(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 7 월 2 일 (02.07.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/138570 A1

(51) 국제특허분류:
C07F 15/00 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/016898

(22) 국제출원일: 2018 년 12 월 28 일 (28.12.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION**) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: 송준명 (**SONG, Joon Myong**); 06553 서울시 서초구 방배로43길 2, 5-803, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이원희 (**LEE, Won Hee**); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

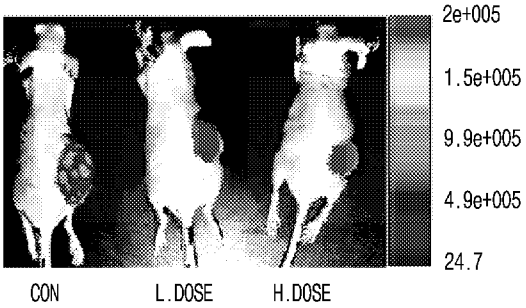
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

WO 2020/138570 A1

(54) Title: NOVEL RUTHENIUM COMPLEX COMPOUND, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAME AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION OR TREATMENT OF CANCER

(54) 발명의 명칭: 신규 루테늄 착화합물, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a novel ruthenium complex compound, a preparation method therefor, and a pharmaceutical composition comprising same as an active ingredient for prevention or treatment of cancer. A novel Ru complex compound according to the present invention exhibits not only an excellent killing effect on cancer cells, but also can outstandingly inhibit resistance mechanisms of cancer stem cells. Thus, the complex compound can be effectively used as an active ingredient in a pharmaceutical composition for prevention or treatment of cancer or a composition for inhibiting resistance to anticancer agents, and can be used in combination of other chemotherapeutic agents in a pharmaceutical composition for prevention or treatment of cancer, which solves conventional problems of resistance to anticancer agents.

(57) 요약서: 본 발명은 신규 루테늄 착화합물, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 신규 Ru 착화합물은 암 세포에 대하여 우수한 사멸 효과를 나타낼 뿐 아니라, 암줄기세포의 내성 발생 기작을 우수하게 저해할 수 있는 바, 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 항암제 내성 억제용 조성물, 및 이를 여타의 화학 요법제와 병용하여 기존의 항암제 내성 문제가 개선된 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 신규 루테늄 착화합물, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 신규 루테늄 착화합물, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 백금 기반 시스플라틴 유도체는 현재 암 치료에 사용되는 가장 유망한 화학요법 약물이다. 그러나 백금 유도체의 장기간 투여는 부작용뿐만 아니라 약물 내성과 암의 재발을 초래하는 것으로 보고되었다(비특허문헌 1: Shen D-W, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. 2012. Pharmacological reviews 64:706-721).

[3] 이에, 백금 유도체의 대안으로 루테늄 기반의 금속 착체가 제안되고 있으며, 최근 루테늄 금속 착화합물에 대한 in-vitro 및 in vivo 연구에서 루테늄 착화합물이 Fe와 비슷하게 혈청 알부민과 트랜스페린에 대해 강한 친화성을 나타내며, 혈관계를 가로 지르는 Ru 착화합물 수송이 가능한 것으로 보고되었다.

[4] 한편, 세포의 빠른 분열은 높은 농도의 철분을 필요로하는데, Fe와 유사한 특성의 루테늄 착화합물은 정상세포 대비 분열이 빠른 암 조직에 축적될 가능성이 크고, 전이 암에서 트랜스페린과 페리틴과 같은 Fe 수송 단백질의 발현이 증가하는 것으로 보고되었다(비특허문헌 2: Brookes et al., 2006; Kwok and Richardson 2002).

[5]

[6] 한편, 미토콘드리아 또는 ER에서 전이 금속 착화합물이 축적되면 펜톤(fenton)형 산화, 환원 반응을 통해 활성산소종(ROS)이 효과적으로 생성되고, 때문에 산화 환원 순환은 전이 금속의 중요한 특성이며, 이 특성은 전이 금속이 항산화 단백질을 동시에 비활성화시키고 산성 미세 환경 하에서 암세포에서 자유 라디칼을 생성 할 수있게 한다.

[7] 과도한 ROS 생성은 암세포의 특징 중 하나이고, 퍼옥시좀과 미토콘드리아의 증가된 대사 활동은 종양에서 ROS 생성의 주요 원인이다. 암세포는 세포 증식, 혈관 신생 및 전이 진행에 ROS를 효과적으로 사용하는데, 암세포는 글루타티온과 티 오레독신(thioredoxin)과 같은 항산화 단백질의 발현을 증가시켜 과량의 ROS를 정교하게 조절할 수 있어, 암 세포는 ROS 독성의 한계점까지 견딜 수 있다.

[8] 또한, 암줄기세포(Cancer Stem Cell)는 증식성 암 세포와 비교하여 비효소 항산화 단백질뿐 아니라 항산화 효소의 단백질을 높은 수준을 발현시킨다는 것이 잘 입증되어있다(비특허문헌 3: Nagano et al., 2013; Trachootham et al., 2009). 상술된 암 세포의 생존 메커니즘은 CSC가 화학 요법 약물에 대한 약물

내성을 개발할 수있게 한다.

[9] 이에, 암세포의 항산화 능을 억제하는 것뿐만 아니라 ROS 생성을 동시에 증가시키는 것과 같은 치료 전략이, 비가역적 산화 스트레스와 후속 세포 사멸을 유도 할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

[10] 이전의 연구에 따르면, 특정 항산화 단백질 발현을 억제하여, ROS 수준을 암세포의 한계치를 넘어서서 세포 사멸 메커니즘을 통해 암세포를 효과적으로 죽일 수 있음이 확인된 바 있으나(비특허문헌 4: Dharmaraja 2017, Sznarkowska et al., 2017), 아직까지 이렇다 할 항암제, 또는 암과 암줄기세포의 내성 발생을 효과적으로 억제시킬 수 있는 치료제 개발은 이루어지지 못하고 있어, 지속적인 연구와 노력이 요구된다.

[11]

[12] 이에, 본 발명자들은 종래 백금계 화학 요법제로 암의 내성, 부작용 발생 등의 문제를 해결할 수 있으며, 특히, 암줄기세포의 내성 발생 기작을 우수하게 저해할 수 있고, 나아가, 항암제로서도 우수한 세포 사멸 효과를 달성할 수 있는 치료제를 개발하기 위하여 노력하던 중, 본 발명에 따른 신규 Ru 착화합물이 암줄기세포의 내성 발생 기작을 우수하게 억제할 뿐 아니라, ROS 생성을 현저하게 유도하여, 우수한 암세포 사멸 효과가 있음을 규명한 바, 본 발명을 완성하였다.

[13]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[14] 본 발명의 목적은 암세포 사멸 효과가 있는 항암제의 유효성분으로 사용될 수 있거나, 또는 암 내성 발생 기작을 우수하게 저해하여, 내성 발생 저해제의 유효성분으로 제공될 수 있는 신규 전이금속 착화합물을 제공하는 것이다.

[15]

[16] 본 발명의 다른 목적은 상기 전이금속 착화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[17]

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 전이금속 착화합물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[19]

[20] 본 발명의 다른 목적은 상기 전이금속 착화합물을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[21]

[22] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 전이금속 착화합물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

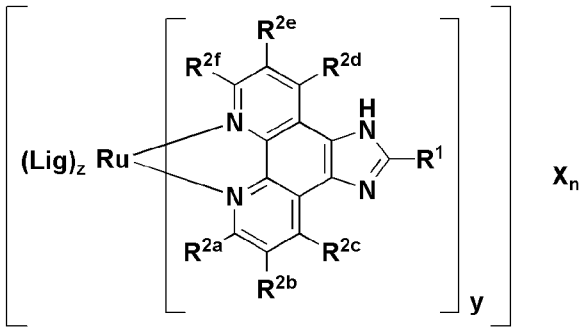
[23]

과제 해결 수단

[24] 상기 목적을 해결하기 위해,

[25] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[26] [화학식 1]

[27] 

[28] 상기 화학식 1에 있어서,

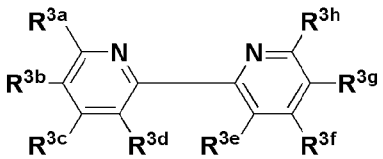
[29] X는 Cl^-, PF_6^-, Br^-, BF_4^-, ClO_4^-, $CF_3SO_3^-$ 및 SO_4^{-2}로 이루어진 군으로 부터 선택되는 1종 이상이고;

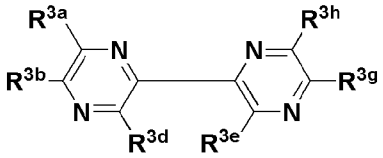
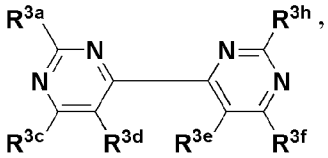
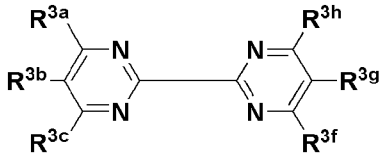
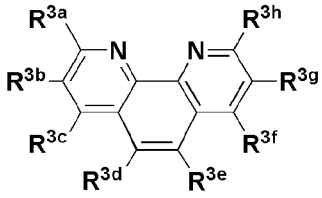
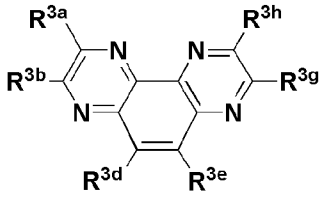
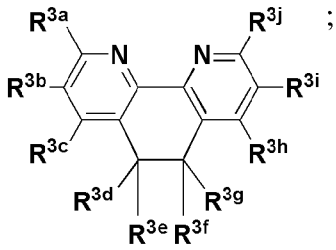
[30] 상기 n은 0 내지 5의 정수이고;

[31] y는 1 내지 3의 정수이고;

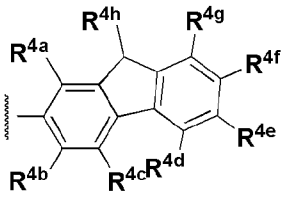
[32] z는 0 내지 3이고;

[33] Lig는 각각 독립적으로, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 리간드이고,

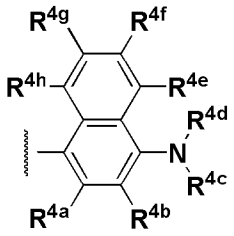
[34] ,

[35] , , , , , 및 ;

[36]



또는



이고;

[37]

[38] R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고;

[39]

[40] 상기 R^{3a}, R^{3b}, R^{3c}, R^{3d}, R^{3e}, R^{3f}, R^{3g}, R^{3h}, R^{3i} 및 R^{3j}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고,

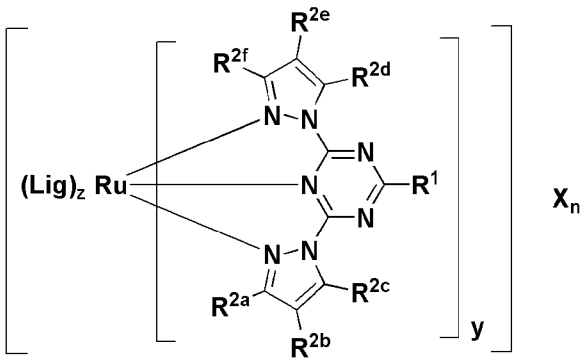
[41] 상기 R^{4a}, R^{4b}, R^{4c}, R^{4d}, R^{4e}, R^{4f}, R^{4g}, 또는 R^{4h}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환된다.

[42]

[43] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[44] [화학식 2]

[45]



[46] 상기 화학식 2에 있어서,

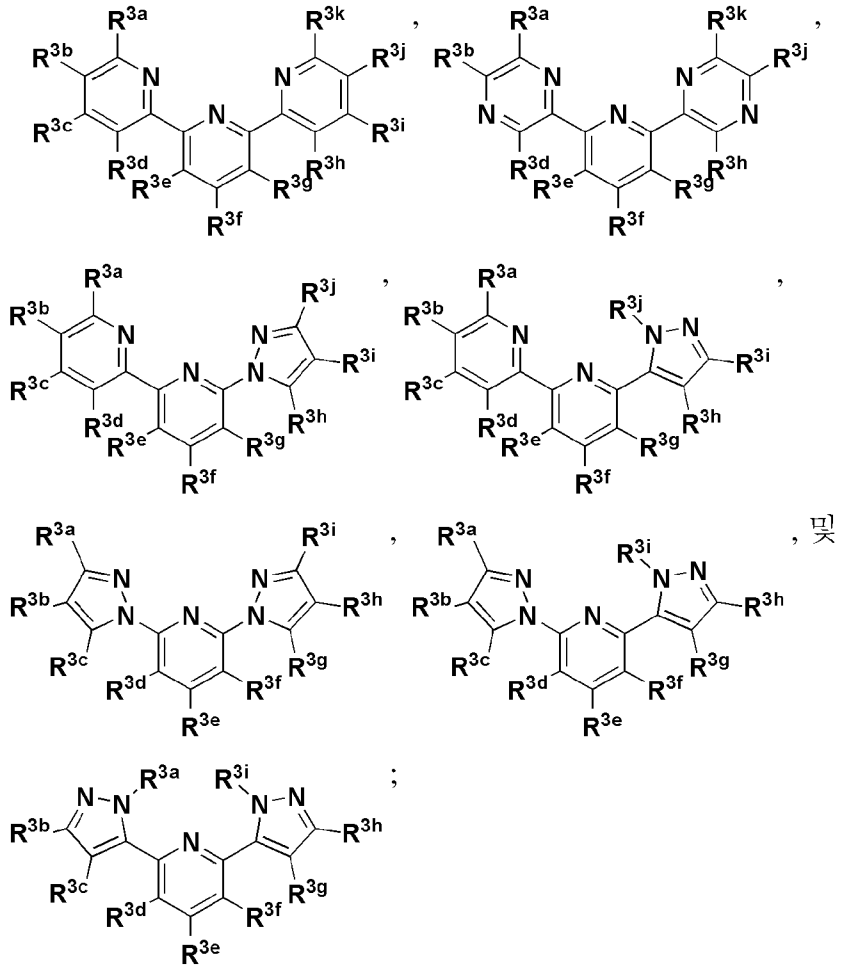
[47] X는 Cl^-, PF_6^-, Br^-, BF_4^-, ClO_4^-, $CF_3SO_3^-$ 및 SO_4^{-2}로 이루어진 군으로 부터 선택되는 1종 이상이고;

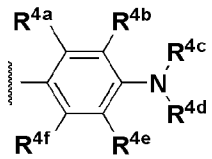
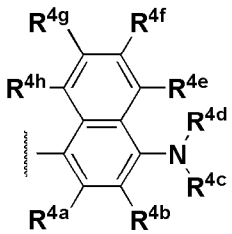
[48] 상기 n은 0 내지 5의 정수이고;

[49] y는 1 내지 2의 정수이고;

[50] z는 0 내지 1이고;

[51] Lig는 각각 독립적으로, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 리간드이고,

[52] 

[53] R^1은  또는  이고;

[54]

[55] R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고;

[56]

[57] 상기 R^{3a}, R^{3b}, R^{3c}, R^{3d}, R^{3e}, R^{3f}, R^{3g}, R^{3h}, R^{3i}, R^{3j}, 및 R^{3k}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로

치환되고,

[58] 상기 R^{4a}, R^{4b}, R^{4c}, R^{4d}, R^{4e}, R^{4f}, R^{4g}, 또는 R^{4h}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환된다.

[59]

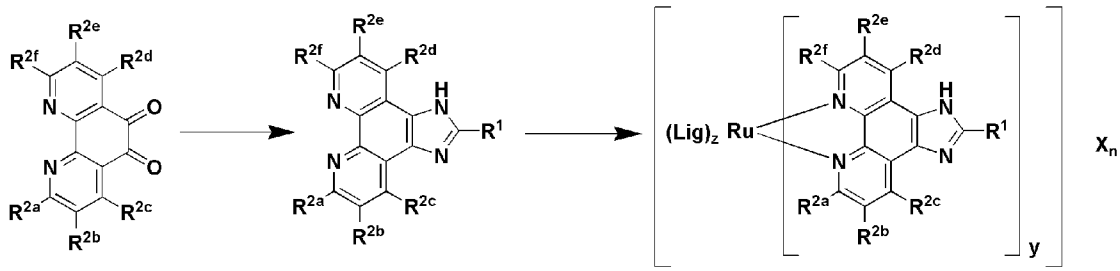
[60] 나아가, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[61] 화학식 3으로 표시되는 화합물로부터 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

[62] 상기 단계에서 제조된 화학식 4로 표시되는 화합물로부터 화학식 1로 표시되는 착화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 착화합물의 제조방법을 제공한다:

[63] [반응식 1]

[64]



3 4 1

[65] 상기 반응식 1에 있어서,

[66] X, n, y, z, Lig, R^1, R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

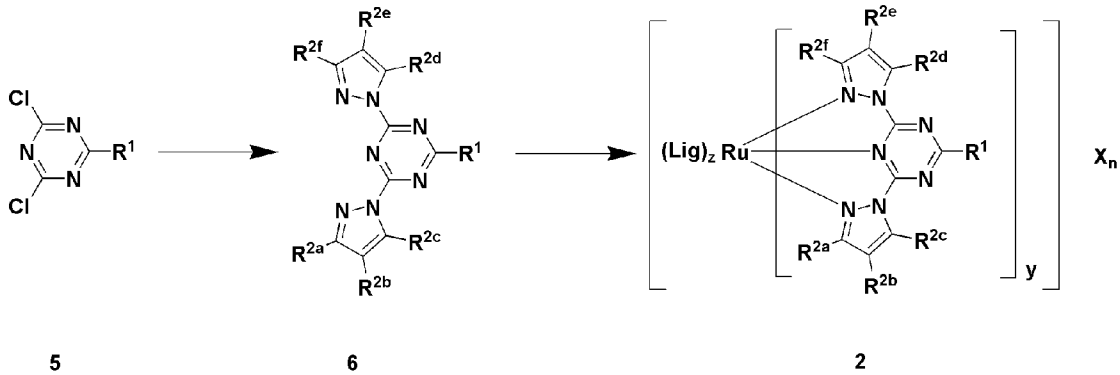
[67]

[68] 또한, 본 발명은 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

[69] 화학식 5로 표시되는 화합물로부터 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

[70] 상기 단계에서 제조된 화학식 6으로 표시되는 화합물로부터 화학식 2로 표시되는 착화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 상기 화학식 2로 표시되는 착화합물의 제조방법:

[71] [반응식 2]

[72] 

5 6 2

[73] 상기 반응식 2에 있어서,

[74] X, n, y, z, Lig, R^1, R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 상기 화학식 2에서 정의한 바와 같다.

[75]

[76] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[77]

[78] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 조성물을 제공한다.

[79]

[80] 나아가, 본 발명은 상기 항암제 내성 억제용 조성물, 및 화학 요법제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[81]

발명의 효과

[82] 본 발명에 따른 신규 Ru 착화합물은 암 세포에 대하여 우수한 사멸 효과를 나타낼 뿐 아니라, 암줄기세포의 내성 발생 기작을 우수하게 저해할 수 있는 바, 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 항암제 내성 억제용 조성물, 및 이를 여타의 화학 요법제와 병용하여 기존의 항암제 내성 문제가 개선된 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[83]

도면의 간단한 설명

[84] 도 1a의 FACS 분석은 10 μM의 본 발명 실시예 1 처리 후, 서로 다른 시점(30, 60 및 90 분)에서의 CD44 양성 MCF7 세포에 의한 흡수도를 나타낸 그래프이고, 도 1b의 FACS 분석은 10 μM의 본 발명 실시예 2(RU-2) 처리 후, 서로 다른 시점(30, 60 및 90 분)에서의 CD44 양성 MCF7 세포에 의한 흡수도를 나타낸 그래프이고, 도 1c의 FACS 분석은 10 μM의 본 발명 실시예 3(RU-3) 처리 후, 서로 다른

시점(30, 60 및 90 분)에서의 CD44 양성 MCF7 세포에 의한 흡수도를 나타낸 그래프이다.

[85] 도 2는 Cd133 양성 HCT-116 세포에서의 본 발명 실시예 1 처리 후, 공초점 현미경으로 관측된 세포 내 국소화 위치(localization)를 나타낸다: (도 2A) 미토콘드리아에서의 국소화 위치 - (a) 핵 염색 (b) 실시예 1의 발광 (c) Mito-tracker red 의 발광 (d) 중첩 이미지; (도 2B) 소포체에서의 국소화 위치 - (a) 핵 염색 (b) 실시예 1의 발광 (c) ER-tracker red의 발광 (d) 중첩 이미지.

[86] 도 3은 1, 5 및 10μM의 다른 농도의 실시예 1로 처리된 CD44 양성 MCF7 및 CD133 양성 HCT-116 세포에서의 세포 내 ROS 발생 정도를 나타내는 형광 이미지(도 3a) 및 1, 5 및 10μM의 다른 농도의 실시예 1로 처리된 CD44 양성 MCF7 및 CD133 양성 HCT-116 세포에서의 세포 내 ROS 발생 정도를 나타낸 그래프(도 3b)이다. 막대 그래프는 2',7'-디클로로플루오레신 디아세테이트의 평균 형광 강도를 나타낸다. 오차 막대는 세번의 독립적인 측정의 표준 편차를 나타낸다(**P<0.01, ***P<0.001 Vs 대조군(Control)).

[87] 도 4는 AOTF를 사용하여 수행한 본 발명 실시예 1 처리된 CD133 양성 HCT-116 세포에서의 MPTP, 세포질 칼슘 및 카스파제 3/7을 찾아내기 위한, 고함량 분석 결과를 도시한 이미지(도 4a) 및 그래프(도 4b)이다. 암 세포를 5 % CO_2의 가습 분위기에서 37 시간 동안 16 시간 동안 Ru-1 (1, 5 및 10μM)의 다른 농도로 처리 하였고, 칼세인 AM, 칼슘 오렌지 및 매직 레드 카스파제 3/7의 형광 방출은 AOTF를 사용하여 각각 525nm, 580nm 및 630nm에서 모니터링되었다. 녹색 형광 이미지는 MPT의 세포 이미지에 해당하고 주황색 형광 이미지(도 4a)는 세포질 칼슘을 나타내며 적색 형광 이미지는 카스파제 3/7을 나타낸다. 막대 그래프(도 4b)는 칼세인 AM, 칼슘 지시약 오렌지 및 카스파제 3/7의 평균 형광 강도를 나타낸다.

