

Tyrosinase Inhibitory Effect of (*E*)-2-(substituted benzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one Derivatives

Eun Kyeong Lee, Ju Hyun Kim, Kyoung Mi Moon, Sugyeong Ha, Sang-Gyun Noh, Dae Hyun Kim, Bonggi Lee, Do Hyun Kim, Su Jeong Kim, Sultan Ullah, Hyung Ryong Moon and Hae Young Chung*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received November 10, 2016 / Revised December 6, 2016 / Accepted January 17, 2017

The inhibition of tyrosinase, a key enzyme in mammalian melanin synthesis, plays an important role in preventing skin pigmentation and melanoma. Therefore, tyrosinase inhibitors are very important in the fields of medicine and cosmetics. However, only a few tyrosinase inhibitors are currently available because of their toxic effects on skin or lack of selectivity and stability. Therefore, we synthesized a novel series of (*E*)-2-(substituted benzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one derivatives and evaluated their inhibitory effects on mushroom tyrosinase, with the aim of discovering a novel tyrosinase inhibitor. Among 19 derivatives, MHY3655 ($IC_{50} = 0.1456 \mu M$) showed the strongest inhibitory effect on tyrosinase activity compared to kojic acid ($IC_{50} = 17.2 \mu M$), a well-known tyrosinase inhibitor. In addition, MHY3655 showed competitive inhibition on Lineweaver-Burk plots. We confirmed that MHY3655 strongly interacts with mushroom tyrosinase residues through the docking simulation. Substitutions with a hydroxy group at both R2 and R4 in the phenyl ring indicated that these groups play a major role in the high binding affinity to tyrosinase. Further, MHY3655 did not show cytotoxicity at the concentrations tested in B16F10 melanoma cells. In conclusion, the novel compound MHY3655 potentially shows tyrosinase inhibitory activity, and it could be used as an ingredient in whitening cosmetics.

Key words : Melanin, MHY3655, skin, (*E*)-2-(substituted benzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one, tyrosinase inhibitor

서 론

멜라닌(melanin)은 여러 동물들의 피부나 눈 등의 조직에 존재하는 흑색 또는 갈색 색소를 총칭한다[11]. 특히, 멜라닌은 사람의 피부색을 결정하는 중요한 요소로서 인종에 따라서 멜라닌 발현 유전자가 다르고 이에 따라 멜라닌 세포의 양이 조절되어 피부색이 결정된다[9]. 피부에서 멜라닌의 기능은 자외선 차단 기능으로서 피부의 체온을 유지시켜주고 자외선으로부터 피부를 보호해 주지만[5], 과도한 멜라닌 생성은 기미, 주근깨, 피부 반점 형성에 원인이 되며, 더 나아가 피부암 유발에 기여한다[6].

멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌 세포의 멜라노솜에서 합성되며 멜라닌 형성의 주효소인 tyrosinase가 tyrosine에서 DOPA로의 전환과 이후 DOPA quinone으로의 전환을 매개한다. 결국, DOPA quinone은 자동 산화반응과 효소반응

으로 DOPA chrome을 거쳐 공중합체인 멜라닌이 형성된다 [10].

현재 화장품 분야에는 이러한 멜라닌 형성과정의 불균형으로 인한 색소침착을 막기 위하여 tyrosinase을 타겟하는 물질들을 개발 중이며 대표적으로 코직산(kojic acid)을 들 수 있다. 코직산은 tyrosinase 활성 부위의 copper를 chelating하여 tyrosine에서 DOPA로 그리고 DOPA에서 DOPA quinone으로 진행되는 과정을 저해한다[2]. 코직산은 안전성의 문제로 금지되었다가 다시 사용되고 있으나 논쟁의 여지가 있다[4]. 따라서, 부작용이 없는 안전한 피부미백제 개발이 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 새롭게 합성된 19종류의 (*E*)-2-(substituted benzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one 유도체들이 tyrosinase 활성에 대한 억제효과를 나타내는지 조사하였으며, 그 중에서 신물질 MHY3655가 우수한 tyrosinase 저해활성을 나타냄을 확인하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

본 실험에서 사용한 용매 및 언급하지 않은 시약은 부차적인 정제과정 없이 시판품을 사용하였다. ESIMS 데이터는 Advion Expression CMS Spectrometer (NY, USA)로 측정하

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2814, Fax : +82-51-518-2821

E-mail : hyjung@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

여 m/z 로 나타내었으며, 마이크로웨이브 반응은 마이크로웨이브 합성반응기인 Monowave 300 (Anton Paar)을 사용하였다. $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectra는 CDCl_3 또는 $\text{DMSO-}d_6$ 를 용매로 하여 Varian Unity INOVA 400 spectrometer 또는 Varian Unity AS500 spectrometer로 측정하였으며, chemical shift는 ppm (parts per million)으로 coupling constant는 Hz (hertz)로 나타내었다. Column chromatography용 silica gel (230-400 mesh, Merck)를 사용하였고 TLC (Thin Layer Chromatography)는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)를 사용하였다. 무수 용매는 사용하기 직전에 CaH_2 혹은 Na/benzophenone 의 존재 하에서 증류하여 사용하였다.

물질 합성

(E)-Ethyl 3-(naphthalen-2-yl)acrylate (20) and its (Z)-isomer

2-Naphthaldehyde (4.0 g, 25.61 mmol)와 (carbethoxy-methylene)triphenylphosphorane (10.0 g, 28.71 mmol)를 함유하는 무수 톨루엔(30 ml) 용액을 실온에서 24시간 교반시켰다. 생성된 고체를 여과하고 헥산으로 씻어주었다. 여과액을 감압하에서 증발시키고 얻어진 잔사를 디클로로메탄을 전개 용매로 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피로 정제하여 (E)-이성질체 20과 (Z)-이성질체의 혼합물(5.69 g, 98.2%)을 흰색 고체로 얻었다. 혼합물에서 일부 양을 취하여 디클로로메탄을 전개용매로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 재정제하여 각 이성질체를 분리하여 각 이성질체의 NMR 데이터를 얻었다. (E)-이성질체와 (Z)-이성질체의 비율은 50:1 이었다.

