

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2022/265178 A1

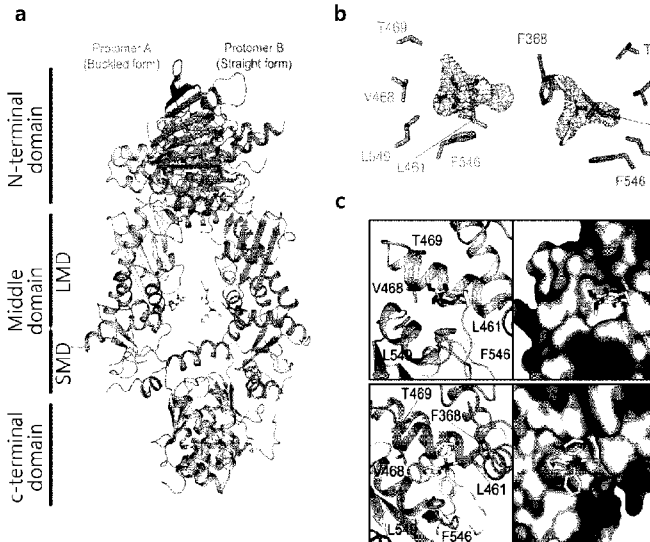
2022년 12월 22일 (22.12.2022) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: C07F 9/54 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/662 (2006.01) A61K 31/665 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/001195
- (22) 국제출원일: 2022년 1월 24일 (24.01.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2021-0077326 2021년 6월 15일 (15.06.2021) KR
10-2021-0077327 2021년 6월 15일 (15.06.2021) KR
- (71) 출원인: 주식회사 스마틴바이오 (SMARTIN BIO INC.) [KR/KR]; 28160 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 194-25, 3층 에이-16호, Chungcheongbuk-do (KR). 울산과학기술원 (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) [KR/KR]; 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).
- (72) 발명자: 강병헌 (KANG, Byoung Heon); 44920 울산시 울주군 범서읍 구영로 75-9, 308동 501호, Ulsan (KR). 김소연 (KIM, So-Yeon); 44920 울산시 울주군 범서읍 구영로 101-7, 508동 1403호, Ulsan (KR). 윤남구 (YOON, Nam Gu); 16295 경기도 수원시 장안구 경수대로976번길 22, 116동 803호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 아이피에스 (IPS PATENT FIRM); 06656 서울시 서초구 반포대로23길 14, 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) Title: TRAP1 INHIBITOR AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: TRAP1 억제제 및 이의 용도

[도 1]



(57) Abstract: The present specification provides a compound that inhibits TRAP1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof. In this case, the compound or the pharmaceutically acceptable salt thereof can inhibit the binding between TRAP1 and the client protein. In addition, the present specification provides: a pharmaceutical composition for the treatment of cancer or ophthalmic disease comprising a compound that inhibits TRAP1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof; and use thereof.

(57) 요약서: 본 명세서는 TRAP1 을 억제하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다. 이때, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 TRAP1 과 클라이언트 단백질의 결합을 억제할 수 있다. 또한, 본 명세서는 TRAP1 을 억제하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암 또는 안과질환 치료용 약학적 조성물 및 이의 용도를 제공한다.

[다음 쪽 계속]

WO 2022/265178 A1

럼 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: TRAP1 억제제 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 명세서는 TRAP1 억제를 위한 화합물 및 그의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 TRAP1 억제제 및 이를 포함하는 암 치료 또는 안과질환 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] TRAP1 (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. 본 발명자는 TRAP1 억제를 위한 화합물을 합성하였고, 상기 화합물을 이용하여 TRAP1을 억제하고, 더 나아가 안과 질환 치료를 위한 약학적 조성물로 화합물의 용도를 인식하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

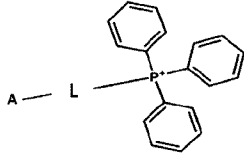
- [3] 본 명세서는 일 구현예로, TRAP1을 억제하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.
- [4] 본 명세서는 또 다른 일 구현예로, TRAP1 과 클라이언트 단백질의 결합을 억제하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.
- [5] 본 명세서는 또 다른 일 구현예로, TRAP1을 억제하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [6] 본 명세서는 또 다른 일 구현예로, TRAP1을 억제하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에서 투여하는 것을 포함하는 질병 치료 방법을 제공한다.
- [7] 본 명세서는 일 구현예로, TRAP1을 억제하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 안과질환 치료 용도를 제공한다.
- [8] 본 명세서는 일 구현예로, TRAP1을 억제하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 안과질환 치료용 조성물을 제공한다.
- [9] 본 명세서는 일 구현예로, TRAP1을 억제하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 안과질환 치료용 조성물 제조 용도를 제공한다.
- [10] 본 명세서는 일 구현예로, TRAP1을 억제하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 안과질환 치료방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [11] 본 명세서는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 포함하는 암 또는 안과 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[12] [화학식 1]

[13]



[14] 이때, L은 $(CH_2)_n$ 을 포함하고,

[15] 상기 n은 7이상 40이하의 정수이며,

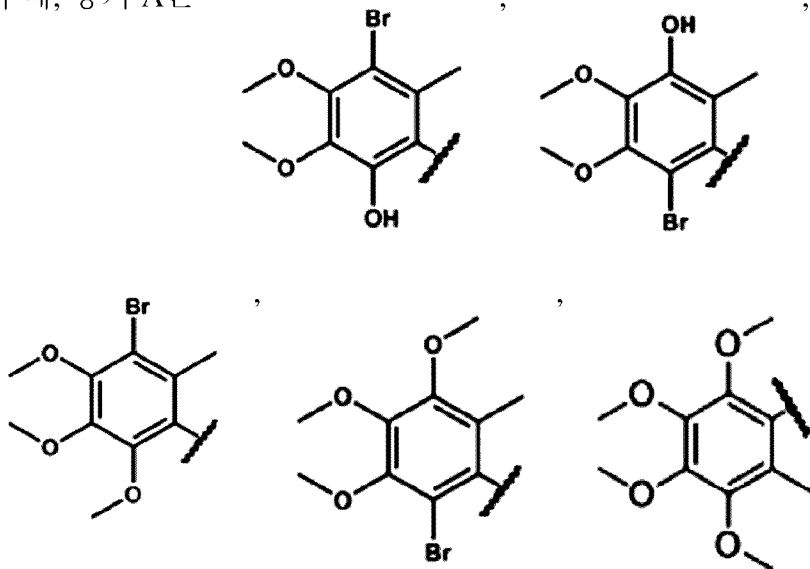
[16] A는 메틸, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 시클로알킬 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴 중에서 선택되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[17] 이때, 상기 A는 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 아릴, 시클로알킬 및 헤테로시클릴 중에서 선택되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

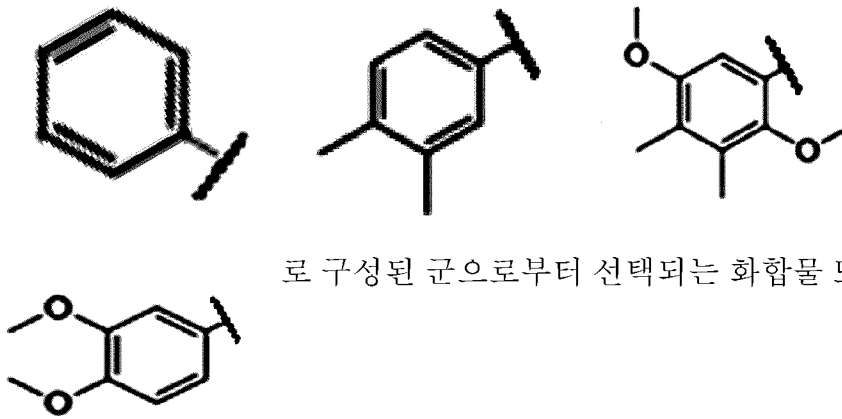
[18] 이때, 상기 A는 치환 또는 비치환된 아릴이고,

[19] 상기 치환 또는 비치환된 아릴은 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환된 또는 비치환된 페닐인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[20] 이 때, 상기 A는



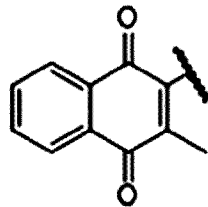
및



로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물 또는 이의

약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약제 조성물을 제공한다.

- [21] 이때, 상기 A는 치환 또는 비치환된 아릴이고,
 [22] 상기 치환 또는 비치환된 아릴은 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 나프탈렌인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 포함하는 약제 조성물을 제공한다.
 [23] 이때, 상기 A는

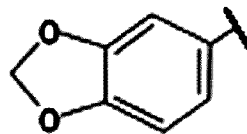


인 화합물 또는 이의 약학적으로

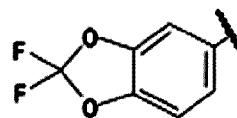
허용가능한 염 및 이를 포함하는 약제 조성물을 제공한다.

- [24] 이때, 상기 A는 치환 또는 비치환된 아릴이고,
 [25] 상기 치환 또는 비치환된 아릴은 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 벤조디옥솔인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 포함하는 약제 조성물을 제공한다.

- [26] 이때, 상기 A는



또는



인 화합물 또는

이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 포함하는 약제 조성물을 제공한다.

- [27] 이때, 상기 A는 치환 또는 비치환된 시클로알킬이고,
 [28] 상기 치환 또는 비치환된 시클로알킬은 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐,

히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 시클로헥실인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

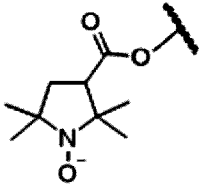
[29] 이때, 상기 A는 비치환된 시클로헥실인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[30] 이때, 상기 A는 치환 또는 비치환된 헥테로시클릴이고,

[31] 상기 치환 또는 비치환된 헥테로시클릴은 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 피롤리딘 또는 크로만인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[32] 이때, 상기 A는 옥시카르보닐, C1~5 알킬 및 =O 로부터 선택된 하나 이상으로 치환된 피롤리딘인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

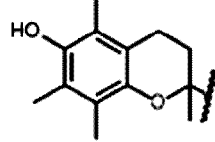
[33] 이때, 상기 A는  인 화합물 또는 이의 약학적으로



허용가능한 염 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[34] 이때, 상기 A는 C1~5 알킬, 히드록실로부터 선택된 하나 이상으로 치환된 크로만-2-일(chroman-2-yl)인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[35] 이때, 상기 A는  인 화합물 또는 이의 약학적으로



허용가능한 염 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[36] 이때, 상기 n은 9이상의 정수인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[37] 이때, 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 암 또는 안과질환 치료 방법을 제공한다.

[38] 이때, 상기 약학적 조성물은 경구 투여되는 암 또는 안과 질환 치료 방법을 제공한다.

[39] 이때, 상기 약학적 조성물은 안약을 이용하여 국소적 투여되는 안과 질환 치료 방법을 제공한다.

- [40] 이때, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 TRAP1 억제제를 제공한다.
- [41] 이때, 상기 TRAP1 억제제는 CBS에 결합하는 것을 특징으로 하는 억제제를 제공한다.
- [42] 이때, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 TRAP1과 클라이언트 단백질의 결합 억제제를 제공한다.

발명의 효과

- [43] 본 명세서에서 제공하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이용하면 TRAP1을 억제할 수 있다.
- [44] 본 명세서에서 제공하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이용하면 TRAP1과 클라이언트 단백질의 결합을 억제할 수 있다.
- [45] 본 명세서에서 제공하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물은 TRAP1 메커니즘과 관련된 특정 질병을 치료하는 용도로 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물은 암 또는 안과 질환을 치료하는 용도로 이용될 수 있다.
- [46] 본 명세서에서 제공하는 화합물은 TRAP1을 선택적으로 억제함을 통해 정상 세포에 대한 부작용을 나타내지 않는 장점 및 안구 점안 투여와 같은 비침습적 치료가 가능한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [47] 도1a는 zTRAP1 이량체와 MitoQ 및 AMPPNP가 결합된 전체적인 구조이다. Protomer A와 protomer B는 각각 연한 그레이 및 진한 그레이로 표시 되어있다.
- [48] 도1b는 TRAP1에 의한 MitoQ의 인식을 자세히 나타낸다. 잔기의 사이드체인이 MitoQ와 상호작용하는 것을 볼 수 있다. Fo-Fc 맵 (회색 메시)는 MitoQ가 없을 때 계산되었다.
- [49] 도1c는 MitoQ 결합 포켓 구조를 나타낸다. 위는 Ub 아래는 TPP 결합 포켓을 나타낸다.
- [50] 도2는 TRAP1과 MitoQ의 결합 결정구조를 나타낸다.
- [51] 도3은 알킬-TPP의 구조를 나타낸다.
- [52] 도4는 알킬-TPP의 TRAP1 내 CBS(Client binding site) 결합력 분석 결과를 나타낸다.
- [53] 도5는 항산화제-TPP 컨쥬게이트 구조를 나타낸다.
- [54] 도6은 항산화제-TPP 컨쥬게이트의 TRAP1 내 CBS 결합력 분석 결과를 나타낸다.
- [55] 도7은 기타 합성 화합물 구조를 나타낸다.
- [56] 도8a 및 도8b는 각각 기타 합성 화합물의 TRAP1 내 CBS 결합력 분석 결과를 나타낸다.

- [57] 도9a는 알킬-TPP의 TRAP1 ATPase 활성 분석 결과를 나타낸다.
- [58] 도9b는 알킬-TPP의 TRAP1의 ATP binding pocket 결합력 분석 결과를 나타낸다. mP는 millipolarization을 나타낸다.
- [59] 도10은 암세포에서 TRAP1 및 Hsp90의 억제 결과를 나타낸다.
- [60] 도11a는 링커 길이에 따른 TRAP1 ATPase 활성 분석 결과를 나타낸다.
- [61] 도11b는 링커 길이에 따른 millipolarization(mP) 분석 결과를 나타낸다.
- [62] 도12는 항산화제-TPP 컨주게이트의 세포에 대한 효과를 나타낸다.
- [63] 도13은 MitoQS, Mito-VitEL, 및 Mito-CPS의 Hsp90 및 TRAP1에 대한 효과를 나타낸다.
- [64] 도14는 기타 합성 물질의 TRAP1 ATPase 활성 분석 결과를 나타낸다.
- [65] 도15는 기타 합성 물질의 TRAP1 억제 결과를 나타낸다.
- [66] 도16은 기타 합성 물질의 생체 내 종양 성장 억제 효과 결과를 나타낸다.
- [67] 도17은 종양의 웨스턴블랏 결과를 나타낸다.
- [68] 도18 내지 19는 당뇨병성 망막증 모델에서 TRAP1의 발현 증가를 나타낸다.
- [69] 도18a는 연령 일치 room air 망막과 비교한 OIR 망막의 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸다. TRAP1 단백질 수준은 β -액틴으로 정상화되었다.
- [70] 도18b는 room air 망막과 OIR 망막에서 TRAP1 발현의 qPCR 분석 결과를 나타낸다.
- [71] 도19a는 연령 일치 대조군과 비교한 STZ-DM 망막의 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸다.
- [72] 도19b는 대조군과 비교한 STZ-DM 망막에서 TRAP1 발현의 qPCR 분석결과를 나타낸다.
- [73] 도18c 및 19c는 STZ-DM 및 연령 일치 대조군 또는 OIR 및 room air의 망막에서 TRAP1(TRAP1), GFAP(glial fibrillary acidic protein), GS(glutamine synthetase) 및 DAPI(Merge 내 중간 회색) 염색 결과이다.
- [74] 도20은 TRAP1 녹아웃이 OIR 모델에서 병적 망막 신생 혈관 형성의 형성을 약화시키는 결과를 나타낸다.
- [75] 도20a는 CD31을 사용한 P17 OIR 망막의 전체 마운트 염색결과를 나타낸다.
- [76] 도20b,c는 TRAP1 +/+로 정규화된 신생 혈관 다발 및 무혈관 영역의 정량화 결과를 나타낸다.
- [77] 도21a는 STZ 마우스 망막의 HIF1 α 면역 형광 염색결과를 나타낸다.
- [78] 도21b는 P17 OIR 마우스 망막의 HIF1 α 면역 형광 염색결과를 나타낸다.
- [79] 도22a는 STZ-DM 망막에서 VEGF-A 및 ANGPTL4 발현의 qPCR 분석결과를 나타낸다.
- [80] 도22b는 P17 OIR 망막에서 VEGF-A 및 ANGPTL4 발현의 qPCR 분석결과를 나타낸다.
- [81] 도23a 및 24a는 생체 내에서 MitoQ의 HIF1 α 억제 활성을 조사하기 위해, MitoQ를 P12에서 OIR 마우스에 유리 체내 주사 또는 안약을 처리한 것을

나타낸다.

[82] 도23b 및 24b는 CD31을 사용한 망막의 전체 마운트 염색 결과를 나타낸다.

[83] 도23c 및 24c는 MitoQ 투여에 따른 OIR 망막의 무혈관 및 신생 혈관 영역 비율을 나타낸다.

[84] 도25는 MIO-MI HRE GFP 세포주를 이용하여 알킬-TPP의 HIF1 α 억제활성을 분석한 결과이다.

[85] 도26은 MIO-MI HRE GFP 세포주를 이용하여 TPP-항산화제 컨쥬게이트의 HIF1 α 억제활성을 분석한 결과이다.

[86] 도27은 MIO-MI HRE GFP 세포주를 이용하여 기타 합성물질의 HIF1 α 억제활성을 분석한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[87] 용어 정의

[88] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 기타 다른 참고문헌은 전체가 참고로 포함된다.

[89]

[90] 이하, 발명의 구체적인 내용을 개시한다.

[91] TRAP1

[92] TRAP1은 Hsp90의 파라로그 중 하나로, 미토콘드리아에만 존재하는 미토콘드리아 단백질이다. 상기 TRAP1을 포함한 Hsp90은 두개의 단위체(protomer)가 결합되어 있는 구조를 가지고 있다. 이때, 각각의 단위체를 제1단위체, 제2단위체로 명칭한다. Hsp90은 Hsp90에 대하여 특이적인 클라이언트 단백질(client protein)이 결합되면 서로 떨어져 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. Hsp90s는 파라로그 간의 N-말단 부위의 상동성이 매우 높으나, 중단 부위의 상동성은 낮은 특징이 있다. 이에 따라, N-말단 부위를 타겟으로 하는 화합물의 경우 Hsp90의 파라로그에 대해 비선택적으로 작용하고, 그 이외에 상동성이 낮은 부위를 타겟으로 하는 화합물의 경우 Hsp90 파라로그에 대해 선택적으로 작용할 수 있다. 상기 Hsp90은 다른 언급이 없는 한 세포질에 존재하는 Hsp90s인 Hsp90- α 1, Hsp90- α 2, Hsp90- β 를 포함한다.

[93] 또한, 상기 TRAP1이 억제되면, SIRT3 및 SDHB의 발현이 줄어든다고

알려져있다(Interplay between TRAP1 and Sirtuin-3 Modulates Mitochondrial Respiration and Oxidative Stress to Maintain Stemness of Glioma Stem Cells. *Cancer Res* 79, 1369-1382 참고). 이에 따라, TRAP1의 억제 여부를 확인하기 위해서, 본 명세서에서는 SIRT3 및 SDHB의 발현을 확인할 수 있다.

[94] 아릴

[95] "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, 시클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 및/또는 헤테로시클릴일 수 있다. 아릴 기는 벤젠, 나프탈렌, 페난트렌, 페놀, 아닐린, 및 이와 같은 것을 포함한다.

[96] 시클로알킬

[97] "시클로알킬" 기는 완전히 포화된 시클릭 탄화수소이다. "시클로알킬"은 모노시클릭 및 바이시클릭 고리를 포함한다. 다르게 정의되지 않는 한 일반적으로, 모노시클릭 시클로알킬기는 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.

[98] 헤테로시클릴

[99] "헤테로시클릴"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. "헤테로시클릭" 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, 시클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 및/또는 헤테로시클릴일 수 있다. 헤테로시클릴 기는, 예를 들어, 피페리딘, 피페라진, 피롤리딘, 몰폴린, 락톤, 락탐, 및 이와 같은 것을 포함한다.

[100] 히드록시알킬

[101] "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.

[102] **안과질환**

[103] 본 명세서에서 사용되는 "안과질환"은 맥락막 신생혈관형성 질환, 망막 신생혈관형성 질환, 망막하 신생혈관형성 질환, 각막 신생혈관형성 질환, 홍채 신생혈관형성 질환 또는 신생혈관 녹내장인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안과 질환을 포함한다. 또한, 상기 신생혈관형성성 안과 질환은 망막 신생혈관형성 질환을 의미할 수 있고, 상기 망막 신생혈관형성 질환은 당뇨망막병증, 미숙아망막병증 또는 망막정맥폐쇄인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안과 질환을 의미할 수 있다. 추가적으로, 상기 맥락막 신생혈관형성 질환은 노인성 습식 황반변성(wet AMD)을 의미할 수 있다.

[104] **약학적으로 허용가능**

[105] 본 명세서에서 사용된 "약학적으로 허용가능"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.

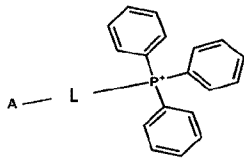
[106]

[107] **I. 화학식 1의 화합물**

[108] **1. 화학식 1**

[109] [화학식 1]

[110]



[111] 본 명세서는 상기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물을 제공한다.

[112] A는 메틸, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 시클로알킬 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴 중에서 선택될 수 있다.

[113] L은 $(CH_2)_n$ 을 포함하고,

[114] 상기 $(CH_2)_n$ 에서 n은 일 실시예로, 7이상 10이하, 7이상 20이하, 7이상 30이하, 7이상 40이하 또는 7이상 50이하의 정수일 수 있다. 상기 $(CH_2)_n$ 에서 n은 구체적인 일 실시예로 7이상 40이하의 정수일 수 있다. 다만 이에 제한되지

않는다. 본 명세서에서 상기 L은 연결부 또는 링커에 대응되는 개념으로 이해될 수 있다.

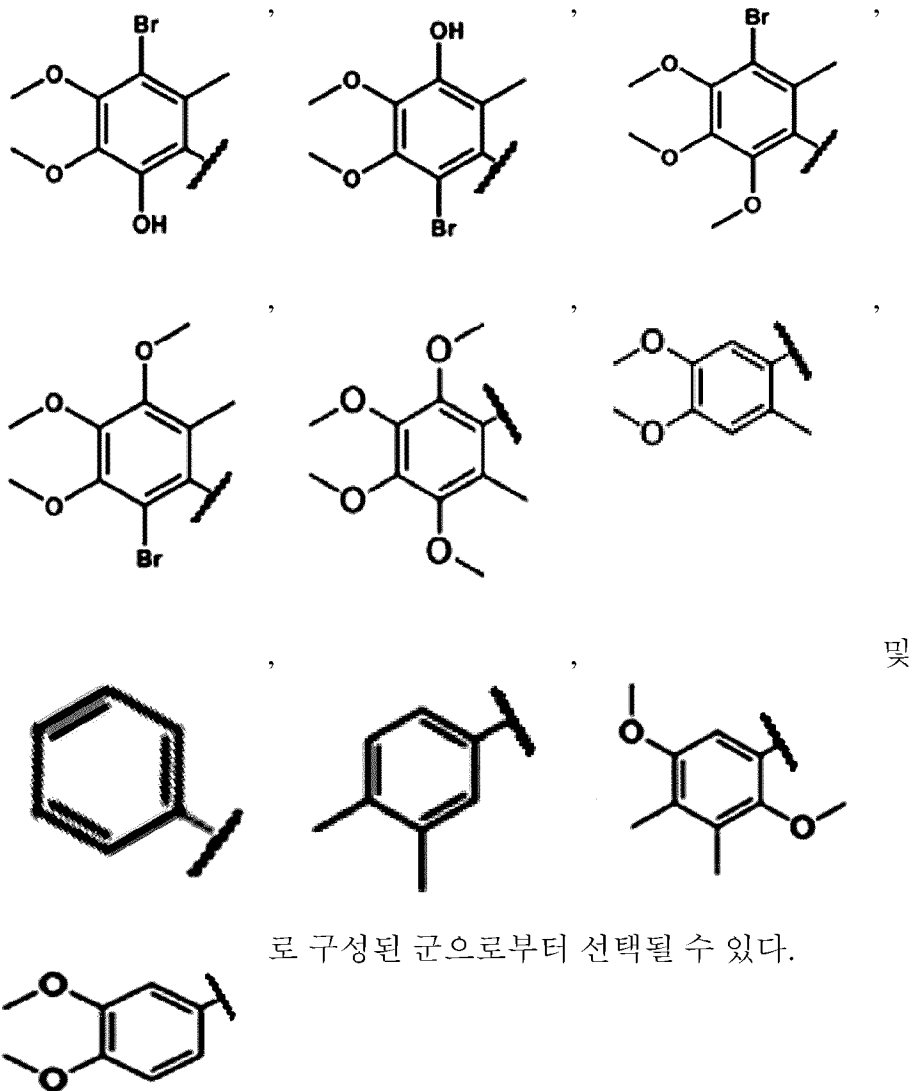
[115] 2. A의 구조

[116] 1) 메틸

[117] 상기 A는 일 실시예로, 메틸일 수 있다.

[118] 2) 치환 또는 비치환된 아릴

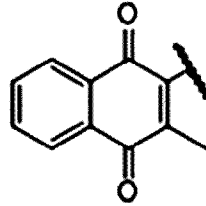
[119] 상기 A는 일 실시예로, 치환 또는 비치환된 아릴일 수 있다. 상기 A는 구체적인 일 실시예로, 할로젠, =O, 히드록시, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환된 또는 비치환된 아릴일 수 있다. 상기 A는 보다 더 구체적인 일 실시예로, 할로젠, =O, 히드록시, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환된 또는 비치환된 페닐일 수 있다. 상기 A는 보다 더 구체적인 일 실시예로,



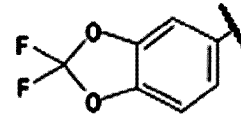
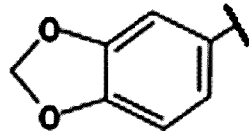
로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[120] 상기 A는 또 다른 구체적인 일 실시예로, 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐,

히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 나프탈렌일 수 있다. 상기 A는 보다 더 구체적인 일 실시예로, C1~5 알킬, =O 로부터 선택된 하나 이상으로 치환된 나프탈렌-2-일(naphthalen-2-yl)일 수 있다. 상기 A는 보다 더 구체적인 일 실시예로 일 수 있다.



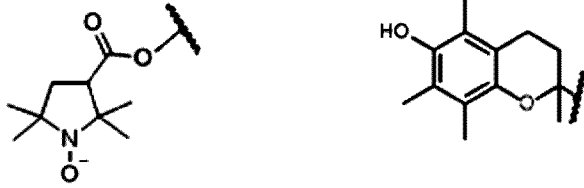
- [121] 상기 A는 또 다른 구체적인 일 실시예로, 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 치환 또는 비치환된 벤조디옥솔(benzodioxole)일 수 있다. 상기 A는 보다 더 구체적인 일 실시예로, 1,3-벤조디옥솔 또는 2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔일 수 있다. 상기 A는 구체적인 일 실시예로, 또는 일 수



있다.

- [122] 다만, 상기 A는 이에 제한되지 않는다.
- [123] 3) 치환 또는 비치환된 시클로알킬
- [124] 상기 A는 일 실시예로, 치환 또는 비치환된 시클로알킬일 수 있다. 상기 A는 구체적인 일 실시예로, 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 3 내지 10 개의 탄소를 가지는 모노시클릭 시클로알킬일 수 있다. 보다 더 구체적인 일 실시예로, 상기 A는 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 시클로헥실일 수 있다. 다만, 상기 A는 이에 제한되지 않는다.
- [125] 4) 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴
- [126] 상기 A는 일 실시예로, 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴일 수 있다. 상기 A는 구체적인 일 실시예로, 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 피롤리딘, 크로만일 수 있다. 보다 더 구체적인 일 실시예로, 상기 A는 옥시카르보닐, C1~5 알킬 및 =O로부터 선택된 하나 이상으로 치환된 피롤리딘일 수 있다. 또 다른 구체적인 일 실시예로, 상기 A는 C1~5 알킬, 히드록실로부터 선택된 하나 이상으로 치환된

크로만-2-일(chroman-2-yl)일 수 있다. 상기 A는 구체적인 일 실시예로,
또는 일 수 있다.



[127] 3. L의 구조

[128] 상기 화학식 1에서 상기 L은 특정한 길이를 갖는 구조일 수 있다. 일 실시예로, 알킬, 알케닐, 알키닐 및/또는 에틸렌옥시를 포함하는 구조일 수 있다. 구체적인 일 실시예로, 상기 L은 $(CH_2)_n$ 을 포함하는 구조일 수 있다. 이때, 상기 n은 일 실시예로, 7이상 40이하의 정수일 수 있다. 상기 n은 본 출원의 화합물에서 연결부 또는 링커의 길이를 결정하는 요소로서, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물이 TRAP1에 결합하는데 중요한 역할을 할 수 있다.

[129] 다만, 상기 L의 구조는 이에 제한되지 않는다. 이때, 상기 L의 길이는 일 실시예로, 10, 15, 20 또는 25 앙스트롬 이상인 구조일 수 있다. 이때, 일 실시예로, 상기 L의 길이는 최대값으로 50, 60, 70, 80 또는 90 앙스트롬인 구조일 수 있다. 다만, L 길이의 최대값은 이에 제한되지 않는다. 상기 L은 일 실시예로, 상기 길이를 갖는 알킬, 알케닐, 알키닐 및/또는 에틸렌옥시를 포함하는 구조일 수 있다. 구체적인 일 실시예로, 상기 L은 상기 길이를 갖는 알킬구조일 수 있다.

[130] 1) TPP로부터의 거리에 따른 결합능

[131] 도2의 TRAP1 MitoQ(본 명세서에서 SMX와 상호교환적으로 사용됨)의 결합 결정구조를 참조하면, TRAP1의 두개의 protomer사이의 거리가 약 25Å으로 MitoQ의 Ub모이어티와 TPP 모이어티간의 거리가 적당해야 효과적인 결합이 가능함을 확인할 수 있다. 또한, 더 나아가 알킬-TPP(알킬-TPP의 구조는 도3에 나타냄) 실험 결과를 참고하면, octyl-TPP부터 SB-TM2와의 경쟁적 결합이 가능함을 확인할 수 있다.

[132] 즉, 본 출원의 화합물 구조에서, TPP에 결합된 알킬 체인(CH_2)_n의 길이가 C8이상의 크기를 가지게 되면, 상기 화합물은 TRAP1에 효과적으로 결합할 수 있다. 보다 구체적으로 TPP에 결합된 알킬 체인의 길이가 C8이상의 크기를 가지게 되면, 상기 화합물은 TRAP1의 CBS(client binding site)에 결합할 수 있다. 또한, 이러한 결합력은 TPP와의 거리가 늘어날 수록, 예를 들어, 알킬 체인의 길이가 증가할수록 결합력이 증가한다. 일 구체예에서, 추가적으로, SMX(MitoQ)와의 결합력을 비교하면, dodecyl-TPP, tetradecyl-TPP, hexadecyl-TPP 결합력이 SMX 대비 우수한 것으로 나타난다. 또한, 일 실시예에서, 특별히 알킬 체인의 길이가 가장 긴 hexadecyl-TPP에서 SMX 대비 2배 강한 결합력을 확인하였다(표1 및 도4 참고).

[133] [표1]

알킬-TPP의 TRAP1 결합력 분석 결과

IC ₅₀ (μM), SB-TM2를 이용한 FP 분석		
Drug	IC ₅₀	SMX 대비 활성
TPP-1	N.D.	N.D.
TPP-2	N.D.	N.D.
TPP-4	N.D.	N.D.
TPP-6	18.85 ± 5.39	0.03
TPP-8	2.572 ± 0.258	0.24
TPP-10	0.6931 ± 0.0578	0.90
TPP-12	0.3769 ± 0.0354	1.65
TPP-14	0.3835 ± 0.0392	1.62
TPP-16	0.3091 ± 0.0260	2.01
SMX	0.6227 ± 0.0375	1

[134] 2) 항산화제-TPP 컨쥬게이트

[135] 항산화제와 TPP가 결합된 컨쥬게이트(MitoQ, Mito-CP, SkQ1, Mito-VitE^L, Mito-TEMPO, MitoQ^s, Mito-VitE, Mito-CP^s의 구조는 도5에 나타냄)를 이용한 실험 결과를 참고하면, 짧은 링커를 가지는 Mito-TEMPO, Mito-CP^s Mito-VitE는 TRAP1 결합력이 없는 것을 확인할 수 있다(표2 및 도6 참고). 즉, 링커의 적당한 거리가 TRAP1의 결합에 필수적임을 확인할 수 있다.

[136] [표2]

항산화제-TPP 컨쥬게이트의 TRAP1 결합력 분석 결과

IC ₅₀ (μM), SB-TM2를 이용한 FP 분석		
Drug	IC ₅₀	SMX 대비 활성
SkQ1	0.6959 ± 0.0554	1.18
Mito-CP	1.074 ± 0.0818	0.77
Mito-VitE ^L	0.9187 ± 0.0714	0.90
Mito-TEMPO	N.D.	N.D.
Mito-CP ^s	N.D.	N.D.
Mito-VitE	N.D.	N.D.
SMX	0.824 ± 0.0512	1

[137] 3) 기타 합성 화합물

[138] n이 10인 기타 화합물(합성 물질들의 구조는 도7에 나타냄)을 이용한 결합 실험 결과를 참고하면, TPP와 다양한 화합물 구조가 특정한 길이를 갖는 탄화수소를 통해 연결된 경우 TRAP1에 대해 결합력을 가지는 것을 확인할 수 있다(표3, 4 및 도8 참고).

[139] [표3]
기타 합성 화합물의 TRAP1 결합력 분석 결과

IC ₅₀ (μM), SB-TM2를 이용한 FP 분석		
Drug	IC ₅₀	SMX 대비 활성
SB-U005	0.3853 ± 0.0835	2.051907604
SB-U009	0.9086 ± 0.1363	0.87012987
SB-U011	0.6838 ± 0.0729	1.156186019
SB-U012	0.6010 ± 0.0906	1.31547421
SMX	0.7906 ± 0.0512	1

[140] [표4]
기타 합성 화합물의 TRAP1 결합력 분석 결과

IC ₅₀ (μM), SB-TM2를 이용한 FP 분석		
Drug	IC ₅₀	SMX 대비 활성
SB-U014	0.8046 ± 0.0994	0.50
SB-U015	1.835 ± 0.2849	0.22
SB-K001	0.1658 ± 0.0230	2.45
SB-B001	2.966 ± 1.055	0.14
SB-B002	0.1451 ± 0.13	2.80
SMX	0.4063 ± 0.0389	1

[141] 즉, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물이 TRAP1에 결합하는데 중요한 것은 n이 최소한 7이상의 정수를 가진다는 것이다. 또한, n 값이 증가할수록 TRAP1 결합력이 증가하는 것을 확인할 수 있고, 이에 따라, n은 일 실시예로, 최대 20, 30, 40 또는 50의 정수를 가질 수 있다. 다만, n의 최대값은 이에 제한되지 않는다.

[142] **4. 화학식 1의 염**

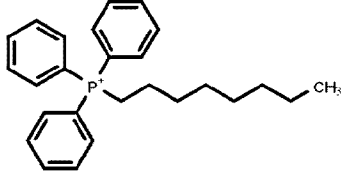
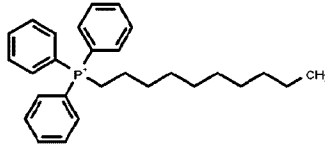
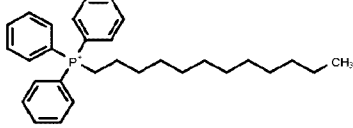
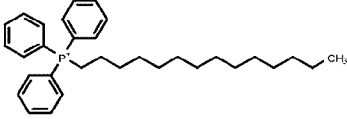
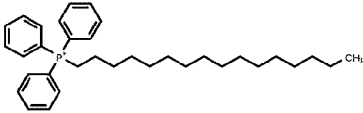
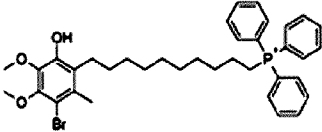
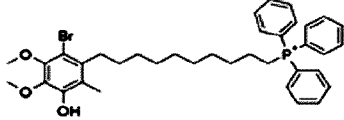
[143] 본 명세서에서 개시되는 화합물은 이의 염의 형태가 고려될 수 있다. 이때, 염은 제약상 허용가능한 염을 포함한다. 본 명세서에서 개시되는 염은 산 부가염(acid addition salt) 또는 염기 부가염(basic addition salt)을 포함한다. 상기 염을 형성하는 예시적인 산은 염산, 황산, 인산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 시트르산, 숙신산, 글루타르산 등을 포함하고, 염을 형성하는 예시적인 염기는

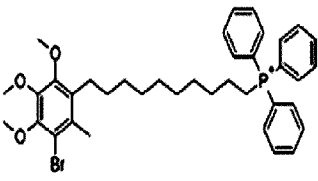
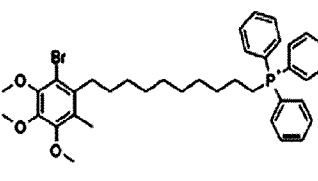
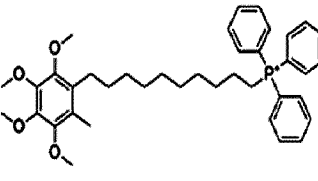
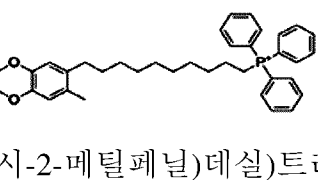
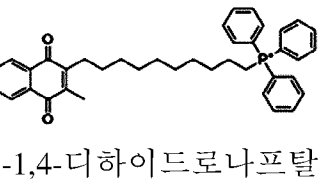
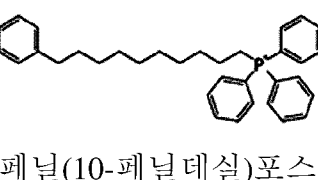
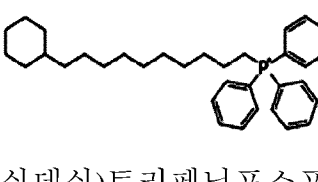
리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 메틸아민, 트리메틸 아민 등을 포함한다.
다만, 이에 제한되지 않고 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다.