[88] 도 5는 본 발명 실시예 1 처리된 CD133 양성 HCT116 세포에서의 세포 사멸 유도 및 항-세포 사멸 단백질의 발현을 나타낸 이미지 및 그래프이다: 도 5a. Bax(1열-DAPI, 2열-Bax, 3열-중첩)의 발현; 도 5b. Bak(1열-DAPI, 2열-Bak, 3열-중첩)의 발현; 도 5c. Bcl-2(1열-DAPI, 2열-Bcl-2, 3열-중첩)의 발현; 도 5d. 대조군 또는 실시예 1 처리된 세포에서의, Bcl-2, Bax 및 Bak의 웨스턴 블롯 분석; 및 도 5e. 그래프는 대조군 대비 실시예 1 처리에 따른 Bcl-2, Bax 및 Bak의 상대적인 발현을 도시한 그래프이다. 오차 막대는 세번의 독립적인 측정의 표준 편차를 나타낸다(* P <0. ** P <0.01, Vs Control).

[89] 도 6은 Discovery Studio의 CDOCKER 프로그램으로부터 얻어진 GRP 78로 도킹된 본 발명 실시예 1의 이미지이다.

[90] 도 7: 도 7a는 pTag-YFP-GRP78-C, pDs-CLU-Red2-N1 및 pAC-ATR-GFP1-N1으로 형질감염된 HEK293 세포에서 본 발명 실시예 1의 상이한 농도에 따른 (a) GRP78, (b) 클루스테린(Clusterin), (c) ATR의 발현을 나타낸 이미지이고; 도 7b는 본 발명 실시예 1의 각각의 상이한 농도에서의

플라스미드 형질감염된 HEK293 세포에서의 GFP,RFP 및 GFP의 평균 형광 강도를 나타낸 막대 그래프이고; 도 7c는 본 발명 실시예 1로 처리된 CD133 양성 HCT116 세포에서 GRP78의 mRNA 발현을 나타낸 그래프이다. 여기서, mRNA 발현은 RT-PCR로 분석되었다; 도 7d는 대조군 또는 본 발명 실시예 1(0, 6, 및 12μM)로 처리된 CD133 양성 HCT116 세포에서의 GRP78의 발현을 나타낸다. GRP-78의 발현 형광은 ER tracker red의 형광과 일치된다; 도 7e는 각각 다른 농도의 실시예 1로 처리된 CD133 양성 HCT 암 세포에서 GRP-78의 평균 형광 강도를 나타낸 막대 그래프이고; 도 7f는 대조군 또는 실시예 1 처리된 CD133 양성 HCT116 세포에서 GRP78의 발현을 나타낸 웨스턴 블롯이고; 및 도 7g는 대조군 대비 GRP-78의 상대적 발현을 나타낸 막대 그래프이다. 오차 막대는 세번의 독립적인 측정의 표준 편차를 나타낸다(** P <0.01, Vs Control).

[91] 도 8: 도 8a. 처치 프로토콜: 마우스에 CD133 양성 HCT116 세포를 0일 시점에 정맥 주사하였고, 14-18일의 시점에서 본 발명 실시예 1을 마우스에 처치하여 치료하였다. 마우스는 실험 마지막 날에 희생되었다; 도 8b. 실험용 마우스의 사진(대조군, 저용량 및 고용량 처치); 도 8c. 실험용 마우스에서 분리한 종양의 사진대조군, 저용량 및 고용량 처치); 도 8d. 치료 기간 동안의 실험용 마우스의 종양 부피; 도 8e. 실험용 마우스로부터 분리된 종양 이종이식된 종양의 무게; 도 8f. 대조군 또는 본 발명 실시예 1 처리된 실험용 마우스에서 Alexaflour680으로 표지된 CD133 항체의 형광 방출을 나타낸 이미지이고; 및 도 8g는 Alexaflour680으로 표지된 CD133 항체의 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

[92]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

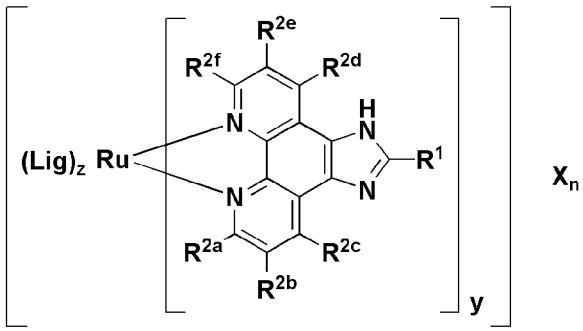
[93] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[94]

[95] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[96] [화학식 1]

[97]



[98] 상기 화학식 1에 있어서,

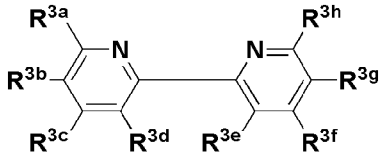
[99] X는 Cl^-, PF_6^-, Br^-, BF_4^-, ClO_4^-, $CF_3SO_3^-$ 및 SO_4^{-2}로 이루어진 군으로 부터 선택되는 1종 이상이고;

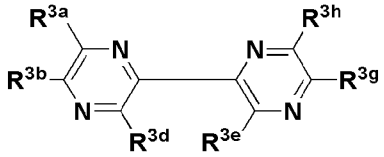
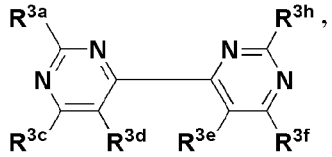
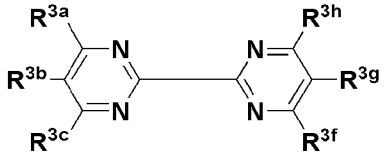
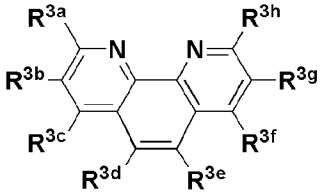
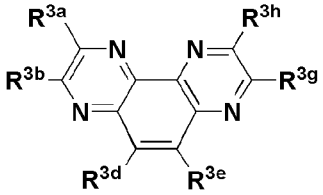
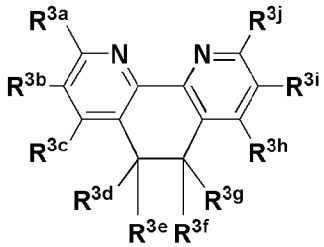
[100] 상기 n은 0 내지 5의 정수이고;

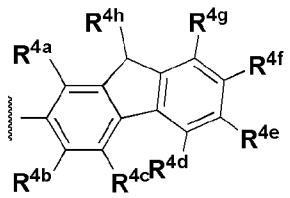
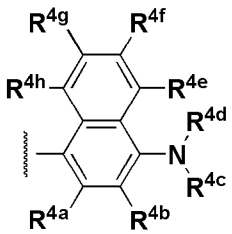
[101] y는 1 내지 3의 정수이고;

[102] z는 0 내지 3이고;

[103] Lig는 각각 독립적으로, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 리간드이고,

[104] ,

[105] , , , , , 및 ;

[106] R^1은  또는  이고;

[107]

[108] R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고;

[109]

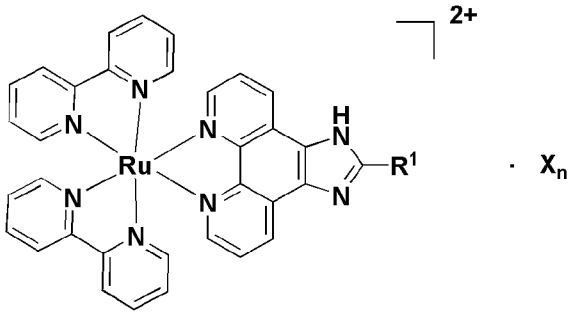
[110] 상기 R^{3a}, R^{3b}, R^{3c}, R^{3d}, R^{3e}, R^{3f}, R^{3g}, R^{3h}, R^{3i} 및 R^{3j}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고,

[111] 상기 R^{4a}, R^{4b}, R^{4c}, R^{4d}, R^{4e}, R^{4f}, R^{4g}, 또는 R^{4h}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환된다.

[112]

[113] 본 발명의 일 양태에서, 상기 화학식 1로 표시되는 착화합물은 하기 화학식 1'의 착화합물일 수 있다.

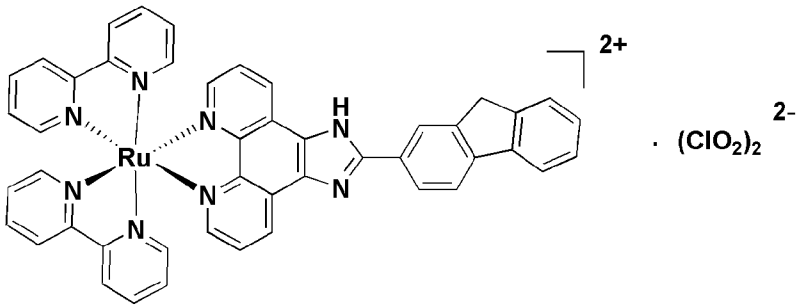
[114] [화학식 1']

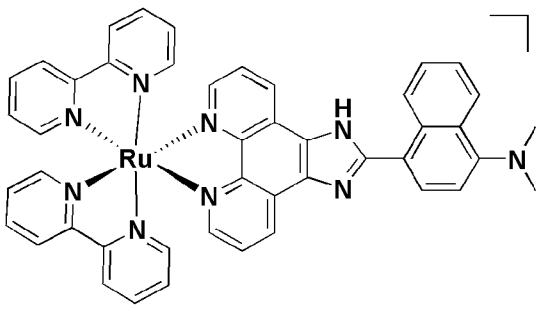
[115] 

[116] 여기서, 상기 R^1, X, n은 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[117]

[118] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 화학식 1로 표시되는 착화합물은,

[119]  ; 또는

[120]  일 수 있다.

[121]

[122] 한편, 상기 화학식 1로 표시되는 착화합물에 있어서, 본 발명의 Ru 착화합물의 Lig(리간드)는 이좌배위자(bidentate)의 리간드를 사용할 수 있다.

[123] 본 발명의 일 측면에서, 상기 Ru 착화합물은 세포질의 약산성 상태에서 이온화되고, 이로부터 Ru(II) 착화합물은 특히 암 세포의 미토콘드리아 또는 ER에

축적된다. 이러한 축적은 계속해서 ROS(활성산소종)의 생성을 유도하게 되는 것이다. 보통 이러한 ROS 생성을 암세포는 항산화 단백질 발현을 조절하여 억제하거나 조절하게 되는데, 본 발명 Ru 착화합물은 ROS 생성 외에도, 이러한 항산화 단백질 발현 자체를 억제하는 바, 세포에 부하되는 산화 스트레스를 크게 상승시키고, 또한 암세포의 사멸 아포톱시스를 적극적으로 유도하여, 결국 암과 암줄기세포를 사멸시키는 효과를 나타낸다.

[124] 따라서, 본 발명의 Ru 착화합물은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하고, 나아가, 본 발명에서 규명한 바와 같이, 특히 세포 유입이 용이하고 신속한 바, 더욱 우수한 항암제로 사용될 수 있다.

[125]

[126] 한편, 본 발명의 일 측면에서, 본 발명의 신규 Ru 착화합물은 암과 암줄기세포에 대한 사멸효과 외에, 암의 내성 발생 기작을 억제하는 우수한 효과를 나타낸다. 구체적으로, 종래 암 내성 발생기작으로, 암줄기세포(CSC)에 의한 GRP-78의 발현 증대로부터 항암제에 대한 내성이 발생되는 것으로 규명된 바 있다. 때문에 GRP-78에 대한 억제 활성은 항암제 내성 발생을 억제 또는 방지할 수 있는 중요한 경로이다.

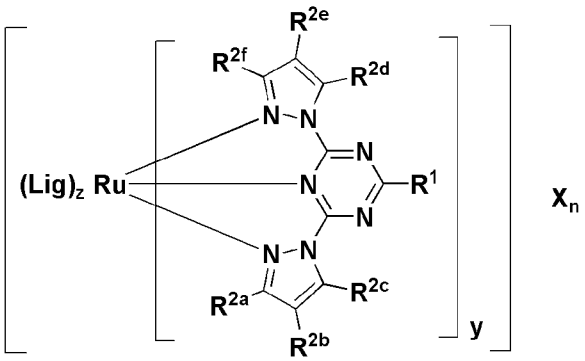
[127] 본 발명의 일 구체예에서는, 본 발명의 신규 Ru 착화합물이 GRP-78 발현과 활성을 현저하게 억제시키는 것을 확인하였다. 특히, 본 발명 Ru 착화합물이 GRP-78의 발현을 억제할 뿐 아니라, GRP-78 이량체에 결합(binding)되어, 이의 활성이 억제됨을 실험적으로 확인한 바, 그 의미가 있고, 이를 암 세포주에서 CSC만을 분리하여 대상으로 확인한 바, 암줄기세포의 내성 발생 기작이 현저히 억제됨을 규명한 것이다. 따라서, 본 발명의 신규 Ru 착화합물은 항암제 내성 억제용 조성물로 사용될 수 있고, 특히 종래 화학 요법제, 예를 들어 백금계 화학 요법제의 내성을 나타내는 암에 있어서, 병용 처치할 수 있는 항암용 보조제로 유용하게 사용될 수 있다.

[128]

[129] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[130] [화학식 2]

[131]



[132] 상기 화학식 2에 있어서,

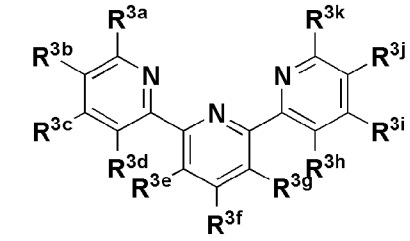
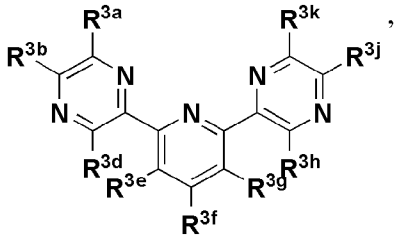
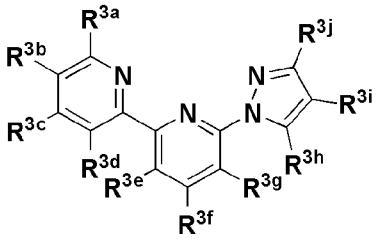
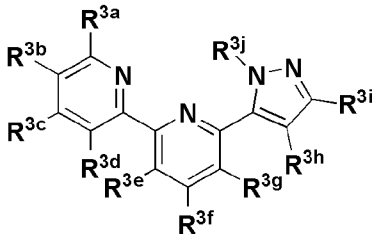
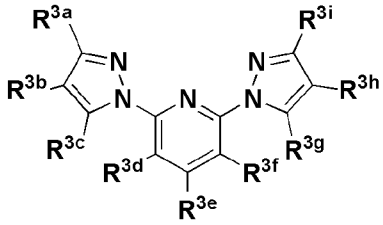
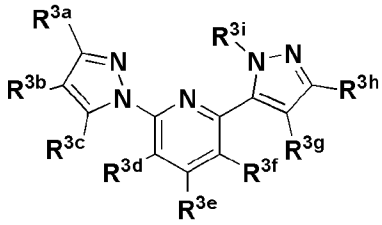
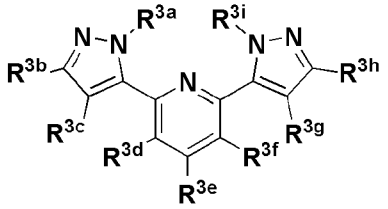
[133] X는 Cl^-, PF_6^-, Br^-, BF_4^-, ClO_4^-, $CF_3SO_3^-$ 및 SO_4^{-2}로 이루어진 군으로 부터 선택되는 1종 이상이고;

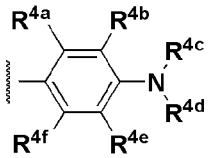
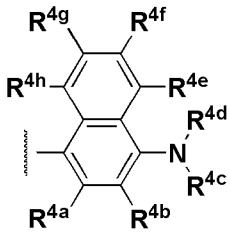
[134] 상기 n은 0 내지 5의 정수이고;

[135] y는 1 내지 2의 정수이고;

[136] z는 0 내지 1이고;

[137] Lig는 각각 독립적으로, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 리간드이고,

[138] , , , , , , 및 ;

[139] R^1은  또는  이고;

[140]

[141] R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고;

[142]

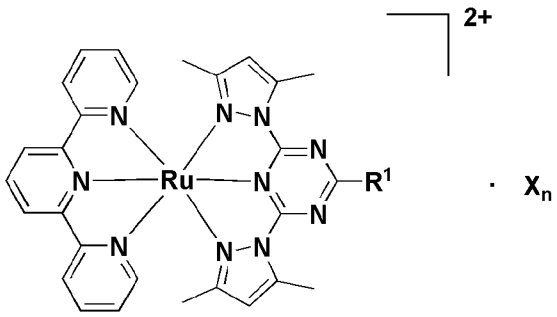
[143] 상기 R^{3a}, R^{3b}, R^{3c}, R^{3d}, R^{3e}, R^{3f}, R^{3g}, R^{3h}, R^{3i}, R^{3j}, 및 R^{3k}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고,

[144] 상기 R^{4a}, R^{4b}, R^{4c}, R^{4d}, R^{4e}, R^{4f}, R^{4g}, 또는 R^{4h}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환된다.

[145]

[146] 본 발명의 일 측면에서, 상기 화학식 2로 표시되는 착화합물은, 하기 화학식 2'의 착화합물일 수 있다.

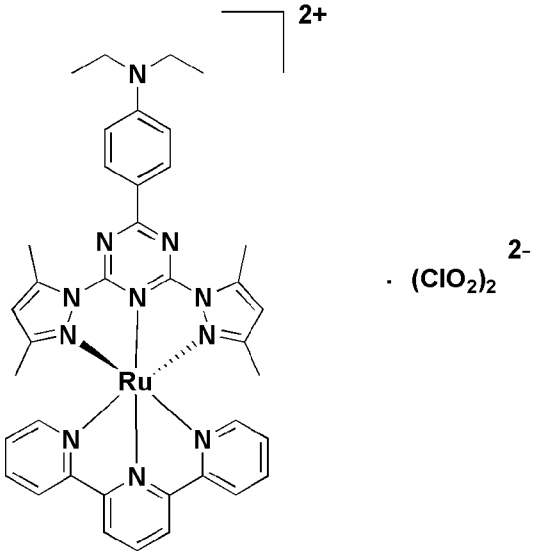
[147] [화학식 2']

[148] 

[149] 여기서, 상기 R^1, X, n은 상기 화학식 2에서 정의한 바와 같다.

[150]

[151] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 화학식 2로 표시되는 착화합물은,

[152] 

[153] 일 수 있다.

[154]

[155] 한편, 상기 화학식 2로 표시되는 착화합물에 있어서, 본 발명의 Ru 착화합물의 Lig(리간드)는 삼좌배위자(tridentate)의 리간드를 사용할 수 있다. 특히, 상기 화학식 2로 표시되는 착화합물에 있어서, Lig로 표시되는 리간드는 삼좌배위자 리간드이면 제한 없이 사용될 수 있고, 본 발명은 이를 포함한다.

[156] 본 발명의 일 측면에서, 상기 Ru 착화합물은 세포질의 약산성 상태에서 이온화되고, 이로부터 Ru(II) 착화합물은 특히 암 세포의 미토콘드리아 또는 ER에 축적된다. 이러한 축적은 계속해서 ROS(활성산소종)의 생성을 유도하게 되는 것이다. 보통 이러한 ROS 생성을 암세포는 항산화 단백질 발현을 조절하여 억제하거나 조절하게 되는데, 본 발명 Ru 착화합물은 ROS 생성 외에도, 이러한 항산화 단백질 발현 자체를 억제하는 바, 세포에 부하되는 산화 스트레스를 크게 상승시키고, 또한 암세포의 사멸 아포톱시스를 적극적으로 유도하여, 결국 암과 암줄기세포를 사멸시키는 효과를 나타낸다. 특히, 종래의 백극 화학 요법제(항암제)인 시스플라틴의 암세포 사멸 효과에 비하여, 보다 우수한 사멸 효과가 나타남을 본 발명에서 입증하였다(하기 실험예 1, 표 2 참조).

[157] 따라서, 본 발명의 Ru 착화합물은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하고, 나아가, 본 발명에서 규명한 바와 같이, 특히 세포 유입이 용이하고 신속한 바, 더욱 우수한 항암제로 사용될 수 있다.

[158]

[159] 한편, 본 발명의 일 측면에서, 본 발명의 신규 Ru 착화합물은 암과 암줄기세포에 대한 사멸효과 외에, 암의 내성 발생 기작을 억제하는 우수한 효과를 나타낸다. 구체적으로, 종래 암 내성 발생기작으로, 암줄기세포(CSC)에 의한 GRP-78의 발현 증대로부터 항암제에 대한 내성이 발생되는 것으로 규명된 바 있다. 때문에 GRP-78에 대한 억제 활성은 항암제 내성 발생을 억제 또는 방지할 수 있는 중요한 경로이다.

[160] 본 발명의 일 구체예에서는, 본 발명의 신규 Ru 착화합물이 GRP-78 발현과 활성을 현저하게 억제시키는 것을 확인하였다. 특히, 본 발명 Ru 착화합물이 GRP-78의 발현을 억제할 뿐 아니라, GRP-78 이량체에 결합(binding)되어, 이의 활성이 억제됨을 실험적으로 확인한 바, 그 의미가 있고, 이를 암 세포주에서 CSC만을 분리하여 대상으로 확인한 바, 암줄기세포의 내성 발생 기작이 현저히 억제됨을 규명한 것이다. 따라서, 본 발명의 신규 Ru 착화합물은 항암제 내성 억제용 조성물로 사용될 수 있고, 특히 종래 화학 요법제, 예를 들어 백금계 화학 요법제의 내성을 나타내는 암에 있어서, 병용 처치할 수 있는 항암용 보조제로 유용하게 사용될 수 있다.

[161]

[162] 본 발명의 일 측면에서, 본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산,

아인산 등과 같은 무기산류, 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류 등과 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산 등과 같은 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염의 종류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 다이하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등을 포함한다.

[163] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1 또는 화학식 2의 유도체를 메탄올, 에탄올, 아세톤, 디클로로메탄, 아세토니트릴 등과 같은 유기용매에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조시켜 제조하거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조시켜 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[164] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[165]

[166] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 용매화물, 광학이성질체, 수화물 등을 모두 포함한다.

