





2016년 8월 석사학위 논문

15-PGDH 활성 억제를 위한 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene) methyl)phenyl 2-phenylacetate 유도체 합성 및 구조-활성 상관관계 분석

조선대학교 대학원 신재생에너지융합학과

박 소 희



15-PGDH 활성 억제를 위한 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene) methyl)phenyl 2-phenylacetate 유도체 합성 및 구조-활성 상관관계 분석

Synthesis and structure-activity relationship(SAR) analysis of 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene) methyl)phenyl 2-phenylacetate derivatives as 15-PGDH inhibitors

2016년 8월 25일

조선대학교 대학원 신재생에너지융합학과 박 소 희





15-PGDH 활성 억제를 위한 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene) methyl)phenyl 2-phenylacetate 유도체 합성 및 구조-활성 상관관계 분석

지도교수 조 훈

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2016년 4월

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

박 소 희





박소희의 석사학위논문을 인준함

- 위원장 조선대학교 교수 유지강 (인)
- 위 원 조선대학교 교수 김준섭 (인)
- 위 원 조선대학교 교수 조 훈 (인)

2016년 5월

조선대학교 대학원





CONTENTS

List of Tables
List of Schemes
List of Figures
Abbreviations
Abstract
1. Introduction 1
2. Experimental procedures 14
2.1. Reagents and analysis apparatuses14
2.2. Synthesis of 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-phenylacetate
derivatives 16
2.2.1. General procedures for the synthesis of compounds a - e 16
2.2.2. General procedures for the synthesis of compounds 1 - 19 19
2.2.3. General procedures for the synthesis of compounds 20 - 38 27
2.2.4. General procedures for the synthesis of compounds 39 - 57 35
2.2.5. General procedures for the synthesis of compounds 58 - 76 44
2.2.6. General procedures for the synthesis of compounds 77 - 95 53
2.3. Expression and purification of 15-PGDH 62
2.4. Bradford protein assay 63
2.5. SDS-PAGE63
2.6. 15-PGDH inhibition assay
2.7. Cell culture
2.8. Determination of extracellular PGE ₂ levels 67
2.9. MTT assay



2.10. Scratch - wound healing assay 70
2.11. Statistical analysis 7
3. Results and Discussion 72
3.1. Chemical evaluation of 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene) methyl) phenyl
2-phenylacetate derivatives 72
3.2. Biological evaluation
3.2.1. Inhibition effect of human 15-PGDH
3.2.2. Extracellular PGE ₂ levels
3.2.3. Cytotoxicity of the lead compounds for HEK293cell line
3.2.4. Determination of the wound healing effect
4. Conclusion 94
References
¹ H NMR Spectra



List of Tables

Table 1. Characterization of compounds 1-19 73
Table 2. Characterization of compounds 20-38 73
Table 3. Characterization of compounds 39-57 74
Table 4. Characterization of compounds 58-76 74
Table 5. Characterization of compounds 77-95 75
Table 6. Inhibitory potency of compounds 1-19 77
Table 7. Inhibitory potency of compounds 20-38 77
Table 8. Inhibitory potency of compounds 39-57 78
Table 9. Inhibitory potency of compounds 58-76 79
Table 10. Inhibitory potency of compounds 77-95 79
Table 11. Effects of compound 1-48 on PGE ₂ release
Table 12. Effects of compound 49-95 on PGE ₂ release
Table 13. IC_{50} values for lead compounds in the three different exposure times
Table 14. Keratinocyte migration effect of lead compounds





List of Schemes

Scheme	1.	Synthetic pathway for the synthesis of 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)
		phenyl 2-phenylacetate derivatives
Scheme	2.	Reaction routes and mechanism of 1st step 11
Scheme	3.	Reaction routes and mechanism of 2nd step 12
Scheme	4.	Synthesis of compounds a-e
Scheme	5.	Synthesis of compounds 1-19
Scheme	6.	Synthesis of compounds 20-38
Scheme	7.	Synthesis of compounds 39-57
Scheme	8.	Synthesis of compounds 58-76 43
Scheme	9.	Synthesis of compounds 77-95
Scheme	10	. General structure of 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-phenylacetate
		derivatives ······ 72





List of Figures

Fig.	1.	Schematic representation of complex step of wound repair	
Fig.	2.	Overview of eicosanoid biosynthesis based on current knowledge from mammalian	
		models ······ 3	
Fig.	3.	G-protein coupled EP receptor signaling pathway	
Fig.	4.	Schematic view of the interactions of NAD^+ and PGE_2 with 15-PGDH residues \cdots 8	
Fig.	5.	5. 3D structure of the homodimer of human 15-PGDH in complex with NAD^+ and	
		PGE ₂ 9	
Fig.	6.	SDS-PAGE of human 15-PGDH 64	
Fig.	7.	Confluent culture in monolayer. a)A549; b)HaCaT; c)HEK293 cell line	
Fig.	8.	PGE ₂ enzyme-linked immunosorbent assay procedure	
Fig.	9.	The MTT cell viability with the time/dose-response relationship of compounds 88	
Fig.	g. 10. Fluorescent microscope image to evaluate wound healing in vitro in the scratch		
		assay using a confluent monolayer of HaCaT keratinocytes	
Fig.	11.	Fluorescent microscope image to evaluate wound healing in vitro in the scratch	
		assay using a confluent monolayer of HaCaT keratinocytes	
Fig.	12.	Results of the wound closure rate (%) illustrated in plots	





Abbreviations

NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PGs	prostaglandins
PUAA	polyunsaturated arachidonic acid
PLA ₂	phospholipase A ₂
COX	cyclooxygenase
PGG ₂	prostaglandin G ₂
PGH ₂	prostaglandin H ₂
ATP	adenosine triphosphate
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
РКА	protein kinase A
PLC-β	phospholipase C-β
GDP	guanosine diphosphate
GTP	guanosine triphosphate
РКС	protein kinase C
15-PGDH	15-hydroxyprostaglandin degydrogenase
NAD^+	nicotinamide adenine dinucleotide
$NADP^+$	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
SDR	short chain dehydrogenase / reductase
H^+	proton
TD	thiazolidinedione
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DHU	dihexylurea
NMR	nuclear magnetic resonance
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis



- vi -



OD	optical density
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
DTT	dithiothreitol
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopytanoside
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
DPBS(-)	Dulbecco's phosphate-buffered saline without Calcium chloride,
	magnesium chloride
DPBS(+)	Dulbecco's phosphate-buffered saline without Calcium chloride,
	magnesium chloride
TLC	thin layer chromatography
BSA	bovine serum albumin
R^2	coefficient of determination
APS	ammonium persulfate
TEMED	Tetramethylethylenediamine
CBB	Coomassie brilliant blue
ND	no detectable activity





Abstract

Synthesis and structure-activity relationship (SAR) analysis of 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-phenylacetate derivatives as 15-PGDH inhibitors

So Hee Park

Academic Advisor : Prof. Cho Hoon, Ph. D. Department of Energy Convergence Graduate School of Chosun University, South Korea

Background During the wound healing, Prostaglandin E_2 (PGE₂) as a lipid signaling molecule which is involved in pathological conditions such as neutrophils influx into the wound sites, angiogenesis, cell migration and proliferation synthesized by cyclooxygenase (COX-1/2) triggered by external stimulations. However it is rapidly metabolized to 15-keto prostaglandin E_2 through chemical reaction of the NAD⁺ dependent 15-PGDH, which prevents specific EP-receptor coupling. This phenomenon delays wound healing in the inflammatory conditions with rapid *in vivo* degradation of PGE₂. In this study, 15-PGDH was selected as the target protein to increase the PGE₂ level which have short half-life in human body.

Experimental procedures In this study, 95 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl) phenyl 2-phenylacetate derivatives, the series of Thiazolidiendione (TD) which was proved to have pharmacological effect through various research, were synthesized and analyzed for structure activity relationship (SAR). In order to analyze the inhibition effect of 15-PGDH, cDNA of human 15-PGDH was inserted into the pGEX-2T expression vector and transformed into E. coli BL-21 DE₃ and purified. Then, the optical density of NADH which is produced by inhibiting the enzyme was measured. The extracellular PGE₂ levels was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with sample from the A549 cell line. 4 lead







compounds (10, 29, 31, 45, 66, 67, 69 and 86) were found by screening of the two data sets. These compounds were used in the MTT assay using HEK293 cell line and scratch-wound healing assay using human keratinocyte HaCaT cell line. The experimental data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) using IBM SPSS statistics version 20.0 (IBM inc., Armonk, NY, USA), and the average differences of the groups were tested with one-way ANOVA or general linear model (GLM - repeated measures) with Dunnet-t post-hoc test. A significance probability, *P*<0.05 was considered significant. Also IC₅₀ values were calculated from the best-fit equation obtained by removing the outlier through the simple regression analysis. The curves were plotted and fitted using Sigmapolt for Windows. Ver. 10.0

Results The lead compounds showed IC₅₀ values ranging from 0.01 to 0.05 μ M. They also increased levels of extracellular PGE₂ in A549 cell. Especially, compounds **66**, **67**, **69** and **86** were significantly increased level of PGE₂ approximately 3 - 4 fold higher than that of negative control. MTT assay were analyzed in confluent monolayers of human embryonic kidney cell line HEK293. Introduction of halogen at C-2 position of intermediate phenyl ring (**66**, **67**, **69** and **86**) showed higher IC ₅₀ values which was represented lower cell cytotoxicity than the other substituents. They also showed significantly improved cell migration and proliferation with respect to negative control in the scratch - wound healing assay using confluent monolayers of human keratinacyte HaCaT cells.

Conclusion Among the lead compounds, introduction of halogen at both terminal phenyl ring and C-2 position of intermediate phenyl ring increased inhibitory potency of 15-PGDH. They also significantly increased extracellular PGE_2 levels and improved wound closure rate with a lower toxicity. It was found that compound **69** [(Z)-2-bromo-4-((2,4 -dioxo-thiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-fluorophenyl)acetate] was the most potent inhibitor that was effective in the nanomolar range. Thus, it can be used for the tissue regeneration and treatment of diverse diseases caused by PGE_2 deficiency.

Key words PGE₂, NAD⁺, 15-PGDH, inhibitors, TD, IC₅₀ values, halogen, wound healing







1. Introduction

Traumatic wound 또는 organ resection 등의 외과적 수술로 인한 조직의 결손은 손상 조직의 기능과 형태적 특성을 정상화시키기 위해 빠른 치유 및 복원이 필요하며, 상처 가 적절히 치료되지 않을 경우 출혈, 2차 감염으로 인한 조직 괴사를 비롯한 각종 합 병증, 반흔, 봉합 부위의 벌어짐, 문합 부 유출 등에 의해 체내 장기에 치명적인 손상 을 일으킬 수 있다[1-2]. 이를 위해 수술 부의 봉합기술 및 수술 기구 등을 개선하는 물리적인 노력과 항생제를 사용함으로써 2차 감염을 막거나, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)를 사용하여 염증반응을 억제하는 등의 내과적 처치에 도 불구하고 부작용 및 상처 치유 속도를 오히려 지연시킬 수 있어 손상 조직의 치유 와 재생을 위한 궁극적 치료가 어렵다[3-7]. 상처치유 과정은 Figure 1 에 도시 된 바와 같이 혈소판 (platelets)과 호중구 (neutrophils)의 유입으로 조직의 연속성이 파괴 되어있 는 상처부위에 섬유소성 응고 (blood clot)를 형성하여 출혈을 막는 지혈기 (hemostasis), 백혈구의 식균 작용 및 대식세포(macrophage)에서 다양한 growth factors, cytokines 및 chemokines 등의 신호분자를 방출하여 증식기의 cell migration 및 proliferation 에 관여 하는 염증기 (inflammatory phase)를 거친 후, 신생혈관, 콜라겐 기질 및 육아조직 형성, 재 상피 화, 상처 수축(wound contraction)등이 일어나는 증식기 (proliferative phase), 상 처 공간이 육아조직으로 완전히 대체되고 혈관 생성이 최고조에 달하며, 교원섬유의 양이 풍부해져 상처치유가 완료되어 조직의 연속성이 다시 유지 되어지는 성숙기 (remodeling)가 복잡하면서도 정교하게 진행된다[8-10]. 상처 치유 과정 중 염증기는 치 유 속도에 가장 영향을 미치며 각질 형성 세포 및 섬유아세포의 상처 부위로의 migration 및 proliferation 이 증가되는 반면, 만성 궤양에서는 각질 형성 세포 및 섬유 아세포의 궤양 주변부로의 cell migration 및 proliferation 이 멈추어있음이 보고되어, 상 처 치유 과정에서 cell migration 및 proliferation 이 중요함을 시사한다. 이는 염증반응 에 관여하는 histamine, bradykinin, prostaglandin, serotonin, norepinephrine등의 signal molecules 들의 상호작용에 의해 정밀하게 조절된다[11-14].





Figure 1. Schematic representation of complex step of wound repair.

이러한 신호분자들 중 염증반응을 조절하는 중요한 인자로 오랫동안 연구되어 생체 내에서의 다양한 기능이 알려진 prostaglandins (PGs)은 eicosanoids라 불리는 signal molecules의 한 종류로 생체 내에서 미리 합성되어 저장되지 않고, C₂₀ fatty acid로부터 유래 된 polyunsaturated arachidonic acid (PUAA, 20:4^{^5,8,11,14})의 순환경로로부터 생성되 며, 이러한 PGs의 생합성 경로를 **Figure 2** 에 도식화 하였다[15-16]. 염증성 자극이 세 포막을 자극하면 arachidonic acid는 phospholipase A₂ (PLA₂)에 의해 분해되어 membrane phospholipid bilayer로부터 세포 내로 유리된 후, 환원된 glutathione과 cyclooxygenase (COX)에 의해 O₂ 분자와 반응하여 prostaglandin G₂ (PGG₂)가 된다. 이는 불안정한 대 사산물인 prostaglandin H₂ (PGH₂)가 되고 세포의 종류나 자극에 따라 다양한 프로스타 글란던 생성 효소(prostaglandin synthase)들에 의해 PGE₂, PGD₂, TXA₂ 등으로 대사되어 심혈관계, 염증 및 면역계, 신경계, 생식계 등에서 극히 소량으로 강력한 생리활성을 나타낸다. arachidonic acid 합성의 순환경로에서 촉매역할을 하는 COX 는 세 종류의



HOSUN UNIVER



isoenzyme COX-1, COX-2 그리고 COX-3이 존재하며 NSAIDs 의 target 이 된다. COX-1 은 지속적으로 다양한 조직에서 발현되어 세포의 항상성을 유지하는 반면, COX-2는 상처 또는 질병과 같은 염증 자극에 반응하여 발현되는 induced enzyme 이므로 COX-2 에 의해 생성된 PGs 이 염증반응과 세포증식에 관여한다[17].



Figure 2. Overview of eicosanoid biosynthesis based on current knowledge from mammalian models. Eicosanoid biosynthesis starts with the cleavage of arachidonic acid from cell membrane phospholipids by cytosolic phospholipase A_2 . Three different prostaglandin E_2 synthases have been identified; microsomal prostaglandin E synthase (mPGES)-1, cytosolic PGES (cPGES), and mPGES-2.



PGs는 스테로이드 호르몬과는 달리 원형질막을 직접적으로 통과할 수 없기 때문에 세포 표면의 특이적인 receptor protein과의 결합을 통해 작용한다[18-21]. PGE2, PGD2, PGF_{2α}, TXA₂ 특이적 수용체를 각각 EP (Ptger), DP (Ptgdr), FP (Pgfr), TP (Tbxa2r) 라 약기하며, 특히 PGE₂의 EP receptor 는 네 종류의 subtype (EP1, EP2, EP3, EP4)을 갖는 다. PGE2가 표적 세포상의 EP receptor 와 특이적이고 친화력 높은 결합을 하게 되면 PGE₂ - EP receptor 의 상호작용으로 구조가 변하면서 인접한 α, β, γ 로 구성된 trimer 인 G - protein과의 결합으로 다양한 후속의 signal metabolism을 중재 한다 (Figure 3). EP2 와 EP4 receptor는 Gαs - protein과 coupling하여 adenylate cyclase를 활성화 시켜 adenosine triphosphate (ATP)로부터 second messenger인 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)를 생성하고, protein kinase A (PKA)를 활성화시킨다. G-protein은 cAMP에 작용 하는 효과 이외에 EP1 receptor - Gα_q-protein결합을 형성하여 phospholipase C-β (PLC-β) 를 활성화한다. 이 효소는 phosphatidylinositol-4,5 -bisphosphate (PIP₂)에 대해 substrate specificity를 갖는다. PGE₂ - EP1 receptor 복합체는 인접한 G - protein의 Gα 상 에서 guanosine diphosphate (GDP)를 guanosine triphosphate (GTP)로 교체하는 반응을 촉매하 며 활성화된 Gα는 GTP와 결합한 후, PLC로 이동하여 활성화시킨다. 활성화된 PLC는 PIP₂를 inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃)과 diacylglycerol (DAG)로 가수분해한다. IP₃는 Ca²⁺ specific ion channel에서 Ca²⁺을 소포체로부터 세포질로 운반하여 세포질의 Ca²⁺농도를 증가시키며, 비극성 DAG는 원형질막을 통해 Ca²⁺농도를 증가시킨다. 또한, 막 - 결합 protein kinase C (PKC)를 활성화함으로써 second messenger로 작용한다. EP3는 Gα, protein과 coupling 함으로써 adenvlate cvclase를 억제하여 세포 내의 cAMP를 감소시키거 나 Gα, - protein 과 coupling 하여 adenylate cyclase를 활성화 시켜 세포 내 cAMP 를 증가시킨다. EP2, EP4 receptor 는 adenvlate cyclase를 활성화시키는 공통된 세포 내 신 호전달기전을 가진 것으로 알려져 있지만, 최근 EP4 receptor는 adenylate cyclase활성화 이외에 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)를 활성화 시켜 cell migration에 대한 선택적 작용을 하는 것으로 밝혀졌다[22-23]. 또한 염증반응에서 PGE2가 보이는 호중구의 증 가, 신생 혈관의 생성, cell migration 및 proliferation 등의 다양한 활성은 각각의 세포나 조직에 존재하는 특이적인 EP receptor와 세포 내 신호전달과정에 의해 나타나며, 현재 이러한 EP receptor에 특이적인 선택성을 갖는 agonist 와 antagonist를 사용하여 이들 receptor 의 다양한 역할들이 밝혀지고 있다[25-27]. 이러한 연구 결과들에 의해 특이적 인 EP receptor를 통한 PGE2의 신생 혈관 생성, 럼프구의 분화와 증식 등의 기능이 증 명 되었으나, PGE2가 급성염증에서의 혈관 확장, 부종, 발열 등을 유발하며 자가 면역 질환인 류마티스 질환에서는 신생혈관의 생성으로 인해 조직 파괴의 원인이 되며 악성 종양의 유발에 영향을 미칠 수 있어, 과거 많은 연구에서는 흔히 구할 수 있는 NSAIDs 인 aspirin, ibuprofen, naproxen 및 indomethacin등을 투여하여 COX-1 과 COX-2

Collection @ chosun

의 활성을 억제하거나 자가 면역 질환의 경우 면역억제제 및 EP receptor의 작용을 선 택적으로 억제하는 약물을 처방하는 등 세포 내 PGE₂의 생성을 억제하는 것에 초점을 맞춘 약물 설계 및 치료적 접근법을 제시하였다[28-31].

그러나 최근 이러한 PGE₂의 catabolic effect에 반하여 anabolic effect를 증명하고 손상 된 장기에서 tissue regeneration능력을 규명한 연구가 활발히 이루어지고 있다[32-34]. 특 히 James, M.J. 등의 연구에서 NSAIDs의 사용이 오히려 염증의 만성화를 가져올 수 있 음을 COX에 의해 생성되는 eicosanoid인 TXA2와 PGE2의 비와 관련하여 설명하였다 [35]. TXA2 대식세포에서 IL-1β나 TNF-α와 같은 염증성 cytokines을 증가시켜 염증반 응을 촉진하고[36], PGE2는 염증 초기에 급성 염증 작용을 매개하여 혈관확장, 부종, 발열, 동통 등을 유발하지만, 염증반응이 진행됨에 따라 대식세포의 IL-1β 와 TNF-α 의 발현을 억제하고 Th 1 type의 cytokines생성을 억제하며, Th 2세포의 분화를 촉진하 여 염증성 cytokines에 의한 조직파괴나 세포면역반응을 감소시킨다[35]. TXA2와 PGE2 는 동일한 전구체인 PGH2로부터 합성되므로 발현되는 TXA2 / PGE2의 비는 각각의 prostaglandin synthease (PGES)의 능력에 의존하는데, TXA synthase는 PGE synthase에 비 해 낮은 기질 농도에서 포화상태가 되고 PGH2에 상대적으로 강한 친화력을 가지고 있 어 PGH2의 농도가 낮은 염증반응의 초기에는 상대적으로 TXA2의 비가 높게 나타난 다. 반면 시간이 지남에 따라 유도된 COX-2에 의해 PGH2의 농도가 높아진 염증반응 후기에는 TXA synthase가 이미 포화되어 TXA2의 생성은 일정하게 유지되는 반면, PGE2의 생성은 지속적으로 증가되어 PGE2의 비가 우세하게 된다[37]. 따라서 염증질환 에서 NSAIDs의 사용은 PGE, 발현 및 활성을 억제하여 단기적으로는 염증반응으로부터 의 증상을 완화시키는 효과를 볼 수 있으나, TXA2 / PGE2의 balance를 TXA2의 활성이 우세한 방향으로 기울게 하여 염증성 cytokines에 의한 조직파괴를 조장하고, 염증이 만성화 될 가능성이 제기되었다[38]. 또한 세포의 항상성을 유지시키는 COX-1까지 억 제시킴으로써 위염, 위 계양 및 위 천공 까지도 유도하는 등 심각한 부작용이 강조되 고 있다[39]. PGE₂의 억제는 단기적으로는 염증에 의한 증상의 조절에 도움을 줄 수 있지만 면역반응을 Th 1 type면역반응으로의 편향을 초래하여 병의 지속을 초래할 수 있으므로, 역으로 PGE2수준을 상향 조절 시켜 염증에 대한 잠재적인 치료 및 조직의 재생에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.





Figure 3. G-protein coupled EP receptor signaling pathway. PGE_2 mediates its biological functions by binding to four different types of membrane-bound, G-protein coupled receptors. Immediately upon biosynthesis, PGs exit the site of production passively of through constitutively expressed facilitated transport (MRP₄).

