



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0020372
(43) 공개일자 2018년02월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 41/06 (2006.01) C07C 41/46 (2006.01)
C07C 43/205 (2006.01) C07C 43/23 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07C 41/06 (2013.01)
A61K 31/045 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0104590

(22) 출원일자 2016년08월18일

심사청구일자 2016년08월18일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

전종갑

강원도 춘천시 한림대학길 1, 화학과 (옥천동, 한림대학교)

장하영

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교 화학과

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 8 항

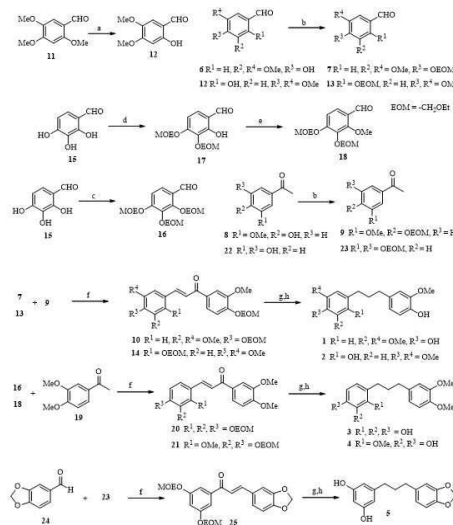
(54) 발명의 명칭 다이아릴프로판 합성방법 및 이를 포함하는 항염증 약학 조성물

(57) 요약

과제: 다이아릴프로판 화합물 합성방법 및 부작용 없는 효과적인 항염증제를 제공하려는 것.

해결수단: 본 발명자들은 개시물질로부터 다이아릴프로판 및 그 유도체들 (화합물 1 내지 5)을 높은 수율로 효과적으로 합성하는 방법을 발명하였다. 또한, 그들의 항염증 효과를 LPS-유도 RAW-264.7 대식세포에서 평가하였다. 다이아릴프로판 화합물은 세포독성을 나타내지 않으며, 10 μ M 농도에서 LPS로 유도되는 산화질소 생성을 약하게 또는 잘 저해하는 것으로 나타났다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07C 41/46 (2013.01)

C07C 43/2055 (2013.01)

C07C 43/23 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2009-0094071

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중점연구소사업

연구과제명 중추신경계 질환 치료를 위한 천연물 유래 신소재 개발 및 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2016.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

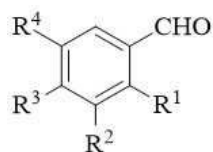
가) 화학식 6으로 표시되는 화합물 6에 DMF 용매에서 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 테트라부틸암모늄 요오드화물을 가하여 상온에서 반응하여 화학식 7로 표시되는 화합물 7을 얻는 단계;

나) 화학식 8로 표시되는 화합물 8에 DMF 용매에서 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 테트라부틸암모늄 요오드화물을 가하여 상온에서 반응하여 화학식 9로 표시되는 화합물 9를 얻는 단계;

다) 상기 화합물 7과 화합물 9에 KOH를 가하여 MeOH/ H_2O = 2/1 용매 하, 상온에서 교반하여 화학식 10으로 표시되는 화합물 10을 얻는 단계; 및

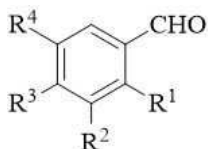
라) 수소 분위기 하에서 화합물 10에 강산과 MeOH를 가하여 에논기를 환원하고, 이후 수소 풍선과 Pd/C, 아세트산을 가하여 EOM기 탈보호기화 반응으로 화학식 1로 표시되는 화합물 1을 얻는 단계;를 포함하는 다이아릴프로판 합성방법.

<화학식 6>



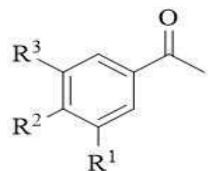
(단, 화합물 6은 $R^1 = H$, R^2 , $R^4 = OMe$, $R^3 = OH$)

<화학식 7>



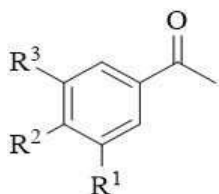
(단, 화합물 7은 $R^1 = H$, R^2 , $R^4 = OMe$, $R^3 = OEOM$)

<화학식 8>



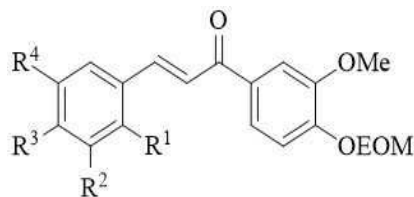
(단, 화합물 8은 $R^1 = OMe$, $R^2 = OH$, $R^3 = H$)

<화학식 9>



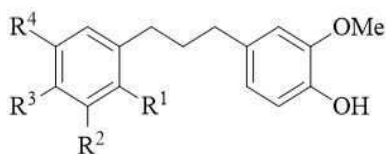
(단, 화합물 9는 $R^1 = \text{OMe}$, $R^2 = \text{OEOM}$, $R^3 = \text{H}$)

<화학식 10>



(단, 화합물 10은 $R^1 = \text{H}$, $R^2, R^4 = \text{OMe}$, $R^3 = \text{OEOM}$)

<화학식 1>



(단, 화합물 1은 $R^1 = \text{H}$, $R^2, R^4 = \text{OMe}$, $R^3 = \text{OH}$)

청구항 2

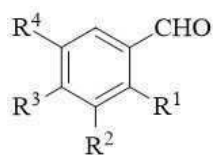
가) 화학식 6으로 표시되는 화합물 12에 DMF 용매에서 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 테트라부틸암모늄 요오드화물을 가하여 상온에서 반응하여 화학식 7로 표시되는 화합물 13을 얻는 단계;

나) 화학식 8로 표시되는 화합물 8에 DMF 용매에서 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 테트라부틸암모늄 요오드화물을 가하여 상온에서 반응하여 화학식 9로 표시되는 화합물 9를 얻는 단계;

다) 상기 화합물 13과 화합물 9에 KOH를 가하여 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 2/1$ 용매 하, 상온에서 교반하여 화학식 10으로 표시되는 화합물 14를 얻는 단계; 및

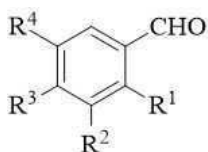
라) 수소 분위기 하에서 화합물 14에 강산과 MeOH를 가하여 에논기를 환원하고, 이후 수소 풍선과 Pd/C, 아세트산을 가하여 EOM기 탈보호기화 반응으로 화학식 1로 표시되는 화합물 2를 얻는 단계;를 포함하는 다이아릴프로판 합성방법.

<화학식 6>



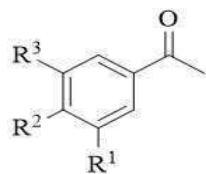
(단, 화합물 12는 $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3, R^4 = \text{OMe}$)

<화학식 7>



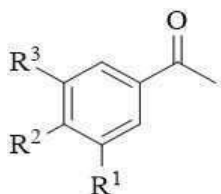
(단, 화합물 13은 $R^1 = \text{OEOM}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3, R^4 = \text{OMe}$)

<화학식 8>



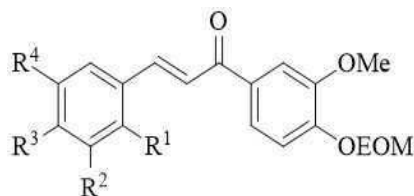
(단, 화합물 8은 $R^1 = \text{OMe}$, $R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{H}$)

<화학식 9>



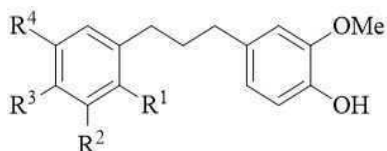
(단, 화합물 9는 $R^1 = \text{OMe}$, $R^2 = \text{OEOM}$, $R^3 = \text{H}$)

<화학식 10>



(단, 화합물 14는 $R^1 = \text{OEOM}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3, R^4 = \text{OMe}$)

<화학식 1>



(단, 화합물 2는 $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3, R^4 = \text{OMe}$)

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 화합물 12는 2,4,5-트리메톡시벤즈알데하이드에 CH_2Cl_2 용매 하에서 CH_2Cl_2 에 용해한 BCl_3 를 가하여 -78°C ~상온 조건으로 반응시켜 선택적 탈메틸화로 얻어진 것임을 특징으로 하는 다이아릴프로판 합성방법.

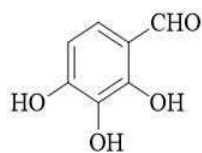
청구항 4

가) 화학식 15로 표시되는 화합물 15에 클로로메틸에틸에테르, NaH 및 DMF를 가하여 0°C ~ 40°C 에서 반응시켜 화학식 16으로 표시되는 화합물 16을 제조하는 단계;

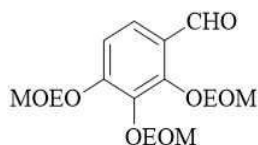
나) 상기 화합물 16에 화학식 19로 표시되는 화합물 19를 가하고 KOH를 가하여 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 2/1$ 용매 하, 상온에서 교반하여 화학식 20으로 표시되는 화합물 20을 얻는 단계;

다) 상기 화합물 20에 강산과 MeOH를 가하여 에논기를 환원하고, 이후 수소 풍선과 Pd/C, 아세트산을 가하여 EOM기 탈보호기화 반응으로 화학식 3으로 표시되는 화합물 3을 얻는 단계;를 포함하는 다이아틸프로판 합성방법.

