(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0007447
(43) 공개일자 2022년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 487/04 (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 487/04 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0085681
(22) 출원일자 2020년07월10일
심사청구일자 2020년07월10일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
강병헌
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
윤남구
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

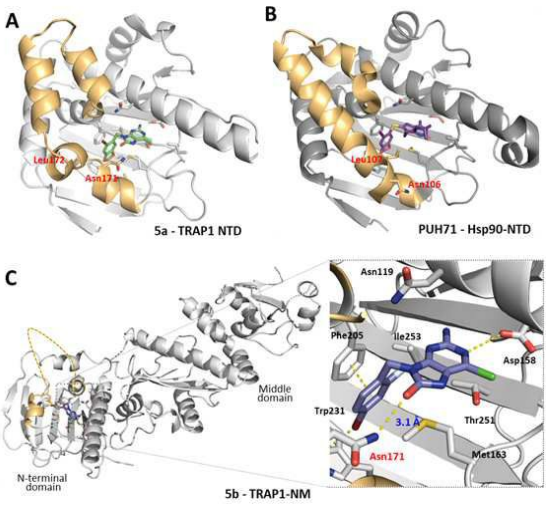
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **TRAP1 선택적 억제제로서의 화합물 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

TRAP1 선택적 억제제로서의 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염, 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07D 473/00 (2013.01)

(72) 발명자
양수재
서울특별시 강서구 화곡로 374, 501호(등촌동)
박은선
서울특별시 송파구 법원로4길 5, 939호(문정동)
강수성
인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 77, 902동 1103호(송도동, 더샵 엑스포)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711112860
과제번호 2019R1A2C2086618
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 미토콘드리아 샤페론 TRAP1에 의한 종양과 종양 미세환경 조절
기 여 율 50/100
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711104704
과제번호 2019M3E5D4065251
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 인공지능신약개발플랫폼구축사업(R&D)
연구과제명 빅데이터/인공지능 기반 약물설계 및 후보물질 도출
기 여 율 20/100
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711113569
과제번호 2019R1A2C2004142
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 퇴행성 뇌질환 치료제 개발을 위한 L-type 칼슘 채널 CaV1.3 선택적 조절 연구
기 여 율 25/100
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711114860
과제번호 2018R1A5A2025286
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 섬유화질환 제어 연구센터
기 여 율 5/100
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

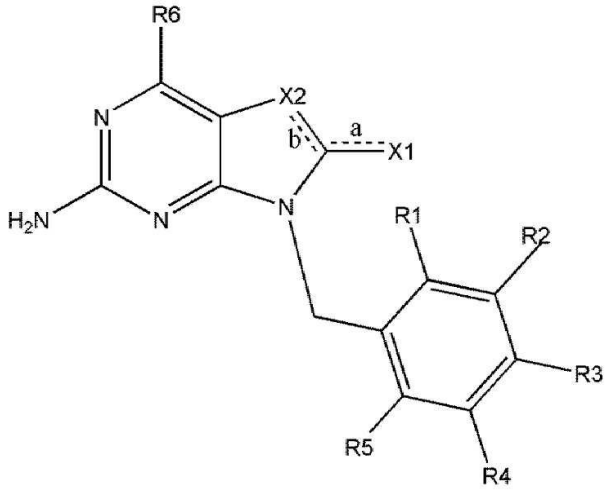
명 세 서

청구범위

청구항 1

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

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

X1은 OH, NH_2, SH, 또는 O이고;

X2는 N, NH 또는 CH_2이고;

a 및 b 중 어느 하나는 단일 결합이고, 다른 하나는 이중 결합이고;

R1, R2, R3, R4 및 R5는 각각 독립적으로, H, 할로, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, 시아노, OR7, SR7 또는 NHR7이거나,

R1, R4 및 R5는 각각 독립적으로, H, 할로, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, 시아노, OR7, SR7 또는 NHR7이고, R2 및 R3은 함께 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1개 또는 2개의 헤테로원자를 포함하는 4원 내지 7원의 헤테로고리를 형성하고;

R6은 H, 할로 또는 C_{1-6} 알킬이고;

상기 R7은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

상기 C_{1-6} 알킬 또는 C_{2-6} 알케닐은 선택적으로 할로 또는 C_{1-6} 알킬로 치환될 수 있다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 X1은 OH, NH_2 또는 SH이고, 상기 X2는 N이고, 상기 a는 단일 결합이고, 상기 b는 이중 결합인 것인, 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 X1은 O이고, 상기 X2는 NH 또는 CH_2이고, 상기 a는 이중 결합이고, 상기 b는 단일 결합인 것인, 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 R1, R2, R3, R4 및 R5는 각각 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, C_{1-4} 알킬, C_{2-4} 알케닐, 시아노, OR7, SR7 또는 NHR7이거나,

R1, R4 및 R5는 각각 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, C_{1-4} 알킬, C_{2-4} 알케닐, 시아노, OR7, SR7 또는 NHR7이고, R2 및 R3은 함께 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1개 또는 2개의 헤테로원자를 포함하는 5원 내지 6원의 헤테로고리를 형성하고;

R6은 H, 할로 또는 C_{1-4} 알킬이고;

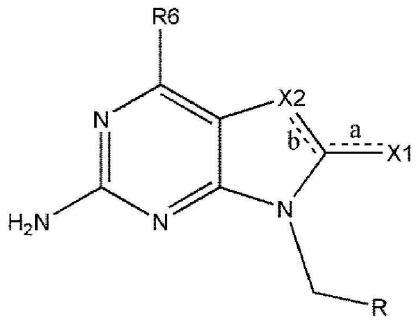
상기 R7은 H 또는 C_{1-4} 알킬이고;

상기 C_{1-4} 알킬 또는 C_{2-4} 알케닐은 선택적으로 F, Cl, Br 또는 메틸로 치환될 수 있는 것인, 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

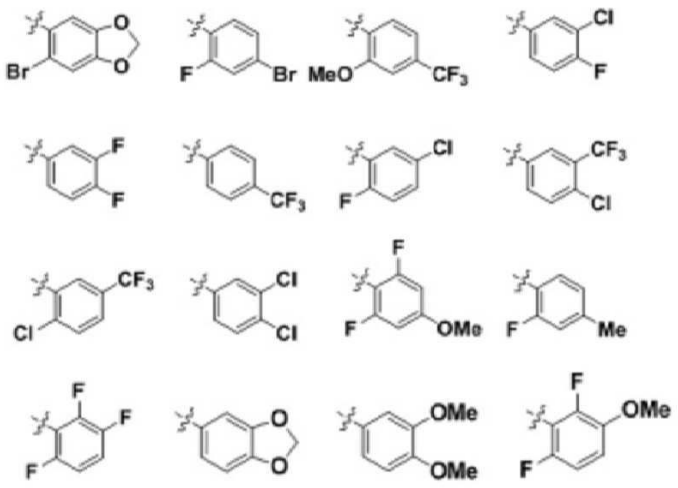
청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 화학식 1a로 표시되는 것인, 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1a]



X1, X2, a, b 및 R6은 청구항 1에 정의된 바와 같고;

R은 하기로부터 선택된다:



.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염:

2-아미노-9-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-9-(4-브로모-2-플루오로벤질)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(2-메톡시-4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(5-클로로-2-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(4-클로로-3-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(3,4-디클로로벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(2,6-디플루오로-4-메톡시벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(2-플루오로-4-메틸벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-6-클로로-9-(2,3,6-트리플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올;

2-아미노-9-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-티올;

2-아미노-9-(4-브로모-2-플루오로벤질)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-티올;

2-아미노-6-클로로-9-(2-메톡시-4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-티올;

2-아미노-6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올;

2-아미노-6-클로로-9-(3,4-디플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올;

2-아미노-6-클로로-9-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-티올;

2-아미노-6-클로로-9-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-티올;

2-아미노-6-클로로-9-(3,4-디클로로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올;

2-아미노-6-클로로-9-(2,6-디플루오로-4-메톡시벤질)-9*H*-퓨린-8-티올;

2-아미노-6-클로로-9-(2-플루오로-4-메틸벤질)-9*H*-퓨린-8-티올;

2-아미노-6-클로로-9-(2,3,6-트리플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올;

9-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-6-클로로-9*H*-퓨린-2,8-디아민;

9-(4-브로모-2-플루오로벤질)-6-클로로-9*H*-퓨린-2,8-디아민;

6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-2,8-디아민;

6-클로로-9-(3,4-디플루오로벤질)-9*H*-퓨린-2,8-디아민;

2-아미노-7-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-4-클로로-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;

2-아미노-4-클로로-7-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;

2-아미노-7-(4-브로모-2-플루오로벤질)-4-클로로-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;

2-아미노-4-클로로-7-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;

2-아미노-4-클로로-7-(3,4-디클로로벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;

2-아미노-4-클로로-7-(2-플루오로-4-메틸벤질)-5,7-디히드로-6H-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;

2-아미노-7-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일메틸)-4-클로로-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;

2-아미노-4-클로로-7-(2,3-디메톡시벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;

2-아미노-4-클로로-7-(2,6-디플루오로-3-메톡시벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;

2-아미노-7-((6-브로모벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-4-메틸-5,7-디히드로-6H-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;
및

2-아미노-7-(4-브로모-2-플루오로벤질)-4-메틸-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 따른 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은, Hsp90 (Heat shock protein 90) 또는 Grp94 (Glucose-regulated protein 94)에 비해 TRAP1 (TNF receptor-Associated Protein 1)를 선택적으로 억제하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 암은 TRAP1의 활성과 연관된 암인 것인 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 암은 유방암, 췌장암, 대장암, 폐암, 전립선암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신경교종, 간암, 난소암, 뇌암, 방광암, 신장암, 신경아세포종, 구강암, 위암, 골암, 직장암, 갑상선암, 피부암, 흑색종, 혈액암, 림프종, 및 췌장신경내분비종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 7에 있어서, 항암제를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

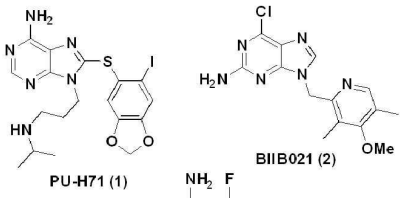
[0001] TRAP1 선택적 억제제로서의 화합물, 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] Hsp90 (heat shock protein 90) 패밀리에 속하는 TRAP1 (TNF Receptor-Associated Protein 1)은 다른 단백질이 올바르게 접히는 것을 돕는 미토콘드리아 분자 샤페론이다. TRAP1은 정상 세포에서 거의 검출되지 않지만, 유방암, 전립선암, 췌장암, 폐암 및 결장암과 같은 다양한 암에서 과발현되며, 암 세포가 가혹한 종양 환경에 적응할 수 있도록 세포 대사를 재프로그래밍한다. TRAP1의 불활성화는 *in vitro* 및 *in vivo* 암 세포에서 대량의 세포사멸 (apoptosis)을 유도하므로, TRAP1을 표적으로 하는 억제제가 개발되고 있다(Kang, B. H., TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mi-tochondria-targeted TRAP1 inhibitors. BMB Rep. 2012, 45, 1-6).

[0003] Hsp90 패밀리는 Hsp90α, Hsp90β, Grp94 및 TRAP1을 포함하는 4 개의 서로 다른 파라로그 (paralog)로 구별된다. Hsp90 패밀리는 세포에서 서로 달리 위치하고 발현되지만, 이들은 모두 호모다이머로서 존재한다. 각 프로토머 (protomer)에는 세 가지 특징적인 도메인이 있다: N-말단 도메인 (NTD), 중간 도메인 (M-도메인) 및 C-말단 도메인 (CTD). 호모다이머 상의 각 프로토머의 CTD는 1차 이량체화를 제공하기 위해 상호 작용한다. M-도메인은 다양한 클라이언트 단백질과 상호 작용할 수 있는 넓은 표면을 갖는다. NTD는 결합된 ATP가 ADP로 가수분해되는 ATPase 촉매 부위를 갖는다. 이 ATP 결합 부위는 약물 결합 부위로도 알려져 있다. ATP의 가수분해는 프로토머 이량체화를 용이하게 하기 위해 전체 단백질 구조의 형태적 재배열을 담당한다. NTD 입체형태 변화의 주요 원인은 ATP-lid의 이동이며, 이는 NTD 이량체화에 필수적인 소수성 표면을 제공하기 위해 ATP 결합 부위에 걸쳐 폐쇄되어야 한다. ATP-lid의 힌지 운동을 위해, 여러 유연한 서열이 ATP-lid의 적절한 위치에 위치되어 있다. 이는 약물-결합 부위가 다양한 억제제 스캐폴드에 대한 다양한 유도-적합에 적응할 수 있게 한다. Hsp90 및 Grp94의 공-결정 구조는 결합 포켓의 구조적 다양성을 나타내며, ATP 또는 ADP에 의해 결합 될 때 Hsp90의 부분 개방/폐쇄 추정 중간 형태를 보여준다. Hsp90 패밀리 단백질에 대한 몇몇 억제제들은 NTD 상의 ATP 결합 부위를

타겟으로 하여 개발되었다(Jhaveria, k. et al., Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2012, *1823*, 742-755.). Hsp90 억제제로는 PU-H71 (**1**), BIIB021 (**2**), SNX-0723 (**3**) 등이 공개되어 있다(Immormino, R. M. et al., Structural and quantum chemical studies of 8-aryl-sulfanyl adenine class Hsp90 inhibitors. *J. Med. Chem*. 2006, 49, 4953-4960.; Lundgren, K. et al., BIIB021, an orally available, fully synthetic small-molecule inhibitor of the heat shock protein Hsp90. *Mol. Cancer. Ther*. 2009, 8, 921-929.; Ernst, J. T. et al., Identification of Novel HSP90α/β Isoform Selective Inhibitors Using Structure-Based Drug Design. Demonstration of Potential Utility in Treating CNS Disorders such as Huntington's Disease *J. Med. Chem*. 2014, 57, 3382-3400.).





[0004]

[0005] 또한, 본 발명자들은 최근 Hsp90 및 TRAP1과 같은 Hsp90 상동단백질을 동시에 저해하는 화합물인 DN401을 개발하였으며, 이는 한국 공개특허공보 제10-2018-0045781호로 공개되어 있다.

