.

표 1

[0089]

합성된 금속 복합체의 IC₅₀ 수치(μM)

Complex	T98G	KB	SNU80	HEK293
1	144.0(±17.5)	124.7(±9.6)	107.3(±5.1)	156.6(±9.9)
2	143.7(±13.4)	86.6(±6.9)	80.1(±7.4)	90.0(±8.2)
3	32.5(±5.2)	76.6(±6.3)	70.1(±5.4)	65.3(±5.3)
4	5.2(±2.0)	15.5(±2.3)	18.3(±3.0)	36.2(±5.1)
5	4.5(±2.1)	13.0(±1.2)	12.0(±2.8)	35.0(±3.8)
Cisplatin	69.6(±7.9)	72.6(±6.2)	49.3(±5.4)	17.3(±3.6)

[0090]

<실시예 3> 성장 동력학(Growth Kinetics)

[0091]

도 8(A) 및 (B)는 T98G 세포의 성장 동력학 패턴을 나타낸다. 성장 동력학 분석 결과, 복합체 4 및 5는 T98G 세포 상에서 시간 의존적 경향으로 상당한 억제 효과를 갖는 것으로 나타났다. 세포 부유액은 6-웰 플레이트에 4mm 배지층에서 만들어졌고, 배양된 세포들은 0.5 내지 16 μM 농도의 두 복합체로 처리되었다. 복합체 4에 노출시킨 세포는 복합체 5에 노출시킨 세포보다 약간 더 약한 성장 억제 효과를 나타냈다는 것은 중요하다. 복합체 5로 24시간 처리 후 32.4%-92.4%의 세포 성장 억제(생존율은 7.6%-77.6%)를 보여, 최대 효과는 복합체 5로 처리한 후에 나타났다. 여러 농도에서 24시간 동안 복합체 4에 노출시킨 T98G 세포의 경우, 2%-81.8% 세포가 사멸하였고, 생존율은 18.2%-98.0%로 기록되었다. 종합하면, 복합체 4 및 복합체 5는 T98G 세포의 성장을 용량 및 배양시간-의존적으로 억제시켰다. 상기 실험들은 두 복합체가 T98G 암세포 성장을 억제하고, 억제는 성장 정지 또는 세포 사멸 때문일 수 있다는 것을 나타낸다.

[0092]

<실시예 4> 세포의 콜로니 형성 능력 억제

[0093]

도 8(C)는 T98G 세포 콜로니 형성 능력에 대한 복합체들의 효과를 나타낸다. 접종된 세포 일부는 세포 독성 약물 처리 후 콜로니를 생산할 수 있는 능력을 유지하였다. 집락형성성(clonogenicity)을 측정하기 위한 시험관 내 집락 형성 방법은 세포 내 종양 성장에 대한 타당한 대체 분석으로 인식되고 있다. 복합체 농도가 증가되면 T98G 세포군의 세포 사멸을 향상시켰고, 콜로니 형성 능력은 억제되었다. 집락형성 분석을 통해 콜로니-형성 능력 및 지수 성장한 T98G 세포의 생존에 대한 복합체 4 및 5의 효과를 확인하였다. 합성된 복합체 처리 후, T98G 세포의 생존 부분이 상당히 감소함을 관찰할 수 있었다. 복합체 4 및 5의 처리가 농도-의존적으로 T98G 세포군의 세포 사멸을 향상시키고, 또한 콜로니 형성 능력을 억제한다는 것은 중요한 사실이다.

[0094]

<실시예 6> HMBCs의 안정성

[0095]

복합체 4 및 5의 안정성을 확인하기 위해서, 6μM 용액의 복합체 4 및 5는 세포 배양 배지(DMEM) 및 DMSO에서 0, 10, 25 및 50 h 동안 37℃에서 전-반응시켰다. T98G 종양 세포에 대한 MTT 세포 생존능 분석을 통해 세포 성장을 측정하였다. 도 8(D)에 나타난 바와 같이, 세포 배양 배지에서 전-반응 ~50 시간 후, 복합체 4 및 5의 성장-억제 활성이 50% 감소된 것으로 관측되었다. 반대로, DMSO 존재하에서는 성장 억제 활성이 전-반응 후 ~25 h까지는 안정적이었다. 성장 억제 활성의 감소는 배지로부터 복합체의 손실과 유사할 것으로 예상되는데, 이는 복합체 4 및 5가 세포 배양 배지에서 전-반응 후 <25 h 동안은 안정적일 수도 있다는 것을 나타낸다. 상기 결과는 최소한 복합체가 세포 생존에 강력한 효과를 갖는 시기 동안만큼은, 복합체 4 및 5가 DMSO 및 세포 배양 배지에서 안정적이라는 것을 나타낸다.

