



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0117480
(43) 공개일자 2014년10월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 19/00 (2006.01) A61K 33/32 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7021727
- (22) 출원일자(국제) 2012년12월04일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년08월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2012/056959
- (87) 국제공개번호 WO 2013/102806
국제공개일자 2013년07월11일
- (30) 우선권주장
61/583,377 2012년01월05일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
플레드파르마 에이비
스웨덴 에스-114 46 스톡홀름 그레브 투레가탄 1
1씨
- (72) 발명자
칼슨, 잔, 올로프
노르웨이 엔-7018 트론헤임 펠로밀라 80
라이네케, 칼
미국 12309 뉴욕 니스카유나 폭스힐 드라이브
2182
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김병진, 노태정

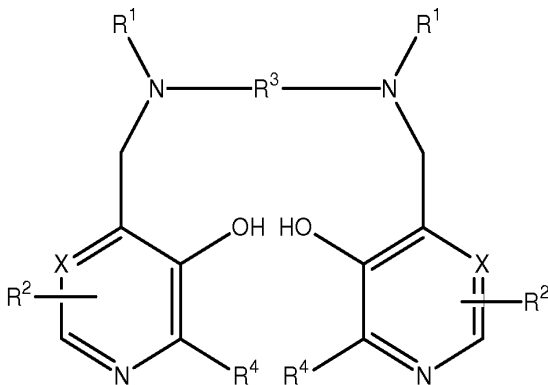
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 칼망가포디피르, 신규 화학 물질 및 기타 혼합 금속 착물, 제조방법, 조성물 및 치료방법

(57) 요약

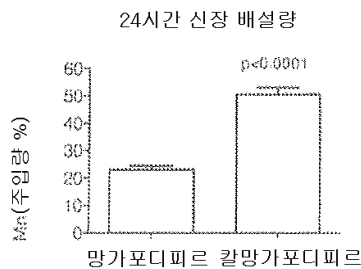
식 I 화합물의 혼합된 금속 착물 또는 그 염(상기 혼합된 금속은 III-XII 족 전이금속 및 II 족 금속으로 구성됨):

식 I



(상기 식에서 X, R¹, R², R³ 및 R⁴는 본 명세서에 정의된 바와 같음)은 상기 III-XII 족 전이금속, 상기 II 족 금속 및 식 I의 화합물의 용액으로부터 단일 단계 결정화(one-step crystallization)에 의해 제조된다. 환자의 병리 상태, 예를 들어 산소-유래 자유 라디칼의 존재에 의해 유발되는 병리 상태의 치료 방법은 상기 혼합된 금속 착물을 환자에게 투여하는 것으로 구성된다.

대표도 - 도6b



(72) 발명자

쿠르츠, 티노

스웨덴 에스-582 25 린셰핑 린네가탄 10:49

앤더슨, 롴프

스웨덴 에스-590 47 비킹스테드 요한 베르그스트롬
스바그 18

홀, 미카엘

미국 12206 뉴욕 올버니 로즈몬트 스트리트 155

맥리플린, 크리스티나

미국 12205 뉴욕 올버니 로커스트 파크 36

야콥슨, 스벤

스웨덴 에스-112 49 스톡홀름 스바르바르가탄 18

나쉴트롬, 자끄

스웨덴 에스-168 39 브롬마 스칼노라바겐 6

(30) 우선권주장

61/656,178 2012년06월06일 미국(US)

61/668,679 2012년07월06일 미국(US)

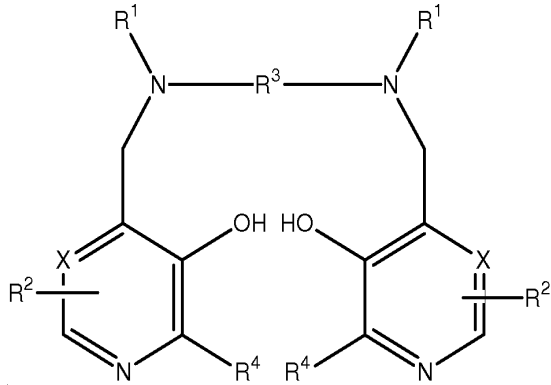
61/721,575 2012년11월02일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

아래 식 I 화합물의 혼합된 금속 착물 또는 그 염(상기 혼합된 금속은 III-XII 족 전이금속 및 II 족 금속으로 구성됨):

식 I



(상기 식에서 X는 CH 또는 N을 나타내고,

각각의 R¹은 독립적으로 수소 또는 -CH₂COR⁵을 나타내고;

R⁵는 히드록시, 선택적으로 히드록실화된 알콕시, 아미노 또는 알킬아미노를 나타내고;

각각의 R²는 독립적으로 ZYR⁶를 나타내며, Z는 선택적으로 R⁷로 치환된, C₁₋₃ 알킬렌 또는 옥소알킬렌기 또는 하나의 결합을 나타내고;

Y는 하나의 결합, 산소 원자 또는 NR⁶을 나타내고;

R⁶는 수소 원자, COOR⁸, 알킬, 알케닐, 시클로알킬, 아릴 또는 아랄킬기로서, 선택적으로 COOR⁸, CONR⁸, NR⁸, OR⁸, =NR⁸, =O, OP(O)(OR⁸)R⁷ 및 OSO₃M로부터 선택되는 하나 이상의 기로 치환된 것이며;

R⁷은 히드록시, 선택적으로 히드록실화된, 선택적으로 알콕실화된 알킬 또는 아미노알킬기이며;

R⁸은 수소 원자 또는 선택적으로 히드록실화된, 선택적으로 알콕실화된 알킬기이고;

M은 수소 원자 또는 1 당량의(one equivalent of) 생리적으로 허용가능한 양이온이며;

R³는 C₁₋₈ 알킬렌, 1,2-시클로알킬렌 또는 1,2-아틸렌기로서, 선택적으로 R⁷으로 치환된 것을 나타내며;

각각의 R⁴는 독립적으로 수소 또는 C₁₋₃ 알킬을 나타냄).

청구항 2

청구항 1에 있어서, R⁵는 히드록시, C₁₋₈ 알콕시, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 아미노 또는 C₁₋₈ 알킬아미노이며; Z는 하나의 결합 또는 CH₂, (CH₂)₂, CO, CH₂CO, CH₂CH₂CO 및 CH₂COCH₂로부터 선택된 기이며; Y는 하나의 결합이고; R⁶는 모노- 또는 폴리(히드록시 또는 알콕실화된) 알킬기 또는 식 OP(O)(OR⁸)R⁷의 기이고; R⁷은 히드록시 또는

미치환된 알킬 또는 아미노알킬기인 것을 특징으로 하는, 혼합된 금속 착물.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, R^3 는 에틸렌이고 각 R^1 기는 $-CH_2COR^5$ 를 나타내며, 여기서 R^5 는 히드록시인 것을 특징으로 하는, 혼합된 금속 착물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 식 I의 화합물은 N,N'-비스-(피리독살-5-포스페이트)-에틸렌디아민-N,N'-디아세트산(DPDP), 또는 N,N'-디피리독살 에틸렌디아민-N,N'-디아세트산(PLIED) 또는 그것의 제약학적으로 허용가능한 염인 것을 특징으로 하는, 혼합된 금속 착물.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 III-XII 족 전이 금속은 Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} 및/또는 Ni^{2+} 이며 상기 II 족 금속은 Ca^{2+} 및/또는 Mg^{2+} 인 것을 특징으로 하는, 혼합된 금속 착물.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 III-XII 족 전이 금속은 Mn^{2+} 이며 상기 II 족 금속은 Ca^{2+} 또는 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 의 혼합물인 것을 특징으로 하는, 혼합된 금속 착물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 II 족 금속은 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 의 혼합물이며, Ca^{2+}/Mg^{2+} 의 몰비는 약 0.1-50인 것을 특징으로 하는, 혼합된 금속 착물.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 II 족 금속 대 III-XII 족 전이 금속의 몰비는 약 1-10인 것을 특징으로 하는, 혼합된 금속 착물.

청구항 9

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 III-XII 족 전이 금속은 Mn^{2+} 이며 상기 II 족 금속은 Ca^{2+} 이고, Ca^{2+}/Mn^{2+} 의 몰비는 약 4인 것을 특징으로 하는, 혼합된 금속 착물.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 착물은 동결 건조된 것을 특징으로 하는, 혼합된 금속 착물.

청구항 11

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 의한 혼합된 금속 착물 및 하나 이상의 생리적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제로 구성되는 제약학적 조성물.

청구항 12

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 의한 혼합된 금속 착물의 제조 방법으로서, 상기 III-XII 족 전이금속, 상기 II 족 금속 및 식 I의 화합물, 또는 그것의 염의 용액으로부터 단일 단계 결정화(one-step crystallization)하는 것으로 구성되는, 혼합된 금속 착물의 제조 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 칼슘 망간 착물은 칼슘, 망간 및 식 I의 화합물, 또는 그것의 염의 용액으로부터 단일 단계 결정화함으로써 제조되는 것을 특징으로 하는, 혼합된 금속 착물의 제조 방법.

청구항 14

환자의 병리 상태를 치료하는 방법으로서, 청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 의한 혼합된 금속 착물(선택적으로 하나 이상의 생리적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제와 함께)을 환자에게 투여하는 것으로 구성되는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 산소-유래 자유 라디칼의 존재로 인해 유발되는 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 초과산화물에 의해 유발되어 이어서 지질 과산화 및/또는 단백질 니트로화를 일으키는 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 17

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 세포독성 또는 세포증식억제 약물 장애인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 세포독성 또는 세포증식억제 약물은 암 치료 약물인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 상기 세포독성 또는 세포증식억제성 약물은 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 5-플루오로우라실(fluorouracil), 도세탁셀(docetaxel) 또는 파클리탁셀(paclitaxel) 중 적어도 하나로 구성되는 것을 특징

으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 20

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 골수 억제(myelosuppression) 또는 신경독성(neurotoxicity) 또는 양자 모두인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 21

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 허혈재관류-유도된 장애인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 22

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 죽상 경화증(atherosclerosis) 및/또는 당뇨병과 관련된 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 23

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 혈전용해 치료(thrombolytic treatment), 심폐우회기(cardiopulmonary bypass) 또는 혈관성형술(percutaneous transluminal angioplasty)과 관련되거나, 또는 심장 또는 기관 이식 수술 또는 뇌졸중의 결과인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 24

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 아세트아미노펜-유도 급성 간부전인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 25

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 철 또는 구리의 병리 상태인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 26

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 지중해 빈혈(thalassemia), 겸상 적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), 수혈 혈철증(transfusional hemosiderosis), 또는 윌슨병(Wilson's disease)인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 27

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 간염-유래 간 경변증(hepatitis-induced liver cirrhosis), 비알콜성 지방간염(NASH), 또는 바이러스-유도된 만성 간염(viral-induced chronic hepatitis)인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 28

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 방사선 유도된 장해인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 29

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 낮은 망간 초과산화물 디스무타아제(MnSOD) 활성인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 30

청구항 14에 있어서, 상기 병리 상태는 대세포 폐암, 대장암(colorectal cancer), 전립선암, 유방암, 췌장암, 또는 악성 흑색종(malignant melanoma)인 것을 특징으로 하는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

청구항 31

청구항 14 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.01 내지 50 $\mu\text{mol/kg}$ 체중의 상기 혼합된 금속 착물을 투여하는 것으로 구성되는, 환자의 병리 상태의 치료 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 디피리독실(dipyridoxyl) 화합물, 예를 들어 N,N'-비스-(피리독살(pyridoxal)-5-포스페이트)-에틸렌디아민-N,N'-디아세트산 (DPDP 또는 포디피르(fodipir)) 또는 기타 식 I의 화합물(이후 피리독실 에틸디아민 유도체 또는 PLED-유도체라 함)의 혼합 금속 착물에 관한 것이며, 상기 혼합 금속은 III-XII 족 전이 금속 및 II 족 금속으로 구성된다. 구체적 실시예에서, 상기 혼합 금속 착물은 칼슘 및 망간 착물이다. 본 발명은 또한 그러한 혼합 금속 착물을 함유하는 조성물, 그러한 혼합 착물, 예를 들어 단일 단계 결정화로 제조하는 방법, 및 그러한 혼합 금속 착물을 이용한 치료방법에 관한 것이다. 상기 치료방법은 치료 효과를 위해 종래 망간-DPDP 착물을 이용하는 방법을 포함한다. 구체적 일 실시예에서, 상기 조성물은 인체 내 산소-유래 자유 라디칼의 존재로 인해 유발되는 병리 상태, 즉 산화 스트레스의 치료에 사용될 수 있다. 상기 혼합 금속 착물, 특히 여기 개시되는 혼합된 칼슘-망간 착물 칼망가포디피르(calmangafodipir)는 신규 화학 물질을 구성한다.

배경기술

[0002] 산화 스트레스(Oxidative stress)는 정상적 세포 기능의 일부로서 반응성 산소 종(reactive oxygen species; ROS) 및 반응성 질소 종(reactive nitrogen species; RNS)의 발생으로 시작된다. ROS 발생에는 다수의 세포적 소스가 있지만 가장 중요한 것은 미토콘드리아 전자 전달 복합체 I 및 III, 소포체 내 P450 효소, 및 막 결합된 NADPH 옥시다아제이다. 이들 소스들 각각에 의한 ROS 생성은 시토키인, 염증, 바이러스 단백질, 및 화학요법 약제(chemotherapy drugs), 허혈재관류(ischemia-reperfusion), 및 철 및 구리 오버로드(overload)와 같은 기타 메커니즘에 의해 자극될 수 있다. 중요하게는, 이들 공정이 초기에 자유 라디칼 초과산화물(superoxide) ($\bullet\text{O}_2^-$)을 생성하고, 이어서 이것이 환원되어 과산화수소, 히드록실 라디칼, 및 최종적으로 물을 형성한다. 그러나, 높은 산화 스트레스 및 결과적으로 초과산화물의 높은 생성 조건하에서, 이들 반응성 중간체들은 다른 분자들과 용이하게 상호작용하여 2차적으로 유해한 ROS, 예를 들어 지질 과산화(lipid peroxidation) 생성물 및 퍼옥시니트라이트(peroxynitrite)를 형성한다(Singal 등, Liver Int. 2011; 31: 1432-1448). 이는 엄격한 통제하에 초과산화물의 세포적 양(cellular amount)을 유지하는 중요성을 나타낸다. 정상 조건하에서 이는 초과산화물 디스무타아제(superoxide dismutases) (SOD)에 의해 달성된다. SOD가 알려진 효소 중 가장 빠른 반응 속도를 갖지만, 높은 산화 스트레스 상태에서, 이들 효소는 ROS 및 RNS에 의해 뒤처지고(outcompeted) 심지어 비가역적으로 비활성화될 수 있다. 이는 또한 병적 산화 스트레스와 싸우기 위해, SOD 효소를 모방한 저분자 약물

의 치료적 사용, 즉 소위 SOD 모방(SOD mimetics)을 열어준다.

[0003] 단명하지만 고반응성의 산소-유래 자유 라디칼은, 특히 암환자에 대한 세포독성제(cytotoxics)/세포증식억제제(cytostatics) 및 방사선 요법(radiotherapy)을 처리하는 동안의 병적 조직 손상(Towart 등, Arch Pharmacol 1998; 358 (Suppl 2): R626, Laurent 등, Cancer Res 2005; 65:948-956, Karlsson 등, Cancer Res 2006; 66:598, Alexandre 등, J Natl Cancer Inst 2006; 98:236-244, Doroshow, J Natl Cancer Inst 2006; 98:223-225, Citrin 등, Oncologist, 2010; 15:360-371, Kurz 등, Transl Oncol 2012; 5:252-259), 아세트아미노펜-유도된 간부전(liver failure) (Bedda 등, J Hepatol 2003; 39:765-772; Karlsson, J Hepatol 2004; 40:872-873), 허혈성 심질환(Cuzzocrea 등, Pharmacol Rev 2001; 53: 135-159) 및 다양한 신경 퇴행성 질환, 예를 들어 알츠하이머 질병, 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 파킨슨병, 및 다발성 경화증(multiple sclerosis) (Knight, Ann Clin Lab Sci. 1997; 27: 11-25)에 관여하는 것으로 오랫동안 알려져 왔다. 산소-유래 자유 라디칼의 과생산은 또한 철 오버로드의 병리 상태((Rachmilewitz 등, Ann N Y Acad Sci. 2005; 1054:118-23), 예를 들어 지중해빈혈(thalassemia), 겸상 적혈구 빈혈증(sickle cell anemia) 및 수혈 혈철증(transfusional hemosiderosis)에 책임이 있다. 산소-유래 자유 라디칼은 또한 간염-유래 간 경변증(hepatitis-induced liver cirrhosis) (Farrell 등, Anat Rec 2008; 291:684-692) 및 소음에 의한 청력 상실(noise-induced hearing loss) (Wong 등, Hear Res 2010;260:81-88)에 책임이 있다.

[0004] 약물에 디피리독실 기재 킬레이트제 및 그 금속 킬레이트와 특정의 망간-함유 화합물, 특히 망간 킬레이트를 사용하는 것은 공지되어 있다. 예를 들어 EP 0910360, US 6147094, EP 0936915, US 6258828, EP 1054670, US 6310051, EP 1060174 및 US 6391895을 참조할 수 있으며, 이는 특정의 킬레이트제, 특히 디피리독실 킬레이트제 및 그것의 금속 킬레이트가 안트라시클린-유도된 심장독성, 방사선-유도된 독성, 허혈재관류-유도된 장해(injuries), 및 파라세타몰(아세트아미노펜) 유도된 간부전, 또는 좀 더 일반적 관점에서, 인간 및 동물에서 산소-유래 자유 라디칼의 존재로 인해 유발된 모든 병리 상태, 즉 산화 스트레스를 치료 또는 예방하는데 효과적임을 개시한다. 또한, 상기 디피리독실 화합물 망가포디피르(MnDPDP)는 놀랍게도 추가로 암 세포에 대항하는 세포독성 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다(EP 16944338). 그러나, WO 2009/078794 A1(Kurz 등), 2012에 기재된 바와 같이, 이는 포디피르(DPDP) 단독 또는 그것의 탈인산화된 대응물(dephosphorylated counterparts), DPMP 및 PLED의 고유 특성이며, 금속 착물 MnDPDP 또는 그것의 탈인산화된 대응물, MnDPMP 및 MnPLED의 고유 특성은 아니다.

[0005] MnPLED-유도체들 중 하나, 즉 망가포디피르로서도 알려진, 망간 N,N'-비스-(피리독살-5-포스페이트)-에틸렌디아민-N,N'-디아세트산 (망간 디피리독실 디포스페이트; MnDPDP)은 인체 내 진단용 MRI 조영제로서의 용도로 승인되었다. 흥미롭게도, 망가포디피르는 또한 몇 가지 세포독성/세포증식억제 약물 (독소루비신(doxorubicin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 5-플루오로우라실(fluorouracil) 및 파클리탁셀(paclitaxel))의 심각한 부작용으로부터, 이들 약물의 항암 작용을 부정적으로 방해하지 않으면서, 생쥐를 보호하는 것이 입증되었다(Towart 등, 1998, Laurent 등, 2005, Karlsson 등, 2006, Alexandre 등, 2006, Doroshow, 2006, Kurz 등, 2012). 망가포디피르는 폴리네이트(folinat), 5-플루오로우라실 및 옥살리플라틴의 조합물로 고식적 치료(palliative treatment)를 하는 한 대장암 환자에게 시험하였다(Yri 등, Acta Oncol. 2009; 48:633-635). 이러한 단일 환자로부터의 임상전 데이터 및 결과는 너무 유망하여(promising) 암환자에 대한 임상 시험이 시작되었다. 옥살리플라틴의 가장 문제 있는 부작용, 즉 옥살리플라틴-유도된 감각 신경 독성에 관한 한, 우리가 알기로, 망가포디피르의 보호 작용을 보여주는 어떠한 임상 전 데이터도 존재하지 않는다(Karlsson 등, Transl Oncol. 2012; 5:32-38). Yri 등(2009)은 환자가 "Nordic FLOX"의 15회 완전 용량(full-doses)을 받은 것으로 기재하였다. 14회 주기에서, 상기 환자는 망가포디피르로 사전 처리를 받았다. 상기 환자는 누적 용량 1275 mg/m 옥살리플라틴을 받았으며, 이는 신경독성 증상을 줄 수 있는 용량이다. 다섯번째 주기 동안 망가포디피르를 의도적으로 생략하고 환자가 말초 감각 신경 장애를 경험한 때를 제외하고, 어떠한 신경 독성 증상도 관찰되지 않았다. 이는 망가포디피르가 말초 신경 독성에 대하여 보호할 수 있음을 암시한다. 5주기 후에, 상기 환자의 기능 상태는 현저히 개선되었고, 진통제에 대한 요구는 현저히 감소되었다. 호중구 감소증(Neutropenia)은 상기 화학요법 주기 동안 발생하지 않았다.

