(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0081889
(43) 공개일자 2008년09월10일

(51) Int. Cl.
C07D 217/04 (2006.01) *A61K 31/70* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0084163(분할)
(22) 출원일자 2008년08월27일
심사청구일자 2008년08월27일
(62) 원출원 특허 10-2006-0124270
원출원일자 2006년12월08일
심사청구일자 2006년12월08일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
황온유
서울특별시 강남구 개포동 경남아파트 9동 1303호
지대윤
서울특별시 용산구 이촌1동 한가람아파트 215동 804호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정경옥

전체 청구항 수 : 총 7 항

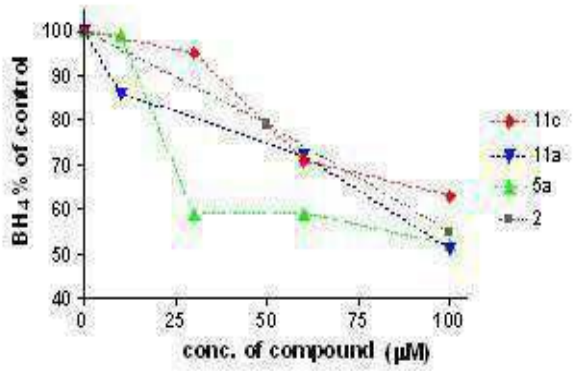
(54) 퇴행성질환 및 염증질환에 대한 예방치료 효과를 갖는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체

(57) 요 약

본 발명은 신규 화합물인 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린(HMTIQ) 유도체 및 그 용도에 관한 것으로, 상기 화합물은 활성 소교세포에서 일산화질소(NO) 및 초과산화물의 증가를 현저하게 억제하고, TNF-α, IL-1β, 유도형 일산화질소 신타아제 및 사이클로옥시게나제-2의 유전자발현을 억제하고, NF-kB의 핵으로의 이동을 억제하고, 반응성 산화물질(ROS)의 생성을 저감케하고, GTP cyclohydrolase I 유전자 발현과 테트라하이드로바이옵테린 (BH4)의 과생산을 억제하고, 활성 소교세포가 도파민성 신경세포에 미치는 손상에 대하여 현저한 보호 효과를 나타낸다.

결과적으로 본 발명의 신규 합성한 화합물은 염증성질환 및 퇴행성신경질환 처치용 약제로서 효과를 갖는다.

대 표 도 - 도13



(72) 발명자

손효진

서울특별시 송파구 송파동 85-18 203호

서재웅

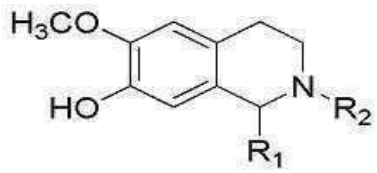
인천광역시 연수구 옥련동 현대5차아파트 504동 1102호

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체:

[화학식 1]



단, 상기 화학식에서,

R_1은 H, CH_3, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$, C_6H_5, $CH_2C_6H_5$, C_4H_7, C_3H_5 및 C_6H_{11}로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

R_2는 $COCH_2CH_3$, $COCH_2CH_2CH_3$, $COCH(CH_3)_2$, $COCH_2CH(CH_3)_2$ 및 COC_6H_{11}로 이루어진 그룹으로부터 선택됨.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식에서 R_1은 H이고 R_2는 $COCH_2CH_3$인 것을 특징으로 하는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화학식에서 R_1은 H이고 R_2는 $COCH_2CH_2CH_3$인 것을 특징으로 하는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화학식에서 R_1은 H이고 R_2는 $COCH(CH_3)_2$인 것을 특징으로 하는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화학식에서 R_1은 H이고 R_2는 $COCH_2CH(CH_3)_2$인 것을 특징으로 하는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체.

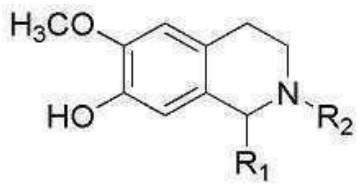
청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화학식에서 R_1은 H이고 R_2는 COC_6H_{11}인 것을 특징으로 하는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체.

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학조성물:

[화학식 1]



단, 상기 화학식에서,

R_1은 H, CH_3, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$, C_6H_5, $CH_2C_6H_5$, C_4H_7, C_3H_5 및 C_6H_{11}로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

R_2는 $COCH_3$, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $CH_2CH_2CH_2CH_3$, $CH_2C_6H_5$, $CH_2CH_2C_6H_5$, $COCH_2CH_3$, $COCH_2CH_2CH_3$, $COCH(CH_3)_2$, $COCH_2CH(CH_3)_2$, $CH_2C_6H_{11}$ 및 COC_6H_{11}로 이루어진 그룹으로부터 선택됨.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 퇴행성질환 및 염증질환에 대한 예방치료 효과를 갖는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 최근 염증반응이 신경퇴행을 유발하는 주요 기전의 하나라는 사실이 밝혀지고 있다. 즉 중추신경계에 존재하는 면역세포인 소교세포는 다양한 외인성, 내인성 물질로 인해 활성될 수 있으며, 활성된 소교세포는 염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-1β, 일산화질소 (NO), 프로스타글란딘, 초과산화물 등의 물질을 생산, 방출한다.

<3> 이러한 물질들의 생성은 단기적으로는 면역반응을 유발하지만, 그 과도한 생산이나 지속적인 생산은 근접한 신경세포들의 사멸을 유도하여 결국 신경퇴행을 유발한다는 것이다. 또 사멸 중인 신경세포가 방출하는 물질들이 소교세포의 활성을 다시 유발하게 되므로, 신경퇴행은 지속적인 악순환에 빠지게 된다. 실제로 소교세포의 활성이 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfelt-Jakob Disease; CJD)들의 다양한 퇴행성 신경질환과 관계가 있음이 보고되었다.

<4> 따라서, 활성 소교세포가 방출하는 다양한 염증성 물질의 생산을 억제하는 것은 퇴행성 신경질환의 예방 및/또는 치료에 매우 유용할 것으로 생각되며 최근 이에 대한 활발한 연구가 국내외적으로 진행되고 있다.

<5> 파킨슨병에 대한 현 치료법은 도파민 전구체인 L-DOPA를 투여함으로써 운동장애 증상을 완화시키는 것에 집중되어 있다. 그러나 불행히도 L-DOPA 투여는 삶의 질을 정상인에 가깝게 하지 못할 뿐 아니라, 만성적으로는 다양한 신체적, 정신적 역효과를 야기한다. 또 L-DOPA 자체가 신경독성이 있을 수 있다는 증거가 제기되고 있다. 무엇보다도, 파킨슨병에서 퇴행의 진행을 억제하는 치료법이나 예방법은 전무한 상태이다.

<6> 알츠하이머 질병의 경우, 현재의 약제학적 치료법은 아세틸콜린스테라제 억제제 혹은 메만틴, N-메틸-D-아스파테이트 채널 차단제에 기초하고 있으며 현재 ㅅ시크리타아제(secretase) 억제제 등 다양한 약물들의 개발이 시도되고 있으나 아직 임상에 적용 중인 물질은 없다. 루게릭병, 크로이츠펠트 야콥병 및 헌팅턴병과 같은 기타 퇴행성 신경질환들 역시 그 효과적인 치료법은 아직까지 개발되지 않은 상태이다.

<7> 따라서 상술한 질병들의 병인에 기초한 보다 효과적인 치료 방법의 개발이 시급하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 이에 본 발명의 일 목적은 활성 소교세포에서 일어나는 다양한 염증성 사이토카인 및 독성물질들의 생산의 하향조절을 유발하는 신규 화합물을 제공하려는 데에 있다.

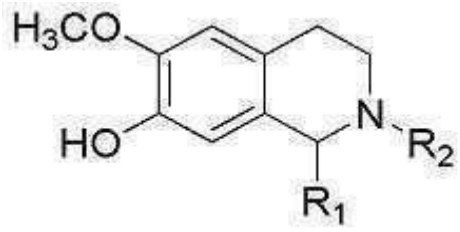
<9> 본 발명의 다른 목적은 산화성 스트레스에 의한 신경세포 손상을 억제하는 효과를 가지는 신규 화합물을 제공하려는 데에 있다.

<10> 본 발명의 또 다른 목적은 다양한 퇴행성 신경질환의 예방 및/또는 치료에 효과적인 신규 화합물의 제조방법을 제공하려는 데에 있다.

과제 해결수단

<11> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체를 제공한다:

<12> [화학식 1]



<13>

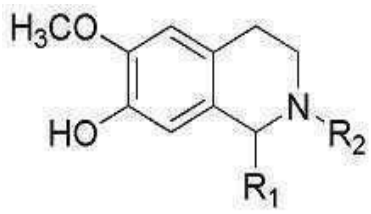
<14> 단, 상기 화학식에서,

<15> R_1은 H, CH_3, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$, C_6H_5, $CH_2C_6H_5$, C_4H_7, C_3H_5 및 C_6H_{11}로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

<16> R_2는 $COCH_2CH_3$, $COCH_2CH_2CH_3$, $COCH(CH_3)_2$, $COCH_2CH(CH_3)_2$ 및 COC_6H_{11}로 이루어진 그룹으로부터 선택됨.

<17> 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다:

<18> [화학식 1]



<19>

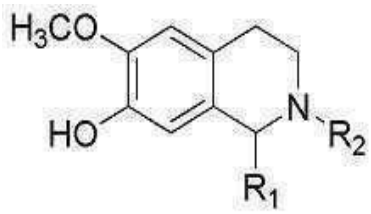
<20> 단, 상기 화학식에서,

<21> R_1은 H, CH_3, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$, C_6H_5, $CH_2C_6H_5$, C_4H_7, C_3H_5 및 C_6H_{11}로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

<22> R_2는 $COCH_3$, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $CH_2CH_2CH_2CH_3$, $CH_2C_6H_5$, $CH_2CH_2C_6H_5$, $COCH_2CH_3$, $COCH_2CH_2CH_3$, $COCH(CH_3)_2$, $COCH_2CH(CH_3)_2$, $CH_2C_6H_{11}$ 및 COC_6H_{11}로 이루어진 그룹으로부터 선택됨.

<23> 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체를 유효성분으로 함유하는 신경보호 효과를 갖는 약학조성물을 제공한다:

<24> [화학식 1]



<25>

<26> 단, 상기 화학식에서,

<27> R_1은 H, CH_3, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$, C_6H_5, $CH_2C_6H_5$, C_4H_7, C_3H_5 및 C_6H_{11}로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

<28> R_2는 $COCH_3$, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $CH_2CH_2CH_2CH_3$, $CH_2C_6H_5$, $CH_2CH_2C_6H_5$, $COCH_2CH_3$, $COCH_2CH_2CH_3$, $COCH(CH_3)_2$,

$COCH_2CH(CH_3)_2$, $CH_2C_6H_{11}$ 및 COC_6H_{11}로 이루어진 그룹으로부터 선택됨.

<29> 상기 리간드들, R_1 및 R_2의 구체적인 적용 예는 다음과 같다.

표 1

<30>

화학식명	R_1	R_2
2	H	$COCH_3$
5a	CH_3	$COCH_3$
9a	CH_2CH_3	$COCH_3$
9b	$CH_2CH_2CH_3$	$COCH_3$
9c	$CH(CH_3)_2$	$COCH_3$
9e	$CH_2CH(CH_3)_2$	$COCH_3$
5b	C_6H_5	$COCH_3$
9d	$CH_2C_6H_5$	$COCH_3$
9f	C_3H_5	$COCH_3$
9g	C_4H_7	$COCH_3$
9h	C_6H_{11}	$COCH_3$
11a	H	$COCH_2CH_3$
11b	H	$COCH_2CH_2CH_3$
11d	H	$COCH(CH_3)_2$
11e	H	$COCH_2CH(CH_3)_2$
11c	H	COC_6H_{11}
12d	H	CH_2CH_3
12a	H	$CH_2CH_2CH_3$
12b	H	$CH_2CH_2CH_2CH_3$
12c	H	$CH_2C_6H_{11}$
12e	H	$CH_2C_6H_5$
12f	H	$CH_2CH_2C_6H_5$

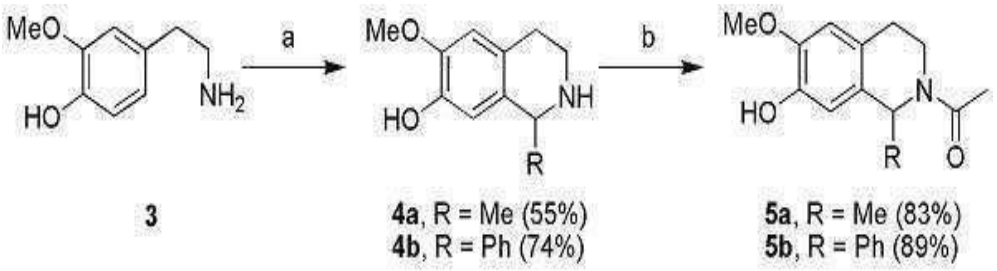
<31> 상기 화합물들은 그 trans, cis체를 모두 사용가능하다.

<32> 본 발명의 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린(HMTIQ) 유도체(화학식 1)는 예컨대 구체적으로는 다음의 방법에 의해 제조할 수가 있다.

<33> 알데히드와 페닐에틸아민을 이용한 Pictet-Spengler 반응에 의해 C1 위치에 여러 가지 알킬 유도체들을 도입하였다(반응식 1). 즉, 하기식 **3**의 화합물과 아세트알데히드를 산성 매질하에 고리화 반응시키면 1-메틸화합물(화학식 4a)이 쉽게 얻어지나 수성 용매 사용시에는 벤즈알데히드의 용해도 때문에 1-페닐화합물(화학식 4b)을 생성하는 데 실패하였다. 다른 방법으로 이민을 생성하도록 메탄올 하에 반응을 수행한 다음 트리플루오로아세트산(TFA)를 첨가하여 고리 반응에 의하여 화학식 4b의 화합물을 수득한다.

<34> 화학식 4a와 4b의 화합물을 아세트산 무수물로 아세틸화시키면 각각 화학식 5a와 5b의 화합물을 합성하게 된다.

반응식 1



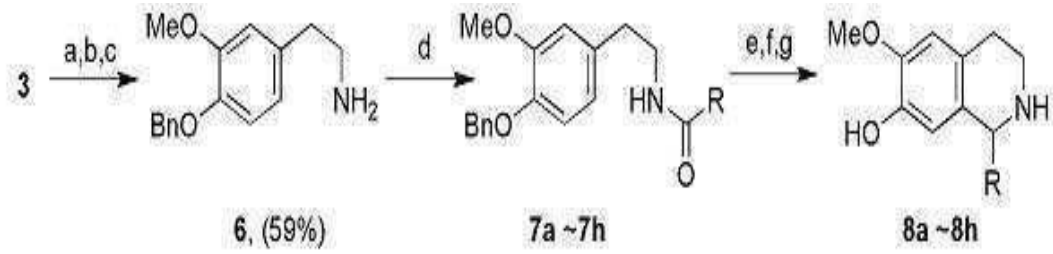
<35>

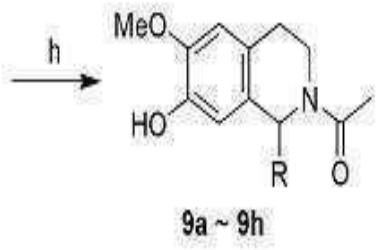
<36> 반응식 1 내의 화학식 **4a**의 화합물 합성조건: 아세트알데히드, 1 M HCl, 100 ℃, 24 h;

<37> 반응식 1 내의 화학식 **4b**의 화합물 합성조건: i. 벤즈알데히드, $MgSO_4$, TEA, MeOH, 환류, 3 h; ii. TFA, 80 ℃, 1 h 40 min

<38> 반응식 1 내의 화학식 **5a**와 **5b**의 화합물 합성조건: (b) Ac_2O, Et_3N, CH_2Cl_2, 상온, 1 h.

반응식 2





7a (90%), **8a** (18%), **9a** (58%), R = CH_2CH_3
7b (94%), **8b** (77%), **9b** (45%), R = $CH_2CH_2CH_3$
7c (96%), **8c** (70%), **9c** (67%), R = $CH(CH_3)_2$
7d (63%), **8d** (63%), **9d** (94%), R = CH_2Ph
7e (93%), **8e** (67%), **9e** (73%), R = $CH_2CH(CH_3)_2$
7f (88%), **8f** (58%), **9f** (72%), R = cyclopropyl
7g (79%), **8g** (81%), **9g** (80%), R = cyclobutyl
7h (85%), **8h** (72%), **9h** (80%), R = cyclohexyl

<39>

<40> 반응식 2 내의 화학식 **6**번의 화합물 합성조건: (a) $(Boc)_2O$, Et_3N, $CHCl_3$, 상온, 24 h; (b)의 합성: 벤질 브로마이드, K_2CO_3, 아세톤, 환류, 12 h; (c)의 합성: TFA, CH_2Cl_2, 0 ℃, 40 min

<41> 반응식 2 내의 화학식 **7a-7h**의 화합물 합성조건: 아실 클로라이드, TEA, CH_2Cl_2, 상온, 30 min~1 h;

<42> 반응식 2 내의 화학식 **8a-8h**의 화합물 합성조건: (e) $POCl_3$, CH_3CN, 환류, 2 h-5 h; (f) $NaBH_4$, 0 ℃-상온, 24 h; (g) Pd/C, H_2, HCl, MeOH, 상온, 12 h

<43> 반응식 2 내의 화학식 **9a-9h**의 화합물 합성조건: (h) Ac_2O, CH_2Cl_2, 0 ℃-상온, 2 h.

