



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2018년 8월

석사학위 논문

세포 내의 PGE₂ 농도 조절을 위한
새로운 ((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)
methyl)phenyl 유도체 합성 및
구조-활성 상관관계 분석

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

나 아 리

세포 내의 PGE₂ 농도 조절을 위한
새로운 ((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)
methyl)phenyl 유도체 합성 및
구조-활성 상관관계 분석

**Synthesis and structure-activity relationship(SAR) analysis of
new ((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl derivatives for
regulating intracellular concentration of PGE₂**

2018년 8월 24일

조선대학교 대학원
신재생에너지융합학과
나 아 리

세포 내의 PGE₂ 농도 조절을 위한
새로운 ((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)
methyl)phenyl 유도체 합성 및
구조-활성 상관관계 분석

지도교수 조 훈

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2018년 04월

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

나 아 리

나아리의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 유지강 (인)

위 원 조선대학교 교수 최재곤 (인)

위 원 조선대학교 교수 조 훈 (인)

2018년 05월

조선대학교 대학원

CONTENTS

List of Tables	iii
List of Schemes	iv
List of Figures	v
Abbreviations	vi
Abstract	viii
1. Introduction	1
2. Experimental procedures	8
2.1. Reagents and analysis apparatuses	8
2.2. Synthesis of ((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl derivatives	9
2.2.1. General procedures for the synthesis of compounds 1 - 18	9
2.2.2. General procedures for the synthesis of compounds 19 - 37	19
2.2.3. General procedures for the synthesis of compounds 38	30
2.2.4. General procedures for the synthesis of compounds 39	33
2.3. Expression and purification of 15-PGDH	37
2.4. Bradford protein assay	38
2.5. SDS-PAGE	38
2.6. 15-PGDH inhibition assay	40
2.7. Determination of extracellular PGE ₂ levels.	41
2.8. Scratch - wound healing assay	44
3. Results and Discussion	45
3.1. Inhibition effect of human 15-PGDH	45
3.2. Extracellular PGE ₂ levels	53
3.3. Determination of the wound healing effect	57

4. Conclusion	61
References	63
¹H NMR Spectra	66

List of Tables

Table 1. PGE ₂ Standard preparation	42
Table 2. Inhibitory potency of compound EJ-1 ~ EJ-60	47
Table 3. Inhibitory potency of compound 1-18	48
Table 4. Inhibitory potency of compound 19-37	50
Table 5. Inhibitory potency of compound 38, 39	51
Table 6. Effects of compound 1-18 on PGE ₂ release	54
Table 7. Effects of compound 19-37 on PGE ₂ release	55
Table 8. Lead compound list	56
Table 9. Wound closure rate of lead compounds	60

List of Schemes

Scheme 1. General procedures synthesis of compounds 1-18	9
Scheme 2. General procedures synthesis of compounds 19-37	19
Scheme 3. General procedures synthesis of compounds 38	30
Scheme 4. General procedures synthesis of compounds 39	33

List of Figures

Fig. 1. Biosynthesis of prostaglandins	2
Fig. 2. Action of PGE ₂ with EP receptors	3
Fig. 3. A stereoview of 3D structure of 15-PGDH-NAD ⁺ -PGE ₂ complex	4
Fig. 4. Proposed catalytic mechanism of 15-PGDH	5
Fig. 5. Structures of the 15-PGDH inhibitors Ciglitazone and CT-8 and TD203	6
Fig. 6. Map of the pGEX-2T expression vector showing the reading frames and main feature	37
Fig. 7. SDS-PAGE of human 15-PGDH	39
Fig. 8. PGE ₂ enzyme-linked immunosorbent assay procedure	43
Fig. 9. Structure of EJ-14 and EJ-59	45
Fig. 10. IC ₅₀ value ratio according to Ester position in the compound	46
Fig. 11. IC ₅₀ value ratio according to Methoxy position in the compound	49
Fig. 12. 3D model structure with inhibitor bound to 15-PGDH-NAD ⁺ -PGE ₂ complex	52
Fig. 13. 3D model with detailed binding of 15-pgdh and inhibitor	52
Fig. 14. Fluorescent microscope image to evaluate wound healing in vitro in the scratch assay using a confluent monolayer of HaCaT keratinocytes.	59
Fig. 15. wound closure rate of lead compounds	60

Abbreviations

NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PGs	prostaglandins
PLA ₂	phospholipase A ₂
COX	cyclooxygenase
PGG ₂	prostaglandin G ₂
PGH ₂	prostaglandin H ₂
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
15-PGDH	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide
NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
H ⁺	proton
TD	thiazolidinedione
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	4-dimethylaminopyridine
NMR	nuclear magnetic resonance
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
OD	optical density
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
DTT	dithiothreitol
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
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

Abstract

Synthesis and structure-activity relationship(SAR) analysis of new ((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl derivatives for regulating intracellular concentration of PGE₂

A Ri Na

Academic Advisor : Prof. Cho Hoon, Ph. D.

Department of Energy Convergence

Graduate School of Chosun University, South Korea

Prostaglandin (PG) plays a crucial role in generating inflammatory reactions. It is also involved in key reactions in acute inflammation where it performs various physiological functions. Prostaglandin E₂ is a type of PG related to both the inflammatory and anti-inflammatory effects that suppress excessive inflammatory reactions and enhance normal wound healing processes. However, when PGE₂ is produced during PG biosynthesis, it is rapidly oxidized to 15-keto PGE₂ by the NAD⁺-dependent 15-PGDH, which reduces the physiological activity of PGE₂. Thus, the present study focused on developing a powerful inhibitor of 15-PGDH to increase the concentration of physiologically active PGE₂.

To design the novel drug, 39 new derivatives were synthesized by altering the structure of TD203, one of several TD derivatives synthesized based on ciglitazone that exhibited good inhibitory effects. To estimate the inhibitory effects of these synthetic compound against 15-PGDH, DNA encoding 15-PGDH was inserted into the pGEX-2T expression vector and transformed into *Escherichia coli* BL-21 DE3 cells to produce highly pure 15-PGDH protein. Purified 15-PGDH was treated with the different compounds, and the

concentration of the produced NADH was measured with a fluorescence spectrophotometer to obtain IC_{50} values for each compound. Subsequently, the concentration of PGE_2 produced from A549 cells depending on each compound was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Compounds 4, 22, 23, 38, and 39 were selected as lead compounds, as they led to an increase in PGE_2 concentration of greater than 100% compared to that observed for the control. To verify their effects on cellular healing, scratch wound healing assays were carried out. Compounds 4, 22, 38, and 39 showed far greater wound healing effects than the positive control transforming growth factor- β 1. These results show that phenylpropyl substituent of compound was considered essential for increasing the PGE_2 concentration.

Furthermore, the strongest effects on wound recovery of greater than 200% was exhibited by **4-((2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl)phenyl 4-phenylbutanoate (compound 39)**, indicating that this compound can be used to develop novel derivatives in future studies.

Therefore, lead compounds (2, 22, 38, 39) will be valuable for the therapeutic management of various diseases caused by PGE_2 deficiency.

1. Introduction

조직 손상 시 성인 피부 상처 치유는 각기 다른 피부 조직과 세포의 상호작용을 필요로 하는 복잡한 과정이며 급성 상처는 일반적으로 지혈, 염증, 증식 및 개조로 별개의 단계를 거쳐 진행된다[1, 2]. 이 중 염증은 감염과 상해에 대한 면역 체계의 반응으로써 잠재적인 병원균을 제거하고 생리 기능을 회복시키는 정상적인 조직 항상성을 유지하기 위한 중요한 과정이다[3].

급성 염증이 해결되지 않을 시에는 만성 이형성 염증 및 과도한 조직 손상 또는 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD)과 같은 염증성 질환이 유발될 수 있으며 많은 연구에서 상처 치유 과정 중 염증기는 최종 외상 결과에 중대한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[4].

이러한 염증 반응의 생성에 Prostaglandin (PG)은 중요한 역할을 지니며 급성 염증의 주요 징후 발달에 기여한다. 또한 Prostaglandin E₂ (PGE₂)는 신체에서 생산되는 가장 풍부한 PG 중 하나로 통증, 염증 및 세포 증식에 관여하는 내인성 신호 전달 분자이며 조직 손상 시 염증기의 호중구의 수를 현저하게 감소시켜 상처 치유 회복을 향상시키는 후보 물질로 알려져 있다[5, 6].

염증 반응 동안 PG 생성의 수준과 윤곽은 크게 변화된다. PG의 생산은 일반적으로 비 발진 조직에서 매우 낮지만 백혈구를 모집하고 면역세포가 침투하기 전에 급성 염증에서 즉시 증가한다[3]. Figure 1.과 같이 PG은 막 인지질로부터 Phospholipase A₂ (PLA₂)에 의해 방출되는 Arachidone acid (AA) 및 기타 다중 불포화 지방산의 생물학적 활성 유도체이다. AA의 초기 변형은 Cyclooxygenase (COX) 효소에 의해 불안정한 중간체인 Prostaglandin G₂ (PGG₂)가 산소화 및 고리화를 수반하여 생성되며 동일한 효소로부터 별도의 Peroxidase 부위를 통해 PGG₂를 Prostaglandin H₂ (PGH₂)로 감소시킨다. 다양한 Isomerase와 Oxidoreductase가 PGH₂를 4종류의 Prostaglandin (PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂)과 Thromboxane A₂ (TXA₂)로 구성된 Eicosanoid의 그룹을 생성한다[7, 8].

현재 염증성 질환에서 가장 흔히 사용되는 약물은 비 스테로이드 성 소염진통제 (NSAIDs)로서 위 생합성 과정에서 PG 형성을 촉매하는 2개의 Cyclooxygenase isoforms 인 COX-1과 COX-2를 억제한다. 하지만 NSAIDs은 위장 부식, 신방 및 간부전증, 단백뇨, 급성 신장 기능 부전 등 여러 부작용이 따르며 COX 억제에 의존적이라는 연구 결과가 있다[9]. 따라서 NSAIDs의 임상 효능에도 불구하고 PGE₂는 염증의 촉진과 해소

모두에 기능할 수 있어 상처 치유 효능에 도움을 줄 것으로 기대된다.

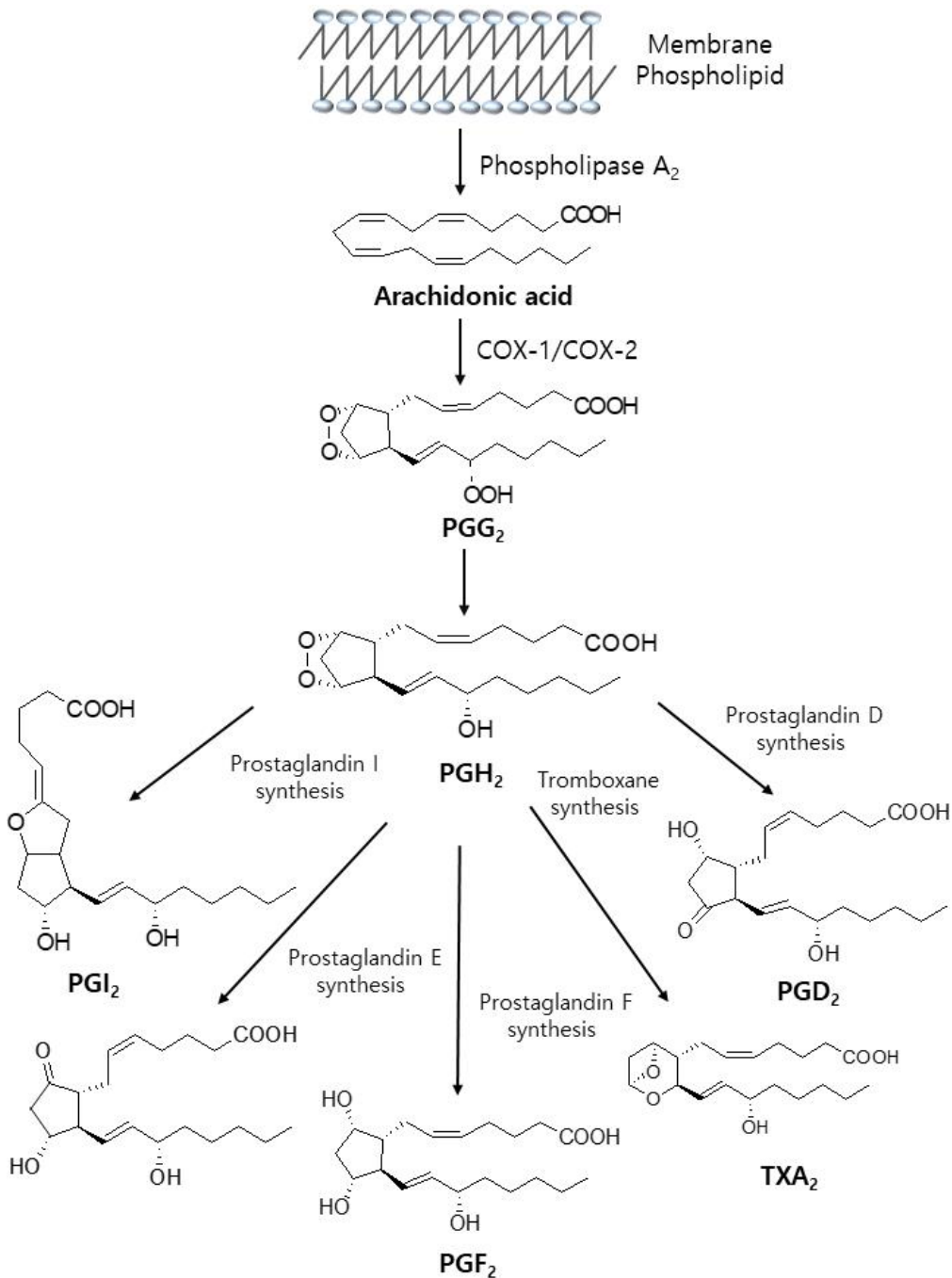


Figure 1. Biosynthesis of prostaglandins

PG 생합성 과정으로부터 생성된 PGE₂는 즉시 확산되어 7개의 Transmembrane G-protein-coupled 수용체 군에 속하는 특정 E-Prostanoid receptor (EP₁-EP₄)를 활성화시킨다. PGE₂는 하나 이상의 수용체에 결합하여 국소적으로 작용하며 각각의 EP 아형은 별개의 신호 전달 특성을 가지므로 PGE₂는 다양한 생리적 기능을 발휘한다. Figure 2. 와 같이 EP₁은 G_q를 통한 세포 내 Ca²⁺ 농도를 상승시키며 EP₂ 및 EP₄는 G_s와 결합하여 Adenyl cyclase (AC) - cyclic adenosine monophosphate (cAMP) - protein kinase A (PKA) 경로를 자극한다. 대조적으로 EP₃는 G_i와 결합하여 AC 활성을 억제하여 cAMP 농도를 감소시킨다[10, 11].

특히 PGE₂와 결합 친화력이 가장 높은 EP₄ 수용체는 cAMP 신호전달 외에도 β-arrestin 경로를 통한 Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 활성화를 유도하여 혈관 확장, 뼈 재형성, 위장 항상성 등 생리 기능을 유지하는 역할을 지닌다. 최근 연구에서 수지상 세포 (DC)와 T 세포의 PGE₂-EP₄ 신호가 Th1과 Interleukin-23 의존성 Th17 분화를 촉진하여 다발성 경화증, 류마티스 성 관절염 및 접촉성 피부염 등 다양한 면역 질환에서 염증을 매개하는 것으로 나타났다. 또한 Th1 분화, B 세포 기능 및 알레르기 반응을 억제하며 호중구 및 Natural killer (NK) 세포와 같은 선천성 면역 세포에 대한 항염증 작용을 일으킬 수 있음을 밝혀냈다. 따라서 PGE₂는 관련 조직에서 수용체 유전자 발현의 조절을 통해 염증 효과 및 항염증 효과에 모두 관여함으로써 과도한 염증 반응을 억제하고 정상적인 상처 치유에 중요한 역할을 할 것으로 보여진다[12].

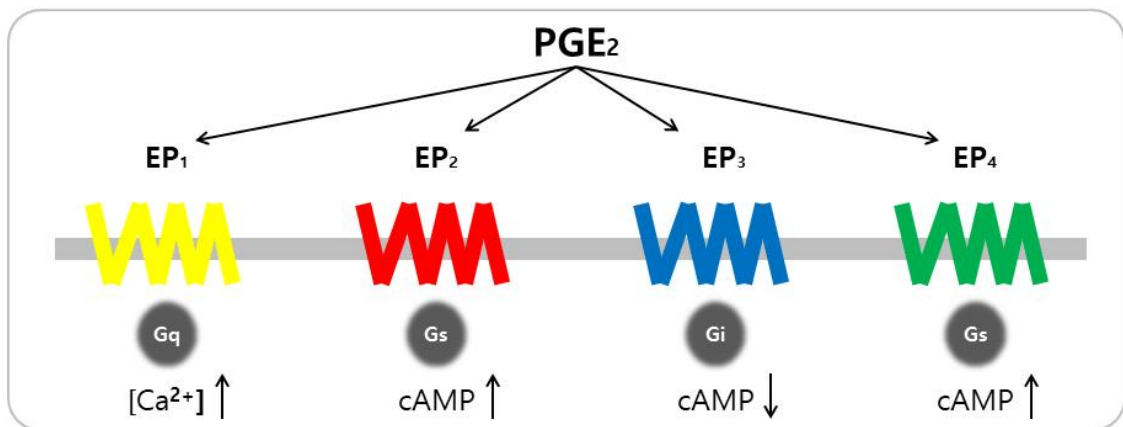


Figure 2. Action of PGE₂ with EP receptors

하지만 PGE₂는 NAD⁺ 의존성 15-Prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)라는 세포질 효소에 의해 15-Keto PGE₂로 산화됨으로써 빠르게 대사되기 때문에 생체 내에서 짧은 수명을 가진다. 이러한 PGE₂의 빠른 산화는 조직 복구 및 재생에 부정적인 결과를 초래하므로 생체 내에서 PGE₂의 수준을 상승시키기 위해 15-PGDH에 대한 강력하고 안전한 억제제의 발견을 목표로 삼았다. 15-PGDH는 포유류 조직에 특히 편재되어 있으며 약 29 KDa의 분자량을 가진 동일한 서브유닛으로 구성된 이량체로 알려져 있지만 최근 증거에 의하면 15-PGDH는 원래 형태로 단량체 일 수 있다.

15-PGDH는 2가지의 유형이 존재한다. Type 1은 NAD⁺에 특화되어 Prostaglandin에 대한 Km이 낮은 반면, Type 2는 NADP⁺를 선호하며 훨씬 더 넓은 기질 특이성을 가지면서 높은 Km을 나타낸다. 따라서 PGE₂ 대사에 관한 본 연구는 더 빠른 불활성화를 가져오는 Type 1의 NAD⁺에 초점을 맞추었다. 분자 도킹 및 분자 역학 시뮬레이션을 통해 얻어진 15-PGDH - NAD⁺ - PGE₂ 복합체 전체의 3차원 (3D) Model을 Figure 3.에 나타내었다[13, 14].

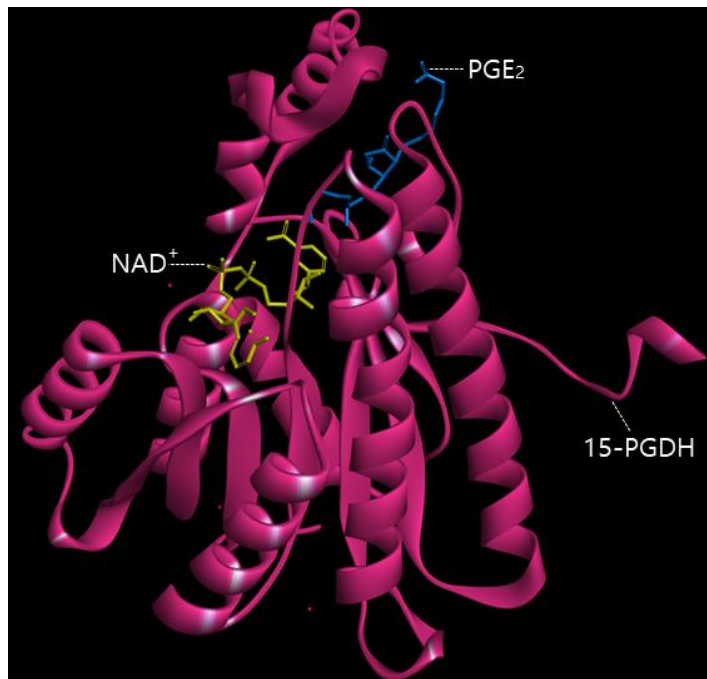


Figure 3. A stereoview of 3D structure of 15-PGDH-NAD⁺-PGE₂ complex

위의 3D Model을 통해 PGE₂와 15-PGDH의 상세한 결합이 확인되었다. 15-PGDH의 Tyrosine 151, Lysine 155, Serine 138은 PGE₂의 산화 과정에서 특히 결정적이며 이러한 3개의 아미노산 외에도 Glutamine 148의 측쇄 산소 원자가 기질과 강한 수소결합을 이루면서 촉매 mechanism에 영향을 주는 것을 확인하였다[15]. 이러한 15-PGDH - NAD⁺에 의한 PGE₂ 산화 반응 메커니즘을 Figure 4.에 도식화하였다.

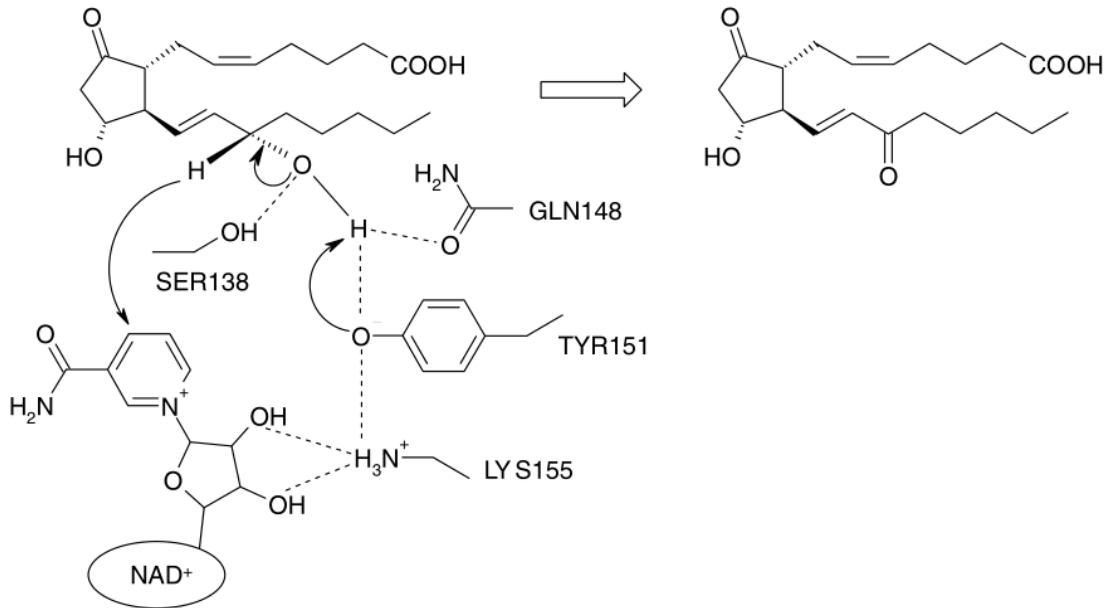


Figure 4. Proposed catalytic mechanism of 15-PGDH [15]

이렇듯 15-PGDH는 PGE₂ 산화 반응의 주요 물질로서 관여하기 때문에 15-PGDH 억제제 발견을 목표로 많은 연구들이 진행되어왔다. 당뇨병 치료제로 처음 개발되어진 Ciglitazone은 생체 내에서 안정성이 검증되었으며 15-PGDH 효소 활성의 가장 강력한 길항제로 보고되어진다. 따라서 이전 연구들은 이러한 Ciglitazone을 기준으로 구조식 변화를 통해 많은 유도체들을 합성하여 억제제 효능을 검증해왔다.

대표적으로 Ciglitazone의 중심 Phenyl ring에 2,4-Thiazolidindione을 연결하는 탄소 사슬을 이중결합으로 대체한 약물인 CT-8이 유도체로서 존재하며 이 약물 또한 우수한

억제 효능을 보였다. 또한 2,4-Thiazolidindione (TD)의 좀 더 세부적인 구조 변화가 억제 효능을 현저하게 감소시킨다는 결과와 함께 이러한 TD 구조는 15-PGDH 억제 효능에 필수적임을 밝혀내었다. 따라서 본 연구는 TDs계 약물 설계에 초점을 맞추어 선행 연구에서 가장 효능이 좋았던 TD203을 기준으로 유도체를 합성하였다. Figure 4.에 약물 Ciglitazone, CT-8, TD 203의 구조식을 각각 나타내었다[16-18].

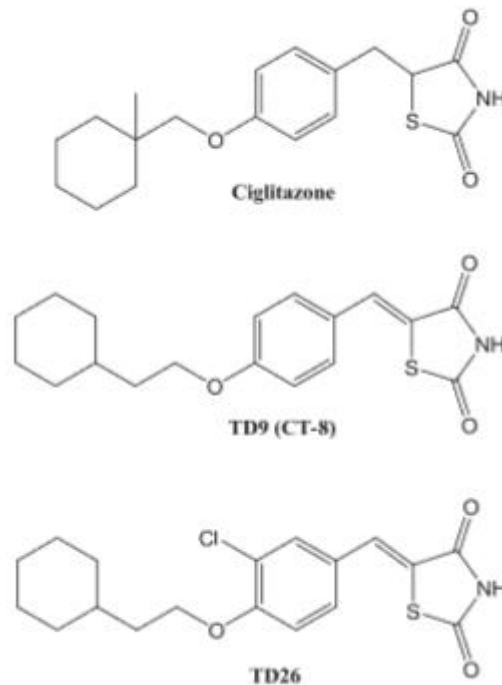


Figure 5. Structures of the 15-PGDH inhibitors Ciglitazone and CT-8 and TD203

TD203은 기존 TD 유도체에서 Ether를 Ester 결합으로 바꿔 합성하면서 Methoxy기가 중심 Phenyl ring에 연결된 화합물이다. 이러한 TD203을 기준으로 Methoxy기를 제외하고 Ester 결합의 위치를 meta로 바꾼 1-18의 화합물을 합성하였으며 화합물 19-37의 경우에는 Ester 결합과 Methoxy기의 위치를 맞바꿔 두 유도체를 완성하였다. 또한 기존 Ester 결합과 결합의 방향을 바꿔 합성한 화합물 38, 39에서 TD가 연결된 이중 결합을

단일 결합으로 환원시켜 각 화합물을 합성하였다.

합성한 화합물들의 15-PGDH 억제 효능을 확인하기 위해 15-PGDH의 DNA를 pGEX-2T expression vector의 BamHI와 EcoRI 사이에 삽입한 후 재조합 Plasmid를 사용하여 chemically competent E. coli BL21-DE₃ cell 50을 형질 전환하였다. 이후 Affinity chromatography, Bradford protein assay, SDS-PAGE 과정을 통해 순도 높은 15-PGDH를 정제하여 15-PGDH inhibition assay를 실시하였다. 형광분광광도계로부터 각 화합물에 대한 NADH 생성 정도를 측정함으로써 15-PGDH 활성을 50% 억제하는 IC₅₀ 값을 도출하였다. 또한 화합물들이 15-PGDH를 억제함으로써 세포 내 PGE₂ 농도에 얼마나 영향을 주는지 보기 위해 competitive ELISA(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) 방법을 통해 A549 cell로부터 생성된 PGE₂ 농도를 측정하였다. 이 결과를 바탕으로 control 대비 100% 이상의 PGE₂ 농도 증가율을 보이는 4, 22, 23, 38, 39 화합물들을 lead compound로 선정하였으며 이들을 Scratch wound healing assay 실시하여 증가한 PGE₂ 농도로부터 상처를 낸 HacaT cell의 상처 치유 효능을 확인하였다.

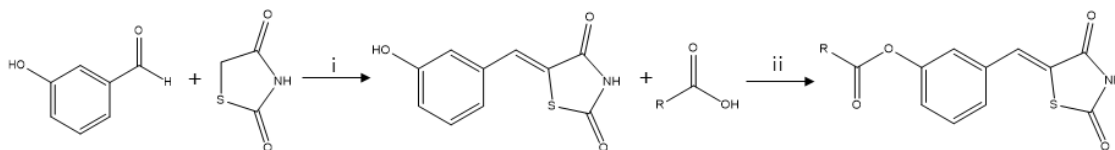
2. Experimental procedures

2.1. Reagents and analysis apparatuses

실험에 사용된 모든 시약과 용매는 TCI(Japan), Sigma aldrich(USA), Alfa aesar(UK), Acros(USA), Samchun(Korea)에서 순도 99% 이상의 것들로 구매하였다. 합성한 화합물들의 구조를 분석하기 위한 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 DMSO(dimethyl sulfoxide)용매를 사용하여 JEOL JNM-LA 300 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan)에서 기록되었다. 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.

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

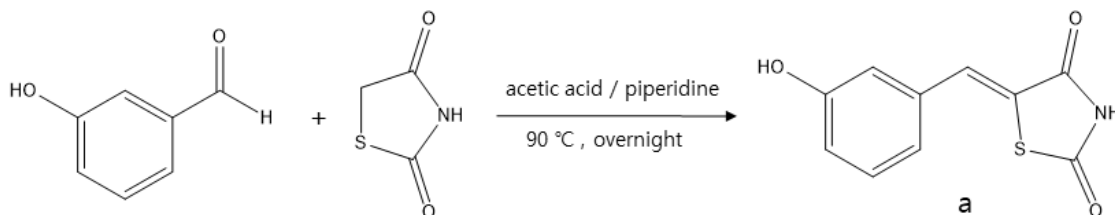
2.2.1. General procedures for the synthesis of compounds 1-18



Scheme 1. Synthesis of compounds 1-18 reagents and conditions; (i) acetic acid, piperidine, toluene (ii) DCC, 4-DMAP, dichloromethane (CH_2Cl_2)

compounds 1-18의 전체적인 합성 방법을 scheme 1.에 도식화 하였다. i, ii 과정의 구체적인 실험방법은 아래 a와 1의 과정에서 나타내었으며 나머지 합성물들의 실험 방법은 모두 동일하므로 생략하였다.

