(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0058653
(43) 공개일자 2013년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/54 (2006.01) *A61K 31/548* (2006.01)
A61K 31/549 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0134893
(22) 출원일자 2012년11월26일
심사청구일자 2012년11월26일
(30) 우선권주장
1020110124603 2011년11월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
강상원
서울시 서초구 잠원동 강변아파트 4동 1101호
강동훈
경기도 성남시 중원구 성남동 2508 리전빌아파트 1102호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 10 항

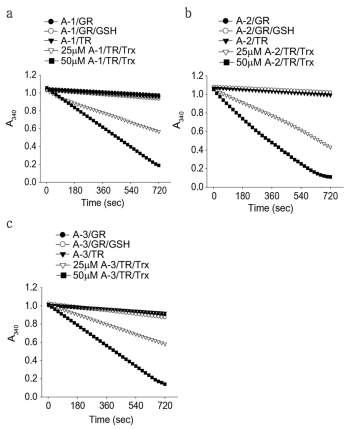
(54) 발명의 명칭 **에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체 ; 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 혈관재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 에피디티오디옥소피페라진(epidithiodioxopiperazine; ETP) 화합물 또는 이의 유도체; 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관재협착의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들은 손상된 혈관에서 2-Cys-Prx 중 특히 PrxⅡ의 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 발명의 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들은 혈관재협착의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

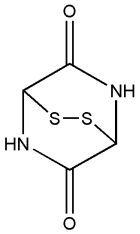
과제고유번호	20110019696
부처명	교육과학기술부
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	혈관재협착 표적 단백질의 임상적용을 위한 혈관세포체계에서의 기능 검증
주관기관	이화여자대학교
연구기간	2011.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진(epidithiodioxopiperazine) 화합물 또는 이의 유도체; 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

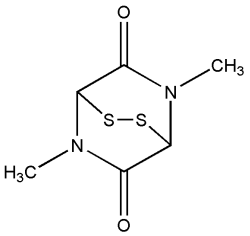
[화학식 1]



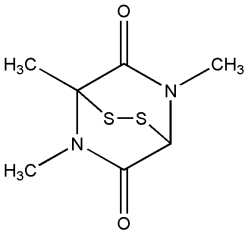
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유도체는 하기 화학식 2 내지 19로 표시되는 화합물 중 어느 하나인 것인 약학적 조성물.

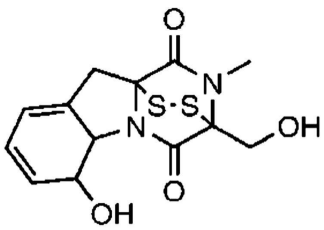
[화학식 2]



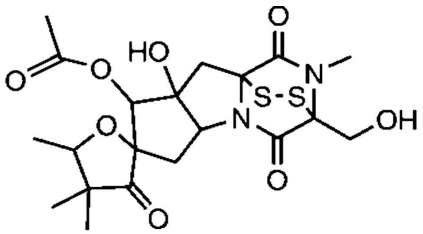
[화학식 3]



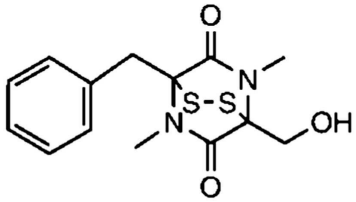
[화학식 4]



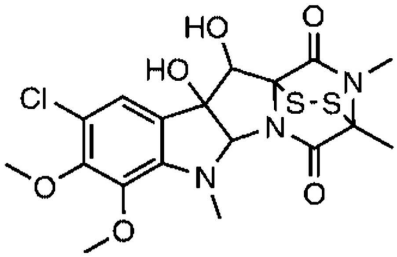
[화학식 5]



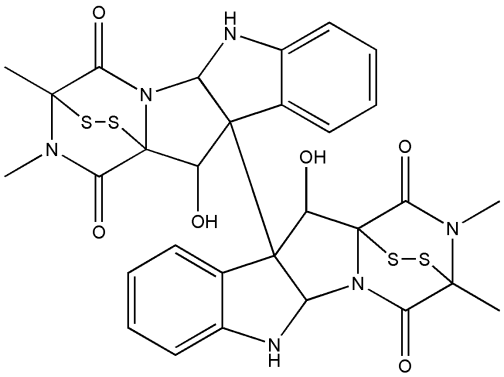
[화학식 6]



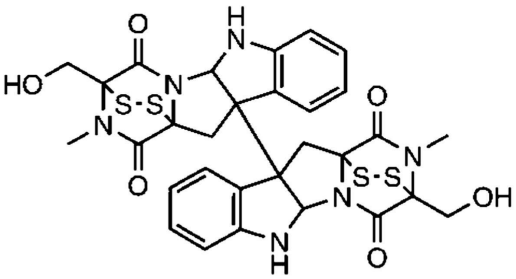
[화학식 7]



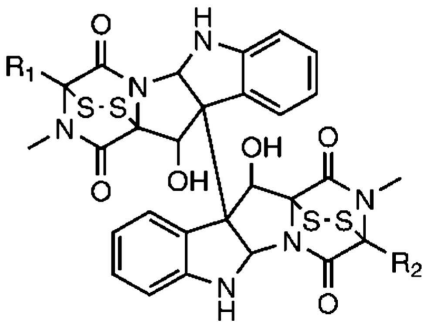
[화학식 8]



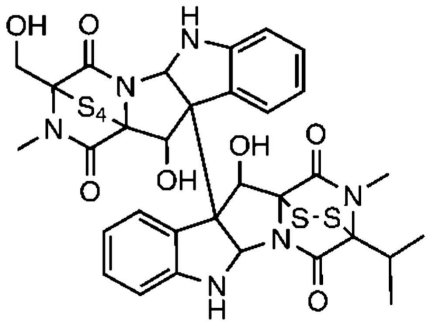
[화학식 9]



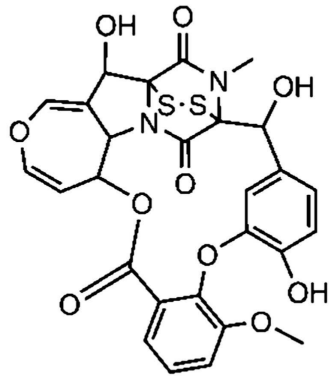
[화학식 10]



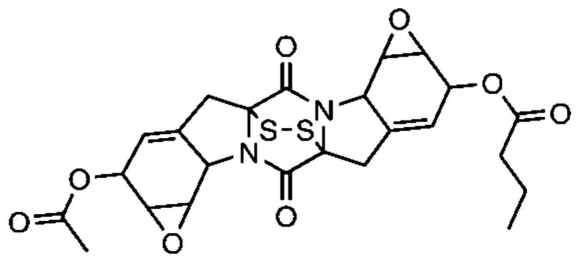
[화학식 11]



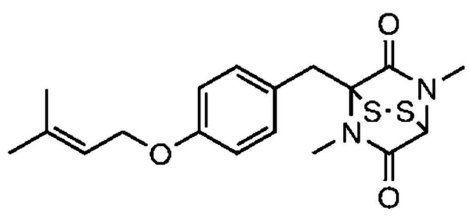
[화학식 12]



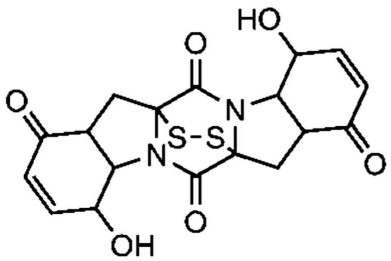
[화학식 13]



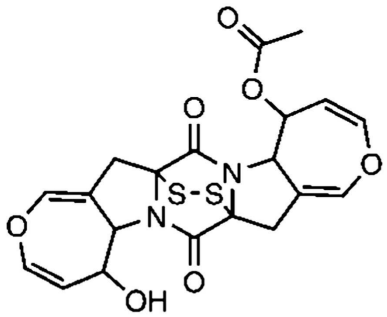
[화학식 14]



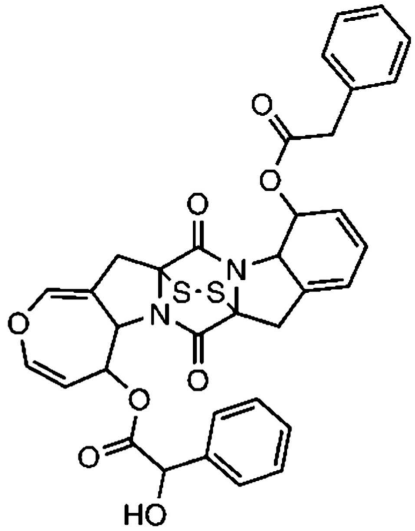
[화학식 15]



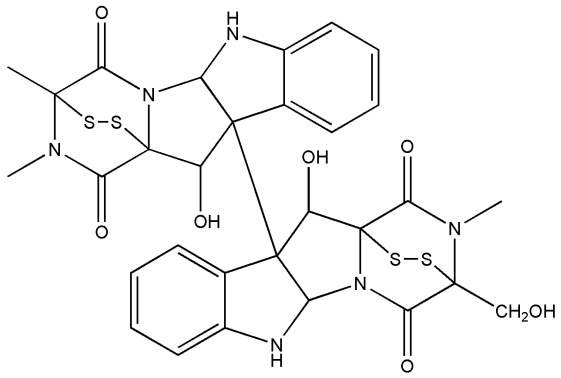
[화학식 16]



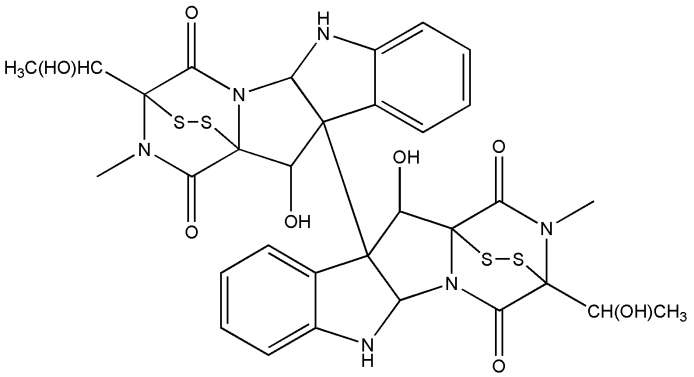
[화학식 17]



[화학식 18]



[화학식 19]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 혈관은 경동맥, 관상동맥, 말초동맥 또는 신동맥인 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 혈관재협착은 혈관이식, 혈관절단, 동맥경화, 혈관 내 지방축적, 고혈압, 혈관염증 또는 혈관성형술에 의한 것인 약학적 조성물.

청구항 5

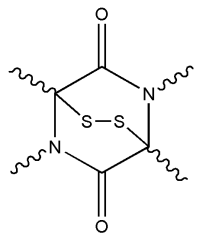
제1항에 있어서, 상기 조성물은 혈관평활근세포의 증식이나 이동을 억제하면서 동시에 혈관내피세포의 증식이나 이동을 촉진시키는 것인 약학적 조성물.

청구항 6

(a) 하기 화학식 20로 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 방법.

[화학식 20]



청구항 7

제6항에 있어서, 2-Cys-퍼록시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는지 여부의 확인은, 상기 화학식 20로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 고리를 하나 이상 포함하는 화합물을 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TR), NADPH, 완충용액 및 H_2O_2와 혼합하여 반응시켜 NADPH 산화반응 또는 H_2O_2 환원반응이 일어나는지 여부를 확인하는

단계; 및 NADPH 산화반응 또는 H_2O_2 환원반응이 일어나면 2-Cys-퍼록시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는 것으로 판단하는 단계에 의하여 수행되는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 포함하는 국소투여용 약물전달 장치.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 국소투여용 약물 전달장치는 스텐트인 것인 장치.

청구항 10

제8항에 있어서 상기 국소투여용 약물 전달장치는 상기 약학적 조성물을 서방으로 전달하는 것인 장치.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 에피디티오디옥소피페라진(epidithiodioxopiperazine; ETP) 화합물 또는 이의 유도체; 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 혈관재협착의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 동맥경화증은 콜레스테롤, 인지질, 칼슘 등을 함유한 지방성 물질(plaque)이혈관내막에 축적되어 염증이 발생하고, 동맥이 탄력성을 잃고 좁아져서 혈액 공급이 저해되거나 압력이 높아져 파열되거나 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.

[0003] 이러한 혈관협착을 극복하기 위한 방법으로는 동맥 이식 수술 방법과 수술에 의하지 않고 혈관을 확장시켜 주는 방법인 경피적 혈관 성형술이 있다. 이러한 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 끝에 풍선이 부착되어 있는 도관을 혈관의 협착부위에 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 수술을 통한 방법보다 간편하고 전신 마취에 의한 위험부담을 줄일 수 있으며 성공률도 높아 세계적으로 널리 이용되고 있는 추세이다.

[0004] 혈관재협착(restenosis)은 혈관조영술에 의한 진단으로 혈관성형술 후 추적 조영술 상 혈관내경의 협착이 50% 이상인 경우를 말한다. 약 70%의 비율로 스텐트를 이용하는 시술이 증가하면서 재협착 발생율이 감소하기는 하였으나, 혈관성형술(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 동맥내강이 좁아져서 재협착에 이르게 되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 최근 평활근 세포의 증식이 혈관성형술의 효율을 제한하는 주요한 임상상의 문제로 제기되었다. 따라서 혈관평활근세포의 증식을 억제하는 약물이나 물질을 방출하는 개선된 스텐트를 개발하여 임상에 사용하였다. 그러나 현재 이러한 목적으로 사용되고 있는 약물들

은 독성이 높아 혈관평활근세포를 사멸시키는 기전을 통해 내막의 과형성을 방지하는 것으로 그 독성에 의해 평활근세포 뿐 아니라 내피세포까지 사멸에 이르게 하는 등 임상 사용에 있어 그 한계를 드러내고 있다. 따라서, 혈관평활근세포의 성장은 선택적으로 억제하면서 손상된 내피세포층의 회복을 촉진할 수 있는 약물의 개발이 시급하다.

[0005] 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(D. M. Gardiner *et al.*, 2005, *Microbiology*, 151: 1021). 또한 상기 에피디티오디옥소피페라진 유도체인 키토신(chaetocin)과 키토민(chetomin) 또한 항암활성을 가지는 것으로 보고되었다(Y. M. Lee *et al.*, 2011, *Hepatology*, 53: 171; C. R. Isham *et al.*, 2007, *Blood*, 109: 2579; A. L. Kung *et al.*, 2004, *Cancer Cell*, 6: 33).

[0006] 이와같이 에피디티오디옥소피페라진 화합물들을 치료제로서 활용하기 위하여 분자적 타겟을 찾고자 하는 무수한 노력이 계속되고 있다. 그 결과, 글리오톡신은 NF-κB, 파테실전이효소 및 식세포성 NOX2와 같은 몇몇 효소를 억제하고(H. L. Pahl *et al.*, 1996, *J. Exp. Med.*, 183: 1829; S. Nishida *et al.*, 2005, *Infect. Immun.*, 73: 235; D. M. Vigushin *et al.*, 2004, *Med. Oncol*, 21: 21), 키토신은 티오레독신 환원효소 또는 히스톤 메틸전이효소를 억제하는 것으로 밝혀졌다(J. D. Tibodeau *et al.*, 2009, *Antioxid Redox Signal.*, 11: 1097; D. Greiner *et al.*, 2005, *Nat. Chem. Biol.*, 1: 143). 또한, 키토민은 저산소증-유도 인자-1(hypoxia-inducible factor-1; HIF-1)과 p300 간의 상호작용을 억제하는 것으로 밝혀졌다(A. L. Kung *et al.*, 2004, *Cancer Cell*, 6: 33). 이와 같이 ETP 화합물들의 일부 세포 활성이 밝혀졌음에도 불구하고, 이들의 화학적 구조와 세포 활성 간의 논리적 상관관계를 추론하기는 어려웠다. 특히, ETP 화합물과 이들 유도체의 핵심구조 모핵인 에피디티오디옥소피페라진 고리 구조의 세포적 기능은 밝혀지지 않고 있다.

[0007] 본 발명자들은 에피디티오디옥소피페라진(epidithiodioxopiperazine; ETP) 화합물 또는 이의 유도체들의 디티올(dithiol) 그룹이 시험관 내 및 생체 내 2-Cys-Prx 유사 활성을 나타냄을 최초로 밝혔다. 또한, 상기 화합물 또는 이의 유도체들이 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(re-endothelization)는 증진시켜 궁극적으로 혈관재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진(epidithiodioxopiperazine) 화합물 또는 이의 유도체; 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 혈관재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

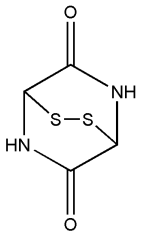
[0009] 또한, 본 발명은 화학식 20으로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 고리를 하나 이상 포함하는 화합물이 2-Cys-퍼록시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는지 여부를 확인하는 단계; 및 상기 NADPH 산화반응 또는 H_2O_2 환원반응이 일어나면 상기 화합물을 혈관재협착 예방 또는 치료제로 판단하는 단계를 포함하는 혈관재협착 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 혈관재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 포함하는 국소투여용 약물전달 장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

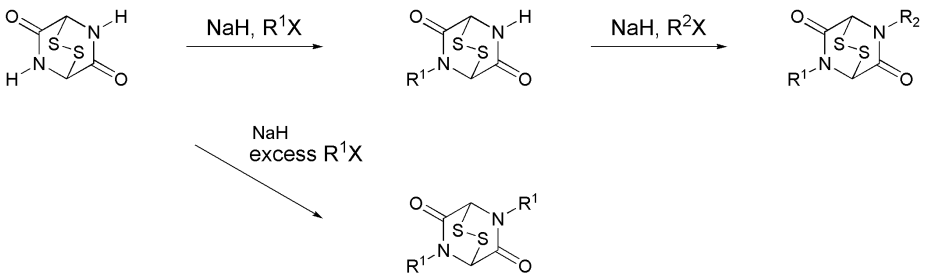
[0011] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진(epidithiodioxopiperazine) 화합물 또는 이의 유도체; 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 혈관재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0012] [화학식 1]



[0013]

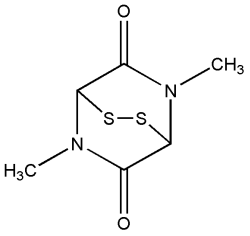
[0014] 상기 에피디티오디옥소피페라진 화합물의 유도체는 활성을 나타내는 모핵으로서 에피디티오디옥소피페라진 고리를 포함하는 화합물을 의미한다. 상기 유도체는 상기 화학식 1로 표시된 화합물 고리 중의 NH기 또는 CH기에 당업계에 공지된 종류의 다양한 치환기로 치환시킨 화합물이거나, 통상의 기술자에게 자명한 여러 화합물들을 결합시킨 구조를 가진 화합물을 포함할 수 있으며 이에 제한되지 않는다. 상기 화학식 1의 화합물 구조의 변형, 치환은 예컨대 다음과 같은 과정으로 당업자가 용이하게 수행할 수 있다.



[0015]

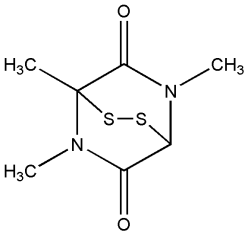
[0016] 바람직하게, 상기 에피디티오디옥소피페라진의 유도체는 하기 화학식 2 내지 19로 표시되는 화합물 중 어느 하나일 수 있다.

