

핵자기 공명법에 의한 항암제 Tallysomycin 금속착물 합성과 배위구조에 관한 연구

元 浩 植

한양대학교 이과대학 화학과
(1997. 12. 1 접수)

NMR Studies of Anticancer Drug Tallysomycin Metal Complexes and its Coordination Modes

Hoshik Won

Department of Chemistry, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea
(Received December 1, 1997)

요약. 항암제 금속착물(Metalloc-tallysomycin)은 특이한 암세포를 인식하고 비공유결합 형태로 DNA의 염기서열에 결합하여 서열을 균열시킨다. 금속착물의 기능을 이해하기 위해 금속결합 항암제 금속착물(Zn, Co-tallysomycin)를 합성하고 정제 하였다. 최적 pH 조건을 찾고 온도의존 NMR 실험을 시행하여 교환가능한 ¹H-NMR 신호를 지정하였다. 최근에 개발된 NERD(2D NOESY 1-1 echo)실험을 통하여 용액상에서의 착물의 결합양식과 구조에 관한 정보를 얻었다. β-aminoalanine, β-hydroxyhistidine, imidazole, 그리고 pyrimidine 고리의 질소원자들이 Zn(II) 이온과 결합하고 있으며, Co(III) 이온의 경우는 각각 1당량과 2당량의 tallysomycin과 결합할 수 있다는 사실이 밝혀졌다.

ABSTRACT. Metalloc-tallysomycin (an anticancer drug metal complex) recognizes specific tumor cell, and noncovalently binds to DNA base pair to cleave sequence. Anticancer drug metal complexes, zinc- and cobalt-binding tallysomycins, were synthesized and purified in order to understand the functions of metal complexes. Complete exchangeable ¹H-NMR signal assignment was accomplished by optimal pH- and temperature-dependent ¹H-NMR studies. In addition, a recently developed NERD (2D NOESY-1-1 echo) experiment gave a detail structural feature which is useful for NMR-based solution state determinatin of complex. Results exhibit that nitrogen atoms of β-aminoalanine, β-hydroxyhistidine, imidazole, and pyrimidine ring are the metal binding sites with a Zn(II) ion, whereas Co(III) ion can bind to one and two equivalent of tallysomycin, respectively.

서 론

Tallysomycin(TLM)은 항암제로 사용되고 있는 bleomycin(BLM)의 유도체로서 당과 펩타이드 그리고 몇개의 작용기로 이루어진 glycopeptide이다.¹⁻³ 이 TLM은 금속착물 형태로 DNA의 특정한 염기배열을 인식하고 비공유 결합형태로 결합하여 염기를 자탕하고 있는 당을 균열시킴으로써 암세포의 기능을 저지시킨다.^{1,4-8} 이런 관점에서 금속이온을 매개로 한 DNA 균열반응 메카니즘을 이해하고 치료를 목적으로 한 제약개발에 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 자연계에 존재하는 이 항암제를 분리 연구하고 재평가

함은 같은 기능을 가지는 제약을 개발 합성하는데 중요한 도구가 된다. BLM이나 TLM 착물의 일반적인 특징은 금속이온이 결합한 후 작용기의 역활로 인해 DNA 나선까지 운반되고 금속이온을 매개로하여 국부적으로 라디칼(산소분자 radical 또는 hydroxide radical)을 형성하여 DNA 균열을 활성화 시키는 것으로 알려져 왔다.

인디아 토양의 *Actinomycetes*에서 추출된 TLM은 BLM의 유도체(제 3세대 항암제)로 구조적인 특징을 살펴보면 Fig. 1의 tallysomicin-A(TLMA)에서 찾아 볼 수 있다. 주요 차이점은 bithiazole에 연결된 4-

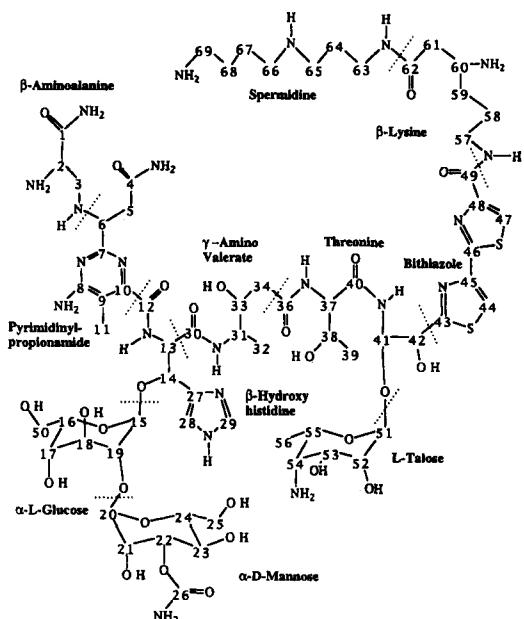


Fig. 1. Molecular structure of tallysomycin-A (TLMA) with functional group participating as metal binding sites.

