



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0134974
(43) 공개일자 2022년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07F 15/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07F 15/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0040334

(22) 출원일자 2021년03월29일

심사청구일자 2021년03월29일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

재단법인대구경북과학기술원

대구 달성군 현풍읍 테크노중앙대로 333

(72) 발명자

조재홍

대구광역시 수성구 범어천로 200, 201동 905호 (범어동, 월드메르디앙 웨스턴 카운티)

권남

전라북도 익산시 평동로 530-7, 201동 1302호 (평화동, 클래식아파트)

(74) 대리인

김종선, 이형석

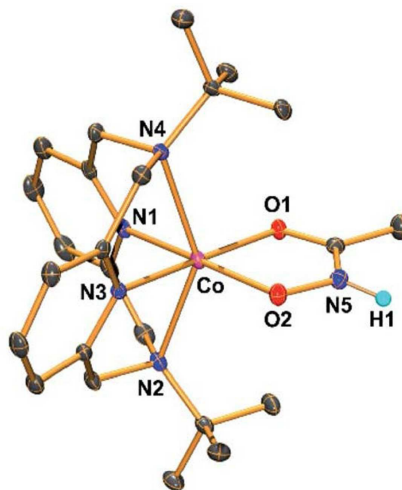
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 하이드록사메이트 결합 코발트 복합체 및 이의 전환 방법

(57) 요약

본 발명은 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체 및 이의 전환 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 프로드러그 전달 반응에서 환원된 중간단계 물질인 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체 및 상기 전달 반응에서 하이드록사메이트가 전달되는 반응 메커니즘에 따른 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법에 관한 것이다. 상술한 바에 따른 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체는 프로드러그 전달 반응에서 환원된 중간단계 물질로써 암세포에서 과발현되는 매트릭스 메탈로프로테나아제의 활성을 억제할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111745
과제번호	2019R1A2C2086249
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	생체모사체를 통한 금속 효소의 탈포밀화 반응 연구
기 여 율	1/3
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103762
과제번호	2016M3D3A1A01913243
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	Heme 효소 활성자리 모사/개량을 통한 고효율 메탄 전환 촉매 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111268
과제번호	2018R1A5A1025511
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	자성기반 라이프케어 연구센터
기 여 율	1/3
과제수행기관명	대구경북과학기술원
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

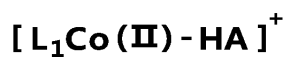
명세서

청구범위

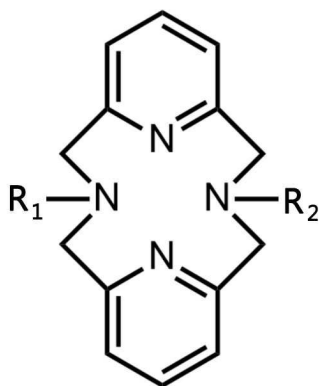
청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

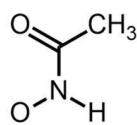


상기 L_1 은

이고,

상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 치환 또는 비치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{6-10} 의 아릴이고,

여기서, 상기 치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 치환된 C_{6-10} 의 아릴은 할로젠, -OH, -CN, -NO₂, C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 및 C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 C_{6-10} 의 아릴이고,



상기 HA는 이다.)

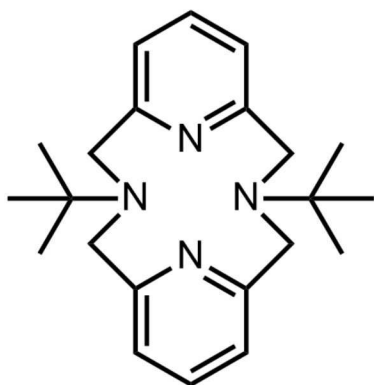
청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 t-부틸 또는 사이클로헥실인 것을 특징으로 하는, 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,



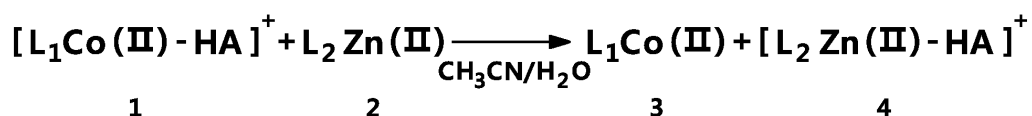
상기 L_1 은 $\text{Co}(\text{II})$ 인 것을 특징으로 하는, 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체.

청구항 4

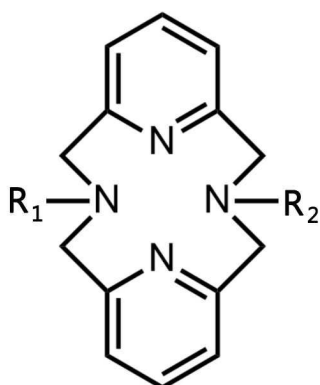
하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

하기 화학식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체를 하기 화학식 2로 표시되는 리간드 결합 아연(II) 화합물과 반응시켜, 하기 화학식 3으로 표시되는 리간드 결합 코발트(II) 화합물과 하기 화학식 4로 표시되는 하이드록사메이트 결합 아연(II) 복합체로 전환시키는 것을 특징으로 하는, 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법:

[반응식 1]



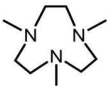
(상기 반응식 1에서,

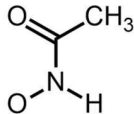


상기 L_1 은 $\text{Co}(\text{II})$ 이고,

상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 치환 또는 비치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{6-10} 의 아릴이고,

여기서, 상기 치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 치환된 C_{6-10} 의 아릴은 할로젠, $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 및 C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 C_{6-10} 의 아릴이고,

상기 L_2 는  이고,

상기 HA는  이다.)

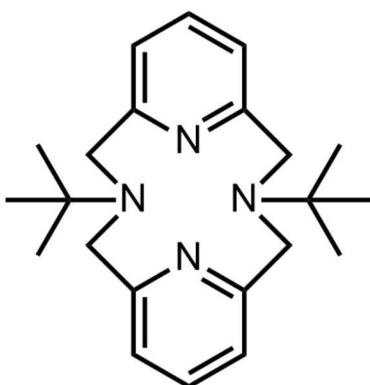
청구항 5

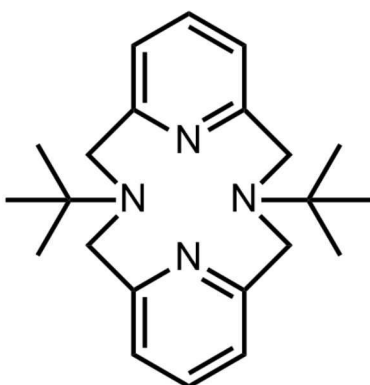
제4항에 있어서,

상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 t-부틸 또는 사이클로헥실인 것을 특징으로 하는, 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,



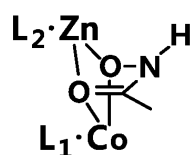
상기 L_1 은  인 것을 특징으로 하는, 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 화학식 3으로 표시되는 리간드 결합 코발트(II) 화합물과 상기 화학식 4로 표시되는 하이드록사메이트 결합 아연(II) 복합체로 전환될 때, 하기 화학식 5로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) · 아연(II) 복합체를 중간체로서 거쳐 전환되는 것을 특징으로 하는, 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법.

[화학식 5]



발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체 및 이의 전환 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 프로드러그 전달 반응에서 환원된 중간단계 물질인 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체 및 상기 전달 반응에서 하이드록사메이트가 전달되는 반응 메커니즘에 따른 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포에서 아세틸화(acetylation) 같은 전사 후 수정(post-translational modification)은 생물학적 과정의 중심에서 매우 중요한 조절 모듈이며, 다수의 효소에 의해 엄격히 제어된다. 히스톤(histone)은 염색질을 구성하는 중심 단백질로써, 이들은 DNA가 감기는 축 역할을 하여 DNA의 응축(condensation)을 도와준다. 또한, 히스톤의 아세틸화(acetylation)와 탈아세틸화(deacetylation) 간의 균형은 유전자 발현의 매우 중요한 역할을 담당한다.

[0003] 히스톤 탈아세틸화효소(Histone deacetylases; HDACs)는 염색질을 구성하는 히스톤 단백질 라이신(lysine) 잔기의 아세틸(acetyl)기를 제거하는 효소로써, 유전자 침묵(gene silencing)과 관련이 있으며 세포주기 정지, 혈관형성억제, 면역조절, 세포 사멸 등을 유도한다고 알려져 있다(Hassig et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 1997, 1, 300-308). 또한, HDAC 효소 기능의 억제는 생체 내에서 암세포 생존 관련 인자들의 활성을 저하시키고 암세포 사멸관련 인자들을 활성화시킴으로써 암세포 스스로 사멸을 유도하는 것으로 보고되고 있다(Warrell et al., J. Natl. Cancer Inst. 1998, 90, 1621-1625).

