(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0082765
(43) 공개일자 2016년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 15/00 (2006.01) *A61K 31/555* (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0191962
(22) 출원일자 2014년12월29일
심사청구일자 2014년12월29일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
지기환
울산광역시 중구 우정3길 9 104동 903호 (우정동,선경1차아파트)
조재호
울산광역시 동구 대송1길 10 102동 1010호 (화정동,대송현대아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

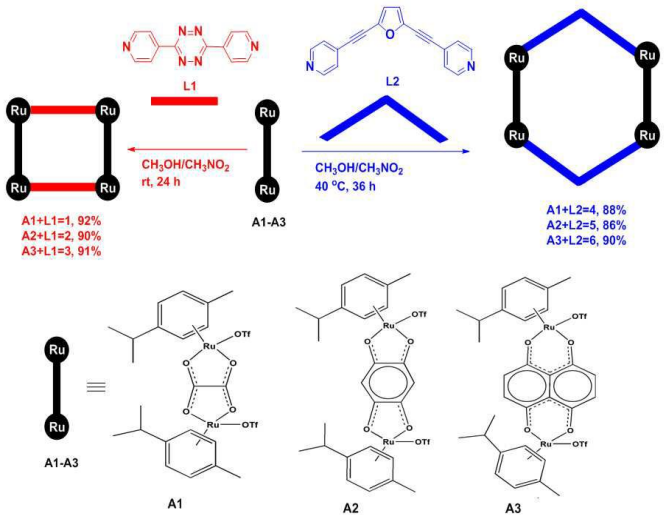
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 4핵 아렌-루테늄 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 신규 4핵 아렌-루테늄 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 상기 4핵 아렌-루테늄 화합물은 공지된 항암 약물인 시스플라틴과 독소루비신과 비교하여 보다 나은 항암 활성을 보이며, 특히 결장암 세포에서 낮은 농도에서 자가 포식 작용을 강하게 유도함으로써 뛰어난 항암 활성을 나타내는 바, 암 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A2006859

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단(미래부)

연구사업명 기본연구(커리어과학자)

연구과제명 자체조립을 이용한 초분자의 효과적 합성과 생화학적 응용(2)

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

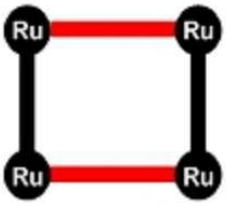
명 세 서

청구범위

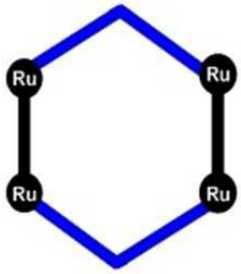
청구항 1

하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

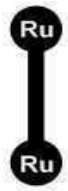
[화학식 1]



[화학식 2]

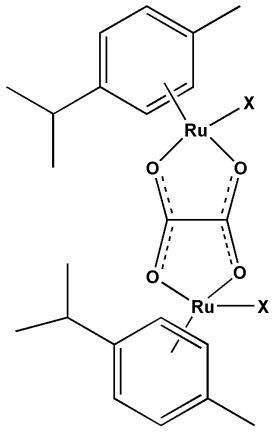


이고,

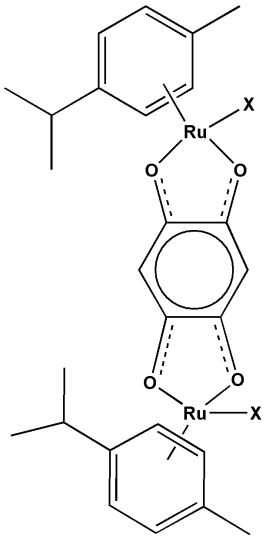


는,

[화학식 3a]

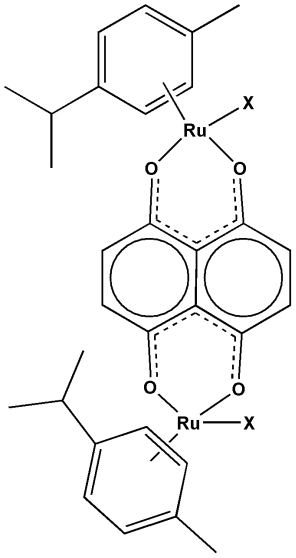


[화학식 3b]



또는

[화학식 3c]

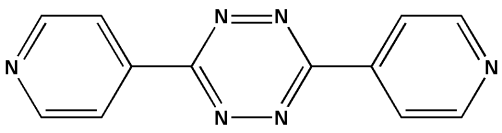


이고,

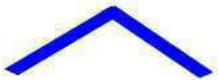
상기 화학식 3a, 화학식 3b 및 화학식 3c에서 상기 X는 각각 독립적으로 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf), 니트레이트(NO_3), 톨루엔-4-설포네이트(toulene-4-sulfonate, OTs), 메탄설포네이트(methanesulfonate, OMs), Cl, Br, I, BF_4, PF_6, ClO_4, CH_3COO 또는 CF_3COO 이며, 상기 ------는 단일결합 또는 이중결합이며,

상기 화학식 1의  는,

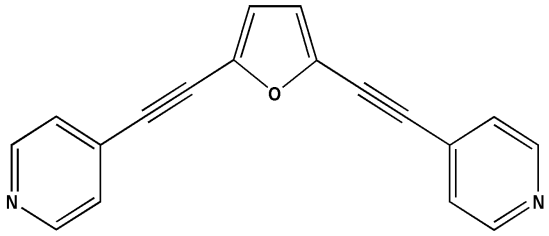
[화학식 4]



이며,

상기 화학식 2의  은,

[화학식 5]



이고,

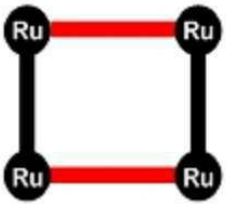
상기 화학식 4 또는 5의 방향족 고리내의 질소 원자와 화학식 3a 내지 화학식 3c의 루테늄이 각각 결합하며, 상기 X가 떨어져 나가 화학식 1 또는 2의 화합물을 형성함.

청구항 2

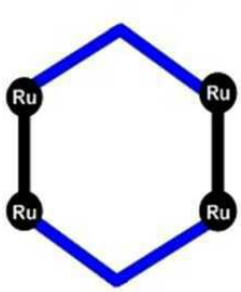
제 1항에 있어서,

상기 아렌-루테늄 화합물은 하기 화학식 4 또는 5의 방향족 고리내의 질소 원자와 화학식 3c의 루테늄이 결합하며, 하기 X가 떨어져 나가 하기 화학식 1 또는 2의 화합물을 형성한 것을 특징으로 하는, 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



[화학식 2]

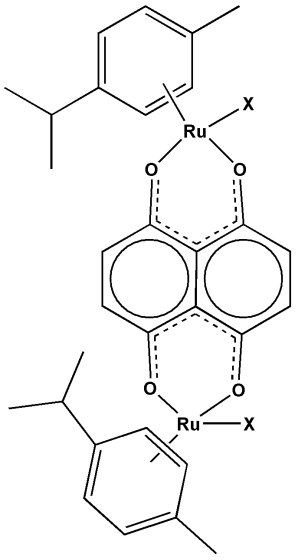


이고,



는,

[화학식 3c]

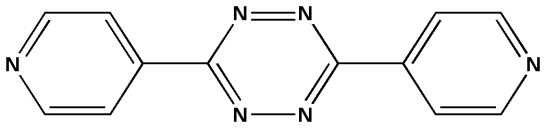


이고,

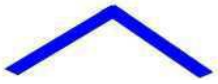
상기 화학식 3c에서 상기 X는 각각 독립적으로 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf), 니트레이트(NO_3), 톨루엔-4-설포네이트(toulene-4-sulfonate, OTs), 메탄설포네이트(methanesulfonate, OMs), Cl, Br, I, BF_4, PF_6, ClO_4, CH_3COO 또는 CF_3COO 이며, 상기 ------ 는 단일결합 또는 이중결합이며,

상기 화학식 1의  는,

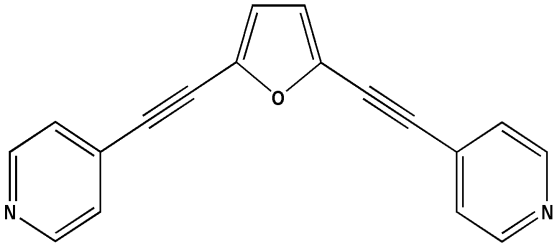
[화학식 4]



이며,

상기 화학식 2의  은,

[화학식 5]

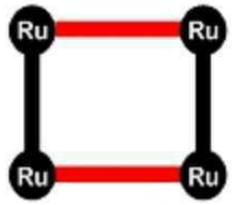


임.

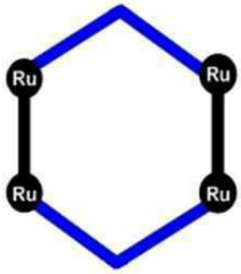
청구항 3

하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

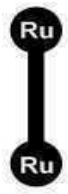
[화학식 1]



[화학식 2]

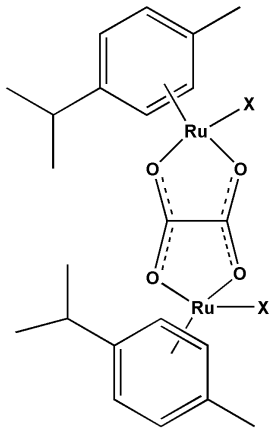


이고,

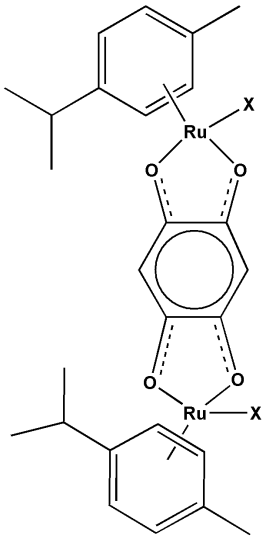


는,

[화학식 3a]

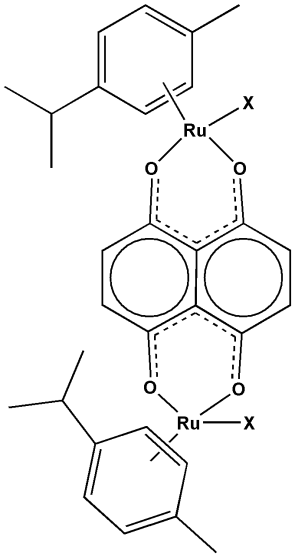


[화학식 3b]



또는

[화학식 3c]

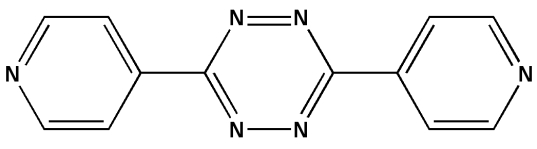


이고,

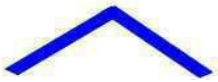
상기 화학식 3a, 화학식 3b 및 화학식 3c에서 상기 X는 각각 독립적으로 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf), 니트레이트(NO_3), 톨루엔-4-설포네이트(toulene-4-sulfonate, OTs), 메탄설포네이트(methanesulfonate, OMs), Cl, Br, I, BF_4, PF_6, ClO_4, CH_3COO 또는 CF_3COO 이며, 상기 ------는 단일결합 또는 이중결합이며,

상기 화학식 1의  는,

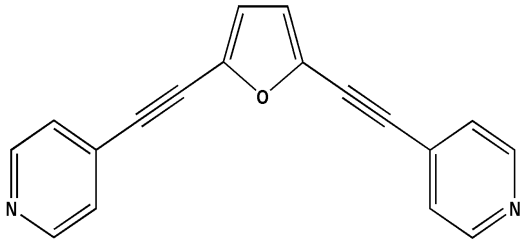
[화학식 4]



이며,

상기 화학식 2의  은,

[화학식 5]



이고,

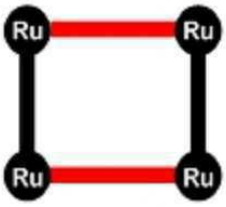
상기 화학식 4 또는 5의 방향족 고리내의 질소 원자와 화학식 3a 내지 화학식 3c의 루테늄이 각각 결합하며, 상기 X가 떨어져 나가 화학식 1 또는 2의 화합물을 형성함.