[0017] [화학식 2]



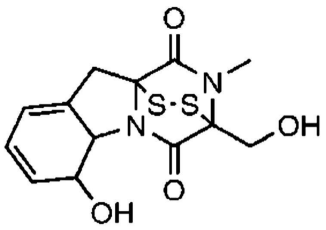
[0018]

[0019] [화학식 3]

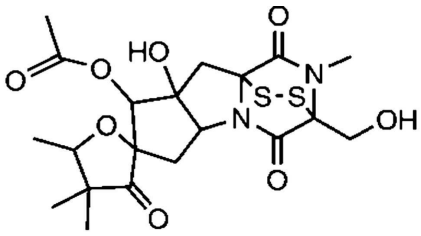


[0020]

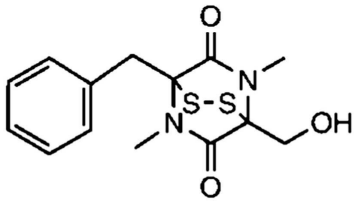
[0021] [화학식 4]

[0022] 

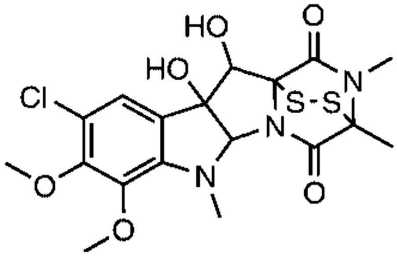
[0023] [화학식 5]

[0024] 

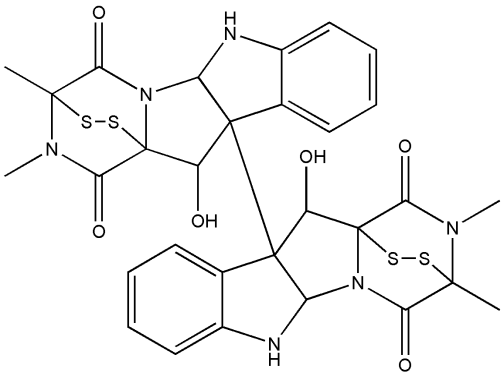
[0025] [화학식 6]

[0026] 

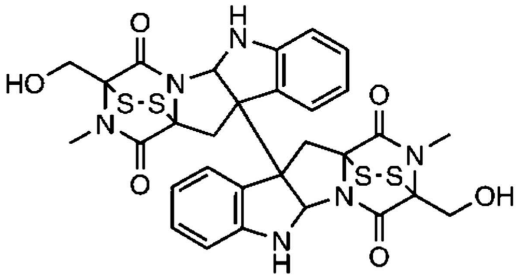
[0027] [화학식 7]

[0028] 

[0029] [화학식 8]

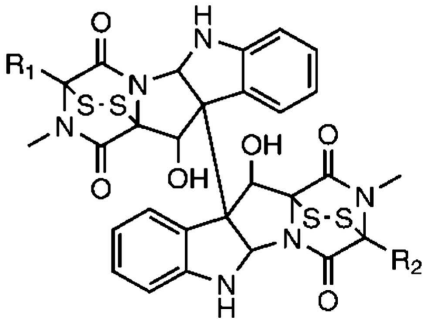
[0030] 

[0031] [화학식 9]



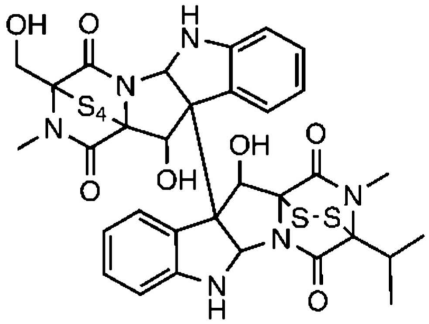
[0032]

[0033] [화학식 10]



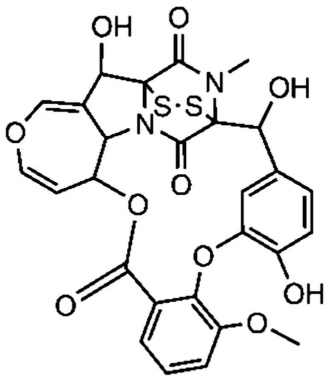
[0034]

[0035] [화학식 11]



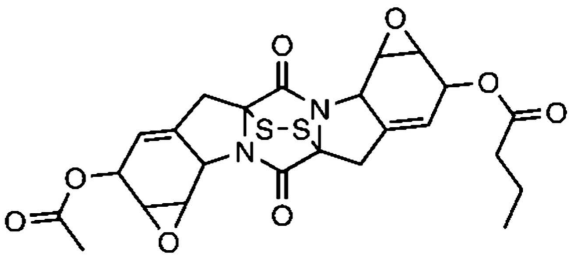
[0036]

[0037] [화학식 12]



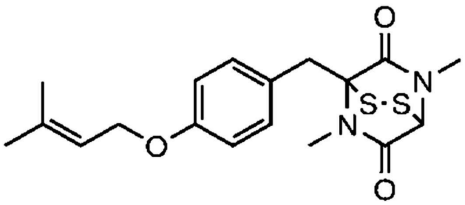
[0038]

[0039] [화학식 13]



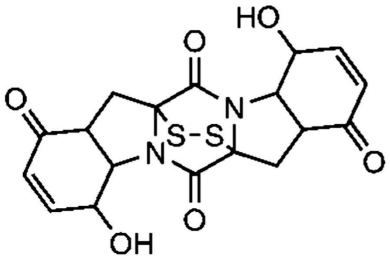
[0040]

[0041] [화학식 14]



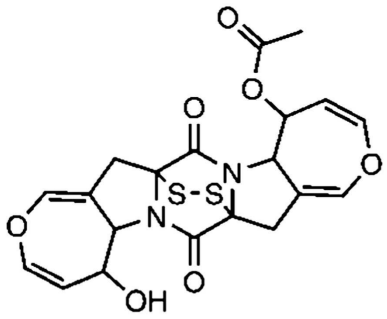
[0042]

[0043] [화학식 15]



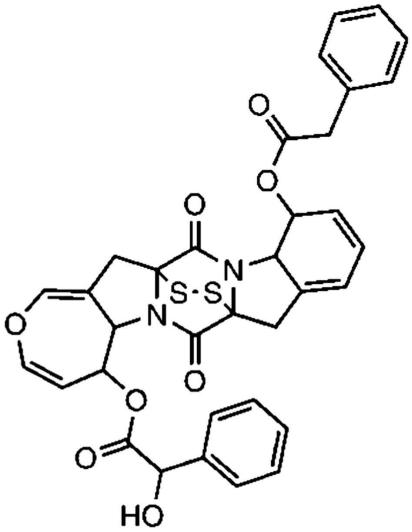
[0044]

[0045] [화학식 16]



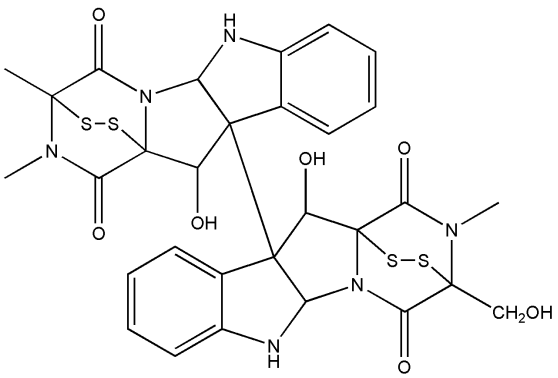
[0046]

[0047] [화학식 17]



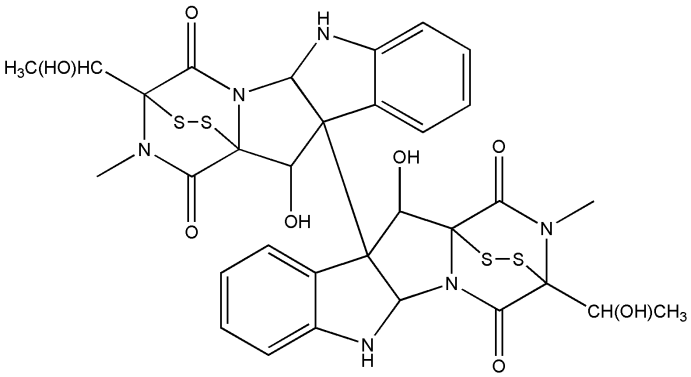
[0048]

[0049] [화학식 18]



[0050]

[0051] [화학식 19]



[0052]

[0053] 상기 화학식 2의 화합물 및 화학식 3의 화합물은 공지의 방법을 참고하여 당업자가 합성하여 사용할 수 있다. 본 발명자들은 구체적인 일 실시예에서 상기 화학식 2의 화합물 및 화학식 3의 화합물을 합성하여 사용하였으며 구체적인 합성방법은 실시예 1에 기재한 방법으로 제조하였다.

[0054] 상기 화학식 4의 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].

[0055] 상기 화학식 5의 화합물은 시로데스민(sirodesmin)이라 불리는 ETP 화합물로 렙토스패리아 마쿠란스(*Leptosphaeria maculans*) 또는 시로데스미움 디베르숨(*Sirodesmium diversum*)등의 균, 이의 배양액, 대사체, 또는 이차대사체로부터 분리될 수 있다[Curtis *et al.*, 1977, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 180-189; Ferezou *et al.*, 1977, *Nouv. J. Chim.*, 1: 327-334].

[0056] 상기 화학식 6의 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].

[0057] 상기 화학식 7의 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].

[0058] 상기 화학식 8의 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].

[0059] 상기 화학식 9의 화합물은 키토신(chaetocin))이라 불리는 ETP 화합물로 키토미움 종(*Chaetomium spp.*)으로부터 분리될 수 있다[Sekita *et al.*, 1981, *Can. J. Microbiol.*, 27: 766-772].

[0060] 상기 화학식 10의 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].

[0061] 상기 화학식 11의 화합물은 렙토신(leptosin)이라 불리는 ETP 화합물로 렙토스패리아 아종(*Leptosphaetia sp.*)으로부터 분리될 수 있다[Takahashi *et al.*, 1994, *J. Antibiot.*, 47: 1242-1249].

[0062] 상기 화학식 12의 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].

[0063] 상기 화학식 13의 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].

[0064] 상기 화학식 14의 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].

[0065] 상기 화학식 15의 화합물은 에피코라진(epicorazine)이라 불리는 ETP 화합물로 스테럼 히르수텀(*Stereum hirsutum*), 에피코쿰 푸르푸라센스(*Epicoccum purpurascens*) 또는 에피코쿰 니그럼(*Epicoccum nigrum*)으로부터 분리될 수 있다[Deffieux *et al.*, 1977, *Acta Christallogr.*, B33: 1474-1478; Kleinwachter *et al.*, 2001, *J. Antibiot.*, 54: 521-525].

[0066] 상기 화학식 16의 화합물은 아라노틴(Aranotin)이라 불리는 ETP 화합물로 아라크니오투스 아우러스(*Arachniotus aureus*) 또는 아스페르길루스 테러스(*Aspergillus terreus*)로부터 분리될 수 있다[Neuss *et al.*, 1968, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 8: 213-219].

[0067] 상기 화학식 17의 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].

[0068] 상기 화학식 18의 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].

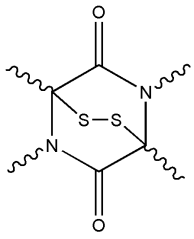
[0069] 상기 화학식 19의 화합물은 글리오클라디움 카테누라텀(*Gliocladium* catenulatum)으로부터 분리될 수 있다[Byeng *et al.*, 1999, *Nat. Prod. Lett.*, 13: 213-222; Joshi *et al.*, 1999, *J. Nat. Prod.*, 62: 730-733; Kirby and Robins, 1980, *The Biosynthesis of Mycotoxins*, New York: Sekita *et al.*, 1981, *Can. J.*

Microbiol., 27: 766-772].

[0070] 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.

[0071] 본 발명의 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들의 특징은 분자 내 이황 가교(intermolecular disulfide bridge)의 존재에 있다. 이러한 특징적인 화학적 구조는 세포적 섭취에 관여하여, 일단 상기 화합물 또는 유도체들이 세포 내로 도입되면 예상보다 훨씬 더 높은 세포 내 농도로 축적되어 세포 내부에 구속된다[P. H. Bernardo *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 46549]. 이러한 이유로 본 발명에 따른 상기 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들은 내재적 세포 독성을 피할 수 있는 매우 낮은 농도로 투여됨에도 불구하고 효과적으로 혈관재협착을 예방 또는 치료할 수 있는 것이다.

[0072] [화학식 20]

[0073] 

[0074] 구체적인 일 실시예에 따르면, 화학식 2의 화합물, 화학식 3의 화합물, 글리오톡신, 키토신 및 키토민이 Trx/TR 시스템 존재시 과산화수소-환원 활성을 나타내었으며, 혈관평활근세포의 증식과 이동을 억제하면서 동시에 혈관내피세포의 증식과 이동을 촉진하는 활성이 있음을 확인하였다. 그러나, 이황 가교가 환원되어 노출된 티올기를 메틸화한 유도체는 과산화수소-환원 활성을 나타내지 않았으며, 상기 세포기능 조절 작용 또한 나타내지 않았다. 그리고 이황 가교가 환원되어 노출된 디티올기를 가지는 화합물의 경우 과산화수소-환원 활성은 나타내었지만, 상기 세포기능 조절 작용은 나타내지 않았다. 이는 이황 가교의 환원된 형태를 가지는 화합물은 세포 내로 흡수되지 않기 때문이며, 이로써, 본 발명에 따른 화합물 또는 유도체들의 과산화수소-환원 활성이 화합물 내 에피디티오디옥소피페라진 고리 중의 특히 이황 결합의 존재에 의한 것임을 알 수 있었다.

[0075] 본 발명의 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 화합물 또는 이의 유도체들은 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합하거나 집합으로 사용될 수 있다.

[0076] 본 발명에서 사용된 용어, "약학적으로 허용가능한 염"은 상기 화합물 또는 유도체들의 원하는 생물학적 및/또는 생리학적 활성을 보유하고 있고, 원하지 않는 독물학적 효과는 최소한으로 나타내는 모든 염을 의미한다. 본 발명에 있어서는 분자 내 이황 가교를 포함하는 디케토피페라진 고리를 유지하는 한 염 종류에 제한없이 사용 가능하다. 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 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 메탄 술폰산, p-톨루엔 술폰산, 아세트산, 트리프루오로아세트산, 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), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0077] 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.

[0078] 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 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.

[0079] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 혈관이식, 혈관절단, 동맥경화, 혈관내 지방축적, 고혈압, 혈관염증, 혈관성형술 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 혈관성형술 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.

[0080] 본 발명에 따른 상기 하기 화학식 1로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진(epidithiodioxopiperazine) 화합물 또는 이의 유도체; 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물은 혈관평활근세포의 증식이나 이동을 억제하면서 동시에 혈관내피세포의 증식이나 이동을 촉진시키는 것을 특징으로 한다.

[0081] 상기 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들은 2-Cys-Prx 활성을 모방하는 특징을 가진다. 본 발명에서 사용된 용어, "PrxII(peroxiredoxin II)"는 세포 내 과산화수소를 환원시키는 퍼록시다제 2-Cys Prx 중 하나를 의미하는 것으로, 혈관평활근세포에서 PDGF에 의해 생성되는 과산화수소를 환원시켜, PDGFRβ-PLCγ1에서 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, 435:347-353]. 반면 혈관내피세포에서는 PrxII가 산화적 비활성화로부터 VEGFR2를 보호하여 VEGF-유도 신호전달을 활성화한다는 사실이 보고된 바 있다[D. H. Kang *et al.*, 2011, *Mol Cell* 44: 545-558]. 본 발명자들은 PrxII siRNA를 주입하여 PrxII를 녹아웃시킨 세포 및 혈관손상 동물모델을 이용하여 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들이 PrxII의 세포기능을 대신할 수 있음을 확인하였다.

[0082] 한편, 상기 2-Cys-Prx를 모방하는 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들의 항산화 활성은 단순한 항산화 활성과는 상이하며, 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, 비특이적 항산화 화합물인 N-아세틸시스틴 및 부틸화 히드록시아니솔을 처리한 경우에는 동일한 활성을 달성할 수 없었다.

[0083] 본 발명자들은, 상기 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들이 세포 내 2-Cys-Prx 활성을 모방할 수 있음을 최초로 밝혀냄으로써, 종래 독성이 높은 것으로 알려진 에피디티오디옥소피페라진 화합물들이 PDGF-유도 혈관평활근세포의 이동 및 증식을 억제하는 동시에 VEGF-유도 혈관내피세포의 이동 및 증식을 촉진할 수 있다는 것을 밝혔다.

[0084] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 화합물 중 화학식 2의 화합물, 화학식 3의 화합물, 글리오톡신, 키토신 및 키토민은 혈관평활근세포의 PDGF-유도 이동 및 증식을 억제하여 혈관내막이 비대해지는 것을 방지하는 한편, 혈관내피세포의 VEGF-유도 이동 및 증식을 촉진함으로써 재내피화를 향상시켜 혈관이 얇아지는 부작용 없이 혈관재협착을 억제하는 것을 확인하였다. 또한 회복된 내피는 기능적, 구조적으로 온전한 내피임을 구체적

실시예를 통해 확인하였다.

[0085] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 혈관세포의 사멸을 야기하는 농도보다 낮은 농도로 제공되는 것이 바람직하다. 본 발명에서 사용된 용어, "혈관세포 사멸을 야기하는 농도보다 낮은 농도"는, 생체 내 혈관평활근세포, 혈관내피세포의 사멸을 일으키지 않는 농도로서, 당업계에 공지된 방법에 의해 결정할 수 있으며, 이에 제한되지 않으나 시험관 내 MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide] 분석, 터널 분석, 트리판 블루 분석(Trypan blue analysis), 배양 배지로 방출되는 LDH(lactate dehydrogenase) 측정, FACS(fluorescence-activated cell sorter) 분석, CCK-8(cholecystokinin octapeptide) 분석으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법을 이용하여 혈관세포 사멸을 일으키지 않는 농도를 결정한 후, 투여 후 인간 환자에서 투여부위에서의 수준이 상기 결정된 농도를 달성하도록 당업계에 공지된 방법에 따라 결정하여 제공될 수 있다.

[0086] 바람직하게 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들; 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물은 투여 후 세포 내 유효농도가 약 100 pmoles/10^5세포 농도가 되도록 제공될 수 있다.

[0087] 구체적으로 25 nM의 글리오톡신으로 혈관평활근세포와 혈관내피세포를 처리한 후, 이들 메탄올 추출물을 HPLC로 정제할 때, 세포 내 글리오톡신의 농도는 혈관평활근세포에서 53±2.7 pmoles/10^5, 혈관내피세포에서 63.8±9.6 pmoles/10^5이었다. 세포 하나 당 평균 부피를 고려할 때, 실제 세포당 글리오톡신의 농도는 약 100 μM이며, 이는 다양한 세포주들에서 평가된 2-Cys-Prx들의 평균 세포농도인 약 10 내지 100 μM와 유사한 수준이다.

