



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0094819
(43) 공개일자 2019년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 311/22 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 311/22 (2013.01)

A61K 31/352 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0014410

(22) 출원일자 2018년02월06일

심사청구일자 2018년02월06일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

전종갑

강원도 춘천시 한림대학길 1, 화학과 (옥천동, 한림대학교)

공가라 다모다르

강원도 춘천시 한림대학길 1 (옥천동) 한림대학교 화학과

(74) 대리인

강성혜

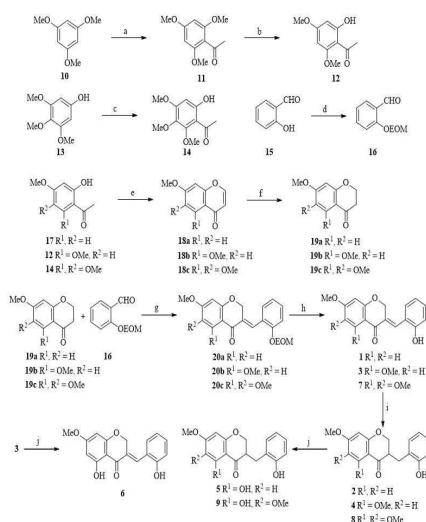
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 포르툴라카는 화합물과 그 유도체 합성방법 및 이를 포함하는 항염증 약학 조성물

(57) 요약

본 발명자들은 공지된 포르툴라카는 유도체 (화합물 1 및 2)를 비롯하여 *Portulaca oleracea* L (POL)로부터 분리된 천연 호모이소플라보노이드 (±)-포르툴라카는 A-C (화합물 4,8,9) 및 과 그 유도체들 (화합물 3, 5 및 7)을 합성하였다. LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 NO 생성을 억제하는 능력을 항염증 활성의 지표로 평가하였다. 시험된 모든 화합물은 명확한 세포독성을 나타내지 않았으며, RAW 264.7 대식세포에서 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였다. 화합물 3 (10 µM에서 97.2% 저해; IC₅₀ = 1.26 µM)은 화합물 1 (10 µM에서 91.4% 저해; IC₅₀ = 1.75 µM) 및 화합물 7 (10 µM에서 83.0% 저해; IC₅₀ = 2.91 µM)과 비교하여 상당한 억제효과를 나타냈다. 본 발명의 화합물들은 NO 생산 표적 항염증 약물 개발에 유용하다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

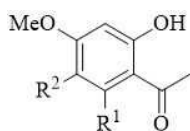
(가) 화학식 12로 표시되는 화합물 17, 화합물 12 및 화합물 14를 DMF-DMA (*N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal)로 축합한 후, 생성된 상응하는 아미노케톤 화합물을 각각 산 처리하여 화학식 18로 표시되는 상응하는 4*H*-크로멘-4-온 (4*H*-chromen-4-ones) 화합물 18a, 18b, 18c를 각각 얻는 단계;

(나) 상기 4*H*-크로멘-4-온 (4*H*-chromen-4-ones) 화합물 18a, 18b 및 18c를 촉매 Pd/C를 이용하여 수소화하여 화학식 19로 표시되는 상응하는 크로만-4-온 (chroman-4-ones) 화합물 19a, 19b, 19c를 각각 얻는 단계;

(다) 상기 크로만-4-온 (chroman-4-ones) 화합물 19a, 19b, 19c에 EtOH/H₂O (5/1), KOH, 화학식 16으로 표시되는 화합물 16를 가하여 응축반응하여 화학식 20으로 표시되는 상응하는 화합물 20a, 20b, 20c를 각각 얻는 단계; 및

(라) 1*N* HCl을 사용하여 상기 화합물 20a, 20b, 20c를 탈보호기화하여 화학식 1로 표시되는 상응하는 화합물 1, 3 및 7을 각각 얻는 단계;를 포함하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법.

<화학식 12>

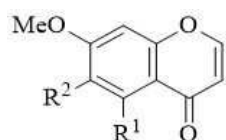


(단, 화합물 17: $R^1, R^2 = H$,

화합물 12: $R^1 = OMe, R^2 = H$,

화합물 14: $R^1, R^2 = OMe$)

<화학식 18>

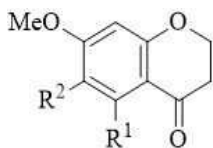


(단, 화합물 18a: $R^1, R^2 = H$,

화합물 18b: $R^1 = OMe, R^2 = H$,

화합물 18c: $R^1, R^2 = OMe$)

<화학식 19>

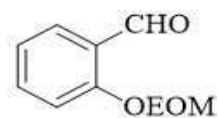


(단, 화합물 19a: $R^1, R^2 = H$,

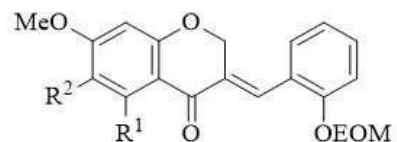
화합물 19b: $R^1 = OMe, R^2 = H$,

화합물 19c: $R^1, R^2 = \text{OMe}$)

<화학식 16>



<화학식 20>

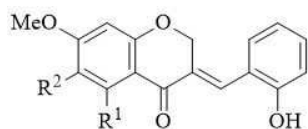


(단, 화합물 20a: $R^1, R^2 = \text{H}$,

화합물 20b: $R^1 = \text{OMe}, R^2 = \text{H}$,

화합물 20c: $R^1, R^2 = \text{OMe}$)

<화학식 1>



(단, 화합물 1: $R^1, R^2 = \text{H}$,

화합물 3: $R^1 = \text{OMe}, R^2 = \text{H}$,

화합물 7: $R^1, R^2 = \text{OMe}$)

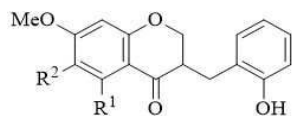
청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 (라) 단계 이후

(마) 상기 화합물 1, 3 및 7을 Pd/C 촉매를 이용하여 수소화 반응하여 화학식 2로 표시되는 상응하는 호모이소플라보노이드 화합물 2, 4 및 8을 각각 얻는 단계;가 더 부가되는 것을 특징으로 하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법.

<화학식 2>



(단, 화합물 2: $R^1, R^2 = \text{H}$,

화합물 4: $R^1 = \text{OMe}, R^2 = \text{H}$,

화합물 8: $R^1, R^2 = OMe$)

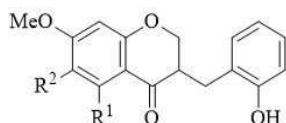
청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 (마) 단계 이후

(바) 상기 화합물 2 및 8을 1.0M BCl_3 를 사용하여 CH_2Cl_2 내에서 선택적 오르쏘-탈메틸화 반응으로 화학식 5로 표시되는 상응하는 화합물 5 및 9를 각각 얻는 단계;가 더 부가되는 것을 특징으로 하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법.

<화학식 5>



(단, 화합물 5: $R^1 = OH, R^2 = H$,

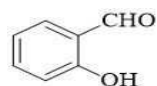
화합물 9: $R^1 = OH, R^2 = OMe$)

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 화합물 16은 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 TBAI(tetrabutylammonium iodide)를 이용하여 화학식 15로 표시되는 살리실알데하이드를 에톡시메틸 보호기화하여 생성됨을 특징으로 하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법.

<화학식 15>

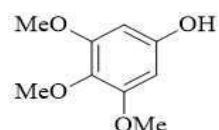


청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 화합물 14는 화학식 13으로 표시되는 화합물 13에 Ac_2O, Et_3N, CH_2Cl_2 를 가하여 상온에서 아세틸화하는 반응 및 $BF_3 \cdot Et_2O, AcOH$ 를 가하여 후속적인 재배열 반응으로 생성됨을 특징으로 하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법.

<화학식 13>



청구항 6

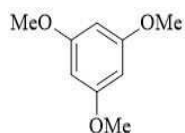
청구항 1에 있어서,

상기 화합물 12는

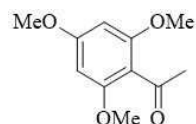
(ㄱ) 화학식 10으로 표시되는 1,3,5-트리메톡시벤젠을 삼불화붕소다이에틸에테레이트 (boron trifluoride diethyl etherate)의 존재하에 아세트산 무수물로 처리하여 프리델-크라프트 아실화 (Friedel-Crafts acylation) 반응으로 화학식 11로 표시되는 화합물 11을 얻는 단계; 및

(ㄴ) 상기 화합물 11에 AlCl_3 를 가하여 환류하여 선택적 오르쏘-탈메틸화 (*ortho*-demethylation) 반응으로 화합물 12를 얻는 단계;를 거쳐 생성됨을 특징으로 하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법.

<화학식 10>



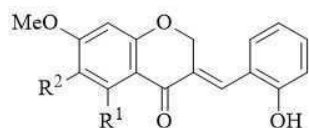
<화학식 11>



청구항 7

화학식 1로 표시되는 포르톨라카논 유도체 화합물 1, 3, 7 및 화학식 2로 표시되는 포르톨라카논 유도체 화합물 2, 포르톨라카논 A, 포르톨라카논 B, 화학식 5로 표시되는 포르톨라카논 유도체 화합물 5 및 포르톨라카논 C 중 선택된 한 가지 이상을 포함하는 항염증 약학 조성물.

<화학식 1>

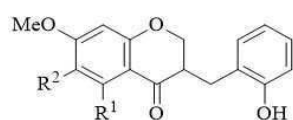


(단, 화합물 1: $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{H}$,

화합물 3: $\text{R}^1 = \text{OMe}, \text{R}^2 = \text{H}$,

화합물 7: $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{OMe}$)

<화학식 2>

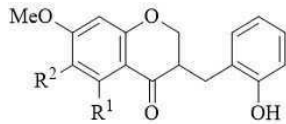


(단, 화합물 2: $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{H}$,

화합물 4: $\text{R}^1 = \text{OMe}, \text{R}^2 = \text{H}$,

화합물 8: $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{OMe}$)

<화학식 5>



(단, 화합물 5: $R^1 = OH$, $R^2 = H$,

화합물 9: $R^1 = OH$, $R^2 = OMe$)

청구항 8

청구항 7에 있어서,

포르톨라카는 유도체 화합물 1, 3 및 7 중 선택된 한 가지 이상을 포함하는 항염증 약학 조성물.