청구항 4

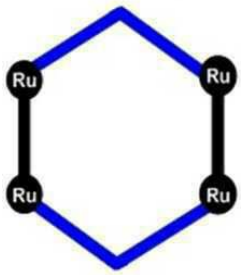
제 3항에 있어서,

상기 아렌-루테늄 화합물은 하기 화학식 4 또는 5의 방향족 고리내의 질소 원자와 화학식 3c의 루테늄이 결합하며, 하기 X가 떨어져 나가 하기 화학식 1 또는 2의 화합물을 형성한 것을 특징으로 하는, 암 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

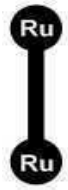
[화학식 1]



[화학식 2]

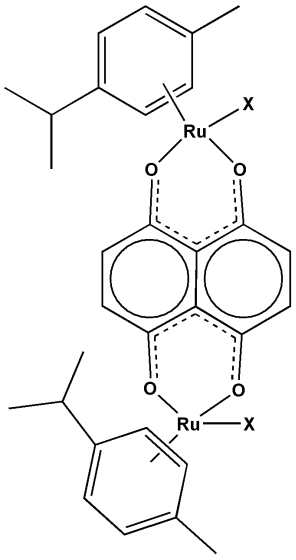


이고,



는,

[화학식 3c]

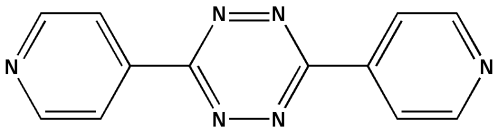


이고,

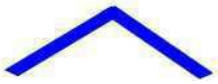
상기 화학식 3c에서 상기 X는 각각 독립적으로 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf), 니트레이트(NO_3), 톨루엔-4-설포네이트(toulene-4-sulfonate, OTs), 메탄설포네이트(methanesulfonate, OMs), Cl, Br, I, BF_4, PF_6, ClO_4, CH_3COO 또는 CF_3COO 이며, 상기 ┅┅ 는 단일결합 또는 이중결합이며,

상기 화학식 1의  는,

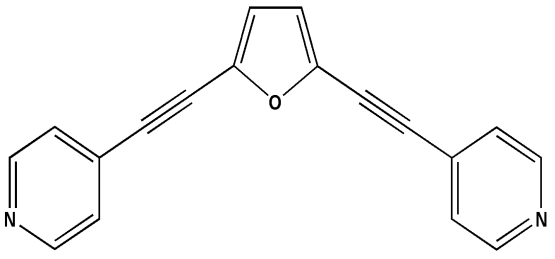
[화학식 4]



이며,

상기 화학식 2의  은,

[화학식 5]



임.

청구항 5

제 3항 또는 제 4항에 있어서,

상기 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 자가포식 작용을 활성화하여 세포사멸을 증가시켜 항암활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

제 3항 또는 제 4항에 있어서,

상기 암은 고형암인 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 고형암은 대장암, 위암, 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 핍지교종, 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, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 직장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암 또는 피부암인 것인 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 4핵 아렌-루테늄 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자가포식(Autophagy)은 세포 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 하며 세포 생존, 성장, 분화 및 숙주 방어 반응에 기여하는 가장 중요한 분자 반응(molecular responses) 중 하나로써 고려된다. 최근에, 자가포식이 암 치료에 반응하는 다양한 유형의 암세포에서 일어나는 세포 사멸 메커니즘인 것으로 알려졌다(비특허문헌 1 및 2 참고).

[0003] 많은 연구를 통해 B 세포 림포마-2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2), 피케이시델타(PKCδ), 조직 트랜스글루타미나제 2(tissue transglutaminase 2, TG2)와 같은 항-자가포식 단백질(anti-autophagic proteins)의 억제에 의한 자가포식의 유도는 일부의 세포사멸-저항성(apoptosis-resistant)을 가진 암(예를 들어, 유방암과 췌장암)의 자가탐식(autophagic cell death)을 이끌 수 있다는 것이 증명되었다.

[0004] 더불어, 암 세포에서 자가포식 작용의 억제의 일부 케이스는 DNA 손상 시약(DNA damaging agents), 항호르몬 요법(antihormone therapies) 그리고 방사선 요법(radiation therapy)과 같은 다양한 요법에 대한 암의 민감성을 증가시킬 수 있는 치료학적 이득을 보였다.

[0005] 따라서, 세포의 특징(cellular feature)에 따라, 자가포식의 유도 또는 억제는 환자에 대한 치료적 이득을 제공할 수 있으므로, 자가포식 조절자의 설계 및 합성은 암에 대한 새로운 치료학적 전략으로 이용될 수 있다.

[0006] 금속약학 분야는 금속 기반 약물의 치료학적 응용(therapeutic application)을 통해 급속도로 대중화되고 있다. 그 중 백금 복합체(Platinum complexes)인 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin) 및 옥소플라틴(oxoplatin)은 가장 효과 있는 화학요법제(chemoherapeutic agents)로써 알려져 있다.

[0007] 그러나, 시스플라틴은 신독성(nephrotoxicity)과 신경독성(neurotoxicity)의 심각한 부작용을 가지고 있다.

[0008] 따라서 부작용이 없는 금속 기반 약물의 개발이 요구되고 있으며, 최근 백금 약물(platinum drugs)에 저항성을 가지는 종양에서 낮은 독성과 높은 활성을 보이는 루테늄(ruthenium)을 기반으로 한 복합체가 새로운 금속 기반 약물로 주목받고 있다.

[0009] 하지만 이러한 루테늄 기반의 복합체에 많은 연구가 행해지고 있지만, 자가 포식에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) 1. Cancer Res. 2006, 66, 9349-9351.

(비특허문헌 0002) 2. Autophagy 2010, 6, 322-329.

발명의 내용

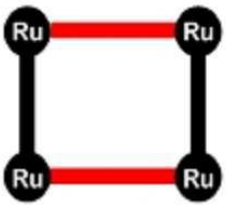
해결하려는 과제

[0011] 따라서 본 발명은 신규한 4핵 아렌-루테늄 화합물 및 이의 항암 치료용 용도를 제공하고자 한다.

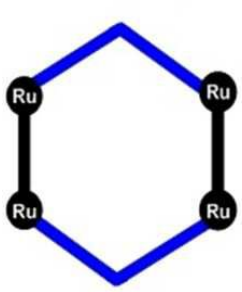
과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

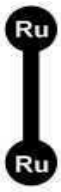
[0013] [화학식 1]

[0014] 

[0015] [화학식 2]

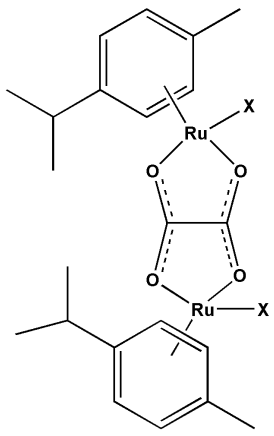
[0016] 

이고,

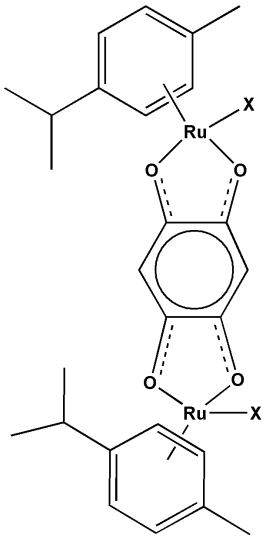
[0017] 

는,

[0018] [화학식 3a]

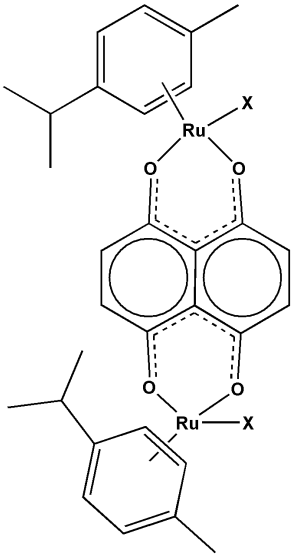
[0019] 

[0020] [화학식 3b]



[0021] 또는

[0022] [화학식 3c]

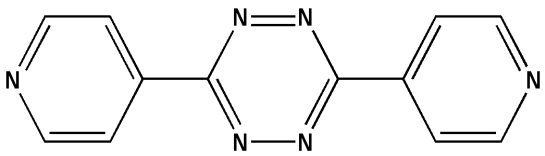


[0023] 이고,

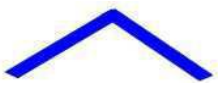
[0024] 상기 화학식 3a, 화학식 3b 및 화학식 3c에서 상기 X는 각각 독립적으로 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf), 니트레이트(NO_3), 톨루엔-4-설포네이트(toulene-4-sulfonate, OTs), 메탄설포네이트(methanesulfonate, OMs), Cl, Br, I, BF_4, PF_6, ClO_4, CH_3COO 또는 CF_3COO 이며, 상기 ------는 단일결합 또는 이중결합이며,

[0025] 상기 화학식 1의  는,

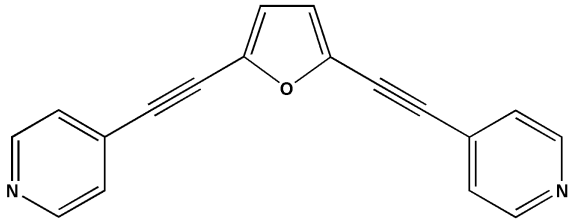
[0026] [화학식 4]



[0027] 이며,

[0028] 상기 화학식 2의  은,

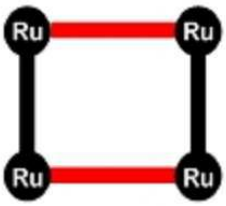
[0029] [화학식 5]

[0030]  이고,

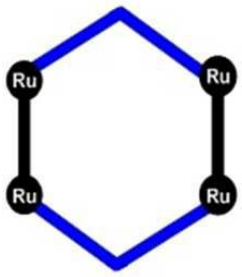
[0031] 상기 화학식 4 또는 5의 방향족 고리내의 질소 원자와 화학식 3a 내지 화학식 3c의 루테늄이 각각 결합하며, 상기 X가 떨어져 나가 화학식 1 또는 2의 화합물을 형성함.

