(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0028108
(43) 공개일자 2019년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/381 (2006.01) *A61K 33/24* (2019.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/381 (2013.01)
A61K 33/24 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2017-0115162
(22) 출원일자 2017년09월08일
심사청구일자 2017년09월08일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
지기환
울산광역시 중구 우정3길 9, 104동 903호 (우정동, 선경아파트)
김태근
울산광역시 중구 신기12길 70, 702동 201호 (태화동, 희마아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 5 항

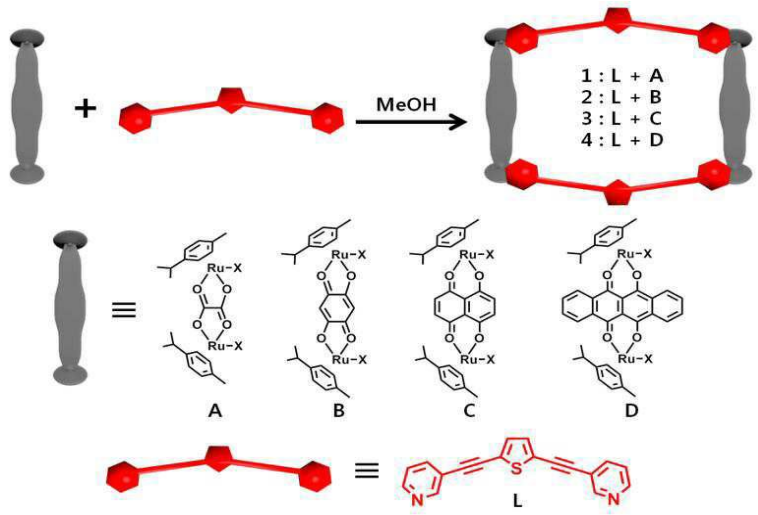
(54) 발명의 명칭 **티오펜 유래 공여체 및 아렌-루테늄 수용체를 이용한 자체조립 화합물을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 티오펜 유래 공여체 및 아렌-루테늄 수용체를 이용한 자체조립 화합물을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서는 티오펜 유래 공여체 및 아렌-루테늄 수용체를 이용하여 자체조립 거대고리 화합물을 제조하였으며, 상기 자체조립 거대고리 화합물은 간암 세포주인 HepG2 세포주의 세포 증식을 억제하고, 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라제(poly-(ADP-ribose) polymerase; PARP), 카스파제-3(caspase-3) 및 카스파제-8의 절단을 촉진하며, Bax/Bcl-2의 발현 비율을 증가시켜 외인성 및 내인성 세포사멸 경로를 활성화시킴으로써 암세포의 세포사멸을 유도할 수 있다.

따라서, 상기와 같은 효과를 가지는 본 발명의 자체조립 거대고리 화합물은 암질환 예방 또는 치료용 약학 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A2B4007433
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인연구지원사업(중견연구)
연구과제명 배위결합이 원동력인 자체조립을 이용한 초분자공학 연구 및 이의 생화학적 응용(2)
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

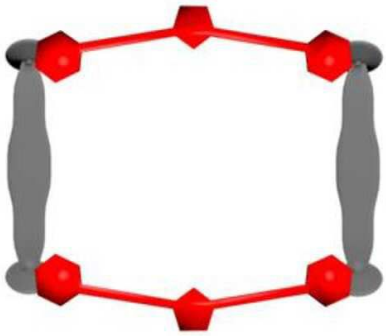
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 자체조립 거대고리 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]

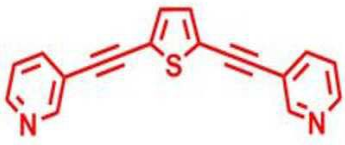


상기 화학식 1에서,



은 하기 화학식 1-1로 표시되는 화합물이고,

[화학식 1-1]

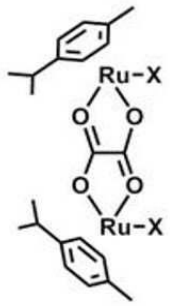


상기 화학식 1에서,

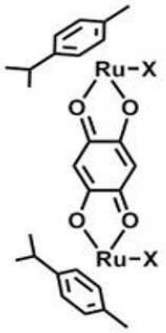


은 하기 화학식 1-2 내지 1-5로 표시되는 화합물 중에서 선택된 어느 하나이며,

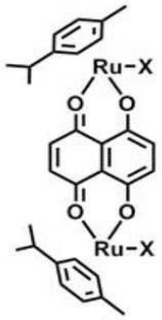
[화학식 1-2]



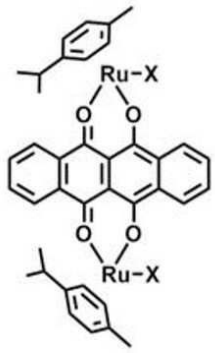
[화학식 1-3]



[화학식 1-4]



[화학식 1-5]



상기 화학식 1-2 내지 1-5에서 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 화학식 1-1로 표시되는 화합물의 양 말단에 존재하는 방향족 고리 내의 질소 원자가 상기 화학식 1-2 내지 1-5로 표시되는 화합물 중 어느 하나에 존재하는 루테늄과 각각 결합하며, 상기 X가 떨어져 나가 화학식 1의 화합물을 형성함.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 자체조립 거대고리 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암세포의 세포 생존율을 감소시키고, 암세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 자체조립 거대고리 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라제(poly-(ADP-ribose) polymerase; PARP), 카스파제-3(caspase-3) 및 카스파제-8의 절단을 촉진하고, Bax/Bcl-2의 발현 비율을 증가시켜 암세포의 사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 암질환은 고형암인 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 고형암은 간암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 위암, 대장암, 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 구강암, 흉부종양, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 직장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 티오펜 유래 공여체 및 아렌-루테늄 수용체를 이용한 자체조립 화합물을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자체조립(self-assembly)이란, 구성물이 본질적으로 갖고 있는 내재된 정보에 의해 분자종들이 자발적이고 가역적인 화합체를 만들어 더 크고 복잡한 초분자(supermolecule)를 형성하는 것을 의미한다. 분자는 수소결합, 반데르발스 결합(van der waals force), 정전기력 등에 의해 자신들끼리 모여 더 큰 분자를 이루는데, 이들 힘은 공유결합 보다 약하지만, 집단적으로 작용할 때는 공유결합 못지 않은 결합력을 발휘하며 생명체에서 흔히 발견된다. 자체조립에서 일반적으로 리간드(ligand)는 배위결합을 할 수 있는 비공유 전자쌍을 가지고 있어야 하며, 수용체는 전자를 받아들일 수 있는 전이금속이나 전이금속이 포함된 분자들이 주로 쓰인다. 자체조립 분자는 리간드와 수용체가 반데르발스 힘, 수소결합, 배위결합 등의 분자 간 상호작용으로 인하여 50 kcal 미만의 에너지로 형성됨으로 열역학적으로 조절되는 가역적 반응이 일어나게 된다. 이러한 특징으로 인해 형성되는 분자는 선형 고분자 형태 보다는 고리 화합물이 선호된다.