amino-4,6-dideoxy-L-talose를 TLM이 더 소유하고 있고, 대신에 BLM은 γ -amino valerate기에 C34탄소 위치에 methyl기를 하나 더 소유하고 있다. 또한 본 연구에서 사용된 tallysomycin_{s10b}(TLM_{s10b})는 꼬리부분의 61번 탄소이하가 없는 것이다 특징이다. 구조상 첫 영역은 금속결합의 활성부위로서 pyrimidine, β -aminoalanine, 그리고 β -hydroxyhistidine으로 이루어져 있으며, 두번째 영역은 bithiazole과 꼬리부분(tail region)이고, 세번째 영역은 glucose와 mannose 잔기로서 각 영역들은 특수한 기능을 갖는다. Bleomycin의 두개의 당들 즉 glucose 및 carbamoyl기가 있는 mannose는 암세포를 선택하는 기능이 있고 bithiazole기는 DNA와 비공유 결합하는 기능이 있다고 알려져 왔다. Bithiazole과 꼬리 부분에 의한 결합의 의미는 공유결합 형태보다는 정전기적인 작용에 의하여 DNA의 염기쌍 helix외각에 intercalation한다는 사실이 더 우세적이다. TLM은 BLM과 같이 구조상 그리고 기능상 DNA 균열작용을 가지고 있어 최근에 치료목적으로 이용되기 시작하였다. BLM에 의한 DNA 결합-균열 메카니즘이 확실하게 알려지지 않고 있지만 이 두종류의 제약이 비슷하게 작용할 것이라 믿어지고 있다. 더욱기 이들은 금속착물(metallo-

BLM/TLM)을 형성할때 분자의 제 1영역으로부터 질소주체 리간드를 받아 유사한 분자기하 구조를 이루는 금속이온 결합 motif를 가지고 있다.^{9~10}

이 항암제들의 금속착물 형태가 DNA균열에 참여한다는 사실은 최근 발견됨에 따라 metallo-BLM/TLM(Fe, Co, Ni, Cu, Zn-BLM/TLM)을 폭넓게 연구하게 되었다.¹ 특히 Fe-BLM은 생체내에서 활성이 있어 주목을 받아 왔고 Co-BLM은 ⁵⁷Co의 운반체로 암세포의 위치를 진단하는 도구로 사용될 가능성이 있어 최근 주목을 받기 시작하였다.¹¹ Iron착물의 활성에 비하여 Cobalt착물은 빛의 유도에 의해 DNA를 균열시키는 있다는 사실이 최근 증명되었다.^{12~13}

입체적으로 금속착물이 어떻게 DNA염기 배열과 상호작용(intercalation or wrapping)하여 이와같은 결과를 주는지 구조적 연구결과는 매우 미흡한 편이다.¹ 분자 수준에서 항암제의 3차원적 구조는 금속이온을 매개로한 DNA균열 메카니즘을 확립하는데 필수적이다. 또한 분광학적인 방법에 의해 리간드 BLM/TLM의 결합양식을 예측하는데 있어서 합리적인 방안을 확립하는데 도움이 된다. 그러나 X-ray에 의한 구조연구를 할만한 단결정을 얻는데 어려움이 있어 구조적인 연구가 매우 부족하여 모델을 합성하거나 부분적으로 다른 분광학적인 방법에 의해 금속착물에 관하여 연구가 진행되고 있다.

X-ray 결정학 연구에 적합한 단결정이 아직 얻어지지 않고 있어 정확한 구조에 관한 정보가 미흡하였는데 구조분석이 핵자기 공명법에 의해 착물에 대해 구조연구가 실행되었다. 구조에 관한 연구는 착물형태가 DNA의 염기배열에 도달하여 금속이온을 매개로 염기배열을 지지하고 있는 당의 균열에 관한 이해를 증진시키는데 매우 중요한 역할을 한다. NMR방법에 의한 액상구조 연구는 원래 긴 범위의 쌍극자 상호작용(long range dipolar interaction)¹⁴이 있는 생체 거대분자에만 국한되어 있던 방법인데 최근 방법이 비교적 분자량(MW=1000 dalton)이 작은 분자구조 결정에 대해 사용함으로서 확장 개발되었다.¹⁴ 액상 구조결정의 작업으로, 동핵 ¹H-¹H 상호연관 실험법을 사용하여 ¹H NMR signal이 결정되었으며 TLM과 Zn, Co 금속이온사이의 결합양식에 관한 정보를 얻었다. 정제된 착물에 대해 최적 온도 및 pH 조건을 찾음으로써 교환 ¹H-NMR 신호들을 완전하게 지정하였다. 최근개발된 2D-NMR 방법중의 하나

인 NERD(NOESY 1-1 echo) 실험을 실행하여 착물의 액상구조를 구할 수 있도록 입체적인 연구가 진행되었다.

