



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0097422
(43) 공개일자 2017년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 231/08 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/166 (2006.01) C07C 233/75 (2006.01)
C07C 37/055 (2006.01) C07C 37/14 (2006.01)
C07C 39/21 (2006.01) C07C 39/215 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07C 231/08 (2013.01)
A61K 31/05 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0019156

(22) 출원일자 2016년02월18일

심사청구일자 2016년02월18일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

전종갑

강원도 춘천시 한림대학길 1, 화학과 (옥천동, 한림대학교)

문인수

서울특별시 강동구 구천면로11길 20-20, 가동 20 1호

(74) 대리인

강성혜

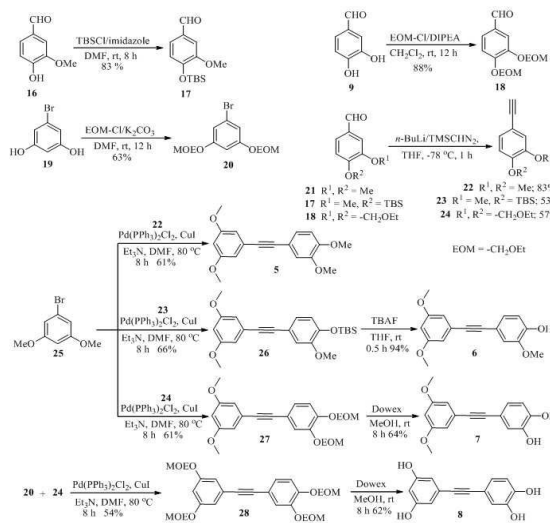
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 피스아타놀 유도체 합성방법 및 피스아타놀 유도체를 포함하는 항염증 약학 조성물

(57) 요약

비티그-호너 반응, 콜빈 재배열 및 소노가시라 반응을 이용하여 피스아타놀 유도체를 용이하게 합성하였다. LPS 로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 합성된 화합물들에 대하여 항염증 활성을 조사한 결과, 화합물 6~8이 10 μ M 농도에서 현저한 활성을 나타내었고, 화합물 7 (90.1%), 화합물 8 (60.8%), 화합물 6 (55.2%)은 세포독성을 나타내지 않았다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/166 (2013.01)

C07C 233/75 (2013.01)

C07C 37/055 (2013.01)

C07C 37/14 (2013.01)

C07C 39/21 (2013.01)

C07C 39/215 (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

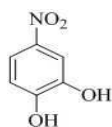
청구범위

청구항 1

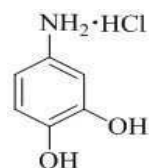
가) 화학식 14로 표시되는 4-나이트로벤젠-1,2-다이올로부터 화학식 15로 표시되는 4-아미노벤젠-1,2-다이올 하이드로클로라이드를 얻는 단계; 및

나) 상기 4-아미노벤젠-1,2-다이올 하이드로클로라이드와 화학식 11로 표시되는 3,5-다이하이드록시벤조익산에 커플링제로 HATU {1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate}를 이용하여 커플링 반응하여 화학식 4로 표시되는 *N*-(3,4-다이하이드록시페닐)-3,5-다이하이드록시벤즈아마이드 {*N*-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxybenzamide}를 얻는 단계;를 포함하는 피스아타놀 유도체 제조방법.

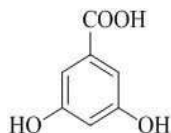
<화학식 14>



<화학식 15>



<화학식 11>



청구항 2

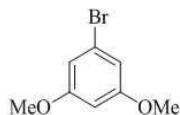
청구항 1에 있어서,

상기 가) 단계는 4-나이트로벤젠-1,2-다이올 용액에 Pd/C를 가하고 상온, 수소 분위기 하에서 수소화 반응으로 진행하여 조화합물을 얻고, 조화합물은 디에틸에테르에 용해하고 HCl 기체를 가하여 거품이 일도록 반응시켜 4-아미노벤젠-1,2-다이올 하이드로클로라이드를 얻는 것을 특징으로 하는 피스아타놀 유도체 제조방법.

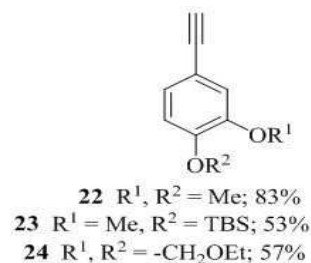
청구항 3

DMF (*N,N*-dimethylformamide) 내에서 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2/\text{CuI}/\text{Et}_3\text{N}$ 시스템을 이용하여 화학식 25로 표시되는 1-브로모-3,5-다이메톡시벤젠과 화학식 22 중 화합물 22로 표시되는 4-에티닐-1,2-다이메톡시벤젠 (4-Ethynyl-1,2-dimethoxybenzene)을 소노가시라 커플링 반응하여 화학식 5로 표시되는 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-1,2-다이메톡시벤젠을 얻는 피스아타놀 유도체 제조방법.

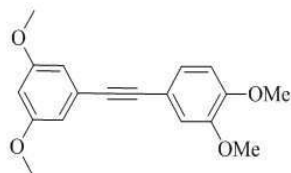
<화학식 25>



<화학식 22>



<화학식 5>



청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 4-에티닐-1,2-다이메톡시벤젠 (4-Ethynyl-1,2-dimethoxybenzene)은

가) (트리메틸실릴)다이아조메탄을 무수 THF에 넣고 -78 °C에서 교반한 용액에 *n*-BuLi 용액을 한 방울씩 가하고 교반하여 반응 혼합물을 얻는 단계;

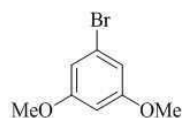
나) 상기 반응 혼합물에 3,4-다이메톡시벤즈알데하이드의 무수 THF 용액을 한 방울씩 가하고 교반하는 단계; 및
 다) 상기 나) 단계 반응 완료 후, 수용성 포화 NH₄Cl 용액을 서서히 가하고, 반응 혼합물은 상온까지 온도를 올려 EtOAc로 추출하는 단계;를 포함하여 생성된 것임을 특징으로 하는 피스아타놀 유도체 제조방법.

청구항 5

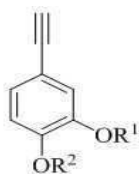
가) DMF (*N,N*-dimethylformamide) 내에서 PdCl₂(PPh₃)₂/CuI/Et₃N 시스템을 이용하여 화학식 25로 표시되는 1-브로모-3,5-다이메톡시벤젠과 화학식 22 중 화합물 23으로 표시되는 *tert*-부틸(4-에티닐-2-메톡시페녹시)다이메틸실란 {*tert*-Butyl(4-ethynyl-2-methoxyphenoxy)dimethylsilane}을 소노가시라 커플링 반응하여 화학식 26으로 표시되는 *tert*-부틸(4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-2-메톡시페녹시)다이메틸실란 {*tert*-Butyl(4-((3,5-dimethoxyphenyl)ethynyl)-2-methoxyphenoxy) dimethyl silane}을 얻는 단계; 및

나) *tert*-부틸(4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-2-메톡시페녹시)다이메틸실란을 무수 THF 내에서 교반한 용액에 TBAF (Tetrabutyl ammonium fluoride) 용액을 서서히 가하고 상온에서 교반하여 반응 완료 후, H₂O를 가하고 EtOAc로 추출하여 화학식 6으로 표시되는 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-2-메톡시페놀 {4-((3,5-Dimethoxyphenyl)ethynyl)-2-methoxyphenol}을 얻는 단계;를 포함하는 피스아타놀 유도체 제조방법.