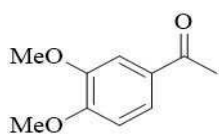
<화학식 15>



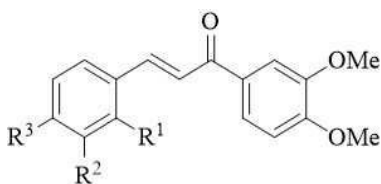
<화학식 16>



<화학식 19>

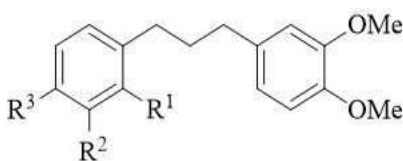


<화학식 20>



(단, 화합물 20은 $R^1, R^2, R^3 = \text{OEOM}$)

<화학식 3>



(단, 화합물 3은 $R^1, R^2, R^3 = \text{OH}$)

청구항 5

가) 화학식 15로 표시되는 화합물 15에 클로로메틸에틸에테르, N,N-다이아이소프로필에틸아민과 CH_2Cl_2 를 가하여 반응시켜 화학식 17로 표시되는 화합물 17을 얻는 단계;

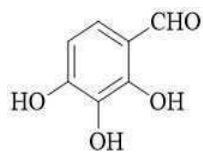
나) 상기 화합물 17에 요오드화 메틸, NaH 및 DMF를 가하여 상온에서 반응시켜 화학식 18로 표시되는 화합물 18을 얻는 단계;

다) 상기 화합물 18에 화학식 19로 표시되는 화합물 19를 가하고 KOH를 가하여 MeOH/ H_2O = 2/1 용매 하, 상온에서 교반하여 화학식 21로 표시되는 화합물 21을 얻는 단계;

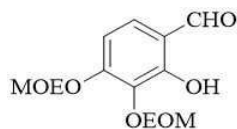
라) 상기 화합물 21에 강산과 MeOH를 가하여 에논기를 환원하고, 이후 수소 풍선과 Pd/C, 아세트산을 가하여 EOM기 탈보호기화 반응으로 화학식 3으로 표시되는 화합물 4를 얻는 단계;를 포함하는 다이아틸프로판

합성방법.

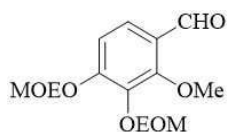
<화학식 15>



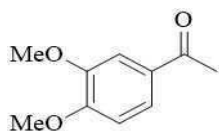
<화학식 17>



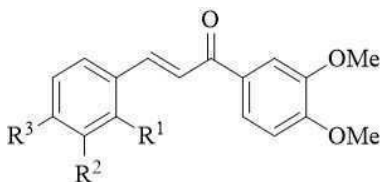
<화학식 18>



<화학식 19>

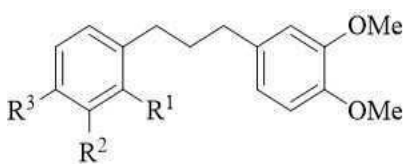


<화학식 20>



(단, 화합물 21은 $R^1 = \text{OMe}$, $R^2, R^3 = \text{OEOM}$)

<화학식 3>



(단, 화합물 4는 $R^1 = \text{OMe}$, $R^2, R^3 = \text{OH}$)

청구항 6

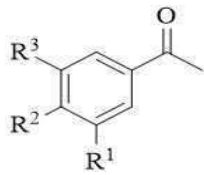
가) 화학식 8로 표시되는 화합물 22에 DMF 용매에서 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 테트라부틸암모늄 요오드화물을 가하여 상온에서 반응하여 화학식 9로 표시되는 화합물 23을 얻는 단계;

나) 화학식 24로 표시되는 화합물 24에 상기 화합물 23과 KOH를 가하여 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 2/1$ 용매 하, 상온에서 교반하여 화학식 25로 표시되는 화합물 25를 얻는 단계; 및

다) 상기 화합물 25에 강산과 MeOH를 가하여 에논기를 환원하고, 이후 수소 풍선과 Pd/C, 아세트산을 가하여

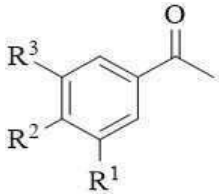
EOM기 탈보호기화 반응으로 화학식 5로 표시되는 화합물 5를 얻는 단계;를 포함하는 다이아틸프로판 합성방법.

<화학식 8>



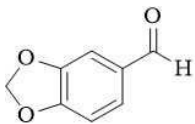
(단, 화합물 22는 $R^1, R^3 = OH$, $R^2 = H$)

<화학식 9>

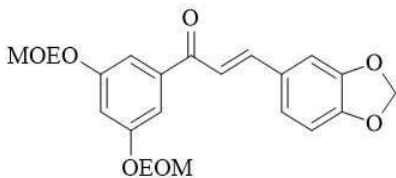


(단, 화합물 23은 $R^1, R^3 = OEOM$, $R^2 = H$)

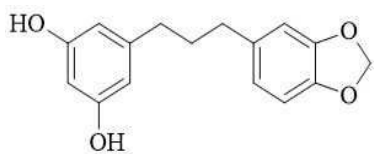
<화학식 24>



<화학식 25>



<화학식 5>



청구항 7

4-(3-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)프로필)-2,6-다이메톡시페놀, 2-(3-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)프로필)-4,5-다이메톡시페놀, 4-(3-(3,4-다이메톡시페닐)프로필)벤젠-1,2,3-트리올, 4-(3-(3,4-다이메톡시페닐)프로필)-3-메톡시벤젠-1,2-다이올 및 5-(3-(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)프로필)벤젠-1,3-다이올 중 1종 이상을 함유하는 항염증 약학 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

4-(3-(3,4-다이메톡시페닐)프로필)-3-메톡시벤젠-1,2-다이올을 함유하는 항염증 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다이아릴프로판 합성방법, 그리고 이를 포함하는 항염증 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증은 조직 손상, 부상, 감염 물질 또는 자기면역반응에 대한 주요한 자기방어반응 중 하나이며, 면역반응의 필수적인 부분이다 [1]. 염증반응은 부종, 부분적인 붓어짐, 통증 및 때때로 기능의 손실을 포함한다 [2]. 염증 기작은 크게 아라키돈산 (AA)-의존적 경로와 AA-비의존적 경로로 나눌 수 있다 [2]. 아라키돈산-의존적 경로에서는 포스포라이페이스 A2 (PLA2), 사이클로옥시게네이즈 (COX-1, -2, -3) 및 리폭시게네이즈 (5-LOX, 8-, 12-, 15-) 효소 패밀리와 COX 경로에 의해 생성되는 친염증성 프로스타글란딘 (PGs), LOX 경로에 의해 생성되는 류코트리엔 (LTs)이 관여한다. 염증의 두 번째 기작은 산화질소 합성효소 (NOS; 내피 NOS(eNOS), 신경-NOS(nNOS) 및 유도 가능한 NOS(iNOS)), NF- κ B (nuclear factor- κ B) 및 PPAR (peroxisome proliferator activated receptor)을 포함한다.

[0003] 산화질소 합성효소는 L-아르기닌으로부터 산화질소를 생성하며, 산화질소는 작고 확산이 잘 되는 전이 프리라디칼이며, 인간 생리와 병리생리에서 다양한 측면의 역할을 수행한다 [3]. 염증 질병 발생에서 산화질소는 일반적으로 농도 의존적이다 [4]. 생리적으로 필수적인 양의 산화질소는 병인에 효율적으로 대응하기 위하여 염증성 자극에 대응하여 iNOS에 의해 만들어지는 반면, iNOS에 의한 과도한 NO 생산은 염증, 천식, 당뇨, 뇌졸중, 암 및 신경퇴행성 질환을 일으킬 수 있다 [5]. 따라서, 산화질소 생성 연쇄작용을 약학적으로 저해하는 것은 염증 질환에 있어서 효과적인 전략이다.

[0004] 1,3-다이아릴프로판은 식물에서 유래하는 중요한 2차 대사산물이고 몇 가지만 예를 들면 향금팡이 [6], 항염증 [7], 항암 [8], 항지방세포형성 [9], 항결핵 [8a] 및 항말라리아 [10] 활성과 같은 다양한 생물학적 활성을 나타낸다. 안트라닐릭산 (anthranilic acid)이 부착된 1,3-다이아릴프로판은 알츠하이머병에서 β -아밀로이드 집합체 형성의 저해제로서 연구된바 있다 [11]. 광범위한 생물활성으로 인하여, 1,3-다이아릴프로판은 화학, 생물 의학 뿐만 아니라 농업 및 식품화학 분야의 수많은 연구그룹의 관심을 받고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Quintans, J. Immunol. Cell Biol. 1994, 72, 262-264.
- (비특허문헌 0002) (a) Ruedi, K. B. et al., Inammation 2008, 31, 167-179. (b) Coussens, L. M.; Werb, Z. Nature 2002, 420, 860-867.
- (비특허문헌 0003) Calabrese, V. et al., Nat. Rev. Neurosci. 2007, 8, 766-775
- (비특허문헌 0004) Bogdan, C. Nat. Immunol. 2001, 2, 907-916.
- (비특허문헌 0005) Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Physiol. Rev. 2007, 87, 315-424.
- (비특허문헌 0006) Takasugi, M. et al., Chem. Lett. 1980, 339-340.
- (비특허문헌 0007) Huang, G. -J. et al., Eur. J. Med. Chem. 2012, 48, 371-378.
- (비특허문헌 0008) (a) Moosophon, P. et al., J. Nat. Prod. 2011, 74, 2216-2218. (b) Pan, E. et al., J. Nat. Prod. 2010, 73, 1792-1795.
- (비특허문헌 0009) Youn, U. J. et al., J. Nat. Prod. 2009, 72, 1895-1898.
- (비특허문헌 0010) Gibbard, L. et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2016, 60, 3065-3069.
- (비특허문헌 0011) Simons, L. J. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19, 654-657
- (비특허문헌 0012) (a) Seo, Y. H. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016, 26, 1521-1524. (b) Jung, J. -W. et al., Chem. Pharm. Bull. 2016, 64, 632-637.

