



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월29일  
(11) 등록번호 10-1323413  
(24) 등록일자 2013년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/52 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0082045

(22) 출원일자 2012년07월26일

심사청구일자 2012년07월26일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110090058 A

US20100137577 A1

US7199127 B2

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

정낙신

서울특별시 강남구 역삼동 754-1 역삼푸르지오아파트 107동 402호

하현주

서울특별시 용산구 이촌1동 301-10 로얄아파트 103호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 6 항

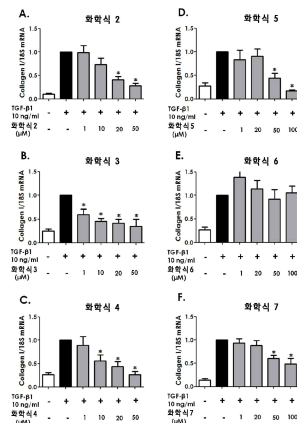
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 및 이의 유도체를 포함하는 만성신장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

## (57) 요약

본 발명은 만성신장질환 예방 또는 치료 더 나아가서는 신장섬유화의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 및 이의 유도체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로서 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올(화학식 2의 화합물)의 전처리는 요관이 폐쇄된 신장에서 상피세포-중간엽 세포 이행 (EMT)과 증가된 세포외 기질 (ECM) 축적을 효과적으로 억제하였으며, 이의 유도체(화학식 3 내지 7의 화합물)는 TGF- $\beta$ 1에 의한 콜라겐 I mRNA 발현에 대한 보호 효과를 나타냈으며 이에 따라서 만성신장질환 및 신장섬유화의 예방 또는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

## 대표도 - 도11



(72) 발명자

**이혁우**

경기도 화성시 반송동 시범한빛마을한화꿈에그린아파트 234동 701호

**이지윤**

서울특별시 양천구 신정3동 동일하이빌아파트 104동 104호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R31-208-000-10010-0  
부처명 교육과학기술부  
연구사업명 WCU 사업  
연구과제명 바이오레독스 시스템 융합 연구  
주관기관 이화여자대학교  
연구기간 2008.12.01 ~ 2013.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-1676-1-1  
부처명 이화여자대학교  
연구사업명 글로벌 탑5과제  
연구과제명 나노바이오 의약사업단  
주관기관 이화여자대학교  
연구기간 2011.09.01 ~ 2012.08.31

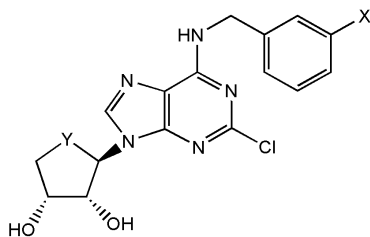
---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 만성신장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서, Y는 O 또는 S이고,

X는 F, Cl, Br 또는 I 이다.

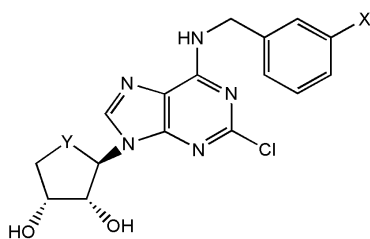
### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Y는 S이고, X는 I인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신장섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서, Y는 O 또는 S이고,

X는 F, Cl, Br 또는 I 이다.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 Y는 S이고, X는 I인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 5

제3항에 있어서, 상기 신장섬유화는 세뇨관간질성 섬유화인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

## 청구항 6

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 약학적 조성물과 로자르탄을 병용하여 투여하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 만성신장질환 예방 또는 치료 더 나아가서는 신장 섬유화의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 및 이의 유도체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 만성신장질환(chronic kidney disease: CKD)은 전세계적으로 심각한 질환으로 인식되고 있다. 최근 수십년 동안, 질환 발병과 사망의 주 원인이 영양과잉/결핍과 점진적인 만성염증성 질환으로 바뀌고 있다. 만성신장질환의 늘어나는 발병율은 이러한 전환의 일면이다(1. Schieppati A, & Remuzzi G).

[0003] 투석이나 이식과 같은 신장 대체요법을 필요로 하는 만성신장질환을 겪고 있는 환자의 상태를 말기 신장병(end-stage renal disease; ESRD)이라고 한다. 현재까지 엔지오텐신수용체차단제(angiotensin receptor blockers; ARBs)와 엔지오텐신전환효소(angiotensin converting enzyme; ACE) 억제제 단독으로 또는 병합된 것과 같은 레닌-엔지오텐신-알도스테론계(renin-angiotensin-aldosterone system; RASS) 억제제 이외에는 효과를 보이는 치료제가 없는 실정이다(2. Brenner BM, Cooper ME et al; 3. Lewis EJ, Hunsicker LG et al; 4. Nakao N, Yoshimura A et al; 5. MacKinnon M, Shurraw S et al).

[0004] 그러나 이러한 치료제 조차도 일부 CKD 환자에서 말기 신장병(the end-stage renal disease; ESRD)의 시작을 지연시키거나 사구체여과율(GFR)의 감소를 억제하는데 효과가 있을 뿐 대다수 CKD 환자에서는 그 효과가 미미하다(6. Vilayur E, & Harris DCH). 따라서 레닌-엔지오텐신-알도스테론계(renin-angiotensin-aldosterone system; RASS) 억제제의 한계점을 극복할 수 있는 보다 새로운 치료제 개발에 대한 필요성이 강조되고 있다.

[0005] 증가된 세포외기질(extracellular matrix; ECM) 축적과 상피세포-중간엽 세포 이행(epithelial-to-mesenchymal transition; EMT)에 의해 특징지어지는 세뇨관간질성 섬유화는 말기신장병으로 이어지는 모든 신장병의 공통 경로이다(7. Boor P, Ostendorf T, Floege J et al). 또한, Smad-의존적 또는 Smad-독립적 형질전환성장인자(Transforming growth factor- $\beta$ 1; TGF- $\beta$ 1) 신호 경로는 세포외기질(ECM) 축적에 있어서 가장 중요한 친섬유화(profibrotic) 성장인자이다(8. Liu Y et al).

[0006] 지금까지 수많은 연구들이 TGF- $\beta$ 1이 세뇨관상피 세포에서 이케드헤린(E-cadherin)과 같은 상피세포 표적 단백질을 손실하고  $\alpha$ -평활근 액틴( $\alpha$ -smooth muscle actin:  $\alpha$ -SMA)을 포함하는 간엽세포 지표(mesenchymal markers)를 상향조절한다고 보고한 바 있다(9. Liu Y et al; 10. Yang J, & Liu Y et al). 상피세포-중간엽 세포 이행(EMT) 및 세포외기질(ECM) 상향조절에 관여하는 신호전달 중 하나는 세포분열촉진 단백질(mitogen-activated protein kinases; MAPK); 즉 c-Jun N-terminal kinases (JNK), extracellular signal-regulated kinases (ERK) 그리고 p38 MAPK 경로이다(11. Wang W, Koka V et al; 12. Rhyu DY, Yang Y et al; 13. Liu Q, Mao H et al). 따라서 세포분열촉진 단백질(MAPK) 경로의 억제는 신장섬유화를 예방 또는 치료하기 위한 전략으로 사료된다.

[0007] 한편, 아데노신은 정상적인 신장에 존재하며 신장 저산소증이나 신장내 허혈 기간 동안 세포외 공간에서 획기적으로 그 농도가 증가한다(14. Jacobson KA, & Gao ZG et al). 세포 외 아데노신은 4가지 즉,  $A_1AR$ ,  $A_{2A}AR$ ,  $A_{2B}AR$  그리고  $A_3AR$ 로 알려진 아데노신 수용체를 통해서 그 생리/병리적 기능을 나타낸다. 이러한 4가지 아데노신 수용체들은 모두 G 단백질 연결 수용체 (G-protein-coupled receptors; GPCRs)에 속한다 (15. Hasko G, Linden J et al).

- [0008] 이러한 4가지 아데노신 수용체는 전체 신장 균질액에서 측정되고, 몇몇의 연구는 특정 아데노신 수용체 아형의 신장 내 발현 부위를 측정한 바 있다(16. Bauerle JD, Grenz A et al). 우리는 이전 연구에서 아데노신의 4가지 아형 모두가 요관이 폐쇄된 신장에서 상향조절된다고 보고한 바 있다 (Lee J, Hwang I, Ha H: Adenosine receptors are upregulated in unilateral ureteral obstructed rat kidneys. Transplant Proc 44(4):1166-1168, 2012). 또한 최근에 보고된 연구에서는 아데노신 탈아미노효소(adenosine deaminase; ADA) 결핍 마우스에서 증가된 아데노신으로 인하여 세뇨관간질성 섬유화가 발생한다고 보고된 바 있다(17. Dai Y, Zhang W et al). 그러나 만성신장질환에서 아데노신과 아데노신 수용체의 병인론적 역할이나 그 기전은 거의 밝혀지지 않았다.
- [0009] A<sub>3</sub>AR 길항제의 신장보호 효과는 이미 보고된 바 있지만, 이전의 연구들은 급성신장손상에 집중되어 있었다 (20. Lee HT, & Emala CW et al; 21. Lee HT, Ota-Setlik A, Xu H et al). 아데노신 탈아미노효소 결핍 생쥐에서 신장 섬유화가 유의성 있게 증가하기 때문에, 아데노신이 신장섬유화에 관여할 수 있을 것으로 최근에 제안되었다. 그러나 이 연구에서는 아데노신 탈아미노효소(ADA) 결핍 생쥐의 신장에서 가장 많이 증가된 아데노신 수용체인 A<sub>2b</sub>AR의 병인론적 역할에 중점을 두었다. 또한 신장은 다른 기관과 달리 서로 이질적인 여러 가지 세포(혈관내피세포, 상피세포, 메산지움 세포 등)로 구성되어 있어 손상을 억제하는 기술 및 물질의 약리 기전에 대한 연구는 매우 초기 단계인 상태이다.
- [0010] 따라서, 본 발명자는 강력한 신장조직보호(renoprotective) 약학적 조성물로서 A<sub>3</sub>AR 선택적 길항제에 대한 연구를 진행하였다.
- [0011] 이전 연구들은 약리학적으로 A<sub>3</sub>AR이 차단된 A<sub>3</sub>AR 결핍 마우스가 국소허혈 재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)과 마이오글로빈뇨(myoglobinuria)에 의해 유도된 급성 신부전에서 두드러진 신장보호 작용을 한다고 보고하였다. A<sub>3</sub>AR과 관련된 다양한 세포내 신호전달 경로들 중 하나는 세포분열촉진 단백질(mitogen-activated protein kinases; MAPK)이다 (18. KIM H, KANG JWOO, LEE S et al; 19. Merighi S, Benini A, Mirandola P et al).
- [0012] 상기에서 기재한 상피세포-중간엽 세포 이행(EMT)에서의 세포분열촉진 단백질(mitogen-activated protein kinases; MAPK)의 역할을 고려할 때, A<sub>3</sub>AR은 세포분열촉진 단백질(MAPK)을 통해 상피세포-중간엽 세포 이행(EMT)과 세포외기질(ECM)의 과다 축적을 유발할 수 있다.
- [0013] 본 발명자는 만성신장질환의 치료제로서 A<sub>3</sub>AR 길항제를 최초로 연구하여 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 전처리가 요관이 폐쇄된 신장에서 상피세포-중간엽 세포 이행(EMT)과 증가된 세포외기질(ECM) 축적을 효과적으로 억제한다는 것을 확인하였으며, 이의 유도체들이 TGF-β1에 의한 콜라겐 I mRNA 발현을 억제하는 보호 효과를 확인하였는 바, 만성신장질환 및 신장섬유화의 예방 또는 치료효과가 있는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0014] [비특허문헌]
- [0015] (비특허문헌 0001) Schieppati A, & Remuzzi G: Chronic renal diseases as a public health problem: Epidemiology, social, and economic implications Kidney Int Suppl (98): S7-S10, 2005
- [0016] (비특허문헌 0002) Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S: Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients

with type 2 diabetes and nephropathy. N Engl J Med 345: 861-869, 2001

- [0017] (비특허문헌 0003) Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD: The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. N Engl J Med 329: 1456-1462, 1993
- [0018] (비특허문헌 0004). Nakao N, Yoshimura A, Morita H, Takada M, Kayano T, Ideura T: RETRACTED: Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal disease (COOPERATE): A randomised controlled trial. The Lancet 361: 117-124, 2003
- [0019] (비특허문헌 0005). MacKinnon M, Shurraw S, Akbari A, Knoll GA, Jaffey J, Clark HD: Combination therapy with an angiotensin receptor blocker and an ACE inhibitor in proteinuric renal disease: A systematic review of the efficacy and safety data. American Journal of Kidney Diseases 48: 8-20, 2006
- [0020] (비특허문헌 0006). Vilayur E, & Harris DCH: Emerging therapies for chronic kidney disease: What is their role? Nature Reviews Nephrology 5: 375-383, 2009
- [0021] (비특허문헌 0007). Boor P, Ostendorf T, Floege J: Renal fibrosis: Novel insights into mechanisms and therapeutic targets. Nature Reviews Nephrology 6: 643-656, 2010
- [0022] (비특허문헌 0008). Liu Y: Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. Kidney Int 69: 213-217, 2006
- [0023] (비특허문헌 0009). Liu Y: Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: Pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. Journal of the American Society of Nephrology 15: 1-12, 2004
- [0024] (비특허문헌 0010). Yang J, & Liu Y: Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. The American Journal of Pathology 159: 1465, 2001
- [0025] (비특허문헌 0011). Wang W, Koka V, Lan HY: Transforming growth factor- $\beta$  and smad signalling in kidney diseases. Nephrology 10: 48-56, 2005
- [0026] (비특허문헌 0012). Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh S, Lee HB: Role of reactive oxygen species in TGF- $\beta$ 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. Journal of the American Society of Nephrology 16: 667-675, 2005
- [0027] (비특허문헌 0013). Liu Q, Mao H, Nie J, Chen W, Yang Q, Dong X, Yu X: Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces epithelial-mesenchymal transition by activating the JNK-Smad3 pathway in rat peritoneal mesothelial cells. Peritoneal Dialysis International 28: S88-S95, 2008
- [0028] (비특허문헌 0014). Jacobson KA, & Gao ZG: Adenosine receptors as therapeutic targets Nat Rev Drug Discov 5: 247-264, 2006
- [0029] (비특허문헌 0015). Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P: Adenosine receptors: Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. Nature Reviews Drug Discovery 7: 759-770, 2008
- [0030] (비특허문헌 0016). Bauerle JD, Grenz A, Kim JH, Lee HT, Eltzschig HK: Adenosine generation and signaling during acute kidney injury J Am Soc Nephrol 22: 14-20, 2011
- [0031] (비특허문헌 0017). Dai Y, Zhang W, Wen J, Zhang Y, Kellems RE, Xia Y: A2B adenosine Receptor-Mediated induction of IL-6 promotes CKD. Journal of the American Society of Nephrology 22: 890-901, 2011
- [0032] (비특허문헌 0018). KIM H, KANG JWOO, LEE S, CHOI WONJUN, JEONG LAKS, YANG Y, HONG JINTAE, YOON DOY: A3 adenosine receptor antagonist, truncated thio-cl-IB-MECA, induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells. Anticancer Res 30: 2823, 2010
- [0033] (비특허문헌 0019). Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, MacLennan S, Baraldi PG, Borea PA: Modulation of the Akt/Ras/Raf/MEK/ERK pathway by A3 adenosine receptor. Purinergic

Signalling 2: 627-632, 2006

- [0034] (비특허문헌 0020). Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA: Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy Kidney Int 75: 1145-1152, 2009
- [0035] (비특허문헌 0021). Docherty NG, Calvo IF, Quinlan MR, Perez-Barriocanal F, McGuire BB, Fitzpatrick JM, Watson RWG: Increased E-cadherin expression in the ligated kidney following unilateral ureteric obstruction. Kidney Int 75: 205-213, 2008
- [0036] (비특허문헌 0022). Lee HT, & Emala CW: Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: Role of A1 and A3 receptors. American Journal of Physiology-Renal Physiology 278: F380-F387, 2000
- [0037] (비특허문헌 0023). Lee HT, Ota-Setlik A, Xu H, D'Agati VD, Jacobson MA, Emala CW: A3 adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia-and myoglobinuria-induced renal failure. American Journal of Physiology-Renal Physiology 284: F267-F273, 2003
- [0038] (비특허문헌 0024). Ma FY, Flanc RS, Tesch GH, Han Y, Atkins RC, Bennett BL, Friedman GC, Fan JH, Nikolic-Paterson DJ: A pathogenic role for c-jun amino-terminal kinase signaling in renal fibrosis and tubular cell apoptosis. Journal of the American Society of Nephrology 18: 472-484, 2007
- [0039] (비특허문헌 0025). Pat B, Yang T, Kong C, Watters D, Johnson DW, Gobe G: Activation of ERK in renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction: Modulation by antioxidants. Kidney Int 67: 931-943, 2005
- [0040] (비특허문헌 0026). Stambe C, Atkins RC, Tesch GH, Masaki T, Schreiner GF, Nikolic-Paterson DJ: The role of p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase activation in renal fibrosis. Journal of the American Society of Nephrology 15: 370-379, 2004
- [0041] (비특허문헌 0027). Liu Q, Mao H, Nie J, Chen W, Yang Q, Dong X, Yu X: Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces epithelial-mesenchymal transition by activating the JNK-Smad3 pathway in rat peritoneal mesothelial cells. Peritoneal Dialysis International 28: S88-S95, 2008
- [0042] (비특허문헌 0028). Furukawa F, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yoshida K, Sugano Y, Yamagata H, Matsushita M, Seki T, Inagaki Y: p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. Hepatology 38: 879-889, 2003
- [0043] (비특허문헌 0029). Hayashida T, DECAESTECKER M, SCHNAPER HW: Cross-talk between ERK MAP kinase and smad signaling pathways enhances TGF- $\beta$ -dependent responses in human mesangial cells. The FASEB Journal 17: 1576-1578, 2003
- [0044] (비특허문헌 0030). Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S: Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. Kidney Int 47: 1285-1294, 1995
- [0045] (비특허문헌 0031). Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Klahr S: Delayed treatment with enalapril halts tubulointerstitial fibrosis in rats with obstructive nephropathy Kidney Int 49: 1110-1119, 1996

## 발명의 내용

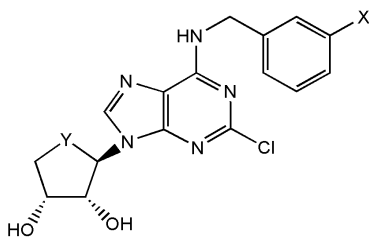
## 해결하려는 과제

- [0046] 본 발명은 만성신장질환 및/또는 신장섬유화를 예방 또는 치료할 수 있는 A<sub>3</sub>AR 길항제로서 작용하는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 및 이의 유도체를 포함하는 만성신장질환 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

# 과제의 해결 수단

[0047] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 만성신장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0048] [화학식 1]



[0049]

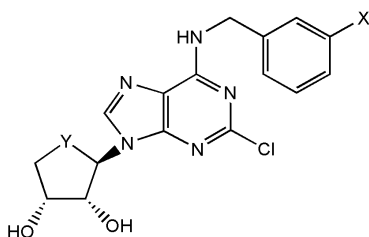
[0050] 상기 식에서, Y는 O 또는 S이고,

[0051] X는 F, Cl, Br 또는 I 이다.

[0052] 또한, 본 발명에서 있어서 상기 식에서 Y는 S이고, X는 I인 (2R,3R,4S)-2-(2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 만성신장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용하는 것이 바람직하다.

[0053] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신장섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0054] [화학식 1]



[0055]

[0056] 상기 식에서, Y는 O 또는 S이고,

[0057] X는 F, Cl, Br 또는 I 이다.

[0058] 또한, 본 발명에서 있어서 상기 식에서 Y는 S이고, X는 I인 (2R,3R,4S)-2-(2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 신장섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용하는 것이 바람직하다.

[0059] 또한, 본 발명에 있어서 예방 또는 치료되는 신장섬유화의 증상은 보다 바람직하게는 세뇨관간질성 섬유화일 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 로자르탄과 병용하여 투여하는 것이 만성신장질환 및/또는 신장섬유화의 예방 또는 치료 효과를 더욱 증가시킬 수 있다.

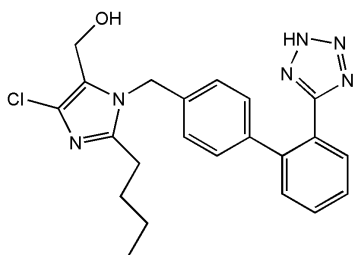
[0061] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0062] 본 발명에서 사용되는 용어 "만성신장질환(Chronic kidney disease, CKD)"은 단백뇨가 지속적으로 나오거나 혈뇨와 같은 신장 손상의 증거가 있거나, 3개월 이상 지속적으로 신장 기능이 감소하는 상태를 의미한다. 만성 신부전(Chronic renal failure, CRF)은 신장 기능이 50% 이하로 떨어진 상태가 3개월 이상 지속될 때 만성 신부전이라고 하며 만성신장질환보다는 좁은 의미이다. 자각증세로는 다뇨, 눈 주위와 하지가 부음, 몸이 나른함, 쉽게 피로해짐, 식욕이 없음, 구역질이 남, 피부의 가려움, 구취(암모니아 냄새의 증세)등이 있으며, 빈혈과 고혈압의 증세를 동반하며 어린이는 발육이 늦어지고 안색이 나빠지는 증세를 동반할 수 있다.

[0063] 본 발명에서 사용되는 용어 "신장섬유화"는 신장의 조직 및/또는 혈관이 단단하게 굳어지는 증상을 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "세뇨관간질성 섬유화"는 세뇨관과 세뇨관 사이, 즉 세뇨관간질 섬유화를 의미한다. 대부분의 만성신장질환의 경우 세뇨관간질성 섬유화로 진행하게 된다.

[0064] 본 발명에서 사용되는 용어 "로자르탄(losartan)"은 하기 화학식 8의 (2-부틸-4-클로로-1-{[2'-(1H-테트라졸-5-일)바이페닐-4-일]메틸}-1H-이미다졸-5-일}메탄올)화합물로서 엔지오텐신 II 수용체 길항제로서 일반적으로 고혈압 치료제로서 널리 사용된다.

[0065] [화학식 8]



[0066]

[0067]

[0068] 본 발명에서, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 만성신장질환 및/또는 신장섬유화에 의한 증상을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"란 조성물의 투여에 의해 만성신장질환 및/또는 신장섬유화에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0069] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 염"은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 제조된 염을 의미하며, 이러한 제조방법은 당업자에게 공지되어 있다. 구체적으로, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 약리학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 다음 무기산과 유기산 및 염기로부터 유도된 염을 포함하지만 이것으로 한정되지는 않는다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 포함할 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 알칼리 금속, 예를 들어, 나트륨, 또는 칼륨, 알칼리 토금속, 예를 들어, 마그네슘을 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명의 만성신장질환 및/또는 신장섬유화의 예방 또는 치료용 조성물은 제형의 제조에 있어서, 활성성분을 담체와 함께 혼합 또는 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시키는 것이 바람직하다. 또한 본 발명의 만성신장질환 및/또는 신장섬유화의 예방 또는 치료용 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를

들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0071] 본 발명의 만성신장질환 및/또는 신장섬유화의 예방 또는 치료용 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0072] 본 발명의 만성신장질환 및/또는 신장섬유화의 예방 또는 치료용 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0073] 본 발명의 만성신장질환 및/또는 신장섬유화의 예방 또는 치료용 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0074] 또한 바람직하게는 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화 될 수 있다. 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 같은 활성성분의 투여량은 처리되는 대상, 질병 또는 상태의 심각도, 투여의 속도 및 처방 의사의 판단에 따른다. 유효성분으로서 화학식 1로 표시되는 화합물은 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루 1 내지 100 mg/kg(체중), 바람직하게는 5 내지 50 mg/kg(체중)의 양으로 1일 1회 또는 분할하여 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여될 수 있다. 일부의 경우에 있어서, 상기 언급된 범위보다 적은 투여량이 보다 적합할 수 있고, 해로운 부작용을 일으키지 않으면서도 보다 많은 양이 사용될 수도 있으며, 보다 많은 투여량의 경우는 하루에 걸쳐 수회의 적은 분량으로 분배된다.