(E)-이성질체: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93(s, 1H, 1'-H), 7.85(d, 1H, $J=16.0$ Hz, 3-H), 7.85 - 7.82(m, 3H, 4'-H, 5'-H, 8'-H), 7.67(dd, 1H, $J=1.6$, 8.4 Hz, 3'-H), 7.52(dt, 1H, $J=2.0$, 6.4 Hz), 7.50(dt, 1H, $J=2.0$, 6.4 Hz), 6.55(d, 1H, $J=16.0$ Hz, 2-H), 4.29(q, 2H, $J=6.8$ Hz, CH_2CH_3), 1.36(t, 3H, $J=6.8$ Hz, CH_2CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 167.3, 144.9, 134.4, 133.5, 132.2, 130.2, 129.0, 128.7, 128.0, 127.4, 126.9, 123.7, 118.7, 60.8, 14.6. (Z)-이성질체: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.04(s, 1H, 1'-H), 7.85 - 7.79(m, 3H, 4'-H, 5'-H, 8'-H), 7.73(dd, 1H, $J=2.0$, 8.0 Hz, 3'-H), 7.49(dt, 1H, $J=2.0$, 6.5 Hz), 7.47(dt, 1H, $J=2.0$, 6.5 Hz), 7.10(d, 1H, $J=12.5$ Hz, 3-H), 6.02(d, 1H, $J=12.5$ Hz, 2-H), 4.20(q, 2H, $J=7.0$ Hz, CH_2CH_3), 1.25(t, 3H, $J=7.0$ Hz, CH_2CH_3).

Ethyl 3-(naphthalen-2-yl)propanoate (21)

화합물 20(5.70 g, 25.19 mmol)을 함유하는 디클로로메탄 용액(25 ml)을 10% Pd/C(285 mg, Degussa type E101 NE/W)과 수소 존재하에서 실온에서 밤새 격렬하게 교반하였다. 반응 혼합물을 Celite 패드를 통과시켜 여과하고, 그 여과액을 감압

하에서 증발시켜 상기의 화합물 21(5.18 g, 91%)을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.81-7.77(m, 3H, 4'-H, 5'-H, 8'-H), 7.65(s, 1H, 1'-H), 7.46(dt, 1H, $J=1.5$, 7.0 Hz), 7.43(dt, 1H, $J=1.5$, 7.0 Hz), 7.34(dd, 1H, $J=1.5$, 8.5 Hz, 3'-H), 4.14(q, 2H, $J=7.0$ Hz, CH_2CH_3), 3.12(t, 2H, $J = 8.0$ Hz, 3-H₂), 2.72(t, 2H, $J = 8.0$ Hz, 2-H₂), 1.23(t, 3H, $J=7.0$ Hz, CH_2CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 138.3, 133.8, 132.4, 128.3, 128.0, 127.7, 127.3, 126.7, 126.3, 125.6, 60.7, 36.1, 31.4, 14.5.

3-(Naphthalen-2-yl)propanoic acid (22)

화합물 21(5.18 g, 22.69 mmol)을 THF (35 ml)와 H_2O (35 ml)에 녹이고 NaOH (1.40 g, 35 mmol)를 부가하고 60°C에서 6시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 식힌 후, 디클로로메탄과 물로 추출하고 수층을 1N-HCl 수용액으로 pH 2까지 산성화시켜 얻어진 고체를 여과하고 물로 씻어주어 화합물 22(4.27 g, 94%)를 흰색 고체로 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 11.38(brs, 1H, OH), 7.82-7.78(m, 3H, 4'-H, 5'-H, 8'-H), 7.66(s, 1H, 1'-H), 7.47(t, 1H, $J=7.0$ Hz, 7'-H), 7.44(t, 1H, $J=7.0$ Hz, 6'-H), 7.35(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 3'-H), 3.14(t, 2H, $J=8.0$ Hz, 3-H₂), 2.79(t, 2H, $J=8.0$ Hz, 2-H₂); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 179.3, 137.8, 133.8, 132.4, 128.4, 127.9, 127.8, 127.1, 126.7, 126.3, 125.7, 35.7, 30.9.

2,3-Dihydro-1H-cyclopenta[a]naphthalen-1-one (23) and its regioisomer, 2,3-dihydro-1H-cyclopenta[b]naphthalen-1-one (23')

화합물 22(4.294 g, 21.45 mmol)를 함유하는 methanesulfonic acid (20 ml) 용액을 마이크로웨이브 반응기(Monowave 300, Anton Paar)에 넣고 90°C에서 1.5시간 반응시켰다. 식힌 후 물을 부가하고 생성된 고체를 여과하여 얻은 여과 고체를 디클로로메탄과 1N-NaOH 수용액으로 추출하여 얻어진 유기층을 무수 MgSO_4 로 건조하고 감압하에서 증발시켰다. 얻어진 잔사를 디클로로메탄을 전개용매로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 23(2.98 g, 76%)과 regioisomer 23' (272 mg, 7%)을 각각 순수하게 얻었다.