(비특허문헌 0013) (a) Zhang, X. -Y. et al., J. Integr. Plant Biol. 2006, 48, 236-240. (b) Hu, X. Q. et al., Arch. Pharm. Res. 2014, 37, 1411-1415.

(비특허문헌 0014) Zhaung, J. C.; Wogan, G. N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94, 11875-11880.

(비특허문헌 0015) (a) Chen, B.; Stout, R.; Campbell, W. F. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996, 14, 109-120. (b) Salerno, L. et al., Curr. Pharm. Des. 2002, 8, 177-200. (c) Ueda, S. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 313-316.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 다이아릴프로판을 효율적으로 합성하는 방법을 제공하고, 합성된 다이아릴프로판 유도체의 생물 활성을 확인하여 안전하고 새로운 항염증 약학 조성물을 제공하는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 NO 억제 잠재력을 가진 생물활성 천연산물 및 그들의 유도체 합성에 관하여 지속적으로 연구해오던 중 1,3-다이아릴프로판 (화합물 1~5)의 효율적인 합성방법 및 이 화합물들의 인 비트로 항염증 활성을 확인하였다 (도 1). 이 화합물들 중 화합물 1, 2 (힌드시프로판 C; hindsiiopropane C) 및 화합물 4 (힌드시프로판 B; hindsiiopropane B)는 천연 1,3-다이아릴프로판이고, 화합물 1은 파셀라리아 콤프레사 (*Phacellaria compressa* Benth)에서 분리된 것이고, 화합물 2와 화합물 4는 셀라스트루스 힌드시 (*Celastrus hindsii*)에서 분리된 것이다. 다른 화합물 3과 화합물 5는 천연에서 분리된 바 없는 합성 화합물이다.

[0009] 다이아릴프로판 화합물 1~5 합성은 삼염화붕소 (boron trichloride)를 이용한 2,4,5-트리메톡시벤즈알데하이드 (화합물 11)의 선택적 탈메틸화로 시작하였다 (도 2). 본 발명자들은 1,3-다이아릴프로판 화합물 1~5의 합성이 해당 찰콘 유도체로부터 얻어질 수 있을 것으로 그려보았다. 이에 따라, 합성은 무수 DMF 내에서 EOM-Cl (chloromethyl ethyl ether), K_2CO_3 및 촉매 TBAI (tetrabutylammonium iodide)를 이용하여 페놀릭 알데하이드 화합물 6 및 12의 EOM (ethoxymethyl) 보호기화로 시작하였다 (도 2). 알데하이드 화합물 15의 선택적 보호기화는 DIPEA (*N,N*-diisopropylethylamine)를 이용하였고, 그 결과 di-EOM 보호기화된 알데하이드 화합물 17을 얻었으며, 이것은 메틸화되어 화합물 18이 되었다. 그러나, 염기로서 DIPEA 대신 NaH를 이용하여 화합물 22를 보호기화하면 선택성 없이 모두 보호기화된 화합물 23이 얻어졌다. 3-메톡시-4-하이드록시아세토펜 (3-Methoxy-4-hydroxyacetophenone) (화합물 8) 및 3,5-다이하이드록시아세토펜 (3,5-dihydroxyacetophenone) (화합물 22) 또한 EOM-Cl (chloromethyl ethyl ether), K_2CO_3 및 촉매 TBAI (tetrabutylammonium iodide)를 처리하여 EOM기로 보호되었다. 다음으로, MeOH/H₂O (2/1) 내 상온에서 염기로서 KOH 존재 하에 아세토펜은 화합물 9, 19, 23 및 알데하이드 화합물 7, 13, 16, 18, 24 간의 클라이젠-슈미트 응축 반응으로 EOM기로 보호되는 찰콘 화합물 10, 14, 20, 21, 25를 각각 얻었다. 최종적으로 수소 분위기 하에서 화합물 10, 14, 20, 21, 25의 완전한 에논기 (enone group) 환원 이후 6N HCl을 이용한 EOM기 탈보호기화로 각각 1,3-다이아릴프로판 화합물 1~5를 얻었다. 최종 화합물 1~5의 구조는 스펙트럼 데이터 (¹H 및 ¹³C-NMR)로부터 결정하였다.

[0011] 제조한 다이아릴프로판 (화합물 1~5)의 항염증 효과를 평가하기 위하여, 지다당으로 자극한 RAW264.7 대식세포에서 염증의 필수적인 매개자 중 하나인 산화질소 (NO)의 양을 측정하였다 [14]. 실제로, 짧은 반감기 및 다른 포집 분자의 존재로 인하여 본래의 NO 정량이 어렵다. 따라서, 축적된 안정적인 분해 생성물인 아질산염 (NO₂⁻) 및 질산염 (NO₃⁻) 측정이 바람직하고, 아질산염과 질산염 조합의 측정을 위해서는 Griess 시약을 사용한다.

표 1

Compound	NO Production (% inhibition)	
	1 μ M	10 μ M
Medium(MED)	1.2 $\pm$ 0.7 (98.8)***	1.2 $\pm$ 0.7 (98.8)***
LPS	100.0 $\pm$ 7.4 (0.0)	100.0 $\pm$ 7.4 (0.0)
1	72.8 $\pm$ 8.1 (27.2)	78.2 $\pm$ 3.4 (21.8)
2	61.8 $\pm$ 8.4 (38.2)	43.5 $\pm$ 1.1 (56.5)
3	70.4 $\pm$ 20.5 (29.6)	71.4 $\pm$ 12.0 (28.6)
4	63.1 $\pm$ 8.6 (36.9)	0.0 $\pm$ 0.0 (100.0)***
5	59.2 $\pm$ 2.1 (40.8)	46.4 $\pm$ 8.3 (53.6)
L-NMMA	85.0 $\pm$ 4.4 (15.0)	9.9 $\pm$ 2.7 (90.1)***

The results are reported as mean value $\pm$ SEM for n=3. Statistical significance is based on the difference when compared with LPS-treated groups (***P < 0.001).

% Inhibition is based on LPS as shown in parenthesis.

[0012]

[0014]

유도된 대식세포에 의한 NO 생성에 대한 화합물 1~5의 항염증 효과를 모니터링하였다 (표 1). 지다당 처리한 RAW264.7 세포는 iNOS 활성화를 통하여 NO 생성을 자극하였고, L-NMMA(*N*⁶-monomethyl-L-arginine acetate) [15]는 양성 대조군으로 이용하였다. 화합물 1과 3을 제외한 모든 시험 화합물은 농도 의존적으로 NO 생성을 현저히 감소시켰다. NO 생산 억제율은 최고 농도 (10 μ M)에서 100.0% ~ 21.8%이었고, 최저 농도 (1 μ M)에서 40.8% ~ 27.2%였다. 다섯 개의 화합물 중 화합물 4 (hindsiiopropane B) (100.0%)를 10 μ M 처리했을 때 강한 저해 활성이 관찰되었다 (표 1).

[0015]

다음으로, 화합물 (1~5) 처리군에서 세포 사멸이 NO 발현 감소에 의한 것이 아님을 확인하기 위하여 활성화된 RAW 264.7 세포 생존율을 NO 1 μ M 및 10 μ M에서 MTT 세포 생존 분석법으로 분석하였다 (표 2). 10 μ M 농도에서 세포 생존율 평가 결과, 모든 화합물은 현저한 세포독성을 나타내지 않았는데, 이는 NO 생성의 효율적인 억제를 이끌었다. 화합물 1~5의 IC₅₀ 값은 GraphPad Prism 4.0 소프트웨어를 이용하여 평가하였고, 각각 16.40, 4.46, 10.72, 1.84 및 1.30 μ M로 나타났다 (표 2).

표 2

Compound	NO Production (% inhibition)		IC ₅₀ (μ M)
	1 μ M	10 μ M	
Medium(MED)	100.0 $\pm$ 4.8	100.0 $\pm$ 4.8	
1	98.4 $\pm$ 2.9	98.7 $\pm$ 1.9	16.40
2	135.2 $\pm$ 8.5**	112.6 $\pm$ 6.6	4.46
3	110.5 $\pm$ 1.8	130.3 $\pm$ 7.2	10.72
4	117.9 $\pm$ 4.6	103.1 $\pm$ 7.7	1.84
5	115.9 $\pm$ 1.2	102.2 $\pm$ 8.3	1.30
L-NMMA	100.1 $\pm$ 3.1	100.3 $\pm$ 2.1	2.73

*The results are reported as mean value $\pm$ SEM for n=3 (**P < 0.01).

[0016]

[0018]

이러한 결과는 화합물 4 (hindsiiopropane B)가 IC₅₀ 값 1.84 μ M로 L-NMMA (IC₅₀ 2.73) 보다도 더 좋은 활성을 가지고 있으며 가장 강력한 NO 저해활성을 나타내었음을 말해준다. LPS-유도 NO 생산을 감소시키는 화합물 1~5의 기본 분자 메커니즘을 이해하기 위해, RAW 264.7 세포의 iNOS 단백질 발현에 화합물 1~5가 미치는 효과를 웨스턴 블롯 분석으로 관찰하였다.