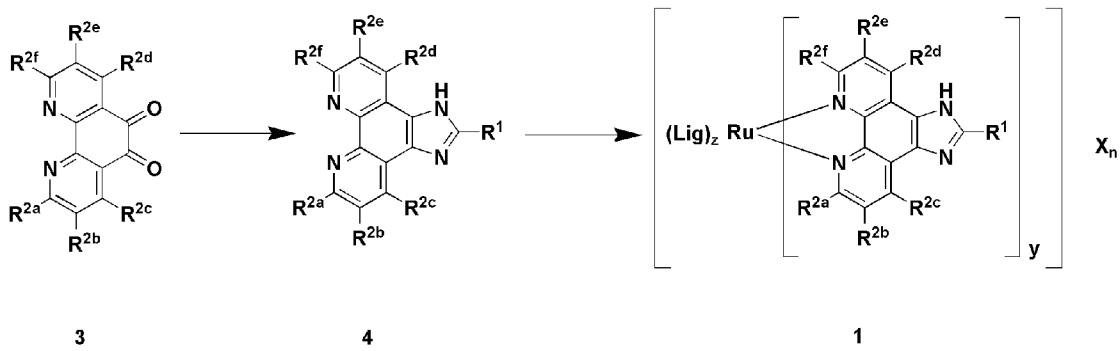
[167]

[168] 나아가, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[169] 화학식 3으로 표시되는 화합물로부터 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

[170] 상기 단계에서 제조된 화학식 4로 표시되는 화합물로부터 화학식 1로 표시되는 착화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 착화합물의 제조방법을 제공한다:

[171] [반응식 1]

[172] 

3 4 1

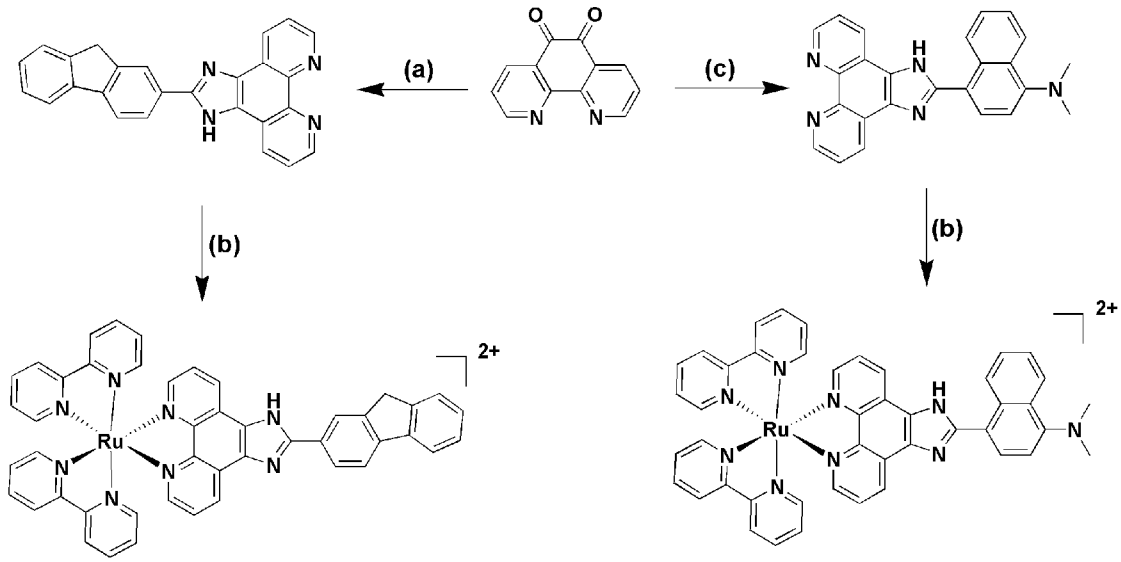
[173] 상기 반응식 1에 있어서,

[174] X, n, y, z, Lig, R^1, R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[175]

[176] 본 발명의 반응식 1 제조방법에 있어서, 일 측면에서 상기 제조방법은 하기 반응식 1'로 표시되는 제조방법과 같이 수행될 수 있다.

[177] [반응식 1']

[178] 

[179]

[180] 이하, 본 발명 화학식 1로 표시되는 착화합물의 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.

[181]

[182] 상기 반응식 1에 있어서,

[183] 단계 (a)는 1, 10-페난스롤린-5,6-디온으로부터 단계 (a) 목적 화합물이 제조될 수 있는 방법이라면, 이를 제한없이 포함하나, 일 구체예로,

플루오렌-2-카복스알데히드, 암모늄 아세테이트, 빙초산을 환류시키는 것으로 진행될 수 있다.

[184] 여기서, 반응 조건, 예를 들어, 용매, 반응 온도 및 반응 시간은 특별한 제약 없이, 통상의 기술자가 제조되는 목적 화합물의 수율 및 부반응 정도 등을 고려하여, 조절할 수 있고, 본 발명은 이를 제한 없이 포함하나, 바람직하게 반응 시간은 3시간 내지 8시간으로 수행될 수 있다.

[185] 또한, 단계 (b)는 단계(a)에서 제조된 화합물, cis-$[Ru(bpy)_2Cl_2].2H_2O$을 에틸렌 글리콜에서 반응시키는 것으로 수행될 수 있다.

[186] 여기서, 반응 조건, 예를 들어, 용매, 반응 온도 및 반응 시간은 특별한 제약 없이, 통상의 기술자가 제조되는 목적 화합물의 수율 및 부반응 정도 등을 고려하여, 조절할 수 있고, 본 발명은 이를 제한 없이 포함하나, 바람직하게 N_2 분위기하에 90 내지 150℃에서, 반응 시간은 5시간 내지 10시간으로 수행될 수 있다.

[187] 한편, 상기 반응식 1'의 단계 (c)는 1, 10-페난스롤린-5,6-디온으로부터 단계 (c) 목적 화합물이 제조될 수 있는 방법이라면, 이를 제한없이 포함하나, 일 구체예로, 4-(디메틸아미노)-1-나프트알데히드, 플루오렌-2-카복스알데히드, 암모니아 아세테이트, 빙초산을 환류시키는 것으로 진행될 수 있다.

[188] 여기서, 반응 조건, 예를 들어, 용매, 반응 온도 및 반응 시간은 특별한 제약 없이, 통상의 기술자가 제조되는 목적 화합물의 수율 및 부반응 정도 등을 고려하여, 조절할 수 있고, 본 발명은 이를 제한 없이 포함하나, 바람직하게 반응 시간은 3시간 내지 8시간으로 수행될 수 있다.

[189]

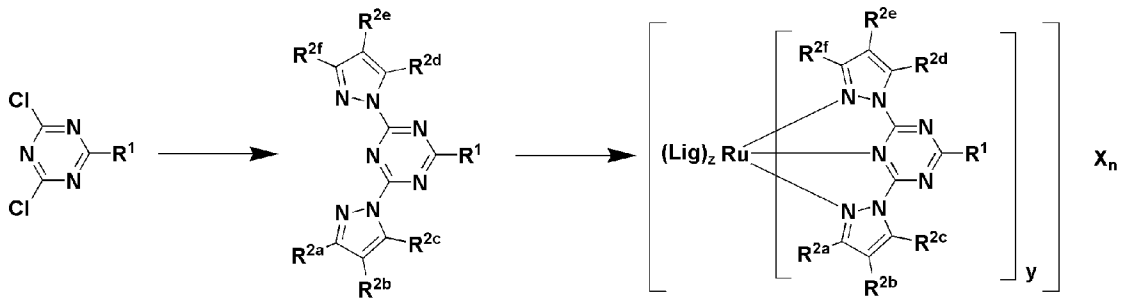
[190] 또한, 본 발명은 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

[191] 화학식 5로 표시되는 화합물로부터 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

[192] 상기 단계에서 제조된 화학식 6으로 표시되는 화합물로부터 화학식 2로 표시되는 착화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 상기 화학식 2로 표시되는 착화합물의 제조방법:

[193] [반응식 2]

[194]



5 6 2

[195] 상기 반응식 2에 있어서,

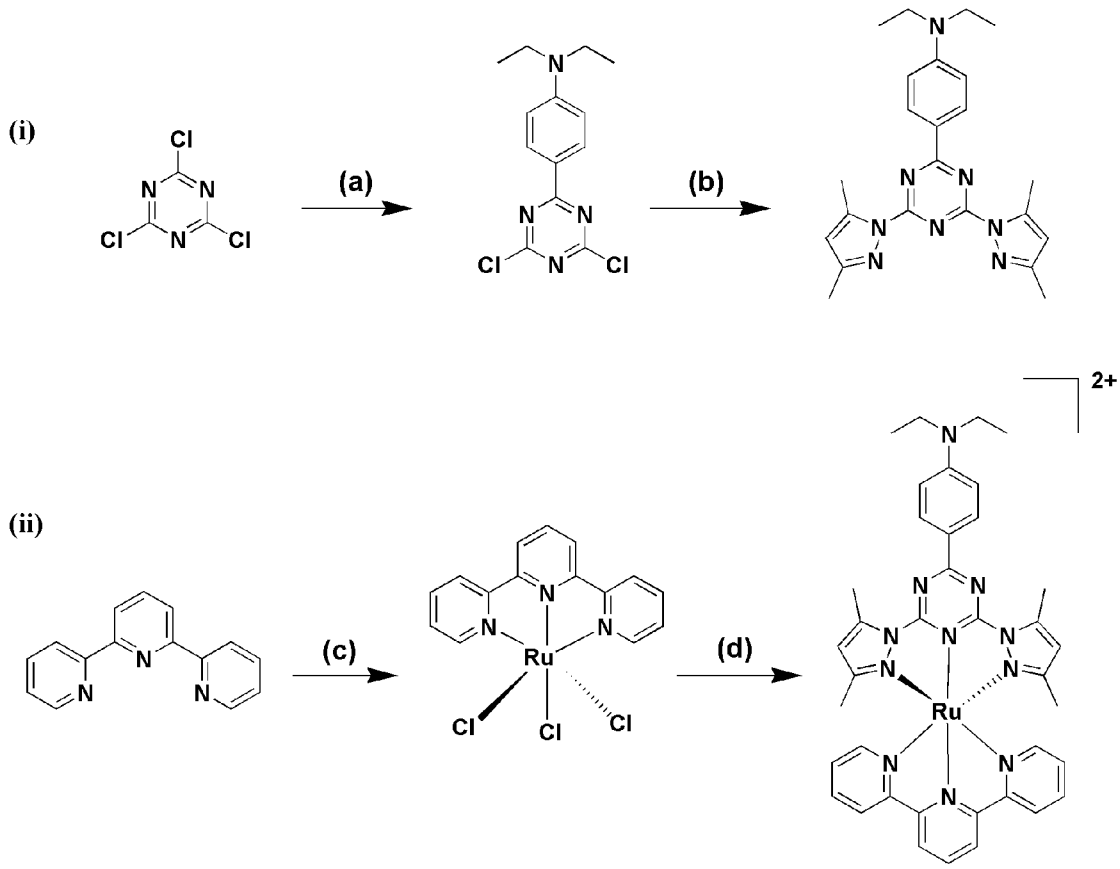
[196] X, n, y, z, Lig, R^1, R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 상기 화학식 2에서 정의한 바와 같다.

[197]

[198] 본 발명의 반응식 2 제조방법에 있어서, 일 측면에서 상기 제조방법은 하기 반응식 2'로 표시되는 제조방법과 같이 수행될 수 있다.

[199] [반응식 2']

[200]



[201]

[202] 이하, 본 발명 화학식 2로 표시되는 착화합물의 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.

[203]

[204] 상기 반응식 2에 있어서,

[205] 단계 (a)는 1, 2,4,6-트리클로로-1,3,5-트리아진으로부터 단계 (a) 목적 화합물이 제조될 수 있는 방법이라면, 이를 제한없이 포함하나, 일 구체예로, N,N-디에틸아닐린과 반응시키는 것으로 진행될 수 있다.

[206] 여기서, 반응 조건, 예를 들어, 용매, 반응 온도 및 반응 시간은 특별한 제약 없이, 통상의 기술자가 제조되는 목적 화합물의 수율 및 부반응 정도 등을 고려하여, 조절할 수 있고, 본 발명은 이를 제한 없이 포함하나, 바람직하게 반응 온도는 50 내지 90℃일 수 있고, 반응 시간은 5시간 내지 12시간으로 수행될 수

있다.

[207] 또한, 단계 (b)는 단계(a)에서 제조된 화합물, 3,5-디메틸피라졸, K 메탈을 THF에서 환류시키는 것으로 수행될 수 있다.

[208] 여기서, 반응 조건, 예를 들어, 용매, 반응 온도 및 반응 시간은 특별한 제약 없이, 통상의 기술자가 제조되는 목적 화합물의 수율 및 부반응 정도 등을 고려하여, 조절할 수 있고, 본 발명은 이를 제한 없이 포함하나, 반응 시간은 5시간 내지 12시간으로 수행될 수 있다.

[209] 한편, 상기 반응식 2'의 단계 (c)는 2,2':6',2"-테르피리딘(Terpyridine)으로부터 단계 (c) 목적 화합물이 제조될 수 있는 방법이라면, 이를 제한없이 포함하나, 일 구체예로, 테르피리딘, $RuCl_3.3H_2O$를 에탄올에서 환류시키는 것으로 진행될 수 있다.

[210] 여기서, 반응 조건, 예를 들어, 용매, 반응 온도 및 반응 시간은 특별한 제약 없이, 통상의 기술자가 제조되는 목적 화합물의 수율 및 부반응 정도 등을 고려하여, 조절할 수 있고, 본 발명은 이를 제한 없이 포함하나, 바람직하게 반응 시간은 1시간 내지 5시간으로 수행될 수 있다.

[211] 또한, 단계 (d)는 상기 단계(c)에서 제조한 화합물과, 상기 단계(b)에서 제조한 화합물로부터 최종 목적 화합물인, 본 발명 Ru 착화합물을 제조할 수 있는 방법이라면, 제한 없이 본 발명에 포함되나, 일 구체예로, 상기 단계(c)에서 제조한 화합물과, 상기 단계(b)에서 제조한 화합물을 에틸렌 글리콜에서 반응시키는 것으로 진행될 수 있다.

[212] 여기서, 반응 조건, 예를 들어, 용매, 반응 온도 및 반응 시간은 특별한 제약 없이, 통상의 기술자가 제조되는 목적 화합물의 수율 및 부반응 정도 등을 고려하여, 조절할 수 있고, 본 발명은 이를 제한 없이 포함하나, 바람직하게 N_2 분위기하에 환류시켜, 반응 시간은 12시간 내지 36시간으로, 또는 밤새도록 수행될 수 있다.

[213]

[214] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[215] 본 발명의 일 측면에서, 상기 약학적 조성물은 본 발명 Ru 착화합물, 즉 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물을 유효성분으로 함유하며, 특히, 본 발명의 실험예에서 보인 바와 같이, 항암 활성(암 또는 암 줄기세포의 사멸 효과, ROS 생성 유도 효과)을 나타내고, 암 또는 암 줄기세포의 ROS 방어 기작인 효소적, 비효소적 항산화 단백질 발현을 유의미하게 억제하는 효과를 나타낸다.

[216] 이에, 본 발명의 Ru 착화합물을 유효성분으로 하는 암의 예방 또는 치리용 약학적 조성물은 본 발명의 Ru 착화합물이 암 또는 암줄기세포로 세포 유입이 우수함을 확인하였고, 특히 세포질의 약산성 조건에서 이온화 되어 미토콘드리아, 또는 ER에 축적됨을 확인하였으며, 이로부터 ROS 생성이

현저함을 확인하였다. 또한, 효소적, 비효소적 항산화 단백질 발현을 유의미하게 억제하고, 사멸 유도(pro-apotopsis) 단백질 발현이 유의미하게 증가되는 것으로부터, 암 또는 암줄기세포에 비가역적 산화 스트레스를 유발하고, 이로부터 우수한 세포 사멸(apotopsis) 효과를 입증하였다. 나아가, 대장암 또는 유방암의 암세포주, 암줄기세포(CSC)의 In vitro 실험 외에도, 생체 내 동물 모델 실험에서, 항암제로 우수하게 사용될 수 있음이 입증되는 바, 본 발명의 Ru 착화합물을 유효성분으로 하는 암의 예방 또는 치리용 약학적 조성물의 유용함을 알 수 있다.

[217] 한편, 상기 암에 있어서, 본 발명이 상술한 바와 같이, 실험적으로 입증한 효과를 기반으로 치료될 수 있는 암이라면, 제한 없이 포함되나, 바람직하게 상기 암은, 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 미만성거대B세포림프종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 비호지킨림프종, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신경모세포종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직 암, 악성골암, 악성림프종, 악성중피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 윌름스암, 유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신융모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성 골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문근육종, 후두암, 흉막암, 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[218] 나아가, 바람직하게 상기 암은 급성 골수 백혈병(AML); 만성적 골수성 백혈병(CML); 급성 림프아구성 백혈병(ALL); 만성적 림프구성 백혈병(CLL); 호지킨 질환(HD); 비-호지킨 림프종(NHL); B-세포 림프종; T-세포 림프종; 다발성 골수종(MM); 아밀로이드증; 발덴스트롬 거대글로불린혈증; 골수이형성 증후군(MDS); 작은 림프구 림프종(SLL); 변연부 림프종; 무증상 다발성 골수종; 및 골수증식성 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[219]

[220] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 조절되지 않는 또는 이상조절된 세포 증식, 감소된 세포성 분화, 주위의 조직에 침입하는 부절적한 능력, 및/또는 이소성 부위에서 신규 성장을 확립하는 능력을 특징으로 하는 세포성 장애를 의미한다. 용어 "암"은 비제한적으로, 고형 종양 및 혈액매개 종양 (혈액성

악성종양)을 포함한다. 용어 "암"은 피부, 조직, 기관, 골, 연골, 혈액, 및 혈관의 질환을 포함한다. 용어 "암"은 추가로, 1차 및 전이암을 포함한다.

[221]

[222] 상기 고형 종양은 췌장암; 침습성 방광암 포함하는 방광암; 결장직장암; 갑상선암, 위암, 전이성 유방암을 포함하는 유방암; 안드로겐-의존적 및 안드로겐-독립적인 전립선암을 포함하는 전립선암; 예를 들면, 전이성 신장 세포암종을 포함하는 신장암; 예를 들면 간세포 암 및 간내 담관을 포함하는 간암; 비-소세포 폐암 (NSCLC), 편평상피 폐암, 세기관지폐포 암종 (BAC), 폐의 선암종, 및 소세포 폐암 (SCLC)을 포함하는 폐 및 기관지 암; 예를 들면, 진행성 상피성 또는 1차 복막 암을 포함하는 난소암; 자궁경부암; 예를 들면 자궁 체부 및 자궁 경부를 포함하는 자궁암; 자궁내막 암; 위암; 식도암; 예를 들면, 두경부의 편평상피 세포 암종, 비인두 암, 구강 및 인두를 포함하는 두경부 암; 흑색종; 전이성 신경내분비 종양을 포함하는 신경내분비 암; 예를 들면, 신경아교종/교모세포종, 역형성 희소돌기아교세포종, 성인 교모세포종 다형성, 및 성인 역형성 별아교세포종을 포함하는 뇌암; 전이성 신경내분비 종양; 골암이고; 그리고 연조직 육종을 포함하는 신경내분비를 포함한다.

[223]

[224] 상기 혈액성 악성종양은 급성 골수 백혈병 (AML); 만성적 골수성 백혈병 (CML) (가속화된 CML 및 CML 아세포기 (CML-BP) 포함); 급성 림프아구성 백혈병 (ALL); 만성적 림프구성 백혈병 (CLL); 호지킨 질환 (HD); 비-호지킨 림프종 (NHL) (여포성 림프종 및 외투 세포 림프종 포함); B-세포 림프종 (미만성 큰 B-세포 림프종 (DLBCL) 포함); T-세포 림프종; 다발성 골수종 (MM); 아밀로이드증; 발덴스트롬 거대글로불린혈증; 골수이형성 증후군 (MDS) (난치의 빈혈 (RA), 관상 철아구 (RARS)를 갖는 난치의 빈혈 (과다 모세포 (RAEB), 및 형질전환 동반 RAEB (RAEB-T)를 갖는 난치의 빈혈) 포함); 작은 림프구 림프종 (SLL); 변연부 림프종; 무증상 다발성 골수종; 및 골수증식성 증후군을 포함한다.

[225]

[226] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 조성물을 제공한다.

[227] 본 발명의 일 측면에서, 본 발명의 신규 Ru 착화합물은 상술한 항암제로서의 효과와 함께, 암의 항암제 내성을 발생시키는 기작인, CSC(암줄기세포)의 GRP-78의 발현, 및 활성 증가를 통하는 내성 발생을 우수하게 억제할 수 있음을 실험적으로 입증하였다. 특히 농도 증가에 따라 비례적 억제 활성을 입증하였을 뿐 아니라, 매우 적은 농도로도 유의미한 GRP-78의 발현, 및 활성을 우수하게 억제할 수 있음이 실험적으로 입증되는 바, 본 발명 신규 Ru 착화합물을 기존 항암제에 대한 내성을 가지는 암, 또는 암줄기세포를 대상으로 유용한 내성

억제용 조성물로 사용될 수 있다.

[228] 본 발명의 또 다른 측면에서, 배경기술에서 기술한 바와 같이, 종래 화학 요법제(항암제)는 암줄기세포(CSC)의 내성 발생 기작으로, 내성이 생겨 더 이상 약물 치료 효과가 없어지거나, 적어지는 것 등의 문제가 있었고, 또한 약물 부작용 문제가 있었다. 종래 화합 요법제 중 특히, 전이금속 착화합물, 예를 들어 백금 착화합물의 내성과 부작용 문제는 CSC의 내성 작용으로부터 한계를 들어내는 것으로 보고되었다.

[229] 이러한 관점에서, 본 발명이 입증한 신규 Ru 착화합물의 CSC의 내성 발생 기작의 억제 효과는 매우 중요한 것이고, 이로부터 본 발명 Ru 착화합물을 종래 화학 요법제와 함께 병용, 전 처리 또는 후 처리 등의 제한 없는 방법으로 암, 또는 암줄기세포의 항암제 내성을 억제할 수 있는 치료제로서 유용할 것이다.

[230]

[231] 따라서, 본 발명은 상기 항암제 내성 억제용 조성물, 및 화학 요법제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[232] 상술된 바와 같이, 본 발명이 GRP-78 발현 및 활성을 농도 의존적으로 억제함이 입증되었고, 이로부터 실제 암세포, 또는 암줄기세포에서 우수한 세포 사멸 효과를 확인하였을 뿐 아니라, 동물 모델 실험에서도, 그 효과를 입증한 바, 본 발명 신규 Ru 착화합물은 그 자체로 항암제로 사용될 수 있고, 또는 종래 화학 요법제(항암제)와 병용 처리될 수 있는 치료제로서 유용하게 제공된다.

