



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0138545
(43) 공개일자 2014년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 513/08 (2006.01) A61K 31/542 (2006.01)
A61K 31/548 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0063283
(22) 출원일자 2014년05월26일
심사청구일자 2014년05월26일
(30) 우선권주장
1020130059351 2013년05월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
강상원
서울 서초구 잠원로 166-17, 4동 1101호 (잠원동, 강변아파트)
강동훈
경기 성남시 중원구 광명로 114, 1102호 (성남동, 리전빌아파트)
이두재
서울 서초구 방배로43길 21, 3동 403호 (방배동, 삼호아파트)
(74) 대리인
손민

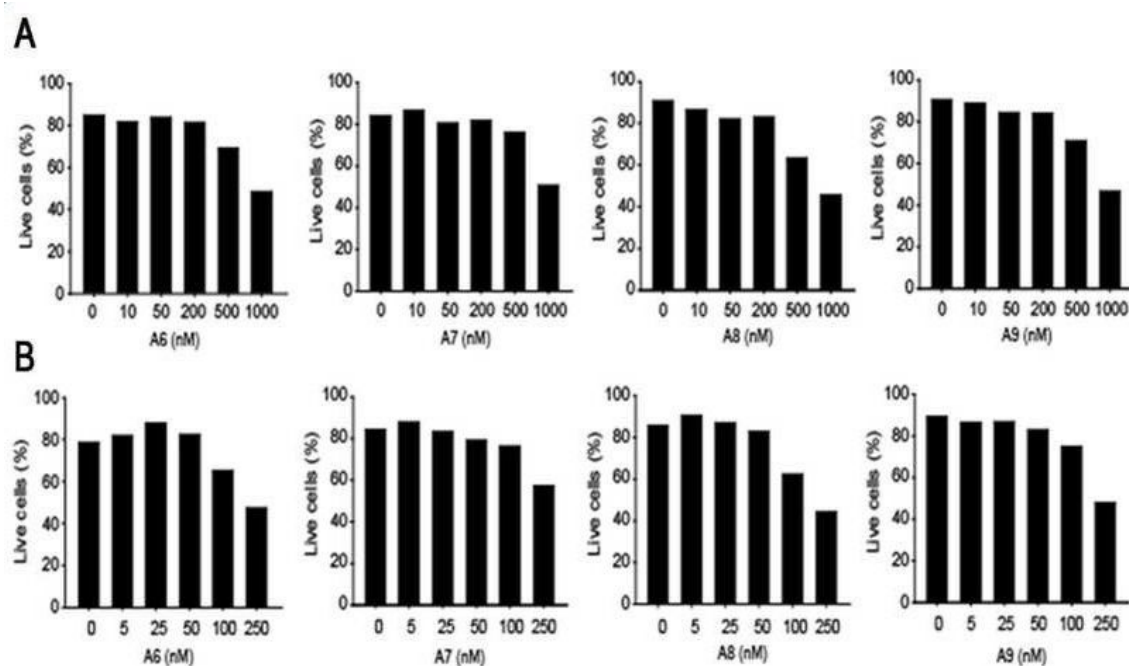
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체, 및 이의 용도

(57) 요약

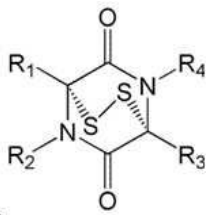
본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 환원형 유도체; 세포 내 침투성이 향상되고 세포 내에서 환원되어 2-Cys-Prx 활성을 모방하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법; 상기 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관질환 예방 (뒷면에 계속)

대표도



또는 치료용 약학적 조성물; 상기 약학적 조성물을 포함하는 국소투여용 약물전달 장치; 및 상기 에피티디오디옥 소피페라진 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 흑색종 전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[화학식 1]



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345197981

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-바이오의료기술개발사업-의학첨단과학기술융합원천기술

연구과제명 혈관재협착표적단백질의임상적용을위한혈관세포체계에서의기능검증

기 여 율 50/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2011.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345176121

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-바이오의료기술개발사업-신약타겟검증연구사업

연구과제명 레독스신호조절효소인Peroxiredoxin-2의암억제기능의검증

기 여 율 30/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711001307

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업(학술진흥)-바이오의료기술개발사업-질환타겟레독스믹스원천기술개발사업

연구과제명 심혈관및호흡기질환에서레독스체계의검증기술개발

기 여 율 20/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

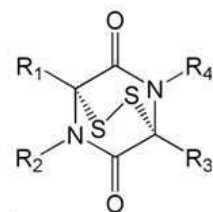
연구기간 2012.09.01 ~ 2017.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 환원형 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



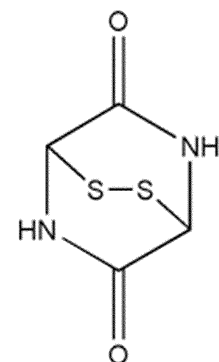
상기 화학식 1에서,

상기 R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소, 할로젠원소, 히드록시기, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl) 또는 알키닐(alkynyl), C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 히드록시알킬, 치환된 또는 비치환된 벤질, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬아릴, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 퍼플루오르알킬기, 치환된 또는 비치환된 아릴기, 치환된 또는 비치환된 퍼플루오르아릴기, 고리에 헤테로원소로써 산소, 질소 또는 황원자를 포함하는 치환된 또는 비치환된 헤테로아릴기, 또는 치환된 또는 비치환된 에피디티오디옥소피페라진기, 상기 알킬 및 아릴기는 그 쇄의 중간에 산소, 질소 또는 황의 헤테로원자를 포함할 수 있으며, 상기 치환된 에피디티오디옥소피페라진기는 각각 독립적으로 상기 정의된 치환기들을 포함할 수 있으며 모핵의 에피디티오디옥소피페라진과 동일하거나 다른 구조를 가질 수 있음;

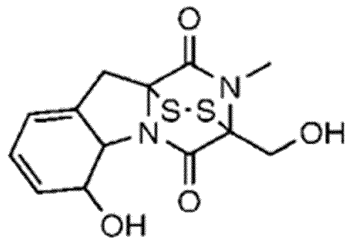
R₁과 R₂, 및 R₃과 R₄는 각각 독립적으로 이들이 부착된 탄소원자와 함께 치환된 또는 비치환된 C3-C6 사이클로알킬기를 형성하거나; 이들이 부착된 탄소원자 및 추가의 탄소 또는 헤테로원자와 함께, 5 내지 8개의 고리 원자를 갖는, 치환된 또는 비치환된 헤테로사이클릭 고리를 형성하고, 여기에서 헤테로사이클릭 고리의 1 내지 2개의 고리 원자는 질소(N), 산소(O) 또는 황(S)로부터 선택되는 화합물;

단, 하기 화학식 15 내지 46으로 표시되는 화합물은 배제함.

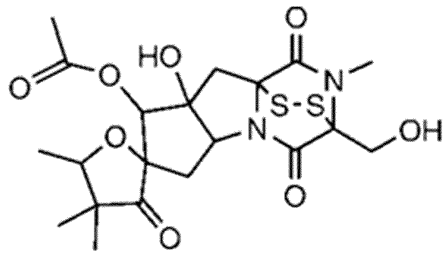
[화학식 15]



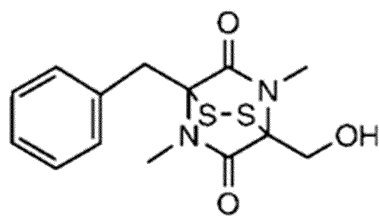
[화학식 16]



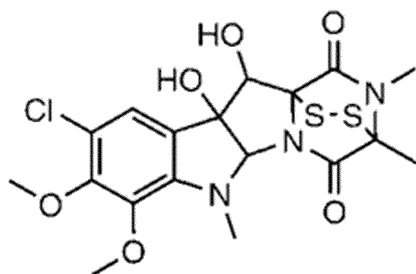
[화학식 17]



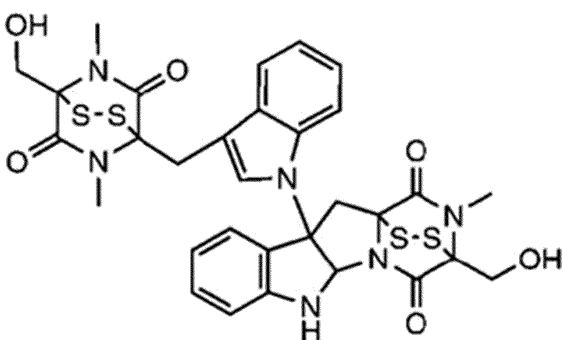
[화학식 18]



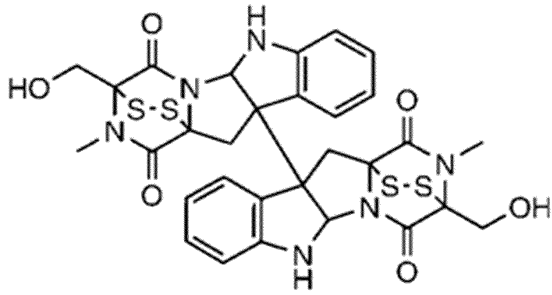
[화학식 19]



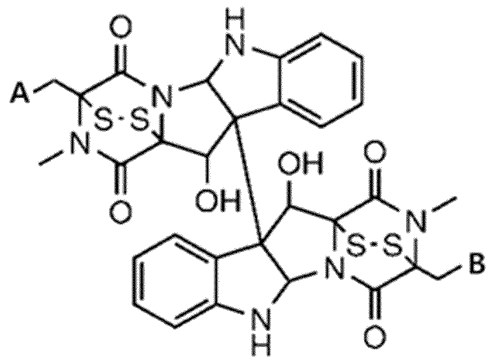
[화학식 20]



[화학식 21]

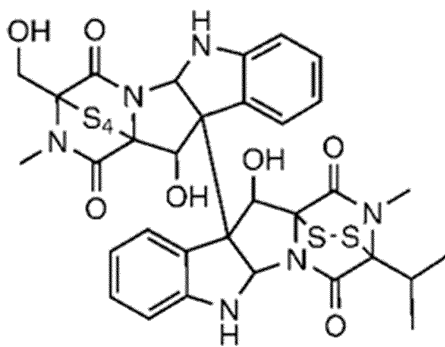


[화학식 22]

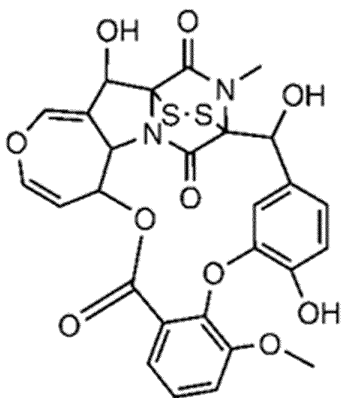


여기서, A 및 B는 각각 독립적으로 수소, 메톡시 또는 히드록실기이다.

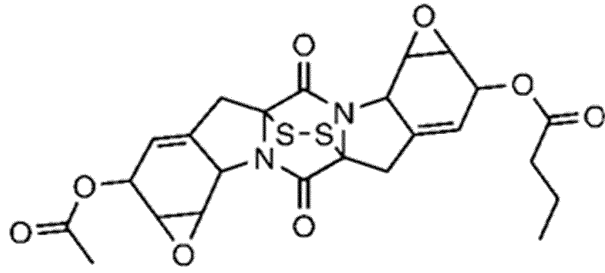
[화학식 23]



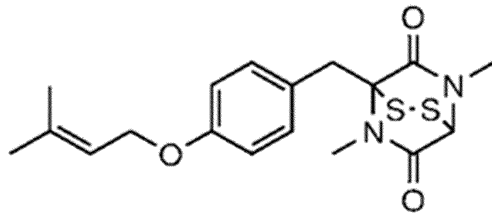
[화학식 24]



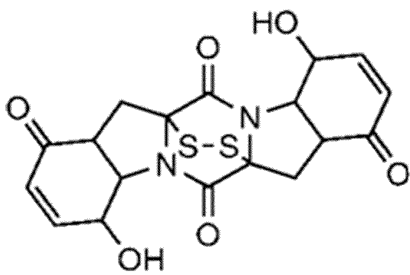
[화학식 25]



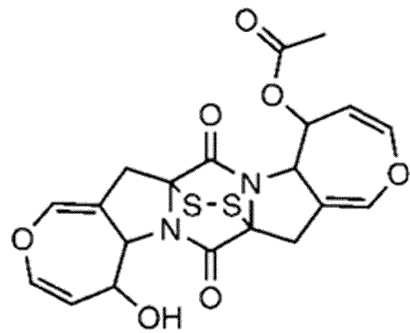
[화학식 26]



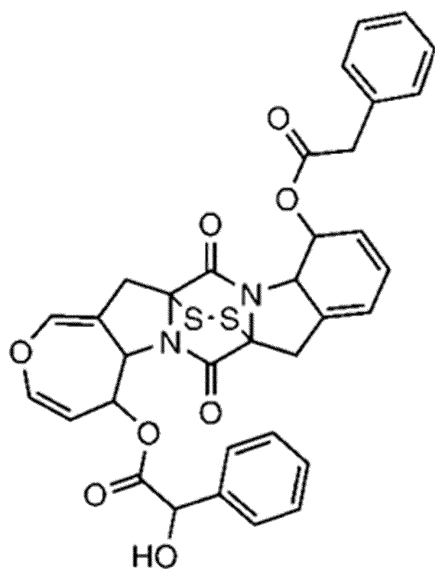
[화학식 27]



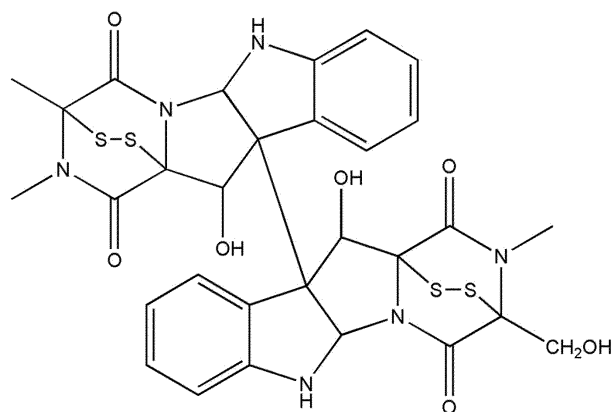
[화학식 28]



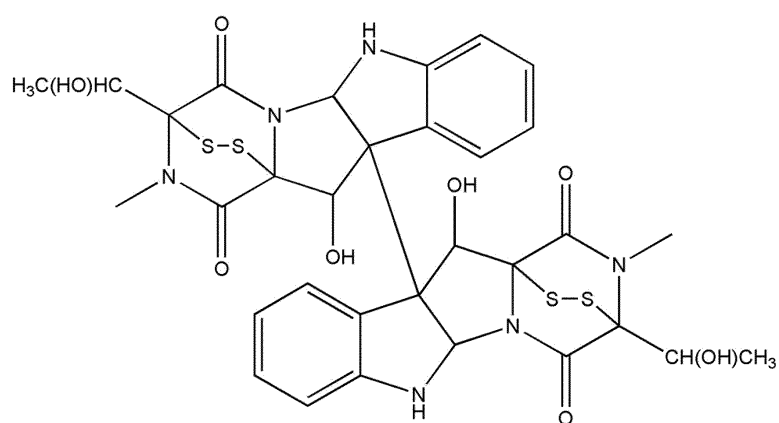
[화학식 29]



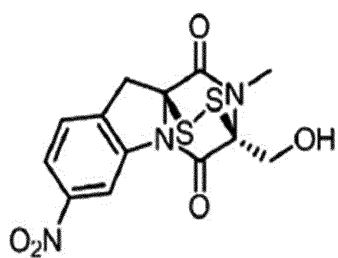
[화학식 30]



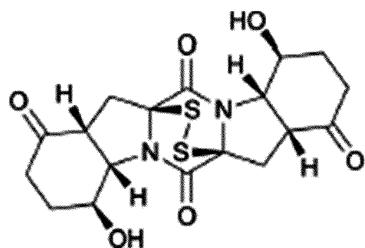
[화학식 31]



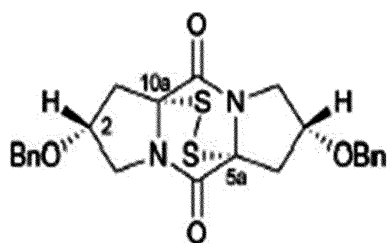
[화학식 32]



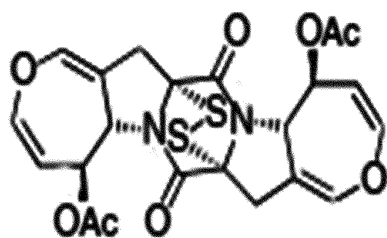
[화학식 33]



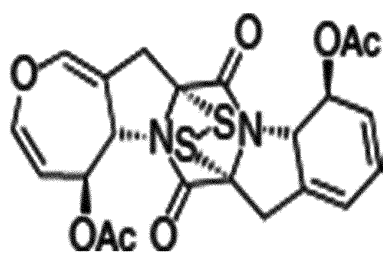
[화학식 34]



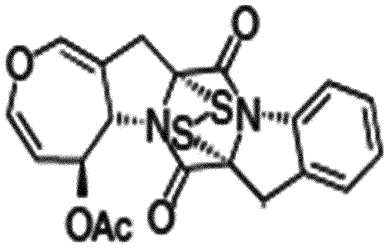
[화학식 35]



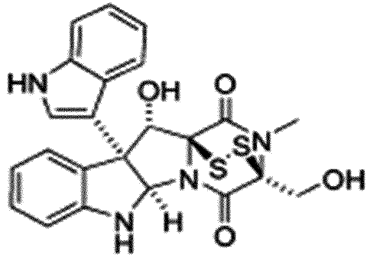
[화학식 36]



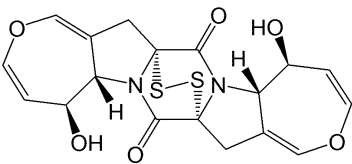
[화학식 37]



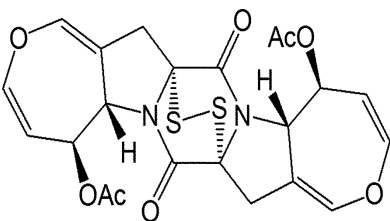
[화학식 38]



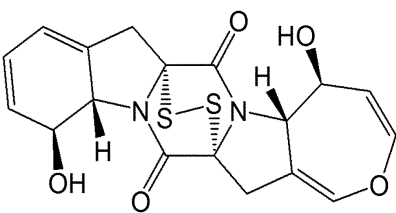
[화학식 39]



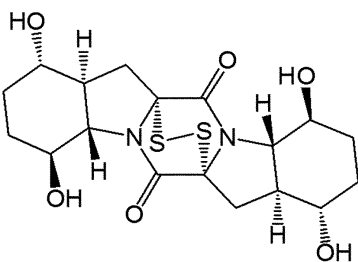
[화학식 40]



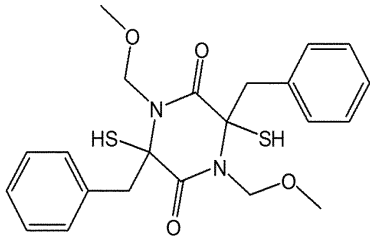
[화학식 41]



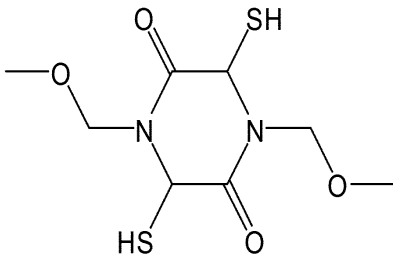
[화학식 42]



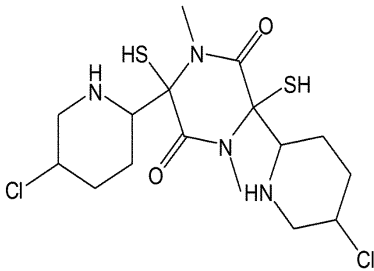
[화학식 43]



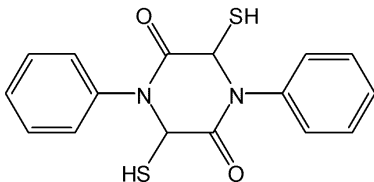
[화학식 44]



[화학식 45]



[화학식 46]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬 또는 알케닐, 알콕시벤질, 알콕시알킬 또는 벤즈히드릴(benzhydryl)인 것인 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

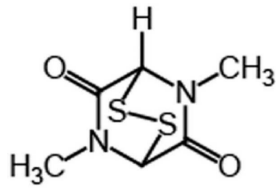
상기 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소, 메틸, n-부틸, 알릴(allyl), 4-메톡시벤질, 3-메톡시프로필 또는 벤즈히드릴인 것인 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

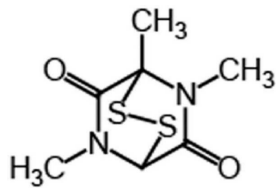
제1항에 있어서,

상기 유도체는 하기 화학식 7 내지 14로 표시되는 화합물 중 어느 하나인 것인 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

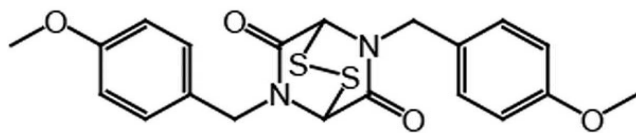
[화학식 7]



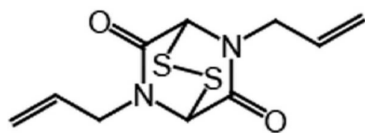
[화학식 8]



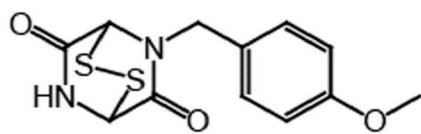
[화학식 9]



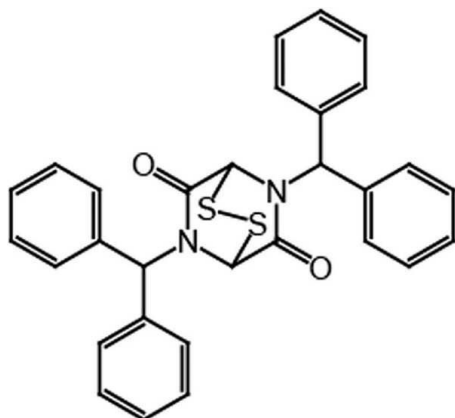
[화학식 10]



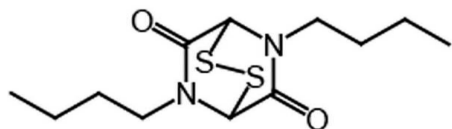
[화학식 11]



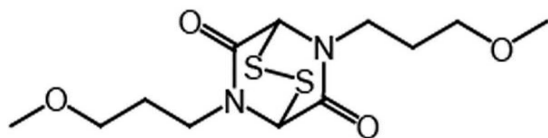
[화학식 12]



[화학식 13]



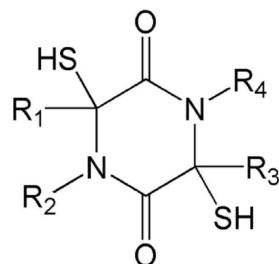
[화학식 14]



청구항 5

산화반응에 의해 하기 화학식 2로 표시되는 디머캡토피페라진디온(dimercaptopiperazinedione) 유도체로부터 분자내 이황가교결합을 형성하는 단계를 포함하는, 세포 내 침투성이 향상되고 세포 내에서 환원되어 2-Cys-Prx 활성을 모방하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체의 제조방법:

[화학식 2]



상기 화학식 2에서,

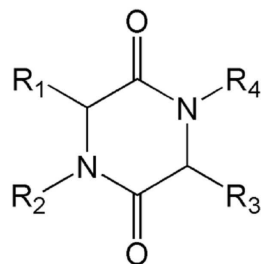
R₁ 내지 R₄는 제1항에 정의된 바와 동일함.

청구항 6

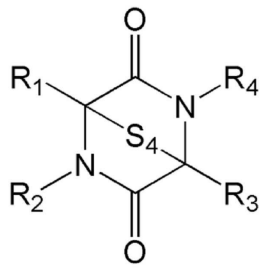
제5항에 있어서,

하기 화학식 3으로 표시되는 피페라진디온(piperazinedione) 유도체를 황(S)과 LiHMDS(lithium bis(trimethylsilyl)amide) 또는 NaHMDS와 반응시켜 하기 화학식 4로 표시되는 중간체를 제조하는 단계 및 상기 중간체를 환원시켜 화학식 2로 표시되는 디머캡토피페라진디온 유도체를 제조하는 단계를 추가로 포함하는 제조방법:

[화학식 3]



[화학식 4]



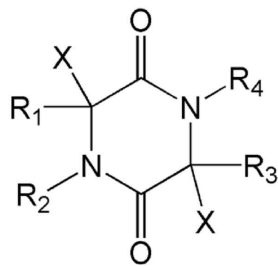
상기 R₁ 내지 R₄는 제1항에 정의된 바와 동일함.

청구항 7

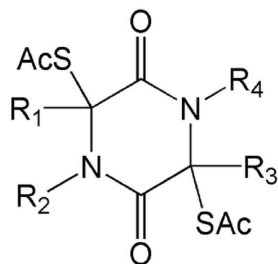
제5항에 있어서,

하기 화학식 5로 표시되는 할로겐원자가 치환된 피페라진디온 유도체를 티오아세트산 알칼리금속염(MSAc)과 반응시켜 티오아세테이트기를 포함하는 하기 화학식 6으로 표시되는 중간체를 제조하는 단계 및 상기 중간체를 산 용액과 반응시켜 화학식 2로 표시되는 디머캅토피페라진디온 유도체를 제조하는 단계를 추가로 포함하는 제조방법:

[화학식 5]



[화학식 6]

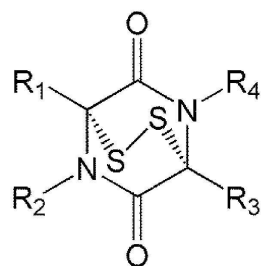


상기 알칼리금속염은 나트륨 또는 칼륨염이고, X는 할로겐원소이며, R₁ 내지 R₄는 제1항에 정의된 바와 동일함.

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



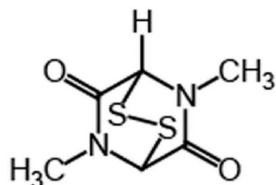
상기 화학식 1에서,

상기 R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소, 할로겐원소, 히드록시기, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl) 또는 알키닐(alkynyl), C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 히드록시알킬, 치환된 또는 비치환된 벤질, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬아릴, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 퍼플루오르알킬기, 치환된 또는 비치환된 아릴기, 치환된 또는 비치환된 퍼플루오르아릴기, 고리에 헤테로원소로써 산소, 질소 또는 황원자를 포함하는 치환된 또는 비치환된 헤테로아릴기, 또는 치환된 또는 비치환된 에피디티오디옥소피페라진기, 상기 알킬 및 아릴기는 그 쇄의 중간에 산소, 질소 또는 황의 헤테로원자를 포함할 수 있으며, 상기 치환된 에피디티오디옥소피페라진기는 각각 독립적으로 상기 정의된 치환기들을 포함할 수 있으며 모핵의 에피디티오디옥소피페라진과 동일하거나 다른 구조를 가질 수 있음;

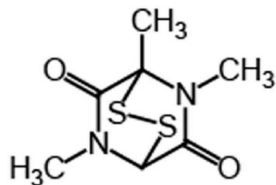
R₁과 R₂, 및 R₃과 R₄는 각각 독립적으로 이들이 부착된 탄소원자와 함께 치환된 또는 비치환된 C3-C6 사이클로알킬기를 형성하거나; 이들이 부착된 탄소원자 및 추가의 탄소 또는 헤테로원자와 함께, 5 내지 8개의 고리 원자를 갖는, 치환된 또는 비치환된 헤테로사이클릭 고리를 형성하고, 여기에서 헤테로사이클릭 고리의 1 내지 2개의 고리 원자는 질소(N), 산소(O) 또는 황(S)로부터 선택되는 화합물;

여기서 상기 화학식 1로 표시되는 유도체에서 하기 화학식 7, 8 및 15 내지 31로 표시되는 화합물은 배제함.

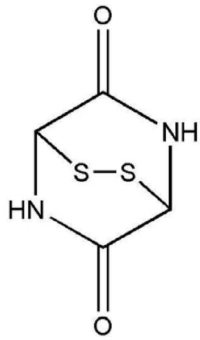
[화학식 7]



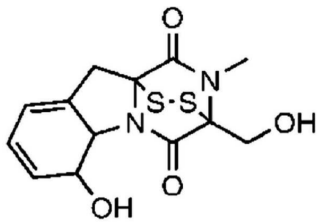
[화학식 8]



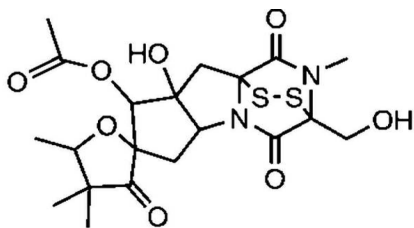
[화학식 15]



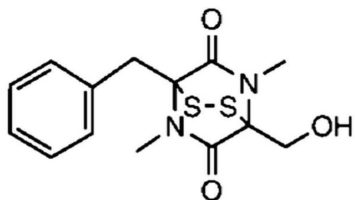
[화학식 16]



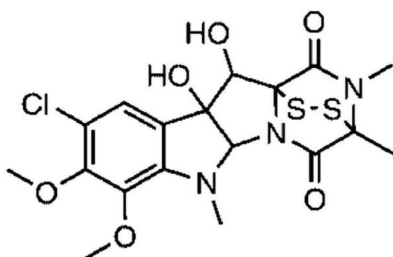
[화학식 17]



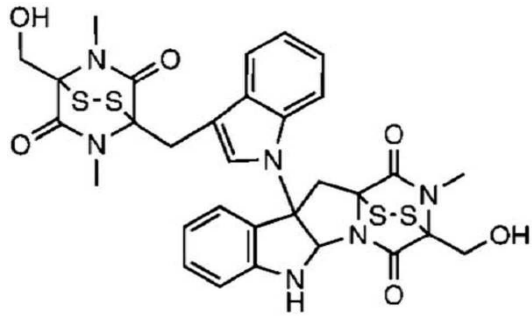
[화학식 18]



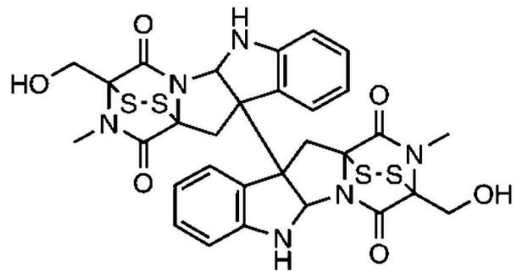
[화학식 19]



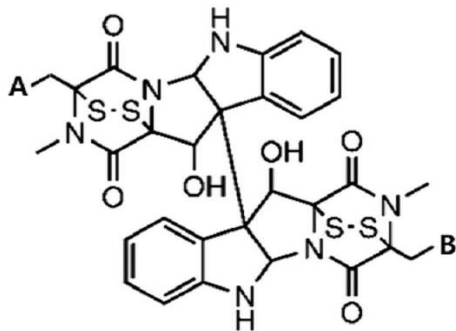
[화학식 20]



[화학식 21]

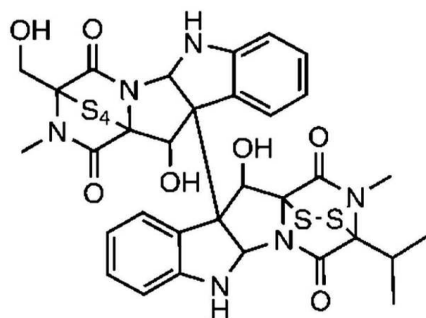


[화학식 22]

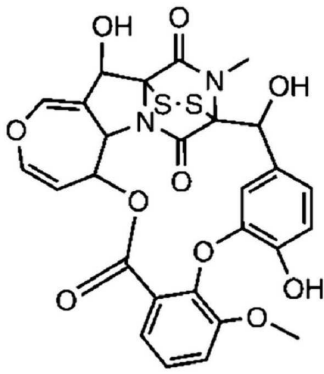


여기서, A 및 B는 각각 독립적으로 수소; 메톡시; 또는 히드록실기임.

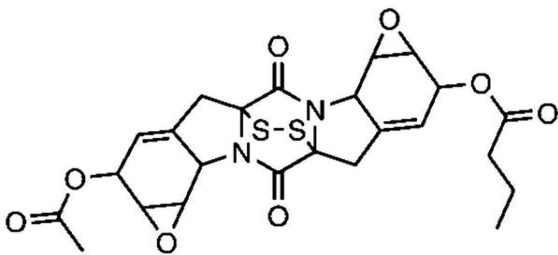
[화학식 23]



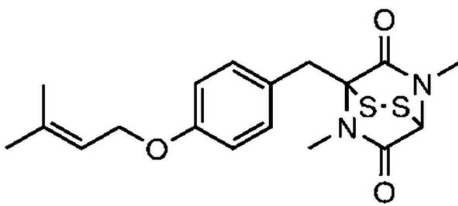
[화학식 24]



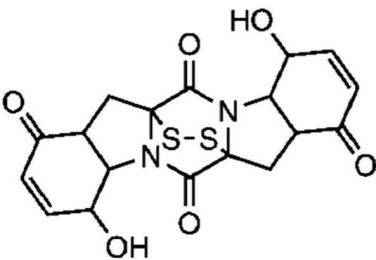
[화학식 25]



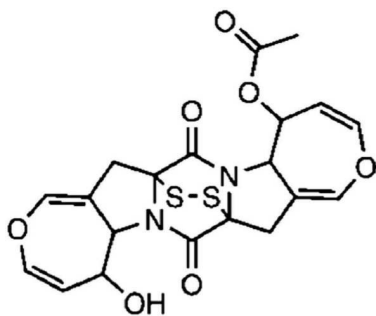
[화학식 26]



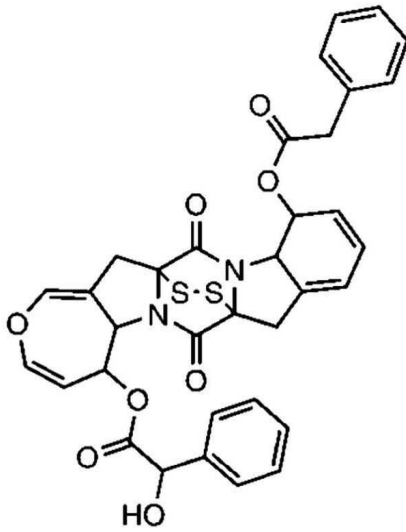
[화학식 27]



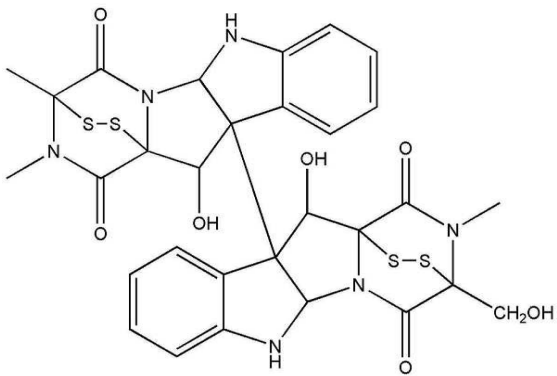
[화학식 28]



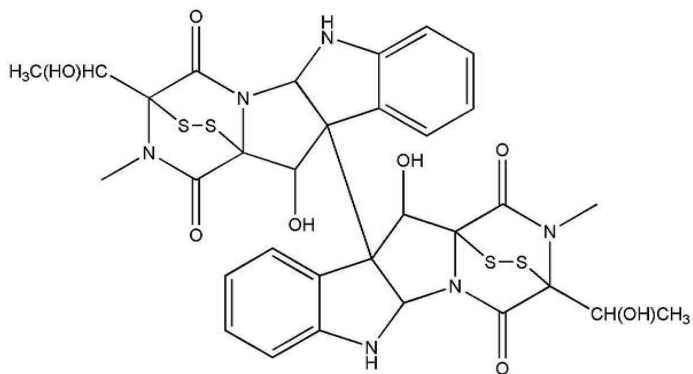
[화학식 29]



[화학식 30]



[화학식 31]

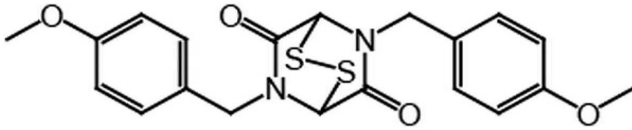


청구항 9

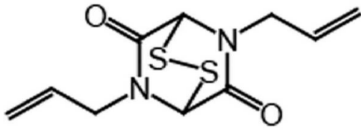
제8항에 있어서,

상기 에피디티오디옥소피페라진 화합물은 하기 화학식 9 내지 14 중 어느 하나인 것인 조성물:

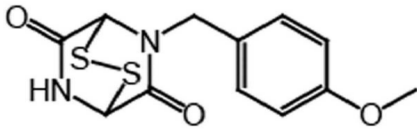
[화학식 9]



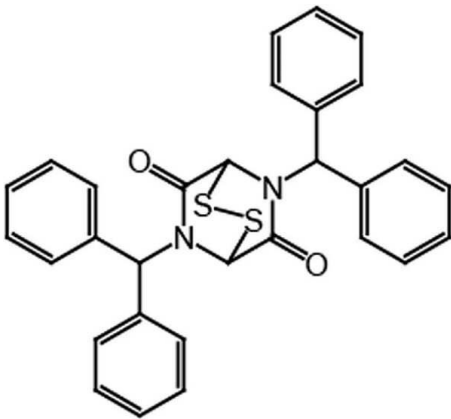
[화학식 10]



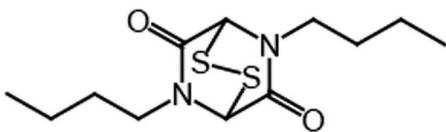
[화학식 11]



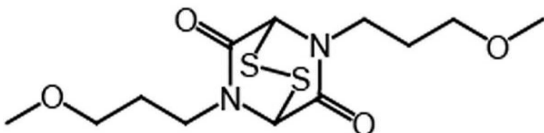
[화학식 12]



[화학식 13]



[화학식 14]



청구항 10

제8항에 있어서,

상기 혈관질환은 고혈압, 협심증, 심근경색, 불안정성 협심증과 같은 허혈성 관상동맥질환, 중풍과 같은 대뇌동맥폐색, 동맥경화증, 버거스병과 같은 말초동맥폐색질환, 혈전색전증, 당뇨병성족부병변, 정맥성폐양, 심부정맥혈전증, 경동맥의 동맥경화증, 혈관연축, 동맥염 및 혈관재협착으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인

조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 혈관계협착은 혈관이식, 혈관절단, 동맥경화, 혈관 내 지방축적, 고혈압, 혈관염증 또는 혈관성형술에 의한 것인 조성물.

청구항 12

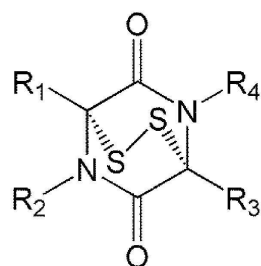
제8항에 있어서,

상기 조성물은 혈관평활근세포의 증식이나 이동을 억제하면서 동시에 혈관내피세포의 증식이나 이동을 촉진시키는 것인 조성물.

청구항 13

하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 흑색종 전이 억제용 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

상기 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소, 할로겐원소, 히드록시기, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬 (alkyl), 알케닐(alkenyl) 또는 알키닐(alkynyl), C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 히드록시알킬, 치환된 또는 비치환된 벤질, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬아릴, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 퍼플루오르알킬기, 치환된 또는 비치환된 아릴기, 치환된 또는 비치환된 퍼플루오르아릴기, 고리에 헤테로원소로써 산소, 질소 또는 황원자를 포함하는 치환된 또는 비치환된 헤테로아릴기, 또는 치환된 또는 비치환된 에피디티오디옥소피페라진기, 상기 알킬 및 아릴기는 그 쇄의 중간에 산소, 질소 또는 황의 헤테로원자를 포함할 수 있으며, 상기 치환된 에피디티오디옥소피페라진기는 각각 독립적으로 상기 정의된 치환기들을 포함할 수 있으며 모핵의 에피디티오디옥소피페라진과 동일하거나 다른 구조를 가질 수 있음;

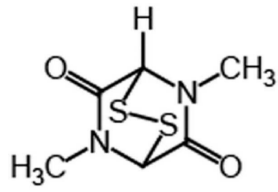
R_1 과 R_2 , 및 R_3 과 R_4 는 각각 독립적으로 이들이 부착된 탄소원자와 함께 치환된 또는 비치환된 C3-C6 사이클로알킬기를 형성하거나; 이들이 부착된 탄소원자 및 추가의 탄소 또는 헤테로원자와 함께, 5 내지 8개의 고리 원자를 갖는, 치환된 또는 비치환된 헤테로사이클릭 고리를 형성하고, 여기에서 헤테로사이클릭 고리의 1 내지 2개의 고리 원자는 질소(N), 산소(O) 또는 황(S)로부터 선택되는 화합물임.

청구항 14

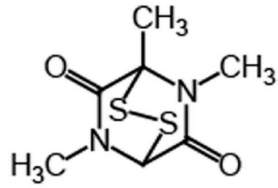
제13항에 있어서,

상기 에피디티오디옥소피페라진 화합물은 하기 화학식 7 내지 31로 표시되는 화합물 중 어느 하나인 것인 조성물:

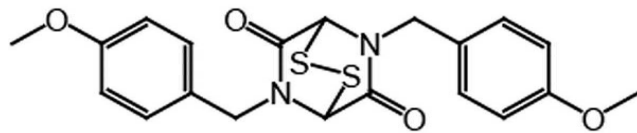
[화학식 7]



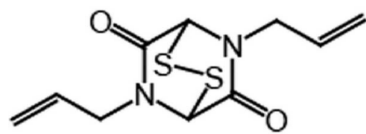
[화학식 8]



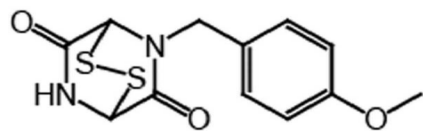
[화학식 9]



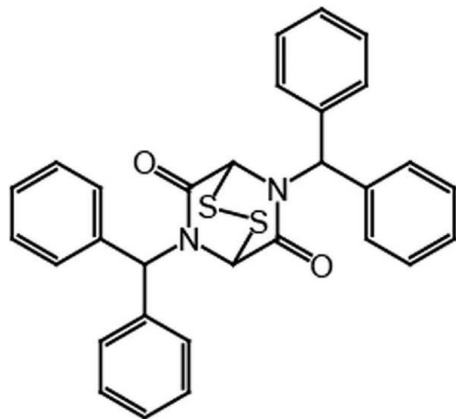
[화학식 10]



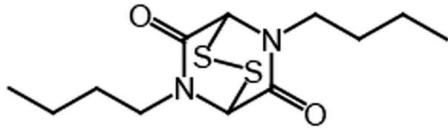
[화학식 11]



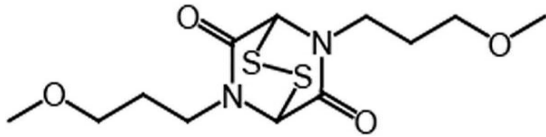
[화학식 12]



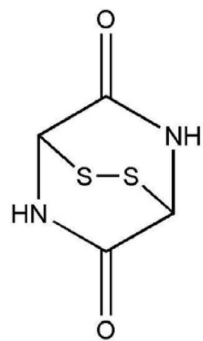
[화학식 13]



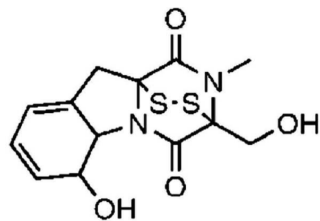
[화학식 14]



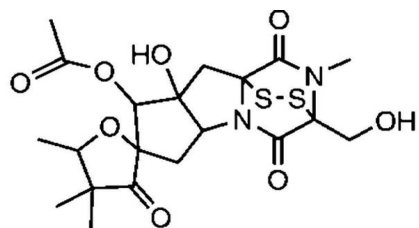
[화학식 15]



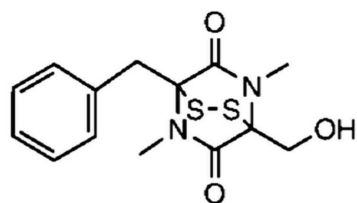
[화학식 16]



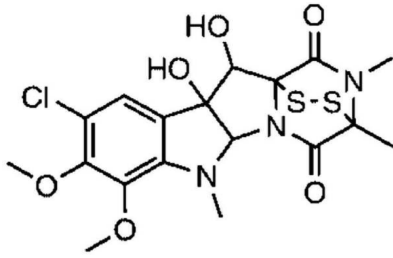
[화학식 17]



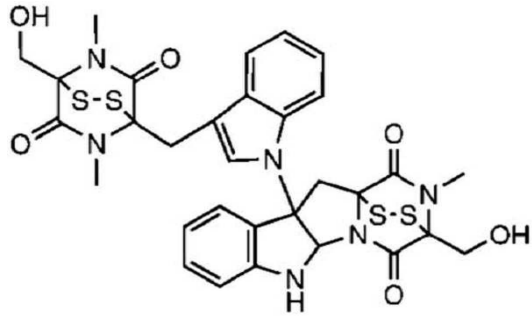
[화학식 18]



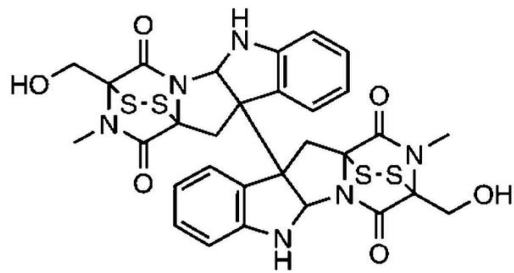
[화학식 19]



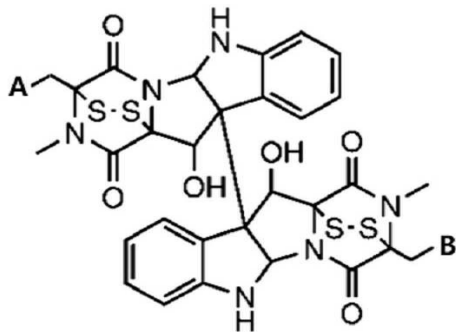
[화학식 20]



[화학식 21]

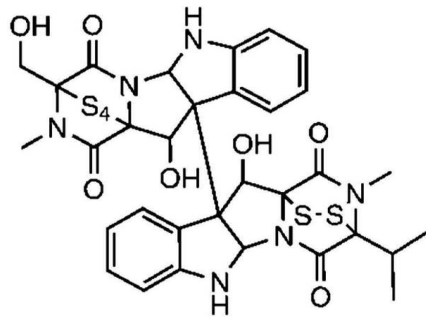


[화학식 22]

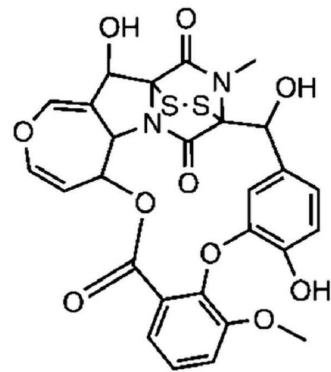


여기서, A 및 B는 각각 독립적으로 수소; 메톡시; 또는 히드록실기임.

