



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0010150
(43) 공개일자 2017년01월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 15/00 (2006.01) A61K 31/015 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01) C07C 13/60 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 15/0046 (2013.01)
A61K 31/015 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0100362
(22) 출원일자 2015년07월15일
심사청구일자 2015년07월15일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
지기환
울산광역시 중구 우정3길 9 104동 903호 (우정동, 선경1차아파트)
송영호
울산광역시 중구 서원1길 40-2 302호 (북산동, 신태양맨션)
(74) 대리인
특허법인태백

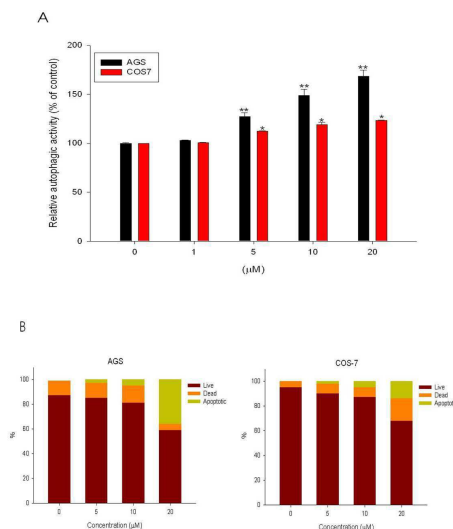
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 신규 페난트렌-루테늄 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 신규한 페난트렌-루테늄 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 상기 페난트렌-루테늄 화합물은 암 세포에서 Akt-mTOR 신호경로를 억제하고 카스파제 활성을 증가시켜, 암세포의 자가소화작용을 활성화시키고 아폽토시스 세포 사멸을 유도함으로써 암세포의 증식을 저해하는 뛰어난 항암활성을 나타내었으며, 기존의 항암제보다 낮은 농도에서도 우수한 항암활성을 나타내는 것이 확인됨에 따라, 본 발명의 페난트렌-루테늄 화합물은 암질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/555 (2013.01)

C07C 13/60 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-0493

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 자체조립을 이용한 초분자의 효과적 합성과 생화학적 응용

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

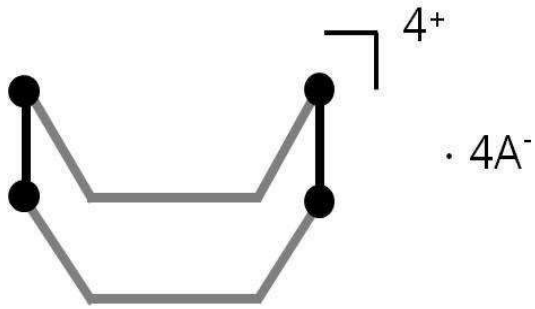
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 페난트렌-루테튬 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

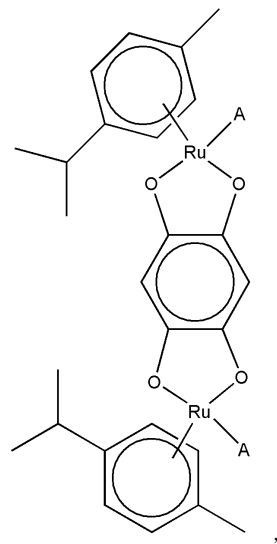
[화학식 1]



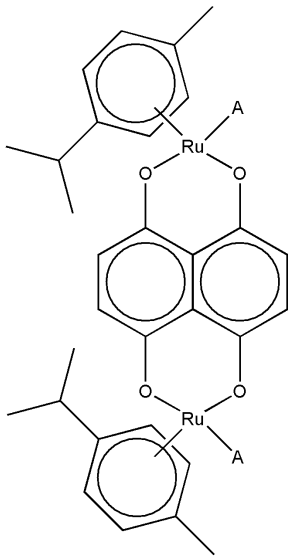
상기 화학식 1에서,



[화학식 2]

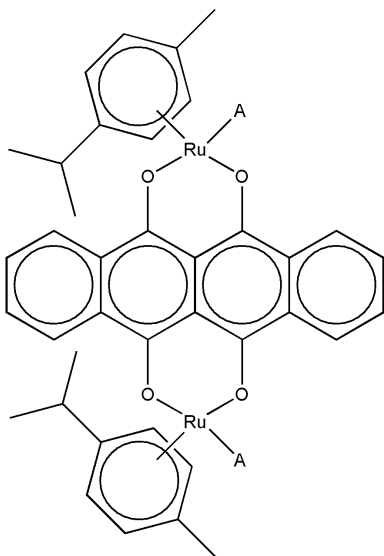


[화학식 3]



또는

[화학식 4]

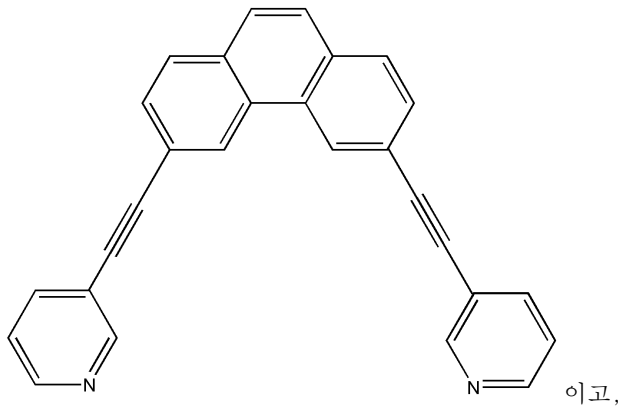


이고,

상기 화학식 2, 화학식 3 또는 화학식 4에서 A는 각각 독립적으로 OTf(trifluoromethylsulfonate), 니트레이트(NO_3), OTs(톨루엔-4-설포네이트), OMs(메탄설포네이트), Cl, Br, I, BF_4 , PF_6 , ClO_4 , CH_3COO 또는 CF_3COO 이며,



[화학식 5]



상기 화학식 2, 화학식 3 또는 화학식 4의 화합물에서 A가 떨어져 나가고 루테늄과 화학식 5의 방향족 고리 내의 질소원자가 결합하여 화학식 1의 화합물을 형성함.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 페난트렌-루테늄 화합물은 화학식 3의 화합물에서 A가 떨어져 나가고 루테늄과 화학식 5의 방향족 고리 내의 질소원자가 결합하는 것을 특징으로 하는 페난트렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항의 페난트렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 페난트렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암세포의 자가포식 및 아폽토시스 세포사멸을 유도하여 항암활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 암질환은 고형암인 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 고형암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 췌장교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 구강암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 직장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성 생식기종양, 음경암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 페난트렌-루테늄 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전이성 고형암에 대한 루테늄-기반 작은 분자의 임상실험이 성공적으로 평가됨에 따라, 항암제로써 나노 크기의 Ru(II)-기반 자가조립 구조에 대한 관심이 증가하였으며, 특히 루테늄-기반, 자가조립된 거대 2D 및 3D 구조를 항암제로 사용하는 기술에 대한 연구가 증가하였다.

