(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0178147
(43) 공개일자 2024년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/555 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/555 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0080010
(22) 출원일자 2023년06월21일
심사청구일자 2023년06월21일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
숙명여자대학교산학협력단
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)
(72) 발명자
홍승우
서울특별시 용산구 백범로90다길 12, 201동 508호(문배동, 용산씨제이나인파크)
배우균
전라남도 화순군 화순읍 서양로 322 화순전남대학교병원
유경현
서울특별시 용산구 새창로8길 7, 113동 605호(도원동, 도원동삼성래미안아파트)
(74) 대리인
특허법인 천지

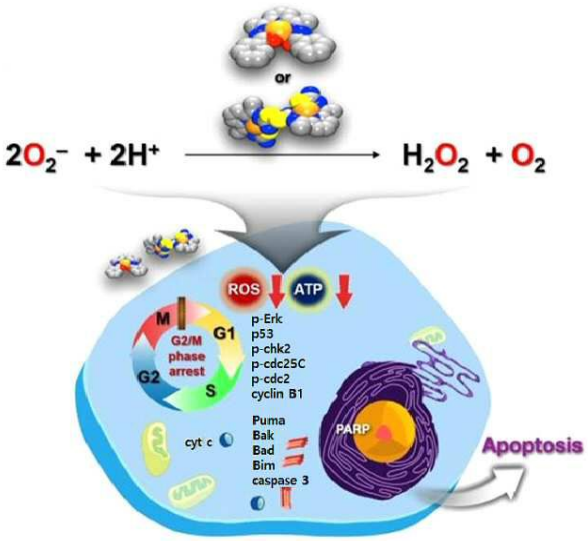
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **대장암 세포 증식을 억제하는 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 모방 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 화합물**

(57) 요 약

본 발명은 대장암 세포 증식을 효율적으로 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 모방 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 화합물에 관한 것이다. 구체적으로는 SOD를 모방한 구리 착물이 대장암 세포 내 ROS 및 ATP 농도를 효과적으로 감소시키고, 대장암 세포 주기를 G2/M 단계에서 정지시키며, 대장암 세포에서 세포 사멸 신호 전달 경로를 유도하는 것을 특징으로 한다. 본 발명은 대장암 세포에 특이적인 항암 효과를 보이며 다양한 용도, 예를 들어 의약, 건강 기능성 식품, 건강 보조 식품 등에 활용이 가능하다. 본 발명은 자연 모방 모델로서 암 치료를 위한 적절한 화학요법 전략으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711192295
과제번호	2020R1C1C1008886
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	무기고분자 설계 기반 생체 모방 인공효소 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711153649
과제번호	2020M3A9G3080281
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	면역치료 도전 연구단
기 여 율	1/2
과제수행기관명	전남대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2024.12.31

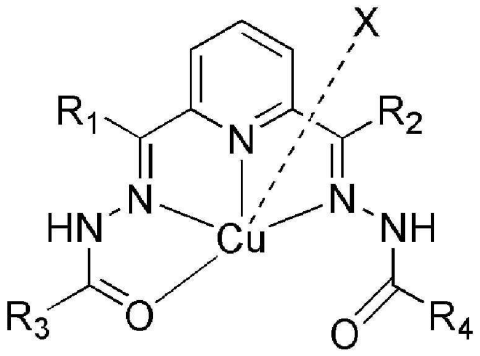
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1을 갖는 화합물, 하기 화학식 2를 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용되는 염 및 이들의 조합을 포함하는 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



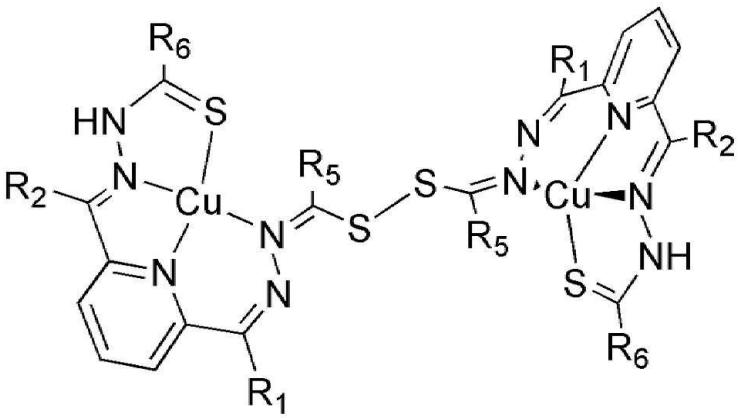
상기 화학식 1에서

R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지쇄인 알킬이고,

R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{14}의 아릴이고,

X는 ClO_4^- 또는 $CF_3SO_3^-$이고,

[화학식 2]



상기 화학식 2에서

R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지쇄인 알킬이고,

R_5 및 R_6는 각각 독립적으로 수소, NH_2 또는 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지쇄인 알킬이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

R_1 및 R_2는 CH_3이고,

R_3 및 R_4는 페닐기이고,

R_5 및 R_6는 NH_2이고,

X는 ClO_4^-

인 것을 특징으로 하는 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물의 반응억제 농도(IC_{50}) 값은 15 μM 이하인 것이고, 상기 반응억제 농도는 대장암 세포에 대한 표준화된 흡광도가 50%로 감소되기 위해 필요한 상기 화합물의 농도인 것을 특징으로 하는 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물로 처리된 정상 간 세포에서의 ROS 수준 감소 대비 상기 조성물로 처리된 대장암 세포에서의 ROS 수준 감소가 2배 이상인 것이고, 상기 ROS 수준은 DCFDA 분석을 통하여 측정된 형광 강도인 것을 특징으로 하는 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물로 처리된 세포에서 인산화된 cdc25C 수준이 대조군에 비해 감소하고, p-ERK, p53, p-chk2, p-cdc2 및 cyclin B1의 수준이 대조군에 비해 증가하는 것이고, 상기 대조군은 상기 화합물이 포함되지 않은 DMSO 용액으로 처리된 세포인 것을 특징으로 하는 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물로 처리한 세포 중 사멸 세포의 비율이 대조군의 사멸 세포 비율보다 1.5 배 이상 많은 것이고, 상기 대조군은 상기 화합물이 포함되지 않은 DMSO 용액으로 처리된 세포인 것을 특징으로 하는 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물을 투여한 이후 종양의 성장 배수(tumor growth fold)가 대조군의 0.5 배 이하이고, 상기 대조군은 상기 화합물이 포함되지 않은 증류수를 투여한 것을 특징으로 하는 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대장암 세포 증식을 효율적으로 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(Superoxide Dismutases; SOD) 모방 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 화합물에 관한 것이다. 구체적으로는 SOD를 모방한 구리 착물이 대장암 세포 내 ROS 및 ATP 농도를 효과적으로 감소시키고, 대장암 세포 주기를 G2/M 단계에서 정지시키며, 대장암 세포에서 세포 사멸 신호 전달 경로(apoptotic signaling pathway)를 유도하는 것을 특징으로 한다. 본 발명은 대장암 세포에 특이적인 항암 효과를 보이며 다양한 용도, 예를 들어 의약, 건강 기능성 식품, 건강 보조 식품 등에 활용이 가능하다. 본 발명은 자연 모방 모델로서 암 치료를 위한 적절한 화학요법 전략으로 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] SOD는 대량의 슈퍼옥사이드 라디칼 생성을 억제하여 자유 라디칼로 인한 세포 손상을 예방하는 항산화 효소이다. SOD 효소는 활성산소(reactive oxygen species; ROS)를 덜 유해한 산소 분자 또는 과산화수소로 전환하는 환원반응을 촉진하는 산화방어체계를 갖는다. 그러나 종양 발생을 억제하기 위하여 SOD 모방 착물을 사용하는 것에 대해서는 밝혀진 것이 없었다.

발명의 내용

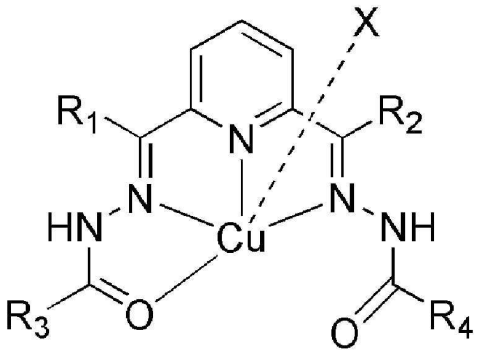
해결하려는 과제

[0003] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 대장암 세포 증식을 억제하는 SOD 모방 화합물을 제공하는 것이다. 구체적으로는 SOD를 모방한 구리 착물을 사용하여 대장암 세포 내 ROS 및 ATP 농도를 효과적으로 감소시키고, 대장암 세포 주기를 G2/M 단계에서 정지시키며, 세포 사멸 신호 전달 경로를 유도하는 것을 특징으로 하는 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명의 일 실시상태는 하기 화학식 1을 갖는 화합물, 하기 화학식 2를 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용되는 염 및 이들의 조합을 포함하는 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

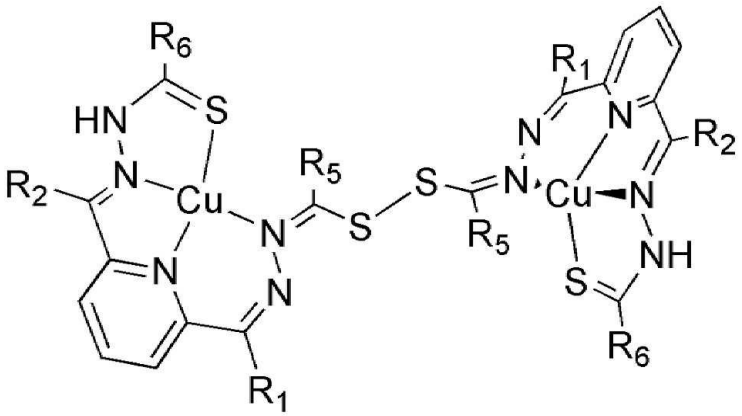
[0005] [화학식 1]



[0006]

[0007] 상기 화학식 1에서 R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지쇄인 알킬이고, R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{14}의 아릴이고, X는 ClO_4^- 또는 $CF_3SO_3^-$이다.