<화학식 25>



<화학식 22>

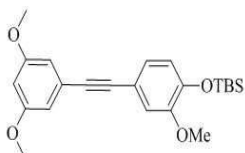


22 R¹, R² = Me; 83%

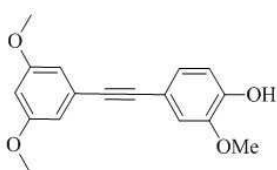
23 R¹ = Me, R² = TBS; 53%

24 R¹, R² = -CH₂OEt; 57%

<화학식 26>



<화학식 6>



청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 *tert*-부틸(4-에티닐-2-메톡시페녹시)다이메틸실란은

가) (트리메틸실릴)다이아조메탄을 무수 THF에 넣고 -78 °C에서 교반한 용액에 *n*-BuLi 용액을 한 방울씩 가하고 교반하여 반응 혼합물을 얻는 단계;

나) 상기 반응 혼합물에 4-((*tert*-부틸다이메틸실릴)옥시)-3-메톡시벤즈알데하이드 {4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-methoxybenzaldehyde}의 무수 THF 용액을 한 방울씩 가하고 교반하는 단계; 및

다) 상기 나) 단계 반응 완료 후, 수용성 포화 NH₄Cl 용액을 서서히 가하고, 반응 혼합물은 상온까지 온도를 올려 EtOAc로 추출하는 단계;를 포함하여 생성된 것임을 특징으로 하는 피스아타놀 유도체 제조방법.

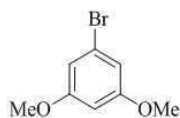
청구항 7

가) DMF (*N,N*-dimethylformamide) 내에서 PdCl₂(PPh₃)₂/CuI/Et₃N 시스템을 이용하여 화학식 25로 표시되는 1-브로모-3,5-다이메톡시벤젠과 화학식 22 중 화합물 24로 표시되는 1,2-다이(에톡시메톡시)-4-에티닐벤젠 {1,2-Di(ethoxymethoxy)-4-ethynylbenzene}을 소노가시라 커플링 반응하여 화학식 27로 표시되는 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-1,2-*bis*(에톡시메톡시)벤젠 {4-((3,5-Dimethoxyphenyl)ethynyl)-1,2-*bis*(ethoxymethoxy)benzene}을 얻는 단계; 및

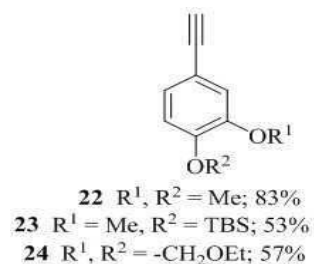
나) 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-1,2-*bis*(에톡시메톡시)벤젠을 무수 THF 내에서 교반한 용액에 TBAF

(Tetrabutyl ammonium fluoride) 용액을 서서히 가하고 상온에서 교반하여 반응 완료 후, H₂O를 가하고 EtOAc로 추출하여 화학식 7로 표시되는 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)벤젠-1,2-다이올 {4-((3,5-Dimethoxyphenyl)ethynyl)benzene-1,2-diol}을 얻는 단계;를 포함하는 피스아타놀 유도체 제조방법.

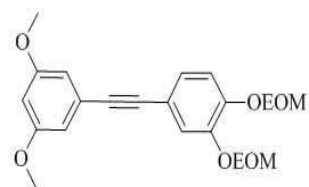
<화학식 25>



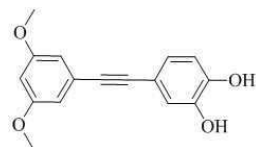
<화학식 22>



<화학식 27>



<화학식 7>



청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-1,2-bis(에톡시메톡시)벤젠은

가) (트리메틸실릴)다이아조메탄을 무수 THF에 넣고 -78 °C에서 교반한 용액에 *n*-BuLi 용액을 한 방울씩 가하고 교반하여 반응 혼합물을 얻는 단계;

나) 상기 반응 혼합물에 4-((*tert*-부틸다이메틸실릴)옥시)-3-메톡시벤즈알데하이드 {4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-methoxybenzaldehyde}의 무수 THF 용액을 한 방울씩 가하고 교반하는 단계; 및

다) 상기 나) 단계 반응 완료 후, 수용성 포화 NH₄Cl 용액을 서서히 가하고, 반응 혼합물은 상온까지 온도를 올려 EtOAc로 추출하는 단계;를 포함하여 생성된 것임을 특징으로 하는 피스아타놀 유도체 제조방법.

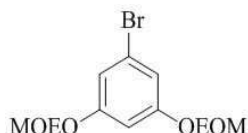
청구항 9

가) DMF (*N,N*-dimethylformamide) 내에서 PdCl₂(PPh₃)₂/CuI/Et₃N 시스템을 이용하여 화학식 20으로 표시되는 1-브로모-3,5-다이(에톡시메톡시)벤젠 {1-Bromo-3,5-di(ethoxymethoxy) benzene}과 화학식 22 중 화합물 24로 표시되는 1,2-다이(에톡시메톡시)-4-에티닐벤젠 {1,2-Di(ethoxymethoxy)-4-ethynylbenzene}을 소노가시라 커플링

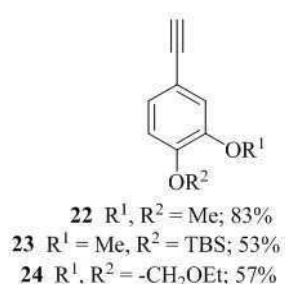
반응하여 화학식 28로 표시되는 4-((3,5-다이(에톡시메톡시)페닐)에티닐)-1,2-비스(에톡시메톡시)벤젠 {4-((3,5-Di(ethoxymethoxy)phenyl)ethynyl)-1,2-bis(ethoxymethoxy)benzene}을 얻는 단계; 및

나) 4-((3,5-다이(에톡시메톡시)페닐)에티닐)-1,2-비스(에톡시메톡시)벤젠을 무수 THF 내에서 교반한 용액에 TBAF (Tetrabutyl ammonium fluoride) 용액을 서서히 가하고 상온에서 교반하여 반응 완료 후, H₂O를 가하고 EtOAc로 추출하여 화학식 8로 표시되는 4-((3,5-다이하이드록시페닐)에티닐)벤젠-1,2-다이올 {4-((3,5-Dihydroxy phenyl)ethynyl)benzene-1,2-diol}을 얻는 단계;를 포함하는 피스아타놀 유도체 제조방법.

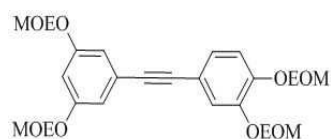
<화학식 20>



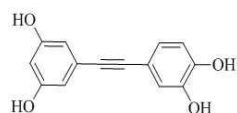
<화학식 22>



<화학식 28>



<화학식 8>



청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-1,2-bis(에톡시메톡시)벤젠은

가) (트리메틸실릴)다이아조메탄을 무수 THF에 넣고 -78 °C에서 교반한 용액에 *n*-BuLi 용액을 한 방울씩 가하고 교반하여 반응 혼합물을 얻는 단계;

나) 상기 반응 혼합물에 4-((*tert*-부틸다이메틸실릴)옥시)-3-메톡시벤즈알데하이드 {4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-methoxybenzaldehyde}의 무수 THF 용액을 한 방울씩 가하고 교반하는 단계; 및

다) 상기 나) 단계 반응 완료 후, 수용성 포화 NH₄Cl 용액을 서서히 가하고, 반응 혼합물은 상온까지 온도를 올려 EtOAc로 추출하는 단계;를 포함하여 생성된 것임을 특징으로 하는 피스아타놀 유도체 제조방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서,

상기 1-브로모-3,5-다이(에톡시메톡시)벤젠은

가) 5-브로모레소르시놀을 무수 DMF에서 교반한 용액에 K_2CO_3 를 가하고 상온에서 교반하여 현탁액을 얻는 단계;

나) 클로로메틸에틸에테르를 상기 현탁액에 서서히 가하고 교반하여 반응시키는 단계;

다) 상기 나) 단계의 반응 완료 후 반응물을 여과하여 여과물을 에테르로 씻는 단계;

라) H_2O 를 세척한 여과물에 가하여 수용액층과 유기용매층을 분리하는 단계;

마) 상기 수용액층은 에테르로 추출하는 단계; 및

바) 상기 유기용매층은 H_2O 및 식염수 중 1종 이상으로 씻는 단계;를 통하여 얻은 것임을 특징으로 하는 피스아타놀 유도체 제조방법.