화합물 23: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.16(d, 1H, $J=8.4$ Hz, 9-H), 8.03(d, 1H, $J=8.4$ Hz, 5-H), 7.88 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, 6-H), 7.66(t, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.55(t, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.51(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 4-H), 3.21(t, 2H, $J=5.6$ Hz, 3-H₂), 2.80(t, 2H, $J=5.6$ Hz, 2-H₂); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 207.9, 158.7, 136.0, 132.8, 131.2, 129.6, 129.1, 128.3, 126.8, 124.3, 124.2, 37.2, 26.4. 화합물 23': $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.38(s, 1H, 9-H), 7.99(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 8-H), 7.89(s, 1H, 4-H), 7.86(d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 5-H), 7.58(t, 1H, $J=7.5$ Hz, 6-H), 7.50(t, 1H, $J=7.5$ Hz, 7-H), 3.32(t, 2H, $J=6.5$ Hz, 3-H₂), 2.81(t, 2H, $J=6.5$ Hz, 2-H₂).

General procedure for the synthesis of compounds 1-19

화합물 23(70 mg, 0.38 mmol)과 치환된 벤즈알데히드(1.4 당량)를 함유하는 1N-HCl 아세트산 용액(1.0 ml)을 실온에서

밤새 교반하였다. 디에틸에테르로 포화된 물을 부가하고 생성된 고체를 여과하고 물을 비롯하여 디클로로메탄, 메탄올 또는/및 헥산으로 씻어주고 건조하여 상기의 화합물을 고체로 얻었다.

(*E*)-2-(4-Hydroxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (1, MHY3653)

노란색 고체; 수율, 67%; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.09(브스, 1H, OH), 9.17(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 9-H), 8.23(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 5-H), 8.06(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 6-H), 7.75(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 4-H), 7.72(t, 1H, $J=7.5$ Hz, 8-H), 7.67(d, 2H, $J=8.0$ Hz, 2'-H, 6'-H), 7.61(t, 1H, $J=7.5$ Hz, 7-H), 7.47(s, 1H, vinylic H), 6.90(d, 2H, $J=8.5$ Hz, 3'-H, 5'-H), 4.15(s, 2H, 3-H $_2$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 194.7, 160.0, 153.5, 136.1, 133.6, 133.1, 132.8, 132.0, 129.7, 129.5, 129.3, 127.3, 126.8, 124.9, 124.0, 116.7, 33.0; LRMS (ESI+) m/z 287(M+H) $^+$, 341(M+MeOH+Na) $^+$.

(*E*)-2-(3,4-Dihydroxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (2, MHY3654)

노란색 고체; 수율, 51%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.68(s, 1H, OH), 9.28(s, 1H, OH), 9.16(d, 1H, $J=8.8$ Hz, 9-H), 8.23(d, 1H, $J=8.4$ Hz, 5-H), 8.05(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 6-H), 7.74(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 4-H), 7.72(t, 1H, $J=8.0$ Hz, 8-H), 7.61(t, 1H, $J=7.6$ Hz, 7-H), 7.38(s, 1H, vinylic H), 7.24(s, 1H, 2'-H), 7.13(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 6'-H), 6.85(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 5'-H), 4.12(s, 2H, 3-H $_2$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 194.7, 153.4, 148.6, 146.3, 136.1, 133.5, 133.1, 132.6, 132.1, 129.7, 129.5, 129.3, 127.3, 127.2, 124.9, 124.8, 124.0, 118.1, 116.7, 33.1; LRMS (ESI+) m/z 303(M+H) $^+$, 357(M+MeOH+Na) $^+$, 389(M+2MeOH+Na) $^+$.

(*E*)-2-(2,4-Dihydroxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (3, MHY3655)

갈색 고체; 수율, 41%; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.13(s, 1H, OH), 9.92(s, 1H, OH), 9.19(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 9-H), 8.21(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 5-H), 8.05(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 6-H), 7.91(s, 1H, vinylic H), 7.74(d, 1H, $J=9.0$ Hz, 4-H), 7.71(t, 1H, $J=7.5$ Hz, 8-H), 7.62(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 6'-H), 7.60(t, 1H, $J=7.0$ Hz, 7-H), 6.42(d, 1H, $J=2.0$ Hz, 3'-H), 6.39(dd, 1H, $J=2.0, 8.5$ Hz, 5'-H), 4.09(s, 2H, 3-H $_2$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 194.8, 161.5, 160.2, 153.3, 135.7, 133.1, 132.2, 131.6, 131.0, 129.7, 129.3, 129.3, 127.8, 127.2, 124.9, 124.0, 114.4, 108.6, 103.1, 33.1; LRMS (ESI+) m/z 303(M+H) $^+$, 357(M+MeOH+Na) $^+$, 389(M+2MeOH+Na) $^+$.

(*E*)-2-(4-Hydroxy-3-methoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (4, MHY3656)

노란색 고체; 수율, 52%; ^1H NMR (500 MHz, CDCl $_3$) δ 9.33(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 9-H), 8.05(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 5-H), 7.90(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 6-H), 7.69(t, 1H, $J=7.5$ Hz, 8-H), 7.60(s, 1H,

vinylic H), 7.59(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 4-H), 7.57(t, 1H, $J=7.5$ Hz, 7-H), 7.30(dd, 1H, $J=1.5, 8.0$ Hz, 6'-H), 7.16(d, 1H, $J=1.5$ Hz, 2'-H), 7.01(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 5'-H), 5.92(s, 1H, OH), 4.07(s, 2H, 3-H $_2$), 3.98(s, 3H, OCH $_3$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 194.7, 153.6, 149.5, 148.5, 136.1, 133.5, 133.1, 132.9, 132.0, 129.7, 129.5, 129.9, 127.3, 127.2, 125.6, 124.9, 124.0, 116.6, 115.2, 56.3, 32.9; LRMS (ESI+) m/z 317(M+H) $^+$, 371(M+MeOH+Na) $^+$.