착물합성 및 NMR 실험

Tallysomycin의 분리정제. 연구에서 사용한 리간드 Tallysomycin-A(TLM-A)와 Tallysomycin_{s10b}(TLM_{s10b})는 Bristol Myer사에서 구입하고 분리정제하여 사용하였다. 10 mg의 TLM 유도체들과 100 mg의 mannitol 및 기타 함유물이 들어 있는 Blenoxane과 0.01 M NaCl과 TLM을 약산성 CM Sephadex C-25 column(1×10 cm)에 주입함으로써 분리하였다. Mannitol은 0.01 M NaCl 용액으로 column에서 씻어내었고, TLM은 16 mL, 3 M NaCl 용액을 흘려줌으로써 분리시켰다. 회전 증발기를 이용하여 수용액상의 TLM/NaCl 부피를 1 mL 감소시켰다. Sephadex G-10 column상에서 H₂O(deionized water)를 용리시킴으로써 탈 염화시된 TLM을 얻었다. 용리액을 약 4 mL정도로 부피를 줄인후 냉동건조 시켰다. 얻어진 TLM시약은 약간의 옅은 노란색을 띤다.

ZnTLMa착물 합성. ZnCl₂ 표준용액은 ZnCl₂·6H₂O(Aldrich, 순도 99.98%)를 HPLC용 H₂O에 녹인 후 표준 EDTA(0.1 M)용액으로 적정함으로써 준비되었다. 물의 양을 최소화하기 위해 동결건조 시킨 후 D₂O에 녹인 ZnCl₂ 표준용액은 micro-syringe로 tallysomycin-A와 당량반응을 시켰다. 반응성의 정도는 H₂O 및 D₂O에서 각각 REDFIELD NMR 실험을 이용하여 추적되었다. 착물형성은 pH 6.5와 pH 7.0의 범위에서 이루어 졌으며 리간드의 착물형성시 발생되는 pH값의 강하는 NaOD(혹은 DNO₃)로 연속적으로 조절되었다. 최종 sample의 농도는 2.5 mM의 것을 NMR 실험에 사용하였다.

Co(III)-TLM_{s10b} 및 Co(III)-(TLM_{s10b})₂ 착물 형성.

2.3793 g의 CoCl₂·6H₂O 를 Mettler 분석저울(정확도 1/1000 mg)로 칭량하여 0.1 M CoCl₂(pH 4.7) 수용액이 되도록 100 mL volumetric flask에 녹였다. 표준화된 EDTA를 이용하여 정확한 농도를 결정하였다. 자동 피펫으로 TLM 2.5~5.0 m mole 정도를 농도가 알려진 stock 용액(ca. 17 mM to 3 mM)에서 5 mL flask에 분취하였다. 용액의 pH를 6.8~7.2 정도로 묽은 NaOH로 조절하였다. TLM농도의 95%에 해

당되는 0.1 M CoCl₂ 용액을 25 mL 주사기를 이용하여 가하였다. 용액의 pH는 빠르게 내려가는데 pH를 6.8~7.2 정도로 재조정하고 pH변화에 요동이 없을 때 까지 묽은 NaOH로 조정하였다. 이때 용액의 색깔은 무색에서 yellow-brown으로 변한다. Co(III)의 산화를 위해 용액을 24~48시간 정도 공기와 접촉할 수 있도록 용기를 열어두고, 강렬하게 저어주면서 방치하였다. pH는 매우 서서히 6시간 정도 연속해서 강하한다. 이시간 동안 주기적으로 pH를 묽은 NaOH로 재조정하여 7.0을 유지하였다. pH변화가 밤새 방치해도 변화가 없는, 이때를 반응이 종결되었다고 보았다. 용액을 동결건조 시키고 0.5 mL 99.98% D₂O에 녹인후 반복해서 전조시켜 사용하였다. ¹H-NMR로 Mono-TLMCo, Co(III)-TLM_{s10b}이 합성되었는지 확인하였고 최종 3.2 mM 농도를 NMR 실험에 사용하였다. 전조된 가루는 초록색이며 용액상에서는 yellow-brown 색을 띤다.

