



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0058093
(43) 공개일자 2017년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07F 15/00 (2006.01) A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01) C07D 235/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07F 15/0046 (2013.01)

A61K 31/4184 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0161880

(22) 출원일자 2015년11월18일

심사청구일자 2015년11월18일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

지기환

울산광역시 중구 우정3길 9, 104동 903호 (우정동, 선경아파트)

김동환

울산광역시 북구 오치골2길 15, 502호 (양정동, 하이트빌)

(74) 대리인

특허법인태백

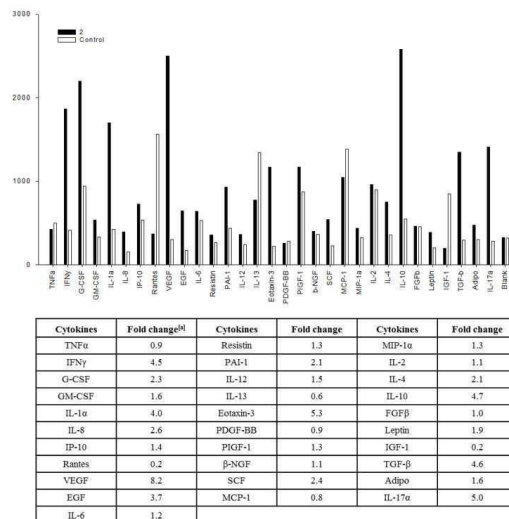
전체 청구항 수 : 총 5 항

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

(57) 요약

본 발명은 신규 벤즈이미다졸-루테늄 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 상기 벤즈이미다졸-루테늄 화합물은 AGS (위암세포주), HCT-15 (직장암세포주) 및 SK-hep-1 (간암세포주) 세포의 증식을 낮은 마이크로몰 농도에서 억제하며, 특히 대식세포에 영향을 주어 IFN γ 와 같은 종양을 형성하는 사이토카인의 분비를 억제하고, 란테스(RANTES) 및 IGF-1과 같은 항암 효과를 나타내는 사이토카인의 분비를 증가시켜 암세포의 성장을 억제하는 효과를 나타내는 바, 암질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 31/555 (2013.01)

C07D 235/04 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015023087

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구

연구과제명 자체조립을 이용한 초분자의 효과적 합성과 생화학적 응용

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

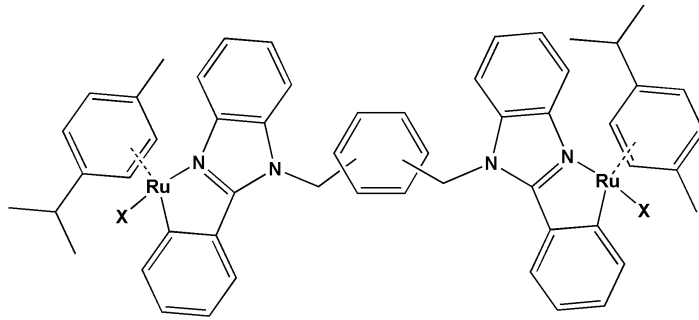
명세서

청구범위

청구항 1

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

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 X는 할로젠임.

청구항 2

제 1항의 벤즈이미다졸-루테튬 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 벤즈이미다졸-루테튬 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 대식세포에 영향을 주어 종양을 형성하는 사이토카인의 분비를 억제하고, 항암 효과를 나타내는 사이토카인의 분비를 증가시켜 암 세포의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 암질환은 고형암인 것을 특징으로 하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 고형암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 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, 남성생식기종양, 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 벤즈이미다졸릴 유도체로부터 유래한 신규 벤즈이미다졸-루테튬 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 금속약학 분야는 금속 기반 약물의 치료학적 적용 때문에 의학 화학의 중요한 새로운 분야로서 대두되었다((a) M. Mascini, G. Bagni, M. L. D. Pietro, M. Ravera, S. Baracco and D. Osella, *Bio Metals*, 2006, 19, 409; (b) T. W. Hambley, *Dalton Trans.*, 2007, 4929). 넓은 범위의 배위수로부터 3차원 공간에서유기 리간드의 재 배열 및 조절가능한 금속 중심의 접근가능한 산화-환원상태는 의학 목적에 사용될 수 있는 반응성의 넓은 스펙트럼을 제공한다(U. Schatzschneider and N.Metzler-Nolte, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, 45, 1504.).
- [0003] 백금 복합체 특히 시스플라틴, 카보플래틴 및 옥소플래틴은 그들의 높은 독성 및 불필요한 신경, 간, 및 신장 독성 부작용에도 불구하고((a) Y. Jung and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2007, 107, 1387; (b) C. Gianomenico and M. U. S. Christen, Patent 6413953, 2000), 현재 가장 효과적인 화학적 치료제로서 사용되고 있다((a) L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer*, 2007, 7, 573; (b) J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, 1303). 그러나 백금계 약물과 관련된 높은 전신 독성 및 저항성 문제들은 대안적인 금속계 항종양제((a) C. H. A. Goss, W. Henderson, A. L. Wilkins and C. J. Evans, *J. Organomet. Chem.* 2003, 679, 194; (b) A. G. Quiroga and C. N. Ranninger, *Coord. Chem. Rev.* 2004, 248, 119; (c) W. Henderson, B. K. Nicholson and E. R. T. Tiekink, *Inorg. Chim. Acta*, 2006, 359, 2046) 및 더 안전하고 더욱 효과적인 치료제의 설계 및 약리학적 발전에 관심을 갖는 새 시대를 열었다.
- [0004] 특히, 루테튬 복합체는 백금계 약물에 잘 반응하지 않는 종양에 있어서 저독성 및 고활성을 갖는 금속계 약물로 촉망받는 새로운 분류를 대표한다((a) C. G. Hartinger, S. Zorbas-Selfried, M.A. Jakupiec, B. Kynast, H. Zorbas and B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* 2006, 100, 891; (b) Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam and P. J. Sadler *Chem. Commun.*, 2005, 4764). 두 루테튬 복합체, ImH[트랜스 RuCl₄(DMSO)Im]](NAMI-A) 및 K01019가 임상 1상을 성공적으로 통과한 최초 1핵 루테튬계 항암 약물이다((a) J. M. Rademaker-Lakhai, D. Van Den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens, *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10, 3717; (b) M. Groessl, C. G. Hartinger, K. Polec-Pawlak, M. Jarosz, P. J. Dyson and B. K. Keppler, *Chem. Biodiversity*, 2008, 5, 1609.).
- [0005] 다핵 약물 또한 치료가능한 종양의 범위를 증대시키기 위해 설계되었다. 많은 고분자 백금 화합물((a) Z. Yang, X. Wang, H. Diao, J. Zhang, H. Li, H. Sung and Z. Guo, *Chem. Commun.*, 2007, 3453; (b) N. J. Wheate, A. I. Day, R. J. Blanch, A. P. Arnold, C. Cullinane and J. G. Collins, *Chem. Commun.*, 2004, 1424), 예를 들면 고분자 링크된 디아미노사이클로헥실 금속 화학적 치료제(AP5346) 및 Pt-배위된 고차분지구조를 갖는 폴리글리세롤 폴리머가 선택적 투과, 보유 효과(EPR)(Y. Matsumura and H. Maeda, *Cancer. Res.*, 1986, 46, 6387.) 및 긴 범위 가닥간 및 가닥내 DNA 교차결합을 통해 약물이 선택적으로 암세포 내에서 축적하도록 하는 이들의 독특한 세포막 환경 때문에 잠재적으로 타겟 특정형 종양 세포에 사용될 수 있을 것이다. 이에 따라, 다핵 금속-고분자 복합체 화합물에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 일본공개특허 제2001-533141호(2000.10.26) 공개