[0008] [화학식 2]



[0009]

[0010] 상기 화학식 2에서 R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지쇄인 알킬이고, R_5 및 R_6는 각각 독립적으로 수소, NH_2 또는 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지쇄인 알킬이다.

[0011] 본 명세서에서, 용어 "치환된" 기는 기의 하나 이상의 치환 가능한 위치에 치환기를 갖고, 임의의 주어진 구조 내의 1 초과의 위치가 치환되는 경우, 치환기는 각각의 위치에서 동일하거나 서로 상이할 수 있다. "치환된"이란 용어는 유기 화합물의 모든 허용 가능한 치환기를 이용한 치환을 포함하는 것으로 고려되며, 이때 본 명세서에 기재된 임의의 치환기는 안정한 화합물의 형성을 초래한다. 본 발명의 일 실시상태에 따르며, 안정한 화합물

에 도달하기 위해 임의의 이러한 모든 조합을 고려한다. 바람직하게 상기 치환은 -OH, -SH, 할로겐으로 치환된 것일 수 있다.

[0012] 본 명세서에서, 상기 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지쇄인 알킬은 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 2-메틸프로필, n-펜틸, 2-메틸부틸, 3-메틸부틸, 2-에틸프로필, n-헥실, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 4-메틸펜틸 또는 2-에틸부틸인 것일 수 있다.

[0013] 본 명세서에서 용어 "염"은 일 양상에 따른 특정 화합물과 비교적 무독성인 산 또는 염기를 이용해서 조제되는 염을 의미할 수 있다.

[0014] 본 명세서에서 용어 "약학적으로 허용되는"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미할 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"이란, 일 양상에 따른 특정 화합물과 비교적 무독성인 산 또는 염기를 이용해서 조제되는 염을 의미한다. 상기 화합물이 상대적으로 산성 관능기를 포함할 때, 순수 용액 또는 적합한 불활성 용매 중에서 충분한 양의 염기를 이러한 화합물의 중성 형태와 접촉시킴으로써 염기 부가염을 얻을 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염기 부가염은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 암모늄, 유기 아민, 혹은 마그네슘의 염 또는 유사한 염이 포함된다. 상기 화합물이 상대적으로 염기성 관능기를 포함할 때, 순수 용액 또는 적합한 불활성 용매 중에서 충분한 양의 산을 이러한 화합물의 중성 형태와 접촉시킴으로써 산 부가염을 얻을 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 산 부가염은 염산, 브롬화 수소산, 질산, 탄산, 탄산 수소 이온, 인산, 인산 1수소 이온, 인산 2수소 이온, 황산, 황산 수소 이온, 요오드화 수소산 또는 아인산 등의 무기산의 염, 그리고 아세트산, 프로피온산, 이소부티르산, 말레산, 말론산, 안식향산, 숙신산, 수베르산, 푸마르산, 락트산, 만델산, 프탈산, 벤젠술폰산, p-톨릴술폰산, 구연산, 주석산, 메탄술폰산 등의 유기산의 염을 들 수 있고, 나아가 아미노산(예를 들면 아르기닌 등)의 염 및 글루쿠론산 등의 유기산의 염도 포함된다.

[0016] **도 1**은 SOD 모방 구리 착물이 슈퍼옥사이드 이온을 제거하여 항암 활성을 가질 수 있음을 나타내는 것이다. 상기 도 1을 참고하면, 본 발명의 일 실시상태에 따른 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물은 슈퍼옥사이드 이온을 O_2와 H_2O_2로 분해하는 능력을 가지며, (i) 세포 내 ROS 및 ATP 농도를 효과적으로 감소시키고, (ii) 암세포 주기를 G2/M 단계에서 정지시키며, (iii) 세포 사멸 신호 전달 경로를 유도함으로써 체외(*in vitro*) 및 체내(*in vivo*)에서 대장암 세포의 증식을 억제할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 화학식 1 또는 화학식 2에서 R_1 및 R_2는 CH_3이고, R_3 및 R_4는 페닐기이고, R_5 및 R_6는 NH_2이고, X는 ClO_4^-일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 화합물은 약학적으로 허용되는 염인 것일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 화합물은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "약학적으로 허용되는 염"은 무기 또는 유기 염기 및 무기 또는 유기 산을 포함한 제약상 허용되는 비-독성 염기 또는 산으로부터 제조된 염을 지칭하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 화학식 1은 $[Cu(bSC\text{-}Bn)(ClO_4)]^+$] (착물 1-Bn, bSC-Bn = (1,1'-(피리딘-2,6-디일)비스(에탄-1-일-1-일리덴))디벤조하이드라지드)이고, 상기 화학식 2는 $[Cu_2(bTSC)_2]^{2+}$ (착물 2, bTSC = (1,1'-(피리딘-2,6-디일)비스(에탄-1-일-1-일리덴))비스(하이드라진카르보티오아마이드))일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 화합물의 반응억제 농도(IC_{50}) 값은 15 μM 이하인 것이고, 상기 반응억제 농도는 대장암 세포에 대한 표준화된 흡광도가 50%로 감소되기 위해 필요한 상기 화합물의 농도일 수 있다. 구체적으로 상기 화합물의 반응억제 농도(IC_{50}) 값이 0 μM 초과 15 μM 이하인 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 화합물의 반응억제 농도(IC_{50}) 값이 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 μM 이하일 수 있다. 상술한 범위에서 상기 화합물의 반응억제 농도 값을 낮춤으로써, 세포 독성을 향상시킬 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 조성물로 처리된 정상 세포에서의 ROS 수준 감소 대비 상기 조성물로 처리된 대장암 세포에서의 ROS 수준 감소가 2배 이상인 것이고, 상기 ROS 수준은 DCFDA (2',7'-dichlorofluorescin diacetate) 분석을 통하여 측정된 형광 강도(fluorescence intensity)일 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물로 처리된 대장암 세포에서의 ROS 수준 감소가 정상 간 세포에서의 ROS 수준 감소의 1.5배 이

상일 수 있다. 세포 내 ROS 수준 감소는 미토콘드리아 항상성 손상을 통해 ATP 수준 감소로 이어질 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 조성물로 처리된 세포에서 G2/M 주기의 정지가 유발될 수 있다. 구체적으로 상기 조성물로 처리된 세포에서 인산화된 cdc25C 수준이 대조군에 비해 감소하고, p-ERK, p53, p-chk2, p-cdc2 및 cyclin B1의 수준이 대조군에 비해 증가하는 것이고, 상기 대조군은 상기 화합물이 포함되지 않은 DMSO 용액으로 처리된 세포인 것일 수 있다. 세포의 세포 생성 주기가 G2/M 단계에서 정지됨에 따라 세포의 무분별한 증식을 차단할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 조성물로 처리한 세포의 세포 사멸 신호 경로가 활성화될 수 있다. 구체적으로 상기 조성물로 처리된 세포 중 사멸 세포의 비율이 대조군의 사멸 세포 비율보다 1.5 배 이상 많은 것이고, 상기 대조군은 상기 화합물이 포함되지 않은 DMSO 용액으로 처리된 세포인 것일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 조성물로 처리한 세포 중 사멸 세포의 비율이 대조군의 사멸 세포 비율보다 1.3 배 내지 1.8 배 이상 많은 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 조성물로 처리한 세포에서 Puma, Bak, Bad, Bim, 시토크롬 c, cleaved caspase 3 및 cleaved PARP와 같은 프로-세포 사멸 단백질(pro-apoptic proteins)의 수준이 증가할 수 있다. 무분별하게 증식된 세포들의 세포 사멸 신호 경로가 활성화됨에 따라 대장암이 치료될 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시상태에 따르면, 상기 조성물을 투여한 이후 종양의 성장 배수(tumor growth fold)가 대조군의 0.5 배 이하이고, 상기 대조군은 상기 화합물을 포함되지 않은 증류수를 투여한 것일 수 있다. 본 명세서에서, 상기 종양의 성장 배수는 종양의 크기 또는 중량을 측정하기 시작한 시점을 기준으로 종양의 크기 또는 중량이 증가되는 비율을 의미하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 일 실시상태에 따른 대장암 예방용 또는 치료용 약학적 조성물은 슈퍼옥사이드 이온을 O_2와 H_2O_2로 분해하는 능력을 가지며, (i) 세포 내 ROS 및 ATP 농도를 효과적으로 감소시키고, (ii) 암세포 주기를 G2/M 단계에서 정지시키며, (iii) 세포 사멸 신호 전달 경로를 유도함으로써 체외(*in vitro*) 및 체내(*in vivo*)에서 대장암 세포의 증식을 억제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] **도 1**은 SOD 모방 구리 착물이 슈퍼옥사이드 이온을 제거하여 항암 활성을 가질 수 있음을 나타내는 것으로, (i) 세포 내 ROS 및 ATP 농도를 효과적으로 감소시키고, (ii) 암세포 주기를 G2/M 단계에서 정지시키며, (iii) 세포 사멸 신호 전달 경로를 유도함으로써 체외 및 체내에서 대장암 세포의 증식을 억제하는 것을 나타낸다.

도 2는 단핵 및 이핵 구리(II) 비스(티오세미카바존) 및 비스(세미카바존) 착물의 분자 구조를 나타낸다. **도 2a**는 착물 1, **도 2b**는 착물 1-Bn, **도 2c**는 착물 2, **도 2e**는 착물 2-Bn의 구조를 보여준다. **도 2d** 및 **도 2f**는 각각 착물 2 및 착물 2-Bn의 공간 충전 모델이다.

