(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0016809
(43) 공개일자 2018년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 41/46 (2006.01) *C07C 43/205* (2006.01)
C07C 43/23 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 41/46 (2013.01)
A61K 31/05 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0100614
(22) 출원일자 2016년08월08일
심사청구일자 2016년08월08일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
전종갑
강원도 춘천시 한림대학길 1, 화학과 (옥천동, 한림대학교)
박형진
강원도 원주시 이화4길 50-14, 3층 (단계동)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 5 항

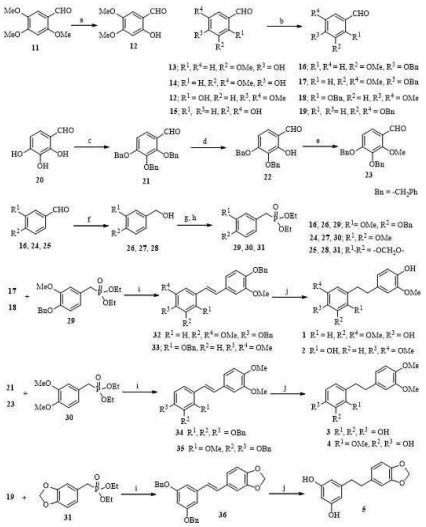
(54) 발명의 명칭 **다이하이드로스틸벤 합성방법 및 이를 포함하는 항염증 약학 조성물**

(57) 요 약

과제: 부작용 없는 효과적인 항염증제를 제공하려는 것.

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

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C07C 43/205 (2013.01)
C07C 43/23 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2009-0094071
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중점연구소사업
연구과제명 중추신경계 질환 치료를 위한 천연물 유래 신소재 개발 및 기전 연구
기 여 율 1/1
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2013.09.01 ~ 2016.03.31

명 세 서

청구범위

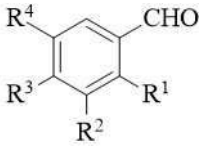
청구항 1

가) 화학식 13으로 표시되는 알데하이드 화합물 12, 13 또는 14에 벤질 브로마이드와 K_2CO_3의 아세톤 용액을 가하여 보호기화하여 화학식 16으로 표시되는 알데하이드 화합물 16, 17 또는 18을 각각 얻는 단계;

나) 상기 알데하이드 화합물 16을 $NaBH_4$로 환원하여 화학식 26으로 표시되는 벤질 알콜 화합물 26을 얻고, 이를 삼브롬화 인산 처리과정 및 트리에틸 아인산염과 크실렌 환류 과정을 거쳐 화학식 29로 표시되는 해당 위티그-호너 화합물 29로 전환하는 단계; 및

다) 상기 가) 단계에서 얻은 화합물 17 또는 18에 상기 나) 단계에서 얻은 화합물 29를 염기로서 NaH 존재 하에 위티그-호너 반응시켜 화학식 32로 표시되는 화합물 32 또는 33을 각각 얻고, 과량의 트리에틸실란과 Pd/C를 가하여 화학식 1로 표시되는 화합물 1 또는 2를 각각 얻는 단계;를 포함하는 다이하이드로스틸벤 합성방법.

<화학식 13>

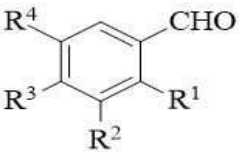


(단, 화합물 13은 R^1,R^4 = H, R^2 = OMe, R^3 = OH,

화합물 14는 R^1 = H, R^2,R^4 = OMe, R^3 = OH,

화합물 12는 R^1 = OH, R^2 = H, R^3,R^4 = OMe임)

<화학식 16>



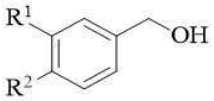
(단, 화합물 16은 R^1,R^4 = H, R^2 = OMe, R^3 = OBn,

화합물 17은 R^1 = H, R^2,R^4 = OMe, R^3 = OBn,

화합물 18은 R^1 = OBn, R^2 = H, R^3,R^4 = OMe,

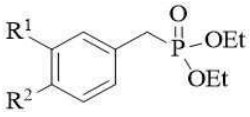
화합물 19는 R^1,R^3 = H, R^2, R^4 = OBn임)

<화학식 26>



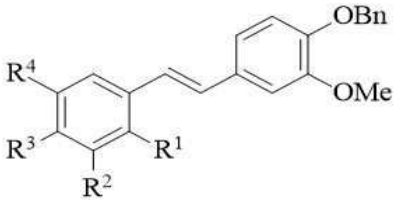
(단, 화합물 26은 R^1 = OMe, R^2 = OBn임)

<화학식 29>



(단, 화합물 29는 R^1 = OMe, R^2 = OBn임)

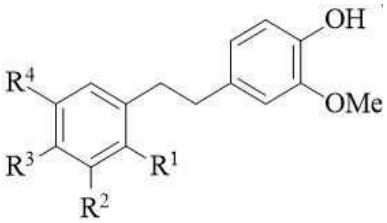
<화학식 32>



(단, 화합물 32는 R^1 = H, R^2,R^4 = OMe, R^3 = OBn,

화합물 33은 R^1 = OBn, R^2 = H, R^3,R^4 = OMe임)

<화학식 1>



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

화합물 2는 R^1 = OH, R^2 = H, R^3,R^4 = OMe임)

청구항 2

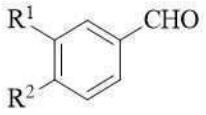
가) 2,3,4-트리하이드록시벤즈알데하이드를 DMF (*N*,*N*-dimethylformamide) 용액 내에서 벤질 브로마이드와 Cs_2CO_3로 처리하고 2,3,4-트리스(벤질옥시)벤즈알데하이드를 얻는 단계;

나) 상기 2,3,4-트리스(벤질옥시)벤즈알데하이드를 $MgBr_2 \cdot Et_2O$를 이용하여 선택적 탈벤질화하고, 얻어진 3,4-비스(벤질옥시)-2-하이드록시벤즈알데하이드는 DMF 용액 내에서 MeI와 K_2CO_3로 처리하여 메틸화하여 3,4-비스(벤질옥시)-2-메톡시벤즈알데하이드를 얻는 단계;

다) 화학식 16'로 표시되는 알데하이드 화합물 24를 $NaBH_4$로 환원하여 화학식 26으로 표시되는 벤질 알콜 화합물 27을 얻고, 이를 삼브롬화 인산 처리과정 및 트리에틸 아인산염과 크실렌 환류 과정을 거쳐 화학식 29로 표시되는 해당 위티그-호너 화합물 30으로 전환하는 단계; 및

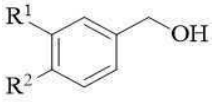
라) 상기 가) 단계에서 얻은 2,3,4-트리스(벤질옥시)벤즈알데하이드 또는 상기 나) 단계에서 얻은 3,4-비스(벤질옥시)-2-메톡시벤즈알데하이드에 상기 다) 단계에서 얻은 화합물 30을 염기로서 NaH 존재 하에 위티그-호너 반응으로 화학식 34로 표시되는 화합물 34 또는 35를 각각 얻고, 과량의 트리에틸실란과 Pd/C를 가하여 화학식 3으로 표시되는 화합물 3 또는 4를 얻는 단계;를 포함하는 다이하이드로스틸벤 합성방법.

<화학식 16'>



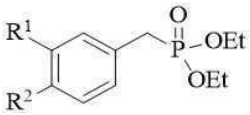
(단, 화합물 24는 R^1,R^2 = OMe임)

<화학식 26>



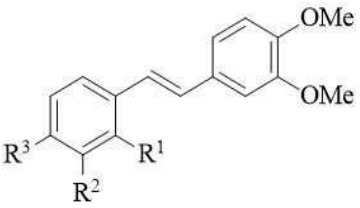
(단, 화합물 27은 R^1,R^2 = OMe임)

<화학식 29>



(단, 화합물 30은 R^1,R^2 = OMe임)

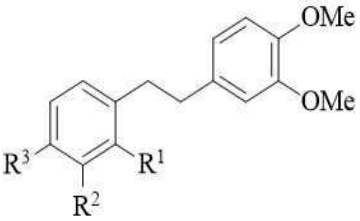
<화학식 34>



(단, 화합물 34는 R^1,R^2,R^3 = OBn,

화합물 35는 R^1 = OMe, R^2,R^3 = OBn임)

<화학식 3>



(단, 화합물 3은 R^1,R^2,R^3 = OH,

화합물 4는 R^1 = OMe, R^2,R^3 = OH임)

청구항 3

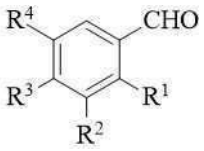
가) 화학식 13으로 표시되는 알데하이드 화합물 15에 벤질 브로마이드와 K_2CO_3의 아세톤 용액을 가하여 보호기화하여 화학식 16으로 표시되는 알데하이드 화합물 19를 얻는 단계;

나) 화학식 16'로 표시되는 알데하이드 화합물 25를 $NaBH_4$로 환원하여 화학식 26으로 표시되는 벤질 알콜 화합

물 28을 얻고, 이를 삼브롬화 인산 처리과정 및 트리에틸 아인산염과 크실렌 환류 과정을 거쳐 화학식 29로 표시되는 해당 위티그-호너 화합물 31로 전환하는 단계; 및

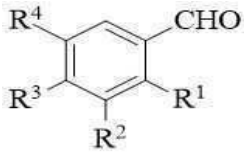
다) 상기 가) 단계에서 얻은 화합물 19에 상기 나) 단계에서 얻은 화합물 31을 염기로서 NaH 존재 하에 위티그-호너 반응하여 화학식 36으로 표시되는 화합물 36을 얻고, 과량의 트리에틸실란과 Pd/C를 가하여 화학식 5로 표시되는 화합물 5를 얻는 단계;를 포함하는 다이하이드로스틸벤 합성방법.

