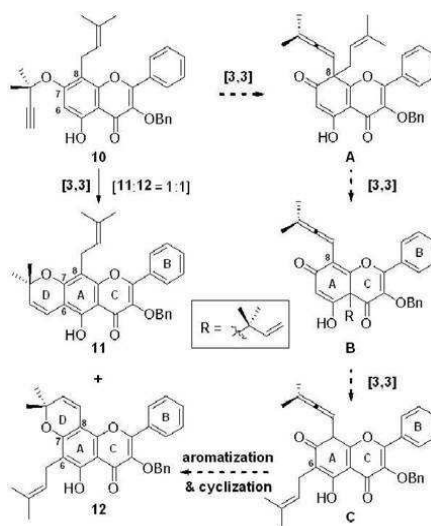


- 전체 청구항 수 : 총 6 항

- (57) 요약

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

**A61P 13/12** (2018.01)

(72) 발명자

**장홍준**

경기도 수원시 장안구 조원로69번길 23 가동 102  
호 (조원동, 동일그린맨션)

**김은선**

경기도 안산시 상록구 선진로 114 202동 610호 (사동, 본오2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1C1B3002626

부처명 과학기술정보통신부(2017Y)

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업 / 신진연구지원사업 / 신진 연구(총 연구비3억초과~5억이하)

연구과제명 Neurovascular unit 통합조절에서 autophagy 매개 허혈성 뇌졸중 손상 기전 및 위해 기여  
요인 규명

기 여 율 1/1

주관기관 한양대학교 에리카산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

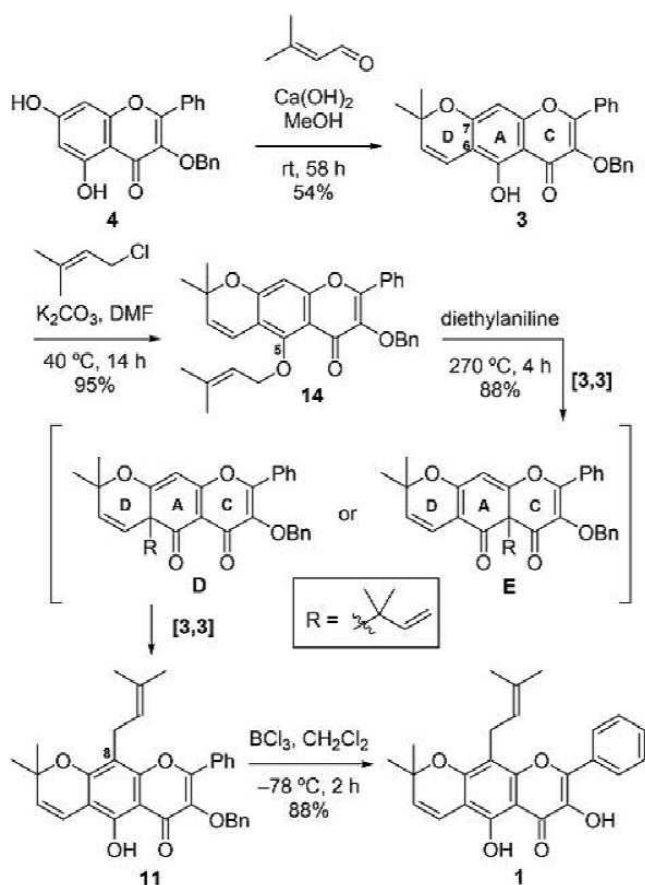
하기 반응식 1에서, 화합물 4의 전자고리화(electrocyclization)에 의한 화합물 3의 합성 단계;

상기 화합물 3의 하이드록실기의 프레닐화에 의한 화합물 14의 합성 단계;

상기 화합물 14의 [3,3] 시그마트로픽 재배열(sigmatropic rearrangement)에 의한 화합물 11의 합성 단계; 및

상기 화합물 11의 탈보호 반응에 의한 화합물 1의 세리세틴의 합성 단계를 포함하는 세리세틴의 합성방법:

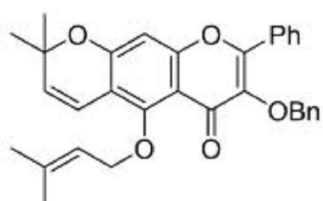
[반응식 1]



#### 청구항 2

하기 화학식 1로 표현되는 화합물:

[화학식 1]

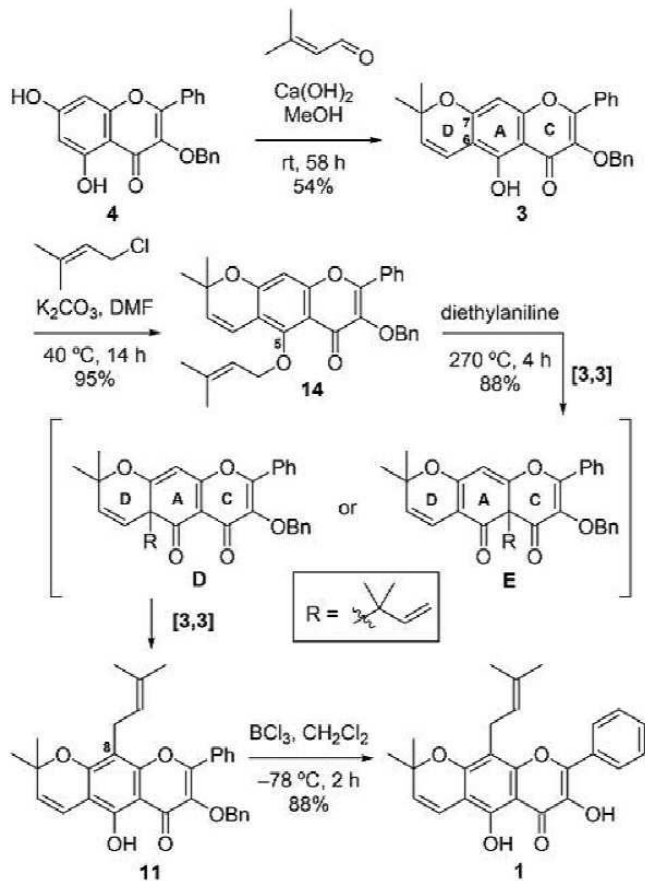


### 청구항 3

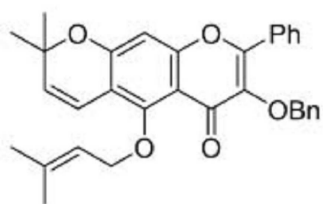
하기 반응식 1에서, 화합물 4의 전자고리화(electrocyclization)에 의한 화합물 3의 합성 단계; 및

상기 화합물 3의 하이드록실기의 프레닐화에 의한 화합물 14의 합성 단계를 포함하는 하기 화학식 1의 화합물 14의 합성방법:

[반응식 1]



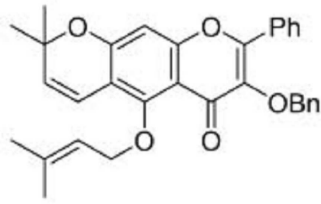
[화학식 1]



### 청구항 4

하기 화학식 1의 화합물을 포함하는 약물유도 신장손상 예방 및 치료용 조성물:

[화학식 1]



#### 청구항 5

제4항에 있어서,

약물은 항암제인, 약물유도 신장손상 예방 및 치료용 조성물.

#### 청구항 6

제4항에 있어서,

약물유도 신장손상은 급성 및 만성 신부전을 포함하는, 약물유도 신장손상 예방 및 치료용 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 약물유도 신장손상 보호활성을 나타내는 신규 세리세틴 전합성법 및 이를 유효성분으로 하는 약학 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0003] 프레닐화 플라보노이드는 항산화제, 항암제, 항진균제 및 에스트로겐 활성과 같은 광범위한 생물학적 특성을 갖는 플라보노이드의 하위 클래스이다. 이들 플라보노이드에 친유성 프레닐기를 첨가하면 친유성을 증가시켜 생체 내에서의 투과성 및 생체이용률을 증가시킬 수 있다.

[0004] 프레닐화 플라보노이드인 세리세틴(Sericetin)(1)은 처음에 1960년 진노랑상사화(*Mundulea sericea*)의 뿌리 껍질에서 분리되었다(도 1). 이 천연 플라보노이드는 C(8) 프레닐기로서 A 고리에 부착된 2개의 이소프렌 단위 및 C(6)/C(7) 디하이드로펜 고리를 갖는다. 세리세틴의 구조는 원래 결정되지 않았지만 분광 분석 결과에 기초하여 화합물 1 또는 화합물 2인 것으로 제안되었다. 화합물 1의 첫 번째 합성은 Jain 및 Zutshi에 의해 달성되었으며 갈란긴(galangin)의 C(6) 및 C(8)-비스프레닐화/DDQ-매개 산화 고리화를 이용하여 1% 미만의 수율의 미량의 생성물로서 세리세틴(1)을 합성하여 화합물 1을 올바른 구조로 결정하였다.

[0005] 이 독특한 프레닐화 플라보놀 천연물의 생물학적 특성은 2011년 Mahidol과 Ruchirawat가 던바리아 롱가세모사(*Dunbaria longacemosa*)의 전체 식물에서 규명하였으며, 상기 천연물은 다양한 암 세포주에서 항종양 활성을 나타냈다.

[0006] 그러나, 현재까지 고수율로 세리세틴을 합성할 수 있는 방법은 개시된 바 없다.