한편 PGE₂는 화학적으로 불안정하고 생체 내 (*in vivo*)에서 빠른 대사로 인해 짧은 half life를 갖으며[40], 이러한 PGs및 이들 동족체가 일반적으로 hydroxyl (-OH) 및 carboxyl (-COOH) group을 가진 형태에서 active site를 갖으나, NAD⁺ - dependent 15-hydroxyprostaglandin degydrogenase (15-PGDH)에 의해 빠르게 15-ketoprostaglandin으로 대사되어 EP receptor와 결합하지 못하고 생리활성을 잃게 된다[41]. PGE₂의 불활성화 과정은 15번 탄소(C-15) 위치에 hydroxyl group (-OH)을 갖는 프로스타글란딘 계 화합 물의 C-15를 케톤 (RC(=O)R')으로 산화시킴으로 인해 EP receptor가 갖는 특이적인 선





택성에 따라 PGE, - EP receptor복합체를 형성하지 못하여 원형질막을 통과하지 못 하 게 된다. 결국 signal molecules로서의 역할을 할 수 없어 다양한 생리적 활성을 띄는 것이 불가능하게 된다. 세포질 효소 (cytosolic enzyme)인 15-PGDH는 인간뿐만 아니라 다양한 포유동물의 조직에 편재되어있으며 발견 초기에 태반, 폐 및 신장으로부터 추 출되어 분리된 이후 고유의 입체구조와 생리적 활성을 규명하고자 하는 많은 연구가 이루어지고 있다. 이 효소는 정상적인 촉매활성을 위해 organic cofactor로 coenzyme 와 의 결합을 통해 산화 - 환원 반응을 촉매하고, coenzyme에 따라 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)와 결합하는 Type I과 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺)와 결합하는 Type Ⅱ로 나눌 수 있다[42]. 전자 의 경우 기질 PGs에 대한 속도 상수인 Km값이 후자에 비해 더 낮은 것으로 밝혀졌으며, Km값이 낮을수록 효소 - 기 질 중간 복합체 (intermediate enzyme-substrate complex)형성에 반응 속도가 빠르므로, NAD⁺ - dependent 15-PGDH가 기질 PGs에 대해 친화성이 더 높음을 의미한다[43-44]. 따라서 전자는 PGs를 생리적으로 불활성화 시키는 주요한 요인으로 여겨지며, 본 연구 에서는 PGE2대사에 관여하는 15-PGDH를 Type I에 초점을 두었다. 15-PGDH의 구조 와 PGs불활성화 mechanism을 규명하기 위한 많은 연구들은 인간의 세포질에서 얻은 이 효소의 DNA sequencing 을 통해 primary structure 를 얻는 것으로부터 시작되었다. 현재 총 266개 아미노산들의 암호화된 배열에서 이 효소는 짧은 사슬 탈수소 효소/환 원효소 (short chain dehydrogenase / eductase, SDR)종에 속하고 28,975 Da (약 29 kDa)의 분자량을 갖는 것으로 밝혀졌다[44]. 또한 단백질 분자 모델링을 통한 삼차구조의 예측 을 통해 두 개의 protein subunits가 homodimer를 이루어 활성 띄며 site-directed mutagenesis연구를 통해 NAD⁺와 상호작용을 하는 기능 부위를 예측해 볼 수 있다. 이 효소의 PGs 불활성화 시키는 반응의 mechanism을 Figure 4 에 나타낸 바와 같이 분자 수준에서 분석하였으며, 15-PGDH-NAD⁺ - PGE₂의 3차원 구조 모델을 Figure 5 에 도식 화 하였다. 15-PGDH의 amino acid residues들은 NAD⁺와 상호작용을 하며, 특히 PGE₂를 15-ketoprostaglandin으로 산화시킴에 있어 Serine 138 (Ser 138), Tyrosine 151 (Tyr 151) 및 Lysine 155 (Lys 155) 의 촉매 작용이 매우 중요하다[45]. Lys 155 는 ribose의 -OH 들과의 hydrogen bond를 통해 NAD⁺의 배향을 결정하며, 정전기적 상호작용으로 Tyr 151 의 pKa값을 낮추어 강산이 된다. 이는 곁사슬의 proton (H⁺)을 쉽게 내어주고 산소 원자에 음전하를 갖게 함으로써 염기로 작용하게 된다. 그 후 C-15의 -OH group에서 H⁺을 제거하고 연쇄적으로 NAD⁺에 수소음이온 (H:⁻)을 전달함으로써 NADH로 환원 되며 PGE₂는 15-ketoprostaglandin으로 전환되어 생리활성을 잃게 된다.







Figure 4. Schematic view of the interactions of NAD^+ and PGE_2 with 15-PGDH residues. The hydrogen bonds are indicated with dashed lines; Catalytically important triad (Ser138, Lys155 and Try151) is highlighted in blue.









최근 Zhang, Y.G. 등의 15-PGDH knockout mice와 wild type mice의 비교 연구에서, 선천적으로 15- PGDH가 결핍된 쥐의 조직에서 PGE₂ 농도가 2 - 3배 이상 증가했으며 골수이식, 대장염 유발 물질 (2% dextran sulfate sodium, DSS)투여, 간 절제술을 시행 한 결과 대조군인 정상 쥐에 비해 골수 세포의 신속한 복원, 대장염 발생 감소 와 더 불어 두 배 이상의 간 재생능력을 보여 15-PGDH의 활성을 억제 할 경우 세포 내 PGE₂의 농도가 높아지며 장기 절제술 및 골수질환, 염증성 장 질환, 피부 및 부속 장 기 등 여러 장기의 조직 재생을 촉진시키는 치료제로 폭넓게 사용할 수 있는 가능성이 제시 되었다[32].

따라서 외상이나 외과적 수술 시 손상된 조직에서 PGE₂수준을 상향 조절 시킬 경 우, 세포의 분화를 촉진하여 조직의 재생에 도움을 주어 빠른 회복을 기대 해 볼 수 있을 것이며 이를 위해서는 PGE를 불활성화 시키는 15-PGDH를 억제시키는 약물개발 이 필요하다. 이에 본 연구에서는 손상된 조직의 regeneration을 위해 15-PGDH를 target protein으로 정하였으며, 이를 억제시켜 세포 내 PGE₂발현을 증가시키는 것에 초점을 두어 2,4-thiazolidinedione (TD)을 출발 물질로 하는 TD계 약물을 설계하였다. 이 물질 은 1954년 처음 thiazolidinedione계 유도체의 항 결핵 효과에 대한 연구가 보고된 이후 다양한 유도체들의 염증 작용 감소, 항 당뇨 효과, 고 중성 지방 혈증, 유리지방산 및



혈압을 감소시키는 효과가 증명된 바 있어 임상에서 여러 질환의 치료제로서 다양한 활성이 기대되는 물질로[46-48], 이에 착안하여 TD계열의 유도체를 합성하여 15-PGDH 억제와 관련 된 약리 활성 측정 및 분석을 하였다. 2,4-thiazolidinedione을 출발물질로 하여 합성 한 TD계 유도체인 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-phenyl -acetate 유도체의 전반적인 합성 경로는 scheme 1 에 나타낸 바와 같이 두 단계 반응 을 포함하며 scheme 2 와 scheme 3 에 각 단계의 mechanism 을 제시하였다[49].



Scheme 1. Synthetic pathway for the synthesis of 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-phenyl -acetate derivatives

scheme 2 에 나타낸 1st step reaction은 촉매인 piperidine과 acetic acid의 존재 하에 이루어지며 α수소 원자를 갖는 aldehyde와 ketone의 aldol reaction이라 부르는 염기 - 촉 때 carbonyl condensation과 산/염기 촉매에 의해 탈수되어 콘쥬게이션 엔온이 생성되는 반응이다. 염기 (base)인 piperidine에 의해 TD의 α수소 원자의 제거로부터 엔올 음이온으로 전환되며(i), 엔올 음이온은 친핵성 주개로 작용하고 알데하이드의 친전자성 카 보닐기에 첨가됨으로써 새로운 C-C 결합이 생성(ii)된다. 그 후 정 사면체 형 알콕시 화 이온 중간체의 양성자 첨가는 중성 축합 생성물인 β-하이드록시 카보닐 화합물을 생성(iii)하고 염기촉매는 재생된다. 이 화합물은 카보닐기가 있기 때문에 하이드록시 이온이 나쁜 이탈기 임에도 불구하고 산/염기 촉매에 의해 쉽게 탈수된다. 염기성 조건 에서는 산성인 α수소가 제거되고, 엔올 음이온이 형성되면서 ElcB 반응으로 -OH 이 탈기를 밀어내며 산성 조건에서는 엔올이 생성(iv)되고 -OH 기에 양성자가 첨가된 다 음, El 반응이나 E2 반응처럼 물이 떨어져나감으로써 이중결합이 생성(v)된다. 염기성 조건과 산성 조건 모두 시험 해 본 결과 산 촉매를 사용 할 경우의 수득률이 더 높았 기 때문에, 본 실험에서는 탈수 과정에서 acetic acid를 사용하였다.

schem 3 에 나타낸 바와 같이 ester bond를 형성하는 단계인 2nd reaction은 산과 알 콜의 esterification으로, 카볼실산의 -OH 기는 나쁜 이탈기이기 때문에 direct esterification 에 의해서는 합성이 어렵다. 따라서 본 실험에서는 N,N'-dicyclohexylcarbo -diimide (DCC)를 사용하여 전이상태의 에너지를 낮추어 반응물의 바닥상태와 전이상 태 사이의 에너지 차이인 활성화 에너지 (ΔG^{*})를 감소시킴으로써 반응속도를 빠르게 해 주었으며, DCC와 카복실산의 부가체 (adduct)에서 acyl group이 이동하는 부반응을 억제하기 위하여 촉매로서 4-dimethylaminopyridine (DMAP)를 사용하였다. 카복실 산에





의해 DCC에 H⁺이 첨가되어 좀 더 좋은 전자 받개가 되는 것(i)으로부터 시작되어 카 복실산 음이온은 양성자 첨가된 carbodiimide에 첨가(ii)된다. 그 후 DMAP와 결합함으 로써(iii) dihexylurea (DHU)가 떨어져 나가며(iv), 첫 번째 반응 생성물의 -OH기의 친 핵성 공격(v)이 진행되어 DMAP가 떨어져나가면서 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene) methyl)phenyl 2-phenylacetate유도체가 생성(vi)된다.



Scheme 2. Reaction routes and mechanism of 1st step

Collection @ chosun





Scheme 3. Reaction routes and mechanism of 2nd step

Collection @ chosun

위의 반응 mechanism에 따라 동일 반응계에서 다양한 치환기를 가진 유도체를 합성 한 후 nuclear magnetic resonance (NMR)을 통해 구조를 분석하였으며 15-PGDH활성 억 제 평가를 위해 인간 태반 유래 15-PGDH (human placental 15-PGDH)의 DNA가 삽입된 pGEX-2T expression vector를 chemically competent E. coli BL21 - DE₃ cell에 형질 전환 시킨 후 배양 및 정제 하여 Bradford방법으로 농도를 정량하였고, sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)을 통해 분자량 및 순도를 확인하 였다[50-51]. 정제 한 15-PGDH는 다양한 농도로 약물을 처리하여 NADH의 optical density (OD)값을 측정하여 활성을 50% 억제하는 농도 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)를 계산하였다. NADH는 효소를 도와 정상적인 촉매활성을 위해 필 요한 조효소 NAD⁺의 환원된 형태로 세포의 대사 작용과 대사의 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 수행한다[52]. 이러한 NADH는 wavelength 340nm의 UV를 조사 할 경우 460nm에서 형광을 발광하는 특성을 갖는 반면, NAD⁺의 흡수 극대 과장 (absorption maximum wavelength)이 260nm이므로 NAD⁺ ↔ NADH의 변화는 340nm영역의 UV를 조 사하여 훕광도를 측정함으로써 확인할 수 있다[53-54]. 이는 NAD⁺ -dependent 15-PGDH 에 의해 PGE₂의 C₁₅ - OH group으로부터 H:⁻가 NAD⁺로 이동함으로써 생성된 NADH 양을 흡광도를 통해 산출할 수 있다. 즉, 15-PGDH의 활성을 강하게 억제할수록 NADH 의 농도는 감소하게 되며, NADH의 흡광도 또한 감소하게 된다. 15-PGDH 억제는 세포 내 PGE₂의 농도를 상향 조절하게 되며, 이는 인간 유래 폐암 세포 주 A549 cell line을 이용한 cell model을 통해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)에 따라 PGE2농도 를 정량함으로써 증명하였다[55-57]. 위의 두 실험을 통해 얻은 data를 분석하여 낮은 농도에서도 15-PGDH를 강력하게 억제하여 PGE2를 효율적으로 증가시키는 lead compounds을 선정하였으며, 선정된 후보 물질은 인간 유래 각질 형성 세포주인 HaCaT cell line을 이용하여 invitro상에서 인간 피부 조직의 각질을 재현하고 물리적인 scratch 를 형성시킨 후 약물에 노출시켜 wound width를 비교함으로써 cell migration 및 proliferation 에 대한 효능을 확인하여 상처치유 가능성을 제시하였다[58]. 또한 인간 유 래 정상 신장세포주인 HEK293 cell line을 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2 -vl)-2,5-diphenvl tetrazolium bromide)) 환원 (reduction)방법에 따라 세포 독성과 생존율을 측정하여 의약품으로서 안전성을 검증하였다[59-60]. lead compounds를 이용한 실험을 통해 합성한 물질의 구조에 따른 약리 활성을 종합적으로 검토하였으며 전 임상시험 (preclinical test) 을 목적하는 candidate를 선정하였다[61-62].





2. Experimental procedures

2.1. Reagents and analysis apparatuses

2.1.1. Chemical

유도체 합성에 사용된 시약은 Sigma aldrich(USA), TCI(Japan), Alfa aesar(UK), Acros(USA)등 시판 되고 있는 제품을 구입하여 사용하였으며 합성 및 정제에 사용 된 용매는 국내 시약사로부터 99%이상의 순도 높은 것으로 구매하여 별도의 건조 및 증 류과정을 거치지 않고 사용하였다. 정제 된 유도체의 ¹H-NMR구조 분석에 사용된 기 기 및 용매는 FT-NMR spectroscopy (JEOL JNM-LA 300 spectrometer, 300MHz, Japan), DMSO(dimethyl sulfoxide) Sigma aldrich(USA)를 사용하였으며 chemical shift 는 ppm (part per million; δ), signal은 s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (double of doublet), dt (double of triplet), td (triple of doublet), m (multiplet)으로 표시하였다.

2.1.2. Biological

15-PGDH 발현을 위한 DNA는 GST gene fusion (BamH I와 EcoR I site에 15-PGDH를 삽입 한) pGEX-2T expression vector (pharmacia, USA)를 사용하였으며 competent E. coli 는 BL21-DE3 (Novagen, Germany)를 사용하였다. 실험에 사용한 시약은 LB broth miller, Ampicillin sodium salt, Tris(hydroxymethyl)aminomethane 는 Bioshop (Canada), agar 는 Difco (USA), isopropyl-β-D-thiogalactopytanoside (IPTG), L-Glutathione reduced minimum, Mitomycin C from Streptomyces caespitosus, NAD⁺, PGE₂, dithiothreitol (DTT), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Sigma aldrich (USA), Glutathione Sepharose-4B는 GE Healthcare (UK), Bio-rad Protein assay dye reagent concentrate, Coomassie brilliant blue - R250은 (BIO-RAD, USA), Fetal bovine serum (FBS) ,Dulbecco's phosphate-buffered saline without Calcium chloride, magnesium chloride (DPBS(-))는 Welgene (Korea)제품을 사용하였으며, FBS의 경우 해동 후 56℃ water bath 에서 30분간 heat-inactivation 과정을 거쳐 50ml conical tube 에 분주하여 -20℃에 보관 하였고 필요에 따라 해동하여 사용하였다. RPMI-1640 medium (1X) [with 2.05mM L-Glutamine, 0.1µm sterile filtered], Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) / HIGH GLUCOSE [with 4.00mM L-Glutamine, 4500mg L-Glucose, sodium pyruvate, $0.1 \mu m$ sterile filtered] 는 Hyclone (USA), 0.25% Trypsin-EDTA (1X), Antibiotic-Antimycotic (100X) 은 Gibco (USA), Pageruler prestained protein ladder 는 Thermo Fisher scientific (USA), TGF-





β1은 Biovision (USA)그리고 ab133021-Prostaglandin E₂ ELISA Kit는 abcam (UK)제품을 사용하였다. 분석 장비로는 형광분광광도계 (fluorescence spectrophotometer; data analysis software: RF-5301 PC, Shimadzu, Japan), micro plate spectrophotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer; BioTek, USA; light source: Xenon flash; data analysis software: Gen 5 ™)및 광학 현미경 (biological microscope IX71; light source: TH4-200; data analysis software : DP2-BSW; Olympus, Japan)을 사용하였다.



2.2. Synthesis of 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-phenylacetate derivatives

2.2.1. General procedures for the synthesis of compounds a - e

합성 중간물질인 화합물 a - e의 합성 방법은 Scheme 4 에 도식화 하였다. 구체적인 실험 방법은 (a) 에 나타내었으며 나머지 화합물의 경우 합성 방법이 a 와 동일하므로 생략하였다.



Х=Ң, ОСҢ, ОСҢ_СҢ, Вг, С

Scheme 4. Synthesis of compounds a-e. reagents and conditions; piperidine, acetic acid, 80°C, reflux, 18h with dean-stark trap

5-(4-hydroxy-benzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione (a)



100ml 둥근 flask 에 2,4-thiazolidinedione 1g (8.54mmol)과 4-hydroxy benzaldehyde 1.043g (1.0eq; 8.54mmol) 를 toluene 20ml에 용해시키고 piperidine 0.422ml (0.5eq; 4.27mmol) 과 acetic acid 0.247 (0.5eq; 4.27mmol) 을 천천히 적가한 후 dean-stark trap 장치를 이용하여 80℃에서 18시간 이상 reflux 시켰다. 반응의 완료는 Hexane : Ethyl acetate = 1:1 을 전개용매로 하여 thin layer chromatography (TLC)상에서 확인할 수 있 었으며, 생성된 화합물은 감압 농축하여 용매를 제거한 후 잔사를 methanol (CH₃OH) 을 사용하여 씻어주었고 감압 여과 후 건조시켜 황색의 순수한 결정을 얻었다.

위의 합성 방법을 통해 황색의 결정을 얻었다. Rf = 0.4 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 95.7%; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.46 (s, 1H), δ 10.32 (s, 1H),

- 16 -



Collection @ chosun

δ 7.69 (s, 1H), δ 7.46 (d, J= 8.79 Hz, 2H), δ 6.92 (d, J=8.40 Hz, 2H)

5-(4-hydroxy-3-methoxy benzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione (b)



화합물 a 와 동일한 반응으로 황색의 결정 b 를 얻었다. Rf = 0.43 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 92.4% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.46 (s, 1H), δ 9.95 (s, 1H), δ 7.71 (s, 1H), δ 7.17 (d, *J*= 2.22 Hz, 1H), δ 7.08 (dd, *J*=8.43 and 8.07 Hz, 1H), δ 6.93 (d, *J*= 8.04 Hz, 1H), δ 3.82 (s, 3H)

5-(4-hydroxy-3-ethoxy benzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione (c)



화합물 a 와 동일한 반응으로 황색의 결정 c 를 얻었다. Rf = 0.49 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 93.8% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.47 (s, 1H), δ 9.89 (s, 1H), δ 7.70 (s, 1H), δ 7.15 (d, *J*= 1.83 Hz, 1H), δ 7.08 (dd, *J*=8.43 and 8.07 Hz, 1H), δ 6.94 (d, *J*= 8.07 Hz, 1H), δ 4.10 (m, 2H), δ 1.38 (t, 3H)

5-(3-bromo-4-hydroxy benzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione (d)



화합물 a 와 동일한 반응으로 황색의 결정 d 를 얻었다. Rf = 0.41 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 91.4% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.54 (s, 1H), δ

11.16 (s, 1H), δ 7.78 (d, J= 2.19Hz, 1H), δ 7.69 (s, 1H), δ 7.45 (dd, J=8.79 Hz, 1H), δ 7.10 (d, J= 8.40 Hz, 1H)

5-(3-cholro-4-hydroxy benzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione (e)



화합물 a 와 동일한 반응으로 황색의 결정 e 를 얻었다. Rf = 0.44 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 91.9% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.51 (s, 1H), δ 11.16 (s, 1H), δ 7.69 (s, 1H), δ 7.63 (d, J= 2.19Hz, 1H), δ 7.42 (dd, J=8.79 Hz, 1H), δ 7.12 (d, J= 8.43 Hz, 1H)



2.2.2. General procedures for the synthesis of compounds 1-19

화합물 1-19 의 합성 방법은 Scheme 5 에 도식화 하였다. 구체적인 실험 방법은 (1) 에 나타내었으며 나머지 화합물의 경우 합성 방법이 1 과 동일하므로 생략하였다.



Scheme 5. Synthesis of compounds 1-19. reagents and conditions; DCC, 4-DMAP, methylenechloride, o°C (5min)→r.t(3h)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(o-tolyl)acetate (1)



등근 flask 에 화합물 a 1g (4.52mmol)을 넣고 o-tolyl acetic acid 0.679g (1.0eq; 4.52mmol) 과 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP) 55mg (10mol%; 0.45mmol) 을 넣은 후 용매 methylene chloride (CH₂Cl₂) 20ml을 가하여 ice bath에서 5분 간 교반하였다. 그 후 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 0.93g (1.0eq; 4.52mmol) 을 넣어 상온에서 약 3시간 동안 반응시켰다. 반응의 진행은 Hexane : Ethyl acetate = 1:1을 전개용매로 하여 thin layer chromatography (TLC)상에서 확인 할 수 있었으며 반응이 종결됨을 확인한 후 생 성 된 dihexylurea (DHU)를 감압 여과하였다. 여과 후 여액은 0.5M HCl 수용액, 포화 NaHCO₃ 수용액 순으로 차례로 추출하였으며, 중간에 brine 과 물로 반복하여 씻어내는 과정을 통해 불순물을 제거하였고 unhydrous MgSO₄로 탈수시킨 후 감압 농축하여 용 매를 제거하였다. 생성 된 고체는 ethanol을 사용하여 재결정 하여 순수한 결정을 얻을 수 있었다.