[0003] 금속 약학 분야는 금속 기반 약물의 치료학적 적용 때문에 의약 화학의 중요한 분야로 대두되고 있다. 배금 복합체 특히, 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin) 및 옥사플라틴(oxaplatin)은 높은 독성 및 신경, 간 및 신장 독성 부작용에도 불구하고, 현재 가장 효과적인 화학적 치료제로 사용되고 있다. 그러나 백금계 약물과 관련된 높은 전신 독성 및 저항성 문제들은 대안적인 금속계 항종양제 및 더욱 안전하고 효과적인 치료제의 설계 및 약리학적 발전에 관심을 갖는 새 시대를 열었다. 종래 문제점들을 개선하기 위하여, 무기금속, 유기, 유기-무기금속 혼합형 약제에 대한 시도가 이루어졌다. 특히, 루테늄(ruthenium) 복합체는 백금계 약물에

잘 반응하지 않는 종양에 있어서 저독성 및 고활성을 갖는 금속계 약물로 촉망받고 있다. 또한, 최근 다양한 리간드와 자체조립을 통한 금속 덴드리머 형에서부터 다양한 크기와 형태를 가진 다양하고 선택적인 약제들의 개발이 연구 중에 있다.

[0004] 방향족 5원자 헤테로고리 화합물인 티오펜(thiophene)은 생물학적 과정에서 필수적인 역할을 하고, 화학, 농약 및 약리학적으로 중요한 헤테로고리 화합물을 대표한다. 또한, 티오펜은 광범위한 효과를 가지는 많은 약물의 기본 구조 단위이며, 항염증제, 항우울제, 항응고제, 항정신병제, 항곰팡이 및 항암제로 사용되고, 신규 다중키나아제 억제제(multikinase inhibitor)인 OSI-930 또한 티오펜 잔기를 함유하고 있다. 그러나, 암질환에 있어서 티오펜 유래 공여체 및 아렌-루테늄 수용체를 이용한 자체조립 화합물의 항암 효과는 현재까지 밝혀진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-1683350호 (2016.11.30 등록)

발명의 내용

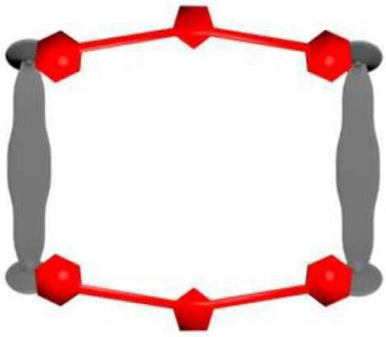
해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 티오펜 유래 공여체 및 아렌-루테늄 수용체를 이용하여 [2+2] 배위결합 유도를 통해 제조된 자체조립 거대고리 화합물을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 자체조립 거대고리 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다:

[0008] [화학식 1]



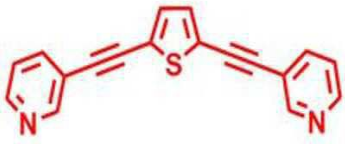
[0009]

[0010] 상기 화학식 1에서,



[0011] 은 하기 화학식 1-1로 표시되는 화합물이고,

[0012] [화학식 1-1]



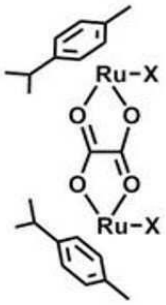
[0013]

[0014] 상기 화학식 1에서,



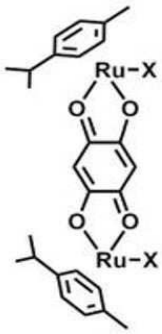
[0015] 은 하기 화학식 1-2 내지 1-5로 표시되는 화합물 중에서 선택된 어느 하나이며,

[0016] [화학식 1-2]



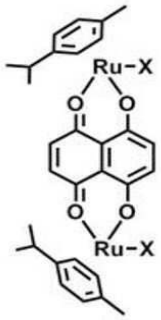
[0017]

[0018] [화학식 1-3]



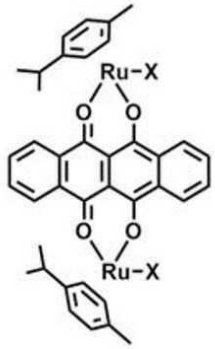
[0019]

[0020] [화학식 1-4]



[0021]

[0022] [화학식 1-5]



[0023]

[0024] 상기 화학식 1-2 내지 1-5에서 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,

[0025] 상기 화학식 1-1로 표시되는 화합물의 양 말단에 존재하는 방향족 고리 내의 질소 원자가 상기 화학식 1-2 내지 1-5로 표시되는 화합물 중 어느 하나에 존재하는 루테늄과 각각 결합하며, 상기 X가 떨어져 나가 화학식 1의 화합물을 형성함.

발명의 효과

[0026] 본 발명에서는 티오펜 유래 공여체 및 아렌-루테늄 수용체를 이용하여 자체조립 거대고리 화합물을 제조하였으며, 상기 자체조립 거대고리 화합물은 간암 세포주인 HepG2 세포주의 세포 증식을 억제하고, 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라제(poly-(ADP-ribose) polymerase; PARP), 카스파제-3(caspase-3) 및 카스파제-8의 절단을 촉진하며, Bax/Bcl-2의 발현 비율을 증가시켜 외인성 및 내인성 세포사멸 경로를 활성화시킴으로써 암세포의 세포사멸을 유도할 수 있다.

[0027] 따라서, 상기와 같은 효과를 가지는 본 발명의 자체조립 거대고리 화합물은 암질환 예방 또는 치료용 약학 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 배위결합 유도를 통해 자체조립된 금속거대고리 1 내지 4의 합성을 도시하여 나타낸 것이다.

도 2는 금속거대고리 1 내지 4 및 공여체 L의 ^1H NMR 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 금속거대고리 4의 분자 구조를 도시하여 나타낸 것이다.

도 4는 HepG2 세포에서 금속거대고리 3에 의한 세포 증식 억제 효과를 MTT 분석으로 확인한 것이다.

도 5는 HepG2 세포에서 금속거대고리 3에 의한 안정성을 MTT 분석으로 확인한 것이다.

도 6은 HepG2 세포에서 금속거대고리 3에 의한 내인성 및 외인성 경로 사이 크로스 톡(cross talk) 자극에 의한

세포사멸 유도에 관한 것으로, (A)는 금속거대고리 3에 의한 세포사멸(녹색) 및 세포괴사(빨간색)를 Tali 이미지 기반 세포 계측법으로 확인한 것이며, (B)는 금속거대고리 3에 의한 Bax, Bcl-2, 카스파제-8, 절단된 카스파제-8, 카스파제-3, 절단된 카스파제-3, PARP 및 절단된 PARP의 단백질 수준을 웨스턴 블랏으로 확인한 것이며, (C) 내지 (F)는 상기 (B)의 결과를 그래프로 도시하여 나타낸 것이다.