도 3a는 착물 1 (사각형 표시, 2.0 mM), 착물 1-Bn (원형 표시, 2.0 mM), 착물 2 (마름모 표시, 2.0 mM) 및 착물 2-Bn (세모 표시, 2.0 mM)의 DMSO 용액에 $TBAPF_6$ (0.10 M)을 포함하고 298 K에서 유리탄소 작동전극을 사용하여 얻은 주기전압법 그래프이다(스캔 속도는 0.20 V/s).

도 3b는 298 K DMSO 조건에서 KO_2 (500 μM)와 착물 1-Bn (20 μM)의 반응으로 얻은 UV-Vis 스펙트럼 변화이다.

도 3c 및 **도 3d**는 KO_2의 이상분해 반응의 k_2 값을 결정하기 위하여 착물 1-Bn 농도 및 착물 2 농도에 대한 k_{obs}의 그래프를 나타낸 것이다.

도 3e는 HCT116 및 CCD-986Sk에 대한 착물 1-Bn (4.2 μM) 및 착물 2 (11.5 μM) 처리의 효과를 나타낸 것이다. 착물을 추가하지 않은 경우의 세포의 생존율을 100%로 보고 정규화하였다.

도 3f의 좌측 그래프에서는 DMSO, 착물 1, 착물 1-Bn, 착물 2 및 착물 2-Bn로 세포를 처리한 이후 세포 독성을 나타낸다. 우측 그래프에서는 DMSO, bSC, bSC-Bn, bTSC, bTSC-Bn 및 구리(II) 이온으로 세포를 처리한 이후 세포 독성을 나타낸다. 착물을 추가하지 않은 경우의 세포의 생존율을 100%로 보고 정규화하였다.

도 3g는 착물 1, 착물 1-Bn 및 착물 2의 IC_{50} 값과 HCT116 세포에서 37° C, 24시간 배양 후에 (a) 친유성($\log P_{calc}$)와 (b) 환원 전위(E_{red} 값, Ag/Ag^+ 대비)와의 관계이다.

도 3h는 HCT116 및 CCD-986Sk에서 착물 1-Bn (4.2 μM) 및 착물 2 (11.5 μM)에 의해 유발된 산화 스트레스에 대한 세포 내 ROS 검출 결과(DCFDA 검사 결과)를 나타낸다.

도 3i는 HCT116 및 CCD-986Sk에서 착물 1-Bn (4.2 μM) 및 착물 2 (1.51 μM)에 의한 ATP 검사 결과를 나타낸다.

도 4a 및 **도 4b**는 HCT116 세포에서 착물 1-Bn 및 착물 2의 세포 주기 분석 결과를 나타낸다. HCT116 세포에서 착물 1-Bn 및 착물 2를 24시간 처리한 후, 세포 주기 분포를 흐름세포측정법(flow cytometry)을 사용하여 검출했다. 통계 분석은 양측 짝지은 t 검정을 사용하여 수행되었다(* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, ns = 통계적으로 유의하지 않음).

도 4c는 HCT116 세포에서 착물 1-Bn 및 착물 2 처리 후 착물 1-Bn 및 착물 2에 대한 p-Erk, p53, p-chk2, p-cdc25C, p-cdc2, cyclin B1 및 B-actin의 Western blot 분석 결과를 나타낸다.

도 4d는 HCT116 세포에서 착물 1-Bn 및 착물 2를 24시간 처리한 후 흐름세포측정법을 사용한 자기 사멸 분석 결과를 나타낸다.

도 4e는 HCT116 세포에서 착물 1-Bn 및 착물 2 처리 후 48시간 동안 Bak, Bad, Bim, Puma, 시토크롬 c, caspase-3, cleaved caspase-3, PARP, cleaved PARP 및 β-actin의 Western blot 분석 결과를 나타낸다.

도 5는 체내 착물 1-Bn 및 착물 2의 처리에 의한 종양 성장 억제를 나타낸다. **도 5a**는 NOD/SCID/IL-2Rγnull (NSG) 마우스를 사용한 체내 대장암 항암 연구의 계획을 나타낸다. 증류수 대조군 및 착물 1-Bn, 착물 2가 복막내 주입으로 6회에 걸쳐 21일간 처리되었다. **도 5b**는 9일부터 21일까지 총 6회의 종양 성장 배율(X)을 계산한 결과를 나타낸다. **도 5c**는 21일에 측정한 체중, 종양 및 간 중량을 나타낸다. **도 5d**는 대조군, 착물 1-Bn 및 착물 2로 처리한 종양 조직에서 Puma, Bad, Bak, 시토크롬 c, caspase-3, cleaved caspase-3, PARP, cleaved PARP 및 β-actin에 대한 Western blot 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0029] **실시예 1: SOD 모델의 합성 및 분광학적 특성화**

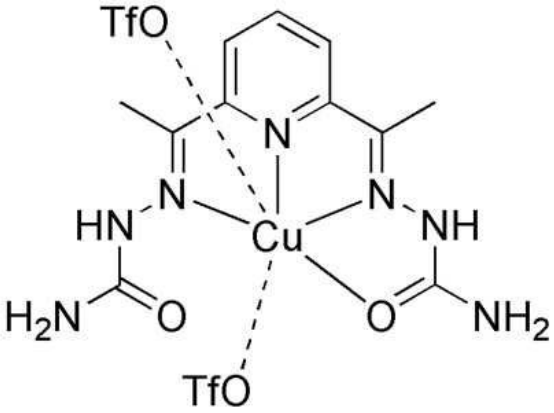
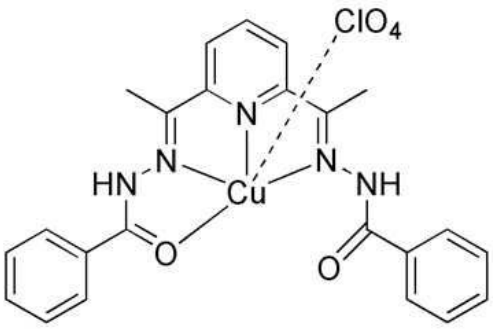
[0030] **1-1. 다섯 자리 리간드 bSC, bTSC, bSC-Bn 및 bTSC-Bn의 합성**

[0031] (티오)세미카바자이드와 2,6-디아세틸피리딘을 2:1 몰비로 산성 에탄올 용액에서 혼합한 후 환류 단계를 거쳐 비스(티오)세미카바존 유도체인 (1) (1,1'-(피리딘-2,6-디일)비스(에탄-1-일-1-일리덴))비스(하이드라진카르복사마이드) (bSC), (2) (1,1'-(피리딘-2,6-디일)비스(에탄-1-일-1-일리덴))비스(하이드라진카르보티오아마이드) (bTSC), (3) (1,1'-(피리딘-2,6-디일)비스(에탄-1-일-1-일리덴))디벤조하이드라지드) (bSC-Bn) 및 (4) (1,1'-(피리딘-2,6-디일)비스(에탄-1-일-1-일리덴))-비스(N-페닐하이드라진카르보티오아마이드) (bTSC-Bn)을 합성하였다. bSC 리간드에서 bTSC 리간드로의 변환은 리간드 내의 두 개의 산소 원자를 두 개의 황 원자로 교체하여 얻어진 것이며, 그 결과 구리 착물의 코디네이션 환경과 산화환원 특성을 변화시킬 수 있었다. 또한, bSC 및 bTSC에 벤질 기를 도입함으로써 친지성이 증가된 bSC-Bn 및 bTSC-Bn 리간드를 합성하였다. 이로 인해 구리 착물의 세포막 투과성이 향상될 수 있었다.

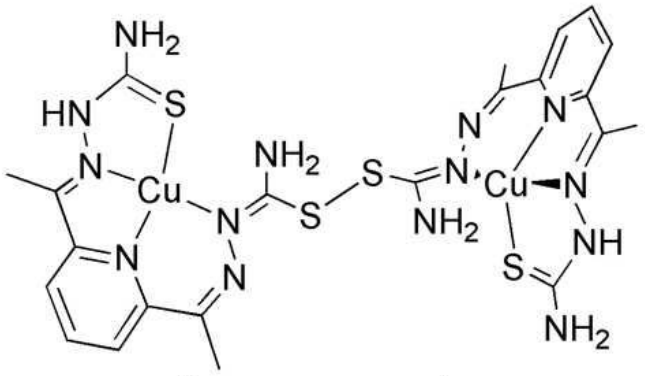
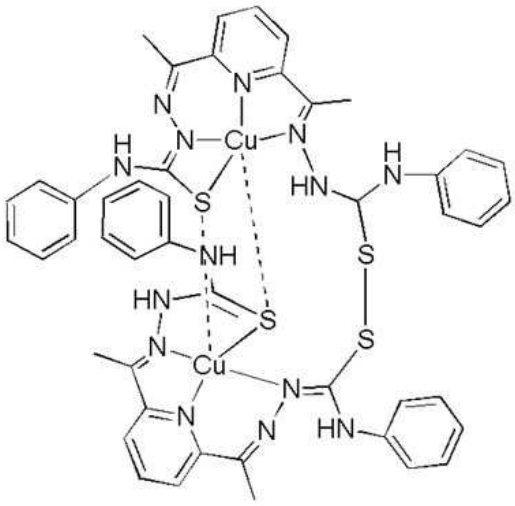
[0032] **1-2. 착물 1, 착물 1-Bn, 착물 2 및 착물 2-Bn의 합성**

[0033] 이온쌍 증착법을 사용하여 비스(티오)세미카바존 유도체인 상기 bSC, bTSC, bSC-Bn 및 bTSC-Bn을 $Cu(CF_3SO_3)_2$ 또는 $Cu(ClO_4)_2$와 등몰 비율로 DMSO 용매에서 반응시켜 각각 착물 1, 착물 1-Bn, 착물 2 및 착물 2-Bn을 합성하였다. 하기 표 1에 상기 비스(티오)세미카바존 유도체와 합성된 착물을 정리하였다.