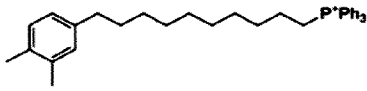
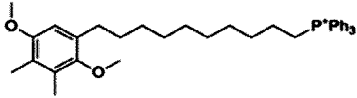
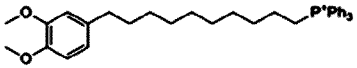
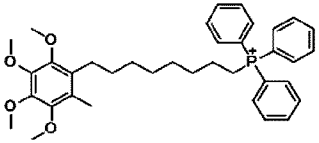
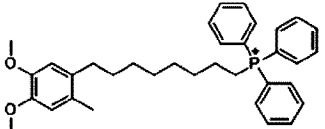
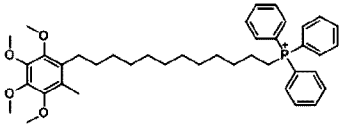
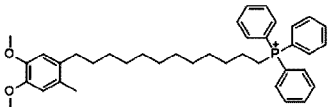
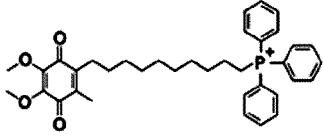
[144] 5. 구체적인 화합물의 예시

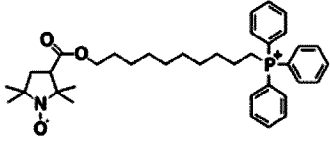
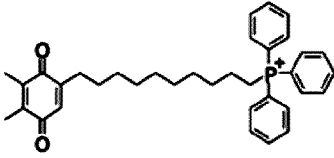
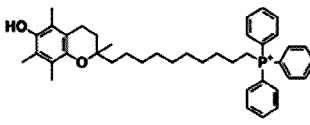
[145] [표5]

본 명세서에서 개시하는 화합물의 구체적인 예시

No.	화합물 명
1	 <p>옥틸트리페닐포스포늄</p>
2	 <p>데실트리페닐포스포늄</p>
3	 <p>도데실트리페닐포스포늄</p>
4	 <p>테트라데실트리페닐포스포늄</p>
5	 <p>헥사데실트리페닐포스포늄</p>
6	 <p>(10-(3-브로모-4,5,6-트리메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄</p>
7	 <p>(10-(2-브로모-5-히드록시-3,4-디메톡시-6-메틸페닐)데실)트리페닐포</p>

	스포늄
8	 <p>(10-(3-브로모-4,5,6-트리메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄</p>
9	 <p>(10-(2-브로모-3,4,5-트리메톡시-6-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄</p>
10	 <p>트리페닐(10-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)데실)포스포늄</p>
11	 <p>(10-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄</p>
12	 <p>(10-(3-메틸-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일)데실)트리페닐포스포늄</p>
13	 <p>트리페닐(10-페닐데실)포스포늄</p>
14	 <p>(10-사이클로헥실데실)트리페닐포스포늄 클로라이드</p>

15	 <p>(10- (3, 4-디메틸 페닐)데실)트리페닐포스포늄</p>
16	 <p>10-(2,5-디메톡시-3,4-디메틸-페닐)데실-트리페닐-포스포늄</p>
17	 <p>(10- (3, 4-디메톡시페닐) 데실) 트리페닐포스포늄</p>
18	 <p>트리페닐(8-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)옥틸)포스포늄</p>
19	 <p>(8-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)옥틸)트리페닐포스포늄</p>
20	 <p>트리페닐(12-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)도데실)포스포늄</p>
21	 <p>(12-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)도데실)트리페닐포스포늄</p>
22	 <p>(10-(4,5-디메톡시-2-메틸-3,6-디옥소시클로헥사디엔-1-일)데실)트리페닐포스포늄</p>

23	 <p>2,2,5,5-테트라메틸-3-(((10-(트리페닐포스포니오)데실)옥시)카르보닐)피롤리딘-1-올레이트</p>
24	 <p>(10-(4,5-디메틸-3,6-디옥소시클로헥사-1,4-디엔-1-일)데실)트리페닐포스포늄</p>
25	 <p>(10-(6-히드록시-2,5,7,8-테트라메틸크로만-2-일)데실)트리페닐포스포늄</p>

[146]

[147] **II. 화학식 1의 화합물의 용도**[148] **1. TRAP1 억제**

[149] 본 명세서에서 개시하는 일 발명은, 상기 설명한 화합물의 TRAP1을 억제하는 용도를 제공한다.

[150] 본 명세서에서 개시하는 화합물은 TRAP1에 결합하여 TRAP1의 기능을 억제함을 통해, SDHB, SIRT3의 발현을 감소시킨다. 또한, 추가적으로 TRAP1 억제의 마커로 알려진 p-AMPK, CHOP(Control of tumor bioenergetics and survival stress signaling by mitochondrial Hsp90s. Cancer cell 22, 331-344, Mitochondrial Hsp90s suppress calcium-mediated stress signals propagating from mitochondria to the ER in cancer cells. Molecular cancer 13, 148. 참고)를 증가시킨다(도10, 12, 13, 15 및 17 참고).

[151] 본 명세서에서 제공하는 화합물은 ATP-pocket-binding-site에 결합하는 것으로 알려진 PU-H71과 달리, TPP-alkyl의 경우 농도 의존적으로 ATPase의 활성을 억제하지 않는다. 즉, 본 명세서에서 제공하는 화합물은 ATPase 활성 억제와는 관련이 없다. 또한, 추가적으로, 본 명세서에서 제공하는 화합물은 ATP binding site에 결합하지 않는다. 이는 본 발명의 일 실시예에서, ATP pocket 결합력 분석을 통해 확인하였다(도9, 11 및 14 참고).

[152] 이에 따라, 본 명세서에서 제공하는 화합물은 TRAP1에 결합하여, TRAP1을

- 억제할 수 있다. 보다 더 구체적으로, 본 명세서에서 제공하는 화합물은 TRAP1의 ATP binding site에 결합하지 않고 TRAP1을 억제할 수 있다.
- [153] 즉, 본 명세서는 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 TRAP1 억제제를 제공할 수 있다. 이때, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 ATP binding site에 결합하지 않는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [154] 또한, 본 명세서는 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 TRAP1 억제제 제조에 이용할 수 있다.
- [155] **2. TRAP1과 클라이언트 단백질 결합의 억제**
- [156] 상기 화합물은 TRAP1의 중단 단위체에 결합함을 통해 TRAP1의 활성을 억제할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 화합물은 TRAP1의 Client binding site에 결합하고, ATP binding site에는 결합하지 않으면서 TRAP1의 활성을 억제한다.
- [157] 본 발명자들은 이를 확인하기 위해, TRAP1과 MitoQ의 결합 구조를 분석하여 Client binding site에 결합하는 형광 프로브를 제작한 후, 이를 이용하여 화합물들의 결합력을 분석하였다(도1, 2, 4, 6 및 8 참고). 실험 결과를 참고하면, TPP-알킬, 항산화제-TPP 컨쥬게이트 및 기타 화합물 모두 TRAP1의 Client binding site에 결합하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 더 나아가, ATPase 활성 분석, ATP binding site 결합여부 확인 및 세포질 Hsp90의 억제 여부 확인 결과, 본 명세서의 화합물은 ATP binding site에 결합하지 않고, TRAP1의 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도9, 11 및 14 참고).
- [158] 또한, 구체적으로, 본 명세서의 화합물은 세포질 Hsp90의 클라이언트 단백질(Akt, Cdk4), Hsp90 억제의 마커인 Hsp70(Evidence for Efficacy of New Hsp90 Inhibitors Revealed by Ex Vivo Culture of Human Prostate Tumors. *Clinical Cancer Research* 18, 3562-3570. 참고)에 영향을 주지 않고, TRAP1만을 선택적으로 억제한다(도10, 12, 13, 15 및 17 참고).
- [159] 즉, 본 명세서의 화합물은 TRAP1의 중단 단위체에 결합하고, ATP가 결합되어 Hsp90s의 활성을 위한 에너지를 생산하는 N-말단 부위에는 영향을 주지 않는다.
- [160] 이에 따라, 본 명세서에서 제공하는 화합물은 TRAP1의 중단 단위체에 결합하여 중단 단위체에 결합하는 것으로 알려져 있는 클라이언트 단백질의 결합을 억제할 수 있다. 즉, 본 명세서의 화합물은 TRAP1과 클라이언트 단백질의 결합을 억제하는데 이용될 수 있다.
- [161] 본 명세서에서는 화학식1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 TRAP1 - 클라이언트 단백질 결합 억제제를 제공할 수 있다.
- [162] 본 명세서에서는 화학식1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 TRAP1-클라이언트 단백질 결합 억제제 제조에 이용할 수 있다.
- [163] **3. 약학적 조성물**
- [164] 본 명세서에서 제공하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약학적

조성물로 이용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서는 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 명세서에서는 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 약학적 조성물 제조에 이용할 수 있다.

- [165] 상기 약학적으로 허용되는 염은 여러가지 생리적으로 허용가능한 유기 및 무기 반대 이온으로부터 유래하는 화합물의 염을 포함한다. 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, 캄포르황산, 시트르산, 엠본산(embonic acid) (파모산), 에탄설포산, 포름산, 푸마르산, 푸로산, 갈락투론산, 겐티신산, 글루콘산, 글루쿠론산, 글루탐산, 글리콜산, 이소니코틴산, 이소티온산, 란트산, 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 부가 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.
- [166] 상기 약학적 조성물은 TRAP1의 억제를 통해 치료될 수 있는 질병을 치료하는데 이용될 수 있다.
- [167] 상기 질병은 일 실시예로, 암을 포함한다. 상기 TRAP1은 암과 연관성이 있음이 많이 알려져 있고, TRAP1이 암 치료의 타겟이 될 수 있다(Regulation of Tumor Cell Mitochondrial Homeostasis by an Organelle-Specific Hsp90 Chaperone Network,

2007, Kang et al; Control of Tumor Bioenergetics and Survival Stress Signaling by Mitochondrial Hsp90s, 2012, Chae et al; The mitochondrial chaperone TRAP1 as a candidate target of oncotherapy, 2001, Xie et al; TRAP1: a viable therapeutic target for future cancer treatments, 2017, Lettini et al. 참고). 또한, 실험 결과를 참고하면, 본 명세서에서 제공하는 화합물은 암세포에서 TRAP1을 억제하고 이를 통해, 암의 크기를 줄이는 것을 확인할 수 있다.

- [168] 이에 따라, 본 명세서의 화합물은 암 치료를 위한 약학적 조성물의 제조에 이용될 수 있다.
- [169] 본 명세서는 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [170] 이때, 상기 암은 갑상선암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 간암, 전립선암, 췌장암, 담낭암, 담도암 등을 포함할 수 있다. 다만, 상기 질병은 암에 제한되지 않고, TRAP1과 관련되어 있음이 공지되어 있는 모든 질병을 포함한다.
- [171]
- [172] 또한, 상기 질병은 일 실시예로, 안과 질환을 포함한다. 이때, 상기 안과질환은 맥락막 신생혈관형성 질환, 망막 신생혈관형성 질환, 망막하 신생혈관형성 질환, 각막 신생혈관형성 질환, 홍채 신생혈관형성 질환 또는 신생혈관 녹내장인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안과 질환을 포함한다. 또한, 상기 신생혈관형성성 안과 질환은 망막 신생혈관형성 질환을 의미할 수 있고, 상기 망막 신생혈관형성 질환은 당뇨망막병증, 미숙아망막병증 또는 망막정맥폐쇄인 것을 특징으로 하는 신생혈관형성성 안과 질환을 의미할 수 있다. 추가적으로, 상기 맥락막 신생혈관형성 질환은 노인성 습식 황반변성(wet AMD)을 의미할 수 있다.
- [173] **1) 안과질환**
- [174] 본 명세서에 기재된 안과질환은 이상이 발생하는 안구 구조에 따라 분류될 수 있다. 이때, 상기 안구 구조는 결막, 공막, 각막, 홍채, 모양체, 수정체, 맥락막, 망막, 유리체, 시신경 또는 안근육을 포함하는 안구 구성요소 일 수 있다. 이 때, 상기 구조 중에서 망막에 발생하는 안과 질환은 망막증 또는 망막병증(retinopathy)으로 호칭된다.
- [175] 또한, 안과 질환은 신생혈관형성(neovascularization) 여부에 따라 분류될 수 있다. 상기 신생혈관형성은 기형성된 혈관의 주변에 새로운 혈관들이 형성되는 신체적 현상을 말한다. 상기 신생혈관형성은 비정상적인 혈관 약화, 허혈, 또는 신생혈관형성 인자의 과다 생성에 의해 비정상적으로 발생할 수 있다. 이때, 비정상적인 신생혈관형성으로 인해 혈관 구조가 밀집되고 혈관이 충분히 두껍게 성장하지 못함으로써, 혈관의 압력이 상승하고 혈관이 안구 구조로부터 분리되는 등 이상 증상이 발생할 수 있다.
- [176] 상기 신생혈관형성과 관련된 안과 질환은 맥락막 신생혈관형성 (choroidal neovascularization), 망막 신생혈관형성 (retinal neovascularization), 망막하

신생혈관형성 (subretinal neovascularization), 각막 신생혈관형성 (corneal neovascularization) 또는 홍채 신생혈관형성 (Rubeosis iridis; iris neovascularization)을 포함한다. 또한, 상기 망막 신생혈관형성은 당뇨망막병증 (diabetic retinopathy), 미숙아망막병증 (retinopathy of prematurity) 또는 망막정맥폐쇄 (retinal vein occlusion) 등을 야기할 수 있다. 추가적으로, 망막하 신생혈관형성은 습식 나이관련황반변성 (wet age-related macular degeneration; wet AMD)을 야기할 수 있다.

[177] 본 명세서에서 안과질환 치료 용도의 안과질환은 상기 기재된 신생혈관형성과 관련된 안과질환을 의미할 수 있다.

[178] **2) 안과질환과 TRAP1의 연관성**

[179] **망막병증 모델에서 TRAP1 발현**

[180] 안과질환과 TRAP1의 연관성을 확인하기 위해, 망막병증 모델을 이용하여 TRAP1의 발현량을 확인하였다.

[181] 실험 결과를 참고하면 산소 유도 망막병증(oxygen-induced retinopathy) 모델과, STZ(streptozotocin) 유도 당뇨병성 망막병증 모델에서 모두 TRAP1의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있다(도18,19 참고).

[182] 즉, 안과질환과 TRAP1 발현의 증가는 연관성이 있는 것을 확인할 수 있다.

[183] 또한, 산소 유도 망막병증(oxygen-induced retinopathy) 모델과, STZ(streptozotocin) 유도 당뇨병성 망막병증 모델에서 TRAP1의 증가와 함께, 저산소 마커 HIF1 α , 하위 신생혈관 인자 VEGF-A가 증가되는 것을 확인할 수 있다(도18a, 19a 참고). 또한, 염색 결과 TRAP1이 망막병증 질환 진행 동안 다양한 혈관 신생 인자의 생성을 담당하는 뮐러 세포(Muller cells)의 마커인 GS(glutamine synthase)의 염색과 함께 위치하는 것을 확인할 수 있다(도18c, 19c 참고).

[184] 즉, 해당 결과를 통해 저산소 환경으로 인해 뮐러 세포에서 TRAP1의 발현이 증가된다는 것을 확인할 수 있다.

[185] **망막병증 모델에서 TRAP1 녹아웃**

[186] 실험결과를 참고하면, TRAP1을 녹아웃시킨 OIR 모델의 경우 신생혈관 영역 및 무혈관 영역이 감소된 것을 확인할 수 있다(도20 참고).

[187] 즉, TRAP1을 억제하는 경우 병리적 망막 혈관 신생을 개선할 수 있음을 나타낸다.

[188] 또한, 추가적으로 망막의 HIF1 α 염색 결과를 참고하면, STZ 또는 OIR 모델에서 TRAP1 녹아웃된 경우에 HIF1 α 가 감소함을 확인할 수 있다(도21 참고).

[189] 즉, TRAP1을 억제하는 경우 HIF1 α 를 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있다.

[190] 또한, VEGF-A 및 ANGPTL4 발현결과를 참고하면, VEGF-A 및 ANGPTL4의 mRNA 수준은 Con TRAP1+/+에 비해 STZ TRAP1 +/+에서 상승했지만 STZ-TRAP1-/-에서는 상승하지 않았다. 즉, TRAP1이 억제되면 VEGF-A 및 ANGPTL4의 발현이 증가하지 않음을 알 수 있다(도 22a 참고).

- [191] 추가적으로, OIR 모델 망막에서 TRAP1 +/+와 비교하여 VEGF-A 및 ANGPTL4의 mRNA 수준은 TRAP1+/- 및 TRAP1-/-에서 감소했다. 즉, TRAP1이 억제되면, VEGF-A 및 ANGPTL4의 발현이 감소됨을 알 수 있다(도 22b 참고).
- [192] 결론적으로, TRAP1의 억제는 HIF1 α 를 불안정하게 하여 저산소 상태에서 망막병증을 유발하는 다양한 혈관 신생 인자를 감소시킨다고 할 수 있다.
- [193] **TRAP1 억제제와 망막병증**
- [194] TRAP1 억제제를 처리하면 망막의 무혈관 및 신생혈관 영역을 감소시킬 수 있다. 실험결과를 참고하면, MitoQ를 처리한 경우 OIR 모델의 망막에서 무혈관 및 신생혈관 영역 모두를 현저하게 감소시키는 것을 확인할 수 있다. 이는 MitoQ가 TRAP1을 억제함을 통해 비정상적인 혈관 신생을 억제하고, 정상적인 혈관 신생을 자극하여 혈관 질환의 발병을 억제하는 것임을 확인할 수 있다. 이러한 실험 결과는 MitoQ가 유리 체내 주사된 경우와 안약으로 투여된 경우에 동일하게 나타났다. 이는 안약 적용의 경우에도 효과적으로 조직에 침투하여 효과를 나타낸다는 것을 보여준다(도23,24 참고).
- [195] 추가적으로, 다른 TRAP1 억제제 화합물이 망막병증 치료에 적용될 수 있는지 확인하기 위해, 상기 화합물들이 HIF1 α 를 억제할 수 있는지 확인하였다. 그 결과, TRAP1을 억제하는 것으로 확인된 알킬-TPP, TPP-항산화제 킨쥬게이트(적당한 길이의 링커 가지는 경우) 및 기타 합성 화합물들이 모두 HIF1 α 억제 활성을 가지는 것을 확인하였다(도25-27 및 표6-9 참고).
- [196] [표6]
알킬-TPP의 HIF1 α 억제 활성

IC ₅₀ (μ M), MIO-M1세포에서 HIF1 α 억제활성		
Drug	IC ₅₀	SMX 대비 활성
TPP-1	N.D.	N.D.
TPP-2	N.D.	N.D.
TPP-4	N.D.	N.D.
TPP-6	1.431 \pm 5.39	0.33
TPP-8	0.6427 \pm 0.258	0.73
TPP-10	0.3138 \pm 0.0578	1.49
TPP-12	0.1110 \pm 0.0354	4.21
TPP-14	0.0340 \pm 0.0392	13.76
TPP-16	0.0300 \pm 0.0260	15.59
SMX	0.4678 \pm 0.0151	1

[197] [표7]

TPP-항산화제 컨쥬게이트의 HIF1 α 억제 활성

IC ₅₀ (μ M), MIO-M1세포에서 HIF1 α 억제활성		
Drug	IC ₅₀	SMX 대비 활성
SkQ1	0.1827 \pm 0.0091	1.79
Mito-CP	0.2967 \pm 0.0236	1.10
Mito-VitE ^L	0.1424 \pm 0.0088	2.30
Mito-TEMPO	N.D.	N.D.
Mito-CP ^S	N.D.	N.D.
Mito-VitE	N.D.	N.D.
SMX	0.3269 \pm 0.0229	1

[198] [표8]

기타 합성 화합물의 HIF1 α 억제 활성

IC ₅₀ (μ M), MIO-M1세포에서 HIF1 α 억제활성		
Drug	IC ₅₀	SMX 대비 활성
SB-U005	0.131 \pm 0.0091	3.92
SB-U009	0.1912 \pm 0.0236	2.69
SB-U011	0.0853 \pm 0.0088	6.02
SB-U012	0.1771 \pm 0.0088	2.90
SMX	0.5137 \pm 0.0552	1

[199] [표9]

기타 합성 화합물의 HIF1 α 억제 활성

IC ₅₀ (μ M), MIO-M1세포에서 HIF1 α 억제활성		
Drug	IC ₅₀	SMX 대비 활성
SB-U014	0.0694 \pm 0.0031	4.02
SB-U015	0.0887 \pm 0.0058	3.14
SB-K001	0.0555 \pm 0.0033	5.03
SB-B001	0.0947 \pm 0.0132	2.95
SB-B002	0.0223 \pm 0.0010	12.51
SMX-R	0.2141 \pm 0.0093	1.30
SMX	0.2789 \pm 0.0170	1

[200] 3) 안과질환 치료를 위한 약학적 조성물

[201] 본 명세서는 TRAP1억제제를 포함하는 안과질환 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다. 상기 TRAP1 억제제는 화학식1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 또한, 본 명세서는 TRAP1 억제제를 안과질환 치료용 약학적 조성물 제조에 이용하는 용도를 제공한다. 구체적으로, 본 명세서는 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 안과 질환 치료용 약학적 조성물 제조 용도를 제공한다. 상기 기재한 것과 같이, 안과질환은 TRAP1과 연관되어 있다. 또한, 상기 TRAP1을 억제하면 HIF1 α 를 불안정하게 하여 저산소 상태에서 망막병증을 유발하는 다양한 혈관 신생 인자를 감소시킬 수 있다는 것을 실험 결과를 통해 확인하였다. 이에 따라, TRAP1을 억제함을 통해 안과질환이 치료될 수 있다.

[202] 4. 치료 방법

[203] 본 명세서에서 제공하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되어 특정 질병을 치료하는데 이용될 수 있다. 즉, 본 명세서는 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 특정 질병 치료 방법을 제공한다.

[204] 상기 질병은 TRAP1의 억제를 통해 치료가능한 질병을 모두 포함한다. 상기 질병은 일 실시예로, 암을 포함하지만, 이에 제한되지 않고, TRAP1과 관련되어 있음이 공지되어 있는 모든 질병을 포함한다. 이때, 상기 암은 갑상선 암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 간암, 전립선암, 췌장암, 담낭암, 담도암 등을 포함할 수 있다.

[205] 또한, 구체적인 일 실시예로, 본 명세서에서 제공하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 안과 질환 치료 방법을 제공한다. 이때, 상기 안과 질환은 "3. 약학적 조성물 1) 안과 질환"에 기재된 모든 안과 질환을 포함한다.

[206] 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것은 다양한 경로를 통해 수행될 수 있다. 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 폐서리, 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. 일 실시예로, 상기 약학적 조성물은 경구 투여될 수 있다. 또 다른 일 실시예로, 상기 약학적 조성물은 안약을 이용하여 국소적 투여될 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

- [207] 상기 대상체는 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 바람직할 수 있다. 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 주사가능한 유기 에스테르와 같은 기타 용매 또는 운반체를 포함한다.
- [208] 약학적 조성물의 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.
- [209] 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.
- [210] 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.
- [211] 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).
- [212] 특정 실시예에서, 본 명세서에서 제공하는 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.

- [213] 특정 실시예에서, 본 명세서에서 제공하는 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 명세서의 화합물 및 하나 이상의 추가적인 치료제의 개별 투여의 효과의 각각을 합한 것을 의미한다.

[214]

[215] III. 실험예

[216] 1. 화합물 합성

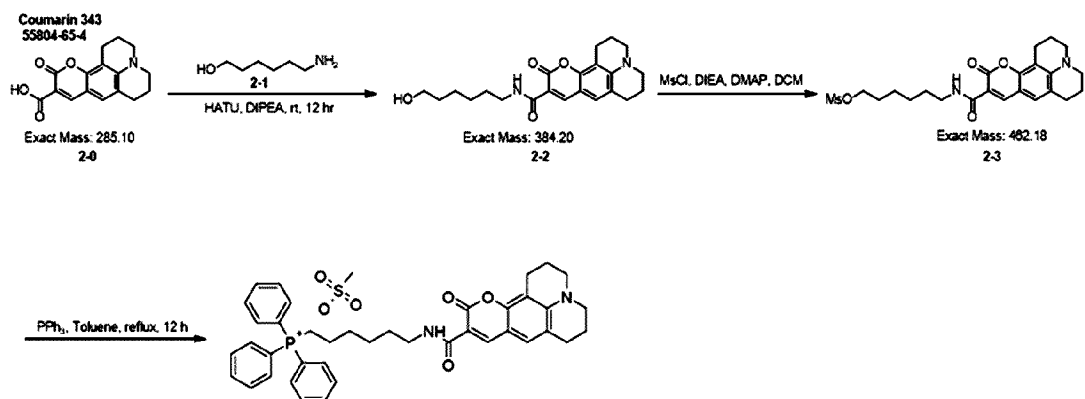
- [217] 본 발명자들은 화합물들의 TRAP1 결합력을 확인하기 위해 TRAP1에 결합하는 형광 프로브인 SB-TM2를 제작하였고, 이외에 실험에 사용하기 위한 화합물들을 합성 및 구입하였다.

- [218] 메틸트리페닐포스포늄 브로마이드(Alfa Aesar (Cat.# A15878)), 에틸트리페닐포스포늄 브로마이드(Alfa Aesar (Cat.# B23096)), 부틸트리페닐포스포늄 브로마이드(Alfa Aesar (Cat.# A10504)), 헥실트리페닐포스포늄 브로마이드(Alfa Aesar (Cat.# A13826)), 옥틸트리페닐포스포늄 브로마이드(Alfa Aesar (Cat.# L02412)), 데실트리페닐포스포늄 브로마이드(Alfa Aesar (Cat.# A11021)), 도데실트리페닐포스포늄 브로마이드(Alfa Aesar (Cat.# A14295)), 테트라데실트리페닐포스포늄 브로마이드(Alfa Aesar (Cat.# L04311)), 헥사데실트리페닐포스포늄 브로마이드(Alfa Aesar (Cat.# A15180)), MitoQ(BioVision, Cat #: B1309), SkQ1(MedchemExpress Cat. #: HY-100474) 및 Mito-TEMPO(SIGMA Cat #: SML0737)를 구입하여 실험에 사용하였다.

- [219] 1-1. SB-TM2 probe 합성

- [220] SB-TM2: 6-(11-옥소-2,3,5,6,7,11-헥사하이드로-1H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-10-카르복사미도)헥실)트리페닐포스포늄 메탄 설페이트.

[221]



- [222] 단계 A.
N-(6-하이드록시헥실)-20-옥소-27-옥사-23-아자테트라사이클로헵타데카-(14),1(16),15(18),17(19)-테트라엔-16-카르복사미드
- [223] DMF (30 mL) 내 화합물
14-옥소-20-옥사-16-아자테트라사이클로헵타데카-(8),1(10),9(12),11(13)-테트라엔-10-카르복실산(376.5 mg, 1.31 mmol), 6-아미노헥산-1-올 (170.12 mg, 1.38 mmol), HATU (602.15 mg, 1.58 mmol)의 용액에 DIPEA (511.67 mg, 3.95 mmol)가 첨가되었고, 이어서 25 °C에서 12 시간 동안 교반되었다. LCMS는 스타팅 물질이 소모되고 원하는 생성물이 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 60 mL의 H₂O에 부어지고, 이어서 에틸 아세테이트(50 mL x 2)로 추출되었다. 합한 에틸 아세테이트가 포화된 염수(50 mL x 2)로 세척되고, Na₂SO₄상에서 건조되었다. 유기층이 증발 건조되어 조생성물이 노란 폼으로 제공되었고, 이는 컬럼 크로마토그래피(SiO₂, Petroleum ether/ EtOAc = 1:0 to 1:4)로 정제되어 원하는 생성물은 노란색 폼으로(465 mg, 1.17 mmol, 92.4% yield) 얻어졌다.
- [224] MS (ESI): mass calcd. for C₂₂H₂₈N₂O₄, 384.2; m/z found, 385.2 [M+H]⁺.
- [225] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.36 - 1.50 (m, 4 H), 1.51 - 1.72 (m, 4 H), 1.92 - 2.06 (m, 4 H), 2.78 (t, J=6.0 Hz, 2 H), 2.90 (t, J=6.3 Hz, 2 H), 3.28 - 3.39 (m, 4 H), 3.45 (q, J=6.8 Hz, 2 H), 3.65 (t, J=6.5 Hz, 2 H), 7.02 (s, 1 H), 8.61 (s, 1 H), 8.88 (br s, 1 H).
- [226] 단계 B. 6-[(21-옥소-29-옥사-24-아자테트라사이클로헵타데카-1(15),2(17),16(19),18(20)-테트라엔-17-카르보닐)아미노]헥실 메탄설포네이트
- [227] N-(6-하이드록시헥실)-20-옥소-27-옥사-23-아자테트라사이클로헵타데카-(14),1(16),15(18),17(19)-테트라엔-16-카르복사미드 (400 mg, 1.04 mmol)가 DCM (25 mL)에 용해되었고 이어서 DMAP (1.27 mg, 10.40 μmol) 및 DIEA (1.34 g, 10.40 mmol)가 첨가되었고 생성된 혼합물이 0 °C로 냉각되었다. MsCl (106 mg, 9.25 mmol)가 적가되고 이어서 2시간동안 0 °C에서 교반되었다. TLC (petroleum ether : EtOAc = 1:1, R_f = 0.43)는 스타팅 알코올이 소모되고 하나의 주요한 새로운 스팟이 형성되었음을 보여주었다. 혼합물이 디클로로메탄(35 mL) 및 sat. aq. NaHCO₃ (35 mL) 사이에 분배되었다. 유기층이 수집되었고, Na₂SO₄ 상에서 건조되고, 여과되고 진공 하에서 농축되어 조생성물을 노란색 고체로 얻었다. HNMR은 다음 단계 반응을 위해 충분히 순수함을 보여주었다.
- [228] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.36 - 1.56 (m, 4 H), 1.60 - 1.85 (m, 4 H), 1.99 (m, 4 H), 2.78 (m, 2 H), 2.90 (m, 2 H), 3.01 (s, 3 H), 3.26 - 3.39 (m, 4 H), 3.44 (q, J=6.6 Hz, 2 H), 4.23 (t, J=6.5 Hz, 2 H), 7.02 (s, 1 H), 8.61 (s, 1 H), 8.88 (br d, J=4.9 Hz, 1 H).
- [229] 단계 C. (6-(11-옥소-2,3,5,6,7,11-헥사하이드로-1H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-10-카르복사미도)헥실)트리페닐포스포늄 메탄 설포네이트
- [230] 6-[(21-옥소-29-옥사-24-아자테트라사이클로헵타데카-1(15),2(17),16(19),18(20)-테트라엔-17-카르보닐)아미노]헥실 메탄 설포네이트 (97 mg, 203.41 μmol)가 완전히 5 mL의 톨루엔(5 mL) 내 트리페닐포스포산 (266.76 mg, 1.02

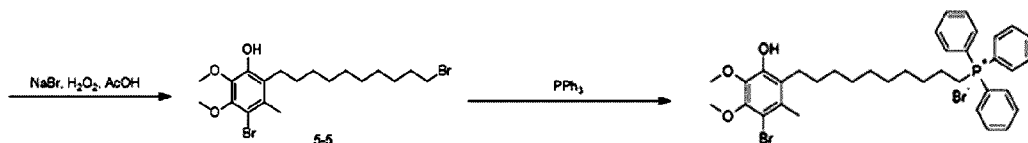
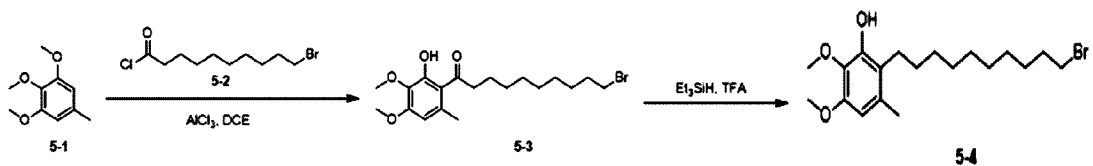
mmol)과 혼합되었고, 이어서 생성된 용액이 N₂하에 130 °C에서 18 시간동안 교반되었다. LCMS는 설포네이트가 소모되고 원하는 생성물이 주요 구성물질로 생성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 실온에서 냉각되고 증발 건조되었다. TLC (DCM : MeOH = 10:1, R_f = 0.24)는 OPPh₃ 아래에 하나의 주요한 새로운 스팟이 형성되었음을 보여주었다. 상기 조생성물은 실리카겔 상에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(먼저 20분에 걸쳐 50-100% EtOAc in petroleum 로 용리하고 원하는 생성물 위의 모든 불순물을 제거하기 위해 15분 동안 100% 유지하고, 이어서 20분에 걸쳐 0-10% MeOH in DCM 으로 전환하고 20분 동안 10% 유지)로 정제되어 원하는 생성물을 트리페닐포스포늄 메탄설포네이트 염으로 얻었다. 상기 생성물은 추가적으로 동결건조되어 잔류 용매를 제거하여 노란색 고체를 얻었다(106 mg, 145.55 umol, 23.85% yield, 98.24% purity).

[231] MS (ESI): mass calcd. for C₄₀H₄₂N₂O₃P⁺, 629.29; m/z found, 629.5 [M+H]⁺.

[232] ¹H NMR (400MHz, MeOD) δ 1.45 (m, 2 H), 1.52 - 1.78 (m, 6 H), 1.90 - 2.04 (m, 4 H), 2.69 (s, 3 H), 2.74 - 2.87 (m, 4 H), 3.34 - 3.50 (m, 8 H), 7.08 (s, 1 H), 7.62 - 7.97 (m, 15 H), 8.44 (s, 1 H), 9.04 (br s, 1 H); ³¹P NMR (162 MHz, METHANOL-d₄) δ ppm 23.81 (s, 1 P).

[233] 1-2. (10-(3-브로모-4,5,6-트리메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 브로마이드 합성

[234]



[235] 단계 A. 10-브로모-1-(2-히드록시-3,4-디메톡시-6-메틸-페닐)데칸-1-온

[236] 새로 분말화된 AlCl₃ (457.89 mg, 3.43 mmol)를 건조 DCE(10mL) 내 10-브로모데카노일 클로라이드(0.536 g, 1.89 mmol) 및 1,2,3-트리메톡시-5-메틸-벤젠 (312.86 mg, 1.72 mmol)에 첨가하고, 25°C에서 40hr 동안 교반되었다. LCMS는 원하는 생성물이 주요 구성요소로 형성되었음을 보여주었다. 혼합물이 얼음물에 부어지고 CH₂Cl₂(50mL*2)로 추출되었다. 합한 추출물이 물로 세척되고, Na₂SO₄로 건조되고 농축되어 오일이 얻어졌으며, 이를 컬럼 크로마토그래피(SiO₂, 10:0 to 10:1 Petroleum ether/EtOAc)로 정제하여 무색

오일(520 mg, 66.56% yield)이 얻어졌다.

[237] MS (ESI): mass calcd. for $C_{19}H_{29}BrO_4$, 400.12; m/z found, 402.8 [M+H]⁺.

[238] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 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).

[239] 단계 B. 2-(10-브로모데실)-5,6-디메톡시-3-메틸-페놀

[240] 10-브로모-1-(2-히드록시-3,4-디메톡시-6-메틸-페닐)데칸-1-온 (520 mg, 1.14 mmol)이 TFA (10 mL)에 용해되었고, 이어서 Et₃SiH (2 mL)이 첨가되고, 이어서 80 °C에서 12 시간 동안 교반되었다. LCMS는 스타팅 케톤이 소모되고 하나의 새로운 피크가 형성됨을 보여주었다. 반응 혼합물을 증발 건조시키고, 이를 컬럼 크로마토그래피(SiO₂, 5:0 to 5:1 Petroleum ether/ EtOAc)로 정제하여 무색 오일(410 mg, 82.34% yield)을 얻었다.

[241] MS (ESI): mass calcd. for $C_{19}H_{31}BrO_3$, 386.15; m/z found, 388.9 [M+H]⁺.

[242] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 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).