청구항 12

N-(3,4-다이하이드록시페닐)-3,5-다이하이드록시벤즈아마이드, 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-1,2-다이메톡시벤젠, 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-2-메톡시페놀, 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)벤젠-1,2-다이올 및 4-((3,5-다이하이드록시페닐)에티닐)벤젠-1,2-다이올 중 1종 이상의 피스아타놀 유도체를 포함하는 항염증 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피스아타놀 유도체 합성방법 및 피스아타놀 유도체를 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자연에서 생성되는 폴리페놀 트랜스-스틸베노이드 화합물은 지난 수년간 전 지구적으로 상당한 관심을 끌어왔는데, 이는 다양한 종양, 바이러스 감염, 중앙신경계 질환, 당뇨 및 심혈관계 질환 제어에 효과를 나타내는 등 생물학적으로 유용한 활성을 나타내기 때문이다. 레스베라트롤 (화합물 1)과 피스아타놀 (화합물 2)는 트랜스-스틸베노이드 패밀리에 속하는 대표적인 화합물들이다 (도 1).

[0003] 레스베라트롤은 포도, 베리 및 땅콩을 비롯한 70여개 식물에서 발견되는 피토알렉신 (phytoalexin)이다 [1]. 화합물 1의 생물학적 활성은 종래 문헌에 잘 설명되어 있다 [2]. 피스아타놀 (Piceatannol) {(*E*)-3,3',4,5'-tetrahydroxystilbene} (화합물 2) 또한 피토알렉신이며 C3'-하이드록실화된 레스베라트롤 유사체이고, 병원성 물질 및 스트레스 조건 하에서 반응하여 생성되어 포도, 사탕수수, 베리 및 땅콩에 낮은 함량으로 포함되어 있다 [3]. 피스아타놀 (화합물 2)은 항산화, 항염증, 항암, 항당뇨, 항노화 및 심장보호활성을 포함하여 다양한 약리학적 특성을 나타내는 것으로 알려져 있다 [4]. 사람 간 마이크로솜에서 항암제인 화합물 1은 CYP1B1 및 CYP1A2와 같은 사이토크롬 P450s에 의하여 화합물 2로 전환된다는 것이 알려져 있다 [5]. 피스아타놀은 레스베라트롤보다 더 우수한 항산화 활성을 나타내는데, 이는 카테콜 모티프를 포함하는 화합물이 시험관 내에서 세포 독성이 높고 항산화 활성이 높기 때문이다 [6].

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Sobolev, V. S.; Cole, R. J. J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 1435.

(비특허문헌 0002) Keylor, M. H.; Matsuura, B. S.; Stephenson, C. R. J. Chem. Rev. 2015, 115, 8976.

(비특허문헌 0003) (a) Rimando, A. M.; Kalt, W.; Magee, J. B.; Dewey, J.; Ballington, J. J. Agr. Food Chem. 2004, 52, 4713. (b) Brinker, A.M.; Seigler, D. S. Phytochemistry 1991, 30, 3229. (c) Cantos, E.; Espin, J. C.; Fernandez, M. J.; Oliva, J.; Tomas-Barberan, F. A. J. Agr. Food Chem. 2003, 51, 1208. (d) Bavaresco, L.; Vezzulli, S.; Battilani, P.; Giorni, P.; Pietri, A.; Bertuzzi, T. J. Agr. Food

Chem. 2003, 51, 6151.

(비특허문헌 0004) (a) Piotrowska, H.; Kucinska, M.; Murias, M. *Mutat. Res.* 2011, 750, 60. (b) Son, P. S.; Park, S. A.; Na, H. K.; Jue, D. M.; Kim, S.; Surh, Y.J. *Carcinogenesis* 2010, 31, 1442. (c) Kwon, G. T.; Jung, J. I.; Song, H. R.; Woo, E. Y.; Jun, J.-G.; Kim, J.-K.; Her, S.; Park, J. H. *J. Nutr. Biochem.* 2011, 23, 228. (d) Roupe, K. A.; Remsberg, C. M.; Yanez, J. A.; Davies, N. M. *Curr. Clin. Pharmacol.* 2006, 1, 81.

(비특허문헌 0005) (a) Piver, B.; Fer, M.; Vitrac, X.; Merillon, J. M.; Dreano, Y.; Berthou, F.; Lucas, D. *Biochem. Pharmacol.* 2004, 68, 773. (b) Potter, G. A.; Patterson, L. H.; Wanogho, E.; Perry, P. J.; Butler, P. C.; Ijaz, T.; Ruparelia, K. C.; Lamb, J. H.; Farmer, P. B.; Stanley, L. A.; Burke, M. D. *Br. J. Cancer* 2002, 86, 774. (c) Mikstacka, R.; Rimando, A. M.; Szalaty, K.; Stasik, K.; Baer-Dubowska, W. *Xenobiotica* 2006, 36, 269.

(비특허문헌 0006) (a) Cai, Y. I.; Wei, Q. Y.; Fang, J. G.; Yang, L.; Liu, Z. L.; Wyche, J. H.; Han, Z. *Anticancer Res.* 2004, 24, 999. (b) Visioli, F.; Galli, C. J. *Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4292.

(비특허문헌 0007) (a) Seo, Y. H.; Kim, J.-K.; Jun, J.-G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24, 5727. (b) Seo, Y. H.; Damodar, K.; Kim, J.-K.; Jun, J.-G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, 57(3), 1183-1186. (c) Damodar, K.; Kim, J.-K.; Jun, J.-G. *Tetrahedron Lett.* 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.02.006>.

(비특허문헌 0008) Han, S. Y.; Lee, H. S.; Choi, D. H.; Hwang, J. W.; Yang, D. M.; Jun, J.-G. *Synth. Commun.* 2009, 39, 1425.

(비특허문헌 0009) (a) Horner, L.; Hoffmann, H. M. R.; Wippel, H. G. *Ber.* 1958, 91, 61. (b) Wadsworth W. S., Emmons W. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1961, 83, 1733. (c) Bisceglia, J. A.; Orelli, L. R. *Curr. Org. Chem.* 2012, 16, 2206.

(비특허문헌 0010) (a) Colvin, E. W.; Hamill, B. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1973, 151. (b) Habrant, D.; Rauhala, V.; Koskinen, A. M. *P. Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 2007.

(비특허문헌 0011) (a) Sonogashira, K. *J. Organomet. Chem.* 2002, 653, 46. (b) Thomas, A. M.; Sujatha, A.; Anilkumar, G. *RSC Adv.* 2014, 4, 21688.

(비특허문헌 0012) Quintans, J. *Immunol. Cell Biol.* 1994, 72, 262.

(비특허문헌 0013) (a) Duncan, A. J.; Heales, S. J. *Mol. Aspects Med.* 2005, 26, 67-96. (b) Bian, K.; Murad, F. *Front. Biosci.* 2003, 8, d264.