[0006] 제 1 타당성 조사(MANFOL I)가 완료되었고, 골수 보호 효과를 포함하는 긍정적 결과가 스웨덴 의료원(Swedish Medical Agency)에 보고되어 공개된 바 있다(Karlsson 등, 2012).

[0007] 망가포디피르는 또한 생쥐 내 아세트아미노펜-유도된 급성 간부전(ALF)에 대하여 생쥐를 보호하는 것으로 기재된 바 있다(Bedda 등, 2003; Karlsson, 2004). ALF는 대량 간세포 세포사(massive hepatocyte cell death), 글

루타치온 결핍, 산소-유래 자유 라디칼 및 미토콘드리아 손상으로 인해 유발되는 상태를 특징으로 한다.

[0008]

망가포디피르는, 체내 조건하에 있는 동안 그것이 세포 보호 효과를 발휘할 수 있기 전에 아마도 N,N'-디피리독실 에틸렌디아민-N,N'-디아세트산 (MnPLED)으로 대사되어야 한다는 점에서 전구 약물(pro-drug)이다 (예를 들어 Karlsson 등, *Acta Radiol* 2001; 42:540-547; Kurz 등, 2012 참조). 망간은 잠재적으로 신경 독성의 금속일 뿐만 아니라 필수적이다. 수년간 알려진 바에 의하면 높은 수준의 망간에 만성적으로 노출되는 조건하에서, 임상적으로 다른 질병 형태이기는 하지만, 파킨슨 증상과 유사한 추체 외로 기능 장애(extrapyramidal dysfunction)의 증상이 흔히 발생한다 (Scheuhammer & Cherian, *Arch Environm Contam Toxicol* 1982; 11:515-520 참조). 망가포디피르의 진단용 MR 영상화 용량이 인체 내로 정맥 내 주사될 경우, 투여된 망간의 약 80%가 방출된다(Toft 등, *Acta Radiol* 1997; 38:677-689). 상자성(paramagnetic) 망간의 방출은 사실상 망가포디피르의 진단용 MR 영상 특성을 위한 전제 조건이다 (Wendland, *NMR Biomed* 2004; 17:581-594). Elizondo 등 (*Radiology* 1991; 178:73-78)은 상기 포디피르 부분이 간세포 상의 피리독실 5' 포스페이트 수용체에 결합되어 간 내 망가포디피르의 높은 세포 내 농도를 보장한다고 했다. 이러한 가설은 최근 Coriat 등에 의한 논문(PLoS One 2011; 6:1-6, e27005)에서도 제안되었다. 이는 근사한 가설이지만 불행하게도 입증되지 않고 매우 가능성이 낮은 것이어서, 발표된 이후 바로 사라졌다. 망가포디피르가 정맥 내 주사되면(i.v.) 상기 금속 착물의 약 80%는 떨어져 나가며(Toft 등, *Radiol* 1997), 같은 몰의 Mn 용량에 대하여, MnCl₂는 망가포디피르보다 동등하거나 더 나은 간 MR 영상화 조영 효능을 가진다(Southon 등, *Acta Radiol* 1997). 또한, 망가포디피르를 주사한 후에 모든 포디피르는 소변에서 회수되지만(대부분은 PLED로서), 대부분의 망간은 대변(feces)에서 회수된다(Hustvedt 등, *Acta Radiol* 1997; 38:690-699). 반면, 망가포디피르(MnDPDP) 및 그것의 탈인산화된 대응물 MnDPMP (N,N'-디피리독실 에틸렌디아민-N,N'-디아세트레이트-5-포스페이트) 및 MnPLED의 치료 효과는 온전한(intact) 금속 착물에 의존한다 (Brurok 등, *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254:768-721, Karlsson 등 2001; 42:540-547).

[0009]

PLED-유도체는 미토콘드리아 효소 망간 초과산화물 디스뮤타아제(MnSOD)를 모방한다 (Brurok 등, 1999). MnSOD는, 정상적 호기 조건 동안 상당히 많은 양으로 생산되는, 산소 대사로부터의 부산물인 초과산화물 라디칼로부터 포유동물 세포를 보호하며; 어떠한 포유동물도 기능적 MnSOD 없이 살아남지 못한다. MnSOD는 임의의 공지된 효소 중 가장 빠른 전환수(turnover number) (그 기질과의 반응 속도)를 갖는다($>10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Fridovich, *J Exp Biol.* 1998; 201:1203-1209). 저분자량 MnSOD 모방은 본래의 MnSOD에 가까운 전환 속도를 가질 수 있다 (Cuzzocrea 등, 2001). 흥미롭게도, 망간과 같은 전이 금속을 함유하는 생리 버퍼가 유사한 높은 전환수를 가질 수 있다(Culotta 등, *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763:747-758). 그러나, 본래의 SOD 효소의 중요성은 선호 유기체(favoring organisms)의 선택 과정과 일치하며, 이는 초과산화물 불균화(dismutation)를 위한 전이 금속 촉매를 그러한 불균화에 대한 요구가 높은 세포의 부분들, 예를 들어 미토콘드리아로 국소화(localizing)하는 수단을 상세히 말해준다. 또한, 마취시킨 돼지의 심근 허혈재관류로부터의 결과가 불가피하게 보여주는 것은, 망간 자체가 아닌, 온전한 MnPLED이 산화 스트레스로부터 보호하며, 이는 경색부 크기의 감소로 보여진다 (Karlsson 등, 2001). 초과산화물의 효과적 불활성화는 매우 파괴적인(devastating) 히드록실 라디칼 및 퍼옥시니트라이드의 생성을 방지하는데 필수적이다(Cuzzocrea 등, 2001). 병적 산화 스트레스 동안, 초과산화물 라디칼의 형성은 불활성화의 내생 능력(endogenous capacity)을 종종 초과한다. 또한, 초과산화물은 내생 MnSOD를 니트로화(nitration)하는 퍼옥시니트라이드의 생성을 자극한다. 이 단백질은 Tyr-34로 퍼옥시니트라이드에 의해 니트로화된다 (Radi, *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:4003-4008). 일단 니트로화되면, MnSOD는 효소적 활성을 잃으며, 초과산화물 및 초과산화물-유발된 손상의 축적을 선호하는 사건이다(Muscoli 등, *Br J Pharmacol* 2003; 140:445-460).

[0010]

최근의 결과는 니트로화에 의한 MnSOD 불활성화가 파라세타몰-유래 간 독성에서 초기 발생하는 것임을 보여준다 (Agarwal 등, *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337: 110-116). 또한 예전 결과는 MnSOD의 니트로화 및 불활성화가 인체에 이식된 신장의 만성 거부반응에 관여함을 나타낸다(MacMillan-Crow 등, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11853-11858). 또한 관련해서 알아둘 수 있는 것은, 세포 단백질의 5% 이상을 구성할 수 있는 액틴(actin)이 겸상 적혈구 빈혈증에서 심하게 니트로화되고 관찰된 니트로화 정도는 세포 골격 중합(cytoskeletal polymerization)을 유도하기에 충분하다는 것이다(Radi, 2004). 3-니트로티로신의 순환 레벨은 또한 죽상 경화증 위험(atherosclerosis risks)을 평가하는 바이오마커(biomarker)의 기능을 할 수 있다. 또한, 죽상 경화증 외에, 퍼옥시니트라이드 및 3-니트로티로신은 심근허혈, 패혈성 및 허약한 폐, 염증성 장 질환, 근위축성 측색 경화증(Beckman 등, *Am J Physiol* 1996; 271:0424-0437) 및 당뇨병에 관여하는 것으로 믿어진다(Fonstermann 등, *Br J Pharmacol.* 2011; 164:213-223).

- [0023] R^7 은 히드록시, 선택적으로 히드록실화된, 선택적으로 알콕실화된 알킬 또는 아미노알킬기이며;
- [0024] R^8 은 수소 원자 또는 선택적으로 히드록실화된, 선택적으로 알콕실화된 알킬기이고;
- [0025] M은 수소 원자 또는 1 당량의(one equivalent of) 생리적으로 허용가능한 양이온이며;
- [0026] R^3 는 C_{1-8} 알킬렌, 1,2-시클로알킬렌 또는 1,2-아틸렌기로서, 선택적으로 R^7 으로 치환된 것을 나타내며;
- [0027] 각각의 R^4 는 독립적으로 수소 또는 C_{1-3} 알킬을 나타냄)
- [0028] 또는 그 염.
- [0029] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 식 I 화합물의 칼슘 및 망간 착물에 관한 것이다. 상기 혼합된 금속 착물, 특히 여기에 개시된 혼합된 칼슘-망간 착물 칼망가포디피르는 새로운 화학 물질을 구성한다.
- [0030] 본 발명은 또한 혼합 금속 착물의 제조 방법에 관한 것으로서, 이는 III-XII 족 전이금속, II 족 금속 및 식 I 화합물의 용액으로부터 단일 단계 결정화(one-step crystallization)하는 것으로 구성된다.
- [0031] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 환자의 병리 상태를 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 혼합 금속 착물(선택적으로 하나 이상의 생리적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제와 함께)을 환자에게 투여하는 것으로 구성된다.
- [0032] 본 발명에 따른 착물은 II 족 금속이 III-XII 족 전이 금속의 배출로부터 상기 착물을 안정화시킨다는 점에서 이롭다. 이는 이전의 III-XII 족 전이 금속 착물, 예를 들어 망가포디피르와 같은 MnPLED 유도체의 사용과 관련된 독성 효과를 감소시킨다. 본 발명의 착물은 또한 병리 상태, 특히 산소-유래 자유 라디칼로 인해 유발되는 것들, 즉 산화 스트레스에 대하여 개선된 치료 및/또는 보호를 나타낼 수 있다. 본 발명의 추가 개선점 및 잇점은 아래의 상세한 설명을 통해 더 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 아래의 상세한 설명은 도면을 참고로 더 완전히 이해될 것이다.
- 도 1은 실시예 1에 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 단일 단계 결정화 방법에서 얻어진, 약 4:1의 대략적 Ca:Mn 몰비를 갖는 포디피르(DPDP)의 칼슘 망간 착물 (여기서 "칼망가포디피르"라 함)의 3가지 결정 형태의 X-선 분말 회절(XRPD) 패턴을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명에 따른 착물이라기 보다, 칼슘 포디피르(칼포디피르) 및 망간 포디피르(망가포디피르)의 혼합물의 XRPD 패턴을 나타내며, 이들 XRPD 패턴은 실시예 2에 기재된 바와 같이, 모든 생성물이 무정형이고 물을 신속히 흡수하는 것으로 나타났음을 보여준다.
- 도 3은 칼망가포디피르, 로트 # 7755-C-R0-01-30-01의 푸리에 변환 적외선(Fourier transform infrared; FT-IR) 흡수 스펙트럼을 보여주며, 특징적 적외선 흡수 밴드(파수) 및 대응하는 배정(assignments)은 실시예 3에 기재되어 있다.
- 도 4a 및 4b는 실시예 3에 기재된 바와 같이, 칼망가포디피르, 로트 # 7755-C-R0-01-30-01(660-850 m/z)의 질량 스펙트럼(도 4a) 및 확대 질량 스펙트럼(도 4b)를 나타낸다.
- 도 5는 실시예 3에 기재된, 칼망가포디피르의 화학 구조를 나타낸다.
- 도 6a는 각각 2.59 μ mol 및 2.52 μ mol Mn을 함유하는 망가포디피르 또는 칼망가포디피르가 주입된 쥐로부터, 0-24 시간 소변 내 망간(Mn) 함량의 증가(총 Mn 함량 빼기 Mn의 기초 함량으로 표현됨)를 나타낸다. 도 6b는 주입된 용량의 %로서 표현되는 소변 내 Mn 함량의 증가를 나타낸다. 도 6c는 동일 동물에서 24 시간 소변의 아연 함량의 증가를 나타낸다. 결과는 평균 \pm S.E.M.으로 표현되며; 각 그룹에서 n=4이다. 이들 도면은 실시예 4에 더 완전히 기재되어 있다.
- 도 7a-7d는 3일과 6일 후 주입(post injection)으로 옥살리플라틴의 용량을 증가시켜(7.5, 10.0 및 12.5 mg/kg) 정맥 내 단일 주입한 결과 백혈구(WBC), 림프구(LYM), 호중구(NEU) 및 혈소판(PLC) 각각에 대한 골수억제성 효과(myelosuppressive effects)를 보여준다. 결과는 평균 \pm S.E.M.으로 표현되며; 각 그룹에서 n=5이고,

실시에 5에 기재된 바와 같다.

도 8a-8d는 balb/c 마우스에 옥살리플라틴 단독 처리 또는 칼망가포디피르 또는 망가포디피르와 조합하여 처리한 후의 WBC, LYM, NEU 및 PLC 각각을 나타낸다. 대조구는 담체 처리(vehicle treatment) 만을 받았다. 결과는 평균 \pm S.E.M.으로 표현되며; 각 그룹에서 n=5이고, 실시예 5에 기재된 바와 같다.

도 9a-9b는 대장암 CT26 세포에 대한 농도 증가에 따른 다양한 PLED-유도체 및 CaCl₂의 세포독성 활성을 보여준다. 결과는 평균 \pm S.D.로 표현되며; n=3이고, 실시예 6에 기재된 바와 같다.

도 10a는 비교적 높은 용량의 칼망가포디피르(50 mg/kg)의 부재 및 존재시, CT26 동형 골수이식(syngenic) balb/c 마우스에서 고용량 옥살리플라틴(20 mg/kg)의 항종양 효과를 보여준다. 도 10b는 비교적 낮은 용량의 칼망가포디피르의 부재 및 존재시, 저용량의 옥살리플라틴(10 mg/kg)의 항종양 효과를 보여준다. 결과는 평균 \pm S.E.M.으로 표현되며; 담체 및 도 10a의 옥살리플라틴 20 mg/kg 그룹에서 n=10이고, 기타 모든 그룹에서 n=5 이고, 실시예 7에 기재된 바와 같다.

도 11a-11c는 NaCl (대조구), 망가포디피르 또는 칼망가포디피르의 39회 투여 후(양쪽 모두 2800 μ mol/kg 망간의 누적량에 대응함) 뇌, 척장 및 간의 Mn 함량을 나타낸다. 결과는 평균 \pm S.E.M.으로 표현되며; 각 그룹에서 n=17-18이고, 실시예 8에 기재된 바와 같다.

도 12a-12d는 3일과 6일 후 주입으로 카르보플라틴의 용량을 증가시켜(75, 100 및 125 mg/kg) 정맥 내 단일 주입한 결과 백혈구(WBC), 림프구(LYM), 호중구(NEU) 및 혈소판(PLC) 각각에 대한 골수억제성 효과(myelosuppressive effects)를 보여준다. 결과는 평균 \pm S.E.M.으로 표현되며; 각 그룹에서 n=5이고, 실시예 9에 기재된 바와 같다.

도 13a-13d는 balb/c 마우스에서 카르보플라틴과 칼망가포디피르를 조합하여 처리한 후 WBC, LYM, NEU 및 PLC 각각을 나타낸다. 대조구는 담체 처리만을 받았다. 결과는 평균 \pm S.E.M.으로 표현되며; 각 그룹에서 n=5이고, 실시예 9에 기재된 바와 같다.

도 14는 비교적 낮은 용량의 칼망가포디피르(50 mg/kg)의 부재 및 존재시, CT26을 포함하는 면역 적격의 balb/c 마우스 및 면역 결핍된 누드(nude) balb/c 마우스(nu/nu)에서 낮은 용량의 옥살리플라틴(10 mg/kg)의 항종양 효과를 보여준다. 결과는 \pm S.E.M.으로 표현되며; 각 그룹에서 n=5 이고, 실시예 10에 기재된 바와 같다.

도 15a 및 15b는 대세포(non-small cell) 폐암 세포 U1810 및 LLC1 각각에서 칼망가포디피르 및 망가포디피르의 세포독성 활성을 나타낸다. 결과는 평균 \pm S.D.로 표현되며; n=3이고, 실시예 11에 기재된 바와 같다.

상기 도면들은 실시예에 비추어 더 완전히 이해될 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 본 발명의 착물, 조성물 및 방법은 PLED 유도체, 즉 피리독살 에틸디아민-유도체의 금속 착물의 제조 및 사용을 개선하는 것에 관한 것이다(비록 상기 유도체는 대사되어 생체 내에서 PLED를 형성할 수 있어서 PLED의 전구 약물로서 작용하는 것으로 인식되지만).
- [0035] WO 2011/004325 A1는 망가포디피르(MnDPDP)에 대한 포디피르(DPDP)의 공급과잉 첨가가 투여한 후 망간의 배출로부터 어떻게 그것을 안정화시키고 CNS로의 흡수를 감소시키며, 따라서 망가포디피르의 신경독성 전위(neurotoxic potential)를 현저히 낮추는지를 보여준다. SOD-모방 및 세포보호 효과를 발휘하는 것은 온전한 망간-함유 착물이기 때문에, 포디피르의 과잉공급은 신경독성 전위(neurotoxic potential)를 낮출 뿐만 아니라 세포보호 작용도 상당히 증가시킬 것이다.
- [0036] 망간 N,N'-비스-(피리독살-5-포스페이트)-에틸렌디아민-N,N'-디아세트산(망가포디피르)를 포함하는 MnPLED-유도체들로부터 망간의 체내 배출은 인체 내 자유 또는 용이하게 분리가능한 아연의 존재에 의존한다. 아연은 포디피르 또는 그것의 탈인산화된 대응물에 대하여 망간 보다 약 1000배 더 높은 친화도를 갖는다(Rocklage 등, 1989). 실험에 의한 연구에 의하면 망가포디피르로부터의 체내 망간 배출은 5 μ mol/kg을 초과하는 용량에서 포화된다(Southon 등, 1997). 건강한 지원자들에게서 망가포디피르로 심장 및 간 영상화를 하면 인간에게서 유사한 포화 용량을 나타낸다(Skjold 등, J. Magn. Reson. Imaging 2004; 20:948-952, Toft 등, 1997).
- [0037] WO 2011/004325 A1에 기재된 발명에서, 특성의 치료적 조성물은 2개의 활성 제약학적 성분들(API), 예를 들어 망가포디피르 및 포디피르를 바로 사용가능한(ready-to-use) 용액으로 혼합하거나 이들을 별도로 투여함으로써

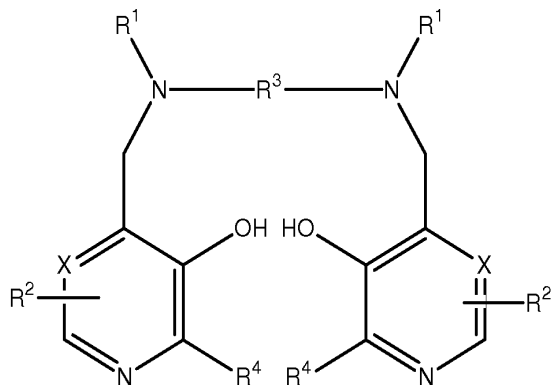
얻어지는 것으로 가정하였다. 약 5 내지 10 $\mu\text{mol/kg}$ 의 투여 용량의 포디피르가 망가포디피르에 대하여 상당한 체내 안정화 효과를 갖는 것이 입증되었다. 첫 번째 임상 경험(Yri 등, 2009 및 Karlsson 등, 2011)은 망가포디피르가 인체 내 2 내지 10 $\mu\text{mol/kg}$ 사이의 어딘가의 용량 레벨에서 치료적으로 효과적임을 보여준다. 망가포디피르 더하기 포디피르의 더 높은 효능을 고려하면, 망가포디피르가 1 $\mu\text{mol/kg}$ 에 근사한 용량 레벨에서 환자에게 치료적으로 효과적임을 추정하는 것이 합당하다. 이것이 또한 우리에게 교시하는 바는, 5에 근사한 (포디피르 + 망가포디피르) / 망가포디피르의 비, 즉 망가포디피르보다 포디피르를 4배 더 많이 함유하는 바로 사용가능한 (ready-to-use) 제제가 효과적이라는 것이다. 이는 또한, 40 mM 포디피르 및 10 mM 망가포디피르를 함유하는 바로 사용가능한 제제 - 체중 kg 당 0.1 내지 0.2 ml의 상기 배합의 투여 -가 1 내지 2 $\mu\text{mol/kg}$ 망가포디피르 및 4 내지 8 $\mu\text{mol/kg}$ 포디피르의 용량이 얻어지도록 할 것임을 제안한다.