발명의 내용

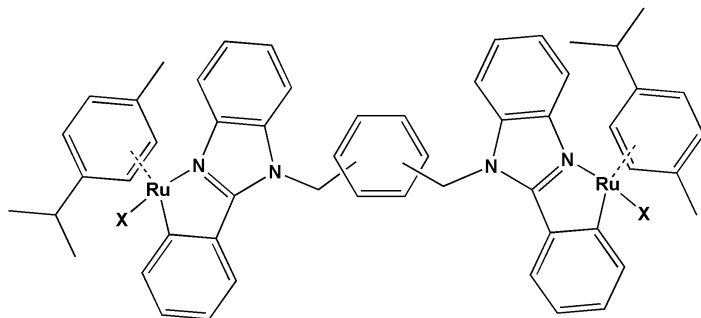
해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 신규 벤즈이미다졸-루테튬 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸-루테튬 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 상기 화학식 1에서 X는 할로젠일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 벤즈이미다졸-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 신규 벤즈이미다졸-루테늄 화합물은 세포의 생리활성을 조절하는 신호분자인 사이토카인을 분비하는 대식세포에 영향을 주어 종양을 형성하는 사이토카인의 분비를 억제하고 항암 효과를 나타내는 사이토카인의 분비를 증가시켜 암세포의 성장을 억제하는 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 본 발명의 벤즈이미다졸-루테늄 화합물은 암질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 루테나사이클 [1M-C1]⁺의 HR-ESI-MS 스펙트라 계산 값(파란색) 및 실험값(적색)을 나타낸 결과이다.

도 2는 벤즈이미다졸-루테늄 화합물 3의 X-ray 결정 구조이다.

도 3은 20 μM 시스플라틴(Cp) 및 10 μM 벤즈이미다졸-루테늄 화합물 2를 24시간 동안 처리된 AGS 세포에서 GeneFishing DEG system을 이용한 RT-PCR 방법으로 차등 발현된 유전자를 스크리닝한 결과이다.

도 4는 1.25 내지 20 μM 벤즈이미다졸-루테늄 화합물 2 및 20 μM 시스플라틴(Cp)를 24시간 동안 AGS 세포에 처리하고 RPS21 발현을 qRT-PCR 분석으로 확인한 결과로, 평균±표준오차(n = 3) 값으로 나타내었으며, * p < 0.05 및 ** p < 0.01은 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타낸다.

도 5는 24시간 동안 10 μM 벤즈이미다졸-루테늄 화합물 2가 처리된 THP-1 사람 대식세포의 사이토카인 분비 변화를 확인한 결과이며, [a]는 대조군 1과 비교하여 변화배율을 나타낸 값이다.

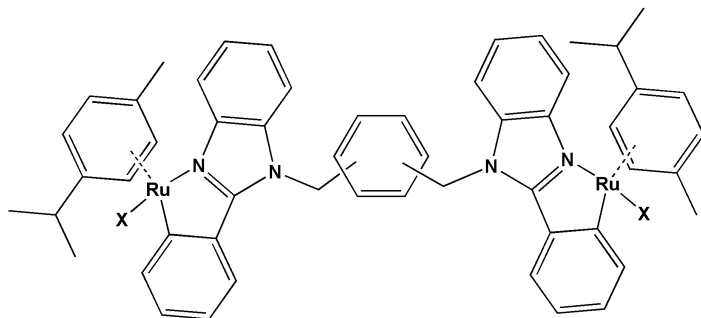
도 6은 20 μM 벤즈이미다졸-루테늄 화합물 2을 0, 12, 24 및 48 시간 동안 AGS 세포에 처리하고 시간 경과에 따른 벤즈이미다졸-루테늄 화합물 2의 성장 억제 활성 손실을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0017] [화학식 1]

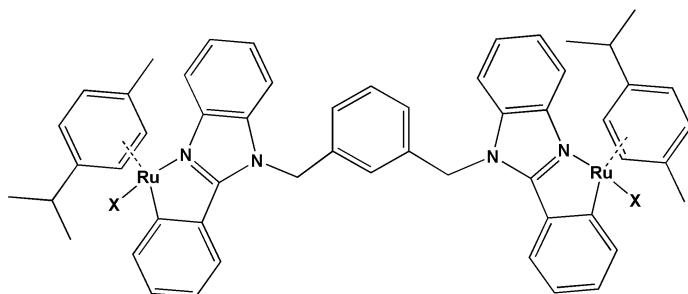


[0018]

[0019] 상기 화학식 1에서 X는 할로젠일 수 있다.

[0020] 특히, 상기 벤즈이미다졸-루테늄 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 벤즈이미다졸-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염일 수 있다:

[0021] [화학식 2]



[0022]

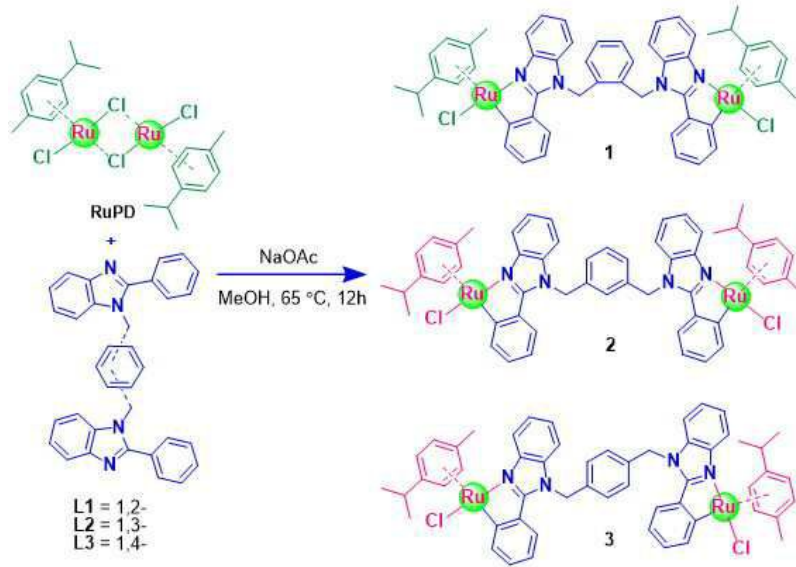
[0023] 본 발명의 벤즈이미다졸-루테늄 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 무기산으로는 염산, 유기산으로는 메탄설폰산을 사용할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명의 벤즈이미다졸-루테늄 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0025] 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.

[0026] 본 발명에 따른 벤즈이미다졸-루테늄 화합물은 하기 반응식 1과 같이 디클로로(p-시멘)루테늄(II) 이합체(RuP D)와 페닐-벤즈이미다졸을 갖는 양팔형 N,C-공여체 리간드를 동량 반응시켜 제조할 수 있으며, 특히 메탄올과 NaOAc 존재 하에서 50 내지 80℃에서 8 내지 20시간 동안 환류반응시켜 제조할 수 있다.

[0027] [반응식 1]



[0028]

[0029]

본 발명에 따른 벤즈이미다졸-루테튬 화합물은 제조 후, 적외선 분광법, 핵자기 공명 스펙트럼, 질량 분광법, 액체 크로마토그 래피법, X-선 구조결정법, 선광도 측정법 및 대표적인 화합물의 원소분석 계산치와 실측치의 비교에 의해 분자구조를 확인할 수 있다.

[0030]

또한, 이하 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 본 발명에 따른 벤즈이미다졸-루테튬 화합물은 AGS (위암세포주), HCT-15 (직장암세포주) 및 SK-hep-1 (간암세포주) 세포의 증식을 낮은 마이크로몰 농도에서 억제하며, 특히 대식세포에 영향을 주어 IFN γ 와 같은 종양을 형성하는 사이토카인의 분비를 억제하고, 란테스(RANTES) 및 IGF-1과 같은 항암 효과를 나타내는 사이토카인의 분비를 증가시켜 암세포의 성장을 억제하는 효과를 나타내는 바, 항암제의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0031]

따라서 본 발명은 상기 벤즈이미다졸-루테튬 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환의 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0032]

또한, 본 발명은 항암제의 제조를 위한 상기 벤즈이미다졸-루테튬 화합물의 의학적 용도를 제공한다.