<화학식 13>



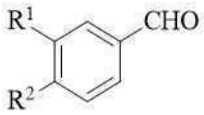
(단, 화합물 15는 R^1,R^3 = H, R^2, R^4 = OH임)

<화학식 16>



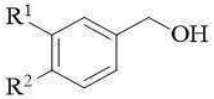
(단, 화합물 19는 R^1,R^3 = H, R^2, R^4 = OBn임)

<화학식 16'>



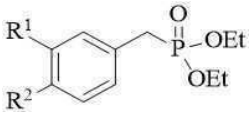
(단, 화합물 25는 R^1,R^2 = $-OCH_2O-$임)

<화학식 26>



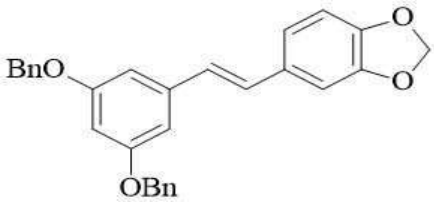
(단, 화합물 28은 R^1,R^2 = $-OCH_2O-$임)

<화학식 29>

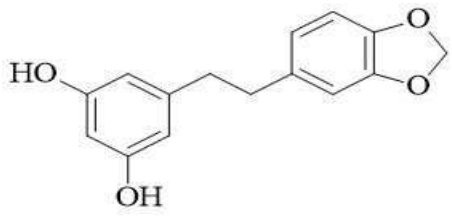


(단, 화합물 31은 R^1,R^2 = $-OCH_2O-$임)

<화학식 36>



<화학식 5>



청구항 4

4-(4-하이드록시-3-메톡시페네틸)-2,6-다이메톡시페놀, 2-(4-하이드록시-3-메톡시페네틸)-4,5-다이메톡시페놀, 4-(3,4-다이메톡시페네틸)벤젠-1,2,3-트리올, 4-(3,4-다이메톡시페네틸)-3-메톡시벤젠-1,2-다이올 및 5-(2-(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)에틸)벤젠-1,3-다이올 중 1종 이상의 다이하이드로스틸벤 화합물을 함유하는 항염증 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

다이하이드로스틸벤으로서 4-(3,4-다이메톡시페네틸)-3-메톡시벤젠-1,2-다이올을 함유하는 항염증 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

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

배 경 기 술

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

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

[0004] 스틸베노이드 (스틸벤, 다이하이드로스틸벤, 페난쓰렌 (phenanthrenes) 및 그들의 올리고머)는 1,2-다이페닐에탄 골격에 의해 묘사되며, 생합성에 있어서는 플라보노이드와 밀접하게 관련이 있다. 특히, 다이하이드로스틸벤 (1,2-다이아릴에탄 또는 바이벤질(bibenzyls))은 항염증 [6], 항진균 [7], 항균 [8], 항산화 [9] 및 항암 [10] 활성과 같은 주목할 만한 약학적 효능의 관점에서 중요한 피토케미칼이다.

[0005] 광범위한 생물활성에 힘입어 다이하이드로스틸벤은 화학, 생물의학뿐만 아니라 농학 및 식품화학분야의 수많은

연구그룹의 관심의 대상이 되고 있다.

[0006] 산화질소 저해 가능성을 지닌, 생물활성을 나타내는 천연화합물 및 그 유사체 합성에 대한 연구를 계속해온 본 발명자들은 본 발명에서 다이하이드로스틸벤의 효율적인 합성방법과 인 비트로 항염증 활성에 관하여 밝힌다. 본 발명에서 화합물 1 (모스카틸린) 및 화합물 5 (아필랄 C)는 천연 다이하이드로스틸벤이며, 각각 덴드로븀 모스카툼 (*dendrobium moscatum*)과 덴드로븀 아필룸 (*dendrobium aphyllum*)에서 분리하였다. 다른 화합물 2~4는 합성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Quintans, J. Immunol. Cell Biol. 1994, 72, 262-264.

(비특허문헌 0002) 2. (a) Ruedi, K. B.; Christina, F.; Paul, N.; Michael, S.; Sterner-Kock, A.; Kock, M.; Putney, L.; Ferrick, D. A.; Hyde, D. M.; Love, R. B. Inammation 2008, 31, 167-179. (b) Coussens, L. M.; Werb, Z. Nature 2002, 420, 860-867.

(비특허문헌 0003) 3. Calabrese, V. et al., Nat. Rev. Neurosci. 2007, 8, 766-775.

(비특허문헌 0004) Bogdan, C. Nat. Immunol. 2001, 2, 907-916.

(비특허문헌 0005) Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Physiol. Rev. 2007, 87, 315-424.

(비특허문헌 0006) 6. (a) Estrada, S. et al., Planta. Med. 1999, 65, 109-114. (b) Wang, J.; Matsuzaki, K.; Kitanaka, S. Chem. Pharm. Bull. 2006, 54, 1216-1218.

(비특허문헌 0007) Zhang, Y. -Z.; Xu, G. -B.; Zhang, T. J. Asian Nat. Prod. Res. 2008, 10, 634-639.

(비특허문헌 0008) Lin, L. -G.; Yang, X. -Z.; Tang, C. -P.; Ke, C. -Q.; Zhang, J. -B.; Yang Ye, Y. Phytochemistry 2008, 69, 457-463.

(비특허문헌 0009) Biondi, D. M.; Rocco, C.; Ruberto, G. J. Nat. Prod. 2003, 66, 477-480.

(비특허문헌 0010) Cushman, M.; Nagarathnam; D.; Gopal, D.; Chakraborti, A.K.; Lin, C. M.; Hamel, E. J. Med. Chem. 1991, 34, 2579-2588.

(비특허문헌 0011) (a) Seo, Y. H. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016, 26, 1521-1524. (b) Jung, J. -W. et al., Chem. Pharm. Bull. 2016, 64, 632-637.

(비특허문헌 0012) (a) Majumder, P. L.; Sen, R. C. Phytochemistry 1987, 26, 2121-2124. (b) Yang, D.; Liu, L.-Y.; Cheng, Z. -Q.; Xu, F. -Q.; Fan, W. -W.; Zi, C. -T.; Dong, F. -W.; Zhou, J.; Ding, Z. -T.; Hu, J. -M. Fitoterapia 2015,100, 11-18.

(비특허문헌 0013) (a) Wittig, G.; Geissler G. Liebigs Ann. 1953, 580, 44-57; (b) Horner, L. et al., Chem. Ber. 1958, 91, 61; (c) Bisceglia, J. A.; Orelli, L. R. Curr. Org. Chem. 2012, 16, 2206.

(비특허문헌 0014) Mandal, P. K.; McMurray, J. S. J. Org. Chem. 2007, 72, 6599-6601.

(비특허문헌 0015) Zhaung, J. C.; Wogan, G. N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94, 11875-11880.

(비특허문헌 0016) (a) Chen, B.; Stout, R.; Campbell, W. F. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996, 14, 109-120. (b) Salerno, L.; Sorrenti, V.; Di Giacomo, C.; Romeo, G.; Siracusa, M .A. Curr. Pharm. Des. 2002, 8, 177-200. (c) Ueda, S. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 313-316.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 다이하이드로스틸벤을 효율적으로 합성하는 방법을 제공하고, 합성된 다이하이드로스틸벤 유도체의

생물 활성을 확인하여 안전하고 새로운 항염증 약학 조성물을 제공하는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 다이하이드로스틸벤 (화합물 1~5) 합성은 BCl_3를 이용한 2,4,5-트리메톡시벤즈알데하이드 (화합물 11)의 선택적 탈메틸화로부터 시작하였다 (도 2). 알데하이드 화합물 (12)와 바닐린 (화합물 13), 시링알데하이드 (화합물 14) 및 3,5-다이하이드록시벤즈알데하이드 (화합물 15)는 벤질브로마이드와 K_2CO_3의 아세톤 용액을 이용하여 보호기화되어 각각 알데하이드 16~19를 생성했다. 2,3,4-트리하이드록시벤즈알데하이드 (화합물 20)는 벤질브로마이드와 Cs_2CO_3의 DMF (*N,N*-dimethylformamide) 용액으로 처리하고, 얻어진 2,3,4-트리스(벤질옥시)벤즈알데하이드 (화합물 21)는 DMF 내에서 벤질 브로마이드와 Cs_2CO_3로 처리하였고, 얻어진 2,3,4-트리스(벤질옥시)벤즈알데하이드 (화합물 21)는 $MgBr_2 \cdot Et_2O$를 이용하여 선택적 탈벤질화하여 치환된 살리실알데하이드 (화합물 22)가 되었으며, 이것은 메틸화되어 알데하이드 화합물 23이 되었다. 다음으로, 알데하이드 화합물 16, 3,4-다이메톡시벤즈알데하이드 (화합물 24) 및 피페로날 (화합물 25)은 $NaBH_4$로 환원되어 벤질 알콜 화합물 26~28이 되었으며, 이 화합물들은 2단계 합성 순서에 의하여 각각 해당 위티그-호너 화합물 29~31로 전환되었다. 다음으로, 화합물 29~31과 알데하이드 17,18,21,23 및 29 간의 위티그-호너 반응 [13]은 염기로서 수소화나트륨 (NaH)의 존재 하에 수행되었고, 해당 스틸벤 화합물 32~36이 높은 수율로 얻어졌다. 마지막으로, 스틸벤 화합물 32~36의 탈벤질화 및 올레핀 결합 환원은 과량의 트리에틸실란 (12~15당량) 및 Pd/C 시스템을 이용하여 아주 짧은 반응시간 (20분) 내에 한 단계로 이루어졌고, 각각 원하는 다이하이드로스틸벤 화합물 1~5를 좋은 수율로 얻었다. 최종 화합물 1~5의 구조는 스펙트럼 데이터로 결정하였다.