[0006] 그러나, Hsp90은 저해하지 않으면서 Hsp90의 파라로그인 TRAP1을 선택적으로 저해하는 TRAP1 선택적 억제제의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0008] 다른 양상은 상기 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, TRAP1의 활성과 연관된 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 다른 양상은 상기 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

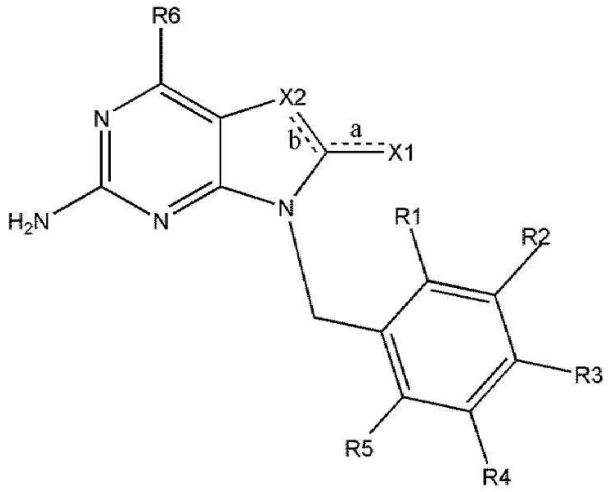
[0010] 다른 양상은 상기 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0011] 다른 양상은 암 예방 또는 치료용 의약의 제조에 사용하기 위한 상기 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0012] 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0013] [화학식 1]



[0014]

[0015] 상기 화학식 1에서,

[0016] X1은 OH, NH_2, SH, 또는 O이고;

[0017] X2는 N, NH 또는 CH_2이고;

[0018] a 및 b 중 어느 하나는 단일 결합이고, 다른 하나는 이중 결합이고;

[0019] R1, R2, R3, R4 및 R5는 각각 독립적으로, H, 할로, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, 시아노, OR7, SR7 또는 NHR7이거나,

[0020] R1, R4 및 R5는 각각 독립적으로, H, 할로, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, 시아노, OR7, SR7 또는 NHR7이고, R2 및 R3은 함께 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1개 또는 2개의 헤테로원자를 포함하는 4원 내지 7원의 헤테로고리를 형성하고;

[0021] R6은 H, 할로 또는 C_{1-6} 알킬이고;

[0022] 상기 R7은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

[0023] 상기 C_{1-6} 알킬 또는 C_{2-6} 알케닐은 선택적으로 할로 또는 C_{1-6} 알킬로 치환될 수 있다.

[0025] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 TRAP1 선택적 억제제로 사용 가능하다. 본 발명자들은 TRAP1 구조를 기초로 일련의 퓨린-8-온 및 피롤로[2,3-*d*]피리미딘 유도체를 설계하고 합성하였으며, 합성된 화합물들은 *in vitro*에서 파라로그성(paralogous) 효소 Hsp90 및 Grp94에 비해 TRAP1에 대해 매우 선택적인 것으로 확인되었다. ATP-lid의 Asn171 잔기의 이용을 통한 TRAP1 선택적 억제 전략은 X-선 결정학 및 MD 시뮬레이션 연구에 기초하여 조사되었다. 다양한 합성된 강력한 TRAP1 억제제 중에서, 일 실시예에 따른 화합물 5j는 Hsp90에 비해 65 배 선택성 및 Grp94에 비해 13 배 선택성을 가졌다. 또한, 일 실시예에 따른 화합물 6j의 TRAP1에 대한 IC_{50}은 63.5 nM이었고 Hsp90 및 Grp94에 비해 각각 78 배 및 30 배 선택성을 가졌다. 따라서, 일 양상에 따른 화합물들은 우수한 TRAP1 선택적 억제 활성을 가진다.

[0027] 용어 “치환”은 유기 화합물 중의 하나 이상의 수소 원자를 다른 원자단으로 치환하여 유도체를 형성한 경우 수소 원자 대신에 도입되는 것을 말하고, 치환기는 도입된 원자단을 말한다.

[0028] 용어 “할로 (halo)”는 “할로겐 (halogen)”과 상호교환적으로 사용된다. 상기 할로는 예를 들어, F, Cl, Br, 또는 I 등이다.

[0029] 용어 “알킬 (alkyl)”은 완전 포화된 분지형 또는 비분지형 (또는, 직쇄 또는 선형) 탄화수소 라디칼을 말한다. 상기 알킬은 C_1 내지 C_{10}, 또는 C_1 내지 C_6인 알킬기일 수 있다. 상기 알킬은 예를 들어, 메틸, 에틸, n-

프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, 2차 부틸(sec-butyl), n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, iso-아밀, n-헥실, 3-메틸헥실, 2,2-디메틸펜틸, 2,3-디메틸펜틸, n-헵틸, n-옥틸, n-노닐, 또는 n-데실이다.

[0030] 용어 "알케닐 (alkenyl)"은 적어도 하나 이상의 탄소-탄소 이중결합(C=C)을 갖는 불포화된 탄화수소 라디칼을 말한다. 상기 알케닐은 C_2 내지 C_{10}, 또는 C_2 내지 C_6인 알케닐기일 수 있다. 상기 알케닐은 예를 들어, 비닐, 프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 또는 헥세닐이다.

[0031] 용어 "헤테로고리"는 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하는 포화 또는 부분적으로 불포화된 4-, 5-, 6-, 및 7-원의 헤테로고리를 말한다. 용어, "헤테로고리", "헤테로시클릴", "헤테로시클릴 라디칼"은 상호교환적으로 사용된다. 상기 헤테로고리는 예를 들어, 테트라히드로퓨라닐, 테트라히드로티에닐, 테트라히드로피라닐, 피롤리디닐, 피롤리도닐, 피페리디닐, 옥세타닐, 옥사졸리디닐, 피페라지닐, 디옥사닐, 디옥소라닐, 모르폴리닐, 디히드로퓨라닐, 디히드로피라닐, 디히드로피리디닐, 테트라히드로피리디닐, 디히드로피리미디닐, 또는 테트라히드로피리미디닐이다. 상기 헤테로고리는 모노시클릭 또는 바이시클릭일 수 있다.

[0033] 상기 화학식 1에서, 상기 X1은 OH, NH_2 또는 SH이고, 상기 X2는 N이고, 상기 a는 단일 결합이고, 상기 b는 이중 결합일 수 있다. 구체적으로, 상기 X1은 OH이고, 상기 X2는 N이고, 상기 a는 단일 결합이고, 상기 b는 이중 결합이거나; 상기 X1은 NH_2이고, 상기 X2는 N이고, 상기 a는 단일 결합이고, 상기 b는 이중 결합이거나; 상기 X1은 SH이고, 상기 X2는 N이고, 상기 a는 단일 결합이고, 상기 b는 이중 결합일 수 있다.

[0035] 상기 화학식 1에서, 상기 X1은 O이고, 상기 X2는 NH 또는 CH_2이고, 상기 a는 이중 결합이고, 상기 b는 단일 결합일 수 있다. 구체적으로, 상기 X1은 O이고, 상기 X2는 NH이고, 상기 a는 이중 결합이고, 상기 b는 단일 결합이거나; 상기 X1은 O이고, 상기 X2는 CH_2이고, 상기 a는 이중 결합이고, 상기 b는 단일 결합일 수 있다.

[0037] 상기 화학식 1에서, 상기 R1, R2, R3, R4 및 R5는 각각 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, C_{1-4} 알킬, C_{2-4} 알케닐, 시아노, OR7, SR7 또는 NHR7이거나,

[0038] R1, R4 및 R5는 각각 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, C_{1-4} 알킬, C_{2-4} 알케닐, 시아노, OR7, SR7 또는 NHR7이고, R2 및 R3은 함께 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1개 또는 2개의 헤테로원자를 포함하는 5원 내지 6원의 헤테로고리를 형성하고;

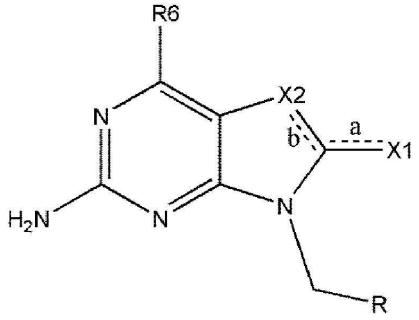
[0039] R6은 H, 할로 또는 C_{1-4} 알킬이고;

[0040] 상기 R7은 H 또는 C_{1-4} 알킬이고;

[0041] 상기 C_{1-4} 알킬 또는 C_{2-4} 알케닐은 선택적으로 F, Cl, Br 또는 메틸로 치환될 수 있다.

[0043] 일 구체예에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 화학식 1a로 표시되는 것일 수 있다:

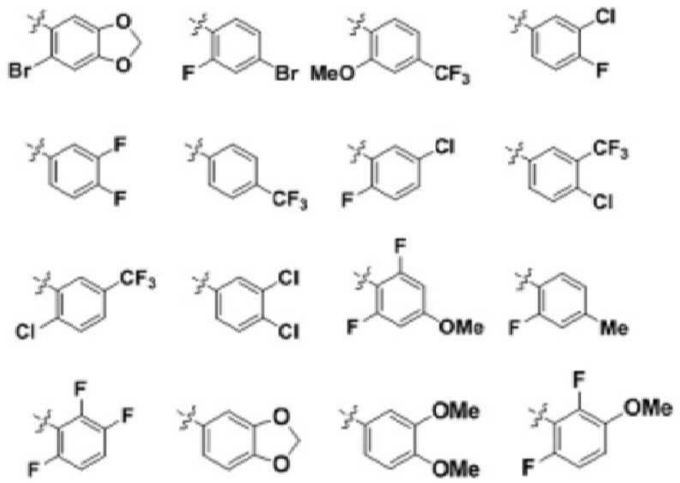
[0044] [화학식 1a]



[0045]

[0046] X1, X2, a, b 및 R6은 상기에서 정의된 바와 같고;

[0047] R은 하기로부터 선택된다:

[0048] 

.

[0050] 일 구체예에서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0051] 2-아미노-9-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5a);

[0052] 2-아미노-9-(4-브로모-2-플루오로벤질)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5b);

[0053] 2-아미노-6-클로로-9-(2-메톡시-4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5c);

[0054] 2-아미노-6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5d);

[0055] 2-아미노-6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5e);

[0056] 2-아미노-6-클로로-9-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5f);

[0057] 2-아미노-6-클로로-9-(5-클로로-2-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5g);

[0058] 2-아미노-6-클로로-9-(4-클로로-3-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5h);

[0059] 2-아미노-6-클로로-9-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5i);

[0060] 2-아미노-6-클로로-9-(3,4-디클로로벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5j);

[0061] 2-아미노-6-클로로-9-(2,6-디플루오로-4-메톡시벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5k);

[0062] 2-아미노-6-클로로-9-(2-플루오로-4-메틸벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5l);

[0063] 2-아미노-6-클로로-9-(2,3,6-트리플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (화합물 5m);

[0064] 2-아미노-9-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6a);

[0065] 2-아미노-9-(4-브로모-2-플루오로벤질)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6b);

[0066] 2-아미노-6-클로로-9-(2-메톡시-4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6c);

[0067] 2-아미노-6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6d);

[0068] 2-아미노-6-클로로-9-(3,4-디플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6e);

[0069] 2-아미노-6-클로로-9-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6f);

[0070] 2-아미노-6-클로로-9-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6i);

[0071] 2-아미노-6-클로로-9-(3,4-디클로로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6j);

[0072] 2-아미노-6-클로로-9-(2,6-디플루오로-4-메톡시벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6k);

[0073] 2-아미노-6-클로로-9-(2-플루오로-4-메틸벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6l);

[0074] 2-아미노-6-클로로-9-(2,3,6-트리플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (화합물 6m);

[0075] 9-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-6-클로로-9*H*-퓨린-2,8-디아민 (화합물 7a);

[0076] 9-(4-브로모-2-플루오로벤질)-6-클로로-9*H*-퓨린-2,8-디아민 (화합물 7b);

[0077] 6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-2,8-디아민 (화합물 7d);

[0078] 6-클로로-9-(3,4-디플루오로벤질)-9*H*-퓨린-2,8-디아민 (화합물 7e);

[0079] 2-아미노-7-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-4-클로로-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 11a);

[0080] 2-아미노-4-클로로-7-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 11f);

[0081] 2-아미노-7-(4-브로모-2-플루오로벤질)-4-클로로-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 11g);

[0082] 2-아미노-4-클로로-7-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 11i);

[0083] 2-아미노-4-클로로-7-(3,4-디클로로벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 11j);

[0084] 2-아미노-4-클로로-7-(2-플루오로-4-메틸벤질)-5,7-디히드로-6H-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 11l);

[0085] 2-아미노-7-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일메틸)-4-클로로-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 11n);

[0086] 2-아미노-4-클로로-7-(2,3-디메톡시벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 11o);

[0087] 2-아미노-4-클로로-7-(2,6-디플루오로-3-메톡시벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 11p);

[0088] 2-아미노-7-((6-브로모벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-4-메틸-5,7-디히드로-6H-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 15a); 및

[0089] 2-아미노-7-(4-브로모-2-플루오로벤질)-4-메틸-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (화합물 15b).

[0091] 용어 "입체이성질체"의 "이성질체(isomer)"는 분자식은 같지만 분자 내에 있는 구성 원자의 연결 방식이나 공간 배열이 동일하지 않은 화합물을 말한다. 이성질체는 예를 들면, 구조 이성질체(structural isomers), 및 입체이성질체(stereoisomer)를 포함한다. 상기 입체이성질체는 부분입체 이성질체(diasteromer) 또는 거울상 이성질체(enantiomer)일 수 있다. 거울상이성질체는 왼손과 오른손의 관계처럼 그 거울상과 겹쳐지지 않는 이성질체를 말하고, 광학 이성질체(optical isomer)라고도 한다. 거울상 이성질체는 키랄 중심 탄소에 4개 이상의 치환기가 서로 다른 경우 R(Rectus: 시계방향) 및 S(Sinister: 반시계 방향)로 구분한다. 부분입체이성질체는 거울상 관계가 아닌 입체 이성질체를 말하고, 원자의 공간 배열이 달라 생기 시스(cis)-트랜스(trans) 이성질체로 나뉠 수 있다.

[0092] 용어 "용매화물(solvate)"는 유기 또는 무기 용매에 용매화된 화합물을 말한다. 상기 용매화물은 예를 들어 수화물이다.

[0093] 용어 "염(salt)"은 화합물의 무기 및 유기산 부가염을 말한다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 염일 수 있다. 상기 무기산염은 염산염, 브롬산염, 인산염, 황산염, 또는 이황산염일 수 있다. 상기 유기산염은 포름산염, 아세트산염, 프로피온산염, 젖산염, 옥살산염, 주석산염, 말산염, 말레인산염, 구연산염, 푸마르산염, 베실산염, 캠실산염, 에디실염, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산염, 벤조산염, 글루콘산염, 메탄술폰산염, 글리콜산염, 숙신산염, 4-톨루엔술폰산염, 갈룩투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 에탄술폰산염, 벤젠술폰산염, p-톨루엔술폰산염, 또는 아스파르트산염일 수 있다. 상기 금속염은 칼슘염, 나트륨염, 마그네슘염, 스트론튬염, 또는 칼륨염일 수 있다.

[0095] 다른 양상은 일 양상에 따른 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, TRAP1의 활성과 연관된 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0096] 다른 양상은 일 양상에 따른 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0097] 화합물, 입체이성질체, 용매화물, 및 약학적으로 허용가능한 염은 전술한 바와 같다.

[0098] 용어 "예방"은 조성물의 투여에 의해 질병을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다. 용어 "치료"는 조성물의 투여에 의해 질병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.

[0099] 상기 약학 조성물에 있어서, 상기 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은, Hsp90 (Heat shock protein 90) 또는 Grp94 (Glucose-regulated protein 94)에 비해 TRAP1 (TNF receptor-Associated Protein 1)를 선택적으로 억제하는 것일 수 있다. 예를 들어, 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 암세포의 세포자살 (apoptosis)을 유도하는 것일 수 있다.