청구항 9

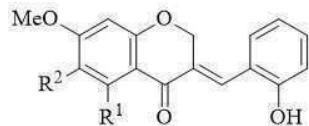
청구항 8에 있어서,

상기 포르톨라카는 유도체 화합물 1, 3 및 7은 IC_{50} 값이 1~3 μM 임을 특징으로 하는 항염증 약학 조성물.

청구항 10

아래 화학식 1로 표시되는 신규한 포르톨라카는 유도체 화합물 3

<화학식 1>

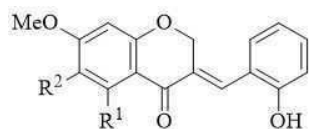


(단, 화합물 3: $R^1 = OMe$, $R^2 = H$)

청구항 11

아래 화학식 1로 표시되는 신규한 포르톨라카는 유도체 화합물 7

<화학식 1>

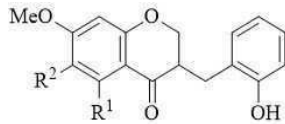


(단, 화합물 7: $R^1, R^2 = OMe$)

청구항 12

아래 화학식 5로 표시되는 신규한 포르톨라카는 유도체 화합물 5

<화학식 5>



(단, 화합물 5: $R^1 = OH$, $R^2 = H$)

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 공지된 포르툴라카는 유도체 (화합물 1 및 2)를 비롯하여 *Portulaca oleracea* L (POL)로부터 분리된 천연 호모이소플라보노이드 화합물인 (±)-포르툴라카는 A-C (화합물 4,8,9) 및 그 유도체들 (화합물 3, 5 및 7)을 합성하는 방법, 그리고, 이를 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 염증은 병원체, 손상된 세포 또는 자극 물질에 의한 감염에 대한 신체 세포/조직의 기본적인 보호 반응이다 (1,2). 염증은 치료 과정의 시작으로 여겨지며 급성 또는 만성 염증으로 나눌 수 있다. 하나는 감염 또는 상해에 대한 숙주의 적응성 방어 메커니즘이며 자체 제한적(self-limiting)인 반면, 다른 하나는 당뇨병, 관절염 및 암을 비롯한 다양한 질환을 유발할 수 있다. 염증 과정 동안 산화질소 (NO), 프로스타글란딘 (PG), 혈관 활성 아민 (히스타민, 세로토닌), 류코트리엔 (LT), 사이토카인 (종양 괴사 인자 및 인터루킨-1, 12)이 혈장 단백질로 분리되거나 비만 세포, 호중구, 혈소판 및 단핵 식세포/대식세포와 같은 세포에서 분비된다. 이런 매개물질들은 세포의 특정 표적 수용체에 결합하여 혈관 투과성을 증가시키고, 평활근 수축을 촉진하며, 호중구 주화성을 촉진하고, 직접적인 효소 활성을 증가하며, 통증을 유도하고/또는 산화성 손상을 중재한다(3).

[0004] 산화질소는 산화질소 합성효소 (내피-NOS, 신경-NOS 및 유도-NOS)에 의해 아미노산 L-아르기닌으로부터 합성되는 중요한 신호전달분자 중 하나이다. 산화질소는 다양한 생리적 및 병리 생리학적 과정을 조절하며 NO의 농도는 염증 발생에서 결정적인 역할을 수행한다(4). 내피-NOS 및 신경-NOS에 의해 생성되는 생리학적 NO 농도가 높으면 세포 생존 및 증식이 촉진되는 반면 유도-NOS에 의해 생성되는 NO 농도가 높으면 세포주기가 정지되고 세포 사멸이 촉진된다(5). 슈퍼 옥사이드와 수산화 라디칼과 같은 활성산소종과 NO의 상호 작용은 NO 농도의 감소로 이어지며, 신호전달 활성을 방해하고, 그 결과 얻어지는 활성 질소종(reactive nitrogen species)은 산화 및 질산화 스트레스 (oxidative and nitrosative stress) 반응을 증가시킬 수 있다(6). 비스테로이드성 항염증제 (non-steroidal anti-inflammatory drugs), 스테로이드 및 항히스타민제는 통증, 염증 및 발열 치료에 일반적으로 선호되지만, 이 약제들은 단점이 있다. 따라서, 염증성 질환에 대한 여러 가지 치료적 개입 중에서 NO 생산 캐스케이드와의 약리학적 간섭이 유망한 전략으로 주장되고 있다.

[0005] 자연적으로 발생하는 플라보노이드 화합물, 특히 호모이소플라보노이드로 알려진 플라보노이드의 서브클래스는 최근 몇 년간 큰 생물학적 잠재력을 보여 주었다(7,8). 종래 연구들은 호모이소플라보노이드의 항산화, 항염증, 항박테리아, 항곰팡이, 항바이러스, 항세포독성, 항돌연변이 및 항당뇨병 활성을 보여준다(8,9). 이 외에도 몇몇 유도체들은 효소 억제 특성을 나타냈다(10).

[0006] Tan 등은 식물 포르툴라카 올레라세아 *L.* (*Portulaca oleracea* L.; POL)에서 포르툴라카는 (portulacanone) A-D (도 1)라는 4개의 호모이소플라보노이드를 분리하였으며, 포르툴라카 올레라세아 *L.*은 식용 식물로뿐만 아니라 광범위한 질병을 완화하는 민간의약으로 사용되는 널리 분포하는 약용식물이다(11). 이 화합물들은 분리 후 SGC-7901, NCI-H460, K-562 및 SF-268을 포함하는 4종의 인간 종양세포주에 대하여 시험관 내에서 세포독성 활성을 나타내었다(11). 지금까지 포르툴라카는 A-D의 합성 및 이 화합물들과 그 유도체들의 NO 생성에 관한 어떠한 보고도 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Quintans J. Immunol Cell Biol. 1994;72:262-264.
- (비특허문헌 0002) Fullerton JN, Gilroy DW. Nat. Rev Drug Discov. 2016;15:551-567.
- (비특허문헌 0003) Coleman JW. Clin Exp Immunol. 2002;129:4-10.
- (비특허문헌 0004) Lyons CR. Adv Immunol. 1995;60:323-371.
- (비특허문헌 0005) Lundberg JON et al., Nat Med. 1997; 3:30-31.
- (비특허문헌 0006) Thomas DD et al., Free Radic Biol Med. 2008;45:18-31.
- (비특허문헌 0007) Andersen, ØM et al., Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Boca Raton, CRC Press; 2006.
- (비특허문헌 0008) Lin L-G et al., Planta Med. 2014;80:1053-1066.
- (비특허문헌 0009) Abegaz BM et al., Nat Prod Commun. 2007;2:475-498.
- (비특허문헌 0010) Lin LG et al., J Med Chem. 2008;51:4419-4429.
- (비특허문헌 0011) Jian Yan J et al., Phytochemistry 2012;80:37-41.
- (비특허문헌 0012) Iranshahy M et al., J Ethnopharmacol. 2017;205:158-172.
- (비특허문헌 0013) Damodar K, Kim J-K, Jun J-G. Tetrahedron Lett. 2017;58:50-53.
- (비특허문헌 0014) Seo YH, Damodar K, Kim J-K, Jun J-G. Bioorg Med Chem Lett. 2016;26:1521-1524.
- (비특허문헌 0015) Kontogiorgis CA, Hadjipavlou-Litina D. Med Res Rev. 2002;22:385-418.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 포르톨라카논 A-C 및 그 유도체의 합성방법을 제공하려는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 포르톨라카논 A-C 및 그 유도체의 생물활성을 연구하여 유용한 약제를 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 산화질소 억제제로서 생물활성을 지닌 천연 산물 및 그 유사체의 합성과 평가에 초점을 맞춘 지속되는 연구의 일환으로 본 발명에서는 자연에서 생성되는 (±)-포르톨라카논 A-C (화합물 4, 8 및 9) 및 그 유도체들 (화합물 1-3, 5 및 7)을 합성하였다 (도 1).
- [0013] 포르톨라카논 또는 그 유도체 (화합물 1-9)의 합성은 상업적으로 이용 가능한 1,3,5-트리메톡시벤젠 (화합물 10)의 프리델-크라프트 아실화 (Friedel-Crafts acylation)로 시작되었다 (도 2). 삼불화붕소소다이에틸에테레이트 (boron trifluoride diethyl etherate, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$)의 존재하에 아세트산 무수물로 화합물 10을 처리하여 화합물 11을 수율 89%로 얻었다. 화합물 11은 AlCl_3 를 사용하여 선택적 오르쏘-탈메틸화 (ortho-demethylation)되어 화합물 12를 수율 87%로 얻었다. 또 다른 아세트페논 14는 화합물 13에서 얻은 것이다. 화합물 13의 아세틸화 및 후속적인 재배열로 두 단계에 걸쳐 93%의 현저한 수율로 화합물 14를 얻었다. 클로로메틸에틸에테르 (EOM-Cl), K_2CO_3 및 TBAI(tetrabutylammonium iodide)를 이용하여 살리실알데히드 (화합물 15)의 에톡시메틸 (EOM) 에테르로 보호기화한 화합물 16을 수율 83%로 얻었다. 다음으로, 시판중인 2-하이드록시-4-메톡시아세토

페논 (화합물 17), 화합물 12 및 화합물 14를 DMF-DMA (*N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal)로 축합한 후, 생성된 아미노 케톤을 산 처리하여 상응하는 4*H*-크로멘-4-온 (4*H*-chromen-4-ones) 화합물 18a-18c를 각각 수율 88-91%로 얻었다. 화합물 18a-18c의 축매를 이용한 수소화로 상응하는 크로만-4-온 (chroman-4-ones) 화합물 19a-19c를 얻었다.

