



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0076875
(43) 공개일자 2021년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/662 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/662 (2013.01)
A61K 9/0048 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0176125
(22) 출원일자 2020년12월16일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020190168238 2019년12월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 스마틴바이오
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로
194-25 ,3층에이-16호(청주SB플라자)
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
강병현
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과
학기술원
김소연
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과
학기술원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 아이피에스

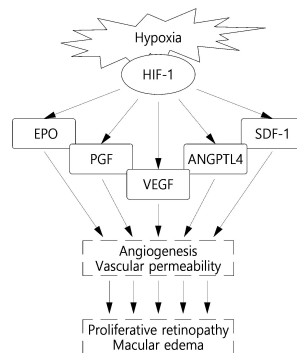
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 신생혈관형성인자의 억제를 위한 화합물 및 그 용도

(57) 요약

본 출원은 신생혈관형성인자의 억제를 위한 화합물 및 그 용도에 관한 것이다. 나아가 본 출원은 상기 화합물을 이용한 신생혈관형성성 질병의 치료 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 27/02 (2018.01)

(72) 발명자

윤남구

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

이창욱

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

박동호

대구광역시 중구 동덕로 130 경북대학교 병원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1425140465

과제번호

S2783310

부처명

중소벤처기업부

과제관리(전문)기관명

중소기업기술정보진흥원

연구사업명

창업성장기술개발(R&D)

연구과제명

VEGF억제제보다 약효가 뛰어나고 점안방식인 Best in Class, First in Class 당뇨병

막증 치료제

기 여 율

32.50/100

과제수행기관명

주식회사 스마틴바이오

연구기간

2020.01.01 ~ 2020.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711105843

과제번호

2019M3A9A8065669

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

바이오.의료기술개발(R&D)

연구과제명

당뇨망막증 치료용 신규 타겟 검증 및 경구용 후보물질 도출

기 여 율

67.50/100

과제수행기관명

울산과학기술원

연구기간

2020.03.01 ~ 2020.12.31

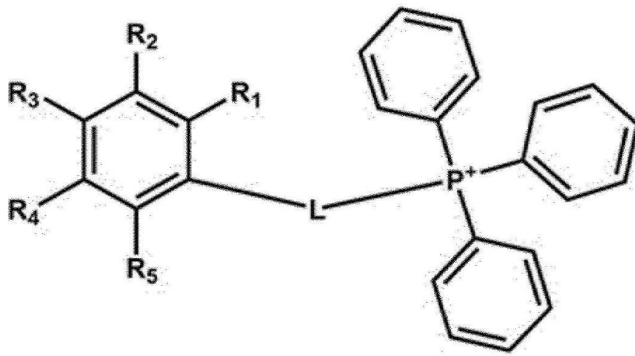
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이의 전구약물:

[화학식1]



이때,

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , 및 R_5 는 각각 H, 할로겐, 히드록시, 히드록시 C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, C_{1-5} 알키닐, 및 C_{1-5} 알콕시로부터 선택되고,

(R_1 , R_4)는 이들 중 어느 하나가 히드록시인 경우 나머지 하나가 히드록시가 아니며, 또한 (R_2 , R_5)는 이들 중 어느 하나가 히드록시인 경우 나머지 하나가 히드록시가 아니고,

L은 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하며, 또한

n은 5 내지 12의 정수임을 특징으로 함.

청구항 2

제1항에 있어서,

R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

R_3 , 및 R_4 는 각각 C_{1-5} 알콕시인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서

R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐이고,

R₃, 및 R₄는 각각 C₁₋₅알콕시인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서,

R₂ 및 R₅는 각각 히드록시, 알콕시 또는 할로젠이고, R₂ 및 R₅ 중 적어도 하나는 할로젠인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서,

R₁은 H, C₁₋₅알킬, C₁₋₅알케닐, 또는 C₁₋₅알키닐이고,

R₃, 및 R₄는 각각 C₁₋₅알콕시이며,

R₂ 및 R₅는 각각 히드록시, 알콕시 또는 할로젠이고, R₂ 및 R₅ 중 적어도 하나는 할로젠인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 7

제1항에 있어서,

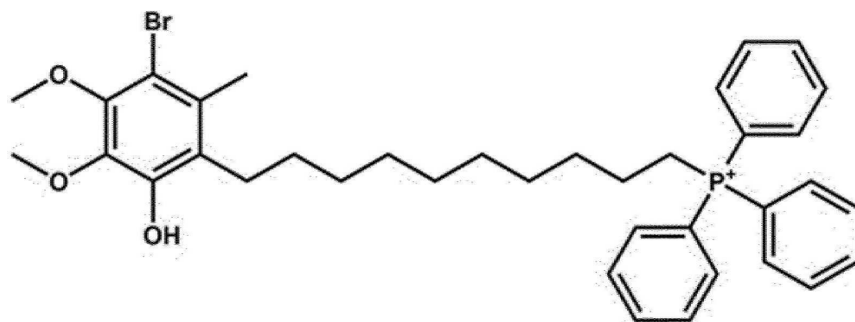
n=10인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 8

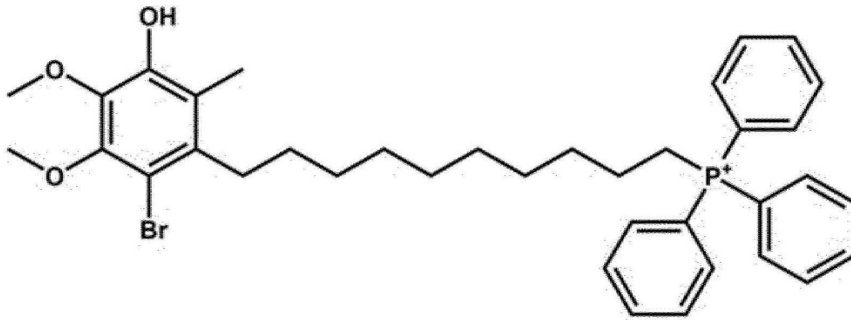
제1항에 있어서,

상기 화학식 1는 하기 화학식 2 내지 5로부터 선택되는 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 하는 화합물:

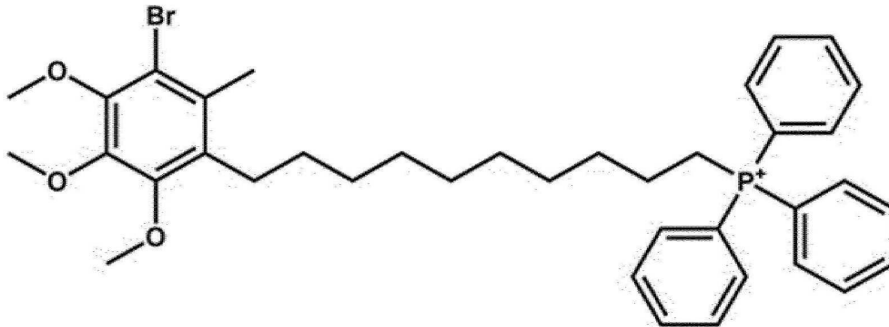
[화학식2]



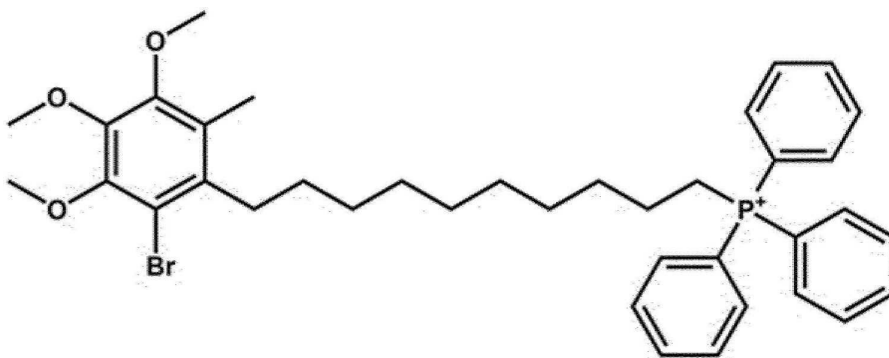
[화학식3]



[화학식4]



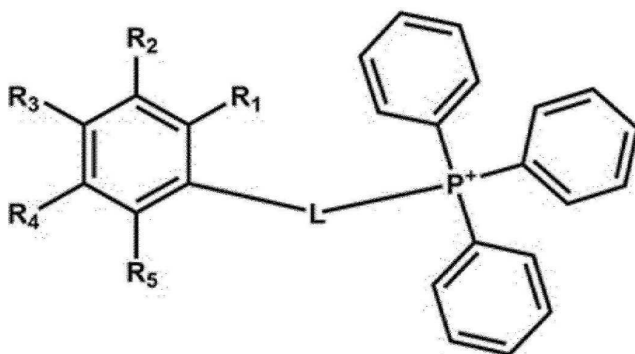
[화학식5]



청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이의 전구약물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



이때,

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , 및 R_5 는 각각 H, 할로겐, 히드록시, 히드록시 C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, C_{1-5} 알키닐, 및 C_{1-5} 알콕시로부터 선택되고,

(R_1 , R_4)는 이들 중 어느 하나가 히드록시인 경우 나머지 하나가 히드록시가 아니며,

또한 (R_2 , R_5)는 이들 중 어느 하나가 히드록시인 경우 나머지 하나가 히드록시가 아니고,

L은 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하며, 또한

n은 5 내지 12의 정수임을 특징으로 함.

청구항 10

제9항에 있어서,

R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

R_3 , 및 R_4 는 각각 C_{1-5} 알콕시인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서

R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐이고,

R_3 , 및 R_4 는 각각 C_{1-5} 알콕시인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서,

R_2 및 R_5 는 각각 히드록시, 알콕시 또는 할로겐이고, R_2 및 R_5 중 적어도 하나는 할로겐인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제9항에 있어서,

R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐이고,

R_3 , 및 R_4 는 각각 C_{1-5} 알콕시이며,

R_2 및 R_5 는 각각 히드록시, 알콕시 또는 할로겐이고, R_2 및 R_5 중 적어도 하나는 할로겐인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

제9항에 있어서,

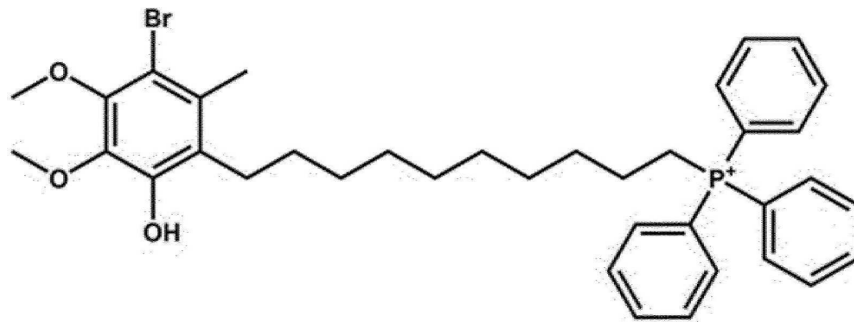
n=10인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

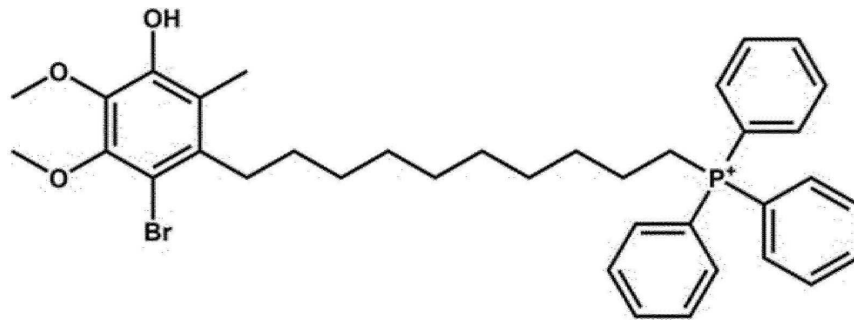
제9항에 있어서,

상기 화학식 1은 하기 화학식 2 내지 5로부터 선택되는 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물:

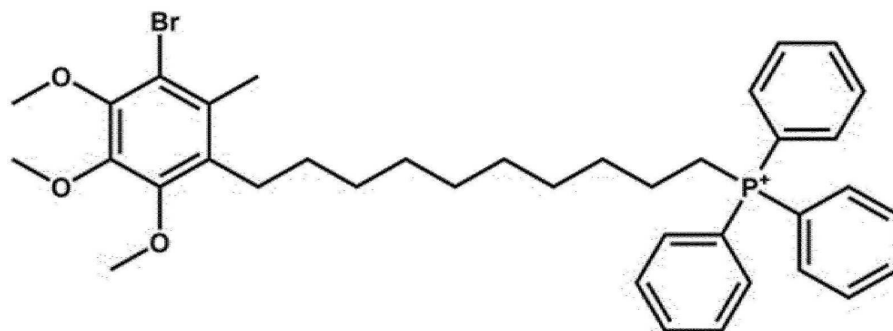
[화학식2]



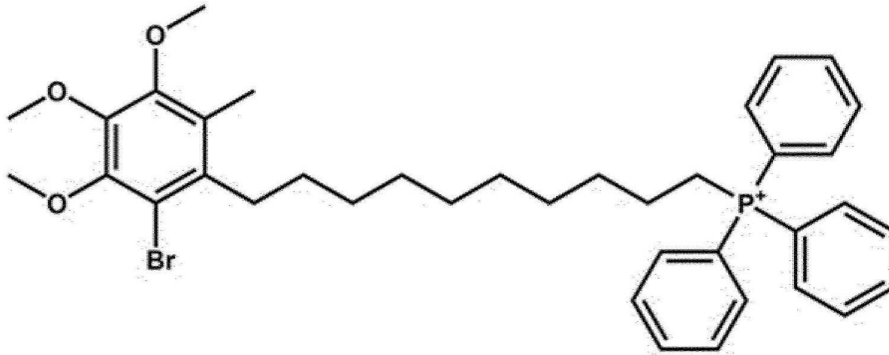
[화학식3]



[화학식4]



[화학식5]



청구항 17

제9항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 점안 투여용인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 18

제9항에 있어서,

상기 신생혈관형성성 안구 질환은 맥락막 신생혈관형성 질환, 망막 신생혈관형성 질환, 망막하 신생혈관형성 질환, 각막 신생혈관형성 질환, 홍채 신생혈관형성 질환, 신생혈관형성성 녹내장인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

제9에 있어서,

상기 신생혈관형성성 안구 질환은 망막 신생혈관형성 질환으로서,

상기 망막 신생혈관형성 질환은 당뇨망막병증, 미숙아망막병증 또는 망막정맥폐쇄증인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 20

제9항에 있어서,

상기 신생혈관형성성 안구 질환은 맥락막 신생혈관형성 질환으로서,

상기 맥락막 신생혈관형성 질환은 노인성 습식 황반변성(AMD)인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 신생혈관형성인자의 억제를 위한 화합물 및 그 용도에 관한 것이다. 나아가 본 출원은 상기 화합물을 이용한 신생혈관형성성 질병의 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신생혈관형성 (Neovascularization)은 기형성된 혈관의 주변에 새로운 혈관들이 형성되는 신체적 현상으로, 비정상적으로 발생하는 경우 질병 또는 질환의 원인이 될 수 있다. 본 출원에서 언급하는 신생혈관형성은 기형성

된 혈관으로부터 새로운 혈관이 뻗어 나오는 혈관신생 (angiogenesis)을 포함하며, 두 용어를 구별하지 않고 사용한다.

[0003] 예를 들어, 암 세포는 신생혈관형성인자 (Neovascularization factor)를 과다 생성함으로써 과다 성장한 암 조직에 미세혈관을 형성하고, 이를 통해 산소 및 양분을 공급하여 암 세포의 생존 능력을 높인다. 또한, 안구 구조 (ocular structure)에서 신생혈관형성인자가 과다 생성되면 다양한 안구 질환 (ocular disease)의 원인이 되는 것으로 알려져 있다.

[0004] 이러한 신생혈관형성성 질병 (neovascular disease)을 치료하기 위한 기존의 연구는 대부분 주요 신생혈관형성 인자인 VEGF를 억제하는 것에 치중되어 있다 [1, 2]. 구체적으로 VEGF 억제 치료는 다음 세 가지 접근법에 의하고 있다: 먼저, VEGF 리간드 (VEGF ligand)가 VEGF 수용기 (VEGF receptor)에 결합하는 것을 막기 위하여 VEGF 리간드 특이적 항체를 사용하는 방법 (e.g. bevacizumab, aflibercept, ranibizumab); VEGF 수용기 특이적 항체를 사용하는 방법 (e.g. ramucirumab); 또는 VEGF 수용기를 억제하는 티로신 키나제 억제제 (tyrosin kinase inhibitor; TKI)를 투여하는 방법 (sorafenib, sunitinib, pazopanib).

[0005] 이 중, 항체를 사용하는 접근법은 항체의 물리적 한계가 문제된다 [3]. 항체는 분자량이 커지면 약동학적 특성이 개선되나 혈관 투과도가 낮아져 조직 침투능이 낮아지는 문제가 있다. 단일 클론 항체 (monoclonal antibody)는 약동학적 특성이 개선되나 조직 침투능이 떨어지고, 단일 사슬 가변 분절 항체 (Single-chain variable fragment; ScFv) 등 항체의 절편은 조직 침투능이 개선되나 약동학적 특성이 떨어진다. 이로 인해 대부분의 항체 치료법은 약물이 비정상 조직에 직접 작용하도록 하기 위하여 주사 투여에 의한 침습적 (invasive) 방법에 의존하고 있으며, 구강 투여 (oral administration), 피부 경로 투여 (transdermal delivery) 등의 비침습적 (non-invasive) 방법이 불가능하다.

[0006] 또한, 항체를 통해 VEGF를 직접적으로 억제하면 부작용이 발생할 수 있다 [4]. VEGF는 다양한 기능을 갖는 성장 인자이기 때문에 VEGF 억제제가 전신에 작용하는 경우 조직의 정상적인 성장에 영향을 미칠 수 있다. 이로 인해 VEGF 억제 치료법은 비정상 조직에 직접 투여하거나 유도 치료되지 못하면 안전성이 크게 떨어지는 문제가 있다. 이러한 단점들로 인하여 VEGF 억제 치료법은 현재 주류 치료법이기는 하나 그 한계가 뚜렷하며, VEGF 억제제가 아닌 새로운 기전을 통한 치료법의 연구가 필요하다.

[0007] TRAP-1은 VEGF의 상위 조절자 중 하나인 HIF-1 α 를 조절하는 것으로 알려져 있다. TRAP-1은 HSP90의 파라로그 중 하나이고, 기존에 HSP90의 억제제가 활발히 연구되었으나 이러한 억제제는 HSP90 및 이의 파라로그들에 비선택적으로 작용하여 높은 독성을 보이는 문제를 가지고 있었다 (한국특허 공개공보 KR20150109540A 참조). 본 출원의 발명자는 TRAP-1이 VEGF를 대신할 수 있는 치료학적 타겟이 될 수 있음을 인식하였으며, TRAP-1을 선택적으로 억제할 수 있는 신규한 방법을 발명하게 되어 본 출원에 이르게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) [1] Kellen L. Meadows and Herbert I. Hurwitz, Anti-VEGF Therapies in the Clinic, Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Oct 1;2(10).
- (비특허문헌 0002) [2] Katja Zirlik and Justus Duyster, Anti-Angiogenics: Current Situation and Future Perspectives, Oncol Res Treat. 2018;41(4):166-171.
- (비특허문헌 0003) [3] Patrick Chames, Marc Van Regenmortel, Etienne Weiss and Daniel Baty, Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future, Br J Pharmacol. 2009 May;157(2):220-33.
- (비특허문헌 0004) [4] T Kamba and DM McDonald, Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer, Br J Cancer. 2007 Jun 18;96(12):1788-95.
- (비특허문헌 0005) [5] Peter A. Campochiaro, Ocular Neovascularization, J Mol Med (Berl). 2013 March ; 91(3): 311-321.
- (비특허문헌 0006) [6] Barbara Onnis, Annamaria Rapisarda and Giovanni Melillo, Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy, J. Cell. Mol. Med. Vol 13, No 9A, 2009 pp. 2780-2786.

(비특허문헌 0007) [7] Young Chan Chae, M. Cecilia Caino, Sofia Lisanti, and et al. Control of Tumor Bioenergetics and Survival Stress Signaling by Mitochondrial HSP90s, Cancer Cell. 2012 Sep 11;22(3):331-44.

(비특허문헌 0008) [8] Stuart K. Calderwood and Thomas L. Prince, Chaperones: Methods and Protocols, Humana Press, 2018, pp. 424-432.

(비특허문헌 0009) [9] Daniel T. Gewirth, Paralog specific Hsp90 Inhibitors - a brief history and a bright future, Curr Top Med Chem. 2016 ; 16(25): 2779-2791.

(비특허문헌 0010) [10] Ionica Masgras, Carlos Sanchez-Martin, Giorgio Colombo and Andrea Rasola, The Chaperone TRAP1 As a Modulator of the Mitochondrial Adaptations in Cancer Cells, Front Oncol. 2017 Mar 29;7:58.

(비특허문헌 0011) [11] Verba KA, Wang RY, Arakawa A, Liu Y, Shirouzu M, Yokoyama S, and Agard DA, Atomic structure of Hsp90-Cdc37-Cdk4 reveals that Hsp90 traps and stabilizes an unfolded kinase, Science. 2016 Jun 24;352(6293):1542-7.

발명의 내용

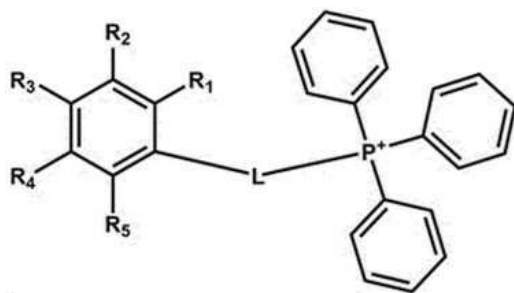
해결하려는 과제

- [0009] 본 출원에 의해 개시되는 일 과제는, 신생혈관형성인자를 억제하기 위한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 출원에 의해 개시되는 다른 과제는, 상기 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 전구약물을 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 출원에 의해 개시되는 또 다른 과제는, 상기 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 전구약물을 포함하는 약학적 조성물을 처방함을 포함하는 신생혈관형성성 질환을 치료하기 위한 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 나아가, 본 출원에 의해 개시되는 또 다른 과제는 신생혈관형성성 질환 중 신생혈관형성성 안구 질환을 치료하기 위한 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 더 나아가, 본 출원에 의해 개시되는 또 다른 과제는 신생혈관형성성 안구 질환을 치료하기 위한 점안 투여용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 또한, 본 출원에 의해 개시되는 또 다른 과제는 상기 약학적 조성물을 구강 투여 또는 안구 점안 투여함을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환을 치료하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 출원은 하기 [화학식1]로 표시되는 구조를 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이의 전구약물을 제공한다:

- [0016] [화학식1]



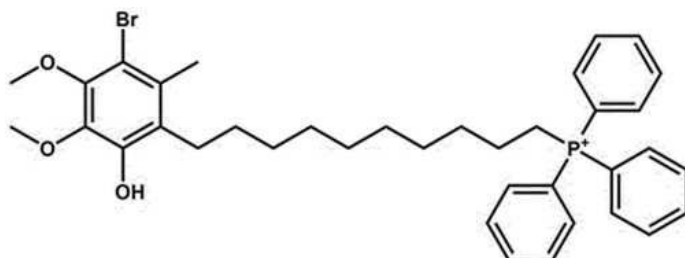
- [0017]

- [0018] 이때,

- [0019] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , 및 R_5 는 각각 H, 할로젠, 히드록시, 히드록시 C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, C_{1-5} 알키닐, 및 C_{1-5} 알콕시로부터 선택되고,
- [0020] (R_1 , R_4)는 이들 중 어느 하나가 히드록시인 경우 나머지 하나가 히드록시가 아니며, 또한 (R_2 , R_5)는 이들 중 어느 하나가 히드록시인 경우 나머지 하나가 히드록시가 아니고,
- [0021] L은 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하며, 또한
- [0022] n은 5 내지 12의 정수임을 특징으로 함.
- [0023] 또는, 상기 화학식1에서 R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐인 것을 특징으로 하는 화합물을 제공한다.
- [0024] 또는, 상기 화학식1에서 R_3 , 및 R_4 는 각각 C_{1-5} 알콕시인 것을 특징으로 하는 화합물을 제공한다.
- [0025] 또는, 상기 화학식1에서 R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐이고, R_3 , 및 R_4 는 각각 C_{1-5} 알콕시인 것을 특징으로 하는 화합물을 제공한다.
- [0026] 또는, 상기 화학식1에서 R_2 및 R_5 는 각각 히드록시, 알콕시 또는 할로젠이고, R_2 및 R_5 중 적어도 하나는 할로젠인 것을 특징으로 하는 화합물을 제공한다.
- [0027] 또는, 상기 화학식1에서 R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐이고, R_3 , 및 R_4 는 각각 C_{1-5} 알콕시이며, R_2 및 R_5 는 각각 히드록시, 알콕시 또는 할로젠이고, R_2 및 R_5 중 적어도 하나는 할로젠인 것을 특징으로 하는 화합물을 제공한다.
- [0028] 또는, 상기 화학식1에서 L은 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하며, 이때 $n=10$ 인 것을 특징으로 하는 화합물을 제공한다.

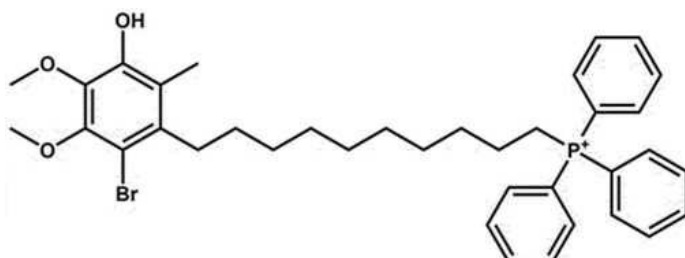
- [0030] 또는, 상기 화학식1은 하기 [화학식2] 내지 [화학식5]로부터 선택되는 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 하는 화합물을 제공한다:

[0031] [화학식2]



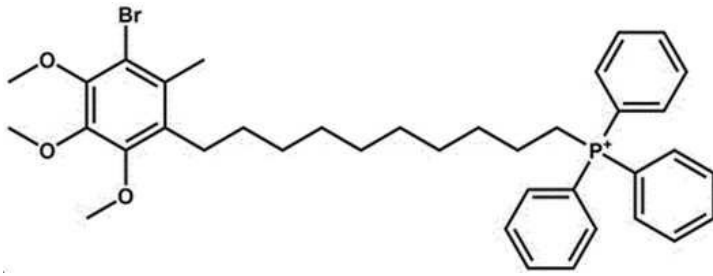
[0032]

[0033] [화학식3]



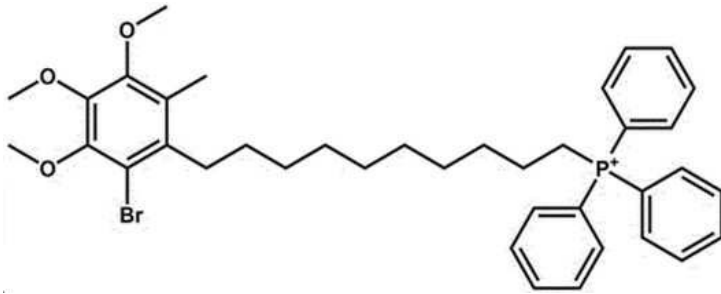
[0034]

[0035] [화학식4]



[0036]

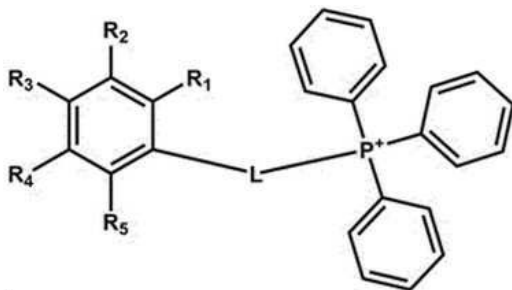
[0037] [화학식5]



[0038]

[0040] 나아가, 본 출원은 하기 [화학식1]로 표시되는 구조를 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이의 전구약물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0041] [화학식1]



[0042]

[0043] 이때,

[0044] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , 및 R_5 는 각각 H, 할로젠, 히드록시, 히드록시 C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, C_{1-5} 알키닐, 및 C_{1-5} 알콕시로부터 선택되고,

[0045] (R_1 , R_4)는 이들 중 어느 하나가 히드록시인 경우 나머지 하나가 히드록시가 아니며, 또한 (R_2 , R_5)는 이들 중 어느 하나가 히드록시인 경우 나머지 하나가 히드록시가 아니고,

[0046] L은 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하며, 또한

[0047] n은 5 내지 12의 정수임을 특징으로 함.

[0048] 또는, 상기 화학식1에서 R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0049] 또는, 상기 화학식1에서 R_3 , 및 R_4 는 각각 C_{1-5} 알콕시인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0050] 또는, 상기 화학식1에서 R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐이고, R_3 , 및 R_4 는 각각 C_{1-5} 알콕시인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.

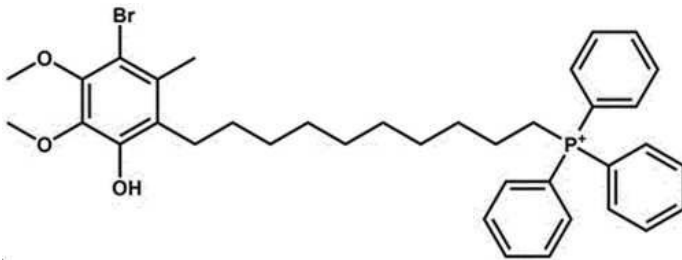
[0051] 또는, 상기 화학식1에서 R_2 및 R_5 는 각각 히드록시, 알콕시 또는 할로젠이고, R_2 및 R_5 중 적어도 하나는 할로젠인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0052] 또는, 상기 화학식1에서 R_1 은 H, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, 또는 C_{1-5} 알키닐이고, R_3 , 및 R_4 는 각각 C_{1-5} 알콕시이며, R_2 및 R_5 는 각각 히드록시, 알콕시 또는 할로젠이고, R_2 및 R_5 중 적어도 하나는 할로젠인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0053] 또는, 상기 화학식1에서 L은 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하며, 이때 $n=10$ 인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.

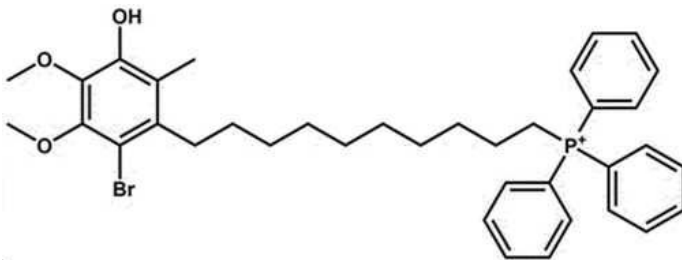
[0055] 또는, 상기 화학식 1은 하기 [화학식2] 내지 [화학식5]로부터 선택되는 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0056] [화학식2]



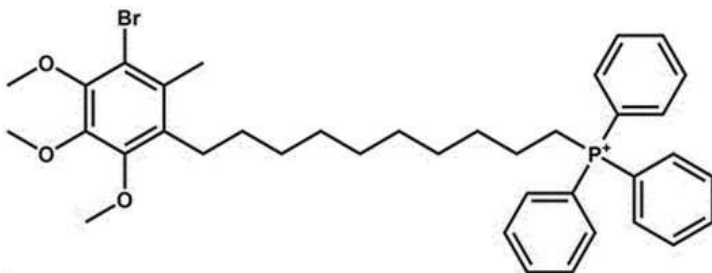
[0057]

[0058] [화학식3]



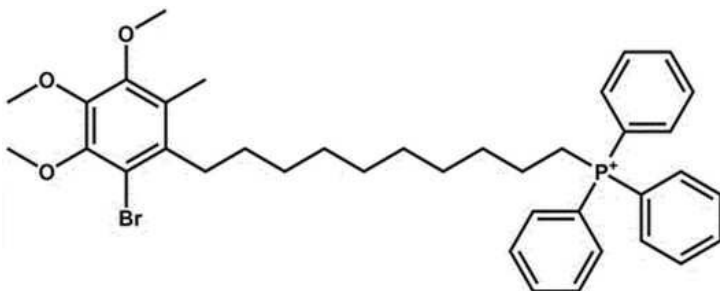
[0059]

[0060] [화학식4]



[0061]

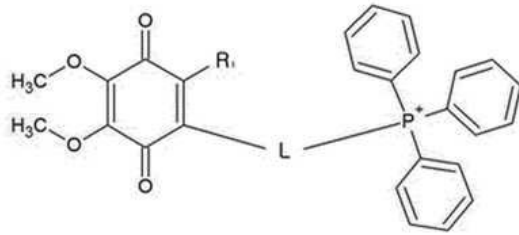
[0062] [화학식5]



[0063]

[0065] 또한, 본 출원은 하기 [화학적식6]으로 표시되는 구조를 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이의 전구약물을 포함하는 신생혈관형성성 안구 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다:

[0066] [화학적식6]



[0067]

[0068] 이때,

[0069] R₁은 메틸이고,

[0070] L은 -(CH₂)_n-를 포함하며 n은 5 이상 12 이하의 정수임을 특징으로 함.

[0071] 또는, 상기 구조에 있어 L은 -(CH₂)₁₀-인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물이 본 출원에서 제공된다.

[0073] 나아가, 본 출원의 약학적 조성물은 점안 투여용인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물이 제공된다.