[0100] 상기 암은 TRAP1의 활성과 연관된 암일 수 있다. TRAP1의 활성과 연관된 암은, 예를 들어, 유방암, 췌장암, 대장암, 폐암 (Kang, Byoung Heon, et al. "Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network." *Cell* 131.2 (2007): 257-270; Costantino, Eleonora, et al. "TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptotis in human colorectal carcinoma cells." *Cancer letters* 279.1 (2009): 39-46); 전립선암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신경교종, 간암 (Park, Hye-Kyung, et al. "Unleashing the full potential of Hsp90 inhibitors as cancer therapeutics through simultaneous inactivation of Hsp90, Grp94, and TRAP1." *Experimental & molecular medicine* (2020): 1-13); 난소암 (Aust, Stefanie, et al. "Role of TRAP1 and estrogen receptor alpha in patients with ovarian cancer-a study of the OVCAD consortium." *Molecular cancer* 11.1 (2012): 69); 뇌암 (Park, Hye-Kyung, et al. "Interplay between TRAP1 and sirtuin-3 modulates mitochondrial respiration and oxidative stress to maintain stemness of glioma stem cells." *Cancer research* 79.7 (2019): 1369-1382); 방광암, 신장암 (Yoshida, Soichiro, et al. "Molecular chaperone TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.17 (2013): E1604-E1612; Si, Tong, et al. "Expression of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 and its clinical significance in kidney cancer." *International journal of clinical and experimental pathology* 8.10 (2015): 13090.); 신경아세포종 (Ramkumar, Balaji, et al. "Mitochondrial chaperone, TRAP1 as a potential pharmacological target to combat cancer metabolism." *Mitochondrion* 50 (2020): 42-50); 구강암 (Landriscina, Matteo, et al. "Mitochondrial chaperone Trap1 and the calcium binding protein Sorcin interact and protect cells against apoptosis induced by antiblastic agents." *Cancer research* 70.16 (2010): 6577-6586); 위암 (Han, Ping, Qing-Ling Wang, and Xia Zhang. "Expression of TRAP1 in gastric cancer tissue and its correlation with malignant biology." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 9.1 (2016): 67-71); 골암 (Gesualdi, N. Montesano, et al. "Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis." *Stress* 10.4 (2007): 342-350); 직장암

(Chen, Ru, et al. "Up-regulation of mitochondrial chaperone TRAP1 in ulcerative colitis associated colorectal cancer." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20.45 (2014): 17037); 갑상선암 (Palladino, Giuseppe, et al. "TRAP1 regulates cell cycle and apoptosis in thyroid carcinoma cells." *Endocrine-related cancer* 23.9 (2016): 699-709); 피부암, 흑색종 (Basit, Farhan, et al. "Mitochondrial complex I inhibition triggers a mitophagy-dependent ROS increase leading to necroptosis and ferroptosis in melanoma cells." *Cell death & disease* 8.3 (2017): e2716-e2716); 혈액암, 림프종, 췌장신경내분비종양 (Hu, Jiangting, et al. "TRAP1 is involved in cell cycle regulated by retinoblastoma susceptibility gene (RB1) in early hypoxia and has variable expression patterns in human tumors." *Journal of Cancer Research Updates* 2.3 (2013): 194-210) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0101] 일 구체예에서, 상기 암은 유방암, 췌장암, 대장암, 폐암, 전립선암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신경교종, 간암, 난소암, 뇌암, 방광암, 신장암, 신경아세포종, 구강암, 위암, 골암, 직장암, 갑상선암, 피부암, 흑색종, 혈액암, 림프종, 및 췌장신경내분비종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0102] 상기 약학적 조성물은 항암 활성을 갖는 공지의 유효성분을 더 포함할 수 있다. 항암 활성을 갖는 공지의 유효성분은 항암제일 수 있다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염과 상기 항암제는 동시 또는 순차 투여를 위한 단일 또는 개별 조성물일 수 있다.

[0103] 상기 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 담체, 부형제 및 희석제는 예를 들면, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀 룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유를 포함할 수 있다.

[0104] 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0105] 상기 약학적 조성물에 있어서, 경구 투여를 위한 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제일 수 있다. 상기 고형 제제는 부형제를 더 포함할 수 있다. 부형제는 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 또는 젤라틴일 수 있다. 또한, 상기 고형 제제는 마그네슘 스테아레이트, 또는 탈크와 같은 윤활제를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 있어서, 경구를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 또는 시럽제일 수 있다. 상기 액상 제제는 물, 또는 리퀴드 파라핀을 포함할 수 있다. 상기 액상 제제는 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 또는 보존제를 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 있어서, 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 또는 및 좌제일 수 있다. 비수성용제 또는 현탁제는 식물성 기름 또는 에스테르를 포함할 수 있다. 식물성 기름은 예를 들면, 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 또는 올리브 오일일 수 있다. 에스테르는 예를 들면 에틸올레이트일 수 있다. 좌제의 기제는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 또는 글리세로젤라틴 일 수 있다.

[0106] 상기 약학적 조성물은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 유효한 양으로 포함할 수 있다. 용어 "유효한 양"은 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체에게 투여되는 경우 예방 또는 치료의 효과를 나타내기에 충분한 양을 말한다. 상기 유효한 양은 당업자가 선택되는 세포 또는 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 상기 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 예를 들면, 약 0.0001 ㎎/㎏ 내지 약 100 ㎎/㎏, 또는 약 0.001 ㎎/㎏ 내지 약 100 ㎎/㎏의 양을 1일 1회 내지 24회, 2일 내지 1주에 1 내지 7회, 또는 1개월 내지 12개월에 1 내지 24회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 약학적 조성물에서 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 전체 조성물 총 중량에 대하여 약 0.0001 중량% 내지 약 10 중량%, 또는 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%로 포함될 수 있다.

[0107] 투여 방법은 경구, 또는 비경구 투여일 수 있다. 투여 방법은 예를 들어, 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal), 또는 피내 경로일 수 있다.

상기 조성물은 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있고, 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 함께 투여될 수 있다.

[0109] 다른 양상은 일 양상에 따른 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0110] 상기 약학적 조성물, 암, 예방, 및 치료는 전술한 바와 같다.

[0111] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 마우스, 래트, 소, 말, 돼지, 개, 원숭이, 양, 염소 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 암과 연관된 증상을 앓고 있거나, 앓을 가능성이 큰 개체일 수 있다.

[0112] 상기 방법은 상기 개체에 항암제를 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 항암제는 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염과 동시, 개별, 또는 순차로 상기 개체에 투여될 수 있다.

[0113] 투여 방법은 경구, 또는 비경구 투여일 수 있다. 투여 방법은 예를 들어, 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal), 또는 피내 경로일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있고, 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 함께 투여될 수 있다.

[0114] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 ㎎/㎏ 내지 약 100 ㎎/㎏, 약 0.01 ㎎/㎏ 내지 약 10 ㎎/㎏, 또는 약 0.1 ㎎/㎏ 내지 약 1 ㎎/㎏의 범위 내 일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.

[0116] 다른 양상은 암 예방 또는 치료용 의약의 제조에 사용하기 위한 일 양상에 따른 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0117] 일 양상에 따른 신규 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 TRAP1 선택적 억제 활성을 가지므로, TRAP1과 연관된 다양한 종류의 암을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0118] 도 1은 (A) TRAP1 NTD에서 화합물 5a의 X-선 공-결정 구조, (B) Hsp90-NTD에서 PU-H71의 X-선 공-결정 구조, (C) TRAP1 NM 도메인에서 화합물 5b의 X-선 공-결정 구조를 나타낸 것이다. 골드색은 ATP-lid를 나타낸다.

도 2는 (A) DN401-TRAP1 NTD 구조, (B) 화합물 5a-TRAP1 NTD 구조를 나타낸 X-선 결정학 결과이다. 물은 붉은색 구체이다.

도 3은 TRAP1-5a 복합체의 MD 시뮬레이션 (300ns)을 나타낸 것이다. (A) 30 ns 간격에서 화합물 5a의 결합 방식의 중첩. (B) TRAP1 잔기와의 화합물 5a 상호 작용의 상세한 원자의 개략도. 선택한 궤적 (0-300 ns)에서 30% 이상의 시뮬레이션 시간에 발생하는 상호 작용이 표시된다. (C) 300 ns MD 궤적에 따른 TRAP1 NTD의 RMSD 변화. (D) 5a-TRAP1 상호 작용 분획 누적 막대 차트; 수소 결합 (녹색), 소수성 결합 (회색), 이온성 결합 (빨간색) 및 물 연결 (파란색).

도 4는 화합물 5a 또는 DN401과 Hsp90의 도킹된 복합체의 MD 시뮬레이션을 나타낸 것이다. (A) 30 ns 간격에서 Hsp90-5a 복합체의 결합 방식의 중첩. (B) 30 ns 간격에서 Hsp90-DN401 복합체의 결합 방식의 중첩. (C) 300 ns MD 궤적에 따른 Hsp90 NTD의 RMSD 변화. (D) 300 ns MD 궤적에 따른 Hsp90 NTD의 RMSD 변화.

도 5는 TRAP1 NTD 및 Hsp90 NTD와 다양한 억제제들의 RMSF 값을 나타낸 것이다.

도 6은 300 ns MD 시뮬레이션의 30 ns 간격에서 (A) BIIB021, (B) SNX0723 및 (C) PUH71의 Hsp90에 대한 결합 방식의 중첩을 나타낸 것이다.

도 7은 Hsp90 (청록색) MD 시뮬레이션의 궤적 (90 ns)과 함께 TRAP1-5a 복합체 (TRAP1: 흰색, 5a: 녹색)를 오버레이한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0119] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0121] **합성 방법**

[0122] 출발 물질은 Sigma-Aldrich, TCI, Alfa-Aesar 및 Combi-Blocks에서 구입하였다. 모든 물질은 추가 정제 없이 사용하였다.

[0123] 마이크로웨이브 보조 반응은 바이오티지 이니시에이터 마이크로웨이브 시스템을 사용하였다.

[0124] 반응은 Merch 사전 코팅된 실리카 겔 60 F254 플레이트에서 수행된 박막 크로마토그래피에 의해 모니터링되었다.

[0125] 다양한 사전 패킹된 실리카 겔 카트리지를 갖는 Teledyne ISCO 플래시 정제 시스템을 플래시 컬럼 크로마토그래피에 사용하였다.

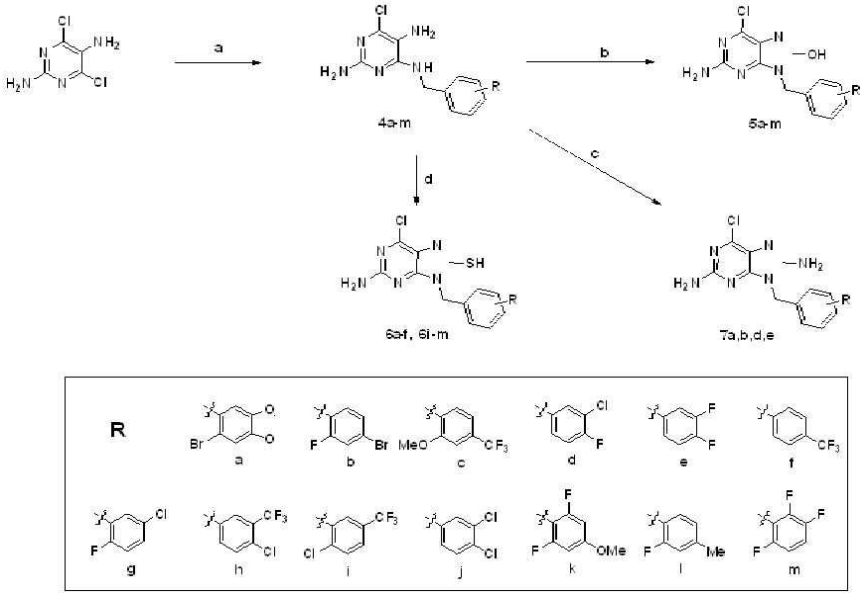
[0126] ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian Unity 400 기기 (^{1}H 및 ^{13}C의 경우 각각 400 및 101 MHz) 분광계를 사용하여 지시된 용매에서 기록하였다.

[0127] 화학적 이동은 DMSO-*d6* 또는 $CDCl_3$의 내부 표준으로서 TMS (0.0)에서 백만 다운필드 당 델타 값으로 보고하였다.

[0128] 질량분석(Mass Spectrometry, MS)은 Agilent 6230B TOF (Time of Flight) 액체 크로마토 그래피-질량 분석계에서 전자 분무 이온화 (ESI) 소스로 구성된 시스템에서 수행되었다.

[0129] 생물학적 분석을 거친 모든 화합물의 순도는 >95%이었다.

[0131] [반응도식 1]



[0132]

[0133] [a] 시약 및 조건: (a) 4,6-디클로로피리미딘-2,5-디아민, DIEA, n-BuOH, 170 ℃, 2.5시간, 마이크로웨이브, 50~85%; (b) 1,1'-카르보닐디이미다졸, 실온, 3시간, 15~65%; (c) 1,1'-티오카르보닐디이미다졸, 실온, 3시간, 23%; (d) 시아노겐 브로마이드, EtOH, 밤새 환류, 15%.

[0135] **제조예 1: 중간체 4a 내지 4m의 합성**

[0136] n-부탄올 (1.5 mL) 중 벤질 아민 (8 mmol), 4,6-디클로로피리미딘-2,5-디아민 (8 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (10.4 mmol)을 170 ℃에서 2.5 시간 동안 마이크로웨이브 반응기에서 교반 하였다. 실온으로 냉각 한 후, 진공 하에서 용매를 제거하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hex)로 정제하여 목적 화합물 **4a** 내지 **4m**을 수득하였다.

[0137] **제조예 1-1: N^4-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-6-클로로피리미딘-2,4,5-트리아민 (4a)**

[0138] 수율: 36%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.21 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 6.03 (s, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.47 (2H, s), 3.95 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{12}H_{11}BrClN_5O_2$ $[M+H]^+$ 계산치 372.98, 실측치 372.95.

[0139] **제조예 1-2: N^4-(4-브로모-2-플루오로벤질)-6-클로로피리미딘-2,4,5-트리아민 (4b).** 수율: 27%; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.26 - 7.22 (m, 3H), 5.73 (s, 1H), 4.61 (dd, *J* = 6.2, 1.1 Hz, 4H), 2.70 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{11}H_{10}BrClFN_5$ $[M+H]^+$ 계산치 346.98, 실측치 346.90.

[0140] **제조예 1-3: 6-클로로-N^4-(2-메톡시-4-(트리플루오로메틸)벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4c).** 수율: 34%; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.21 - 7.17 (m, 1H), 7.08 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 4.64 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.58 (s, 2H), 2.73 (d, *J* = 16.8 Hz, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{13}H_{13}ClF_3N_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 349.07, 실측치 349.05.

[0141] **제조예 1-4: 6-클로로-N^4-(3-클로로-4-플루오로벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4d).** 수율: 68%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.54 - 7.49 (m, 1H), 7.39 - 7.30 (m, 2H), 7.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 4.52 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{13}H_{13}ClF_3N_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 349.07, 실측치 349.05.