[0004] 다양한 HDAC 억제제들의 공통적인 구조적 특징은 Vorinostat의 구조와 같이 캡 그룹(Cap group), 링커 그룹(Linker group) 및 아연-결합 그룹(Zinc Binding Group, ZBG)으로 이루어져 있다. 많은 연구자들이 캡 그룹과 링커 그룹의 구조적 변형을 통해 효소에 대한 억제 활성 및 선택성에 대해서 연구를 수행하였다. 이중에서 아연-결합 그룹은 효소 억제 활성과 선택성에 있어서 더욱 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다(Wiest et al., J. Org. Chem. 2013 78: 5051-5065; Methot et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18, 973-978).

[0005] 상기 아연-결합 그룹의 대부분은 하이드록사믹산(hydroxamic acid) 또는 벤즈아마이드(benzamide)가 그 역할을 하며, 이중 하이드록사믹산 유도체는 강력한 HDAC 억제 효과를 나타내지만 낮은 생체이용률(bioavailability)과 심각한 오프타겟 활성(off-target activity) 문제를 가지고 있다. 벤즈아마이드의 경우는 아닐린(aniline)을 포함하고 있기 때문에 생체 내에서 독성 대사체(toxic metabolites)를 생성할 수 있는 문제점이 있다.

[0006] 이에 따라, 암(cancer), 염증성(inflammatory) 질환, 자가면역(autoimmune) 질환, 신경학적(neurological diseases) 질환 및 퇴행성 신경(neurodegenerative disorders) 질환 등의 치료를 위해 부작용이 있는 비선택적인 억제제와 달리 부작용이 없으면서 생체이용률이 개선된 아연-결합 그룹을 가지는 선택적인 HDAC 억제제의 개발이 필요한 실정이다.

[0007] 하이드록사믹산 관능기는 아연을 활성중심으로 가지는 여러 효소의 저해제로써 많은 연구가 이루어져 왔으며, 특히 암세포에서 과발현되는 매트릭스 메탈로프로테이나아제(metalloproteinases, MMPs)의 효과적인 저해제로써 많은 연구가 이루어져 왔다. 매트릭스 메탈로프로테이나아제는 관절염으로부터 암까지의 다수의 질환에 수반되는 조직 파괴와 연관되는 것으로 알려진 콜라게나제, 스트로멜리신 및 겔라티나제를 포함하는 세포외 효소의 부류이다. 또한, 하이드록사믹산 관능기와 효과적인 약물 전달체인 코발트 착물을 활용해 산소 농도가 적은 암세포에 선택적으로 활성화되는 프로드러그에 관한 연구 또한 진행되고 있다.

[0008] 하이드록사믹산 관능기가 결합된 코발트 착물을 선택적인 항암제로 사용하고자 하는 노력은 있었지만, 실제 약물이 전달되는 단계인 환원된 중간단계 물질에 대해서는 구체적으로 특정된바 없었으며 생체 내 하이드록사믹산 관능기가 효소의 활성중심에 전달되는 메커니즘에 대해서는 분자적 수준으로 다루어지지 않았다.

[0009] 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명의 발명자들은 프로드러그 전달 반응에서 중간단계 물질로 알려진 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체를 합성 및 특징화하였고 아연을 활성중심으로 가지는 효소의 모델 화합물을 합성하여 하이드록사메이트의 전달 메커니즘을 분자수준으로 밝혀 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Hassig et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 1997, 1, 300-308
 (비특허문헌 0002) Warrell et al., J. Natl. Cancer Inst. 1998, 90, 1621-1625
 (비특허문헌 0003) Wiest et al., J. Org. Chem. 2013 78: 5051-5065; Methot et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18, 973-978
 (비특허문헌 0004) Inorg. Chem. 2012, 51, 9350-9356

발명의 내용

해결하려는 과제

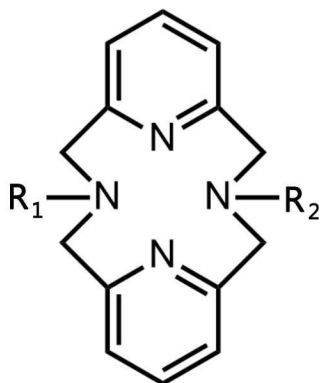
- [0011] 상술한 바와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 프로드러그 전달 반응에서 환원된 중간단계 물질인 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체 및 상기 전달 반응에서 하이드록사메이트가 전달되는 반응 메커니즘에 따른 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법에 대해 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

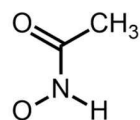
- [0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체를 개시한다.

- [0013] [화학식 1]

- [0014] $[L_1Co(II)-HA]^+$

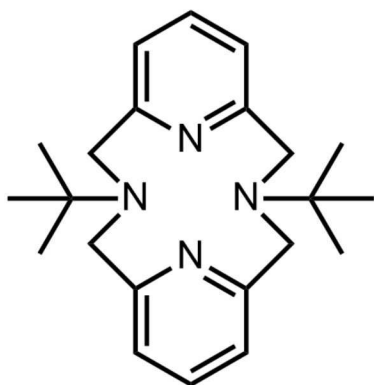


- [0015] 상기 화학식 1에서, 상기 L_1 은 이고, 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 치환 또는 비치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{6-10} 의 아릴이고, 여기서, 상기 치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 치환된 C_{6-10} 의 아릴은 할로젠, -OH, -CN, -NO₂, C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 및 C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환



된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 C_{6-10} 의 아릴이고, 상기 HA는 이다.

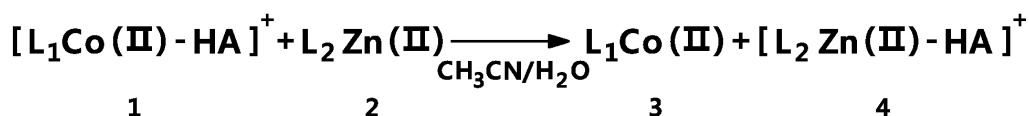
- [0016] 여기서, 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 t-부틸 또는 사이클로헥실일 수 있다.



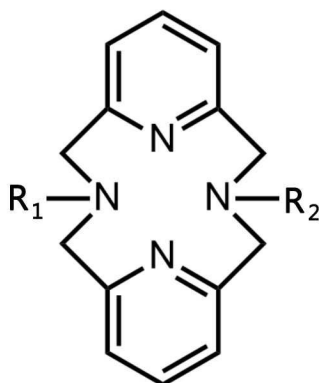
[0017] 여기서, 상기 L_1 은 일 수 있다.

[0018] 한편, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이, 하기 화학식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체를 하기 화학식 2로 표시되는 리간드 결합 아연(II) 화합물과 반응시켜, 하기 화학식 3으로 표시되는 리간드 결합 코발트(II) 화합물과 하기 화학식 4로 표시되는 하이드록사메이트 결합 아연(II) 복합체로 전환시키는 것을 특징으로 하는, 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법을 추가로 개시한다.

[0019] [반응식 1]

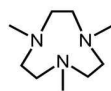


[0020]

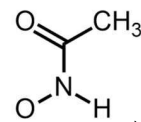


[0021] 상기 반응식 1에서, 상기 L_1 은 이고, 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 치환 또는 비치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{6-10} 의 아릴이고, 여기서, 상기 치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 치환된 C_{6-10} 의 아릴은 할로젠, -OH, -CN, -NO₂, C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 및 C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환

된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 C_{6-10} 의 아릴이고, 상기 L_2 는

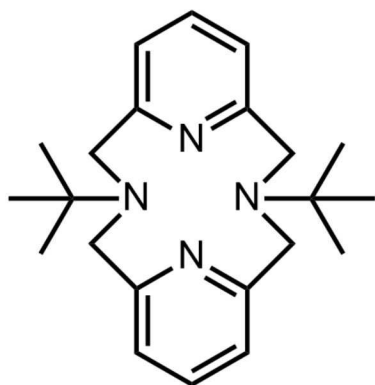


이고, 상기 HA는



이다.

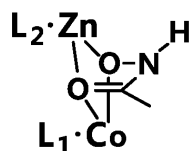
[0022] 여기서, 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 t-부틸 또는 사이클로헥실일 수 있다.



[0023] 여기서, 상기 L_1 은 일 수 있다.