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

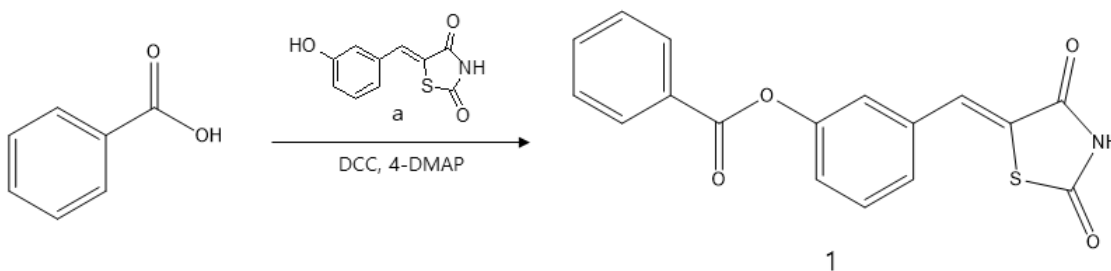


toluene 15 ml에 3-Hydroxybenzaldehyde 1 g (8.19 mmol)와 2,4-thiazolidinedione 0.78 g (1.0 eq; 8.19 mmol)를 용해시킨 후 acetic acid 0.23 ml (0.5 eq; 4.10 mmol), piperidine 0.4 ml (0.5 eq; 4.10 mmol)를 넣어준다. 혼합물이 든 둥근 flask에 dean-stock 장치를 장착한 후 90°C에서 overnight 반응시킨다. 반응의 종결을 TLC로 확인한 후 methanol로부터 불순물을 씻듯이 제거하며 감압여과 한다. 얻은 고형물은 재결정하여 순수한 황색의 결정 a를 얻어 ^1H NMR (Nuclear magnetic resonance)를 통해 확인하였다.

yield : 95.7%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.61 (s, 1H), δ 9.85 (s, 1H), δ 7.69 (s, 1H), δ 7.35 (t, *J*=3.84, 1H), δ 7.05 (d, *J*=4.02 Hz, 1H), δ 6.97 (s, 1H), δ 6.89 (dd, *J*=4.02 Hz, 1H)

(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl benzoate (1)

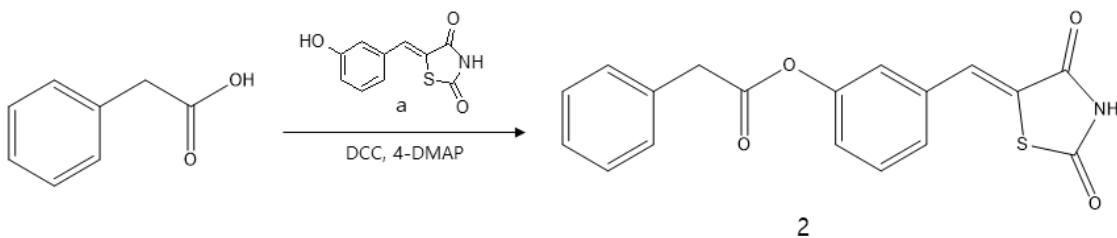


용매 Dichloromethane 5 ml에 앞서 합성한 화합물 a 0.5 g (2.26 mmol)과 Benzoic acid 0.276 g (1 eq, 2.26mmol), 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP) 0.0232 g (0.084 eq, 0.19 mmol)를 넣고 0°C에서 약 5분간 반응시킨다. 그 후 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 0.429 g (0.92 eq, 2.08 mmol)를 20분에 걸쳐 천천히 적가한다. 실온에서 약 8시간 반응 후 TLC로 반응의 종결을 확인한 뒤 생성된 dihexylurea (DHU)를 여과한다. 남은 여액의 불순물을 제거하기 위해 0.5M HCl과 포화 NaHCO₃ 용액으로 산, 염기 추출을 반복하여 진행 하고 unhydrous MgSO₄로 탈수시킨다. 감압 농축하여 용매를 제거하고 생성된 고체는 ethanol로 재결정하여 순수한 결정 1을 얻어 ¹H NMR (Nuclear magnetic resonance)를 통해 확인하였다.

yield : 85.4%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.69 (s, 1H), δ 8.17 (m, 2H), δ 7.81 (m, 2H), δ 7.66 (m, 3H), δ 7.55 (m, 2H), δ 7.44 (m, 1H)

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

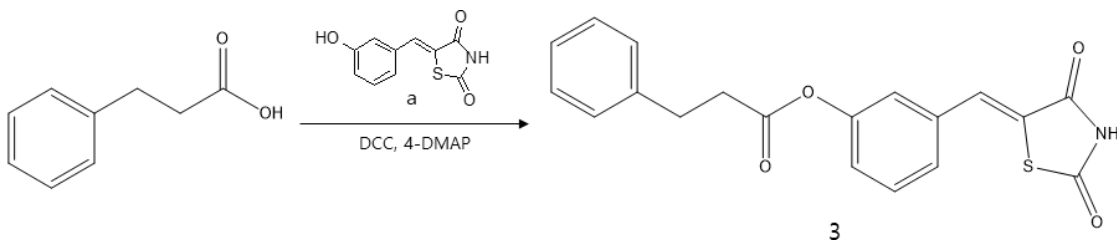


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 2를 얻는다.

yield : 87.8%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.77 (s, 1H), δ 7.60 (m, 9H), δ 4.00 (s, 2H)

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

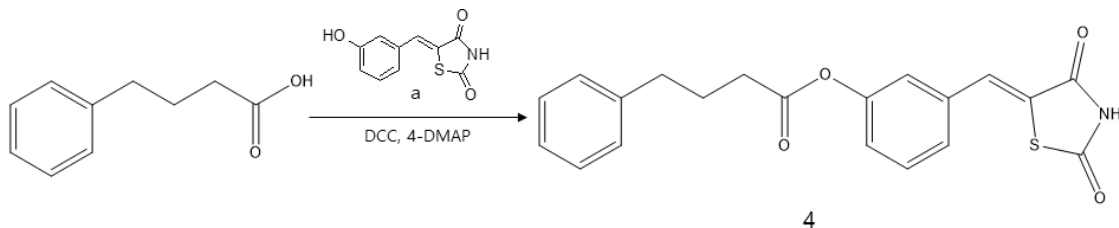


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 3을 얻는다.

yield : 91.4%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.59 (m, 2H), δ 7.32 (m, 7H), δ 3.01 (m, 4H)

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

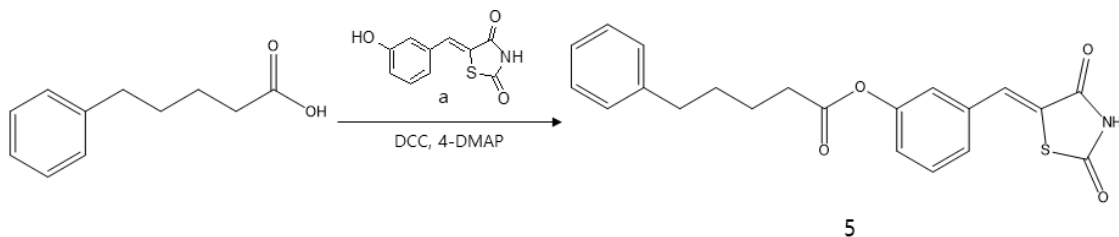


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 4를 얻는다.

yield : 88.7%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.60 (m, 2H), δ 7.37 (m, 7H), δ 2.71 (m, 4H), δ 2.00 (quin, $J=3.66$ Hz, 2H)

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

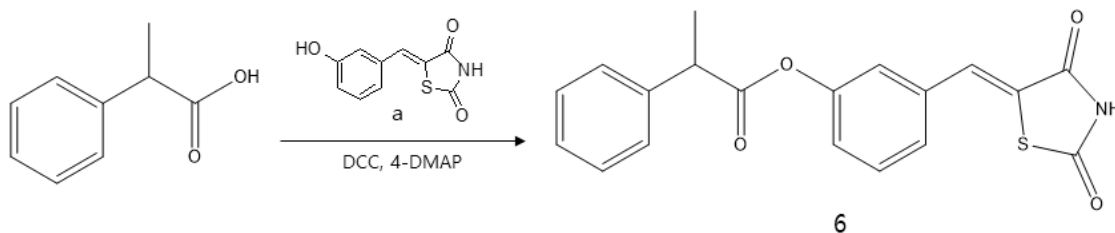


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 5를 얻는다.

yield : 86.9%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), δ 7.59 (t, $J=4.04$ Hz, 1H), δ 7.49 (d, $J=3.86$ Hz, 1H), δ 7.34 (m, 7H), δ 2.64 (d, $J=1.28$ Hz, 4H), δ 1.67 (s, 4H)

(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-phenylpropanoate (6)

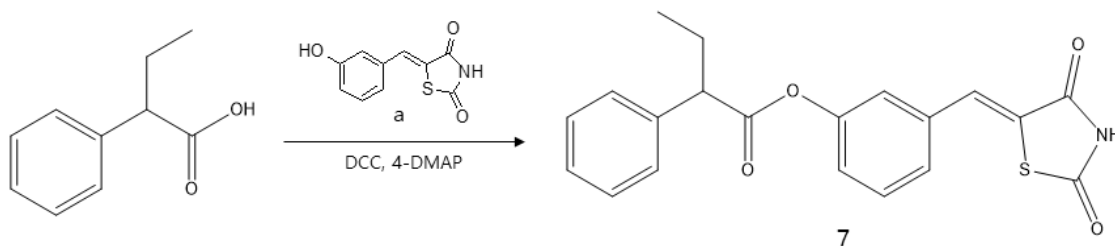


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 6을 얻는다.

yield : 92.0%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.58 (d, $J=4.04$ Hz, 1H), δ 7.49 (m, 7H), δ 7.17 (d, $J=3.48$ Hz, 1H), δ 4.17 (q, $J=3.66$ Hz, 1H), δ 1.53 (d, $J=3.48$ Hz, 3H)

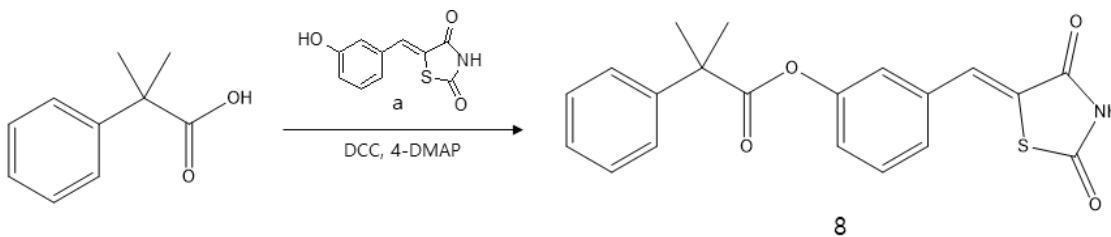
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-phenylbutanoate (7)



화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 7을 얻는다.

yield : 89.1% ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.58 (t, $J=4.02$ Hz, 1H), δ 7.49 (d, $J=4.02$ Hz, 1H), δ 7.42 (d, $J=2.01$ Hz, 4H), δ 7.35 (m, 1H), δ 7.25 (s, 1H), δ 7.15 (d, $J=1.61$ Hz, 1H), δ 3.91 (t, $J=3.84$ Hz, 1H), δ 2.15 (quin, $J=3.30$ Hz, 1H), δ 1.84 (quin, $J=3.48$ Hz, 1H), δ 0.95 (t, $J=3.66$ Hz, 1H)

(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-methyl-2-phenylpropanoate (8)

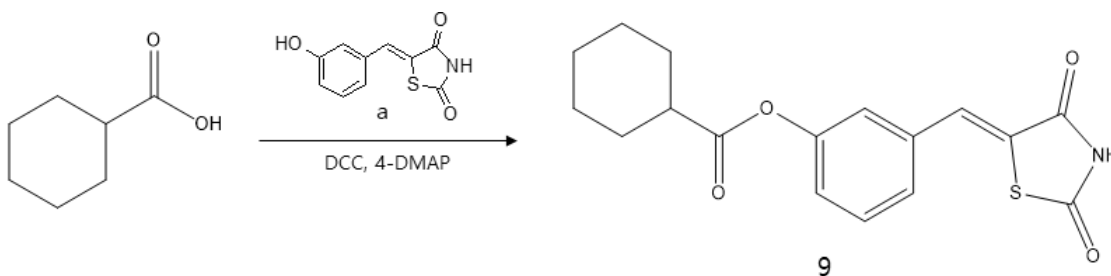


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 8을 얻는다.

yield : 94.9% ;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.69 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.59 (t, $J=4.04$ Hz 1H), δ 7.49 (m, 5H), δ 7.33 (m, 2H), δ 7.17 (d, $J=4.02$ Hz 1H), δ 1.73 (s, 6H)

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

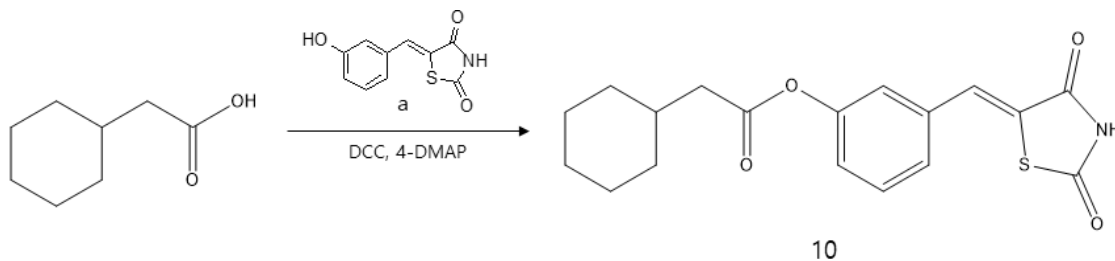


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 9를 얻는다.

yield : 92.4%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.69 (s, 1H), δ 7.81 (s, 1H), δ 7.61 (t, $J=4.02$ Hz 1H), δ 7.50 (d, $J=3.84$ Hz 1H), δ 7.36 (s, 1H), δ 7.25 (d, $J=3.86$ Hz 1H), δ 1.85 (m, 6H), δ 1.34 (m, 5H)

(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-cyclohexylacetate (10)

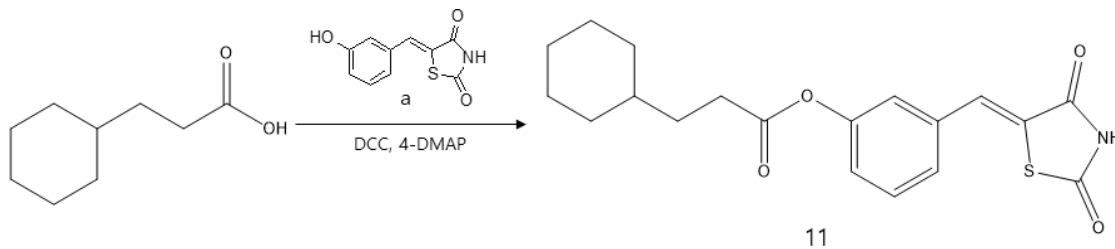


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 10을 얻는다.

yield : 88.2%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.67 (s, 1H), δ 7.78 (s, 1H), δ 7.60 (t, *J*=3.84 Hz 1H), δ 7.49 (d, *J*=3.66 Hz 1H), δ 7.36 (s, 1H), δ 7.25 (d, *J*=4.38 Hz 1H), δ 2.01 (d, *J*=6.23 Hz 2H), δ 1.75 (m, 11H)

(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 3-cyclohexylpropanoate (11)

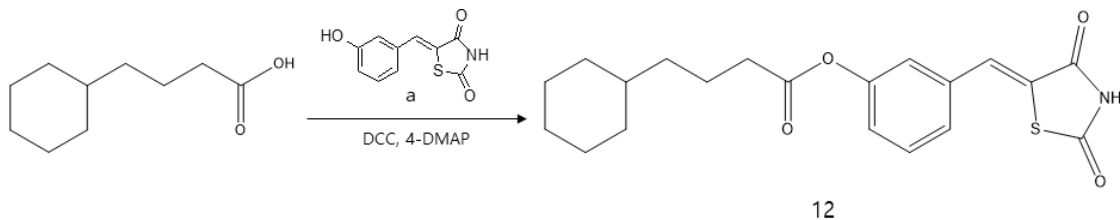


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 11을 얻는다.

yield : 85.1%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.67 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.58 (t, *J*=3.84 Hz 1H), δ 7.50 (d, *J*=4.03 Hz 1H), δ 7.35 (s, 1H), δ 7.26 (d, *J*=3.84 Hz 1H), δ 2.64 (t, *J*=3.86 Hz 2H), δ 1.75 (m, 7H), δ 1.23 (m, 5H)

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

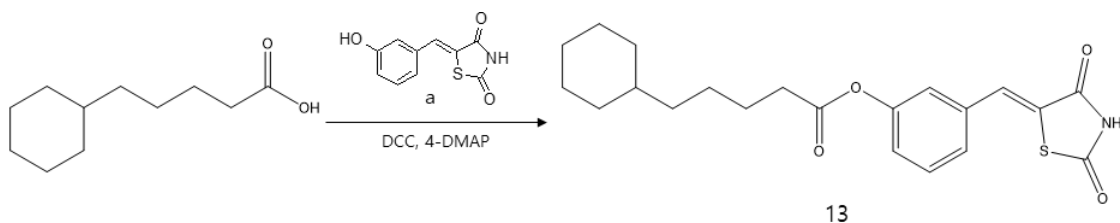


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 12를 얻는다.

yield : 87.4%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.60 (t, $J=3.84$ Hz 1H), δ 7.35 (s, 1H), δ 7.26 (s, 1H), δ 7.26 (d, $J=3.48$ Hz 1H), δ 2.61 (t, $J=3.66$ Hz 2H), δ 1.73 (m, 8H), δ 1.27 (m, 7H)

(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 5-cyclohexylpentanoate (13)

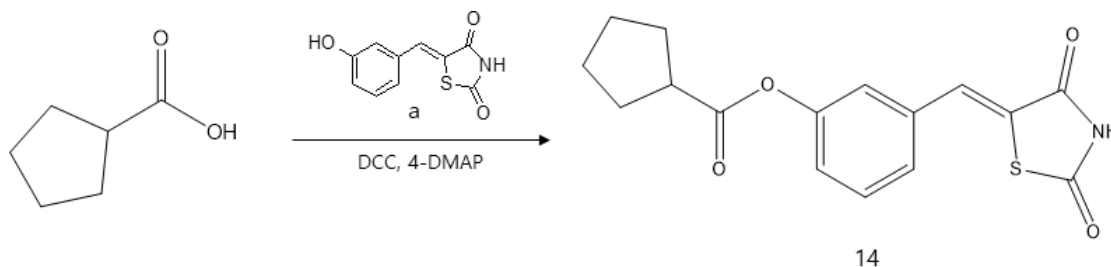


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 13을 얻는다.

yield : 91.9%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.65 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.60 (t, $J=4.02$ Hz 1H), δ 7.50 (d, $J=4.02$ Hz 1H), δ 7.34 (s, 1H), δ 7.25 (d, $J=3.86$ Hz 1H), δ 2.63 (t, $J=3.66$ Hz 2H), δ 1.71 (m, 7H), δ 1.42 (m, 1H), δ 1.22 (m, 6H), δ 0.91 (m, 2H)

(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl cyclopentanecarboxylate (14)

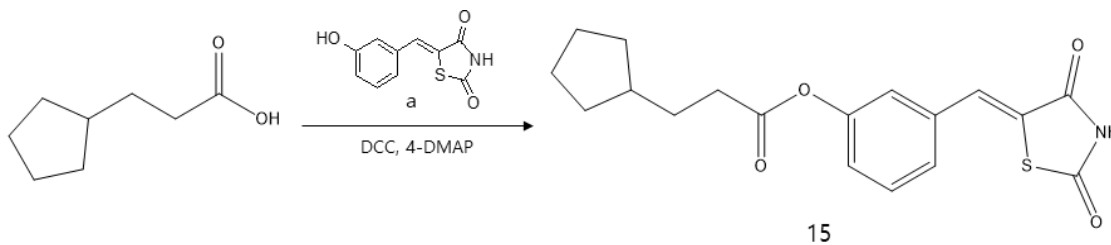


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 14를 얻는다.

yield : 92.1%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.60 (t, $J=4.04$ Hz 1H), δ 7.49 (d, $J=3.84$ Hz 1H), δ 7.38 (s, 1H), δ 7.26 (d, $J=3.86$ Hz 1H), δ 3.10 (quin, $J=4.22$ Hz 1H), δ 1.97 (m, 4H), δ 1.68 (m, 4H)

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

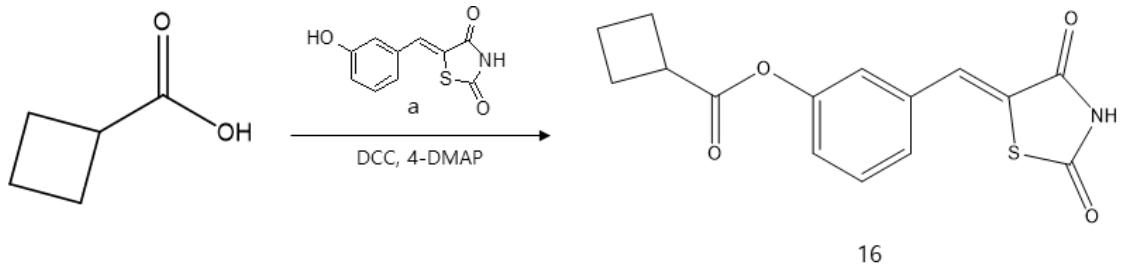


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 15를 얻는다.

yield : 87.4%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), δ 7.60 (t, $J=3.84$ Hz, 1H), δ 7.50 (d, $J=4.02$ Hz, 1H), δ 7.36 (s, 1H), δ 7.26 (d, $J=3.48$ Hz, 1H), δ 2.64 (t, $J=3.66$ Hz, 2H), δ 1.86 (m, 11H), δ 1.27 (m, 4H)

(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl cyclobutanecarboxylate (16)

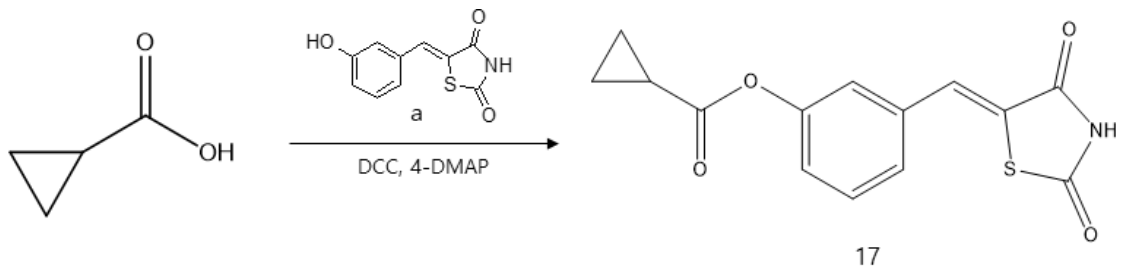


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 16을 얻는다.

yield : 92.6%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.61 (t, *J*=4.04 Hz, 1H), δ 7.49 (d, *J*=3.84 Hz, 1H), δ 7.38 (s, 1H), δ 7.28 (d, *J*=4.04 Hz, 1H), δ 3.51 (quin, *J*=4.40 Hz 1H), δ 2.06 (m, 2H), δ 1.73 (m, 2H), δ 1.27 (m, 2H)

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

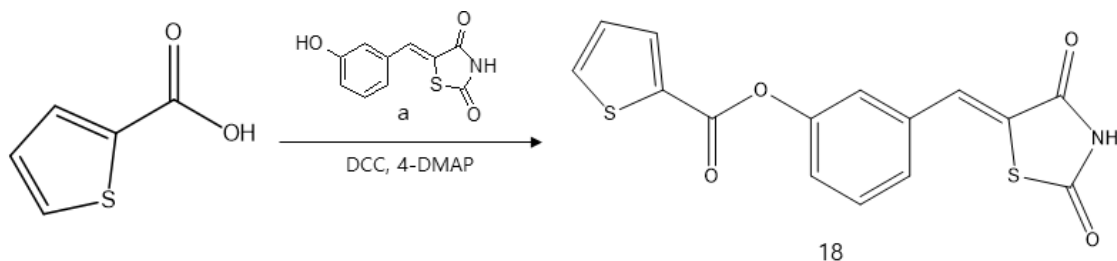


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 17을 얻는다.

yield : 87.9%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), δ 7.79 (s, 1H), δ 7.60 (t, *J*=4.04 Hz, 1H), δ 7.45 (d, *J*=3.84 Hz, 1H), δ 7.39 (s, 1H), δ 7.28 (d, *J*=3.66 Hz, 1H), δ 1.93 (m, 1H), δ 1.11 (m, 4H)

(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl thiophene-2-carboxylate (18)

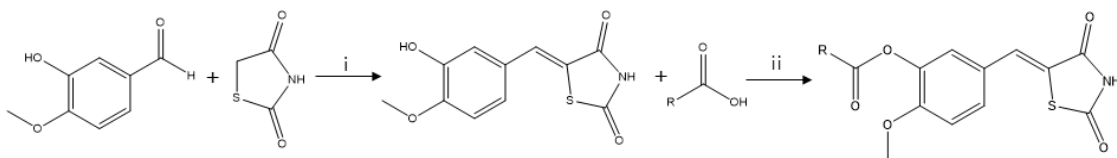


화합물 1과 동일한 반응으로 화합물 18을 얻는다.

yield : 92.9%

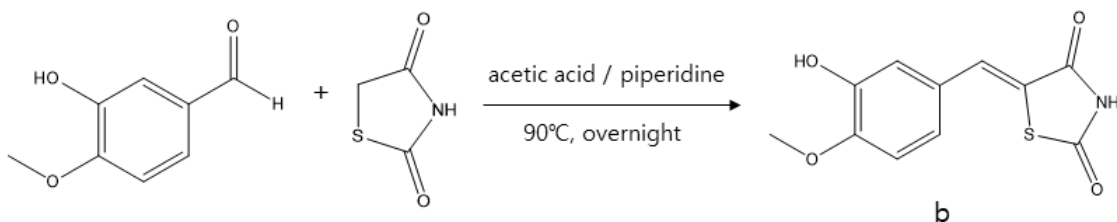
^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.68 (s, 1H), δ 8.13 (dd, $J=2.37$ Hz and $J=2.47$ Hz 1H), δ 8.07 (dd, $J=2.03$ Hz and $J=1.93$ Hz 1H), δ 7.82 (s, 1H), δ 7.66 (t, $J=4.22$ Hz 1H), δ 7.55 (m, 2H), δ 7.44 (d, $J=3.66$ Hz 1H), δ 7.35 (t, $J=1.94$ Hz 1H)

2.2.2. General procedures for the synthesis of compounds 19-37



Scheme 2. Synthesis of compounds 19-37 reagents and conditions; (i) acetic acid, piperidine, toluene (ii) DCC, 4-DMAP, dichloromethane (CH_2Cl_2)

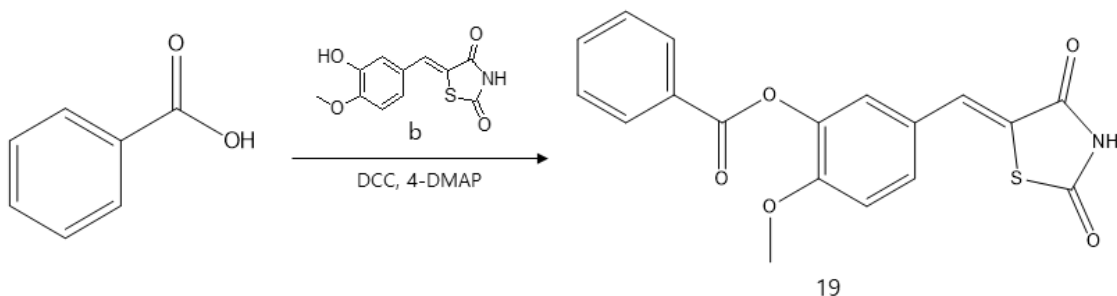
compounds 19-37 의 전체적인 합성 방법을 scheme 에 도식화 하였다. i, ii 과정의 구체적인 실험방법은 아래 b와 19의 과정에서 나타내었으며 나머지 합성물들의 실험 방법은 모두 동일하므로 생략하였다.

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


Toluene 15 ml에 Isovanillin 1 g (6.57 mmol), 2,4-thiazolidinedione 0.77 g (1.0 eq; 6.57 mmol)를 용해시킨 후 acetic acid 0.19 ml (0.5 eq; 3.29 mmol), piperidine 0.32 ml (0.5 eq; 3.29 mmol)를 넣어준다. 혼합물이 든 둥근 flask에 dean-stock 장치를 장착한 후 90°C에서 overnight 반응시킨다. 반응의 종결을 TLC로 확인한 후 methanol으로부터 불순물을 씻듯이 제거하며 감압여과 한다. 얻은 고형물은 재결정하여 순수한 황색의 결정 a를 얻어 ^1H NMR (Nuclear magnetic resonance)를 통해 확인하였다.

yield : 88.3%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.49 (s, 1H), δ 9.52 (s, 1H), δ 7.65 (s, 1H), δ 7.11 (d, $J=4.58$ 3H), δ 3.86 (s, 3H)

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl benzoate (19)


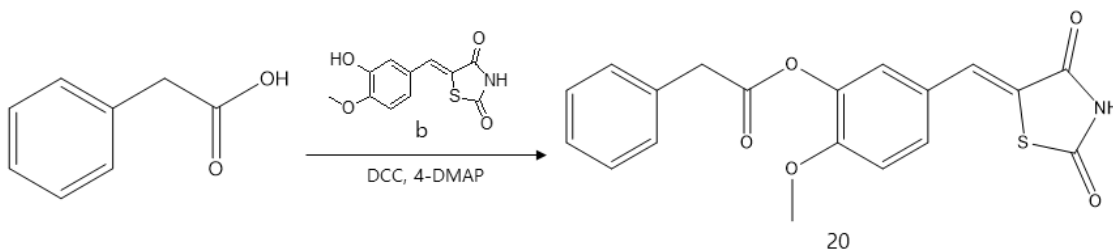
용매 Dichloromethane 5 ml에 앞서 합성한 화합물 b 0.5 g (1.99 mmol)과 Benzoic acid 0.243 g (1 eq, 1.99mmol), 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP) 0.02 g (0.084 eq, 0.16

mmol)를 넣고 0°C에서 약 5분간 반응시킨다. 그 후 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 0.38 g (0.92 eq, 1.83 mmol)를 20분에 걸쳐 천천히 적가한다. 실온에서 약 8시간 반응 후 TLC로 반응의 종결을 확인한 뒤 생성된 dihexylurea (DHU)를 여과한다. 남은 여액의 불순물을 제거하기 위해 0.5M HCl과 포화 NaHCO₃ 용액으로 산, 염기 추출을 반복하여 진행 하고 unhydrous MgSO₄로 탈수시킨다. 감압 농축하여 용매를 제거하고 생성된 고체는 Ethanol로 재결정하여 순수한 화합물 19를 얻어 ¹H NMR (Nuclear magnetic resonance)를 통해 확인하였다.

yield : 93.4%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.58 (s, 1H), δ 8.15 (d, *J*=3.66 Hz 2H), δ 7.80 (t, *J*=3.66 Hz 1H), δ 7.65 (m, 4H), δ 7.38 (d, *J*=4.40 1H), δ 3.84 (s, 3H)

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-phenylacetate (20)

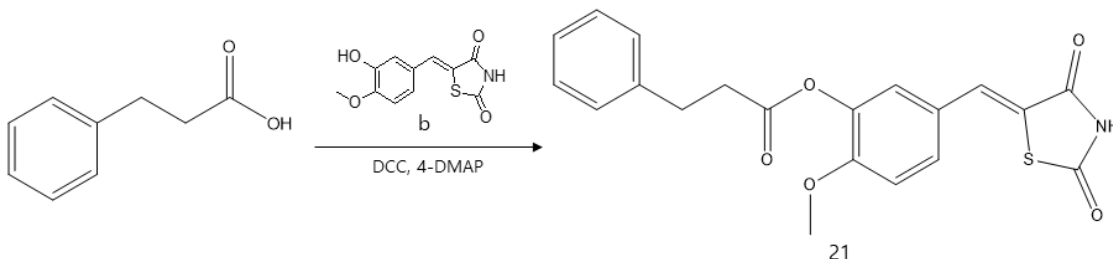


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 20을 얻는다.

yield : 88.7%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.57 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.53 (dd *J*=4.2 Hz and *J*=4.21 Hz 1H), δ 7.39 (m, 8H), δ 3.99 (s, 2H), δ 3.81 (s, 3H)

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 3-phenylpropanoate (21)

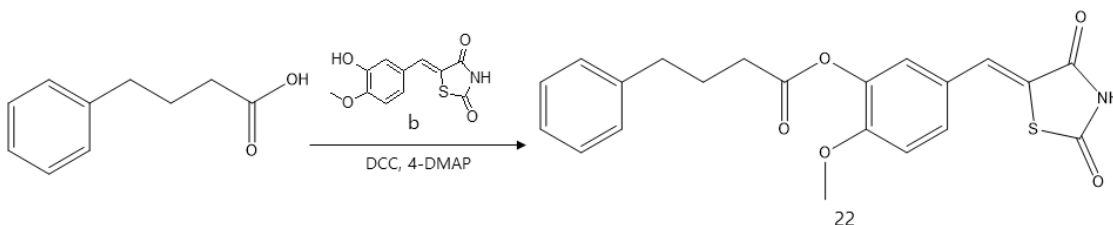


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 21을 얻는다.

yield : 86.0%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.58 (s, 1H), δ 7.73 (s, 1H), δ 7.53 (d, $J=3.29$ Hz 1H), δ 7.35 (m, 7H), δ 3.81 (s, 3H), δ 2.98 (m, 4H)

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 4-phenylbutanoate (22)

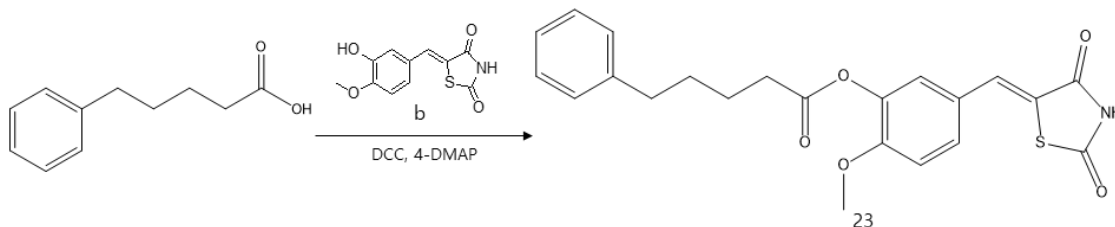


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 22를 얻는다.