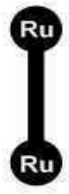
[0032] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0033] [화학식 1]

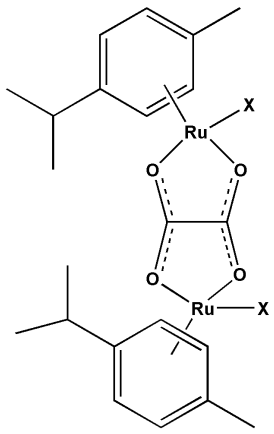
[0034] 

[0035] [화학식 2]

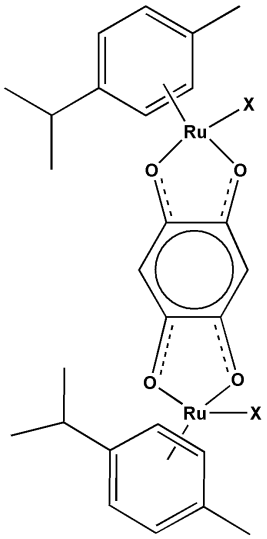
[0036]  이고,

[0037]  는,

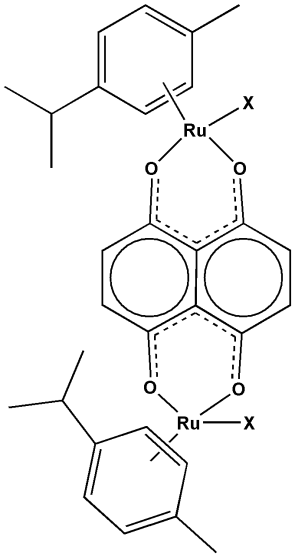
[0038] [화학식 3a]

[0039] 

[0040] [화학식 3b]

[0041]  또는

[0042] [화학식 3c]

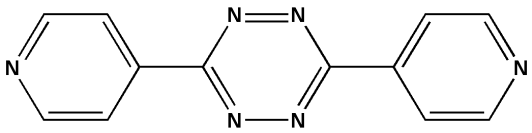


[0043] 이고,

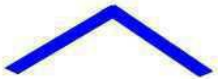
[0044] 상기 화학식 3a, 화학식 3b 및 화학식 3c에서 상기 X는 각각 독립적으로 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf), 니트레이트(NO_3), 톨루엔-4-설포네이트(toulene-4-sulfonate, OTs), 메탄설포네이트(methanesulfonate, OMs), Cl, Br, I, BF_4, PF_6, ClO_4, CH_3COO 또는 CF_3COO 이며, 상기 ------는 단일결합 또는 이중결합이며,

[0045] 상기 화학식 1의  는,

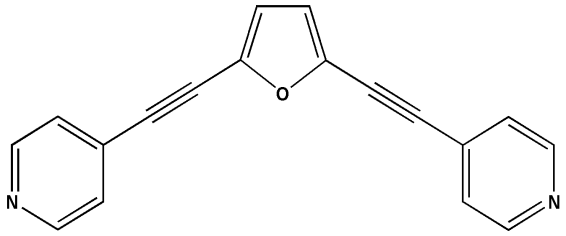
[0046] [화학식 4]



[0047] 이며,

[0048] 상기 화학식 2의  은,

[0049] [화학식 5]

[0050]  이고,

[0051] 상기 화학식 4 또는 5의 방향족 고리내의 질소 원자와 화학식 3a 내지 화학식 3c의 루테늄이 각각 결합하며, 상기 X가 떨어져 나가 화학식 1 또는 2의 화합물을 형성함.

발명의 효과

[0052] 본 발명에 따른 4핵 아렌-루테늄 화합물은 공지된 항암 약물인 시스플라틴과 독소루비신과 비교하여 보다 나은 항암 활성을 보이며, 특히 결장암 세포에서 낮은 농도에서 자가 포식 작용을 강하게 유도함으로써 뛰어난 항암 활성을 나타내는 바, 암 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 본 발명에 따른 화합물 1 내지 6의 제조 모식도이다.

도 2는 니트로메탄-D_3(Nitromethane-D_3, CD_3NO_2)에 기록된 ^1H 핵자기공명 (nuclear magnetic resonance, NMR) 스펙트라 결과이며, 도 2 중 a는 화합물 L1에 대한 결과이며, 도 2 중 b는 본 발명에 따른 화합물 1의 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 화합물 4 내지 6의 전자스프레이 이온화 질량분석(Electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)결과이다.

도 4는 자외선/가시광선 스펙트라(UV/Vis spectra) 결과이며, 도 4 중 a는 본 발명에 따른 화합물 1 내지 3의 결과이며, 도 4 중 b는 본 발명에 따른 화합물 4 내지 6의 결과이며, 도 4 중 c는 수용체(A1 내지 A3)와 공여체(L1과 L2)의 결과이다.

도 5 중 a는 본 발명에 따른 화합물 1의 X-선 크리스탈 구조(X-ray crystal structure)이며, 도 5 중 b는 빈 공간을 채운 모델(space-filling model, CPK model)에 따라 본 발명에 따른 화합물 1의 구조를 나타낸 것이다(초록색: 루테늄, 빨간색: 산소, 파란색: 질소 및 회색: 탄소).

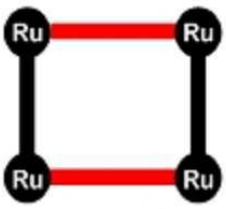
도 6은 결장암 세포에서 본 발명에 따른 화합물 3과 화합물 6의 항암 효과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 결장암 세포에서 본 발명에 따른 화함물 3과 화합물 6의 농도 변화에 따른 자식 작용을 나타낸 그래프이다.

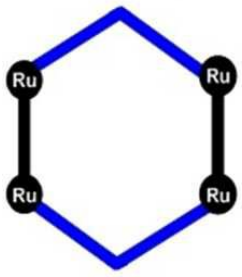
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 본 발명은 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

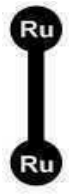
[0055] [화학식 1]

[0056] 

[0057] [화학식 2]

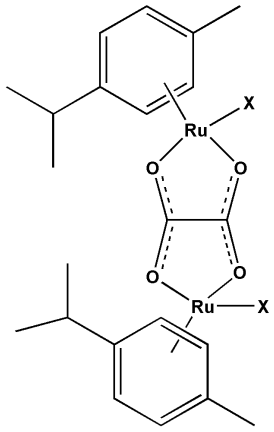
[0058] 

이고,

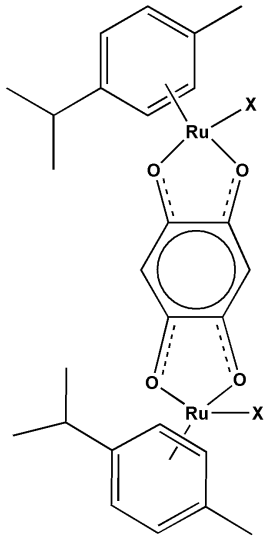
[0059] 

는,

[0060] [화학식 3a]

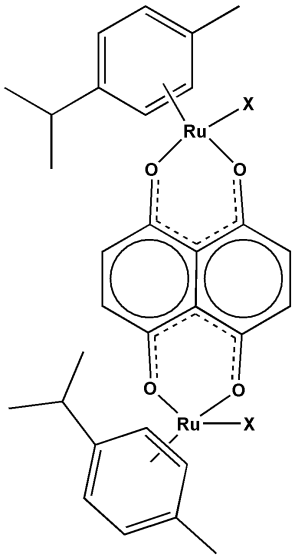
[0061] 

[0062] [화학식 3b]

[0063] 

또는

[0064] [화학식 3c]

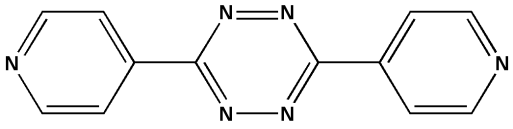


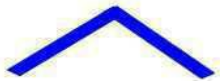
[0065] 이고,

[0066] 상기 화학식 3a, 화학식 3b 및 화학식 3c에서 상기 X는 각각 독립적으로 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf), 니트레이트(NO_3), 톨루엔-4-설포네이트(toulene-4-sulfonate, OTs), 메탄설포네이트(methanesulfonate, OMs), Cl, Br, I, BF_4, PF_6, ClO_4, CH_3COO 또는 CF_3COO 이며, 상기 ------는 단일결합 또는 이중결합이며,

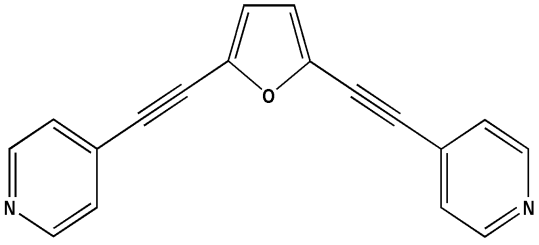
[0067] 상기 화학식 1의  는,

[0068] [화학식 4]

[0069]  이며,

[0070] 상기 화학식 2의  은,

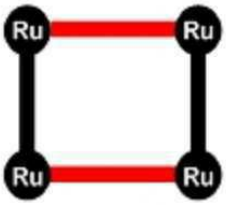
[0071] [화학식 5]

[0072]  이고,

[0073] 상기 화학식 4 또는 5의 방향족 고리내의 질소 원자와 화학식 3a 내지 화학식 3c의 루테늄이 각각 결합하며, 상기 X가 떨어져 나가 화학식 1 또는 2의 화합물을 형성한다.

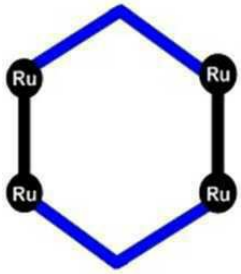
[0074] 더불어 본 발명은 하기 화학식 4 또는 5의 방향족 고리내의 질소 원자와 화학식 3c의 루테늄이 결합하며, 하기 X가 떨어져 나가 하기 화학식 1 또는 2의 화합물을 형성한 것을 특징으로 하는, 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0075] [화학식 1]

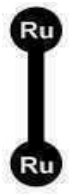


[0076]

[0077] [화학식 2]

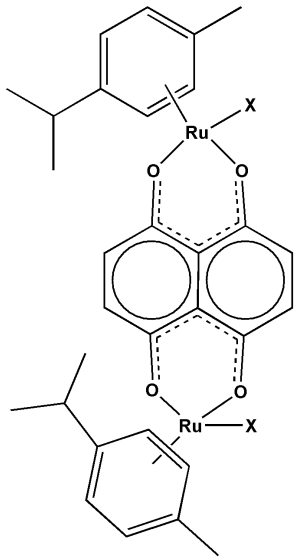


[0078] 이고,



[0079] 는,

[0080] [화학식 3c]

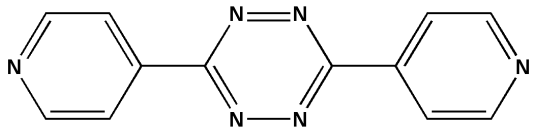


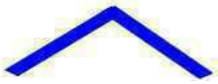
[0081] 이고,

[0082] 상기 화학식 3c에서 상기 X는 각각 독립적으로 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf), 니트레이트(NO_3), 톨루엔-4-설포네이트(toulene-4-sulfonate, OTs), 메탄설포네이트(methanesulfonate, OMs), Cl, Br, I, BF_4, PF_6, ClO_4, CH_3COO 또는 CF_3COO 이며, 상기 ┈┈ 는 단일결합 또는 이중결합이며,

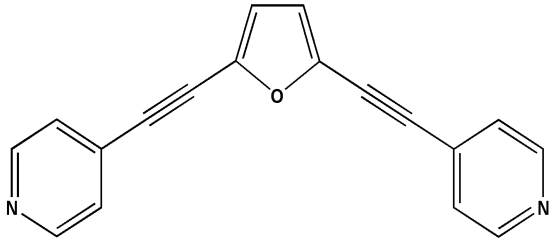
[0083] 상기 화학식 1의  는,

[0084] [화학식 4]

[0085]  이며,

[0086] 상기 화학식 2의  은,

[0087] [화학식 5]

[0088]  이다.