[0014]

화합물 19a-19c와 화합물 16을 얻은 다음, 우리는 알돌 응축 반응을 연구하였다. 처음에는 *p*-톨루엔설폰산 (*p*TsOH)과 벤젠을 사용하여 화합물 19b와 화합물 15 사이의 반응을 시도했는데 성공하지 못했다. 다음으로, 30-100°C에서 DMF 용매뿐만 아니라 벤젠 용매에서 염기로서 피페리딘을 사용하는 화합물 19b와 16의 응축 반응에서 화합물 20b를 낮은 수율 (20% 미만)로 얻었다. 만족스럽게, 우리는 EtOH/H₂O (5/1)에서 KOH가 화합물 19b와 화합물 16의 응축에 효과적이라는 것을 확인하였다. 이어서, 화합물 19a 및 화합물 19c와 화합물 16의 반응으로 각각 화합물 20a (48%)와 화합물 20c (25%)를 얻었다. 1*N* HCl을 사용한 화합물 20a-20c의 탈보호기로 화합물 1, 3 및 7을 고수율로 얻었다. 화합물 1, 3 및 7의 축매를 이용한 수소화 반응으로 호모이소플라보노이드 화합물 2, 4 및 8을 각각 수율 86-91%로 얻었다. 마지막으로, 1.0*M* BCl₃ (CH₂Cl₂ 용액 내에서)를 사용하여 화합물 4, 8 및 3의 선택적 오르쏘-탈메틸화로 남은 3개의 표적 화합물 5, 9 및 6을 잘 합성하였다. 모든 최종 화합물 1-9의 구조는 스펙트럼 데이터 (¹H, ¹³C NMR 및 MS)로 결정했다.

[0015]

합성한 호모이소플라보노이드 (화합물 1-9)에 대하여 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 NO 생성을 억제하는 능력을 분석하였다. RAW 264.7 대식세포를 LPS로 처리하면 NO 생성이 유도된다는 것이 잘 알려져 있다. L-NMMA (*N*^G-monomethyl-L-arginine)는 NO 생성을 현저히 억제한다고 보고되었다(15). 본 발명에서는 RAW 264.7 대식세포를 LPS로 유도하고, 0.1, 1, 10, 25, 50 및 100 μ*M* 농도의 화합물 1-9 및 L-NMMA를 대조군으로 사용하여 NO 생성 및 세포 생존율을 측정하였다. 그러나 25, 50 및 100 μ*M* 농도에서 화합물 1-9는 거의 동일한 수준의 활성을 보였다 (도 3). 1 내지 10 μ*M*에서 NO 생성 억제의 유의한 변화가 관찰되었다. 따라서 본 발명자들은 합성한 화합물 1-9를 1과 10 μ*M* 농도에서만 분석하였다. 대식세포로부터 나온 NO의 농도는 그리스 시약 (Griess reagent)을 사용하여 배양 상등액에 NO의 안정한 산화 생성물인 아질산염의 농도를 측정함으로써 결정하였다.

표 1

[0016]

Compound	NO Production (% inhibition)		
	1 μ <i>M</i>	10 μ <i>M</i>	IC ₅₀ (μ <i>M</i>)
LPS	100.0 ± 0.8 (0.0)	100.0 ± 0.8 (0.0)	-
1	71.6 ± 1.4 (28.4)***	8.6 ± 1.2 (91.4)***	1.75
2	90.8 ± 1.7 (9.2)*	80.3 ± 6.5 (19.7)***	14.17
3	61.5 ± 1.7 (38.5)***	2.8 ± 0.7 (97.2)***	1.26
4	102.8 ± 1.7 (-2.8)	79.5 ± 7.3 (20.5)***	14.17
5	97.2 ± 1.7 (2.8)	62.0 ± 2.1 (38.0)***	12.42
6	78.9 ± 2.0 (21.1)***	7.5 ± 0.8 (92.5)***	2.09
7	83.8 ± 1.9 (16.2)**	17.0 ± 0.8 (83.0)***	2.91
8	124.6 ± 17.6 (-24.6)	84.1 ± 2.7 (15.9)	13.43
9	111.8 ± 1.3 (-11.8)*	65.9 ± 2.9 (34.1)***	12.16
L-NMMA	112.5 ± 4.6 (-12.5)	85.8 ± 6.4 (14.2)	16.11

[0018]

시험한 모든 화합물 1-9는 RAW 264.7 대식세포에서 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰다 (표 1). NO 저해 백분율은 가장 높은 (10 μ*M*) 농도에서 97.2%에서 15.9%의 범위였다. 화합물 1-9 중 4개의 화합물, 즉 화합물 3 (97.2%), 화합물 6 (포르톨라카논 D) (92.5%), 화합물 1 (91.4%) 및 화합물 7 (83.0%)이 10 μ*M*에서 가장 효율적인 저해 효과를 보였다 (표 1 및 도 3). 가장 낮은 농도 (1 μ*M*)에서, 화합물 3은 여전히 RAW 264.7 대식세포에서 NO 생성 (38.5%)을 현저하게 감소시켰다. 화합물 1-9의 IC₅₀ 값을 GraphPad Prism 4.0 소프트웨어로 평가하였고, 각각 1.75, 14.17, 1.26, 14.17, 12.42, 2.09, 2.91, 13.43 및 12.16 μ*M*을 나타내었다 (표 1).

표 2

[0019]

Compound	Proliferation effect			
	1 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M
Medium(MED)	100.0 $\pm$ 2.4	100.0 $\pm$ 2.4	100.0 $\pm$ 2.4	100.0 $\pm$ 2.4
1	101.8 $\pm$ 1.5	97.7 $\pm$ 13.3	11.0 $\pm$ 0.1***	11.1 $\pm$ 0.2***
2	152.1 $\pm$ 2.4***	118.3 $\pm$ 1.1	49.4 $\pm$ 3.9***	31.5 $\pm$ 0.3***
3	107.6 $\pm$ 12.0	113.6 $\pm$ 5.5	13.3 $\pm$ 1.6***	11.7 $\pm$ 0.9***
4	98.6 $\pm$ 10.5	164.6 $\pm$ 8.3**	55.2 $\pm$ 1.0***	41.3 $\pm$ 1.4***
5	97.7 $\pm$ 0.9	81.1 $\pm$ 4.8**	34.2 $\pm$ 2.0***	12.5 $\pm$ 0.2***
6	94.0 $\pm$ 4.4	97.0 $\pm$ 4.6	10.7 $\pm$ 0.1***	11.0 $\pm$ 0.1***
7	94.6 $\pm$ 3.5	93.4 $\pm$ 2.8	11.8 $\pm$ 0.1***	10.9 $\pm$ 0.3***
8	89.6 $\pm$ 2.9	87.2 $\pm$ 3.2*	58.7 $\pm$ 2.6***	44.0 $\pm$ 1.4***
9	97.6 $\pm$ 5.4	96.7 $\pm$ 2.0	41.1 $\pm$ 5.3***	15.5 $\pm$ 0.3***

[0020]

^a결과는 n=3에 대한 평균값 $\pm$ SEM이다 (*P <0.05, **P <0.01 및 ***P<0.001).

[0021]

화합물 1-9의 NO 억제 효과가 세포 사멸로 인한 것이 아님을 확인하기 위해 RAW 264.7 대식세포에 대한 화합물의 세포 독성을 MTT 분석으로 시험하였다. 그 결과, 시험 화합물 1-9 모두 24시간 동안 10 μ M 농도에서 탐지할 만한 세포 독성이 관찰되지 않았고, NO 생산을 효과적으로 억제하였다 (표 2). 화합물 1-9가 50 μ M과 100 μ M에서 NO 생성에 대해 우수한 억제활성을 나타냈지만, 이는 대식세포에 대한 화합물 1-9의 세포 독성 효과 때문일 가능성이 크다 (도 3 및 표 2). 50 μ M 및 100 μ M에서의 세포 생존율은 각각 10.7-58.7% 및 10.9-44.0%의 범위에 불과했다. 웨스턴 블랏 분석을 이용하여 이 억제효과가 iNOS의 조절과 관련이 있는지를 평가하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 그 결과는 NO 생산과 관련된 결과와 일치하였으며 (표 1 및 도 3), RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 iNOS의 단백질 발현은 화합물 1, 3, 6 및 7 처리에 의해 현저하게 억제되었다. 그러나 이들 화합물은 항존 유전자(housekeeping gene)인 β -액틴의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 이것은 이러한 화합물 노출로 인한 iNOS의 발현 감소가 NO 생산 억제에 책임이 있음을 나타낸다. 본 발명에서는 제한된 수의 화합물, 즉 단지 9개의 화합물을 스크리닝했기 때문에, 충분한 구조-활성 관계 (SAR) 분석은 불가능하다. 그러나 다음은 주목할 만하다.: 1) 화합물 1, 3, 6 및 7이 NO의 저해에 가장 효과적이었으므로 C3와 C11 사이의 이중 결합이 결정적인 것으로 보인다. 2) 화합물 (1, 3, 6 및 7)을 포함하여 C3 및 C11 이중 결합 중에, 2개의 메톡시기 (-OMe)를 갖는 화합물 (화합물 3) 또는 하나의 메톡시기 (-OMe) 및 하나의 하이드록시기 (-OH)를 갖는 화합물 (화합물 1)이 하나의 메톡시기를 갖는 화합물 (화합물 1) 및 3개의 메톡시기를 갖는 화합물 (화합물 7)을 갖는 화합물보다 우수한 NO 억제 활성을 나타낸다. 3) 화합물 6 (포르톨라카논 D)의 강한 NO 저해 효과는 염증성 질환의 치료에서 포르톨라카 올레라세아 *L.* (*Portulaca oleracea L.*) 식물의 유용성을 지지하고 이 종의 전통적인 지시를 입증하는데 도움을 줄 수 있다.

[0022]

결론적으로, 본 발명자들은 포르톨라카 올레라세아 *L.* (*Portulaca oleracea L.*)에서 분리된 천연 호모이소플라보노이드 ($\pm$)-포르톨라카논 A-C (화합물 4,8,9), 포르톨라카논 D (화합물 6)와 그 유도체들 (화합물 3, 5 및 7)과 공지의 유도체들 (화합물 1 및 2)을 시판 화합물로부터 합성하였다. 이들 합성한 화합물에 대하여 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 항염증 활성의 지표로 NO 생성을 억제하는 능력을 평가하였다. 시험한 모든 화합물은 명확한 세포독성을 나타내지 않았으며, RAW 264.7 대식세포에서 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였다. 화합물 3 (10 μ M에서 억제율 97.2%; IC₅₀ = 1.26 μ M), 화합물 6 (포르톨라카논 D) (10 μ M에서 억제율 92.5%; IC₅₀ = 2.09 μ M), 화합물 1 (10 μ M에서 억제율 91.4%; IC₅₀ = 1.75 μ M) 및 화합물 7 (10 μ M에서 억제율 83.0%; IC₅₀ = 2.91 μ M)은 합성한 화합물 중 상당한 억제효과를 나타냈다. 이 발견은 LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현 억제와 관련이 있다. 본 발명에서 얻은 정보는 화합물 3을 NO 생산 표적 항염증 약물 개발을 위한 선도 구조로 간주할 수 있는 기반을 제공할 수 있고, 또한 염증성 질환 치료에 민간 약용 식물로서의 포르톨라카 올레라세아 *L.* (*Portulaca oleracea L.*)의 유용성에 대한 과학적 증거를 제공할 수 있다.