[0096]

<실시예 7> 세포내 ATP 수준의 감소

[0097]

미토콘드리아 대사 상태에 대한 복합체 4 및 5의 효과를 확인하기 위해서, 본 발명자들은 T98G 뇌종양 세포에서 세포 사멸에 중요한 역할을 하는 세포 내 ATP 생성을 측정하였다. 세포 내 ATP는 세포 배양 배지가 함유된 혈청 내에서 Promega Ultra-Glo™ 재조합 루시페라아제에 의해 정량하였다. 도 9(A)는 복합체 4 및 5가 ATP 생산에 있어 거의 비슷한 경향으로 상당한 변화를 유도하였다는 것을 나타낸다. 처리 24시간 후, 상대적인 ATP 수치는

복합체의 농도가 증가될수록 더 감소하였다. 0.05 μM 농도의 복합체의 효과는 거의 무시할 정도였으나, 더 높은 농도(2, 4 및 8 μM)는 T98G 종양 세포에서 미토콘드리아의 ATP 생산을 상당히 감소시켰다.

[0098]

<실시예 8> 세포 내 ROS 수준을 향상시키는 HMBSs 처리

[0099]

합성된 복합체로 처리 후, T98G 세포에서의 세포 내 ROS 측정 결과는 도 9(B)에 나타났다. 성장 억제 및 집락 형성 증가 억제로 인해 감소된 MTT 포르마잔은 산화스트레스를 증가시킬 수도 있고, T98G 세포의 생존을 억제할 수도 있다. 합성 복합체의 처리가 악성 종양 세포 내 산화스트레스의 정상 상태를 향상시키는지 확인하기 위해서, 세포들을 산화-민감성 프로브(H_2DCFDA)로 표지하였는데, 이는 ROS에 의한 산화에 따라, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 여기 파장 485 nm 및 흡수 파장 528 nm에서 측정할 수 있는 형광 산물(DCF)을 방출한다. 처리 24시간 후, 복합체 4 및 5는 0.5-2 μM 농도에서 T98G 암세포 내 ROS 생산을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 복합체 4로 처리하면 T98G 세포 내 DCF 형광도가 0.5, 1 및 2 μM 의 농도에서 미처리 대조군(MFI-153)에 비해 각각 39.2% (MFI-213), 70.5% (MFI-261) 및 98.6% (MFI-304) 증가하였다. 또한, 복합체 5로 처리하면 T98G 세포 내 DCF 형광도가 0.5, 1 및 2 μM 의 농도에서 미처리 대조군에 비해 각각 68.8% (MFI-260), 90.2% (MFI-293) 및 120.1% (MFI-339) 증가하였다. 하지만, 0.1 μM 농도로 처리된 세포들은 ROS 생산에 있어 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 흥미롭게도, 액체 홀딩 조건은 연구된 세포주 내의 산화스트레스에 아무런 영향을 미치지 않았는데, 미처리 세포의 DCF 형광도는 PBS 및 성장 배지와 유사했다(MFI in PBS, DCF = 144; MFI in growth media, DCF = 153).

[0100]

<실시예 9> 세포 내 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 HMBCs

[0101]

세포자멸사(Apoptosis)는 프로그램된 세포 사멸을 가장 잘 설명하고 있고, 세포막 기포형성(blebbing), 세포 부피의 감소, 카스파제의 활성화, 크로마틴 응축 및 핵 단편화와 같은 명백한 형태학적 특성에 의해 특징지어진다. 처리 후 세포 생존이 급격하게 감소되었으므로, 본 발명자들은 복합체들이 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는지 유세포 분석(BD FACS Verse)을 통해 확인하였다. 세포군은 플루오레세인 이소티오시아이드(fluorescein isothiocyanate; FITC)-표지된 아넥신(annexin) V(녹색 형광)에 의해 측정되었고, 비-생체 염료인 프로피디움 이오다이드(propidium iodide; PI)를 제외하였다. 상기 방법에서, 본 발명자들은 미손상, 초기 세포자멸사, 후기 세포자멸사 및 괴사 세포를 구별할 수 있었다. 도 10에 있어서, PI 제외 및 FITC-annexin V 결합 음성(FITC-/PI-)인, 사이토그램(cytograms)의 사분면 왼쪽 아래(Q1-LL)는 생존 세포를 나타낸다. FITC-annexin V 결합 및 PI 흡수 양성(FITC+/PI+)인, 사분면 오른쪽 위(Q1-UR)는 후기 세포자멸사, 비-생체, 괴사 세포를 나타낸다. 사분면 오른쪽 아래(Q1-LR)는 FITC-annexin V에 결합하고 세포질막이 미손상된(FITC+/PI-) 세포자멸사 세포를 나타낸다. 모든 처리는 용량-의존적 경향으로 세포 내 세포자멸사를 상당히 유도하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, 복합체 4 및 5의 처리는 annexin V-FITC 결합을 2-4배 증가시켰다. 음성 대조군은 5% 수준의 annexin V-FITC 결합을 나타낸 반면, 2 μM 농도의 복합체 4 및 5는 각각 20.88% 및 21.01% 수준을 나타냈다.