[0038] 칼슘은 아연보다 포디피르에 대하여 약 10^9 배 더 낮은 친화도 및 망간보다 포디피르에 대하여 약 10^6 배 더 낮은 친화도를 갖는다. 그러나, 칼슘이 아연 및 망간보다 훨씬 더 높은 세포의 농도로 존재함을 고려하면, 포디피르의 신속한 정맥내 볼루스(bolus) 투여는 자유 칼슘의 세포외 농도의 급격한 감소를 유도할 수 있다. 심장은 혈액 펌핑 활성에 대하여 세포외 칼슘에 절대적으로 의존하기 때문에, 자유 칼슘의 세포외 함량의 감소는 결국 급성 심부전(acute heart failure)을 유도할 수 있다. 그러나 WO 2011/004325 A1에서 논의된 바와 같이, 이러한 문제는 칼슘-착화된 DPDP, 즉 CaDPDP를 이용함으로써 용이하게 해결될 수 있다.

[0039] 놀랍게도, CaDPDP이 PLED-유도체에서 망간과의 착물에 이용될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 놀랍게도, 칼슘과 망간의 착물, 예를 들어 칼망가포디피르, 및 기타 II 족 금속 및 III-XII 족 전이 금속의 착물이 얻어질 수 있다.

[0040] 따라서, 일 측면에 의하면, 본 발명은 식 I 화합물 또는 그 염의 혼합 금속 착물에 관한 것이며, 상기 혼합 금속은 III-XII 족 전이금속 및 II 족 금속으로 구성된다:

[0041] 식 I



[0042] 상기 식에서 X는 CH 또는 N을 나타내고,
 [0043] 각각의 R¹은 독립적으로 수소 또는 -CH₂COR⁵을 나타내고;

[0044] 각각의 R⁵는 히드록시, 선택적으로 히드록실화된 알콕시, 아미노 또는 알킬아미노를 나타내고;
 [0045] 각각의 R²는 독립적으로 ZYR⁶를 나타내며, Z는 선택적으로 R⁷로 치환된, C₁₋₃ 알킬렌 또는 옥소알킬렌기 또는 하나의 결합을 나타내고;

[0046] Y는 하나의 결합, 산소 원자 또는 NR⁶을 나타내고;
 [0047] R⁶는 수소 원자, COOR⁸, 알킬, 알케닐, 시클로알킬, 아릴 또는 아랄킬기로서, 선택적으로 COOR⁸, CONR⁸₂, NR⁸₂, OR⁸, =NR⁸, =O, OP(O)(OR⁸)R⁷ 및 OSO₃M로부터 선택되는 하나 이상의 기로 치환된 것이며;

[0048] R⁷은 히드록시, 선택적으로 히드록실화된, 선택적으로 알콕실화된 알킬 또는 아미노알킬기이며;
 [0049] R⁸은 히드록시, 선택적으로 히드록실화된, 선택적으로 알콕실화된 알킬 또는 아미노알킬기이며;

- [0050] R^8 은 수소 원자 또는 선택적으로 히드록실화된, 선택적으로 알콕실화된 알킬기이고;
- [0051] M은 수소 원자 또는 일 당량의 생리적으로 허용가능한 양이온이며;
- [0052] R^3 는 C_{1-8} 알킬렌, 1,2-시클로알킬렌 또는 1,2-아틸렌기로서, 선택적으로 R^7 으로 치환된 것을 나타내며;
- [0053] 각각의 R^4 는 독립적으로 수소 또는 C_{1-3} 알킬을 나타낸다.
- [0054] 여기서 사용되는 용어 "알킬" 및 "알킬렌"은 직쇄 및 분지형, 포화 및 불포화된 탄화수소를 포함한다. "1,2-시클로알킬렌"이란 용어는 5-8개 탄소 원자를 갖는 시스 및 트랜스 시클로알킬렌기 및 알킬 치환된 시클로알킬렌기를 포함한다. "1,2-아틸렌"이란 용어는 6 내지 10개 탄소 원자를 갖는 페닐 및 나프틸기 및 알킬 치환된 유도체를 포함한다. 달리 특정되지 않는 한, 임의의 알킬, 알킬렌 또는 알케닐 부분은 편리하게 1 내지 20, 구체적으로 1-8, 좀 더 구체적으로 1-6, 좀 더 구체적으로 1-4개 탄소 원자를 포함할 수 있다. 시클로알킬 부분은 편리하게 3-18 고리 원자, 구체적으로 5-12 고리 원자, 좀 더 구체적으로 5-8 고리 원자를 포함할 수 있다. 페닐 또는 나프틸기로 구성되는 아틸 부분이 바람직하다. 아탈킬기로서는, 페닐 CI -8 알킬, 특히 벤질이 바람직하다. 상기 기가 히드록실기에 의해 선택적으로 치환될 수 있는 경우, 이는 단일치환 또는 다치환(polysubstitution)일 수 있으며, 다치환의 경우 알콕시 및/또는 히드록실 치환체가 알콕시 치환체에 의해 운반될 수 있다(carried).
- [0055] 식 I의 화합물은 두 개의 페리딜 고리에 동일하거나 상이한 R^2 기를 가질 수 있으며 이는 동일하거나 상이한 고리 위치에 부착될 수 있다. 구체적 일 실시예에서, 상기 치환은 5- 및 6-위치이거나, 좀 더 구체적으로 6-위치, 즉 히드록실기에 대한 파라(para) 위치이다. 구체적 일 실시예에서, 상기 R^2 기는 동일하고 동일하게 위치하며, 좀 더 구체적으로 6,6'-위치이다. 또 다른 구체적 실시예에서, 각각의 R^6 는 모노- 또는 폴리(히드록시 또는 알콕실화된) 알킬기 또는 식 $OP(O)(OR^8)R^7$ 의 기이다.
- [0056] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 식 I 화합물의 칼슘 및 망간 착물에 관한 것이다. 일 실시예에서, R^5 는 히드록시, C_{1-8} 알콕시, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 아미노 또는 C_{1-8} 알킬아미노이며; Z는 하나의 결합 또는 CH_2 , $(CH_2)_2$, CO, CH_2CO , CH_2CH_2CO 및 CH_2COCH_2 로부터 선택되며; Y는 하나의 결합이고; R^6 는 모노- 또는 폴리(히드록시 또는 알콕실화된) 알킬기 또는 식 $OP(O)(OR^8)R^7$ 의 기이고; R^7 은 히드록시 또는 미치환된 알킬 또는 아미노알킬기이다. 좀 더 구체적 일 실시예에서, R^3 는 에틸렌이고 각 R^1 기는 $-CH_2COR^5$ 를 나타내며 여기서 R^5 는 히드록시이다. 또 다른 실시예에서, 식 I의 화합물은 N,N'-비스-(페리독살-5-포스페이트)-에틸렌디아민-N,N'-디아세트산 (DPDP), 또는 그것의 제약학적으로 허용가능한 염이다. 또 다른 실시예에서, 상기 제약학적 물질은 N,N'-비스-(페리독살-5-포스페이트)-에틸렌디아민-N,N'-디아세트산, 또는 그 염의 혼합 망간 및 칼슘 착물이다.
- [0057] 상기 혼합 금속 착물은 상기 표시된 족들의 금속의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 구체적 일 실시예에서, 상기 III-XII 족 전이 금속은 Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} 및/또는 Ni^{2+} 이며 상기 II 족 금속은 Ca^{2+} 및/또는 Mg^{2+} 이다. 좀 더 구체적 일 실시예에서, 상기 III-XII 족 전이 금속은 Mn^{2+} 이며 상기 II 족 금속은 Ca^{2+} 또는 Ca^{2+} 및 Mg의 혼합물이다. 좀 더 구체적 실시예에서, 상기 II 족 금속은 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 의 혼합물이며, Ca^{2+}/Mg^{2+} 의 몰비는 약 0.1-50, 좀 더 구체적으로 약 0.1-10이다.
- [0058] 또 다른 실시예에서, 상기 혼합 금속 착물은 약 1-10의 II 족 금속 대 III-XII 족 전이 금속 몰비를 갖는다. 구체적 일 실시예에서, III-XII 족 전이 금속은 Mn^{2+} 이며 II 족 금속은 Ca^{2+} 이며, Ca^{2+}/Mn^{2+} 의 몰비는 약 4이다. 좀 더 구체적 일 실시예에서, III-XII 족 전이 금속은 Mn^{2+} 이며 II 족 금속은 Ca^{2+} 이며, Ca^{2+}/Mn^{2+} 의 몰비는 약 4이고, 식 I 화합물은 DPDP, 즉 상기 착물은 여기 기재된 칼망가포디피르 화합물이다.
- [0059] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하나의 제조/결정화 단계로, 본 발명의 혼합 금속 착물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 III-XII 족 전이금속, II 족 금속 및 식 I 화합물의 용액으로부터 단일 단계 결정화(one-step crystallization)하는 것으로 구성된다. 구체적 일 실시예에서는, 망간, 칼슘 및 식 I 화합물의 용액으로부터 단일 단계 결정화가 수행된다. 좀 더 구체적 일 실시예에서, 상기 용액은 $(4+1)/1=5$ 에 가까운 $(Ca+Mn)/Mn$

비, $\text{Ca}_4\text{Mn}(\text{DPDP})_5$ 에 가까운 조성 화학량론(stoichiometry)을 갖는다.

- [0060] X-선 분말 회절(XRPD)이 결정형 고체들의 식별 및 특징화에 가장 널리 사용되며, 상기 고체 각각은 구별되는 회절 패턴을 생성한다. 각 선의 위치(격자 간격에 대응) 및 상대적 강도가 특징의 상 및 물질을 가리키므로, 비교가 되는 "지문"을 제공하게 된다. 실시예에 도시된 바와 같이, 칼망가포디피르의 XRPD 분석은 의심 없이 칼망가포디피르가 단순한 블렌드라기 보다는 하나의 화학 물질, 즉 착물임을 보여준다(실시예 1 참조). 도 1은 주위 습도에 따라 상호 전환되는 3가지 결정 형태의 칼망가포디피르의 그래프(stacked plot)를 보여준다. 가변 습도 XRPD 분석은 형태 B가 40% 상대 습도(RH) 위로 안정적이고, 형태 A는 0-10% RH에서 안정적이며, 형태 C는 6-36% RH 사이에서 안정적임을 보여준다. 형태 B 및 C의 혼합물은 38-44% RH 사이로 관찰되었고, 10 mg 스케일에서 3 시간 내에 형태 전환이 일어나는 것이 관찰되었다.
- [0061] 상기 단일 단계 제조는 시딩(seeding)하면서 또는 시딩 없이 수행될 수 있지만, 시딩(실시예 1에서 예시되는 바와 같이)은 결정화를 더 잘 통제할 수 있도록 한다.
- [0062] 상기 간단히 언급된 단일 단계 제조는 개별 금속 착물들을 혼합하는 것 보다 더 우수하다. 따라서, 구체적 일 실시예에서, 칼슘 및 망간의 착물은 결정형 물질로서, 실시예 2에서 보여지는 바와 같이, 바람직한 양의 망가포디피르(MnDPDP) 및 칼포디피르(CaDPDP)의 단순 혼합물과는 쉽게 구별된다.
- [0063] 실시예들은 또한, 칼슘-망간 착물 칼망가포디피르에 의해 나타나는 바와 같이, 본 발명에 따른 착물의 개선점 및 잇점을 보여준다. 생체내 망간의 안정성과 관련하여, 칼망가포디피르는 실시예 4에서 보여지는 바와 같이, 적어도 망가포디피르 및 포디피르의 진정한 혼합물만큼 안정적이다. 이는 실시예 8에서 보여지는 바와 같이, 뇌내에 망간이 현저히 덜 보유(retention)되는 결과를 일으킬 것이다. 세포 보호 효능은 온전한 망간 착물 망가포디피르 또는 그것의 탈인산화된 대응물, MnDPMP 및 MnPLED 에 주로 의존하기 때문에, 칼망가포디피르의 효능은 실시예 5에서 예시되는 바와 같이, 망가포디피르의 효능 보다 우수하다. 또한, 망가포디피르는 놀랍게도 암세포, 예를 들어 CT26 세포에 대항하는 세포독성 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다(Laurent 등, 2005; Alexandre 등, 2006; EP 16944338). 그러나 WO 2009/078794 A1 및 Kurz 등, 2012에 기재된 바와 같이, 이는 포디피르 단독 또는 그것의 탈인산화된 대응물, DPMP 및 PLED 의 고유 특성이인 것이지, 온전한 금속 착물 망가포디피르 또는 그것의 탈인산화된 대응물, MnDPMP 및 MnPLED 의 고유 특성은 아니다. 실시예 6에서는, 포디피르가 CT26 대장암 세포를 사멸시키는데 있어 망가포디피르보다 약 20배 더 효과적임을 보여주며, 실시예 11은 칼망가포디피르가 U1810 대세포 폐암 세포를 사멸시키는데 있어 망가포디피르 보다 약 28배 더 효과적임을 보여준다. 체외 조건(in vitro conditions) 하에서, 포디피르로부터 망간이 어느 정도 분리되는 것은, 망가포디피르의 암 사멸 효능(cancer killing efficacy)을 가장 가능성 있게 설명한다. 망간의 같은 몰 농도에서 망가포디피르와 비교할 때, 실시예 1, 2 및 3에 기재된 칼망가포디피르는 반면 포디피르 단독 만큼 효과적이다. 즉, 칼망가포디피르의 사멸 효능은 같은 몰의 망간 농도에서 망가포디피르의 효능 보다 훨씬 높다. 이러한 발견은 두 가지 중요한 특성을 제안한다. 첫째, 탈인산화된 PLED 은 아마도 암세포 사멸 능력의 면에서 그것의 인산화된 대응물 포디피르 만큼 효과적이며, 둘째, 망가포디피르와 비교해서 더 낮은 MnPLED 의 안정성(Rocklage 등, 1989)은 아마도 MnPLED 의 더 높은 효능을 설명한다. ZnDPDP 및 ZnPLED 의 세포보호 활성의 결여는 그것의 망간 대응물과 비교할 때 이들 착물의 1000 배 더 높은 안정도 때문이다(Rocklage 등, 1989).
- [0064] MRI 조영제로서 망가포디피르를 개발하는 중에, MnDPDP 가 토끼에서는 아니지만 쥐에서 태아 골격 이상(fetal skeletal abnormalities)을 일으키는 것이 발견되었다. 중요한 것은, 쥐에서 보여진 이러한 기형 유발 효과(teratogenic effect)는 온전한 망가포디피르 자체에 의해 유발되는 것이 아니라 분리된 망간에 의한 것이라는 것이다(Grant 등, Acta Radiol. 1997;38:759-769). 망간이 인간의 태아에 골격 이상을 유발하는지 여부는 불확실하지만, 임신 계획인(potentially pregnant) 여성이 망가포디피르에 노출되는 것으로부터 보호하는 것은 물론 중요하다. 이는 대부분의 임상 적용에 있어서는 작은 문제지만 직업상 주요 문제를 나타내는데, 특히 가임 및 임신 계획인 여성을 망가포디피르에 대한 노출로부터 보호하기 위해 비용이 드는 조치를 취하여야 하는 생산 과정 중(during the production) 그러하다. 중요한 것은, 칼망가포디피르가 인체에 우연히 흡수된 후 망가포디피르 보다 훨씬 덜 망간을 배출할 것이라는 사실이 물론 태아가 골격 기형을 발전시킬 위험을 상당히 감소시킬 것이라는 것이다. 둘째, 칼망가포디피르가 같은 몰 용량의 망간에서 망가포디피르보다 훨씬 더 효과적이므로, 망간에 대한 요구는 생성되는 칼망가포디피르의 모든 용량에 대하여 상당히 감소되며, 이는 생산 과정 동안 더 적은 망간 노출이 되도록 할 것이다.
- [0065] 또한, 단일의 활성 제약학적 성분의 제조는 치료 용량의 제조 비용을 감소시킨다. 또한, 단일 물질의 투약(dosing)에 대한 요구는 생성물 제제에서의 오차 가능성을 감소시킨다. 안정성 테스트에서, 결정형 생성물의 안

정도는 2개의 API 혼합물을 분무 건조하여 형성되는 것과 같은, 무정형 물질 보다 우수한 것으로 나타났다. 실시예 2에서 예시되는 바와 같이, 분무 건조로부터 얻어지는 무정형 물질은 물을 신속히 흡수하여, 25°C/60% RH 및 40°C/75% RH에서 24시간 내 노출시 용융 입자 및/또는 끈적이는 고형물을 형성하는 것으로 나타났다. 대조적으로, 결정형 칼망가포디피르는 동일한 노출 조건하에서 7일 후에도 자유 유동(free flowing) 고형물로 남았다.

[0066] WO 2011/004325 A1에 기재된 바와 같이, MnPLED-유도체 치료에 대하여 과잉 망간-미함유 PLED 유도체, 예를 들어 DPDP을 첨가하는 것이 신경 독성 망간을 체내 배출하는 것으로부터 망가포디피르를 보호하는 것이 발견되었다. 비록 뇌 내로 망간이 흡수되는 것 배후의 메카니즘은 완전히 이해되지 않지만, 망가포디피르와 같은 망간-함유 PLED 유도체와 조합하여 투여되는 포디피르와 같은 망간-미함유 PLED 유도체의 과잉은 망간의 뇌 흡수를 현저히 감소시킨다. 이론에 구속되기를 원치 않지만, WO 2011/004325 A1의 발명에 따른 조합이 MnPLED 킬레이터(chelator) 형태를 유지하고, 그럼으로써 증가된 양의 킬레이터가 배설물로 이용가능하고 뇌 및 기타 기관으로 흡수되는 자유 Mn의 양이 감소되는 것으로 믿어진다. MnPLED-유도체와 같은 저 분자량 망간 킬레이터 및 그것의 Zn-대응물은 신장을 거쳐 용이하게 배출될 것이며, 이는 사구체 여과율(GFR)에 의해 지배되고, 반면 저 분자량 킬레이터에 결합되지 않은 망간은 체내에 꽤 오랜 동안 유지되고 주로 담즙 경로를 거쳐 천천히 배설될 것이다(Toft 등, 1997). 여기서 아래의 실시예 8에서 보여지는 바와 같이, 고용량(임상적 추정 용량의 36배)의 칼망가포디피르를 쥐에게 반복하여(3개월 동안 39회) 정맥 내 주사한 결과 뇌에 망간이 훨씬 덜 유지되는 결과가 얻어졌는데, 이는 망가포디피르에 의해 얻어지는 결과와 비교된다. 두 가지 경우 총 투여량은 약 2800 μmol/kg의 망간에 대응하였다. 이러한 예는 또한, 체장이 분리된 망간(dissociated manganese)을 비교적 많은 정도로 취하고 보유함을 보여주는데, 이는 Ni 등에 의해 이미 기재된 특성(Acta Radiol 1997; 38:700-707)이며 체장의 유망한 진단 MRI 범으로 이용되었다(Ahlstrom 등, Acta Radiol 1997; 38:660-664). 망가포디피르로 처리된 쥐와 비교하여 칼망가포디피르-처리된 쥐의 체장 내 상당히 더 낮은 망간 레벨은 칼망가포디피르의 개선된 독성학적 프로파일을 더 확실히 보여준다. 비록 간의 Mn 함량은 망가포디피르기에서 통계적으로 유의하게 상승되었지만, 상대적 상승은 뇌와 체장에서보다 훨씬 덜했다. 망가포디피르의 단일 진단 투여량(5 μmol/kg 체중(b.w.))은 쥐의 체장 및 간 모두의 Mn 함량을 신속히 증가시키는 것으로 알려져 있다 - 2시간 후 체장의 Mn 함량은 기초값 보다 약 10배 더 높았으며, 간의 대응하는 값은 약 2배 증가되었다(Ni 등, 1997). Ni 등은 Mn 함량이 체장에서 24시간 후에도 여전히 상승된 것(기초 값의 약 5배)으로 나타났지만, 그 시점에 간에서는 기준치로 돌아간 것이었다. 이는 아마도 망간을 헨들링하는 간의 높은 능력과 망간 항상성(homeostasis)에 있어서의 그것의 중요한 생리적 역할을 반영하는 것이다. 이는 망가포디피르에 많이 노출된 뒤 간 내 Mn의 아주 적당한 증가를 보여주는 본 결과에 의해 더 뒷받침된다. 칼망가포디피르의 개선된 독성학적 프로파일은 여기서의 실시예 8에 의해 명백히 설명된다.