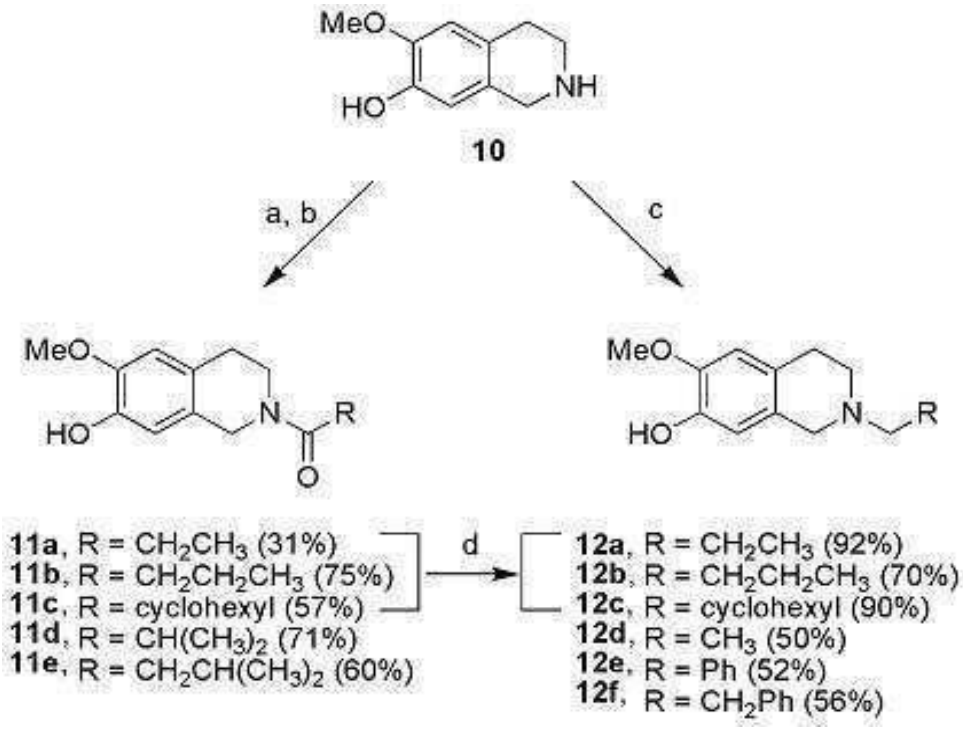
<44> 1번 탄소위치의 테트라하이드로이소퀴놀린 유도체의 추가 합성은 Bischler-Napieralski 반응을 사용하여 수행하였다. 화합물 **6**은 **3**번 화합물로부터 1차 아민을 tert-부틸옥시카보닐 무수물로 보호하고, 페놀을 벤질 브로마이드로 보호한후 tert-부틸옥시카보닐기를 탈착시킴으로서 합성할 수 있다. 프로피오닐, 부티릴, 이소부티릴, α-페닐아세틸, 4-메틸부티릴, 시클로프로판카보닐, 시클로부탄카보닐 및 시클로헥산카보닐 클로라이드와 같은 다

수의 아실 클로라이드로 6번 화합물과 아실화시키면 아민 유도체(화학식 7a-7h)를 합성할 수 있다.

<45> 이들 아실화된 화합물(화학식 7a-7h)를 포스포러스 옥시클로라이드로 처리하면 고리화된 디하이드로이소퀴놀린을 얻을 수 있고 이들을 소디움 시아노보로하이드라이드로 환원시키면 7-벤질옥시테트라하이드로이소퀴놀린 유도체들을 합성할 수 있다. 팔라듐 촉매화된 디벤질화 반응에 의해 하이드로클로라이드염으로서 다수의 C1 알킬 치화된 테트라하이드로이소퀴놀린 유도체(화학식 8a-8h)가 얻어진다.

<46> 이들 화합물을 아세트산 무수물과 반응시키면 표적 화합물로서 화학식 9a-9h가 생성된다. 모든 C1 치환된 테트라하이드로이소퀴놀린 유도체(화학식 5a,5b, 9a-9h)는 라세믹 혼합물로서 분리된다.

반응식 3



<47>

<48> 반응식 3 내의 화학식 11a-11e의 화합물 합성조건: (a) 프로피온산 무수물, 부티릴 클로라이드, 시클로헥산카보닐 클로라이드, 이소부티릴 클로라이드, 혹은 3-메틸부티릴 클로라이드, TEA, CH_2Cl_2, 상온, 1 h; (b) K_2CO_3, MeOH, 환류, 2 h

<49> 반응식 3 내의 화학식 12d-12f의 화합물 합성조건: (c) i.아세트알데히드, 벤즈알데히드, 또는 페닐아세틸알데히드, $Ti(OiPr)_4$, EtOH, 상온, 1 h, ii. $NaCNBH_3$, THF, 상온, 20 h

<50> 반응식 3 내의 화학식 12a-12c의 화합물 합성조건: (d) LAH, THF, 환류, 3-5 h.

<51> *N2*-아실 유도체 (화학식 11a-11e) 및 그 카보닐기의 환원된 유도체들 (화학식 12a-12f) 을 합성하였다.

<52> 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 (화학식 10)을 공지된 방법에 따라 준비하였다 [Seo, J. W.; Srisook, E.; Son, H. J.; Hwang, O.; Cha, Y.-N.; Chi, D.Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3369]. 다수의 *N2*-카보닐알킬테트라하이드로이소퀴놀린(화학식 11a-11e)를 디클로로메탄 용매 하에서 아실 클로라이드(부티릴 클로라이드, 시클로헥산카보닐 클로라이드, 이소부티릴 클로라이드, 혹은 3-메틸부티릴 클로라이드) 혹은 그 무수물 (프로피온산 무수물)을 트리에틸아민과 함께 처리하여 상온에서 반응한 후에 혼합물을 추출하고 용매을 메탄올로 바꾸고 포타슘카보네이트를 넣어 환류함으로써 합성하였다.

<53> *N2*-알킬 유도체(화학식 12a-12f)의 합성은 2가지 방법에 의해 합성하였다. *N2*-에틸, 프로필 및 시클로헥실 테트라하이드로이소퀴놀린(화학식 12a-12c)은 아미드(화학식 11a-11c)를 리튬알루미늄 하이드라이드로 환원시켜 제조하였으며, 기타 3차아민 유도체(화학식 12d-12f)는 아세트알데히드, 벤즈알데히드, 또는 페닐아세틸알데히드를 티타늄(IV)이소프로폭사이드로 이민을 형성한 후에 소디움 시아노보로하이드라이드를 첨가하여 합성할 수 있다.

<54> 상술한 본 발명의 화합물 HMTIQ는 활성 소교세포에서 다수의 염증성 사이토카인 및 염증유도 물질들을 하향 조절하는 효과를 가지며, 신경세포를 산화성, 염증성 손상으로부터 보호하는 효과를 가질 뿐만 아니라 다수의 신경퇴행성 질환의 예방 및/또는 치료에 효과를 가진다.

<55> 따라서 본 발명에 의한 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체(HMTIQ) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 신경퇴행성 질환 또는 염증성 질환을 예방 및 치료하는데 사용된다.

<56> 나아가 상기 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체(HMTIQ) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 약학적으로 허용 가능한 희석제 또는 담체를 포함하는 퇴행성 질환 또는 염증성을 예방 및 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제공할 수 있다.

효 과

<57> 본 발명에 의한 HMTIQ는 활성 소교세포에서 NO 및 초과산화물의 증가를 현저하게 억제하고, TNF-α, IL-1β, 유도형 일산화질소 신타아제 및 사이클로옥시게나제-2의 유전자발현을 억제하고, NF-kB의 핵으로의 이동을 억제하고, ROS의 생성을 감소시키고, GTP cyclohydrolase I 유전자 발현과 테트라하이드로바이옵테린 (BH4)의 과생산을 억제하고, 활성 소교세포가 도파민성 신경세포에 미치는 손상에 대하여 현저한 보호효과를 나타낸다.

<58> 결과적으로 본 발명의 신규 합성한 화합물은 염증성 질환 및 퇴행성신경질환 치료용 약제로서 효과를 갖는다.

<59> [종래기술의 문헌 정보]

<60> 1. Stuehr, D. J.; Kwon, N. S.; Nathan, C. F.; Griffith, O. W.; Feldman, P. L.; Wiseman, J. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 6259.

<61> 2. Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. *Nature* **1980**, *288*, 373.

<62> 3. (a) Moncada, S.; Higgs, A. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 2002. (b) Nathan, C.; Xie, Q. W. *Cell* **1994**, *78*, 915. (c) Bredt, D. S.; Snyder, S. H. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 175.

<63> 4. F, U.; Pollock, J. S.; Schmidt, H. H. H. W.; Heller, M.; Murad, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 1788.

<64> 5. Schmidt, H. H. H. W.; Murad, F. *Biochem. Biophys. Res.Commun.* **1991**, *181*, 1372.

<65> 6. Kr, K. D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V. *Biol. Chem.* **1995**, *376*, 327.

<66> 7. Marletta, M. A. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12231.

<67> 8. Choi, D. W.; Rothman, S. M. *Annu. Rev. Neurosci.* **1990**, *13*, 171.

<68> 9. Dorheim, M. A.; Tracey, W. R.; Pollock, J. S.; Grammas, P. *Biochem.* Biophys. Res. Commun. **1994**, *205*, 659.

<69> 10. Good, P. F.; Hsu, A.; Werner, P.; Perl, D. P.; Olanow, C. W. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1998**, *57*, 338.

<70> 11. (a) Li, H.; Wallerath, T.; M, T.; F, U. *Nitric Oxide* **2002**, *7*, 149. (b) Kobayashi, N.; Mori, Y.; Mita, S.-i.; Nakano, S.; Kobayashi, T.; Tsubokou, Y.; Matsuoka, H. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *422*, 149.

<71> 12. Wright, C. E.;Rees, D. D.; Moncada, S. *Cardiovasc. Res.* **1992**, *26*, 48.

<72> 13. Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. *Biochem. J.* **2001**, *357*, 593.

<73> 14. (a) Reif, A.; Fr, L. G.; Kotsonis, P.; Frey, A.; B, H. M.; Wink, D.A.; Pfleiderer, W.; Schmidt, H. H. H. W. *J. 1. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24921. (b) Channon, K. M. *Trends Cardiovasc. Med.* **2004**, *14*, 323.

<74> 15. (a) Cho, S; Volpe, B. T.; Bae, Y; Hwang, O.; Choi, H. J.; Gal, J.; Park, L. C. H.; Chu, C. K.; Du, J.; Joh, T. H. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 878. (b) Cho, S.; Kim, Y.; Cruz, M. O.; Park, E.-M.; Chu, C. K.; Song, G. Y.; Joh, T. H. *Glia* **2001**, *33*, 324.

<75> 16. Seo, J. W.; Srisook, E.; Son, H. J.; Hwang, O.; Cha, Y.-N.; Chi, D.Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3369.

<76> 17. Pictet, A.; Spengler, T. *Chem. Ber.* **1911**, *44*, 2030.

<77> 18. Hantzsch, A. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1882**, *215*, 1.

<78> 19. Bischler, A.; Napieralski, B. *Ber*, **1893**, *26*, 1903.

<79> 20. Green, L. C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131.

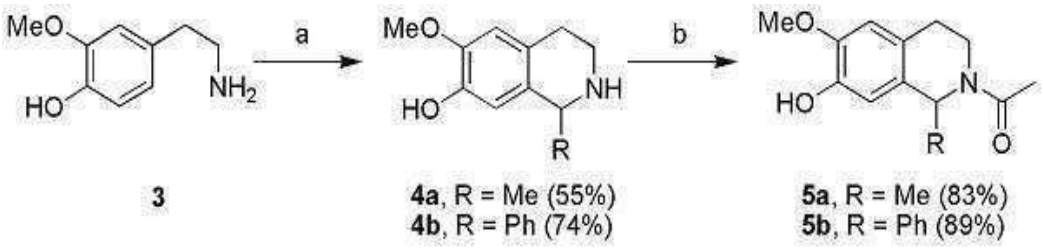
<80> 21. Choi, H. J.; Jang, Y. J.; Kim, H. J.; Hwang, O. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 633.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<81> 이하, 실시예를 참조하여 본 발명에 대하여 보다 상세히 살펴보도록 한다. 중간물질의 합성방법에 대한 언급과 위의 언급한 약효를 보이는 합성의 마지막 단계 물질(5a, 5b, 9a-9h, 11a-11e, 12a-12f)들의 구조분석을 보이고자 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하고자 하는 것으로 본 발명을 이에 한정하려는 의미는 아니다.

<82> 실시예 1: **C1위치에 메틸 또는 페닐이 치환된 2-아세틸-7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 유도체(AHMTIQ)의 합성 및 구조분석**

<83> [반응식 1]



<84>

<85> ⅰ) 2-아세틸-7-히드록시-6-메톡시-1-메틸-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린(**5a**)의 제법 및 분석

<86> 3-O-메틸 도파민 하이드로클로라이드(1.96 mmol, 400 mg)가 녹아 있는 1M HCl 용액(10 mL)에 아세트 알데하이드(15.7 mmol, 692 mg)를 넣은 압력튜브 안에서 24시간동안 100℃에서 반응하였다. 반응용기를 식힌 후에 소듐바이카보네이트로 중성화하였고 물과 남아있는 용매들을 감암하에 제거하고 진공으로 건조하였다. 메탄올을 부은 후 남아있는 침전물을 필터한 후 짧은 관크로마토그래피로 **4a**를 분리하였다. 분리된 **4a**를 하이드로 클로라이드 염의 형태로 결정화하여 흰 파우더의 **4a**를 55%의 수율로(250 mg) 얻을 수 있었다.

<87> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) d 9.93 (br s, 1H), 9.40 (br s, 1H), 9.06 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 4.32-4.30 (m, 1H), 3.47 (s, 3H), 3.28-3.36 (m, 1H), 3.21-3.22 (m, 1H), 2.29-2.00 (m, 1H) 1.52 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)

<88> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) d 147.1, 145.4, 126.0, 122.1, 112.7, 111.9, 55.6, 49.7, 38.6, 24.6, 19.1 MS (CI) 194 (M^{+}+1, 100), 178, 164

<89> 위의 중간체 **4a** (0.435 mmol, 100 mg)를 다이클로로메테인(5 mL)용매에 넣은 후 아세트산무수물(0.435 mmol, 45 mg)과 트리에틸아민(1.0 mmol)을 상온에서 첨가하였다. 1 시간동안 교반시킨 후에 잔휴하는 용매를 감압하에 제거하였다. 포화된 소듐바이카보네이트 용액을 부은 후 다이클로로메테인 용매로 추출하였고 재결정을 통하여 흰색의 **5a**(91 mg, 83%)를 얻을 수 있었다.

<90> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 6.96 (s, one conformer of C5-H), 6.66 (s, one conformer of C5-H), 6.59 (s, one conformer of C8-H), 6.57 (s, one conformer of C8-H), 5.83 (s, one conformer of O-H), 5.78 (s, one conformer of O-H), 5.53 (q, *J* = 6.6 Hz, one conformer of C1-H), 4.83 (q, *J*= 6.6 Hz, one conformer of C1-H), 4.70-4.65 (m, one conformer of C3-H), 3.82-3.76 (m, one conformer of C3-H), 3.52-3.44 (m, one

conformer of C3-H), 3.02-2.95 (m, one conformer of C3-H), 2.90-2.79 (m, 1H), 2.75-2.70 (m, one conformer of C4-H), 2.69-2.60 (m, one conformer of C4-H), 2.18 (s, one conformer of C1-CH_3), 2.15 (s, one conformer of C1-CH_3), 1.49 (d, *J*= 6.4 Hz, one conformer of COC-H_3), 1.40 (d, *J*= 6.8 Hz, one conformer of COC-H_3);

<91> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 168.8, 168.7, 145.5, 145.3, 144.3, 144.1, 131.3, 130.0, 125.6, 124.4, 112.8, 112.3, 110.8, 110.4, 55.9, 52.3, 47.9, 40.4, 34.8, 29.0, 28.2, 22.5, 21.9, 21.5, 21.4 MS (EI): 471, 264, 236 (M^++ 100), 220.