[0024]

본 발명은

[0025]

(가) 화학식 12로 표시되는 화합물 17, 화합물 12 및 화합물 14를 DMF-DMA (*N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal)로 축합한 후, 생성된 상응하는 아미노케톤 화합물을 각각 산 처리하여 화학식 18로 표시되는 상응하는

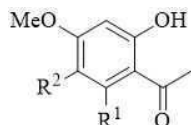
4*H*-크로멘-4-온 (4*H*-chromen-4-ones) 화합물 18a, 18b, 18c를 각각 얻는 단계;

[0026] (나) 상기 4*H*-크로멘-4-온 (4*H*-chromen-4-ones) 화합물 18a, 18b 및 18c를 촉매 Pd/C를 이용하여 수소화하여 화학식 19로 표시되는 상응하는 크로만-4-온 (chroman-4-ones) 화합물 19a, 19b, 19c를 각각 얻는 단계;

[0027] (다) 상기 크로만-4-온 (chroman-4-ones) 화합물 19a, 19b, 19c에 EtOH/H₂O (5/1), KOH, 화학식 16으로 표시되는 화합물 16를 가하여 응축반응하여 화학식 20으로 표시되는 상응하는 화합물 20a, 20b, 20c를 각각 얻는 단계; 및

[0028] (라) 1N HCl을 사용하여 상기 화합물 20a, 20b, 20c를 탈보호기화하여 화학식 1로 표시되는 상응하는 화합물 1, 3 및 7을 각각 얻는 단계;를 포함하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법에 관한 것이다.

[0029] <화학식 12>



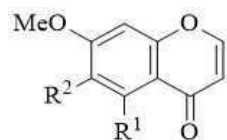
[0030]

[0031] (단, 화합물 17: R¹, R² = H,

[0032] 화합물 12: R¹ = OMe, R² = H,

[0033] 화합물 14: R¹, R² = OMe)

[0034] <화학식 18>



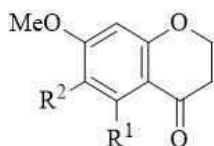
[0035]

[0036] (단, 화합물 18a: R¹, R² = H,

[0037] 화합물 18b: R¹ = OMe, R² = H,

[0038] 화합물 18c: R¹, R² = OMe)

[0039] <화학식 19>



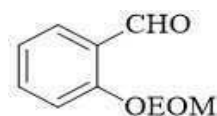
[0040]

[0041] (단, 화합물 19a: R¹, R² = H,

[0042] 화합물 19b: R¹ = OMe, R² = H,

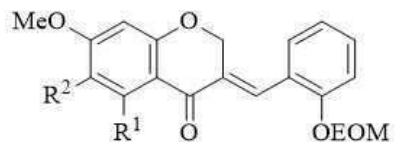
[0043] 화합물 19c: R¹, R² = OMe)

[0044] <화학식 16>



[0045]

<화학식 20>

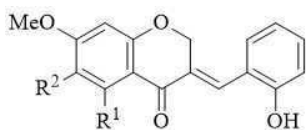


(단, 화합물 20a: $R^1, R^2 = H$,

화합물 20b: $R^1 = OMe, R^2 = H$,

화합물 20c: $R^1, R^2 = OMe$)

<화학식 1>



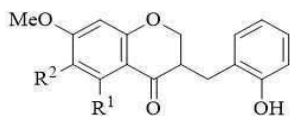
(단, 화합물 1: $R^1, R^2 = H$,

화합물 3: $R^1 = OMe, R^2 = H$,

화합물 7: $R^1, R^2 = OMe$)

또한, 본 발명은 상기 (라) 단계 이후 (마) 상기 화합물 1, 3 및 7을 Pd/C 촉매를 이용하여 수소화 반응하여 화학식 2로 표시되는 상응하는 호모이소플라보노이드 화합물 2, 4 및 8을 각각 얻는 단계;가 더 부가되는 것을 특징으로 하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법에 관한 것이다.

<화학식 2>



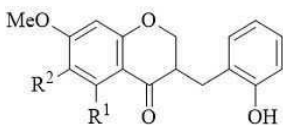
(단, 화합물 2: $R^1, R^2 = H$,

화합물 4: $R^1 = OMe, R^2 = H$,

화합물 8: $R^1, R^2 = OMe$)

또한, 본 발명은 상기 (마) 단계 이후 (바) 상기 화합물 2 및 8을 1.0M BCl_3 를 사용하여 CH_2Cl_2 내에서 선택적 오르쏘-탈메틸화 반응으로 화학식 5로 표시되는 상응하는 화합물 5 및 9를 각각 얻는 단계;가 더 부가되는 것을 특징으로 하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법에 관한 것이다.

<화학식 5>

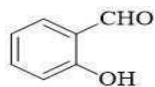


(단, 화합물 5: $R^1 = OH, R^2 = H$,

화합물 9: $R^1 = OH, R^2 = OMe$)

[0067] 또한, 본 발명은 상기 화합물 16이 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 TBAI(tetrabutylammonium iodide)를 이용하여 화학식 15로 표시되는 살리실알데하이드를 에톡시메틸 보호기화하여 생성됨을 특징으로 하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법에 관한 것이다.

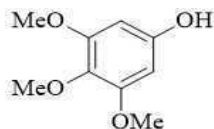
[0068] <화학식 15>



[0069]

[0070] 또한, 본 발명은 상기 화합물 14가 화학식 13으로 표시되는 화합물 13에 Ac_2O , Et_3N , CH_2Cl_2 를 가하여 상온에서 아세틸화하는 반응 및 $BF_3 \cdot Et_2O$, $AcOH$ 를 가하여 후속적인 재배열 반응으로 생성됨을 특징으로 하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법에 관한 것이다.

[0071] <화학식 13>



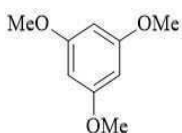
[0072]

[0073] 또한, 본 발명은 상기 화합물 12가

[0074] (ㄱ) 화학식 10으로 표시되는 1,3,5-트리메톡시벤젠을 삼불화붕소다이에틸에테레이트 (boron trifluoride diethyl etherate)의 존재하에 아세트산 무수물로 처리하여 프리델-크라프츠 아실화 (Friedel-Crafts acylation) 반응으로 화학식 11로 표시되는 화합물 11을 얻는 단계; 및

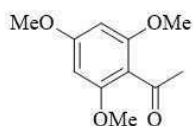
[0075] (ㄴ) 상기 화합물 11에 $AlCl_3$ 를 가하여 환류하여 선택적 오르쏘-탈메틸화 (ortho-demethylation) 반응으로 화합물 12를 얻는 단계;를 거쳐 생성됨을 특징으로 하는 호모이소플라보노이드 화합물 합성방법에 관한 것이다.

[0076] <화학식 10>



[0077]

[0078] <화학식 11>



[0079]

[0080] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 포르툴라카는 유도체 화합물 1, 3, 7 및 화학식 2로 표시되는 포르툴라카는 유도체 화합물 2, 포르툴라카는 A, 포르툴라카는 B, 화학식 5로 표시되는 포르툴라카는 유도체 화합물 5 및 포르툴라카는 C 중 선택된 한 가지 이상을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

[0081] 또한, 본 발명은 특히 포르툴라카는 유도체 화합물 1, 3, 7 중 선택된 한 가지 이상을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

[0082] 또한, 본 발명은 상기 포르툴라카는 유도체 화합물 1, 3, 7의 IC_{50} 값이 $1 \sim 3 \mu M$ 임을 특징으로 하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

[0083] 또한, 본 발명은 본 발명에서 처음으로 합성한 신규한 포르툴라카는 유도체 화합물 3, 5 및 7에 관한 것이다.

발명의 효과

[0085] 본 발명의 합성방법에 의하면 포르툴라카 올레라세아 *L.* (*Portulaca oleracea L.*) 유래 화합물인 포르툴라카는

A-C 및 그 유도체를 높은 수율로 합성할 수 있다.

[0086] 또한, 본 발명의 방법으로 합성된 포르톨라카는 A-C 및 그 유도체들, 특히 화합물 3, 1, 7은 세포독성을 나타내지 않으며, 우수한 항염증 활성을 나타내어 염증질환의 치료제로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0088] 도 1은 포르톨라카는 A-D (화합물 4, 8, 9 및 6) 및 그 유도체 (화합물 1-3, 5 및 7)의 구조이다.

도 2는 본 발명의 포르톨라카는 A-D 및 그 유도체의 합성방법에 관한 반응식을 도시한 것이다. 시약 및 조건 : (a) Ac_2O , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, EtOAc , 상온, 4시간, 89%; (b) AlCl_3 , CH_2Cl_2 , 환류, 22시간, 87%; (c) (i) Ac_2O , Et_3N , CH_2Cl_2 , 상온, 6시간; (ii) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, AcOH , 70°C , 2시간, 93% (2단계 전체); (d) 클로로메틸 에틸 에테르, K_2CO_3 , TBAI (Tetrabutylammonium iodide), 아세톤, 0°C -상온, 24시간, 83%; (e) *N,N*-디메틸포름아마이드 다이메틸 아세탈, 벤젠, 90°C , 밤새 반응, 88-91%; (f) H_2 , Pd/C (10%), MeOH, 상온, 0.75-1시간, 83-87%; (g) KOH, EtOH/ H_2O (5/1), $25-30^\circ\text{C}$, 10-24시간, 25-48%; (h) 1N HCl, MeOH, 55°C , 1시간, 85-88%; (i) H_2 , Pd/C (10%), MeOH, 상온, 0.75-1시간, 86-91%; (j) 1.0 M BCl_3 (in CH_2Cl_2), CH_2Cl_2 , 0°C -상온, 3시간, 83-86%.