[0075] 또는, 상기 신생혈관형성성 안구 질환은 맥락막 신생혈관형성 질환, 망막 신생혈관형성 질환, 망막하 신생혈관형성 질환, 각막 신생혈관형성 질환, 홍채 신생혈관형성 질환 또는 신생혈관 녹내장인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물이 제공된다. 더 나아가, 상기 신생혈관형성성 안구 질환은 망막 신생혈관형성 질환으로서, 상기 망막 신생혈관형성 질환은 당뇨망막병증, 미숙아망막병증 또는 망막정맥폐쇄인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물이 제공된다. 더 나아가, 상기 망막 신생혈관형성 질환은 당뇨망막병증인 것을 특징으로 신생혈관형성성 안구 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물이 제공된다. 더 나아가, 상기 맥락막 신생혈관형성 질환은 노인성 습식 황반변성(wet AMD)인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안구 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물이 제공된다.

발명의 효과

[0076] 본 출원의 약학적 조성물에 의하여 신생혈관형성성 질환의 치료가 가능하다. 그 중 특히 신생혈관형성성 안구 질환의 치료가 가능하다. 본 출원의 약학적 조성물을 이용하여 이하의 효과를 얻을 수 있다.

[0077] 본 출원의 약학적 조성물을 이용하면 비침습적 치료가 가능하다. 본 출원의 SMx 및 신규 화합물 분자는 단백질이 아닌 저분자 (small molecule)로서 조직 침투능이 높다. 이로 인해 비정상 조직에 대한 직접적 주사 투여가 불필요하며 구강 투여 또는 안구 점안 투여와 같은 비침습적 치료가 가능한 장점이 있다.

[0078] 또한, 본 출원에 의해 개시되는 약학적 조성물 혹은 이 약학적 조성물을 이용한 치료법은 기존의 치료제 혹은 치료법 보다 더 높은 안정성을 가진다. 이는 기존의 치료제는 비정상 세포와 정상 세포 모두에서 발현되는 인자를 타겟하는 것인 반면, 본 출원에 의해 개시되는 약학적 조성물인 SMx 및 신규 화합물 분자는 비정상 세포에서 과다하게 발현되는 인자를 타겟하기 때문에, 비정상 세포에 대한 특이적 치료를 가능하게 한다. 이로 인해 정상 세포에 대한 부작용을 나타내지 않으므로써, 본 출원에 의해 개시되는 약학적 조성물은 보다 독성이 개선된 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1은 TRAP-1 및 이와 관련된 신생혈관형성인자들의 신호경로를 나타낸 것이다.

도 2는 TRAP-1과 HIF-1 α 사이의 구체적인 신호경로를 나타낸 것이다.

도 3은 TRAP-1의 구조 및 이의 작동 과정을 나타낸 것이다.

도 4는 TRAP-1 +/+ 마우스 및 TRAP-1 +/- 마우스로 준비된 산소 유도 망막증 모델의 망막 혈관 사진이다.

도 5는 도 4에서 TRAP-1 +/+ 마우스 및 TRAP-1 +/- 마우스로 준비된 산소 유도 망막증 모델의 망막 혈관 사진을 통계 처리한 결과이다.

도 6은 TRAP-1을 녹다운 시킨 세포에 대한 tube formation assay 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 도 6에 의한 tube formation assay 결과를 통계 처리한 결과이다.

도 8은 SMx의 농도에 따라 HIF-1 α 의 발현 변화를 확인한 웨스턴 블랏의 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 HIF-1 α SMx를 처리하였을 때 신생혈관형성인자의 발현 변화를 확인한 웨스턴 블랏의 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 기존 논문에서 확인한 HSP90과 클라이언트 단백질의 결합 구조를 도시한 것이다.

도 11은 도 10에 의한 HSP90-클라이언트 단백질 간 결합 위치와 도 12에 의한 TRAP-1-SMx 간 결합 위치를 오버랩한 것이다.

도 12는 TRAP-1과 SMx의 결합 구조의 X-ray crystallography 분석결과이다.

도 13은 TRAP-1 상에서 SMx와의 결합에 관여하는 위치의 중간 보존성 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 SMx가 클라이언트 단백질과 경쟁적으로 TRAP-1에 결합하는 것을 검증하기 위한 풀 다운 어세이 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 TRAP-1 상에서 SMx와의 결합에 관여하는 위치가 TRAP-1 상에서 클라이언트 단백질과의 결합에 관여하는 위치와 동일하다는 것을 확인하기 위한 실험 결과이다. 좌측은 해당 위치를 변형시킨 후 수행한 풀 다운 어세이 결과이고, 우측은 해당 위치를 변형시킨 후 수행한 SIRT3 활성 실험 결과이다.

도 16은 SMx와 PU-H71을 처리한 야생형 (wild type) 및 돌연변이형 (mutant) TRAP-1에 대한 ATPase activity assay 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 SMx와 Eylea (Aflibercept)를 안구 주사한 산소 유도 망막증 마우스 모델의 망막 혈관 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 SMx를 점안 투여한 산소 유도 망막증 마우스 모델의 망막 혈관 분석 사진이다.

도 19는 SMx를 점안 투여한 산소 유도 망막증 마우스 모델의 망막 혈관 분석 사진을 통계 처리한 결과이다.

도 20은 (10-(2-브로모-5-하이드록시-3,4-디메톡시-6-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄포메이트((10-(2-bromo-5-hydroxy-3,4-dimethoxy-6-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium formate)를 제조하는 단계를 나타낸 모식도이다.

도 21은 (10-(3-브로모-4,5,6-트리메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 브로마이드((10-(3-bromo-4,5,6-trimethoxy-2-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium bromide)를 제조하는 단계를 나타낸 모식도이다.

도 22는 (10-(2-브로모-3,4,5-트리메톡시-6-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 브로마이드((10-(2-bromo-3,4,5-trimethoxy-6-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium bromide)를 제조하는 단계를 나타낸 모식도이다.

도 23은 (10-(3-브로모-4,5,6-트리메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 브로마이드((10-(3-bromo-4,5,6-trimethoxy-2-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium bromide)를 제조하는 단계를 나타낸 모식도이다.

도 24은 SMx 및 신규 화합물 분자(SB-U005, SB-U009, SB-U011, SB-U012)가 클라이언트 단백질과 경쟁적으로 TRAP-1에 결합하는 것을 검증하기 위한 풀 다운 어세이 결과를 나타낸 것이다.

도 25는 MIO-M1 HRE 세포주에 SMx 및 신규 화합물 분자(SB-U005, SB-U009, SB-U011, SB-U012)를 처리하였을 때 IC₅₀ 값을 나타낸 것이다.

도 26은 망막색소상피세포인 ARPE-19 세포주에 SMx 및 신규 화합물 분자(SB-U005, SB-U009, SB-U011, SB-U012)를 처리하였을 때 신생혈관형성인자(HIF-1 α)의 발현 변화를 확인한 웨스턴 블랏의 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0080] 1. 용어 정의
- [0081] "알콕시"라는 용어는 알킬 기, 바람직하게는 저급 알킬 기로서, 이에 산소가 결합된 것을 의미한다. 대표적인 알콕시 기는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, tert-부톡시 및 이와 같은 것을 포함한다.
- [0082] "알콕시알킬"이라는 용어는 알킬 기로서 알콕시 기로 치환된 것을 의미하고 또한 일반 화학식으로는 알킬-O-알킬로 대표될 수 있다.
- [0083] "알케닐"이라는 용어는, 본 출원에서 사용되는 한, 지방족 잔기로서 적어도 하나의 이중 결합을 포함하는 것을 의미하고 또한 "비치환된 알케닐" 및 "치환된 알케닐"을 둘 다 포함하도록 의도되었으며, 이중 후자는 알케닐 기로서 상기 알케닐 기의 하나 이상의 탄소 상에서 수소를 대신하는 치환기를 갖는 것을 의미한다. 이러한 치환기는 하나 이상의 이중 결합에 포함되거나 포함되지 않는 하나 이상의 탄소 상에 존재할 수 있다. 나아가, 이러한 치환기는 안정성이 문제되는 경우를 제외하고는, 하기에서 논의되는 바와 같이, 알킬 기에 관하여 고려될 수 있는 모든 것들을 포함한다. 예를 들어, 하나 이상의 알킬, 카르보시클릴, 아릴, 헤테로시클릴, 또는 헤테로아릴 기로의 알케닐 기의 치환을 고려할 수 있다.
- [0084] "알킬" 기 또는 "알칸"은 사슬 모양 또는 가지 모양 비방향족 탄화수소로서 완전히 포화된 것이다. 대표적으로, 사슬 모양 또는 가지 모양 알킬 기는 다르게 정의되지 않는 한 1 내지 약 20 개의 탄소 원자를 갖는다. 사슬 모양 및 가지 모양 알킬 기는 메틸, 에틸, n-프로필, iso-프로필, n-부틸, sec-부틸, tert-부틸, 펜틸, 헥실, 헨틸 및 옥틸을 포함한다. C₁-C₆ 사슬 모양 또는 가지 모양 알킬 기는 다른 명칭으로 "저급 알킬" 기로 언급된다.
- [0085] 나아가, 본 명세서, 예시, 및 청구항 전반에서 사용되는 "알킬" (또는 "저급 알킬")이라는 용어는 "비치환된 알킬" 및 "치환된 알킬"을 둘 다 포함하도록 의도되었으며, 이중 후자는 알킬 기로서 상기 탄화수소의 하나 이상의 탄소 상에서 수소를 대신하는 치환기를 갖는 것을 의미한다. 상기 치환기는, 다르게 명시되지 않는 한, 예시적으로, 할로젠, 히드록실, 카르보닐 (예를 들어 카르복실, 알콕시카르보닐, 포르밀, 또는 아실), 티오키르보닐 (예를 들어 티오에스테르, 티오아세테이트, 또는 티오포르메이트), 알콕시, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로, 아지도, 술폰히드릴, 알킬티오, 설페이트, 술폰네이트, 설파모일, 술폰아미도, 술폰, 헤테로시클릴, 아랄킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 기를 포함할 수 있다. 치환하는 것이 적절한 경우, 탄화수소 사슬 상의 치환된 잔기가 그 자체로도 치환될 수 있다는 것은 당업자에게 이해될 수 있다. 예를 들어, 치환된 알킬의 치환기는 치환된 형태 및 비치환된 형태의 아미노, 아지도, 이미노, 아미도, 포스포릴 (포스포네이트 및 포스피네이트를 포함함), 술폰 (설페이트, 술폰아미도, 설파모일 및 술폰네이트를 포함함), 및 실릴 기를 포함할 수 있고, 에테르, 알킬티오, 카르보닐 (케톤, 알데히드, 카르복실레이트, 및 에스테르를 포함함), -CF₃, -CN 및 이와 같은 것을 마찬가지로 포함할 수 있다. 시클로알킬은 알킬, 알케닐, 알콕시, 알킬티오, 아미노알킬, 카르보닐-치환된 알킬, -CF₃, -CN, 및 이와 같은 것으로 추가적으로 치환될 수 있다.
- [0086] 용어 "히드록시알킬"은 적어도 하나의 히드록시 치환기를 갖는 알킬 기로서, 예를 들어, 하나 또는 두 개의 히드록시기로 치환되며 1 내지 6개의 탄소원자를 포함하는 선형의 일가 탄화수소 라디칼 또는 3 내지 6개의 탄소원자를 포함하는 분지형의 일가 탄화수소 라디칼을 의미하며, 단, 두 개의 히드록시기가 존재하는 경우, 이들 둘 모두가 동일한 탄소원자에 존재하지는 않는다. 구체적으로, 히드록시메틸, 2-히드록시에틸, 2-히드록시프로필, 3-히드록시프로필, 1-(히드록시메틸)-2-메틸프로필, 2-히드록시부틸, 3-히드록시부틸, 4-히드록시부틸, 2,3-디히드록시프로필, 1-(히드록시메틸)-2-히드록시에틸, 2,3-디히드록시부틸, 3,4-디히드록시부틸 및 2-(히드록시메틸)-3-히드록시프로필 및 이와 같은 것을 포함한다.
- [0087] "알키닐"이라는 용어는, 본 출원에서 사용되는 한, 적어도 하나의 삼중 결합을 포함하는 지방족 잔기를 의미하고 또한 "비치환된 알키닐" 및 "치환된 알키닐"을 둘 다 포함하도록 의도되었으며, 이중 후자는 알키닐 기로서 상기 알키닐 기의 하나 이상의 탄소 상에서 수소를 대신하는 치환기를 갖는 것을 의미한다. 이러한 치환기는 1 개 이상의 삼중 결합에 포함되거나 또는 포함되지 않은 하나 이상의 탄소 상에 있을 수 있다. 또한, 이러한 치환기는 안정성이 문제되는 경우를 제외하고는, 상기에서 논의된 바와 같이, 알킬 기에 관하여 고려되었던 모든 것들을 포함한다. 예를 들어, 알키닐기를 하나 이상의 알킬, 카르보시클릴, 아릴, 헤테로시클릴, 또는 헤테로아릴 기로 치환하는 것을 고려할 수 있다.

- [0088] " C_{x-y} "라는 용어는, 예를 들어, 아실, 아실옥시, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 또는 알콕시 같은 잔기와 함께 사용되는 경우 사슬에 x 내지 y 개의 탄소를 포함하는 잔기를 포함하도록 의도되었다. 예를 들어, " C_{x-y} 알킬"이라는 용어는 치환된 또는 비치환된 포화된 탄화수소 기로서, 사슬 모양 알킬 및 가지 모양 알킬 기로서 사슬에 x 내지 y 개의 탄소를 포함하는 것을 포함하고, 예시적으로 트리플루오로메틸 및 2,2,2-트리플루오로에틸, 등과 같은 할로알킬 기를 포함하는 것을 의미한다. C_0 알킬은 말단 위치에 있는 경우 수소를, 내부에 있는 경우 결합을 의미한다. " C_{2-y} 알케닐" 및 " C_{2-y} 알킬닐"이라는 용어는 상기 알킬에 대한 정의에서 설명된 것과 같이 길이 및 가능한 치환에 관한 정의가 적용되는 치환된 또는 비치환된 불포화된 지방족 잔기이지만, 각각 적어도 하나의 이중 또는 삼중 결합을 포함하는 것을 의미한다.
- [0089] "아릴"이라는 용어는 본 출원에서 사용되는 한 치환된 또는 비치환된 단일-고리 방향족 기로서 고리의 각각의 원자가 탄소인 것을 포함한다. 바람직하게는, 상기 고리는 5- 내지 7-원자고리 고리이고, 더욱 바람직하게는 6-원자고리 고리이다. "아릴"이라는 용어는 또한 폴리시클릭 고리 계로서 2 개 이상의 시클릭 고리를 갖고 2 개의 서로 접한 고리가 2 개 이상의 탄소를 공유하며 적어도 하나의 상기 고리가 방향족인 것을 포함하고, 예를 들어, 상기 다른 시클릭 고리는 시클로알킬, 시클로알케닐, 시클로알킬닐, 아릴, 헤테로아릴, 및/또는 헤테로시클릴일 수 있다. 아릴 기는 벤젠, 나프탈렌, 페난트렌, 페놀, 아닐린, 및 이와 같은 것을 포함한다.
- [0090] "카르보사이클", 및 "카르보시클릭"이라는 용어는, 본 출원에서 사용되는 한, 포화된 또는 불포화된 고리로서 고리의 각각의 원자가 탄소인 것을 의미한다. 카르보사이클이라는 용어는 방향족 카르보사이클 및 비방향족 카르보사이클을 둘 다 포함한다. 비방향족 카르보사이클은 모든 탄소 원자가 포화된, 시클로알칸 고리, 및 적어도 하나의 이중 결합을 포함하는, 시클로알켄 고리를 포함한다.
- [0091] "카르보사이클"이라는 용어는 5-7 원자고리 모노시클릭 및 8-12 원자고리 바이시클릭 고리를 포함한다. 바이시클릭 카르보사이클의 각각의 고리는 포화, 불포화 또는 방향족 고리로부터 선택될 수 있다. 카르보사이클은 바이시클릭 분자로서 2 또는 3 또는 그 이상의 원자가 2 개의 고리 사이에서 공유된 것을 포함한다. "융합된 카르보사이클"이라는 용어는 바이시클릭 카르보사이클로서 각각의 고리가 다른 고리와 함께 인접한 2 개의 원자를 공유하는 것을 의미한다. 융합된 카르보사이클의 각각의 고리는 포화, 불포화 및 방향족 고리로부터 선택될 수 있다. 예시적인 실시예에서, 방향족 고리(예: 페닐)가, 포화된 또는 불포화된 고리(예: 시클로헥산, 시클로펜탄, 또는 시클로헥센)와 융합될 수 있다. 포화, 불포화 및 방향족 바이시클릭 고리의 모든 조합은, 원자에게 의하여 허용되는 한, 카르보시클릭의 정의에 포함된다. 예시적인 "카르보사이클"은 시클로펜탄, 시클로헥산, 바이시클로[2.2.1]헵탄, 1,5-시클로옥타디엔, 1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌, 바이시클로[4.2.0]옥트-3-엔, 나프탈렌 및 아다만탄(adamantane)을 포함한다. 예시적인 융합된 카르보사이클은 데칼린(decalin), 나프탈렌, 1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌, 바이시클로[4.2.0]옥탄, 4,5,6,7-테트라하이드로-1H-인덴 및 바이시클로[4.1.0]헵트-3-엔을 포함한다. "카르보사이클"은 수소 원자를 가질 수 있는 모든 하나 이상의 위치에서 치환될 수 있다.
- [0092] "시클로알킬" 기는 완전히 포화된 시클릭 탄화수소이다. "시클로알킬"은 모노시클릭 및 바이시클릭 고리를 포함한다. 다르게 정의되지 않는 한 일반적으로, 모노시클릭 시클로알킬 기는 3 내지 약 10 개의 탄소 원자를 갖고, 더욱 일반적으로 3 내지 8 개의 탄소 원자를 갖는다. 바이시클릭 시클로알킬의 두 번째 고리는 포화, 불포화 및 방향족 고리로부터 선택될 수 있다. 시클로알킬은 바이시클릭 분자로서 1, 2 또는 3 또는 그 이상의 원자가 2 개의 고리 사이에서 공유된 것을 포함한다. "융합된 시클로알킬"이라는 용어는 바이시클릭 시클로알킬로서 각각의 고리가 다른 고리와 함께 인접한 2 개의 원자를 공유하는 것을 의미한다. 융합된 바이시클릭 시클로알킬의 두 번째 고리는 포화, 불포화 및 방향족 고리로부터 선택될 수 있다. "시클로알케닐" 기는 하나 이상의 이중 결합을 포함하는 시클릭 탄화수소이다.
- [0093] "헤테로아릴" 및 "헤테리얼(hetaryl)"이라는 용어는 치환된 또는 비치환된 방향족 단일 고리 구조로서, 바람직하게는 5- 내지 7-원자고리 고리이고, 더욱 바람직하게는 5- 내지 6-원자고리 고리이며, 이의 고리 구조가 적어도 하나의 헤테로원자, 바람직하게는 1 내지 4 개의 헤테로원자, 더욱 바람직하게는 1 또는 2 개의 헤테로원자를 포함하는 것을 포함한다.
- [0094] "헤테로아릴" 및 "헤테리얼"이라는 용어는 또한 폴리시클릭 고리 계로서 2 개 이상의 시클릭 고리를 갖고 2 개의 서로 접한 고리가 2 개 이상의 탄소를 공유하며 적어도 하나의 상기 고리가 헤테로방향족인 것을 포함하고, 예시적으로, 다른 시클릭 고리는 시클로알킬, 시클로알케닐, 시클로알킬닐, 아릴, 헤테로아릴, 및/또는 헤테로시클릴일 수 있다. 헤테로아릴 기는, 예를 들면, 피롤, 퓨란, 티오펜, 이미다졸, 옥사졸, 티아졸, 피라졸, 피리

딘, 피라진, 피리다진, 및 피리미딘, 및 이와 같은 것을 포함한다.

- [0095] "헤테로원자"라는 용어는 본 출원에서 사용되는 한 탄소 또는 수소가 아닌 모든 원소의 원자를 의미한다. 바람직한 헤테로원자는 질소, 산소, 및 황이다.
- [0096] "헤테로시클릴", "헤테로사이클", 및 "헤테로시클릭"이라는 용어는 치환된 또는 비치환된 비방향족 고리 구조이고, 바람직하게는 3- 내지 10-원자고리 고리이고, 더욱 바람직하게는 3- 내지 7-원자고리 고리이며, 이의 고리 구조가 적어도 하나의 헤테로원자, 바람직하게는 1 내지 4 개의 헤테로원자, 더욱 바람직하게는 1 또는 2 개의 헤테로원자를 포함하는 것을 의미한다. "헤테로시클릴" 및 "헤테로시클릭"이라는 용어는 또한 폴리시클릭 고리 계로서 2 개 이상의 시클릭 고리를 갖고 2 개의 서로 접한 고리가 2 개 이상의 탄소를 공유하며 적어도 하나의 상기 고리가 헤테로시클릭인 것을 포함하고, 예시적으로, 다른 시클릭 고리는 시클로알킬, 시클로알케닐, 시클로알킬닐, 아릴, 헤테로아릴, 및/또는 헤테로시클릴일 수 있다. 헤테로시클릴 기는, 예를 들어, 피페리딘, 피페라진, 피롤리딘, 몰폴린, 락톤, 락탐, 및 이와 같은 것을 포함한다.
- [0097] "저급"이라는 표현은 예를 들어, 아실, 아실옥시, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 또는 알콕시와 같은 화학적 잔기와 함께 사용되면 치환기 내에 10 개 이하, 바람직하게는 6 개 이하의 수소가 아닌 원자가 존재하는 잔기를 포함하는 것으로 의도되었다. "저급 알킬"은, 예를 들어, 알킬 기로서 10 개 이하, 바람직하게는 6 개 이하의 탄소 원자를 포함하는 것을 의미한다.
- [0098] "공유 결합 (covalent bond)"이라는 용어는 원자 간의 화학적 결합으로서 이온 결합이 아닌 것을 의미한다.
- [0099] "X 포함 잔기 (functional group comprising X)"라는 용어는 화학적 잔기로서 X 원자를 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, 대표적인 O 포함 잔기로는 케톤, 히드록시, 알콕시알킬, 카르복시 등이 있다.
- [0100] "hsp90s"는 샤페론 단백질인 HSP90 (Hsp90- α 1, Hsp90- α 2, Hsp90- β) 및 체내에 존재하는 이들의 파라로그들 (grp94, TRAP-1)을 모두 지칭한다. "HSP90"은 다른 언급이 없는 한 세포질에 존재하는 hsp90s인 Hsp90- α 1, Hsp90- α 2, Hsp90- β 를 포괄 지칭한다.
- [0101] "결합능 (binding ability)"은 두 분자 간의 정전기적 힘 (electrostatic force) 및/또는 소수성 상호작용 (hydrophobic effect)에 의하여 발생하는 생물화학적 및/또는 물리적 현상을 모두 지칭하며, 특정 수준 이상의 강도를 갖는 상호작용으로 제한하기 위한 것이 아니다.
- [0102] "전구 약물(prodrug)"은 생체 내 투약 후 목적하는 의약 작용 물질로 변환되는 것을 지칭하며, 여기서 변환은 효소적이거나 비효소적인 것일 수 있다. 활성 화합물의 전구 약물은 활성 모(parent) 화합물에 대하여 통상의 조작을 통해 또는 생체내에서 개변이 절단되게 하는 방식으로 활성 화합물 내의 작용기를 개변(modify)하여 제조할 수 있다. 전구 약물은 하이드록시, 아미노 또는 머캅토기가 임의의 기에 결합되는 화합물을 포함하며, 즉, 활성 화합물의 전구 약물은 대상체에게 투여될 때, 절단하여 각각 유리(free) 하이드록시, 유리 아미노 또는 유리 머캅토기를 형성한다. 전구 약물의 예로는 활성 화합물 내의, 알콜 또는 아세트 아미드의, 아세테이트, 포르메이트 및 벤조에이트 유도체와, 아민 작용기의 포름아미드 및 벤즈아미드 유도체 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0103] "약학적으로 허용가능한 염"은 여러가지 생리적으로 허용가능한 유기 및 무기 반대 이온으로부터 유래하는 화합물의 염을 언급한다. 상기 반대 이온은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 알루미늄, 리튬 및 암모늄, 예를 들어 테트라알킬암모늄 등 (분자가 산성 작용기를 함유할 때); 및 분자가 염기성 작용기를 함유할 때, 유기 또는 무기 산의 염, 예컨대 하이드로크로라이드, 설페이트, 포스페이트, 디포스페이트, 니트레이트 하이드로브로마이드, 타르트레이트, 메실레이트, 아세테이트, 말레이트, 말레에이트, 푸마레이트, 타르트레이트, 숙시네이트, 시트레이트, 락테이트, 파모에이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 메탄설포네이트, p-톨루엔설포네이트, 및 옥살레이트 등을 포함한다. 적합한 그의 약학적으로 허용가능한 염은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, pg. 1418 (1985) 및 P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (Eds.), Handbook of Pharmaceutical Salts Properties, Selection, and Use; 2002]에 열거된 것들을 포함한다. 산 부가 염의 예는 산 예컨대 요오드화수소산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산, 및 유기산으로, 예컨대 알긴산, 아스코르빈산, 안트라닐산, 벤조산, 캄포르산, 시트르산, 엠본산 (embonic acid) (파모산), 에탄설포산, 포름산, 푸마르산, 푸로산, 갈락투론산, 겐티신산, 글루콘산, 글루쿠론산, 글루탐산, 글리콜산, 이소니코틴산, 이소티온산, 란탄산, 말산, 만델산, 메탄설포산, 뮤신산, 판토텐산, 페닐아세트산, 프로피온산, 사카린산, 살리실산, 스테아르산, 숙신산, 설피닐산, 트리플루오로아세트산 및 아릴설포산 예를 들어 벤젠설포산 및 p-톨루엔설포산으로부터 형성된 염을 포함한다. 알칼리 금속 및 알킬리 토금속 및 유기 염기로 형성된 염기 부

가 염의 예는 클로로프로카인, 콜린, N,N-디벤질에틸렌디아민, 디에탄올라민, 에틸렌디아민, 라이신, 메글루마인 (N-메틸글루카민), 및 크로카인, 뿐만 아니라 내부에서 형성된 염을 포함한다. 비-생리적으로 허용가능한 음이온 또는 양이온을 갖는 염은 생리적으로 허용가능한 염의 제조를 위한 및/또는 비-치료적으로, 예를 들어, 시험관 내, 상황에서 사용하기 위한 유용한 중간체로서 본 발명의 범위 안에 있다. 본 출원에 의한 약학적으로 허용가능한 염은 할로젠 염, 즉 플루오르염, 브롬염, 요오드염 등을 포함한다.

2. 본 출원의 화합물 구조

본 출원은 TRAP-1을 억제하기 위한 약물 분자를 제공한다.

본 출원에 의한 약물 분자는 하기 [화학식 7]로 표시되는 구조를 갖는 화합물로서,

[화학식 7]

$B-L-C^+$

이때,

B는 TRAP-1 단위체에 대한 친화력이 있는 결합부 (bonding moiety)이고, L은 결합부와 양전하부를 연결하기 위한 연결부 (linking moiety)이며, C^+ 는 양전하를 띠는 양전하부 (cationic moiety)이다.

이때, 결합부는 시클릭 고리를 포함하거나, 나아가 4 내지 10 모노시클릭 고리를 포함하거나, 더 나아가 5 내지 7 모노시클릭 고리를 포함할 수 있다. 또한, 상기 시클릭 고리는 카르보시클릭 고리일 수 있고 또는 헤테로시클릭 고리일 수 있다. 이때, 헤테로시클릭 고리를 구성하는 헤테로원자는 예시적으로 질소, 산소, 황 또는 인일 수 있다. 또한, 상기 시클릭 고리는 아릴일 수 있다. 또한, 상기 시클릭 고리는 바이시클릭 고리 등의 다환식 고리일 수 있다.

또는, 상기 시클릭 고리는 하나 이상의 치환기로 치환된 것일 수 있다. 이때, 상기 치환기는 알킬, 알케닐, 또는 알키닐일 수 있다. 또는, 상기 치환기는 헤테로원자 포함 잔기일 수 있다.

이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 할로젠 포함 잔기일 수 있다. 이때, 할로젠 포함 잔기는 예시적으로 F, Cl, Br 또는 I일 수 있다.

또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 산소 포함 잔기일 수 있다. 이때, 산소 포함 잔기는 예시적으로 히드록시, 카르보닐, 포르밀, 알콕시카르보닐옥시, 카르복시, 알콕시카르보닐, 알콕시 또는 메틸렌디옥시일 수 있다.

또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 질소 포함 잔기일 수 있다. 이때, 질소 포함 잔기는 예시적으로 아미드, 아민, 암모늄, 이민, 이미드, 시아네이트, 나이트레이트, 니트릴, 피리딘, 아지드 또는 카르바메이트일 수 있다.

또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 황 포함 잔기일 수 있다. 이때, 황 포함 잔기는 예시적으로 티올, 설파이드, 디설파이드, 술폭사이드, 술포, 술포 산, 술포네이트, 티온, 티알, 티오에이트 또는 디티오에이트일 수 있다.

이때, 연결부는 지방족 잔기, 예를 들어 알킬 $((CH_2)_n)$ 을 포함할 수 있다.

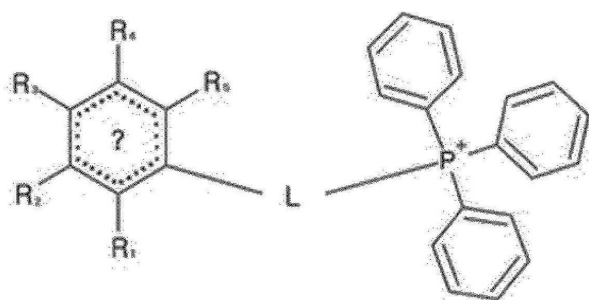
이때, n은 1 이상 20 이하의 정수일 수 있다. 나아가, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가, n은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가 n은 5 이상 12 이하의 정수일 수 있다. 바람직한 예시에서, n은 10일 수 있다.

또는 이때, 상기 연결부는 알케닐 또는 알키닐을 포함할 수 있다.

- [0124] 또는 이때, 상기 지방족 잔기는 헤테로 원자를 통하여 결합부, 양전하부, 또는 다른 지방족 잔기와 결합될 수 있다. 이때 상기 헤테로 원자는 예시적으로 산소, 질소, 황을 포함한다. 예를 들어, 예시적인 하나의 연결부는 $-(CH_2)_x-O-(CH_2)_y-$ 의 구조를 가질 수 있다 (x, y 는 0 이상의 정수).
- [0125] 또는, 연결부는 에틸렌옥시 단위 $((C_2H_4O)_m)$ 을 포함할 수 있다. 이때, m 은 1 이상의 정수이거나 또는 0일 수 있다.
- [0126] 또는, 연결부는 알킬 및 에틸렌옥시 단위를 포함할 수 있다.
- [0127] 또는, 연결부는 특정 범위의 길이를 가질 수 있다. 이때, 연결부의 길이는 5 내지 60 옹스트롬이거나, 나아가 10 내지 50 옹스트롬이거나, 더 나아가 20 내지 40 옹스트롬이거나, 더 나아가 25 내지 35 옹스트롬일 수 있다.
- [0129] C는 양전하부 (cationic moiety)로서 양전하를 띠는 부위 또는 이의 환원된 형태이다.
- [0130] 이때, 양전하부는 양전하를 띌 수 있다.
- [0131] 이때, 양전하부는 산화된 원자 (oxidized atom)를 포함할 수 있다. 나아가, 산화된 원자는 N^+ 또는 P^+ 일 수 있다.
- [0132] 또는 이때, 양전하부는 산화된 원자를 포함하는 잔기를 포함할 수 있다.
- [0133] 이때, 상기 잔기는 아민 기, 포스페인 기 (phosphane)일 수 있다.
- [0134] 또는 이때, 양전하부는 이의 환원된 형태일 수 있다.
- [0135] 또는, 양전하부는 시클릭 고리를 포함하거나, 나아가 4 내지 10 모노시클릭 고리를 포함할 수 있고, 더 나아가 5 내지 7 모노시클릭 고리를 포함할 수 있다. 또한, 상기 시클릭 고리는 카르보시클릭 고리일 수 있고 또는 헤테로시클릭 고리일 수 있다. 이때, 헤테로시클릭 고리를 구성하는 헤테로원자는 예시적으로 질소, 산소, 황 또는 인일 수 있다. 또한, 상기 시클릭 고리는 아릴일 수 있다. 또한, 상기 시클릭 고리는 바이시클릭 고리 등의 다환식 고리일 수 있다.
- [0136] 또는, 상기 시클릭 고리는 하나 이상의 치환기로 치환된 것일 수 있다. 이때, 상기 치환기는 알킬, 알케닐, 또는 알킬닐일 수 있다. 또는, 상기 치환기는 헤테로원자 포함 잔기일 수 있다.
- [0137] 또는, 양전하부가 산화된 원자를 포함하는 경우, 상기 시클릭 고리는 산화된 원자에 결합된 치환기일 수 있다.
- [0139] 또는, 전체 분자의 위치 관계에서 결합부 및 양전하부 사이의 거리는 5 내지 60 옹스트롬이거나, 나아가 10 내지 50 옹스트롬이거나, 더 나아가 20 내지 40 옹스트롬이거나, 더 나아가 25 내지 35 옹스트롬일 수 있다.

[0141] 본 출원에 의한 약물 분자는 화학식 8의 구조를 갖는 화합물일 수 있다.

[0142] [화학식 8]



- [0143]
- [0144] 이때, 좌측의 결합부를 구성하는 6-원자 시클릭 고리는 카르보시클릭 고리일 수 있고 또는 헤테로시클릭 고리일 수 있다. 6-원자 시클릭 고리 내부에 표기된 점선과 "?"는 상기 고리를 구성하는 원자들 간의 결합이 허용되는 범위 내에서 임의로 단일 결합 또는 다중 결합을 구성할 수 있다는 의미를 갖는다. 이때, 헤테로시클릭 고리를

구성하는 헤테로원자는 예시적으로 질소, 산소, 황 또는 인일 수 있다. 또한, 상기 6-원자 시클릭 고리는 아릴일 수 있다.