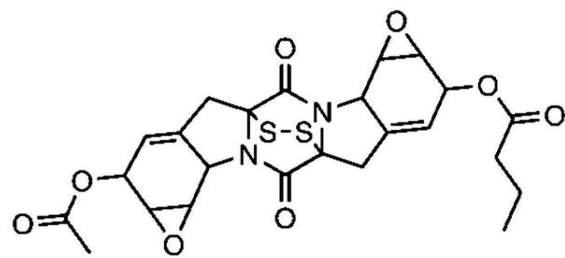
[화학식 23]



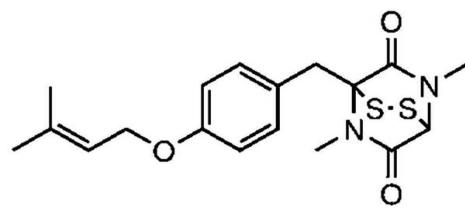
[화학식 24]



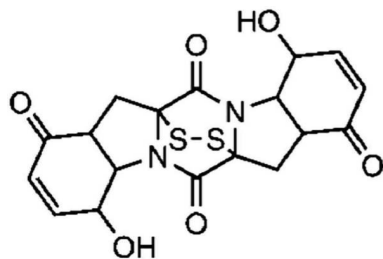
[화학식 25]



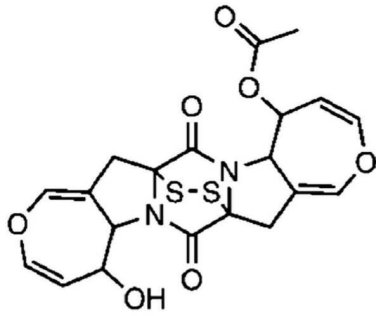
[화학식 26]



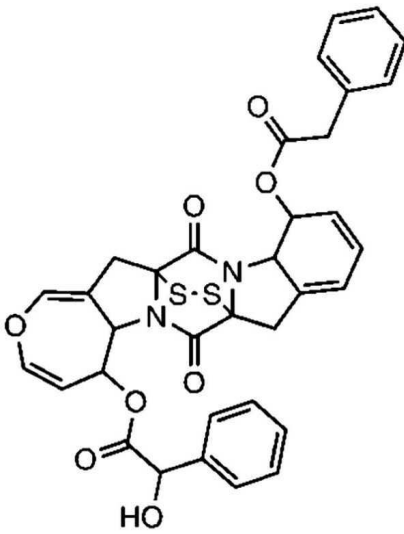
[화학식 27]



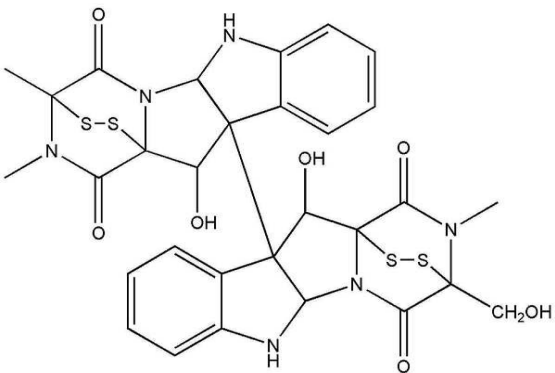
[화학식 28]



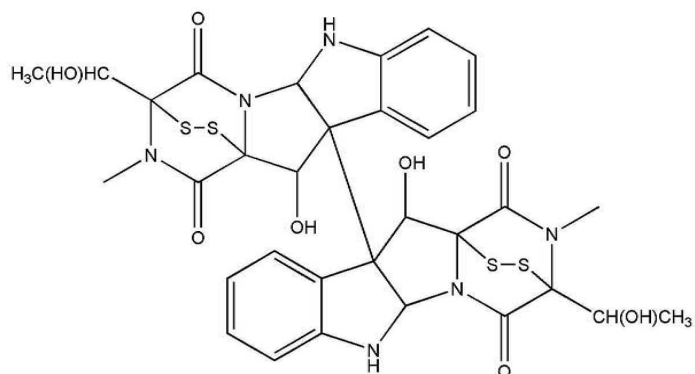
[화학식 29]



[화학식 30]



[화학식 31]



청구항 15

제13항에 있어서,

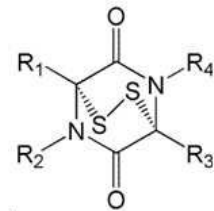
상기 흑색종의 전이 억제제는 PrxII의 세포 내 활성을 모방함으로써 달성되는 것인 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 환원형 유도체; 세포 내 침투성이 향상되고 세포 내에서 환원되어 2-Cys-Prx 활성을 모방하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법; 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 상기 약학적 조성물을 포함하는 국소투여용 약물전달 장치; 및 상기 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 흑색종 전이 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0002] [화학식 1]



[0003]

배경기술

[0004] 동맥경화증은 콜레스테롤, 인지질, 칼슘 등을 함유한 지방성 물질(plaque)이 혈관내막에 축적되어 염증이 발생하고, 동맥이 탄력성을 잃고 좁아져서 혈액 공급이 저해되거나 압력이 높아져 혈관의 파열 또는 박리 등이 일어나는 상태를 말한다. 특히, 이로 인해 발생하는 동맥의 협착은 혈액 공급을 감소시켜 영양분과 산소가 부족하게 되고 이는 혈관계 질환의 주요 원인이 된다. 상기 혈관계 질환은 일반적으로 동맥경화증, 심부전, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 심근경색증 및 협심증 등의 심장질환과, 뇌졸중 및 말초혈관질환 등의 혈관질환을 포함한다.

[0005] 이러한 혈관협착을 극복하기 위한 방법으로는 외과적 수술 방법인 동맥 이식 수술 방법 및 수술에 의하지 않고 혈관을 확장시켜 주는 방법인 경피적 혈관 성형술이 있다. 상기 경피적 혈관 성형술로는 경피적 혈관 풍선 확장술, 경피적 혈관 스텐트 삽입술 등이 있다. 경피적 혈관 풍선 확장술은 대퇴부나 팔의 동맥을 통하여 가이드용 도관을 삽입하여 병변이 있는 혈관의 입구에 위치시키고, 이 도관의 내부를 통하여 말단에 풍선이 부착되어 있는 도관을 혈관의 협착 부위에 위치시킨 후, 풍선을 확장시켜 플라크 등을 압착하여 좁아진 혈관을 확장시킴으로써 혈관의 혈류개선을 가져오는 방법이다. 또한, 스텐트 삽입술은 철망이 입혀진 풍선을 협착부위에 위치시킨 후 풍선을 확장하여 혈관의 내벽에 철망을 입히는 것이며, 이러한 스텐트는 풍선 확장술만 시술하였을 때보다는 재협착의 발생율이 낮으며 스텐트가 혈관내벽에 대한 지지대 역할을 하는 특성이 있으므로 풍선 확장시 발생하는 합병증의 치료에 사용되고 있다. 이러한 혈관 성형술을 이용한 중재적 시술은 외과적 수술을 통한 방법보다 간편하고 전신 마취에 의한 위험부담을 줄일 수 있으며 성공률도 높아 세계적으로 널리 이용되고 있는 추세이다.

[0006] 혈관재협착(restenosis)은 혈관조영술에 의한 진단으로 혈관 성형술 후 추적 조영술 상 혈관내경의 협착이 50% 이상인 경우를 말한다. 약 70%의 비율로 스텐트를 이용하는 시술이 증가하면서 재협착 발생율이 감소하기는 하였으나, 혈관 성형술(풍선확장술 및 스텐트 삽입)을 시술받은 환자에서 30% 정도의 비율로 여전히 혈관재협착이 발생하고 있다. 이러한 재협착의 기전은 아직 정확히 규명되지는 않았으나, 시술과정 동안의 혈관내피세포 손상으로 인해 성장인자 및 사이토카인이 국소적으로 분비되고 이들이 혈관평활근의 증식 및 이동을 유도하여 동맥 내강이 좁아져서 재협착에 이르게 되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 최근 평활근세포의 증식이 혈관 성형술의 효율을 제한하는 주요한 임상상의 문제로 제기되었다. 따라서 혈관평활근세포의 증식을 억제하는 약물이나 물질

을 방출하는 개선된 스텐트를 개발하여 임상에 사용하였다. 그러나, 현재 이러한 목적으로 사용되고 있는 약물들은 독성이 높아 혈관평활근세포를 사멸시키는 기전을 통해 내막의 과형성을 방지하는 것으로 그 독성에 의해 평활근세포 뿐 아니라 내피세포까지 사멸에 이르게 하는 등 임상 사용에 있어서 그 한계를 드러내고 있다. 따라서, 혈관평활근세포의 성장은 선택적으로 억제하면서 손상된 내피세포층의 회복을 촉진할 수 있는 약물의 개발이 시급하다.

[0007] 한편, 에피디티오디옥소피페라진(epidithiodioxopiperazine; ETP) 구조를 가지는 대표적인 물질인 글리오톡신(gliotoxin; GT)은 면역 억제, 항암 및 항바이러스 활성 등의 다양한 약리활성을 가진다고 보고된 바 있다. 또한 상기 에피디티오디옥소피페라진 유도체인 키토신(chaetocin)과 키토민(chetomin) 또한 항암활성을 가지는 것으로 보고되었다.

[0008] 이와 같이 에피디티오디옥소피페라진 화합물들을 치료제로서 활용하기 위하여 분자적 타겟을 찾고자 하는 무수한 노력이 계속되고 있다. 그 결과, 글리오톡신은 NF- κ B, 파테실전이효소 및 식세포성 NOX2와 같은 몇몇 효소를 억제하고, 키토신은 티오레독신 환원효소 또는 히스톤 메틸전이효소를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또한 키토민은 저산소증-유도 인자-1(hypoxia-inducible factor-1; HIF-1)과 p300 간의 상호작용을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 ETP 화합물들의 일부 세포활성이 밝혀졌음에도 불구하고, 이들의 화학적 구조가 매우 상이하여 세포활성 간의 논리적 상관관계를 추론하기는 어려웠다. 특히, ETP 화합물과 이들 유도체의 공통구조로 알려진 에피디티오디옥소피페라진 고리 구조의 생화학적 활성이나 세포적 기능은 밝혀지지 않았다.

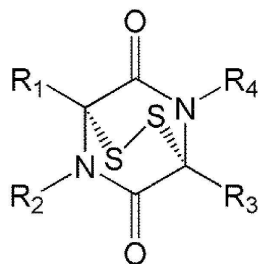
[0009] 이에, 본 발명자들은 혈관내막 비후를 억제하는 것으로 알려진 2-Cys-Prx의 활성을 모방하여 혈관질환을 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 찾고자 예의 연구노력한 결과, ETP 화합물이 세포 내에서 2-Cys-Prx의 일종인 PrxII(peroxiredoxin II)의 활성을 나타낼 수 있음에 착안하여 분자 내 이황가교결합을 갖는 일련의 신규한 ETP 유도체를 합성하고 이들이 PrxII의 세포 내 활성을 모방함으로써 혈관평활근세포에서는 PDGF-유도성 증식 및 이동을 억제하고 혈관내피세포에서는 VEGF-유도성 증식 및 이동을 촉진함으로써, 혈관평활근세포의 과다한 증식으로 인한 혈관내막 비후는 저해하고 혈관내피층 회복, 즉 재내피화(reendothelization)는 증진시켜 궁극적으로 혈관질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다. 나아가 상기 ETP 화합물이 2-Cys-Prx, 특히 PrxII의 세포 내 활성을 모방할 수 있음에 착안하여 ETP 화합물이 PrxII 결핍 또는 불활성화에 의해 유도되는 악성 흑색종의 전이를 억제할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 환원형 유도체를 제공하는 것이다:

[0011] [화학식 1]



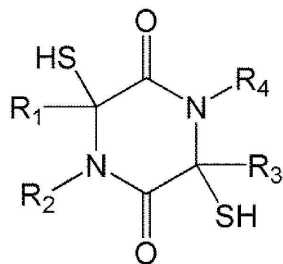
[0012]

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 유도체를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 산화반응에 의해 하기 화학식 2로 표시되는 디머캡토피페라진디온(dimercaptopiperazinedione) 유도체로부터 분자내 이황가교결합을 형성하는 단계를 포함하는, 세포 내 침투성

이 향상되고 세포 내에서 환원되어 2-Cys-Prx 활성을 모방하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다:

[화학식 2]



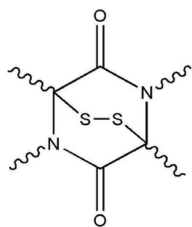
본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 약학적 조성물을 혈관질환 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 혈관질환의 치료방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 포함하는 국소투여용 약물전달 장치를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 흑색종 전이 억제용 약학적 조성물, 및 상기 약학적 조성물을 흑색종 전이 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 흑색종을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 화학식 47로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 고리를 하나 이상 포함하는 화합물이 2-Cys-퍼옥시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는지 여부를 확인하는 단계; 및 상기 NADPH 산화반응 또는 H₂O₂ 환원반응이 일어나면 상기 화합물을 혈관재협착 예방 또는 치료제로 판단하는 단계를 포함하는 혈관재협착 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

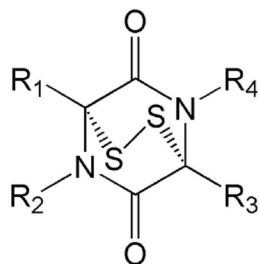
[화학식 47]



과제의 해결 수단

상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소 피페라진 유도체를 제공한다.

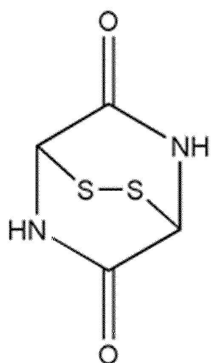
[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소, 할로젠원소, 히드록시기, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지

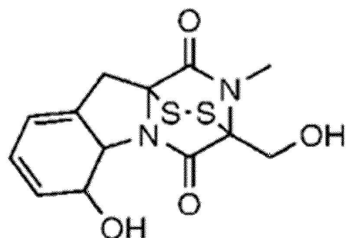
쇄 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl) 또는 알키닐(alkynyl), C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 히드록시알킬, 치환된 또는 비치환된 벤질, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬아릴, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 퍼플루오르알킬기, 치환된 또는 비치환된 아릴기, 치환된 또는 비치환된 퍼플루오르아릴기, 고리에 헤테로원소로써 산소, 질소 또는 황원자를 포함하는 치환된 또는 비치환된 헤테로아릴기, 또는 치환된 또는 비치환된 에피디티오디옥소피페라진기, 상기 알킬 및 아릴기는 그 쇄의 중간에 산소, 질소 또는 황의 헤테로원자를 포함할 수 있으며, 상기 치환된 에피디티오디옥소피페라진기는 각각 독립적으로 상기 정의된 치환기들을 포함할 수 있으며 모핵의 에피디티오디옥소피페라진과 동일하거나 다른 구조를 가질 수 있음; 또는 R₁과 R₂, 및 R₃과 R₄는 각각 독립적으로 이들이 부착된 탄소원자와 함께 치환된 또는 비치환된 C3-C6 사이클로알킬기를 형성하거나; 이들이 부착된 탄소원자 및 추가의 탄소 또는 헤테로원자와 함께, 5 내지 8개의 고리 원자를 갖는, 치환된 또는 비치환된 헤테로사이클릭 고리를 형성하고, 여기에서 헤테로사이클릭 고리의 1 내지 2개의 고리 원자는 질소(N), 산소(O) 또는 황(S)로부터 선택되는 화합물로써, 단, 상기 유도체에서 하기 화학식 15 내지 46으로 표시되는 화합물은 배제될 수 있다.

[0027] [화학식 15]



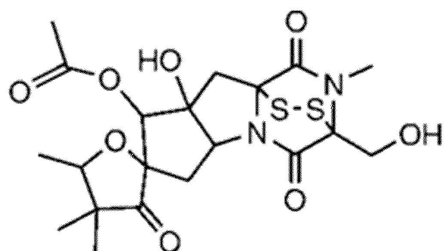
[0028]

[0029] [화학식 16]



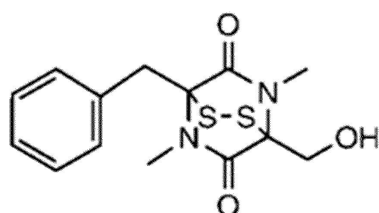
[0030]

[0031] [화학식 17]



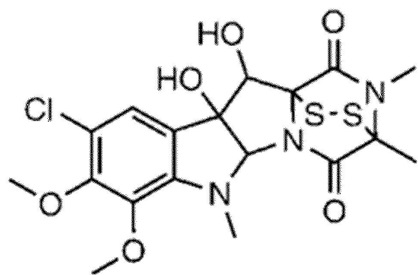
[0032]

[0033] [화학식 18]



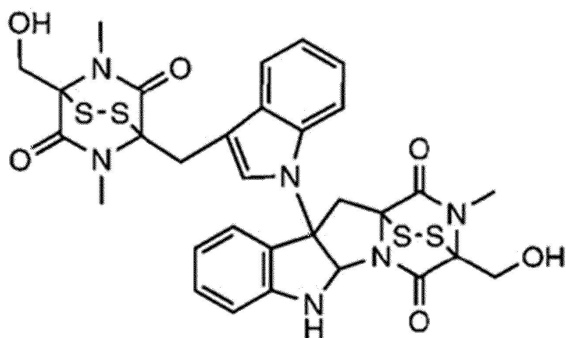
[0034]

[0035] [화학식 19]



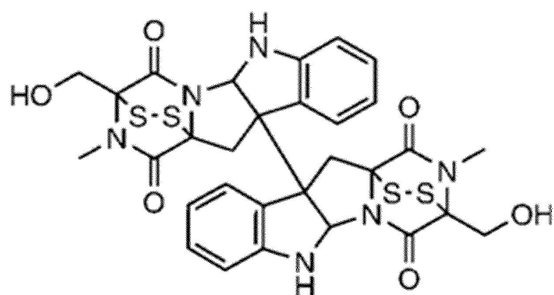
[0036]

[0037] [화학식 20]



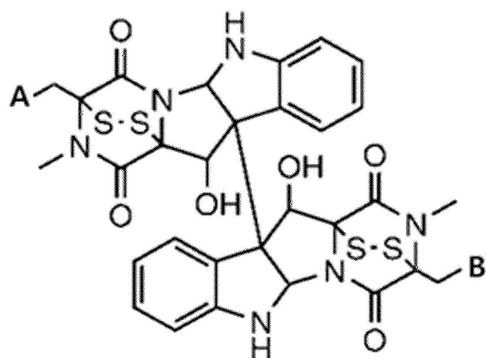
[0038]

[0039] [화학식 21]



[0040]

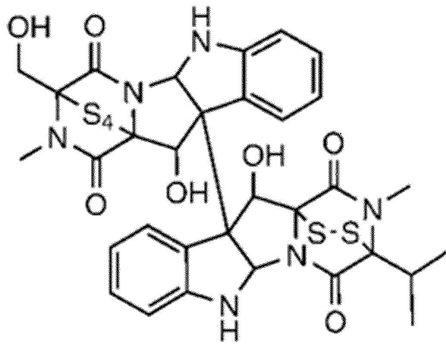
[0041] [화학식 22]



[0042]

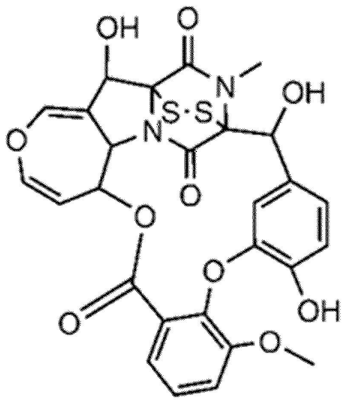
[0043] 여기서, A 및 B는 각각 독립적으로 수소, 메톡시 또는 히드록실기이다.

[0044] [화학식 23]



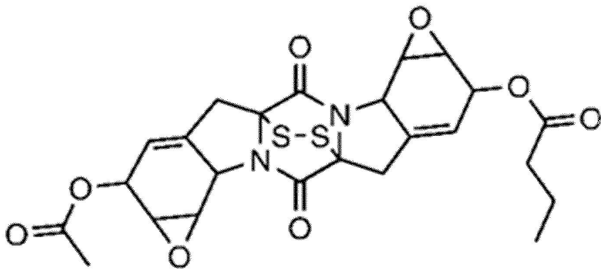
[0045]

[0046] [화학식 24]



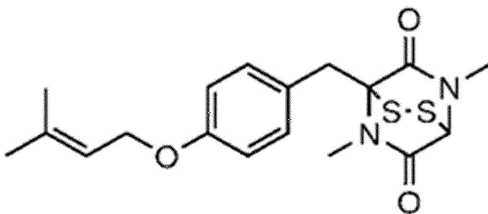
[0047]

[0048] [화학식 25]



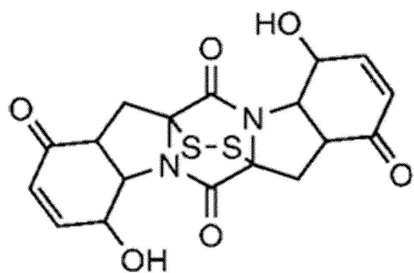
[0049]

[0050] [화학식 26]



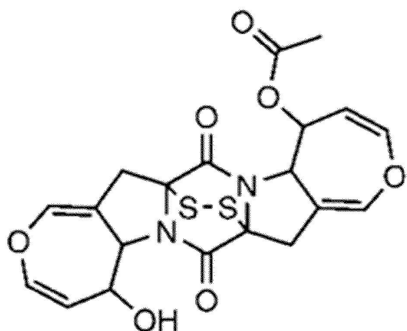
[0051]

[0052] [화학식 27]



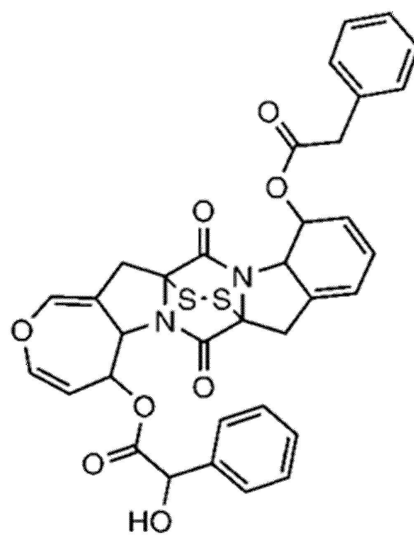
[0053]

[0054] [화학식 28]



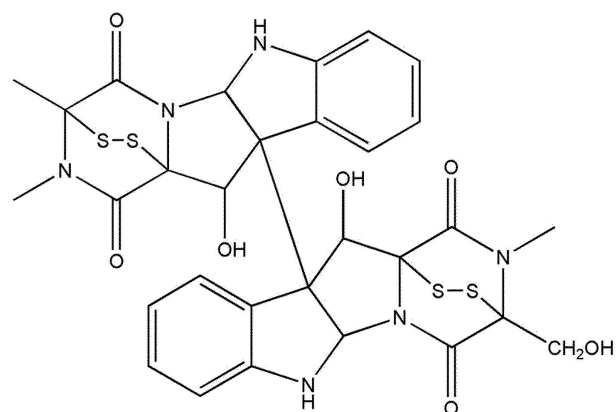
[0055]

[0056] [화학식 29]



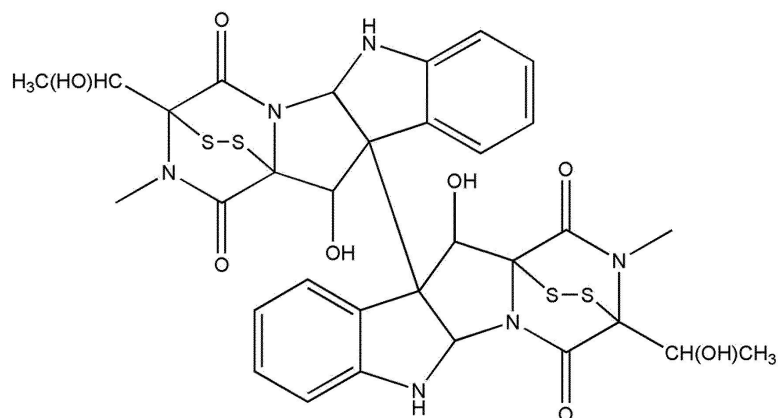
[0057]

[0058] [화학식 30]



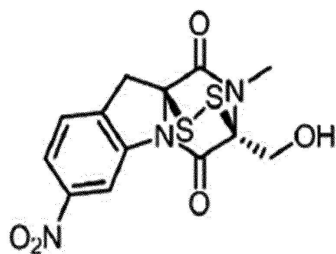
[0059]

[0060] [화학식 31]



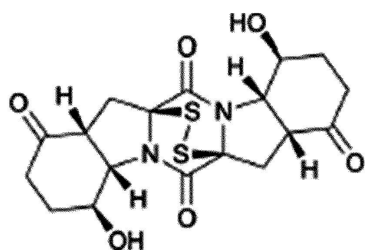
[0061]

[0062] [화학식 32]



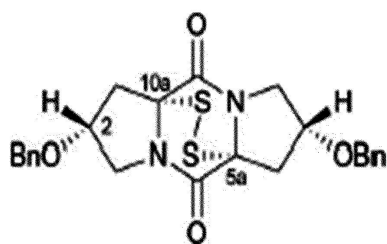
[0063]

[0064] [화학식 33]



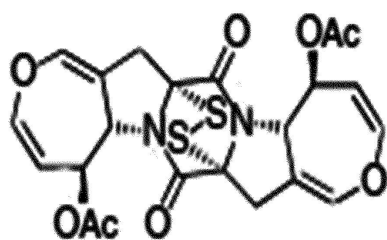
[0065]

[0066] [화학식 34]



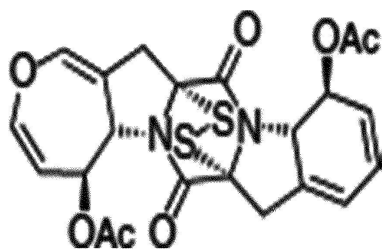
[0067]

[0068] [화학식 35]



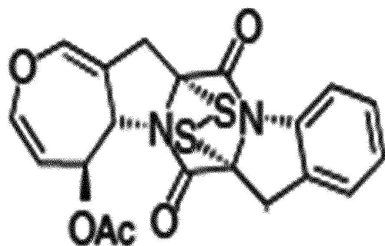
[0069]

[0070] [화학식 36]



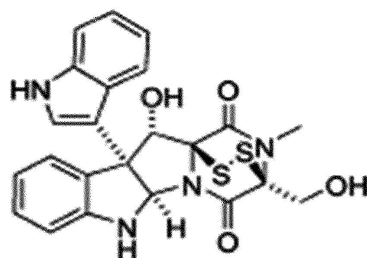
[0071]

[0072] [화학식 37]



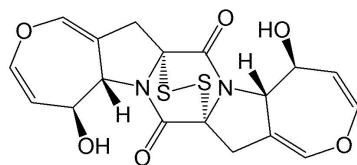
[0073]

[0074] [화학식 38]



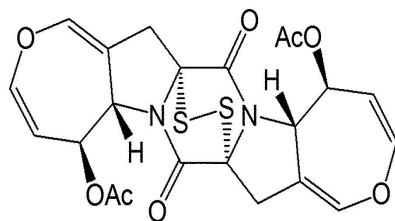
[0075]

[0076] [화학식 39]



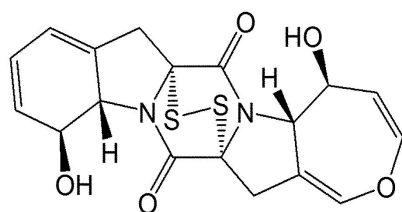
[0077]

[0078] [화학식 40]



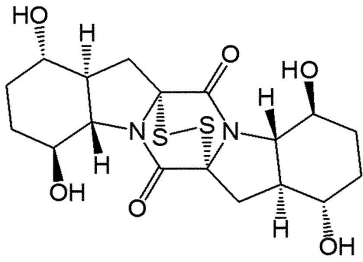
[0079]

[0080] [화학식 41]



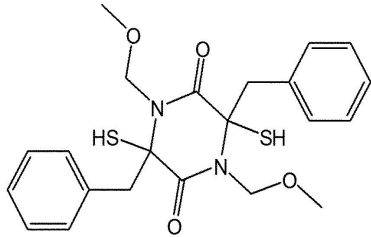
[0081]

[0082] [화학식 42]



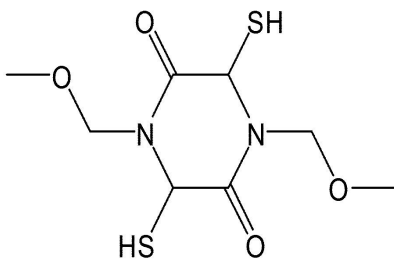
[0083]

[0084] [화학식 43]



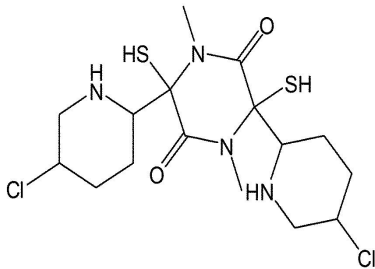
[0085]

[0086] [화학식 44]



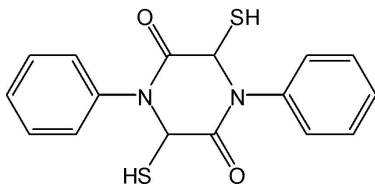
[0087]

[0088] [화학식 45]



[0089]

[0090] [화학식 46]



[0091]

[0092] 상기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 환원형 유도체는 천연 공급원으로부터 분리하거나, 천연 공급원으로부터 수득하여 화학적인 개질에 의해 제조하거나, 또는 공지의 제조방법을 참고하여 당업자가 화학적으로 합성하여 제조할 수 있다. 바람직하게, 상기 에피디티오디옥소피페라진 유도체는 당업계에 알려진 공지의 방법에 따라 균, 이의 배양액 또는 대사체 등으로부터 분리하여 사용하거나 본 발명의 실시예에서 기재하고 있는 제조방법으로 합성하여 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 유도체의 환원형 유도체는 동일한 치환기를 갖는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 합성을 위한 전구체로 사용될 수

있다. 상기 환원형 유도체로부터 에피디티오디옥소피페라진 유도체를 합성하는 구체적인 방법은 후술할 것이다.

[0093] 바람직하게, 상기 유도체의 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬 또는 알케닐, 알콕시벤질, 알콕시알킬 또는 벤즈히드릴(benzhydryl)일 수 있고, 구체적으로 상기 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소, 메틸, n-부틸, 알릴(allyl), 4-메톡시벤질, 3-메톡시프로필 또는 벤즈히드릴일 수 있다.

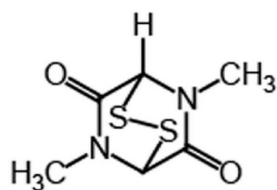
[0094] 보다 바람직하게, 상기 R_1 및 R_3 는 수소이고, R_2 및 R_4 는 서로 같고, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬 또는 알케닐; 알콕시벤질; 알콕시알킬 또는 벤즈히드릴, 구체적으로 메틸, n-부틸, 알릴, 4-메톡시벤질, 3-메톡시프로필 또는 벤즈히드릴일 수 있으며,

[0095] 상기 R_2 및 R_4 는 C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 그 예로 메틸, 프로필 또는 n-부틸이고, R_1 및 R_3 는 각각 독립적으로 수소; 또는 C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 그 예로 메틸, 프로필 또는 n-부틸일 수 있으며,

[0096] 상기 R_1 및 R_3 는 수소이고, R_2 및 R_4 는 각각 독립적으로 수소; 또는 알콕시벤질, 그 예로 4-메톡시벤질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

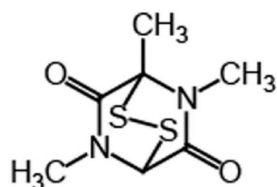
[0097] 가장 바람직하게 상기 유도체는 하기 화학식 7 내지 14로 표시되는 화합물 중 어느 하나인 것인 유도체 또는 이의 환원형 유도체일 수 있다.

[0098] [화학식 7]



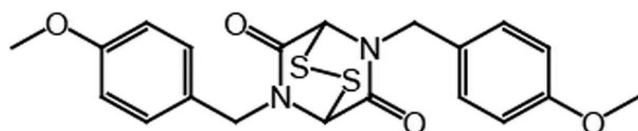
[0099]

[0100] [화학식 8]



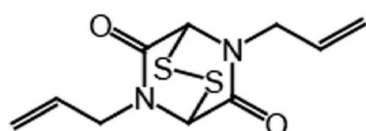
[0101]

[0102] [화학식 9]



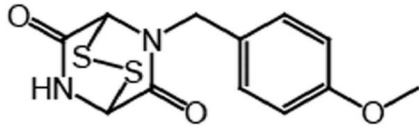
[0103]

[0104] [화학식 10]



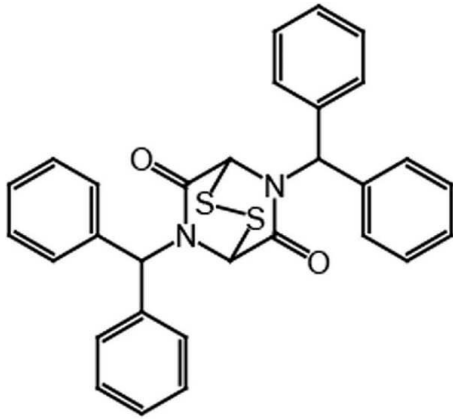
[0105]

[0106] [화학식 11]



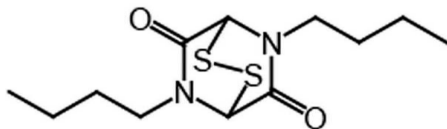
[0107]

[0108] [화학식 12]



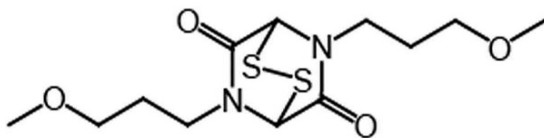
[0109]

[0110] [화학식 13]



[0111]

[0112] [화학식 14]

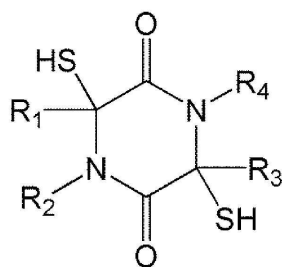


[0113]

[0114] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 입체 이성질체를 가지는 경우 이를 모두 포함한다.

[0115] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 산화반응에 의해 하기 화학식 2로 표시되는 디머캡토피페라진디온 (dimercaptopiperazinedione) 유도체로부터 분자 내 이황가교결합을 형성하는 단계를 포함하는, 세포 내 침투성이 향상되고 세포 내에서 환원되어 2-Cys-Prx 활성을 모방하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0116] [화학식 2]



[0117]

[0118] 상기 화학식 2에서, R₁ 내지 R₄는 상기에서 정의한 바와 같다.

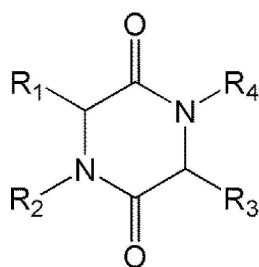
[0119] 본 발명의 에피디티오디옥소피페라진 유도체의 하나의 특징은 세포 내에서 2-Cys-Prx 활성을 모방하는데 있다. 상기 "2-Cys-Prx"는 세포 내에서 과산화수소, 퍼옥시나이트라이트(peroxy nite) 및 다른 히드로과산화물(hydroperoxide)을 환원시키는 퍼옥시다제 활성을 통해 세포를 보호하는 역할을 하는 티올-특이적 항산화단백질(thiol-specific antioxidant protein)이다. 이의 기능성 단위는 동종이합체로, 상기 효소의 활성화에 중요한 작용을 하는 고유한 분자 내 산화환원 활성 이황화물 중심을 갖는다. 환원상태에서 이합체의 각 시스테인은 티올기로 존재한다. 한편, 과산화물과 반응시 2-Cys-Prx의 과산화(peroxidatic) 시스테인은 술펜산 중간체(sulfenic acid intermediate)로 산화하여 티올기를 유지하는 이합체의 다른 소단위의 시스테인과 구분되며, 상기 중간체의 술펜산기와 티올기는 탈수축합하여 분자 내 이황화물교결합을 형성한다. 예컨대, 세포 내에서 2-Cys-Trx는 두 개의 티올기를 포함하는 환원형에서 상기 두 개의 티올기가 서로 분자 내 이황화물교결합을 형성하는 산화형으로 산화하면서 세포 내 과산화물을 환원시킨다. 이때, 분자 내 이황화물교결합을 포함하는 산화형의 2-Cys-Prx는 티오레독신(thioredoxin; Trx) 및 티오레독신 환원효소(Trx reductase; TR); AhpF(alkyl hydroperoxide reductase); 트립파노치온 환원효소(trypanothione reductase), 트립파노치온(trypanothione) 및 트립파레독신(tryparedoxin) 또는 리포아미드 탈수소효소(lipoamide dehydrogenase), SucB(dihydrolipoyltranssuccinylase) 및 AhpD 등을 포함하는 산화환원 시스템에 의해 두 개의 티올기를 갖는 활성형인 환원형으로 전환될 수 있다.

[0120] 본 발명의 에피디티오디옥소피페라진 유도체의 다른 특징은 분자 내 이황화물교결합(intramolecular disulfide bridge)의 존재에 있다. 이러한 특징적인 화학적 구조는 세포적 섭취에 관여하므로, 일단 상기 화합물들이 세포 내로 도입되면 예상보다 훨씬 더 높은 세포 내 농도로 축적되어 세포 내부에 구속된다(P. H. Bernardo *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.*, 278: 46549). 이러한 이유로 본 발명에 따른 상기 에피디티오디옥소피페라진 유도체는 내재적 세포 독성을 피할 수 있는 매우 낮은 농도로 투여하더라도 효과적으로 혈관질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0121] 상기 기술한 바와 같이 본 발명의 에피디티오디옥소피페라진 유도체는 분자 내 이황화물교결합을 포함하도록 고안되어 세포 내로의 용이하게 도입될 수 있고, 세포 내에서는 세포 내 산화환원 시스템에 의해 두 개의 티올기를 갖는 분자로 빠르게 전환되어 과산화물을 환원시킬 수 있으므로, 세포 내 2-Cys-Prx의 활성을 효과적으로 모방할 수 있다. 이에 제한되지 않으나, 상기 세포 내 산화환원 시스템은 티오레독신 및 티오레독신 환원효소를 포함하는 산화환원 시스템인 것이 바람직하다.

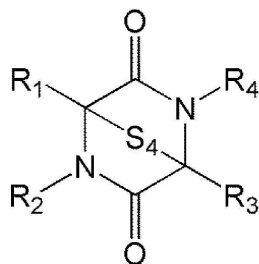
[0122] 상기 화학식 2로 표시되는 디머캅토피페라진디온 유도체는 하기 화학식 3으로 표시되는 피페라진디온(piperazinedione) 유도체를 황(S)과 LiHMDS(lithium bis(trimethylsilyl)amide) 또는 NaHMDS와 반응시켜 하기 화학식 4로 표시되는 4개의 황원자를 포함하는 고리구조를 포함하는 중간체를 제조하는 단계 및 상기 중간체를 상기 4개 황원자를 포함하는 고리구조로부터 2개의 티올기를 형성하도록 환원시킴으로써 제조할 수 있다.

[0123] [화학식 3]



[0124]

[0125] [화학식 4]

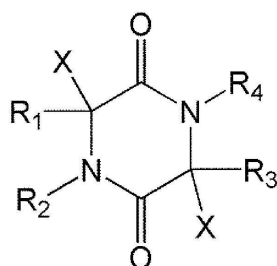


[0126]
[0127] 상기 화학식 3 및 4에서 R₁ 내지 R₄는 상기에서 정의한 바와 같다.

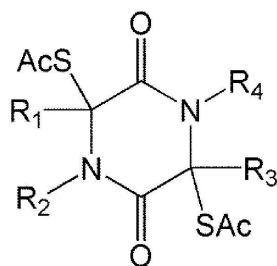
[0128] 이때 상기 환원반응은 당업계에 공지된 반응을 제한없이 이용하여 수행될 수 있으며, 바람직하게는 소듐 боро하이드라이드 또는 리튬 알루미늄 하이드라이드와 같은 하이드라이드 계열의 환원제를 사용하여 수행될 수 있다. 보다 바람직하게는 소듐 боро하이드라이드를 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0129] 또한, 상기 화학식 2로 표시되는 디머캅토피페라진디온 유도체는 하기 화학식 5로 표시되는 할로겐원자가 치환된 피페라진디온 유도체를 티오아세트산 알칼리금속염(MSAC)과 반응시켜 티오아세테이트기를 포함하는 하기 화학식 6으로 표시되는 중간체를 제조하는 단계 및 상기 중간체를 산용액과 반응시켜 황원자에 결합된 아세틸기를 수소원자로 치환함으로써 두 개의 티올기를 포함하도록 제조할 수 있다.

[0130] [화학식 5]



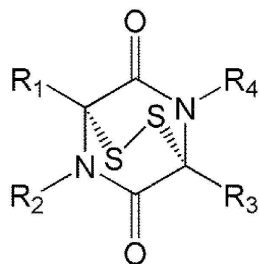
[0131]
[0132] [화학식 6]



[0133]
[0134] 상기 알칼리금속염은 나트륨 또는 칼륨염이고, X는 F, Cl, Br 또는 I와 같은 할로겐원소이며, R₁ 내지 R₄는 상기에서 정의한 바와 동일하다.

[0135] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 혈관질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 및 상기 조성물을 혈관질환 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈관질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0136] [화학식 1]



[0137]

[0138] 상기 화학식 1에서 R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소, 할로젠원소, 히드록시기, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 히드록시알킬, C1 내지 C6의 직쇄 또는 분지쇄 퍼플루오르알킬기, 치환된 또는 비치환된 아릴기, 치환된 또는 비치환된 퍼플루오르아릴기, 고리에 헤테로원소로써 산소, 질소 또는 황원자를 포함하는 치환된 또는 비치환된 헤테로아릴기; 또는 R₁과 R₂, 및 R₃과 R₄는 각각 독립적으로 이들이 부착된 탄소원자와 함께 치환된 또는 비치환된 C3-C6 사이클로알킬기를 형성하거나; 이들이 부착된 탄소원자 및 추가의 탄소 또는 헤테로원자와 함께, 5 내지 8개의 고리 원자를 갖는, 치환된 또는 비치환된 헤테로사이클릭 고리를 형성하고, 여기에서 헤테로사이클릭 고리의 1 내지 2개의 고리 원자는 N, O 및 S로부터 선택되는 것일 수 있다.

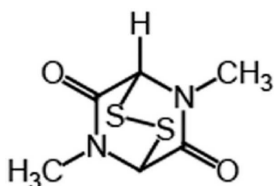
[0139] 본 발명의 유도체들은 공통적으로 분자 내 이황가교결합을 포함한다. 이황가교결합은 상기 유도체의 세포 내 도입을 용이하게 하며 세포 내에 도입된 화합물은 빠르게 두 개의 티올기로 환원되어 세포 내 활성을 나타낸다. 따라서, 상기 활성자리로의 기질의 접근이 용이하도록 치환기에 의한 가리움을 배제할 수 있도록 분자를 고안하는 것이 요구된다. 그러므로, 상기 유도체의 피페라진 고리에 결합된 치환기들은 치환기 자체의 부피감 또는 회전에 의한 자리차지에 의해 입체적으로 이황가교결합을 가리지 않도록 크기가 작은 것이거나, 회전하지 않도록 서로 연결되어 고리를 형성하는 것이 바람직하다.

[0140] 따라서, 상기 화학식 1로 표시되는 유도체에서 상기 R₁ 및 R₃은 수소원자이고, R₂ 및 R₄는 각각 독립적으로 수소, C1 내지 C6의 알킬, 알케닐, 그 쇄의 중간에 산소, 질소 또는 황의 헤테로원자를 포함하는 알킬기, 알콕시벤질 또는 벤즈히드릴일 수 있으며, 보다 바람직하게는 R₁ 및 R₃은 수소원자이고, R₂ 및 R₄는 각각 독립적으로 수소, 또는 C1 내지 C6의 알킬 또는 알케닐일 수 있으며; 또는 R₁ 내지 R₃은 수소원자이고, R₄는 C1 내지 C6의 알킬, 알케닐, 그 쇄의 중간에 산소, 질소 또는 황의 헤테로원자를 포함하는 알킬기, 또는 4-메톡시벤질과 같은 치환된 벤질기 또는 비치환된 벤질기일 수 있으며; R₁, R₂ 및 R₄는 C1 내지 C6의 알킬기, R₃은 수소일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0141] 또는 상기 R₁과 R₂, 또는 R₃과 R₄ 중 하나 이상의 쌍이 치환된 또는 비치환된 사이클로알킬기 또는 헤테로사이클릭 고리를 형성하는 것일 수 있다.

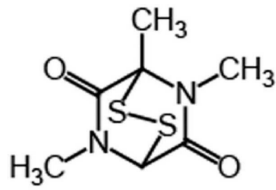
[0142] 상기 조성물에 포함되는 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 7 내지 31로 표시되는 화합물 중 어느 하나인 것일 수 있다.