위와 유사한 방법으로 BisTLMCo, Co(III)-(TLM_{s10b})₂를 합성하였다. 농도를 알고 있는 TLM용액에서 자동밸류트으로 5.0 또는 10.0 mmole의 TLM을 분취하여 5 mL flask에 담그고 용액의 pH를 6.8~7.2 정도로 묽은 NaOH로 조절하였다. TLM농도의 50%에 해당되는 0.1 M CoCl₂ 용액을 25 mL 주사기를 이용하여 취한후 매 30분마다 10회에 걸쳐 5%씩 가하였다. 용액은 강렬하게 저어주며 CoCl₂를 매번 가할 때마다 pH 값을 묽은 NaOH로 조절하였다. 용기를 공기중에 열어두며 강력하게 저어주면서 12~24시간 정도 방치하였다. pH 값은 연속해서 3시간 정도 걸쳐 서서히 내려가는데 주기적으로 pH를 7.0 정도로 재조정하였다. 밤새 방치하면 pH 변화가 없는데 이때 반응이 종결되었다고 보았다. 용액은 동결 전조시키며 0.5 mL 99.98% D₂O에 녹인후 동결건조를 반복하였다. NMR 실험에 사용한 시료의 농도는 2.5 mM을 사용하였다. MonoTLMCo과 같이 시료는 가루상태에서 푸른색을 띠나 용액에서는 yellow-brown-green 색을 띤다.

온도 및 pH의존 NMR 실험. 표준금속이온 Zn(II)(ZnCl₂ 표준용액)과 표준금속이온 Co(II)(CoCl₂ 표준용액)과 TLM과 착물합성은 Redfield NMR 실험법(H₂O NMR)을 사용하여 반응정도를 확인하였다. 착물 형성정도에 관한 ¹H-NMR 실험은 Nicolet NT-360 MHz spectrometer로 실행되었으며, NMR 실험의 변수는 16 K의 data점과 0.5 Hz의 line broaden-

ing, 32 scan이 각각 사용되었다. 최적 온도 및 pH 조건 실험은 H_2O -NMR 실험을 통하여 이루어졌다. H_2O (95%)/ D_2O (5%)의 용매 조건하에서 pH =(4.5-6.7) 그리고 온도는 T =(1-50) $^{\circ}C$ 범위에서 각각 sodium trimethylsilyl propionate(TSP) 내부 기준신호를 이용하였다. 교환 1H -NMR 신호지정을 위해 최근 개발된 NERD 실험을 GE GN-500MHz와 GE Ω -600 MHz NMR spectrometer를 이용하여 실행하였다. NMR data 프로세스를 위하여 Silicon Graphic사의 Indigo 워크스테이션과 FELIXTM을 각각 사용하였다. 1 $^{\circ}C$ 에서 물의 공명은 5.01 ppm으로 지정되었으며 data를 얻는동안 H_2O 신호제거(presaturation)를 decoupler를 사용하지 않았다. 스펙트럼은 8,000 Hz의 원도우에 4 k의 data점 256회수의 t1증가가 사용되었다. 순수한 리간드 및 합성 정제된 금속 치물들을 이차원적 해자기 공명법(2D-NMR) 중 1H - 1H 동핵상호관련 분광법인 Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy(NOESY)를 이용하였다. NOESY 분광법은 분자내의 1H 과 1H 사이의 공간을 통한 이중쌍극자의 이완작용(dipolar relaxation)에 기인한 실험법으로 1H - 1H 쌍들 사이에 떨어져 있는 거리의 정보(through space connectivity)를 얻을 수 있었다. NOESY 실험을 H_2O 에서 확장 실행하여 금속착물의 분자내에서 화학적으로 치환(chemical exchange)될 수 있는 수소쌍(1H - 1H)들의 상호거리 정보를 얻어내었다. H_2O 에서 실험을 수행하기 위하여 최근에 이목적을 위하여 개발된 NMR Pulse Sequence(NERD)를 사용하였다. 이 방법은 기존의 NOESY-1-1-echo spectra에서 볼수 있는 radiation damping으로 인한 NMR 기계의 digitizer가 overflow되는 경우가 생기는 것을 제거하기 위하여 부가적으로 90 $^{\circ}$ pulse 및 phase cycle을 첨가한 방법으로 H_2O NMR 실험방법에 적절하다.¹⁵

실험결과

동핵 1H - 1H 상호연관 실험법을 사용하여 1H -NMR signal이 지정되었으며 TLMA와 zinc사이의 결합양식에 관한 정보가 얻어졌다. 정제된 치물에 대해 최적 온도 및 pH 조건을 얻음으로써 교환 1H -NMR 신호들을 완전하게 지정하였다. 최근 개발된 2D-NMR 방법 중의 하나인 NERD(NOESY 1-1 echo) 실험을 실행하여 치물의 액상구조를 구할 수 있도록 입체적인 연구