[0033]

또한, 본 발명은 상기 벤즈이미다졸-루테튬 화합물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암질환의 치료방법을 제공한다.

[0034]

본 발명의 한 구체예에서, 상기 약학조성물은 약학조성물 100 중량부에 대하여 화학식 1의 벤즈이미다졸-루테튬 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 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 달라질 수 있다.

[0035]

본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학조성물은 담체, 부형제, 붕해제, 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.

[0036]

구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 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

위텡솔(witepsol), 마크로폴, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 약학조성물의 제형은 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0038] 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.

[0039] 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 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.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 암질환은 고형암일 수 있으며, 더욱 구체적으로 본 발명에 따른 화학식 1의 벤즈이미다졸-루테늄 화합물은 뇌종양(Brain tumor), 양성성상세포종 (Low-grade astrocytoma), 악성성상세포종 (High-grade astrocytoma), 뇌하수체 선종 (Pituitary adenoma), 뇌수막종 (Meningioma), 뇌림프종 (CNS lymphoma), 핍지교종 (Oligodendroglioma), 두개내인종 (Craniopharyngioma), 상의세포종 (Ependymoma), 뇌간종양 (Brain stem tumor), 두경부 종양(Head & Neck tumor), 후두암 (Larygeal cancer), 구인두암 (Oropharyngeal cancer), 비강/부비동암 (Nasal cavity/PNS tumor), 비인두암 (Nasopharyngeal tumor), 침샘암 (Salivary gland tumor), 하인두암 (Hypopharyngeal cancer), 갑상선암 (Thyroid cancer), 구강암 (Oral cavity tumor), 흉부종양(Chest Tumor), 소세포성 폐암 (Small cell lung cancer), 비소세포성 폐암 (Non small cell lung cancer), 흉선암 (Thymoma), 종격동 종양 (Mediastinal tumor), 식도암 (Esophageal cancer), 유방암 (Breast cancer), 남성유방암 (Male breast cancer), 복부종양 (Abdomen-pelvis tumor), 위암 (Stomach cancer), 간암 (Hepatoma), 담낭암 (Gall bladder cancer), 담도암 (Billiary tract tumor), 췌장암 (pancreatic cancer), 소장암 (Small intestinal tumor), 대장(직장)암 (Large intestinal tumor), 항문암 (Anal cancer), 방광암 (Bladder cancer), 신장암 (Renal cell carcinoma), 남성생식기종양 (Male genital cancer), 음경(요도)암 (Penile cancer), 전립선암 (Prostatic cancer), 여성생식기종양 (Female genital cancer), 자궁경부암 (Cervix cancer), 자궁내막암 (Endometrial cancer), 난소암 (Ovarian cancer), 자궁육종 (Uterine sarcoma), 질암 (Vaginal cancer), 여성외부생식기암 (Vulva cancer), 여성요도암 (Urethral cancer) 또는 피부암 (Skin cancer)의 치료에 사용함이 바람직하다. 보다 더 바람직하게는 위암, 간암, 폐암 또는 직장암의 치료에 사용될 수 있으나 이제 제한되는 것은 아니다.

[0042] 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.

[0043] <참고예> 화학물질 및 화합물 분석

[0044] 화학약품 2-페닐벤즈이미다졸[2-phenylbenzimidazole], 1,2-디(브로모메틸)벤젠[2-di(bromomethyl)benzene], 1,3-디(브로모메틸)벤젠[1,3-di(bromomethyl)benzene], 1,4-디(브로모메틸)벤젠[1,4-di(bromomethyl)benzene], 소듐아세테이트무수물[sodium acetate anhydrous], 루테늄 금속염ruthenium metal salt [(η⁶-cymene)RuCl₂]₂를 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며 추가 정제 없이 사용하였다.

[0045] 중수소화 NMR 용제를 Cambridge Isotope Laboratory (Andover, MA, USA)에서 구입하였으며, Bruker 300 MHz 분광기를 이용하여 NMR 스펙트라를 얻었다.

[0046] ¹H NMR 화학이동은 중수소화 CDCl₃ (7.26 ppm) 및 중수소화 DMSO-d₆ (2.50 ppm)의 잔류 양성자에 관련있는 것으로 보고되어졌다.

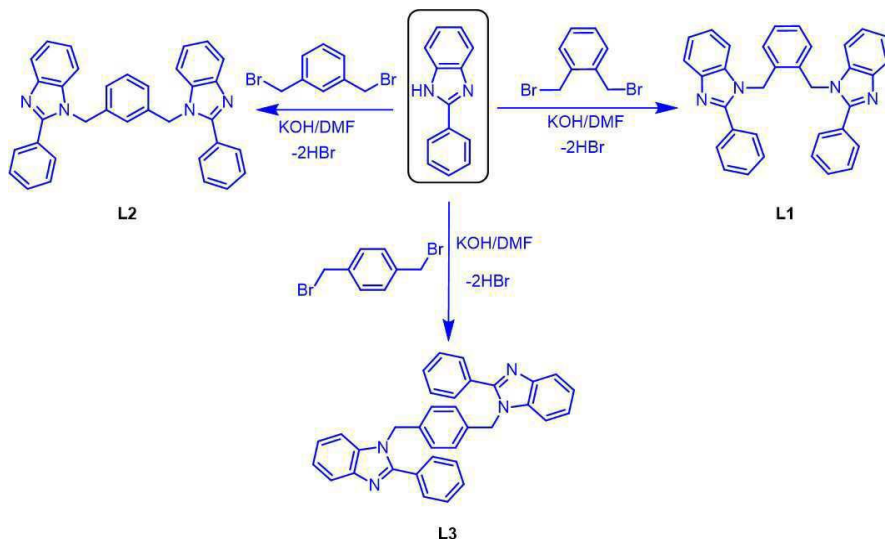
[0047] 전기분무이온화(electrospray ionization)를 이용한 Triple Quadrupole LC-Mass spectrometry (Finnigan TSQ Quantum Ultra EMR)로 리간드 및 루테나사이클의 ESI MS 데이터를 얻었으며, Korea Basic Science Institute (Seoul)의 MassLynx software suite system으로 분석하였다.

[0048]

[0049] <실시예 1> 페닐벤즈이미다졸 양팔형 리간드(L1 내지 L3) 합성

[0050] 하기 반응식으로 L1 내지 L3 화합물을 합성하였다.

[0051] [반응식 1]



[0052]

[0053] 1. 리간드 L1 합성

[0054] 디메틸포름아마이드(DMF) 7 mL에 2-페닐벤즈이미다졸(294 mg, 1.515 mmol) 및 KOH (170 mg, 3.031 mmol)를 녹인 혼합물을 둥근바닥 플라스크에 넣고 40 °C에서 1시간 동안 교반하였다. 그 후, 반응혼합물에 1,4-디(브로모메틸)벤젠(200 mg, 0.757 mmol)을 첨가하여 40 °C에서 24시간 동안 교반한 후, 잔사에 증류수 100 mL를 부었다. 유백색의 침전물을 여과하고 과량의 증류수로 세척하였다.

[0055] 며칠 후, 실온에서 에탄올로부터 무색 결정성 물질을 81% (299 mg)수율로 얻었다.

[0056] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 5.34 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 6.91-6.95 (m, 2H, ArH), 7.07 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, ArH), 7.22-7.25 (m, 1H, ArH), 7.27-7.30 (m, 2H, ArH), 7.33-7.36 (m, 2H, ArH), 7.38-7.44 (m, 4H, ArH), 7.46-7.51 (m, 2H, ArH), 7.58-7.61 (m, 4H, ArH), 7.89 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, ArH) and 8.08-8.11 (m, 1H, ArH). Anal. Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{N}_4$ (Mwt. 490.59): C, 83.24; H, 5.34; N, 11.42. Found: C, 83.22; H, 5.34; N, 11.29. ESI-MS for L1: $m/z = 491.10$ $[\text{M}]^+$.