[0143] [화학식 7]



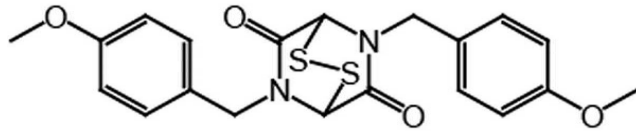
[0144]

[0145] [화학식 8]



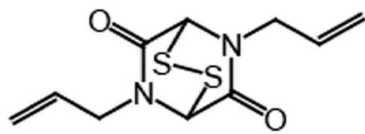
[0146]

[0147] [화학식 9]



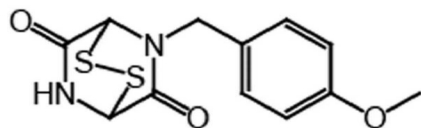
[0148]

[0149] [화학식 10]



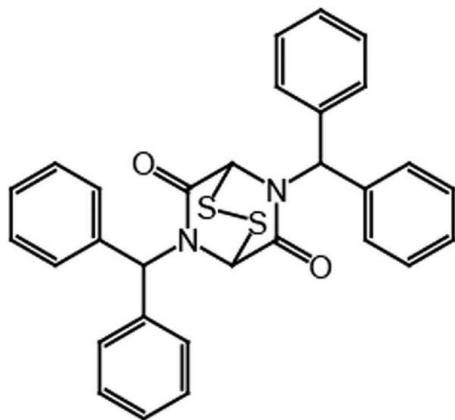
[0150]

[0151] [화학식 11]



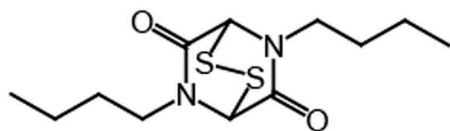
[0152]

[0153] [화학식 12]



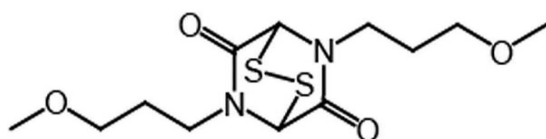
[0154]

[0155] [화학식 13]



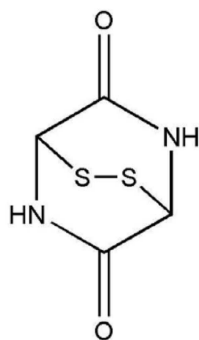
[0156]

[0157] [화학식 14]



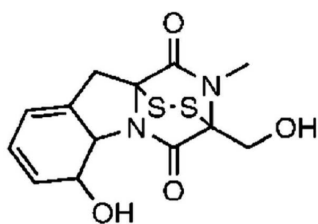
[0158]

[0159] [화학식 15]



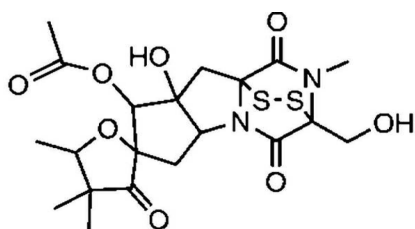
[0160]

[0161] [화학식 16]



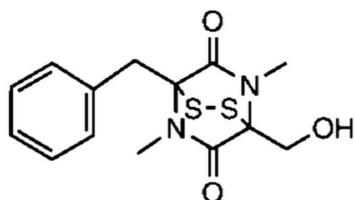
[0162]

[0163] [화학식 17]



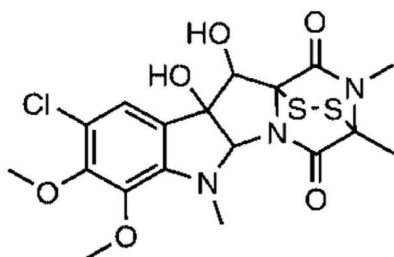
[0164]

[0165] [화학식 18]



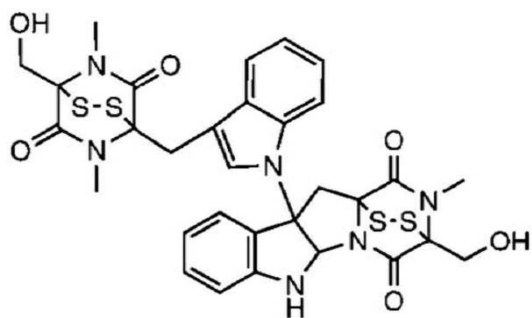
[0166]

[0167] [화학식 19]



[0168]

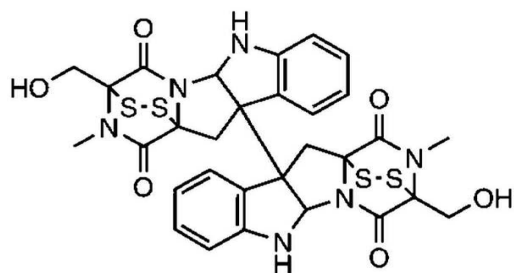
[0169] [화학식 20]



[0170]

[0171]

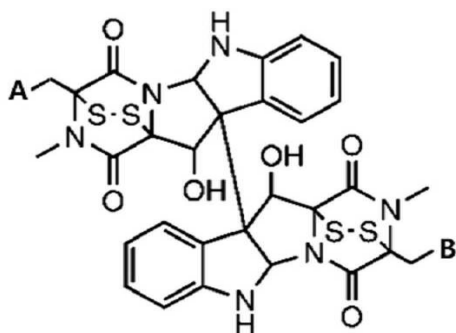
[화학식 21]



[0172]

[0173]

[화학식 22]



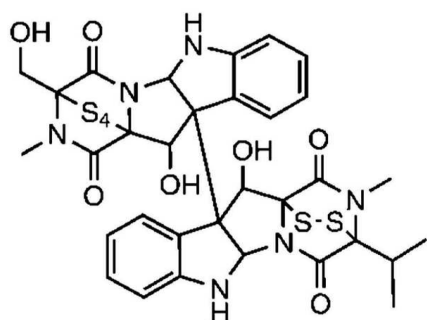
[0174]

[0175]

여기서, A 및 B는 각각 독립적으로 수소; 메톡시; 또는 히드록실기임.

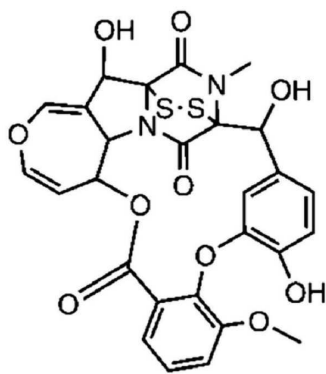
[0176]

[화학식 23]



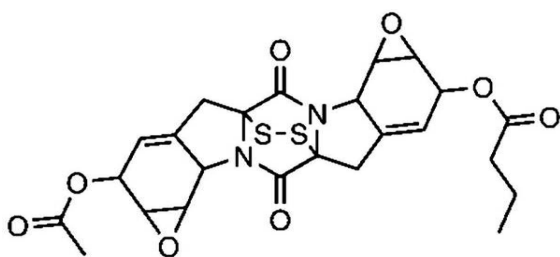
[0177]

[0178] [화학식 24]



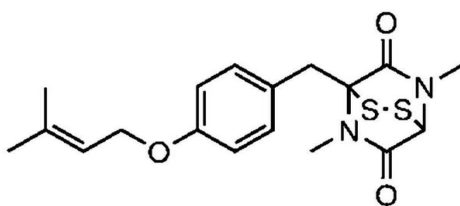
[0179]

[0180] [화학식 25]



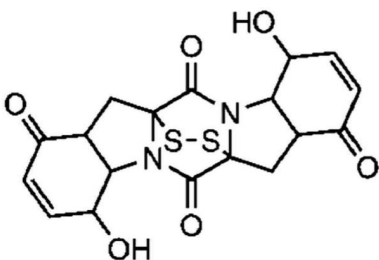
[0181]

[0182] [화학식 26]



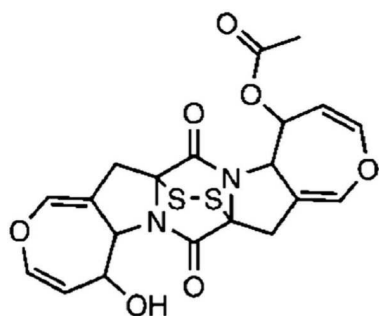
[0183]

[0184] [화학식 27]



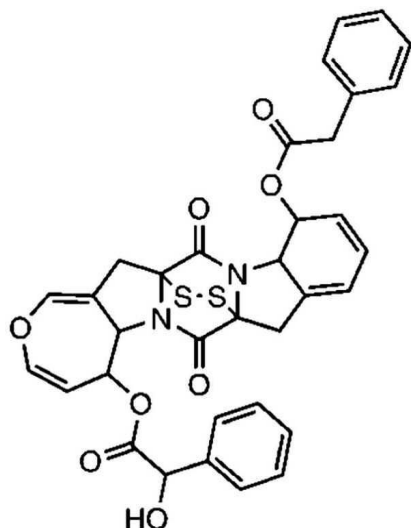
[0185]

[0186] [화학식 28]



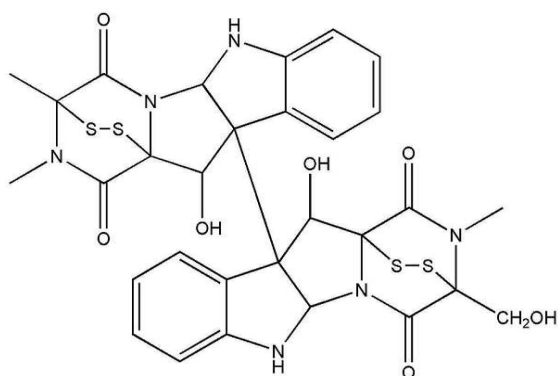
[0187]

[0188] [화학식 29]



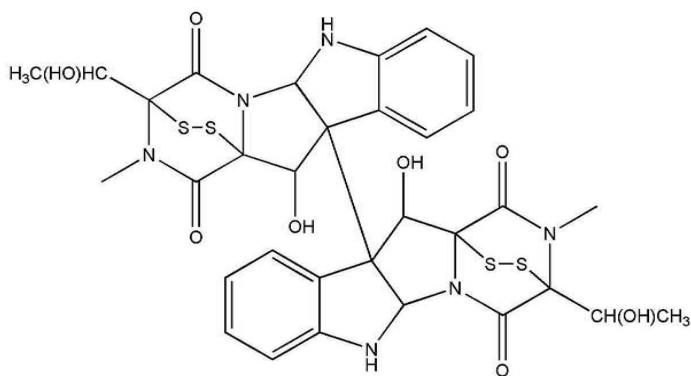
[0189]

[0190] [화학식 30]



[0191]

[0192] [화학식 31]



[0193]

[0194] 상기 화학식 16의 화합물은 글리오톡신(gliotoxin;GT)이라고 불리는 대표적인 ETP 화합물로서 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 트리코더마 비렌스(*Trichoderma virens*), 페니실리움 종(*Penicillium spp.*) 또는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 등의 균, 이의 배양액, 대사체, 또는 이차대사체로부터 분리될 수 있다[Kirby and Robins, 1980, *The Biosynthesis of Mycotoxins*, New York: Academic Press; Shah and Larsen, 1991, *Mycopathologia*, 116: 203-208].

[0195] 상기 화학식 17의 화합물은 시로데스민(sirodesmin)이라 불리는 ETP 화합물로 렙토스페리아 마쿠란스(*Leptosphaeria maculans*) 또는 시로데스미움 디베르sum(*Sirodesmium diversum*)등의 균, 이의 배양액, 대사체, 또는 이차대사체로부터 분리될 수 있다[Curtis *et al.*, 1977, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 180-189; Ferezo *et al.*, 1977, *Nouv. J. Chim.*, 1: 327-334].

- [0196] 상기 화학식 18의 화합물은 히알로덴드린(hyalodendrin)이라 불리는 ETP 화합물로 히알로덴드론 아종(*Hyalodendron sp.*)등의 균, 이의 배양액, 대사체, 또는 이차대사체로부터 분리될 수 있다[Stillwell *et al.*, 1974, *Can. J. Microbiol.*, 20: 759-764].
- [0197] 상기 화학식 19의 화합물은 스포리데스민 A(sporidesmin A)라 불리는 ETP 화합물로 피토마이시즈 차타룸(*Pithomyces chartarum*)등의 균, 이의 배양액, 대사체, 또는 이차대사체로부터 분리될 수 있다[Kirby and Robins, 1980, *The Biosynthesis of Mycotoxins*, New York: Academic Press].
- [0198] 상기 화학식 20의 화합물은 키토민(chetomin)이라 불리는 ETP 화합물로 키토미움 글로보숨(*Chaetomium globosum*)으로부터 분리될 수 있다[Sekita *et al.*, 1981, *Can. J. Microbiol.*, 27: 766-772].
- [0199] 상기 화학식 21의 화합물은 키토신(chetocin)이라 불리는 ETP 화합물로 키토미움 종(*Chaetomium spp.*)으로부터 분리될 수 있다[Sekita *et al.*, 1981, *Can. J. Microbiol.*, 27: 766-772].
- [0200] 상기 화학식 22의 화합물은 베르티실린스(verticillins)라 불리는 ETP 화합물로 베르티실리움 종(*Verticillium spp.*) 또는 페니실리움 아종(*Penicillium sp.*) 으로부터 분리될 수 있다[Byeng *et al.*, 1999, *Nat. Prod. Lett.*, 13: 213-222; Joshi *et al.*, 1999, *J. Nat. Prod.*, 62: 730-733; Kirby and Robins, 1980, *The Biosynthesis of Mycotoxins*, New York: Sekita *et al.*, 1981, *Can. J. Microbiol.*, 27: 766-772]. 상기 베르티실린스는 베르티실린스 A, 베르티실린스 13, 베르티실린스 D, 베르티실린스 E 및 베르티실린스 F를 모두 포함한다.
- [0201] 상기 화학식 23의 화합물은 렙토신(leptosin)이라 불리는 ETP 화합물로 렙토스페리아 아종(*Leptosphaetia sp.*) 으로부터 분리될 수 있다[Takahashi *et al.*, 1994, *J. Antibiot.*, 47: 1242-1249].
- [0202] 상기 화학식 24의 화합물은 에메스트린(emestrin)이라 불리는 ETP 화합물로 아스페르길루스 종(*Aspergillus spp.*)로부터 분리될 수 있다[Seya *et al.*, 1986, *Chem. Pharm. Bull.*, 34: 2411-2416].
- [0203] 상기 화학식 25의 화합물은 스카브로신(scabrosin)이라 불리는 ETP 화합물로 크산토파르멜리아 스카브로사(*Xanthoparmelia scabrosa*)로부터 분리될 수 있다[Ernst-Russell *et al.*, 1999, *Aust. J. Chem.*, 52: 279-283; Moerman *et al.*, 2003, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 190: 232-240].
- [0204] 상기 화학식 26의 화합물은 디티오실바틴(dithiosilvatin)이라 불리는 ETP 화합물로 아스페르길루스 실바티쿠스(*Aspergillus silvaticus*)로부터 분리될 수 있다[Kawahara *et al.*, 1987, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2099-2101].
- [0205] 상기 화학식 27의 화합물은 에피코라진(epicorazine)이라 불리는 ETP 화합물로 스테럼 히르수툼(*Stereum hirsutum*), 에피코쿰 푸르푸라센스(*Epicoccum purpurascens*) 또는 에피코쿰 니그럼(*Epicoccum nigrum*)으로부터 분리될 수 있다[Deffieux *et al.*, 1977, *Acta Crystallogr.*, B33: 1474-1478; Kleinwachter *et al.*, 2001, *J. Antibiot.*, 54: 521-525].
- [0206] 상기 화학식 28의 화합물은 아라노틴(Aranotin)이라 불리는 ETP 화합물로 아라크니오투스 아우리스(*Arachniotus aureus*) 또는 아스페르길루스 테러스(*Aspergillus terreus*)로부터 분리될 수 있다[Neuss *et al.*, 1968, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 8: 213-219].
- [0207] 상기 화학식 29의 화합물은 에메탈리신(emethallicin)이라 불리는 ETP 화합물로 아스페르길루스 헤테로탈리쿠스(*Aspergillus heterothallicus*)로부터 분리될 수 있다[Kawahara *et al.*, 1989, *Chem. Pharm. Bull.*, 37: 2592-2595].
- [0208] 상기 화학식 30의 화합물은 베르티실린스(verticillins)라 불리는 ETP 화합물로 베르티실리움 종(*Verticillium spp.*)으로부터 분리될 수 있다[Byeng *et al.*, 1999, *Nat. Prod. Lett.*, 13: 213-222; Joshi *et al.*, 1999, *J. Nat. Prod.*, 62: 730-733; Kirby and Robins, 1980, *The Biosynthesis of Mycotoxins*, New York: Sekita *et al.*, 1981, *Can. J. Microbiol.*, 27: 766-772].
- [0209] 상기 화학식 31의 화합물은 글리오클라디움 카테누라툼(*Gliocladium catenulatum*)으로부터 분리될 수 있다[Byeng *et al.*, 1999, *Nat. Prod. Lett.*, 13: 213-222; Joshi *et al.*, 1999, *J. Nat. Prod.*, 62: 730-733; Kirby and Robins, 1980, *The Biosynthesis of Mycotoxins*, New York: Sekita *et al.*, 1981, *Can. J. Microbiol.*, 27: 766-772].

- [0210] 상기 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들은 천연 공급원으로부터 분리하거나, 천연 공급원으로부터 수득하여 화학적인 개질에 의해 제조하거나, 또는 공지의 제조방법을 참고하여 당업자가 화학적으로 합성하여 제조하거나, 상업적으로 구입하여 사용할 수 있다. 바람직하게, 상기 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들은 당업계의 공지의 방법에 따라 균, 이의 배양액 또는 대사체 등으로부터 분리하여 사용하거나 본 발명의 실시예에서 기재하고 있는 제조방법으로 합성하여 사용할 수 있다.
- [0211] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 치환기 모두가 수소원자인 A1; 각각 2 내지 3개의 메틸기가 치환된 A2 및 A3; 피페라진고리의 두 개의 질소원자에 2-프로페닐기가 치환된 A5 및 부틸기가 결합된 A8이 각각 PDGF에 의해 유도되는 혈관평활근세포의 증식 및 이동을 억제하면서 VEGF에 의해 유도되는 혈관내피세포의 증식 및 이동을 향상시키는 우수한 활성을 나타내었다. 한편, 하나의 메톡시벤질기가 치환된 A6 및 헤테로원자를 포함하여 5개 원자로 구성된 메톡시프로필이 2개 치환된 A9의 경우 상대적으로 중간정도의 활성을 나타내며, 두 개의 메톡시벤질기가 치환된 A4 및 두 개의 벤즈히드릴기가 치환된 A7의 경우 낮은 활성을 나타내었다. 이로부터 비교적 작은 크기의 치환기 예컨대, C1 내지 C4의 알킬 또는 알케닐기로 치환된 유도체의 경우 치환기의 수에 무관하게 우수한 활성을 나타낼 수 있으나, 상대적으로 크기가 큰 치환기를 갖는 유도체의 경우 활성이 다소 감소하나, 치환기의 종류 및/또는 갯수를 조절하여 활성을 조절할 수 있음을 유추할 수 있다.
- [0212] 본 발명의 에피디티오디옥소피페라진 유도체는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 화합물들은 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합하거나 집합으로 사용될 수 있다.
- [0213] 본 발명에서 사용된 용어, "약학적으로 허용가능한 염"은 상기 화합물들의 원하는 생물학적 및/또는 생리학적 활성을 보유하고 있고, 원하지 않는 독물학적 효과는 최소한으로 나타내는 모든 염을 의미한다. 본 발명에 있어서는 분자내 이황화교를 포함하는 디케토피페라진 고리를 유지하는 한 염의 종류에 제한 없이 사용 가능하다. 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜(예, 글리콜 모노메틸 에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 히드로브롬산, 인산, 질산, 황산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루코론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.
- [0214] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [0215] 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 유도체들의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 모두 포함한다. 예를 들어 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.
- [0216] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 고혈압, 협심증, 심근경색, 불안정성 협심증과 같은 허혈성

관상동맥질환, 중풍과 같은 대뇌동맥폐색, 동맥경화증, 버거스병과 같은 말초동맥폐색질환, 혈전색전증, 당뇨병성족부병변, 정맥성폐양, 심부정맥혈전증, 경동맥의 동맥경화증, 혈관연축, 동맥염 및 혈관재협착과 같이 혈관평활근의 비후 및/또는 혈관내피의 손실로 인해 유발되는 혈관질환의 예방 또는 치료에 제한 없이 사용될 수 있다. 혈관이식, 혈관절단, 동맥경화, 혈관 내 지방축적, 고혈압, 혈관염증, 혈관 성형술 등에 의해 유발되는 혈관재협착의 예방 또는 치료에 제한 없이 사용될 수 있다. 혈관재협착이 발생하는 이유는 명확하게 밝혀진 바는 없으나, 여러 가지 이유로 인한 혈관손상 또는 혈관 성형술 시술시 삽입되는 장치에 의한 혈관내피손상 후 이를 회복시키기 위한 기전으로 주위 세포에서 분비되는 성장인자 및/또는 사이토카인으로 인해 혈관평활근세포가 비정상적으로 이동하고 증식하여 혈관내막 비후를 야기하기 때문인 것으로 알려져 있다. 상기 혈관은 경동맥, 관상동맥, 말초동맥, 신동맥 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

- [0217] 상기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물은 혈관평활근세포의 증식이나 이동을 억제하면서 동시에 혈관내피세포의 증식이나 이동을 촉진시키는 것을 특징으로 한다.
- [0218] 상기 에피디티오디옥소피페라진 유도체는 2-Cys-Prx 활성을 모방하는 특징을 갖는 것이 바람직하다. "PrxII(peroxiredoxin II 또는 Prx2로 병기)"는 세포 내 과산화수소를 환원시키는 퍼옥시다제 2-Cys-Prx 중 하나로, 혈관평활근세포에서 PDGF에 의해 생성되는 과산화수소를 환원시켜, PDGFR β -PCL γ 1에서 자리특이적 방식으로 일어나는 인산화 억제를 통해 세포신호전달 증폭을 억제하는 작용을 한다. 이러한 기작을 통해 상기 PrxII는 손상된 혈관에서 평활근세포의 이동 및 증식을 억제하고 혈관내막의 비후를 억제하는 활성을 갖는다(M. H. Choi *et al.*, 2005, *Nature*, 435: 347). 반면 혈관내피세포에서는 PrxII가 산화적 비활성화로부터 VEGFR2를 보호하여 VEGF-유도 신호전달을 활성화한다는 사실이 보고된 바 있다(D. H. Kang *et al.*, 2011, *Mol. Cell.*, 44: 656). 본 발명자들은 PrxII siRNA를 주입하여 PrxII를 녹아웃시킨 세포 및 혈관손상 동물모델을 이용하여 본 발명에 다른 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들이 PrxII의 세포기능을 대신할 수 있음을 확인하였다.
- [0219] 본 발명의 일 양태에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 속하는 대표적인 화합물인 글리오톡신, 키토신, 키토민 및 화학식 7 내지 15로 표시되는 화합물, 즉 에피디티오디옥소피페라진 구조를 가지는 세포 내 2-Cys-Prx 활성을 모방할 수 있고 세포 내 도입능이 향상됨을 확인하였고, 또한, 이러한 화합물들이 PDGF-유도 혈관평활근세포의 이동 및 증식을 억제하는 동시에 VEGF-유도 혈관내피세포의 이동 및 증식을 촉진할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 상기 화학식 1로 표시되는 다른 화합물들 역시 에피디티오디옥소피페라진 구조를 공유하므로, 혈관내피세포의 이동 및 증식을 촉진하고, 혈관평활근세포의 이동 및 증식을 억제함으로써 혈관질환, 특히 혈관재협착의 치료 효과를 가지고 올 수 있다.
- [0220] 본 발명에 따른 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되거나 무균성이고, 물, 완충제, 등장제 등일 수 있고 상기 용액은 멸균되거나 무균성이며, 또는 동물 또는 사람에게 적용할 경우, 알레르기 또는 기타 유해한 반응을 일으키지 않는, 당해 기술 분야의 숙련자에게 공지된 기타 성분을 포함할 수 있다.
- [0221] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 모든 용매, 분산 매질, 피복물, 항균제, 항진균제 및 등장제 등을 포함한다. 약학적 활성 물질용으로 상기 매질 및 제제를 사용하는 것은 당해 기술 분야에 익히 알려져 있다. 활성 성분과 비혼화성인 통상적인 매질 또는 제제 이외에, 치료학적 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 또한, 보충성 활성 성분을 당해 조성물에 혼입시킬 수도 있다.
- [0222] 상기 조성물은 액제, 유제, 현탁제 또는 크림제 등의 제형으로 제조할 수 있으며, 비경구로 사용될 수 있다. 상기 조성물의 사용량은 혈관질환 예방 또는 치료에 대한 통상적인 사용량으로 사용할 수 있고, 환자의 연령, 성별, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 병용되는 약물 등에 따라 달리 적용되는 것이 바람직하다.
- [0223] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 혈관질환을 억제시키거나 발병을

지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 혈관질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0224] 본 발명에서, 용어 "개체"란 혈관질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 혈관질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 혈관질환 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0225] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적으로 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0226] 상기 본 발명의 약학적 조성물과 병용할 수 있는 공지의 치료제로는 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 시롤리무스(silormus) 등을 예시할 수 있고, 공지의 치료제의 약학적 유효량은 당업계에 공지되어 있으며 증상의 정도, 본 발명의 조성물과의 병용 투여 등의 제반 조건을 고려하여 처치의가 그 양을 조절할 수 있다. 이와 같이 공지의 치료제를 병용 투여함으로써, 본 발명의 조성물에 의해 공지의 치료제의 부작용 등을 경감시킬 수 있을 뿐만 아니라, 상승적인 치료효과도 기대할 수 있다. 이들 공지의 치료제는 경우에 따라 복합제제로 또는 동시에 투여되거나, 또는 본 발명의 조성물과 시간 간격을 두고 투여될 수 있다.

[0227] 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 이에 제한되는 것은 아니나, 비경구투여가 바람직하며, 보다 바람직하게는 병변에 국소 투여할 수 있으며, 약물 국소 투여를 위해 이중 풍선카테터, 디스패치 또는 미세공풍선(microporous balloon) 등이 이용될 수 있으며, 특히 장기간 약물을 전달하기 위해 스텐트 또는 서방성 미세입자를 사용할 수 있다. 가장 바람직하게는 본 발명의 조성물을 스텐트 내에 도포하여 협착 부위에 직접 투여할 수 있다.

[0228] 또한, 본 발명은 상기 혈관질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 포함하는 국소투여용 약물전달 장치를 제공한다. 상기 국소투여용 약물전달 장치는 이중 풍선카테터, 디스패치, 미세공풍선, 스텐트 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않고, 바람직하게는 스텐트일 수 있다.

[0229] 본 발명에서 "스텐트"라 함은 상기에서 언급한 바와 같이 관내 적용(endoluminal application), 예를 들면 혈관 내에 적용하기 위한 일반적인 장치를 의미하는 것으로, 혈액의 흐름이 순조로워야 되는 부위에 질환이 발생하여 그 흐름에 장애가 발생하였을 때, 외과적으로 개복 수술을 하지 않고 X-선 투시 하에서 좁아지거나 막힌 혈관부위에 삽입하여 혈액의 흐름을 정상화시키는 원통형의 의료용 재료를 의미한다. 예를 들어 혈관 내 스텐트(vascular stent)는 Eric J. Topol 저 "Textbook of Interventional Cardiology"(Saunders Company, 1994)에 기술되어 있다. 바람직하게는 서방형 약물방출형 스텐트이다.

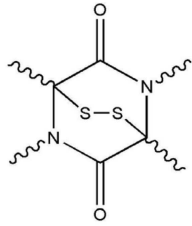
[0230] 상기 스텐트에 본 발명의 약학적 조성물을 코팅하는 방법으로는 본 발명의 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 통상의 코팅방법을 적용할 수 있고, 예를 들어 침염코팅(dip-coated)과 고분자와 함께 코팅(polymer coated)하는 방법이 있으며, 침염코팅법은 가장 간단한 코팅 방법이며, 약학 조성물만이 코팅되기 때문에 약물만의 생물학적 효과를 관찰하기에 용이하나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 본 발명에 따른 조성물이 천천히 방출될 수 있도록 상기 조성물을 약물방출형 스텐트에 고분자 물질과 혼합한 후 코팅하여 본 발명의 스텐트를 제조할 수 있다. 약물방출형 스텐트에 사용될 수 있는 고분자 물질은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 폴리우레탄, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, PLLA-폴리-글리콜산 공중합체(PLGA), 폴리카프로락톤, 폴리-(히드록시부티레이트/히드록시발레레이트)공중합체, 폴리비닐피롤리돈, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리(2-히드록시에틸메타크릴레이트), 폴리(에테르우레탄 우레아), 실리콘, 아크릴, 에폭사이드, 폴리에스테르, 우레탄, 파알렌, 폴리포스파진 고분자, 플루오로 고분자, 폴리아마이드, 폴리올레핀 및 이들의 혼합물 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0231] 스텐트는 폴리사카라이드, 헤파린, 젤라틴, 콜라겐, 알지네이트, 히알루론산, 알기닌산, 카라게난, 콘드로이틴, 펙틴, 키토산 및 이들의 유도체와 공중합체로부터 선택되는 하나 이상의 물질로 구성되거나 이들을 포함하는 항혈전제 층으로 더 코팅될 수 있다. 적절하게, 이들 물질들은, 미국공개특허 US 2006/0083772에 기술된 바와 같

이, 생체적합성 탐코트에 통합될 수 있다. 폴리머와 약물화합물의 혼합물로부터 스텐트를 형성하는 방법은 Blindt *et al.*, 1999, *Int. J. Artif. Organs*, 22: 843에 개시되어 있다.

- [0232] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 흑색종 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0233] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 흑색종의 전이를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0234] 상기 조성물에 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물은 상기 화학식 7 내지 31로 표시되는 화합물 중 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0235] 상기 "흑색종"은 어두운 색소인 멜라닌을 생성하는 멜라닌세포의 악성 종양을 의미하는 것으로 악성 흑색종(malignant melanoma)라고도 한다. 상기 멜라닌세포는 피부색을 결정하며, 주로 피부에 잘 나타나지만 창자와 눈을 포함한 신체의 다른 부위에도 나타날 수 있다. 따라서 흑색종은 멜라닌세포가 분포하는 신체의 어떠한 부위에서라도 발병할 수 있다. 흑색종은 다른 피부암에 비해 일반적인 질환은 아니지만 조기에 발견하기 어려워 훨씬 더 위험한 질환으로, 피부암에 관련된 사망원인의 대부분(75%)이 이에 기인한다. 전이성 흑색종은 식육부진, 구토, 피로 등의 비특이적 증상을 야기할 수 있다. 상대적으로 드물기는 흑색종은 초기에 전이되기도 한다. 뇌전이는 전이성 흑색종 환자에서 가장 보편적으로 관찰된다. 또한 간, 뼈, 복부 또는 원거리의 림프절까지도 전이될 수 있다.
- [0236] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 상기 흑색종의 전이에 PrxII가 관여함을 확인하였다. 구체적으로, 흑색종 세포주에서 PrxII의 발현 수준이 낮은 세포주(SK5 및 SK28)에서 세포 내 과산화수소 수준은 높은 것을 확인하였다. 나아가 이들 세포주는 PrxII를 발현하는 흑색종 세포주(A375 및 G361)에 비해 증식활성 및 이동활성이 높음을 확인하였다. 한편, 상기 PrxII를 저발현하는 흑색종 세포주에서 PrxII 발현을 증가시켰을 때, 증식 및 이동이 감소하는 것을 확인하였다. 나아가 siRNA를 이용하여 상기 PrxII를 발현하는 흑색종 세포주에서 PrxII를 선택적으로 녹다운시켰을 때, 증식 및 이동이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 PrxII 녹다운 마우스모델을 이용하여 PrxII가 흑색종의 전이에 관여함을 생체 내에서도 확인하였다(실험예 9 (1)). 전술한 바와 같이 PrxII는 2-Cys-Prx의 일종이며, 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 유도체가 세포 내에서 2-Cys-Prx 예컨대, PrxII의 활성을 모방할 수 있음에 착안하여, 본 발명의 유도체에서 활성을 나타내는 것으로 확인된 분자 내 이황가교결합 구조를 포함하는 곰팡이 대사체로부터 분리된 에피디티오디옥소피페라진 유도체의 일종인 글리오톡신(gliotoxin; GT), 키토신 및 키토민을 처리하여 흑색종의 전이능을 억제할 수 있음을 확인하였다(실험예 9 (2) 및 (3)). 따라서, 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 유도체는 세포 내에서 PrxII 활성을 모방함으로써 PrxII 결핍 또는 불활성화에 의해 야기되는 흑색종의 전이를 효과적으로 억제할 수 있다.
- [0237] 또한, 본 발명은 상기 화학식 47로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 고리를 하나 또는 그 이상 포함하는 에피디티오디옥소피페라진(epidithiodioxopiperazine; ETP) 화합물이 2-Cys-퍼록시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는지 여부를 확인하는 단계; 및 상기 단계에서 2-Cys-퍼록시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는 것으로 확인된 화합물을 생산하는 단계를 포함하는 혈관재협착 예방 또는 치료제의 제조방법을 제공한다.
- [0238] 또한, 본 발명은 (a) 하기 화학식 47로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 고리를 하나 이상 포함하는 화합물이 2-Cys-퍼록시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는지 여부를 확인하는 단계; 및 (b) 상기 NADPH 산화반응 또는 H_2O_2 환원반응이 일어나면 상기 화합물을 혈관재협착 예방 또는 치료제로 판단하는 단계를 포함하는 혈관재협착 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0239] [화학식 47]



[0240]

[0241] 상기 (a) 단계에서 2-Cys-퍼옥시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는지 여부의 확인은, 화학식 47로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 고리를 하나 이상 포함하는 화합물을 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TR), NADPH, 완충용액 및 H_2O_2 와 혼합하여 반응시켜 NADPH 산화반응 또는 H_2O_2 환원반응이 일어나는지 여부를 확인하는 단계; 및 NADPH 산화반응 또는 H_2O_2 환원반응이 일어나면 2-Cys-퍼옥시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는 것으로 판단하는 단계에 의하여 수행될 수 있다.

[0242] 구체적으로, 에피디티오디옥소피페라진 고리를 포함하는 후보 화합물을 먼저 Trx, TR, NADPH, EDTA와 완충용액에서 반응시키고, H_2O_2 와 혼합하여 산화반응을 수행하여 실험군을 준비하고, 시료를 제외하고 동일한 반응을 수행하여 대조군을 준비한 후 각각의 340 nm에서 흡광도의 감소를 모니터링하여 비교할 수 있다. 이때, 대조군은 일정한 흡광도를 나타내며, 2-Cys-Prx 활성을 나타내는 후보 화합물을 포함한 경우 시간에 따른 흡광도의 감소가 관찰되며, 활성은 흡광도의 감소정도에 비례한다. 따라서, 상기 단계를 수행하여 흡광도의 감소가 관찰되는 에피디티오디옥소피페라진 고리를 포함하는 후보 화합물을 혈관재협착 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질로 판단할 수 있다. 상기 Trx 및 TR은 효모, 인간 또는 랫트로부터 유래된 것일 수 있고, 바람직하게는 효모로부터 유래된 것일 수 있다. 2-Cys-퍼옥시레독신 (2-Cys-Prx) 활성을 나타내는지 여부의 확인은 대한민국 공개특허 10-2006-0020140에 기재된 방법에 따라 수행할 수 있으며, 상기 공개 특허의 내용은 본 명세서에 참조로서 포함된다.

발명의 효과

[0243] 본 발명은 일련의 신규한 에피디티오디옥소피페라진 유도체에 관한 것이며, 상기 유도체들은 분자내 이황가교결합을 포함하여 세포 내 침투성이 향상되고 세포 내에서는 2개의 티올기를 갖는 화합물로 빠르게 환원되어 2-Cys-Prx 중 특히 PrxII 이소폼(isoform)의 기능을 모방하여 PDGF-유도 혈관평활근세포의 이동 및 증식을 억제하여 혈관내막 비후를 저해하는 한편, VEGF-유도 혈관내피세포의 이동 및 증식은 촉진하여 재내피화를 향상시킬 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 유도체들은 혈관질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다. 또한 세포 내 PrxII 활성 모방을 통해 흑색종의 전이를 억제할 수 있으므로, 흑색종 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0244] 도 1은 본 발명에 따른 화합물 A1의 과산화수소 환원에 대한 촉매활성을 나타낸 도이다. 도 1 내지 도 4에서 그래프 내에 표시된 Vo는 분당 환원되는 과산화수소의 농도 (nmole)로 표시되는 환원반응의 활성속도를 나타낸다.

도 2는 본 발명에 따른 화합물 A2, 비교예로써 A2의 분자내 이황가교결합이 환원되어 디티올기를 가지는 화합물 A2R, 및 화합물 A3의 과산화수소 환원에 대한 촉매활성을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명에 따른 화합물 A4, 비교예로써 A4의 분자내 이황가교결합이 환원되어 디티올기를 가지는 화합물 A4R, 화합물 A5, 및 이의 분자내 이황가교결합이 환원되어 디티올기를 가지는 화합물 A5R의 과산화수소 환원에 대한 촉매활성을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명에 따른 화합물 A6, A7, A8 및 A9의 과산화수소 환원에 대한 촉매활성을 나타낸 도이다.

도 5는, ETP 화합물의 과산화수소 환원에 대한 촉매활성을 나타낸 도이다. (a) 내지 (c)는 각각 글리옥토신, 키토신 및 키토민의 과산화수소 환원력을 나타낸다. 그래프에 명시한 커플링 산화 환원 시스템 존재 하에 각각 25 μ M의 ETP 화합물을 첨가하여 시험관 내 과산화효소 반응을 수행하였다. (d) 내지 (f)는 ETP 화합물의 전형적인

Trx-의존 과산화효소 활성을 나타낸 도이다. 그래프에 명시한 Trx/TR 커플링 시스템의 요소들을 첨가하여 반응을 수행하였다. 세가지 실험의 대표적인 반응 곡선을 도시하였다. (g)는 ETP 화합물의 농도-의존적 퍼옥시다아제 활성을 나타낸 도이다. 3회의 독립적인 실험을 수행하여 초기속도를 평균±표준오차로 나타내었다. 음성대조군으로는 이황가교결합이 환원되고 메틸화된 비스(메틸티오)글리오톡신을 사용하였다.

도 6은 본 발명에 따른 화합물 A1의 (A) 인간혈관평활근세포(human aortic smooth muscle cells; HASMC) 및 (B) 인간혈관내피세포(human aortic endothelial cells; HAEC)에 대한 세포독성 실험결과를 살아있는 세포의 백분율로 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명에 따른 화합물 A2, 비교예로써 A2R, 및 화합물 A3의 (A) 인간혈관평활근세포(human aortic smooth muscle cells; HASMC) 및 (B) 인간혈관내피세포(human aortic endothelial cells; HAEC)에 대한 세포독성 실험결과를 살아있는 세포의 백분율로 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명에 따른 화합물 A4, 비교예로써 A4R, 화합물 A5, 및 이의 비교예 A5R의 (A) 인간혈관평활근세포(human aortic smooth muscle cells; HASMC) 및 (B) 인간혈관내피세포(human aortic endothelial cells; HAEC)에 대한 세포독성 실험결과를 살아있는 세포의 백분율로 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명에 따른 화합물 A6 내지 A9의 (A) 인간혈관평활근세포(human aortic smooth muscle cells; HASMC) 및 (B) 인간혈관내피세포(human aortic endothelial cells; HAEC)에 대한 세포독성 실험결과를 살아있는 세포의 백분율로 나타낸 도이다.

도 10은 GT 및 키토신의 시험관 내 및 생체 내 세포독성 실험결과를 나타낸 도이다. (a) 및 (d)는 그래프에 표시한 농도의 GT를 처리한 인간 대동맥 혈관평활근세포(human aortic smooth muscle cells; HASMCs)와 인간 대동맥 내피세포(human aortic epithelial cells; HAECs)의 현미경 사진이다. (b) 및 (c)는 HASMCs에 각각 GT 또는 키토신을 처리하였을 때 농도에 따른 생존율을 나타낸 도이고, (e) 및 (f)는 HAECs에 각각 GT 또는 키토신을 처리하였을 때의 생존율을 나타낸 도이다. 이때 각각의 ETP 화합물은 0.5% FBS를 포함한 기본 배지에서 혈청을 고갈시킨 세포에 해당 농도로 2시간 동안 선처리한 후, 세포를 회수하여 트리판 블루로 염색하여 생존율을 확인하였다. 생존율은 총 세포수에 대한 염색되지 않은 살아있는 세포수의 백분율로 표기하였다. (g)는 랫트 경동맥에서 GT의 생체 내 세포독성을 나타낸 도이다. GT를 표시한 농도로 풍선-손상 경동맥혈관의 내강에 주사하고 30분간 인큐베이션하였다. 대조군으로는 DMSO를 사용하였다. 대표적인 HE-염색 이미지를 도시하였으며 HE-염색 경동맥 시료로부터 측정된 내막 대 중간막 비율을 평균±표준오차로 나타내었다(군 당 n=7). 세포 사멸은 풍선-손상 경동맥혈관의 파라핀 절편을 TUNEL 염색하여 확인(좌)하였고 DAPI-양성 세포 당 TUNEL-양성 세포의 백분율(우)로 계산하였다.

도 11은, PrxII siRNA를 주입하고 DMSO(대조군) 또는 GT로 2시간 동안 선처리한 HASMCs 및 HAECs에서 글리오톡신에 의한 PDGF- 및 VEGF-의존적 과산화수소의상반된(reciprocal) 조절 능력을 나타낸다. (a) 및 (b)는 각각 HASMCs 및 HAECs에서 세포 내 과산화수소 수준을 DCF 형광 이미지의 상대적인 세기로 나타내었다. 그래프는 50 내지 80개의 세포로부터 평균한 상대적인 DCF 형광세기를 평균±표준오차로 나타내었다(n=3, *p<0.01, **p<0.001).

도 12의 (a)는 PrxII 녹다운된 HASMCs에서 PDGF-유도 타이로신 인산화에 대한 GT의 영향을 면역블롯 분석으로 나타낸 도이고, 도 12의 (b)는 PrxII 녹다운된 HAECs에서 VEGF-유도 타이로신 인산화에 대한 GT의 영향을 면역블롯 분석으로 나타낸 도이다. 총 타이로신 인산화(pTyr)는 항-인산타이로신 항체(4G10)에 의해 3회 반복실험하여 대표적인 블롯을 도시하였다. 또한 HASMCs에서는 PDGFR-β 및 PLCγ1의 활성화, HAECs에서는 VEGFR 및 Erk의 활성화를 대표적인 블롯으로 도시하였다.

도 13은 PrxII 녹다운된 혈관세포의 성장인자-유도 증식 및 이동에 대한 GT의 영향을 나타낸 도이다. (a) 및 (b)는 각각 PDGF에 반응하는 HASMCs의 증식 및 이동에 대한, (c) 및 (d)는 각각 VEGF에 반응하는 HAECs의 증식 및 이동에 대한 GT의 영향을 나타낸 도이다. 각 세포의 배수증가를 평균±표준오차로 나타내었다(n=3, *p<0.05, **p<0.001).

도 14는 본 발명에 따른 화합물 A1의 PrxII 녹다운된 혈관세포의 성장인자-유도 증식 및 이동에 대한 영향을 나타낸 도이다. A는 PDGF에 반응하는 HASMC의 증식 및 이동에 대한 영향을, B는 VEGF에 반응하는 HAEC의 증식 및 이동에 대한 영향을 나타낸다.

도 15는 본 발명에 따른 화합물 A2의 PrxII 녹다운된 혈관세포의 성장인자-유도 증식 및 이동에 대한 영향을 나타낸 도이다. A는 PDGF에 반응하는 HASMC의 증식 및 이동에 대한 영향을, B는 VEGF에 반응하는 HAEC의 증식 및

이동에 대한 영향을 나타낸다.

도 16은 본 발명에 따른 화합물 A2에 대한 비교예인 화합물 A2R의 PrxII 녹다운된 혈관세포의 성장인자-유도 증식 및 이동에 대한 영향을 나타낸 도이다. A는 PDGF에 반응하는 HASMC의 증식 및 이동에 대한 영향을, B는 VEGF에 반응하는 HAEC의 증식 및 이동에 대한 영향을 나타낸다. 이는 분자 내 이항가교가 환원된 화합물은 혈관세포들로 들어 가지 못함을 의미한다.

도 17은 본 발명에 따른 화합물 A3의 PrxII 녹다운된 혈관세포의 성장인자-유도 증식 및 이동에 대한 영향을 나타낸 도이다. A는 PDGF에 반응하는 HASMC의 증식 및 이동에 대한 영향을, B는 VEGF에 반응하는 HAEC의 증식 및 이동에 대한 영향을 나타낸다.

도 18은 본 발명에 따른 화합물 A4 및 A5와 이들에 대한 비교예인 화합물 A4R 및 A5R의 PrxII 녹다운된 혈관세포의 성장인자-유도 증식에 대한 영향을 나타낸 도이다. A는 PDGF에 반응하는 HASMC의 증식에 대한 영향을, B는 VEGF에 반응하는 HAEC의 증식에 대한 영향을 나타낸다.

도 19는 본 발명에 따른 화합물 A5의 PrxII 녹다운된 혈관세포의 성장인자-유도 이동에 대한 영향을 나타낸 도이다. A는 PDGF에 반응하는 HASMC의 이동에 대한 영향을, B는 VEGF에 반응하는 HAEC의 이동에 대한 영향을 나타낸다.

도 20은 본 발명에 따른 화합물 A6 내지 A9의 PrxII 녹다운된 혈관세포의 성장인자-유도 증식에 대한 영향을 나타낸 도이다. A는 PDGF에 반응하는 HASMC의 증식에 대한 영향을, B는 VEGF에 반응하는 HAEC의 증식에 대한 영향을 나타낸다.

도 21은 본 발명에 따른 화합물 A8의 PrxII 녹다운된 혈관세포의 성장인자-유도 이동에 대한 영향을 나타낸 도이다. A는 PDGF에 반응하는 HASMC의 이동에 대한 영향을, B는 VEGF에 반응하는 HAEC의 이동에 대한 영향을 나타낸다.

도 22는, HASMCs 및 HAECs에서 NOX 활성화에 대한 GT 및 키토신의 효과를 나타낸 도이다. HASMCs (a)와 HAECs (b)를 0.5% FBS를 포함한 기본 배지에서 혈청을 고갈시킨 후 해당 농도의 GT 또는 키토신으로 2시간 동안 선처리하고, PDGF 또는 VEGF로 10분간 처리하였다. 데이터는 자극된 세포 대 자극되지 않은 세포에서 과산화물 양의 백분율을 평균±표준오차로 나타내었다(n=3, *p<0.05, **p<0.001).

도 23은 풍선-손상 경동맥에서 GT에 의한 혈관내막 과다형성 억제 및 재내피화 촉진효과를 나타낸 도이다. (a)는 풍선-손상 경동맥에서 회복기간 동안 시간에 따른 혈관내막 비후를 보여주는 대표적인 HE-염색 이미지이다. HE-염색 경동맥 절편으로부터 측정된 내막 대 중간막 비율을 평균±표준오차로 나타내었다(군 당 n=4). (b)는 풍선 손상에 의해 유도된 경동맥혈관에서의 2-Cys-Prx의 과산화를 나타내는 것으로 항-과산화 2-Cys-Prx(Prx-SO2/3) 항체를 이용하여 면역조직화학을 수행하였다. 양성 대조군으로 10분간 과산화수소 용액으로 처리한 정상 경동맥혈관을 염색하였다. 차단 항원 펩타이드가 면역-양성 신호를 제거한다. 4개의 독립적인 시료로 부터의 대표적인 DAB-염색 이미지를 나타내었다. (c)는 손상된 경동맥 추출물을 사용한 세포 내 2-Cys-Prx의 과산화에 대한 면역블롯 분석 결과를 나타낸 것이다. 비교를 위하여 과산화수소를 처리한 정상 경동맥혈관으로부터의 추출물을 함께 로딩하였다.

도 24는 PrxII siRNA의 생체 내 주입에 의한 풍선-손상 경동맥에서 혈관내막 비후 촉진 효과를 나타낸 도이다. (a)는 풍선 손상에 의해 유도된 혈관내막 비후에 대한 PrxII 녹다운의 효과를 대표적인 HE-염색 이미지로 나타낸 것이다. HE-염색 경동맥 절편으로부터 측정된 내막 대 중간막 비율을 평균±표준오차로 나타내었다(군 당 n=7, *p<0.01). (b)는 손상된 경동맥 추출물의 랫트 PrxII에 대한 웨스턴블롯팅 결과이다. (c)는 손상된 경동맥 조직 절편에서 랫트 PrxII를 면역형광염색한 결과이다. 이는 풍선-손상 경동맥에서 siRNA 주입에 의한 내재적 PrxII의 녹다운을 나타낸다.

