



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0032914

(43) 공개일자 2016년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 211/54 (2006.01) *A61K 31/435* (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0123654

(22) 출원일자 2014년09월17일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

이공주

서울특별시 종로구 창의문로5길 32-2 (부암동)

이희윤

대전광역시 유성구 대학로 291, 카이스트 자연과학동 화학과 4104호 (구성동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

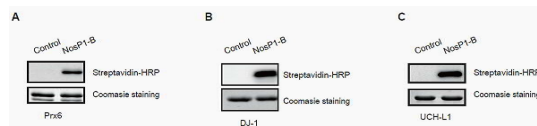
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 벤젠설폰아미드 화합물

(57) 요약

본 발명은 화학식 1로 표시되는 벤젠설폰아미드 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물을 제공한다. 본 발명의 화합물은 시스테인의 산화되지 않은 설프하이드릴기(-SH)와 선택적으로 반응하고, 산화적 변형물과는 반응하지 않는 작용효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 화합물은 시스테인의 설프하이드릴기를 검출할 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 각각의 시스테인의 산화반응에 대한 반응성을 측정할 수 있으며, 이에 따라 활성산소 타겟 단백질을 스크리닝할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이제진

서울특별시 양천구 목동서로 400, 1019동 902호 (신정동, 목동신시가자아파트10단지)

하수라

대전광역시 유성구 대학로 291, 카이스트 자연과학동 화학과 4109호 (구성동)

김희정

서울특별시 서대문구 이화여대길 50-5, 110동 1102호 (대현동, 럭키아파트)

하현주

서울특별시 서대문구 증가로 52, 105호 (연희동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345180202
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글로벌연구실사업
연구과제명	활성산소종 매개 신호전달체계의 새로운 약물타겟 발굴 및 작용기전 규명
기 여 율	6/10
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2012.08.01 ~ 2015.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	1345169626
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업(학술진흥)-바이오의료기술개발사업-다중오믹스신기술개발
연구과제명	세포신호전달계 바이오의약 Target Validation 및 효능물질 설계
기 여 율	4/10
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2010.03.01 ~ 2013.02.28

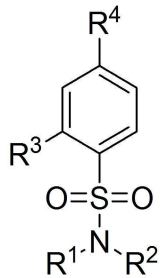
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 벤젠설포아미드 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R^1 또는 R^2 는 각각, 수소, C_{1-6} 직쇄 또는 분지형 알킬, C_{3-7} 사이클로알킬 또는 C_{6-10} 아릴이고(상기 C_{3-7} 사이클로알킬 또는 C_{6-10} 아릴의 수소는 할로젠, $-\text{OH}$ 또는 C_{1-4} 알킬로 치환될 수 있음), 또는 R^1 및 R^2 는 서로 연결되어 질소 원자와 함께 5-원 내지 6-원의 헤테로고리(상기 헤테로고리의 수소는 할로젠, $-\text{OH}$ 또는 C_{1-4} 알킬로 치환될 수 있음)를 형성하고,

R^3 또는 R^4 는 각각 $-\text{COR}^5$, $-\text{CN}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CF}_3$ 또는 $-\text{CCl}_3$ 이고,

R^5 는 수소, C_{1-4} 알킬, $-\text{OH}$, 할로젠, C_{1-4} 알콕시, $-\text{NR}^6\text{R}^7$ 이고,

R^6 또는 R^7 은 각각, 수소 또는 C_{1-6} 직쇄 또는 분지형 알킬이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 헤테로고리는 피페리딘 고리인 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, R^3 는 $-\text{NO}_2$ 인 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, R^4 는 $-\text{COR}^5$ 또는 $-\text{NO}_2$ 이고, R^5 는 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시 또는 $-\text{NH}_2$ 인 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물:

- 1) 메틸 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤조에이트;
- 2) 1-(3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)페닐)에탄논;
- 3) 1-(2,4-디니트로페닐설포닐)피페리딘; 및

4) 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤즈아미드.

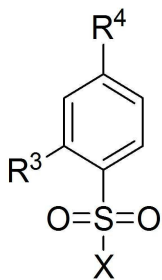
5) 3-니트로-N-(2-(4-(2-옥소헥사하이드로-1H-싸이에노[3,4-d]이미다졸-4-일)부틸아미노)에틸)-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤즈아미드; 및

6) 3-니트로-N-(16-옥소-20-((3R,6S)-2-옥소헥사하이드로-1H-싸이에노[3,4-d]이미다졸-4-일)-3,6,9,12-테트라옥사-15-아자이코질)-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤즈아미드.

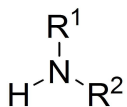
청구항 6

하기 화학식 2의 설포닐할라이드 화합물과 하기 화학식 3의 아민 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 화학식 I의 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물을 제조하는 방법:

[화학식 2]



[화학식 3]

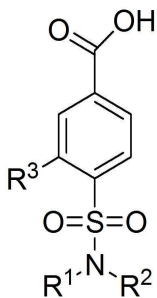


상기 화학식 1에서, R¹ 내지 R⁷은 제1항에서 정의한 바와 같고, X는 할로젠이다.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 바이오틴화는 하기 화학식 I-1의 카르복실산 화합물과 바이오틴화 시약을 반응시켜 수행되는 것인 제조방법.

[화학식 I-1]



청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 화학식 I의 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물을 포함하는, 시스테인의 설파하이드릴기(-SH) 검출용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 화학식 I의 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물을 이용하여, 시스테인의 설파하이드릴기(-SH)를 검출하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

(S1) pH 또는 산화 스트레스 조건을 변화시키면서 단백질을 화학식 I의 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물과 접촉시키는 단계; 및

(S2) 각각의 반응에서 단백질의 라벨링 여부를 확인하는 단계;

를 포함하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 화학식 I의 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물을 포함하는, 활성산소 매개 질환의 타겟 단백질 스크리닝용 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 활성산소 매개 질환은 염증성 질환, 퇴행성 뇌질환 및 노화로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 염증성 질환은 암 또는 당뇨병인 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병, 파킨슨병 또는 치매인 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 화학식 I의 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물을 이용하는, 활성산소 매개 질환의 타겟 단백질을 스크리닝하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

(S1) 산화 스트레스 조건을 변화시키면서 단백질을 화학식 I의 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물과 접촉시키는 단계;

(S2) 각각의 반응에서 단백질의 라벨링 여부를 확인하는 단계; 및

(S3) 반응성의 패턴에 따라 단백질을 분류하는 단계;

를 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벤젠설폰아미드 화합물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0002] 보다 상세하게 본 발명은 활성 시스테인과 선택적으로 반응하고 산화환원에 민감하게 반응하는 단백질을 검출할 수 있는 화합물, 이의 제조방법, 이를 포함하는 활성 시스테인 검출용 조성물 및 이를 이용한 활성 시스테인 검출 방법 및 더 나아가 활성산소 타겟 단백질 스크리닝용 조성물 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)은 정상적인 인체 대사 과정에서 끊임없이 생성되어 세포 내 다양한 생물학적 과정에 중요한 기능을 한다.

[0004] 그러나, 정상세포가 자외선, 바이러스 감염, 고혈당 등의 환경에 노출되어 활성산소의 농도가 과다하게 증가하

게 되면, 세포 내의 특정 유전자나 단백질 등이 활성산소와 반응하여 고유의 기능을 상실하고, 세포의 손상을 주는 산화적 스트레스(Oxidative stress)를 일으켜 암, 당뇨와 같은 염증성 질환의 유발 원인으로 작용한다고 알려져 있다. 뿐만 아니라, 세포 내 활성산소는 알츠하이머병, 파킨슨병, 노화와도 깊은 관련이 있다.

[0005] 구체적으로, 활성산소종(ROS)은 시스테인(Cysteine)의 설프하이드릴기(-SH)를, 설펜산(sulfenic acid)(Cys-SOH), 설펜산(sulfinic acid)(Cys-SO₂H), 설펜산(sulfonic acid)(Cys-SO₃H) 또는 이황화 결합(Cys-SS-Cys) 등으로 산화시켜 세포의 증식, 사멸, 세포 이동 및 염증 등에 관여하게 된다.

[0006] 그러나, 산화 스트레스에 대한 시스테인의 산화 민감도는 산해리상수(pKa) 등 주변 환경에 의해 결정되며, 낮은 산해리상수(pKa)를 갖는 시스테인은 '산화환원 민감성 시스테인(redox sensitive Cys)' 이라 불리우며, 산화환원 민감성 시스테인을 포함하는 단백질이 바로 활성산소의 주요한 타겟이 되므로 '활성산소 타겟 단백질(ROS target protein)' 이라 불리운다.