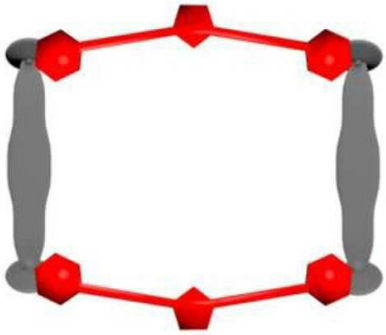
도 7은 금속거대고리 3에 의한 세포사멸 경로를 도시하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명의 발명자들은 티오펜 유래 공여체 및 아렌-루테늄 수용체를 이용하여 [2+2] 배위결합 유도 자체조립을 통해 거대고리 화합물을 제조하였으며, 그 중 거대고리 3 화합물이 인간 암 세포주에서 우수한 항암 활성 효과를 가짐으로써, 새로운 암 치료제로서의 가능성을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

[0031] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 자체조립 거대고리 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다:

[0032] [화학식 1]



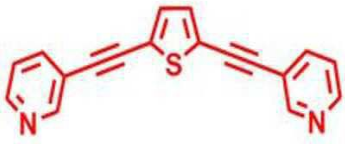
[0033]

[0034] 상기 화학식 1에서,



[0035] 은 하기 화학식 1-1로 표시되는 화합물이고,

[0036] [화학식 1-1]



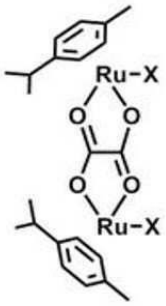
[0037]

[0038] 상기 화학식 1에서,



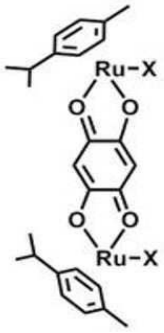
[0039] 은 하기 화학식 1-2 내지 1-5로 표시되는 화합물 중에서 선택된 어느 하나이며,

[0040] [화학식 1-2]



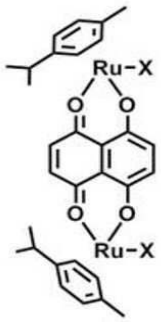
[0041]

[0042] [화학식 1-3]



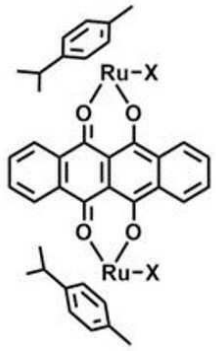
[0043]

[0044] [화학식 1-4]



[0045]

[0046] [화학식 1-5]



[0047]

[0048] 상기 화학식 1-2 내지 1-5에서 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,

[0049] 상기 화학식 1-1로 표시되는 화합물의 양 말단에 존재하는 방향족 고리 내의 질소 원자가 상기 화학식 1-2 내지 1-5로 표시되는 화합물 중 어느 하나에 존재하는 루테늄과 각각 결합하며, 상기 X가 떨어져 나가 화학식 1의 화합물을 형성함.

[0050] 바람직하게는, 상기 자체조립 거대고리 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암세포의 세포 생존율을 감소시키고, 암세포의 증식을 억제할 수 있다.

[0051] 바람직하게는, 상기 자체조립 거대고리 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라제(poly-(ADP-ribose) polymerase; PARP), 카스파제-3(caspase-3) 및 카스파제-8의 절단을 촉진하고, Bax/Bcl-2의 발현 비율을 증가시켜 암세포의 사멸을 유도할 수 있다.

[0052] 바람직하게는, 상기 암질환은 고형암일 수 있으며, 상기 고형암은 간암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 위암, 대장암, 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 구강암, 흉부종양, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 직장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0054] 바람직하게는, 상기 약학적으로 허용가능한 염은 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에칠아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염기성 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0055] 바람직하게는, 상기 약학적으로 허용가능한 염은 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 구연산, 초산, 말레산, 퓨마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캠퍼설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산 및 아스파르탄산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 산성 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0057] 본 발명의 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0058] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제

형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0059] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0061] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0063] **실시예 1: 시약 및 재료**

[0064] ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Bruker AV-300(MHz) 분광계를 이용하여 분석하였다. 중수소화된 NMR 용매는 Cambridge Isotope Laboratory(Andover, MA, USA)에서 구매하였다. ^{1}H NMR 스펙트럼의 화학적 이동은 중수소화된 CD_3OD(3.31 ppm)의 잔류 양성자에 대한 ppm으로 분석하였다. 자체조립에 대한 전기 분무 이온화 질량 분석(elemental analysis, and electrospray ionization mass spectrometry; ESI-MS) 데이터는 전자 분무 이온 소스(electrospray ion source)를 이용하여 Triple Quadrupole LC-Mass 분광기(Finnigan TSQ Quantum Ultra EMR)에 기록하였으며, 데이터는 한국 기초 과학 연구소(Seoul Basic Science Institute)의 MassLynx 소프트웨어로 분석하였다.

[0066] **실시예 2: 단결정 X-선 회절**

[0067] 거대고리 4 결정의 강도 데이터는 Sapramolecular Crystallography Beamline 2D(Pohang Accelerator Laboratory(PAL), Pohang, Korea)에서 싱크로트론(synchrotron) 방사선(λ = 0.70000Å)를 이용하여 ADSC Quantum 210 CCD 회절 계에서 100K로 수집하였다. 데이터(raw data)는 HKL2000 프로그램을 이용하여 처리하고 확장하였다. 거대고리 4의 구조는 직접법을 이용하여 측정하였고, 정제는 SHELXTL 프로그램 패키지에 구현된 소프트웨어를 이용하여 F2에 대한 full-matrix least-squares 방법을 이용하여 수행하였다. 모든 비 수소 원자는 이방성(anisotropically)으로 정제하였고, 수소 원자는 그들의 기하학적으로 이상적인 위치에 첨가하였다. 가장 불규칙적인 용매 분자의 첨가는 PLATON 소프트웨어에서 SQUEEZE 루틴을 사용하여 회절 데이터로부터 제거하였고, 최종 정제를 수행하였다.

[0069] **실시예 3: 화합물 합성**

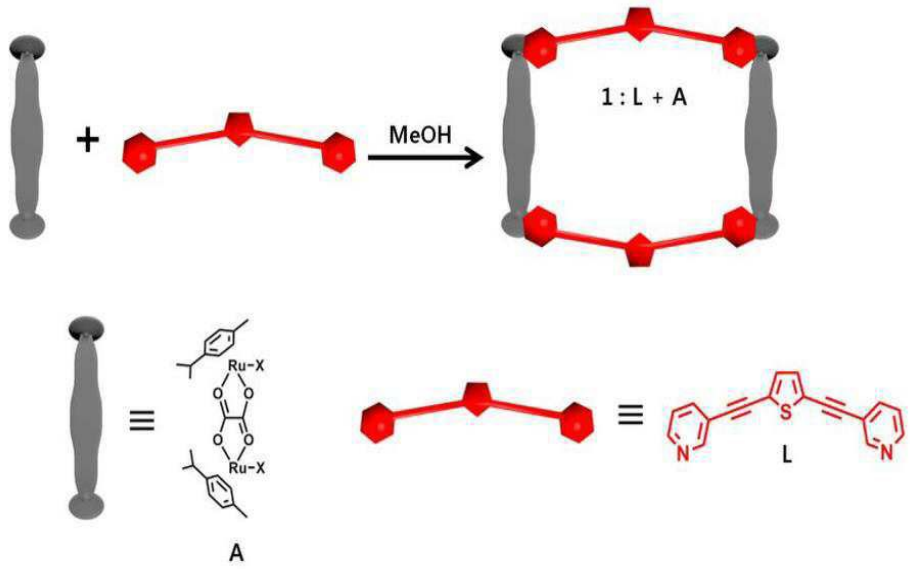
[0070] **3-1. 금속거대고리 1의 자체조립**

[0071] 아렌-루테늄(II) 수용체 A(6.85 mg, 0.008 mmol) 및 공여체 L(2.29 mg, 0.008 mmol)을 실온에서 6시간 동안 메탄올(2 ml)에서 교반하였다. 상기 용액에 디에틸 에테르(diethyl ether)를 적가하여 생성물을 침전시키고, 디에틸 에테르로 2회 세척하고, 원심분리한 후, 건조시켜 황색 결정 분말을 획득하였다(8.94 mg, 수율 91%). 상기 반응식은 하기 반응식 1에 나타내었다.