도 25는 풍선 손상 랫트 경동맥에서 혈관내막 비후 및 내피층 재생에 대한 GT의 효과를 나타낸 도이다. (a)는 대조군 및 GT 처리 후 풍선 손상 랫트 경동맥의 혈관내막을 나타낸 도이다. 각각 DMSO와 GT를 처리하여 30분간 인큐베이션하여 얻은 대표적인 HE-염색 이미지를 도시하였다. 화살표는 비대해진 혈관내막층을 나타낸다. HE-염색 경동맥 시료로부터 측정된 내막 대 중간막 비율을 평균±표준오차로 나타내었다(군 당 n=9, *p<0.01). (b)는 평활근 α-액틴(SMA) 및 CD31의 면역형광 염색 결과를 나타낸 도이다(n=3). 정상 경동맥혈관은 전형적인 내피단층(화살)을 나타낸다. DAPI 염색으로 핵을 나타내었다.

도 26은 풍선 손상에 의해 유도된 혈관내막 비후에 대한 Bis-(메틸티오)GT 단독 또는 GT+TR 억제제(DNCB,

auranofin)의 처리에 따른 HE-염색 이미지를 나타낸 도이다.

도 27은 2-Cys-Prx 과산화에 GT가 미치는 영향을 확인한 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 도이다.

도 28은, 본 발명에 따른 ETP 유도체인 A1 내지 A3, A5, A6 및 A8가 신생내막(neointima) 평활근세포의 증식을 억제함을 나타내는 도이다. 대표적인 H&E 염색 사진을 나타내었으며, 그래프에 표시된 데이터는 HE-염색 경동맥 절편으로부터 측정된 내막 대 중간막 비율을 평균±표준오차로 나타내었다(* $p < 0.01$). N.S., not significant.

도 29는, 풍선 손상 경동맥 모델에 본 발명에 따른 ETP 유도체인 A1 내지 A3, A5, A6 및 A8를 처리하였을 때, 재내피화(reendothelialization)가 유도됨을 나타내는 도이다. DMSO 또는 상기 ETP 유도체가 처리된 손상된 경동맥에 CD31 및 SMA(smooth muscle α -actin)의 공동 염색을 수행하여, 해당 부분을 표시하였다. 화살표는 두꺼워진 신생내막(neointima) 부위를 나타내며, 화살촉은 ETP 유도체가 처리된 경동맥의 전형적인 내피 단층을 나타낸다. DAPI로 세포 핵을 염색하였다. 두 번의 독립적인 실험의 대표적인 사진을 나타내었다.

도 30은 풍선 손상 랫트 경동맥에서 혈관 투과도 및 내강 표면 상태에 대한 GT의 영향을 나타낸 도이다. (a)는 대조군과 GT 처리 풍선-손상 랫트 경동맥혈관 내 에반스 블루 유입정도를 나타낸다. 좌측에 대표적인 이미지를 나타내었고, 우측의 그래프에는 혈관 내 유입된 에반스 블루를 추출하여 620 nm에서의 흡광도를 평균±표준오차로 나타내었다(군 당 $n=7$, * $p < 0.01$). (b)는 대조군 및 GT 처리 풍선-손상 랫트 경동맥혈관내강 표면의 주사 전자 현미경검사 결과이다. 3회의 독립적인 실험을 수행하고 대표적인 zoomed 이미지를 도시하였다.

도 31은 세포 증식 및 이동에 대한 키토신 처리 효과를 나타낸 도이다. PrxII 녹다운 시킨 HASMCs ((a) 및 (b))와 HAECs ((c) 및 (d))를 키토신으로 2시간 동안 선처리하고 PDGF 또는 VEGF로 24시간 동안 자극시켰다. 그래프에 배수증가를 평균±표준오차로 나타내었다($n=3$, * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, # $p < 0.001$).

도 32는 풍선 손상에 의해 유도되는 혈관내막 비후에 대한 키토신과 키토민의 효과를 나타낸 도이다. 풍선 손상 시킨 랫트 경동맥을 키토신 또는 키토민과 30분간 인큐베이션하였다. 대조군으로는 DMSO를 사용하였고, 대표적인 HE-염색 이미지((a) 및 (b))를 나타내었다. 화살표는 비후된 혈관내막층을 나타낸다. HE-염색 경동맥 시료로부터 측정된 내막 대 중간막 비율을 평균±표준오차로 나타내었다(군 당 $n=9$, * $p < 0.01$). (c) 및 (d)에는 평활근 α -액틴(SMA) 및 CD31의 면역형광 염색 결과를 나타내었다. 화살은 내피단층을 나타낸다.

도 33은 HAECs에서 VEGF 신호전달에 대한 다양한 항산화 화합물의 효과를 나타낸 도이다. VEC에 PrxII siRNA를 주입하고 증가된 농도의 표기된 화합물(N-아세틸시스테인; NAC, 부틸화 히드록시아니솔; BHA)로 2시간 동안 선처리하였다. 세포를 10분간 VEGF로 처리하고 면역블롯팅에 의해 분석하였다.

도 34는 PrxII 결핍 혈관세포에서 PDGF와 VEGF 의존적 타이로신 인산화 신호에서 GT의 영향을 확인한 웨스턴 블롯 결과((a), (b)) 및 PrxII 결핍 마우스에서 Ligation 유도 혈관내막 비후에 대한 GT의 영향을 확인한 HE-염색 결과(C)를 나타낸 도이다.

도 35은 본 발명에 따른 화합물 A1(화학식 15)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 36은 본 발명에 따른 화합물 A2(화학식 7)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 37은 본 발명에 따른 화합물 A2R의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 38은 본 발명에 따른 화합물 A3(화학식 8)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 39는 본 발명에 따른 화합물 A4(화학식 9)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 40은 본 발명에 따른 화합물 A4R의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 41은 본 발명에 따른 화합물 A5(화학식 10)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 42는 본 발명에 따른 화합물 A5R의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 43은 본 발명에 따른 화합물 A6(화학식 11)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 44는 본 발명에 따른 화합물 A7(화학식 12)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 45는 본 발명에 따른 화합물 A8(화학식 13)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 46은 본 발명에 따른 화합물 A9(화학식 14)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 47은 흑색종 세포주의 증식 및 이동에 대한 PrxII(Prx2)의 영향을 나타낸 도이다. A는 각기 다른 4종의 흑색

중 세포주(SK5, SK28, A375 및 G361)에서 PrxII의 발현 수준을 나타낸다. B는 상기 흑색종 세포주의 세포 내 과산화수소 수준을 나타낸다. 세포 내 과산화수소 수준은 산화-민감성 염료인 DCFH-DA를 이용하여 검출하고 정량하였다. 대표적인 이미지를 도시하였으며, 그래프의 바는 60 내지 80개 세포로부터 평균한 상대적인 DCF 형광값의 평균±표준편차이다. C는 상기 흑색종 세포주 간의 증식활성을 비교하여 나타낸 도이다. D 및 E는 흑색종 세포주 간의 이동 활성을 비교하여 나타낸 도로써, 화학주성 이동 에세이(chemotactic transmigration assay; D) 및 상처 치유 에세이(wound healing assay; E)로 측정하였다. 실험은 3회 반복하였다(*P<0.01, **P<0.005).

도 48은 PrxII 결핍 SK-MEL 세포주에서 PrxII 발현에 의한 증식 및 이동 억제효과를 나타낸 도이다. A는 SK-MEL 세포주에서 PrxII의 레트로바이러스성 발현(retroviral expression)을 나타낸 도이다. B 내지 D는 각각 대조군(vec) 및 PrxII-발현 SK-MEL 세포주의 증식(B) 및 이동(C 및 D)을 나타낸 도이다. 세포를 콘트롤 및 PrxII-인코딩 레트로바이러스로 24시간 동안 감염시켰다. 실험은 3회 반복하였다(*P<0.01, **P<0.005).

도 49는 PrxII-발현 흑색종 세포주의 증식 및 이동에 대한 PrxII 녹다운의 영향을 나타낸 도이다. A는 두 가지 다른 특이적 siRNA를 이용한 G361 및 A375 세포주에서 인간 PrxII의 선택적인 녹다운을 나타낸 도이다. B 및 C는 대조군(con) 및 PrxII 녹다운시킨 G361 및 A375 세포주의 증식(B) 및 이동(C)을 나타낸 도이다. D는 특이적인 siRNA를 이용하여 PrxI을 녹다운시킨 A375 세포의 혈청 자극에 대한 증식 및 이동을 나타낸 도이다. 세포를 표기한 바와 같이 콘트롤 또는 이소형(isoform)-특이적 siRNA로 24시간 동안 감염시켰다. 실험은 3회 반복하였다(*P<0.01; **P<0.005; N.S., not significant).

도 50은 PTP 활성 보존을 통한 혈청-유도 Src 및 ERK 활성화에 대한 PrxII의 억제효과를 나타낸 도이다. A 및 B는 대조군(vec) 및 PrxII-발현 SK28 세포에서 혈청-유도 타이로신 인산화를 나타낸 도이다. 항-pTyr 항체(4G10)를 이용한 면역블롯팅(A)과 면역염색(B)으로 타이로신 인산화를 검출하였다. 대표적인 블롯과 이미지를 도시하였다(n=3). C는 대조군 및 PrxII-발현 SK28 세포에서 PTP 활성을 나타낸 도이다. 폴리-(Glu4-pTyr) 펩타이드를 이용하여 토탈 PTP 활성을 측정하였다. D 및 E는 PrxII-발현 SK28 세포(D) 및 PrxI/II-결핍 G361 세포(E)에서 세포 내 신호전달 분자의 활성화를 나타낸 도이다. G361 세포는 혈청으로 30분 동안 자극시켰다. 인산-특이적(phospho-specific) 밴드를 정량하고 상응하는 비-인산 단백질(non-phospho protein) 밴드의 세기에 대해 표준화하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 상대적인 밴드 세기의 평균±표준편차로 나타내었다. F 및 G는 특이적 MEK(F) 및 Src(G) 억제제 존재 시 SK28 흑색종 세포의 증식 및 이동을 나타낸 도이다. SK28 세포를 24시간 동안 혈청 고갈시키고 PD98059(5 μ M) 또는 PP2/PP3(1 μ M each)로 혈청 자극에 앞서 1시간 동안 선처리하였다. PP3은 PP2의 불활성 유사체(inactive analog)이다. 비처리 시료에 대한 대조 비히클로는 DMSO를 사용하였다. 실험은 3회 반복하였다(*P<0.01; **P<0.005; #P<0.001; N.S., not significant).

도 51은 PrxII 발현에 의한 흑색종 세포의 adherens junction에서 E-카데린/ β -카데닌 복합체의 증가를 나타낸 도이다. A는 대조군(vec) 및 PrxII-발현 SK28 세포에서 adherens junction 단백질의 발현을 나타낸다. β -카데린 및 E-카데린 밴드의 세기를 정량하고 상응하는 튜불린 밴드의 세기에 대해 표준화하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 상대적인 밴드 세기의 평균±표준편차로 나타내었다(*P<0.005; N.S., not significant). B는 PrxII-발현 SK5 및 PrxII-결핍 G361 세포에서 β -카데린 및 E-카데린의 발현을 나타낸 도이다. C 및 D는 PrxII-발현 SK5(C) 및 PrxII-결핍 G361(D) 세포에서 β -카데린 및 E-카데린의 면역염색을 나타낸 도이다. 중첩된 이미지는 PrxII-발현 세포의 형질막(plasma membrane)에서 두 가지 단백질의 공존을 나타낸다(Yellow). 흰 화살표를 따라 형광세기를 정량하고(Upper right) 토탈 세기에 대한 표시된 부분(indicated fraction)의 세기의 백분율로 표현하였다(Lower right, n=33 cells per group, *P<0.001). M1 및 M2는 형질막을, Cyto는 세포질을 나타낸다. E는 SK28 세포에서 PrxII 발현에 의한 β -카데린 Y654 인산화의 감소를 나타낸 도이다. 인산-특이적 밴드를 정량하고 상응하는 비-인산 단백질(non-phospho protein) 밴드의 세기에 대해 표준화하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 상대적인 밴드 세기의 평균±표준편차로 나타내었다. F는 G361 세포에서 PrxII 녹다운에 의해 증가된 β -카데린 Y654 인산화를 나타낸 도이다. 같은 결과를 나타내는 3회의 독립적인 실험으로부터 대표적인 면역블롯을 도시하였다.

도 52는 생체 내에서(in vivo) PrxII에 의한 흑색종 세포의 전이 활성 억제효과를 나타낸 도이다. A는 B16F10 마우스 흑색종 세포에서 PrxII 녹다운에 의해 향상된 Src/ERK 활성화 및 β -카데린 인산화, 및 감소된 E-카데린 발현을 나타낸 도이다. B는 대조군 및 PrxII-결핍 B16F10 마우스 흑색종 세포에서 혈청 자극에 대한 증식 및 이동을 나타낸 도이다(n=3, **P<0.001). C는 B16F10 세포에서 PrxII 녹다운 기간에 따른 PrxII의 발현 수준을 나타낸 도이다. 세포를 mPrx2-1 siRNA로 전달감염시키고 면역블롯 분석을 수행하였다. PrxII 밴드의 세기를 정량하고 상응하는 튜불린 밴드의 세기에 대해 표준화하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터의 상대적인 밴드 세기의 평균±표준편차로 나타내었다. D 및 E는 대조군 및 PrxII 녹다운시킨 B16F10 흑색종 세포의 폐전이

를 나타낸 도이다. 마우스에 전달감염세포를 정맥내주사로 주입하였다. 10일 후, 폐를 적출하여 (D) 표면 및 (E) HE-염색된 조직 절편에서 흑색종 종양 결절(melanoma tumor nodules)을 계수하였다. 데이터는 평균±표준오차(S.E.M.)로 나타내었다(*P<0.005, **P<0.001).

도 53은 ETP 유도체 글리오톡신(gliotoxin; GT)에 의한 흑색종 세포의 전이 활성 억제효과를 나타낸 도이다. A는 대조 비히클(DMSO) 또는 GT 처리 SK28 흑색종 세포주에서 세포 내 과산화수소 수준을 나타낸 도이다. 대표적인 이미지를 도시하였으며, 그래프의 바는 60 내지 80개 세포로부터 평균한 상대적인 DCF 형광값의 평균±표준편차이다(**P<0.005). B는 대조 비히클(DMSO) 및 GT 처리 SK28 세포에서 혈청-유도 단백질 인산화 및 E-카데린 발현을 나타낸 도이다. C 및 D는 대조 비히클(DMSO) 및 GT 처리 SK5 및 SK28 세포주의 증식(C) 및 이동(D)을 나타낸 도이다. 혈청고갈(serum-starved) 세포를 GT(100 nM)로 1시간 동안 선처리한 후 혈청으로 자극하였다. 실험은 3회 반복하였다(*P<0.01, **P<0.005). E 및 F는 대조 비히클 및 GT 주입 마우스에서 B16F10 흑색종 세포의 폐전이를 나타낸 도이다. 마우스(각 군당 7마리)에 부모(E) 또는 mPrx2-1 siRNA-전달감염시킨(F) B16F10 흑색종 세포를 정맥 내 주사한 후 DMSO 또는 GT(300 µg/kg, i.p.)를 10일 동안 5회 주입하였다. 이후, 폐를 적출하여 표면에서 흑색종 종양 결절(melanoma tumor nodules)을 계수하였다. 데이터는 평균±표준오차(S.E.M.)로 나타내었다(*P<0.01). G는 흑색종 세포에서 PrxII의 항-전이 기능을 도식화하여 나타낸 개략도이다. PrxII 부재시, 세포 내 과산화수소 수준은 보다 높아진다. 이와 같이 증가된 세포 과산화수소는 자극에 대한 Src 및 ERK 활성을 향상시킨다. 활성화된 Src 키나아제는 β-카데닌(β-cat)을 인산화하여 세포질에 대한 adherens junction으로부터의 이의 방출을 유발하는 한편, 활성화된 ERK 키나아제는 E-카데린(E-cad)의 발현을 억제한다. 결과적으로, adherens junction에서 E-카데린/β-카데닌 복합체를 파괴하고 따라서 흑색종 세포는 보다 전이성을 갖게 된다. 반대로, PrxII 발현은 세포 내 과산화수소를 제거하여 Src 및 ERK 활성화를 억제한다. 따라서, β-카데닌 단백질이 유지되고 E-카데린 수준은 증가되어 adherens junction에서 E-카데린/β-카데닌 복합체가 증가한다. 결론적으로, PrxII 발현은 전이되지 않도록 흑색종 세포 간의 부착력을 강화한다.

도 54는 키토신 및 키토민에 의해 흑색종 세포의 증식 및 이동이 억제되는 것을 나타낸 도이다. 비히클 (DMSO) 또는 표시된 ETP 화합물 100nM을 SK-MEL28 흑색종 세포에 처리하고 세포독성(A), 증식(B) 및 이동(C)을 측정한다. 결과를 그래프로 나타내었다. 각 ETP 화합물은 세포독성이 없는 100nM에서 사용되었다. 세포의 증식 및 이동은 혈청(FBS)으로 촉진시켰다. 각 그래프에서 P값은 통계학적으로 유의한 것을 나타낸다.

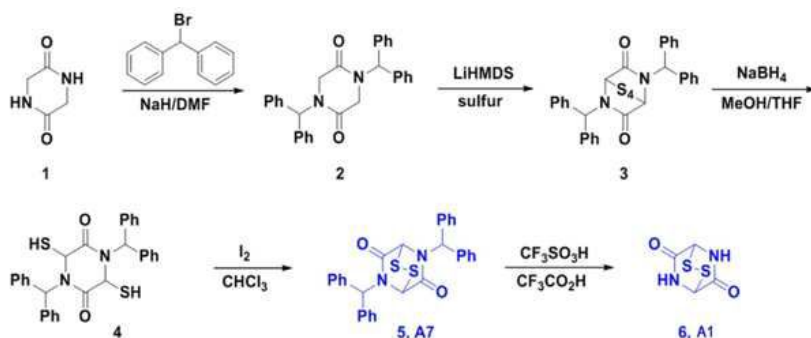
도 55는, 대조군 비히클 (DMSO) 또는 ETP 화합물이 주입된 마우스에서의 B16F10 흑색종 세포의 폐전이 여부를 나타내는 도이다. 생쥐(그룹당 5마리)에 B16F10 흑색종 세포를 정맥 주입한 다음, DMSO 또는 ETP 화합물(300 mg/kg, i.p.)을 10일간 5회 주입하였다. 분리된 폐에서 표면에 위치한 흑색종 종양 결절을 계수하였고, 이를 그래프로 나타내었다. 그래프에서 P값은 통계학적으로 유의한 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0245] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0246] <분자내 이황가교결합을 포함하는 예피디티오디옥소피페라진 유도체의 합성>

[0247] 제조예 1: 2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(A1, 화학식 15)의 제조



[0248]

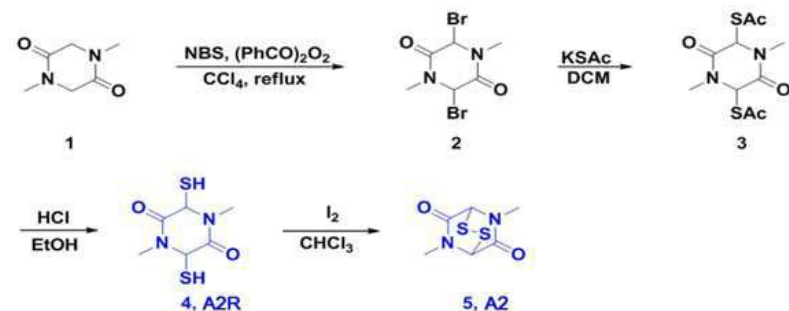
- [0249] **A. 1,4-디벤즈히드릴피페라진-2,5-디온(2)**
- [0250] DMF 10 mL에 NaH(60% 분산 in 미네랄 오일, 385 mg, 9.64 mmol)를 분산시킨 후 얼음수조 하에서 무수 글리신 (500 mg, 4.38 mmol)을 첨가하였다. 10분 동안 교반한 후 브로모디페닐 메탄(2.27 g, 2.1 eq.)을 천천히 첨가 하였다. 상온에서 밤새도록 반응시켰다. 반응액에 물을 첨가하고 교반하였다. 침전물을 여과하여 물로 세척하였 다. 감압 건조하여 1,4-디벤즈히드릴피페라진-2,5-디온(2)을 얻었다(1.4 g, 수율 71%).
- [0251] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.39-7.31 (m, 12H), 7.21-7.19 (d, 8H), 7.09 (s, 2H), 3.83 (s, 4H).
- [0252] **B. 7,9-디벤즈히드릴-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온(3)**
- [0253] 황(402 mg, 12.54 mmol)을 건조 THF 5 mL에 분산시킨 후 아르곤 대기 하에 LiHMDS(1.0 M in THF, 4.7 mL, 3.0 eq.)를 2분에 걸쳐 1방울씩 가하였다. 1분 정도 교반한 후 상기 A 단계에서 수득한 화합물(2; 700 mg, 1.567 mmol)을 20 mL THF에 용해시킨 용액을 1방울씩 가하였다. 1분 정도 교반한 후 LiHMDS(1.0 M in THF, 3.13 mL, 2.0 eq.)를 1방울씩 첨가하고 30분간 교반하였다. 반응이 완료되면 포화 NH_4Cl 용액과 EA(X3)를 가하여 2회 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 처리한 후 여과하여 용매를 제거하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그 래피(Hex:EA=2:1)로 정제하여 7,9-디벤즈히드릴-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디 온을 얻었다(3; 230 mg, 수율: 26%).
- [0254] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.39-7.32 (m, 12H), 7.21 (m, 4H), 7.07 (m, 4H), 6.95 (s, 2H), 5.14 (s, 2H).
- [0255] **C. 3,6-디머캅토-1,4-디벤즈히드릴피페라진-2,5-디온(4)**
- [0256] 메탄올에 7,9-디벤즈히드릴-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온(3; 230 mg, 0.401 mmol)을 용해시킨 후, 얼음수조 하에서 NaBH_4 (45 mg, 3.0 eq.)를 서서히 첨가하였다. 30분 동안 교반한 후 반응 이 완료되면 용매를 제거하였다. 조 화합물에 물과 EA(X3)를 첨가하여 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘 으로 처리한 후 여과하고 용매를 제거한 후, 감압 건조하여 3,6-디머캅토-1,4-디벤즈히드릴피페라진-2,5-디온 (4)을 얻었다. 상기 화합물은 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다.
- [0257] **D. 5,7-디벤즈히드릴-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(5)**
- [0258] 클로로포름 30 mL에 상기 획득한 디티올 조 화합물(4)을 용해시킨 후 아이오딘(101 mg, 0.401 mmol)을 녹인 클 로로포름 용액 20 mL를 첨가하였다. 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 용매를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피(EA:Hex=1:2)로 정제하여 5,7-디벤즈히드릴-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(5)을 얻었다(130 mg, 2 단계 수율-63%).
- [0259] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.37-7.28 (m, 12H), 7.27 (m, 4H), 7.14 (m, 4H), 6.77 (s, 2H), 5.31 (s, 2H).
- [0260] ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$): 531 calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 508.
- [0261] **E. 2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(6; A1)**
- [0262] 상기 D 단계에서 수득한 조 화합물(5; 50 mg)을 TFA(1 mL)에 용해시킨 후 얼음수조에서 트리플릭산(triflic acid; $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$, 0.1 mL)을 첨가하여 반응시켰다. 30분 동안 반응시킨 후 반응액에 빙냉수를 첨가하여 반응을 종 료하고 교반하였다. 생성된 고체를 여과하고 건조하였다. 이후 에테르에서 다시 교반시켜 여과하고 감압 건조하 여 2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(6; 8 mg, 47%)을 얻었다. 얻어진 최종 생성물의 NMR

데이터는 도 35에 나타내었다.

[0263] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 9.69 (br d, 2H), 5.65 (d, 2H).

[0264] ESI-MS (M-1): 175 calc. for $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 176.

[0265] **제조예 2: 5,7-디메틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]-옥탄-6,8-디온(A2, 화학식 7)의 제조**



[0266]

[0267] **A. 3,6-디브로모-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온(2)**

[0268] 사염화탄소(50 ml)에 살코신 무수물(1)(500 mg, 3.52 mmol), N-브로모숙신이미드(1.87 g, 3.0 eq.) 및 벤조일 퍼록사이드(85 mg, 0.1 eq.)를 분산(dispersion)시킨 후, 2시간 동안 가열 환류시켰다. 반응이 완료되면 상온으로 냉각한 후 얻어진 숙신이미드를 여과하고 사염화탄소로 세척하였다. 여액을 합하고 황산마그네슘으로 건조하고 다시 여과하였다. 용매 제거 후 잔사를 감압 건조하여 3,6-디브로모-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온(2)을 얻었다. 추가 정제 없이 다음 반응에 그대로 사용하였다.

[0269] ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3): δ ppm 6.04 (s, 2H), 3.15 (s, 6H).

[0270] **B. 1,4-디메틸-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트(3)**

[0271] 3,6-디브로모-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온(2)(조 1.05 mg, 3.52 mmol)을 디클로로메탄(DCM; 100 ml)에 용해시키고 얼음수조에서 포타슘 티오아세테이트(1.2 g, 3.0 eq.)를 첨가하였다. 혼합물을 상온에서 밤새 교반하였고 얻어진 침전물들을 여과하여 DCM으로 세척하였다. 여액은 합하였고 잔사를 진공에서 증발시켰다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(DCM:에틸아세테이트(EA)=5:1)로 정제하여 1,4-디메틸-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트(3)를 얻었다(흰색 고체; 200 mg, 2 단계 수율-20%).

[0272] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.77 (s, 2H), 2.94 (s, 6H), 2.48 (s, 6H).

[0273] **C. 3,6-디머캅토-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온 (4)**

[0274] 에탄올(20 ml)에 디티오아세테이트(195 mg, 0.67 mmol)를 용해시킨 후 에탄올성 염산 용액(아세틸 클로라이드 1.5 ml를 에탄올 7 ml에 가하여 제조함)을 첨가하였다. 상기 혼합 용액을 2시간 동안 가열 환류시켰다. 반응이 완료되면 용매를 제거하고 감압 건조하여 3,6-디머캅토-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온(4)을 밝은 노란 고체로 얻었다(90mg, 65%). 얻어진 화합물은 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다.

[0275] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.00 (s, 2H), 3.09 (s, 6H).

[0276] ESI-MS (M-1): 205 calc. for $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 206.

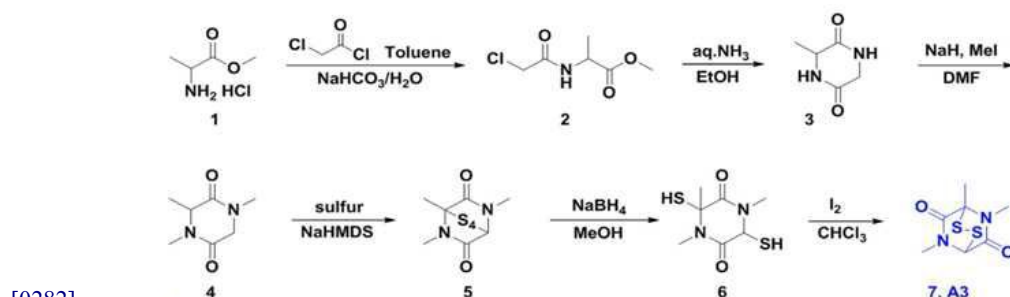
[0277] D. 5,7-디메틸-2,3-디티오-5,7-디아자바이시클로[2,2,2]옥탄-6,8-디온(5; A2)

[0278] 클로로포름 10 ml에 녹인 3,6-디머캡토-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온(50 mg, 0.242 mmol) 용액에 DCM 10 ml에 녹인 아이오딘(63 mg, 1.0 eq.) 용액을 첨가하였다. 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 완료되면 소듐 티오설파이트를 함유한 포화 NaHCO₃ 용액을 붓고 아이오딘에 의한 색이 없어질 때까지 교반하였다. 유기층을 분리하고 수용성 층을 DCM으로 2회 추가로 추출한 후 유기층을 모아 황산마그네슘으로 건조하였다. 이후 여과하고 진공 농축하여 잔사를 얻고 이를 에탄올을 이용하여 재결정을 형성한 후 여과하고 헥산(hexane; Hex)으로 세척한 후 감압 건조하여 밝은 노란 고체인 5,7-디메틸-2,3-디티오-5,7-디아자바이시클로[2,2,2]옥탄-6,8-디온(5)을 얻었다(18 mg, 36%). 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 36에 나타내었다.

[0279] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 5.21 (s, 2H), 3.12 (s, 6H).

[0280] ESI-MS (M+Na): 227 calc. for C₆H₈N₂O₂S₂ 204.

[0281] 제조예 3: 1,5,7-트리메틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(A3, 화학식 8)의 제조



[0282]

[0283] A. 메틸 2-(2-클로로아세트아미도)프로파노에이트(2)

[0284] 알라닌 메틸 에스테르 하이드로클로라이드(2 g, 14.3 mmol)를 물 6 ml에 용해시킨 후 얼음 수조에서 탄산수소나트륨(NaHCO₃; 2.8 g, 33.6 mmol)을 서서히 첨가하였다. 반응물에 5 ml의 톨루엔에 용해시킨 클로로아세틸 클로라이드(1.67 ml, 20.9 mmol) 용액을 한 방울씩 가하면서 혼합하였고 상온에서 3시간 동안 격렬히 교반하였다. 반응이 완료된 후 유기층을 분리하고 수용액층을 톨루엔으로 추가 세척하였다. 유기층을 합하여 황산마그네슘으로 처리하고 여과하여 용매 제거하였다. 감압 건조하여 조 메틸 2-(2-클로로아세트아미도)프로파노에이트(2)을 얻었다(2.6 g).

[0285] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7.23 (br s, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 1.42 (d, 3H).

[0286] B. 3-메틸피페라진-2,5-디온(3)

[0287] 메틸 2-(2-클로로아세트아미도)프로파노에이트(2; 2.6 g, 14.3 mmol)를 에탄올 12 ml에 용해시킨 후 30% 수용성 암모니아 용액 6.1 ml(43.4 mmol)을 첨가하였다. 70℃에서 5시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료되면 상온으로 냉각한 후, 에탄올을 제거하였다. 남아있는 소량의 물에서 고체가 형성되면 여과하여 물과 헥산으로 세척하였다. 감압 건조하여 3-메틸피페라진-2,5-디온(3)을 하얀 고체로 얻었다(420 mg, 2 단계 수율-23%).

[0288] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 8.13 (br s, 1H), 7.95 (br s, 1H), 3.84 (q, 1H), 3.72 (s, 2H), 1.26 (d, 3H).

[0289] **C. 1,3,4-트리메틸피페라진-2,5-디온(4)**

[0290] 디메틸포름아미드(DMF) 25 ml에 3-메틸피페라진-2,5-디온(3; 420 mg, 3.28 mmol)을 분산시킨 후 얼음수조 하에서 NaH(400 mg, 9.83 mmol)를 첨가하였다. 메틸 아이오다이드(2 ml, 10 eq.)를 첨가하고 상온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응이 완료되면 DMF를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(DCM:메탄올=20:1 내지 9:1)로 정제하여 1,3,4-트리메틸피페라진-2,5-디온(4)을 얻었다(무색의 고체; 440 mg, 수율 86%).

[0291] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 4.08 (d, 1H), 3.92 (q, 1H), 3.85 (d, 1H), 2.98 (s, 6H), 1.47 (d, 3H).

[0292] **D. 6,7,9-트리메틸-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온(5)**

[0293] 황(1.64 g, 51.2 mmol)을 건조 THF 20 ml에 분산시킨 후 아르곤 대기 하에 NaHMS(1.0 M in THF, 19.2 ml)에 2분에 걸쳐 1방울씩 가하였다. 1분 정도 교반한 후 상기 C 단계에서 수득한 화합물(4; 1 g, 6.4 mmol)을 20 ml THF에 용해시킨 용액을 1방울씩 가하였다. 1분 정도 교반한 후 NaHMS(1.0 M in THF, 12.8 ml, 2.0 eq.)를 1방울씩 첨가하고 30분간 교반하였다. 반응이 완료되면 포화 NH_4Cl 용액과 DCM(X3)을 가하여 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 처리한 후 여과하여 용매를 제거하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EA:헥산=1:1)로 정제하여 6,7,9-트리메틸-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온을 얻었다(5; 250 mg, 수율: 14%).

[0294] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.13 (s, 1H), 3.06 (d, 6H), 2.00 (s, 3H).

[0295] **E. 3,6-디머캅토-1,3,4-트리메틸피페라진-2,5-디온(6)**

[0296] 메탄올 20 ml에 6,7,9-트리메틸-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온 (5)(250 mg, 0.885 mmol)을 용해시킨 후, 얼음수조 하에서 NaBH_4 (167 mg, 4.43 mmol)에 서서히 첨가하였다. 30분 동안 교반한 후 반응이 완료되면 용매를 제거하였다. 조 화합물(crude compound)에 물과 DCM(X3)을 첨가하여 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 처리한 후 여과하고 용매를 제거한 후, 감압 건조하여 3,6-디머캅토-1,3,4-트리메틸피페라진-2,5-디온(6)을 얻었다. 상기 화합물은 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다.

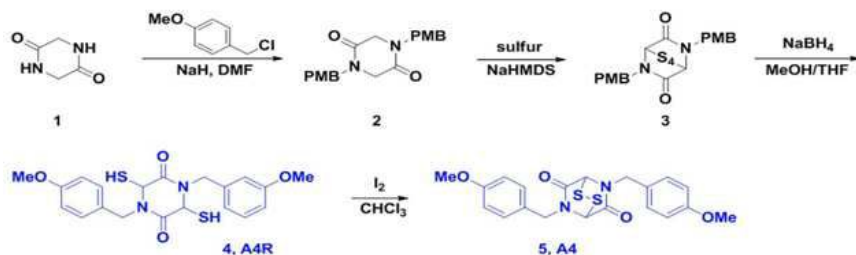
[0297] **F. 1,5,7-트리메틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(7; A3)**

[0298] 클로로포름 30 ml에 상기 획득한 디티올 화합물(35 mg)을 용해시킨 후 아이오딘(249 mg, 1.0 eq.)을 녹인 클로로포름 용액 25 ml를 첨가하였다. 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 용매를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EA:Hex = 1:1)로 정제하여 1,5,7-트리메틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(7)을 밝은 노란 고체로 얻었다(24 mg, 2 단계 수율-12%). 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 38에 나타내었다.

[0299] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.29 (s, 1H), 3.14 (s, 3H), 3.03 (s, 1H), 1.98 (s, 3H).

[0300] ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$): 241 calc. for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 218.

[0301] **제조예 4: 1,4-비스(4-메톡시벤질)-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(A4, 화학식 9)의 제조**



A. 1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(2)

NaH(1.54 g, 38.5 mmol)를 20 ml DMF에 분산시킨 후 얼음수조 하에서 무수 글리신(2 g, 17.5 mmol)을 첨가하였다. 10분 동안 교반한 후 벤질 클로라이드(5.94 ml, 2.5 eq)를 30 분에 걸쳐 천천히 첨가하였다. 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 물을 첨가하고 교반하였다. 침전물을 여과하고 물로 세척하였다. 얻어진 고체화합물을 EA와 Hex의 혼합용액(EA:Hex=9:1)에서 교반한 후 여과하고 감압 건조하여 1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(2; 5.1 g, 82%)을 얻었다.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.21 (d, 4H), 6.87 (d, 4H), 4.51 (s, 4H), 3.89 (s, 4H), 3.80 (s, 6H).

B. 7,9-비스(4-메톡시벤질)-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온(3)

황(72 mg, 2.257 mmol)을 건조 THF 2 ml에 분산시킨 후 아르곤 대기 하에 NaHMDS(1.0 M in THF, 0.85 ml, 3.0 eq.)에 2분에 걸쳐 1방울씩 가하였다. 1분 정도 교반한 후 상기 A 단계에서 수득한 화합물(2; 100 mg, 0.282 mmol)을 20 ml THF에 용해시킨 용액을 1방울씩 가하였다. 1분 정도 교반한 후 NaHMDS(1.0 M in THF, 0.56 ml, 2.0 eq.)를 1방울씩 첨가하고 30분간 교반하였다. 반응이 완료되면 포화 NH_4Cl 용액과 EA(X2)를 가하여 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 처리한 후 여과하여 용매를 제거하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Hex:EA=4:1 내지 2:1)로 정제하여 7,9-비스(4-메톡시벤질)-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온을 얻었다(3; 35 mg, 수율: 26%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.21 (d, 4H), 6.87 (d, 4H), 5.37 (d, 2H), 4.99 (s, 2H), 3.84 (d, 2H), 3.81 (s, 6H).

C. 3,6-디머캅토-1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(4)

메탄올 20 ml에 7,9-비스(4-메톡시벤질)-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온(3)(420 mg, 0.873 mmol)을 용해시킨 후, 얼음수조 하에서 NaBH_4 (99 mg, 3.0 eq.)에 서서히 첨가하였다. 30분 동안 교반한 후 반응이 완료되면 용매를 제거하였다. 조 화합물에 물과 EA(X3)를 첨가하여 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 처리한 후 여과하고 용매를 제거한 후, 감압 건조하여 3,6-디머캅토-1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(4)을 얻었다. 상기 화합물은 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.20 (d, 4H), 6.89 (d, 4H), 5.21 (d, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.12 (d, 2H), 3.85 (s, 6H), 3.05 (br s, 2H).

ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$): 441 calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ 418.

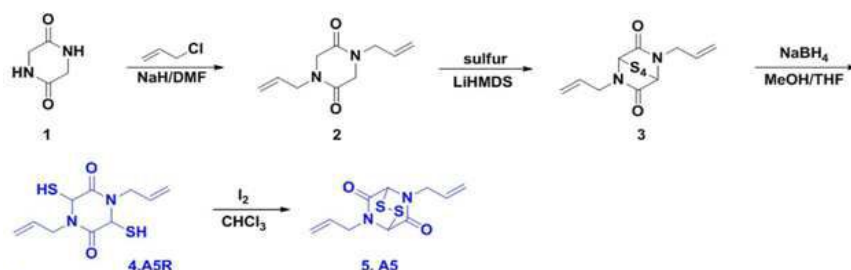
D. 5,7-비스(4-메톡시벤질)-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(5; A4)

클로로포름 50 ml에 상기 획득한 디티올 화합물(4; 380 mg)을 용해시킨 후 아이오딘(221 mg, 0.873 mmol)을 녹인 클로로포름 용액 100 ml을 첨가하였다. 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 용매를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EA:Hex=1:1)로 정제하여 5,7-비스(4-메톡시벤질)-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(5)을 얻었다(120 mg, 2 단계 수율-33%). 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 39에 나타내었다.

[0315] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.22 (d, 4H), 6.91 (d, 4H), 5.21 (s, 2H), 4.77 (d, 2H), 4.45 (d, 2H), 3.81 (s, 6H).

[0316] ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$): 439 calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ 416.

[0317] **제조예 5: 5,7-디알릴-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(A5, 화학식 10)의 제조**



[0318]

[0319] **A. 1,4-디알릴피페라진-2,5-디온(2)**

[0320] DMF 25 ml에 NaH(1.3 g, 32.8 mmol)를 분산시킨 후 얼음수조 하에서 무수 글리신(1.5 g, 13.1 mmol)을 첨가하였다. 10분 동안 교반한 후 알릴 클로라이드(3.2 ml, 3.0 eq.)를 30분에 걸쳐 천천히 첨가하였다. 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 반응액에 EA(X2)와 포화 NH_4Cl 을 첨가하여 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 처리한 후 여과하여 용매를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피($\text{DCM}:\text{EA}=1:1$)로 정제하여 1,4-디알릴피페라진-2,5-디온(2)을 얻었다(1.4 g, 수율 56%).

[0321] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.79–5.69 (m, 2H), 5.30–5.22 (m, 4H), 4.04 (d, 4H), 3.96 (s, 4H).

[0322] **B. 7,9-디알릴-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온(3)**

[0323] 황(1.32 g, 41.2 mmol)을 건조 THF 10 ml에 분산시킨 후 아르곤 대기 하에 NaHMDS(1.0 M in THF, 15.4 ml, 3.0 eq.)에 2분에 걸쳐 1방울씩 가하였다. 1분 정도 교반한 후 상기 A 단계에서 수득한 화합물(2; 1 g, 5.15 mmol)을 20 ml THF에 용해시킨 용액을 1방울씩 가하였다. 1분 정도 교반한 후 NaHMDS(1.0 M in THF, 10.3 ml, 2.0 eq.)를 1방울씩 첨가하고 30분간 교반하였다. 반응이 완료되면 포화 NH_4Cl 용액과 EA(X3)를 가하여 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 처리한 후 여과하여 용매를 제거하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피($\text{Hex}:\text{EA}=9:1$ 내지 4:1)로 정제하여 7,9-디알릴-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온을 얻었다(3; 530 mg, 수율: 32%).

[0324] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.83–5.73 (m, 2H), 5.40–5.33 (m, 4H), 5.21 (s, 2H), 4.81 (d, 2H), 3.51–3.45 (m, 2H).

[0325] **C. 3,6-디머캅토-1,4-디알릴피페라진-2,5-디온(4)**

[0326] 메탄올/THF 혼합용매에 7,9-디알릴-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온(3)(530 mg, 1.65 mmol)을 용해시킨 후, 얼음수조 하에서 NaBH_4 (187 mg, 3.0 eq.)를 서서히 첨가하였다. 30분 동안 교반한 후 반응이 완료되면 용매를 제거하였다. 조 화합물에 물과 EA(X3)를 첨가하여 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 처리한 후 여과하고 용매를 제거한 후, 감압 건조하여 3,6-디머캅토-1,4-디알릴피페라진-2,5-디온(4)을 얻었다. 상기 화합물은 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다.

[0327] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.80–5.70 (m, 2H), 5.39–5.31 (m, 4H), 5.07 (s, 2H), 4.68 (d, 2H), 3.70–3.64 (m, 2H), 3.09 (br s, 2H).

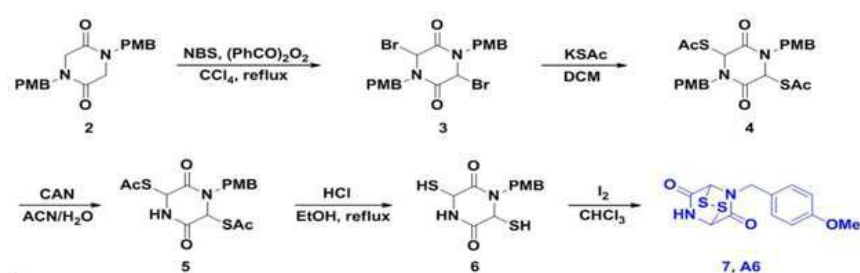
[0328] D. 5,7-디알릴-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(5; A5)

[0329] 클로로포름 30 ml에 상기 획득한 디티올 화합물(4; 430 mg)을 용해시킨 후 아이오딘(419 mg, 1.0 eq.)을 녹인 클로로포름 용액 60 ml을 첨가하였다. 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 용매를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EA:Hex=1:9 내지 1:4)로 정제하여 5,7-디알릴-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(5)을 얻었다(110 mg, 2 단계 수율-26%). 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 41에 나타내었다.

[0330] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.86-5.81 (m, 2H), 5.38-5.34 (m, 4H), 5.30 (s, 2H), 4.32-4.27 (m, 2H), 4.00-3.95 (m, 2H).

[0331] ESI-MS (M+K): 295 calc. for $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 256.

[0332] 제조예 6: 5-(4-메톡시벤질)-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(A6, 화학식 11)의 제조



[0333]

[0334] A. 1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(2)

[0335] 상기 제조예 3의 A 단계와 동일한 방법으로 1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(2)을 얻었다.

[0336] B. 3,6-디브로모-1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(3)

[0337] 사염화탄소(250 ml)에 1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(2; 1 g, 2.82 mmol), N-브로모숙신이미드(1.05 g, 2.1 eq.) 및 벤조일 퍼옥사이드(6.8 mg, 0.01 eq.)를 분산(dispersion)시킨 후, 2시간 동안 환류하면서 반응시켰다. 반응이 완료되면 상온으로 냉각한 후 생성된 고체를 여과하였다. 용매를 제거하고 감압 건조하여 3,6-디브로모-1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(3)을 얻었다. 추가 정제 없이 다음 반응에 그대로 사용하였다.

[0338] ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.22 (d, 4H), 6.89 (d, 4H), 5.89 (s, 2H), 5.30 (d, 2H), 3.93 (d, 2H), 3.82 (s, 6H).

[0339] C. 1,4-비스(4-메톡시벤질)-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트(4)

[0340] 3,6-디브로모-1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(3; 1.44 g, 2.82 mmol)을 디클로로메탄(DCM; 100 ml)에 용해시키고 얼음수조에서 소듐 티오아세테이트(966 mg, 3.0 eq.)를 첨가하였다. 혼합물을 상온에서 밤새 교반하였고 얻어진 침전물들을 여과하고 용매를 제거하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Hex:EA=2:1 내지 1.5:1)로 정제하여 1,4-비스(4-메톡시벤질)-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트(4)를 얻었다(600 mg, 2 단계 수율-43%).

[0341] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.22 (d, 4H), 6.86 (d, 4H), 5.83 (s, 2H), 4.98 (d, 2H), 3.89 (d, 2H), 3.81 (s, 6H), 2.45 (s, 6H).

[0342] D. 1-(4-메톡시벤질)-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트(5)

[0343] 1,4-비스(4-메톡시벤질)-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트(4; 1.37 g, 2.73 mmol)를 ACN/H₂O(90 ml/20 ml) 혼합용매에 용해시킨 후 (NH₄)₂Ce(NO₃)₆(ceric ammonium nitrate; CAN, 4.5 g, 3.0 eq)를 첨가하고 2 시간 동안 교반하였다. 유기용매를 제거한 후 DCM(X2)과 물을 첨가하여 추출하였다. 유기용매에 황산마그네슘으로 처리한 후 여과하여 용매를 제거하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Hex:EA = 2:1 내지 1.5:1)로 정제하여 1-(4-메톡시벤질)-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트(5; 380 mg, 36%)를 얻었다.

[0344] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7.27 (d, 2H), 6.88 (d, 2H), 6.73 (br s, 1H), 5.78-5.74 (m, 2H), 5.12 (d, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (d, 1H), 2.46 (s, 6H)

[0345] E. 3,6-디머캡토-1-(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(6)

[0346] 에탄올(20 ml)에 상기 디티오아세테이트(5; 150 mg, 0.392 mmol)를 분산시킨 후 에탄올성 염산 용액(아세트알로라이드 1.5 ml를 에탄올 7 ml에 가하여 제조함)을 첨가하였다. 상기 혼합 용액을 2시간 동안 환류하면서 반응시켰다. 반응이 완료되면 용매를 제거하고 감압 건조하여 3,6-디머캡토-1-(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(6)을 얻었다. 얻어진 화합물은 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다.