[0007] 따라서, 산화환원 민감성 시스테인을 검출하고 활성산소 타겟 단백질을 스크리닝하는 것은 활성산소 관련 질환의 ROS-매개 세포신호 전달 경로를 연구하는데 매우 중요한 역할을 할 수 있고, 이에 따라 상기 질환의 치료제를 개발하는데 큰 도움이 될 수 있다.

[0008] 종래에는 시스테인을 검출하기 위하여 아이오도아세트아미드(Iodoacetamide; IAA) 또는 N-에틸말레이미드(N-ethylmaleimide; NEM)과 같은 알킬화제를 사용하였다. 그러나, 상기 알킬화제들은 시스테인의 산화되지 않은 설프하이드릴기(-SH) 뿐만 아니라, 설프하이드릴기가 산화된 형태인 설펜산(-SOH), 설펜산(-SO₂H)과도 반응할 수 있으므로, 단순히 시스테인을 검출할 수 있을 뿐, 산화환원 민감성 시스테인을 검출하는데 한계가 있다.

[0009] 따라서, 산화환원 민감성 시스테인을 검출하고, 활성산소 타겟 단백질을 스크리닝하기 위하여, 시스테인의 설프하이드릴기와 선택적으로 반응하고 산화적 변형물과는 반응하지 않는 새로운 화합물의 개발이 매우 시급하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제2012-0074843호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 시스테인의 설프하이드릴기와 선택적으로 반응하는 벤젠설펜아미드 화합물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 이를 포함하는 활성 시스테인 검출용 조성물 및 이를 이용한 활성 시스테인 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 이를 포함하는 활성산소 타겟 단백질 스크리닝 조성물 및 이를 이용한 활성산소 타겟 단백질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

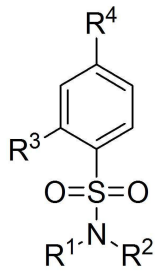
과제의 해결 수단

[0014] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 벤젠설펜아미드 화합물, 이의 제조방법, 이를 포함하는 활성 시스테인 검출용 조성물 및 이를 이용한 활성 시스테인 검출 방법, 이를 포함하는 활성산소 타겟 단백질의 스크리닝용 조성물 및 이를 이용한 활성산소 타겟 단백질의 스크리닝 방법을 제공한다. 이하에서는 각각의 발명에 대하여 상세히 살펴본다.

[0015] **벤젠설펜아미드 화합물**

[0016] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 벤젠설펜아미드 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물을 제공한다:

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 상기 화학식 1에서,

[0020] R^1 또는 R^2 는 각각, 수소, C_{1-6} 직쇄 또는 분지형 알킬, C_{3-7} 사이클로알킬 또는 C_{6-10} 아릴이고(상기 C_{3-7} 사이클로알킬 또는 C_{6-10} 아릴의 수소는 할로젠, -OH 또는 C_{1-4} 알킬로 치환될 수 있음), 또는 R^1 및 R^2 는 서로 연결되어 질소 원자와 함께 5-원 내지 6-원의 헤테로고리(상기 헤테로고리의 수소는 할로젠, -OH 또는 C_{1-4} 알킬로 치환될 수 있음)를 형성하고,

[0021] R^3 또는 R^4 는 각각 -COR⁵, -CN, -SO₃H, -NO₂, -CF₃ 또는 -CCl₃이고,

[0022] R⁵는 수소, C_{1-4} 알킬, -OH, 할로젠, C_{1-4} 알콕시, -NR⁶R⁷이고,

[0023] R⁶ 또는 R⁷은 각각, 수소 또는 C_{1-6} 직쇄 또는 분지형 알킬이다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 헤테로고리는 피롤리딘 고리, 피페리딘 고리 또는 몰폴린 고리인 것이 바람직하다. 또한, 상기 헤테로고리는 피페리딘 고리인 것이 보다 바람직하다.

[0025] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, R³는 -NO₂인 것이 바람직하다.

[0026] 또한, 본 발명의 다른 구체예에 따르면, R⁴는 -COR⁵ 또는 -NO₂이고, R⁵는 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시 또는 -NH₂인 것이 바람직하다. 또한, R⁴는 -COMe, -COOMe, -CONH₂ 또는 -NO₂인 것이 보다 바람직하다.

[0027] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 상기 바이오틴화된 화합물은 R⁴ 위치에 바이오틴화될 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 화학식 I의 화합물은 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0029] 1) 메틸 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤조에이트;

[0030] 2) 1-(3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)페닐)에탄논;

[0031] 3) 1-(2,4-디니트로페닐설포닐)피페리딘; 및

[0032] 4) 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤즈아미드.

[0033] 또한, 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 상기 바이오틴화된 화합물은 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0034] 1) 3-니트로-N-(2-(4-(2-옥소헥사하이드로-1H-싸이에노[3,4-d]이미다졸-4-일)부틸아미노)에틸)-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤즈아미드; 및

[0035] 2) 3-니트로-N-(16-옥소-20-((3R,6S)-2-옥소헥사하이드로-1H-싸이에노[3,4-d]이미다졸-4-일)-3,6,9,12-테트라옥사-15-아자이코질)-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤즈아미드.

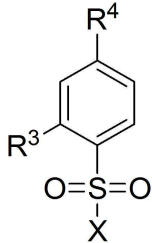
[0036] 본 발명의 벤젠설포나미드 화합물은 시스테인의 산화되지 않은 설프하이드릴기(-SH)와 선택적으로 반응하고, 산화적 변형물들과는 반응하지 않는다. 따라서, 본 발명의 벤젠설포나미드 화합물은 시스테인의 검출, 특히 산화환원 민감성 시스테인의 검출용으로 사용될 수 있고, 더 나아가 활성산소 타겟 단백질을 스크리닝하는데 사용될

수 있다.

[0037] **벤젠설폰아미드 화합물의 제조방법**

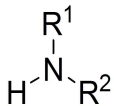
[0038] 본 발명의 벤젠설폰아미드 화합물은 하기 화학식 2의 설폰닐할라이드 화합물과 하기 화학식 3의 아민 화합물을 반응시켜 제조할 수 있다.

[0039] [화학식 2]



[0040]

[0041] [화학식 3]



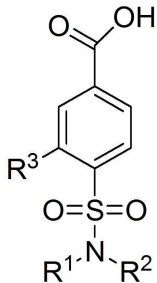
[0042]

[0043] (R^1 내지 R^7 은 위에서 상기 정의한 바와 같고, X는 할로젠이다.)

[0044] 상기 반응은 설폰닐할라이드 화합물과 아민 화합물의 통상적인 반응조건에서 수행될 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 바이오틴화는 하기 화학식 I-1의 카르복실산 화합물과 바이오틴화 시약을 반응시켜 수행될 수 있다.

[0046] [화학식 I-1]



[0047]

[0048] 상기 반응에 사용되는 상기 바이오틴화 시약은 바이오틴, 바이오틴 에틸렌 다이아민, 바이오틴-PEG4-아민, 바이오틴-PEG4-알킨, 바이오틴 하이드라자이드, 바이오틴 폴리(에틸렌옥사이드) 아민, 바이오틴 폴리(에틸렌옥사이드) 아이오도아세트아마이드 등을 사용할 수 있으며, 아민기를 말단기에 가지고 있는 바이오틴 에틸렌 다이아민 또는 바이오틴-PEG4-아민을 사용하는 것이 바람직하다.

[0049] 상기 바이오틴화 반응은 통상적인 커플링 시약인 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드(EDCI), 1-히드록시벤조트리아졸 수화물(HOBt), 바이오틴 에틸렌 다이아민, 디에틸이소프로필아민 존재 하에서 수행될 수 있다.

[0050] **시스테인 검출용 조성물 및 검출방법**

[0051] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 벤젠설폰아미드 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물은 시스테인의 산화되지 않은 설프하이드릴기(-SH)와 반응하므로 시스테인 검출용 조성물에 포함될 수 있다.

[0052] 특히, 본 발명의 조성물은 pH 변화 또는 산화 스트레스 조건에 따라 시스테인의 설프하이드릴기가 산화하였는지 여부를 확인할 수 있다.

[0053] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 본 발명의 벤젠설폰아미드 화합물 또는 이것이 바이오틴화된 화합물을 이용하

여, 시스테인의 설프하이드릴기(-SH)를 검출하는 방법을 제공한다.

[0054] 또한, 본 발명의 방법은 pH 변화 또는 산화 스트레스 조건에 따라 시스테인의 설프하이드릴기의 산화 여부를 확인할 수 있다.