[0146] 이때, R_1 내지 R_5 는 각각 독립적으로 H, 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 헤테로원자 포함 잔기일 수 있다. 예시적으로 R_1 내지 R_5 중 어느 하나는 알킬일 수 있고, 나아가 상기 알킬은 C_{1-5} 알킬일 수 있고, 더 나아가 상기 알킬은 메틸일 수 있다.

[0147] 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 산소 포함 잔기일 수 있다.

[0148] 이때, 산소 포함 잔기는 예시적으로 히드록시, 카르보닐, 포르밀, 알콕시카르보닐옥시, 카르복시, 알콕시카르보닐, 알콕시, 알콕시알킬 또는 메틸렌디옥시 기일 수 있다.

[0149] 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 C_{1-5} 알콕시일 수 있고, 더 나아가 메톡시일 수 있다. 또 다른 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 히드록시 또는 카르보닐일 수 있다.

[0150] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 할로젠 포함 잔기일 수 있다. 이때, 할로젠 포함 잔기는 예시적으로 F, Cl, Br 또는 I일 수 있다.

[0151] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 질소 포함 잔기일 수 있다. 이때, 질소 포함 잔기는 예시적으로 아미드, 아민, 암모늄, 이민, 이미드, 시아네이트, 나이트레이트, 니트릴, 피리딘, 아지드 또는 카르바메이트일 수 있다.

[0152] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 황 포함 잔기일 수 있다. 이때, 황 포함 잔기는 예시적으로 티올, 설파이드, 디설파이드, 술폭사이드, 술포, 술포 산, 술포네이트, 티온, 티알, 티오에이트 또는 디티오에이트일 수 있다.

[0154] 상기 화학식 8 중 L은 연결부 (linking moiety)로서 결합부와 양전하부를 연결하는 부위이다.

[0155] 이때, 연결부는 지방족 잔기, 예를 들어 알킬 ($(CH_2)_n$)을 포함할 수 있다.

[0156] 이때, n은 1 이상 20 이하의 정수일 수 있다. 나아가, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가, n은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가 n은 5 이상 12 이하의 정수일 수 있다. 바람직한 일 예에서, n은 10일 수 있다.

[0157] 또는 이때, 상기 연결부는 알케닐 또는 알키닐을 포함할 수 있다.

[0158] 또는 이때, 상기 지방족 잔기는 헤테로 원자를 통하여 결합부, 양전자부, 또는 다른 지방족 잔기와 결합될 수 있다. 이때 상기 헤테로 원자는 예시적으로 산소, 질소, 황을 포함한다. 예를 들어, 예시적인 하나의 연결부는 $-(CH_2)_x-O-(CH_2)_y-$ 의 구조를 가질 수 있다 (x, y는 0 이상의 정수).

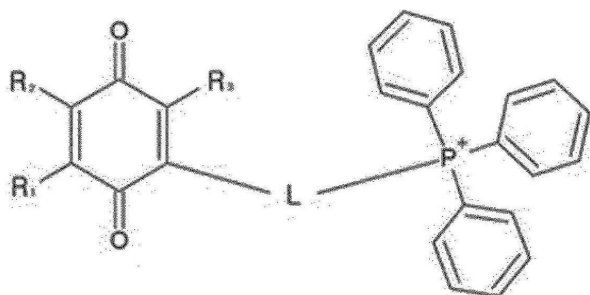
[0159] 또는, 연결부는 에틸렌옥시 단위 ($(C_2H_4O)_m$)을 포함할 수 있다. 이때, m은 1 이상의 정수이거나 또는 0일 수 있다.

[0160] 또는, 연결부는 알킬 및 에틸렌옥시 단위를 포함할 수 있다.

[0161] 또는, 연결부는 특정 범위의 길이를 가질 수 있다. 이때, 연결부의 길이는 5 내지 60 옹스트롬이거나, 나아가 10 내지 50 옹스트롬이거나, 더 나아가 20 내지 40 옹스트롬이거나, 더 나아가 25 내지 35 옹스트롬일 수 있다.

[0163] 본 출원에 의한 약물 분자는 화학식 9의 구조를 갖는 화합물일 수 있다.

[0164] [화학식9]



[0165]

[0166] 이때, R₁ 내지 R₃는 각각 독립적으로 H, 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 헤테로원자 포함 잔기일 수 있다. 예시적으로 R₁ 내지 R₃ 중 어느 하나는 알킬일 수 있고, 나아가 상기 알킬은 C₁₋₅ 알킬일 수 있고, 더 나아가 상기 알킬은 메틸일 수 있다.

[0167] 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 산소 포함 잔기일 수 있다.

[0168] 이때, 산소 포함 잔기는 예시적으로 히드록시, 카르보닐, 포르밀, 알콕시카르보닐옥시, 카르복시, 알콕시카르보닐, 알콕시, 알콕시알킬 또는 메틸렌디옥시 기일 수 있다.

[0169] 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 C₁₋₅ 알콕시일 수 있고, 더 나아가 메톡시일 수 있다. 또 다른 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 히드록시 또는 카르보닐일 수 있다.

[0170] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 할로겐 포함 잔기일 수 있다. 이때, 할로겐 포함 잔기는 예시적으로 F, Cl, Br 또는 I일 수 있다.

[0171] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 질소 포함 잔기일 수 있다. 이때, 질소 포함 잔기는 예시적으로 아미드, 아민, 암모늄, 이민, 이미드, 시아네이트, 나이트레이트, 니트릴, 피리딘, 아지드 또는 카르바메이트일 수 있다.

[0172] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 황 포함 잔기일 수 있다. 이때, 황 포함 잔기는 예시적으로 티올, 설파이드, 디설파이드, 술폰사이드, 술폰, 술폰 산, 술폰네이트, 티온, 티알, 티오에이트 또는 디티오에이트일 수 있다.

[0174] 상기 화학식 9 중 L은 연결부 (linking moiety)로서 결합부와 양전하부를 연결하는 부위이다.

[0175] 이때, 연결부는 지방족 잔기, 예를 들어 알킬 ((CH₂)_n)을 포함할 수 있다.

[0176] 이때, n은 1 이상 20 이하의 정수일 수 있다. 나아가, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가, n은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가 n은 5 이상 12 이하의 정수일 수 있다. 바람직한 한 예시에서, n은 10일 수 있다.

[0177] 또는 이때, 상기 연결부는 알케닐 또는 알키닐을 포함할 수 있다.

[0178] 또는 이때, 상기 지방족 잔기는 헤테로 원자를 통하여 결합부, 양전하부, 또는 다른 지방족 잔기와 결합될 수 있다. 이때 상기 헤테로 원자는 예시적으로 산소, 질소, 황을 포함한다. 예를 들어, 예시적인 하나의 연결부는 -(CH₂)_x-O-(CH₂)_y-의 구조를 가질 수 있다 (x, y는 0 이상의 정수).

[0179] 또는, 연결부는 에틸렌옥시 단위 ((C₂H₄O)_m)을 포함할 수 있다. 이때, m은 1 이상의 정수이거나 또는 0일 수 있다.

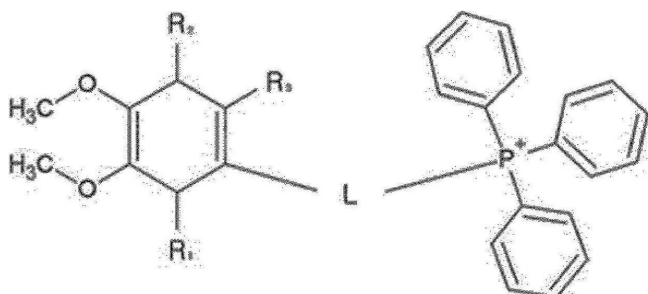
[0180] 또는, 연결부는 알킬 및 에틸렌옥시 단위를 포함할 수 있다.

[0181] 또는, 연결부는 특정 범위의 길이를 가질 수 있다. 이때, 연결부의 길이는 5 내지 60 옹스트롬이거나, 나아가 10 내지 50 옹스트롬이거나, 더 나아가 20 내지 40 옹스트롬이거나, 더 나아가 25 내지 35 옹스트롬일 수 있다.

[0183] 또는, 본 출원에 의한 약물 분자는 화학식 9의 구조를 갖는 화합물의 환원된 형태의 화합물일 수 있다.

[0185] 본 출원에 의한 약물 분자는 하기 화학식 10의 구조를 갖는 화합물일 수 있다.

[0186] [화학식10]



[0187]

[0188] 이때, R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 H, 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 헤테로원자 포함 잔기일 수 있다. 예시적으로 R_1 내지 R_3 중 어느 하나는 알킬일 수 있고, 나아가 상기 알킬은 C_{1-5} 알킬일 수 있고, 더 나아가 상기 알킬은 메틸일 수 있다.

[0189] 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 산소 포함 잔기일 수 있다.

[0190] 이때, 산소 포함 잔기는 예시적으로 히드록시, 카르보닐, 포르밀, 알콕시카르보닐옥시, 카르복시, 알콕시카르보닐, 알콕시, 알콕시알킬 또는 메틸렌디옥시 기일 수 있다.

[0191] 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 C_{1-5} 알콕시일 수 있고, 더 나아가 메톡시일 수 있다. 또 다른 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 히드록시 또는 카르보닐일 수 있다.

[0192] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 할로젠 포함 잔기일 수 있다. 이때, 할로젠 포함 잔기는 예시적으로 F, Cl, Br 또는 I일 수 있다.

[0193] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 질소 포함 잔기일 수 있다. 이때, 질소 포함 잔기는 예시적으로 아미드, 아민, 암모늄, 이민, 이미드, 시아네이트, 나이트레이트, 니트릴, 피리딘, 아지드 또는 카르바메이트일 수 있다.

[0194] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 황 포함 잔기일 수 있다. 이때, 황 포함 잔기는 예시적으로 티올, 설파이드, 디설파이드, 술폰사이드, 술폰, 술폰 산, 술포네이트, 티온, 티알, 티오에이트 또는 디티오에이트일 수 있다.

[0196] 상기 화학식 10 중 L은 연결부 (linking moiety)로서 결합부와 양전하부를 연결하는 부위이다.

[0197] 이때, 연결부는 지방족 잔기, 예를 들어 알킬 ($(CH_2)_n$)을 포함할 수 있다.

[0198] 이때, n은 1 이상 20 이하의 정수일 수 있다. 나아가, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가, n은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가 n은 5 이상 12 이하의 정수일 수 있다. 바람직한 한 예에서, n은 10일 수 있다.

[0199] 또는 이때, 상기 연결부는 알케닐 또는 알키닐을 포함할 수 있다.

[0200] 또는 이때, 상기 지방족 잔기는 헤테로 원자를 통하여 결합부, 양전자부, 또는 다른 지방족 잔기와 결합될 수 있다. 이때 상기 헤테로 원자는 예시적으로 산소, 질소, 황을 포함한다. 예를 들어, 예시적인 하나의 연결부는 $-(CH_2)_x-O-(CH_2)_y-$ 의 구조를 가질 수 있다 (x, y는 0 이상의 정수).

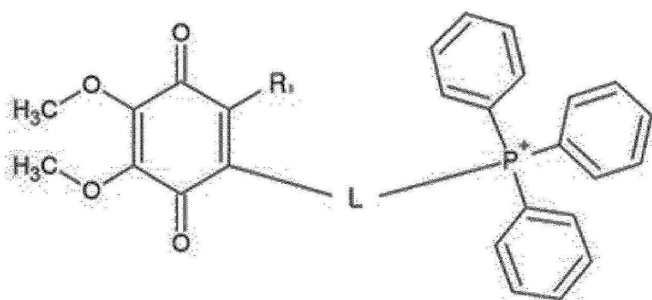
[0201] 또는, 연결부는 에틸렌옥시 단위 ((C₂H₄O)_m)을 포함할 수 있다. 이때, m은 1 이상의 정수이거나 또는 0일 수 있다.

[0202] 또는, 연결부는 알킬 및 에틸렌옥시 단위를 포함할 수 있다.

[0203] 또는, 연결부는 특정 범위의 길이를 가질 수 있다. 이때, 연결부의 길이는 5 내지 60 옹스트롬이거나, 나아가 10 내지 50 옹스트롬이거나, 더 나아가 20 내지 40 옹스트롬이거나, 더 나아가 25 내지 35 옹스트롬일 수 있다.

[0205] 본 출원에 의한 약물 분자는 하기 화학식 6의 구조를 갖는 화합물일 수 있다.

[0206] [화학식6]



[0207]

[0208] 이때, R₁은 H, 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 헤테로원자 포함 잔기일 수 있다. 예시적으로 R₁은 알킬일 수 있고, 나아가 상기 알킬은 C₁₋₅ 알킬일 수 있고, 더 나아가 상기 알킬은 메틸일 수 있다.

[0209] 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 산소 포함 잔기일 수 있다.

[0210] 이때, 산소 포함 잔기는 예시적으로 히드록시, 카르보닐, 포르밀, 알콕시카르보닐옥시, 카르복시, 알콕시카르보닐, 알콕시, 알콕시알킬 또는 메틸렌디옥시 기일 수 있다.

[0211] 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 C₁₋₅ 알콕시일 수 있고, 더 나아가 메톡시일 수 있다. 또 다른 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 히드록시 또는 카르보닐일 수 있다.

[0212] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 할로젠 포함 잔기일 수 있다. 이때, 할로젠 포함 잔기는 예시적으로 F, Cl, Br 또는 I일 수 있다.

[0213] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 질소 포함 잔기일 수 있다. 이때, 질소 포함 잔기는 예시적으로 아미드, 아민, 암모늄, 이민, 이미드, 시아네이트, 나이트레이트, 니트릴, 피리딘, 아지드 또는 카르바메이트일 수 있다.

[0214] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 황 포함 잔기일 수 있다. 이때, 황 포함 잔기는 예시적으로 티올, 설파이드, 디설파이드, 술폭사이드, 술폰, 술폰 산, 술포네이트, 티온, 티알, 티오에이트 또는 디티오에이트일 수 있다.

[0216] 상기 화학식 6 중 L은 연결부 (linking moiety)로서 결합부와 양전하부를 연결하는 부위이다.

[0217] 이때, 연결부는 지방족 잔기, 예를 들어 알킬 ((CH₂)_n)을 포함할 수 있다.

[0218] 이때, n은 1 이상 20 이하의 정수일 수 있다. 나아가, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가, n은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가 n은 5 이상 12 이하의 정수일 수 있다. 바람직한 예시에서, n은 10일 수 있다.

[0219] 또는 이때, 상기 연결부는 알케닐 또는 알키닐을 포함할 수 있다.

[0220] 또는 이때, 상기 지방족 잔기는 헤테로 원자를 통하여 결합부, 양전하부, 또는 다른 지방족 잔기와 결합될 수 있다. 이때 상기 헤테로 원자는 예시적으로 산소, 질소, 황을 포함한다. 예를 들어, 예시적인 하나의 연결부는

$-(CH_2)_x-O-(CH_2)_y-$ 의 구조를 가질 수 있다 (x, y 는 0 이상의 정수).

[0221] 또는, 연결부는 에틸렌옥시 단위 $((C_2H_4O)_m)$ 을 포함할 수 있다. 이때, m 은 1 이상의 정수이거나 또는 0일 수 있다.

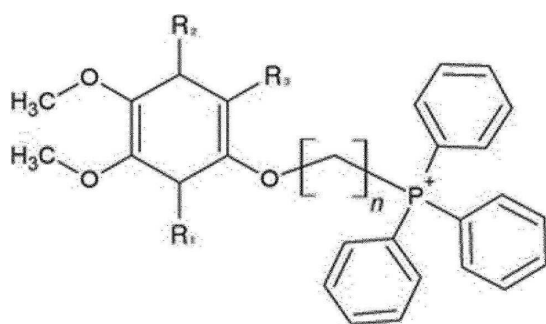
[0222] 또는, 연결부는 알킬 및 에틸렌옥시 단위를 포함할 수 있다.

[0223] 또는, 연결부는 특정 범위의 길이를 가질 수 있다. 이때, 연결부의 길이는 5 내지 60 옹스트롬이거나, 나아가 10 내지 50 옹스트롬이거나, 더 나아가 20 내지 40 옹스트롬이거나, 더 나아가 25 내지 35 옹스트롬일 수 있다.

[0225] 또는, 본 출원에 의한 약물 분자는 화학식 6의 구조를 갖는 화합물의 환원된 형태의 화합물일 수 있다.

[0227] 본 출원에 의한 약물 분자는 하기 화학식 11의 구조를 갖는 화합물일 수 있다.

[0228] [화학식11]



[0229]

[0230] 이때, R_1 내지 R_3 는 H, 알킬, 알케닐, 알킬닐 또는 헤테로원자 포함 잔기일 수 있다. 예시적으로 R_1 내지 R_3 는 알킬일 수 있고, 나아가 상기 알킬은 C_{1-5} 알킬일 수 있고, 더 나아가 상기 알킬은 메틸일 수 있다.

[0231] 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 산소 포함 잔기일 수 있다.

[0232] 이때, 산소 포함 잔기는 예시적으로 히드록시, 카르보닐, 포르밀, 알콕시카르보닐옥시, 카르복시, 알콕시카르보닐, 알콕시, 알콕시알킬 또는 메틸렌디옥시 기일 수 있다.

[0233] 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 C_{1-5} 알콕시일 수 있고, 더 나아가 메톡시일 수 있다. 또 다른 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 히드록시 또는 카르보닐일 수 있다.

[0234] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 할로젠 포함 잔기일 수 있다. 이때, 할로젠 포함 잔기는 예시적으로 F, Cl, Br 또는 I일 수 있다.

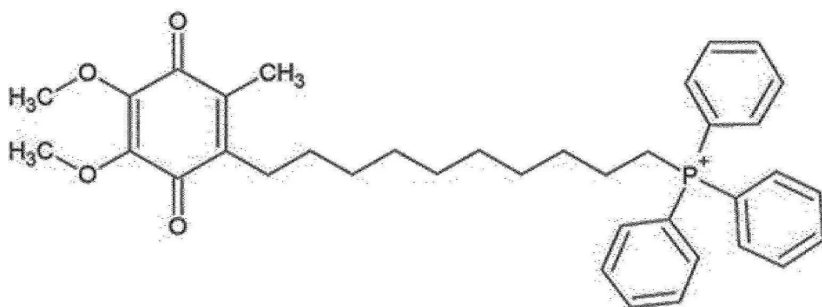
[0235] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 질소 포함 잔기일 수 있다. 이때, 질소 포함 잔기는 예시적으로 아미드, 아민, 암모늄, 이민, 이미드, 시아네이트, 나이트레이트, 니트릴, 피리딘, 아지드 또는 카르바메이트일 수 있다.

[0236] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 황 포함 잔기일 수 있다. 이때, 황 포함 잔기는 예시적으로 티올, 설파이드, 디설파이드, 술폭사이드, 술폰, 술폰 산, 술포네이트, 티온, 티알, 티오에이트 또는 디티오에이트일 수 있다.

[0238] 또한, 연결부의 구조 중 탄화수소 부분에 있어 n 은 1 이상의 정수이다. 이때, n 은 1 이상 20 이하의 정수일 수 있다. 나아가, n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가, n 은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가 n 은 5 이상 12 이하의 정수일 수 있다. 바람직한 예에서, n 은 10일 수 있다. 이때, 상기 탄화수소 부분은 허용되는 범위 내에서 다중 결합을 포함할 수 있다.

[0239] 또는, 연결부는 특정 범위의 길이를 가질 수 있다. 이때, 연결부의 길이는 5 내지 60 옹스트롬이거나, 나아가 10 내지 50 옹스트롬이거나, 더 나아가 20 내지 40 옹스트롬이거나, 더 나아가 25 내지 35 옹스트롬일 수 있다.

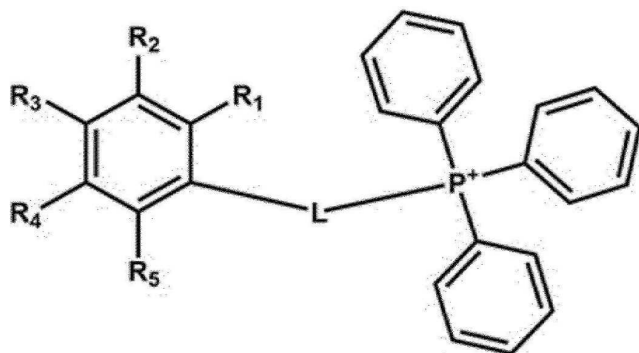
[0241] 예시적으로, 상기 화학식 6에 의한 화합물은 다음 중 어느 하나일 수 있다.



[0242]

[0244] 나아가, 본 출원에 의한 화합물 분자는 하기 화학식 1의 구조를 갖는 신규한 화합물일 수 있다.

[0245] [화학식1]



[0246]

[0247] 이때, R_1 내지 R_5 는 각각 독립적으로 H, 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 헤테로원자 포함 잔기일 수 있다. 예시적으로 R_1 내지 R_5 중 어느 하나는 알킬일 수 있고, 나아가 상기 알킬은 C_{1-5} 알킬일 수 있고, 더 나아가 상기 알킬은 메틸일 수 있다.

[0248] 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 산소 포함 잔기일 수 있다.

[0249] 이때, 산소 포함 잔기는 예시적으로 히드록시, 히드록시알킬, 카르보닐, 포르밀, 알콕시카르보닐옥시, 카르복시, 알콕시카르보닐, 알콕시, 알콕시알킬 또는 메틸렌디옥시 기일 수 있다.

[0250] 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 C_{1-5} 알콕시일 수 있고, 더 나아가 메톡시일 수 있다. 또 다른 바람직한 일 예에서, 상기 산소 포함 잔기는 히드록시, 히드록시알킬일 수 있다.

[0251] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 할로젠 포함 잔기일 수 있다. 이때, 할로젠 포함 잔기는 예시적으로 F, Cl, Br 또는 I일 수 있다.

[0252] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 질소 포함 잔기일 수 있다. 이때, 질소 포함 잔기는 예시적으로 아미드, 아민, 암모늄, 이민, 이미드, 시아네이트, 나이트레이트, 니트릴, 피리딘, 아지드 또는 카르바메이트일 수 있다.

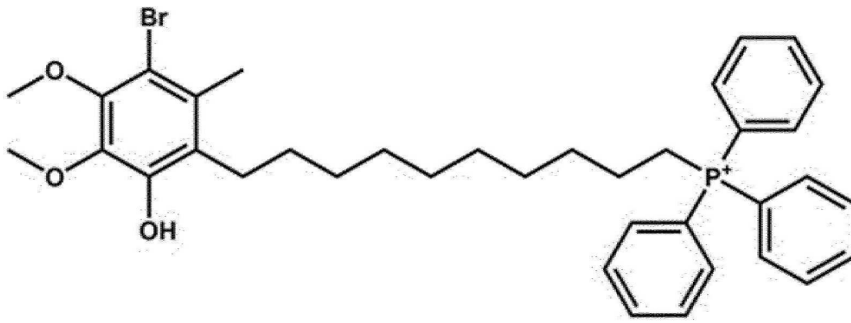
[0253] 또는 이때, 상기 헤테로원자 포함 잔기는 황 포함 잔기일 수 있다. 이때, 황 포함 잔기는 예시적으로 티올, 설파이드, 디설파이드, 술폰사이드, 술폰, 술폰 산, 술포네이트, 티온, 티알, 티오에이트 또는 디티오에이트일 수 있다.

[0254] 일 예로, 상기 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , 및 R_5 는 각각 H, 할로젠, 히드록시, 히드록시 C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알킬, C_{1-5} 알케닐, C_{1-5} 알

키널, 및 C₁₋₅알콕시로부터 선택될 수 있다.

- [0255] 이때, R₁, R₂, R₃, R₄, 및 R₅ 중 어느 하나가 히드록시인 경우, 히드록시와 마주보는 방향에 위치하는 치환기는 히드록시가 아닐 수 있다. 여기서, 마주보는 방향에 위치하는 치환기란, 예를 들어, (R₁ 및 R₄) 또는 (R₂ 및 R₅) 일 수 있다. 구체적으로, R₁ 및 R₄는 이들 중 어느 하나가 히드록시인 경우 나머지 하나가 히드록시가 아니며, 또는 R₂ 및 R₅는 이들 중 어느 하나가 히드록시인 경우 나머지 하나가 히드록시가 아닐 수 있다. 여기서 "(x 및 y)"는 x 및 y로 구성된 집합을 의미한다.
- [0256] 상기 R₁, R₂, R₃, R₄, 및 R₅ 중 마주보는 치환기가 모두 히드록시인 경우, 예를 들어, R₁ 및 R₄가 모두 히드록시 이거나, R₂ 및 R₅가 모두 히드록시인 화합물의 경우, 화합물 자체 원소의 전자기 교환으로 산화/환원 반응을 일으킬 수 있다. 따라서, 상기 화학식 2 화합물의 마주보는 치환기 중 하나가 히드록시인 경우, 나머지 하나가 히드록시가 아닌 것을 특징으로 함에 따라 화합물 자체적으로 일어나는 산화/환원반응을 비활성화 시키는 효과를 가질 수 있다.
- [0257] 구체적으로, 상기 화학식 1에서 R₁은 H, C₁₋₅알킬, C₁₋₅알케닐, 또는 C₁₋₅알키닐일 수 있고, 나아가 C₁₋₅알킬일 수 있고, 더 나아가 메틸일 수 있다.
- [0258] 또는, 상기 R₃, 및 R₄는 각각 C₁₋₅알콕시일 수 있다.
- [0259] 또는, 상기 R₂ 및 R₅는 각각 히드록시, 알콕시 또는 할로젠이고, 이때, R₂ 및 R₅ 중 적어도 하나는 할로젠일 수 있다.
- [0261] 나아가, 상기 화학식 1 중 L은 연결부 (linking moiety)로서 R₁ 내지 R₅ 치환기를 포함하는 결합부(좌)와 트리페닐포스포늄(우)을 연결하는 부위이다.
- [0262] 이때, 연결부는 지방족 잔기, 예를 들어 알킬 $-(CH_2)_n$ 을 포함할 수 있다.
- [0263] 이때, n 은 1 이상 20 이하의 정수일 수 있다. 나아가, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가, n은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 중 선택된 두 개의 수 사이의 정수일 수 있다. 더 나아가 n은 5 이상 12 이하의 정수일 수 있다. 바람직한 예시에서, n은 10일 수 있다.
- [0264] 또는 이때, 상기 연결부는 알케닐 또는 알키닐을 포함할 수 있다.
- [0265] 또는 이때, 상기 지방족 잔기는 헤테로 원자를 통하여 결합부, 양전자부, 또는 다른 지방족 잔기와 결합될 수 있다. 이때 상기 헤테로 원자는 예시적으로 산소, 질소, 황을 포함한다. 예를 들어, 예시적인 하나의 연결부는 $-(CH_2)_x-O-(CH_2)_y-$ 의 구조를 가질 수 있다 (x, y는 0 이상의 정수).
- [0267] 또는, 연결부는 에틸렌옥시 단위 $((C_2H_4O)_m)$ 을 포함할 수 있다. 이때, m은 1 이상의 정수이거나 또는 0일 수 있다.
- [0268] 또는, 연결부는 알킬 및 에틸렌옥시 단위를 포함할 수 있다.
- [0269] 또는, 연결부는 특정 범위의 길이를 가질 수 있다. 이때, 연결부의 길이는 5 내지 60 옹스트롬이거나, 나아가 10 내지 50 옹스트롬이거나, 더 나아가 20 내지 40 옹스트롬이거나, 더 나아가 25 내지 35 옹스트롬일 수 있다.
- [0271] 바람직한 일 예로, 상기 화학식 1은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다.

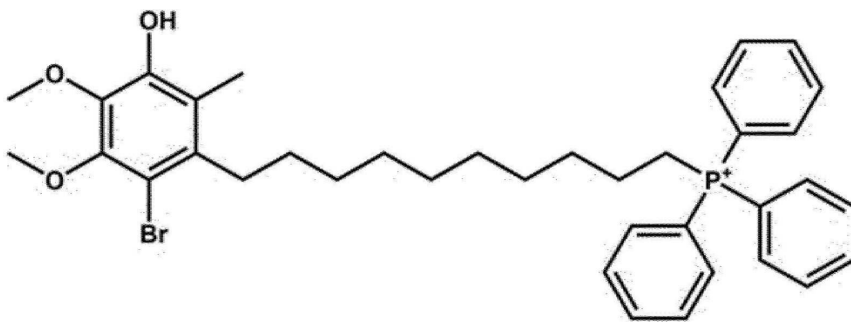
[0272] [화학식2]



[0273]

[0275] 다른 일 예로, 상기 화학식 1은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물일 수 있다.

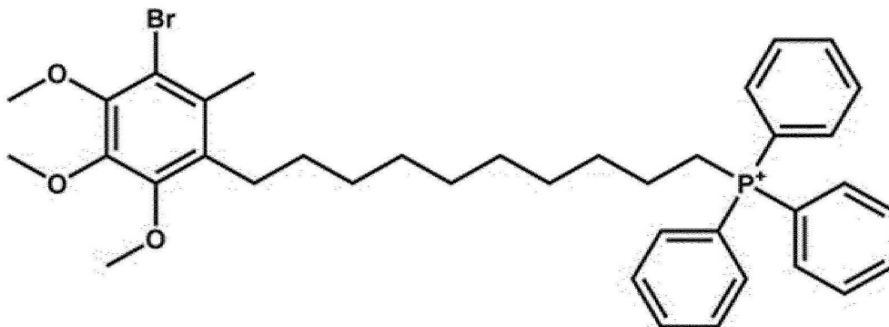
[0276] [화학식 3]



[0277]

[0279] 또 다른 일 예로, 상기 화학식 1은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물일 수 있다.

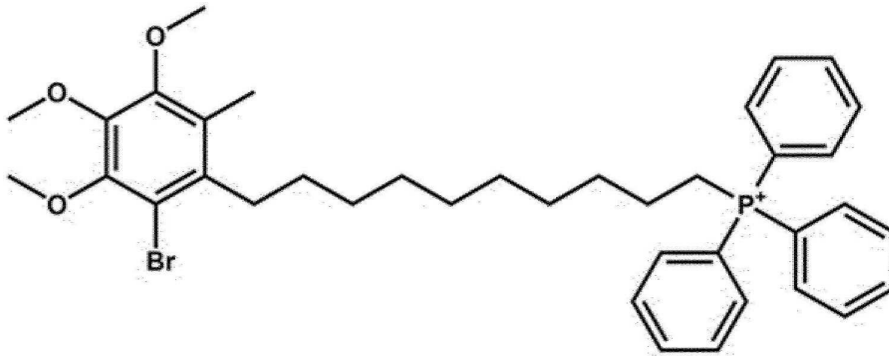
[0280] [화학식 4]



[0281]

[0283] 또 다른 일 예로, 상기 화학식 1은 하기 화학식 5로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0284] [화학식 5]



[0285]

[0287] 상기 화학식 1 내지 11로 표시되는 본 출원에 의한 화합물은 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이의 전구약물 형태로 제공될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 약학적으로 허용가능한 염은 산 부가 염, 또는 할로겐 염일 수 있다. 바람직하게는, 상기 약학적으로 허용가능한 염은 브롬염일 수 있다.

[0289] 3. 신생혈관형성인자와 신생혈관형성성 질환의 관계

[0290] 신생혈관형성성 질환은 비정상적인 신생혈관형성으로 인해 발생한다. 신생혈관형성은 본디 조직에의 원활한 혈액 공급을 위한 정상적인 항상성 유지 행위이다. 다만 이러한 신생혈관형성이 정상적인 조직보다 과다한 경우 이러한 비정상적인 신생혈관형성으로 인해 신생혈관형성성 질환이 발병하게 된다. 신생혈관형성성 질환의 발생 요인은 몇몇 공통점을 공유하고 있으나 동일한 병리 기전을 갖는다고 볼 수 없으며, 대체로 상세한 병리 기전은 명확히 알려져 있지 않다. 그러나 공통적으로 대부분의 신생혈관형성성 질환에 있어 신생혈관형성 인자가 주요 원인으로 관여하고 있다.

[0291] 신생혈관형성성 질환에 있어 비정상 세포는 정상 세포에 비하여 신생혈관형성 인자를 과다 생성한다. 중요한 것으로 알려진 신생혈관형성 인자 중 대표적인 것은 VEGF (Vascular endothelial growth factor)이다. VEGF 리간드와 VEGF 수용체 (VEGFR) 및 이들의 신호 전달에 관여하는 인자를 억제하면 이러한 비정상적인 신생혈관형성이 개선되는 것으로 알려져 있다.

[0292] 또한 최근 들어 HIF-1 α (HIF-1-alpha, Hypoxia-inducible factor 1-alpha)가 신생혈관형성에 관여한다는 연구 결과가 발표되고 있다. 예를 들어, HIF-1 α 가 안구에서 망막 및 망막 하의 신생혈관형성을 유도한다는 결과가 있다 [5]. HIF-1 α 는 저산소 상태에서 과발현되는 인자로서 세포의 성장 및 생존에 관여하는 인자로 알려져 있다. 이에 더하여, HIF-1 α 는 신생혈관형성에 관여하며 VEGF의 상위 조절자 (parent moderator) 중 하나이다. HIF-1 α 의 신생혈관형성 신호 전달 경로는 도 1과 같다. HIF-1 α 의 직접적인 억제 치료 가능성이 연구되고 있음에도 불구하고, 현재까지는 예상치 못한 독성으로 인하여 큰 성과가 나지 못하고 있는 현황이다 [6].