[0102]

<실시예 10> 세포자멸사를 유도하는 HMBCs와 관련된 미토콘드리아 막 전위 및 카스파제 활성화 감소

[0103]

ROS 수준이 향상된 치료제는 세포 자멸사의 초기 단계에서 종종 미토콘드리아 막 투과성의 변화를 유도한다. 복합체 4 및 5의 처리는 막 분극을 파괴하는 활성종을 발생시킨다. 유사한 처리 조건 하에서, 반응 24시간 후 T98G 세포는 JC-1 염료로 30분 동안 반응시켰고, 세포들은 FACS 분석을 통해 분석되었다. 도 11 및 도 12A에 의하면, 암세포의 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential; MMP) 변화를 확인할 수 있다. 복합체 4 및 5 처리된 T98G 세포의 막 전위는 미처리 대조군과 비교하여 상당한 변화를 나타냈다. 1 및 2 μM 농도의 복합체 4로 처리하면, 세포 내에서 각각 11.08% 및 34.75%의 MMP 변화를 유도하였다. 복합체 5 처리에 의해 최대 효과를 나타냈고, 1 및 2 μM 농도의 복합체 5로 처리시 각각 22.60 % 및 45.23%의 MMP를 변화시켰다. 도 11은 반응 24시간 후 관측된 세포 내 밴드 전이 현상을 나타낸다. 복합체 4 및 5로 처리하면, 세포 내에서 용량-의존적으로 세포자멸사의 징후인 미토콘드리아 막 탈분극이 나타났다. 카스파제 3 및 7은 세포자멸사 과정 중 세포 구성 성분을 분열시키는데 중요한 역할을 한다. 도 12(B)는 대조군 및 24시간 후처리된 처리 세포에서의 카스파제 활성을 나타낸다. 미처리 세포에서, 검출된 카스파제 활성 수준은 자연적 노화로 인한 성장 개체군에 존재하는 일부 세포자멸사 세포와 관련된 것이다. 처리 세포에서, 카스파제 3/7 활성은 기본 수준 이상으로 증

가하였다. T98G 세포에서 2 uM 농도의 복합체 4 및 5는 카스파제 활성을 각각 2.5 및 4배로 상당히 증가시켰다. 한편, 복합체 4 및 5는 고 농도(8 uM)에서도 카스파제 활성을 각각 6.3 및 9배로 크게 증가시켰다.

[0104]

<실시예 11> 형광 검출 및 현미경 분석

[0105]