### 선행기술문헌

#### 비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 1. Peralta, M. A. et al. Food Chem. Toxicol. 2018, 114, 285291.

- (비특허문헌 0002) 2. Tao, Z. et al. Sci. Rep. 2017, 7, 12445.
- (비특허문헌 0003) 3. Sun, Y. J. et al. RSC Adv. 2015, 5, 8273682736.
- (비특허문헌 0004) 4. Yang, X. et al. Trends Food Sci. Technol. 2015, 44, 93104.
- (비특허문헌 0005) 5. Botta, B. et al. Curr. Med. Chem. 2005, 12, 713739.
- (비특허문헌 0006) 6. Mukai, R. et al. J. Nutr. 2013, 143, 15581564.
- (비특허문헌 0007) 7. Chen, Y. et al. Pharm. Res. 2008, 25, 21902199.
- (비특허문헌 0008) 8. Mukai, R. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2018, 82, 207215.
- (비특허문헌 0009) 9. Terao, J. et al. Arch. Biochem. Biophys. 2014, 559, 1216.
- (비특허문헌 0010) 10. Burrows, B. F. et al. Proc. Chem. Soc. 1960, 177179.
- (비특허문헌 0011) 11. Jain, A. C. et al. Tetrahedron 1973, 29, 33473350.

## 발명의 내용

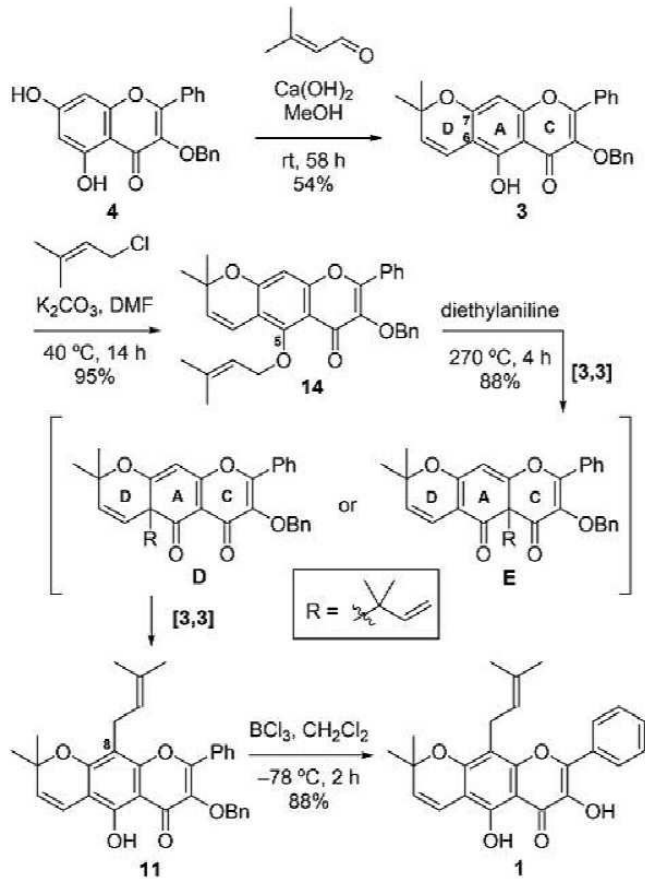
### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 고수율의 세리세틴의 역합성 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 세리세틴의 역합성 시 생성되는 신규한 프레닐화 4환계 중간체 및 이의 합성방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 세리세틴의 프레닐화 4환계 중간체의 약물유도 신장손상 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 반응식 1에서, 화합물 4의 전자고리화(electrocyclization)에 의한 화합물 3의 합성 단계; 상기 화합물 3의 하이드록실기의 프레닐화에 의한 화합물 14의 합성 단계; 상기 화합물 14의 [3,3] 시그마트로픽 재배열(sigmatropic rearrangement)에 의한 화합물 11의 합성 단계; 및 상기 화합물 11의 탈보호 반응에 의한 화합물 1의 세리세틴의 합성 단계를 포함하는 세리세틴의 합성방법을 제공한다:

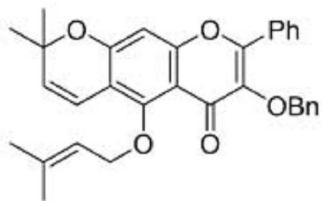
[0014] [반응식 1]



[0015]

[0016] 본 발명은 또한 하기 화학식 1로 표현되는 화합물을 제공한다:

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 본 발명은 또한 상기 반응식 1에서, 화합물 4의 전자고리화(electrocyclization)에 의한 화합물 3의 합성 단계; 및 상기 화합물 3의 하이드록실기의 프레닐화에 의한 화합물 14의 합성 단계를 포함하는 상기 화학식 1의 화합물 14의 합성방법을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한 상기 화학식 1의 화합물을 포함하는 약물유도 신장손상 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한 유효량의 상기 화학식 1의 화합물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 약물유도 신장손상의 치료방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0023] 본 발명은 (3) 0-벤질 갈란신의 전자고리화, 프레닐화, Claisen/Cope 재배열 및 탈보호의 4단계 반응을 통해 간단하고 효율적인 세리세틴 합성법을 제공하며, 상기 합성 공정에서 수득한 중간체는 약물유도 신장손상에 대해 예방 및 치료적 효과를 제공한다.

## 도면의 간단한 설명

[0025]

도 1은 세리세틴 및 이소세리세틴의 구조를 나타낸다.

도 2는 우연한 이성질체화의 이론적 근거를 나타낸다.

도 3은 시스플라틴-유도 신세관 세포 죽음에 대한 화합물(CPD) 1, 2, 11, 12 및 14의 보호 효과를 나타낸다.

신세관 상피세포(Renal tubular epithelial cells; NRK-52E cells)에 시스플라틴(CP; 30  $\mu$ M)의 유무 하에서 화합물 1, 2, 11, 12 및 14(20  $\mu$ M)를 24시간 동안 처리한다. MTT 분석을 통해 세포생존율을 측정하였다. 디메틸 설펝사이드(DMSO; 최종 농도 0.2%)를 비히클 대조군으로 사용한다. 값은 평균 $\pm$ SEM이다. \*\*  $p<0.01$  대 대조군, ##  $p<0.01$  대 시스플라틴-처리 세포. N=3

도 4는 신세관 세포에서 화합물(CPD) 14에 의한 시스플라틴-유도 세포독성의 억제를 나타낸다. 신세관 상피세포(NRK-52E cells)에 시스플라틴(CP; 30  $\mu$ M) 유무 하에서 화합물 14(0, 1, 10 및 50  $\mu$ M)를 24시간 동안 처리한다.

(A) 현미경 하에서 관찰된 형태적 변화를 나타낸다. 스케일 바; 100  $\mu$ m.

(B-C) MTT 분석을 통해 측정된 세포생존율을 나타낸다. 값은 평균 $\pm$ SEM이다. \*\*  $p<0.01$  대 대조군. ##  $p<0.01$  대 시스플라틴-처리 세포. N=3.

도 5는 신세관 세포에서 시스플라틴-유도 세포손상에 대한 화합물(CPD) 14의 보호 메커니즘을 나타낸다.

신세관 상피세포(NRK-52E cells)에 시스플라틴(CP; 30  $\mu$ M) 유무 하에서 화합물 14(10  $\mu$ M)를 24시간 동안 처리한다.

(A) 디클로로플루오레세인(DCF) 염색을 통해 측정된 활성 산소종 발생 변화를 나타낸다(왼쪽 패널). DCF 플루오레세인 신호 점수는 ROI 통계 프로그램을 이용하여 계산한다(오른쪽 패널).

(B) JC-1 염료 및 형광 현미경을 이용하여 분석한 미토콘드리아 막 전위를 나타낸다(왼쪽 패널). 형광 신호는 ROI 통계 프로그램을 이용하여 계산한다(오른쪽 패널). 적색 형광은 정상 막 전위에서 존재하는 JC-1의 응집 형태에 해당하고, 녹색 형광은 붕괴된 낮은 막 전위에서 존재하는 단량체 형태를 나타낸다.

(C) 웨스턴 블랏팅을 통해 검출된 절단된 카스파제-3(17-19 kDa)의 발현을 나타낸다. 밴드 강도는 Image J 프로그램을 이용하여 계산한다. 값은 평균 $\pm$ SEM이다. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  대 대조군. #  $p<0.05$ , ##  $p<0.01$  대 시스플라틴-처리 세포. N=3.

도 6은 랫트에서 시스플라틴-유도 신장손상에 대한 화합물(CPD) 14에 의한 생체내 신장보호를 나타낸다.

CP(6 mg/kg) 및/또는 화합물 14(1 mg/kg)를 랫트에 투여한다.

(A) 웨스턴 블랏팅을 통해 분석된 신장에서의 카스파제-3 활성화의 수준을 나타낸다.

(B) 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 통해 관찰된 신장 조직에서의 조직학적 변화를 나타낸다. 스케일 바; 100  $\mu$ m. \*, 각질제거 및 살로링; #, 세포 죽음 및 세관 손상; 화살촉, 캐스트 형성.