[0055] 본 발명의 검출방법은 (S1) pH 또는 산화 스트레스 조건을 변화시키면서 단백질을 화학식 I의 화합물 또는 이것이 바이오티화된 화합물과 접촉시키는 단계 및 (S2) 각각의 반응에서 단백질의 라벨링 여부를 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0056] 상기 산화 스트레스 조건은 H_2O_2 의 농도를 변화시킴으로써 조건을 변화시키는 것이 가능하며, 다만 이에 한정되지 않는다.

[0057] **활성산소 타겟 단백질 스크리닝용 조성물 및 스크리닝 방법**

[0058] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 벤젠설포아미드 화합물 또는 이것이 바이오티화된 화합물은 활성산소 매개 질환의 타겟 단백질 스크리닝용 조성물에 포함될 수 있다.

[0059] 상기 활성산소 매개 질환은 활성산소에 의하여 유발되는 모든 질환을 의미한다. 예를 들어, 활성산소 매개 질환은 염증성 질환, 퇴행성 뇌질환 및 노화로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 염증성 질환은 암 또는 당뇨병일 수 있고, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병(AD) 또는 파킨슨병(PD)일 수 있다.

[0060] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 본 발명의 벤젠설포아미드 화합물 또는 이것이 바이오티화된 화합물을 이용하는 활성산소 매개 질환의 타겟 단백질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0061] 상기 스크리닝 방법은 (S1) 산화 스트레스 조건을 변화시키면서 단백질을 화학식 I의 화합물 또는 이것이 바이오티화된 화합물과 접촉시키는 단계, (S2) 각각의 반응에서 단백질의 라벨링 여부를 확인하는 단계 및 (S3) 반응성의 패턴에 따라 단백질을 분류하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0062] 본 발명의 화합물은 시스테인의 산화되지 않은 설프하이드릴기(-SH)와 선택적으로 반응하고, 산화적 변형물과는 반응하지 않는 작용효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 화합물은 시스테인의 설프하이드릴기를 검출할 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명의 화합물은 각각의 시스테인의 산화반응에 대한 반응성을 측정할 수 있으며, 이에 따라 활성산소 타겟 단백질을 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 본 발명의 화합물이 단백질(Prx6, DJ-1, UCH-L1) 내 시스테인의 설프하이드릴기와 반응하는지 여부를 확인하는 Streptavidin-HRP 결과이다.

도 2a 내지 2d는 본 발명의 화합물이 단백질(Prx6, DJ-1, UCH-L1) 내 시스테인의 설프하이드릴기와 반응하는지 여부 및 반응 위치를 확인하는 nano UPLC-ESI-q-TOF tandem mass spectrometry을 이용한 질량분석 스펙트럼 결과이다.

도 3a 및 3b는 pH 변화 또는 H_2O_2 농도 증가에 따른 UCH-L1 야생형(WT) 및 UCH-L1 C90S 돌연변이에 대한 NPSB-B의 라벨링의 변화를 확인하는 Streptavidin-HRP 결과이다.

도 4a는 H_2O_2 농도 증가에 따른 Prx1 및 Prx6에 대한 NPSB-B의 라벨링 여부의 변화를 확인하는 Streptavidin-HRP 결과이다. 도 4b는 도 4a의 결과를 정량적으로 나타낸 그래프이다.

도 5a는 H_2O_2 농도 증가에 따른 Nm23-H1 야생형(WT), Nm23-H1 C4S 돌연변이, Nm23-H2의 라벨링 여부를 나타낸다. 도 5b는 도 5a의 결과를 정량적으로 나타낸 그래프이다. 도 5c는 Nm23-H1 야생형(WT), Nm23-H1 돌연변이(C4S, C109A, C145S) 및 Nm23-H2에 대한 라벨링 여부의 변화를 확인하는 Streptavidin-HRP 결과이다.

도 6a는 H_2O_2 농도 변화에 따른 단백질의 상대적인 산화환원 반응성에 대한 히트맵이다. 도 6b는 H_2O_2 농도 증가에 따른 Hsp60, GAPDH 및 STAT1에 대한 NPSB-B의 라벨링 여부의 변화를 확인하는 Streptavidin-HRP 결과 및 상대적인 산화환원 반응성의 차이를 나타낸다. 도 6c는 H_2O_2 농도 증가에 따른 Nm23-H1에 대한 NPSB-B의 라벨링 여

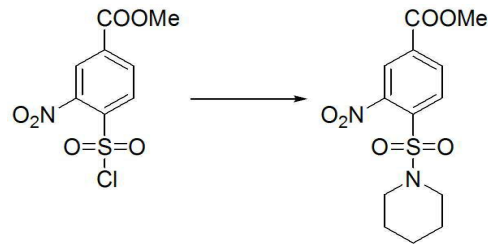
부의 변화를 확인하는 Streptavidin-HRP 결과이다. 도 6d는 H₂O₂ 농도 증가에 따른 GAPDH에 대한 NPSB-B의 라벨링 여부의 변화를 확인하는 Streptavidin-HRP 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 메틸 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤조에이트(NPSB-1)의 제조

[반응식 1]

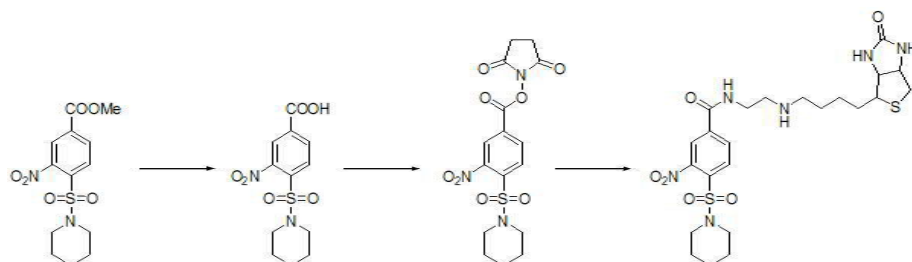


잘 건조된 디클로로메탄(DCM) 3.6 mL에 아르곤 조건 하에서 메틸 4-(클로로설포닐)-3-니트로벤조에이트(104 mg, 0.37 mmol)를 녹인 후, 0 °C로 냉각하고 피페리딘(39 μ L, 0.39 mmol)을 천천히 가하였다. 여기에 다시 피리딘(45 μ L, 0.56 mmol)을 가하였다. 이후 실온으로 온도를 높여주고 5 시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응이 완결되면 포화 염화암모늄 수용액 10 ml 를 가하여 반응을 종결시키고 DCM으로 추출하여(4 mL씩 총 3회) 얻어진 유기층을 무수 황산마그네슘을 처리하여 수분을 제거하고 침전물을 걸러내었다. 얻어진 용액을 감압 증류하여 농축하고 관 크로마토그래피로 정제하여 목적 화합물을 84 mg(0.27 mmol, 72 %)를 얻었다.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.26 (dd, J = 8.2, 1.6Hz, 1H), 8.20 (s, J = 1.6Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.2Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.26-3.22 (m, 4H), 1.63-1.51 (m, 6H)

<실시예 2> 3-니트로-N-(2-(4-(2-옥소헥사하이드로-1H-싸이예노[3,4-d]이미다졸-4-일)부틸아미노)에틸)-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤즈아미드(NPSB-B)의 제조

[반응식 2]



단계 1 : 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤조산의 제조

아르곤 조건 하에서 dry THF 0.9 mL에 실시예 1에서 제조한 메틸 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤조에이트(60 mg, 0.18 mmol)을 녹인 후, 5.0 N 수산화나트륨 용액 0.1 mL을 가하였다. 이후 실온으로 온도를 높여주고 30 분 동안 실온에서 교반하였다. 반응이 완결되면 1.0 N 염화수소 수용액으로 중성화시켜 주어 pH 4~5 로 맞춰 주었다. 에틸아세테이트로 추출하여(3 mL씩 총 5회) 얻어진 유기층에 무수 황산마그네슘을 처리하여 수분을 제거하였다. 침전물을 걸러내고 얻어진 용액을 감압 증류로 농축시켜 관 크로마토그래피로 정제하여 목적 화합물 56 mg(0.18 mmol, 99 %)을 얻었다.