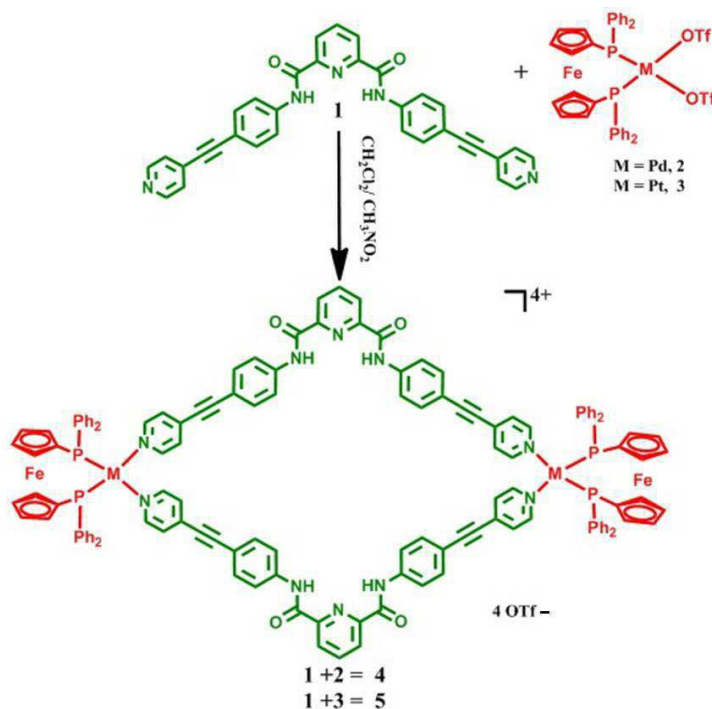
1-4 uM 농도의 복합체에 노출된 세포 내 에티닐 피리딘 아마이드 리간드(ethynyl pyridine amide ligand)의 특정 형광도를 정량화하여, 복합체 4 및 5의 흡수에 대해서도 연구하였다. 상기 결과는 도 13에 나타냈는데, T98G 세포는 뛰어난 세포 흡수 프로파일을 나타냈다. 이러한 결과는 형광 현미경에 의해 확인되었다(도 13). 그 결과, 에티닐 피리딘 아마이드 리간드(ethynyl pyridine amide ligand)와 관련된 파란색 형광도로 나타냈는데, 미처리 대조군에서는 보이지 않았다. 복합체 4에 노출된 세포는 복합체 5에 노출된 세포보다 약간 약한 형광도를 나타냈다. 종합하면, T98G 세포의 세포질 내에 복합체 4 및 5가 2 및 4 uM 농도에서 축적된다는 것을 확인하였다.

[0106]

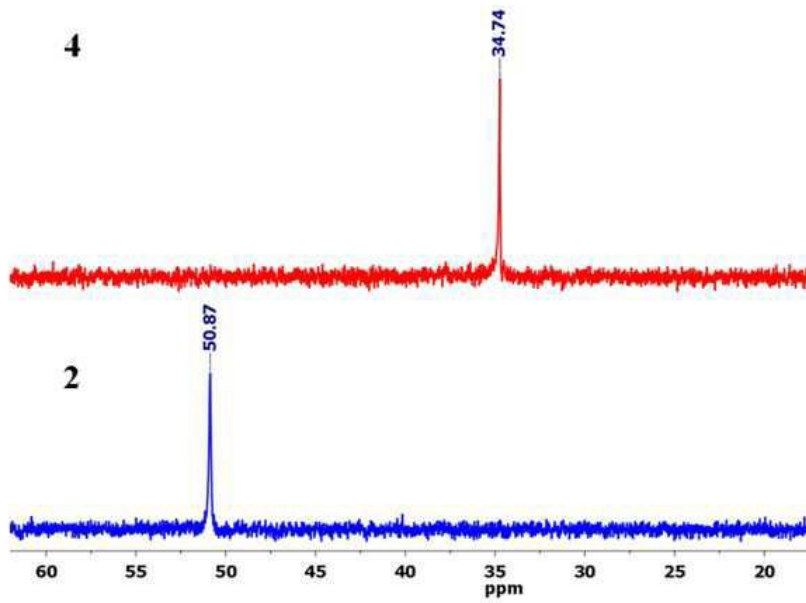
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