위의 합성 방법을 통해 연황색의 결정 1 을 얻었다. Rf = 0.59 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 78.13% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.66 (dt, *J*=8.79 and 1.83 Hz, 2H), δ 7.30 (m, 3H), δ 7.23 (m, 3H), δ 4.00 (s, 2H), δ 2.31 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(m-tolyl)acetate (2)



화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 2 를 얻었다. Rf = 0.72 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 75.47% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.63 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.66 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.31 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.25 (d, *J*=7.32 Hz, 2H), δ 7.18 (d, *J*=9.15 Hz, 2H), δ 7.12 (d, *J*=7.32 Hz, 1H), δ 3.94 (s, 2H), δ 2.31 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl2-(2-chlorophenyl)acetate (3)



화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 3 을 얻었다. Rf = 0.69 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 74.77% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.63 (s, 1H), δ 7.82 (s, 1H), δ 7.66 (d, *J*=7.26 Hz, 2H), δ 7.30 (t, *J*=8.79 Hz, 4H), δ 7.18 (d, *J*=8.04 Hz, 2H), δ 3.93 (s, 2H), δ 2.29 (s, 3H)







화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 4 를 얻었다. Rf = 0.68 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 78.06% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.66 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.54 (m, 2H), δ 7.38 (m, 4H), δ 4.13 (s, 2H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl2-(3-chlorophenyl)acetate (5)



화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 5 를 얻었다. Rf = 0.67 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 67.73% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.63 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.67 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.48 (s, 1H), δ 7.43 (m, 5H), δ 4.05 (s, 2H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl2-(4-chlorophenyl)acetate (6)



화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 6 을 얻었다. Rf = 0.64 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 68.07% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.67 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.42 (m, 4H), δ 7.32 (dt, *J*=8.79 and

- 21 -



1.83 Hz, 2H), δ 4.02 (s, 2H)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (7)

화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 7 을 얻었다. Rf = 0.67 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 71.23% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.63 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.67 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.55 (d, *J*=7.68 Hz, 2H), δ 7.41 (t, *J*=7.68 Hz, 1H), δ 7.32 (d, 8.79 Hz, 2H), δ 4.30 (s, 2H)





화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 8 을 얻었다. Rf = 0.67 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 82.38% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.68 (d, *J*=8.43 Hz, 3H), δ 7.54 (d, *J*=7.71 Hz, 1H), δ 7.43 (t, *J*=7.32 Hz, 1H), δ 7.32 (m, 3H), δ 4.14 (s, 2H)





화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 9 를 얻었다. Rf = 0.69 (Hexane :




Ethyl acetate = 1:1); yield : 81.69% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.67 (m, 3H), δ 7.51 (d, J=7.71 Hz, 1H), δ 7.41 (d, J=7.71 Hz, 1H), δ 7.35 (m, 3H), δ 4.04 (s, 2H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl2-(4-bromophenyl)acetate (10)



화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 10 을 얻었다. Rf = 0.68 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 81.32% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.67 (d, **J**=8.79 Hz, 2H), δ 7.58 (dt, **J**=8.43 and 1.86 Hz, 2H), δ 7.37 (m, Hz, 4H), δ 4.01 (s, 2H)





화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 11 을 얻었다. Rf = 0.75 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 81.92% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.66 (d, *J*=8.76 Hz, 2H), δ 7.49 (td, *J*=7.32 and 1.44 Hz, 1H), δ 7.41 (m, 5H), δ 4.06 (s, 2H)







화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 12 를 얻었다. Rf = 0.70 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 74.75% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.67 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.45 (m, 1H), δ 7.33 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.27 (t, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.17 (td, *J*=8.43 and 2.19 Hz, 1H), δ 4.05 (s, 2H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl2-(4-fluorophenyl)acetate (13)



화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 13 을 얻었다. Rf = 0.72 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 74.87% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.66 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.45 (m, 2H), δ 7.32 (dt, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 2H), δ 7.21 (m, 2H), δ 4.00 (s, 2H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl2-(2-methoxyphenyl)acetate (14)



화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 14 를 얻었다. Rf = 0.65 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 83.36% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.66 (d, *J*=8.76 Hz, 2H), δ 7.31 (m, 4H), δ 7.04 (m, 1H), δ 6.95 (t,



J=7.35 Hz, 1H), δ 3.88 (s, 2H), δ 3.83 (s, 3H)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl2-(3-methoxyphenyl)acetate (15)

화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 15 를 얻었다. Rf = 0.64 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 72.94% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.66 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.31 (m, 3H), δ 6.96 (m, 2H), δ 6.88 (dd, *J*= 8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 3.96 (s, 2H), δ 3.75 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl2-(4-methoxyphenyl)acetate (16)



화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 16 을 얻었다. Rf = 0.65 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 71.33% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.66 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.30 (d, *J*=7.71 Hz, 4H), δ 6.93 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 3.91 (s, 2H), δ 3.74 (s, 3H)









Ethyl acetate = 1:1); yield : 68.05% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.67 (d, J=8.79 Hz, 2H), δ 7.31 (d, J=8.79 Hz, 2H), δ 6.98 (m, 3H), δ 3.90 (s, 2H), δ 3.75 (s, 6H)





화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 18 을 얻었다. Rf = 0.31 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 67.02% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.66 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.67 (d, J=8.79 Hz, 2H), δ 7.34 (d, J=8.79 Hz, 2H), δ 6.70 (s, 2H), δ 3.92 (s, 2H), δ 3.77 (s, 6H), δ 3.64 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl2-(4-ethoxyphenyl)acetate (19)



화합물 1 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 19 를 얻었다. Rf = 0.49 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 72.75% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.66 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.66 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.30 (m, 4H), δ 6.91 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 4.03 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 3.90 (s, 2H), δ 1.33 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)



2.2.3. General procedures for the synthesis of compounds 20-38

화합물 20-38 의 합성 방법은 Scheme 6 에 도식화 하였다. 구체적인 실험 방법은 (20) 에 나타내었으며 나머지 화합물의 경우 합성 방법이 20과 동일하므로 생략하였다.



Scheme 6. Synthesis of compounds 20-38. reagents and conditions; DCC, 4-DMAP, methylenechloride, o°C $(5min) \rightarrow r.t(3h)$





등근 flask 에 화합물 b 1g (3.98mmol)을 넣고 o-tolyl acetic acid 0.598g (1.0eq; 3.98mmol) 과 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP) 49mg (10mol%; 0.40mmol) 을 넣은 후 용매 methylene chloride (CH₂Cl₂) 20ml을 가하여 ice bath 에서 5분 간 교반하였다. 그 후 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 0.82g (1.0eq; 3.98mmol) 을 넣어 상온에서 약 3 시간 동안 반응시켰다. 반응의 진행은 Hexane : Ethyl acetate = 1:1을 전개용매로 하여 thin layer chromatography (TLC) 상에서 확인 할 수 있었으며 반응이 종결됨을 확인한 후 생성 된 dihexylurea (DHU) 를 감압 여과하였다. 여과 후 여액은 0.5M HCl 수용액, 포화 NaHCO₃ 수용액 순으로 차례로 추출하였으며, 중간에 brine 과 물로 반복하여 씻 어내는 과정을 통해 불순물을 제거하였고 unhydrous MgSO₄ 로 탈수시킨 후 감압 농축 하여 용매를 제거하였다. 생성 된 고체는 ethanol을 사용하여 재결정 하여 순수한 결정 을 얻을 수 있었다.

위의 합성 방법을 통해 연황색의 결정 20 을 얻었다. Rf = 0.62 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 80.42% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ

- 27 -



7.80 (s, 1H), δ 7.37 (d, J=1.83 Hz, 1H), δ 7.31 (m, 1H), δ 7.27 (s, 1H), δ 7.24 (m, 4H), δ 3.98 (s, 2H), δ 3.80 (s, 3H), δ 2.31 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(m-tolyl)acetate (21)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 21 을 얻었다. Rf = 0.65 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 83.95% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.37 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.27 (m, 2H), δ 7.19 (m, 3H), δ 7.14 (t, *J*=6.96 Hz, 1H), δ 3.92 (s, 2H), δ 3.80 (s, 3H), δ 2.31 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(p-tolyl)acetate (22)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 22 를 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 84.86% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.37 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.26 (d, *J*=8.04 Hz, 3H), δ 7.19 (m, 3H), δ 3.91 (s, 2H), δ 3.79 (s, 3H), δ 2.29 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(2-chlorophenyl)acetate (23)



- 28 -



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 23 을 얻었다. Rf = 0.61 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 71.04% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.54 -7.32 (m, 5H), δ 7.27 (d, J= 8.04 Hz, 1H), δ 7.20 (dd, J=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.12 (s, 2H), δ 3.81 (s. 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3-chlorophenyl)acetate (24)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 24 를 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 67.79% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.47 (s, 1H), δ 7.41 (m, 4H), δ 7.3 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), δ 7.20 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.03 (s, 2H), δ 3.80 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(4-chlorophenyl)acetate (25)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 25 를 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 72.39% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.45 (m, 5H), δ 7.28 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.19 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.00 (s, 2H), δ 3.79 (s, 3H)



Collection @ chosun

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (26)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 26 을 얻었다. Rf = 0.65 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 74.69% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.55 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.41 (m, 2H), δ 7.30 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.20 (dd, *J*=8.07 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.28 (s, 2H), δ 3.81 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(2-bromophenyl)acetate (27)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 27 을 얻었다. Rf = 0.57 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 65.92% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.67 (dd, *J*=7.68 and 1.11 Hz, 1H), δ 7.54 (dd, *J*=7.71 and 1.47 Hz, 1H), δ 7.42 (m, 2H), δ 7.29 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.20 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.12 (s, 2H), δ 3.81 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3-bromophenyl)acetate (28)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 28 을 얻었다. Rf = 0.62 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 74.17% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H),

δ 7.80 (s, 1H), δ 7.61 (s, 1H), δ 7.52 (t, *J*=7.41 Hz, 1H), δ 7.40 (m, 4H), δ 7.20 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.03 (s, 2H), δ 3.81 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(4-bromophenyl)acetate (29)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 29 를 얻었다. Rf = 0.62 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 72.02% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.58 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.37 (m, 2H), δ 7.28 (d, *J*=8.04 Hz, 1H), δ 7.19 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 3.99 (s, 2H), δ 3.79 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(2-flouorophenyl)acetate (30)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 30 을 얻었다. Rf = 0.59 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 85.23% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.48 (t, *J*=7.68 Hz, 1H), δ 7.40 (m, 2H), δ 7.28 (m, 4H), δ 4.04 (s, 2H), δ 3.80 (s, 3H)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3-flouorophenyl)acetate (31)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 31 을 얻었다. Rf = 0.64 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 84.70% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.45 (m, 2H), δ 7.30 (m, 5H), δ 4.03 (s, 2H), δ 3.80 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(4-flouorophenyl)acetate (32)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 32 를 얻었다. Rf = 0.62 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 78.48% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.43 (m, 3H), δ 7.28 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.22 (t, *J*=8.79 Hz, 3H), δ 3.99 (s, 2H), δ 3.79 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(2-methoxyphenyl)acetate (33)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 33 을 얻었다. Rf = 0.54 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 84.29% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.37 (d, *J*=1.47 Hz, 1H), δ 7.31 (m, 4H), δ 7.03 (d, *J*=8.07 Hz, 1H), δ 6.95 (t, *J*=7.32 Hz, 1H), δ 3.87 (s, 2H), δ 3.82 (s, 6H)

- 32 -





(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3-methoxyphenyl)acetate (34)

화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 34 를 얻었다. Rf = 0.55 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 87.13% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.37 (d, J=1.83 Hz, 1H), δ 7.30 (m, 2H), δ 7.19 (dd, J=8.43 and 1.87 Hz, 1H), δ 6.95 (m, 2H), δ 6.88 (d, J=8.43 Hz, 1H), δ 3.94 (s, 2H), δ 3.80 (s, 3H), δ 3.75 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(4-methoxyphenyl)acetate (35)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 35 를 얻었다. Rf = 0.55 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 79.81% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.29 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.29 (d, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 7.19 (s, 1H), δ 7.19 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 6.94 (dt, *J*=8.79 and 2.19 Hz, 2H), δ 3.89 (s, 2H), δ 3.79 (s, 3H), δ 3.74 (s, 3H)





화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 36 을 얻었다. Rf = 0.41 (Hexane :





Ethyl acetate = 1:1); yield : 71.65% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.66 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.38 (d, J=1.83 Hz, 1H), δ 7.27 (d, J=8.4 Hz, 1H), δ 7.19 (dd, J=8.4 and 1.83 Hz, 1H), δ 6.96 (m, 3H), δ 3.89 (s, 2H), δ 3.80 (s, 3H), δ 3.75 (s, 3H), δ 3.74 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acetate (37)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 37 을 얻었다. Rf = 0.42 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 73.24% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.66 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.38 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.29 (d, *J*=8.04 Hz, 1H), δ 7.20 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 6.68 (s, 2H), δ 3.90 (s, 2H), δ 3.80 (s, 3H), δ 3.77 (s, 6H), δ 3.64 (s, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(4-ethoxyphenyl)acetate (38)



화합물 20 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 38 을 얻었다. Rf = 0.64 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 87.63% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.66 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.37 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.27 (m, 3H), δ 7.19 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 6.92 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 4.04 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 3.89 (s, 2H), δ 3.79 (s, 3H), δ 1.34 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)



2.2.4. General procedures for the synthesis of compounds 39-57

화합물 39-57의 합성 방법은 Scheme 7 에 도식화 하였다. 구체적인 실험 방법은 (39) 에 나타내었으며 나머지 화합물의 경우 합성 방법이 39 와 동일하므로 생략하였다.



Scheme 7. Synthesis of compounds 39-57. reagents and conditions; DCC, 4-DMAP, methylenechloride, o°C $(5min) \rightarrow r.t(3h)$

⁽Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(o-tolyl)acetate (39)



등근 flask 에 화합물 c 1g (3.77mmol) 을 넣고 o-tolyl acetic acid 0.598g (1.0eq; 3.77mmol) 과 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP) 47mg (10mol%; 0.38mmol) 을 넣은 후 용매 methylene chloride (CH₂Cl₂) 20ml 을 가하여 ice bath 에서 5분 간 교반하였다. 그 후 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 0.805g (1.0eq; 3.77mmol) 을 넣어 상온에서 약 3 시간 동안 반응시켰다. 반응의 진행은 Hexane : Ethyl acetate = 1:1을 전개용매로 하여 thin layer chromatography (TLC) 상에서 확인 할 수 있었으며 반응이 종결됨을 확인한 후 생성 된 dihexylurea (DHU) 를 감압 여과하였다. 여과 후 여액은 0.5M HCl 수용액, 포화 NaHCO₃ 수용액 순으로 차례로 추출하였으며, 중간에 brine 과 물로 반복하여 씻 어내는 과정을 통해 불순물을 제거하였고 unhydrous MgSO₄ 로 탈수시킨 후 감압 농축 하여 용매를 제거하였다. 생성 된 고체는 ethanol 을 사용하여 재결정 하여 순수한 결 정을 얻을 수 있었다.

위의 합성 방법을 통해 연황색의 결정 39 를 얻었다. Rf = 0.67 (Hexane : Ethyl





acetate = 1:1); yield : 94.87% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.63 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.33 (m, 2H), δ 7.24 (s, 1H), δ 7.22 (m, 4H), δ 4.08 (q, J=6.96 Hz, 2H), δ 3.97 (s, 2H), δ 2.33 (s, 3H), δ 1.27 (t, J=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(m-tolyl)acetate (40)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 40 을 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 75.11% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.63 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.32 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.27 (m, 5H), δ (d, *J*=7.32 Hz, 1H), δ 4.07 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 3.90 (s, 2H), δ 2.30 (s, 3H), δ 1.25 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(p-tolyl)acetate (41)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 41 을 얻었다. Rf = 0.68 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 69.25% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.33 (d. *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.26 (d, *J*=8.04 Hz, 3H), δ 7.17 (d, *J*=8.07 Hz, 3H), δ 4.07 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 3.90 (s, 2H), δ 2.29 (s, 3H), δ 1.26 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)



Collection @ chosun

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(2-chlorophenyl)acetate (42)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 42 를 얻었다. Rf = 0.66 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 74.18% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.55 (m, 2H), δ 7.37 (m, 3H), δ 7.27 (d, *J*=8.04 Hz, 1H), δ 7.19 (dd, *J*=8.4 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.11 (s, 2H), δ 4.10 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 1.31 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(3-chlorophenyl)acetate (43)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 43 을 얻었다. Rf = 0.69 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 74.46% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.46 (s, 1H), δ 7.43 (m, 4H), δ 7.30 (d, *J*=8.07 Hz, 1H), δ 7.19 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.07 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 4.01 (s, 2H), δ 1.25 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(4-chlorophenyl)acetate (44)







Ethyl acetate = 1:1); yield : 78.60% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.63 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.45 (m, 4H), δ 7.33 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.28 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.19 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.07 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 3.98 (s, 2H), δ 1.24 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (45)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 45 를 얻었다. Rf = 0.64 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 72.95% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.55 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.41 (m, 2H), δ 7.30 (d, *J*=8.04 Hz, 1H), δ 7.19 (dd, *J*=8.04 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.28 (s, 2H), δ 4.10 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 1.32 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(2-bromophenyl)acetate (46)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 46 을 얻었다. Rf = 0.62 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 81.68% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.68 (d, J=8.04 Hz, 1H), δ 7.54 (dd, J=7.68 and 1.47 Hz, 1H), δ 7.42 (t, J=7.71 Hz, 1H), δ 7.35 (d, J=1.47 Hz, 1H), δ 7.29 (m, 2H), δ 7.19 (dd, J=8.04 and 1.44 Hz, 1H), δ 4.12 (s, 2H), δ 4.08 (q, J=6.96 Hz, 2H), δ 1.31 (t, J=6.96 Hz, 3H)





(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(3-bromophenyl)acetate (47)

화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 47 을 얻었다. Rf = 0.71 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 74.29% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.60 (s, 1H), δ 7.52 (dt, *J*=7.68 Hz, 1H), δ 7.41 (m, 4H), δ 7.19 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.07 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 4.00 (s, 2H), δ 1.25 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(4-bromophenyl)acetate (48)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 48 을 얻었다. Rf = 0.69 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 69.97%; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.57 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.35 (d, *J*=8.43 Hz, 3H), δ 7.28 (d, *J*=8.04 Hz, 1H), δ 7.18 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.06 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 3.96 (s, 2H), δ 1.24 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(2-fluorophenyl)acetate (49)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 49 를 얻었다. Rf = 0.70 (Hexane :





Ethyl acetate = 1:1); yield : 89.23% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.48 (t, J=7.71 Hz, 1H), δ 7.40 (m, 2H), δ 7.28 (m, 2H), δ 7.19 (m, 2H), δ 4.08 (q, J=6.96 Hz, 2H), δ 4.02 (s, 2H), δ 1.28 (t, J=6.96 Hz, 3H)





화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 50 을 얻었다. Rf = 0.66 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 80.66% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.34 (m, 7H), δ 4.07 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 4.01 (s, 2H), δ 1.25 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(4-fluorophenyl)acetate (51)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 51 을 얻었다. Rf = 0.66 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 78.05% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.44 (m, 2H), δ 7.33 (d, J=1.83 Hz, 1H), δ 7.28 (d, J=8.04 Hz, 1H), δ 7.22 (m, 3H), δ 4.07 (q, J=6.96 Hz, 2H), δ 3.97 (s, 2H), δ 1.24 (t, J=6.96 Hz, 3H)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(2-methoxyphenyl)acetate (52)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 52 를 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 74.18% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.34 (m, 5H), δ 7.03 (d, *J*=8.04 Hz, 1H), δ 6.95 (t, *J*=7.68 Hz, 1H), δ 4.10 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 3.87 (s, 2H), δ 3.81 (s, 3H), δ 1.32 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(3-methoxyphenyl)acetate (53)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 53 을 얻었다. Rf = 0.69 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 71.22% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.34 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.30 (m, 2H), δ 7.19 (dd, *J*=8.4 and 1.83 Hz, 1H), δ 6.96 (m, 2H), δ 6.88 (d, *J*=8.07 Hz, 1H), δ 4.07 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 3.93 (s, 2H), δ 3.75 (s, 3H), δ 1.25 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(4-methoxyphenyl)acetate (54)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 54 를 얻었다. Rf = 0.66 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 91.76% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H),



δ 7.78 (s, 1H), δ 7.33 (d, J=1.83 Hz, 1H), δ 7.30 (d, J=8.79 Hz, 2H), δ 7.24 (s, 1H), δ 7.18 (dd, J=8.07 and 1.83 Hz, 1H), δ 6.94 (dt, J=8.79 and 2.19 Hz, 2H), δ 4.07 (q, J=6.96 Hz, 2H), δ 3.88 (s, 2H), δ 3.74 (s, 3H), δ 1.26 (t, J=6.96 Hz, 3H)

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate (55)



화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 55 를 얻었다. Rf = 0.53 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 91.14% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.33 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.27 (d, *J*=8.07 Hz, 1H), δ 7.18 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), 6.95 (m, 3H), δ 4.07 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 3.87 (s, 2H), δ 3.74 (s, 6H), δ 1.25 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)





화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 56 을 얻었다. Rf = 0.46 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 69.82% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.34 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.29 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), δ 7.19 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 6.67 (s, 2H), δ 4.07 (q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 3.88 (s, 2H), δ 3.76 (s, 6H), δ 3.64 (s, 3H), δ 1.23 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)









화합물 39 와 동일한 반응으로 연황색의 결정 57 을 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 84.95% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.64 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.33 (d, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.28 (dd, *J*=8.43 and 4.77 Hz, 3H), δ 7.18 (dd, *J*=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 6.91 (d, *J*= 8.43 Hz, 2H), δ 4.07 (m, *J*=6.96 Hz, 4H), δ 3.87 (s, 2H), δ 1.33 (t, *J*=6.96 Hz, 3H), δ 1.26 (t, *J*=6.96 Hz, 3H)



2.2.5. General procedures for the synthesis of compounds 58-76

화합물 58-76 의 합성 방법은 Scheme 8 에 도식화 하였다. 구체적인 실험 방법은 (58) 에 나타내었으며 나머지 화합물의 경우 합성 방법이 58 과 동일하므로 생략하였다.