[0293] 이외에도 HIF-1 α 의 하위 조절자 (child moderator) 중 EPO, PGF, ANGPTL4, SDF-1, VEGFR1, VEGFR2, PDGFR β , CXCR4 또한 신생혈관형성 인자로 기능한다.

[0295] 4. TRAP-1의 억제를 통한 신생혈관형성성 질환의 치료

[0296] 본 출원의 발명자는 기존에 주요 타겟으로 다루어진 VEGF 및 HIF-1 α 가 아닌 이의 상위 조절자로서, 비정상 세포에만 발현되는 인자를 규명해냈다. 본 출원은 이를 억제하는 방법 및 억제하는 효능이 있는 물질, 또한 이를 포함하는 제형 및 치료 방법을 포함하고 있다.

[0298] TRAP-1 (Tumor necrosis factor receptor-associated protein-1)은 샤페론 단백질인 HSP90 (heat shock protein-90)의 파라로그 (paralog)로서, 미토콘드리아에만 존재하는 미토콘드리아 단백질 (mitochondrial protein)이다.

- [0299] HSP90은 체내 단백질의 상당 부분을 담당하는 샤페론 단백질로서 세포의 항상성 (homeostasis)를 조절하는 기능에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이로 인해 항암 타겟으로 연구되었다 [7]. 그러나 HSP90은 비정상 세포 또는 정상 세포를 구분하지 않고 발현되는 일반적인 샤페론 단백질이므로 이를 억제함은 예상치 못한 부작용을 낳는 경우가 많았다. 이로 인해 1999년부터 임상 실험 단계에 진입한 HSP90 억제제는 18개였으나, 2018년까지 임상 실험이 지속 중인 HSP90 억제제는 5개에 불과했다 [8].
- [0301] TRAP-1을 포함한 hsp90s은 두 개의 단위체 (protomer)가 결합되어 있는 구조를 가지고 있다. 이때, 각각의 단위체를 제 1 단위체, 제 2 단위체로 명칭한다. hsp90s는 hsp90s에 대하여 특이적인 클라이언트 단백질 (client protein)이 결합되면 서로 떨어져 배치되어 있던 단위체가 가까워지면서 ATP가 결합하여 분해되고, 클라이언트 단백질의 입체 구조를 형성하는 기능을 한다. 각각의 단위체는 N-말단 부위 (N-terminal domain), 중단 부위 (middle domain), C-말단 부위 (C-terminal domain)으로 구성되어있다. N-말단 부위는 ATP가 결합되어 hsp90s의 활성을 위한 에너지를 생산하는 부위이다. 중단 부위는 각각의 hsp90s에 특이적인 클라이언트 단백질이 결합하는 부위이다. C-말단 부위는 두 개의 단위체가 연결되는 부위이다. 예시적으로 TRAP-1의 구조와 작동 과정이 도 3에 나타나있다.
- [0302] hsp90s는 파라로그 간의 N-말단 부위의 상동성이 매우 높으나, 중단 부위의 상동성은 낮은 특징이 있다. 기존의 HSP90 저해제는 ATP와 상동성이 있는 아데노신 백본을 포함하고 있어 hsp90s의 N-말단에 ATP가 결합하는 것을 경쟁적으로 저해함으로써 HSP90을 억제하였다. 이로 인해 기존의 HSP90 저해제는 모든 hsp90s에 대하여 비선택적으로 작용하는 문제가 있었다 [9]. 이로 인해 각각의 파라로그에 대하여 상동성이 낮은 부위를 타겟으로 하는 선택적 억제제의 필요성에 관한 문제의식이 있었으나, 실용적인 약물 분자의 개발로 이어지지는 못했다 [10].
- [0304] 본 출원의 발명자는 hsp90s 및 이의 억제제를 연구하던 중, 신생혈관형성성 질병에 있어 세포질의 hsp90s이 아닌 미토콘드리아 내부의 hsp90s가 비정상 세포의 물질대사에 적극 관여함을 확인하였다. 이에 착안하여 HSP90의 억제제로 알려진 젤다나마이신에 미토콘드리아 막 투과능이 있는 잔기를 부착한 개미트리넵을 개발, 우수한 치료 효과가 있음을 확인하였다. 다만 개미트리넵은 여전히 세포질의 hsp90s에 대해서도 억제능을 보여 강한 독성을 보이는 문제가 있었다 (한국특허 공개공보 KR20150109540A 참조).
- [0305] 이에 나아가, 본 출원의 발명자는 신생혈관형성성 질병이 발생한 조직을 분석하던 중 미토콘드리아 hsp90s 중 TRAP-1이 비정상 조직 부위에만 발현되어 있음을 발견하였다. 이에 TRAP-1에 대한 선택적 억제의 필요성을 인식하고 TRAP-1을 억제하는 실험을 진행한 결과, TRAP-1이 신생혈관형성성 질병을 치료하기 위한 유효한 타겟임을 검증하였다. 이에 이어서 TRAP-1을 선택적으로 억제할 수 있는 억제제를 지속적으로 연구한 끝에 TRAP-1의 선택적 억제제를 최초로 개발할 수 있었다. 그중 하나인 본 출원에 의한 화합물은 TRAP-1의 단위체 중 상동성이 낮은 중단부에 결합함으로써, TRAP-1의 선택적 억제를 가능하게 한다.
- [0306] TRAP-1은 HIF-1 α 의 상위 조절자로, 확인된 TRAP-1과 HIF-1 α 의 신호 전달 체계는 도 2와 같다.
- [0308] **5. 본 출원의 화합물에 의한 TRAP-1의 억제**
- [0309] 본 목차에서는 본 출원에 의한 화합물의 구조와 TRAP-1 사이의 상호작용에 관해서 규명하는 것을 목적으로 하며 또한 이와 관련된 화합물의 구조적 특징을 개시하는 것을 목적으로 한다.
- [0311] 본 출원에 의한 약물 분자는 화학식 7의 구조를 갖는 화합물로서,
- [0312] [화학식 7]
- [0313] B-L-C⁺
- [0315] 이때,
- [0316] B는 TRAP-1 단위체에 대한 친화력이 있는 결합부 (bonding moiety)이고, L은 결합부와 양전하부를 연결하기 위

한 연결부 (linking moiety)이며, C^+ 는 양전하를 띄는 양전하부 (cationic moiety)이다.

- [0318] 이때, 결합부는 TRAP-1 단위체의 N-말단 부위, 중단 부위, 또는 C-말단 부위에 대한 결합능이 있을 수 있다. 이때 결합부는 TRAP-1 단위체의 활성 부위 (active site)에 대한 결합능이 있어야 하며, 그 중에서도 중단 부위에 대한 결합능이 있는 것이 바람직하다.
- [0319] 또한 결합부는 특정 부피를 갖는 것이 바람직하다. TRAP-1 단위체의 특정 부위에 대한 결합능을 갖기 위하여 적합한 부피를 가지는 것이 바람직할 수 있기 때문이다. 바람직한 어떤 실시예에서, 결합부는 치환기로서 알콕시기를 포함할 수 있다. 나아가, 결합부는 치환기로서 2 개 이상의 알콕시기를 포함할 수 있다. 바람직한 어떤 실시예에서, 결합부는 치환기로서 카르보닐기를 포함할 수 있다. 나아가, 결합부는 치환기로서 2 개 이상의 카르보닐기를 포함할 수 있다. 바람직한 어떤 실시예에서, 결합부는 치환기로서 알콕시기, 및 카르보닐기를 포함할 수 있다. 나아가, 결합부는 치환기로서 2개 이상의 알콕시기, 2개 이상의 카르보닐기 및 알킬기를 포함할 수 있다.
- [0321] 이때, 연결부의 길이는 TRAP-1과 본 출원의 약물 분자 사이의 상호작용에 영향을 미칠 수 있다. TRAP-1과 약물 분자 사이의 상호작용은 (1) TRAP-1의 2 개의 전구체의 특정 부위에 각각 약물 분자가 결합하는 경우, (2) TRAP-1의 2개의 전구체의 특정 부위에 한 개의 약물 분자가 모두 결합하는 경우, (3) TRAP-1의 전구체의 특정 부위에 약물 분자가 결합하지 못하는 경우가 있을 수 있다. (3)의 경우를 제외할 때, 예시적으로 연결부의 길이가 특정 길이 미만인 경우, (1)의 비율이 (2)의 비율 보다 높을 수 있다. 또한, 연결부의 길이가 특정 길이 이상인 경우, (2)의 비율이 (1)의 비율 보다 높을 수 있다. 또한, 연결부의 길이가 특정 길이인 경우, (2)의 비율이 제일 높도록 최적화될 가능성이 있다.
- [0322] 또한 연결부의 길이는 TRAP-1이 ATP와 결합하지 않은 상태에 있어, 제 1 단위체의 특정 구성요소와 제 2 단위체의 특정 구성요소 사이의 거리에 근접한 값일 수 있다. 이때, 각 단위체의 특정 구성요소는 각각 N-말단 부위, 중단 부위 또는 C-말단 부위일 수 있다. 나아가 이때, 각 단위체의 특정 구성요소 중 적어도 하나는 중단 부위일 수 있다. 또는 이때, 연결부의 길이는 TRAP-1이 ATP와 결합한 상태에 있어, 제 1 단위체의 특정 구성요소와 제 2 단위체의 특정 구성요소 사이의 거리와 근접한 값일 수 있다. 이때, 각 단위체의 특정 구성요소는 각각 N-말단 부위, 중단 부위 또는 C-말단 부위일 수 있다. 나아가 이때, 각 단위체의 특정 구성요소 중 적어도 하나는 중단 부위일 수 있다.
- [0324] 또는, 양전하부는 높은 지방 친화성 (lipophilicity)을 가질 수 있다. 예시적으로 지방 친화성이 큰 분자는 부피가 큰 무극성 부위를 갖거나, 극성 부위가 무극성 부위로 둘러싸여 있거나, 큰 분자량을 가질 수 있다. 양전하부는 미토콘드리아의 막을 투과함으로써 약물 분자가 미토콘드리아 내부로 전달될 수 있도록 한다.
- [0325] 부가적으로, 양전하부는 단위체의 N-말단 부위, 중단 부위, 또는 C-말단 부위에 대한 결합능이 있을 수 있다. 양전하부가 단위체에 대하여 결합능을 보이는 경우 치료학적으로 유효한 약물 분자의 최소량을 효율적으로 줄일 수 있기 때문이다. 다만, 양전하부의 단위체에 대한 결합능은 결합부와 동등할 필요는 전혀 없다.
- [0326] 또한 결합부의 특정 부위는 특정 부피를 갖는 것이 바람직하다. 단위체의 특정 부위에 대한 결합능을 갖기 위하여 적합한 부피를 가져야 할 수 있기 때문이다. 이때, 상기 특정 부위는 시클릭 구조를 가질 수 있다.
- [0328] **6. 안구 질환의 분류**
- [0329] 안구 질환은 여러 방법으로 분류될 수 있다. 먼저, 안구 질환은 이상이 발생한 안구 구조 (ocular structure)에 따라 분류될 수 있다.
- [0330] 이때, 이상이 발생하는 안구 구조는 안구를 둘러싸고 있는 안구 주변 구조 (eyeball surrounding structure)일 수 있다. 안구 주변 구조는 눈꺼풀 또는 눈물샘일 수 있다.
- [0331] 또는, 이상이 발생하는 안구 구조는 안구를 구성하는 안구 구성요소 (component of eyeball)일 수 있다. 안구 구성요소는 결막, 공막, 각막, 홍채, 모양체, 수정체, 맥락막, 망막, 유리체, 시신경 또는 안근육일 수 있다.

이때 망막에 발생하는 안구 질환은 망막증 또는 망막병증 (retinopathy)으로 호칭한다.

- [0333] 또한, 안구 질환은 신생혈관형성 (neovascularization) 여부에 따라 분류될 수 있다.
- [0334] 특정 안구 구조 또는 안구 전체의 신생혈관형성에 의하여 발생하는 안구 질환을 신생혈관형성성 안구 질환 (neovascular ocular disease)으로 명명한다. 신생혈관형성은 기형성된 혈관의 주변에 새로운 혈관들이 형성되는 신체적 현상을 말하며, 본 출원에서는 기형성된 혈관으로부터 새로운 혈관이 뻗어 나오는 현상인 혈관신생 (angiogenesis)를 포함한다. 비정상적인 혈관 약화, 허혈 (ischemia) 또는 신생혈관형성 인자 (neovascularization factor)의 과다 생성에 의하여 안구 구조에서 비정상적인 신생혈관형성이 발생할 수 있다. 이로 인해 혈관 구조가 밀집되고 혈관이 충분히 두껍게 성장하지 못함으로써, 혈관의 압력이 상승하고 혈관이 안구 구조로부터 분리되는 등 이상 증상이 발생하게 된다.
- [0335] 신생혈관형성성 안구 질환은 신생혈관형성이 발생하는 안구 구조에 따라 분류될 수 있다. 이때, 신생혈관형성성 안구 질환은 맥락막 신생혈관형성 (choroidal neovascularization), 망막 신생혈관형성 (retinal neovascularization), 망막하 신생혈관형성 (subretinal neovascularization), 각막 신생혈관형성 (corneal neovascularization) 또는 홍채 신생혈관형성 (Rubeosis iridis; iris neovascularization)일 수 있다.
- [0336] 그중 망막 신생혈관형성은 망막의 내부에서 시작된 신생혈관형성이 망막과 유리체의 경계까지 돌출되면서 발생한다. 신생 혈관 발생하는 허혈에 의하여 유리체의 오염, 망막 분리 등의 증상이 나타난다. 이에 의한 안구 질환은 당뇨망막병증 (diabetic retinopathy), 미숙아망막병증 (retinopathy of prematurity) 또는 망막정맥폐쇄 (retinal vein occlusion) 등이 있다. 망막 신생혈관형성 질환은 망막 혈관의 허혈 증상이 동반되어 허혈성 망막증 (ischemia retinopathy)으로 불리기도 한다.
- [0337] 망막하 신생혈관형성은 망막의 하부 구조에서 시작된 신생혈관형성이 하부 구조와 망막의 경계까지 돌출되면서 발생한다. 이때, 망막하 신생혈관형성은 맥락막 신생혈관형성에 의하여 발생할 수 있다. 이에 의한 대표적인 안구 질환은 습식 나이관련황반변성 (wet age-related macular degeneration; wet AMD) 등이 있다. 습식 나이관련황반변성의 경우, 황반의 아래로 침투한 신생혈관에서 발생한 허혈에 의하여 황반의 광수용체 및 황반 세포의 변성이 발생한다.
- [0338] 또는, 신생혈관형성성 안구 질환은 특정한 안구 구조에 특정하지 않고 증상에 따라 분류될 수 있다. 예컨데, 신생혈관 녹내장 (neovascular glaucoma)가 이에 속한다.
- [0339] 특정 안구 구조 또는 안구 전체에서 신생혈관형성이 관측되지 않는 안구 질환을 비신생혈관형성성 안구 질환 (non-neovascular ocular disease)로 명명한다. 건식 나이관련황반변성 (dry age-related macular degeneration; dry AMD)이 이에 속한다.
- [0340] 본 출원에서 치료 대상이 되는 안구 질환은 신생혈관형성성 안구 질환에 해당된다.

[0342] 7. 본 출원에 의한 약학적 조성물

- [0343] 본 출원은 본 출원에 의한 화합물들 중 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공할 수 있다. 이때, 본 출원에 의한 화합물은 화학식 1 내지 11로 표시되는 화합물을 의미하며, 상기 화학식 1 내지 11에 관해서는 "2. 본 출원의 화합물 구조"의 내용을 준용한다.
- [0344] 일 구체예에서, 본 출원에 의한 약학적 조성물은 신생혈관형성성 안구 질환 치료용일 수 있다. 나아가, 상기 신생혈관형성성 안구 질환은 맥락막 신생혈관형성 질환, 망막 신생혈관형성 질환, 망막하 신생혈관형성 질환, 각막 신생혈관형성 질환, 홍채 신생혈관형성 질환, 신생혈관형성성 녹내장일 수 있다. 일 레에서, 상기 신생혈관형성성 안구 질환은 망막 신생혈관형성 질환일 수 있다. 더 나아가, 상기 망막 신생혈관형성 질환은 당뇨망막병증, 미숙아망막병증 또는 망막정맥폐쇄증일 수 있다. 바람직하게는, 상기 망막 신생혈관형성 질환은 당뇨망막병증일 수 있다. 다른 예에서, 상기 신생혈관형성성 안구 질환은 맥락막 신생혈관형성 질환일 수 있다. 나아가, 상기 맥락막 신생혈관형성 질환은 노인성 습식 황반변성 (wet AMD)일 수 있다.
- [0345] 일 구체예에서, 본 출원에 의한 약학적 조성물은 경구용, 또는 점안 투여용일 수 있다. 바람직하게는, 본 출원에 의한 약학적 조성물은 점안 투여용일 수 있다.

- [0347] 본 출원은 본 출원에 의한 화합물들 중 선택되는 하나 이상을 투여함을 포함하는 신생혈관형성성 안구 질환의 치료 방법을 제공할 수 있다. 이때, 본 출원에 의한 화합물은 화학식 1 내지 11로 표시되는 화합물을 의미하며, 상기 화학식 1 내지 11에 관해서는 "2. 본 출원의 화합물 구조"의 내용을 준용한다.
- [0348] 일 구체예에서, 상기 신생혈관형성성 안구 질환은 맥락막 신생혈관형성 질환, 망막 신생혈관형성 질환, 망막하 신생혈관형성 질환, 각막 신생혈관형성 질환, 홍채 신생혈관형성 질환, 신생혈관형성성 녹내장일 수 있다. 일례에서, 상기 신생혈관형성성 안구 질환은 망막 신생혈관형성 질환일 수 있다. 더 나아가, 상기 망막 신생혈관형성 질환은 당뇨망막병증, 미숙아망막병증 또는 망막정맥폐쇄증일 수 있다. 바람직하게는, 상기 망막 신생혈관형성 질환은 당뇨망막병증일 수 있다. 다른 예에서, 상기 신생혈관형성성 안구 질환은 맥락막 신생혈관형성 질환일 수 있다. 나아가, 상기 맥락막 신생혈관형성 질환은 노인성 습식 황반변성 (AMD)일 수 있다.
- [0349] 일 구체예에서, 본 출원에 의한 신생혈관형성성 안구 질환의 치료 방법은 본 출원에 의한 화합물을 경구 경로로 투여함, 또는 점안 경로로 투여함을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 출원에 의한 신생혈관형성성 안구 질환의 치료 방법은 본 출원에 의한 화합물을 점안 경로로 투여함을 포함할 수 있다.
- [0351] 본 출원의 조성물 및 발명은 이를 필요로 하는 대상을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시예에서, 대상은 인간 등의 포유류이거나, 또는 인간이 아닌 포유류이다. 대상, 예를 들어 인간에게 투여될 때 조성물 또는 화합물은, 예를 들어, 본 출원의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물로서 투여되는 것이 바람직하다. 약학적으로 허용가능한 담체는 기술 분야에서 잘 알려진 것이며, 예를 들어, 물과 같은 수용성 용액 또는 생리학적으로 완충된 식염수 또는 글리콜, 글리세롤, 올리브 오일 등의 오일, 또는 주사가 가능한 유기 에스테르와 같은 기타 용매 또는 운반체를 포함한다. 바람직한 실시예에서, 이러한 약학적 조성물이 인간을 투여 대상으로 할 때, 특히 침습적 경로로 투여될 때 (즉, 주사 또는 이식처럼, 상피 장벽을 통한 수송 또는 확산을 피해가는 경로) 수용액은 발열성 물질이 없거나, 또는 실질적으로 발열성 물질이 없다. 첨가제는 예를 들어 제제의 지속적인 방출에 기여하거나 또는 하나 이상의 세포, 조직 또는 기관을 선택적으로 대상으로 하기 위하여 선택될 수 있다. 약학적 조성물은 알약, 캡슐 (스프링클 캡슐 (sprinkle capsule), 젤라틴 캡슐을 포함함), 과립제, 재성형될 수 있는 동결건조물, 가루, 용액, 시럽, 좌약, 주사 또는 그 외의 투여 단위 제형으로 제공될 수 있다. 조성물은 또한 경피 전달 시스템, 예를 들어 피부 패치로 제공될 수 있다. 조성물은 또한 국소적 투여에 적합한 용액, 예를 들어 안약으로 제공될 수 있다.
- [0352] 약학적으로 허용가능한 담체는 생리학적으로 허용가능한 제제로서 예를 들어, 안정화하거나, 용해도를 증가시키거나 또는 본 출원의 화합물과 같은 화합물의 흡수를 증가시키는 기능을 하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 생리학적으로 허용가능한 제제는 예를 들어, 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브 산 또는 글루타티온과 같은 항산화제, 킬레이트 작용제, 저분자량 단백질 또는 다른 스테빌라이저 또는 첨가제를 포함한다. 약학적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 생리학적으로 허용가능한 제제의 선택은 예를 들어, 조성물의 투여 경로에 의존한다. 상기 약학적 조성물의 제제는 자기-유화 약물 전달 시스템 (self-emulsifying drug delivery system) 또는 자기-마이크로유화 약물 전달 시스템 (self-microemulsifying drug delivery system)일 수 있다. 약학적 조성물 (제제)는 리포솜 또는 다른 폴리머 기질로서, 이들의 내부에, 예를 들어 본 출원의 화합물이 포함되어 있는 것일 수 있다. 리포솜은, 예를 들자면, 인지질 또는 다른 지질로 구성된 것으로서, 무독성이고, 생리학적으로 허용가능하며 또한 대사가능 (metabolizable)한 담체로서 상대적으로 제조하고 투여하는 것이 용이한 것이다.
- [0353] 본 명세서에서 사용된 "약학적으로 허용가능한"이라는 용어는 합리적인 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지 반응, 또는 기타 문제 또는 부작용을 보이지 않아 대상의 조직과 접촉시키기에 적합하고, 합리적인 이익/위험 비율 (benefit/risk ratio)을 갖는 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여 제형을 말한다.
- [0354] 본 명세서에서 사용된 "약학적으로 허용가능한 담체"라는 용어는 약학적으로 허용가능한 물질, 조성물 또는 운반체로서, 예를 들어 액체 또는 고체 필러, 희석액, 첨가제, 용매 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 각각의 담체는 "허용가능"해야 하며 이는 제형의 다른 성분과 호환될 수 있고 또한 대상에게 피해를 주지 않아야 함을 의미한다. 약학적으로 허용가능한 담체로 기능할 수 있는 물질의 일부 예시는 다음을 포함한다: (1) 락토스, 글루코스 및 수크로스와 같은 당류; (2) 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 전분; (3) 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 셀룰로스, 및 이의 유도체; (4) 트라가칸트 가루 (powdered

tragacanth); (5) 몰트; (6) 젤라틴; (7) 활석; (8) 코코아 버터 및 좌약용 왁스와 같은 첨가제; (9) 땅콩 오일, 면실유, 잇꽃유, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 콩 오일과 같은 오일; (10) 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; (11) 글리세린, 소르비톨, 마니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; (12) 에틸 올레산 및 에틸 라우린산과 같은 에스테르; (13) 한천; (14) 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄과 같은 완충제; (15) 알긴산; (16) 발열성 물질이 없는 물; (17) 등장성 증류수; (18) 링거액; (19) 에틸 알코올; (20) 포스페이트 완충용액; 및 (21) 약학적 제형에 포함된 그밖의 무독성 호환가능 물질.

[0355] 약학적 조성물 (제제)는 대상에게 다양한 투여 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 투여 경로는 예를 들어, 경구 (예를 들어, 수용성 또는 비수용성 용액 또는 현탁액과 같은 드렌치, 알약, 캡슐 (스프링클 캡슐 및 젤라틴 캡슐을 포함함), 덩어리, 가루, 과립제, 혀에 도포하기 위한 페이스트); 구강 점막을 통한 흡수 (예: 설하); 향문, 직장 또는 질 (예를 들어 페서리, 크림 또는 폼); 비경구 (근육 내, 정맥 내, 피하 또는 척수강 내로, 예를 들어 멸균 용액 또는 현탁액으로); 비강; 복강내; 피하; 경피 (예를 들어 피부에 붙이는 패치); 및 국소적 (예를 들어 크림, 연고 또는 피부에 도포되는 스프레이, 또는 안약) 투여를 포함한다. 화합물은 또는 흡입할 수 있도록 조제될 수 있다. 특정 실시예에서, 화합물은 단순히 멸균수에 용해되거나 현탁될 수 있다. 적절한 투여 경로 및 이에 적합한 조성물의 구체적인 예시는 예를 들어, U.S. Pat. Nos. 6,110,973, 5,763,493, 5,731,000, 5,541,231, 5,427,798, 5,358,970 및 4,172,896, 및 이들이 인용하는 특허들에서 찾을 수 있다.

[0356] 제형은 편리하게 단위 투여 단위 제형으로 제공될 수 있고 또한 약제학 분야에서 잘 알려진 임의의 방법을 통하여 제조될 수 있다. 단일 투여 제형을 제조하기 위해 담체 물질과 혼합될 수 있는 유효 물질의 양은 치료 대상, 특정한 투여 방법에 따라 달라질 것이다. 단일 투여 제형을 제조하기 위해 담체 물질과 혼합될 수 있는 유효 물질의 양은 일반적으로 치료학적 효과를 나타내기 위한 화합물의 양일 것이다. 일반적으로, 100 퍼센트를 기준으로, 상기 양은 유효 물질 1 퍼센트 내지 약 99 퍼센트이고, 바람직하게는 약 5 퍼센트 내지 약 70 퍼센트이며, 가장 바람직하게는 10 퍼센트 내지 30 퍼센트이다.

[0357] 이러한 제형 또는 조성물의 제조 방법은 유효 화합물, 예를 들어 본 출원의 화합물을 담체 및, 선택적으로, 하나 이상의 부가 성분과 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 본 출원의 화합물을 액체 담체, 또는 쉽게 분화된 고체 담체, 또는 둘 다에 균일하고 친밀하게 결합시키고, 그후, 필요한 경우, 제품을 성형함으로써 제조된다.

[0358] 구강 투여에 적합한 본 출원의 제형은 캡슐 (스프링클 캡슐 및 젤라틴 캡슐을 포함함), 카시에 (cachets), 정제, 알약, 지제 (lozenge) (향첨가된 베이스를 사용하며, 주로 스크로스 및 아카시아 또는 트라카칸트를 씹), 동결건조물, 가루, 과립제, 또는 수용성 또는 비수용성 액체의 용액 또는 현탁액, 또는 유중수 또는 수중유 액체 에멀전, 또는 엘릭서 또는 시럽, 또는 캔디 (불활성 베이스를 사용하며, 예를 들어 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아를 씹) 및/또는 함유제 및 이와 같은 것으로서, 각각 유효 물질로서 미리 정해진 양의 본 출원의 화합물을 포함하는 형태일 수 있다. 조성물 또는 화합물은 또한 덩어리, 연약 또는 페이스트 형태로 투여될 수 있다.

[0359] 고체 투여 제형을 제조하기 위해서 (캡슐 (스프링클 캡슐 및 젤라틴 캡슐을 포함함), 알약, 정제, 당제 (dragee), 가루, 과립제 및 기타), 유효 성분은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 소듐 시트르 산 또는 디칼슘 포스페이트, 및/또는 다음 중 임의의 것들과 혼합된다: (1) 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 마니톨, 및/또는 규산과 같은 필러 또는 증량제; (2) 예를 들어, 카르복시메틸셀룰로스, 알긴산, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아와 같은 결합제; (3) 글리세롤과 같은 보습제; (4) 우뮷가사리, 칼슘 카르보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이트, 및 소듐 카르보네이트와 같은 붕해제 (disintegrating agent); (5) 파라핀과 같은 용액 지연제 (solution retarding agent); (6) 4차 암모늄 화합물과 같은 흡수촉진제 (absorption accelerators); (7) 예를 들어, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트와 같은 습윤제 (wetting agents); (8) 카올린 및 벤토나이트 점토와 같은 흡수제; (9) 활석, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트 (lauryl sulfate), 및 이의 혼합물과 같은 윤활제; (10) 개질 및 비개질된 시클로텍스트린과 같은 착화제 (complexing agents); 및 (11) 착색제. 캡슐 (스프링클 캡슐 및 젤라틴 캡슐을 포함함), 알약 및 정제의 경우, 약학적 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 종류의 고체 조성물은 마찬가지로 락토스 또는 유당, 및 고분자 폴리에틸렌 글리콜 및 기타를 사용하여 연질 및 경질 젤라틴 캡슐의 필러로 사용될 수 있다.

[0360] 알약은 선택적으로 하나 이상의 부가 성분과 함께 압축 또는 성형을 통하여 만들어 질 수 있다. 압축 알약 (compressed tablet)은 결합제 (예를 들어, 젤라틴 또는 히드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 비활성

회석제, 보존제, 봉해제 (예를 들어, 소듐 전분 글라이콜레이트 또는 교차결합 소듐 카르복시메틸셀룰로스), 계면활성 또는 분산제를 사용하여 제조될 수 있다. 성형 알약 (molded tablet)은 적절한 기계에서 가루 형태의 화합물을 불활성 액체 회석제로 적신 혼합물을 성형하여 제조할 수 있다.

- [0361] 알약, 및 약학적 조성물의 다른 고체 투여 제형은, 예를 들어 당제, 캡슐 (스프링클 캡슐 및 젤라틴 캡슐을 포함함), 정제 및 과립제는, 장용성 코팅 및 약학적 제형 기술분야에서 잘 알려진 기타 코팅과 같은 코팅 및 셀로 선택적으로 감싸지거나 제조될 수 있다. 이러한 제형은 또한 이들 내부에 포함된 활성 성분이 지연되어 또는 조절되어 방출될 수 있도록 예를 들어, 목적하는 방출 프로파일을 나타내기 위한 다양한 비율의 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 기타 폴리머 기질, 리포솜 및/또는 마이크로스피어를 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 제형은 예를 들어, 박테리아 거름 필터를 통해 거르거나, 또는 살균수에 용해될 수 있는 살균된 고체 조성물 형태의 살균제를 결합시키거나, 또는 사용하기 바로 전에 살균용 주사 물질을 적당량 넣어줌으로써 살균될 수 있다. 이러한 조성물은 선택적으로 불투명화제를 포함할 수 있고 또한 유효 성분을 반드시, 또는 우선적으로, 위장관에서 특정량으로 방출하고, 선택적으로, 지연적으로 방출하는 조성물의 형태일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물 (embedding composition)의 예시는 폴리머성 물질 및 왁스를 포함한다. 유효 물질은 또한, 이것이 적절한 경우, 하나 이상의 상기 언급된 첨가제와 함께 마이크로캡슐 형태로 제공될 수 있다.
- [0362] 경구 투여에 유용한 액체 투여 제형은 약학적으로 허용가능한 에멀전, 제성형할 수 있는 동결건조물, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서를 포함한다. 유효 성분은 더하여, 액체 투여 제형은 기술 분야에서 흔히 사용되는 불활성 회석제, 예를 들어, 물 또는 그밖의 용매, 시클로텍스트린 및 이의 유도체, 가용화제 및 유화제, 예를 들어 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (구체적으로, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 캐스터유 및 참깨유), 글리세롤, 테트라하이드로퓨틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0363] 불활성 회석제 외에도, 경구용 조성물은 또한 습윤제, 유화 또는 현탁제, 감미, 조미, 착색, 착향 및 보존성 물질과 같은 어쥬번트를 포함할 수 있다.
- [0364] 현탁액은, 활성 물질에 더하여, 예를 들어 에톡시화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로스 (microcrystalline cellulose), 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 우뭇가사리 및 트라가칸트, 및 이의 혼합물과 같은 현탁제를 포함할 수 있다.
- [0365] 직장, 질, 또는 요도 투여를 위한 약학적 조성물의 제형은 좌약으로 제공될 수 있고, 하나 이상의 활성 화합물과 하나 이상의 적절한 무자극성 첨가제 또는 담체로서 예를 들어, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌약용 왁스 또는 살리실 산 염, 및 상온에서 고체이지만, 체온에서 액체이며, 이로 인하여, 직장 또는 질강 내에서 용해되어 활성 화합물을 방출하는 것을 포함하는 것을 혼합하여 제조될 수 있다.
- [0366] 구강으로 투여하기 위한 약학적 조성물의 제형은 흡수제, 또는 구강 스프레이, 또는 구강 연고로 제공될 수 있다.
- [0367] 대안적으로 또는 부가적으로, 조성물은 카테터, 스텐트, 와이어, 또는 기타 강내치료기구 (intraluminal device)를 통한 전달을 위하여 조제될 수 있다. 이러한 기구를 통한 전달은 특히 방광, 요도, 요관, 직장, 또는 장으로의 전달에 유용할 수 있다.
- [0368] 질 투여에 적합한 제형은 또한 패서리, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 폼 또는 스프레이 제형으로서 적절한 기술 분야에서 잘 알려진 담체를 포함하는 것을 포함한다.
- [0369] 국소 또는 경피 투여를 위한 투여 제형은 가루, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 유효 화합물은 살균 환경에서 약학적으로 허용가능한 담체, 및 필요로 하는 경우 임의의 보존제, 완충제, 또는 추진제와 혼합될 수 있다.
- [0370] 연고, 페이스트, 크림 및 젤은, 활성 화합물에 더하여, 동물 및 식물 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 활석 및 징크 옥사이드, 또는 이의 혼합물과 같은 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0371] 가루 및 스프레이는, 활성 화합물에 더하여, 락토스, 활석, 규산, 수산화 알루미늄, 칼슘 실리케이트 및 폴리아미드 가루, 또는 상기 물질의 혼합물과 같은 첨가제를 포함할 수 있다. 스프레이는 추가적으로 클로로플루오로하이드로카본 및, 부탄 및 프로판과 같은 휘발성 비치환 하이드로카본과 같은 일반적인 추진제를 포함할 수 있

다.