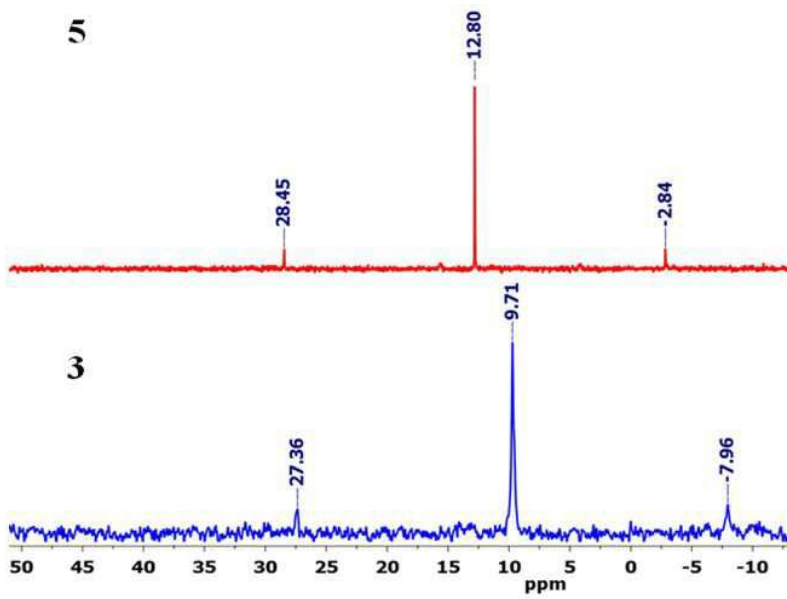
도면1



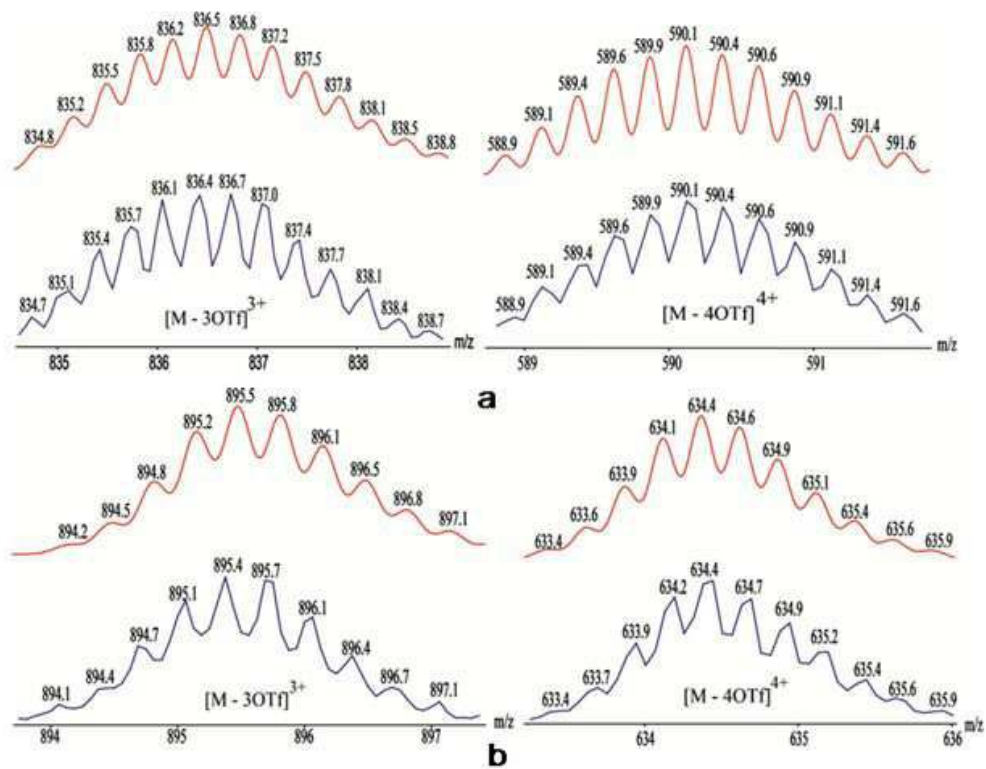
도면2



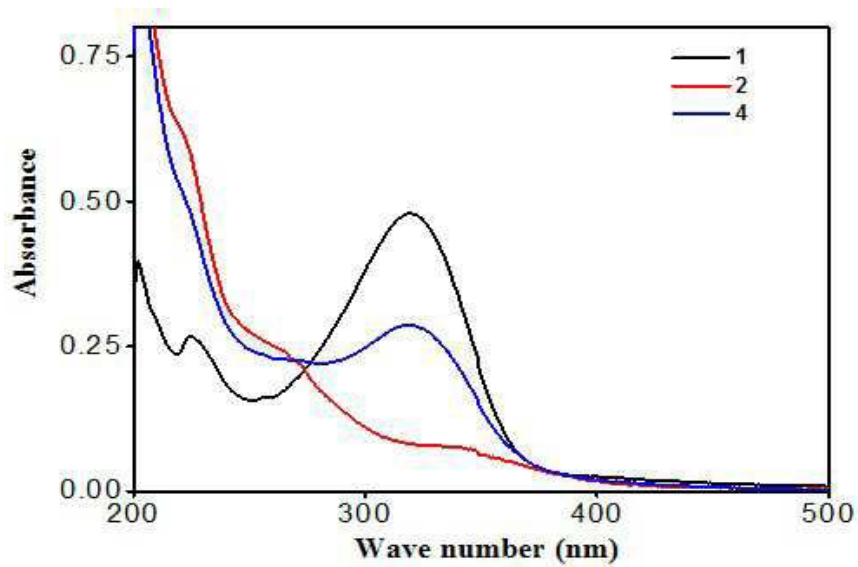