- [0003] Therrien등은 유한 디자인과 나노 크기의 분자로 접근하기 위해, 유기금속 반-샌드위치 수용체 클립 및 피리딜-기반 공여체의 결합을 통한 자가조립을 이용하였다.
- [0004] 반-샌드위치 아렌-루테튬 복합체 기반의 나노구조는 암 치료제로 유망한 후보물질로 낮은 독성 및 친수성과 소수성의 균형과 같은 장점이 있으며, 특히 생물학적 매개를 전달하는데 중요한 역할을 할 수 있다.
- [0005] 또한, 페난트렌 유래 합성물 및 자연생성물은 세포독소, 식물독성 및 항염증성, 항균성, 항산화, 항혈소판 응집 및 항알레르기 활성과 같은 다양한 약학적 효과가 확인됨에 따라, 페난트렌 유래 공여체와 아렌-루테튬 기반 수용체를 이용한 새로운 나노 크기의 자가결합 구조는 기존의 항암화학요법과 비교하여 향상된 생물학적 결과를 기대할 수 있게 되었다.
- [0006] 페난트렌 유래 공여체와 아렌-루테튬 기반 수용체로 구성된 복합체는 상보적인 빌딩 블록으로 페난트렌 단위는 DNA와 상호작용하는 반면, 루테튬 중심은 단백질과 결합한다.
- [0007] 기존에는 안트라센(Anthracene), 나프탈렌 디이미드(naphthalenediimide), 카바졸(carbazole) 및 다른 많은 디피리딜 공여체들을 이용한 다양한 분자 구조의 자가결합은 우수한 항암 활성을 나타내었으나, 페난트렌 유도체와 루테튬 기반의 구조의 항암활성에 대해서는 보고된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 일본공개특허 2014-156403(2014.8.28)

발명의 내용

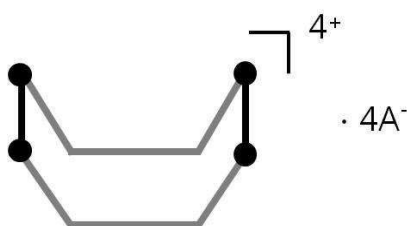
해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 신규한 페난트렌-루테튬 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 항암 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 페난트렌-루테튬 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

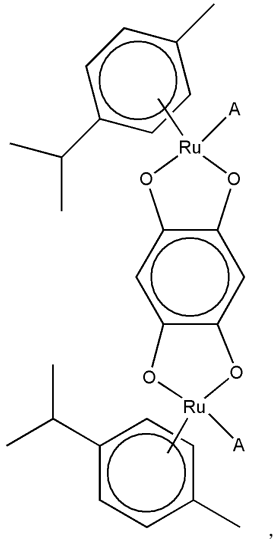
- [0011] [화학식 1]



- [0012]
- [0013] 상기 화학식에서,



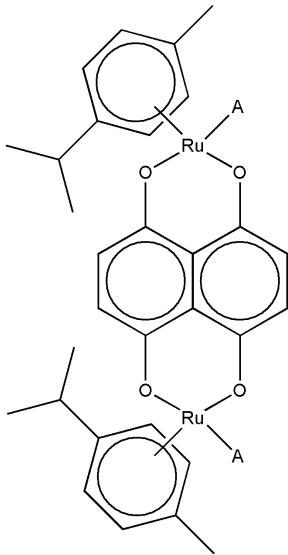
- [0014] 는
- [0015] [화학식 2]



[0016]

[0017]

[화학식 3]

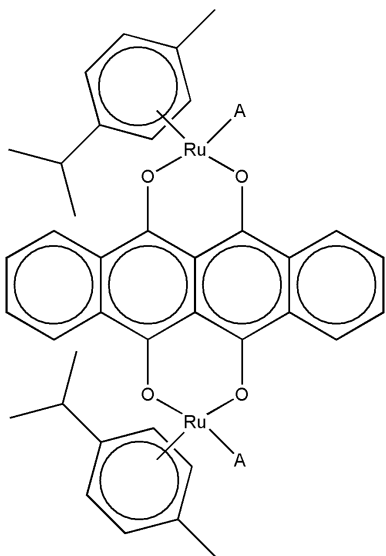


[0018]

[0019]

[화학식 4]

또는



[0020]

[0021]

이고,

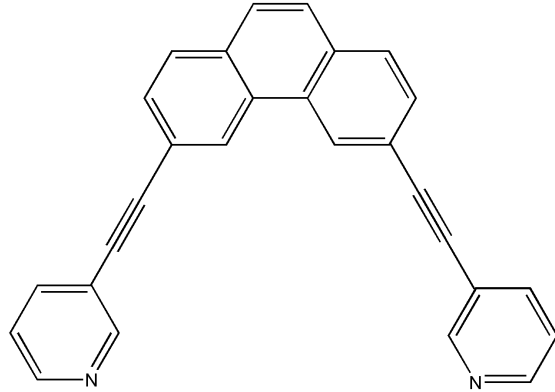
상기 화학식 2, 화학식 3 또는 화학식 4에서 A는 각각 독립적으로 OTf(trifluoromethylsulfonate), 니트레이트

(NO₃), OTs(톨루엔-4-설포네이트), OMs(메탄설포네이트), Cl, Br, I, BF₄, PF₆, ClO₄, CH₃COO 또는 CF₃COO이며,



는

[화학식 5]



이고,

상기 화학식 2, 화학식 3 또는 화학식 4의 화합물에서 A가 떨어져 나가고 루테늄과 화학식 5의 방향족 고리 내의 질소원자가 결합하여 화학식 1의 화합물을 형성한다.

또한, 본 발명은 상기 페난트렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

본 발명에 따른 페난트렌-루테늄 화합물은 암 세포에서 Akt-mTOR 신호경로를 억제하고 카스파제 활성을 증가시켜, 암세포의 자가소화작용을 활성화시키고 아폽토시스 세포 사멸을 유도함으로써 암세포의 증식을 저해하는 뛰어난 항암활성을 나타내었으며, 기존의 항암제보다 낮은 농도에서도 우수한 항암활성을 나타내는 것이 확인됨에 따라, 본 발명의 페난트렌-루테늄 화합물은 암질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 화합물 5-7의 전기분무 이온화 질량 분석(ESI-MS) 스펙트럼으로 A는 [5-30Tf]³⁺, B는 [6-30Tf]³⁺, C는 [7-30Tf]³⁺ 스펙트럼 결과이다.

도 2는 화합물 5의 X-ray 결정 구조를 두 방향에서 확인한 결과이다.

도 3은 AGS 및 COS7 세포 주에서 0, 1, 5, 10 및 20 μM 화합물 6을 24시간 처리하고 화합물 6에 의한 세포사멸 효과를 확인한 것으로, 도 3A는 화합물 6 처리에 따른 상대적 자가소화 활성을 확인한 결과이며, 도 3B는 화합물 6 처리에 따른 아폽토시스 세포사멸 효과를 확인한 결과이다.

도 4는 화합물 6에 의한 세포 사멸 조절 과정을 확인한 결과로, 도 4A는 화합물 6에 의해 유도되는 자가포식 반응에서 LC3 및 p62 단백질 수준을 확인한 결과이며, 도 4B는 AGS 및 COS7 세포 주에서 Akt 및 mTOR 발현 정도를 확인하여 화합물 6의 아폽토시스 및 자가포식 효과를 확인한 결과이다.

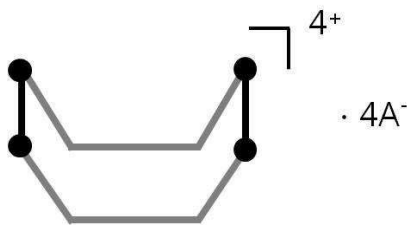
도 5는 화합물 6 처리된 AGS 세포에서 카스파제-3 활성을 확인한 결과이다.