[0067] 임상 투여량의 MnPLED-유도체, 예를 들어 망가포디피르(즉, 5-10 μmol/kg b.w., 정맥 내 투여)가 인간의 MRI 조영제로서 사용될 경우, 포디피르(DPDP)에 결합된 망간의 약 80%는 아연과 상호교환된다(Toft 등, 1997). 더 적은 투여량의 망가포디피르가 투여되면, 분리되는 망간의 퍼센트는 훨씬 더 클 것이다. 그러한 관점에서 망가포디피르는 쥐와 개에서 유사한 방식으로 행동하지만(Hustvedt 등, 1997); 망가포디피르 내 거의 모든 망간은 상기 화합물이 돼지에 투여될 경우 아연과 상호교환되어 돼지에서 세포보호 작용이 없다(Karlsson 등, 2001). 반면, 낮은 투여량의 MnPLED의 투여는 돼지에서 상당한 세포보호 효과를 일으키며, 이는 허혈재관류에 의해 상당히 감소된 심근 경색 크기(myocardial infarct size)로 보여진다. 비록 Mn²⁺ 과 PLED 사이의 보고된 안정도 상수(stability constant)는 Mn²⁺ 과 포디피르에 대한 대응하는 수치 보다 상당히 낮지만(Rocklage 등, 1989), 뭔가 알려지지 않은 이유로 MnPLED는 금속 교환을 피해간다. 망간의 이동은 전제 조건이며, 따라서 예를 들어 간 및 체장의 진단 목적으로, MRI 조영제로서 사용하기에 바람직하다. 그러나, 다양한 형태의 산화 스트레스에 대항하는 SOD-모방 치료 효과는 온전한 망간 PLED-유도체 착물에 완전히 의존한다(Brurok 등, 1999; Karlsson 등, 2001). 예를 들어, 망가포디피르의 체내 투여는 다양한 산화 스트레스 요인들, 예를 들어 허혈-재관류, 세포독성/세포증식억제 약물 및 아세트아미노펜 중독에 대하여 보호하지만, 허혈재관류-유도된 심근 경색에 대하여 돼지 심장을 보호하지는 않으며 (Karlsson 등, 2001), 이로부터의 결과로 결론지을 수 있는 것은 MnPLED-유도체의 체내 세포보호 효과는 온전한 망간 착물의 고유 특성이라는 것이다.

[0068] 칼망가포디피르에서와 같이, Mn 에 약 4배 과량의 Ca의 존재는 주입 후 망간을 배출하는 것으로부터 상기 착물 또는 그것의 탈인산화된 대응물을 현저히 안정화시키며, 따라서 또 다른 중요한 잇점, 즉 증가된 치료 효능을 제공한다. 예를 들어, 임상적으로 관련된 영상화 투여량의 MnDPDP (5-10 μmol/kg)이 정맥 내 주사되면, DPDP에 원래 결합된 망간의 약 80%는 배출되어, 영상화 효능에 기여한다. 결과적으로 20% 미만이 DPDP 또는 그것의 탈인산화된 대응물에 결합된 채로 남아서, MnDPDP의 치료적 활성에 기여하게 된다. 상기 착물로부터 망간의 배출

은 칼망가포디피르 내 Mn에 비하여 약 4배 과량의 Ca에 의해 효과적으로 감소될 수 있으므로, 이는 본 발명에서 명백히 예시되는 바와 같이, 망간이 동등한(equipotent) 치료 효과를 위하여 상당히 감소될 수 있음을 의미한다. 더 낮은, 그리고 특정의 실시예에서는, 더 많은 치료적 상대 투여량에서, Ca의 안정화 효과는 훨씬 더 두드러질 것이다. 이는 또한 망가포디피르에 비하여 칼망가포디피르의 사용이 - 체내 안정화 효과의 결과 및 $Ca_4Mn(DPDP)_5$ 에 가까운 조성 화학량론(stoichiometry)을 갖는, 신규 제약학적 물질 칼망가포디피르의 증가된 치료 효능의 결과 모두로서 - 신경 독성 전위(neurotoxic potential)에 현저한 효과를 가질 것임을 의미한다.

[0069] 아연은 모든 신체 조직 및 유체에 존재한다. 인체의 모든 아연 함량은 2-3 g인 것으로 추정되어 왔다 (Folin 등, *BioMetals* 1994; 7:75-79). 혈장(Plasma) 아연은 총 신체 아연 함량의 약 0.1%를 나타내며, 투여 후 포디피르 또는 그것의 탈인산화된 대응물, DPMP 및 PLED에 결합하기 위해 망간과 경쟁하는 것은 주로 이러한 작은 분량의 아연이다. 인체는 위장의 흡수 및 배설에서 상승적 조절을 통해 아연 항상성을 유지하는 매우 높은 능력을 갖는다(King 등, *J Nutr* 2000; 130:1360S-1366S).

[0070] 이론에 구속되기를 원치 않지만, 사전 임상 작업(Southon 등, 1997) 및 임상 작업(Skjold 등, 2004)으로부터, 인체가 망가포디피르와 같은 MnPLED-유도체에서 망간과 용이하게 상호교환될 수 있는 아연을 5 내지 10 μ mol/kg 체중(b.w.) 함유하는 것으로 추정하는 것이 합당할 수 있다. 이는 상기 기재된 혈장의 아연 함량에 실질적으로 대응한다. 포디피르와 같은 PLED-유도체는 분자 당 망간/아연에 대한 하나의 결합 위치를 포함한다. 따라서, 킬레이터에 대한 아연의 1000배 더 높은 친화도를 고려하면, 망간에 비하여 대략 4의 비율로 칼망가포디피르 내 칼슘이 존재하는 것은 환자에게 비경구 투여 후 망간의 배출에 대항하여 보호할 것이다.

[0071] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 착물의 투여로 인해, 산소-유래 자유 라디칼의 존재로 인해 유발되는 병리 상태, 즉 산화 스트레스를 포함하지만 이에 한하지 않는 환자의 병리 상태를 치료하는 방법에 관한 것이다. 구체적 일 실시예에서, 상기 병리 상태는 초과산화물에 의해 유발되어 이어서 지질 과산화(lipid peroxidation) 및/또는 단백질 니트로화(protein nitration)를 일으킨다. 구체적 일 실시예에서, 상기 착물은 인간 환자 또는 다른 포유류에서 그러한 병리 상태의 치료를 위해 투여될 수 있다. 또 다른 구체적 실시예에서, 본 발명에 따른 착물은 포유류 내에서, 산소-유래 자유 라디칼의 존재로 인해 유발되는 병리 상태, 즉 산화 스트레스를 치료하기 위해 투여된다.

[0072] 일 실시예에서, 상기 착물은 세포독성 또는 세포 증식 억제 약물 치료에서 사용되며, 상기 착물은 세포독성/세포증식억제 약물, 예를 들어 암환자에 대한 하나 이상의 암 약물의 불리한 부작용으로부터 보호하기 위해 투여된다. 좀 더 구체적 일 실시예에서, 상기 세포독성 또는 세포 증식 억제성 약물은 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 5-플루오로우라실(flourouracil), 도세탁셀(docetaxel) 또는 파클리탁셀(paclitaxel) 중 적어도 하나로 구성된다. 추가의 실시예들에서, 상기 병리 상태는 골수 억제(myelosuppression) 또는 신경 독성(neurotoxicity) 또는 이들 양자 모두이다.

[0073] 본 발명에 의한 방법은 또한, 아세트아미노펜-유도 간부전, 비알콜성 지방간염(NASH), 바이러스-유도된 만성 간염, 윌슨병, 당뇨병, 허혈성 심질환, 예를 들어 허혈재관류-유도된 장애, 또는 심근 허혈재관류-유도 장애(양자 모두 선택적 세팅(elective setting) 뿐 아니라 급성인 경우), 혈전용해 치료(thrombolytic treatment), 심폐 우회기(cardiopulmonary bypass) 또는 혈관성형술(percutaneous transluminal angioplasty)과 관련된 상태, 또는 심장 또는 기관 이식 수술의 결과 또는 뇌졸중의 치료를 포함하지만 이에 한하지 않을 수 있다. 추가의 실시예에서, 본 발명에 따른 방법은 철 오버로드(iron overload)를 포함하는 철-관련 상태, 예를 들어 지중해 빈혈(thalassemia), 겸상 적혈구 빈혈증(sickle cell anemia) 또는 수혈 혈철증(transfusional hemosiderosis), 간염-유래 간 경변증(hepatitis-induced liver cirrhosis), 방사선 유도된 장애(radiation induced injury), 예를 들어 방사선 치료로 인해 얻어지는 장애, 다양한 신경 퇴행성 질환, 예를 들어 알츠하이머병, 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 파킨슨병, 및 다발성 경화증(multiple sclerosis) 및 기타의 치료를 또한 포함할 수 있다.

[0074] 또 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 방법은 낮은 망간 초과산화물 디스뮤타아제(manganese superoxide dismutase; MnSOD) 활성의 병리 상태, 예를 들어 다양한 형태의 암으로 발생하는 상태의 대체 요법으로서 투여된다(Buettner, *Anticancer Agents Med Chem.* 2011; 11 :341-346). 따라서, 일 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 착물, 또는 좀 더 구체적으로 칼망가포디피르를 투여함으로써 대세포 폐암의 치료 방법에 관한 것이다. 추가의 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 착물, 또는 좀 더 구체적으로 칼망가포디피르를 투여함으로써 대장암(colorectal cancer), 전립선암, 유방암, 췌장암, 또는 악성 흑색종(malignant melanoma)의 치료 방법에 관한

것이다.

[0075] 망가포디피르의 흥미롭고 중요할 수 있는 항종양 효과 특성은 그것의 림프구 보호 특성일 수 있으며, 이는 실시예 5, 및 Laurent 등, 2005 및 Alexandre 등, 2006에 의해 보여지는 바와 같다. 비록 산화 스트레스에 부차적인 염증 과정(inflammatory processes)이 정상 조직을 손상시키지만, 이는 성장 인자-풍부 미세환경을 생성하고 암 클론(cancerous clones)의 성장을 촉진함으로써 종양 조직에 사실상 유익할 수 있다(Anscher, *Oncologist* 2010; 15:350-359; Kareva, *Transl Oncol* 2011; 4:266-270; Kerkar 등, *Cancer Res* 2012; 72:3125-3130). 현저한 예는 종양-관련 대식세포(macrophages)의 존재이며, 이는 종양의 빈약 혈관 영역(poorly vascularized regions)에 우선적으로 축적되고 종양 성장을 실제 촉진시키는 시토킨(cytokines)을 분비한다. 또한, 이들 시토킨은 종양 성장을 촉진할 뿐만 아니라 종양 제거에 가장 효과적인 CD8+ T-림프구의 활성을 억제하는 것으로 밝혀져 왔다. 실제로, 항암 화학요법의 결과에 대한 T-림프구-매개성 면역 반응의 중요성에 대한 관심이 증가하고 있다 (Zitvogel 등, *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 151-160; Kerkar 등, 2012). 심각한 림프구 감소증(lymphopenia) (< 1000 cells/ μ l)이 항암화학요법 반응에 부정적으로 영향을 주는 것은 알려져 있다. 한 무리(collection)의 마우스 암 (CT26 대장암, MCA205 섬유육종(fibrosarcomas), TSA 세포계 유방암(cell-line breast cancers), GOS 세포계 골육종(osteosarcomas) 및 EL4 흉선종(thymomas)을 포함)은 면역 결핍 숙주, 즉 누드 마우스 보다 동형 골수이식(syngenic) 면역 적격 마우스에 이식되었을 때 독소루비신 및 옥살리플라틴으로의 화학요법에 훨씬 더 효율적으로 반응한다(Zitvogel 등, 2011). 이는 IFN- γ -생성 CD8+ T-림프구가 강력한 암 면역 효과기(cancer immune effectors)임을 나타내는 임상 연구와 일치한다. 또한, 높은 호중구(neutrophil)/림프구 비율은 진행성 대장암(advanced colorectal cancer)을 갖는 환자에 대하여 전체적으로 낮은 생존과 관련된다(Chua 등, *Br J Cancer* 2011;104:1288- 1295). 망가포디피르, 특히 칼망가포디피르가 화학요법 중에 매우 효과적인 림프구-보호제임을 고려하면, 이러한 특징이 체내 상태에 있는 동안 특히 중요할 것임을 알 수 있다.

[0076] 임상적으로 유용하기 위해서는, 암 환자에 사용되는 화학요법 보호제 또는 방사선 요법 보호제가 3가지 기준을 충족시켜야 한다: (i) 상기 제제는 화학요법/방사선 요법-유래 독성으로부터 정상 조직을 보호하지만 종양 조직은 보호하여서는 아니된다(적어도 상당한 정도가 아님) - 그렇지 않으면 어떠한 이득도 얻어지지 않을 것이다; (ii) 상기 제제는 비교적 쉽게 최소한의 독성으로 전달되어야 한다; (iii) 상기 제제는 투여량-제한 독성(dose-limiting toxicities) 또는 생활의 질(quality of life)을 현저히 감소시키는데 책임 있는 것에 대하여 정상 조직을 보호하여야 한다(Citrin 등, 2010). 본 발명의 화합물, 특히 칼망가포디피르는 여기서의 실시예가 보여주는 바와 같이, 이들 기준을 모두 충족한다. 망가포디피르 및 칼망가포디피르가 악성이 아닌 세포는 보호하지만 암세포는 해치는 이유는 겉보기에는 역설적(paradox)이다. 그러나, 이론에 구속되기를 원치 않지만, 악성이 아닌 세포의 보호 및 세포 독성 작용은 같은 동전의 양면일 수 있다. 상승된 산화 상태는 변형 세포에서의 미토겐 자극(mitogenic stimulation)을 위해 필수 불가결하다(Irani 등, *Science* 1997;275: 1649-1652). 다수의 연구가 보고하는 바에 따르면 반응성 산소종(ROS)이 종양 전이(tumor metastasis)를 촉진하는데 있어 중요한 역할을 한다(예를 들어, Behrend 등, *Mol Cell Biol* 2005; 25:7758-7769). 이들 데이터는 다수의 문헌과 일치하며, 이는 CT26 세포를 포함(Laurent 등, 2005; Alexandre 등, 2006)하여, 많은 상피 종양 세포의 산화환원 균형이 상승된 산화제 설정 값(oxidant set point)을 선호함을 제안한다(Doroshov, 2006). MnSOD는 다양한 암 세포계 및 마우스 모델에서 세포 성장을 억제한다. 또한, MnSOD의 과발현(overexpression)은 인간의 대장암 세포계 HCT116에서 성장 정지(growth arrest)를 유도하였으며 p53의 유도(induction)를 필요로 하는 노화를 증가시켰다(Behrend 등, 2005). 암세포에 정상적 MnSOD 유전자를 도입하면 표현형(phenotype)이 바뀌며 세포들은 배지에서 군락을 형성하고 누드 마우스에서 종양을 형성하는 능력을 상실한다 (Church 등, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3113- 3117). 암세포에서 나타나는 상승된 산화 상태는 보통 $\cdot O_2^-$ 의 생성을 증가시키며, 이는 $\cdot NO$ 와 용이하게 반응하여 매우 독성인 ONOO $^-$ 을 생성하여 결과적으로 $\cdot NO$ 의 "추한(ugly)" 측면인 티로신 니트로화를 일으킨다(Beckman 등, 1996; Radi, 2004). 흥미롭게도, 유력한 증거는 티로신 니트로화가 앞서 기재된, 종양에서의 CD8+ 림프구 매개성 면역 반응의 억제에 관여한다고 제안한다 (Bronte 등, *J Exp Med* 2005; 201, 1257-1268; Molon 등, *J Exp Med* 2011; 208:1949-1962). 칼망가포디피르가 그것의 SOD 모방 행동을 통해 ONOO $^-$ 생성 및 이에 따른 면역 억제를 억제하는 것일 수 있으며, 이는 실시예 10에서 보여지는 바와 같이, 면역 적격의 마우스에서는 보여지지만 면역 부적격 마우스에서는 보여지지 않는 항종양 효과의 증가를 설명한다. 퍼옥시니트라이트(Peroxynitrite)는 직접 단백질 니트로화를 할 수 없지만 보통 철 또는 구리와 같은 산화환원 활성인 전이 금속을 필요로 한다(망간도 이러한 요구를 충족시킬 수 있다) (Radi, 2004). 포디피르 및 그것의 탈인산화된 대사물질(metabolites)은 Fe $^{3+}$ 에 대하여 매우 높은 친화도를 갖는다 (Rocklage 등, 1989). 칼망가포디피르의 SOD

모방 행동 외에, 이러한 특성은 항종양 활성을 위해 특히 중요할 수 있다. 상기 T-림프구-의존성 작용 외에, DPDP 및 PLED의 직접적 면역-의존성 작용은 최근의 Kurz에 의한 논문(2012)이 제안하는 바와 같이, 토포이소머라아제(topoisomerase) II의 억제로 인한 것일 수 있다.

[0077] 상기 착물은 제약학적 조성물로 투여될 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 제약학적 조성물은 당업계에 잘 알려진 방법으로, 하나 이상의 생리적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 착물은 예를 들어, 선택적으로 제약학적으로 허용가능한 부형제가 첨가된, 액체 매질에 현탁되거나 용해될 수 있다. 상기 제약학적 조성물의 적당한 부형제는 임의의 종래의 제약학적 또는 수의과적 제제 부형제를 포함하며, 이는 안정화제, 항산화제, 삼투압 조절제(osmolality adjusting agents), 버퍼, pH 조절제, 결합제(binders), 필러(fillers) 등을 포함하지만 이에 한하지 않는다. 상기 제약학적 조성물은 비경구 및 경장(enteral) 투여 모두를 포함하는, 투여를 위한 적합한 형태일 수 있다. 구체적인 일 실시예에서, 상기 조성물은 예를 들어 주사 또는 주입용으로 적당한 형태이다. 따라서, 본 발명의 제약학적 조성물은 종래의 제약학적 투여 형태, 예를 들어 정제(tablet), 캡슐, 분말, 용액, 서스펜션, 분산물, 시럽, 좌약(suppository), 에어로졸(aerosol), 연고, 플라스터(plaster) 또는 기타일 수 있다. 또 다른 일 실시예에서, 상기 착물은 동결 건조된 형태이며, 원하는 경우 투여되기 전에 재구성될 수 있다. 상기 동결 건조된 착물은 하나 이상의 안정화제 및/또는 동결 건조에 사용되는 것으로 알려진 기타의 부형제를 함유하는 동결 건조된 조성물일 수 있다.

[0078] 본 발명에 의한 상기 조성물은 다양한 경로를 통해, 예를 들어 경구로(orally), 경피성으로(transdermally), 직장으로(rectally), 척추강내로(intrathecally), 국소적으로(topically) 또는 흡입(inhalation) 또는 주사, 특히 피하(subcutaneous), 근육 내(intramuscular), 복강 내(intraperitoneal) 또는 정맥 내 주사를 통해 투여될 수 있다. 다른 투여 경로도 또한 이용될 수 있으며, 이는 고막내(intratympanic) 및 비강내(intranasal)를 포함하며, 생성물의 효과, 생체이용성 또는 내성(tolerance)을 증가시키는 경로가 바람직하다. 가장 적절한 경로는 사용된 특정 제제에 따라 당업계의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 선택될 수 있다. 적당한 투여량은 선택된 치료에 대하여 명백할 것이다. 일 실시예에서, 본 발명에 의한 치료 방법은 약 0.01 내지 50 μmol/kg 체중의 상기 혼합 금속 착물을 투여하는 것으로 구성된다. 좀 더 구체적인 실시예에서, 본 발명에 의한 치료 방법은 약 0.1 내지 10 μmol/kg 또는 약 0.1 내지 5 μmol/kg 체중의 상기 혼합 금속 착물을 투여하는 것으로 구성된다.