[243] 단계 C. 4-브로모-2-(10-브로모데실)-5,6-디메톡시-3-메틸-페놀

[244] 2-(10-브로모데실)-5,6-디메톡시-3-메틸-페놀(410 mg, 940.98 umol) 및 NaBr (145.23 mg, 1.41 mmol)이 AcOH (10 mL)에서 용해되고, 이어서 H₂O₂ (160.04 mg, 1.41 mmol, 30%)가 25 °C에서 첨가되고, 이어서 2 시간 동안 교반되었다. LCMS는 스타팅 물질이 소모되고 새로운 피크가 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(50 mL)로 퀘칭하였고, EtOAc (40 mL x 2)로 추출하였다. 합한 유기층을 pH > 7까지 포화 NaHCO₃ (40 mL)로 세척하였고, 이어서 Na₂SO₄으로 건조하고, 무색오일(300 mg, crude)로 농축되었다.

[245] MS (ESI): mass calcd. for $C_{19}H_{30}Br_2O_3$, 464.06; m/z found, 466.9 [M+H]⁺.

[246] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 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).

[247] 단계 D. (10-(3-브로모-4,5,6-트리메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스폰늄 브로마이드

[248] 4-브로모-2-(10-브로모데실)-5,6-디메톡시-3-메틸-페놀 (300 mg, 597.11 umol) 및 PPh₃ (939.68 mg, 3.58 mmol) 톨루엔 (1 mL)에서 용해되었고, 이어서 N₂하에서 130 °C에서 18시간 동안 교반되었다. TLC (DCM: MeOH = 10:1, R_f = 0.2)는 하나의 메인 피크가 OPPh₃ 아래에 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 증발시켜 갈색 잔류물을 얻었고, 이를 Prep-HPLC (Column: 3_Phenomenex Luna C18 75*30mm*3um; mobile phase: [water(0.2%FA)-ACN]; B%: 52%-82%, 6 min)로 정제하였다. 원하는 생성물이 동결 건조 후 백색 고체로 얻어졌다(16 mg, 12.24% yield, 97.2% purity).

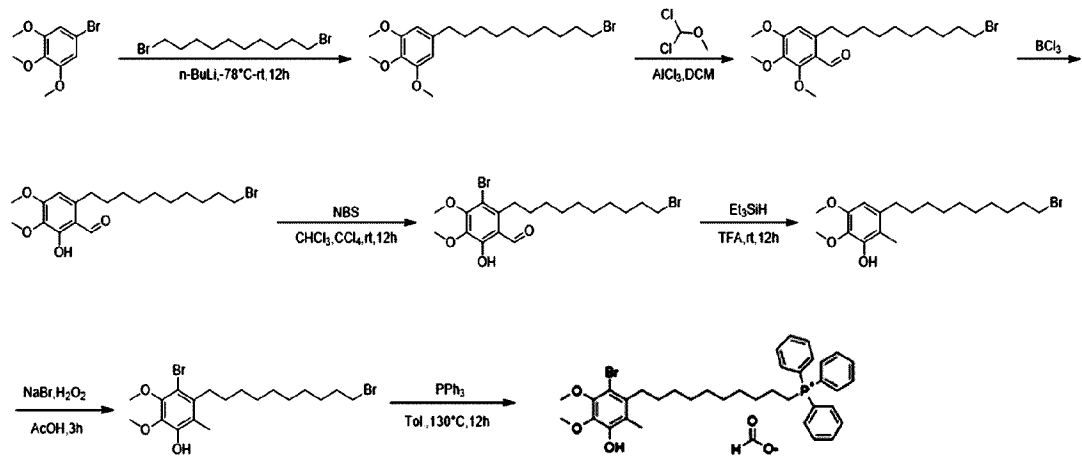
[249] MS (ESI): mass calcd. for $C_{37}H_{45}BrO_3P^+$, 647.23; m/z found, 649.3 $[M+H]^+$.

[250] 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).

[251] 1-3.

(10-(2-브로모-5-히드록시-3,4-디메톡시-6-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 포르메이트 합성

[252]



[253] 단계 A. 5-(10-브로모데실)-1,2,3-트리메톡시-벤젠

[254] THF (20 mL) 내 5-브로모-1,2,3-트리메톡시-벤젠 (1.3 g, 5.26 mmol, 1 eq)의 용액에 n -BuLi (2.5 M, 2.10 mL, 1 eq)이 $-78^\circ C$ 에서 적가되었다. 첨가 후, 혼합물이 그 온도에서 1시간 동안 교반되었고, 이어서 THF (10 mL) 내 1,10-디브로모데칸 (3.16 g, 10.52 mmol, 2 eq) 용액이 $-78^\circ C$ 에서 적가되었다. 생성된 혼합물이 $20^\circ C$ 에서 11 시간 동안 교반되었다. LCMS는 원하는 질량의 50.6%가 검출되었음을 보여주었다. 잔류물이 sat. NH_4Cl (10 mL)로 희석되고 EtOAc (50 mL * 3)로 추출되었다. 합한 유기층이 Na_2SO_4 상에서 건조되었고, 감압 하에서 여과 농축되어 잔류물이 얻어졌다. 잔류물이 컬럼 크로마토그래피로 정제되었다(SiO_2 , Petroleum ether/Ethyl acetate=100/0 to 95/5). 화합물 5-(10-브로모데실)-1,2,3-트리메톡시-벤젠 (580 mg, 1.02 mmol, 19.35% yield, 68% purity)이 무색 오일로 얻어졌다.

[255] MS (ESI): mass calcd. for $C_{19}H_{31}BrO_3$, 387.4; m/z found, 387.1 $[M+H]^+$.

[256] 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) 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)

[257] 단계 B. 6-(10-브로모데실)-2,3,4-트리메톡시-벤즈알데히드

[258] 5-(10-브로모데실)-1,2,3-트리메톡시-벤젠(580 mg, 1.02 mmol, 1 eq)의 건조 CH_2Cl_2 (2 mL) 용액이 $AlCl_3$ (239 mg, 1.79 mmol, 97.95 μL , 1.76 eq)의 건조 CH_2Cl_2 (8

mL) 용액에 점차적으로 0°C에서 적가하였다. 혼합물을 동일한 온도에서 45분 동안 교반하고, 디클로로 (메톡시)메탄 (188.97 mg, 1.64 mmol, 145.36 uL, 1.61 eq, 68% purity)의 건조 CH₂Cl₂ (2 mL)용액을 여기에 10분에 걸쳐 점진적으로 적가하였다. 혼합물을 0°C에서 2시간 5분 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 얼음물 30mL에 부어졌고, 메틸렌 클로라이드 상이 분리되었고, 수성상을 50mL의 메틸렌 클로라이드로 2회 추출하였다. 합한 유기층을 Na₂SO₄상에서 건조하고, 감압 하에서 여과 농축하여 잔류물을 얻었다. 조생성물을 추가적인 정제 없이 다음 단계에 사용하였다. 화합물 6-(10-브로모데실)-2,3,4-트리메톡시-벤즈알데히드 (510 mg, 858.27 umol, 84.29% yield, 69.9% purity)가 무색 오일로 얻어졌다.

[259] MS (ESI): mass calcd. for C₂₀H₃₁BrO₄, 415.4; m/z found, 415.1 [M+H]⁺.

[260] 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)

[261] 단계 C. 6-(10-브로모데실)-2-히드록시-3,4-디메톡시-벤즈알데히드

[262] BCl₃ (1 M, 1.9 mL, 2.21 eq)가 CH₂Cl₂ (10 mL) 내 6-(10-브로모데실)-2,3,4-트리메톡시-벤즈알데히드 (510.00 mg, 858.27 umol, 1eq, 69.9% purity)의 용액에 0°C에서 적가되었다. 혼합물이 0°C에서 30분 동안 교반되었고, 20°C에서 30분동안 교반되었다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 잔류물이 얼음물(30 mL)에 부어졌고 CH₂Cl₂ (50 mL * 3)로 추출되었다. 합한 유기층이 Na₂SO₄상에서 건조되었고, 감압 하에서 여과 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물이 컬럼크로마토그래피(SiO₂, Petroleum ether/Ethyl acetate=100/0 to 95/5)로 정제되었다. 화합물 6-(10-브로모데실)-2-히드록시-3,4-디메톡시-벤즈알데히드(300 mg, 583.06 umol, 67.93% yield, 78% purity)가 무색오일로 얻어졌다.

[263] MS (ESI): mass calcd. for C₁₉H₂₉BrO₄, 401.3; m/z found, 401.1 [M+H]⁺.

[264] 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)

[265] 단계 D. 3-브로모-2-(10-브로모데실)-6-히드록시-4,5-디메톡시-벤즈알데히드

[266] CHCl₃ (2.5 mL) 및 CCl₄ (2.5 mL) 내 6-(10-브로모데실)-2-히드록시-3,4-디메톡시-벤즈알데히드 (250 mg, 622.92 umol, 1 eq)의 용액에 NBS (133.04 mg, 747.51 umol, 1.2 eq)가 0°C에서 첨가되었다. 혼합물이 0°C에서 1시간 동안 교반 되었다. 이어서 혼합물이 11시간동안 20°C에서 교반되었다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 혼합물이 sat. NaHCO₃ (10 mL)으로 희석되었고 EtOAc (20 mL * 3)로 추출되었다. 합한 유기층이 Na₂SO₄상에서 건조되었고, 감압 하에서 여과 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 prep-TLC (SiO₂, Petroleum ether/Ethyl acetate= 4:1)로

정제하였다. 화합물

3-브로모-2-(10-브로모데실)-6-히드록시-4,5-디메톡시-벤즈알데히드(200 mg, 307.77 μmol , 49.41% yield, 73.9% purity)를 노란색 오일로 얻었다.

[267] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_4$, 480.2; m/z found, 481.0 [M+H]⁺.

[268] 단계 E. 5-(10-브로모데실)-2,3-디메톡시-6-메틸-페놀

[269] CH_2Cl_2 (4 mL) 내

3-브로모-2-(10-브로모데실)-6-히드록시-4,5-디메톡시-벤즈알데히드(190 mg, 292.38 μmol , 1 eq, 73.9% purity) 및 Et_3SiH (169.99 mg, 1.46 mmol, 233.50 μL , 5 eq)의 용액에 0 °C에서 TFA (708.40 mg, 6.21 mmol, 460 μL , 21.25 eq)가 5분에 걸쳐 추가 깔때기를 통해 적가되었다. 반응 혼합물이 0 °C에서 2시간 동안 교반되었다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 혼합물이 천천히 sat. NaHCO_3 (50 mL)에 부어졌고 CH_2Cl_2 100 mL (100 mL * 3)로 추출하였다. 합한 유기층이 Na_2SO_4 상에서 건조되었고, 감압 하에서 여과 농축되어 잔류물이 얻어졌다. 잔류물이 prep-TLC (SiO_2 , Petroleum ether: Ethyl acetate=4:1)로 정제되었다. 화합물 5-(10-브로모데실)-2,3-디메톡시-6-메틸-페놀(130 mg, 241.64 μmol , 82.65% yield, 72% purity)이 무색오일로 얻어졌다.

[270] 단계 F. 4-브로모-5-(10-브로모데실)-2,3-디메톡시-6-메틸-페놀

[271] AcOH (5 mL) 내 5-(10-브로모데실)-2,3-디메톡시-6-메틸-페놀 (130 mg, 241.64 μmol , 1 eq, 72%purity) 및 NaBr (37.29 mg, 362.46 μmol , 11.65 μL , 1.5 eq)의 교반된 용액에 H_2O_2 (41.09 mg, 362.46 μmol , 34.82 μL , 30% purity, 1.5 eq)가 첨가되었고, 이어서 20 °C에서 3시간 동안 교반되었다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 잔류물이 sat NaHCO_3 ; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ =10:1 (30) mL으로 희석되었고 EtOAc (30 mL * 3)으로 추출되었다. 합한 유기층이 염수(10 mL)로 세척되고, Na_2SO_4 상에서 건조되고, 감압 하에서 여과 농축되어 잔류물이 얻어졌다. 조생성물이 추가 정제없이 다음 단계에서 사용되었다. 화합물

4-브로모-5-(10-브로모데실)-2,3-디메톡시-6-메틸-페놀(140 mg, 195.18 μmol , 80.77% yield, 65% purity)이 노란색 오일로 얻어졌다.

[272] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{Br}_2\text{O}_3$, 466.3; m/z found, 466.9 [M+H]⁺.

[273] ^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)

[274] 단계 G.

(10-(2-브로모-5-히드록시-3,4-디메톡시-6-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 포르메이트

[275] 톨루엔 (2 mL) 내 4-브로모-5-(10-브로모데실)-2,3-디메톡시-6-메틸-페놀(140 mg, 195.18 μmol , 1 eq, 65% purity) 및 PPh_3 (255.96 mg, 975.88 μmol , 5 eq)의 교반된 용액이 125 °C에서 N_2 하에서 8시간 가열되었다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 용매를 진공하에서 제거하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼

크로마토그래피(SiO_2 , Petroleum ether/Ethyl acetate=100/0 to 0/100; Ethyl acetate: MeOH=100/0 to 92/8)로 정제하였다. 잔류물을 prep-HPLC (FA condition; column: Xtimate C18 100*30mm*3um; mobile phase: [water(0.225%FA)-ACN]; B%: 40%-70%, 8min)로 정제하였다. 화합물 (10-(2-브로모-5-히드록시-3,4-디메톡시-6-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 포르메이트(6 mg, 8.61 μmol , 4.41% yield, 99.54% purity)가 무색 검으로 얻어졌다.

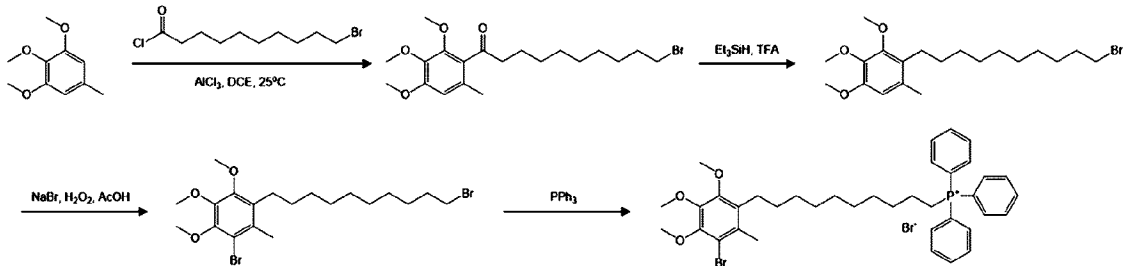
[276] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{BrO}_3\text{P}^+$, 648.6; m/z found, 649.2 [M+H]⁺.

[277] 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)

[278] ³¹P NMR (162MHz, CDCl_3) δ = 24.17 (s, 1P)

[279] 1-4. (10-(3-브로모-4,5,6-트리메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 브로마이드 합성

[280]



[281] 단계 A. 10-브로모-1-(2,3,4-트리메톡시-6-메틸-페닐)데칸-1-온

[282] DCE (10 mL) 내 4-브로모-1,2,3-트리메톡시-5-메틸-벤젠(449.11 mg, 1.72 mmol) 및 10-브로모데카노일 클로라이드(536.94 mg, 1.89 mmol)의 교반된 용액에 AlCl_3 (206.41 mg, 1.55 mmol)이 첨가되었고, 이어서 25 °C에서 18시간 동안 교반되었다. LCMS는 원하는 생성물이 주요 구성물질로 형성되었음을 보여주었다. TLC (Petroleum ether : EtOAc = 3:1, R_f = 0.4)는 하나의 주요 새로운 스팟이 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 얼음물에 부어졌고 DCM (30 mL x3)으로 추출되었고, 이어서 Na_2SO_4 상에서 건조되었고, 농축되어 노란색 오일이 얻어졌고, 이는 실리카겔에서 플래쉬 컬럼으로 정제되어(0-100% EtOAc in petroleum ether over 30 min)무색 오일이 얻어졌다(215 mg, 29.1% yield).

[283] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{BrO}_4$, 414.14; m/z found, 416.8 [M+H]⁺.

[284] 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).

[285] 단계 B. 4-(10-브로모데실)-1,2,3-트리메톡시-5-메틸-벤젠

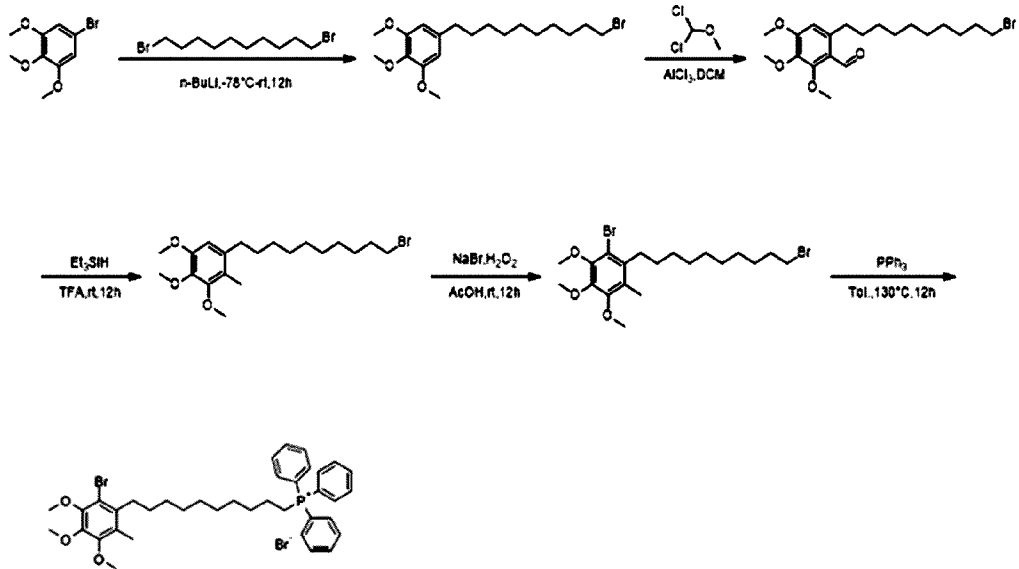
[286] TFA (10 mL) 내 10-브로모-1-(2,3,4-트리메톡시-6-메틸-페닐)데칸-1-온 (210 mg, 455.03 μmol)의 교반된 용액에 Et_3SiH (1.46 g, 12.52 mmol, 2 mL)이 25 °C에서 첨가되었고, 이어서 2시간 동안 80 °C에서 교반되었다. LCMS는 원하는 생성물이 주요 구성물질로 생성되었음을 보여주었다. TLC (petroleum ether: EtOAc = 4:1,

Rf=0.45)는 하나의 주요 새로운 스팟이 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 진공하에 증발 건조시켜 무색 오일이 얻어졌고, 이는 실리카겔에서 플래쉬컬럼 크로마토그래피로 추가 정제되었다(25 g, 0-50% EtOAc in petroleum ether over 30 min). 원하는 생성물

4-(10-브로모데실)-1,2,3-트리메톡시-5-메틸-벤젠(118 mg, 250.93 μmol , 55.15% yield)이 무색 오일로 얻어졌다.

- [287] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{BrO}_3$, 400.16; m/z found, 403.0 [M+H]⁺.
- [288] 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).
- [289] 단계 C. 1-브로모-5-(10-브로모데실)-2,3,4-트리메톡시-6-메틸-벤젠
- [290] AcOH (5 mL) 내 4-(10-브로모데실)-1,2,3-트리메톡시-5-메틸-벤젠 (118 mg, 250.93 μmol) 및 NaBr (38.73 mg, 376.39 μmol)의 교반된 용액에 H_2O_2 (42.68 mg, 376.39 μmol)가 첨가되었고, 이어서 25 °C에서 2시간 동안 교반되었다. LCMS는 원하는 생성물이 주요 구성물질로 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 EtOAc/ H_2O (80 mL/60 mL)사이에 분배하였다. 유기층을 pH >7까지 sat. aq. NaHCO_3 (60 mL)으로 세척하였다. 수집된 유기층을 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 농축하여 노란색 오일(140 mg, crude)을 얻었다. HNMR은 다음 단계에 충분한 순도로 원하는 생성물과 일치함을 보여주었다.
- [291] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{Br}_2\text{O}_3$, 478.07; m/z found, 481.0 [M+H]⁺.
- [292] 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).
- [293] 단계 D. (10-(3-브로모-4,5,6-트리메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 브로마이드
- [294] 톨루엔 (1 mL) 내 1-브로모-5-(10-브로모데실)-2,3,4-트리메톡시-6-메틸-벤젠 (140 mg, 279.13 μmol) 및 PPh_3 (366.06 mg, 1.40 mmol)의 교반된 용액을 130 °C에서 N_2 하에 18시간 동안 가열하였다. LCMS는 원하는 생성물이 형성되었음을 보여주었다. TLC(DCM: MeOH = 10:1, Rf = 0.2)는 OPPh_3 하에 주요한 새로운 피크가 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 증발시켜 갈색 잔류물을 얻었고, 이는 실리카겔 상에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피로 정제되었다(25 g, 0-15% MeOH in DCM over 30 min). 원하는 생성물이 동결건조 후에 백색 고체로 얻어졌다(108.5 mg, 51.41% yield, 98.2% purity).
- [295] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{BrO}_3\text{P}^+$, 661.24; m/z found, 663.3 [M+H]⁺.
- [296] 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); ³¹P NMR (162 MHz, CHLOROFORM-d) δ 24.53 (s, 1 P).
- [297] 1-5. (10-(2-브로모-3,4,5-트리메톡시-6-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 브로마이드 합성

[298]



[299] 단계 A. 5-(10-브로모데실)-1,2,3-트리메톡시-벤젠

[300] THF (30 mL) 내 5-브로모-1,2,3-트리메톡시-벤젠 (2 g, 8.09 mmol, 1 eq)의 용액에 n-BuLi (2.5 M, 3.24 mL, 1 eq)을 -78 °C에서 적가하였다. 첨가 후, 혼합물을 그 온도에서 1시간 동안 교반하였고, 이어서 THF (10 mL) 내 1,10-디브로모데칸 (4.86 g, 16.19 mmol, 2 eq) 용액을 -78 °C에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 20 °C에서 11시간 동안 교반하였다. LCMS는 원하는 질량의 20%가 검출되었음을 보여주었다. 잔류물은 sat.NH₄Cl (10 mL)로 희석되었고 EtOAc (50 mL * 3)로 추출되었다. 합한 유기층은 Na₂SO₄상에서 건조되었고, 여과되었고 감압 하에서 농축되어 잔류물이 얻어졌다. 잔류물이 컬럼크로마토그래피(SiO₂, Petroleum ether/Ethyl acetate=100/0 to 95/5)로 정제되었다. 화합물 5-(10-브로모데실)-1,2,3-트리메톡시-벤젠 (430 mg, 395.86 umol, 4.89% yield, 35.66% purity)이 무색 오일로 얻어졌다.

[301] MS (ESI): mass calcd. for C₁₉H₃₁BrO₃, 387.4; m/z found, 389.1 [M+H]⁺.

[302] 단계 B. 6-(10-브로모데실)-2,3,4-트리메톡시-벤즈알데히드

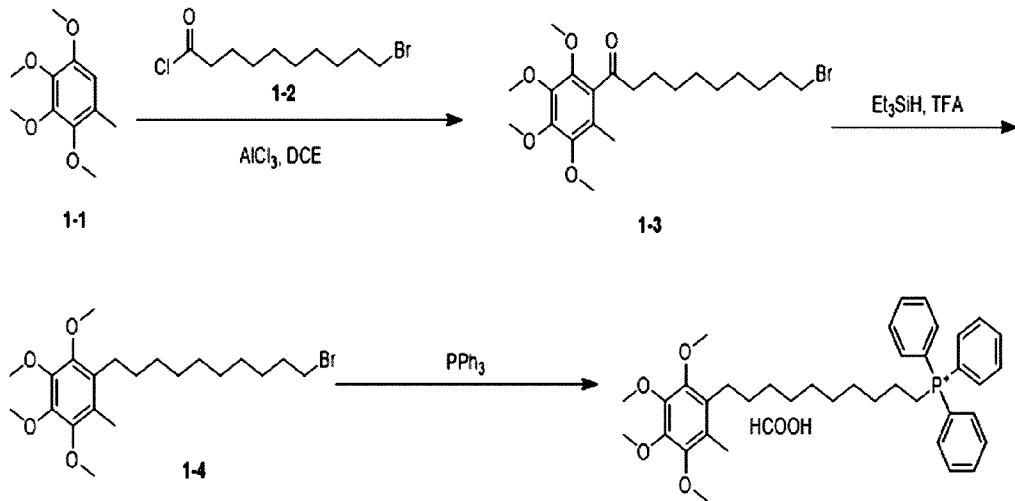
[303] 5-(10-브로모데실)-1,2,3-트리메톡시-벤젠 (430 mg, 395.86 umol, 1 eq, 35.66% purity)의 건조 CH₂Cl₂ (2 mL) 용액에 AlCl₃ (178 mg, 1.33 mmol, 72.95 uL, 3.37 eq)의 건조 CH₂Cl₂ (6 mL) 용액이 점진적으로 0 °C에서 적가되었다. 혼합물이 같은 온도에서 45분 동안 교반되었고, 디클로로(메톡시)메탄 (140 mg, 1.22 mmol, 107.69 uL, 3.08 eq)의 건조 CH₂Cl₂ (2 mL) 용액이 10분에 걸쳐 점진적으로 적가되었다. 혼합물이 0 °C에서 2시간 5분 동안 교반되었다. LCMS 는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 얼음물 30 mL에 부어졌고, 메틸렌 클로라이드 상이 분리되고, 수성 상이 50 mL의 메틸렌 클로라이드로 2번 추출되었다. 합한 유기층이 Na₂SO₄상에서 건조되었고, 여과되고 감압 하에서 농축되어 잔류물이 얻어졌다. 조생성물이 추가의 정제없이 다음 단계에 사용되었다. 화합물 6-(10-브로모데실)-2,3,4-트리메톡시-벤즈알데히드(410 mg,

384.97 μmol , 97.25% yield, 39% purity)를 무색 오일로 얻었다.

- [304] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{BrO}_4$, 415.4; m/z found, 415.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [305] 단계 C. 1-(10-브로모데실)-3,4,5-트리메톡시-2-메틸-벤젠
- [306] 6-(10-브로모데실)-2,3,4-트리메톡시-벤즈알데히드(410 mg, 384.97 μmol , 1 eq, 39% purity) 및 Et_3SiH (447.64 mg, 3.85 mmol, 614.89 μL , 10 eq)의 혼합물에 TFA (3 mL)가 첨가되었다. 혼합물은 20 °C에서 12시간 동안 교반되었다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 혼합물이 천천히 sat. NaHCO_3 (50 mL)에 부어지고 CH_2Cl_2 (50 mL*3)로 추출되었다. 합한 유기층이 Na_2SO_4 상에서 건조되었고, 여과되고 감압 하에서 농축되어 잔류물이 얻어졌다. 잔류물이 prep-TLC (SiO_2 , Petroleum ether/Ethyl acetate= 4:1)로 정제되었다. 화합물 1-(10-브로모데실)-3,4,5-트리메톡시-2-메틸-벤젠 (120 mg, 152.18 μmol , 39.53% yield, 50.9% purity)이 무색 오일로 얻어졌다.
- [307] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{BrO}_3$, 401.4; m/z found, 402.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [308] 단계 D. 1-브로모-2-(10-브로모데실)-4,5,6-트리메톡시-3-메틸-벤젠
- [309] AcOH (4 mL) 내 1-(10-브로모데실)-3,4,5-트리메톡시-2-메틸-벤젠 (120 mg, 152.18 μmol , 1 eq, 50.9% purity) 및 NaBr (15.66 mg, 152.18 μmol , 4.89 μL , 1 eq)의 교반된 용액에 H_2O_2 (17.25 mg, 152.18 μmol , 14.62 μL , 30% purity, 1 eq)이 첨가되었고, 이어서 20 °C에서 12시간 동안 교반되었다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 잔류물을 sat NaHCO_3 : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ =10:1 (30) mL으로 희석하고 EtOAc (30 mL * 3)로 추출하였다. 합한 유기층을 염수(10 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조하였고, 여과하고 감압 하에서 농축하여 잔류물을 얻었다. 조생성물을 추가의 정제없이 다음 단계에서 사용하였다. 화합물 1-브로모-2-(10-브로모데실)-4,5,6-트리메톡시-3-메틸-벤젠 (130 mg, crude)을 노란색 오일로 얻었다.
- [310] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{Br}_2\text{O}_3$, 480.3; m/z found, 480.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [311] 단계 E. 1-브로모-2-(10-BLAH데실)-4,5,6-트리메톡시-3-메틸-벤젠
- [312] 톨루엔 (2 mL) 내 1-브로모-2-(10-브로모데실)-4,5,6-트리메톡시-3-메틸-벤젠 (130 mg, 162.41 μmol , 1 eq, 60% purity) 및 PPh_3 (212.99 mg, 812.04 μmol , 5 eq)의 교반된 용액이 125 °C에서 N_2 하에 12시간 동안 가열되었다. LCMS는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 용매를 진공하에 제거하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2 , Petroleum ether/Ethyl acetate=100/0 to 0/100; Ethyl acetate:MeOH=100/0 to 92/8)로 정제하였다. 화합물 1-브로모-2-(10-BLAH데실)-4,5,6-트리메톡시-3-메틸-벤젠 (30 mg, 39.69 μmol , 24.44% yield, 98.234% purity)을 무색 오일로 얻었다.
- [313] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{BrO}_3\text{P}^+$, 662.7; m/z found, 663.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [314] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) 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) ^{31}P NMR (162MHz, CDCl_3) δ = 24.54 (s, 1P)

[315] 1-6. 포름산, 트리페닐(10-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)데실)포스포늄 염
합성

[316]



[317] 단계 A. 10-브로모-1-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸-페닐)데칸-1-온

[318] DCE (15 mL) 내 1,2,3,4-테트라메톡시-5-메틸-벤젠(710 mg, 3.35 mmol, 1 eq) 및 10-브로모데카노일 클로라이드(992.09 mg, 3.68 mmol, 1.1 eq)의 교반된 용액에 AlCl₃ (401.45 mg, 3.01 mmol, 164.53 μ L, 0.9 eq)이 첨가되고 이어서 25 °C에서 18시간 동안 교반되었다. LCMS는 스타팅 물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 반응혼합물이 DCM (15ml*3)으로 10ml H₂O로 추출되었다. 이어서 합한 유기층이 증발 건조되어 생성물이 얻어졌다. 잔류물이 플래쉬 실리카 겔 크로마토그래피(ISCO®; 20 g SepaFlash® Silica Flash Column, Eluent of 15-20% Ethyl acetate/Petroleum ethergradient @ 45 mL/min)로 정제되었다. 화합물 10-브로모-1-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸-페닐)데칸-1-온 (800 mg, crude)이 노란색 오일로 얻어졌다.

[319] MS (ESI): mass calcd. for C₂₁H₃₃BrO₅, 444.15; m/z found, 445.2 [M+H]⁺.

[320] 단계 B. 1-(10-브로모데실)-2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸-벤젠

[321] TFA (15 mL) 내 10-브로모-1-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸-페닐)데칸-1-온 (350 mg, 785.83 μ mol, 1 eq)의 교반된 용액에 트리에틸실란(2.55 g, 21.91 mmol, 3.50 mL, 27.89 eq)이 25 °C에서 첨가되었고, 이어서 2시간 동안 80 °C에서 교반되었다. LCMS는 스타팅 물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 진공하여 농축되어 조생성물이 얻어졌다. 잔류물이 플래쉬 실리카 겔 크로마토그래피(ISCO®; 40 g SepaFlash® Silica Flash Column, Eluent of 15-20% Ethyl acetate/Petroleum ethergradient @ 45 mL/min)로 정제되었다. 화합물 1-(10-브로모데실)-2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸-벤젠 (150 mg, 347.70 μ mol, 44.25% yield)을 무색 오일로 얻었다.

[322] MS (ESI): mass calcd. for C₂₁H₃₅BrO₄, 430.17; m/z found, 433.2 [M+3]⁺.

[323] 단계 C. 포름산, 트리페닐 (10-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)데실)

포스포늄 염

[324] 톨루엔 (1 mL) 내 1-(10-브로모데실)-2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸-벤젠 (130 mg, 301.34 μmol , 1 eq) 및 PPh_3 (344.51 mg, 1.31 mmol, 4.36 eq)의 교반된 용액을 130 °C에서 N_2 하에 18시간 동안 가열하였다. LCMS는 스타팅 물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 진공하에 농축되어 조생성물이 얻어졌다. 잔류물이 prep-HPLC (FA condition).column: Xtimate C18 100*30mm*10 μm ;mobile phase: [water(0.225%FA)-ACN];B%: 40%-70%,10min로 정제되었다. 화합물

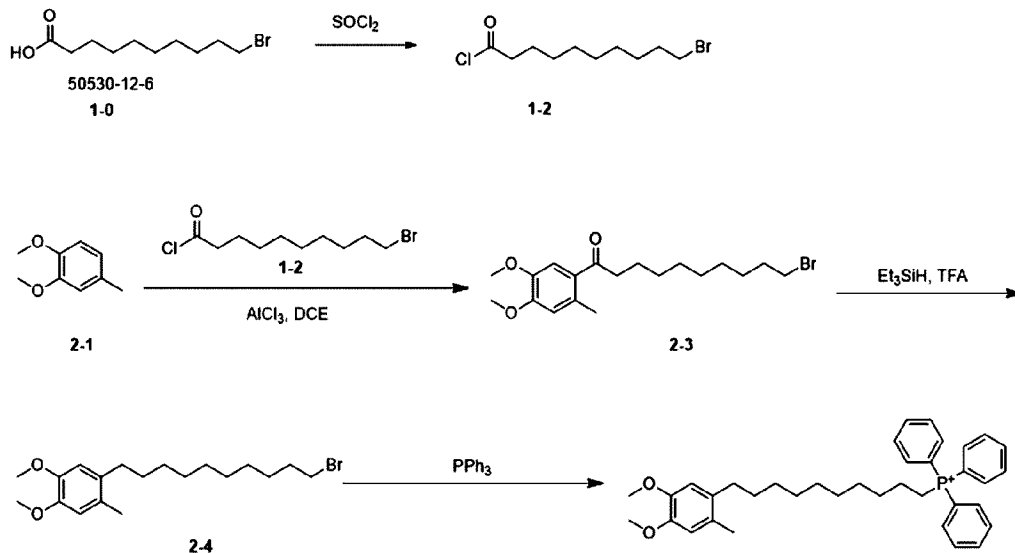
트리페닐-[10-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸-페닐)데실]포스포늄(64.7 mg, 103.30 μmol , 34.28% yield, 98% purity)이 노란색 오일로 얻어졌다.

[325] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{P}^+$, 613.34; m/z found, 613.6 [M+H] $^+$.

[326] ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.17 - 1.37 (m, 12 H) 1.40 - 1.59 (m, 4 H) 2.04 - 2.11 (m, 3 H) 2.49 (br s, 2 H) 3.55 - 3.60 (m, 2 H) 3.65 - 3.68 (m, 3H) 3.69 - 3.72 (m, 3 H) 3.76 - 3.81 (m, 6 H) 7.72 - 7.84 (m, 12 H) 7.87 - 7.97 (m, 3 H) 8.21 - 8.43 (m, 1 H)

[327] 1-7. 포름산, (10-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 염 합성

[328]



[329] 단계 A. 10-브로모데카노일 클로라이드

[330] DCM (4 mL) 내 10-브로모데칸 산(500 mg, 1.99 mmol, 1 eq)의 혼합물에 SOCl_2 (947.36 mg, 7.96 mmol, 577.66 μL , 4 eq)가 첨가되었다. 반응 혼합물이 25°C에서 2시간 동안 교반되었다. TLC는 스타팅물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 진공하에서 농축되었다. 조생성물은 정제하지 않았다. 화합물 10-브로모데카노일 클로라이드(500 mg, crude)가 주황색 오일로 얻어졌다.

[331] 단계 B. 10-브로모-1-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)데칸-1-온

[332] DCE (10 mL) 내 1,2-디메톡시-4-메틸-벤젠 (250 mg, 1.64 mmol, 1 eq) 및 10-브로모데카노일 클로라이드(487.17 mg, 1.81 mmol, 1.1 eq) 용액에 AlCl_3

(197.13 mg, 1.48 mmol, 80.79 μ L, 0.9 eq)가 첨가되었다. 혼합물이 25 °C에서 16시간 동안 교반되었다. LCMS는 스타팅물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 H₂O (10 mL)로 킨칭되었고 혼합물이 여과되었다. 반응 여과물이 DCM (20 mL*3)으로 추출되었다. 유기층이 분리되었고, Na₂SO₄ 상에서 건조되고, 여과되고 감압 하에서 농축되어 잔류물을 얻었다. 잔류물이 플래쉬 실리카 겔 크로마토그래피(ISCO®; 12 g SepaFlash® Silica Flash Column, Eluent of 0~20% Ethyl acetate/Petroleum ethergradient @ 80 mL/min)로 정제되었다. 화합물 10-브로모-1-(4,5-디메톡시-2-메틸-페닐)데칸-1-온 (300 mg, 737.59 μ mol, 44.90% yield, 94.740% purity)이 백색 고체로 얻어졌다.

[333] MS (ESI): mass calcd. for C₁₉H₂₉BrO₃, 384.13; m/z found, 387.0 [M+3]⁺.