[0142] **제조예 1-5: 6-클로로-N^4-(3,4-디플루오로벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4e).** 수율: 84%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.42 - 7.32 (m, 2H), 7.17 (ddt, *J* = 7.5, 5.3, 2.3 Hz, 1H), 7.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 4.52 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{11}H_{10}ClF_2N_5$ $[M+H]^+$ 계산치 287.06, 실측치 287.00.

[0143] **제조예 1-6: 6-클로로-N^4-(4-(트리플루오로메틸)벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4f).** 수율: 53%; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.62 - 7.58 (m, 2H), 7.43 (dp, *J* = 8.1, 0.8 Hz, 2H), 5.82 (s, 1H), 4.67 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.64 (s, 2H), 2.73 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{12}H_{11}ClF_3N_5$ $[M+H]^+$ 계산치 319.06, 실측치 319.00.

[0144] **제조예 1-7: 6-클로로-N^4-(5-클로로-2-플루오로벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4g).** 수율: 32%; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.33 (dd, *J* = 6.4, 2.7 Hz, 1H), 7.21 (ddd, *J* = 8.7, 4.5, 2.7 Hz, 1H), 7.03 - 6.97 (m, 1H), 5.75 (s, 1H), 4.64 (d, *J* = 1.1 Hz, 2H), 4.61 (s, 2H), 2.72 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{11}H_{10}Cl_2FN_5$ $[M+H]^+$ 계산치 303.03, 실측치 302.95.

[0145] **제조예 1-8: 6-클로로-N^4-(4-클로로-3-(트리플루오로메틸)벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4h).** 수율: 30%; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.65 (dq, *J* = 2.1, 0.7 Hz, 1H), 7.48 - 7.41 (m, 2H), 5.81 (s, 1H), 4.62 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 2.72 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{12}H_{11}Cl_2F_3N_5$ $[M+H]^+$ 계산치 352.03, 실측치 352.50.

[0146] **제조예 1-9: 6-클로로-N^4-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4i).** 수율: 25%; ^{1}H

NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.27 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 7.25 (t, J = 0.6 Hz, 1H), 6.90 - 6.85 (m, 2H), 5.57 (s, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.52 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.69 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{12}H_{11}Cl_2F_3N_5$ $[M+H]^+$ 계산치 352.03, 실측치 352.35.

[0147] **제조예 1-10: 6-클로로-N^4-(3,4-디클로로벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4j).** 수율: 73%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.59 - 7.55 (m, 2H), 7.31 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 7.12 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 4.53 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{11}H_{11}Cl_3N_5$ $[M+H]^+$ 계산치 318.01, 실측치 318.95.

[0148] **제조예 1-11: 6-클로로-N^4-(5-플루오로-4-메톡시-2-메틸벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4k).** ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.50 - 6.41 (m, 2H), 5.55 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.59 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 2.69 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{12}H_{13}ClF_2N_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 316.08, 실측치 317.00.

[0149] **제조예 1-12: 6-클로로-N^4-(2-플루오로-4-메틸벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4l).** 수율: 66%; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.23 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.93 - 6.85 (m, 2H), 5.65 (s, 1H), 4.61 (d, J = 5.9 Hz, 4H), 2.70 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{12}H_{14}ClFN_5$ $[M+H]^+$ 계산치 282.09, 실측치 282.05.

[0150] **제조예 1-13: 6-클로로-N^4-(2,3,6-트리플루오로벤질)피리미딘-2,4,5-트리아민 (4m).** 수율: 80%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.47 (dtd, J = 10.1, 9.2, 5.1 Hz, 1H), 7.15 (tdd, J = 9.2, 3.9, 2.2 Hz, 1H), 6.82 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 5.61 (s, 2H), 4.58 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 3.94 (s, 2H); MS (ESI, m/z) $C_{11}H_9ClF_3N_5$ $[M+H]^+$ 계산치 304.06, 실측치 305.00.

[0152] **실시예 1: 화합물 5a 내지 5o의 합성**

[0153] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 **4** (0.4 mmol) 및 카르보닐디이미다졸 (0.48 mmol)을 질소 대기 하에 실온에서 3-4 시간 동안 교반하였다. 물 (20 mL) 첨가 후, 유기 물질을 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하고, MgSO4로 건조시키고 여과하였다. 여과물을 진공하에 농축시키고 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hex)로 정제하여 화합물 **5a** 내지 **5o**를 수득하였다.

[0154] **실시예 1-1: 2-아미노-9-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-올 (5a)**

[0155] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.38 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.58 (s, 2H), 6.04 (s, 2H), 5.75 (s, 1H), 4.77 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.6, 152.9, 152.5, 147.5, 147.5, 135.8, 128.1, 112.5, 111.7, 110.5, 107.5, 102.0, 43.0; MS (ESI, m/z) $C_{13}H_9BrClN_5O_3$ $[M+H]^+$ 계산치 399.9628, 실측치 399.9631.

[0156] **실시예 1-2: 2-아미노-9-(4-브로모-2-플루오로벤질)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-올 (5b)**

[0157] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.40 (s, 1H), 7.57 (dd, J = 9.8, 1.9 Hz, 1H), 7.46 - 7.31 (m, 1H), 7.16 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 6.63 (s, 2H), 4.89 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.6 (d, J = 250.5 Hz), 158.6, 152.8, 152.3, 135.9, 130.7 (d, J = 4.5 Hz), 127.8 (d, J = 3.3 Hz), 122.9 (d, J = 14.4 Hz), 120.9 (d, J = 9.6 Hz), 118.8 (d, J = 24.5 Hz), 110.2, 36.4 (d, J = 5.1 Hz); HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_8BrClFN_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 373.9636, 실측치 373.9637.

[0158] **실시예 1-3: 2-아미노-6-클로로-9-(2-메톡시-4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5c)**

[0159] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.42 (s, 1H), 7.30 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H),

7.00 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.59 (s, 2H), 4.87 (s, 2H), 3.94 (s, 3H); HRMS (ESI, m/z) $C_{14}H_{11}ClF_3N_5O_2$ $[M+H]^+$ 계산치 374.0626, 실측치 374.0630.

[0160] **실시예 1-4: 2-아미노-6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5d)**

[0161] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.38 (s, 1H), 7.52 (dd, J = 7.1, 2.2 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 9.4, 8.5 Hz, 1H), 7.28 (ddd, J = 8.5, 4.7, 2.2 Hz, 1H), 6.63 (s, 2H), 4.87 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.6, 156.6 (d, J = 246.0 Hz), 152.8, 152.3, 135.8, 134.4 (d, J = 3.6 Hz), 129.3, 127.9 (d, J = 7.6 Hz), 119.5 (d, J = 17.8 Hz), 117.1 (d, J = 21.1 Hz), 110.2, 41.5; HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_8Cl_2FN_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 328.0163, 실측치 328.0166.

[0162] **실시예 1-5: 2-아미노-6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5e)**

[0163] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.36 (s, 1H), 7.44 - 7.33 (m, 2H), 7.13 - 7.07 (m, 1H), 6.62 (s, 2H), 4.86 (s, 2H); HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_8ClF_2N_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 312.0461, 실측치 312.0458.

[0164] **실시예 1-6: 2-아미노-6-클로로-9-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5f)**

[0165] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.41 (s, 1H), 7.71 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.64 (s, 2H), 4.98 (s, 2H); HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_9ClF_3N_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 344.0520, 실측치 344.0525.

[0166] **실시예 1-7: 2-아미노-6-클로로-9-(5-클로로-2-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5g)**

[0167] 수율: 30%, 흰색 고체 ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.38 (s, 1H), 7.46 - 7.37 (m, 1H), 7.34 - 7.23 (m, 2H), 6.61 (s, 2H), 4.91 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.6, 158.4 (d, J = 246.0 Hz), 152.8, 152.3, 129.4 (d, J = 8.5 Hz), 128.6 (d, J = 4.2 Hz), 128.4 (d, J = 3.2 Hz), 125.5 (d, J = 16.3 Hz), 117.4 (d, J = 23.3 Hz), 110.4, 36.5 (d, J = 4.7 Hz); HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_8Cl_2FN_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 328.0163, 실측치 328.0164.

[0168] **실시예 1-8: 2-아미노-6-클로로-9-(4-클로로-3-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5h)**

[0169] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.40 (s, 1H), 7.82 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 6.60 (s, 2H), 4.95 (s, 2H); HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_8C_{12}F_3N_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 378.0131, 실측치 378.0133.

[0170] **실시예 1-9: 2-아미노-6-클로로-9-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5i)**

[0171] 수율: 52%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.43 (s, 1H), 7.83 - 7.68 (m, 2H), 7.44 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.63 (s, 2H), 5.01 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 158.6, 152.9, 152.5, 136.0, 135.9, 135.0, 130.7, 128.1 (q, J = 32.3 Hz), 126.1 (q, J = 3.7 Hz), 124.7 (q, J = 3.6 Hz), 123.6 (q, J = 272.3 Hz), 110.4, 40.7; HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_8C_{12}F_3N_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 378.0131, 실측치 378.0134.

[0172] **실시예 1-10: 2-아미노-6-클로로-9-(3,4-디클로로벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5j)**

[0173] 수율: 60%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.38 (s, 1H), 7.64 - 7.53 (m, 2H), 7.24 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.62 (s, 2H), 4.88 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.6, 152.8, 152.3, 137.6, 135.8,

131.1, 130.8, 130.1, 129.2, 127.4, 110.2, 41.5; HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_8Cl_3N_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 343.9867, 실측치 343.9872.

[0174] **실시예 1-11: 2-아미노-6-클로로-9-(2,6-디플루오로-4-메톡시벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5k)**

[0175] 수율: 20%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.26 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 4.84 (s, 1H), 3.76 (s, 1H) ; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 161.5 (dd, J = 253.5 Hz), 160.4 (t, 14.6 Hz), 158.5, 152.2, 152.1, 135.5, 110.0, 103.4 (t, J = 19.0 Hz), 98.2 (d, J = 28.4 Hz), 56.0, 31.8-31.5 (t, J = 3.0 Hz); HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_{10}ClF_2N_5O_2$ $[M+H]^+$ 계산치 342.0564, 실측치 342.0567.

[0176] **실시예 1-12: 2-아미노-6-클로로-9-(2-플루오로-4-메틸벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5l)**

[0177] 수율: 55%, ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.36 (s, 1H), 7.07 - 7.01 (m, 2H), 6.95 (ddd, J = 7.9, 1.6, 0.8 Hz, 1H), 6.61 (s, 2H), 4.88 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.5 (d, J = 244.8 Hz), 158.6, 152.8, 152.4, 139.6 (d, J = 7.9 Hz), 135.8, 128.6 (d, J = 4.4 Hz), 125.1 (d, J = 3.0 Hz), 120.0 (d, J = 14.6 Hz), 115.7 (d, J = 20.7 Hz), 110.1, 36.5 (d, J = 4.6 Hz), 20.5 (d, J = 1.6 Hz); HR HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_{11}ClFN_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 308.0709, 실측치 308.0711.

[0178] **실시예 1-13: 2-아미노-6-클로로-9-(2,3,6-트리플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-올 (5m)**

[0179] 수율: 20%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.30 (s, 1H), 7.48 (qd, J = 9.5, 5.0 Hz, 2H), 7.12 (tdd, J = 9.2, 3.8, 2.1 Hz, 2H), 6.57 (s, 2H), 4.97 (s, 2H); HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_7ClF_3N_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 330.0364, 실측치 330.0365.

[0181] **실시예 2: 화합물 6a 내지 6g 및 6j 내지 6o의 합성**

[0182] 무수 DMF (3 mL) 중 화합물 **3** (0.4 mmol) 및 티오카르보닐디이미다졸 (0.48 mmol)을 질소 대기하에 실온에서 3-4 시간 동안 교반하였다. 물 (20 mL)을 첨가 한 후, 유기 물질을 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하고, MgSO4로 건조시키고 여과하였다. 여과물을 진공하에 농축시키고, 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc / Hex)로 정제하여 화합물 **6a-g**, **6j-o**를 수득하였다.

[0183] **실시예 2-1: 2-아미노-9-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-티올 (6a)**

[0184] 수율: 18%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.43 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.14 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.6, 159.5, 153.6, 147.4, 147.3, 137.9, 127.3, 113.4, 112.4, 111.4, 107.0, 101.9, 45.5; HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_9BrClN_5O_2S$ $[M+H]^+$ 계산치 413.9422, 실측치 413.9401.

[0185] **실시예 2-2: 2-아미노-9-(4-브로모-2-플루오로벤질)-6-클로로-9*H*-퓨린-8-티올 (6b)**

[0186] 수율: 15%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.45 (s, 1H), 7.58 (dd, J = 9.8, 2.0 Hz, 1H), 7.35 - 7.28 (m, 1H), 6.97 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 5.26 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.6, 159.7, 159.5 (d, J = 250.1 Hz), 153.6, 138.0, 130.1 (d, J = 4.6 Hz), 127.7 (d, J = 3.6 Hz), 122.3 (d, J = 14.3 Hz), 120.7 (d, J = 9.6 Hz), 118.7 (d, J = 24.5 Hz), 113.1, 39.0 (d, J = 4.6 Hz); HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_8BrClFN_5S$ $[M+H]^+$ 계산치 389.9406, 실측치 389.9405.

[0187] **실시예 2-3: 2-아미노-6-클로로-9-(2-메톡시-4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (6c)**

[0188] 수율: 25%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.48 (s, 1H), 7.32 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.94 (s, 2H), 6.77 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.25 (s, 2H), 3.98 (s, 3H); HRMS (ESI, m/z) $C_{14}H_{11}ClF_3N_5OS$ $[M+H]^+$ 계산치 390.0398, 실측치 390.0401.

[0189] **실시예 2-4: 2-아미노-6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (6d)**

[0190] 수율: 20%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.41 (s, 1H), 7.56 (dd, J = 7.2, 2.2 Hz, 1H), 7.40 - 7.25 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.5, 159.6, 156.5 (d, J = 246.3 Hz), 153.5, 138.0, 133.7 (d, J = 3.9 Hz), 129.6, 128.2 (d, J = 7.7 Hz), 119.4 (d, J = 17.9 Hz), 116.9 (d, J = 21.1 Hz), 113.2, 44.0; HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_8Cl_2FN_5S$ $[M+H]^+$ 계산치 343.9934, 실측치 343.9936.

[0191] **실시예 2-5: 2-아미노-6-클로로-9-(3,4-디플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (6e)**

[0192] 수율: 15%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.41 (s, 1H), 7.48 - 7.30 (m, 2H), 7.15 (s, 1H), 6.92 (s, 2H), 5.25 (s, 2H); HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_8ClF_2N_5S$ $[M+H]^+$ 계산치 328.0230, 실측치 328.0232.

[0193] **실시예 2-6: 2-아미노-6-클로로-9-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (6f)**

[0194] 수율: 18%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.45 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.49 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.96 (s, 2H), 5.37 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.7, 159.7, 153.6, 140.5, 138.0, 128.5 (q, J = 31.6 Hz), 126.8 (q, J = 268.7 Hz), 127.9, 125.4 (q, J = 3.5 Hz), 113.1, 44.7; HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_9ClF_3N_5S$ $[M+H]^+$ 계산치 360.0292, 실측치 360.0296.