[0019] 도 2와 같이, RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 iNOS의 단백질 발현이 화합물 4 (hindsiiopropane B) 처리에 의해 극적으로 억제되었고, NO 생성 (표 1, 2)에 관한 연구 결과와 일치했다. 이는 이들 화합물 노출에 의한 iNOS 발현 감소가 NO 생성 억제의 원인임을 나타낸다.

[0020] 상기 약리학적 결과로부터, NO 억제 활성에 영향을 미치는 몇몇 구조적 특징이 화합물 1~5의 화학적 구조 비교로부터 도출될 수 있다. 화합물 4 (hindsiiopropane B)는 NO 생성 표적 항염증제의 개발을 위한 잠재적 화합물 또는 선도 화합물로서 고려할 수 있다.

[0021] 결론적으로 본 발명자들은 시판되는 출발 물질로부터 클라이젠-슈미트 응축반응과 수소화 반응을 주요 단계로 하여 다이아틸프로판 화합물 (1-5)의 효율적인 합성 방법을 발명하였다. 또한, 본 발명자들은 LPS 유도-RAW 264.7 대식 세포에서 NO 생성 저해 효과를 항염증 활성 지시자로서 평가하였다. 화합물 1과 3을 제외하고, 모든 시험 화합물은 농도 의존적으로 현저하게 NO 생성을 억제하였다. 본 발명에서, 화합물 4 (hindsiiopropane B) (100.0%; $IC_{50} = 1.84 \mu M$)는 양성 대조군 L-NMMA (90.1%; $IC_{50} = 2.73 \mu M$)보다도 더 강력한 억제 활성을 나타냈다. 이것은 LPS에 의해 유도된 iNOS의 억제와 좀 더 관련이 있다. 본 발명의 화합물 4, 즉 3',4"-다이메톡시페닐 및 3',4'-다이하이드록시-2'-메톡시페닐 모티프인 1,3-다이아틸프로판 구조체는 NO 생성을 표적으로 하는 항염증제로서 가능성 있는 화합물 또는 리드 화합물이 될 수 있을 것으로 사료된다.

[0022] 본 발명은

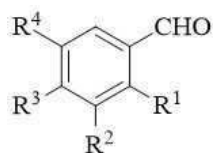
[0023] 가) 화학식 6으로 표시되는 화합물 6에 DMF 용매에서 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 테트라부틸암모늄 요오드화물을 가하여 상온에서 반응하여 화학식 7로 표시되는 화합물 7을 얻는 단계;

[0024] 나) 화학식 8로 표시되는 화합물 8에 DMF 용매에서 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 테트라부틸암모늄 요오드화물을 가하여 상온에서 반응하여 화학식 9로 표시되는 화합물 9를 얻는 단계;

[0025] 다) 상기 화합물 7과 화합물 9에 KOH를 가하여 MeOH/ $H_2O = 2/1$ 용매 하, 상온에서 교반하여 화학식 10으로 표시되는 화합물 10을 얻는 단계; 및

[0026] 라) 수소 분위기 하에서 화합물 10에 강산과 MeOH를 가하여 에논기를 환원하고, 이후 수소 풍선과 Pd/C, 아세트산을 가하여 EOM기 탈보호기화 반응으로 화학식 1로 표시되는 화합물 1을 얻는 단계;를 포함하는 다이아틸프로판 합성방법에 관한 것이다.

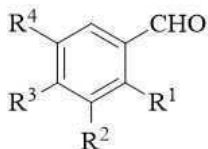
[0027] <화학식 6>



[0028]

[0029] (단, 화합물 6은 $R^1 = H$, R^2 , $R^4 = OMe$, $R^3 = OH$)

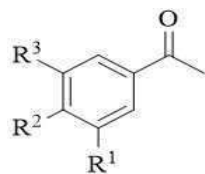
[0030] <화학식 7>



[0031]

[0032] (단, 화합물 7은 $R^1 = H$, R^2 , $R^4 = OMe$, $R^3 = OEOM$)

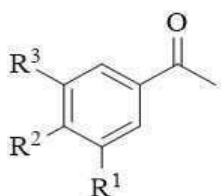
[0033] <화학식 8>



[0034]

[0035] (단, 화합물 8은 $R^1 = \text{OMe}$, $R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{H}$)

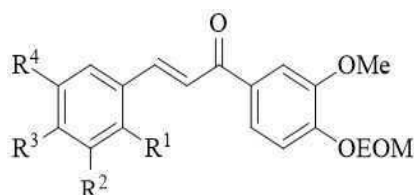
[0036] <화학식 9>



[0037]

[0038] (단, 화합물 9는 $R^1 = \text{OMe}$, $R^2 = \text{OEOM}$, $R^3 = \text{H}$)

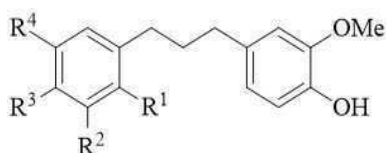
[0039] <화학식 10>



[0040]

[0041] (단, 화합물 10은 $R^1 = \text{H}$, $R^2, R^4 = \text{OMe}$, $R^3 = \text{OEOM}$)

[0042] <화학식 1>



[0043]

[0044] (단, 화합물 1은 $R^1 = \text{H}$, $R^2, R^4 = \text{OMe}$, $R^3 = \text{OH}$)

[0045] 또한, 본 발명은

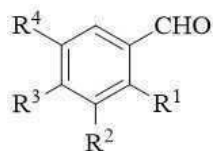
[0046] 가) 화학식 6으로 표시되는 화합물 12에 DMF 용매에서 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 테트라부틸암모늄 요오드화물을 가하여 상온에서 반응하여 화학식 7로 표시되는 화합물 13을 얻는 단계;

[0047] 나) 화학식 8로 표시되는 화합물 8에 DMF 용매에서 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 테트라부틸암모늄 요오드화물을 가하여 상온에서 반응하여 화학식 9로 표시되는 화합물 9를 얻는 단계;

[0048] 다) 상기 화합물 13과 화합물 9에 KOH를 가하여 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 2/1$ 용매 하, 상온에서 교반하여 화학식 10으로 표시되는 화합물 14를 얻는 단계; 및

[0049] 라) 수소 분위기 하에서 화합물 14에 강산과 MeOH를 가하여 에논기를 환원하고, 이후 수소 풍선과 Pd/C, 아세트산을 가하여 EOM기 탈보호기화 반응으로 화학식 1로 표시되는 화합물 2를 얻는 단계;를 포함하는 다이아릴프로판 합성방법에 관한 것이다.

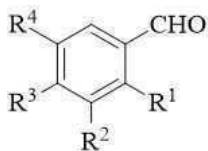
[0050] <화학식 6>



[0051]

[0052] (단, 화합물 12는 $R^1 = OH$, $R^2 = H$, $R^3, R^4 = OMe$)

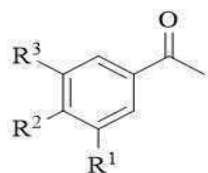
[0053] <화학식 7>



[0054]

[0055] (단, 화합물 13은 $R^1 = OEOM$, $R^2 = H$, $R^3, R^4 = OMe$)

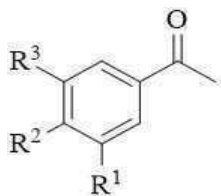
[0056] <화학식 8>



[0057]

[0058] (단, 화합물 8은 $R^1 = OMe$, $R^2 = OH$, $R^3 = H$)

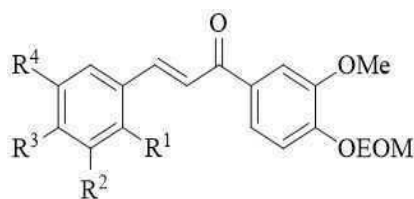
[0059] <화학식 9>



[0060]

[0061] (단, 화합물 9는 $R^1 = OMe$, $R^2 = OEOM$, $R^3 = H$)

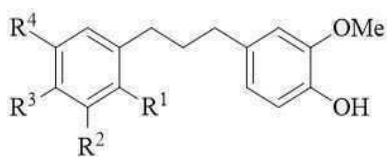
[0062] <화학식 10>



[0063]

[0064] (단, 화합물 14는 $R^1 = OEOM$, $R^2 = H$, $R^3, R^4 = OMe$)

[0065] <화학식 1>



[0066]

[0067] (단, 화합물 2는 $R^1 = OH$, $R^2 = H$, $R^3, R^4 = OMe$)

[0068] 또한, 본 발명은 상기 화합물 12가 2,4,5-트리메톡시벤즈알데하이드에 CH_2Cl_2 용매 하에서 CH_2Cl_2 에 용해한 BCl_3 를 가하여 -78°C ~상온 조건으로 반응시켜 선택적 탈메틸화로 얻어진 것임을 특징으로 하는 다이아릴프로판 합성 방법에 관한 것이다.