(비특허문헌 0014) (a) Chen, B.; Stout, R.; Campbell, W. F. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996, 14, 109. (b) Salerno, L.; Sorrenti, V.; Di Giacomo, C.; Romeo, G.; Siracusa, M. A. *Curr. Pharm. Des.* 2002, 8, 177. (c) Ueda, S.; Terauchi, H.; Yano, A.; Ido, M.; Matsumoto, M.; Kawasaki, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 313.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

본 발명은 피스아타놀 유도체를 효율적으로 합성하는 방법을 제공하고, 합성된 피스아타놀 유도체의 생물 활성을 확인하려는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0006]

본 발명의 피스아타놀 유도체 (화합물 4~8) 합성방법은 도 2와 도 3에 나타내었다. 합성은 3,4-다이하이드록시벤즈알데하이드 (화합물 9)의 벤질화로 시작한다. 다음으로, 3,5-다이하이드록시벤조익산 (화합물 11)이 포스포네이트 (화합물 12)로 전화되었다 [8]. 테트라하이드로퓨란 (THF) 내에서 화합물 10과 화합물 12의 비티그-호너 반응 (Wittig-Horner reaction)으로 (E)-스틸벤 화합물 13이 97% 수율로 생성되었다. 벤질기 탈보호기화는

BBr₃/촉매용 아스코빅산 시스템을 이용하여 수행하였고, 그 결과 32% 수율로 피스아타놀 (화합물 2)을 얻었다. 10% Pd/C (용매는 MeOH)를 이용하여 수소 분위기 하에서 화합물 13의 올레핀 결합 환원 및 벤질기 탈보호기화로 피스아타놀 유도체 화합물 3을 64% 수율로 얻었다. 피스아타놀 아마이드 유도체 (화합물 4)는 커플링제로 HATU {1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate}를 이용하여 4-나이트로벤젠-1,2-다이올 (화합물 14)로부터 얻은 4-아미노벤젠-1,2-다이올 하이드로클로라이드 (화합물 15)와 화합물 11을 커플링 반응하여 얻었다.

[0007] 다음으로, 피스아타놀의 알킨 유도체 (화합물 5~8) 합성은 비닐린 (화합물 16)을 그의 TBS (*tert*-butyldimethylsilyl)-보호기화 화합물인 화합물 17로 전환시키는 반응에서부터 시작하였다. 화합물 9와 5-브로모레소르시놀 (화합물 19)을 DIPEA (diisopropylethylamine) (화합물 9 반응시 넣음) 또는 K₂CO₃ (화합물 19 반응시 넣음) 존재 하에서 EOM-Cl (chloromethyl ethyl ether)로 처리하여 각각 EOM기로 보호되는 화합물 18과 화합물 20을 얻었다. 3,4-다이메톡시벤즈알데하이드 (화합물 21), 화합물 17 및 화합물 18을 콜빈 재배열 반응하여 각각 해당 알킨 화합물 22~24를 상당한 수율로 얻었다. 그 이후, 1-브로모-3,5-다이메톡시벤젠 (화합물 25)과 알킨 화합물 22~24 및 화합물 20과 화합물 24를 DMF (*N,N*-dimethylformamide) 내에서 PdCl₂(PPh₃)₂/CuI/Et₃N 시스템을 이용하여 소노가시라 커플링 반응하여 해당 다이아릴알킨 화합물 5와 화합물 26~28을 얻었다. 화합물 26의 TBS기 탈보호기화는 THF 용매 내에서 TBAF (tetrabutylammonium fluoride)를 이용하여 수행하여 94% 수율로 화합물 6을 얻었다. 마지막으로 EOM-보호기화된 다이아릴알킨 화합물 27과 28을 상온에서 과량의 Dowex® 수지로 처리하여 각각 EOM기가 없는 피스아타놀 유도체 화합물 7과 8을 얻었다. 모든 목표 화합물 2~8은 NMR (¹H 및 ¹³C)과 질량분석 데이터를 보고 확인하였다.

[0009] 항염증 활성

[0010] 염증반응은 조직(세포)이 손상되거나 외부감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)에 노출되었을 때 국소 혈관과 체액에 존재하는 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 체액침윤, 세포 이동, 조직 파괴, 홍반, 부종 발열 통증 등이 나타나는 것을 말한다. 이 과정에서 활성화된 염증세포들 (호중구, 호산구, 단핵 식균세포 및 대식세포)은 산화질소, 프로스타글란딘, 인터류킨 (IL)-1β, IL-6 및 종양괴사인자 (tumor necrosis factor; TNF)와 같은 사이토카인을 분비한다.

[0011] 이들 중 가장 두드러진 것은 산화질소이며, 이는 세 종류의 NOS (nitric oxide synthase) 효소에 의해 L-아르기닌으로부터 생성되는 작고, 친지방성이며, 일시적인 프리라디칼종이다. 상기 세 종류의 NOS로는 내피세포 NOS (eNOS), 신경 NOS (nNOS) (이 두 가지 NOS는 지속적으로 발현됨) 및 유도성 NOS (iNOS)가 있다.

[0012] 과량의 산화질소는 염증, 천식, 암, 뇌졸중 및 신경퇴화질환을 일으킨다 [13]. 따라서, 과량의 NO 생산을 제어하면 항염증 효과를 나타낼 수 있다.

[0013] 유도된 대식세포에 의하여 iNOS에 의해 매개되는 NO 생성의 저해에 미치는 화합물 2~8의 영향을 모니터링하였다 (표 1). LPS (Lipopolysaccharide)로 처리된 RAW264.7 세포는 iNOS의 활성화를 통해 NO 생성을 촉진하는데 이용하였고, L-NMMA (*N*^G-monomethyl-L-arginine acetate)는 양성 대조군으로 이용하였다 [14]. 이 실험에서, 세 종류의 화합물 즉, 화합물 6, 7과 8은 10 μM에서 유의미한 활성을 나타냈다. 일곱 개의 화합물 중에서, 최대저해활성은 화합물 7 (90.1% 저해)이 나타내었고, 그 다음으로는 화합물 8 (60.8%), 화합물 6 (55.2%) 순이었다.

[0014] 10 μM 농도에서 세포 생존율은 표 2와 같이 세포독성을 나타내지 않은 화합물들에 의해서 영향을 받지 않았다. 화합물 2~8의 IC₅₀ 값은 GraphPad Prism 4.0 소프트웨어를 이용하여 평가하였으며, 그 결과 각각 69.65, 66.70, 140.20, 23.38, 20.10, 4.59 및 45.65 μM을 나타내었다 (표 2). 이러한 결과를 볼 때 최소한 하나의 -OH기를 갖는 화합물 2의 다이아릴알킨 유도체들 즉, 화합물 6~8은 세포독성 없이 강한 항염증 활성을 나타내었다.

[0015] 결론적으로, 본 발명자들은 비티그-호너 반응, 콜빈 재배열 반응 및 소노가시라 반응을 이용하여 피스아타놀 유도체를 효율적으로 합성하였고, 이 화합물들의 항염증 효과를 LPS로 유도한 RAW264.7 대식세포에서 확인하였다. 그 결과, 화합물 6, 7 및 8이 10 μM 농도에서 현저한 항염증 활성을 나타내며, 최대 활성은 화합물 7 (90.1%), 그 다음은 화합물 8 (60.8%) 및 화합물 6 (55.2%) 순이었고, 세포독성은 없었다.

[0017] 본 발명의 피스아타놀 유도체 (화합물 4~8) 중 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 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, 탠크, 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)를 첨가한, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0018] 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.

[0019] 나아가, 본 발명은 상기 피스아타놀 유도체 (화합물 4~8)를 유효성분으로 하고 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아토피, 피부소양증과 같은 피부염증을 비롯한 염증질환의 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0020] 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

[0021] 위와 같이, 본 발명에 의하면 피스아타놀 유도체를 효율적으로 합성할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명에 의하면 합성된 피스아타놀 유도체들은 높은 항염증 활성을 나타내어 항염증 약학 조성물로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 레스베라트롤 (화합물 1), 피스아타놀 (화합물 2) 및 피스아타놀 유도체 (화합물 3~8)의 화학구조식이다.

도 2는 본 발명에 의한 피스아타놀 (화합물 2)과 그 유도체 화합물 3 및 4의 합성방법을 나타낸다.