[0057] 2. 리간드 L2 합성

[0058] 디메틸포름아마이드(DMF)에 2-페닐벤즈이미다졸(294 mg, 1.515 mmol) 및 KOH (170 mg, 3.031 mmol)를 녹인 혼합물을 이용하여 상기 리간드 L1 합성과정과 동일한 방법으로 리간드 L2를 합성하였다.

[0059] 며칠 후, 메탄올로부터 흰색 고체 물질을 80 % (312 mg) 수율로 얻었다.

[0060] ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 5.43 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 6.52 (s, 1H, ArH), 6.93 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, ArH), 7.17-7.39 (m, 11H, ArH), 7.44-7.47 (m, 6H, ArH) and 7.72 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, ArH). Anal. Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{N}_4$ (Mwt. 490.59): C, 83.24; H, 5.34; N, 11.42. Found: C, 83.34; H, 5.36; N, 11.32. ESI-MS for L2: $m/z = 491.19$ $[\text{M}]^+$.

[0061] 3. 리간드 L3 합성

[0062] 디메틸포름아마이드(DMF)에 2-페닐벤즈이미다졸(294 mg, 1.515 mmol) 및 KOH (170 mg, 3.031 mmol)를 녹인 혼합물을 이용하여 상기 리간드 L1 합성과정과 동일한 방법으로 리간드 L3을 합성하였다.

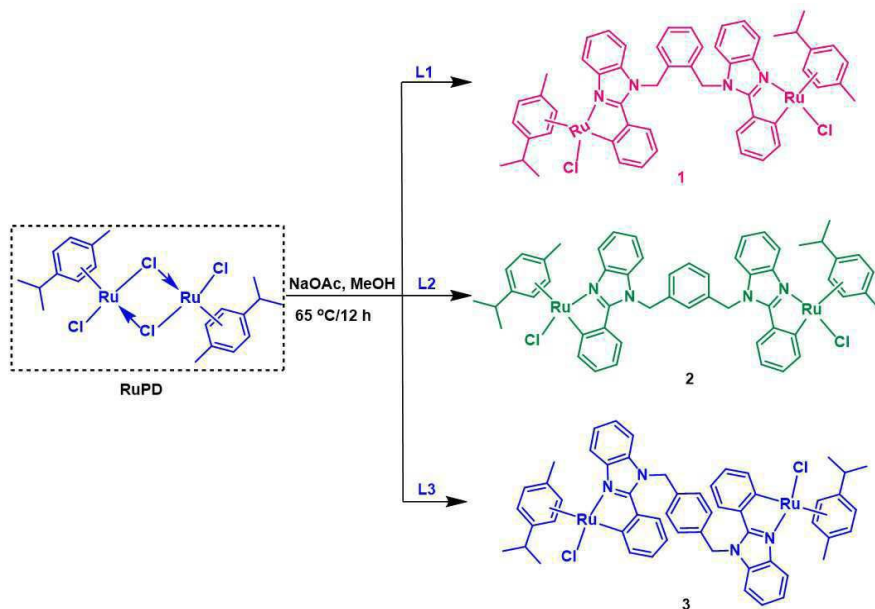
[0063] 며칠 후, 메탄올로부터 흰색 고체 물질을 87 % (324 mg) 수율로 얻었다.

[0064] ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): 5.51 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 6.91 (s, 4H, ArH), 7.18-7.26 (m, 4H, ArH), 7.39-7.26 (m, 4H, ArH), 7.48-7.51 (m, 6H, ArH) and 7.65-7.71 (m, 6H, ArH). Anal. Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{N}_4$ (Mwt. 490.59): C, 83.24; H, 5.34; N, 11.42. Found: C, 83.12; H, 5.41; N, 11.14. ESI-MS for L3: $m/z = 491.21 [\text{M}]^+$.

[0065] <실시예 2> 고리금속 루테니움 화합물 합성

[0066] 하기 반응식 2로 고리금속 루테니움 화합물 1 내지 3을 합성하였다.

[0067] [반응식 2]



[0068]

[0069] 1. 고리금속 루테니움 화합물 1 합성

[0070] 양팔형 페닐벤즈이미다졸 유도체 리간드 L1(50 mg, 0.081 mmol)의 일 당량을 질소대기하 건조된 둥근바닥 플라스크에서 새로운 증류 메탄올에 용해시켰다.

[0071] 실온에서 무수 나트륨 아세테이트(1.2 mmol) 2.3 equiv.를 상기 혼합물에 첨가하여 교반한 후, 1 몰농도의 $[(\eta^6\text{-cymene})\text{RuCl}_2]_2$ (0.5 mmol)를 첨가하였다.

[0072] 상기 반응혼합물을 $\sim 65^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 교반하고 TLC를 이용하여 반응 과정을 확인하였다.

[0073] 완전히 전환 후, 감압하에 메탄올을 제거하고 진공하에 건조시켰다.

[0074] 건조된 고체를 디클로로메탄(10 mL)에 용해시키고 오렌지 레드 용액을 여과한 후 2 mL 정도로 농축시키고 메탄올을 첨가하여 결정화하였다.

[0075] 며칠 후, 결정성 산물을 91.9% (77.32 mg)수율로 얻었다.

[0076] Anal. Calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{52}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{Ru}_2 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (Mwt. 1062.11): C, 62.20; H, 5.31; N, 5.28. Found: C, 62.12; H, 5.25; N, 5.53. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 0.76 (d, 6H, $J = 6.0$ Hz), 0.82 (d, 6H, $J = 6.0$ Hz), 2.06 (d, 6H, $J = 6.0$ Hz), 2.11-2.19 (m, 2H, $-\text{CH}-$), 5.70 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, ArCH), 5.74-5.80 (m, 4H, ArCH), 6.06-6.09 (m, 2H), 6.15-6.17 (m, 4H, ArCH/CH₂), 6.87-6.95 (m, 4H), 7.02-7.10 (m, 3H), 7.42-7.45 (m, 3H), 7.49-7.53 (m, 4H), 7.77 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 8.13 (d, 2H, $j = 6$ Hz) and 8.29-8.34 (m, 2H); ESI-MS for ruthenacycle 1: $m/z = 995.28 [1\text{M} - \text{Cl}]^+$.

[0077] 2. 고리금속 루테니움 화합물 2 합성

[0078] 양팔형 페닐벤즈이미다졸 유도체 리간드 L2(50 mg, 0.081 mmol)의 일 당량을 질소대기하 건조된 둥근바닥 플라스크에서 새로운 증류 메탄올에 용해시켰다.