(*E*)-2-(3-Ethoxy-4-hydroxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (5, MHY3657)

노란색 고체; 수율, 45%; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.62(s, 1H, OH), 9.17(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 9-H), 8.23(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 5-H), 8.06(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 6-H), 7.76(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 4-H), 7.72(t, 1H, $J=8.0$ Hz, 8-H), 7.61(t, 1H, $J=8.0$ Hz, 7-H), 7.47(s, 1H, vinylic H), 7.35(s, 1H, 2'-H), 7.28(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 6'-H), 6.92(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 5'-H), 4.18(s, 2H, 3-H $_2$), 4.14(q, 2H, $J=6.5$ Hz, CH $_2$ CH $_3$), 1.38(t, 3H, $J=6.5$ Hz, CH $_2$ CH $_3$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 194.7, 153.6, 149.7, 147.7, 136.1, 133.5, 133.1, 132.9, 132.0, 129.7, 129.5, 129.3, 127.3, 127.2, 125.6, 124.9, 124.0, 116.7, 116.4, 64.5, 32.9, 15.4; LRMS (ESI+) m/z 331 (M+H) $^+$, 385 (M+MeOH+Na) $^+$.

(*E*)-2-(3-Hydroxy-4-methoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (6, MHY3658)

노란색 고체; 수율, 79%; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.29(브스, 1H, OH), 8.17(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 9-H), 8.24(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 5-H), 8.06(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 6-H), 7.76(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 4-H), 7.73(t, 1H, $J=8.0$ Hz, 8-H), 7.62(t, 1H, $J=7.5$ Hz, 7-H), 7.41(s, 1H, vinylic H), 7.27(s, 1H, 2'-H), 7.24(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 6'-H), 7.04(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 5'-H), 4.14(s, 2H, 3-H $_2$), 3.83(s, 3H, OCH $_3$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 194.7, 153.6, 150.2, 147.4, 136.2, 133.5, 133.1, 131.9, 129.7, 129.5, 129.3, 128.5, 127.3, 124.9, 124.5, 123.9, 117.5, 112.8, 56.3, 33.0; LRMS (ESI+) m/z 317(M+H) $^+$, 371(M+MeOH+Na) $^+$.

(*E*)-2-(4-Methoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (7, MHY3659)

노란색 고체; 수율, 79%; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.16(d, 1H, $J=8.0$ Hz, 9-H), 8.24(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 5-H), 8.06(d, 1H, $J=8.5$ Hz, 6-H), 7.77(d, 2H, $J=8.5$ Hz, 2'-H, 6'-H), 7.76(d, 1H, $J=7.5$ Hz, 4-H), 7.73(t, 1H, $J=8.5$ Hz, 8-H), 7.62(t, 1H, $J=8.0$ Hz, 7-H), 7.51(s, 1H, vinylic H), 7.07(d, 2H, $J=8.5$ Hz, 3'-H, 5'-H), 4.17(s, 2H, 3-H $_2$), 3.82(s, 3H, OCH $_3$); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 194.7, 161.2, 153.7, 136.3, 133.8, 133.3, 133.1, 132.6, 131.9, 129.7, 129.6, 129.4, 128.3, 127.3, 124.9, 123.9, 115.3, 56.1, 33.0; LRMS (ESI+) m/z 301(M+H) $^+$, 355(M+MeOH+Na) $^+$.

(*E*)-2-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclo-

penta[*a*]naphthalen-1-one (8, MHY3660)

노란색 고체; 수율, 42%; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.17(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 9-H), 8.25(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 5-H), 8.07(d, 1H, *J*=8.5 Hz, 6-H), 7.78(d, 1H, *J*=8.5 Hz, 4-H), 7.73(t, 1H, *J*=8.0 Hz, 8-H), 7.62(t, 1H, *J*=8.0 Hz, 7-H), 7.52(s, 1H, vinylic H), 7.41(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 6'-H), 7.39(s, 1H, 2'-H), 7.09(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 5'-H), 4.23(s, 2H, 3-H₂), 3.87(s, 3H, OCH₃), 3.83(s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.4, 153.5, 150.9, 149.3, 136.0, 133.7, 132.8, 132.8, 131.7, 129.5, 129.3, 129.1, 128.3, 127.1, 125.1, 124.6, 123.7, 114.2, 112.4, 56.1, 32.6; LRMS(ESI+) *m/z* 331(M+H)⁺, 369(M+K)⁺, 385(M+MeOH+Na)⁺.

(*E*)-2-(2,4-Dimethoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (9, MHY3661)

흰색 고체; 수율, 63%; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.17(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 9-H), 8.23(d, 1H, *J*=8.5 Hz, 5-H), 8.06(d, 1H, *J*=8.5 Hz, 6-H), 7.87(s, 1H, vinylic H), 7.79(d, 1H, *J*=9.0 Hz, 6'-H), 7.74(d, 1H, *J*=8.5 Hz, 4-H), 7.72(t, 1H, *J*=7.5 Hz, 8-H), 7.61(t, 1H, *J*=7.5 Hz, 7-H), 6.68-6.67(m, 2H, 3'-H, 5'-H), 4.13(s, 2H, 3-H₂), 3.90(s, 3H, OCH₃), 3.84(s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.7, 163.0, 160.9, 153.6, 136.1, 133.2, 133.1, 132.0, 131.5, 129.7, 129.5, 129.4, 127.3, 126.6, 124.9, 124.0, 116.9, 106.8, 99.0, 56.6, 56.2, 33.0; LRMS (ESI+) *m/z* 331(M+H)⁺, 353(M+Na)⁺, 369(M+K)⁺, 385(M+MeOH+Na)⁺.