[0088] 본 발명의 실시예에 의하면, 세포독성이 없는 낮은 나노몰랄 농도(평활근세포에 대해 50nM, 내피세포에 대해 25 nM)로 글리오톡신을 처리하면 시험관 내 실험에서 PDGF에 의한 혈관평활근세포의 이동 및 증식을 억제하고, VEGF로 인한 혈관내피세포의 이동 및 증식은 촉진시킴을 확인하였고(도 9), 풍선카테터로 손상시킨 경동맥을 손상시킨 랫트 모델에서 약 1~2 microM 까지의 농도까지 혈관내막 비후를 저해하고 내피회복을 유도하는 것을 확인하였다(도 15). 또한 주사전자현미경 검사 및 혈관 투과도 시험을 통해 글리오톡신 처리시, 손상된 경동맥에서 균일하게 내피층이 재형성되고 그 기능 또한 회복되는 것을 확인하였다(도 18). 더불어 키토신 및 키토민 또한 동일한 방식으로 세포이동 및 증식을 조절하고 손상된 혈관에서 혈관내막 비후를 차단하고 내피 재형성을 촉진하는 효과가 있음을 확인하였다(도 19 및 20).

[0089] 본 발명에 따른 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되거나 무균성이고, 이러한 용액은 멸균되거나 무균성이고, 물, 완충제, 등장제 또는 동물 또는 사람에게 적용할 경우, 알레르기 또는 기타 유해한 반응을 일으키지 않는, 당해 기술 분야의 숙련가에게 공지된 기타 성분을 포함할 수 있다.

[0090] 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.

[0091] 상기 조성물은 액제, 유제, 현탁제 또는 크림제 등의 제형으로 제조할 수 있으며, 비경구로 사용될 수 있다. 상기 조성물의 사용량은 혈관재협착 방지에의 통상적인 사용량으로 사용할 수 있고, 환자의 연령, 성별, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율 및 병용되는 약물 등에 따라 달리 적용되는 것이 바람직하다.

[0092] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관재협착의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0093] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 혈관재협착을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 혈관재협착에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0094] 본 발명에서, 용어 "개체"란 혈관재협착이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 혈관재협착을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 혈관재협착 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0095] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 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.

[0096] 상기 본 발명의 약학적 조성물과 병용할 수 있는 공지의 치료제로는 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 시롤리무스(silorimus) 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 복합제제 또는 동시에 투여되거나, 또는 본 발명의 조성물과 시간 간격을 두고 투여될 수 있다.

[0097] 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 내 도포하여 협착 부위에 직접 투여할 수 있다.

[0098] 또한, 본 발명은 상기 화학식 20로 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 대량생산하는 단계를 포함하는 혈관재협착 예방 또는 치료제의 제조방법을 제공한다.

[0099] 또한, 본 발명은 (a) 상기 화학식 20로 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.

[0100] 상기 (a) 단계에서 2-Cys-퍼록시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는지 여부의 확인은, 화학식 20로 표시되는 에피디티오디옥소피페라진 고리를 하나 이상 포함하는 화합물을 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TR), NADPH, 완충용액 및 H_2O_2와 혼합하여 반응시켜 NADPH 산화반응 또는 H_2O_2 환원반응이 일어나는지 여부를 확인하는 단계; 및 NADPH 산화반응 또는 H_2O_2 환원반응이 일어나면 2-Cys-퍼록시레독신(2-Cys-Prx) 활성을 나타내는 것으로 판단하는 단계에 의하여 수행될 수 있다.

[0101] 구체적으로, 에피디티오디옥소피페라진 고리를 포함하는 후보 화합물을 먼저 Trx, TR, NADPH, EDTA와 완충용액에서 반응시키고, H_2O_2와 혼합하여 산화반응을 수행하여 실험군을 준비하고, 시료를 제외하고 동일한 반응을 수행하여 대조군을 준비한 후 각각의 340 nm에서 흡광도의 감소를 모니터하여 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-퍼록시레독신 (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.

[0102] 또한, 본 발명은 상기 혈관재협착 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 포함하는 국소투여용 약물전달 장치를 제공한다. 상기 국소투여용 약물 전달장치는 이중 풍선카테터, 디스패치, 미세공풍선, 스텐트 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않고, 바람직하게는 스텐트일 수 있다.

[0103] 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, 1994에 기술되어 있다. 바람직하게는 서방형 약물방출형 스텐트이다.

[0104] 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-글라이콜산 공중합체(PLGA), 폴리카프로락톤, 폴리-(하이드록시부티레이트/하이드록시발레레이트)공중합체, 폴리비닐피롤리돈, 폴리테트라 플루오로에틸렌, 폴리(2-하이드록시에틸메타크릴레이트), 폴리(에테루레탄 우레아), 실리콘, 아크릴, 에폭사이드, 폴리에스테르, 우레탄, 파알렌, 폴리포스파진 고분자, 플루오로 고분자, 폴리아마이드, 폴리올레핀 및 이들의 혼합물 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0105] 스텐트는 폴리사카라이드, 헤파린, 젤라틴, 콜라겐, 알지네이트, 히알룬산, 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, US 2006/0083772에 기술된 바와 같이, 생체적 합성 탑 코트에 통합될 수 있다. 폴리머와 약물화합물의 혼합물로부터 스텐트를 형성하는 방법은 Blindt *et al.*, 1999, *Int. J. Artif. Organs*, 22: 843-853에 개시되어 있다.

발명의 효과

[0106] 본 발명의 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들은 손상된 혈관에서 2-Cys-Prx 중 특히 PrxII isoform의 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 발명의 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들은 혈관재협착의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0107] 도 1은 본 발명에 따른 화학식 2의 화합물(A-1), 화학식 2의 화합물에서 이황 가교결합이 환원되어 디티올기를 가지는 화합물(A-2) 및 화학식 3의 화합물(A-3)의 과산화수소 환원에 대한 촉매활성을 나타낸 도이다. (a) 내지 (c) 각각 A-1 내지 A-3의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 ETP 화합물의 과산화수소 환원에 대한 촉매활성을 나타낸 도이다. (a) 내지 (c)는 각각 글리오톡신, 키토신 및 키토민의 과산화수소 환원력을 나타낸다. 그래프에 명시한 커플링 산화 환원 시스템 존재 하에 각각 25 μM의 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 퍼록시다아제 활성을 나타낸 도이다. 3회의 독립적인 실험을 수행하여 초기속도를 평균±표준오차로

나타내었다. 음성대조군으로는 이황가교결합이 환원되고 메틸화된 비스(메틸티오)글리오톡신을 사용하였다.

도 3은 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 생존률을 나타낸 도이고, (e) 및 (f)는 HAECs에 각각 GT 또는 키토신을 처리하였을 때의 생존률을 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 생존률을 확인하였다. 생존률은 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 4는 화학식 2의 화합물(A-1), 화학식 2의 화합물에서 이황 가교결합이 환원되어 디티올기를 가지는 화합물(A-2) 및 화학식 3의 화합물(A-3)의 혈관평활근세포(SMC)에 대한 세포독성 실험 결과를 생세포 %로 나타낸 그래프이다.

도 5는 화학식 2의 화합물(A-1), 화학식 2의 화합물에서 이황 가교결합이 환원되어 디티올기를 가지는 화합물(A-2) 및 화학식 3의 화합물(A-3)의 혈관내피세포(EC)에 대한 세포독성 실험 결과를 생세포 %로 나타낸 그래프이다.

도 6은 PrxII siRNA를 주입하고 DMSO(대조군) 또는 GT로 2시간 동안 선처리한 HASMCs 및 HAECs에서 글리오톡신에 의한 PDFT- 및 VEGF-의존적 신호전달의 상반된(reciprocal) 조절 능력을 나타낸다. (a) 및 (b)는 각각 HASMCs 및 HAECs에서 세포 내 과산화수소 수준을 DCF 형광 이미지와 상대적인 세기로 나타내었다. 그래프는 50 내지 80개의 세포로부터 평균한 상대적인 DCF 형광세기를 평균±표준오차로 나타내었다(n=3, *p<0.01, **p<0.001).

도 7은 HASMCs 및 HAECs에서 NOX 활성에 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 8의 (a)는 PrxII 넉다운된 HASMCs에서 PDGF-유도 타이로신 인산화에 대한 GT의 영향을 면역블롯 분석으로 나타낸 도이고, 도 8의 (b)는 PrxII 넉다운된 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 9는 PrxII 넉다운된 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 10은 PrxII 넉다운된 혈관세포의 성장인자-유도 증식 및 이동에 대한 화학식 2의 화합물(A-1)의 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 화학식 2의 화합물(A-1)의 영향을 나타낸 도이다.

도 11은 PrxII 넉다운된 혈관세포의 성장인자-유도 증식 및 이동에 대한 화학식 2의 화합물에서 이황 가교결합이 환원되어 디티올기를 가지는 화합물(A-2)의 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 상기 A-2의 영향을 나타낸 도이다.

도 12는 PrxII 넉다운된 혈관세포의 성장인자-유도 증식 및 이동에 대한 화학식 3의 화합물(A-3)의 영향을 나타낸 도이다. (a) 및 (b)는 각각 PDGF에 반응하는 HASMCs의 증식 및 이동에 대한, (c) 및 (d)는 각각 VEGF에 반

응하는 HAECs의 증식 및 이동에 대한 A-3의 영향을 나타낸 도이다.

도 13은 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-$SO_{2/3}$) 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 14는 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 내제적 PrxII의 녹다운을 나타낸다.

도 15는 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 16은 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 17은 2-Cys-Prx 과산화에 GT가 미치는 영향을 확인한 면역조직화학 염색 결과를 나타내낸 도이다.

도 18은 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 줌인 이미지를 도시하였다.

도 19는 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 PDFG 또는 VEGF로 24시간 동안 자극시켰다. 그래프에 배수증가를 평균±표준오차로 나타내었다(n=3, *p<0.01, **p<0.005, #p<0.001).

도 20은 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 21은 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 22는 PrxⅡ 결핍 혈관세포 및 마우스에 대한 GT의 영향을 확인한 웨스턴 블롯 결과((a), (b)) 및 HE-염색 결과(C)를 나타낸 도이다.

도 23은 화학식 2의 화합물(A-1)의 NMR 데이타 결과를 나타낸 도이다.

도 24는 화학식 2의 화합물(A-1)의 NMR 데이타 결과를 나타낸 도이다.

도 25는 화학식 2의 화합물(A-1)의 NMR 데이타 결과를 나타낸 도이다.

도 26은 화학식 3의 화합물(A-3)의 NMR 데이타 결과를 나타낸 도이다.

도 27은 화학식 2의 화합물(A-1)의 이황가교가 환원되어 디티올기를 가지는 화합물(A-2)의 NMR 데이타 결과를 나타낸 도이다.

도 28은 화학식 2의 화합물(A-1)의 이황가교가 환원되어 디티올기를 가지는 화합물(A-2)의 NMR 데이타 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

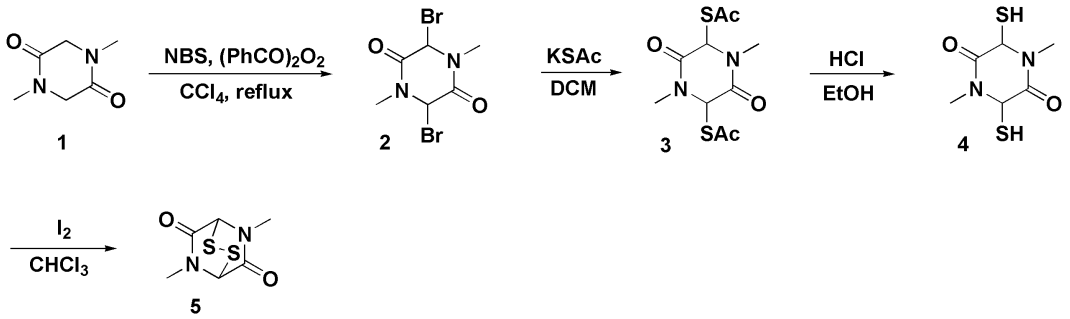
[0108] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0109] **<실험방법>**

[0110] 실시예 1: 에피디티오디옥소피페라진 화합물의 합성

[0111] **1-1. 화학식 2의 화합물(5,7-디메틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로**[2.2.2]-옥탄-6,8-디온)의 제조

[0112] 화학식 2의 화합물은 하기 반응식을 통하여 제조하였다.

[0113] 

[0114] **A. 3,6-디브로모-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온 (2)**

[0115] 사염화탄소(50 ㎖) 중의 살코신 무수물(1)(500 mg, 3.5 mmol), N-브로모숙신이미드(1.87 g, 10.5 mmol), 및 벤조일 퍼록사이드(85 mg, 0.35 mmol) 혼합물을 2시간 동안 가열 환류시키고, 냉각한 후 얻어진 숙신이미드를 여과하고 사염화탄소로 세척하였다. 여액을 합하고 황산마그네슘으로 건조하고 다시 여과하였다. 잔사를 진공에서 증발시켜 3,6-디브로모-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온 (2)를 얻었다(crude: 900mg, 82%). ^{1}HNMR(400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 6.04 (s, 2H), 3.15 (s, 6H).

[0116] **B. 1,4-디메틸-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트 (3)**

[0117] 3,6-디브로모-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온 (2)(조 900 mg, 3.0 mmol)을 디클로로메탄(100 ㎖)에 용해시키고 포타슘 티오아세테이트(1.03 g, 9.0 mmol)로 0℃에서 처리하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하엿고 얻어진 침전물들을 여과하고 디클로로메탄으로 세척하였다. 여액은 합하였고 잔사를 진공에서 증발시켰다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(DCM:EA=5:1)를 통하여 1,4-디메틸-3,6-디옥소피페라진-2,5-디일-디에탄티오에이트 (3)을 흰색 고체로 얻었다(200 mg, 23%). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 5.77 (s, 2H), 2.94 (s, 6H), 2.48 (s, 6H).

[0118] **C. 3,6-디메르캅토-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온 (4)**

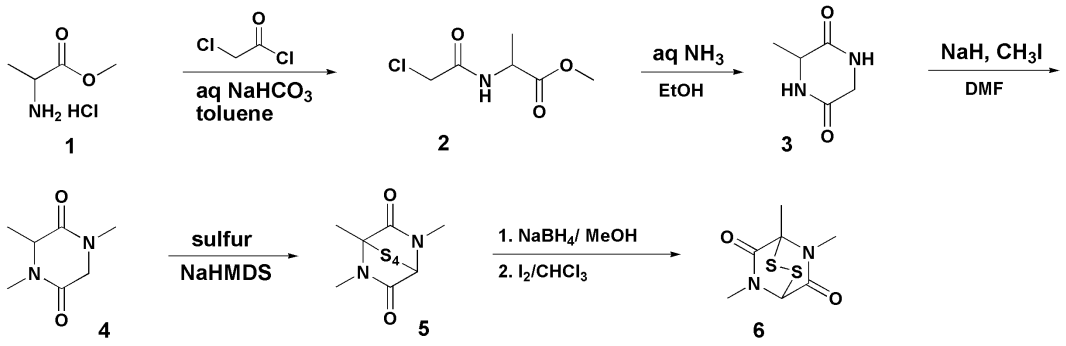
[0119] 에탄올성 염산 용액(아세틸 클로라이드 1.5 ㎖를 에탄올 7 ㎖에 가하여 제조함)을 에탄올(20 ㎖) 중의 디티오아세테이드 (195 ㎎, 0.67 mmol)의 교반된 용액에 한방울씩 가하였다. 그리고 얻어진 용액을 1.5시간 동안 가열 환류시켰다. 냉각 후에, 휘발성 물질들을 감압으로 제거하고 잔사를 재결정(EA/Hex)으로 정제하여 3,6-디메르캅토-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온 (4)를 밝은 노란 고체로 얻었다(90㎎, 65%). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 5.00 (s, 2H), 3.09 (s, 6H)

[0120] **D. 5,7-디메틸-2,3-디티오-5,7-디아자바이시클로[2,2,2]옥탄-6,8-디온 (5)**

[0121] 클로로포름 10 ㎖ 중의 아이오딘(63 ㎎, 0.246 mmol) 용액을 클로로포름 10 ㎖ 중의 3,6-디메르캅토-1,4-디메틸피페라진-2,5-디온(50 ㎎, 0.242 mmol)에 상온에서 가하였다. 1시간 동안 교반하면서 방치하고 소듐 티오설페이트를 함유한 포화 $NaHCO_3$ 용액을 붓고 아이오딘에 의한 색이 없어질 때까지 교반하였다. 유기층을 분리하고 수용성 층을 디클로로메탄으로 2회 추출하고 황산마그네슘으로 건조하였다. 여과하고 진공 농축하여 잔사를 얻고 이를 에탄올을 이용하여 재결정하여 밝은 노란 고체인 5,7-디메틸-2,3-디티오-5,7-디아자바이시클로[2,2,2]옥탄-6,8-디온 (5)을 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 5.21 (s, 2H), 3.12 (s, 6H). 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 23 내지 25에 나타내었다.

[0122] **1-2. 화학식 3의 화합물(1,5,7-트리메틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로**[2.2.2]옥탄-6,8-디온)의 제조

[0123] 화학식 3의 화합물은 하기 반응식을 통하여 제조하였다.

[0124] 

[0125] **A. 메틸 2-(2-클로로아세트아미도)프로파노에이트 (2)**

[0126] 알라닌 메틸 에스터 하이드로클로라이드(2 g, 14.3 mmol)을 물 6 ㎖에 용해시켰다. 수용액을 0℃로 냉각하고 탄산수소나트륨(2.8 g, 33.6 mmol)과 혼합하였다. 반응물에 톨루엔 5 ㎖ 중의 클로로아세틸 클로라이드(1.67 ㎖, 20.9 mmol) 용액을 한 방울씩 가하면서 혼합하였고 3시간 동안 교반하였다. 상 분리 후에, 수 층은 톨루엔으로 추가 추출하였다. 합한 유기층은 용매 제거하고 조 메틸 2-(2-클로로아세트아미도)프로파노에이트 (2)을 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 7.23 (br s, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 1.42 (d, 3H).

[0127] **B. 3-메틸피페라진-2,5-디온 (3)**

[0128] 메틸 2-(2-클로로아세트아미도)프로파노에이트 (2)를 에탄올 15 ㎖에 용해시키고 30% 수용성 암모니아 용액 6.1 ㎖와 혼합하였다. 반응물을 70℃에서 5시간 동안 교반하고 냉각한 후, 침전된 고체를 여과하였다. 모액을 증발 건조하고 잔사를 소량의 물로 용해시키고, 남은 침전물을 여과하여 합하고 진공건조하여 3-메틸피페라진-2,5-디

온 (3)을 하얀 고체로 얻었다(420 mg, 수율 23%). ^{1}H 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)

[0129] **C. 1,3,4-트리메틸피페라진-2,5-디온 (4)**

[0130] 건조 디메틸포름아미드 20 ㎖ 중에 3-메틸피페라진-2,5-디온 (3) 420 mg, 3.27 mmol) 용액에 서서히 NaH (오일 중 60%, 400 mg, 9.83 mmol)을 0℃에서 가하였다. 메틸 아이오다이드 1 ㎖를 교반하면서 조금씩 가하고 혼합물을 4시간 동안 상온에서 교반하였다. 용매를 증발시키고 남은 잔사를 디클로로메탄과 물로 추출하였다. 수용성 층은 디클로로메탄으로 2회 세척하였고, 합한 유기층은 황산마그네슘으로 건조하고 여과하였다. 잔사를 진공증발시켰고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(DCM:MeOH=20:1~9:1)로 1,3,4-트리메틸피페라진-2,5-디온 (4)를 무색의 고체로 얻었다(440 mg, 수율 86%). ^{1}H 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).