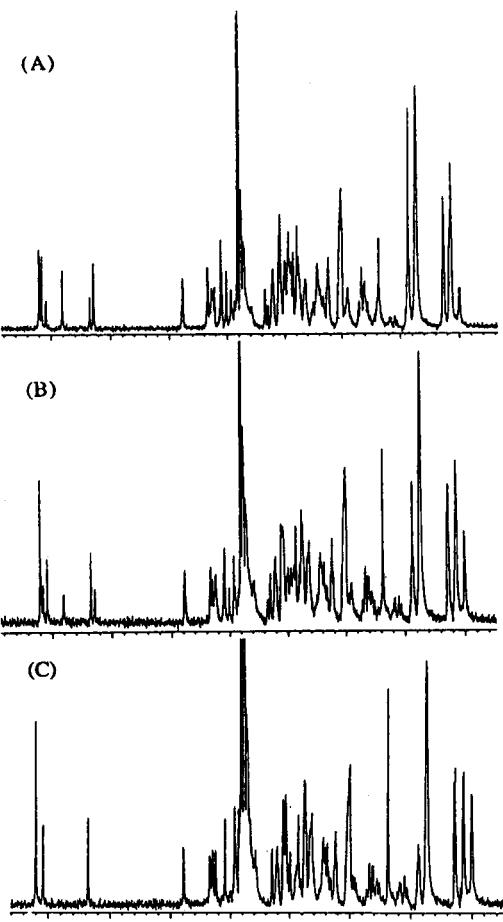


Fig. 2. Degree of complexation between Zn ion and talysomycin-A monitored by microtitration and 1H -NMR experiment in a finger print of 7.3-8.3 ppm. Two peaks 7.3 ppm (H28) and 7.8 ppm (H29) of TLMA is subject to move to 7.4 ppm and 8.1 ppm after complexation, respectively. Symbol A stands for the spectra after adding 0.33 equivalent of $ZnCl_2$ into metal-free TLMA. Symbol B and C exhibit the spectra after adding 0.67 equivalent of Zn to TLMA, and 1 equivalent into TLMA, respectively.

가 진행되었다. Fig. 2는 치물형성의 정도를 추적한 실험으로 반응전 free-TLMA의 imidazole고리의 세개의 1H -NMR 신호 H28(7.3 ppm), H29(7.8 ppm)이 반응 정도를 나타내는 지문을 보여준다. 그럼에서 기호 A (0.33 당량의 금속이온이 적정된 경우, 33% 치물형성), B(67% 치물형성), C(100% 치물 형성)는 반응의 정도를 나타낸다.

Fig. 3은 최적 온도 및 pH 조건을 찾는 과정을 나

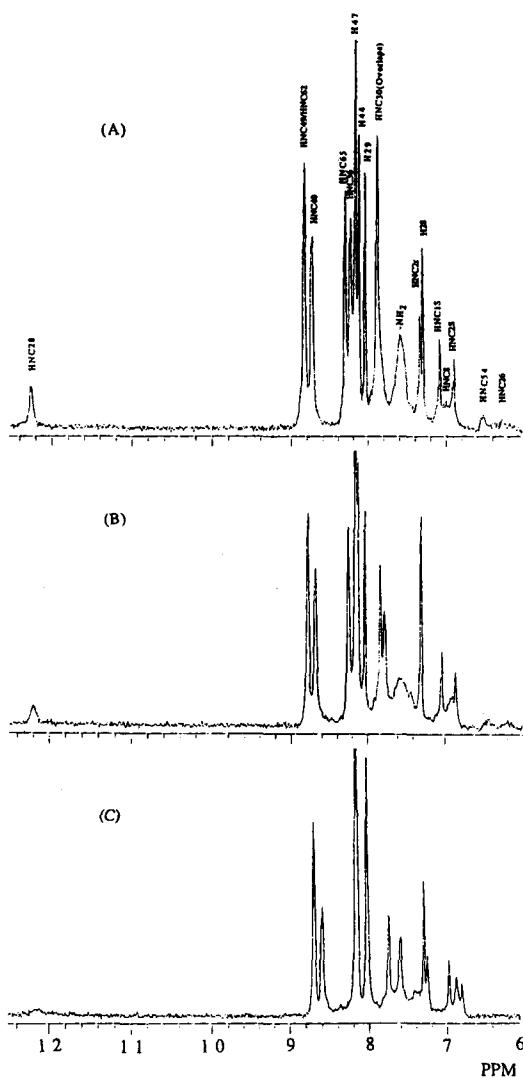


Fig. 3. Optimal pH and temperature condition for the exchangeable ^1H -NMR signal assignment. Spectra obtained in water NMR experiment (95% H_2O and 5% D_2O) exhibit that pH=4.5 and temperature 1°C is appropriate enough to assign NMR signal. Symbol A, B, and C stand for ^1H -NMR spectra recorded at 1°C, 15°C, and 25°C, respectively.