표 1

리간드	구리 착물 명칭 및 구조
bSC	 착물 1 ([Cu(bSC)(CF$_3$SO$_3$)$_2$])
bSC-Bn	 착물 1-Bn ([Cu(bSC-Bn)(ClO$_4$)]$^+$)

[0034]

bTSC	 착물 2 ([$Cu_2(bTSC)_2$]$^{2+}$)
bTSC-Bn	 착물 2-Bn ([$Cu_2(bTSC\text{-}Bn)_2$]$^{2+}$)

[0035]

[0036] **1-3. 착물의 분광학적 특성**

[0037] **(1) UV-vis 스펙트럼 분석**

[0038] 착물 1의 UV-vis 스펙트럼은 특징적인 π-π* 전하이동 대역을 305 nm (ε = 20000 $M^{-1}cm^{-1}$)에서 보여주었으며, 리간드에서 구리(II)로의 리간드-금속 전하이동(ligand-to-metal charge transfer; LMCT) 대역으로 해석 가능한 약한 숄더 밴드(weak shoulder band)가 400 nm (ε = 2000 $M^{-1}cm^{-1}$)에 나타났다.

[0039] 착물 2의 경우 π-π* 전하이동 대역과 LMCT 대역은 각각 313 nm (ε = 50000 M^{-1} cm^{-1})와 425 nm (ε = 10000 M^{-1} cm^{-1})로 적색 이동되었다. 이는 황 원자의 전기 음성도가 산소 원자보다 낮기 때문인 것으로 판단된다.

[0040] 착물 1-Bn 및 착물 2-Bn의 경우 π-π* 전하이동 대역의 흡수 대역이 320-360 nm 범위로 적색 이동되었으며, 이는 페닐기의 도입에 따라 π 전자의 추가적인 공액화 때문인 것으로 판단된다.

[0041] **(2) 전기 스프레이 이온화 질량 스펙트럼 분석**

[0042] 착물 1과 착물 1-Bn의 전기 스프레이 이온화 질량 (electrospray ionization mass spectrometry; ESI MS) 스펙트럼의m/z 값은 각각 677.0 및 461.3에서 두드러지는 피크를 나타내었으며, 이들의 질량 및 동위원소 분포 패턴은 [$Cu(bSC)(ClO_4)$]$^+$ 및 [$Cu(bSC\text{-}Bn)(ClO_4)$]$^+$에 해당한다.

[0043] 착물 2 및 착물 2-Bn은 각각 [$Cu_2(HbTSC)_2$]$^{2+}$, [$Cu_2(HbTSC)_2(CF_3SO_3)$]$^+$, [$Cu_2(HbTSC\text{-}Bn)_2$]$^{2+}$ 및 [$Cu_2(HbTSC\text{-}Bn)_2(CF_3SO_3)$]$^+$의 m/z 값인 371.1, 890.6, 523.2 및 1194.8에서 두드러지는 피크를 나타냈다. 이러한 결과는 착

물 2가 S-S 결합을 통해 연결된 두 개의 bTSC 리간드를 포함하는 이중핵 구리(II) 착물임을 보여주었으며, 착물 2-Bn 역시 합성 후 이황화 결합을 가질 가능성이 있음을 시사했다.

[0044] 대조적으로, 착물 1 및 착물 1-Bn의 ESI MS 스펙트럼은 두 개의 bSC 리간드 간의 O-O 결합 형성에 대한 높은 에너지 장벽으로 인해 이중핵 구리(II) 착물의 피크가 나타나지 않았다. 이는 리간드 시스템 내의 황 원자를 산소 원자로 교체하는 것이 이중핵 구리(II) 착물의 형성을 제한한다는 것을 보여준다.

[0045] **(3) X-선 결정학적 분석**

[0046] 구리(II) 착물 및 그들의 생물학적 활성을 더 깊게 이해하기 위해 X-선 결정학을 사용하여 착물 1, 착물 1-Bn, 착물 2 및 착물 2-Bn의 분자 구조를 비교하였다. **도 2**는 단핵 및 이핵 구리(II) 비스(티오세미카바존) 및 비스(세미카바존) 착물의 분자 구조를 나타낸다. **도 2a**는 착물 1, **도 2b**는 착물 1-Bn, **도 2c**는 착물 2, **도 2e**는 착물 2-Bn의 구조를 보여준다. **도 2a**와 **도 2b**에서 볼 수 있듯이 착물 1과 착물 1-Bn의 결정학적 데이터는 착물 2와 착물 2-Bn과 명확하게 다른 기하학적 형태를 나타냈다.

[0047] 착물 1은 왜곡된 팔면체 기하학적 형태를 가진 단핵성 6방위 구리(II) 착물로, 평면상에서 bSC 리간드의 세 개의 질소 원자와 하나의 산소 원자가 배위된 상태이며, 뾰족한 위치에는 약하게 결합된 트리플레이트 음이온의 두 개의 산소 원자가 위치하며 $O_{triflate}$-Cu-$O_{triflate}$ 각도는 163.0(3)° 이다. 착물 1의 평균 C-O 결합 거리는 1.222(8) Å로, C=O 결합이 결합 과정에서 보존되었음을 시사한다. 착물 1-Bn의 경우, bSC-Bn 리간드는 유사한 방식으로 구리(II) 주위에 배위되었지만, bSC-Bn 리간드 내의 추가적인 페닐기가 뾰족한 위치에서의 육방위 용매 결합을 방해하였다.

[0048] ESI MS 결과와 일치하게, 착물 2와 착물 2-Bn 모두 이합체 구리(II) 착물로 확인되었고, 착물 1과 착물 1-Bn은 단량체 형태였다(**도 2**). bTSC 리간드는 각각의 구리(II) 원자를 중심으로 세 개의 질소 원자와 하나의 황 원자로 이루어진 약간 왜곡된 사각 평면 기하학적 형태를 형성하였다. 두 개의 bTSC 리간드는 나머지 두 개의 황 원자를 통해 S-S 결합을 형성하며 S-S 결합 거리는 2.069(4) Å이었다.

[0049] 한편, 착물 2-Bn의 경우 다른 형태의 기하학이 관찰되었다. 두 개의 구리(II) 중심은 거의 사각뿔 형태로, 세 개의 질소 원자와 두 개의 황 원자를 가지고 있으며, 두 개의 bTSC-Bn 리간드는 S-S 결합을 통해 서로 결합되었으며 거리는 2.0285(12) Å이다. bTSC의 아미노기에 부피가 큰 페닐기를 도입하여 국부적인 입체 장애를 만들어낸 결과, 다른 bTSC-Bn이 S-S 결합 형성과 함께 뒤집히는 현상이 발생했다. 이는 구리(II) 중심에 다른 황 원자가 배위하도록 하여, 사각뿔 형태의 μ-설피도 가교 이합체(sulfido bridged dimer)를 형성하게 했다. 착물 2의 뾰족한 위치에서의 평균 Cu-S 결합 거리는 2.8845(11) Å로, 진정한 Cu-L 결합과 이차적 상호작용 사이의 범위에 위치한다. 한편, 전형적인 C=S 결합 거리는 1.73 Å 이하인 것을 고려하면, 착물 2의 평균 C-S 결합 거리는 1.761(3) Å이므로, 티온 대신 티올레이트 형태로 구리를 배위하는 것을 시사한다.

[0050] **(4) EPR 스펙트럼 분석**

[0051] 착물 1, 착물 1-Bn, 착물 2 및 착물 2-Bn의 EPR 스펙트럼은 비슷한 비정형 신호를 나타내었으며, g_z (2.41), g_y (착물 1 및 착물 1-Bn의 경우 2.27 또는 착물 2 및 착물 2-Bn의 경우 2.07) 및 g_x (착물 1 및 착물 1-Bn의 경우 1.99 또는 착물 2 및 착물 2-Bn의 경우 2.0)를 가지고 있다.

[0052] 그러나 대형 하이퍼파인 결합 상수는 착물 1 및 착물 1-Bn의 경우 약 90 G로, 착물 2 및 착물 2-Bn의 경우 약 160 G로 결정되었으며, 이는 착물 2 및 착물 2-Bn이 사각뿔 형태 기하학을 가지고 있는 반면 착물 1 및 착물 1-Bn은 동결 용액에서 왜곡된 팔면체 기하학에 가까웠음을 나타낸다.

[0054] **실시예 2. 단핵성 및 이핵성 구리 SOD 모델의 전기화학적 특성**

[0055] 구리 착물의 산화환원 전위는 항증식 효과에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로, 주기전압법으로 구리 착물의 전기화학적 특성을 조사하였다. 디이민 백본(diimine backbone)의 변경이 구리 착물의 산화환원 전위와 산화환원 속도에 큰 영향을 미치는 경향이 있다. 본 실시예에서 사용한 모든 구리 착물은 디이민 백본에 동일한 피리딘기를 가지므로, 산화환원 전위가 크게 변화할 것으로 예상되지 않았다. 대신, 구리 착물의 착물 개수와 리간드의 도너 원자의 종류가 산화환원 특성에 영향을 줄 수 있었다.

[0056] 결과는 하기 표 2에 기재되었다. **도 3a**는 착물 1 (사각형 표시, 2.0 mM), 착물 1-Bn (원형 표시, 2.0 mM), 착

물 2 (마름모 표시, 2.0 mM) 및 착물 2-Bn (세모 표시, 2.0 mM)의 DMSO 용액에 $TBAPF_6$ (0.10 M)을 포함하고 298 K에서 유리탄소 작동전극을 사용하여 얻은 주기전압법 그래프이다(스캔 속도는 0.20 V/s).