도 6은 AGS 세포 배양 배지에서 사전 배양된 화합물 6의 성장 억제 활성 감소를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 페난트렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0030] [화학식 1]



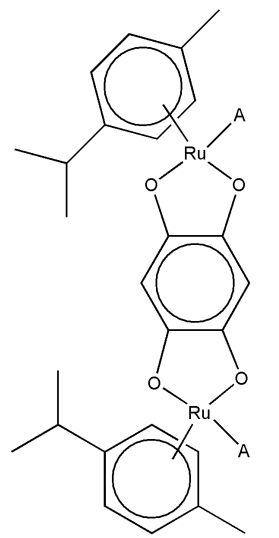
[0031]

[0032] 상기 화학식에서,



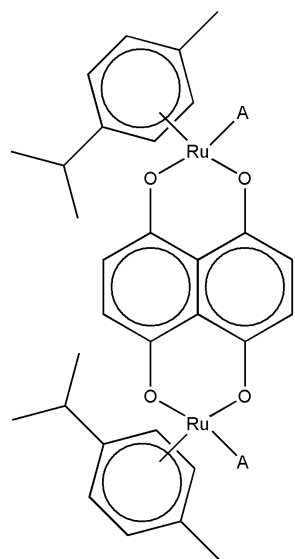
[0033] 는

[0034] [화학식 2]



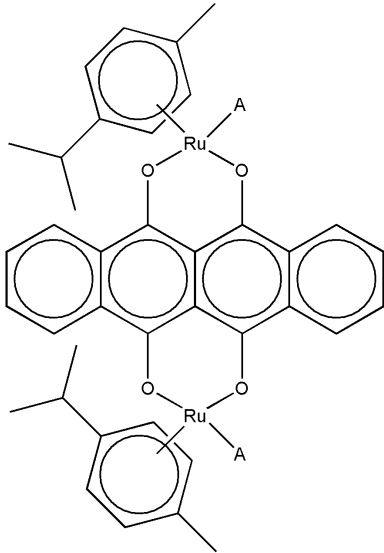
[0035]

[0036] [화학식 3]



[0037] 또는

[0038] [화학식 4]



[0039]

이고,

[0040]

상기 화학식 2, 화학식 3 또는 화학식 4에서 A는 각각 독립적으로 OTf(trifluoromethylsulfonate), 니트레이트(NO_3), OTs(톨루엔-4-설포네이트), OMs(메탄설포네이트), Cl, Br, I, BF_4 , PF_6 , ClO_4 , CH_3COO 또는 CF_3COO 이며,

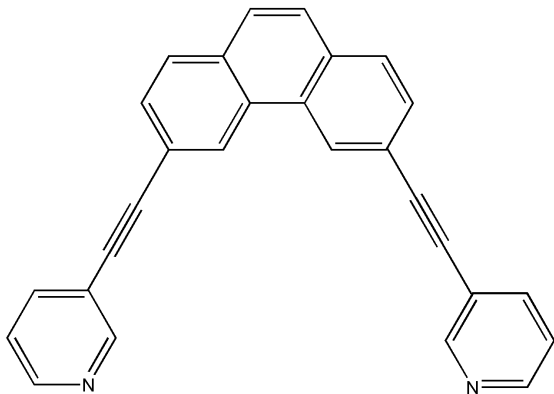
[0041]



는

[0042]

[화학식 5]



[0043]

이고,

[0044]

상기 화학식 2, 화학식 3 또는 화학식 4의 화합물에서 A가 떨어져 나가고 루테튬과 화학식 5의 방향족 고리 내의 질소원자가 결합하여 화학식 1의 화합물을 형성한다.

[0045]

보다 바람직하게는 상기 화학식 1로 표시되는 페난트렌-루테튬 화합물은 화학식 3의 화합물에서 A가 떨어져 나가고 루테튬과 화학식 5의 방향족 고리 내의 질소원자가 결합하는 것을 특징으로 하는 페난트렌-루테튬 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[0046]

본 발명의 페난트렌-루테튬 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 피마르산, 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.

[0047]

또한, 본 발명의 페난트렌-루테튬 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0048]

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.

- [0049] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 화합물 5 내지 화합물 7과 같은 페난트렌-루테늄 화합물은 HCT-15(직장암세포주), SK-hep-1(간암세포주) 및 AGC(위암세포주) 세포에서 Akt-mTOR 신호경로를 억제하고 카스파제 활성을 증가시켜, 암세포의 자가소화작용 및 아폽토시스 세포 사멸을 유도함으로써 암세포의 증식을 저해하는 뛰어난 항암활성을 나타내었으며, 특히 AGS 세포에서 시스플라틴(cisplatin)은 100 μ M 이상의 농도에서 IC₅₀ 값을 나타낸 반면, 화합물 6이 처리된 AGS 세포의 IC₅₀ 값은 독소루비신보다 3.2배 낮은 것이 확인됨에 따라, 기존의 항암제보다 낮은 농도에서도 높은 항암활성을 나타낸 것이 확인되었다.
- [0050] 따라서 본 발명은 화학식 1의 페난트렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0051] 상기 페난트렌-루테늄 화합물은 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암세포의 자가포식 및 아폽토시스 세포 사멸을 유도하여 항암활성을 나타낼 수 있다.
- [0052] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 약학조성물은 약학조성물 100 중량부에 대하여 화학식 1의 페난트렌-루테늄 화합물을 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, 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 달라질 수 있다.
- [0053] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학조성물은 담체, 부형제, 봉해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0054] 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 윤활제들도 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 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 약학조성물의 제형은 과립제, 산제, 피
- [0056] 복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 일실시예에 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.
- [0058] 상기 약학조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 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.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 암질환은 고형암일 수 있으며, 상기 고형암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 췌장교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 구강암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비

소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 직장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성 생식기종양, 음경암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 직장암, 간암 또는 위암의 치료에 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 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.

[0062] <참고예> 출발물질 합성 및 NMR 분석방법

[0063] 모든 화학 약품을 구매하여 추가 정제 없이 사용하였으며, 모든 용액은 표준방법에 따라 희석하여 사용하였다.

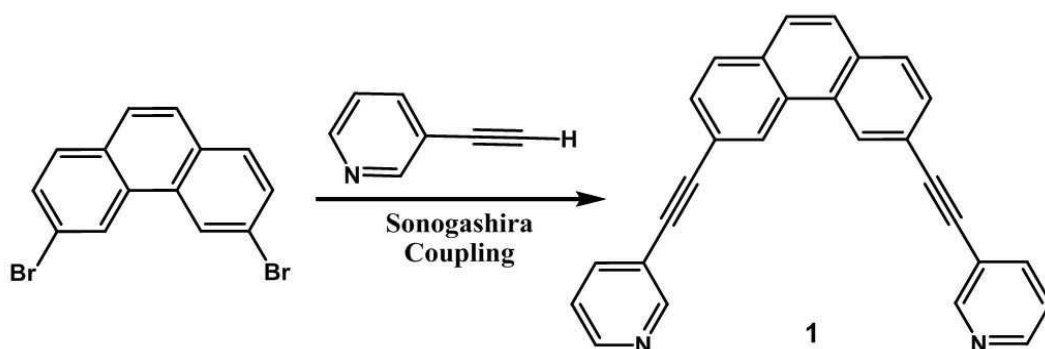
[0064] 본 실험에 사용된 아렌-루테늄 엑셉터 클립은 중래 문헌(Therrien B, Suss-Fink G, Govindaswamy P, Renfrew AK, Dyson PJ. 2008, 47, 3773-3776. ; Barry NPE, Furrer J, Therrien B. 2010, 93, 1313-1328), 3,6-디브로모페난트렌은 중래 문헌(Nakamura Y, Tsuihiji T, Mita T, Minowa T, Tobita S, Shizuka H, Nishimura J. 1996, 118, 1006-1012)에 따라 합성되었다.