(C 및 D) 혈중 요소 질소(BUN; C) 및 혈청 크레아티닌(D) 수준을 통해 측정된 신장 기능에서의 변화를 나타낸다. 값은 평균 $\pm$ SEM이다. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  대 대조군, #  $p<0.05$  대 시스플라틴-처리 랫트. N=6 rats/group.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

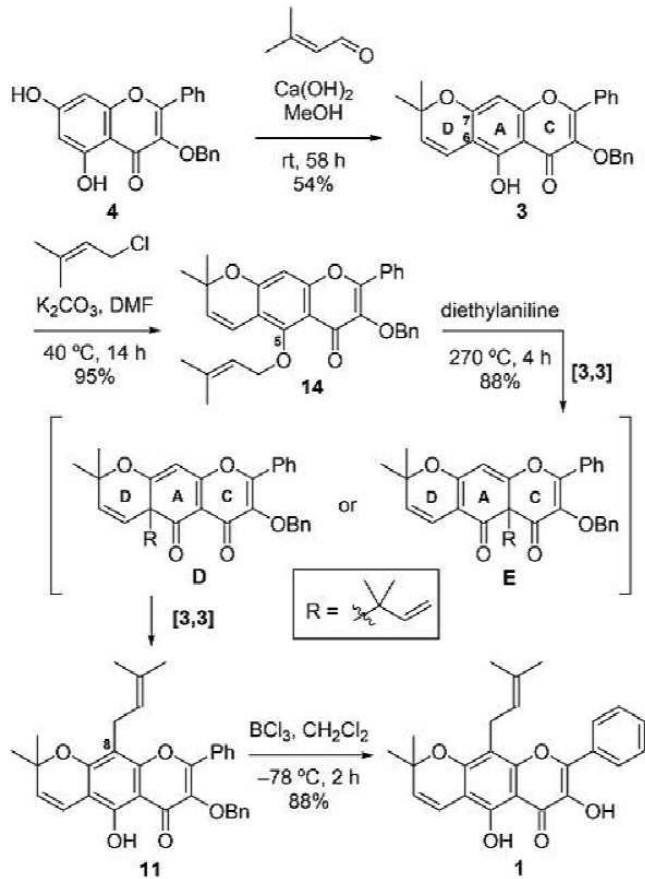
[0026]

이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0027]

본 발명은 하기 반응식 1에서, 화합물 4의 전자고리화(electrocyclization)에 의한 화합물 3의 합성 단계; 상기 화합물 3의 하이드록실기의 프레닐화에 의한 화합물 14의 합성 단계; 상기 화합물 14의 [3,3] 시그마트로픽 재배열(sigmatropic rearrangement)에 의한 화합물 11의 합성 단계; 및 상기 화합물 11의 탈보호 반응에 의한 화합물 1의 세리세틴의 합성 단계를 포함하는 세리세틴의 합성방법을 제공한다:

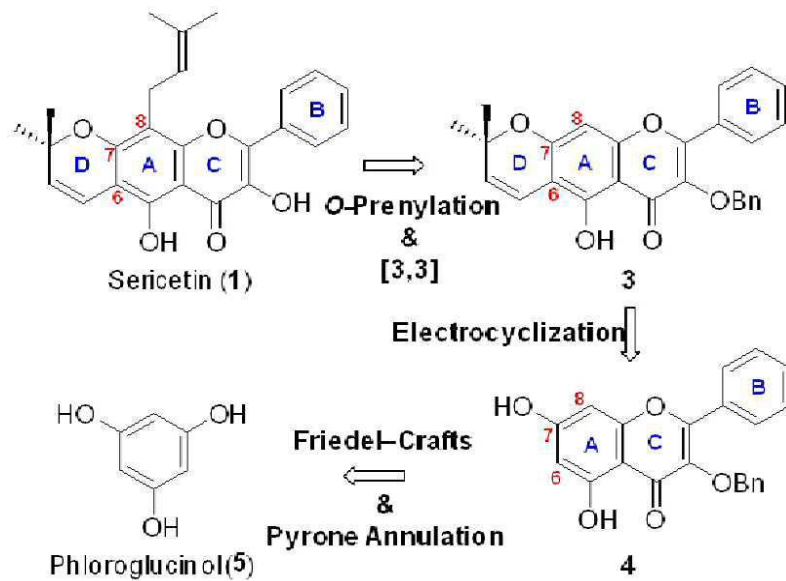
[0028] [반응식 1]



[0029]

[0030] 본 발명자들은 천연물에서 발견되는 플라보노이드의 합성 및 생물학적 평가에 대한 지속적인 노력의 일환으로, 4환계 플라보노이드 세리세틴(1)의 합성과 이의 시스플라틴-유도 급성 신장 손상(AKI)에 미치는 영향에 관심을 가졌다. 본 발명의 세리세틴의 합성방법은 하기 반응식 2의 세리세틴(1)의 역합성 방법이다:

[0031] [반응식 2]



[0032]

[0033] 즉, C(3) O-벤질 갈란긴(화합물 4)으로부터 4환계 페놀 3을 획득하기 위한 전자고리화, 페놀 3의 프레닐화, 방향족 [3,3]-시그마트로픽 재배열 및 탈보호 반응을 활용한 간단한 합성 공정을 통해 고수율로 세리세틴을 합성하는 것을 특징으로 한다.

[0034] 본 발명의 세리세틴의 합성방법을 단계별로 설명하면 다음과 같다:

[0035] 제1단계는 0-벤질 갈란긴(화합물 4)의 전자고리화를 통해 공지의 플라보놀 3(화합물 3)을 합성하는 것이다. 이를 위해, 0-벤질 갈란긴(화합물 4)을  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  및 3-메틸-2-부테날과 반응시켜 전자고리화를 통해 4단계 코어를 갖는 화합물 3을 합성한다. 상기 화합물 4는 상기 반응식 2의 화합물 5(플로로글루시놀(phloroglucinol))의 통상적인 프리델 크래프트/피론 고리형성을 통해 합성할 수 있다.

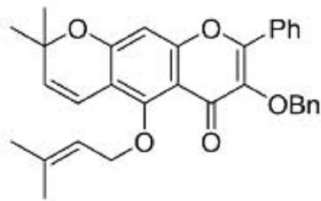
[0036] 제2단계는 4단계 코어를 갖는 플라보놀 3의 프레닐화를 통해 화합물 14(아릴 프레닐 에테르)를 합성하는 것이다. 이를 위해, 플라보놀 3을  $\text{K}_2\text{CO}_3$  및 프레닐 클로라이드와 반응시켜 플라보놀 3의 하이드록실기를 프레닐 화시켜 화합물 14(아릴 프레닐 에테르,  $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_5$ )를 수득한다.

[0037] 제3단계는 화합물 14(아릴 프레닐 에테르)의 [3,3]-시그마트로픽 재배열을 통해 화합물 11( $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_5$ )을 수득하는 것이다. [3,3]-시그마트로픽 재배열은 방향족 클라이젠(Claissen) 재배열로 화합물 14(아릴 프레닐 에테르)를 디에틸아닐린 중에 용해시켜 화합물 11을 수득할 수 있다.

[0038] 제4단계는 화합물 11의 탈보호 반응을 통해 화합물 1의 세리세틴( $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_5$ )을 수득하는 것이다.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에서  $\text{BCl}_3$ 에 의한 화합물 11의 벤질기의 탈보호를 통해 세리세틴을 수득할 수 있다.

[0040] 본 발명은 또한 하기 화학식 1로 표현되는 화합물을 제공한다:

[0041] [화학식 1]



[0042]

[0043] 또한, 본 발명은 상기 반응식 1에서, 화합물 4의 전자고리화(electrocyclization)에 의한 화합물 3의 합성 단계; 및 상기 화합물 3의 하이드록실기의 프레닐화에 의한 화합물 14의 합성 단계를 포함하는 상기 화학식 1의 화합물 14의 합성방법을 제공한다.

[0044] 상기 화학식 1의 화합물 14(아릴 프레닐 에테르,  $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_5$ )는 본 발명의 세리세틴 합성방법 중에서 생성되는 중간체로 상기 반응식 1에서, 0-벤질 갈란긴(화합물 4)의 전자고리화를 통해 4단계 코어를 갖는 플라보놀 3을 합성하고, 4단계 코어를 갖는 플라보놀 3의 프레닐화를 통해 합성할 수 있다.

[0046] 본 발명은 또한 상기 화학식 1의 화합물을 포함하는 약물유도 신장손상 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0047] 급성 신장손상(Acute Kidney Injury, AKI)은 약물 또는 화합물질로 인한 대표적인 신장손상으로 만성 신부전의 발병에 기여한다. 시스플라틴과 같은 항암제를 사용하는 경우 신장에 고농도의 항암제가 축적되면 신장손상이 발생하여 신장 기능이 손상될 수 있다.

[0048] 상기 화학식 1의 화합물 14는 신세관 세포에서 항암제에 의해 유도된 신장손상에 대해 농도 의존적으로 강력한 보호 활성을 갖는 특징이 있다.