타내었다. $\text{H}_2\text{O}(95\%)/\text{D}_2\text{O}(5\%)$ 의 용매 조건 및 2.5 mM sample 농도 조건하에서 교환 ^1H -NMR 신호의 경우 pH=(4.5~6.7) 범위에서 pH가 낮을수록 교환시간이 늦어짐으로써 NMR 신호가 더 잘 관측되며 그리고 온도는 $T=(1\sim 50)$ °C 범위에서 실험을 실행한 결과 낮은 온도에서 최적 조건임을 알 수 있었다.

pH 값이 4.5 보다 더 낮아지는 경우 착물이 서서히 분해되는 것이 관측되었다. 기호 A, B, C는 각각 pH 4.5 조건에서 온도가 1°C, 15°C, 25°C일 때 NMR 실험을 행한 것으로 1°C인 경우 교환되는 NH신호가 잘분리되며 온도가 낮아짐에 따라 12.2 ppm의 HNC28 피크가 점점 커짐을 알 수 있다. 2D NOESY 실험의 1D-spectra와 NERD 펄스 sequence를 나타낸다. 주어진 펄스 서열은 $[90^\circ_{\text{x}}, -90^\circ_{\text{x}} - \Delta_1 - 90^\circ_{\text{y}} - (2\tau + \delta) - 90^\circ_{\text{y}} - \Delta_2]$ 로서 얻어지는 NH 신호를 최대화하기 위하여 다음 파라미터값($\tau=65\ \mu\text{s}$, $d\delta=10\ \mu\text{s}$, $\Delta_1=142\ \mu\text{s}$, $\Delta_2=112\ \mu\text{s}$)을 사용하였고 50 ms의 homospoil 펄스와 512/2047 Z-gradient가 NOE 혼합시간동안 사용되었다. 실험결과 200 ms의 혼합시간 착물실험에 적당함을 알 수 있었다. 이 실험으로서 배위구조 정보에 유용한 교환 ^1H -NMR 신호들을 완전하게 지정할 수 있었다. Fig. 4에 5.5 ppm에서 9.8 ppm영역의 교환 가능한 수소와 인접수소들과의 공간을 통한 쌍극자 이완 연결을 나타내었다. NMR 실험중 field gradient를 이용하여 HOD 피크를 제거하면 이와 더불어 NOE 정보가 소실되는데, 본 NERD 방법을 통하여 효과적으로 교환 가능 수소들의 신호를 지정하고, 공간적인 연결 정보를, 그리고 착물의 배

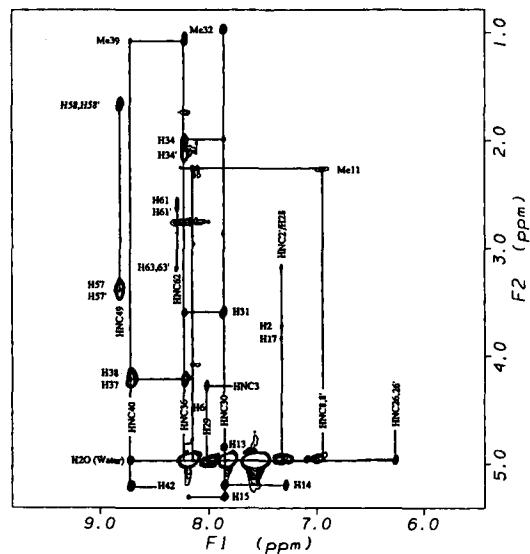


Fig. 4. Portion of 2D NOE11 spectrum of ZnTLMA indicating dipolar connectivity between exchangeable protons attached to nitrogens and protons attached to carbon atoms. Spectrum in the range of 5.5~9.8 ppm are recorded at 200 ms mixing period.

Table 1. Comparison of $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of ZnTLMA for the metal-binding sites recorded at 22°C and pH 6.7

$^1\text{H-Signal}$	TLMA	Zn-TLMA	$^1\text{(TLMA-ZnTLMA)}$
H2	4.04	3.73	+0.31 ppm
H3	2.95	2.43	+0.52 ppm
H3'	2.99	3.35	-0.36 ppm
H5	2.62	2.85	-0.21 ppm
H5'	2.72	3.30	-0.48 ppm
Me11	1.91	2.23	-0.32 ppm
H13	5.14	4.84	+0.30 ppm
H14	5.28	5.20	+0.08 ppm
H22	4.77	4.00	+0.77 ppm
H28	7.35	7.40	-0.05 ppm
H29	7.87	8.07	-0.20 ppm

위 형태에 관한 금속결합 위치를 알 아낼 수 있었다.