¹H NMR (300 MHz, Methanol-d₄) δ 8.30-8.15 (m, 1H), 8.15-8.04 (m, 1H), 8.01-7.87 (m, 1H), 3.28 (s, 4H), 1.70-1.45 (m, 6H)

단계 2 : 2,5-다이옥소피롤리딘-1-일-3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤조에이트의 제조

[0078] 아르곤 조건 하에서 dry THF 0.8 mL에 단계 1에서 제조한 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤조산(25 mg, 0.08 mmol)을 녹인 후, 1-하이드록시피롤리딘-2,5-다이온(19 mg, 0.16 mmol)과 DCC(19 μ L, 0.12 mmol)를 가하고 14 시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응이 완결되면 필터를 하고 에틸아세테이트로 씻어주었다. 필터액은 무수 황산마그네슘으로 수분을 제거하고 침전물은 걸러내어 얻어진 용액을 감압증류로 농축하고 관 크로마토그래피로 정제하여 목적 화합물 4 mg(0.010 mmol, 10 %)을 얻었다.

[0079] ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.40 (dd, J = 8.3, 1.7Hz, 1H), 8.34 (dd, J = 1.7, 0.4Hz, 1H), 8.17 (dd, J = 8.3, 0.4Hz, 1H), 3.36-3.28 (m, 4H), 2.97 (s, 4H), 1.73-1.55 (m, 6H)

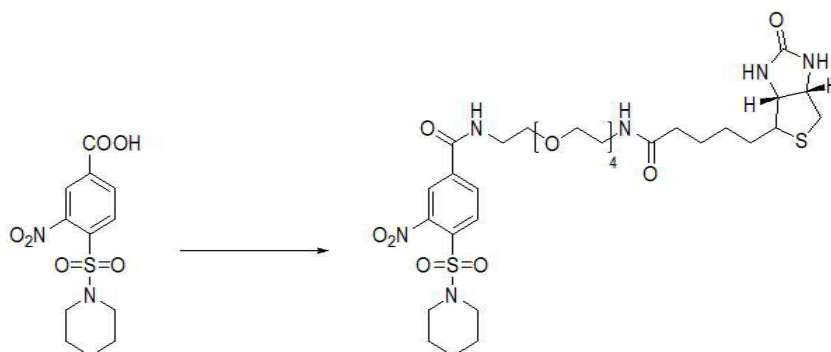
[0080] 단계 3 : 3-니트로-N-(2-(4-(2-옥소헥사하이드로-1H-싸이에노[3,4-d]이미다졸-4-일)부틸아미노)에틸)-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤즈아미드의 제조

[0081] 아르곤 조건 하에서 dry DMF 0.4 mL에 단계 2에서 제조한 2,5-디옥소피롤리딘-1-일-3-나이트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤조에이트(1.6 mg, 0.004 mmol)를 녹이고, 트리에틸아민(Et_3N ; 4 μ L, 0.028 mmol)를 가했다. 바이오틴 에틸아민 하이드로브로마이드(2 mg, 0.005 mmol)을 가한 후 하루 동안 실온에서 교반하였다. 반응이 완결되면 용매를 감압증류로 건조하였다. 관 크로마토그래피로 정제하여 목적 화합물 3 mg(0.005 mmol, 97 %)을 얻었다.

[0082] ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.38 (t, J = 5.1Hz, 1H), 8.24-8.16(m, 1H), 7.96 (d, J = 8.7Hz, 1H), 6.81 (t, J = 5.5Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.47 (dd, J = 7.8, 4.8Hz, 1H), 4.27 (dt, J = 7.8, 3.0Hz, 1H), 3.69 (s, 4H), 3.50 (t, J = 5.0Hz, 2H), 3.36 (q, J = 5.2Hz, 2H), 3.26-3.18 (m, 5H), 3.09 (td, J = 7.4, 4.5Hz, 1H), 2.87 (dd, J = 12.8, 4.9Hz, 1H), 2.69 (d, J = 12.8Hz, 1H), 2.17 (t, J = 7.4Hz, 2H), 1.73-1.54 (m, 8H), 1.52 (tt, J = 6.8, 4.0Hz, 2H), 1.38 (p, J = 7.5Hz, 2H)

[0083] <실시예 3> 3-니트로-N-(16-옥소-20-((3R,6S)-2-옥소헥사하이드로-1H-싸이에노[3,4-d]이미다졸-4-일)-3,6,9,12-테트라옥사-15-아자이코질)-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤즈아미드의 제조

[0084] [반응식 3]



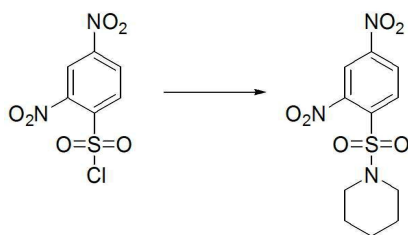
[0085]

[0086] 아르곤 조건 하에서 dry DMF 0.9 mL에 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤조산(28 mg, 0.09 mmol)을 녹이고, 디이소프로필에틸아민(62 μ L, 0.36 mmol)을 가하고 5 분 동안 교반하였다. 여기에 PyBop(93 mg, 0.18 mmol)과 HOBT(24 mg, 0.18 mmol)를 가하고 실온에서 5 분 동안 교반하였다. 이후 Biotin-PEG₄-NH₂(41 mg, 0.09 mmol)을 가하고 실온에서 30 시간 교반하였다. 반응이 완결되면 용매를 감압 증류로 제거한 후, 관 크로마토그래피로 정제하여 목적 화합물 27 mg(0.036 mmol, 40 %)을 얻었다.

[0087] ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.38 (t, J = 5.2Hz, 1H), 8.22-8.17 (m, 1H), 7.99-7.94 (m, 1H), 6.81 (t, J = 5.6Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.47 (dd, J = 7.8, 4.8Hz, 1H), 4.27 (dt, J = 7.8, 3.0Hz, 1H), 3.72-3.53 (m, 20H), 3.50 (t, J = 5.0Hz, 2H), 3.36 (q, J = 5.2Hz, 2H), 3.25-3.18 (m, 5H), 3.09 (td, J = 7.4, 4.5Hz, 1H), 2.87 (dd, J = 12.8, 4.9Hz, 1H), 2.69 (d, J = 12.9Hz, 1H), 2.17 (t, J = 7.4Hz, 2H), 1.73-1.55 (m, 8H), 1.52 (tt, J = 6.8, 4.0Hz, 2H), 1.43-1.33 (m, 2H)

[0088] <실시예 4> 1-(2,4-디니트로페닐설포닐)피페리딘의 제조

[0089] [반응식 4]



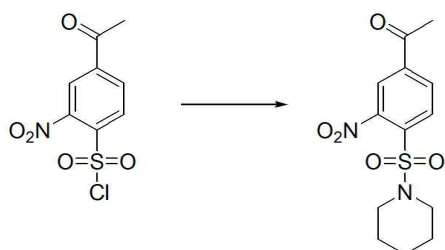
[0090]

[0091] 잘 건조된 디클로로메탄(DCM) 9.5 mL에 아르곤 조건 하에서 2,4-디니트로벤젠-1-설포닐 클로라이드(506 mg, 1.90 mmol)를 녹인 후, 0 °C로 냉각하고 피페리딘(197 μL, 1.99 mmol)을 천천히 가하였다. 여기에 다시 피리딘(230 μL, 2.85 mmol)을 가하였다. 이후 실온으로 온도를 높여주고 4 시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응이 완결되면 포화 염화암모늄 수용액 10 ml 를 가하여 반응을 종결시키고 DCM으로 추출하여(4 mL씩 총 3회) 얻어진 유기층을 무수 황산마그네슘을 처리하여 수분을 제거하고 침전물을 걸러내었다. 얻어진 용액을 감압 증류하여 농축하고 관 크로마토그래피로 정제하여 목적 화합물 162 mg(0.51 mmol, 27 %)를 얻었다.

[0092] ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.47 (dd, *J* = 8.6, 2.2Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 2.2Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.6Hz, 1H), 3.33-3.25 (m, 4H), 1.70-1.61 (m, 4H), 1.53 (s, 2H)

[0093] <실시예 5> 1-(3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)페닐)에탄논의 제조

[0094] [반응식 5]



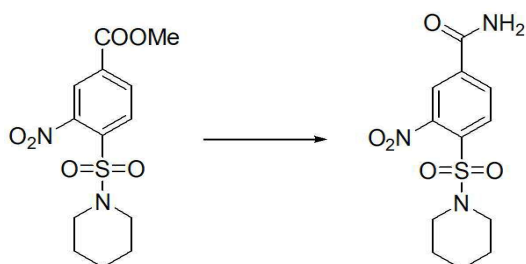
[0095]

[0096] 잘 건조된 DCM 3.6 mL에 아르곤 조건하에서 4-아세틸-2-니트로벤젠-1-설포닐 클로라이드(213 mg, 0.81 mmol)를 녹인 후, 0 °C로 냉각하고 피페리딘(84 μL, 0.85 mmol)을 천천히 가하였다. 여기에 다시 피리딘(98 μL, 1.21 mmol)을 가하였다. 이후 실온으로 온도를 높여주고 8 시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응이 완결되면 포화 염화암모늄 수용액 10 ml를 가하여 반응을 종결시키고 DCM으로 추출하여(4 mL씩 총 3회) 얻어진 유기층을 무수 황산마그네슘을 처리하여 수분을 제거하고 침전물을 걸러내었다. 얻어진 용액을 감압 증류하여 농축하고 관 크로마토그래피로 정제하여 목적 화합물 67 mg(0.21 mmol, 26 %)을 얻었다.