[0195] **실시예 2-7: 2-아미노-6-클로로-9-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (6i)**

[0196] 수율: 13%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.50 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.75 - 7.68 (m, 1H), 7.18 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.96 (s, 2H), 5.36 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.8, 159.6, 153.8, 138.1, 135.8, 134.4, 130.7, 128.0 (q, J = 32.4 Hz), 126.0 (q, J = 3.8 Hz), 123.5 (d, J = 272.5 Hz), 124.0 (q, J = 3.7, 3.0 Hz), 113.5, 43.2; HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_8C_{12}F_3N_5S$ $[M+H]^+$ 계산치 393.9902, 실측치 393.9907.

[0197] **실시예 2-8: 2-아미노-6-클로로-9-(3,4-디클로로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (6j)**

[0198] 수율: 29%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.42 (s, 1H), 7.65 - 7.52 (m, 2H), 7.26 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.96 (s, 2H), 5.26 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.5, 159.6, 153.5, 138.0, 136.9, 131.0, 130.7, 130.1, 129.4, 127.7, 113.2, 44.1; HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_8Cl_3N_5S$ $[M+H]^+$ 계산치 361.9610, 실측치 361.9614.

[0199] **실시예 2-9: 2-아미노-6-클로로-9-(2,6-디플루오로-4-메톡시벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (6k)**

[0200] 수율: 58%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.27 (s, 1H), 6.90 (s, 2H), 6.71 - 6.64 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.76 (s, 3H)); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d6) δ 169.4, 161.3 (dd, J = 246.3, 11.6 Hz), 160.3 (t, J = 14.4 Hz), 159.5, 153.7, 137.7, 112.8, 103.0 (t, J = 18.2 Hz), 99.3 (dd, J = 21.4, 7.6 Hz); HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_{10}ClF_2N_5OS$ $[M+H]^+$ 계산치 358.0335, 실측치 358.0335.

[0201] **실시예 2-10: 2-아미노-6-클로로-9-(2-플루오로-4-메틸벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (6l)**

[0202] 수율: 43%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.42 (s, 1H), 7.05 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 6.93 (s, 2H), 6.90 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 6.83 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.27 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.8, 159.7, 159.4 (d, J = 244.7 Hz), 153.7, 139.4 (d, J = 8.0 Hz), 137.9, 127.9 (d, J = 4.5 Hz), 125.0 (d, J = 3.0 Hz), 119.3 (d, J = 14.4 Hz), 115.6 (d, J = 20.7 Hz), 113.1, 20.5 (d, J = 1.6 Hz); HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_{11}ClFN_5S$ $[M+H]^+$ 계산치 324.0480, 실측치 324.0481.

[0203] **실시예 2-11: 2-아미노-6-클로로-9-(2,3,6-트리플루오로벤질)-9*H*-퓨린-8-티올 (6m)**

[0204] 수율: 36%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.35 (s, 1H), 7.46 (qd, J = 9.4, 5.0 Hz, 1H), 7.09 (tdd, J = 9.5, 3.9, 2.2 Hz, 1H), 6.93 (s, 2H), 5.32 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.8, 159.61, 159.4 (d, J = 244.8 Hz), 153.6, 139.3 (d, J = 7.8 Hz), 137.9, 127.8 (d, J = 4.4 Hz), 124.9 (d, J = 3.0 Hz), 119.3 (d, J = 14.5 Hz), 115.5 (d, J = 20.6 Hz), 113.1, 39.0; HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_7ClF_3N_5S$ $[M+H]^+$ 계산치 346.0136, 실측치 346.0139.

[0206] **실시예 3: 화합물 7a, 7b, 7d 및 7e의 합성**

[0207] EtOH (3 mL) 중 화합물 **4** (0.4 mmol) 및 시아노겐 브로마이드 (0.48 mmol)를 밀봉된 반응 용기에서 밤새 환류 가열 하였다. 용매를 진공 하에서 제거하고 EA 및 물로 희석하였다. 유기 층을 MgSO4로 건조시키고 여과하였다. 여과물을 진공하에 농축시키고, 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc / Hex)로 정제하여 화합물 **7a-b** 및 **7d-e**를 수득하였다.

[0208] **실시예 3-1: 9-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-6-클로로-9*H*-퓨린-2,8-디아민 (7a)**

[0209] 수율: 14%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.30 (s, 1H), 6.89 (s, 2H), 6.34 (s, 2H), 6.02 (s, 2H), 5.95 (s, 1H), 5.02 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 157.5, 155.0, 153.7, 147.5, 147.4, 141.4, 128.3, 122.8, 112.8, 111.6, 106.0, 102.1, 44.3; HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_{11}BrClN_6O_2$ $[M+H]^+$ 계산치 396.9810, 실측치 396.9811.

[0210] **실시예 3-2: 9-(4-브로모-2-플루오로벤질)-6-클로로-9*H*-퓨린-2,8-디아민 (7b)**

[0211] 수율: 15%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.59 (dd, J = 9.8, 1.9 Hz, 1H), 7.41 - 7.30 (m, 1H), 6.87 (s, 2H), 6.72 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.15 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159.4 (d, J = 250.4 Hz), 157.4, 155.0, 153.5, 141.4, 129.0 (d, J = 4.7 Hz), 127.6 (d, J = 3.1 Hz), 123.0 (d, J = 14.8 Hz), 122.7, 120.6 (d, J = 9.3 Hz), 118.6 (d, J = 24.1 Hz), 38.1 (d, J = 3.7 Hz); HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_9BrClFN_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 372.9795, 실측치 372.9798.

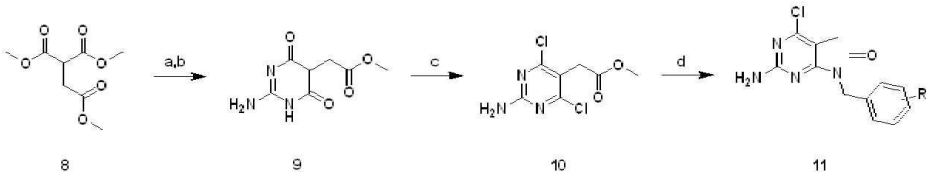
[0212] **실시예 3-3: 6-클로로-9-(3-클로로-4-플루오로벤질)-9*H*-퓨린-2,8-디아민 (7d)**

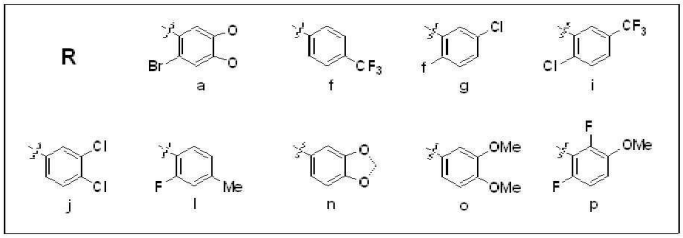
[0213] 수율: 10%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.47 (dd, J = 7.1, 2.2 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 9.4, 8.6 Hz, 1H), 7.19 (ddd, J = 8.6, 4.7, 2.3 Hz, 1H), 6.90 (s, 2H), 6.35 (s, 2H), 5.11 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 157.5, 156.5 (d, J = 246.4 Hz), 155.1, 153.3, 141.3, 134.3 (d, J = 3.9 Hz), 129.2, 127.7 (d, J = 7.5 Hz), 122.7, 119.4 (d, J = 18.0 Hz), 117.1 (d, J = 21.1 Hz), 42.52; HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_9C_{12}FN_6$ $[M+H]^+$ 계산치 326.0253, 실측치 327.0326.

[0214] **실시예 3-4: 6-클로로-9-(3,4-디플루오로벤질)-9*H*-퓨린-2,8-디아민 (7e)**

[0215] 수율: 15%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.44 - 7.37 (m, 1H), 7.36 - 7.30 (m, 1H), 7.04 - 6.99 (m, 1H), 6.89 (s, 2H), 6.34 (s, 2H), 5.11 (s, 2H)); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 157.5, 155.1, 153.4, 149.3 (dd, J = 246.2, 12.7 Hz), 148.8 (dd, J = 245.4, 12.6 Hz), 141.4, 134.1 (dd, J = 5.5, 3.5 Hz), 123.8 (dd, J = 6.8, 3.6 Hz), 122.7, 117.8 (d, J = 17.1 Hz), 116.4 (d, J = 17.8 Hz), 42.7; HRMS (ESI, m/z) $C_{12}H_9ClF_2N_6$ $[M+H]^+$ 계산치 311.0622, 실측치 311.0618.

[0217] [반응도식 2]





[0218]

[0219] [a] 시약 및 조건: (a) 구아니딘 히드로클로라이드, NaH, EtOH, 0 ℃ → rt, 1h; (b) 밤새 환류 (수율: 59.7%); (c) BTEA-Br, 디메틸아닐린, $POCl_3$, 아세토니트릴, 밤새 환류 (수율: 28.5%); (d) 마이크로웨이브, 벤질아민, DIEA, 1-BuOH, 170 ℃, 1-2 시간 (수율: 16.4% -79.6%).

[0221] **제조예 2: 메틸 2-(2-아미노-4,6-디옥소-1,4,5,6-테트라히드로피리미딘-5-일)아세테이트 (9)의 합성**

[0222] 소듐 하이드라이드 (1.3g, 53.3mmol)를 0 ℃에서 메탄올 (101ml)에 용해시켰다. 이어서, 구아니딘 히드로클로라이드 (2.7 g, 28.3 mmol)를 동일한 온도에서 용액에 첨가하고 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 용액을 여과하고 필터 케이크를 메탄올로 3 회 세척하였다. 트리메틸 에탄-1,1,2-트리카르복실레이트 (6.02 g, 29.4 mmol)를 여과물에 0 ℃에서 첨가하고 용액을 밤새 환류시켰다. 생성된 침전물을 여과하고 필터 케이크를 건조시켜 메틸 2-(2-아미노-4,6-디옥소-1,4,5,6-테트라히드로피리미딘-5-일)아세테이트 (3.36 g, 59.7 %)를 흰색 형태로 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.4 (s, 4H), 3.5 (s, 3H), 3.2 (s, 1H), 3.1 (s, 2H); HRMS (ESI, m/z) $C_{21}H_{24}ClN_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 398.1742, 실측치 398.1746.

[0224] **제조예 3: 메틸 2-(2-아미노-4,6-디클로로피리미딘-5-일)아세테이트 (10)의 합성**

[0225] 옥시 염화인 (15.7mL, 169mmol)을 아세토 니트릴 (30 mL) 중 메틸 2-(2-아미노-4,6-디옥소-1,4,5,6-테트라히드로피리미딘-5-일)아세테이트 (3.36g, 16.9), 벤질트리에틸암모늄 브로마이드 (0.45 g, 1.66 mmol) 및 *N,N*-디메틸아닐린 (1.0 g, 8.25 mmol) 용액에 적가하였다. 밤새 환류시킨 후, 용액을 아이스 배스(ice bath)에서 냉각시키고 포화 수성 NaHCO3로 pH를 7로 조정하였다. 생성된 혼합물을 에틸 아세테이트 (50 mL)로 3 회 추출하고, 합한 유기층을 MgSO4상에서 건조시켰다. 잔류물을 EtOAc-헥산 (1:3)으로 용리하는 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 메틸 2-(2-아미노-4,6-디클로로피리 미딘-5-일)아세테이트, 즉 중간체 (1.13 g, 28.3 %)를 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.5 (s, 2H), 3.7 (s, 2H), 3.7 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.1, 161.5, 160.8, 111.7, 51.7, 34.0; HRMS (ESI, m/z) $C_{21}H_{24}ClN_5O$ $[M+H]^+$ 계산치 398.1742, 실측치 398.1746.

[0227] **실시예 4: 화합물 11a 내지 11p의 합성**

[0228] t-BuOH (2 mL) 중 메틸 2-(2-아미노-4,6-디클로로피리미딘-5-일)아세테이트 (1 eq), 벤질 아민 (1.05 eq) 및 디이소프로필에틸아민 (2 eq)의 용액을 마이크로웨이브 조건 하에서 180 ℃에서 2 시간 동안 가열하였다. 물 (50mL) 첨가 후, 유기 물질을 에틸 아세테이트 (50mL)로 추출하고, MgSO4 상에서 건조시키고, 증발 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피 (EtOAc/Hex, 1:2)로 정제하여 **11a-p**를 수득하였다.

[0229] **실시예 4-1: 2-아미노-7-((6-브로모벤조[*d*][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-4-클로로-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (11a)**

[0230] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.3 (s, 1H), 7.1 (s, 2H), 6.7 (s, 1H), 6.0 (s, 2H), 4.6 (s, 2H), 3.6 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 174.2, 165.9, 162.5, 151.6, 147.5, 147.4, 127.8, 112.5, 111.6, 107.4, 102.0, 42.6, 32.6; HRMS (ESI, m/z) $C_{14}H_{10}BrClN_4O_3$ $[M+H]^+$ 계산치 398.9676, 실측치 398.9678.

[0231] **실시예 4-2: 2-아미노-4-클로로-7-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (11f)**

[0232] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.7 - 7.7 (m, 2H), 7.5 - 7.5 (m, 2H), 7.1 (s, 2H), 4.9 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 174.1, 165.9, 162.6, 151.8, 141.0 (d, J = 1.3 Hz), 128.0 (q, J = 32.2 Hz), 127.9, 125.4 (q, J = 3.8 Hz), 124.2 (q, J =273.0 Hz), 101.6, 41.8, 32.4; HRMS (ESI, m/z) $C_{14}H_{10}ClF_3N_4O$ $[M+H]^+$ 계산치 343.0568, 실측치 343.0571.

[0233] **실시예 4-3: 2-아미노-7-(4-브로모-2-플루오로벤질)-4-클로로-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (11g)**

[0234] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.6 (dd, J = 9.8, 1.9 Hz, 1H), 7.4 (dd, J = 8.3, 1.7 Hz, 1H), 7.2 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 7.1 (s, 1H), 4.8 (s, 1H), 3.6 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 211.6, 203.4, 200.2, 197.3 (d, J = 250.3 Hz), 189.4, 168.3 (d, J = 4.6 Hz), 165.3 (d, J = 3.6 Hz), 160.3 (d, J = 14.5 Hz), 158.4 (d, J = 9.5 Hz), 156.4 (d, J = 24.5 Hz), 139.3, 73.6 (d, J = 4.4 Hz), 70.1; HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_9BrClFN_4O$ $[M+H]^+$ 계산치 372.9683, 실측치 372.9684.

[0235] **실시예 4-4: 2-아미노-4-클로로-7-(2-클로로-5-(트리플루오로메틸)벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (11i)**

[0236] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.7 - 7.7 (m, 2H), 7.5 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.0 (s, 2H), 4.8 (s, 2H), 3.6 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 173.9, 165.7, 162.7, 153.0, 136.5 (d, J = 1.3 Hz), 134.4, 130.2, 129.0 (q, J = 32.9 Hz), 126.5 (q, J =207.05 Hz) 125.6 (q, J = 3.8 Hz), 124.8 (q, J = 3.9 Hz), 101.6, 40.5, 32.7; HRMS (ESI, m/z) $C_{14}H_9Cl_2F_3N_4O$ $[M+H]^+$ 계산치 377.0178, 실측치 377.0181.