[233] 여기서, 상기 암은 본 명세서에 암으로 설명되는 모든 암종을 포함하며, 이의 1종 또는 1종 이상을 말한다.

[234]

[235] 상술된 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조될 수 있다.

[236]

[237] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제, 트로키제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘 등과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염 등과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[238]

[239] 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물을 유효 성분으로 하는 약학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의하였다.

[240] 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[241]

[242] 상기 제제화의 예시는 통상적인 제제예에 관한 것일 뿐, 본 발명의 제제화가 이에 제한되지는 않음을 통상의 기술지식을 가진 자라면 용이하게 이해할 수 있다.

[243] 나아가, 본 발명의 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 인체에 대한 투여량은 대상의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70Kg인 성인 대상를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.1-1000 mg/일이며, 바람직하게는 1-500 mg/일이며, 또한 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[244]

[245] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[246]

[247] 이때, 상기 암은 상술된 모든 암 질환을 말하며, 비제한적인 예로, 상기 암은 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 미만성거대B세포림프종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 비호지킨림프종, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신경모세포종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직 암, 악성골암, 악성림프종, 악성중피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 윌름스암, 유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신융모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성 골암, 전이성뇌암,

종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문근육종, 후두암, 흉막암, 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[248]

[249] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 치료학적으로 유효한 양으로 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.

[250]

[251] 이때, 상기 치료학적 유효량은 투여 방법에 따라, 체내로 투여시 대상(subject)의 증상 또는 상태를 치료, 예방 또는 개선시킬 수 있을 정도의 양을 말한다. 또한 상기 양은 투여하는 대상의 체중, 나이, 성별, 상태, 가족력에 따라 상이할 수 있고, 본 발명에서 상기 치료 방법은 이처럼 대상별로 상이한 조건에 따라 다른 양의 투여량을 정할 수 있다.

[252]

[253] 상기 "유효한 양"은, 예를 들어 암을 치료하는데 유효한 양이다. 다른 구체예에서, 화합물의 "유효한 양"은 암 또는 암줄기세포 사멸을 야기시킬수 있는 양이다.

[254]

[255] 본 발명의 방법에 따른 착화합물 및 조성물은 질환을 치료하는데 유효한 임의의 양 및 임의의 투여 경로를 사용하여 투여될 수 있다. 필요한 정확한 양은 대상(subject)의 종, 연령, 및 일반적인 병태, 감염의 중증도, 특정한 제제, 그것의 투여 방식, 등에 따라 대상별로 변할 것이다. 본 발명의 착화합물은 복용량의 투여 용이성 및 균일성에 대해 투약량 단위 형태로 빈번하게 제형화된다. 표현 "투약량 단위 형태"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이 치료될 대상에 적절한 제제의 물리적으로 별개의 단위를 의미한다. 또한, 본 발명의 착화합물 및 조성물의 총 일일 사용량이 건전한 의료 판단의 범위 내에 주치의에 의해 결정될 것으로 이해될 것이다. 임의의 특정한 대상 또는 유기체에 대한 특정 유효한 투여 수준은 하기를 포함하는 다양한 인자에 의존된다: 치료될 질환 및 질환의 중증도; 이용된 특정 화합물의 활성; 특정 조성물 이용된; 연령, 체중, 일반적인 건강, 대상의 성별 및 다이어트; 투여 시간, 투여 경로, 및 이용된 특정 화합물의 배출 속도; 치료의 지속시간; 이용된 특정 화합물 단독 또는 공동투여된 약물, 및 의료 기술에서 잘 알려진 이 외의 요인.

[256]

[257] 용어 "대상(subject)"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 동물, 예를 들면 포유동물, 예컨대 인간을 의미한다.

[258]

[259] 본 발명 루테늄 착화합물은 항암 활성을 나타내고, 약제 내성 단백질과 항암

활성을 위한 세포 내 소기관을 표적으로하는 금속 착체인 것으로 확인된 바, 암줄기세포에서 다제 내성을 극복할 수 있다.

[260]

[261] 일반적으로 암 종양 미세 환경(pH 6.5-6.8)은 정상 조직(pH 7.4)에 비해 더 산성입니다. 이 종양 산성 pH에서, 생리 학적 조건에서 본 발명 Ru 착화합물의 양성자화는 보다 용이하며, 내부 미토콘드리아 막(IMM) 음전위에 보다 쉽게 이끌어지는 것으로 추측된다.

[262] 놀랍게도, 본 발명 Ru 착화합물은 미토콘드리아와 ER 모두에 공존한다. 미토콘드리아 또는 ER에서 전이 금속 착화합물이 축적되면 펜톤형 산화 환원 반응을 통해 활성 산소 종(ROS)을 효과적으로 생성 할 수 있고, 이 특성은 전이 금속이 항산화 단백질을 동시에 비활성화시키고 산성 미세 환경 하에서 암세포에서 자유 라디칼을 생성 할 수 있게하는 바, 암 세포는 신진 대사 및 약리학적 부하를 ROS 독성의 한계점까지 견딜 수 있습니다. 또한 CSC는 증식성 암 세포와 비교하여 비효소 항산화 단백질뿐만 아니라 항산화 효소의 높은 수준을 나타내어, 이 생존 메커니즘으로부터 CSC가 화학 요법 약물에 대한 약물 내성을 개발할 수 있게 한다.

[263] 따라서, 암세포의 항산화 능을 억제하는 것뿐만 아니라 ROS 생성을 동시에 증가시키는 것과 같은 치료 전략은 비가역 산화 스트레스와 후속 세포 사멸을 유도 할 수 있는 바, 본 발명 Ru 착화합물은 처리 6 시간 이내에 농도 의존적으로 HCT-116 및 MCF-7 세포의 CSC에서 상승된 ROS 생성을 나타내고, 우수한 세포 독성을 나타내는 것이 확인되었다.

[264]

발명의 실시를 위한 형태

[265] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

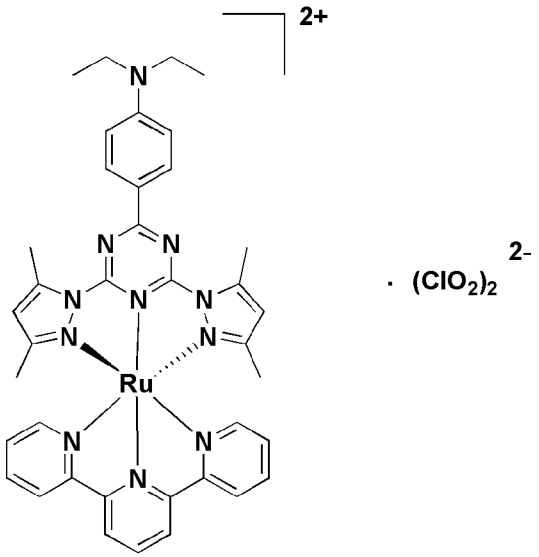
[266] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[267]

[268] 루테늄 트리클로라이드 트리하이드레이트 및 기타 시약 또는 화학 물질은 Sigma Aldrich, South Korea에서 구입했습니다. 분석 등급 용매는 Alfa Aesar 또는 Sigma Aldrich South Korea에서 구입하여 반응에 사용하기 전에 20 분 동안 100 % 건조 질소로 탈기시켰다. 염소산 나트륨 용액의 제조에는 탈 이온수를 사용하였다. 컬럼 정제를 위해 아세토 니트릴 및 톨루엔 상업용 용매를 사용하였고 한국 대정 화학 (Daejung Chemicals, Korea)에서 구입하였다.

[269]

[270] <실시예 1> 루테늄 착화합물-1(RU-1)의 합성: $[Ru(bdpta)(tpy)](ClO_2)_2$

[271] 

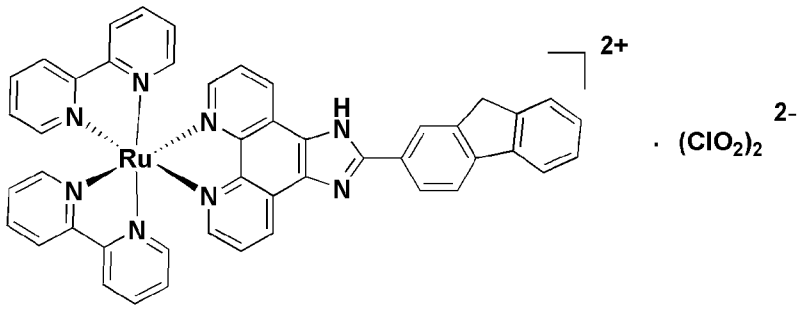
[272] 무수 에탄올(80 ml) 중 테르피리딘 2(300 mg, 1.29 mmol) 및 0.336 g의 $RuCl_3 \cdot 3H_2O$(1.29 mmol)의 혼합물을 80℃에서 3시간 동안 환류시켰다. 과량의 에탄올을 회전 증발기로 농축시켜 적색 고체를 얻었으며,이를 디에틸에테르 및 헥산으로 세척하였다. 적색 고체 $[Ru(tpy)Cl_3]$가 수득되었고, 건조시켜서, 추가의 스펙트럼 분석없이 합성의 다음 단계에 사용하였다. 400 mg의 $[Ru(tpy)Cl_3]$ 물질, 25 ml의 건조 에틸렌 글리콜 및 0.9 mmol의 bdpta 리간드를 넣고 N_2 대기 하에서 밤새 170℃에서 환류시켰다. 이어서, 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 1M $NaClO_4$를 첨가하였다. 이어서, 회전 증발기에서 용매를 증발시켰다. 조질의 루테늄 착화합물을 중성 알루미나(CH_3CN/톨루엔, 40/60, v/v)상에서 컬럼 크로마토그래피로 2회 정제하였다. 어두운 적갈색의 색 띠가 수집되었고, 포화 $NaClO_4$를 첨가 한 다음, 용매를 증류시켜 ClO_4^- 염으로서 생성물을 수득하였다. 이어서, 고체를 디에틸 에테르, 헥산으로 세척하고 진공하에 건조시켰다.

[273] 수율: 400 mg, 51.4%. Anal. Calcd for $C_{38}H_{39}N_{11}Ru$ (%): C, 60.78; H, 5.24; N, 20.52. Found: C, 60.82; H, 5.40; N, 20.75. . ^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ 10.38 - 10.31 (m, 1H, tpy), 8.84 (dd, 1H, tpy), 8.69 (dd, J = 8.2, 1.4 Hz, 1H, tpy), 8.43 - 8.36 (m, 2H, aniline ring Ar proton), 8.35 - 8.25 (m, 2H, tpy), 7.98 (t, J = 7.9 Hz, 1H, tpy), 7.89 (ddd, J = 7.1, 5.7, 1.3 Hz, 1H, tpy), 7.66 (td, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H, tpy), 7.20 - 7.10 (m, 2H, tpy), 6.97 - 6.89 (m, 2H, aniline ring Ar proton), 6.52 (dd, J = 7.7, 1.1 Hz, 1H, tpy), 6.31 (s, 2H, pyrazole CH proton), 3.61 (q, J = 7.1 Hz, 4H, alkyl CH_2), 3.34 (s, 6H, pyrazole ring 2-CH_3), 3.07 (s, 6H, pyrazole ring 2-CH_3), 1.34 - 1.21 (m, 6H, alkyl CH_3). ^{13}C NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 12.68, 14.05, 16.18, 110.81, 111.45, 121.07, 121.24, 123.82, 131.60, 136.91, 137.98, 144.02, 149.23, 151.70, 152.59, 155.45, 156.34, 164.01. MALDI-TOF mass spectra: 752.07 ($C_{38}H_{39}N_{11}Ru$), UV-Visible spectrum (CH_3CN): λmax 380 nm and 515 nm. HRMS (ESI): Calcd for $C_{38}H_{39}N_{11}Ru$: 750.8770, found: 750.8780.

[274]

[275] <실시예 2> 루테늄 착화합물-2(RU-2)의 합성: $[Ru(bpy)_2(Fip)](ClO_2)_2$

[276]

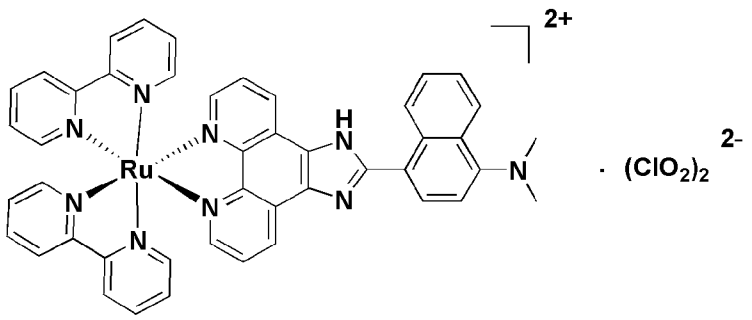


[277] 중간체 2-(9H-플루오렌-2-일)-1H-이미다조[4,5-f][1,10]페난트롤린(250 mg, 0.65 mmol) 및 시스-$[Ru(bpy)_2Cl_2]$. $2H_2O$(315 mg, 0.65 mmol)를 혼합하고 40 ml의 에틸렌 글리콜에 용해시켰다. 그런 다음 반응 혼합물을 N_2 환경 하에서 120℃에서 7시간 동안 환류시켰다. TLC로 반응 완결을 확인했다. 이어서, 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 100 ml의 DI 수로 희석시켰다. 이 혼합물에 포화 $NaClO_4$ 용액을 첨가 한 후, 천천히 교반하여 진한 적색을 띤 오렌지색 고체를 얻었다. 생성된 조 생성물을 여과하고, 중성 알루미나를 고정상, 톨루엔/아세토니트릴 (40/60, v/v)을 이동상 용매로하여 컬럼 크로마토그래피로 2회 정제하였다. 어두운 붉은색 오렌지색 밴드가 수집되었고, 용매는 감압하에 농축되었다. 그런 다음 포화된(50%) $NaClO_4$ 용액을 천천히 첨가하여 생성물을 ClO_4^- 염으로 수득하였다.

[278] 수율: 450 mg. 아세톤/DMSO 혼합물 중의 $[Ru(bpy)_2(Fip)](ClO_2)_2$을 천천히 증발시켜 X-선 결정 구조를 결정하였다. Anal. Calcd for $C_{46}H_{32}N_8Ru$(%): C, 69.25; H, 4.04; N, 14.04. Found: C, 69.55; H, 4.24; N, 14.10. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 14.36 (s, 1H, NH), 9.13 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 8.86 (dd, J = 15.5, 8.2 Hz, 4H), 8.55 (s, 1H), 8.42 - 8.35 (m, 1H), 8.27 - 8.16 (m, 3H), 8.16 - 7.89 (m, 7H), 7.85 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 7.72 - 7.55 (m, 5H), 7.51 - 7.38 (m, 2H), 7.35 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 4.15 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 36.94, 121.23, 121.77, 123.73, 124.95, 125.85, 126.13, 126.77, 127.00, 127.59, 128.21, 128.44, 138.41, 140.82, 143.80, 144.32, 144.50, 151.97, 153.62, 157.11. MALDI-TOF mass spectra: 797.10 ($C_{46}H_{32}N_8Ru$), UV-Visible spectrum (CH_3CN): λmax 337 nm and 463 nm. HRMS (ESI) Calcd for $C_{46}H_{32}N_8Ru$: 797.8880, found: 797.8889.

[279]

[280] <실시예 3> 루테늄 착화합물-3(RU-3)의 합성: $[Ru(bpy)_2(Ipna)](ClO_2)_2$

[281] 

[282] 중간체

4-(1H-이미다조[4,5-f][1,10]페난트롤린-2-일)-N,N-디메틸나프탈렌-1-아민 (200 mg, 0.51 mmol) 및 시스-[$Ru(bpy)_2Cl_2$]. $2H_2O$(250 mg, 0.51 mmol)를 혼합하고 40 ml의 에틸렌 글리콜에 용해시켰다. 그런 다음 반응 혼합물을 N_2 환경 하에 120℃에서 7시간 동안 환류시켰다. 반응 완결은 TLC로 확인하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 100 ml의 DI 수로 희석시켰다. 이 혼합물에 포화 $NaClO_4$ 용액을 첨가한 후, 천천히 교반하여 진한 적색을 띤 오렌지색 고체를 얻었다. 생성된 조 생성물을 여과하고 물로 세척하고, 중성 알루미나를 고정상으로하고, 톨루엔/아세토니트릴 (20/80, v/v)을 이동상 용매로하여 컬럼 크로마토 그래피로 2회 정제하였다. 어두운 붉은 색의 밴드를 수집하고, 용매를 감압하에 농축시켰다. 그런 다음 포화된(50 %) $NaClO_4$ 용액을 천천히 첨가하여 생성물을 ClO_4^- 염으로 수득하였다.

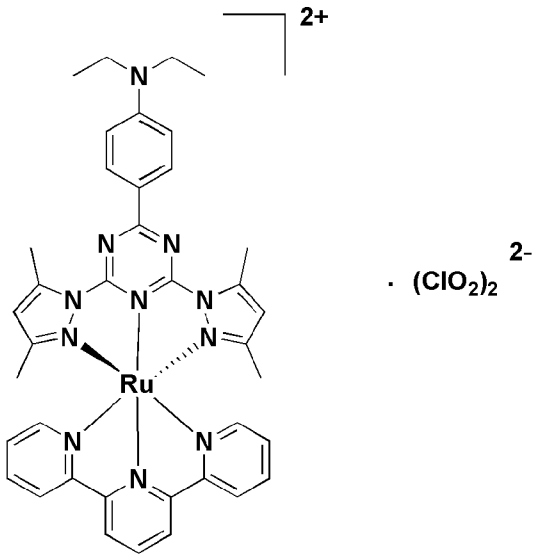
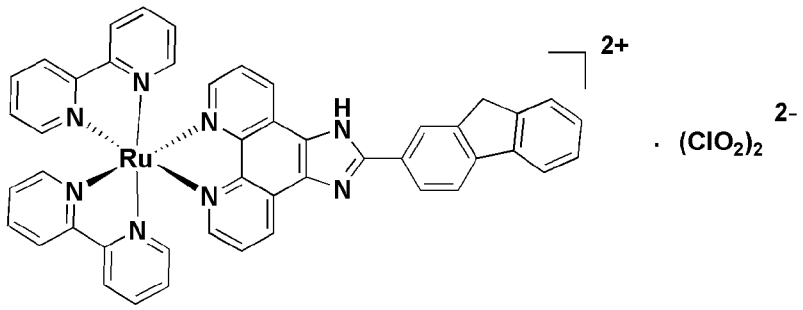
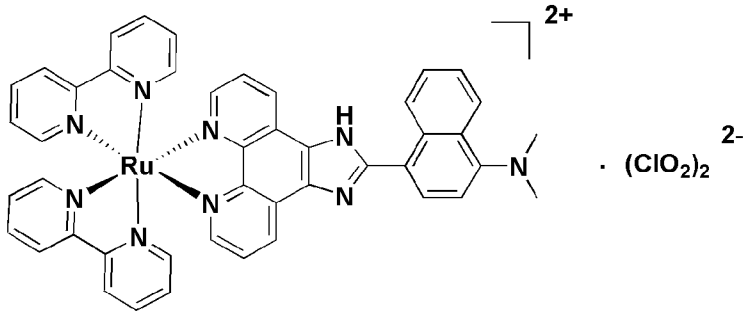
[283] 수율: 350 mg, Anal. Calcd for $C_{45}H_{35}N_9Ru$(%): C, 67.32; H, 4.39; N, 15.70. Found: C, 67.72; H, 4.45; N, 15.72. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 14.37 (s, 1H), 9.16 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 1H), 9.09 (dd, J = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 9.05 - 8.99 (m, 1H), 8.87 (dd, J = 14.6, 8.2 Hz, 4H), 8.35 - 8.29 (m, 1H), 8.26 - 8.19 (m, 2H), 8.16 - 7.99 (m, 5H), 7.98 - 7.90 (m, 2H), 7.87 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 7.68 - 7.56 (m, 6H), 7.35 (td, J = 7.9, 3.6 Hz, 3H), 2.96 (s, 6H). ^{13}C NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 45.21, 113.42, 121.21, 121.76, 124.93, 126.15, 127.64, 128.30, 129.33, 132.31, 138.48, 150.31, 152.00, 153.38, 157.10, and 157.32. MALDTI-TOF mass spectra: 802.2($C_{45}H_{35}N_9Ru$), UV-Visible spectrum (CH_3CN): λmax 365nm and 464nm, HRMS (ESI) Calcd for $C_{45}H_{35}N_9RuClO_4$: 903.2059, found: 903.2065.

[284]

[285] 상기 실시예 1-3에서 제조한 본 발명 루테늄 착화합물의 화학 구조식을 하기 표 1에 나타냈다.

[286]

[287] [표1]

실시예	화학 구조식
1	
2	
3	

[288] <실험예 1> 암 세포 및 암줄기세포에 대한 독성 평가

[289]

[290] 본 발명 Ru 착화합물의 암 세포 및 암줄기세포에 대한 독성을 평가하기 위하여, 다음과 같이 실험하였다.

[291]

[292] MTT 분석으로 실시예 1-3 Ru 착화합물의 암 세포, 및 암줄기세포에 대한 독성을 평가하였다.

[293] 구체적으로, 여기서, 티아졸일 블루 테트라졸륨 브로마이드(MTT) 염료 기초

세포 독성 분석은 제조원의 프로토콜(Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154), Thermofischer Scientific, USA)에 따라 수행하였고,

[294] 암 세포로는 MCF-7 세포주, HCT-116 세포주를 사용하였고, 암줄기세포(CSC)로는 CD44 양성 MCF7 세포, CD133 양성 HCT116 세포를 각각 사용하여 실험하였다.

[295] 여기서, 상기 유방암 세포주 MCF-7 및 대장암 세포주 HCT-116은 한국 세포주 은행(KCLB, 서울)에서 구입하여 사용하였고,

[296] 이의 암줄기세포(CSC)인 CD44 양성 MCF7 세포 및 CD133 양성 HCT116 세포는 MCF-7 및 HCT-116 세포주에서 CSC(암줄기세포) 마커를 사용하여 분리한 것을 사용하였는데, 구체적으로, MCF-7 세포주에서는 CD44 마커를, HCT-116 세포주에서는 CD133 마커를 사용하여 CSC를 분리하여 사용하였다(CD44 및 CD133 마이크로 비드 키트(MACS Miltenyi Biotec)를 사용).