도 3은 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 NO 생성에 대한 호모이소플라보노이드 1-9의 억제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 4는 iNOS 발현에 대한 화합물 1-9의 효과를 시험한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0091] 화학 물질 등

[0092] 모든 화학 물질은 특별한 언급이 없는 한 구입한 그대로 정제하지 않고 사용하였다. 반응에 사용한 모든 용매는 질소 가스 하에서 적절한 탈수제로부터 증류되었다. 크로마토그래피에 사용한 모든 용매는 구입하여 별도의 정제 없이 바로 사용하였다. 박막 크로마토그래피 (TLC)는 DC-Plastikfolien 60, F254 (Merck, 층 두께 0.2mm) 플라스틱판에 실리카겔을 입힌 플레이트를 이용하였고, UV (254nm)를 이용하여 관찰하거나 또는 p-아니스알데히드 및/또는 포스포몰리브딕산 (PMA)으로 염색하여 관찰하였다. 크로마토그래피 정제는 Kieselgel 60 (60-120mesh, Merck)을 이용하여 수행하였다. ^1H -NMR 스펙트럼은 Varian Mercury-300MHz FT-NMR 및 ^{13}C 에 대해서는 75MHz로 기록하였고, 화학적 이동 (δ)은 TMS에 대하여 ppm (parts per million)으로 나타내었고, 커플링 상수 (J)는 Hz로 인용하였다. 피크 분열 패턴은 s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet of doublet) 및 m (multiplet)으로 약칭하고, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{COCE}_3$ 는 용매 및 내부 스탠다드로 이용하였다. 고해상도 질량 스펙트럼 전기 분무 이온화 (HRMS-ESI)는 Agilent technologies 6220 TOF LC / MS 분광기를 이용하여 기록하였다. 녹는점은 MEL-TEMP II 장치에서 측정하고, 보정하지 않았다.

[0094] 1-(2,4,6-트리메톡시페닐)에타는 {1-(2,4,6-Trimethoxyphenyl)ethanone} (화합물 11):

[0095] 1,3,5-트리메톡시벤젠 (0.84g, 5.00mmol) 및 무수 아세트산 (0.47mL, 7.50mmol)를 에틸 아세테이트 (5mL)에 혼합하고, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.32mL, 2.50mmol)를 질소 분위기 하에서 서서히 가하였다. 반응물을 상온으로 가온하고 4시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, H_2O (40mL)를 가하고, 15분 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 (3x30mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 포화 NaHCO_3 용액 (2x20mL), H_2O (2x20mL), 식염수 (20mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하여, 진공에서 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피 ($\text{EtOAc}/\text{Hexane}=1/3-1/2$)로 조화합물을 정제하여 순수한 백색 고체 화합물 (0.94g, 89%)을 얻었다. 녹는점 $98-100^\circ\text{C}$ (Lit. $_1$ 101-103 $^\circ\text{C}$); ^1H NMR

(300MHz, CDCl_3) δ 6.09 (2H, s), 3.82 (3H, s), 3.79 (6H, s), 2.46 (3H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 201.7, 162.3, 158.4, 113.7, 90.7, 56.0, 55.6, 32.8.

[0097] 1-(2-하이드록시-4,6-다이메톡시페닐)에타논 {1-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)ethanone} (화합물 12):

[0098] 화합물 11 (0.9g, 4.28mmol)을 무수 CH_2Cl_2 (10mL)에 넣고 교반한 용액에 질소 분위기 하에서 AlCl_3 (0.71g, 5.35mmol)를 가하고, 혼합물을 22시간 동안 환류하였다. 반응 완료 후 0℃로 냉각하고 1N HCl (6mL)을 첨가하고 혼합물을 상온에서 15분 동안 교반하였다. 혼합물을 CH_2Cl_2 (2x50mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H_2O (2x25mL)와 식염수 (20mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하여 진공 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피 ($\text{EtOAc}/\text{Hexane}=1/4$)로 조화합물을 정제하여 순수한 백색 고체 화합물을 얻었다 (0.72g, 87%). 녹는점 79-80℃ (문헌상 녹는점은 81-82℃); ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 6.03 (1H, d, $J=2.1\text{Hz}$), 5.90 (1H, d, $J=2.1\text{Hz}$), 3.84 (3H, s), 3.80 (3H, s), 2.60 (3H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 203.1, 167.6, 166.1, 162.9, 106.1, 93.6, 90.8, 55.8, 33.2.

[0100] 1-(6-하이드록시-2,3,4-트리메톡시페닐)에타논 {1-(6-Hydroxy-2,3,4-trimethoxyphenyl)ethanone} (화합물 14):

[0101] 3,4,5-트리메톡시페놀 (화합물 13) (1.55g, 8.42mmol)을 무수 CH_2Cl_2 (16mL)에 넣고 교반한 용액에 Et_3N (2.36mL, 16.63mmol)를 가하고 상온에서 15분 동안 교반하였다. 무수 아세트산 (1.2mL, 12.62mmol)을 가하고 상온에서 6시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, CH_2Cl_2 (80mL)로 희석하고, 2N HCl (8mL), H_2O (2x20mL), 식염수 (20mL)로 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조하여, 진공 농축하였다. 아세틸화된 무색 고체 화합물 (1.88g, 99%)을 얻고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다. 녹는점 68-70℃; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 6.32(2H, s), 3.82(9H, s), 2.28(3H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 169.5, 153.5, 146.8, 136.0, 99.3, 61.1, 56.4, 21.4.

[0102] 상기 3,4,5-트리메톡시페닐 아세테이트 (1.88g, 8.33mmol)를 AcOH (2.2mL)에 넣고 교반한 용액에 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3.6mL, 29.16mmol)를 상온의 질소 분위기 하에서 한 방울씩 가하였다. 생성된 혼합물을 70℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후 상온으로 식히고 얼음물 (5mL)을 넣고 15분 동안 교반하였다. 혼합물을 EtOAc (3x35mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H_2O (3x20mL), 식염수 (2x20mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하여, 진공에서 농축하고, 담황색 액체 화합물 14 (1.77g, 94%)를 얻고, 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다. ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 6.22 (1H, s), 3.98 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.77 (3H, s), 2.65 (3H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 203.3, 161.9, 160.1, 155.3, 134.8, 108.6, 96.3, 61.2, 61.1, 56.3, 32.1.

[0104] 2-(에톡시메톡시)벤즈알데하이드 {2-(Ethoxymethoxy)benzaldehyde} (화합물 16):

[0105] 살리실알데하이드 (0.53mL, 5.00mmol)를 무수 아세톤 (12mL)에 넣고 교반한 용액에 K_2CO_3 (1.38g, 20.00mmol)를 질소 분위기 하에서 첨가하고, 0℃로 식혔다. 20분 동안 교반한 후, 클로로메틸 에틸 에테르 (EOM-Cl) (0.56mL, 6.0mmol)를 한 방울씩 가한 다음, TBAI (tetrabutylammonium iodide) (0.2mmol, 0.1당량)의 무수 아세톤 (3.0mL) 용액을 가하였다. 생성된 혼합물을 상온으로 가온하고 24시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 셀라이트® 패드로 여과하고 아세톤 (10mL)으로 세척하고, 여과액을 진공 농축하였다. 조생성물을 EtOAc (60mL)에 용해하고, H_2O (3x15mL), 식염수 (15mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하여, 진공에서 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피 ($\text{EtOAc}/\text{Hexane}=1/10$)로 조화합물을 정제하여 거의 무색 오일의 순수한 EOM-보호 알데하이드 화합물 16 (0.75g, 83%)을 얻었다. ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 10.47 (1H, s), 7.82 (1H, d, $J=7.5\text{Hz}$), 7.52 (1H, td, $J=8.1, 2.1\text{Hz}$), 7.23 (1H, d, $J=8.1\text{Hz}$), 7.06 (1H, td, $J=7.5, 2.1\text{Hz}$), 5.34 (2H, s), 3.77 (2H, q, $J=7.0\text{Hz}$), 1.24 (3H, t, $J=7.0\text{Hz}$); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 189.7, 159.8, 135.9, 128.3, 125.4, 121.7, 115.1, 93.4, 65.0, 15.4.

[0107] **치환된 4H-크로멘-4-온 (4H-chromen-4-ones)의 일반적인 제조 방법**

[0108] 치환된 2-하이드록시아세토펜 (1.4mmol)을 무수 벤젠 (4mL)에 넣고 교반한 용액에 *N,N*-다이메틸포름아마이드 다이메틸 아세탈 (4.2mmol)을 상온, 질소 분위기 하에서 첨가하였다. 혼합물을 90℃에서 밤새 교반하였다. 반응 완료 후 0℃로 냉각하고, 포화 HCl (0.85mL)를 가하였다. 생성된 혼합물을 55℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, EtOAc (40 mL)로 희석하고, H₂O (3x10mL)와 식염수 (2x15mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조하여, 진공에서 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane=1/1-2/1)로 조화합물을 정제하여 순수한 치환된 4H-크로멘-4-온을 얻었다.

[0110] **7-메톡시-4H-크로멘-4-온 {7-Methoxy-4H-chromen-4-one}(화합물 18a):** 수율: 91%; 담황색 고체; 녹는점 97-99℃; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 8.08(1H, d, *J*= 8.7Hz), 7.75 (1H, d, *J*= 6.0Hz), 6.94 (1H, dd, *J*= 8.7, 2.4Hz), 6.81 (1H, d, *J*= 2.4Hz), 6.25 (1H, d, *J*= 6.0Hz), 3.89(3H, s); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 177.0, 164.2, 158.4, 154.9, 127.4, 119.0, 114.7, 113.1, 100.6, 56.1.

[0112] **5,7-다이메톡시-4H-크로멘-4-온 {5,7-Dimethoxy-4H-chromen-4-one}(화합물 18b):** 수율: 90%; 담황색 고체; 녹는점 131-133℃; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.60(1H, d, *J*= 6.0Hz), 6.41 (1H, d, *J*= 2.1Hz), 6.34 (1H, d, *J*= 6.0Hz), 6.17 (1H, d, *J*= 6.0Hz), 3.93 (3H, s), 3.87 (3H, s); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 176.6, 163.9, 161.0, 160.1, 152.6, 114.6, 110.4, 96.3, 92.9, 56.6, 55.9.