표 2

[0057]

착물	분배계수	$Cu^{II/I}$ 환원 전위
	(Log P_{calc})	(V vs Ag/AgCl)
1	0.405	-0.41
1-Bn	0.681	-0.40
2	0.762	-0.35
2-Bn	0.992	-0.11

[0058] 상기 **표 2**와 상기 **도 3a**를 참고하면, 위에서 예측한 대로, 착물 1 및 착물 1-Bn과 같은 단핵성 구리 착물은 거의 역가역환류형의 일 전자 $Cu^{II/I}$ 산화환원 쌍을 나타내며, 해당 전위는 각각 -0.41 및 -0.40 V (Ag/AgCl 대비)이다. 알려진 전기원자 수를 가진 피리딘기는 다른 보고된 구리 비스(티오세미카바존) 착물들에 비해 $Cu^{II/I}$ 산화환원 전위를 -0.44 V에서 -0.63 V으로 양의 방향으로 이동시킨다(Ag/AgCl 대비). 산소 도너(예: 착물 1의 경우 -0.41 V)에서 황 도너로의 치환(예: 착물 2의 경우 -0.35 V)은 산화환원 거동의 약간의 증가로 이어진 반면, 사각 평면 구조(예: 착물 2)에서 유사 사각뿔 구조(예: 착물 2-Bn, -0.11 V)로의 구조적 변화는 $Cu^{II/I}$ 산화환원 전위를 극적으로 양의 방향으로 이동시켰다. 이러한 결과는 N 원자의 말단에서의 치환기가 $Cu^{II/I}$ 산화환원 쌍의 산화환원 전위에는 거의 영향을 주지 않을 수 있지만, 구조적 변화를 유발하고 산화환원 거동에 영향을 줄 수 있음을 나타낸다.

[0060] **실시예 3. 구리 모델의 SOD 반응성에 대한 평가**

[0061] 구리 착물의 SOD 반응성에 대한 통찰력을 얻기 위해 구리 착물 대비 과잉의 KO_2가 DMSO에서 298 K 조건 하에 사용되었다. **도 3b**는 298 K DMSO 조건에서 KO_2 (500 μM)와 착물 1-Bn (20 μM)의 반응으로 얻은 UV-Vis 스펙트럼 변화이다. 상기 **도 3b**에는 착물 1-Bn 또는 착물 2와 KO_2 간의 불균일반응으로 인해 275 nm에서의 흡수량이 감소된 것이 도시되어 있다. 세모 표시의 그래프가 상기 착물을 KO_2와 반응시킨 이후의 UV-vis 스펙트럼 분석이다. 한편, 우측상단에는 시간에 따른 KO_2의 분해가 도시되어 있으며, 마름모 표시의 그래프가 상기 착물과 KO_2를 반응시킨 것이다.

[0062] **도 3c** 및 **도 3d**는 KO_2의 이상분해 반응의 k_2 값을 결정하기 위하여 착물 1-Bn 농도 및 착물 2 농도에 대한 k_{obs}의 그래프를 나타낸 것이다. 유사 1차 속도상수(k_{obs})는 착물 1-Bn 또는 착물 2의 농도 증가에 따라 선형적으로 증가하며, 이로 인해 2차 속도상수(k_2) 값은 각각 25(5) $M^{-1}s^{-1}$과 20(5) $M^{-1}s^{-1}$로 확인되었다(**도 3c** 및 **3d**).

[0063] KO_2에서 기인한 불균일반응 생성물이 산소(O_2)와 과산화수소(H_2O_2)일 것으로 예상되어 가스 크로마토그래피 및 아이오드로메트릭 적정(iodometric titration)을 수행하였다. 보정 곡선에 기초하여 착물 1-Bn (1.0 mM) 또는 착물 2 (1.0 mM)와 KO_2 (2.0 mM)의 반응에서 얻어진 O_2의 양은 각각 착물 1-Bn에 대해 0.76 mM이고, 착물 2에 대해 1.25 mM이었다.

[0064] 동일한 반응 조건에서 최종 혼합물에서 생성된 H_2O_2의 농도는 DMSO에서 I^-의 흡광계수에 기초하여 착물 1-Bn에 대해 1.5 mM이고, 착물 2에 대해서는 미량으로 존재하였다. 이러한 결과로부터 착물 1-Bn과 착물 2 모두 슈퍼옥사이드 음이온을 불균일반응시킬 수 있으며, 착물 1-Bn은 효과적으로 O_2와 H_2O_2를 생성하고, 착물 2는 H_2O_2의 생성이 제한되어 SOD 반응성이 더 적은 것으로 나타났다.

[0066] **실시예 4. 지방성 구리 SOD 모델은 대장암 세포에 대한 항암 활성을 나타냄**

[0067] 항암 활성의 체외 평가는 DMSO에서 비스(티오)세미카바존 리간드와 이에 해당하는 구리 착물의 존재 여부에서 대장암 세포주(예: HCT116 세포)의 생존도를 평가하는 것에 기반한다.

[0068] **도 3e**는 HCT116 및 CCD-986Sk에 대한 착물 1-Bn (4.2 μM) 및 착물 2 (11.5 μM) 처리의 효과를 나타낸 것이다. 착물을 추가하지 않은 경우의 세포의 생존율을 100%로 보고 정규화하였다. **도 3f**의 좌측 그래프에서는 DMSO, 착물 1, 착물 1-Bn, 착물 2 및 착물 2-Bn로 세포를 처리한 이후 세포 독성을 나타낸다. 우측 그래프에서는 DMSO, bSC, bSC-Bn, bTSC, bTSC-Bn 및 구리(II) 이온으로 세포를 처리한 이후 세포 독성을 나타낸다. 착물을 추가하지 않은 경우의 세포의 생존율을 100%로 보고 정규화하였다. 비스(티오)세미카바존 리간드의 존재에서 HCT116 세포의 생존도는 적은 정도로 감소되었지만, 착물 1-Bn 및 착물 2의 존재에서 HCT116 세포에 대한 유의한 세포 독성이 관찰되었다(**도 3e**). 한편, 착물 1과 bSC 리간드는 세포 증식을 효과적으로 감소시키지 못했다(**도 3f**). 이러한 결과는 비스(티오)세미카바존이 잘 알려진 킬레이트임에도 불구하고 구리 착물의 항신생물학적 활성이 해당 리간드보다 우수하다는 것을 명확히 나타낸다. 착물 1-Bn 및 착물 2로 치료된 HCT116 세포의 대표적인 이미지는 착물 1-Bn 및 착물 2의 항세포증식 활성으로 인해 세포 형태가 변화하고 합류(confluency)의 감소를 보여준다.

[0069] 착물 1, 착물 1-Bn 및 착물 2의 반응억제 농도(IC_{50}) 값은 각각 50, 4.2 및 11 μM으로 결정되었다. 단순히 말단 N 원자를 벤젠으로 대체하는 것만으로 두드러진 세포 독성이 유발되는 것이 확인되었다. **도 3g**는 착물 1, 착물 1-Bn 및 착물 2의 IC_{50} 값과 HCT116 세포에서 37° C, 24시간 배양 후에 (a) 친유성($\log P_{calc}$)와 (b) 환원 전위(E_{red} 값, Ag/Ag^{+} 대비)와의 관계이다. 구리 착물의 환원 전위(E_{red})와 친유성($\log P_{calc}$)을 IC_{50} 값과 독립적으로 상관시켰을 때, 계산된 구리 착물의 친유성과 항암 활성 간에 강한 상관관계가 있으며, 환원 전위와 항암 활성 간에는 약한 상관관계가 확인되었다(**표 2** 및 **도 3g**).

[0070] 그러나 가장 높은 친유성을 가진 착물 2-Bn은 세포의 친유성 막으로 흡수되는 능력으로 인해 미미한 효능을 나타냈다(예: 세포 구획화 또는 보존 효과). **도 2d** 및 **도 2f**는 각각 착물 2 및 착물 2-Bn의 공간 충전 모델이다. 친유성 외에도 착물 2-Bn의 구조는 구리 중심이 bTCS-Bn 리간드와 부피가 큰 벤젠 부분의 뒤집힘에 의해 방해받았으며, 이에 비해 착물 2의 구조에서 구리 중심은 상대적으로 더 노출되었다(**도 2d 및 2f**). 따라서 암세포에 최적으로 침투하고 항암 작용을 더욱 촉진하기 위해 설계된 구리 착물의 친유성에는 일정한 한계가 존재할 수 있다.

[0071] 중요한 점은 정상 섬유아 세포(CCD-986Sk)와 암 세포(HCT116 세포)가 동일한 조건에서 각각 착물 1-Bn 및 착물 2로 처리되었을 때, 착물 1-Bn은 높은 저산소 선택성을 나타내었으며, 착물 2는 정상 세포와 암 세포 간에 크지 않은 차이를 보였다(**도 3c**). 구리 (비스)티오세미카바존 착물은 -0.50 V 이하의 $E_{1/2}$ 값이 있는 저산소 선택성을 나타낼 수 있다. 착물 1-Bn의 E_{red} 값(즉, -0.40 V)이 착물 2의 값(즉, -0.35 V)보다 더 낮으므로 착물 1-Bn에 대해 더 좋은 저산소 선택성이 기대될 수 있다.

[0073] **실시예 5. 착물 1-Bn과 착물 2의 ROS 수준 감소**

[0074] 실시예에서 착물 1-Bn과 착물 2가 체외 시스템에서 세포 내 ROS 수준을 감소시키는지 여부를 조사했다(**도 3d**). DCFDA 실험 결과, 착물 1-Bn과 착물 2로 처리된 HCT116 세포에서는 대조군에 비해 세포 내 ROS 수준이 유의적으로 감소되었다. 착물 2로 처리된 CCD-986Sk 세포에서는 ROS 수준이 약간 감소했지만, HCT116 세포에서는 감소가 더욱 두드러졌으며 (착물 1-Bn 기준으로 약 4.5배, 착물 2 기준으로 약 2.3배), 이는 착물 1-Bn과 착물 2의 SOD 활성이 정상 세포보다 대장암 세포에서 훨씬 더 향상되었음을 시사한다. 착물 1-Bn과 착물 2의 세포 내 SOD 활성은 그들의 슈퍼옥사이드 불균일 활성과 일치한다(**도 3a**).