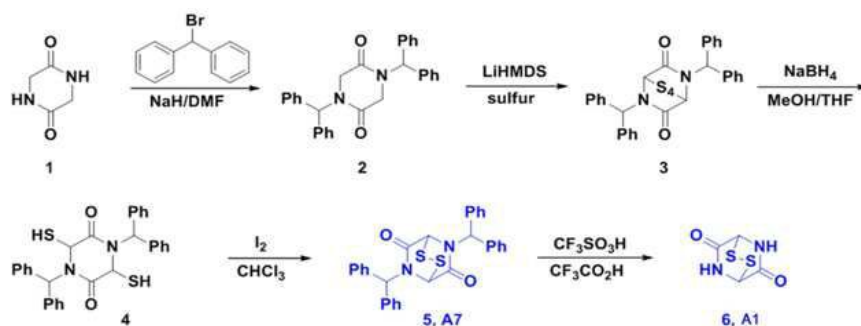
[0347] F. 5-(4-메톡시벤질)-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(7; A6)

[0348] DCM 20 ml에 녹인 3,6-디머캡토-1-(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(6; 117 mg, 0.392 mmol) 용액에 DCM 15 ml에 녹인 아이오딘(99.5 mg, 1.0 eq.) 용액을 첨가하였다. 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 완료되면 용매를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Hex:EA=1:1)로 2회 정제하여 5-(4-메톡시벤질)-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(7)을 얻었다(4 mg). 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 43에 나타내었다.

[0349] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7.23 (d, 2H), 7.15 (br s, 1H), 6.89 (d, 2H), 5.39 (d, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.84 (d, 1H), 4.45 (d, 1H), 3.81 (s, 3H).

[0350] ESI-MS (M+Na): 319 calc. for C₁₂H₁₂N₂O₃S₂ 296.

[0351] 제조예 7: 5,7-디벤즈히드릴-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(A7, 화학식 12)의 제조



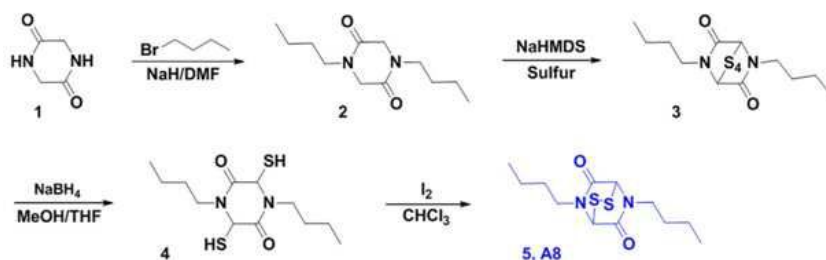
[0352] .

[0353] 상기 제조예 1의 A 내지 D 단계와 동일한 방법으로 5,7-디벤즈히드릴-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온을 얻었다. 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 44에 나타내었다.

[0354] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7.37-7.28 (m, 12H), 7.27 (m, 4H), 7.14 (m, 4H), 6.77 (s, 2H), 5.31 (s, 2H).

[0355] ESI-MS (M+Na): 531 calc. for C₃₀H₂₄N₂O₂S₂ 508.

[0356] 제조예 8: 5,7-디부틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(A8, 화학식 13)의 제조



[0357]

[0358] A. 1,4-디부틸피페라진-2,5-디온(2)

[0359] DMF 10 ml에 NaH(430 mg, 10.95 mmol)를 분산시킨 후 얼음수조 하에서 무수 글리신(500 mg, 4.38 mmol)을 첨가하였다. 10분 동안 교반한 후 1-브로모부탄(1.8 g, 13.14 mmol, 3 eq.)를 30분에 걸쳐 천천히 첨가하였다. 상온에서 밤새도록 반응시킨 후 반응액에 포화 NH_4Cl 로 quenching하고 EA(X2)로 추출하였다. 유기층을 모아 물로 세척하고 황산마그네슘으로 건조한 후 여과하였다. 감압 농축한 후 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(DCM:EA=1:1)로 정제하여 1,4-디부틸피페라진-2,5-디온(2)을 얻었다(410 mg, 수율 41%, 노란색 오일).

[0360] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 3.95 (s, 4H), 3.39 (t, 4H), 1.54 (m, 4H), 1.34 (m, 4H), 0.94 (t, 6H).

[0361] B. 7,9-디부틸-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온(3)

[0362] 황(450 mg, 14.16 mmol)을 건조 THF 5 ml에 분산시킨 후 아르곤 대기 하에 LiHMDS(1.0 M in THF, 5.31 ml, 3.0 eq.)에 2분에 걸쳐 1방울씩 가하였다. 1분 정도 교반한 후 상기 A 단계에서 수득한 화합물(2; 400 mg, 1.567 mmol)을 20 ml THF에 용해시킨 용액을 1방울씩 가하였다. 1분 정도 교반한 후 LiHMDS(1.0 M in THF, 3.54 ml, 2.0 eq.)를 1방울씩 첨가하고 30분간 교반하였다. 반응이 완료되면 포화 NH_4Cl 용액과 EA(X3)를 가하여 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 건조한 후 여과하고 감압 농축하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Hex:EA=3:1)로 정제하여 7,9-디부틸-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온을 얻었다(3; 100 mg, 수율: 16%).

[0363] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.15 (s, 2H), 3.90 (m, 2H), 3.05 (m, 2H), 1.61 (m, 4H), 1.35 (m, 4H), 0.95 (t, 6H).

[0364] C. 3,6-디머캅토-1,4-디부틸피페라진-2,5-디온(4)

[0365] 메탄올/THF 혼합용매(1:1)에 7,9-디부틸-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온(3; 100 mg, 0.28 mmol)을 용해시킨 후, 얼음수조 하에서 NaBH_4 (32 mg, 0.84 mmol, 3.0 eq.)를 서서히 첨가하였다. 30분 동안 교반한 후 반응이 완료되면 용매를 제거하였다. 조 화합물에 포화 NH_4Cl 용액과 EA(X3)를 첨가하여 추출하였다. 유기층을 모아 황산마그네슘으로 건조한 후 여과하고 감압 농축하여 3,6-디머캅토-1,4-디부틸피페라진-2,5-디온(4)을 얻었다. 상기 화합물은 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다.

[0366] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.03 (d, 2H), 3.80 (m, 2H), 3.21 (m, 2H), 1.63 (m, 4H), 1.37 (m, 4H), 0.96 (t, 6H).

[0367] D. 5,7-디부틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(5; A8)

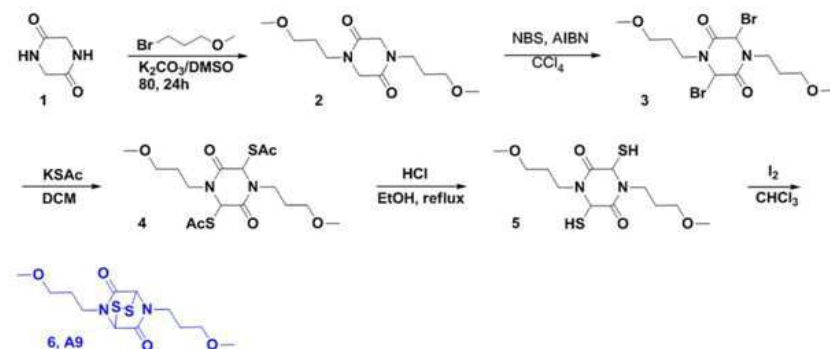
[0368] 클로로포름 30 ml에 상기 획득한 디티올 조 화합물(4)을 용해시킨 후 아이오딘(86 mg, 0.34 mmol)을 녹인 클로로포름 용액 20 ml를 첨가하였다. 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 감압 농축하여 용매를 제거하고 실리카겔 컬

럼 크로마토그래피(EA:Hex=1:3)로 정제하여 5,7-디부틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(5)을 얻었다(26 mg, 2 단계 수율-32%). 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 45에 나타내었다.

[0369] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.27 (s, 2H), 3.50 (m, 4H), 1.66 (m, 4H), 1.35 (m, 4H), 0.95 (t, 6H).

[0370] ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$): 311 calc. for $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 288.

[0371] **제조예 9: 5,7-비스(3-메톡시프로필)-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(A9, 화학식 14)의 제조**



[0372]

[0373] **A. 1,4-비스(3-메톡시프로필)피페라진-2,5-디온(2)**

[0374] DMSO 10 ml에 무수 글리신(0.5 g, 4.38 mmol)과 K_2CO_3 (2.12 g, 15.33 mmol)를 분산시킨 후 승온시켜 80°C에서 15분간 교반하였다. 1-클로로-3-메톡시프로판(1.43 ml, 13.14 mmol)을 1방울씩 천천히 첨가하였다. 80°C에서 24 시간 동안 반응시킨 후 반응을 종료하고 고체를 여과하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(DCM:MeOH=9:1)로 정제하여 1,4-비스(3-메톡시프로필)피페라진-2,5-디온(2)을 얻었다(350 mg, 수율 31%). 잔류 DMSO는 물로 추가 세척하였다.

[0375] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 3.98 (s, 4H), 3.48 (t, 4H), 3.41 (t, 4H), 3.32 (s, 6H), 1.84 (m, 4H).

[0376] **B. 3,6-디브로모-1,4-비스(3-메톡시프로필)피페라진-2,5-디온(3)**

[0377] 사염화탄소(50 ml)에 1,4-비스(4-메톡시프로필)피페라진-2,5-디온(2; 200 mg, 0.77 mmol), N-브로모숙신이미드(276 mg, 1.55 mmol, 2.01 eq.) 및 AIBN(azo-bis-isobutyronitrile; 6.3 mg, 0.04 mmol, 0.05 eq.)를 분산(dispersion)시킨 후, 2시간 동안 환류하면서 반응시켰다. 반응이 완료되면 상온으로 냉각한 후 생성된 고체를 여과하였다. 용매를 제거하고 감압 건조하여 3,6-디브로모-1,4-비스(3-메톡시프로필)피페라진-2,5-디온(3)을 얻었다. 추가 정제 없이 다음 반응에 그대로 사용하였다.

[0378] ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3): δ ppm 6.21 (s, 2H), 3.92 (m, 2H), 3.41 (m, 4H), 3.32 (s, 6H), 3.25 (m, 2H), 1.87 (m, 4H).

[0379] **C. 1,4-비스(3-메톡시프로필)-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트(4)**

[0380] 3,6-디브로모-1,4-비스(4-메톡시프로필)피페라진-2,5-디온(3; 400 mg, 0.96 mmol)을 DCM 30 ml에 용해시키고 얼음수조에서 소듐 티오아세테이트(329 mg, 2.888 mmol, 3.0 eq.)를 첨가하였다. 혼합물을 상온에서 밤새 교반하였고 생성된 고체를 여과하고 용액에서 용매를 제거하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EA:Hex=1:1 내지 3:1)로 정제하여 1,4-비스(4-메톡시프로필)-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트(4)를 얻었다(65 mg, 2 단계 수율-6.4%).

[0381] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.88 (s, 2H), 3.95 (m, 2H), 3.43 (m, 4H), 3.37 (s, 6H), 2.98 (m, 2H), 2.43 (s, 6H), 1.90 (m, 4H).

[0382] D. 3,6-디머캅토-1,4-비스(3-메톡시프로필)피페라진-2,5-디온(5)

[0383] 에탄올에 상기 디티오아세테이트(4; 40 mg, 0.1 mmol)를 분산시킨 후 에탄올성 염산 용액(아세트릴 클로라이드 0.75 ml를 에탄올 3.5 ml에 가하여 제조함)을 1방울씩 첨가하고, 상기 혼합 용액을 2시간 동안 환류하면서 반응시켰다. 반응이 완료되면 상온까지 냉각시켜 유기 용매를 제거하고 건조하여 3,6-디머캅토-1,4-비스(메톡시프로필)피페라진-2,5-디온(5)을 얻었다. 얻어진 화합물은 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다.

[0384] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.08 (d, 2H), 3.89 (m, 2H), 3.41 (m, 4H), 3.35 (s, 6H), 3.23 (m, 2H), 3.18 (d, 2H), 1.93 (m, 4H).

[0385] E. 5,7-비스(3-메톡시프로필)-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(6; A9)

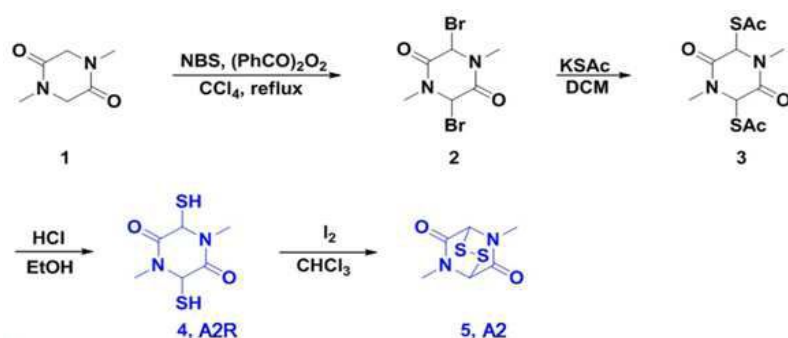
[0386] 클로로포름 10 ml에 녹인 3,6-디머캅토-1,4-비스(메톡시프로필)피페라진-2,5-디온(5; 25 mg, 0.08 mmol) 용액에 DCM 15 ml에 녹인 아이오딘(20.3 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq.) 용액을 첨가하고, 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 완료되면 용매를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Hex:EA=1:1 내지 1:2)로 정제하여 5,7-비스(메톡시프로필)-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온(6)을 얻었다(9 mg, 수율 36%). 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 46에 나타내었다.

[0387] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.35 (s, 2H), 3.69 (m, 2H), 3.57-3.9 (m, 6H), 3.36 (s, 6H), 1.93 (m, 4H).

[0388] ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$): 343 calc. for $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ 320.

[0389] <환원형의 디티올기를 포함하는 피페라진디온 유도체의 합성>

[0390] 제조예 10: 3,6-디머캅토-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온(A2R)



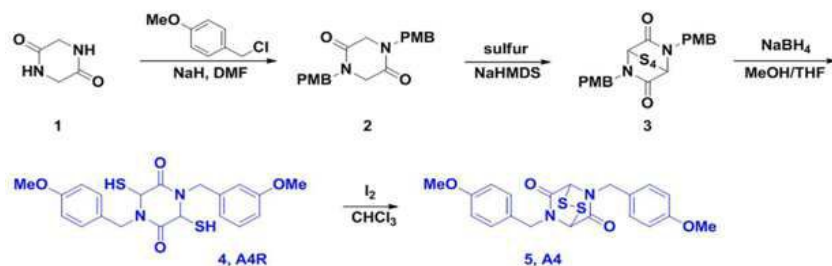
[0391] .

[0392] 상기 제조예 2의 A 내지 C 단계와 동일한 방법으로 3,6-디머캅토-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온을 얻었다. 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 37에 나타내었다.

[0393] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.00 (s, 2H), 3.09 (s, 6H).

[0394] ESI-MS ($\text{M}-1$): 205 calc. for $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 206.

[0395] 제조예 11: 3,6-디머캅토-1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온(A4R)



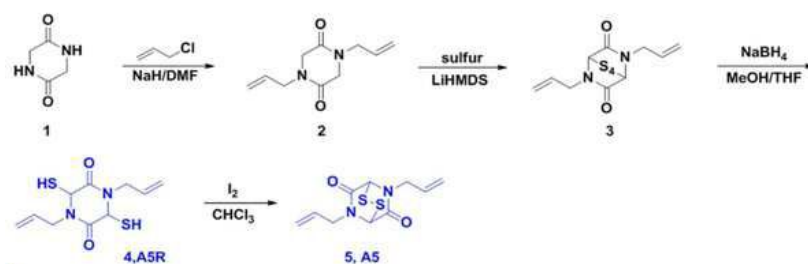
[0396]

[0397] 상기 제조예 4의 A 내지 C 단계와 동일한 방법으로 3,6-디머캅토-1,4-비스(4-메톡시벤질)피페라진-2,5-디온을 얻었다. 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 40에 나타내었다.

[0398] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.20 (d, 4H), 6.89 (d, 4H), 5.21 (d, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.12 (d, 2H), 3.85 (s, 6H), 3.05 (br s, 2H).

[0399] ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$): 441 calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ 418.

[0400] 제조예 12: 3,6-디머캅토-1,4-디알릴피페라진-2,5-디온(A5R)



[0401]

[0402] 상기 제조예 5의 A 내지 C 단계와 동일한 방법으로 3,6-디머캅토-1,4-디알릴피페라진-2,5-디온을 얻었다. 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 42에 나타내었다.

[0403] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5.80-5.70 (m, 2H), 5.39-5.31 (m, 4H), 5.07 (s, 2H), 4.68 (d, 2H), 3.70-3.64 (m, 2H), 3.09 (br s, 2H).

[0404] 실시예 1: 재료

[0405] 항-PrxI 및 PrxII 항체는 AbFrontier(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 본 발명에 사용된 PrxII 특이적 siRNA의 서열은 하기와 같다: 5'-CGCUUGUCUGAGGAUUACGUU-3'(human PrxII siRNA-1, Prx2-1; 서열번호 1), 5'-AGGAUAUUUCUCCAAACAUU-3'(human PrxII siRNA-2, Prx2-2; 서열번호 2), 5'-ACTCAACTGCCAAGTGATTUU-3'(human PrxI siRNA, Prx1; 서열번호 3) 및 5'-AAAUCAAGCUUCGGACUAUU-3'(mouse PrxII siRNA-1, mPrx2-1; 서열번호 4). 상기 siRNA 올리고뉴클레오타이드 이합체는 Dharmacon으로부터 합성되었다. 대조 siRNA로는 초파리 루시페라아제 siRNA를 합성하여 사용하였다. siRNA 이합체는 리포펙타민 RNAi MAXTM Invitrogen)을 이용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 전달감염시켰다.

[0406] 랫트 경동맥 풍선 손상 실험을 위해 랫트 PrxII에 대한 4개의 siRNA 이합체의 SMART pool(5'-GCAACGCGCACAUCCGAAAUU(서열번호 5), 5'-GAUCACAGUCAACGACCUAUU(서열번호 6), 5'-AGAAUACGGCGUGUGAAAUU(서열번호 7), 및 5'-ACGUGAGGACUUCGAAAUU(서열번호 8); Dharmacon Cat. no. D-089973)을 사용하였다. 대조 siRNA로는 초파리 루시페라아제 siRNA를 합성하여 사용하였다.

[0407] 글리오톡신(gliotoxin), 키토신(chetocin) 및 키토민(chetomin)은 시그마-알드리치로부터 구입하였다. 비스(메틸티오)글리오톡신(bis(methylthio)gliotoxin)은 산타크루즈 바이오테크놀로지로부터 구입하였다. SU-5416은

Calbiochem으로부터 구입하였다. 인산-PLC γ 1(pY673), PLC γ 1 및 인산-VEGFR2(pY1175) 항체는 Cell Signaling Technology로부터 구입하였다. 항-PDGFR- β (M-20) 및 KDR/Flk-1(VEGFR2) 항체는 산타크루즈 바이오테크놀로지로부터 구입하였다. 항-인산타이로신(4G10) 및 PDGF-BB는 업스테이트로부터 구입하였다. VEGF-A(인간 VEGF₁₆₅)는 R&D 시스템즈로부터 구입하였다. 마우스 항-랫트 CD31 항체는 BD 바이오사이언스로부터 구입하였다. Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit 및 Alexa Fluor 568-conjugated donkey anti-mouse 2차 항체는 Invitrogen으로부터 구입하였다. 바이오틴화 염소 항-래빗 IgG, 아비딘-HRP 및 DAB 기질은 Vector Laboratories로부터 구입하였다. PrxI, PrxII, Prx-SO_{2/3} 및 인산-PDGFR- β pY857) 래빗 다클론 항체는 이전에 설명된 대로 준비하였다[M. H. Choi *et al.*, 2005, *Nature*, 435: 347].

[0408] 실시예 2: 세포 배양

인간 동맥 내피 세포(human aortic endothelial cells; HAECs)와 인간 동맥 평활근 세포(human aortic smooth muscle cells; HASMCs)를 Clonetics-BioWhittaker(venders, Belgium)로부터 구입하였다. 0.1% 젤라틴 코팅 접시에 시딩하여 37°C의 5% 이산화탄소를 포함하는 습식 배양기에서 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS)과 전체 보충물(full supplement; HAECs에 대해 Cat. no. cc-4176, 및 HASMCs에 대해 Cat. no. cc-4149; Clonetics-BioWhittaker)을 포함한 내피 기본 배지(Endothelial Basal Medium; EBMTM-2)와 평활근 세포 기본 배지(Smooth Muscle Cell Basal Medium; smBMTM) SingleQuotes 로 각각 배양하였다. 본 발명에서는 5 내지 7계대의 세포를 사용하였다.

흑색종 세포주 SK-MEL-5, A375 및 B16F10 세포는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS)를 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)을 이용하여 37°C의 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. SK-MEL-28 및 G361 세포는 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지에 배양하였다.

인간 표피 멜라닌세포(human epidermal melanocyte)는 인간 멜라닌세포 성장 보충물을 포함하는 미디엄 254(Cascade BiologicsTM)에 배양하였다. 본 발명에 사용된 흑색종 세포주 및 멜라닌 세포는 American Type Culture Collection으로부터 구입하였다.

[0412] 실시예 3: 퍼록시다아제(Peroxidase) 활성 분석

공지된 방법에 따라 본 발명에 따른 에피타이오디옥소피페라진 유도체들(이하에서, ETP 화합물이라 지칭하였다)의 퍼록시다아제 활성 분석을 수행하였다[대한민국 등록특허 제10-0953326호]. 250 μ M NADPH, 3 μ M 효모 티오레독신(thioredoxin; Trx), 1.5 μ M 효모 티오레독신 환원효소(Trx reductase; TR), 25 μ M ETP 화합물 및 1.2 ml 과산화수소를 포함하는 1 mM EDTA 함유 50 mM Hepes-NaOH 완충액(pH 7.0)의 반응혼합물 200 μ L로 분광광도법 분석을 위한 표준 퍼록시다아제 반응을 수행하였다. 글루타치온(glutathione; GSH)-의존 퍼록시다아제 반응과 비교를 위해, 효모 Trx와 TR 대신 GSH(1 mM)와 효모 글루타치온 환원효소(GSH reductase; GR)(1 Unit)를 첨가하였다. 각각의 반응은 과산화수소를 가함으로 시작되었고, 30°C에서 12분간 Agilent UV8453 분광광도계(Hewlett Packard, USA)로 340 nm에서 흡광도 감소를 따라 NADPH 산화를 모니터링하였다. 초기반응속도는 곡선의 선형부분을 사용하여 계산하였고 분당 산화되는 NADPH의 양으로 표현하였다.

[0414] 실시예 4: 시험관 내 혈관 세포 기능 분석

세포 증식 분석을 위하여, siRNA-전달감염(transfection) 시약 혼합물을 포함하는 96-웰 플레이트에 HAECs를 4000 세포/웰의 농도로 최종 부피를 100 μ L로 하여 분주하였다. 24시간 동안 siRNA-전달감염 후, 18시간 동안 세포를 혈청 고갈되게 하고 추가적인 24시간 동안 VEGF-A165(25 ng/ml, Cat. no. 293-VE, R&D systems)를 첨가한 EBM-2 기본 배지에 두었다. 세포 증식 정도를 WST-1 세포 증식 분석 키트(Roche Diagnostics, USA)를 사용하여 측정하였고, 세포 수를 600 nm에서 흡광도를 감하고 3개 웰에서 평균하여 450 nm에서의 흡광도로 표현하였다.

세포 이동 분석은 24-웰 트랜스웰 배양 챔버(Costar; 8- μ m pore size)에서 수행하였다. 여과기의 바닥을 젤라틴 B(1 mg/ml)로 코팅하고 1시간 동안 자연 건조시켰다. siRNA 전달감염 복합체를 포함하는 상부 챔버에

HAECs(6×10^3)를 더하였다. 24시간 후, siRNA 전달감염시킨 HAECs를 밤새도록 혈청-고갈시켰다. 0.5% 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA)을 포함하는 기본 배지에 VEGF-A(25 ng/ml) 용액을 제조하여 바닥 챔버에 첨가하였다. 상부 챔버 웰은 0.5% BSA를 포함하는 각각의 기본 배지로 채웠다. 트랜스웰 챔버는 37°C/5% 이산화탄소 조건하에서 8시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 여과기 위쪽의 비이동 세포를 제거하였고 여과기의 바닥으로 이동한 세포는 고정하여 0.6% 헤마톡실린 및 0.5% 에오신으로 염색하였다. 염색된 세포를 사진으로 찍고 계수하였다. 이동한 세포의 수는 3개의 웰로부터 평균하였다.

[0417] 실시예 5: 면역블롯 분석

세포를 빙냉의 PBS로 세척하고 20 mM Hepes(pH 7.0), 1% 트리톤 X-100, 150 mM NaCl, 10% 글리세롤, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, 1 mM AEBSF, 아프로티닌(aprotinin; 5 $\mu\text{g/ml}$) 및 루페틴(leupeptin; 5 $\mu\text{g/ml}$)을 포함하는 추출완충액에 용해시켰다. 12,000xg로 원심분리한 후, 정제된 세포 추출물을 면역블롯팅에 사용하였다. 로딩을 조절하기 위하여 67 mM Tris (pH 6.7), 2% SDS, 100 mM 2-머캅토에탄올 용액에 60°C에서 30분간 흔들어 막을 벗겨내고 적절한 팬(pan)-항체로 재표지하였다.

[0419] 실시예 6: 면역세포화학

유리 커버 슬라이드 상에 세포를 배양하여 미리 데운 4% 파라포름알데하이드 용액으로 15분간 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 2회 세척하고 0.2% 트리톤 X-100으로 상온에서 30분 동안 처리하여 세포투과성을 갖도록 하였다. 이후, 세포를 2% BSA를 포함하는 PBS 용액으로 1시간 동안 차단하고 차단 완충액(blocking buffer)에 희석시킨 일차 항체와 함께 4°C에서 밤새도록 인큐베이션하였다: 항-인산타이로신(anti-phosphotyrosine; clone 4G10, 1:100), 항-Prx1(1:300), 항-Prx2(1:300), 항- β -카테닌(1:200) 및 항-E 카테린(1:200). 차단 완충액으로 세포를 3회 세척하고 알렉사 플루오르 568 또는 알렉사 플루오르 488 결합된 이차항체와 30분간 인큐베이션하였다. 상기 염색된 커버슬립을 차단 완충액으로 3회 세척하고 마운트하였다. 형광이미지는 LSM510 META 공초점 레이저 주사 현미경(Zeiss)으로 기록하였다.

[0421] 실시예 7: 세포 내 과산화수소의 측정

세포 내 H_2O_2 수준은 산화-민감성 형광염료(oxidation-sensitive fluorescent dye)인 5,6-클로로메틸-2',7'-디클로로디히드로플루오레신 디아세테이트(CM-DCFH-DA, Invitrogen)를 이용하여 측정하였다. 인간 포피 멜라닌세포, SK-MEL-5, SK-MEL-28, A375 및 G361 세포(3×10^5)를 35 mm 배양접시에 배양하여 24시간 동안 레트로바이러스로 감염시켰다. 이후 세포로부터 18시간 동안 혈청을 고갈시키고 페놀레드를 포함하지 않는 배지에서 20% FBS로 10분 동안 자극하였다. 이와 같이 자극시킨 후, 세포를 크렙-링거 용액(Krebs-Ringer solution)으로 빠르게 세척하고 5 μM CM-DCFH-DA와 5분 동안 인큐베이션하였다. 도립(inverted) Axiovert 200 형광현미경(Zeiss)으로 2',7'-디클로로디히드로플루오레신(2',7'-dichlorodihydrofluorescein; DCF) 형광을 10초 동안 수집하였다. ImageQuant™ 소프트웨어(GE Healthcare)를 이용하여 각각의 이미지로부터 바탕신호를 제거한 후 60 내지 80개 세포의 형광세기를 평균하여 상대적인 DCF 형광을 계산하였다. 탈착된 둥근 세포는 정량에서 배제하였다.

[0423] 실시예 8: 레트로바이러스 생산

bicitronic pLXIN 벡터와 Retro-X Q 벡터 시스템(Clontech)을 이용하여 인간 PrxII를 인코딩하는 레트로바이러스를 생산하였다. 먼저, PCR 클로닝으로 인간 PrxII 야생형(WT) 코딩 서열을 pLXIN에 삽입하였다. 결과로 얻은 벡터를 안정적인 NIH3T3 기반 dualtropic packaging 세포주 RetroPack™ PT67에 안정적으로 전달감염시켜 바이러스를 생산하였다. 상기 바이러스는 주로 SK-MEL 세포에서 PrxII의 과발현을 위해 사용하였다. 바이러스농도(viral titers)를 결정하고(1×10^6 바이러스 입자/ml) 분주하여 -70°C에 보관하였다. 레트로바이러스 감염을 위해, 분주한 바이러스를 따뜻한 수조에서 녹이고 10 $\mu\text{g/ml}$ 폴리브렌(polybrene)과 혼합하였다.

[0425] **실시예 9: 증식 및 이동 에세이**

[0426] WST-1 세포 증식 에세이 키트(Roche Diagnostics, USA)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 세포 증식을 측정하였다. 세포 수는 600 nm에서 혼탁도(turbidity)를 감한 후 3개 웰로부터 평균한 450 nm에서 흡광도 값으로 나타내었다. 24-웰 트랜스웰 배양 챔버(Costar; polycarbonate membrane insert with 8- μ m pore size)에서 화학주성이동 에세이를 수행하였다. 삽입물(insert)의 바닥을 젤라틴B(1 mg/ml)로 코팅하고 1시간 동안 대기중에 건조하였다. 흑색종 세포(6×10^3)를 레트로바이러스 또는 전달감염 복합체(transfection complex)를 포함하는 삽입물에 가하였다. 24시간 후, 감염된 또는 전달감염된 흑색종 세포를 18시간 동안 혈청 고갈시켰다. 20% FBS 용액을 0.5% BSA를 함유한 기본배지를 포함하는 바닥챔버에 첨가하였다. 상부 챔버 웰은 각각 0.5% BSA를 함유한 기본배지로 채웠다. 트랜스웰 챔버를 37°C/5% CO₂ 인큐베이터에 12시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 여과기 상부로부터 이동하지 않은 세포를 제거하였다. 여과기의 바닥으로 이동한 세포를 고정하고 0.6% 헤마톡실린(hematoxylin)과 0.5% 에오신(eosin)으로 염색하였다. 염색된 세포를 사진으로 찍어 계수하였다. 이동한 세포의 수는 3개 웰로부터 평균하였다.

[0427] **실시예 10: 상처 봉합 에세이**

[0428] 피펫 팁으로 긁어 세포 단층에 상처를 만들었다. PBS로 세척하여 세포조각을 제거하고 신선한 배지를 공급하였다. 이후 12시간 동안 상처로 세포가 증식하고 이동하도록 하였다. 상처부위의 세포의 이동을 현미경으로 관찰하였다. 상처 너비는 Image J 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

[0429] **실시예 11: 마우스에서 B16F10 흑색종 세포의 폐전이**

[0430] B16F10 세포를 PrxII siRNA로 24시간 동안 일시 전달감염시키고, 트립신화한 후 헝크 균형 염용액(Hank's balanced salt solution; HBSS)에 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 C57/BL6 마우스에 정맥내주사로 주입하였다(마우스 당 1×10^6 세포). 10일 후 마우스를 치사시키고 3.7% 포름알데하이드를 포함하는 헤파린화 식염수(heparinized saline)로 경심관류-고정(transcardiac perfusion-fixation) 후 폐를 적출하였다. 적출한 폐는 파라핀에 포매시키고 회전식 마이크로톰(rotary microtome; Leica RM2255)으로 절편을 제조하였다. 두 개의 연속적인 조직 절편(4 μ m 두께)을 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 폐의 표면 및 HE-염색된 조직 절편에서 전이된 흑색종 중앙 결절을 계수하였다. 글리오톡신(glutoxin; GT), 키토신 및 키토민의 효과를 확인하기 위하여, C57/BL6 마우스에 흑색종 세포를 정맥내로 주사한 후 글리오톡신(300 mg/kg)을 10일 동안 5회 복강내로 주사하였다.

[0431] **실시예 12: NADPH 산화효소 활성 분석**

[0432] 전세포 과산화물(superoxide) 생성은 증강된 발광 시스템(Diogenes, National Diagnostics)을 사용하여 측정하였다. 분석을 위하여, 혈청-고갈된 세포를 100 μ L의 Diogene 시약과 37°C에서 5분간 미리 인큐베이션하였다. 표기된 성장인자로 자극받은 후 화학발광을 TD-20/20 Luminometer(Turner Biosystems)로 10분간 매초 검출하였다.

[0433] **실시예 13: 랫트 경동맥의 풍선-손상 모델(balloon-injury model of rat carotid artery)**

[0434] 동물실험은 이화여자대학교의 동물실험 윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 규정에 따라 수행하였다. 풍선 손상은 좌측 총경동맥(common carotid artery)에 삽입된 2F Fogarty 풍선 카테터를 사용하여 하기와 같이 생성하였다: 10주령 수컷 Sprague-Dawley 랫트를 이소플루란 가스(N₂O:O₂/70%:30%) 흡입으로 마취시키고, 좌측 외경동맥(external carotid artery)을 노출시킨 후, 그 가지를 전기-응고시켰다. 카테터를 외경동맥의 가로동맥절개(transverse arteriotomy)를 통해 1 cm 밀어넣고 총경동맥을 따라 3회 통과시켜 내피를 박리시켰다. 카테터 제거 후 도려낸 부위를 봉하고 덧붙인 총경동맥은 혈류 재개를 위해 개방되었다. 달리 언급되지 않는 한, 랫트는 10일 동안 우리(cage)에서 회복시키고 조직학적 및 면역학적 분석에 사용되었다.

[0435] **실시예 14: 조직학적 분석**

[0436] 랫트를 마취시키고 3.7% 포름알데히드를 포함한 해파린화 염용액으로 경심 관류-고정(transcardiac perfusion-fixation) 후 총경동맥을 절개하였다. 혈관을 파리핀 함몰시키고 회전 마이크로톰(Leica RM2255)으로 절단하였다. 총경동맥의 중앙부위로부터 두 개의 연속 조직 단편(4 μ m 두께)을 얻어 헤마톡실린과 에오신(HE)으로 염색하였다. 내강, 내부 탄력판, 및 외부 탄력판 부분을 NIH Image v1.62를 사용하여 측정하였다. 내막 및 내측 부분은 내부 탄력부분으로부터 내강 부분을 제거하여 그리고 외부 탄력부분으로부터 내부 탄력부분을 제거하여 결정하였다. 분석을 위해 각각의 랫트에 대해 연속된 두 개의 단편으로부터의 값을 평균하였다.

[0437] **실시예 15: 경동맥 내 siRNA 또는 ETP 화합물 또는 유도체의 국소 전달**

[0438] siRNA의 생체 내 주입을 위해, 랫트 PrxII(200 nM)에 특이적인 siRNA 혼합물을 제조업자(Ambion)의 지시에 따라 siPORTTM NeoFXTM 시약과 미리 혼합하였다. 풍선 손상 직후, Opti-MEM으로 간단히 세척한 후 siRNA 주입 혼합물(200 μ L)을 카테터를 통해 주사하였다. 15분 인큐베이션 후, 혈류를 재개하였다. 형광 염료-결합 대조 siRNA인 siGLO-Red(Dharmacon)를 사용하여 생체 내 siRNA 주입 효율을 최적화하였다. 유사하게, ETP 화합물(200 nM in DMSO)을 카테터를 통해 주사하고 30분간 인큐베이션하였다.

[0439] **실시예 16: 면역조직화학 및 면역형광 염색**

[0440] 항-Prx-SO_{2/3} 항체(1:1000 희석)를 사용하여 파라핀 단편에서 과산화된 2-시스 Prx(overoxidized 2-Cys Prx)에 대한 면역조직화학을 수행하였다. 간략히 설명하면, 자일렌에서 단편의 밀랍을 벗기고 에탄올에서 재수화하고, 이어서 구연산 완충액(pH 6.0)에서 가열하여 항체 회수(retrieval)를 수행하였다. 이후 절편을 1차 항체와 4°C에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 인산완충염용액으로 3회 세척 후 절편을 퍼록시다아제-결합 2차 항체와 인큐베이션하고 3',3'-디아미노벤지딘(3', 3'-diaminobenzidine; DAB) 기질(substrate) 용액으로 염색하였다. 음성 염색을 위해, Prx-SO_{2/3} 항체를 해당 항원웹타이드(DFTFVC(SO_{2/3})PTEI)로 차단하였다. 간접적인 면역형광 염색을 위하여, 파라핀 절편을 PBST(0.3% 트리톤 X-100의 PBS 용액)에서 5% 정상 래빗 혈청(Vector Laboratories)으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 이후, 절편을 랫트 smooth muscle alpha-actin(1:300 희석)과 랫트 CD31(PECAM-1, 1:200 희석)에 대한 항원과 4°C에서 밤새도록 인큐베이션하였다. 핵은 DAPI로 표지하였다. PBST로 수 회 세척 후, 시료를 실온에서 2시간 동안 Alexa Fluor 568-conjugated donkey anti-mouse 및 Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG 항체와 인큐베이션하였다. 형광이미지는 아르곤 및 헬륨-네온 레이저가 장착된 LSM 510 Meta 공초점 현미경을 사용하여 100X의 스크린 배율로 조직 절편 당 세군데의 임의의 영역에서 기록하였다.

[0441] **실시예 17: TUNEL 분석**

[0442] 파라핀 절편을 0.1% 트리톤 X-100을 포함한 PBS에서 10분간 인큐베이션하였다. 이후, TUNEL 반응을 제자리 세포 사멸 검출 키트(In situ Cell Death Detection Kit), 플루오레신(Roche Diagnosrics Corp.)을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 37°C에서 60분간 수행하였다. 세포 핵은 DAPI로 대조염색하였다.

[0443] **실시예 18: 혈관 투과성 실험**

[0444] 마우스에 100 μ L의 5% 에반스 블루(Evans blue)를 30분간 정맥내 주사하고 5분간 PBS로 관류시켰다. 손상되지 않은 결가지와 손상된 동측 모두로부터 총경동맥을 제거하였다. 이를 절개하고 세로로 개방하여 위상차 현미경에서 20배의 배율로 관찰하였다. 정량을 위하여, 55°C에서 하룻밤 동안 포름아마이드에 두어 혈관 내 유입된 에반스 블루를 추출하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 수거하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 에반스 블루 염료의 바탕 값은 740 nm에서 측정하여 경동맥에서의 값으로부터 제거하였다. VEGFR2 억제제를 위하여, SU5416(20 mg/kg)를 풍선 손상 전과 후 3회(Day-1, 1 및 3) 복강내 주사하였다. 대조 주사는 비히클을 포함한 PBS 200 μ L (5% DMSO)를 사용하였다.

[0445] **실시예 19: 주사 전자 현미경검사(Scanning Electron Microscopy; SEM)**

[0446] 동물들로부터 경동맥 혈관을 취하여 세로로 개방하고 2.5% 글루타르알데히드로 24시간 동안 고정하였다. 조직을 PBS로 세척하고 1% 오스뮴 테트라옥사이드와 인큐베이션하고, 일련의 에탄올 희석을 통해 탈수시켰다. 조직을 임계점까지 건조시키고 콜로이드 은 페이스트로 주사 전자 현미경 stub에 고정하였다. 금/팔라듐으로 스퍼터-코팅한 후 검체를 주사 전자 현미경(Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

[0447] **실험예 1: 과산화수소 환원에 대한 촉매활성**

[0448] 본 발명의 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들의 화학적 특징은 에피디티오디옥소피페라진 고리 부분(ring moiety)에 있는 분자내 이황가교(internal disulfide bridge)이다. 세포의 퍼록시다아제는 두 개의 전자-전달 경로 즉, Trx/TR 또는 GSH/GR을 통해 NADPH로부터 유래된 전자를 이용하여 과산화수소를 환원시키므로, 각각의 시스템 존재 하에 과산화수소-환원 활성에 대해 분광광도 분석을 수행하였고 그 결과를 도 1 내지 5에 나타내었다.

[0449] 그 결과, 도 1 내지 5에 나타나듯이 에피디티오디옥소피페라진 구조를 공유하는 A1 내지 A9, 글리오톡신, 키토신 및 키토민 모두는 Trx/TR 시스템 존재 시 우수한 과산화수소-환원 활성을 나타내었다. 특히, 흥미롭게도 Trx/TR 시스템 존재 시 키토신 및 키토민의 활성은 각각 8.18 ± 0.24 및 8.62 ± 0.51 nmol/min으로 GT(3.72 ± 0.53 nmol/min)보다 약 2배 높은 것으로 나타났다(도 5). GSH/GR 시스템 존재 시 키토신과 키토민은 각각 1.51 ± 0.39 및 2.53 ± 0.79 nmol/min의 활성을 보이나 Trx/TR 시스템과 비교하면 미약하다. 따라서, 도 5d 내지 5f에 나타난 바와 같이, ETP 화합물의 과산화수소-환원 활성은 Trx/TR/NADPH 시스템의 모든 세가지 요소를 요구하며, 이는 농도에 비례하였다. 또한, 대조군으로는 티올기가 메틸화된 비스(메틸티오)글리오톡신을 사용하였다. 그 결과 티올기가 메틸화된 비스(메틸티오)글리오톡신의 경우 퍼록시다아제 활성이 관찰되지 않았다(도 5g). 또한, 티올기가 메틸기로 치환된 비스(메틸티오)글리오톡신의 경우 산화-환원 반응 등에 의한 이황 가교가 거의 불가능하기에 퍼록시다아제 활성조차 없는 것을 알 수 있었다. 이로부터 화합물 내 고리에서 디티올(dithiol)의 산화-환원 순환(oxidation-reduction cycle)이 퍼록시다아제 활성에 필수적이라는 것을 알 수 있었다. 또한 상기 결과로부터 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들의 2-Cys-Prx-유사 퍼록시다아제 활성이 Trx/TR 시스템 의존적임을 확인하였다.

[0450] 또한, A2, A4 및 A5의 환원형(A2R, A4R 및 A5R)을 이용하여 그 결과를 비교해보았다(도 3 및 4). 이들 환원형 화합물은 해당 산화형(각각 A2, A4 및 A5)와 유사한 과산화수소-환원 활성을 나타내었다. 나아가 상기 비교군은 분자 내 이황가교결합이 환원되어 두 개의 티올기를 포함하는 화합물로서 이들 화합물은 세포 내 2-Cys-Prx의 활성형과 유사한 형태를 가지므로 Trx/TR 시스템에 의한 환원형으로의 전환과정 없이 직접 과산화수소의 환원에 이용될 수 있으므로, 과산화수소 환원에 대한 초기 반응속도는 해당 산화형에 비해 높은 값을 갖는 것으로 확인되었다.

[0451] 한편, 후술할 실험에서 A2R, A4R 및 A5R은 실제로 PDGF- 및 VEGF-의존적인 세포 증식 및 이동 조절 활성을 나타내지 않는데, 이는 티올기가 노출된 환원형의 상태로 세포 내부로 유입이 불가능하기 때문에 PDGF- 및 VEGF-의존적인 세포증식 및 이동을 조절하는 활성이 없는 것으로 유추할 수 있었다. 이로부터 ETP 유도체 내의 피페라진 고리에서 분자 내 이황가교결합과 디티올 간의 산화-환원 순환(oxidation-reduction cycle)이 퍼록시다아제 활성에 필수적이라는 것을 알 수 있었다. 또한 상기 결과로부터 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들의 2-Cys-Prx-유사 퍼록시다아제 활성이 Trx/TR 시스템 의존적임을 확인하였다.

[0452] **실험예 2: 시험관 내 및 생체 내 세포독성 실험**

[0453] 종래에 ETP 화합물들은 대부분 동물세포에 대하여 독성을 가진다고 알려져 있다. 따라서 본 발명자들은 혈관세포에 대한 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들의 안전한 농도 범위를 결정하였다. 이를 위해 인간 대동맥 혈관평활근세포(HASMCs) 및 대동맥 혈관내피세포(HAECs)를 다양한 농도의 글리오톡신 또는 키토신 및 본 발명에 따른 ETP 유도체인 A1 내지 A9으로 2시간 동안 선처리하고 신선한 배지에 24시간 동안 배양한 후 세포생존력 분석을 수행하였다(도 6 내지 10).

[0454] 그 결과, 혈청-결핍 조건하에서 글리오톡신 및 A1 내지 A9에 대한 HASMCs와 HAECs의 생존력은 각각 200 nM과 50

nM 이하의 농도에서 보장되었다. 키토신은 상대적으로 독성이 보다 낮은 결과를 나타내었다. 이러한 고농도에서 두 세포의 낮은 생존력은 NF- κ B 억제를 포함한 다양한 부작용으로 여겨진다. 따라서, 본 발명자들은 이하 실험을 위하여 HASMCs와 HAECs에 대한 시험관 내 실험에 안전한 용량인 100 nM과 50 nM 농도까지의 범위에서 ETP 화합물을 사용하되 경향성이 낮은 화합물에 대해서는 200 nM 및 100 nM 범위까지 높여 실험하였다.

[0455] **실험예 3: 성장인자-유도 신호전달 및 세포증식/이동에서 글리오톡신 및 에피디티오디케토피페라진 유도체에 의한 PrxII 기능의 대체 효과**

[0456] **(1) 글리오톡신의 PrxII 기능의 대체 효과**

[0457] 먼저, PrxII 녹다운된 HASMCs 및 HAECs에서 GT의 세포 내 과산화수소 제거능력을 시험하였다. 세포의 과산화수소 생성을 산화제-감응 형광 염료(2',7'-디히드로-클로로플루오레신 디아세테이트, H₂DCF-DA)를 사용하여 모니터링하였다. 세포 내 과산화수소 수준은 혈청-결핍 대조 HASMCs에서 PDGF 처리에 의해 약 2배로 증가하였고, PrxII 녹다운과 결합하여 현격히 증가되었다(도 11a). 그러나, GT 처리는 농도-의존적 방식으로 증가된 세포 내 과산화수소 수준을 완전히 상쇄하였다(도 11a). 또한, PrxII 녹다운에 의해 상당히 증가된 HAECs에서의 세포 내 과산화수소 기저 수준 역시 GT 처리에 의해 완전히 제거되었다(도 11b).

[0458] 또한, PDGFR β - 및 VEGFR2-매개 신호전달 경로에 대한 GT의 조절효과를 시험하였다. HASMCs에서 GT 처리는 PrxII 녹다운에 의해 증가된 PDGF-유도 타이로신 인산화와는 확연히 구분된다(도 12a). 특별히, PDGFR β 와 PLC γ 1 활성화 수준을 자극된 대조군 세포의 수준으로 감소시켰다. 이와 달리 HAECs에서 GT 처리는 PrxII 녹다운에 의해 감소되었던 VEGFR2 및 ERK의 VEGF-의존적 활성화를 회복시켰다(도 12b). 나아가 혈관세포 기능에서 GT의 효과를 확인하였다. 증가된 농도의 GT 처리는 PrxII 녹다운에 의해 증가된, PDGF에 반응하는 HASMCs의 증식 및 화학주성 이동을 점차적으로 감소시켰다(도 13a 및 13b). 반대로, HAECs에 대한 동일한 처리는 PrxII 녹다운에 의해 손상되었던 VEGF-유도 증식 및 화학주성 이동을 향상시켰다(도 13c 및 13d).