[0075] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물은, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함하고, 가능한 모든 입체이성체도 포함한다. 상기 화학식 1의 화합물의 용매화물, 수화물 및 입체이성체는 통상적인 방법들을 사용하여 화학식 1의 화합물로부터 제조하여 사용할 수 있다.

[0076] 또한, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 화학식 1의 화합물이 결정 형태로 제조될 경우, 임의로 수화되거나 용매화 될 수 있다. 본 발명에서는 화학식 1의 화합물의 화학양론적 수화물 뿐만 아니라 다양한 양의 물을 함유하는 화합물이 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 화학식 1의

화합물의 용매화물은 화학양론적 용매화물 및 비화학양론적 용매화물 모두를 포함한다.

- [0077] 본 발명의 일실시예에 따르면, 요관이 폐쇄된 신장에서는  $\alpha$ -SMA, 파이프록틴 그리고 콜라겐 I mRNA 및 단백질 발현이 대조군에 비하여 두드러지게 상향조절되었고 본 발명의 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 전처리는 용량의존방식으로  $\alpha$ -SMA, 파이프록틴 및 콜라겐 I 발현 상승을 효과적으로 억제하였다. 또한, 콜라겐을 염색하는 메이슨의 트리크롬 염색은 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 처리를 하면 일측성 요관폐색에 의해 유도된 세뇨관간질의 콜라겐 축적이 효과적으로 감소되는 것을 보여 주었다.
- [0078] 또한, 10 mg/kg의 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여) 하였을 때 세뇨관간질성 섬유화(tubulointerstitial fibrosis)에 대해서 로자르탄과 동등한 치료효과를 보여 주었다.
- [0079] 또한, 일측성 요관폐색에 의해 유도된 콜라겐 I과 파이프록틴 단백질발현은 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 또는 로자르탄의 한가지 또는 조합에 의해서 효과적으로 감소되었다.
- [0080] 또한, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올과 로자르탄의 조합에 의한 치료는 콜라겐 I 및 파이프록틴 mRNA 상향조절을 감소시키며 이케드헤린 단백질 하향조절을 반대로 하는 시너지효과를 나타냈다.
- [0081] 또한, JNK 와 ERK의 일측성 요관폐색 또는 TGF- $\beta$ 1에 의한 인산화작용은 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올에 의해 두드러지게 감소하였다.
- [0082] 또한, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 mProx 세포에서 TGF- $\beta$ 1에 의한 Smad3 인산화를 감소시켰다.
- [0083] 또한, TGF- $\beta$ 1에 의한 콜라겐 I mRNA 발현에 대한  $A_3$ AR 길항제의 효과를 측정한 결과 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 2의 화합물), (2R,3R,4S)-2-(6-(3-브로모벤질아미노)-2-클로로-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 3의 화합물), (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-클로로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 4의 화합물), (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-플루오로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 5의 화합물)은 효과적으로 TGF- $\beta$ 1에 의한 콜라겐 I mRNA 발현의 증가를 저해하였다.
- [0084] 따라서,  $A_3$ AR 길항제인 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 및 이의 유도체는 세뇨관간질성 섬유화(tubulointerstitial fibrosis)의 발생을 차단할 뿐만 아니라 신장섬유화의 진행을 약화시킴을 제시하여, 만성신장질환의 새로운 치료제로서 사용될 수 있다.
- [0085] 이하 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0086] 본 발명의 일 실시예에 따르면,  $A_3$ AR의 선택적 억제제인 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 요관이 폐쇄된 신장에서 세뇨관간질성 섬유화를 예방 및 치료하

는 효과를 나타낸다.

- [0087] 요관이 폐쇄된 신장에서 세뇨관상피세포는  $\alpha$ -SMA와 증가된 세포외 기질 단백질 (파이버로틴과 콜라겐 I) 상향 조절을 발현하는 근섬유아세포로 분화된다 (22. Chevalier RL, Forbes MS et al).
- [0088] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일측성 요관폐색모델은  $\alpha$ -SMA와 세포외 기질 단백질이 요관이 폐쇄된 신장에서 효과적으로 유도되었다. 상피부착의 손실은 상피세포-중간엽 세포 이행(EMT) 시기에 아주 중요한 일이지만 이케드헤린 (E-cadherin) 발현은 본 실험조건에서 감소하지 않았다(도 1B 및 도 1E). 일측성 요관폐색 5일 경 이케드헤린 mRNA와 단백질의 발현이 감소하지 않는 이유는 분명하지 않다. 그러나, 이전에 보고된 바에 의하면 이케드헤린 mRNA와 단백질 발현이 무게가 200-250g (2개월)된 Wistar 랫모델에서 일측성 요관폐색 3일과 10일째에 증가하는 것으로 보고된 바 있다 (23. Docherty NG, Calvo IF et al).
- [0089] 또한, 이케드헤린 단백질 발현의 손실은 CD-1 마우스에서 일측성 요관폐색 7일 이후에 발견되었지만 일측성 요관폐색 1일이나 3일째인 초기 단계에서 이케드헤린이 요관이 폐쇄된 신장에서 증가하는 경향을 나타내었다.
- [0090] 또한, 4가지 아데노신 아종 모두가 요관이 폐쇄된 신장에서 상향조절되는 것으로 나타났으며 아데노신 수용체의 mRNA 발현은 일측성 요관폐색 손상 타임코스와 상호관련이 있으며 이러한 결과는 아데노신과 신장손상간의 관계를 보여준다(도 8). 또한 TGF- $\beta$ 1은 mProx 세포에서  $A_3AR$  이성체 1과 1/3로 mRNA발현을 크게 증가시켰다(도 9).
- [0091] 상기 결과는  $A_3AR$ 을 포함한 증가된 아데노신 수용체가 세뇨관간질성 섬유화를 포함한 요관이 폐쇄된 신장손상과 관계가 있음을 보여준다. 본 발명에서는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 신장조직보호 메커니즘으로서 MARK 인산화를 측정하였다 (도 6).
- [0092] 일측성 요관폐색에 의한 신장손상과 관련된 기작은 소변축적, AngII, TGF- $\beta$ 1 및 염증성 사이토카인으로부터 기계적 스트레치를 포함하는 여러 가지가 존재한다. 이러한 요인들의 대부분은 MAPK를 포함한 다양한 이펙터(effectors)와 관련이 있는 GPCR 또는 타이로신 키나아제 수용체(tyrosine kinase receptors)의 하류신호를 통해 작용한다. MAPK 군은 3개의 병렬신호경로 즉 JNK, ERK 그리고 p38 MAPK를 활용한다.
- [0093] 이것은 JNK, ERK 그리고 p38 MAPK의 인산화가 요관이 폐쇄된 신장에서 모두 증가하고 EMT와 ECM 축적과 관련이 있음을 잘 입증해 준다 (24. Ma FY, Flanc RS, Tesch GH et al; 25. Pat B, Yang T et al; 26. Stambe C, Atkins RC et al).
- [0094] 본 발명에서는 이전의 연구와 일치하는 비이클(vehicle) 처리된 요관이 폐쇄된 신장에서 JNK와 ERK의 인산화는 증가하지만 p38 MAPK의 인산화는 증가하지 않았다. 요관이 폐쇄된 신장에서 p38 MAPK의 인산화가 왜 증가하지 않았는지는 명확하지 않다. (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 요관이 폐쇄된 신장에서 JNK와 ERK의 인산화를 상당히 감소시킨다. 세포배양을 이용한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 또한 TGF- $\beta$ 1에 의한 JNK와 ERK의 인산화를 감소시킨다.
- [0095] 따라서 JNK와 ERK의 억제제는 적어도 부분적으로 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 항-섬유 효과를 설명한다. 그러나 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 요관이 폐쇄된 신장에서 Smad3 인산화를 변경하지는 않는다 (도 7). 또한 MAPK 인산화는 TGF- $\beta$ 1에 의한 Smad 경로와 혼선된다 (27. Liu Q, Mao H, Nie J et

al; 28. Furukawa F, Matsuzaki K et al; 29. Hayashida T, DECAESTECKER M et al).

- [0096] (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올에 의한 MAPK 인산화 억제제는 Smad3 인산화의 감소로 이어질 수 있으며 이것은 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 또 다른 항-섬유화 메커니즘이 될 수 있다.
- [0097] (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 만성신장 질환 및 신장섬유화 예방효과와 같은 선상에서 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여) 하였을 때 요관이 폐쇄된 신장에서 세뇨관간질성 섬유화 또한 효과적으로 줄일 수 있다(도 3 및 도 4).
- [0098] 안지오텐신전환효소(ACE) 억제제와 안지오텐신-2-수용체차단제(ARB)와 같은 레닌안지오텐신 알도스테론(RAAS) 억제제는 신장섬유화에 대한 최초 약물이다. 본 연구에서 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 치료효과를 양성조절자로서 안지오텐신II 수용체 길항제(ARB)인, 로자르탄(losartan)과 비교하였다. (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 로자르탄(losartan)과 유사한 치료효과를 나타내었다.
- [0099] 일측성 요관폐색에 의해 유도된 콜라겐 I과 파이버넥틴 단백질 발현은 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이나 로자르탄의 단일 또는 조합에 의해 효과적으로 감소하였다. 게다가 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올과 로자르탄의 조합치료는 TGF- $\beta$ 1, 콜라겐 I 및 파이버넥틴 mRNA 발현의 상승을 효과적으로 감소시키며 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이나 로자르탄의 단일치료에 의해 역전되지 않는 이케드헤린(E-cadherin)의 단백질발현을 증가시킨다. (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이나 로자르탄(losartan)의 단일처리가 왜 콜라겐 I 및 파이버넥틴 mRNA 발현에 영향을 미치지 않는지는 명확하지 않다.
- [0100] 이전 연구에서는 엔지오텐신전환효소(ACE) 억제제나 엔지오텐신수용체차단제(ARB)와 같은 레닌-엔지오텐신-알도스테론계(RAAS) 억제제가 일측성 요관폐색에 의해 유도된 신장섬유화를 효과적으로 줄인다고 보고한 바 있다(30. Ishidoya S, Morrissey J et al; 31. Ishidoya S, Morrissey J et al). 이러한 연구들은 레닌-엔지오텐신-알도스테론계(RAAS) 억제제가 본 연구에서 나타나지 않은 ECM 단백질의 mRNA발현을 줄인다고 보고하였다.
- [0101] 처음에 본 발명에서 사용한 적용량은 신장섬유화에 미치는 효과를 측정하기 위하여 보통 20 mg/kg 이상의 엔지오텐신수용체차단제(ARB)를 사용하여 mRNA 전사를 조절하기에 충분하지 않았다. 또한 10 mg/kg (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여) 하였을 때 mRNA 수준을 조절하는데 충분하지 않을 수 있었다. 또한 세포외기질(ECM) 단백질의 저하가 촉진될 가능성이 존재하였다. 이것을 평가하기 위하여 세포외기질(ECM) 단백질의 저하를 조절하는 PAI-1과 기질 금속단백질분해효소(MMPs)의 농도를 측정하였다. 그러나 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올과 로자르탄(losartan)의 조합치료는 mRNA발현에 더욱 효과적으로 나타나 이러한 결과는 A<sub>3</sub>AR 길항제와 엔지오텐신수용체차단제(ARB)의 시너지 효과를 보여 주었다. 그리고 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 레닌-엔지오텐신-알도스테론계(RAAS) 억제제와 다른 기작에 의해서 세뇨관간질성 섬유화의 치료 역할을 할 수 있다고 제시한다.
- [0102] 따라서, 본 실험결과는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜

-3,4-다이올이 신장섬유화의 예방과 치료 효과가 있음을 제시하고 있다.

[0103] 또한, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 항-섬유 효과는 신장섬유화에 기여하는 c-Jun N-terminal kinases (JNK)과 extracellular signal-regulated kinases (ERK) 경로 그리고 Smad3의 억제와 관련이 있다. 대부분의 경우 말기신부전증(ESRD)은 신장섬유화의 점진적 발생이 앞서므로, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여) 하였을 때 신장섬유화의 발생을 둔화시키거나 치료하는 효과가 있다.