[0075] ROS 수준 감소가 세포 생존에 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에, 착물 1-Bn 및 착물 2로 처리된 HCT116 및 CCD-968Sk 세포의 세포 증식을 WST-8 실험으로 평가했다(**도 3d**). 놀랍게도, 착물 1-Bn 및 착물 2로 처리된 HCT116 세포의 증식이 현저하게 감소되었으며, CCD-968Sk 세포에서는 생존율이 유사한 것을 확인되었다. 일반적으로 염증과 종양 부위의 미토콘드리아 항상성은 세포 증식을 지원하고 종양의 공격성을 증가시키기 위해 ATP 수준이 증가하는 것과 밀접한 관련이 있다. 따라서, 본 실시예에서 ROS와 ATP 간의 상관 관계를 확인하기 위해 형광 ATP 실험을 수행했고, 미토콘드리아 항상성의 손상으로 인해 세포 증식이 감소되었다는 것을 확인했다.

이어서, 착물 1-Bn 및 착물 2의 처리 후 HCT116 세포에서 세포 ATP 수준의 현저한 감소가 확인되었다. 세포 내 ROS 수준 감소가 미토콘드리아 항상성 손상을 통해 ATP 수준 감소로 이어진다는 것이 확인되었다(**도 3e**).

[0077] **실시예 6. 착물 1-Bn과 착물 2의 G2/M 정지와 세포 자살 유발 효과**

[0078] ATP는 세포 과정에서의 주요 에너지원이며, 증식과 세포사멸 조절에 중요한 역할을 한다. **도 4a** 및 **도 4b**는 HCT116 세포에서 착물 1-Bn 및 착물 2의 세포 주기 분석 결과를 나타낸다. HCT116 세포에서 착물 1-Bn 및 착물 2를 24시간 처리한 후, 세포 주기 분포를 흐름세포측정법(flow cytometry)을 사용하여 검출했다. 통계 분석은 양측 짝지은 t 검정을 사용하여 수행되었다(* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, ns = 통계적으로 유의하지 않음). 본 실시예에서 착물 1-Bn과 착물 2 처리 후 감소된 ATP 양이 세포 증식과 밀접한 관련이 있으며, 이로 인해 세포주기 정지가 발생한 것으로 보았다(**도 4a 및 도 4b**). 형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cell sorting; FACS) 분석을 수행한 결과, 착물 1-Bn과 착물 2 처리 후 G2/M 단계에 있는 세포 군은 유의적으로 증가하였으며, G1 단계에 있는 세포 군은 감소하는 것이 확인되었다. **도 4c**는 HCT116 세포에서 착물 1-Bn 및 착물 2 처리 후 착물 1-Bn 및 착물 2에 대한 p-Erk, p53, p-chk2, p-cdc25C, p-cdc2, cyclin B1 및 B-actin의 Western blot 분석 결과를 나타낸다. 웨스턴 블롯 분석 결과 착물 1-Bn과 착물 2는 G2/M 주기 정지를 유발하는 유의미한 효과가 있는 것으로 확인되었다(**도 4c**). 착물 1-Bn과 착물 2로 처리된 세포에서는 인산화된 cdc25C 수준이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, p-ERK, p53, p-chk2, p-cdc2 및 cyclin B1의 수준이 증가하였다. 이는 착물 1-Bn과 착물 2가 G2/M 주기 정지를 유도한다는 것을 나타내는 결과로, G2/M 주기 정지와 관련된 분자의 변화를 보여주었다.

[0079] 이어서, 착물 1-Bn과 착물 2의 세포 사멸 신호 경로에 대한 효과를 조사했다(**도 4d 및 4e**). **도 4d**는 HCT116 세포에서 착물 1-Bn 및 착물 2를 24시간 처리한 후 흐름세포측정법을 사용한 자기 사멸 분석 결과를 나타낸다. **도 4e**는 HCT116 세포에서 착물 1-Bn 및 착물 2 처리 후 48시간 동안 Bak, Bad, Bim, Puma, 시토크롬 c, caspase-3, cleaved caspase-3, PARP, cleaved PARP 및 β-actin의 Western blot 분석 결과를 나타낸다. 아넥신 V(Annexin V)로 염색한 사멸 세포는 착물 1-Bn과 착물 2 경우 대조군에 비해 약 1.5배와 1.8배 증가되었다. 또한, 착물 1-Bn과 착물 2 처리 후 Puma, Bak, Bad, Bim, 시토크롬 c, cleaved caspase 3, cleaved PARP와 같은 프로-세포 사멸 단백질의 수준이 높아졌으며, 이는 아넥신 V 분석 결과와 일치했다. 이러한 결과들은 착물 1-Bn과 착물 2가 G2/M 주기 정지와 함께 세포 사멸을 통해 잠재적인 항암 효과를 가지고 있다는 것을 입증하였다.

[0081] **실시예 7. 착물 1-Bn과 착물 2의 체내에서 종양 성장 억제**

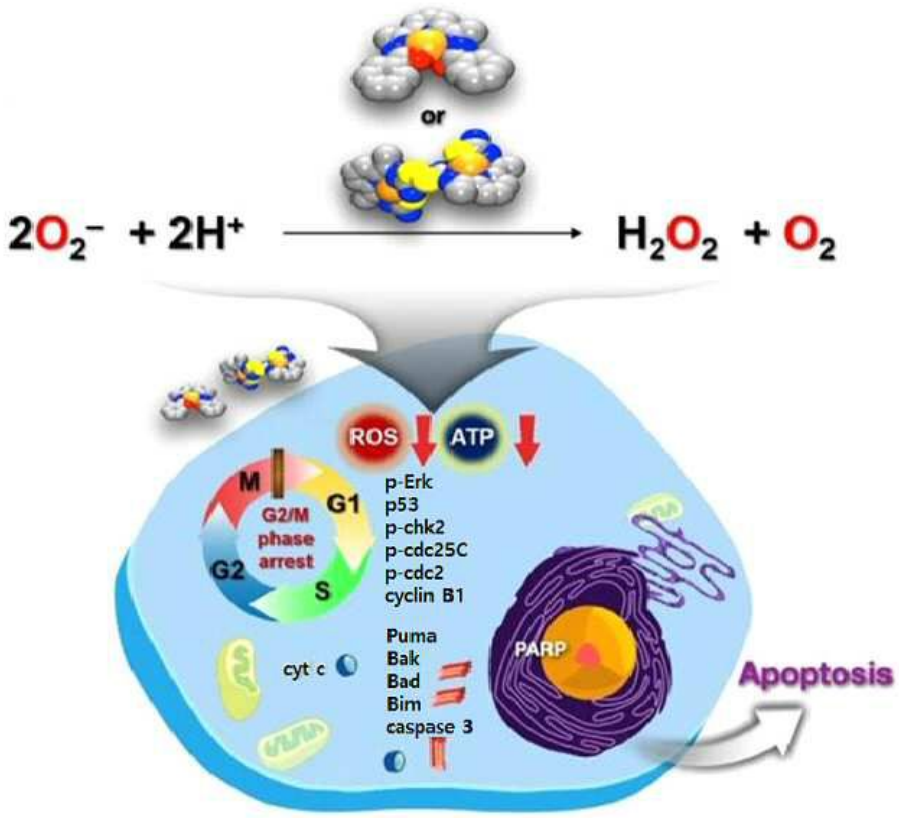
[0082] **도 5**는 체내 착물 1-Bn 및 착물 2의 처리에 의한 종양 성장 억제를 나타낸다. **도 5a**는 NOD/SCID/IL-2Rγnull (NSG) 마우스를 사용한 체내 대장암 항암 연구의 계획을 나타낸다. 증류수 대조군 및 착물 1-Bn, 착물 2가 복막내 주입으로 6회에 걸쳐 21일간 처리되었다. 본 실시예에서 착물 1-Bn과 착물 2의 항암 활성을 쥐 대장암 모델에서 조사했다. HT29 세포를 피하에 주사한 이식종 모델에 착물 1-Bn과 착물 2를 복강 내 주사로 2주 동안 총 6회 주입하였다(**도 5a**). **도 5b**는 9일부터 21일까지 총 6회의 종양 성장 배율(X)을 계산한 결과를 나타낸다. 착물 1-Bn과 착물 2 복강 내 주사 군에서 종양 성장이 대조군에 비해 유의적으로 2배 이상 감소된 것이 확인되었다(**도 5b**). 또한, **도 5c**는 21일에 측정한 체중, 종양 및 간 중량을 나타낸다. 종양 무게는 착물 1-Bn과 착물 2 군에서 효과적으로 감소되었으며, 간 무게는 영향받지 않았다(**도 5c**). 착물 1-Bn과 착물 2 주사 군에서 종양 성장 억제가 세포 사멸 신호 경로와 관련이 있는지 확인하기 위해, 이전에 체외 연구에서 관찰된 유사 단백집단의 발현을 조사했다. **도 5d**는 대조군, 착물 1-Bn 및 착물 2로 처리한 종양 조직에서 Puma, Bad, Bak, 시토크롬 c, caspase-3, cleaved caspase-3, PARP, cleaved PARP 및 β-actin에 대한 Western blot 분석 결과를 나타낸다. Puma, Bak, Bad, Bim, 시토크롬 c, cleaved caspase 3, cleaved PARP의 발현이 착물 1-Bn과 착물 2 주사 군에서 현저히 증가되었다(**도 5d**). 결과적으로, 착물 1-Bn과 착물 2가 세포 사멸을 통해 동일한 항암 효과를 가진다는 것이 확인되었다.

[0083] 합성된 SOD 구리 착물이 자유 라디칼 및 연쇄 반응에 대한 성공적인 보호 효과가 입증되었다. 이 착물들은 빠르고 효율적으로 세포 내 반응성 산소 종(예: 슈퍼옥사이드 이온)를 H_2O_2와 O_2로 불균등화시켜 줌으로써 세포 내 슈퍼옥사이드 라디칼을 강력하게 감소시킨다. 슈퍼옥사이드 라디칼을 감소시킴으로써, 구리 착물은 홀전자를 제거할 뿐만 아니라 세포 내 산화환원 균형을 파괴하고 세포 사멸 신호 경로를 유발하는 외적 요인으로서 역할을 한다.