[0114] **5,6,7-트리메톡시-4H-크로멘-4-온 {5,6,7-Trimethoxy-4H-chromen-4-one}(화합물 18c):** 수율: 88%; 담황색 고체; 녹는점 113-115℃; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.63 (1H, d, *J*= 6.0Hz), 6.65 (1H, s), 6.16 (1H, d, *J*= 6.0Hz), 3.95 (3H, s), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 176.2, 157.8, 154.8, 153.0, 152.6, 140.5, 114.1, 113.9, 96.4, 62.3, 61.7, 56.4.

[0116] **치환된 4H-크로멘-4-온의 수소화를 위한 일반적인 절차**

[0117] 치환된 4H-크로멘-4-온 (1.0mmol)을 MeOH (8mL)에 넣고 교반한 용액에 10% Pd/C (치환된 4H-크로멘-4-온에 대하여 5% w/w)를 상온의 수소 분위기 하에서 가하여 혼합물을 0.75-1시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후 셀라이트® 패드로 여과하고, MeOH (10 mL)로 세척하여 여과액을 감압하에 농축하였다. 조생성물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane = 1/3-1/2)로 정제하여 순수한 치환된 크로멘-4-온을 얻었다.

[0119] **7-메톡시크로만-4-온 (7-Methoxychroman-4-one)(화합물 19a):** 수율: 87%; 백색 고체; 녹는점 49-50℃; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.80 (1H, d, *J*= 8.7Hz), 6.55 (1H, dd, *J*= 8.7, 2.4Hz), 6.38 (1H, d, *J*= 2.4Hz), 4.50 (2H, t, *J*= 6.3Hz), 3.82 (3H, s), 2.74 (2H, t, *J*= 6.3Hz); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 190.4, 166.0, 163.8, 128.9, 115.4, 110.0, 100.9, 67.6, 55.8, 37.7.

[0121] **5,7-다이메톡시크로만-4-온 (5,7-Dimethoxychroman-4-one)(화합물 19b):** 수율: 83%; 백색 고체; 녹는점 92-94℃; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 6.04(2H, s), 4.43 (2H, t, *J*= 6.3Hz), 3.87 (3H, s), 3.81 (3H, s), 2.71 (2H, t, *J*= 6.3Hz); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 189.1, 165.7, 165.2, 162.3, 106.4, 93.4, 93.0, 67.0, 56.3, 55.7, 39.0.

[0123] **5,6,7-트리메톡시크로만-4-온** {5,6,7-Trimethoxychroman-4-one} (**화합물 19c**): 수율: 84%; 백색 고체; 녹는점 58-60℃; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 6.24(1H, s), 4.43 (2H, t, *J*= 6.3Hz), 3.91 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.80 (3H, s), 2.71 (2H, t, *J*= 6.3Hz); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 189.1, 160.0, 159.3, 154.3, 137.4, 109.7, 96.2, 67.1, 61.7, 61.5, 56.3, 38.9.

[0125] **EOM-보호기화된 호모이소플라보노이드의 일반적인 제조 과정**

[0126] 치환된 크로만-4-온 (0.30mmol)과 EOM-보호기화 살리실알데하이드 화합물 **16** (0.07g, 0.39mmol)을 EtOH/H₂O (1.8mL, 5/1)에 넣고 교반한 용액에 KOH (0.05g, 0.90mmol)를 가하여 25-30℃에서 10-24시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, EtOH를 감압하에 제거하였다. 조생성물을 1N HCl로 중화하고, EtOAc (2x25mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H₂O (3x10mL)와 식염수 (10mL)로 세척하고 무수 Na₂SO₄로 건조하여 진공에서 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane = 1/5-1/3)로 조화합물을 정제하여 순수한 EOM-보호 호모이소플라보노이드 화합물을 얻었다.

[0128] **(*E*)-3-(2-(에톡시메톡시)벤질리덴)-7-메톡시크로만-4-온** {(*E*)-3-(2-(Ethoxymethoxy)benzylidene)-7-methoxychroman-4-one} (**화합물 20a**): 수율: 48%; 담황색 액체; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.96-7.93 (2H, m), 7.35-7.30 (1H, m), 7.20 (1H, d, *J*= 8.7Hz), 7.04-6.98 (2H, m), 6.60 (1H, dd, *J*= 8.7, 2.4Hz), 6.37 (1H, d, *J*= 2.4Hz), 5.24 (2H, s), 5.20 (2H, d, *J*= 1.5Hz), 3.81 (3H, s), 3.71 (2H, q, *J*= 7.0Hz), 1.20 (3H, t, *J*= 7.0Hz); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 181.1, 165.9, 163.2, 156.2, 133.2, 130.9, 130.4, 129.7, 124.5, 121.4, 116.0, 114.9, 110.4, 100.9, 93.5, 68.5, 64.8, 55.8, 15.3.

[0130] **(*E*)-3-(2-(에톡시메톡시)벤질리덴)-5,7-다이메톡시크로만-4-온** {(*E*)-3-(2-(Ethoxymethoxy)benzylidene)-5,7-dimethoxychroman-4-one} (**화합물 20b**): 수율: 40%; 담황색 액체; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.95 (1H, s), 7.37-7.31 (1H, m), 7.20 (1H, d, *J*= 8.1 Hz), 7.06-7.00 (2H, m), 6.12 (1H, s), 6.07 (1H, s), 5.26 (2H, s), 5.12 (2H, s), 3.93 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.73 (2H, q, *J*= 7.0 Hz), 1.23 (3H, t, *J*= 7.0 Hz); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 179.8, 165.8, 165.0, 163.0, 156.1, 132.4, 132.1, 130.7, 130.4, 125.1, 121.5, 115.0, 107.5, 93.8, 93.7, 93.6, 68.1, 64.9, 56.5, 55.9, 15.4.6

[0132] **(*E*)-3-(2-(에톡시메톡시)벤질리덴)-5,6,7-트리메톡시크로만-4-온** {(*E*)-3-(2-(Ethoxymethoxy)benzylidene)-5,6,7-trimethoxychroman-4-one} (**화합물 20c**): 수율: 25%; 담황색 액체; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.93 (1H, s), 7.30-7.26 (1H, m), 7.15 (1H, d, *J*= 8.1Hz), 7.02-6.98 (1H, m), 6.22 (1H, d, *J*= 7.8Hz), 6.20 (1H, s), 5.20 (2H, d, *J*= 1.2Hz), 5.06 (2H, s), 3.96 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.77 (3H, s), 3.67 (2H, q, *J*= 7.0Hz), 1.20 (3H, t, *J*= 7.0Hz).

[0134] **EOM-탈보호기화 호모이소플라보노이드 합성의 일반적인 절차**

[0135] EOM-보호 호모이소플라보노이드 (0.2mmol)를 MeOH (5mL)에 넣고 교반한 용액에 상온에서 1N HCl (0.6mL)를 가하고 혼합물을 55℃에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하였다. 조생성물을 EtOAc (35mL)에 용해하고 H₂O (2x10mL)와 식염수 (10mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조하여, 진공에서 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane=1/3-1/1)로 조화합물을 정제하여 순수한 EOM-탈보호기화된 호모이소플라보노이드 화합물을 얻었다.

[0137] **(*E*)-3-(2-하이드록시벤질리덴)-7-메톡시크로만-4-온** {(*E*)-3-(2-Hydroxybenzylidene)-7-methoxychroman-4-one} (**화합물 1**): 수율: 89%; 담황색 고체; 녹는점 135-137℃; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.99 (1H, br s),

7.92 (1H, d, J = 8.7Hz), 7.27 (1H, dd, J = 8.7, 2.1Hz), 7.02-6.90 (3H, m), 6.81 (1H, s), 6.58 (1H, dd, J = 8.7, 2.4Hz), 6.34 (1H, d, J = 2.1Hz), 5.19 (2H, d, J = 1.5Hz) 3.82 (3H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 181.9, 166.3, 163.6, 155.4, 133.4, 131.2, 131.1, 130.3, 129.9, 122.0, 120.3, 116.7, 115.8, 110.7, 100.9, 68.5, 55.9; EI-MS m/z 282(M^+ , base), 265, 253, 131; HRMS: Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_4(\text{M}^+)$: 282.0892, found: 282.0901.

[0139]

(*E*)-3-(2-하이드록시벤질리덴)-5,7-다이메톡시크로만-4-온 {(*E*)-3-(2-Hydroxybenzylidene)-5,7-dimethoxychroman-4-one}(화합물 3): 수율: 86%; 담황색 고체; ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.02 (1H, s), 7.70(1H, s), 7.23 (1H, td, J = 8.1, 1.8Hz), 7.03(1H, d, J = 6.6Hz), 6.91 (1H, d, J = 7.8Hz), 6.84(1H, t, J = 7.5Hz), 6.24 (1H, d, J = 2.1Hz), 6.16(1H, d, J = 2.1Hz), 5.11(2H, d, J = 1.5Hz), 3.81(3H, s), 3.80(3H, s); ^{13}C NMR (75MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 177.7, 165.0, 163.8, 162.1, 156.2, 130.8, 130.7, 130.6, 130.1, 121.1, 118.7, 115.5, 106.5, 93.7, 93.4, 67.4, 55.9, 55.6; EI-MS m/z 312(M^+), 295, 180 (base), 131; HRMS: Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5(\text{M}^+)$: 312.0998, found: 312.0993.

[0141]

(*E*)-3-(2-하이드록시벤질리덴)-5,6,7-트리메톡시크로만-4-온 {(*E*)-3-(2-Hydroxybenzylidene)-5,6,7-trimethoxychroman-4-one}(화합물 7): 수율: 85%; 담황색 고체; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.00 (1H, s), 7.81 (1H, br s), 7.21 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.00 (1H, d, J = 7.5 Hz), 6.96 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.86 (1H, t, J = 7.5 Hz), 6.19 (1H, s), 5.08 (2H, s), 3.96 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.79 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 180.5, 160.0, 159.5, 155.6, 154.7, 137.6, 133.4, 131.3, 131.1, 130.2, 122.0, 119.9, 116.6, 110.4, 96.3, 68.0, 61.8, 61.5, 56.3; EI-MS m/z 342(M^+ , base), 311, 210, 166; HRMS: Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6(\text{M}^+)$: 342.1103, found: 342.1110.