### 발명의 효과

[0104] 본 발명의 A<sub>3</sub>AR 길항제로서 작용하는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 및 이의 유도체를 포함하는 약학적 조성물은 일측성 요관폐색에 의해 유도된 세뇨관 간질성섬유화에 대하여 강력하고 선택적이며 종독립적이면서 경구로 투여가능한 만성신장질환 예방 또는 치료 더 나아가서는 신장섬유화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0105] 도 1은, 요관이 폐쇄된 신장에서 상피세포-중간엽 세포 이행(EMT)에 관한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 전처리 효과를 나타낸 것이다. α-SMA (A, D)와 이케드헤린 (B, E)발현을 측정하였다. mRNA 발현 (A,B)을 측정하기 위해 실-시간 PCR을 실시하였고, 단백질 발현을 (C) 측정하기 위해 웨스턴 블롯을 본 발명의 실험방법에서 언급한 것처럼 실시하였다. 표지된 단백질의 발현정도는 농도계로 정량하고 β-액틴 (D, E)으로 조정하였다. 실험자료는 그룹별 6마리의 랫트에 대한 평균 ± 표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 겔보기 신장, † P<0.05 vs 비이클(vehicle) 처리된 일측성 요관폐색.

도 2는, 요관이 폐쇄된 신장에서 증가된 세포외 기질 축적에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 전처리 효과를 나타낸 것이다. 콜라겐 I (A, D)과 파 이브로넥틴 (B, E)발현을 요관이 폐쇄된 신장의 증가된 세포외 기질 축적에 관한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 효과를 평가하기 위하여 측정하였다. mRNA 발현(A,B)을 측정하기 위해 실-시간 PCR을 실시하였고, 단백질 발현을(C) 측정하기 위해 웨스턴 블롯을 본 연구방법에서 언급한 것처럼 실시하였다. 표지된 단백질의 발현정도는 농도계로 정량하고 β-액틴 (D, E)으로 조정하였다. 메이스의 트리크롬 염색(F)을 실시하여 요관이 폐쇄된 신장의 콜라겐 축적에 관한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 효과를 평가하였다. 실험자료는 그룹별 6마리의 랫트를 사용하였고 평균 ± 표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 겔보기 신장, † P<0.05 vs 비이클(vehicle) 처리된 일측성 요관폐색.

도 3은, 점진적으로 요관이 폐쇄된 신장에서 상피세포-중간엽 세포 이행 (EMT)에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여) 하였을 때의 효과를 나타낸 것이다. α-SMA (A, D)와 이케드헤린 (B, E) 발현을 조사하기 위하여 점진적으로 요관이 폐쇄된 신장에서 상피세포-중간엽 세포 이행 (EMT)에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 치료효과를 측정하였다. mRNA 발현(A,B)을 측정하기 위해 실-시간 PCR을 실시하였고, 단백질 발현을(C) 측정하기 위해 웨스턴 블롯을 본 발명의 실험방법에서 기재한 것처럼 실시하였다. 표지된 단백질의 발현 정도는 농도계로 정량하고 β-액틴 (D, E)으로 조정하였다. V: 비이클(vehicle) 처리된 10 일째 일측성 요관폐색, LJ: 10 mg/kg (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이 처리된 10 일째 일측성 요관폐색, L0: 10 mg/kg 로자르탄(losartan)이 처리된 10 일째 일측성 요관폐색, LJ+L0: 10 mg/kg (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올과 10 mg/kg 로자르탄(losartan)이 둘 다 처리된 10 일째 일측성 요관폐색. 실험자료는 그룹별 6마리의 랫트를 사용하였고 평균 ± 표준오차로

나타내었다. \*P<0.05 vs 겉보기 신장, † P<0.05 vs 비이클(vehicle) 처리된 일측성 요관폐색.

도 4는, 점진적으로 요관이 폐쇄된 신장에서 증가된 세포외 기질(ECM) 축적에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여) 하였을 때의 효과를 나타낸 것이다. 콜라겐 I (A, D) 및 파이프록틴 (B, E) 발현을 점진적으로 요관이 폐쇄된 신장의 증가된 세포외 기질 축적에 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이 미치는 치료효과를 평가하기 위하여 측정하였다. mRNA 발현(A,B)을 측정하기 위해 실-시간 PCR을 실시하였고 단백질 발현을(C) 측정하기 위해 웨스턴 블롯을 본 발명의 실험방법에서 기재한 것처럼 실시하였다. 표지된 단백질의 발현정도는 농도계로 정량하고  $\beta$ -액틴 (D, E)으로 조정하였다. 메이슨의 트리크롬 염색(F)을 또한 실시하여 요관이 폐쇄된 신장의 콜라겐 축적에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이 미치는 효과를 평가하였다. V: 비이클(vehicle) 처리된 10 일째 일측성 요관폐색, LJ: 10 mg/kg (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이 처리된 10 일째 일측성 요관폐색, LO: 10 mg/kg 로자르탄(losartan)이 처리된 10 일째 일측성 요관폐색, LJ+LO: 10 mg/kg (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올과 10 mg/kg 로자르탄(losartan)이 둘 다 처리된 10 일째 일측성 요관폐색. 실험자료는 그룹별 6 마리의 랫트를 사용하였고 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 겉보기 신장, † P<0.05 vs 비이클(vehicle) 처리된 일측성 요관폐색.

도 5는, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이 TGF- $\beta$ 1에 의한 프로피브로틱(profibrotic) 마커를 약화시키는 효과를 나타낸 것이다. mProx 세포는 20  $\mu$ M (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올과 함께 또는 단독으로 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1에 의해 자극되었다. TGF- $\beta$ 1에 의한  $\alpha$ -SMA (A), 콜라겐 I (B), 및 파이프록틴 (C) mRNA 발현에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이 미치는 효과를 실-시간 PCR로 측정하였다. 실험자료는 4회 실시하였고 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 대조군, † P<0.05 vs 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1.

도 6은, c-Jun N-terminal kinases(JNK)와 extracellular signal-regulated kinases (ERK) 인산화를 두드러지게 억제하는 A<sub>3</sub>AR 차단효과를 나타낸 것이다. 요관이 폐쇄된 신장에서 JNK와 ERK의 인산화에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이 미치는 효과를 측정하기 위하여 웨스턴 블랏 분석을 실시하고, 농도계로 정량화한 다음 총 JNK와 ERK로 조정하였다. 실험자료는 그룹별 6 마리의 랫트로 실시하였고 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 겉보기 신장, †P<0.05 vs 비이클(vehicle) 처리된 일측성 요관폐색. mProx 세포는 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1을 첨가하기 전 30분 동안 20  $\mu$ M (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올과 함께 또는 단독으로 전처리를 하였다. 15분이 지난 후, JNK와 ERK 인산화에 미치는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 효과를 측정하였다. 단백질 발현은 농도계로 정량화하고 총 JNK와 ERK로 조정하였다. 실험자료는 4회 실시하였고 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 대조군, †P<0.05 vs 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1.

도 7은, A<sub>3</sub>AR 차단은 mProx 세포에서 TGF- $\beta$ 1에 의한 Smad3 인산화를 감소시킨다는 것을 나타낸 것이다. 요관이 폐쇄된 신장에서 Smad3의 인산화(A)에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이 미치는 효과를 측정하였다. 단백질 발현은 농도계로 정량화 한 다음  $\beta$ -액틴으로 조정하였다. 실험자료는 그룹별 6 마리의 랫트로 실시하였고 평균  $\pm$  표준오차로 나타냈다. \*P<0.05 vs 겉보기 신장, †P<0.05 vs 비이클(vehicle) 처리된 일측성 요관폐색. mProx 세포는 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1를 첨가하기 전 30분 동안 20  $\mu$ M (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올과 함께 또는 단독으로 전처리를 하였다. 30분이 지난 후, Smad3 인산화에 미치는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 효과를 측정하였다. 단백질 발현은 농도계로 정량화하고 총 Smad3로 조정하였다.

실험자료는 4회 실시하였고 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 대조군, †P<0.05 vs 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1.

도 8은, 모든 아데노신 수용체의 mRNA 발현은 시간의존 방법으로 요관이 폐쇄된 신장에서 증가한다는 것을 나타낸 것이다. 신피질을 수확하여 아데노신 수용체 mRNA 발현을 실-시간 PCR로 측정하였다. A<sub>1</sub>AR (A), A<sub>2A</sub>AR (B),

A<sub>2B</sub>AR (C) 그리고 A<sub>3</sub>AR (D)의 시간별 mRNA 발현을 또한 실-시간 PCR 방법으로 측정하였다. 실험자료는 그룹별 6마리의 랫트로 실시하였고 평균 ± 표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 겔보기 신장, †P<0.05 vs 비이클(vehicle) 처리된 일측성 요관폐색.

도 9는, 모든 아데노신 수용체 mRNA 발현에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 효과를 나타낸 것이다. A<sub>1</sub>AR (A), A<sub>2A</sub>AR (B), A<sub>2B</sub>AR (C) 그리고 A<sub>3</sub>AR (D) mRNA 발현에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 전처리 효과를 실-시간 PCR 방법으로 측정하였다. 실험자료는 그룹 별 6마리의 랫트로 실시하였고 평균 ± 표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 겔보기 신장, †P<0.05 vs 비이클(vehicle) 처리된 일측성 요관폐색. # 1 mg/kg (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 처리한 일측성 요관폐색.

도 10은, TGF-β1이 모든 아데노신 수용체 mRNA 발현을 조절한다는 것을 나타낸 것이다. mProx 세포는 6시간 또는 24시간 동안 10 ng/ml TGF-β1으로 자극하였다. A<sub>1</sub>AR (A), A<sub>2A</sub>AR (B), A<sub>2B</sub>AR (C), A<sub>3</sub>AR 이성체 1(D), A<sub>3</sub>AR 이성체 2 (E) 그리고 A<sub>3</sub>AR 이성체 1/3 (F)의 mRNA 발현은 실-시간 PCR 방법으로 측정하였다. 실험자료는 3 내지 6 회 실시하였고 평균 ± 표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 대조군.

도 11은, TGF-β1에 의한 콜라겐 I mRNA 발현에 대한 다양한 A<sub>3</sub>AR 길항제인 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 2의 화합물) 및 그 밖의 화합물 (화학식 3 내지 7의 화합물)의 보호 효과를 나타낸 것이다. mProx 세포는 6 시간 동안 다양한 A<sub>3</sub>AR 길항제의 존재 또는 비존재시에 10 ng/ml TGF-β1에 의하여 자극되었다. (A)는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올(화학식 2의 화합물), (B)는 (2R,3R,4S)-2-(6-(3-브로모벤질아미노)-2-클로로-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올(화학식 3의 화합물), (C)는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-클로로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올(화학식 4의 화합물), (D)는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-플루오로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 5의 화합물), (E)는 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이오도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로퓨란-3,4-다이올 (화학식 6의 화합물), (F)는 (2R,3R,4R)-2-(6-(3-브로모벤질아미노)-2-클로로-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로퓨란-3,4-다이올 (화학식 7의 화합물)이다. TGF-β1에 의한 콜라겐 I mRNA 발현에 대한 각각의 화합물의 효과는 실-시간 PCR에 의해서 측정하였다.

도 12는, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 일측성 요관 폐색 예방효과 측정을 위한 동물 모델의 실험방법을 나타낸 것이다.

도 13은, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 일측성 요관 폐색 치료효과 측정을 위한 동물 모델의 실험방법을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0106] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0107] **제조예: 본 발명의 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 및 이의 유도체의 제조.**

[0108] 본 발명의 화학식 2의 화합물 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올, 화학식 3의 화합물 (2R,3R,4S)-2-(6-(3-브로모벤질아미노)-2-클로로-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올, 화학식 4의 화합물 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-클로로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올, 화학식 5의 화합물 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-플루오로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올, 화학식 6의 화합물 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이오도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로퓨란-3,4-다이올, 화학식 7의 화합물 (2R,3R,4R)-2-(6-(3-브로모벤질아미노)-2-클로로-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로퓨란-3,4-다이올은 Xiyan Hou, Mahesh S. Majik et al,

Structure-Activity Relationships of Truncated C2- or C8-Substituted Adenosine Derivatives as Dual Acting A2A and A3 Adenosine, J. Med. Chem. 2012, 55, 342-356에 기재된 방법에 의해서 제조하였다.