- [0372] 경피용 패치는 본 출원의 화합물을 신체에 조절하여 전달되도록 하는 부가적인 장점을 갖는다. 이러한 투여 제형은 적절한 매개체에 활성 화합물을 용해시키거나 또는 분산시켜서 만들어질 수 있다. 피부를 통과하는 화합물의 흐름을 증가시키기 위하여 흡수 증강제가 사용될 수 있다. 이러한 흐름의 속도는 속도 조절을 위한 막을 제공하거나 또는 화합물을 폴리머 기질 또는 젤에 분산시킴으로써 조절될 수 있다.
- [0373] 안과 제형, 안연고, 가루, 용액 및 이와 같은 것은, 또한 본 출원의 범위 내의 것으로 고려된다. 예시적인 안과 제형은 참고 자료로서 그 내용이 본 출원에 포함되는 U.S. 공보 번호. 2005/0080056, 2005/0059744, 2005/0031697 및 2005/004074 및 U.S. 특허 번호. 6,583,124에 설명되어 있다. 원하는 경우, 액체 안과 제형은 눈물, 수양액 또는 유리액과 유사한 물성을 갖거나 또는 이러한 유체와 호환될 수 있다. 바람직한 투여 경로는 국소적 투여이다 (예를 들어, 안약 또는 이식물을 통한 투여와 같은 국소 투여).
- [0374] 본 출원에서 사용된 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여됨"이라는 용어는 장관 및 국소 투여를 제외한 투여 방법으로, 일반적으로 주사에 의한 것이고, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관경유, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0375] 비경구 투여에 적합한 약학적 조성물은 하나 이상의 활성 화합물이 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 살균된 등장성 수용성 또는 비수용성 용액, 분산물, 현탁액 또는 에멀전, 또는 살균된 가루로서 사용하기 바로 전에 살균된 용액 또는 분산물로 재성형될 수 있는 것과 혼합되어 포함되고, 항산화제, 완충제, 세균발육저지제, 제형을 의도된 투여대상자의 혈액에 투여하는 경우 등장성을 띠도록 조정하는 용질 또는 현탁 또는 농후제를 포함할 수 있다.
- [0376] 본 출원의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수용성 또는 비수용성 담체의 예시는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 이와 같은 것), 및 이의 적절한 혼합물, 식물성 오일, 예를 들어 올리브 오일, 및 주사가 가능한 유기성 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용, 분산물인 경우 필요한 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용을 통하여 유지될 수 있다.
- [0377] 이러한 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 어쥬번트를 포함할 수 있다. 미생물 활동의 억제제는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브 산, 및 기타와 같은 다양한 항세균 및 항진균제를 포함함으로써 확실하게 할 수 있다. 또한 당류, 소듐 클로라이드, 및 기타와 같은 등장제를 조성물에 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 추가적으로, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 포함함으로써 주사가 가능한 약학적 제형의 연장된 흡수를 불러올 수 있다.
- [0378] 일부 경우에서, 약물의 효과를 연장하기 위해, 피하 및 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 늦추는 것이 바람직하다. 이는 낮은 수용성을 갖는 결정성 또는 무정형 물질의 액체 현탁액을 사용하여 달성될 수 있다. 이 경우 약물의 흡수 속도는 물질의 용해 속도에 의존하고, 즉, 결정의 크기 및 결정의 형태에 의존할 수 있다. 대안적으로, 비경구 투여된 약물 제형의 지연된 흡수는 약물을 오일 운반체에 용해시키거나 또는 현탁시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0379] 주사가 가능한 데포 제형 (depot form)은 대상 화합물이 폴리락타이드-폴리글리콜라이드와 같은 생분해성 폴리머 내부에 있는 마이크로캡슐화된 기질을 형성함으로써 만들어진다. 약물 대 폴리머의 비율, 및 사용된 특정 폴리머의 특성에 따라, 약물의 방출 속도가 조절될 수 있다. 기타 생분해성 폴리머의 예시는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(안하이드라이드)를 포함한다. 데포 주사가 가능 제형은 약물을 인체 조직과 호환가능한 리포솜 또는 마이크로에멀전에 가둠으로써 제조될 수도 있다.
- [0380] 본 출원의 방법에 사용하기 위하여, 활성 화합물은 그 자체로 또는 예를 들어, 0.1 내지 99.5% (더욱 바람직하게는, 0.5 내지 90%)의 활성 성분을 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 약학적 조성물로 제공될 수 있다.
- [0381] 도입 방법은 또한 재충전가능 또는 생분해성 장치를 통해 제공될 수 있다. 단백질 바이오약물질을 포함한, 최근 약물의 방출을 조절하기 위하여 다양한 서방성 폴리머 장치 (slow release polymeric device)가 개발되고 생체 내에서 실험되어왔다. 생분해성 및 비분해성 폴리머를 모두 포함한, 다양한 생체적합 폴리머(하이드로젤 포함)가 특정 목표 장소에서 화합물을 지속적으로 방출하기 위한 이식물을 만들기 위하여 사용될 수 있다.

- [0382] 약학적 조성물 내의 활성 성분의 실제 투여량은 특정 환자, 조성물, 및 투여 방법에 대하여 환자에게 독성을 나타내지 않고, 원하는 치료학적 반응을 달성하기에 효과적인 양의 활성 성분을 수득하기 위하여 달라질 수 있다.
- [0383] 선택된 투여량은 특정 화합물 또는 사용된 화합물의 조합, 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 배출 속도, 치료 기간, 사용된 특정 화합물과 함께 사용된 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 나이, 성별, 체중, 상태, 일반건강 및 치료 중인 대상의 병력, 및 기타 의학 분야에서 잘 알려진 요인을 포함하는 다양한 요인들에 의존할 것이다.
- [0384] 그 분야에서 통상의 지식을 가진 의사 또는 수의사는 약학적 조성물의 필요로 하는 치료학적 유효량을 쉽게 결정하고 또한 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 약학적 조성물 또는 화합물의 투여량을 원하는 치료학적 효과를 달성하기 위해서 필요한 정도 보다 낮은 수치에서 시작하고 원하는 효과가 달성될 때까지 천천히 투여량을 증가시킬 수 있다. "치료학적 유효량"은 원하는 치료학적 효과를 도출하기에 충분한 화합물의 농도를 의미한다. 일반적으로 화합물의 유효량은 대상의 체중, 성별, 및 병력에 의하여 달라질 수 있다고 이해되고 있다. 유효량에 영향을 주는 다른 요소는 대상의 상태의 심각함, 치료 대상인 장애, 화합물의 안정성, 및, 원하는 경우, 본 출원의 화합물과 함께 투여되는 다른 유형의 치료제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 대량의 총 투여량은 제제를 여러 회 투여하여 전달될 수 있다. 효능 및 투여량을 결정하는 방법은 당업자에게 알려져 있다 (Isselbacher et al. (1996) Harrison's Principles of Internal Medicine 13 ed., 1814-1882, 본 명세서에 참고 문헌으로 포함됨).
- [0385] 일반적으로, 본 출원의 조성물 및 방법에 사용되는 활성 화합물의 적합한 일일 투여량은 치료 효과를 만들기 위해 효과적인 최저 투여량의 화합물일 것이다. 이러한 효과적 투여량은 일반적으로 위에서 기술된 요인들에 의존할 것이다.
- [0386] 특정 실시예에서, 본 출원의 화합물은 단독으로 또는 다른 유형의 치료제와 공동으로 투여될 수 있다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, "공동 투여 (conjoint administration)"라는 용어는 그 전에 투여된 치료 화합물이 아직 신체에서 효과가 있는 동안 제2화합물이 투여되도록 2 개 이상의 상이한 치료 화합물을 투여하는 임의의 방식이다 (예를 들어, 2 개의 화합물은 대상에게 동시에 효과적이고, 2 개의 화합물의 동반상승 효과를 포함할 수 있음). 예를 들어, 상이한 치료 화합물은 동일한 제형 또는 별도의 제형으로, 부수적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 특정 실시예에서, 상이한 치료 화합물은 서로 1 시간, 12 시간, 24 시간, 36 시간, 48 시간, 72 시간 또는 1 주일 이내에 투여될 수 있다. 따라서, 이러한 치료를 받는 대상은 상이한 치료 화합물의 병용 효과로부터 이익을 얻을 수 있다.
- [0387] 특정 실시예에서, 본 출원의 화합물과 하나 이상의 추가적인 치료제 (예를 들어, 하나 이상의 추가적인 화학요법제)의 공동 투여는 본 출원의 화합물 또는 하나 이상의 추가적인 치료제를 각각 개별 투여하는 것에 비해 개선된 효능을 제공한다. 이러한 특정 실시예에서, 공동 투여는 부가적 효과를 제공하며, 여기서 부가적 효과는 본 출원의 화합물 및 하나 이상의 추가적인 치료제의 개별 투여의 효과의 각각을 합한 것을 의미한다.
- [0388] 본 출원은 본 출원의 조성물 및 방법에서의 본 출원의 화합물의 약학적으로 허용되는 염의 용도를 포함한다. 특정 실시예에서, 본 출원의 의도된 염은, 알킬, 디알킬, 트리알킬 또는 테트라-알킬 암모늄 염을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 실시예에서, 본 출원의 의도된 염은, L-아르기닌, 베네타민, 벤자틴, 베타인, 수산화 칼슘, 콜린, 데아놀, 디에탄올아민, 디에틸아민, 2-(디에틸아미노)에탄올, 에탄올아민, 에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 히드라바민, 1H-이미다졸, 리튬, L-라이신, 마그네슘, 4-(2-히드록시에틸)몰폴린, 피페라진, 포타슘, 1-(2-히드록시에틸)피롤리딘, 소듐, 트리에탄올아민, 트로메타민, 및 아연 염을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 실시예에서, 본 출원의 의도된 염은 Na, Ca, K, Mg, Zn 또는 다른 금속 염을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0389] 약학적으로 허용가능한 산 부가 염은 또한 물, 메탄올, 에탄올, 디메틸포름아미드, 및 기타 다양한 용매화물로서 존재할 수 있다. 이러한 용매화물의 혼합물 또한 제조될 수 있다. 이러한 용매화물의 공급원은 결정화되는 용매로부터일 수 있고, 이는 제조 또는 결정화되는 용매의 내재적 특징으로 인한 것이거나, 또는 상기 용매에 따라 우연적 원인으로 인한 것일 수 있다.
- [0390] 소듐 라우릴 설페이트 및 마그네슘 스테아레이트와 같은 습윤제, 유화제 및 윤활제, 및 착색제, 방출제, 코팅제, 감미, 향미 및 착향제, 보존제 및 항산화제 또한 상기 조성물에 있을 수 있다.
- [0391] 약학적으로 허용가능한 항산화제의 예는 다음을 포함한다: (1) 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 소듐 바이설페이트, 소듐 메타바이설페이트, 소듐 설페이트 및 기타와 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔

미테이트, 부틸 화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈 레이트 및 알파-토 코페롤, 및 기타와 같은 유용성 항산화제; 및 (3) 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산, 및 기타와 같은 금속-킬레이트 작용제.

[0393] **구체적인 실시예**

[0394] 실시예 1. 이하 실험을 위한 실험 수행 방법

[0395] - 산소 유도 망막증 마우스 모델 및 SMX 안구 주사

[0396] 산소 유도 망막증 마우스 모델은 탄생 후 7일(P7)된 C57BL/6J(효창사이언스) 새끼 마우스를 고 산소 챔버(Coy lab. in vivo chamber, 75% O₂)에 5일동안 키운 다음(P12), 정상 산소 환경에서 5일동안 키움(P17)으로서 유도 하였다. 고산소 챔버에서 새끼 마우스를 꺼낸 뒤 (P12) SMX를 1회, 0.15mM 농도(0.1% DMSO)로 1ul 안구 주사하 였다. 안구 주사에 사용한 SMX는 1xPBS (Phosphate buffer saline)에 0.1%로 희석시킨 후 사용하였으며, 컨트롤 마우스에는 1Xpbs에 DMSO 0.1%를 사용하였다. Eylea(Aflibercept, anti-VEGF ab) 의 경우, 40ug을 1ul에 희 석시켜 1ul 안구주사 하였다.

[0398] - 망막 혈관 분석

[0399] 산소유도 망막 마우스 모델을 형성한 뒤, 1XPBS, 4%PFA로 perfusion한다. 마우스 눈을 적출하고 4% PFA로 고정 한 뒤, 망막을 분리한다. 분리한 망막을 1XPBS로 씻은 뒤, 1시간동안 상온에서 Blocking(0.1%BSA, 0.1% Tryton X-100 in 1XPBS) 한다. 4℃에서 하룻동안 CD31 혈관염색 antibody(CD31, cell signaling, 1:100)로 염색한다. 다음날, 1XPBS로 씻은 뒤, 2nd antibody로 4℃에서 하룻동안 염색한다. (alexa flour 594-anti rabbit antibody, 1:500) 다음날, 1XPBS로 씻은 뒤, mounting한다. 형광현미경으로 혈관 염색을 분석한다(Zen, axio zoom). 분석은 Zen software을 이용하였다.

[0401] - 세포배양

[0402] 뮐러세포(MIO-M1)를 37℃ CO₂ 에서 배양하였으며, 배지는 DMEM-low glucose(sigma) + 10% Fetal bovine serum + 1% penicillin & streptomycin의 조건으로 사용하였다. 저 산소 챔버는 37℃ CO₂, 1% O₂ 로 유지하였다.

[0404] - 웨스턴 블롯(western blot)

[0405] 뮐러세포(MIO-M1)를 60밀리 플레이트에 4 x10⁵의 수로 세포를 분주하고, 3ml의 배지에서 24시간 배양하였다. 다 음날, 미토콘드리아 열단백질90 (TRAP1) 저해제인 SMX를 그림에 표기된 농도별로 처리하고 저 산소 챔버에 6시 간동안 배양하였다. 배양된 세포로부터 전체 세포 용해물 (Whole cell lysates)을 만들어서 전기영동 하고, PVDF 막에 이동시킨 후, 일차항체를 4℃에서 18시간 처리하였다. 다음날, 이차항체를 1시간 처리하고, 웨스턴 블롯팅 검출 시약을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다.

[0407] - Total RNA 추출 및 RNA level 분석

[0408] 뮐러세포에 개미트리넵 과 SMX를 3uM로 처리하고, 1% O₂ 환경에서 8시간 배양후 total RNA를 추출하였다 (Quiazen, total RNA extraction kit). 1ug의 total RNA에서 cDNA를 합성하였다(NEB, cDNA synthesis kit). angiogenic factor들을 PCR을 이용해 합성한 뒤, 아가로스 전기영동하여 RNA level을 분석하였다.

[0410] - Tube formation assay

[0411] 뮐러세포에서 siRNA를 이용하여 TRAP1을 knock down 하였다. media를 바꿔준 뒤 1% O₂ 환경에서 24시간 배양하 여 conditioned media를 만들어서 -86℃에 보관하였다. 96웰 플레이트에 matrigel로 코팅하고 HUVEC cell과

conditioned media를 섞어서 분주하였다. 37℃에서 4시간동안 배양 후 tube formation을 분석하였다. Bio image navigator 현미경을 이용하여 이미지를 찍고, image j 프로그램으로 분석하였다.

[0413]

- ATPase Activity Assay

[0414]

ATPase 활성은 제조사의 매뉴얼에 따라 PiColorLock Gold Phosphate Detection Kit (Innova Biosciences)를 통하여 비유기성 인산염의 방출을 측정함으로써 측정되었다. TRAP1 (0.5 μM)을 0.2 mM ATP와 함께 100 mM Tris, 20 mM KCl, 및 6 mM MgCl₂에서, pH7.0, 37 °C 조건에서 3 h 동안 배양했다. 이후, 100 μL ATP 가수분해물 샘플에 PiColorLock Gold reagent와 촉진제 (100:1)를 첨가했다. 25 °C에서 5 min 동안 배양한 후, 10 μL 정지액 (stop solution)을 첨가하여 색상 변화를 정지시키고, SYNERGY NEO microplate reader (BioTek Instruments)를 통해 620nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0415]

억제능 분석을 위해, TRAP-1을 정해진 농도 (0.520 μM)의 억제제와 함께 30 min 동안 배양한 후 ATP와 교반하였다. 흡광도의 값은 DMSO 대조군으로 정규화하였으며 데이터는 % ATPase 활성으로 표현되었다.

[0417]

실시예 2. TRAP1의 억제는 신생혈관형성성 안구질환의 치료 효과를 갖는다.

[0418]

실시예 2.1. TRAP1 +/+, +/- 마우스를 이용한 산소 유도 망막증 마우스 모델의 준비

[0419]

TRAP1 +/- (암컷)과 TRAP1 +/- (수컷)을 교배하여 같은 배에서 나온 TRAP1 +/+ 와 TRAP1 +/- 마우스를 사용하였다.

[0420]

TRAP1 wild, hetero 새끼 마우스를 탄생 7일부터 12일까지(P7-P12) 고 산소 챔버(Coy lab. in vivo chamber, 75% O₂)에서 키운 다음 12일부터 17일까지 정상 산소 환경에서 키워서 망막증 마우스 모델을 만들었다.

[0422]

실시예 2.2. TRAP-1 +/+, +/- 산소 유도 망막증 마우스 모델의 망막 혈관 분석

[0423]

산소유도 망막 마우스 모델을 형성한 뒤, 1XPBS, 4%PFA로 perfusion한다. 마우스 눈을 적출하고 4% PFA로 고정한다. 망막을 분리한다. 분리한 망막을 1XPBS로 씻은 뒤, 1시간동안 상온에서 Blocking(0.1%BSA, 0.1% Tryton X-100 in 1XPBS) 한다. 4℃에서 하룻동안 CD31 혈관염색 antibody(CD31, cell signaling, 1:100)로 염색한다. 다음날, 1XPBS로 씻은 뒤, 2nd antibody로 4℃에서 하룻동안 염색한다. (alexa flour 594-anti rabbit antibody, 1:500) 다음날, 1XPBS로 씻은 뒤, mounting한다. 형광현미경으로 혈관 염색을 분석한다(Zen, axio zoom). 분석은 Zen software을 이용하였다.

[0424]

망막 혈관 분석 결과 TRAP-1 +/+ 산소 유도 망막증 마우스 모델은 망막의 무혈관 영역 (avascular area)이 증가하고 동시에 신생혈관 영역 (neovascular area)이 증가한 것이 관측되어 산소 유도 망막증의 증상이 확연하게 관측되었다. 반면, TRAP-1 +/- 산소 유도 망막증 마우스 모델은 망막의 무혈관 영역 (avascular area)과 신생혈관 영역 (neovascular area)의 변화가 확연히 작게 관측되어 산소 유도 망막증이 크게 개선되었음을 확인할 수 있었다 (도 4, 도 5). 또한, TRAP-1 +/- 산소 유도 망막증 마우스 모델은 산소 유도 망막증이 개선된 것 외에 야생형 마우스와 상이한 표현형이 관측되지 않아 억제에 따른 부작용이 없는 것을 확인할 수 있었다. 이를 종합할 때, TRAP-1은 망막 신생혈관형성 질환을 치료 또는 예방하기 위한 유효하며 안전한 타겟이라는 결론을 도출할 수 있었다.

[0426]

실시예 2.3. TRAP-1을 억제하면 신생혈관형성인자의 생성이 억제된다.

[0427]

TRAP-1은 HIF-1α의 상위 조절자로서 동시에 VEGF 등의 신생혈관형성인자의 상위 조절자임을 앞서 언급한 바 있다 (도 2). 당뇨 망막증의 경우 대표적인 망막 신생혈관형성 질환이므로 TRAP-1을 억제하면 신생혈관형성인자가 억제되고, 당뇨 망막증 역시 치료될 것이다.

[0428]

TRAP-1이 신생혈관형성인자의 상위 조절자임을 검증하기 위하여 tube formation assay를 수행하였다.

[0429]

필러세포(MIO-M1)를 37℃ CO₂ 에서 배양하였으며, 배지는 DMEM-low glucose(sigma) + 10% Fetal bovine serum

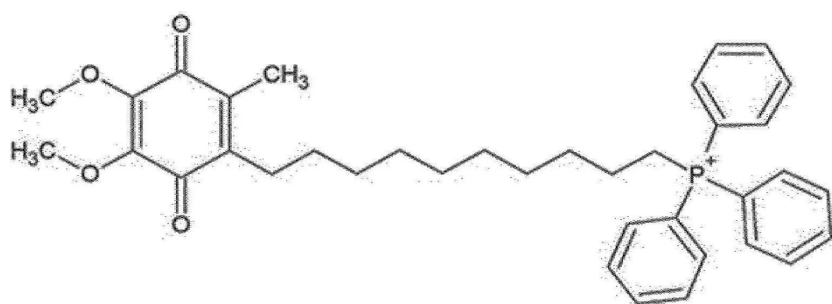
+ 1% penicillin & streptomycin의 조건으로 사용하였다. 저 산소 챔버는 37℃ 5% CO₂, 1% O₂ 로 유지하였다. 필러세포에서 siRNA를 이용하여 TRAP1을 knock down 하였다. media를 바꿔준 뒤 1% O₂ 환경에서 24시간 배양하여 conditioned media를 만들어서 -86℃에 보관하였다. 96웰 플레이트에 matrigel로 코팅하고 HUVEC cell과 conditioned media를 섞어서 분주하였다. 37℃에서 4시간동안 배양 후 tube formation을 분석하였다. Bio image navigator 현미경을 이용하여 이미지를 찍고, image j 프로그램으로 분석하였다.

[0430] Tube formation assay 결과 (도 6, 도 7), TRAP-1을 녹다운 시킨 필러세포로부터 만든 conditioned media를 사용한 그룹에서 튜브의 길이, 가지의 수, 교차점이 감소하여 신생혈관형성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0432] 실시예 3. SMx 분자는 TRAP-1의 억제능을 갖는다.

[0433] 실시예 3.1. 실험에 사용한 물질 및 입수처

[0434] 실험 수행을 위하여 하기 구조식의 SMx 분자를 획득하였다. SMx 분자는 MedchemExpress를 통하여 입수하였다 (CAS No. 845959-50-4).



[0435]

[0436] 또한, SMx와의 비교를 위하여 hsp90s의 N-말단 부위 억제제인 PU-H71 및 기존에 발명자가 개발하였던 개미트리넵을 획득하였다. PU-H71은 Tocris를 통하여 획득했으며, 개미트리넵은 레고캠바이오사이언스를 통해 획득하였다.

[0438] 실시예 3.2. TRAP-1과 SMx의 결합 구조

[0439] TRAP-1 상에서 SMx가 결합하는 위치를 확인하기 위하여 TRAP-1과 SMx의 결합 구조에 대한 X-ray diffraction (XRD) 측정을 수행하였다. TRAP-1은 zebrafish의 TRAP-1을 사용하였다. TRAP-1과 SMx의 결합 구조를 관측한 결과는 도 12와 같다. 도 12의 우측에는 TRAP-1 상에서 SMx와의 결합에 관여한 주요 아미노산 잔기들을 표시하였다. 상기 잔기들이 갖는 기능을 이해하기 위하여 해당 잔기들의 중간 보존성을 분석하였다. 분석 결과, 해당 잔기들은 중간 보존성이 매우 높은 부위로서 TRAP-1의 기능에 중요한 역할을 한다고 예상할 수 있었다 (도 13).

[0440] 이들의 역할을 조금 더 이해하기 위하여, 상기 결합 구조를 TRAP-1의 Homolog인 Hsp90의 구조와 비교 분석하였다. 기존 논문으로부터 Hsp90와 이의 클라이언트 단백질인 CDK4의 결합구조를 도출하였다 [11]. 양 구조를 비교 분석한 결과, TRAP-1 상의 SMx와의 결합 위치가 Hsp90 상의 클라이언트 단백질과의 결합 위치와 일치함을 구조 비교를 통해 확인할 수 있었다. 해당 위치는 TRAP-1의 중단 부위에 속하는 잔기로써, SMx가 클라이언트 단백질과 경쟁적으로 TRAP-1에 결합함을 예상할 수 있었다 (도 11).

[0442] 실시예 3.3. SMx는 클라이언트 단백질과 경쟁적으로 TRAP-1에 결합한다.

[0443] SMx가 TRAP-1의 클라이언트 단백질로 알려진 SIRT3 및 SDHB와 경쟁적으로 결합하는지를 확인하기 위해 Pull down assay를 진행하였다. GST fusion 형태의 TRAP1 단백질을 bacteria cell로부터 정제한 후 Glutathione bead에 결합시켜 TRAP1-bead 형태를 만든 후 mammalian cell로부터 isolation한 미토콘드리아와 (Thermo scientific mitochondria isolation kit) 4℃에서 약물과 함께 18시간 동안 결합시킨다. 약물로는 SMx와 기존에 개발된 hsp90s의 N-말단 부위 억제제인 개미트리넵 및 PU-H71을 그림에 표기된 농도별로 처리하였다. Pull down assay 결과 (도 14), SMx의 농도에 따라 클라이언트 단백질의 결합이 유의미하게 감소함을 확인하였다. 이는 SMx가 TRAP-1의 중단 부위에 대한 결합능을 갖는다는 강력한 증거이다. 개미트리넵 및 PU-H71의 처리 결과에

서 SIRT3 및 SDHB의 발현이 크게 변하지 않았다는 사실은 이를 뒷받침한다.

[0444] 또한, 실시예 2.2.에서 확인된 TRAP-1 상 SMx의 결합 부위를 변형시킨 뮤턴트들의 TRAP1 mutant-bead 형태를 준비한 후 pull down assay를 수행하였다 (도 15, 좌측). 실험 결과, 해당 위치를 변형시킨 뮤턴트들의 경우 클라이언트 단백질과 제대로 결합하지 못하는 것으로 관측되었다. 이는 SMx가 TRAP-1과 결합하는 위치가 TRAP-1이 클라이언트 단백질과 결합하는 부위와 동일하다는 것을 교차 검증하고 있다.

[0446] 실시예 3.4. SMx에 의하여 혈관생성인자의 발현이 감소한다.

[0447] 뮐러세포(MIO-M1)를 37°C 5% CO₂ 에서 배양하였으며, 배지는 DMEM-low glucose(sigma) + 10% Fetal bovine serum + 1% penicillin & streptomycin의 조건으로 사용하였다. 저 산소 챔버는 37°C 5% CO₂, 1% O₂ 로 유지하였다. 뮐러세포(MIO-M1)를 60mm 플레이트에 4 x10⁵의 수로 세포를 분주하고, 3ml의 배지에서 24시간 배양하였다. 다음날, 미토콘드리아 열단백질90 (TRAP1) 저해제인 SMx, 기존에 개발된 hsp90s의 N-말단 부위 억제제인 개미트리넵 및 PU-H71을 그림에 표기된 농도별로 처리하고 저 산소 챔버에 24시간동안 배양하였다. 배양된 세포로부터 전체 세포 용해물 (Whole cell lysates)을 만들어서 전기영동 하고, PVDF 막에 이동시킨 후, 일차항체를 4°C에서 18시간 처리하였다. 다음날, 이차항체를 1시간 처리하고, 웨스턴 블롯팅 검출 시약을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다.

[0448] 또한 웨스턴 블랏과 정량적 중합효소연쇄반응 결과, SMx에 의하여 HIF-1 α 를 비롯하여 (도 8) 잘 알려진 신생혈관형성인자들의 발현 (도 9)이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0450] 실시예 3.5. SMx는 기존 hsp90s 억제제와 다른 신규한 기작으로 TRAP-1을 억제한다.

[0451] 실시예 3.3.의 결과에 의하여 SMx가 TRAP-1의 기능을 성공적으로 억제하고 있음을 확인할 수 있었다. 이어서, SMx가 기존 hsp90s 억제제와는 다른 신규한 기작을 통하여 TRAP-1을 억제함을 검증하기 위하여 TRAP-1에 SMx와 PU-H71을 각각 처리하여 ATPase activity assay를 수행했다.

[0452] 기존 hsp90s 억제제 (개미트리넵, PU-H71)는 ATPase의 기능을 하는 hsp90s의 N-말단 부위와 결합하는 특성을 가지고 있어 TRAP-1의 ATPase 활성을 떨어뜨리는 특성을 가지고 있다. 다만, hsp90s의 N-말단 부위는 파라로그 간의 상동성이 매우 높아 이러한 억제제가 비선택적으로 hsp90s를 억제하는 문제가 있었다. hsp90s를 비선택적으로 억제하는 경우 나타날 수 있는 문제점에 대해서는 앞서 '4. TRAP-1의 억제를 통한 신생혈관형성성 질환의 치료'에서 언급한 바 있다.

[0453] 따라서 SMx가 앞서 언급한 바와 같이 TRAP-1의 N-말단 부위에 결합하지 않고 TRAP-1을 억제할 수 있다면 기존 hsp90s의 문제점을 혁신적으로 해결할 수 있을 것이다. 또한 이는 SMx를 처리한 후 TRAP-1의 ATPase 활성을 측정함으로써 검증될 수 있을 것이다.

[0454] ATPase 활성은 제조사의 매뉴얼에 따라 PiColorLock Gold Phosphate Detection Kit (Innova Biosciences)를 통하여 비유기성 인산염의 방출을 측정함으로써 측정되었다. TRAP1 (0.5 μ M)을 0.2 mM ATP와 함께 100 mM Tris, 20 mM KCl, 및 6 mM MgCl₂에서, pH7.0, 37 ° C 조건에서 3 h 동안 배양했다. 이후, 100 μ L ATP 가수분해물 샘플에 PiColorLock Gold reagent와 촉진제 (100:1)를 첨가했다. 25 ° C에서 5 min 동안 배양한 후, 10 μ L 정지액 (stop solution)을 첨가하여 색상 변화를 정지시키고, SYNERGY NEO microplate reader (BioTek Instruments)를 통해 620nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0455] 억제능 분석을 위해, TRAP-1을 정해진 농도 (0.520 μ M)의 억제제와 함께 30 min 동안 배양한 후 ATP와 교반하였다. 흡광도의 값은 DMSO 대조군으로 정규화하였으며 데이터는 % ATPase 활성으로 표현되었다.

[0456] ATPase activity assay 결과, TRAP-1에 PU-H71을 처리한 경우 농도에 따라 TRAP-1의 ATPase 활성이 모두 유의미하게 감소하였으나 SMx를 처리한 경우 이와 반대로 농도에 따라 TRAP-1의 ATPase 활성이 유의미하게 증가하는 것이 관측되었다 (도 16). 이는 SMx가 TRAP-1의 N-말단 부위에 결합하지 않는다는 것을 보여주는 동시에 클라이언트 단백질의 결합 위치에 결합함으로써 ATP의 결합을 촉진한다는 것을 강하게 보여주고 있다.

[0458] 실시예 4. SMx 분자는 신생혈관형성성 안구질환의 치료 효능을 갖는다.

- [0459] 산소 유도 망막증 마우스 모델은 탄생 후 7일(P7)된 C57BL/6J(효창사이언스) 새끼 마우스를 고 산소 챔버(Coy lab. in vivo chamber, 75% O₂)에 5일동안 키운 다음(P12), 정상 산소 환경에서 5일동안 키움(P17)으로서 유도하였다. 고산소 챔버에서 새끼 마우스를 꺼낸 뒤 (P12) SMx를 1회, 0.15mM 농도(0.1%DMSO)로 1ul 안구 주사하였다. 안구 주사에 사용한 SMx는 1xPBS (Phosphate buffer saline)에 0.1%로 희석시킨 후 사용하였으며, 컨트롤 마우스에는 1xpbs에 DMSO 0.1%를 사용하였다. 기존에 당뇨망막증 치료 효능이 있다고 알려진 Eylea(Aflibercept, anti-VEGF ab) 의 경우, 40ug을 1ul에 희석시켜 1ul 안구주사 하였다.
- [0460] 산소유도 망막 마우스 모델을 형성한 뒤, 1XPBS, 4%PFA로 perfusion한다. 마우스 눈을 적출하고 4% PFA로 고정 한 뒤, 망막을 분리한다. 분리한 망막을 1XPBS로 씻은 뒤, 1시간동안 상온에서 Blocking(0.1%BSA, 0.1% Tryton X-100 in 1XPBS) 한다. 4℃에서 하룻동안 CD31 혈관염색 antibody(CD31, cell signaling, 1:100)로 염색한다. 다음날, 1XPBS로 씻은 뒤, 2nd antibody로 4℃에서 하룻동안 염색한다. (alexa flour 594-anti rabbit antibody, 1:500) 다음날, 1XPBS로 씻은 뒤, mounting한다. 형광현미경으로 혈관 염색을 분석한다(Zen, axio zoom). 분석은 Zen software을 이용하였다.
- [0461] 컨트롤 마우스, Eylea 주사 마우스, SMx 주사 마우스의 망막 혈관 분석 결과 (도 17), 먼저 SMx 주사 마우스 망막의 신생혈관 영역이 Eylea 주사 마우스 망막과 동등하게 감소하여 당뇨망막증의 치료 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 이례적으로, SMx 주사 마우스 망막의 무혈관 영역이 Eylea 주사 마우스 망막과 비교하여 현저히 감소하는 것이 확인된 바, 이를 통해 SMx가 Eylea와 달리 망막의 혈관생성 패턴을 정상화하는 효능을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0463] 실시예 5. 본 출원의 분자는 저분자 (small molecule) 약물로서 구강/점안 투여가 가능하다.
- [0464] 기존의 당뇨 망막증 치료제는 VEGF에 대한 항체 약물로서 큰 분자량으로 인해 조직에 대한 침습성이 낮고 이로 인하여 안구 주사에 의한 처방만 가능했다. 본 출원에 의한 SMx 및 신규 화합물 분자는 저분자 약물로서 전달의 측면에서 현저히 개선될 것으로 생각된 바, 마우스 모델에 대한 점안 투여를 실시하였다.
- [0465] 산소 유도 망막증 마우스 모델은 탄생 후 7일(P7)된 C57BL/6J(효창사이언스) 새끼 마우스를 고 산소 챔버(Coy lab. in vivo chamber, 75% O₂)에 5일동안 키운 다음(P12), 정상 산소 환경에서 5일동안 키움(P17)으로서 유도하였다.
- [0466] 산소 유도 망막증 마우스 모델은 탄생 후 7일(P7)된 C57BL/6J(효창사이언스) 새끼 마우스를 고 산소 챔버(Coy lab. in vivo chamber, 75% O₂)에 5일동안 키운 다음(P12), 정상 산소 환경에서 5일동안 키움(P17)으로서 유도하였다. 정상산소로 나와 산소 유도 망막증이 유도되는 시기인 P12 ~ P17 (5일간)에 SMx를 리포직(용매)에 1mM로 희석시킨뒤, 하루에 3회 점안 투여하였다. 오른쪽 눈은 SMx를, 왼쪽 눈에는 대조군인 리포직을 투여하였다.
- [0467] 산소유도 망막 마우스 모델을 형성한 뒤, 1XPBS, 4%PFA로 perfusion한다. 마우스 눈을 적출하고 4% PFA로 고정 한 뒤, 망막을 분리한다. 분리한 망막을 1XPBS로 씻은 뒤, 1시간동안 상온에서 Blocking(0.1%BSA, 0.1% Tryton X-100 in 1XPBS) 한다. 4℃에서 하룻동안 CD31 혈관염색 antibody(CD31, cell signaling, 1:100)로 염색한다. 다음날, 1XPBS로 씻은 뒤, 2nd antibody로 4℃에서 하룻동안 염색한다. (alexa flour 594-anti rabbit antibody, 1:500) 다음날, 1XPBS로 씻은 뒤, mounting한다. 형광현미경으로 혈관 염색을 분석한다(Zen, axio zoom). 분석은 Zen software을 이용하였다.
- [0468] 점안 투여 후 망막 혈관 분석한 사진 및 프로그램 분석 결과는 도 18, 도 19과 같다. 각 개체의 오른쪽 눈에 SMx를 점안 투여하였으며 왼쪽 눈은 SMx를 투여하지 않아 대조군으로 하였다. 그 결과, SMx를 주사한 안구에서 신생혈관 영역 및 무혈관 영역이 유의미하게 감소하여 망막 신생혈관형성 질환이 개선되었음을 확인할 수 있었다.
- [0470] 실시예 6. 본 출원의 신규 화합물 합성 방법
- [0471] 본 출원의 [화학식2] 내지 [화학식5]로 표시되는 신규 분자의 제조 방법을 제공한다.
- [0472] 상기 화합물을 제조하는 방법은 하기 기술하는 구체적인 실시예에 한정되는 것은 아니고, 당업자에게 널리 알려진 방법을 이용하여 제조할 수 있다.