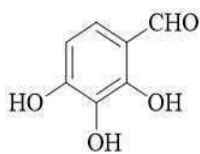
[0069] 또한, 본 발명은

[0070] 가) 화학식 15로 표시되는 화합물 15에 클로로메틸에틸에테르, NaH 및 DMF를 가하여 0°C ~ 40°C 에서 반응시켜 화학식 16으로 표시되는 화합물 16을 제조하는 단계;

[0071] 나) 상기 화합물 16에 화학식 19로 표시되는 화합물 19를 가하고 KOH를 가하여 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 2/1$ 용매 하, 상온에서 교반하여 화학식 20으로 표시되는 화합물 20을 얻는 단계; 및

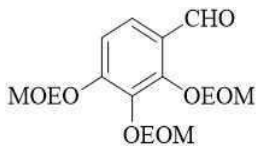
[0072] 다) 상기 화합물 20에 강산과 MeOH를 가하여 에너지를 환원하고, 이후 수소 풍선과 Pd/C, 아세트산을 가하여 EOM기 탈보호기화 반응으로 화학식 3으로 표시되는 화합물 3을 얻는 단계;를 포함하는 다이아릴프로판 합성 방법에 관한 것이다.

[0073] <화학식 15>



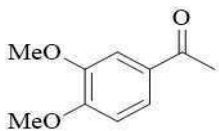
[0074]

[0075] <화학식 16>



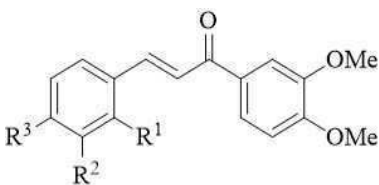
[0076]

[0077] <화학식 19>



[0078]

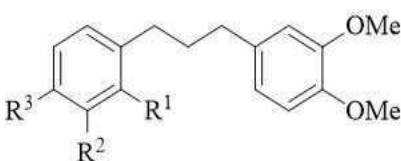
[0079] <화학식 20>



[0080]

[0081] (단, 화합물 20은 $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3 = \text{OEt}$)

[0082] <화학식 3>



[0083]

[0084] (단, 화합물 3은 $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3 = \text{OH}$)

[0085] 또한, 본 발명은

[0086] 가) 화학식 15로 표시되는 화합물 15에 클로로메틸에틸에테르, N,N-다이아이소프로필에틸아민과 CH_2Cl_2 를 가하여

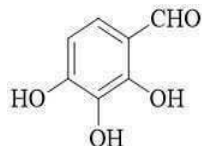
반응시켜 화학식 17로 표시되는 화합물 17을 얻는 단계;

[0087] 나) 상기 화합물 17에 요오드화 메틸, NaH 및 DMF를 가하여 상온에서 반응시켜 화학식 18로 표시되는 화합물 18을 얻는 단계;

[0088] 다) 상기 화합물 18에 화학식 19로 표시되는 화합물 19를 가하고 KOH를 가하여 MeOH/H₂O = 2/1 용매 하, 상온에서 교반하여 화학식 21로 표시되는 화합물 21을 얻는 단계; 및

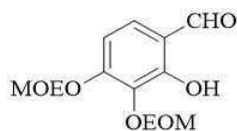
[0089] 라) 상기 화합물 21에 강산과 MeOH를 가하여 에논기를 환원하고, 이후 수소 풍선과 Pd/C, 아세트산을 가하여 EOM기 탈보호기화 반응으로 화학식 3으로 표시되는 화합물 4를 얻는 단계;를 포함하는 다이아릴프로판 합성방법에 관한 것이다.

[0090] <화학식 15>



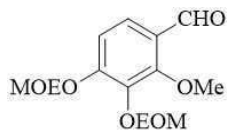
[0091]

[0092] <화학식 17>



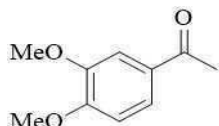
[0093]

[0094] <화학식 18>



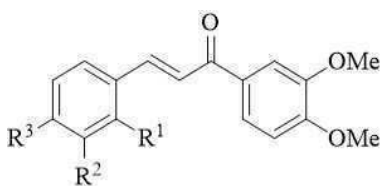
[0095]

[0096] <화학식 19>



[0097]

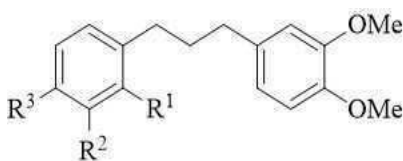
[0098] <화학식 20>



[0099]

[0100] (단, 화합물 21은 R¹ = OMe, R², R³ = OEOM)

[0101] <화학식 3>



[0102]

[0103] (단, 화합물 4는 R¹ = OMe, R², R³ = OH)

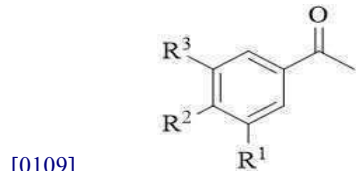
[0104] 또한, 본 발명은

[0105] 가) 화학식 8로 표시되는 화합물 22에 DMF 용매에서 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 및 테트라부틸암모늄 요오드화물을 가하여 상온에서 반응하여 화학식 9로 표시되는 화합물 23을 얻는 단계;

[0106] 나) 화학식 24로 표시되는 화합물 24에 상기 화합물 23과 KOH를 가하여 MeOH/H₂O = 2/1 용매 하, 상온에서 교반하여 화학식 25로 표시되는 화합물 25를 얻는 단계; 및

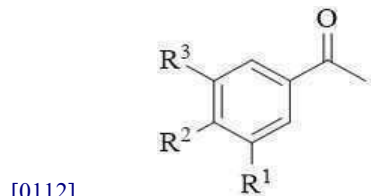
[0107] 다) 상기 화합물 25에 강산과 MeOH를 가하여 에논기를 환원하고, 이후 수소 풍선과 Pd/C, 아세트산을 가하여 EOM기 탈보호기화 반응으로 화학식 5로 표시되는 화합물 5를 얻는 단계;를 포함하는 다이아릴프로판 합성방법에 관한 것이다.

[0108] <화학식 8>



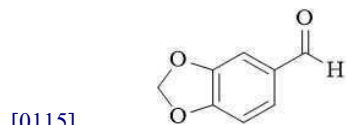
[0110] (단, 화합물 22는 $R^1, R^3 = OH$, $R^2 = H$)

[0111] <화학식 9>

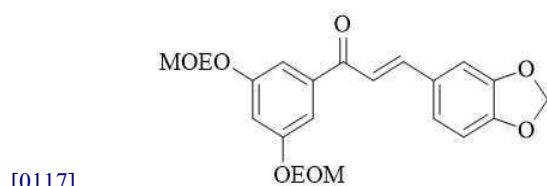


[0113] (단, 화합물 23은 $R^1, R^3 = OEOM$, $R^2 = H$)

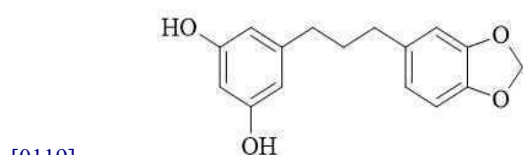
[0114] <화학식 24>



[0116] <화학식 25>



[0118] <화학식 5>



[0120] 뿐만 아니라, 본 발명은 4-(3-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)프로필)-2,6-다이메톡시페놀, 2-(3-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)프로필)-4,5-다이메톡시페놀, 4-(3-(3,4-다이메톡시페닐)프로필)벤젠-1,2,3-트리올, 4-(3-(3,4-다이메톡시페닐)프로필)-3-메톡시벤젠-1,2-다이올 및 5-(3-(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)프로필)벤젠-1,3-다이올 중 1종 이상을 함유하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

[0121] 본 발명의 다이아릴프로판 (화합물 1~5) 중 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분

야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보존제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0122] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0123] 나아가, 본 발명은 상기 다이아릴프로판 (화합물 1~5)을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아토피, 피부소양증과 같은 피부염증을 비롯한 염증질환의 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0124] 본 발명에서 정의되는 염증질환이란 아토피 피부염을 포함하는 피부염증질환, 신경교종세포 등 신경세포 염증질환, 척추염, 요도염, 방광염, 신염, 신우신염, 혈관염, 비염, 인후염, 편도염, 급성통증 또는 염증성 장질환 등이며, 바람직하게는 피부염증질환, 요도염, 방광염, 신염, 신우신염, 비염, 인후염, 편도염 또는 염증성 장질환이다.

발명의 효과

[0125] 본 발명의 방법에 의하면, 다이아릴프로판 및 그 유도체들을 간단한 공정으로 높은 수율로 제조할 수 있었다.

[0126] 또한, 본 발명의 방법에 의하여 제조된 다이아릴프로판 및 그 유도체들은 세포 독성 없이 염증 억제효과를 나타내었다. 따라서, 본 발명의 제조방법으로 제조된 다이아릴프로판 및 그 유도체들은 항염증제로 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0127] 도 1은 다이아릴프로판 (화합물 1~5) 및 이들 유도체의 화학구조식이다.

도 2는 본 발명의 다이아릴프로판 및 이들의 유도체의 합성방법을 도시한 것이다. 시약과 조건은 다음과 같다. a) 1.0 M BCl_3 (in CH_2Cl_2), CH_2Cl_2 , -78°C ~상온, 3h, 98%; b) 클로로메틸에틸에테르, K_2CO_3 , 테트라부틸암모늄 요오드화물, DMF, 상온, 12h, 41~86%; c) 클로로메틸에틸에테르, NaH, DMF, 0°C ~ 40°C , 12h, 85%; d) 클로로메틸에틸에테르, N,N-다이아이소프로필에틸아민, CH_2Cl_2 , 40°C , 12h, 63%; e) 요오드화 메틸, NaH, DMF, 상온, 3h, 89%; f) KOH, MeOH/ H_2O (2/1), 상온, 8h, 76~94%; g) 6N HCl, MeOH, 상온, 1h; h) H_2 (풍선), Pd/C, 아세트산, 상온, 48h, 43~62% (두 단계 이상).