[0459] **(2) A1 내지 A9의 PrxII 기능의 대체 효과**

[0460] PDGFR β - 및 VEGFR2-매개 신호전달 경로에 대한 ETP 유도체 A1 내지 A9의 조절효과를 시험하였다. 혈관세포 즉, 혈관평활근세포(HASMCs) 및 혈관내피세포(HAECs)의 기능에 대한 ETP 유도체의 효과를 확인하였다. 상기한 바와 같이 각각의 ETP 유도체는 HASMCs와 HAECs에 대해 각각 세포독성을 나타내지 않는 농도범위인 100 nM과 50 nM 이하의 농도 범위에서 사용하되 활성이 미미한 몇몇 화합물(A4, A7 및 A9)에 대해서는 최대 200 nM과 100 nM까지 농도를 높여 사용하였다.

[0461] 그 결과, 증가된 농도의 ETP 유도체 처리는 PrxII 녹다운에 의해 증가된, PDGF에 반응하는 HASMCs의 증식 및 화학주성 이동을 점차적으로 감소시켰다(도 14A 내지 21A). 반대로, HAECs에 대한 동일한 처리는 PrxII 녹다운에 의해 손상되었던 VEGF-유도 증식 및 화학주성 이동을 향상시켰다(도 14B 내지 21B).

[0462] 또한 티올기가 노출된 A2R, A4R 및 A5R을 사용하여 그 결과를 비교해보았다. 그 결과, HASMCs와 HAECs 모두에서 유의적인 변화를 일으키지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 16 및 18).

[0463] 세포독성을 나타내지 않는 낮은 나노몰랄 농도의 ETP 유도체 A1 내지 A9가 HASMCs 및 HAECs에서 RTK 신호전달과 세포 기능 조절을 충분히 조절할 수 있다는 사실은 주목할 만하다. 특히 상대적으로 크기가 작은 치환기를 갖거나 적은 수의 치환기를 갖는 A1 내지 A3, A5 및 A8에서 우수한 활성을, A6 및 A9에서 중간정도의 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 결론적으로 상기 실험결과는 낮은 농도의 ETP 유도체들이 PrxII 결여로 손상된 PDGF- 및 VEGF-유도 신호전달을 회복시킬 수 있음을 나타낸다.

[0464] **실험예 4: NADPH 산화제(NOX) 활성화에 대한 ETP 화합물의 효과**

[0465] HASMCs 및 HAECs를 PDGF-B와 VEGF-A로 각각 자극시켰을 때, NOX 활성은 약 2배로 증가하였다. 그러나, GT 및 키토신 처리시에는 상기 화합물들의 농도가 독성한계를 초과하는 500 nM로 증가할 때까지 NOX 활성을 억제하지 않았다(도 22). 따라서, 이들 ETP 화합물들은 두 가지 혈관세포 모두에서 PrxII를 대신할 수 있는 과산화수소

환원제로서 작용하나, 그 기전은 과산화수소 생성체 NOX를 억제하는 것은 아님을 알 수 있었다.

[0466] **실험예 5: 풍선-손상 경동맥에 대한 생체 내 실험을 통한 2-Cys-Prx, 특히 PrxII의 과산화 확인**

[0467] VSMCs 과다 증식 및 혈관의 재내피화를 모니터링할 수 있는 혈관손상 실험동물 모델(랫트 경동맥 풍선-유도 손상)을 사용하여 생체 내 ETP 화합물의 효과를 확인하였다. 풍선 카테터의 삽입으로 동맥이 손상되었을 때, 내피는 박리된다. 따라서, 손상된 혈관을 복구하기 위해 혈소판과 대식세포가 손상된 병변에 축적된다. 이들은 과산화수소를 포함한 활성 산소 라디칼을 생성하므로, 이웃한 혈관세포의 2-Cys Prx 효소는 술핀산/술폰산에 대한 활성자리 시스템 잔기(Cys-SO₂/3)의 과산화에 의해 불활성화된다고 여겨진다. 이러한 가능성을 설명하기 위해, 항-Prx-SO₂/3 항체를 이용하여 풍선-손상 랫트 경동맥의 2-Cys Prx 과산화를 확인하였다. 풍선 손상은 시간에 따라 경동맥의 혈관내막 비후를 유발하고(도 23a), 면역조직화학적 분석은 손상 후 5일과 7일에 내층과 혈관내막 층 모두에서 2-Cys Prx가 심하게 과산화됨을 나타낸다(도 23b). 과산화수소-처리 정상 혈관에서 해당 항원 펩타이드로 차단하여 면역-반응성 신호전달 특이성을 확인하였다. 면역블롯 분석은 풍선 손상에 의해 주요 2-Cys Prx의 과산화가 유도됨을 뒷받침한다. 항-PrxI 항체로 면역침전하여 PrxI과 PrxII를 분리하였을 때, PrxII의 과산화가 PrxI 또는 PrxIII에 비해 혈관내막 비후에 따라 주도적으로 증가됨을 확인하였다(도 23c). 이는 PrxI 과산화가 뚜렷한 과산화수소-처리 대조혈관과 대조된다. VSMCs의 PDGF-의존적 성장에서 PrxII의 음성적 조절 역할은 과산화에 의한 PrxII의 불활성화가 손상된 혈관벽에서 SMC 과다형성에 기여함을 입증한다. 실질적으로, 경동맥벽에서 PrxII 발현의 siRNA-매개 녹다운은 풍선 손상으로 유도되는 혈관내막 비후를 악화시킨다(도 24).

[0468] 다음으로, GT가 PrxII 과산화가 일어나는 손상된 혈관의 적절한 복구를 조율하는지를 실험하였다. 풍선 손상 후 카테터를 통해 GT 용액을 다양한 농도로 경동맥 혈관의 내강에 국소투여하였을 때, TUNEL 염색으로 확인한 바, 세포 사멸을 유도하지 않는 나노몰랄 범위에서 농도 의존적 방식으로 혈관내막 비후를 뚜렷이 억제하였다(도 25a). 이는 GT가 SMC 과다형성을 억제함을 나타낸다.

[0469] 또한, 대조실험으로 메틸화된 디티올기를 가진 비스(메틸티오)글리오톡신 및 TR 억제제(DNCB 5 μM 혹은 Auranafin 0.5 μM)를 단독 또는 GT와 혼합하여 처리하고 조직에 대한 HE-염색 이미지를 관찰하였다.

[0470] 그 결과, 비스(메틸티오)글리오톡신은 비대해진 혈관내막층을 억제하지 못하였으며, TR 억제제들은 모두 GT의 혈관내막 비후 억제작용을 상쇄하는 것을 확인하였다(도 26). 이로써 티올기가 메틸화된 비스(메틸티오)글리오톡신은 혈관 손상 회복에 효과가 없다는 것을 알 수 있었고, GT는 TR 조절을 통하여 혈관 손상 회복 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

[0471] 이어서, GT가 손상된 혈관벽에서 실질적으로 내피복구를 촉진하는지를 실험하였다. 내피마커 CD31의 면역형광 염색은 정상 경동맥혈관과 같이 GT를 처리한 손상 혈관에서 내강과 접한 내피 단층이 형성되는 반면, 대조 손상 경동맥에서는 그렇지 아니함을 확인하였다(도 25b). 또한 α-평활근 액틴(SMA)과의 동시-면역염색은 혈관내막 SMC층 위에 내피층이 덮여있음을 보여주었다.

[0472] 또한, 2-Cys-퍼옥시레독신(2-Cys-Prx) 과산화에 GT가 미치는 영향을 확인하고자 과산화된 2-Cys-Prx (Prx-SO₂/3) 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 실시하였고, DAB-염색 도면은 5개의 다른 경동맥 샘플 중에서 대표적인 이미지를 도시하였다. 그 결과, 도 27에 나타나듯이 대조군과 GT 처리군 간에는 표본 데이터상 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 이 결과는 GT가 2-Cys-Prx의 산화를 막는 것이 아니라 과산화 후에 세포 내에서 2-Cys-Prx의 기능을 대체하고 있음을 뒷받침하는 결과이다.

[0473] 또한, 본 발명에 따른 ETP 유도체인 A1 내지 A3, A5, A6 및 A8이 동맥 평활근 세포의 증식을 억제할 수 있는지 확인하였다.

[0474] 구체적으로, 상기 유도체가 PrxII 과산화가 일어나는 손상된 혈관의 적절한 복구를 조율하는지를 실험하였다. 풍선 손상 후 카테터를 통해 상기 유도체를 포함하는 용액을 200nM 농도로 경동맥 혈관의 내강에 국소투여하고, 조직에 대한 HE-염색 이미지를 관찰하였다.

[0475] 그 결과, 도 28에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 ETP 유도체들 모두는 평활근 세포의 증식을 효과적으로 억제하는 결과를 나타내었다.

[0476] 이어서, 상기 유도체 A1 내지 A3, A5, A6 및 A8가 손상된 혈관벽에서 실질적으로 내피복구를 촉진하는지를 실험하였다. 내피마커 CD31의 면역형광 염색은 A1 내지 A3, A5, A6 또는 A8를 처리한 손상 혈관에서 내강과 접한 내피 단층에서 형성되는 반면, 대조 손상 경동맥에서는 그렇지 아니함을 확인하였다(도 29). 또한 α -평활근 액틴(SMA)과의 동시-면역염색은 혈관내막 SMC층 위에 내피층이 덮여있음을 보여주었다.

[0477] 실험예 6: 혈관 투과도 테스트

[0478] 에반스 블루 유입으로 회복된 내피의 투과성을 시험하였다. 풍선 손상에 의한 내피 박리는 투과도 조절능력의 완전한 상실을 유발한다. 반면, 손상되지 않은 결경동맥은 정상 내피의 온전한 장막기능을 가졌다(도 30a). 풍선 손상된 경동맥에 대한 GT 처리는 대조군(DMSO) 처리한 손상된 경동맥에 비해 약 2/3정도 감소된 에반스 블루 유입을 보였다. 보다 확실히 하기 위해, VEGFR2 키나아제-특이적 억제제로 처리하였을 때, GT에 의해 유도된 내피 기능 회복은 차단되었다. 이는 GT의 효과가 PrxII의 과산화에 의해 유도되는 산화적 불활성화로부터 VEGFR2 기능을 보호한다는 것을 제시하였다.

[0479] 손상된 경동맥 혈관의 내강 표면에서 내피 세포 간 접합을 주사전자현미경으로 확인하였다. GT-처리 랫트의 경동맥 내피세포는 널리 퍼져 견고한 이음새를 갖는 균일한 층을 형성한 반면, 대조-처리 랫트에서는 축소되고 드문드문하게 존재했다(도 30b). 결과적으로 GT 처리에 의해 회복된 내피는 기능적으로나 구조적으로 온전하며 따라서 혈관 투과성을 조절하기에 충분한 것을 알 수 있었다.

[0480] 실험예 7: 키토신과 키토민 및 다른 항산화 화합물의 효과

[0481] 본 발명자들은 키토신과 키토민 등 다른 ETP 화합물들도 손상된 혈관의 적절한 회복을 유도할 수 있는지 확인하였다. 먼저 혈관세포 기능에서 키토신의 효능을 확인하였다. 증가된 농도의 키토신 처리는 PrxII 녹다운에 의해 증가된 PDGF에 반응하는 HASMCs의 증식 및 화학주성 이동을 현저히 감소시켰다(도 31a 및 31b). 반면, 동일한 처리는 PrxII 녹다운에 의해 손상된 HAECs의 VEGF-유도 증식 및 화학주성 이동을 눈에 띄게 향상시켰다(도 31c 및 31d). 실험예 2에서 언급한 바와 같이 키토신은 GT보다 세포 독성이 낮으므로, VSMCs 및 HAECs의 기능을 조절하는 키토신의 효능은 다소 높은 농도에서도 중요하다. 이와 같은 시험관 내 활성과 함께, 키토신의 처리는 손상된 동맥벽에서 혈관내막 비후를 눈에 띄게 차단하고 부수적으로 재내피화를 촉진하였다(도 32a 및 32c). 이는 GT와 더불어 키토신도 VSMCs 및 VECs에 대해 상반된 조절자로 작용함을 나타낸다. 키토민 또한 손상된 동맥벽의 회복에서 유사한 효과를 나타내었다(도 32b 및 32d). 결론적으로 ETP 계열의 화합물들은 혈관손상 회복을 위한 이상적인 치료제로 작용할 수 있음을 확인하였다.

[0482] 마지막으로, 대표적인 ETP 화합물인 GT의 혈관세포에 대한 효과를 항산화 화합물로 알려진 다른 화합물들, 예를 들면, N-아세틸시스틴(N-acetylcysteine) 또는 부틸화된 히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole)과 비교하였고 그 결과를 도 33에 나타내었다. siRNA를 주입하여 PrxII를 녹다운시킨 HAECs에 도면에 표시된 농도로 각각의 화합물을 2시간 동안 선처리한 후 10분간 VEGF로 처리하여 면역블롯팅하였다. 그 결과, N-아세틸시스틴과 부틸화된 히드록시아니솔은 GT에 비해 1000배 내지 10000배의 농도로 사용하였을 때도 VEGFR2 및 하류 ERK 활성화를 유도하지 못하였다. 상기 비교실험으로부터 본 발명자들은 ETP 화합물의 구별된 세포적 작용이 분명히 PrxII-유사 활성화에 기인하며, 추가적으로 디티오키토페라진 고리의 특별한 화학적 특성에 기인한다는 결론에 이르렀다.

[0483] 실험예 8: PrxII 결핍 혈관세포 및 마우스에 대한 GT의 영향 확인

[0484] 정상 마우스와 PrxII-/- 마우스에서 대동맥 혈관평활근(A)과 혈관내피세포(B)를 분리하여 배양하고 GT를 처리하거나 처리하지 않고, PDGF-BB 및 VEGF-A를 각각 10분간 처리하였다. PDGFR β , PLC γ 1, VEGFR2 및 ERK의 활성화를 각각 단백질에 대한 인산화-특이 결합 항체를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 34의 A 및 B에 나타나듯이

Prx-/- 마우스에서 분리된 혈관평활근세포(VSMC, vascular smooth muscle cell) 및 혈관내피세포(VEC, vascular endothelial cell)에서 각각 PDGF 신호전달과 VEGF 신호전달에 GT가 미치는 상반된 조절 효과를 확인할 수 있었다.

[0485] 또한, PrxII-/- 마우스에서 혈관 비대화에 GT가 미치는 영향을 확인하기 위하여 PrxII-/- 마우스의 좌경동맥에 가요선(flexible wire)을 이용하여 손상을 주었다. 손상 후, 와트만 No.1 filter 종이 스트립에 대조 vehicle 또는 GT 용액을 적서 혈관외피 표면에 30분간 부착하여 조직에 스며들게 하였다. 마우스는 손상 후 10일째에 회복되었다. 결과는 HE-염색 경동맥 시료로부터 측정된 내막 대 중간막 비율을 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었다(군당 n=8, *p<0.01). 그 결과, 도 34의 C에 나타나듯이 GT는 혈관 비대화를 현저하게 감소시키는 것을 알 수 있었다.

[0486] 실험예 9: 흑색종 세포의 증식 및 이동에 대한 PrxII의 억제효과 및 ETP 화합물 또는 이의 유도제 처리에 의한 흑색종 세포의 시험관 내 이동 억제 및 생체 내 폐전이 억제 확인

[0487] (1) 흑색종 세포의 증식 및 이동과 PrxII의 억제와의 관련성 확인

[0488] PrxII-특이적 항체를 이용하여 PrxII 단백질 수준에 대해 흑색종 세포를 면역스크린하였다. SK-MEL-5(SK5) 및 SK-MEL-28(SK28) 흑색종 세포는 PrxII를 거의 발현하지 않는 반면, 다른 두 가지 세포주, A375 및 G361은 PrxII 단백질을 발현하였다(도 47A). A375에서 PrxII 발현 수준은 인간 멜라닌 세포의 것과 유사하였다. 반대로, 가장 유사한 이소형(isoform) Prx1의 단백질 수준은 4 가지 세포주에서 동일하였다. 또한, SK-MEL 세포주에서 Prdx2 유전자의 프로모터 영역은 메틸화되었으나, A375 및 G361 세포에서는 그렇지 않았다. 이는 PrxII 발현의 침묵에 관여하는 분자적 기전을 제공한다. PrxII가 세포질 항산화 효소임을 고려하여 산화-민감성 형광 염료인 DCFH-DA를 이용하여 세포의 과산화수소 수준을 측정하였다.

[0489] 그 결과, PrxII가 결여된 SK-MEL 세포에서 기본 과산화수소 수준이 높게 나타난 반면, PrxII가 존재하는 일차 멜라닌 세포뿐만 아니라 A375 및 G361에서는 낮았다(도 47B). 이는 PrxII가 흑색종 세포에서 세포 내 과산화수소 수준을 조절하는 중요한 항산화 효소임을 암시한다.

[0490] 나아가, 4 가지 흑색종 세포형의 증식 및 이동과 같은 시험관 내 세포활성을 비교하였다. 혈청 조건이 복합적인자가 관여하는 종양 전이에 생리학적으로 관련되므로, 혈청-의존적 세포활성 유도를 극대화하기 위하여 세포를 혈청 고갈 조건에 두고 이후 20% 태아혈청으로 자극하였다. 결과로서, PrxII-결핍 SK-MEL 세포는 다른 2가지 PrxII-발현 흑색종 세포와 비교하여 보다 높은 증식 활성을 나타내었다(도 47C). 혈청에 대한 화학주성이동 및 상처봉합에서 나타난 이동 활성은 다른 PrxII-발현 흑색종 세포에서 보다 SK-MEL 세포에서 더 높았다(도 47D 및 E). 이는 흑색종 세포형에서 세포 기능과 PrxII 수준간의 반비례 관계를 암시한다.

[0491] 또한 PrxII의 외인발현(exogenous expression) 및 특이적 녹다운에 의한 흑색종 세포에 대한 PrxII의 직접 조절 효과를 확인하였다. SK-MEL 세포에서 PrxII의 외인발현은 인간 Prdx2 유전자의 레트로바이러스성 형질도입(retroviral transduction)에 의해 달성되었다(도 48A). SK-MEL 세포의 증식 활성을 확인하였을 때, PrxII의 레트로바이러스성 발현은 혈청 자극에 의해 유도되는 세포의 증식을 감소시켰다(도 48B). 화학주성이동 및 상처봉합에서 나타난 SK-MEL 세포의 이동 활성은 PrxII 발현에 의해 훨씬 더 크게 감소되었다(도 48C 및 D). 이어서, G361 및 A375 세포에서 두 가지 다른 siRNA를 이용하여 PrxII 발현을 특이적으로 녹다운하였다(도 49A). PrxII 녹다운은 두 가지 세포 모두에서 혈청 자극에 반응하는 세포 증식 및 이동을 현저히 증가시켰다(도 49B 및 C). 반대로, 또 다른 세포질 Prx 이소형인 Prx1의 녹다운은 흑색종 세포 활성에 영향을 주지 않았다(도 49D). 종합적으로, 이는 PrxII 효소가 흑색종 세포의 증식 및 이동에 대한 선택적 항산화 억제제로서 작용함을 나타낸다.

[0492] (2) PrxII 부재에 의한 흑색종 세포의 폐전이 증가

[0493] 흑색종 세포의 증식 및 이동에 있어서 PrxII의 조절 활성에 기초하여 마우스 흑색종 세포인 B16F10을 이용한 폐

전이 모델을 사용하여 생체 내 실험을 수행하였다. B16F10 세포는 야생형 BRAF를 발현하는 것으로 알려져 있으므로, PrxII가 여전히 B16F10 세포의 세포활성 및 Src/ERK 경로를 조절하는지를 확인하였다. B16F10 세포에서 마우스 PrxII-특이적 siRNA를 이용한 PrxII 녹다운은 Src/ERK 활성화 및 β -카데닌 인산화를 증가시키는 한편 E-카데린 수준은 감소시켰다(도 52A). 이와 일치하게, PrxII 녹다운은 혈청 자극에 반응하는 B16F10의 증식 및 이동을 증가시켰다(도 52B). 이는 흑색종 세포에서 PrxII의 기능이 발암성 BRAF 돌연변이(oncogenic BRAF mutation)와 독립적일 수 있음을 나타낸다.

[0494] 생체 내 실험을 위하여, PrxII 발현의 siRNA-매개 녹다운을 이용하여 폐전이 에세이 동안 PrxII 발현의 안정적 결핍을 보장하였다(도 52C). 이후, mPrxII siRNA로 전달감염시킨 B16F10 세포를 꼬리 정맥을 통해 마우스에 주입하였다. 10일 후, 마우스 폐를 적출하여 전이된 종양 결절을 확인하였다. 폐 표면 및 HE-염색된 조직 절편 모두에 대한 현미경 검사는 대조군 세포 보다 PrxII를 녹다운시킨 B16F10 세포가 보다 공격적으로 폐에 침투되어 대량서식됨(invaded and colonized)을 나타내었다(도 52D and E).

[0495] (3) ETP 유도체, 글리오톡신 처리에 의한 흑색종 세포의 시험관 내 이동 억제 및 생체 내 폐전이 억제

[0496] 글리오톡신(gliotoxin; GT)이라 알려진 곰팡이 2차 대사체는 전형적인 Prx 활성화로 대표되는 티오레독신-의존적 퍼록시다제 활성을 나타내는 것으로 알려진 첫번째 천연물이므로 흑색종 전이 억제에 대한 GT의 치료 가능성을 확인하였다. 사실, 비독성 수준에서 GT 처리는 PrxII-결핍 SK28 세포에서 세포 내 과산화수소 수준을 감소시킨다(도 53A). 이로써 GT의 퍼록시다제 활성을 검증한다. 재차, SK28 세포에서 GT 처리는 Src/ERK 활성화 및 β -카데닌 인산화를 감소시키는 한편, E-카데린의 발현을 증가시킨다(도 53B). 나아가, GT는 SK5 및 SK28 세포 모두에서 항혈청 자극에 반응하는 증식 및 이동을 감소시켰다(도 53C 및 D). 이는 GT가 흑색종 세포에서 PrxII에 대한 소분자 대체제(substitute)로서 역할을 수행함을 나타낸다. 생체 내 치료 효율을 확인하기 위하여, GT를 B16F10 세포 주입 후 복강내로 마우스에 주입하였다. GT 처리는 흑색종 세포에서 뚜렷하게 폐전이를 감소시켰다(도 53E). 또한 GT는 PrxII가 녹다운된 B16F10의 폐전이를 보다 현저하게 감소시켰다(도 53F). 이는 GT가 흑색종 전이 억제제로서 PrxII에 대한 소분자 대체물로서 작용할 수 있으므로 폐전이 억제용 치료제로서의 잠재력을 가짐을 나타낸다.

[0497] 또한, 키토신 및 키토민의 흑색종 세포의 활성 억제 여부를 확인하였다.

[0498] 구체적으로, 키토신 및 키토민을 농도별(0, 100, 200, 500 및 1000nM)로 SK-MEL28 흑색종 세포에 처리한 다음, 세포 생존력을 확인하였고, 그 결과를 도 54 A에 나타내었다. 그 결과, 도 54 A에 나타낸 바와 같이, 100nM 농도에서 독성을 나타내지 않은 결과를 나타내어, 하기 증식 및 이동 실험에서는 100nM를 사용하였다.

[0499] 이에 키토신 및 키토민을 100nM 농도로 SK-MEL28 흑색종 세포에 1시간 처리하고 증식 및 이동성을 확인하였고, 증식 및 이동은 혈청(FBS)으로 촉진시켰다.

[0500] 그 결과, 도 54 B 및 C에 나타낸 바와 같이, 키토신 및 키토민의 처리는 흑색종 세포의 증식 및 이동을 모두 효과적으로 저해시키는 결과를 나타내었다.

[0501] 또한, 생체 내 치료 효율을 확인하기 위하여, B16F10 세포 주입 후 복강내로 마우스에 키토신 및 키토민을 주입하였다. 키토신 및 키토민의 처리는 흑색종 세포에서 뚜렷하게 폐전이를 감소시켰다(도 55).

[0502] 따라서, 본 발명에 따른 생체 내 PrxII 활성을 모방하는 ETP 유도체들도 PrxII 활성화를 통한 흑색종의 전이 억제에 유사한 활성을 나타낼 것임을 유추할 수 있다.

[0503] 전이악성(metastatic malignancy)은 수직성장기(vertical growth phase)의 흑색종에서 가장 결정적인 이슈이다. 흑색종 전이에 관련된 주요 유전자 또는 신호전달 네트워크가 규명되었음에도 불구하고, 어떠한 항산화 효소가 관여하는지에 대한 증거는 없다. 본 발명자들은 PrxII 수준이 흑색종 세포의 전이 활성화에 역으로 상관관계를 나타냄을 최초로 규명하였다. 침묵된 PrxII 발현(silenced PrxII expression)을 갖는 SK-MEL 흑색종

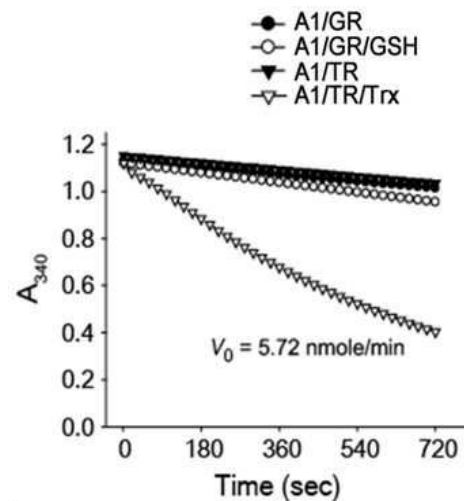
세포는 PrxII를 고발현하는 A375 및 G361 세포에 비해 보다 증식성 및 이동성이 뛰어난 것을 확인하였다. SK-MEL 세포에서 PrxII의 외인성 재발현은 세포의 증식 및 이동을 감소시키는 한편, A375 및 G361 세포에서 PrxII의 녹다운은 상기 두 가지 세포 활성을 증가시켰다. 분자수준에서, PrxII는 Src/REK 활성화를 감소시키는 방향으로 조절하고 형질막에서 E-카데린 및 Y654 인산화-의존적 β -카테닌의 유지를 차례로 강화하였다. PrxII가 결핍된 마우스 흑색종 B16F10 세포는 생체 내에서 향상된 폐전이율을 나타내었다. 흥미롭게도, Prx-유사 활성을 나타내는 천연화합물 글리오톡신은 PrxII 결핍 흑색종 세포의 폐전이뿐만 아니라 증식 및 이동을 억제하였다. 따라서, 본 발명은 PrxII 및 이의 소분자 모방체가 흑색종 전이에 대한 억제제로서 잠재적인 치료제로서의 가능성을 가짐을 확인하였다.

[0504]

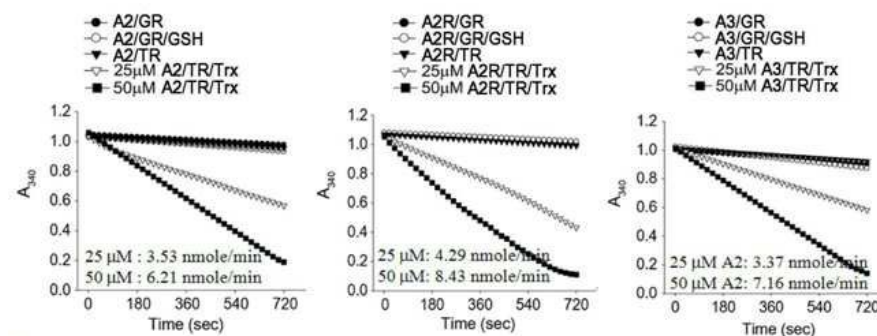
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