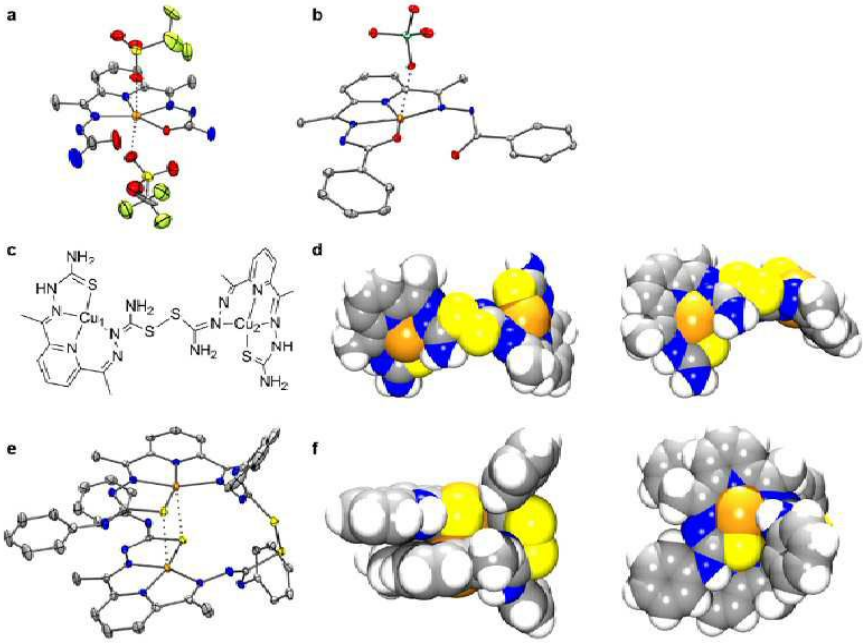
[0084] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

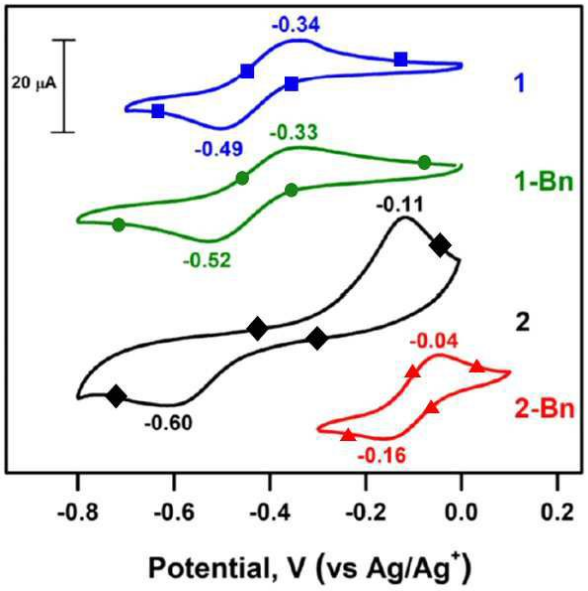
도면1



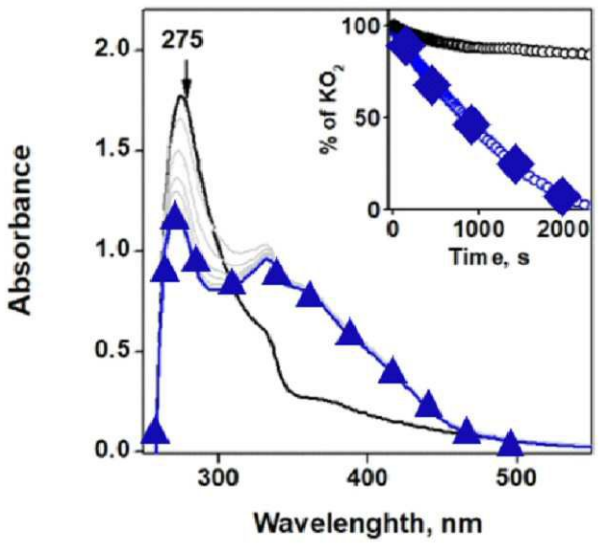
도면2


a
b
c
d
e
f

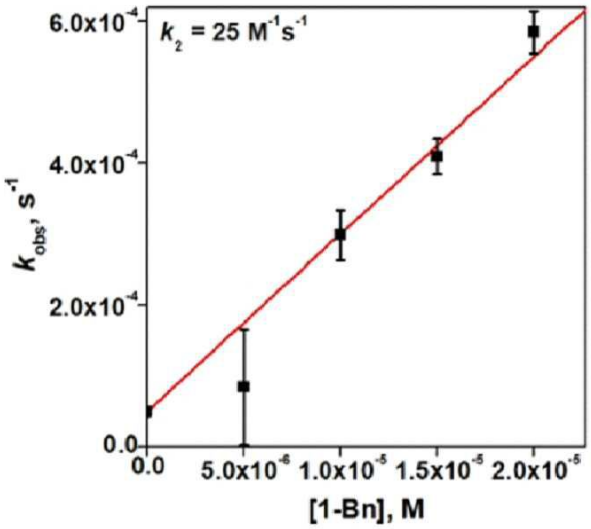
도면3a


20 μA
-0.34
1
-0.49
-0.33
1-Bn
-0.11
-0.52
2
-0.04
2-Bn
-0.60
-0.16
-0.8
-0.6
-0.4
-0.2
0.0
0.2
Potential, V (vs Ag/Ag+)