yield : 87.7%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.56 (s, 1H), δ 7.73 (s, 1H), δ 7.53 (d, $J=3.29$ Hz 1H), δ 7.36 (m, 7H), δ 3.85 (s, 3H), δ 2.72 (t, $J=3.66$ Hz 2H), δ 2.62 (t, $J=3.66$ Hz 2H), δ 1.97 (t, $J=3.84$ Hz 2H)

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

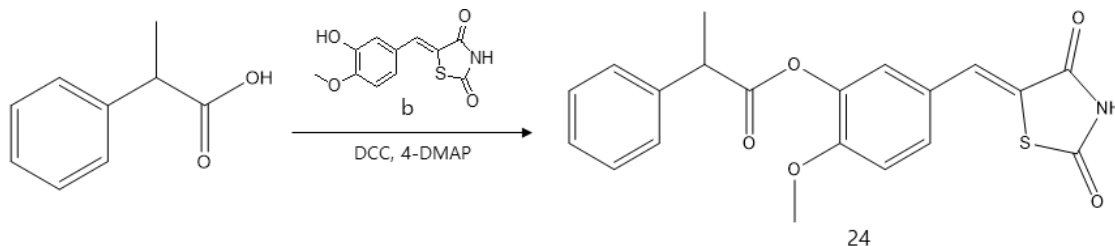


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 23을 얻는다.

yield : 89.7%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.57 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.52 (d, $J=4.40$ Hz 1H), δ 7.33 (m, 7H), δ 3.81 (s, 3H), δ 2.63 (d, $J=1.29$ Hz 4H), δ 1.67 (s, 4H)

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-phenylpropanoate (24)

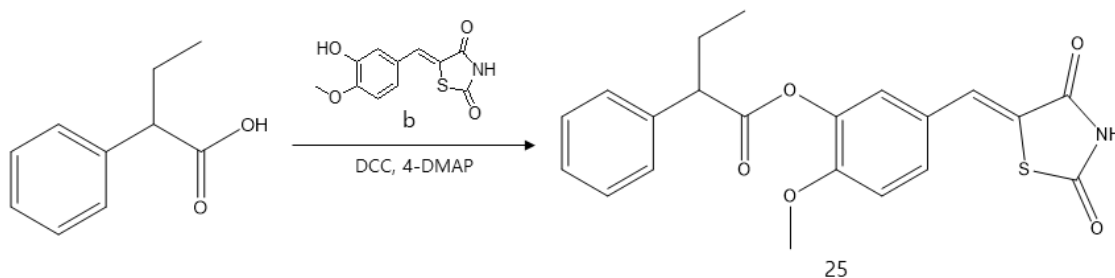


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 24를 얻는다.

yield : 91.2%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.57 (s, 1H), δ 7.73 (s, 1H), δ 7.51 (d, $J=4.40$ Hz 1H), δ 7.41 (d, $J=2.21$ Hz 4H), δ 7.34 (m, 3H), δ 4.16 (q, $J=3.48$ Hz 1H), δ 1.52 (d, $J=3.66$ Hz 3H)

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

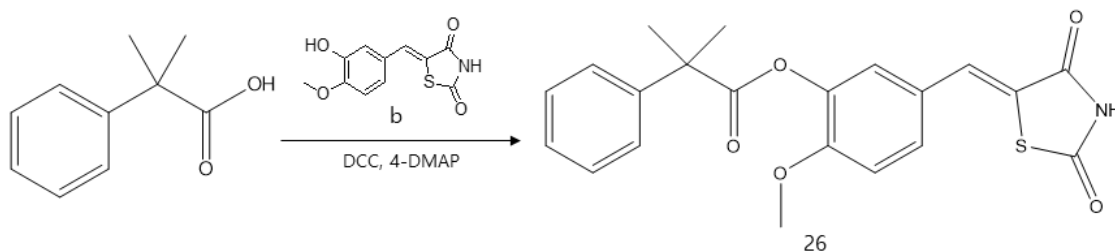


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 25를 얻는다.

yield : 89.8%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.56 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.51 (dd, $J=4.22$ Hz and $J=4.31$ Hz 1H), δ 7.41 (t, $J=2.20$ Hz 5H), δ 7.34 (m, 2H), δ 7.25 (d, $J=1.11$ Hz 1H), δ 3.90 (t, $J=3.68$ Hz 1H), δ 3.75 (s, 3H), δ 2.15 (quin, $J=3.66$ Hz 1H), δ 1.85 (quin, $J=3.66$ Hz 1H)

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-methyl-2-phenylpropanoate (26)

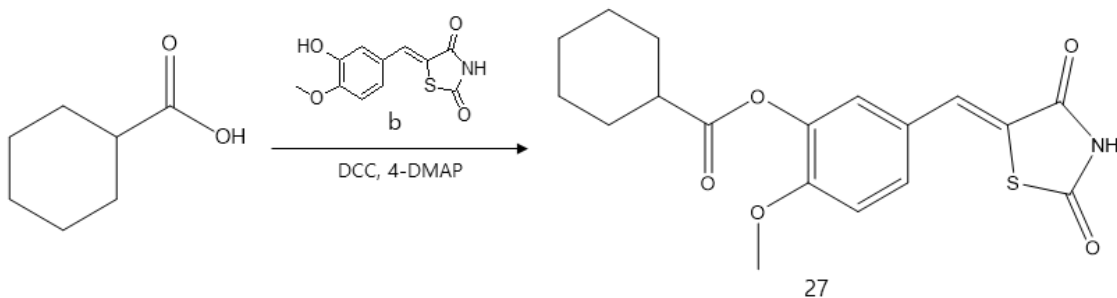


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 26을 얻는다.

yield : 89.6%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.58 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.51 (m, 5H), δ 7.33 (m, 3H), δ 7.38 (s, 3H), δ 1.65 (s, 7H)

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

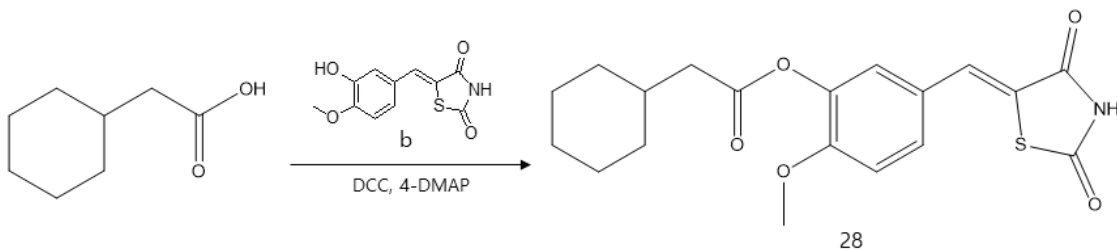


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 27을 얻는다.

yield : 87.3%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.58 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.51 (d, $J=4.40$ 1H), δ 7.33 (m, 2H), δ 3.83 (s, 3H), δ 2.67 (m, 1H), δ 1.98 (d, $J=6.4$ 2H), δ 1.75 (d, $J=6.05$ 2H), δ 1.63 (m, 7H)

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-cyclohexylacetate (28)

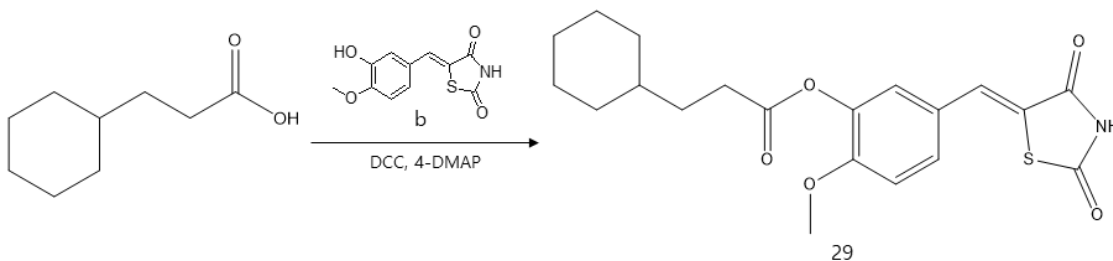


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 28을 얻는다.

yield : 91.2%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.57 (s, 1H), δ 7.75 (s, 1H), δ 7.52 (dd, $J=4.40$ Hz, 1H), δ 7.34 (m, 2H), δ 3.83 (s, 1H), δ 2.47 (d, $J=3.48$ Hz, 2H), δ 1.81 (m, 6H), δ 1.29 (m, 6H)

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 3-cyclohexylpropanoate (29)

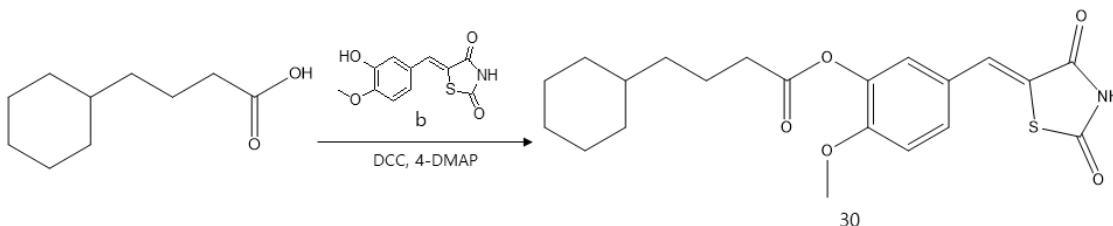


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 29를 얻는다.

yield : 94.7%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.57 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.53 (dd, $J=4.20$ Hz, 1H), δ 7.33 (m, 2H), δ 7.29 (s, 2H), δ 3.84 (s, 3H), δ 2.62 (t, $J=3.84$ Hz, 2H), δ 1.75 (m, 8H), δ 1.23 (m, 5H), δ 0.92 (q, $J=5.49$ Hz, 2H)

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

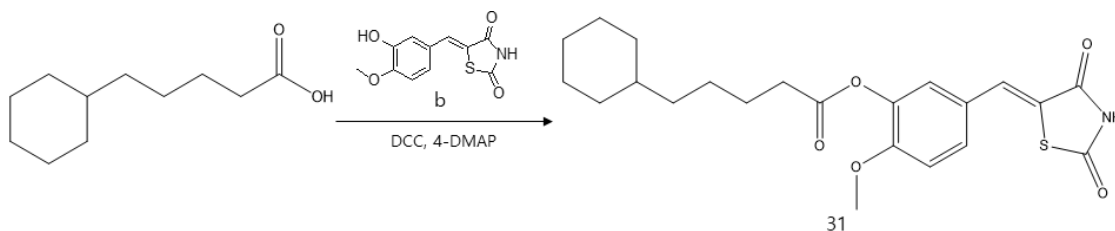


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 30을 얻는다.

yield : 89.7%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.58 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.53 (dd, $J=4.40$ Hz and $J=1.11$ Hz, 1H), δ 7.33 (m, 2H), δ 3.83 (s, 3H), δ 2.56 (t, $J=3.66$ Hz, 2H), δ 1.72 (m, 8H), δ 1.28 (m, 7H), δ 0.93 (m, 2H)

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 5-cyclohexylpentanoate (31)

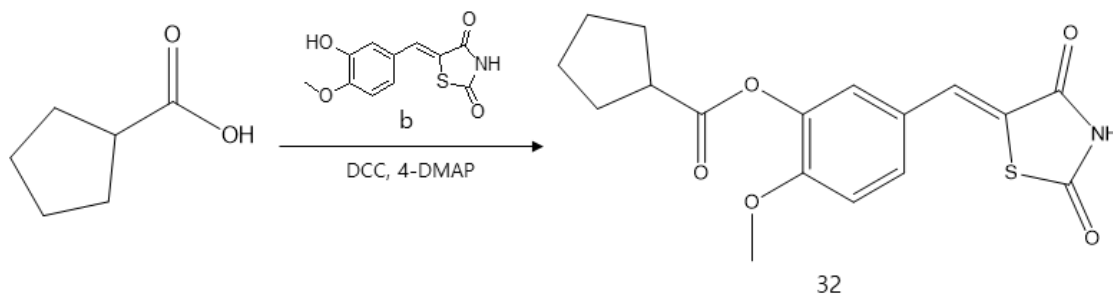


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 31을 얻는다.

yield : 85.6%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.52 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.53 (dd, $J=4.22$ Hz, 1H), δ 7.32 (m, 2H), δ 3.83 (s, 3H), δ 2.60 (t, $J=3.48$ Hz, 2H), δ 1.71 (m, 10H), δ 1.43 (m, 12H), δ 0.91 (m, 2H)

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

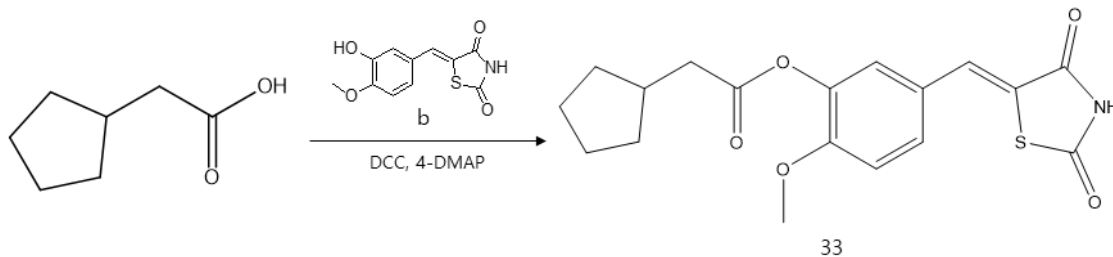


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 32을 얻는다.

yield : 89.4%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.57 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.51 (dd, $J=4.17$ Hz, 1H), δ 7.36 (m, 2H), δ 3.83 (s, 3H), δ 3.09 (quin, $J=4.04$ Hz, 1H), δ 1.95 (m, 4H), δ 1.67 (m, 4H)

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

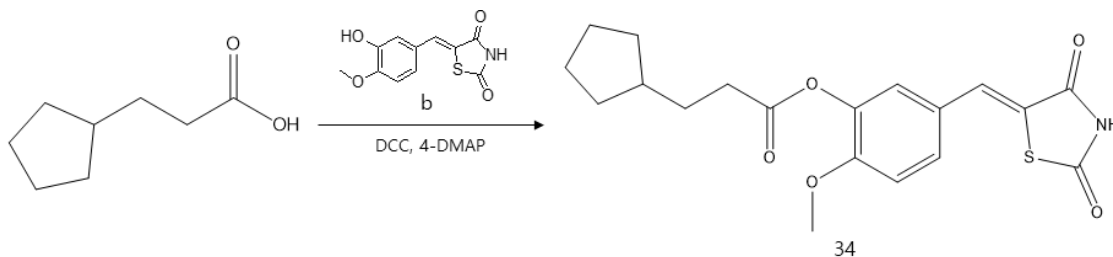


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 33을 얻는다.

yield : 91.3%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.58 (s, 1H), δ 7.75 (s, 1H), δ 7.52 (d, $J=4.40$ Hz, 1H), δ 7.34 (m, 2H), δ 3.84 (s, 3H), δ 2.60 (d, $J=3.66$ Hz, 2H), δ 2.28 (quin, $J=3.84$ Hz, 1H), δ 1.87 (m, 2H), δ 1.66 (m, 4H), δ 1.29 (m, 2H)

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

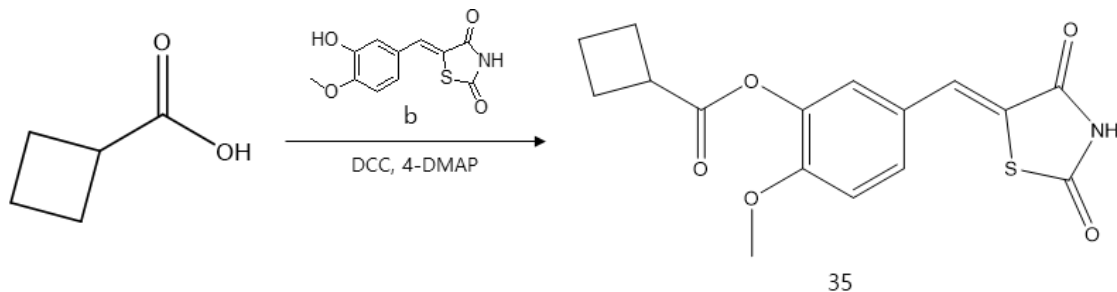


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 34를 얻는다.

yield : 90.5%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.58 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.52 (dd, $J=4.22$ Hz, 1H), δ 7.34 (m, 2H), δ 3.83 (s, 3H), δ 2.62 (t, $J=3.84$ Hz, 2H), δ 1.85 (m, 10H), δ 1.15 (m, 2H)

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

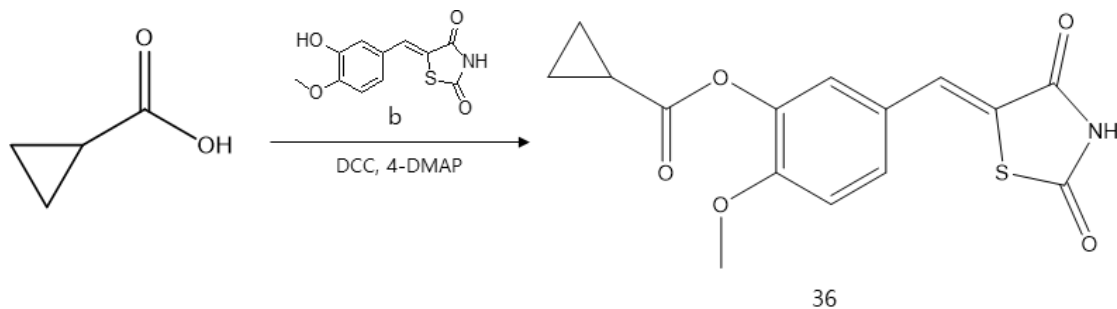


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 35를 얻는다.

yield : 91.2%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.57 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.52 (dd, $J=4.40$ Hz, 1H), δ 7.35 (s, 1H), δ 7.31 (m, 2H), δ 3.84 (s, 3H), δ 3.49 (quin, $J=4.22$ Hz, 2H), δ 2.35 (m, 4H), δ 2.05 (m, 2H)

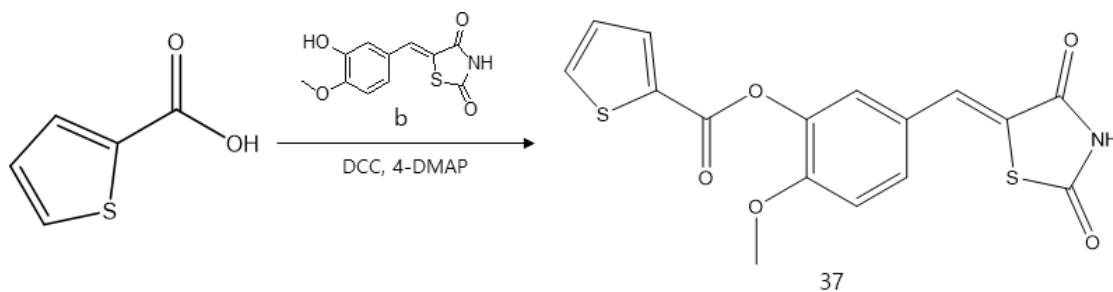
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl cyclopropanecarboxylate (36)



화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 36을 얻는다.

yield : 92.7% $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 12.57 (s, 1H), δ 7.74 (s, 1H), δ 7.51 (dd, $J=4.20$ Hz, 1H), δ 7.37 (s, 1H), δ 7.31 (d, $J=4.40$ Hz, 1H), δ 3.84 (s, 3H), δ 1.95 (m, 1H), δ 1.11 (m, 4H)

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl thiophene-2-carboxylate (37)

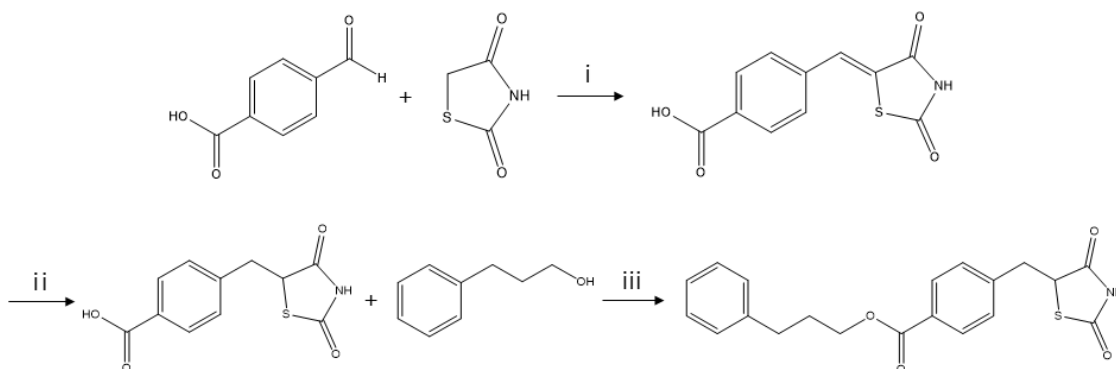


화합물 19와 동일한 반응으로 화합물 37을 얻는다.

yield : 92.5%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.57 (s, 1H), δ 8.13 (dd, $J=12.09$ Hz and $J=2.39$ Hz, 2H), δ 7.77 (s, 1H), δ 7.59 (m, 2H), δ 7.38 (m, 2H), δ 3.86 (s, 3H), δ 1.95 (m, 1H), δ 1.11 (m, 4H)

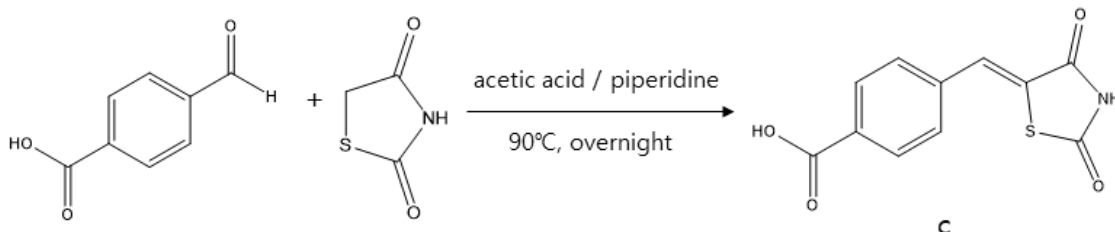
2.2.3. General procedures for the synthesis of compounds 38



Scheme 3. Synthesis of compounds 38. reagents and conditions; (i) acetic acid, piperidine, toluene (ii) $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dimethylglyoxime, NaBH_4 , THF, DMF (iii) DCC, 4-DMAP, dichloromethane (CH_2Cl_2)

compounds 38의 전체적인 합성 방법을 scheme에 도식화 하였다. i, ii, iii 과정의 구체적인 실험방법은 아래 (c), (d), (37)의 과정에서 나타내었다.

(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)benzoic acid (c)

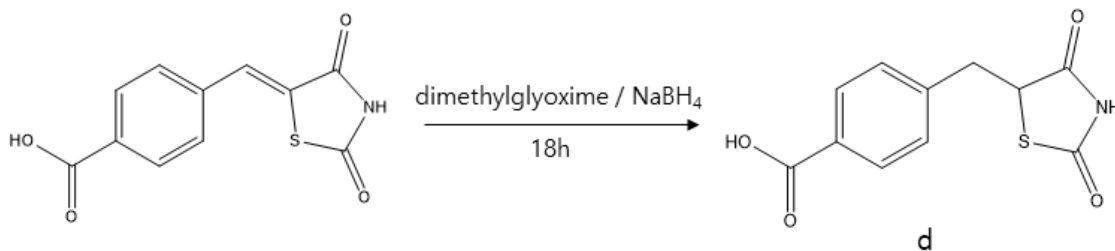


Toluene 15 ml에 Terephthalaldehydic acid 1 g (6.66 mmol), 2,4-thiazolidinedione 0.78 g (1.0 eq; 6.66 mmol)를 용해시킨 후 acetic acid 0.19 ml (0.5 eq; 3.33 mmol), piperidine 0.33 ml (0.5 eq; 3.33 mmol)를 넣어준다. 혼합물이 든 둥근 flask에 dean-stock 장치를 장착한 후 90°C에서 overnight 반응시킨다. 반응의 종결을 TLC로 확인한 후 methanol로부터 불순물을 씻듯이 제거하며 감압여과 한다. 얻은 고형물은 재결정하여 순수한 황색의 결정 **c**를 얻어 ¹H NMR (Nuclear magnetic resonance)를 통해 확인하였다.

yield : 96.2%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.97 (s, 1H), δ 8.05 (d, *J*=4.22 Hz, 2H), δ 7.80 (s, 1H), δ 7.70 (d, *J*=4.22 Hz, 2H)

4-((2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl)benzoic acid (d)

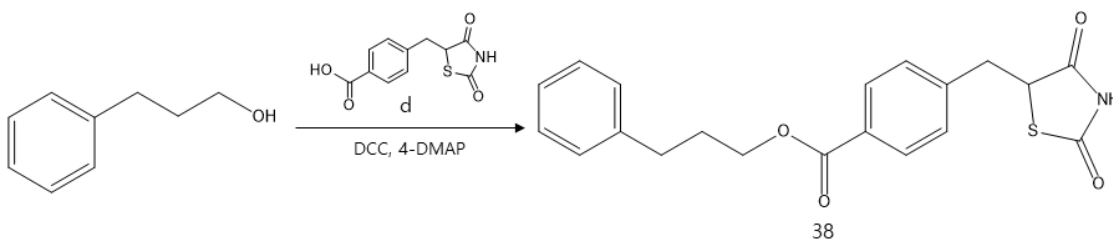


100 ml 둥근 flask에 $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.43 mg (0.019 mmol), dimethylglyoxime 86.97 mg (0.749 mmol)을 용매 H_2O 10 ml에 용해시킨다. 뒤이어 1.0 N NaOH를 sputum을 이용하여 4방울 정도 가해주고 NaBH_4 472.19 mg (12.48 mmol)를 넣어준 후 ice bath에서 교반하며 0°C 까지 맞춰준다. 그 후 앞서 합성한 e 화합물 1 g을 THF (Tetrahydrofuran) 10 ml 와 DMF (dimethylformamide) 5 ml 용액에 용해시킨 혼합물을 20분에 걸쳐 천천히 넣어 준다. 실온에서 18시간 동안 반응시킨 후 반응의 종결을 TLC로 확인한다. 더 이상 반응이 진행되지 않으면 Acetic acid로 혼합물의 pH가 대략 6이 될 때까지 맞춰준다. 불순물 제거를 위해 Ethyl acetate와 H_2O 를 이용하여 여러 번 추출을 진행한 후 MgSO_4 로부터 수분을 완전히 제거한다. 회전식 감압증류기로 감압하여 흰색의 순수한 결정 f를 얻는다.

yield : 75.3%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.95 (s, 1H), δ 12.08 (s, 1H), δ 7.89 (d, $J=4.02$ Hz, 2H), δ 7.38 (d, $J=4.02$ Hz, 1H), δ 4.99 (q, $J=2.19$ Hz, 1H), δ 3.48 (dd, $J=6.96$ Hz and $J=2.21$ Hz, 1H), δ 3.26 (m, 1H)

3-phenylpropyl 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl)benzoate (38)



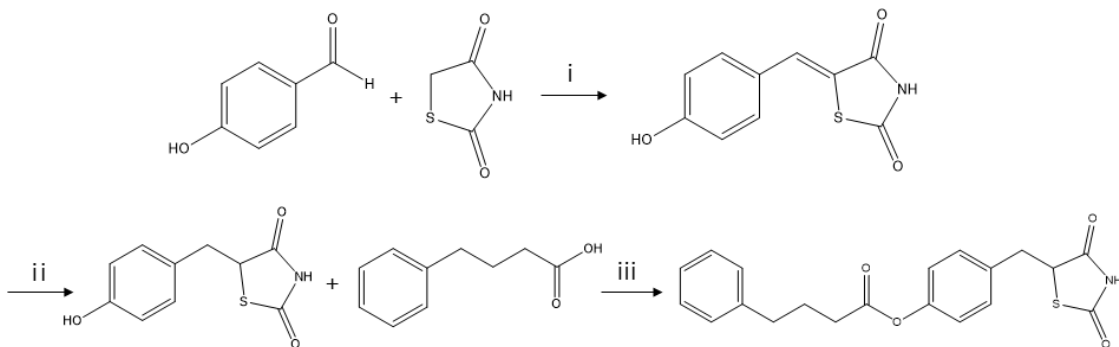
용매 Dichloromethane 5 ml에 앞서 합성한 화합물 d 0.5 g (1.99 mmol)과 Benzoic acid 0.271 g (1 eq, 1.99 mmol), 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP) 0.02 g (0.084 eq, 0.16 mmol)를 넣고 0°C 에서 약 5분간 반응시킨다. 그 후 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 0.38 g (0.92 eq, 1.83 mmol)를 20분에 걸쳐 천천히 적가한다. 실온에서 약 8시간 반응 후 TLC로 반응의 종결을 확인한 뒤 생성된 dihexylurea (DHU)를 여과한다. 남은 여액의 불순물을 제거하기 위해 0.5M HCl과 포화 NaHCO_3 용액으로 산, 염기 추출을 반복

하여 진행 하고 unhydrous $MgSO_4$ 로 탈수시킨다. 감압 농축하여 용매를 제거하고 생성된 고체는 ethanol로 재결정하여 순수한 화합물 38를 얻어 1H NMR (Nuclear magnetic resonance)를 통해 확인하였다.

yield : 55.7%

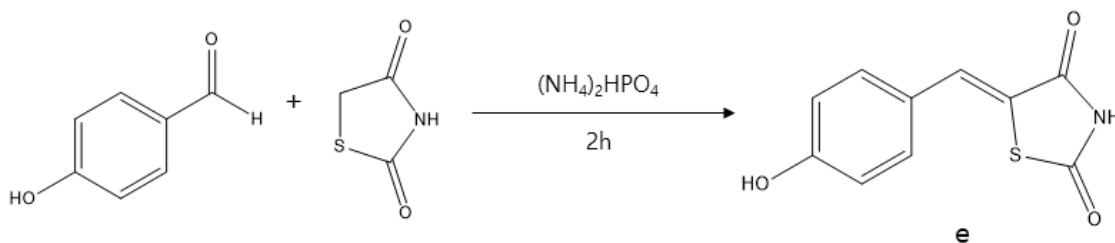
1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.07 (s, 1H), δ 7.91 (m, 2H), δ 7.45 (m, 2H), 7.31 (m, 5H), δ 4.99 (m, 1H), δ 4.27 (t, $J=3.11$ Hz, 2H), δ 3.49 (m, 1H), δ 3.28 (m, 1H), δ 2.76 (t, $J=3.68$ Hz, 2H), δ 2.07 (quin, $J=3.11$ Hz, 2H)

2.2.4. General procedures for the synthesis of compounds 39



Scheme 4. Synthesis of compounds 39. reagents and conditions; (i) $(NH_4)_2HPO_4$, H_2O , (ii) $CoCl_2 \cdot H_2O$, dimethylglyoxime, $NaBH_4$, THF, DMF (iii)DCC, 4-DMAP, dichloromethane (CH_2Cl_2)

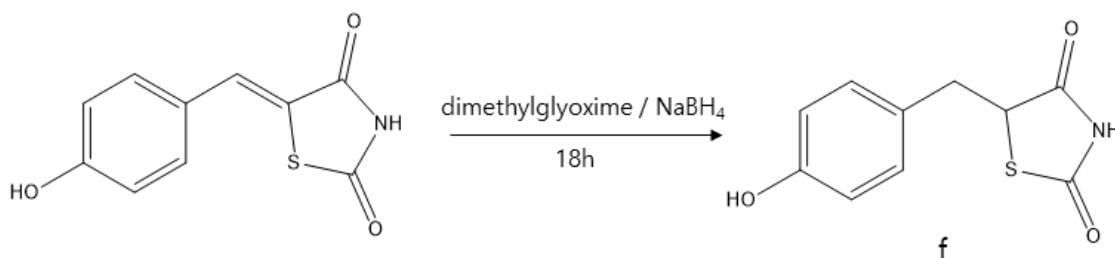
compounds 39의 전체적인 합성 방법을 scheme에 도식화 하였다. i , ii , iii 과정의 구체적인 실험방법은 아래 (e), (f), (39)의 과정에서 나타내었다.