[0131] **D. 6,7,9-트리메틸-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온 (5)**

[0132] THF 20 ㎖ 중의 황 원소(1.64 g, 51.2 mmol) 현탁액을 아르곤 하에 NaHMDS (1.0M in THF, 19.2 ㎖)에 2분마다 1방울씩 가하였다. 첨가하는 동안, 불용성 노란 S_8이 빠르게 색을 변화시켰고, 초기에 어두운 초록색에서 어두운 오렌지색 마지막으로 밝은 오렌지색 용액이 되었다. 용액을 1분 더 교반하고, THF 20 ㎖ 중의 1,3,4-트리메틸피페라진-2,5-디온 (4)(1 g, 6.4 mmol)을 가하여 얻은 혼합물을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응물을 포화 수용성 NH_4Cl 용액으로 quenched 하고 에틸 아세테이트로 두 번 추출하였다. 합한 유기층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하고 농축하여 잔사를 얻었다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EA:Hex=1:1)을 통하여 6,7,9-트리메틸-2,3,4,5-테트라티아-7,9-디아자바이시클로[4.2.2]데칸-8,10-디온 (5)을 얻었다(250 mg, 수율: 14%). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 5.13 (s, 1H), 3.06 (d, 6H), 2.00 (s, 3H).

[0133] **E. 1,5,7-트리메틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온** (6)

[0134] 단계 1: 메탄올 20 ㎖ 중의 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 아르곤 하에 0 ℃에서 $NaBH_4$ (167 mg, 4.4 mmol)에 가하였다. 얻어진 혼합물을 45분 동안 교반하여 적당한 온도에 다다르게 하였다. 용매를 증발시키고 잔사를 EA와 포화 NH_4Cl 용액으로 추출하였다. 수용성 층을 EA로 두번 세척하였고, 합한 유기층은 황산마그네슘으로 건조하고 여과하였다. 잔사는 진공으로 건조하였다.

[0135] 단계 2: 클로로포름 20 ㎖ 중의 아이오딘(249 mg, 0.885 mmol)을 클로로포름 30 ㎖ 중의 디티올 화합물 용액에 실온에서 가하였다. 용액을 1시간 동안 교반하면서 방치하고 소듐 티오설페이트를 함유한 포화 $NaHCO_3$ 용액을 부워 아이오딘에 의한 색이 없어질 때까지 혼합물을 교반하였다. 유기층을 분리하고 수용성 층을 디클로로메탄으로 두 번 추출하였다. 합한 유기층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하고 진공에서 농축하여 잔사를 얻었다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EA:Hex = 1:1)를 통하여 1,5,7-트리메틸-2,3-디티아-5,7-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄-6,8-디온 (6)를 밝은 노란 고체로 얻었다(24 mg, 12%). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 5.29 (s, 1H), 3.14 (s, 3H), 3.03 (s, 1H), 1.98 (s, 3H). 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이타는 도 26에 나타내었다.

[0136] **비교예 1: 화학식 2의 화합물 중 이황가교를 환원시켜 디티올기를 노출시킨** 화합물의 제조

[0137] 실시예 1의 방법으로 제조한 화학식 2의 화합물을 공지의 환원제를 이용하여 화합물 내의 이황가교를 환원시켜 디티올기가 노출된 화합물을 제조하였고, 얻어진 최종 생성물의 NMR 데이터는 도 27 및 28에 나타내었다.

[0138] **실시예 2: 재료**

[0139] 글리오톡신(gliotoxin), 키토신(chaetocin) 및 키토민(chetomin)은 시그마-알드리치로부터 구입하였다. 비스(메틸티오)글리오톡신(bis(methylthio)gliotoxin)은 산타크루즈 바이오테크놀로지로부터 구입하였다. SU-5416은 Calbiochem으로부터 구입하였다. 인산-PLCγ1(pY673), PLCγ1 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 $VEFG_{165}$)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].

[0140] 인간 PrxII에 대한 두 개의 siRNA 이합체의 서열은 5'-CGCUUGUCUGAGGAUUACGUU-3' (PrxII-1, 서열번호 1) 및 5'-AGGAAUAUUUCUCCAAACAUU-3' (PrxII-2, 서열번호 2)이다. PrxII-1 siRNA 이합체는 주로 시험관 내 실험에 사용되었다. 랫트 경동맥 풍선 손상 실험을 위해 랫트 PrxII에 대한 4개의 siRNA 이합체의 SMART pool(5'-GCAACGCGCACAUCGGAAAUU(서열번호 3), 5'-GAUCACAGUCAACGACCUAUU(서열번호 4), 5'-AGAAUUACGGCGUGUUGAAUU(서열번호 5), 및 5'-ACGCUGAGGACUUCCGAAAUU(서열번호 6); Dharmacon Cat. no. D-089973)을 사용하였다. 대조 siRNA로는 초파리 루시페라아제 siRNA를 합성하여 사용하였다.

[0141] 이하에서 실시예 1-1에서 제조한 화학식 2의 화합물을 A-1, 비교예에서 제조한 화학식 2의 화합물에서 이황 가교가 환원되어 디티올기가 노출된 화합물을 A-2, 실시예 1-2에서 제조한 화학식 3의 화합물을 A-3, 글리오톡신을 GT라고 약어로 지칭하였다.

[0142] **실시예 3: 세포 배양**

[0143] 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℃의 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; EBM™-2)와 평활근 세포 기본 배지(Smooth Muscle Cell Basal Medium; smBM™) SingleQuotes®로 각각 배양하였다. 본 발명에서는 5 내지 7계대의 세포를 사용하였다.

[0144] **실시예 4: 퍼록시다아제(Peroxidase) 활성 분석**

[0145] 공지된 방법에 따라 본 발명에 따른 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들(이하에서, ETP 화합물이라 지칭하였다)의 퍼록시다아제 활성 분석을 수행하였다[대한민국 공개특허 10-2006-0020140]. 250 μM NADPH, 3 μM 효모 티오레독신(thioredoxin; Trx), 1.5 μM 효모 티오레독신 환원효소(Trx reductase; TR), 25 μM ETP 화합물 및 1.2 ml 과산화수소를 포함하는 1 mM EDTA 함유 50 mM Hepes-NaOH 완충액(pH 7.0)의 반응혼합물 200 μl로 분광광도법 분석을 위한 표준 퍼록시다아제 반응을 수행하였다. 글루타치온(glutathione; GSH)-의존 퍼록시다아제 반응을 위해, GSH(1 mM)와 효모 글루타치온 환원효소(GSH reductase; GR)(1 Unit)를 효모 Trx와 TR 대신 첨가하였다. 과산화수소를 가함으로 반응이 시작되었고, 30℃에서 12분간 Agilent UV8453 분광광도계(Hewlett Packard, USA)로 340 nm에서 흡광도 감소를 따라 NADPH 산화를 모니터하였다. 초기반응속도는 곡선의 선형부분을 사용하여 계산하였고 분당 산화되는 NADPH의 양으로 표현하였다.

[0146] **실시예 5: 시험관 내 세포 기능 분석**

[0147] 세포 증식 분석을 위하여, HAECs를 4000 세포/웰의 농도로 최종 부피를 100 μl로 하여 siRNA-주입(transfection) 시약 혼합물을 포함하는 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 24시간 동안 siRNA-주입 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 혼탁도를 감하고 3개 웰에서 평균하여 450 nm에서의 흡광도로 표현하였다.

[0148] 세포 이동 분석은 24-웰 트랜스웰 배양 챔버(Costar; 8-μm pore size)에서 수행하였다. 여과기의 바닥을 젤라틴 B(1 mg/ml)로 코팅하고 1시간 동안 자연 건조시켰다. siRNA 주입 복합체를 포함하는 상부 챔버에 HAECs(6*10^3)를 더하였다. 24시간 후, siRNA 주입된 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℃/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.

[0149] **실시예 6: 면역블롯 분석**

[0150] 적절한 처리 또는 siRNA 주입 후, 세포를 빙냉의 인산완충염용액으로 1회 세척하고, 20 mM Hepes(pH 7.0), 1% 트리톤 X-100, 150 mM 염화나트륨, 10% 글리세롤, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM Na3VO4, 6 mM NaF, 1 mM AEBSF, 아프로티닌(5 μg/ml) 및 루펩틴(5 μ/ml)을 포함하는 추출 완충액으로 용해시켰다. 12,000 g로 원심분리 시킨 후 정제된 세포 추출액을 면역블롯에 사용하였다. 세포 추출물을 SDS 시료 완충액에서 가열하고 SDS 변성 젤에서 분리하였다. 필요에 따라, 67 mM Tris(pH 6.7), 2% SDS, 100 mM 2-머캅토에탄올로 37℃에서 60분간 교반하여 막을 벗기고 적절한 범 항체로 재검출하였다.

[0151] **실시예 7: 세포 내 과산화수소 농도 측정**

[0152] 자극 후, 세포를 페놀레드-유리 기본 배지로 세척하고 5 μM 5,6-클로로메틸-2',7'-디클로로디히드로플루오레신 디아세테이트(CM-H_2DCFDA)(Molecular Probe)와 37℃에서 5분간 인큐베이션하였다. 형광 이미지는 형광현미경(Axiovert 200 Basic standard, Zeiss, Germany)으로 기록하였다. 상대적인 DCF 형광은 바탕형광을 제거한 후 50 내지 80개의 세포로부터의 형광 수준을 평균하여 계산하였다.

[0153] **실시예 8: NADPH 산화효소 활성 분석**

[0154] 전세포 과산화물(superoxide) 생성은 증강된 발광 시스템(Diogenes, National Diagnostics)을 사용하여 측정하였다. 분석을 위하여, 혈청-고갈된 세포를 100 μl의 Diogene 시약과 37℃에서 5분간 미리 인큐베이션하였다. 표기한 성장인자로 자극받은 후 화학발광을 TD-20/20 Luminometer(Turner Biosystems)로 10분간 매초 검출하였다.

[0155] **실시예 9: 랫트 경동맥의 풍선-손상 모델(balloon-injury model of rat** carotid artery)

[0156] 동물실험은 이화여자대학교의 동물실험 윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 규정에 따라 수행하였다. 풍선 손상은 좌측 총경동맥(common carotid artery)에 잠입된 2F Fogarty 풍선 카테터를 사용하여 하기와 같이 생성하였다: 10주령 수컷 Sprague-Dawley 랫트를 이소플루란 가스(N_2O:O_2/70%: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.

[0157] **실시예 10: 조직학적 분석**

[0158] 랫트를 마취시키고 3.7% 포름알데히드를 포함한 헤파린화 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 μm 두께)을 얻어 헤마톡실린과 에오신(HE)으로 염색

하였다. 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.

[0159] **실시예 11: 경동맥 내 siRNA 또는 ETP 화합물의 국소 전달**

[0160] siRNA의 생체 내 주입을 위해, 랫트 PrxII(200 nM)에 특이적인 siRNA 혼합물을 제조업자(Ambion)의 지시에 따라 siPORT™NeoFX™ 시약과 미리 혼합하였다. 풍선 손상 직후, Opti-MEM으로 간단히 세척한 후 siRNA 주입 혼합물(200 μl)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)를 카테터를 통해 주사하고 30분간 인큐베이션하였다.

[0161] **실시예 12: 면역조직화학 및 면역형광 염색**

[0162] 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℃에서 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 항원펩타이드(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 α-actin(1:300 희석)과 랫트 CD31(PECAM-1, 1:200 희석)에 대한 항원과 4℃에서 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.

[0163] **실시예 13: TUNEL 분석**

[0164] 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℃에서 60분간 수행하였다. 세포 핵은 DAPI로 대조염색하였다.

[0165] **실시예 14: 혈관 투과성 실험**

[0166] 마우스에 100 μl의 5% 에반스 블루(Evans blue)를 30분간 정맥내 주사하고 5분간 PBS로 관류시켰다. 손상되지 않은 곁가지와 손상된 동측 모두로부터 총경동맥을 제거하였다. 이를 절개하고 세로로 개방하여 위상차 현미경에서 20배의 배율로 관찰하였다. 정량을 위하여, 55℃에서 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 억제를 위하여, SU5416(20 mg/kg)를 풍선 손상 전과 후 3회(Day-1, 1 및 3) 복강내 주사하였다. 대조 주사는 비히클을 포함한 PBS 200 μl(5% DMSO)를 사용하였다.

[0167] **실시예 15: 주사 전자 현미경검사(Scanning Electron Microscopy; SEM)**

[0168] 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-코

팅한 후 검체를 주사 전자 현미경(Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

[0169] **<실험결과>**

[0170] **실험예 1: 과산화수소 환원에 대한 촉매활성**

[0171] 본 발명의 에피디티오디옥소피페라진 화합물 또는 이의 유도체들의 화학적 특징은 에피디티오디옥소피페라진 고리 부분(ring moiety)에 있는 분자 내 이황 가교(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 및 2에 나타내었다.

[0172] 그 결과, 도 1 및 2에 나타나듯이 A-1, A-3, GT, 키토신 및 키토민 모두 Trx/TR 시스템 존재 시 뛰어난 과산화수소-환원 활성을 나타내었다. 한편, 흥미롭게도 키토신 및 키토민의 활성은 각각 8.18±0.24 및 8.62±0.51 nmol/min으로GT(3.72±0.53 nmol/min)보다 약 2배 높은 것으로 나타났다. 이는 화합물 내에 존재하는 이황 가교를 포함하는 피페라진 고리의 수에 상응한다.

[0173] 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 2d 내지 2f에 나타낸 바와 같이, ETP 화합물의 과산화수소-환원 활성은 Trx/TR/NADPH 시스템의 모든 세가지 요소를 요구하며, 이는 농도에 비례하였다(도 2g).

[0174] 대조군으로는 디케토피페라진 고리에서 이황 결합이 환원되어 두 개의 티올기가 노출된 A-2와 노출된 티올기가 메틸화된 비스(메틸티오)글리오톡신을 사용하였다. 그 결과 A-2의 경우 인 비트로 시험상 퍼록시다아제 활성이 있는 것으로 나타났으며(도 1b), 티올기가 메틸화된 비스(메틸티오)글리오톡신의 경우 퍼록시다아제 활성이 관찰되지 않았다(도 2g). 후술할 실험에서 A-2는 실제로 PDGF- 및 VEGF-의존적인 세포 증식 및 이동 조절 활성을 나타내지 않는데, 이는 티올기가 노출된 A-2의 상태로 세포 내부로 유입이 불가능하기 때문에 PDGF- 및 VEGF-의존적인 세포증식 및 이동을 조절하는 활성이 없는 것으로 추측되었다. 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.

[0175] **실험예 2: 시험관 내 및 생체 내 세포독성 실험**

[0176] 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 GT 또는 키토신으로 2시간 동안 선처리하고 신선한 배지에 24시간 동안 배양한 수 세포생존력 분석을 수행하였다(도 3 내지 5).

[0177] 그 결과, 혈청-결핍 조건하에서 A-1, A-3 및 GT에 대한 HASMCs와 HAECs의 생존력은 각각 200 nM과 50 nM 이하의 농도에서 보장되었다. 키토신은 상대적으로 독성이 보다 낮은 것으로 밝혀졌다. 고농도에서 두 세포의 낮은 생존력은 NF-κB 억제를 포함한 다양한 부작용으로 여겨진다. 따라서, 본 발명자들은 이하 실험을 위하여 HASMCs와 HAECs에 대한 시험관 내 실험에 안전한 용량인 50 nM과 25 nM 농도의 ETP 화합물을 사용하였다.

[0178] **실험예 3: HASMCs 및 HAECs에서 GT에 의한 PrxⅡ 기능의 대체 효과시험**

[0179] 2-Cys-Prx의 멤버 중에 PrxII 가 혈관평활근세포의 증식 및 이동을 억제하는 반면 혈관내피세포의 증식과 이동을 촉진한다는 사실(Choi et al, 2005, Nature, 435:347-353; Kang DH et al, 2011, Mol Cell., 44: 545-558)에 근거하여 본 발명자들은 ETP 화합물의 PrxII 기능 치환능력을 시험하였다. 이를 위하여 본 발명자들은 대표적인 ETP 화합물로서 GT를 사용하여 RTK 신호전달과 혈관세포 기능에 대한 ETP 화합물의 생물학적 효과를 연구하였다. 먼저, PrxII 녹다운된 HASMCs 및 HAECs에서 GT의 세포 내 과산화수소 제거능력을 시험하였다. 세포의 과산화수소 생성을 산화제-감응 형광 염료(2',7'-디히드로-클로로플루오레신 디아세테이트, H_2DCF-DA)를 사

용하여 모니터하였다. 세포 내 과산화수소 수준은 혈청-결핍 대조 HASMCs에서 PDGF 처리에 의해 약 2배로 증가하였고, PrxII 녹다운과 결합하여 현격히 증가되었다(도 6a). 그러나, GT 처리는 농도-의존적 방식으로 증가된 세포 내 과산화수소 수준을 완전히 상쇄하였다(도 6a). 또한, PrxII 녹다운에 의해 상당히 증가된 HAECs에서의 세포 내 과산화수소 기저 수준 역시 GT 처리에 의해 완전히 제거되었다(도 6b).

[0180] **실험예 4: NOX 활성에 대한 ETP 화합물의 효과**

[0181] Nishida는 GT가 중성구(neutrophil)에서 NADPH 산화제(NOX) 활성을 억제함을 보고하였다[S. Nishida *et al.*, 2005, *Infect. Immun.*, 73: 235]. 따라서 본 발명자들은 이러한 부작용을 배제하고자 혈관세포에서 NOX 활성을 측정하였다. 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 7). 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.

[0182] **실험예 5: 성장인자-유도 신호전달 및 세포증식/이동에서 GT에 의한 PrxII** 기능의 대체 효과

[0183] PDGFRβ- 및 VEGFR2-매개 신호전달 경로에 대한 GT의 조절효과를 시험하였다. HASMCs에서 GT 처리는 PrxII 녹다운에 의해 증가된 PDGF-유도 타이로신 인산화와는 확연히 구분된다(도 8a). 특별히, PDGFRβ와 PLCγ1 활성화 수준을 자극된 대조군 세포의 수준으로 감소시켰다. 이와 달리 HAECs에서 GT 처리는 PrxII 녹다운에 의해 감소되었던 VEGFR2 및 ERK의 VEGF-의존적 활성화를 회복시켰다(도 8b). 나아가 혈관세포 기능에서 GT의 효과를 확인하였다. 증가된 농도의 GT 처리는 PrxII 녹다운에 의해 증가된, PDGF에 반응하는 HASMCs의 증식 및 화학주성 이동을 점차적으로 감소시켰다(도 9a 및 9b). 반대로, HAECs에 대한 동일한 처리는 PrxII 녹다운에 의해 손상되었던 VEGF-유도 증식 및 화학주성 이동을 향상시켰다(도 9c 및 9d).