[297]

[298] 상술된 과정으로부터 준비된, 각각의 암 세포주 또는 암줄기세포를 96-웰 플레이트에 개별적으로 시딩하고 10% FBS가 보충 된 DMEM 배지에 37℃에서 24시간 동안 항온 배양하였다. 그 후, 세포를 다양한 농도(0 내지 100 μM)의 실시예 1-3 Ru 착화합물로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이어서, DMEM 배지를 제거하고 세포를 100 μL의 MTT 용액과 함께 37℃에서 3시간 동안 배양하였다. 75 μL의 MTT 용액을 제거한 후 50 μL의 DMSO를 첨가하여 포르마잔 결정을 용해시켰다. 멀티 플롯 판독기(Molecular Devices, Gemini XS)를 사용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 시스플라틴을 양성 대조군으로 사용하였고, 상기 암 세포주에 대한 실시예 1-3 및 시스플라틴의 IC_{50} 값을 산출하여, 그 결과를 하기 표 2에 나타냈다.

[299]

[300] [표2]

	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
처리 화합물	MCF-7	CD44 + MCF-7	HCR-116	CD133 + HCR-116
실시예 1	8.9±0.72	10.1±1.03	11.9±0.16	15.1±0.13
실시예 2	19.3±2.84	27.67±4.12	22.3±1.32	30.6±3.71
실시예 3	67±7.67	72.35±9.17	65.6±6.4	77.9±4.26
양성 대조군(시스플라틴)	44.47±5.09	62.18±8.48	39.45±5.16	59.34±6.52

[301] 표 2에서 확인되는 바와 같이, 실시예 1 > 실시예 2 > 시스플라틴 > 실시예 3의 순서로 암 세포, 및 암줄기세포에 대한 세포 독성이 관찰되었다.

[302] 특히, 루테늄 금속 착체 중에서 실시예 1이 암 세포, 암줄기세포에 대한 독성이

가장 우수한 것으로 확인되었는데, MCF-7, CD44 + MCF-7, HCT-116 및 CD133 + HCT-116에 대한 실시예 1의 IC_{50} 값은 각각 8.9 μM, 10.1 μM, 11.9 μM, 15.1 μM으로 확인된다.

[303] 이는, 시스플라틴과 비교하여, 실시예 1이 MCF7 세포주 및 CD44 양성 MCF7 세포에 대해 5 내지 6 배의 우수한 암세포 사멸 효과를 나타내고, HCT116 세포주 및 CD133 양성 HCT116 세포에서도 3 내지 4 배의 우수한 암줄기세포 사멸 효과를 나타내는 것으로 확인되는 결과이다.

[304]

[305] 따라서, 본 발명에 따른 신규 루테늄 착화합물은 우수한 암 세포, 및 암줄기세포 사멸 효과가 확인되는 바, 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 예방 또는 개선용 건강기능식품으로서 우수하게 사용될 수 있을 뿐 아니라, 본 발명 신규 루테늄 착화합물은 약물 내성을 발생시키는 주요 원인인 암줄기세포에 대하여 역시 우수한 사멸 효과를 나타내는 바, 암의 치료 또는 예방에 사용되는 화학 요법의 약물로서도 유용하게 사용될 수 있다.

[306]

[307] <실험예 2> 세포 유입 평가

[308] 약물의 성공적인 화학 요법의 효능은 세포 내 기관에서의 흡수 및 축적에 의존하는 바, 본 발명 루테늄 착화합물의 세포 유입을 평가하기 위하여, 다음과 같이 실험하였다.

[309]

[310] <2-1> 실시예 1의 세포 유입 평가

[311] 본 발명 Ru 착화합물의 세포 흡수 수준을 평가하기 위해, 암줄기세포인, CD44 양성 MCF-7 세포를 10 μM의 실시예 1로 처리한 후, 620 nm에서 루테늄 착화합물의 세포 내 형광 강도를 FACS을 사용하여, 시간 간격(30, 60, 90 분)을 두어 측정하였고, 그 결과를 도 1a에 나타냈다.

[312]

[313] 도 1a를 살펴보면, 본 발명 실시예 1 루테늄 착화합물의 형광 강도가 30분 이상의 시점에서 유의미하게 증가하고, 60분의 시점에서 포화 상태에 도달함을 확인할 수 있고, 본 발명 실시예 1이 MCF-7의 CSC(암줄기세포)로 빠르게 흡수되었음이 확인된다.

[314]

[315] <2-2> 실시예 2 및 실시예 3의 세포 유입 평가

[316] CD44 양성 MCF-7 세포(CSC)에서 상기 <2-1>과 동일한 조건으로 실험을 수행하되, 본 발명 실시예 2 또는 실시예 3을 사용하였고, FACS 분석 결과를 도 1b 및 도 1c에 도시하였다.

[317]

[318] 도 1b 및 도 1c에서 확인되는 바와 같이, 90분 경과 시점에 실시예 2 역시 암줄기세포로의 세포 유입이 관찰되나, 실시예 2 또는 실시예 3에 비하여

상대적으로, 실시예 1이 현저하게 우수한 세포 유입(침투성)이 확인되는 것을 알 수 있다(실시예 1 > 실시예 2 > 실시예 3).

[319]

[320] 따라서, 본 발명 Ru 착화합물은 암줄기세포로의 유입이 우수하여 암 세포의 사멸 효과를 보다 우수하게 유도할 수 있는 바, 이를 유효성분으로 함유하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 약물 내성을 가지는 암의 예방 또는 치료용 화학 요법 보조제로 유용하게 사용될 수 있다.

[321]

[322] <실험예 3> 약물의 세포 내 국소화 위치 분석

[323] 본 발명 Ru 착화합물의 작용 메커니즘을 분석하기 위해, 세포 내 국소화 위치 분석을 실시하였고, 세포 특이적 염료를 사용하여 CD44 양성 MCF-7 및 HCT-116 세포의 암줄기세포(CSC)에서 수행하였다.

[324]

[325] <3-1> 실시예 1의 세포 내 국소화 위치 분석

[326] 암줄기세포, CD133 양성 HCT-116, 및 CD44 양성 MCF-7를 커버 글래스에 위치시키고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포를 10 μM의 본 발명 실시예 1 루테늄 착화합물로 처리하고 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 약물 처리 후, 세포를 1×PBS로 세척하고 Hoechst 33258 핵 염료(Sigma Aldrich)와 함께 MitoTracker® Red CMXRos(Thermofischer scientific, USA) 또는 ER-ID® Red(Enzo Life Sciences, Inc., USA) , USA)를 사용하여, 30분 동안 배양하였다. 마지막으로, 세포를 실온에서 15분 동안 4% 포름알데히드로 고정시켰다.

[327] 이를 공초점 현미경(Nikon, Eclipse Ti-U / Yokogawa, CSU-X1)을 사용하여 트래커 염료 및 본 발명 실시예 1 루테늄 착화합물의 형광 강도를 관찰하였고, 그 결과를 도 2에 나타냈다.

[328]

[329] 도 2의 A 및 B를 살펴보면, 중첩 공초점 형광 현미경 이미지는 CD133 양성 HCT-116의 세포질의 미토콘드리아(도 2의 A) 및 ER(소포체)(도 2의 B)에 실시예 1 착화합물이 주로 분포하고 있음이 명확하게 확인된다. 또한, CD44 양성 MCF-7에서도 실시예 1 착화합물이 미토콘드리아 및 ER에 효과적으로 분포함이 확인된다.

[330]

[331] <3-2> 실시예 2 및 실시예 3의 세포 내 국소화 위치 분석

[332] 상기 <3-1>과 유사하게, CD44 양성 MCF-7을 사용하여 실시예 2 또는 실시예 3에 대하여 세포 내 위치 분석을 수행하였고, 그 결과, 실시예 2는 미토콘드리아 보다 상대적으로 ER에 밀도있게 분포되어 있음이 확인되나, 실시예 3은 ER과 미토콘드리아 모두에서 고른 분포를 보였다.

[333]

[334] 이러한 결과로부터 본 발명 Ru 착화합물이 ER, 및 미토콘드리아를 매개하는

세포 사멸 경로를 통하여 작용됨을 알 수 있다.

[335]

[336] <실험예 4> 암 세포에서의 ROS 생성 평가

[337] 본 발명 Ru 착화합물의 암줄기세포에서의 ROS 생성을 평가하기 위하여, 다음과 같이 실험하였다.

[338]

[339] <4-1> 실시예 1의 ROS 생성 평가

[340] MCF-7 및 HCT-116 세포의 CSC(암줄기세포)를 12-웰 배양 플레이트에 시딩하고 37℃, 5% CO_2에서 밤새 배양하였다. 이어서, 세포를 본 발명 Ru 착화합물(실시예 1을 1 μM, 5 μM, 10 μM로 처리)를 사용하거나, 또는 사용하지 않고, 6시간 동안 처리한 후, 37℃, 5% CO_2 환경에서 배양하였다. 처리 종료시, 세포를 4% 포름알데히드로 고정시키고 실온에서 10분 동안 배양하였다. 1×PBS로 세척한 후, 세포를 20 μM의 2',7'-디클로로플루오레신 2 아세테이트(DCFDA)로 처리하고 실온에서 15분 동안 항온 배양하였다.ROS 유도된 2',7'-디클로로플루오레신의 형광 세기는 495 및 529 nm의 여기 및 방출 파장에서 측정되었고, 그 결과를 도 3a 및 도 3b에 나타냈다.

[341]

[342] 도 3a 및 도 3b를 살펴보면, 본 발명 실시예 1은 CSC(암줄기세포)에서 농도 비례적(0, 1, 5 및 10 μM)으로 ROS 생성을 유도하는 것으로 확인된다. 산화에 민감한 DCFH-DA는 ROS가 생성되면 녹색 형광을 생성한다. 도 3b는 1 μM, 5 μM, 및 10 μM 농도의 실시예 1로 처리된 세포에서의 DCFH-DA 염색의 평균 형광 강도를 나타낸 막대 그래프이고, 농도 비례적으로 형광 강도가 상승됨이 확인된다.

[343]

[344] <4-2> 실시예 2 및 실시예 3의 ROS 생성 평가

[345] 상기 <4-1>과 동일하게 실험하되, MCF-7 세포의 CSC(암줄기세포)에서 실시예 2 또는 실시예 3을 농도별로 사용하여, ROS 생성을 평가하였고, 그 결과, 실시예 2 및 실시예 3은 농도 의존적으로 ROS 생성을 유도하는 것으로 확인되며, 각각 12 및 60 μM에서 최대 ROS 생성이 유도됨을 확인할 수 있다.

[346]

[347] 따라서, 암 세포, 및 암줄기세포에서 본 발명 루테늄 착화합물은 산화 환원 순환 작용으로부터 ROS 생성을 현저히 유도하고, 이로부터 세포의 산화 스트레스, 세포 사멸 효과를 우수하게 달성할 수 있는 바, 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 약물 내성을 가지는 암의 예방 또는 치료용 화학 요법 보조제로 유용하게 사용될 수 있다.

[348]

[349] <실험예 5> 고 함량 MPT, 세포질 Ca^{2+} 및 카스파제 3/7 스크리닝 분석

[350] 고함량 분석은 내부 미토콘드리아 막에 미토콘드리아 투과성 전이

공극(MPTP)의 유도, 세포질 칼슘 수준 및 카스파제-3의 활성화를 평가하기 위해 수행되었으며, 이를 토대로 세포 사멸 메카니즘을 분석하였다.

[351]

[352] <5-1> 실시예 1의 MPT, 세포질 Ca^{2+} 및 카스파제 3/7 스크리닝 분석

[353] HCT-116과 MCF-7의 암줄기세포(CSC)는 각각 12 웰 배양 플라스크에서 배양하고, 37℃, 5% CO_2 분위기에서 24시간 동안 10% FBS가 보충된 DMEM 배지에 유지되었다. 다음, 세포는 본 발명 Ru 착화합물 실시예 1(1, 5 및 10μM 농도별) 처리, 또는 처리 없이 16시간 동안 유지되었다. 1×PBS 완충액으로 세척한 후, 세포를 칼슘 지시약 오렌지(Invitrogen, CA, USA)와 함께 암실에서 실온에서 45분 동안 배양하였다. 세포를 1×PBS로 세척하고 37℃에서 30분 동안 칼세인-AM(칼세인acetoxymethyl ester, Invitrogen, CA, USA)와 함께 배양하였다. 이어서, 카스파제-3 기질을 첨가하고, 세포를 어두운 37℃에서 6분 동안 배양하였다. 이어서, $CoCl_2$를 첨가하고 37℃에서 10분 동안 암실 배양하였다. 마지막으로, 세포를 1×PBS로 세척하고 이전에 기술된 바와 같이(Kim et al), 현미경 장치가 장착된 음향-광학변조필터(AOTF)를 사용하여 영상 분석을 수행하였다. 상업적으로 이용 가능한 소프트웨어(MetaMorph, 버전 7.7, Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 이미지를 분석하였고, 그 결과를 도 4 (a) 및 (b)에 나타냈다.

[354]

[355] 도 4 (a) 및 (b)를 살펴보면, 칼세인 AM, 칼슘 오렌지 및 매직 레드 카스파제 3/7의 형광 방출은 AOTF를 사용하여 각각 525nm, 580nm 및 630nm에서 모니터링되었다. 녹색 형광 이미지는 MPT의 세포 이미지에 해당하고 주황색 형광 이미지는 세포질 칼슘을 나타내며 적색 형광 이미지는 카스파제 3/7을 나타낸다. (b)의 막대 그래프는 칼세인 AM, 칼슘 지시약 오렌지 및 카스파제 3/7의 평균 형광 강도를 나타낸다.

[356] MPTP는 미토콘드리아로 이동된 칼세인 AM의 형광 강도를 측정함으로써 평가되었다. 관찰된 결과는 실시예 1 처리가 CSC의 미토콘드리아에 축적된 칼세인-AM의 형광 강도를 농도 의존적으로 대조군에 비해 현저하게 감소 시켰다는 것을 보여준다($p < 0.01$). 미토콘드리아에 축적된 칼세인-AM의 형광 강도의 급격한 감소가 2 μM의 실시예 1 처리에서 관찰되었으며 4 μM의 실시예 1 처리에서 포화되었다.

[357] 또한, 루테늄 착화합물 처리에 반응하여 농도 의존적으로 증가된 수준의 세포질 칼슘 및 카스파제-3 활성화가 관찰되었다.

[358]

[359] 상술된 결과로부터, HCT-116과 MCF-7의 CSC에서의 실시예 1의 세포 사멸 메커니즘을 알 수 있다.

[360] 세포질 국소화 연구는 실시예 1 착화합물이 대부분 미토콘드리아와 ER에 분포되어 있음을 분명히 나타냈다. 따라서, 실시예 1에 의해 유도된 ROS는

ER로부터 칼슘 방출을 매개할 수 있으며, 이것은 카스파제 매개 세포 사멸의 활성화에 역할을 할 수 있다.

[361] 또한 증가 된 ROS와 세포질 칼슘은 미토콘드리아 투과성 전이 공극(MPTP) 형성에 관여한다. 내부 미토콘드리아 막의 MPTP 형성은 막 탈분극, 매트릭스 팽윤 및 외부 막의 파열을 유발한다. 그것은 총체적으로 Cyt-c의 방출과 카스파제-3의 후속 활성화를 일으킨다. 이 실험에서 수행된 고 함량 분석은 HCT-116 및 MCF-7 세포의 CSC에서 실시예 1의 처리에 비례하여 MPTP 형성, 세포질 칼슘 및 활성 카스파제 3이 증가함을 명확하게 나타내는 바, 세포 사멸이 유도된다.

[362]

[363] <5-2> 실시예 2 및 3의 MPT, 세포질 Ca^{2+} 및 카스파제 3/7 스크리닝 분석

[364] 상기 <5-1>과 동일하게 수행하되, MCF-7의 암줄기세포(CD44(+) MCF-7)에서 실시예 2 및 실시예 3을 사용하여 수행하였고 그 결과, 실시예 2 및 실시예 3 역시 세포 사멸 메카니즘을 따르는 형상이 나타나는 것으로 보이나, 실시예 1이 가장 처리 농도에 민감하게 반응하는 것으로 확인되었다.

[365]

[366] <실험예 6> 세포 사멸 유도, 항-세포 사멸 단백질의 발현 분석

[367] 본 발명 Ru 착화합물의 처리에 따른 암 세포 사멸 효과를 평가하기 위하여, 세포 사멸 유도 또는 항-세포 사멸 단백질의 발현을 분석하였다.

[368]

[369] 구체적으로, Bcl-2, Bax, Bak 및 GRP78에 대한 면역 형광 분석을 실시하였고, 이전에 기술된 바에 따라 수행하였다(Ahn et al., 2014). 형광 이미지는 Olympus FLUOVIEW 500 공초점 현미경을 사용하여 얻어졌다.

[370] 또한, 이전에 기술된 바와 같이 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다(Parthasarathy et al., 2013).

[371]

[372] <6-1> 실시예 1 처리된 HCT-116 CSC에서의 세포 사멸 유도 단백질의 발현 분석

[373] 도 5는 실시예 1이 처리 된 CD133 양성 HCT116 세포에서의 세포 사멸 유도, 및 항-세포 사멸 단백질의 발현을 나타낸다.

[374]

[375] 도 5 A는 대조군 및 실시예 1 처리된 HCT-116 CSC에서 Bcl-2 발현의 면역 형광 분석을 나타낸다. Bcl-2의 단백질 수준을 웨스턴 블랏 방법으로 추가로 평가하고 도 5 D에 나타냈다.

[376] 그 결과, 대조군에 비해 Bcl-2 발현이 실시예 1 처리 CSC에서 유의하게 억제되었음이 확인된다.

[377]

[378] 한편, 도 5 B 및 5 C는 각각 대조군 및 실시예 1 처리된 CSC에서의 Bax 및 Bak의

발현을 나타낸다. Bax와 Bak의 올리고머 구조가 실시예 1 처리 세포에서 관찰되었다. 그러나, Bax 및 Bak의 올리고머화는 대조군 세포에서 잘 관찰되지 않았다. 세포 사멸 유도 단백질 Bax와 Bak는 일반적으로 세포질에 존재하지만, 세포 사멸 중에 그들은 미토콘드리아의 외막을 올리고머화 하여 MOMP를 야기한다.

[379] 즉, 이러한 Bak/Bax의 올리고머화는 사이토크롬 c(Cyt c)의 방출을 일으키는 미토콘드리아 외막 투과성화(MOMP)로 이어진다.

[380] 도 5 D는 Bak 및 Bax의 웨스턴 블랏 분석을 나타낸 것으로, 대조군에 비해 실시예 1 처리된 CSC 세포에서 Bax 및 Bak 수준이 유의하게 증가되었음이 확인된다($p < 0.01$).

[381]

[382] 따라서, 본 발명 실시예 1 처리에 따라 세포 사멸을 유도하는 Bak과 Bax의 활성화가 관찰되고, 이러한 Bak/Bax의 올리고머화는 사이토크롬 c(Cyt c)의 방출을 일으키는 미토콘드리아 외막 투과성화(MOMP)로 이어진다. 세포질에서 Cyt c는 프로테아제 활성 인자 1(Apaf1)과 프로테아제 카스파제-9와 함께 아포토좀(apoptosome)를 형성한다. 이 다합체 아포토좀 착화합물은 카스파제-3와 카스파제-7을 활성화시킨다.

[383] \MOMP는 세포 생존을 위하여 되돌리 수 없고, 더욱이, 실시예 1 처리된 세포에서 관찰된 감소된 항-세포 사멸 Bcl-2 발현은 미토콘드리아로부터의 Cyt-c 방출을 유지시킨다.

[384] 또한, 활성화된 Bax가 ER에서 칼슘 방출을 적극적으로 조절하는 바, Bax의 일시적인 과다 발현은 미토콘드리아의 Ca^{2+} 및 사이토 크롬 c 방출의 증가와 함께 ER Ca^{2+}의 방출을 초래하는 바, 결과적으로 세포 사멸은 유도되며, 항-세포 사멸은 억제되어, 암 세포의 현저한 사멸 효과가 나타나는 것이다.

[385]

[386] 이로부터, 본 발명의 루테늄 착화합물이 암세포의 미토콘드리아에서 MPTP와 MOMP 형성을 유도하고 암세포의 효과적인 내재적 세포 사멸 매개 작용을 확인하였다.

[387]

[388] <실험예 7> 분자 도킹

[389] 분자 모델링 연구는 본 발명 Ru 착화합물이 GRP 78에 결합하는 방식에 대한 더 많은 정보를 제공하기 위해 수행되었다.

[390]

[391] 먼저, 두 가지 가능성이 GRP 78과 함께 리간드 실시예 1의 도킹에 대해 고려되었다:

[392] 1) 실시예 1은 GRP 78의 ATPase 도메인 결합; 또는

[393] 2) 단량체 유니트 A 및 B 둘 다의 아미노산 잔기를 이용하여 이량체 인터페이스에 결합

[394] 첫 번째 시나리오의 ATP 도메인에는 수용될 수 없었고, 실시예 1 착화합물의 크기가 큰만큼 두 번째 시나리오의 GRP 78의 이량체 인터페이스로 성공적으로 모델링되었다.

[395] 이에 상응하는 도킹 결과는 실시예 1과 GRP 78의 상호 작용의 3D 도를 도 6에 도시하였다.

[396] 이러한 컴퓨터 시뮬레이션 도킹 결과는 본 발명 Ru 착화합물의 생물학적 활성으로, 강력한 항암 활성을 갖는 GRP 78 억제제인 것으로 확인되었다.

[397]

[398] ROS로 유도된 산화 과정이 단백질의 구조적 변화를 유도하여 유비퀴틴화 되기 쉬운 것으로 보고되었고, 이를 확인하기 위해 Accelrys Discovery Studio(v 4.0)를 사용하여 GRP 78(PDB : 3ldl)의 X 선 결정 구조로 분자 도킹 결과, 본 발명실시예 1은 단백질의 이량체 구조의 계면에서 GRP-78의 특정 아미노산 잔기와 강한 비공유 상호 작용을 형성하여 GRP-78의 이량체 구조를 인터칼레이팅 한다.

[399] 관찰된 도킹 결과는 실시예 1 및 GRP-78 계면 부근에서 생성된 ROS가 GRP-78의 구조를 변형시키고, 이어서 유비퀴틴 매개 융합을 변형시킬 수 있음을 암시한다.