(Z)-5-(4-hydroxybenzylidene)thiazolidene-2,4-dione (e)


4-Hydroxybenzaldehyde 1 g (8.19 mmol), 2,4-thiazolidinedione 0.96 g (1.0 eq; 8.19 mmol), Diammonium hydrogen phosphate 0.1 g (0.1 eq; 0.82 mmol)를 100 ml 둥근 flask 에 넣고 condensor를 장착시킨 후 용매 H_2O 5 ml에서 reflux 하에 교반시킨다. 2시간 후 전개용매 Hexane : Ethyl acetate = 1:1를 이용하여 TLC로부터 반응의 진행 정도를 확인한다. 더 이상 반응이 진행하지 않으면 Methanol로 불순물을 씻듯이 제거하며 감압 여과하여 황색의 순수한 결정 e를 얻어 ^1H NMR (Nuclear magnetic resonance)를 통해 확인하였다.

yield : 94.8%

^1H NMR (DMSO, 300 MHz) δ 12.46 (s, 1H), δ 10.32 (s, 1H), 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-hydroxybenzyl)thiazolidine-2,4-dione (f)


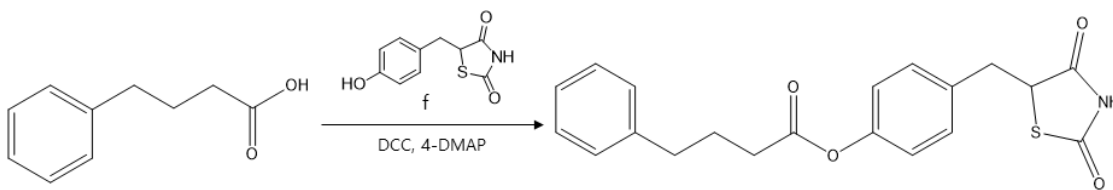
100 ml 둥근 flask에 $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.91 mg (0.022 mmol), dimethylglyoxime 104 mg (0.896 mmol)을 용매 H_2O 10 ml에 용해시킨다. 뒤이어 1.0 N NaOH를 spuit를 이용하여 4방울 정도 가해주고 NaBH_4 566.2 mg (14.97 mmol)를 넣어준 후 ice bath에서 교반하

며 0°C까지 맞춰준다. 그 후 앞서 합성한 e 화합물 1 g (4.52 mmol)을 THF (Tetrahydrofuran) 10 ml와 DMF (dimethylformamide) 5 ml 용액에 용해시킨 혼합물을 20 분에 걸쳐 천천히 넣어준다. 실온에서 18시간 동안 반응시킨 후 반응의 종결을 TLC로 확인한다. 더 이상 반응이 진행되지 않으면 Acetic acid로 혼합물의 pH가 대략 6이 될 때까지 맞춰준다. 불순물 제거를 위해 Ethyl acetate와 H₂O를 이용하여 여러 번 추출을 진행한 후 MgSO₄로부터 수분을 완전히 제거한다. 회전식 감압증류기로 감압하여 흰색의 순수한 결정 f를 얻어 ¹H NMR (Nuclear magnetic resonance)를 통해 확인하였다.

yield : 69.7%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.98 (s, 1H), δ 9.33 (s, 1H), δ 7.04 (d, *J*=4.04 Hz, 2H), δ 6.94 (d, *J*=4.02 Hz, 2H), δ 4.84 (m, 1H), δ 3.27 (m, 1H), δ 3.03 (m, 1H)

4-((2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl)phenyl 4-phenylbutanoate (39)



39

용매 Dichloromethane 5 ml에 앞서 합성한 화합물 f 0.5 g (1.84 mmol)과 Benzoic acid 0.303 g (1 eq, 1.84 mmol), 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP) 0.019 g (0.084 eq, 0.15 mmol)를 넣고 0°C에서 약 5분간 반응시킨다. 그 후 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 0.35 g (0.92 eq, 1.69 mmol)를 20분에 걸쳐 천천히 적가한다. 실온에서 약 8시간 반응 후 TLC로 반응의 종결을 확인한 뒤 생성된 dihexylurea (DHU)를 여과한다. 남은 여액의 불순물을 제거하기 위해 0.5M HCl과 포화 NaHCO₃ 용액으로 산, 염기 추출을 반복하여 진행 하고 unhydrous MgSO₄로 탈수시킨다. 감압 농축하여 용매를 제거하고 생성된 고체는 Ethanol로 재결정하여 순수한 화합물 39를 얻어 ¹H NMR (Nuclear magnetic resonance)를 통해 확인하였다.

yield : 61.5%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.07 (s, 1H), δ 7.33 (m, 7H), δ 7.08 (d, $J=4.22$ Hz, 2H),
4.94 (q, $J=2.01$ Hz, 1H), δ 3.42 (m, 2H), δ 3.17 (m, 1H), δ 2.69 (t, $J=3.66$ Hz, 2H), δ
2.59 (t, $J=3.66$ Hz, 2H), δ 1.98 (quint, $J=3.66$ Hz, 2H)

2.3. Expression and purification of 15-PGDH

15-PGDH의 DNA를 pGEX-2T expression vector의 BamHI와 EcoRI 사이에 삽입한 후 Recombinant DNA를 chemically competent *E. coli* BL21-DE₃ cell 50에 형질 전환하였다. 이어서 Ampicillin을 함유하는 500 ml LB 배지에서 37°C로 overnight 배양한 후 다음 날 생성된 단일 colony를 15ml의 LB배지에 접종하여 shaking incubator를 이용해 37°C, 220rpm에서 성장시켰다. 이후 단백질 발현을 유도하기 위해 배양액을 1.5L LB 배지에 접종하였고 wave length 600nm에서 흡광도 값이 약 0.6에 도달하였을 때 IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 1 M 농도로 첨가하여 20°C에서 추가로 12시간 동안 성장시켰다.

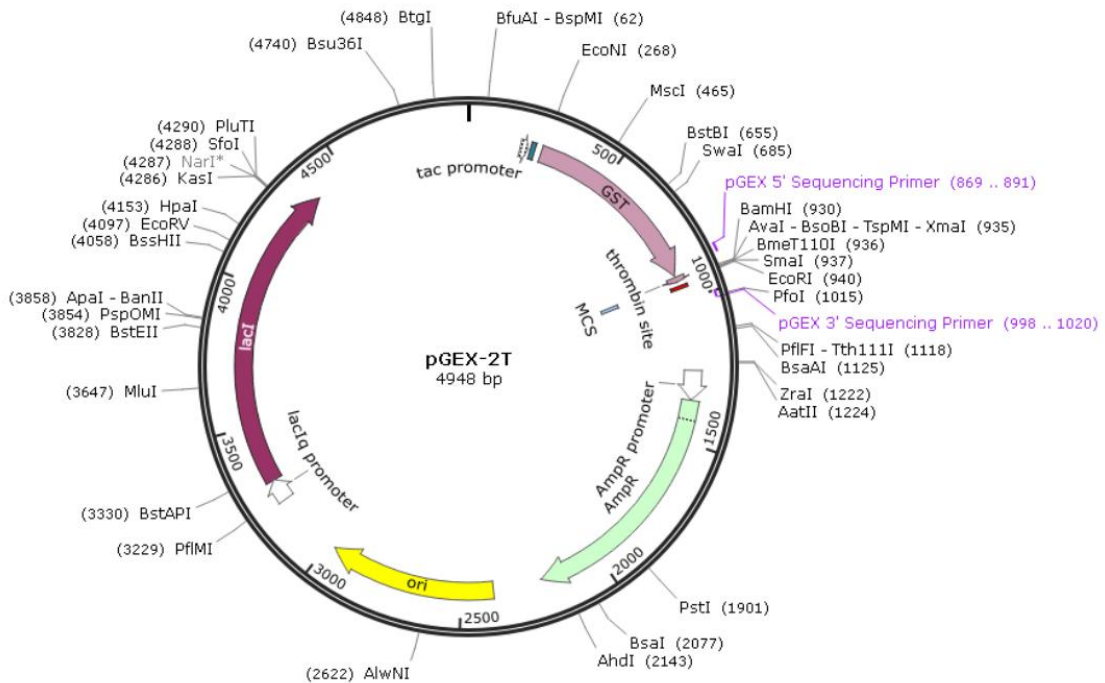


Figure 6. Map of the pGEX-2T expression vector showing the reading frames and main features [19].

15-PGDH 단백질을 용출하기 위해 먼저 배양액을 4°C에서 15분간 centrifuge하여 상등액을 제거한 후 cell pellet을 1 mM EDTA 및 0.1 mM DTT를 함유하는 세포 용해 완충액 [1×DPBS buffer (pH 7.4)]에 현탁시켰다. 이후 세포 파괴를 위해 4회 반복하여 초음파 처리를 진행하였고 생성된 세포 용해물을 20000 *g*-force에서 30분간 centrifuge하여 제거하였다. 4°C에서 column 상에 column buffer [1 mM EDTA 및 0.1 mM DTT를 함유하는 PBS 완충액 (pH 7.4)]로 평형화 시킨 Glutathione-sephatose 4B bead를 이용하여 상등액에 용해되어있는 단백질을 bead에 binding시켰다. 이후 washing buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.7]로 binding 되지 않은 단백질들을 세척하였으며 단백질을 용출시키기 위해 Elution buffer [50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione, pH 8.0]를 이용하여 5분 동안 실온에서 incubation하여 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질은 1×Bradford reagent을 이용하여 발색을 통해 육안으로 확인하였다.

2.4. Bradford protein assay

15-PGDH의 농도를 측정하기 위해 Bradford assay를 실시하였다. 먼저 표준곡선을 얻기 위해 bovine serum albumin (BSA)를 멸균 증류수를 이용하여 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.3125 mg/ml, 0.156 mg/ml 농도로 희석하였다. 단백질 정량 시약으로는 Bradford reagent을 사용하였으며 spectrophotometer로부터 BSA를 넣지 않은 1 ml의 Bradford reagent를 blank 값으로 지정하였다. 이어서 농도별로 희석한 BSA 3 μ l와 Bradford reagent 997 μ l를 섞은 후 595 nm에서 각각의 흡광도 값을 측정하였다. 측정값을 통해 표준 곡선을 작성하였고 회귀 식 [$y=0.1868x+0.0116$, $R^2=0.9914$]을 도출하였다. 이 후 정제된 15-PGDH를 같은 조건에서 흡광도를 측정하여 회귀 식을 통해 농도[1.0246 mg/ml]를 계산하였다.

2.5. SDS-PAGE

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 Polyacrylamide gel 전기영동의 한 변형체로 전기장에서 분자 질량에 의한 혼합물 내의 하전된 분자를 분리하는 생화학의 분석 방법이다[20]. 따라서 정량한 15-PGDH의 순도 및 크기 등

을 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시하였다. 미리 plate와 casting frame을 조합하여 고정된 후 12 % separation gel [4.9 ml H₂O, 6.0 ml 30% acrylamide mix, 3.8 ml 1.5 M Tris – HCl (PH 8.8), 150 µl 10 % SDS, 150 µl 10 % APS, 6 µl TEMED]을 plate 사이에 넣어 gel이 굳을 때까지 방치하였다. 굳은 separation gel위에 8 % stacking gel [3.4 ml H₂O, 0.83 ml 30% acrylamide mix, 0.63 ml 1.0 M Tris – HCl (PH 6.8), 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 5 µl TEMED]을 끝까지 주입한 후 comb를 꽂고 gel을 굳혔다. gel이 굳은 것을 확인한 후 comb를 제거하고 plate를 전기영동 장치에 결합하여 설치하였다.

15-PDGH는 앞서 얻은 농도를 통해 넣을 양을 계산하여 2×SDS와 1:1 비율로 혼합한 후 95°C에서 미리 열처리하였으며 장치의 mini tank에는 running buffer 1L [1g SDS, 3g Tris, 14.4g glycine]를 안쪽, 바깥쪽 모두 채워 준비하였다. molecular weight marker와 열처리한 단백질 2, 4, 6 µg을 well에 차례로 주입하고 70V의 전압을 걸어 단백질을 분리하였다. 전기영동을 마치면 plate로부터 gel을 분리하여 증류수로 반복하여 세척한 후 Methanol, Acetic acid, 증류수를 포함한 CBB staining solution과 destaining solution를 통해 염색과 탈색을 차례로 진행하였다. Figure와 같이 Marker를 기준으로 15-PGDH의 크기는 약 55 kDa임을 확인하였으며 이는 기존에 알려진 15-PGDH의 크기와 동일한 결과로써 높은 순도의 단백질을 얻었음을 확인하였다.

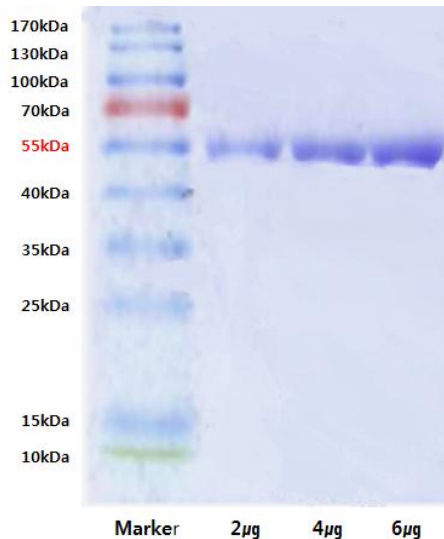


Figure 7. SDS-PAGE of human 15-PGDH

2.6. 15-PGDH inhibition assay

NAD⁺ 의존성 15-PGDH는 PGE₂의 15-hydroxyl의 산화를 촉매하며 동시에 환원된 NADH가 생성된다 [21]. 따라서 15-PGDH inhibition assay는 NADH의 감소 정도를 측정함으로써 15-PGDH의 억제 활성 능력을 분석할 수 있다.

미리 제조해 둔 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 250 μM NAD⁺, 0.1 mM DTT, 21 μM PGE₂의 sample들은 ice bath에서 4°C를 유지하였다. 먼저 형광분광광도계 (fluorescence spectrophotometer; RF-5301)를 이용하여 wavelength은 excitation: 340nm, emission: 468nm, reaction time 70.00sec로 설정한 후 증류수로 깨끗이 씻은 4면이 투명한 석영 cuvette을 기기에 넣고 cell blank를 찍는다. 그 후 cuvette에 미리 희석해 둔 inhibitor stock (1, 0.1, 0.01 mM)과 sample들을 혼합한 후 정제된 15-PGDH를 넣어 총 부피 2 ml를 맞추어 측정한다. cell blank와 동일한 조건에서 각 inhibitor들은 최소 6개 이상의 농도로 처리하여 OD(optical density)값을 측정하였으며 5-65 sec 값을 기록하였다. 측정값을 통해 각 39개 inhibitor의 회귀 식을 얻었으며 inhibitor를 처리하지 않은 control의 절반 값을 대입하여 15-PGDH 활성을 50% 억제하는 IC₅₀ 값을 도출하였다.

2.7. Determination of extracellular PGE₂ levels.

합성한 inhibitor들이 세포 내 PGE₂ 농도에 얼마나 영향을 주는지에 대한 실험을 진행하였다. 실험에 사용된 세포는 A549 cell로서 인간 폐포 기저막 상피 세포이며 이는 성질이 편평하고 생체 내에서 단층처럼 접착력 있게 성장한다[22]. PGE₂의 정확한 농도를 측정하기 위해 competitive ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) 방법을 사용하였고 이는 항원-항체 특이적 결합 반응과 효소를 이용한 발색 반응으로 sample을 정성 및 정량 분석하는 기술을 가지고 있다. PGE₂ 농도를 측정하기 전 모든 실험은 UV 램프와 환기장치를 갖춘 clean bench에서 무균적으로 진행하였으며 모든 Vial과 sample 들의 표면은 70% 에탄올과 Alcohol 램프로 소독하였다. Korean Collection for Type Cultures Biological Resource Center로부터 구매한 A549 cell은 액화질소 탱크 (-196 °C)에 동결 보존한 후 실험 시 동결된 세포를 Water bath에서 1~2분간 신속히 녹여 사용하였다. 녹인 세포는 37°C Water bath에서 미리 항온시킨 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)]에 현탁시킨 후 이를 2000 RPM, 200 sec, 25°C 조건으로 5분간 centrifuge 하였다. 상층액을 제거한 cell pellet에 새로운 medium 10 ml을 넣고 cell을 잘 풀어준 후 polystyrene (PS) cell culture dish에 옮겨 5% CO₂, 37°C, 90% 이상의 습도에서 이를 간 배양하였다. 위와 동일한 조건으로 새로운 medium으로 갈아주며 최소 3회 이상 계대 배양하였다.

PGE₂ 농도 측정 전 동일한 농도의 cell에 약물을 처리하기 위해 계대 배양 한 A549 cell을 회수하여 새로운 medium과 함께 2.5×10^5 cells/ml 의 농도로 희석하였다. 이 후 48 well plate에 희석한 cell을 250 µl 씩 주입하여 CO₂ incubator에서 약 24시간 동안 배양하였다. cell이 대략 80% 정도 성장하였을 때 1×DPBS buffer(-)으로 희석해둔 500µM 농도의 inhibitors들을 각각 2.5 µl 씩 주입하여 5µM의 농도로 처리하였다. control 에는 약물 대신 1×DPBS buffer(-)를 2.5 µl 주입하였고 CO₂ incubator에서 12시간 동안 배양하였다. 측정된 PGE₂ 농도를 측정하기 위해 cell plate로부터 각각의 상층액을 멸균된 e-tube에 걸어내었다.

abcam[®]으로부터 구매한 ab133021-prostaglandin E2 ELISA kit를 사용하였으며 먼저 kit 내의 Prostaglandin E2 standard로부터 Table 과 같이 7개의 농도로 희석하였다. 이를 쥐의 IgG 항체가 코팅되어있는 96well plate에 차례로 100 µl씩 주입하였으며 비표지 항

원인 걸어낸 39개의 sample들을 각 inhibitor 당 3 well에 100 μ l 씩 첨가하였다. 이어서 같은 well에 표지 항원인 PGE₂ alkaline Phosphatase Conjugate와 prostaglandin E₂ Antibody를 50 μ l 씩 빠르게 첨가한 후 well plate를 2시간 동안 vortexing하였고 이 때 항체에 대한 항원간의 경쟁반응으로부터 항원-항체 복합체가 생성된다. 2시간 후 1×washing buffer로 3회 반복하여 결합되지 않은 항체를 제거하였고 pNpp Substrate를 200 μ l 씩 주입한 후 45분간 실온에서 배양하였다. sample 내의 PGE₂ 농도가 높을수록 표지된 항원과 substrate의 신호는 감소하게 된다. 이와 같은 측정에 대한 원리를 Figure 8.에서 도식화하여 설명하였다. 마지막으로 신호의 포화를 방지하기 위해 빠르게 Stop solution 50 μ l를 주입한 뒤 micro plate spectrophotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek®, USA; light source: Xenon flash; data analysis software: Gen 5™)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였고 PGE₂ standard로부터 얻은 회귀식을 이용하여 각 inhibitor 당 PGE₂ 증가율을 도출하였다.

Table 1. PGE₂ Standard preparation

standard #	sample to dilute	Volume to Dilute (μ L)	Volume of Diluent (μ L)	Starting conc. (pg/mL)	Final Conc. (pg/mL)
1	Stock	50	9500	50,000	2,500
2	Standard 1	500	500	2,500	1,250
3	Standard 2	500	500	1,250	625
4	Standard 3	500	500	625	313
5	Standard 4	500	500	313	156
6	Standard 5	500	500	156	78.1
7	Standard 6	500	500	78.1	39.1

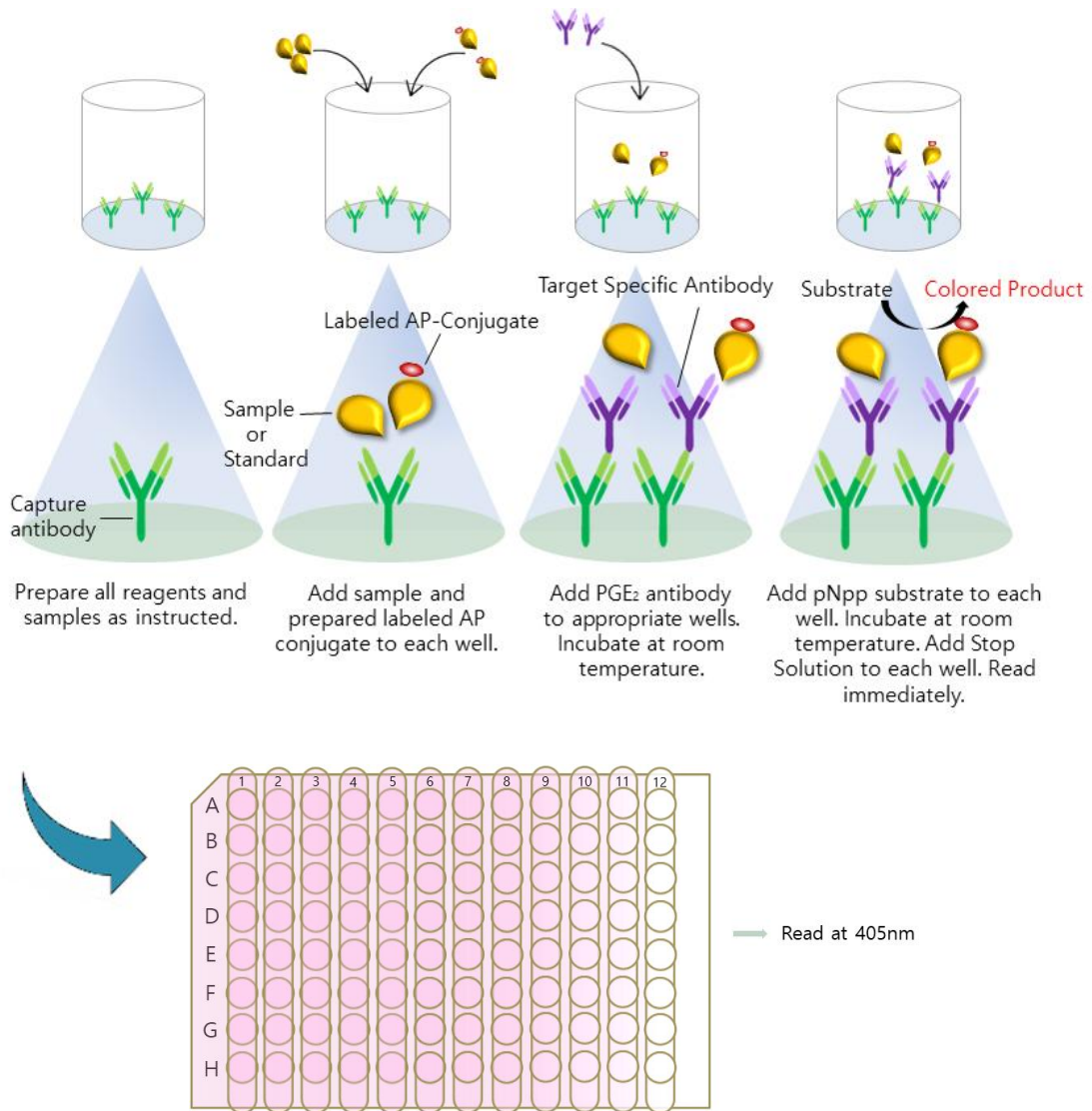


Figure 8. PGE₂ enzyme-linked immunosorbent assay procedure.

2.8. Scratch-wound healing assay

in vivo에서 세포 단층에 물리적인 ‘상처’를 만든 후 약물을 처리함으로써 생성된 PGE₂ 농도가 세포 재생에 얼마나 효과를 주는지 확인하기 위해 scratch wound healing assay를 진행하였다. 사용된 세포는 HaCaT cell로서 성인 인간의 피부 조직에서 자발적으로 변형된 각질 세포주이다 [23].

DMEM/high glucose 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 이용하여 cell을 풀어준 후 이틀간 CO₂ incubator [5% CO₂, 37°C, 90% 이상의 습도]에서 배양하였다. 이를 최소 2회 이상 반복하여 계대 배양하였으며 모든 작업은 clean banch에서 무균상태로 이루어졌다.

동일한 농도로 cell의 seeding을 위해 계대 배양을 마친 cell을 새로운 배지로 교체한 후 도립현미경을 이용하여 세포수를 counting하였다. 이를 배지와 함께 2.0×10⁵ cells/ml의 농도로 희석시키고 6well plate에 2 ml씩 주입하여 24시간 동안 배양하였다. cell이 70 - 80% 정도 성장하였을 때 배지를 제거하고 1×DPBS buffer(-)으로 washing하였다. 세포의 분열을 억제하기 위해 FBS와 Antibiotic-antimycotic이 첨가되지 않은 DMEM/high glucose medium 2ml와 함께 mitomycin C를 30 µg/ml 농도로 처리하여 CO₂ incubator에서 정치하였다. 2시간 후 남아있는 mitomycin C와 배지를 suction하여 제거하였고 pipette tip의 끝을 이용하여 culture dish에 부착된 세포 단층에 물리적인 scratch를 내주었다. 이 과정에서 떨어져 나온 세포들을 제거하기 위해 1×DPBS buffer(-)으로 2회 washig한 후 광학 현미경 (biological microscope IX71, Olympus, Japan ; light source: TH4-200 ; software : DP2-BSW) 을 이용하여 약물을 처리하지 않은 상태의 scratch 부분의 이미지를 capture하였다.

상처를 낸 cell에 DMEM/high glucose medium 2ml 씩 주입한 후 inhibitor (4, 22, 23, 38, 39)을 5µM의 농도로 처리하였다. inhibitor대신 positive control에는 TGF-β1 1 ng/ml 와 negative control에는 1×DPBS buffer(-)를 inhibitor와 동일한 부피로 처리하였다. CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 광학현미경을 이용하여 약물 처리 전 촬영한 동일한 위치를 capture하였다. 약물을 처리하기 전과 후에 촬영한 이미지로부터 cell의 scratch 사이의 너비를 각각 측정하여 비교하였다.

3. Results and Discussion

3.1. Inhibition effect of human 15-PGDH

앞선 연구에서 전체적으로 가장 효과가 좋았던 EJ-14, EJ-59 Figure 9를 기준으로 Ester 결합을 포함한 구조 변형을 통해 39개의 억제제를 합성하였다.

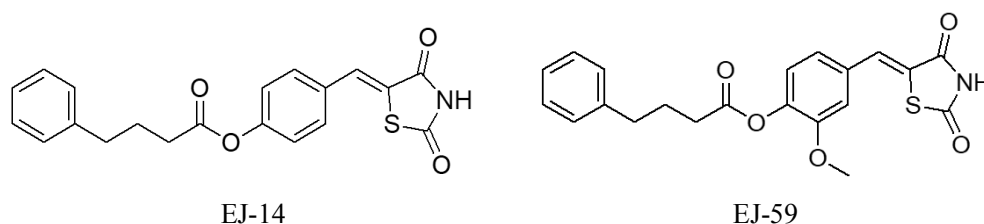


Figure 9. Structure of EJ-14 and EJ-59 [24].

이 억제제들의 구조 변화에 따른 15-PGDH 효소 억제 활성 정도를 측정하기 위해 15-PGDH assay를 실시하여 IC_{50} 값으로부터 비교 분석하였다. 각 억제제의 IC_{50} 값은 Table 3.4.5에 각각 표기하였다.

2,4-Thiazolidinedione기로부터 Ester 결합이 para 위치에 존재하는 EJ-1~EJ-15와 달리 화합물 1-18은 5-(3-Hydroxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione로부터 합성하여 meta 위치에 Ester결합이 존재하는 (Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 유도체를 완성하였다. Ester 결합 위치에 따른 IC_{50} 값은 Figure 10.와 같이 전반적으로 para 위치 (EJ-1~EJ-15)에서 억제 활성 효능이 더 높은 것으로 보였으나 치환기 구조에 따른 IC_{50} 값은 두 유도체 모두 비슷한 경향성을 보였다. 각각의 IC_{50} 값은 Table 2.와 Table 3.에 나타내었다.

화합물 1-5의 Phenyl치환기를 보았을 때 IC_{50} 값이 phenyl < phenylmethyl < phenylethyl < phenylpropyl < phenylbutyl 순으로 낮아졌다. 즉 치환기의 $-CH_2-$ 그룹이 증가할수록 억제 효능이 증가하였으며 compound 6-8에서와 같이 Phenyl 치환기를 연결하는 탄소사슬에 methyl, ethyl이 존재하면 IC_{50} 값이 확연히 떨어짐으로써 이는 억제제

가 15-PGDH binding site에 결합하는데 있어 방해 요인으로 작용한다는 것을 알 수 있다. 또한 Cyclohexyl 치환기도 Phenyl 치환기와 마찬가지로 사슬의 길이가 길어질수록 억제 효능이 높아졌으나 cyclohexylbutyl기부터는 오히려 효능이 떨어지는 것을 확인하였다. Cyclo 치환기의 고리 크기에 따라서는 cyclopropyl < cyclobutyl < cyclopentyl < cyclohexyl 순으로 고리의 크기가 커질수록 억제 효능이 증가하였다. (Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 유도체 중 가장 효능이 좋았던 억제제는 IC₅₀ 값 0.0290 μM으로 Cyclohexylpropyl 치환기가 연결된 화합물 12이다.