- [0079] 실온에서 무수 나트륨 아세테이트(1.2 mmol) 2.3 equiv.를 상기 혼합물에 첨가하여 교반한 후, 실온에서 1 몰농도의 $[(\eta^6\text{-cymene})\text{RuCl}_2]_2$ (0.5 mmol)를 첨가하였다.
- [0080] 상기 반응혼합물을 ~65°C에서 12시간 동안 교반하고 TLC를 이용하여 반응 과정을 확인하고, 완전히 전환한 후, 감압하에 메탄올을 제거하고 진공하에 건조시켰다.
- [0081] 건조된 고체를 디클로로메탄(10 mL)에 용해시키고 오렌지 레드 용액을 여과한 후 2 mL 정도로 농축시키고 메탄올을 첨가하여 결정화하였다.
- [0082] 노르스름한 갈색을 나타내는 벤즈이미다졸-루테늄(화합물 2)를 89.9% (75.41 mg)수율로 얻었다.
- [0083] Anal. Calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{52}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{Ru}_2 \cdot \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ (Mwt. 1080.20): C, 61.16; H, 5.41; N, 5.19. Found: C, 60.86; H, 5.11; N, 5.18. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.66 (d, 6H, J = 6.0 Hz), 0.76 (d, 6H, J = 6.0 Hz), 1.98 (s, 6H, CH_3), 2.06-2.15 (m, 2H, -CH-), 5.33 (d, 2H, J = 6.0 Hz, ArCH), 5.74 (d, 2H, ArCH), 5.66 (d, 2H, J = 6.0 Hz), 5.86 (s, 4H, -CH₂-), 6.07 (d, 2H, J = 6.0 Hz, ArCH), 6.69-6.75 (m, 4H, ArCH), 6.97 (br, 1H), 7.04-7.09 (m, 3H, ArCH), 7.34 (t, 2H, J = 3 Hz, ArCH), 7.77 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 7.62 (d, 2H, J = 9 Hz), 8.05 (d, 2H, J = 9.0 Hz) and 8.30 (d, 2H, J = 9.0 Hz, ArCH); ESI-MS for ruthenacycle 2: m/z = 995.13 $[\text{2M} - \text{Cl}]^+$.
- [0084] 3. 고리금속 루테니움 화합물 3 합성
- [0085] 양팔형 페닐벤즈이미다졸 유도체 리간드 L3(50 mg, 0.081 mmol)의 일 당량을 질소대기하 건조된 둥근바닥 플라스크에서 새로운 증류 메탄올에 용해시켰다.
- [0086] 실온에서 무수 나트륨 아세테이트(1.2 mmol) 2.3 equiv.를 상기 혼합물에 첨가하여 교반한 후, 1 몰농도의 $[(\eta^6\text{-cymene})\text{RuCl}_2]_2$ (0.5 mmol)를 첨가하였다.
- [0087] 상기 반응혼합물을 ~65°C에서 12시간 동안 교반하고 TLC를 이용하여 반응 과정을 확인하고, 완전히 전환한 후, 감압하에 메탄올을 제거하고 진공하에 건조시켰다.
- [0088] 건조된 고체를 디클로로메탄(10 mL)에 용해시키고 오렌지 레드 용액을 여과한 후 2 mL 정도로 농축시키고 메탄올을 첨가하여 결정화하였다.
- [0089] 며칠 후, 결정성 산물을 93.5% (81.32 mg)수율로 얻었다.
- [0090] Anal. Calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{52}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{Ru}_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$ (Mwt. 1094.15): C, 61.47; H, 5.53; N, 5.12. Found: C, 61.75; H, 5.26; N, 5.51. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.62 (d, 6H, J = 6.0 Hz), 0.75 (d, 6H, J = 6.0 Hz), 1.99 (s, 6H, CH_3), 2.05-2.11 (m, 2H, -CH-), 5.23 (d, 2H, J = 9.0 Hz, ArCH), 5.57 (d, 2H, J = 9.0 Hz, ArCH), 5.66 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 5.66 (d, 2H, J = 6 Hz), 5.87 (s, 4H, -CH₂-), 6.03 (d, 2H, J = 6.0 Hz, ArCH), 6.86 (t, 2H, J = 9 Hz, ArCH), 6.93 (br, 2H, ArCH), 7.04 (t, 2H, J = 9.0 Hz, ArCH), 7.34 (t, 2H, J = 6 Hz, ArCH), 7.43 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 7.57 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.65 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.85 (d, 2H, J = 9 Hz, ArCH) and 8.26 (d, 2H, J = 9.0 Hz, ArCH); ESI-MS for ruthenacycle 3: m/z = 995.15 $[\text{3M} - \text{Cl}]^+$.
- [0091] 4. 화합물 분석
- [0092] 상기 과정으로 합성된 벤즈이미다졸-루테늄의 구조를 다양한 분석 방법으로 확인하였다. 모든 루테나사이클 다운필드 이동을 그에 해당되는 리간드 L1 내지 L3와 비교하여 화합물 1-3의 ^1H NMR 화학적 이동이 확인되었으며, 새로운 피크로 δ 0.50-0.80 ppm 범위에서 두 이중선, δ 2.40-2.60 ppm 사이에 하나의 단일선 및 δ 2.00-2.10 ppm 범위에서 하나의 다중선이 확인됨에 따라, 각 화합물 마다 알킬 부분에 루테늄 p-cymene 모이어티가 존재하는 것이 확인되었다.
- [0093] 또한, 아릴 부분에서 리간드 양성자 공명과 함께 8개의 양성자 공명이 확인되었는데 이는 두개의 p-cymene 모이어티가 존재하기 때문인 것으로 확인되었다.
- [0094] HR-ESI-MS 데이터를 통하여 벤즈이미다졸-루테늄 1-3의 추가적인 구조를 확인하였다. 벤즈이미다졸-루테늄의 질

량 스펙트럼 m/z 995.28 $[2M-C1]^+$ 및 $[3M-C1]^+$ 부분에서 하나의 클로라이드 리간드 손실 신호와 m/z 480.17 $[2M-2C1]^{2+}$ 및 $[3M-2C1]^{2+}$ 부분에서 두 개의 클로라이드 리간드 손실 신호를 통하여 이중 고리금속 구조를 확인할 수 있었으며, 도 1과 같이 상기 관찰된 실험 스펙트라 패턴 및 이론적으로 계산된 동위원소 분포는 서로 일치하였다.

[0095] 상기 구조의 특징, 확인 및 루테늄 금속 주위의 배위 구조를 이해하기 위해, 방사광가속기를 이용한 단일 결정 X-ray 회절(XRD) 분석을 통하여 벤즈이미다졸-루테늄 3을 확인하였다.

[0096] 수 일간 실온에서 화합물 3 메탄올 용액의 느린 증발을 통하여 XRD에서 적합한 레드-오렌지 컬러의 단일 결정을 얻었다.

[0097] 구조적 정제를 통하여 도 2와 같은 벤즈이미다졸-루테늄 구조를 확인할 수 있었다.

[0098] 루테나사이클 내 루테늄(II) 금속은 리간드 양측에 C,N-킬레이트와 클로라이드 리간드 및 p-cymene 모이어티가 포함된 피아노 의자(piano-stool) 구조로 둘러싸여 있었으며, 흥미롭게도 두 개의 클로라이드 리간드는 서로 반대방향에 위치하고 각각 트랜스 구조인 것을 확인할 수 있었다.

[0099] 또한, 루테나사이클은 C-H...Cl, C-H... π 및 C-H...N와 같은 몇 개의 강하고 약한 비공유결합에 의해 안정성이 증가된 것이 확인되었다.

[0100] <실시예 3> 종양세포 성장억제 효과 확인

[0101] 상기 실시예 1 및 2에 합성된 루테늄 기반 화합물인 RuPD, 리간드 L1 내지 L3 및 벤즈이미다졸-루테늄 1 내지 3의 암세포 독성을 확인하였다.

[0102] AGS (human gastric carcinoma), SK-hep-1 (human hepatocellular carcinoma) 및 HCT-15 (human colorectal carcinoma) 세포주를 10% 열 비활성된 소태아혈청(FBS) 및 1% 페닐실린/스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640 및 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 성장시켰다.

[0103] 세포 현탁액을 96-웰 플레이트에 1×10^4 cells/well 농도로 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 각 화합물을 0.8, 4, 20 및 100 μ M 농도로 24, 48 및 72시간 동안 처리하였다.

[0104] 2 mg/mL 화합물, 옥살리플라틴 및 독소루비신의 저장용액을 DMSO (dimethylsulfoxide)로 준비하고 -20°C에 저장하고, 시스플라틴은 0.9% NaCl (5 mM)에 용해시켰다.