[400]

[401] <실험예 8> 암의 내성 발생 억제 평가

[402] 본 발명에 따른 신규 Ru 착화합물의 항암제에 대한 암의 내성 발생을 억제하는 효과에 있어서, 평가하기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

[403]

[404] 암 세포의 항암제에 대한 내성 발생은 암줄기세포(CSC)의 GAP-78 발현 증가, 활성 증가와 같은 경로를 통하여 이루어지는 것으로 보고되어 있고, 이에 본 발명의 신규 Ru 착화합물이 어떠한 효과를 보이는지 평가하기로 하였다.

[405]

[406] <8-1> GRP-78, CLU 및 ATR의 플라스미드 제작 및 형질 감염

[407] 대조군 인간 샘플의 게놈 DNA는 QIAamp DNA Blood Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 분리 하였다.

[408] GRP-78: 정방향(50 pmol; 5'-AAAGCTTTTATGAAGCTCTCCCTGGTGG-3') 및

[409] GRP-78: 역방향(50 pmol; 5'-AGGATCCCTACAACTCATCTTTTTCTGCTG-3') 또는

[410] CLU: 정방향(50 pmol; 5'-AAAGCTTATGCAGGTTTGCAGCCAGC-3') 및

[411] CLU: 역방향(50 pmol; 5'-GGATCCTTTTATTTTATTTTCCTCACTCTCCT-3')

[412] ATR: 정방향(50 pmol, 5'-AAGCTTATGGCCACGGCGGAGC-3') 및

[413] ATR: 역방향(50 pmol; 5'-GGATCCTTTTATTTTATTTTCCTCACTCTCCT -3')

[414] 의 특이 프라이머로 DNA 200ng을 증폭시켰고,

[415] 다음의 온도 프로파일을 갖는다: 95℃에서 4 분; 95℃ 30 초, 59 초 66℃ 30 초, 72℃ 1분 30 사이클; 마지막 연장은 72℃에서 5 분간이다.

[416] GRP78, CLU 및 ATR 프라이머는 각각의 유전자의 GRP78, CLU 및 ATR 전사체를 증폭하도록 설계되었다.

[417] PCR 증폭은 1.9kb GRP78, 1.5kb CLU 및 850bp ATR 단편을 표준 분자량 마커를 가진 1.2 % 아가로오스 겔을 사용하여 분석함으로써 확인되었다.

[418] PCR 증폭된 GRP78, CLU 및 ATR 단편은 HindIII/BamHI 효소로 제한되었다. 제한된 GRP78, CLU 및 ATR 단편을 각각 pTag-YFP-C (4.7 kb; Evrogen, Moscow, Russia), pDs-Red2-N1 (4.7 kb; Clontech, USA) 및 pAC-GFP1-N1 (4.7 kb; Clontech, USA)로 접합하였다.

[419] 접합된 융합 유전자 벡터를 제조자(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의해 제안 된 바와 같이 화학적 변형을 통해 E. coli 대장균 DH5α 세포로 개별적으로 형질전환시켰다.

[420] 형질전환체(pTag-YFP-GRP78-C, pDs-CLU-Red2-N1 및 pAC-ATR-GFP1-N1)를 카나마이신(30 ㎍/mL)을 첨가한 LB 한천 플레이트에서 선별하였다. 플라스미드 미디 키트(Qiagen)를 사용하여 내성 콜로니로부터의 플라스미드를 분리하였다. GRP78, CLU 및 ATR 유전자로 클로닝된 플라스미드를 HEK-293 세포에 동시 형질감염시켰다.

[421]

[422] 구체적으로, 인간 배아 신장 세포(HEK-293)를 한국 세포주 은행 (KCLB1, Seoul, Korea)으로부터 얻고 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 배양 하였다. 먼저, HEK-293 세포($5x10^5$ 세포/웰)를 24 시간 동안 항생제가 없는 DMEM 및 FBS를 함유한 24-웰 배양 플레이트에 시딩하였다. 다음날, 제조사의 지시에 따라 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 사용하여 HEK-293 세포에 플라스미드 DNA(GRP78, CLU 및 ATR)를 동시 형질감염시켰다.

[423]

[424] 세포 배양 플레이트를 CO_2 배양기에서 37℃에서 6시간 동안 유지하였다. 그런 다음 세포를 세척하고 CO_2 배양기 37℃에서 48시간 동안 배지에서 성장시켰다. GRP78, CLU 및 ATR 증폭 세포를 5% CO_2 배양기 37℃에서 16시간 동안 10 μM의 실시예 1과 배양하였다. 그 다음, HEK-293 세포의 형광 현미경 사진을 정량 분석을 위해 관측하였다. 데이터 수집 및 정량 분석은 이전에 기술 된 바와 같이 수행되었다(Naoghare et al., 2008).

[425]

[426] <8-2> 정량적 RT-PCR

[427]

[428] HEK293 세포는 실시예 1을 16 시간 처리 한 후 37℃의 DMEM 배지에서 CO_2 배양기로 유지시켰다. 그 후, 제조사의 프로토콜(Dynabeads® MRNA Purification Kit, Invitrogen, USA)에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 분리된 RNA의 무결성은 260/280 nm에서 흡광도의 비율에 의해 정성적으로 평가된 다음 1% 아가로즈 RNA 겔 전기 영동에 의해 정성적으로 평가되었다.

[429] RNA의 농도는 Nanodrop(Thermo Scientific, U.S.A)을 사용하여 260 nm에서 측정하였다. 총 RNA, GAPDH에 특이적인 cDNA 및 GRP78은 제조사의 프로토콜에 따라 QuantiTect Reverse Transcription Kit(Qiagen, USA)를 사용하여 준비하였다. 2개의 피코몰 프라이머를 표적 m-RNA의 증폭에 사용하였다. GAPDH 발현을 이용하여 샘플의 시작 템플레이트 양을 결정한 후, 정량적 PCR 반응을 수행 하였다.

[430] 다음의 프라이머를 사용 하였다: GAPDH 센스 CATGAGAAGTATGACAACAGCCT, 안티센스 AGTCCTTCCACGATACCAAAGT; GRP78 센스 TGCCGCTTTGCAGGTGTATT, 안티센스 CCGATGCTCAGAGCTTTCTCC.

[431] RT-PCR(SYBR green qPCR kit, Thermo Scientific, USA)을 수행하기 위해 SYBR green 방법을 사용 하였다. Applied Biosystems ™ Real-Time PCR 장비 (7300)를 사용하여 RT-PCR을 실행했다.

[432] 데이터를 GAPDH로 표준화하고, $2^{-\Delta\Delta C}$T 방법으로 분석하였다.

[433]

[434] <8-3> 퀀텀닷-항체 접합

[435] GRP78에 특이적인 항체를 Q-dot 705(Quantum Dot Conjugation Kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 각각 접합시켰다. 항체와 퀀텀닷 접합을 개시하기 위해, 먼저 항체를 디설파이드 결합 붕괴를 유도하는 디티오트레이톨(DTT)으로 처리하고 항체를 환원 상태로 전환시켰다. 이어서, 항체를 실온에서 1시간 동안 말레이미드-작용화된 퀀텀닷과 함께 인큐베이션 하였다.

[436] 이어서, 말레이미드 기를 제거하기 위해 접합체를 2-머캅토에탄올로 처리하였다. 비 접합된 퀀텀닷은 키트에 제공된 컬럼을 사용하여 용리되었다.

[437] Q-dot 항체 접합체를 면역 형광 분석을 위해 1% BSA로 1:200으로 희석 하였다. 형광 분석에 사용 된 여기 및 방출은 각각 405/705 nmdl었다.

[438]

[439] 그 결과, 공초점 분석은 ER 영역 내에서 GRP-78 발현의 최대가 중첩되었음을 확인했다. 또한, 실시예 1의 농도에 따라 GRP78의 발현이 감소함을 확인하였다. ROS의 수명은 마이크로 초이며, 따라서 ROS의 수명은 본 발명 루테늄 착화합물이 존재했던 부근에서 더 많이 일어난다.

[440]

[441] 이는 실시예 1과 GRP-78의 결합이 유비퀴틴 매개 분해를 유도하는 GRP-78의 구조 변화를 일으킬 수 있다고 결론내릴 수 있다.

[442] 또한, 웨스턴 블랏 분석은 또한 실시예 1 용량이 GRP-78의 단백질 수준을 의존적으로 감소시킨다는 것을 확인하였다.

[443]

[444] GRP-78 발현의 상승은 CD44+ MCF-7 세포에서 나타나는데, 이저에도 CD24-CD44+ Grp78+ 세포가 두 경부암 세포주에서 CD24-CD44 + 세포보다

우수한 화학 요법 및 내성을 보이는 것으로 보고된 바 있다. 마찬가지로, GRP78의 녹다운은 시스플라틴 및 방사선 치료에 대하여 향상된 민감성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다.

[445] 따라서, GRP-78에 대한 실시예 1의 억제 효과가 암 치료에서 종양 재발의 가능성을 감소시키고, 암의 약물 내성을 극복할 수 있는 매우 유용한 특성임을 명확하게 제시하는 것이다.

[446]

[447] <실험예 9> 인간 대장 암종 이종 이식 모델

[448] 본 발명 Ru 착화합물의 암 세포 사멸 효과를 평가하기 위하여, 인간 대장 암종 이종 이식 동물 모델을 대상으로 다음과 같은 실험을 실시하였다.

[449]

[450] 본 생체 내(in vivo) 동물 실험은 서울 대학교 기관 동물 보호 및 이용 위원회의 승인을 받아 수행되었고, Daehan Biolink(서울, 대한민국)에서 7 주생 스위스 암컷 무흉선 마우스를 구입하여 사용하였다. 모든 마우스는 서울 대학교 약학 대학 동물원 센터(서울, 대한민국)에서 특정 병원균이 없는 상태로 적응시키고, 24 - 26℃에서 12시간의 명암 사이클을 유지 하여 관리하였다.

[451] HCT-116 세포 배양으로부터 분리된 CD133 양성 HCT-116 세포(3×10^6 세포)를 100μl의 LDEV-Free 감소 성장 인자 기저막 매트릭스(Geltrex; Thermofischer Scientific, USA)와 혼합한 후, 마우스의 오른쪽 옆구리로 피하 주사하였다. 종양이 100 mm^3의 부피에 도달하면 마우스를 각각 6 마리 세 그룹으로 나누었다.

[452] 먼저, 대조군은 4 % DMSO를 함유하는 1×PBS를 복강내 주사하고;

[453] 다른 2 군의 마우스는 매일 0.03 mg/kg/체중 또는 0.06 mg/kg/체중의 용량으로 실시예 1(실시예 1을 DMSO에 용해시키고 1×PBS로 희석한 것)을 복강내 주사하였다.

[454] 치료는 2주 동안 반복하였고, 대조군의 종양 크기가 약 1500 mm^3에 도달하면실험을 중단하였다.

[455] 치료 과정에서 종양의 크기와 무게를 매일 모니터하여 관찰하였다.

[456] 종양 체적(mm^3)은 다음과 같이 계산 하였다:

[457] 부피 = (최대 직경(mm)) (수직 직경(mm))^2 × 0.5.

[458]

[459] <9-1> 실시예 1의 생체 내 항암 활성

[460] 상술된 바와 같이, 무흉선 누드 마우스에서 CD133 + HCT-116 세포 유래 이종 이식에 대한 실시예 1 착화합물의 생체 내 화학 요법 가능성을 조사하였다.

[461]

[462] 도 8A는 이종 이식 모델의 실험 진행 프로토콜을 기술한다. 2 주간의 치료 기간 동안 실험군에 매일 0.03 mg 또는 0.06 mg의 실시예 1 Ru 착화합물/kg/체중 를 투여시켰고, 그 결과, 실시예 1 처리 실험군 마우스 그룹의 종양 무게 및 부피는 대조군 마우스 그룹과 비교하여 현저하게 감소되었음이 확인된다(도 8 B 및 C).

[463] 종양 무게는 대조군에 비해 55% 내지 80%로 현저히 감소하였다(도 8D).

[464] 또한, 대조군, 실험군(저용량), 실험군(고용량)에서의 종양 무게는 각각 3.2g, 1.6g, 1.15g으로 확인되었고, 이는 실시예 1의 현저한 항암 효능을 나타낸다(도 8E).

[465] 한편, 실시예 1 처리된 실험군의 마우스는 전체 치료 과정 동안 정상 체중을 유지하였고, 사망률은 관찰되지 않은 바, 본 발명 Ru 착화합물은 정상 세포에 있어서독성이 없는 것으로 확인되었다.

[466]

[467] 주로, 항암 치료의 실패 및 암의 재발은 암줄기세포(CSC)와 그의 숫자에 의존하는데, 특히, 이러한 관점에서 상술된 본 발명 Ru 착화합물의 CSC에 대한 우수한 항암 활성은, 새로운 항암제, 및 화학 요법 보조제로서 유용할 수 있음을 암시하는 것이다.

[468] 실시예 1 처리된 실험용 마우스는 대조군과 비교하여 저용량 및 고 복용량 처리군에서 각각 2배 및 4배의 형광 강도 감소가 나타나는 것으로 확인되는데(도 8G), 이는 본 발명 Ru 착화합물이 GRP78 억제 활성으로부터, CSC에 대하여 우수한 세포 독성을 보이고, 우수한 세포 사멸 효과가 나타나는 것임을 입증하는 것이다.

[469] 따라서, 본 발명의 Ru 착화합물은 항암제, 및 기존 화학 요법의 보조제(내성 억제용 조성물)로서 유용하게 사용될 수 있다. 나아가, 본 발명 Ru 착화합물은 대장암 이종 이식 모델에 대하여 우수한 생체 내 치료 가능성을 확인한 바, 본 발명 Ru 착화합물이 내성, 부작용 등의 문제가 있었던 백금 기반 화학 치료제와 같은 기존의 치로제의 대안으로 우수하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[470]

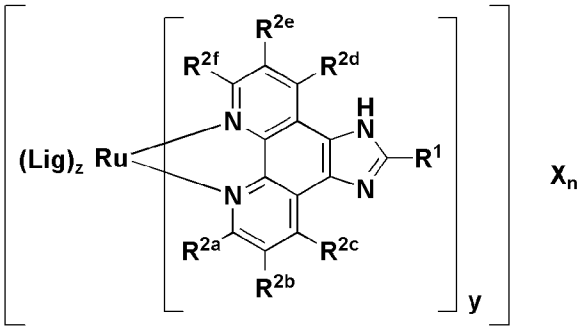
산업상 이용가능성

[471] 본 발명에 따른 신규 Ru 착화합물은, 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 항암제 내성 억제용 조성물, 및 이를 여타의 화학 요법제와 병용하여 기존의 항암제 내성 문제가 개선된 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에 있어서,

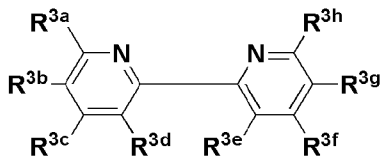
X는 Cl^-, PF_6^-, Br^-, BF_4^-, ClO_4^-, $CF_3SO_3^-$ 및 SO_4^{-2}로 이루어진 군으로 부터 선택되는 1종 이상이고;

상기 n은 0 내지 5의 정수이고;

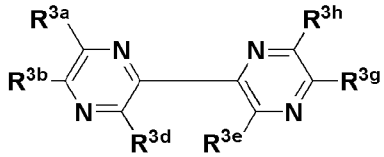
y는 1 내지 3의 정수이고;

z는 0 내지 3이고;

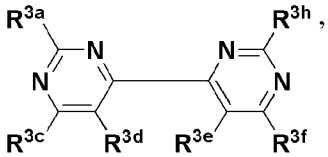
Lig는 각각 독립적으로, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 리간드이고,



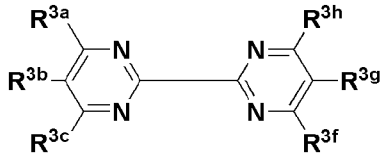
,



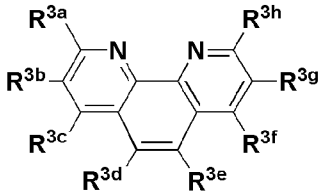
,



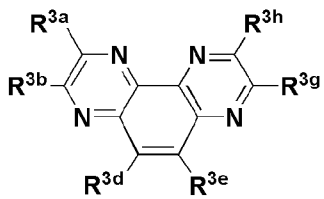
,



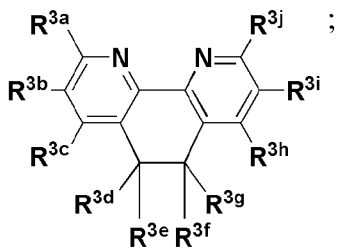
,



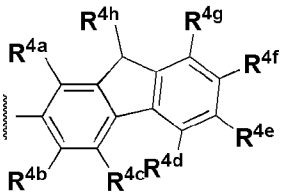
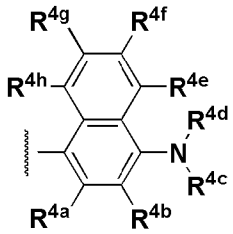
,



, 및



;

R^1은  또는  이고;

R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고;

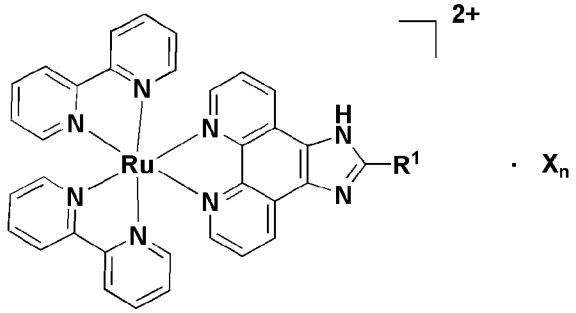
상기 R^{3a}, R^{3b}, R^{3c}, R^{3d}, R^{3e}, R^{3f}, R^{3g}, R^{3h}, R^{3i} 및 R^{3j}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고,

상기 R^{4a}, R^{4b}, R^{4c}, R^{4d}, R^{4e}, R^{4f}, R^{4g}, 또는 R^{4h}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환된다.

[청구항 2] 제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 착화합물은, 하기 화학식 1'의 착화합물인 것을 특징으로 하는 착화합물, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

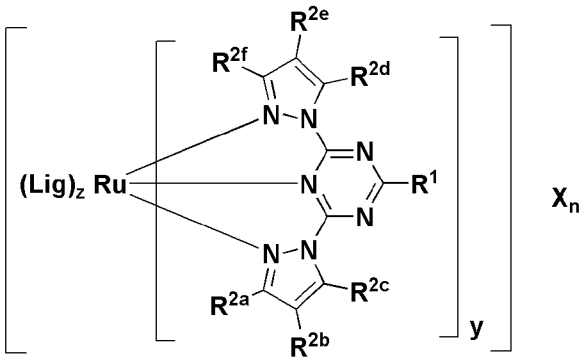
[화학식 1']



여기서, 상기 R^1, X, n은 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[청구항 3] 하기 화학식 2로 표시되는 착화합물, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 2]



상기 화학식 2에 있어서,

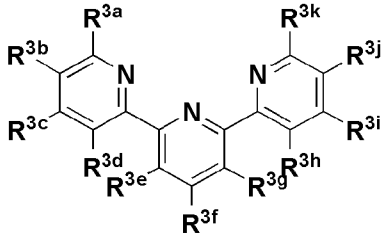
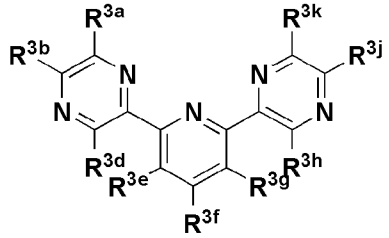
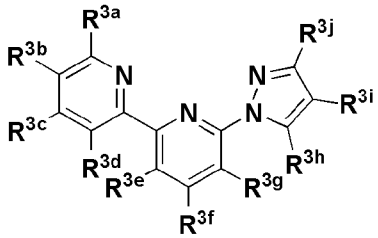
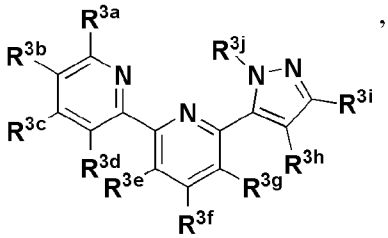
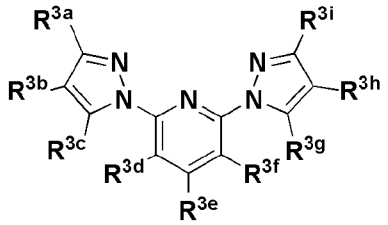
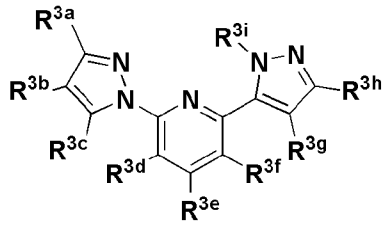
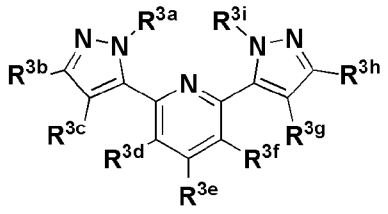
X는 Cl^-, PF_6^-, Br^-, BF_4^-, ClO_4^-, $CF_3SO_3^-$ 및 SO_4^{-2}로 이루어진 군으로 부터 선택되는 1종 이상이고;

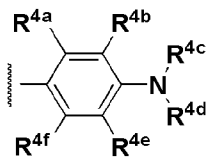
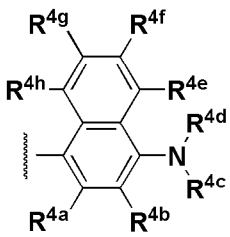
상기 n은 0 내지 5의 정수이고;

y는 1 내지 2의 정수이고;

z는 0 내지 1이고;

Lig는 각각 독립적으로, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 리간드이고,


,

,

,

,

,

, 및

;


또는

이고;

R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고;

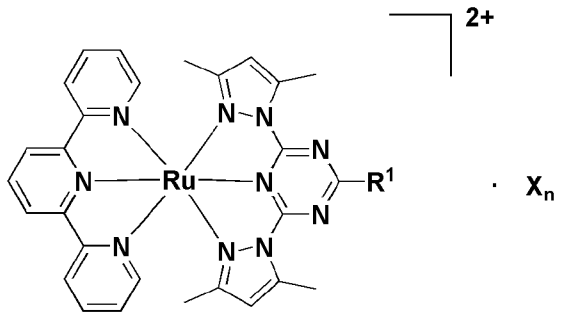
상기 R^{3a}, R^{3b}, R^{3c}, R^{3d}, R^{3e}, R^{3f}, R^{3g}, R^{3h}, R^{3i}, R^{3j}, 및 R^{3k}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환되고,

상기 R^{4a}, R^{4b}, R^{4c}, R^{4d}, R^{4e}, R^{4f}, R^{4g}, 또는 R^{4h}는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 측쇄 또는 직쇄 알콕시이되, 여기서, 상기 치환된 알킬, 및 치환된 알콕시는 할로젠, 옥소, 니트로, 및 시아노로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 치환된다.