도 3은 본 발명에 의한 피스아타놀 유도체 화합물 5~8의 합성방법을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정된 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0026] 모든 화학제품은 특별한 언급이 없는 한 구입한 그대로 정제하지 않고 사용하였다. 반응에 사용된 모든 용매는 질소 가스 하에서 적절한 탈수제로 증류하였다. 크로마토그래피에 사용한 모든 용매는 구입하여 별도의 정제 없이 바로 사용하였다. ¹H-NMR 스펙트럼은 Varian Mercury에 300 MHz FT-NMR 및 ¹³C에 대해서는 75 MHz로 기록하였고, 화학적 이동 (δ)은 TMS에 대하여 ppm (parts per million)로 나타내었고, CDCl₃/CD₃OD/CD₃COCD₃는 용매 및 내부 스탠다드로 이용하였다. 질량 스펙트럼은 Agilent-5977E spectrometer를 이용하여 기록하였다. 녹는점은 MEL-TEMP II 장치에서 측정하고, 보정하지 않았다. 박막 크로마토그래피 (TLC)는 DC-Plastikfolien 60, F₂₅₄ (Merck, 층 두께 0.2 mm) 플라스틱 판에 실리카겔을 입힌 플레이트를 이용하였고, UV (254 nm)를 이용하여 관찰하거나 또는 p-아니스알데하이드와 포스포몰리브딕산 (PMA)으로 염색하여 관찰하였다. 크로마토그래피 정제는

Kieselgel 60 (60-120 mesh, Merck)을 이용하여 수행하였다.

[0028] **3,4-다이벤질옥시벤즈알데하이드 (3,4-Dibenzylloxybenzaldehyde) (화합물 10)**

[0029] 3,4-다이하이드록시벤즈알데하이드 (화합물 9) (1.0g, 7.24 mmol)와 K_2CO_3 (4.302g, 31.13mmol)를 DMF (18mL)에 넣고 교반한 현탁액에 벤질 브로마이드 (2.58mL, 21.72mmol)를 상온에서 한 방울씩 가하였다. 혼합물은 80℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 상온으로 식히고, Celite® 패드로 여과한 후 에테르 (50 mL)로 씻었다. H_2O (20mL)를 여과물에 가하고 두 층을 분리하였다. 수용액층은 에테르 (2x60mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H_2O (3x50mL), 식염수 (2x50mL)로 씻고, 무수 Na_2SO_4 로 건조한 후 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc:Hexane=1:1)로 정제하여 순수한 화합물 10 (2.14g, 93%)을 얻었다. 수율: 93%; R_f =0.53 (EtOAc:Hexane=1:5); 녹는점 89-91 °C; 1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ 9.81 (1H, s), 7.49-7.27 (12H, m), 7.03 (1H, d, J = 8.1 Hz), 5.28 (2H, s), 5.23 (2H, s); ^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ 190.6, 154.0, 149.0, 136.4, 136.1, 130.1, 128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 127.2, 126.9, 126.6, 112.9, 112.1, 70.9, 70.8.

[0031] **트랜스-3,3',4,5'-테트라벤질옥시스티렌 (*trans*-3,3',4,5'-Tetrabenzyl oxystilbene) (화합물 13)**

[0032] NaH (0.018 g, 0.77 mmol)를 무수 THF (2 mL)에 넣고 교반한 현탁액에 0 °C에서 화합물 12 (0.1 g, 0.23 mmol)의 무수 THF (2 mL) 용액을 한 방울씩 가하고 30분간 교반하였다. 화합물 10 (0.067 g, 0.21 mmol)의 무수 THF (4 mL) 용액을 상기 용액에 한 방울씩 가하고, 혼합물은 한 시간 동안 환류하였다. 반응 완료 후, 0 °C로 식히고 얼음물로 반응을 멈추었다. 혼합물은 EtOAc (2x25mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 식염수 (2x20mL)로 씻고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc:Hexane=1:5)로 정제하여 연노란색 고체 화합물 13 (0.123g, 97%)을 얻었다. R_f =0.55 (EtOAc:Hexane=1:3); 녹는점 155-157 °C; 1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ 7.51-7.32 (20H, m), 7.13 (1H, d, J = 1.5 Hz), 7.02 (1H, dd, J = 8.4, 1.5 Hz), 6.97 (1H, d, J = 16.5 Hz), 6.92 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.83 (1H, d, J = 16.5 Hz), 6.74 (2H, d, J = 2.1Hz), 6.55 (1H, t, J = 2.1 Hz), 5.23 (2H, s), 5.21 (2H, s), 5.08 (4H, s).

[0034] **트랜스-3,3',4,5'-테트라하이드록시스티렌 (*trans*-3,3',4,5'-Tetra hydroxystilbene) (피스아타놀, piceatannol) (화합물 2)**

[0035] 화합물 13 (0.079g, 0.13 mmol)과 촉매로서 아스코빅산 (0.002g, 0.01 mmol)을 무수 CH_2Cl_2 (2mL) 내에서 교반한 용액에 BBr_3 (CH_2Cl_2 에 용해한 1.0M 용액, 0.52mmol)를 한 방울씩 -20 °C에서 가하고 이 온도로 한 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물은 상온이 되도록 하고 두 시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 0 °C로 식히고 H_2O (2mL)를 서서히 가하였다. 혼합물은 EtOAc (2x20mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 식염수 (2x10mL)로 씻고, 무수 Na_2SO_4 로 건조한 후 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 :MeOH=10:1)로 정제하여 연노란색 고체인 정제된 화합물 2 (0.01 g, 32%)를 얻었다. R_f =0.81 (CH_2Cl_2 :MeOH=4:1); 녹는점 227-229 °C; 1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 6.85 (1H, d, J = 2.4 Hz), 6.78 (1H, d, J = 15.9 Hz), 6.72 (1H, dd, J = 8.4, 2.4 Hz), 6.62 (1H, d, J = 15.9 Hz), 6.61 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.31 (2H, d, J = 2.4 Hz), 6.03 (1H, t, J = 2.4 Hz); ^{13}C NMR (75MHz, CD_3OD) δ 159.5, 146.4, 146.3, 141.1, 103.9, 129.5, 126.8, 120.0, 116.3, 113.7, 105.6, 102.5; EI-MS m/z 244 (M^+), 227, 149 (base).

[0037] **4-(3,5-다이하이드록시페네틸)벤젠-1,2-다이올 {4-(3,5-Dihydroxy phenethyl)benzene-1,2-diol} (화합물 3)**

[0038] 화합물 13 (0.302 g, 0.50 mmol)을 MeOH (5 mL)에서 교반한 용액에 10% Pd/C (0.150 g)를 가하고 상온에서 밤

새 수소 1기압 하에서 수소화 반응을 진행하였다. 혼합물은 Celite® 패드로 여과하고, 여과물은 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc:Hexane=1:3)로 정제하여 연노란색 고체 화합물 3 (0.079 g, 64%)을 얻었다. $R_f=0.23$ (EtOAc:Hexane=1:1); 녹는점 151-153 °C; ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 6.58 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.54 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.41 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz), 6.06 (2H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.02 (1H, t, $J = 1.8$ Hz), 2.67 (4H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CD_3OD) δ 159.0, 145.8, 145.5, 144.0, 134.8, 120.5, 116.4, 116.1, 107.9, 101.0, 39.6, 38.3; EI-MS m/z 246 (M^+), 179, 123 (base).