[0089] 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 본 발명의 아렌-루테늄 화합물은 약학적으로 허용가능한 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, 퓨마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 무기산으로는 염산, 유기산으로는 메탄설폰산을 사용할 수 있다.

[0090] 본 발명의 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 본 발명의 아렌-루테늄 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0091] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물을 수혼화성 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.

[0092] 본 발명에 따른 아렌-루테늄 화합물 1 내지 6의 제조 모식도를 도 1에 나타내었다. 도 1을 참조하면, 화학식 1의 4핵 아렌-루테늄 화합물은 화학식 3a의 $[Ru_2(\mu-\eta^4-C_2O_4)(\eta^6-p-iPrC_6H_4Me)_2][O_3SCF_3]_2$ (**A1**), 화학식 3b의 $[Ru_2(dobq)(\eta^6-p-Pr^iC_6H_4Me)_2][O_3SCF_3]_2$ (**A2**) 또는 화학식 3c의 $[Ru_2(donq)(\eta^6-p-Pr^iC_6H_4Me)_2][O_3SCF_3]_2$ (**A3**)와 화학식 4의 디피리딜 공여체 (dipyridyl donor)인 3,6-디(피리딘-4-일)-1,2,4,5-테트라진(3,6-di(pyridin-4-yl)-1,2,4,5-tetrazine, **L1**)이 동등한 몰로 포함된 용액을 니트로메탄/다이메틸에테르(CH_3NO_2/CH_3OH)에 넣고 교반하여 금속함유고리(metallacycles)인 자가 조립체(self-assembly) 1 내지 3으로써 수득하였다.

[0093] 또한 화학식 2의 4핵 아렌-루테늄 화합물은 화학식 3a의 $[Ru_2(\mu-\eta^4-C_2O_4)(\eta^6-p-iPrC_6H_4Me)_2][O_3SCF_3]_2$ (**A1**), 화학식 3b의 $[Ru_2(dobq)(\eta^6-p-Pr^iC_6H_4Me)_2][O_3SCF_3]_2$ (**A2**) 또는 화학식 3c의 $[Ru_2(donq)(\eta^6-p-Pr^iC_6H_4Me)_2][O_3SCF_3]_2$ (**A3**)와 화학식 5의 2,5-비스(피리딘-4-일에티닐)퓨란(2,5-bis(pyridin-4-ylethynyl)furan, **L2**)이 동등한 몰로 포함된 용액을 니트로메탄/다이메틸에테르(CH_3NO_2/CH_3OH)에 넣고 교반하여 금속함유고리(metallacycles)인 자가 조립체(self-assembly) 4 내지 6으로써 수득하였다.

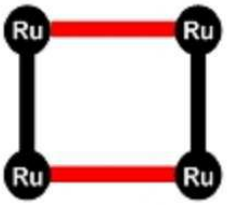
[0094] 상기와 같이 제조된 신규한 아렌-루테늄 화합물은 제조 후, 적외선 분광법, 핵자기 공명 스펙트럼, 질량분광법, 액체 크로마토그 래피법, X-선 구조결정법, 선광도 측정법 및 대표적인 화합물의 원소분석 계산치와 실측치의 비교에 의해 분자구조를 확인할 수 있다.

[0095] 또한 이하 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 화학식 1 또는 2의 4핵 아렌-루테늄 화합물은 인간 AGS(위암) 및 HCT-15(결장암) 세포주에서 자가포식 작용을 유도하여 암 세포의 세포사멸을 유도함으로써

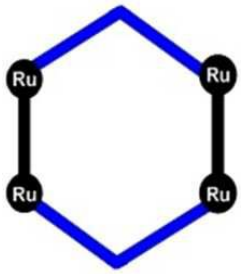
뛰어난 항암활성을 나타내는 바, 항암제의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0096] 따라서 본 발명은 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

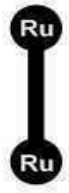
[0097] [화학식 1]

[0098] 

[0099] [화학식 2]

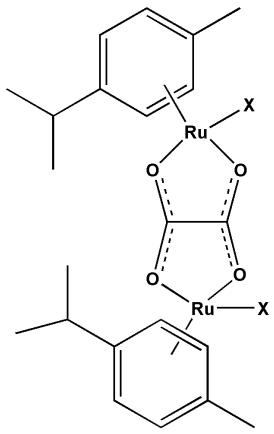
[0100] 

이고,

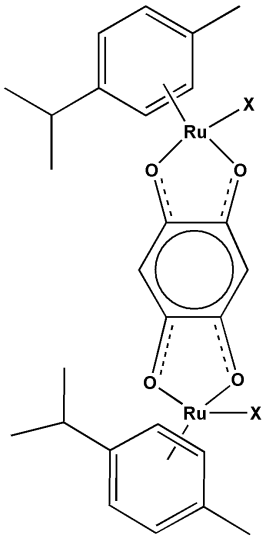
[0101] 

는,

[0102] [화학식 3a]

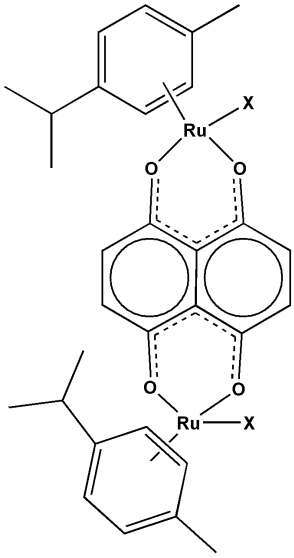
[0103] 

[0104] [화학식 3b]



[0105] 또는

[0106] [화학식 3c]

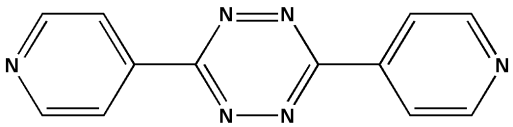


[0107] 이고,

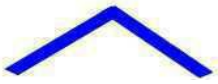
[0108] 상기 화학식 3a, 화학식 3b 및 화학식 3c에서 상기 X는 각각 독립적으로 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf), 니트레이트(NO_3), 톨루엔-4-설포네이트(toulene-4-sulfonate, OTs), 메탄설포네이트(methanesulfonate, OMs), Cl, Br, I, BF_4, PF_6, ClO_4, CH_3COO 또는 CF_3COO 이며, 상기 ------는 단일결합 또는 이중결합이며,

[0109] 상기 화학식 1의  는,

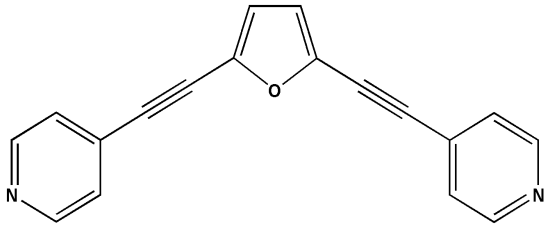
[0110] [화학식 4]



[0111] 이며,

[0112] 상기 화학식 2의  은,

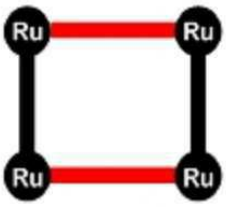
[0113] [화학식 5]

[0114]  이고,

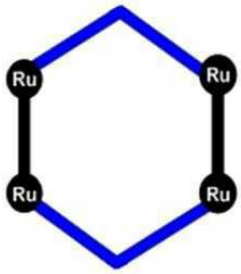
[0115] 상기 화학식 4 또는 5의 방향족 고리내의 질소 원자와 화학식 3a 내지 화학식 3c의 루테늄이 각각 결합하며, 상기 X가 떨어져 나가 화학식 1 또는 2의 화합물을 형성한다.

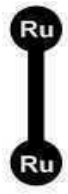
[0116] 또한 상기 아렌-루테늄 화합물은 하기 화학식 4 또는 5의 방향족 고리내의 질소 원자와 화학식 3c의 루테늄이 결함하며, 하기 X가 떨어져 나가 하기 화학식 1 또는 2의 화합물을 형성하는 것을 특징으로 하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0117] [화학식 1]

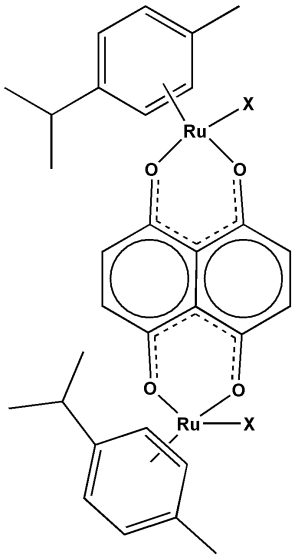
[0118] 

[0119] [화학식 2]

[0120]  이고,

[0121]  는,

[0122] [화학식 3c]

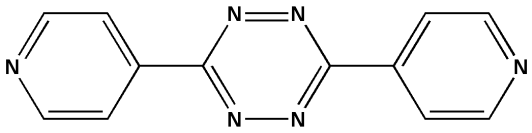


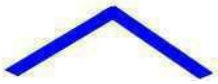
[0123] 이고,

[0124] 상기 화학식 3c에서 상기 X는 각각 독립적으로 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf), 니트레이트(NO_3), 톨루엔-4-설포네이트(toulene-4-sulfonate, OTs), 메탄설포네이트(methanesulfonate, OMs), Cl, Br, I, BF_4, PF_6, ClO_4, CH_3COO 또는 CF_3COO 이며, 상기 ------ 는 단일결합 또는 이중결합이며,

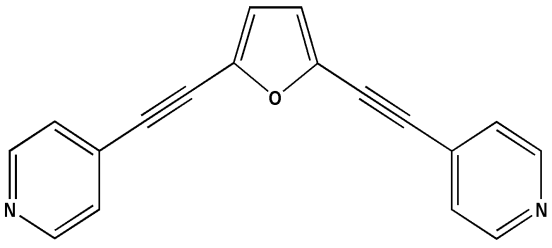
[0125] 상기 화학식 1의  는,

[0126] [화학식 4]

[0127]  이며,

[0128] 상기 화학식 2의  은,

[0129] [화학식 5]

[0130]  이다.

[0131] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물 100 중량부에 대하여 상기 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 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.

[0132] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

[0133] 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 스티레이트, 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, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0134] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제형은 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0135] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0136] 상기 아렌-루테늄 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 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.

[0137] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0138] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 암은 고형암일 수 있으며, 더욱 구체적으로 본 발명에 따른 화학식 1 또는 2의 아렌-루테늄 화합물은 위암(Gastric cancer), 결장(대장)암(Colorectal cancer), 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 (Oropgaryngeal 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), 간암 (Hepatoma), 담낭암 (Gall bladder cancer), 담도암 (Billiary tract tumor), 췌장암 (pancreatic cancer), 소장암 (Small intestinal tumor), 직장암 (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 또는 결장(대장)암의 치료에 사용될 수 있으나 이제 제한되는 것은 아니다.