[0184] 또한, A-1 및 A-3에 대해서도 PDGFRβ- 및 VEGFR2-매개 신호전달 경로에 대한 효과를 상기 GT와 동일하게 확인하였고 대조군으로서 티올기가 노출된 A-2를 사용하였다. 그 결과, A-1 및 A-3는 GT와 마찬가지로 PDGF에 반응하는 HASMCs의 증식 및 화학주성 이동을 점차적으로 감소시켰고(도 10a 및 10b, 도 12a 및 12b), HAECs에 대한 동일한 처리는 PrxII 녹다운에 의해 손상되었던 VEGF-유도 증식 및 화학주성 이동을 향상시켰다(도 10c 및 10d, 도 12c 및 12d). 그러나 대조군인 A-2의 경우 HASMCs와 HAECs 모두에서 유의적인 변화를 일으키지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 11a 내지 11d).

[0185] 낮은 나노몰랄 농도의 A-1, A-3 및 GT가 HASMCs 및 HAECs에서 RTK 신호전달과 세포 기능 조절을 충분히 조절할 수 있다는 사실은 주목할 만하다. 결론적으로 상기 실험결과는 낮은 농도의 A-1, A-3 또는 GT가 PrxII 결여로 손상된 PDGF- 및 VEGF-유도 신호전달을 회복시킬 수 있음을 나타낸다.

[0186] **실험예 6: 풍선-손상 경동맥에 대한 생체 내 실험을 통한 2-Cys-Prx, 특히** PrxⅡ의 과산화 확인

[0187] VSMCs 과다 증식 및 혈관의 재내피화를 모니터할 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 라디컬을 생성하므로, 이웃한 혈관세포의 2-Cys Prx 효소는 술핀산/술폰산에 대한 활성자리 시스틴 잔기($Cys\text{-}SO_{2/3}$)의 과산화에 의해 불활성화된다고 여겨진다. 이러한 가능성을 설명하기 위해, 항-$Prx\text{-}SO_{2/3}$ 항체를 이용하여 풍선-손상 랫트 경동맥의 2-Cys Prx 과산화를 확인하였다. 풍선 손상은 시간에 따라 경동맥의 혈관내막 비후를 유발하고(도 13a), 면역조직화학적 분석은 손상 후 5일과 7일에 내층과 혈관내막층 모두에서 2-Cys Prx가 심하게 과산화함을 나타낸다(도 13b). 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 13c). 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, 경동

맥벽에서 PrxII 발현의 siRNA-매개 녹다운은 풍선 손상으로 유도되는 혈관내막 비후를 악화시킨다(도 14).

[0188] 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 3g 및 15a). 이는 GT가 SMC 과다형성을 억제함을 나타낸다.

[0189] 또한, 대조실험으로 메틸화된 디티올기를 가진 비스(메틸티오)글리오톡신 및 TR 억제제(DNCB 5 μM, 혹은 Auronafin 0.5 μM)를 단독 또는 GT와 혼합하여 처리하고 조직에 대한 HE-염색 이미지를 관찰하였다. 그 결과, 비스(메틸티오)글리오톡신은 비대해진 혈관내막층을 억제하지 못하였으며, TR 억제제들은 모두 GT의 혈관내막 비후 억제작용을 상쇄하는 것을 확인하였다(도 16). 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.

[0190] 이어서, GT가 손상된 혈관벽에서 실질적으로 내피복구를 촉진하는지를 실험하였다. 내피마커 CD31의 면역형광염색은 정상 경동맥혈관과 같이 GT를 처리한 손상 혈관에서 내강과 접한 내피 단층이 형성되는 반면, 대조 손상 경동맥에서는 그렇지 아니함을 확인하였다(도 15b). 또한 α-평활근 액틴(SMA)과의 동시-면역염색은 혈관내막 SMC층 위에 내피층이 덮여있음을 보여주었다.

[0191] 또한, 2-Cys-퍼록시레독신(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 17에 나타나듯이 대조군과 GT 처리군 간에는 표본 데이터상 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 이 결과는 GT가 2-Cys-Prx의 산화를 막는 것이 아니라 과산화후에 세포 내에서 2-Cys-Prx의 기능을 대체하고 있음을 뒷받침하는 결과이다.

[0192] **실험예 7: 혈관 투과도 테스트**

[0193] 에반스 블루 유입으로 회복된 내피의 투과성을 시험하였다. 풍선 손상에 의한 내피 박리는 투과도 조절능력의 완전한 상실을 유발한다. 반면, 손상되지 않은 곁경동맥은 정상 내피의 온전한 장막기능을 갖는다(도 18a). 풍선 손상된 경동맥에 대한 GT 처리는 대조군(DMSO) 처리한 손상된 경동맥에 비해 약 2/3정도 감소된 에반스 블루 유입을 보인다. 보다 확실히 하기 위해, VEGFR2 키나아제-특이적 억제제로 처리하였을 때, GT에 의해 유도된 내피 기능 회복은 차단된다. 이는 GT의 효과가 PrxII의 과산화에 의해 유도되는 산화적 불활성화로부터 VEGFR2 기능을 보호한다는 것을 제시한다. 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 18b). 결과적으로 GT 처리에 의해 회복된 내피는 기능적으로나 구조적으로 온전하며 따라서 혈관 투과성을 조절하기에 충분한 것을 알 수 있었다.

[0194] **실험예 8: 키토신과 키토민 및 다른 항산화 화합물의 효과**

[0195] 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 19a 및 19b). 반면, 동일한 처리는 PrxII 녹다운에 의해 손상된 HAECs의 VEGF-유도 증식 및 화학주성 이동을 눈에 띄게 향상시켰다(도 19c 및 19d). 실험예 2에서 언급한 바와 같이 키토신은 GT보다 세포 독성이 낮으므로, VASMCs 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 20a 및 20c). 이는 GT와 더불어 키토신도 VSMCs 및 VECs에 대해 상반된 조절자로 작용함을 나타낸다. 키토민 또한 손상된 동맥벽의 회복에서 유사한 효과를 나타내었다(도 20b 및 20d). 결론적으로 ETP 계열의 화합물들은 혈관손상 회복을 위한 이상적인 치료제로 작용할 수 있음을 확인하였다.

[0196] 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 21에 나타내었다. siRNA를 주입하여 PrxII를 녹다운시킨 HAECs에 도면에 표시된 농도로 각각

의 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 활성에 기인하며, 추가적으로 디티오케토피페라진 고리의 특별한 화학적 특성에 기인한다는 결론에 이르렀다.

[0197] **실험예 9: PrxII 결핍 혈관세포 및 마우스에 대한 GT의 영향 확인**

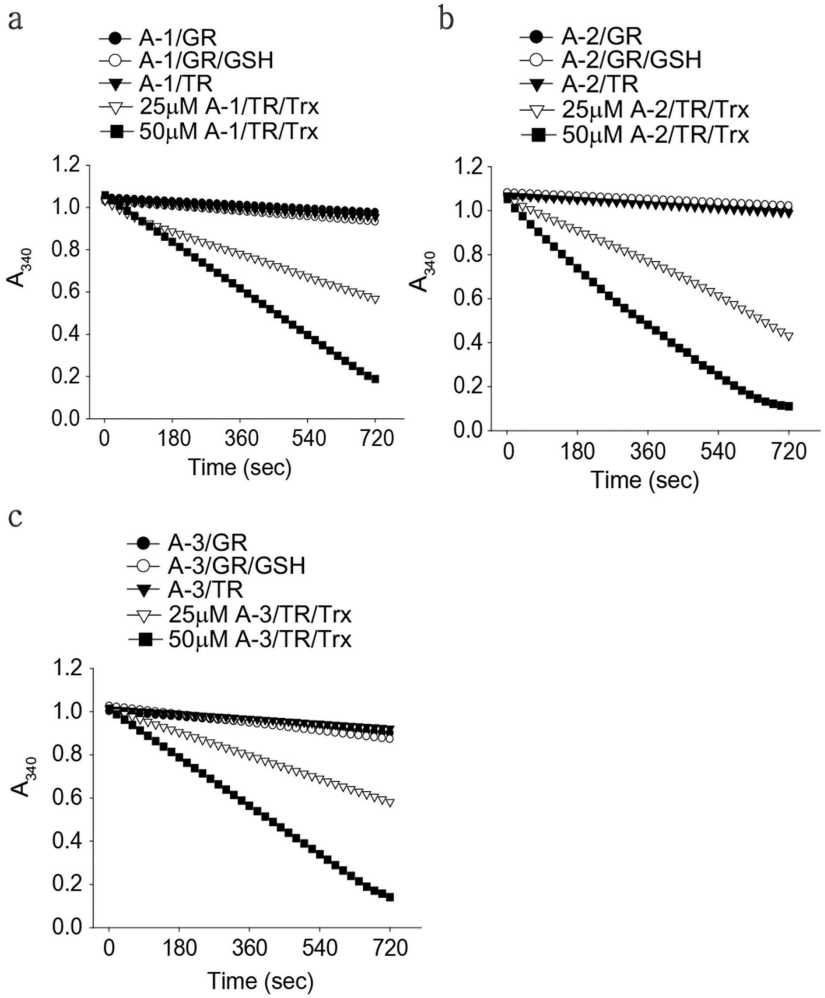
[0198] 정상 마우스와 PrxII-/- 마우스에서 대동맥 혈관평활근(A)과 혈관내피세포(B)를 분리하여 배양하고 GT를 처리하거나 처리하지 않고, PDGF-BB 및 VEGF-A를 각각 10분간 처리하였다. PDGFRβ, PLCγ1, VEGFR2 및 ERK의 활성화를 각각 단백질에 대한 인산화-특이 결합 항체를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 22의 A 및 B에 나타나듯이 Prx-/- 마우스에서 분리된 혈관평활근세포(VSMC, vascular smooth muscle cell) 및 혈관내피세포(VEC, vascular endothelial cell)에서 각각 PDGF 신호전달과 VEGF 신호전달에 GT가 미치는 상반된 조절 효과를 확인할 수 있었다.

[0199] 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 적셔 혈관외피 표면에 30분간 부착하여 조직에 스며들게 하였다. 마우스는 손상 후 10일째에 회복되었다. 결과는 HE-염색 경동맥 시료로부터 측정된 내막 대 중간막 비율을 평균 +- 표준오차로 나타내었다(군당 n=8, *p<0.01). 그 결과, 도 22의 C에 나타나듯이 GT는 혈관 비대화를 현저하게 감소시키는 것을 알 수 있었다.

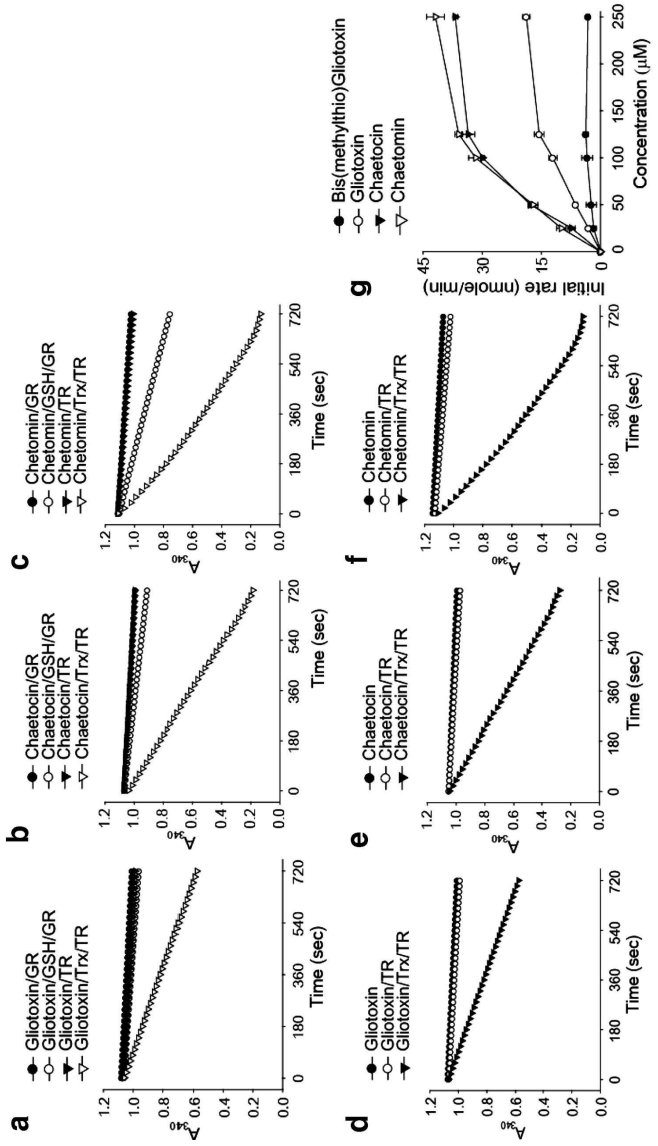
[0200] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

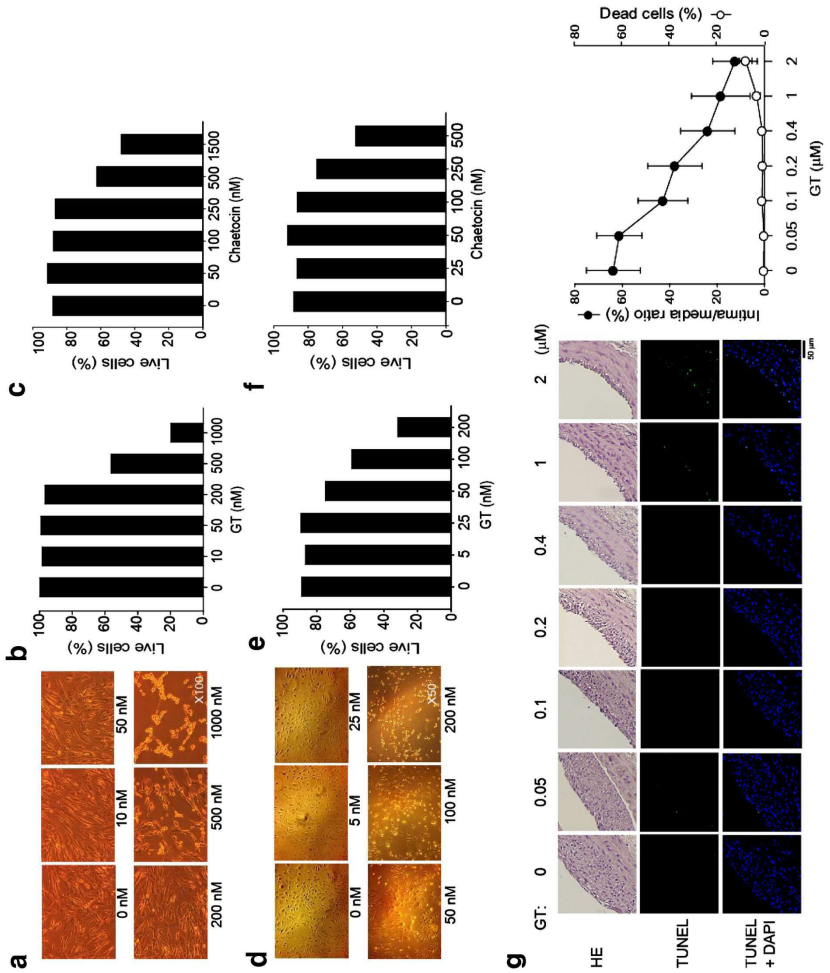
도면1


a
A-1/GR
A-1/GR/GSH
A-1/TR
25μM A-1/TR/Trx
50μM A-1/TR/Trx
A340
Time (sec)
b
A-2/GR
A-2/GR/GSH
A-2/TR
25μM A-2/TR/Trx
50μM A-2/TR/Trx
A340
Time (sec)
c
A-3/GR
A-3/GR/GSH
A-3/TR
25μM A-3/TR/Trx
50μM A-3/TR/Trx
A340
Time (sec)

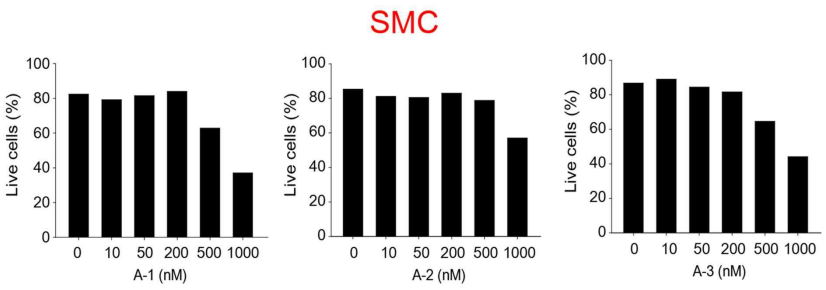
도면2


a
Gliotoxin/GR
Gliotoxin/GSH/GR
Gliotoxin/TR
Gliotoxin/Trx/TR
b
Chaetocin/GR
Chaetocin/GSH/GR
Chaetocin/TR
Chaetocin/Trx/TR
c
Chetomin/GR
Chetomin/GSH/GR
Chetomin/TR
Chetomin/Trx/TR
d
Gliotoxin
Gliotoxin/TR
Gliotoxin/Trx/TR
e
Chaetocin
Chaetocin/TR
Chaetocin/Trx/TR
f
Chetomin
Chetomin/TR
Chetomin/Trx/TR
g
Bis(methylthio)Gliotoxin
Gliotoxin
Chaetocin
Chaetomin
A340
Time (sec)
Initial rate (nmole/min)
Concentration (μM)

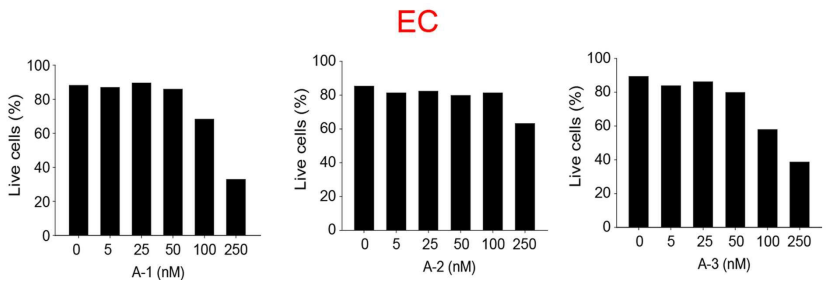
도면3


a
b
c
d
e
f
g
Live cells (%)
Chaetocin (nM)
GT (nM)
Dead cells (%)
Intima/media ratio (%)
GT (μM)
HE
TUNEL
TUNEL + DAPI
GT:
0 nM
10 nM
50 nM
200 nM
500 nM
1000 nM
5 nM
25 nM
100 nM