[0143]

3-(2-하이드록시벤질)-7-메톡시크로만-4-온 {3-(2-Hydroxybenzyl)-7-methoxychroman-4-one}(화합물 2): 19a-19cs 합성에 사용된 일반적인 절차에 따라, 화합물 1 (0.04g, 0.14mmol)을 수소 (풍선) 분위기 하에서 교반하여 백색 고체 화합물 2 (0.037g, 91%)를 얻었다. 녹는점 132-134°C; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.12 (1H, br s), 7.82(1H, d, J = 8.7Hz), 7.10 (1H, td, J = 8.1, 1.8Hz), 7.02(1H, dd, J = 7.8, 1.8Hz), 6.90(1H, dd, J = 8.1, 1.2Hz), 6.80 (1H, td, J = 7.5, 1.2Hz), 6.54(1H, dd, J = 8.7, 2.1Hz), 6.36 (1H, d, J = 2.7Hz), 4.51 (1H, dd, J = 11.4, 1.5Hz), 4.21 (1H, t, J = 10.8Hz), 3.80 (3H, s), 3.21-3.03 (2H, m), 2.87-2.79 (1H, m); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 195.2, 166.6, 164.1, 154.8, 131.2, 129.4, 128.5, 124.8, 120.3, 117.3, 114.2, 110.4, 100.7, 70.9, 55.9, 46.6, 27.2; EI-MS m/z 284(M^+), 283 (M-H), 267, 177 (base); HRMS: Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4(\text{M}^+)$: 284.1049, found: 284.1055

[0145]

3-(2-하이드록시벤질)-5,7-다이메톡시크로만-4-온 {3-(2-Hydroxybenzyl)-5,7-dimethoxychroman-4-one}(화합물 4): 19a-19c 합성에 사용된 일반적인 절차에 따라, 화합물 3 (0.02g, 0.06mmol)을 수소 (풍선) 분위기 하에서 교반하여 백색 고체의 화합물 4 (0.018g, 87%)를 얻었다. 녹는점 137-139°C; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.22 (1H, br s), 7.10(1H, td, J = 7.8, 1.8Hz), 7.01 (1H, dd, J = 7.5, 1.8Hz), 6.90 (1H, dd, J = 8.1, 1.2Hz), 6.79 (1H, td, J = 7.5, 1.2Hz), 6.01 (2H, d, J = 2.1Hz), 4.49(1H, dd, J = 11.4, 5.4Hz), 4.15 (1H, t, J = 11.4Hz), 3.85 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.09-2.98 (2H, m), 2.80-2.72 (1H, m); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 193.8, 166.5, 165.4, 162.7, 155.0, 131.0, 128.4, 125.1, 120.2, 117.6, 105.4, 93.4, 93.1, 70.5, 56.4, 55.8, 47.8, 27.1; EI-MS m/z 314(M^+), 207, 181 (base), 132; HRMS: Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5(\text{M}^+)$: 314.1154, found: 314.1150.

[0147]

3-(2-하이드록시벤질)-5,6,7-트리메톡시크로만-4-온 {3-(2-hydroxybenzyl)-5,6,7-trimethoxychroman-4-one}(화

합물 8): 19a-19c 합성에 사용된 일반적인 절차에 따라, 화합물 7 (0.02g, 0.06mmol)을 수소 (풍선) 분위기 하에서 교반하여 백색 고체 화합물 8 (0.017g, 86%)을 얻었다. 녹는점 102-104℃; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 8.09 (1H, br s), 7.12-7.02 (2H, m), 6.91 (1H, d, *J* = 8.1Hz), 6.79 (1H, t, *J* = 7.2Hz), 6.23 (1H, s), 4.43 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.2Hz), 4.19-4.12 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.14-3.00 (2H, m), 2.78 (1H, dd, *J* = 13.2, 5.7Hz); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 193.9, 160.2, 159.9, 154.9, 154.4, 137.4, 131.1, 128.3, 124.8, 120.1, 116.9, 108.5, 96.1, 70.1, 61.8, 61.5, 56.3, 47.2, 27.4; EI-MS *m/z* 344(M⁺, base), 327, 237, 210; HRMS: Calcd for C₁₉H₂₀O₆(M⁺): 344.1260, found: 344.1271

[0149] 호모이소플라보노이드의 오르쏘-탈메틸화를 위한 일반적인 절차

[0150] 호모이소플라보노이드 (0.12mmol)를 무수 CH₂Cl₂(4mL)에 넣고 교반한 용액에 BC1₃ 용액 (1.0M in CH₂Cl₂; 0.36mL)을 0℃, 질소 분위기 하에서 한 방울씩 가하였다. 혼합물을 0-5℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, H₂O (5mL)를 첨가하고 15분 동안 교반한 후 CH₂Cl₂ (2x20mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H₂O (3x10mL)와 식염수 (2x10mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조하여, 진공에서 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane = 1/3-1/1)로 조화합물을 정제하여 순수한 호모이소플라보노이드를 얻었다.

[0152] 5-하이드록시-3-(2-하이드록시벤질)-7-메톡시크로만-4-온 {5-Hydroxy-3-(2-hydroxybenzyl)-7-methoxychroman-4-one}(화합물 5): 수율: 86%; 백색 고체; 녹는점 128-130℃; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 11.78 (1H, s), 7.12 (1H, td, *J* = 8.1, 1.8Hz), 7.06-7.01 (2H, m), 6.87-6.81 (2H, m), 6.03 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 5.96 (1H, d, *J* = 2.4Hz), 4.44 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.5Hz), 4.17 (1H, t, *J* = 11.4Hz), 3.79 (3H, s), 3.17-3.07 (2H, m), 2.89-2.81 (1H, m); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 199.3, 168.4, 164.4, 163.2, 154.5, 131.3, 128.6, 124.3, 120.6, 116.7, 102.8, 95.2, 94.2, 70.0, 55.9, 45.6, 27.4; EI-MS *m/z* 300(M⁺), 299 (M-H), 193 (base), 165; HRMS: Calcd for C₁₇H₁₆O₅(M⁺): 300.0998, found: 300.0995

[0154] 5-하이드록시-3-(2-하이드록시벤질)-6,7-다이메톡시크로만-4-온 {5-Hydroxy-3-(2-hydroxybenzyl)-6,7-dimethoxychroman-4-one}(화합물 9): 수율: 83%; 담황색 고체; 녹는점 135-137℃; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 11.71 (1H, s), 7.12 (1H, t, *J* = 7.5Hz), 7.06 (1H, d, *J* = 7.5Hz), 6.98 (1H, br s), 6.87-6.81 (2H, m), 6.01(1H, s), 4.42 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.2Hz), 4.21-4.14 (1H, m), 3.86 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.18-3.09 (2H, m), 2.87-2.79 (1H, m); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 199.7, 161.3, 159.2, 155.2, 154.4, 131.3, 130.6, 128.6, 124.3, 120.7, 116.8, 102.9, 91.6, 70.2, 61.1, 56.4, 45.7, 27.3; EI-MS *m/z* 330(M⁺, base), 313, 223, 152; HRMS: Calcd for C₁₈H₁₈O₆(M⁺): 330.1103, found: 330.1095

[0156] (E)-5-하이드록시-3-(2-하이드록시벤질리덴)-7-메톡시크로만-4-온 {(E)-5-Hydroxy-3-(2-hydroxybenzylidene)-7-methoxychroman-4-one}(화합물 6): 수율: 84%; 담황색 고체; 녹는점 172-174℃; ¹H NMR (300MHz, CD₃COCD₃) δ 12.76 (1H, s), 9.09 (1H, br s), 8.02 (1H, s), 7.31 (1H, t, *J* = 7.8Hz), 7.16 (1H, d, *J* = 7.5Hz), 7.02 (1H, d, *J* = 7.8Hz), 6.42 (1H, t, *J* = 7.5Hz), 6.06 (1H, d, *J* = 2.1Hz), 5.99 (1H, d, *J* = 2.1Hz), 5.29 (2H, d, *J* = 1.8Hz), 3.86 (3H, s); ¹³C NMR (75MHz, CD₃COCD₃) δ 186.9, 169.5, 166.6, 164.0, 157.9, 134.7, 133.0, 132.1, 130.5, 122.9, 121.1, 117.3, 104.6, 96.4, 95.1, 69.3, 57.0; EI-MS *m/z* 298(M⁺), 281, 253, 131 (base); HRMS: Calcd for C₁₇H₁₄O₅(M⁺): 298.0841, found: 298.0847

[0158] 시약

[0159] 에서리치아 콜라이 (Escherichia Coli) 유래 지다당(LPS), DMSO (dimethylsulfoxide) 및 β-액틴 항체를 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. DMEM (Dulbeccos modified Eagles medium), 우태혈청

(FBS), 페니실린 및 스트렙토마이신은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. Cell Titer 96® Aqueous One Solution 및 Griess 시약 시스템은 Promega (Madison, MI, USA)에서 구입하였다.

[0161] **세포배양 및 세포생존율 분석**

[0162] RAW 264.7 쥐 대식세포는 한국세포은행 (서울, 한국)에서 입수하여 10% 우태혈청, 100U/mL 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신이 함유된 DMEM에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 세포생존율에 미치는 다양한 화합물의 효과는 CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay of cell proliferation (Promega, Madison, WI, USA)으로 시험하였는데, 이것은 생존세포를 계수하기 위하여 발색반응법을 이용한다. 이 분석법은 배양과정이 완료된 후 남아있는 생존세포 수를 측정하는데 이용하였다. RAW 264.7 세포는 96-웰의 평평한 바닥을 가진 플레이트에 2X10⁴ 세포 밀도가 되도록 놓고 각 화합물을 지시한 농도대로 각 플레이트에 가하였다. 24시간 배양 후 제조사의 지시대로 생존세포 수를 계수하였다. 이 분석방법은 테트라졸리움 화합물 MTS가 포마잔으로 환원되는 것에 기초한 것인데, 포마잔은 490nm에서 최대 흡광도를 나타낸다. 따라서, 세포 배양액 내의 산물의 양은 490nm에서 포마잔의 광학적 밀도로 나타내며, 이것은 직접적으로 생존세포 수와 비례한다.