도 3은 iNOS 발현에 미치는 화합물 1~5의 효과를 웨스턴 블롯 분석으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0128] 아래에서는 구체적인 실시예 및 실험예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0130] 2-하이드록시-4,5-다이메톡시벤즈알데하이드 (2-Hydroxy-4,5-dimethoxybenzaldehyde) (화합물 12):

[0131] 2,4,5-트리메톡시벤즈알데하이드 (화합물 11) (0.5g, 2.548 mmol)을 CH_2Cl_2 (20.00 mL)에 넣고 교반한 용액에 -78°C 에서 BCl_3 (1.0 M in CH_2Cl_2 ; 6.37 mL)를 한 방울씩 가하였다. 반응 온도를 상온으로 올리고 세 시간 동

안 교반하였다. 반응 완료 후 0℃로 냉각하고, 40% HCl 수용액 (1.3 mL)을 한 방울씩 가한 후, CH₂Cl₂ (3 x 30 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 식염수 (2 x 40 mL), 정제수 (40 mL)로 세척한 후 무수 Na₂SO₄로 건조하고 진공농축하여 밝은 갈색의 고체 화합물 12 (0.455g, 98%)를 얻었다. R_f= 0.60 (EtOAc/Hexane=1/1); 녹는점 99-101 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.39 (1H, s), 9.68 (1H, s), 6.89 (1H, s), 6.46 (1H, s), 3.93 (3H, s), 3.88 (3H, s); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 194.0, 159.5, 157.5, 143.2, 113.7, 113.1, 100.4, 56.8, 56.6.

[0133] **EOM 보호의 일반적인 절차**

[0134] 페놀릭 알데하이드/케톤 (2.00 mmol, 1.5당량)을 무수 DMF (6 mL)에 넣고 교반한 용액에 K₂CO₃ (3.00 mmol, 1.5당량)를 질소 분위기 하, 상온에서 가하고 30분간 교반하였다. 반응 종료 후, 무수 DMF (1.0 mL)용액 내에서 TBAI (tetrabutylammonium iodide) (0.2 mmol, 0.1당량)를 가한 후 EOM-Cl (chloromethyl ethyl ether) (2.4 mmol, 1.2당량)을 천천히 가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 12 시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, 물을 첨가하고 에테르 (3 x 20 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H₂O (3 x 20 mL, 식염수 (2 x 20 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane=1/2)로 정제하여 정제된 EOM-보호 알데하이드/케톤을 얻었다 [2.3당량의 EOM-Cl, 0.2당량의 TBAI 및 2.3당량의 K₂CO₃가 화합물 23의 합성에 사용되었고, 8시간 동안 반응하였다].

[0136] **4-(에톡시메톡시)-3,5-다이메톡시벤즈알데하이드 {4-(Ethoxymethoxy)-3,5-dimethoxybenzaldehyde}(화합물 7)**

[0137] 수율: 85%; R_f= 0.60 (EtOAc/Hexane=1/2); 무색 고체; 녹는점 54-56 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.85 (1H, s), 7.12 (2H, s), 5.25 (2H, s), 3.91 (6H, s), 3.88 (2H, q, J = 7.0 Hz), 1.20 (3H, t, J = 7.0 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 191.1, 154.0, 132.3, 106.7, 96.7, 65.4, 56.4, 15.3.

[0139] **2-(에톡시메톡시)-4,5-다이메톡시벤즈알데하이드 {2-(Ethoxymethoxy)-4,5-dimethoxybenzaldehyde}(화합물 13)**

[0140] 수율: 78%; R_f= 0.32 (EtOAc/Hexane=1/3); 연노란색 액체; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.30 (1H, s), 7.28 (1H, s), 6.80 (1H, s), 5.30 (2H, s), 3.94 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.78 (2H, q, J = 7.0 Hz), 1.25 (3H, t, J = 7.0 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 187.7, 156.4, 155.5, 144.5, 118.4, 108.6, 99.7, 94.3, 64.8, 56.2, 56.1, 15.2.

[0142] **1-(4-(에톡시메톡시)-3-메톡시페닐)에타논 {1-(4-(Ethoxymethoxy)-3-methoxyphenyl)ethanone}(화합물 9)**

[0143] 수율: 86%; R_f= 0.43 (EtOAc/Hexane=1/2); 무색 고체; 녹는점 44-46 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.53 (1H, d, J = 2.1 Hz), 7.51 (1H, dd, J = 9.0 Hz), 7.20 (1H, d, J = 9.0 Hz), 5.34 (2H, s), 3.93 (3H, s), 3.76 (2H, q, J = 6.9 Hz), 2.56 (3H, s), 1.22 (3H, t, J = 6.9 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 196.6, 151.1, 149.7, 131.7, 123.0, 114.7, 110.8, 93.9, 64.9, 56.2, 26.4, 15.3.

[0145] **1-(3,5-비스(에톡시메톡시)페닐)에타논 {1-(3,5-Bis(ethoxymethoxy)phenyl)ethanone}(화합물 23)**

[0146] 수율: 41%; R_f= 0.68 (EtOAc/Hexane=1/2); 무색 액체; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (2H, dd, J = 2.1 Hz), 6.94 (1H, t, J = 2.1 Hz), 5.22 (4H, s), 3.71 (4H, q, J = 6.9 Hz), 2.55 (3H, s), 1.22 (6H, t, J =

6.9 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 197.0, 158.3, 139.0, 109.3, 93.1, 64.3, 26.7, 15.1.

[0148] **2,3,4-트리스(에톡시메톡시)벤즈알데하이드 {2,3,4-Tris(ethoxymethoxy)benzaldehyde}(화합물 16)**

[0149] NaH (60% in mineral oil; 0.47 g, 19.5 mmol)를 무수 DMF (3 mL)에 넣고 교반한 용액에 알데하이드 화합물 15 (0.50 g, 3.24 mmol)의 무수 DMF (2 mL) 용액을 질소 분위기 하에서 가하고 0 °C로 냉각하였다. 30분 동안 교반한 후, TBAI (0.2 g, 0.54 mmol) 무수 DMF (1 mL) 용액을 가하고, 이어 EOM-Cl (0.61 mL, 6.58 mmol) 무수 DMF (2 mL) 용액을 한 방울씩 가하였다. 반응 혼합물을 40 °C로 가온하고 12시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후 (TLC로 확인함), 상온으로 냉각하고, 물을 가하여 에테르 (3 x 20 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H_2O (3 x 25 mL), 식염수 (2 x 20 mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane=1/2)로 정제하여 정제된 연노란색 액체 화합물 16 (0.91 g, 85%)을 얻었다. R_f = 0.58 (EtOAc/Hexane=1/2); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.26 (1H, s), 7.59 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.05 (1H, d, J = 8.7 Hz), 5.30 (2H, s), 5.29 (2H, s), 5.18 (2H, s), 3.90-3.70 (6H, m), 1.26-1.19 (9H, m); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 189.1, 156.9, 154.4, 138.8, 125.0, 124.3, 111.5, 98.8, 97.2, 93.6, 66.2, 65.5, 65.0, 15.2.

[0151] **3,4-비스(에톡시메톡시)-2-하이드록시벤즈알데하이드 {3,4-Bis(ethoxymethoxy)-2-hydroxybenzaldehyde}(화합물 17)**

[0152] 알데하이드 15 (0.5 g, 3.244 mmol)를 무수 CH_2Cl_2 (12 mL)에 넣고 교반한 용액에 *N,N*-다이이소프로필 에틸아민 {*N,N*-diisopropylethylamine}(0.8 mL, 4.9 mmol)을 0 °C, 질소 분위기 하에서 가하였다. 30분 동안 교반한 후, EOM-Cl (0.54 mL, 13.0 mmol)를 한 방울씩 가하였다. 반응 혼합물을 40 °C로 가온하고 12시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후 물을 가하고 CH_2Cl_2 (2 x 20 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H_2O (2 x 20 mL), 식염수 (20 mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane=1/4)로 정제하여 무색의 액체인 EOM-보호 알데하이드 화합물 17 (0.55 g, 63%)를 얻었다. R_f = 0.39 (EtOAc/Hexane=1/4); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 11.25 (1H, s), 9.73 (1H, s), 7.26 (1H, d, J = 9.0 Hz), 6.84 (1H, d, J = 9.0 Hz), 5.32 (2H, s), 5.21 (2H, s), 3.92 (2H, q, J = 7.0 Hz), 3.74 (2H, q, J = 7.0 Hz), 1.22 (3H, t, J = 7.0 Hz), 1.21 (3H, t, J = 7.0 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 195.0, 157.5, 156.3, 133.5, 130.3, 117.0, 107.4, 96.6, 93.6, 65.3, 65.2, 15.4, 15.3.