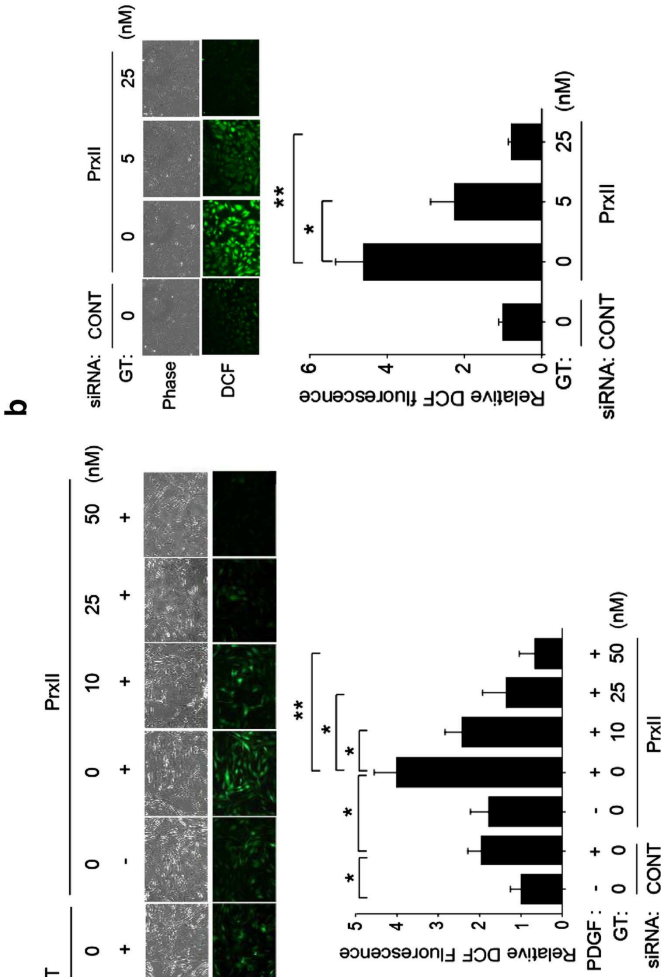
도면4


SMC
Live cells (%)
A-1 (nM)
A-2 (nM)
A-3 (nM)

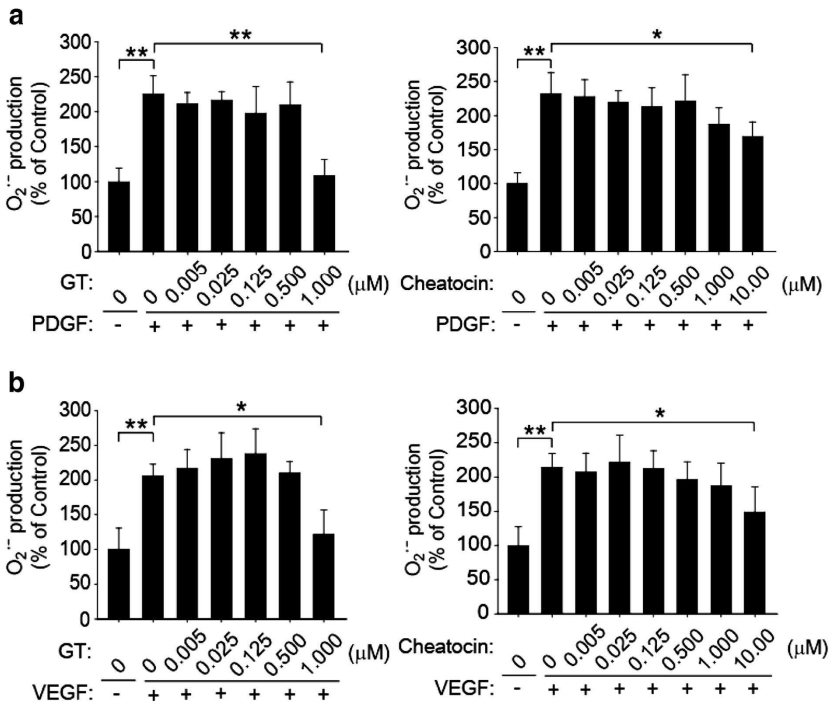
도면5


EC
Live cells (%)
A-1 (nM)
A-2 (nM)
A-3 (nM)

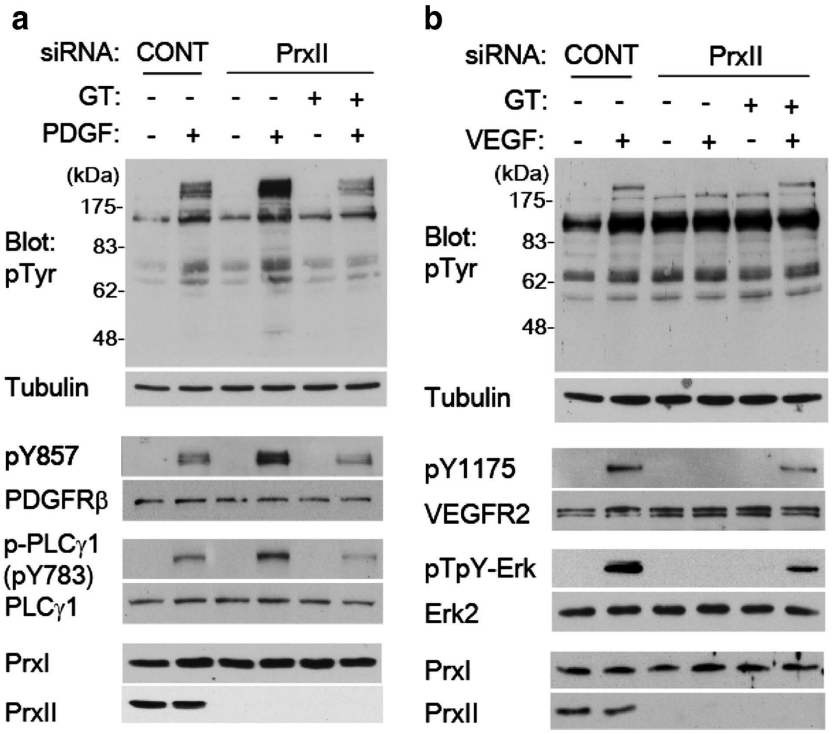
도면6


a
siRNA: CONT PrxII
GT: 0 0 0 0 0 0 (nM)
PDGF: - + - + + +
Phase
DCF
Relative DCF Fluorescence
PDGF: - + - + + +
GT: 0 0 0 0 0 0 (nM)
siRNA: CONT PrxII
b
siRNA: CONT PrxII
GT: 0 0 0 5 25 (nM)
Phase
DCF
Relative DCF fluorescence
GT: 0 0 0 5 25 (nM)
siRNA: CONT PrxII

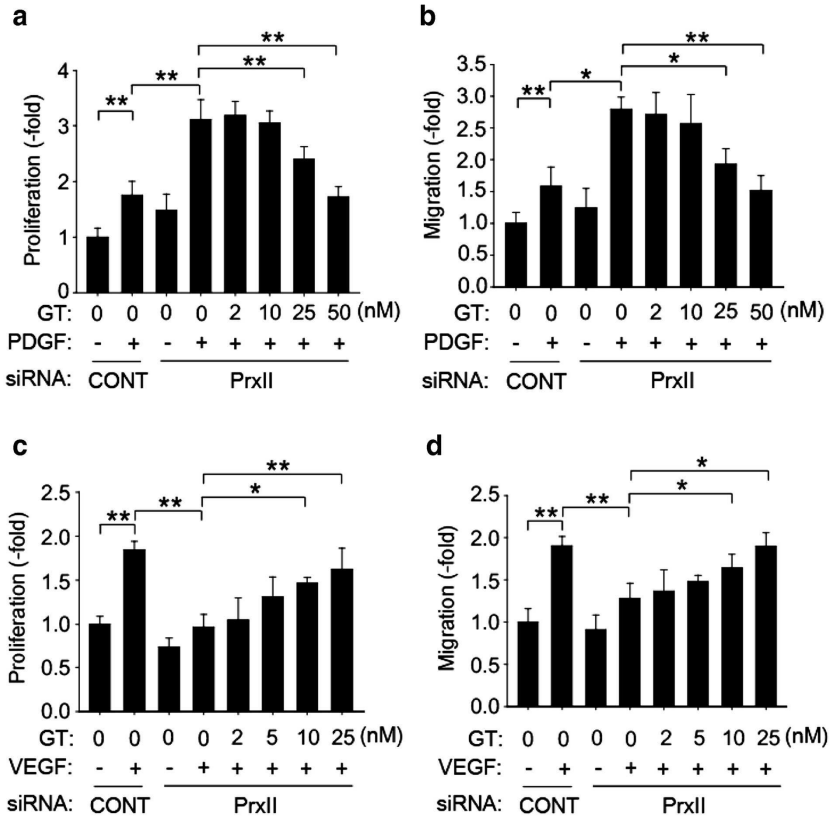
도면7


a
b
$O_2^{\cdot-}$ production (% of Control)
GT:
Cheatocin:
PDGF:
VEGF:
(μM)
0
0.005
0.025
0.125
0.500
1.000
10.00

도면8

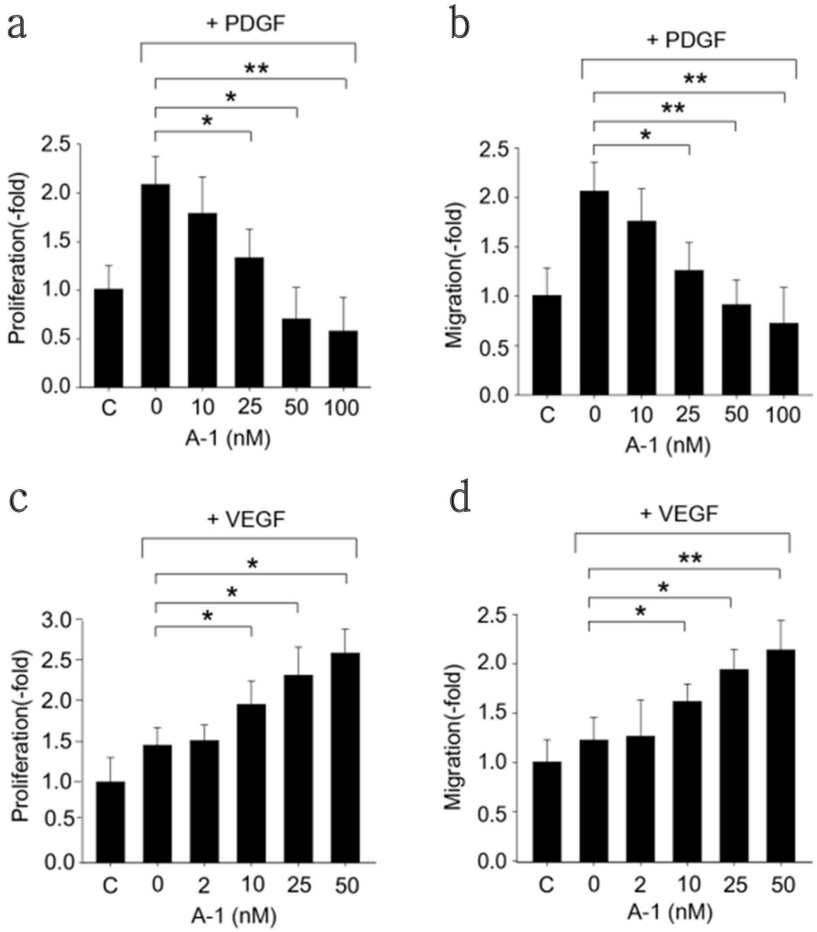

a
b
siRNA: CONT PrxII
GT:
PDGF:
VEGF:
(kDa)
175-
83-
62-
48-
Blot: pTyr
Tubulin
pY857
PDGFRβ
p-PLCγ1 (pY783)
PLCγ1
pY1175
VEGFR2
pTpY-Erk
Erk2
PrxI
PrxII

도면9


a
Proliferation (-fold)
GT: 0 0 0 0 2 10 25 50 (nM)
PDGF: - + - + + + + +
siRNA: CONT PrxII
b
Migration (-fold)
GT: 0 0 0 0 2 10 25 50 (nM)
PDGF: - + - + + + + +
siRNA: CONT PrxII
c
Proliferation (-fold)
GT: 0 0 0 0 2 5 10 25 (nM)
VEGF: - + - + + + + +
siRNA: CONT PrxII
d
Migration (-fold)
GT: 0 0 0 0 2 5 10 25 (nM)
VEGF: - + - + + + + +
siRNA: CONT PrxII

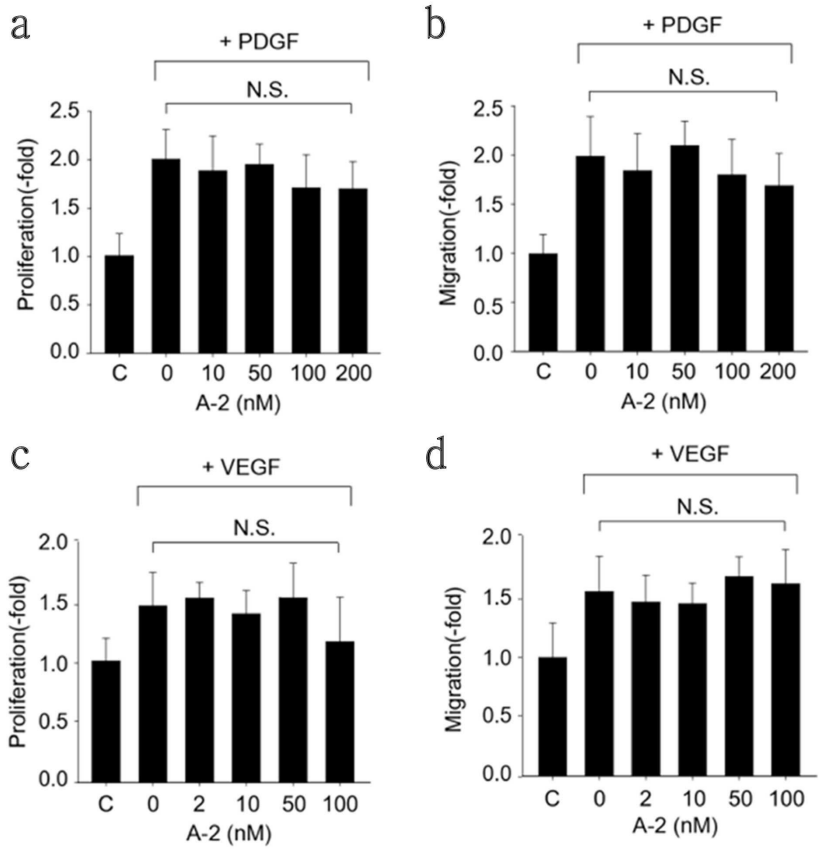
도면10

A-1


a
+ PDGF
**
*
*
Proliferation(-fold)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C
0
10
25
50
100
A-1 (nM)
b
+ PDGF
**
**
*
Migration(-fold)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C
0
10
25
50
100
A-1 (nM)
c
+ VEGF
*
*
*
Proliferation(-fold)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C
0
2
10
25
50
A-1 (nM)
d
+ VEGF
**
*
*
Migration(-fold)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C
0
2
10
25
50
A-1 (nM)

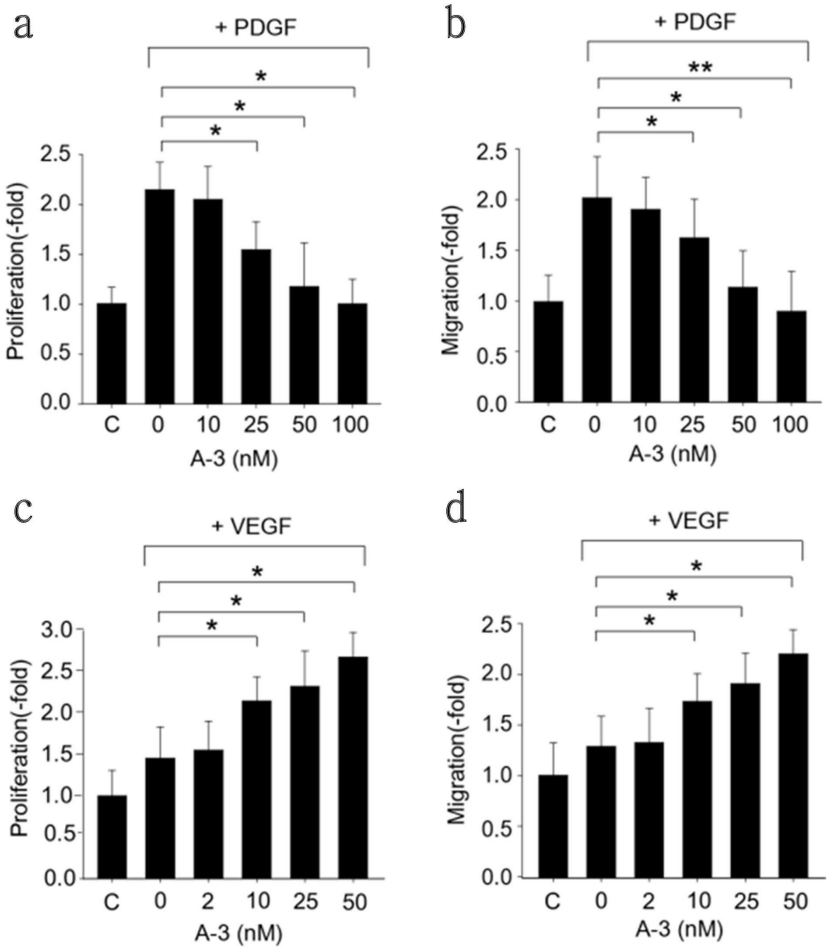
도면11

A-2

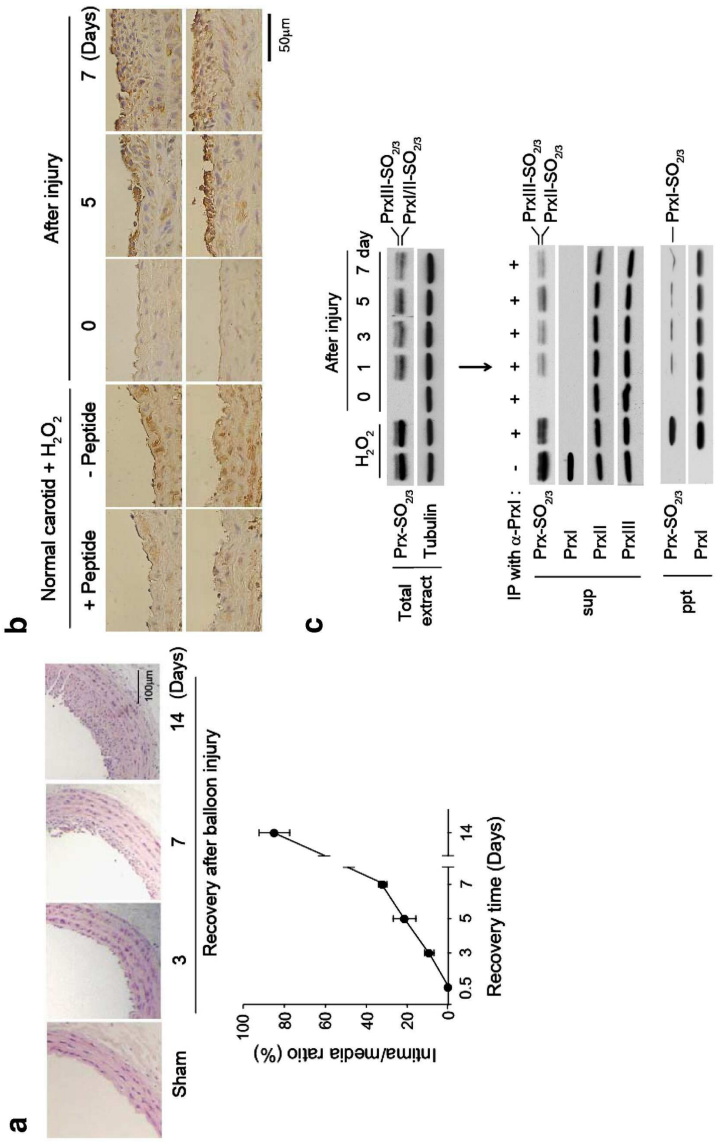

a
+ PDGF
N.S.
Proliferation(-fold)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C 0 10 50 100 200
A-2 (nM)
b
+ PDGF
N.S.
Migration(-fold)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C 0 10 50 100 200
A-2 (nM)
c
+ VEGF
N.S.
Proliferation(-fold)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C 0 2 10 50 100
A-2 (nM)
d
+ VEGF
N.S.
Migration(-fold)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C 0 2 10 50 100
A-2 (nM)