[0065] ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Bruker 300 MHz 스펙트로미터에서 기록되었다. 자가조립에 대한 질량 스펙트럼은 MassLynx 작동 시스템으로 전자스프레이 이온화를 이용한 Micromass Quattro II triple-quadrupole 질량 스펙트로미터 상에서 기록되었다.

[0066] <실시예 1> 디피리딜 페난트렌 공여체(화합물 1) 합성

[0067] 하기 반응식 1과 같은 과정으로 공여체 화합물 1을 합성하였다.

[0068] [반응식 1]



[0069]

[0070] 3,6-디브로모페난트렌(89.6 mg, 0.267 mmol), 3-에티닐피리딘(63.3 mg, 0.613 mmol), CuI(2.5 mg, 0.013 mmol), $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ (11.2 mg, 0.016 mmol), 및 PPh_3 (4.2 mg, 0.016 mmol)을 둥근 바닥 플라스크에 넣고, THF(5 mL) 및 트리에틸아민(5 mL)을 첨가하여 10분간 N_2 로 거품을 내었다.

[0071] 상기 반응 혼합물을 질소하에서 2일 동안 환류시키고 냉각시킨 후, 감압하에서 용매를 제거하였다. 남은 잔여물을 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 흰색 고체인 화합물 1을 얻었다.(수율 48%, 도 1 참조)

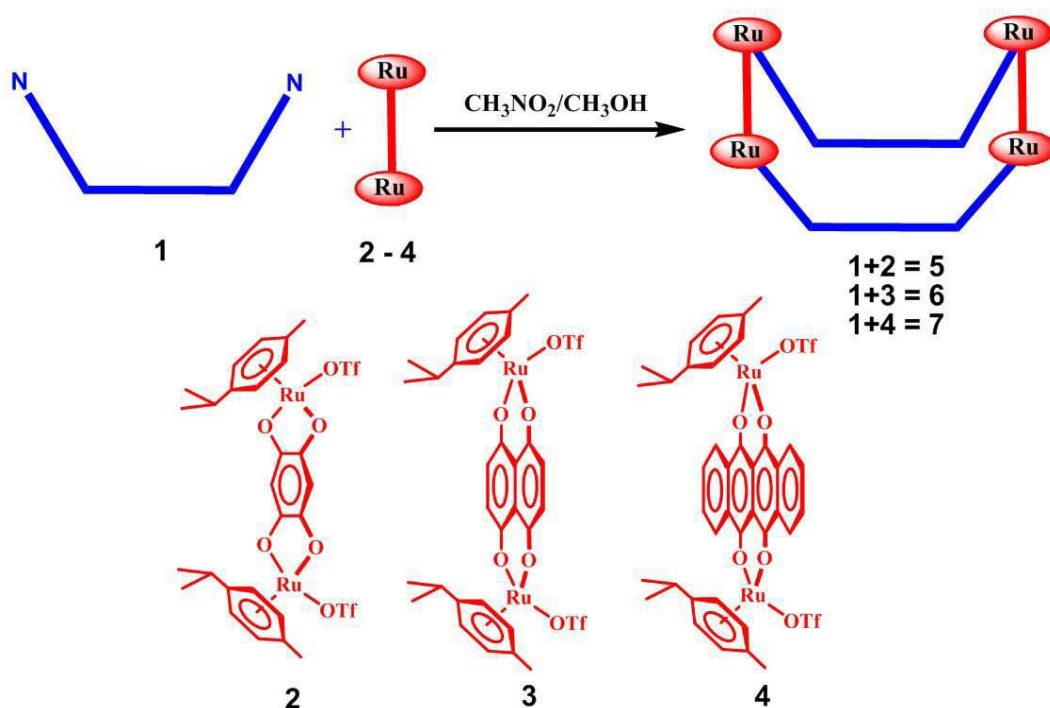
[0072] Mp: 221-223 $^{\circ}\text{C}$. Anal. calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{16}\text{N}_2$: C, 88.40; H, 4.24; N, 7.36. Found: C, 88.12; H, 4.22; N, 7.40. ^1H NMR (300 MHz, $\text{CD}_3\text{NO}_2/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 9.03 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.82 (dd, J = 1.8, 0.9 Hz, 1H), 8.56 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H),

7.82 (dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 1H), 7.51 (ddd, $J = 7.9, 4.8, 0.9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 152.17, 148.53, 138.99, 132.33, 129.82, 129.69, 129.04, 127.83, 126.74, 123.45, 121.04, 120.75, 93.57, 86.91. HRMS for $\text{C}_{28}\text{H}_{16}\text{N}_2$: calcd., 380.1313; observed, 380.1314.

[0073] <실시예 2> 화합물 5 내지 7 합성

[0074] 하기 반응식 2와 같은 과정으로 화합물 5 내지 7을 합성하였다.

[0075] [반응식 2]



[0076]

[0077] 니트로메탄/메탄올(1:1 부피비) 1.5 mL에 공여체인 화합물 1과 아렌-Ru(II) 수용체 2, 3 및 4를 각각 첨가하고 6시간 동안 실온에서 교반하여 깨끗한 용액을 얻었다. 상기 용액에 디에틸 에테르를 한 방울씩 첨가하여 침전물을 생성하였다. 상기 침전물을 디에틸 에테르로 두 번 세척하여 원심분리하고 결정체 분말로 건조시켜 순수한 분자 볼(bowls) 5 내지 7을 얻었다.

[0078] 1. 화합물 5 합성

[0079] 페난트렌 공여체 1(화합물 1; 1.14 mg, 0.003 mmol) 및 수용체 2(2.72 mg, 0.003 mmol)를 이용하여 상기 동일한 과정으로 자가조립하여 어두운 적색의 결정형 분말인 분자 볼 5(화합물 5)를 얻었다.(수율 92%, 도 2 참조)

[0080] Mp: 233–235 $^{\circ}\text{C}$ (dec.). Anal. calcd. for $\text{C}_{112}\text{H}_{92}\text{F}_{12}\text{N}_4\text{O}_{20}\text{Ru}_4\text{S}_4$: C, 52.25; H, 3.60; N, 2.18. Found: C, 52.39; H, 3.59; N, 2.17. ^1H NMR (300 MHz, $\text{CD}_3\text{NO}_2/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 8.41 (s, 2H), 8.37 (s, 2H), 8.24 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 7.53–7.36 (m, 8H), 6.07 (d, $J = 6.3$ Hz, 4H), 5.84 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 2.91 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.22 (s, 6H), 1.35 (d, $J = 6.9$ Hz, 12H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CD}_3\text{NO}_2/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 184.77, 155.68, 152.58, 142.90, 133.28, 130.20, 129.95, 129.68, 128.69, 127.05, 124.31, 124.03, 120.62, 119.80, 105.49, 102.82, 100.41, 97.07, 84.69, 84.65, 82.76, 32.54, 22.46, 18.29. ESI-MS for $\text{C}_{109}\text{H}_{92}\text{F}_{12}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{Ru}_4\text{S}$: calcd., 709.42 [$5-3\text{OTf}$] $^{+3}$; observed, 709.32.