(*E*)-2-(3,4,5-Trimethoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (10, MHY3662)

분홍색 고체; 수율, 58%; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.16(d, 1H, *J*=8.5 Hz, 9-H), 8.26(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 5-H), 8.06(d, 1H, *J*=8.5 Hz, 6-H), 7.78(d, 1H, *J*=8.5 Hz, 4-H), 7.74(t, 1H, *J*=8.0 Hz, 8-H), 7.62(t, 1H, *J*=8.0 Hz, 7-H), 7.51(s, 1H, vinylic H), 7.12(s, 2H, 2'-H, 6'-H), 4.27(s, 2H, 3-H₂), 3.88(s, 6H, 2*OCH₃), 3.72(s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.4, 153.7, 153.5, 139.5, 136.3, 135.1, 132.9, 132.8, 131.6, 131.0, 129.4, 129.4, 129.2, 127.2, 124.6, 123.7, 108.8, 60.6, 56.5, 32.4; LRMS (ESI+) *m/z* 361(M+H)⁺, 415(M+MeOH+Na)⁺.

(*E*)-2-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (11, MHY3663)

노란색 고체; 수율, 71%; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.18(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 9-H), 9.09(brs, 1H, OH), 8.24(d, 1H, *J*=8.5 Hz, 5-H), 8.06(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 6-H), 7.78(d, 1H, *J*=8.5 Hz, 4-H), 7.73(t, 1H, *J*=7.5 Hz, 8-H), 7.62(t, 1H, *J*=7.5 Hz, 7-H), 7.49(s, 1H, vinylic H), 7.10(s, 2H, 2'-H, 6'-H), 4.24(s, 2H, 3-H₂), 3.87(s, 6H, 2*OCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.7, 153.6, 148.7, 138.7, 136.2, 133.9, 133.2, 133.1, 132.0,

129.7, 129.5, 129.4, 127.3, 126.0, 124.9, 124.0, 109.3, 56.8, 32.8; LRMS(ESI+) *m/z* 347(M+H)⁺, 401(M+MeOH+Na)⁺.

(*E*)-2-(3-Bromo-4-hydroxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (12, MHY3664)

베이지색 고체; 수율, 56%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.94(s, 1H, OH), 9.14(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 9-H), 8.23(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 5-H), 8.05(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 6-H), 7.94(s, 1H, 2'-H), 7.75(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 4-H), 7.72(t, 1H, *J*=8.0 Hz, 8-H), 7.66(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 6'-H), 7.60(t, 1H, *J*=8.0 Hz, 7-H), 7.42(s, 1H, vinylic H), 7.06(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 5'-H), 4.15(s, 2H, 3-H₂); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.6, 156.3, 153.7, 136.3, 135.9, 134.2, 133.1, 132.4, 131.8, 131.5, 129.7, 129.6, 129.4, 128.5, 127.3, 124.9, 123.9, 117.3, 110.7, 32.8; LRMS(ESI+) *m/z* 365(M+H)⁺, 367(M+2+H)⁺, 419(M+MeOH+Na)⁺, 421(M+2+MeOH+Na)⁺.

(*E*)-2-(3,5-Dibromo-4-hydroxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (13, MHY3665)

노란색 고체; 수율, 54%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.57(s, 1H, OH), 9.12(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 9-H), 8.25(d, 1H, *J*=8.8 Hz, 5-H), 8.05(d, 1H, *J*=8.8 Hz, 6-H), 7.98(s, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.79(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 4-H), 7.72(t, 1H, *J*=8.0 Hz, 8-H), 7.61(t, 1H, *J*=7.6 Hz, 7-H), 7.40(s, 1H, vinylic H), 4.18(s, 2H, 3-H₂); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.2, 153.7, 152.4, 136.4, 135.7, 134.7, 132.9, 131.4, 130.1, 129.7, 129.4, 129.4, 129.2, 127.2, 124.7, 123.7, 112.7, 32.3.

(*E*)-2-(4-Hydroxy-3-methylbenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (14, MHY3666)

노란색 고체; 수율, 29%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.03(s, 1H, OH), 9.16(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 9-H), 8.22(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 5-H), 8.04(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 6-H), 7.74(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 4-H), 7.71(t, 1H, *J*=7.6 Hz, 8-H), 7.60(t, 1H, *J*=7.6 Hz, 7-H), 7.54(s, 1H, 2'-H), 7.48(d, 1H, *J*=8.8 Hz, 6'-H), 7.42(s, 1H, vinylic H), 6.90(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 5'-H), 4.13(s, 2H, 3-H₂), 2.18(s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.7, 158.3, 153.5, 136.0, 134.3, 133.3, 133.1, 132.5, 132.0, 131.1, 129.7, 129.4, 129.3, 127.3, 126.6, 125.5, 124.9, 124.0, 115.9, 33.0, 16.7; LRMS (ESI+) *m/z* 301(M+H)⁺, 355(M+MeOH+Na)⁺.

(*E*)-2-(4-Hydroxy-3,5-dimethylbenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (15, MHY3667)

노란색 고체; 수율, 84%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.16(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 9-H), 8.93(brs, 1H, OH), 8.21(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 5-H), 8.04(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 6-H), 7.75(d, 1H, *J*=8.8 Hz, 4-H), 7.71(t, 1H, *J*=7.6 Hz, 8-H), 7.60(t, 1H, *J*=7.6 Hz, 7-H), 7.39(s, 1H, vinylic H), 7.39(s, 2H, 2'-H, 6'-H), 4.14(s, 2H, 3-H₂), 2.22(s, 6H, 2*CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.7, 156.2, 153.6, 136.0, 133.4, 133.1, 132.7, 132.2, 132.0,

129.7, 129.4, 129.3, 127.3, 126.8, 125.4, 124.9, 123.9, 33.0, 17.4; LRMS (ESI+) m/z 315(M+H)⁺, 369(M+MeOH+Na)⁺.