[0097] ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.15 (dd, *J* = 8.2, 1.7Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 1.6Hz, 1H), 8.03 (dd, *J* = 8.2, 0.3Hz, 1H), 3.28-3.20 (m, 4H), 2.64 (s, 3H), 1.66-1.57 (m, 4H), 1.56-1.47 (m, 2H)

[0098] <실시예 6> 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤즈아미드의 제조

[0099] [반응식 6]



[0100]

[0101] 아르곤 조건하에서 dry THF에 실시예 1에서 제조한 메틸 3-니트로-4-(피페리딘-1-일설포닐)벤조에이트(13.76

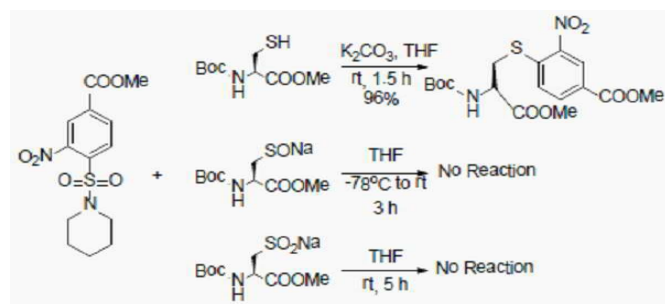
mg, 0.042 mol)을 녹이고 수산화암모늄 0.4 ml를 가하였다. 50 °C로 온도를 높여주고, 12 시간마다 추가적으로 수산화암모늄 용액 0.2 ml씩 가하면서 4 일간 교반시켰다. 반응이 완결되면 1 M 염화수소 수용액을 가하여 pH 5에 맞추었다. 반응을 종결시키고 에틸아세테이트(EA)로 추출하여(4 mL씩 총 3 회) 얻어진 유기층을 무수 황산마그네슘을 처리하여 수분을 제거하고 침전물을 걸러내었다. 얻어진 용액을 감압 증류하여 농축하고 관 크로마토그래피로 정제하여 목적 화합물 4.3 mg(0.014 mmol, 33 %)을 얻었다.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.07 (dd, *J* = 1.1, 0.7Hz, 2H), 8.05 (t, *J* = 1.1Hz, 1H), 3.33-3.27 (m, 4H), 1.68 (p, *J* = 5.7Hz, 4H), 1.62-1.54 (m, 2H)

<실시예 7> 본 발명의 화합물의 선택적 반응성 확인

실시예 1에서 제조한 NPSB-1를 하기 반응식 7과 같이 Cys-SH, Cys-SOH, Cys-SO₂H와 반응시켰다.

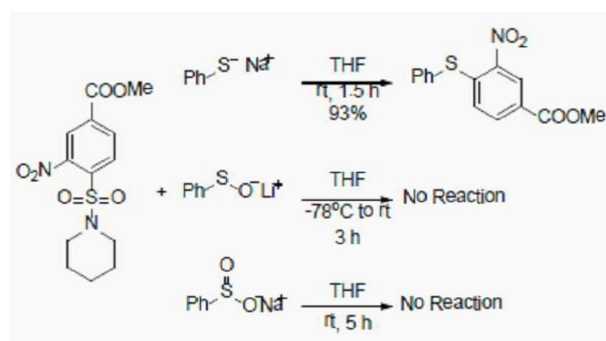
[반응식 7]



그 결과, NPSB-1은 Cys-SH와 선택적으로 반응한 반면, 설포하이드릴기가 산화된 변형물과는 반응하지 않았다.

이러한 선택적인 반응성을 다시 한 번 확인하기 위하여, 하기 반응식 8과 같이 NPSB-1을 싸이오페놀, 벤젠 설펜산, 벤젠 설피산과 반응시켰다.

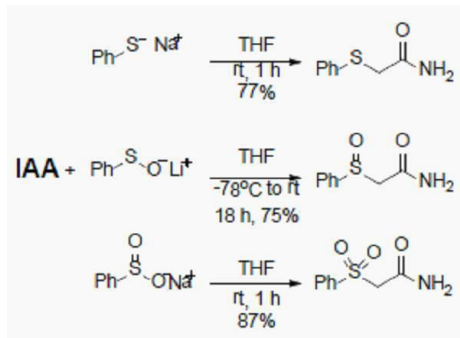
[반응식 8]



그 결과, NPSB-1은 마찬가지로 싸이오페놀과 선택적으로 반응한 반면, 벤젠 설펜산 또는 벤젠 설피산과 반응하지 않았다.

한편, 종래의 시스테인 프로브인 IAA의 선택성을 확인하기 위하여, 하기 반응식 9와 같이 NPSB-1을 싸이오페놀, 벤젠 설펜산, 벤젠 설피산과 반응시켰다.

[0113] [반응식 9]



[0114]

[0115] 그 결과, NPSB-1과 달리 IAA는 싸이오페놀, 벤젠 설펜산 및 벤젠 설피산과 모두 반응함이 확인되었다. 따라서, IAA는 시스테인의 설프하이드릴기와 선택적으로 반응하지 않음을 알 수 있다.

[0116] <실시예 8> 본 발명의 화합물을 이용하여 산화환원 민감성 시스테인 검출

[0117] 본 발명의 화합물의 산화환원 민감성 시스테인 검출 여부를 확인하기 위하여, 산화환원 민감성 시스테인을 포함하는 활성산소 타겟 단백질로 알려진 Prx6, DJ-1, UCH-L1과 실시예 1에서 제조한 NPSB-1 및 실시예 2에서 제조한 NPSB-B와 반응시켰다.

[0118] Prx6는 H₂O₂의 센서로서 항산화 단백질 중 하나이며, Cys47이 활성 사이트임이 알려져 있다. 도 1a에 도시된 바와 같이, NPSB-B는 Prx6와 결합함이 확인되며, 도 2a에 도시된 바와 같이, Cys47에서 179.02의 질량증가가 확인되어 Cys47에서 NPSB-1이 결합함을 알 수 있다.

[0119] DJ-1은 신경퇴행성 질환 관련 단백질로서, Cys106이 활성 사이트임이 알려져 있다. 도 1b에 도시된 바와 같이, NPSB-B는 DJ-1과 결합함이 확인되며, 도 2b에 도시된 바와 같이, Cys106에서 179.02의 질량증가가 확인되어 Cys106에서 NPSB-1이 결합함을 알 수 있다.

[0120] UCH-L1은 UCH-L1 하이드로라아제 효소 활성화에 의해 매개되는 암세포 침입 및 전이에 중요한 역할을 하며, Cys90 및 Cys152 중 Cys90이 활성 시스테인임이 알려져 있다. 도 1c에 도시된 바와 같이, NPSB-B는 UCH-L1과 결합함이 확인되며, 도 2c 및 2d에 도시된 바와 같이, Cys90 및 Cys152 모두에서 179.02의 질량증가가 확인되어 NPSB-1이 결합함을 알 수 있다.

[0121] 따라서, 본 발명의 화합물은 활성 시스테인의 존재를 확인할 수 있으며, 그 위치까지 알 수 있다.

[0122] <실시예 9> 각각의 시스테인의 반응성 차이 확인

[0123] 실험 1. 1개의 단백질 내 여러 시스테인의 반응성 비교

[0124] 시스테인의 pKa는 8.4이나, 단백질 내 시스테인의 pKa는 단백질의 환경에 따라 4~9로 변화한다. 시스테인의 -SH 근처에 염기성 잔기는 시스테인의 pKa를 낮추어 -SH를 싸이올레이트(-S⁻)로 이온화시키고 그 결과 ROS와의 높은 반응성을 가지게 된다.

[0125] 단백질 내 각각의 시스테인의 반응성 차이를 확인하기 위하여, UCH-L1의 야생형(wild type; WT)과 C90S 돌연변이형을 pH를 변화시키고(pH 6.5 및 7.4) 다양한 H₂O₂ 농도로 처리하였다.