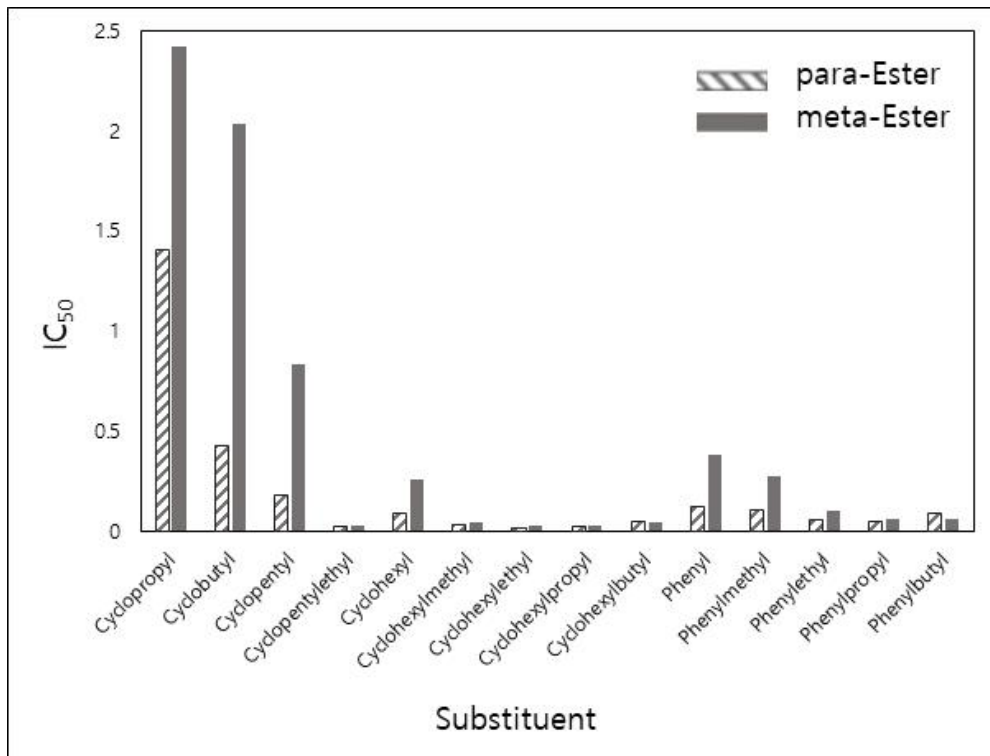
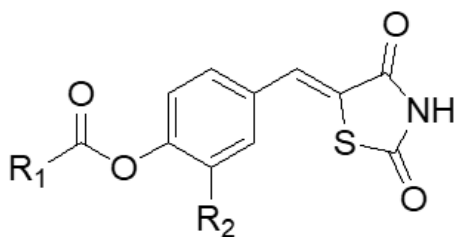
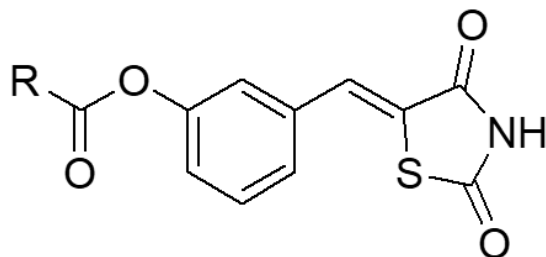


Figure 10. IC₅₀ value ratio according to Ester position in the compound

Table 2. Inhibitory potency of compound EJ-1 ~ EJ-60 [24]


compound No.	Substitution		15-PGDH scavenging activity (IC ₅₀ , μM)
	R ₁	R ₂	
EJ-1	Cyclopropyl	H	1.4100
EJ-2	Cyclobutyl	H	0.4307
EJ-3	Cyclopentyl	H	0.1787
EJ-4	Cyclopentylmethyl	H	0.0527
EJ-5	Cyclopentylethyl	H	0.0232
EJ-6	Cyclohexyl	H	0.0888
EJ-7	Cyclohexylmethyl	H	0.0305
EJ-8	Cyclohexylethyl	H	0.0184
EJ-9	Cyclohexylpropyl	H	0.0261
EJ-10	Cyclohexylbutyl	H	0.0504
EJ-11	Phenyl	H	0.1236
EJ-12	Phenylmethyl	H	0.1083
EJ-13	Phenylethyl	H	0.0544
EJ-14	Phenylpropyl	H	0.0507
EJ-15	Phenylbutyl	H	0.0921
EJ-46	Cyclopropyl	Methoxy	1.1239
EJ-47	Cyclobutyl	Methoxy	1.1186
EJ-48	Cyclopentyl	Methoxy	0.4936
EJ-49	Cyclopentylmethyl	Methoxy	0.0602
EJ-50	Cyclopentylethyl	Methoxy	0.0234
EJ-51	Cyclohexyl	Methoxy	0.2423
EJ-52	Cyclohexylmethyl	Methoxy	0.0278
EJ-53	Cyclohexylethyl	Methoxy	0.0173
EJ-54	Cyclohexylpropyl	Methoxy	0.0175
EJ-55	Cyclohexylbutyl	Methoxy	0.0282
EJ-56	Phenyl	Methoxy	0.1507
EJ-57	Phenylmethyl	Methoxy	0.0422
EJ-58	Phenylethyl	Methoxy	0.0286
EJ-59	Phenylpropyl	Methoxy	0.0239
EJ-60	Phenylbutyl	Methoxy	0.0389

Table 3. Inhibitory potency of compound 1-18


compound	Substitution	15-PGDH scavenging activity
No.	R	(IC ₅₀ , μM)
1	Phenyl	0.3796
2	Phenylmethyl	0.2723
3	Phenylethyl	0.1022
4	Phenylpropyl	0.0647
5	Phenylbutyl	0.0622
6	1-Phenylethyl	0.7885
7	1-Phenylpropyl	1.7297
8	1-methyl-1-Phenylethyl	2.4403
9	Cyclohexyl	0.2598
10	Cyclohexylmethyl	0.0410
11	Cyclohexylethyl	0.0321
12	Cyclohexylpropyl	0.0290
13	Cyclohexylbutyl	0.0444
14	Cyclopentyl	0.8332
15	Cyclopentylethyl	0.0624
16	Cyclobutyl	2.0361
17	Cyclopropyl	2.4231
18	Thiophenyl	0.1820

화합물 19-37은 EJ-46~EJ-60에서 중심 Phenyl ring의 Methoxy기와 Ester 결합의 위치를 맞바꾼 형태로 합성한 (Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 유도체이다. 각 유도체의 IC₅₀ 값을 통해 화합물 내의 맞바꾼 치환기 위치에 따른 15-PGDH 억제 효능 정도를 비교 분석하였다. 두 유도체를 각 치환기에 따라 비교하였을 때 Figure 11.와 같이 para 위치에 Ester 결합, meta 위치에 Methoxy기가 존재하는 유도체 (EJ-46~EJ-60)가 전체적으로 억제 효능이 높음을 확인하였다. 위의 유도체와 마찬가지로 19-37의 화합물도 EJ-46~EJ-60와 비슷한 경향성을 나타내었다. Phenyl 치환기와 Cyclohexyl 치환기에서는 -CH₂- 그룹이 증가할수록 억제 효능이 높아졌지만 Cyclohexylbutyl 치환기에서는 오히려 억제 효능이 떨어지는 양상을 보였다. Phenyl 치환기를 연결하는 탄소 사슬에 1-2개의 methyl, ethyl이 존재하는 유도체 역시 억제 효능이 떨어졌으며 Cyclohexyl보다 고리의 크기가 더 작은 Cyclopentyl, Cyclobutyl, Cyclopropyl은 IC₅₀ 값이 3배 이상으로 억제 효능이 눈에 띄게 감소하였다.

(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 유도체에서 가장 적합한 억제제는 IC₅₀ 값 0.0359 μM 으로 Cyclohexylpropyl 치환기가 연결된 화합물 30이다.

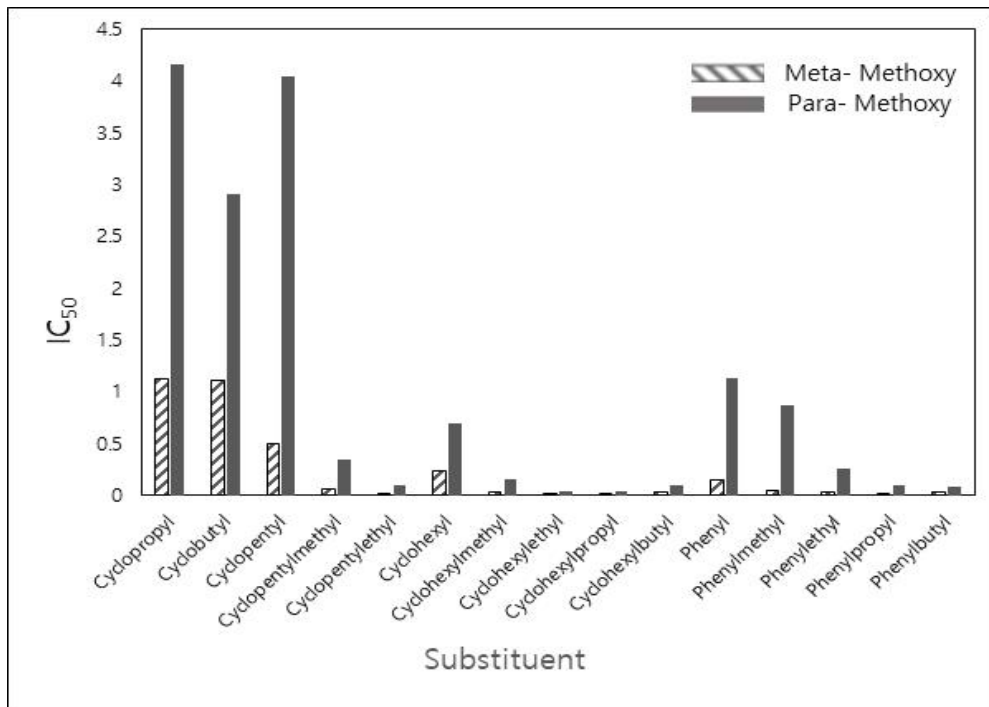
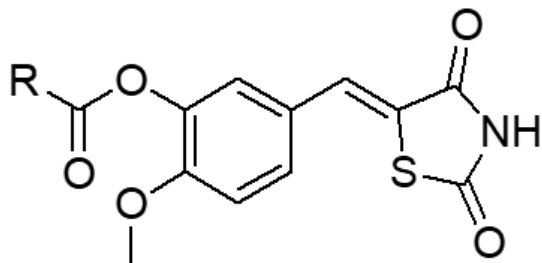


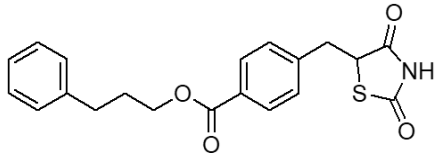
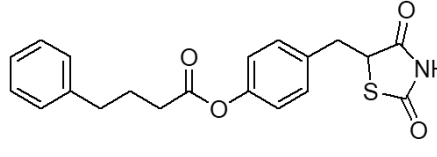
Figure 11. IC₅₀ value ratio according to Methoxy position in the compound

Table 4. Inhibitory potency of compound 19-37


compound	Substitution	15-PGDH scavenging activity
No.	R	(IC ₅₀ , μM)
19	Phenyl	1.1327
20	Phenylmethyl	0.8783
21	Phenylethyl	0.2635
22	Phenylpropyl	0.0920
23	Phenylbutyl	0.0899
24	1-Phenylethyl	1.6800
25	1-Phenylpropyl	2.5761
26	1-methyl-1-Phenylethyl	3.3194
27	Cyclohexyl	0.7037
28	Cyclohexylmethyl	0.1555
29	Cyclohexylethyl	0.0481
30	Cyclohexylpropyl	0.0359
31	Cyclohexylbutyl	0.1030
32	Cyclopentyl	4.0493
33	Cyclopentylmethyl	0.3535
34	Cyclopentylethyl	0.0945
35	Cyclobutyl	2.9118
36	Cyclopropyl	4.1586
37	Thiophnyl	0.7691

화합물 38는 EJ-14 Figure 9.와 같이 연결된 치환기는 모두 동일하지만 중심 Phenyl ring과 2,4-thiazolidinedione이 연결된 이중결합을 단일결합으로 환원시켰으며 중심 Phenyl ring에 연결된 Ester 결합 내의 Carbonyl기와 Oxyzen의 위치가 서로 바뀐 3-phenylpropyl 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl)benzoate를 합성하였다. EJ-14와 비교하였을 때 화합물 38의 IC₅₀ 값이 약 6배 증가로 억제 효능이 확연히 떨어지는 것을 알 수 있었다. 따라서 화합물 내 단일 결합으로의 변화와 방향을 바꿔 합성한 Ester 결합 중 억제 효능 감소에 어떠한 구조 변화가 영향을 주었는지 분석하기 위해 화합물 39를 합성하였다. 화합물 39는 EJ-14에서 2,4-thiazolidinedione이 연결된 이중결합을 단일결합으로 환원시켰으며 다른 구조는 모두 동일한 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl)phenyl 4-phenylbutanoate를 합성하였다. 화합물 39의 IC₅₀ 값은 Table 5.과 같이 1.7329 μM으로 EJ-14보다는 억제 효능이 떨어지지만 화합물 38보다는 높은 활성을 나타내는 것으로 보아 방향을 바꿔 합성한 화합물 내 Ester결합이 15-PGDH 억제 효능 감소에 더 큰 영향을 미치는 것으로 보인다.

Table 5. Inhibitory potency of compound 38, 39

compound No.	Structural formula	15-PGDH scavenging activity (IC ₅₀ , μM)
38		2.9927
39		1.7329

따라서 15-PGDH 억제 효능 실험에서 가장 효과가 좋았던 화합물 12를 분자 역학 시뮬레이션을 통해 NAD^+ - 15-PGDH - PGE_2 복합체에 도킹하여 Figure과 같이 3D model을 나타내었다. 또한 이를 통해 억제제는 15-PGDH의 Ile 214, Ile 210, Ile 194, Gln 148, Leu 191의 다섯 가지 아미노산과 결합하여 15-PGDH를 억제하는 것으로 확인하였다.

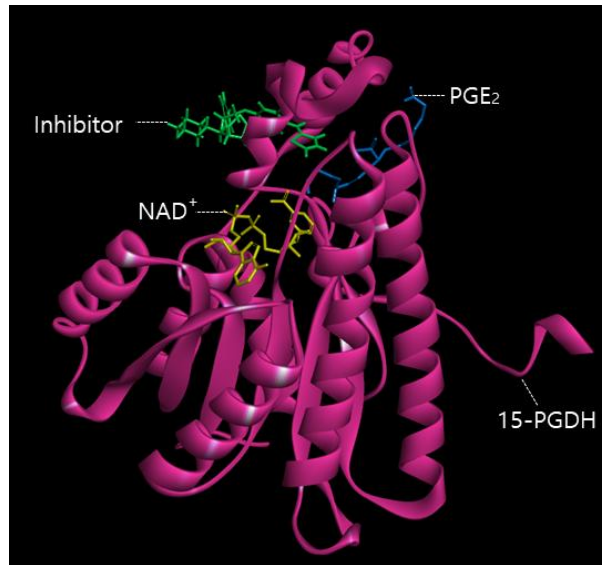


Figure 12. 3D model structure with inhibitor bound to 15-PGDH- NAD^+ - PGE_2 complex

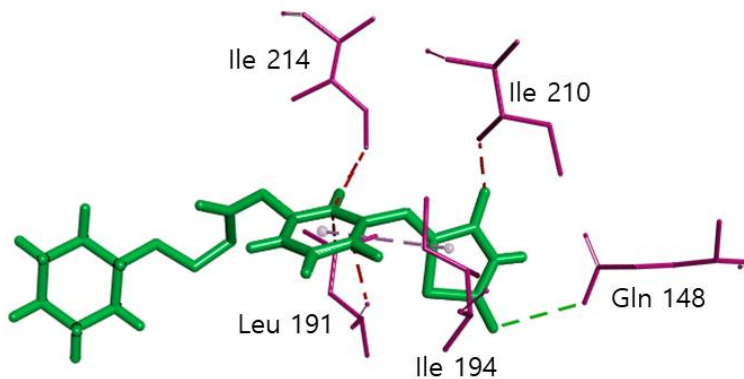


Figure 13. 3D model with detailed binding of 15-PGDH and inhibitor

3.2. Extracellular PGE₂ levels

앞선 실험에서 39개의 억제제들의 15-PGDH 억제 효능 정도를 확인하였으며 이러한 억제제들을 세포에 처리하여 세포 내 PGE₂ 농도 증가가 15-PGDH 억제 효율과 같은 양상을 보이는지 확인하기 위해 Competitive ELISA를 시행하였다.

화합물 1-39의 control 대비 PGE₂ 농도 증가율은 Table 6.7에 표시하였다. 15-PGDH inhibition assay에서 IC₅₀ 값이 상대적으로 높았던 화합물 25, 26, 27의 경우에 각각 -15.125, -33.931, -42.712 %로써 매우 낮은 PGE₂ 농도 증가율을 보였으며 이는 Phenyl 치환기의 1번 탄소에 사슬이 존재하는 화합물들로 두 가지 실험에서 비슷한 양상을 보였다. 하지만 15-PGDH 억제 정도와 PGE₂ 농도 증가율은 완전히 동일한 양상을 보이지는 않았다. 15-PGDH 억제 효능이 가장 좋았던 화합물 12, 30의 경우에 PGE₂ 농도 증가율이 각 9.6792, 13.2472 %로 상대적으로 낮은 결과 값을 나타내었다. 이는 각 화합물에 따른 cell에 대한 투과율 차이와 세포 내 여러 가지 반응에 따른 요인이라 생각된다.

화합물 1-37에서는 4, 22, 23이 각각 122.190, 100.144, 206.801%로 가장 높은 PGE₂ 농도 증가율을 보였다. 또한 중심 Phenyl ring과 2,4-thiazolidinedione이 단일 결합으로 연결된 화합물 38, 39의 경우에 15-PGDH 억제 효능은 상대적으로 좋지 않았지만 PGE₂ 농도 증가율은 106.811, 118.656%로써 높은 결과 값을 나타내었다.

따라서 control 대비 100% 이상의 PGE₂ 농도 증가율을 보이는 4, 22, 23, 38, 39 화합물들을 lead compound (Table 8.)로 선정하였으며 이들 중 화합물 23을 제외하고는 모두 Phenylpropyl 치환기를 지니고 있으며 이는 Ester 결합이 존재하는 화합물에서 Phenylpropyl 치환기는 PGE₂ 농도 증가를 촉진시키는 중요한 구조적 요인이라 판단된다.

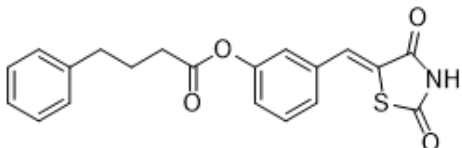
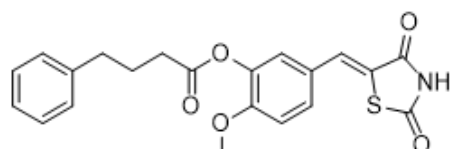
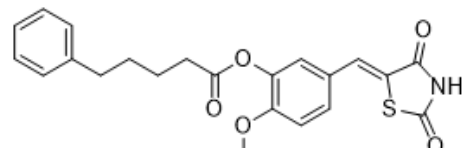
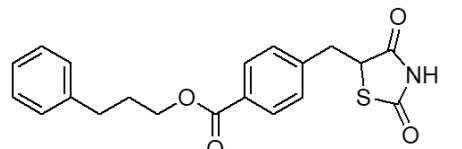
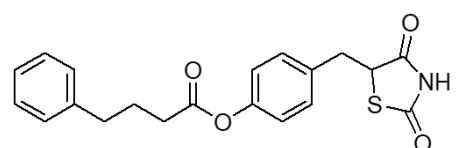
Table 6. Effects of compound 1-18 on PGE₂ release

No. compound	PGE ₂ conc. (pg/ml)		increment (%)
	mean	mean difference	
control	221.482		
1	369.487	148.005	66.825
2	404.756	183.274	82.749
3	240.382	18.900	8.534
4	492.111	270.629	122.190
5	313.753	91.171	41.661
6	345.579	124.097	56.030
7	239.576	18.094	8.169
8	311.789	90.307	40.774
9	314.279	92.797	41.898
10	351.464	129.982	58.688
11	220.654	-0.828	-0.374
12	242.919	21.438	9.679
13	293.452	71.970	32.495
14	317.720	96.238	43.452
15	311.528	91.046	40.656
16	283.338	61.856	27.928
17	320.394	98.912	44.659
18	316.127	94.645	42.733

Table 7. Effects of compound 19-37 on PGE₂ release

No. compound	PGE ₂ conc. (pg/ml)		increment (%)
	mean	mean difference	
control	221.482		
19	292.840	71.358	32.218
20	294.803	73.321	33.105
21	396.479	174.997	79.012
22	443.282	221.800	100.144
23	679.509	458.027	206.801
24	406.390	184.908	83.487
25	187.982	-33.500	-15.125
26	146.331	-75.151	-33.931
27	126.883	-94.599	-42.712
28	245.208	23.726	10.712
29	182.089	-39.393	-17.786
30	250.822	29.340	13.247
31	229.150	7.668	3.462
32	378.136	156.654	70.730
33	440.439	218.957	38.860
34	435.071	213.589	96.437
35	371.431	149.949	67.703
36	368.912	147.430	66.566
37	369.069	147.587	66.636
38	458.050	236.567	106.811
39	484.282	262.800	118.656

Table 8. Lead compound list

compound No.	Structural formula	Increment (%)
4		122.190
22		100.144
23		206.801
38		106.811
39		118.656

3.3. Determination of the wound healing effect

앞선 실험에서 PGE₂ 농도 증가율 100% 이상을 보였던 화합물들을 lead compound로 선정하였고 이들을 HaCaT cell을 이용하여 Wound healing assay를 실시하였다. 이는 억제제로부터의 PGE₂ 농도 증가가 세포 재생에 얼마나 영향을 미치는지 보기 위함으로써 세포에 물리적인 상처를 가한 후 약물을 처리하여 24시간 후 상처 치유효과를 관찰하였다. Figure 14.는 약물을 처리하기 전 (0 hour)과 약물처리 후 (24 hour) 각각 동일한 scratch 부분을 촬영한 사진들이며 약물을 처리하지 않은 negative control과 성장인자인 TGF-β1 을 처리한 positive control을 함께 비교하였다.

Figure 14.의 24 hour 사진들을 비교하였을 때 대부분의 억제제들은 negative control에 비하여 더 높은 회복률을 보였다. 또한 화합물 22와 39의 경우에는 TGF-β1을 처리한 세포보다 눈에 띄게 scratch 너비 간격이 좁아지는 것을 확인하였다.

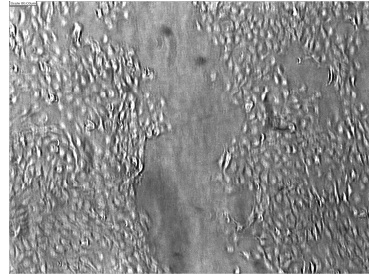
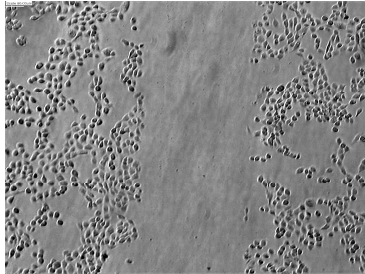
각 억제제의 상처 치유효과를 수치상으로 비교하기 위해 촬영한 사진으로부터 scratch 너비 간격을 3회 반복하여 측정하였으며 측정값들의 평균으로부터 0 hour 대비 좁아진 너비 간격의 차이를 계산하였다. negative control의 회복률을 100%로 보았을 때 억제제들의 회복률을 Table 9.에 나타내었으며 Figure 15.에서 그래프를 통해 비교하였다.

화합물 23을 제외한 모든 화합물들은 TGF-β1보다 높은 회복률을 보였으며 이들은 공통적으로 Phenylpropyl 치환기를 지니고 있어 PGE₂ 농도 증가율과 동일한 양상을 보였다. 또한 화합물 22와 39는 200% 이상의 가장 높은 회복률을 보였다.

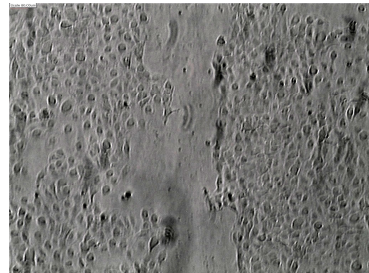
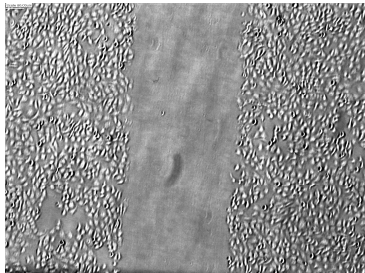
0 hour

24 hour

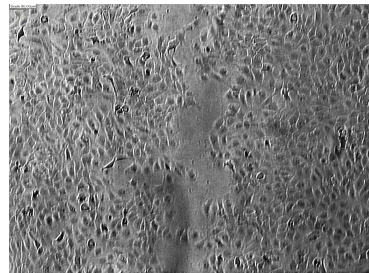
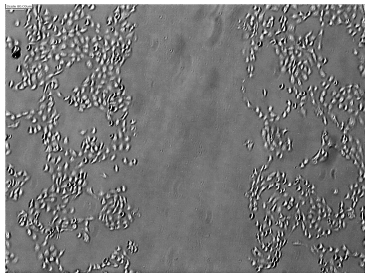
control



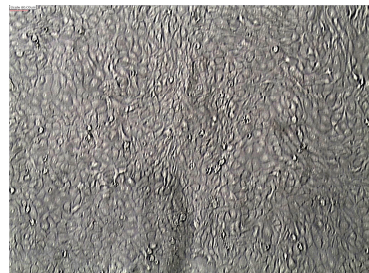
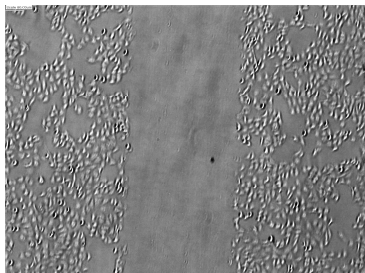
TGF-β1



compound
4



compound
22



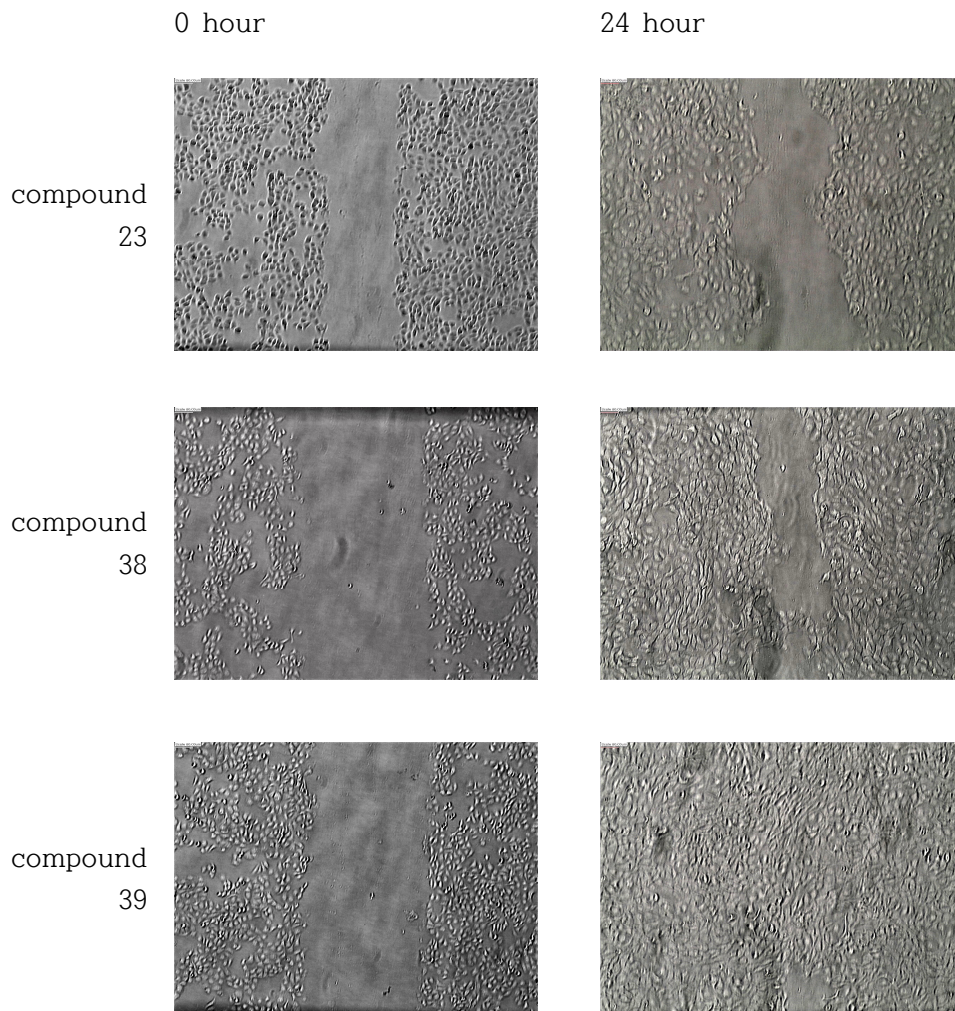


Figure 14. Fluorescent microscope image to evaluate wound healing *in vitro* in the scratch assay using a confluent monolayer of HaCaT keratinocytes.

Table 9. Wound closure rate of lead compounds

No.	Width of the wound area (μm)		Wound closure rate (%)
	Immediately after the wounding	after 24hours incubation	
Control	1138.178	410.009	100.000
TGF-β1	1117.154	549.874	138.358
4	1132.817	525.304	148.171
22	1068.041	84.703	247.559
23	858.068	501.108	87.062
38	1179.436	463.047	174.725
39	1086.903	256.960	202.421

Wound closure rate (%) = ((average width of the initial wound - average width of the after 24hours incubation) / mean difference of negative control) × 100

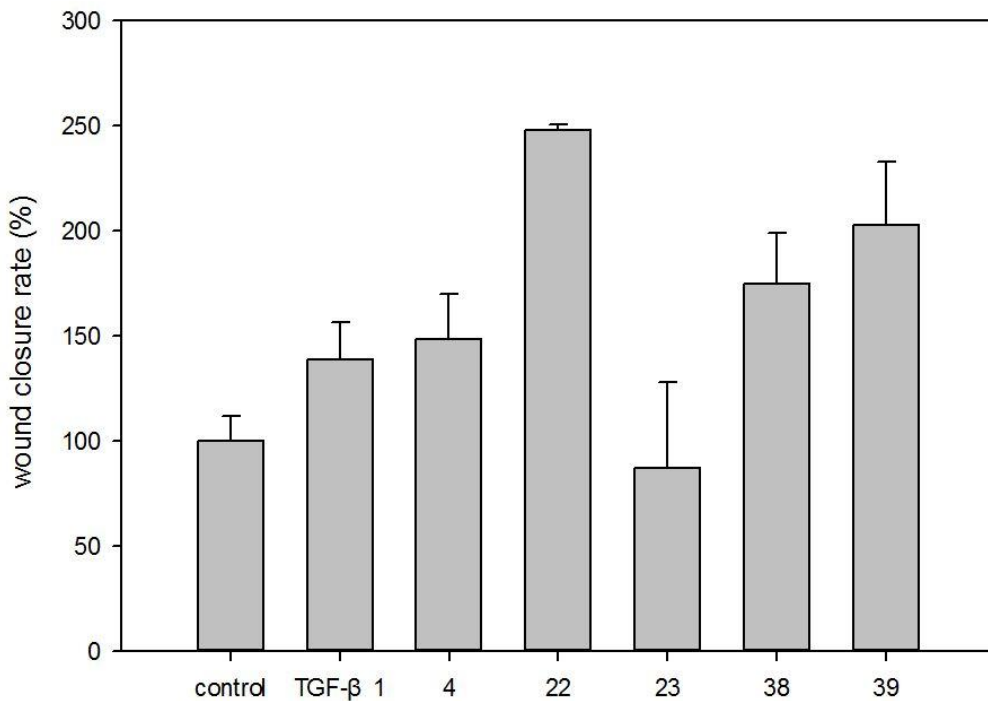


Figure 15. wound closure rate of lead compounds

4. Conclusion

생체 내 PGE₂는 염증 반응을 매개하며 상처 치유 회복을 향상시키는 Prostaglandin 중 하나로서 Arachidonic acid로부터 COX 효소에 의해 생성된다. 하지만 PGE₂는 NAD⁺의 존성 15-PGDH에 의해 빠르게 산화되어 생체 내에서 짧은 반감기를 가진다. 따라서 15-PGDH를 억제하여 생체 내 PGE₂ 농도를 증가시키는 약물 중 가장 효과가 좋았던 TD203을 기준으로 ((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 유도체를 합성하였다. 화합물 1-17은 TD203에서 중심 Phenyl ring의 para 위치에 존재한 Ester 결합을 meta 위치에서 합성하여 완성하였으며 18-37의 화합물은 TD203의 Methoxy기와 Ester 결합을 맞바꾼 구조로 합성하였다. 이들의 15-PGDH 억제 효능 측정 결과 두 유도체 모두 TD203과 치환기에 따른 IC₅₀ 값에서 동일한 경향성을 보였다. Phenyl 치환기에서는 phenyl < phenylmethyl < phenylethyl < phenylpropyl < phenylbutyl 순으로 IC₅₀ 값이 감소하였으며 이는 치환기의 -CH₂- 그룹이 증가할수록 억제 효능이 증가함을 확인하였다. 또한 Phenyl 치환기를 연결하는 탄소 사슬에 1-2개의 methyl, ethyl이 존재하면 IC₅₀ 값이 확연히 떨어짐으로써 이는 억제제가 15-PGDH binding site에 결합하는데 있어 방해요인으로 작용한다는 것을 알 수 있다. Cyclohexyl 치환기도 마찬가지로 지방족 사슬이 증가할수록 높은 억제 효능을 보였지만 Cyclohexylbutyl기에서는 오히려 억제 효능이 떨어짐을 보였다. Cyclo 치환기의 고리 크기에 따라서는 cyclopropyl < cyclobutyl < cyclopentyl < cyclohexyl 순으로 고리의 크기가 커질수록 억제 효능이 증가하였으며 두 유도체 모두 Cyclohexylpropyl 치환기에서 가장 좋은 억제 효능을 보였다.

화합물 38, 39는 각각 방향을 반대로 바꿔 합성한 Ester 결합과 기존의 Ester결합이 존재하며 두 화합물 모두 2,4-thiazolidinedione이 연결된 이중결합을 단일결합으로 환원시켰다. 이들의 15-PGDH 억제 효능은 확연히 떨어짐을 보였으나 화합물 38과 39를 비교하였을 때 화합물 내 방향을 바꿔 합성한 Ester결합이 15-PGDH 억제 효능 감소에 더 큰 영향을 미치는 것으로 보인다.

세포 내 PGE₂ 농도 측정 실험에서는 각 화합물의 15-PGDH 억제 정도와 완전히 동일한 양상을 보이지는 않았다. 이는 각 화합물에 따른 cell에 대한 투과율 차이와 세포 내 여러 가지 반응에 따른 요인이라 생각된다. Control 대비 100% 이상의 PGE₂ 농도 증가율을 보이는 4, 22, 23, 38, 39 화합물들을 lead compound로 선정하였으며 이들 모두 negative control보다 높은 Wound closure rate를 보였다. 또한 화합물 23을 제외한 4,

22, 38, 39 모두 Phenylpropyl 치환기를 지니고 있으며 positive control인 TGF- β 1보다 높은 상처 치유 회복율을 보였다. 이는 Ester 결합이 존재하는 화합물에서 Phenylpropyl 치환기는 PGE₂ 농도 증가를 촉진시키는 중요한 구조적 요인이라 판단된다. 또한 2,4-thiazolidinedione이 연결된 탄소사슬을 단일 결합으로 바꿔 더 높은 상처 치유 효율을 보인 38, 39 화합물을 통해 앞으로의 연구에서 이들은 새로운 유도체 개발의 출발점이 될 수 있음을 보여준다.