도면3



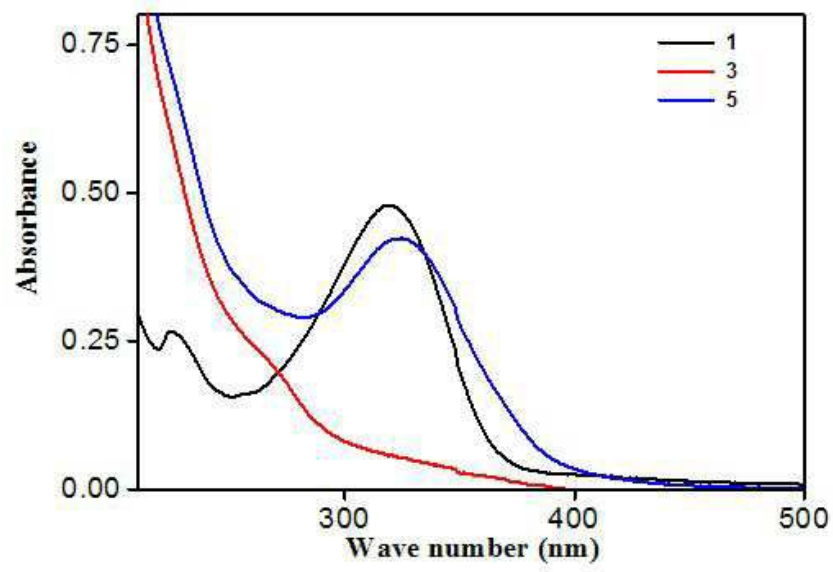
도면4



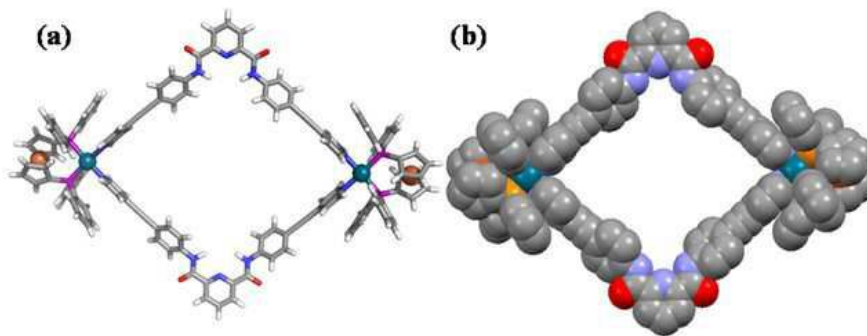
도면5