[0109]

[0110] 실험예 : 실험 방법

[0111] 1. 일측성 요관폐색 실험 동물 모델

[0112] 일측성 요관폐색 모델은 8주된 수컷 스프래그-다우리 랫트(Central Lab Animal Inc, Seoul, Korea)로 만들었다. 일측성 요관폐색은 10 mg/kg tiletamine/zolazepam (VIRBAC Laboratories, Carros, France)에 의한 마취를 통해 실시하였다.

[0113] 마취된 랫트를 37℃가 유지되는 히팅 패드에 놓았다. 왼쪽 요관을 측면 접근법으로 보이게 한 다음 두 부위를 실크(4/0)로 결찰하고 요로 감염을 막기 위해 결찰물 사이를 절개했다. 오른쪽 요관은 같은 수술절차를 시행하였지만 요관 결찰 없이 실시하였다.

[0114] 2. (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 일측성 요관 폐색 예방효과 측정을 위한 동물 모델

[0115] 신장섬유화의 진행에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 예방효과를 조사하기 위하여 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 매일 경구투여로 1 또는 10 mg/kg을 투여하였다. 대조군은 경구투여로 0.25% 카르복시메틸 셀룰로스 (CMC)와 같은 양을 투여하였다. 모든 군에서 약물처리는 충분한 약물효과를 보기 위해 수술 5일 전에 시작하여 희생될 때 까지 지속하였다. 일측성 요관 폐색이 되고 5일이 경과한 후 희생시켰다.

[0116] 3. (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 일측성 요관 폐색 치료효과 측정을 위한 동물 모델

[0117] 점진적인 신장섬유화에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 효과를 조사하기 위하여 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 신장장애가 일어난 후 3 일째에 투여하였다. I 군과 II 군은 모형을 제작하거나 일측성 요관폐색된 랫트를 수술 3일이 지난 후 희생시켰다. III군과 IV군은 일측성 요관폐색 손상을 입은 랫트이며, 3일에서 10일 동안(7일 동안) 바이클(vehicle) 또는 10 mg/kg (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 처리한 것이다. 모든 약물처리는 매일 경구투여 되었으며 희생될 때까지 지속적으로 실시하였다.

[0118] 4. 세포배양

[0119] C57BL/6J 성체 마우스 신장의 미세하게 절개된 프록시멀 튜블라 세그먼트(proximal tubular segments)에서 유래된 불멸화된 murine proximal tubular 세포 (mProx)는 일본 가나가와에 있는 마리아나 의과대학의 Sugaya 박사에게서 공급받았다.

[0120] mProx 세포는 37℃에서 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 환경에서, 10% 태아소혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 /ml 스트렙토마이신 그리고 44 mM NaHCO<sub>3</sub>이 함유된 DMEM 배지를 공급하였다. 모든 실험에서 세포들이 합류될 정도로 자란 배양된 세포는 실험시작 24 시간 전에 0.15% 태아소혈청을 함유하는 DMEM 배지로 교환하여 세포성장을 멈추게 하였다.

[0121] 5. 역-전사와 실-시간 PCR

- [0122] 트리졸(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 조직에서 총 RNA를 추출하였고, 내부조절자로서 18srRNA와 함께 실시간 정량 RT-PCRs을 실시하고자 SYBR green PCR master mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)와 ABI 7300 실-시간 PCR thermal cycler (Applied Biosystems)를 사용하였다.
- [0123] 시험유전자와 내부조절자 18srRNA의 정량분석은 Applied Biosystems 소프트웨어를 이용하여 얻은 표준곡선으로 측정하였다. 시험유전자의 mRNA 발현수준은 18srRNA 수준으로 보정하였다. 각 유전자에 대한 프라이머 시퀀스는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

| 유전자                    | 정방향                             | 역방향                             |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 랫트 프라이머                |                                 |                                 |
| 18s rRNA               | 5'-AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3'      | 5'-GTGCAGCCCCGACATCTAAG-3'      |
| A <sub>1</sub> AR      | 5'- AGTACTTCTGGGGTACCG- 3'      | 5'-CCATGTTTGGCTGGAACAAC-3'      |
| A <sub>3</sub> AR      | 5' -CTTCAGAGAGACGCGTGCAT -3'    | 5' - TGCAGGCGTAGACAATAGGG -3'   |
| A <sub>2A</sub> AR     | 5'-CGGGATCCGTCCTGGCCATCATCGT-3' | 5'-GGAATCCCCCTCAGTGTGTGAGC-3'   |
| A <sub>2B</sub> AR     | 5 '-AGTAAAGACCGTGCCACCAG-3'     | 5'-GGAAGGACACACCCAAAGAA-3'      |
| α-SMA                  | 5' -GATCACCATCGGGAATGAACGC -3'  | 5' - CTTAGAAGCATTGCGGTGGA -3'   |
| 콜라겐 I                  | 5'- TCTAAGACATCCCTGGTCAC -3'    | 5'-GTCCTTCCAGAAGAAACCTT -3'     |
| 이케트헤린                  | 5' -CTGATTCTGATCTCCTGCTCCT -3'  | 5' - ATCATTTCGAATCACTTCCGGT -3' |
| 파이브로넥틴                 | 5'- TTATGACGACGGGAAGACCT -3'    | 5'-GCTGGATGGAAGATTACTC -3'      |
| 마우스 프라이머               |                                 |                                 |
| 18s rRNA               | 5' -AAACGGCTACCACATCCAAG-3'     | 5' -CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'     |
| A <sub>1</sub> AR      | 5'- GTGATTGGGCTGTGAAGGT -3'     | 5'-AGTAGGTCTGTGGCCCAATG -3'     |
| A <sub>2A</sub> AR     | 5'- GGCTCCTCGGTGTACATCAT -3'    | 5'-GTTCTGCAGGTGTGTGTTGA -3'     |
| A <sub>2B</sub> AR     | 5'- GCGAATAAAAGCTGCTGTCC -3'    | 5'-AGGCCACCATGAAGATTTTG -3'     |
| A <sub>3</sub> AR i1   | 5'-GGACTGGCTGAACATCACCT-3'      | 5'-AGCCAGTGTAGGGAGACAA-3'       |
| A <sub>3</sub> AR i2   | 5'- GGCCAGAGATGACATGGATT -3'    | 5'-CAGCTTTGGAAGCCCTACAG -3'     |
| A <sub>3</sub> AR i1/3 | 5'- CCCTGGTTGTCTGTGTGTC -3'     | 5'-TGTCTTGAACCCCGTCCAT -3'      |
| α-SMA                  | 5' -GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-3'    | 5' -TCGGATACTCAGCGTCAGGA-3'     |
| 콜라겐 I                  | 5' -CGGATAGCAGATTGAGAATCCG-3'   | 5' -CGGCTGAGTACGGAACACACA-3'    |
| 파이브로넥틴                 | 5' -CGGCGTATGCTGTCACTGGCCG-3'   | 5' -AAGTTGAAGGCAGCCACCTG-3'     |

## [0125] 6. Western Blot 분석

- [0126] 신장조직이나 세포는 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% 글리세론, 2% 소듐 도데실 설페이트 (SDS), 0.1% 브로모페놀, 0.2% 2-머캅토에탄올을 함유하는 5×샘플 buffer와 혼합된 Laemmli lysis buffer를 이용하여 용해시켰다. 이 용해물을 95 ℃에서 10분 동안 가열하고, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 실시하여 분리시킨 다음, PVDF 멤브레인으로 옮겨서 역-α-SMA (Sigma-Aldrich, ST.Louis, MO, USA), 역-이케트헤린 (BD bioscience, San Jose, CA, USA), 역-파이브로넥틴 (SantaCruz Biotechnology, CA, USA), 역-타입 I 콜라겐 (Southern Biotech, Brimigham, AL, USA), 역-인산 JNK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), 역-전체 JNK (Cell Signaling Technology), 역-인산 ERK (Cell Signaling Technology), 역-전체 ERK (Cell Signaling Technology), 역-인산 p38 MAPK (Cell Signaling Technology), 역-전체 p38 MAPK (Cell Signaling Technology), 역-인산 Smad3 (Cell signaling Technology) 그리고 역-전체 Smad3 (Cell signaling Technology)와 같은 여러가지 항체를 사용하여 검출하였다. 상기 블롯들을 2차 항체와 반응시킨 다음 ECL을 처리하고 LAS-3000 (Fuji photo film, Tokyo, Japan)을 이용하여 이미지를 분석하였다. 양성 면역반응 밴드는 β

-액틴으로 보정된 농도계 (densitometry)를 이용하여 정량화하여 대조군과 비교분석하였다.

## [0127] 7. 조직학적 분석 및 자료분석

[0128] 랫트를 희생시킨 다음, 신장을 떼어내어 수직으로 얇게 썰어 pH 7.4 인 2% paraformaldehyde-lysine-periodate 로 전-고정처리를 하였다. 점진적인 알코올과 100% 자일렌을 이용한 통상의 처리과정 다음, 이 신장을 파라핀에 박아 4- $\mu$ m의 두께로 절단하였다. 이 절편을 메이슨의 변형된 트리크롬 방법으로 염색하여 콜라겐 기질의 축적을 확인하였다. 각각의 표본은 메이슨 트리크롬 염색 키트 (HT15-1KT)를 이용하여 제조업체의 설명에 따라 염색하였다.

[0129] 상기의 모든 결과는 실험 수 N과 함께 평균  $\pm$  표준편차 (SE)로 나타내었다. 각 그룹간의 차이점에 대한 통계적 의의는 analysis of variance (ANOVA) 및 Fisher post-hoc analysis에 의해 비교분석하였다. 모든 경우에 있어서 통계적으로 유의한 차이 값은  $P < 0.05$ 이다.

## [0130] 실험예 : 결과

[0131] 1.  $A_{\beta}$ AR의 선택적 억제제인 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오픈-3,4-다이올 (화학식 2의 화합물)의 요관이 폐쇄된 신장에서 세뇨관간질성 섬유화를 예방하는 효과

[0132] 상피세포-중간엽 세포 이행 (EMT)과 증가된 세포외 기질 (ECM) 축적은 세뇨관간질성 섬유화의 핵심적인 양상이다. 상피세포-중간엽 세포 이행(EMT)의 표지로  $\alpha$ -SMA 및 이캐드헤린 (E-cadherin) 발현을 측정하였다.  $\alpha$ -SMA의 mRNA와 단백질 발현은 일측성 요관폐색에 의해 증가했으며 10 mg/kg/day로 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오픈-3,4-다이올을 투여한 결과 억제되었다.

[0133] 이캐드헤린 (E-cadherin)의 mRNA 발현은 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오픈-3,4-다이올이 처리된 요관이 폐쇄된 신장에서 두드러지게 증가하였다 (도 1).

[0134] 증가된 세포외 기질 (ECM) 축적에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오픈-3,4-다이올의 전처리효과를 평가하기 위하여 콜라겐을 염색하는 메이슨의 트리크롬 염색을 실시하였다 (도 2F). 겔보기신장(대조군)에서 콜라겐 침전은 없었다. 그러나 예상했던 것처럼 비이클(vehicle) 처리된 요관이 폐쇄된 신장에서는 콜라겐 침전, 세뇨관 위축 및 팽창이 있었다.

[0135] (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오픈-3,4-다이올의 처리를 통하여 용량 의존적인 방법으로 콜라겐 축적을 효과적으로 감소시켰다. 이와 같이 콜라겐 I과 파이프록틴의 일측성 요관폐색에 의해 유도된 mRNA와 단백질 발현은 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오픈-3,4-다이올에 의해 감소되었다. 특히 콜라겐 I의 단백질 발현은 기초수준까지 감소하였다(도 2).

[0136] 2. (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오픈-3,4-다이올을 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여) 하였을 때 막힌신장에서 세뇨관간질성 섬유화 억제 효과

[0137] (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오픈-3,4-다이올을 막힌신장에서 세뇨관간질성 섬유화를 억제하기 위해 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여)하였다.

[0138] 만성신장질환을 지닌 환자는 그들이 만성신장질환 진단을 받을 때, 어느 정도의 신장섬유화를 보통 가지고 있기

때문에 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이 이미 형성된 세뇨관간질성 섬유화에서 신장섬유화의 진행을 반전시키거나 지연시킬 수만 있다면 유용할 것으로 판단하고 실험을 진행하였다. 즉, 일측성 요관폐색 손상에 의한 세뇨관간질성 섬유화의 진행에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여) 하였을 때의 효과를 평가하였다. 또한, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 효과와 신장 조직 보호제로서 양성조절자인 로자르탄(losartan)의 효과를 비교하였다.