- [0474] 실시예 6.1. (10-(2-bromo-5-hydroxy-3,4-dimethoxy-6-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium formate 를 제조하는 방법(SB-U009).
- [0475] 본 출원에서 [화학식2]로 표시되는 화합물의 제조 방법을 설명한다(도 20). 상기 화학식2의 화합물을 제조하는 방법은 하기 1 내지 7의 제조 단계를 포함한다.
- [0477] 단계1. 5-(10-bromodecyl)-1,2,3-trimethoxy-benzene의 제조
- [0478] 테트라하이드로퓨란(THF, 20mL)에 5-bromo-1,2,3-trimethoxy-benzene (1.3 g, 5.26 mmol, 1 eq)을 녹인 용액에, -78 ° C에서 n-부틸리튬(n-BuLi, 2.5 M, 2.10 mL, 1 eq)을 적가하였다.
- [0479] 첨가 후, 상기 혼합물을 동일한 온도에서 1시간 동안 교반한 다음, THF (10 mL)에 1,10-dibromodecane(3.16 g, 10.52 mmol, 2 eq) 용액을 -78 ° C에서 적가한 후, 생성된 혼합물을 20 ° C에서 11시간 동안 교반하였다.
- [0480] 액체 크로마토그래피 질량 분석기(LCMS)를 통해 원하는 질량의 50.6%가 검출된 것을 확인하였다.
- [0481] 잔류물을 포화된 NH₄Cl(10 mL)로 희석하고, EtOAc (50 mL * 3)을 이용하여 추출하였다.
- [0482] 혼합된 유기층(combined organic layers)을 [Na₂SO₄]상에서 건조 후, 여과하고, 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하였다.
- [0483] 상기 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, Petroleum ether/Ethyl acetate=100/0 ~ 95/5)로 정제하여, 무색 오일의 5-(10-bromodecyl)-1,2,3-trimethoxy-benzene (580 mg, 1.02 mmol, 수율 19.35%, 순도 68%) 화합물을 수득하였다.
- [0484] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 6.40 (s, 2H), 3.86 (s, 6H), 3.83 (s, 3H), 3.42 (t, J=6.8 Hz, 2H), 2.59 - 2.52 (m, 2H), 1.86 (quin, J=7.2 Hz, 2H), 1.60 (br d, J=5.5 Hz, 2H), 1.48 - 1.38 (m, 2H), 1.38 - 1.26 (m, 10H).
- [0485] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물(C₁₉H₃₁BrO₃)의 질량을 측정하여, 387.4; m/z found, 387.1 [M+H]⁺임을 확인하였다.
- [0487] 단계2. 6-(10-bromodecyl)-2,3,4-trimethoxy-benzaldehyde의 제조
- [0488] 무수 디클로로메테인(dry CH₂Cl₂, 2 mL)에 녹인 5-(10-bromodecyl)-1,2,3-trimethoxy-benzene (580 mg, 1.02 mmol, 1 eq) 용액을, 0° C에서 AlCl₃의 dry CH₂Cl₂(8 mL)에 적가하였다.
- [0489] 상기 혼합물을 동일한 온도에서, 45분 동안 교반하고, 여기에 10분 동안 dichloro(methoxy)methane(188.97 mg, 1.64 mmol, 145.36 uL, 1.61 eq, 수율 68%)의 dry CH₂Cl₂(2 mL) 용액을 차차 적가한 후, 상기 혼합물을 0° C에서 5분 동안 교반하였다.
- [0490] 이때, LCMS를 통해 상기 반응이 완료된 것을 확인하였다.
- [0491] 상기 반응 혼합물을 얼음물 30 mL에 붓고, 디클로로메테인(methylene chloride) 상을 분리한 후, 상기 수성상을 디클로로메테인(methylene chloride, 50 mL)을 이용하여 2회 추출하였다.
- [0492] 상기 혼합된 유기층을 [Na₂SO₄]상에서 건조하고, 여과한 후, 감압 하에 농축하여 잔류물을 수득하였다.
- [0493] 상기 원생성물(crude product)을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.
- [0494] 무색 오일의 6-(10-bromodecyl)-2,3,4-trimethoxy-benzaldehyde (510 mg, 858.27 umol, 수율 84.29%, 순도 69.9%) 화합물을 수득하였다.
- [0495] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 10.41 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.43

(t, J=6.9 Hz, 2H), 2.99 - 2.92 (m, 2H), 1.93 - 1.82 (m, 2H), 1.49 - 1.39 (m, 4H), 1.32 (br s, 10H).

[0496] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물(C₂₀H₃₁BrO₄)의 질량을 측정하여, 415.4; m/z found, 415.1 [M+H]⁺임을 확인하였다.

[0498] 단계3. 6-(10-bromodecyl)-2-hydroxy-3,4-dimethoxy-benzaldehyde의 제조

[0499] 삼염화붕소(BCl₃, 1 M, 1.9 mL, 2.21 eq)를 0° C에서 CH₂Cl₂(10 mL)에 녹인 6-(10-bromodecyl)-2,3,4-trimethoxy-benzaldehyde(510.00 mg, 858.27 umol, 1eq, 순도 69.9%) 용액에 적가하였다.

[0500] 상기 혼합물을 0° C에서 30분 동안 교반한 후, 20° C에서 30분 동안 교반하였다.

[0501] 이때, LCMS를 통해 상기 반응이 완료되었음을 확인하였다.

[0502] 상기 잔류물을 얼음물(30mL)에 붓고, CH₂Cl₂(50 mL * 3)를 이용하여 추출하였다.

[0503] 상기 혼합된 유기층을 [Na₂SO₄]상을 이용하여 건조하고, 여과한 후, 감압 하에 농축하여 잔류물을 수득하였다.

[0504] 상기 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(SiO₂, Petroleum ether/Ethyl acetate=100/0 ~ 95/5))를 이용하여 정제하여, 무색 오일의 6-(10-bromodecyl)-2-hydroxy-3,4-dimethoxy-benzaldehyde (300 mg, 583.06 umol, 수율 67.93%, 순도 78%) 화합물을 수득하였다.

[0505] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물(C₁₉H₂₉BrO₄)의 질량을 측정하여, 401.3; m/z found, 401.1 [M+H]⁺임을 확인하였다.

[0506] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 12.30 - 12.20 (m, 1H), 10.24 - 10.03 (m, 1H), 6.34 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.43 (t, J=6.9 Hz, 2H), 2.90 - 2.83 (m, 2H), 1.88 (quin, J=7.1 Hz, 2H), 1.70 - 1.60 (m, 2H), 1.50 - 1.38 (m, 3H), 1.49 - 1.29 (m, 1H).

[0508] 단계4. 3-bromo-2-(10-bromodecyl)-6-hydroxy-4,5-dimethoxy-benzaldehyde의 제조

[0509] 클로로포름(CHCl₃, 2.5 mL) 및 사염화 탄소(CCl₄, 2.5 mL)에 녹인 6-(10-bromodecyl)-2-hydroxy-3,4-dimethoxy-benzaldehyde (250 mg, 622.92 umol, 1 eq) 용액을 0° C에서 N-브로모숙신이미드(NBS, N-Bromosuccinimide, 133.04 mg, 747.51 umol, 1.2 eq)에 첨가하였다.

[0510] 상기 혼합물을 0° C에서 1시간 동안 교반한 후, 20° C에서 11시간 동안 교반하였다.

[0511] 이때, LCMS를 통해 반응이 완료된 것을 확인하였다.

[0512] 상기 혼합물을 포화 탄산수소 나트륨(NaHCO₃, 10 mL) 및 에틸 아세테이트(EtOAc, 20 mL * 3)을 이용하여 추출하였다.

[0513] 상기 혼합된 유기층을 [Na₂SO₄]을 이용하여 건조하고, 여과한 후, 감압 하에 농축하여 잔류물을 수득하였다.

[0514] 상기 잔류물을 prep-TLC(SiO₂, Petroleum ether/Ethyl acetate= 4:1)으로 정제하여, 황색 오일의 3-bromo-2-(10-bromodecyl)-6-hydroxy-4,5-dimethoxy-benzaldehyde (200 mg, 307.77 umol, 수율 49.41%, 순도 73.9%) 화합물을 수득하였다.

[0515] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물(C₁₉H₂₈Br₂O₄)의 질량을 측정하여, 480.2; m/z found, 481.0 [M+H]⁺임을 확인하였다.

[0517] 단계5. 5-(10-bromodecyl)-2,3-dimethoxy-6-methyl-phenol 제조

[0518] 0° C에서 CH₂Cl₂(4 mL)에 녹인 3-bromo-2-(10-bromodecyl)-6-hydroxy-4,5-dimethoxy-benzaldehyde (190 mg,

292.38 μmol , 1 eq, 순도 73.9%) 및 트리에틸실란(TES, Et_3SiH , 169.99 mg, 1.46 mmol, 233.50 μL , 5 eq)을 트리플루오로아세트산(TFA, Trifluoroacetic acid, 708.40 mg, 6.21 mmol, 460 μL , 21.25 eq)에 첨가 깔때기 (addition funnel)를 통해 5분 동안 적가하였다.

[0519] 상기 반응 혼합물을 0 ° C에서 2시간 동안 교반하였다.

[0520] 이때, LCMS를 통해 상기 반응이 완료된 것을 확인하였다.

[0521] 상기 혼합물은 포화 탄산수소나트륨(NaHCO_3 , 50 mL)에 천천히 흘려 넣은 후, CH_2Cl_2 100 mL (100 mL * 3)를 이용하여 추출하였다.

[0522] 상기 혼합된 유기층은 $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ 상에서 건조시키고, 여과한 후, 감압 하에 농축하여 잔류물을 수득하였다.

[0523] 상기 잔류물을 prep-TLC(SiO_2 , Petroleum ether: Ethyl acetate=4:1)를 이용하여 정제하여, 무색 오일의 5-(10-bromodecyl)-2,3-dimethoxy-6-methyl-phenol (130 mg, 241.64 μmol , 수율 82.65%, 순도 72%) 화합물을 수득하였다.

[0525] 단계6. 4-bromo-5-(10-bromodecyl)-2,3-dimethoxy-6-methyl-phenol의 제조

[0526] 아세트산(AcOH , 5mL)에 녹이고, 교반된 5-(10-bromodecyl)-2,3-dimethoxy-6-methyl-phenol (130 mg, 241.64 μmol , 1 eq, 순도 72%) 및 브롬화 나트륨(NaBr , 37.29 mg, 362.46 μmol , 11.65 μL , 1.5 eq) 용액을 과산화수소 (H_2O_2 , 41.09 mg, 362.46 μmol , 34.82 μL , 순도 30%, 1.5 eq)에 첨가한 후, 20 ° C에서 3시간 동안 교반하였다.

[0527] 이때, LCMS를 통해 상기 반응이 완료된 것을 확인하였다.

[0528] 상기 잔류물을 30mL의 10 : 1 비율의 포화 $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 으로 희석한 후, EtOAc(30 mL * 3)을 이용하여 추출하였다.

[0529] 상기 혼합된 유기층을 염수(brine, 10 mL)로 세척한 후, $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ 상에서 건조시키고, 여과한 후, 감압 하에 농축하여 잔류물을 수득하였다.

[0530] 상기 원생성물은 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[0531] 이를 통해, 황색 오일의 4-bromo-5-(10-bromodecyl)-2,3-dimethoxy-6-methyl-phenol (140 mg, 195.18 μmol , 수율 80.77%, 순도 65%) 화합물을 수득하였다.

[0532] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{Br}_2\text{O}_3$)의 질량을 측정하여, 466.3; m/z found, 466.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인하였다.

[0533] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ = 5.73 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.34 (t, J=6.9 Hz, 2H), 2.71 - 2.64 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.84 - 1.76 (m, 2H), 1.37 (br d, J=4.1 Hz, 7H), 1.24 (br s, 7H).

[0535] 단계7. (10-(2-bromo-5-hydroxy-3,4-dimethoxy-6-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium formate의 제조

[0536] 톨루엔(toluene, 2 mL)에 녹인 4-bromo-5-(10-bromodecyl)-2,3-dimethoxy-6-methyl-phenol (140 mg, 195.18 μmol , 1 eq, 순도 65%) 및 트리페닐포스핀(PPh_3 , 255.96 mg, 975.88 μmol , 5 eq)의 교반된 용액을 N_2 하에, 125 ° C에서 8시간 동안 가열하였다.

[0537] 이때, LCMS를 통해 상기 반응이 완료된 것을 확인하였다.

[0538] 상기 용매를 진공 상태에서 제거하여 잔류물을 수득하였다.

[0539] 상기 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(SiO_2 , Petroleum ether/Ethyl acetate=100/0 ~ 0/100; Ethyl acetate: MeOH=100/0 ~ 92/8)를 이용하여 정제하였다.

[0540] 상기 잔류물을 prep-HPLC(FA 조건; 컬럼: Xtimate C18 100*30mm*3 μm ; 이동상: [water(0.225%FA)-ACN]; B%: 40%-70%, 8분)을 이용하여 정제하였다.

- [0541] 무색 검(gum)의 (10-(2-bromo-5-hydroxy-3,4-dimethoxy-6-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium formate (6 mg, 8.61 μmol , 수율 4.41%, 순도 99.54%) 화합물을 수득하였다.
- [0542] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{BrO}_3\text{P}^+$)의 질량을 측정하여, 648.6; m/z found, 649.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인하였다.
- [0543] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ = 8.56 (br s, 1.309H), 7.78 - 7.59 (m, 15H), 3.84 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.44 (br s, 2H), 2.70 - 2.59 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.50 (br s, 4H), 1.40 - 1.12 (m, 12H).
- [0544] ^{31}P NMR (162MHz, CDCl_3) δ = 24.17 (s, 1P).
- [0546] 실시예6.2.(10-(3-bromo-4,5,6-trimethoxy-2-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium bromide를 제조하는 방법(SB-U005).
- [0547] 본 출원에서 [화학식3]으로 표시되는 화합물의 제조 방법을 설명한다(도 21). 상기 화학식 3의 화합물을 제조하는 방법은 하기 1 내지 4의 제조 단계를 포함한다.
- [0549] 단계1. 10-bromo-1-(2-hydroxy-3,4-dimethoxy-6-methyl-phenyl)decan-1-one의 제조
- [0550] Freshly powdered AlCl_3 (457.89 mg, 3.43 mmol)를 dry DCE (10 mL)하에서, 10-bromodecanoyl chloride (0.536 g, 1.89 mmol) 및 1,2,3-trimethoxy-5-methyl-benzene (312.86 mg, 1.72 mmol) 용액에 첨가한 후, 25 ° C에서 40시간 동안 교반하였다.
- [0551] 이때, LCMS를 통해 원하는 물질이 주요 성분으로써 생성되었음을 확인하였다.
- [0552] 상기 혼합물을 얼음물에 붓고 CH_2Cl_2 (50 mL x 2)을 이용하여 추출하였다.
- [0553] 상기 혼합된 추출물을 물로 세척한 후, Na_2SO_4 를 이용하여 건조하고, 농축하여 오일을 수득하였다. 상기 수득된 오일을 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2 , 10:0 ~ 10:1 Petroleum ether/EtOAc)로 정제하여 무색 오일(520 mg, 수율 66.56%)을 수득하였다.
- [0554] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{BrO}_4$)의 질량을 측정하여, 400.12; m/z found, 402.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인하였다.
- [0555] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.21 - 1.55 (m, 10 H), 1.56 - 1.78 (m, 2 H), 1.85 (m, 2 H), 2.46 (s, 3 H), 2.89 (t, $J=7.4$ Hz, 2 H), 3.41 (t, $J=6.8$ Hz, 2 H), 3.88 (d, $J=12.3$ Hz, 6 H), 6.31 (s, 1 H), 10.38 (s, 1 H).
- [0557] 단계2. 2-(10-bromodecyl)-5,6-dimethoxy-3-methyl-phenol의 제조
- [0558] 10-bromo-1-(2-hydroxy-3,4-dimethoxy-6-methyl-phenyl)decan-1-one (520 mg, 1.14 mmol)을 트리플루오로아세트산(TFA, 10 mL)에 용해시킨 다음 Et_3SiH (2 mL)를 첨가한 후 80 ° C에서 12시간 동안 교반하였다.
- [0559] 이때, LCMS를 통해 starting ketone이 소모되고 하나의 새로운 피크가 형성된 것을 확인하였다.
- [0560] 상기 반응 혼합물을 증발 건조시키고, 이를 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2 , 5:0 - 5:1 Petroleum ether/ EtOAc)로 정제하여 무색 오일 (410 mg, 수율 82.34%)을 수득하였다.
- [0561] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{BrO}_3$)의 질량을 측정하여, 386.15; m/z found, 388.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인하였다.

[0562] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.22 - 1.55 (m, 14 H), 1.86 (quin, $J=7.1$ Hz, 2 H), 2.26 (s, 3 H), 2.51 - 2.65 (m, 2 H), 3.42 (t, $J=6.9$ Hz, 2 H), 3.86 (m, 6 H), 5.82 (s, 1 H), 6.29 (s, 1 H).

[0564] 단계3. 4-bromo-2-(10-bromodecyl)-5,6-dimethoxy-3-methyl-phenol의 제조

[0565] 2-(10-bromodecyl)-5,6-dimethoxy-3-methyl-phenol (410 mg, 940.98 μmol) 및 NaBr (145.23 mg, 1.41 mmol)을 아세트산(AcOH , 10mL)에 용해시킨 다음, 과산화수소(H_2O_2 , 160.04 mg, 1.41 mmol, 30%)를 첨가한 후 25°C 에서 2시간 동안 교반하였다.

[0566] 이때, LCMS를 통해 출발 물질(starting material)이 소모되고 하나의 새로운 피크가 형성된 것을 확인하였다.

[0567] 상기 반응 혼합물을 50mL의 물에 급냉시키고, EtOAc (40 mL x 2)을 이용하여 추출하였다.

[0568] 상기 혼합 유기상을 pH > 7까지 포화된 NaHCO_3 으로 세척한 후, Na_2SO_4 으로 건조하고, 농축하여 무색 오일(300 mg, crude)로 농축하였다.

[0569] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{Br}_2\text{O}_3$)의 질량을 측정하여, 464.06; m/z found, 466.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인하였다.

[0570] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.22 - 1.55 (m, 14 H), 1.86 (quin, $J=7.1$ Hz, 2 H), 2.26 (s, 3 H), 2.51 - 2.65 (m, 2 H), 3.42 (t, $J=6.9$ Hz, 2 H), 3.85 (s, 3 H), 3.93 (s, 3 H), 5.77 (s, 1 H).

[0572] 단계4. (10-(3-bromo-4,5,6-trimethoxy-2-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium bromide의 제조

[0573] 4-bromo-2-(10-bromodecyl)-5,6-dimethoxy-3-methyl-phenol (300 mg, 597.11 μmol) 및 트리페닐포스핀(PPh_3 , 939.68 mg, 3.58 mmol)을 톨루엔(toluene, 1 mL)에 용해시킨 다음, N_2 하에, 130°C 에서 18시간 교반하였다.

[0574] 얇은층 크로마토그래피(TLC, DCM: MeOH = 10:1, R_f = 0.2))을 통해 OPPh_3 아래 하나의 주요한 새로운 피크가 형성되었음을 확인하였다.

[0575] 상기 반응 혼합물을 증발시켜 갈색 잔류물을 얻었고, 이를 Prep-HPLC (컬럼: 3_Phenomenex Luna C18 75*30mm*3 μm ; 이동상: [water(0.2%FA)-ACN]; B%: 52%-82%, 6 분)을 통해 정제하였다.

[0576] 동결 건조 후, 백색 고체의 원하는 생성물(16 mg, 수율 12.24%, 순도 97.2%)을 수득하였다.

[0577] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{BrO}_3\text{P}^+$)의 질량을 측정하여, 647.23; m/z found, 649.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인하였다.

[0578] ^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ 1.13 - 1.70 (m, 16 H), 2.34 (s, 3 H), 2.56 - 2.76 (m, 2 H), 3.65 - 3.79 (m, 2 H), 3.68 - 3.77 (m, 1 H), 3.83 (s, 3 H), 3.88 (s, 3 H), 7.61 - 7.93 (m, 15 H), 8.76 (s, 1 H); ^{31}P NMR (162 MHz, CHLOROFORM-d) δ 24.47 (s, 1 P).

[0580] 실시예6.3. (10-(2-bromo-3,4,5-trimethoxy-6-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium bromide를 제조하는 방법(SB-U012).

[0581] 본 출원에서 [화학식4]로 표시되는 화합물의 합성 방법을 설명한다(도 22). 상기 화학식 4의 화합물을 제조하는 방법은 하기 1 내지 5의 제조 단계를 포함한다.

[0583] 단계1. 5-(10-bromodecyl)-1,2,3-trimethoxy-benzene의 제조

[0584] THF (30 mL)에 녹인 5-bromo-1,2,3-trimethoxy-benzene (2 g, 8.09 mmol, 1 eq) 용액을 -78°C 에서 n-BuLi

(2.5 M, 3.24 mL, 1 eq)에 적가하였다.

[0585] 첨가 후, 상기 혼합물을 같은 온도에서 1시간 동안 교반한 다음, THF (10 mL)에 녹인 1,10-dibromodecane (4.86 g, 16.19 mmol, 2 eq) 용액을 78 ° C에서 적가하였다.

[0586] 상기 생성된 혼합물을 20 ° C에서 11시간 동안 교반하였다.

[0587] 이때, LCMS를 통해 원하는 질량의 20%가 검출되는 것을 확인하였다.

[0588] 상기 잔류물을 포화 NH_4Cl (10 mL)로 희석하고, EtOAc (50 mL * 3)로 추출하였다.

[0589] 상기 혼합 유기층을 $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ 상에서 건조시키고, 여과한 후 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하였다.

[0590] 상기 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2 , Petroleum ether/Ethyl acetate=100/0 ~ 95/5)를 이용하여 정제하여 무색 오일의 5-(10-bromodecyl)-1,2,3-trimethoxy-benzene (430 mg, 395.86 μmol , 수율 4.89%, 순도 35.66%) 화합물을 수득하였다.

[0591] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{BrO}_3$)의 질량을 측정하여, 387.4; m/z found, 389.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인하였다.

[0593] 단계2. 6-(10-bromodecyl)-2,3,4-trimethoxy-benzaldehyde의 제조

[0594] 5-(10-bromodecyl)-1,2,3-trimethoxy-benzene (430 mg, 395.86 μmol , 1 eq, 35.66% purity)의 dry CH_2Cl_2 (2 mL) 용액을 0 ° C에서 점차적으로 AlCl_3 (178 mg, 1.33 mmol, 72.95 μL , 3.37 eq)의 CH_2Cl_2 (6 mL) 용액에 적가하였다.

[0595] 상기 혼합물을 같은 온도에서 45분 동안 교반하고, dichloro(methoxy)methane (140 mg, 1.22 mmol, 107.69 μL , 3.08 eq)의 CH_2Cl_2 (2 mL) 용액을 10분에 걸쳐 점차적으로 적가하였다.

[0596] 상기 반응 혼합물을 30mL의 얼음물에 붓고, 메틸렌 클로라이드 상(methylene chloride phase)을 분리한 후, 수성 상(aqueous phase)을 50mL의 메틸렌 클로라이드로 2회 추출하였다.

[0597] 상기 혼합 유기층을 $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ 상에서 건조시키고, 여과한 후 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하였다.

[0598] 상기 원생성물을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0599] 무색 오일의 6-(10-bromodecyl)-2,3,4-trimethoxy-benzaldehyde (410 mg, 384.97 μmol , 수율 97.25%, 순도 39%) 화합물을 수득하였다.

[0600] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{BrO}_4$)의 질량을 측정하여, 415.4; m/z found, 415.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인하였다.

[0602] 단계3. 1-(10-bromodecyl)-3,4,5-trimethoxy-2-methyl-benzene의 제조

[0603] TFA (3 mL)를 6-(10-bromodecyl)-2,3,4-trimethoxy-benzaldehyde (410 mg, 384.97 μmol , 1 eq, 순도 39%) 및 Et_3SiH (447.64 mg, 3.85 mmol, 614.89 μL , 10 eq) 혼합물에 첨가하였다.

[0604] 상기 혼합물을 20 ° C에서 12시간 동안 교반하였다.

[0605] 이때, LCMS를 통해 상기 반응이 완료되었는지 확인하였다.

[0606] 상기 혼합물을 포화 NaHCO_3 (50 mL)에 천천히 붓고, CH_2Cl_2 (50 mL*3)을 이용하여 추출하였다.

[0607] 상기 혼합물 유기층을 $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ 상에서 건조시키고, 여과한 후 감압 하에 농축하여 잔류물을 수득하였다.

[0608] 상기 잔류물을 prep-TLC (SiO_2 , Petroleum ether/Ethyl acetate= 4:1)로 정제하여 무색 오일의 1-(10-bromodecyl)-3,4,5-trimethoxy-2-methyl-benzene (120 mg, 152.18 μmol , 수율 39.53%, 순도 50.9%) 화합물을 수득하였다.

- [0609] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($C_{20}H_{33}BrO_3$)의 질량을 측정하여, 401.4; m/z found, 402.8 [M+H]⁺임을 확인하였다.
- [0611] 단계4. 1-bromo-2-(10-bromodecyl)-4,5,6-trimethoxy-3-methyl-benzene의 제조
- [0612] 1-(10-bromodecyl)-3,4,5-trimethoxy-2-methyl-benzene (120 mg, 152.18 μ mol, 1 eq, 순도 50.9%) 및 NaBr (15.66 mg, 152.18 μ mol, 4.89 μ L, 1 eq)을 AcOH (4 mL)에 녹인 교반 용액에 H₂O₂ (17.25 mg, 152.18 μ mol, 14.62 μ L, 순도 30%, 1 eq) 을 첨가하고, 20 ° C에서 12시간 동안 교반하였다.
- [0613] 이때, LCMS를 통해 상기 반응이 완료된 것을 확인하였다.
- [0614] 상기 잔류물을 포화 NaHCO₃: Na₂S₂O₃ =10:1 (30) mL로 희석하고, EtOAc (30 mL * 3)을 이용하여 추출하였다.
- [0615] 상기 혼합 유기층을 brine (10 mL)으로 세척 후, [Na₂SO₄]상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축하여 잔류 물을 수득하였다.
- [0616] 상기 원 생성물은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.
- [0617] 황색 오일의 1-bromo-2-(10-bromodecyl)-4,5,6-trimethoxy-3-methyl-benzene (130 mg, crude) 화합물을 수득하였다.
- [0618] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($C_{20}H_{32}Br_2O_3$)의 질량을 측정하여, 480.3; m/z found, 480.9 [M+H]⁺임을 확인하였다.
- [0620] 단계5. 1-bromo-2-(10-BLAHdecyl)-4,5,6-trimethoxy-3-methyl-benzene의 제조
- [0621] 1-bromo-2-(10-bromodecyl)-4,5,6-trimethoxy-3-methyl-benzene (130 mg, 162.41 μ mol, 1 eq, 순도 60%) 및 PPh₃ (212.99 mg, 812.04 μ mol, 5 eq)를 톨루엔(toluene, 2 mL)에 녹인 교반 용액을 N₂ 하에, 125 ° C에서 12 시간 동안 가열하였다.
- [0622] 이때, LCMS를 통해 상기 반응이 완료된 것을 확인하였다.
- [0623] 상기 용매를 진공 하에 제거하여 잔류물을 수득하였다.
- [0624] 상기 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, Petroleum ether/Ethyl acetate=100/0 ~ 0/100; Ethyl acetate: MeOH=100/0 ~ 92/8)로 정제하여, 무색 오일의 1-bromo-2-(10-BLAHdecyl)-4,5,6-trimethoxy-3-methyl-benzene (30 mg, 39.69 μ mol, 수율 24.44%, 순도 98.234%) 화합물을 수득하였다.
- [0625] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($C_{38}H_{47}BrO_3P^+$)의 질량을 측정하여, 662.7; m/z found, 663.2 [M+H]⁺임을 확인하였다.
- [0626] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 7.93 - 7.66 (m, 15H), 3.94 - 3.78 (m, 11H), 2.78 - 2.67 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.64 (br s, 4H), 1.50 - 1.34 (m, 4H), 1.25 (br d, J=10.1 Hz, 8H).
- [0627] ³¹P NMR (162MHz, CDCl₃) δ = 24.54 (s, 1P).
- [0629] 실시예6.4.(10-(3-bromo-4,5,6-trimethoxy-2-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium bromide를 제조하는 방법(SB-U011).
- [0630] 본 출원에서 [화학식5]로 표시되는 화합물의 제조 방법을 설명한다(도 23).상기 화학식 5의 화합물을 제조하는 방법은 하기 1 내지 4의 제조 단계를 포함한다.