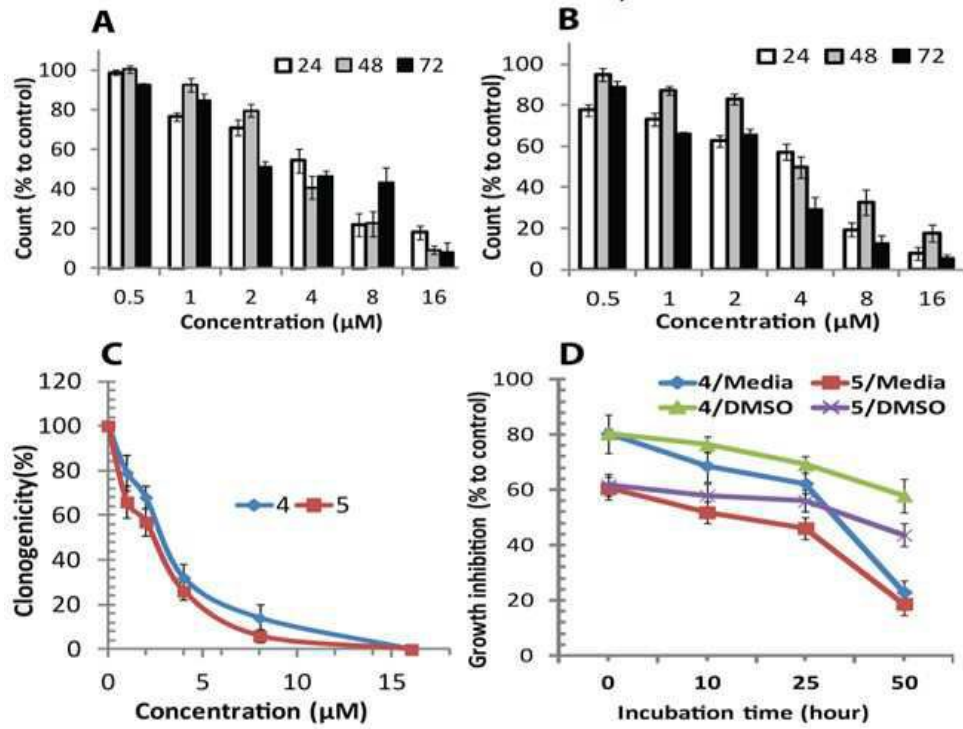
도면6



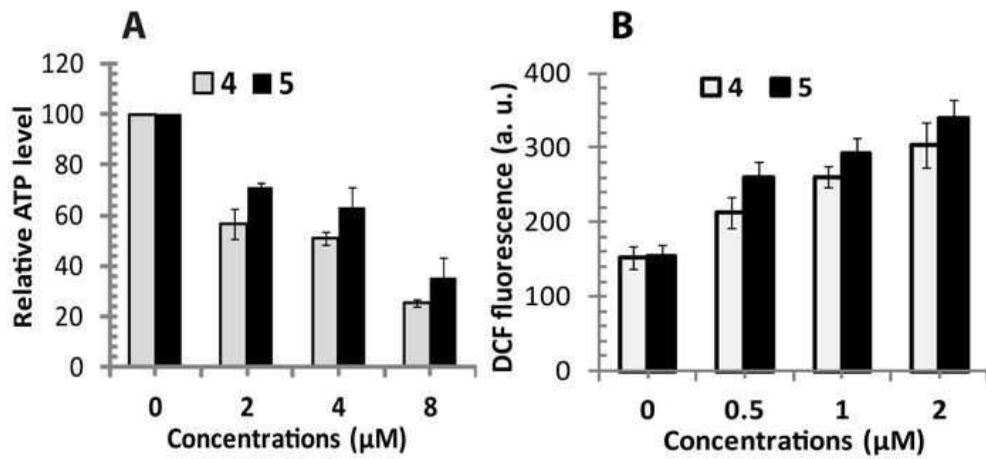
도면7



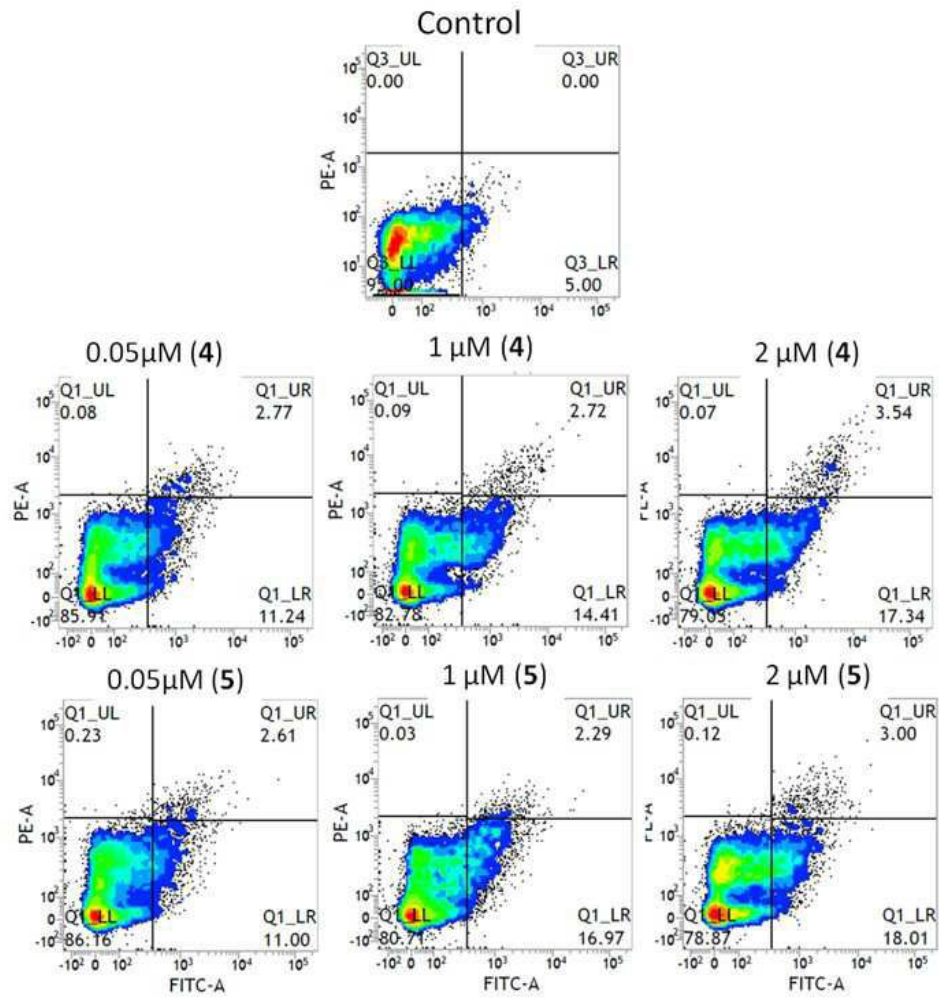