Scheme 8. Synthesis of compounds 58-76. reagents and conditions; DCC, 4-DMAP, methylenechloride, o°C (5min)→r.t(3h)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(o-tolyl)acetate (58)



등근 flask 에 화합물 d lg (3.33mmol) 을 넣고 o-tolyl acetic acid 0.50g (1.0eq; 3.33mmol) 과 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP) 34mg(10mol%; 0.33mmol)을 넣은 후 용 때 methylene chloride (CH₂Cl₂) 20ml 을 가하여 ice bath 에서 5분 간 교반하였다. 그 후 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 0.632g (1.0eq; 3.33mmol) 을 넣어 상온에서 약 3시 간 동안 반응시켰다. 반응의 진행은 Hexane : Ethyl acetate = 1:1을 전개용매로 하여 thin layer chromatography (TLC) 상에서 확인 할 수 있었으며 반응이 종결됨을 확인한 후 생성 된 dihexylure (DHU) 를 감압 여과하였다. 여과 후 여액은 0.5M HCl 수용액, 포화 NaHCO₃ 수용액 순으로 차례로 추출하였으며, 중간에 brine 과 물로 반복하여 씻 어내는 과정을 통해 불순물을 제거하였고 unhydrous MgSO 4로 탈수시킨 후 감압 농축 하여 용매를 제거하였다. 생성 된 고체는 ethanol을 사용하여 재결정 하여 순수한 결정 을 얻을 수 있었다.

위의 합성 방법을 통해 연황색의 결정 58 을 얻었다. Rf = 0.68 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 70.58% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.71 (s, 1H), δ

- 44 -



7.97 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.64 (dd, J=8.43 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.46 (d, J=8.43 Hz, 1H), δ 7.28 (m, 3H), δ 7.12 (d, J=7.32 Hz, 1H), δ 4.00 (s, 2H), δ 2.31 (s, 3H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(m-tolyl)acetate (59)



화합물 58의 합성 방법을 통해 연황색의 결정 59 를 얻었다. Rf = 0.54 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 73.80% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.71 (s, 1H), δ 7.97 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.64 (dd, J=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 7.47 (d, J=8.43 Hz, 1H), δ 7.33 - δ 7.17 (m, 4H), δ 4.07 (s, 2H), δ 2.34 (s, 3H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(p-tolyl)acetate (60)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 60 을 얻었다. Rf = 0.55 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 75.70% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.70 (s, 1H), δ 7.97 (d, *J*= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.64 (dd, *J*=8.4 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.46 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.29 (d, *J*=8.04 Hz, 2H), δ 7.18 (d, *J*=8.07 Hz, 2H), δ 3.99 (s, 2H), δ 2.29 (s, 3H)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-chlorophenyl)acetate (61)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 61 을 얻었다. Rf = 0.52 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 73.80% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.71 (s, 1H), δ 7.97 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.64 (dd, J=8.79 and 2.22 Hz, 1H), δ 7.56 (m, 2H), δ 7.47 (d, J=8.43 Hz, 1H), δ 7.39 (m, 2H), δ 4.20 (s, 2H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-chlorophenyl)acetate (62)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 62 를 얻었다. Rf = 0.67 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 78.26% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.71 (s, 1H), δ 7.98 (d, J= 2.22 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.66 (dd, J=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 7.50 (s, 1H), δ 7.47 (s, 1H), δ 7.40 (m, 3H), δ 4.11 (s, 2H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-chlorophenyl)acetate (63)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 63 을 얻었다. Rf = 0.65 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 70.76% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.71 (s, 1H), δ 7.98 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.65 (dd, J=8.79 and 2.19 Hz, 1H), δ

- 46 -



7.49 (s, 1H), δ 7.46 (d, J=7.32 Hz, 4H), δ 4.09 (s, 2H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (64)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 64 를 얻었다. Rf = 0.62 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 72.50% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.70 (s, 1H), δ 7.98 (d, *J*= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.65 (dd, *J*=8.79 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.56 (d, *J*=7.68 Hz, 2H), δ 7.49 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.43 (dd, *J*=8.79 and 7.32 Hz, 1H), δ 4.36 (s, 2H)





화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 65 를 얻었다. Rf = 0.61 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 74.26% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.99 (d, *J*= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.68 (m, 2H), δ 7.55 (d, *J*=5.85 Hz, 1H), δ 7.48 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.43 (t, *J*=7.32 Hz, 1H), δ 7.30 (t, *J*=7.68 Hz, 1H), δ 4.21 (s, 2H)





(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-bromophenyl)acetate (66)

화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 66 을 얻었다. Rf = 0.62 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 70.84% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.98 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.64 (m, 2H), δ 7.53 (m, 2H), δ 7.43 (d, J=7.68 Hz, 1H), δ 7.36 (t, J=7.68 Hz, 1H), δ 4.11 (s, 2H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-bromophenyl)acetate (67)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 67 을 얻었다. Rf = 0.60 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 73.01% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.98 (d, *J*= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.65 (dd, *J*=8.79 and 2.22 Hz, 1H), δ 7.58 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.48 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.38 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), δ 4.07 (s, 2H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-fluorophenyl)acetate (68)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 68 을 얻었다. Rf = 0.60 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 84.22% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H),



 δ 7.98 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.65 (dd, J=8.4 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.50 - 7.19 (m, 5H), δ 4.12 (s, 2H)





화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 69 를 얻었다. Rf = 0.59 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 77.15% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.98 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.65 (dd, J=8.79 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.50 (m, 2H), δ 7.28 (m, 2H), δ 7.18 (td, J=9.15 and 2.15 Hz, 1H), δ 4.11 (s, 2H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-fluorophenyl)acetate (70)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 70 을 얻었다. Rf = 0.52 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 75.55% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.98 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.65 (dd, J=8.4 and 1.83 Hz, 1H), δ 7.48 (m, 3H), δ 7.23 (t, J=8.79 and 2.19 Hz, 2H), δ 4.07 (s, 2H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-methoxyphenyl)acetate (71)



- 49 -



Collection @ chosun

화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 71 을 얻었다. Rf = 0.49 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 72.30% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.98 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.64 (dd, J=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 7.42 (d, J=8.43 Hz, 2H), δ 7.33 (m, 2H), δ 7.03 (d, J=8.07 Hz, 1H), δ 6.96 (t, J=7.32 Hz, 1H), δ 3.94 (s, 2H), δ 3.82 (s, 3H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-methoxyphenyl)acetate (72)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 72 를 얻었다. Rf = 0.45 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 71.02% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.98 (d, *J*= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.65 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), δ 7.48 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.31 (t, *J*=8.07 Hz, 1H), δ 6.97 (m, 2H), δ 6.89 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 3.75 (s, 3H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-methoxyphenyl)acetate (73)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 73 을 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 71.27% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.97 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.64 (dd, J=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 7.46 (d, J=8.43 Hz, 1H), δ 7.32 (d, J=8.4 Hz, 2H), δ 6.94 (d, J=8.4 Hz, 2H), δ 3.97 (s, 2H), δ 3.74 (s, 3H)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate (74)

화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 74 를 얻었다. Rf = 0.48 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 72.08% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.71 (s, 1H), δ 7.98 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.65 (dd, J=8.79 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.47 (d, J=8.4 Hz, 1H), δ 6.98 (m, 3H), δ 3.96 (s, 2H), δ 3.75 (s, 3H), δ 3.74 (s, 3H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3,4,3-trimethoxyphenyl)acetate (75)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 75 를 얻었다. Rf = 0.47 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 71.98% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.99 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.65 (dd, J=8.4 and 1.83 Hz, 1H), δ 7.49 (d, J=8.4 Hz, 1H), δ 6.71 (s, 2H), δ 3.98 (s, 2H), δ 3.77 (s, 6H), δ 3.64 (s, 3H)

(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-ethoxyphenyl)acetate (76)



화합물 58 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 76 을 얻었다. Rf = 0.58 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 79.08% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.71 (s, 1H), δ 7.97 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.64 (dd, J=8.43 and 2.22 Hz, 1H), δ



7.45 (d, J=8.43 Hz, 1H), δ 7.30 (d, J=8.4 Hz, 2H), δ 6.92 (dt, J=8.79 and 2.19 Hz, 2H), δ 4.04 (q, J=6.96 Hz, 2H), δ 3.96 (s, 2H), δ 1.33 (t, J=6.96 Hz, 3H)



2.2.6. General procedures for the synthesis of compounds 77-95

화합물 77-95 의 합성 방법은 Scheme 9 에 도식화 하였다. 구체적인 실험 방법은 (77) 나타내었으며 나머지 화합물의 경우 합성 방법이 77 과 동일하므로 생략하였다.



Scheme 9. Synthesis of compounds 77-95. reagents and conditions; DCC, 4-DMAP, methylenechloride, o°C (5min)→r.t(3h)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(o-tolyl)acetate(77)



등근 flask 에 화합물 e 1g (3.91mmol) 을 넣고 o-tolyl acetic acid 0.50g (1.0eq; 3.91mmol) 과 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP) 40mg (10mol%; 0.39mmol) 을 넣은 후 용매 methylene chloride (CH₂Cl₂) 20ml 을 가하여 ice bath 에서 5분 간 교반하였다. 그 후 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 0.743g (1.0eq; 3.91mmol) 을 넣어 상온에서 약 3 시간 동안 반응시켰다. 반응의 진행은 Hexane : Ethyl acetate = 1:1을 전개용매로 하여 thin layer chromatography (TLC) 상에서 확인 할 수 있었으며 반응이 종결됨을 확인한 후 생성 된 dihexylurea (DHU) 를 감압 여과하였다. 여과 후 여액은 0.5M HCl 수용액, 포화 NaHCO₃ 수용액 순으로 차례로 추출하였으며, 중간에 brine 과 물로 반복하여 씻 어내는 과정을 통해 불순물을 제거하였고 unhydrous MgSO4로 탈수시킨 후 감압 농축 하여 용매를 제거하였다. 생성 된 고체는 ethanol 을 사용하여 재결정 하여 순수한 결 정을 얻을 수 있었다.

위의 합성 방법을 통해 연황색의 결정 77 을 얻었다. Rf = 0.58 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 77.78% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ

- 53 -



Collection @ chosun

7.84 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.61 (dd, J=8.79 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.50 (d, J=8.4 Hz, 1H), δ 7.32 - 7.16 (m, 4H), δ 4.07 (s, 2H), δ 2.32 (s, 3H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(m-tolyl)acetate (78)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 78 을 얻었다. Rf = 0.58 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 73.14% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.84 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.61 (dd, J=8.43 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.50 (d, J=8.4 Hz, 1H), δ 7.28 (m, 4H), δ 4.01 (s, 2H), δ 2.30 (s, 3H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(p-tolyl)acetate (79)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 79 를 얻었다. Rf = 0.64 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 70.37% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.83 (d, *J*= 2.19 Hz, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.60 (dd, *J*=8.43 and 2.22 Hz, 1H), δ 7.48 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.28 (d, *J*=7.71 Hz, 2H), δ 7.18 (d, *J*=8.04 Hz, 2H), δ 4.00 (s, 2H), δ 2.29 (s, 3H)







화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 80 을 얻었다. Rf = 0.59 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 73.47% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.85 (d, J= 2.22 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.62 (dd, J=8.79 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.56 - 7.33 (m, 5H), δ 4.21 (s, 2H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-chlorophenyl)acetate (81)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 81 을 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 73.15% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.85 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.62 (dd, J=8.43 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.48 (d, J=8.4 Hz, 2H), δ 7.44 (m, 3H), δ 4.12 (s, 2H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-chlorophenyl)acetate (82)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 82 를 얻었다. Rf = 0.59 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 72.90% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.83 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.61 (dd, J=8.79 and 2.22 Hz, 1H), δ



7.50 (d, J=8.4 Hz, 1H), & 7.42 (m, 4H), & 4.09 (s, 2H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (83)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 83 을 얻었다. Rf = 0.61 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 70.31% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.85 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.62 (m, 4H), δ 7.43 (m, 1H), δ 4.37 (s, 2H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-bromophenyl)acetate (84)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 84 를 얻었다. Rf = 0.58 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 70.52% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.85 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.68 (m, 4H), δ 7.43 (td, J=7.32 and 1.11 Hz, 1H), δ 7.30 (td, J=7.71 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.21 (s, 2H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-bromophenyl)acetate (85)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 85 를 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane :





Ethyl acetate = 1:1); yield : 70.56% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.85 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.64 (m, 2H), δ 7.53 (d, J=8.43 Hz, 2H), δ 7.42 (d, J=7.68 Hz, 1H), δ 7.36 (t, J=7.71 Hz, 1H), δ 4.11 (s, 2H)





화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 86 을 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 70.67% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.84 (d, *J*= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.61 (m, 3H), δ 7.50 (d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 7.37 (d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 4.07 (s, 2H)





화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 87 을 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 70.85% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.73 (s, 1H), δ 7.85 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.61 (dd, J=8.43 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.50 (m, 2H), δ 7.42 (m, 1H), δ 7.27 (m, 2H), δ 4.13 (s, 2H)





Collection @ chosun



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-fluorophenyl)acetate (88)

화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 88 을 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 76.95% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.73 (s, 1H), δ 7.84 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.61 (dd, J=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 7.52 (d, J=8.4 Hz, 1H), δ 7.45 - 7.23 (m, 3H), δ 7.18 (td, J=8.4 and 1.83 Hz, 1H), δ 4.12 (s, 2H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-fluorophenyl)acetate (89)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 89 를 얻었다. Rf = 0.64 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 77.27% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.73 (s, 1H), δ 7.85 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.61 (dd, J=8.79 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.51 (d, J=8.4 Hz, 1H), δ 7.46 (m, 2H), δ 7.23 (t, J=8.79 Hz, 2H), δ 4.08 (s, 2H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-methoxyphenyl)acetate (90)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 90 을 얻었다. Rf = 0.61 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 86.15% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H),
δ 7.84 (d, J= 2.19 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.61 (dd, J=8.43 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.45 (d, J=8.43 Hz, 1H), δ 7.32 (m, 2H), δ 7.03 (d, J=8.43 Hz, 1H), δ 6.95 (t, J=7.35 Hz, 1H), δ 3.95 (s, 2H), δ 3.81 (s, 3H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-methoxyphenyl)acetate (91)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 91 을 얻었다. Rf = 0.61 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 73.73% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.72 (s, 1H), δ 7.85 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.61 (dd, J=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 7.50 (d, J=8.43 Hz, 1H), δ 7.31 (t, J=8.07 Hz, 1H), δ 6.97 (m, 2H), δ 6.89 (dt, J=6.96 and 2.19 Hz, 1H), δ 4.03 (s, 2H), δ 3.75 (s, 3H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-methoxyphenyl)acetate (92)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 92 를 얻었다. Rf = 0.59 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 79.25% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.73 (s, 1H), δ 7.85 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.61 (dd, J=8.79 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.51 (d, J=8.4 Hz, 1H), δ 7.46 (m, 2H), δ 7.23 (t, J=8.79 Hz, 2H), δ 4.08 (s, 2H)



Collection @ chosun



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate (93)

화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 93 을 얻었다. Rf = 0.45 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 70.11% ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 12.71 (s, 1H), δ 7.84 (d, *J*= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.60 (dd, *J*=8.76 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.48 (d, *J*=8.43 Hz, 1H) ,δ 7.31 (dt, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 6.95 (dt, *J*=8.76 and 2.19 Hz, 1H), δ 3.98 (s, 2H), δ 3.74 (s, 3H)





화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 94 를 얻었다. Rf = 0.44 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 69.29% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.73 (s, 1H), δ 7.86 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.62 (dd, J=8.43 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.52 (d, J=8.4 Hz, 1H), δ 6.71 (s, 2H), δ 3.99 (s, 2H), δ 3.77 (s, 6H), δ 3.64 (s, 3H)

(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-ethoxyphenyl)acetate (95)



화합물 77 과 동일한 반응으로 연황색의 결정 95 를 얻었다. Rf = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1:1); yield : 77.06% ; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 12.73 (s, 1H),

δ 7.84 (d, J= 1.83 Hz, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.60 (dd, J=8.43 and 1.83 Hz, 1H), δ 7.48 (d, J=8.43 Hz, 1H), δ 7.30 (d, J=8.79 Hz, 2H), δ 6.92 (d, J=8.79 Hz, 2H), δ 4.04 (q, J=6.96 Hz, 2H), δ 3.99 (s, 2H), δ 1.33 (s, 3H)



2.3. Expression and purification of 15-PGDH

2.3.1. [1 day] Transformation

15-PGDH 를 E. coli에 transformation 하기 위하여, 먼저 - 80 °C에 저장 된 chemically competent E. coli BL21 - DE₃ cell 50 를 ice bath에서 해동한 후 BamHI과 EcoR I 사이에 인간 태반 유래 15-PGDH (human placental 15-PGDH) 의 DNA 가 삽입된 pGEX-2T expression vector 2.5 µl를 round bottom tube 에 넣어 mix 하고 20 분간 ice 에 방치함으로써 DNA 가 cell 의 pore 로 들어가게 하였다. 그 후 42 °C에서 2 분간 heat shock 하여 pore 을 닫아준 후 다시 ice 에서 2 분간 안정화 시켰다. 형질전환 된 cell 은 SOC medium 250 µl 를 넣어 37 °C의 shaking incubator 에서 1 시간 동안 배양 후, 배양액 중 100 µl 를 LB agar plate (1/1000 AMP+) 에 도말하여 overnight 으로 배양하 였다.

2.3.2. [2 day] Pre-cultivation

E. coli 에 plasmid 가 도입되어 형성된 colony 에서 뭉치지 않은 단일 colony 만을 선 별하여 LB medium (1/1000 AMP+) 15 μl 에 접종하고 37 °C, 220 RPM 의 shaking incubator 에서 으로 overnight 으로 배양하였다.

2.3.3. [3 day] IPTG induction

전배양액을 LB medium (1/1000 AMP+) 1.5 L 에 접종하여 37 ℃, 150 RPM 의 shaking incubator 에서 배양하였다. 약 네 시간 후 spectrophotometer 로 wave length 600 nm 일 때의 흡광도 측정 시 OD₆₀₀ 값이 0.6 - 0.8 에 달했을 때 IPTG 1M stock 1.5 ml 를 접종하고 20 ℃, 150 RPM 의 shaking incubator 에서 으로 overnight 으로 induction 하였다.

2.3.4. [4 day] Purification

over expression 된 배양액을 250 ml tube 에 옮겨 6000 RPM, 4 ℃, 10 분간 centrifuge 후 상등액을 완전히 제거하고 침전된 E. coli 들을 lysis buffer [1×DPBS buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT] 로 용해시켰다. 완전히 resuspending 한 후 30 sec burst (60 sec cooling), 4 ℃, 37 % 조건으로 4회 sonication 하여 cell 을 파쇄 함으로써 단백질을

- 62 -



buffer 중으로 용출시켰다. 파쇄 된 cell 들을 20000 *g*-force, 35 min, 4 ℃ centrifuge 하 였으며, 상등액을 lysis buffer 로 평형화 시킨 glutathione-sepharose 4B bead 와 mix 하여 1 시간 동안 rolling 함으로써 단백질을 bead 에 binding 시켰다. 단백질이 흡착된 bead 는 column 에 충진 시킨 후 200 ml 의 washing buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.7)] 로 washing 하였으며 elution buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM L-Glutathione reduced, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT] 를 이용해 순수한 단백질을 용출시켰다. 이 때 eppendorf tube 에 500 µl 씩 분주해 둔 1 × Bradford reagent 에 용출 되고 있는 단백질 5 µl 를 넣었을 때 발색됨을 육안으로 확인할 수 있었으며 정제 된 단백질의 농도는 Bradford 방법으로 정량하였고 SDS-PAGE 를 통해 purity 를 평가하였다.

2.4. Bradford protein assay

표준곡선을 얻기 위한 표준물질로서 bovine serum albumin (BSA) 를 멸균 3 차 증류 수를 사용하여 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.3125 mg/ml, 0.156 mg/ml 농도로 희석하여 BSA standard solution 을 제조하였다. 또한 5 × Bradford reagent 는 멸균 3 차 증류수를 사용하여 1× 로 희석한 후 eppendorf tube 에 997 µl 씩 분주하였으며 spectrophotometer 의 blank 값 (0값) 을 지정하기 위해 cuvette 에 희석한 정량 시약 1 ml 을 취해 wavelength 595 nm 에서 OD 를 측정하였다. 분주 해 둔 정량 시약에는 농도 별 standard solution 3 µl 를 첨가하여 voltex mixer 로 mixing 한 후 OD 를 측정하였고, 농도 별 측정값은 simple regression analysis를 이용하여 0.99 이상의 결 정계수 (R²) 를 갖는 적합도가 높은 표준곡선을 얻을 수 있었다. 정제 된 15-PGDH 역 시 위와 같은 방법으로 OD 를 측정하였으며 측정값을 표준곡선에서 얻은 회귀 식에 대입하여 농도를 추정하였다.

2.5. SDS-PAGE

spacer plate (1.0mm) 와 short plate 를 casting frame 에 끼워 gasket 이 깔린 stand 에 고정시킨 후 12 % separation gel [6.6 ml H₂O, 8.0 ml acrylamide mix, 5.0 ml 1.5 M Tris – HCl (PH 8.0), 200 µl 10 % SDS, 200 µl 10 % APS, 8 µl TEMED] 을 plate 사이에 주입 하였고 isopropylalcohol 1 ml 을 주입하여 공기와의 접촉을 차단하고 균일하게 굳 도록 방치하였다. 완전히 굳은 separation gel 윗부분의 alcohol 을 제거하고 8 % stacking gel [5.5 ml H₂O, 1.3 ml acrylamide mix, 1.0 ml 1.0 M Tris – HCl (PH 8.0), 80 µl 10 % APS, 8 µl TEMED] 을 넘치도록 주입하였으며 gel 내부에 기포가 생기지 않게 조심스럽게 comb (1.0 mm, 10 well) 을 꽂아 굳혔다. 완전히 굳은





gel 은 comb 을 제거하고 casting stand 와 frame 에서 분리하여 electrode assembly 에 밀착하여 결합시켰으며 이를 clamping frame 에 고정시켜 mini tank 에 넣은 후 1 × running buffer [10 × running buffer (final volume 1 L)를 1/10 dilution - 1 L H₂O, 30g Tris, 144g glycin, 10g SDS] 를 가득 부어 준비 해 두었다. 단백질 sample 은 loading 할 양을 계산하여 1 × SDS와 1:1 혼합한 후 95 ℃ 에서 5 분간 열처리 하여 folding 된 단백질을 펴 주었으며, 이를 gel cassette 의 well 에 molecular weight marker 와 함께 6 µg, 4 µg, 2 µg 양으로 loading 한 후 70 V의 전압을 걸어주어 단백질을 분리시킨 후 gel 을 cassette 에서 분리하여 CBB staining solution 으로 염색 및 destaining solution 으 로 gel background 를 탈색함으로써 **Figure 6** 와 같이 band 를 더욱 선명하게 관찰할 수 있었으며 농도를 달리 하여 한 point 만이 검출 되어 순도가 상당히 높음을 확인 하였다.