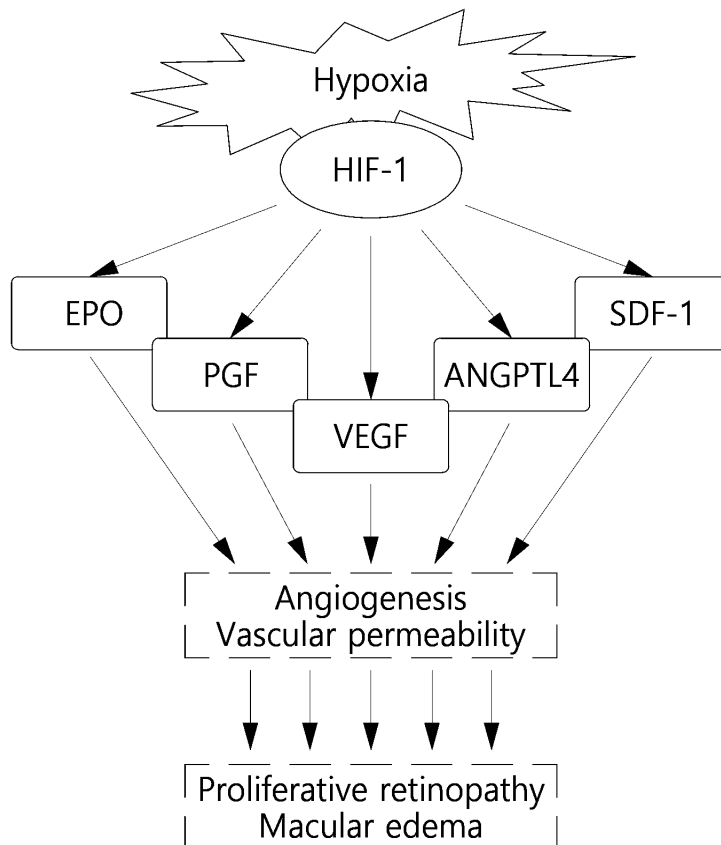
- [0632] 단계1. 10-bromo-1-(2,3,4-trimethoxy-6-methyl-phenyl)decan-1-one의 제조
- [0633] 4-bromo-1,2,3-trimethoxy-5-methyl-benzene (449.11 mg, 1.72 mmol) 및 0-bromodecanoyl chloride (536.94 mg, 1.89 mmol)을 DCE (10 mL)에 녹인 교반 용액에 AlCl_3 (206.41 mg, 1.55 mmol)을 첨가한 후 25 ° C에서 18 시간 동안 교반하였다.
- [0634] 이때, LCMS를 통해 원하는 생성물이 주요 성분으로써 생성된 것을 확인하였다.
- [0635] TLC (Petroleum ether : EtOAc = 3:1, R_f = 0.4)를 통해 하나의 주요한 새로운 스팟이 형성된 것을 확인하였다.
- [0636] 상기 반응 혼합물을 얼음물에 붓고, DCM (30 mL x3)으로 추출한 후, Na_2SO_4 으로 건조하고, 농축하여, 황색 오일을 수득하였다.
- [0637] 상기 황색 오일을 실리카겔(0-100% EtOAc in petroleum ether, 30분)에서 플래시 컬럼(Flash column)으로 정제하여 무색 오일(215 mg, 수율 29.1%)을 수득하였다.
- [0638] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{BrO}_4$)의 질량을 측정하여, 414.14; m/z found, 416.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인하였다.
- [0639] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.32 (m, 8 H), 1.38 - 1.49 (m, 2 H), 1.67 (m, 2 H), 1.86 (quin, $J=7.2$ Hz, 2 H), 2.19 (s, 3 H), 2.75 (t, $J=7.4$ Hz, 2 H), 3.41 (t, $J=6.9$ Hz, 2 H), 3.77 - 3.92 (m, 9 H), 6.48 (s, 1 H).
- [0641] 단계2. 4-(10-bromodecyl)-1,2,3-trimethoxy-5-methyl-benzene의 제조
- [0642] TFA (10 mL)에 녹인 10-bromo-1-(2,3,4-trimethoxy-6-methyl-phenyl)decan-1-one (210 mg, 455.03 μmol) 교반된 용액에 25 ° C에서 Et_3SiH (1.46 g, 12.52 mmol, 2 mL)을 첨가한 후, 80 ° C에서 2시간 동안 교반하였다.
- [0643] 이때, LCMS를 통해 원하는 생성물이 주요 성분으로서 생성되었는지 확인하였다.
- [0644] TLC (petroleum ether : EtOAc = 4:1, R_f =0.45)를 통해 하나의 새로운 주요 스팟이 형성된 것을 확인하였다.
- [0645] 상기 반응 혼합물을 진공 하에 증발 시켜 건조하여 무색 오일을 수득하였고, 상기 무색 오일은 실리카겔 (silical gel, 25 g, 0-50% EtOAc in petroleum ether, 30분)에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(Flash Column chromatography)를 이용하여 추가로 정제하여, 무색 오일의 원하는 생성물 4-(10-bromodecyl)-1,2,3-trimethoxy-5-methyl-benzene (118 mg, 250.93 μmol , 수율 55.15%)을 수득하였다.
- [0646] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{BrO}_3$)의 질량을 측정하여, 400.16; m/z found, 403.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인하였다.
- [0647] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.20 - 1.54 (m, 14 H), 1.77 - 1.96 (m, 2 H), 2.27 (s, 3 H), 2.46 - 2.64 (m, 2 H), 3.42 (t, $J=6.8$ Hz, 2 H), 3.76 - 3.97 (m, 9 H), 6.49 (s, 1 H).
- [0649] 단계3. 1-bromo-5-(10-bromodecyl)-2,3,4-trimethoxy-6-methyl-benzene의 제조
- [0650] 4-(10-bromodecyl)-1,2,3-trimethoxy-5-methyl-benzene (118 mg, 250.93 μmol) 및 NaBr (38.73 mg, 376.39 μmol)을 AcOH (5 mL)에 녹인 교반 용액에 H_2O_2 (42.68 mg, 376.39 μmol)를 첨가한 후 25 ° C에서 2시간 동안 교반하였다.
- [0651] 이때, LCMS를 통해 원하는 생성물이 주요 성분으로서 형성된 것을 확인하였다.
- [0652] 상기 반응 혼합물을 EtOAc/ H_2O (80 mL/60 mL) 사이에 분배하였다.
- [0653] 상기 유기층을 $\text{pH}>7$ 까지 sat. aq. NaHCO_3 (60 mL)를 이용하여 세척하였다.

- [0654] 상기 수집된 유기층을 Na_2SO_4 로 건조시키고, 농축하여 황색 오일 (140 mg, crude)을 수득하였다.
- [0655] 이때, HNMR을 통해 다음 단계를 위한 충분한 순도의 원하는 생성물임을 확인하였다.
- [0656] 또한, 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{Br}_2\text{O}_3$)의 질량을 측정하여, 478.07; m/z found, 481.0 [M+H]⁺임을 확인하였다.
- [0657] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.20 - 1.52 (m, 14 H), 1.78 - 1.94 (m, 2 H), 2.36 (s, 3 H), 2.62 (m, 2 H), 3.42 (t, J=6.9 Hz, 2 H), 3.81 - 3.98 (m, 9 H).
- [0659] 단계4.(10-(3-bromo-4,5,6-trimethoxy-2-methylphenyl)decyl)triphenylphosphonium bromide의 제조
- [0660] 1-bromo-5-(10-bromodecyl)-2,3,4-trimethoxy-6-methyl-benzene (140 mg, 279.13 μmol) 및 PPh_3 (366.06 mg, 1.40 mmol)를 toluene (1 mL)에 녹인 후 교반한 용액을 N_2 하에, 130 ° C에서 18시간 동안 가열하였다.
- [0661] 이때, LCMS를 통해 원하는 생성물이 생성된 것을 확인하였다.
- [0662] 또한, TLC(DCM: MeOH = 10:1, R_f = 0.2)를 통해 OPPh_3 아래 하나의 주요한 새로운 피크가 형성된 것을 확인하였다.
- [0663] 상기 반응 혼합물을 증발시켜 갈색 잔류물을 수득하였고, 이것을 실리카겔((25 g, 0-15% MeOH in DCM, 30분 동안)에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(Flash Column chromatography)를 이용하여 정제하였다.
- [0664] 상기 원하는 생성물을 동결 건조하여, 백색 고체 (108.5 mg, 수율 51.41%, 순도 98.2%)를 수득하였다.
- [0665] 전기분무 질량분석법(MS-ESI)을 통해 상기 수득된 화합물($\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{BrO}_3\text{P}^+$)의 질량을 측정하여, 661.24; m/z found, 663.3 [M+H]⁺임을 확인하였다.
- [0666] ^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ 1.12 - 1.50 (m, 12 H), 1.64 (m, 4 H), 2.34 (s, 3 H), 2.52 - 2.71 (m, 2 H), 3.77 - 3.97 (m, 11 H), 7.60 - 7.97 (m, 15 H); ^{31}P NMR (162 MHz, CHLOROFORM-d) δ 24.53 (s, 1 P).
- [0668] 실시에 7. 본 출원의 SMx 및 신규 화합물 분자는 클라이언트 단백질과 경쟁적으로 TRAP-1에 결합하여 TRAP-1을 억제한다.
- [0669] - 세포배양
- [0670] 22Rv1 세포주를 37°C CO_2 에서 배양하였으며, 배지는 RPMI(Gibco) + 10% Fetal bovine serum + 1% penicillin & streptomycin의 조건으로 사용하였다.
- [0672] - 웨스턴 블롯(western blot)
- [0673] 22Rv1 세포주를 6-well 플레이트에 3 x 10⁵의 수로 세포를 분주하고, 2ml의 배지에서 24시간 배양하였다. 다음 날, 미토콘드리아 열단백질90 (TRAP1) 저해제인 SB-시리즈(SB-U005, SB-U009, SB-U011, SB-U012)와 SMx를 5 μM 로 처리하고 2시간 동안 배양하였다. 배양된 세포로부터 전체 세포 용해물 (Whole cell lysates)을 만들어서 전기영동 하고, PVDF 막에 이동시킨 후, 일차 항체를 4°C에서 18시간 처리하였다. 다음날, 이차 항체를 1시간 처리하고, 웨스턴 블롯팅 검출 시약을 이용하여 pull down assay를 통하여 단백질 발현을 분석하였다 (도 24).
- [0674] 약물로는 SMx 분자와 상기 실시에 6에서 합성한 신규 화합물 분자 SB-U005, SB-U009, SB-U011, 및 SB-U012를 처리하고, DMSO로 정규화하였다.
- [0675] Pull down assay 결과 (도 24), 각 신규 화합물 분자를 처리한 경우, 실시에 3.3의 SMx를 처리한 경우의 결과와 같이 클라이언트 단백질(SIRT3, SDHB)의 농도가 유의미하게 감소함을 확인할 수 있다(도 24). 즉, 이러한 결과는 본 출원의 신규 화합물 분자가 Client 단백질과 경쟁적으로 TRAP-1의 중단 부위에 결합하여 TRAP-1을 억제한다는 강력한 증거가 될 수 있다.

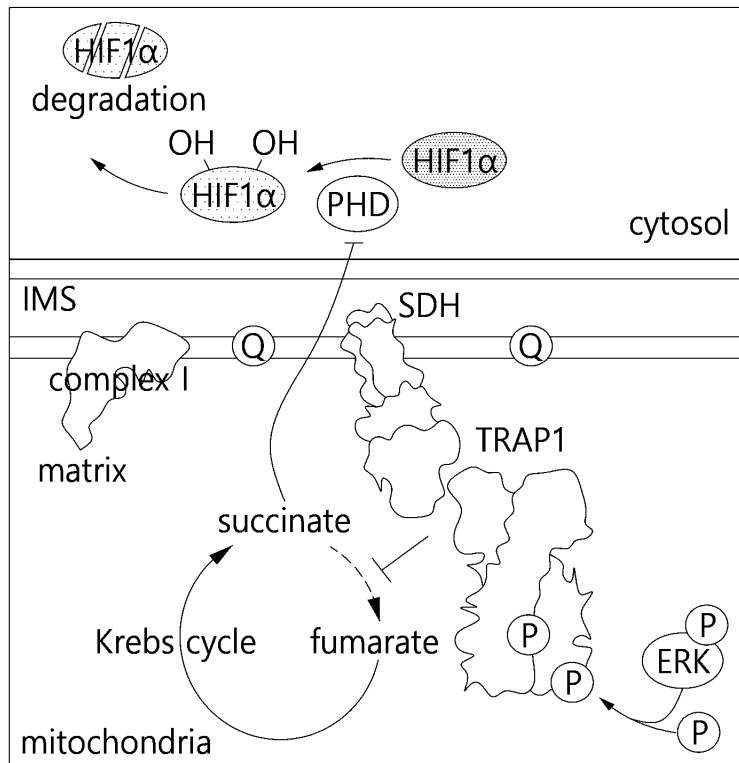
- [0677] 실시예 8. 본 출원의 SMx 및 신규 화합물 분자는 당뇨병망막증(DR)에 대한 치료 효능이 있다.
- [0678] - MIO-M1 HRE 세포주를 이용한 약물활성 분석
- [0679] MIO-M1 필터 세포에 5HRE/GFP 플라스미드(addgene.#46926)을 트랜스펙션(jetprime kit)한 뒤, selectable marker인 G418(Neomycin) 1mg/ml을 이용하여 플라스미드가 트랜스펙션 된 세포를 선별하였다. Single cell에서 colony형태를 띄며 자라는 세포를 선별하여 stable cell line을 제작하였다. 제작한 MIO-M1-HRE/GFP stable cell line을 96well에 분주하고 다음날 약물을 농도별로 처리한다. 저산소 환경에서(1% O₂) 24시간 노출시킨 다음 GFP (Ex/Em : 488/507) 형광 신호를 SYNERGY NEO microplate reader (BioTek Instrument)으로 측정하였다. 음성대조군으로는 약물을 녹인 용매인 DMSO를 사용하였고, 음성대조군을 100% 기준으로 계산하였다.
- [0680] MIO-M1 세포주에 SMx 및 신규 화합물 분자를 처리한 경우 신혈관생성인자인 HIF1- α 를 억제하는 것을 확인할 수 있다(도25), 이러한 결과를 통해 본 출원의 SMx 및 신규 화합물 분자의 당뇨병망막증(DR)에 대한 치료 효능이 있음을 알 수 있다.
- [0682] 실시예 9. 본 출원의 SMx 및 신규 화합물 분자의 노인성 습식 황반변성(wet-AMD)에 대한 치료 효능이 있다.
- [0683] - 세포 배양
- [0684] 망막색소상피세포(human retinal pigmented epithelium)인 ARPE-19 세포는 10% FBS와 1% 항생제가 포함된 DMEM/F-12 세포 배양액으로 5% CO₂, 95% 대기공기 및 37℃ 세포배양기에서 60mm 세포 배양판에 3X10⁵ 세포 수로 seeding 후 이틀간 배양하였다. 이틀 후 DMSO(0.5%), SMx, SB-U005, SB-U009, SB-U011, 및 SB-U012를 1 μ M로 처리하여 Hypoxia chamber에서 1% 산소조건으로 6시간 배양한 후 western blot 실험을 수행하였다.
- [0686] - 웨스턴 블롯(western blot)
- [0687] 세포 배양 실험 완료 후 세포배양액을 제거하고 차가운 PBS로 1회 세척 후, RIPA 용액 (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.25% Na-deoxycholate, 1% NP-40)을 넣어 cell scraper로 세포를 harvest 하였다. 세포를 충분히 용해시킨 후 저온 원심분리하여 얻은 세포 부유액에 6X sample buffer를 섞어 95℃에서 5분간 끓인 후 12% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 PVDF membrane으로 350mA, 1시간 20분간 transfer 후 blocking(10% skim milk)하여 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체 결합을 예방하였다. 일차 항체 HIF-1 α (1:1000)와 Actin(1:3000)은 Antibody solution(TBS-T with 0.02% sodium azide, 1mg/ml BSA)으로 희석하여 membrane과 4℃에서 overnight 반응시켰다.
- [0688] 이후 TBS-T(Tris-Buffered Saline+Tween-20)로 2회 세척 후 2차 항체(1:5,000으로 희석)와 상온에서 1시간 반응하였다. Membrane은 TBS-T로 2회 세척 후 Clarity Western ECL Substrate(Bio-rad)를 사용하여 Chemidoc system(GE, LAS4000)으로 단백질 발현 양의 변화를 측정하였다.
- [0689] 그 결과, SMx 및 본 출원의 신규 화합물 분자가 ARPE-19 세포주에서 HIF-1 α 를 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 26). 이를 통해 본 출원의 화합물이 습성 노인성 황반변성(wt-AMD)에 대한 치료 효능을 갖는 것을 알 수 있다.

도면

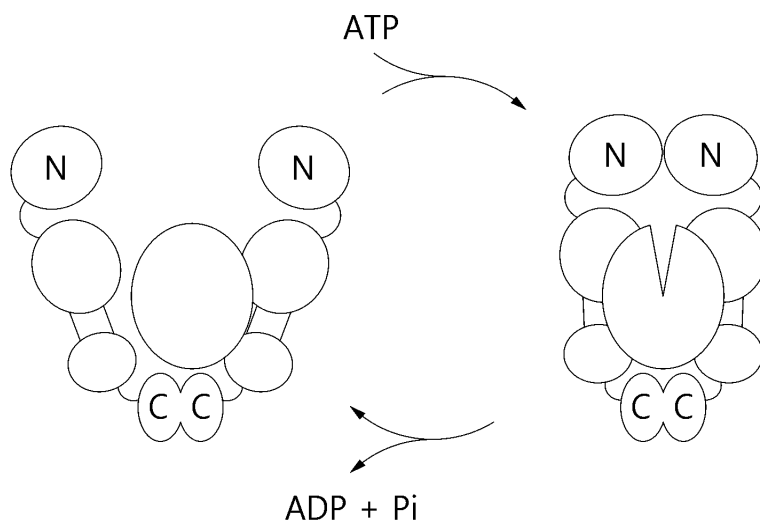
도면1



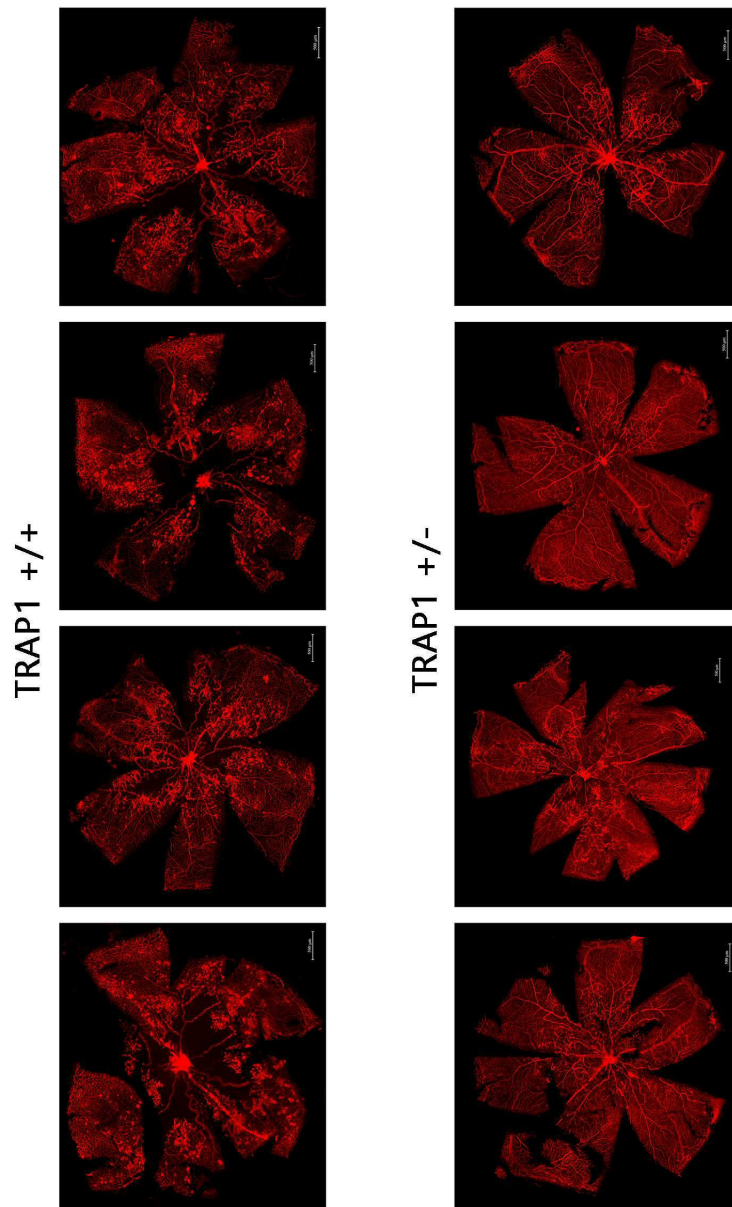
도면2



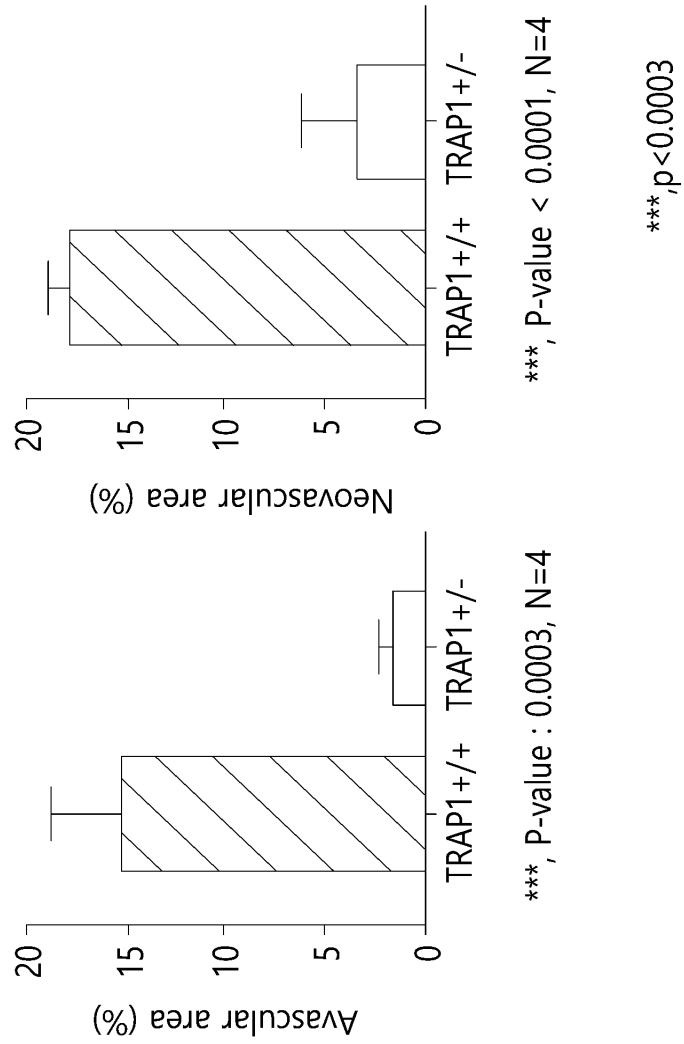
도면3



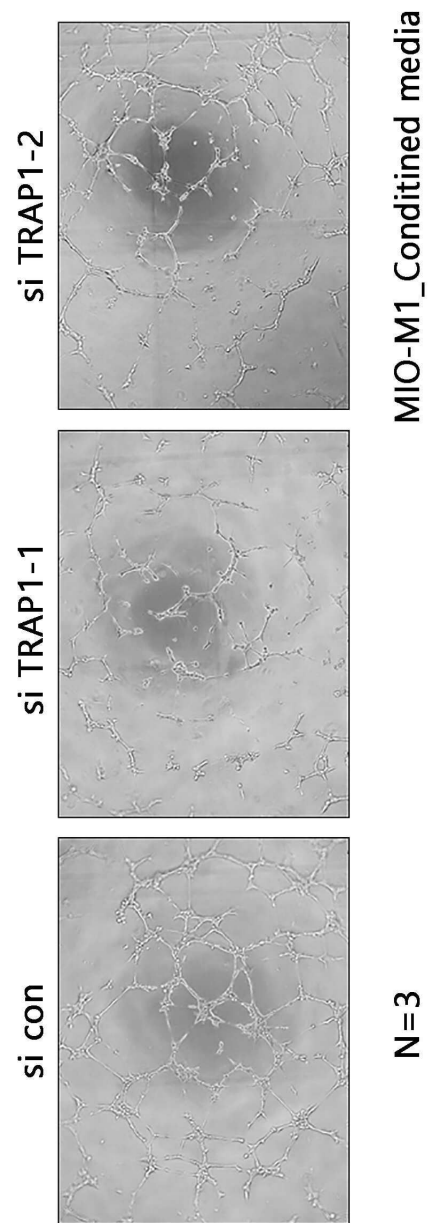
도면4



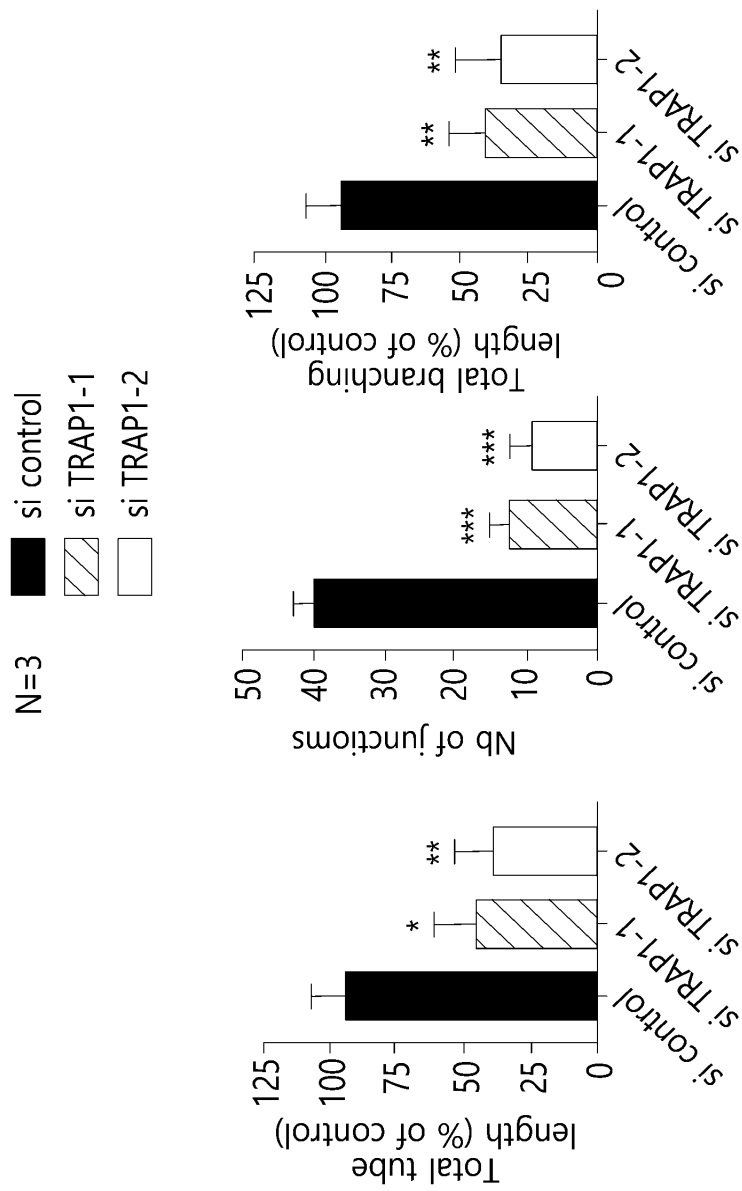
도면5



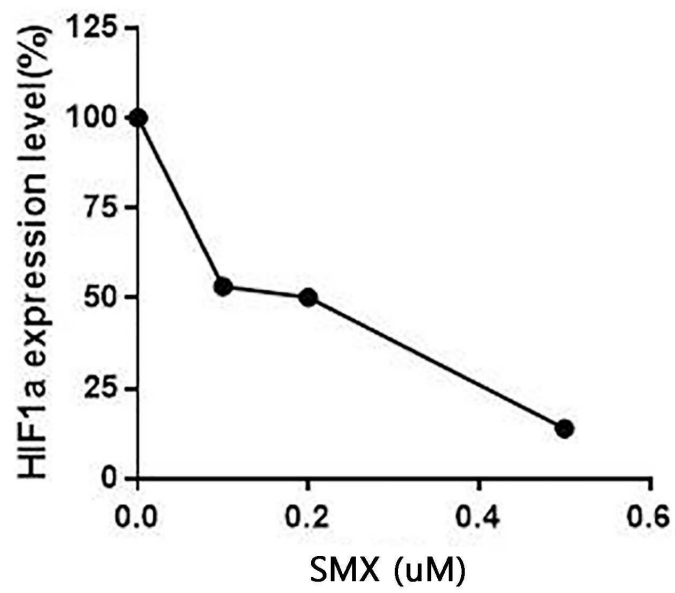
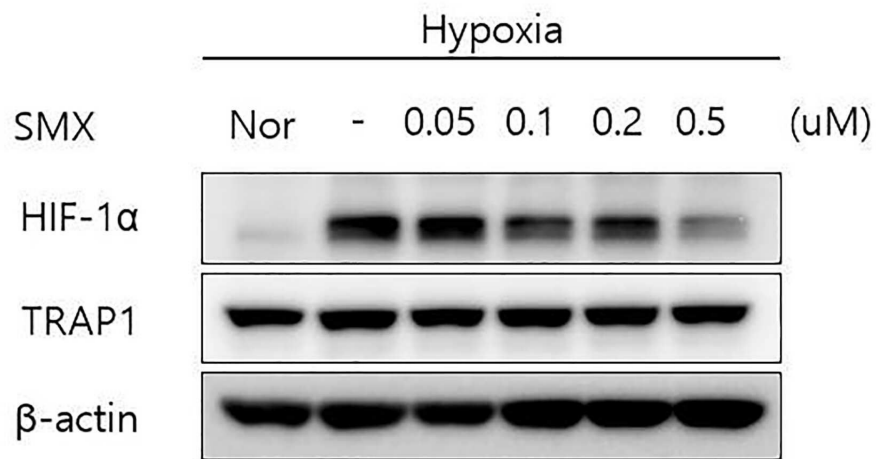
도면6