(E)-2-(4-Fluoro-3-methoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (16, MHY3668)

분홍색 고체; 수율, 48%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.13(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 9-H), 8.24(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 5-H), 8.05(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 6-H), 7.74(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 4-H), 7.73(t, 1H, *J*=7.6 Hz, 8-H), 7.61(t, 1H, *J*=7.6 Hz, 7-H), 7.55(d, 1H, *J*=8.0 Hz, 2'-H), 7.51(s, 1H, vinylic H), 7.39(m, 1H, 6'-H), 7.30(t, 1H, *J*=8.4, 10.4 Hz, 5'-H), 4.21(s, 2H, 3-H₂), 3.93(s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.6, 154.0, 152.8 (d, *J*=244.2 Hz), 148.0(d, *J*=10.6 Hz), 136.6, 136.0, 133.1, 132.8 (d, *J*=3.8 Hz), 131.9, 131.7, 129.7, 129.6, 129.4, 127.4, 124.8, 124.2(d, *J*=7.6 Hz), 123.9, 117.1(d, *J*=18.2 Hz), 116.7, 56.8, 32.7; LRMS (ESI+) m/z 319(M+H)⁺, 355(M+MeOH+Na)⁺, 405(M+2MeOH+Na)⁺.

(E)-2-(3,4-Difluorobenzylidene)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (17, MHY3669)

분홍색 고체; 수율, 70%; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.13(d, 1H, *J*=7.5 Hz, 9-H), 8.28(d, 1H, *J*=7.5 Hz, 5-H), 8.08(d, 1H, *J*=7.5 Hz, 6-H), 7.90-7.54(m, 6H, 4-H, 7-H, 8-H, 2'-H, 5'-H, 6'-H), 7.52(s, 1H, vinylic H), 4.24(s, 2H, 3-H₂); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.5, 154.2, 137.3, 136.9, 133.6, 133.1, 131.5, 130.4, 129.8, 129.6, 129.4, 128.8, 127.5, 124.8, 123.9, 119.8(d, *J*=17.4 Hz), 118.8(d, *J*=17.5 Hz), 32.6; LRMS(ESI+) m/z 307(M+H)⁺, 361(M+MeOH+Na)⁺, 393(M+2MeOH+Na)⁺.

(E)-2-(2,4-Difluorobenzylidene)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (18, MHY3670)

노란색 고체; 수율, 41%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.27(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 9-H), 8.05(d, 1H, *J*=8.8 Hz, 5-H), 7.88(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 6-H), 7.79(s, 1H, vinylic H), 7.77-7.66(m, 2H, 6'-H, 8-H), 7.56(t, 1H, *J*=7.6 Hz, 7-H), 7.55(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 4-H), 6.97(dt, 1H, *J*=2.4, 7.6 Hz, 5'-H), 6.89(dt, 1H, *J*=2.4, 10.8 Hz, 3'-H), 4.00(s, 2H, 3-H₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 194.4, 163.7(dd, *J*=12.2, 252.2 Hz), 162.3(dd, *J*=11.8, 254.3 Hz), 152.4, 136.7, 136.3, 133.0, 132.4, 131.1(dd, *J*=3.9, 9.5 Hz), 130.0, 129.3, 128.6, 127.1, 124.6, 123.6, 120.3(dd, *J*=3.7, 11.8 Hz), 112.1 (dd, *J*=3.8, 21.3 Hz), 104.8(t, *J*=25.8 Hz), 32.8; LRMS (ESI+) m/z 307(M+H)⁺, 361(M+MeOH+Na)⁺, 393(M+2MeOH+Na)⁺.

(E)-2-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidene)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[*a*]naphthalen-1-one (19, MHY3671)

주황색 고체; 수율, 61%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.17(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 9-H), 8.23(d, 1H, *J*=8.8 Hz, 5-H), 8.05 (d, 1H, *J*=8.0 Hz, 6-H), 7.79(d, 1H, *J*=8.4 Hz, 4-H), 7.72(t, 1H, *J*=7.6 Hz, 8-H), 7.61(t, 1H, *J*=7.6 Hz, 7-H), 7.58(s, 1H, OH),

7.56(s, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.49(s, 1H, vinylic H), 4.15(s, 2H, 3-H₂), 1.44(s, 18H, 2**t*-C₄H₉); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.7, 156.7, 153.5, 139.8, 136.1, 134.3, 133.1, 132.8, 132.0, 129.7, 129.5, 129.3, 128.6, 127.3, 127.1, 125.0, 124.0, 35.3, 32.9, 30.8; LRMS (ESI+) m/z 399(M+H)⁺.

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정을 위해서 일반적으로 많이 사용하고 있는 버섯유래 tyrosinase를 사용하였다. Tyrosinase 저해활성 효과 측정을 위해 96-well microplate (SPL Life Sciences Co., Ltd., Pocheon, Korea)에 1 mM L-tyrosine와 0.5 M phosphate buffer (pH 6.5)가 포함된 완충용액 170 μ l와 tyrosinase (300 U) 20 μ l 그리고 50 μ M MHY 유도체들과 코직산 10 μ l을 각각 첨가한 뒤, 25°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, microplate reader (Berthold, Bad Wildbad, Germany)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 합성물질과 코직산은 DMSO로 각각 12.5, 25, 50 μ g/ml의 농도범위로 단계적으로 희석하여 사용하였다. 합성물질과 코직산 대신에 DMSO 10 μ l을 가하여 control로 하였다. 또한 tyrosinase 대신 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 20 μ l를 가하여 blank로 하였다. 이때의 효소 활성 저해율(%)은 아래와 같이 계산하고, 효소의 활성을 50% 저해하는 농도를 내삽법으로 구하여 이를 IC₅₀ 값으로 나타내었다[8].