Figure 6. SDS-PAGE of human 15-PGDH. Molecular mass markers are on the lane 1 and the 15-PGDH protein bands are lane 2, 6 μ g; lane 3, 4 μ g; lane 4, 2 μ g. The Mw of the pGEX-2T-GST-15PGDH fusion protein is approximately 54 kDa.





2.6. 15-PGDH inhibition assay

합성 한 화합물들의 15-PGDH 활성을 50 %억제하는 농도(IC₅₀)를 계산하기 위해 다 양한 농도로 약물을 처리하여 NADH 의 OD 를 측정하고 그로부터 얻은 회귀식에 약 물을 처리하지 않은 대조군의 절반 농도를 대입하여 IC₅₀ 을 계산하였다. 실험 하는 동 안 모든 reagent solution 및 protein sample은 ice bath 에 두어 0 - 4 °C를 유지 하였으 며 sample 측정에 앞서 형광분광광도계 (fluorescence spectrophotometer; RF-5301) 4 면 투명 cuvette 을 3차 증류수를 사용하여 washing 후 비어있는 상태로 cell blank 를 하였 다. sample 의 NADH 농도 측정 시 cuvette 에 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 μ M NAD⁺, 0.1 mM DTT, 21 μ M PGE₂, 미리 다양한 농도로 dilution 해 둔 inhibitor stock 과 정제 된 10 μ g protein sample 을 혼합하여 형광분광광도계의 wavelength - excitation 340 nm / emission 468 nm, reaction time 70 sec 으로 측정하였으며 각각 농도의 OD 값은 0-5 sec와 65-70 sec를 제외한 5-65 sec의 값만을 사용하여 R² > 0.99 인 적합도 높은 회귀 곡선을 얻을 수 있었다. 이로부터 얻은 회귀 식에 inhibitor 를 처리하지 않 은 blank의 절반 값을 대입하여 IC₅₀를 추정하였다.





2.7. Cell Culture

15-PGDH 의 활성을 억제함으로써 얻을 수 있는 효과에 대한 모든 cell based assav 는 itvitro 상에서 이루어졌으며 먼지 및 virus 등에 의한 오염을 방지하기 위하여 강력 한 환기 장치를 갖춘 clean bench 에서 최소 10분 이상 자외선 살균과정을 거친 후 실 험을 하였다. 또한 본 연구에 사용 된 모든 세포 주는 기벽 의존성을 갖는 단층 부착 세포 (monolayer cell) 이며 동결 보존 된 인간유래 세포 주 (human cell line)를 표면 특 수 처리 된 polystyrene (PS) cell culture dish 에 인공적으로 *invivo* 와 유사한 조건을 제 공하여 배양하였다. 액화질소 (liquid nitrogen; -196 ℃)내 동결 보존 된 cell ampule 을 37 ℃ water bath 에서 신속히 해동하여 미리 37 ℃로 항온 한 medium 에 현탁 한 후 2000 RPM, 200 sec, 17-25 ℃ centrifuge 하여 freezing medium 을 제거하고 새로운 medium 10 ml 에 가라앉은 cell pellet 을 현탁시켜 100 ₽ culture dish 에 5 ml 접종하 고 새로운 midium 으로 final volume 10 ml 을 맞추어 37 ℃, 5 % CO₂, 90 % 이상의 습도를 유지하며 하루 동안 배양하였다. 다음 날 medium 을 suction 하고 새로운 medium 으로 교체하였으며 이후부터는 도립현미경 (inverted microscope) 을 사용하여 세포를 관찰하며 2-3 일 간격으로 계대배양 하였다. 계대배양 시 medium 을 suction 한 후 멸균한 1 ×DPBS buffer (-) 로 세포층을 3 회 washing 하였고, 0.25 % Trypsin -EDTA (1×) 2 ml 을 처리하여 배양기에 세포가 탈착 될 때 까지 약 5-10 분 정도 정치 하였으며 현미경으로 세포가 탈착됨을 확인한 후 새로운 medium 10 ml을 가하여 현탁 시킨 후 2000 RPM, 200 sec, 17-25 °C centrifuge 하여 cell dissociation reagent 를 제거하 였다. 순수한 cell pellet 만 남은 상태에서 새로운 medium 10 ml 을 첨가하여 현탁 한 후 100 Φ culture dish 에 2 ml 접종하고 final volume 10 ml 을 맞추어 CO₂ incubator 에서 배양하였다. 세포 내 PGE2 수준에 대한 활성 평가는 인간 유래 폐암 세포 주 A549cell line 을 사용하였고, 피부 조직 재생 능력 평가는 인간 유래 각질 형성 세포 주 HaCaT cell line 을 사용하였으며 inhibitor 의 세포 독성 평가는 인간 유래 신장 세 포 주 HEK293 cell line 을 사용하였다 (Figure 7).



Figure 7. Confluent culture in monolayer. a)A549; b)HaCaT; c)HEK293 cell line.

- 66 -



2.8. Determination of extracellular PGE_2 levels.

RPMI-1640 medium [+ 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic (10,000 units/ml of penicillin, 10,000 µg/ml of streptomycin, and 25 µg/ml of amphotericin B)] 을 사용하여 이틀 간격으로 3 회 이상 계대배양 한 A549 cell을 conical tube 에 회수하여 hemocytometer 를 이용하여 세포 수를 counting 하였으며 medium 을 이용하여 2.5×10⁵ cells/ml 농도로 희석한 cell suspension 을 48well plate 에 500 µl 씩 seeding 하여 CO₂ incubator 에서 24 시간 동안 부착시켰다. 도립 현미경을 이용하여 세포가 70-80 % 증 식 된 것을 확인한 후 새로운 medium 으로 교체하였으며 미리 멸균 1×DPBS buffer(-) 를 사용하여 dilution 해 둔 inhibitor stock 을 10 µM농 도로 배지 아래 부분에 접종하였다. 한편 negative control 으로는 inhibitor stock 대신 동일한 부피의 멸균 1×DPBS buffer(-) 를 처리하였다. CO₂ incubator 에서 12 시간 배양한 후 배양 상등액 (culture supernatant) 을 분리하여 medium 에 축적 된 PGE₂ 양은 ab133021-Prostaglandin E₂ ELISA Kit (abcam[®], U.K) 를 이용하여 측정하였다.

측정 과정은 **Figure 8**에 나타낸 바와 같이 primary antibody (Goat anti-mouse IgG) 가 코팅 된 96 well palte 에 미리 dilution 해 둔 PGE₂ standards 와 비 표지된 항원 (sample) 을 100 µl 씩 주입한 후, 표지 된 항원 인 labeled alkaline phosphatase conjugated PGE₂ (AP-conjugated PGE₂) 와 항원에 특이적으로 결합하는 항체 (PGE₂ antibody) 를 50 µl 씩 주입하였다. sample 과 reagent 를 주입 한 well plate 를 plate shaker (Lv.2) 를 이용하여 제한 된 binding site 에 대해 두 가지 항원 간의 경쟁반응을 유도시켰으며 2 시간 후 각 well 당 400µl 1×washing buffer 를 사용하여 총 3 회 washing 하였다. 그 후 pNpp substrate 200 µl 씩 주입하고 45 분 동안 실온에 정치하였 으며 stop solution 50 µl 씩 빠르게 주입하여 micro plate spectrophotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek[®], USA; light source: Xenon flash; data analysis software: Gen 5[™])를 사용하여 405 nm에서 OD를 측정하였다.







IgG pre-coated 96 well plate

Figure 8. PGE₂ enzyme-linked immunosorbent assay procedure.



1



2.9. MTT assay

의약품으로서 inhibitor 의 안전성을 검증하기 위하여, 인간 유래 신장세포주 HEK293 cell line 을 이용한 normal cell 에 대한 cell cytotoxicity 및 viability 실험은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)) 의 환원 (reduction) 방법을 이용하여 측정하였다. HEK293 세포를 DMEM/high glucose [+ 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic (10,000 units/ml of penicillin, 10,000 µg/ml of streptomycin, and 25 ug/ml of amphotericin B)] 를 사용하여 이틀 간격으로 3 회 이상 계대배양 후 cell 을 counting 하였으며 medium 을 이용하여 2.5×10⁵ cells/ml, 1.5×10⁵ cells/ml, 0.5×10⁵ cells/ml농도로 희석하였고 96 well plate 에 90 μl 씩 seeding하여 CO₂ incubator 에서 24 시간 동안 부착시켰다. 그 후 medium 을 suction하고 새로운 medium 90 ul 로 교체 하 였으며 미리 멸균한 1×DPBS buffer(+) 에 다양한 농도로 dilution 해 둔 inhibitor stock 을 1 mM, 500 μM, 250 μM, 125 μM, 62.5 μM, 31.25 μM, 15.625 μM, 7.8125 μM 농도 로 처리하였다. negative control 에는 inhibitor 대신 동일한 부피의 멸균 1×DPBS buffer(+) 를 처리하여 CO₂ incubator 에서 배양하였다. 본 실험에 사용한 HEK293 cell 부착력이 좋지 못하므로 medium 교체 및 약물처리 전 washing 단계는 생략하였다. 24 시간 후 culture room 과 clean bench 를 소등하여 빛을 차단한 상태에서 2.5×10⁵ cells/ml 농도로 seeding 한 plate 의 모든 well 에 담황색의 MTT solution (0.5 mg/ml) 을 10 ul 씩 주입하고 CO₂ incubator 에서 4 시간 동안 정치하였다. 그 후 well 바닥에 형 성된 보라색의 MTT formazan 이 흩어지지 않게 medium 을 조심스럽게 suction 하였으 며 멸균 한 DMSO 150 ul 를 주입하고 plate shaker (Lv.2) 를 사용하여 formazan 을 녹 여주었다. 10 분 후 micro plate spectrophotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek[®], USA; light source: Xenon flash; data analysis software: Gen 5™) 를 사용하여 570 nm에서 OD 를 측정하였으며 농도 별 OD값을 통해 R² > 0.99인 적합도 높은 검정 곡선을 얻을 수 있었고, 약물에 의해 세포가 50 % 생존할 때의 농도를 약물을 처리하 지 않은 control 의 절반이 되는 값을 회귀식에 대입함으로써 IC50 값을 산출 할 수 있 었다. 한편 1.5×10⁵ cells/ml 농도로 seeding 한 plate 는 48 시간 후, 0.5×10⁵ cells/ml 농 도로 seeding 한 plate는 72 시간 후에 위와 같은 방법으로 OD 를 측정하여 time -concentration dependant 한 결과를 도출하였다. compound 각각의 cytotoxity 는 다음 식 에 따라 생존율로 표시하였다.

> Cell viability = <u>compound OD</u> ×100 (%) = <u>negative control OD</u> ×100

> > - 69 -





2.10. Scratch-wound healing assay

invitro 상에서 인간 피부 조직의 각질을 재현하기 위한 model 로서 인간 유래 각질 형성 세포 주 인 HaCaT cell line 을 DMEM/high glucose [+ 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic (10,000 units/ml of penicillin, 10,000 µg/ml of streptomycin, and 25 μg/ml of amphotericin B)]를 사용하여 이틀 간격으로 3 회 이상 계대배양 한 후 conical tube 에 회수하여 세포 수를 counting 하였으며 medium 을 이용하여 2.0×10⁵ cells/ml 농 도로 희석하였고 6 well plate 에 2 ml 씩 seeding 하여 CO₂ incubator 에서 24 시간 동 안 부착시켰다. 도립 현미경을 이용하여 세포가 70-80 % 증식 된 것을 확인한 후 medium 을 suction 하고 멸균한 1×DPBS buffer(-) 로 세포층을 3 회 washing 하였으며 FBS 와 항생제를 첨가하지 않은 medium 을 각 well 에 2 ml 씩 주입하였다. 그 후 세 포 효소계 및 핵산대사를 저해함으로써 세포의 증식을 억제시키기 위해 culture room 과 clean bench 를 소등하여 빛을 차단한 상태에서 mitomycin C 1 mg/ml stock 을 60 ul/well (30 ug/ml)농도로 처리한 후 CO₂ incubator 에서 정치하였다. 2시 간 후 medium suction 후 멸균 하여 washing 함으로써 well 에 잔류하는 mitomycin 을 제거한 후 멸균 한 200 μl pipette tip 을 이용하여 각 well 에 물리적인 scratch 를 내 주었다. scratch 를 내는 과정에서 well 의 바닥에서 떨어져 나온 세포들은 1×DPBS buffer(-) 를 이용하여 2 회 이상 washing 하였으며 FBS 와 항생제가 첨가된 medium 을 각 well 에 2 ml 씩 주입하였다. 약물을 처리하지 않은 상태 (0시간) 의 세포 응집 정도 및 scratch 의 상태 를 광학 현미경 (biological microscope IX71, Olympus, Japan ; light source: TH4-200 ; software : DP2-BSW) 을 사용하여 촬영하였고 scratch의 width 를 측정하여 기록하였다. 약물처리 전 상태를 확인한 후 새로운 medium 으로 교체하였으며 experimental group 은 15-PGDH inhibitors (compound 10, 29, 31, 45, 66, 67, 69, 86) 를 10 μM농도로 처리 한 반면 inhibitor 의 상처치유 효과를 검증하기 위하여 positive control 으로 TGF-β1 을 1 ng/ml 농도로 처리하였으며, negative control 에는 inhibitor 대신 동일한 부피의 멸균 1×DPBS buffer(-) 를 처리하였다. 또한 15-PGDH 의 과도한 발현이 조직의 손상에 미치 는 영향을 검증하고자 정제 한 15-PGDH를 0.5 mg/ml 농도로 처리하였다. 약물 처리 후 세포는 CO2 incubator 에서 24 시간 동안 배양 후 광학 현미경을 사용하여 24 시간 후의 상태를 촬영하였으며 scratch 의 너비를 측정하여 기록하여 0 시간에 대한 비교를 통해 결과를 도출하였다.





2.11. Statistical analysis

모든 실험 data 는 평균 ± 표준편차 (mean ± SD) 로 나타내었으며, cell based assay 의 경우 세포를 seeding 하지 않은 well 에서 측정된 OD 에 대하여 보정된 값으로 산 출하였다. 실험 오차를 추정하여 평균의 정확도를 검증하기 위하여 실험은 3 회 이상 반복하였으며 (n>3), IBM SPSS statistics Ver. 20.0 (IBM inc, Armonk, NY, USA)을 이용 하여 각 처리구 간의 유의성 (*P*<0.05) 검정을 위해 one-way ANOVA 또는 general linear model (GLM-repeated measures) 후 Dunnet-t post-hoc test 를 통해 다중 비교를 실시하였 다. IC₅₀ value 의 경우 simple regression analysis 를 이용하여 best-fit equation 을 얻은 후 이에 대입하여 산출하였으며, data plotting 에는 Sigmaplot for Windows. Ver. 10.0 을 사용하였다.





3. Results and Discussion



scheme 10. General structure of 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene) methyl) phenyl 2-phenylacetate derivatives

3.1. Chemical evaluation of 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene) methyl) phenyl 2-phenylacetate derivatives

schem 2 와 schem 3 의 반응 mechanism 에 따라 ester 결합이 포함된 4-((2.4-dioxothiazolidin-5-vlidene) methyl) phenyl 2-phenylacetate 유도체를 합성하였으며 유도체의 최종 구조 및 화합물 각각의 특성은 Table 1-5 에 나타내었으며, 각 compound의 구조는 scheme 10을 통해 확인 할 수 있다. Scheme 4 와 같이 TD 에 hydroxy group 이 치환 된 phenyl group 을 도입하는 첫 번째 step 에서는 반응 후 methanol 을 사용하여 침전물을 씻어주어 쉽게 불순물을 제거할 수 있었으며 이후 2step 에서는 산·염기 추출 및 ethanol 을 사용한 재결정을 통해 생성물을 정제하여 약 65-95 %의 높은 수득률을 얻을 수 있었다. 정제 된 화합물들은 ¹H NMR 을 통해 구조 를 분석 하였으며 chemical shift 는 ppm (part per million; δ), signal은 s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (double of doublet), dt (double of triplet), td (triple of doublet), m (multiplet)으로 표시하였다. 또한 Hexane : Ethyl acetate = 1:1을 전개용매로 하는 TLC 상에서 Rf 값은 Rı 의 경우 H > OCH2CH3 > OCH3 > Cl > Br 순으로 높게 나타났으 며, 이는 R₁ 에 halogen 치환된 화합물의 경우 상대적으로 polarity 가 큼을 알 수 있다. 한편, 말단 phenyl ring에 CH₃ - F, Cl, Br - OCH₂CH₃ - OCH₃ 순으로 Rf 값이 낮아지 는 양상을 보여, 말단 phenyl ring에는 halogen보다 methoxy 또는 ethoxy group을 도입 할 경우 polarity가 높음을 알 수 있다. 특히 trimethoxy를 도입하였을 경우 전반적으로 낮은 Rf 값을 보이는 것으로 보아 다른 화합물에 비해 상대적으로 polarity가 높음을 알 수 있었다. 이러한 화합물들의 polarity차이는 target protein과의 친화도에 영향을 미 칠 수 있으며 그에 따른 생리적 활성에도 차이가 있을 것으로 사료된다.





No.	Molecular formula	Substitution ^a						Mol. Wt	R f [™]	Yield ^c
	-	Rı	R 2	R 3	R 4	R 5	R6	(g/mol)		(%)
1	C19H15NO4S	Н	Н	Н	Н	Η	CH3	353.39	0.59	78.13
2	C19H15NO4S	Н	Н	Н	Н	CH3	Н	353.39	0.72	75.47
3	C19H15NO4S	Н	Н	Н	CH3	Η	Н	353.39	0.69	74.77
4	C18H12CINO4S	Н	Н	Н	Н	Η	Cl	373.81	0.68	78.06
5	C18H12CINO4S	Н	Н	Н	Н	Cl	Н	373.81	0.67	67.73
6	C18H12CINO4S	Н	Н	Н	Cl	Η	Н	373.81	0.64	68.07
7	C18H11Cl2NO4S	Н	Cl	Н	Н	Η	Cl	408.26	0.67	71.23
8	C18H12BrNO4S	Н	Н	Н	Н	Η	Br	418.26	0.67	82.38
9	C18H12BrNO4S	Н	Н	Н	Н	Br	Н	418.26	0.69	81.69
10	C18H12BrNO4S	Н	Н	Н	Br	Н	Н	418.26	0.68	81.32
11	C18H12FNO4S	Н	Н	Н	Н	Η	F	357.36	0.75	81.92
12	C18H12FNO4S	Н	Η	Η	Н	F	Η	357.36	0.7	74.75
13	C18H12FNO4S	Н	Н	Н	F	Η	Н	357.36	0.72	74.87
14	C19H15NO5S	Н	Η	Η	Н	Η	OCH3	369.39	0.65	83.36
15	C19H15NO5S	Н	Н	Н	Н	OCH3	Н	369.39	0.64	72.94
16	C19H15NO5S	Н	Н	Н	OCH ₃	Н	Н	369.39	0.65	71.33
17	C20H17NO6S	Н	Η	Η	OCH3	OCH3	Η	399.42	0.66	68.05
18	C21H19NO7S	Н	Н	OCH3	OCH ₃	OCH3	Н	429.44	0.31	67.02
19	C20H17NO5S	Н	Н	Н	OCH2CH3	Н	Н	383.42	0.49	72.75

Table 1. Characterization of compounds 1-19

a) The substituent groups of each compound are shown in schem 10. b) Isolated yield after recrystalization from ethanol. c) In thin layer chromatography (TLC), the Rf value is defined as the migration distance of compound divided by the migration distance of solvent front (hexane : ethylacetate = 1:1, v/v).

Table 2. C	Characterization	of	compounds	20-38
------------	------------------	----	-----------	-------

No.	Molecular formula	Substitution ^a						Mol. Wt	Rf	Yield ^c
		Rı	R2	R 3	R 4	R5	R6	(g/mol)		(%)
20	C20H17NO5S	OCH3	Н	Η	Н	Н	CH3	383.42	0.62	80.42
21	C20H17NO5S	OCH3	Η	Н	Η	CH3	Η	383.42	0.65	83.95
22	C20H17NO5S	OCH3	Н	Н	CH3	Н	Н	383.42	0.63	84.86
23	C19H14ClNO5S	OCH3	Н	Н	Н	Н	Cl	403.84	0.61	71.04
24	C19H14ClNO5S	OCH3	Н	Η	Н	Cl	Н	403.84	0.63	67.79
25	C19H14ClNO5S	OCH3	Н	Н	Cl	Н	Н	403.84	0.63	72.39
26	C19H13Cl2NO5S	OCH3	Cl	Η	Н	Η	Cl	438.28	0.65	74.69
27	C19H14BrNO5S	OCH3	Н	Н	Н	Н	Br	448.29	0.57	65.92
28	C19H14BrNO5S	OCH3	Н	Η	Н	Br	Н	448.29	0.62	74.17
29	C19H14BrNO5S	OCH3	Н	Н	Br	Η	Н	448.29	0.62	72.02
30	C19H14FNO5S	OCH3	Η	Н	Н	Η	F	387.38	0.59	85.23
31	C19H14FNO5S	OCH3	Н	Н	Н	F	Н	387.38	0.64	84.7
32	C19H14FNO5S	OCH3	Η	Н	F	Η	Η	387.38	0.62	78.48
33	C20H17NO6S	OCH3	Н	Н	Н	Η	OCH3	399.42	0.54	84.29
34	C20H17NO6S	OCH3	Η	Н	Н	OCH3	Η	399.42	0.55	87.13
35	C20H17NO6S	OCH3	Н	Н	OCH3	Η	Н	399.42	0.55	79.81
36	C21H19NO7S	OCH3	Н	Н	OCH3	OCH3	Н	429.44	0.41	71.65
37	C22H21NO8S	OCH3	Н	OCH3	OCH ₃	OCH3	Η	459.47	0.42	73.24
38	C21H19NO6S	OCH3	Н	Η	OCH2CH3	Η	Н	413.44	0.64	87.63

a) The substituent groups of each compound are shown in schem 10. b) Isolated yield after recrystalization from ethanol. c) In thin layer chromatography (TLC), the Rf value is defined as the migration distance of compound divided by the migration distance of solvent front (hexane : ethylacetate = 1:1, v/v).