<92> ii) 2-아세틸-7-히드록시-6-메톡시-1-페닐-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린(**5b**)의 제법 및 분석

<93> 무수메탄올(15 mL)에 **3**번 화합물(1.0 mmol, 204 mg)과 마그네슘설페이트(2.49 mmol, 300 mg)와 벤즈알데하이드(1.0 mmol, 106 mg), 그리고 트리에틸아민(2.0 mmol, 202 mg)을 넣은 후에 3 시간동안 환류하였다. 반응용기가 식은 후에 셀라이트로 필터를 수행하였다. 용매를 감암하에 제거한 후 에틸아세테이트를 넣고 침전된 하얀색 고체를 필터하였다. 걸러진 용액은 다시 필터한 후 감압하고 진공건조하였다. 이 혼합물에 트리플루오로아세트산을 넣은 후 1시간 반동안 환류한 후 감압하여 용매를 제거하였다. 소듐바이카보네이트로 중화한 후 다이클로로메테인으로 추출하였다.

<94> 소듐설페이트로 유기층을 건조한 후 제거하고 용매는 갑압제거하였다. 관컬럼크로마토그래피로(5%메탄올, 95%다이클로로메테인) 중간체인 **4b**(188 mg, 74%)를 얻었다.

<95> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) d 8.57 (br s, 1H),7.22-7.32 (m, 5H), 6.63 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.01-3.10 (m, 1H), 2.76-2.89 (m, 2H), 2.55-2.65 (m, 1H);

<96> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) d 146.0, 145.6, 144.1, 130.7, 128.9, 128.0, 126.8, 125.7, 114.4, 112.2, 60.8, 55.5, 42.0, 28.8 MS (CI): 284, 256 (M^++1, 100), 178.

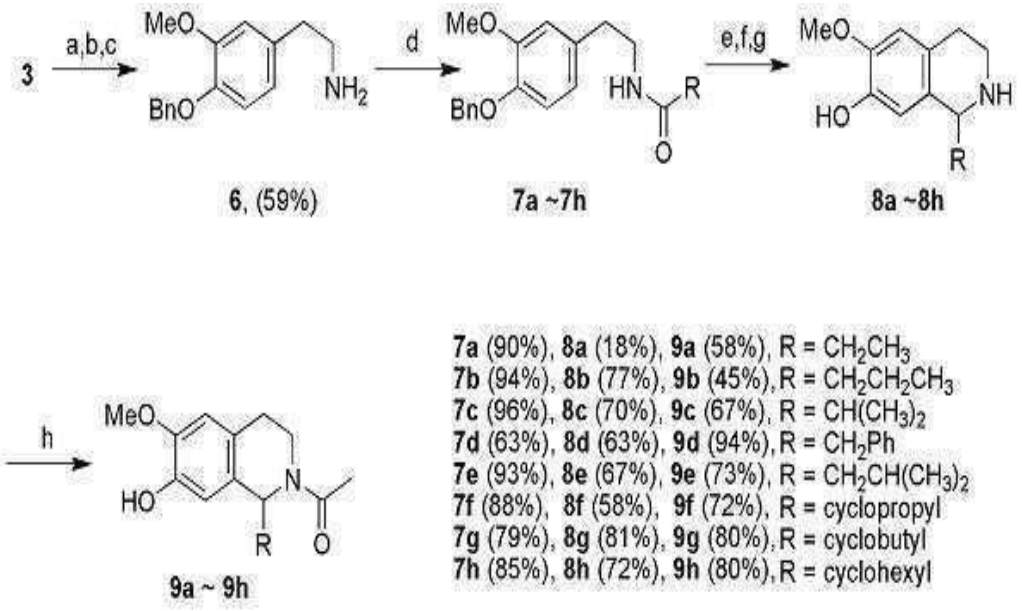
<97> 중간체 **4b**(0.223 mmol, 57 mg)를 클로로포름(5 mL)에 넣은 후 아세트산 무수물(0.223 mmol, 23 mg)을 상온에서 더하였다. 1시간 동안 교반시킨 후 감압하에 용매를 제거하고 포화된 소듐바이카보네이트를 첨가하였다. 다이클로로메테인으로 추출한 후에 용매를 제거하고 재결정하여 하얀색 고체의 **5b**(59 mg, 89%)를 얻었다.

<98> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 7.32-7.18 (m, 5H), 6.86-6.58 (m, several conformer peak of C5-H and C8-H, H3), 5.84-5.30 (m, several conformer peak of O-H, 1H), 4.33-4.27 (m, one conformer of C1-H), 3.89 (s, 3H) 3.72-3.66 (m, one conformer of C1-H), 3.46-3.38 (m, one conformer of C3-H), 3.27-3.21 (m, one conformer of C3-H), 2.96-2.82 (m, one conformer of C4-H) 2.76-2.60 (m, one conformer of C4-H) 2.74 (s, one conformer of COC-H_3), 2.15 (s, one conformer of COC-H_3);

<99> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 169.7, 168.9, 145.8, 144.2, 143.9, 142.4, 141.4, 128.6, 129.5, 128.1, 127.8, 127.7, 127.5, 127.2, 126.8, 125.7, 114.5, 113.8, 110.8, 110.4, 60.2, 55.9, 54.4, 40.4, 37.6, 28.6, 27.4, 22.1, 21.7 MS (EI): 297 (M^+),254, 239, 220, 178 (100), 163.

<100> 실시예 2: **C1위치에 여러 알킬들이 치환된 2-아세틸-7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린(AHMTIQ) 유도체들(6, 7a-h, 8a-h, 9a-h)의 합성방법 및 화합물분석**

<101> [반응식 2]



<102>

<103> ① N-(2-(4-히드록시-3-O-메틸페닐)에틸)-터셔리부틸카보네이트(6) 합성방법 및 화합물분석

<104> 방법 a) 3번 화합물(6.35 mmol, 1.30 g)을 클로로포름(20 mL)에 넣은 후 터셔리부틸옥시카보닐 무수물(7.63 mmol, 1.67 g)과 트리에틸아민(19.5 mmol, 1.93 g)을 더하였다. 24시간동안 상온에서 교반시킨 후에 암모늄클로라이드 용액을 더하였다. 다이클로로메테인 용매로 추출한 후에 유기층을 물로 2번 더 씻어주었다. 관크로마토그리피로 분리한 후 재결정하여 하얀색 결정(1.32 g, 59%)을 얻었다.

<105> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.63-6.67 (m, 2H), 5.83 (s, 1H), 6.45 (br s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.35 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.70 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H);

<106> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d155.9, 146.5, 144.1, 130.6, 121.2, 114.4, 111.2, 79.1, 55.7, 41.9, 35.7, 28.3

MS (CI) 318, 267 (M^+ +1), 212, 168, 151 (100), 138.

<107> 얻어진 하얀색 결정을 아세톤에 녹인 후 포타슘카보네이트와 벤질 브로마이드를 넣고 12시간동안 환류하였다. 용매를 감압제거한 후 물을 넣고 에틸아세테이트로 추출하였다. 유기층은 소듐설페이트로 건조한 후 제거하고 용매를 제거한 후 관 크로마토그래피로 하얀색 고체 (1.57 g, 95%)를 얻었다.

<108> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 7.27-7.46 (m, 5H), 6.82 (d, J = 8.0Hz, 1H), 6.73 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.65 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.55 (br s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.44 (q, J= 6.6 Hz, 2H), 2.72 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H);

<109> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d 155.9, 149.9, 147.0, 137.4, 132.4, 128.5, 127.7, 127.3, 120.8, 114.8, 112.9, 79.2, 71.4, 56.1, 42.0, 35.9, 28.4 LC/MS (ESP): 615, 559, 379, 358 (M^++1), 301 (100), 241, 224.

<110> 위에서 얻은 하얀색 고체(16.8 mmol, 6.0 g)를 다이클로로메테인 용매(20 mL)에 넣은 후 트리플루오로아세트산 (20 mL)을 0 ℃에서 천천히 더하였다. 40분 동안 교반 후에 반응용액을 천천히 얼음이 들어있는 소듐바이카보네이트 용액에 넣었다. 다이에틸이써 용매로 추출한 후 용매를 제거하고 다시 클로로포름에 녹여서 포화된 소듐바이카보네이트 용액으로 중화하고 용매를 제거하였다. 1mole염산 다이에틸이써 용매(20 mL)를 써서 하이드로클로라이드 염으로 하얀색의 6번 중간체(1.32 g, 64%)를 얻을 수 있었다.

<111> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 8.24 (br s, 2H), 7.28-7.45 (m, 5H), 6.96 (d, J = 8.0Hz, 1H), 6.90 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.73 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.96-3.03 (m, 2H), 2.80-2.88 (m,

2H);

<112> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d 149.3, 146.6, 137.2, 130.3, 128.2, 127.6, 127.5, 120.5, 114.1, 113.0, 70.1, 55.6, 32.4 MS (CI): 258 (M^+), 241 (100), 228, 91.

<113> ② *N*-[2-(4-벤질옥시-3-메톡시페닐)에틸]알킬아마이드 (7a-h)의 일반적 합성방법 및 화합물 분석

<114> **6**번 화합물을 다이클로로메테인 용매에 녹인 후 알킬클로라이드 (프로피오닐, 부티릴, 아이소부티릴, 알파-페틸아세틸l, 4-메틸부티릴, 싸이클로프로페인카보닐, 싸이클로부테인카보닐, 싸이클로헥세인카보닐 클로라이드)를 넣고 트리에틸아민을 천천히 0 ℃에서 더한 후에 30분에서 1시간까지 교반하였다. 용매를 감압제거 후에 물을 넣은 후 에틸아세테이트로 유기물들을 추출하였다. 유기층을 물로 씻은 후 소듐설페이트로 유기층 수분을 제거한 후 필터하였다. 필터된 용액의 용매는 감압하에 제거하고 재결정 또는 관컬럼크로마토그래피에 의해 **7a-h** 를 얻을 수 있었다.

<115> **ⅰ) *N*-[2-(4-벤질옥시-3-메톡시페닐)에틸]프로피온아마이드 (7a)**

<116> **6**번 화합물 (3.50 mmol, 900 mg), 프로피오닐 클로라이드 (4.55 mmol, 421 mg), 트리에틸아민 (10.5 mmol, 1.06 g), 수득율- **7a** (984 mg, 90%):

<117> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 7.26-7.46 (m, 5H), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.73 (d, *J*= 2.2 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J*= 8.2, 1.9 Hz, 1H), 5.65 (br s, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.46 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.73 (t, *J*= 7.0 Hz, 2H), 2.14 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.11 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H)

<118> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz)173.7, 149.6, 146.7, 137.1, 132.1, 128.4, 127.7, 127.2, 120.5, 114.2, 112.4, 71.0, 55.8, 40.5, 35.2, 29.6, 9.8 MS (EI): 313 (M^+), 240, 149, 137, 91 (100), 65, 57, 30.

<119> **ⅱ) *N*-[2-(4-벤질옥시-3-메톡시페닐)에틸]부틸아마이드 (7b)**

<120> **6**번 화합물(3.50 mmol, 900 mg), 부티릴클로라이드(4.20 mmol, 448 mg), 트리에틸아민(10.5 mmol,. 1.06 g), 수득율- **7b** (1.08 g, 94%):

<121> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 7.46-7.26 (m, 5H), 6.81 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 8.0, 1.8, 1H), 5.56 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.47 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.09 (t, *J*= 7.6 Hz, 2H), 1.61 (sext, *J* = 7.4 Hz, 2H), 0.91 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)

<122> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d 172.9, 149.7, 146.7, 137.2, 132.0, 128.4, 127.7, 127.2, 120.5, 114.2, 112.4, 71.1, 55.9, 40.5, 38.6.35.3, 19.1, 13.7 MS (EI): 327 (M^+), 240, 149, 137, 91 (100), 43.

<123> **ⅲ) *N*-[2-(4-벤질옥시-3-메톡시페닐)에틸]아이소부틸아마이드 (7c)**

<124> **6**번 화합물(3.50 mmol, 900 mg), 아이소부티릴 클로라이드(4.20 mmol, 448 mg), 트리에틸아민(10.5 mmol, 1.06 g), 수득율- **7c** (1.10 g, 96%):

<125> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 7.46-7.26 (m, 5H), 6.82 (d, *J* = 8.2Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 8.0, 1.4, 1H), 5.56 (br s, 1H), 5.13 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.47 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.28 (quin, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.11 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H)

<126> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) : d 176.8, 149.7, 146.7, 137.1, 132.1, 128.4, 127.7, 127.2, 120.6, 114.2, 112.4, 71.1, 55.9, 40.4, 35.5, 35.2, 19.5 MS (EI): 327 (M^+), 240, 149, 137, 91(100), 43.

<127> **ⅳ) *N*-[2-(벤질옥시-3-메톡시페닐)에틸]-2-페닐아세트아마이드 (7d)**

<128> **6**번 화합물(3.42 mmol, 1.0 g), 트리에틸아민(10.3 mmol, 1.04 g), 페닐아세틸 클로라이드(3.76 mmol, 518

mg), 수득율- **7d** (802 mg, 63%):

<129> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 7.71-7.47 (m, 10H), 6.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* =1.8Hz, 1H), 6.44 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 5.39 (br s, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.51 (s, 2H), 3.42 (q, *J* =6.4 Hz, 2H), 2.65 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H)

<130> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d170.8, 149.6, 146.7, 137.2, 134.7, 131.7, 129.4, 128.9, 128.5, 127.8, 127.2, 127.1, 120.5, 114.1, 112.2, 71.0, 55.9, 43.8, 40.6, 35.0 MS (EI): 375 (M^+), 240, 149, 137, 91(100), 65.

<131> **v) *N*-[2-(4-벤질옥시-3-메톡시페닐)에틸]-3-메틸부틸아마이드 (7e)**

<132> 6번 화합물(3.50 mmol, 900 mg), 아이소바레릴 클로라이드(4.20 mmol, 506 mg), 트리에틸아민(10.5 mmol, 1.06 g), 수득율- **7e** (1.11 g, 93%):

<133> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 7.46-7.25 (m, 5H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 8.2, 2.0, 1H), 5.51(br s, 1H), 5.13 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.49 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.15-1.95 (m, 3H), 0.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H);

<134> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d 172.4, 149.7, 146.7, 137.1, 132.0, 128.5, 127.7, 127.2, 120.5, 114.2, 112.4, 71.1, 55.9, 46.1, 40.4, 35.3, 22.4 MS (EI): 341 (M^+), 240, 149, 137, 91 (100), 65, 57, 30.

<135> **vi) *N*-[2-(4-벤질옥시-3-메톡시페닐)에틸]-2-싸이클로프로필아세트아마이드 (7f)**

<136> 6번 화합물 (3.89 mmol, 1.0 g), 싸이클로프로패노카보닐 클로라이드cyclopropanocarbonyl chlorid (5.45 mmol, 589 mg) 트리에틸아 (11.7 mmol, 1.18 g), 수득율- **7h** (1.12 g, 88%):

<137> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 7.45-7.26 (m, 5H), 6.82 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 5.77 (br s, 1H), 5.13 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.48(q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.85-1.19 (m, 1H), 0.95 (quin, *J* = 3.8 Hz, 2H), 0.74-0.64 (m, 2H)

<138> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d 173.4, 149.6, 146.7, 137.2, 132.1, 128.4, 127.7, 127.2, 120.5, 114.2, 112.4, 71.1, 55.9, 40.8, 35.3, 14.6, 7.0 MS (EI): 325 (M^+), 240, 149, 137, 91 (100), 69, 41.

<139> **vii) *N*-[2-(4-벤질옥시-3-메톡시페닐)에틸]-2-싸이클로부틸아세트아마이드 (7g)**

<140> 6번 화합물(3.50 mmol, 900 mg), 싸이클로부테노카보닐 클로라이드(4.55 mmol, 539 mg), 트리에틸아민(10.5 mmol,. 1.06 g), 수득율- **7g** (737 mg, 79%):

<141> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 7.46-7.25 (m, 5H), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 5.49 (br s, 1H), 5.13 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.47 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.92 (quin, *J* = 8.5 Hz, 1H), 2.73 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.37-1.98 (m, 4H), 1.94-1.78 (m, 2H);

<142> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d 174.9, 149.7, 146.7, 137.2, 132.1, 128.4, 127.7, 127.2, 120.6, 114.2, 112.4, 71.1, 55.9, 40.4, 39.9, 35.2, 25.3, 18.1 MS (EI): 339 (M^+), 240, 149, 137, 91 (100), 55.