[0040] **4-아미노벤젠-1,2-다이올 하이드로클로라이드 (4-Aminobenzene-1,2-diol hydrochloride) (화합물 15)**

[0041] 4-나이트로벤젠-1,2-다이올, 화합물 14 (0.079 g, 0.51 mmol)를 MeOH (5 mL)에서 교반한 용액에 10% Pd/C (palladium on carbon) (0.08 g)를 가하고 상온에서 밤새 수소 1기압 하에서 수소화 반응을 진행하였다. 혼합물은 Celite® 패드로 여과하고, 여과물은 진공농축하였다. 조화합물은 다이에틸에테르 (6 mL)에 용해하고 HCl 기체로 15분간 거품이 일도록 하였다. 용매는 감압하여 제거하고 화합물 15 (0.063 g, 77%)를 얻었으며, 이것은 더 정제하지 않고 다음 반응에 이용하였다. ^1H NMR (300MHz, D_2O) δ 6.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.70 (1H, s), 6.61 (1H, d, $J = 8.4$ Hz); ^{13}C NMR (75MHz, D_2O) δ 144.9, 144.5, 122.1, 116.6, 115.1, 110.9.

[0043] ***N*-(3,4-다이하이드록시페닐)-3,5-다이하이드록시벤즈아마이드 {*N*-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxybenzamide} (화합물 4)**

[0044] 화합물 15 (0.050 g, 0.31 mmol)를 무수 DMF (4 mL)에 넣고 교반한 용액에 트리에틸아민 (45 μL , 0.32 mmol)을 상온에서 한 방울씩 15분간 가하였다. 3,5-다이하이드록시벤조익산, 화합물 11 (0.048 g, 0.31 mmol)을 무수 DMF (4 mL)에 넣고 교반한 용액에 HATU {1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate} (0.126 g, 0.33 mmol)를 가하고 상온에서 15분간 교반하였다. 이 용액에 상기 용액에 함유된 화합물 15를 주사바늘로 천천히 가하고, 얻어진 혼합물은 12시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 용매는 진공 하에서 제거하고 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 :MeOH=10:1)로 정제하여 연황색 시럽 모양의 화합물 4 (0.027 g, 33 %)를 얻었다. $R_f=0.17$ (CH_2Cl_2 :MeOH=5:1); ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 7.17(1H,t, $J = 1.5$ Hz), 6.84 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz), 6.74 (2H, d, $J = 1.5$ Hz), 6.70 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.40 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 3.32 (1H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CD_3OD) δ 168.7, 159.6, 146.0, 143.4, 138.4, 131.8, 115.9, 114.2, 110.8, 106.8, 106.5; EI-MS m/z 261 (M^+), 223, 149 (base).

[0046] **4-((*tert*-부틸다이메틸실릴)옥시)-3-메톡시벤즈알데하이드 {4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-methoxybenzaldehyde} (화합물 17)**

[0047] 이미다졸 (0.179 g, 2.63 mmol)을 무수 DMF (4 mL)에서 교반한 용액에 TBDMS-Cl (0.396 g, 2.63 mmol)을 가하고 상온에서 30분간 교반하였다. 4-하이드록시-3-메톡시벤즈알데하이드, 화합물 16 (0.2 g, 1.31 mmol)의 무수 DMF (3 mL) 용액을 상기 혼합물에 서서히 가하고 8시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 진공 하에서 용매를 제거하고 H_2O (10mL)를 가하여 CH_2Cl_2 (2x30mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 식염수 (2x30mL)로 씻고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc:Hexane=1:9)로 정제하여 연황색 액체인 순수한 화합물 17 (0.291 g, 83%)을 얻었다. $R_f=0.33$ (EtOAc:Hexane=1:8); ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.82 (1H, s), 7.39 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.35 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz), 6.95 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 3.86 (3H, s), 1.00 (9H, s), 0.20 (6H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 190.7, 151.4, 151.1, 130.7, 126.1, 120.5, 109.9, 55.3, 25.6, 18.5, -4.5.

[0049] **3,4-다이(에톡시메톡시)벤즈알데하이드 {3,4-Di(ethoxymethoxy) benzaldehyde} (화합물 18)**

[0050] 3,4-다이하이드록시벤즈알데하이드, 화합물 9 (0.2 g, 1.45 mmol)를 무수 CH_2Cl_2 (6mL)에 넣고 교반한 용액에 다이아이소프로필에틸아민 (DIPEA, 1.26mL, 7.24mmol)을 가하고 상온에서 10분간 교반하였다. 클로로메틸에틸에테르 (0.4mL, 4.34mmol)를 상기 용액에 서서히 가하고 12시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, H_2O (10mL)를 가하고 두 층을 분리하였다. 수용액 층은 CH_2Cl_2 (2x30mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 식염수 (2x30mL)로 씻고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 ($\text{EtOAc}:\text{Hexane}=1:7$)로 정제하여 무색 고체인 정제된 화합물 18 (0.324 g, 88 %)을 얻었다. $R_f=0.66$ ($\text{EtOAc}:\text{Hexane}=1:1$); 녹는점 41-43 °C; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.87 (1H, s), 7.70 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.52 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz), 7.32 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 5.38 (2H, s), 5.35 (2H, s), 3.79 (2H, q, $J = 6.9$ Hz), 3.78 (2H, q, $J = 6.9$ Hz), 1.25 (3H, t, $J = 6.9$ Hz), 1.24 (3H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 190.7, 152.6, 147.4, 130.9, 126.1, 115.8, 115.2, 94.0, 93.6, 64.8, 64.7, 15.2.

[0052] **1-브로모-3,5-다이(에톡시메톡시)벤젠 {1-Bromo-3,5-di(ethoxymethoxy) benzene} (화합물 20)**

[0053] 5-브로모레소르시놀 (화합물 19) (0.6 g, 3.17 mmol)를 무수 DMF (15 mL)에서 교반한 용액에 K_2CO_3 (2.63g, 19.05mmol)를 가하고 상온에서 30분간 교반하였다. 클로로메틸에틸에테르 (1.18mL, 12.70mmol)를 상기 현탁액에 서서히 가하고, 혼합물은 12시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, Celite® 패드로 여과하고 여과물은 에테르 (30mL)로 씻었다. H_2O (20mL)를 여과물에 가하고 두 층을 분리하였다. 수용액층은 에테르 (2x30mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H_2O (3x30mL), 식염수 (2x30mL)로 씻고, 무수 Na_2SO_4 로 건조한 후 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 ($\text{EtOAc}:\text{Hexane}=1:10$)로 정제하여 연노란색 액체인 정제된 화합물 20 (0.61 g, 63 %)을 얻었다. $R_f=0.77$ ($\text{EtOAc}:\text{Hexane}=1:1$); ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 6.88 (2H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.68 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 5.19 (4H, s), 3.73 (4H, q, $J = 6.9$ Hz), 1.25 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 158.7, 122.6, 113.1, 103.9, 93.2, 64.5, 15.2.

[0055] **콜빈 재배열 (Colvin rearrangement) 반응의 일반적 절차**

[0056] (트리메틸실릴)다이아조메탄 (TMSCHN_2 , 다이에틸에테르 내 2.0 M 용액, 3 mL, 6.00 mmol)을 무수 THF (6 mL)에 넣고 -78 °C에서 교반한 용액에 *n*-BuLi (사이클로헥산 내 2.0 M 용액, 2.73 ml, 5.45 mmol)를 한 방울씩 가하고 30분간 교반하였다. 여기에 3,4-두 개 작용기가 치환된 알데하이드 (3.00 mmol)의 무수 THF (4 mL) 용액을 한 방울씩 가하고 한 시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 수용성 포화 NH_4Cl 용액 (2mL)을 서서히 가하고, 반응 혼합물은 상온까지 온도를 올렸다. 반응 혼합물은 EtOAc (2x30mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 식염수 (2x25mL)로 씻고, 무수 Na_2SO_4 로 건조한 후 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 ($\text{EtOAc}:\text{Hexane}=1:8 - 1:7$)로 정제하여 순수한 알킨 화합물을 얻었다.