[0139] 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.

[0140] **1. 일반 사항**

[0141] 수용체 클립(acceptor clip)인 $[Ru_2(\mu-\eta^4-C_2O_4)(\eta^6-p-iPrC_6H_4Me)_2][O_3SCF_3]_2$ (**A1**), $[Ru_2(dobq)(\eta^6-p-Pr^iC_6H_4Me)_2][O_3SCF_3]_2$ (**A2**) 및 $[Ru_2(donq)(\eta^6-p-Pr^iC_6H_4Me)_2][O_3SCF_3]_2$ (**A3**)는 표준 슈랭크 기술(standard Schlenk technique)를 따라 건성 질소(dry nitrogen) 대기 하에서 합성되었다. 3,6-디(피리딘-4-일)-1,2,4,5-테트라진(3,6-di(pyridin-4-yl)-1,2,4,5-tetrazine) (**L1**)와 2,5-비스(피리딘-4-일에티닐)퓨란(2,5-bis(pyridin-4-ylethynyl)furan) (**L2**)은 이미 공지된 방법(Chem. Soc. 2010, 132, 950-952 및 Chem. 2000, 39, 2547-2557)을 따라 합성하였고, 이미 공지된 방법(Pergamon Press, Oxford, UK, 1988)을 따라 건조한 후, 증류시켰다.

[0142] ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Bruker 300 MHz 스펙트로미터에서 기록되었다.

[0143] ^1H NMR 스펙트럼에서의 화학적 이동(δ)은 테트라메틸실란(Me_4Si)을 국제 표준(0.0ppm)으로 한 상대적인 ppm 값으로 기록되었다. 질량 스펙트럼은 MassLynx 작동 시스템으로 전자스프레이 이온화를 이용한 Micromass Quattro II triplequadrupole 질량 스펙트로미터 상에서 기록되었다. 원소 분석(Elemental analyses)은 Elemental GmbH Vario EL-3 장비를 사용하여 수행되었다.

[0144] 본 발명에 따른 화합물 **1**의 단일 결정(single crystal)에서 회절 데이터(diffraction data)는 ADSC Quantum 210 CCD 회절계(diffractometer)의 100 K와 초분자 결정학 빔라인 2D(Supramolecular Crystallography Beamline 2D)에서 l = 0.80000 A의 방사광(synchrotron radiation)에서 수집하였다(Pohang Accelerator Laboratory (PAL), Pohang, Korea).

[0145] 데이터 원본은 HKL200 프로그램을 이용하여 처리하고 변환하였다. 구조는 직접 분석법(direct methods)를 이용하여 분석하였고, SHELXTL program package의 F2 with appropriate software의 전체-매트릭스 최소 제곱법(full-matrix least-squares)를 이용하여 정제하였다. UV-Vis 스펙트럼은 Cary 100 Conc에 기록되었다.

[0146] **<실시예 1> 화합물 합성**

[0147] **1. 화합물 1 합성**

[0148] 공여체인 **L1**(2.36 mg, 0.01 mmol)과 루테늄 수용체인 **A1**(8.56 mg, 0.01 mmol)의 혼합물을 2mL의 니트로메탄/다이메틸에테르(CH_3NO_2/CH_3OH, 1:1)에 넣고 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 여과하고, 감압하에 용매를 제거하여 고체를 얻었다. 얻은 고체를 디에틸 에테르(diethyl ether)를 이용하여 세척하고 건조하여 수율 92%로 갈색 가루로써 화합물 **1**을 얻었다.

[0149] ^1H NMR (300 MHz, [D_3]Nitromethane): δ=8.47 (d, *J* = 6.0 Hz, 8H), 8.37 (d, *J* = 6.0 Hz, 8H), 5.96 (d, *J* = 6.3 Hz, 8H), 5.81 (d, *J* = 6.3 Hz, 8H), 2.85-2.98 (m, 4H), 2.27 (s, 12H), 1.39 ppm (d, *J* = 6.9 Hz, 24H); ^{1}3C NMR (75MHz, [D_3]Nitromethane): δ=166.9, 158.0, 150.0, 136.8, 119.7, 99.1, 93.9, 78.1, 77.7, 27.0, 17.0, 12.9; MS (ESI) for 1 ($C_{72}H_{72}F_{12}N_{12}O_{20}Ru_4S_4$): 597.57 $[\mathbf{1}\text{-}3OTf]^{3+}$ and 397.42 $[\mathbf{1}\text{-}4OTf]^{4+}$; C,H,N analysis (%) calcd for $C_{72}H_{72}F_{12}N_{12}O_{20}Ru_4S_4$ (2185.93): C 39.56, H 3.32, N 7.69; found: C 39.23, H 3.63, N 7.37.

[0150] **2. 화합물 2 합성**

[0151] 공여체인 **L1**(2.36 mg, 0.01 mmol)과 루테늄 수용체인 **A2**(9.06 mg, 0.01 mmol)의 혼합물을 2mL의 니트로메탄/다이메틸에테르(CH_3NO_2/CH_3OH, 1:1)에 넣고 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 여과하고, 감압하에 용매를 제거하여 고체를 얻었다. 얻은 고체를 디에틸 에테르(diethyl ether)를 이용하여 세척하고 건조하여 수율 90%로 포도주 빛(Wine-red color)의 가루로써 화합물 **2**를 얻었다.

[0152] ^{1}H NMR (300 MHz, [D_3]Nitromethane): δ=8.66 (d, *J* = 6.4 Hz, 8H), 8.49 (d, *J* = 6.4 Hz, 8H), 6.01 (d, *J* = 6.1 Hz, 8H), 5.75-5.89 (m, 12H), 2.87-3.03 (m, 4H), 2.25 (s, 12H), 1.40 (d, *J* = 6.9 Hz, 24H); ^{13}C NMR (75MHz, [D_3]Nitromethane): δ= 180.5, 150.0, 119.4, 100.1, 97.3, 94.9, 79.3, 78.1, 27.2, 17.0, 12.9; MS (ESI) for 2 ($C_{80}H_{76}F_{12}N_{12}O_{20}Ru_4S_4$): 422.44 [**2**-4OTf]$^{4+}$; C,H,N analysis (%) calcd for $C_{80}H_{76}F_{12}N_{12}O_{20}Ru_4S_4$ (2286.05): C 42.03, H 3.35, N 7.35; found: C 41.83, H 3.27, N 6.90.

[0153] **3. 화합물 3 합성**

[0154] 공여체인 **L1**(2.36 mg, 0.01 mmol)과 루테늄 수용체인 **A3**(9.57 mg, 0.01 mmol)의 혼합물을 2mL의 니트로메탄/다이메틸에테르(CH_3NO_2/CH_3OH, 1:1)에 넣고 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 여과하고, 감압하에 용매를 제거하여 고체를 얻었다. 얻은 고체를 디에틸 에테르(diethyl ether)를 이용하여 세척하고 건조하여 수율 91%로 바다색 (sea-green)의 가루로써 화합물 **3**을 얻었다.

[0155] ^{1}H NMR (300 MHz, [D_3]Nitromethane): δ= 8.81 (d, *J* = 6.3 Hz, 8H), 8.44 (d, *J* = 6.3 Hz, 8H), 7.28 (s, 8H), 5.82 (d, *J* = 6.2 Hz, 8H), 5.63 (d, *J* = 6.2 Hz, 8H), 2.86-3.01 (m, 4H), 2.20 (s, 12H), 1.38 (d, *J* = 7.0 Hz, 24H); ^{13}C NMR (75MHz, [D_3]Nitromethane): δ=172.5, 163.3, 154.7, 147.3, 132.4, 128.7, 127.9, 103.8, 99.3, 84.0, 83.4, 32.7, 22.8, 18.3; C,H,N analysis (%) calcd for $C_{88}H_{104}F_{12}N_{12}O_{20}Ru_4S_4$ (2386.17): C 44.30, H 3.38, N 7.04; found: C 43.18, H 3.44, N 6.68.

[0156] **4. 화합물 4 합성**

[0157] 공여체인 **L2**(2.70 mg, 0.01 mmol)의 CH_3NO_2 (1 mL) 용액을 루테늄 수용체인 **A1**(8.56 mg, 0.01 mmol)의 CH_3OH 용액(1 ml)에 적가하였다. 적가 후 혼합물을 40℃에서 36시간 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 여과하고, 감압하에 용매를 제거하여 고체를 얻었다. 얻은 고체를 디에틸 에테르(diethyl ether)를 이용하여 세척하고 건조하여 수율 88%로 노란색의 고체로써 화합물 **4**를 얻었다.

[0158] ^{1}H NMR (300 MHz, [D_4]Methanol): δ=8.03 (d, *J* = 6.0 Hz, 8H), 7.53 (d, *J* = 6.0 Hz, 8H), 6.89 (s, 4H), 5.92 (d, *J* = 6.1 Hz, 8H), 5.75 (d, *J* = 6.1 Hz, 8H), 2.74-2.88 (m, 4H), 2.21 (s, 12H), 1.35 (d, *J* = 6.7 Hz, 24H); ^{13}C NMR (75MHz, [D_4]Methanol): δ=172.5, 153.9, 139.1, 134.7, 128.3, 122.3, 103.9, 99.0, 92.7, 89.1, 83.3, 32.6, 22.7, 18.2; MS (ESI) for 4 ($C_{84}H_{76}F_{12}N_4O_{22}Ru_4S_4$): 602.38 [**4**-3OTf]$^{3+}$; C,H,N analysis (%) calcd for $C_{84}H_{76}F_{12}N_4O_{22}Ru_4S_4$ (2254.04): C 44.76, H 3.40, N 2.49; found: C 43.97, H 3.72, N 2.68.

[0159] **5. 화합물 5 합성**

[0160] 공여체인 **L2**(2.70 mg, 0.01 mmol)의 CH_3NO_2 (1 mL) 용액을 루테늄 수용체인 **A2**(9.06 mg, 0.01 mmol)의 CH_3OH 용액(1 ml)에 적가하였다. 적가 후 혼합물을 40℃에서 36시간 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 여과하고, 감압하에 용매를 제거하여 고체를 얻었다. 얻은 고체를 디에틸 에테르(diethyl ether)를 이용하여 세척하고 건조하여 수율 86%로 와인색(wine-red)의 고체로써 화합물 **5**를 얻었다.

[0161] ^{1}H NMR (300 MHz, [D_4]Methanol): δ=8.27 (d, *J* = 6.3 Hz, 8H), 7.49 (d, *J* = 6.3 Hz, 8H), 6.93 (s, 4H), 6.03 (d, *J* = 6.2 Hz, 8H), 5.76-5.84 (m, 12H), 2.80-2.95 (m, 4H), 2.19 (s, 12H), 1.35 (d, *J* = 7.0 Hz, 24H); ^{13}C NMR (75 MHz, [D_4]Methanol): δ=185.5, 154.2, 139.0, 134.7, 128.4, 124.2, 121.9, 119.9, 105.5, 103.0, 100.3, 92.3, 88.1, 85.0, 83.5, 32.8, 22.7, 18.3; MS (ESI) for 5 ($C_{92}H_{80}F_{12}N_4O_{22}Ru_4S_4$):

635.72 [**5**-3OTf]$^{3+}$, 439.55 [**5**-4OTf]$^{4+}$; C,H,N analysis (%) calcd for $C_{92}H_{80}F_{12}N_4O_{22}Ru_4S_4$ (2354.16): C 46.94, H 3.43, N 2.38; found: C 46.47, H 3.77, N 3.01.