[0139] 그 결과, 이케드헤린 (E-cadherin) 단백질 발현은 10 일째 일측성 요관폐색에서 두드러지게 감소하였고, 이러한 감소는 10 mg/kg (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 또는 10 mg/kg 로자르탄(losartan)의 투여로는 상승하지 않지만 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올과 로자르탄(losartan)의 조합치료는 이케드헤린 (E-cadherin) 단백질 발현에 있어서 두드러진 증가를 나타내었다(도 3).

[0140] 또한, 세뇨관간질성 섬유화의 진행에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여) 하였을 때의 효과를 평가하기 위하여 콜라겐 I 및 파이브로넥틴 발현을 측정하였다. 콜라겐 I 및 파이브로넥틴 mRNA와 단백질 발현은 겔보기 신장과 비교하여 3일과 10일된 일측성 요관폐색의 요관이 폐쇄된 신장에서 두드러지게 상승하였다.

[0141] (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올과 로자르탄의 조합치료는 콜라겐 I 과 파이브로넥틴 mRNA 발현을 효과적으로 감소시켰다.

[0142] 또한, 콜라겐 I과 파이브로넥틴의 단백질 발현은 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 또는 로자르탄의 단독처리에 의해 현저히 감소하였다 (도 4).

[0143] 콜라겐을 염색하는 메이슨의 트릭롬 염색은 또한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올이나 로자르탄의 지연성 치료 그리고 조합치료가 세포사이에서 일측성 요관폐색에 의해 유도된 콜라겐 축적을 효과적으로 감소시킨다는 것을 보여 주었다 (도 4F).

[0144] 상기의 결과에 의해서 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 섬유화가 진행된 후에 투여(지연성 투여)하였을 때 일측성 요관폐색에 의해 유도된 세뇨관간질성 섬유화의 진행을 차단하는데 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

[0145] 또한, 세포배양시 A<sub>3</sub>AR 억제제를 조사하기 위하여 a-SMA, 콜라겐 I 그리고 파이브로넥틴과 같은 상피세포-중간엽 세포 이행(EMT)과 증가된 세포외 기질(ECM) 관련 유전자를 10 ng/ml TGF-β1이 처리된 mProx 세포에 조사하였다. TGF-β1은 a-SMA, 콜라겐 I 그리고 파이브로넥틴의 mRNA 발현을 현저하게 자극한다. A<sub>3</sub>AR의 억제는 mProx 세포에서 TGF-β1에 의한 상피세포-중간엽 세포 이행 (EMT) 및 증가된 세포외 기질 (ECM)과 관련된 유전자 발현을 효과적으로 감소시켰다. (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 TGF-β1에 의한 a-SMA, 콜라겐 I과 파이브로넥틴 mRNA 상향조절을 효과적으로 억제하였다 (도 5).

### [0146] 3. A<sub>3</sub>AR 억제에 의해 조절된 c-Jun N-terminal kinases (JNK) 와 extracellular signal-regulated kinases (ERK)의 인산화 분석

[0147] 상기 실시예 1 및 2에 따르면, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 일측성 요관폐색모델과 TGF-β1이 처리된 mProx 세포에서 세뇨관간질성 섬유화의 유도 및 진행을 효과적으로 차단하였다.

[0148] 세뇨관간질성 섬유화에 관한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸

이오펜-3,4-다이올의 예방 및 치료효과와 관련이 있는 기작을 조사하기 위하여 상피세포-중간엽 세포 이행 (EMT)과 증가된 세포의 기질(ECM) 축적과 관련이 있는 세포분열촉진 단백질 (MAPK) 인산화를 분석하였다.

[0149] JNK와 ERK의 인산화는 겔보기 신장과 비교해서 요관이 폐쇄된 신장에서 증가하였다. JNK와 ERK의 일측성 요관폐색에 의해 유도된 인산화는 10 mg/kg (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올에 의해 억제되었다(그림 6A). 또한 TGF-β1은 mProx 세포에서 JNK와 ERK 인산화를 유도하였다. (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 전처리 JNK와 ERK 인산화를 효과적으로 감소시켰다(도 6B).

[0150] 또한, A<sub>3</sub>AR 억제는 mProx 세포에서 TGF-β1에 의한 Smad3의 인산화를 감소시켰다. 본 실험에서는 TGF-β1/Smad3 축이 EMT와 ECM 축적의 진행에 주요한 신호전달경로이기 때문에 Smad3의 인산화를 측정하였다. 그 결과, Smad3의 인산화와 전체 Smad3의 비율은 증가하지 않았지만 Smad3의 인산화 자체는 요관이 폐쇄된 신장에서 상당히 증가하였다. 또한, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 TGF-β1에 의한 Smad3의 인산화를 현저하게 억제하였다.

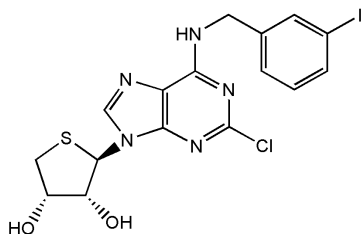
[0151] 4. TGF-β1-유도된 콜라겐 I mRNA 발현에 대한 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 2의 화합물) 및 그 밖의 화합물의 IC<sub>50</sub>

[0152] TGF-β1은 신장 섬유화를 유도하는 주요 사이토카인이기 때문에, TGF-β1에 의한 콜라겐 I mRNA 발현에 대한 A<sub>3</sub>AR 길항제의 효과를 측정하였다. 6시간 동안 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올을 포함하는 다양한 A<sub>3</sub>AR 길항제의 존재 및 부존재 하에서 10 ng/ml TGF-β1에 의해서 mProx 세포를 처리하였다. 복용량 의존적으로 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올은 TGF-β1에 의한 콜라겐 I mRNA 발현을 감소시켰다. (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올의 IC<sub>50</sub>은 29.972 μM이고, 나머지 (2R,3R,4S)-2-(6-(3-브로모벤질아미노)-2-클로로-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 3의 화합물) (IC<sub>50</sub>은 8.799 μM), (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-클로로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올(화학식 4의 화합물) (IC<sub>50</sub>은 8.110 μM), (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-플루오로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 5의 화합물) (IC<sub>50</sub>은 25.779 μM) 역시 효과적으로 TGF-β1에 의한 콜라겐 I mRNA 발현의 증가를 저해하였다. 이러한 화합물은 TGF-β1에 의한 콜라겐 I mRNA 발현에 있어서 효과적이었다. 그러나, (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로퓨란-3,4-다이올 (화학식 6의 화합물)(IC<sub>50</sub>은 >100 μM), (2R,3R,4R)-2-(6-(3-브로모벤질아미노)-2-클로로-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로퓨란-3,4-다이올 (화학식 7의 화합물) (IC<sub>50</sub>은 73.165 μM)은 콜라겐 I mRNA 발현을 감소시키지 않거나, 아주 약간만 감소시켰다. 화학식 2 내지 7 화합물에 대한 각각의 IC<sub>50</sub> 값을 하기에 표로 기재하였다 (도 11). 값은 4-6회의 실험에 걸쳐서 평균 ± 표준오차로 나타내었다. \*P<0.05 vs 10 ng/ml TGF-β1.

[0153] 화학식 1에 있어서, 상기 Y는 S이고, X는 I인 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 2의 화합물)

[0154] [화학식 2]

[0155]



[0156]

표 2

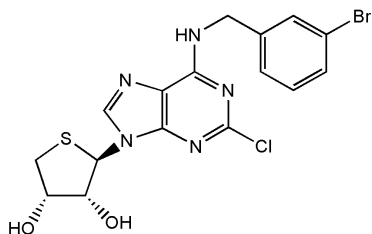
| 화학식 2의 화합물       | mean      | % 저해도  |
|------------------|-----------|--------|
| con              | 0.105     | 100.00 |
| 0                | 1.000     | 0.00   |
| 1                | 0.988     | 1.34   |
| 10               | 0.764     | 26.37  |
| 20               | 0.575     | 47.49  |
| 50               | 0.271     | 81.45  |
| IC <sub>50</sub> | 20.972 uM |        |

[0157]

화학식 1에 있어서, 상기 Y는 S이고, X는 Br인 (2R,3R,4S)-2-(6-(3-브로모벤질아미노)-2-클로로-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 3의 화합물)

[0158]

[화학식 3]



[0159]

표 3

[0160]

| 화학식 3의 화합물       | mean     | % 저해도  |
|------------------|----------|--------|
| con              | 0.255    | 100.00 |
| 0                | 1.000    | 0.00   |
| 1                | 0.677    | 43.36  |
| 10               | 0.624    | 50.47  |
| 20               | 0.417    | 78.26  |
| 50               | 0.353    | 86.85  |
| IC <sub>50</sub> | 8.799 uM |        |

[0161]

화학식 1에 있어서, 상기 Y는 S이고, X는 Cl인 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-클로로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 4의 화합물)

[0162]

[화학식 4]

[0163]

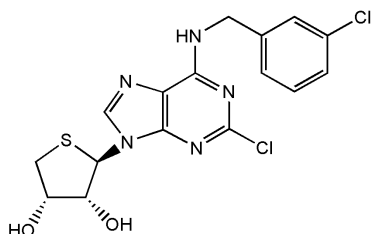


표 4

[0164]

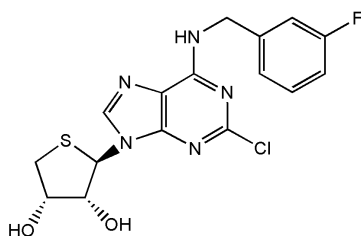
| 화학식 4의 화합물       | mean     | % 저해도  |
|------------------|----------|--------|
| con              | 0.264    | 100.00 |
| 0                | 1.000    | 0.00   |
| 1                | 0.890    | 14.95  |
| 10               | 0.559    | 59.92  |
| 20               | 0.442    | 75.82  |
| 50               | 0.271    | 99.05  |
| IC <sub>50</sub> | 8.110 uM |        |

[0165]

화학식 1에 있어서, 상기 Y는 S이고, X는 F인 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-플루오로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로싸이오펜-3,4-다이올 (화학식 5의 화합물)

[0166]

[화학식 5]



[0167]

표 5

[0168]

| 화학식 5의 화합물       | mean      | % 저해도  |
|------------------|-----------|--------|
| con              | 0.278     | 100.00 |
| 0                | 1.000     | 0.00   |
| 1                | 0.831     | 23.41  |
| 20               | 0.907     | 12.88  |
| 50               | 0.438     | 77.84  |
| 100              | 0.169     | 115.10 |
| IC <sub>50</sub> | 25.779 uM |        |

[0169]

화학식 1에 있어서, 상기 Y는 O이고, X는 I인 (2R,3R,4S)-2-(2-클로로-6-(3-아이오도벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로퓨란-3,4-다이올 (화학식 6의 화합물)

[0170]

[화학식 6]

[0171]

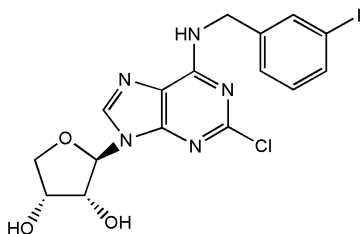


표 6

[0172]

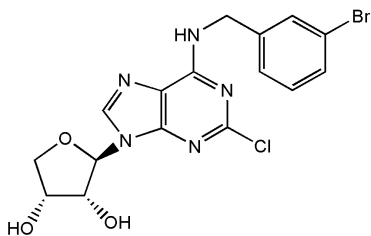
| 화학식 6의 화합물       | mean     | % 저해도  |
|------------------|----------|--------|
| con              | 0.271    | 100.00 |
| 0                | 1.000    | 0.00   |
| 1                | 1.383    | -52.54 |
| 20               | 1.140    | -19.20 |
| 50               | 0.919    | 11.11  |
| 100              | 1.054    | -7.41  |
| IC <sub>50</sub> | > 100 uM |        |

[0173]

화학식 1에 있어서, 상기 Y는 0이고, X는 Br인 (2R,3R,4R)-2-(6-(3-브로모벤질아미노)-2-클로로-9H-퓨린-9-일)-테트라하이드로퓨란-3,4-다이올 (화학식 7의 화합물)