금속이온과 리간드사이의 착물이 형성됨에 따라 결합부위의 $^1\text{H-NMR}$ 신호가 이동하는데 이는 착물의 결합배위에 관한 중요한 정보를 제공하여 준다. Zn-TLMA 착물의 금속결합 부위인 β -aminoalanine, β -hydroxyhistidine, imidazole, 그리고 pyrimidine 고리의 인접 수소들에 대한 화학적이동 변화값을 Table 1에 요

약하여 보았다.

항암제 tallysomycin_{s10b}를 이용하여 두개의 TLM이 리간드로서 Co(III)와 결합하는 Co(III)-(TLM)₂의 새로운 착물이 형성되는 것을 1D $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 확인하였다. 그러나 이 화합물이 생체 활성이 있는지 구체적으로 분광학적 방법에 의한 연구가 아직 진행되지 않았다. ^{57}Co 의 암세포 진단목적 뿐만 아니라 두분자의 항암제를 DNA의 염기배열로 운반되기 때문에 효과적으로 암세포 DNA균열을 기대할 수 있다. Fig. 5는 새로운 착물 Co(III)-(TLM)₂에 대한 $^1\text{H-NMR}$ spectrum으로 스펙트럼의 지문으로서 upfield(0.8-1.4 ppm) 영역에서 3개의 methyl기가 두 종류의 다른 환경 즉 6개의 peaks를 보여준다. 미반응(ca 5% of metal free TLM) 상태의 methyl기가 주는 peak들은 1.3-1.5 ppm에서 확인할수 있다. 또한 downfield(7.6-8.7 ppm) 영역에서 방향족 peak들에 관한 두종류의 지문을 확인할 수 있다. 미반응(ca 5% of metal free TLM) 상태의 H28, H29, H44, H47 peak들이 7.3, 7.8, 8.2, 8.3 ppm에서 얻어지며, Co 이온과 결합한 $^1\text{H-NMR}$ 신호들이 이중으로 분열된 형태로 7.65, 8.63, 8.15, 8.25 ppm(Fig. 5에 표시됨)에

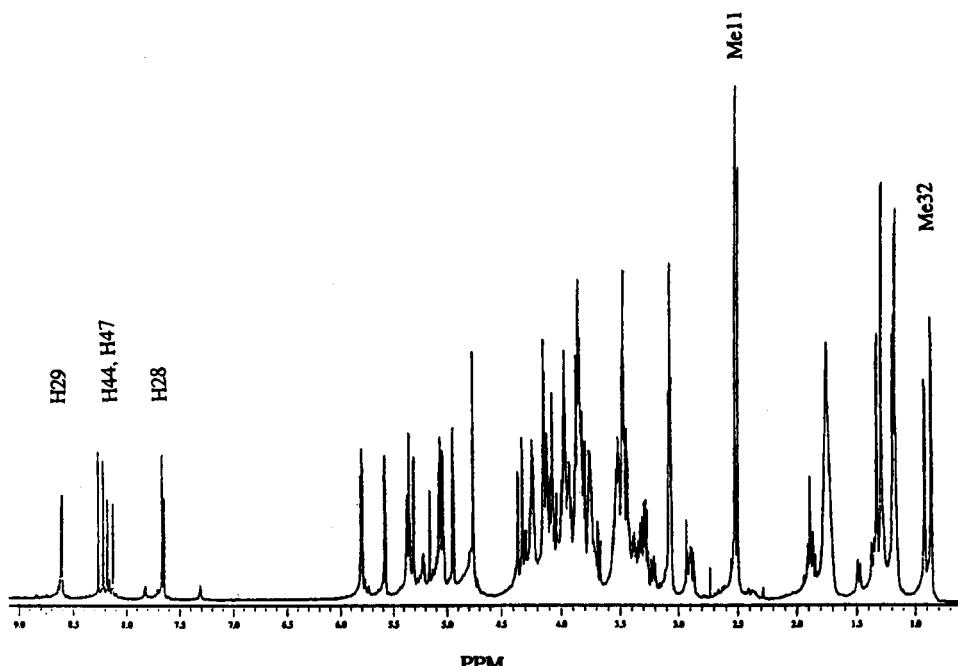


Fig. 5. $^1\text{H-NMR}$ spectra of Co(III)-(TLM)_{s10b}₂ indicating a finger print of dimer formation. Some folded peaks for H28, H29, H44, H47, and Me32 $^1\text{H-NMR}$ peaks appeared at 7.65, 8.63, 8.15, 8.25, and 1.32 ppm are labeled, respectively.

서 각각 얻어지는데, 이 지문들은 환경이 다른 TLM이 Co 이온과 착물을 형성할 때 나타내는 신호로 해석된다.