[0024] 여기서, 상기 화학식 3으로 표시되는 리간드 결합 코발트(II) 화합물과 상기 화학식 4로 표시되는 하이드록사메이트 결합 아연(II) 복합체로 전환될 때, 하기 화학식 5로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II)·아연(II) 복합체를 중간체로서 거쳐 전환될 수 있다.

[0025] [화학식 5]



[0026]

발명의 효과

[0027] 상술한 바에 따른 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체는 프로드러그 전달 반응에서 환원된 중간단계 물질로써 암세포에서 과발현되는 매트릭스 메탈로프로테나아제의 활성을 억제할 수 있는 효과가 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법은 거대고리 배위자를 활용한 보다 안정한 중간단계 물질인 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연을 활성중심으로 가지는 효소의 반응을 통하여 분자 수준의 하이드록사메이트의 전달 메커니즘을 제시할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 ORTEP(Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot) 다이어그램을 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체의 반응에 따른 UV-vis 스펙트럼 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체의 반응에 따른 ESI-MS 스펙트럼 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체의 반응에서 속도 상수 및 활성화 매개 변수에 대한 그래프를 도시한 것이다.

도 5a는 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체의 반응에서 자유 에너지 프로파일 (Free energy profile)를 도시한 것이고, 도 5b는 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체의 반응에서 전이 상태에서의 형태학적 구조를 도시한 것이다.

도 6은 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체 및 하이드록시마토 코발트(III) 복합체의 순환전압전류법에 따른 결과를 그래프로 도시한 것이다.

도 7은 하이드록시마토 코발트(III) 복합체의 순환전압전류법에 따른 결과를 그래프로 도시한 것이다.

도 8은 하이드록사메이트 그룹 전달 반응에서 매트릭스 메탈로프로테나아제-9(MMP-9)의 촉매 도메인에 도킹된 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 가능한 결합 형태를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 출원에서 사용하는 용어는 단지 특정한 예를 설명하기 위하여 사용되는 것이다. 때문에 가령 단수의 표현은 문맥상 명백하게 단수여야만 하는 것이 아닌 한, 복수의 표현을 포함한다. 덧붙여, 본 출원에서 사용되는 “포함하다” 또는 “구비하다” 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 단계, 기능, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 명확히 지칭하기 위하여 사용되는 것이지, 다른 특징들이나 단계, 기능, 구성요소 또는 이들을 조합한 것의 존재를 예비적으로 배제하고자 사용되는 것이 아님에 유의해야 한다.

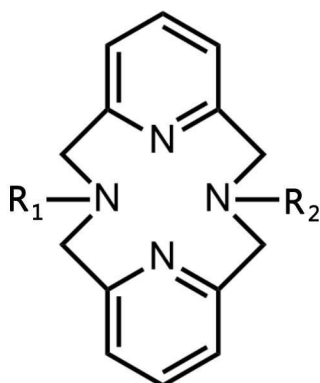
[0031] 한편, 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진 것으로 보아야 한다. 따라서, 본 명세서에서 명확하게 정의하지 않는 한, 특정 용어가 과도하게 이상적이거나 형식적인 의미로 해석되어서는 안 된다.

[0033] 본 발명의 발명자들은 프로드러그 전달 반응에서 중간단계 물질로 알려진 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체를 합성 및 특징화하였고 아연을 활성중심으로 가지는 효소의 모델 화합물을 합성하여 하이드록사메이트의 전달 메커니즘을 분자수준으로 밝혀 본 발명을 완성하였다.

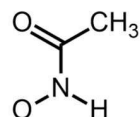
[0034] 본 발명자들은 상술한 과제를 해결하기 위하여 연구한 결과, 하기와 같은 발명을 안출하기에 이르렀다. 본 명세서는 하기 화학식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체를 개시한다.

[0035] [화학식 1]

[0036] $[L_1Co(II) - HA]^+$



[0037] 상기 화학식 1에서, 상기 L_1 은 이고, 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 치환 또는 비치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{6-10} 의 아릴이고, 여기서, 상기 치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 치환된 C_{6-10} 의 아릴은 할로젠, -OH, -CN, -NO₂, C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 및 C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환

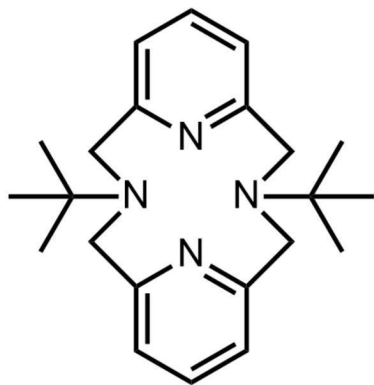


된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 C_{6-10} 의 아릴이고, 상기 HA는 이다.

[0038] 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체는 생물학적 환원제(biological reductant)와 함께 하이드록시마토 코발트(III) 복합체(hydroximatocobalt(III) complex)의 환원에 의하여 제조될 수 있고, 염기 존재 하에서 코발트 복합체(cobalt(II) complex)와 아세토히드록삼산(acetohydroxamic acid)의 반응을 통하여 제조될 수 있다.

[0039] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체에서 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 t-부틸 또는 사이클로헥실일 수 있다.

[0040] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체에서 상기 L₁은



일 수 있다. 상기 L₁은 거대고리 4자리 N4 리간드를 포함하는 리간드 물질로써, N,N'-di-tert-butyl-2,11-diaza[3.3](2,6)-pyridinophane(이하, 'TBDAP'이라 한다)로 명명될 수 있다. 즉, 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체는 [Co(II)(TBDAP)(CH₃C(-NH₂)(O))]⁺와 같이 표현될 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체는 매트릭스 메탈로프로테이나아제(metalloproteinases, MMPs)의 저해제 내지 억제제로써, 약제학적으로 허용되는 이의 염 또는 이의 프로드러그로 제공될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 "약제학적으로 허용 가능한 염"이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1로 표시되는 복합체의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 복합체의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0043] 본 발명에서 제공하는 상기 화학식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체는 약학적 조성물의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 HDAC3만을 선택적으로 억제하여 암세포의 성장을 효과적으로 저해할 수 있다.

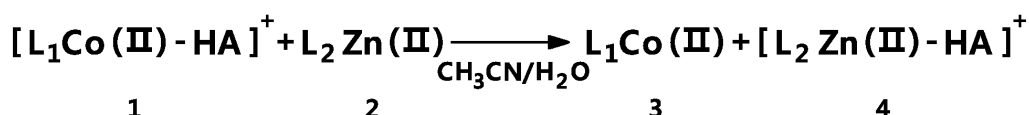
[0044] 본 발명의 약학적 조성물은 통상적인 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 통상적인 방법에 따라 제제화할 수 있으며, 정제, 환제, 산제, 캡슐제, 시럽, 에멀전, 마이크로에멀전 등의 다양한 경구 투여 형태 또는 근육내, 정맥내 또는 피하 투여와 같은 비경구 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 상기한 담체, 부형제 또는 희석제 외에도 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

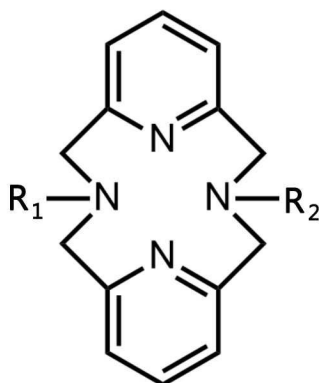
[0046] 본 발명의 약제학적으로 허용되는 이의 염, 이의 프로드러그 및 이의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적인 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0048] 한편, 본 명세서는 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이, 하기 화학식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체를 하기 화학식 2로 표시되는 리간드 결합 아연(II) 화합물과 반응시켜, 하기 화학식 3으로 표시되는 리간드 결합 코발트(II) 화합물과 하기 화학식 4로 표시되는 하이드록사메이트 결합 아연(II) 복합체로 전환시키는 것을 특징으로 하는, 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법을 추가로 개시한다.

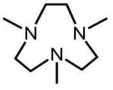
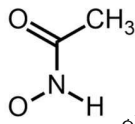
[0049] [반응식 1]



[0050]

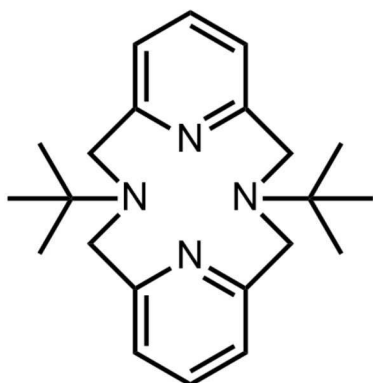


[0051] 상기 반응식 1에서, 상기 L_1 은 이고, 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 치환 또는 비치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_{6-10} 의 아릴이고, 여기서, 상기 치환된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 치환된 C_{6-10} 의 아릴은 할로젠, -OH, -CN, -NO₂, C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 및 C_{1-5} 의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기가 치환

된 C_{3-10} 의 사이클로알킬 또는 C_{6-10} 의 아릴이고, 상기 L_2 는  이고, 상기 HA는  이다.