[0174]

[화학식 7]



[0175]

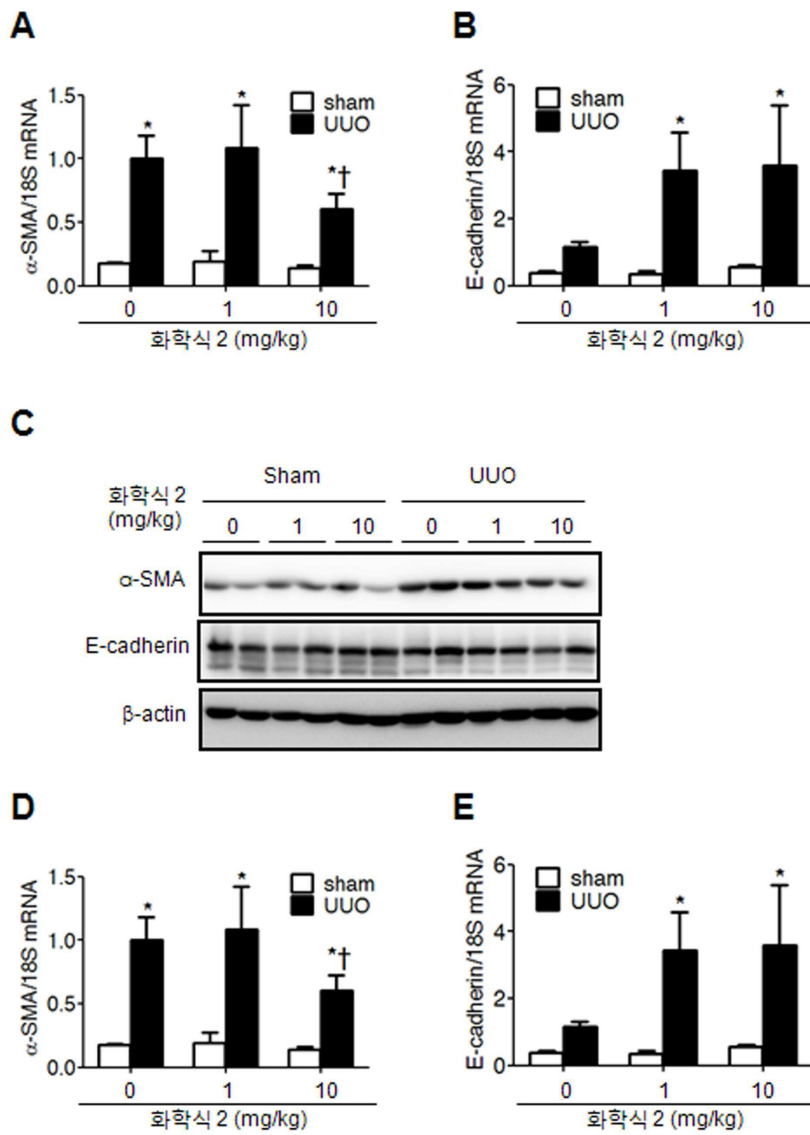
표 7

[0176]

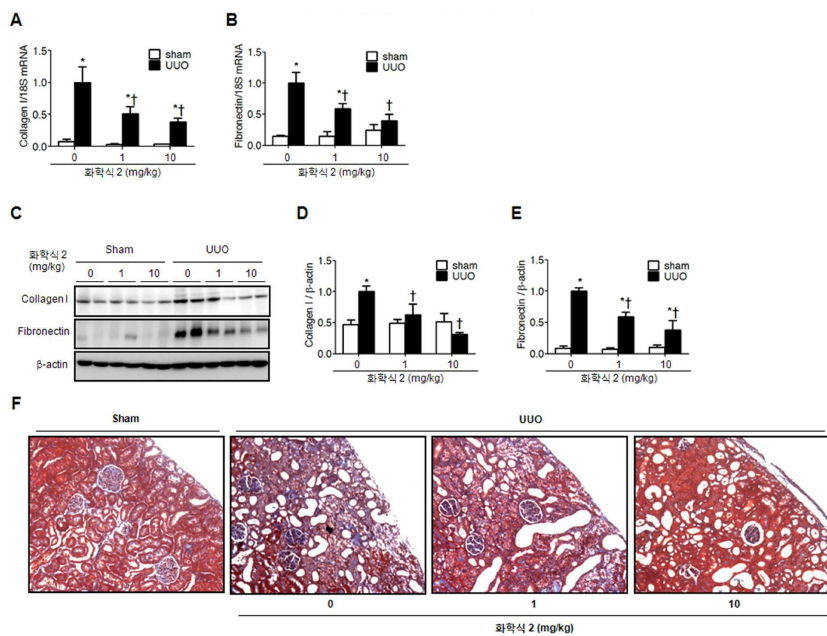
| 화학식 7 화합물        | mean      | % 저해도  |
|------------------|-----------|--------|
| con              | 0.143     | 100.00 |
| 0                | 1.000     | 0.00   |
| 1                | 0.938     | 7.23   |
| 20               | 0.881     | 13.89  |
| 50               | 0.607     | 45.86  |
| 100              | 0.488     | 59.74  |
| IC <sub>50</sub> | 73.165 uM |        |

도면

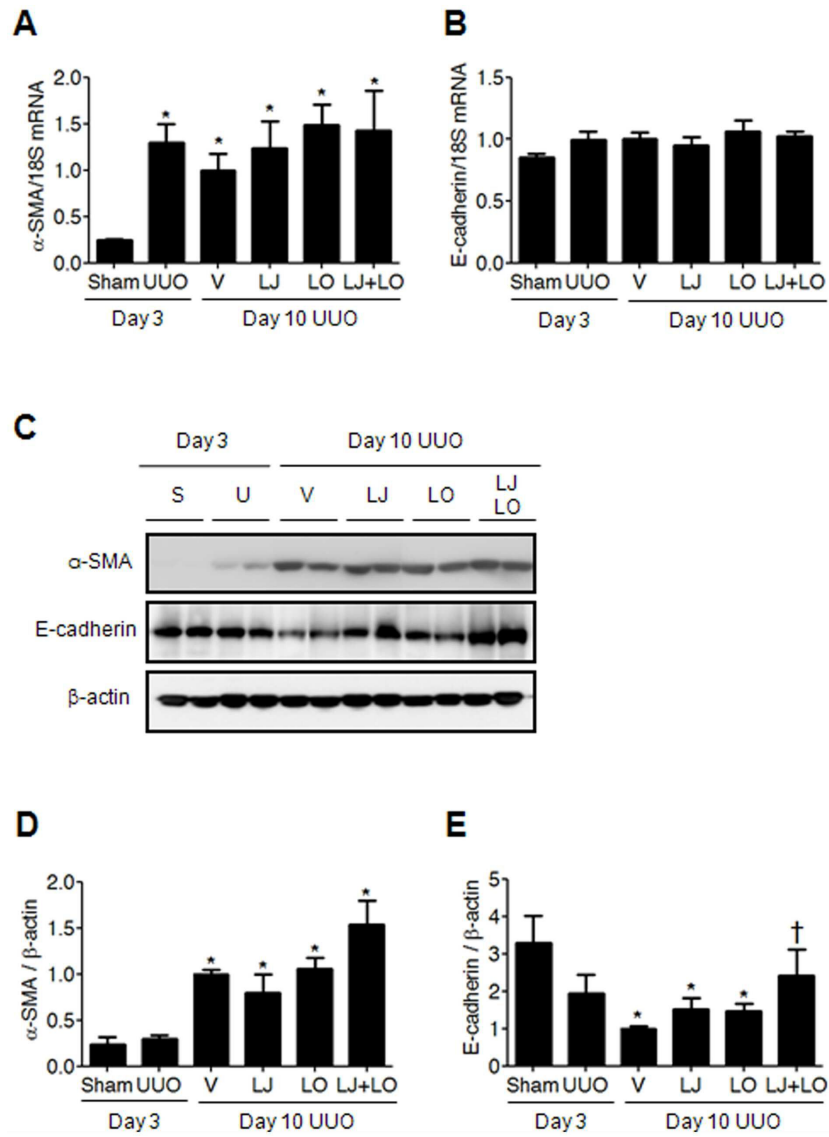
도면1



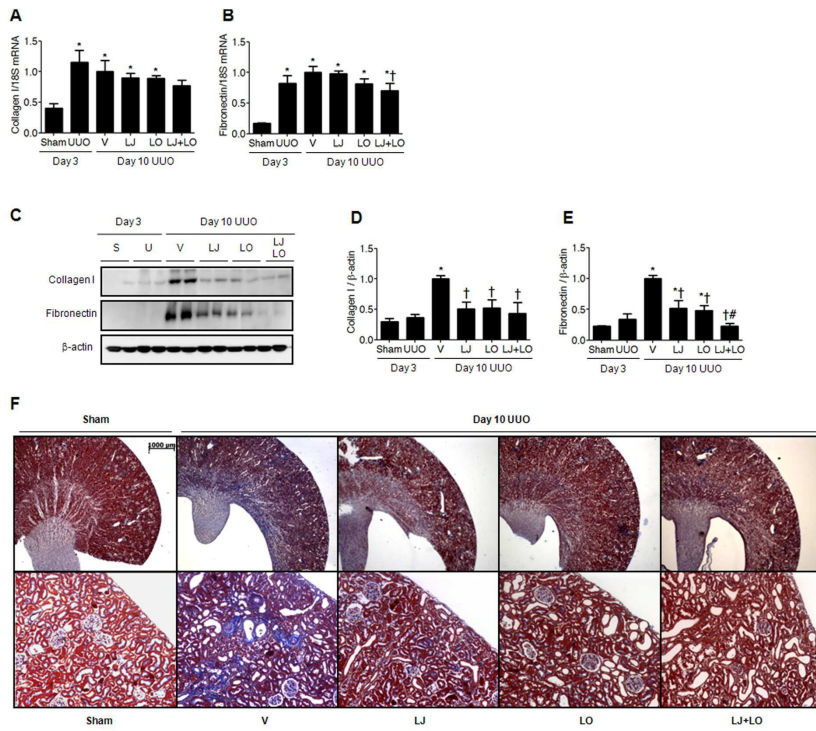
도면2



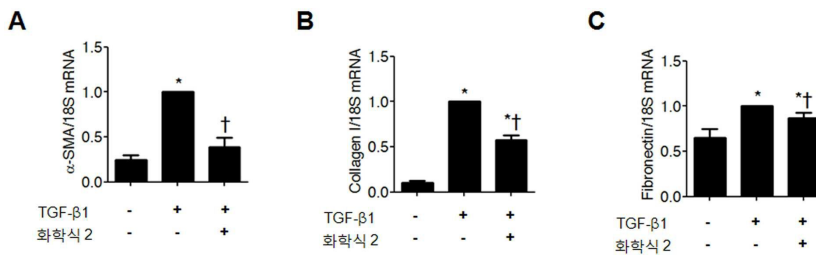
도면3



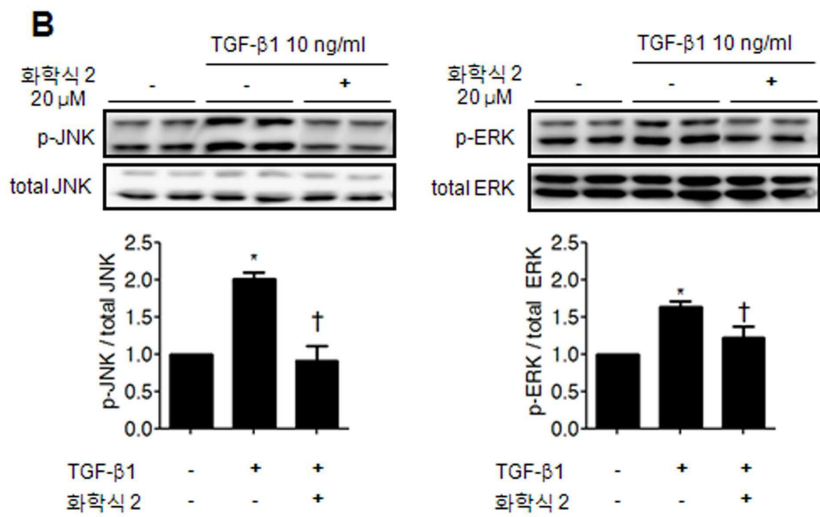
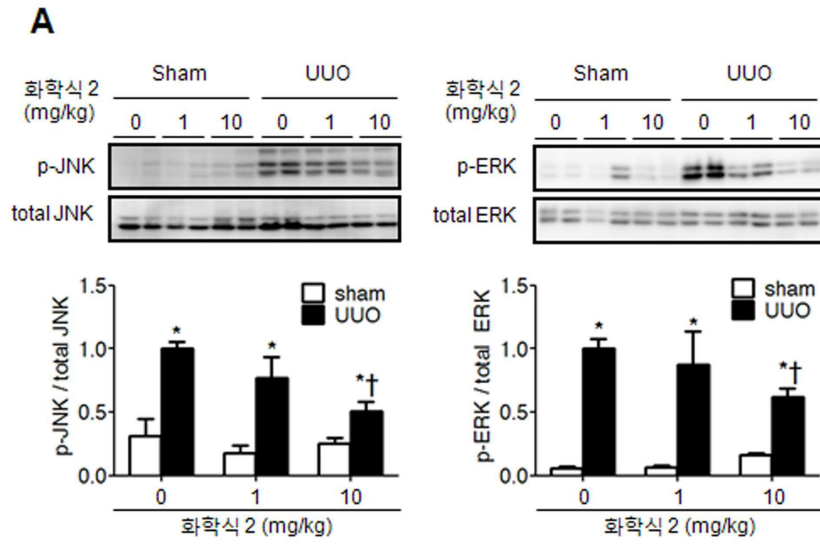
# 도면4