[0049] 또한, 항암제에 의해 유도된 신장손상은 활성산소종(ROS) 및 미토콘드리아 기능장애에 의해 매개될 수 있다. 항암제는 신세관 세포에서 ROS 발생을 증가시키고 증가된 ROS는 화합물 14를 처리함으로써 감소된다. 또한, 항암제에 의해 유도된 레독스 균형이 세관 세포에서 미토콘드리아 손상을 초래할 수 있는데 미토콘드리아 막 전위를 측정하면 항암제에 노출된 세관 세포에서 형광이 유의하게 증가되어 미토콘드리아 막 전위에 영향을 줄 수 있다. 그러나, 화합물 14 및 항암제가 함께 처리된 신세관 세포에서 형광은 역전되어 정상적인 막 전위가 회복됨이 확인된다. 또한, 항암제 처리 시 세관 세포에서 세포사멸성 카스파제 캐스케이드가 활성화되며, 화합물 14는 절단된 카스파제-3의 수준을 상당히 감소시킨다. 아울러, 항암제에 의해 유도된 AKI 동물 모델에서 화합물

14 및 항암제를 처리하면 동물 모델의 신장에서 카스파제-3의 활성화가 증가되지 않는다. 또한, 동물 모델의 신장 조직의 조직병리학적 분석 및 신장 기능에 대한 대표적인 임상 마커인 혈중 요소 질소와 혈청 크레아티닌 수준 측정 결과, 화합물 14의 처리는 손상된 신장 기능을 유의하게 회복시켜, 상기 화합물 14는 약물유도 신장손상에 대한 치료적 특징을 갖는다.

- [0050] 따라서, 본 발명의 화합물 14는 약물유도 신장손상에 대해 예방 및 치료제로 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, 화합물 14는 상기 약물유도 신장손상에 의한 급성 및 만성 신부전의 예방 및 치료에 적용할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 투여될 수 있으며, 경구 투여 시에는 상기 유효성분 이외에 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 추가로 포함할 수 있다. 주사제의 경우에, 본 발명의 약학적 조성물은 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있다. 또한 국소 투여 시에 본 발명의 조성물은 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같이 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약앰플 또는 다중 투약형태로 제조할 수 있다. 기타 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0053] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 구강, 에어로졸, 협측, 피부, 피부내, 흡입, 근육내, 비강내, 안구내, 폐내, 정맥내, 복막 내, 비강, 안구, 경구, 귀, 주사, 패치, 피하, 허 밀, 국소, 또는 경피 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0055] 이와 같은 임상 투여를 위해 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 기술을 이용하여 적합한 제형으로 제제화할 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 유효성분은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 또한, 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야의 공지된 기법 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 약학적 조성물의 유효 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 당해 기술 분야의 통상의 전문가에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로, 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직하게는, 1일 0.001 내지 100 mg/체중 kg으로, 보다 바람직하게는 0.01 내지 30 mg/체중 kg으로 투여한다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 여러 번 나누어 투여할 수도 있다. 본 발명의 화합물 14는 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%의 양으로 존재할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여방법에는 제한이 없으며, 예를 들면, 경구, 직장, 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막, 또는 뇌혈관(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명은 유효량의 상기 화학식 1의 화합물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 약물유도 신장손상의 치료방법을 제공한다.
- [0061] 상기 대상체는 인간 및 비인간 동물(예를 들어, 마우스, 랫트, 소, 말, 돼지, 양, 원숭이, 개, 고양이, 새 등)

이나, 특별히 제한하지는 않는다.

[0062] 본 발명의 약물유도 신장손상의 치료방법의 유효성분인 화학식 1의 화합물 14, 이의 합성법, 이의 제형, 투여법 등은 상기에서 구체적으로 설명하고 있으므로 중복 기재를 피하기 위해 별도로 기재하지 않는다.

[0063] 본 발명의 약물유도 신장손상의 치료방법의 치료 대상은 약물유도 신장손상에 따른 만성 신부전의 치료에 적용할 수 있다.

[0064] 이하, 본 발명의 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식이 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0066] <실시예>

[0067] (실험 과정)

[0068] Varian Mercury 400 및 JEOL ECZ600R에서 양성자( $^1\text{H}$ ) 및 탄소( $^{13}\text{C}$ ) NMR 스펙트럼을 얻었다. 화학적 이동은 내부 표준으로서  $\text{Me}_4\text{Si}$  또는  $\text{CHCl}_3$ 와 함께 ppm 단위로 보고된다. 녹는점은 IA9100에서 얻었다. 모든 반응은 통상적으로 드라이 질소의 불활성 분위기 하에서 수행되었다. 박막 크로마토그래피(Kieselgel 60 F254, Merck)로 반응을 확인하였다. 스팟은 UV 광 하에서 관찰하고, 아세트산, 황산 및 메탄올의 혼합물에서 p-아니스알데히드 용액에 침지시킨 후 탄화시켜 컬러화함으로써 검출하였다. 수성 후 처리에서, 모든 유기 용액을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고 회전 증발 전에 여과하였다. 미정제 화합물을 실리카겔(Kieselgel 60, 70-230 mesh, Merck)상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 달리 언급되지 않는 한, 물질 및 모든 용매는 상업적 공급업체로부터 얻어 정제없이 사용되었다. 톨루엔, 메틸렌 클로라이드 및 THF를 4Å 분자체로 건조시켰다. 시스플라틴(시스-디아민클로로플라티늄 II)은 미국 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 구입하였다. 시스플라틴은 시험관내 및 생체내 실험을 위해 포스페이트-완충 식염수(PBS)에 용해된 스톱 용액으로서 새로 제조되었다.  $\text{CM-H}_2\text{-DCFDA}$ (5-(및 -6)-클로로메틸 -2', 7''-디클로로디하이드로플루오레세인 디아세테이트 아세틸 에스테르) 및 JC-1은 Invitrogen(UK)에서 구입하였다. 카스파제-3을 표적화하는 1차 항체는 Cell Signaling Technology(USA)로부터 얻었다. 다른 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich에서 구입했다.

[0069] (아릴 프로파질 에테르 10의 시그마트로픽 재배열)

[0070] 디에틸아닐린(10 mL) 중 아릴 프로파질 에테르 10(40.1 mg, 0.081 mmol)의 용액을 270°C에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공에서 농축시키고 실리카겔의 패드(헥산/EtOAc, 5/1)를 통해 여과하여 화합물 11 및 화합물 12의 1:1 혼합물을 수득하였다. 혼합물을 칼럼 크로마토그래피(실리카겔; 헥산/EtOAc, 50/1 내지 30/1)로 정제하여 11(18.1 mg, 45%) 및 12(17.3 mg, 43%)를 수득하였다.

[0071] **[11의 경우]** 밝은 노란색 고체(mp 140/141°C):  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.9 (s, 1H), 8.017.98 (m, 2H), 7.497.42 (m, 3H), 7.337.31 (m, 2H), 7.277.25 (m, 3H), 6.76 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 5.63 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 5.52 (dddd,  $J$  = 7.2, 7.2, 1.4, 1.4 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 3.46 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.77 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.47 (s, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.0, 156.6, 156.0, 154.1, 153.5, 137.6, 136.2, 131.5, 130.7, 130.5, 128.58, 128.51, 128.19, 128.09, 128.00, 127.85, 122.1, 115.7, 107.3, 105.7, 105.0, 77.8, 74.4, 28.3, 25.9, 21.6, 18.1; HREIMS  $m/z$ 는 494.2095에서 확인( $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_5$ 에 대한 계산치  $[\text{M}]^+$  494.2093).

[0072] **[12의 경우]** 밝은 노란색 고체(mp 114/115°C):  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.9 (s, 1H), 7.967.94 (m, 2H), 7.487.41 (m, 3H), 7.307.28 (m, 2H), 7.257.22 (m, 3H), 6.73 (d,  $J$  = 9.9 Hz, 1H), 5.57 (d,  $J$  = 10.4 Hz, 1H), 5.26 (dddd,  $J$  = 7.3, 7.3, 1.2, 1.2 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 3.36 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 1.82 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.47 (s, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.0, 158.7 157.2, 155.9, 149.5, 137.8, 136.3, 131.5, 130.8, 130.6, 128.81, 128.60, 128.33, 128.19, 128.13, 127.0, 122.0, 115.1, 112.5, 105.5, 100.7,

77.9, 74.4, 28.1, 25.8, 21.3, 17.9; HREIMS  $m/z$ 는 494.2092에서 확인( $C_{32}H_{30}O_5$ 에 대한 계산치  $[M]^+$  494.2093).

[0073] (세리세틴(1)의 합성)

[0074]  $CH_2Cl_2$ (10 mL) 중 화합물 11(120.1 mg, 0.242 mmol)의 냉각된 용액( $-78^\circ C$ )에  $BCl_3$ (0.484 mL, 톨루엔 중 1.0M 용액, 0.484 mmol)을 첨가하고 생성된 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 동일한 온도에서  $H_2O$ (100 mL)로 토크닝하고 EtOAc(30 mL)로 희석하였다. 층을 분리하고, 수층을 EtOAc로 추출하였다. 혼합한 유기층을 염수로 세척하고, 무수  $Na_2SO_4$  상에서 건조시키고, 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(실리카겔; 헥산/EtOAc, 4/1 내지 2/1)로 정제하여 황색 고체의 세리세틴(1)(86.1 mg, 88 %)을 수득하였다( $mp$  151152 $^\circ C$ ):  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  11.9 (s, 1H), 8.228.19 (m, 2H), 7.547.51 (m, 2H), 7.487.45 (m, 1H), 6.75 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 5.65 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 5.23 (dddd,  $J$  = 7.1, 7.1, 1.3, 1.3 Hz, 1H), 3.53 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.83 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.48 (s, 6H);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  175.7, 157.2, 153.8, 153.0, 144.8, 136.4, 131.8, 131.2, 130.1, 128.6, 128.2, 127.6, 122.1, 115.7, 107.8, 104.9, 103.6, 77.9, 28.3, 25.8, 21.5, 18.1; HREIMS  $m/z$ 는 404.1625에서 확인( $C_{25}H_{24}O_5$ 에 대한 계산치  $[M]^+$  404.1624).