[0079] 다음의 실시예는 본 발명의 다양한 실시예 및 측면을 예시한다.

[0080] **실시예 1**

[0081] **방법**

[0082] N₂로 플러싱된(flushed) 재킷형(jacketed) 100-L 반응기를 포디피르(DPDP) (4.0 kg 무수물 기재, 6.27 mol, 1 equiv) 및 탈이온(DI)수 (19.2 L, 4.88 vol)로 충전하였다. 상기 배치의 pH는 35분에 걸쳐 희석 NaOH (총 8.9 L, 17.5 mol NaOH, 2.8 equiv; 1.41 kg의 50 중량% NaOH 및 8.0 L의 DI수로부터 제조됨) (21.0-23.3°C; 외부 냉각)로 5.7로 조절하였다. 상기 슬러리를 1시간 동안 20-25°C에서 교반하였으며 그 동안 용액이 형성되었다. 이어서 이것에 Ca(OH)₂ (361.1 g, 4.87 mol, 0.78 equiv), L-아스코르브산(55.1 g, 0.313 mol, 5 mole) 및 MnO (80 g, 1.13 mol, 0.18 equiv)을 충전하였다. 각 제제를 첨가한 다음, 상기 배치를 30-60분 동안 20-25°C에서 교반하고 pH를 측정하였다(Ca 첨가 후 = 6.24, 약간 탁한 옅은 노랑 내지 러스트(rust); 아스코르브산 후 = 6.28, 덜 탁한 러스트; Mn 후 = 6.38, 탁한 러스트 내지 노랑-녹색). 상기 탁한 배치를 16 시간 동안 20-25°C에서 교반하고 pH를 측정하고(6.36) 상기 배치를 0.3 μ 인라인(in-line) 필터를 통과시켜 깨끗한 100-L 반응기 내로 여과하였다. 한편, 에탄올(EtOH) 23A 용액을 아세톤(5.9 L, 1.47 vol) 및 에탄올(74 L, 18.5 vol)로 제조하였다. 에탄올 23A 용액의 일부 분량(8.0 L, 2 vol)을 30분 동안 20-25°C에서 상기 배치로 충전하였으며 그 동안 상기 용액은 탁해졌다. 상기 배치를 칼망가포디피르(40 g, 1 중량%)로 시딩(seeding)하고 30분 동안 20-25°C에서 교반하여 고형물이 유지되도록(persisted) 하였다.

[0083] 상기 배치 온도는 1시간의 과정 동안 15°C로 조절된 다음 30분 동안 13.8-15.5°C에서 숙성되도록 하였다. 상기 배치에 에탄올 23A (56 L, 14 vol)을 10시간(11-14°C) 동안 충전되도록 하였다. 상기 슬러리를 13시간 동안 5-10°C에서 혼합한 다음 여과하여 고형물을 수거하였다. 상기 반응기 및 고형물을 차가운(0-10°C) 에탄올 23A (14 L, 3.5 vol)로 헹구고, 고형물을 2시간 동안 컨디셔닝하였으며, 그 다음 45°C 진공 오븐에서 72 시간 동안 건조하여 4.819 kg (93%, 물 함량에 대하여 조절된 수율)의 칼망가포디피르(lot #11AK0105B)를 노란색 고형물로서 얻었다. HPLC 분석 결과 98.8%의 순도를 나타냈다. 오븐 칼 피셔(Karl Fisher) 분석(@ 170°C)은 10.1% 물을 나

타내었다. ICP 분석은 4.27의 Ca/Mn 비에 대하여 4.27% Ca, 1.37% Mn, 8.64% Na를 나타냈으며, 즉 $\text{Ca}_4\text{Mn}(\text{DPDP})_5$ 에 가까운 조성물 화학량론을 갖는다.

[0084] **결과**

[0085] XRPD(X-선 분말 회절) 분석을 수행하였으며 그 결과 패턴은 도 1에 보여진다. 상기 XRPD 패턴이 보여주는 것은 칼망가포디피르가 단순한 블렌드라기 보다는 단일의 화학 물질(single chemical entity)이라는 것이다. 도 1은 주위 습도(ambient humidity)에 따라 상호 전환되는 3가지 공지된 결정 형태의 칼망가포디피르의 그래프를 차례로(stacked plot) 보여준다. 가변 습도(variable humidity) XRPD 분석은 형태 B가 40% 상대 습도(RH) 위로 안정적이고, 형태 A는 0-10% RH에서 안정적이며, 형태 C는 6-36% RH 사이에서 안정적임을 보여준다. 형태 B 및 C의 혼합물은 38-44% RH 사이로 관찰되었고, 10 mg 스케일에서 3 시간 내에 형태 전환이 일어나는 것이 관찰되었다.

[0086] **결론**

[0087] 상기 XRPD는 놀랍게도 칼망가포디피르가 단순한 블렌드라기 보다는 하나의 화학 물질(one chemical entity)임을 보여준다(도 1).

[0088] **실시예 2**

[0089] **방법**

[0090] 4: 1 비율로 약 200 mg의 칼포디피르(CaDPDP) 및 50 mg의 망가포디피르(MnDPDP)를 측정하여 40 mL 유리병에 넣고 실온에서 40 mL의 DI 수에 용해시켜 노란색 용액을 얻었다. 상기 노랑 수용액을 Buchi Mini-Spray Dryer B-290으로 분무 건조하면서, 그 동안 에어컨디셔너로서 Buchi 제습기 B-296에 부착시켜 실험실로부터 공기가 흡입 되도록 하였다. 분무 건조 최적화 실험은 공급 속도를 변화시켜 가며(20, 30, 40, 50 및 60) 상승된 입구 온도((220°C)에서 실행하였다. 생성물의 회수는 180-230 mg 이었다.

[0091] **결과**

[0092] 결과 얻어진 물질을 XRPD로 분석하였으며(도 2), 이는 모든 생성물이 무정형이고 물을 신속하게 흡수하여 25°C/60% RH 및 40°C/75% RH에서 24시간 내 노출에 용융된 입자(fused particles) 및/또는 끈적거리는 고형물(sticky solids)을 형성함을 보여준다.

[0093] **실시예 3**

[0094] 본 실시예는 적외선 흡수 분광법; 질량 분광법; 및 원소 분석을 이용하여 신규 화학 물질인 칼망가포디피르의 구조를 설명한다. NMR 분석은 Mn의 상자성 성질로 인하여 칼망가포디피르의 분석에 이용될 수 없다.

[0095] **방법**

[0096] 본 실시예에 기재된 분석은 여기에 기재된 단일 단계 방법에 의하여 제조된 생성물에 대하여 수행되었다. 생성물은 lot# 7755-C-R0-01-30-01로서 식별되며, 본질적으로 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조되었다. 이 생성물의 일부는 칼망가포디피르의 표준으로서 증명되었다.

[0097] **적외선 흡수 분광법.** 칼망가포디피르, lot # 7755-C-R0-01-30-01의 푸리에 변환 적외선 (FT-IR) 흡수 스펙트럼을 Thermo-Nicolet Avatar 370 분광계 상에서 감쇠 전반사(attenuated total reflection; ATR)를 이용하여 얻었다.

[0098] **질량 분광법.** 칼망가포디피르, lot # 7755-C-R0-01-30-01의 질량 스펙트럼은 Waters Q-Tof Micro MS/MS 시스템에서 얻었다. MS 분석을 위해 전자분무 이온화(ESI) (양이온 극성 모드)를 선택하였다. 샘플을 10 µg/mL의 농도로 50:50 아세트니트릴/물 + 0.1% 포름산 용액에 용해시켰다. 상기 용액을 10 µL/분의 속도로 상기 소스에 직접 주입하였다.

[0099] **원소 분석.** 칼망가포디피르, lot # 7755-C-R0-01-30-01을 4.26 및 2.8 mol Na/포디피르 몰의 Ca/Mn 몰비를 이용하여 제조하였다. 이러한 조성을 갖는 착물의 이론적 금속 함량은 1.41% Mn, 4.38% Ca, 및 8.69% Na 이다.

[0100] **결과**

[0101] 적외선 흡수 스펙트럼은 도 3에 보여지며, 특징적 적외선 흡수 밴드(파수) 및 대응하는 배정(assignments)은 다음과 같다:

파 수 (cm ⁻¹)	배 정
3250	N - H
3027 - 2848	C - H
1581	C = O
1528	C = C
1471, 1437	CH ₂ , CH ₃
1383	CH ₃
1277	P = O
1092	P - OH
1038, 977, 933, 913	P - O - C
827, 813, 770, 751	방향족 C - II

[0102]

[0103] 상기 샘플의 질량 스펙트럼 및 확대 질량 스펙트럼은 도 4a 및 4b에 각각 보여진다. 상기 스펙트럼은 서로에 대하여 겹쳐진 칼포디피르 및 망가포디피르의 스펙트럼을 제시한다. 완전히 양성자화된(fully protonated) 칼포디피르의 정확한 질량은 676이며 [M+1]에 대해서는 677의 질량이 관찰된다. 모노소듐, 디소듐, 트리소듐 및 테트라소듐에 대한 정확한 질량은 각각 698, 720, 742 및 764이다. 상기 스펙트럼은 각 종에 대하여 각각 699, 721, 743 및 765에서 [M+1]을 보여준다. 완전히 양성자화된 망가포디피르의 정확한 질량은 691이며 대응하는 모노소듐, 디소듐, 트리소듐 및 테트라소듐 종은 각각 713, 735, 757 및 779 이다. 상기 스펙트럼은 각 종에 대하여 [M+1]으로 692, 714, 736, 758 및 780의 질량을 나타낸다.

[0104] lot# 7755-C-R0-01-30-01에 대한 금속 함량 결과는 1.48% Mn, 4.44% Ca, 및 8.56% Na 이었고 이는 예상 값과 일치하며, 이는 망간과 칼슘 모두가 나트륨을 반대이온(counterion)으로 하여 착화되며, 칼슘은 거의 또는 전혀 단순히 반대 이온으로서 존재하지 않음을 확인시켜 준다.

[0105] **결론**

[0106] 이들 결과는 도 5에 도시된 구조와 일치한다. 도 5는 3 Na를 반대이온으로 하는 이상적인 제네릭(generic) 4: 1 Ca/Mn을 보여주며, 이는 도 5에 보여지는 바와 같이 745.43의 분자량을 나타낸다. 본 실시예에서 기재되고 연구된 바와 같이 제조된 물질에 대한 평균 분자량은 4.26 Ca/Mn 비 및 반대 이온으로 2.8 Na를 가지며 740.89의 분자량을 갖는다.

[0107] **실시예 4**

[0108] 본 실시예는 Mn 동일 몰 투여량으로, 칼망가포디피르 또는 망가포디피르가 주입된 동물 내에서 망간 (Mn) 및 아연 (Zn) 소변 배설량을 측정하였다.

[0109] **방법**

[0110] 8마리의 수컷 Wistar 쥐(약 250 g)에게 꼬리 정맥들 중 하나를 통해, 약 10mM Mn을 함유하는 50 mM 칼망가포디피르 (lot #11AK0105B) 0.25 ml, 또는 10mM Mn을 함유하는 10 mM 망가포디피르(lot #02090106) 0.25 ml를 정맥 내 주사하였다. 주사 후, 상기 쥐들을 즉시 대사 케이지(metabolic cages)에 넣고 0-24 시간에 걸쳐 소변을 수거하였다. 소변 내 망간(Mn) 및 아연(Zn)의 기본 함량을 얻기 위하여, 추가로 2개의 (대조구) 쥐에게 0.25 ml 식염수(saline)를 주입하고 대사 케이지에 넣어 동일한 시간 동안 소변 수거를 하였다. 그 다음 소변 샘플들을 Mn 분석을 할 때까지 - 80°C에서 저장하였다. 분석하기 전에 상기 샘플들을 해동시키고 충분히 흔들어서 균질의 샘플을 얻었다. 각 샘플로부터 5개의 ml 부분 표본(aliquot)을 취하고 5 ml 농축 질산을 첨가하였다. 그 다음 샘플들을 마이크로웨이브 오븐에서 회전시키고, 그 다음 증류수로 희석하여 최종 부피 50 ml가 되도록 하였다. 각 샘플의 Mn 함량은 ICP-MS (유도 결합 플라즈마(Inductively Coupled Plasma) 질량 분광법)에 의해 분석하였다. 쥐에 주입된 것들과 동일한 칼망가포디피르 및 망가포디피르 샘플(즉, 0.25 ml)을 제거하여 시험관에 주입

하였다. 이들 샘플은 상기 소변 샘플과 동일한 방식으로 취급하여 Mn 함량을 분석하였다. 결과는 총 0-24 시간 소변 Mn 함량($\mu\text{mol}/\text{kg} \pm \text{S.E.M.}$ 로 표현됨) 및 주사된 양의 퍼센트($\pm \text{S.E.M.}$)로서 주어진다. 망간의 소변 내 배설량에 대하여, 칼망가포디피르 및 망가포디피르를 받은 동물들 사이의 통계적 차이는 배우자 없는 학생의 t-테스트(unpaired Student's t-test)에 의해 시험하였다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 차이로 간주되었다.

[0111] **결과**

[0112] 결과는 도 6a, 6b 및 6c에 보여진다. $2.59 \mu\text{mol}$ 망간(Mn)을 함유하는 10 mM 망가포디피르 0.25 ml를 체내 주입한 후 24시간에, $0.60 \pm 0.04 \mu\text{mol}$ Mn을 소변에서 회수하였으며(도 6a), 이는 ($0.035 \mu\text{mol}$ 의 기초 배설량을 뺀 뒤, 도 6b) 주입된 양의 $23.1 \pm 1.4\%$ 에 대응하는 것이다. $2.52 \mu\text{mol}$ Mn을 함유하는 50 mM 칼망가포디피르 0.25 ml를 주입한 후 대응하는 숫자는 $1.27 \pm 0.07 \mu\text{mol}$ Mn 이었으며(도 6a), 이는 주입된 양의 $50.5 \pm 2.6\%$ 에 대응하는 것이다(도 6b). 망가포디피르와 칼망가포디피르 사이의 차이는 매우 유의한 것이었다($p < 0.0001$). 신장의 Mn 배설량 차이는 아연(Zn)의 신장 배설량 차이에 다소간 반영되었으며; 이는 증가된 Zn 배설량으로 표현되고, 즉 기초 24 시간 배설량($0.068 \mu\text{mol}$)을 뺀 것이다(도 6c).

[0113] **결론**

[0114] 따라서, 동등한 Mn 양(dose)에서, 칼망가포디피르는 망가포디피르에 비하여 소변 내 Mn 배설량이 두 배였다. 망가포디피르를 정맥 내 주사한 후 0-24 시간 동안 소변 내 배설된 Mn 퍼센트는 쥐(Hustvedt 등, 1997) 및 인간(Toft 등, 1997)에 대하여 이전에 보고된 수치와 매우 잘 대응된다. 현재의 결과는 칼망가포디피르가 망가포디피르 보다 생체 내 조건에서 훨씬 더 적은 Mn을 배출함을 보여준다. 이는, 뇌 및 기타 기관에 흡수되도록 이용 가능한 자유 Mn의 양이 감소되고, 치료 지수(therapeutic index)가 더 많은 치료적 망가포디피르 또는 그것의 탈인산화된 대응물, MnDPMP 및 MnPLED이 생체 내에서 이용 가능함에 따라 상당히 증가된다는 점에서 상당한 잇점을 제공한다. 따라서, 칼망가포디피르는 망가포디피르 보다 치료 요법이 상당히 덜 독성이고 훨씬 더 효율적이 되도록 한다.

[0115] **실시예 5**

[0116] 이 실시예는 balb/c 마우스 내 옥살리플라틴의 골수억제 효과와 관련하여 칼망가포디피르의 세포보호 효과를 망가포디피르 및 MnPLED의 세포보호 효과와 비교한 것이다.

[0117] **방법**

[0118] 첫 번째 일련의 실험에서는, 각각 5마리의 balb/c 마우스로 구성되는 3 그룹에 각각 7.5, 10.0 및 12.5 mg/kg 옥살리플라틴으로 옥살리플라틴을 복강내로(intraperitoneally) 한 번 처리하였다. 옥살리플라틴을 처리하기 하루 전(기준치)과 처리 후 3일 및 6일에 50 μl EDTA 혈액 샘플을 유리 모세관으로 궤도 정맥 열기(orbital venous plexus)로부터 취하였다. 상기 혈액 샘플들은 자동 시스템 CELL-DYN® Emerald (Abbott Diagnostics)을 이용하여 백혈구(WBC), 림프구(LYM), 호중구(NEU) 및 혈소판(PLC)의 함량을 분석하였다. 결과(도 7a-7d)로부터, 칼망가포디피르, 망가포디피르 및 MnPLED의 골수 억제 효과를 시험하기 위한 추가 실험이 12.5 mg/kg 옥살리플라틴에서 수행되어야 하고, 혈구(blood cell)의 샘플 분석은 모든 마우스에서 옥살리플라틴을 투여하기 전날 및 투여 후 6일에 수행되어야 함이 결론내려졌다. 옥살리플라틴 (12.5 mg/kg)을 투여하기 30분 전 및 투여 24시간 후에 상기 마우스에 식염수, 칼망가포디피르(5 mg/kg; lot #11AK0105B), 망가포디피르(1 및 10 mg/kg; lot #02090106) 또는 MnPLED (1 mg/kg)을 정맥 내로 주입하였다(각 그룹 당 5마리 마우스). 5 mg/kg 투여량의 칼망가포디피르는 1 mg/kg 망가포디피르와 동일한 양의 망간, 즉 $1.3 \mu\text{mol}$ 을 함유하였으며; 1 mg/kg의 MnPLED는 약간 더 많은 망간(대략 $2 \mu\text{mol}$)을 함유하였다. 대조군은 옥살리플라틴 대신 담체 (5% 포도당) 및 식염수를 투여 받았다. 결과는 다양한 처리 및 혈구에 대하여 기준치로부터의 상대적 차이로서 그래프에 제시된다 ($\pm \text{S.E.M.}$). 처리군 사이의 통계적 차이는 적절한 경우 배우자 없는 학생의 t-테스트에 의해 시험하였다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 차이로 간주되었다.

[0119] **결과**

[0120] 결과는 도 8a-8d에 보여진다. 동일한 망간 양에서, 즉 5 mg/kg 칼망가포디피르는 백혈구(WBC) 총수에서 옥살리플라틴-유도된 하강(oxaliplatin-induced fall)으로부터 마우스를 보호하기에 1 mg/kg 망가포디피르 보다 통계적으로 유의하게 더 효과적이었다(도 8a). 12.5 mg/kg 옥살리플라틴의 단일 투여는 WBC가 80% 보다 많이 하강되

도록 하는 반면, 칼망가포디피르로 처리된 동물 내에서의 하강은 단지 약 25% 이었다. 1 또는 10 mg/kg 망가포디피르로 처리된 마우스 내 대응하는 하강은 대략 50% 였다. 이러한 결과는 또한 짐작컨대, MnDPDP는 그것이 골수억제 효과를 발휘할 수 있기 전에 MnPLED로 탈인산화되어야 하며; 칼망가포디피르와 같이, 1 mg/kg MnPLED는 1 및 10 mg/kg 망가포디피르 보다 WBC를 보호하는데 있어 상당히 더 효과적이었음을 시사한다. 비슷한 하강이 옥살리플라틴 처리 후 림프구(LYM; 도 8b) 및 호중구(NEU; 도 8c)에서 보여진다. 정성적으로(Qualitatively) 유사한 결과가 또한 호중구(NEU)를 분석하였을 경우에도 얻어졌다(도 8c). WBC, LYM 및 NEU와 비교하여, 혈소판(PLC; 도 7d 및 8d)에 대해서, 그들은 시험 물질의 세포 독성 효과 및 옥살리플라틴에 대한 민감도(sensitivity) 모두에서 달랐다.

[0121] **결론**

[0122] 칼망가포디피르는 동일 몰의 망간 양에서 항암 약제 옥살리플라틴의 골수 억제 효과에 대하여 balb/c 마우스를 보호하기에 망가포디피르 보다 상당히 더 강력하였다.