[0162] **6. 화합물 6 합성**

[0163] 공여체인 **L2**(2.70 mg, 0.01 mmol)의 CH_3NO_2 (1 mL) 용액을 루테늄 수용체인 **A3**(9.57 mg, 0.01 mmol)의 CH_3OH 용액(1 ml)에 적가하였다. 적가 후 혼합물을 40℃에서 36시간 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 여과하고, 감압하에 용매를 제거하여 고체를 얻었다. 얻은 고체를 디에틸 에테르(diethyl ether)를 이용하여 세척하고 건조하여 수율 90%로 바다색(sea-green)의 고체로써 화합물 **6**을 얻었다.

[0164] ^{1}H NMR (300 MHz, [D_4]Methanol): δ=8.42 (d, *J* = 6.6 Hz, 8H), 7.43 (d, *J* = 6.6 Hz, 8H), 7.24 (s, 8H), 6.92 (s, 4H), 5.84 (d, *J* = 6.4 Hz, 8H), 5.61 (d, J = 6.4 Hz, 8H), 2.75-2.89 (m, 4H), 2.09 (s, 12H), 1.32 (d, *J* = 6.8 Hz, 8H); ^{13}C NMR (75 MHz, [D_4]Methanol): δ=172.5, 153.3, 138.8, 134.5, 128.2, 121.6, 119.9, 112.8, 105.2, 101.3, 92.4, 87.7, 86.0, 84.2, 32.2, 22.7, 17.5; MS (ESI) for **6** ($C_{100}H_{84}F_{12}N_4O_{22}Ru_4S_4$): 669.07 [**6**-3OTf]$^{3+}$; C,H,N analysis (%) calcd for $C_{100}H_{84}F_{12}N_4O_{22}Ru_4S_4$ (2456.04): C 48.94, H 3.45, N 2.28; found: C 48.03, H 3.60, N 2.62.

[0165] **<실시예 2> 화합물 분석**

[0166] **1. NMR 분석**

[0167] ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Bruker 300 MHz 스펙트로미터에서 기록되었다.

[0168] ^{1}H NMR 스펙트럼에서의 화학적 이동(δ)은 테트라메틸실란(Me_4Si)을 국제 표준(0.0ppm)으로 한 상대적인 ppm 값으로 기록되었다.

[0169] 도 2를 참조하면, L1에 상대적으로 피리딘 고리(pyridine rings)의 Hα 핵(Hα nuclei)는 업필드 이동(upfield shifts, Δδ = 0.17-0.51 ppm)을 보였고, 대부분의 스펙트라는 루테늄(II) 중심(Ru(II) centers)으로의 피리딘-N(pyridine-N)의 배위(coordination)에 따른 전자 밀도의 손실로 인해 발생하였다.

[0170] 캡핑된(capped) P-시멘 잔기(p-cymene moiety)에 해당하는 양성자는 약 δ = 5.63-6.01 ppm에서 2개의 이중선(doublets)으로 발생하였으며, 본 발명에 따른 화합물 **2**의 벤조퀴논(benzoquinone) 양성자에 대한 신호는 δ = 5.84 ppm에서, 본 발명에 따른 화합물 **3의** 나프토퀴논(naphthoquinone) 양성자에 대한 신호는 δ = 7.28 ppm에서 날카로운 단일선(singlets)으로 관찰되었다.

[0171] **2. 질량 스펙트럼 분석**

[0172] 본 발명에 따른 화합물의 구성에 대한 정확한 분석을 위하여 전자스프레이 이온화 질량분석(Electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)을 수행하였다.

[0173] 도 3의 ESI-MS 분석의 결과에서, [2+2]자가-조립의 4핵의 매크로사이클([2+2] self-assembled tetranuclear macrocycles) **1**과 **2**의 형성은 다중 전하 단편화 이온(multiply charged fragmented ions)의 출현으로 확인하였다.

[0174] 본 발명에 따른 화합물 **1**에 대한 다중 전하 단편화 이온은 m/z 579.57 [**1**-3TfO]$^{3+}$와 m/z = 397.42 [**1**-4TfO]$^{4+}$에서 관찰되었고, 본 발명에 따른 화합물 **2**에 대한 다중 전하 단편화 이온은 m/z 422.44 [**2**-4TfO]$^{4+}$에서 관찰되었으며, 이 피크들은 동위 원소적으로 분석되었다.

[0175] 동위원소적 패턴(isotopic patterns)과 마찬가지로 예상된 피크의 출현을 통해 본 발명에 따른 화합물 **1**과 **2**의 [2+2] 자가 조립체 형성을 명백히 확인하였다.

[0176] 본 발명에 따른 화합물 **4** 내지 **6**의 ES1 질량 스펙트럼의 결과에서 4는 m/z 602.38 [**4**-3OTf]$^{3+}$, 5는 636.06 [**5**-3OTf]$^{3+}$와 439.55 [**5**-4OTf]$^{4+}$, 6은 669.05 [**6**-3OTf-]$^{3+}$에서 피크를 보였다.

[0177] **3. UV-vis 분석**

[0178] 본 발명에 따른 화합물 **1** 내지 **6**과 그들의 해당하는 금속 수용체(A1 내지 A3)와 공여체(L1 그리고 L2)에 대한 UV-vis흡수 스펙트라의 결과는 메탄올 용액에 기록되었다.

[0179] 그 결과 도 4와 같이, 본 발명에 따른 화합물 **1** 내지 **6**에서 관찰된 높은 에너지 밴드는 자유 L1과 L2에서도 관찰되었고, 이는 자가 조립시에 보존된 디피리딜 리간드(dipyridyl ligand)의 확장된 방향족 시스템(aromatic system)에 대하여 π→π*전이(transitions)가 발생할 것을 시사한다.

[0180] 복핵 아렌-루테늄 수용체(dinuclear arene-Ru acceptors)도 250-300 nm에서 약간 높은 에너지 흡수 밴드를 가지며, A3의 동크 스페이서(donq spacer) 또한 ~400 내지 550nm으로부터 광범위하게 낮은 에너지 흡수 밴드가 발생되는 것을 확인하였다.

[0181] **4. 화합물 1의 분자구조**

[0182] 본 발명에 따른 화합물 **1**의 분자구조는 X-선 결정학(X-ray crystallography)을 통해 확인하였다.

[0183] 싱크로트론 방사(synchrotron radiation)을 이용하는 X-선(X-ray) 분석을 위한 적절한 화합물 **1**의 단 결정(single crystal)은 화합물 **1**의 메탄올 용액(methanol solution)에 디에틸 에테르(diethyl ether)를 느리게 증기 확산(vapor diffusion)시켜 얻었다.

[0184] 도 5와 같이, 단일 결정 x선 회절 분석(single crystal X-ray differaction analysis)의 결과에서 화합물 **1**은 4핵 직사각형 구조(tetranuclear rectangular architecture)를 가지며, 결정학상의 반전 중심(crystallographic inversion center)에 놓여 있는 것을 확인하였다.

[0185] 또한 화합물 **1**의 투시도(Perspective drawings)를 결정했으며, 하기 표 1에 선택된 본드(bond)의 길이와 각도를 기재하였다.

표 1

[0186]

Ru(1)-N(1)와 Ru(1)#-N(1)#	2.110(10)	**Ru(1)-O(1)**	2.102(8)
Ru(1)-O(2)	2.112(9)	**Ru(2)-N(2)와 Ru(2)#-N(2)#**	2.098(9)
Ru(2)-O(3)	2.092(9)	**Ru(2)-O(4)**	2.118(8)
O(1)-Ru(1)-O(2)	78.7(3)	**O(1)-Ru(1)-N(1)**	82.2(4)
O(2)-Ru(1)-N(1)	81.3(3)	**O(3)-Ru(2)-O(4)**	78.8(3)
O(3)-Ru(2)-N(2)	82.8(4)	**O(4)-Ru(2)-N(2)**	84.6(3)

[0187] **<실시예 3> 세포 외 항암 활성 분석**

[0188] **1. 세포 준비**

[0189] 인간 위암 세포주 AGS와 인간 결장암 세포주 HCT15는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서 얻었다. 모든 세포는 37℃, 5% CO_2 존재 하에 5% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 배지(RPMI 1640 medium)에서 배양하였다.

[0190] **2. 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드 (colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 분석**

[0191] 상기 실시예 3 중 1에서 준비한 두 세포에 본 발명의 화합물 **1** 내지 **6**을 처리한 후 MTT 분석으로 세포 생존율을

평가하였다. 세포를 96-웰 플레이트에 접종하고, 37℃에서 배양한 후, 각각의 화합물로 24시간 동안 자극하였다. 각 웰의 세포를 37℃, 5% CO_2 존재 하에서, 10 μL의 MTT 용액과 4시간 동안 배양한 후 100 μL의 다이메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO)를 첨가하였다. 그런 후 효소결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 리더기를 이용하여 파장 550nm에서 흡광도 농도 값을 측정하였다. 흡광도 농도 값(absorbance density values)은 처리되지 않은 세포와 처리된 세포의 흡광도 비로부터 계산하였다. 세포 성장을 위한 최대량-절반의 억제 농도(inhibitory concentration, IC_{50})값은 선행 회귀 함수(linear regression function)를 사용하여 약물 농도의 대수(logarithm)에 대한 세포 생존의 밸분율 대수의 플롯(plot)을 피팅(fitting)하여 구하였다.

[0192] 상기 IC_{50} 값은 이미 공지된 항종양 약물인 시스플라틴(cisplatin), 독소루비신(doxorubicin)과 비교하여 하기 표 2에 기재하였다.

표 2

[0193]

Sample	IC_{50}[μM][a]	
	AGS	HCT-15
1	>200	>200
2	180.4±11.64	>200
3	29.6±0.58	29.1±0.64
4	>200	>200
5	105.0±10.16	>200
6	22.8±1.00	26.8±2.50
L1	>200	>200
L2	152.2±5.13	>200
A3	125.2±7.64	>200
시스플라틴	107.4±1.87	12.4±1.85
독소루비신	3.0±0.09	15.2±1.43

[0194] 그 결과 본 발명에 따른 화합물 **3**과 **6**은 상당한 효능을 보여주었다. 화합물 **3**과 **6**(IC_{50} = 29.6 μM, 22.8 μM)의 효능은 AGS 암 세포에 대하여 시스플라틴(IC_{50} = 107.4 μM)보다 효능이 더 좋았으며, HCT-15 암 세포에서 화합물 **3**과 **6**(IC_{50} = 29.1 μM, 26.8 μM)의 효능은 시스플라틴(IC_{50} = 12.4 μM)과 독소루비신(IC_{50} = 15.2 μM)의 효능과 비슷하였다.