[0081] 2. 화합물 6 합성

[0082] 페난트렌 공여체 1(화합물 1; 1.14 mg, 0.003 mmol) 및 수용체 3(2.87 mg, 0.003 mmol)를 이용하여 상기 동일한 과정으로 자가조립하여 녹색의 결정형 분말인 분자 볼 6(화합물 6)을 얻었다.(수율 90%)

[0083] Mp: 238-239 °C (dec.). Anal. calcd. for $C_{120}H_{96}F_{12}N_4O_{20}Ru_4S_4$: C, 53.89; H, 3.62; N, 2.09. Found: C, 53.81; H, 3.63; N, 2.10. ^1H NMR (300 MHz, CD_3NO_2/CD_3OD) δ 8.50 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 8.38 (s, 2H), 8.20 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 8.16 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.44-7.32 (m, 6H), 7.26 (s, 4H), 5.84 (d, J = 6.3 Hz, 4H), 5.59 (d, J = 6.3 Hz, 4H), 2.89 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 2.14 (s, 6H), 1.34 (d, J = 6.9 Hz, 12H). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3NO_2/CD_3OD) δ 171.91, 154.93, 151.80, 142.60, 138.66, 133.19, 130.32, 129.86, 129.72, 128.60, 127.03, 126.44, 123.83, 120.72, 119.81, 112.59, 104.81, 101.26, 96.42, 85.65, 85.00, 83.73, 31.94, 22.40, 17.43. ESI-MS for $C_{117}H_{96}F_3N_4O_{11}Ru_4S$: calcd., 742.77 [$6-30Tf$] $^{+3}$; observed, 742.95.

[0084] 3. 화합물 7 합성

[0085] 페난트렌 공여체 1(화합물 1; 1.14 mg, 0.003 mmol) 및 수용체 4(3.17 mg, 0.003 mmol)를 이용하여 상기 동일한 과정으로 자가조립하여 어두운 녹색의 결정형 분말인 분자 볼 7(화합물 7)을 얻었다.(수율 94%)

[0086] Mp: 240-241 °C (dec.). Anal. calcd. for $C_{136}H_{104}F_{12}N_4O_{20}Ru_4S_4$: C, 56.82; H, 3.65; N, 1.95. Found: C, 56.89; H, 3.64; N, 1.96. ^1H NMR (300 MHz, CD_3NO_2/CD_3OD) δ 8.74 (dd, J = 5.8, 3.3 Hz, 4H), 8.60 (s, 2H), 8.21 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 8.16 (s, 2H), 8.06 (dd, J = 5.8, 3.3 Hz, 4H), 7.98 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.34 (s, 2H), 7.19 (dd, J = 8.1, 5.7 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.04 (d, J = 6.3 Hz, 4H), 5.75 (d, J = 6.3 Hz, 4H), 3.05 (dt, J = 13.9, 6.9 Hz, 2H), 2.26 (s, 6H), 1.39 (d, J = 6.9 Hz, 12H). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3NO_2/CD_3OD) δ 170.33, 155.58, 151.69, 141.96, 134.87, 134.26, 133.06, 130.03, 129.82, 129.43, 128.54, 128.32, 126.83, 126.35, 123.52, 120.53, 119.80, 108.27, 104.42, 101.34, 96.15, 85.75, 84.80, 83.11, 32.07, 22.56, 17.92. ESI-MS for $C_{133}H_{104}F_3N_4O_{11}Ru_4S$: calcd., 809.46 [$7-30Tf$] $^{+3}$; observed, 809.49.

[0087] 4. 화합물 5 내지 7의 특징 확인

[0088] 상기 방법으로 합성된 신규한 화합물 5-7의 특징을 ^1H 및 ^{13}C NMR, 전기분무 이온화 질량 분석(ESI-MS) 및 성분 분석을 통하여 확인하였으며, 복합체 5의 고체 상태 구조를 단결정 X-ray 분석으로 확인하였다.

[0089] $CD_3OD/CD_3NO_2(1/1)$ 내 ^1H NMR 스펙트럼을 통하여 상기 실시예 2에서 합성된 화합물 5-7 분자에서 자유 공여체와 수용체의 금속 리간드 결합에 비례한 전형적인 공진 이동(resonance shifts)이 확인되었다.

[0090] 도 1을 참고하면 공여체 1의 α -피리딜 양성자가 수용체 2-4와 복합체를 형성하면서 0.4-0.6 ppm 업필드 이동되었으며, 페난트렌 단위와 관련된 ^1H NMR 피크 역시 유의하게 업필드 이동되었다.

[0091] 또한 전기분무 이온화 질량 분석(ESI-MS) 결과, 화합물 5, 6, 및 7의 동위원소 분포 피크가 각각 m/z 709.32, 742.96 및 809.49에서 확인되었으며 각각의 $[M-30Tf]^{3+}$ 와 일치하였으며, 상기 결과는 화합물 5-7의 이론적인 동위원소 분포 패턴과 동일한 것으로 확인되었다.

[0092] X-선 구조 분석

[0093] 화합물 5의 분자 구조를 단결정 X-ray 분석방법으로 명확하게 확인하였다.

[0094] 단결정에 부착된 루프로부터 회절 데이터를 포함 가속기 연구소(PAL)에서 Macromolecular Crystallography

Beamline 2D의 100 K에서 싱크로트론 방사선($\lambda=0.80000\text{\AA}$)을 이용한 ADSC 양자 210 CCD 회절미터상에서 수집하였다.

[0095] 초기 데이터를 HKL2000 프로그램을 이용하여 가공 및 축소하였다. 구조는 직접적인 방법에 의해 규명되었고, SHELXTL 프로그램 패키지에 있는 적절한 소프트웨어를 이용하여 F^2 상에 fullmatrix least-squares refinement로 정련하였다.

[0096] 화합물 5의 X-선 데이터: $C_{113} H_{96} F_{12} N_4 O_{21} Ru_4 S_4$, $M = 2606.46$, triclinic, P , $a = 16.457(3)\text{\AA}$, $b = 18.067(4)\text{\AA}$, $c = 22.099(4)\text{\AA}$, $\alpha = 68.36(3)^\circ$, $\beta = 81.25(3)^\circ$, $\gamma = 64.86(3)^\circ$, $V = 5527.2(19)\text{\AA}^3$, $Z = 2$, $T = 100\text{ K}$, $\mu(\text{synchrotron}) = 0.504\text{ mm}^{-1}$, $\rho_{\text{calcd}} = 1.566\text{ g cm}^{-3}$, 26273 reflections measured, $R1 = 0.0670$ 및 $wR2 = 0.2255$ for 26273 reflections ($I > 2\sigma(I)$), $R1 = 0.1163$ 및 $wR2 = 0.2834$ (all data), $GoF = 1.233$, 1498 파라미터 및 195 restraints, CCDC:1062887.

[0097] 모든 비-수소 원자는 이방성으로 정련되고, 수소 원자는 기하학상 이상적인 위치에 가해졌다.