[0164] **NO 측정**

[0165] 마우스 대식세포에 의해 생성된 NO의 양은 RAW 264.7 세포배양액 상층액에서 측정한 값으로 나타내었다. RAW 264.7 세포는 200 μ L의 배양배지가 든 96-웰 세포배양 플레이트에 5X10⁴ 세포 밀도가 되도록 가하고 12시간 동안 배양하였다. 세포에는 500ng/mL의 LPS와 화합물 1~10을 지시한 농도대로 넣고 18시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess reagent system (Promega)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

[0167] **면역블롯팅 분석**

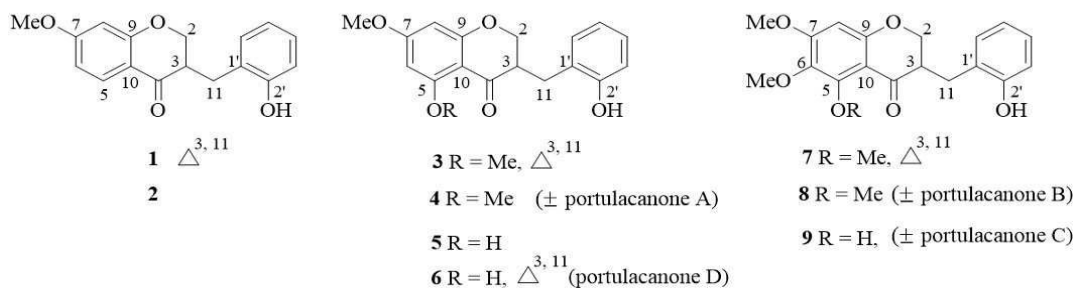
[0168] RAW 264.7 세포에서 이 화합물들이 iNOS 발현을 유도하는 능력을 알아보기 위하여 세포를 LPS 500ng/mL 존재 하에 각 화합물 10 μ M에 18시간 동안 노출하였다. 그 후 세포를 차가운 PBS로 세척하고, 100 μ L의 세포 용균 완충액 (200mM Tris-HCl, pH 7.5, 125mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM MgCl₂, 25mM β -글리세로포스페이트, 50mM NaF, 100 μ M Na₃VO₄, 1mM PMSF, 10 μ g/ml 류펩틴 (leupeptin) 및 10 μ g/ml 아프로티닌)을 각 시료에 가하였다. 단백질을 SDS (sodium dodecylsulfate)로 변성한 후 시료는 SDS-PAGE한 후 나이트로셀룰로스 막으로 전이하였다. 상온에서 5% 탈지분유를 함유하는 TBST (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl 및 0.1% tween-20) 완충액에 막을 노출하여 비특이적 결합을 저해하였다. 그 후 막은 iNOS 특이적 항체 (BD Biosciences) 및 β -액틴 특이적 항체 (Sigma)와 함께 4°C에서 밤새 배양하였다. 면역반응성 밴드는 시료를 호스래디쉬 퍼옥시데이즈-결합 이차 항체 및 증강 화학발광제 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)와 함께 배양하여 탐지하였다.

[0170] **도 4 설명**

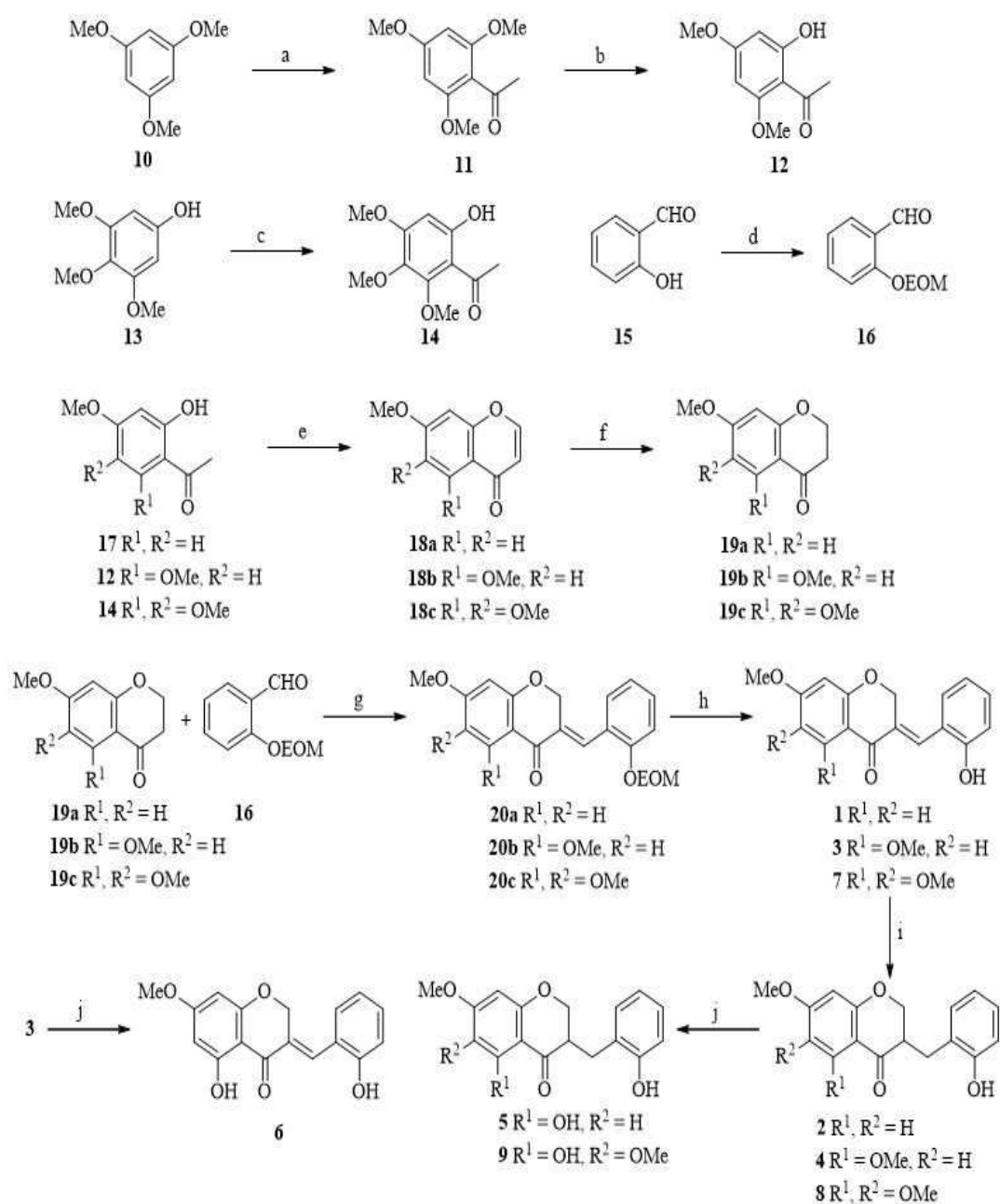
[0171] 쥐의 대식세포에서 이 화합물들이 LPS-유도 iNOS 발현을 유도하는 능력을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 500ng/mL LPS와 각 화합물 10 μ M 또는 LPS 단독에 18시간 동안 노출하였다. 각 세포 용해물로부터 얻은 30 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE로 분석하였다. 면역블롯팅은 상기와 같이 수행하였다. β -액틴을 대조군으로 사용하였다. 이미지 분석 소프트웨어를 사용하여 밴드를 정량하고, 담체-처리된 RAW 264.7 세포의 이미지와 비교한 상대 강도를 나타내었다.

도면

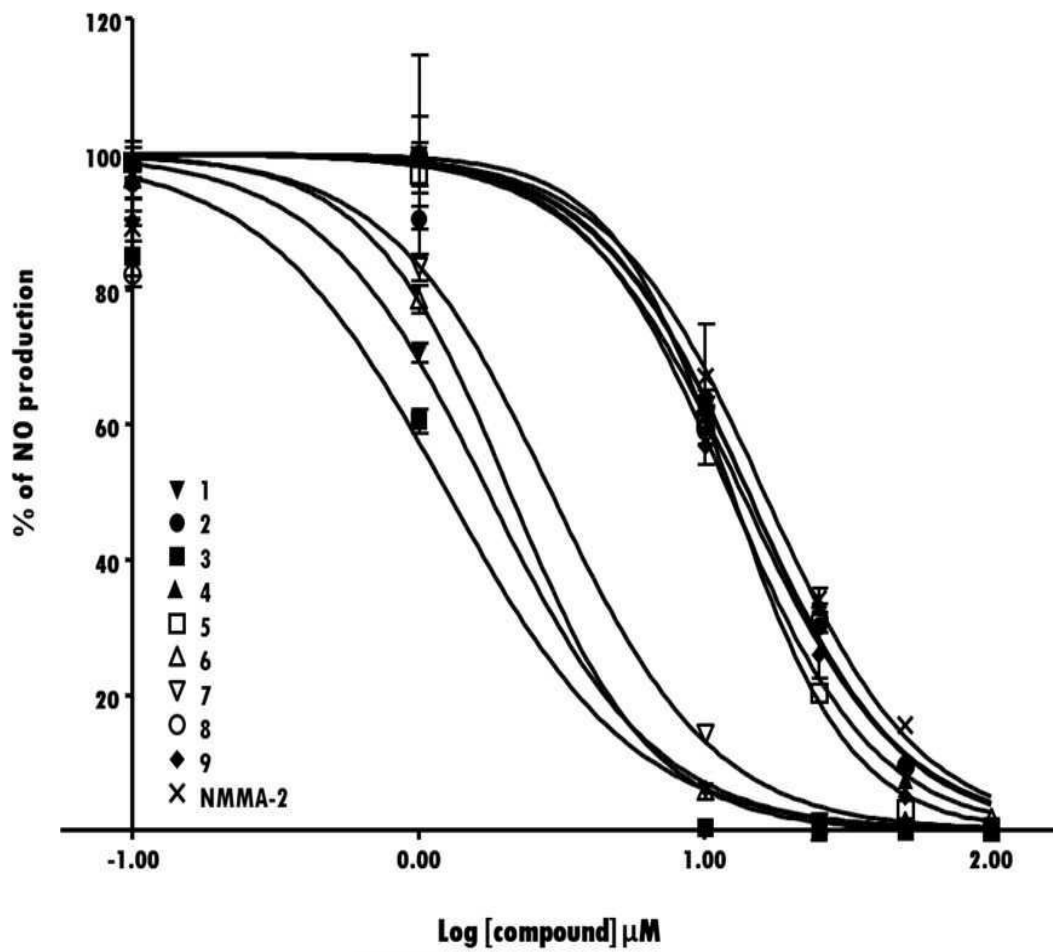
도면1



도면2



도면3



도면4