[0123] **실시예 6**

[0124] 쥐의 대장암 세포 내에서 칼망가포디피르의 세포독성 활성을 망가포디피르, 포디피르, MnPLED, ZnPLED, ZnDPDP, 칼포디피르(CaDPDP), PLED 및 CaCl₂ 의 그것과 비교하였다.

[0125] **방법**

[0126] 세포의 생존력(viability)을 MTT 검정(assay)을 이용하여 측정하였다. 간단히, 8,000 CT26 (마우스 대장암) 세포를 96-웰 플레이트(well plate)에서 웰(well) 마다 시딩되도록(seeded) 하여 5% CO₂를 갖는 습한 공기 내 37 °C에서 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum), 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지에서 밤새 성장시켰다. 그 다음 세포를 37°C에서 48 시간 동안 1-1,000 µM 칼망가포디피르(lot #11AK0105B), 포디피르(DPDP; lot #RDL02090206), PLED (lot #KER-AO- 122(2)), 칼포디피르(CaDPDP), 망가포디피르(lot #02090106), MnPLED, ZnPLED, ZnDPMP 및 CaCl₂에 노출시켰다. 그 다음 세포의 생존력은, 0.5 mg/ml의 최종 농도로 5 mg/ml 메틸티아졸레테트라졸륨(methylthiazolotetrazolium; MTT)을 첨가하고 추가 4시간 동안 37°C에서 세포를 배양함으로써 평가하였다. 그 다음 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소(mitochondrial dehydrogenases)에 의해 형성되는 청색 포르마잔(formazan)을 10% SDS 및 10 mM HCl을 첨가하여 37°C에서 밤새 용해시켜 최종 농도 5% SDS 및 5 mM HCl로 하였다. 마지막으로, 상기 용액의 흡광도(absorbance)를 570 nm에서 판독하였으며, 이는 Softmax Pro VI.2.0 프로 그램(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 운영하는 애플 매킨토시 컴퓨터에 연결된 마이크로플레이트 판독기 Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 670 nm를 기준으로 하였다.

[0127] **결과**

[0128] 포디피르, PLED, 칼포디피르 또는 칼망가포디피르의 세포독성 활성은 망가포디피르의 그것보다 약 20 배 더 높았다(도 9a 및 9b). MnPLED는 망가포디피르 보다 CT26 암세포를 사멸시키는 능력이 거의 10 배 더 강력했다(도 9a). 사용된 농도에서 ZnDPDP, ZnPLED 및 CaCl₂ 어느 것도 세포독성 활성을 전혀 나타내지 못했다(도 9a 및 9b).

[0129] **결론**

[0130] 칼망가포디피르와 망가포디피르를 비교하면, 칼망가포디피르가 CT26 암세포를 사멸하는데 있어 망가포디피르 보다 약 20배 더 강력한 것으로 밝혀졌다. 포디피르로부터 망간이 어느 정도 분리되는 것이 아마도 망가포디피르의 사멸 효능을 설명할 것이다. 반면 실시예 1 및 3에서 정의된 바와 같이, 칼망가포디피르는 망간의 동일 몰 농도에서, 포디피르 단독 만큼의 효능이 있다. 즉, 칼망가포디피르의 사멸 효능은 동일 몰 망간 농도에서 망가포디피르의 그것 보다 훨씬 높다. 이러한 발견은 두 가지 중요한 특성을 제안한다. 첫째, 탈인산화된 PLED는 암세포 사멸 능력에 관하여 아마도 그것의 인산화된 대응물인 포디피르 만큼 효능이 있으며, 둘째, 망가포디피르의 비하여 MnPLED의 더 낮은 안정성(Rocklage 등, 1989)은 MnPLED의 더 높은 효능을 아마도 설명한다는 것이다. ZnDPDP 및 ZnPLED의 세포독성 활성 결여는 아마도 그것의 망간 대응물과 비교할 때 이들 착물의 1000배 더 높은 안정성 때문이다(Rocklage 등, 1989).

[0131] **실시예 7**

[0132] 본 실시예는 칼망가포디피르의 존재 및 부재시 쥐 대장암(CT26)-함유 마우스 모델에서 옥살리플라틴의 항종양 활성을 비교한다.

[0133] **방법**

[0134] CT26 세포를 5% CO₂를 갖는 습한 공기 내 37°C에서 10% 소 태아 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지에서 75 cm² 배양 플라스크에서 성장시켰다. 상기 세포들이 ~50% 합류(confluency)에 도달하였을 때 트립신 처리(trypsinization)에 의해 세포를 수확하였다(harvested). 간단히, 세포를 포스페이트 기초 식염수(PBS) (pH 7.3)로 세척하고 0.05% 트립신/0.53 mM EDTA에 37°C에서 ~5 분 동안 노출되도록 하였다. 상기 트립신 처리는 RPMI1640 배양 배지를 첨가함으로써 중단시켰다. 세포를 계수하여 5분 동안 200xg 에서 원심분리시켰다. 그 다음, 이를 PBS에서 세척하고, 다시 원심 분리한 다음, 마우스 내로 주입하기 위해 PBS에 2x10⁶/350 µl로 재현탁되도록 하였다. Laurent 등, 2005에 기재된 바와 같이, 6주 내지 8주 연령의 Balb/c 암컷 마우스를 이용하였다. 간단히, 0일째, 마우스 각각의 목 뒤 피하로 2 x 10⁶의 CT26 세포를 주입하였다. 종양이 감지 가능한 7일 후(day 7), 종양 크기를 캘리퍼(caliper)로 측정하여 마우스를 그룹으로 나누어(각 그룹에 5마리) 그룹 당 종양 크기가 통계적으로 다르지 않도록 하였다. 옥살리플라틴±칼망가포디피르(lot #11AK0105B)를 주입하고 한 그룹의 마우스는 담체(0.9% 식염수 + 5% 포도당) 처리만을 받았다. 첫 번째 일련의 실험에서, 마우스에게 20 mg/kg 옥살리플라틴(5% 포도당으로 희석됨) 또는 5% 포도당을 복강내(i.p.) 투여하기 30분 전에 식염수 또는 50 mg/kg 칼망가포디피르를 체내(i.v.) 주입하였다. 이들 마우스는 24시간 후에 추가로 식염수 또는 50 mg/kg 칼망가포디피르를 받았다(day 8). 또 다른 일련의 실험에서는, 마우스에게 10 mg/kg 옥살리플라틴(5% 포도당으로 희석됨) 또는 5% 포도당을 투여 30분 전에 식염수 또는 5 mg/kg 칼망가포디피르를 체내(i.v.) 주입하였고, 24시간 후에 식염수 또는 5 mg/kg 칼망가포디피르를 주입받았다(day 8). 마우스를 데이 10에 죽이고 종양을 잘라내어 습윤 중량(wet weights)을 측정하였다. 적절한 경우, 처리 그룹들 간의 통계적 차이는 배우자 없는 학생의 t-테스트로 시험하였다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 차이로 간주되었다.

[0135] **결과**

[0136] 결과는 도 10a 및 10b에 보여진다. 첫 번째 일련의 실험에서, 마우스에게 최고 내성 용량(highest tolerated dose)에 가까운, 20 mg/kg 옥살리플라틴을 주입하였다. 옥살리플라틴으로의 단일 처리로 통계적으로 유의한 결과가 얻어졌고 종양 무게가 50% 보다 많이 감소되었다. 칼망가포디피르로의 처리(50 mg/kg)는 고용량에서 옥살리플라틴의 항종양 효과에 어떠한 부정적 영향도 주지 않았다 (도 10a). 그러나, 10 mg/kg의 옥살리플라틴이 사용된 두 번째 일련의 실험에서 비교적 낮은 용량의 칼망가포디피르(5 mg/kg)로의 처리는 통계적으로 유의한 더 나은 항종양 효과의 결과가 얻어졌으며(도 10b); 10 mg/kg 옥살리플라틴 더하기 5 mg/kg 칼망가포디피르의 결합된 효과는 거의 20 mg/kg 옥살리플라틴 단독의 경우만큼 효과가 있었다.

[0137] **결론**

[0138] 칼망가포디피르는 옥살리플라틴의 항종양 작용을 부정적으로 방해하지 않았으며, 반대로 비교적 낮은 용량의 옥살리플라틴(10 mg/kg)에서, 칼망가포디피르는 항종양 효능을 실제로 증가시켰다.

[0139] **실시예 8**

[0140] 본 실시예는 쥐의 뇌, 척장 및 간에서 칼망가포디피르 및 망가포디피르의 정맥 내 주사를 반복한 후(33주에 걸쳐 39회) 망간의 레벨을 비교한다.

[0141] **방법**

[0142] Wistar 수컷 및 암컷 쥐에 0.9% NaCl, 72.0 µmol/kg 망가포디피르(lot #02090106; 72 µmol/kg의 망간에 대응) 또는 374.4 µmol/kg 칼망가포디피르(lot #11AK0105B; 72 µmol/kg의 망간에 대응)를 13주 동안 일주일에 3회 정맥내 주사하였다(각 처리군은 9 마리 수컷 + 9 마리 암컷으로 구성되었다). 칼망가포디피르의 각 용량은 추정되는 임상 용량(assumed clinical dose; ACD)의 약 36배에 해당하는 것이었다. 13-주 투여 기간이 지난

다음, 쥐들을 희생시켜 뇌 및 체장을 절개해 내고 약 0.5 g 샘플들은 Mn 분석을 할 때까지 냉동 저장하였다. 각 샘플의 Mn 함량은 ICP-MS에 의해 분석하였다. 결과는 $\mu\text{g/g}$ 습윤 중량 \pm S.E.M.로서 표현된다.

[0143] Mn 함량과 관련하여, 망가포디피르 군과 칼망가포디피르 군 사이의 통계적 차이는 배우자 없는 학생의 t-테스트로 시험하였다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 차이로 간주되었다.

[0144] **결과**

[0145] 결과는 도 11a-c에 보여진다. NaCl-처리된 대조군 쥐, 망가포디피르-처리된 쥐 및 칼망가포디피르-처리된 쥐에 있어서 Mn 뇌 함량은 각각 0.38 ± 0.01 , 0.99 ± 0.02 및 $0.74 \pm 0.01 \mu\text{g/g w.w.}$ 이었다. 체장에서의 대응하는 Mn 함량은 1.66 ± 0.06 , 5.54 ± 0.45 및 $3.35 \pm 0.19 \mu\text{mol/kg}$ 이었다. 비록 간의 Mn 함량은 망가포디피르 군에서 통계적으로 유의하게 향상되었지만(도 11c), 상대적 상승(relative elevation)은 뇌 및 체장에서 보여지는 것 보다 훨씬 덜했다.

[0146] **결론**

[0147] 높은 누적 용량의 칼망가포디피르를 쥐에게 투여하면 망가포디피르에 비하여 뇌 및 체장에서 망간이 훨씬 덜 유지되는 결과가 얻어진다(양쪽 모두의 경우 총 용량은 대략 $2800 \mu\text{mol/kg}$ 의 망간에 해당하였다). 이러한 결과는 망가포디피르에 비하여 개선된 독성학적 프로파일을 갖는 칼망가포디피르를 시사한다.

[0148] **실시예 9**

[0149] 본 실시예는 balb/c 마우스에서 카르보플라틴의 골수 억제 효과에 대하여 칼망가포디피르의 세포보호 효과를 보여준다.

[0150] **방법**

[0151] 첫 번째 일련의 실험에서, 각각 5마리 암컷 balb/c 마우스로 구성되는 3개 그룹을 각각 75, 100 및 125 mg/kg 카르보플라틴으로 카르보플라틴을 일회 복강내 투입하였다. 카르보플라틴 처리 하루 전(기준치) 뿐만 아니라 3일 및 6일 후, $50 \mu\text{l}$ EDTA 혈액 샘플을 유리 모세관으로 케도 정맥 열기(orbital venous plexus)로부터 취하였다. 상기 혈액 샘플들은 자동 시스템 CELL-DYN® Emerald (Abbott Diagnostics)을 이용하여 백혈구(WBC), 림프구(LYM), 호중구(NEU) 및 혈소판(PLC)의 함량을 분석하였다. 결과(도 12a-12d)로부터, 칼망가포디피르의 골수 억제 효과를 시험하기 위한 추가 실험이 125 mg/kg 카르보플라틴에서 수행되어야 하고, WBC, NEU 및 LYM의 경우, 혈구(blood cell) 샘플 분석은 카르보플라틴을 투여하기 전날 및 투여 후 3일에 수행되어야 하고, PLC의 경우 혈구 샘플 분석이 카르보플라틴을 투여하기 전날 및 투여 후 6일에 수행되어야 함이 결론내려졌다. 카르보플라틴 (125 mg/kg)을 투여하기 30분 전 및 투여 24시간 후에 상기 마우스에 식염수 또는 칼망가포디피르(1, 3, 10 또는 30 mg/kg; lot #11AK0105B)를 주입하였다. 대조군은 대신 카르보플라틴 대신 담체 (식염수) 및 식염수를 투여받았다. 결과는 다양한 처리에 대하여 기준치로부터의 상대적 차이로서 그래프에 제시된다 (평균 \pm S.E.M.). 처리군 사이의 통계적 차이는 적절한 경우 배우자 없는 학생의 t-테스트에 의해 시험하였다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 차이로 간주되었다.

[0152] **결과**

[0153] 결과는 도 13a-13d에 보여진다. 카르보플라틴(125 mg/kg)은 NEU 및 LYM 에서 뿐만 아니라 WBC에서 대략 50% 감소를 일으켰다. 3 mg/kg 용량으로 칼망가포디피르를 처리하면 이러한 감소가 없어졌다. 칼망가포디피르의 용량-반응(dose-response)은 각각의 경우 종(bell) 형상의 외관을 나타냈으며, 이는 CD 마우스에서 독소루비신(doxorubicin)에 대항하여 심장보호 효과와 관련하여 망가포디피르에 대하여 이전에 기재된 것과 유사한 방식이다 (Kurz 등, Transl Oncol 2012; 5:252-259).

[0154] WBC, LYM 및 NEU에 비하여 혈소판(PLC, 도 12d 및 13d)의 경우, 이들은 카르보플라틴에 대한 민감도가 서로 달랐다.

[0155] **결론**

[0156] 칼망가포디피르는 항암 약제인 카르보플라틴의 골수 억제 효과에 대항하여 balb/c 마우스를 상당히 보호한다.

[0157] **실시예 10**

[0158] 본 실시예는 칼망가포디피르의 존재 및 부재시, 대장암(CT26)-함유 면역 적격 balb/c 마우스 및 면역 결핍된 누드 balb/c 마우스(nu/nu)에서 옥살리플라틴의 항종양 활성을 비교한다.

[0159] **방법**

[0160] CT26 세포를 5% CO₂를 갖는 습한 공기 내 37°C에서 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum), 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI 1640 배지 내 75 cm² 배양 플라스크에서 성장시켰다. 상기 세포들이 ~50% 합류(confluency)에 도달하였을 때 트립신 처리(trypsinization)에 의해 세포를 수확하였다. 간단히, 세포를 PBS(pH 7.3)로 세척하고 0.05% 트립신/0.53 mM EDTA에 37°C에서 ~5 분 동안 노출 되도록 하였다. 상기 트립신 처리는 RPMI 1640 배양 배지를 첨가함으로써 중단시켰다. 세포를 계수하여 5분 동안 200xg 에서 원심분리시켰다. 그 다음, 이를 PBS에서 세척하고, 다시 원심 분리한 다음, 마우스 내로 주입하기 위해 PBS에 2x10⁶/350 μl의 농도로 재현탁시켰다. Laurent 등, 2005에 기재된 바와 같이, 6주 내지 8주 연령의 면역 적격 balb/c 암컷 마우스(balb/c) 및 면역 결핍된 누드 암컷 balb/c 마우스(balb/c nu/nu)를 이용하였다. 간단히, 데이 0일 때, 마우스 각각의 목 뒤 피하로 2 x 10⁶의 CT26 세포를 주입하였다. 종양이 감지 가능한 7일 후(데이 7), 종양 크기를 캘리퍼로 측정하여 마우스를 그룹으로 나누어(각 그룹에 5마리) 그룹 당 종양 크기가 통계적으로 다르지 않도록 하였다. 마우스에게 10 mg/kg 옥살리플라틴(5% 포도당으로 희석됨) 또는 5% 포도당을 복강내(i.p.) 투여하기 30분 전에 식염수 또는 5 mg/kg 칼망가포디피르(lot #11AK0105B)를 체내(i.v.) 주입하였다. 이들 마우스는 24시간 후에 추가로 식염수 또는 5 mg/kg 칼망가포디피르를 받았다(day 8). 마우스를 데이 10에 희생시키고 종양을 잘라내어 습윤 중량(wet weights)을 측정하였다. 결과는 다양한 처리에 대하여 그래프에 제시된다 (평균±S.E.M.). 적절한 경우, 처리 그룹들 간의 통계적 차이는 배우자 없는 학생의 t-테스트로 시험하였다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 차이로 간주되었다.

[0161] **결과**

[0162] 결과는 도 14에 보여진다. 종양이 면역 적격의 balb/c nu/nu 마우스에서보다 면역 결핍된 balb/c 마우스에서 더 크게 자라는 경향이 명백했지만, 이러한 차이는 통계적 유의에 이르지 못했다(p=0.0870). 10 mg/kg 옥살리플라틴으로 단일 처리시 면역 적격 및 면역 결핍된 balb/c 마우스에서 종양 무게에 있어 통계적으로 유의한 20 내지 30% 감소되는 결과가 얻어졌다. 5 mg/kg 칼망가포디피르의 처리는 면역 적격 또는 면역 비적격 마우스에서 옥살리플라틴의 항종양 효과에 어떠한 부정적 영향도 주지 않았다. 평균 종양 중량은 실제로 대조구에 비하여 5 mg/kg 칼망가포디피르로 처리된 면역 적격 마우스에서 통계적으로 유의하게 감소되었다. 그러나, 면역 결핍된 마우스에서는 그러한 감소가 전혀 나타나지 않았다.

[0163] **결론**

[0164] 칼망가포디피르는 면역 적격 또는 면역 결핍된 마우스에서 옥살리플라틴의 항종양 작용을 부정적으로 방해하지 않았지만, 칼망가포디피르가 항종양 효능을 실제로 증가시킨 것은 면역 적격의 마우스에서만이었다.

[0165] **실시예 11**

[0166] 인간의 대세포 폐암 (NSCLC) U1810 세포 및 쥐의 대세포 폐암 (LLC1)에 대한 칼망가포디피르의 세포독성 활성을 망가포디피르의 그것과 비교하였다.

[0167] **방법**

[0168] 세포의 생존력(viability)을 MTT 검정(assay)을 이용하여 측정하였다. 간단히, 8,000개의 인간의 U1810 NSCLC 또는 LLC1 NSCLC 세포를 96-웰 플레이트(well plate)에서 웰(well) 마다 시딩되도록(seeded) 하여 5% CO₂를 갖는 습한 공기 내 37°C에서 10% 소 태아 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지에서 밤새 성장시켰다. 그 다음 세포를 48 시간 동안 1-1,000 μM 칼망가포디피르(lot #11AK0105B) 또는 망가포디피르(lot #02090106)에 노출시켰다. 그 다음 세포의 생존력은, 0.5 mg/ml의 최종 농도로 5 mg/ml 메틸티아졸레테트라졸륨(methylthiazoletetrazolium; MTT)을 첨가하고 추가 4시간 동안 37°C에서 세포를 배양함으로써 평가하였다. 그 다음 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소(mitochondrial dehydrogenases)에 의해 형성되는 청색 포르마잔(formazan)을 10% SDS 및 10

mM HCl을 첨가하여 37°C에서 밤새 용해시켜 최종 농도 5% SDS 및 5 mM HCl로 하였다. 마지막으로, 상기 용액의 흡광도(absorbance)를 570 nm에서 관독하였으며, 이는 Softmax Pro VI.2.0 프로그램(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 운영하는 애플 매킨토시 컴퓨터에 연결된 마이크로플레이트 관독기 Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 670 nm를 기준으로 하였다. 농도를 증가시킨 칼망가포디피르 또는 망가포디피르의 존재하에 U1810 또는 LLC1 세포의 생존력은 농도 반응성 곡선으로 제시된다 (평균 ± S.D.). 개별 곡선들은 S자형의 가변 기울기 반응 로지스틱 방정식(sigmoidal variable slope response logistic equation)에 맞았다 (Graphpad Prism, version 5.02). 이러한 분석으로부터 테스트 물질의 50% 억제력을 일으키는 농도(IC₅₀)를 계산하였다.