[334] ¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.32 - 1.38 (m, 2 H) 1.52 - 1.69 (m, 4 H) 1.78 (quin, J=7.13 Hz, 4 H) 2.28 (t, J=7.50 Hz, 2 H) 2.42 (s, 3 H) 2.79 (t, J=7.38 Hz, 2 H) 3.33 (t, J=6.82 Hz, 2 H) 3.84 (d, J=4.25 Hz, 6 H) 6.59 - 6.70 (m, 1 H) 7.10 - 7.17 (m, 1 H)

[335] 단계 C. 1-(10-브로모데실)-4,5-디메톡시-2-메틸벤젠

[336] TFA (10 mL) 내 10-브로모-1-(4,5-디메톡시-2-메틸-페닐)데칸-1-온 (250 mg, 648.79 μ mol, 1 eq)의 용액에 Et₃SiH (1.82 g, 15.65 mmol, 2.50 mL, 24.13 eq)이 첨가되었다. 혼합물이 80 °C에서 2시간 동안 교반되었다. LCMS는 스타팅물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 진공하에서 농축되어 조생성물이 얻어졌다. 잔류물이 플래쉬 실리카겔 크로마토그래피(ISCO®; 20 g SepaFlash® Silica Flash Column, Eluent of 0~15% Ethyl acetate/Petroleum ether gradient @ 80 mL/min)로 정제되었다. 화합물

1-(10-브로모데실)-4,5-디메톡시-2-메틸-벤젠 (130 mg, 350.07 μ mol, 53.96% yield)이 무색오일로 얻어졌다.

[337] MS (ESI): mass calcd. for C₁₉H₃₁BrO₂, 370.15; m/z found, 371.2 [M+H]⁺.

[338] ¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.14 - 1.35 (m, 12 H) 1.41 (dt, J=15.10, 7.65 Hz, 2 H) 1.73 (quin, J=7.16 Hz, 2 H) 2.09 - 2.19 (m, 3 H) 2.36 - 2.43 (m, 2 H) 3.28 (t, J=6.82 Hz, 2 H) 3.72 (d, J=3.13 Hz, 6 H) 6.43 - 6.62 (m, 2 H)

[339] 단계 D. 포름산, (10-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)데실)트리페닐포스포늄 염

[340] 톨루엔 (5 mL) 내 1-(10-브로모데실)-4,5-디메톡시-2-메틸-벤젠 (100 mg, 269.29 μ mol, 1 eq)의 용액에 PPh₃ (353.16 mg, 1.35 mmol, 5 eq)이 첨가되었다. 혼합물이 130 °C에서 24시간 동안 교반되었다. LCMS는 스타팅물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 반응 혼합물이 진공하에서 농축되어 조생성물이 얻어졌다. 잔류물이 prep-HPLC (FA condition:column: Phenomenex Luna C18 75*30mm*3 μ m;mobile phase: [water(0.225%FA)-ACN];B%: 35%-70%,35min)로 정제되어 원하는 화합물(40 mg, purity 93.747%)이 백색 고체로 얻어졌고, 이는 prep-HPLC (condition: column: Phenomenex Luna C18 75*30mm*3 μ m;mobile phase: [water(0.225%FA)-ACN];B%: 35%-70%,35min)로 추가로 분리되었다. 화합물

10-(4,5-디메톡시-2-메틸-페닐)테실-트리페닐-포스포늄(17 mg, 27.41 μmol , 10.18% yield, 96.703% purity, FA)이 무색 오일로 얻어졌다.

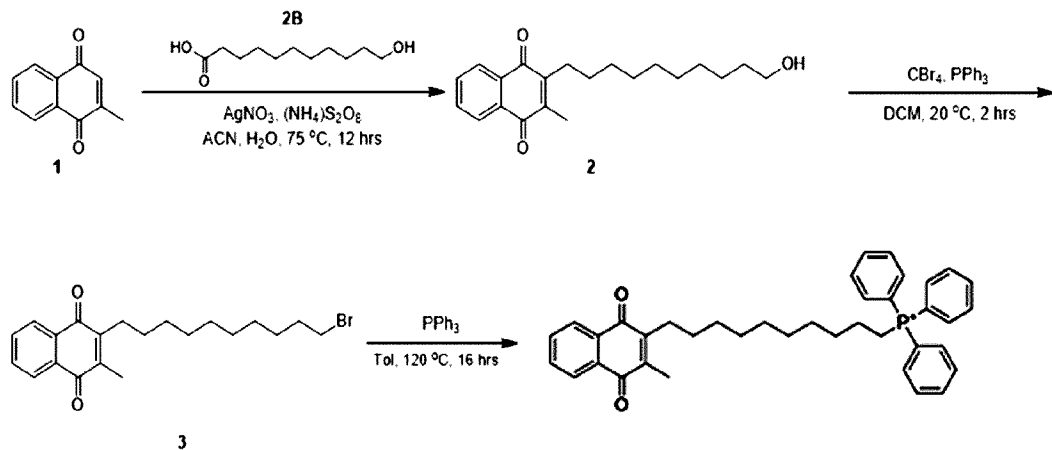
[341] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{O}_2\text{P}^+$, 553.32; m/z found, 553.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[342] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.16 - 1.31 (m, 10 H) 1.38 - 1.60 (m, 6 H) 2.16 (s, 3 H) 2.40 - 2.48 (m, 2 H) 3.56 - 3.60 (m, 2 H) 3.69 (d, $J=2.75$ Hz, 6 H) 6.68 (s, 1 H) 6.72 (s, 1 H) 7.74 - 7.85 (m, 12 H) 7.87 - 7.94 (m, 3 H) 8.44 (s, 1 H)

[343] 1-8.

(10-(3-메틸-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일)테실)트리페닐포스포늄 합성

[344]



[345] 화합물 2의 제조 절차

[346] Cpd.1 (10.0 g, 58.0 mmol, 1.00 eq) 및 Cpd.2B (12.9 g, 63.8 mmol, 1.10 eq)를 첨가하고, AgNO_3 (9.87 g, 58.0 mmol, 1.00 eq)를 ACN (100 mL) 및 H_2O (100 mL)로 채워진 둥근 바닥 플라스크에 넣었다. 혼합물에 H_2O (100 mL) 내 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (15.9 g, 69.6 mmol, 15.1 mL, 1.20 eq)의 용액을 적가하였다. 혼합물이 75 °C에서 암흑 하에 4시간 동안 교반되었다. LCMS (ET36187-5-P1L, Cpd.2: RT = 1.431 min)는 부분적으로 소모된 Cpd.1 및 형성된 Cpd.2를 보여주었다. 혼합물을 20 °C로 냉각시켰다. 혼합물을 EtOAc (100.0 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 NaHCO_3 (50.0 mL) 및 염수(50.0 mL)로 세척하였다. 유기층을 진공에서 농축하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(SiO_2 , Petroleum ether/Ethyl acetate = 1/0 to 0/1)로 정제하였다. Cpd.2 (5.91 g, 17.9 mmol, 30.9% yield)를 백색 고체로 얻었다.

[347] 화합물 3의 제조 절차

[348] DCM (200.0 mL)으로 충전된 3구 둥근 바닥 플라스크에 Cpd.2 (2.00 g, 6.09 mmol, 1.00 eq)를 추가하였다. CBr_4 (2.42 g, 7.31 mmol, 1.20 eq) 및 PPh_3 (1.92 g, 7.31 mmol, 1.20 eq)를 혼합물에 추가하였다. 반응물을 20 °C에서 2시간 동안 교반하였다. TLC (Petroleum ether/Ethyl acetate = 15/1 Rf = 0.53)는 소모된 Cpd.2 및 형성된 Cpd.3를 보여주었다. LCMS (ET36249-7-p1a, Cpd.3: RT = 1.678 min)는 Cpd.3이 형성되었음을 보여주었다. 진공에서 농축하였다. 잔류물이 컬럼

크로마토그래피(SiO₂, Petroleum ether/Ethyl acetate = 2/1 to 15/1)로 정제되었다.
Cpd.3 (1.10 g, 2.81 mmol, 46.1% yield)을 노란색 오일로 얻었다.

[349] ¹H NMR: ET36249-7-P1a (400 MHz, CDCl₃).

[350] δ 8.07~8.09 (m, 2H), 7.68~7.70 (m, 2H), 3.41 (t, J = 4 Hz, 2H), 2.63 (t, J = 8 Hz, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.48~1.87 (m, 2H), 1.30~1.46(m, 15H).

[351] 표적 화합물의 제조 절차

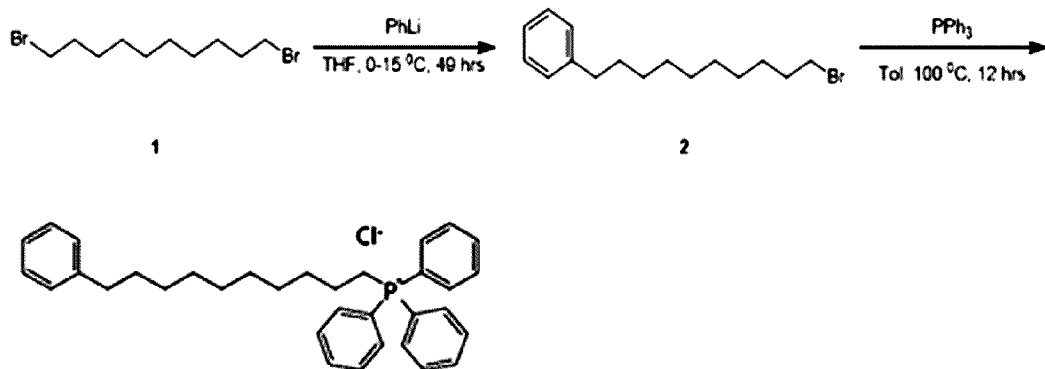
[352] Cpd.3 (0.20 g, 511 μmol, 1.00 eq)을 Tol. (1.40 mL)로 충전된 1구 둥근 바닥 플라스크에 추가하였다. 혼합물에 PPh₃ (160 mg, 613 μmol, 1.20 eq)를 추가하였다. N₂로 3회 탈기하였다. 120 °C에서 16시간 동안 저어주었다. TLC (Dichloromethane/Methanol = 10/1, R_f = 0.50)는 Cpd.3가 소모되고 반응이 완료되었음을 보여주었다. HPLC (ET36249-13-p1e)는 표적의 순도가 91.2%임을 보여주었다. 진공에서 농축하여 Tol. (1.40 mL)을 제거하였다. 잔류물을 MeOH (4.00 ml)로 채웠다. 잔류물을 prep-TLC (Dichloromethane/Methanol = 10/1)로 정제하였다. 표적(12.0 mg, 18.3 μmol, 3.59% yield)을 오렌지색 검으로 얻었다.

[353] ¹H NMR: ET36249-13-P1d (400 MHz, MeOD-d₄).

[354] δ 7.88~8.04 (m, 2H), 7.75~7.87 (m, 15H), 3.42~3.35 (m, 2H), 2.63 (t, J = 8 Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.28~1.69 (m, 16H).

[355] 1-9. 트리페닐(10-페닐데실)포스포늄 클로라이드 합성

[356]



[357] 화합물 2의 제조 절차

[358] Cpd.1 (3.00 g, 10.0 mmol, 1.00 eq)을 THF (7.50 mL)에 0 °C에서 첨가하였다. 혼합물을 N₂로 3번 탈기하였다. PhLi (1.80 M, 1.83 mL, 0.33 eq)를 용액에 0 °C에서 적가하였다. 1 시간 동안 0 °C에서 교반하고, 15 °C로 가온하였다. 48시간 동안 15 °C에서 교반하였다. TLC (Petroleum ether : Ethyl acetate= 1 : 0, R_f (Cpd.2) = 0.60)는 Cpd.1이 소모되고 반응이 완료되었음을 보여주었다. 진공에서 농축하였다. 추가정제는 하지 않았다. Cpd.2 (2.30 g, crude)를 무색 오일로 얻었다.

[359] ¹H NMR: ET41362-1-P1C1 (400 MHz, CDCl₃)

[360] δ 7.27-7.26 (m, 2H), 7.19-7.17 (d, J = 8 Hz, 2H), 1.89-1.82 (m, 15H), 1.59-1.52 (m,

9H), 1.30 (s, 32H), 0.94-0.90 (t, J = 8 Hz, 12H).

[361] 트리페닐(10-페닐데실)포스포늄 클로라이드의 제조 절차

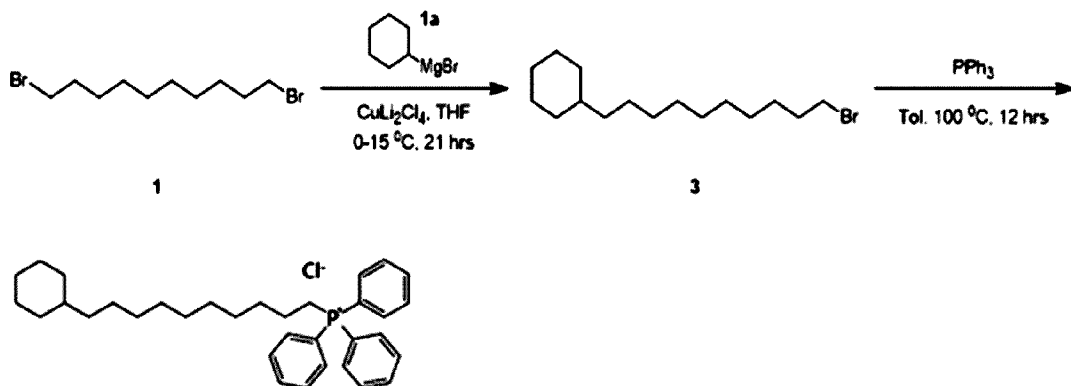
[362] Cpd.2 (0.70 M, 11.0 mL, 1.00 eq)를 톨루엔(27.0 mL)에 15 °C에서 첨가하였다. PPh₃ (4.06 g, 15.4 mmol, 2.00 eq)를 용액에 첨가하였다. 혼합물을 N₂로 3번 탈기하고 100 °C로 가열하였다. 12시간 동안 100 °C에서 교반하였다. TLC (Dichloromethane : Methanol= 20 : 1, R_f (target 1) = 0.30)는 Cpd.2가 소모되고 반응이 완료되었음을 보여주었다. 진공에서 농축하였다. 실리카겔 크로마토그래피 (Dichloromethane : Methanol= 100 : 0 to 20 : 1)로 조생성물을 정제하였다. 표적 1 (27.0 mg, 54.8 μmol, 7.09e-1% yield, 97.5% LCMS (ET41362-3-P1J1) purity)을 노란색 오일로 얻었다.

[363] ¹H NMR: ET41362-3-P1J1 (400 MHz, CDCl₃)

[364] δ 7.79-7.71 (d, J = 32 Hz, 15H), 7.28-7.16 (m, 6H), 3.95-3.74 (m, 4H), 2.59-2.55 (t, J = 8 Hz, 2H), 1.62-1.56 (m, 4H), 1.25-1.20 (d, J = 20 Hz, 10H).

[365] 1-10. (10-사이클로헥실데실)트리페닐포스포늄 클로라이드 합성

[366]



[367] 화합물 3의 제조 절차

[368] THF (3.00 mL)에 Cpd.1 (3.00 g, 10.0 mmol, 1.00 eq)을 0 °C에서 첨가하였다. 혼합물을 N₂로 3번 탈기하였다. 용액에 CuLi₂C₁₄ (0.10 M, 999 μL, 0.01 eq)를 첨가하였다. Cpd.1a (1.00 M, 12.0 mL, 1.20 eq)를 0 °C에서 용액에 첨가하였다. 1시간 동안 0 °C에서 교반되었고, 15 °C로 가온하였다. 20시간 동안 15 °C에서 교반하였다. TLC (Petroleum ether : Ethyl acetate= 1 : 0, R_f (Cpd.3) = 0.80)는 Cpd.1이 소모되고 반응이 완료되었음을 보여주었다. 진공에서 농축하였다. 추가정제는 하지 않았다. Cpd.3 (3.90 g, crude)을 무색오일로 얻었다.

[369] ¹H NMR: ET41362-2-P1C1 (400 MHz, CDCl₃)

[370] δ 3.43-3.40 (t, J = 8 Hz, 1H), 1.70-1.67 (m, 15H), 1.20-1.12 (m, 14H), 0.90-0.84 (m, 8H).

[371] (10-사이클로헥실데실)트리페닐포스포늄 클로라이드의 제조 절차

[372] Cpd.3 (0.70 M, 18.3 mL, 1.00 eq)을 톨루엔(16.0 mL)에 15 °C에서 첨가하였다. PPh₃ (6.74 g, 25.7 mmol, 2.00 eq)을 용액에 첨가하였다. 혼합물을 N₂로 3번 탈기하고, 100 °C로 가열하였다. 12시간 동안 100 °C에서 교반하였다. TLC

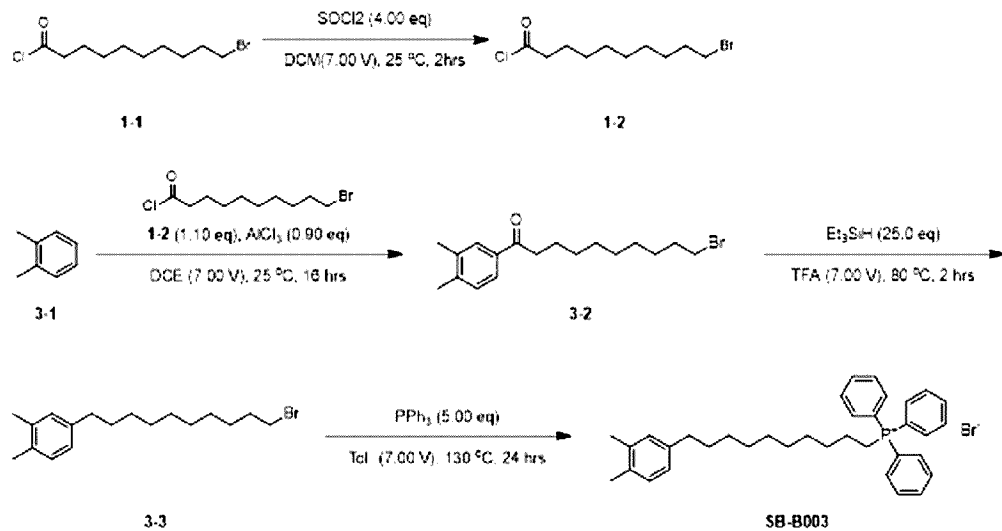
(Dichloromethane : Methanol= 20 : 1, Rf (target 2) = 0.20)는 Cpd.3이 소모되고 반응이 완료되었음을 보여주었다. 진공에서 농축하였다. 조생성물을 실리카겔 크로마토그래피(Dichloromethane : Methanol= 100 : 0 to 20 : 1)로 정제하였다. 타겟 2 (0.02 g, 40.4 μ mol, 3.14e-1% yield, 98.1% LCMS (ET41362-4-P1J1) purity)를 노란색 오일로 얻었다.

[373] $^1\text{H NMR}$: ET41362-4-P1C1 (400 MHz, CDCl_3)

[374] δ 7.89-7.70 (m, 15H), 3.83 (s, 2H), 2.60 (s, 2H), 1.68-1.62 (m, 9H), 1.18 (s, 18H), 0.87-0.79 (m, 2H).

[375] 1-11. (10-(3, 4-디메틸 페닐) 데실) 트리페닐 포스포늄 브로마이드 제조

[376]



[377] 단계 A. 10-브로모데카노일 클로라이드

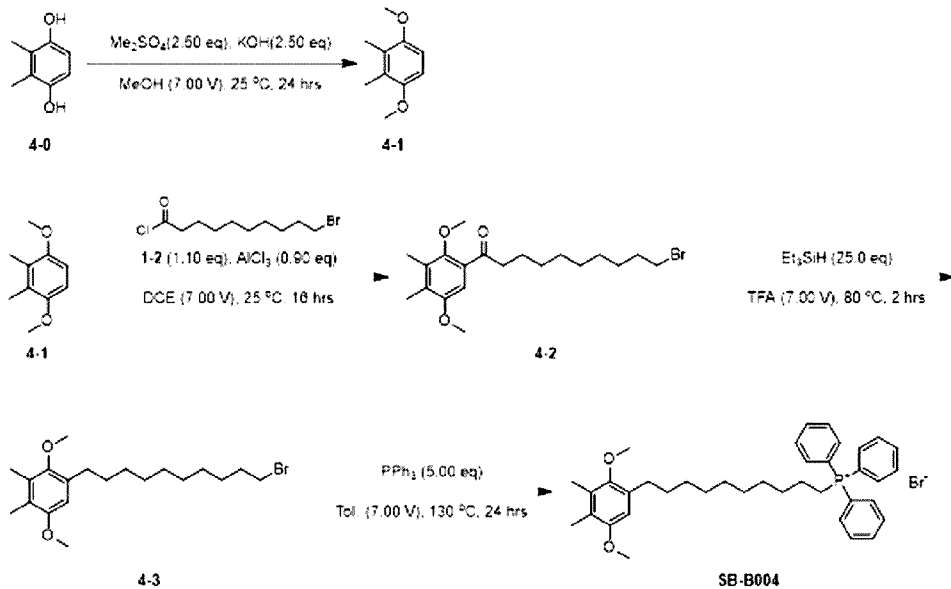
[378] DCM (210 mL) 내 10-브로모데칸산(30.0 g, 119 mmol, 1.00 eq) 용액에 SOCl_2 (56.8 g, 478 mmol, 34.7 mL, 4.00 eq)를 첨가하였다. 혼합물을 25 °C에서 1시간 동안 교반하였다. TLC1 (Petroleum ether : ethyl acetate = 5 : 1, Rf (start material) = 0.30, Rf (product) = 0.52)은 출발물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 혼합물을 진공에서 농축시켰다. 10-브로모데카노일 클로라이드(30.0 g, crude)가 노란색 오일로 얻어졌다.

[379] 단계 B. 10-브로모-1-(3,4-디메틸페닐)데칸-1-온

[380] DCE (35.0 mL) 내 o-자일렌 (5.00 g, 47.1 mmol, 5.69 mL, 1.00 eq) 및 10-브로모데카노일 클로라이드 (14.0 g, 51.8 mmol, 1.10 eq)의 용액에 AlCl_3 (5.65 g, 42.4 mmol, 2.32 mL, 0.90 eq)가 첨가되었다. 혼합물을 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. TLC (Petroleum ether : Ethyl acetate = 5 : 1, starting material Rf = 0.70, Rf (product) = 0.88)는 출발물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 혼합물을 얼음물(50.0 mL)에 붓고 DCM (50.0 mL)으로 추출하였다. 유기상을 분리하고 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 컬럼크로마토그래피(SiO_2 , Petroleum ether : Ethyl acetate = 1 : 0 to 1 : 1)로 정제하였다.

- 10-브로모-1-(3,4-디메틸페닐)데칸-1-온 (6.00 g, 13.4 mmol, 28.3% yield, 75.5% purity)을 HNMR (ET47086-1-P1A2) 및 LCMS (ET47086-1-P1A1, T = 0.996, M + 1 = 339.2)로 확인한 노란색 고체로 얻었다.
- [381] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.74 (s, 1H) 7.70 (dd, J = 7.60, 1.64 Hz, 1H) 7.21 (d, J = 7.60 Hz, 1H) 3.41 (t, J = 6.80 Hz, 2H) 2.93 (t, J = 7.60 Hz, 2H) 2.32 (s, 6H) 1.86 (quin, J = 7.20 Hz, 2H) 1.73 (quin, J = 7.20 Hz, 2H) 1.26 - 1.49 (m, 10H)
- [382] 단계 C: 4-(10-브로모데실)-1, 2-디메틸-벤젠
- [383] TFA (7.00 mL) 내 10-브로모-1-(3,4-디메틸페닐)데칸-1-온 (1.00 g, 2.95 mmol, 1.00 eq)의 용액에 Et_3SiH (8.57 g, 73.7 mmol, 11.8 mL, 25.0 eq)가 첨가되었다. 혼합물을 80°C에서 2시간 동안 교반하였다. TLC (Petroleum ether : ethyl acetate = 5 : 1, Rf (start material) = 0.7, Rf (product) = 0.6)는 출발물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 혼합물을 물(10.0 mL)에 붓고, 이어서 EtOAc (5.00 mL x 3)로 추출하고, 합한 유기층을 염수(10.0 mL)로 세척하였다. 잔류물을 컬럼크로마토그래피(SiO_2 , Petroleum ether : Ethyl acetate=1 : 1 to 0 : 1)로 정제하였다. 4-(10-브로모데실)-1, 2-디메틸-벤젠(0.20 g, 615 μmol , 20.8% yield)을 무색오일로 얻었다.
- [384] 단계 D: 브로마이드 10-(3, 4-디메틸페닐) 데실 트리페닐 포스포늄 염
- [385] Tol. (7.00 mL) 내 4-(10-브로모데실)-1, 2-디메틸-벤젠 (0.20 g, 618 μmol , 1.00 eq)의 용액에 PPh_3 (806 mg, 3.07 mmol, 5.00 eq)이 첨가되었다. 혼합물을 130°C에서 18시간 동안 교반하였다. TLC1 (Dichloromethane : Methanol = 5 : 1, Rf (product) = 0.4), TLC2 (Petroleum ether : Ethyl acetate = 5 : 1, Rf (start material) = 0.8)는 출발물질이 완전히 소모된 것을 보여주었다. 혼합물을 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 PE : MTBE = 2 : 1 (1 mL)로 25°C에서 30분 동안 분쇄하였다. 브로마이드 10-(3, 4-디메틸페닐) 데실 트리페닐 포스포늄염(0.05 g, 84.2 μmol , 13.6% yield, 98.9% purity, Br-)을 백색 고체로 얻었고, 이는 HNMR (ET46959-5-P1B1), LCMS (ET46959-5-P1B1, T = 2.958, M+ = 507.2, HPLC (ET46959-5-P1A3, T = 4.121, Purity = 98.9%)로 확인되었다.
- [386] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d6)
- [387] δ = 7.93 - 7.86 (m, 3H), 7.84 - 7.73 (m, 12H), 7.00 (d, J = 7.60 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.86 (br d, J = 7.60 Hz, 1H), 3.56 (br t, J = 14.4 Hz, 2H), 2.48 - 2.43 (m, 2H), 2.16 (d, J = 5.20 Hz, 6H), 1.57 - 1.38 (m, 6H), 1.20 (br d, J = 15.2 Hz, 10H)
- [388] 1-12. 10-(2,5-디메톡시-3,4-디메틸-페닐)데실-트리페닐-포스포늄 제조

[389]



[390] 단계 A. 10-브로모-1-(2,5-디메톡시-3,4-디메틸-페닐) 데칸-1-온

[391] EtOH (70.0 mL) 내 2,3-디메틸벤젠-1,4-디올 (11.0 g, 79.6 mmol, 1.00 eq)의 용액에 KOH (11.2 g, 199 mmol, 2.50 eq) 및 디메틸 설페이트 (25.1 g, 199 mmol, 18.9 mL, 2.50 eq)가 첨가되었다. 혼합물은 0°C에서 3.5시간 동안 교반되었다. TLC1 (Petroleum ether : ethyl acetate = 5 : 1, Rf (start material) = 0.10, Rf (product) = 0.70)은 출발물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 혼합물을 3M HCl (100 mL)에 부은 다음, 이어서 PE (50.0 mL x 3)로 추출하고, 합한 유기층을 1M HCl (50.0 mL), water (50.0 mL), brine (50.0 mL)로 세척하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(SiO₂, Petroleum ether : Ethyl acetate = 1 : 0 to 0 : 1)로 정제하였다. 10-브로모-1-(2,5-디메톡시-3,4-디메틸-페닐)데칸-1-온 (6.00 g, 36.1 mmol, 45.3% yield)이 갈색 고체로 얻어졌고, LCMS (ET46959-3-P1A1, T = 0.795, M + H = 167.3) 및 HNMR (ET46959-3-P1A1)로 확인되었다.

[392] ¹H NMR (ET46959-3-P1A1, 400 MHz, DMSO-d₆)

[393] δ = 6.71 (s, 2H), 3.70 (s, 6H), 2.06 (s, 6H)

[394] 단계 B. 10-브로모-1-(2,5-디메톡시-3,4-디메틸-페닐)데칸-1-온

[395] DCE (7.00 mL) 내 1,4-디메톡시-2,3-디메틸 벤젠 (1.00 g, 6.02 mmol, 1.14 mL, 1.00 eq) 및 10-브로모데카노일 클로라이드(1.78 g, 6.62 mmol, 1.10 eq)의 용액에 AlCl₃ (722 mg, 5.41 mmol, 296 uL, 0.90 eq)를 첨가하였다. 혼합물은 25°C에서 2시간 동안 교반되었다. TLC (Petroleum ether : ethyl acetate = 5 : 1, Rf (start material) = 0.83, Rf (product) = 0.72)는 출발물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 반응 혼합물은 H₂O (10.0 mL)로 퀀칭되었고 혼합물은 여과되었다. 반응 여과액은 DCM (20.0 mL x 3)으로 추출되었다. 유기상은 분리되었고, Na₂SO₄상에서 건조되었고, 여과되고 감압 하에서 농축되어 잔류물을 얻었다. 잔류물은 컬럼크로마토그래피(SiO₂, Petroleum ether : Ethyl acetate = 1 : 0 to 0 : 1)로

정제하였다. 10-브로모-1-(2,5-디메톡시-3,4-디메틸-페닐)데칸-1-온 (500 mg, 1.25 mmol, 20.8% yield)이 노란색 고체로 얻어졌고, 이는 HNMR (ET46959-6-P1A1), LCMS (ET46985-6-P1A2, T = 1.011, M + H = 399.3)로 확인되었다.

[396] ¹H NMR : (ET46959-6-P1A1, 400 MHz, DMSO-d₆)

[397] δ = 6.89 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 2.93 (t, J = 7.20 Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.39 - 1.24 (m, 16H)

[398] 단계 C. 1-(10-브로모데실)-2,5-디메톡시-3,4-디메틸-벤젠

[399] TFA (5.00 mL) 내 10-브로모-1-(2,5-디메톡시-3,4-디메틸-페닐)데칸-1-온 (500 mg, 1.25 mmol, 1.00 eq)의 용액에 Et₃SiH (3.64 g, 31.3 mmol, 5.00 mL, 25.0 eq)이 첨가되었다. 혼합물이 80°C에서 2시간 동안 교반되었다. TLC (Petroleum ether : ethyl acetate = 5 : 1, R_f (start material) = 0.7, R_f (product) = 0.6)는 출발물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 혼합물이 물(10.0 mL)에 부어지고, 이어서 EtOAc (5.00mL x 3)로 추출되고, 합한 유기층은 염수(10.0 mL)세척되었다. 잔류물이 컬럼 크로마토그래피(SiO₂, Petroleum ether : Ethyl acetate = 1 : 0 to 0 : 1)로 정제되었다. 1-(10-브로모데실)-2,5-디메톡시-3,4-디메틸-벤젠 (0.20 g, 519 μmol, 41.4% yield)이 옅은 노란색 오일로 얻어졌고, 이는 HNMR (ET46959-8-P1A), LCMS (ET46959-8-P1A, T = 1.055. M + H = 385.3)로 확인되었다.

[400] ¹H NMR (ET46959-8-P1A, 400 MHz, DMSO-d₆)

[401] δ = 6.63 - 6.56 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.77 (q, J = 7.20 Hz, 2H), 1.59 - 1.48 (m, 2H), 1.41 - 1.21 (m, 14H))

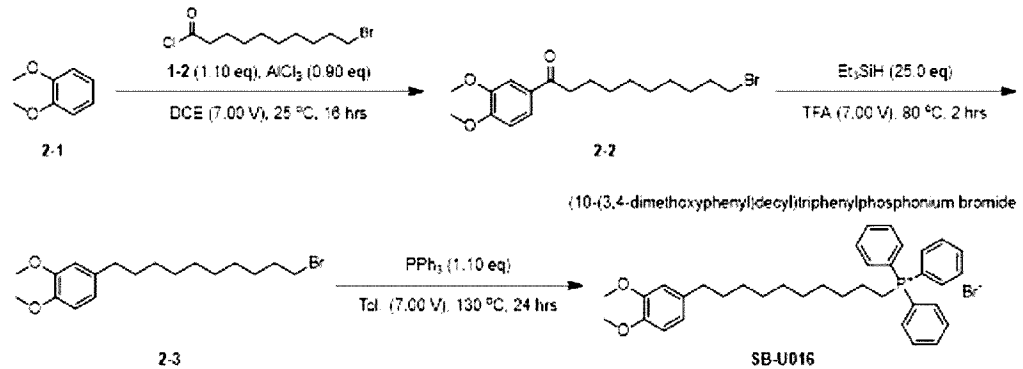
[402] 단계 D. 포름산, 10-(2,5-디메톡시-3,4-디메틸-페닐)데실-트리페닐-포스포늄염

[403] Tol. (3.50 mL) 내 1-(10-브로모데실)-2,5-디메톡시-3,4-디메틸-벤젠(0.20 g, 519 μmol, 1.00 eq)의 용액에 PPh₃ (272 mg, 1.04 mmol, 2.00 eq)이 첨가되었다. 혼합물이 130°C에서 18시간 동안 교반되었다. TLC1 (Dichloromethane : Methanol = 5 : 1, R_f (product) = 0.4), TLC2 (Petroleum ether : Ethyl acetate = 5 : 1, R_f (start material) = 0.8)는 출발물질이 완전히 소모되었음을 보여주었다. 혼합물은 진공에서 농축되었다. 잔류물은 prep-HPLC (column : Phenomene x Luna C18 75 x 30mm x 3μm; mobile phase : [water (FA) - ACN]; B%: 40% - 75%, 8min)로 정제되었다. 포름산, 10-(2,5-디메톡시-3,4-디메틸-페닐)데실-트리페닐-포스포늄염(30.0 mg, 52.5 μmol, 10.1% yield, 99.3% purity)이 노란색 검으로 얻어졌고, 이는 HNMR (ET46959-9-P1A), LCMS (ET46959-9-P1A, T = 2.938. M+ = 567.2), HPLC (ET46959-9-P1B, T = 4.052, Purity = 99.3%)로 확인되었다.

[404] ¹H NMR (ET46959-9-P1A, 400 MHz, DMSO-d₆)

[405] δ = 8.52 (s, 1H), 7.92 - 7.86 (m, 3H), 7.83 - 7.74 (m, 12H), 6.61 - 6.56 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.54 (s, 5H), 2.10 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.56 - 1.38 (m, 7H), 1.30 - 1.15 (m, 11H)

- [406] 1-13. (10-(3,4-디메톡시페닐)데실) 트리페닐포스포늄 브로마이드 제조
 [407]



- [408] 단계 1: 10-브로모-1-(3,4-디메톡시페닐)데칸-1-온
 [409] DCE (35.0 mL) 내 1,2-디메톡시벤젠 (5.00 g, 36.2 mmol, 4.63 mL, 1.00 eq) 및 10-브로모데카노일 클로라이드 (10.7 g, 39.8 mmol, 1.10 eq)의 용액에 AlCl_3 (4.34 g, 32.6 mmol, 1.78 mL, 0.90 eq)가 첨가되었다. 혼합물이 25°C에서 16시간동안 교반되었다. 혼합물이 얼음물(50.0 mL)에 부어지고 DCM (50.0 mL)으로 추출되었다. 유기상이 분리되고 진공에서 농축되었다. 잔류물이 컬럼크로마토그래피(SiO_2 , Petroleum ether : Ethyl acetate = 1 : 0 to 1 : 1)로 정제되었다. 10-브로모-1-(3,4-디메톡시페닐) 데칸-1-온 (3.00 g, 7.92 mmol, 21.8% yield, 98.0% purity)이 백색 고체로 얻어졌다.
- [410] MS (ESI) : mass calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{BrO}_3$, 370.11; m/z found, 371.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$.
 [411] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 -d)
 [412] δ = 7.59 (dd, J = 8.32, 1.96 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 1.96 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 8.44 Hz, 1H), 3.95 (d, J = 3.32 Hz, 6H), 3.41 (t, J = 6.84 Hz, 2H), 2.92 (t, J = 7.40 Hz, 2H), 1.85 (quin, J = 7.16 Hz, 2H), 1.66 - 1.78 (m, 2H), 1.27 - 1.50 (m, 10H)
- [413] 단계 2: 4-(10-브로모데실)-1,2-디메톡시벤젠
 [414] TFA (15.0 mL) 내 10-브로모-1-(3,4-디메톡시페닐) 데칸-1-온 (2.00 g, 5.39 mmol, 1.00 eq)의 용액에 Et_3SiH (15.7 g, 134 mmol, 21.5 mL, 25.0 eq)이 첨가되었다. 혼합물이 80°C에서 1시간 동안 교반되었다. 혼합물이 진공에서 농축되었다. 잔류물이 컬럼 크로마토그래피(SiO_2 , Petroleum ether : Ethyl acetate = 1 : 0 to 10 : 1)로 정제되었다. 4-(10-브로모데실)-1,2-디메톡시-벤젠(1.00 g, 2.79 mmol, 51.7% yield, 99.5% purity)이 옅은 노란색 오일로 얻어졌다.
- [415] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{BrO}_2$, 356.14; m/z found, 357.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$.
 [416] 단계 3: (10-(3,4-디메톡시페닐)데실)트리페닐포스포늄 브로마이드
 [417] Tol. (1.40 mL) 내 4-(10-브로모데실)-1,2-디메톡시-벤젠(200 mg, 559 μmol , 1.00 eq)의 용액에 PPh_3 (161 mg, 615 μmol , 1.10 eq)이 첨가되었다. 혼합물이 130°C에서 12시간 동안 교반되었다. 혼합물이 진공에서 농축되었다. 조생성물을 MeCN (2.00 mL)으로 20°C에서 1시간 동안 분쇄하고, 이어서 역상(neutral condition)으로

정제하였다. 10-(3,4-디메톡시페닐)테실-트리페닐-포스포늄 (50.0 mg, 92.3 μmol , 16.4% yield, 99.6% purity)이 노란색 검으로 얻어졌다.