도면12

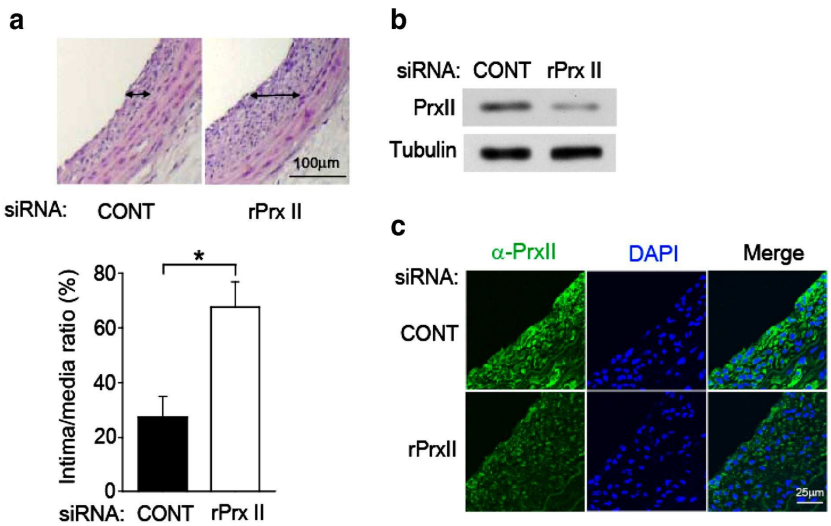
A-3


a
+ PDGF
Proliferation(-fold)
C 0 10 25 50 100
A-3 (nM)
b
+ PDGF
Migration(-fold)
C 0 10 25 50 100
A-3 (nM)
c
+ VEGF
Proliferation(-fold)
C 0 2 10 25 50
A-3 (nM)
d
+ VEGF
Migration(-fold)
C 0 2 10 25 50
A-3 (nM)

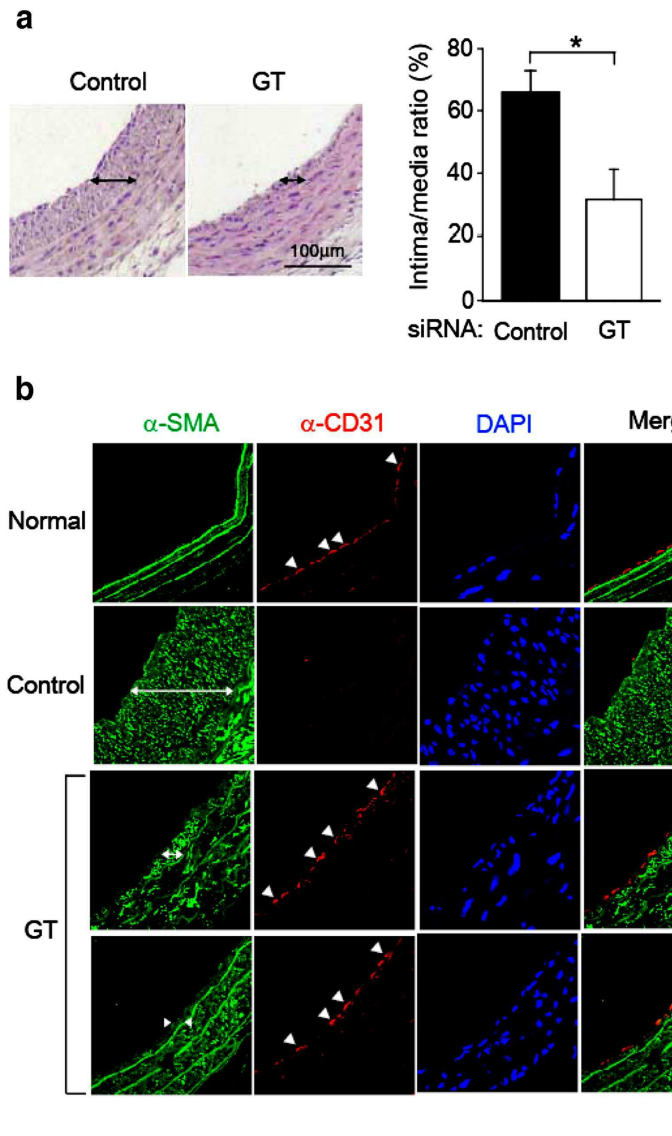
도면13


a
Sham
3
7
14 (Days)
Recovery after balloon injury
100μm
Intima/media ratio (%)
Recovery time (Days)
b
Normal carotid + H_2O_2
+ Peptide
- Peptide
After injury
0
5
7 (Days)
50μm
c
H_2O_2
After injury
0 1 3 5 7 day
$Prx-SO_{2/3}$
Tubulin
Total extract
$PrxIII-SO_{2/3}$
$PrxI/II-SO_{2/3}$
IP with α-PrxI :
PrxI
PrxII
PrxIII
sup
ppt
$PrxI-SO_{2/3}$

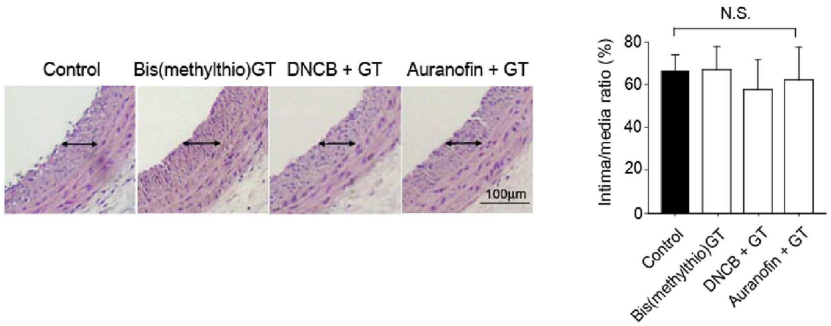
도면14


a
100μm
siRNA: CONT rPrx II
Intima/media ratio (%)
*
b
siRNA: CONT rPrx II
PrxII
Tubulin
c
α-PrxII
DAPI
Merge
siRNA:
CONT
rPrxII
25μm

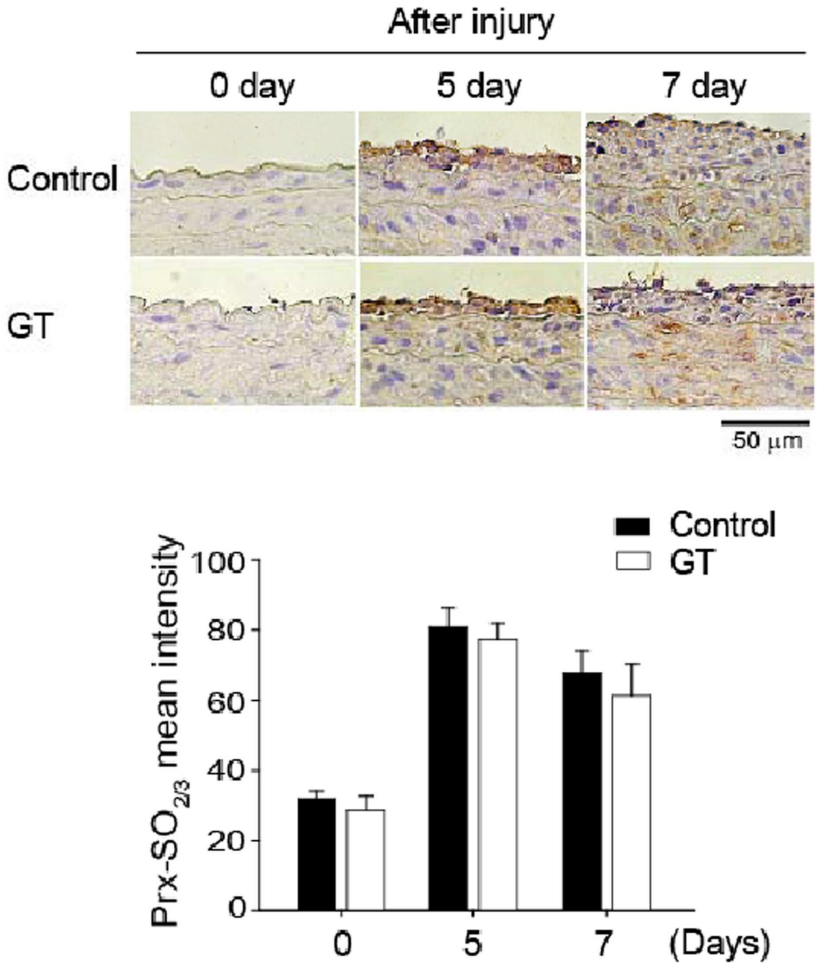
도면15


a
Control
GT
100μm
Intima/media ratio (%)
80
60
40
20
0
*
siRNA: Control
GT
b
α-SMA
α-CD31
DAPI
Merge
Normal
Control
GT
25μm

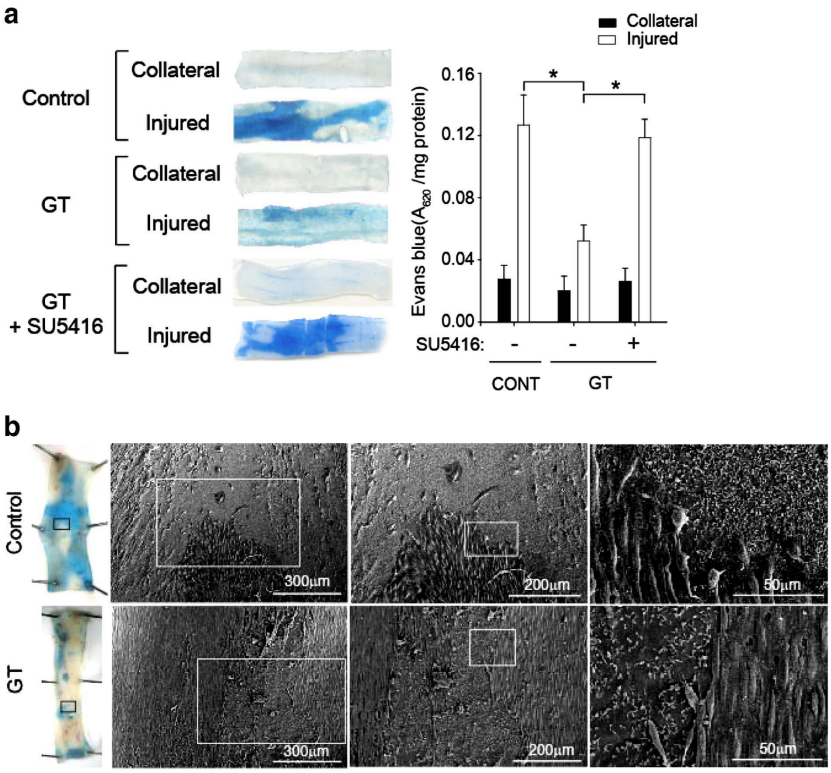
도면16


Control
Bis(methylthio)GT
DNCB + GT
Auranofin + GT
100μm
N.S.
Intima/media ratio (%)
80
60
40
20
0
Control
Bis(methylthio)GT
DNCB + GT
Auranofin + GT

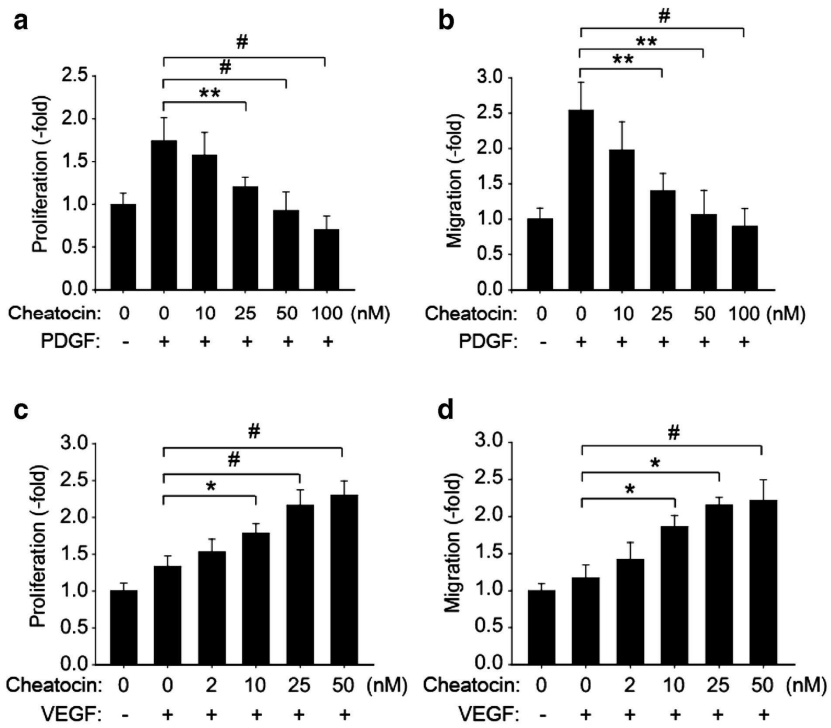
도면17


After injury
0 day
5 day
7 day
Control
GT
50 μm
Control
GT
Prx-SO2/3 mean intensity
100
80
60
40
20
0
0
5
7
(Days)

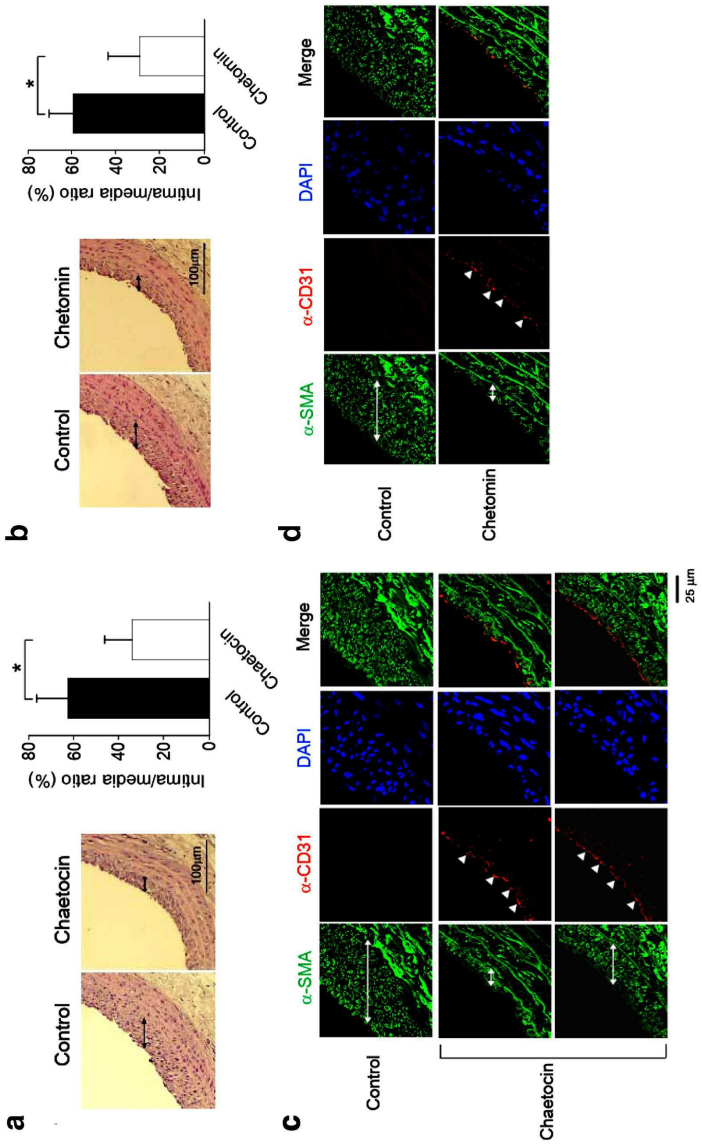
도면18


a
Control
Collateral
Injured
GT
Collateral
Injured
GT
+ SU5416
Collateral
Injured
Collateral
Injured
Evans blue(A620 /mg protein)
0.16
0.12
0.08
0.04
0.00
*
*
SU5416: - - +
CONT
GT
b
Control
GT
300μm
200μm
50μm
300μm
200μm
50μm

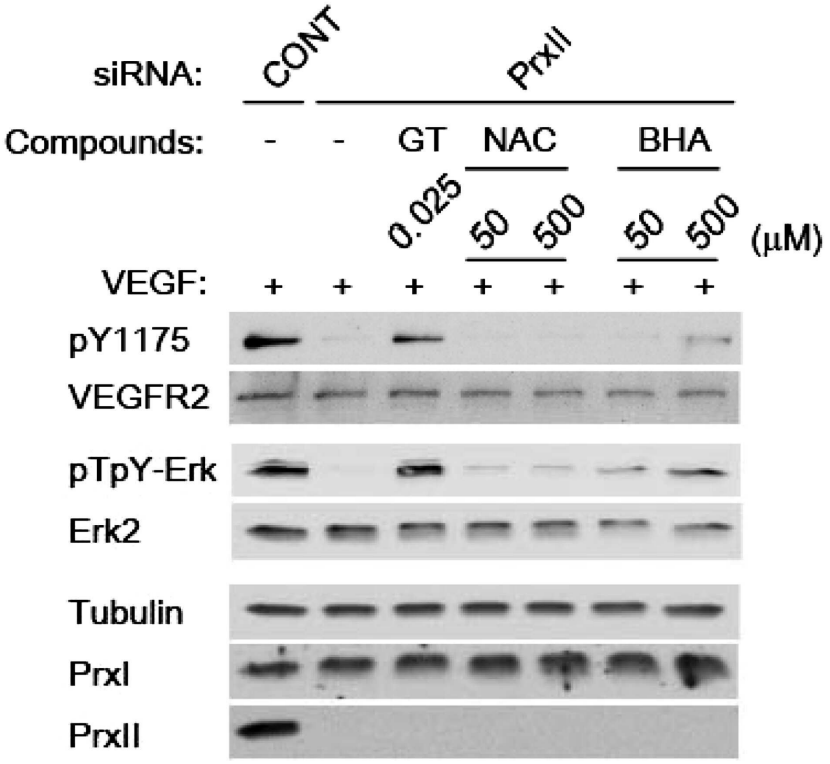
도면19


a
Proliferation (-fold)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
#
#
**
Cheatocin: 0 0 10 25 50 100 (nM)
PDGF: - + + + + +
b
Migration (-fold)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
#
**
**
Cheatocin: 0 0 10 25 50 100 (nM)
PDGF: - + + + + +
c
Proliferation (-fold)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
#
#
*
Cheatocin: 0 0 2 10 25 50 (nM)
VEGF: - + + + + +
d
Migration (-fold)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
#
*
*
Cheatocin: 0 0 2 10 25 50 (nM)
VEGF: - + + + + +