[0010] 제조한 다이하이드로스틸벤 (화합물 1~5)의 항염증 효과를 평가하기 위하여, 지다당으로 자극한 RAW264.7 대식세포에서 염증의 필수적인 매개자 중 하나인 산화질소 (NO)의 양을 측정하였다 [15]. 사실, 짧은 반감기 및 다른 포집 분자의 존재로 인하여 본래의 NO 정량이 어렵다. 따라서, 축적된 안정적인 분해 생성물인 아질산염 (NO_2^-) 및 질산염 (NO_3^-) 측정이 바람직하고, 아질산염과 질산염 조합의 측정을 위해서는 Griess 시약을 사용한다.

표 1

Compound	NO Production (% inhibition)	
	1 μM	10 μM
Medium(MED)	1.2 ± 0.7 (98.8)***	1.2 ± 0.7 (98.8)***
LPS	100.0 ± 7.4 (0.0)	100.0 ± 7.4 (0.0)
1	92.6 ± 19.6 (7.4)	**21.6 ± 5.2 (78.4)*** **
2	64.8 ± 2.7 (35.2)	70.5 ± 3.9 (29.5)
3	57.3 ± 6.8 (42.7)	53.0 ± 1.4 (47.0)
4	75.7 ± 9.7 (24.3)	**24.5 ± 5.8 (75.5)*** **
5	83.0 ± 22.3 (17.0)	71.7 ± 11.6 (28.3)
L-NMMA	85.0 ± 4.4 (15.0)	9.9 ± 2.7 (90.1)***

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

[0012]

[0014] 유도된 대식세포에 의한 NO 생성에 대한 화합물 1~5의 효과를 모니터하였다 (표 1). 지다당 처리한 RAW264.7 세포는 iNOS 활성화를 통하여 NO 생성을 자극하였고, L-NMMA(N^G-monomethyl-L-arginine acetate) [16]는 양성 대조군으로 이용하였다. 화합물 2를 제외한 모든 시험 화합물은 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰다. NO 생산 억제율은 최고 농도 (10 μM)에서 78.4% ~ 28.3%이었고, 최저 농도 (1 μM)에서 42.7% ~ 7.4%였다. 다섯 개의

화합물 중 화합물 1 (78.4%) 및 화합물 4 (75.5%)를 10 μM 처리했을 때 강한 저해 활성이 관찰되었다 (표 1).

[0015] 다음으로, 화합물 (1-5) 처리군에서 세포 사멸이 NO 발현 감소에 의한 것이 아님을 확인하기 위하여 활성화된 RAW 264.7 세포 생존율을 NO 1 μM 및 10 μM에서 MTT 세포 생존 분석법으로 분석하였다 (표 2). 10 μM 농도에서 세포 생존율 평가 결과, 화합물 1 (모스카틸린)을 제외하고, 모든 화합물은 현저한 세포독성을 나타내지 않았는데, 이는 NO 생성의 효율적인 억제를 이끌었다. 화합물 1~5의 IC_{50} 값은 GraphPad Prism 4.0 소프트웨어를 이용하여 평가하였고, 각각 4.40, 13.77, 6.02, 2.98 및 14.53 μM로 나타났다 (표 2). 화합물 1이 10 μM의 농도에서 높은 NO 생성 저해 효과 (78.4%)와 IC_{50} 값 4.40 μM을 나타내었지만, 그 억제 효과는 RAW 264.7 세포 (단지 52.9 %의 세포 생존율)에 대한 세포 독성 효과와 관련된 것으로 보인다.

표 2

Compound	NO Production (% inhibition)		IC_{50} (μM)
	1 μM	10 μM	
Medium(MED)	100.0 ± 4.8	100.0 ± 4.8	
1	143.4 ± 6.0**	52.9 ± 4.5**	4.40
2	119.9 ± 4.2	123.6 ± 13.8	13.77
3	113.9 ± 17.8	114.4 ± 3.7	6.02
4	105.7 ± 3.8	99.9 ± 4.3	**2.98**
5	96.8 ± 4.4	90.8 ± 1.8	14.53
L-NMMA	100.1 ± 3.1	100.3 ± 2.1	2.73

[0016] [a]The results are reported as mean value ± SEM for n=3 (**$P < 0.01$).

[0018] 이러한 결과는 화합물 4가 IC_{50} 값 2.98 μM로 L-NMMA 보다 조금 약한 활성을 가지고 있음을 나타낸다. LPS-유도 NO 생산을 감소시키는 화합물 1~5의 기본 분자 메커니즘을 이해하기 위해, RAW 264.7 세포의 iNOS 단백질 발현에 화합물 1~5가 미치는 효과를 웨스턴 블랏 분석으로 관찰하였다.

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

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

[0021] 결론적으로 본 발명자들은 시판되는 출발 물질로부터 위티그 - 호너 반응과 수소화를 주요 단계로 하여 다이하이드로스틸벤 화합물 (1-5)의 효율적인 합성 방법을 발명하였다. 또한, 본 발명자들은 LPS 유도-RAW 264.7 대식세포에서 NO 생성 저해 효과를 항염증 활성 지시자로서 평가하였다. 화합물 2를 제외하고, 모든 시험 화합물은 농도 의존적으로 현저하게 NO 생성을 억제하였으며, 화합물 1을 제외하고 현저한 세포 독성을 나타내지 않았다. 본 발명에서, 화합물 4 (75.5%; IC_{50} = 2.98 μM)는 양성 대조군 L-NMMA와 유사한 억제 활성을 나타냈다. 이것은 LPS에 의해 유도된 iNOS의 억제와 좀 더 관련이 있다. 본 발명의 화합물 4, 즉, 3",4"-디메톡시페닐 및 3',4'-디하이드록시-2'-메톡시페닐 모티프인 1,2-다이하이드로스틸벤 구조체는 NO 생성을 표적으로 하는 항염증제로서 가능성 있는 화합물 또는 리드 화합물이 될 수 있을 것으로 사료된다.

[0022] 본 발명은

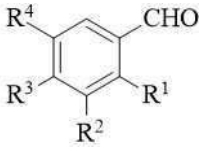
[0023] 가) 화학식 13으로 표시되는 알데하이드 화합물 12, 13 또는 14에 벤질 브로마이드와 K_2CO_3의 아세톤 용액을 가하여 보호기화하여 화학식 16으로 표시되는 알데하이드 화합물 16, 17 또는 18을 각각 얻는 단계;

[0024] 나) 상기 알데하이드 화합물 16을 $NaBH_4$로 환원하여 화학식 26으로 표시되는 벤질 알콜 화합물 26을 얻고, 이를 삼브롬화 인산 처리과정 및 트리에틸 아인산염과 크실렌 환류 과정을 거쳐 화학식 29로 표시되는 해당 위티그-

호너 화합물 29로 전환하는 단계; 및

[0025] 다) 상기 가) 단계에서 얻은 화합물 17 또는 18에 상기 나) 단계에서 얻은 화합물 29를 염기로서 NaH 존재 하에 위티그-호너 반응시켜 화학식 32로 표시되는 화합물 32 또는 33을 각각 얻고, 과량의 트리에틸실란과 Pd/C를 가하여 화학식 1로 표시되는 화합물 1 또는 2를 각각 얻는 단계;를 포함하는 다이하이드로스틸벤 합성방법에 관한 것이다.