[0154] **3,4-비스(에톡시메톡시)-2-메톡시벤즈알데하이드 {3,4-Bis(ethoxymethoxy)-2-methoxybenzaldehyde}(화합물 18)**

[0155] NaH (60% in mineral oil; 0.15 g, 3.82 mmol)를 무수 DMF (2 mL)에 넣고 교반한 용액에 알데하이드 화합물 17 (0.41 g, 1.53 mmol)의 무수 DMF (3 mL) 용액을 0 °C 질소 분위기 하에서 가하였다. 15분 동안 교반한 후, 요오드화 메틸 (1.2 mL, 1.98mmol)을 한 방울씩 가하였다. 반응 혼합물을 상온으로 가온하여 3시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후 (TLC로 확인함), 얼음물을 가하고, 에테르 (3 x 20 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H_2O (3 x 20 mL), 식염수 (2 x 20 mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하고 진공농축하여, 연노란색 액체 화합물 18 (0.36 g, 88.5%)을 얻었고 다음 단계에서 추가 정제 없이 사용하였다. R_f = 0.39 (EtOAc/Hexane=1/4); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.22 (1H, s), 7.57 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.03 (1H, d, J = 8.7 Hz), 5.31 (2H, s), 5.18 (2H, s), 3.99 (3H, s), 3.88 (2H, q, J = 6.9 Hz), 3.74 (2H, q, J = 6.9 Hz), 1.25 (3H, t, J = 6.9 Hz), 1.22 (3H, t, J = 6.9 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 188.8, 157.5, 157.1, 139.3, 124.5, 124.3, 111.3, 97.3, 93.7, 65.6, 65.1, 62.8, 15.3.

[0157] 클라이젠 - 슈미트 응축 반응의 일반적인 절차

[0158] 아세트페논 (0.25 mmol) 및 방향족 알데하이드 (0.3 mmol, 1.2당량)를 MeOH/H₂O (2/1; 15 mL)에 넣고 교반한 용액에 KOH (0.31 g, 5.5 mmol, 22당량)를 가하여 상온에서 8시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후 MeOH를 감압하여 제거하고 EtOAc (2 × 20 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 식염수 (2 × 20 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane = 1/3~1/2)로 정제하여 EOM 보호 착론을 얻었다.

[0160] (*E*)-3-(4-(에톡시메톡시)-3,5-다이메톡시페닐)-1-(4-(에톡시메톡시)-3-메톡시페닐) 프로프-2-엔-1-온 {(*E*)-3-(4-(Ethoxymethoxy)-3,5-dimethoxyphenyl)-1-(4-(ethoxymethoxy)-3-methoxyphenyl) prop-2-en-1-one}(화합물 10)

[0161] 수율: 89%; R_f = 0.25 (EtOAc/Hexane=1/2); 노란 오일; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (1H, d, *J* = 15.3 Hz), 7.63 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz), 7.61 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 15.3 Hz), 7.23 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.85 (2H, s), 5.35 (2H, s), 5.20 (2H, s), 3.95 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.87 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 3.77 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 1.22 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.21 (3H, t, *J* = 7.0 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.4, 153.5, 150.8, 149.6, 144.2, 136.6, 132.2, 130.8, 122.7, 121.0, 114.2, 111.1, 105.4, 96.5, 93.6, 65.0, 64.7, 56.1, 56.0, 15.2, 15.1.

[0163] (*E*)-1-(4-(에톡시메톡시)-3-디메톡시페닐)-3-(2-(에톡시메톡시)-4,5-디메톡시페닐) 프로프-2-엔-1-온 {(*E*)-1-(4-(Ethoxymethoxy)-3-methoxyphenyl)-3-(2-(ethoxymethoxy)-4,5-dimethoxyphenyl) prop-2-en-1-one}(화합물 14)

[0164] 수율: 92%; R_f = 0.28 (EtOAc/Hexane=1/2); 노란 고체; 녹는점 76-78 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.11 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 7.61 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 7.25 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.11 (1H, s), 6.82 (1H, s), 5.36 (2H, s), 5.27 (2H, s), 3.96 (3H, s), 3.92 (3H, s), 3.91 (3H, s), 3.78 (4H, q, *J* = 6.9 Hz), 1.24 (3H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.23 (3H, t, *J* = 6.9 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 189.2, 152.4, 152.3, 150.7, 149.7, 144.3, 139.4, 132.9, 122.6, 120.1, 116.8, 114.5, 111.5, 110.3, 100.7, 94.5, 93.9, 64.9, 64.8, 56.7, 56.3, 15.4, 15.3.

[0166] (*E*)-1-(4-(에톡시메톡시)-3-메톡시페닐)-3-(2,3,4-트리스(에톡시메톡시)페닐) 프로프-2-엔-1-온 {(*E*)-1-(4-(Ethoxymethoxy)-3-methoxyphenyl)-3-(2,3,4-tris(ethoxymethoxy)phenyl) prop-2-en-1-one}(화합물 20)

[0167] 수율: 94%; R_f = 0.33 (EtOAc/Hexane=1/1); 노란 오일; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 7.68 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 1.8 Hz), 7.55 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 7.42 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.02 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.92 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 5.28 (2H, s), 5.24 (2H, s), 5.18 (2H, s), 3.97 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.91-3.82 (4H, m), 3.75 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 1.23 (9H, m); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.8, 153.5, 153.1, 151.2, 149.3, 139.7, 139.5, 131.7, 124.2, 123.4, 123.1, 121.3, 112.0, 110.9, 110.1, 98.6, 97.4, 93.9, 66.2, 65.6, 65.0, 56.4, 56.3, 15.4.

[0169] (*E*)-3-(3,4-비스(에톡시메톡시)-2-메톡시페닐)-1-(3,4-다이메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온 {(*E*)-3-(3,4-Bis(ethoxymethoxy)-2-methoxyphenyl)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one}(화합물 21)

[0170] 수율: 76%; R_f = 0.40 (EtOAc/Hexane=1/2); 노란 오일; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (1H, d, *J* = 15.6

Hz), 7.66 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz), 7.60 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.54 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), 7.38 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.99 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 6.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 3.97 (6H, s), 3.90 (3H, s), 3.88 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 3.75 (2H, q, $J = 6.9$ Hz), 1.28-1.22 (6H, m); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 189.0, 154.1, 153.5, 153.2, 149.3, 140.2, 139.1, 131.8, 123.9, 123.5, 123.0, 121.7, 111.8, 111.0, 110.1, 97.4, 93.9, 65.5, 64.9, 61.7, 56.3, 56.2, 15.4, 15.3.

[0172] (*E*)-3-(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)-1-(3,5-비스(에톡시메톡시)페닐)프로프-2-엔-1-온 {(*E*)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-(3,5-bis(ethoxymethoxy)phenyl)prop-2-en-1-one} (화합물 25)

[0173] 수율: 78%; $R_f = 0.56$ (EtOAc/Hexane=1/2); 노란 오일; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (1H, d, $J = 15.3$ Hz), 7.29 (2H, s), 7.26 (1H, d, $J = 15.3$ Hz), 7.11 (1H, s), 7.06 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.95 (1H, d, $J = 1.2$ Hz), 6.79 (1H, dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz), 5.97 (2H, s), 5.21 (4H, s), 3.73 (4H, q, $J = 6.9$ Hz), 1.23 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 189.4, 158.3, 149.8, 148.3, 144.6, 140.3, 129.2, 125.2, 119.9, 109.5, 108.8, 108.6, 106.6, 101.6, 93.2, 64.5, 15.2.

[0175] EOM 보호 찰콘으로부터 1,3-다이아릴프로판을 합성하기 위한 일반 절차

[0176] EOM-보호 찰콘 (0.5 mmol)을 MeOH (8 mL)에 넣고 교반한 용액에 6N HCl (5 mL)을 가하고 상온에서 1시간 동안 교반하였다 (EOM기 탈보호기화). 용매를 감압 하에 제거하여 잔여물을 25 mL의 2구 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 아세트산 (6 mL)에 용해하고 10% Pd/C를 가하였다. 혼합물을 수소 분위기 하 (각 넥마다 하나의 풍선을 설치)에 서 상온으로 48시간 동안 교반하였다. 반응 종료 (TLC로 확인) 후, Celite 패드로 여과하고, EtOAc (15 mL)로 세척하고 용매는 감압 하에 제거하였다. 조생성물을 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane = 1/3~1/1)로 정제하여 순수한 다이아릴프로판을 수득하였다.

[0178] 4-(3-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)프로필)-2,6-다이메톡시페놀 {4-(3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propyl)-2,6-dimethoxyphenol} (화합물 1)

[0179] 수율: 59%; $R_f = 0.36$ (EtOAc/Hexane=1/1); 회색을 띤 백색 고체; 녹는점 70-72 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.82 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.67 (1H, dd, $J = 8.4, 1.5$ Hz), 6.65 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 6.38 (2H, s), 5.58 (1H, s), 5.45 (1H, s), 2.57 (4H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.89 (2H, quint, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 146.8, 146.3, 143.6, 134.2, 133.4, 132.6, 121.0, 114.2, 111.0, 105.0, 56.4, 56.0, 35.8, 35.3, 33.7; EI-MS m/z 318 (M^+), 167 (base), 153, 137; HRMS: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$ (M^+) 계산값: 318.1467, 측정값: 318.1478.

[0181] 2-(3-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)프로필)-4,5-다이메톡시페놀 {2-(3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propyl)-4,5-dimethoxyphenol} (화합물 2)

[0182] 수율: 48%; $R_f = 0.32$ (EtOAc/Hexane=1/2); 연노란색 액체; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.82 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 6.68 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 6.67 (1H, s), 6.61 (1H, s), 6.39 (1H, s), 5.55 (1H, s), 4.82 (1H, s), 3.85 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.77 (3H, s), 2.60 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 2.55 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.89 (2H, quint, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 148.5, 147.7, 146.7, 144.0, 143.5, 134.3, 121.3, 119.4, 115.0, 114.5, 111.4, 101.8, 57.3, 56.4, 56.3, 35.4, 32.0, 29.3; EI-MS m/z 318 (M^+), 181, 167(base), 137; HRMS: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$ (M^+) 계산값: 318.1467, 측정값: 318.1472.