<143> **viii) *N*-[2-(4-벤질옥시-3-메톡시페닐)에틸]-2-싸이클로헥실아세트아마이드 (7h)**

<144> 6번 화합물(3.50 mmol, 900 mg), 싸이클로헥센카보닐 클로라이드(4.55 mmol, 667 mg), 트리에틸아민(10.5 mmol,. 1.06 g), 수득율- **7h** (1.09 g, 85%):

<145> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 7.41-7.23 (m, 5H), 6.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.61

(dd, J = 8.0, 2.0 Hz 1H), 5.48 (br s, 1H), 5.09(s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.43 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.70 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.00-1.93 (m, 1H), 1.78-1.71 (m, 4H), 1.63-1.59 (m, 1H), 1.40-1.30 (m, 2H), 1.25-1.12 (m, 3H);

<146> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 176.0, 149.7, 146.7, 137.2, 132.1, 128.4, 127.7, 127.2, 120.6, 114.3, 112.5, 71.1, 55.9, 45.4, 40.3, 35.2, 29.6, 25.6 MS (EI): 367 (M^+), 240, 149, 137, 91 (100), 83, 55.

<147> ③ 1-알킬-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀(8a-h)의 제법 및 화합물 분석

<148> **7a-h**가 담겨있는 무수 아세토나이트릴에 포스포러스옥시 클로라이드($POCl_3$)를 넣은 후 2시간에서 5시간 가량 환류한 후 용매를 감압 제거하고 진공건조하였다. 건조된 화합물을 메탄올에 녹인 후에 소듐보로하이드라이드($NaBH_4$)를 0℃에서 천천히 더하였다. 상온에서 24시간 교반한 후 실리카겔로 필터하고 소듐설페이트로 건조하였다. 포화된 소듐바이카보네이트를 부은 후 다이클로로메테인 용매로 유기물을 추출하고난 후 소듐설페이트로 용매를 건조 후 감압제거하였다. 진공건조한 유기물들은 메탄올에 녹이고 염산용액과 10% 팔라듐 탄소를 넣은 후 수소기체와 연결하여 12시간동안 상온에서 교반하였다. 반응 후의 용액은 셀라이트로 필터를 하고 용매를 감압제거한 후 관크로마토그래피나 재결정으로 하이드로 클로라이스염의 화합물들(**8a-h**)을 얻었다.

<149> **ⅰ) 1-에틸-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린(8a)**

<150> **7a** (3.0 mmol, 940 mg), $POCl_3$ (9.0 mmol, 1.38 g), $NaBH_4$ (15 mmol, 587 mg), 10% palladium charcoal (100 mg); 수득율- **8a** (128 mg, 18%):

<151> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) d 9.69 (br s, 1H), 9.07 (br s, 1H), 9.02 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 4.23 (br s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.16 (br s, 1H), 3.01-2.93 (m, 1H), 2.86-2.80 (m, 1H), 1.97-1.87 (m, 2H), 1.01 (t, J = 3.7 Hz, 3H);

<152> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) d 147.1, 145.2, 124.5, 122.5, 113.0, 112.0, 55.6, 55.0, 54.6, 26.2, 24.5, 9.8 LC MS: 208.2 (M^++1, 100).

<153> **ⅱ) 7-히드록시-6-메톡시-1-프로필-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린(8b)**

<154> **7b** (2.99 mmol, 980 mg), $POCl_3$ (8.98 mmol, 1.38 g), $NaBH_4$ (23.9 mmol, 905 mg), 10% palladium charcoal (100 mg); 수득율- **8b** (590 mg, 77%):

<155> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) d 9.80-9.20 (br s, 1H), 9.04 (br s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 4.26 (t, J = 3.2 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.36-3.30 (m, 1H), 3.00-2.93 (m, 1H), 2.85-2.78 (m, 1H), 1.88-1.81 (m, 2H), 1.52-1.42 (m. 2H), 0.92 (t, J = 7.2 Hz, 3H);

<156> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) d 147.1, 145.2, 124.9, 122.5, 123.0, 112.0, 55.6, 53.5, 35.6, 24.5, 18.2, 13.7 LC MS: 479.2, 222.2 (M^++1, 100).

<157> **ⅲ) 7-히드록시-1-이소프로필-6-메톡시-1,2,3,4-t테트라히드로이소퀴놀린(8c)**

<158> **7c** (2.99 mmol, 980 mg), $POCl_3$ (8.98 mmol, 1.38g), $NaBH_4$ (23.9 mmol, 905 mg), 10% palladium charcoal (100 mg); 수득율- **8c** (536 mg, 70%):

<159> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) d 9.81 (br s, 1H), 9.04 (br s, 1H), 8.66 (br s, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.26 (br t, J = 3.4, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.37 (br s, 1H), 3.10-3.08 (m, 2H), 2.78-2.73 (m, 1H), 2.37-2.29 (m, 1H), 1.08 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 7.2 Hz, 3H);

<160> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) d 146.9, 145.3, 123.7, 123.4, 113.0, 111.9, 58.9, 55.5, 43.3, 30.8, 24.6, 19.2, 16.2 LC MS: 479.2, 222.2 (M^++1, 100).

<161> iv) 1-벤질-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린(8d)

<162> **7d** (0.51 mmol, 135 mg); 수득율- **8d** (101 mg, 74%):

<163> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 7.22-7.36 (m, 5H), 6.62 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 4.04-4.10 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.13-3.22 (m, 2H), 2.70-2.90 (m, 3H), 2.62-2.70 (m, 1H)

<164> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d145.1, 143.6, 139.1, 131.2, 129.3, 128.6, 126.6, 126.4, 112.0, 111.1, 56.8, 55.9, 42.4, 40.9, 29.5 MS (CI): 270 (M^++1), 178 (100).

<165> v) 7-히드록시-1-이소부틸-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린(8e)

<166> **7e** (3.13 mmol, 1.07 mg), $POCl_3$ (9.40 mmol, 1.44 g), $NaBH_4$ (25.0 mmol, 947 mg), 10% palladium charcoal (100 mg); 수득율- **8d** (567 mg, 67%):

<167> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) d 9.75 (br s, 1H), 9.36 (br s, 1H), 9.06 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 4.27 (br d, J = 3.6 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.37-3.11 (m, 1H), 3.20-3.08 (m, 1H), 3.02-2.90 (m, 1H), 2.90-2.78 (m, 1H), 2.00-1.89 (m, 1H), 1.88-1.77 (m, 1H), 1.65-1.55 (m, 1H), 0.98 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 6.8 Hz, 3H);

<168> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) d 147.0, 145.2, 125.4, 122.5, 113.0, 112.0, 55.6, 51.8, 43.3, 38.7, 24.4, 23.8, 23.0. 21.6 LC MS: 236.2 (M^++1, 100).

<169> vi) 1-싸이클로프로필-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린(8f)

<170> **7f** (3.07 mmol, 1.0 g), $POCl_3$ (9.22 mmol, 1.4 g), $NaBH_4$ (24.6 mmol, 929 mg), 10% palladium charcoal (100 mg); 수득율- **8f** (458 mg, 58%):

<171> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) d 9.64 (br s, 2H), 9.09 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.55 (d, J= 9.6 Hz, 1H), 3.41-3.36 (m, 1H), 3.14-2.97 (m, 2H), 2.86-2.77 (m, 1H), 1.18-1.09 (m, 1H), 0.88-0.81 (m, 1H), 0.81-0.72 (m, 1H), 0.72-0.64 (m, 1H), 0.60-0.52 (m, 1H);

<172> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) d 147.3, 145.2, 125.1, 122.4, 113.1, 111.9, 58.9, 55.6, 39.8, 24.5, 14.6, 5.8, 2.8 LC MS: 220.2 (M^++1, 100). 203.2.

<173> vii) 1-싸이클로부틸-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린(8g)

<174> **7g** (2.95 mmol, 1.0 g), $POCl_3$ (8.8 mmol, 1.36 g), $NaBH_4$ (23.6 mmol, 893 mg), 10% palladium charcoal (100 mg); 수득율- **8g** (645 mg, 81%):

<175> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) d 9.90-9.00 (br s, 2H), 9.07 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.20 (d, J = 9.2, one conformer of C1-H), 4.14 (br d, J = 4.8, one conformer of C1-H), 3.73 (s, 3H), 3.31-3.25 (m, 1H), 3.16 (d, J= 4.0 Hz, 1H), 3.13-3.07 (m, 1H), 2.98-2.91 (m, 1H), 2.85-2.76 (m, 1H), 2.78-2.67 (m, 1H), 2.17-2.02 (m, 3H), 2.02-1.92 (m, 1H), 1.89-1.70 (m, 2H);

<176> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) d 147.1, 145.1, 124.1, 122.4, 112.9, 112.1, 57.5, 55.5, 48.6, 38.3, 26.8, 25.2, 24.5, 17.6 LC MS: 234.2 (M^++1, 100).

<177> viii) 1-싸이클로헥실-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린(8h)

<178> **7h** (2.53 mmol, 930 mg), $POCl_3$ (7.59 mmol, 1.16 g), $NaBH_4$ (20.2 mmol, 757 mg), 10% palladium charcoal (100 mg); 수득율- **8h** (541 mg, 72%):

<179> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) d 9.85 (br s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.67 (br s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 4.22 (br s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.53 (br s, 1H), 3.04 (br s, 1H), 2.98-2.90 (m, 1H), 2.80-2.74 (m, 1H), 1.91 (br s, 1H), 1.80-1.58 (m, 4H), 1.50-1.00 (m, 6H);

<180> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) d 147.0, 145.1, 123.4, 123.3, 113.3, 112.0, 58.4, 55.5, 40.7, 29.3, 26.2, 25.9, 25.7, 25.6, 24.5 LC MS: 262.2 (M^{+}+1, 100).

<181> ④ 2-아세틸-1-알킬-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (9a-h)의 합성방법 및 화합물 분석

<182> 8a-h을 넣은 반응용기에 다이클로로메테인 용매를 넣은 후 아스트산 무수물을 더하고 트리에틸아민을 상온에서 더하였다. 2시간 가량 교반후에 용매를 감압 제거하고 관크로마토그래피로 **9a-h**를 얻었다. 이후 재결정을 통하여 순수한 **9a-h**를 얻었다.

<183> **ⅰ) 2-아세틸-1-에틸-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린(9a)**

<184> **8a** (85 mg, 0.36 mmol), 아세트산 무수물(36 mg, 0.35 mmol), 트리에틸아민(177 mg, 1.75 mmol); 수득율- **9a** (51 mg 58%):

<185> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d d 6.70 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.65 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.58 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.56 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 5.46-5.40 (dd, J = 8.8, 6.0 Hz, one conformer of C1-H), 4.66-4.59 (m, one conformer of C3-H), 4.59-4.53 (t, J = 7.2 Hz, one conformer of C1-H), 3.859 (s, one conformer of OCH_3), 3.850 (s, one conformer of OCH_3), 3.78-3.73 (m, one conformer of C3-H), 3.55-3.42 (m, one conformer of C3-H), 3.06- 2.97 (m, one conformer of C3-H), 2.94-2.79 (m, one conformer of C4-H, 1H), 2.79-2.70 (m, one conformer of C4-H), 2.65-2.57 (m, one conformer of C4-H), 2.17 (s, one conformer of -$NCOCH_3$), 2.16 (s, one conformer of -$NCOCH_3$), 1.88-1.70 (m, 2H), 0.96 (td, J = 7.2, 29.2 Hz, 3H). Anal. ($C_{14}H_{19}NO_3$) calculated C, 67.45; H, 7.68; N, 5.62; found C, 67.32; H, 7.84; N, 5.67.

<186> **ⅱ) 2-아세틸-7-히드록시-6-메톡시-1-프로필-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (9b)**

<187> **8b** (200 mg, 0.78 mmol), 아세트산 무수물(79 mg, 0.78 mmol), 트리에틸아민(236 mg, 2.34 mmol); 수득율- **9b** (92 mg 45%):

<188> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 6.69 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.64 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.58 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.56 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 5.54-5.48 (m, one conformer of C1-H), 4.70-4.56 (m, one conformer of C1-H and C3-H), 3.854 (s, one conformer of OCH_3), 3.845 (s, one conformer of OCH_3), 3.79-3.71 (m, one conformer of C3-H), 3.57-3.47 (m, one conformer of C3-H), 3.10-3.00 (m, one conformer of C3-H), 2.95-2.58 (m, one conformer of C4-H, 2H), 2.164 (s, one conformer of -$NCOCH_3$), 2.157 (s, one conformer of -$NCOCH_3$), 1.88-1.60 (m, 2H), 1.50-1.24 (m, 2H), 1.12-0.84 (m, 3H).

<189> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 169.4, 145.5, 144.1, 143.8, 130.8, 129.9, 125.5, 124.4, 113.3, 112.5, 110.9, 110.4, 57.1, 55.9, 51.9, 40.7, 29.4, 38.7, 35.4, 28.7, 27.6, 21.8, 21.7, 19.9, 19.6, 14.0. Anal. ($C_{15}H_{21}NO_3$) calculated C, 68.42; H, 8.04; N, 5.32; found C, 68.48; H, 8.04; N, 5.30.

<190> **ⅲ) 2-아세틸-7-히드록시-6-메톡시-1-이소프로필-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (9c)**

<191> **8c** (200 mg, 0.78 mmol), 아세트산 무수물(79 mg, 0.78 mmol), 트리에틸아민(394 mg, 3.9 mmol); 수득율- **9c** (141 mg 67%):

<192> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 6.73 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.67 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.61 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.60 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 5.18 (d, J =

8.8 Hz, one conformer of C1-H), 4.54-4.44 (m, one conformer of C3-H), 4.16 (d, *J* = 8.2 Hz, one conformer of C1-H), 3.857 (s, one conformer of OCH_3), 3.850 (s, one conformer of OCH_3), 3.74-3.62 (m, one conformer of C3-H), 3.26-3.16 (m, one conformer of C3-H), 2.95-2.72 (m, one conformer of C4-H, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.08-1.90 (m, 1H), 1.14-0.92 (m, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 169.9, 169.8, 145.7, 145.5, 143.5, 143.1, 130.0, 128.9, 125.6, 124.9, 114.6, 113.8, 111.0, 110.4, 63.6, 57.7, 55.9, 42.0, 36.5, 33.7, 33.4, 28.0, 26.8, 22.0, 21.98, 20.5, 20.2, 20.0, 19.8. Anal. ($C_{15}H_{21}NO_3$) calculated C, 68.42; H, 8.04; N, 5.32; found C, 68.17; H, 8.28; N, 5.35.

<193> **iv) 2-아세틸-1-벤질-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (9d)**

<194> **8d** (69 mg, 0.26 mmol), 아세트산 무수물(29 mg, 0.28 mmol); 수득율- **9d** (75 mg, 94%):

<195> ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 7.40-6.95 (m, 5H), 6.72 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.58 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.50 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.48 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 4.62-4.40 (m, one conformer of C1-H), 3.85 (s, one conformer of OCH_3), 3.82 (s, one conformer of OCH_3), 3.15-2.95 (m, one conformer of C3-H and one conformer of C4-H), 2.90-2.80 (m, one conformer of benzyl-H), 2.55-2.52 (m, one conformer of benzyl-H), 2.55-2.45 (m, one conformer of benzyl-H), 2.06 (s, one conformer of $-NCOCH_3$), 1.40 (s, one conformer of $-NCOCH_3$). MS (CI): 312 (M^++1, 100), 220, 178.

<196> **v) 2-아세틸-7-히드록시-6-메톡시-1-아이소부틸-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (9e)**

<197> **8e** (199 mg, 0.73 mmol), 아세트산 무수물(75 mg, 0.73 mmol), 트리에틸아민(370 mg, 3.66 mmol); 수득율- **9e** (148 mg 73%):

<198> ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 6.66 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.61 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.58 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.54 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 5.64-5.56 (m, one conformer of C1-H), 4.70-4.64 (m, one conformer of C1-H), 4.58-4.39 (m, one conformer of C3-H), 3.86 (s, one conformer of OCH_3), 3.84 (s, one conformer of OCH_3), 3.80-3.71 (m, one conformer of C3-H), 3.58-3.47 (m, one conformer of C3-H), 3.18-3.07 (m, one conformer of C3-H), 2.94-2.81 (m, one conformer of C4-H, 1H), 2.76-2.69 (m, one conformer of C4-H, 1H), 2.17 (s, one conformer of $-NCOCH_3$), 2.157 (s, one conformer of $-NCOCH_3$), 1.83-1.38 (m, 3H), 1.10-0.88 (m, 6H).

<199> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 169.8, 169.5, 145.5, 145.2, 144.1, 143.8, 131.1, 129.9, 125.5, 124.4, 113.3, 112.5, 110.9, 110.5, 55.9, 55.6, 50.4, 46.5, 46.0, 40.3, 35.8, 28.6, 27.4, 25.0, 24.7, 23.4, 23.1, 22.7, 22.4, 21.6, 21.4. Anal. ($C_{16}H_{23}NO_3$) calculated C, 69.29; H, 8.36; N, 5.05; found C, 69.26; H, 8.60; N, 5.02.