[0026] <화학식 13>

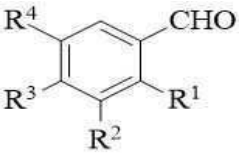
[0027] 

[0028] (단, 화합물 13은 R^1,R^4 = H, R^2 = OMe, R^3 = OH,

[0029] 화합물 14는 R^1 = H, R^2,R^4 = OMe, R^3 = OH,

[0030] 화합물 12는 R^1 = OH, R^2 = H, R^3,R^4 = OMe임)

[0031] <화학식 16>

[0032] 

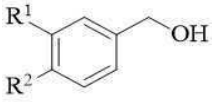
[0033] (단, 화합물 16은 R^1,R^4 = H, R^2 = OMe, R^3 = OBn,

[0034] 화합물 17은 R^1 = H, R^2,R^4 = OMe, R^3 = OBn,

[0035] 화합물 18은 R^1 = OBn, R^2 = H, R^3,R^4 = OMe,

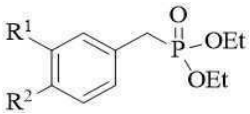
[0036] 화합물 19는 R^1,R^3 = H, R^2, R^4 = OBn임)

[0037] <화학식 26>

[0038] 

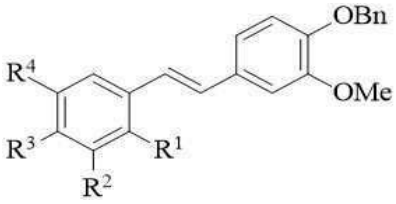
[0039] (단, 화합물 26은 R^1 = OMe, R^2 = OBn임)

[0040] <화학식 29>

[0041] 

[0042] (단, 화합물 29는 R^1 = OMe, R^2 = OBn임)

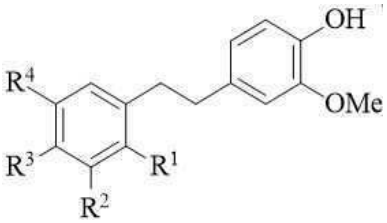
[0043] <화학식 32>

[0044] 

[0045] (단, 화합물 32는 R^1 = H, R^2,R^4 = OMe, R^3 = OBn,

[0046] 화합물 33은 R^1 = OBn, R^2 = H, R^3,R^4 = OMe임)

[0047] <화학식 1>

[0048] 

[0049] (단, 화합물 1은 R^1 = H, R^2,R^4 = OMe, R^3 = OH,

[0050] 화합물 2는 R^1 = OH, R^2 = H, R^3,R^4 = OMe임)

[0051] 또한, 본 발명은

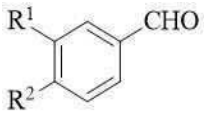
[0052] 가) 2,3,4-트리하이드록시벤즈알데하이드를 DMF (*N*,*N*-dimethylformamide) 용액 내에서 벤질 브로마이드와 Cs_2CO_3로 처리하고 2,3,4-트리스(벤질옥시)벤즈알데하이드를 얻는 단계;

[0053] 나) 상기 2,3,4-트리스(벤질옥시)벤즈알데하이드를 $MgBr_2 \cdot Et_2O$를 이용하여 선택적 탈벤질화하고, 얻어진 3,4-비스(벤질옥시)-2-하이드록시벤즈알데하이드는 DMF 용액 내에서 MeI와 K_2CO_3로 처리하여 메틸화하여 3,4-비스(벤질옥시)-2-메톡시벤즈알데하이드를 얻는 단계;

[0054] 다) 화학식 16'로 표시되는 알데하이드 화합물 24를 $NaBH_4$로 환원하여 화학식 26으로 표시되는 벤질 알콜 화합물 27을 얻고, 이를 삼브롬화 인산 처리과정 및 트리에틸 아인산염과 크실렌 환류 과정을 거쳐 화학식 29로 표시되는 해당 위티그-호너 화합물 30으로 전환하는 단계; 및

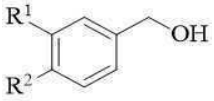
[0055] 라) 상기 가) 단계에서 얻은 2,3,4-트리스(벤질옥시)벤즈알데하이드 또는 상기 나) 단계에서 얻은 3,4-비스(벤질옥시)-2-메톡시벤즈알데하이드에 상기 다) 단계에서 얻은 화합물 30을 염기로서 NaH 존재 하에 위티그-호너 반응으로 화학식 34로 표시되는 화합물 34 또는 35를 각각 얻고, 과량의 트리에틸실란과 Pd/C를 가하여 화학식 3으로 표시되는 화합물 3 또는 4를 얻는 단계;를 포함하는 다이하이드로스틸벤 합성방법에 관한 것이다.

[0056] <화학식 16'>

[0057] 

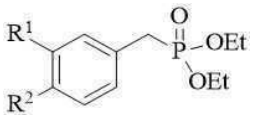
[0058] (단, 화합물 24는 R^1,R^2 = OMe임)

[0059] <화학식 26>

[0060] 

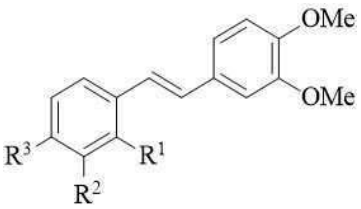
[0061] (단, 화합물 27은 R^1,R^2 = OMe임)

[0062] <화학식 29>

[0063] 

[0064] (단, 화합물 30은 R^1,R^2 = OMe임)

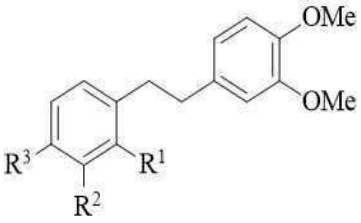
[0065] <화학식 34>

[0066] 

[0067] (단, 화합물 34는 R^1,R^2,R^3 = OBn,

[0068] 화합물 35는 R^1 = OMe, R^2,R^3 = OBn임)

[0069] <화학식 3>

[0070] 

[0071] (단, 화합물 3은 R^1,R^2,R^3 = OH,

[0072] 화합물 4는 R^1 = OMe, R^2,R^3 = OH임)

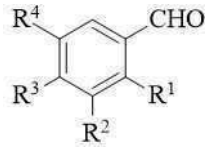
[0073] 뿐만 아니라, 본 발명은

[0074] 가) 화학식 13으로 표시되는 알데하이드 화합물 15에 벤질 브로마이드와 K_2CO_3의 아세톤 용액을 가하여 보호기화하여 화학식 16으로 표시되는 알데하이드 화합물 19를 얻는 단계;

[0075] 나) 화학식 16'로 표시되는 알데하이드 화합물 25를 $NaBH_4$로 환원하여 화학식 26으로 표시되는 벤질 알콜 화합물 28을 얻고, 이를 삼브롬화 인산 처리과정 및 트리에틸 아인산염과 크실렌 환류 과정을 거쳐 화학식 29로 표시되는 해당 위티그-호너 화합물 31로 전환하는 단계; 및

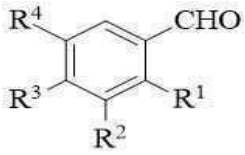
[0076] 다) 상기 가) 단계에서 얻은 화합물 19에 상기 나) 단계에서 얻은 화합물 31을 염기로서 NaH 존재 하에 위티그-호너 반응하여 화학식 36으로 표시되는 화합물 36을 얻고, 과량의 트리에틸실란과 Pd/C를 가하여 화학식 5로 표시되는 화합물 5를 얻는 단계;를 포함하는 다이하이드로스틸벤 합성방법에 관한 것이다.

[0077] <화학식 13>

[0078] 

[0079] (단, 화합물 15는 R^1,R^3 = H, R^2, R^4 = OH임)

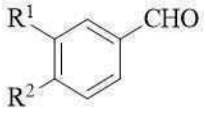
[0080] <화학식 16>



[0081]

[0082] (단, 화합물 19는 R^1,R^3 = H, R^2, R^4 = OBn임)

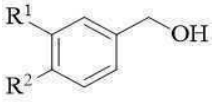
[0083] <화학식 16'>



[0084]

[0085] (단, 화합물 25는 R^1,R^2 = $-OCH_2O-$임)

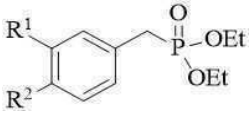
[0086] <화학식 26>



[0087]

[0088] (단, 화합물 28은 R^1,R^2 = $-OCH_2O-$임)

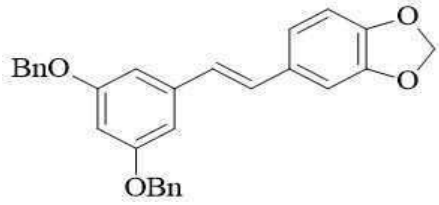
[0089] <화학식 29>



[0090]

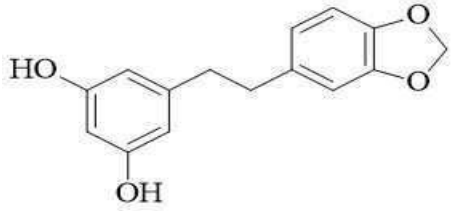
[0091] (단, 화합물 31은 R^1,R^2 = $-OCH_2O-$임)

[0092] <화학식 36>



[0093]

[0094] <화학식 5>



[0095]

[0096] 또한, 본 발명은 4-(4-하이드록시-3-메톡시페네틸)-2,6-다이메톡시페놀, 2-(4-하이드록시-3-메톡시페네틸)-4,5-다이메톡시페놀, 4-(3,4-다이메톡시페네틸)벤젠-1,2,3-트리올, 4-(3,4-다이메톡시페네틸)-3-메톡시벤젠-1,2-다이올 및 5-(2-(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)에틸)벤젠-1,3-다이올 중 1종 이상의 다이하이드로스틸벤 화합물을 함유하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

[0097] 또한, 본 발명은 다이하이드로스틸벤으로서 4-(3,4-다이메톡시페네틸)-3-메톡시벤젠-1,2-다이올을 함유하는 항

염증 약학 조성물에 관한 것이다.

[0098] 본 발명의 다이하이드로스틸벤 (화합물 1~5) 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, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탤크, 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 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0099] 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.

[0100] 나아가, 본 발명은 상기 다이하이드로스틸벤 (화합물 1~5)을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아토피, 피부소양증과 같은 피부염증을 비롯한 염증질환의 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0101] 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

[0102] 본 발명의 방법에 의하면, 다이하이드로스틸벤 및 그 유도체들을 간단한 공정으로 높은 수율로 제조할 수 있었다.