[418] MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{BrO}_2\text{P}$, 618.23; m/z found, 539.2 $[\text{M}]^+$.

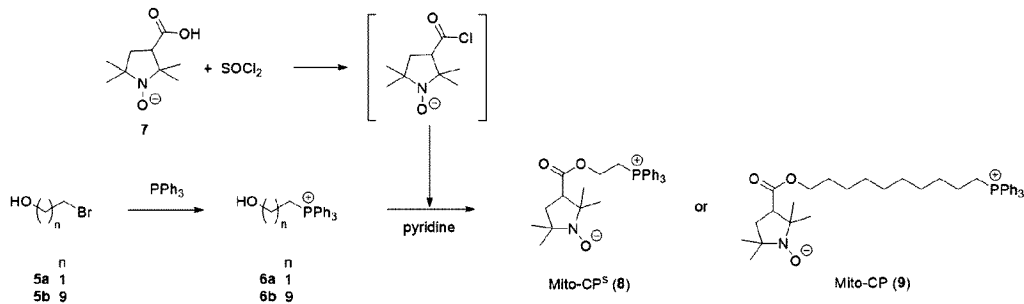
[419] ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)

[420] $\delta = 7.85 - 7.95$ (m, 3H), 7.73 - 7.84 (m, 12H), 6.82 (d, $J = 8.16$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 1.84$ Hz, 1H), 6.66 (dd, $J = 8.08, 1.83$ Hz, 1H), 3.70 (d, $J = 7.96$ Hz, 6H), 3.48 - 3.63 (m, 2H), 2.47 (br s, 2H), 2.07 (s, 1H), 1.37 - 1.59 (m, 6H), 1.10 - 1.32 (m, 10H)

[421] 1-14.

Mito-CP(2,2,5,5-테트라메틸-3-(((10-(트리페닐포스포니오)테실)옥시)카르보닐)피롤리딘-1-올레이트) 및 Mito-CP^s
(2,2,5,5-테트라메틸-3-((2-(트리페닐포스포니오)에톡시)카르보닐)피롤리딘-1-올레이트)제조

[422]



[423] (2-히드록시에틸)트리페닐포스포늄(6a).

[424] 2-브로모에탄올 (1.5 mmol), PPh_3 (1.0 mmol), 및 아세트니트릴 (20 mL)의 혼합물을 24시간 동안 환류하였다. 실온으로 냉각 후에, 용매는 회전 증발을 통해 제거되었다. 잔류 연-황색 오일을 에틸 에테르로 2회 세척하여 포스포늄염 6a를 얻었다. Yield: 77%; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.95 - 7.56 (m, 15H), 5.21 (s, 1H), 4.14 (d, $J = 16.6$ Hz, 2H), 3.83 (s, 2H).

[425] (10-히드록시테실)트리페닐포스포늄(6b).

[426] 6a의 합성 절차를 10-브로모데칸올 (1.5 mmol)과 함께 적용하여 생성물을 갈색 오일로 얻었다. Yield: 85%; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.92 - 7.83 (m, 6H), 7.79 (dd, $J = 7.7, 5.8$ Hz, 3H), 7.70 (m, 6H), 3.91 - 3.81 (m, 2H), 3.63 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.69 - 1.50 (m, 12H), 1.31 (m, 4H).

[427] 2,2,5,5-테트라메틸-3-((2-(트리페닐포스포니오)에톡시)카르보닐)피롤리딘-1-올레이트(Mito-CPs; 8).

[428] 벤젠 내 3-카르복시-2,2,5,5-테트라메틸피롤리딘-1-올레이트(7, 1.0 mmol)의 용액에 피리딘(1.0 mmol)이 첨가되었다. 플라스크는 아이스 베스에서 계속 냉각시키고 티오닐 클로라이드(2.0 mmol)를 1시간 동안 적가하였다. 용매는 진공 증발을 통해 제거되었다. 생성된 잔류물과

(2-히드록시에틸)트리페닐포스포늄(6a, 1.0 mmol)을 디클로로메탄(10 mL)에 용해시켰다. 이 용액에, 피리딘(1.0 mmol)을 아이스 배스 하에 적가하고 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 수성 NaHCO_3 용액으로 웅칭하고 에틸아세테이트(60 ml x 3)로 추출하였다. 합한 유기층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공에서 증발시켰다. 조생성물을 MPLC (MeOH 5% in DCM)로 정제하여 화합물을 얻었다 (21%); HRMS (ESI, m/z) calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{NO}_3\text{P}$ [M]⁺ 475.2276, found 475.2260.

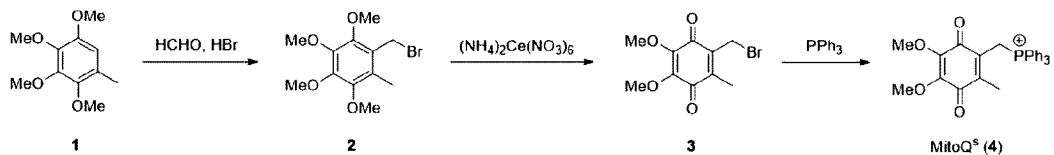
[429] 2,2,5,5-테트라메틸-3-(((10-(트리페닐포스포니오)데실)옥시)카르보닐)피롤리딘-1-올레이트 (Mito-CP; 9).

[430] 8의 합성 절차를 (10-히드록시데실)트리페닐포스포늄(6b, 1.0 mmol)과 함께 적용하여 9를 갈색 오일로 얻었다. Yield: 24%; HRMS (ESI, m/z) calculated for $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{NO}_3\text{P}$ [M]⁺ 587.3528, found 587.3524.

[431] 1-15. MitoQ^s

:((4,5-디메톡시-2-메틸-3,6-디옥소시클로헥사-1,4-디엔-1-일)메틸)트리페닐포스포늄 브로마이드 제조

[432]



[433] 1-(브로모메틸)-2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸벤젠(2).

[434] 1,2,3,4-테트라메톡시-5-메틸벤젠 (2.721 g, 12.7 mmol) 및 파라포름알데히드 (0.763 g, 25.4 mmol)를 47% HBr (10 mL)에 용해시켰다. 이어서 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 교반하고 실온에 두었다. 반응이 완료된 후, 생성물을 헥산(40 mL)으로 추출하고 합한 유기층을 소듐 설페이트 상에서 건조하였다. 남은 용매를 진공에서 제거하여 밝은 노란색 오일 2를 생성하였다 (yield: 88%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.61 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 2.27 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 148.5, 148.0, 147.8, 144.7, 126.6, 124.9, 61.3, 61.1, 61.1, 60.8, 26.6, 11.1.

[435] 2-(브로모메틸)-5,6-디메톡시-3-메틸시클로헥사-2,5-디엔-1,4-디온(3).

[436] 중간체 2 (211 mg, 0.687 mmol)를 THF (10 mL)에 용해시켰다. 이어서 물(10 mL)에 녹인 암모늄 세륨(IV) 질산염(1.5 g, 2.74 mmol)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 생성된 혼합물을 DCM (20 mL)으로 추출하고 추출물을 중성이 될 때까지 염수로 세척하였다. 이어서 합한 유기층을 소듐 설페이트 상에서 건조시키고 남은 용매를 진공에서 제거하였다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 노란색 오일 3을 얻었다(yield: 45%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.39 (s, 2H), 4.03 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 2.17 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 183.9, 181.6,

145.0, 144.5, 141.7, 137.6, 61.4, 61.3, 21.5, 12.0; MS (ESI, m/z) calculated for C₁₀H₁₂BrO₄ [M+H]⁺ 274.99, found 275.00.

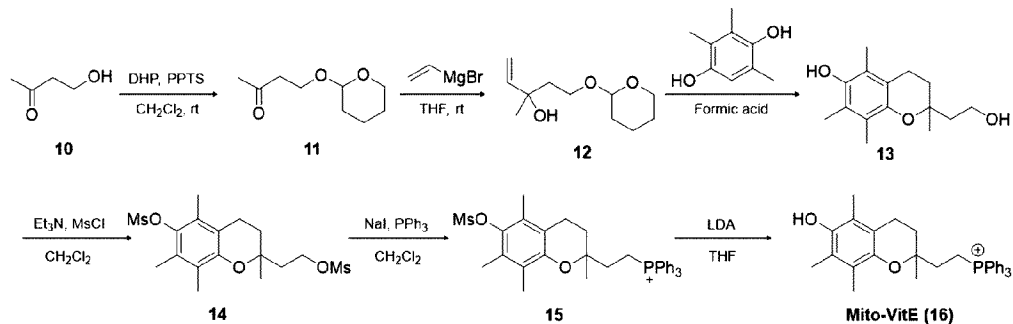
[437] ((4,5-디메톡시-2-메틸-3,6-디옥소시클로헥사-1,4-디엔-1-일)메틸)트리페닐포스포늄 (MitoQs; 4).

[438] 3 (22.31 mg, 0.0726 mmol) 및 트리페닐포스핀(57.1 mg, 0.218 mmol)을 ACN (10 mL)에 용해시키고 반응 혼합물을 밤새 환류시켰다. 실온으로 냉각한 후, 남은 용매를 진공에서 제거하였다. 잔류물을 실리카겔 크로마토 그래피로 정제하여 흰색 고체 4를 얻었다(yield: 18%); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.88-7.81 (m, 3H), 7.70-7.64 (m, 6H), 7.62-7.55 (m, 6H), 3.80 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.34 (s, 2H), 1.81 (d, J = 1.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 182.74 (d, J = 3.3 Hz), 182.65 (d, J = 2.3 Hz), 145.80, 145.70, 145.21, 143.96, 135.27 (d, J = 3.0 Hz), 134.30 (d, J = 10.1 Hz), 130.37 (d, J = 12.8 Hz), 118.14 (d, J = 85.9 Hz), 61.31, 61.26, 24.81 (d, J = 49.8 Hz), 14.68 (d, J = 2.7 Hz); HRMS (ESI, m/z) calculated for C₂₈H₂₆O₄P [M]⁺ 457.1563, found 457.1566.

[439] 1-16.

Mito-VitE:2-(6-히드록시-2,5,7,8-테트라메틸크로만-2-일)에틸)트리페닐포스포늄 제조

[440]



[441] 4-(테트라히드로-2H-피란-2-일)부탄-2-온 (11).

[442] CH₂Cl₂ (15 ml) 내 4-히드록시부탄-2-온 (11.35 mmol) 및 3,4-디히드로-2H-피란 (15.89 mmol)의 용액에, 피리디늄 p-톨루엔설포네이트(1.135 mmol, 0.1 eq)를 첨가하고 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 진공에서 농축하고 잔류물을 Et₂O (50 mL)에 용해시켰다. 이를 포화 수성 NaCl (40 mL) 및 H₂O (10 mL)로 세척하고, 무수 MgSO₄로 건조하고, 여과하고 진공에서 농축하여 화합물 11을 얻었다. Yield: 64%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.60 (t, J = 3.4 Hz, 1H), 4.00 (dt, J = 10.2, 6.2 Hz, 1H), 3.89 - 3.80 (m, 1H), 3.69 (dt, J = 10.1, 6.3 Hz, 1H), 3.55 - 3.45 (m, 1H), 2.71 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.83 - 1.64 (m, 3H), 1.60 - 1.54 (m, 3H).

[443] 3-메틸-5-((테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)펜트-1-엔-3-올(12).

[444] 비닐마그네슘 브로마이드(13.35 mmol)를 THF (25 ml) 내 11 (5.81 mmol) 용액에

-78 °C에서 첨가하였다. 이를 2시간 동안 교반 한 다음 30분에 걸쳐서 실온으로 가온했다. 포화 수성 NH₄Cl (50 mL)를 적가하고 이를 Et₂O로 추출하였다. 합한 유기상을 포화 수성 NaCl로 세척하고, 무수 MgSO₄상에서 건조하고, 여과하고 농축하여 옅은 노란색 오일을 얻었다. 조생성물을 MPLC로 정제하였다.

Yield:93%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.90 (ddd, J = 16.7, 10.7, 5.8 Hz, 1H), 5.38 - 5.27 (m, 2H), 5.10 (ddd, J = 10.3, 8.7, 1.4 Hz, 1H), 4.67 - 4.53 (m, 1H), 3.97 (dt, J = 9.7, 4.2 Hz, 1H), 3.83 (td, J = 11.5, 5.6 Hz, 1H), 3.59 - 3.45 (m, 3H), 1.97 (m, 1H), 1.80 - 1.72 (m, 2H), 1.59 - 1.49 (m, 3H), 1.29 (t, J = 5.0 Hz, 3H).

[445] 2-(2-히드록시에틸)-2,5,7,8-테트라메틸크로만-6-올 (13).

[446] 포름산(10 ml) 내 12 (5.39 mmol) 및 새로 제조된 2,3,5-트리메틸벤젠-1,4-디올 (4.49 mmol)의 용액이 질소환경 하에 3.5시간 동안 환류되었다. 반응 혼합물을 으깬 얼음에 붓고 유기물질을 Et₂O로 추출하였다. 합한 유기상을 H₂O로 세척하고, 무수 MgSO₄로 건조하고, 진공에서 농축하였다. 갈색 유성 잔류물을 MeOH 및 conc. HCl에 용해시키고 아르곤 하에서 30분 동안 환류시켰다. 용매를 진공에서 제거한 후, 잔류물을 Et₂O에 용해시켰다. 아르곤 하에서 H₂O, 포화 수성 NaHCO₃, H₂O로 다시 세척하고, 무수 MgSO₄로 건조하고, 여과하고, 농축하여 갈색 오일을 얻었다. 조생성물을 MPLC로 정제하여 화합물을 얻었다. Yield: 35%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.30 (s, 1H), 4.23 (s, 1H), 3.97 - 3.86 (m, 2H), 2.66 (dd, J = 9.8, 6.2 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.97 (m, 2H), 1.93 - 1.82 (m, 2H), 1.29 (s, 3H).

[447] 2,5,7,8-테트라메틸-2-(2-((메틸설포닐)옥시)에틸)크로만-6-일 메탄설포네이트(14).

[448] CH₂Cl₂ (2 ml) 내 13 (0.479 mmol) 및 트리에틸아민 (2.88 mmol)의 용액에 메탄설포닐 클로라이드(1.055 mmol)를 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂(20 mL)로 희석하였다. 이것을 H₂O로 세척하고, 무수 MgSO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축하여 백색 고체를 얻었다. 이를 EtOH로부터 재결정하여 생성물을 얻었다. Yield: 43%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.56 - 4.45 (m, 2H), 4.41 (dd, J = 14.8, 8.7 Hz, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.63 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.23 (d, J = 13.2 Hz, 6H), 2.09 (s, 3H), 1.86 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.31 (s, 3H).

[449] 트리페닐(2-(2,5,7,8-테트라메틸-6-((메틸설포닐)옥시)크로만-2-일)에틸)포스포늄 (15).

[450] 14(0.256 mmol), 요오드화 나트륨(192 mg, 1.279 mmol), 및 트리페닐포스핀 (1.279 mmol)의 혼합물을 Kimax 튜브에서 아르곤으로 플러싱하고, 이어서 밀봉하고 반응을 90 °C에서 48시간 동안 용융물로 교반하였다. 조생성물을 CH₂Cl₂에 용해시키고 석유 에테르로부터 3회 침전시켰다. 생성물을 메탄올에 용해시키고 -Oms가 로딩된 음이온 교환 컬럼을 통과시켰다. 잔류 용매를 진공에서 제거하여 순수한 생성물 15를 얻었다. Yield: 39%; ¹H NMR (400 MHz,

CDCI₃) δ 7.87 - 7.72 (m, 9H), 7.66 (td, J = 7.9, 3.4 Hz, 6H), 4.12 (m, 2H), 3.28 (s, 3H), 2.61 - 2.49 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.05 (s, 2H), 2.03 (s, 3H), 2.00 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 1.49 (s, 3H).

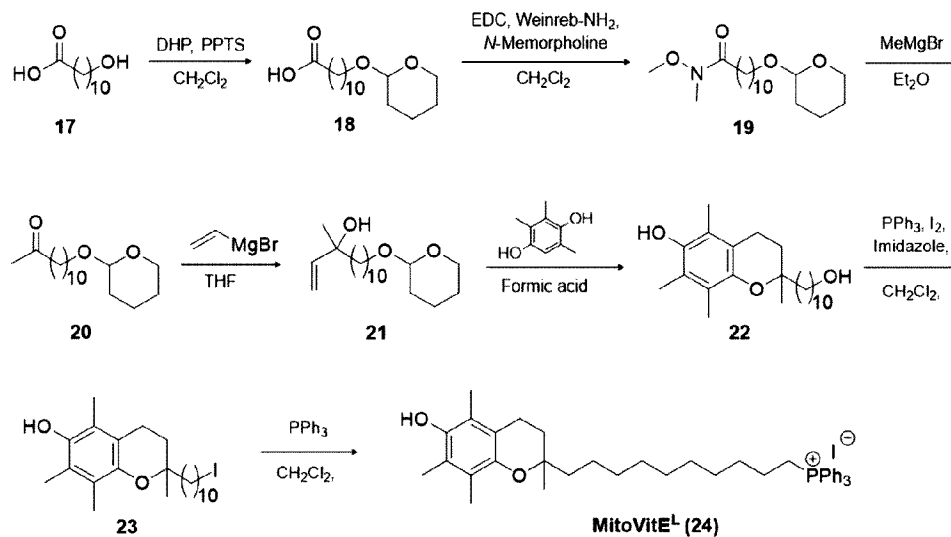
[451] (2-(6-히드록시-2,5,7,8-테트라메틸크로만-2-일)에틸)트리페닐포스포늄(Mito-VitE; 16).

[452] 리튬 다이소프로필아미드(0.119 mmol, 1 M solution in THF)가 0 °C에서 THF (2 ml) 내 15 (0.100 mmol)의 용액에 첨가되었다. 30분 후 용액을 실온으로 가온하고 이어서 수성 포화 NH₄OMs (10 mL)을 첨가하였다. 수성층을 CH₂Cl₂로 3번 추출하고 유기상을 합하여 무수 MgSO₄상에서 건조하고, 여과하고, 진공에서 농축하였다. 잔류물을 MPLC로 정제하여 생성물 16을 얻었다. Yield: 9%; ¹H NMR (400 MHz, CDCI₃) δ 7.85 - 7.73 (m, 4H), 7.71 - 7.58 (m, 11H), 3.77 - 3.64 (m, 2H), 3.41 - 3.28 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.07 (d, J = 11.7 Hz, 6H), 1.94 (m, 4H), 1.34 (d, J = 7.6 Hz, 3H); HRMS (ESI, m/z) calculated for C₃₃H₃₆O₂P [M]⁺ 495.2447, found 495.2445.

[453] 1-17. Mito-VitE^L

:(10-(6-히드록시-2,5,7,8-테트라메틸크로만-2-일)데실)트리페닐포스포늄 아이오다이드 제조

[454]



[455] 11-((테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)운데실산 (18).

[456] CH₂Cl₂ (15 ml) 내 11-히드록시운데실산(17, 11.35 mmol), 3,4-디히드로-2H-피란 (15.89 mmol), 및 피리디늄 p-톨루엔설포네이트(1.135 mmol)의 용액을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공에서 농축하고 잔류물을 Et₂O (50 mL)에 용해시켰다. 이를 포화 수성 NaCl (40 mL) 및 H₂O (10 mL)로 세척하고, 무수 MgSO₄상에서 건조하고, 여과하고, 진공에서 농축하여 18을 얻었다. Yield: 46%; ¹H NMR (400 MHz, CDCI₃) δ 4.63 - 4.48 (m, 1H), 3.88 (ddd, J = 11.1, 7.6, 3.3

- Hz, 1H), 3.75 - 3.64 (m, 1H), 3.55 - 3.48 (m, 1H), 3.38 (dt, J = 9.6, 6.7 Hz, 1H), 2.34 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.91 - 1.44 (m, 14H), 1.32 (d, J = 24.9 Hz, 8H).
- [457] N-메톡시-N-메틸-11-((테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)운데카나미드(19).
- [458] CH₂Cl₂ (10 mL) 내 18 (5.23 mmol)의 용액에, N,O-디메틸히드록실아민 히드로클로라이드(5.75 mmol) 및 N-메틸모르폴린(5.75 mmol)을 -15 °C에서 연속적으로 첨가하였다. 10분 후, N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-테틸카르보디이미드 히드로클로라이드(1.62 g, 5.75 mmol)를 15분에 걸쳐 나누어 첨가하고 3시간 동안 -15 °C에서 교반하였다. 반응을 1M HCl (5 mL) 첨가로 퀀칭하고 유기물을 CH₂Cl₂ (3 x 50 mL)로 추출하였다. 유기 추출물을 합하고 포화 NaHCO₃ 용액(50 mL)으로 세척하고, MgSO₄로 건조하고, 여과하고 증발시켜 원하는 아미드 19 (yield: 80%)를 얻었으며, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. 1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.60 (dd, J = 20.5, 17.9 Hz, 1H), 3.87 (ddd, J = 11.1, 7.4, 3.5 Hz, 1H), 3.79 - 3.65 (m, 4H), 3.50 (dt, J = 5.1, 4.5 Hz, 1H), 3.38 (dt, J = 9.6, 6.7 Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 2.41 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.90 - 1.78 (m, 1H), 1.76 - 1.47 (m, 14H), 1.29 (s, 8H).
- [459] 12-((테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)도데칸-2-온 (20).
- [460] Et₂O (13 mL) 내 19 (4.18 mmol)의 용액에 MeMgI (10.45 mmol)를 0 °C에서 첨가하였다. 동일한 온도에서 3시간 동안 교반한 후, 포화 수성 NH₄Cl 용액(30 mL)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 유기층을 분리하고 수성 층을 tBuOMe (3 X 30 mL)로 추출하였다. 합한 유기층을 Na₂SO₄로 건조시키고 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 플래쉬 크로마토그래피로 정제하여 화합물 20을 얻었다. Yield: 80%; 1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.61 - 4.54 (m, 1H), 3.87 (ddd, J = 11.1, 7.4, 3.4 Hz, 1H), 3.77 - 3.66 (m, 1H), 3.55 - 3.46 (m, 1H), 3.38 (dt, J = 9.6, 6.7 Hz, 1H), 2.41 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.90 - 1.76 (m, 1H), 1.72 (ddd, J = 11.9, 6.0, 3.2 Hz, 1H), 1.63 - 1.47 (m, 14H), 1.37 - 1.20 (m, 6H).
- [461] 3-메틸-13-((테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)트리덱-1-엔-3-올(21).
- [462] 비닐마그네슘 브로마이드(8.3 mmol, 2.5 eq)를 THF (15 ml) 내 20 (3.32 mmol)의 용액에 -78 °C에서 첨가하였다. 이 용액은 2시간 동안 교반되었고 이어서 30분에 걸쳐서 실온으로 가온되었다. 포화 수성 NH₄Cl (50 mL)이 적가되고 유기 물질이 Et₂O로 추출되었다. 합한 유기층이 포화 수성 NaCl로 세척되었고, 무수 MgSO₄ 상에서 건조되고, 여과되고, 농축되고, MPLC로 정제되어 화합물 21을 얻었다. Yield: 93%; 1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.91 (dd, J = 17.4, 10.8 Hz, 1H), 5.20 (dd, J = 17.4, 1.2 Hz, 1H), 5.04 (dd, J = 10.8, 1.2 Hz, 1H), 4.64 - 4.51 (m, 2H), 3.87 (ddd, J = 11.0, 7.4, 3.3 Hz, 2H), 3.77 - 3.65 (m, 2H), 3.56 - 3.46 (m, 2H), 3.38 (dt, J = 9.5, 6.7 Hz, 2H), 1.90 - 1.77 (m, 2H), 1.71 (tt, J = 16.3, 7.0 Hz, 2H), 1.64 - 1.46 (m, 10H), 1.27 (s, 8H).
- [463] 2-(10-히드록시데실)-2,5,7,8-테트라메틸크로만-6-올 (22).
- [464] 포름산 (10 ml) 내 21 (3.08 mmol) 및 새로 제조된 2,3,5-트리메틸벤젠-1,4-디올

(2.56 mmol) 용액이 질소 환경 하에서 3.5시간 동안 환류되었다. 반응 혼합물을 으깬 얼음에 붓고 유기 물질을 아르곤 하에 Et₂O로 추출하였다. 합한 유기상을 H₂O로 세척하고, 무수 MgSO₄상에서 건조하고, 진공에서 농축하였다. 갈색 잔류물을 MeOH 및 conc. HCl에 용해시키고, 반응 혼합물을 아르곤 하에서 추가로 30분 동안 환류시켰다. 용매를 진공에서 제거하고 잔류물을 Et₂O에 용해시켰다. 아르곤 하에서 H₂O, 포화 수성 NaHCO₃, H₂O로 다시 세척하고, 무수 MgSO₄로 건조하고, 여과하고, 농축하여 갈색 오일을 얻었다. 이것을 MPLC로 정제하여 화합물 22를 얻었다. Yield: 35%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.38 (s, 1H), 3.62 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.59 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.10 (s, 6H), 1.76 (qq, J = 13.9, 7.1 Hz, 2H), 1.64 - 1.24 (m, 17H), 1.22 (s, 3H).

[465] 2-(10-아이오도데실)-2,5,7,8-테트라메틸크로만-6-올 (23).

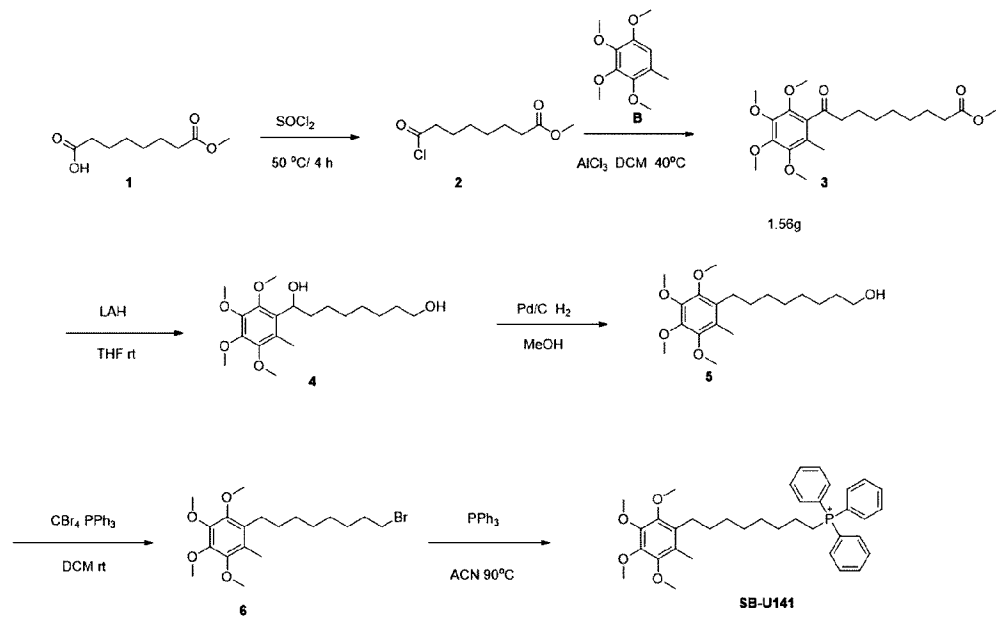
[466] CH₂Cl₂ (2 ml) 내 트리페닐포스핀 (0.348 mmol), 1H-이미다졸 (0.348 mmol), 및 아이오딘 (0.182 mmol)의 용액에 CH₂Cl₂ (2 ml) 내 22 (0.165 mmol)의 용액을 0 °C에서 주사기를 통해 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 추가로 12시간 동안 교반하였다. 혼합물을 Na₂SO₃, H₂O, 염수 용액으로 세척하였고, Na₂SO₄상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 생성된 잔류물을 MPLC로 정제하여 화합물 23을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.19 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 3.19 (t, J = 4.0 Hz, 2H), 2.60 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.16 (m, 3H), 2.11 (s, 6H), 1.90 - 1.69 (m, 5H), 1.63 - 1.47 (m, 4H), 1.44 - 1.21 (m, 10H), 0.99 - 0.95 (m, 1H), 0.86-0.83 (m, 3H).

[467] (10-(6-히드록시-2,5,7,8-테트라메틸크로만-2-일)데실)트리페닐포스포늄 아이오다이드(Mito-VitE; 24).

[468] 23 (0.25 mmol) 및 트리페닐포스핀(327 mg, 1.25 mmol)의 혼합물을 Kimax 튜브에서 아르곤으로 플라싱하고, 밀봉하고, 용융물로 90 °C에서 48시간 동안 교반하였다. 조생성물을 CH₂Cl₂에 용해시키고 석유에테르로부터 3회 침전시켰다. 잔류 용매를 진공에서 제거하여 24를 얻었다. Yield: 12 %; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.86 - 7.79 (m, 9H), 7.73 - 7.68 (m, 6H), 3.76-3.71 (m, 2H), 2.59 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.81-1.72 (m, 2H), 1.63-1.62 (m, 4H), 1.37-1.36 (m, 2H), 1.21-1.18 (m, 15H); HRMS (ESI, m/z) calculated for C₄₁H₅₂O₂P [M]⁺ 607.3699, found 607.2697.

[469] 1-18. SB-U141: 트리페닐(8-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)옥틸)포스포늄의 제조

[470]

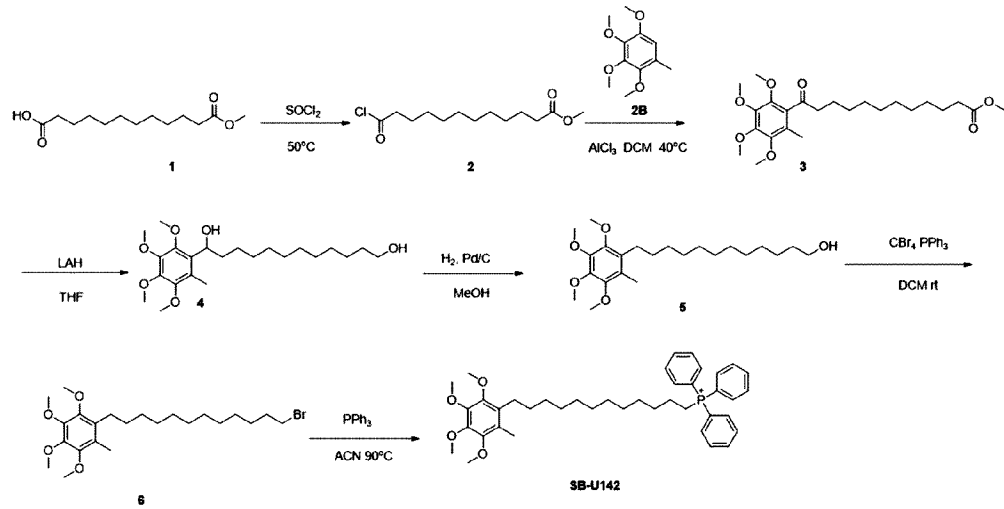


[471] 8-메톡시-8-옥소옥타노이산(1)을 SOCl_2 와 50°C 에서 4시간 반응하여 메틸-8-클로로-8-옥소옥타노에이트(2)를 확보하였다. 2와 1,2,3,4-테트라메톡시-5-메틸벤젠을 AlCl_3 과 디클로로메탄(DCM)에서 40°C 로 반응시켜 메틸 9-옥소-9-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)노나노에이트(3)를 합성하였다. 3을 LAH와 THF에서 상온 반응하여 1-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)옥탄-1,8-디올(4)을 합성하였다. 4를 Pd/C H_2 와 MeOH에서 반응하여 8-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)옥탄-1-올(5)을 합성하였다. 5를 CBr_4PPh_3 와 DCM에서 반응하여 1-(8-브로모옥틸)-2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸벤젠(6)을 확보하였다. 6을 PPh_3 와 ACN에서 90°C 로 반응하여 트리페닐(8-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)옥틸)포스포늄(SB-U141)을 확보하였다.

[472] 1-19. SB-U142:

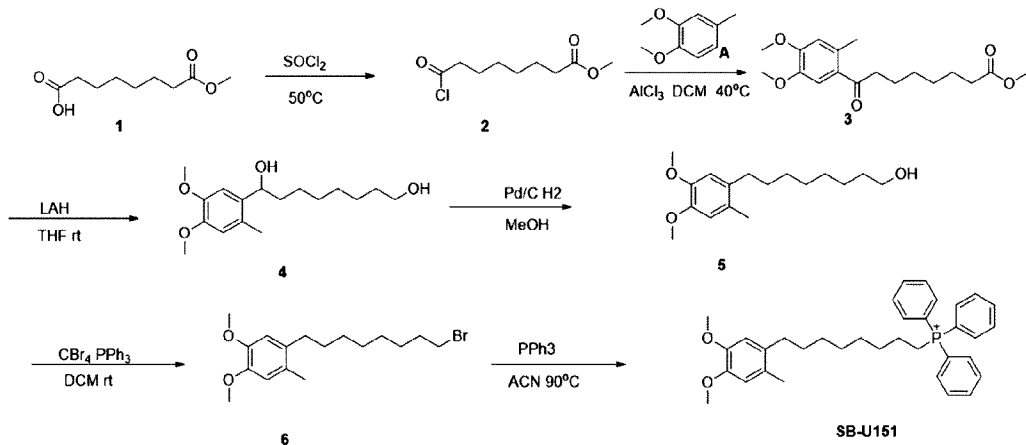
트리페닐(12-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)도데실)포스포늄의 제조

[473]



[474] 12-메톡시-12-옥소도데칸산(1)을 SOCl_2 와 50°C 에서 4시간 반응하여 메틸 12-클로로-12-옥소도데카노에이트(2)를 합성하였다. 2와 1,2,3,4-테트라메톡시-5-메틸벤젠, AlCl_3 을 DCM에서 40°C 반응하여 메틸 12-옥소-12-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)도데카노에이트(3)를 확보하였다. 3과 LAH를 THF에서 반응하여 1-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)도데칸-1,12-디올(4)을 확보하였다. 4를 H_2 , Pd/C와 MeOH에서 반응하여 12-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)도데칸-1-올(5)을 확보하였다. 5와 CBr_4 PPh₃를 DCM에서 상온 반응하여 1-(12-브로모도데실)-2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸벤젠(6)을 합성하였다. 6을 PPh₃와 ACN에서 90°C 로 반응하여 트리페닐(12-(2,3,4,5-테트라메톡시-6-메틸페닐)도데실)포스포늄(SB-U142)을 합성하였다.

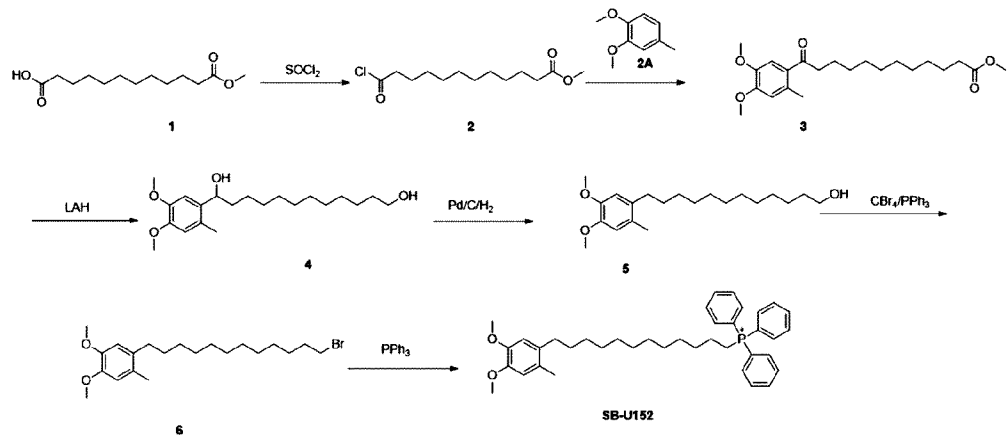
[475] 1-20. SB-U151: (8-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)옥틸)트리페닐포스포늄의 제조
[476]



[477] 8-메톡시-8-옥소옥탄산을 SOCl_2 와 50°C 에서 반응하여 메틸 8-클로로-8-옥소옥타노에이트(2)를 확보하였다. 2를 AlCl_3 와 DCM에서 40°C 에서 반응하여 메틸 8-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)-8-옥소옥타노에이트(3)를 확보하였다. 3을 LAH와 THF에서 상온 반응하여 1-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)옥탄-1,8-디올(4)을 확보하였다. 4와 Pd/C H_2 를 MeOH에서 반응하여 8-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)옥탄-1-올(5)을 확보하였다. 5를 CBr_4 PPh_3 와 DCM에서 상온 반응하여 1-(8-브로모옥틸)-4,5-디메톡시-2-메틸벤젠(6)을 확보하였다. 6을 PPh_3 와 ACN에서 90°C 에서 반응하여 (8-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)옥틸)트리페닐포스포늄(SB-U151)을 확보하였다.