도면8



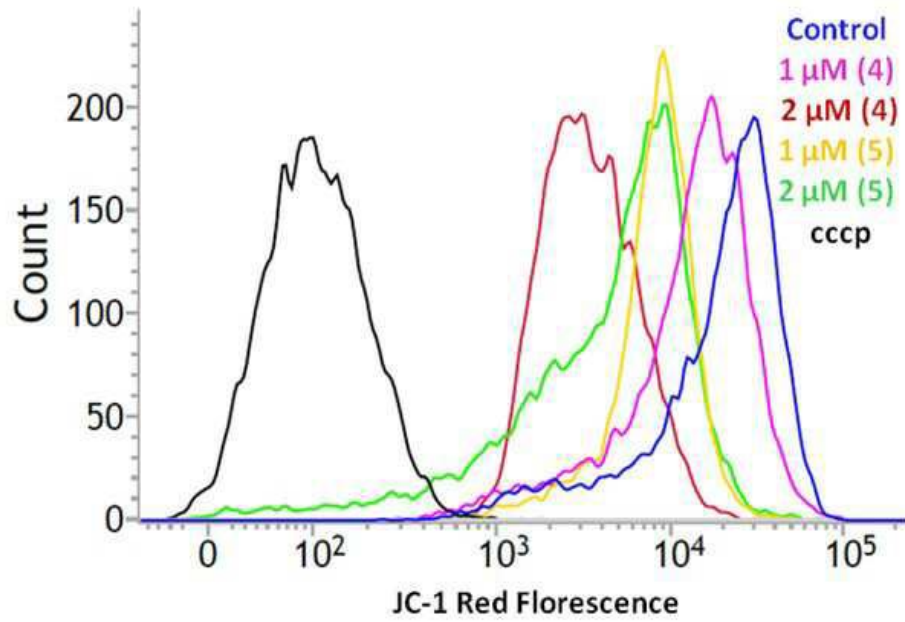
도면9



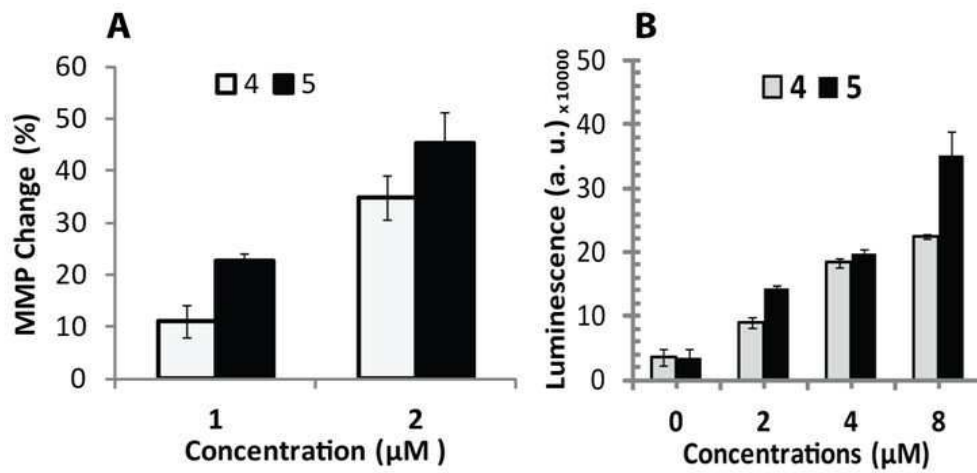
도면10



도면11



도면12



도면13