<200> **vi)2-아세틸-1-싸이클로프로필-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (9f)**

<201> **8f** (196 mg, 0.77 mmol), 아세트산 무수물(78 mg, 0.77 mmol), 트리에틸아민(389 mg, 3.9 mmol); 수득율- **9f** (145 mg 72%):

<202> ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 6.83 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.74 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.59 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.56 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 4.95 (d, *J* = 8.8 Hz, one conformer of C1-H), 4.72-4.63 (m, one conformer of C3-H), 4.17 (d, *J* = 8.0 Hz, one conformer of C1-H), 3.858 (s, one conformer of OCH_3), 3.848 (s, one conformer of OCH_3), 3.85-3.78 (m, one conformer of C3-H), 3.72-3.63 (m, one conformer of C3-H), 3.30-3.18 (m, one conformer of C3-H), 2.96-2.60 (m, one conformer of C4-H, 2H), 2.17 (s, one conformer of $-NCOCH_3$), 2.12 (s, one conformer of $-NCOCH_3$), 1.30-1.10 (m, 1H), 0.77-0.48 (m, 3H), 0.44-0.34 (m, 6H).

<203> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 169.0, 145.5, 144.0, 143.7, 129.9, 128.5, 125.7, 124.5, 114.6, 113.3, 112.7, 110.8, 110.4, 60.4, 55.9, 55.5, 41.2, 36.1, 28.8, 27.7, 21.7, 21.5, 18.0, 17.8, 5.31, 5.25, 2.9, 2.5. Anal. ($C_{15}H_{19}NO_3$) calculated C, 68.94; H, 7.33; N, 5.36; found C, 68.94; H, 7.47; N, 5.35.

<204> **vii) 2-아세틸-1-싸이클로부틸-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (9g)**

<205> **8g** (237 mg, 0.88 mmol), 아세트산 무수물(89 mg, 0.88 mmol), 트리에틸아민(444 mg, 4.4 mmol); 수득율- **9g** (195 mg 80%):

<206> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 6.70 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.65 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.58 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.56 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 5.46 (d, *J* = 9.6 Hz, one conformer of C1-H), 4.68-4.60 (m, one conformer of C3-H), 4.50 (d, *J* = 9.2 Hz, one conformer of C1-H), 3.85 (s, one conformer of OCH_3), 3.84 (s, one conformer of OCH_3), 3.77-3.69 (m, one conformer of C3-H), 3.58-3.44 (m, one conformer of C3-H), 3.04-2.95 (m, one conformer of C3-H), 2.92-2.68 (m, one conformer of C4-H, 2H), 2.66-2.55 (m, 1H), 2.21 (s, one conformer of $-NCOCH_3$), 2.15 (s, one conformer of $-NCOCH_3$), 2.10-1.90 (m, 3H), 1.89-1.68 (m, 3H).

<207> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 169.4, 169.3, 145.6, 145.4, 143.8, 143.5, 129.5, 128.4, 125.2, 124.1, 113.0, 112.2, 111.1, 110.6, 61.5, 56.0, 55.9, 41.4, 41.1, 41.0, 35.7, 28.6, 27.8, 27.6, 27.4, 26.1, 25.5, 21.9, 21.7, 17.6. Anal. ($C_{16}H_{21}NO_3$) calculated C, 69.79; H, 7.69; N, 5.09; found C, 70.01; H, 7.81; N, 5.06.

<208> **viii) 2-아세틸-1-싸이클로헥실-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (9h)**

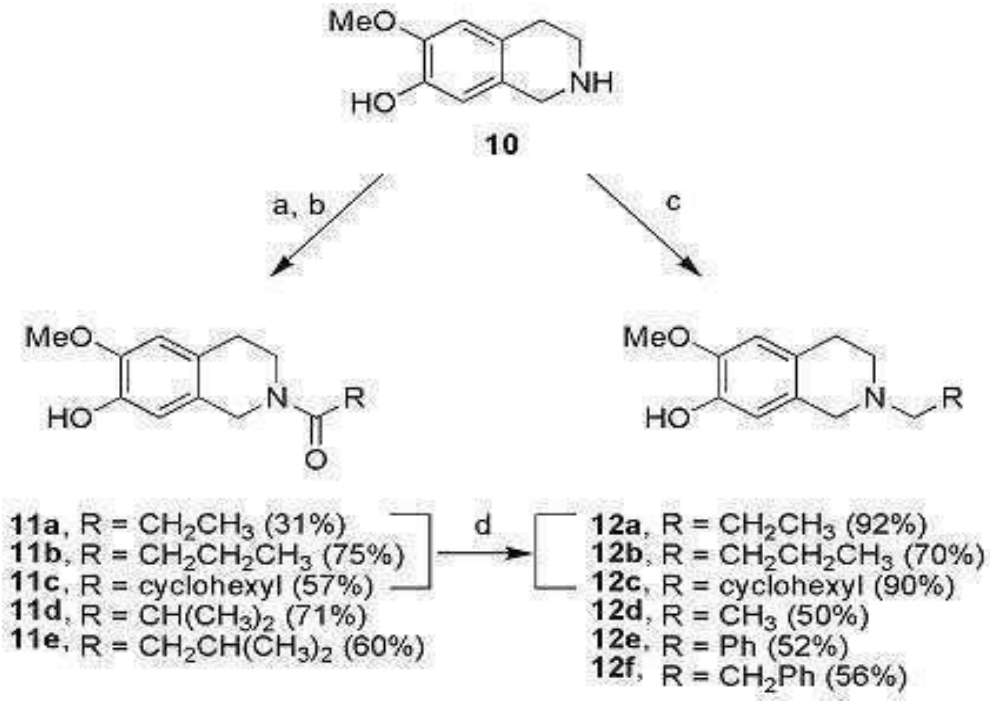
<209> **8h** (200 mg, 0.67 mmol), 아세트산 무수물(68 mg, 0.67 mmol), 트리에틸아민(339 mg, 3.36 mmol); 수득율- **9h** (162 mg 80%):

<210> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) d 6.72 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.63 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.61 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 6.60 (s, one conformer of C6-H or C8-H), 5.19 (d, *J* = 8.8 Hz, one conformer of C1-H), 4.52-4.43 (m, one conformer of C3-H), 4.29 (d, *J* = 9.6 Hz, one conformer of C1-H), 3.86 (s, one conformer of OCH_3), 3.85 (s, one conformer of OCH_3), 3.70-3.60 (m, one conformer of C3-H), 3.25-3.16 (m, one conformer of C3-H), 2.96-2.73 (m, one conformer of C4-H, 2H), 2.15 (s, one conformer of $-NCOCH_3$), 2.14 (s, one conformer of $-NCOCH_3$), 1.84-1.50 (m, 6H), 1.22-0.94 (m, 5H).

<211> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 169.98, 169.92, 145.7, 145.5, 143.4, 143.0, 129.5, 128.6, 125.6, 124.8, 114.8, 114.0, 111.0, 110.4, 62.8, 57.1, 55.9, 42.9, 42.6, 42.1, 36.5, 31.0, 30.6, 30.2, 29.8, 27.9, 26.8, 26.4, 26.2, 26.16, 26.1, 26.06, 22.0, 21.9. Anal. ($C_{18}H_{25}NO_3$) calculated C, 71.26; H, 8.31; N, 4.62; found C, 70.93; H, 8.53; N, 4.62.

<212> **실시예 3: N2-위치에 아마이드 및 알킬들이 치환된 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 (HMTIQ) 유도체들(11a-e, 12a-f)의 합성방법 및 화합물분석**

<213> [반응식 3]



<214>

<215> **① N2-위치에 아마이드들이 치환된 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린(HMTIQ) 유도체들 (11a-e) 제법 및 화합물 분석**

<216> **제법 a,b)** 다이클로로메테인 용매 (10-15 mL)에 10번 화합물 (1.0 mmol 또는 2.0 mmol)을 넣은 후 알킬아실클로라이드 (프로피온산 무수물, 부티릴 클로라이드, 시클로헥산카보닐 클로라이드, 이소부티릴 클로라이드, 혹은 3-메틸부티릴 클로라이드)를 천천히 더하였다. 트리에틸아민 (3.0 mol 또는 6.0 mmol)을 천천히 더한 후에 상온에서 1시간가량 교반하였다.

<217> 물을 넣어서 반응을 종료한 후에 유기층을 취한 뒤 물로 다시 세수하였다. 용매를 감압제거한 후에 메탄올 (10-20 mL)에 녹이고 탄산칼륨 (3.0 또는 6.0 mmol)을 더하고 약 2시간에서 3시간가량 환류하였다. 환류한 용액을 거른 후에 과량의 다이클로로메테인 용매로 추출하고 1.0M 염산 수용액과 물로 유기층을 세수하였다. 용매를 감암제거하고 관크로마토그래피를 이용하여 N2위치에 아마이드가 치환된 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린 (HMTIQ) 유도체 (**11a-e**)를 수득할 수 있었다.

<218> **ⅰ) 2-에틸카보닐-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (EHMTIQ, 11a)**

<219> **10** (420 mg, 2.0 mmol), 프로피온산 무수물(410 mg, 3.0 mmol), 트리에틸아민(1.0 mL), 탄산칼륨(370 mg); 수득율- **11a** (146 mg, 31%):

<220> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 6.71 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.66 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.62 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.60 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.10 (s, one conformer of O-H), 5.96 (s, one conformer of O-H), 4.62 (s, one conformer of C1-H), 4.50 (s, one conformer of C1-H), 3.86 (s, O-CH_3, 3H), 3.95-3.49 (m, C4-H, 2H), 2.85-2.70 (m, C3-H, 2H), 2.46 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.15-1.05 (m, 3H).

<221> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d 172.8, 145.5, 144.6, 144.3, 126.12, 126.11, 112.5, 111.8, 111.0, 110.6, 56.0, 46.8, 43.8, 43.2, 39.8, 29.1, 28.1, 26.9, 26.7, 9.4. MS (EI) 235 (M^+, 100), 220, 178, 163, 150, 135.

<222> **ⅱ) 7-히드록시-6-메톡시-2-프로필카보닐-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (11b)**

<223> **10** (215 mg, 1.0 mmol), 부티릴클로라이드(93 mg, 1.0 mmol), 트리에틸아민(0.45 mL), 탄산칼륨(100 mg); 수득율- **11b** (187 mg, 75%) :

<224> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 6.71 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.66 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.61 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.60 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.21 (s, one conformer of O-H), 6.03 (s, one conformer of O-H), 4.62 (s, one conformer of C1-H), 4.50 (s, one conformer of C1-H), 3.85 (s, O-CH_3, 3H), 3.95-3.60 (m, C4-H, 2H), 2.90-2.70 (m, C3-H, 2H), 2.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.80-1.60 (m, 2H), 1.05-0.90 (m, 3H).

<225> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d 172.1, 145.8, 144.7, 144.5, 126.2, 125.2, 112.7, 111.9, 111.2, 110.8, 56.1, 47.1, 43.9, 43.5, 39.9, 35.8, 35.7, 29.3, 28.2, 18.7, 14.1. MS (EI) 249 (M^+, 100), 220, 178, 163, 150.

<226> **iii) 2-싸이클로헥실카보닐-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (11c)**

<227> **10** (430 mg, 2.0 mmol), 싸이클로헥세인카보닐 클로라이드(590 mg, 4.0 mmol), 트리에틸아민(0.90 mL), 탄산칼륨(320 mg); 수득율- **11c** (302 mg, 57%):

<228> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 6.72 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.68 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.60 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 5.95 (s, one conformer of O-H), 5.76 (s, one conformer of O-H), 4.61 (s, one conformer of C1-H), 4.54 (s, one conformer of C1-H), 3.86 (s, O-CH_3, 3H), 3.72 (m, C4-H, 2H), 3.82-3.62 (m, 2H), 2.85-2.64 (m, C3-H, 2H), 2.62-2.45 (m, 1H), 1.90-1.20 (m, 10H). MS (EI) 289 (M^+, 100), 274, 178, 163, 150.

<229> **iv) 7-히드록시-6-메톡시-2-이소프로필카보닐-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (11d)**

<230> **10** (215 mg, 1.0 mmol), 이소부티릴 클로라이드(21 mL, 2.0 mmol), 트리에틸아민(0.5 mL), 탄산칼륨(160 mg); 수득율- **11d** (178 mg, 71%):

<231> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 6.76 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.67 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.61 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.20 (s, one conformer of O-H), 6.00 (s, one conformer of O-H), 4.61 (s, one conformer of C1-H), 4.55 (s, one conformer of C1-H), 3.86 (s, O-CH_3, 3H), 3.95-3.60 (m, C4-H, 2H), 3.00-2.65 (m, 3H), 1.45 (t, *J* = 6.6 Hz, 6H)

<232> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d 175.8, 145.5, 144.4, 126.3, 125.0, 112.6, 111.7, 111.0, 110.7, 56.0, 46.8, 44.0, 43.1, 40.1, 30.4, 29.4, 28.0, 19.3. MS (EI) 249 (M^+, 100), 234, 206, 178, 163, 150.

<233> **v) 7-히드록시-6-메톡시-2-이소부틸카보닐-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린 (11e)**

<234> **10** (215 mg, 1.0 mmol), 이소발레릴 클로라이드(25 mL, 2.0 mmol), 트리에틸아민(0.5 mL), 탄산칼륨(160 mg); 수득율- **11e** (158 mg 60%):

<235> ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) d 6.71 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.66 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.61 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.60 (s, one conformer of C5-H or C8-H), 6.21 (s, one conformer of O-H), 6.04 (s, one conformer of O-H), 4.63 (s, one conformer of C1-H), 4.51 (s, one conformer of C1-H), 3.85 (s, O-CH_3, 3H), 3.95-3.60 (m, C4-H, 2H), 2.85-2.67 (m, 2H), 2.38-2.05 (m, 3H), 1.10-0.95 (m, 6H)

<236> ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) d 171.4, 145.7, 145.5, 144.6, 144.3, 126.2, 126.1, 125.0, 112.5, 111.7, 111.0, 110.6, 55.9, 47.2, 43.8, 43.6, 42.5, 42.3, 39.8, 29.2, 28.1, 25.6, 22.7. MS (EI) 263 (M^+) 220 (100), 206, 178, 163, 150.

<237> **② N2-위치에 알킬들이 치환된 7-하이드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린(HMTIQ) 유도체들(12a-f) 제법 및 화합물 분석**

<238> **제법 d)** **11a-c**의 화합물을 증류한 테트라하이드로퓨란 용매(10-20 mL)에 녹인 후 리튬알루미늄하이드라이드

1mole(테트라하이드로퓨란)용액을 넣고 4시간에서 5시간정도 환류하였다. 반응을 식힌 후에 약 5당량씩의 에틸 아세테이트와 1.0M 수산화칼슘 용액과 물을 넣은 후에 거르고 다이클로로메테인 용액으로 추출하고 관크로마토그래피로 분리하여 **12a-c**의 화합물을 수득하였다.

<239> **제법 c)** 화합물 **10**을 알데하이드 (아세트알데하이드 또는 페닐아세트알데하이드 또는 벤즈알데하이드)와 타이타늄이소프로필옥사이드를 넣고 약 1시간가량 교반하였다. 이 혼합물을 에탄올에 녹인 후에 소듐사이아노보로하이드라이드를 넣고 20시간 가량 상온에서 교반한 후에 물을 더하여 반응을 중지하였다. 필터 후에 용매를 감압 제거한 후 관컬럼크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 화합물을 메탄올에 녹인 후 35% 염산수용액을 넣어 하이드로클로라이드 염을 만들고 에탄올 다이에틸이써에서 재결정하여 **12d-f**의 화합물을 얻었다.

<240> **ⅰ) 7-히드록시-6-메톡시-2-프로필-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린, 하이드로클로라이드 (12a)**

<241> 제법d를 따름, **11a** (160 mg, 0.68 mmol), 1 M 리튬알루미늄하이드라이드(테트라하이드로퓨란) (0.6 mL, 0.6 mmol); 수득율- **12a** (138mg, 92%):

<242> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) d 9.14 (bs, OH, 1H), 6.74(s, 1H), 6.59 (s, 1H), 4.27 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 16.0, 8.0 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.37 (bs, 1H), 3.25-3.00 (m, 4H), 2.95-2.90 (bm, 1H), 1.85-1.75 (m, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

<243> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) d 147.3, 145.4, 121.6, 120.1, 112.9, 111.8, 56.4, 55.6, 51.0, 48.7, 24.3, 16.8, 11.0. MS (EI) 221 (M^+) 192 (100), 150.

<244> **ⅱ) 2-부틸-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린, 하이드로클로라이드 (12b)**

<245> 제법d를 따름, **11b** (140 mg, 0.56 mmol), 1 M 리튬알루미늄하이드라이드(테트라하이드로퓨란) (0.6 mL, 0.6 mmol); 수득율- **12b** (92 mg, 70%):

<246> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) d 6.77(s, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.34 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 15.2, 8.0 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.37 (bs, 1H), 3.25-3.00 (m, 4H), 2.95-2.90 (bm, 1H), 1.85-1.75 (m, 2H), 1.50-1.25 (m, 2H), 0.93 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

<247> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 50 MHz) d 147.3, 145.4, 121.6, 120.1, 112.9, 111.8, 55.6, 54.6, 51.0, 48.7, 25.1, 24.3, 19.5, 13.5. MS (EI) 235 (M^+) 192 (100), 150.