[0169] **결과**

[0170] NSCLC U1810 및 LLC1 세포에 대한 칼망가포디피르 및 망가포디피르의 세포독성 활성은 도 15a 및 15b에 도시된다. 망가포디피르와 칼망가포디피르 사이에 계산된 IC₅₀ 비(0.0006329/0.0002274)가 보여주는 것은 칼망가포디피르가 U1810 세포를 사멸시키는데 있어 망가포디피르보다 약 28배 더 강력했다는 것이다(도 15a). LLC1 세포를 사멸시키는데 있어 칼망가포디피르가 망가포디피르보다 상당히 더 강력했지만, 망가포디피르 곡선의 불명확한 외관 때문에(도 15b), 망가포디피르 및 칼망가포디피르 사이에 IC₅₀ 비를 계산하는 것은 의미가 없었다.

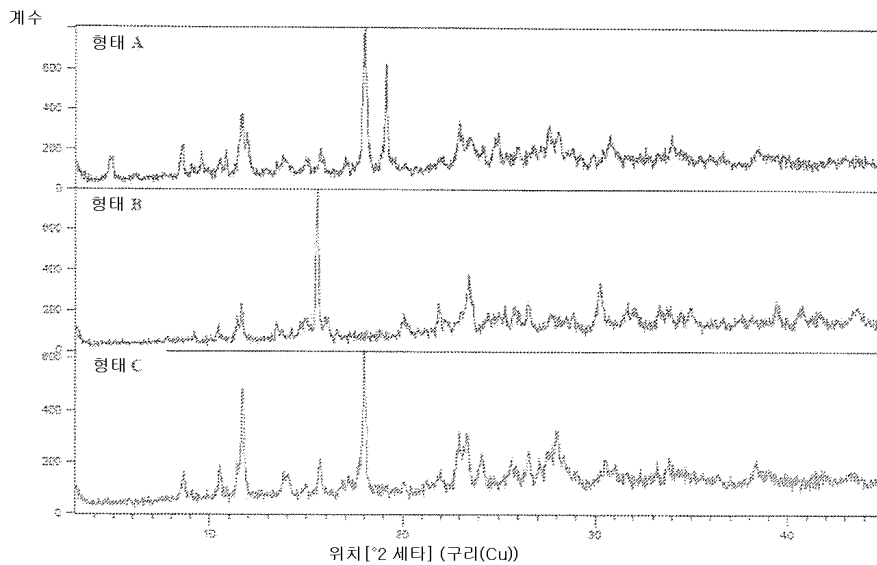
[0171] **결론**

[0172] 결과는 대세포 폐암 세포, U1810 및 LLC1을 사멸시키기에 망가포디피르에 비하여 칼망가포디피르가 더 우월한 효능을 가짐을 나타낸다.

[0173] 여기 기재된 실시예 및 구체적 실시예들은 성질상 단지 예시적인 것이며 이어지는 특허청구범위에 의하여 정의되는 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 받아들여져서는 아니된다. 본 발명의 추가 구체적 실시예 및 잇점은 본 발명의 상세한 설명으로부터 명백할 것이며 특허청구범위의 범위 내에 있다.