No.	Molecular formula		Substitution ^a							Yield ^c
		Rı	R 2	R 3	R 4	R5	R6	(g/mol)		(%)
39	C21H19NO5S	OCH ₂ CH ₃	Η	Η	Н	Н	CH3	397.44	0.67	94.87
40	C21H19NO5S	OCH2CH3	Η	Η	Н	CH3	Н	397.44	0.63	75.11
41	C21H19NO5S	OCH ₂ CH ₃	Η	Н	CH ₃	Н	Н	397.44	0.68	69.25
42	C20H16ClNO5S	OCH2CH3	Η	Η	Н	Н	Cl	417.86	0.66	74.18
43	C20H16ClNO5S	OCH2CH3	Η	Н	Н	Cl	Н	417.86	0.69	74.46
44	C20H16ClNO5S	OCH ₂ CH ₃	Η	Н	Cl	Н	Н	417.86	0.66	78.6
45	C20H15Cl2NO5S	OCH2CH3	Cl	Η	Н	Н	Cl	452.31	0.64	72.95
46	C20H16BrNO5S	OCH ₂ CH ₃	Η	Н	Н	Н	Br	462.31	0.62	81.68
47	C20H16BrNO5S	OCH2CH3	Η	Η	Н	Br	Н	462.31	0.71	74.29
48	C20H16BrNO5S	OCH ₂ CH ₃	Η	Н	Br	Н	Н	462.31	0.69	69.97
49	C20H16FNO5S	OCH ₂ CH ₃	Η	Η	Н	Н	F	401.41	0.7	89.23
50	C20H16FNO5S	OCH2CH3	Н	Н	Н	F	Н	401.41	0.66	80.66
51	C20H16FNO5S	OCH2CH3	Η	Η	F	Н	Н	401.41	0.66	78.05
52	C21H19NO6S	OCH2CH3	Н	Н	Н	Н	OCH3	413.44	0.63	74.18
53	C21H19NO6S	OCH2CH3	Н	Н	Н	OCH3	Н	413.44	0.69	71.22
54	C21H19NO6S	OCH ₂ CH ₃	Η	Н	OCH ₃	Н	Н	413.44	0.66	91.76
55	C22H21NO7S	OCH2CH3	Н	Н	OCH ₃	OCH3	Н	443.47	0.53	91.14
56	C23H23NO8S	OCH ₂ CH ₃	Η	OCH3	OCH ₃	OCH3	Н	473.5	0.46	69.82
57	C22H21NO6S	OCH2CH3	Н	Η	OCH2CH3	Н	Н	427.47	0.63	84.95

Table 3. Characterization of compounds	39-57
---	-------

a) The substituent groups of each compound are shown in schem 10. b) Isolated yield after recrystalization from ethanol. c) In thin layer chromatography (TLC), the Rf value is defined as the migration distance of compound divided by the migration distance of solvent front (hexane : ethylacetate = 1:1, v/v).

Table 4. Characterization of	compounds	58-76
------------------------------	-----------	-------

No.	Molecular formula	Substitution ^a						Mol. Wt	Rf ^b	Yield ^c
		R1	R 2	R 3	R 4	R5	R6	(g/mol)		(%)
58	C19H14BrNO4S	Br	Н	Η	Н	Н	CH3	432.29	0.68	70.58
59	C19H14BrNO4S	Br	Η	Η	Н	CH3	Η	432.29	0.54	73.8
60	C19H14BrNO4S	Br	Н	Η	CH3	Η	Η	432.29	0.55	75.7
61	C18H11ClBrNO4S	Br	Η	Η	Н	Н	Cl	452.71	0.52	73.8
62	C18H11ClBrNO4S	Br	Н	Η	Н	Cl	Η	452.71	0.67	78.26
63	C18H11ClBrNO4S	Br	Η	Η	Cl	Н	Н	452.71	0.65	70.76
64	C18H10Cl2BrNO4S	Br	Cl	Η	Н	Η	Cl	487.15	0.62	72.5
65	C18H11Br2NO4S	Br	Η	Η	Н	Н	Br	497.16	0.61	74.26
66	C18H11Br2NO4S	Br	Н	Η	Н	Br	Η	497.16	0.62	70.84
67	C18H11Br2NO4S	Br	Η	Η	Br	Н	Н	497.16	0.6	73.01
68	C18H11BrFNO4S	Br	Η	Η	Н	Н	F	436.25	0.6	84.22
69	C18H11BrFNO4S	Br	Η	Η	Н	F	Н	436.25	0.59	77.15
70	C18H11BrFNO4S	Br	Η	Η	F	Н	Η	436.25	0.52	75.55
71	C19H14BrNO5S	Br	Η	Η	Н	Н	OCH3	448.29	0.49	72.3
72	C19H14BrNO5S	Br	Η	Η	Н	OCH3	Η	448.29	0.45	71.02
73	C19H14BrNO5S	Br	Η	Η	OCH ₃	Н	Н	448.29	0.63	71.27
74	C20H16BrNO6S	Br	Η	Η	OCH ₃	OCH3	Н	478.31	0.48	72.08
75	C21H18BrNO7S	Br	Η	OCH3	OCH ₃	OCH3	Η	508.34	0.47	71.98
76	C20H16BrNO5S	Br	Η	Η	OCH2CH3	Η	Η	462.31	0.58	79.08

a) The substituent groups of each compound are shown in schem 10. b) Isolated yield after recrystalization from ethanol. c) In thin layer chromatography (TLC), the Rf value is defined as the migration distance of compound divided by the migration distance of solvent front (hexane : ethylacetate = 1:1, v/v).





No.	Molecular formula	Substitution ^a					Mol. Wt	Rf	Yield ^c	
		R 1	R2	R 3	R 4	R 5	R6	(g/mol)		(%)
77	C19H14ClNO4S	Cl	Н	Н	Н	Н	CH3	387.84	0.58	77.78
78	C19H14ClNO4S	Cl	Н	Η	Н	CH3	Н	387.84	0.58	73.14
79	C19H14ClNO4S	Cl	Н	Η	CH3	Η	Н	387.84	0.64	70.37
80	C18H11Cl2NO4S	Cl	Н	Η	Н	Н	Cl	408.26	0.59	73.47
81	C18H11Cl2NO4S	Cl	Н	Η	Н	Cl	Н	408.26	0.63	73.15
82	C18H11Cl2NO4S	Cl	Н	Η	Cl	Н	Н	408.26	0.59	72.9
83	C18H10Cl3NO4S	Cl	Cl	Η	Н	Η	Cl	442.7	0.61	70.31
84	C18H11BrClNO4S	Cl	Н	Η	Н	Η	Br	452.71	0.58	70.52
85	C18H11BrClNO4S	Cl	Н	Η	Н	Br	Н	452.71	0.63	70.56
86	C18H11BrClNO4S	Cl	Н	Η	Br	Η	Н	452.71	0.63	70.67
87	C18H11ClFNO4S	Cl	Н	Η	Н	Η	F	391.8	0.63	70.85
88	C18H11ClFNO4S	Cl	Н	Η	Н	F	Н	391.8	0.63	76.95
89	C18H11ClFNO4S	Cl	Н	Η	F	Η	Н	391.8	0.64	77.27
90	C19H14ClNO5S	Cl	Н	Η	Н	Η	OCH3	403.84	0.61	86.15
91	C19H14ClNO5S	Cl	Н	Η	Н	OCH3	Н	403.84	0.61	73.73
92	C19H14ClNO5S	Cl	Н	Η	OCH ₃	Η	Н	403.84	0.59	79.25
93	C20H16ClNO6S	Cl	Н	Η	OCH3	OCH3	Н	433.86	0.45	70.11
94	C18H18ClNO7S	Cl	Н	OCH3	OCH ₃	OCH3	Н	463.89	0.44	69.29
95	C20H16ClNO5S	Cl	Н	Η	OCH2CH3	Η	Н	417.86	0.63	77.06

Table 5. Characterization of compounds 77-95

a) The substituent groups of each compound are shown in schem 10. b) Isolated yield after recrystalization from ethanol. c) In thin layer chromatography (TLC), the Rf value is defined as the migration distance of compound divided by the migration distance of solvent front (hexane : ethylacetate = 1:1, v/v).





3.2. Biological evaluation

3.2.1. Inhibition effect of human 15-PGDH

합성 한 화합물들의 15-PGDH 활성을 50 % 억제하는 농도 (IC₅₀)를 계산하기 위해 다양한 농도로 약물을 처리하여 NADH의 OD를 측정하였고, 측정값은 단순회귀분석을 통해 R² > 0.99 인 적합도 높은 best-fit equation을 얻을 수 있었으며 약물을 처리하지 않은 대조군의 절반 농도를 대입하여 IC₅₀을 계산하였다 (**Table 6-10**).

전반적인 IC₅₀ 은 R₁ 에 도입한 치환기가 H > OCH₂CH₃ > OCH₃ > Br > Cl 순으로 높은 값을 갖는 양상을 보였으며, 이는 halogen치환된 compound의 경우 더 적은 농도 에서 target protein의 활성을 억제할 수 있음을 뜻한다. Rı 에 동일한 치환기가 도입 된 compound 중 상대적으로 활성이 좋은 compound 는 R₁ = H 인 경우 말단 phenyl ring 의 2 번 탄소 원자에 -CH₃ 치환 된 (2-methyl), compound 2 (0.124 ± 0.006 μM), R₁ = OCH₃ 인 경우에는 말단 phenyl ring의 4 번 탄소 원자에 -Br 치환 된 (4-bromo) compound 29 (0.011 ± 0.001 μM), R₁ = OCH₂CH₃ 인 경우에는 말단 phenyl ring 의 4번 탄소 원자에 -Br 치환 된 (4-bromo), compound 48 (0.042 ± 0.006 μM), R₁ = Br 의 경우 말단 phenyl ring 의 3 번 탄소 원자에 -F 치환 된 (3-fluoro), compound 69 (0.014 ± 0.003 μM) 마지막으로 R₁ = Cl 인 경우 말단 phenyl ring 의 4 번 탄소 원자에 -Br 치 환 된 (R=4-bromo) compound 86 (0.036 ± 0.002 μM)이었다. 이러한 데이터를 통해, R₁ 에는 Br 또는 Cl 이 치환 될 경우 IC50 값이 낮게 나타나 활성이 좋음을 확인하였으 며, 말단 phenyl ring의 4번 탄소 원자에 Br 치환 된 compound의 활성이 전반적으로 좋 은 것으로 나타났다. 특히, R₁ = Br 인 compound 는 69 번 이외에도 66 (R=3-bromo, $0.032 \pm 0.002 \ \mu$ M), 67 (R=4-bromo, $0.027 \pm 0.002 \ \mu$ M), 68 (R=2-fluoro, 0.033 ± 0.006 μM) 등 전반적으로 활성이 눈에 띄게 뛰어났다.

반면, 말단 phenyl ring에 methoxy group을 도입하였을 경우 전반적으로 높은 IC₅₀ 값 을 갖는 양상을 보여 이들은 target protein 에 대하여 활성이 좋지 않음을 알 수 있었 다. 특히 말단 phenyl ring에 methoxy group 이 2개 이상 치환 된 경우 (compound 17, 18, 36, 37, 55, 56, 74, 75, 93 및 94) 단일 치환 compound 에 비 해 활성이 거의 없었 으며 이 중 18 번과 56 번 compound는 각각 28.018 μM, 21.238 μM 이라는 고 농도까 지 처리를 해야만 50 % 의 억제 활성을 보여, 본 실험에서는 활성이 없다고 판단하였 고, ND (no detectable activity)로 표시하였다.





Collection @ chosun

No.	Substitution ^a		15-PGDH scavenging activity
	R1	R ₂ - 6	$(IC_{50}, \mu M)^{b,c}$
1	Н	2-methyl	0.510 ± 0.002
2	Н	3-methyl	0.124 ± 0.006
3	Н	4-methyl	0.244 ± 0.003
4	Н	2-chloro	0.354 ± 0.011
5	Н	3-chloro	0.194 ± 0.006
6	Н	4-chloro	0.282 ± 0.011
7	Н	2,6-dichloro	0.536 ± 0.001
8	Н	2-bromo	0.389 ± 0.002
9	Н	3-bromo	0.260 ± 0.003
10	Н	4-bromo	0.191 ± 0.010
11	Н	2-fluoro	0.316 ± 0.008
12	Н	3-fluoro	0.192 ± 0.002
13	Н	4-fluoro	0.368 ± 0.001
14	Н	2-methoxy	0.943 ± 0.002
15	Н	3-methoxy	0.580 ± 0.002
16	Н	4-methoxy	1.155 ± 0.001
17	Н	3,4-dimethoxy	6.343 ± 0.010
18	Н	3,4,5-trimethoxy	ND^{d}
19	Н	4-ethoxy	2.189 ± 0.004

 Table 6. Inhibitory potency of compound 1-19

a) The substituent groups of each compound are shown in schem 10. b) IC_{50} values were determined from the drug concentrations at which human 15-PGDH were reduced by 50% compared with negative control; The enzyme was assayed fluorometrically, the IC_{50} values are determined using $250\mu M$ NAD⁺ as coenzyme and $21\mu M$ PGE₂ as substrate. c) Reported IC_{50} values are given as mean \pm standard deviation of the mean of three determinations. d) ND = No detectable activity($IC_{50}>10$).

Table	7.	Inhibitory	potency	of	compound	20-38

No.	Su	bstitution ^a	15-PGDH scavenging activity
	R 1	R 2 - 6	(IC50, μM) ^{b,c}
20	OCH3	2-methyl	0.752 ± 0.001
21	OCH3	3-methyl	0.186 ± 0.005
22	OCH3	4-methyl	0.200 ± 0.001
23	OCH3	2-chloro	0.679 ± 0.007
24	OCH3	3-chloro	0.056 ± 0.001
25	OCH3	4-chloro	0.141 ± 0.005
26	OCH3	2,6-dichloro	2.841 ± 0.030
27	OCH3	2-bromo	0.207 ± 0.007
28	OCH ₃	3-bromo	0.610 ± 0.021
29	OCH3	4-bromo	0.011 ± 0.001
30	OCH ₃	2-fluoro	0.058 ± 0.001
31	OCH3	3-fluoro	0.046 ± 0.008
32	OCH3	4-fluoro	0.067 ± 0.008
33	OCH3	2-methoxy	0.452 ± 0.009
34	OCH3	3-methoxy	0.136 ± 0.004
35	OCH ₃	4-methoxy	0.273 ± 0.003
36	OCH3	3,4-dimethoxy	2.942 ± 0.002
37	OCH3	3,4,5-trimethoxy	3.875 ± 0.002
38	OCH3	4-ethoxy	0.578 ± 0.003

a) The substituent groups of each compound are shown in schem 10. b) IC_{50} values were determined from the drug concentrations at which human 15-PGDH were reduced by 50% compared with negative



control; The enzyme was assayed fluorometrically, the IC_{50} values are determined using $250\mu M$ NAD⁺ as coenzyme and $21\mu M$ PGE₂ as substrate. c) Reported IC_{50} values are given as mean \pm standard deviation of the mean of three determinations.

No.	Sub	stitution ^a	15-PGDH scavenging activity
	R 1	R 2 - 6	(IC50, μM) ^{b,c}
39	OCH2CH3	2-methyl	0.397 ± 0.010
40	OCH2CH3	3-methyl	0.107 ± 0.007
41	OCH2CH3	4-methyl	0.154 ± 0.002
42	OCH2CH3	2-chloro	0.362 ± 0.010
43	OCH2CH3	3-chloro	0.217 ± 0.002
44	OCH2CH3	4-chloro	0.128 ± 0.004
45	OCH2CH3	2,6-dichloro	1.093 ± 0.002
46	OCH2CH3	2-bromo	0.587 ± 0.011
47	OCH2CH3	3-bromo	0.089 ± 0.003
48	OCH2CH3	4-bromo	0.042 ± 0.006
49	OCH2CH3	2-fluoro	0.253 ± 0.015
50	OCH2CH3	3-fluoro	0.122 ± 0.006
51	OCH2CH3	4-fluoro	0.214 ± 0.006
52	OCH2CH3	2-methoxy	0.674 ± 0.008
53	OCH2CH3	3-methoxy	0.469 ± 0.006
54	OCH2CH3	4-methoxy	0.454 ± 0.001
55	OCH2CH3	3,4-dimethoxy	5.511 ± 0.001
56	OCH2CH3	3,4,5-trimethoxy	ND^{d}
57	OCH ₂ CH ₃	4-ethoxy	2.468 ± 0.004

 Table 8. Inhibitory potency of compound 39-57

a) The substituent groups of each compound are shown in schem 10. b) IC_{50} values were determined from the drug concentrations at which human 15-PGDH were reduced by 50% compared with negative control; The enzyme was assayed fluorometrically, the IC_{50} values are determined using 250µM NAD⁺ as coenzyme and 21µM PGE₂ as substrate. c) Reported IC_{50} values are given as mean ± standard deviation of the mean of three determinations. d) ND = No detectable activity(IC_{50} >10).





No.	Su	bstitution ^a	15-PGDH scavenging activity
	R 1	\mathbf{R}_2 - 6	(IC50, μM) ^{b,c}
58	Br	2-methyl	0.471 ± 0.003
59	Br	3-methyl	0.744 ± 0.016
60	Br	4-methyl	0.036 ± 0.004
61	Br	2-chloro	0.078 ± 0.005
62	Br	3-chloro	0.047 ± 0.002
63	Br	4-chloro	0.045 ± 0.002
64	Br	2,6-dichloro	0.147 ± 0.005
65	Br	2-bromo	0.046 ± 0.003
66	Br	3-bromo	0.032 ± 0.002
67	Br	4-bromo	0.027 ± 0.002
68	Br	2-fluoro	0.033 ± 0.006
69	Br	3-fluoro	0.014 ± 0.003
70	Br	4-fluoro	0.056 ± 0.042
71	Br	2-methoxy	0.052 ± 0.006
72	Br	3-methoxy	0.044 ± 0.002
73	Br	4-methoxy	0.039 ± 0.005
74	Br	3,4-dimethoxy	1.122 ± 0.007
75	Br	3,4,5-trimethoxy	5.018 ± 0.003
76	Br	4-ethoxy	0.485 ± 0.066

 Table 9. Inhibitory potency of compound 58-76

a) The substituent groups of each compound are shown in schem 10. b) IC_{50} values were determined from the drug concentrations at which human 15-PGDH were reduced by 50% compared with negative control; The enzyme was assayed fluorometrically, the IC_{50} values are determined using $250\mu M$ NAD⁺ as coenzyme and $21\mu M$ PGE₂ as substrate. c) Reported IC_{50} values are given as mean \pm standard deviation of the mean of three determinations.

No.	S	ubstitution ^a	15-PGDH scavenging activity		
	R 1	R 2 - 6	(IC50, μM) ^{b,c}		
77	Cl	2-methyl	0.040 ± 0.002		
78	Cl	3-methyl	0.060 ± 0.022		
79	Cl	4-methyl	0.066 ± 0.002		
80	Cl	2-chloro	0.092 ± 0.002		
81	Cl	3-chloro	0.095 ± 0.003		
82	Cl	4-chloro	0.077 ± 0.002		
83	Cl	2,6-dichloro	0.178 ± 0.003		
84	Cl	2-bromo	0.084 ± 0.003		
85	Cl	3-bromo	0.071 ± 0.006		
86	Cl	4-bromo	0.036 ± 0.002		
87	Cl	2-fluoro	0.200 ± 0.003		
88	Cl	3-fluoro	0.083 ± 0.010		
89	Cl	4-fluoro	0.089 ± 0.004		
90	Cl	2-methoxy	0.266 ± 0.004		
91	Cl	3-methoxy	0.162 ± 0.010		
92	Cl	4-methoxy	0.174 ± 0.005		
93	Cl	3,4-dimethoxy	1.233 ± 0.006		
94	Cl	3,4,5-trimethoxy	0.880 ± 0.003		
95	Cl	4-ethoxy	0.523 ± 0.010		

 Table 10. Inhibitory potency of compound 77-95

a) The substituent groups of each compound are shown in schem 10. b) IC_{50} values were determined from the drug concentrations at which human 15-PGDH were reduced by 50% compared with negative





control; The enzyme was assayed fluorometrically, the IC_{50} values are determined using $250\mu M$ NAD⁺ as coenzyme and $21\mu M$ PGE₂ as substrate. c) Reported IC_{50} values are given as mean \pm standard deviation of the mean of three determinations.





3.2.2. Extracellular PGE₂ levels

experimental group 은 5 µM 과 10 µM 두 가지 농도로 처리하였으며 15-PGDH를 억 제함으로써 증가 된 세포 내의 PGE₂농도를 정량하기 위하여 primary antibody (Goat anti-mouse IgG)가 코팅 된 96 well palte에 미리 dilution해 둔 PGE2 standards와 비 표지 된 항원인 15-PGDH를 주입한 후 표지 된 항원 인 labeled alkaline phosphatase conjugated PGE₂ (AP-conjugated PGE₂)과 항원에 특이적으로 결합하는 항체 (PGE₂ antibody) 를 주입하여 제한 된 binding site에 대해 두 가지 항원 간의 경쟁반응을 유도 시켰으며 pNpp substrate를 주입하여 405 nm에서 OD를 측정함으로써 sample 내의 불필 요한 요소들을 제외하고 PGE2양 만을 검출할 수 있었다. 정량 한 PGE2농도와 약물을 처리하지 않은 negative control대비 평균 차이 및 증가율을 Table 11-12 에 나타내었다. compound 11 번을 제외한 모든 experimental group 에서 유의한 차이를 보였으며 (P<0.05), 전반적으로 R₁ = Br, Cl의 경우 눈에 띄는 PGE₂ 농도 증가를 확인할 수 있었 다. 특히 R₁ = Br 중 66, 67 그리고 69 의 경우 5 μM 농도에서는 각각 0 %, -6.920 %, -5.208 % 로 거의 활성을 띄지 않았지만, 10 µM 처리 시 negative control 대비 300-400 % 의 유의한 증가를 보여 처리 농도에 대하여 sensitivity 가 큰 것으로 나타났으며, Rı = Cl 중 85와 86의 경우 10 μM 처리 시 각각 275.713 %, 309.752 % 증가함을 확인하 였다. 또한 R₁ = OCH₂CH₃ 인 경우 45 와 46 은 10 μM 처리 시 각각 376.526 %, 328.599% 증가함을 보였다.

반면, R₁ = H, OCH₃ 인 경우 전반적으로 PGE₂ 증가 활성이 좋지 않았으며 5 μM 처리군 대비 10 μM 처리 시 PGE₂농도가 유의하게 감소하였다. 특히 R₁ = OCH₃ 인 경 우에서 29, 31 은 15-PGDH 억제 활성이 좋았지만, PGE₂ 증가율은 확인할 수 없었고, 33의 경우 56.359 % 증가하여 5 μM 에서 가장 높은 증가율을 보인 반면 10 μM 처리 시 52.658 % 증가율을 보여 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 32의 경우 5 μM 에서는 2.520 %의 유의한 감소를 보였지만 10 μM 처리 시 69.365 %의 유의한 감소를 보여 5 μM 대비 30% 이상의 감소를 확인할 수 있었다. 또한, 말단 phenyl ring에 methoxy group이 치환 된 경우 5 μM 및 10 μM 처리 군 모두에서 negative control 대비 유의하 게 감소함을 확인하였으며, 특히 15-PGDH 억제 활성이 가장 낮았던 18(X=H, R=3,4,5-trimethoxy)와 56(X=OCH2CH3, R=3,4,5-trimethoxy)의 경우 10 μM 처리 시 각각 -59.253%, -84.730% 유의한 감소를 확인할 수 있었다.