[0072] ^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.22 (s, 4H), 8.02 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.93 (d, J = 5.6 Hz, 4H), 7.39 -

7.31 (m, 4H), 7.21 (s, 4H), 5.99 (d, J = 6.6 Hz, 8H), 5.80 (d, J = 6.6 Hz, 8H), 2.94 - 2.77 (m, 4H), 2.22 (s, 12H), 1.37 (d, J = 6.9 Hz, 24H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 171.70, 154.43, 151.98, 142.43, 135.18, 127.03, 125.17, 123.21, 103.48, 98.78, 89.18, 88.70, 83.01, 82.90, 31.96, 22.02, 17.57; HR-MS (ESI) for **1** ($C_{83}H_{76}F_6N_4O_{17}Ru_4S_5$): m/z =2137.14 [**1** - 1OTf]$^{1+}$.

[0074] [반응식 1]



[0075]

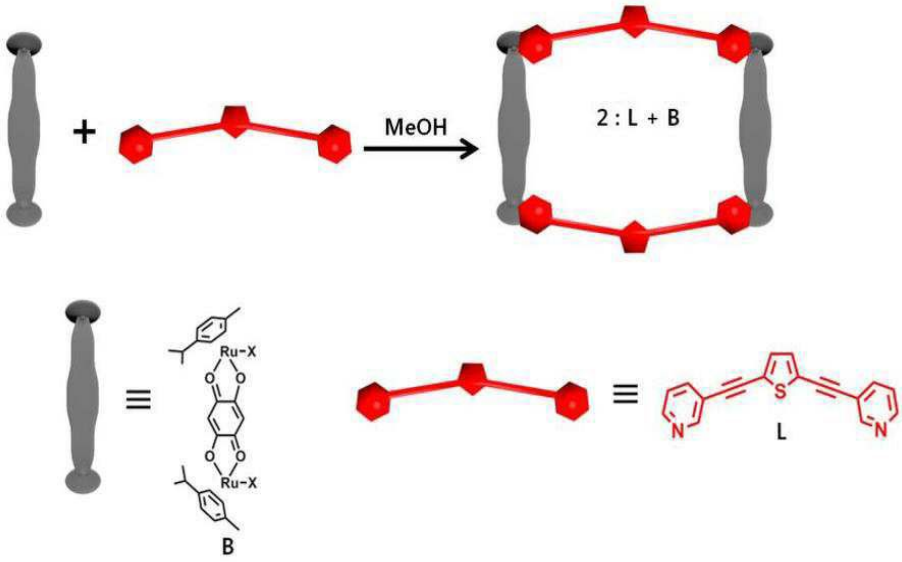
[0076] 상기 반응식 1에서, 수용체 A의 X는 트리플루오르메틸설포네이트(trifluoromethylsulfonate, OTf) 임.

[0078] **3-2. 금속거대고리 2의 자체조립**

[0079] 아렌-루테늄(II) 수용체 B(7.25 mg, 0.008 mmol) 및 공여체 L(2.29 mg, 0.008 mmol)을 실온에서 6시간 동안 메탄올 (2 ml)에서 교반하였다. 생성된 적갈색 용액에 디에틸 에테르를 적가하여 생성물을 침전시키고, 디에틸 에테르로 2회 세척하고, 원심분리한 후, 건조시켜 적갈색 결정 분말을 획득하였다(9.32 mg, 수율 90%). 상기 반응식은 하기 반응식 2에 나타내었다.

[0080] ^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.35 (s, 4H), 8.12 - 8.06 (m, 8H), 7.46 - 7.39 (m, 4H), 7.25 (s, 4H), 6.09 (d, J = 6.4 Hz, 8H), 5.85 (d, J = 6.4 Hz, 8H), 5.80 (s, 4H), 2.96 - 2.83 (m, 4H), 2.20 (s, J = 13.0 Hz, 12H), 1.35 (d, J = 7.0 Hz, 24H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 184.43, 155.15, 152.79, 142.15, 135.07, 126.64, 124.95, 122.95, 105.02, 102.30, 99.89, 88.96, 88.03, 84.27, 82.49, 32.12, 22.09, 17.72; HR-MS (ESI) for **2** ($C_{91}H_{80}F_9N_4O_{17}Ru_4S_5$): m/z =2238.17 [**2** - 1OTf]$^{1+}$.

[0082] [반응식 2]



[0083]

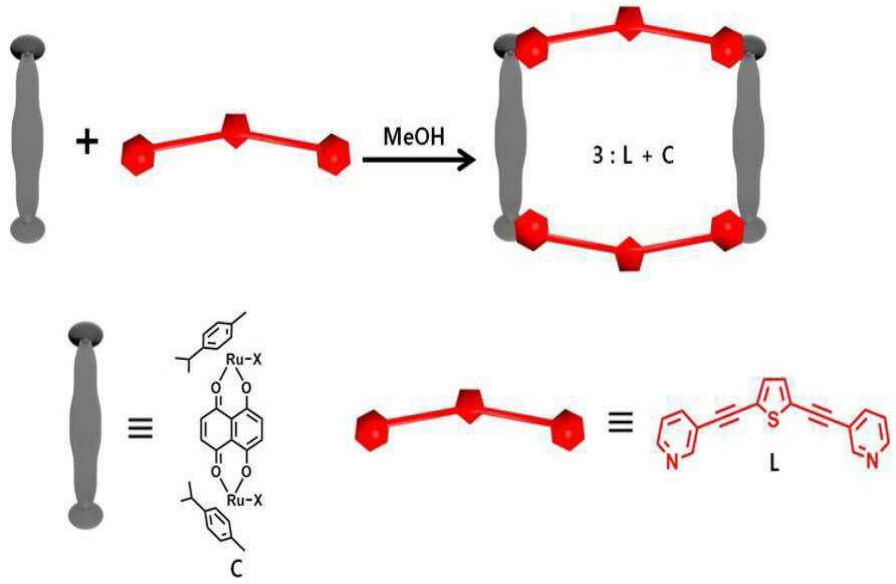
[0084] 상기 반응식 2에서, 수용체 B의 X는 OTf 임.

[0086] **3-3. 금속거대고리 3의 자체조립**

[0087] 아렌-루테늄(II) 수용체 C(7.65 mg, 0.008 mmol) 및 공여체 L(2.29 mg, 0.008 mmol)을 메탄올(2 ml)에서 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 생성된 녹색 용액에 디에틸 에테르를 적가하여 생성물을 침전시키고, 디에틸 에테르로 2회 세척하고, 원심분리한 후, 건조시켜 진녹색의 결정 분말을 획득하였다(9.65 mg, 수율 87%). 상기 반응식은 하기 반응식 3에 나타내었다.

[0088] ^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.48 (s, 4H), 8.27 (d, J = 5.7 Hz, 4H), 8.01 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.35 (dd, J = 7.9, 6.2 Hz, 4H), 7.24 (s, 8H), 7.23 (s, 4H), 5.89 (d, J = 6.3 Hz, 8H), 5.63 (d, J = 6.3 Hz, 8H), 2.92 - 2.77 (m, 4H), 2.10 (s, 12H), 1.33 (d, J = 6.9 Hz, 24H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 171.48, 154.43, 152.04, 142.06, 138.23, 134.94, 126.17, 124.92, 122.64, 112.05, 104.41, 101.00, 89.15, 87.55, 85.42, 83.26, 31.59, 22.05, 16.98; HR-MS (ESI) for **3** ($C_{99}H_{84}F_9N_4O_{17}Ru_4S_5$): m/z =2337.20 [**3** - 1OTf]$^{1+}$.