[0195] **<실시예 4> 동물 모델 내 항암 활성 분석**

[0196] **1. 세포 및 할로우 파이버(Hollow fiber, HFs) 준비**

[0197] HCT-15 세포는 37℃, 95%의 습도, 5%의 CO_2 존재하에서 75-cm^2의 배양 플라스크에서 배양하였다. 폴리비닐이딘 플루오라이드(Polyvinylidene fluoride, HFs)와 1-mm 내경(internal diameter)및 500 kDa의 분자량 컷오프 포인트(molecular weight cutoff point, Spectrum Laboratories, Houston, TX, USA)를 사용하였다. 살균한 HFs는 5 × 10^5 cells/mL의 밀도로 HCT-15 세포를 채우기 전에 정상 성장 메디아(normal growth media)로 세척하였다.

[0198] 각 fiber는 뜨겁고 부드러운 바늘 홀더(hot smooth-jawed needle holder)로 1.5 cm의 간격으로 열 밀봉하였고, 취급의 용이성을 위해 2-mm의 꼬리를 가진 세그먼트(segment)로 잘랐다. 각 HFs 세그먼트는 약 10^5 세포를 포함하였다. 준비된 HFs 세그먼트는 주입 전에 정상적인 성장 조건의 시험관 내에서 24시간 동안 유지하였다.

[0199] **2. 생체 내 이식**

[0200] 상기 실시예 4 중 1에서 준비한 HFs의 생체 내 이식을 위해, 6주령 누드 마우스를 사용하였다.

[0201] 모든 동물들은 12시간 명암 주기(12 h light-dark cycles)에 따라 물과 음식(Purina 5001 Rodent Chow; Purina, St. Louis, MO, USA)을 공급하여 사육하였다. 마우스는 졸레틸(Zoletil)과 럼푼(Rompun)을 이용하여 마취하였다. HFs를 마취한 마우스의 피하(subcutaneou, s.c.) 및 복막(peritoneal, i.p.)에 이식하였고, 피부 스테이플(skin staple)을 이용하여 봉합하였다.

[0202] 이틀 후, 수컷 마우스에게 7일 동안 체중에 대한 100mg/kg의 위관 영양법(gavage)을 이용하여 먹이를 주었다. 그리고 마우스들에게 100 $\mu g\ kg^{-1}$ b.w./day의 화합물 **3**과 **6**을 각각 7일 동안 투여하였다.

[0203] HFs 내의 생존 세포 수를 분석하기 위해, HFs를 0.5 ml의 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)으로 옮긴 후, 메스를 이용하여 길이 방향으로 반으로 절단하고, EDTA 용액으로 3분 동안 세척하였다. 그리고 0.5ml의 트립신(trypsin)으로 5분간 세척한 후, 배지로 3분 동안 세척하였다.

[0204] 모든 세척액을 모아 5분 동안 500g의 속도로 원심분리하여 세포를 모았다. 생존 세포의 수는 트리판 블루 배제 분석(trypan blue exclusion assay)을 사용하여 확인하였다.

[0205] **3. 할로우 파이버 분석(hollow fiber assay)**

[0206] 그 결과 도 6과 같이, 본 발명에 따른 화합물 **3**과 **6**에 의하여 I.P. 부위의 종양 세포의 증식이 억제되었으며, 화합물 **3**에 의한 성장 억제 효과는 14.2%, 화합물 **6**에 의한 성장 억제 효과는 21.8%인 것으로 관찰하였다. S.C.부위에서는 화합물 **3**에 의한 성장 억제 효과는 7.9%, 화합물 **6**에 의한 성장 억제 효과는 8.5%로 I.P. 부위에 비하여 낮은 값을 보였는데 이는 발달된 혈관의 부족에 의한 것이라고 판단된다.

[0207] **<실시예 5> 화합물의 자가포식 작용 활성 효과 확인**

[0208] 생채 내, 생체 외 실험을 통해 화합물 **3**과 화합물 **6**의 항종양 활성을 확인한 후, HCT-15 세포에서 화합물 **3**과 화합물 **6**의 자가포식 작용 유발 여부를 평가하였다. 모노단실카다베린(Monodansylcadaverine, MDC) 염색은 자가포식 작용 숙성 과정에서 축적되는 자가포식 액포(autophagic vacuoles)를 검출하는 데 사용되었다.

[0209] HCT-15 세포는 37℃에서 10분 동안 PPM1640배지에서 0.05mM의 MDC(Sigma)로 표시하였다. 배양 후, 세포를 인산완충염으로 3회 세척하고, 즉시 필터 시스템(V-2A excitation filter:380/420 nm, barrier filter:450 nm)이 장착된 형광현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용하여 분석하였다. 시야 및 형광 이미지는 디지털 카메라(DP30BW; Olympus)로 촬영하였다.

[0210] 그 결과 도 7과 같이, 화합물 **3**과 화합물 **6**의 처리에 의해, 자가포식 액포를 표지한 MDC의 숫자가 현저하게 증가하였다.

[0211] 화합물 **3**과 화합물 **6** 모두, 낮은 농도(0 내지 5μM)에서 자가포식 작용 활동을 강하게 유도하였으며, 더 높은 농도에서는 자가포식 작용 활동이 감소하였다. 이러한 결과는 증가하는 세포 사와 감소하는 세포 증식과 아주 유사하였다.

[0212] 한편, 본 발명에 따른 화합물 **3** 또는 **6**은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 상기 화합물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0213] **<제제예 1> 정제(직접 가압)**

[0214] 5.0mg의 화합물 **3** 또는 **6**을 체로 친 후, 락토스 14.1 mg, 크로스포비돈 USNF 0.8 mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.1 mg을 혼합하고 가압하여 정제로 제조하였다.

[0215] **<제제예 2> 정제(습식 조립)**

[0216] 5.0mg의 화합물 **3** 또는 **6**을 체로 친 후, 락토스 16.0 mg과 녹말 4.0mg을 섞었다. 폴리솔베이트 80 0.3 mg을 순수한 물에 녹인 후 이 용액의 적당량을 첨가한 다음, 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후 콜로이달 실리콘 디옥사이드 2.7 mg 및 마그네슘 스테아레이트 2.0 mg과 섞었다. 미립을 가압하여 정제로 제조하였다.

[0217] **<제제예 3> 분말과 캡슐제**

[0218] 5.0mg의 화합물 **3** 또는 **6**을 체로 친 후에, 락토스 14.8 mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg와 함께 혼합하였다. 상기 혼합물을 적당한 장치를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 넣어 캡슐제를 제조하였다.

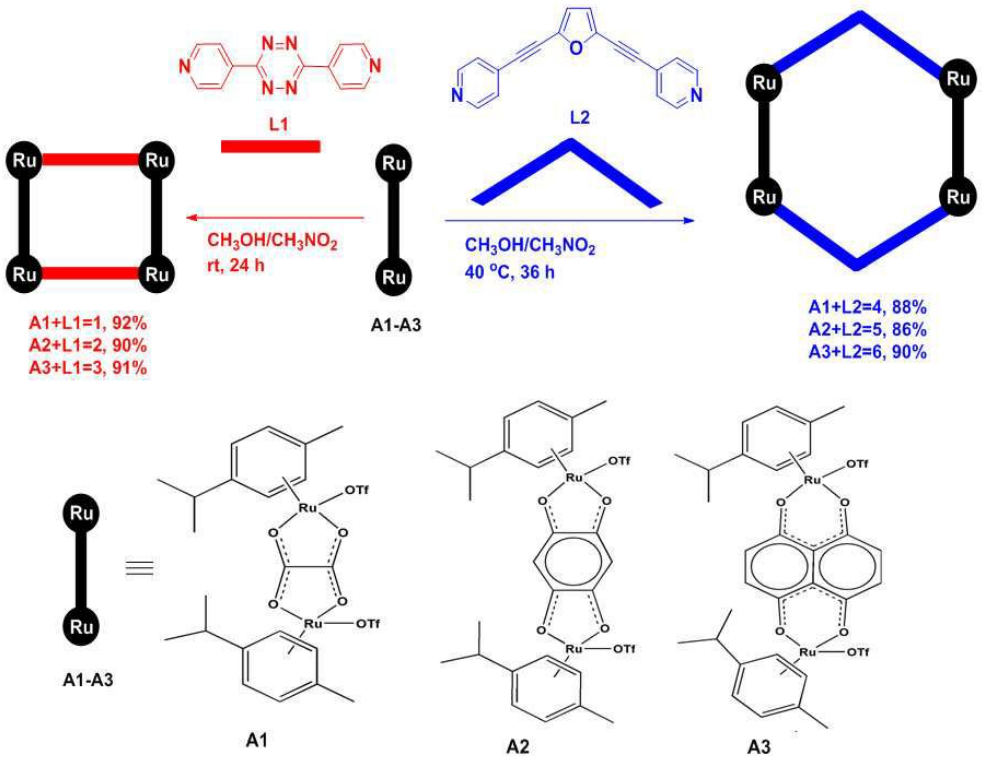
[0219] **<제제예 4> 주사제**

[0220] 100mg의 화합물 **3** 또는 **6**, 만니톨 180 mg, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 26 mg 및 증류수 2974 mg를 혼합하였다. 상기 혼합용액을 투명 유리로 된 앰틀 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 상부 격자하에 봉입시키고, 120 ℃에서 15분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사제를 제조하였다.

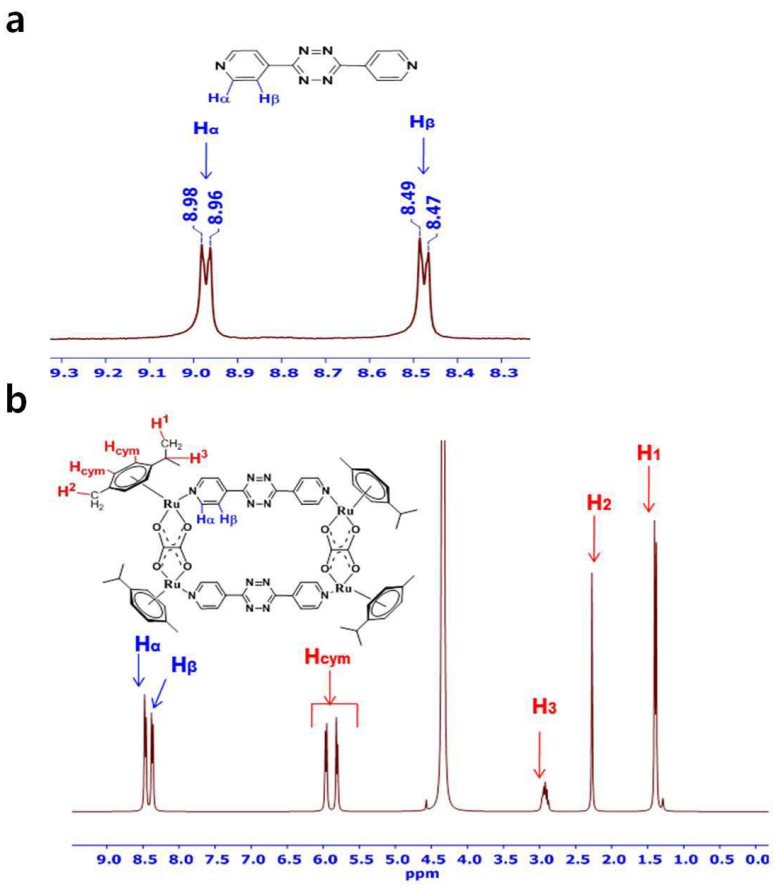
[0221] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서,본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