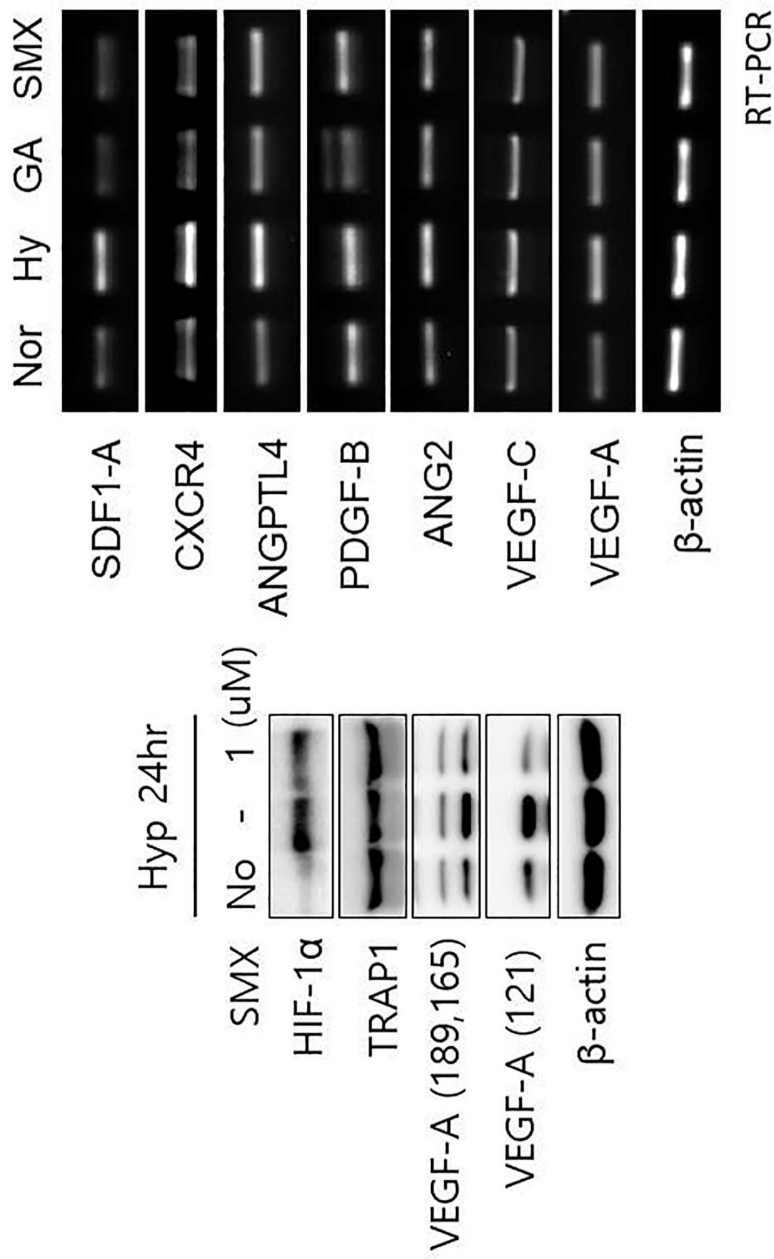
도면7



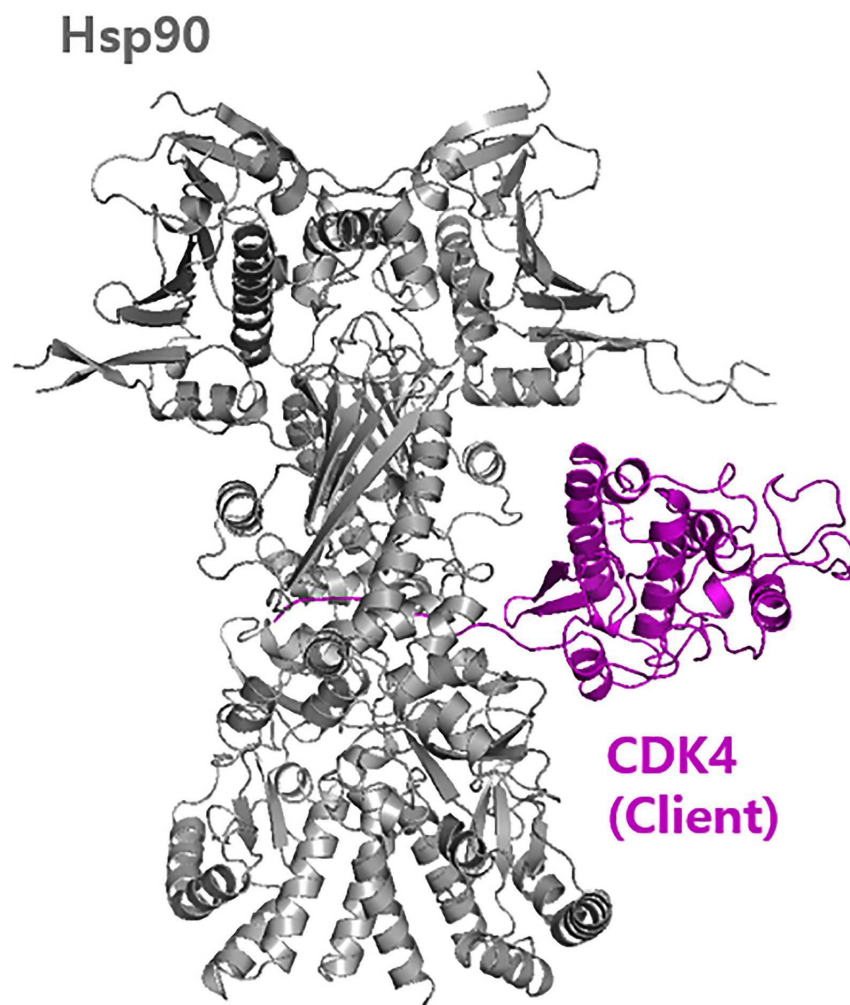
도면8



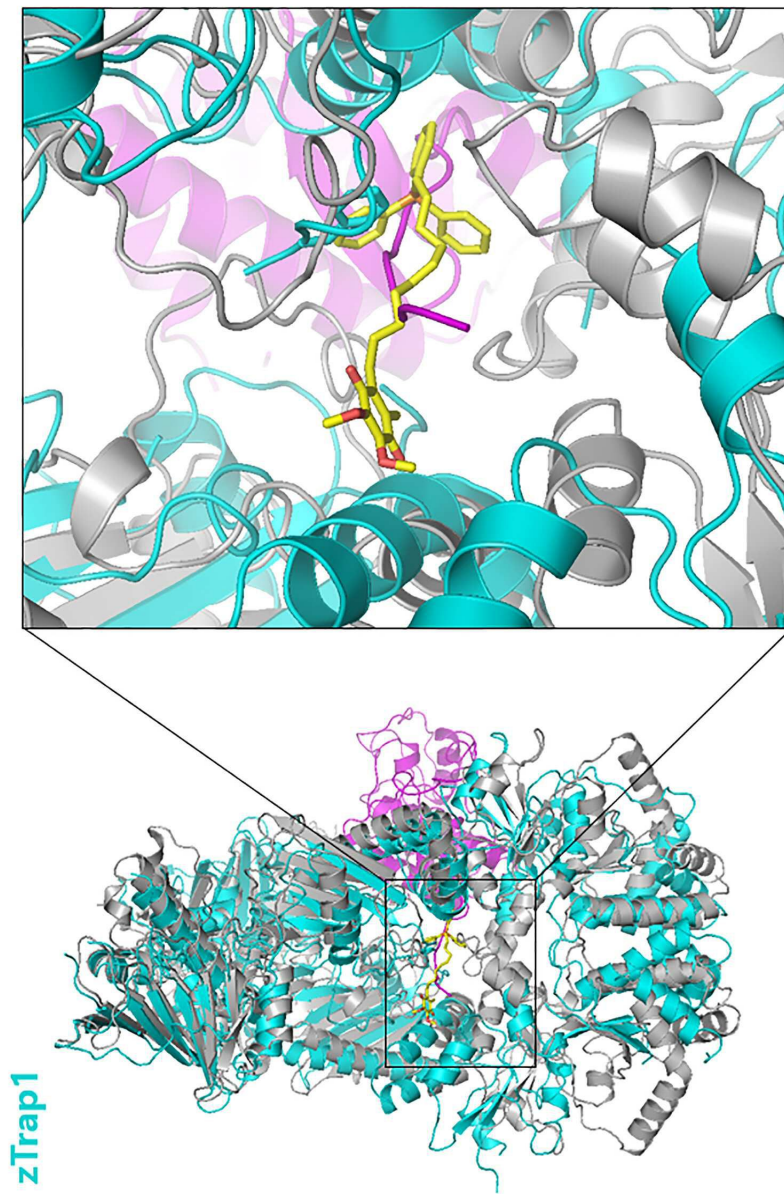
도면9



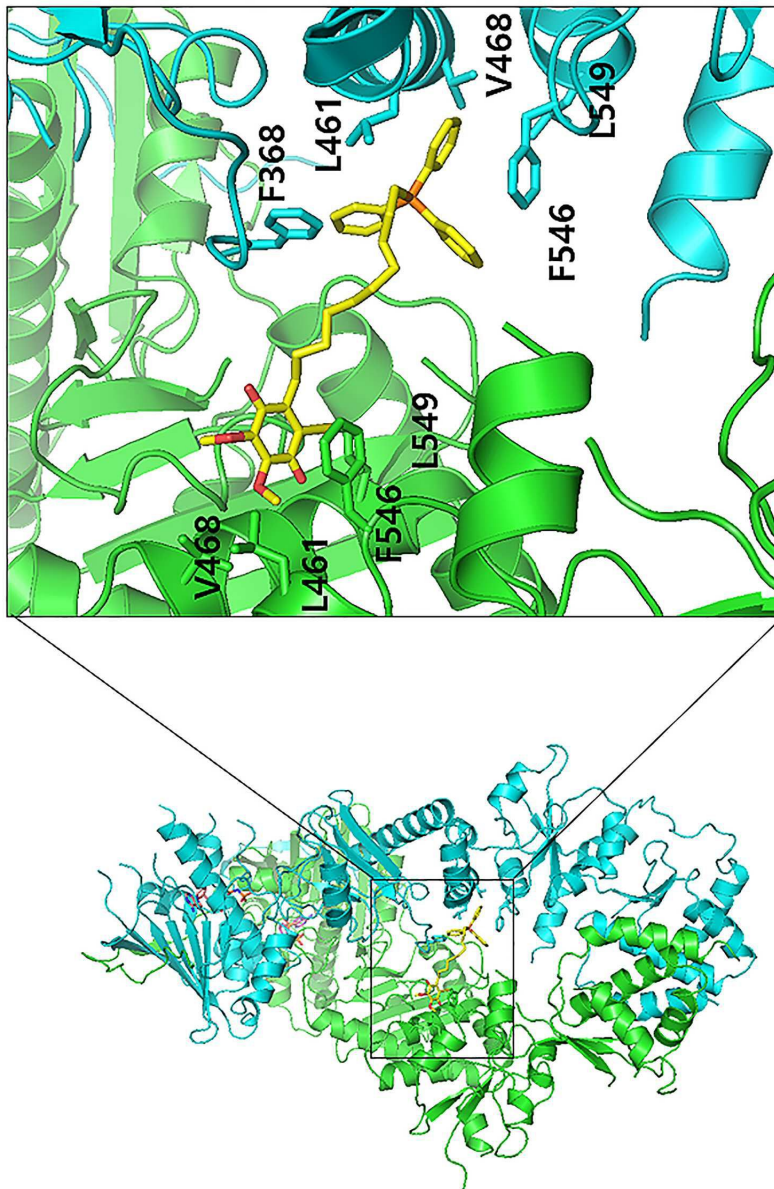
도면10



도면11



도면12

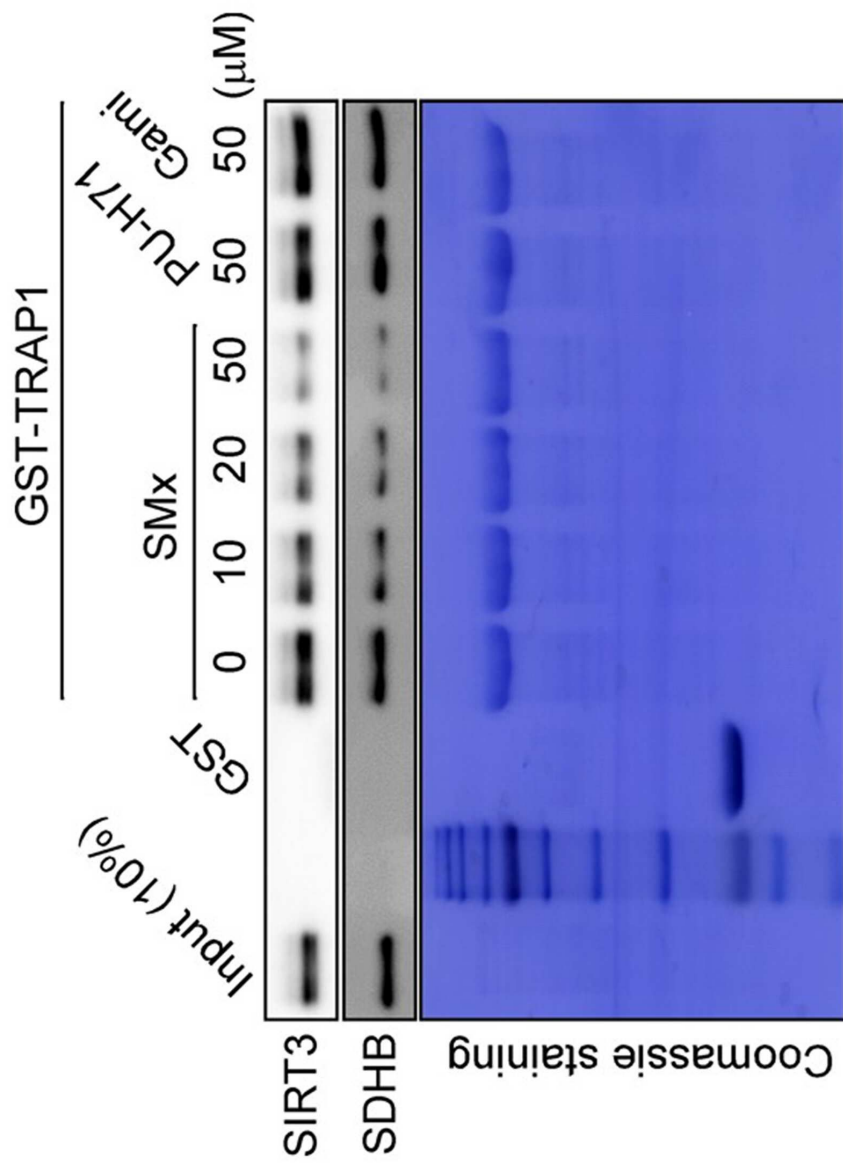


도면13

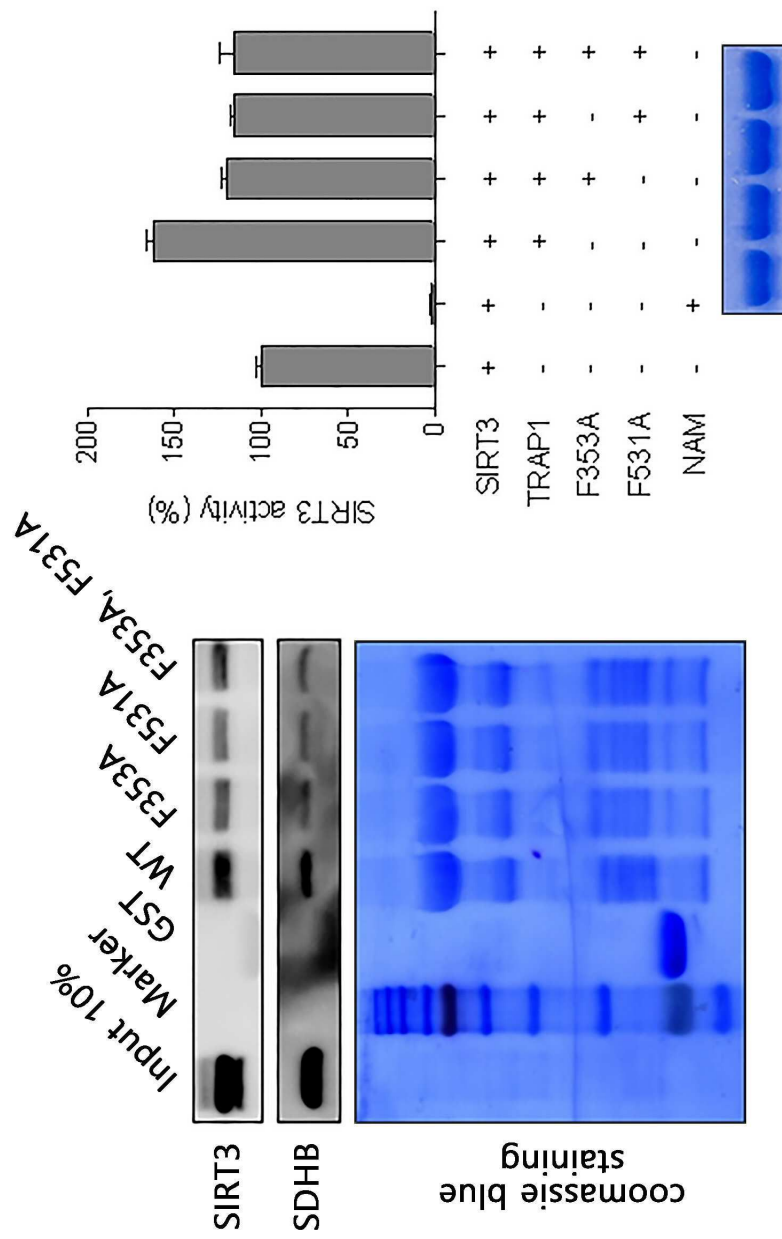
Human	441	FEDYGLFMREGIVTATEQ	458	---	526	FCFEQFDEL	TLLHLR	540
Zebrafish	456	FEDYGLFMREGIVTTGEQ	473	---	541	FCFEQFDEL	TLLHLR	555
Elephant	444	FEDYGLFVREGIVTTTEQ	461	---	529	FCYKQLDEL	TLLHLH	543
Mouse	443	FEDYGLFMREGIVTTAEQ	460	---	528	FCYEQFDEL	TLLHLR	542
Rat	443	FEDYGLFMREGIVTTAEQ	460	---	528	FCYEQFDEL	TLLHLR	542
Dog	439	FEDYGLFMREGIVTTAEQ	458	---	524	FCYEQFDEL	TLLHLR	538
Chimpanzee	469	FEDYGLFMREGIVTATEQ	488	---	554	FCFEQFDEL	TLLHLR	568

Human	MKPSMF	FDVSREL	G	-360
Zebrafish	MKPSMF	FDVSREMG		-375
Elephant	MKPSMF	FDVSQELG		-363
Mouse	MKPSMF	FDVSREL	G	-362
Rat	MKPSMF	FDVSREL	G	-362
Dog	MKPSMF	FDVSREL	G	-358
Chimpanzee	MRPSMF	FDVSREL	G	-388

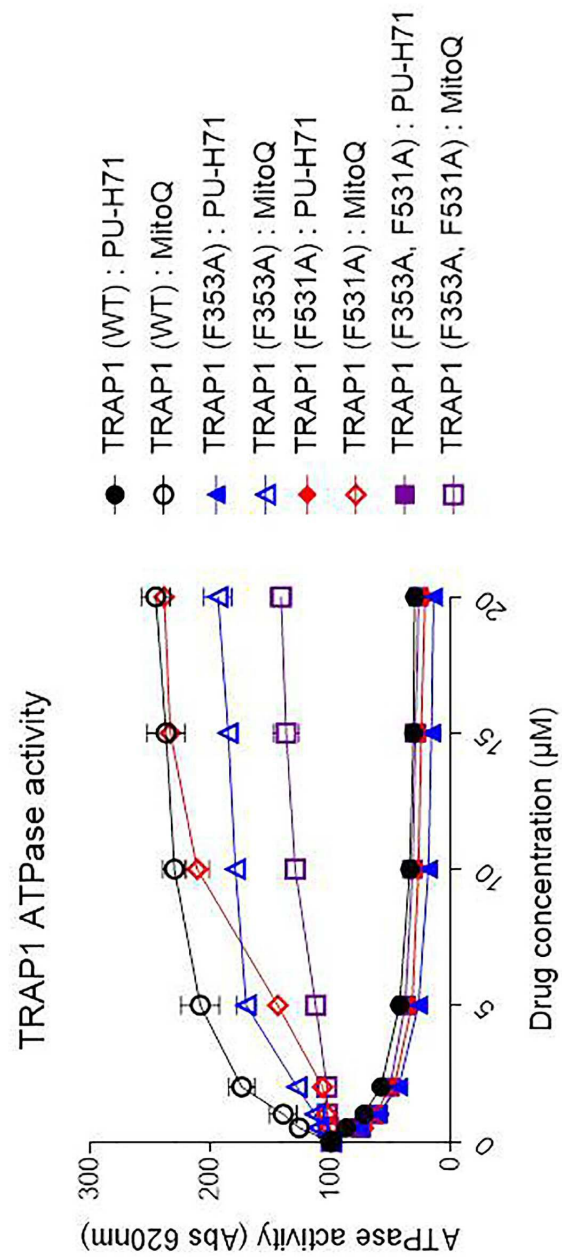
도면14



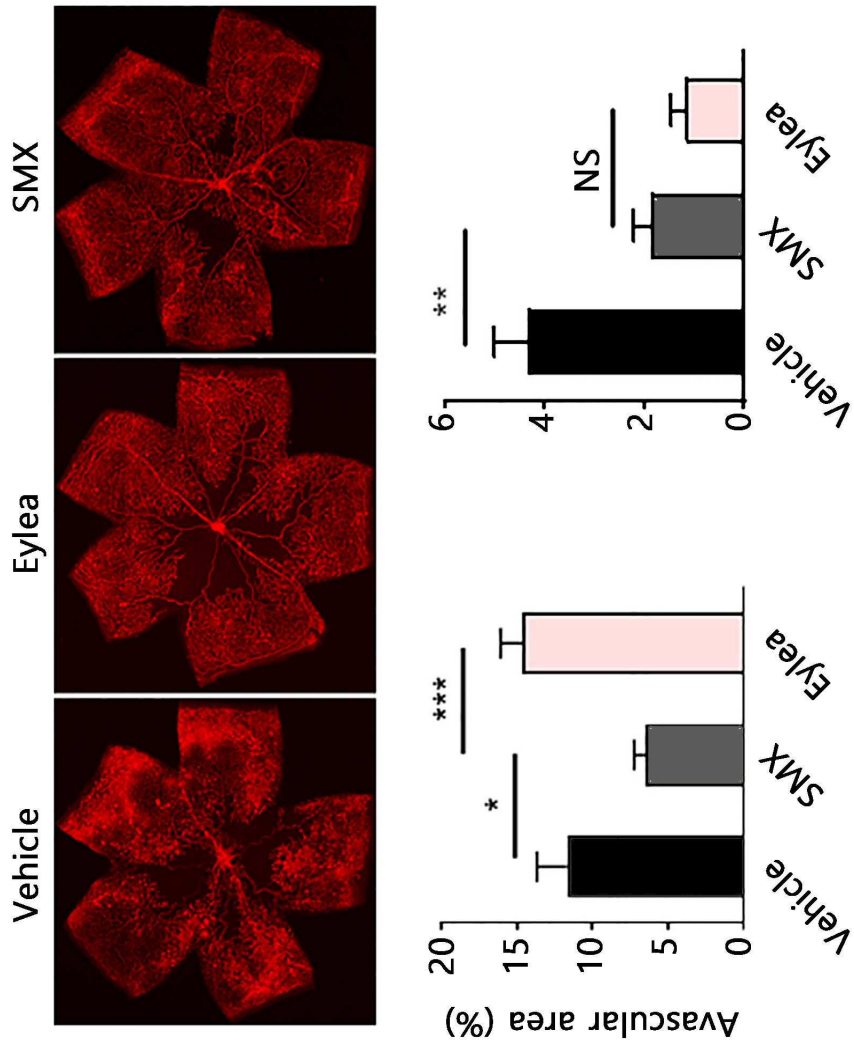
도면15



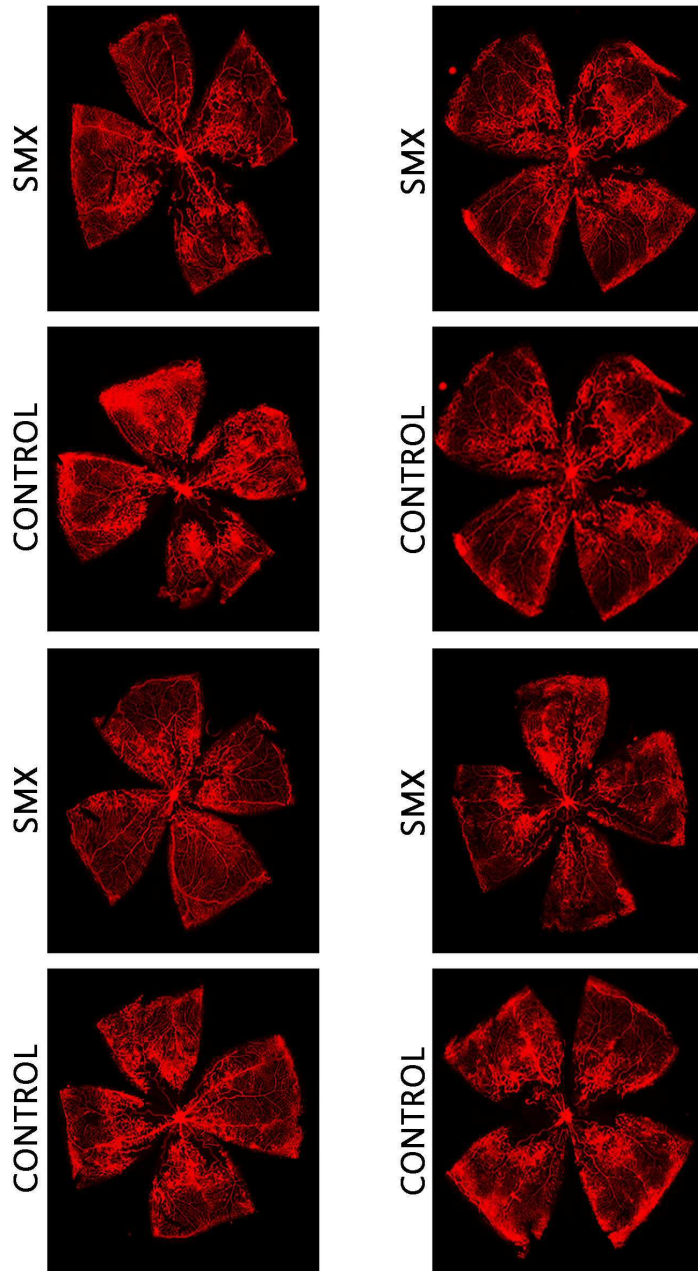
도면16



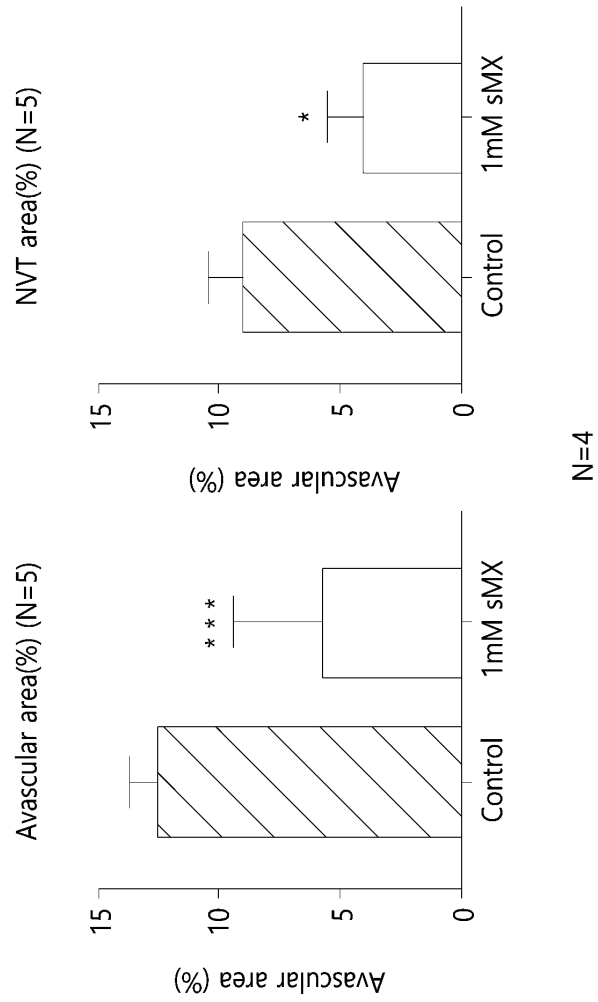
도면17



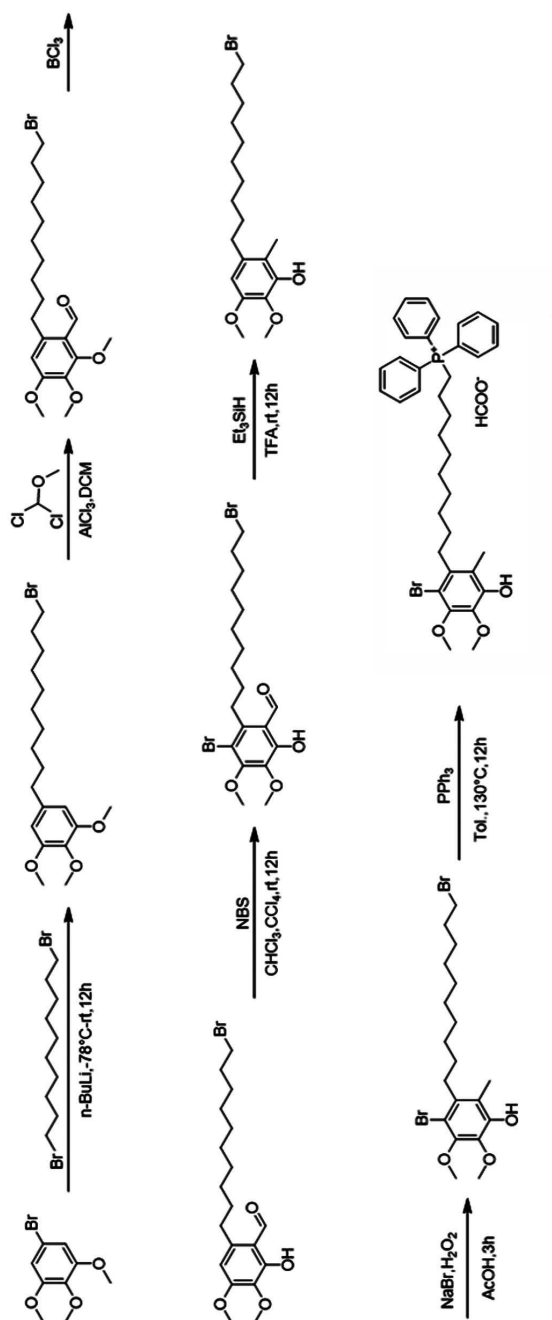
도면18



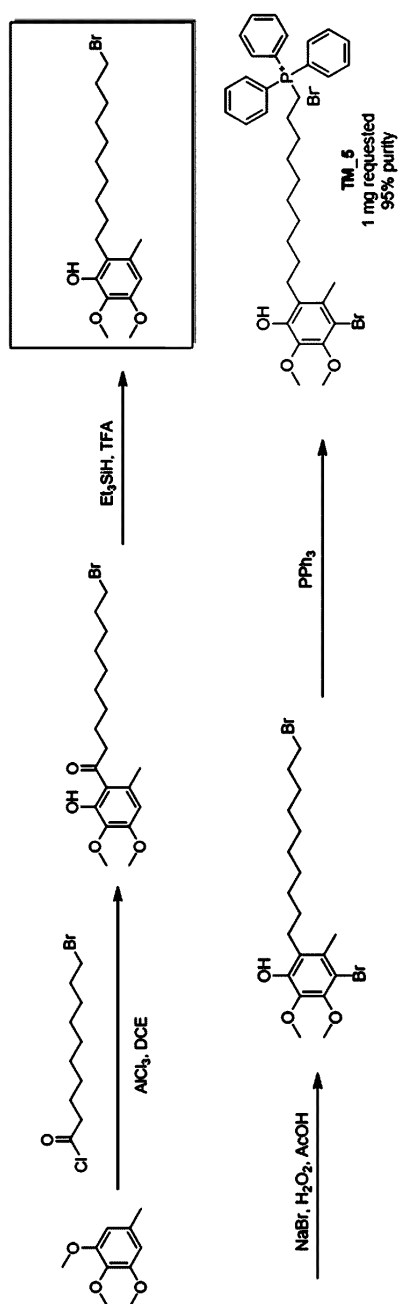
도면19



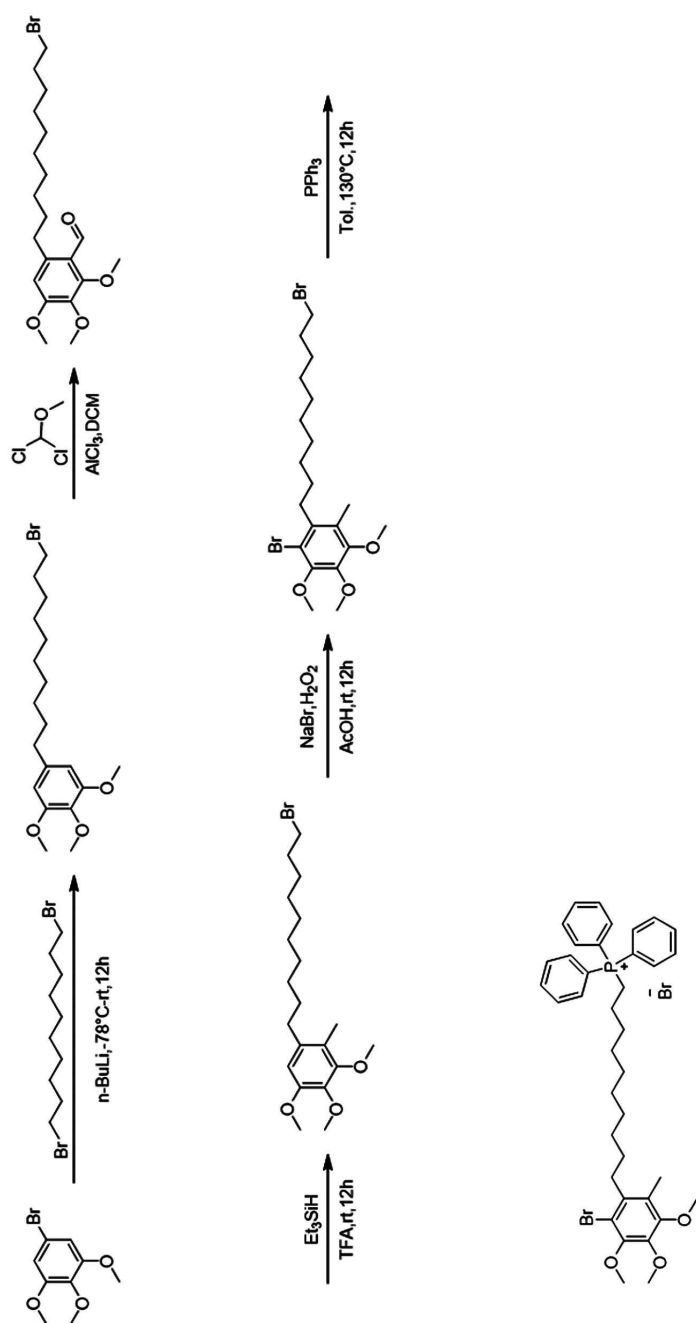
도면20



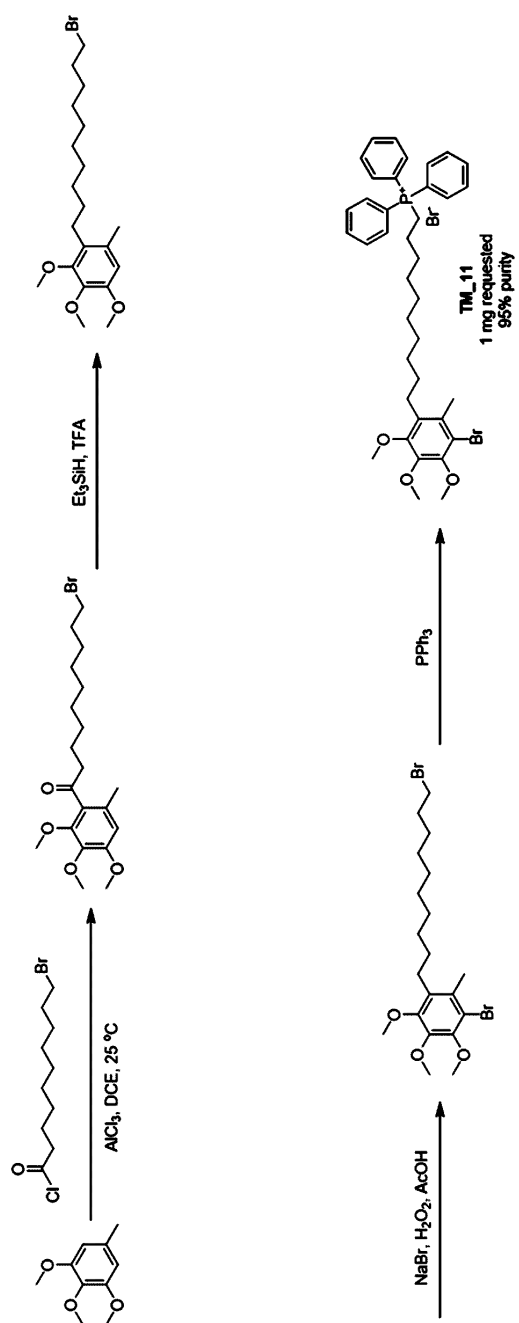
도면21



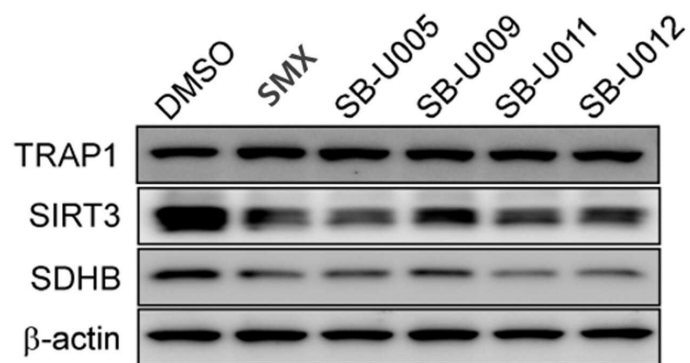
도면22



도면23



도면24



도면25

화합물	HIF1 inhibition under hypoxia
	MIOM1 (IC ₅₀ , μ M)
SMX	0.4707 $\pm$ 0.0155
SB-U005	0.1019 $\pm$ 0.0153
SB-U009	0.1912 $\pm$ 0.0221
SB-U011	0.1035 $\pm$ 0.0584
SB-U012	0.0863 $\pm$ 0.0071
Gamitrinib	1.803 $\pm$ 0.0857
PU-H71	0.149 $\pm$ 0.046

도면26