[0126] 도 3a에 도시된 바와 같이, UCH-L1 WT는 pH 6.5 및 7.4에서 NPSB-B와 결합하고 pH 6.5보다 pH 7.4에서 높은 강도를 보여준 반면, UCH-L1 C90S 돌연변이는 pH 7.4에서 NPSB-B와 결합하고 pH 6.5에서는 야생형보다 낮은 강도를 보여주었으며, 이는 UCH-L1 C90S 돌연변이의 경우 Cys152에서 NPSB-B와 결합함을 나타낸다. 이러한 결과는 UCH-L1의 Cys90이 더 낮은 pKa를 나타내며 Cys152가 더 높은 pKa를 가진다는 기존의 연구와 일치한다.

[0127] 또한, 도 3b에 도시된 바와 같이, UCH-L1 WT는 NPSB-B에 의한 라벨링이 점진적으로 감소하는 반면, UCH-L1 C90S 돌연변이는 NPSB-B에 의한 라벨링이 거의 감소하지 않았다. 이러한 결과는 UCH-L1의 Cys90이 반응성이 있고 산화 스트레스에 반응하여 쉽게 산화되는 반면, Cys152는 반응성이 있으나 쉽게 산화되지 않음을 나타낸다.

[0128] 실험 2. 2개 이상의 단백질 내 시스테인의 반응성 비교

[0131] <실시예 9> 산화환원 신호전달 경로에서 조절 시스템인 검출 확인

[0133] 산화환원 신호전달 경로에서 조절 시스템인 잔기와 NPSB-1의 특이적 반응성을 확인하기 위하여, Nm23-H1을 사용하였다.

[0135] Nm23-H1에서 조절 시스테인 잔기의 반응성을 시험하기 위하여, pH 7.4에서 Nm23-H1 시스테인 돌연변이(C4S, C109A, C145S) 및 Nm23-H2(Cys4가 없는)에 대한 NPSB-B의 라벨링 여부를 확인하였다.

[0137] <실시예 10> 본 발명의 화합물을 이용하여 단백질 스크리닝

[0139] [화학식 4]



[0142] 도 6a는 H₂O₂의 농도 변화에 따른 단백질의 상대적인 산화환원 반응성을 나타내는 히트맵(heat map)이며, 이에 기초하여 단백질을 하기 표 1에 도시된 바와 같이 4개의 유형으로 분류할 수 있다.

[0143] [표 1]

유형	내 용
1	산화적 스트레스가 없는 경우 반응성 시스테인 잔기를 가지는 단백질
2	낮은 산화적 스트레스에서만 반응성 시스테인 잔기를 가지는 단백질
3	산화적 스트레스 이후 반응성 시스테인 잔기를 가지는 단백질
4	반응성 시스테인 잔기를 가지지만 산화적 스트레스에 의하여 산화되지 않는 단백질

[0144]

[0145] 유형 1은 NPSB-1으로 강하게 라벨링되고 H_2O_2 의 농도 증가에 따라 라벨링이 감소한다. 따라서, 유형 1의 단백질은 활성산소에 의해 쉽게 산화되는 특성을 나타내는, 본질적인 산화환원 민감성 시스테인 잔기를 가진다. 이 유형은 산화환원 조절을 가지는 것으로 알려진 수많은 단백질들을 포함하며, 예를 들어 NDKA/Nm23-H1, Prx1, PDIA1, Hsp60, CLIC1 등이 있다. Hsp60은 독립적인 풀다운 실험에서 면역블로팅에 의해 이러한 특성이 확인되었고(도 6b 상단 참조), Prx1은 H_2O_2 의 농도 증가에 따라 라벨링이 급격하게 감소함이 확인되었으며(도 4a 및 4b 참조), Nm23-H1 역시 동일한 패턴을 보인다(도 6c 참조).

[0146] 유형 2는 활성산소의 농도가 낮은 때에서만 반응성 시스테인 잔기를 가지며, 이 유형은 산화 스트레스에 의해 미세 조정된다.

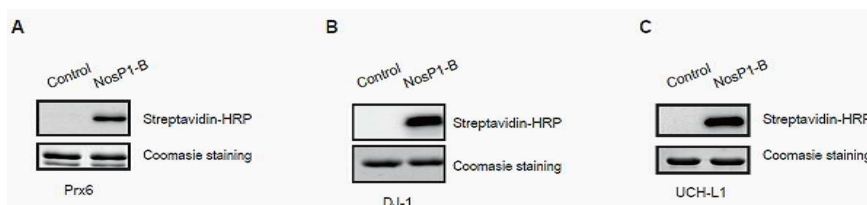
[0147] 유형 3은 H_2O_2 의 농도 증가에 따라 NPSB-B에 의한 라벨링이 증가된다. 유형 3의 시스테인 잔기는 환원된 형태에서는 반응성을 가지지 않으나, 산화 스트레스에 의한 구조 변형에 의해 반응성을 가지게 된다. 이 유형에는 프로테아솜 서브유닛 b1 및 b3, GAPDH, PDIA3, PDIA6, PARP1 등이 검출되었다. GAPDH는 독립적인 풀다운 실험에서 면역블로팅에 의해 이러한 특성이 확인되었으며(도 6b 중단 참조), GAPDH는 H_2O_2 의 농도 증가에 따라 라벨링이 증가함이 확인되었다(도 6d 참조). 이러한 결과는 GAPDH를 포함하는 이러한 유형의 단백질들이 산화된 형태로서 조절 역할을 할 수 있는 가능성을 나타낸다. 따라서 유형 3의 단백질들은 반응성 조절 시스테인이 산화 스트레스에 의해 좌우됨을 보여준다.

[0148] 유형 4는 반응성이 H_2O_2 의 농도에 의존하지 않는다. 이러한 단백질들은 반응성 시스테인 잔기를 가지나, 산화 스트레스에 의해 산화되지 않음을 나타낸다. 이 유형에는 STAT1, 아넥신 A2, GTP-결합 핵 단백질 Ran, G6PD 등이 있다. GAPDH는 독립적인 풀다운 실험에서 면역블로팅에 의해 이러한 특성이 확인되었다(도 6b 하단 참조).

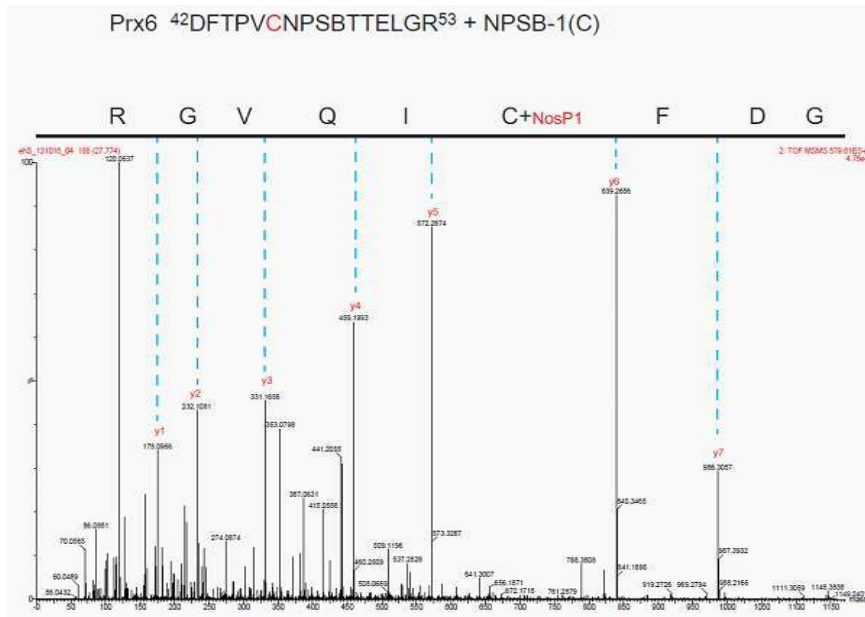
[0149] 이와 같이 본 발명의 화합물은 단백질들의 산화환원 반응성을 스크리닝할 수 있으며, 이에 따라 활성산소 매개 질환의 타겟 단백질 여부를 확인할 수 있다.