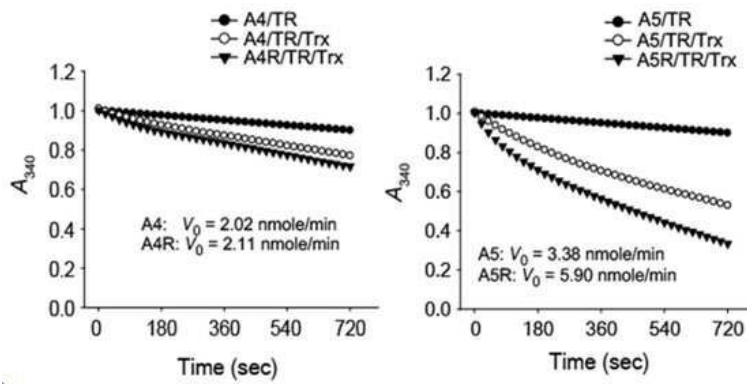
도면1



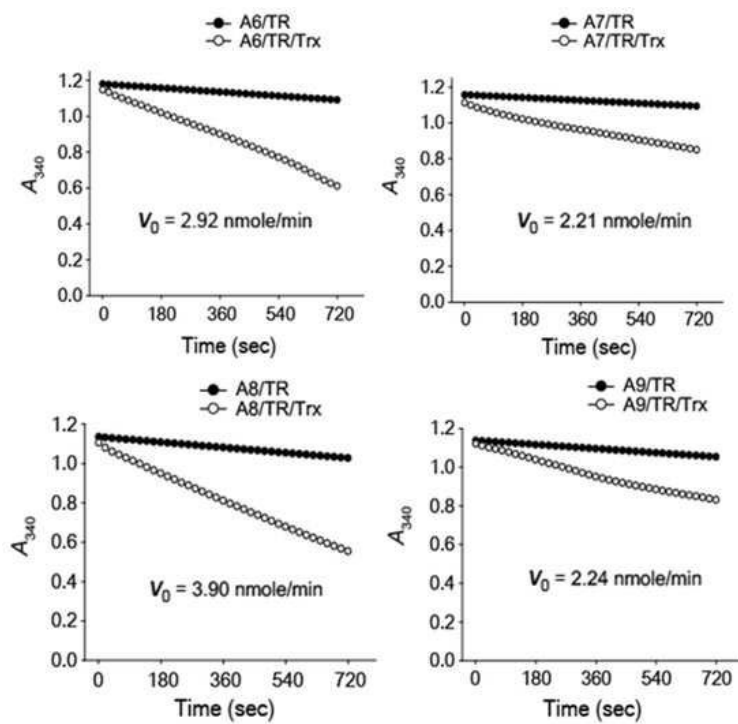
도면2



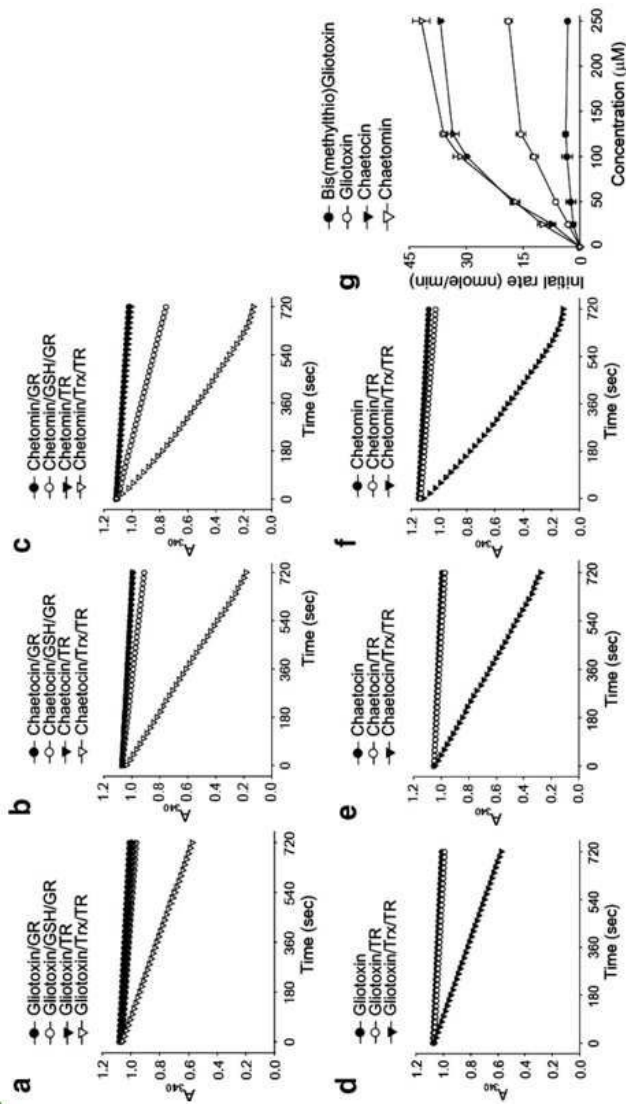
도면3



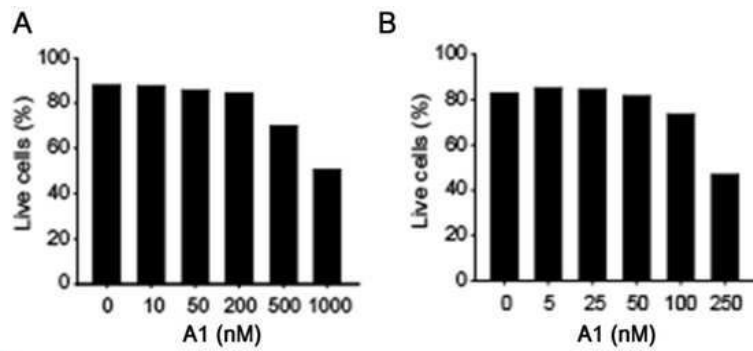
도면4



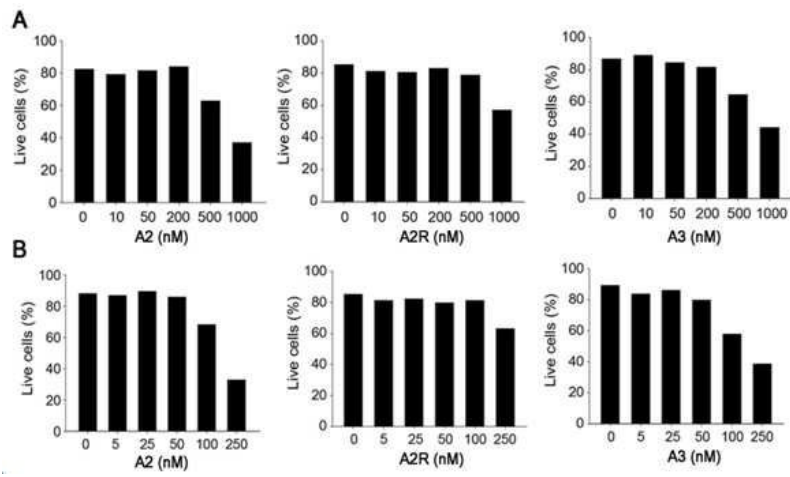
도면5



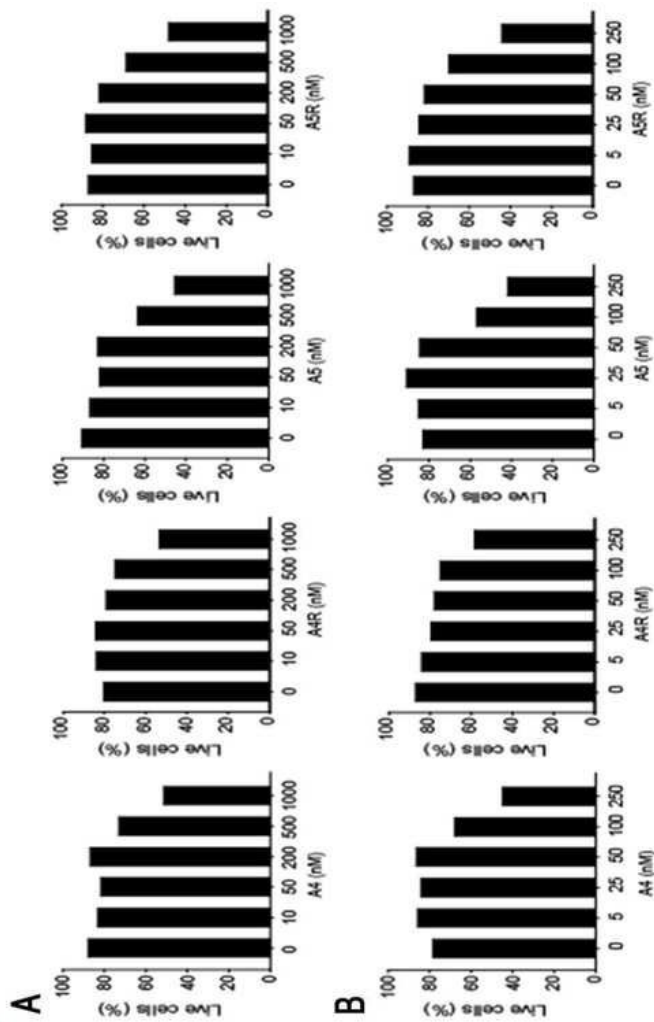
도면6



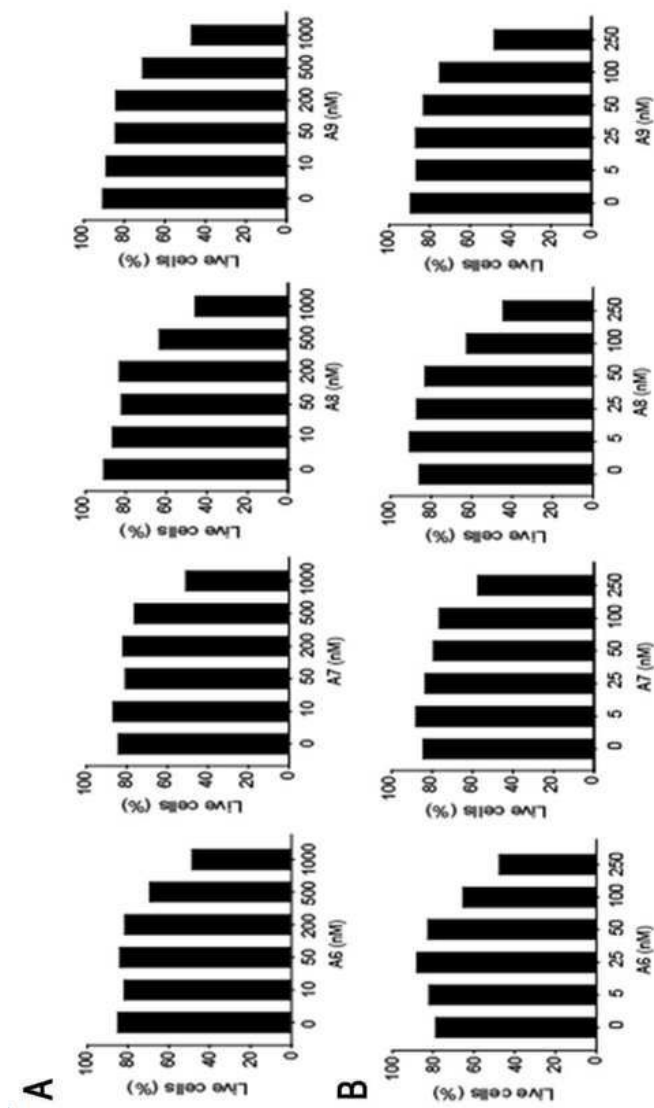
도면7



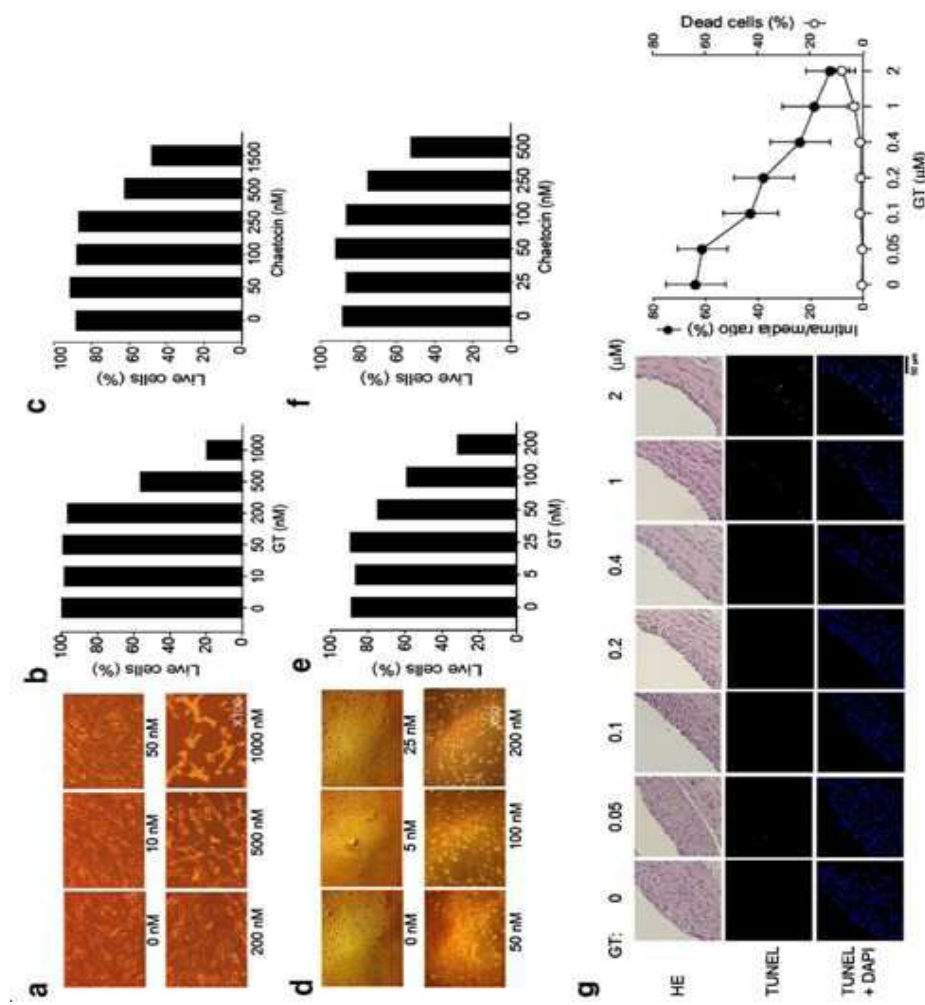
도면8



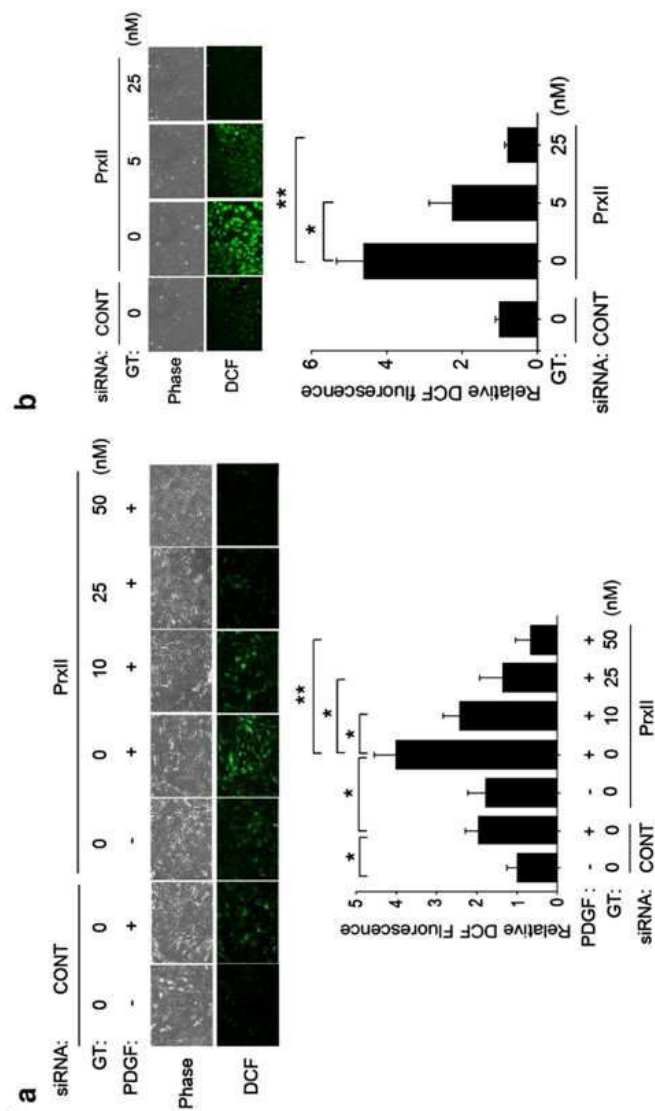
도면9



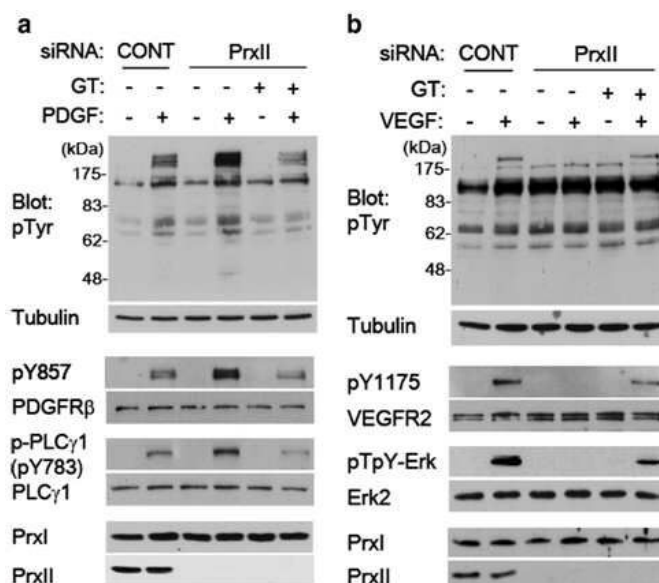
도면10



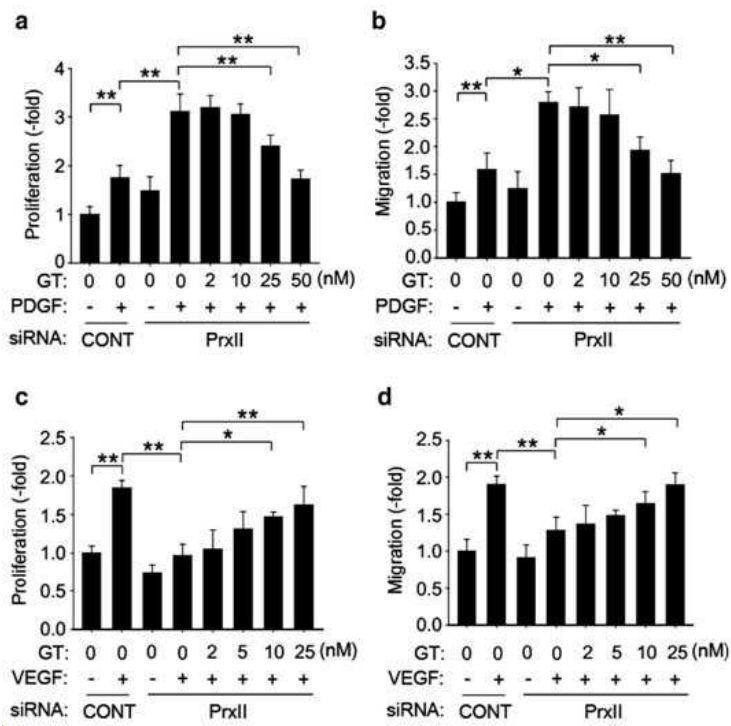
도면11



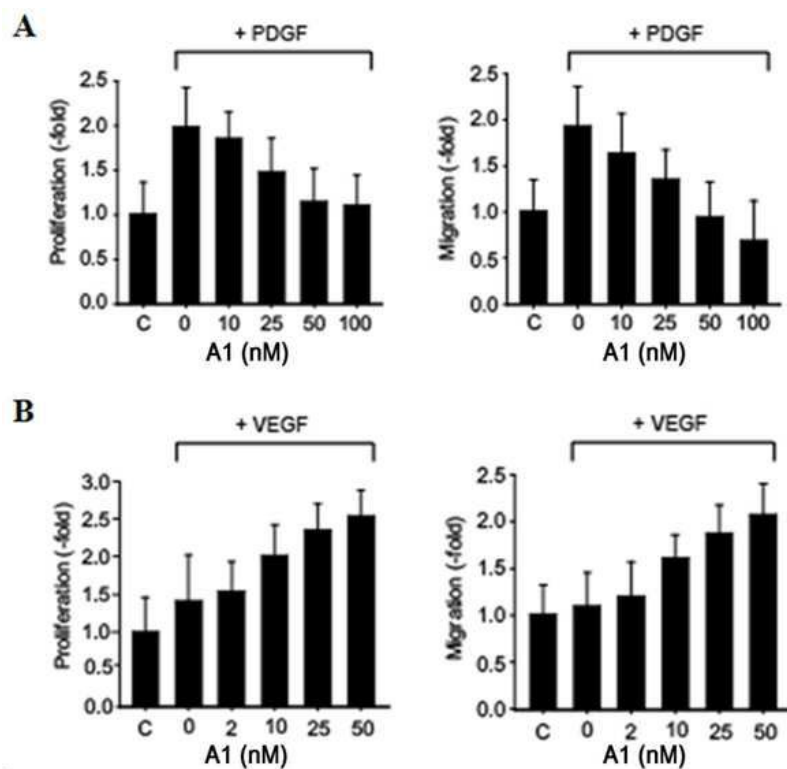
도면12



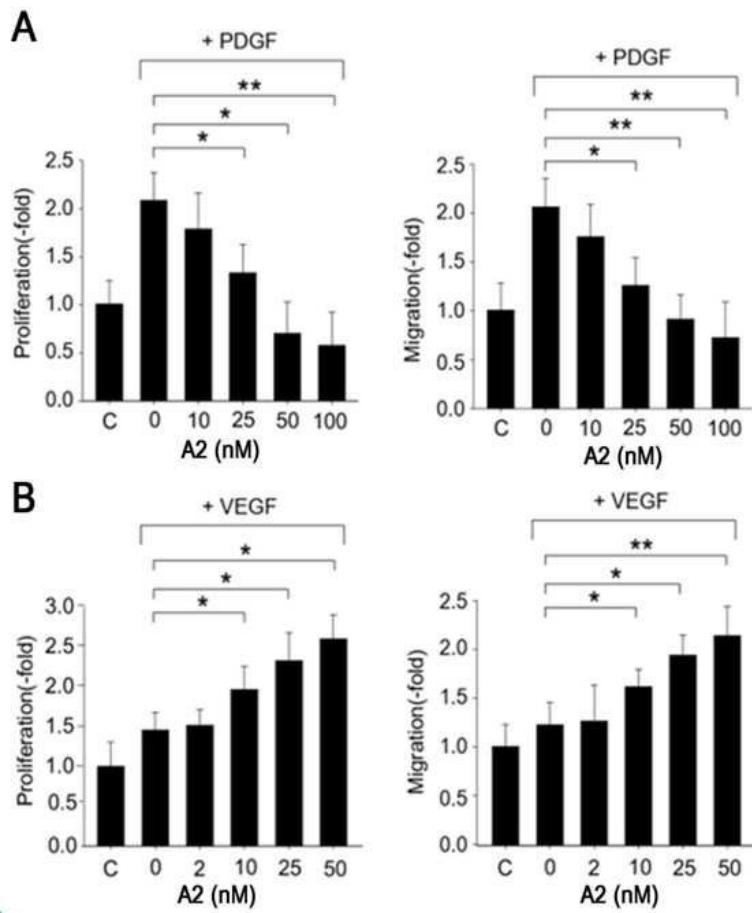
도면13



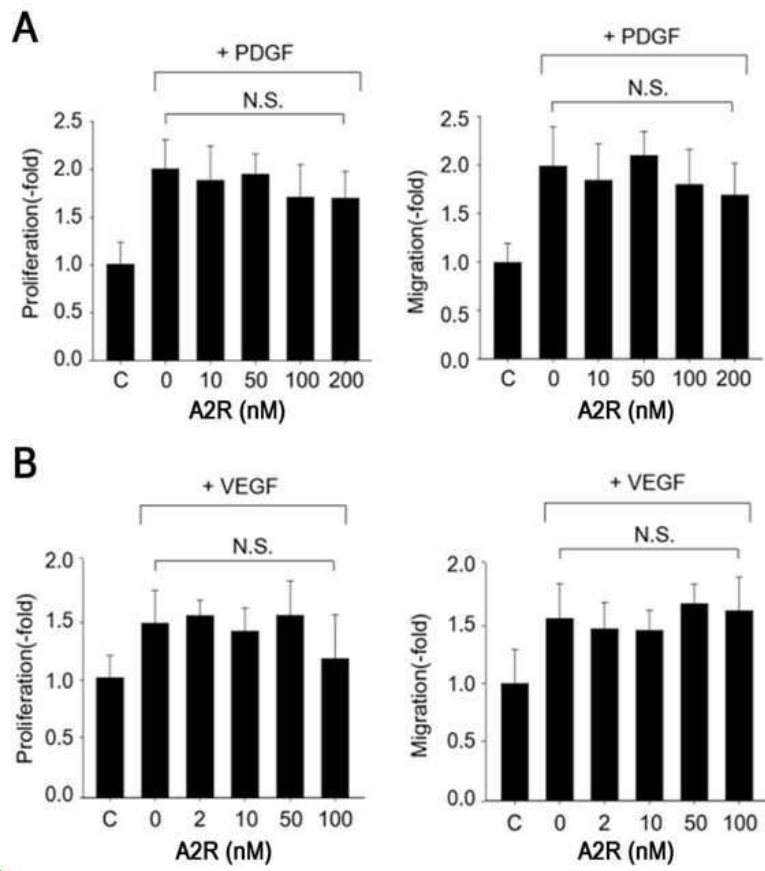
도면14



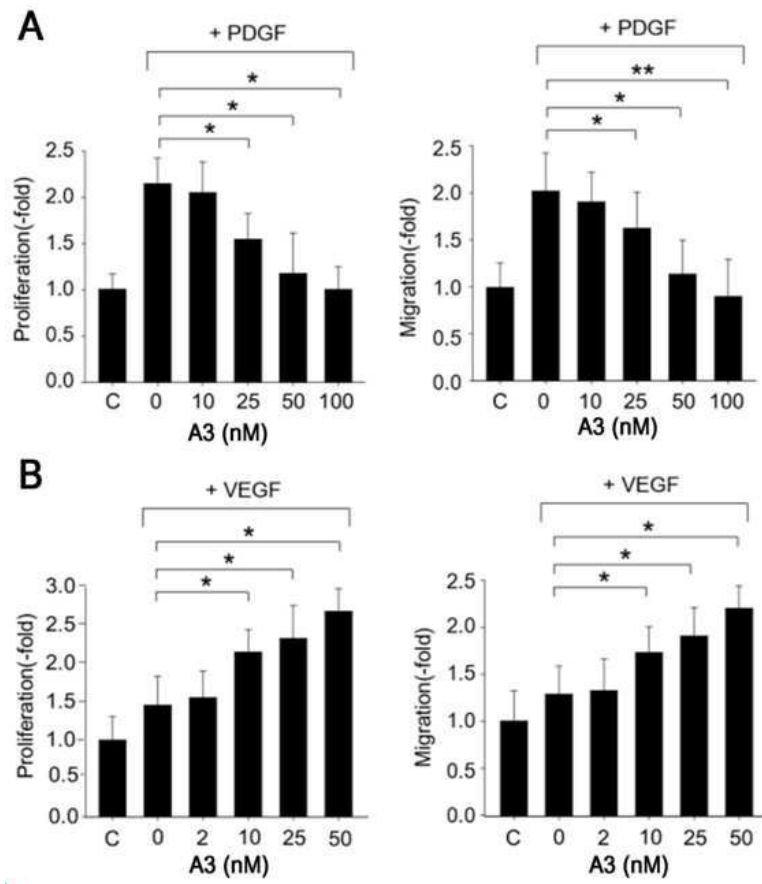
도면15



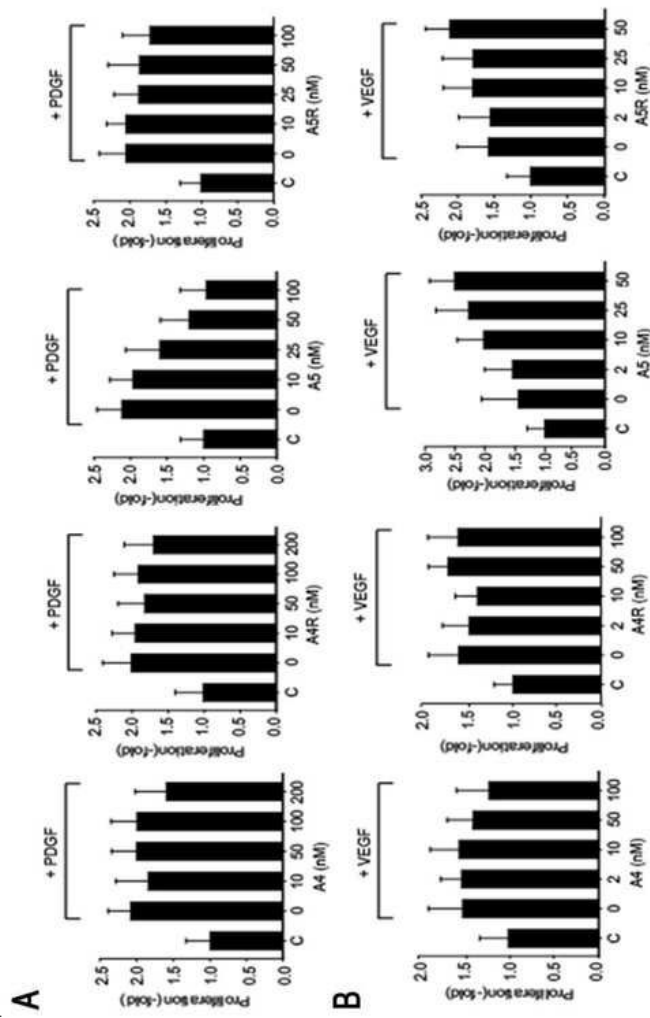
도면16



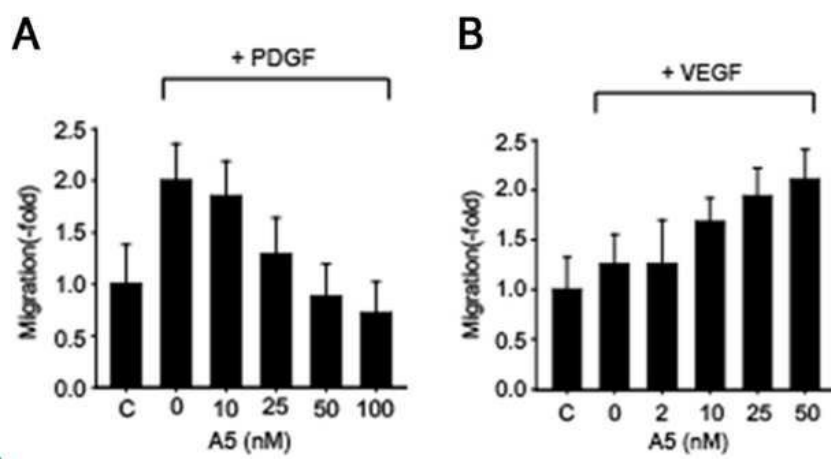
도면17



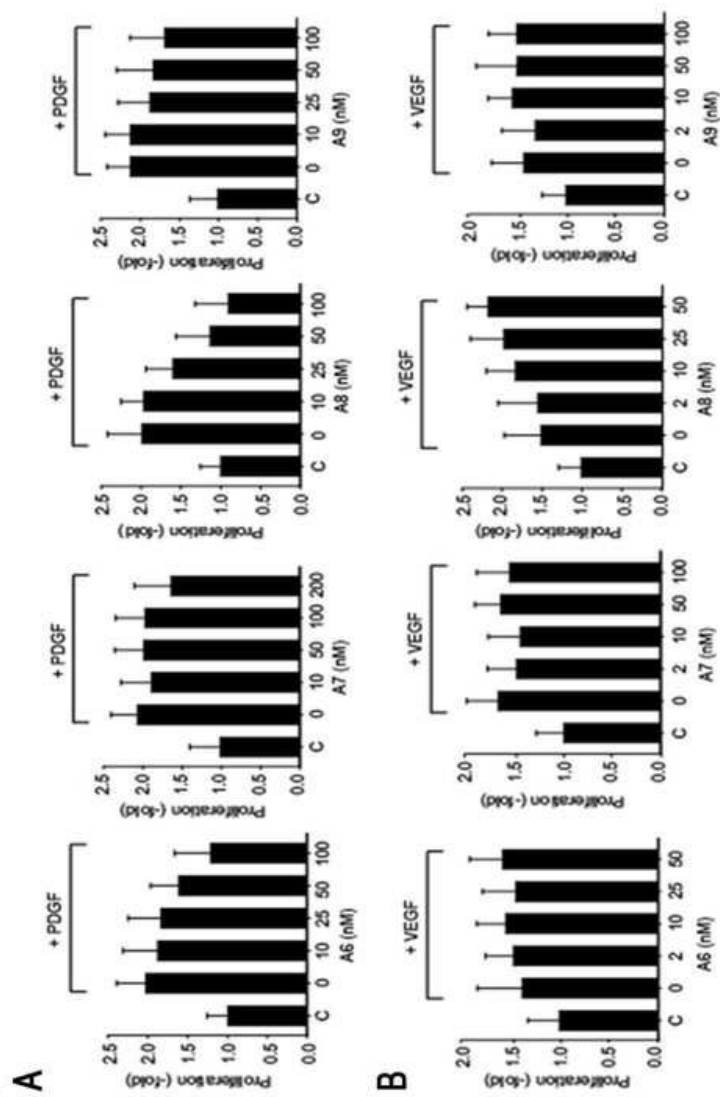
도면18



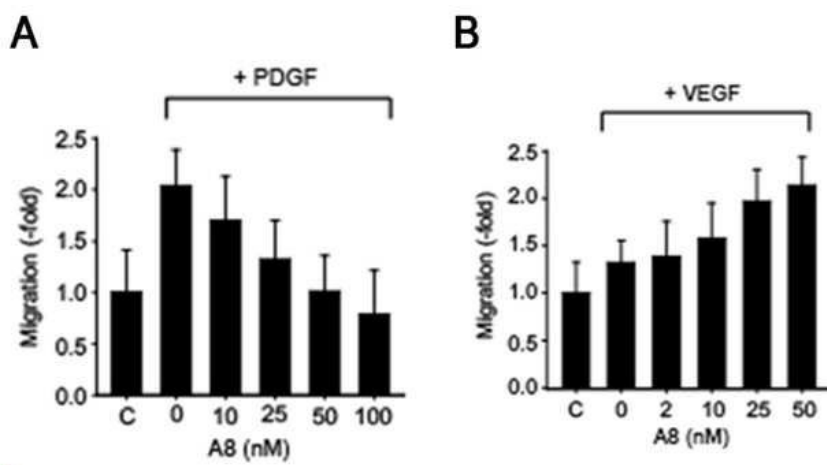
도면19



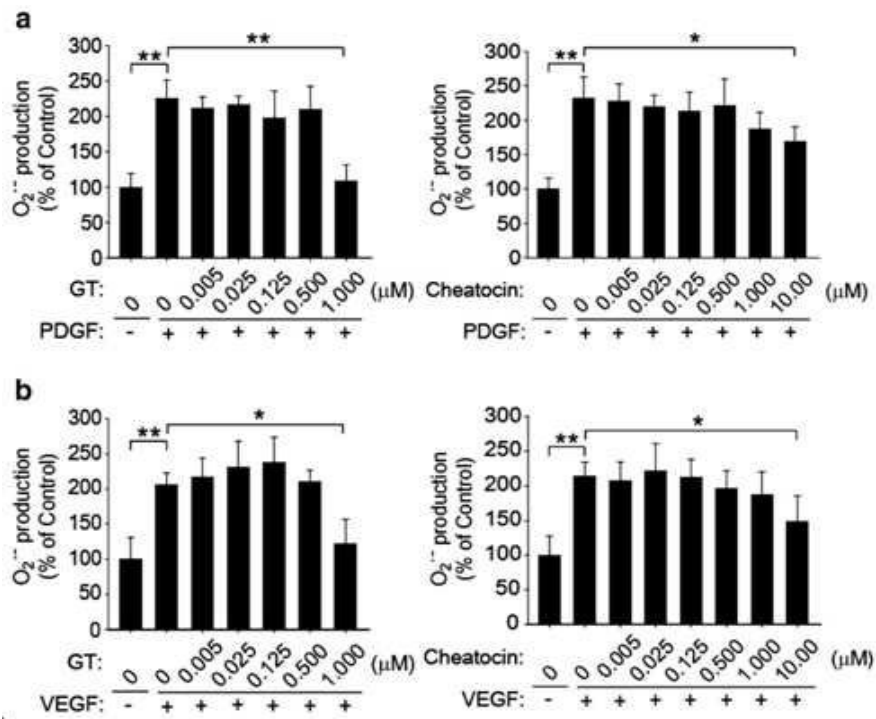
도면20



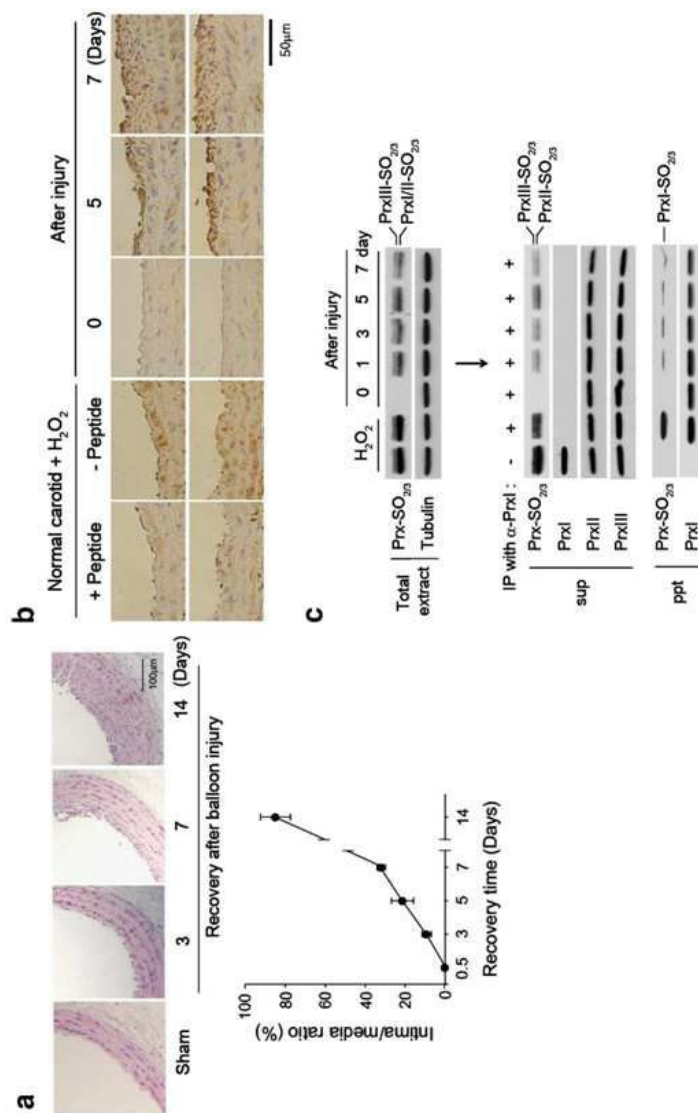
도면21



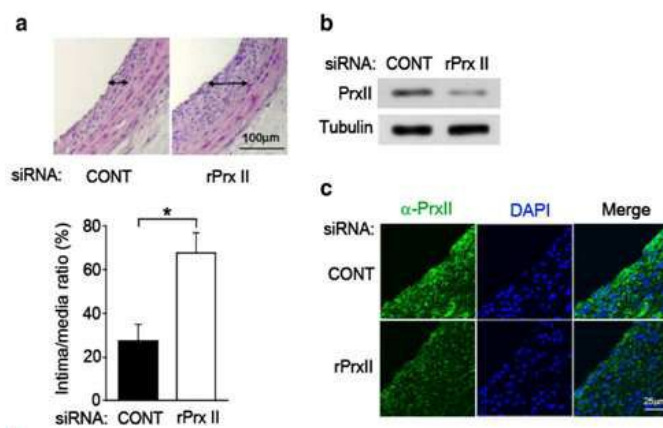
도면22



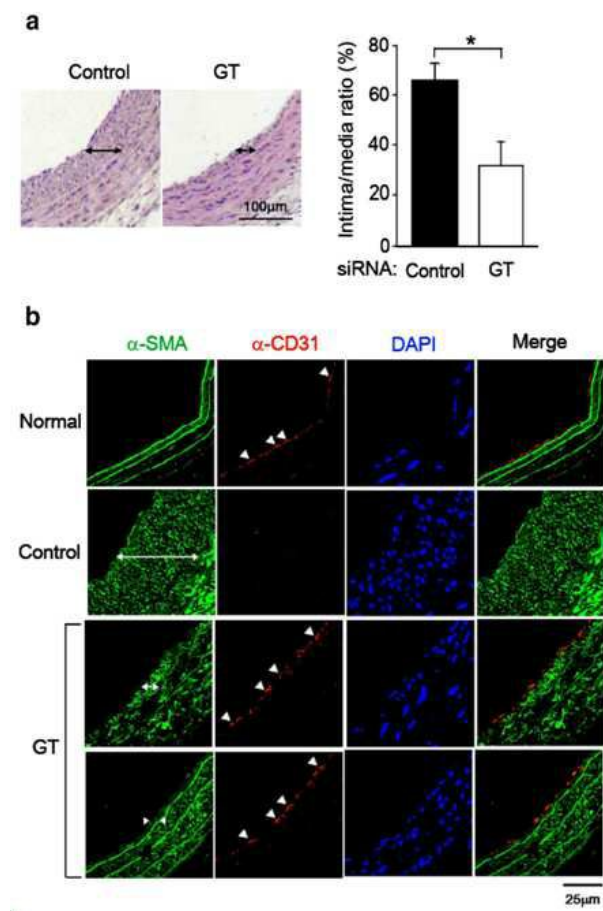
도면23



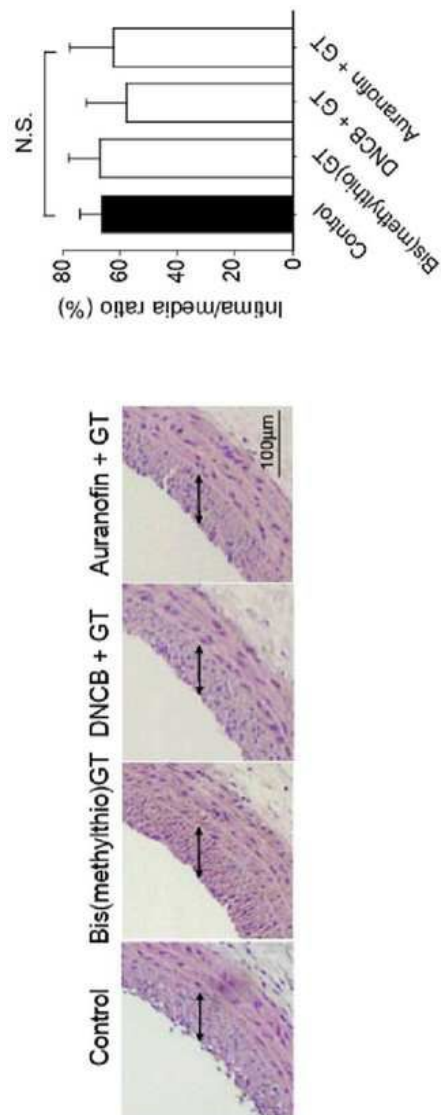
도면24



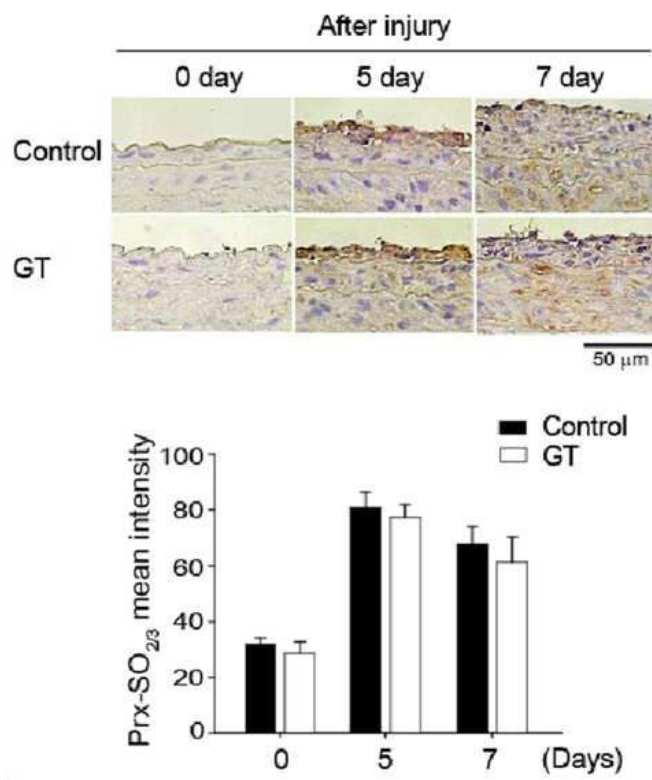
도면25



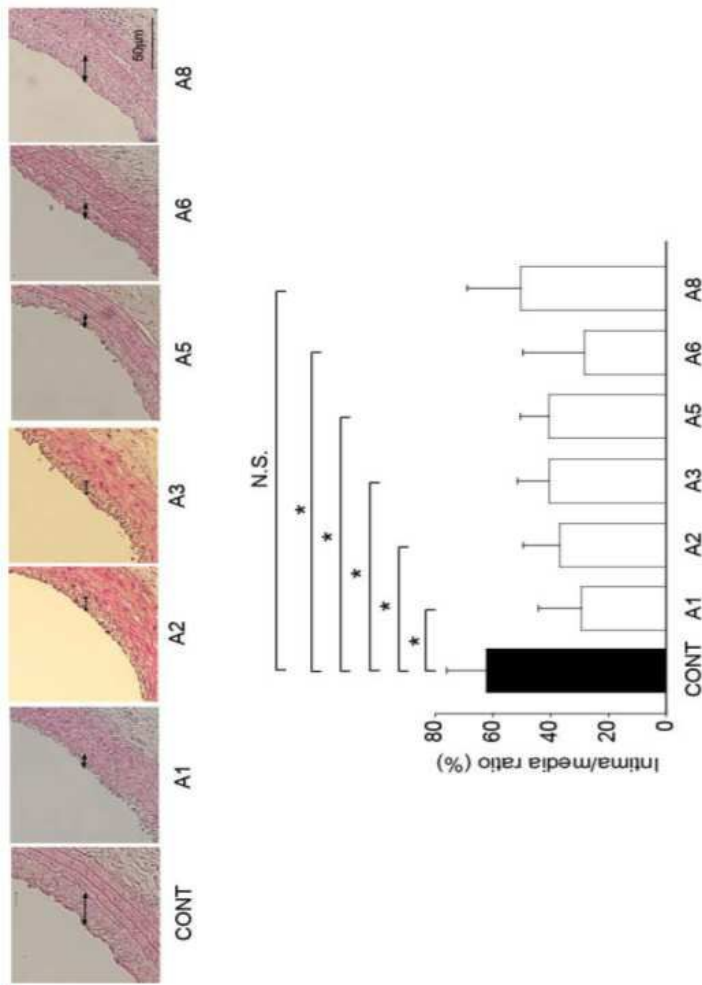
도면26



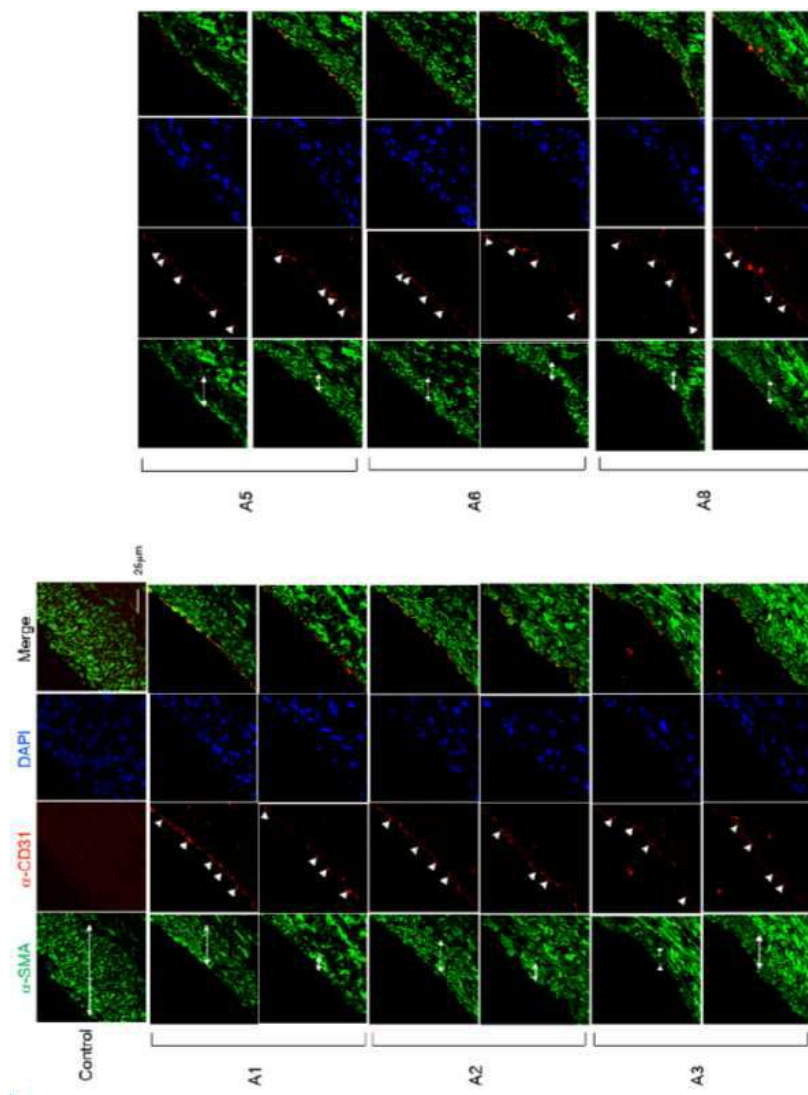
도면27



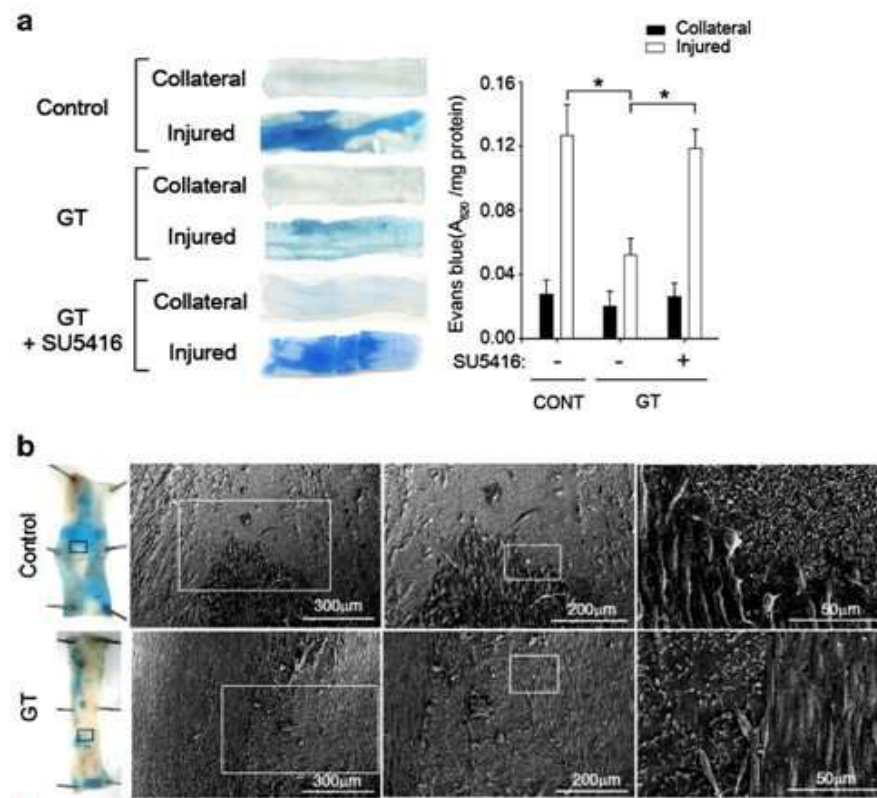
도면28



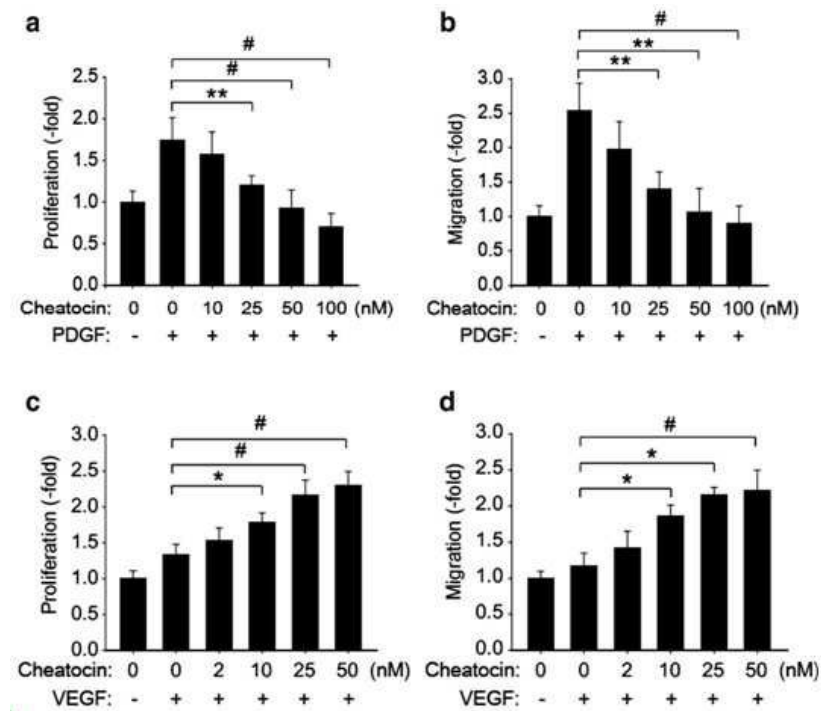
도면29



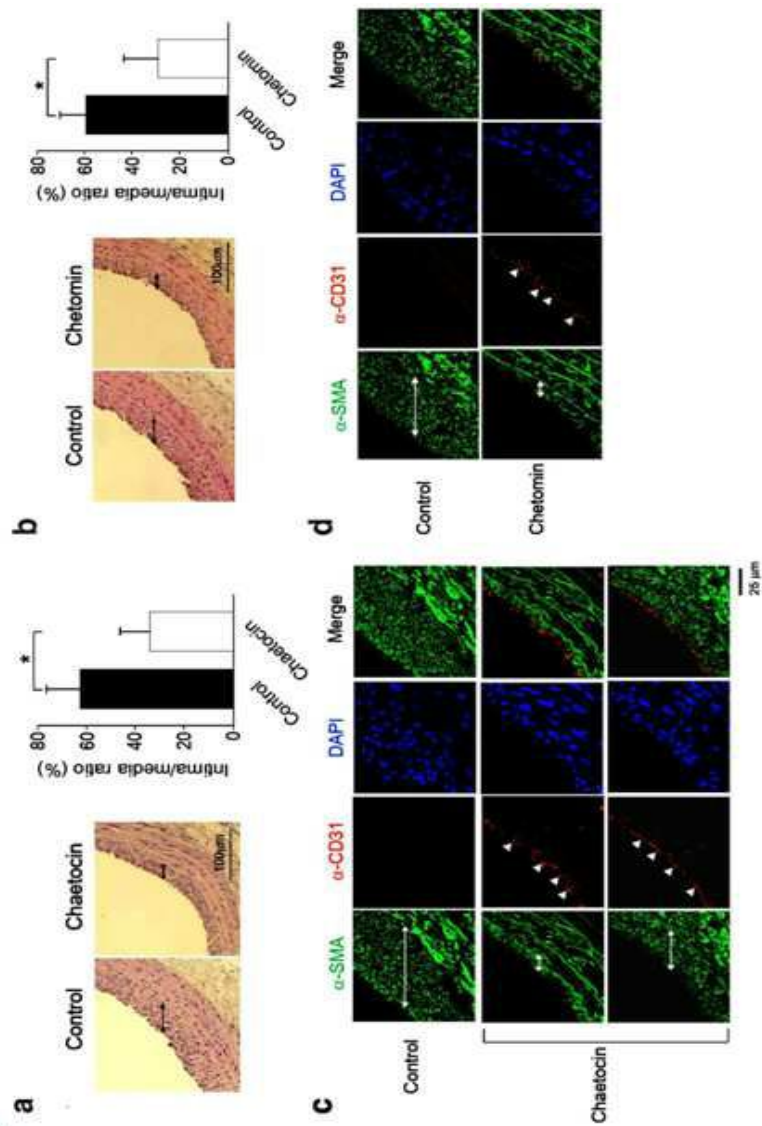
도면30



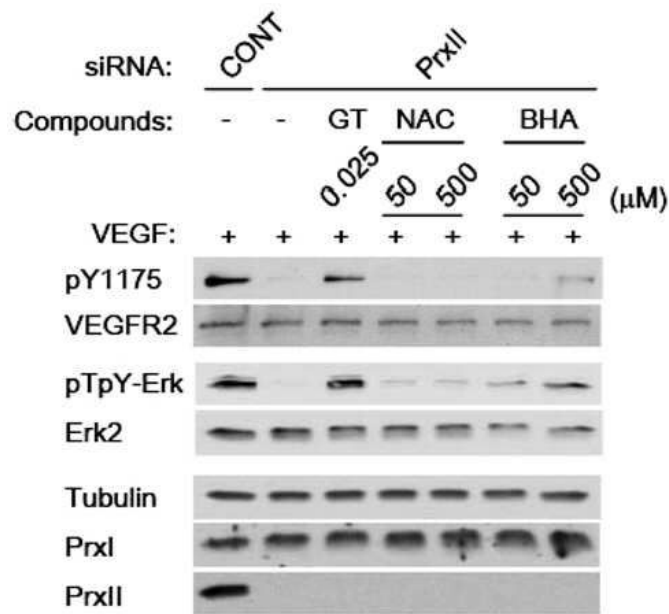
도면31



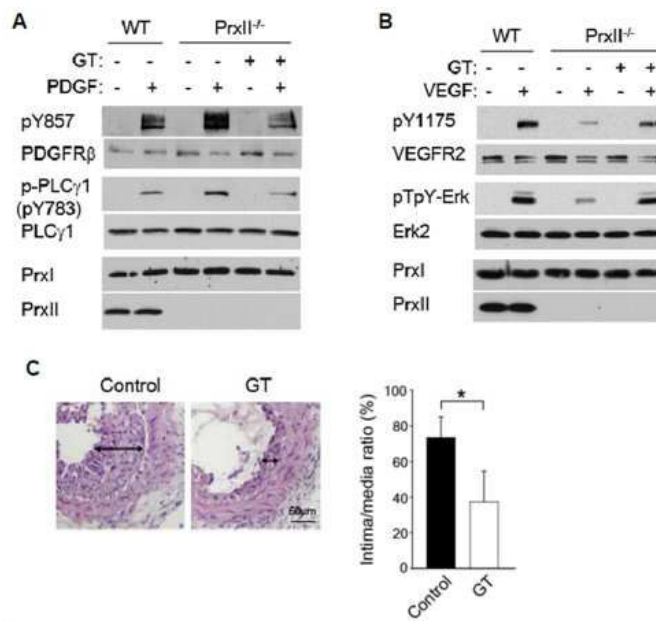
도면32



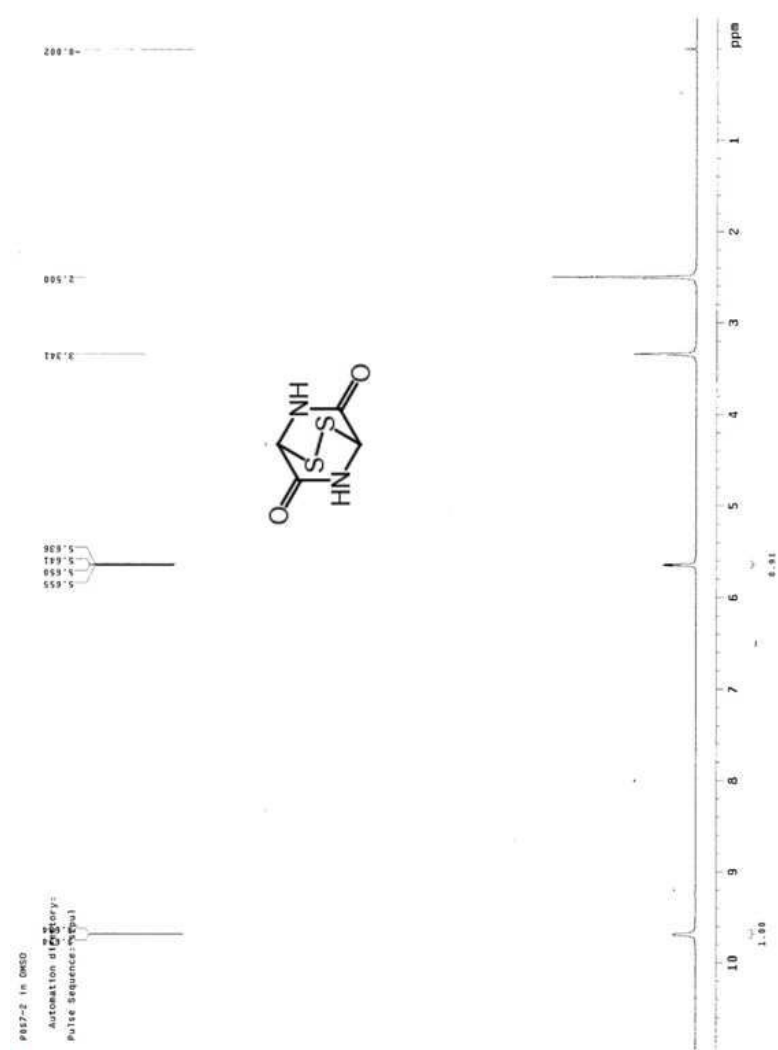
도면33



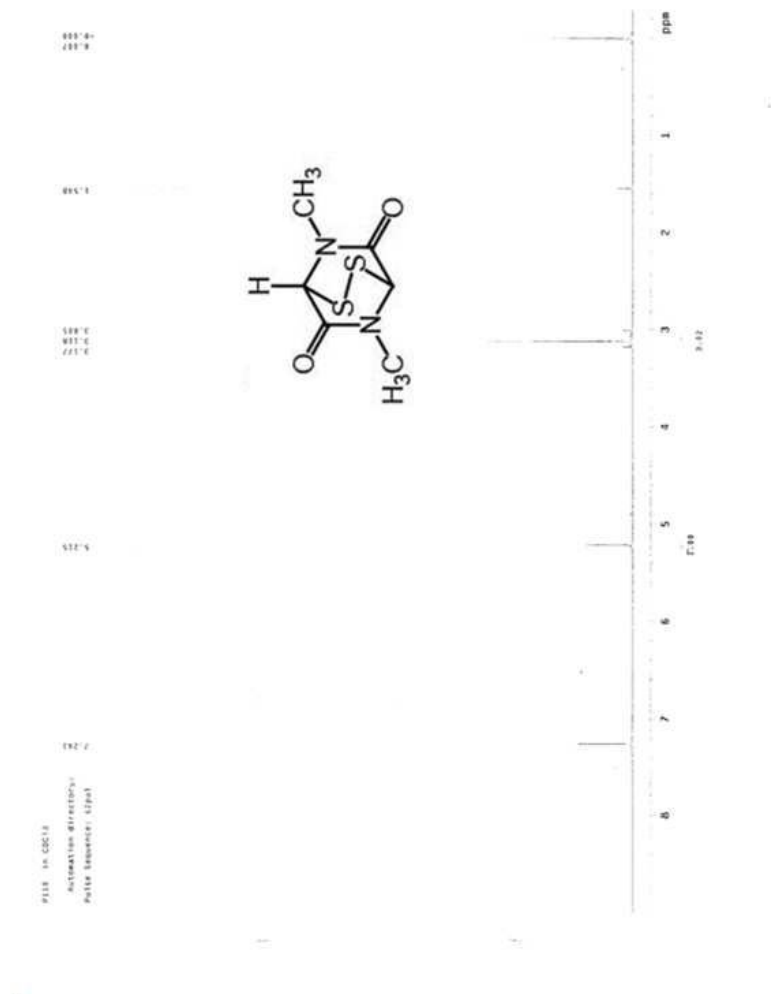
도면34



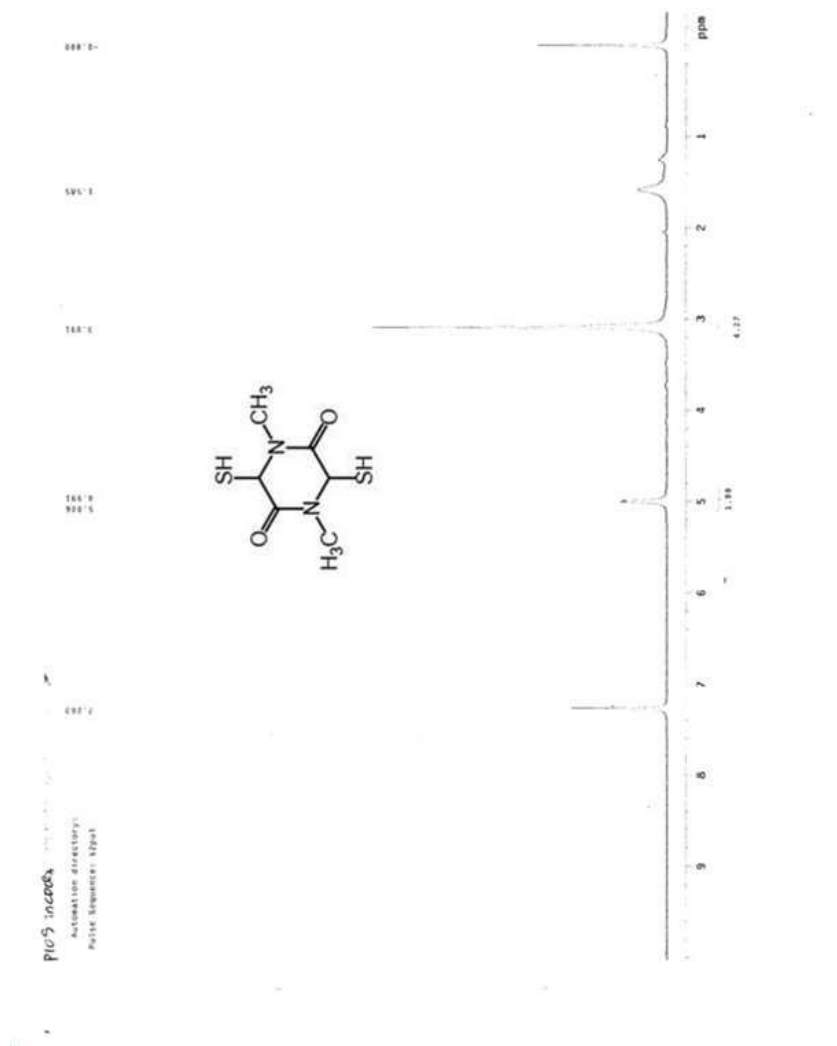
도면35



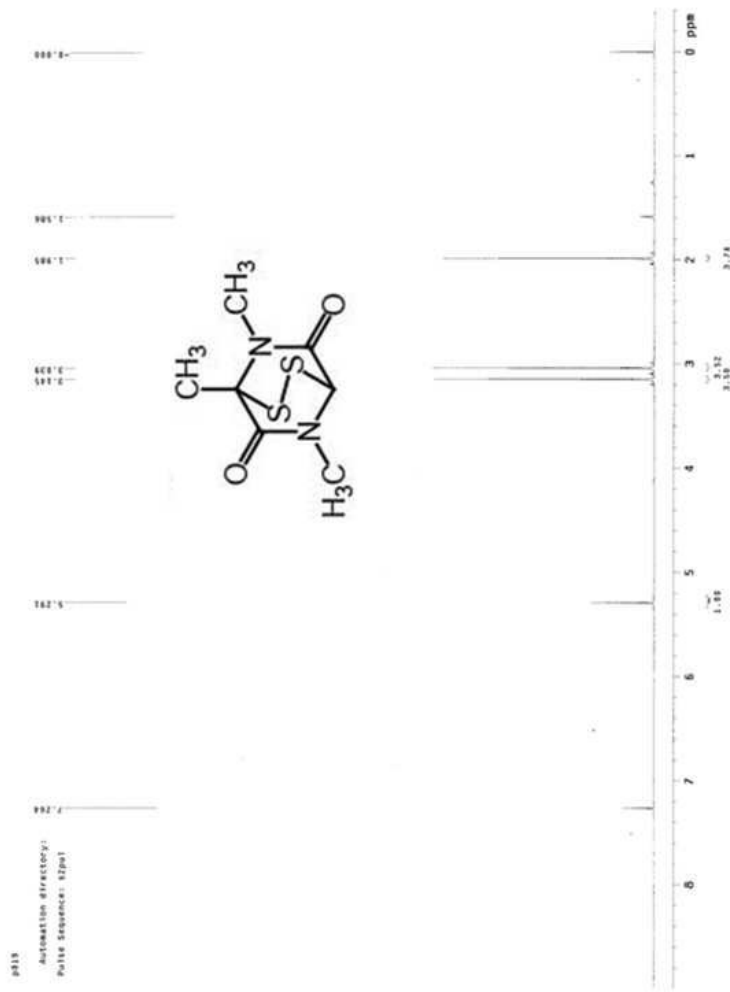
도면36



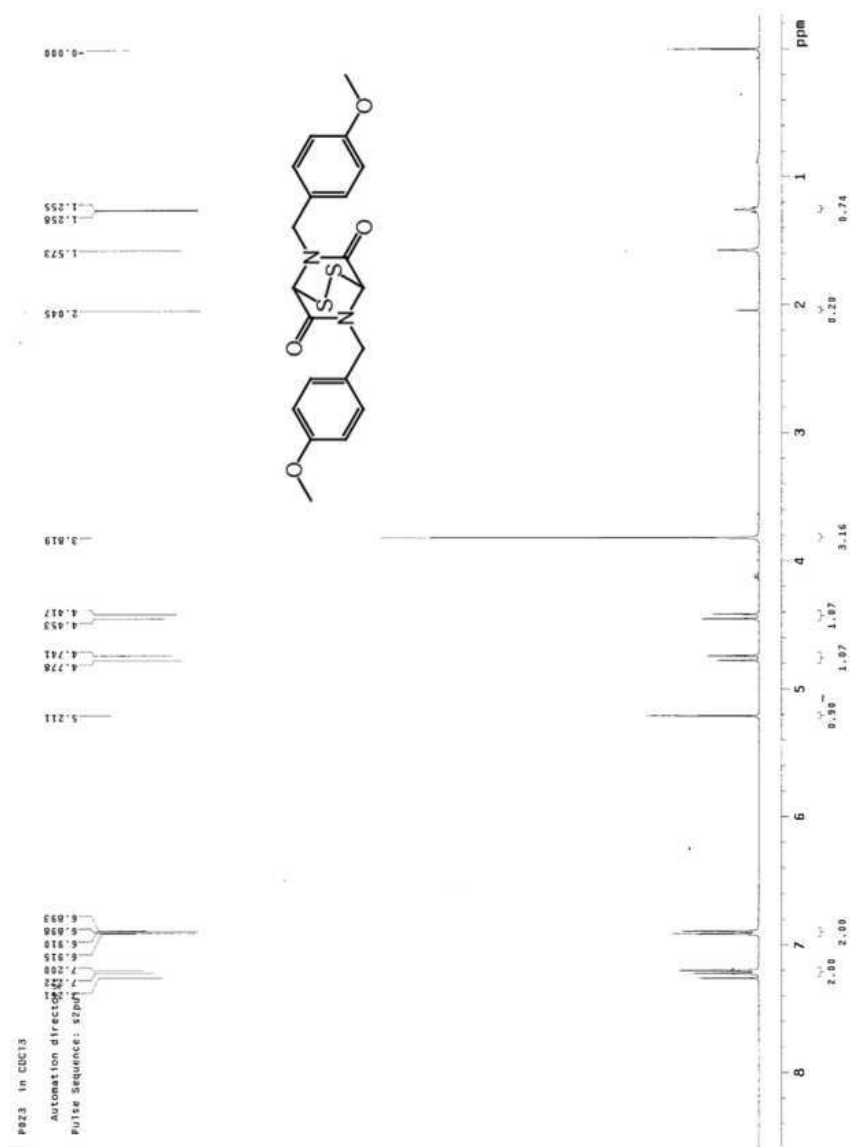
도면37