$$\text{Tyrosinase 활성 저해율(\%)} = \{(A - B) / A\} \times 100$$

A; O.D at 450 nm without sample, B; O.D at 450 nm with sample

MHY3655의 enzyme kinetic assay

Enzyme kinetic assay는 기본적으로 tyrosinase 저해활성 측정방법과 동일한 조건 하에서 수행되었다. L-DOPA, mushroom tyrosinase solution (300 U), 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), MHY3655을 96-well plate (SPL Life Sciences Co., Ltd., Korea)에서 반응 후, dopachrome 형성 정도를 450 nm에서 50분 동안 10분 단위로 측정한 뒤 분당 변화량을 구한다. Lineweaver-Burk식을 이용하여 농도변화에 따른 저해활성을 비교하여 경쟁적, 비경쟁적 저해활성을 판단하였다.

In silico protein-ligand docking simulation

컴퓨터 상에서 단백질(protein)-리간드(ligand)간의 docking simulation을 수행 하기 위해서 docking simulation 프로그램 중 하나인 Autodock Vina를 사용하였다[10]. 필요한 tyrosinase의 3D 구조로는 Agaricus bisporus의 결정 구조를 골랐으며(PDB ID: 2Y9X) Chimera 프로그램 상에서 수소 원자를 떼어서 사용했다. 도킹을 하는 구간인 docking pocket으로는 tyrosinase의 알려진 binding site를 선정했다. 리간드로는

MHY3655를 사용했다. 리간드는 2D 구조 파일을 Chemskech 프로그램(<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/index.php>)으로 3D 구조 변환을 하고 나서 Chimera 프로그램을 통해 수소원자를 붙였다. 단백질-리간드 도킹 후에 pharmacophore를 살펴보기 위하여 LigandScout 3.12 프로그램을 사용하였다[13].

세포배양 및 세포독성 측정

본 실험에 사용한 세포는 생쥐에서 유래한 악성 흑색종 세포주인 B16F10으로 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. B16F10 세포는 DMEM 배지로 5% Fetal Bovine Serum (FBS)와 항생제(Antibiotic antimycotic)를 첨가하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂의 습윤화된 배양기에서 적응시켜서 배양하였다. 세포는 2~3일마다 culture dish의 80~90% 정도 자랐을 때 PBS로 세척하여 Trypsin-EDTA (GibCo/BRL, USA)을 처리하여 계대 배양하였다.

MHY3655에 대한 세포독성 측정은 EZ-cytox cell viability assay Kit (Daeil Lab Service. Co., Ltd., Suwon, Korea)를 이용하여 측정하였다. 먼저, 96-well microplate (SPL Life Sciences Co., Ltd., Korea)에 1×10⁴ cells/ml의 농도로 접종하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양시킨 후 1, 2, 5, 10 μM의 농도로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 그 후 EZ-cytox 10 μl를 처리하여 생존 세포의 효소작용에 의해 환원되도록 2시간 배양하였다. 그 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 구하였다.

통계분석

본 연구 모든 실험의 결과는 3회 이상 반복하여 실시하여 평균값으로 나타내었다. 대조군과 실험군의 통계학적 유의성

검정은 one-way ANOVA 검정을 적용하였으며 p<0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1에 나타난 것처럼, 잠재적인 tyrosinase 저해제를 합성하기 위해 마이크로웨이브 합성반응기를 이용한 산-촉매 하에서의 환 형성 반응, Wittig 반응 및 산성 조건에서의 aldol 축합 반응을 이용하여 (E)-2-(치환된 benzylidene)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[a]naphthalene-1-one 유도체(1-19)들을 합성하였다. 2-Naphthaldehyde를 Wittig 시약인 (carbethoxymethylene) triphenylphosphorane와 반응시켜 (E)-olefin 화합물(20)을 주된 생성물로 얻었다. 이 반응에서 (E)-olefin과 (S)-olefin 입체이성질체의 비율은 50:1이었다. 이들 이성체들의 입체구조는 ¹H NMR 스펙트럼 분석을 통해 쉽게 규명되었다. 주된 화합물로부터 얻어진 vinyl 수소의 J 값은 16.0 Hz를 나타내었으며, 미량 화합물로부터 얻어진 vinyl 수소의 J 값은 12.5 Hz를 나타내었다. 이것은 주된 화합물이 (E) 입체구조를, 그리고 미량 화합물이 (S) 입체구조를 가진다는 것을 증명해 주는 결과이다. 이들 2 개의 화합물에 수소화 반응을 하면 동일한 화합물(21)을 형성하기 때문에, 각 이성질체들의 분리 없이 Pd/C의 존재 하에서 수소화 반응시켜 이중결합을 환원하여 화합물 21을 유일한 생성물로서 얻었다. 가수분해하여 얻은 카복시산 화합물(22)을 acid chloride로 전환시킨 후, AlCl₃ 촉매 하에서 분자 내 Friedel-Crafts 아실화 반응을 시켜 아실화된 화합물 23과 소량의 regioisomer 23' (2,3-dihydro-1H-cyclopenta[b] naphthalen-1-one)을 얻었지만 반응 수율이 50%를 넘지 않았다. 아실화 반응 수율을 높이기 위해, 산 촉매 methanesulfonic acid의 존