따라서, 15-PGDH를 낮은 농도에서도 강력하게 억제하여 PGE₂ 증가 활성이 뛰어났던 66, 67, 69 및 86 번 compound를 lead compounds로 정하였으며, 15-PGDH 억제 활성이 좋았지만 PGE₂증가를 확인할 수 없었던 29, 31번 compound를 wound healing assay를 통 해 그 활성을 비교해 보았다.





No		5µ M			10µ M	
_	PGE ₂ conc.	(pg/ml) ^a	increment _	PGE ₂ conc.	(pg/ml) ^a	increment
	$\frac{\text{mean} \pm \text{SD}}{492,220} \pm 4.507$	mean difference	(%)	$\frac{\text{mean} \pm \text{SD}}{279,002 \pm 0.725}$	mean difference"	(%)*
(-)	482.339 ± 4.507	101.010**	20.042	$3/8.992 \pm 0.735$	04.102**	22 101
1	381.321 ± 3.186	-101.018	-20.943	294.888 ± 0.144	-84.103	-22.191
2	439.816 ± 2.428	-42.523	-8.816	313.455 ± 0.328	-65.53/	-17.292
3	367.982 ± 2.615	-114.356	-23.709	298.136 ± 1.352	-80.856	-21.335
4	363.02 ± 3.789	-119.318	-24.737	183.161 ± 0.950	-195.831	-51.671
5	414.051 ± 4.634	-68.28/	-14.157	102.210 ± 3.008	-2/6./82	-73.031
6	$4/3./36 \pm 5.205$	-8.602	-1.783	225.326 ± 1.246	-153.666	-40.546
7	360.859 ± 2.638	-121.480	-25.186	261.730 ± 3.189	-117.262	-30.941
8	365.76 ± 3.972	-116.579	-24.170	201.767 ± 1.078	-177.225	-46.762
9	366.868 ± 5.934	-115.471	-23.940	157.989 ± 2.166	-221.003	-58.313
10	377.746 ± 6.183	-104.592	-21.684	157.999 ± 1.079	-220.993	-58.311
11	182.347 ± 3.126	-299.992	-62.195	376.148 ± 2.802	-2.843	-0.750
12	218.139 ± 4.241	-264.200	-54.775	147.490 ± 3.255	-231.502	-61.084
13	250.065 ± 3.128	-232.275	-48.156	206.219 ± 1.733	-172.772	-45.587
14	346.579 ± 1.552	-135.761	-28.146	308.165 ± 4.850	-70.827	-18.688
15	333.605 ± 6.7	-148.734	-30.836	128.954 ± 5.706	-250.038	-65.974
16	293.148 ± 5.501	-189.191	-39.224	188.918 ± 3.198	-190.074	-50.153
17	230.222 ± 3.588	-252.117	-52.270	123.475 ± 2.058	-255.517	-67.420
18	219.162 ± 5.935	-263.178	-54.563	154.428 ± 1.332	-224.564	-59.253
19	168.88 ± 1.535	-313.459	-64.987	197.401 ± 4.640	-181.591	-47.914
20	367.782 ± 3.904	-114.558	-23.751	416.851 ± 2.510	37.859	9.989
21	573.16 ± 5.258	90.821	18.829	298.136 ± 1.471	-80.856	-21.335
22	558.748 ± 7.362	76.409	15.841	351.674 ± 1.450	-27.318	-7.208
23	654.196 ± 3.531	171.857	35.630	363.666 ± 5.916	-15.325	-4.044
24	663.849 ± 2.939	181.510	37.631	245.288 ± 2.116	-133.704	-35.279
25	530.846 ± 3.753	48.507	10.057	359.616 ± 2.983	-19.376	-5.112
26	509.388 ± 2.845	27.049	5.608	504.038 ± 2.048	125.047	32.995
27	538.386 ± 6.51	56.047	11.620	480.166 ± 5.106	101.174	26.696
28	554.097 ± 3.646	71.758	14.877	321.879 ± 1.765	-57.113	-15.070
29	431.353 ± 2.219	-50.986	-10.571	100.879 ± 3.688	-278.113	-73.382
30	425.69 ± 4.822	-56.648	-11.744	206.219 ± 6.930	-172.772	-45.587
31	427.115 ± 4.065	-55.223	-11.449	165.303 ± 5.203	-213.689	-56.383
32	470.181 ± 6.389	-12.157	-2.520	116.106 ± 2.843	-262.886	-69.365
33	754.178 ± 6.402	271.840	56.359	578.560 ± 2.571	199.568	52.658
34	453.546 ± 4.857	-28.792	-5.969	131.149 ± 4.784	-247.842	-65.395
35	408.077 ± 3.264	-74.261	-15.396	95.653 ± 4.522	-283.339	-74.761
36	354.763 ± 2.962	-127.576	-26.449	80.874 ± 5.509	-298.118	-78.661
37	382.572 ± 3.116	-99.766	-20.684	84.448 ± 2.691	-294.544	-77.718
38	416.633 ± 3.486	-65.705 _{**}	-13.622	109.023 ± 5.011	-269.969	-71.233
39	545.715 ± 3.455	63.377	13.140	355.619 ± 2.067	-23.373	-6.167
40	455.26 ± 5.815	-27.078	-5.614	134.309 ± 4.987	-244.683	-64.562
41	445.843 ± 4.817	-36.496	-7.566	203.982 ± 5.580	-175.010	-46.178
42	469.303 ± 4.909	-13.036	-2.703	285.436 ± 3.424	-93.556	-24.685
43	444.644 ± 4.432	-37.695	-7.815	$1,256.031 \pm 4.806$	877.039	231.414
44	459.591 ± 2.969	-22.748	-4.716	794.581 ± 3.207	415.589	109.656
45	520.947 ± 2.47	38.608	8.004	$1,805.996 \pm 5.495$	1,427.004	376.526
46	532.753 ± 1.545	50.414	10.452	$1,624.354 \pm 4.408$	1,245.362	328.599
47	397.086 ± 3.168	-85.253	-17.675	660.393 ± 2.278	281.402	74.250
48	402.087 ± 7.099	-80.252	-16.638	749.253 ± 2.130	370.262	97.696

Table 11. Effects of compound 1-48 on PGE₂ release





A549 cells were treated with 5μ M and 10μ M of the synthesized compound for 12hours. Extracellular PGE₂ concentration was detected using ELISA kit. a)The ELISA data was represented as the mean \pm standard deviation of five independent experiments. b) Mean differences = PGE₂ concentration treated compounds - PGE₂ concentration of negative control (-). c)***P*<0.01 compared with the negative control(one way ANOVA, Dunnet-t tests). d) Increment(%) = (Mean difference/PGE₂ concentration of negative control)×100.



No.	12. Effects of compe	5µM			10µ M	
_	PGE ₂ conc.	(pg/ml) ^a	increment	PGE ₂ conc.	(pg/ml) ^a	increment
_	mean ± SD	mean difference ^{b,c}	(%) ^d	mean ± SD	mean difference ^{b,c}	$(\%)^{d}$
(-)	462.39 ± 5.553			417.588 ± 2.949		
49	435.535 ± 2.318	-66.753	-14.437	133.253 ± 1.137	-284.335	-75.024
50	496.519 ± 4.079	-5.769**	-1.248	134.942 ± 2.188	-282.646**	-74.578
51	407.711 ± 3.202	-54.680	-11.826	107.978 ± 2.755	-309.610	-81.693
52	480.606 ± 5.154	18.215	3.939	721.067 ± 1.134	303.479	80.075
53	356.825 ± 5.947	-105.565	-22.830	92.327 ± 2.799	-325.261	-85.823
54	370.032 ± 1.591	-92.358**	-19.974	228.555 ± 1.858	-189.033	-49.878
55	367.324 ± 2.924	-95.066**	-20.560	53.237 ± 1.823	-364.351**	-96.137
56	$400.905\ \pm 4.884$	-61.485	-13.297	96.468 ± 3.599	-321.120	-84.730
57	$417.583 \ \pm 4.847$	-44.807	-9.690	115.537 ± 6.178	-302.051	-79.699
58	395.165 ± 2.84	-67.226	-14.539	239.854 ± 1.794	-177.734	-46.897
59	394.294 ± 5.563	-68.096	-14.727	282.134 ± 2.171	-135.454	-35.741
60	401.352 ± 8.246	-61.038	-13.201	188.606 ± 2.331	-228.982**	-60.419
61	509.496 ± 2.829	47.106	10.188	246.149 ± 2.909	-171.439	-45.236
62	449.505 ± 7.085	-12.885	-2.787	762.308 ± 4.279	344.720**	90.957
63	403.916 ± 2.485	-58.474	-12.646	403.467 ± 1.582	-14.121	-3.726
64	452.591 ± 3.444	-9.799	-2.119	762.308 ± 5.723	344.720	90.957
65	459.445 ± 3.68	-2.945	-0.637	795.542 ± 3.234	377.954	99.726
66	462.39 ± 2.779	0.000	0.000	$1,819.957 \pm 1.726$	1,402.369	370.026
67	430.391 ± 2.981	-31.999	-6.920	$2,016.651 \pm 2.358$	1,599.063	421.925
68	416.224 ± 2.933	-46.166	-9.984	$1,462.520 \pm 4.203$	1,044.932	275.713
69	438.309 ± 2.505	-24.081	-5.208	$1,580.048 \pm 2.168$	1,162.460	306.724
70	443.942 ± 2.898	-18.448	-3.990	$1,354.302 \pm 5.703$	936.714	247.159
71	545.801 ± 5.376	63.463	13.725	$1,626.872 \pm 2.423$	1,209.284	319.079
72	497.472 ± 4.282	15.133	3.273	$1,741.169 \pm 2.654$	1,323.581	349.237
73	468.603 ± 5.371	-13.736	-2.971	469.186 ± 6.269	51.598	13.615
74	424.586 ± 0.001	-57.753	-12.490	398.887 ± 2.632	-18.701	-4.934
75	464.695 ± 3.52	-17.644	-3.816	403.467 ± 2.082	-14.121	-3.726
76	549.09 ± 3.74	66.751	14.436	485.570 ± 2.403	67.982	17.938
77	547.2 ± 3.666	64.861	14.027	487.601 ± 2.722	70.012	18.473
78	532.671 ± 1.429	50.332	10.885	469.277 ± 3.518	51.639	13.625
79	618.42 ± 2.607	136.082	29.430	558.284 ± 2.162	140.696	37.124
80	609.963 ± 2.311	127.624	27.601	547.489 ± 3.577	129.901	34.275
81	508.274 ± 1.106	25.936	5.609	449.272 ± 4.500	31.682	8.360
82	548.297 ± 6.934	65.959	14.265	488.451 ± 2.775	70.862	18.697
83	553.598 ± 6.146	71.260	15.411	495.177 ± 1.803	77.589	20.472
84	514.817 ± 6.567	32.479	7.024	466.918 ± 2.712	49.332	13.017
85	$513.2/8 \pm 3.049$	30.940	6.691	$1,462.520 \pm 1.749$	1,044.932	2/5./13
86	502.85 ± 2.453	20.512	4.436	$1,591.524 \pm 1.419$	1,173.936	309.752
87	504.635 ± 7.916	22.296	4.822	$1,085.968 \pm 2.175$	668.380	1/6.357
88	532.29 ± 5.039	49.952	10.803	512.168 ± 1.975	94.580	24.956
89	512.643 ± 5.42	30.304	6.554	460.588 ± 4.909	43.001	11.346
90	501.38 ± 4.93	19.042	4.118	480.166 ± 5.106	62.578	16.512
91	$48/./6/ \pm /.623$	5.429	1.174	439.748 ± 2.510	22.160	5.847
92	420.012 ± 3.195	-62.326	-15.4/9	359.616 ± 2.983	-5/.9/2	-15.296
93	$486.9// \pm 6.006$	4.639	1.003	427.824 ± 4.522	10.236	2./01
94 05	304.033 ± 3.210	22.290 44.065 ^{**}	4.822	$440.3/8 \pm 2.722$	22.990 46.210 ^{**}	0.000
75	327.304 ± 1.021	44.900	9.124	$403./9/\pm 3.916$	40.219	12.193

Table	12.	Effects	of	compound	49-95	on	PGE ₂	release
Labic	1	Lincow	01	compound	17 75	on	1 0 1 2	1010030

A549 cells were treated with $5\mu M$ and $10\mu M$ of the synthesized compound for 12hours. Extracellular





 PGE_2 concentration was detected using ELISA kit. a)The ELISA data was represented as the mean \pm standard deviation of five independent experiments. b) Mean differences = PGE_2 concentration treated compounds - PGE_2 concentration of negative control (-). c)All data has satisfied the 95% confidence interval; **P<0.01 compared with the negative control(one way ANOVA, Dunnet-t tests). d) Increment(%) = (Mean difference/PGE₂ concentration of negative control)×100.





3.2.3. Cytotoxicity of the lead compounds for HEK293cell line

human normal cell line 에 대하여 4가지 lead compound 의 cytotoxicity 를 알아보고, 추후 HaCaT cell line 을 이용한 실험에서 약물 농도의 허용 수준 결정 및 임상 적용 가능성을 검증하기 위하여 인간유래 정상 신장 세포 주 (HEK293 cell line) 에 약물을 다양한 농도로 처리하고 24 시간, 48 시간 및 72 시간 배양 한 후 미토콘드리아의 효 소에 의해 환원 된 MTT formazan 을 DMSO 에 용해시켜 OD 를 측정하였다. 실험 결 과는 2.10. 절의 formula 에 의해 cell viability 를 계산하였으며, withinin-subject factor에 처리 농도 (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 µM), between-subject factor에 약물 노출 시간 (24, 48, 72 hours) 을 설정하여 GLM-repeated measures 분석을 하였다. 그 결과 다 변량 검정 및 개채 내 효과 검정에서 concentration 에 의한 주 효과와 concentration*time 의 교호작용 분석 모두 P-value값이 0.000으로 나타났으며, post-hoc으 로는 Dunnet-t 검정을 시행하여 negative control (cell viability 100%) 과 각 시간 별 cell viability 의 평균을 비교함으로써 유의성을 검정할 수 있었으며, P-value 값이 0.000으로 나타났다. 즉, 본 연구에서 선정 한 lead compound 의 처리 농도와 노출 시간이 cell viability 의 변화가 통계적으로 유의하였으며, 약물을 처리하는 농도가 높아질수록, 약 물에 노출되는 시간이 길어질수록 cell viability 가 유의하게 감소할 것이라는 것을 확 인할 수 있었다. 이러한 통계적 분석을 토대로 하여 Figure 9 에 나타낸 바와 같이 time/dose dependent 한 plot 을 얻을 수 있었고, 각 point의 error bar 는 ± standard deviation 을 나타낸다. 각각의 compound 에서 상이한 차이를 확인할 수 있었으나 전반 적으로 농도가 증가함에 따라 cell viability 가 유의하게 감소 (P<0.05) 함을 확인하였으 며, 약물 노출 시간이 24시간에서 72시간으로 증가함에 따라 cell viability 가 유의하게 감소 (P<0.05) 하였다. 특히 72시간 노출시킨 경우, 저 농도 처리군의 cell viability 가 대략 60-80 % 의 분포를 보였으며 24 시간 노출시킨 경우 약 100-120 % 의 분포를 보 인 것에 비해 약 40 % 의 유의한 감소를 보였다. 한편 초 과량상태 (1000 μM)의 경우 에는 cell viability 가 시간의 변화에 따라 유의한 차이가 있으나 0%에 가까운 분포를 보여 고 농도 처리 시 거의 모든 세포가 사멸 할 위험이 있음을 확인할 수 있었다. 따 라서 본 연구의 lead compound 를 처리함에 있어 적정 농도와 노출 시간을 결정하기 위하여 ISO 10993, part 5 에 따라 약물에 의해 손실된 세포가 50 %일 때의 농도를 2 등급으로 판정하였다. 즉, 2 등급에 해당하는 농도는 세포에 대한 독성 반응도가 미약 (mild) 함을 뜻하며 3 등급 (세포 손실도 70 %) 과 4 등급 (세포층이 거의 또는 완전히 파괴 됨)과 같이 반응도가 2등급 보다 큰 경우(> 2) 세포 독성이 있는 것으로 간주 하였다. 이에 따라 negative control 의 50%에 해당하는 세포의 사멸 농도를 simple regression analysis 를 통해 이상 값을 제거함으로써 best-fit equation ($R^2 > 0.99$) 을 얻





었으며, 이에 negative control 의 절반 값을 대입하여 각각의 노출 시간 별 IC₅₀을 계산 하여 **Table 13** 에 나타내었다. 이러한 결과를 통해, 본 실험에서 선정 한 lead compounds 및 비교 물질들은 200-400 µM 까지는 처리해도 무방할 것이며, 약물 노출 시간은 48시간 이내로 실험을 하는 것이 독성에 대한 민감도가 낮을 것이라 사료 된 다.





Figure 9. The MTT cell viability with the time/dose-response relationship of compounds; A) compound 29, B) compound 31, C) compound 66, D) compound 67, E) compound 69, and F) compound 86. HEK293





cells were treated with compound 10, 29, 31, 45, 66, 67, 69 and 86 (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625and 7.8125 μ M) for 24(\bullet , 3.0×10⁵cells/ml), 48(\blacktriangle , 1.5×10⁵cells/ml) and 72(\blacklozenge , 0.5×10⁵cells/ml)hours. The MTT assay measured the reduction of MTT to a colored formazan. The X axis is log scale; Each point, expressed as % of control, indicates the mean \pm SD of three independent runs; significant decrease to the control was detected for all three exposure times as determined by general linear model (GLM-repeated measures) with Dunnett-t post-hoc test. curves were plotted and fitted using Sigmapolt for Windows. Ver. 10.0

No.	Substitution		24 h $(3.0 \times 10^5 \text{ cells/ml})$	48 h (1.5×10 ⁵ cells/ml)	72 h $(0.5 \times 10^5 \text{ cells/ml})$	
	R 1	R 2 - 6	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	
29	OCH3	4-bromo	244.095	141.271	53.677	
31	OCH3	3-fluoro	309.527	71.135	20.745	
66	Br	3-bromo	484.813	263.803	213.788	
67	Br	4-bromo	225.484	72.373	59.266	
69	Br	3-fluoro	421.983	230.015	94.589	
86	Cl	4-bromo	352.969	284.514	63.283	

Table 13. IC₅₀ values for lead compounds in the three different exposure times

The toxicity of the tested compounds **10**, **29**, **31**, **45**, **66**, **67**, **69** and **86** on HEK293 cells. As an index for citytotoxicity the IC_{50} values is shown, describing concentration of compounds causing 50% loss of the tested viability parameter (MTT reduction), with the best-fit equation based on the coefficient of determination (R^2). The simple regression analysis was performed using IBM SPSS statistics version 20.0 (IBM inc., Armonk, NY, USA).





3.2.4. Determination of the wound healing effect

15-PGDH 를 억제함으로써 창상 생성 시 염증 부위의 PGE2 를 증가시킴으로써 cell migration 및 proliferation 효과를 확인하여 lead compounds 가 창상 치유 촉진에 효과적 임을 검증하고자 하여 invitro system 에서 물리적 창상을 가한 후 약물을 처리하여 control group (약물을 처리하지 않은 negative control 과 성장인자인 TGF-β1을 처리한 positive control)과의 비교를 시행하였다. 약물 처리 농도와 시간은 MTT assay 결과를 토대로 하여 세포에 독성 영향을 미치지 않으면서 높은 활성을 보일 수 있도록 10 uM 농도로 처리하여 24 시간 동안 노출시켰다. 실험 결과는 광학 현미경을 사용하여 배율 ×100 으로 약물 처리 전 (0 hours) 과 약물 처리 24 시간 후의 상태를 촬영하였으며 현 미경 내에 내장된 컴퓨터 프로그램에 의해 scratch 양 단의 너비를 측정하여 통계적으 로 비교 분석하였다. Figure 10 는 control group과 (C) 15-PGDH의 촬영본 이며, Figure 11 에는 (D) 29, (E) 31, (F) 66, (G) 67 (H) 69 그리고 (I) 86 을 처리 한 촬영 본을 나 타내었다. 본 실험을 통해 확인한 세포의 이동과 증식에 관한 검사에서는 compound 69 로 처리한 군에서 24 시간 후 가장 왕성한 이동과 증식이 확인되어 wound 양단간의 간격이 0 시간대 대비 가장 좁아졌으며, 67과 86의 경우에도 wound 양단간의 간격이 확연하게 좁아짐을 확인하였다. 반면, 정제 한 15-PGDH 를 처리 한 군의 경우 24시간 대에는 세포의 이동 및 증식을 확인할 수 없었으며 오히려 양단간의 간격이 벌어지는 양상을 보였다. 이러한 현상을 통계적으로 분석하기 위하여 각 군의 시간대 별 창상 부위 양 단의 너비를 3 회 반복 실험을 한 값들의 평균과 표준편차로 나타내었으며, wound closure rate (%) 는 negative control 의 회복률을 100 % 로 환산하여 Table 14 와 Figure 12 에 정리 하였다. 또한 one-way ANOVA 와 post-hoc 으로 Dunnet-t test 를 통 해 negative control 과의 유의성을 평가하여 유의수준 95 % 이상에서 의미를 부여하였 다. 그 결과 compound 67, 69, 86 처리 군에서 창상 치유 활성이 negative control 대비 유의하게 증가 (P=0.000)하였으며, 특히 69 번의 경우 wound closure rate 가 315.681 % 로 가장 높음을 확인하였다. 또한 66의 경우 173.564 %로 유의한 증가 (P<0.05)를 확인 할 수 있었으나, 선행 되었던 PGE2 활성 평가를 통해 예측 해 볼 수 있었던 것에는 미 치지 못하였다. *in vitro* 에서의 이러한 실험 결과를 통해, lead compounds인 66, 67, 69 및 86번 compound는 15-PGDH를 강력하게 억제시켜 세포 내의 PGE2 수준을 상향 조절 시킴으로써 wound healing을 촉진함을 확인 하였으며, in vivo 에서도 상처로 인해 조직 의 연속성이 파괴 되었을 때, 세포를 증식시켜 그 조직의 재생을 촉진시킬 수 있을 것

- 90 -





Collection @ chosun

이라 사료 된다. 한편 15-PGDH는 효과적으로 억제시켰지만, PGE₂의 유의한 증가를 보 이지 못 하여 비교 물질로 선정한 29 및 31의 경우에, 각각 159.347 %, 144.415 % 로 증가하였으나, negative control 대비 유의한 증가는 확인할 수 없었다. 또한 정제 한 15-PGDH 처리 군의 경우 24.597 %로 negative control 대비 유의하게 감소 (*P*=0.019)하 였다. 이를 통해 15-PGDH가 PGE₂를 불활성화 시켜 세포 이동, 분화 및 신생 혈관 생 성 등을 지연시켜 창상의 치유를 더디게 하는 요인임을 확인할 수 있었다.