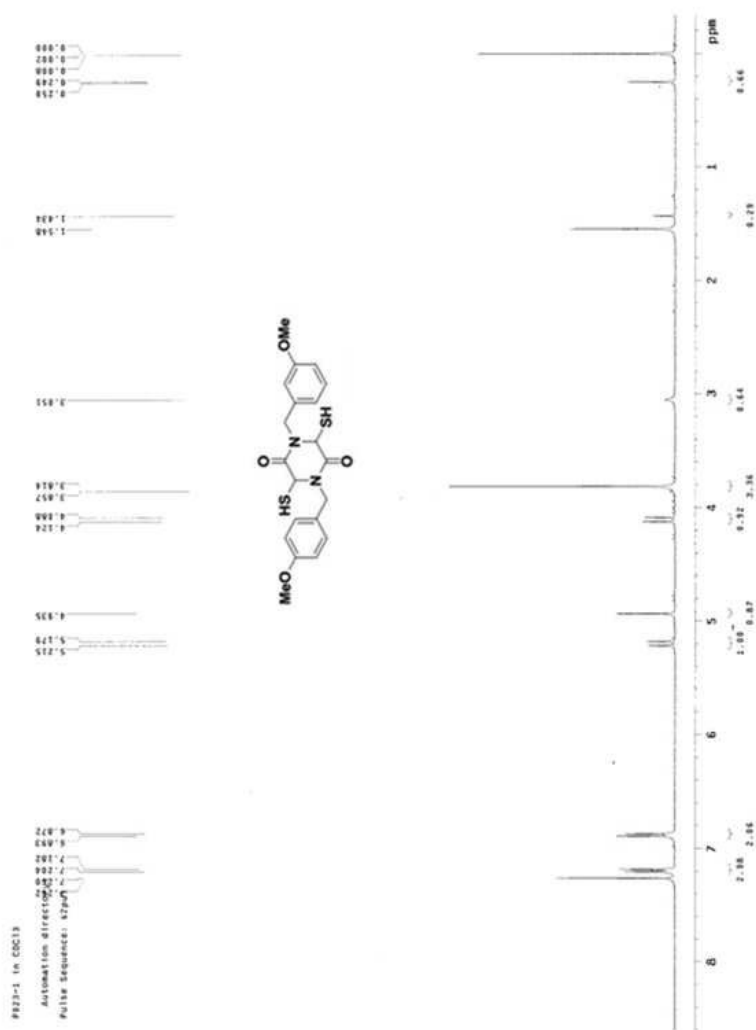
도면38



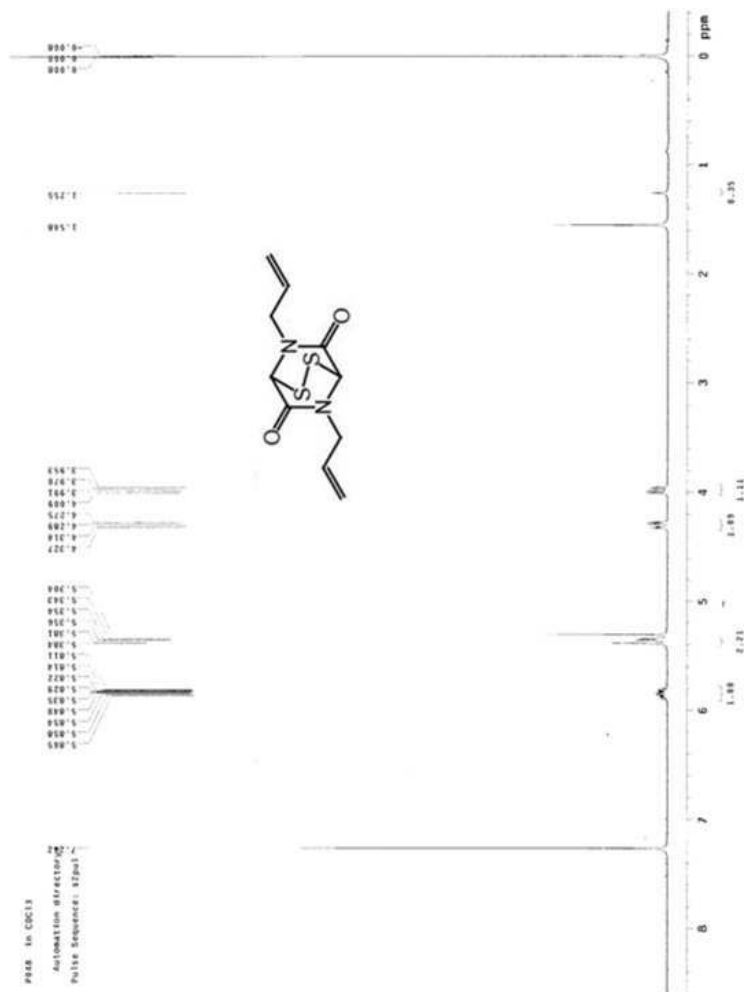
도면39



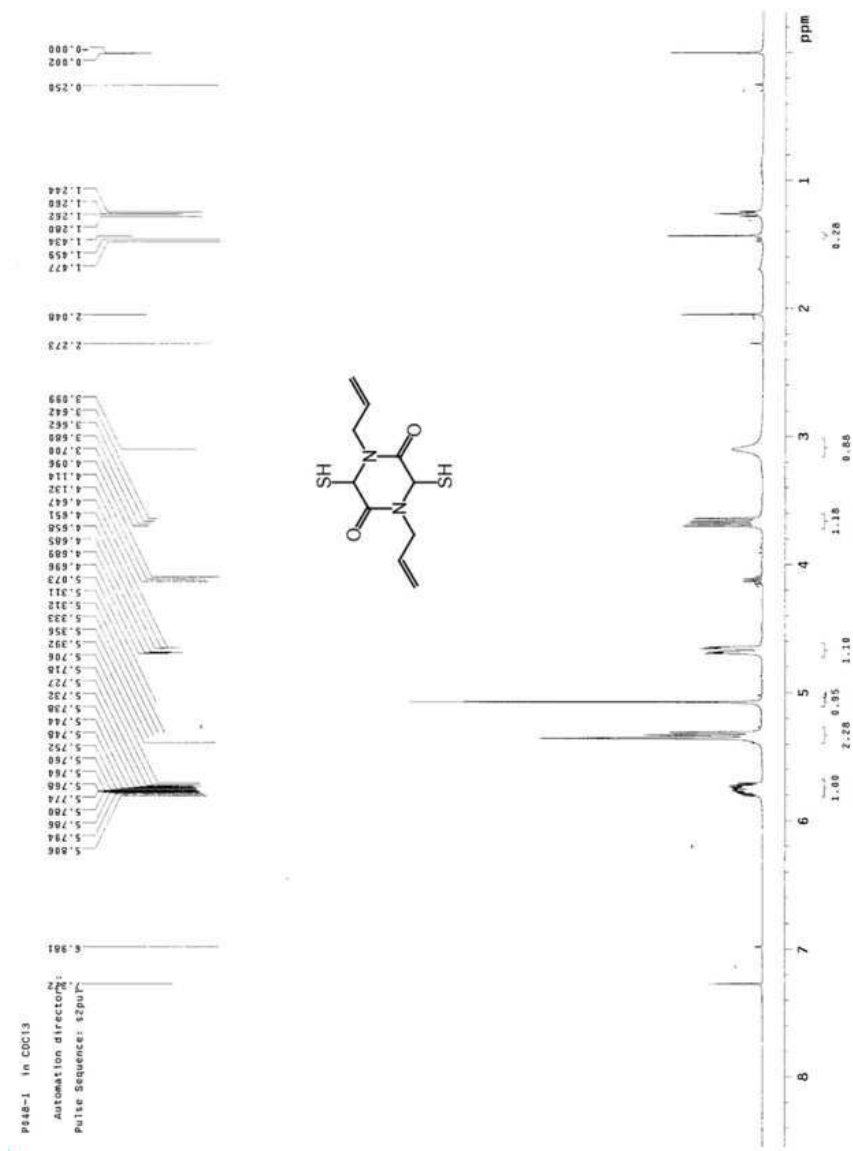
도면40



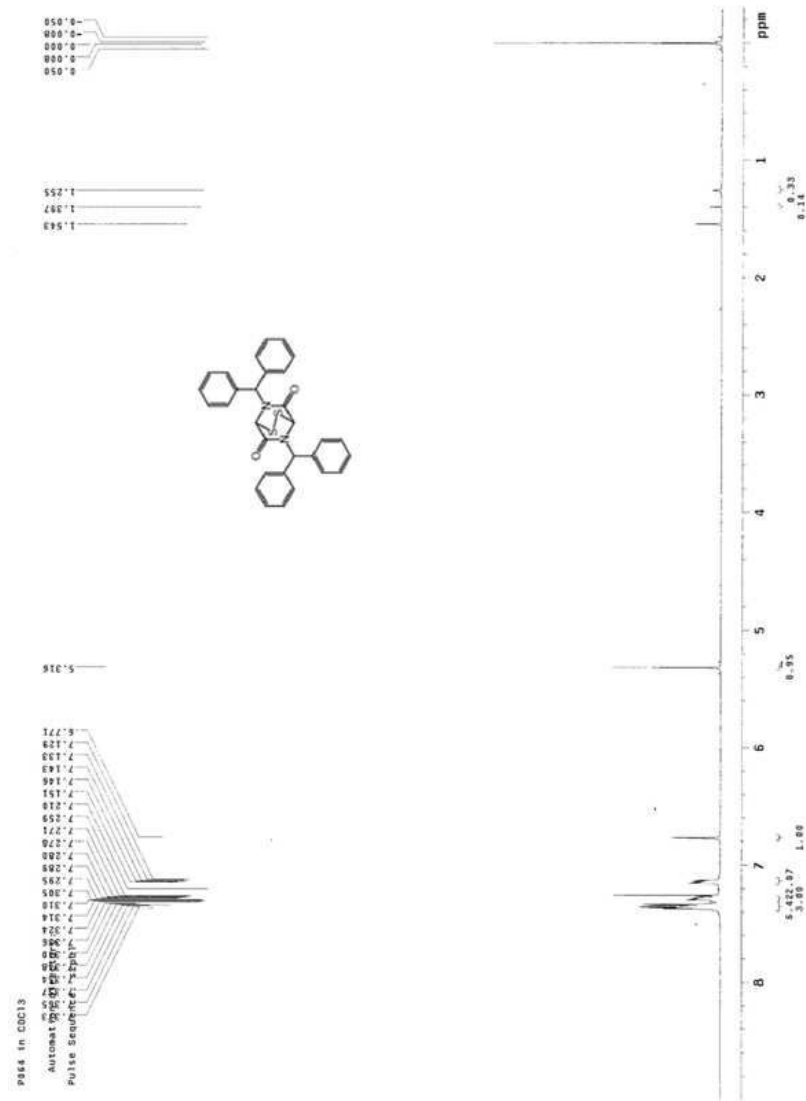
도면41



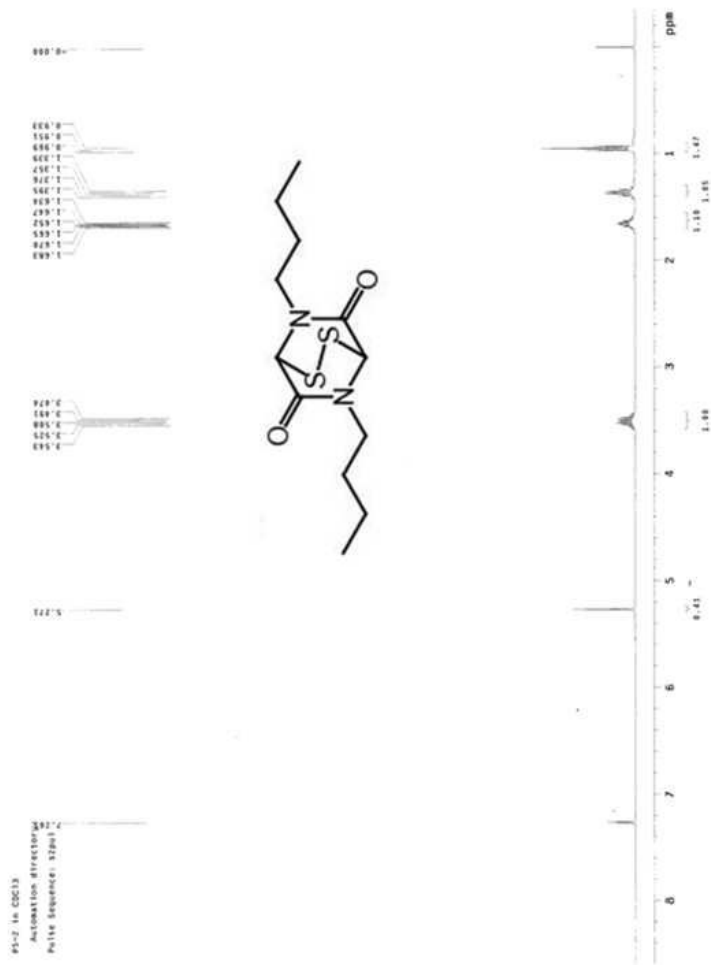
도면42



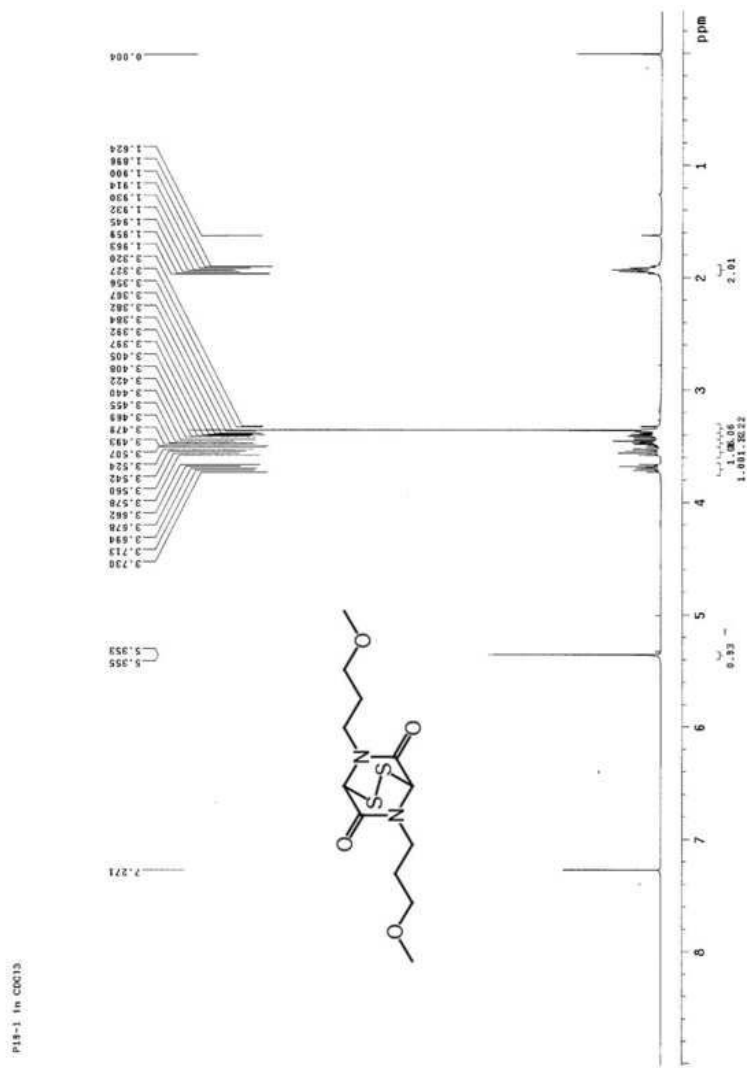
도면44



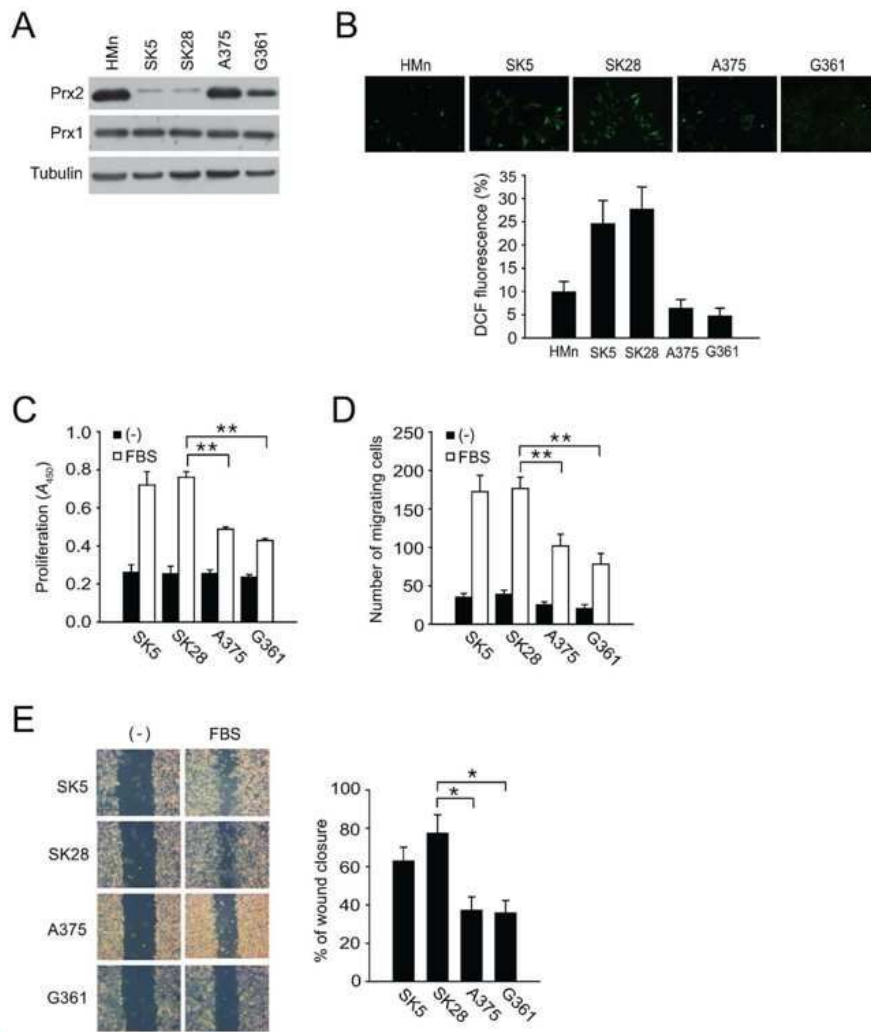
도면45



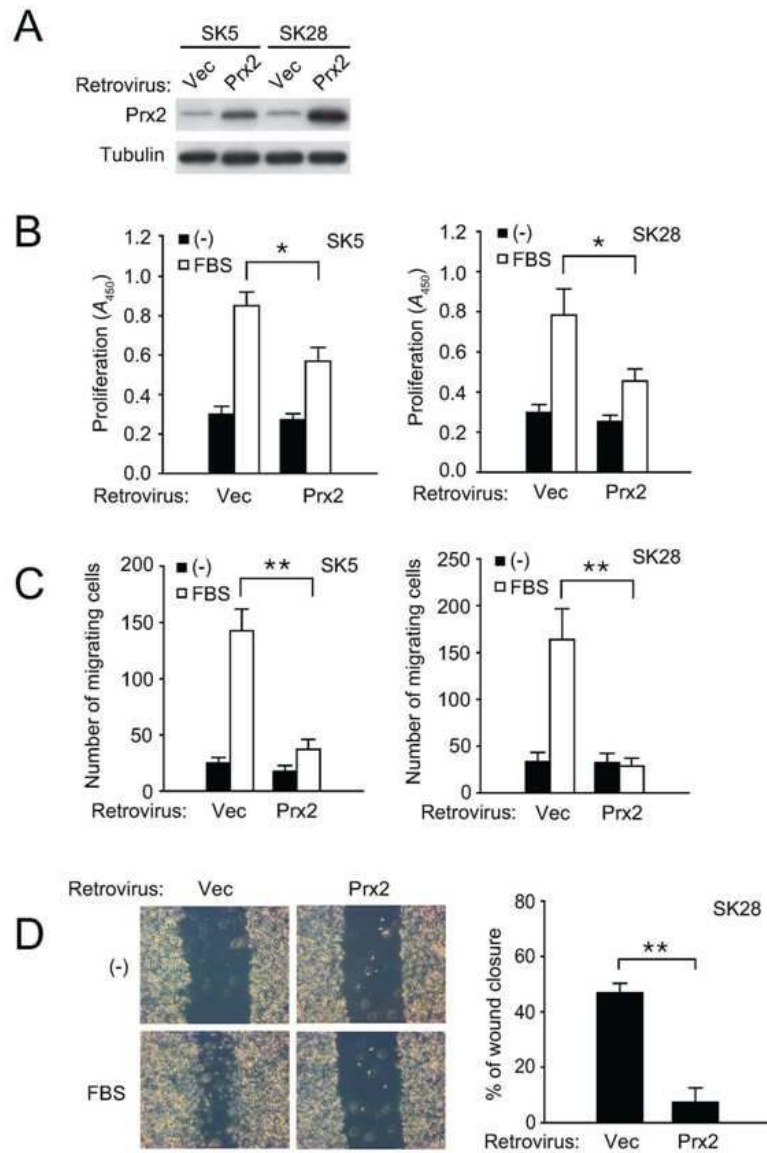
도면46



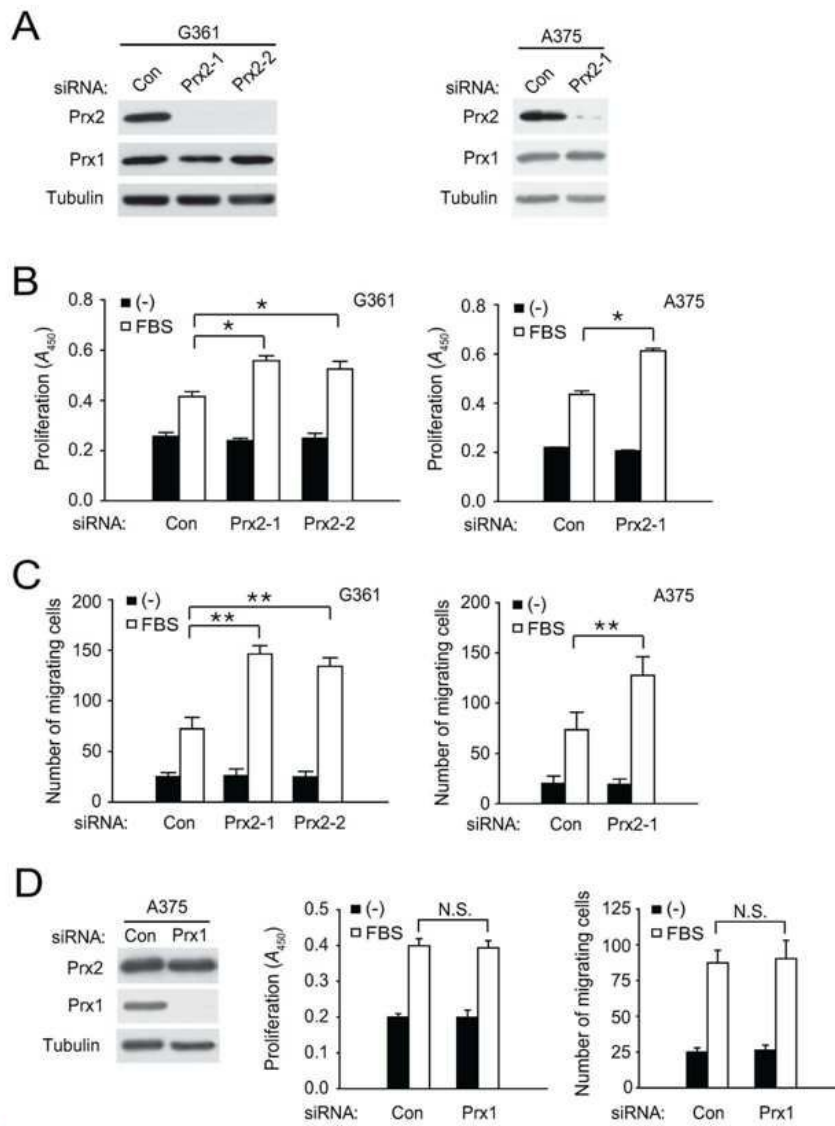
도면47



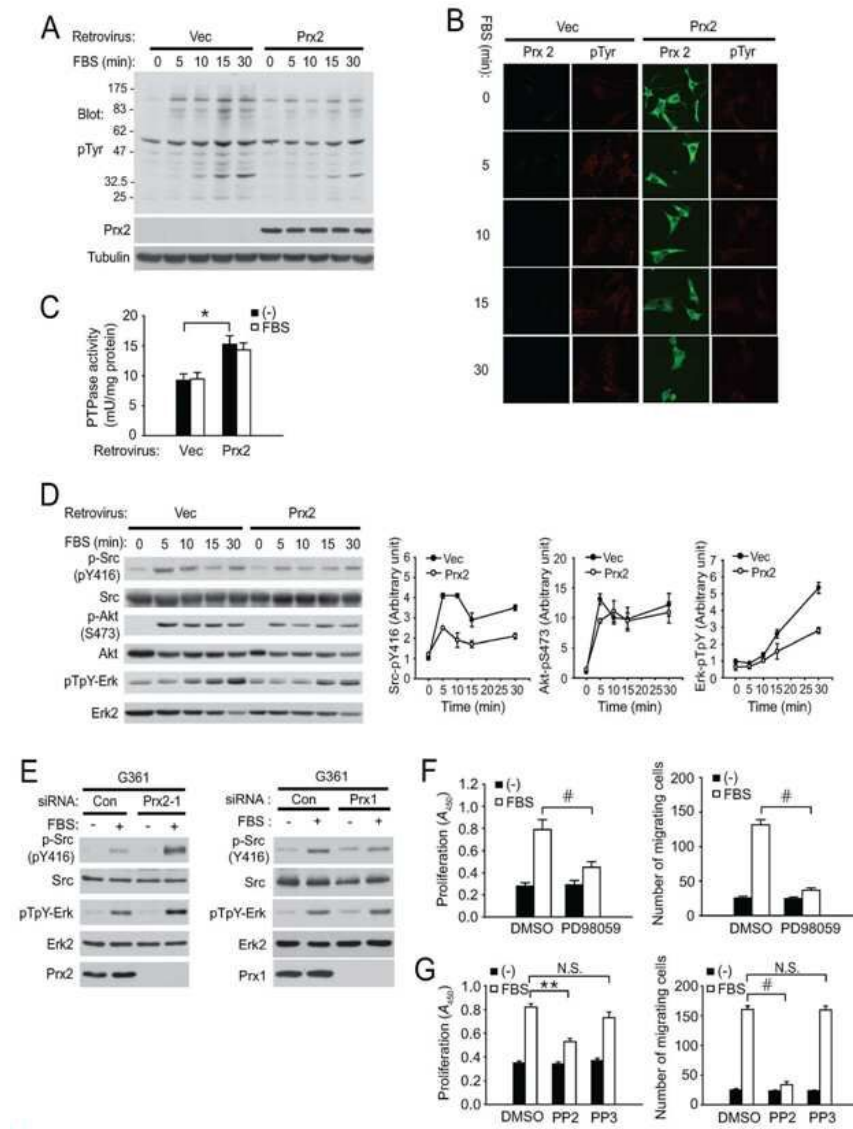
도면48



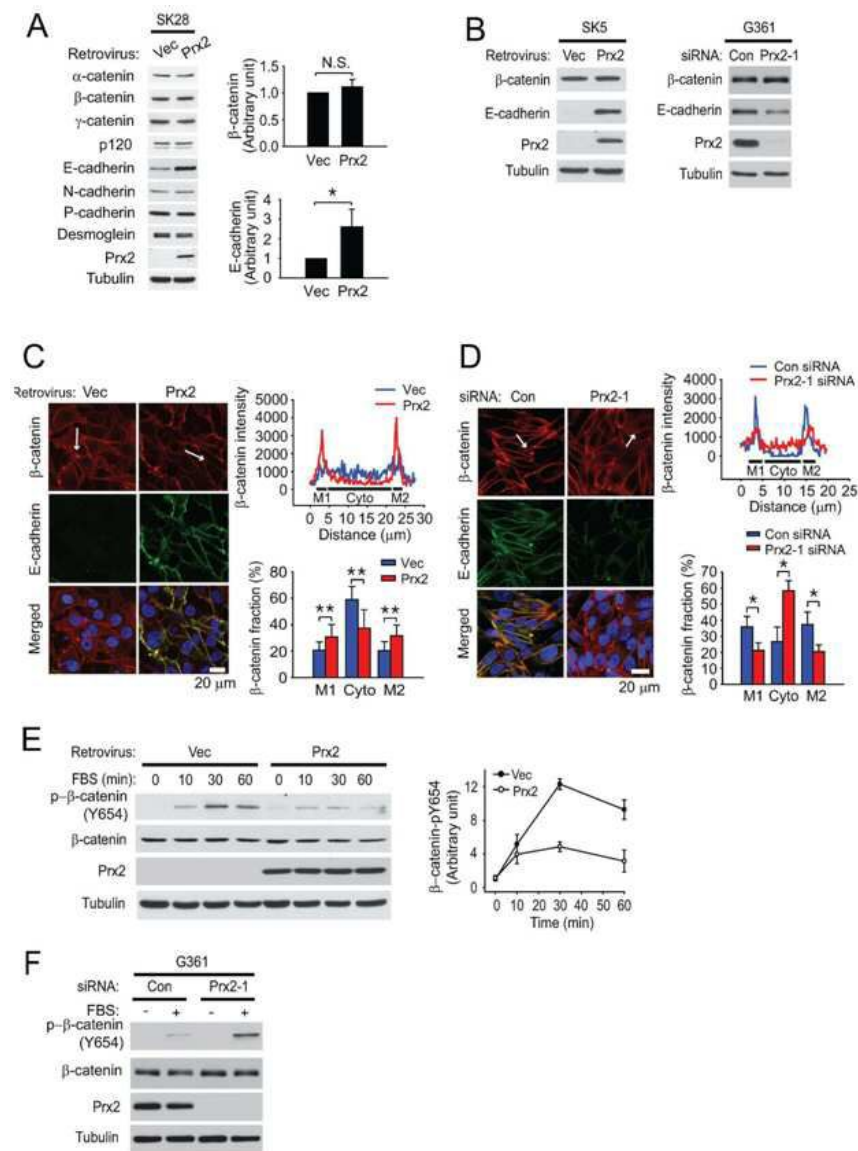
도면49



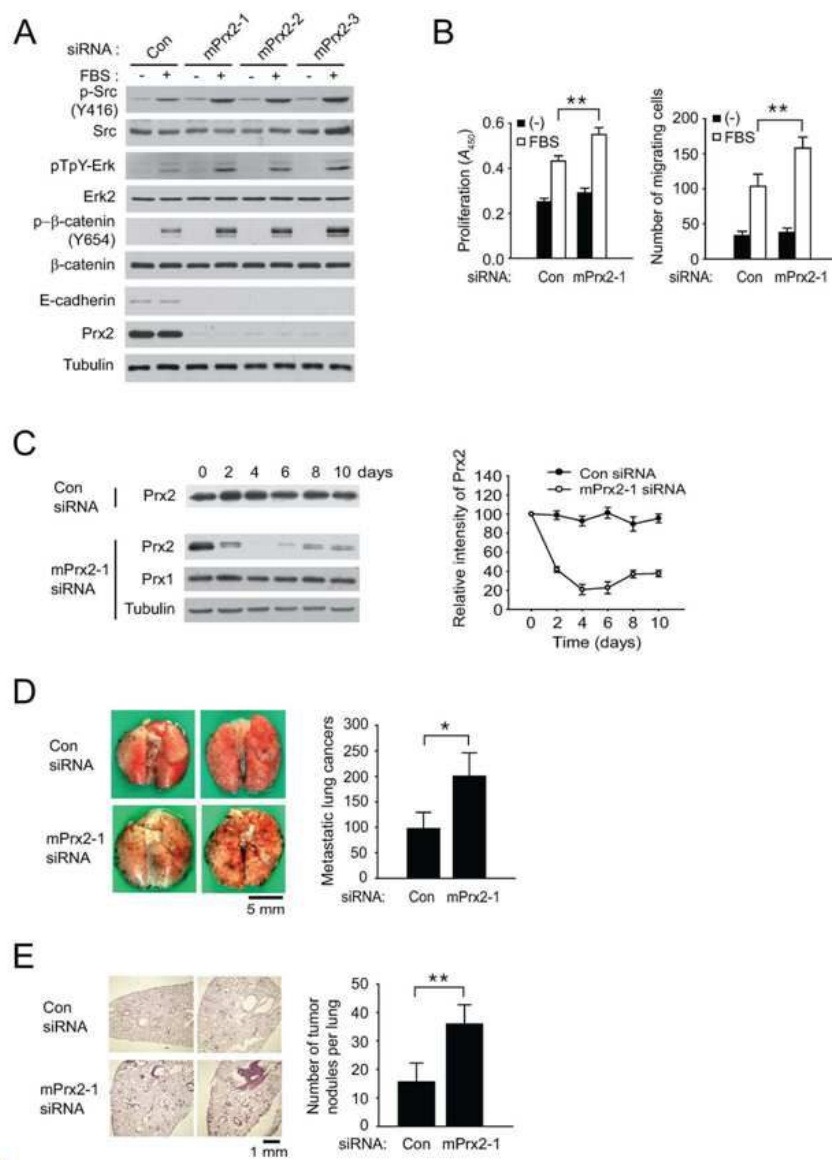
도면50



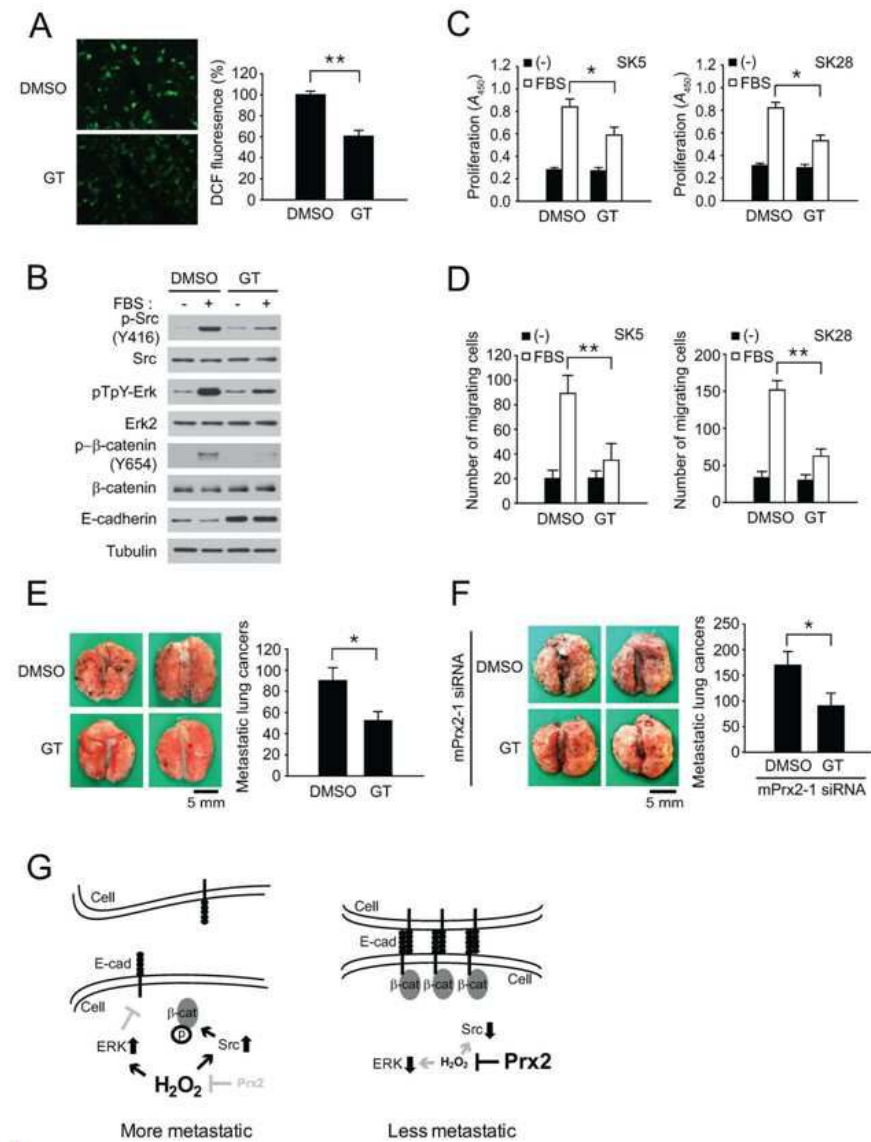
도면51



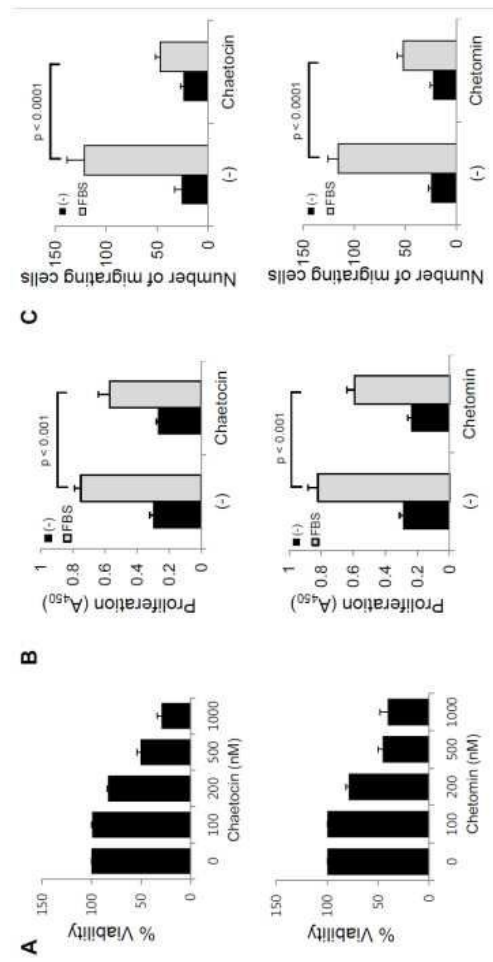
도면52



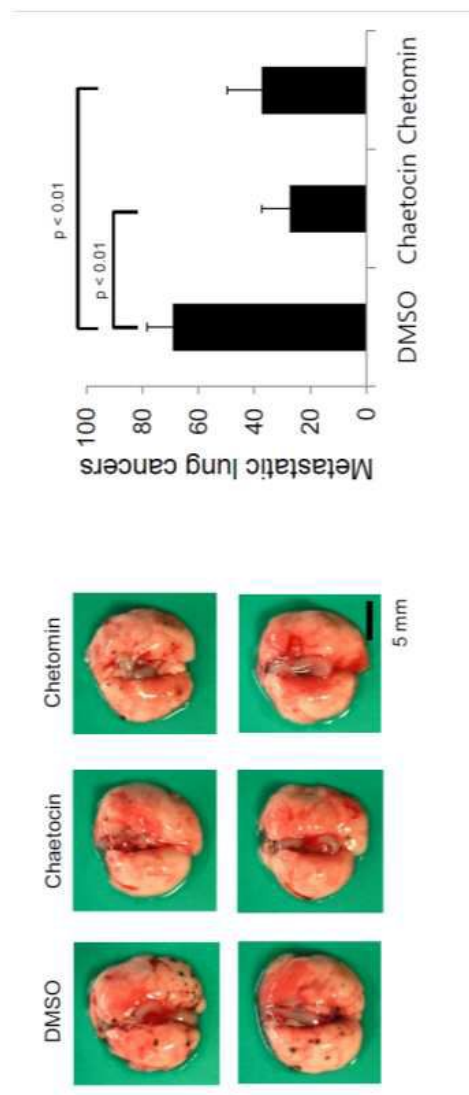
도면53



도면54



도면55



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> EPIDITHIODIOXOPIPERAZINE COMPOUND OR ITS DERIVATIVES, AND THE USE THEREOF
- <130> PA130226-KR-P1
- <150> KR 10-2013-0059351
- <151> 2013-05-24
- <160> 8
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> human PrxII siRNA-1

<400> 1

cgcuugucug aggauuacgu u

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human PrxII siRNA-2

<400> 2

aggaaauuuu cuccaaacau u

21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human PrxI siRNA

<400> 3

actcaactgc caagtgattu u

21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse PrxII siRNA-1

<400> 4

aggaaauuuu cuccaaacau u

21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA for Rat PrxII

<400> 5

gcaacgcgca caucggaau u

21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA for Rat PrxII
 <400> 6
 gaucacaguc aacgaccuau u 21
 <210> 7
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA for Rat PrxII
 <400> 7

 agaauuacgg cguguugaau u 21
 <210> 8
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA for Rat PrxII
 <400> 8
 acgcugagga cuuccgaaau u 21