[0075] (전자고리화에 의한 공지의 플라보놀 3의 합성)

[0076] 메탄올(5mL) 중 화합물 4(248.7 mg, 0.69 mmol)의 교반 혼합물에  $Ca(OH)_2$ (204.4 mg, 2.76 mmol) 및 3-메틸-2-부테날(프레날; 0.67 mL, 6.90 mmol)을 실온에서 첨가하였다. 실온에서 58시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 EtOAc/ $H_2O$ 로 희석하고 5N HCl로 산성화시켰다. 층을 분리하고,  $H_2O$  및 염수로 세척하고, 무수  $Na_2SO_4$  상에서 건조시키고, 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(실리카겔; 헥산/EtOAc, 20/1)로 정제하여 공지의 화합물 3(159.2 mg, 54%)을 수득하였다.

[0077] (아릴 프레닐 에테르 14의 합성)

[0078] DMF(20 mL) 중 페놀 3(498.5 mg, 1.169 mmol)의 용액에  $K_2CO_3$ (807.8 mg, 5.845 mmol) 및 프레닐 클로라이드 (0.395 mL, 3.507 mmol)를 실온에서 첨가하였다. 40 $^\circ C$ 에서 14시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 포화 수성  $NH_4Cl$ 로 토크닝하고 EtOAc로 희석하였다. 층을 분리하고, 수층을 EtOAc로 추출하였다. 혼합한 유기층을 염수로 세척하고, 무수  $Na_2SO_4$  상에서 건조시키고, 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(실리카겔; 헥산/EtOAc, 2/1)로 정제하여 아릴 프레닐 에테르 14(547.9 mg, 95%)를 수득하였다:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.967.92 (m, 2H), 7.437.37 (m, 3H), 7.327.28 (m, 2H), 7.247.19 (m, 3H), 6.76 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.68 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 5.67 (dd,  $J$  = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 5.07(s, 2H), 3.45 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.46 (s, 6H);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  173.4, 157.66, 157.44, 153.84, 153.66, 139.5, 138.3, 136.5, 130.7, 129.99, 129.97, 128.7, 128.3, 127.96, 127.87, 120.1, 113.4, 112.9, 100.3, 77.5, 74.0, 72.2, 28.3, 25.9, 18.2; HREIMS  $m/z$ 는 494.2094에서 확인( $C_{32}H_{30}O_5$ 에 대한 계산치  $[M]^+$  494.2093).

[0079] (아릴 프레닐 에테르 14의 시그마트로픽 재배열에 의한 화합물 11의 합성)

[0080] 디에틸아닐린(100 mL) 중 아릴 프레닐 에테르 14(547.9 mg, 1.108 mmol)의 용액을 270 $^\circ C$ 에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공에서 농축시키고 컬럼 크로마토그래피(실리카겔; 헥산/EtOAc, 20/1 내지 10/1)로 정제하여 화합물 11(481.3 mg, 88%)을 수득하였다.

[0081] (세포 배양)

[0082] 랫트 신세관 상피세포주 NRK-52E 세포는 ATCC(USA)로부터 입수하였다. 세포를 5% 열에 의해 불활성화된 우태아 혈청(HycloneTM, USA), 100 units/mL 페니실린 및 100  $\mu g/mL$  스트렙토마이신(Welgene, Korea)이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)에서 성장시켰다. 이들 세포를 37 $^\circ C$ 에서 가습 인큐베이터(95% 공기, 5%  $CO_2$ )에서 유지시키고, 80-90% 컨플루언스에서 계대 배양 또는 실험에 사용하였다.

- [0083] (세포 생존율)
- [0084] 세포 생존율은 MTT(3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드) 어세이를 사용하여 측정하였다. 간략하게, NRK-52E 세포를 96-웰 배양 플레이트에  $5 \times 10^4$  cells/mL로 씨딩하였다. 인큐베이션 후, 세포를 cisPt 및/또는 CPD 14로 24시간 동안 처리하였다. MTT(최종 농도 5 mg/mL)를 각 웰에 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 불용성 포르마잔을 가용화하기 위해 100 $\mu$ L의 DMSO를 첨가하고 다중 모드 플레이트 리더(PerkinElmer Enspire)를 사용하여 570 nm에서 흡광도에 의해 세포 생존율을 기록하였다.
- [0085] (활성 산소종(ROS) 및 미토콘드리아 막 전위)
- [0086] 세포 손상 동안 ROS 생성은 CM-H<sub>2</sub>-DCFDA 염색을 사용하여 측정되었다. 세포를  $5 \times 10^5$  cells/mL로 6-웰 배양 플레이트에 씨딩하였다. 인큐베이션 후, 세포를 cisPt 및/또는 CPD 14로 24시간 동안 처리하였다. DCF(최종 10  $\mu$  M)를 각 웰에 첨가하고 암실에서 20분 동안 37°C에서 인큐베이션 하였다. JC-1을 사용하여 미토콘드리아 막 전위를 검출하였다. 상기와 같이 처리한 후, JC-1(최종 5  $\mu$  M)을 각 웰에 첨가하고 어두운 곳에서 37°C에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. DCF 및 JC-1로 염색된 세포의 형광 이미지는 형광 현미경(Nikon Eclipse Ti)을 사용하여 관찰되었다. 형광 이미지의 신호 스코어는 관심 영역(ROI) 통계 프로그램을 사용하여 분석되었다.
- [0087] (카스파제-3 활성화)
- [0088] 카스파제-3의 활성화는 절단된 활성 카스파제-3의 웨스턴 블랏팅 분석에 의해 측정되었다. 세포를 6-웰 배양 플레이트에  $5 \times 10^5$  cells/mL로 씨딩하고 24시간 동안 37°C에서 인큐베이션 하였다. 시스플라틴 및/또는 CPD 14로 24시간 동안 처리한 후, 세포를 단백질 분해효소 억제제 카테일(Thermo Scientific)을 함유하는 RIPA 라이시스 버퍼(Thermo Fisher Scientific, USA)에 용해시켰다. 세포 용해물을 4°C에서 15분 동안 14,000rpm으로 원심분리하고, 상층액 중의 단백질 농도를 BSA 어세이(Thermo Scientific)를 사용하여 측정하였다. 단백질을 추출물을 Laemmli 샘플 버퍼와 혼합하고 95°C에서 3분 동안 가열하였다. 단백질을 SDS-PAGE 12% 젤에 의해 분리하고 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막(Bio-Rad, USA)으로 옮겼다. 막을 실온에서 1시간 동안 5% 스킵 밀크를 함유하는 트윈-20을 갖는 트리스-버퍼 식염수(TBS)로 차단하고, 카스파제-3(Cell Signaling Technology, USA) 또는  $\alpha$ -액 티닌을 표적화하는 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후, 막을 TBST로 세척하고 실온에서 1시간 동안 2차 항체와 인큐베이션 하였다. 면역반응성 밴드는 SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate Kit(Thermo Scientific)를 사용하여 검출되었다. 밴드의 밀도는 Image Lab software(Bio-Rad)를 사용하여 계산되었다. 신장에서 카스파제-3 활성화에 대한 실험에서, 단리된 조직을 차가운 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하고 수크로스 버퍼(0.25 M 수크로스, 10 mM 트리스 및 1 mM EDTA, pH 7.4)에서 균질화시켰다. 신장 균질물을 10,000 rpm에서 4°C에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액의 단백질 수준을 측정하고 상기와 같이 웨스턴 블랏 분석에 사용하였다.
- [0089] (동물 및 처치)
- [0090] 모든 동물 실험은 한양대학교 기관 동물 관리 및 사용위원회(IACUC 2016-0155A)의 승인을 받았다. 수컷 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 랫트(8주령, 체중  $200 \pm 10$ g)를 Koatech(한국)로 얻었다. 동물을 무작위로 4개의 그룹으로 나누고, 각각에 6마리의 랫트를 함유하고 12시간의 빛 : 12시간의 어둠 주기 동안  $25 \pm 2$ °C의 온도에서 보관하였다. 모든 동물은 CPD 14를 주사하기 전에 물을 임의로 제공했지만 밤새 금식시켰다. 신장손상을 유도하기 위해, 시스플라틴(6 mg/kg; 0.9% 정상 식염수에 용해)은 (6)의 복강내(i.p) 주사에 의해 랫트에 투여되었다. CPD 14를 0.9% 정상 식염수에서 5% DMSO에 용해시키고 시스플라틴 처리 전 24시간에 1회, 시스플라틴 처리 후 연속 5일 동안 1일 1회 주사하였다. 랫트를 다음과 같이 처리하였다; 비히클 대조군(그룹 1): 식염수 중 1% DMSO; cisPt 단독(그룹 2): cisPt(6 mg/kg)의 단일 투여; CPD 14 + cisPt(그룹 3): 1 mg/kg CPD 14와 함께 cisPt(6 mg/kg); CPD 14 단독(그룹 4): 1 mg/kg CPD 14.
- [0091] 시스플라틴 주사 후 7일째에 모든 동물을 희생시켰다. 신장 기능 및 조직 손상을 분석하기 위해 혈액 및 신장 조직 샘플을 채취하였다. 혈액을 15분 동안 12,000 rpm에서 원심분리하여 혈청을 수득하였다. 혈중 요소 질소(BUN) 및 혈청 크레아티닌에 대한 혈청 샘플의 분석은 Neodin VetLab(한국)에서 측정되었다. 신장은 조직학적 관찰 및 생화학적 분석에 사용되었다.
- [0092] (조직병리학적 시험)
- [0093] 신장 샘플을 4% 포르말린 용액에 고정시켰다. 등급 알코올에서 탈수 후, 포르말린-고정된 신장을 파라핀에 매립