[0103] 또한, 본 발명의 방법에 의하여 제조된 다이하이드로스틸벤 및 그 유도체들은 세포 독성 없이 염증 억제효과를 나타내었다. 따라서, 본 발명의 제조방법으로 제조된 다이하이드로스틸벤 및 그 유도체들은 항염증제로 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0104] 도 1은 다이하이드로스틸벤 (화합물 1~5) 및 이들 유도체의 화학구조식이다.

도 2는 본 발명의 다이하이드로스틸벤 및 이들의 유도체의 합성방법을 도시한 것이다. 시약과 조건은 다음과 같다. a) 1.0 M BCl_3 (in CH_2Cl_2), CH_2Cl_2, -78℃~상온, 3h, 98%; b) 벤질 브로마이드, K_2CO_3, 아세톤, 0℃~40℃, 12h, 81~90%; c) 벤질 브로마이드, Cs_2CO_3, DMF, 0℃~80℃, 21h, 91%; d) $MgBr_2 \cdot Et_2O$, 에테르, 상온, 14h, 71%; e) MeI, K_2CO_3, DMF, 상온, 3h, 98%; f) $NaBH_4$, MeOH, 0℃~상온, 30분, 91~98%; g) 삼브롬화인, CH_2Cl_2, 0℃, 1h; h) 트리에틸 아인산염, 크실렌, 환류, 10h, 89~96% (두 단계 이상); i) NaH, THF, 0℃~상온, 12h, 75~92%; j) 트리에틸실란 (과량), 10% Pd/C, MeOH, 상온, 20분, 75~96%.

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

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105] 아래에서는 구체적인 실시예 및 실험예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0107] **2-하이드록시-4,5-다이메톡시벤즈알데하이드 (2-Hydroxy-4,5-dimethoxybenzaldehyde) (화합물 12):**

[0108] 2,4,5-트리메톡시벤즈알데하이드 (화합물 11) (0.5g, 2.548 mmol)을 CH_2Cl_2 (20.00 mL)에 넣고 교반한 용액에 -78℃에서 BCl_3 (1.0 M in CH_2Cl_2; 6.37 mL)를 한 방울씩 가하였다. 반응 온도를 상온으로 올리고 세 시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후 0℃로 식히고, 40% HCl 수용액 (1.3 mL)을 한 방울씩 가한 후, CH_2Cl_2 (3 x 30 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 식염수 (2 x 40 mL), 정제수 (40 mL)로 세척한 후 무수 Na_2SO_4로 건조하고 진공 농축하여 밝은 갈색의 화합물 12 (0.455g, 98%)를 얻었다.

[0109] R_f= 0.60 (EtOAc/Hexane=1/1); 녹는점 99-101 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 11.39 (1H, s), 9.68 (1H, s), 6.89 (1H, s), 6.46 (1H, s), 3.93 (3H, s), 3.88 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 194.0, 159.5, 157.5, 143.2, 113.7, 113.1, 100.4, 56.8, 56.6.

[0111] **벤질기 보호의 일반적인 절차**

[0112] 페놀릭 알데하이드 (2.00 mmol)를 무수 아세톤 (10 mL)에 넣고 교반한 용액에 K_2CO_3 (3.00 mmol, 1.5당량)를 질소 분위기에서 가하고 0℃로 냉각하였다.

[0113] 벤질 브로마이드 (2.4 mmol, 1.2 당량)를 천천히 첨가하고, 혼합물을 40℃로 승온하고, 12시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 상온으로 냉각하고, Celite 패드로 여과하고, 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane=1/3)로 정제하여 벤질기가 보호되는 순수한 방향족 알데하이드를 얻었다 [주: 2당량의 K_2CO_3를 화합물 18 합성에 이용하였고, 벤질 브로마이드 2.4당량 및 4.0당량의 K_2CO_3를 화합물 19 합성에 이용하였다].

[0115] **4-(벤질옥시)-3-메톡시벤즈알데하이드 (화합물 16)**

[0116] 수율: 88%; R_f = 0.42 (EtOAc/Hexane=1/3); 백색 고체; 녹는점 57-59 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.78 (1H, s) 7.42-7.28 (7H, m), 6.95 (1H, d, J = 8.1 Hz), 5.20 (2H, s), 3.90 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 190.9, 153.7, 150.2, 136.2, 130.5, 128.9, 128.4, 127.4, 126.7, 112.6, 109.5, 71.1, 56.3.

[0118] **4-(벤질옥시)-3,5-다이메톡시벤즈알데하이드 (화합물 17)**

[0119] 수율: 81%; R_f = 0.37 (EtOAc/Hexane=1/3); 백색 고체; 녹는점 41-43 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.84 (1H, s), 7.45 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.37-7.25 (3H, m), 7.10 (2H, s) 5.12 (2H, s) 3.89 (6H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 191.1, 154.0, 137.3, 132.0, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 106.8, 75.2, 56.5.

[0121] **2-(벤질옥시)-4,5-다이메톡시벤즈알데하이드 (화합물 18)**

[0122] 수율: 83%; R_f = 0.24 (EtOAc/Hexane=1/3); 백색 고체; 녹는점 115-117 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10.36 (1H, s), 7.43-7.28 (6H, m), 6.54 (1H, s), 5.17 (2H, s), 3.91 (3H, s), 3.87 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 188.0, 157.7, 155.6, 143.9, 136.1, 128.8, 128.4, 127.5, 118.0, 108.8, 97.9, 71.7, 56.4, 56.3.

[0124] **3,5-비스(벤질옥시)벤즈알데하이드 (화합물 19)**

[0125] 수율: 90%; R_f = 0.55 (EtOAc/Hexane=1/3); 백색 고체; 녹는점 77-79 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.87 (1H, s), 7.43-7.32 (10H, m), 7.09 (2H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.85 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 5.07 (4H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 191.6, 160.6, 138.7, 136.5, 128.8, 128.3, 127.7, 109.0, 108.6, 70.8.

[0127] **2,3,4-트리스(벤질옥시)벤즈알데하이드 (화합물 21)**

[0128] 2,3,4-트리하이드록시벤즈알데하이드 (화합물 20) (0.50 g, 3.24 mmol)를 무수 DMF에 넣고 교반한 용액에 Cs_2CO_3 (5.28 g, 16.22 mmol)를 질소 분위기 하에서 가하고 0℃로 냉각하였다. 벤질브로마이드 (2.00 mL, 16.22 mmol)를 한 방울씩 가하였다. 반응 혼합물을 80℃까지 가온하고 21시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후 1N HCl로 중화하고, 실온으로 냉각시키고, 에테르 (3 x 20 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H_2O (3 × 30 mL), 식염수 (2 × 20 mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane=1/3)로 정제하여 정제된 연노란색 고체 화합물 (0.60 g, 81%)을 얻었다. R_f = 0.48 (EtOAc/Hexane=1/3); 녹는점 75-77 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) 10.12 (1H, s), 7.60 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.46-7.40 (7H, m), 7.38-7.32 (8H, m), 6.86 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 5.24 (2H, s), 5.20 (2H, s), 5.11 (2H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 188.9, 158.6, 156.1, 141.3, 137.1, 136.4, 136.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 127.6, 124.2, 109.4, 77.1, 75.8, 71.2.

[0130] **3,4-비스(벤질옥시)-2-하이드록시벤즈알데하이드 (화합물 22)**

[0131] 알데하이드 화합물 21 (0.40 g, 0.94 mmol)을 무수 다이에틸에테르 (3 mL)에 넣고 교반한 용액에 마그네슘 브로마이드 다이에틸 에터레이트 (0.24 g, 0.94 mmol)를 무수 다이에틸에테르 (2 mL)에 용해한 용액을 질소 분위기 하에서 가하였다. 반응 혼합물은 상온에서 14시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후 0℃로 냉각하여, 1N HCl로 반응을 중지하고 EtOAc (2 x 15 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층은 H_2O (2 x 15 mL), 식염수 (2 x 15 mL)로 씻고, 무수 Na_2SO_4로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (Ether/Hexane=1/3)로 정제하여 연노란 액상 화합물 (0.22 g, 71%)을 얻었다. R_f = 0.40 (EtOAc/Hexane=1/3); ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 11.20 (1H, s), 9.71 (1H, s), 7.46-7.43 (2H, m), 7.36-7.33 (5H, m), 7.30-7.25 (3H, m), 7.22 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.59 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 5.17 (2H, s), 5.10 (2H, s).

[0133] **3,4-비스(벤질옥시)-2-메톡시벤즈알데하이드 (화합물 23)**

[0134] 알데하이드 화합물 22 (0.38 g, 1.14 mmol)를 무수 DMF (5 mL)에 넣고 교반한 용액에 K_2CO_3 (0.24 g, 1.71 mmol)를 질소 분위기 하에서 가하였다. 요오드화 메틸 (0.11 mL, 1.71 mmol)을 실온에서 한 방울씩 가하였다. 생성된 혼합물을 세 시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후 실온으로 냉각하여, 1N HCl로 중화하고 에테르 (2 x 15 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매 층은 H_2O (3 x 15 mL), 식염수 (2 x 15 mL)로 씻고, 무수 Na_2SO_4로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (Ether/Hexane=1/3)로 정제하여 무색 액체 화합물 (0.39 g, 98%)을 얻었다.