[0184] 4-(3-(3,4-다이메톡시페닐)프로필)벤젠-1,2,3-트리올 {4-(3-(3,4-Dimethoxyphenyl)propyl)benzene-1,2,3-triol}(화합물 3)

[0185] 수율: 62%; $R_f = 0.53$ (EtOAc/Hexane=1/1); 회색을 띤 백색 고체; 녹는점 112-114 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.76 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.71 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.69 (1H, s), 6.52 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.37 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 5.52 (3H, br s), 3.82 (6H, s), 2.59 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 2.56 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.88 (2H, quin, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 148.7, 146.9, 142.8, 142.2, 135.5, 131.8, 121.6, 120.8, 120.6, 112.3, 111.8, 107.5, 56.3, 56.1, 35.3, 31.8, 29.2; EI-MS m/z 304 (M^+), 269, 195(base), 152; HRMS: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_5$ (M^+) 계산값: 304.1311, 측정값: 304.1302.

[0187] 4-(3-(3,4-다이메톡시페닐)프로필)-3-메톡시벤젠-1,2-다이올 {4-(3-(3,4-Dimethoxyphenyl)propyl)-3-methoxybenzene-1,2-diol}(화합물 4)

[0188] 수율: 43%; $R_f = 0.52$ (EtOAc/Hexane=1/3); 회색을 띤 백색 고체; 녹는점 92-94 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.79 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.73 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.71 (1H, s), 6.66 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.60 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.03 (1H, br s), 5.94 (1H, br s), 3.86 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.77 (3H, s), 2.63 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 2.60 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.91 (2H, quin, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 148.7, 147.0, 145.6, 142.9, 136.5, 135.1, 126.9, 120.5, 120.3, 111.9, 111.3, 111.2, 61.2, 56.1, 56.0, 35.4, 32.6, 29.1; EI-MS m/z 318 (M^+), 209, 152(base), 121; HRMS: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$ (M^+) 계산값: 318.1467, 측정값: 318.1480.

[0190] 5-(3-(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)프로필)벤젠-1,3-다이올 {5-(3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)propyl)benzene-1,3-diol}(화합물 5)

[0191] 수율: 54%; $R_f = 0.57$ (EtOAc/Hexane=1/1); 무색 액체; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.65 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.58 (1H, s), 6.54 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.19 (2H, s), 6.16 (1H, s), 6.13 (2H, s), 5.85 (2H, s), 2.43 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 2.38 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.73 (2H, quin, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 156.4, 147.4, 145.6, 145.4, 136.2, 121.3, 109.0, 108.4, 108.2, 100.8, 100.6, 35.3, 35.2, 32.8; EI-MS m/z 272 (M^+), 149, 135, 124(base); HRMS: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (M^+) 계산값: 272.1049, 측정값: 272.1039.

[0193] 항염증 활성 분석: 시약 등

[0194] 에셔리치아 콜라이 (*Escherichia Coli*) 유래 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 Solution과 Griess reagent system은 Promega (Madison, MI, USA)에서 구입하였다.

[0196] 세포배양 및 세포생존율 분석

[0197] RAW264.7 쥐 대식세포는 한국세포은행 (서울, 한국)에서 입수하여 10% 우태혈청, 100 U/mL 페니실린 및 100 μg /mL 스트렙토마이신이 함유된 DMEM에서 37 °C, 5% CO_2 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. RAW264.7 세포는 96-웰의 평평한 바닥을 가진 플레

이트에 2×10^4 세포 밀도가 되도록 놓고 각 화합물을 지시한 농도대로 각 플레이트에 가하였다. 24시간 배양 후 제조자의 지시대로 생존세포 수를 계수하였다. 이 분석방법은 테트라졸리움 화합물 MTS가 포마잔으로 환원되는 것에 기초한 것인데, 포마잔은 490 nm에서 최대 흡광도를 나타낸다. 따라서, 세포 배양액 내의 산물의 양은 490 nm에서 포마잔의 광학적 밀도로 나타내며, 이것은 직접적으로 생존세포 수와 비례한다.

[0199] **NO 측정**

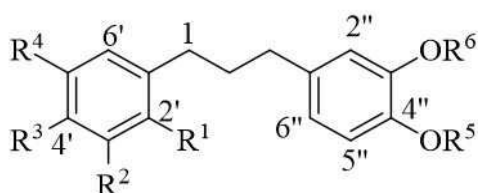
[0200] 마우스 대식세포에 의해 생성된 NO의 양은 RAW264.7 세포배양액 상층액에서 측정한 값으로 나타내었다. RAW264.6 세포는 200 μ L의 배양배지가 든 96-웰 세포배양 플레이트에 5×10^4 세포밀도가 되도록 놓고 12시간 동안 배양하였다. 세포는 500 ng/mL의 LPS 내에서 화합물 1~5를 지시한 농도대로 넣고 18시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess reagent system (Promega)을 이용하여 제조자의 지시에 따라 측정하였다.

[0202] **면역블롯팅 분석**

[0203] RAW 264.7 세포에서 이 화합물들이 iNOS 발현을 유도하는 능력을 알아보기 위하여 세포를 LPS 500 ng/mL 존재 하에 각 화합물 10 μ M에 18시간 동안 노출시켰다. 그 후 세포를 차가운 PBS로 세척하고, 100 μ L의 세포 용균 완충액 (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM $MgCl_2$, 25 mM β -글리세로포스페이트, 50 mM NaF, 100 μ M Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 10 μ g/ml 류페틴 (leupeptin) 및 10 μ g/ml 아프로티닌)을 각 시료에 가하였다. 단백질을 SDS (sodium dodecylsulfate)로 변성한 후 시료는 SDS-PAGE 한 후 나이트로셀룰로스 막으로 전이하였다. 상온에서 5% 탈지분유를 함유하는 TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM 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.

도면

도면1



$R^1, R^5 = H; R^2, R^4 = OMe; R^3 = OH; R^6 = Me; (1)$

$R^1 = OH; R^2, R^5 = H; R^3, R^4 = OMe; R^6 = Me;$

Hindsiiopropane C (2)

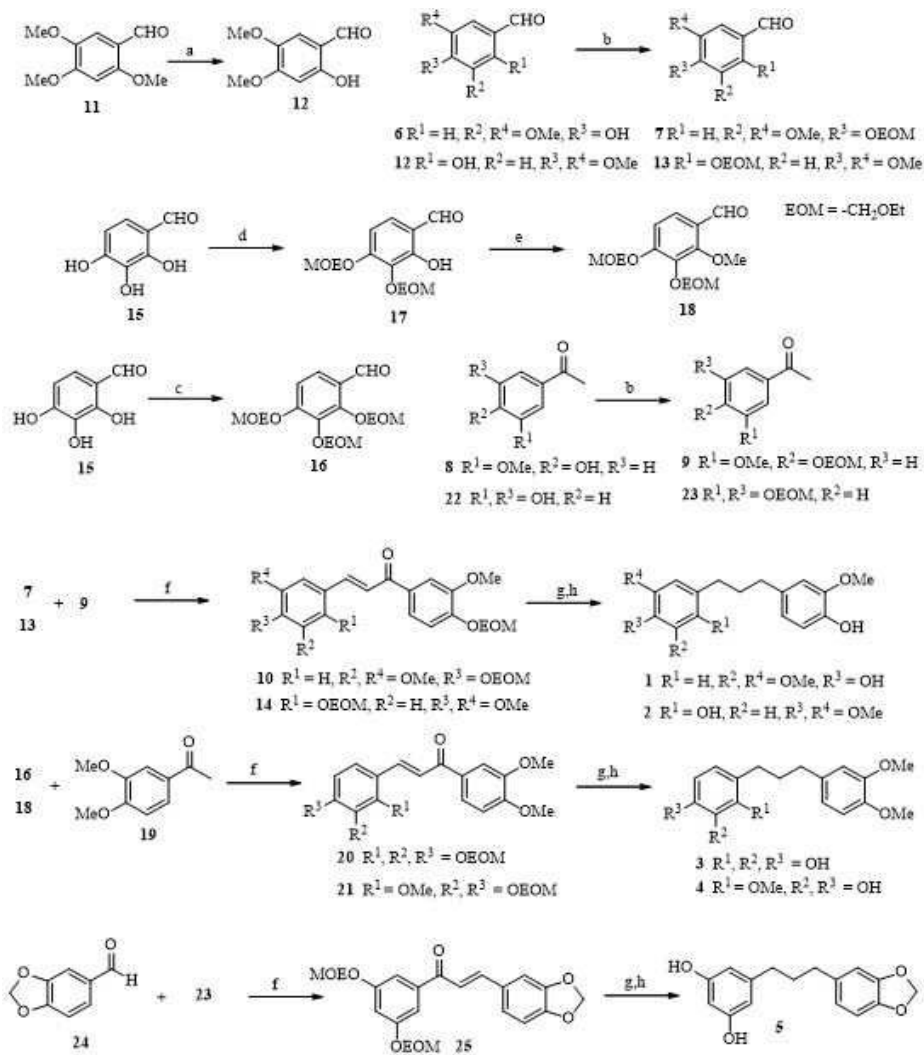
$R^1, R^2, R^3 = OH; R^4 = H; R^5, R^6 = Me; (3)$

$R^1 = OMe; R^2, R^3 = OH; R^4 = H; R^5, R^6 = Me;$

Hindsiiopropane B (4)

$R^1, R^3 = H; R^2, R^4 = OH; R^5-R^6 = -CH_2-; (5)$

도면2



도면3