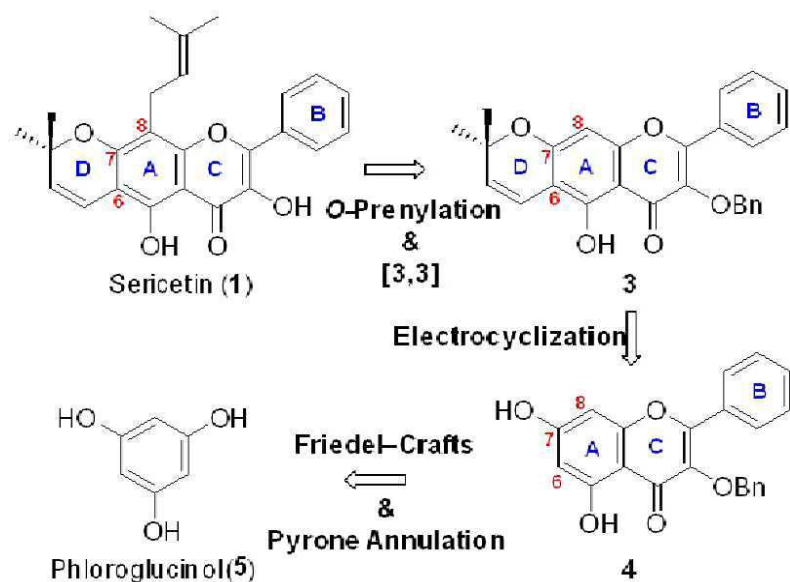
하고, 5  $\mu\text{m}$ 로 구획하고, 분광 현미경에 의한 조직병리학적 평가를 위해 헤마톡실린 및 에오신(H & E)으로 염색하였다. 외부 수질의 외부 스트라이프에서 조직학적 변화를 분석하였고 피질은 세포 괴사, 캐스트 형성, 각질 제거 및 살로잉을 나타내는 세관의 발생을 관찰하였다.

[0094] (통계학적 분석)

[0095] 모든 처리 그룹에 대해 평균 및 평균의 표준 오차(SEM)를 계산하였다. 통계적 유의성을 결정하기 위해 데이터를 t-검정 하였다. 모든 분석에서, p 값 <0.05는 유의한 것으로 간주되었다.

[0096] <실시예 1> 세리세틴의 역합성

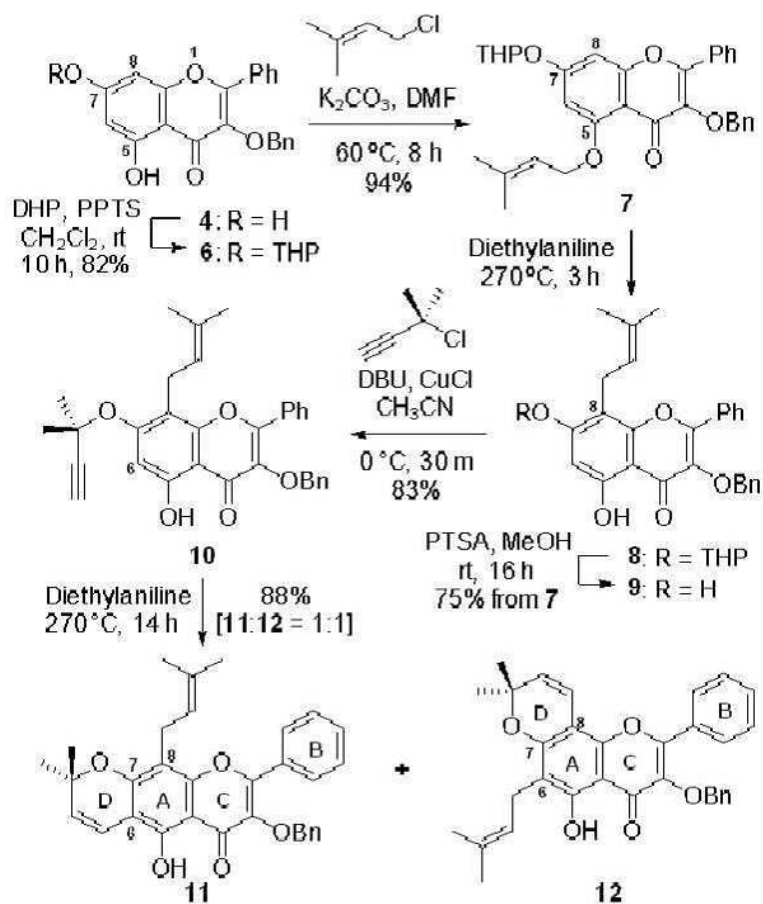
[0097] [반응식 2]



[0098]

[0099] 세리세틴(1)에 대한 역합성 계획은 반응식 2에 요약되어있다. 세리세틴(1)이 프레닐화/방향족 [3,3]-시그마트로픽 재배열을 통해 페놀 3으로부터 합성될 수 있음을 구상했다. 결과적으로, 4단계 페놀 3은 5,7-비스히드록시플라보논(4)을 사용하여 전자고리화를 통해 얻을 수 있으며, 이는 통상적인 프리델 크래프트/피론 고리형성을 통해 상업적으로 이용 가능한 플로로글루시놀(5)로부터 쉽게 제조될 수 있다.

[0100] [반응식 3]

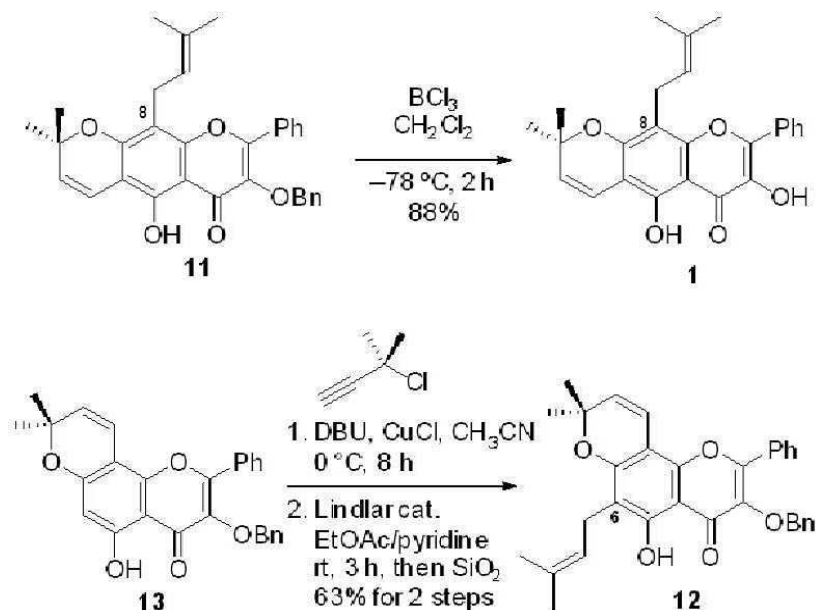


[0101]

[0102]

반응식 3은 세리세틴(1)의 합성에 대한 초기 시도를 도시킨 것이다. 합성은 C(8) 프레닐 플라보놀 9의 제조로 시작되었다. 상업적으로 입수 가능한 플로로글 루시놀(5)로부터 제조된 공지의 플라보놀 4에서 C(7) 하이드록실의 선택적 THP-보호, 공지의 화합물 6 중 C(5) 하이드록실의 프레닐화, 아릴 프레닐 에테르 7을 2단계 후에 77% 수율로 수득하였다. 화합물 7을 순차적 방향족 Claisen/Cope 재배열 조건에 적용하여 산성 조건 하에서 생성된 8에서 THP 기를 탈보호한 후 2단계 동안 75% 수율로 C(8) 프레닐 플라보놀 9를 수득하였다. C(8) 프레닐기를 설치한 후, 천연 산물에서 D-링의 구성에 착수했다. 이를 위해, Claisen 재배열/고리화 조건 하에서 9에서 C(8) 하이드록실의 선택적 프로파길화를 통해 아릴 프로파길 에테르 10을 준비하였다. 그러나 실망스럽게도 10의 Claisen 재배열/고리화는 88%의 결합된 수율로 대략 1:1의 혼합물을 산출했다. 스펙트럼 데이터의 신중한 분석은 1:1 혼합물이 원하는 8-프레닐화 된 C(6)/(7) 피란 부가물 11 및 바람직하지 않은 6-프레닐화 된 C(7)/(8) 피란 부가물 12를 함유함을 나타내어 이는 골격 재배열이 발생하였음을 시사한다. 예상치 못한 이성질체화의 메커니즘을 조사하기 위해, 독립적으로 화합물 11 및 화합물 12를 Claisen 재배열/고리화의 반응 조건에 적용한 결과, 이들 사이에 이성질체화가 관찰되지 않았으며, 이는 D-링의 폐쇄 전에 이성질체화가 발생했음을 시사한다.