[0237] **실시예 4-5: 2-아미노-4-클로로-7-(3,4-디클로로벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (11j)**

[0238] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.6 - 7.6 (m, 2H), 7.3 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 7.1 (s, 2H), 4.8 (s, 2H), 3.6 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 174.1, 165.8, 162.5, 151.7, 137.4, 131.1, 130.6, 130.0, 129.2, 127.5, 101.7, 41.1, 32.5; HRMS (ESI, m/z) $C_{13}H_9C_{13}N_4O$ $[M+H]^+$ 계산치 342.9915, 실측치 342.9918.

[0239] **실시예 4-6: 2-아미노-4-클로로-7-(2-플루오로-4-메틸벤질)-5,7-디히드로-6H-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (11l)**

[0240] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.2 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.9 - 6.8 (m, 2H), 5.1 (s, 2H), 4.9 (s, 2H), 3.5 (s, 2H), 2.3 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.9, 166.6, 162.4, 160.6 (d, J = 247.5 Hz), 153.1, 140.3 (d, J = 8.0 Hz), 129.7 (d, J = 4.3 Hz), 125.0 (d, J = 3.2 Hz), 119.5 (d, J = 14.9 Hz), 116.2 (d, J = 21.1 Hz), 103.2, 36.8, 323.0, 21.2 (d, J = 1.6 Hz); HRMS (ESI, m/z) $C_{14}H_{12}ClFN_4O$ $[M+H]^+$ 계산치 307.0756, 실측치 307.0759.

[0241] **실시예 4-7: 2-아미노-7-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일메틸)-4-클로로-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (11n)**

[0242] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.1 (s, 2H), 6.9 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.8 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.8 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, H), 6.0 (s, 2H), 4.7 (s, 2H), 3.5 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.9, 165.9, 162.5, 151.7, 147.3, 146.5, 130.0, 120.8, 108.1, 107.8, 101.4, 100.9, 41.9, 32.3; HRMS (ESI, m/z) $C_{14}H_{11}ClN_4O_3$ $[M+H]^+$ 계산치 319.0592, 실측치 319.0592.

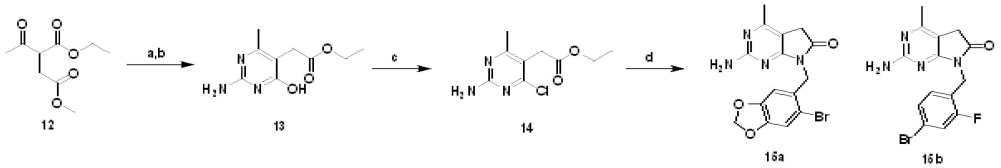
[0243] **실시예 4-8: 2-아미노-4-클로로-7-(2,3-디메톡시벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (11o)**

[0244] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.0 (s, 2H), 7.0 - 6.9 (m, 2H), 6.6 (dd, J = 5.2, 4.1 Hz, 1H), 4.8 (s, 2H), 3.8 (s, 3H), 3.8 (s, 3H), 3.6 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 174.2, 166.2, 162.6, 152.3, 151.7, 145.9, 129.4, 123.9, 118.6, 112.0, 101.6, 60.0, 55.7, 40.1, 32.4; HRMS (ESI, m/z) $C_{15}H_{15}ClN_4O_3$ $[M+H]^+$ 계산치 335.0905, 실측치 335.0907.

[0245] **실시예 4-9: 2-아미노-4-클로로-7-(2,6-디플루오로-3-메톡시벤질)-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (11p)**

[0246] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.1 (td, J = 9.3, 5.2 Hz, 1H), 7.0 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 7.0 (dd, J = 9.3, 1.9 Hz, 1H), 4.8 (s, 2H), 3.8 (s, 3H), 3.5 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 173.5, 165.7, 162.5, 154.1 (dd, J = 241.1, 6.3 Hz), 151.7, 149.9 (dd, J = 249.1, 8.0 Hz), 143.8 (dd, J = 10.7, 3.0 Hz), 113.1 (dd, J = 9.8, 2.8 Hz), 112.2 (dd, J = 19.6, 15.0 Hz), 110.2 (dd, J = 22.9, 4.1 Hz), 101.3, 56.4, 32.1, 31.9 (t, J = 3.8 Hz).; HRMS (ESI, m/z) $C_{14}H_{11}ClFN_4O_2$ $[M+H]^+$ 계산치 341.0611, 실측치 341.0614.

[0248] [반응도식 3]

[0249] 

[0250] [a] 시약 및 조건: (a) 구아니딘 히드로클로라이드, NaH, EtOH, 0 ℃ → rt, 1h; (b) 밤새 환류 65%; (c) BTEA-Br, 디메틸아닐린, $POCl_3$, 아세토니트릴, 밤새 환류 45%; (d) DIEA, 1-BuOH, 120 ℃, 20 시간 (수율: 10 ~ 37%)

[0252] **제조예 4: 에틸 2-(2-아미노-4-히드록시-6-메틸피리미딘-5-일)아세테이트 (13)의 합성**

[0253] EtOH (40 mL) 중 NaOEt (17.5 mmol)의 용액에 구아니딘 히드로클로라이드 (10.5 mmol)를 0 ℃에서 첨가하였다. 1 시간 후, EtOH (20 mL) 중 1-에틸 4-메틸 2-아세틸숙시 네이트 (10.0 mmol)의 용액을 첨가한 다음, 밤새 환

류시켰다. 반응 혼합물을 냉각시킨 후, 고체를 여과로 수집하여 목적 화합물 **13** (65 %)을 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, CD3OD) δ 4.14 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.45 (s, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 3H); MS (ESI, m/z) $C_9H_{13}N_3O_3$ $[M+H]^+$ 계산치 212.1, 실측치 212.0.

[0254] **제조예 5: 에틸 2-(2-아미노-4-클로로-6-메틸피리미딘-5-일)아세테이트 (14)**

[0255] POCl3 (0.93 mL, 10 mmol)을 아세토니트릴 (10 mL) 중 화합물 **13** (1.0 mmol), 벤질트리에틸암모늄 브로마이드 (27 mg, 0.1 mmol) 및 N,N-디메틸아닐린 (60 mg, 0.5 mmol)의 용액에 적가하였다. 밤새 환류시킨 후, 용액을 아이스 배스(ice bath)에서 냉각시키고 포화 수성 NaHCO3로 pH를 7로 조정하였다. 생성된 혼합물을 에틸 아세테이트 (50 mL)로 3 회 추출하고, 합한 유기층을 MgSO4상에서 건조시켰다. 잔류물을 EtOAc-헥산으로 용리하는 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 목적 화합물 (40 %)을 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.34 (bs, 2H), 4.19 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.68 (s, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 5H); MS (ESI, m/z) $C_9H_{13}ClN_3O_2$ $[M+H]^+$ 계산치 230.1, 실측치 230.5.

[0257] **실시예 5: 화합물 15a 및 15b의 합성**

[0258] t-BuOH (2 mL) 중 화합물 **14** (1 eq), 벤질 아민 (1.05 eq) 및 디이소프로필에틸아민 (2 eq)의 용액을 마이크로웨이브 조건 하에서 180 ℃에서 2 시간 동안 가열하였다. 물 (50mL) 첨가 후, 유기 물질을 에틸 아세테이트 (50mL)로 추출하고, MgSO4 상에서 건조시키고, 증발 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피 (EtOAc/Hex, 1:2)로 정제하여 화합물 **15a 및 15b**를 수득하였다.

[0259] **실시예 5-1: 2-아미노-7-((6-브로모벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)메틸)-4-메틸-5,7-디히드로-6H-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (15a)**

[0260] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.25 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.48 (bs, 2H), 6.03 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.15 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 175.2, 164.4, 162.5, 159.1, 147.5, 147.4, 128.2, 112.5, 111.7, 107.2, 102.5, 102.0, 42.1, 32.2, 20.8; MS (ESI, m/z) $C_{15}H_{14}BrN_4O_3$ $[M+H]^+$ 계산치 377.0, 실측치 377.2.

[0261] **실시예 5-2: 2-아미노-7-(4-브로모-2-플루오로벤질)-4-메틸-5,7-디히드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온 (15b)**

[0262] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.6 (dd, J = 9.8, 1.9 Hz, 1H), 7.6 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.2 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 6.5 (s, 2H), 4.8 (s, 2H), 3.5 (s, 2H), 2.1 (s, 3H); HRMS (ESI, m/z) $C_{14}H_{13}BrFN_4O$ $[M+H]^+$ 계산치 351.0251, 실측치 351.0252.

[0264] **실험 재료 및 방법**

[0265] **1. 재조합 단백질 제조 및 형광 편광 분석**

[0266] TRAP1 (전장), Grp94 (N-말단 도메인) 및 Hsp90 (N-말단 도메인) 재조합 단백질을 이전에 보고된 방법에 따라 제조하였다(Park, H. K. et al., Paralog Specificity Determines Subcellular Distribution, Action Mechanism, and Anticancer Activity of TRAP1 Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2017, *60*, 7569-7578). 형광 편광 분석을 위해, 형광 프로브 PU-H71-FITC를 이전에 보고된 방법에 따라 합성 하였다(Taldone, T. et al., Experimental and structural testing module to analyze paraloguespecificity and affinity in the Hsp90 inhibitors series. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 6803-6818). 정제된 재조합 단백질 (50 nM)을 PU-H71-FITC3 (10 nM)과 혼합 한 후, 형광 편광 (Fluorescence polarization, FP) 버퍼 (135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 1.4mM KH_2PO_4, 1mM DTT, 2mM $MgCl_2$, 0.1mg/ml BSA (pH 7.3))에서 다양한 농도의 억제제(PU-H71, DN401, 또는 실시예에서 제조된 화합물)와 함께 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션 하였다. SYNERGY NEO 마이크

로플레이트 리더 (BioTek Instruments, Inc.)를 사용하여 형광 편광을 측정 하였다. IC_{50} 값을 결정하기 위해 Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.)을 사용하여 각 화합물에 대해 선형 억제 곡선을 수득 하였다.

[0268] **2. 결정화 및 구조 결정**

[0269] 결정학적 연구를 위해 인간 TRAP1 NTD (잔기 60-294, hTRAP1-N) 및 C 말단 도메인이 없는 TRAP1 (잔기 60-561, hTRAP1-NM)을 이전에 보고된 방법에 따라 제조하였다(Lee, C. et al., Development of a mitochondria-targeted Hsp90 inhibitor based on the crystal structures of human TRAP1. *J. Am. Chem. Soc*. 2015, 137, 4358-4367). 화합물 **5a**와 복합체화 된 TRAP1을 결정화하기 위해, 50㎕의 hTRAP1-N 단백질 (20mg/mL) 용액을 DMSO (50mM)에 용해된 1.6㎕의 억제제와 혼합하고, 얼음에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 단백질-억제제 혼합물을 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl 및 5mM DTT를 함유하는 완충액으로 희석하여 최종 부피 90㎕가 되도록 하여 DMSO 농도를 감소시켰다. 1 ㎕의 단백질 용액, 및 120 mM 시트레이트 (pH 5.6), 31% PEG 4,000을 포함하는 1 ㎕의 저장 완충제를 혼합함으로써 실온에서 행잉 드롭 확산법을 사용하여 결정을 성장시켰다. 결정을 결정화 용액 + 30% 글리세롤에서 동결 보호하고, 액체 질소에서 급속 냉동시켰다.

[0270] 화합물 **5b**와의 복합체에서 hTRAP1-NM의 경우, 상기한 방법으로 단백질-억제제 혼합물을 제조하였다. TRAP1-**5b** 복합체의 결정을 18 ℃에서 100mM 소듐 카코딜레이트 (sodium cacodylate) pH 6.76, 100mM 칼슘 아세테이트 및 14% PEG 20K를 함유하는 웰 용액에서 성장시키고, 30% 글리세롤로 동결 보호하였다.

[0271] X-선 회절 데이터는 PAL (Pohang Accelerator Laboratory)에 수집되었고 HKL2000에 의해 처리되었다 (Otwinowski, Z. et al., Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Methods in Enzymology, ed Charles W. Carter, Jr. (Academic Press), **1997**, Vol 276, 307-326).

[0272] TRAP1-**5a** 및 TRAP1-**5b**의 구조는 apo 구조 (PDB: 4Z1I 및 5Y3N)를 모델로 사용하여 Phaser-MR 프로그램으로 분자를 대체하였다(McCoy, A. j. et al., Phaser is a Phaser crystallographic software *J. Appl. Cryst*. **2007**, 40, 658-674). TRAP1-**5a** 및 TRAP1-**5b**의 최종 모델은 Phenix 및 COOT를 사용하여 반복적인 정제 및 재구성을 하였다(Adams, P.D. et al., PHENIX: a comprehensive Python-basedsystem for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **2010**, *66*, Pt 2, 213-221). 결정학적 통계는 표 1에 요약하였다.

표 1

[0273]

	TRAP1 (잔기 60-294)	TRAP1 (잔기 60-561)
리간드	SJT009	SJT104
X선원 (X-ray source)	Beamline 5C, PAL	Beamline 5C, PAL
온도 (K)	100	100
공간군 (Space group)	R3	$P4_12_12$
셀 디멘션 (Cell dimensions)		
a, b, c (Å)	109.60, 109.60, 59.90	69.54, 69.54, 251.78
α, β, ɣ(°)	90.00, 90.00, 120.00	90.00, 90.00, 90.00
데이터 가공		
파장 (Å)	0.9795	0.9795
해상도 (Å)	50.00-1.50 (1.53-1.50)	50.00-3.00 (3.05-3.00)
R_{merge} (%)	4.6 (36.9)	10.7 (52.0)
I / σI	32.7 (2.9)	17.7 (2.1)
완전성 (Completeness, %)	99.2 (96.9)	98.8 (98.1)
리던던시 (Redundancy)	3.1 (3.1)	9.9 (6.3)
측정된 리플렉션 (Measured reflections)	131146	128554
고유 리플렉션 (Unique reflections)	42470	13023
리파인먼트 통계학 (Refinement statistics)		
데이터 범위 (Å)	24.10-1.50	24.98-3.00
리플렉션 (Reflections)	42466	12971

R-팩터 (%)	17.35	23.21
R_{free} (%)	20.59	30.30
비수소 원자의 수	1984	3500
R. m. s. 편차		
결합 길이 (Å)	0.008	0.002
결합 각도 (°)	1.084	0.402
라마찬드란 도표		
Favored (%)	98.19	97.12
Allowed (%)	1.36	2.88
Disallowed (%)	0.45	0

[0274] *괄호 안의 값은 각각 가장 높은 해상도 셸(shell)에 대한 것임.