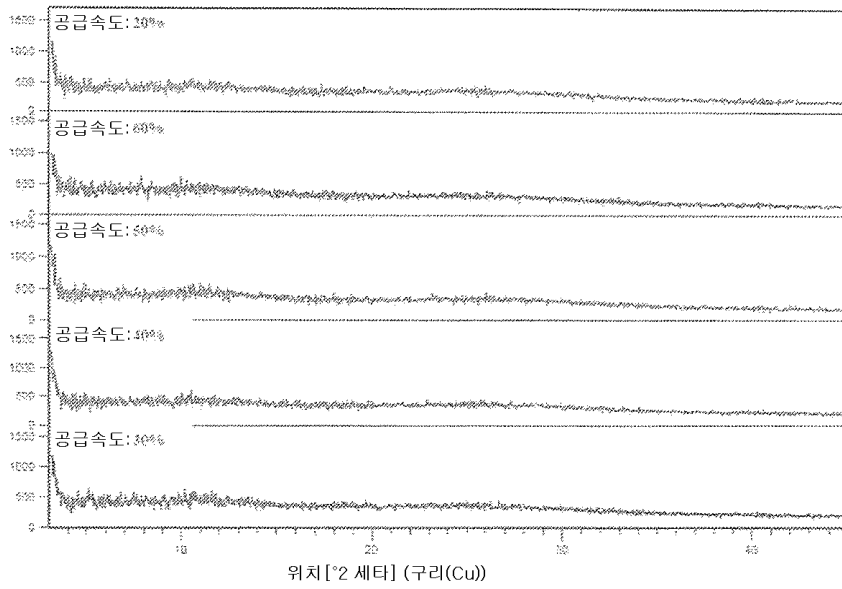
도면

도면1

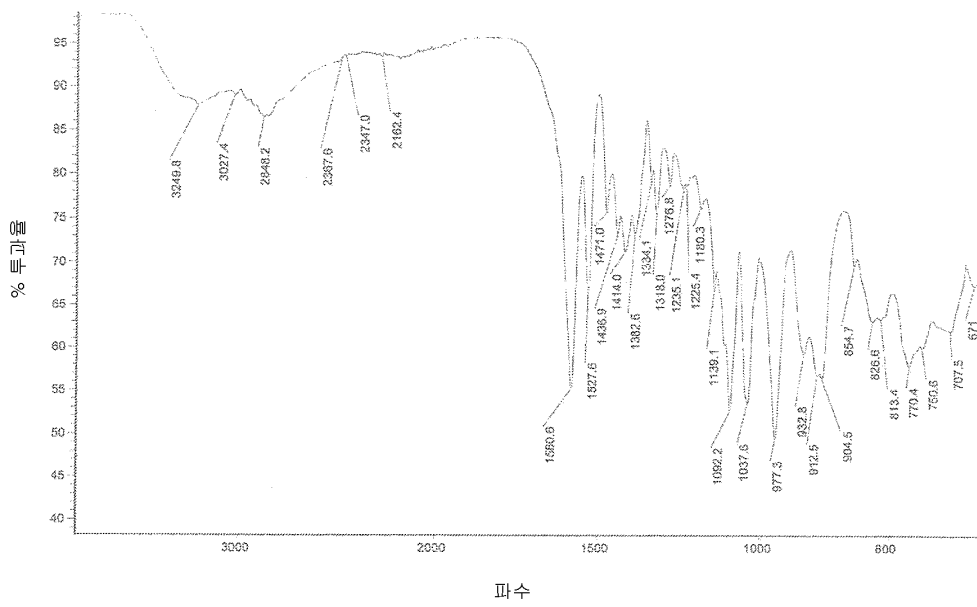


도면2

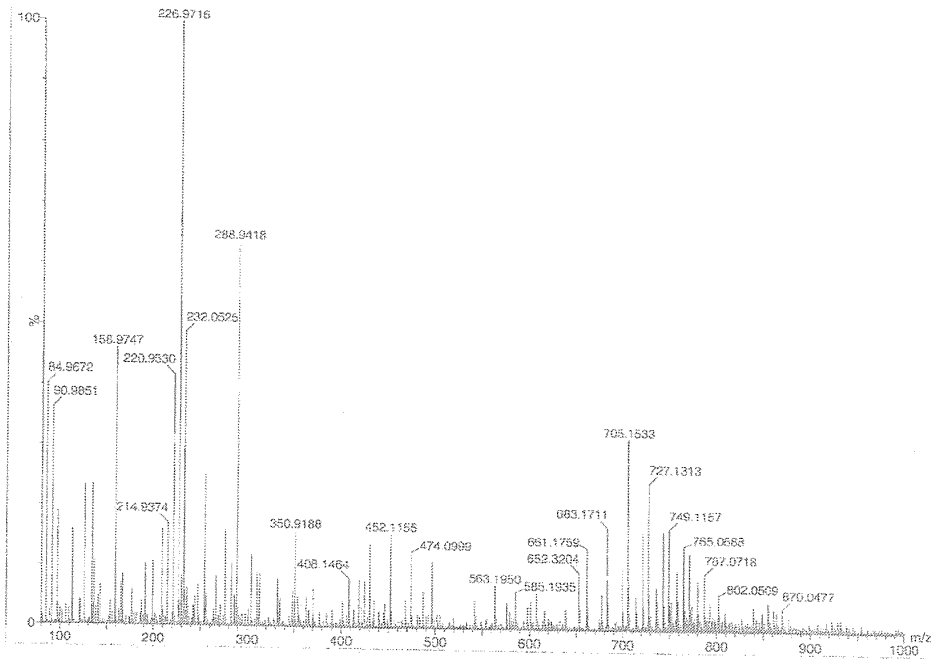
계수



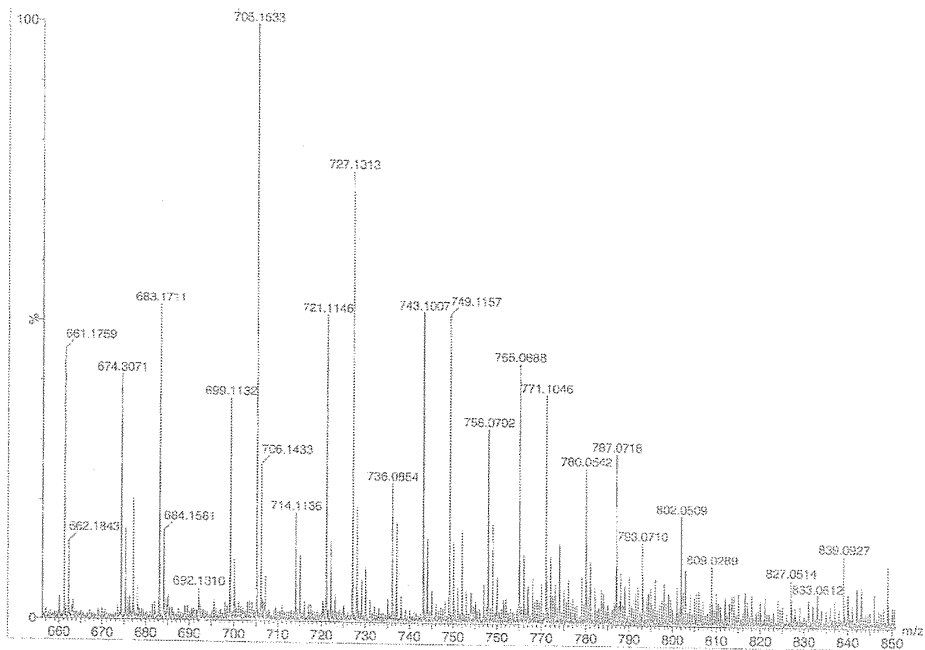
도면3



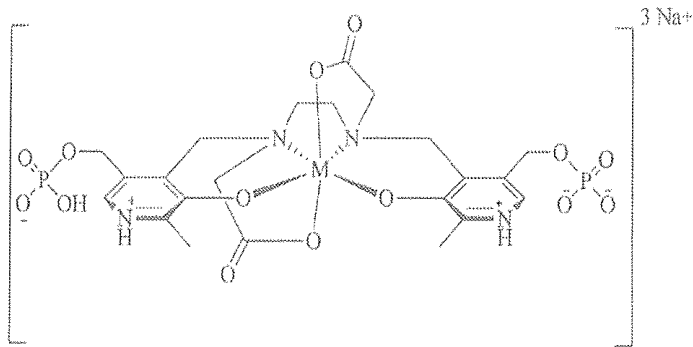
도면4a



도면4b

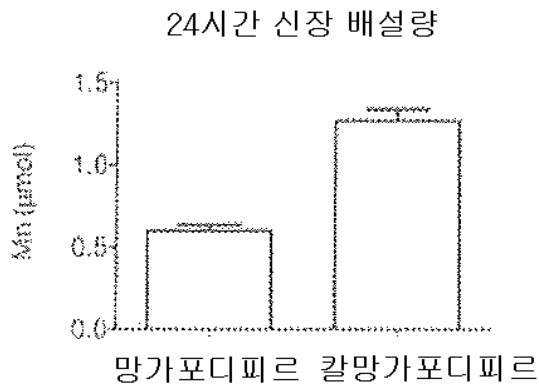


도면5

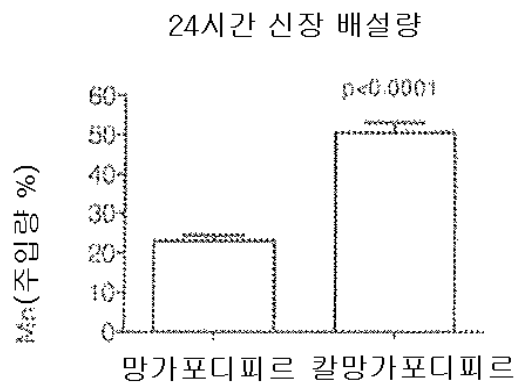


M = 0.8 Ca ; 0.2 Mn
 $C_{22}H_{27}MN_4Na_3O_{14}P_2$
 fwt: 745.43

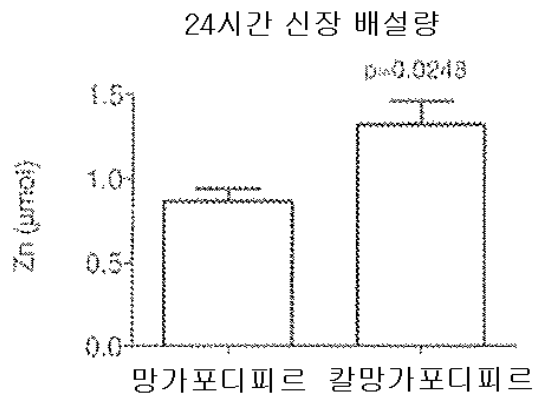
도면6a



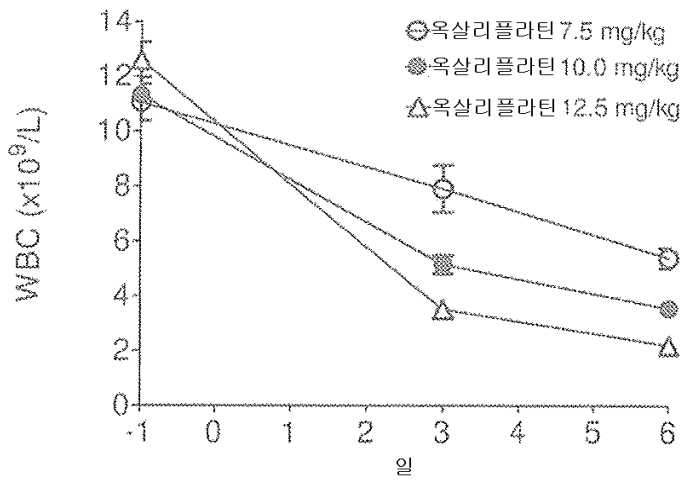
도면6b



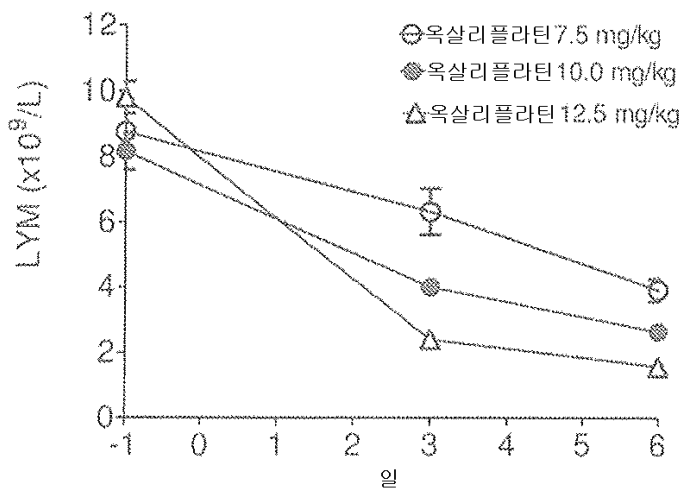
도면6c



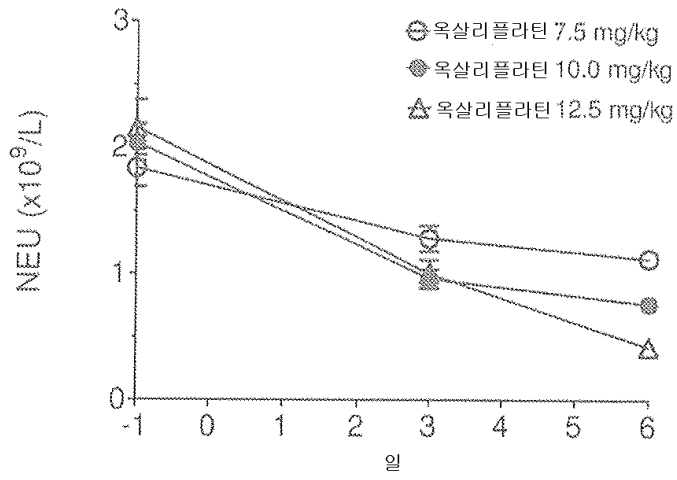
도면7a



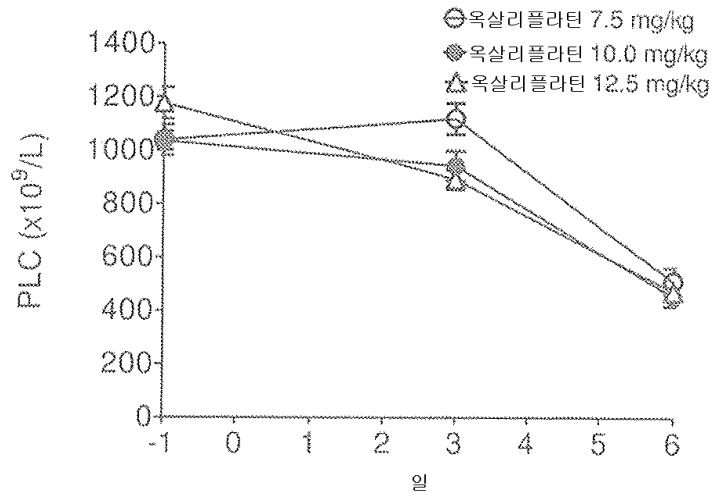
도면7b



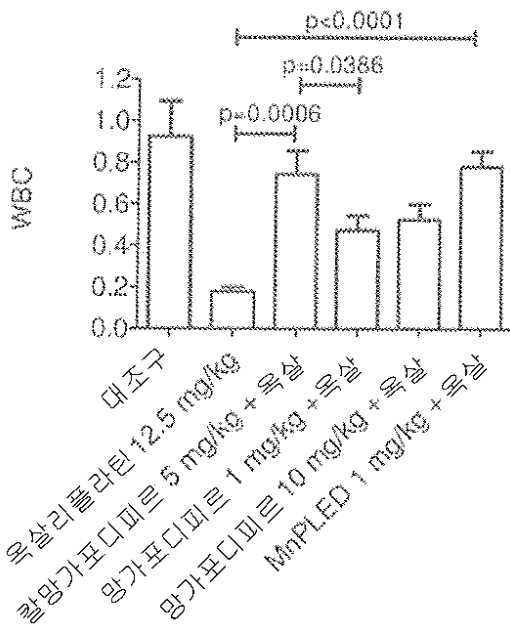
도면7c



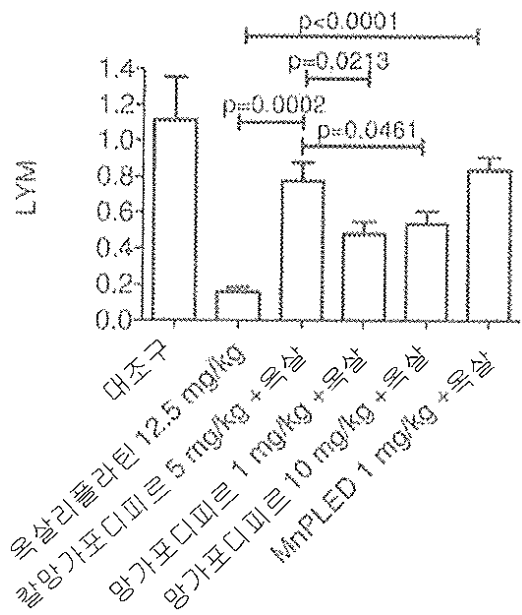
도면7d



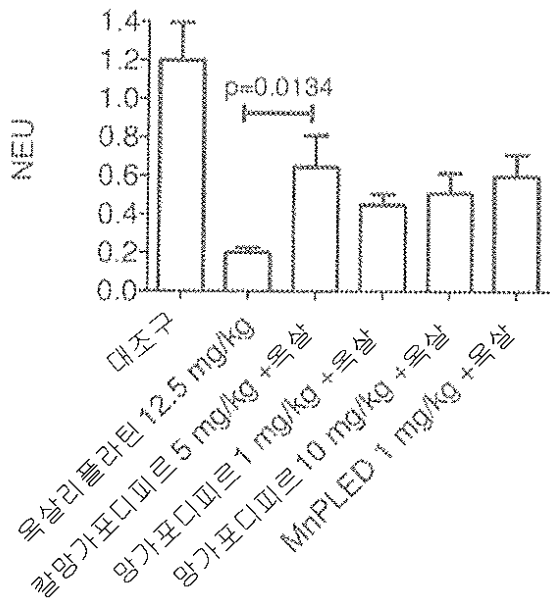
도면8a



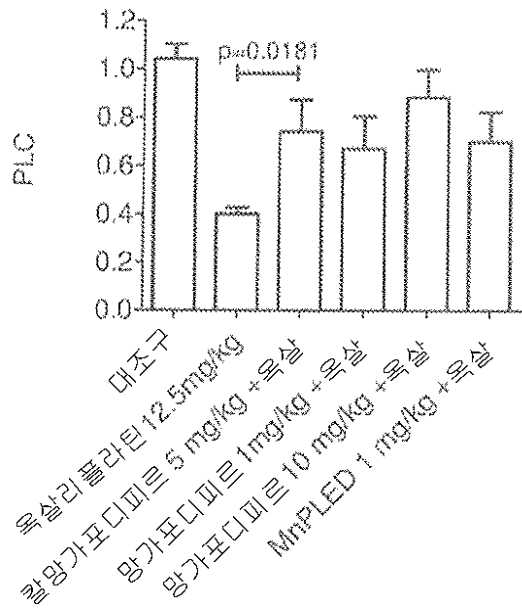
도면8b



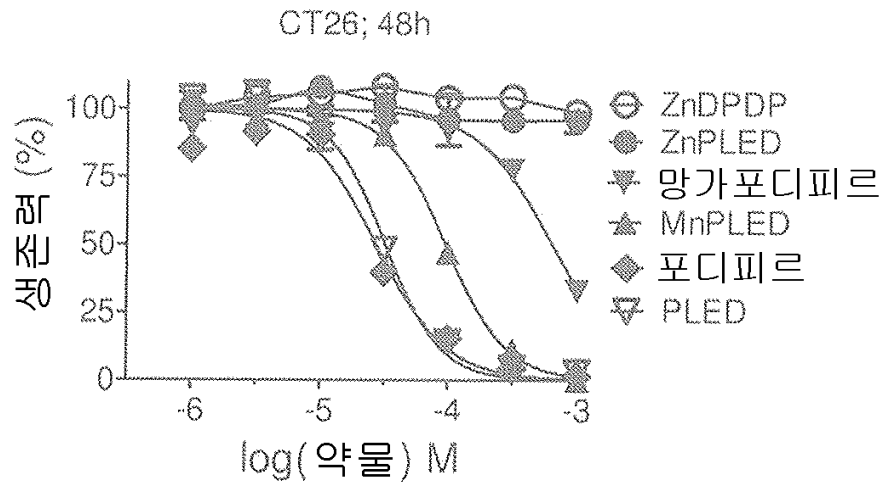
도면8c



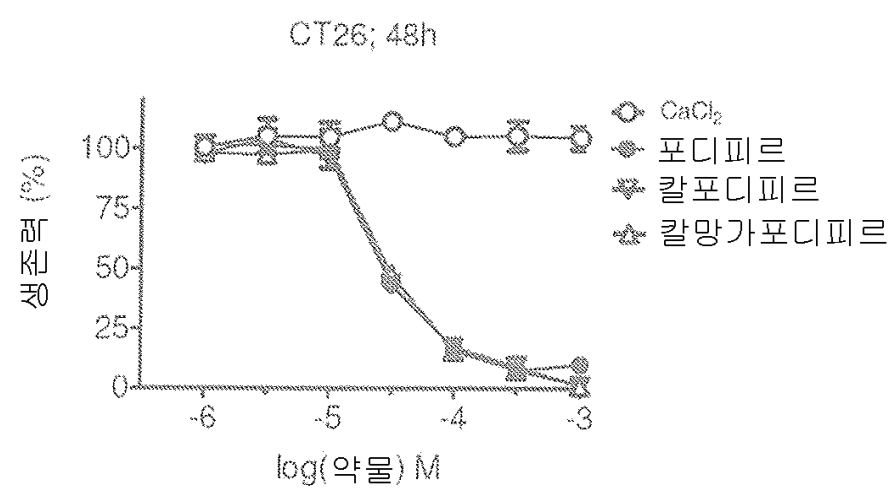
도면8d



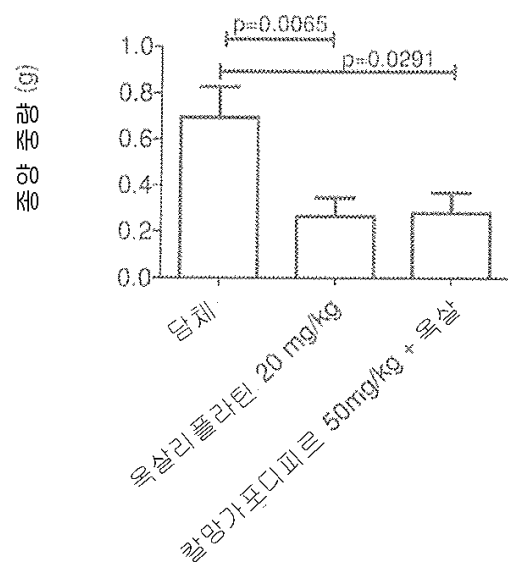
도면9a



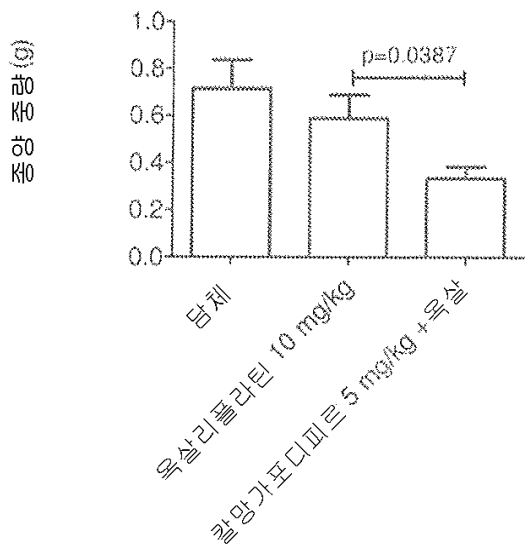
도면9b



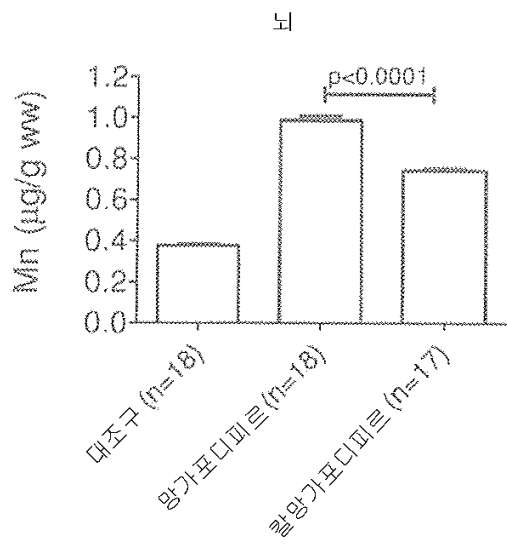
도면10a



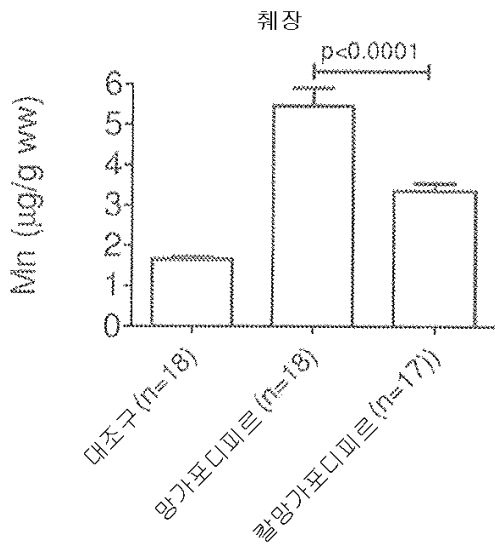
도면10b



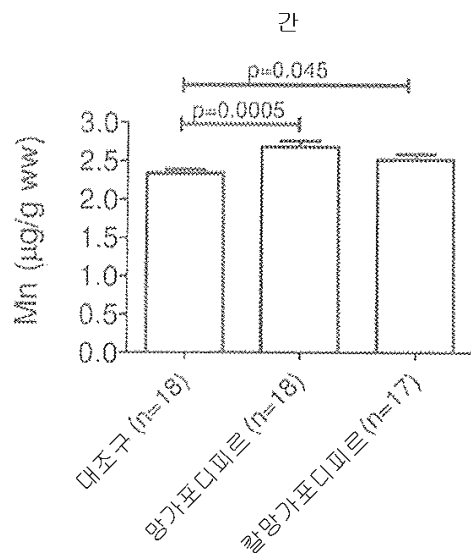
도면11a



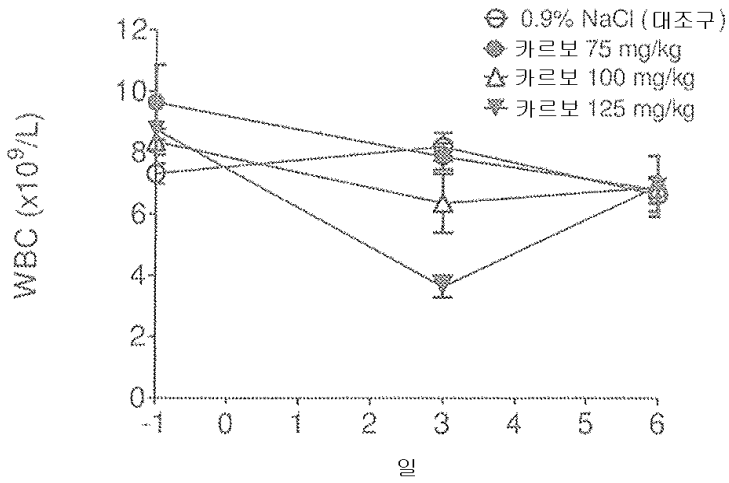
도면11b



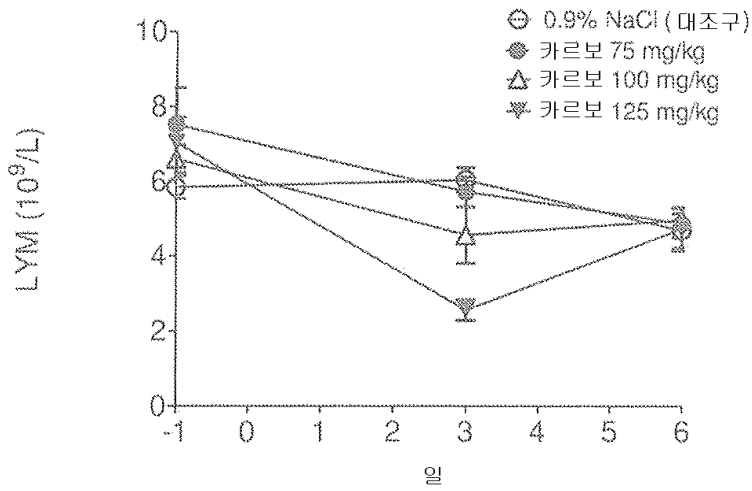
도면11c



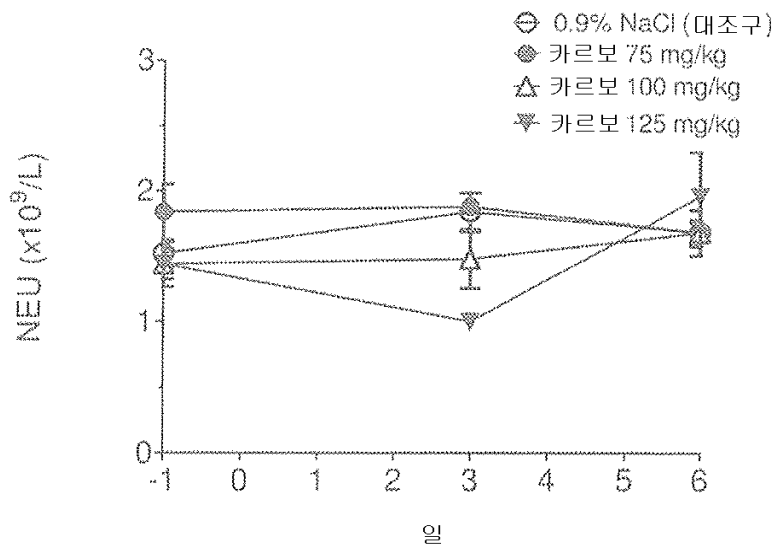
도면12a



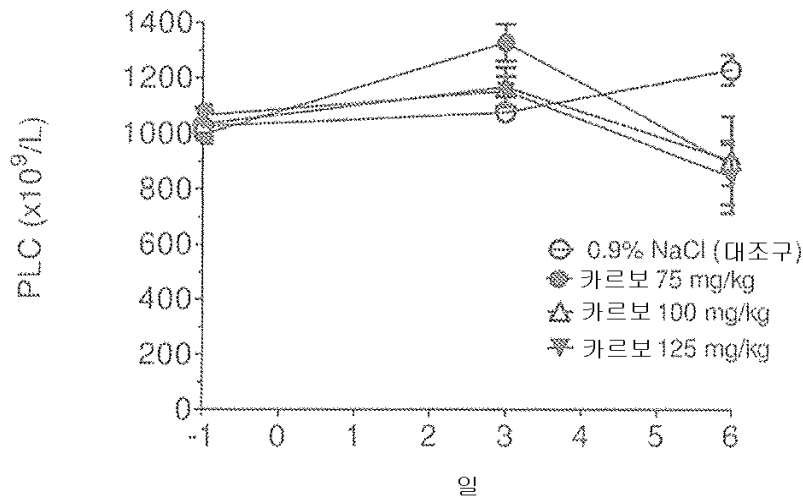
도면12b



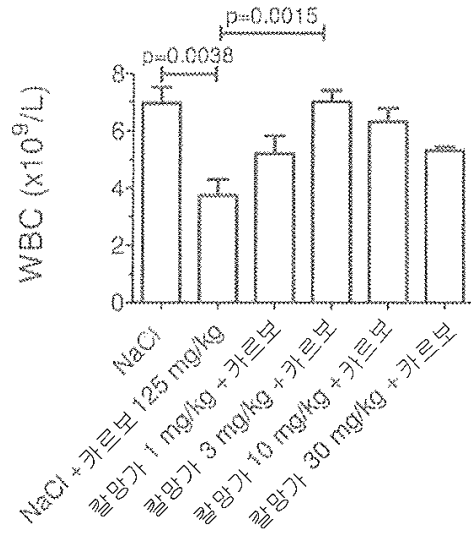
도면12c



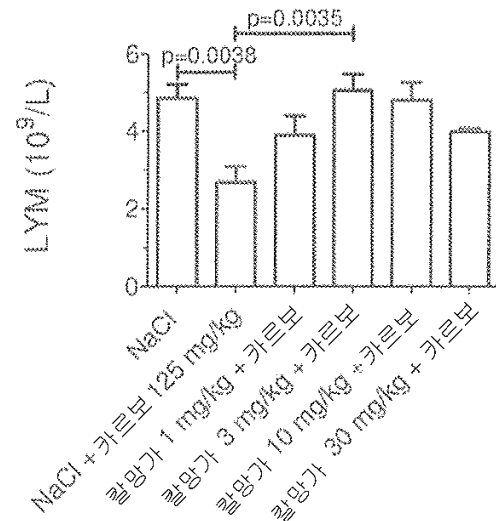
도면12d



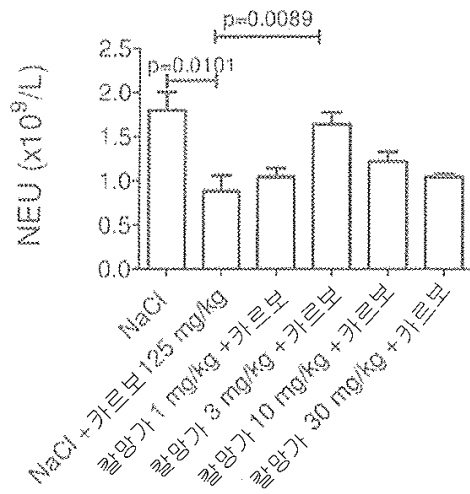
도면13a



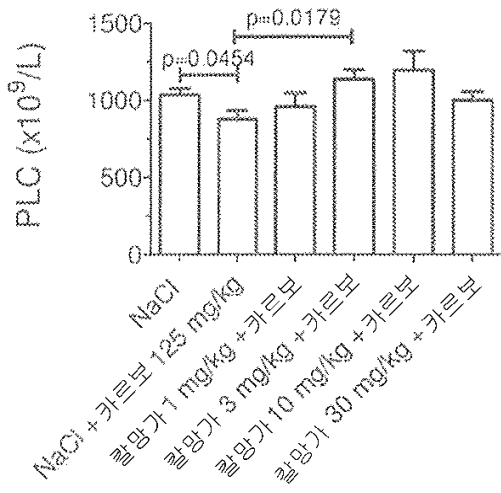
도면13b



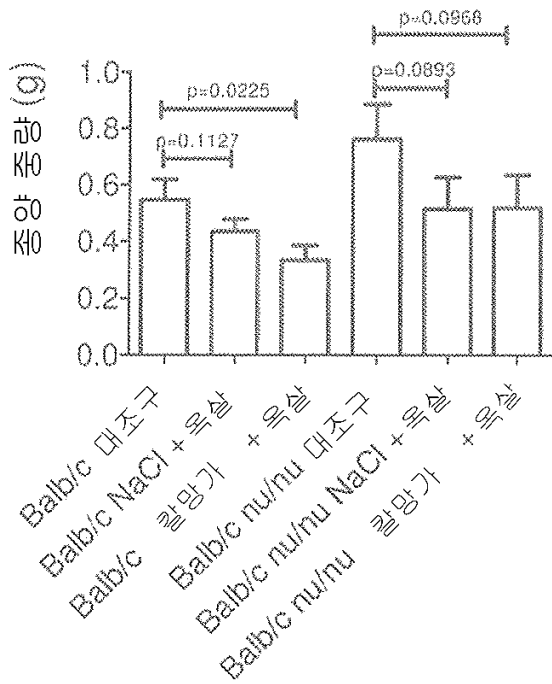
도면13c



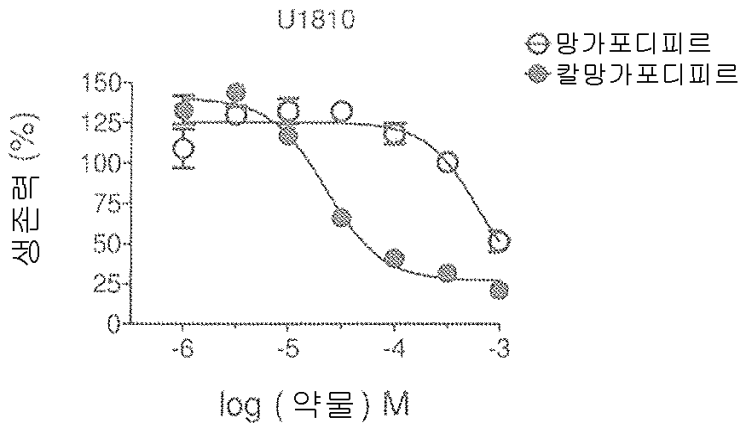
도면13d



도면14



도면15a



도면15b