[0052] 본 발명의 상기 반응식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법에서 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 t-부틸 또는 사이클로헥실일 수 있다.

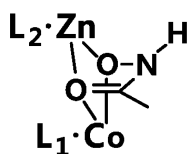
[0053] 본 발명의 상기 반응식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법에서 상기 L_1 은



일 수 있다. 상기 L_1 은 거대고리 4자리 N4 리간드를 포함하는 리간드 물질로써, N,N'-di-tert-butyl-2,11-diaza[3.3](2,6)-pyridinophane(이하, 'TBDAP'이라 한다)로 명명될 수 있다. 즉, 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체는 [Co(II)(TBDAP)(CH₃C(-NH₂)(O))]⁺와 같이 명명될 수 있다.

[0054] 본 발명의 상기 반응식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법에서 상기 화학식 3으로 표시되는 리간드 결합 코발트(II) 화합물과 상기 화학식 4로 표시되는 하이드록사메이트 결합 아연(II) 복합체로 전환될 때, 하기 화학식 5로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II)·아연(II) 복합체를 중간체로서 거쳐 전환될 수 있다.

[0055] [화학식 5]



[0056]

[0057] 상기 화학식 5로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II)·아연(II) 복합체는 3차원 구조를 형성하고 있는

며, 상기 반응식 1에서의 전이상태 단계 물질을 나타낸다.

[0058] 본 발명의 상기 반응식 1로 표시되는 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법은 실제 매트릭스 메탈로프로테이나아제의 활성을 억제하는 반응에서 하이드록사메이트가 전달되는 분자 수준의 반응 메커니즘을 제시한 것에 그 의미가 있다.

[0060] 이하, 첨부한 도면 및 실시예들을 참조하여 본 명세서가 청구하는 바에 대하여 더욱 자세히 설명한다. 다만, 본 명세서에서 제시하고 있는 도면 내지 실시예 등은 통상의 기술자에게 의하여 다양한 방식으로 변형되어 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 본 명세서의 기재사항은 본 발명을 특정 개시 형태에 한정되는 것이 아니고 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 균등물 내지 대체물을 포함하고 있는 것으로 보아야 한다. 또한, 첨부된 도면은 본 발명을 통상의 기술자로 하여금 더욱 정확하게 이해할 수 있도록 돕기 위하여 제시되는 것으로서 실제보다 과장되거나 축소되어 도시될 수 있다.

[0062] {실시예 및 평가}

[0063] 시료(Materials)

[0064] Aldrich Chemical Co.에서 얻은 모든 화학 물질은 사용 가능한 최상의 순도였으며 달리 명시되지 않는한 추가 정제없이 사용되었다. 용매 아세토 니트릴(CH₃CN) 및 디에틸에테르(Et₂O)는 사용하기 전에 용매정제 컬럼(JC Meyer Solvent Systems)을 통과하여 사용되었다. N,N'-di-tert-butyl-2,11-diaza[3.3](2,6)-pyridinophane(TBDAP) 리간드는 2,6-bis-(chloromethyl)pyridine과 2,6-bis[(N-tert-butylamino)methyl]-pyridine를 80 °C에서 반응시킴으로써 제조되었다. [Co(TBDAP)(NO₃)(H₂O)](NO₃) 및 [Co(TBDAP)(CH₃C(=NO)O)](NO₃)(H₂O)(2-NO₃ · H₂O)는 공지된 방법에 따라 제조되었다. 인간의 매트릭스 메탈로프로테이나아제-9(metalloproteinase-9, MMP-9) 전장 단백질 및 4-아미노페닐머큐릭 에세테이트(4-aminophenylmercuric acetate, APMA)는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구입하여 추가 정제없이 사용되었다. PLGMWSR과 HH(여기서, H은 히스티딘을 의미함)의 두 가지 펩타이드는 Anygen Co. Ltd.(Gwangju, Korea)에서 구입하였다.

[0066] 수단(Instrumentation)

[0067] UV-vis 스펙트럼은 저온 실험용 UNISOKU Scientific Instruments 또는 순환 수조가 장착된 Hewlett Packard 8454 다이오드 어레이 분광 광도계에서 기록되었다. Electrospray ionization mass (ESI-MS) 스펙트럼은 Waters (Milford, MA, USA) Acquity SQD quadrupole Mass 기기에서 수동 방법을 사용하여 소스에 직접 샘플을 주입하여 수집하였다. 분무 전압(spray voltage)은 2.5 kV로, 모세관 온도는 80 °C로 설정하였다. 적외선 스펙트럼은 다이아몬드 감쇠 총 반사율(attenuated total reflectance, ATR) 액세서리가 장착된 Thermo Scientific Nicolet iS10 FT-IR 분광기에서 기록되었다. 1H NMR 스펙트럼은 DGIST의 CCRF에서 Bruker AVANCE IIII-400 분광계로 측정되었다. 결정학적 분석은 DGIST의 CCRF에서 Mo X-선 튜브(Mo X-ray tube)가 장착된 SMART APEX II CCD로 수행되었다. MMP-9에 대한 %억제를 분석하기 위한 질량 분석 분석은 ESI 소스가 장착되고, 양이온 모드에서 작동되는 Agilent 6530 Accurate Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) 질량 분석기(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)로 수행하였다. 모세관 전압, 건조 가스 흐름 및 가스 온도는 각각 5.8 kV, 12 L/min 및 300 °C로 설정되었다. 프래그멘터 전압(fragmentor voltage)은 170V로 설정되었다.

[0069] [Co(TBDAP)(CH₃C(-NHO)O)](NO₃)의 합성

[0070] [Co(TBDAP)(NO₃)(H₂O)](NO₃) (0.0278g, 0.050mmol) 및 아세토히드록삼산 (0.0038g, 0.050mmol)을 CH₃CN (10mL) 용액에서 2 당량의 트리에틸아민(triethylamine, TEA)와 반응시켜 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체([Co(II)(TBDAP)(CH₃C(-NHO)O)]⁺)를 제조하였다. 혼합물을 주위 온도에서 6 시간동안 교반함으로써 색상이 분홍색에서 주황색으로 변하였다. 생성된 용액을 진공에서 건조시킨 다음 Et₂O (40 mL)로 세척하였다. X-선 결정학적으로 적합한 결정은 CH₃CN의 복합체 용액에서 Et₂O의 느린 확산에 의해 얻어졌다. 결정 수율 : 94 % (0.0257g). CH₃CN의 UV-vis : λ ε = 361nm (1900M-1cm-1), 468nm (100M-1cm-1). CH₃CN의 ESI-MS :

[Co(TBDAP)(CH₃C(-NHO)O)]⁺에 대한 m / z 485.33. FT-IR (ATR) : 3207cm⁻¹ (w, N-H). μ_{eff} = 4.41. C₂₄H₃₆CoN₆O₅에 대한 계산치 : C, 52.65; H, 6.63; N, 15.35. 실측치 : C, 52.12; H, 6.53; N, 15.33.

[0072] [Zn(Me₃-TACN)(NO₃)](NO₃)(H₂O)의 합성

[0073] Zn(NO₃)₂·6H₂O (0.348g, 1.17mmol)와 Me₃-TACN (0.200g, 1.17mmol)을 에탄올(15mL)에 반응시켜 제조하였다. 혼합물을 6 시간동안 교반하면서 부드럽게 가열하여 무색 용액을 얻었다. 생성된 용액에 Et₂O (40 mL)를 첨가하여 백색 분말을 수득하고 이를 여과로 수집하고 Et₂O로 세척하고 진공에서 건조시켰다. 무색 결정은 CH₃CN의 복합체 용액으로 Et₂O를 천천히 확산시켜 얻었다. 결정 수율 : 58 % (0.2570g). CH₃CN의 ESI-MS : [Zn(Me₃-TACN)(NO₃)]⁺에 대한 m / z 297.2. C₉H₂₃N₅O₇Zn에 대한 계산치 : C, 28.54; H, 6.12; N, 18.49. 실측치 : C, 28.62; H, 6.17; N, 18.70.