[0276] **3. 분자 역학 (Molecular Dymanics, MD) 시뮬레이션 및 리간드 도킹**

[0277] TRAP1 또는 Hsp90 억제제-결합 NTD의 공개된 결정 구조를 슈뢰딩거 소프트웨어 패키지 (2020-1 release)에서 마에스트로 인터페이스에 적용하였다. 결합 순서를 지정하고, 수소를 첨가하고, 금속에 0 차 결합을 생성하고, 이황화 결합을 만들고, 누락된 측쇄를 수정하고, 5Å 이상의 물을 제거하고, Epik 모듈을 사용하여 het 상태를 생성하기 위해 단백질 제조 wizard 모듈을 사용하여 도킹 및 시뮬레이션을 위한 단백질을 제조하였다 (Ph: 7.0±2). OPLS3e 힘장(force field)을 사용하여 제한된 에너지 최소화를 수행하였다. 분자 역학 시뮬레이션을 위해, 용매화 시스템은 Desmond (슈뢰딩거 Release 2020-1)의 시스템 빌더 패널을 사용하여 구축되었다. SPC 용매 모델은 최소 크기의 사방 정계 박스 경계에서 선택되었고, 힘장은 OPLS2005로 설정되었다. 분자 역학 패널을 사용하여 용매화된 시스템을 작업 공간에 로딩 한 후, 시스템 에너지를 1.2로 설정하였고, 사용된 총체 클래스는 NPT였다. 시뮬레이션은 300.0K 및 1.01325 bar에서 실행되도록 설정되었으며, 각 시스템의 총 시뮬레이션 시간은 300ps 궤도 추적 간격으로 300ns로 설정되었다. 매립된 리간드의 선택을 통한 리간드 그리드 생성 후에 글라이드 도킹이 수행되었고, 0.25의 부분 전하 차단으로 반데르발스 반경 스케일링 파라미터 스케일링 팩터 1로 설정되었다.

[0279] **결과 및 분석**

[0280] **실험예 1: TRAP1, Hsp90α 및 Grp94에 대한 화합물의 결합 친화도 분석**

[0281] 실시예에서 제조한 화합물들의 TRAP1, Hsp90α 및 Grp94에 대한 결합 친화도는 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)-표지된 PU-H71을 사용하여 형광 편광 분석으로 분석하였다. 하기 표 2 내지 표 4는 모든 시험된 화합물의 IC_{50} 값을 나타낸 것이다.

표 2

[0282]

화합물	R	IC_{50} (nM)			선택성 (IC_{50} ratio)	
		TRAP1 FP	Hsp90 N FP	Grp94 FP	Hsp90/TRAP1	Grp94/TRAP1
PU-H71		192.4 ± 6.7	72.9 ± 1.8	131.6 ± 6.4	0.38	0.68
DN401		143.2 ± 13.4	430.7 ± 8.3	447.8 ± 18.0	3.0	3.1
5a	3,4-메틸렌디옥시, 6-Br	65.8 ± 1.0	393.7 ± 33.6	193.9 ± 7.7	6.0	2.9
5b	2-F, 4-Br	58.0 ± 1.6	1,134 ± 109	493.6 ± 15.3	19.6	8.5
5c	2-MeO, 4-CF_3	188.6 ± 8.1	774.0 ± 35.0	1,616 ± 59	4.1	8.6
5d	3-Cl, 4-F	728.4 ± 48.4	> 5,000	> 5,000	> 6.9	> 6.9
5e	3-F, 4-F	1,722 ± 115	> 5,000	> 5,000	> 2.9	> 2.9
5f	4-CF_3	292.8 ± 15.7	> 5,000	2,547 ± 51	> 17.1	8.7
5g	2-F, 5-Cl	242.8 ± 14.2	4,494 ± 275	3,370 ± 177	18.5	13.9

5h	3-CF_3, 4-Cl	143.3 ± 4.5	> 5,000	4,579 ± 179	> 34.9	31.9
5i	2-Cl, 5-CF_3	169.7 ± 4.2	3,312 ± 444	1,867 ± 72	19.5	11.0
5j	3-Cl, 4-Cl	76.6 ± 1.0	> 5,000	985.6 ± 7.1	> 65.3	12.9
5k	2-F, 4-MeO, 6-F	1,120 ± 51	> 5,000	>5,000	> 4.5	> 4.5
5l	2-F, 4-Me	62.4 ± 1.2	540.8 ± 49.5	318.0 ± 6.0	8.7	5.1
5m	2-F, 3-F, 6-F	101.4 ± 3.3	2,470 ± 144	1,674 ± 41	24.4	16.5

표 3

[0283]

화합물	R1	IC50 (nM)			선택성 (IC_{50} ratio)	
		TRAP1 FP	Hsp90 N FP	Grp94 FP	Hsp90/TRAP1	Grp94/TRAP1
PU-H71		192.4 ± 6.7	72.9 ± 1.8	131.6 ± 6.4	0.38	0.68
6a	3,4-메틸렌디옥시, 6-Br	738.2 ± 26.2	1,862 ± 86	1,787 ± 63	2.5	2.4
6b	2-F, 4-Br	332.1 ± 18.8	> 5,000	>5,000	> 15.1	> 15.1
6c	2-MeO, 4-CF_3	638.6 ± 19.5	> 5,000	2,803 ± 212	> 7.8	4.4
6d	3-Cl,4-F	590.1 ± 38.3	> 5,000	>5,000	> 8.5	> 8.5
6e	3-F,4-F	720.6 ± 39.0	> 5,000	>5,000	> 6.9	> 6.9
6f	4-CF_3	412.7 ± 26.4	> 5000	3,756 ± 77	> 12.1	9.1
6i	2-Cl,5-CF_3	1,220 ± 126	> 5,000	>5,000	> 4.1	> 4.1
6j	3-Cl, 4-Cl	63.5 ± 1.5	> 5,000	1,881 ± 77	> 78.7	29.6
6k	2-F,4-MeO,6-F	178.2 ± 4.9	> 5,000	839.5 ± 38.2	> 28.1	4.7
6l	2-F,4-Me	82.7 ± 2.7	> 5,000	1,017 ± 46	> 60.5	12.3
6m	2-F, 3-F, 6-F	392.1 ± 33.3	> 5,000	3,440 ± 120	> 12.8	8.8
7a	3,4- 메틸렌디옥시, 6-Br	616.7 ± 33.0	778.1 ± 38.5	1,065 ± 53	1.3	1.7
7b	2-F, 4-Br	476.8 ± 26.8	> 5,000	3,444 ± 173	> 10.5	7.2
7d	3-Cl,4-F	>5,000	> 5,000	>5,000	-	-
7e	3-F,4-F	>5,000	> 5,000	>5,000	-	-

표 4

[0284]

화합물	R1	R2	IC_{50} (nM)			선택성 (IC_{50} ratio)	
			TRAP1 FP	Hsp90 N FP	Grp94 FP	Hsp90/TRAP1	Grp94/TRAP1
PU-H71			192.4 ± 6.7	72.9 ± 1.8	131.6 ± 6.4	0.38	0.68
11a	Cl	3,4-메틸렌디옥시, 6-Br	296.1 ± 23.4	1,097 ± 58	811.6 ± 40.0	3.7	2.7
11f	Cl	4-CF_3	1,037 ± 100	> 5,000	>5,000	> 4.8	> 4.8
11g	Cl	2-F, 4-Br	99.5 ± 6.0	> 5,000	1,259 ± 92	> 50.3	12.7
11i	Cl	2-Cl,5-CF_3	1,790 ± 98	> 5,000	>5,000	> 2.8	> 2.8
11j	Cl	3-Cl, 4-Cl	81.5 ± 3.5	> 5,000	1,725 ± 102	> 61.3	21.2
11l	Cl	2-F,4-Me	89.9 ± 2.2	1,247 ± 76	1,060 ± 68	13.9	11.8
11n	Cl	3,4- 메틸렌디옥시,	339.1 ± 24.7	2,996 ± 140	3,193 ± 255	8.8	9.4
11o	Cl	2-MeO, 3-MeO	330.8 ± 23.7	1,965 ± 92	2,129 ± 90	5.9	6.4
11p	Cl	2-F,6-F, 3-MeO	229.5 ± 17.5	893.2 ± 49.8	648.5 ± 54.1	3.9	2.8
15a	Me	3,4- 메틸렌디옥시 y, 6-Br	2,848 ± 224	> 5,000	>5,000	> 1.8	> 1.8
15b	Me	2-F, 4-Br	597.3 ± 36.6	> 5,000	>5,000	> 8.3	> 8.3

[0285] 표 2 내지 표 4에 나타낸 바와 같이, 우레아 (화합물 **5a**), 티오우레아 (화합물**6a**), 구아니딘 (화합물 **7a**) 및 아미드 (화합물 **11a**) 작용기가 기존 화합물 **DN401**의 5-원 고리에 도입되었을 때, Hsp90 및 Grp94에 비해 TRAP1에 대한 더 우수한 선택성을 가졌다. 그 중에서, 우레아 (화합물 **5a**)가 TRAP1에 대해 가장 강력한 화합물이며, Hsp90 및 Grp94에 비해 더 우수한 선택성을 가졌다. 다양한 분자 중에서, 우레아 유도체 **5a**, **5b**, **5j**, **5l**, 티오우레아 유도체 **6j**, **6l** 및 아미드 유도체 **11j**, **11l**은 90 nM 미만의 IC_{50} 값으로 매우 강한 결합 친화도를 갖는 것으로 밝혀졌다. **5j**, **6j** 및 **11j**가 TRAP1에 대해 100 nM 이하의 IC_{50} 값을 나타내었는데, 페닐 고리의 *메타*-위치 및 *파라*-위치 둘 모두에서의 염소 치환은 TRAP1 소수성 포켓 내로 벤질 모이어티를 수용하는 것으로 판단된다. 또한, 이들 분자의 TRAP1 선택성은 Hsp90 보다 60 배 이상이고 Grp94 보다 13 배 이상이었다. TRAP1에 대한 화합물 **6j**의 IC_{50}은 63.5 nM이고 각각 Hsp90 및 Grp94에 비해 78 배 및 30 배의 선택성을 가졌다. 또한, **5l**, **6l** 및 **11l**와 같이 *오르토*-플루오로 및 *파라*-메틸 치환은 우수한 TRAP1 결합 친화도 (TRAP1의 경우 IC_{50} = 62~90 nM) 및 선택성을 갖도록 효능을 증가시켰다.

[0286] 따라서, 본 실시예에서 제조한 화합물들은 우수한 TRAP1 선택적 억제 활성을 가짐을 확인하였다.

[0288] **실험예 2: 구조-활성 관계 (structure-activity relationship, SAR) 분석**

[0289] 실시예에서 제조한 새로운 화합물들에 대한 구조-활성 관계 분석을 위해, 화합물 **5a**의 TRAP1 N-말단 도메인 (TRAP-NTD)과의 X-선 공-결정 구조 및 화합물 **5b**의 TRAP1 N-말단 및 중간 도메인 (TRAP1-NM)과의 X-선 공-결정 구조를 측정하고, PUH71 화합물과 비교하여 결합 방식을 평가하였다.

[0290] 도 1은 (A) TRAP1 NTD에서 화합물 5a의 X-선 공-결정 구조, (B) Hsp90-NTD에서 PU-H71의 X-선 공-결정 구조, (C) TRAP1 NM 도메인에서 화합물 5b의 X-선 공-결정 구조를 나타낸 X-선 결정학 결과이다.

[0291] 도 1에 나타낸 바와 같이, TRAP1-**5a**의 NTD 구조를 이전에 보고된 Hsp90-PUH71과 비교할 때, TRAP1에서 ATP-lid의 나선형 구조의 일부가 무질서한 것으로 나타났으며, 결과적으로 Asn171 (Hsp90의 Asn106에 상응함) 및 Leu172 (Hsp90의 L107에 상응함)을 ATP 결합 포켓에 위치시켰다. 이 α-나선 무질서는 TRAP1의 ATP-결합 부위를 Hsp90보다 부분적으로 더 극성으로 만들었다. 따라서, X-선 결정학을 통해 화합물 5a 및 5b가 TRAP1에서 Ans171과 직접 상호 작용함을 알 수 있었다.

[0292] 도 2는 (A) DN401-TRAP1 NTD 구조, (B) 화합물 5a-TRAP1 NTD 구조를 나타낸 X-선 결정학 결과이다. 물은 붉은색 구체이다.

[0293] 도 1 및 2에 나타난 바와 같이, 결정 구조는 **5a**의 N-1, N-3 및 2-아미노가 Asn119, Asp158 및 Thr251과 직접 또는 물-매개 수소 결합을 형성함을 보여 주었다. 이는 DN401과 유사하였다. 가장 두드러진 점은 새로 도입된 **5a** 및 **5b**의 카보닐 그룹이 설계된대로 TRAP1에서 Asn171의 아미드와 직접 상호 작용하는 반면(도 2B), DN401은 물-연결된 수소 결합을 통해 Asn171과 상호 작용한다는 것이다(도 2A). 이들 극성 상호 작용은 합성된 분자가 Hsp90에 비해 TRAP1 및 파라로그 선택성에 대한 효능이 개선된 이유를 설명 할 수 있다. **5a**의 3,4-메틸렌디옥시-6-브로모페닐 및 **5b**의 4-브로모-6-플루오로-페닐은 Phe205 및 Trp231로 추가로 π-π 적층하여 Met163, Ile168, Phe205, Trp231 및 Ile253에 의해 형성된 TRAP1 소수성 포켓을 적절히 점유하는 것으로 보인다. 따라서, X-선 결정학을 통해 화합물 5a는 TRAP1의 Asn171과 직접 상호 작용하는 반면, DN401은 물-연결된 수소 결합을 통해 Asn171과 상호 작용하는 것을 알 수 있었다.

[0294] 한편, 화합물 **5a**와 복합체화된 Hsp90을 결정화하여 화합물 **5a**로 ATP-lid 장애가 가능한지 여부를 조사했지만, 공-결정은 형성되지 않았다. 이것은 또한 화합물 **5a**의 Hsp90에 대한 약한 결합 친화도 및 결과적으로 Hsp90에 비한 우수한 선택성을 설명 할 수 있다.

[0296] **실험예 3: 분자 역학 시뮬레이션**

[0297] TRAP1에 결합하는 화합물의 동적 과정 및 Hsp90에 비한 선택성의 기초를 추가로 연구하기 위해, 본 발명자들은 Hsp90 조절제에 대한 이전 연구에서 유용한 것으로 증명된 300ns MD 시뮬레이션을 수행하였다(Colombo, G. et al., Understanding ligand-based modulation of the Hsp90 molecular chaperone dynamics at atomic

resolution *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 7976-7981.). 단백질-리간드의 근 평균 제곱 편차 (root mean square deviation, RMSD)의 시간-의존적 변화, 국소 변화를 특성화하기 위해 사용된 근 평균 제곱 변동 (root mean square fluctuation, RMSF)의 각 잔기, 및 단백질-리간드 상호 작용 분율 계수는 슈뢰딩거 소프트웨어를 사용하여 데스몬드(Desmond) 모듈로부터 수집되었다. 시뮬레이션 궤적의 각 복합물의 결합 포즈는 30 ns 간격으로 0에서 300 ns까지 추출되어 중첩되었다.