[0090] [반응식 3]



[0091]

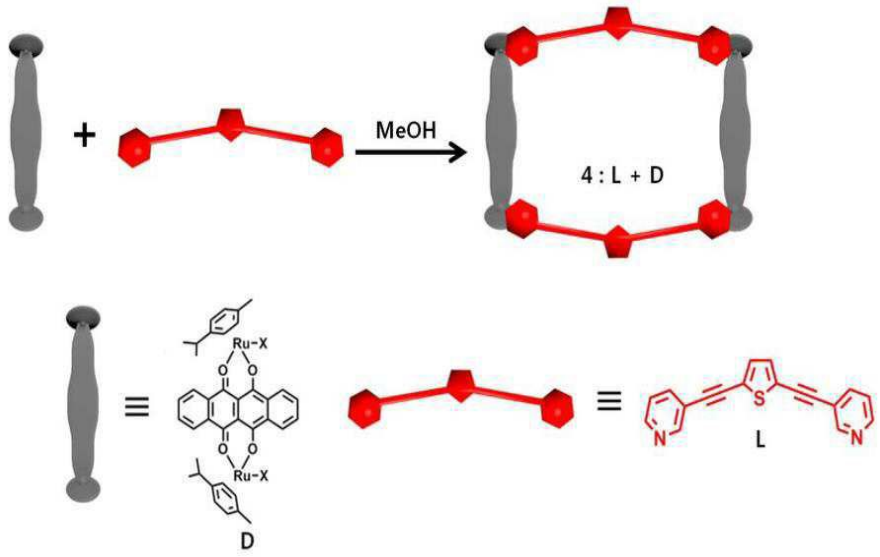
[0092] 상기 반응식 3에서, 수용체 C의 X는 OTf 임.

[0094] **3-4. 금속거대고리4의 자체조립**

[0095] 아렌-루테늄(II) 수용체 D(8.46 mg, 0.008 mmol) 및 공여체 L (2.29 mg, 0.008 mmol)을 실온에서 6시간 동안 메탄올(2 ml)에서 교반하였다. 생성된 청록색 용액에 디에틸 에테르를 적가하여 생성물을 침전시키고, 디에틸 에테르로 2회 세척하고, 원심분리한 후, 건조시켜 녹색 결정 분말을 획득하였다(10.51 mg, 수율 87%).

[0096] ^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.77 (dd, J = 6.0, 3.4 Hz, 4H), 8.52 (s, 4H), 8.31 (d, J = 5.6 Hz, 4H), 8.04 (dd, J = 6.0, 3.4 Hz, 4H), 7.75 (d, J = 7.9 Hz, 4H), 7.24 - 7.17 (m, 4H), 6.90 (s, 4H), 6.09 (d, J = 6.3 Hz, 8H), 5.78 (d, J = 6.3 Hz, 8H), 3.04 - 2.90 (m, 4H), 2.18 (s, 12H), 1.36 (d, J = 6.9 Hz, 24H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 170.00, 154.45, 151.63, 141.76, 134.60, 134.45, 134.08, 127.94, 126.12, 124.48, 122.37, 107.64, 104.00, 101.16, 88.83, 87.08, 85.61, 82.53, 31.73, 22.21, 17.47; HR-MS (ESI) for **4** ($C_{115}H_{92}F_9N_4O_{17}Ru_4S_5$): m/z =2538.24 [**4** - 1OTf]$^{1+}$.

[0098] [반응식 4]



[0099]

[0100] 상기 반응식 4에서, 수용체 D의 X는 OTf 임.

[0102] **실시예 4: 시약 및 세포**

[0103] 인간 HepG2 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)과 1% 페니실린(penicillin, 100 units/ml)/스트렙토마이신(streptomycin, 100 μg/ml) (Gibco, Carlsbad, CA, USA)을 함유한 Dulbecco 's modified Eagle 's 배지(Welgene, Korea)를 이용하여 배양하였다. Bax, Bcl-2, Caspase 8, Caspase 3, PARP(poly(ADP-ribose) polymerase) 및 β-actin은 Cell Signaling Technology(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase(HRP) 표지된 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

[0105] **실시예 5: 세포 배양**

[0106] 인간 HepG2 세포는 10% 우태아혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

[0108] **실시예 6: 세포 생존율 분석**

[0109] 세포 생존율은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 분석을 이용하여 측정하였다. 간략하게, HepG2 세포를 96 웰 플레이트(96 well plate)에 5 x 10^4 세포/ml의 밀도로 접종하고, 37℃, 5% CO2 대기 하에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 다양한 샘플(1, 2, 3, 4, L)로 처리하고, 24시간 또는 48시간 동안 배양한 후, 5 mg/ml 농도의 MTT 시약 10 μl를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후, 형성된 포르마잔(formazan) 생성물을 가용화 시키기 위해, 웰 당 100 μl의 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)를 첨가하고, 진탕기를 이용하여 10분 동안 용해시켰다. 그 다음 다중 판독기(multi-reader, TECAN, switzerland)를 이용하여 570 nm에서 광학 밀도(OD)를 측정하였다.

[0111] **실시예 7: 안정성 테스트**

[0112] 10% 우태아혈청, 1% 페니실린 및 1% 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지에 샘플을 용해시키고, 37℃에서 24시간, 48시간 또는 72시간 동안 수조에 방치하였다. HepG2 세포를 96 웰 플레이트에 2 x 10^5 세포/ml의 밀도로 접종하고, 샘플 용액을 1.25, 2.5, 5, 10 및 20 μM 농도로 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 5 mg/ml

농도의 MTT 시약 10 μl 첨가하고 24시간 동안 배양한 후, 상층액을 제거하고, 형성된 포르마잔 생성물을 가용화 시키기 위해, 웰 당 100 μl의 디메틸 설폭사이드를 첨가하고 용해시킨 다음 다중 판독기를 이용하여 570 nm에서 광학 밀도(OD)를 측정하였다.

[0114] **실시예 8: Tali 이미지 기반 세포 계측법**

[0115] 세포사멸은 Tali 이미지 기반 세포 계측법(Tali Image-Based Cytometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 측정하였다. 간략하게, HepG2 세포를 6 웰 플레이트에 2 x 10^5 세포/ml의 밀도로 접종한 후, 4 내지 16 μM 사이 농도로 거대고리 3을 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. Trypsin/EDTA 시약을 이용하여 세포를 수확한 다음 Tali Apoptosis Kit를 이용하여 세포사멸(apoptosis) 및 세포괴사(necrosis)를 측정하였다.

[0117] **실시예 9: 웨스턴 블랏**

[0118] 세포는 PRO-PREP™ 단백질 용해 버퍼를 이용하여 1시간 동안 용해시키고, 용 해물은 12,000 x g, 4℃에서 10분 동안 원심분리 하였다. 단백질 농도는 BCA 시약(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 정량하였고, 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)을 표준 물질(standard)로 이용하였다. 단백질을 5분간 끓인 다음 12% SDS-PAGE 전기영동으로 분리하고, 단백질을 300 mA에서 120분 동안 니트로셀룰로스(nitrocellulose; NC) 막으로 옮겼다. 그 후, 막은 5% 탈지유로(skim milk) 1시간 동안 블로킹(blocking) 시키고, Bax, Bcl-2, Caspase 8, Caspase 3, PARP 및 β-actin (CST)에 대한 1차 항체로 밤새 반응시켰다. 막을 세척한 후, 1차 항체에 대한 2차 항체로 반응시켰다. EZ-Western Lumi Pico 시약(iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)을 이용하여 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 단백질의 발현을 시각화하였다.