[0135] R_f = 0.54 (EtOAc/Hexane=1/3); ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10.22 (1H, s), 7.56 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.39-7.26 (10H, m), 6.78 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 5.11 (2H, s), 5.02 (2H, s), 4.00 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 188.3, 158.5, 157.4, 141.1, 137.2, 136.1, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.5, 124.2, 123.8, 109.2, 75.5, 71.2, 62.5.

[0137] **방향족 알데하이드를 벤질 알코올로 변환하기 위한 일반적인 절차**

[0138] 방향족 알데하이드 (1.00 mmol)를 MeOH (3 mL)에 넣고 교반한 용액에 0℃에서 수소화 붕소나트륨 (0.05 g, 1.20 mmol, 1.2당량)을 일정 비율로 첨가하였다. 반응 종료 후에 반응 온도를 상온으로 올리고 30분간 교반하였다. 반응 종료 후, 과량의 수소화 붕소나트륨에 물 (1 mL)을 가하여 냉각하고 15분 동안 교반하고, 감압하여 용매를 제거하였다. EtOAc (20 mL) 및 H_2O (10 mL)를 조화합물에 가하고 두 층을 분리하였다. 수용액층을 EtOAc (2 x 20 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층을 식염수 (15 mL)로 세척하고 무수 Na_2SO_4로 건조하고 진공 농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane = 1/3 - 1/1)로 정제하여 순수한 벤질알콜을 얻었다.

[0140] **(4-(벤질옥시)-3-메톡시페닐)메탄올 (화합물 26)**

[0141] 수율: 98%; R_f = 0.41 (EtOAc/Hexane=1/1); 백색 고체; 녹는점 69-71 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) 7.36 (2H, d, J = 7.8 Hz), 7.30-7.21 (3H, m), 6.81 (1H, s), 6.73 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.66 (1H, d, J = 7.8 Hz), 5.03 (2H, s), 4.40 (2H, s), 3.73 (3H, s), 3.29 (1H, br s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 149.4, 147.2, 136.9, 134.3, 128.3, 127.6, 127.1, 119.0, 113.9, 110.9, 70.9, 64.6, 55.6.

[0143] **(3,4-다이메톡시페닐)메탄올 (화합물 27)**

[0144] 수율: 91%; R_f = 0.44 (EtOAc/Hexane=1/1); 무색 액체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.91-6.76 (3H, m), 4.59 (2H, s), 3.87 (3H, s), 3.86 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 149.3, 148.8, 133.9, 119.6, 111.4, 110.8, 65.5, 56.3, 56.2.

[0146] **벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일메탄올 (화합물 28)**

[0147] 수율: 98%; R_f = 0.31 (EtOAc/Hexane=1/3); 무색 액체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.86 (1H, s), 6.81 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.77 (1H, d, J = 8.4 Hz), 5.95 (2H, s), 4.58 (2H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 148.0, 147.3, 135.1, 120.6, 108.4, 108.1, 101.2, 65.6.

[0149] **Wittig-Horner 시약 제조의 일반적인 절차**

[0150] 벤질 알콜 (1.00 mmol)을 CH_2Cl_2 (3 mL)에 넣고 교반한 용액에 0℃에서 삼브롬화인 (38 μL, 0.40 mmol, 0.4당량)을 질소 분위기에서 한 방울씩 가하고 한 시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, 포화 $NaHCO_3$ 용액을 가하여 과량의 시약 반응을 종료하고 CH_2Cl_2 (2 x 15 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매층을 식염수 (15 mL)로 세정하고, 무수 Na_2SO_4로 건조한 후 진공농축하였다. 조화합물을 크실렌 (4 mL) 및 트리에틸 아인산염 (1.5 mmol, 1.5당량)으로 용해하고 생성된 혼합물을 10 시간 동안 환류시켰다. 반응 종료 후 상온으로 냉각하고 용매를 감압하에 제거하였다. 조생성물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane=2/1)로 정제하여 순수한 Wittig-Horner 시약을 얻었다.

[0152] **다이에틸 4-(벤질옥시)-3-메톡시벤질포스포네이트 (화합물 29)**

[0153] 수율: 89%; R_f = 0.14 (EtOAc/Hexane=2/1); 무색 액체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.41-7.24 (5H, m), 6.86 (1H, s), 6.79 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.73 (1H, d, J = 8.4 Hz), 5.11 (2H, s), 4.03-3.9 (4H, m), 3.87 (3H, s), 3.07 (2H, d, J = 21.6 Hz), 1.23 (6H, t, J = 6.9 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 149.6, 147.2, 137.2, 128.6, 127.9, 127.4, 124.6 (d, J = 9.1 Hz), 122.0 (d, J = 7.4 Hz), 114.3 (d, J = 3.2 Hz), 113.6 (d, J = 5.7 Hz), 71.3, 62.4 (d, J = 6.3 Hz), 62.3 (d, J = 6.0 Hz), 56.2, 33.5 (d, J = 137.5 Hz), 16.8

(d, J = 3.9 Hz), 16.7 (d, J = 3.9 Hz).

[0155] **다이에틸 3,4-다이메톡시벤질포스포네이트 (화합물 30)**

[0156] 수율: 86%; R_f = 0.12 (EtOAc/Hexane=2/1); 무색 액체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.84 (1H, s), 6.81 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.79 (1H, d, J = 8.4 Hz), 4.03-3.98 (4H, m), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.09 (2H, d, J = 21.0 Hz), 1.25 (6H, t, J = 7.0 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 149.1, 148.3, 124.2 (d, J = 9.1 Hz), 122.1 (d, J = 7.4 Hz), 113.4 (d, J = 5.4 Hz), 111.7, 62.3 (d, J = 6.0 Hz), 62.1 (d, J = 6.0 Hz), 56.2, 33.6 (d, J = 138.1 Hz), 16.87 (d, J = 3.9 Hz), 16.7 (d, J = 4.2 Hz).

[0158] **다이에틸(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일메틸)포스포네이트 (화합물 31)**

[0159] 수율: 96%; R_f = 0.19 (EtOAc/Hexane=2/1); 무색 액체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) 6.79 (1H, s), 6.75 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.71 (1H, d, J = 8.4 Hz), 5.93 (2H, s), 4.02 (4H, t, J = 7.0 Hz), 3.06 (2H, d, J = 21.0 Hz), 1.26 (6H, t, J = 7.0 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 147.9 (d, J = 3.1 Hz), 146.8, 125.4 (d, J = 9.4 Hz), 123.1 (d, J = 7.7 Hz), 110.4 (d, J = 5.9 Hz), 108.5 (d, J = 3.1 Hz), 101.2, 62.4 (d, J = 6.0 Hz), 62.3 (d, J = 6.3 Hz), 33.9 (d, J = 138.4 Hz), 16.8 (d, J = 4.2 Hz), 16.7 (d, J = 3.9 Hz).

[0161] **Horner-Wittig 반응의 일반적인 절차**

[0162] 수소화나트륨 (0.75 mmol, 1.5 equiv.)을 무수 THF (2 mL)에 넣고 교반한 현탁액에 0 ℃에서 Horner-Wittig 시약 (0.60 mmol, 1.2당량)을 무수 THF (1.5 mL)에 용해한 용액을 질소상태에서 서서히 가하고 30분 동안 교반하였다. 여기에 알데하이드 (0.50 mmol, 1.0 equiv.) 무수 THF (2 mL) 용액을 한 방울씩 가하였다. 혼합액을 상온으로 승온하여 12시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후에 (TLC로 확인) 차가운 물을 가하여 냉각하고 EtOAc (2 x 20 mL)로 추출하였다. 혼합 유기용매 층은 H_2O (2 x 15 mL), 식염수 (2 x 15 mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4로 건조하고 진공농축하였다. 조화합물은 컬럼 크로마토그래피 (Ether/Hexane=1/3)로 정제하여 순수 스틸벤을 얻었다.

[0164] **(*E*)-2-(벤질옥시)-5-(4-(벤질옥시)-3-메톡시스티릴)-1,3-다이메톡시벤젠 (화합물 32)**

[0165] 수율: 92%; R_f = 0.63 (EtOAc/Hexane=1/2); 담황색 고체; 녹는점 113-115 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.50-7.42 (4H, m), 7.38-7.25 (6H, m), 7.06 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.95 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz), 6.94 (1H, d, J =16.2 Hz), 6.87 (1H, d, J = 16.2 Hz), 6.84 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.69 (2H, s), 5.17 (2H, s), 5.01 (2H, s), 3.94 (3H, s), 3.86 (6H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 153.7, 149.8, 148.1, 137.9, 137.1, 136.7, 133.4, 130.9, 128.7, 128.6, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.4, 127.1, 119.8, 114.0, 109.3, 103.5, 75.3, 71.2, 56.3, 56.2.

[0167] **(*E*)-1-(벤질옥시)-2-(4-(벤질옥시)-3-메톡시스티릴)-4,5-다이메톡시벤젠 (화합물 33)**

[0168] 수율: 84%; R_f = 0.40 (EtOAc/Hexane=1/2); 연황색 액체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.49-7.27 (11H, m), 7.11 (1H, s), 7.06 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.96 (1H, dd, J =7.8, 1.8 Hz), 6.94 (1H, d, J = 16.2 Hz), 6.85 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.57 (1H, s), 5.19 (2H, s), 5.10 (2H, s), 3.93 (6H, s), 3.86 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 150.9, 150.1, 149.5, 148.0, 144.4, 137.5, 137.4, 132.2, 128.7, 128.6, 128.1, 127.9, 127.6, 127.4, 127.1, 121.8, 119.9, 119.6, 114.7, 109.9, 101.0, 72.8, 71.5, 56.9, 56.4.