[청구항 4] 제3항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 착화합물은, 하기 화학식 2'의 착화합물인 것을 특징으로 하는 착화합물, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 2']



여기서, 상기 R^1, X, n은 상기 화학식 2에서 정의한 바와 같다.

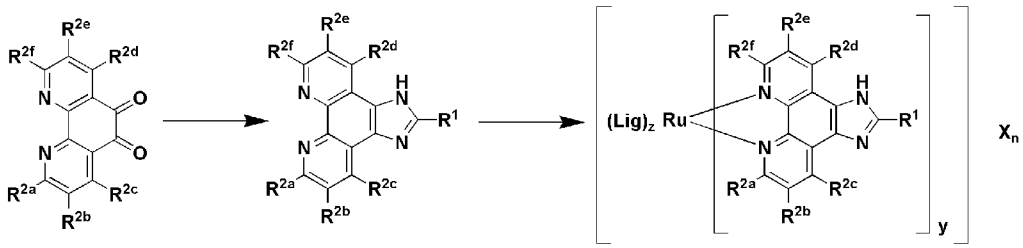
[청구항 5] 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

화학식 3으로 표시되는 화합물로부터 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

상기 단계에서 제조된 화학식 4로 표시되는 화합물로부터 화학식 1로

표시되는 착화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 착화합물의 제조방법:

[반응식 1]



3 4 1

상기 반응식 1에 있어서,

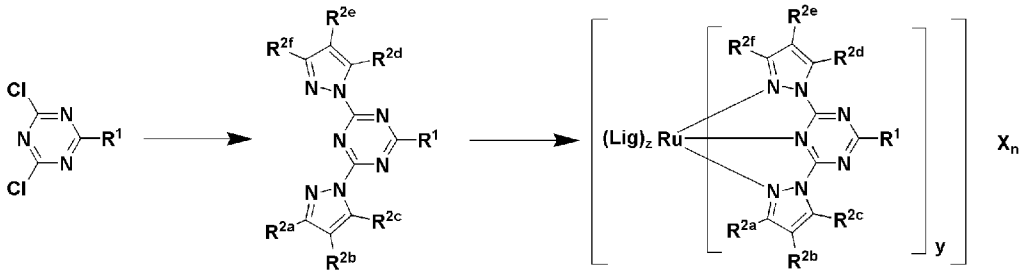
X, n, y, z, Lig, R^1, R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[청구항 6] 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

화학식 5로 표시되는 화합물로부터 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

상기 단계에서 제조된 화학식 6으로 표시되는 화합물로부터 화학식 2로 표시되는 착화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 제3항의 화학식 2로 표시되는 착화합물의 제조방법:

[반응식 2]



5 6 2

상기 반응식 2에 있어서,

X, n, y, z, Lig, R^1, R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e} 및 R^{2f}는 제3항의 화학식 2에서 정의한 바와 같다.

[청구항 7] 제1항 또는 제3항의 착화합물, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서,

상기 암은 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암,

난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 미만성거대B세포림프종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 비호지킨림프종, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신경모세포종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직 암, 악성골암, 악성림프종, 악성중피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 윌름스암, 유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신융모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성 골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문근육종, 후두암, 흉막암, 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

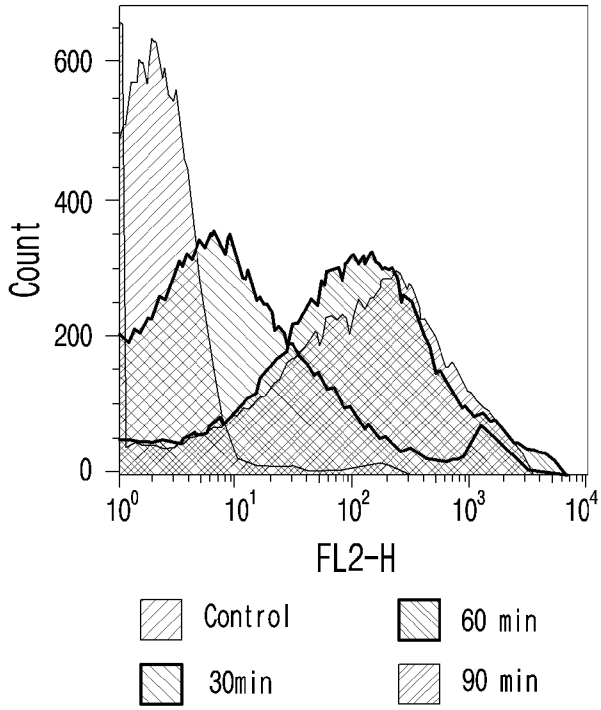
[청구항 9] 제1항 또는 제3항의 착화합물, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 조성물.

[청구항 10] 제9항의 항암제 내성 억제용 조성물, 및 화학 요법제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

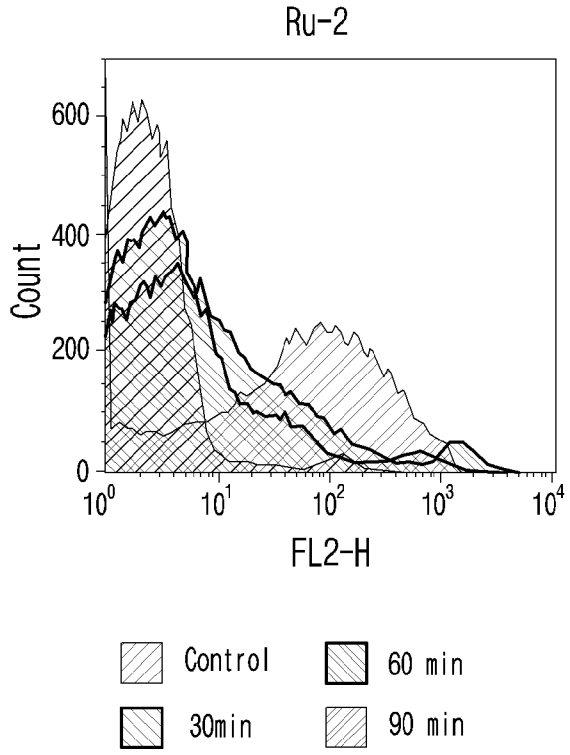
[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 화학 요법제는 백금계 화학 요법제인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

[청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 백금계 화학 요법제는 시스플라틴(cisplatin),
카보플라틴(carboplatin), 이프로플라틴(iproplatin), 또는
옥살리플라틴(oxaliplatin) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

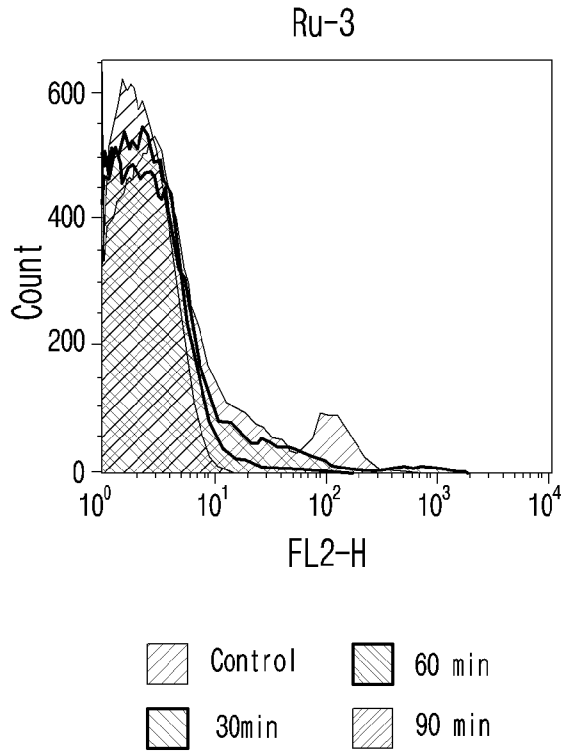
[도1a]


600
400
200
0
Count
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H
Control
60 min
30min
90 min

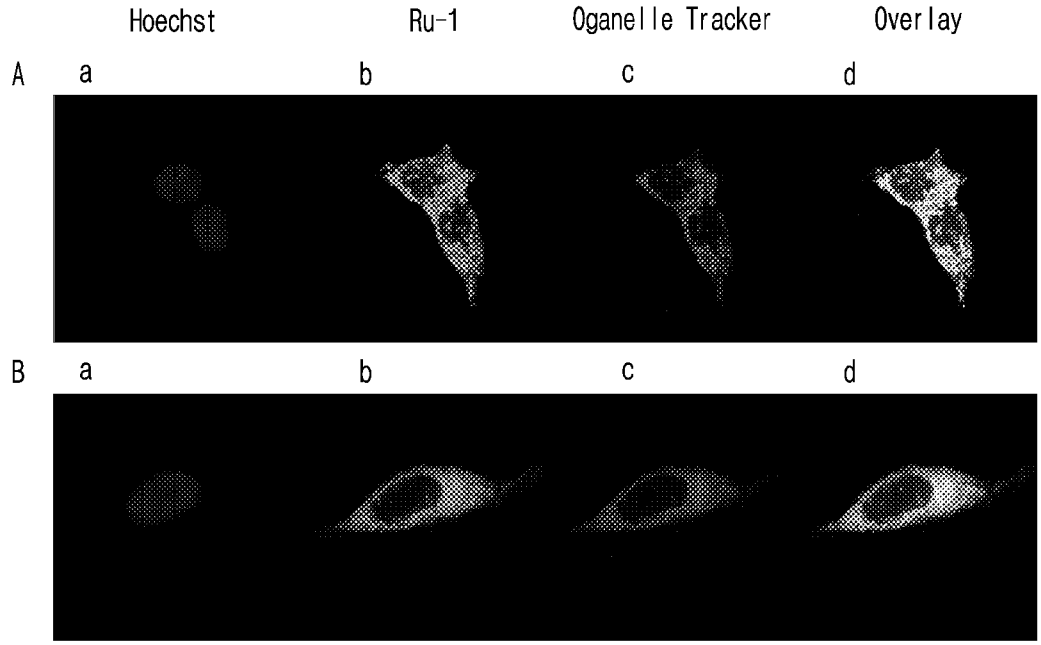
[도1b]


Ru-2
600
400
200
0
Count
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H
Control
60 min
30min
90 min

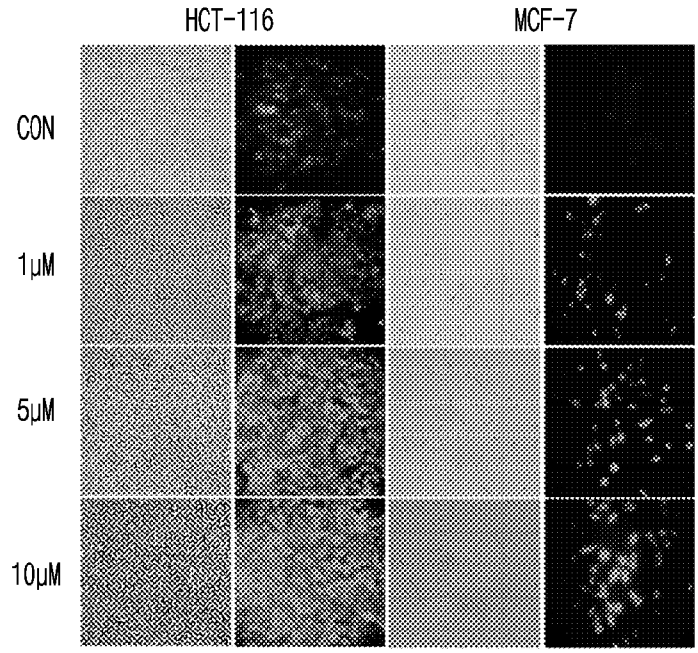
[도1c]


Ru-3
600
400
200
0
Count
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H
Control
60 min
30min
90 min

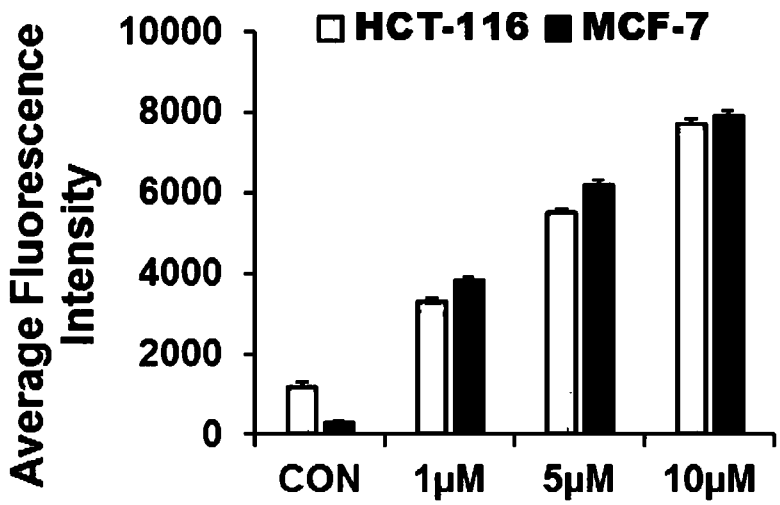
[도2]


Hoechst
Ru-1
Oganelle Tracker
Overlay
A
a
b
c
d
B
a
b
c
d

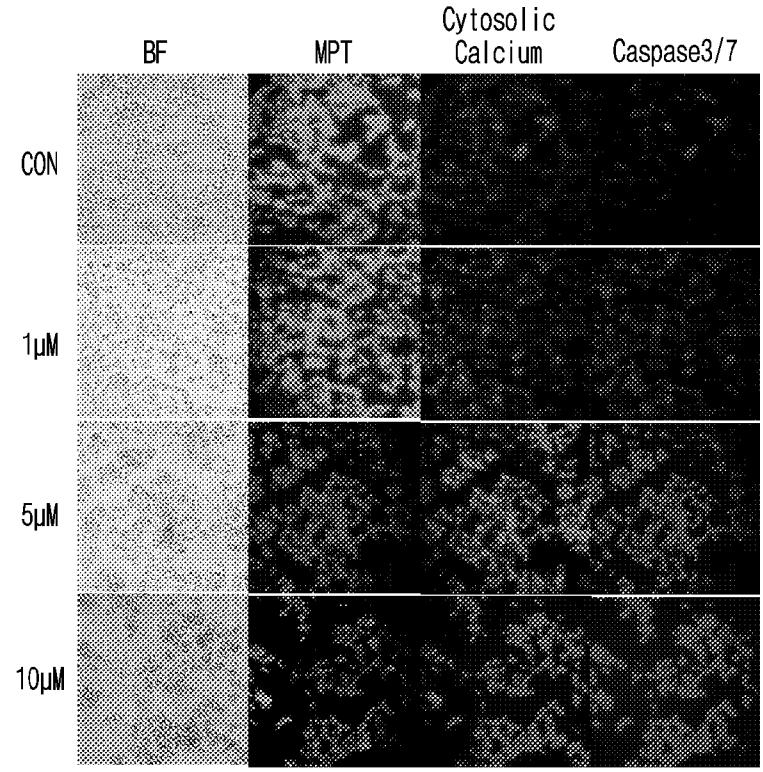
[도3a]


HCT-116
MCF-7
CON
1μM
5μM
10μM

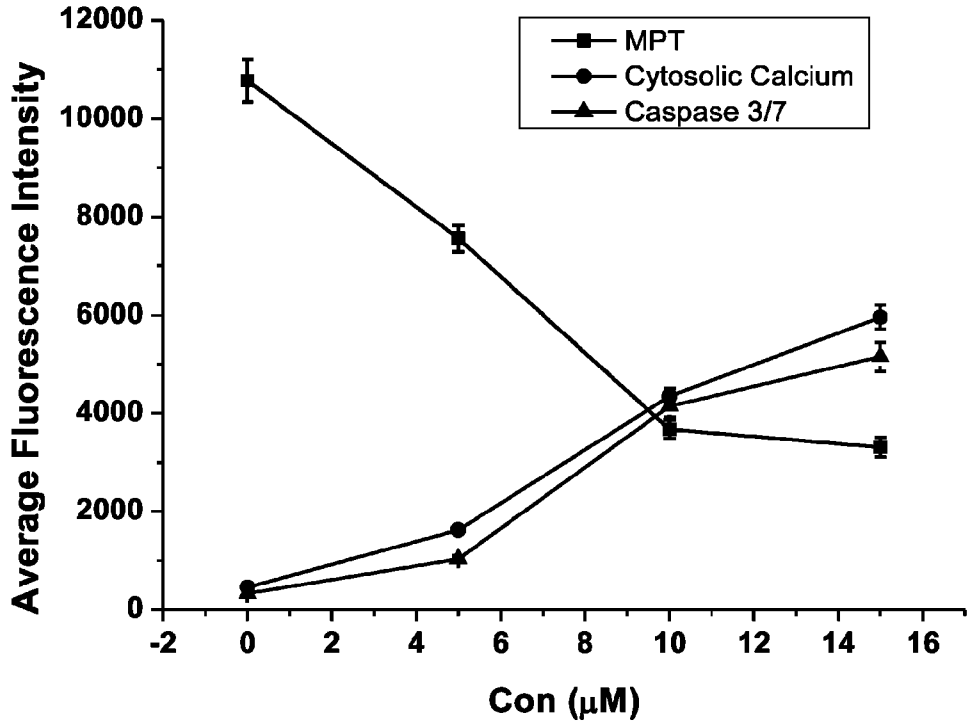
[도3b]


HCT-116
MCF-7
Average Fluorescence Intensity
10000
8000
6000
4000
2000
0
CON
1μM
5μM
10μM

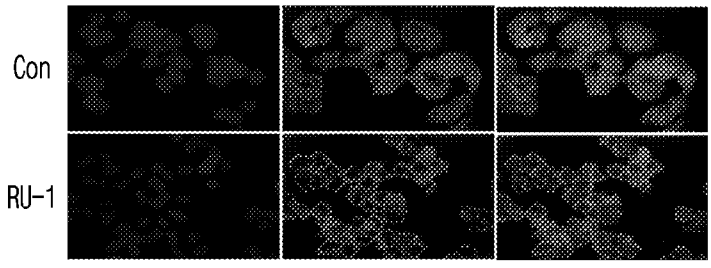
[도4a]


BF
MPT
Cytosolic Calcium
Caspase3/7
CON
1μM
5μM
10μM

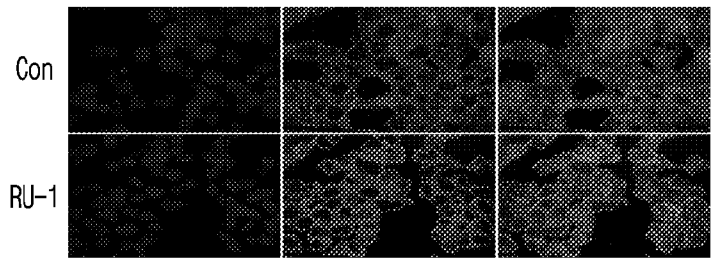
[도4b]


MPT
Cytosolic Calcium
Caspase 3/7
Average Fluorescence Intensity
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Con (μM)

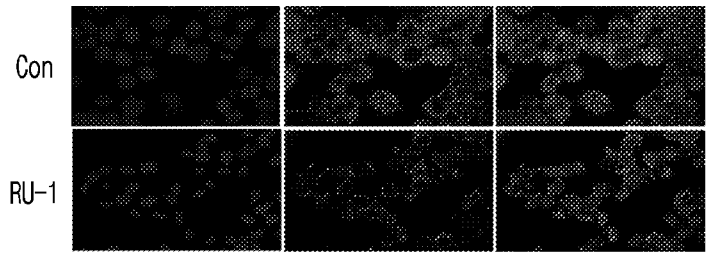
[도5a]


Con
RU-1

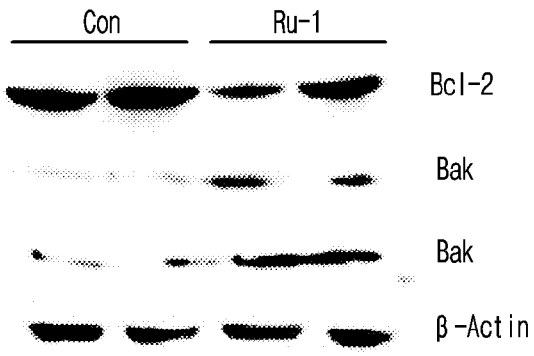
[도5b]



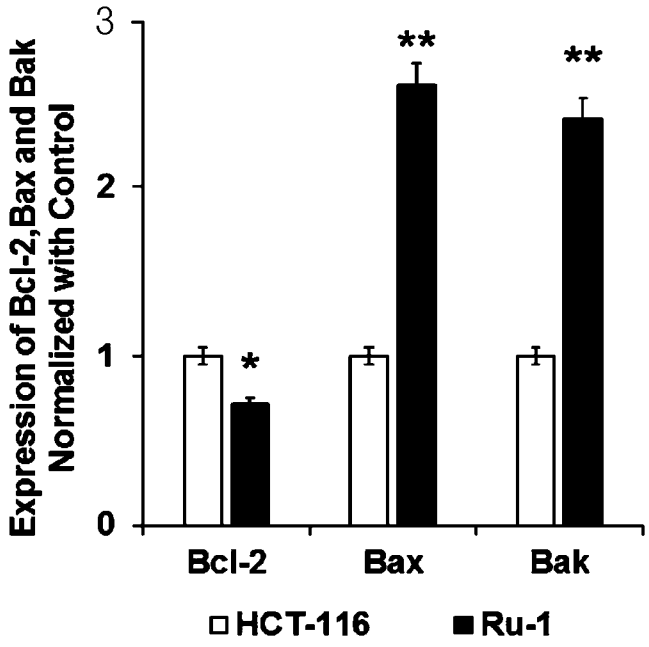
[도5c]



[도5d]