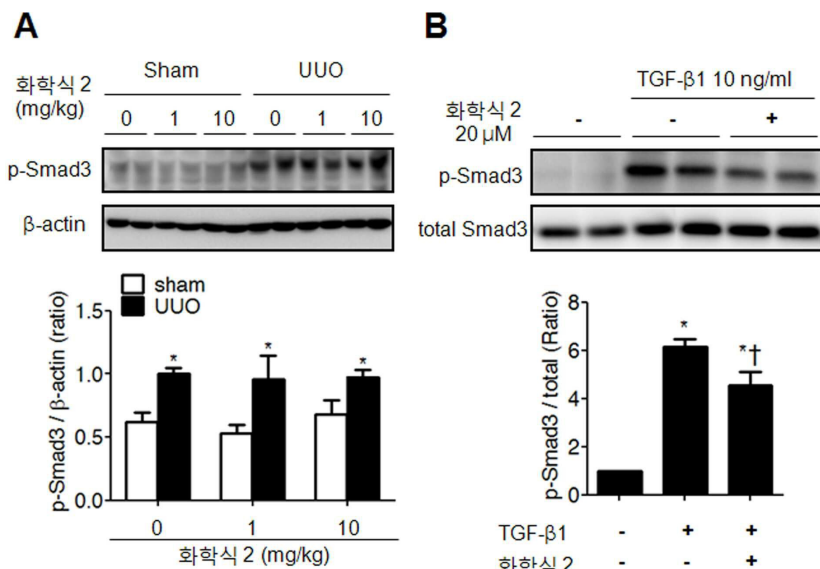
# 도면5



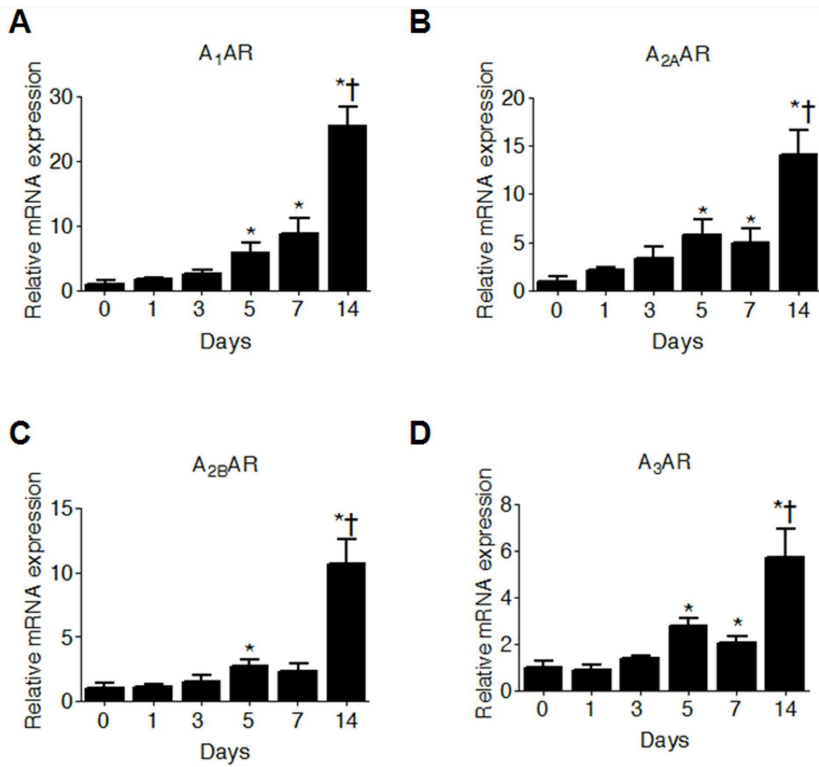
도면6



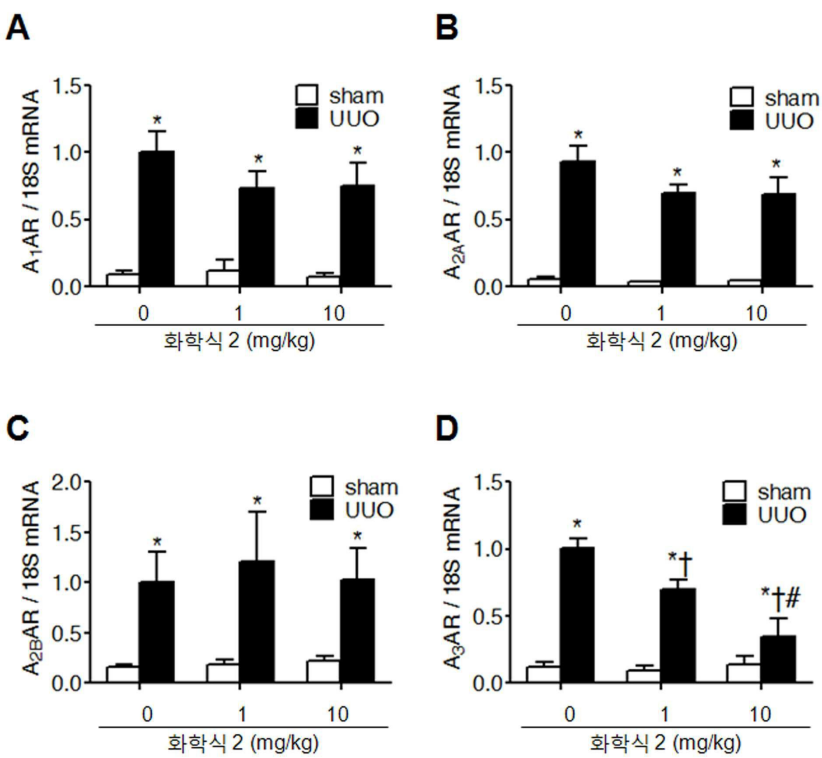
도면7



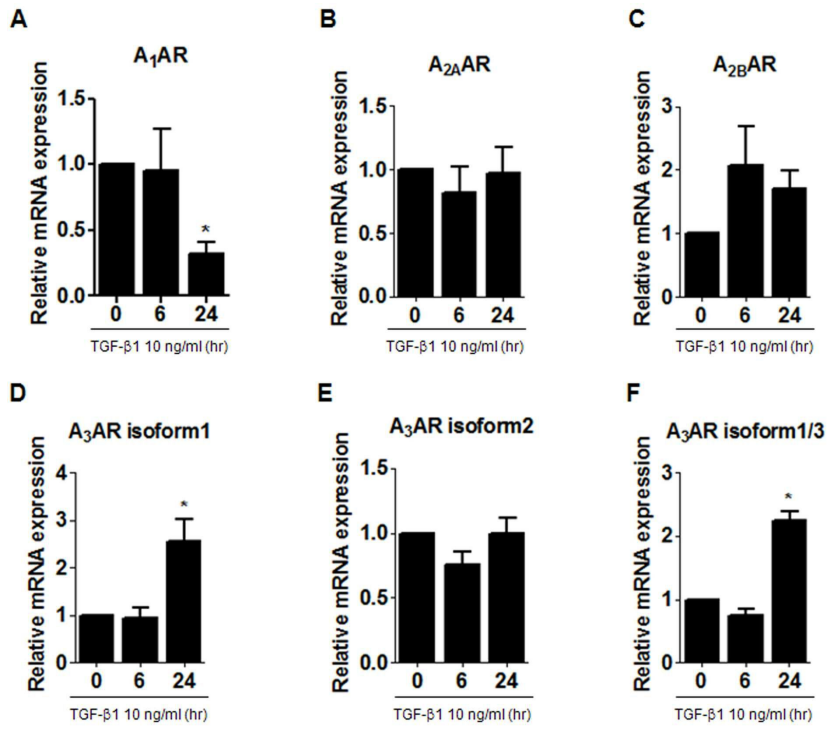
도면8



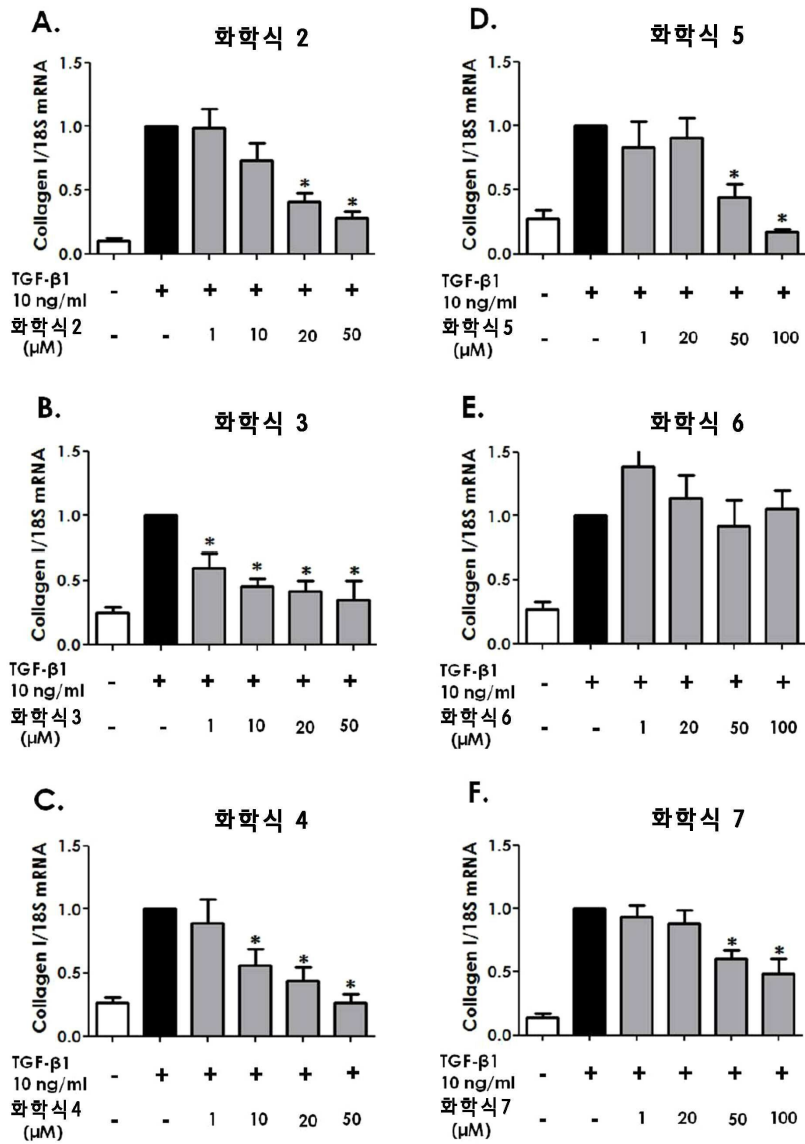
도면9



도면10



도면11



도면12



도면13