[0075] [Zn(Me₃-TACN)(CH₃C(-NHO)O)(CH₃OH)](BPh₄)의 합성

[0076] Zn(Me₃-TACN)(NO₃) (0.0189g, 0.050mmol)과 아세트 히드록삼산 (0.0152g, 0.20mmol)을 CH₃CN (10mL) 용액에서 8 당량의 TEA와 반응시켜 합성하였다. 혼합물을 6 시간 동안 교반하여 무색 용액을 얻었다. 생성된 용액에 Et₂O (40 mL)를 첨가하여 백색 분말을 수득하고 이를 여과로 수집하고 Et₂O로 세척하고 진공에서 건조시켰다. 4-CH₃OH x BPh₄의 X-선 결정학적으로 적합한 결정은 NaBPh₄ (0.0170g)의 존재하에 백색 생성물의 CH₃OH 용액으로 Et₂O를 천천히 확산시켜 수득 하였다. 결정 수율 : 32 % (0.0107g). CH₃CN의 ESI-MS : [Zn(Me₃-TACN)(CH₃C(-NHO)O)]⁺에 대한 m / z 309.4. C₃₆H₄₉BN₄O₃Zn에 대한 계산치 : C, 65.31; H, 7.46; N, 8.46. 실측치 : C, 65.14; H, 7.15; N, 8.55.

[0078] [Co(TBDAP)(CH₃C(-NHO)O)](NO₃)(C₁₀H₈O₄)(H₂O)의 합성

[0079] CH₃CN (1.5mL)에 녹인 [Co(III)(TBDAP)(CH₃C)NO₃O)]⁺ (0.0282g, 0.050mmol)의 용액에 1 당량의 HC₁₀H₈O₄를 첨가하여 -40 °에서 연한 녹색 용액을 생성하여 [Co(III)(TBDAP)(CH₃C(-NHO)O)]²⁺를 제조하였다. 생성된 용액에 Et₂O (40 mL)를 첨가하여 연한 녹색 분말을 수득하고 이를 Et₂O로 세척하고 진공에서 건조시켰다. 연한 녹색 분말은 -40 °에서 CH₃CN에 용해된다. 고체를 느린 확산 Et₂O로부터 재결정하여 -40 °에서 5를 얻었다. 수율 : 40 % (0.0133g). CH₃CN의 UV-vis : λ (ϵ = -1cm⁻¹), 420nm (190M-1cm⁻¹), 820nm (240M-1cm⁻¹). CH₃CN의 ESI-MS : [Co(TBDAP)(CH₃C(-NHO)O)]²⁺에 대한 m / z 242.73. C₂₄H₃₈C₁₀CoN₆O₁₀에 대한 계산치 : C, 43.35; H, 5.76; N, 12.64. 실측치 : C, 43.13; H, 5.37; N, 12.87.

[0081] [Co(TBDAP)(C₆H₅C(-NHO)O)](NO₃)(H₂O)의 합성

[0082] [Co(TBDAP)(NO₃)(H₂O)](NO₃) (0.0278g, 0.050mmol) 및 벤조 히드록삼산 (0.0069g, 0.050mmol)을 CH₃CN (10mL) 용액에서 2 당량의 TEA와 반응시켜 [Co(II)(TBDAP)(C₆H₅C(-NHO)O)]⁺를 제조하였다. 혼합물을 주위 온도에서 6 시간 동안 교반함으로써 색상이 분홍색에서 주황색으로 변하였다. 생성된 용액을 진공에서 건조시킨 다음 Et₂O (40 mL)로 세척하였다. 수율 : 91 % (0.0286g). CH₃CN의 UV-vis : λ (ϵ = -1 cm⁻¹). CH₃CN의 ESI-MS : [Co(TBDAP)(C₆H₅C(-HO)O)]⁺에 대한 m / z 547.1. C₂₉H₄₀CoN₆O₆에 대한 계산치 : C, 55.50; H, 6.42; N, 13.39. 실측치 : C, 55.4; H, 6.21; N, 13.4.

[0084] 자기 모멘트 측정(Magnetic Moment Measurement)

[0085] 유효 자기 모멘트는 25 °에서 ¹H NMR Evans 방법에 의해 결정된다. 블랭크 아세트니트릴-d₃ 용매 (1.0 % TMS 포함)만을 포함하는 WILMADO 동축 삽입물(밀봉된 모세관) 튜브를 아세트니트릴-d₃ (0.03 % TMS 포함)에 용해된 복합체를 포함하는 일반 NMR 튜브에 삽입하였다. 상자성 금속 착물이 있을 때 TMS 피크 (및 / 또는 용매 피크)의 화학적 이동을 내부 동축 삽입 튜브의 TMS 피크 (및 / 또는 용매 피크)와 비교하였다. 유효 자기 모멘트는

방정식 $\mu_{\text{eff}} = 0.0618 (\Delta v / 2fM)^{1/2}$ 를 사용하여 계산되었다. 여기서 f 는 초전도 분광계의 발진기 주파수 (MHz), T 는 절대 온도, M 은 금속의 몰 농도이다. Δv 는 두 기준 신호 사이의 주파수 (Hz) 차이이다.

[0087] 반응성 연구(Reactivity Studies)

[0088] 모든 반응은 반응 용액의 UV-vis 스펙트럼 변화를 모니터링하여 1cm UV 큐벳에서 수행되었으며, 속도 상수는 $[\text{Co(II)}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ 의 붕괴(decay)에 대해 356 nm에서 흡광도 변화를 피팅하여 결정되었다. 반응은 적어도 세 번 실행되었다. 보고된 데이터는 이러한 반응의 평균을 나타낸다. $[\text{Co(II)}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ (0.25mM)의 결정은 반응성 연구에 사용되었다. 반응이 완료된 후, 운동 데이터의 1차(pseudo-first-order) 피팅을 통해 k_{obs} 값을 결정하였다.

[0090] 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry)

[0091] 298 K에서 지지 전해질로 n-Bu4NPF6 (TBAPF6, 0.10 M)를 포함하는 CH3CN에서 CHI600E 전기 화학 분석기에 의해 전기 화학적 측정을 수행하였다. 기존의 3-전극 전지(three-electrode cell)는 백금 작업 전극 (표면적 0.3mm²)과 함께 사용되었다. 백금 와이어를 상대 전극으로 사용하고 Ag / AgNO3 (0.010 M) 전극을 기준 전극으로 사용하였다. 백금 작업 전극 (BAS)은 BAS 연마 알루미늄 현탁액으로 일상적으로 연마하고 사용하기 전에 아세톤과 아세토 니트릴로 세척하였다. 측정된 전위는 Ag / AgNO3 (0.010 M) 기준 전극에 대해 기록되었다. 모든 전위 (vs. Ag/Ag⁺)는 동일한 조건에서 페로센의 전위를 사용하여 SCE 대비한 값으로 변환되었다. 모든 전기 화학적 측정은 N2 분위기에서 수행되었다.

[0093] MMP-9에 대한 억제(Inhibition against MMP-9)

[0094] 펩타이드 PLGMWSR은 MMP-9의 기질로 선택되었다. 기질의 농도는 280 nm에서 용액의 흡광도를 측정하여 결정되었다 ($\epsilon=5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). MMP-9 (44nM)는 50mM 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄, pH 7.4, 100mM NaCl 및 10mM CaCl2에서 APMA (1mM)와 37 °C에서 2 시간 동안 일정하게 배양하여 활성화되었다. 활성화된 MMP-9 (20 nM)를 완충 용액에서 억제제 [아세토히드록삼산, 벤조히드록삼산, $[\text{CoII}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$, $[\text{CoIII}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(\text{NO})\text{O})]^+$ 및 $[\text{CoII}(\text{TBDAP})(\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ (10mM)와 함께 또는 단독으로 실온에서 15 분 동안 일정한 교반 후 기질 (1mM)을 첨가하면서 사전 인큐베이션했다. H2O에서 $[\text{CoII}(\text{TBDAP})(\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ 의 제한된 용해도로 인해 DMSO는 $[\text{CoII}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ 에 비하여 억제 테스트를 위한 매개체로 사용되었다. 반응 혼합물을 교반없이 실온에서 8 또는 12시간동안 인큐베이션하고 질량 분석기에 주입하기 전에 H2O로 1,000 배 희석했다. 모든 측정은 HH (10 μM ; H, 히스티딘)를 내부 표준으로 사용하여 수행되었다. 각 분자에 의한 MMP-9에 대한 억제율은 동일한 부피의 H2O 또는 DMSO로 처리된 대조군과 비교하여 샘플의 기질 양을 분석하여 계산되었다.