도면

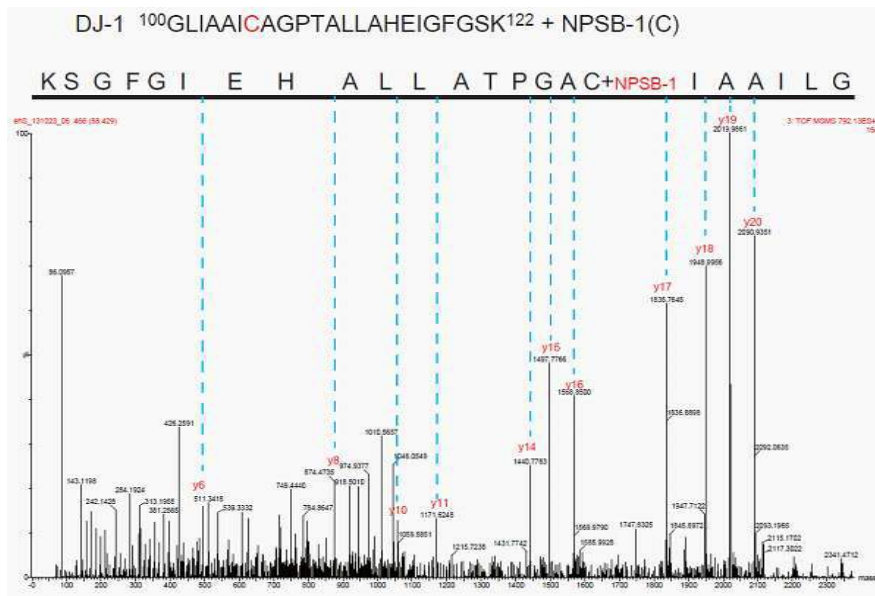
도면1



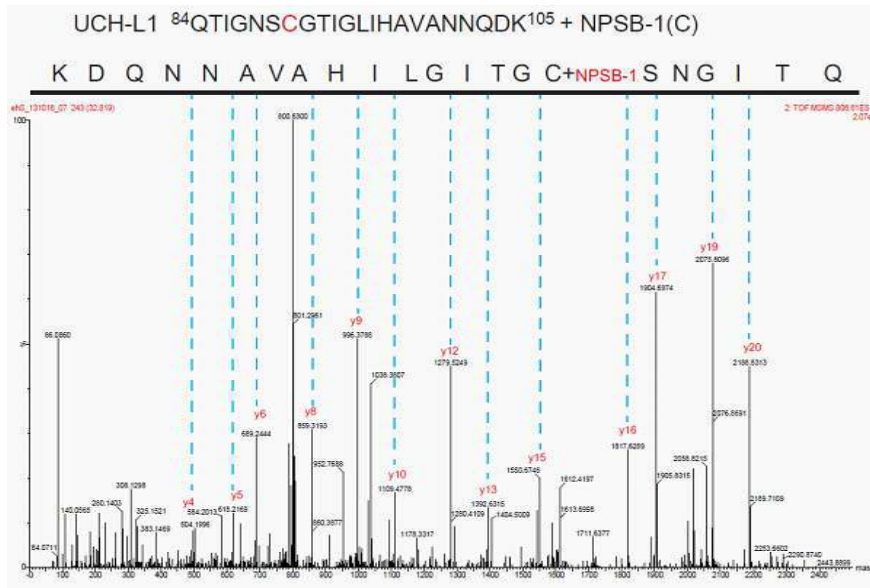
도면2a



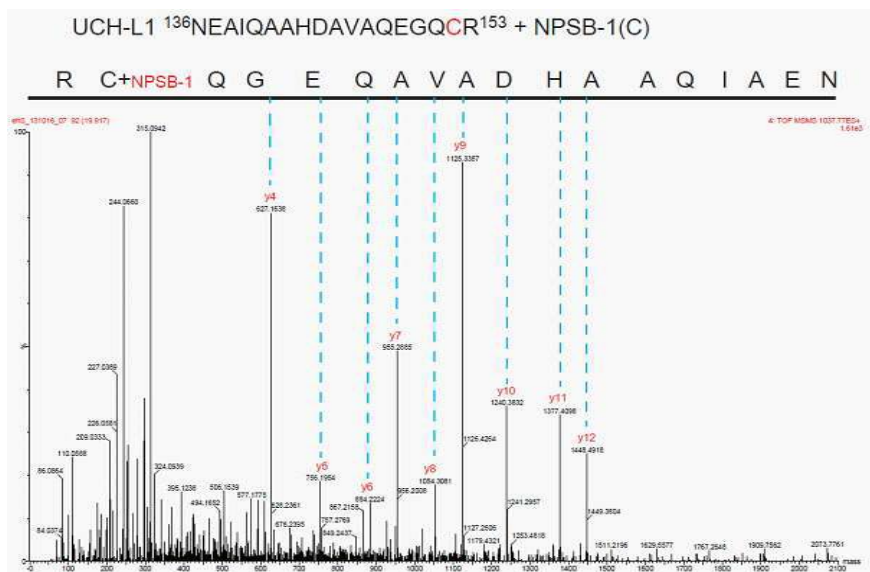
도면2b



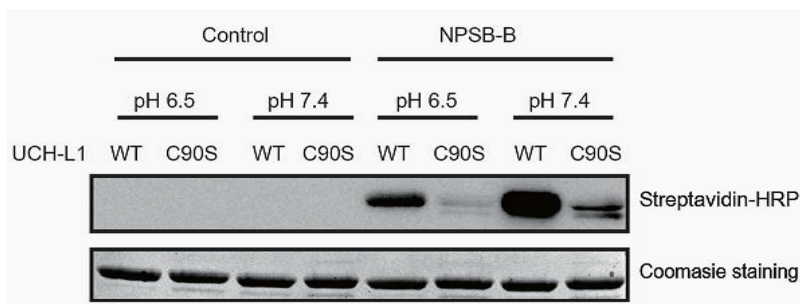
도면2c



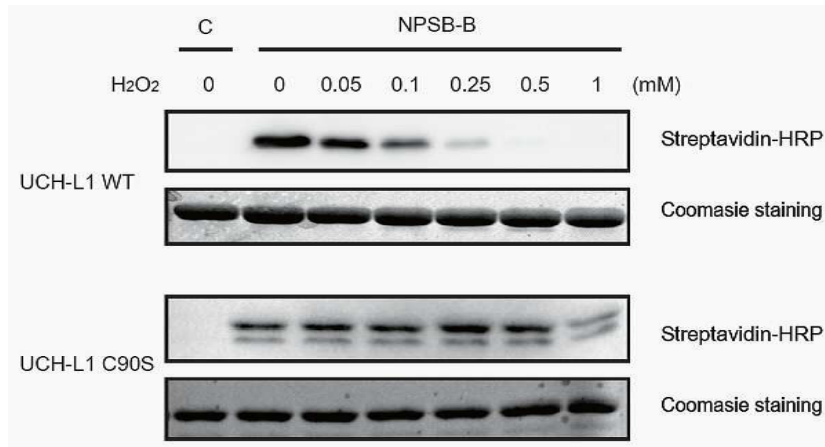
도면2d



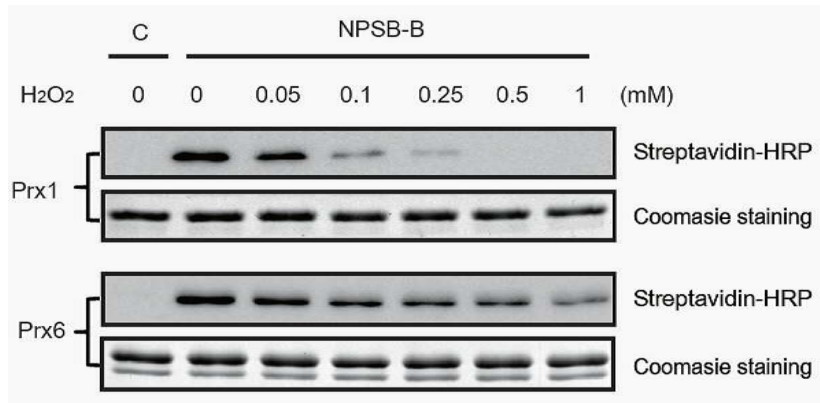
도면3a



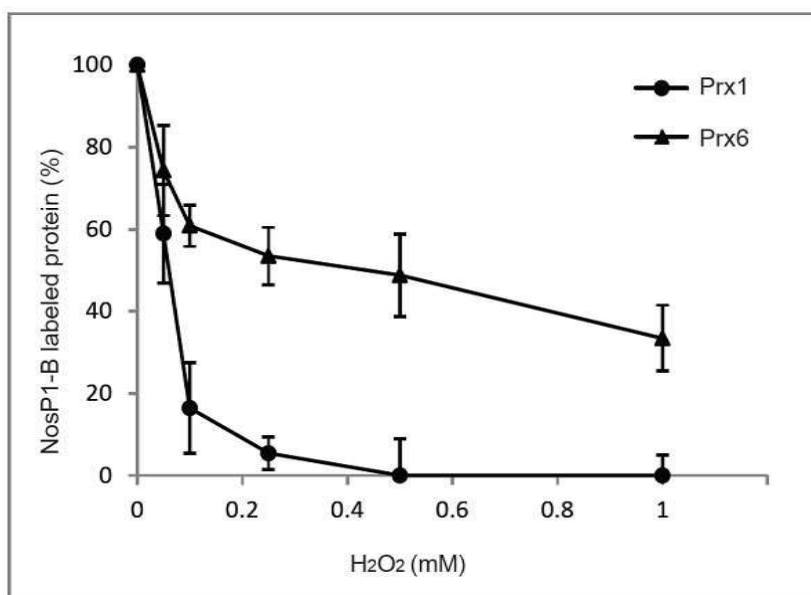