따라서 본 연구에서 개발한 TD 계열 유도체들은 15-PGDH를 억제함으로써 생체 내 빠른 PGE₂ 분해를 막아 정상적인 상처 치유 회복에 도움을 줄 수 있으며 PGE₂의 결핍으로 발생하는 여러 질병 및 합병증 치료에서도 긍정적인 효과를 가져 올 것이다.

References

1. Martin, P. Wound healing — aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75–81 (1997).
2. Diegelmann, RF, Evans, MC: Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004; 1: 283–289.
3. Emanuela Ricciotti, PhD. Garret A. FitzGerald, MD. “Prostaglandins and Inflammation” *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(5) 986–1000. (2011)
4. Catherine A. Loynes¹, Jou A. Lee¹, Anne L. Robertson², Michael JG. Steel¹, Felix Ellett³, Yi Feng⁴, Bruce D. Levy⁵, Moira K Whyte⁴, Stephen A. Renshaw¹ “PGE₂ production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo.” *bioRxiv preprint first posted online Oct. 19, 2017*
5. Emanuela Ricciotti, PhD. Garret A. FitzGerald, MD. “Prostaglandins and Inflammation” *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(5) 986–1000. (2011)
6. Antczak MI, Zhang Y, Wang C, et al. Inhibitors of 15-prostaglandin dehydrogenase to potentiate tissue repair. *J Med Chem.* 2017;60(9):3979–4001.
7. Samuelsson, B., Morgenstern, R. & Jakobsson, P.J. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol. Rev.* 59, 207–224 (2007).
8. 74.K. Kawahara, H. Hohjoh, T. Inazumi, S. Tsuchiya, and Y. Sugimoto, “Prostaglandin E₂-induced inflammation: relevance of prostaglandin e receptors,” *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1851, no. 4, pp. 414–421, 2015.

9. Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep.* 2007;59:247–58.
10. S. Otsuka M.D.yz, T. Aoyama M.D., Ph.D.y, M. Furu M.D.yx, K. Ito M.D.yz, Y. Jin M.D.y,A. Nasu M.D.yx, K. Fukiage M.D.yx, Y. Kohno M.D., Ph.D.yx, T. Maruyama Ph.D.k, T. Kanajik, A. Nishiura Ph.D.k, H. Sugiharak, S. Fujimurak, T. Otsuka M.D., Ph.D.z, T. Nakamura M.D., Ph.D.x and J. Toguchida M.D., Ph.D.y PGE₂ signal via EP2 receptors evoked by a selective agonist enhances regeneration of injured articular cartilage Osteoarthritis and Cartilage (2009) 17, 529e538 ^a 2008
11. Carlo Chizzolini and Nicolo ` C Brembilla “Prostaglandin E2: igniting the fire” *Immunology and Cell Biology* (2009) 87, 510–511
12. Utako Yokoyama, Kousaku Iwatsubo, Masanari Umemura, Takayuki Fujita, and Yoshihiro Ishikawa “The Prostanoid EP4 Receptor and Its Signaling Pathway” *Pharmacol Rev* 65:1010–1052, July 2013
13. Charles Mark Ensor, Hsin-Hsiung Tai Bacterial expression and site-directmutagenesis of two critical residues (tyrosine-151 and lysine-155) of human placental NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase *Biochimica et Biophysica Acta* 1208 (1994) 151-156
14. A. Hamza, H. Cho, H.-H. Tai, C.-G. Zhan Understanding human 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase binding with NAD⁺ and PGE₂ by homology modeling, docking and molecular dynamics simulation. *Bioorg. Med. Chem.*, 109 (2005), pp. 4776-4782
15. Cho, H. et al. Role of glutamine 148 of human 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in catalytic oxidation of prostaglandin E₂. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 6486–6491 (2006).
16. Wu, Y.; Tai, H.-H.; Cho, H. Synthesis and SAR of thiazolidinedione derivatives as 15-PGDH inhibitors *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 1428– 1433

17. Choi, D., Piao, Y.L., Wu, Y., Cho, H. Control of the intracellular levels of prostaglandin E₂ through inhibition of the 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase for wound healing. *Bioorg. Med. Chem.* 2013;21:4477-4484.

18. Y. Wu, S. Karna, C.H. Choi, M. Tong, H.-H. Tai, D.H. Na, et al. Synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinedione analogues as 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase inhibitors. *J Med Chem*, 54 (2011), pp. 5260-5264

19. Exported 2017/2/28 from SnapGene 2.3.2 <http://www.snapgene.com>]

20. Reynolds JA, Charles Tanford (1970). "Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 66 (3): 1002

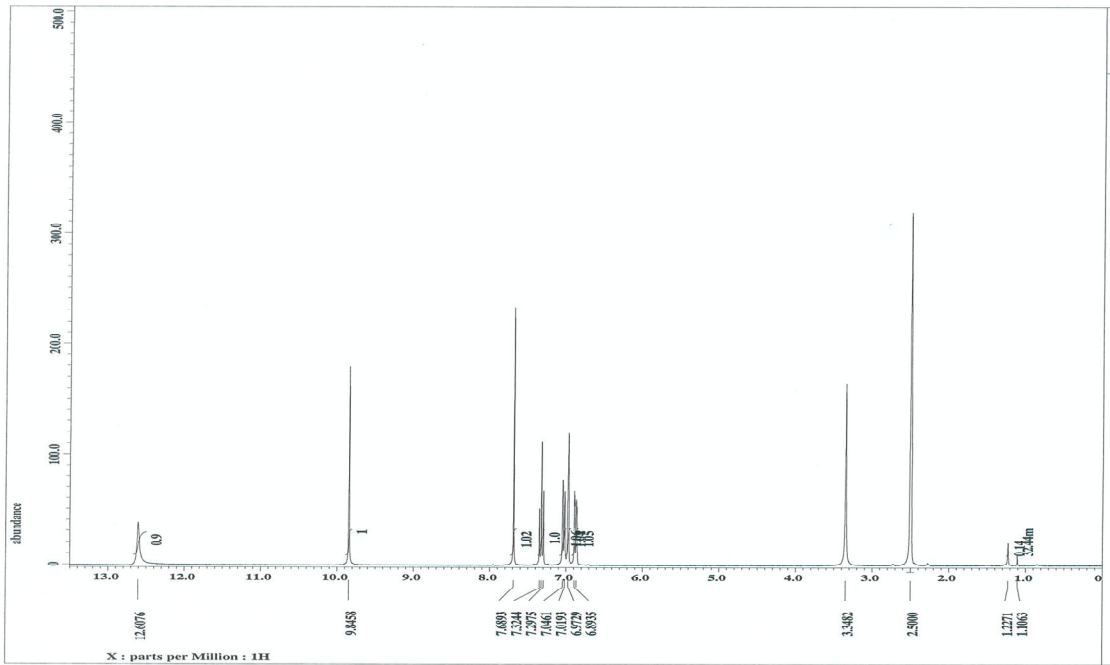
21. Huiping Zhou, Fengxiang Yan and Hsin-Hsiung Tai. C-Terminal region of human NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is involved in the interaction with prostaglandin substrates. *Eur. J. Biochem.* 268, 3368-3374.

22. Raji Sundararajan, Therese Salameh, Ignacio G. Camarillo, R. Raja Prabu, Arutselvan Natarajan, Kavitha Sankaranarayanan. 10-Irreversible electroporation; a drug-free cancer treatment. *Electroporation-Based Therapies for Cancer 2014*, pages 219-243

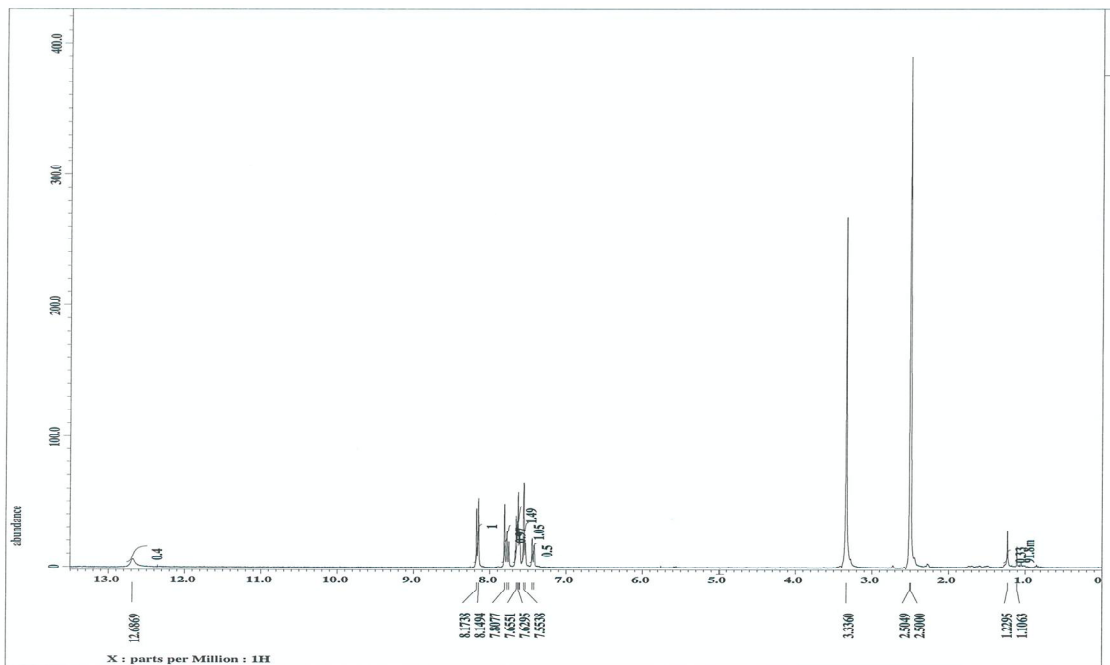
23. Boukamp, Petra; Petrussevska, Rule T.; Breitkreutz, Dirk; Hornung, Jiirgen; Markham, Alex; Fusenig, Norbert E. (March 1988). "Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line". *The Journal of Cell Biology.* 106 (3): 761-771.

24. Eunjeong Yoon, Synthesis and activity evaluation of 2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene derivatives for regulating intracellular concentration of PGE₂, master's thesis, Chosun university, 2016. 2 ,80p -45

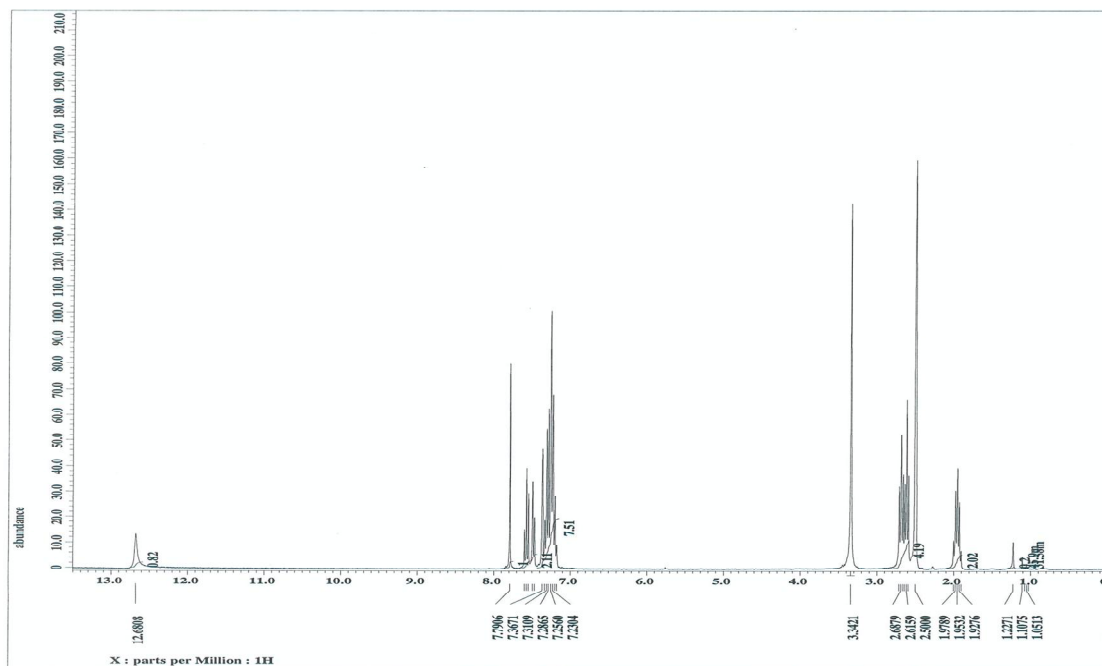
^1H NMR Spectra



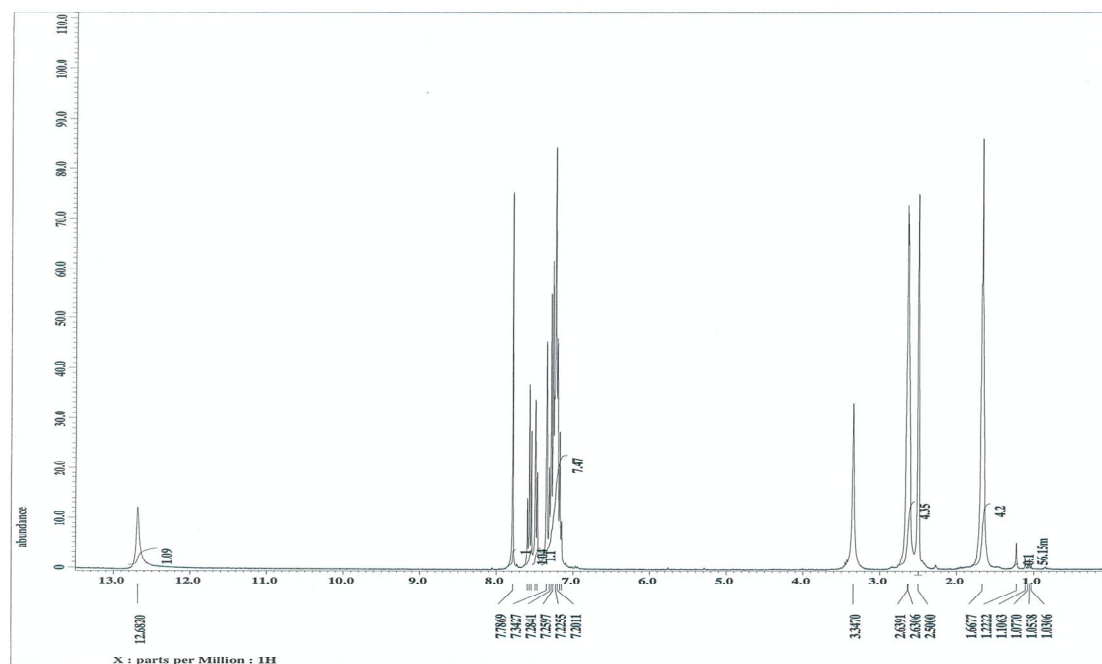
5-(3-Hydroxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (a)



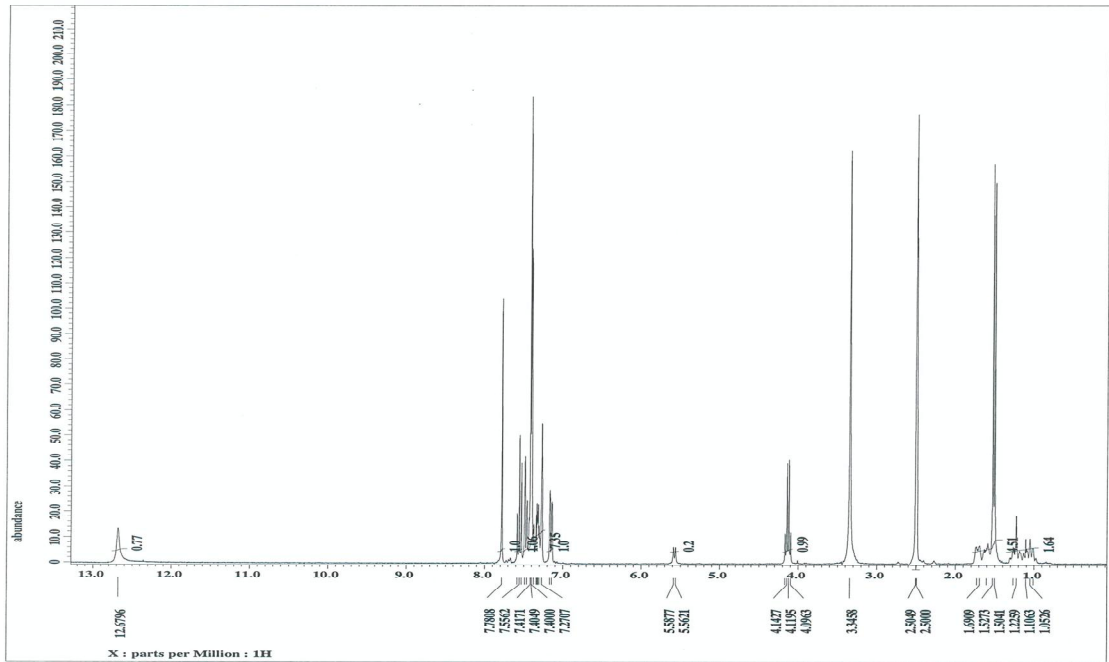
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl benzoate (1)



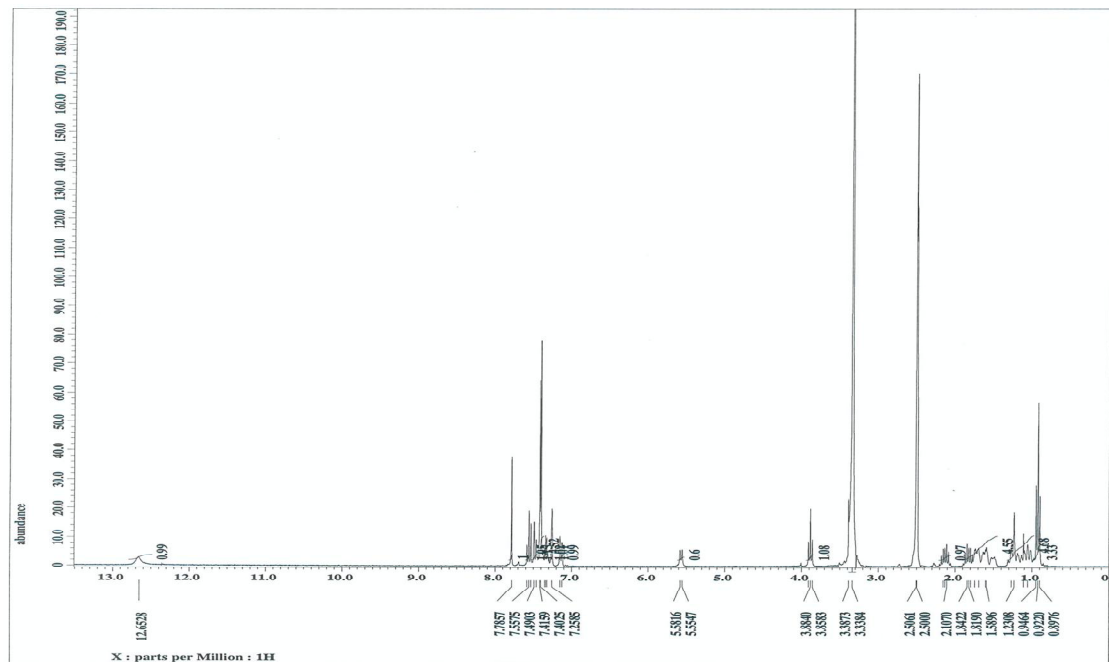
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 4-phenylpentanoate (4)



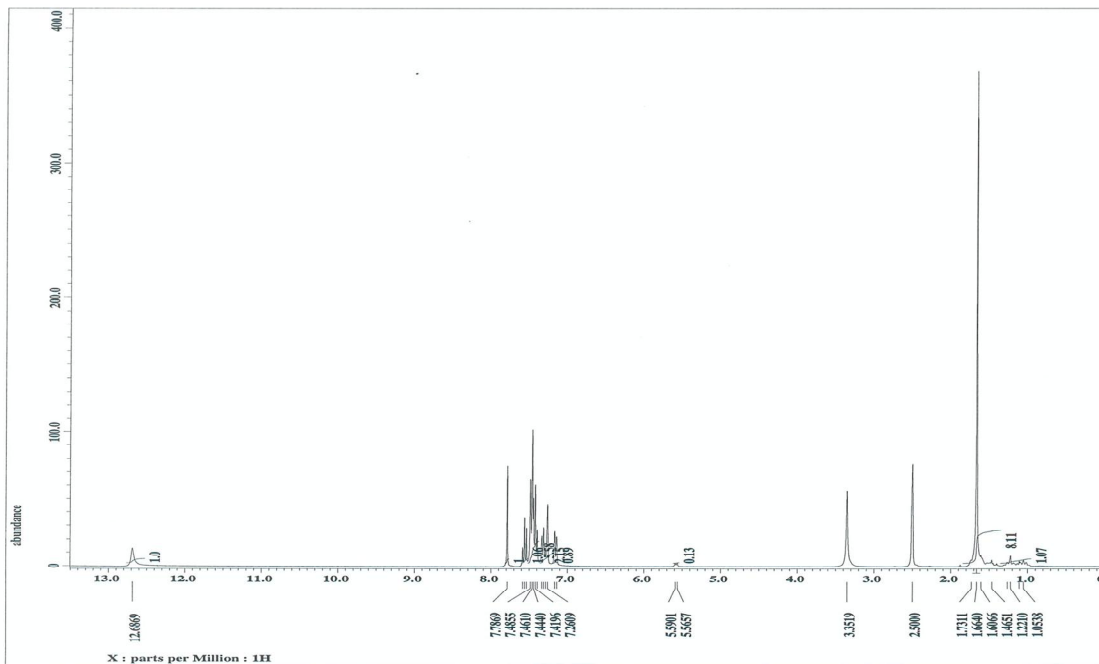
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 5-phenylpentanoate (5)



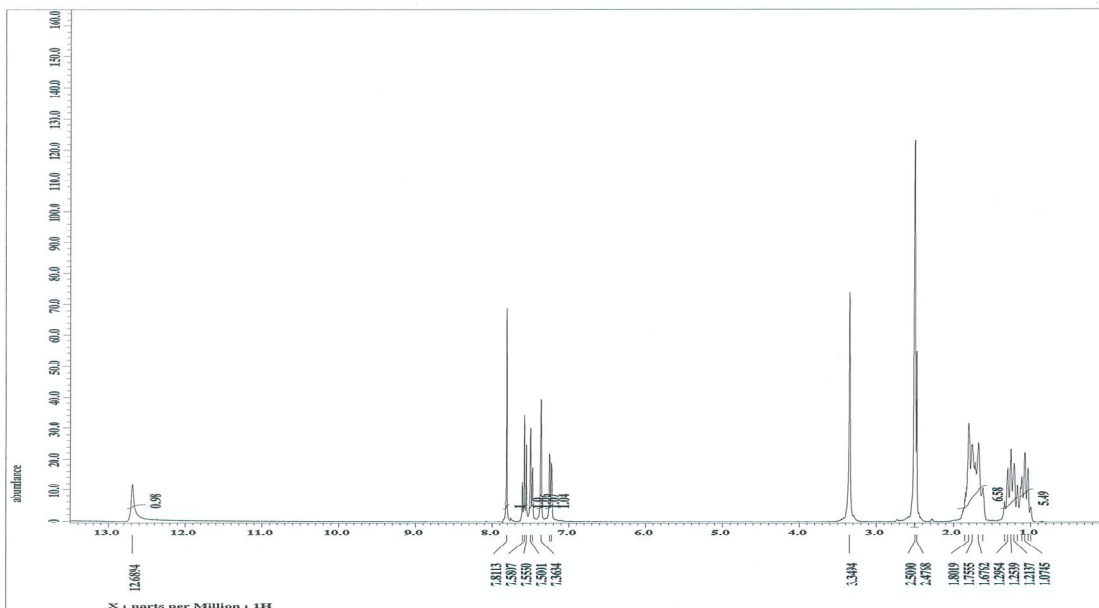
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-phenylpropanoate (6)



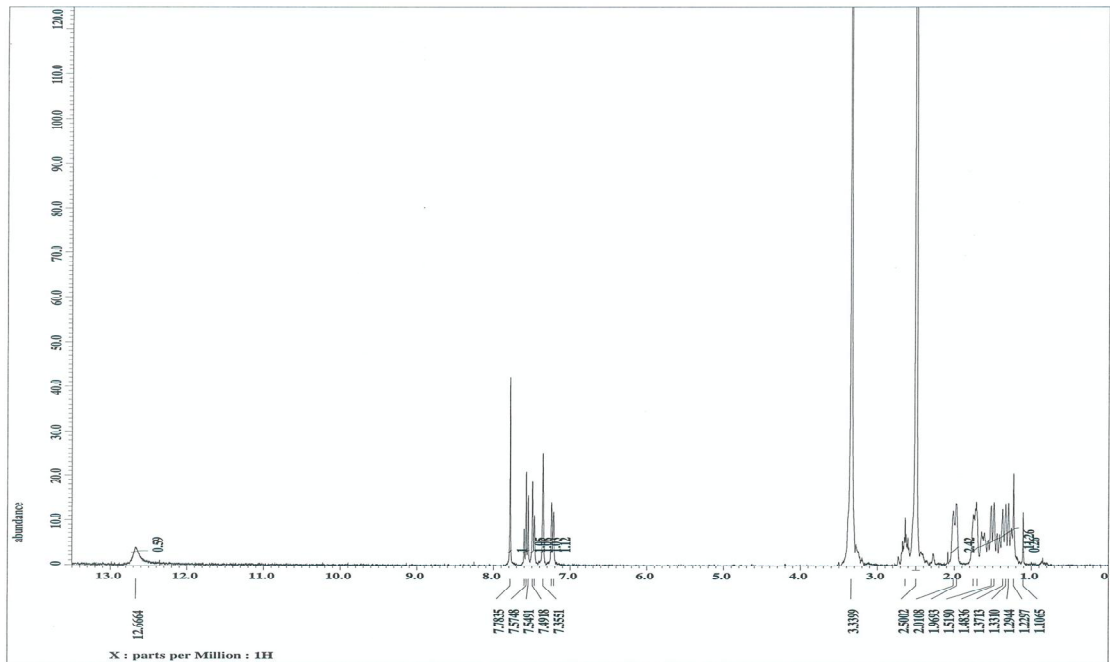
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-phenylbutanoate (7)



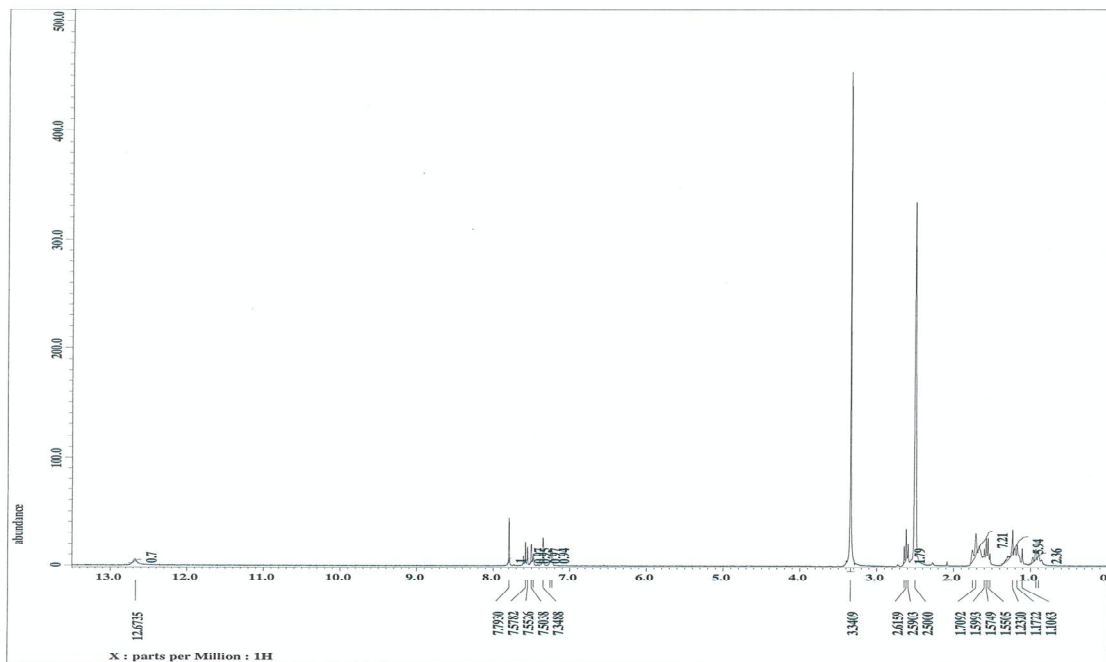
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-methyl-2-phenylpropanoate (8)



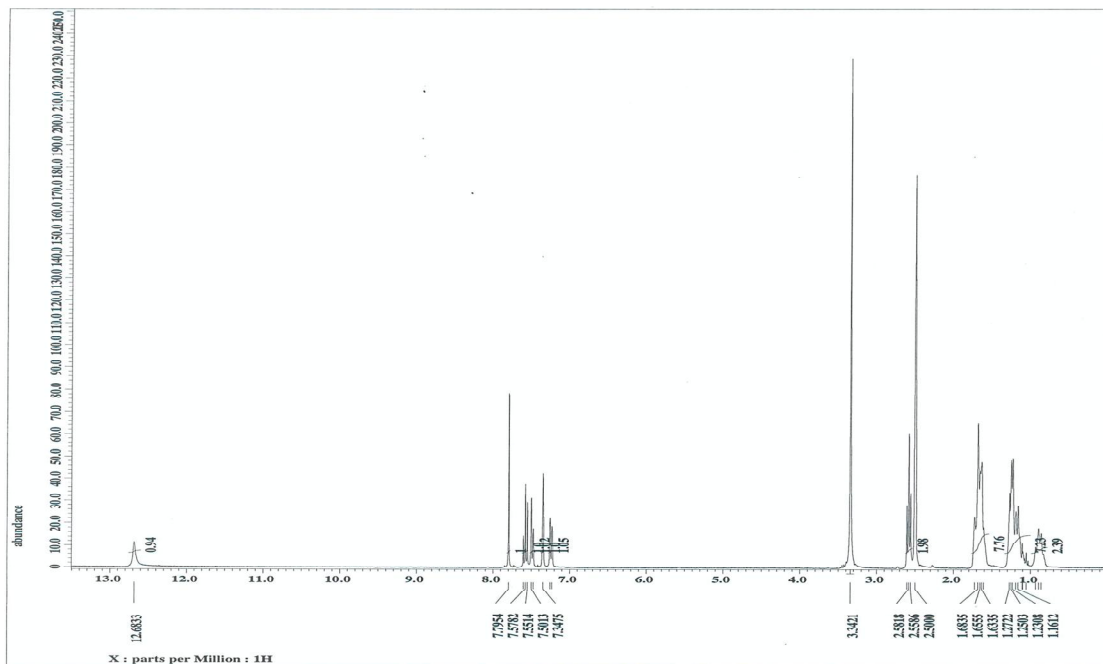
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl cyclohexanecarboxylate (9)



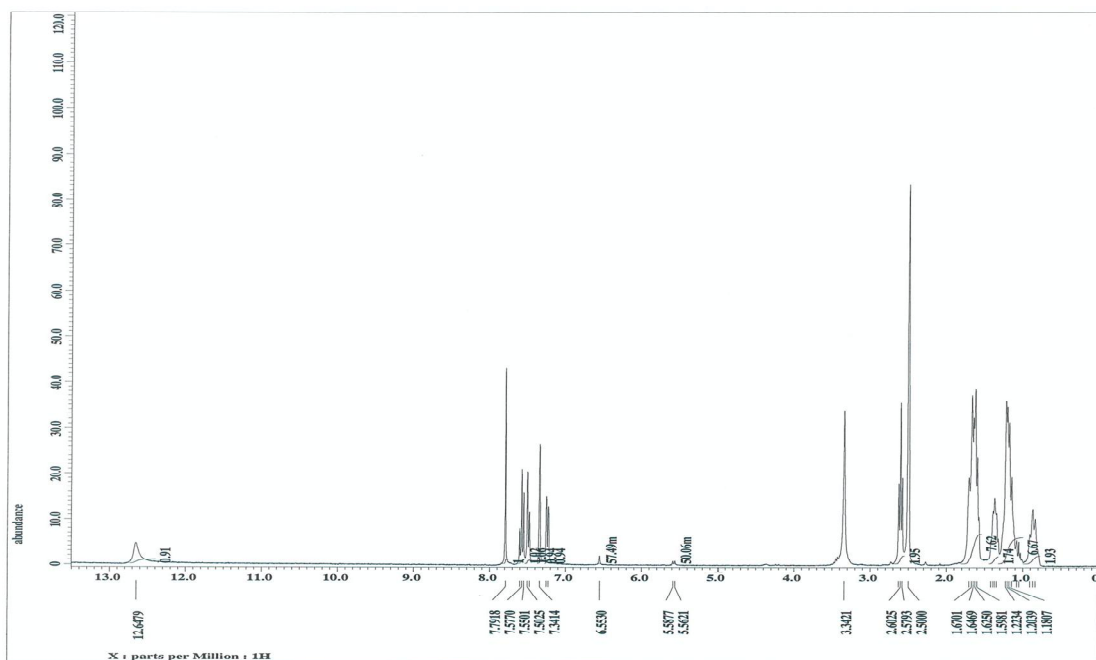
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 2-cyclohexylacetate (10)