[0096] 내부 표준 교정(Internal Standard Calibration)

[0097] HH의 농도는 210 nm에서 용액의 흡광도를 측정하여 결정되었다 ($\epsilon=13180 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). 다른 농도의 PLGMWSR (0.5 - 12.5 μM)을 DMSO (0.1 % v/v) 유무에 관계없이 완충 용액 (0.5 mM tris, pH 7.4, 1 mM NaCl 및 0.1 mM CaCl2)에 준비하고 H2O로 10배 희석하였다. 결과 용액을 내부 표준인 HH (10 μM)와 함께 질량 분석기에 주입하여 보정 플롯을 구성하였다. 교정 방정식은 기질과 내부 표준 사이의 신호 강도 비율의 선형 회귀에 의해 유도되었다.

[0099] 도킹 연구(Docking Studies)

[0100] 이전에 보고된 X-선 결정구조(PDB 4H3X)에서 얻은 MMP-9의 촉매 도메인과 $[\text{CoII}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ 의 도킹은 AutoDock Vina에 의해 결정되었다. $[\text{CoII}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ 의 S20 X-선 결정구조는 Mercury 소프트웨어

어에 의해 PDB 형식으로 변환되었다. 단백질의 구조 파일은 AutoDock Tools에 의해 생성되었고 AutoDock Vina.S20, S21을 실행하기 위해 PyRx로 가져 왔다. 그리드 맵은 단백질의 활성 부위를 포함하도록 설정되었다. 완전성은 1024로 설정되었다. MMP-9의 촉매 도메인을 갖는 $[\text{CoII}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ 의 결과 포즈는 Pymol을 사용하여 시각화되었다.

[0102] 평가 1. 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 구조 분석

[0103] 도 1은 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 ORTEP(Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot) 다이어그램을 도시한 것이다. 도 1을 참조하면, 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체 $[\text{Co}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ 의 X선 결정 구조는 하이드록사메이트 그룹이 두자리 모드로 배위하는 왜곡된 팔면체 구조를 형성하는 것을 확인할 수 있다.

[0104] 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체에서 Co-O 결합 길이(2.034 Å)는 6-(Me2Ph)2TPA 리간드(2.038 Å)가 있는 히드록사마토 코발트(II) 복합체의 길이와 유사하지만, $[\text{Co}(\text{III})(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(\text{INO})\text{O})]^+$ (1.856 Å) 및 기타 하이드록시마토 코발트(III) 복합체보다 더 긴 것을 확인하였다.

[0106] 평가 2. 하이드록사메이트 그룹 전달 반응에서의 분자간 이동 분석

[0107] 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체에서 아연 복합체인 $[\text{Zn}(\text{II})(\text{Me}_3\text{-TACN})(\text{NO}_3)]^+$ 로의 하이드록사메이트 그룹의 분자간 이동을 조사하였다. 여기서, 상기 아연 복합체는 MMP의 활성 부위 모델에 해당한다.

[0108] 도 2는 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체의 반응에 따른 UV-vis 스펙트럼 변화를 그래프로 나타낸 것이다. 또한, 도 2의 별도 삽입된 그래프는 아연 복합체의 농도 증가에 따른 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 농도 감소를 나타낸 것이다. 도 2를 참조하면, 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체에 상기 아연 복합체를 반응시킴에 따라 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 특성 흡수 대역이 사라진 것을 확인할 수 있다.

[0109] 도 3은 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체의 반응에 따른 ESI-MS 스펙트럼 변화를 그래프로 나타낸 것이다. 여기서, 상단의 그래프는 반응 후를 나타내며 하단의 그래프는 반응 전을 나타내고, m/z 309.2 및 485.3의 피크는 $[\text{Zn}(\text{II})(\text{Me}_3\text{-TACN})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ (calcd m/z 309.1) 및 $[\text{Co}(\text{II})(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ (calcd m/z 485.2)에 할당된 것이다. 도 3을 참조하면, 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체에 해당하는 m/z 485.3의 질량 피크는 $[\text{Zn}(\text{II})(\text{Me}_3\text{-TACN})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ 에 해당하는 m/z 309.2에서 질량 피크가 수반되는 모습과 함께 사라진 것을 확인할 수 있다.

[0111] 평가 3. 하이드록사메이트 그룹 전달 반응에 따른 속도 상수 및 활성화 매개 변수 측정

[0112] CH3CN과 H2O (99:1)의 혼합물 내에서 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체에서 아연 복합체인 $[\text{Zn}(\text{II})(\text{Me}_3\text{-TACN})(\text{NO}_3)]^+$ 로의 하이드록사메이트 그룹 전달 반응의 운동학적 연구를 수행하였다. 도 2 및 3을 통하여 -10 °C에서 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체(0.25 mM)에 상기 아연 복합체(2.5 mM)를 첨가함에 따라 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 특성 흡수 밴드가 붕괴되는 것을 확인할 수 있었다.

[0113] 도 4는 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체의 반응에서 속도 상수 및 활성화 매개 변수에 대한 그래프를 도시한 것이다. 보다 구체적으로, 도 4a는 CH3CN과 H2O (99:1)의 혼합물에서 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체인 $[\text{Zn}(\text{II})(\text{Me}_3\text{-TACN})(\text{NO}_3)]^+$ 의 반응에서 2차 속도 상수(k2)를 결정하기 위해 -10 °C에서 $[\text{Zn}(\text{II})(\text{Me}_3\text{-TACN})(\text{NO}_3)]^+$ 의 농도에 대한 k_{obs} 플롯을 도시한 것이다. 또한, 도 4b는 CH3CN과 H2O (99:1)의 혼합물에서 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체인 $[\text{Zn}(\text{II})(\text{Me}_3\text{-TACN})(\text{NO}_3)]^+$ 의 반응에서 활성화 매개 변수를 얻기 위해 1/T에 대한 ln(k2/T)의 Eyring 플롯을 도시한 것이다.

[0114] 도 4a를 참조하면, 반응에 따른 속도 상수는 상기 아연 복합체의 농도에 따라 증가하여 $4.0(2) \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 2차 속도 상수(k_2)를 갖는 것을 확인할 수 있다. 여기서, k_2 값의 온도 의존성은 253 내지 283 K 범위에서 조사되었다. 도 4b를 참조하면, 선형 Eyring 플롯은 $\Delta H=59(3) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 및 $\Delta S=-5(1)$ 의 활성화 매개 변수를 갖는 것을 확인할 수 있다. 도 4a 및 4b의 결과를 종합하면, 하이드록사메이트 전달 반응이 이분자(bimolecular) 메커니즘을 통해 발생한다는 것을 시사하며, 여기서 검출되지 않은 $[(\text{TBDAP})\text{Co}(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})-\text{Zn}(\text{Me}_3-\text{TACN})]^{3+}$ 종의 형성이 속도 결정 단계인 것을 추정할 수 있다.

[0116] 평가 4. 하이드록사메이트 그룹 전달 반응에서 자유 에너지 프로파일 분석

[0117] 도 5a는 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체의 반응에서 자유 에너지 프로파일(Free energy profile)을 도시한 것이고, 도 5b는 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연 복합체의 반응에서 전이 상태에서의 형태학적 구조를 도시한 것이다. 보다 구체적으로, 도 5a는 하이드록사메이트 그룹 전달 반응에서 밀도 범함수 이론(Density functional theory)에 따른 자유 에너지 프로파일을 그래프로 도시한 것이다. 여기서, 각 상태의 자유 에너지를 나타내는 수치의 단위는 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 로 표현되고, L 및 L'는 각각 Co 및 Zn 복합체에 대한 리간드를 나타낸다. 또한, 도 5b는 하이드록사메이트 그룹 전달 반응에서 전이 상태에 해당하는 영역에서의 형태학적 구조를 도시한 것이다. 여기서, 거리를 나타내는 수치의 단위는 Å로 표현된다. 도 5a를 참조하면, Co(II) 복합체에 있는 하이드록사메이트의 NHO- 부분에 있는 산소 원자는 먼저 Int1에서 Zn(II) 복합체에 의해 배위되고, 그 후 하이드록사메이트의 카르보닐 산소는 전이 상태(TS1)를 통해 Co(II) 중심에서 Zn(II) 중심으로 전달되어 생성물 복합체(Int3)를 형성하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 5b를 참조하면, 전이 상태(TS1)에서 하이드록사메이트의 카르보닐 산소는 Co(II) 중심 사이의 거리가 3.37 Å이고, Zn(II) 중심 사이의 거리가 3.46 Å인 것을 확인할 수 있다.