[478] 1-21. SB-U152: (12-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)도데실)트리페닐포스포늄의 제조

[479]



[480] 12-메톡시-12-옥소도데칸산을 SOCl_2 와 50°C 에서 4시간 반응하여 메틸 12-클로로-12-옥소도데카노에이트(2)를 합성하였다. 2를 1,2-디메톡시-4-메틸벤젠과 반응하여 메틸 12-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)-12-옥소도데카노에이트(3)를 합성하였다. 3을 LAH와 반응하여 1-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)도데칸-1,12-디올 (4)를 합성하였다. 4를 Pd/C/ H_2 와 반응하여 12-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)도데칸-1-올(5)을 합성하였다. 5를 CBr_4 / PPh_3 와 반응하여 1-(12-브로모도데실)-4,5-디메톡시-2-메틸벤젠(6)을 합성하였다. 6을 PPh_3 와 반응하여 (12-(4,5-디메톡시-2-메틸페닐)도데실)트리페닐포스포늄(SB-U152)을 합성하였다.

[481]

[482] 실시예 2. 재조합 단백질 제조

[483] zTRAP1, hTRAP1을 암호화하는 유전자를 N- 말단 헥사-히스티딘 태그에 이어 TEV 프로테아제 절단 부위가 있는 변형된 pET-Duet 벡터에 클로닝하고 E. coli

BL21 (DE3) 세포에서 발현시켰다. 20°C에서 0.4mM IPTG로 유도 후 15 시간 후, 세포를 수확하고 초음파처리로 용해시켰다. Ni²⁺ 친화성 크로마토그래피 컬럼 (GE Healthcare)에 용해물의 가용성 분획이 적용되었다. 헥사-히스티딘 태그를 TEV 프로테아제에 의해 절단하고, 단백질을 25mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 5 μ mM beta-메르캅토에탄올 (beta-ME)을 포함하는 완충액에서 겔 여과 크로마토그래피로 추가로 정제하였다.

[484]

[485] 실시예 3. 구조 분석

[486] 본 발명자들은 TRAP1에 결합하는 화합물의 구조를 도출하기 위해, TRAP1과 MitoQ의 결합 구조를 분석하였다.

[487] 정제된 zTRAP1은 1:1.5 몰비로 AMPPNP와 혼합되었다. 결정화는 Lavery et al., 2014에서 설명한대로 수행되었다. 결정이 성장한 후 0.1mM MitoQ를 결정화 drop에 첨가하고 24 시간 동안 배양하였다. X-선 회절 실험을 위해 결정을 20 % 글리세롤을 포함하는 웰 용액으로 옮기고 액체 질소에서 급속 냉동하였다. 회절 데이터는 Pohang Accelerator Laboratory (PAL)의 빔라인 5C에서 수집되었으며 HKL-2000 소프트웨어를 사용하여 처리되었다 (Otwinowski and Minor, 1997). MitoQ의 전자 밀도는 difference Fourier 방법으로 계산되었습니다. 모델 구축 및 정제는 각각 Coot 및 Phenix 프로그램 (Adams et al., 2010; Emsley et al., 2010)에 의해 수행되었다.

[488] 구조분석 결과, TRAP1의 두개의 protomer사이의 거리가 약 25Å으로 Ub 모이어티와 TPP 모이어티간의 거리가 적당해야 TRAP1 내의 CBS에 결합함을 확인하였다. 이를 바탕으로 적당한 길이를 가지는 화합물 구조가 TRAP1에 결합하는데 필수적임을 확인하였다(도1 및 2 참고).

[489]

[490] 실시예 4. 결합력 분석

[491] FP(Fluorescence polarization) 분석

[492] 실시예 4-1. SB-TM2 프로브 이용

[493] Human full-length TRAP1 단백질(400nM)과 SB-TM2 probe (100 nM)이 포함된 FP buffer (35 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄ (pH 7.3), 1 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA)에 분석하고자 하는 물질을 첨가하여 (최종 부피 100 μ l), 상온에서 1시간 동안 반응 (96 well plate). SYNERGY NEO microplate reader를 사용하여 excitation wavelength 440 nm, emission wavelength 500 nm로 설정하여 FP를 측정하였다.

[494] 그 결과, TPP-8부터는 SB-TM2와의 경쟁적 결합이 가능함을 확인하여, alkyl chain의 길이가 C8이상의 크기를 가지게 되면, TRAP1의 CBS에 결합할 수 있음을 확인하였다. 또한, alkyl chain의 길이가 증가할수록 결합력이 증가함을 확인하였다. 더 나아가, SMX(MitoQ)와의 결합력 비교에서 TPP-12, TPP-14, TPP-16의 결합력이 SMX(MitoQ)대비 우수한 것으로 확인되었으며, 특별히 alkyl

chain의 길이가 가장 긴 TPP-16에서 SMX 대비 2배 강한 결합력을 확인하였다(도4 참고).

- [495] 또한, TPP가 결합된 항산화제들 중에서, TPP와 항산화제 간의 연결거리가 충분한 경우, TRAP1의 CBS에 결합함을 확인하였다(도6 참고).
- [496] 추가적으로, TPP와 탄화수소로 연결된 기타 합성 물질들에서 TRAP1의 CBS에 대한 결합력이 있음을 확인하였다(도8 참고).
- [497] 실시예 4-2. PU-H71-FITC 이용
- [498] FP 분석을 위해, 정제된 재조합 TRAP1 (400nM)을 2시간 동안 증가하는 억제제 농도의 존재 하에 Taldone et al., 2013에 기재된 대로 합성된 형광 프로브 PU-H71-FITC (10nM)와 함께 배양하였다. 실온에서 마이크로 플레이트 리더 (Synergy NEO, BioTek)를 사용하여 형광 편광을 측정하였다.
- [499] 그 결과, 알킬-TPP는 PU-H71-FITC(ATP binding site를 타겟으로 하는 Hsp90/TRAP1 억제제)와 경쟁하지 않으며, ATP binding site에 결합하지 않음을 확인할 수 있었다(도9b 참고).
- [500] 또한, 긴 링커를 가지는 TPP-항산화제 컨쥬게이트의 경우도 PU-H71-FITC(ATP binding site를 타겟으로 하는 Hsp90/TRAP1 억제제)와 경쟁하지 않으며, ATP binding site에 결합하지 않음을 확인할 수 있었다(도11b 참고).
- [501]
- [502] 실시예 5. ATPase 활성 분석
- [503] 본 발명자들은 본 명세서에서 개시하는 화합물들이 TRAP1 내의 ATP binding site에 결합하여 ATPase의 활성에 영향을 주는지 확인하기 위해, 분석을 실시하였다.
- [504] PiColorLock Gold Phosphate Detection Kit (Abcam)를 사용하여 TRAP1의 ATPase 활성을 측정하였다. 0.5 μ M TRAP1 (야생형 또는 돌연변이)을 다양한 농도의 억제제와 함께 30 분 동안 사전 인큐베이션 한 다음, 50mM Tris-HCl, 20mM KCl 및 6mM MgCl₂ (pH 7.4)을 포함하는 ATPase 활성 분석 버퍼에서 37 °C에서 3 시간 동안 0.2mM ATP와 함께 인큐베이션하였다. 다음으로, 20 μ L의 PiColorLock Gold 시약과 촉진제 혼합물 (100 : 1)을 각 샘플 (100 μ L)에 첨가하였다. 5분 배양 후, 10 μ L의 안정제를 첨가하여 발색을 중단하였다. 흡광도는 마이크로 플레이트 리더 (Synergy NEO, BioTek)를 사용하여 620 nm에서 측정되었다. 미반응 샘플의 흡광도를 빼서 background signal을 정규화하였다.
- [505] 그 결과, 알킬-TPP의 경우, PU-H71이 농도가 증가함에 따라 ATPase 활성이 감소하는 것과 달리, 농도의존적으로 ATPase의 활성을 감소시키는 경향을 보이지 않았다(도9a 참고). 이는 알킬-TPP가 ATP binding site에 결합하여 ATPase 활성을 억제하는 PU-H71과 다른 방식으로 작용한다는 것을 의미한다.
- [506] 또한, TPP-항산화제 컨쥬게이트 및 기타 합성 물질(SB-U011,014,015)의 경우에도, 농도의존적으로 ATPase의 활성을 감소시키는 경향을 보이지 않았다(도11a 및 14 참고).

[507]

[508] 실시예 6. 단백질 발현 분석

[509] 본 발명자들은 본 명세서에서 개시하는 화합물들이 TRAP1 또는 세포질 Hsp90을 억제하는지 확인하기 위해, 단백질 발현 분석을 실시하였다.

[510] 세포배양 및 처리

[511] 인간 암 세포주 22Rv1은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입했으며 공급 업체가 권장한대로 유지되었다. 간단히 기재하면, 암세포는 10% 소태아혈청 (FBS; ATCC)과 1% 페니실린/스트렙토 마이신 (GIBCO)을 포함하는 DMEM 또는 RPMI 배지 (GIBCO)에서 37°C, 5% CO₂의 가습 분위기에서 배양되었다. 세포는 6개월 이상 배양되지 않았다.

[512] 22Rv1세포는 5 μM의 각각 화합물들로 처리되어 2시간 동안 배양된 후 웨스턴 블랏으로 분석되었다.

[513] 항체

[514] Anti-Phospho-AMPK α , anti-Cdk4, anti-CHOP 및 anti-SIRT3 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였다. anti-Akt 및 anti-AMPK는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다. anti-Hsp70은 BD Biosciences에서 구입하였다. 항- β -액틴 항체는 MP Biomedicals에서 구입하였다. anti-SDHB는 Abcam에서 구입하였다.

[515] 웨스턴블랏

[516] 세포 용해물을 SDS-PAGE로 분리하고 PVDF 막으로 옮겼다. 막을 TBST (0.05% Tween-20을 함유하는 TBS)에서 10% 탈지유로 실온에서 1시간 동안 블락하고 4°C에서 밤새 1차 항체와 함께 배양하였다. 막을 TBST로 1시간 동안 3회 세척하고 TBST 중 10% 탈지유에 희석된 2차 항체(1:5000)와 함께 1시간 동안 배양하였다. 막을 TBST로 3회 세척하고 강화된 화학 발광 검출 키트 (BioRad)를 사용하여 시각화하였다.

[517] 실험 결과, TPP-10 내지 16의 경우 TRAP1을 억제하여 SDHB 및 SIRT3이 감소된 것을 확인할 수 있었고, 그 중에서도 TPP-14 및 16이 강력한 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 알킬-TPP 중 어느 것도 Akt, Cdk4 단백질의 발현에 변화를 야기하지 않았고, Hsp90 억제의 마커로 사용되는 Hsp70에도 변화를 야기하지 않았다(도10 참고). 이는 일정한 길이를 갖는 알킬-TPP가 TRAP1을 억제하고, 세포질 Hsp90에는 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있다.

[518] 또한, TPP-항산화제 컨쥬게이트의 경우, 긴 링커를 가지는 컨쥬게이트의 경우 Hsp90의 억제없이 TRAP1 억제에 따라 SDHB, SIRT3의 감소가 나타나고, 짧은 링커의 경우 단백질 발현에 영향을 주지 않았다(도12 참고). 이는 적당한 길이를 갖는 TPP-컨쥬게이트만이 TRAP1을 억제함을 확인할 수 있다. 추가적으로, 짧은 링커를 가지는 화합물과 달리, 적당한 길이를 가지는 링커의 경우 TRAP1 억제에 따른 마커로서, AMPK를 활성화(p-AMPK)시키고, mitochondrial unfolded protein

response의 유도(CHOP)하는 것을 확인할 수 있다(도13 참고).

[519] 또한, 기타 합성 화합물의 경우에도 TRAP1을 억제하는 것을 웨스턴 블랏 결과를 통해 확인할 수 있다(도15 참고).

[520]

[521] 실시예 7. 암에 대한 화합물의 효과 확인 위한 **In vivo** 실험

[522] 생체 내 마우스 이종 이식

[523] 면역 결핍 무 흉선 누드 마우스 (수컷, 8 주령)는 OrientBio에서 구입하였다.

마우스는 UNIST In Vivo Research Center의 병원균이 없는 시설 (12시간 암/광주기)에서 유지하고 표준식이와 물을 공급하였다. 모든 동물 실험은 UNIST (UNISTIACUC-19-11)에 의해 승인되었다. 22Rv1 세포(1×10^7)를 누드 마우스의 양쪽 측면에 피하 주사하였다. 종양 크기가 약 100mm^3 에 도달하면 PBS 중 20% cremophor EL(Sigma)에 용해된 비히클(DMSO) 및 $3 \text{mg} / \text{Kg}$ 약물 (MitoQ, SB-U014 및 SBU015)을 매일 복강 내 투여했다. 종양 부피는 전자 캘리퍼스를 사용하여 매일 측정하고 다음 공식을 사용하여 계산하였다. $V = 1/2 \times (\text{폭})^2 \times \text{길이}$. 실험이 끝나면 동물을 안락사시키고 조직학 및 웨스턴 블랏을 위해 종양을 수집하였다. 밴드 강도는 ImageJ 소프트웨어 (National Insutitute of Health, USA)를 사용하여 정량화되었다. 이때 웨스턴 블랏은 상기 기재된 방식과 동일하게 수행되었다.

[524] 실험결과, SB-U014,015를 처리한 경우 DMSO를 처리한 경우와 비교하여 종양의 크기가 작아지고, 종양의 무게도 감소한 것을 확인할 수 있었다(도16 참고). 또한, 웨스턴 블랏 결과, TRAP1 억제에 따라 SDHB, SIRT3의 감소가 나타나고, AMPK를 활성화(p-AMPK)시키고, mitochondrial unfolded protein response의 유도(CHOP)가 나타나고, Akt, Cdk4 및 Hsp70에는 변화가 나타나지 않았다(도17 참고).

[525] 이를 통해, 본 명세서에서 개시하는 화합물이 TRAP1억제를 통해 암세포의 성장을 억제하고, 암 세포의 크기를 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[526]

[527] 실시예 8. 안과질환에 대한 화합물의 효과 확인 위한 **In vivo** 실험

[528] 8-1. TRAP1 knockout 실험쥐에서 Oxygen-induced retinopathy (OIR) 유도 실험.

[529] TRAP1+/+ (wild type), TRAP1+/- (hetero), TRAP1-/- (Knockout) 실험쥐는 Black6 J strain의 mouse를 사용하였다. 탄생한지 7일째 새끼마우스와 어미 마우스를 in vivo 챔버(Coy-lab)에 넣고 고산소 ($75\% \text{O}_2$)를 공급하였다. 새끼마우스가 탄생 12일 되는 날 in vivo 챔버에서 마우스를 꺼내고 대리모를 넣어준 뒤 정상산소 ($21\% \text{O}_2$)를 공급하였다. 그 후, 새끼 마우스의 탄생 17일에 안구를 적출하여 실험에 사용하였다.

[530] TRAP1 Knock-out 마우스는 Hetero 암컷 쥐와 수컷 쥐를 교배시켜 한배에서 탄생한 새끼마우스끼리 비교하여 실험을 진행하였다. 유전형 분석은 안구를 적출하는 날 수행하였다.

[531] 8-2. 약물 점안 처리(Eye drop treatment)

[532] *in vivo* 산소유도 망막병증 (OIR) 모델 형성 과정에서 새끼마우스를 고산소 공급 후 정상산소로 꺼내는 날부터 눈을 채취하는 날 (탄생12일-17일)까지 6일 동안 점안 처리를 하였다. 하루 3번 4시간 간격으로 처리하였다. 약물을 처리하는 방법은 Mito Q를 리포직에 1mM 농도로 희석시킨 뒤, 새끼쥐의 눈에 10 μ l drop 후 1분간 깜빡였다. 안구 밖의 잔여량을 면봉으로 닦아준 뒤 다시 어미쥐의 보살핌을 받게 하였다.

[533] 8-3. 약물의 안구주사 처리(intravitreal injection)

[534] *in vivo* 산소유도 망막병증 (OIR) 모델 형성 과정에서 새끼마우스를 고산소 공급 후 정상산소로 꺼내는 날 (탄생 12 일) 안구 주사 처리하였다. 새끼 마우스를 마취약 (2.5% Avertin. 용매는 1X PBS(Phosphate buffer saline) 50ul으로 복강 주사하여 마취시킨 뒤, 새끼마우스의 안구에 핀 홀더로 찢려 구멍을 만든다. 구멍에 미세 유리관을 이용하여 약물을 1ul volume, 0.1ul/sec로 인젝션 한다. MitoQ는 0.1mg/ml 농도로 3차 증류수에 희석(0.1% DMSO + 99.9% 3차 증류수)시켜서 사용하였다.

[535] 8-4. 조직 전체 마운트 염색(Whole mount staining) 및 현미경 이미지 관찰

[536] *In vivo* 산소유도 망막 병증 모델을 만들고 탄생 17일째 눈을 채취하였다. 음성 대조군으로는 정상산소에서 키운 탄생 17일째 눈을 채취하였다. 새끼 마우스를 마취약 (2.5% Avertin. 용매는 1X Phosphate buffer saline) 로 복강 주사하여 마취시킨 뒤, 1X PBS 10ml을 좌심실에 주입하여 혈액을 모두 제거한다. 안구를 적출하여 4% 파라 포르말린으로 4°C조건에서 24시간동안 고정하였다. 망막을 분리한 뒤, 4갈래의 방사상으로 절개하였다. 상온에서 1시간동안 블로킹(1XPBS + 0.5% BSA + 0.1% Tryton-X-100)한 뒤 일차 항체(CD31. 1:100.)를 4°C 24시간동안 처리하였다. 다음날, 세척용액(1XPBS + 0.1% Tryton X-100)으로 20분씩 4번 세척한 뒤 이차 항체(Alexa fluor-594. 1:500. Invitrogen)를 블로킹 용액에 희석시켜 4°C 24시간동안 처리하였다. 다음날, 세척용액(1XPBS + 0.1% Tryton X-100)으로 20분씩 5 세척한 뒤 마운팅 용액(vector lab. H-1700)으로 슬라이드에 조직을 올려 고정시켰다.

[537] 이미지는 스테레오 형광현미경(fluorescence microscope. Axion xoom.Zeiss)를 이용하여 조직 전체 이미지를 관찰하였으며, 특정 부분 확대 사진은 공초점 주사현미경(Multi-photon confocal microscopy. LSM 780. Zeiss.)을 이용하여 관찰하였다.

[538] 8-5. *in vivo* streptozotocin 유도 당뇨 망막병증 모델 (STZ-induced diabetic retinopathy model)

[539] TRAP1 wild type, hetero, Knockout 마우스를 이용하여 실험을 진행하였다. 8주령의 수컷 마우스에 streptozotocin (sigma)을 0.1M sodium citrate 용액(pH 5.0)에 희석시켜 75mg/kg 농도로 하루 1회씩 5일 동안 복강 주사하였다. 일주일 뒤 혈당을 측정하여 350mg/dL 이상임을 측정하여 당뇨가 유발되었는지

확인하였다. STZ 주사 후 8주 뒤부터 16주까지 일주일에 3번 사료를 물에 넣어 이유식을 공급하였다. STZ 주사 후 16주령에 안구를 적출하여 분석하였다.

[540] 8-6. 면역형광 염색(Immunofluorescence staining)

[541] 적출된 안구를 4% 파라 포르말린으로 4°C조건에서 24시간동안 고정하였다.

조직 처리 후 파라핀 블록을 만들어서 10um 두께로 조직을 절단하여 슬라이드에 밀착시켜 조직절편을 제작하였다.

[542] 파라핀을 자일렌으로 녹이고, 100%, 80%, 70%, 50% 에탄올로 자일렌을 제거하였다. 3차 증류수로 수분을 공급한 뒤, 10mM sodium citrate(pH 6.0)용액에 슬라이드를 넣고 압력솥으로 10분간 가열하여 항온을 복구하였다.

1XPBS+1%Tryton X-100용액을 상온에서 1시간 처리하여 투과성을 높혀준 후 상온에서 1시간동안 블로킹(1XPBS +5%BSA +5%FBS

+0.3%Tryton-X-100)하였다. 일차 항체(TRAP1. Thermo. 1:100 / Glutamine synthase. Millipore. 1:100/ GFAP. Abcam. 1:50/ HIF1 α . Novus. 1:20)를 4°C,

24시간동안 처리하고 다음날 세척용액(1XPBS +0.3%Tryton X-100)으로 5분씩 3번 세척하였다. 이차 항체(Alexa fluor-488, 546, 633. 1:500)를 상온에서

한시간동안 처리하고 세척 후, DAPI(Thermo. 300nM)로 핵을 염색하였다. 마운팅 용액으로 슬라이드를 고정시켰다.

[543] 이미지는 공초점 주사현미경(Multi-photon confocal microscopy. LSM 780. Zeiss.)을 이용하여 관찰하였다.

[544] 8-7. 웨스턴 블롯(Western blot) 분석

[545] 마우스 안구를 적출한 뒤 망막을 분리하였다. RIPA 용해 버퍼를 이용하여 전체

세포 용해물 (Whole cell lysates)을 만들어서 전기영동 하였다. PVDF 막에

이동시킨 후, 상온에서 1시간 블로킹(10% 탈지분유) 한 뒤, 일차 항체(TRAP1.

Abcam. / HIF1 α . Novus. / VEGF-A abcam./ GFAP. Millipore./ β -actin. Millipore.

모두 1:500 희석)를 4°C에서 18시간 처리하였다. 다음날, 이차 항체(anti-mouse or

rabbit- HRP. KPL.)를 상온에서 1시간 처리하고, 웨스턴 블롯팅 검출

시약(Bio-rad)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다.

[546] 정량분석은 이미지 J (Image J)를 이용하여 면적 분율을 구하였으며 β -actin을 이용하여 정규화 하였다.

[547] 8-8. 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)

[548] 마우스 안구를 적출한 뒤 Trizol과 chloroform을 이용하여 RNA층을 분리한 뒤,

RNA 추출키트(Qiagen)을 이용하여 RNA를 추출하였다. cDNA 합성키트(NEB)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, cDNA에 대한 정량분석은 SYBR 실시간

중합효소 연쇄반응 마스터 믹스(enzyomics)를 이용하여 실시간 중합효소

연쇄반응으로 분석하였다. 증폭 반응은 LightCycler (Roche) 장비를 이용하여

시행하였다. 분석은 비교 CT분석법(comparative CT)을 사용하였다. β -actin을

이용하여 정규화하였고, 타겟 유전자(TRAP1, VEGF-A, ANGPTL4)의 대조군의

평균 발현양과 비교하여 실험군에서의 증감을 분석하였다.

[549] 8-9. 실험 결과

[550] 도 18, 19를 참고하면, 산소 유도 망막병증(oxygen-induced retinopathy) 모델과, STZ(streptozotocin) 유도 당뇨병성 망막병증 모델에서 모두 TRAP1의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있다. 또한, 상기 모델에서 TRAP1의 증가와 함께, 저산소 마커 HIF1 α , 하위 신생혈관 인자 VEGF-A가 증가되는 것을 확인할 수 있다. 추가적으로, 염색 결과를 참고하면 TRAP1이 망막병증 질환 진행 동안 다양한 혈관 신생 인자의 생성을 담당하는 뮐러 세포(Muller cells)의 마커인 GS(glutamine synthase)의 염색과 함께 위치하는 것을 확인할 수 있다.

[551] 도 20을 참고하면, TRAP1을 녹아웃시킨 OIR 모델의 경우 신생혈관 영역 및 무혈관 영역이 감소된 것을 확인할 수 있다.

[552] 또한, 도 21 망막의 HIF1 α 염색 결과를 참고하면, STZ 또는 OIR 모델에서 TRAP1 녹아웃된 경우에 HIF1 α 가 감소함을 확인할 수 있다.

[553] 도 22a의 VEGF-A 및 ANGPTL4 발현결과를 참고하면, VEGF-A 및 ANGPTL4의 mRNA 수준은 Con TRAP1^{+/+}에 비해 STZ TRAP1^{+/+}에서 상승했지만 STZ-TRAP1^{-/-}에서는 상승하지 않았다. 또한, 도 22b를 참고하면, OIR 모델 망막에서 TRAP1^{+/+}와 비교하여 VEGF-A 및 ANGPTL4의 mRNA 수준은 TRAP1^{-/-} 및 TRAP1^{-/-}에서 감소했다.

[554] 마지막으로 도 23 및 24 결과를 참고하면, MitoQ를 처리한 경우 OIR 모델의 망막에서 무혈관 및 신생혈관 영역 모두를 현저하게 감소시키는 것을 확인할 수 있다.

[555]

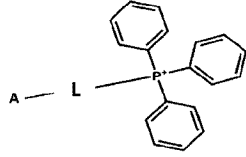
[556] 실시예 9. MIO-M1 HRE 세포주를 이용한 약물활성 분석

[557] MIO-M1 뮐러 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 colony 형태를 띄며 자라는 세포를 선별하여 stable cell line을 제작하였다. 제작한 MIO-M1-HRE/GFP stable cell line을 96well 플레이트에 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 상대적인 형광값을 계산하였다.

[558] 그 결과, 도 25, 26, 27을 참고하면, TRAP1을 억제하는 것으로 확인된 알킬-TPP, TPP-항산화제 컨쥬게이트(적당한 길이의 링커 가지는 경우) 및 기타 합성 화합물들이 모두 HIF1 α 억제 활성을 가지는 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:
[화학식 1]



이때,

L은 $(CH_2)_n$ 을 포함하고,

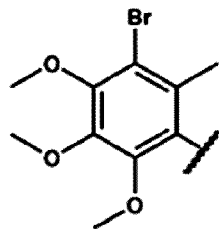
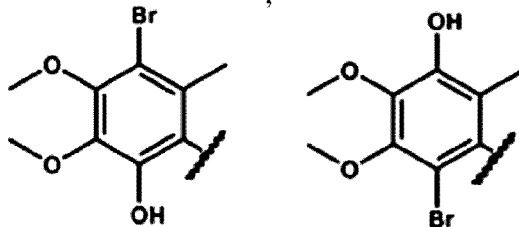
상기 n은 7이상 40이하의 정수이며,

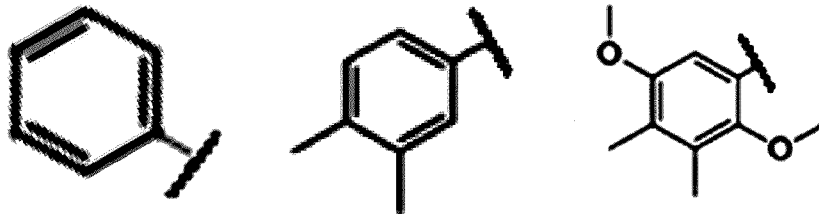
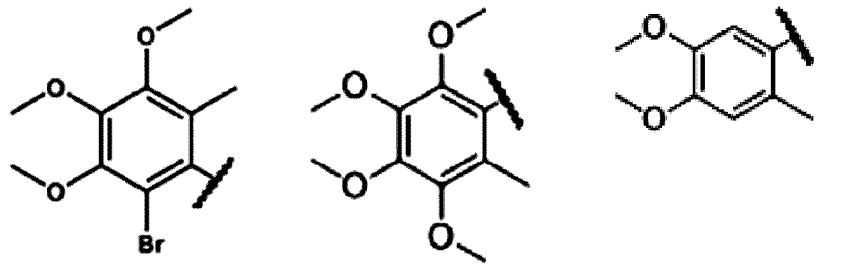
A는 메틸, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 시클로알킬 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴 중에서 선택됨.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 A는 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 아릴, 시클로알킬 및 헤테로시클릴 중에서 선택되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

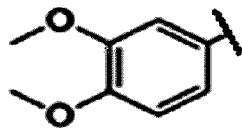
[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 A는 치환 또는 비치환된 아릴이고,
상기 치환 또는 비치환된 아릴은 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환된 또는 비치환된 페닐인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 A는





및



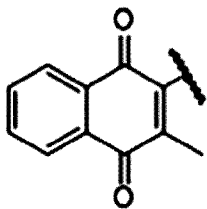
로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물 또는 이의

약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 5]

제2항에 있어서,
 상기 A는 치환 또는 비치환된 아릴이고,
 상기 치환 또는 비치환된 아릴은 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐,
 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5
 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 나프탈렌인
 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 6]

제5항에 있어서,
 상기 A는  인 화합물 또는 이의 약학적으로

허용가능한 염.

[청구항 7]

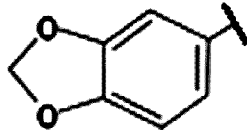
제2항에 있어서,
 상기 A는 치환 또는 비치환된 아릴이고,
 상기 치환 또는 비치환된 아릴은 할로젠, =O, 히드록실, 옥시카르보닐,
 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5 알키닐 및 C1~5
 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 벤조디옥솔인

화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

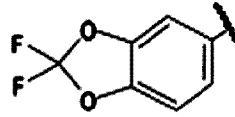
[청구항 8]

제7항에 있어서,

상기 A는



또는



인 화합물 또는

이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 9]

제2항에 있어서,

상기 A는 치환 또는 비치환된 시클로알킬이고,

상기 치환 또는 비치환된 시클로알킬은 할로젠, =O, 히드록실,

옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5

알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 시클로헥실인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 10]

제9항에 있어서,

상기 A는 비치환된 시클로헥실인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 11]

제2항에 있어서,

상기 A는 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴이고,

상기 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴은 할로젠, =O, 히드록실,

옥시카르보닐, 히드록시 C1~5 알킬, C1~5 알킬, C1~5 알케닐, C1~5

알키닐 및 C1~5 알콕시로부터 선택된 하나 이상으로 치환 또는 비치환된 피롤리딘 또는 크로만인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 12]

제11항에 있어서,

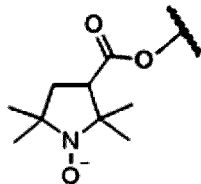
상기 A는 옥시카르보닐, C1~5 알킬 및 =O 로부터 선택된 하나 이상으로 치환된 피롤리딘인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 13]

제12항에 있어서,

상기 A는

인 화합물 또는 이의 약학적으로



허용가능한 염.

[청구항 14]

제11항에 있어서,

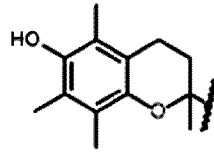
상기 A는 C1~5 알킬, 히드록실로부터 선택된 하나 이상으로 치환된

크로만-2-일(chroman-2-yl)인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 15]

제14항에 있어서,

상기 A는

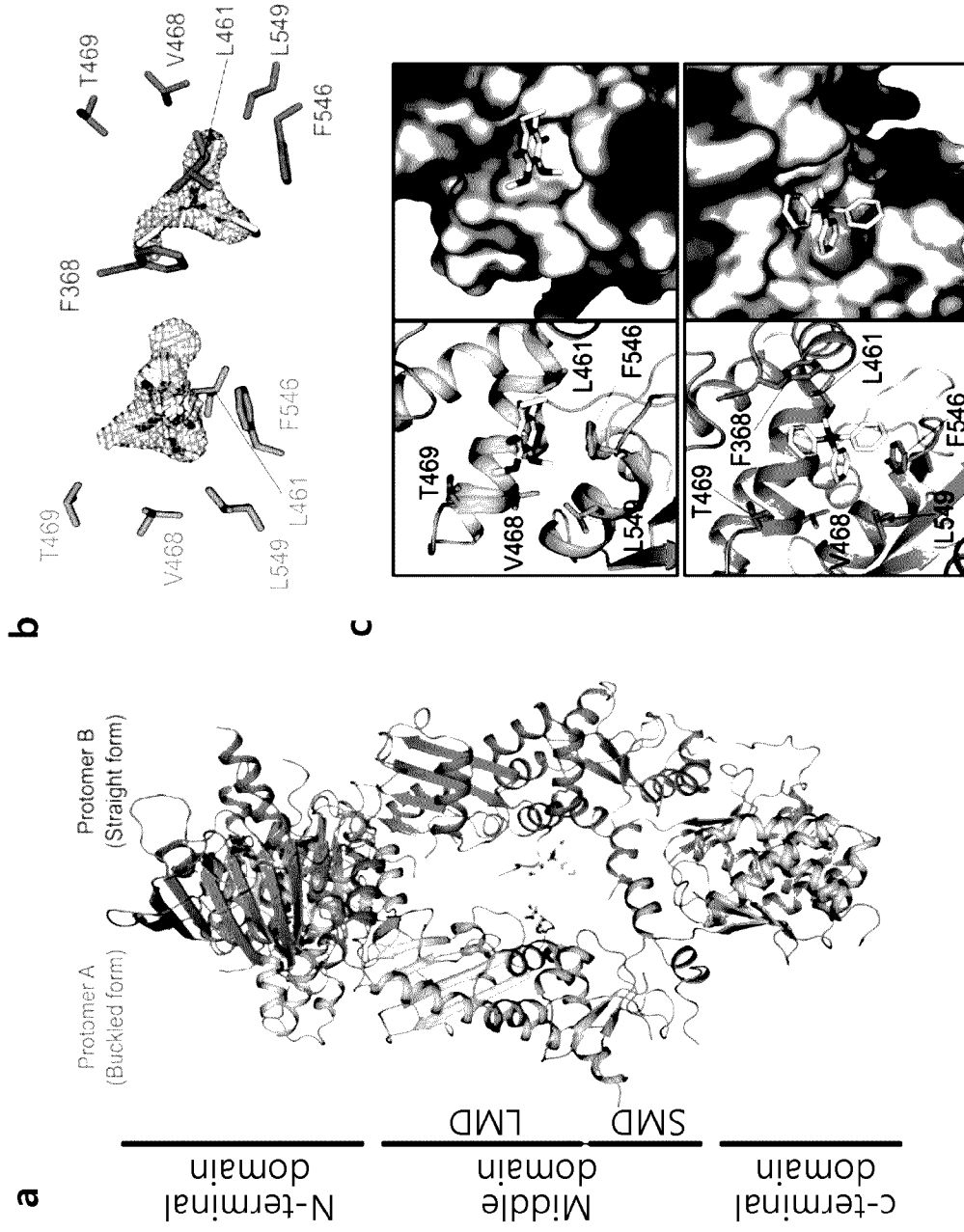


인 화합물 또는 이의 약학적으로

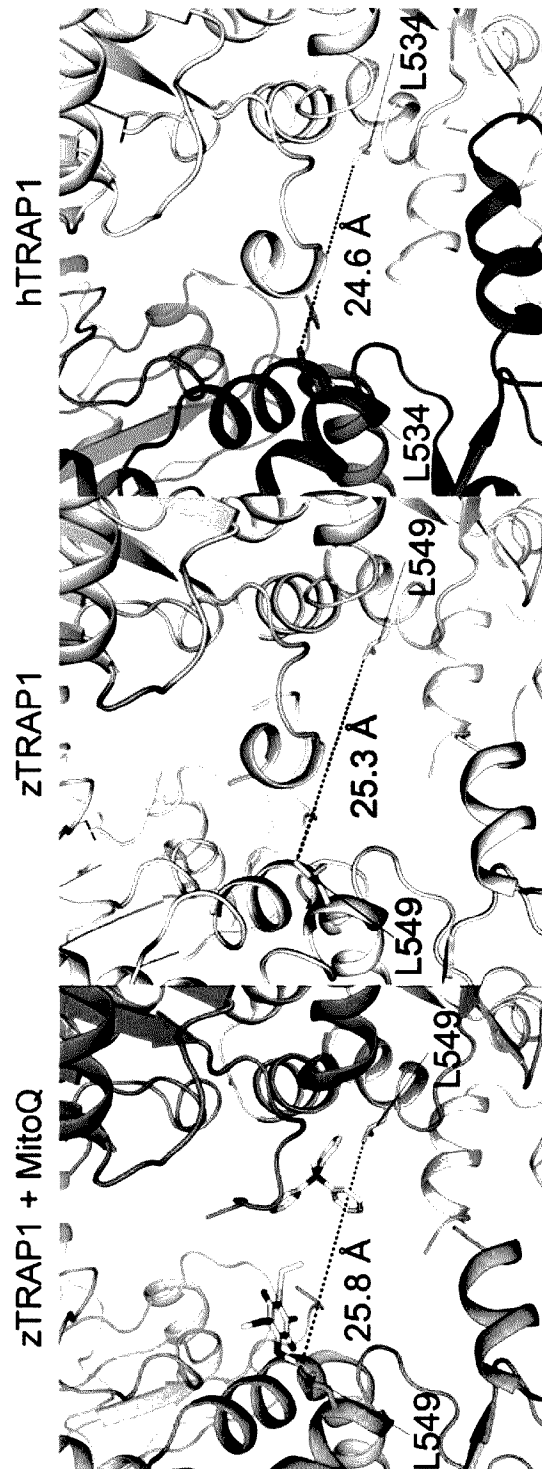
허용가능한 염.

- [청구항 16] 제1항에 있어서,
상기 n은 9이상의 정수인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.
- [청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 화합물은 TRAP1에 결합하는 화합물로서, SB-TM2와 경쟁하는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.
- [청구항 18] 제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 TRAP1 억제제.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 TRAP1 억제제는 CBS에 결합하는 것을 특징으로 하는 억제제.
- [청구항 20] 제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 TRAP1와 클라이언트 단백질의 결합 억제제.
- [청구항 21] 제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 22] 제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 안과 질환 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 23] 제22항에 있어서,
상기 조성물은 경구 투여 또는 안약을 이용하여 국소적 투여되는 안과 질환 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 24] 제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 암 또는 안과질환 치료 방법.