[0105] MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액을 5 mg/mL이 되도록 인산완충식염수(PBS, pH 7.2)에 용해시키고 0.22 μ m 밀리포어 필터로 여과하였다.

[0106] MTT 용액 10 μ L를 각 웰에 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3시간 동안 배양한 후, MTT 용액을 제거하고 DMSO 100 μ L를 각 웰에 첨가하여 세포를 용해시키고 multi-reader (Tecan, Switzerland)를 이용하여 550 nm에서 흡광도 농도 값을 얻어 세포 생존도를 확인하였다.

[0107] 비처리된 세포 비율로부터 생존한 세포의 백분율을 계산하였다.

[0108] 선형 회귀 함수를 이용하여 약물 농도의 대수에 대한 생존 세포의 대수 비율 점 근사를 통하여 세포 성장 억제에 대한 반수 최대 억제 농도(half maximal inhibitory concentration; IC₅₀)를 계산하였다.

[0109] 그 결과, 표 1과 같이 노출 72시간 후, RuPD 및 리간드 L1 내지 L3의 암세포 성장 억제 효과는 노출 48시간과 유사하거나 감소한 반면, 벤즈이미다졸-루테늄 1 내지 3 및 시스플라틴이 처리된 암세포에서는 거의 유사하거나 노출 시간에 비례하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 값

[0110] 또한, 벤즈이미다졸-루테늄 1 내지 3을 72시간 동안 처리했을 때, IC₅₀ 값은 AGS, Sk-hep-1 및 HCT-15 세포에 대하여 각각 6.1-12.5, 7.6-23.7 및 11.1-26.6 μ M 사이인 것으로 확인됨에 따라, 리간드 L1-L3(IC₅₀ 값은 AGS, Sk-hep-1 및 HCT-15 세포에 대하여 각각 9.1-67.2, 39.9-82.5 및 61.9-94.2 μ M 사이인 것으로 확인됨)보다 매우 탁월한 억제 효과를 나타내었다.

[0111] 특히, 대부분의 시료를 위암세포(AGS)에서 특이적인 효과를 나타내었는데, 노출 시간에 따라 AGS 세포의 억제 효과가 증가하였다. 그러나 리간드 L2 및 L3는 노출 48시간(IC₅₀ = 16.6 및 7.6 μ M)보다 72시간(IC₅₀ = 67.2 및

28.6 μM)에서 유의한 억제 효과를 위한 약물 용량이 증가하였다.

[0112] 상기 결과로부터 L2 및 L3는 48시간 이후부터 안정성이 감소하는 것으로 제안될 수 있다.

[0113] 또한, 벤즈이미다졸-루테늄 1 내지 3은 AGS 위암 세포에서 매우 높은 억제 효과를 나타내었으며, 특히 2 화합물은 노출시간에 비례하게 매우 우수한 항암효과($\text{IC}_{50} = 6.1 \mu\text{M}$, 72 h 노출)를 나타내었다.

[0114] 비록 시스플라틴($\text{IC}_{50} = 2.6 \mu\text{M}$)이 벤즈이미다졸-루테늄 2보다 좀 더 높은 항암효과를 나타내었으나, 옥살리플라틴($\text{IC}_{50} = 25.9 \mu\text{M}$)보다는 매우 우수한 항암효과를 나타내었다.

표 1

Compound	AGS			SK-hep-1			HCT-15		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
RuPD	75.6 $\pm$ 2.32 ^a	62.3 $\pm$ 1.51	63.9 $\pm$ 1.60	88.7 $\pm$ 3.94	65.1 $\pm$ 2.26	80.6 $\pm$ 0.78	83.0 $\pm$ 2.29	73.5 $\pm$ 1.59	79.7 $\pm$ 0.74
L1	67.0 $\pm$ 0.77	63.3 $\pm$ 2.38	9.1 $\pm$ 0.80	66.5 $\pm$ 4.06	71.8 $\pm$ 0.65	82.5 $\pm$ 1.39	75.2 $\pm$ 2.64	63.4 $\pm$ 1.92	69.2 $\pm$ 1.07
L2	52.9 $\pm$ 6.40	16.6 $\pm$ 0.21	67.2 $\pm$ 3.12	>100	40.0 $\pm$ 0.45	39.9 $\pm$ 1.44	>100	>100	94.2 $\pm$ 1.36
L3	63.5 $\pm$ 2.16	7.6 $\pm$ 0.55	28.6 $\pm$ 3.44	54.7 $\pm$ 3.46	55.4 $\pm$ 2.19	76.0 $\pm$ 1.49	68.7 $\pm$ 1.60	64.7 $\pm$ 0.92	61.9 $\pm$ 2.55
1	53.0 $\pm$ 2.05	32.9 $\pm$ 3.07	12.5 $\pm$ 0.46	26.4 $\pm$ 2.66	16.5 $\pm$ 0.29	22.8 $\pm$ 2.09	54.1 $\pm$ 2.18	25.0 $\pm$ 1.08	20.2 $\pm$ 0.51
2	26.8 $\pm$ 4.54	17.5 $\pm$ 0.40	6.1 $\pm$ 0.04	9.3 $\pm$ 0.22	7.3 $\pm$ 0.23	7.6 $\pm$ 0.65	27.1 $\pm$ 2.66	14.2 $\pm$ 0.59	11.1 $\pm$ 0.80
3	58.9 $\pm$ 3.08	35.5 $\pm$ 1.76	11.5 $\pm$ 0.42	39.0 $\pm$ 3.09	26.9 $\pm$ 0.24	23.7 $\pm$ 1.12	48.3 $\pm$ 1.44	23.9 $\pm$ 0.92	26.6 $\pm$ 0.35
Cisplatin	78.7 $\pm$ 1.26	32.1 $\pm$ 4.02	2.6 $\pm$ 0.22	65.6 $\pm$ 6.58	17.2 $\pm$ 0.28	16.3 $\pm$ 0.38	76.5 $\pm$ 5.72	67.2 $\pm$ 15.7	4.9 $\pm$ 0.14
Oxaliplatin	>100	>100	25.9 $\pm$ 0.41	>100	>100	>100	>100	12.2 $\pm$ 2.77	31.8 $\pm$ 1.30
Doxorubicin	7.7 $\pm$ 1.10	3.7 $\pm$ 0.06	24.5 $\pm$ 2.31	25.0 $\pm$ 1.62	3.4 $\pm$ 0.09	3.7 $\pm$ 0.24	>100	83.5 $\pm$ 1.07	>100

<실시예 4> 활성 유전자 확인

[0116] 위암세포 AGS에서 벤즈이미다졸-루테늄 2의 암세포 성장 억제 효과와 관련된 유전자 발현 변화를 확인하기 위해, ACP-based differential display RT-PCR technique (GeneFishing DEG screening technology)를 이용하여 유전자 발현 분석을 수행하였다.

1. RNA 추출 및 주형 cDNA 합성

[0117] PureLinkTM RNA Mini Kit (Ambion, USA)를 이용하여 벤즈이미다졸-루테늄 2 화합물이 처리되거나 처리되지 않은 AGS 위 종양세포에서 전체 RNA를 추출하였다.

[0118] 역 전사효소 SuperScript II (Invitrogen, USA)를 제외한 GeneFishing DEG Premix Kit (Seegene, Korea)의 시약으로 cDNA를 합성하였다.

[0119] 전체 RNA 3 μg 을 10 μM cDNA 합성 프라이머 dT-ACP1 (Seegene, Korea) 2 μL 과 DEPC 처리된 물과 혼합하여 최종 부피가 9.5 μL 이 되도록하였다.

[0120] 상기 혼합물을 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 인큐베이트하고 즉시 얼음에 2분간 올려놓은 후 잠시 원심분리하였다.