<248> **ⅲ) 2-(싸이클로헥실메틸)-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린, 하이드로클로라이드 (12c)**

<249> 제법d를 따름, **11c** (175 mg, 0.6 mmol), 1 M 리튬알루미늄하이드라이드(테트라하이드로퓨란) (0.4 mL, 0.4 mmol); 수득율- **12c** (149 mg, 90%):

<250> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) d 6.76(s, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.34 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 4.11 (dd, *J* = 15.2, 7.2 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.65-2.65 (m, 6H), 2.00-1.65 (m, 6H), 1.40-1.80 (m, 5H).

<251> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 50 MHz) d 147.3, 145.4, 121.5, 119.9, 113.1, 111.8, 60.6, 55.9, 55.6, 32.1, 30.7, 25.4, 25.0, 23.9, 18.5. MS (EI) 275 (M^+) 192 (100), 150.

<252> **ⅳ) 2-에틸-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린, 하이드로클로라이드 (12d)**

<253> 화합물 **10** (215 mg, 1.0 mmol), 아세트알데하이드(0.12 mL, 2.0 mmol), 타이타늄이소프로필옥사이드(370 mg, 1.3 mmol), 1.0 M 소듐사이아노보로하이드라이드용액(테트라하이드로퓨란) (0.6 mL, 0.6 mmol); 수득율- **12d** (103 mg, 50%):

<254> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) d 6.76(s, 1H), 6.59 (s, 1H), 4.40-4.20 (bm, 1H), 4.20-3.95 (bm, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.60-2.65 (m, 6H), 1.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).

<255> **ⅴ) 2-벤질-7-히드록시-6-메톡시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린, 하이드로클로라이드(12e)**

<256> 화합물 **10** (215 mg, 1.0 mmol), 벤즈알데하이드(0.1 mL, 1.0 mmol), 타이타늄이소프로필옥사이드(370 mg, 1.3 mmol), 1.0 M 소듐사이아노보로하이드라이드용액 (테트라하이드로퓨란) (0.6 mL, 0.6 mmol); 수득율-**12e** (140 mg, 52%)

<257> **vi) 7-히드록시-6-메톡시-2-(2-페닐에틸)-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린,** 하이드로클로라이드 (12f)

<258> 화합물 **10** (215 mg, 1.0 mmol), 벤즈알데하이드(1.2 mL, 1.0 mmol), 타이타늄이소프로필옥사이드(370 mg, 1.3 mmol), 1 M 소듐사이아노보로하이드라이드용액 (테트라하이드로퓨란) (0.6 mL, 0.6 mmol); 수득율- **12f** (158 mg, 56%):

<259> ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) d 7.42-7.20 (m, 5H), 6.76(s, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.41 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 4.17 (dd, *J* = 14.8, 7.4 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.67 (bs, 1H), 3.48-3.05 (m, 6H), 3.30-2.80 (m, 2H).

<260> ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 50 MHz) d 147.4, 145.5, 137.2, 128.64, 128.61, 126.7, 121.6, 120.1, 112.9, 111.9, 55.8, 55.6, 51.0, 48.9, 29.4, 24.4.

<261> 사용한 용매들은 비등석으로 단순 증류한 디클로로메탄, 에틸 아세테이트 및 헥산을 사용하였으며 언급하지 않은 특정 용매는 > 99% 의 순도를 가지는 용매를 구입하여 사용하였다. 이어서 자외선 혹은 포스포몰리브덴산 지시자에 의해 TLC를 시각화하였다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼을 200 혹은 400 MHz 분광계 (Varian)를 이용하여 관찰하였으며 화합물 쉬프트는 ppm단위로 기록하고 내부 용매 피크를 참고하였다. 질량 스펙트럼은 인하대학교 혹은 기초과학지원연구소의 분석기기를 사용하여 관찰함으로써 미지의 화합물 구조를 확인하였다.

<262> **세포 배양**

<263> BV-2 소교세포주, CATH.a 신경세포주 및 SK-N-BE(2)C 신경세포주를 10% 송아지혈청, 100 IU/l 페니실린, 10 ㎍/ml 스트렙토마이신을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium 배양액과 37 ℃에서 95 % 공기, 5 % CO_2 조건에서 배양하였다. 세포를 하기 밀도로 폴리스티렌 배양접시에 심었다.: BV-2는 2.5x10^{5}세포/24웰 또는 2.6x10^{6} 세포/60 mm 접시, SK-N-BE(2)C는 1.5x10^{5} 세포/24 웰, CATH.a는 2.4x10^{4} 세포/ 96웰.

<264> **NO 생성**

<265> 세포 배양액 200 ㎕ 분획과 Griess 반응물 (2.5% H_3PO_4, 1% 술파닐아미드 및 0.1% 나프틸에틸렌디아민 디하이드로클로라이드) 100㎕을 96 microtiter 플레이트에서 혼합하고 흡광도를 플레이트 판독기를 이용하여 540nm에서 판독하였다. 측정된 아질산염 농도를 아질산나트륨 표준 상에서 산정된 곡선을 사용하여 계산하였다.

<266> **핵 추출물의 웨스턴 블롯 분석**

<267> 세포를 차가운 포스페이트-완충 염수(PBS)로 수세하고 침전된 세포를 다시 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF을 포함하는 완충액 400 ㎕에 조심스럽게 부유시켰다. 15분간 얼음 위에 방치한 후 NP-40 (0.5%) 25㎕를 첨가하고 10초간 반응시켰다. 30초간 원심분리하여 얻은 핵 침전물을 20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 그리고 DTT, EDTA, EGTA 및 PMSF를 각각 1 mM씩 포함하는 차가운 완충액 50 ㎕내에 부유시켰다. 완전히 혼합한 다음 15분간 회전 교반기를 사용하여 섞어주었다. 상기 핵 추출물을 15분간 11,000x*g*에서 원심분리하여 상층액을 얻고 그 단백질 함량을 측정하였다.

<268> 동일한 양 (5 μg)의 단백질을 10% SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리하고 폴리비닐리덴 디플로라이드-니트로셀룰로오스 막으로 이동시켰다. 상기 막을 실온에서 8% 탈지유를 포함하는 TBST에 1시간동안 처리하고, 4℃에서 NF-kB p65 소단위(1:500)에 대하여 제1항체로 밤새 배양시키고, 추가 1시간동안 horse radish peroxidase와 접합된 제2항체로 배양시켰다. 단백질 밴드를 제조업자의 지시에 따라 화학발광 검출방법으로 검출하였다.

<269> **GTPCH, iNOS, TNF-a, IL-1β, COX-2에 대한 RT-PCR**

<270> BV-2 세포로부터 분리된 총 RNA 5 μg을 사용하여 역전사 반응(RT)을 수행하고 94℃에서 30초간, 60℃에서 40초간, 그리고 72℃에서 1분간 30 주기 동안 폴리머라제 사슬 반응(PCR)을 수행하였다. PCR에 사용한 프라이머는 다음과 같다: iNOS (forward, ATGTCCGAAGCAAACATCAC; reverse, TAATGTCCAGGAAG TAGGTG), TNF-α (forward, CAGACCCTCACACTCAGATCATCTT reverse, CAGAGCAATGACTCCAAAGTAGACCT), IL-1β (forward, ATGGCAACTGT TCCTGAACTCAACT; reverse, CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTT), COX-2 (forward, CAGCAAATCCTTGCTGTTCC; reverse,

TGGGCAAAGAA TGCAAACATC), GTPCH (forward, GGATACCAGGAGACCATCTCA; reverse, TAGCATGGTGCTAGTGACAGT). β2M에 대한 RT-PCR를 동시에 수행한 후 내부 대조로 사용하였다. 1.5% 아가로스겔 상에서 PCR 산물을 전기영동하고 기대된 크기의 단일 밴드 가 생성되었음을 확인하였다.

<271> **락테이트 디하이드로게나제 (LDH) 검정**

<272> 세포 배양액(50㎕)에 0.26mM NADH, 2.87mM 피루브산 나트륨 및 100mM 포타슘 포스페이트 버퍼 (pH 7.4)를 섞어 총부피가 200㎕가 되게 한 후 실온에서 배양하였다. 이때 형성되는 NAD^+는 마이크로플레이트 분광계 (SPECTRA MAX 340 pc; Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA)를 사용하여 340nm에서 2초 간격으로 5분간 측정하였다.

<273> **활성 소교세포가 방출하는 물질에 의한 신경세포 사멸에 대한 EHMTIQ(11a)의 보호효과 측정**

<274> BV-2 소교세포를 24-웰 배양접시에 $2.5x10^5$ 세포/ml의 밀도로 심었다. 24시간 후, 세포를 1mg/㎖ LPS 및 EHMTIQ(11a)으로 처리하고 12시간동안 추가 배양하였다. 한편 SK-N-BE(2)C 세포를 24-웰 배양접시에 $0.5x10^5$ 세포/ml 밀도로 심은 후 24시간동안 배양하였다. SK-N-BE(2)C 세포의 배양액을 제거하고 상기 BV-2 배양액을 취하여 SK-N-BE(2) 세포에 넣어주었다. 24시간 후, SK-N-BE(2)C 세포의 사멸 정도를 LDH 방법으로 정량하였다.

<275> **초과산화물(superoxide) 생성량의 측정**

<276> BV-2 소교세포를 96-웰 배양접시에 $0.5x10^5$ 세포/ml 밀도로 심었다. 24시간 후, 세포를 phenol red를 포함하지 않는 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 두 차례 수세하고, EHMTIQ(11a)와 WST-1를 처리하되 일부는 superoxide dismutase (SOD) 20㎕ (800U/ml)를 포함하는 조건, 일부는 포함하지 않는 조건으로 하였다. 37℃에서 10분간 SpectraMax Plus 마이크로플레이트 분광계를 사용하여 450nm에서 흡광도를 판독하였다. 초과산화물 생성량은 SOD 유무하의 흡광도 수치의 차이 값을 이용하여 계산하였다.

<277> **유리 라디칼 소거능 (free radical scavenging activity) 측정**

<278> 항산화 활성은 안정한 2,2-디페닐-1-피크릴 히드라질(DPPH) 라디칼의 소거 효과에 기초하여 평가하였다. DPPH를 80% 메탄올에 용해시켜 최종 농도 100 μM을 만들었다. 디메틸 술폭사이드에 용해시킨 EHMTIQ(11a) 8㎕에 DPPH 라디칼 용액 232㎕를 첨가하여 반응을 시작하였다. 상기 반응물을 실온에서 25분간 배양하고 DPPH의 흡광도를 SpectraMax GEMINI XS fluorescence spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 517nm에서 측정하였다.

<279> **약물 안정성 측정**

<280> EHMTIQ(11a)(1mM)를 1mg의 쥐 간 마이크로좀과 NADPH-재생 시스템 (2.6 mM β-$NADP^+$, 10 mM 글루코오스-6-포스페이트, 4U/ml 글루코오스-6-포스페이트 디하이드로게나제 및 10 mM $MgCl_2$) 존재 하에 0, 30, 120 그리고 240분간 37℃에서 각각 배양하였다.

<281> 과염소산(perchloric acid)을 최종 농도가 500 mM이 되도록 첨가하여 반응을 중지시키고 반응 혼합물을 20분간 16,000 x g로 원심분리하였다. 정량적 분석을 위하여, 상층액(120㎕)을 이동상으로서 5-30% 아세토니트릴의 선형구배를 사용하여 Waters HPLC 시스템 [717 plus autosampler, 515 pump, and Symmetry C18 column (4.6mm x 150mm, 5mm)]으로 분리하였다. EHMTIQ(11a)를 Waters 486 흡광도 UV 검출기를 사용하여 254nm에서 모니터하였고 EMPOWER 소프트웨어 (Millipore Corporation, Milford, MA, USA)로 분석하였다.

<282> **데이터 분석**

<283> 얻어진 데이터는 반복 실험의 평균값±SEM으로 나타내었다. 세 그룹 이상의 대조군을 one-way ANOVA (analysis of variance)로 분석하고, post Dunnett's multiple comparison test를 사용하여 만들었다. PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA)를 사용하여 통계학적 테스트를 수행하였다. $p<0.05$을 전체 분석에 대하여 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

<284> **<실험예: EHMTIQ(11a)의 효과입증실험>**

<285> 1) NO 생성 차단효과 실험

<286> EHMTIQ(11a)가 소교세포내에서 NO의 생성을 차단하는지를 살펴보기 위하여, 쥐에서 분리한 소교세포주 BV-2을 사용하여 실험하였다. 그램-음성 박테리아 세포막 주성분인 LPS을 사용하여 세포의 활성화를 유도하였다. 그

결과를 도 1에 정리하였다.

<287> 도 1에서 보듯이, LPS가 BV-2세포의 NO 생성을 3.5±0.1배로 현저하게 증가시킴을 확인할 수 있었다. 이들 세포를 EHMTIQ(11a)로 처리하면 NO 증가에 대해 농도에 비례한 감소를 야기하였다. 즉, 저농도(5 μM)의 EHMTIQ(11a) 처리는 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 비처리된 대조군에 비하여 63±4%까지 낮출 수 있었다. 또한, 100 μM EHMTIQ(11a)에서는 대조군 수준의 억제를 보였다. 시험된 농도의 EHMTIQ(11a) 단독처리에 의한 세포독성은 없었다(미도시). EHMTIQ(11a)에 대한 IC_{50} 값은 2.81 μM인 것으로 결정되었다.

<288> 2) NADPH 옥시다제-유래 초과산화물 생성관련 효과 실험

<289> 소교세포 활성화로 발생되는 다른 현상으로는 효소 NADPH 옥시다제의 활성화에 의해 매개되는 초과산화물의 생성이 있다. 이에 EHMTIQ(11a)가 NADPH 옥시다제-유래 초과산화물 생성에 미치는 영향에 대해서 시험하였다. 이를 위하여, LPS-처리된 소교세포에서 방출된 초과산화물 함량을 측정하여 NADPH 옥시다제의 활성화를 평가하고 그 결과를 도 2에 정리하였다.

<290> 도 2에서 보듯이, LPS는 초과산화물 생성에 있어 비활성 세포 대비 3.0±0.3 배까지의 증가를 야기하였다. 이때 EHMTIQ(11a)는 농도에 비례하여 초과산화물 생성을 감쇄시켰다. 5 μM 및 10 μM EHMTIQ(11a)는 초과산화물 방출을 각각 62±13.1% 및 65±23.1%까지 저감시킬 수 있었다.

<291> 3) TNF-α의 유전자발현에 미치는 효과

<292> EHMTIQ(11a)가 활성 소교세포 내에서 TNF-α의 생성에 영향을 미치는지에 대하여 시험하였다. 활성 BV-2 세포를 다양한 농도의 EHMTIQ(11a)로 처리하고, TNF-α의 유전자발현 정도를 역전사 반응(RT)-PCR로 평가하고 그 결과를 도 3에 정리하였다.

<293> 도 3에서 보듯이, LPS 처리는 TNF-α의 mRNA 수치에 있어 현저한 증가(26±1배)를 보였다. 그러나 EHMTIQ(11a)와 함께 처리했을 경우에는 농도에 비례하게 TNF-α mRNA 수치의 감소를 이끌었다. 저농도(2.5 μM) EHMTIQ(11a)에서도 통계적으로 현저한 감소효과가 있었고, 5 μM 및 100 μM EHMTIQ(11a) 처리는 TNF-α mRNA 수치를 LPS-단독 대조군에 비하여 각각 74±1% 및 36±1%까지 감소시켰다.

<294> 4) IL-1β의 유전자발현에 미치는 효과

<295> EHMTIQ(11a)처리가 활성 소교세포내 IL-1β의 생성에 효과를 갖는지에 대하여도 동일한 방법을 사용하여 시험하였으며, 그 결과를 도 4에 정리하였다.

<296> 도 4에서 보듯이, LPS 처리는 IL-1β의 mRNA 수치에 있어 현저한 증가를 보였다(26±1배). EHMTIQ(11a)와의 동시처리는 mRNA 수치를 농도에 비례하게 감소시켰다. 저농도(2.5 μM)의 EHMTIQ(11a)에서 통계적으로 현저한 저감 효과를 보이고 있다. 2.5 μM EHMTIQ(11a)는 LPS-단독 대조군에 비하여 IL-1β mRNA 수치를 74±0.7%로 상당히 감소시켰으며, 100 μM EHMTIQ(11a)는 LPS 영향을 현저히 감소시켰다(미처리 대조군 대비 $p>0.05$).

<297> 5) COX-2 유전자발현에 미치는 효과

<298> 사이클로옥시게나제 (COX-2)의 유전자발현은 소교세포 활성화에 의하여 증가하는 효소로서, 프로스타글란딘의 합성을 촉진하며 산화성 신경손상을 야기한다. EHMTIQ(11a)는 다양한 농도의 LPS에 의해 활성된 소교세포내에서 COX-2의 유도를 억제할 수 있다.