[0120] **실험예 1: 금속거대고리 3에 의한 암세포의 증식 억제 효과**

[0121] 백금(platinum) 기반 금속고리 화합물은 항암 활성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 금속거대고리 3의 농도 및 시간 의존적 세포 독성 효과를 분석하기 위해, 인간 간암 세포주인 HepG2 세포주를 이용하여 MTT 분석을 수행하였다.

[0122] 그 결과, 도 4를 참조하여 보면, HepG2 세포는 금속거대고리 3에 의해 농도 및 시간 의존적으로 세포 생존율을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 금속거대고리 3을 1.25, 2.5 또는 5 μM 농도로 24시간 또는 48시간 동안 처리하였을 때, HepG2 세포의 생존율은 각각 100%, 91% 및 57% 또는 92%, 74% 및 37%로 감소하였다. 또한, 대조군으로 사용된 독소루비신은 5 μM의 농도로 24시간 또는 48시간 처리하였을 때, 세포 생존율은 각각 44% 또는 22%로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0123] 또한, 인간 암 세포주인 AGS(위암), A549(폐암), HCT-15(대장암) 세포주에 금속거대고리 1 내지 4 또는 공여체 L을 각각 처리한 후, MTT 분석을 수행하여 IC_{50} 값을 측정하였으며, 이의 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 백금계 약물인 시스플라틴(cisplatin)은 대조군으로 사용하였다. 그 결과, 금속거대고리 3은 다른 거대고리들과 비교하였을 때, 모든 암 세포주에 가장 우수한 암세포 성장 억제 효과를 나타내었으며, 시스플라틴 보다 더 우수한 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

표 1

Compound	$IC_{50}(\mu M)^a$					
	AGS		A549		HCT-15	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1	>20	>20	>20	>20	>20	>20
2	>20	>20	>20	>20	>20	>20
3	<1.25	<1.25	1.47±0.106	1.02±0.272	<1.25	<1.25
4	14.18±1.26	6.02±0.29	18.48±0.23	8.02±0.15	>20	7.70±0.19
L	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Cisplatin	>20	>20	>20	>20	>20	>20

[0125]

[0126] a = IC50: 세포 생존율을 50% 까지 억제하는데 필요한 약물의 농도

[0128] **실험예 2: 금속거대고리 3의 안정성 분석**

[0129] 항암제로 사용이 가능한 금속거대고리 3의 안정성을 평가하기 위해, 금속거대고리 3을 10% 우태아혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지에서 0시간, 24시간, 48시간 또는 72시간 동안 사전 배양한 다음 HepG2 세포에 농도 별로 처리하고 24시간 동안 배양한 후, 세포 생존율을 분석하였다.

[0130] 그 결과, 도 5를 참조하여 보면, 금속거대고리 3을 사전 배양하였을 때, 비 배양 대조군에 비해 농도 의존 세포 증식 억제 효과가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 20 μM 농도를 보면, 사전 배양과 비 배양 대조군에서 세포 생존율 차이가 거의 관찰되지 않았다. 세포 증식은 72시간 사전 배양에서 11%, 비 배양 대조군에서 6%를 나타내었다. 따라서 금속거대고리 3은 HepG2 세포에서 항암 효과를 가지며, 72시간 동안 안정한 상태로 유지되는 것을 확인하였다.

[0132] **실험예 3: 금속거대고리 3에 의한 세포사멸 유도 효과**

[0133] 금속거대고리 3에 의한 항암 활성과 세포사멸과의 연관성을 분석하기 위해, HepG2 세포에 금속거대고리 3을 농도 별로 처리한 후, Tali 세포사멸 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 6(A)를 참조하여 보면, 금속거대고리 3을 각각 4, 8 및 16 μM 농도로 24시간 처리하였을 때, 세포사멸이 각각 53%, 80% 및 62%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0134] 또한, 도 6(B)를 참조하여 보면, 금속거대고리 3에 의한 세포사멸 유도에서 분자 발현 기반 분석을 위해, HepG2 세포에 금속거대고리 3을 처리한 후, 웨스턴 블랏을 수행하여 세포사멸의 내인성 및 외인성 마커를 분석하였다. Bax 및 Bcl-2는 종양 세포사멸의 조절 인자이며, Bax/Bcl-2 비율의 증가는 세포사멸 유도와 일치하는 것으로 알려져 있다. 그 결과, 도 6(C)를 참조하여 보면, 금속거대고리 3을 농도 별로 24시간 동안 처리하였을 때, 금속거대고리 3에 의해 Bax/Bcl-2의 비율이 농도 의존적으로 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 이는 세포사멸을 유도하며, HepG2 세포에서의 세포 독성이 세포사멸 활성에 기인한다는 것을 확인하였다.

[0135] 또한, PARP는 세포사멸 동안 절단되어 분해되고, 세포사멸 유도 시, 카스파제가 PARP 절단을 촉진하여 효소를 불활성화시키고, 89 및 24 kDa 단편(각각 C- 및 N- 말단 단편)을 생성하는 것이 알려진 바 있다. 특히, 카스파

제-3 및 카스파제-8은 PARP의 절단을 매개하는 중요한 단백질 분해 효소(protease)이다.

[0136] 도 6(D)를 참조하여 보면, 금속거대고리 3을 각각 1, 2 및 4 μM 농도로 24시간 동안 처리하였을 때, 대조군에 비하여 카스파제-8(외인성 세포사멸 경로 마커)의 발현 수준이 각각 1.51, 2.07 및 34.1배 증가하는 것을 확인하였다.

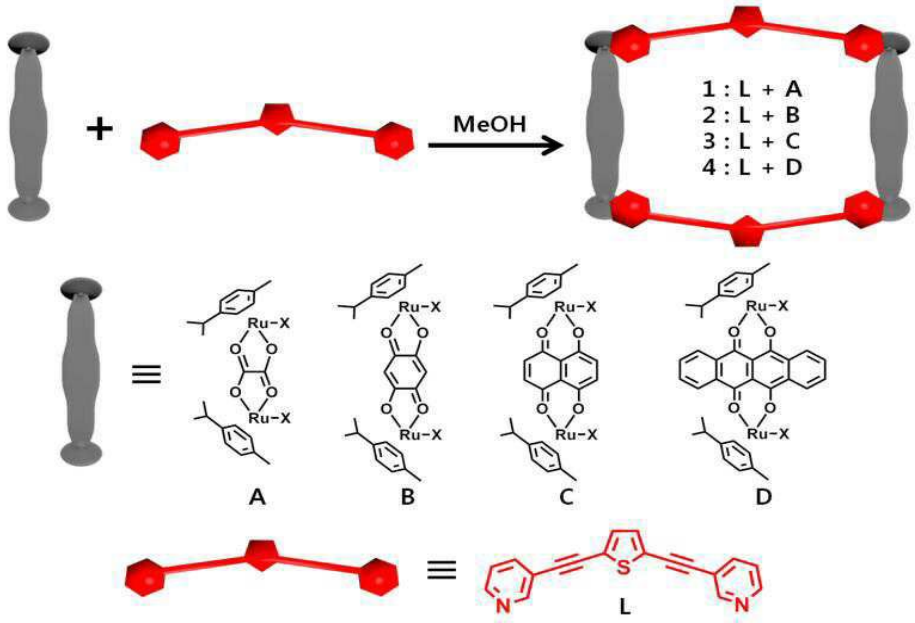
[0137] 또한, PARP의 절단을 중재하는 세포사멸 경로의 핵심 프로테아제인 카스파제-3 및 PAPR의 절단을 분석하였다. 그 결과, 도 6(E) 및 도 6(F)를 참조하여 보면, 금속거대고리 3을 각각 1, 2 및 4 μM 농도로 24시간 동안 처리하였을 때, 대조군에 비하여 절단된 카스파제-3/카스파제-3의 비율이 각각 3.50, 1.86 및 399배로 현저하게 증가하여 HepG2 세포의 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다. 유사하게, 절단된 PARP/PARP의 비율도 각각 3.64, 3.36, 25.5배 증가하는 것을 확인하였다.