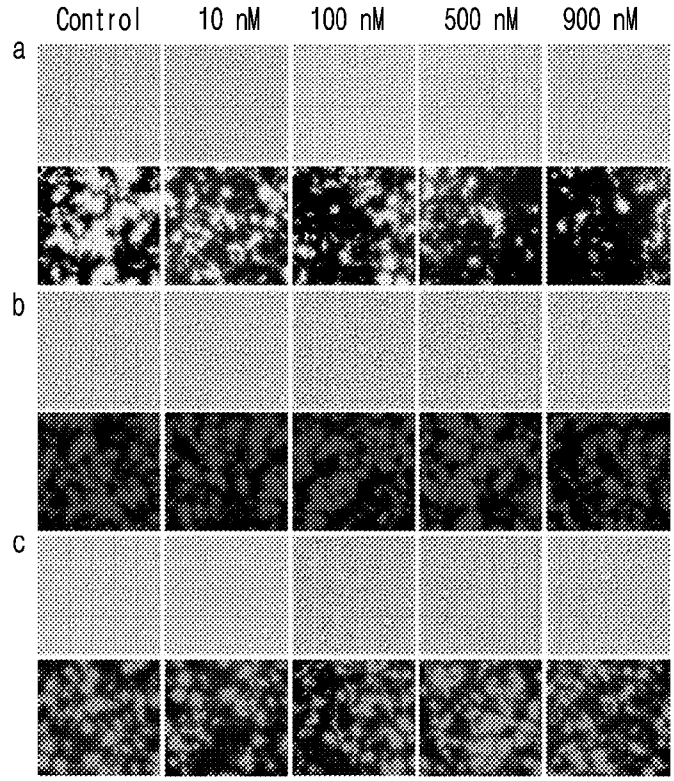
[도5e]



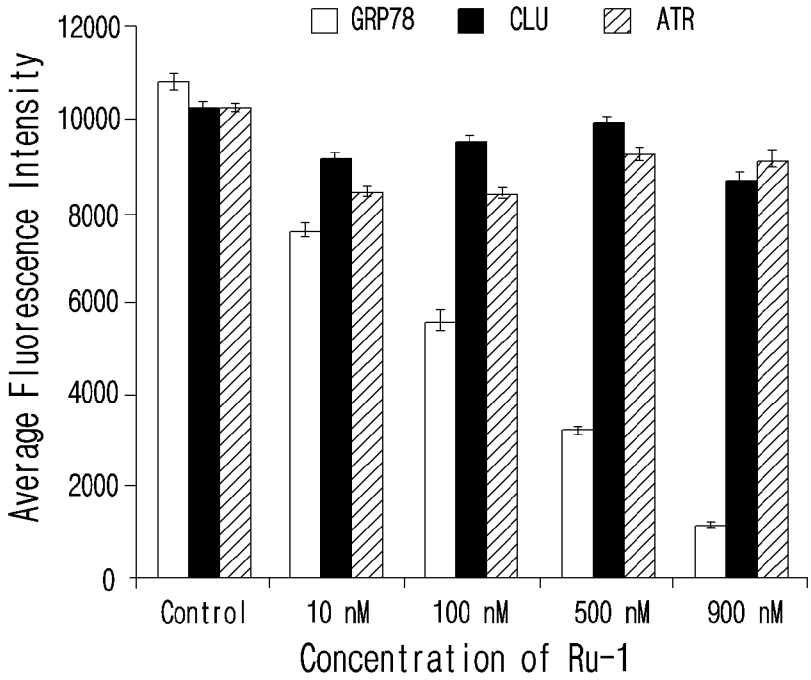
[도6]



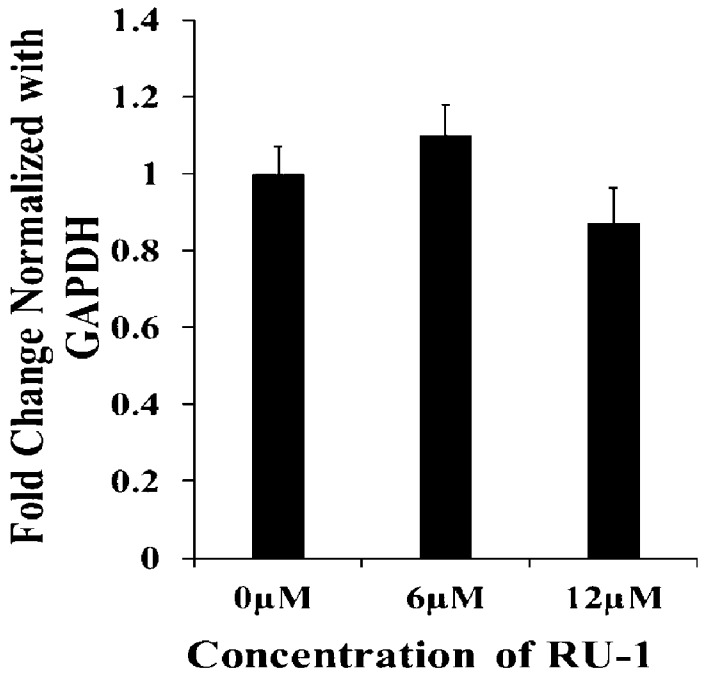
[도7a]



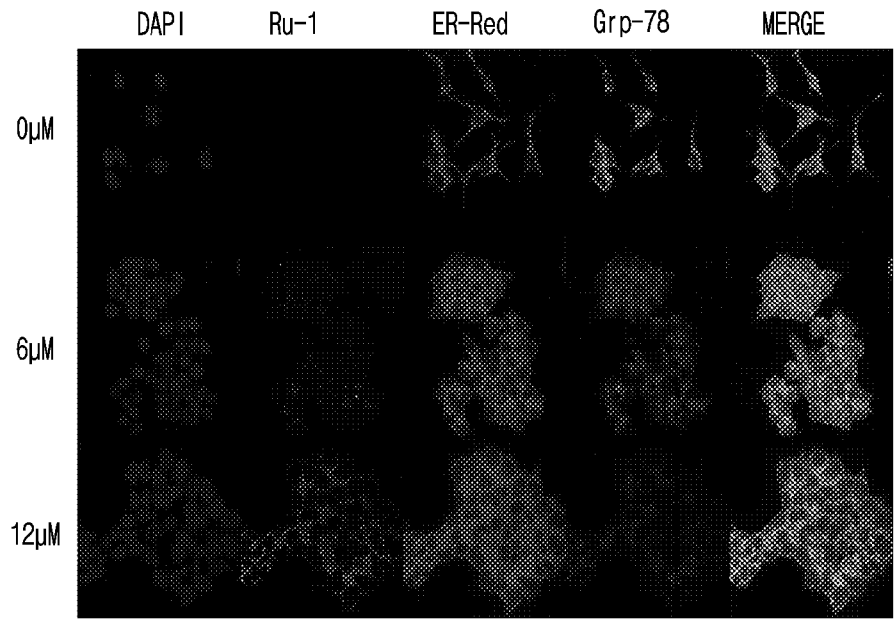
[도7b]


GRP78
CLU
ATR
Average Fluorescence Intensity
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Control
10 nM
100 nM
500 nM
900 nM
Concentration of Ru-1

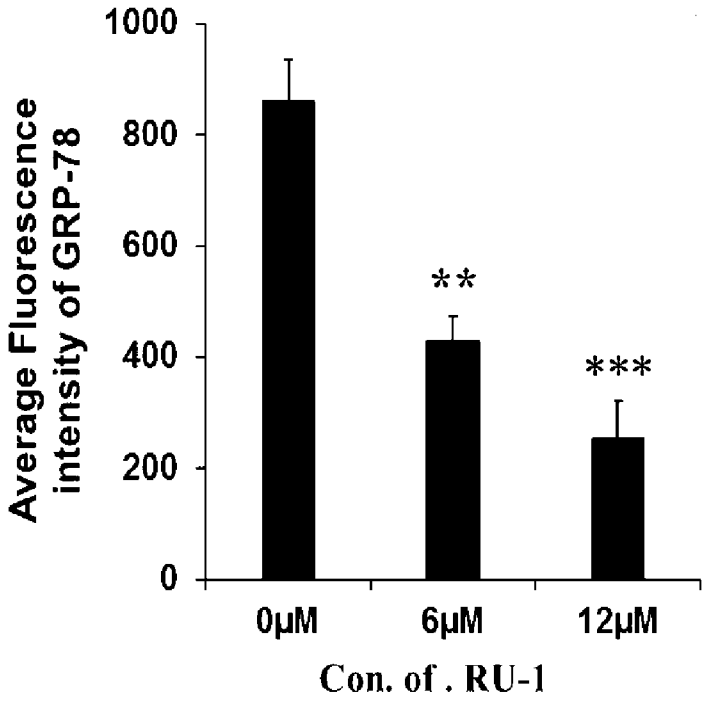
[도7c]


Fold Change Normalized with GAPDH
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0μM
6μM
12μM
Concentration of RU-1

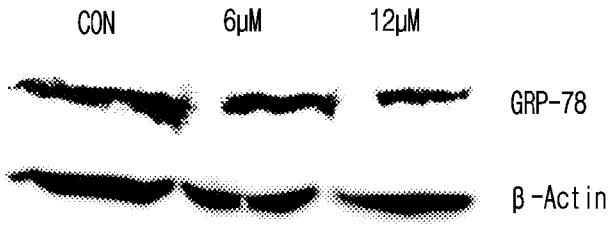
[도7d]


DAPI
Ru-1
ER-Red
Grp-78
MERGE
0μM
6μM
12μM

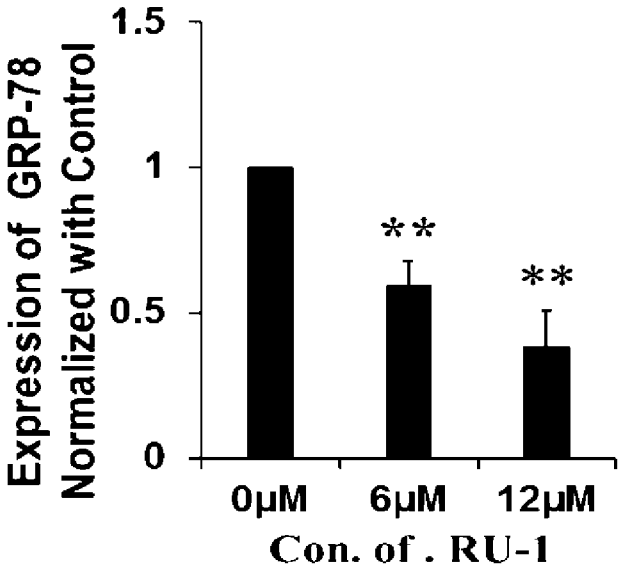
[도7e]


Average Fluorescence intensity of GRP-78
1000
800
600
400
200
0
**
***
0μM
6μM
12μM
Con. of . RU-1

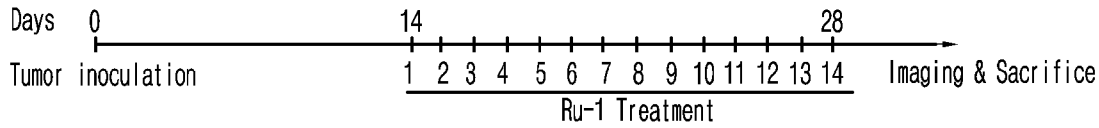
[도7f]


CON
6μM
12μM
GRP-78
β-Actin

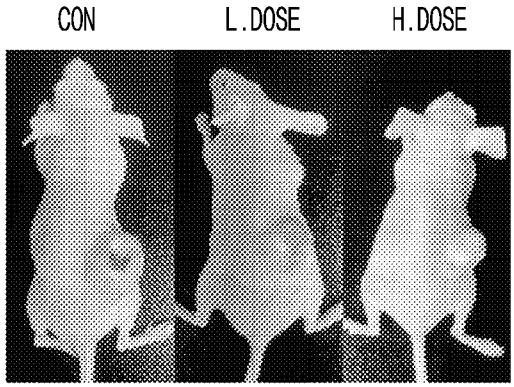
[도7g]



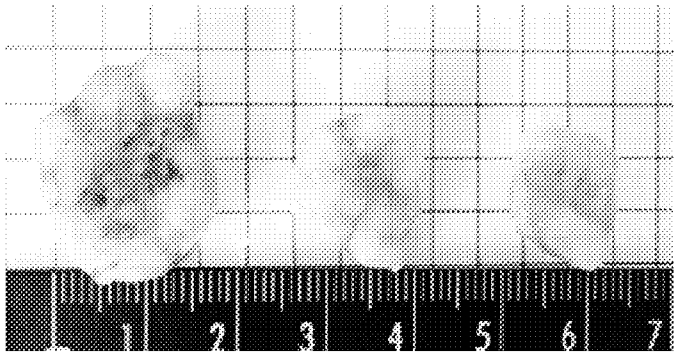
[도8a]



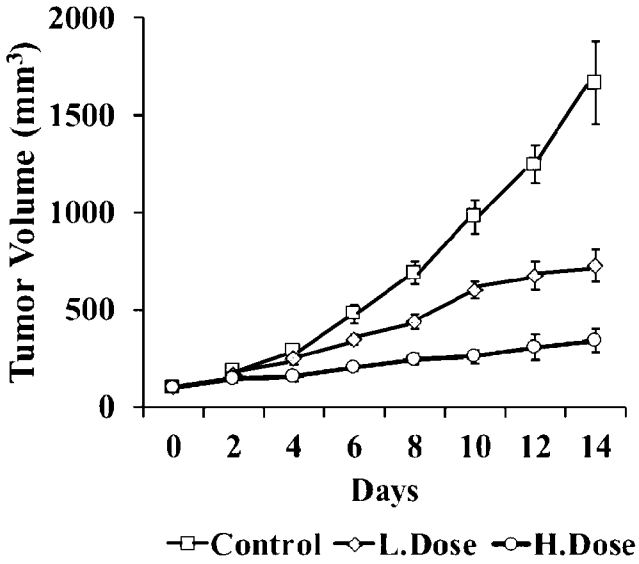
[도8b]



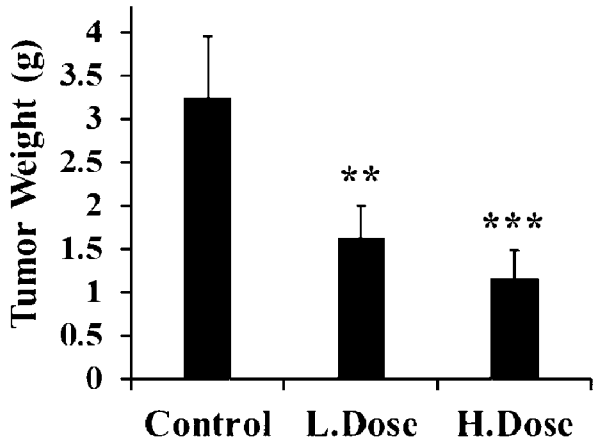
[도8c]



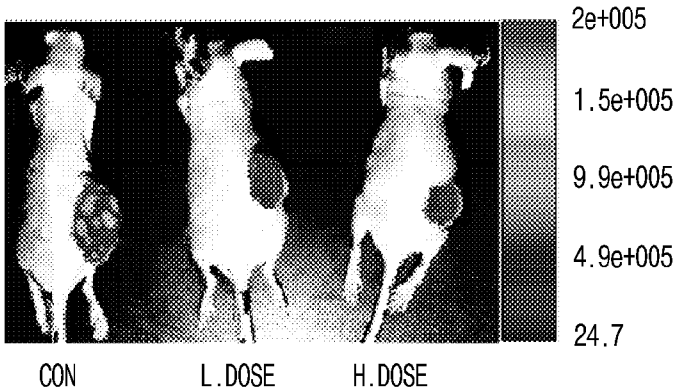
[도8d]


Tumor Volume (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0 2 4 6 8 10 12 14
Days
Control L.Dose H.Dose

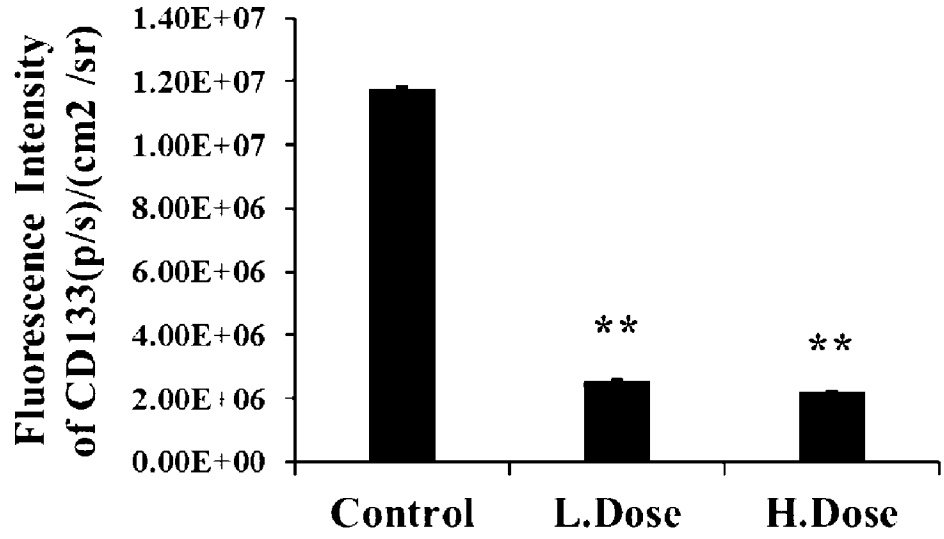
[도8e]


Tumor Weight (g)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
***
Control L.Dose H.Dose

[도8f]


2e+005
1.5e+005
9.9e+005
4.9e+005
24.7
CON L.DOSE H.DOSE

[도8g]


Fluorescence Intensity of CD133(p/s)/(cm2 /sr)
1.40E+07
1.20E+07
1.00E+07
8.00E+06
6.00E+06
4.00E+06
2.00E+06
0.00E+00
**
**
Control
L.Dose
H.Dose

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/016898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07F 15/00(2006.01)i, A61K 31/555(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07F 15/00; A61K 31/28; A61K 31/555; A61P 35/00; A61K 45/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & Keywords: ruthenium, complex, ligand, cancer, tolerance

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHILPA, M. et al. DNA-interactions of ruthenium (II) & cobalt (III) phenanthroline and bipyridine complexes with a planar aromatic ligand 2-(2-fluronyl) 1H-imidazo [4,5-f] [1,10-Phenanthroline]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. 2011, vol. 70, nos. 1-2, pages 187-195 See abstract; introduction; figure 1.	1,2,5
Y		7-8
A		9-12
Y	TAN, L.-F. et al. Nucleic acid binding behaviors and cytotoxic properties of a Ru (II) complex. DNA AND CELL BIOLOGY. 2011, vol. 30, no. 5, pages 277-285 See abstract; Introduction; figure 1.	7-8
A	CN 102942595 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 27 February 2013 See the entire document.	1,2,5,7-12
A	US 8193175 B2 (PFEFFER, M. et al.) 05 June 2012 See the entire document.	1,2,5,7-12
E	KR 10-2019-0074542 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 28 June 2019 See the entire document.	1,2,5,7-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 OCTOBER 2019 (17.10.2019)	**17 OCTOBER 2019 (17.10.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/016898

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Parts of the invention as in claims 1-2 and 5 and the invention as in claims 7-12 pertain to a complex compound of chemical formula 1, a method for preparing same, or a pharmaceutical composition comprising same (hereinafter referred to as "first invention").

Parts of the invention as in claims 3-4 and 6 and the invention as in claims 7-12 pertain to a complex compound of chemical formula 2, a method for preparing same, or a pharmaceutical composition comprising same (hereinafter referred to as "second invention").

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
claims 1-2, 5, 7-12(partly)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/016898

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 102942595 A	27/02/2013	CN 102942595 B	02/12/2015
US 8193175 B2	05/06/2012	AT 435647 T	15/07/2009
		EP 1776103 A1	25/04/2007
		EP 1776103 B1	08/07/2009
		ES 2329697 T3	30/11/2009
		FR 2873037 A1	20/01/2006
		FR 2873037 B1	21/01/2006
		US 2008-0051370 A1	28/02/2008
		WO 2006-016069 A1	16/02/2006
KR 10-2019-0074542 A	28/06/2019	KR 10-2025323 B1	25/09/2019

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/016898

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07F 15/00(2006.01)i, A61K 31/555(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07F 15/00; A61K 31/28; A61K 31/555; A61P 35/00; A61K 45/06

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN(Registry, Caplus), 구글 & 키워드: 루테늄(Ruthenium), 착화합물(complex), 리간드(ligand), 암(cancer), 내성(tolerance)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SHILPA, M. 등, "DNA-interactions of ruthenium (II) & cobalt (III) phenanthroline and bipyridine complexes with a planar aromatic ligand 2-(2-fluronyl) 1H-imidazo [4, 5-f][1, 10-Phenanthroline]", Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2011, 제70권, 제1-2호, 페이지 187-195 초록; introduction; 도면 1 참조.	1,2,5
Y		7-8
A		9-12
Y	TAN, L.-F. 등, "Nucleic acid binding behaviors and cytotoxic properties of a Ru (II) complex", DNA AND CELL BIOLOGY, 2011, 제30권, 제5호, 페이지 277-285 초록; Introduction; 도면 1 참조.	7-8
A	CN 102942595 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 2013.02.27 전체 문헌 참조.	1,2,5,7-12
A	US 8193175 B2 (PFEFFER, M. 등) 2012.06.05 전체 문헌 참조.	1,2,5,7-12
E	KR 10-2019-0074542 A (서울대학교산학협력단) 2019.06.28 전체 문헌 참조.	1,2,5,7-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 10월 17일 (17.10.2019)	2019년 10월 17일 (17.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
권용경
전화번호 +82-42-481-3371

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2018/016898

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

청구항 1-2 및 5 발명과 청구항 7-12 발명의 일부는 화학식 1의 착화합물, 이의 제조방법 또는 이를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이고 (이하 제1 발명'이라 합니다).

청구항 3-4 및 6 발명과 청구항 7-12 발명의 일부는 화학식 2의 착화합물, 이의 제조방법 또는 이를 포함하는 약학 조성물에 관한 것입니다 (이하 제2 발명'이라 합니다).

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☒ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.
청구항 1-2, 5, 7-12(일부)

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/016898

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 102942595 A	2013/02/27	CN 102942595 B	2015/12/02
US 8193175 B2	2012/06/05	AT 435647 T	2009/07/15
		EP 1776103 A1	2007/04/25
		EP 1776103 B1	2009/07/08
		ES 2329697 T3	2009/11/30
		FR 2873037 A1	2006/01/20
		FR 2873037 B1	2006/01/21
		US 2008-0051370 A1	2008/02/28
		WO 2006-016069 A1	2006/02/16
KR 10-2019-0074542 A	2019/06/28	KR 10-2025323 B1	2019/09/25