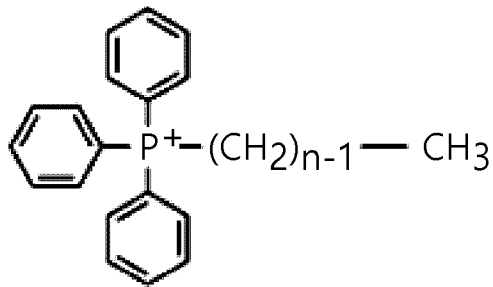
[도 1]



[도2]

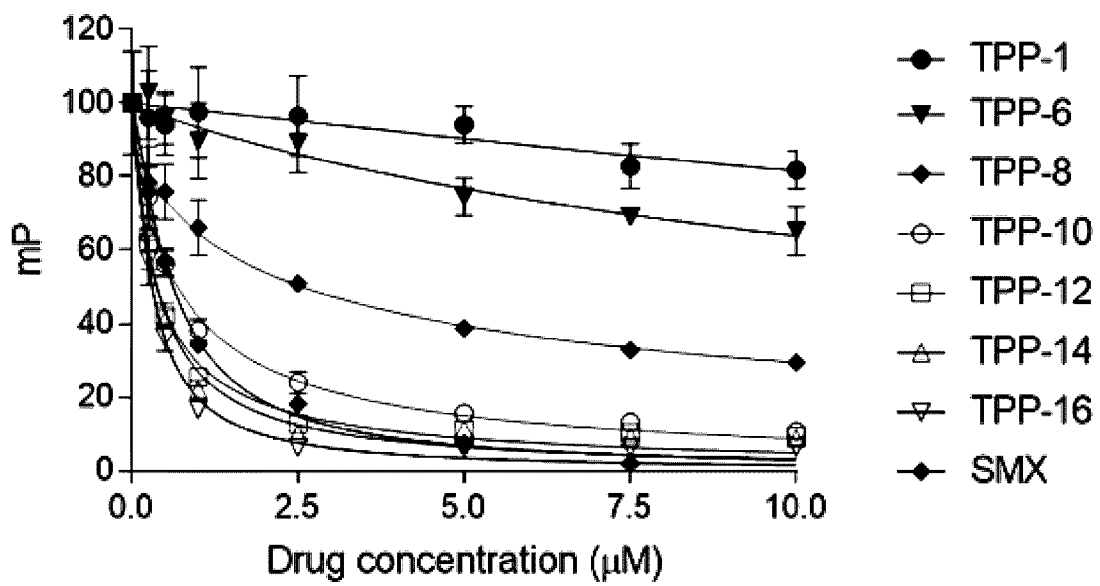


[도3]

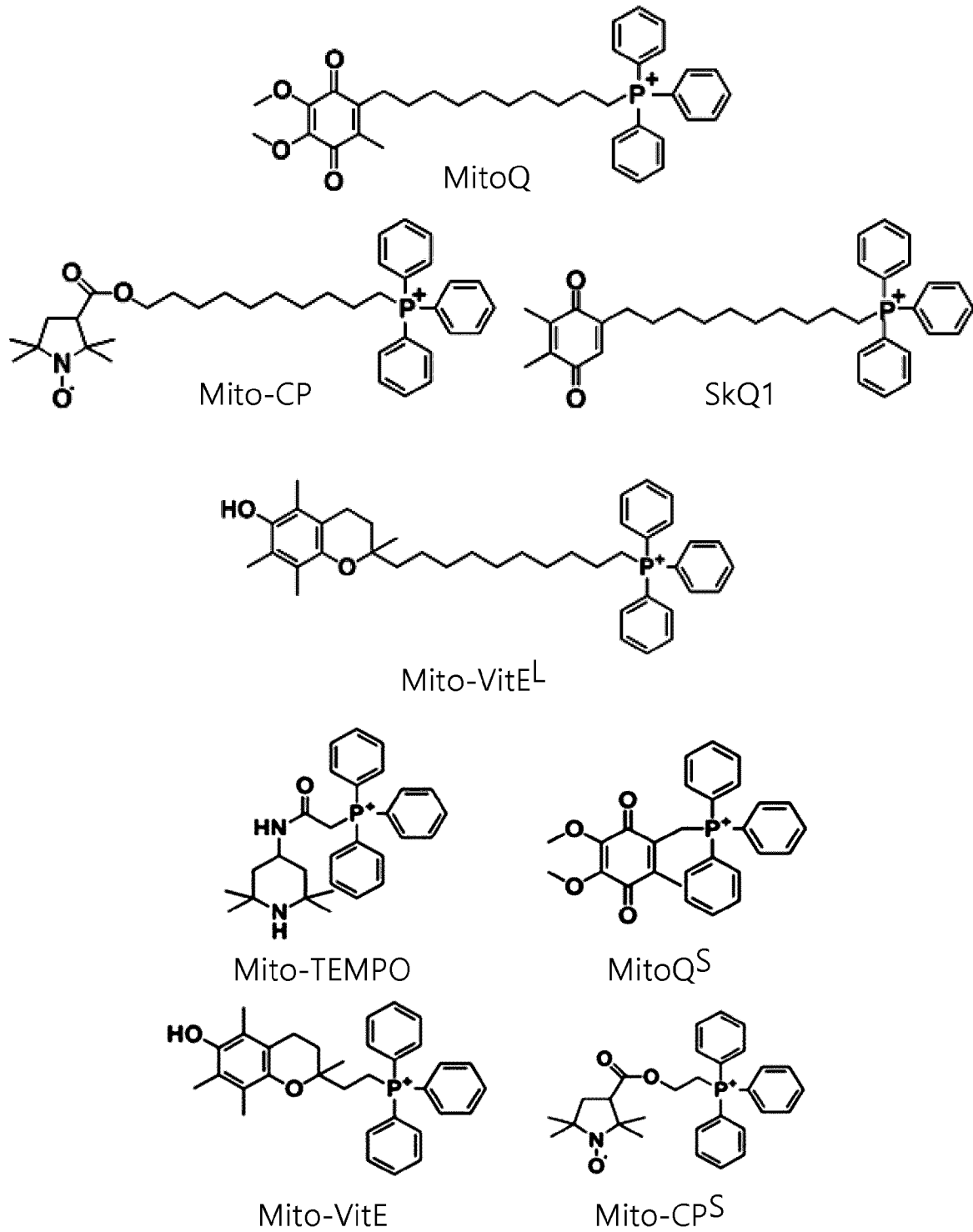


n	name	description
1	TPP-1	metyl-TPP
2	TPP-2	ethyl-TPP
4	TPP-4	butyl-TPP
6	TPP-6	hexyl-TPP
8	TPP-8	octyl-TPP
10	TPP-10	decyl-TPP
12	TPP-12	dodecyl-TPP
14	TPP-14	tetradecyl-TPP
16	TPP-16	hexadecyl-TPP

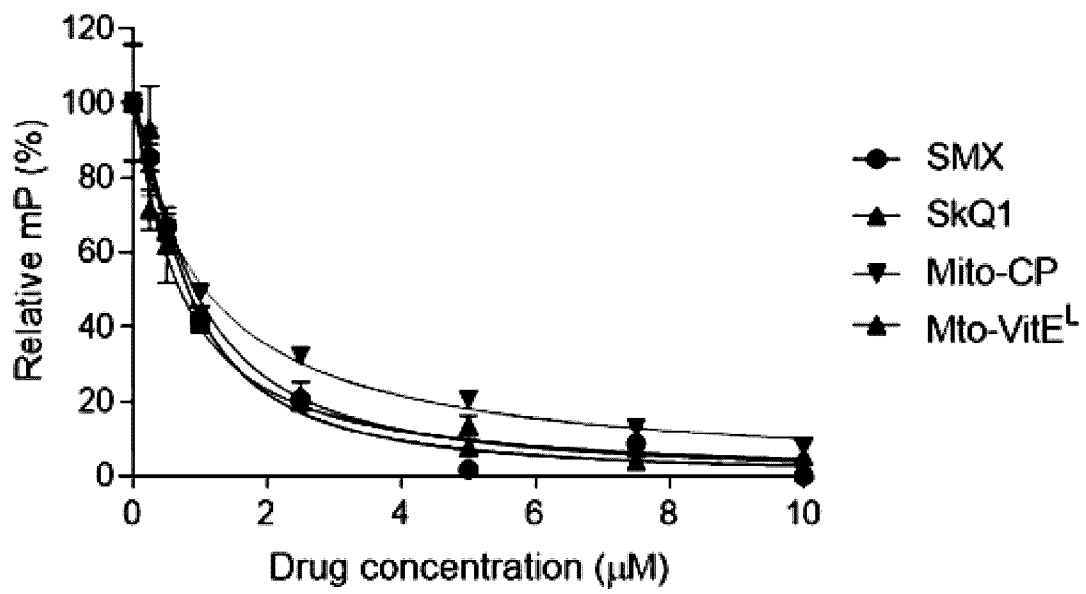
[도4]



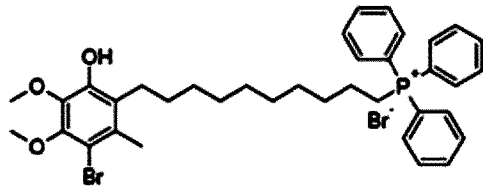
[도5]



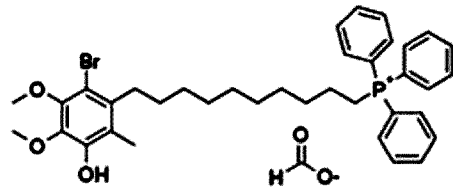
[도6]



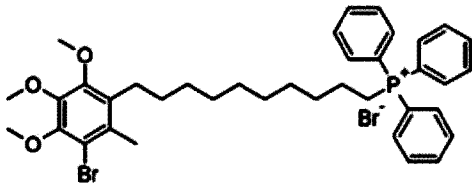
[도7]



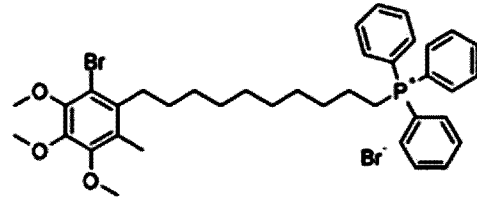
SB-U005



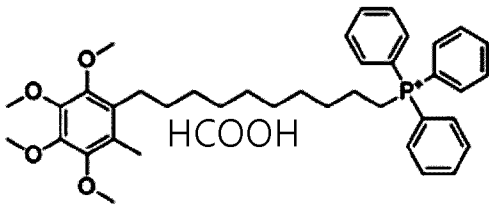
SB-U009



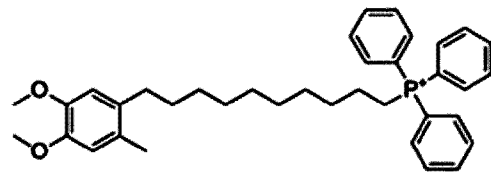
SB-U011



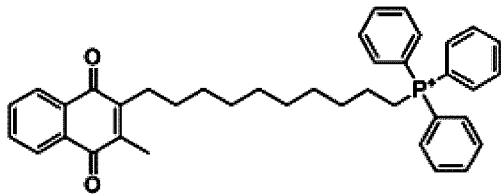
SB-U012



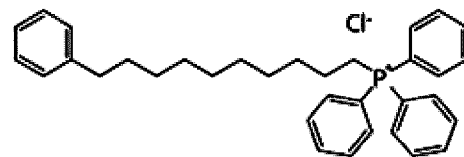
SB-U014



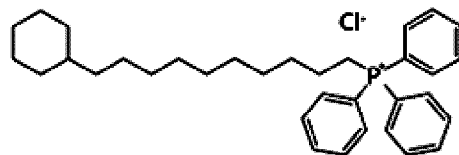
SB-U015



SB-K001



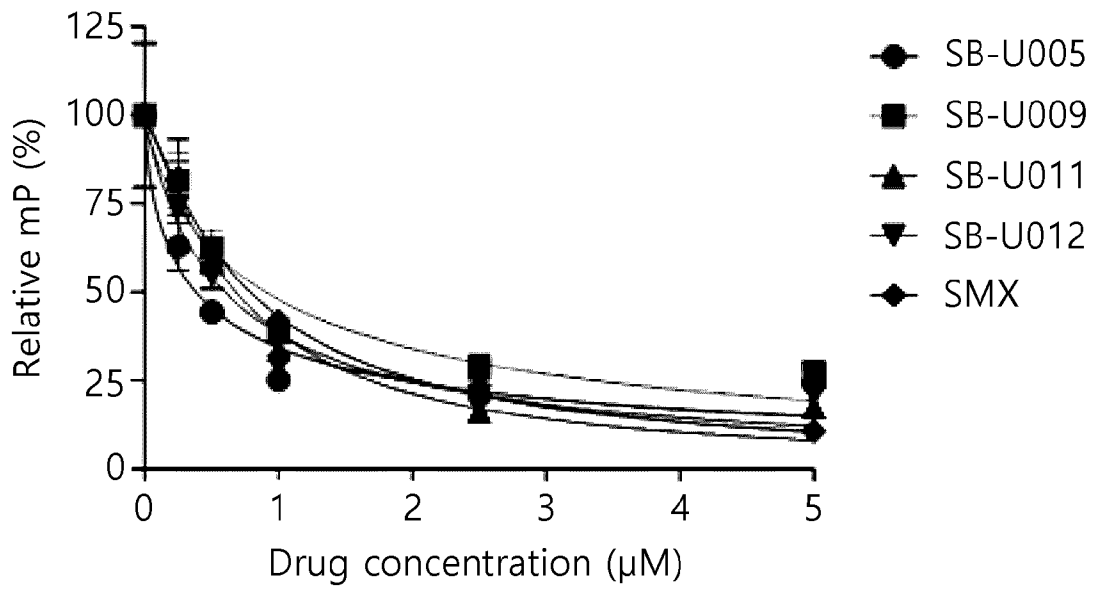
SB-B001



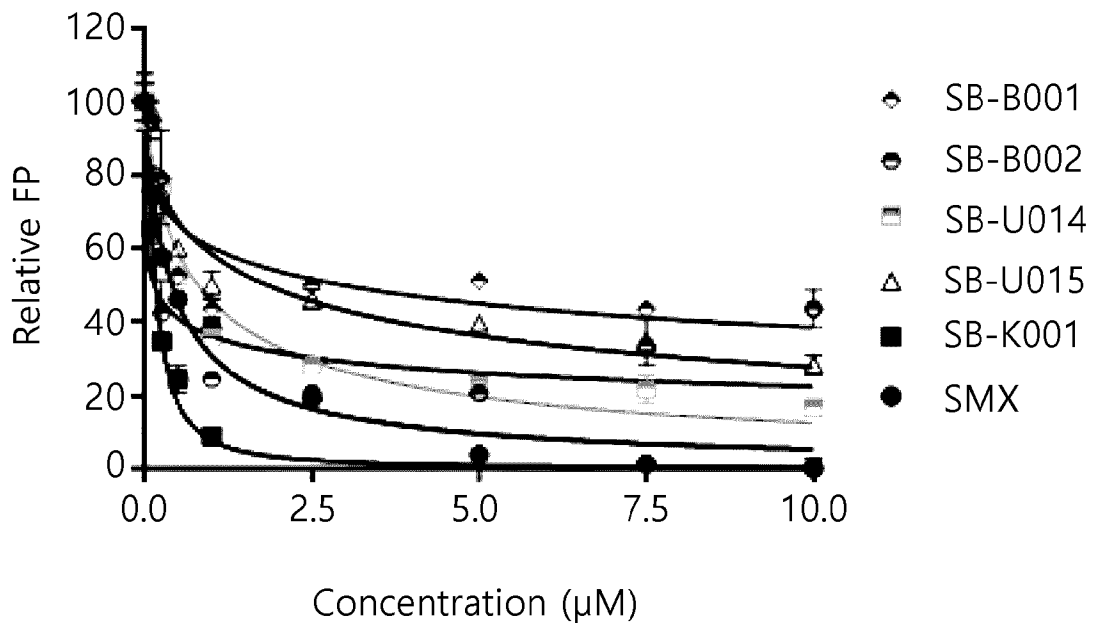
SB-B002

[도8]

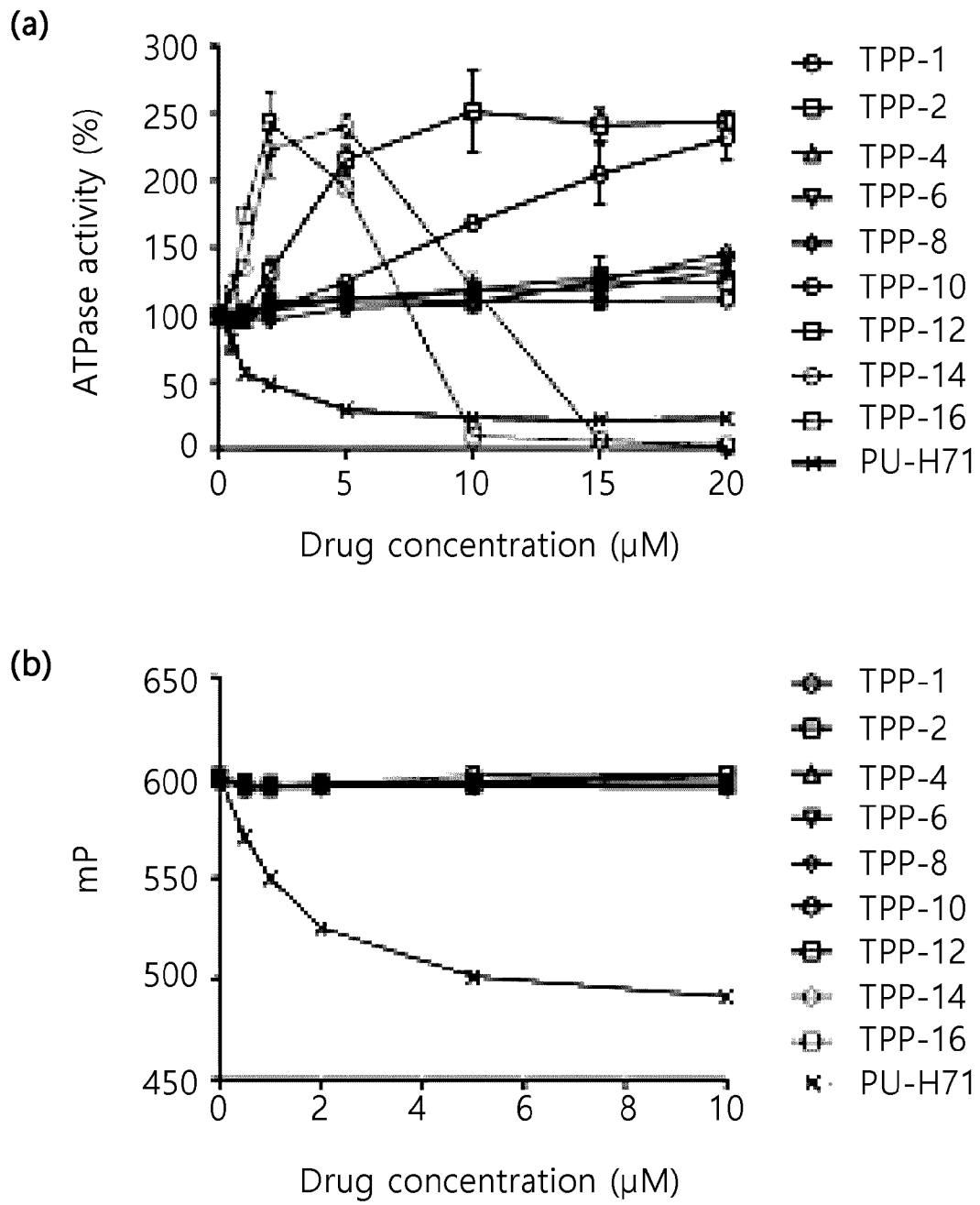
(a)



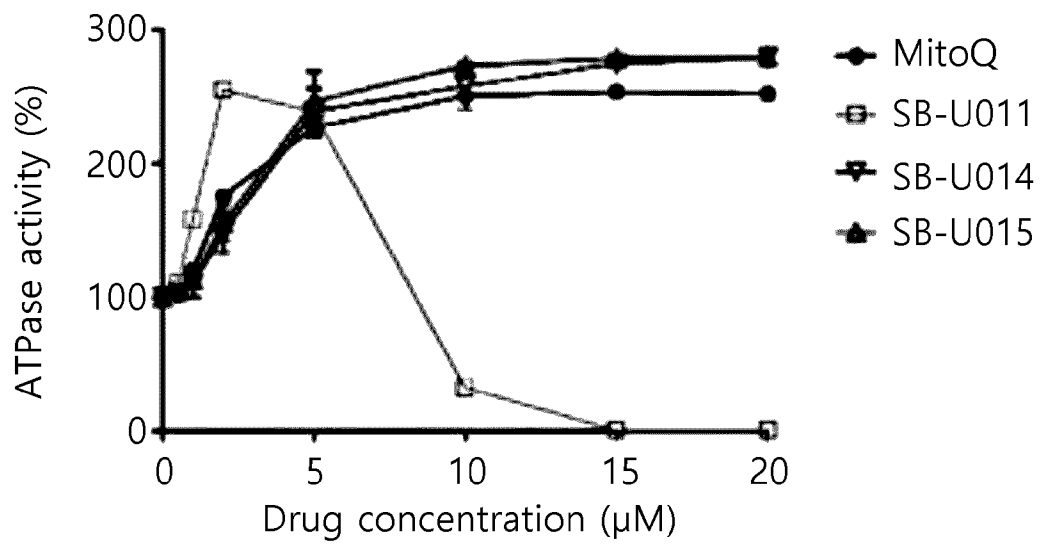
(b)



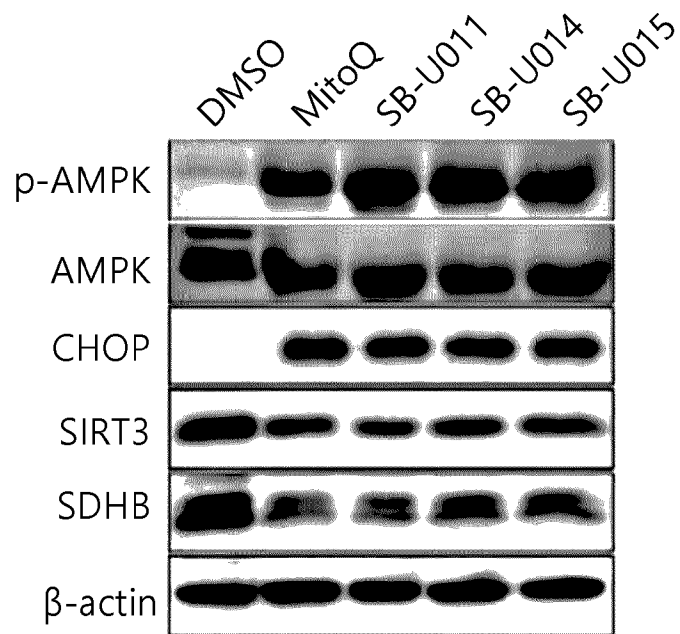
[도9]



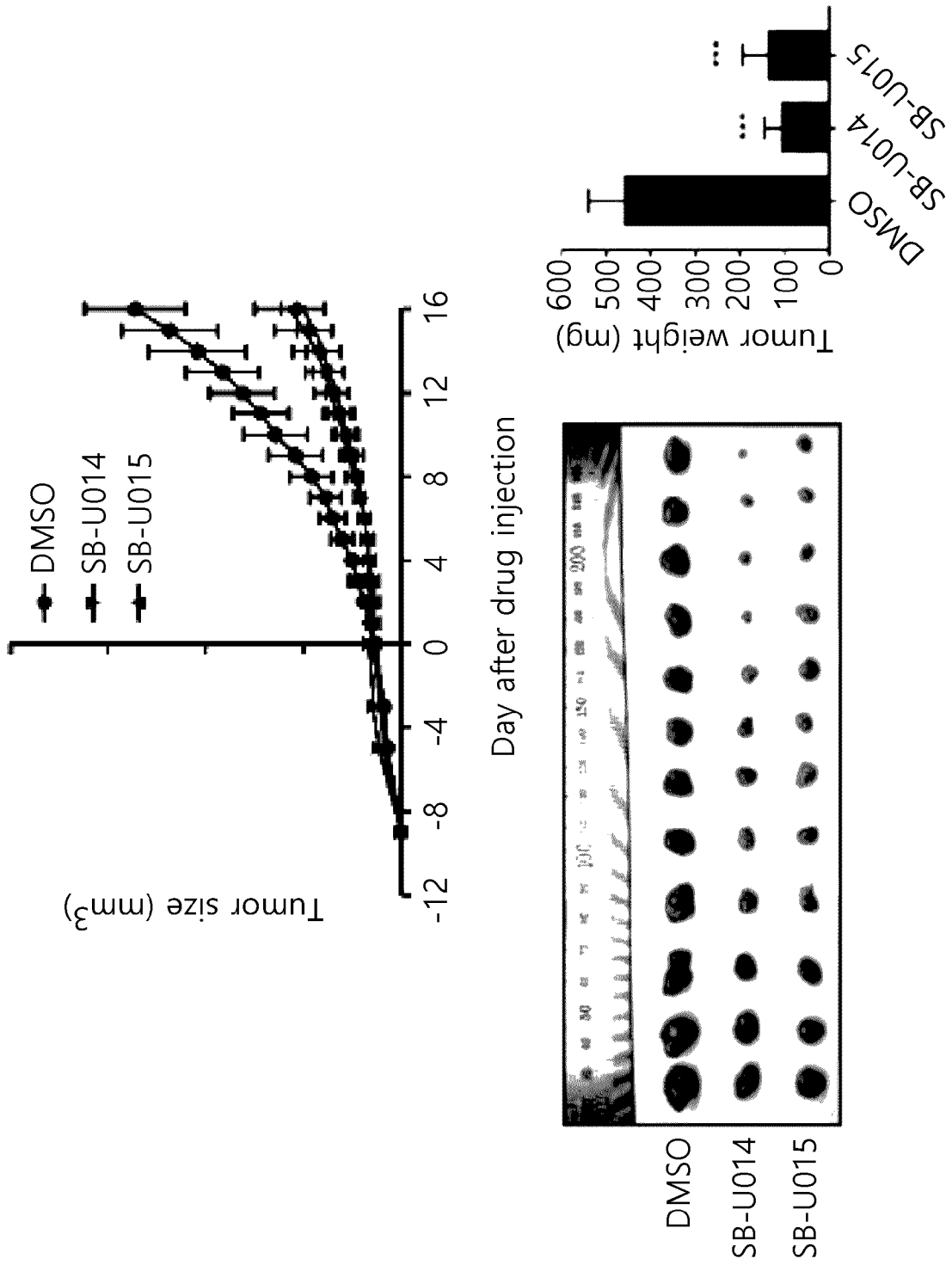
[도14]



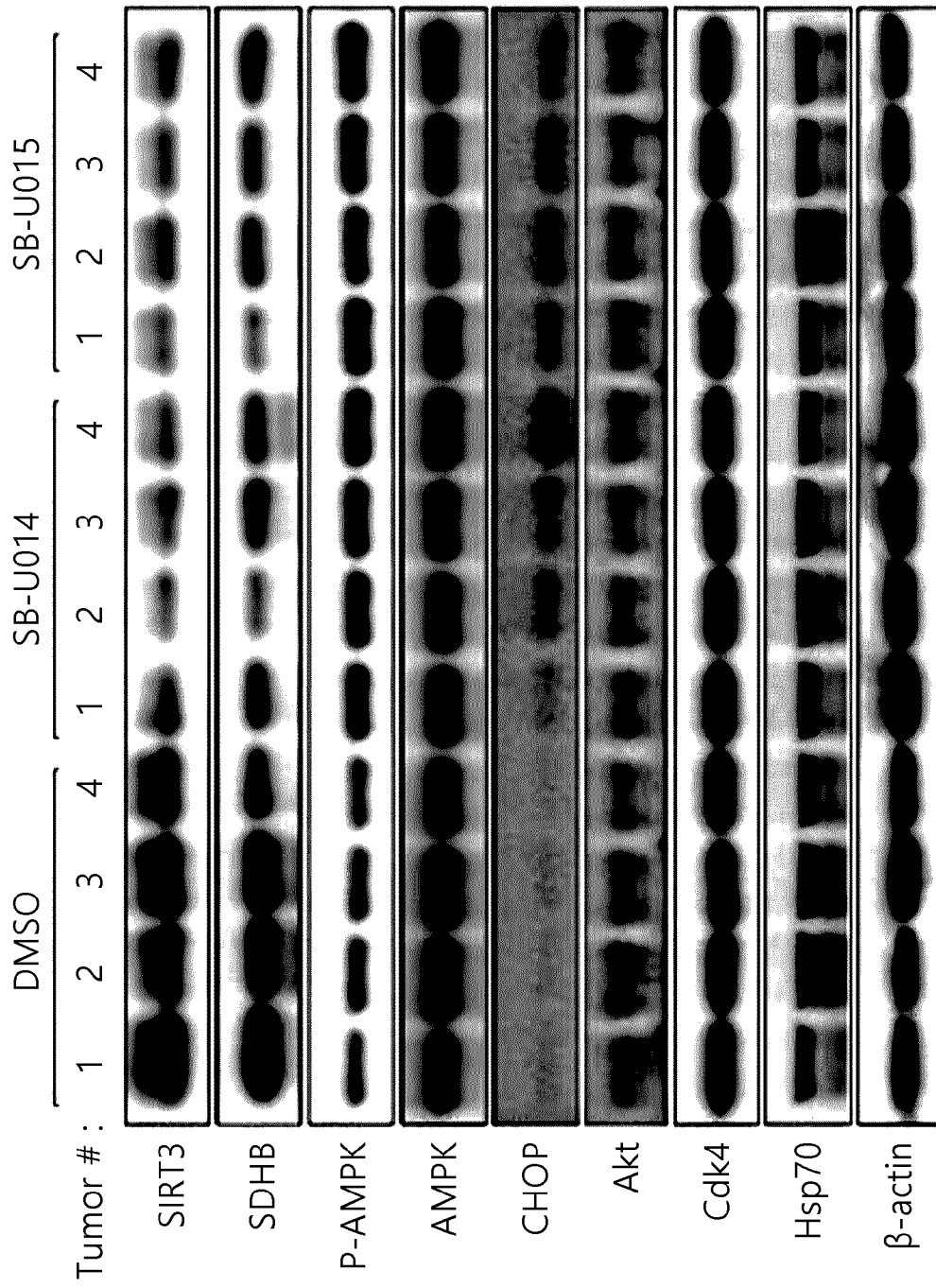
[도 15]



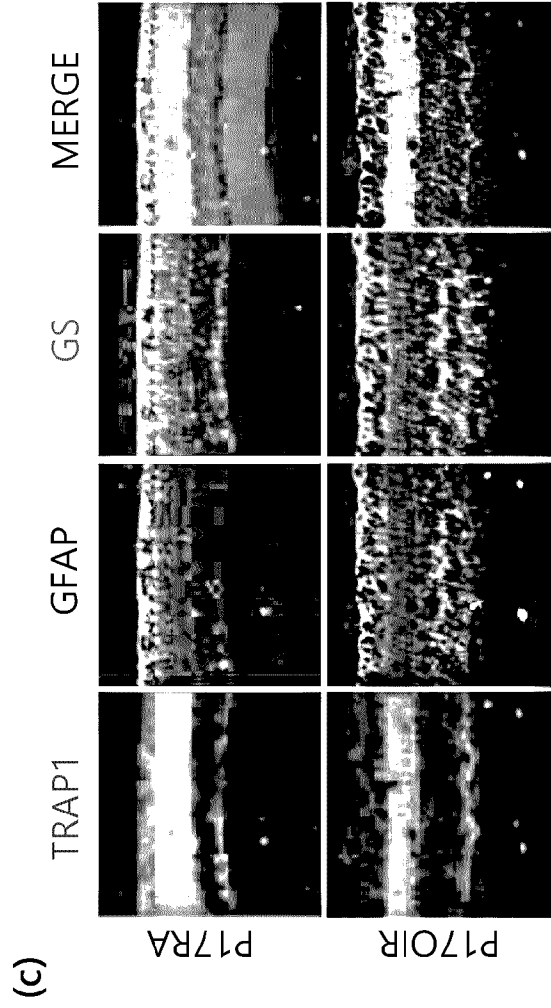
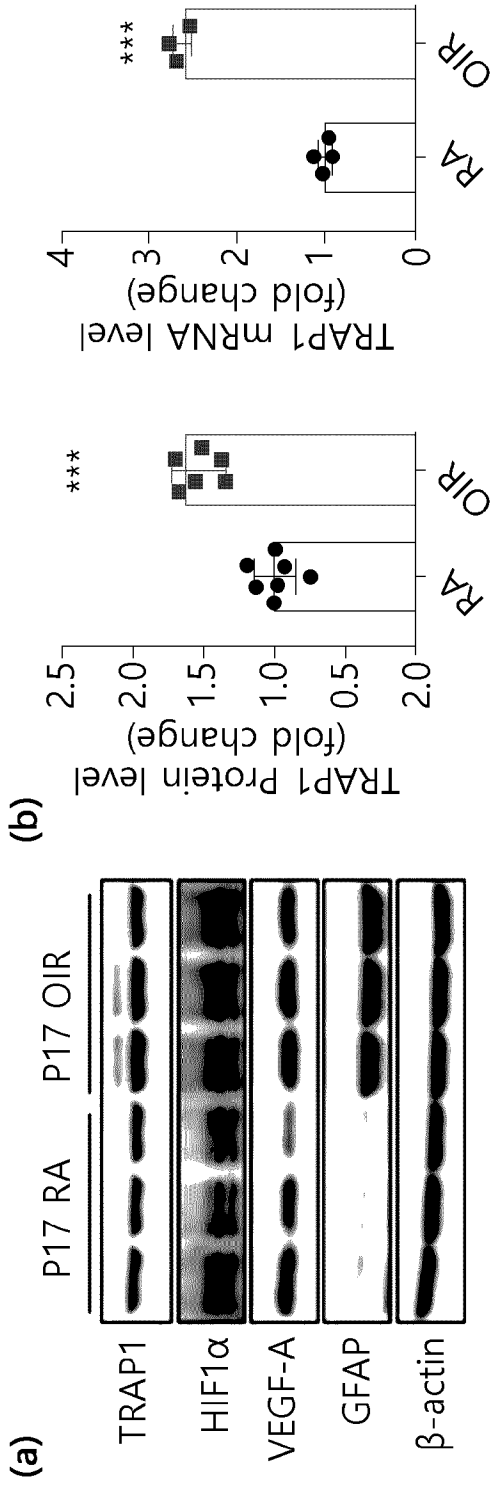
[도16]



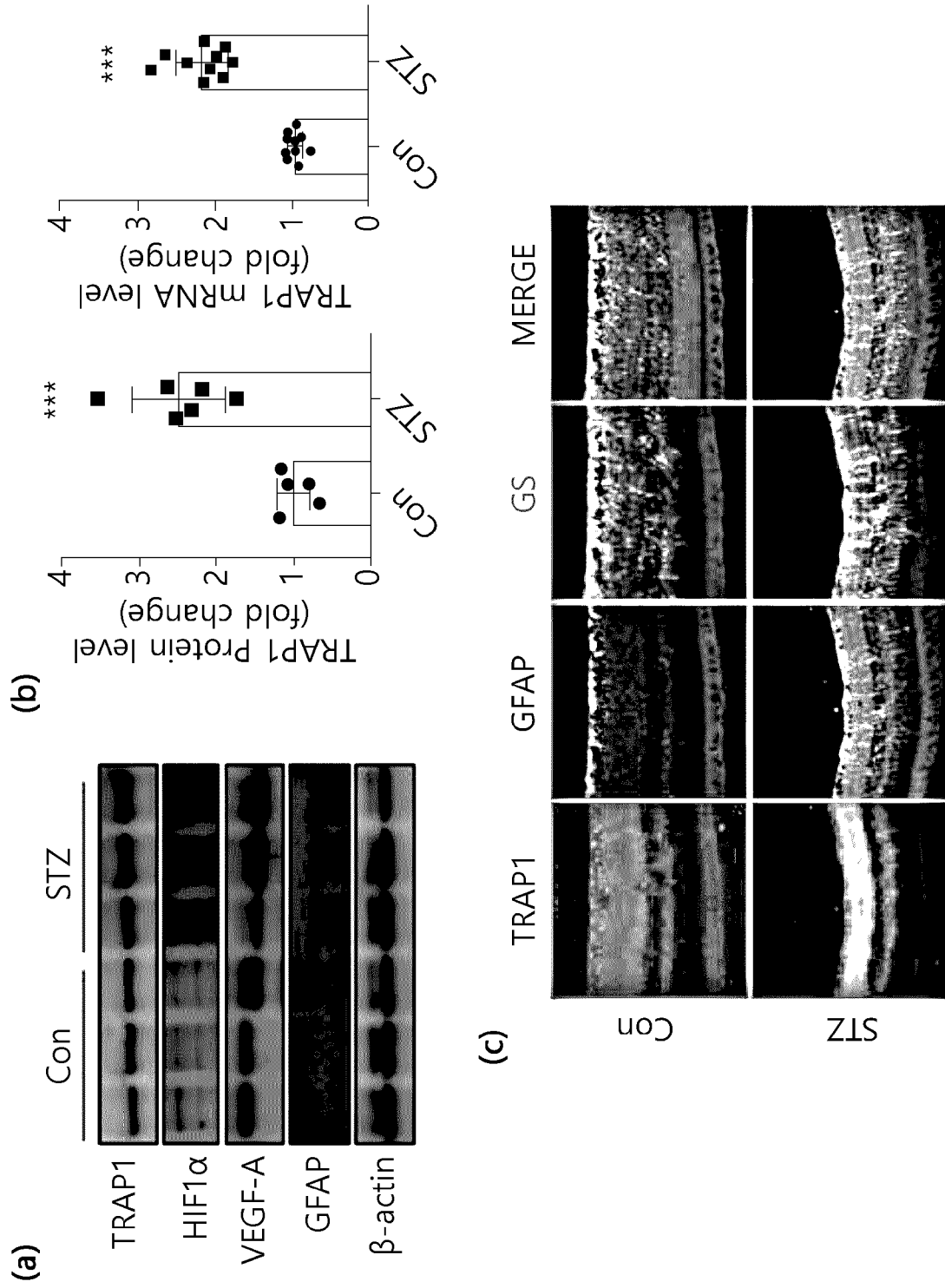
[도17]