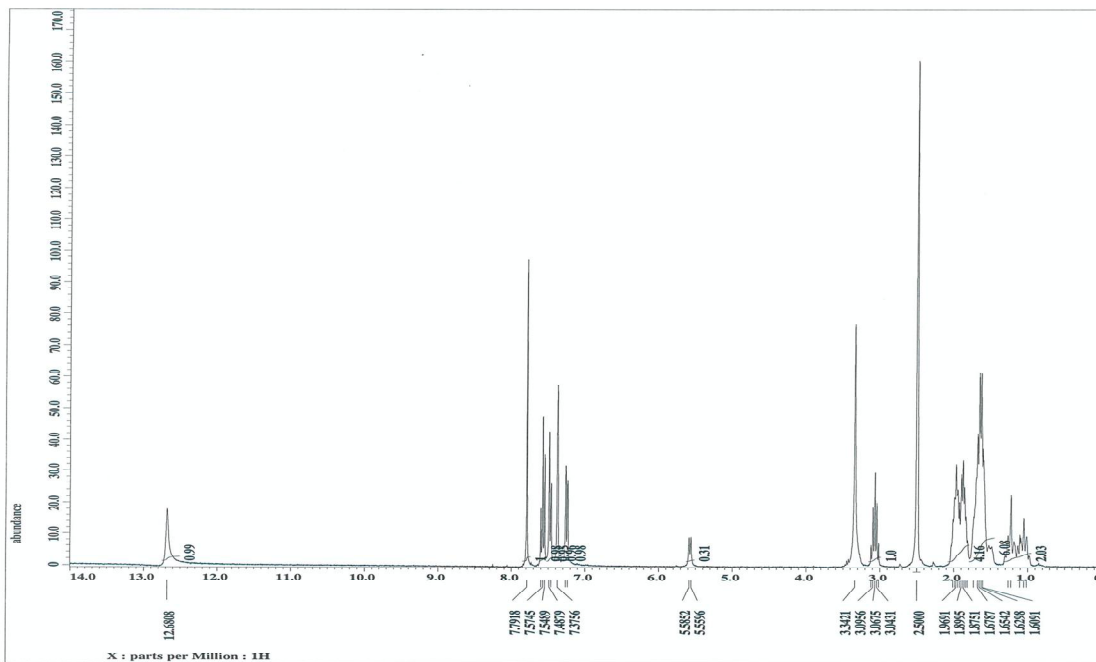
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 3-cyclohexylpropanoate (11)



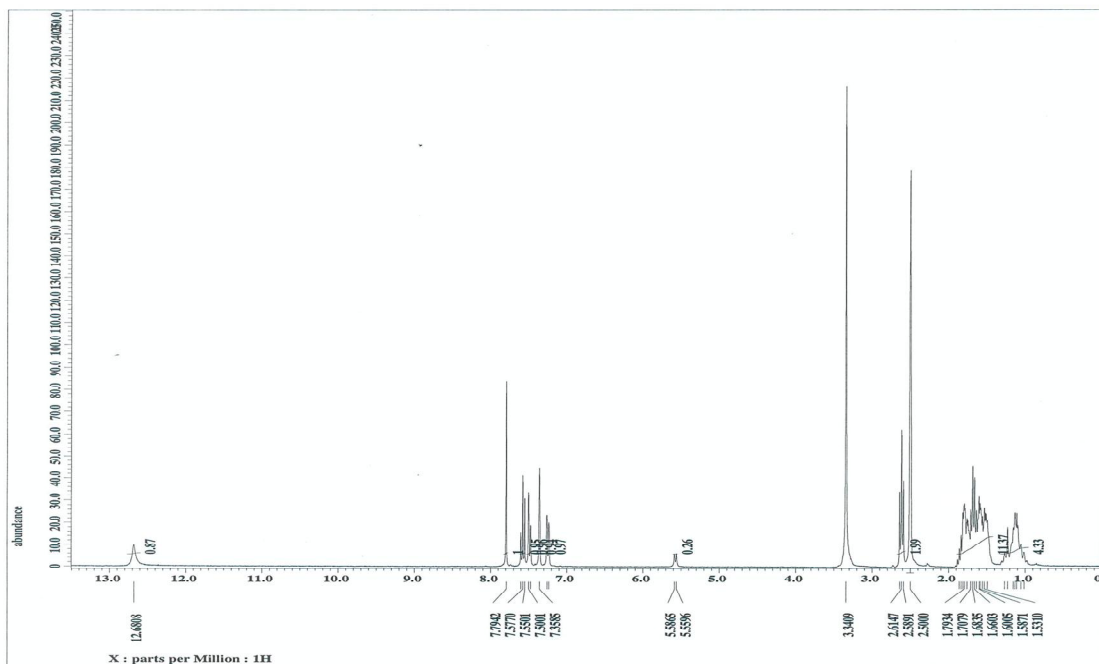
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 4-cyclohexylbutanoate (12)



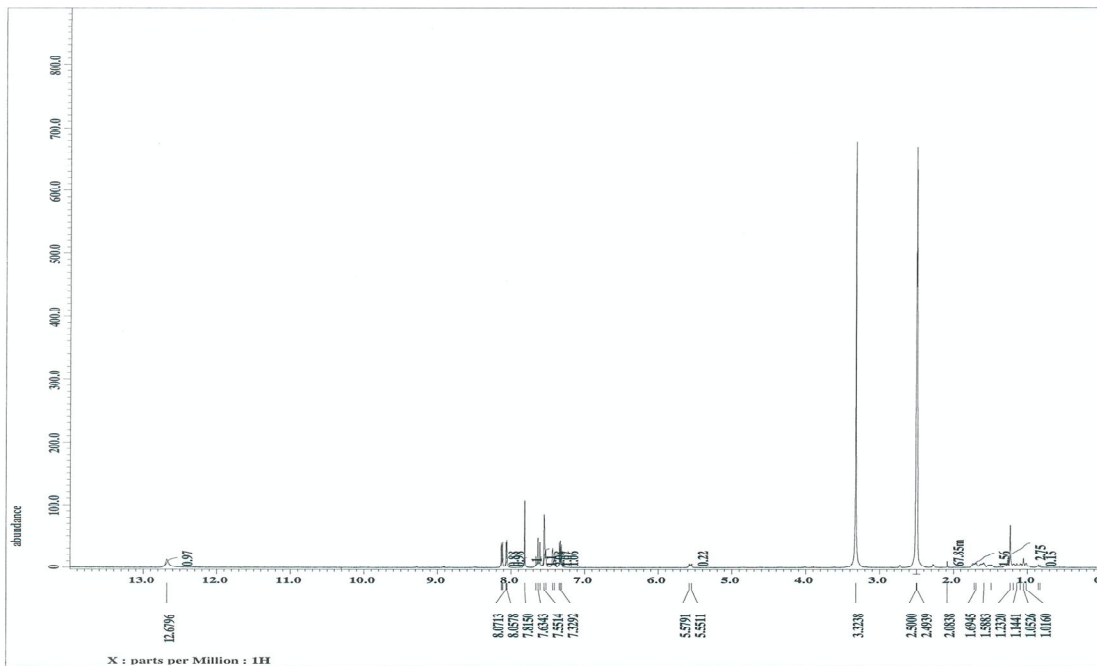
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 5-cyclohexylpentanoate (13)



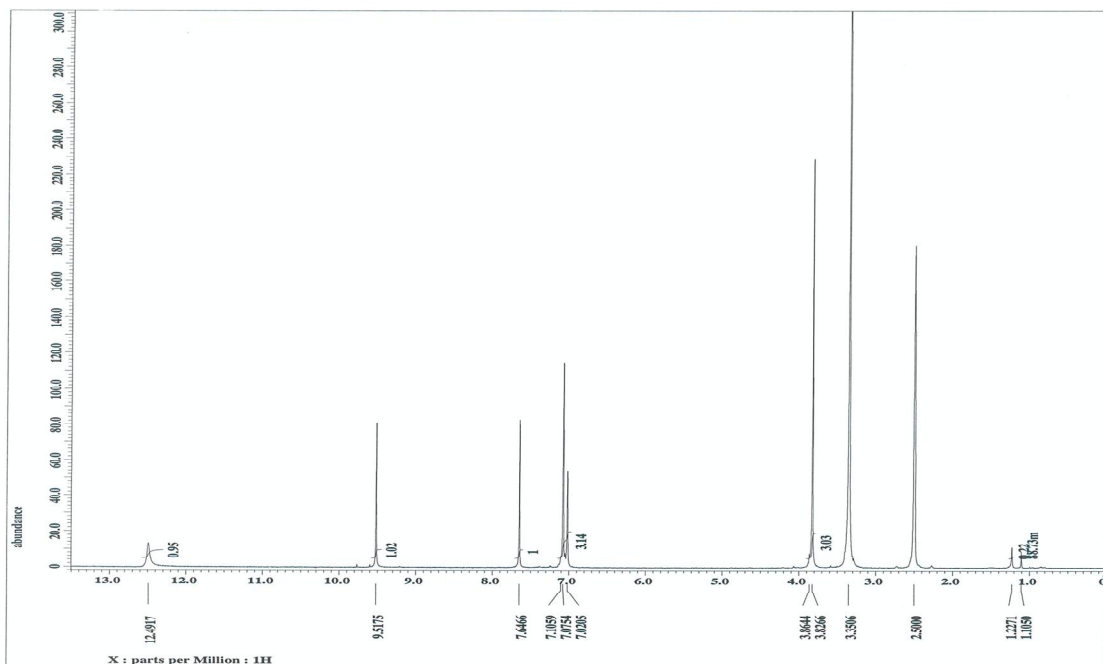
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl cyclopentanecarboxylate (14)



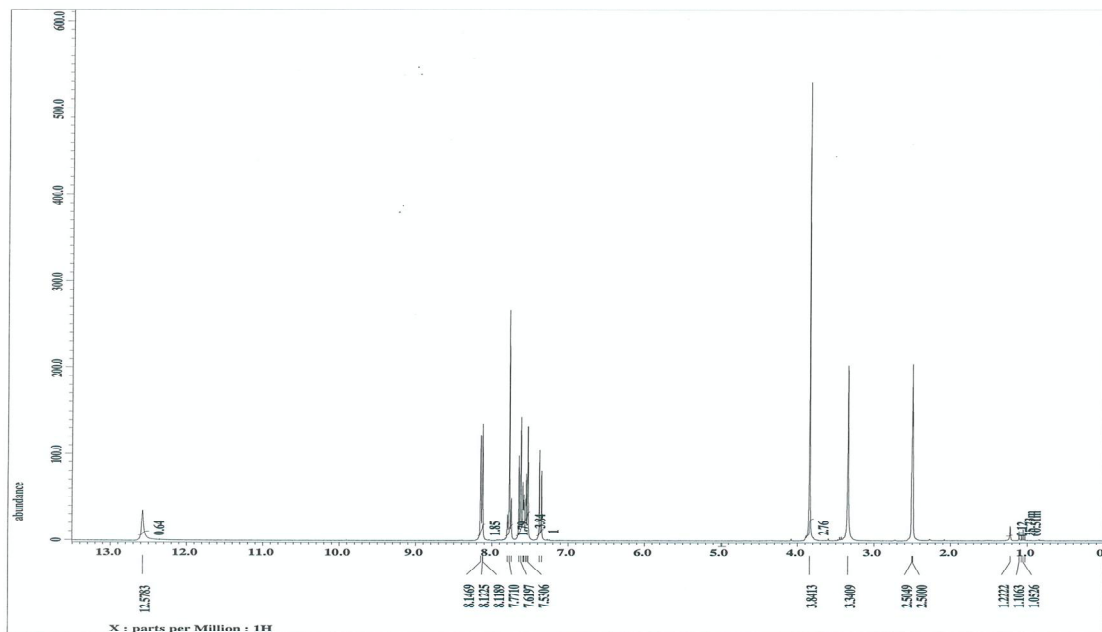
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl 3-cyclopentylpropanoate (15)



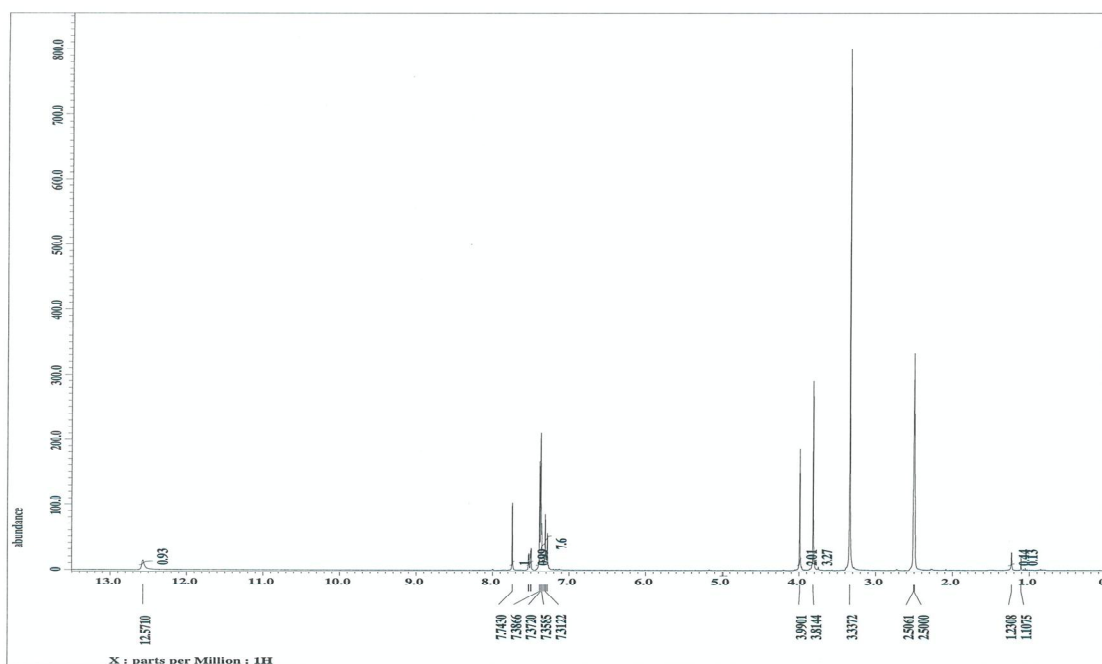
(Z)-3-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl thiophene-2-carboxylate (18)



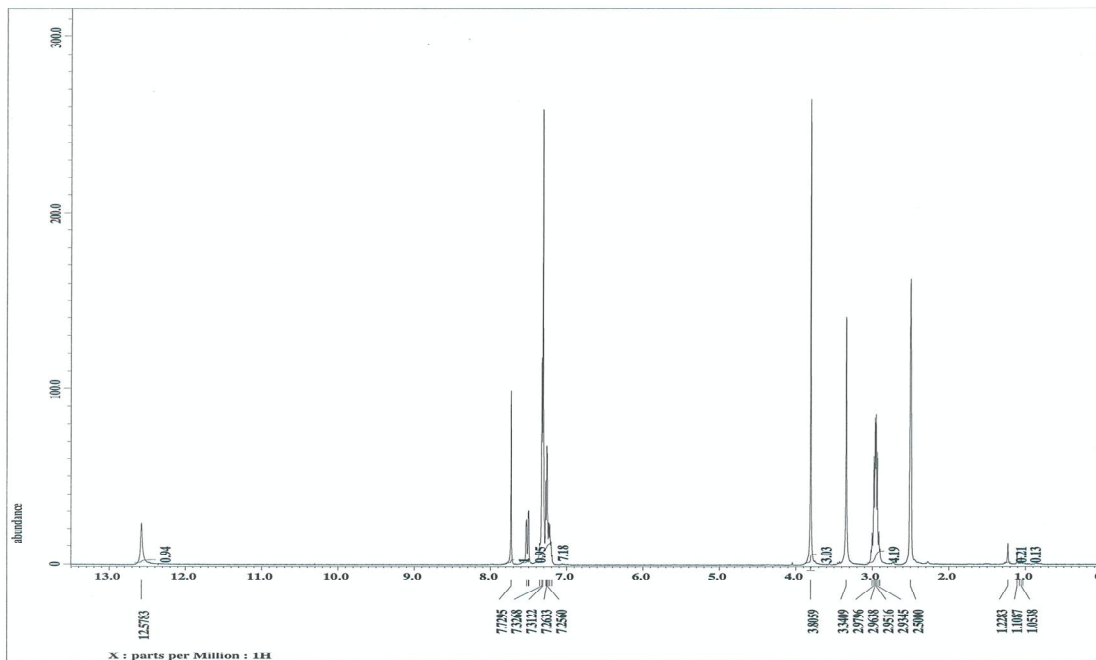
5-(3-Hydroxy-4-methoxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (b)



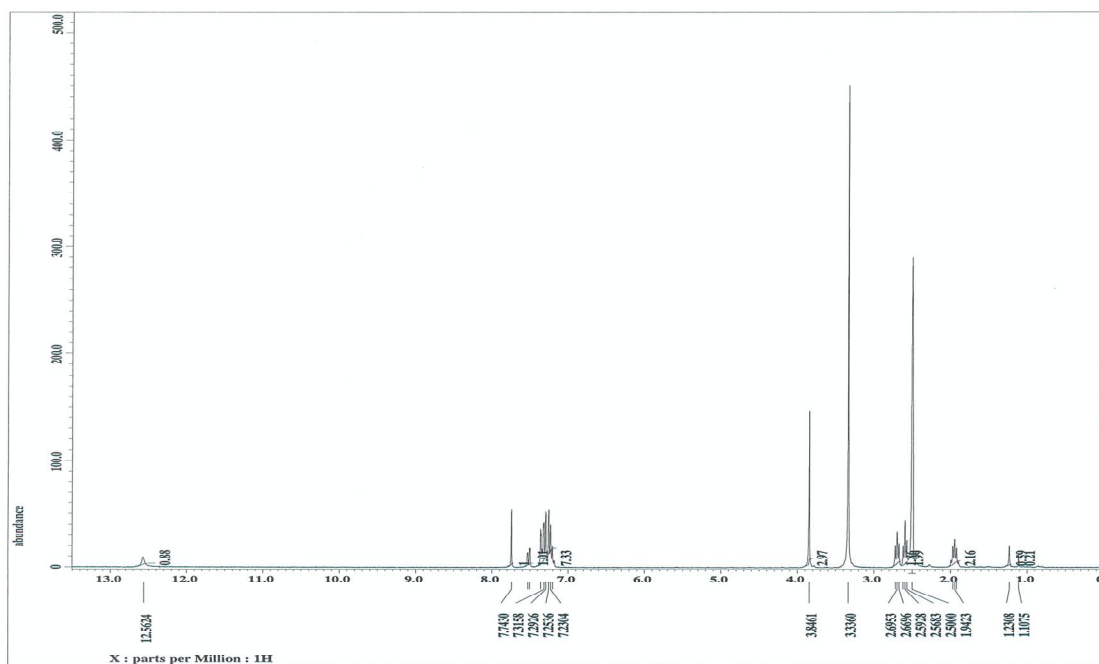
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl benzoate (19)



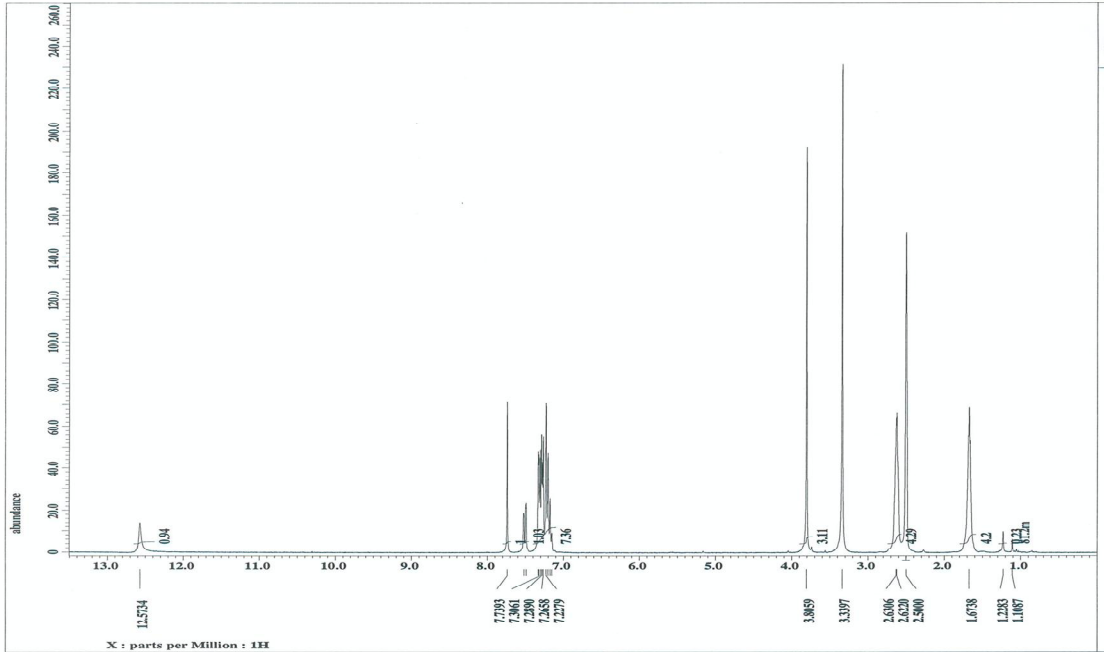
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-phenylacetate (20)



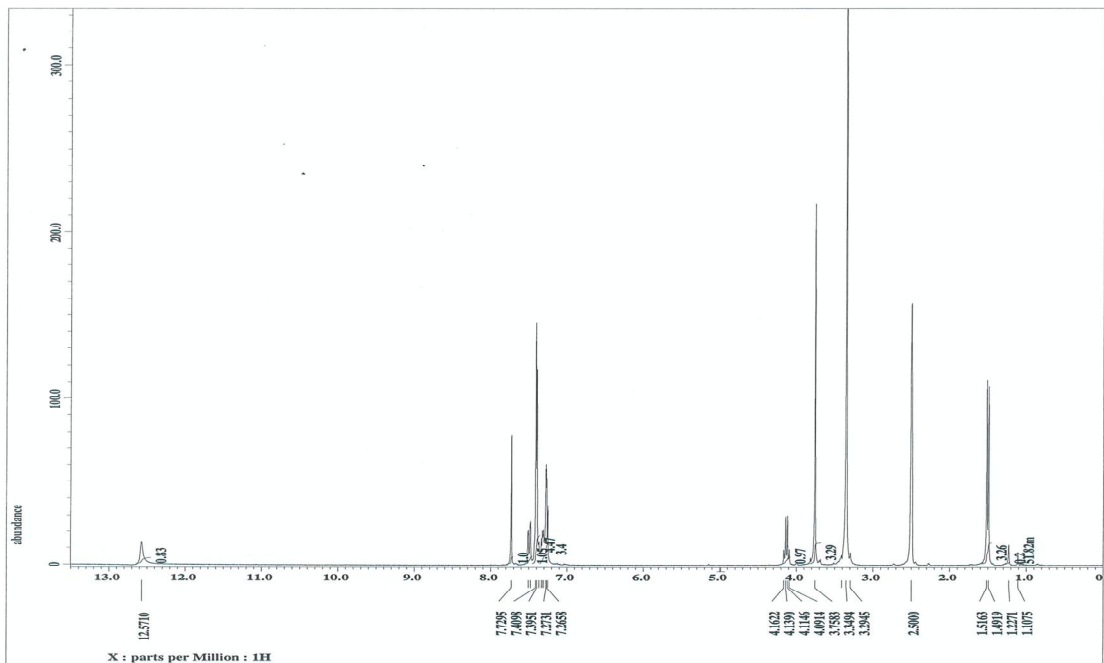
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 3-phenylpropanoate (21)



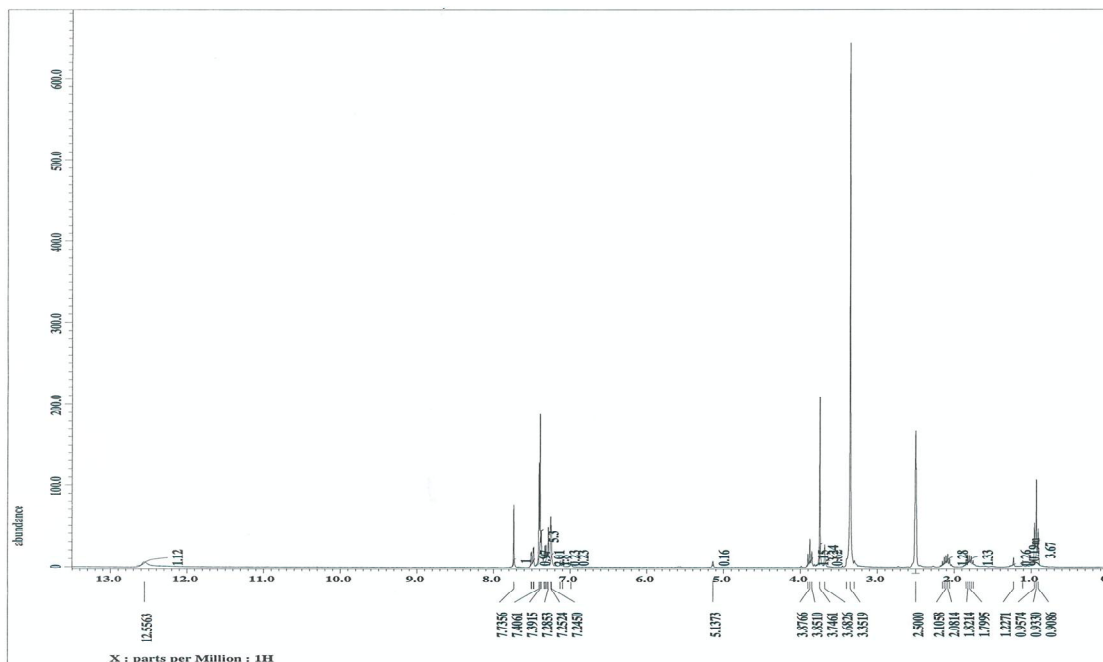
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 4-phenylbutanoate (22)



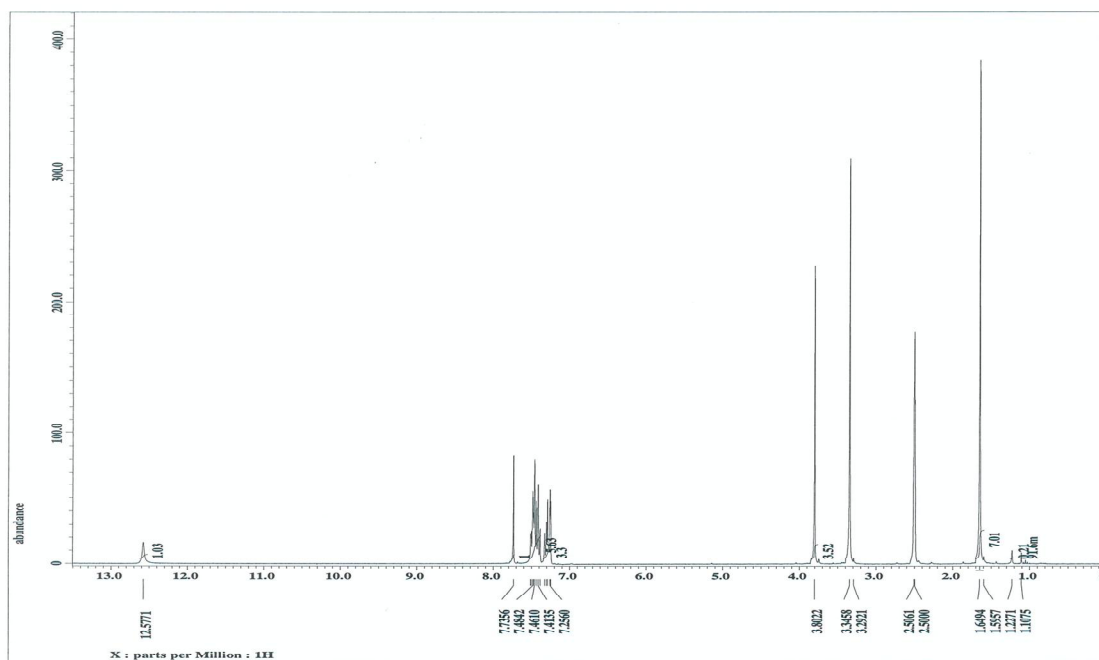
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 5-phenylpentanoate (23)



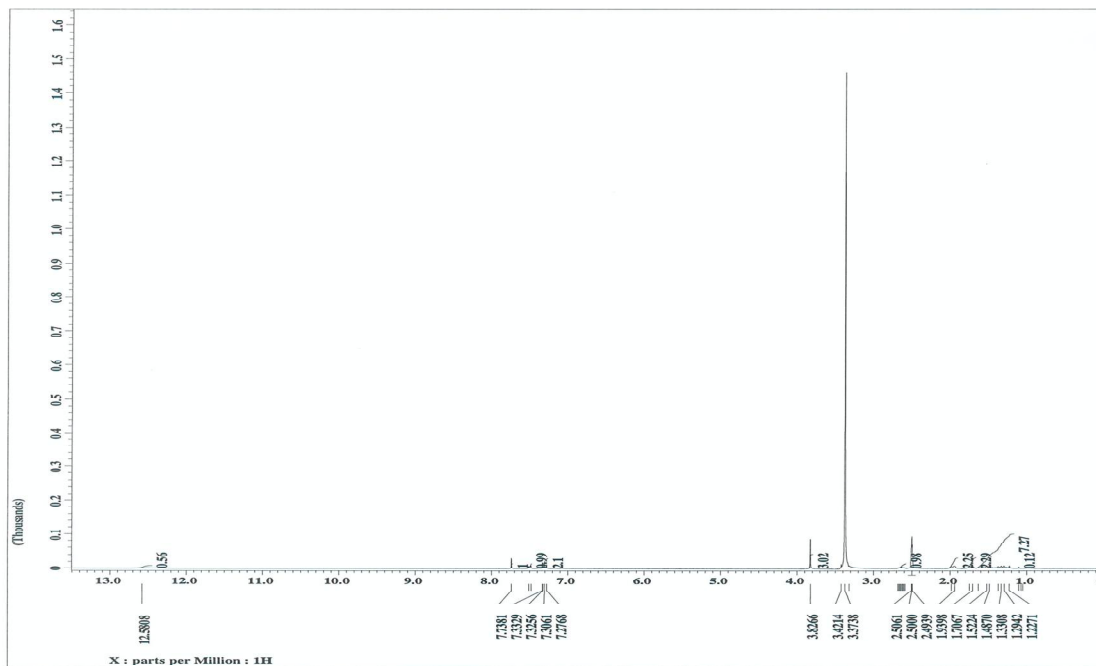
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-phenylpropanoate (24)