[0098] 그 결과, 도 2와 같이 두 개의 페난트렌 단위는 대략 $3.5\text{ \AA}$ 의 거리에서 강한 pi-pi 상호작용을 통해 쌓여 있는 것이 확인되었으며, 페난트렌 단위 사이의 강한 pi-pi 상호작용은 볼(bowl)과 같은 모양의 분자를 형성한다.

[0099] 평균 Ru-N 피리딘 밴드 거리는 $2.11\text{ \AA}$ 이며, 다른 4핵 구조와 유사한 것으로 확인되었다.

[0100] <실험예 1> 실험 방법 및 물질

[0101] 1. 세포 배양 및 시약

[0102] 사람 대장암 세포 HCT-15, 사람 간암 세포 SK-hep-1, 사람 위암 세포 AGS 및 원숭이 섬유아세포 COS-7를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. HCT-15, AGS, 및 COS-7 세포는 DMEM(Dulbecco' modified Eagle' medium)배지에, SK-hep-1 세포는 RPMI 1640 배지에 5% 태아소혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가하여 37°C , 5% CO_2 하에서 배양하였다.

[0103] 2. 세포 생존도 분석

[0104] 각 세포를 96-웰 플레이트에 분주하고 37°C 에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그 후, 일정시간 동안 각 화합물로 처리하여 배양한 후, 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(MTT) 용액 $10\text{ }\mu\text{L}$ 을 처리하여 37°C , 5% CO_2 하에서 4시간 동안 배양하였다.

[0105] 배양기간 동안 형성된 포르마잔을 $100\text{ }\mu\text{L}$ DMSO를 처리하여 용해시키고 마이크로플레이트 리더기로 550nm 에서 흡광도를 측정하였다.

[0106] 세포 성장에 대한 반 최고치 억제 농도(IC_{50}) 값은 선형 회귀 함수를 사용하여 약물 농도의 로그에 대한 생존한 세포의 백분율의 플롯을 피팅함으로써 측정되었다.

[0107] 3. 자기소화액포 라벨링

[0108] 화합물 5 내지 7의 자가소화작용 활성을 형광 MDC(monodansylcadaverine) 염색으로 확인하였다.

[0109] 세포를 RPMI 1640 배지에서 37°C , 10분 동안 0.05 mM MDC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 염색하고 세 번 반복하여 PBS로 세척한 후, 즉시 필터시스템(V-2A excitation filter, $380/420\text{ nm}$; barrier filter, 450 nm)을 갖춘 형광현미경(Nippon Eclipse TE 300, Tokyo, Japan)으로 확인하였다.

[0110] 4. 세포 이미지 분석

[0111] Tali[®] Image-Based Cytometer(Invitrogen)를 이용하여 아파토시스 분석을 수행하였다. AGS 및 COS-7 세포에 0

내지 20 μM 농도의 화합물 6을 처리하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 하에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, Countess[®] Automated Cell Counter를 이용하여 세포의 수를 측정하였다. TrypLE[™] 시약으로 세포를 수확하고 Tali[®] 아팜토시스 키트로 염색하였다. 아팜토시스 세포사멸을 확인하기 위해 세포를 아넥신 V-Alexa Fluor[®] 488 conjugate로 염색하였으며, 죽은 세포를 구별하기 위해 프로피디움 아이오다이드(PI)를 이용하였다. Tali[®] 분석기에 따른 살아있는 세포, 아팜토시스 세포 및 죽은 세포의 개체 퍼센트를 동일한 시료로 유세포 분석기를 통해 각각 측정하여 얻은 데이터와 비교하였다.

5. 웨스턴 블롯

배양된 세포를 차가운 PBS로 세척하고 RIPA 용해 버퍼(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 용해시켜 단백질을 추출물을 얻었으며, protein assay kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질 농도를 측정하였다.

소혈청알부민(Bovine serum albumin; BSA)을 표준 곡선으로 사용하였으며, 각 단백질을 동일한 양(20 μg)으로 10% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 수행하여 분해하였다. 그 후, 이모빌론[®]-P 폴리비닐리덴 다이플루오라이드 막(Amersham, Arlington Heights, IL, USA)에 옮기고 하룻밤 동안 1차 항체로 인큐베이트하였다.

그 후, 상기 막에 호레디쉬 퍼옥시다아제가 결합된 2차 항체를 결합시키고 chemiluminescence (ECL) kit (Amersham)를 이용하여 시각화하였다.

6. 카스파제-3 활성 분석

AGS 세포를 바닥이 투명한 96-웰 플레이트에 분주하였다. 카스파제-3 활성을 Caspase-Glo₃ Assay kit (CG3 kit, Promega, Mannheim, Germany)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 측정하였다.

CG3 분석은 빛을 발생시키는 기질의 특정 서열이 카스파제-3에 의해 절단되면서 발생하는 발광 신호를 통하여 분석하는 방법으로, 형광 발광은 Mikrowin 2000 Plate Reader (Tecan, Switzerland)를 이용하여 485 nm 여기 파장과 527 nm 방출파장에서 측정되었다.

<실험예 2> 암세포에 대한 세포독성 확인

앞선 실시예에서 합성된 각각의 유기금속 다핵성 아렌-루테늄(II) 화합물들의 암세포에 대한 세포독성을 확인하기 위해, 사람 암세포인 HCT-15, SK-hep-1 및 AGS 세포에 공여체인 화합물 1과 화합물 5-7을 처리하고 각 세포의 IC_{50} 값을 측정하였다.

그 결과, 표 1과 같이 공여체 1 및 화합물 5-7은 모든 세포에서 강한 항암효과를 나타내었다. 특히, 화합물 6을 처리한 AGS 세포의 IC_{50} 값이 독소루비신보다 3.2배 낮았다. 시스플라틴(cisplatin)은 AGS 세포에서 100 μM 이상의 농도에서 IC_{50} 값이 나타났으며, 다른 세포들과 비교하였을 때 위암에서 항암효과가 가장 낮은 것으로 확인되었다.

상기 결과로부터 사람 위암 세포인 AGS 세포 주를 선택하여 화합물 5-7의 항암 능력을 추가 분석하였다.

표 1

화합물	IC_{50} [μM] ^[a]		
	HCT-15	SK-hep-1	AGS
1	>100	>100	>100
5	>100	>100	>100
6	3.8 ± 0.15	9.0 ± 0.18	2.5 ± 0.34
7	70.1 ± 1.67	62.9 ± 2.07	68.6 ± 1.33

Cisplatin	72.4±9.42	41.1±5.92	>100
Doxorubicin	22.4±4.88	13.6±3.02	7.96±1.40

^[a] IC₅₀ : 세포 생존력의 50% 가 억제되기 위해 요구되는 약물의 농도

<실험예 3> 화합물 6의 세포독성 확인

앞선 실험 결과인 AGS 세포에서 화합물 6의 세포독성 효과가 자가소화작용 또는 아폽토시스 세포 사멸에 의한 것인지를 확인하기 위해, 상대적 자가소화 활성을 확인하였다.

녹색 형광 단백질(GFP)-형질도입된 세포는 Tali[®] Viability Kit를 이용하여 염색되었으며, AGS 위암 세포 및 COS-7 정상 원숭이 신장섬유아 세포의 죽은 세포는 적색으로 염색되었다.