[0170] **(*E*)-(((4-(3,4-다이메톡시스티릴)벤젠-1,2,3-트리일)트리스(옥시))트리스(메틸렌)트리벤젠 (화합물 34)**

[0171] 수율: 81%; R_f = 0.50 (EtOAc/Hexane=1/2); 연황색 액체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45-7.40 (5H, m), 7.38-7.27 (10H, m), 7.19 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 6.96 (1H, s), 6.94 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 6.81 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.78 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 5.12 (2H, s), 5.09 (2H, s), 5.05 (2H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 152.6, 151.1, 149.4, 149.0, 142.5, 137.9, 137.7, 137.1, 131.4, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.6, 125.8, 121.6 120.8, 120.0, 111.6, 110.5, 108.9, 76.3, 75.8, 71.5, 56.3, 56.1.

[0173] **(*E*)-(((4-(3,4-다이메톡시스티릴)-3-메톡시-1,2-페닐렌)비스(옥시))비스(메틸렌))다이벤젠 (화합물 35)**

[0174] 수율: 79%; R_f = 0.38 (EtOAc/Hexane=1/3); 연황색 액체; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.47-7.27 (11H, m), 7.21 (1H, d, *J* = 16.2 Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.96 (1H, d, *J* = 16.2 Hz), 6.82 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.73 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 5.07 (2H, s), 5.05 (2H, s), 3.92 (6H, s), 3.86 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 152.5, 152.1, 149.4, 149.1, 142.3, 137.9, 137.1, 131.4, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.5, 125.4, 121.5, 120.9, 119.8, 111.9, 110.3, 109.6, 75.5, 71.5, 61.6, 56.2

[0176] **(*E*)-5-(3,5-비스(벤질옥시)스티릴)벤조[d][1,3]다이옥솔 (화합물 36)**

[0177] 수율: 75%; R_f = 0.63 (EtOAc/Hexane=1/3); 연황색 고체; 녹는점 103-105 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42-7.30 (10H, m), 7.01 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 6.95 (1H, d, *J* = 16.2 Hz), 6.89 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz), 6.81 (1H, d, *J* =16.2 Hz), 6.76 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.71 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.51 (1H, t, *J* = 2.4 Hz), 5.93 (2H, s), 5.03 (4H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 160.4, 148.3, 147.6, 139.8, 137.2, 132.0, 129.2, 128.7, 128.1, 127.6, 127.2, 121.7, 108.6, 106.2, 105.9, 101.9, 101.3, 70.5

[0179] **스틸벤에서 다이하이드로스틸벤의 합성을 위한 일반 절차**

[0180] 스틸벤 (0.4 mmol, 1당량)을 MeOH (2.5 mL)에 넣고 교반한 용액에 10% Pd/C (0.02 g)를 가하였다. 이것에 트리에틸실란을 과량으로 (12~15당량) 상온에서 천천히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 20분 동안 교반하였다. 반응 종료 (TLC로 확인) 후, Celite® 패드로 여과하고, EtOAc (15 mL)로 세척하여, 여과액을 감압하에 농축시켰다. 조생성물을 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/Hexane=1/1-2/1)로 정제하여 순수한 다이하이드로스틸벤을 수득하였다.

[0182] **4-(4-하이드록시-3-메톡시페네틸)-2,6-다이메톡시페놀 (Moscatilin) (화합물 1)**

[0183] 수율: 83%; R_f = 0.49 (EtOAc/Hexane=1/1); 백색 고체; 녹는점 83-85 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.82 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.66 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz), 6.59 (1H, d, *J* = 1.8 Hz), 6.34 (2H, s), 5.49 (1H, s), 5.39 (1H, s), 3.83 (6H, s), 3.82 (3H, s), 2.80 (4H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 147.0, 146.4, 144.0, 133.8, 133.2, 133.0, 121.3, 114.4, 111.5, 105.6, 56.6, 56.2, 38.7, 38.1; EI-MS *m/z* 304 (M^+), 167 (base), 137, 123; HRMS: Calcd for $C_{17}H_{20}O_5$ (M^+): 304.1311, found: 304.1297.

[0185] **2-(4-하이드록시-3-메톡시페네틸)-4,5-다이메톡시페놀 (화합물 2)**

[0186] 수율: 75%; R_f = 0.47 (EtOAc/Hexane=1/1); 담황색 고체; 녹는점 137-139 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.66 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.65 (1H, d, *J* = 1.8 Hz), 6.57 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz), 6.49 (1H, s), 6.43 (1H, s), 3.76 (3H, s), 3.74 (3H, s), 3.64 (3H, s), 2.74 (4H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 150.5, 149.6, 148.7, 145.5, 143.5, 135.4, 122.2, 121.3, 117.5, 116.1, 113.8, 106.6, 58.0, 56.9, 56.6, 37.2, 33.4; EI-MS *m/z* 304 (M^+), 167 (base), 137, 123; HRMS: Calcd for $C_{17}H_{20}O_5$ (M^+): 304.1311, found: 304.1319.

[0188] **4-(3,4-다이메톡시페네틸)벤젠-1,2,3-트리올 (화합물 3)**

[0189] 수율 :81%; R_f = 0.09 (EtOAc/Hexane=1/1); 백색 고체; 녹는점 147-149 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 6.77 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.69 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.68 (1H, dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz), 6.30 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.22 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 3.75 (3H, s), 3.73 (3H, s), 2.76 (4H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 150.2, 148.6, 145.2, 137.1, 134.2, 121.9, 121.7, 121.2, 114.2, 113.5, 107.8, 56.9, 56.7, 37.2, 33.5; EI-MS *m/z* 290 (M^+), 195 (base), 165, 151; HRMS: Calcd for $C_{16}H_{18}O_5$ (M^+): 290.1154, found: 290.1149.

[0191] **4-(3,4-다이메톡시페네틸)-3-메톡시벤젠-1,2-다이올 (화합물 4)**

[0192] 수율: 79%; R_f = 0.10 (EtOAc/Hexane=1/1); 백색 고체; 녹는점 119-121 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) 6.77 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.66 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.65 (1H, s), 6.47 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.40 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 3.74 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.71 (3H, s), 2.75 (4H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 150.2, 148.6, 147.8, 145.5, 139.1, 136.7, 127.1, 121.8, 120.6, 114.1, 113.5, 111.7, 60.9, 56.8, 56.5, 37.8, 32.9; EI-MS *m/z* 304 (M^+), 209, 151 (base); HRMS: Calcd for $C_{17}H_{20}O_5$ (M^+): 304.1311, found: 304.1300.

[0194] **5-(2-(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)에틸)벤젠-1,3-다이올 (Apyllal C) (화합물 5)**

[0195] 수율: 96%; R_f = 0.24 (EtOAc/Hexane=1/1); 백색 고체; 녹는점 107-109 ℃; ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) 6.64 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.62 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 6.55 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 6.18-6.13 (3H, m), 5.80 (2H, s), 2.78-2.62 (4H, m); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 159.1, 148.8, 146.9, 145.4, 137.0, 122.2, 109.8, 108.9, 108.2, 101.9, 101.4, 39.3, 38.4; EI-MS *m/z* 258 (M^+), 135 (base), 123; HRMS: Calcd for $C_{15}H_{14}O_4$ (M^+): 258.0892, found: 258.0899.

[0197] **항염증 활성 분석: 시약 등**

[0198] 에셔리치아 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.

[0200] **세포배양 및 세포생존율 분석**

[0201] RAW264.7 쥐 대식세포는 한국세포은행 (서울, 한국)에서 입수하여 10% 우태혈청, 100 U/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신이 함유된 DMEM에서 37 ℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 세포생존율에 미치는 다양한 화합

물의 효과는 CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay of cell proliferation (Promega, Madison, WI, USA)으로 시험하였는데, 이것은 생존세포를 계수하기 위하여 발색반응법을 이용한다. 이 분석법은 배양과정이 완료된 후 남아있는 생존세포 수를 측정하는데 이용하였다. RAW264.7 세포는 96-웰의 평평한 바닥을 가진 플레이트에 2 X 10^4 세포 밀도가 되도록 놓고 각 화합물을 지시한 농도대로 각 플레이트에 가하였다. 24시간 배양 후 제조자의 지시대로 생존세포 수를 계수하였다. 이 분석방법은 테트라졸리움 화합물 MTS가 포마잔으로 환원되는 것에 기초한 것인데, 포마잔은 490 nm에서 최대 흡광도를 나타낸다. 따라서, 세포 배양액 내의 산물의 양은 490 nm에서 포마잔의 광학적 밀도로 나타내며, 이것은 직접적으로 생존세포 수와 비례한다.