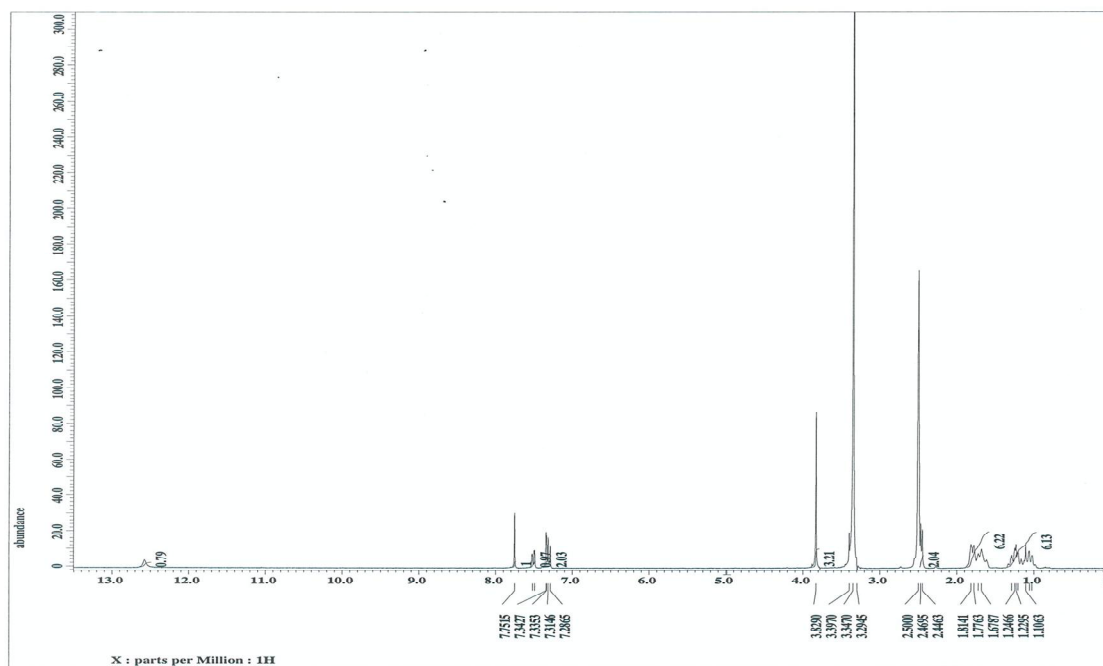
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-phenylbutanoate (25)



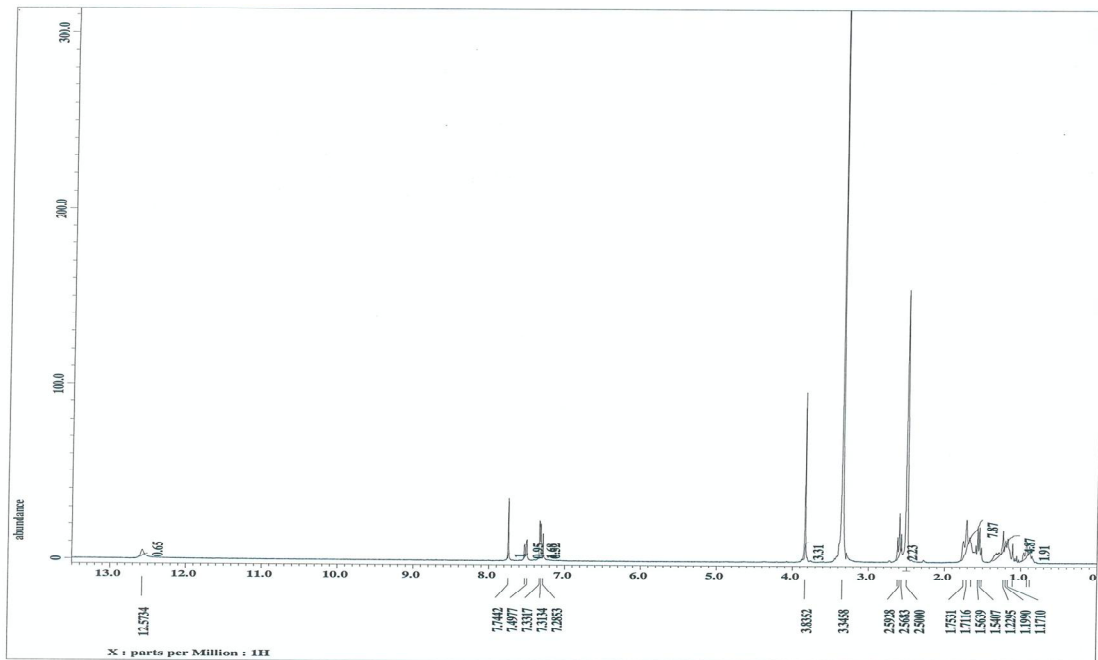
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-methyl-2-phenylpropanoate (26)



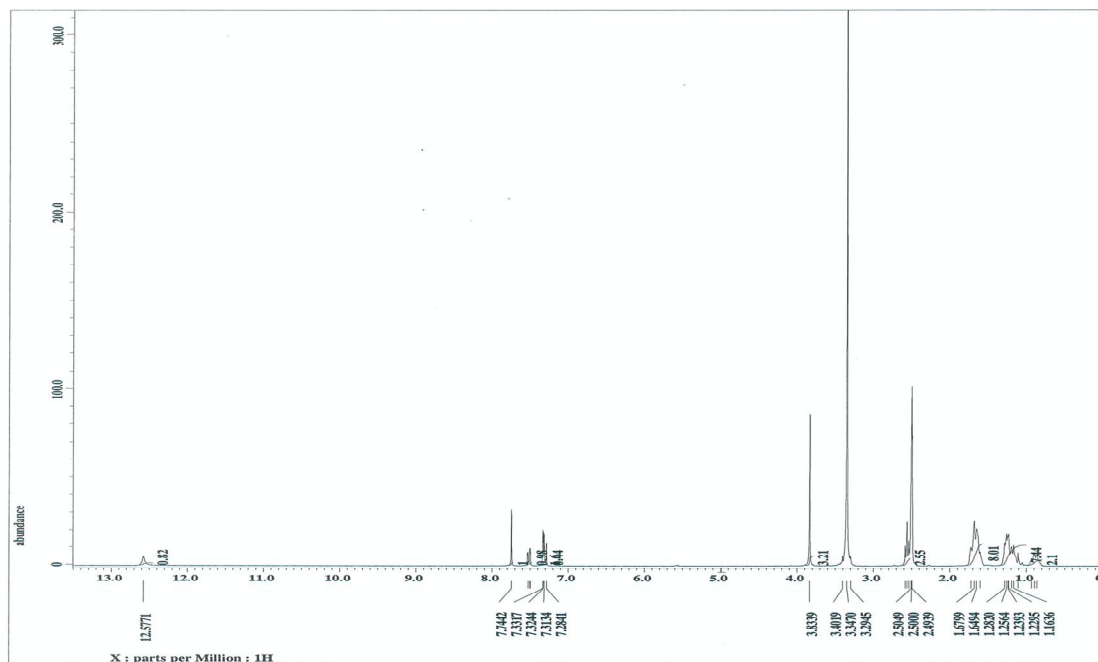
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl cyclohexanecarboxylate (27)



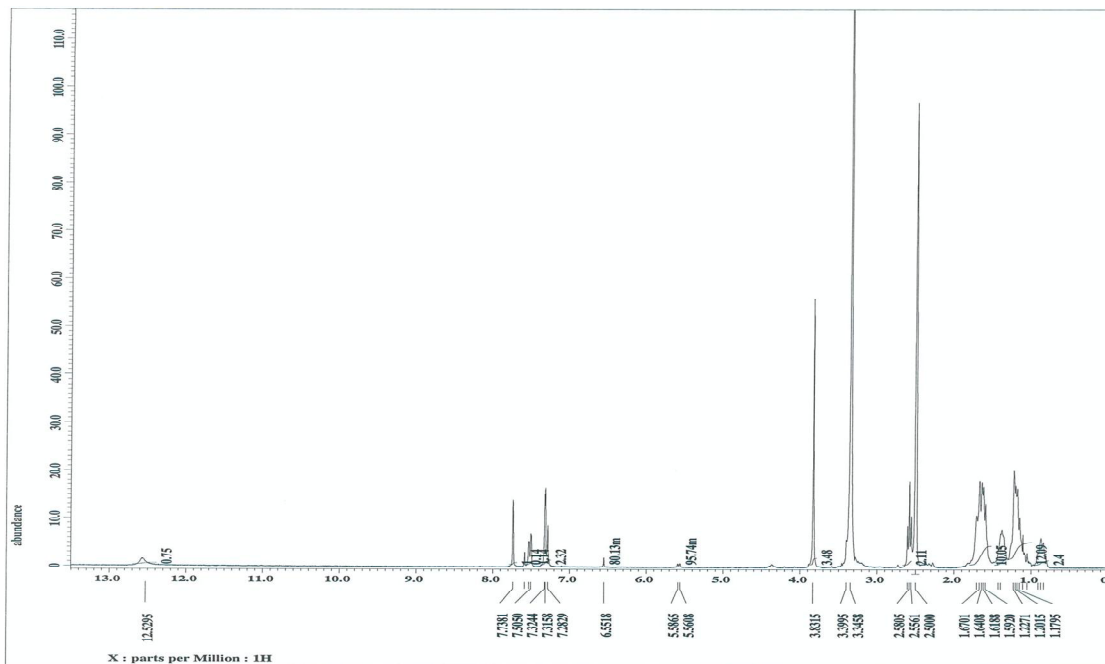
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-cyclohexylacetate (28)



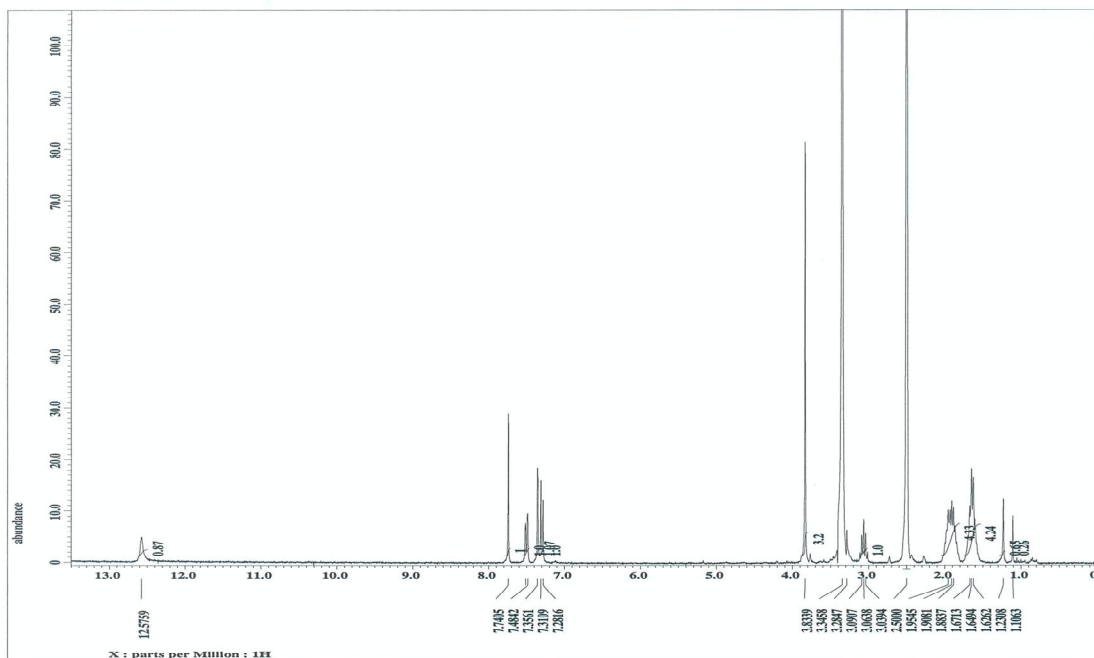
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 3-cyclohexylpropanoate (29)



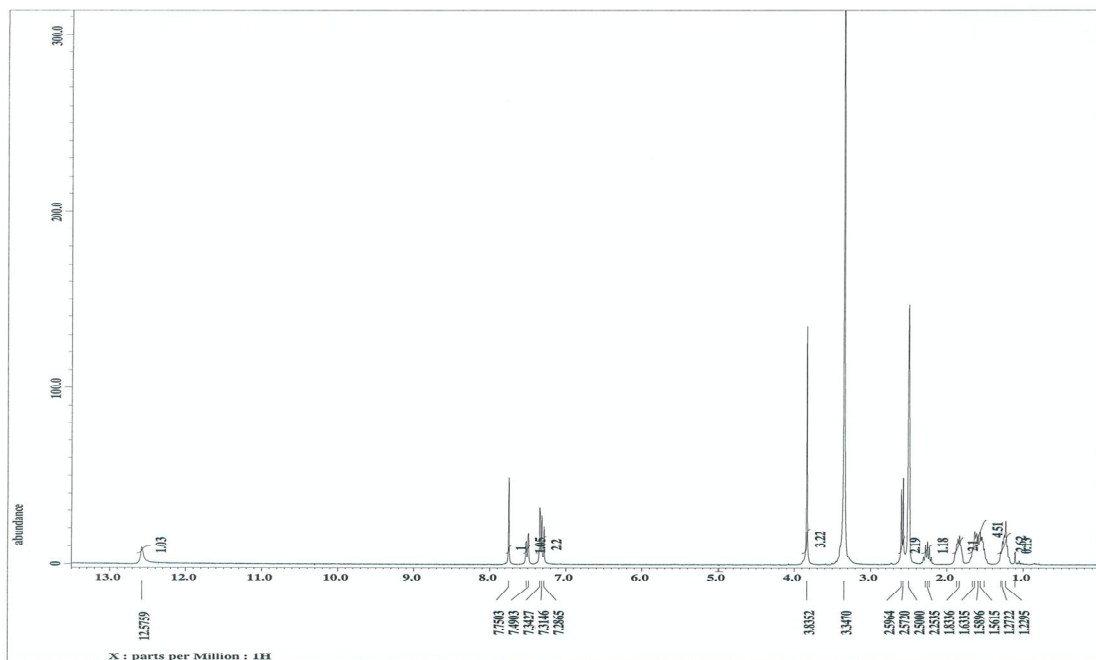
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 4-cyclohexylbutanoate (30)



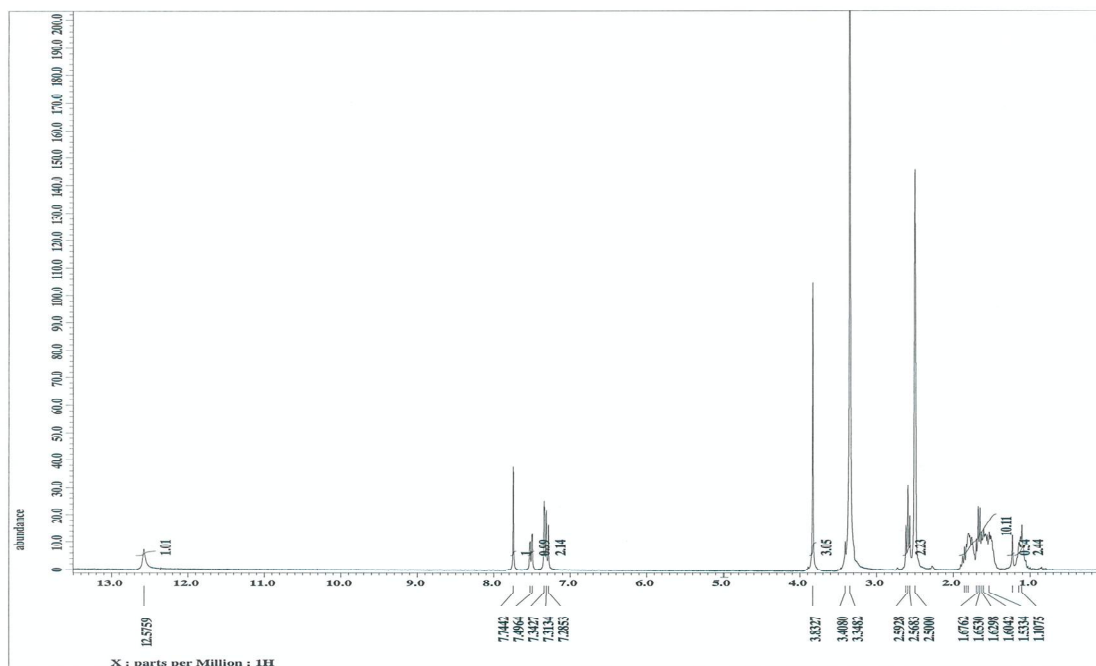
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 5-cyclohexylpentanoate (31)



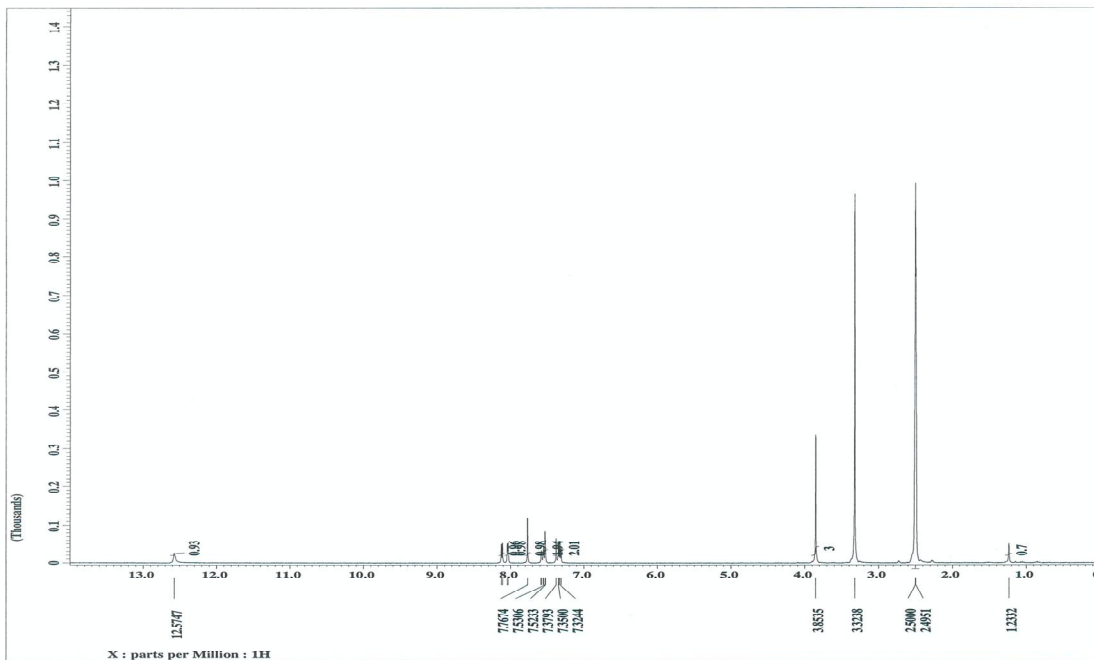
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl cyclopentanecarboxylate (32)



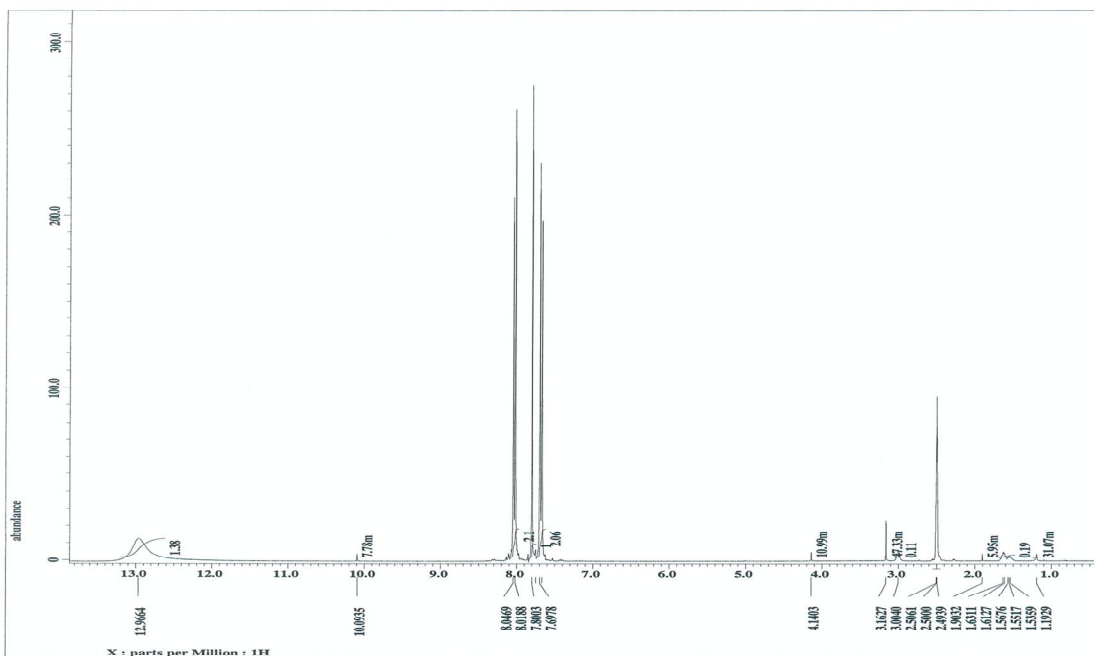
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 2-cyclopentylpropanoate (33)



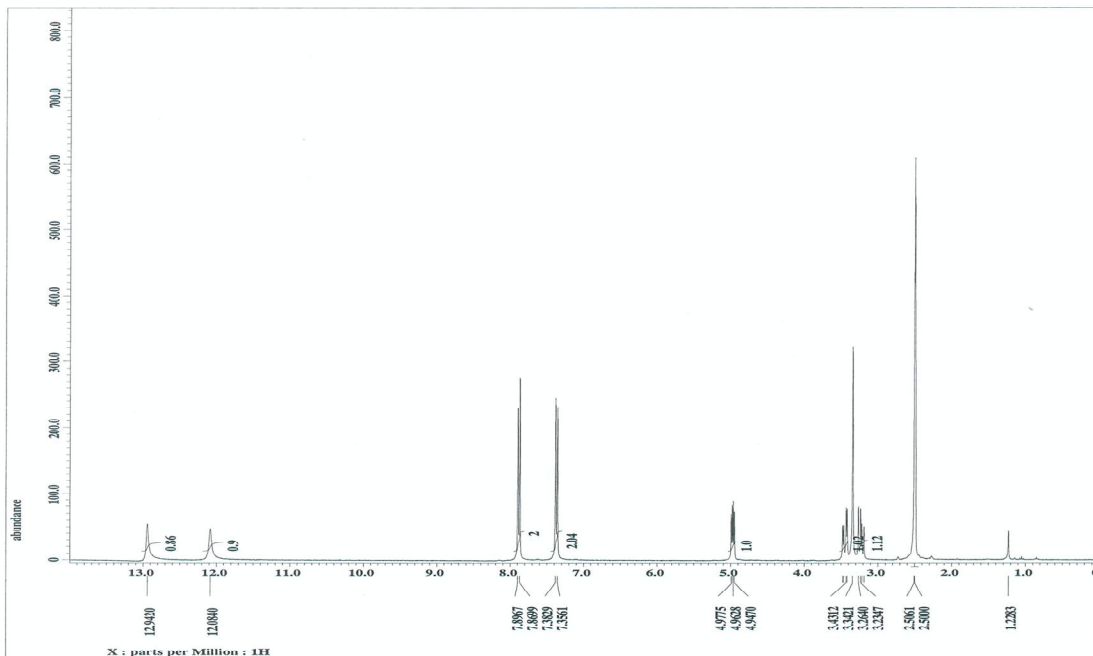
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl 3-cyclopentylpropanoate (34)



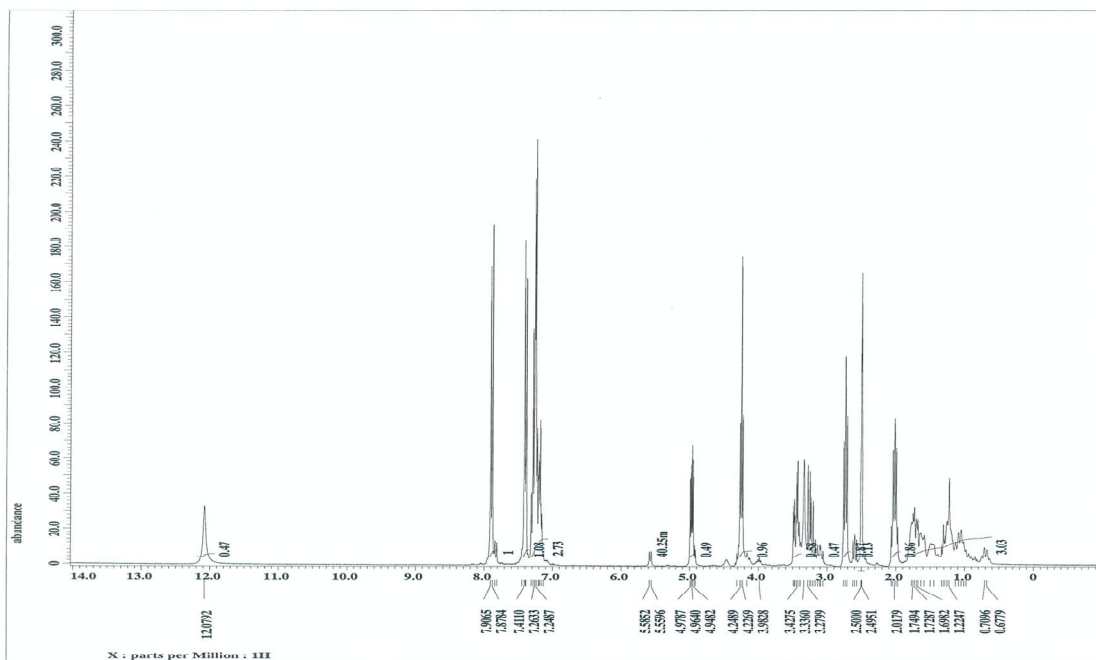
(Z)-5-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-methoxyphenyl thiophene-2-carboxylate (37)



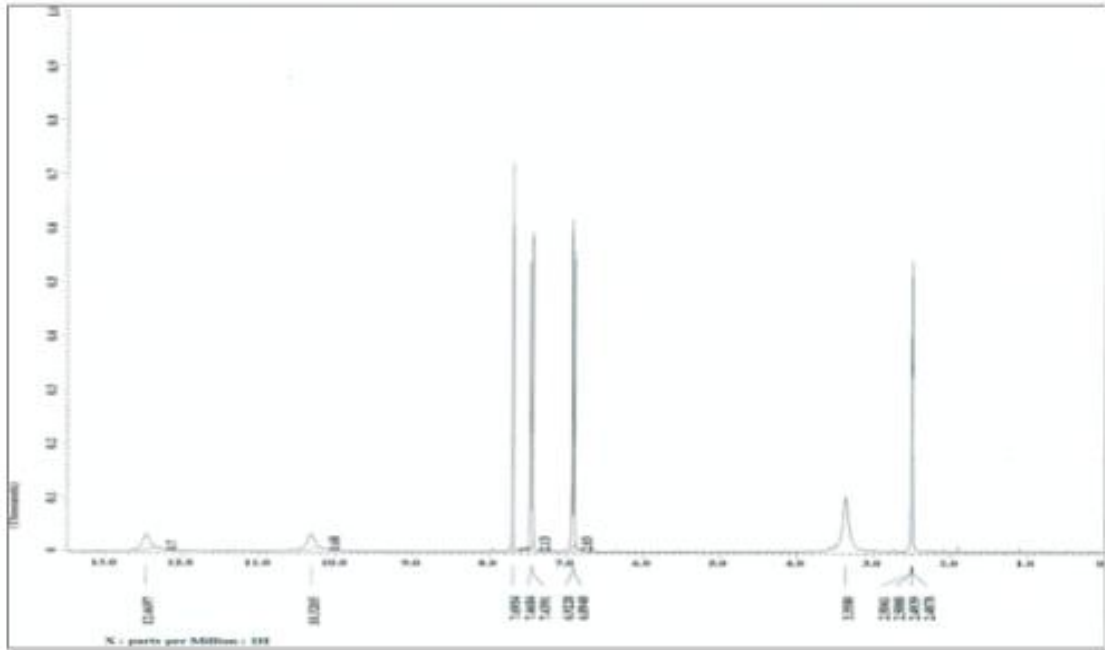
(Z)-4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)benzoic acid (c)



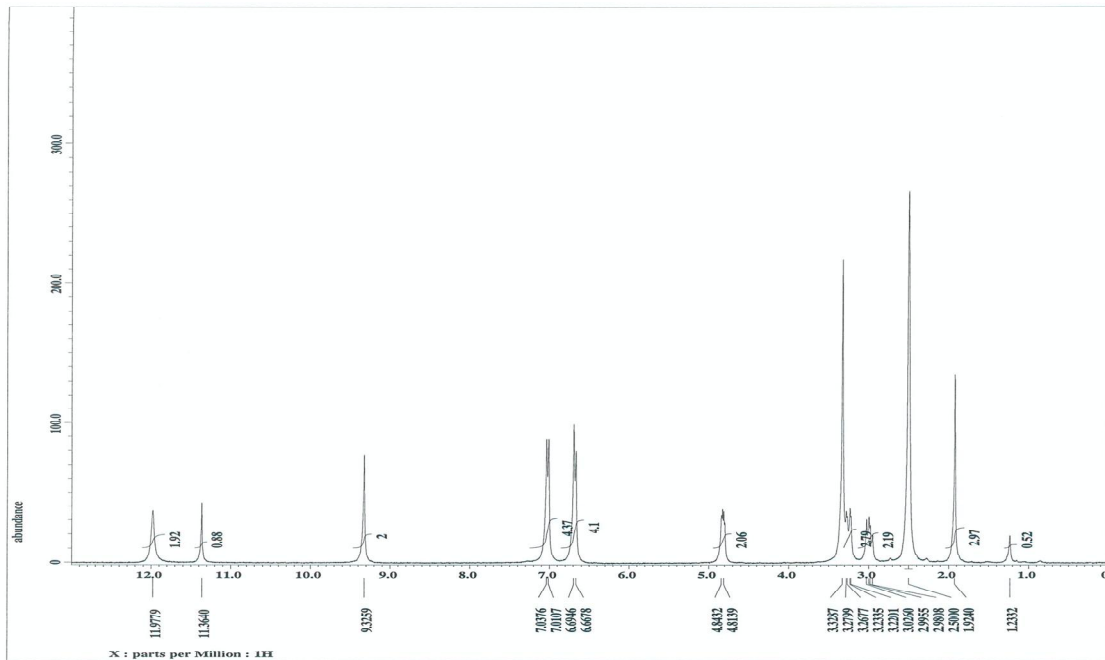
4-((2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl)benzoic acid (d)



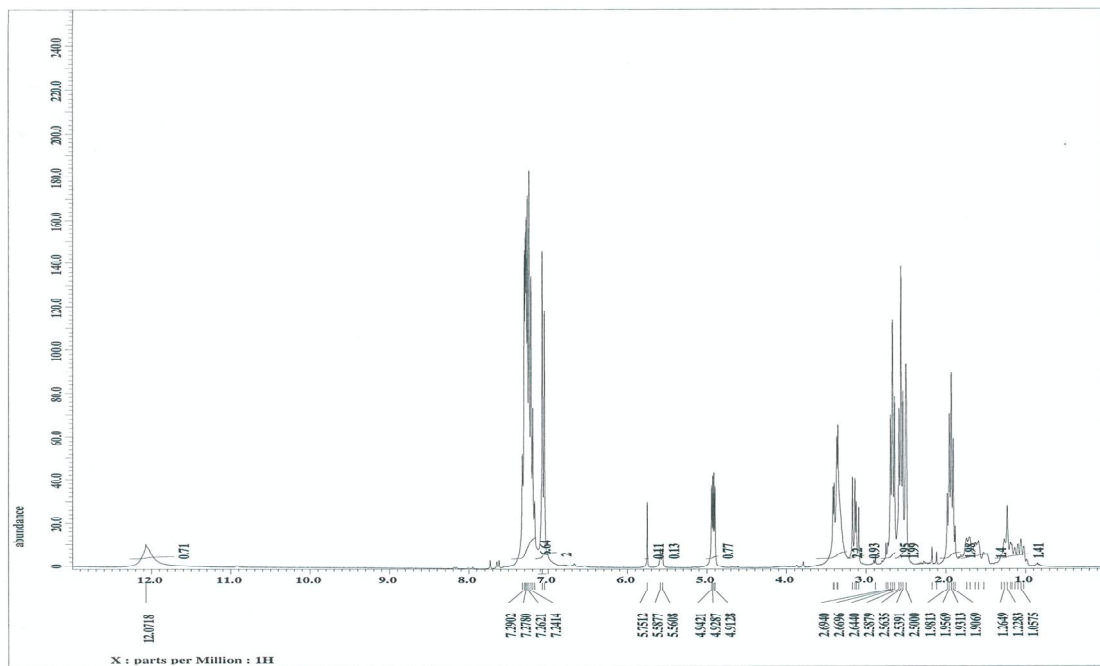
3-phenylpropyl 4-((2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl)benzoate (38)



(Z)-5-(4-hydroxybenzylidene)thiazolidene-2,4-dione (e)



5-(4-hydroxybenzyl)thiazolidine-2,4-dione (f)



4-((2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl)phenyl 4-phenylbutanoate (39)