<299> EHMTIQ(11a)가 농도에 비례하게 COX-2의 유전자발현을 억제하는 것을 도 6에서 확인할 수 있었다. 농도에 따른 분석 결과, 2.5 μM, 5 μM 및 10 μM 농도에서 COX-2발현이 각각 62±3, 75±3 및 83±2%씩 감소하는 것이 확인되었다.

<300> 6) iNOS 유전자발현에 대한 효과

<301> iNOS는 자극받지 않은 소교세포내에서는 매우 낮은 농도로 존재하는 데에 비해, 세포 활성시 그 유전자발현이 급격히 증가하게 된다. 이에 LPS에 의한 iNOS의 유전자발현이 EHMTIQ(11a)에 의해 영향을 받는지에 대하여 시험하였다.

<302> 도 6에서 보듯이, iNOS 유전자발현은 LPS 처리에 의해 8.5배까지 증강되었다. 이와 같은 유도는 5 μM 및 100 μM EHMTIQ(11a)로 처리한 경우 LPS-단독 처리된 대조군에 비해 82±1% 및 24±1% 까지 억제되었다.

<303> 7) GTPCH 유전자발현에 대한 효과

<304> 테트라하이드로바이옵테린 (BH4)은 NO 생성에 필수적이고 따라서 그것의 하향조절은 소교세포에 의한 면역학적 손상의 저감에 기여할 수 있다. GTP cyclohydrolase I (GTPCH)는 BH4 합성경로의 속도를 결정하는 효소이다. BH4 함량은 iNOS의 촉매반응에 작용하므로, GTPCH의 하향조절은 염증에 의한 신경세포 손상을 감쇄시킬 가능성이 있다. 따라서 GTPCH가 LPS에 의해 자극된 소교세포내에서도 유도되는지 그리고 EHMTIQ(11a)가 이와 같은 유도를 차단할 수 있는지에 대하여 시험하고 그 결과를 도 7에 정리하였다.

<305> 도 7에서 보듯이, GTPCH mRNA의 수치가 LPS에 의해 36.2배 증가되었고, EHMTIQ(11a)는 GTPCH mRNA의 증가를 농도 비례하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, EHMTIQ(11a)가 GTPCH의 유전자 발현 유도를 차단함으로써 LPS에 의해 유도된 BH4 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 농도-대비 분석 결과 저농도(2.5 μM)의 EHMTIQ(11a)가 GTPCH 유전자 발현을 17±1%까지 억제하는 것으로 보였다. 최대 억제효과는 100 μM EHMTIQ(11a)에서 관찰되었으며, 이는 GTPCH 유전자 발현을 75±1%까지 억제할 수 있었다. EHMTIQ(11a) 자체는 GTPCH효소의 촉매 활성에 있어서 직접적인 효과는 없었다 (미도시).

<306> 8) NF-kB 핵이동에 대한 효과

<307> 전사인자 NF-kB는 핵 내로 이동하여 염증에 관련되는 다수 유전자의 발현을 조절하는 핵심 전사인자이다. 이에 EHMTIQ(11a)가 NF-kB의 핵으로의 이동을 억제할 수 있는지를 시험하였다. 이를 위하여, 세포를 LPS 단독 혹은 다양한 농도의 EHMTIQ(11a)와 공동처리하고, 각각의 핵 분획을 분리하여 NF-kB p65에 대한 웨스턴 블롯 분석을 수행하고 그 결과를 도 8에 정리하였다.

<308> 도 8에서 보듯이, 핵 추출물에서 미처리 대조군에서는 NF-kB의 검출이 불가능한 반면 LPS 처리시에는 NF-kB가 증가한 것을 확인하였다. 이것은 10 μM EHMTIQ(11a) 존재 하에서 완전히 억제되었다. 따라서, 이 결과는 EHMTIQ(11a)가 소교세포 활성화에 반응하여 발생하는 NF-kB의 핵으로의 이동을 억제할 수 있음을 보여주었다.

<309> 9) 유리 라디칼의 소거 효과

<310> 활성 소교세포 내에서 생성된 유리 라디칼은 신경세포 내 생체분자들의 산화적 손상에 영향을 미치고, 그 결과 단백질, 핵산, 및 지질의 구조 변형을 가져오게 되어, 궁극적으로는 세포 손상을 유발한다. 이에 EHMTIQ(11a)가 유리 라디칼 소거 효과를 갖는지에 대하여 시험하였다. 도 9에서 보듯이, EHMTIQ(11a)는 농도에 비례하게 DPPH 라디칼에 대하여 유리 라디칼 소거효과를 보였다.

<311> 10) 면역학적 손상으로부터의 신경세포 사멸에 대한 보호효과

<312> EHMTIQ(11a)가 활성 소교세포에서 다수의 염증성물질의 생성을 하향 조절한다는 것은 EHMTIQ(11a)가 유효한 항신경염증 약제일 수 있음을 시사한다. 따라서, EHMTIQ(11a)는 활성 소교세포가 방출하는 물질에 의한 손상으로부터 도파민성 세포를 보호할 수 있을 것이다. 이를 확인하기 위하여, LPS로 활성화된 BV-2 세포에 EHMTIQ(11a) 처리 후 이 때 세포에서 방출되는 물질을 포함하고 있는 그 배양액을 SK-N-BE(2)C 세포로 옮겨 넣어주었다.

<313> 도 10에서 보듯이, LPS로 활성화된 BV-2 세포에서 방출되는 물질이 포함된 배양액은 LDH 활성 검정으로 측정한 바 SK-N-BE(2)C 세포를 49±10%까지 손상시켰다. 반면, 5μM EHMTIQ(11a)와 LPS 동시처리된 BV-2 세포로부터 얻어진 배양액을 SK-N-BE(2)C 세포에 처리한 결과, 손상으로부터 현저히 신경 세포를 보호하였다(미처리 대조군 대비 $p>0.05$). EHMTIQ(11a) 단독으로는 SK-N-BE(2)C 세포 사멸에 영향을 미치지 않았다.

<314> 11) 신경세포에 대한 직접적인 보호효과

<315> 신경세포는 소교세포 혹은 성상교세포(astrocytes)보다 훨씬 약한 것으로 알려져 있으며, 본 약제는 소교세포에 의한 면역학적 손상을 줄일 뿐 아니라 그 자체로도 신경세포를 보호함으로서 퇴행성 신경 질환용 치료제로서의 가능성이 있다. 따라서 EHMTIQ(11a)가 신경세포에 대한 보호효과를 갖는지에 대하여 시험하고 그 결과를 도 11에 정리하였다.

<316> 도 11에서 보듯이, EHMTIQ(11a)는 BH4에 대하여 뇌의 카테콜라민 신경세포로부터 유래된 세포주인 CATH.a를 보호할 수 있다. 저농도(5 μM)의 EHMTIQ (11a) (미처리 대조군 대비 $p>0.05$)에서 완전한 보호효과가 달성되었으며, 보다 고농도(10 μM 및 20 μM)에서는 미처리 대조군보다도 훨씬 건강하게 세포가 유지되었다 (미처리 대조군 대비 각각 87±12 및 76±7%).

<317> 12) 약물 안정성

<318> 대부분의 미세분자들은 일단 생체에 침입하면 간에서 효소에 의해 분해되므로, 약물이 이들 효소에 대해 안정성을 갖는 것은 매우 중요하다. 생체 내에서 EHMTIQ(11a)의 생물학적 유용도(bioavailability)을 평가하기

위하여, 간 마이크로좀 효소에 의한 EHMTIQ(11a) 분해율을 측정하였다. 이를 위하여, 간 마이크로좀에 EHMTIQ(11a)를 노출한 후 잔류된 함량을 정량화하였다.

<319> 도 12에서 보듯이, 노출 30분 후 EHMTIQ(11a)의 대부분(95%)이 잔류하였으며, 이는 상기 약제가 간 효소에 대하여 상당히 안정적이라는 것을 보이는 것이다. 2시간 노출 후에는 약 12.52%가 분해 되었으며, 이는 약물이 적당히 작용한 후에는 간 효소에 의해서 분해되어 생체로부터 제거되어질 수 있다는 것을 입증하는 것이다. EHMTIQ의 감소율은 1.115 ± 0.203 nmole(EHMTIQ) / min / mg(간 마이크로좀 단백질) 인 것으로 계산되었다.

<320> **실시예 4: TIQ 유도체 합성 및 실험방법**

<321> 테트라하이드로이소퀴놀린 유도체 20종류를 상기기술한 상세한 방법에 기초하여 합성하고, 그 NO생성, BH4생성 및 세포독성에 대한 효과를 BV-2 활성소교세포에서 다음과 같이 실험하였다.

<322> **세포 배양**

<323> BV-2 세포를 실험 예 1과 마찬가지 방법을 반복하여 배양하고 폴리스티렌 배양접시에 심었다. 실험하려는 테트라하이드로이소퀴놀린 유도체를 다양한 농도에서 LPS와 동시처리하였다. 24시간 후, NO, BH4 및 LDH 활성도를 각각 측정하였다.

<324> **NO 생성**

<325> 세포 배양액 200 ㎕ 분획과 Griess 반응물 (2.5% H_3PO_4, 1% 술파닐아미드 및 0.1% 나프틸에틸렌디아민 디하이드로클로라이드) 100 ㎕을 96 microtiter 플레이트에서 혼합하고 흡광도를 플레이트 판독기를 이용하여 540 nm에서 판독하였다. NO 생성에 있어 각 화합물의 농도를 LPS-처리된 세포에 의해 생성된 NO 대비 %로서 나타내었다.

<326> **BH4 생성**

<327> 생성된 BH4는 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 배양액 900 μL 분획에 1M 인산 100 μL 및 산성 요오드 용액 (0.2 M 트리클로로아세트산 내 0.5% I_2 및 1.0% KI) 200 μL 를 첨가하고 1시간동안 어두운 조건하에 배양시켰다. 0.1% 아스코르브산 0.1 mL를 첨가하여 산화 반응을 멈춘 후 반응 혼합물을 15분간 8,000x*g* 조건으로 원심분리하고 상층액을 증류수로 희석시켰다. BH4는 HPLC로 분리하였으며, 5% 메탄올을 이동상으로 하여, 형광 탐지기 (Waters, Boston, MA, USA)로 검출하였다.

<328> 각각의 실험에 대한 BH4 표준 곡선을 준비하였다. BH4 농도는 Waters 991 computerized integrator system을 사용하여 세포 단백질 mg당 BH4 ng으로서 계산하여 LPS-처리 대조군 %로서 나타내었다.

<329> **세포독성**

<330> 각 화합물의 세포독성을 배양액으로 방출된 LDH의 활성도를 측정하여 검사 하였다. 세포 배양액 분획(50 μl)과 0.26 mM NADH, 2.87 mM 피루브산 나트륨 및 100 mM 포타슘 포스페이트 완충액(pH 7.4)으로 총 부피가 200 μl이 되게 하였다. NAD^+생성율을 5분간 2초 간격으로 microplate spectrophotometer를 사용하여 340nm에서 측정하였다. 각 화합물의 세포 독성 값을 비처리 세포 대비 수치(%)로 표시하였으며, 100에 접근하는 수치일수록 독성이 없음을 시사한다.

표 2

<331>

NO 생성 및 세포 생존[a] 에 미치는 효과

화학식	R_1	R_2	NO[b]	LDH[c]
2	H	$COCH_3$	46	107
5a	CH_3	$COCH_3$	40	104
9a	CH_2CH_3	$COCH_3$	50	-
9b	$CH_2CH_2CH_3$	$COCH_3$	84	-
9c	$CH(CH_3)_2$	$COCH_3$	39	-
9e	$CH_2CH(CH_3)_2$	$COCH_3$	138	-
5b	C_6H_5	$COCH_3$	51	104

9d	$CH_2C_6H_5$	$COCH_3$	96	80
9f	C_3H_5	$COCH_3$	60	-
9g	C_4H_7	$COCH_3$	69	-
11a	H	$COCH_2CH_3$	36	104
11b	H	$COCH_2CH_2CH_3$	74	91
11d	H	$COCH(CH_3)_2$	82	90
11e	H	$COCH_2CH(CH_3)_2$	90	84
11c	H	COC_6H_{11}	64	82
12d	H	CH_2CH_3	92	91
12a	H	$CH_2CH_2CH_3$	82	86
12b	H	$CH_2CH_2CH_2CH_3$	111	93
12c	H	$CH_2C_6H_{11}$	63	87
12e	H	$CH_2C_6H_5$	97	94
12f	H	$CH_2CH_2C_6H_5$	85	94
a 모든 수치는 3회 실험한 값에 대한 평균치이다. **b** NO의 함량은 LPS-처리된 BV-2 세포내 각 약제(100㎛M)의 농도 하에 함량값을 LPS-활성화된 BV-2의 %로서 표시한 수치이다. **c** 각 세포독성은 배지로부터 방출된 락테이트 디하이드로게나제(LDH)를 LPS-활성화된 BV-2의 %로서 나타낸다.				

<332> 상기 표2에서 보듯이, LDH 세포독성 검사를 거친 유도체들은 세포독성을 일으키지 않았다.

<333> 새로이 합성된 유도체의 NO생성에 대한 억제값을 비교하기 위하여 표준 화합물로서 화학식 2의 화합물을 선택하였다. 상기 표에서 보듯이, 이 화합물은 100 ㎛M에서 LPS-단독 대조군에 비해 NO 생성을 46%까지 억제할 수 있었다. 특히 화학식 **5a**, **9c** 및 **11a** 의 화합물들은 상기 화학식 2의 화합물보다 강력한 억제 효과를 보였다.

<334> **실험예 2: TIQ 유도체의 NO 억제활성**

<335> 비-방향족 C1 알킬 치환체(화학식 **5a**, **9a**, **9b**, **9c** 및 **9e**)에 대한 억제 효과는 일반적으로 C1 위치에서 탄소 길이가 증가함에 따라 감소되었다. C1 페닐 화합물 (화학식 **5b**) 와 벤질 화합물(화학식 **9d**)의 경우, NO 생성은 각각 49% 및 4% 정도씩 억제되었다.

<336> 긴 알킬기를 갖는 사이클로프로필 (화학식 **9f**) 및 사이클로부틸 (화학식 **9g**) 화합물의 경우 유동적인 알킬 카본을 갖는 화학식 **9b** 및 **9d**의 화합물보다 훨씬 효과적이었다. 이는 알킬기의 경직도가 결합을 촉진할 수 있다는 추론을 낳는다.

<337> 부가적으로, *N*-아세틸-C1 알킬 치환체중, C1 위치에 시클로헥실기를 갖는 화학식 **5h**의 화합물의 경우 가장 좋은 NO 억제 효과(33% 아질산염 생성)를 보이는 것을 또한 확인할 수 있었다.

<338> N2상에 아실 유도체를 갖는 프로피오닐(화학식 **11a**), 부티릴(화학식 **11b**), 이소부티릴(화학식 **11d**) 및 이소펜타노일(화학식 **11e**)의 경우에는 대조군에 대비하여 NO생성을 각각 36%, 74%, 82%, 및 90%까지 감소시킬 수 있었다. 이와 같은 경향은 위에 언급된 C1 알킬 치환체에서 관찰되는 결과와 매우 유사하다. N2 알킬 치환체(화학식 **12a**, **12b**, **12d**, **12e**, 및 **12f**)는 효과가 뒤떨어졌다. 그러나, 시클로헥실메틸 (화학식 **12c**) 및 시클로헥산카보닐(화학식 **11c**) 화합물의 경우에는 각각 63% 및 64% 저감으로서 매우 효과적이었다.

<339> 이들 화합물의 NO 생성에 미치는 억제 효과가 BH4에 미치는 효과에 기인한 것일 수 있다. 이에 최고의 NO 억제 활성을 나타내는 화학식 **2**, **5a**, **11a**, 혹은 **11c**의 존재하에 BH4 생성도를 측정하고 그 결과를 도 **13**에 정리하였다.

<340> 도 13에서 보듯이, LPS-활성화된 소교세포에서 생성된 BH4의 생성량은 약제 농도에 비례하여 감소된 것을 확인할 수 있다. 즉, 화학식 **2**의 화합물의 경우 50 ㎛M에서는 79%, 100 ㎛M에서는 55%이었으며, 화학식 **5a**의 화합물의 경우 10 ㎛M에서는 99%, 30 ㎛M에서는 59%, 60 ㎛M에서는 59%, 그리고 100 ㎛M에서는 52%이었고, 화학식

11a의 화합물의 경우 10 μM에서는 86%, 60 μM에서는 72%, 그리고 100 μM에서는 51%이었다. 또한, 화학식 11c의 화합물의 경우 30 μM에서는 95%, 60 μM에서는 71%, 그리고 100 μM에서는 63%이었다. 이들 결과는 LPS-단독 대조군 %로서 나타낸 값이다. 따라서, 이들 약제는 BH4 생성을 억제함에 따라 iNOS dimerization의 간섭을 유도하는 것으로 추론된다.