그 결과 도 3A를 참고하면, 5, 10 및 20 μ M 농도의 화합물 6이 처리된 세포군에서 비처리된 세포군과 비교하여 AGS 세포의 자가소화 활성이 각각 27.1, 48.6 및 68.4%로 유의하게 증가하였으며, 정상세포인 COS-7 세포 역시 비처리된 세포와 비교하여 각각 12.5, 18.9 및 23.3%로 자가소화 활성이 증가된 것을 확인하였다.

특히, 20 μ M 농도의 화합물 6이 처리된 AGS 세포의 자가소화 활성이 정상 세포와 비교하여 1.4 배 증가한 것으로 확인되었다.

또한, 도 3B를 참고하면 AGS 세포에서 화합물 6의 농도 의존적으로 아폽토시스 세포 사멸이 유도된 반면, 동일한 양의 화합물 6가 처리된 COS-7 정상세포에서는 AGS 세포보다 생존한 세포의 비율이 매우 높게 나타났으며, 이에 따라 정상세포에서는 화합물 6의 민감도가 낮은 것으로 확인되었다.

상기 결과로부터 화합물 6은 정상 섬유아세포의 자가소화 또는 세포사멸 변화없이 자가소화 활성 및 아폽토시스 세포사멸의 유도를 통하여 암세포의 선택적으로 세포독성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

<실험예 4> 화합물 6의 자가포식 및 세포사멸 유도 확인

화합물 6으로 자가소화작용이 활성화된 AGS 세포에서 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 자가포식의 선택적 타겟인 p62의 발현 및 신뢰할만한 자가소화액포 마커인 LC3 단백질의 세포내 분포를 확인하여 세포 매커니즘을 분석하였다.

LC3 단백질에 결합하는 p62 단백질은 일반적으로 자가포식(autophagic flux)을 평가하기 위해 사용되는 마커로, 자가포식 기간 동안에는 발현이 감소되고 자가포식이 억제되는 동안에는 p62 단백질의 축적이 유도된다.

자가소화액포의 형성에 중요한 역할을 하는 LC3은 세포질 형인 LC3-I과 막 결합형 LC3-II의 2 종류로 구분되며, 특히 자기포식 기간에는 LC3-I의 LC3-II로의 전환이 증가된다.

도 4A를 참고하면 화합물 6가 처리된 AGS 세포에서는 비처리된 AGS 세포보다 p62 단백질의 발현과 LC3-I의 LC3-II 전환이 유의하게 증가된 것을 확인할 수 있었다.

또한, AGS 세포에서 화합물 6에 의해 유도되는 아폽토시스를 확인하기 위해, 웨스턴블롯으로 Akt 및 mTOR 단백질의 인산화를 확인하였다.

사람 암에 있어서, 인산화를 통한 Akt-mTOR 신호경로의 활성화는 암 세포의 증식 및 전이를 유도하는 반면, 자가포식을 활성화시키기 때문에 Akt-mTOR 신호경로의 억제는 자가포식 억제와 관련되어 있다.

이에 따라, 화합물 6이 Akt-mTOR 신호경로에 미치는 영향을 확인하였다.

그 결과, 도 4B와 같이 화합물 6이 처리되지 않은 AGS 세포와 비교하여 화합물 6이 처리된 AGS 세포에서는 p-Akt의 발현이 유의하게 감소되었으며, 이와 함께 mTOR의 발현 역시 감소되었다.

반면, 화합물 6이 카스파제에 의한 아폽토시스의 유도 여부를 확인하기 위해, 기질 절단 반응분석을 통하여 카스파제-3 활성을 확인하였다.

그 결과, 도 5와 같이 화합물 6이 처리된 세포에서 농도 의존적으로 카스파제-3 활성의 증가가 나타났다.

[0143] 상기 결과들로부터 화합물 6은 Akt/mTOR 신호경로를 억제하고 자가포식을 활성화시켜 암 세포 사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

[0144] <실험예 5> 화합물 6의 안정성 확인

[0145] DMSO 및 배양 배지(10% fetal bovine serum in DMEM)에 동일한 조건으로 화합물 6을 처리하여 화합물 6의 안정성을 확인하였다.

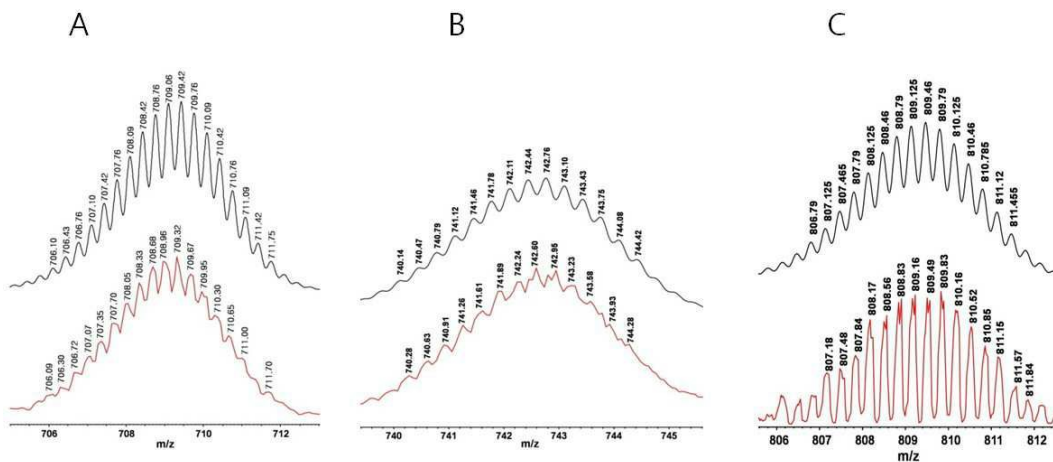
[0146] 10 μ M 화합물 6을 배양 배지에 넣고 37°C에서 다양한 시간 동안 사전배양하고 AGS 세포에 첨가하여 배양하였다. 대조군으로 상기 동일한 조건으로 화합물 6을 DMSO에서 사전 배양하였다.

[0147] 그 결과, 도 6과 같이 10 μ M 화합물 6은 DMSO에서 50시간까지 안정성을 나타냈으며, 화합물 6이 배양 배지에서 24 시간 동안 사전배양될 경우 억제활성이 50% 감소하는 것이 확인되었다.