결론 및 토론

그동안 많은 연구에서¹ 금속결합 BLM/TLM 착물의 합성방법은 리간드에 같은 당량의 금속이온과 첨가하고 HPLC로 분리정제하는 방법을 많이 이용하였으나 과정중의 리간드의 손실과 부산물이 많이 생성되어 방법적으로 좋지 않았다. 그러나 본 연구결과에서는 마이크로 주사기를 이용한 적정법과 NMR을 이용하여 착물의 형성과정을 추적함으로써 합성법에 있어서 좋은 결과를 할 수 있다. Metallo-BLM/TLM의 연구에 있어서 가장 중요한 점은 과량의 리간드를 확보하는 것이라 할 수 있는데 사용된 분리 방법을 이용하면 대량의 BLM/TLM를 항암제에서 분리할 수 있다.

Takita 및 그의 공동연구자들이 처음 BLM의 모델로서 사각뿔 형태의 Cu-함유의 착물(Cu-P-3A)을 처음 합성하여 metallo-bleomycin 착물형성시 리간드 결합부위를 예상하였다. 실험결과 모델착물과 같은 형태인 β -aminoalanine, β -hydroxyhistidine, imidazole, and pyrimidine 고리의 질소주기 리간드가 금속이온과 결합함을 알 수 있었다. 온도의존 NMR 실험 결과 Zn-TLMA는 sample이 열지 않는 범위에서 1°C까지 내렸을 때 수소들의 H/D-교환속도가 저하되어 $^1\text{H-NMR}$ 관측이 용이하였다. 특히 낮은 pH(pH~2)와 높은 pH(>10.0) 범위에서 tallysomycin의 구조적인 변형이 발생하는데 tallysomycin의 pK_a 값들을 고려하고 pH의존 NMR 실험을 시행한 결과 낮은 pH(4.5)에서 착물의 구조적인 변형이 되지 않으며 protonation이 잘되어 교환수소의 교환속도가 낮아지므로 효과적인 $^1\text{H-NMR}$ 신호를 얻을 수 있었다. NMR 장비에서 field gradient장치가 창착되어 있지 않은 경우 새로 개발된 펄스서열을 응용하여 효과적인 water 실험결과를 얻을 수 있었다. 또한 특정 금속이온과 두 개의 TLM 리간드가 결합하는 사례가 구체적으로 밝혀지지 못하였는데 micro-syringe 적정법에 의하여 이합체 Co(III)-(TLM)₂를 합성하였고 다양한 동력 및 이해관련 이차원 NMR 실험결과와 distance

geometry/molecular dynamics를 이용하여 배위결합 형태 및 용액상 3차원 구조를 결정하고 있다.

한국과학재단의 지원(941-0300-036-2)과 NMR 실험을 하도록 도와주신 Emory 대학교 화학과 Marzilli 교수님께 감사를 드립니다.

인용 문헌

1. Stubbe, J.; Kozarich, J. W. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1107.
2. Barton, J. K.; Raphael, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2466.
3. Kross, J.; Henner, W. D.; Hecht, S. M.; Haseltine, W. *Biochemistry* **1982**, *21*, 4310.
4. Umezawa, H.; Takita, T.; Sugiura, Y.; Otsuka, M.; Kobayashi, S.; Ohno, M. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *40*, 501.
5. Oppenheimer, N. J.; Rodrigues, L. O.; Hecht, S. M. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3439.
6. Kross, J.; Henner, W. D.; Haseltine, W.; Rodriguez, L.; Levin, M. D.; Hecht, S. M. *Biochemistry* **1982**, *21*, 3711.
7. Takita, T.; Umezawa, Y.; Saito, S. -I.; Morishima, H.; Naganawa, H.; Umezawa, H.; Tsuchiya, T.; Miyake, T.; Kageyama, S.; Umezawa, S.; Muraoka, Y.; Suzuki, M.; Otsuka, M.; Narita, M.; Kobayashi, S.; Ohno, M. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *23*, 521.
8. Strong, J. E.; Crooke, S. T. *Cancer Research* **1978**, *38*, 3322.
9. Vos, C. M.; Westera, G.; VanZanten, B. *J. Inorg. Biochem.* **1908**, *12*, 45.
10. Dabrowiak, J. C.; Greenaway, F. T. *Organic Magnetic Resonance* **1980**, *13*, 270.
11. Hou, D. -Y.; Hoch, H.; Johnston, G. S.; Tsou, K. C.; Jones, A. E.; Miller, E. E.; Larson, S. M. *J. Surgical Oncology* **1984**, *27*, 189.
12. Saito, I.; Morii, T.; Sugiyama, H.; Matsuura, T.; Meares, C. F.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2307.
13. Chang, C. H.; Meares, C. F. *Biochemistry* **1982**, *21*, 6332.
14. Won, H.; Olson, K. D.; Wolfe, R. S.; Kratky, C.; Hare, D. R.; Summers, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6880.
15. Blake, P. R.; Summers, M. P. *J. Mag. Reson.* **1990**, *86*, 622.