[0119] 평가 5. 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 산화·환원 전위 측정 및 분석

[0120] 도 6은 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체 및 히드록시마토 코발트(III) 복합체의 순환전압전류법에 따른 결과를 그래프로 도시한 것이다. 여기서, TBAPF6 (0.10 M)를 포함하는 CH₃CN 용액에 $[\text{Co}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ 와 $[\text{Co}(\text{III})(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(\text{NO})\text{O})]^+$ 를 각각 3.0 mM씩 투여하였으며, 스캔 속도는 $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ 이었고 모든 전기화학적 측정은 N₂ 분위기 하에서 측정하였다.

[0121] 도 6을 참조하면, E_{1/2} 값에서 $[\text{Co}(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(-\text{NHO})\text{O})]^+$ 와 $[\text{Co}(\text{III})(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(\text{NO})\text{O})]^+$ 의 일 전자 산화 환원 전위는 각각 0.28 V와 0.47 V(SCE 대비)로 결정된 것을 확인할 수 있다. $[\text{Co}(\text{III})(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(\text{NO})\text{O})]^+$ 의 산화 환원 전위는 아스코르브산보다 더 음의 값을 나타내지만, 히드록시마토 코발트(III) 복합체의 양성자화는 더 많은 양의 전위를 가져와 쉽게 환원된다.

[0122] 도 7은 히드록시마토 코발트(III) 복합체의 순환전압전류법에 따른 결과를 그래프로 도시한 것이다. 여기서, TBAPF6 (0.10 M)를 포함하는 CH₃CN 용액에 1당량의 HC104 존재 하에 $[\text{Co}(\text{III})(\text{TBDAP})(\text{CH}_3\text{C}(\text{NO})\text{O})]^+$ 를 3.0 mM 투여하였으며, 스캔 속도는 $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ 이었고 모든 전기화학적 측정은 N₂ 분위기 하에서 측정하였다.

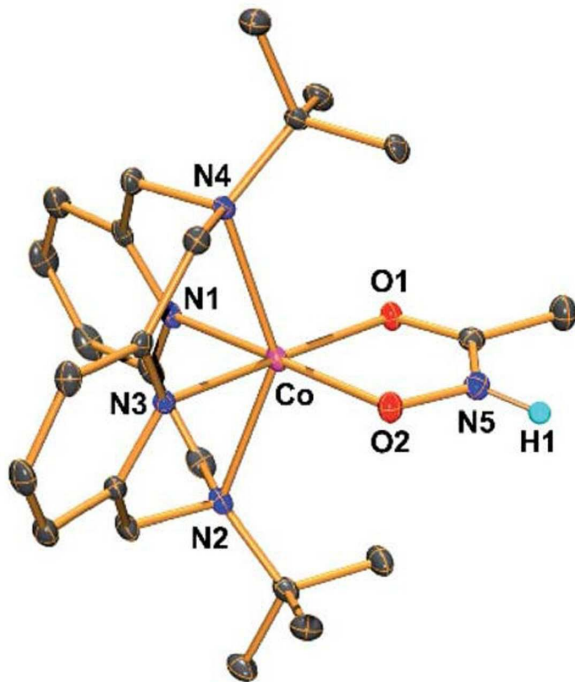
[0123] 도 7을 참조하면, CV 실험에서 히드록시마토 코발트(III) 복합체의 산화 환원 신호는 양성자 추가시 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 산화 환원 신호가 동시에 발생하면서 사라진 것을 확인할 수 있다.

[0124] 아연 함유 효소에 대한 아세트히드록삼산 또는 히드록시마토 코발트(III) 복합체에 비해 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 영향을 확인하기 위해 MMP-9에 대한 억제 활성을 평가하였다. 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체, 히드록시마토 코발트(III) 복합체 또는 아세트히드록삼산의 존재 하에서 기질로서 펩티드와 함께 활성화된 MMP-9의 배양 후, 효소에 의해 절단되지 않은 기질의 양이 분석되었다. 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 히드록시마토 코발트(III) 복합체에 의한 MMP-9에 대한 억제율은 아세트히드록삼산과 대비하여 각각 77(2) %와 24(3) %였다. 즉, MMP-9에 대한 억제 활성은 히드록시마토 코발트(III) 복합체보다 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체가 더 뛰어난 것을 확인하였다.

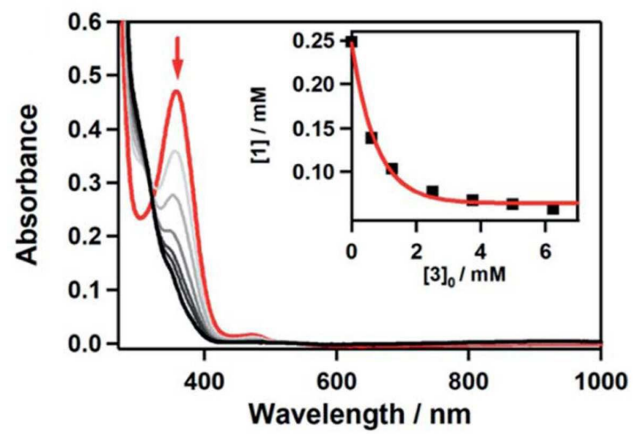
- [0126] 평가 6. 하이드록사메이트 그룹 전달 반응에서의 도킹 연구 및 분석
- [0127] 분자 수준에서 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 MMP-9 사이의 가능한 상호 작용을 시각화 하기 위해 MMP-9 (PDB 4H3X)의 촉매 도메인을 사용하여 도킹 연구를 수행하였다.
- [0128] 도 8은 하이드록사메이트 그룹 전달 반응에서 MMP-9의 촉매 도메인에 도킹된 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 가능한 결합 형태를 도시한 것이다. 이러한 형태는 -5.5 내지 $-3.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 범위에서 계산된 결합 에너지를 나타내고, $3.0 \text{ \AA}$ 내의 수소 결합 및 C-H의 π 결합은 점선으로 표시되었다. MMP-9의 촉매 도메인에있는 Zn(II) 중심은 주황색 구체로 강조 표시되었다.
- [0129] 도 8을 참조하면, 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체는 3 개의 히스티딘 잔기(즉, H226, H230 및 H236)가 활성 Zn(II) 중심에 배위되는 MMP-9의 촉매 틈새에 접근할 수 있는 것을 확인할 수 있다. 보다 구체 적으로, 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체는 MMP-9의 촉매 도메인과 (i) 수소 결합{[하이드 록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 C-H와 A189, A191, E227 및 D235의 산소(O) 공여 원자; H236의 질소(N) 공여 원자] 및 [H236의 C-H와 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 산소(O) 공여 원자]} 및 (ii) C-H의 π 결합(L187 및 H236에서 측쇄의 C-H와 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 피리딘 그룹(pyridine groups))과 같은 다중 접촉이 가능한 것을 확인할 수 있다.
- [0131] 상술한 바에 따른 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체는 프로드러그 전달 반응에서 환원된 중 간단계 물질로써 암세포에서 과발현되는 매트릭스 메탈로프로테나아제의 활성을 억제할 수 있는 효과가 있다.
- [0132] 또한, 본 발명의 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체의 전환 방법은 거대고리 배위자를 활용한 보다 안정 한 중간단계 물질인 하이드록사메이트 결합 코발트(II) 복합체와 아연을 활성중심으로 가지는 효소의 반응을 통 하여 분자 수준의 하이드록사메이트의 전달 메커니즘을 제시할 수 있다.
- [0133] 이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로서, 본 발명이 속하는 기술 분야에 서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가 능할 것이다.
- [0134] 따라서, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위 에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