Figure 10. Fluorescent microscope image to evaluate wound healing *in vitro* in the scratch assay using a confluent monolayer of HaCaT keratinocytes. Cell migration into the wound was observed in response to an artificial injury. A single representative area is shown (A) negative control and (B) 1ng/ml TGF- βl as positive control, C) 15-PGDH. The superscript shown as 0h is immediately after the wounding, 24h means after 24hours incubation.



Collection @ chosun



Figure 11. Fluorescent microscope image to evaluate wound healing *in vitro* in the scratch assay using a confluent monolayer of HaCaT keratinocytes. Cell migration into the wound was observed in response to an artificial injury. A single representative area is shown lead compounds; (D) 29, (E) 31, (F) 66, (G) 67, (H) 69 and (I) 86 as experimental group. The superscript shown as 0h is immediately after the wounding, 24h means after 24hours incubation. All compounds were treated with 10µM.



No.	Width of the wou	Wound closure rate ^b	
	Immediately after the wounding	after 24hours incubation	(%)
Control	603.769 ± 9.585	455.186 ± 33.619	100.000
TGF - β1	546.781 ± 6.281	308.259 ± 13.823	160.531
15-PGDH	553.012 ± 5.448	516.465 ± 11.905	24.597 [*]
29	496.997 ± 2.652	260.234 ± 33.301	159.347
31	583.782 ± 1.857	369.206 ± 27.484	144.415
66	589.867 ± 5.102	331.980 ± 55.906	173.564
67	552.619 ± 11.823	137.211 ± 16.505	279.580***
69	642.160 ± 21.689	173.111 ± 17.654	315.681***
86	561.136 ± 12.697	158.792 ± 42.630	270.787***

Table	14.	Keratinocyte	migration	effect	of	lead	compounds
-------	-----	--------------	-----------	--------	----	------	-----------

a) The width of the wound area has represented as the mean \pm standard deviation of five independent experiments. b) Wound closure rate (%) = ((average width of the initial wound - average width of the after 24hours incubation) / mean difference of negative control)×100; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 compared with negative control (one way ANOVA, Dunnet-t post-hoc tests). The significant decrease at 15-PGDH compared with negative control (P=0.019) was observed, while there were significant increase (almost 2-3 fold) in compound 67, 69 and 86 compared with negative control (P=0.000).



Figure 12. Results of the wound closure rate (%) illustrated in plots. Error bars represent the standard deviation of the measurements. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 compared with negative control (100 %) (one way ANOVA, Dunnet-t post-hoc tests).





생체 내의 PGE2를 불활성화 시키는 15-PGDH 를 억제하여 창상의 치유에 도움을 주 고 자 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl) phenyl 2-phenylacetate 유도체를 합성하고, cell based assay를 통해 in vitro 에서의 활성을 평가하였다. 합성 한 유도체의 Rf 값을 통해, 중간 phenyl의 C2 position 에는 Cl 및 Br 과 같은 halogen이 치환 되었을 때 상대 적으로 polarity가 높게 나타난 반면, 동일한 치환 group을 갖는 series에서 말단의 phenyl ring에 halogen원자가 치환 된 경우에는 다른 치환기를 도입 하였을 때에 비해 상대적으로 낮은 polarity를 보여주었다. 중간 phenyl의 C2 position에는 Cl 및 Br 과 같 은 halogen이 치환 되었을 때 상대적으로 낮은 IC₅₀ 값을 기록하였으며 말단 phenyl ring에는 halogen 이 치환 되었을 경우 더 낮은 값을 보여, 이러한 물질들은 낮은 농도 에서도 강력하게 15-PGDH를 억제하는 것을 알 수 있었다. 반면 말단 phenyl ring에 methoxy group을 도입하였을 때, 특히 di-methoxy 보다 tri-methoxy일 때 저조한 억제 활 성을 보였다. 이러한 양상은 15-PGDH 를 억제함으로써 extracellular PGE₂ 농도의 증가 를 확인하기 위한 실험에서도 유사한 결과를 나타내었다. 이 두 실험에서 낮은 농도에 서도 15-PGDH를 강력하게 억제하여 높은 PGE2 증가율을 보여 woun healing 활성이 기 대 되는 66, 67, 69 및 86번 물질을 lead compounds 로 지정하여 MTT assay 와 wound healing assay 를 진행하였다. HEK293 cell line 을 이용한 cell cytotoxicity 를 확인 한 결과 초 고 농도에서는 세포가 사멸하였지만, 200 μM 까지는 무해 할 것으로 판단 된 다. 정상 세포에 대한 독성 실험을 거쳐 약물 처리 농도와 노출 시간을 10 μΜ / 24 hours 으로 결정하여 human keratinocyte인 HaCaT cell line 에 처리한 결과, 69번 compound의 경우 뛰어난 상처 치유 활성을 보였으며, 이와 유사한 구조를 갖는 66, 67 및 86 역시 상당한 활성을 보였다. 모든 실험을 종합하여 볼 때, 중간 phenyl의 C2 postion과 말단 phenyl ring 모두에 halogen을 도입 할 경우 전반적으로 15-PGDH를 억제 하여 PGE2 수준을 효과적으로 상향 조절 시켰다. 또한 독성이 거의 없으면서 cell migration 및 proliferation 을 효과적으로 조절하여 세포에 운동성을 부여하고, 상처 치 유에 상당한 도움을 줄 수 있는 것을 확인하였다. 특히, 말단 phenyl group의 경우 3번 및 4번 탄소에 Br 또는 F 원자를 치환 할 경우 전반적으로 우수한 활성을 보임을 확 인하였다. 따라서, 이러한 유도체들은 15-PGDH를 억제하여 PGE2를 상향 조절함으로써 창상의 치유와 재생에 도움을 주어 2차 감염 및 여러 합병증 등을 방지할 수 있는 약


물로써의 기능과 더불어 세포에 미치는 특성을 응용하여 피부 세포의 regeneration을 목 적으로 하는 화장품으로서의 기능도 충분히 수행할 수 있을 것이다.

이를 위해서는 *in vivo* 에서의 연구를 통한 wound healing 효과가 입증 되어야 할 것 이며, substituent group에 따른 구조의 변형이 활성에 미치는 영향을 규명하기 위한 실 험이 추가적으로 필요 할 것으로 사료된다.





References

- Cho, A.R. Effect of silver sulfadiazine on the skin cell proliferation and wound healing process in hairless mouse 2nd degree burn model. J. Kor. Pharm. Sci., 32(2), 113-117 (2002).
- Robby, E.C. Fitz, D.G. and Nathan, P. Delivery of topical antimicrobal agents silver sulfadiazine, gentamicin and nystain to infected burn wounds in rats from preloaded synthetic dressings, *Trans. Am. Soc. Artif, Intern. Organs.*, 26, 533-536 (1980).
- 3. Kim, W.I. et al. Fabrication and characterization of polyurethane foam for wound dressing. *Polymer (Korea).* 34(5), 442-449 (2010).
- 4. Yang, K.H. Han, D.Y. Hahn, S.B. and Kim, H.J. Dynamic closing method using elasticity for skin defect. *J. of Korea orthop. Assoc.*, 30(2). 403-409 (1995).
- Piscatelli, S.J. Michaels, B.M. Gregory, P. Jennings, R.W. Longaker, M.T. Harrison, M.R. and Siebert, J.W. Fetal fibroblast contraction of collagen matrices *in vitro*: the effects of epidermal growth factor and transforming growth factor- β, *Ann. Plast. Surg.*, 33. 38-45 (1994).
- Eisinger, M. Sadan, S. Silver, I.A. and Flick, R.B. Growth regulation of skin cells by epidermal cell-derived factors; implications for wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 1937-1941 (1988).
- 7. Park, J.W. Reconstruction of a traumatic soft tissue defect. J. Korean Fract Soc., 28(4). 256-265 (2015).
- 8. Martin, P. Wound healing aming for perfect skin regeneration. *Science*. 276., 75-81 (1997).
- 9. Richard A.F. Clark, et al. The molecular and cellular biology of wound repair. Plenum. New York (1996).
- 10. Werner, S. and Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev. 83(3). 835-870 (2003).
- Kwon, M.J. and Park, j.H. Impaired wound healing in diabetes mellitus. J. Korean Diabetes., 33. 83-90 (2009).
- 12. Kim, W.S. Park, B.S. Sung, J.H. Yang, J.M. Park, S.B. Kwak, S.J. and Park, J.S.





Wound healing effect of adipose - derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. J. Dermatol Sci., 48(1). 15-24 (2007).

- Cornwell, K.G. and Pins, G.D. Enhanced proliferation and migration of fibroblasts on the surface of fibroblast growth factor-2-lasded fibrin microthreads. *Tissue Engineering: Part A.* 16(12). 3669-3677 (2009).
- 14. Ninnemann, J.L. Prostaglandins in inflammation and disease. *Immunol Today.*, 5. 173-175 (1984).
- 15. Schlondorff, D. Renal prostaglandin synthesis sites of production and specific actions of prostaglandins. *Am. J. Med.*, 81. 1-11 (1986).
- Marnett, L.J. Rowlinson, S.W. Goodwin, D.C. Kalgutkar, A.S. and Lanzo, C.A. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. J. Biol. Chem., 274(33). 22903-6 (1999).
- 17. Fahmi, H. mPGES-1 as a novel target for arthritis. *Curr. Opin. Rheum.*, 33. 155-167. (2003).
- Fortler, M.A. Krishnaswamy, K. Danyod, G. Boucher-Kolvalik, S. and Chapdalaine, P. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *J. Physiol Pharmacol.*, 1. 65-89. (2008).
- 19. Bos, C.L. Richel, D.J. Ritsema, T. Peppelenbosch, M.P. and Versteeg, H.H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(7). 1187-1205. (2004).
- Sales, K.J. and Jabbour, H.N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in reproductive tract physiology and pathology. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 71(3-4). 97-117. (2003).
- Hata, A.N. and Breyer, R.M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol. Ther.*, 103(2). 147-166. (2004).
- Fujino, H. Xu, W. and Regan, J.W. Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal - regulated kinase. *J. Biol. Chem.*, 278. 12151-56. (2003).
- 23. Fujino, H. West, K.A. and Regan, J.W. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3





and stimulation of T-cell factor signaling gollowing activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.*, 277. 2614-9. (2002).

- Montine, T.J. Milatovic, D. Gupta, R.C. Valyi-Nagy, T. Morrow, J.D. and Breyer, R.M. Neuronal oxidative damage from activated innate immunity is EP2 receptor-dependent. *J. Neurochem.*, 83. 463-470 (2002).
- Takayama, K. Garcia-Cardena, G. Sukhova, G.K. Comander, J. Gimbrone, M.A. and Libby, P. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J. Biol. Chem.*, 277. 44147-54 (2002).
- Nataraj, C. Tomas, D.W. Tilley, S.L. Nguyen, M.T. Mannon, R. Koller, B.H. et al. Receptors for prostaglandin E (2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J. Clin. Invest.*, 108. 1229-35 (2001).
- Akaogi, J. Yamada, H. Kuroda, Y. Nacionales, D.C. Reeves, W.H. and Satoh, M. Prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 are up-regulated in peritoneal macrophages and joints of pristane-treated mice and modulate TNF-alpha and IL-6 production. *J. Leukoc. Biol.*, 76. 227-236 (2004).
- Flitzik, T. Hotz, H.G. Hotz, B. Wittig, F. and Buhr, H.J. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) reduces prostaglandin E2 production and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *Hepato-gastroenterology.*, 50(52). 1159-1162 (2003).
- Engelhardt, G. Pharmacology of Meloxicam, A New Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug with an Improved Safety Profile Through Preferential Inhibition of COX-2. *British. J. Rheumatology.*, 35(1). 4-12 (1996).
- Takeuchi, K. Tanaka, A. Ohno, R. and Yokota, A. Role of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage. *J. Physiol. Pharmacol.*, 54(4). 165-182 (2003).
- Riendeau, D. Charleson, S. Cromlish, W. Mancini, J.A. Wong, E. and Guay, J. Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. *Canadian. J. Physiol. Pharmacol.*, 75(9). 1088-1095 (1997).
- 32. Zhang, Y.G. et al. Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science.*, 348. 1223-2340 (2015).



- Otsuka, S. et al. PGE2 signal via PGE2 receptors evoked by a selective agonist enhances regeneration of injured articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.*, 17(4). 529-538 (2009).
- 34. Tsujii, H. Okamoto, Y. Kikuchi, E. Matsumoto, M. and Nakano, H. Prostaglandin E2 and rat liver regeneration. *Gastroenterology.*, 105(2). 495-499 (1993).
- 35. James, M.J. Penglis, P.S. Caughey, G.E. Demasi, M. and Cleland, L.G. Eicosanoid production by human monocytes: dose COX-2 contribute to a self-immiting inflammatory response? *Inflamm. Res.*, 50. 249-253 (2001).
- Caughey, G.E. Pouliot, M. Cleland, L.G. and James, M.J. Regulation of tumor necrosis factor-alpha and IL-1 beta synthesis by thromboxane A2 in nonadherent human monocytes. *J. Immunol.*, 158. 351-358 (1997).
- Penglis, P.S. Cleland, L.G. Demasi, M. Caughey, G.E. and James, M.J. Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitiors. *J. Immunol.*, 165. 1605-1611 (2000).
- Kalinski, P. Vieira, P.L. Schuitemaker, J.H. De Jong, E.C. and Kapsenberg, M.L. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood.*, 97. 3466-9 (2001).
- Takeuchi, K. Tanaka, A. Hayashi, Y. and Yokota, A. COX inhibition and NSAID-induced gastric damage--roles in various pathogenic events. *Curr. Top. Med. Chem.*, 5(5). 475-486 (2005).
- 40. Nakano, J. ÄNggard, E. and Samuelsson, B. 15-Hydroxy-Prostanoate Dehydrogenase. Prostaglandins as Substrates and Inhibitors. *Eur. J. Biochem.*, 11. 386-389 (1969).
- 41. Thien, F.C.K. and Walters, E.H. Eicosanoids and asthma: an update. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.*, 52(5). 271-288 (1995).
- Tai, H.H. Cho, H. Tong, M. and Ding, Y. NAD+-Linked 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase: Structure and Biological Functions. *Current Pharmaceutical Design.*, 12(8). 955-962 (2006).
- 43. Ensor, C.M. and Tai, H.H. 15-Hydroxyprostaglandin degydrogenase. J. Lipid Mediat. Cell signal., 12. 313-319 (1995).
- 44. Tai, H.H. and Cho, H. Threonine 11 of human NAD+-dependent 15-hydroxyprostaglandin





dehydrogenase may interact with NAD+ during catalysis. *Prostaglandins, Leukotrienes* and Essential Fatty Acids., 66(5-6). 505-509 (2002).

- 45. Cho, H. Huang, L. Hamza, A. Gao, D. Zhan, C.G. and Tai, H.H. Role of glutamine 148 of human 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in catalytic oxidation of prostaglandin E2. *Bioorg. Med. Chem.*, 14(19). 6486-6491 (2006).
- Jung, S.H. et al. Synthesis and PPAR- y Ligand-Binding Activity of the New Series of 2' -Hydroxychalcone and Thiazolidinedione Derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.*, 54(3). 368-371 (2006).
- 47. Braj, H. et al. Novel indole containing thiazolidinedione derivatives as potent euglycemic and hypolipidaemic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7(7), 785-788 (1997).
- 48. Sarafidis, P.A. Thiazolidinedione derivatives in diabetes and cardiovascular disease: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 22(3). 247-264 (2008).
- 49. John, E. McMurry. Organic Chemistry, 8th Edition. Cengage Learning., (2012).
- 50. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2). 248-254 (1976).
- 51. Zor, T. and Selinger, Z. Linearization of the bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.*, 236(2). 302-308 (1996).
- 52. Kim, H.L. Cho, J.B. Cho, I.H. Lee, J.W. Chang, S.W. and Lee, S.J. NADH variation and process control with NADH fluorometer in full scale biological nutrient removal process. *J. Env. Hlth, Sci.*, 34(6). 423-432 (2008).
- 53. Biellmann, J.F. Lapinte, C. Haid, E. and Weimann, G. Structure of lactate dehydrogenase inhibitor generated from coenzyme. *Biochemistry.*, 18 (7). 1212-7.(1979).
- Lakowicz, J.R. Szmacinski, H. Nowaczyk, K. and Johnson, ML. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(4) 1271-5 (1992).
- 55. Lequin, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 51(12) 2415-8 (2005).
- Leng, S. X. McElhaney, J. E. Walston, J. D. Xie, D. Fedarko, N. S. and Kuchel, G. A. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. J. Gerontol. Ser. A-Biol. Sci. Med. Sci., 63(8) 879-84.(2008).





- Griffin, J. F. T. Spittle, E. Rodgers, C. R. Liggett, S. Cooper, M. Bakker, D. and Bannantine, J. P. Immunoglobulin G1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in red deer (cervus elaphus). *Clin. Vaccine Immunol.*, 12(12) 1401-9. (2005).
- Lee, G.S. Lee, K.M. Yim, D.S. Cheong, J.H. and Kang, T.J. The effect of the butanol fraction from hydnocarpi semen extract on activation of keratinocyte and fibroblast. *Kor. J. Pharmacogn.*, 46(1). 59-64 (2015).
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.*, 65(1-2). 55-63 (1983).
- Cory, A.H. Owen, T.C. Barltrop, J.A. and Cory, J.G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications.*, 3(7). 207-212.(1991).
- 61. Keseru, G.M. and Makara, G.M. Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discovery Today.*, 11 (15-16): 741-8. (2006).
- 62. Bleicher, K.H. Böhm, H.J. Müller, K. and Alanine, A.I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2(5) 369-78 (2003).





¹H NMR Spectra







5-(4-hydroxy-benzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione (a)



5-(4-hydroxy-3-methoxy benzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione (b)







5-(4-hydroxy-3-ethoxy benzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione (c)



5-(3-bromo-4-hydroxy benzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione (d)







5-(3-cholro-4-hydroxy benzylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione (e)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(o-tolyl)acetate (1)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(m-tolyl)acetate (2)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(p-tolyl)acetate (3)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-chlorophenyl)acetate (4)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-chlorophenyl)acetate (5)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-chlorophenyl)acetate (6)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (7)

Collection @ chosun





(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-bromophenyl)acetate (8)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-bromophenyl)acetate (9)

Collection @ chosun





(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-bromophenyl)acetate (10)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-fluorophenyl)acetate (11)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-fluorophenyl)acetate (12)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-fluorophenyl)acetate (13)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-methoxyphenyl)acetate (14)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-methoxyphenyl)acetate (15)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-methoxyphenyl)acetate (16)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate (17)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3,4,5-tridimethoxyphenyl)acetate (18)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-ethoxyphenyl)acetate (19)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(o-tolyl)acetate (20)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(m-tolyl)acetate (21)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(p-tolyl)acetate (22)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(2-chlorophenyl)acetate (23)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3-chlorophenyl)acetate (24)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(4-chlorophenyl)acetate (25)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (26)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(2-bromophenyl)acetate (27)





(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3-bromophenyl)acetate (28)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(4-bromophenyl)acetate (29)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(2-fluorophenyl)acetate (30)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3-fluorophenyl)acetate (31)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(4-fluorophenyl)acetate (32)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(2-methoxyphenyl)acetate (33)





(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3-methoxyphenyl)acetate (34)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(4-methoxyphenyl)acetate (35)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate (36)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acetate (37)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-(4-ethoxyphenyl)acetate (38)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(o-tolyl)acetate (39)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(m-tolyl)acetate (40)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(p-tolyl)acetate (41)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(2-chlorophenyl)acetate (42)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(3-chlorophenyl)acetate (43)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(4-chlorophenyl)acetate (44)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (45)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(2-bromophenyl)acetate (46)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(3-bromophenyl)acetate (47)





(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(4-bromophenyl)acetate (48)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(2-fluorophenyl)acetate (49)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(3-fluorophenyl)acetate (50)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(4-fluorophenyl)acetate (51)






(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(2-methoxyphenyl)acetate (52)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(3-methoxyphenyl)acetate (53)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(4-methoxyphenyl)acetate (54)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate (55)







(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acetate (56)



(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-ethoxyphenyl 2-(4-ethoxyphenyl)acetate (57)







(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(o-tolyl)acetate (58)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(m-tolyl)acetate (59)







(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(p-tolyl)acetate (60)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-chlorophenyl)acetate (61)







(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-chlorophenyl)acetate (62)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-chlorophenyl)acetate (63)







(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (64)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-bromophenyl)acetate (65)







(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-bromophenyl)acetate (66)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-bromophenyl)acetate (67)







(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-fluorophenyl)acetate (68)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-fluorophenyl)acetate (69)







(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-fluorophenyl)acetate (70)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-methoxyphenyl)acetate (71)







(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-methoxyphenyl)acetate (72)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-methoxyphenyl)acetate (73)







(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate (74)



(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acetate (75)







(Z)-2-bromo-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-ethoxyphenyl)acetate (76)



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(o-tolyl)acetate (77)







(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(m-tolyl)acetate (78)



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(p-tolyl)acetate (79)







(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-chlorophenyl)acetate (80)



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-chlorophenyl)acetate (81)







(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-chlorophenyl)acetate (82)



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (83)







(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-bromophenyl)acetate (84)



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-bromophenyl)acetate (85)







(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-bromophenyl)acetate (86)



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-fluorophenyl)acetate (87)







(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-fluorophenyl)acetate (88)



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-fluorophenyl)acetate (89)







(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(2-methoxyphenyl)acetate (90)



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3-methoxyphenyl)acetate (91)







(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-methoxyphenyl)acetate (92)



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate (93)







(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acetate (94)



(Z)-2-chloro-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-(4-ethoxyphenyl)acetate (95)