<341> 한편, 화학식 11a의 화합물의 경우 NO 생성은 LPS-활성된 BV-2 세포내 100 μM에서 64%까지 감소되었고, BH4 생성 또한 49%까지 감소된 것을 확인할 수 있다. 이는 C1 위치에서 작은 알킬기 혹은 N2 위치에서 작은 아실기가 존재하는 경우 BH4 및 NO 생성에 있어 잠재적으로 강력한 억제 효과를 갖는 화합물을 수득할 수 있다는 것을 입증하는 것이다. 또한, 상기 화학식 11a의 화합물의 경우 항염증 관련 손상을 제어하기에 효과적인 화합물로서 제공될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

<342> 도 1은 본 발명의 EHMTIQ (N-ethylcarbonyl-7-hydroxy-6-methoxy-1,2,3, 4-tetrahydroisoquinoline)가 활성 소교세포에서 일산화질소 (NO) 생성에 미치는 억제성 효과를 도시한 그래프이고,

<343> 도 2는 본 발명의 EHMTIQ가 활성 소교세포에서 초과산화물 생성에 미치는 억제성 효과를 도시한 그래프이고,

<344> 도 3은 본 발명의 EHMTIQ가 활성 소교세포에서 TNF-α mRNA 수준에 미치는 억제성 효과를 도시한 도면으로서, A)는 RT-PCR 산물의 아가로스겔 전기영동 사진이고, B)는 TNF-α 밴드를 농도계측 분석 방법으로 정량화한 그래프이고,

<345> 도 4는 본 발명의 EHMTIQ가 활성 소교세포에서 IL-1β mRNA 수준에 미치는 억제성 효과를 도시한 도면으로서, A)는 RT-PCR 산물의 아가로스겔 전기영동 사진이고, B)는 IL-1β 밴드를 농도계측 분석 방법으로 정량화한 그래프이고,

<346> 도 5는 본 발명의 EHMTIQ가 활성 소교세포에서 COX-2 mRNA 수준에 미치는 억제성 효과를 도시한 도면으로서, A)는 RT-PCR 산물의 아가로스겔 전기영동 사진이고, B)는 COX-2 밴드를 농도계측 분석 방법으로 정량화한 그래프이고,

<347> 도 6은 본 발명의 EHMTIQ가 활성 소교세포에서 iNOS mRNA 수준에 미치는 억제성 효과를 도시한 도면으로서, A)는 RT-PCR 산물의 아가로스겔 전기영동 사진이고, B)는 iNOS 밴드를 농도계측 분석 방법으로 정량화한 그래프이고,

<348> 도 7은 본 발명의 EHMTIQ가 활성 소교세포에서 GTPCH mRNA 수준에 미치는 억제성 효과를 도시한 도면으로서, A)는 RT-PCR 산물의 아가로스겔 전기영동 사진이고, B)는 GTPCH 밴드를 농도계측 분석 방법으로 정량화한 그래프이고,

<349> 도 8은 본 발명의 EHMTIQ가 활성 소교세포에서 NF-kB p65의 핵이동에 미치는 억제성 효과를 도시한 그래프이고,

<350> 도 9는 본 발명의 EHMTIQ의 활성 소교세포에서 산화성 물질 축적의 억제성 효과를 도시한 그래프이고,

<351> 도 10은 본 발명의 EHMTIQ가 활성 소교세포에 의하여 사멸하는 도파민 신경세포를 보호하는 효과가 있음을 도시한 그래프이고,

<352> 도 11은 본 발명의 EHMTIQ가 BH4에 의하여 사멸하는 도파민 세포를 보호하는 효과가 있음을 도시한 그래프이고,

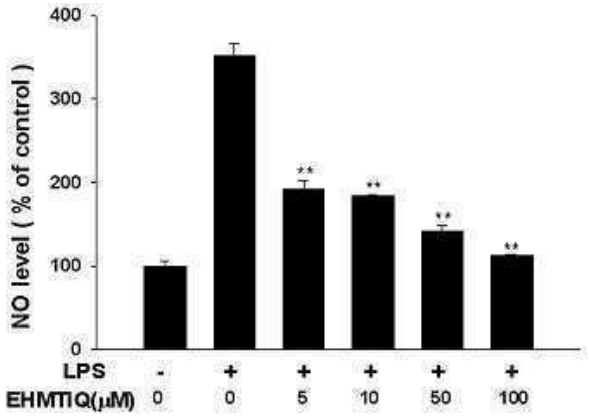
<353> 도 12는 본 발명의 EHMTIQ의 안정성 테스트 결과를 도시한 그래프이고,

<354> 도 13은 본 발명의 HMTIQ(7-hydroxy-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline)들이 활성 소교세포에서 BH4 생산을 억제하는 효과가 있음을 도시한 그래프이다.

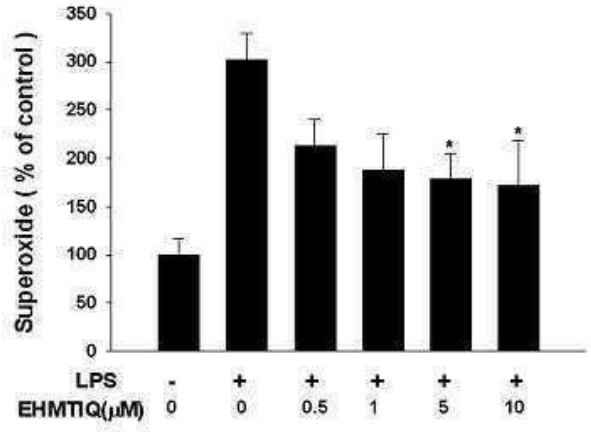
<355>

도면

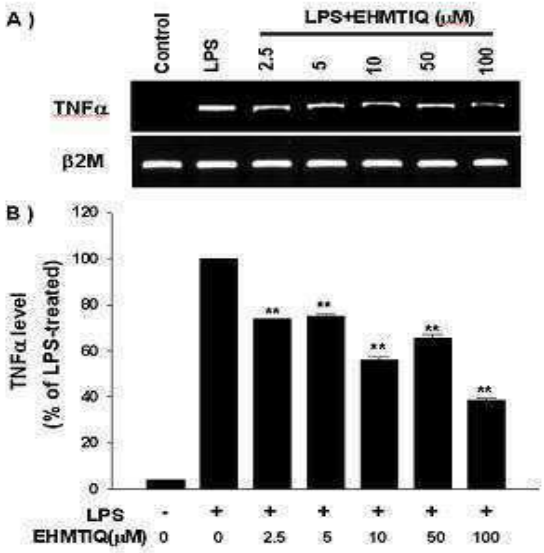
도면1


NO level (% of control)
400
300
200
100
0
**
**
**
**
LPS - + + + + +
EHMTIQ(μM) 0 0 5 10 50 100

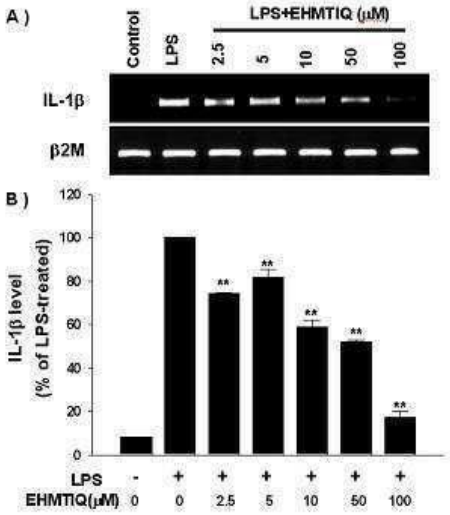
도면2


Superoxide (% of control)
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
LPS - + + + + +
EHMTIQ(μM) 0 0 0.5 1 5 10

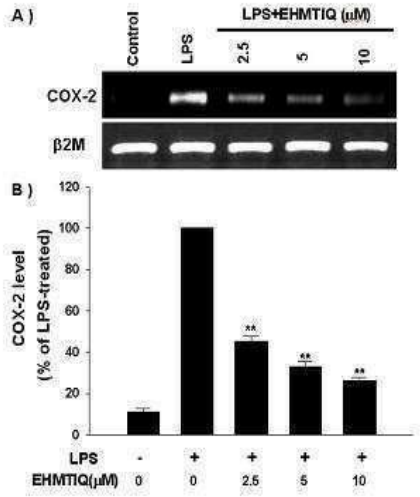
도면3


A)
Control
LPS
LPS+EHMTIQ (μM)
2.5
5
10
50
100
TNFα
β2M
B)
TNFα level
(% of LPS-treated)
120
100
80
60
40
20
0
**
LPS - + + + + + +
EHMTIQ(μM) 0 0 2.5 5 10 50 100

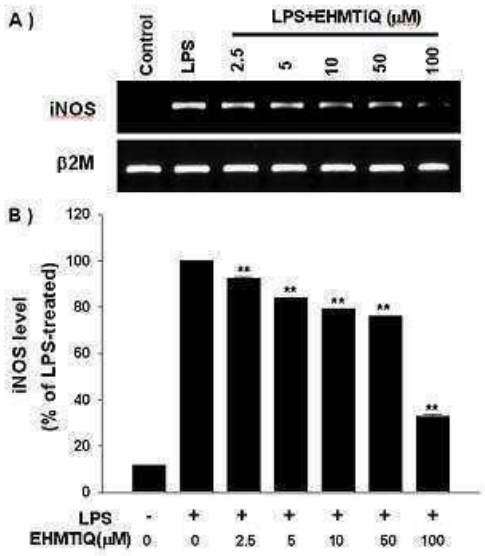
도면4


A)
Control
LPS
LPS+EHMTIQ (μM)
2.5
5
10
50
100
IL-1β
β2M
B)
IL-1β level
(% of LPS-treated)
120
100
80
60
40
20
0
**
LPS - + + + + + +
EHMTIQ(μM) 0 0 2.5 5 10 50 100

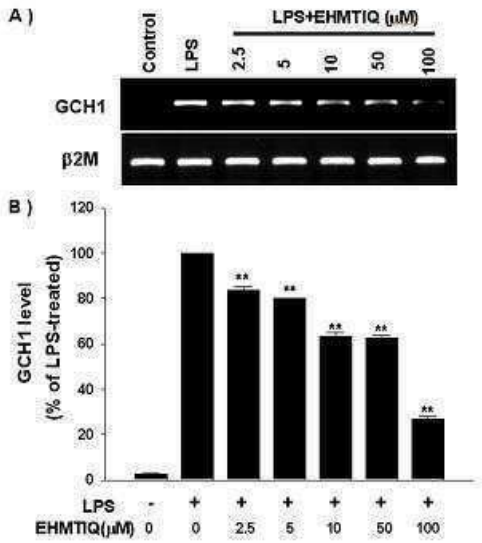
도면5


A)
Control
LPS
LPS+EHMTIQ (μM)
2.5
5
10
COX-2
β2M
B)
COX-2 level
(% of LPS-treated)
120
100
80
60
40
20
0
**
LPS
EHMTIQ(μM)

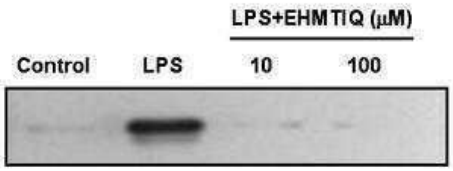
도면6


A)
Control
LPS
LPS+EHMTIQ (μM)
2.5
5
10
50
100
iNOS
β2M
B)
iNOS level
(% of LPS-treated)
120
100
80
60
40
20
0
**
LPS
EHMTIQ(μM)

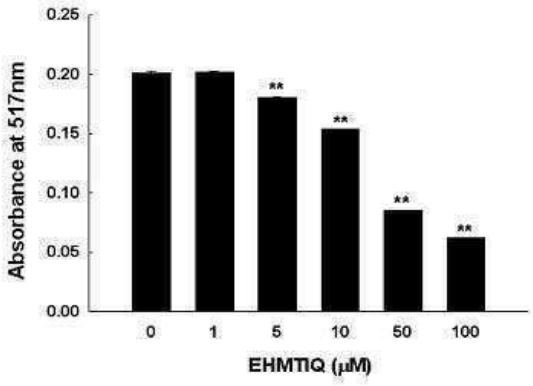
도면7


A)
Control
LPS
LPS+EHMTIQ (μM)
2.5
5
10
50
100
GCH1
β2M
B)
GCH1 level
(% of LPS-treated)
120
100
80
60
40
20
0
**
LPS
EHMTIQ(μM)

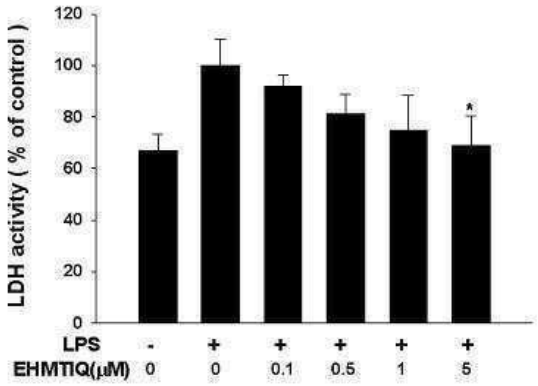
도면8


LPS+EHMTIQ (μM)
Control
LPS
10
100

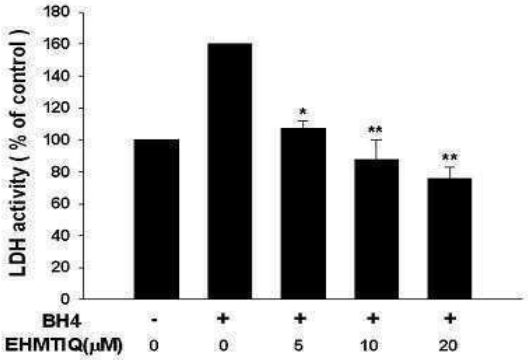
도면9


Absorbance at 517nm
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
**
0
1
5
10
50
100
EHMTIQ (μM)

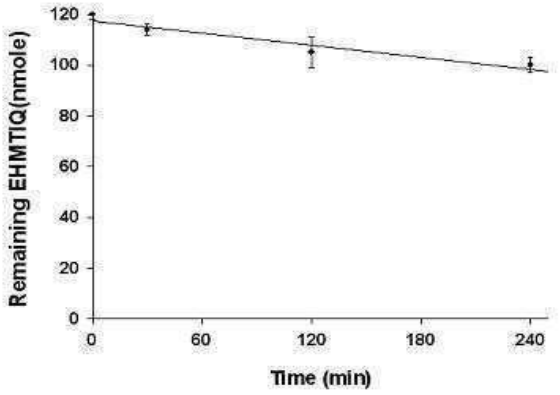
도면10



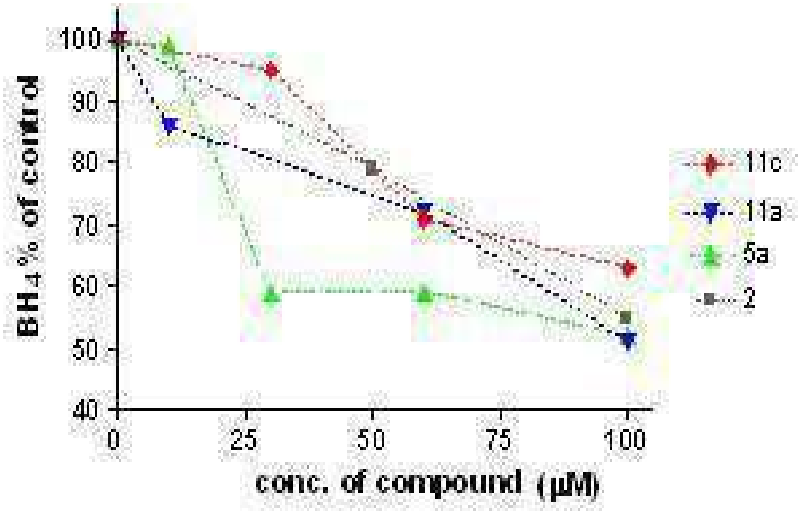
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
<120> 7-hydroxy-6-methoxy-1,2,3,4- tetrahydroisoquinoline derivatives having effects of preventing and treating having Degenerative and anti-inflammatory Diseases

<130> sp-2008-0063

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for iNOS

<400> 1
atgtccgaag caaacatcac 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> backward primer for iNOS

<400> 2
taatgtccag gaagtaggtg 20

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for TNF-a

<400> 3
cagaccctca cactcagatc atctt 25

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> backward primer for TNF-a

<400> 4
cagagcaatg actccaaagt agacct 26

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for IL-1b

<400> 5
atggcaactg ttcctgaact caact 25

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> backward primer for IL-1b

<400> 6
caggacaggt atagattctt tccttt 26

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for COX-2

<400> 7
cagcaaatcc ttgctgttcc 20

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> backward primer for COX-2

<400> 8
tgggcaaaga atgcaaacat c 21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for GTPCH

<400> 9
ggataccagg agaccatctc a 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> backward primer for GTPCH

<400> 10
tagcatggtg ctagtgacag t 21