[0121] 상기 혼합물에 5 μL RT 버퍼(Noble Bio, Korea) 4 μL , 2 mM dNTP (Takara, Japan) 5 μL , 40 U/ μL RNase 억제제 0.5 μL 및 200 U/ μL M-MLV 역 전사효소(Noble Bio, Korea) 1 μL 을 최종 20 μL 부피가 되도록 첨가하였다.

[0122] 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 90분 동안 cDNA 합성을 수행하고 반응물을 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 불활성화시켰다. 2분간 얼음에서 인큐베이트한 후, 80 μL 증류수를 첨가하여 상기 반응물을 5배로 희석하였다.

2. 폴립 조절 프라이머(Annealing control primer; ACP) 기반 증합효소 연쇄 반응(PCR)

[0123] GeneFishingTM DEG kit (Seegene, Korea)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 유의 발현 유전자(Differentially expressed genes; DEGs)를 스크리닝하였다.

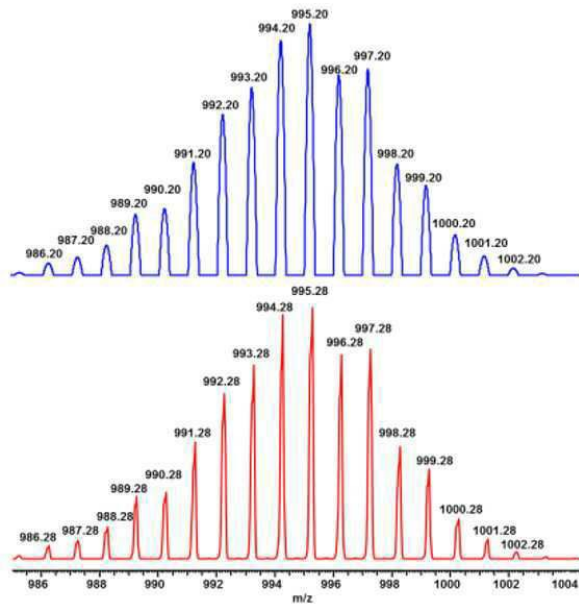
[0124] 희석된 첫 번째 주형 cDNA 3 μL , 10 μM dT-ACP2 1 μL , SeeAmpTM ACPTM master mix 10 μL 및 5 μM arbitrary ACP 2 μL 이 포함된 최종 반응물 20 μL 를 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 한 단계 PCR의 한 사이클로 두 번째 주형 cDNA를 합성하였다.

- [0128] 두 번째 주형 합성을 위한 PCR은 94℃에서 5분, 50℃에서 3분 및 72℃에서 1분간 인큐베이션하는 한 사이클로 수행되었다.
- [0129] 두 번째 주형 cDNA 합성 후, 94℃에서 40초간 변성(denaturation), 65℃에서 40초간 풀림(annealing) 및 72℃에서 40초간 확장(extension)과 같은 과정으로 40 사이클로 증폭한 후 72℃에서 5분간 최종확장 단계의 조건으로 PCR을 수행하였다.
- [0130] 상기 과정을 통해 얻어진 PCR 산물을 0.5×TAE 버퍼와 2% 아가로스 겔을 이용하여 분리시키고 다르게 발현된 cDNA 밴드를 겔에서 잘라내어 정제하였다.
- [0131] SolGent Co. (Daejeon, Korea)에서 DNA 시퀀싱을 수행하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank의 BLASTX search program을 이용하여 서열을 분석하였다.
- [0132] 3. 정량적 RT-PCR 분석
- [0133] 전체 RNA를 AGS 위암세포에서 PureLink™ RNA Mini Kit을 이용하여 추출하였다. 1 µg 전체 RNA, 올리고(oligo: dT) 프라이머, PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis kit (Takara, Japan)에서 제공된 효소 및 버퍼를 포함하여 20 µL 부피로 전체 RNA 역전사를 수행하였다.
- [0134] 정량적 실시간 PCR 반응은 MX3005P(Stratagene, USA)에서 수행되었으며, 다음과 같은 프라이머를 사용하였다.
- [0135] RPS21: 5'-GCTGCTTCCTTCTCTCTCTG-3', 5'- GCCTGTGACCTTGTCACCT-3' 및 β-액틴: 5'-GTCCACCGCAAATGCTTCTA-3', 5'-TGCTGTACCTTCACCGTTC-3'
- [0136] 실시간 PCR은 SYBR Premix Ex Taq II (Takara, Japan)를 이용하여, cDNA 주형 2 µL, Master Mix 12.5 µL, 각 프라이머(10 µM 저장 용액) 1 µL, 멸균된 증류수 8.5 µL를 포함하여 25 µL 최종 용량으로 PCR 반응을 수행하였다.
- [0137] 열 순환 프로파일은 95℃에서 10분간 사전 인큐베이트 단계를 진행한 후, 95℃(30초), 53℃(60초) 및 72℃(30초)로 40 사이클을 수행하였다.
- [0138] RPS21 유전자 수준의 상대적인 정량평가를 comparative CT (cycle threshold) 방법으로 수행하였다.
- [0139] 4. 결과
- [0140] 상기와 같은 방법으로 유전자 발현 분석을 수행한 결과, 도 3과 같이 아가로스 겔 상에서 확인된 mRNA 단편의 차등 발현은 벤즈이미다졸-루테늄 2 화합물이 처리되거나 처리되지 않은 AGS 세포에서 3개의 하향조절된 유전자가 확인되었다.
- [0141] BLAST (NCBI GenBank)를 이용한 분석 결과, ACP1에 의해 발현된 유전자가 리소솜 단백질 S21 (RPS21, CR542132.1)로 확인되었으며, 상기 S21 단백질은 벤즈이미다졸-루테늄 2 화합물 처리된 AGS 세포에서 화합물 2에 의해 감소되는 것이 확인되었다.
- [0142] H36 미토콘드리아(KJ994345.1) 및 ZAM115 미토콘드리아(KJ185427.1)는 ACP11에 의해 유전자 발현되는 유전자인 것으로 확인되었으며, 상기 유전자 역시 벤즈이미다졸-루테늄 2 화합물이 처리된 AGS에서 발현이 감소되었다.
- [0143] 또한, 하향조절된 유전자 RPS21은 진핵세포 리소솜의 구성요소로 알려져 있으며, 사람 세포에서는 리소솜 단백질 SA (RPSA)와 관련되어 있다.
- [0144] 상기 RPSA는 비인테그린 라미닌 수용체로 알려져있으며, 다양한 암세포의 표면에 과발현되어 있다. 따라서, RPSA는 중앙 진행에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 고려되어지고 있다.
- [0145] RPS21 유전자의 발현 수준을 확인하기 위해, 벤즈이미다졸-루테늄 2 화합물 처리된 AGS 세포의 mRNA를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다.
- [0146] 그 결과, 도 4와 같이 화합물 2의 용량 의존적으로 RPS21 mRNA의 발현이 감소하였으며, 2.5 µM 농도의 화합물 2가 처리된 세포에서는 RPS21 mRNA의 발현이 대조군과 비교하여 50% 감소된 것으로 확인되었으며, 특히 20 µM 농도로 처리된 경우, 대조군과 비교하여 88% 발현이 억제된 것으로 나타났다(p < 0.01).
- [0147] 반면, 시스플라틴이 처리된 실험군에서는 RPS21 발현이 증가하였으며, genefishing 결과와 유사하였다.
- [0148] <실시예 5> 분비된 사이토카인 분석