[0058] **4-에티닐-1,2-다이메톡시벤젠 (4-Ethynyl-1,2-dimethoxybenzene) (화합물 22)**

[0059] 수율: 83%; $R_f=0.53$ ($\text{EtOAc}:\text{Hexane}=1:1$); 백색 고체; 녹는점 68-70 °C; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.07 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 3.85 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.01 (1H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 149.5, 148.3, 125.2, 114.4, 113.9, 110.7, 77.4, 76.6, 55.7, 55.5.

[0061] ***tert*-부틸(4-에티닐-2-메톡시페녹시)다이메틸실란 {*tert*-Butyl(4-ethynyl-2-methoxyphenoxy)dimethylsilane}**

(화합물 23)

[0062] 수율: 53%; R_f =0.67 (EtOAc:Hexane=1:7); 연황색 액체; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.01 (1H, dd, J = 8.4, 2.1 Hz), 6.99 (1H, d, J = 2.1 Hz), 6.79 (1H, d, J = 8.4 Hz), 3.82 (3H, s), 3.02 (1H, s), 1.01 (9H, s), 0.18 (6H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 150.5, 146.1, 125.3, 120.8, 115.6, 114.9, 83.9, 75.6, 55.5, 25.7, 18.6, -4.5.

[0064] 1,2-다이(에톡시메톡시)-4-에티닐벤젠 {1,2-Di(ethoxymethoxy)-4-ethynylbenzene} (화합물 24)

[0065] 수율: 57%; R_f =0.66 (EtOAc:Hexane=1:1); 연황색 액체; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.0 (1H, s), 6.80 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.79 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.96 (2H, s), 4.95 (2H, s), 3.45 (2H, q, J = 6.6 Hz), 3.44 (2H, q, J = 6.6 Hz), 2.73 (1H, s), 0.92 (3H, t, J = 6.6 Hz), 0.91 (3H, t, J = 6.6 Hz); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 148.0, 146.6, 126.5, 119.9, 115.8, 115.5, 93.9, 93.7, 83.4, 75.9, 64.4, 15.1.

[0067] 소노가시라 커플링 반응 (Sonogashira coupling)의 일반적 절차

[0068] 3,4-두 작용기가 치환된 아릴 아세틸렌 (0.5 mmol), 화합물 25 (0.12 g, 0.55 mmol)와 트리에틸아민 (0.7 mL, 5.00 mmol)을 무수 DMF (3 mL) 내에서, 환류 응축기에 고정된 10 mL의 목이 두 개인 둥근 바닥 플라스크에 넣고 교반한 용액에 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0.018 g, 5 mmol%)와 CuI (0.004 g, 3.5 mmol%)를 상온에서 가하고 2분간 가스를 제거하였다. 반응 혼합물은 10분간 교반하고, 80 °C로 올려 8시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 상온으로 식히고, 용매는 감압하여 제거하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc:Hexane=1:20-1:7)로 정제하여 순수한 다이아릴알킨 화합물을 얻었다 [주: 화합물 28 합성에는 화합물 25 대신 화합물 20을 사용하였다].

[0070] 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-1,2-다이메톡시벤젠 {4-((3,5-Dimethoxyphenyl)ethynyl)-1,2-dimethoxybenzene} (화합물 5)

[0071] 수율: 61%; R_f =0.61 (EtOAc:Hexane=1:2); 연황색 고체; 녹는점 96-98 °C; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.13(1H, dd, J = 8.4, 1.5 Hz), 7.03 (1H, d, J = 1.5 Hz), 6.82 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.68 (2H, d, J = 2.1 Hz), 6.44 (1H, t, J = 2.1 Hz), 3.90 (6H, s), 3.80 (6H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 160.3, 149.4, 148.4, 124.8, 124.6, 115.1, 114.2, 110.9, 109.1, 101.5, 89.0, 87.9, 55.9, 55.8, 55.4; EI-MS m/z 298 (M^+ , base), 283, 183.

[0073] *tert*-부틸(4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-2-메톡시페녹시)다이메틸실란 {*tert*-Butyl(4-((3,5-dimethoxyphenyl)ethynyl)-2-methoxyphenoxy) dimethyl silane} (화합물 26)

[0074] 수율: 66%; R_f =0.27 (EtOAc:Hexane=1:20); 연황색 액체; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.07 (1H, d, J = 1.8 Hz), 7.00 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz), 6.81 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.63 (2H, d, J = 1.8 Hz), 6.47 (1H, t, J = 1.8 Hz), 3.82 (3H, s), 3.78 (6H, s), 1.01 (9H, s), 0.18 (6H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 162.0, 152.0, 146.9, 126.1, 125.7, 121.8, 117.7, 116.2, 110.1, 102.1, 89.9, 88.7, 56.0, 55.9, 26.2, 18.3, -4.4.

[0076] 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-1,2-bis(에톡시메톡시)벤젠 {4-((3,5-Dimethoxyphenyl)ethynyl)-1,2-bis(ethoxymethoxy)benzene} (화합물 27)

[0077] 수율: 61%; $R_f=0.73$ (EtOAc:Hexane=1:1); 연황색 액체; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.34 (1H, s), 7.14 (2H, brs), 6.67 (2H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.43 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 5.29 (4H, s), 3.80 (6H, s), 3.77 (2H, q, $J = 6.9$ Hz), 3.76 (2H, q, $J = 6.9$ Hz), 1.25 (3H, t, $J = 6.9$ Hz), 1.23 (3H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 160.3, 147.7, 146.8, 126.1, 124.6, 119.4, 116.7, 116.1, 109.1, 101.6, 94.0, 93.9, 88.8, 88.2, 64.5, 64.4, 55.4, 15.2.

[0079] 4-((3,5-다이(에톡시메톡시)페닐)에티닐)-1,2-비스(에톡시메톡시)벤젠 {4-((3,5-Di(ethoxymethoxy)phenyl)ethynyl)-1,2-bis(ethoxymethoxy)benzene} (화합물 28)

[0080] 수율: 54%; $R_f=0.40$ (EtOAc:Hexane=1:4); ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.25 (1H, brs), 7.08 (1H, brs), 7.07 (1H, brs), 6.80 (2H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.69 (1H, t, $J = 1.8$ Hz), 5.21 (2H, s), 5.20 (2H, s), 5.17 (4H, s), 3.76-3.63 (8H, m), 1.21-1.16 (12H, m); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 159.4, 149.3, 148.3, 127.2, 125.8, 121.1, 117.9, 117.8, 113.4, 106.5, 95.2, 95.0, 94.2, 89.8, 88.9, 65.6, 65.5, 65.3, 15.6, 15.5

[0082] 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)-2-메톡시페놀 {4-((3,5-Dimethoxy phenyl)ethynyl)-2-methoxyphenol} (화합물 6)

[0083] 화합물 26 (0.151 g, 0.38 mmol)을 무수 THF (6 mL) 내에서 교반한 용액에 1.0 M TBAF (Tetrabutyl ammonium fluoride) 용액 (용매는 THF) (0.57 mL, 0.57 mmol)을 서서히 가하고 상온에서 30분간 교반하였다. 반응 완료 후, H_2O (4mL)를 가하고 EtOAc (2x25mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 식염수 (2x20mL)로 씻어 무수 Na_2SO_4 로 건조하여 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc:Hexane=1:7)로 정제하여 연황색 고체인 순수한 화합물 6 (0.10 g, 94%)을 얻었다. $R_f=0.27$ (EtOAc:Hexane=1:4); 녹는점 47-49 °C; ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 7.00 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 6.94 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 6.72 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.72 (2H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.39 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 3.79 (3H, s), 3.70 (6H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CD_3OD) δ 161.9, 148.6, 148.5, 126.2, 126.1, 116.3, 115.7, 115.3, 110.0, 101.9, 90.3, 88.1, 56.4, 55.8; EI-MS m/z 284 (M^+ , base), 241, 183.