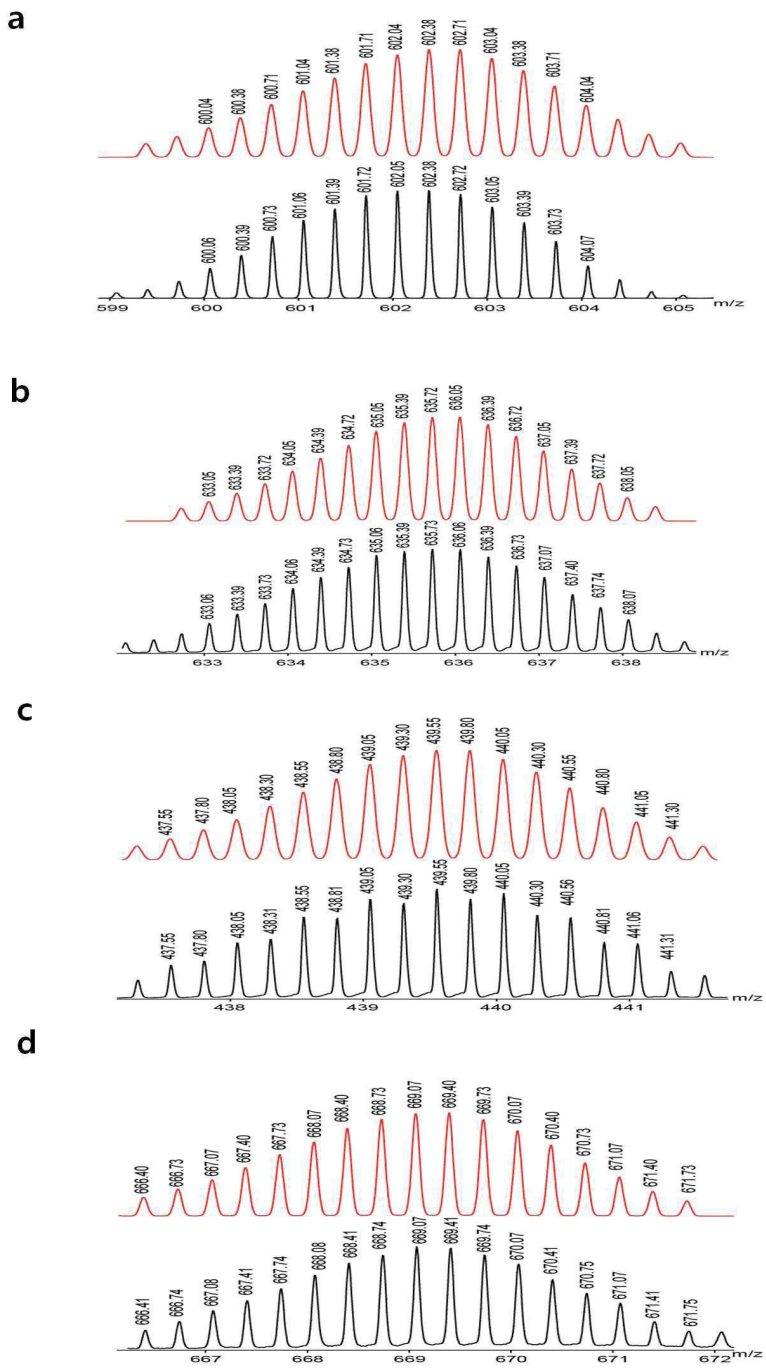
도면1



도면2

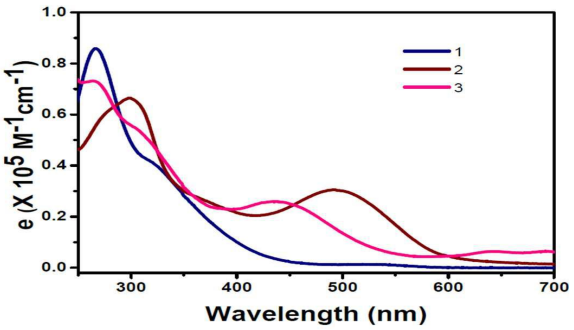

a
Hα
Hβ
8.98
8.96
8.49
8.47
9.3 9.2 9.1 9.0 8.9 8.8 8.7 8.6 8.5 8.4 8.3
b
H1
H2
H3
Hcym
Hα
Hβ
9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
ppm

도면3

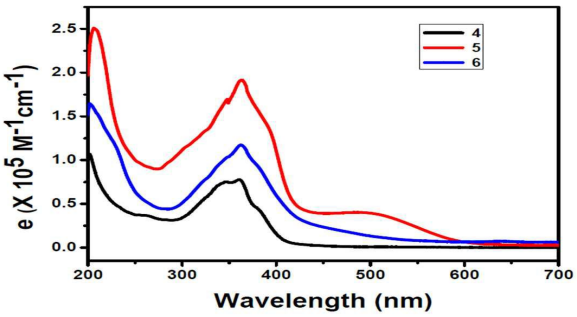

a
600.04
600.38
600.71
601.04
601.38
601.71
602.04
602.38
602.71
603.04
603.38
603.71
604.04
600.06
600.39
600.73
601.06
601.39
601.72
602.05
602.38
602.72
603.05
603.39
603.73
604.07
599
600
601
602
603
604
605
m/z
b
633.05
633.39
633.72
634.05
634.39
634.72
635.05
635.39
635.72
636.05
636.39
636.72
637.05
637.39
637.72
638.05
633.06
633.39
633.73
634.06
634.39
634.73
635.06
635.39
635.73
636.06
636.39
636.73
637.07
637.40
637.74
638.07
633
634
635
636
637
638
m/z
c
437.55
437.80
438.05
438.30
438.55
438.80
439.05
439.30
439.55
439.80
440.05
440.30
440.55
440.80
441.05
441.30
437.55
437.80
438.05
438.31
438.55
438.81
439.05
439.30
439.55
439.80
440.05
440.30
440.56
440.81
441.06
441.31
438
439
440
441
m/z
d
666.40
666.73
667.07
667.40
667.73
668.07
668.40
668.73
669.07
669.40
669.73
670.07
670.40
670.73
671.07
671.40
671.73
666.41
666.74
667.08
667.41
667.74
668.08
668.41
668.74
669.07
669.41
669.74
670.07
670.41
670.75
671.07
671.41
671.75
667
668
669
670
671
672
m/z

도면4

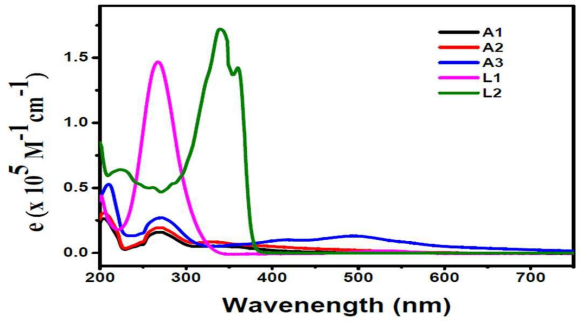
a


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
e (X 10^5 M^-1cm^-1)
1
2
3
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)

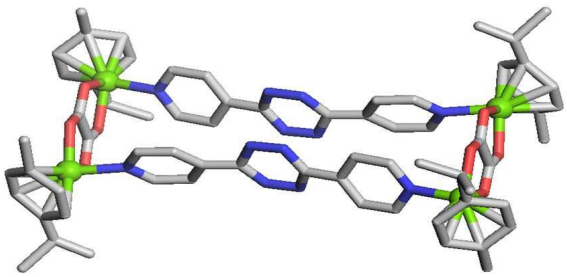
b

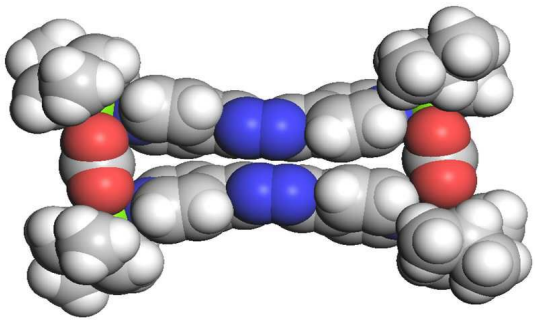

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
e (X 10^5 M^-1cm^-1)
4
5
6
200
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)

c

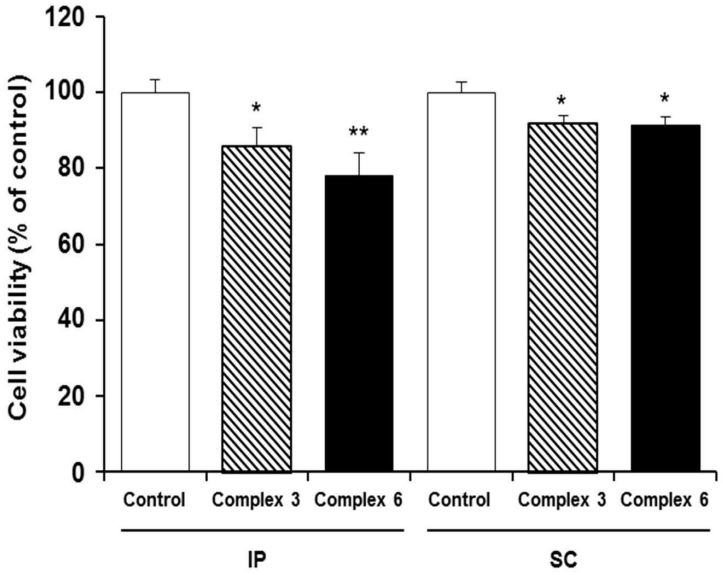

1.5
1.0
0.5
0.0
e (x 10^5 M^-1 cm^-1)
A1
A2
A3
L1
L2
200
300
400
500
600
700
Wavenength (nm)

도면5

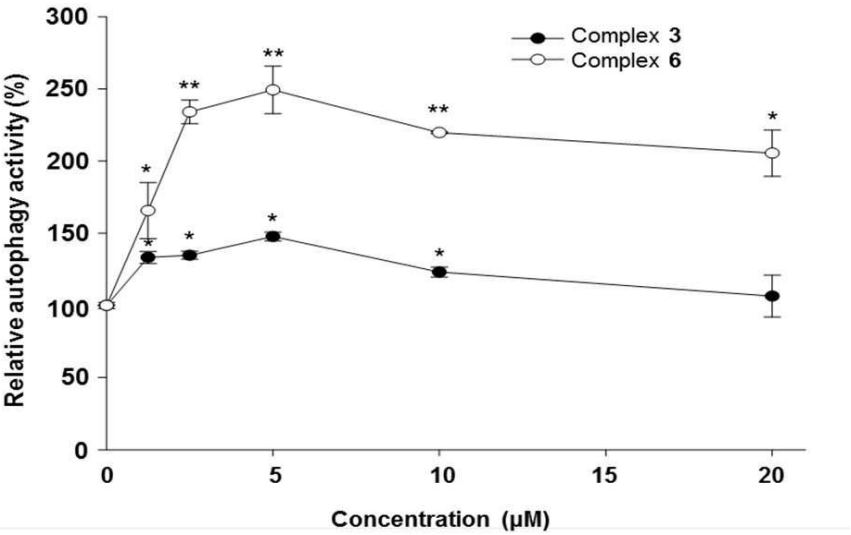




도면6


Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
Control
Complex 3
Complex 6
Control
Complex 3
Complex 6
IP
SC

도면7


Relative autophagy activity (%)
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
Concentration (μM)
Complex 3
Complex 6