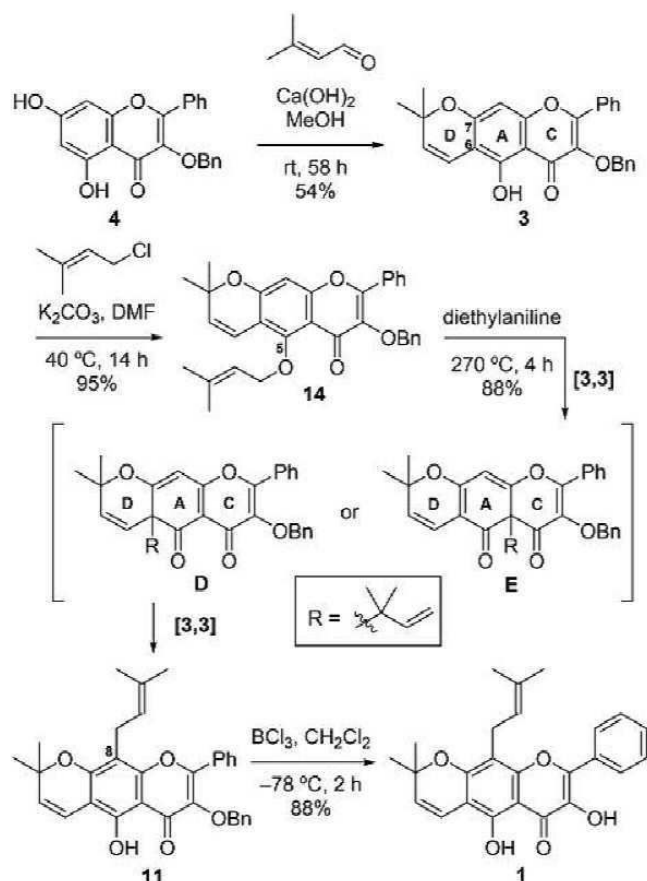
[0103] [반응식 4]



[0104]

[0105] 반응식 4는 구조 11 및 12의 측정을 도시한 것이다. 화합물 11을 탈벤질화하여 세리세틴(1)을 수득하였으며, 이의 스펙트럼 데이터는 천연 산물( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  및 HRMS)에 대해 보고된 것과 동일하여 화합물 11의 구조를 확인하였다(반응식 4). 이성질체 12의 구조는 또한 i) 프로파길화, ii) 반수소화 및 iii) Claisen 재배열(13 → 12)을 통해 알려진 화합물 13로부터의 합성을 통해 확인되었다. 우발적인 골격 재배열에 대한 이론적 근거는 도 2에 도시된다. 원하는 C(6)/C(7) 피란 부가물 11은 프로필렌 프로파길 에테르 10으로부터의 Claisen 재배열을 통해 프로파길 유닛을 C(7) 하이드록실기로부터 C(6)으로 옮김으로써 형성되었다. 대조적으로, 화합물 12의 형성 경로는 더 복잡한 것으로 보인다. 초기에, C(7) 하이드록실기에서 프로파길기는 탈-방향족화 Claisen 재배열을 통해 C(8)로 전달되어 중간체 A를 형성하였다. 이어서, 중간체 A의 C(8)에서의 프레닐기는 중간체 B를 제공하기 위해 순차적으로 Cope 재배열을 받았고, 이는 중간체 C를 통해 화합물 12로 이어지는 순차적인 Cope 재배열/방향족화/고리화에 추가로 참여하였다. 결과적으로, 화합물 10의 프레닐기는 순차적 Claisen/double Cope 재배열을 통해 C(8)에서 C(6)으로 옮겨져 C(6)에서 프레닐 단위를 갖는 화합물 12를 제공하였다.

[0106] [반응식 1]



[0107]

[0108] 반응식 1은 세리세틴(1)의 간결하고 효율적인 합성을 위한 성공적인 경로를 나타낸다. 우리의 초기 결과에 기초하여, 원하는 화합물 11만을 얻고 이전에 관찰된 골격 재배열을 피하기 위해 C(8)에 프레닐기를 설치하기 전에 세리세틴(1)에서 D 고리의 구조가 이루어져야 한다고 결정했다. 따라서, 반응식 1에 기술된 바와 같이 순차적인 Claisen/Cope 재배열을 통해 C(8)-프레닐화 된 4단계 화합물 11의 C(5) 하이드록실기에서 C(8)까지 화합물 14에서 A/D 또는 A/C 방향족 고리 시스템을 가로 질러 프레닐기의 전달을 통해 얻을 수 있어야 한다고 보았다. 이를 위해, 먼저 macakurzin C의 합성에서 화합물 4로부터 4단계로 준비된 화합물 3의 합성을 최적화했다. 최근,  $\alpha, \beta$ -불포화 알데히드로부터 레조르시놀 유도체의 1단계 피란 고리형성 시 전자고리화가 성공적으로 사용되었으며, 천연물에서 D-고리의 합성에 이 방법을 적용하게 되었다. 기쁘게도, 3,3-디메틸아크릴알데히드를 이용한 레조르시놀 유도체 4의 전자고리화를 통해 좋은 수율로 원하는 피란 3을 얻었다(54%). 화합물 3의 C(5) 하이드록실기의 프레닐화(95%) 및 생성된 아릴프레닐 에테르 14의 방향족 클라이젠(Claisen) 재배열 조건에 대한 처리는 중간체 D 또는 E를 통해 임의의 골격 재배열없이 단일 이성질체로서 우수한 수율(88%)로 C(8)-프레닐화 된 4단계 화합물 11을 제공하였다. 상기의 최적화된 합성 경로는 플라보놀의 화합물 4의 A 고리에 2개의 C<sub>5</sub>-이소프렌 유닛을 설치하여 C(3) 0-벤질갈란긴(4)으로부터 단지 3단계로 두 번째 중간체를 세리세틴(1)에 제공했다는 점에 주목할 필요가 있다. 마지막으로, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>에서 BCl<sub>3</sub>에 의한 벤질기의 탈보호는 이 단계에서 83%의 수율로 세리세틴(1)의 합성을 완료하였다.

[0110] <실시예 2> 세리세틴 및 이의 중간체들의 생물학적 분석

[0111] 세리세틴(1)의 간결한 전체 합성이 완료되면, 세리세틴(1), 이소세리세틴(2) 및 3종의 프레닐화 된 4단계 합성 중간체(11, 12 및 14)의 생물학적 활성 평가를 수행하였다. 다양한 세포주에 대해 5종의 화합물(1, 2, 11, 12 및 14)을 모두 시험한 후, 시스플라틴-유도 AKI에 대한 치료 가능성에 관심을 갖게 되었다. AKI는 약물 또는 화학 물질로 인한 대표적인 신장손상이다. 그것은 높은 사망률과 관련이 있으며 만성 신부전의 발병에 기여한다. 약물-유도 AKI를 치료하기 위한 치료 후보 물질을 개발하기 위한 노력이 집중되어 왔다. 시스플라틴은 일반적으로 항암 화학 요법으로 사용된다; 임상 효능에도 불구하고, 신장손상을 포함한 부작용으로 인해 사용이 제한된

다. 신장에 고농도의 시스플라틴이 축적되면 신장손상이 발생하며, 시스플라틴으로 치료받은 환자는 신장 기능이 손상될 수 있다. 시스플라틴-유도된 신장손상은 산화 스트레스, 미토콘드리아 기능장애, 염증성 조직 손상 및 세포사멸에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. 시스플라틴-유도된 AKI는 AKI를 치료 또는 예방하기 위한 약물 후보의 치료적 잠재력 및 메커니즘을 조사하기 위해 잘 확립된 대표적인 모델이다. 진행성 신장 기능장애의 복잡성을 고려하면, 다중 생체 활성 특성을 나타내는 플라보노이드를 포함한 천연 산물은 약물 유발 신장손상에 대한 우수한 치료제 후보로 간주된다. 실제로, 몇몇 천연 산물은 약물유도 신장손상을 예방하기 위한 잠재적인 치료적 중재 및/또는 보조제로서 제안되어왔다.

[0112] MTT 분석법을 사용하여 얻은 세포독성 결과를 바탕으로, 화합물 14는 신세관 세포에서 시스플라틴으로 유도된 세포독성에 대해 가장 강력한 보호 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다(도 3).

[0113] 화합물 14의 보호 활성을 추가로 평가하기 위해, NRK-52E 세포를 다양한 농도의 화합물 14로 처리하였다. 도 4A 및 B에 나타난 바와 같이, 화합물 14는 용량 의존적 방식으로 시스플라틴-유도된 세포독성에 대한 보호 효과를 나타내었고, 시험된 용량 범위에서 세포독성이 아니었다(도 4C).

[0114] 활성 산소종(ROS) 발생 및 미토콘드리아 기능장애는 시스플라틴-유도된 신장손상에서 세포사멸성 세포 죽음의 주요 메커니즘으로 제안되어왔다. 본 발명에서, 시스플라틴은 신세관 세포에서 ROS 발생을 증가시켰으며, 증가된 ROS는 화합물 14로 처리함으로써 상당히 감소되었다(도 5A). 시스플라틴에 의해 유도된 레독스 균형이 세관 세포에서 미토콘드리아 손상을 초래할 수 있기 때문에, JC-1 형광을 사용하여 미토콘드리아 막 전위를 측정하였다. 결과는 시스플라틴에 노출된 세관 세포에서 녹색 형광이 유의하게 증가함을 보여 주었고, 이는 시스플라틴이 미토콘드리아 막 전위에 영향을 미친다는 것을 시사한다. 화합물 14 및 시스플라틴으로 공동 처리된 세포에서 녹색 형광의 증가는 역전되어 정상적인 막 전위가 회복되었음을 보여주었다(도 5B). 시스플라틴-유도된 ROS 발생 및 변경된 미토콘드리아 막 전위는 신세관 세포에서 세포사멸성 세포 죽음을 초래할 수 있다. 절단된 카스파제-3(활성형)의 수준에서 관찰된 바와 같이, 시스플라틴은 세관 세포에서 세포사멸성 카스파제 캐스케이드를 활성화 시켰으며, 화합물 14는 절단된 카스파제-3의 수준을 상당히 감소시켰다(도 5C).