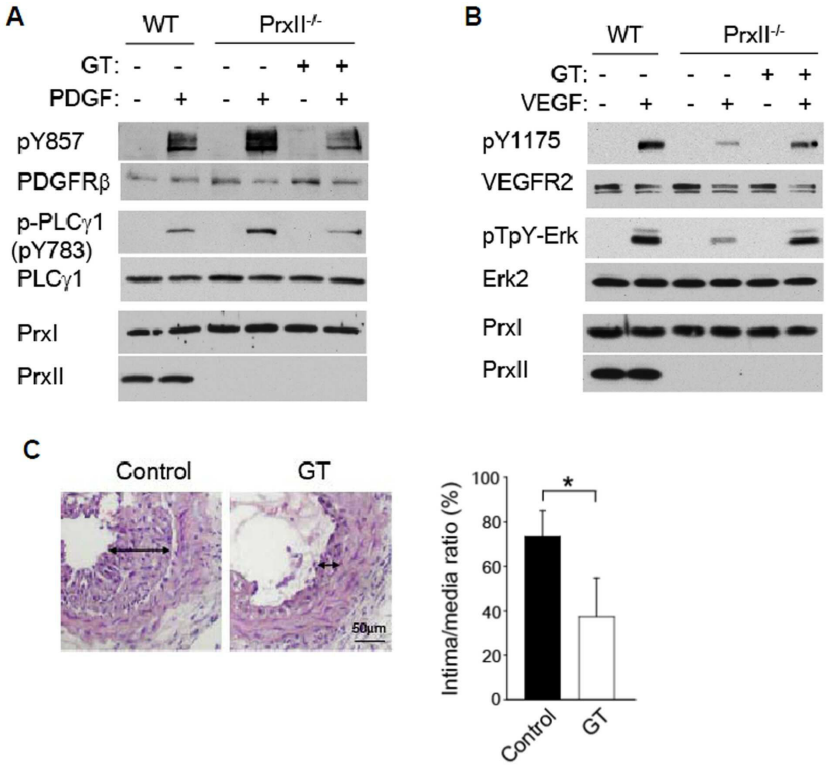
도면20


a
Control
Chaetocin
100μm
Intima/media ratio (%)
0
20
40
60
80
Control
Chaetocin
*
b
Control
Chetomin
100μm
Intima/media ratio (%)
0
20
40
60
80
Control
Chetomin
*
c
α-SMA
α-CD31
DAPI
Merge
Control
Chaetocin
25 μm
d
α-SMA
α-CD31
DAPI
Merge
Control
Chetomin

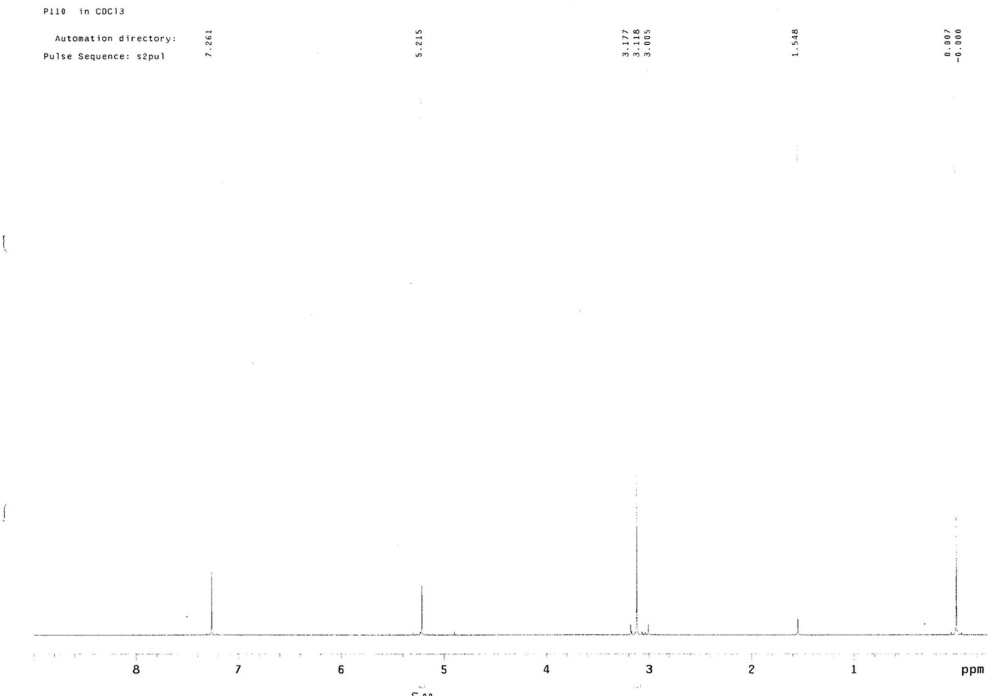
도면21


siRNA:
CONT
PrxII
Compounds:
-
-
GT
NAC
BHA
0.025
50
500
50
500
(μM)
VEGF:
+
+
+
+
+
+
+
pY1175
VEGFR2
pTpY-Erk
Erk2
Tubulin
PrxI
PrxII

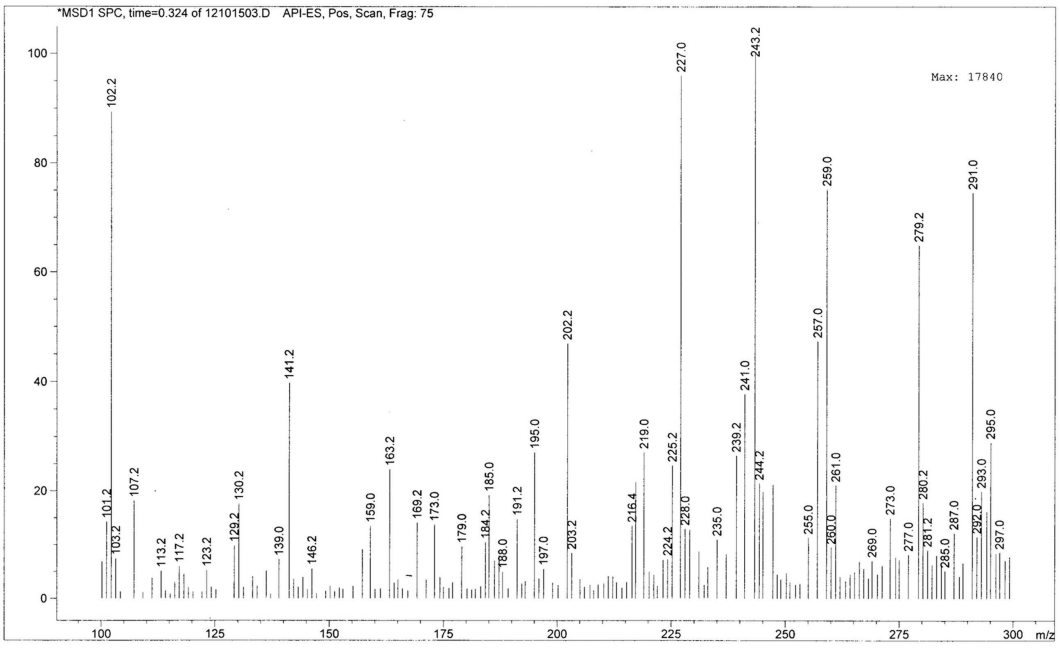
도면22


A
WT
PrxII-/-
GT:
PDGF:
pY857
PDGFRβ
p-PLCγ1
(pY783)
PLCγ1
PrxI
PrxII
B
WT
PrxII-/-
GT:
VEGF:
pY1175
VEGFR2
pTpY-Erk
Erk2
PrxI
PrxII
C
Control
GT
50μm
Intima/media ratio (%)
100
80
60
40
20
0
*
Control
GT

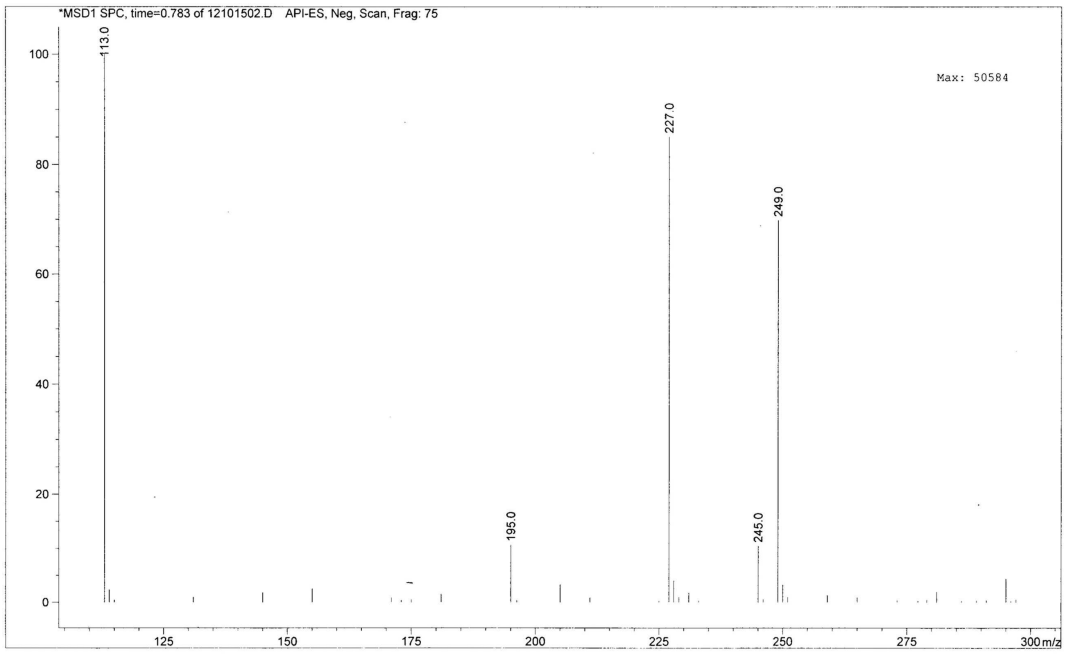
도면23


P110 in CDCl3
Automation directory:
Pulse Sequence: s2pul
7.261
5.215
3.177
3.118
3.005
1.548
0.007
-0.000
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

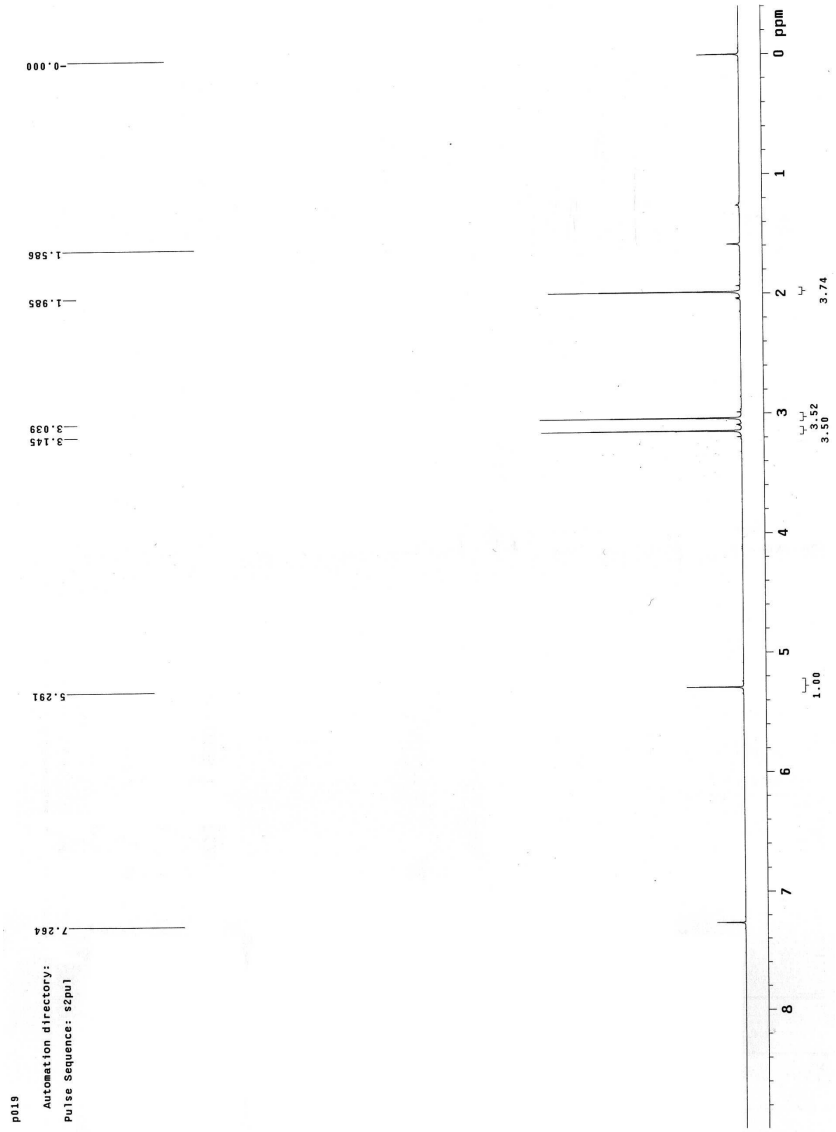
도면24


*MSD1 SPC, time=0.324 of 12101503.D API-ES, Pos, Scan, Frag: 75
Max: 17840
m/z

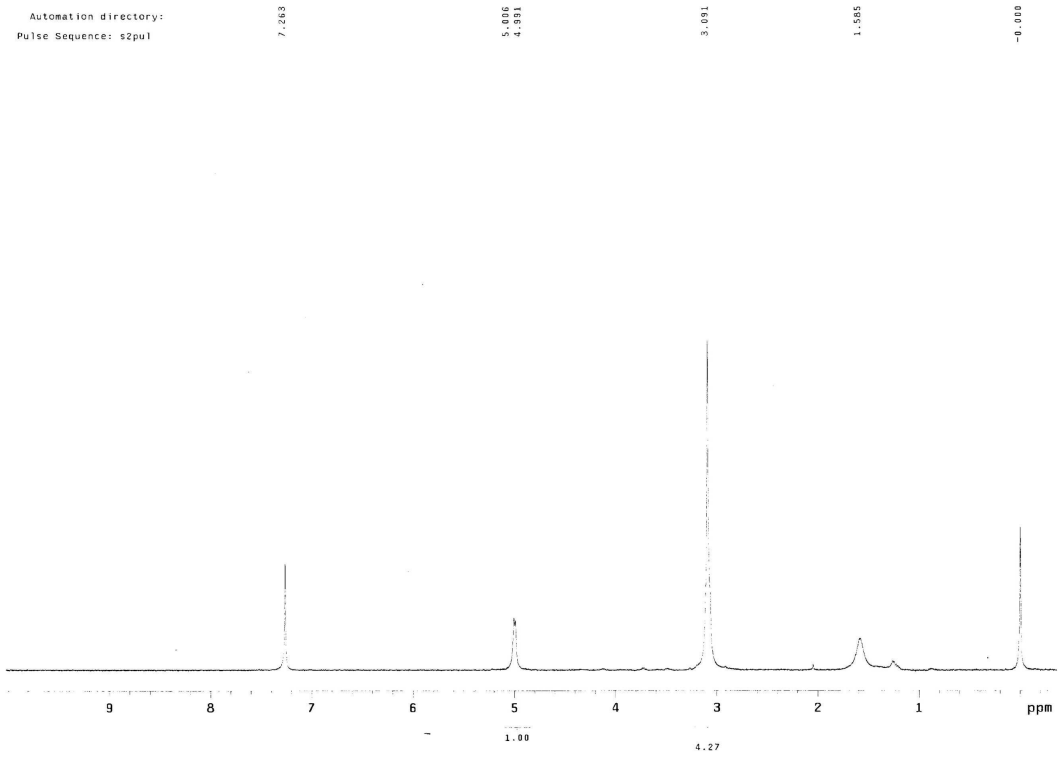
도면25


*MSD1 SPC, time=0.783 of 12101502.D API-ES, Neg, Scan, Frag: 75
Max: 50584
113.0
195.0
227.0
245.0
249.0
100
80
60
40
20
0
125
150
175
200
225
250
275
300 m/z

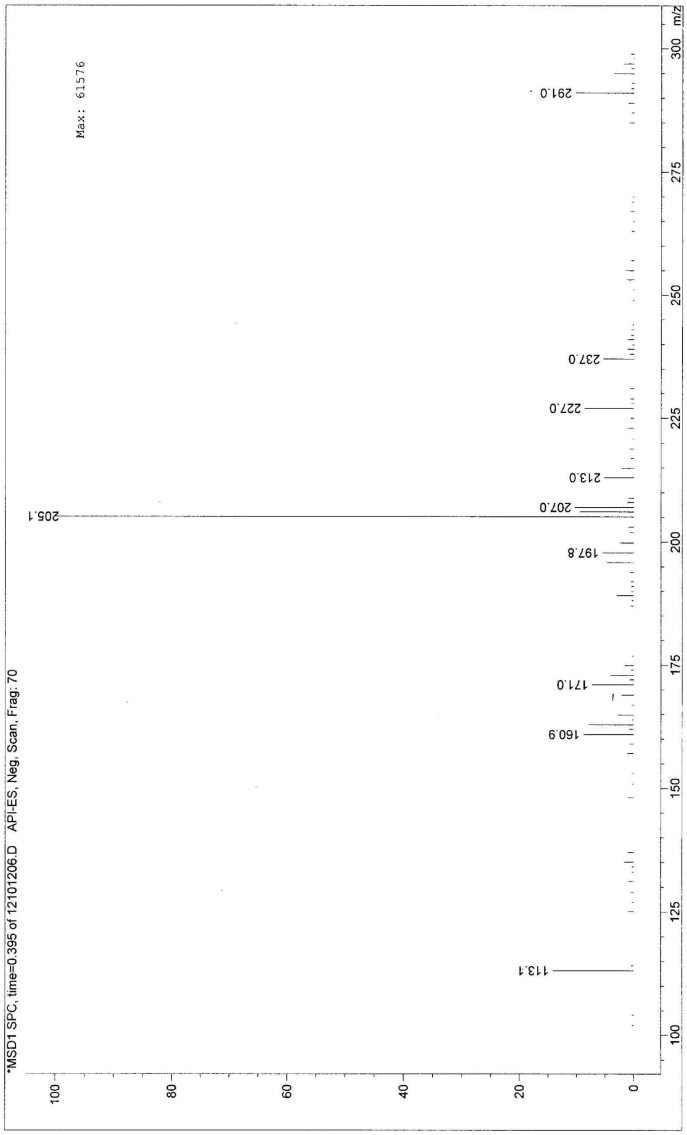
도면26


0.000
1.586
1.985
3.039
3.145
5.291
7.264
p019
Automation directory:
Pulse Sequence: s2pul
0 ppm
1
2
3
4
5
6
7
8
3.74
3.52
3.50
1.00

도면27


Automation directory:
Pulse Sequence: s2pul
7.263
5.006
4.991
3.091
1.585
-0.000
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
1.00
4.27

도면28



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Pharmaceutical composition for preventing or treating restenosis comprising epidithiodioxopiperazine compound or its derivative; or pharmaceutically acceptable salt thereof

<130> PA120707/KR

<150> KR 10-2011-0124603

<151> 2011-11-25

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PrxII-1

<400> 1

cgcuugucug aggauuacgu u 21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PrxII-2

<400> 2

aggaauauuu cuccaaacau u 21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 3

gcaacgcgca caucggaaau u 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 4

gaucacaguc aacgaccuau u 21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 5

agaauuacgg cguguugaau u 21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 6

acgcugagga cuuccgaaau u 21