[0298] 도 3은 TRAP1-5a 복합체의 MD 시뮬레이션 (300ns)을 나타낸 것이다. (A) 30 ns 간격에서 화합물 5a의 결합 방식의 중첩. (B) TRAP1 잔기와의 화합물 5a 상호 작용의 상세한 원자의 개략도. 선택한 궤적 (0-300 ns)에서 30% 이상의 시뮬레이션 시간에 발생하는 상호 작용이 표시된다. (C) 300 ns MD 궤적에 따른 TRAP1 NTD의 RMSD 변화. (D) 5a-TRAP1 상호 작용 분획 누적 막대 차트; 수소 결합 (녹색), 소수성 결합 (회색), 이온성 결합 (빨간색) 및 물 연결 (파란색).

[0299] 도 3에 나타낸 바와 같이, TRAP1에서 **5a**의 시뮬레이션 궤적은 0 내지 300 ns에서 일관된 결합 방식을 보여, 이 시뮬레이션 시스템에서 바람직한 안정성을 나타냈다. TRAP1 백본 분석의 RMSD는 또한 복합체가 1 내지 3Å의 RMSD 범위에서 상당히 안정적임을 나타냈다. TRAP1의 Asp158 (Hsp90의 Asp94)과 **5a** 퓨린 고리의 아민 사이의 잘 알려진 소수성 상호 작용 외에, Met163, Leu168, Leu172, Phe205, Val217 및 Trp231과 같은 소수성 포켓의 잔기를 갖는 **5a**의 벤질의 소수성 상호 작용 및 π-π 스태킹은 강한 결합에 기여하는 것으로 나타났다. 모든 궤적의 단백질-리간드 상호 작용 분획 계수로부터, **5a**의 카르보닐기가 Asn171과 강하게 결합하는 것으로 밝혀졌다. **5a**의 카르보닐과 Ans171 사이의 연속적인 직접 수소 결합은 궤적의 85% 이상에서 관찰되었고, **5a**의 카르보닐과 Ans171 사이의 물 연결된 수소 결합은 궤적의 15%에서 관련되었다(도 3B 및 D).

[0300] 도 4는 화합물 5a 또는 DN401과 Hsp90의 도킹된 복합체의 MD 시뮬레이션을 나타낸 것이다. (A) 30 ns 간격에서 Hsp90-5a 복합체의 결합 방식의 중첩. (B) 30 ns 간격에서 Hsp90-DN401 복합체의 결합 방식의 중첩. (C) 300 ns MD 궤적에 따른 Hsp90 NTD의 RMSD 변화. (D) 300 ns MD 궤적에 따른 Hsp90 NTD의 RMSD 변화.

[0301] 도 4에 나타낸 바와 같이, 화합물 **5a**가 Hsp90에 도킹되고 생성된 복합체를 시뮬레이션 하였을 때, 단백질은 증가된 RMSD 값을 나타내어 70 ns에서부터 불안정성을 나타내기 시작하였다. 화합물 **5a**의 결합 방식은 시뮬레이션 전반에 걸쳐 변화하였다.

[0303] 이전에 보고된 바에 따르면, Hsp90에서 ATP-lid의 입체 형태적 유연성은 Hsp90의 약물 결합 동역학 및 열역학의 차이에도 불구하고 다양한 화학형이 특정 단백질 형태에 결합 할 수 있게 한다(Amaral, M. et al., Protein conformational flexibility modulates kinetics and thermodynamics of drug binding *Nature Commun.* **2017**, *8*, 2276.). 특히, Hsp90 NTD의 ATP-lid에서 서열 104-111이 가장 유연하고 리간드 결합의 화학형에 따라 다양한 입체구조를 채택 할 수 있다. 잔기-기반 RMSF는 국소 역학의 주요 지표이며, 여기에서, 선택된 잔기를 모니터링하여 전체 역학에 대한 형태적 변화를 이해하였다.

[0304] 도 5는 TRAP1 NTD 및 Hsp90 NTD와 다양한 억제제들의 RMSF 값을 나타낸 것이다.

[0305] 도 5에 나타낸 바와 같이, TRAP1의 ATP-lid의 RMSF 값은 결합된 리간드에 따라 Hsp90보다 더 가변적이었다. 그러나, 300 ns 시뮬레이션 동안 TRAP1에서 ATP-lid의 Asn171 및 Leu172 잔기의 RMSF는 매우 낮았다. Hsp90의 경우, 59-76 번째 잔기 및 ATP-lid의 일부를 포함하는 Asn106 및 Leu107의 루프 영역의 RMSF는 결합된 리간드에 따라 변하였다. PU-H71, DN401 및 화합물 **5a**가 리간드로서 적용될 때, Hsp90의 Asn106 및 Leu107 잔기는 TRAP1 상관 잔기인 Asn171 및 Leu172보다 더 가변적인 것으로 보인다.

[0307] 파라로그 선택성을 설명하기 위해, 퓨린 (PU-H71, BIIB021, DN401, **5a**) 또는 벤즈아미드 (SNX0723)와 복합된 Hsp90 NTD의 MD 시뮬레이션을 수행하였다.

[0308] 도 6은 300 ns MD 시뮬레이션의 30 ns 간격에서 (A) BIIB021, (B) SNX0723 및 (C) PUH71의 Hsp90에 대한 결합 방식의 중첩을 나타낸 것이다. 이들 선택된 구조는 Hsp90의 ATP 결합 포켓의 외부에 Asn107을 갖는다.

[0309] 도 6A 및 6B에 나타낸 바와 같이, BIIB021 또는 SNX0723의 Hsp90 복합체의 시뮬레이션 궤적은 약물 결합 부위 외부의 Asn107의 연속적인 집단을 보여주었다. 5-원 고리 상의 카르보닐기로 표시되는 합성된 TRAP1 선택적 화합물 **5**, **6**, **7** 및 **11**은 이러한 궤적에 적합하지 않다.

[0310] 도 6C에 나타낸 바와 같이, PU-H71과 복합된 Hsp90의 ATP-lid의 나선형 구성 요소의 일부는 초기 MD 시뮬레이션 (0-30ns) 동안 90° 주위로 회전 한 다음 나머지 시뮬레이션 시간 (30-300ns)에 걸쳐 여전히 머물렀다. 회전을 통해, 서열 104-111의 α-나선 형태가 Leu107 잔기로부터 빠르게 왜곡되었다. 결과적으로 Asn106은 Leu107의 위치를 대체하고 Leu107은 약물 결합 부위 내부로 이동했다.

[0311] ATP-lid 세그먼트에서의 이러한 화학형 특이적 입체형태 변화는 그의 헬리컬 함량의 현저한 감소를 초래하였고 Hsp90에서 새로운 친유성 결합 포켓을 향한 변형을 초래하였다. 이들 새로 도입된 대안적인 결합 포켓은 이전 Leu107 위치 (TRAP1에서 Asn171 위치)에 Asn106을 가졌지만, 주변 아미노산 Leu107이 **5a** 및 **5b**의 치환된 벤질 고리와 반발적으로 상호 작용하는 친유성 ATP 결합 포켓으로도 회전하기 때문에, Asn106의 아미드 측쇄와 합성된 분자의 카르보닐 사이의 수소 결합 상호 작용은 제한된다. 도 7은 Hsp90 (청록색) MD 시뮬레이션의 궤적 (90 ns)과 함께 TRAP1-5a 복합체 (TRAP1: 흰색, 5a: 녹색)를 오버레이한 것이다. 단백질-리간드 상호 작용 분획 계수에 따르면, Asn106과 Leu107이 결합 부위로 회전 될 때 Asn106과의 **5a** 상호 작용이 증가하지 않았고, Leu-**5a** 상호 작용도 50-300ns 시뮬레이션 동안 감소한 것을 보여주었다(도 7). 즉, 실시예에서 제조된 새로운 화합물들은 Leu107 방해로 인해 MD 시뮬레이션 중에 생성된 Hsp90의 다양한 궤적에 대한 결합이 제한되어 있다.

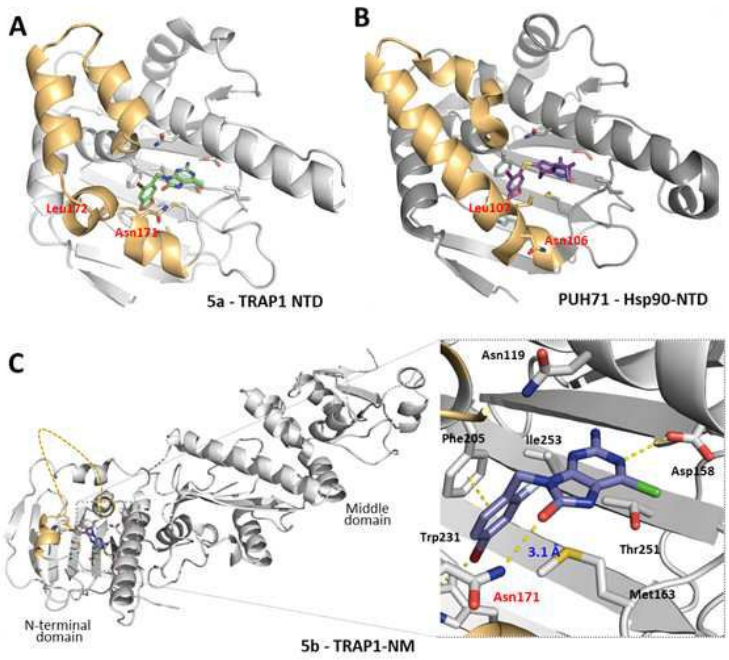
[0313] **결론**

[0314] 본 실시예에서 제조한 화합물들은 *in vitro*에서 파라로그성 효소 Hsp90 및 Grp94에 비해 TRAP1에 대해 매우 선택적인 것으로 확인되었다. Hsp90 패밀리 단백질에서 ATP-lid의 화학형-의존적 결합 입체형태는 이소형 선택성에 크게 영향을 미치는 것으로 보인다. ATP-lid의 Asn171 잔기의 이용을 통한 TRAP1 선택적 억제 전략을 X-선 결정학 및 MD 시뮬레이션 연구에 기초하여 조사하였다. 화합물 **5a** 및 화합물 **5b**는 Asn107 및 Asp158과의 수소 결합 및 친유성 결합 부위에서 Phe205 및 Trp231과의 π-π 적층의 조합에 의해 TRAP1에 안정적으로 결합하는 것으로 나타났다. 그러나, Leu106이 화합물 **5a** 및 화합물 **5b**의 카르보닐기를 접근하지 못하게 하거나 친유성 결합 포켓으로 벤질기가 삽입되는 것을 입체적으로 차단하기 때문에, 이들 상호 작용은 Hsp90 약물 결합 부위에서 제한된다. 특히, 화합물 **5j** (IC50 = 77nM)는 Hsp90에 비해 65 배 선택성 및 Grp94에 비해 13 배 선택성을 갖는다. TRAP1에 대한 화합물 **6j**의 IC_{50}은 63.5 nM이었고 Hsp90 및 Grp94에 비해 각각 78 배 및 30 배 선택성을 가졌다.

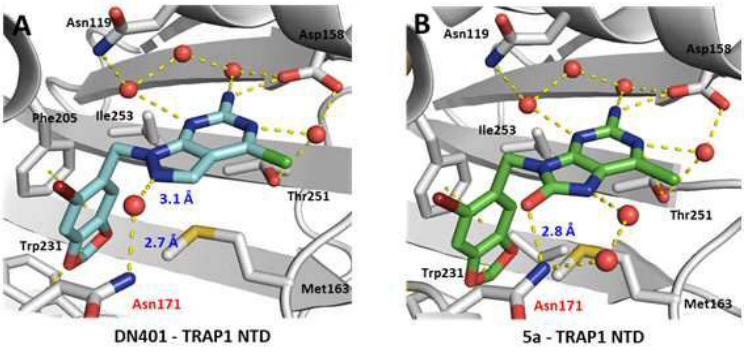
[0315] 따라서, 본 실시예에서 제조된 화합물들은 TRAP1 선택적 억제제로서, TRAP1 활성과 연관된 다양한 질병의 치료에 활용될 수 있다.

도면

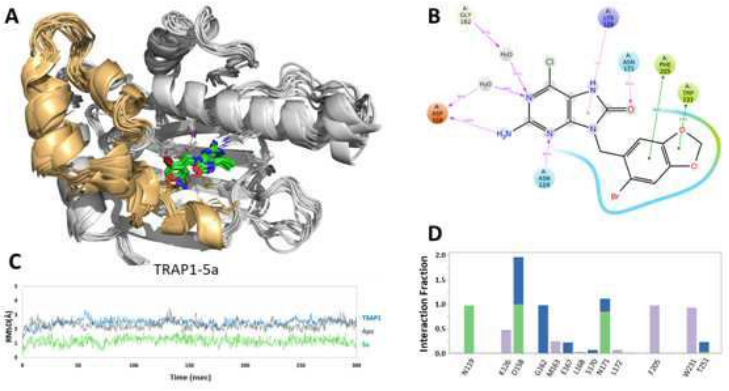
도면1



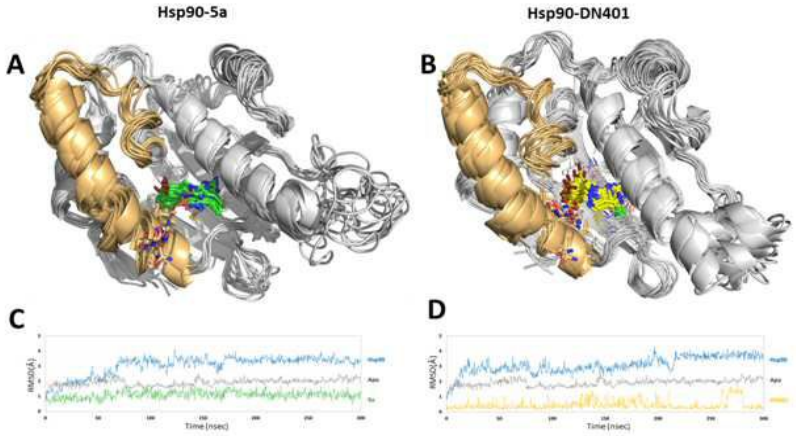
도면2



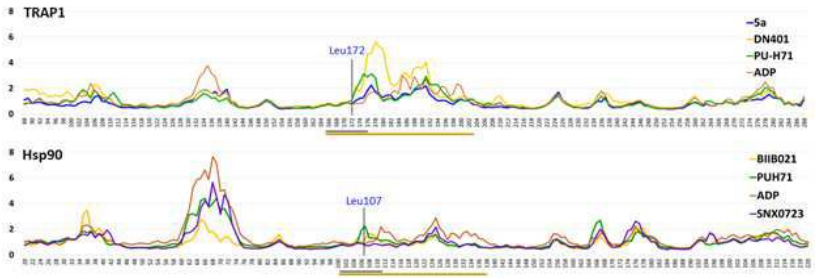
도면3



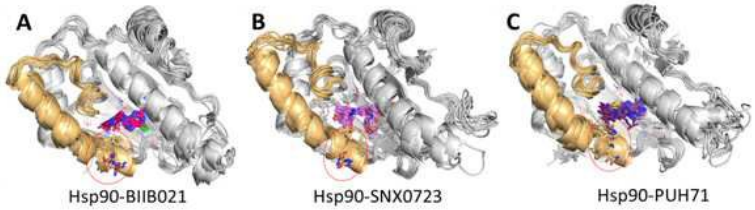
도면4



도면5



도면6



도면7