[0115] 화합물 14의 신장보호 효과의 생체 내 관련성은 시스플라틴-유도된 AKI의 랫트 모델에서 입증되었다. 세관 세포에서 나타난 카스파제-3 활성화와 일치하여(도 5B), 절단된 카스파제-3의 수준은 시스플라틴 노출된 랫트로부터 단리된 신장 조직에서 유의하게 증가한 반면, 카스파제-3 활성화의 증가는 화합물 14 및 시스플라틴 처리된 랫트의 신장에서 관찰되지 않았다(도 6A). 화합물 14의 보호 효과는 신장 조직의 조직 병리학적 분석(도 6B) 및 신장 기능 파라미터의 분석을 통해 밝혀졌다. 신장 기능에 대한 대표적인 임상 마커인 혈중 요소 질소(BUN) 및 혈청 크레아티닌 수준은 시스플라틴-처리된 랫트에서 심하게 영향을 받았으며, 화합물 14의 처리는 손상된 신장 기능을 유의하게 회복시켰다(도 6B). 화합물 14 단독 처리된 랫트에서는 조직학적 또는 기능적 변화가 없었다(미도시됨).

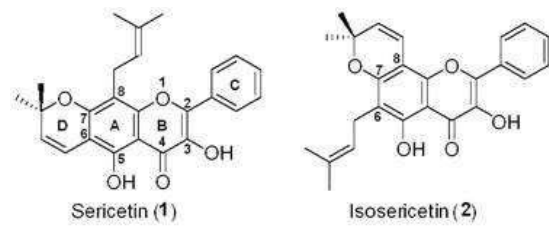
[0116] 요약하면, 쉽게 사용할 수 있는 C(3) 0-벤질 갈란긴(5)으로부터 4단계 코어를 얻기 위한 전자고리화, C(8)에서의 프레닐기 결합, 순차적인 방향족 Claisen/Cope 재배열 및 탈보호 반응을 이용한 4단계를 통해 세리세틴(1)을 합성하였다 (39.7% 전체 수율).

[0117] 또한, 시스플라틴에 의해 유도된 시험관내 AKI에 대한 세리세틴(1), 이소세리세틴(2) 및 3개의 프레닐화 4단계 합성 중간체(11, 12 및 14)의 치료 가능성을 평가한 결과, C(5) 0-프레닐화 4단계 화합물 14는 항산화, 미토콘드리아 보호 및 신세관 세포에서 항-세포사멸 활성을 포함하여, 여러 메커니즘을 통해 시스플라틴-유도된 세포독성에 대해 유리한 효과를 나타냈다.

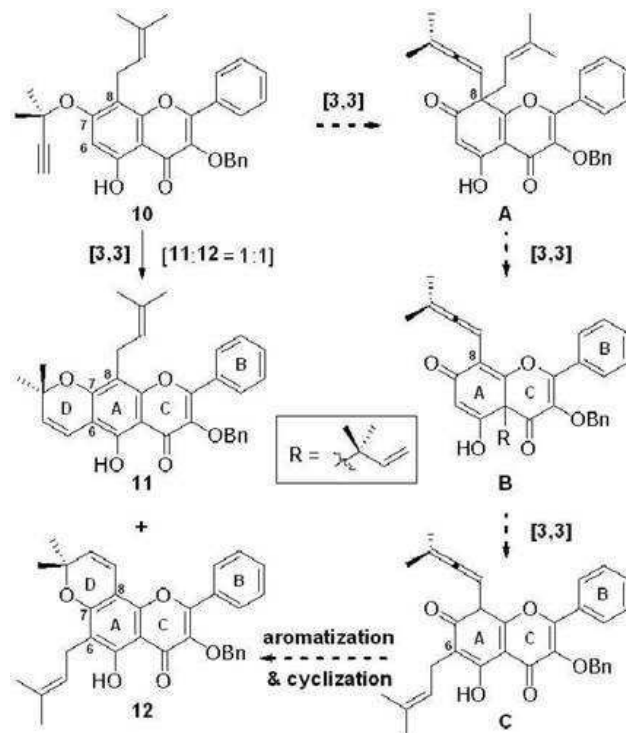
[0118] 또한, 시스플라틴에 의해 유도된 시험관내 AKI에 대한 세리세틴(1), 이소세리세틴(2) 및 3개의 프레닐화 4단계 합성 중간체(11, 12 및 14)의 치료 가능성을 평가한 결과, C(5) 0-프레닐화 된 4단계 화합물 14는 항산화, 미토콘드리아 보호 및 신세관 세포에서 항세포사멸 활성을 포함하여 여러 메커니즘을 통해 시스플라틴-유도 세포독성에 대한 유리한 효과를 나타냈다. 특히, 화합물 14의 신장 보호 효능 및 메카니즘은 조직병리학 및 기능적 개선과 함께 시스플라틴-노출된 랫트 모델에서 확인되었다. 화합물 14는 약물로 인한 신장손상에 대한 치료적 잠재력을 가질 것으로 기대된다.

## 도면

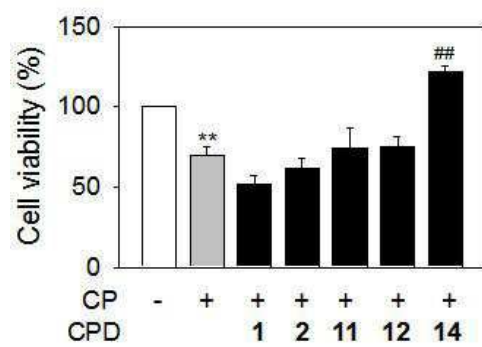
### 도면1



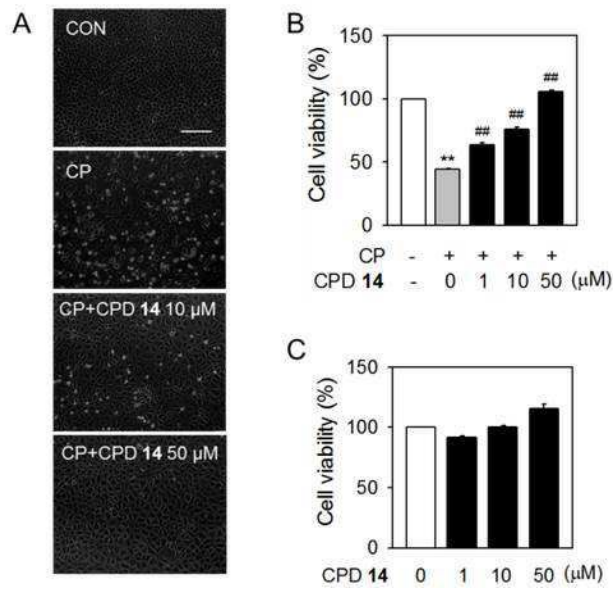
### 도면2



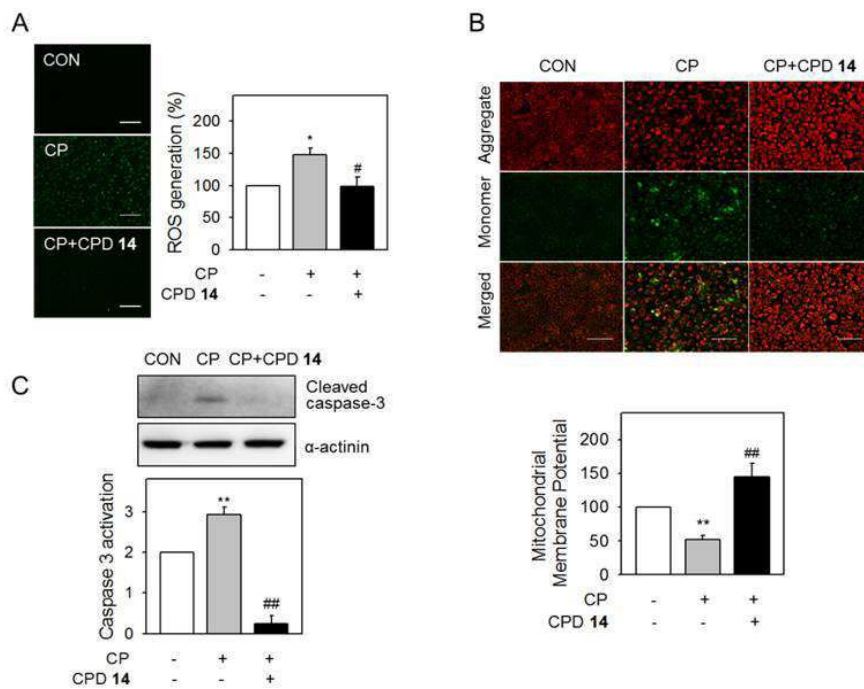
### 도면3



도면4



도면5



도면6