- [0149] 사이토카인은 세포 성장, 분화, 유전자 발현, 이동, 염증 및 면역과 같은 많은 생물학적 과정에서 결정적인 역할을 하는 신호분자로, 염증반응 동안 대식세포는 사이토카인을 다른 세포를 활성화시키고 모으는 역할을 하거나, 직접 사멸시키는 역할을 한다.
- [0150] 아렌-Ru 유도체는 직접적인 암세포 주기를 조절하는데 사용될 수 있으므로 상기 유도체로 생산된 사이토카인은 암세포에 간접적인 영향을 줄 수 있다.
- [0151] 따라서, 벤즈이미다졸-루테늄 2 화합물이 대식세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0152] 사이토카인 31개(TNF- α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, IL-1 α , IL-8, IP-10, Rantes, VEGF, EGF, IL-6, Resistin, PAI-1, IL-12, IL-13, Eotaxin-3, PDGF-BB, PIGF-1, β -NGF, SCF, MCP-1, MIP-1 α , IL-2, IL-4, IL-10, FGF β , Leptin, IGF-1, TGF- β , Adipo 및 IL-17 α)의 분비를 확인하기 위해, 벤즈이미다졸-루테늄 2(10 μ M) 또는 아무것도 처리되지 않은 배양 배지를 THP-1 사람 단핵 백혈구에 24시간 동안 처리하고 Human Cytokine ELISA Plate Array I kit (Signosis, USA)를 이용하여 사이토카인 31개의 함량을 확인하였다.
- [0153] 상기 ELISA 분석은 제조사의 설명서에 따라 수행되었으며, Multi-reader로 화학 발광 검출을 수행하였다.
- [0154] 그 결과, 도 5 내지 8과 같이 10 μ M 농도의 화합물 2가 처리된 AGS 세포에서 사이토카인 IFN γ , IL-1 α , VEGF, EGF, Eotaxin-3, IL-10, TGF- β 및 IL-17 α 가 증가하였으며, VEGF(vascular endothelial growth factor)의 분비량은 화합물 2가 처리되지 않은 대조군과 비교하여 8.2배 증가하였다.
- [0155] 상기 결과와 같이 혈관신생의 중심 매개자로 알려진 사이토카인은 10 μ M 농도의 화합물 2가 처리된 AGS 세포에서 3배 이상 분비되었으며, 이러한 결과는 암세포의 성장에 오히려 도움이 될 수 있다.
- [0156] 그러나, 화합물 2에 의해서 대식세포에서 분비된 사이토카인 중, 인터루킨- γ (IFN γ)는 항암 효과를 나타내는 사이토카인으로 대조군과 비교하여 4.5배 증가하였다. 상기 IFN γ 은 암세포의 증식 및 분화를 조절하거나 면역 조절 반응을 조절하여 직접적으로 항종양형성 효과를 나타낸다.
- [0157] 또한, 벤즈이미다졸-루테늄 2는 대식세포구에서 란테(rantes) 및 IGF-1(insulin-like growth factor 1) 분비를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [0158] 란테는 다양한 암에서 매우 높게 발현되어 암세포 증식 및 혈관신생을 통하여 종양 성장 및 전이를 촉진시키고, IGF-1은 암세포 증식, 세포사멸, 혈관신생 및 전이와 같은 암 발달의 주요 단계에서 강력한 영향을 나타낸다.
- [0159] 상기 결과로부터 벤즈이미다졸-루테늄 2는 대식세포구의 란테 및 IGF-1 분비를 감소시키는 반면, IFN γ 의 분비를 증가시켜 암세포의 성장을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.
- [0160] <실시예 6> 화합물 안정성 확인
- [0161] 벤즈이미다졸-루테늄 2 화합물의 안정성을 확인하기 위해, 20 μ M 농도의 화합물 2를 37 $^{\circ}$ C에서 0, 12, 24 및 48시간 동안 세포 배양배지 및 DMSO에서 배양하고 상기 실시예 3과 같은 과정으로 AGS 암세포 성장을 확인하였다.
- [0162] 그 결과, 도 6과 같이 세포 배양 배지에서 사전 배양 32시간 후 벤즈이미다졸-루테늄 2의 성장 억제 활성이 50% 감소하였다.
- [0163] 대조적으로 DMSO에서는 성장 억제 활성이 24시간까지 안정하게 유지되었다.
- [0164] 상기 결과로부터 벤즈이미다졸-루테늄 2는 세포 배양 배지 및 DMSO에서 24시간까지 안정한 것으로 나타났다.
- [0165] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 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

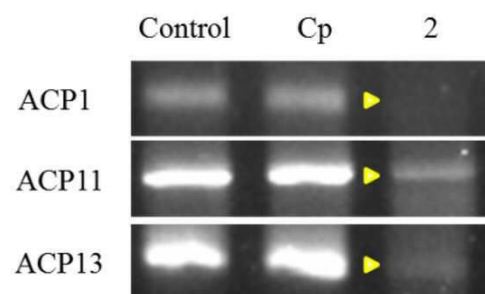
도면1



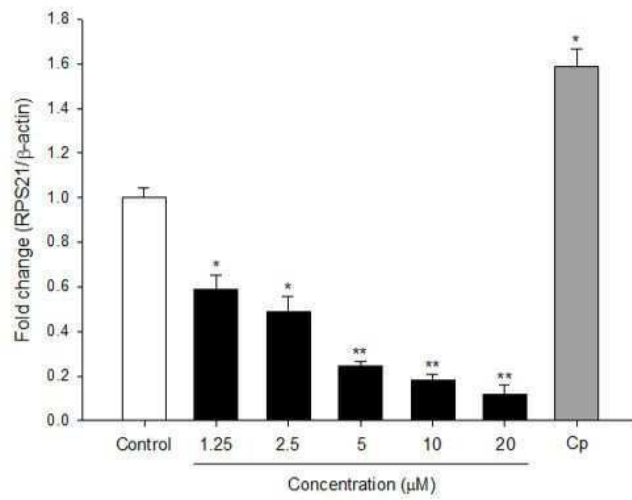
도면2



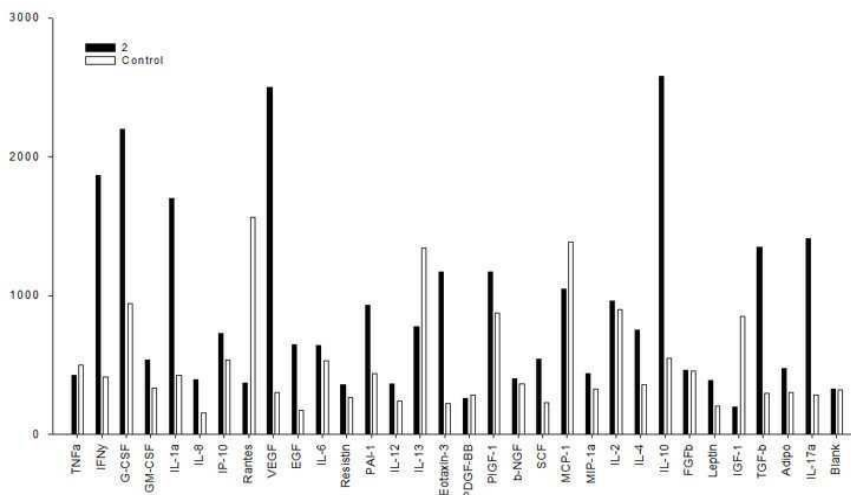
도면3



도면4



도면5



Cytokines	Fold change ^[a]	Cytokines	Fold change	Cytokines	Fold change
TNFα	0.9	Resistin	1.3	MIP-1α	1.3
IFNγ	4.5	PAI-1	2.1	IL-2	1.1
G-CSF	2.3	IL-12	1.5	IL-4	2.1
GM-CSF	1.6	IL-13	0.6	IL-10	4.7
IL-1α	4.0	Eotaxin-3	5.3	FGFβ	1.0
IL-8	2.6	PDGF-BB	0.9	Leptin	1.9
IP-10	1.4	PIGF-1	1.3	IGF-1	0.2
Rantes	0.2	β-NGF	1.1	TGF-β	4.6
VEGF	8.2	SCF	2.4	Adipo	1.6
EGF	3.7	MCP-1	0.8	IL-17α	5.0
IL-6	1.2				

도면6