[0085] 4-((3,5-다이메톡시페닐)에티닐)벤젠-1,2-다이올 {4-((3,5-Dimethoxy phenyl)ethynyl)benzene-1,2-diol} (화합물 7)

[0086] 화합물 27 (0.1 g, 0.26 mmol)을 무수 MeOH (4 mL) 내에서 교반한 용액에 Dowex[®] 50X2-100 이온교환수지 (0.50 g)를 질소 분위기 하에서 넣고, 혼합물을 상온에서 8시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 수지는 Celite[®] 패드로 여과하고, 여과물은 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc:Hexane=1:3)로 정제하여 연황색 점성 오일인 순수한 화합물 7 (0.045 g, 64%)을 얻었다. $R_f=0.43$ (EtOAc:Hexane=1:1); ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 6.89 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.85 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz), 6.72 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.59 (2H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.43 (1H, t, $J = 1.8$ Hz), 3.76 (6H, s); ^{13}C NMR (75MHz, CD_3OD) δ 161.9, 147.4, 146.1, 126.3, 124.9, 119.2, 116.3, 115.3, 110.0, 101.8, 90.3, 87.7, 55.8; EI-MS m/z 270 (M^+), 223, 149 (base).

[0088] 4-((3,5-다이하이드록시페닐)에티닐)벤젠-1,2-다이올 {4-((3,5-Dihydroxy phenyl)ethynyl)benzene-1,2-diol} (화합물 8)

[0089] 화합물 7 제조에 이용한 절차를 따라 무수 MeOH (4 mL)에 녹인 화합물 28 (0.069 g, 0.15 mmol)과 Dowex[®] 50X2-100 이온교환수지 (0.69 g)를 반응시켜 갈색 고체인 화합물 8 (0.023 g, 62%)을 얻었다. $R_f=0.21$ (EtOAc:Hexane=2:1); 녹는점 236-238 °C; ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 6.83 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 6.79 (1H, dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz), 6.68 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.33 (2H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.19 (1H, t, $J = 2.1$ Hz); ^{13}C NMR (75MHz, CD_3OD) δ 159.2, 147.2, 146.0, 126.1, 124.8, 119.1, 116.3, 115.5, 110.6, 103.9, 89.6, 87.9; EI-MS m/z 256 (M^+), 177, 149(base).

[0091] **항염증 활성 분석: 시약 등**

[0092] 에서리치아 콜라이 (*Escherichia Coli*) 유래 LPS, DMSO (dimethylsulfoxide) 및 β -액틴 항체를 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's 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.

[0094] **세포배양 및 세포생존율 분석**

[0095] RAW264.7 쥐 대식세포는 한국세포은행 (서울, 한국)에서 입수하여 10% 우태혈청, 100 U/mL 페니실린, 100 $\mu\text{g/mL}$ 스트렙토마이신이 함유된 DMEM에서 37 °C, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 세포생존율에 미치는 제조된 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 결정하는데 이용하였다. RAW264.7 세포는 96-웰의 평평한 바닥을 가진 플레이트에 2×10^4 세포 밀도가 되도록 놓고 각 화합물은 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.

[0097] **NO 측정**

[0098] 마우스 대식세포에 의해 생성된 NO의 양은 RAW264.7 세포배양액 상층액에서 측정한 값으로 나타내었다. RAW264.6 세포는 200 μL 의 배양배지가 든 24-웰 세포배양 플레이트에서 5×10^4 세포밀도가 되도록 놓고 12시간 동안 배양하였다. 세포는 500 ng/mL의 LPS 내에서 화합물 2~8을 지시한 농도대로 18시간 동안 처리하였다. 생성된 NO의 양은 Griess reagent system (Promega)을 이용하여 제조자의 지시에 따라 측정하였다.

표 1

Compound	NO Production (% inhibition)	
	1 μ M	10 μ M
Medium (MED)	1.0 $\pm$ 0.1 (99.0)***	1.0 $\pm$ 0.1 (99.0)***
Piceatannol (2)	105.0 $\pm$ 0.6 (-5.0)*	91.9 $\pm$ 1.8 (8.1)***
3	105.3 $\pm$ 2.0 (-5.3)	90.9 $\pm$ 0.4 (9.1)***
4	102.8 $\pm$ 0.4 (-2.8)	88.0 $\pm$ 1.6 (12.0)***
5	116.5 $\pm$ 8.8 (-16.5)***	86.6 $\pm$ 4.4 (13.4)***
6	71.0 $\pm$ 6.6 (29.0)***	44.8 $\pm$ 0.7 (55.2)***
7	66.7 $\pm$ 2.4 (33.3)***	9.9 $\pm$ 0.8 (90.1)***
8	72.9 $\pm$ 7.7 (27.1)***	39.2 $\pm$ 2.4 (60.8)***
L-NMMA	79.1 $\pm$ 4.1 (20.9)	7.6 $\pm$ 4.0 (92.4)***

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 < 0.05, *** P < 0.001).
% Inhibition is based on LPS as shown in parenthesis.

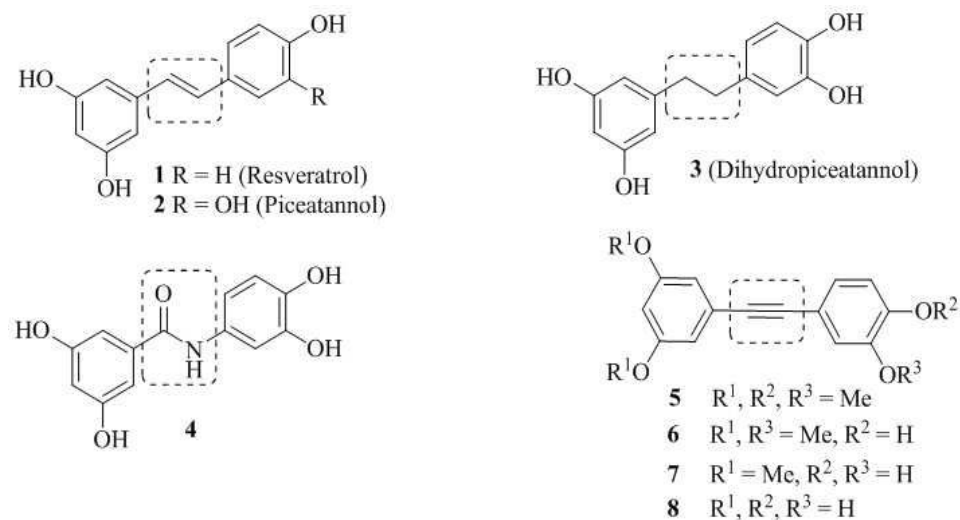
표 2

Compound	Proliferation ^a		IC ₅₀ (μ M)
	1 μ M	10 μ M	
Medium (MED)	100.0 $\pm$ 7.4	100.0 $\pm$ 7.4	
Piceatannol (2)	98.8 $\pm$ 6.9	109.4 $\pm$ 6.1	69.65
3	97.6 $\pm$ 3.3	99.6 $\pm$ 7.3	66.70
4	96.7 $\pm$ 12.8	106.4 $\pm$ 13.1	140.20
5	102.2 $\pm$ 2.6	99.6 $\pm$ 8.3	23.38
6	94.6 $\pm$ 6.3	92.0 $\pm$ 6.4*	20.10
7	95.1 $\pm$ 4.4	92.5 $\pm$ 3.3*	4.59
8	112.1 $\pm$ 5.6	106.4 $\pm$ 5.8	45.65
L-NMMA	98.6 $\pm$ 2.9	97.6 $\pm$ 5.6	2.69

^aThe results are reported as mean value $\pm$ SEM for n=3. Statistical significance is based on the difference when compared with Medium groups (* P < 0.05).

도면

도면1



도면2