도면3b



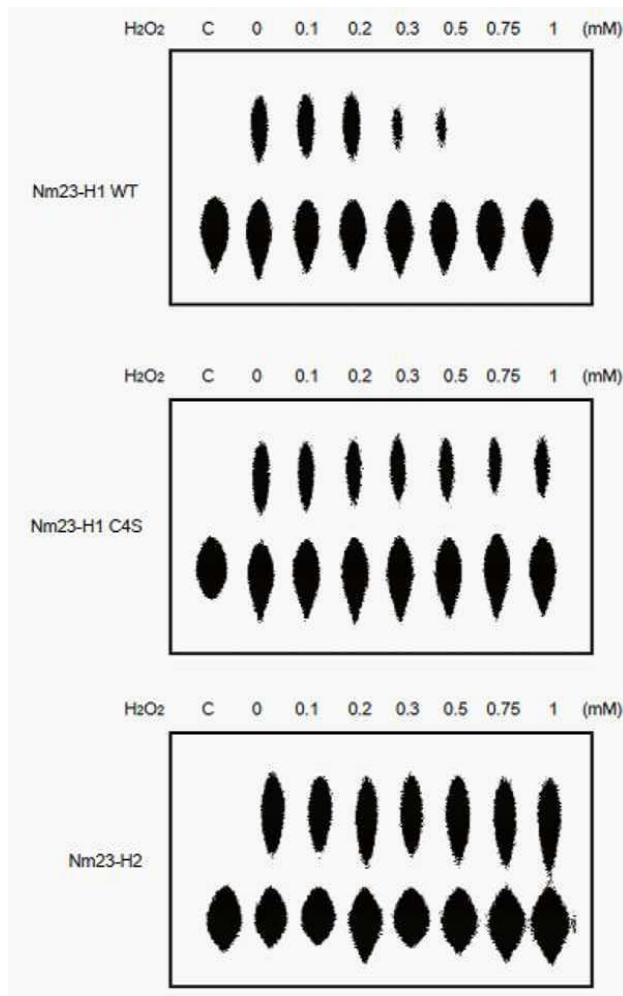
도면4a



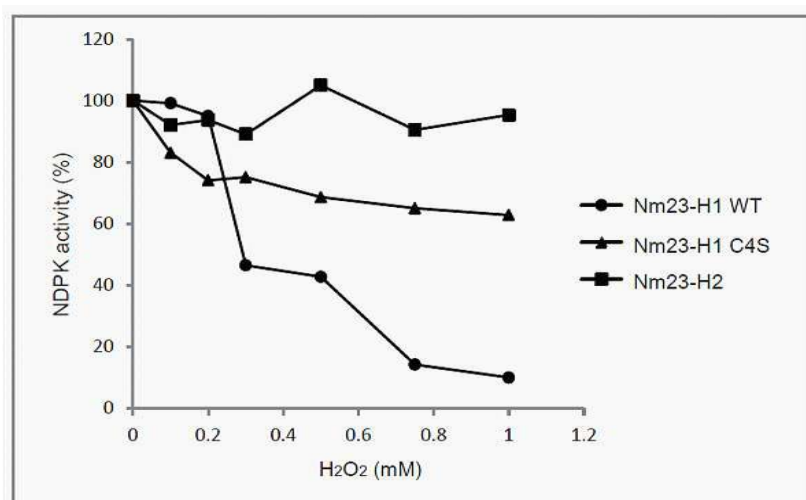
도면4b



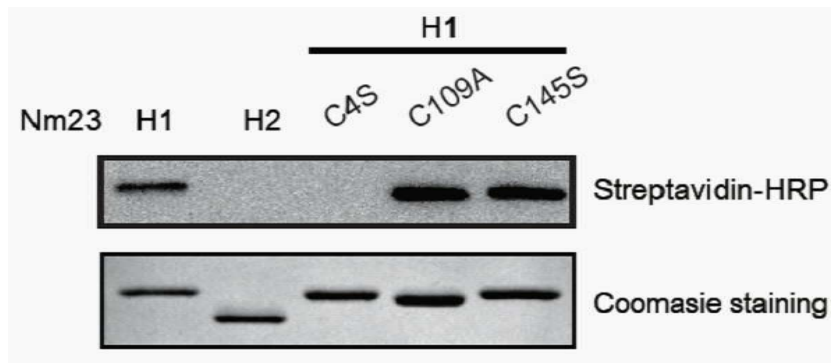
도면5a



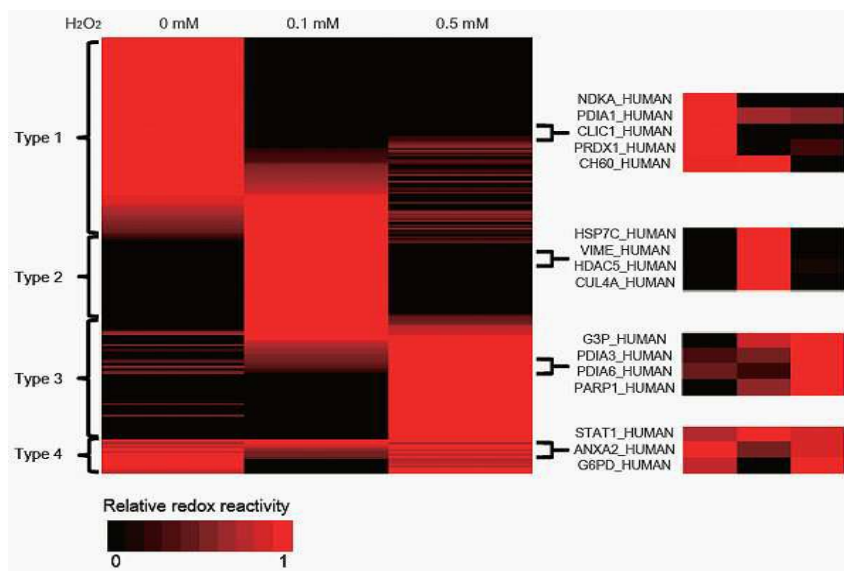
도면5b



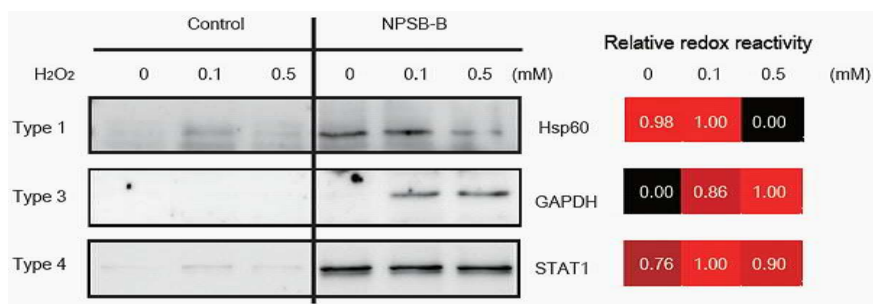
도면5c



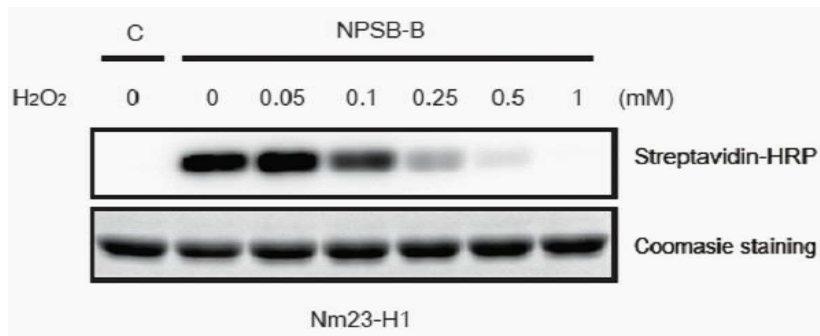
도면6a



도면6b



도면6c



도면6d