[0139] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

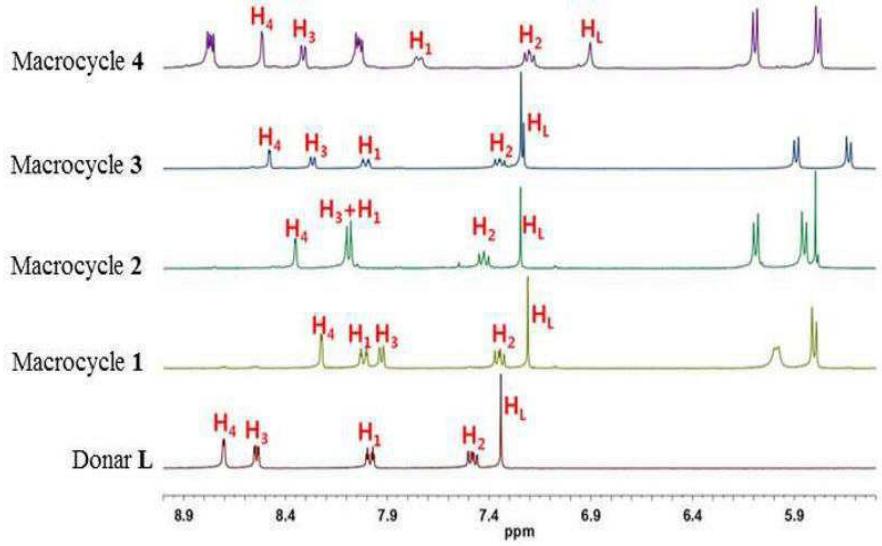
[0140] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

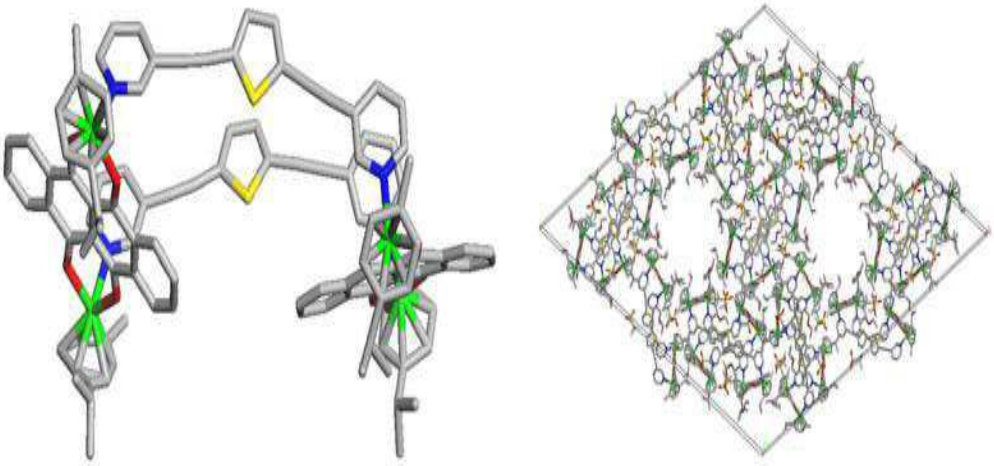
도면1



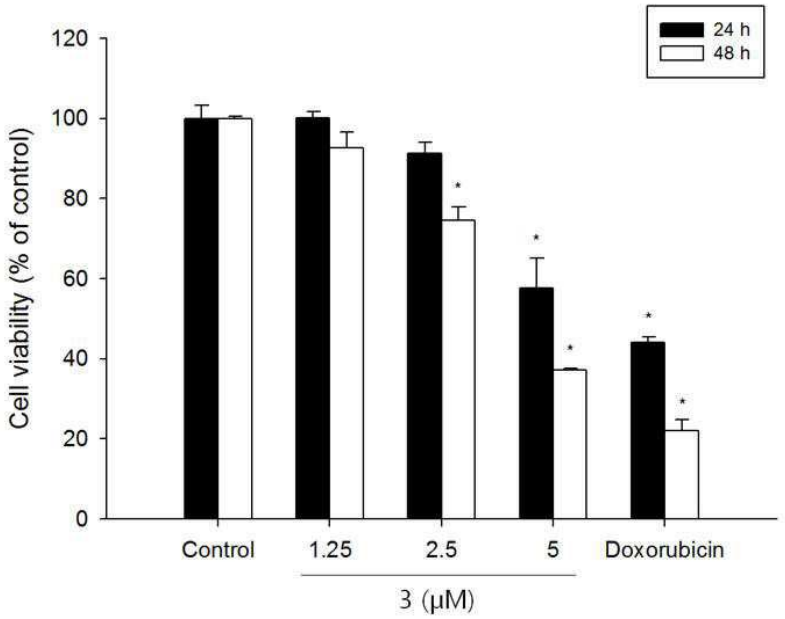
도면2


Macrocycle 4
Macrocycle 3
Macrocycle 2
Macrocycle 1
Donar L
H4
H3
H1
H2
HL
H3+H1
8.9
8.4
7.9
7.4
6.9
6.4
5.9
ppm