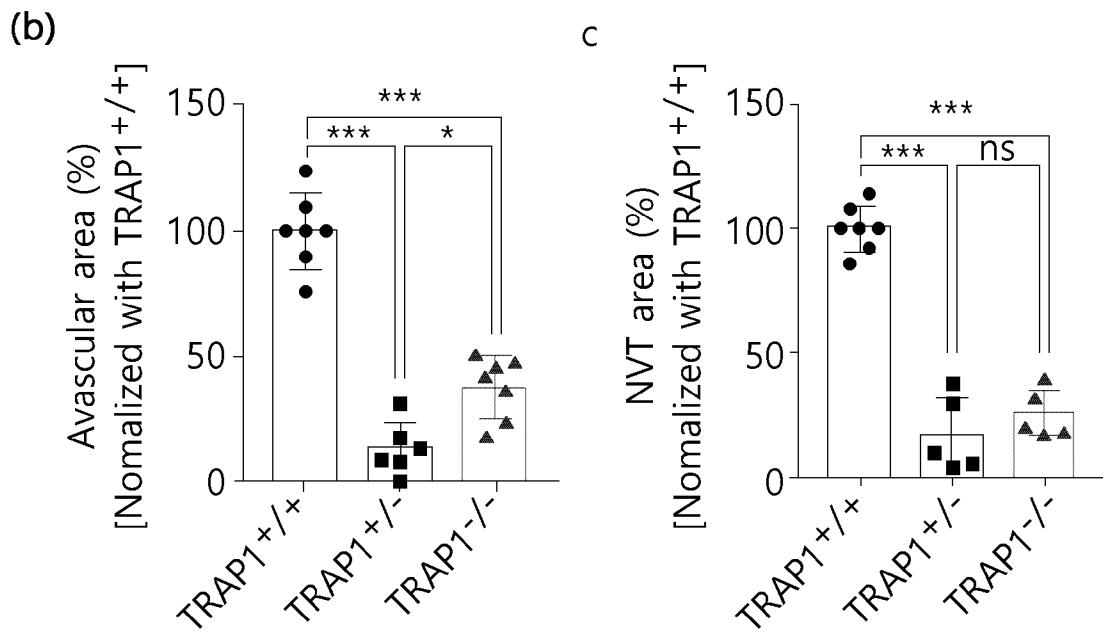
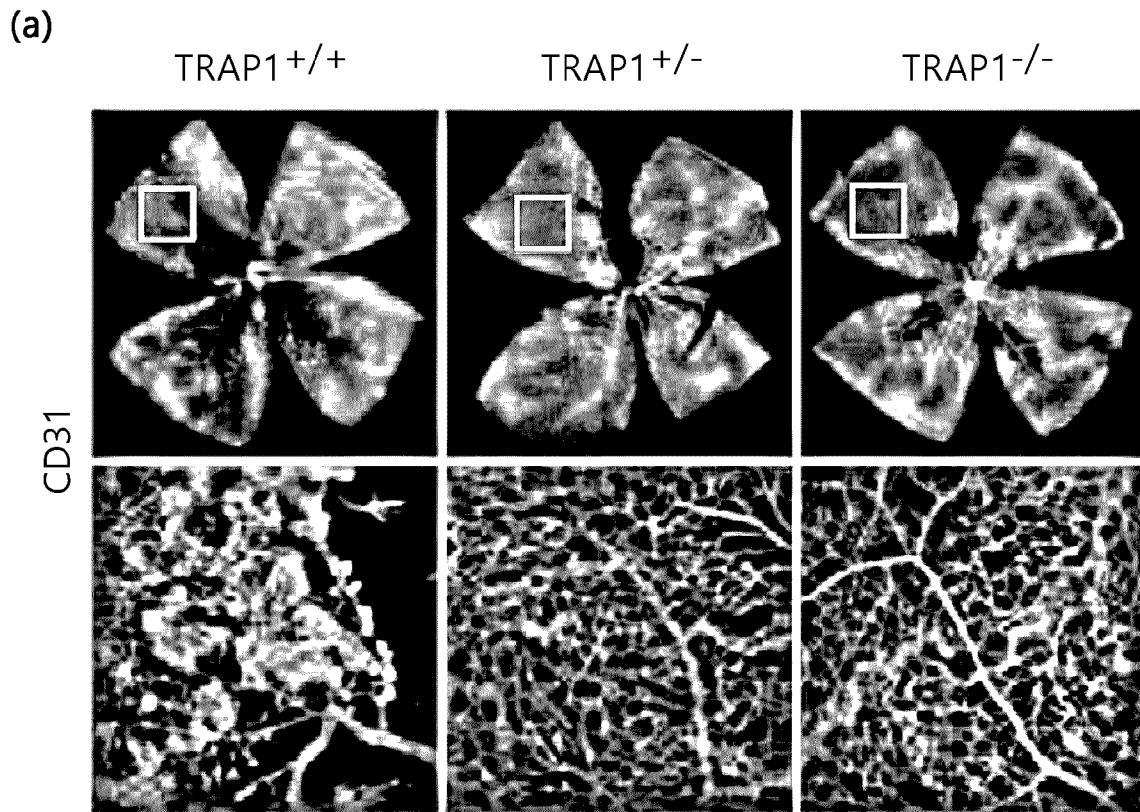
[815]



[도19]

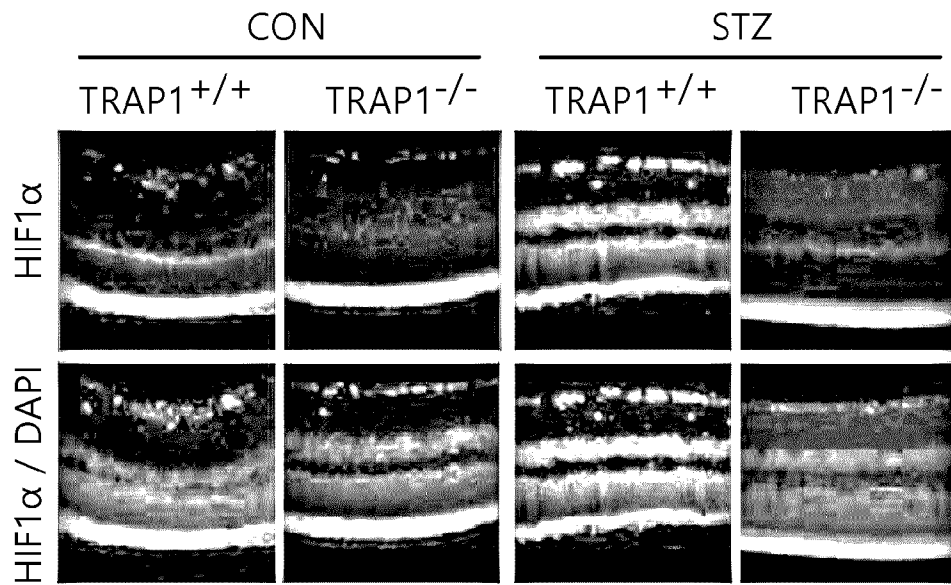


[도20]

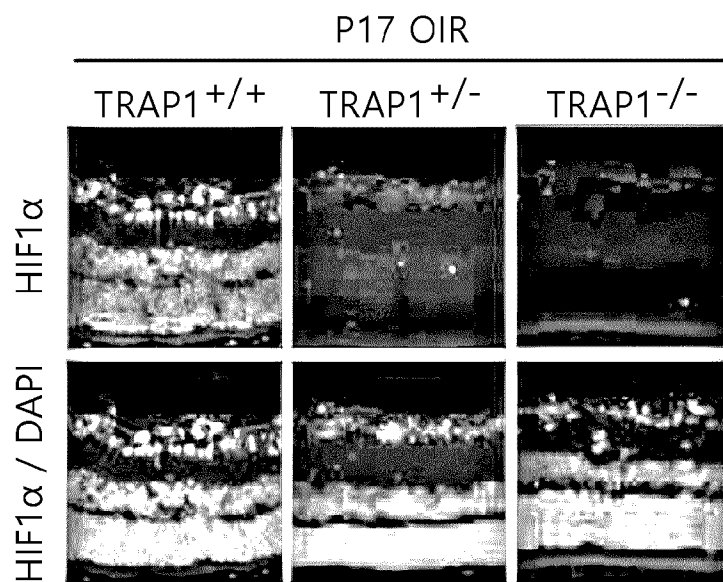


[도21]

(a)

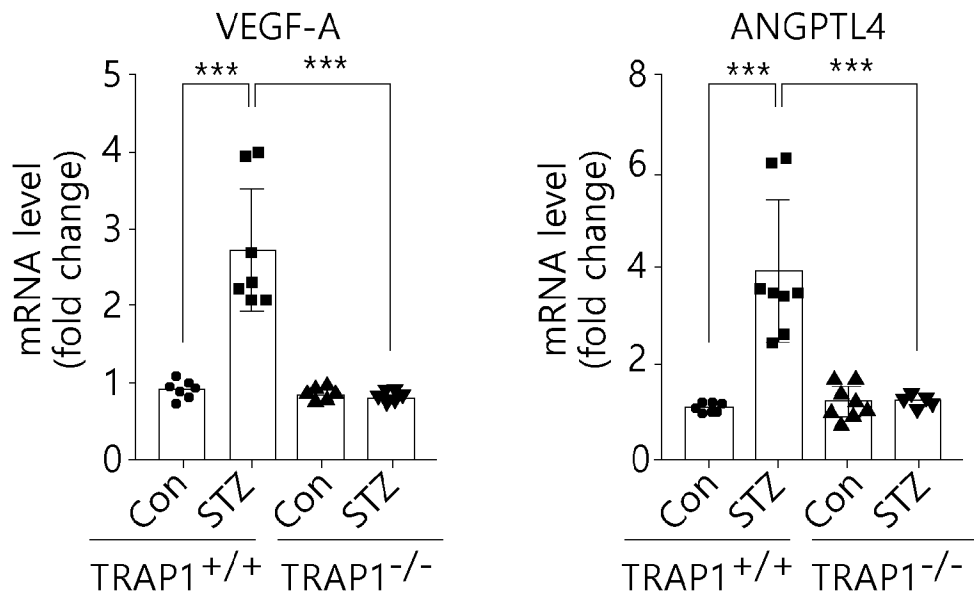


(b)

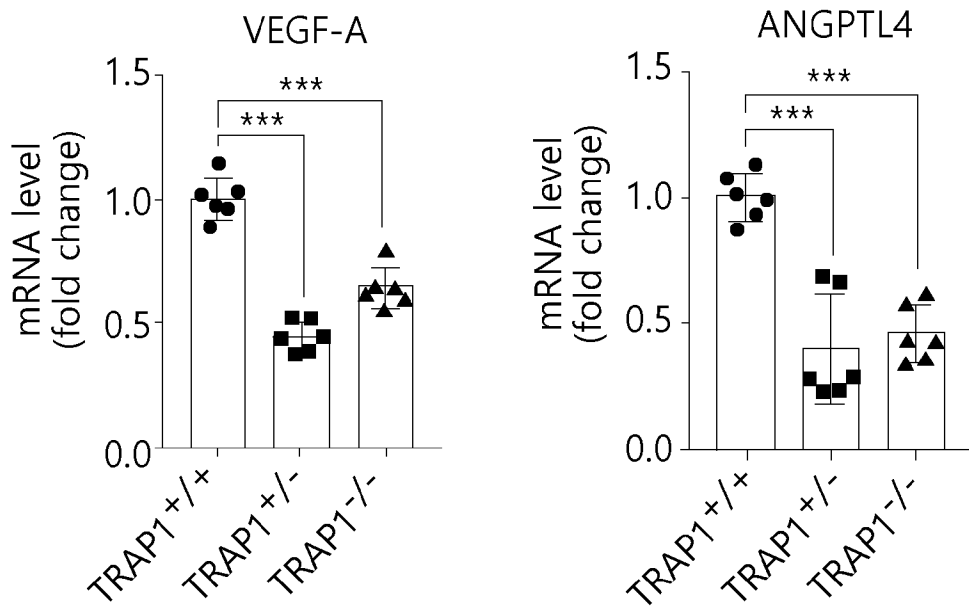


[도22]

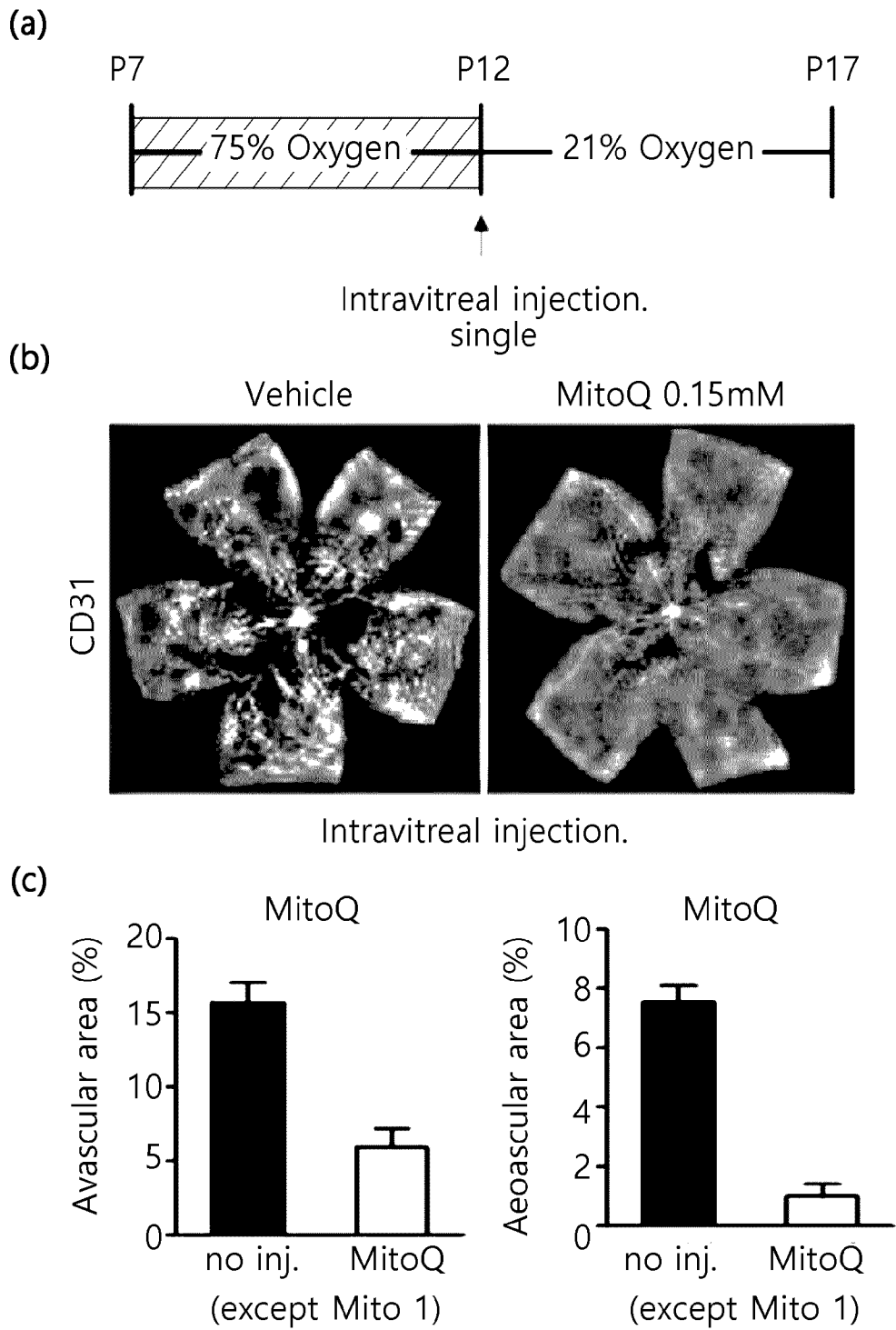
(a)



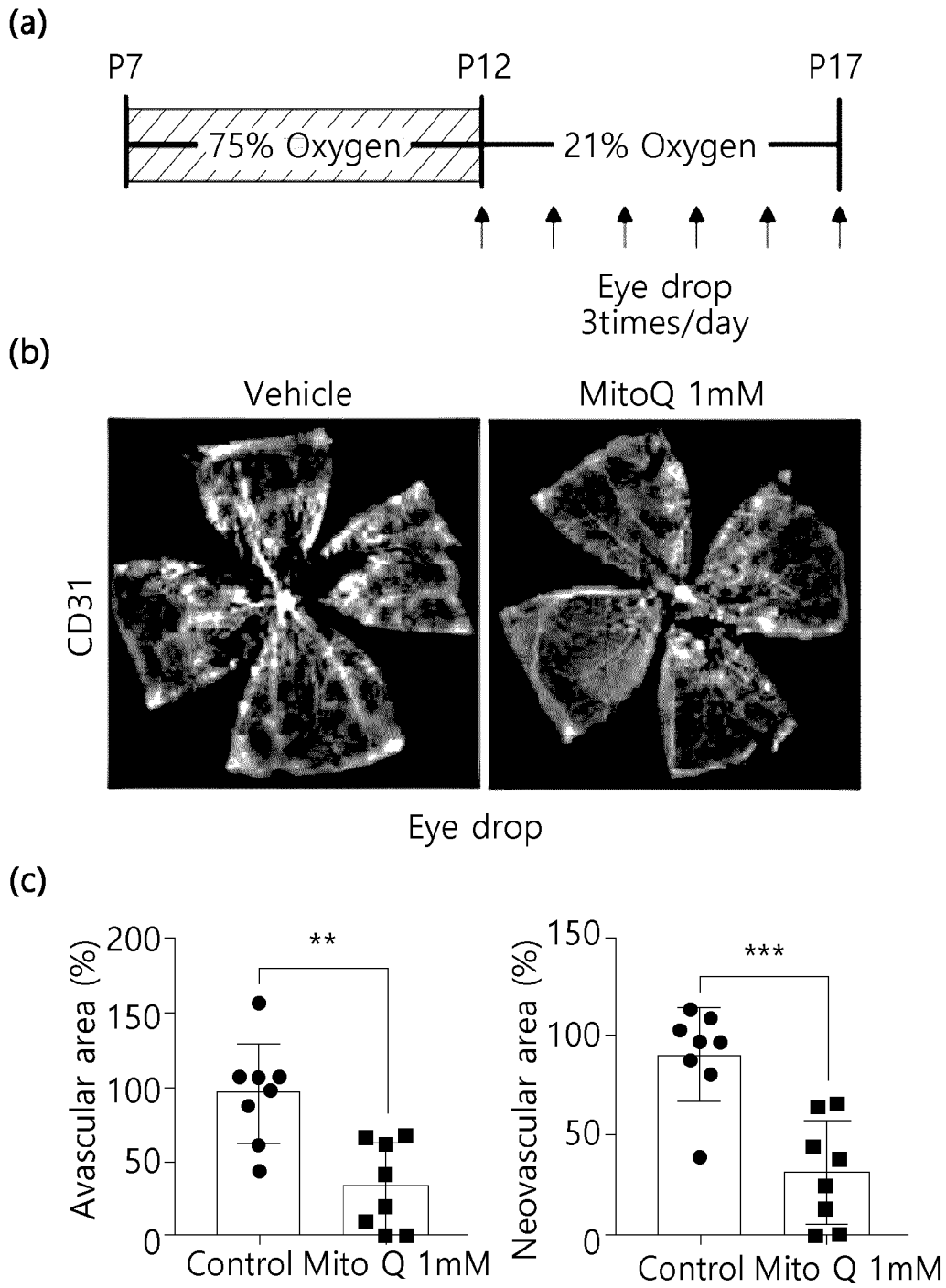
(b)



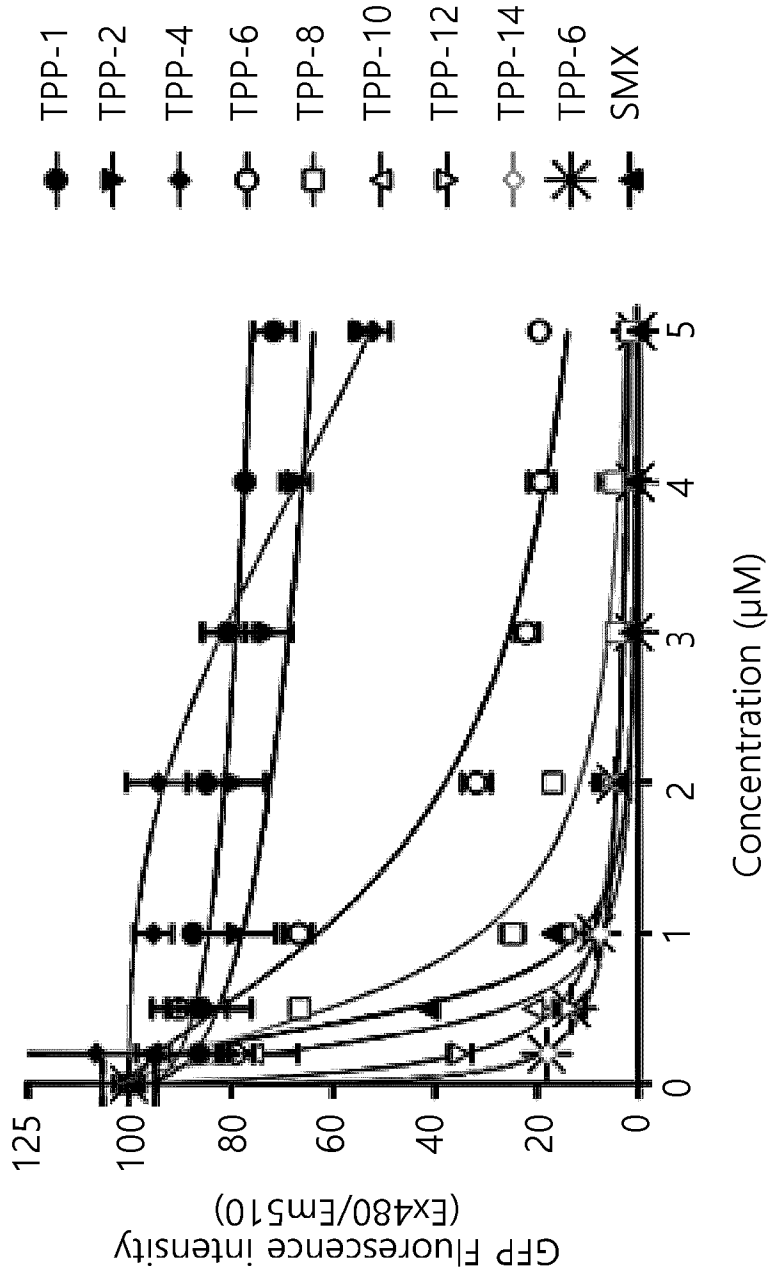
[도23]



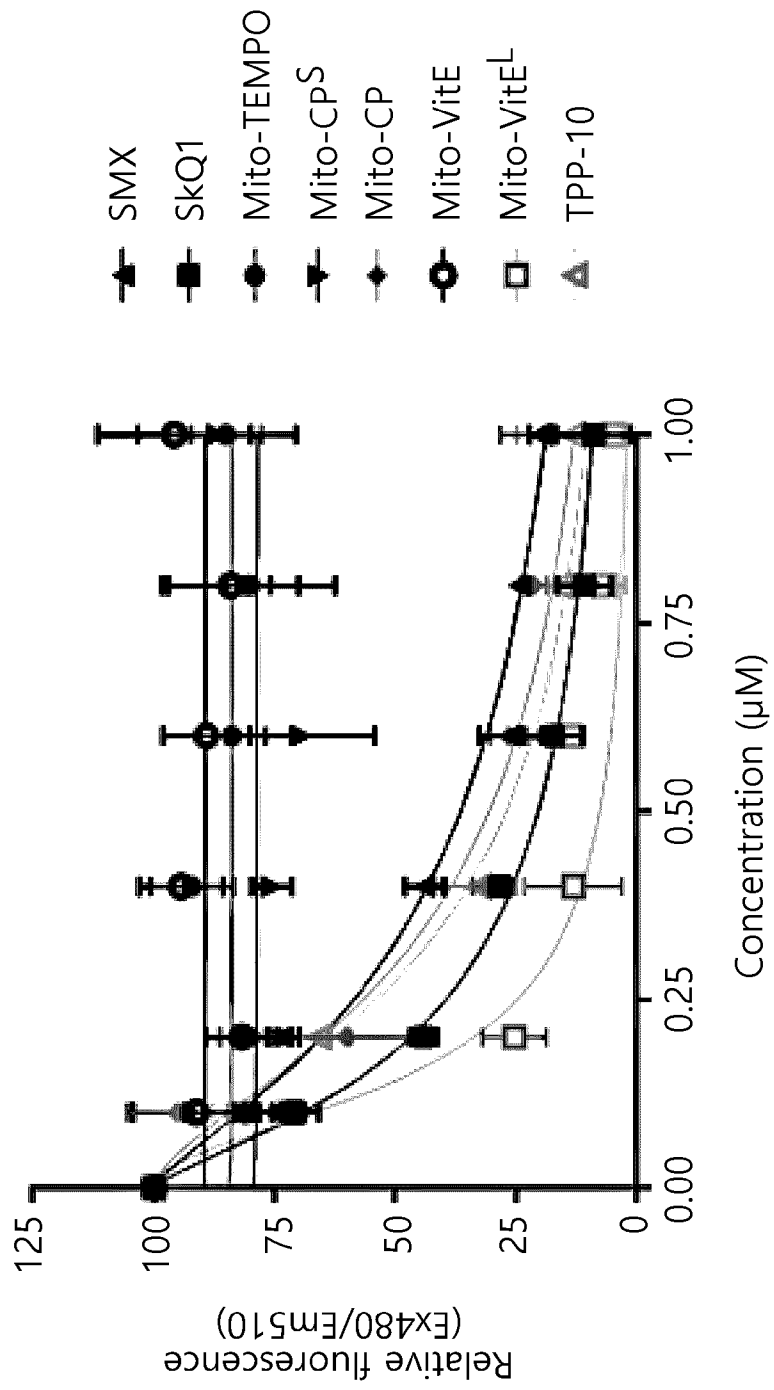
[도24]



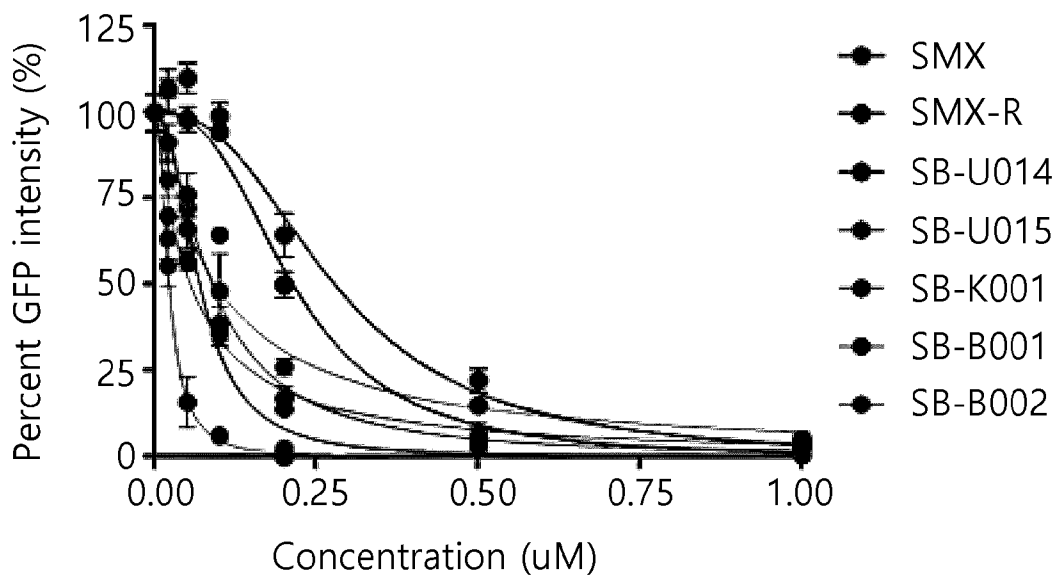
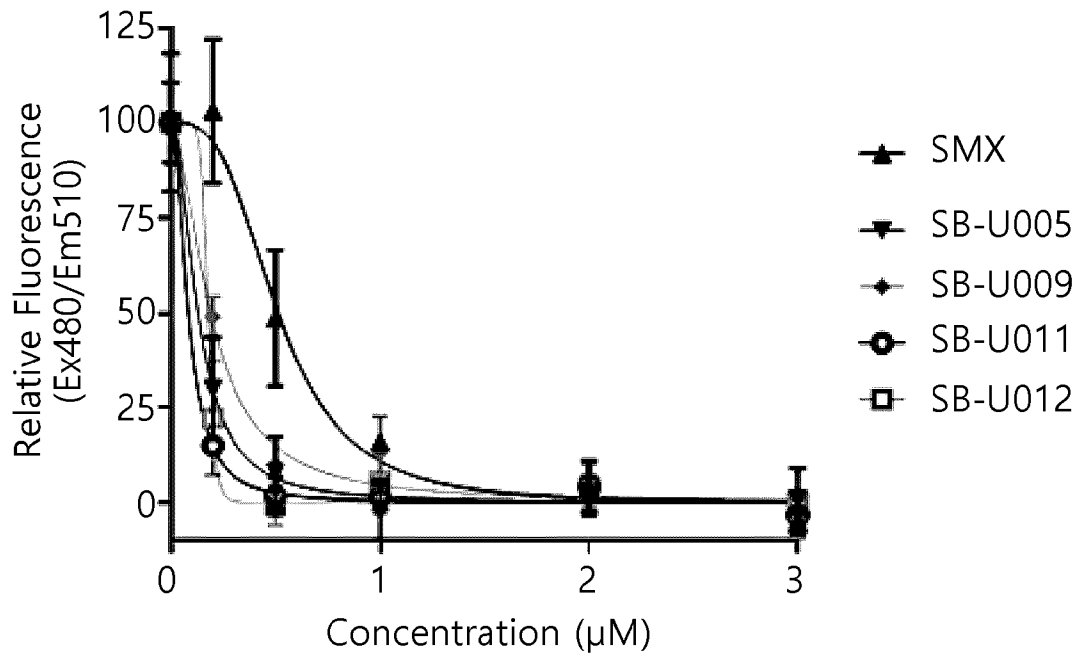
[도25]



[도26]



[도27]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/001195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07F 9/54(2006.01)i; A61K 31/662(2006.01)i; A61K 31/675(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 31/665(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07F 9/54(2006.01); A61K 31/352(2006.01); A61K 31/353(2006.01); A61K 31/66(2006.01); A61K 31/662(2006.01); A61K 49/06(2006.01); A61K 9/00(2006.01); C07F 9/28(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus, Marpat), Google & keywords: 트리페닐포스포늄(triphenylphosphonium), 암(cancer), TRAP1(tumor necrosis factor receptor-associated protein-1)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2012-0008056 A (COLBY PHARMACEUTICAL COMPANY) 25 January 2012 (2012-01-25) See claims 1-21; and paragraphs [0004], [0230] and [0313]-[0334].	1-4,11,14-16,21
Y		17-20
A		5-10,12,13,22,23
Y	ZHANG, B. et al. Aberrantly upregulated TRAP1 is required for tumorigenesis of breast cancer. <i>Oncotarget</i> . 2015, vol. 6, no. 42, pp. 44495-44508. See abstract; and pages 44496 and 44502-44504.	17-20
X	US 2013-0072463 A1 (MITOTEC SA) 21 March 2013 (2013-03-21) See claims 1-9; and paragraphs [0030], [0049], [0053] and [0066].	1-3,5,16,21-23
Y		17-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 May 2022		Date of mailing of the international search report 09 May 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	GOLEVA, T. N. et al. Mitochondria-targeted 1,4-naphthoquinone (SkQN) is a powerful prooxidant and cytotoxic agent. BBA-Bioenergetics. 2020, vol. 1861, article no. 148210, pp. 1-11. See abstract; and figure 1.	1,2,5,6,16,21 17-20
X	US 2009-0214437 A1 (KALYANARAMAN, B. et al.) 27 August 2009 (2009-08-27) See figure 2.	1,2,11-13,16
X	DONG, L. -F. et al. Mitochondrial targeting of Vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. The journal of biological chemistry. 2011, vol. 286, no. 5, pp. 3717-3728, supplemental material. See page 3718; and supplemental material.	1,2,11,14-16
X	Chemical abstract compound. STNext. See RN 25791-20-2 (16 November 1984) and RN 14866-43-4 (16 November 1984).	1,16
PX	KR 10-2021-0076875 A (SMARTIN BIO INC. et al.) 24 June 2021 (2021-06-24) See entire document.	1-4,16-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/001195

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2012-0008056 A	25 January 2012	AU 2010-236203 A1	13 October 2011
		AU 2014-203000 A1	26 June 2014
		CN 102438615 A	02 May 2012
		EP 2419095 A2	22 February 2012
		JP 2012-524074 A	11 October 2012
		JP 2015-172066 A	01 October 2015
		US 2010-0297262 A1	25 November 2010
		WO 2010-121177 A2	21 October 2010
		WO 2010-121177 A3	31 March 2011
		ZA 201108369 B	27 February 2013
US 2013-0072463 A1	21 March 2013	US 2010-0144680 A1	10 June 2010
		US 8349902 B2	08 January 2013
		US 9408859 B2	09 August 2016
		WO 2008-094062 A1	07 August 2008
US 2009-0214437 A1	27 August 2009	US 2013-0142735 A1	06 June 2013
		US 8388936 B2	05 March 2013
KR 10-2021-0076875 A	24 June 2021	WO 2021-125800 A1	24 June 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07F 9/54(2006.01)i; A61K 31/662(2006.01)i; A61K 31/675(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 31/665(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07F 9/54(2006.01); A61K 31/352(2006.01); A61K 31/353(2006.01); A61K 31/66(2006.01); A61K 31/662(2006.01); A61K 49/06(2006.01); A61K 9/00(2006.01); C07F 9/28(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN(Registry, Caplus, Marpat), Google & 키워드: 트리페닐포스포늄(triphenylphosphonium), 암(cancer), TRAP1(tumor necrosis factor receptor-associated protein-1)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2012-0008056 A (콜비 파마수티컬 컴퍼니) 2012.01.25 청구항 1-21; 단락 [0004], [0230], [0313]-[0334]	1-4,11,14-16,21
Y		17-20
A		5-10,12,13,22,23
Y	ZHANG, B. 등, "Aberrantly upregulated TRAP1 is required for tumorigenesis of breast cancer", <i>Oncotarget</i> , 2015, 6권, 42호, 페이지 44495-44508 초록; 페이지 44496, 44502-44504	17-20
X	US 2013-0072463 A1 (MITOTEC SA) 2013.03.21 청구항 1-9; 단락 [0030], [0049], [0053], [0066]	1-3,5,16,21-23
Y		17-20
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년05월09일(09.05.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년05월09일(09.05.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	GOLEVA, T. N. 등, "Mitochondria-targeted 1,4-naphthoquinone (SkQN) is a powerful prooxidant and cytotoxic agent", BBA-Bioenergetics, 2020, 1861권, 아티클 넘버 148210, 페이지 1-11 초록; 도면 1	1,2,5,6,16,21 17-20
X	US 2009-0214437 A1 (KALYANARAMAN, B. 등) 2009.08.27 도면 2	1,2,11-13,16
X	DONG, L. -F. 등, "Mitochondrial targeting of Vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II", The journal of biological chemistry, 2011, 286권, 5호, 페이지 3717-3728, supplemental material 페이지 3718; supplemental material	1,2,11,14-16
X	Chemical abstract compound, STNext RN 25791-20-2 (1984.11.16), RN 14866-43-4 (1984.11.16)	1,16
PX	KR 10-2021-0076875 A (주식회사 스마틴바이오 등) 2021.06.24 전문	1-4,16-23

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0008056 A	2012/01/25	AU 2010-236203 A1	2011/10/13
		AU 2014-203000 A1	2014/06/26
		CN 102438615 A	2012/05/02
		EP 2419095 A2	2012/02/22
		JP 2012-524074 A	2012/10/11
		JP 2015-172066 A	2015/10/01
		US 2010-0297262 A1	2010/11/25
		WO 2010-121177 A2	2010/10/21
		WO 2010-121177 A3	2011/03/31
US 2013-0072463 A1	2013/03/21	ZA 201108369 B	2013/02/27
		US 2010-0144680 A1	2010/06/10
		US 8349902 B2	2013/01/08
		US 9408859 B2	2016/08/09
US 2009-0214437 A1	2009/08/27	WO 2008-094062 A1	2008/08/07
		US 2013-0142735 A1	2013/06/06
KR 10-2021-0076875 A	2021/06/24	US 8388936 B2	2013/03/05
		WO 2021-125800 A1	2021/06/24