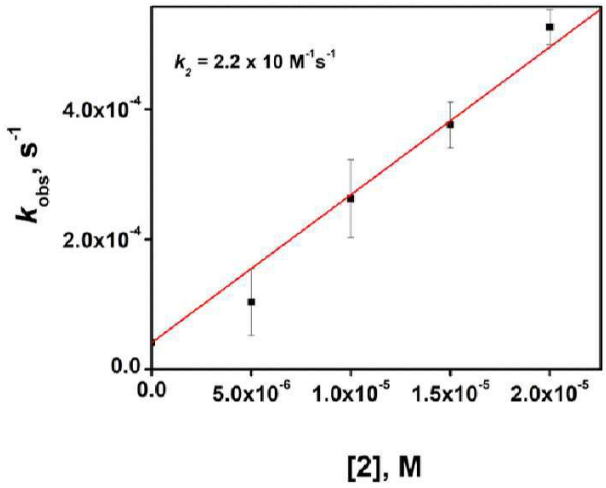
도면3b


275
Absorbance
Wavelenghth, nm
% of KO2
Time, s

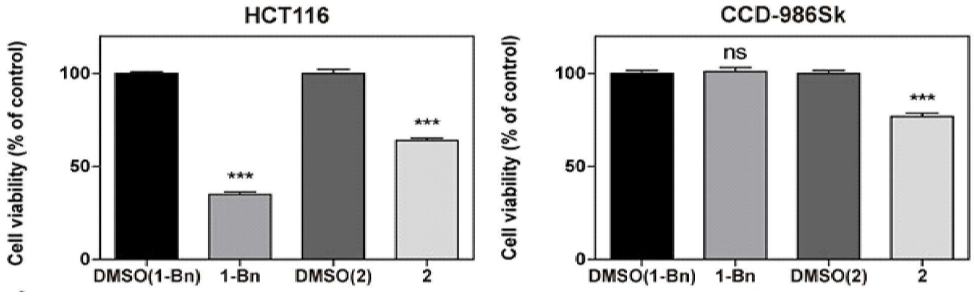
도면3c


k2 = 25 M-1s-1
kobs, s-1
[1-Bn], M

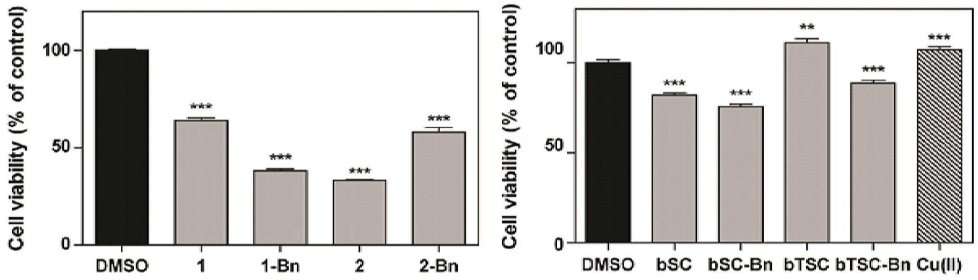
도면3d



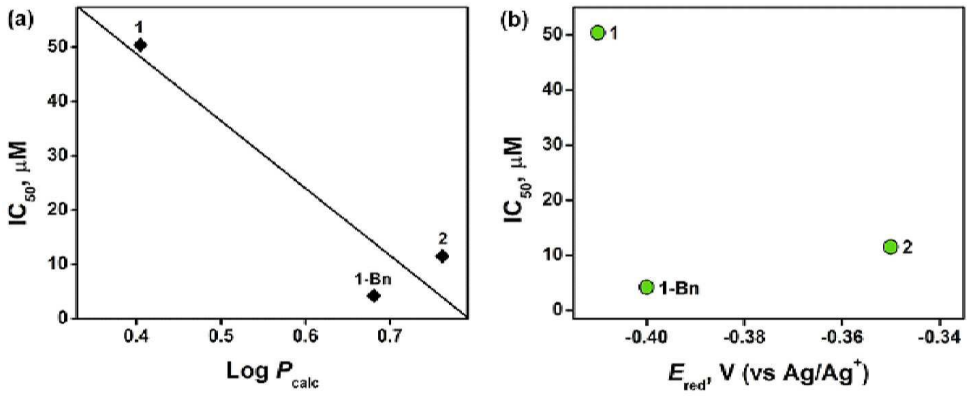
도면3e



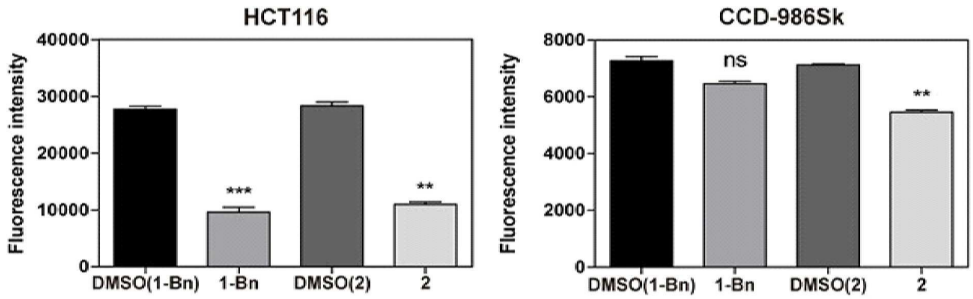
도면3f



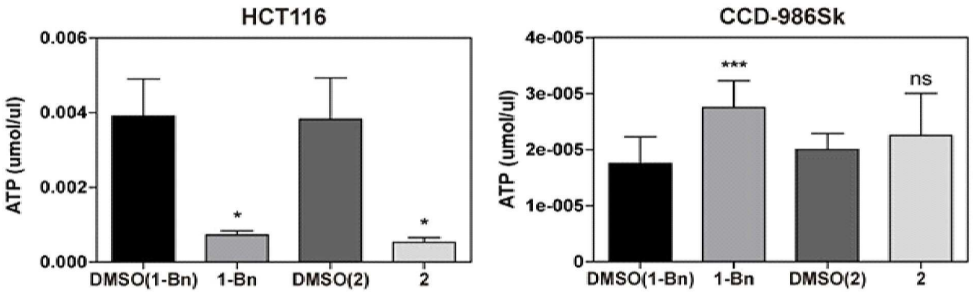
도면3g



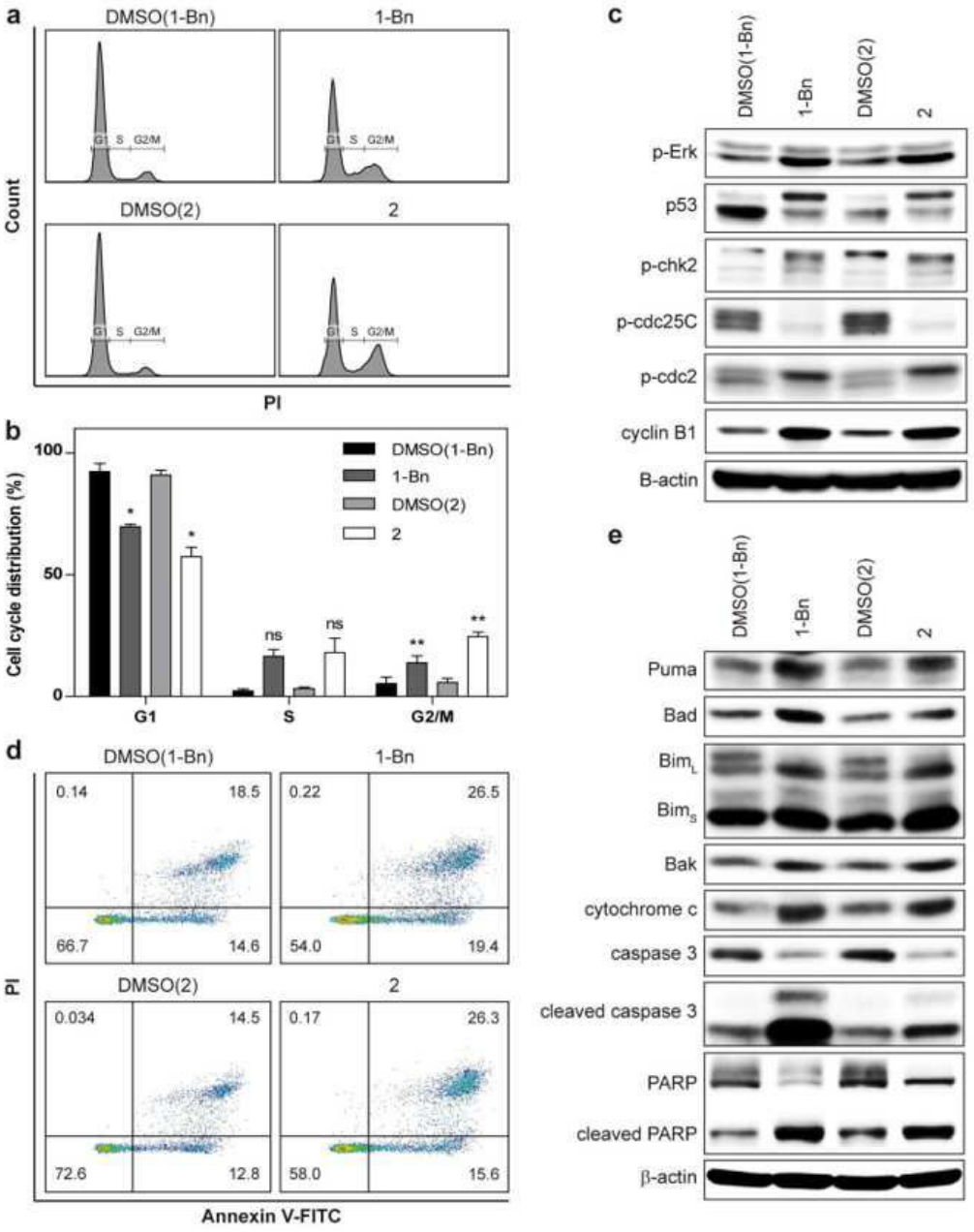
도면3h


HCT116
Fluorescence intensity
40000
30000
20000
10000
0
***
**
DMSO(1-Bn)
1-Bn
DMSO(2)
2
CCD-986Sk
Fluorescence intensity
8000
6000
4000
2000
0
ns
**
DMSO(1-Bn)
1-Bn
DMSO(2)
2

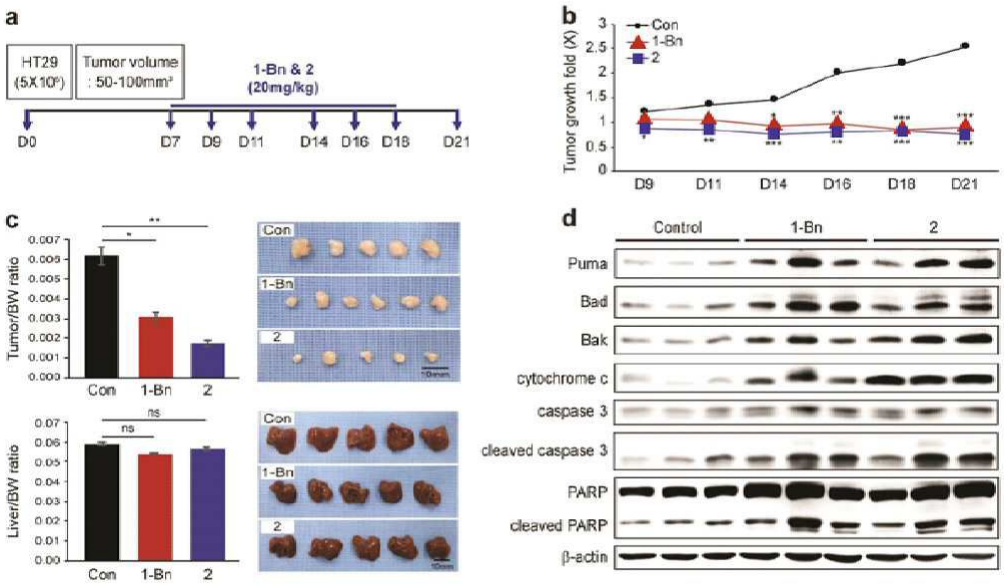
도면3i


HCT116
ATP (umol/ul)
0.006
0.004
0.002
0.000
*
*
DMSO(1-Bn)
1-Bn
DMSO(2)
2
CCD-986Sk
ATP (umol/ul)
4e-005
3e-005
2e-005
1e-005
0
***
ns
DMSO(1-Bn)
1-Bn
DMSO(2)
2

도면4


a
DMSO(1-Bn)
1-Bn
DMSO(2)
2
G1 S G2/M
Count
PI
b
Cell cycle distribution (%)
100
50
0
DMSO(1-Bn)
1-Bn
DMSO(2)
2
ns
ns
**
**
G1
S
G2/M
c
DMSO(1-Bn)
1-Bn
DMSO(2)
2
p-Erk
p53
p-chk2
p-cdc25C
p-cdc2
cyclin B1
B-actin
d
DMSO(1-Bn)
1-Bn
0.14
18.5
66.7
14.6
0.22
26.5
54.0
19.4
DMSO(2)
2
0.034
14.5
72.6
12.8
0.17
26.3
58.0
15.6
PI
Annexin V-FITC
e
DMSO(1-Bn)
1-Bn
DMSO(2)
2
Puma
Bad
Bim$_L$
Bim$_S$
Bak
cytochrome c
caspase 3
cleaved caspase 3
PARP
cleaved PARP
β-actin

도면5


a
HT29
(5X10⁶)
Tumor volume
: 50-100mm³
1-Bn & 2
(20mg/kg)
D0
D7
D9
D11
D14
D16
D18
D21
b
Con
1-Bn
2
Tumor growth fold (X)
D9
D11
D14
D16
D18
D21
c
Tumor/BW ratio
Con
1-Bn
2
Liver/BW ratio
ns
d
Control
1-Bn
2
Puma
Bad
Bak
cytochrome c
caspase 3
cleaved caspase 3
PARP
cleaved PARP
β-actin