[0203] **NO 측정**

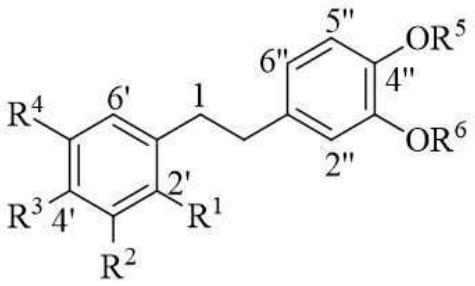
[0204] 마우스 대식세포에 의해 생성된 NO의 양은 RAW264.7 세포배양액 상층액에서 측정한 값으로 나타내었다. RAW264.6 세포는 200 μL의 배양배지가 든 96-웰 세포배양 플레이트에 5 X 10^4 세포밀도가 되도록 넣고 12시간 동안 배양하였다. 세포는 500 ng/mL의 LPS 내에서 화합물 1~5를 지시한 농도대로 넣고 18시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess reagent system (Promega)을 이용하여 제조자의 지시에 따라 측정하였다.

[0206] **면역블롯팅 분석**

[0207] RAW264.7 세포에서 이 화합물들이 iNOS 발현을 유도하는 능력을 알아보기 위하여 세포를 LPS 500 ng/mL 존재 하에 각 화합물 10 μM에 18시간 동안 노출시켰다. 그 후 세포를 차가운 PBS로 세척하고, 100 μL의 세포 용균 완충액 (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM $MgCl_2$, 25 mM β-글리세로포스페이트, 50 mM NaF, 100 μM Na_3VO_4, 1 mM PMSF, 10 ㎍/mL 류펩틴 (leupeptin) 및 10 ㎍/mL 아프로티닌)을 각 시료에 가하였다. 단백질을 SDS (sodium dodecylsulfate)로 변성한 후 시료는 SDS-PAGE 한 후 나이트로셀룰로스 막으로 전이하였다. 상온에서 5% 탈지분유를 함유하는 TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl 및 0.1% tween-20) 완충액에 막을 노출하여 비특이적 결합을 저해하였다. 그 후 막은 iNOS 특이적 항체 (BD Biosciences) 및 β-액틴 특이적 항체 (Sigma)와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 면역반응성 밴드는 시료를 호스래디쉬 퍼옥시데이즈-결합 이차 항체 및 증강 화학발광제 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)와 함께 배양하여 탐지하였다.

도면

도면1



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

Moscatilin (1)

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

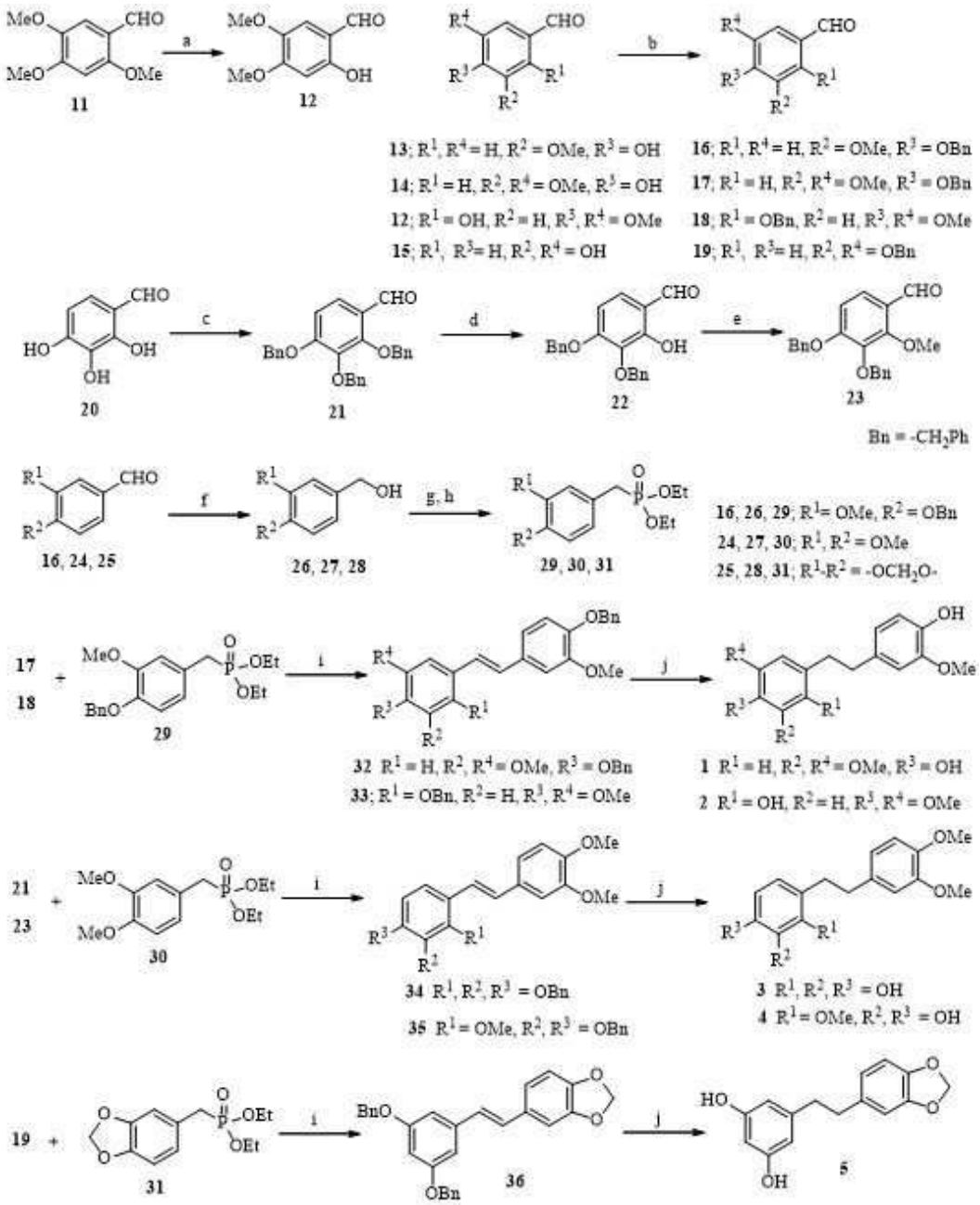
R^1, R^2, R^3 = OH; R^4 = H; R^5, R^6 = Me; (**3**)

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

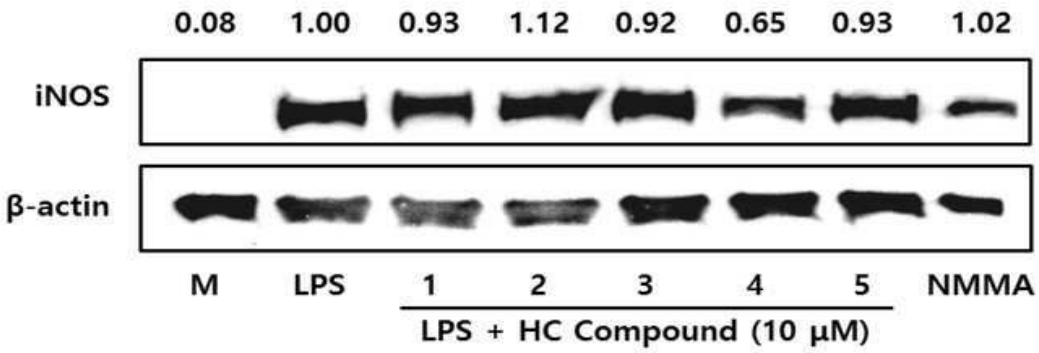
R^1, R^3 = H; R^2, R^4 = OH; R^5-R^6 = -CH_2-;

Aphyllal C (5)

도면2


MeO
CHO
MeO
OMe
11
a
MeO
CHO
MeO
OH
12
b
13; R1, R4 = H, R2 = OMe, R3 = OH
14; R1 = H, R2, R4 = OMe, R3 = OH
12; R1 = OH, R2 = H, R3, R4 = OMe
15; R1, R3 = H, R2, R4 = OH
16; R1, R4 = H, R2 = OMe, R3 = OBn
17; R1 = H, R2, R4 = OMe, R3 = OBn
18; R1 = OBn, R2 = H, R3, R4 = OMe
19; R1, R3 = H, R2, R4 = OBn
CHO
HO
OH
OH
20
c
CHO
BnO
OBn
OBn
21
d
CHO
BnO
OH
OBn
22
e
CHO
BnO
OMe
OBn
23
Bn = -CH2Ph
CHO
16, 24, 25
f
OH
26, 27, 28
g, h
OEt
OEt
29, 30, 31
16, 26, 29; R1 = OMe, R2 = OBn
24, 27, 30; R1, R2 = OMe
25, 28, 31; R1-R2 = -OCH2O-
17
18
MeO
BnO
OEt
OEt
29
i
OBn
OMe
32 R1 = H, R2, R4 = OMe, R3 = OBn
33; R1 = OBn, R2 = H, R3, R4 = OMe
j
OH
OMe
1 R1 = H, R2, R4 = OMe, R3 = OH
2 R1 = OH, R2 = H, R3, R4 = OMe
21
23
MeO
MeO
OEt
OEt
30
i
OMe
OMe
34 R1, R2, R3 = OBn
35 R1 = OMe, R2, R3 = OBn
j
OMe
OMe
3 R1, R2, R3 = OH
4 R1 = OMe, R2, R3 = OH
19
OEt
OEt
31
i
BnO
OBn
36
j
HO
OH
5

도면3


0.08
1.00
0.93
1.12
0.92
0.65
0.93
1.02
iNOS
β-actin
M
LPS
1
2
3
4
5
NMMA
LPS + HC Compound (10 μM)