[0148] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

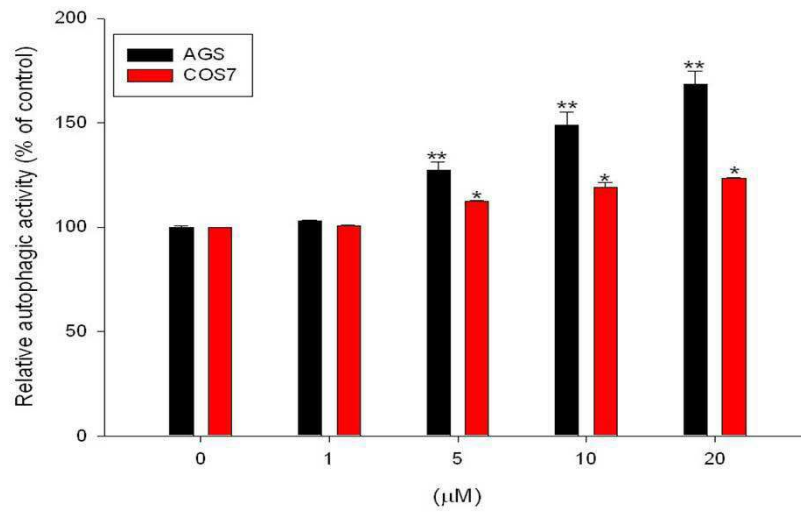
도면

도면1

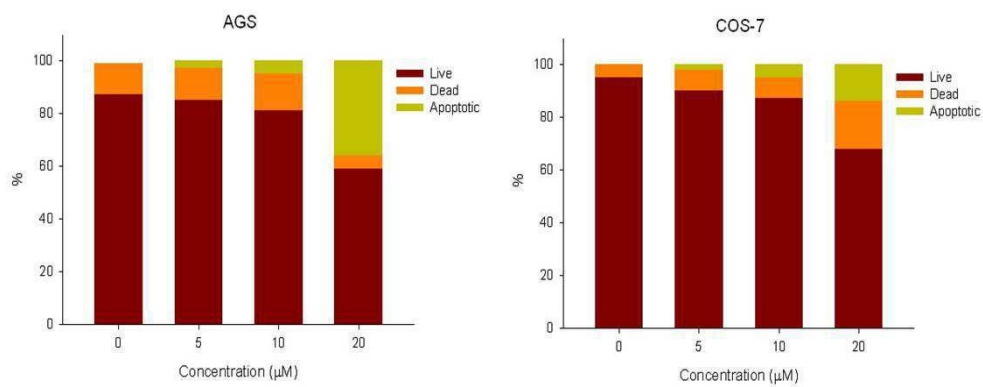


도면3

A

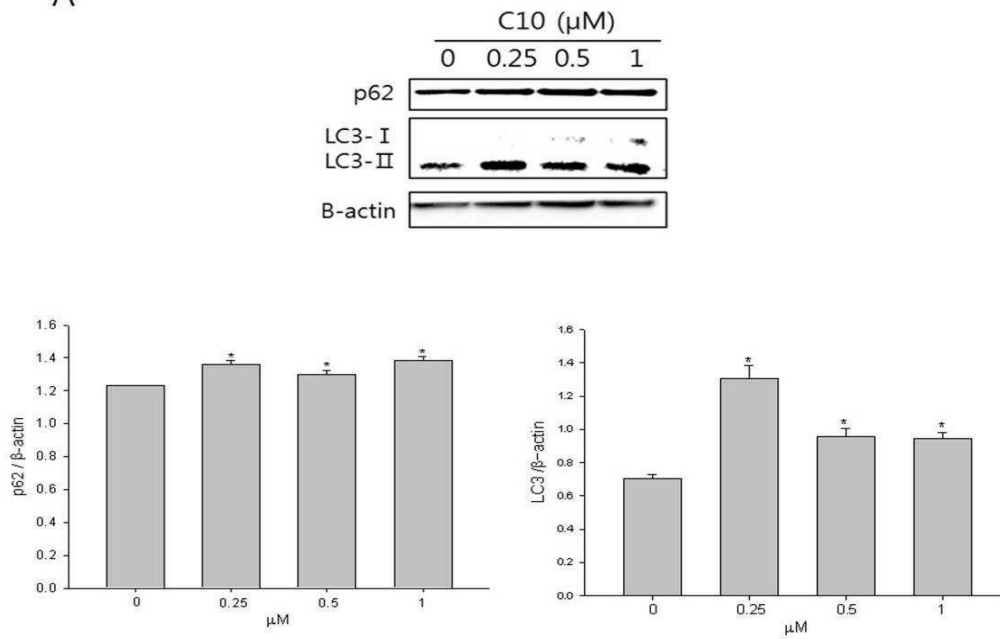


B

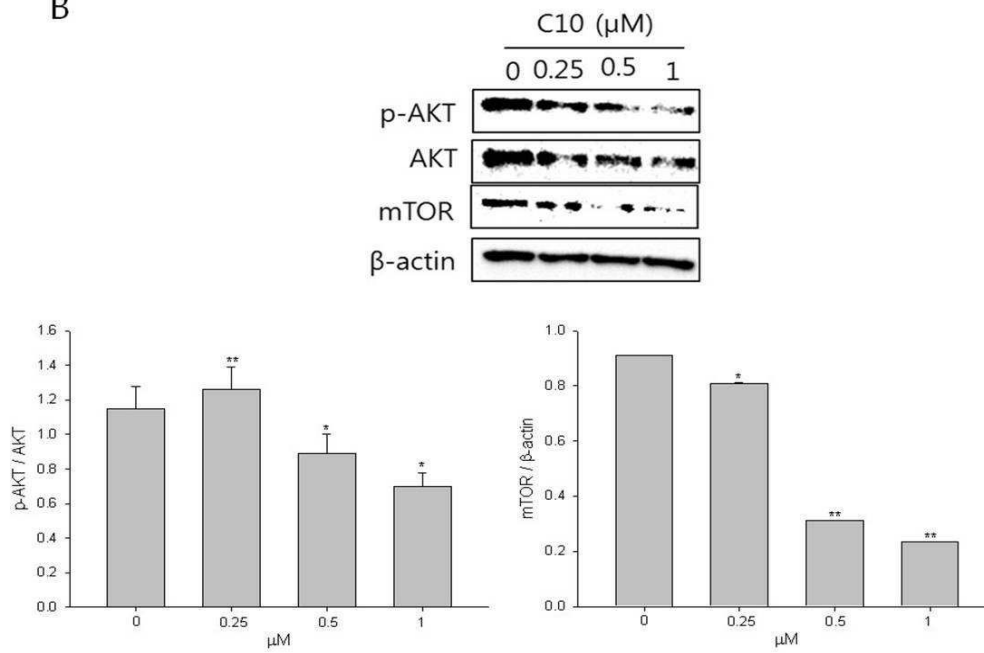


도면4

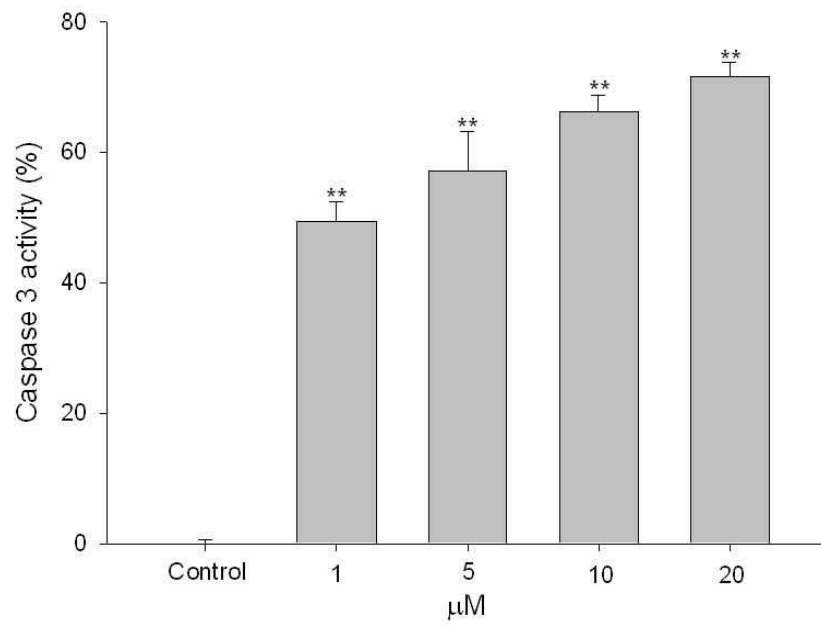
A



B



도면5



도면6