도면3

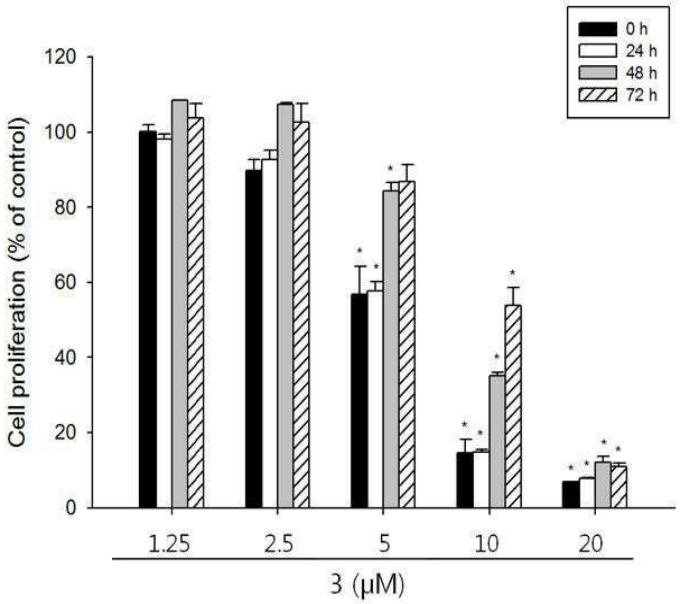


도면4

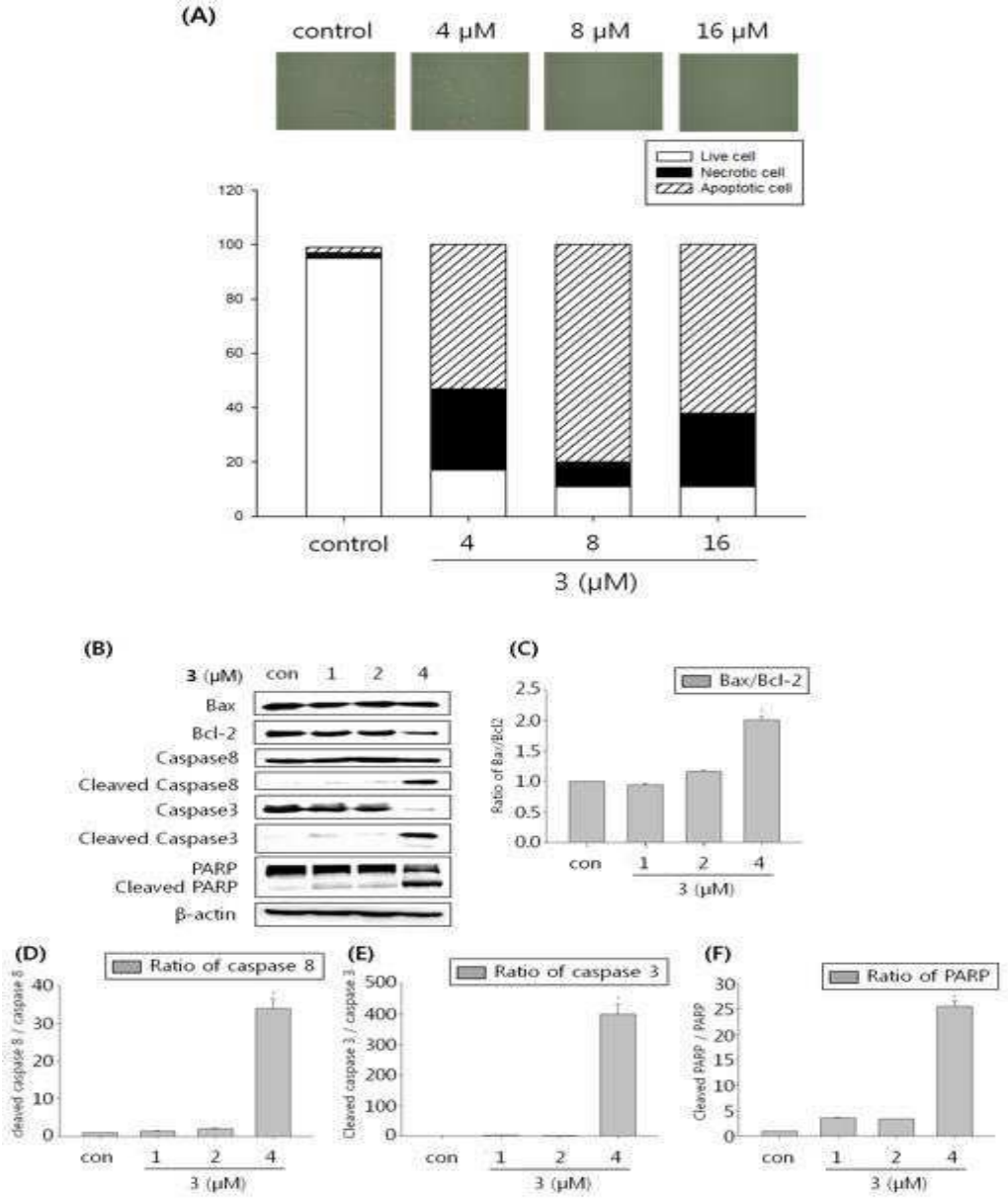


도면5

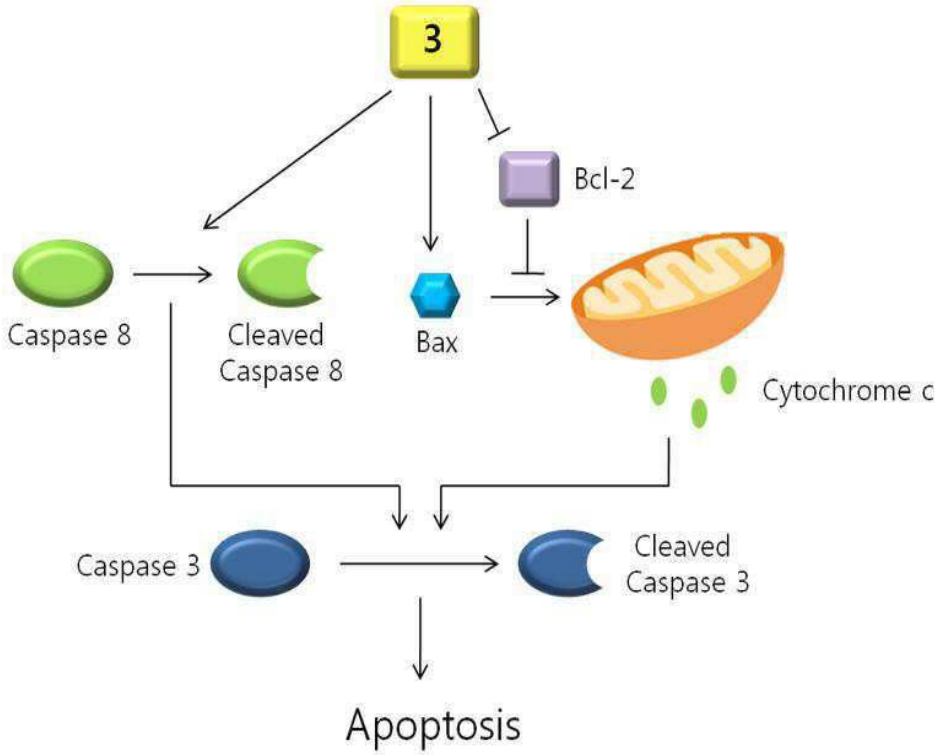
	72h	48h	24h	0h
LD50 (μM)	10.6±1.31	8.5±0.11	5.9±0.21	5.7±0.29



도면6


(A)
control
4 μM
8 μM
16 μM
Live cell
Necrotic cell
Apoptotic cell
120
100
80
60
40
20
0
control
4
8
16
3 (μM)
(B)
3 (μM) con 1 2 4
Bax
Bcl-2
Caspase8
Cleaved Caspase8
Caspase3
Cleaved Caspase3
PARP
Cleaved PARP
β-actin
(C)
Bax/Bcl-2
Ratio of Bax/Bcl2
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
con 1 2 4
3 (μM)
(D)
Ratio of caspase 8
cleaved caspase 8 / caspase 8
40
30
20
10
0
con 1 2 4
3 (μM)
(E)
Ratio of caspase 3
Cleaved caspase 3 / caspase 3
500
400
300
200
100
0
con 1 2 4
3 (μM)
(F)
Ratio of PARP
Cleaved PARP / PARP
30
25
20
15
10
5
0
con 1 2 4
3 (μM)

도면7


3
Bcl-2
Caspase 8
Cleaved
Caspase 8
Bax
Cytochrome c
Caspase 3
Cleaved
Caspase 3
Apoptosis