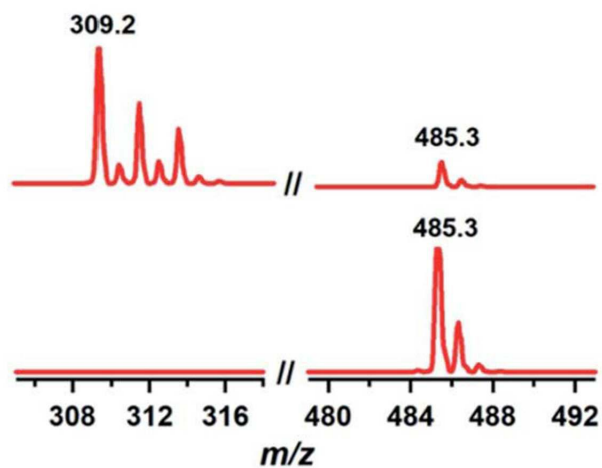
도면1



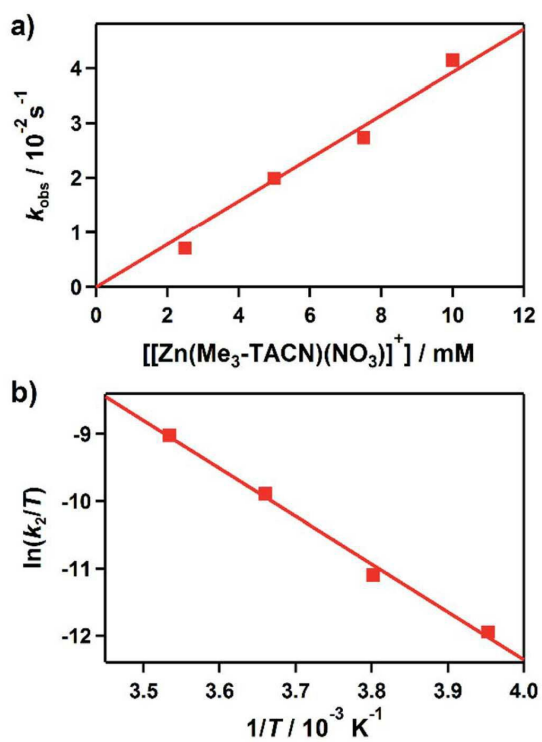
도면2



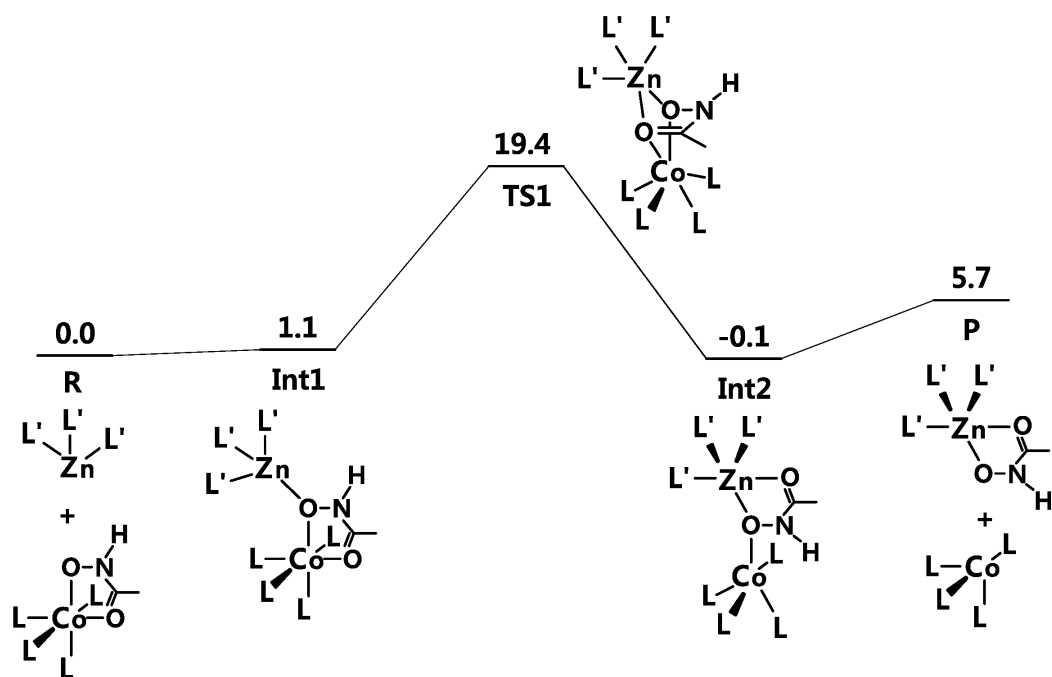
도면3



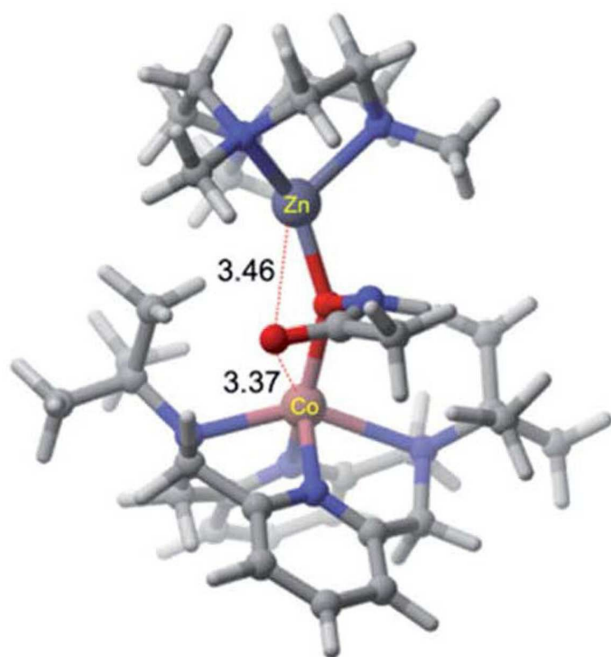
도면4



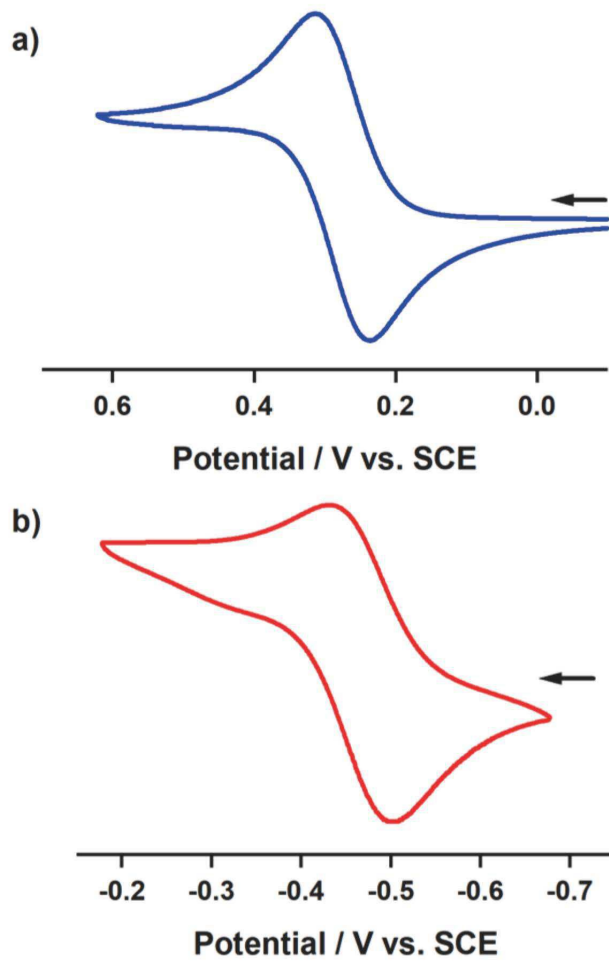
도면5a



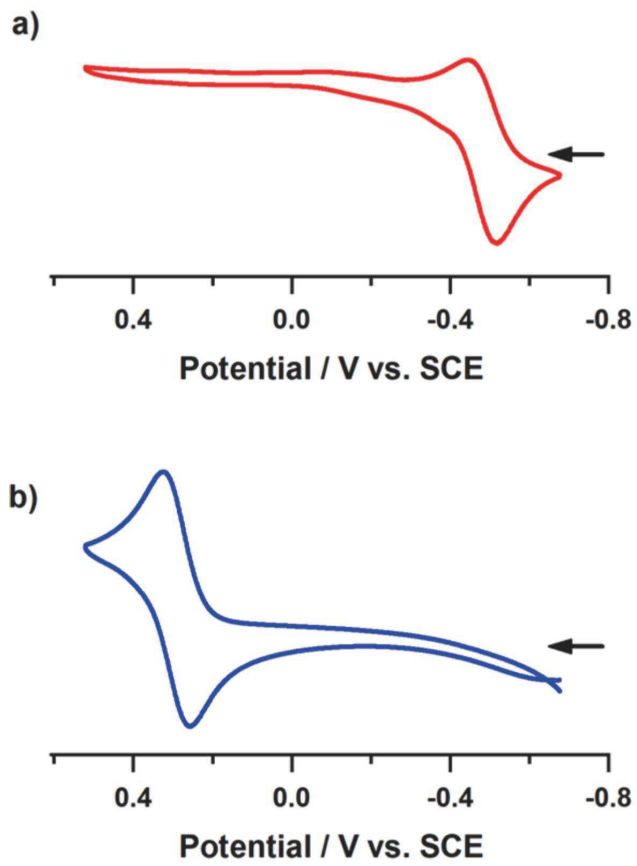
도면5b



도면6



도면7



도면8