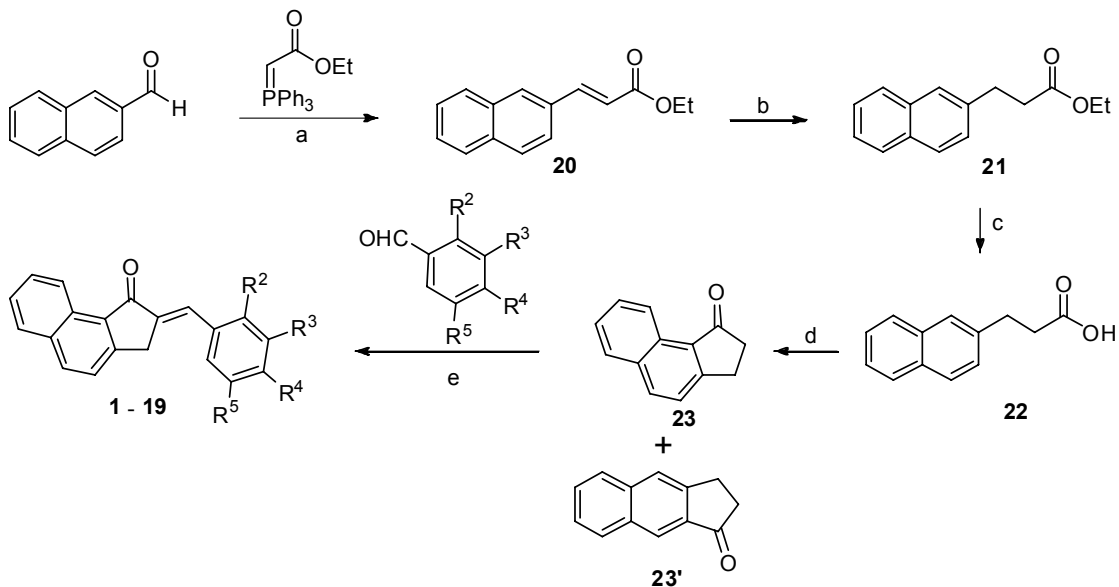


Fig. 1. Synthetic route for the preparation of compounds 1-19.

재 하에서 화합물 22를 마이크로웨이브 반응기를 이용하여 반응시켜 regioisomer (23', 7%)와 함께 76%의 수율로 목적하는 아실화된 화합물(23)을 얻었다. 화합물 23과 다양한 벤즈 알데히드를 1N HCl 아세트산 용액 하에서 반응시켜 목적하는 화합물 1-19를 최종 합성하였다.

새롭게 합성된 (E)-2-(substituted benzylidene)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[a]naphthalen-1-one 유도체들이 미백효능을 가지는지 확인하기 위하여, *in vitro* 상에서 tyrosinase 활성 억제 효능을 확인하였다. 19종류의 유도체들과 대조군인 코직산을 각각 50 µM씩 사용하여 tyrosinase 활성 저해능이 강한 물질을 선별하였다. 그 결과, 합성물질 MHY3655 (97%)가 대조군인 코직산보다(63%) 높은 tyrosinase 활성 저해능을 보였다(Table 1). Table 1에서 보듯이 합성물질의 tyrosinase 활성 저해능에 있어서는 phenyl ring의 R² 와 R⁴ 위치에 OH 잔기가 중요함을 시사한다.

따라서, 본 연구에서는 tyrosinase 활성 저해능이 가장 우수한 MHY3655를 선별하여 tyrosinase 저해제로서의 가능성을 확인하기 위한 추가실험을 진행하였다.

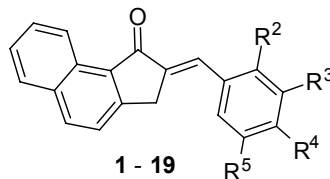
먼저, MHY3655의 tyrosinase 활성저해에 대한 IC₅₀값이 얼

마인지 확인하였다. MHY3655의 tyrosinase 활성저해도가 대조군인 코직산보다 아주 우수하였기 때문에 코직산과 MHY3655를 동일한 농도에서 IC₅₀ 값을 구할 수가 없었다. 따라서, 코직산(12.5, 25, 50 µM)과 MHY3655 (0.0625, 0.125, 0.25 µM)의 농도를 달리하여 IC₅₀ 값을 측정하였다. Table 2에서 보듯이, MHY3655와 대조군인 코직산의 IC₅₀ 값은 각각 0.1456 µM, 17.2 µM을 나타내었다. 이러한 결과로부터, 신물질인 MHY3655가 코직산보다 아주 우수하게 tyrosinase 활성을 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

다음은 새롭게 합성된 MHY3655의 tyrosinase 저해활성의 기전을 알아보기 위하여 Lineweaver-Burk 분석을 수행하였다. MHY3655의 농도가 각각 0.125, 0.25 µM 일때 Km은 7.98, 9.75 mM이고 Vmax은 1.6×10⁻² mM/min이며 Ki는 2.0×10⁻⁶, 1.6×10⁻⁶을 나타내었다(Table 3). 게다가, tyrosinase에 대한 Km은 Vmax 변화량 없이 농도의존적으로 증가하였기 때문에 MHY3655는 경쟁적 저해 기전으로 tyrosinase의 활성을 저해하는 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 2).

MHY3655가 tyrosinase와 직접적으로 결합하는지 재확인하기 위하여 Autodock Vina를 이용하여 docking simulation

Table 1. Substitution pattern and tyrosinase inhibition of the (E)-2-(substituted benzylidene)- 2,3-dihydro-1H-cyclopenta[a] naphthalen-1-one derivatives



Compound	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Tyrosinase inhibition (%)
1 (MHY3653)	H	H	OH	H	84.69±1.11
2 (MHY3654)	H	OH	OH	H	12.92±0.87
3 (MHY3655)	OH	H	OH	H	97.15±1.09
4 (MHY3656)	H	OMe	OH	H	25.31±1.93
5 (MHY3657)	H	OEt	OH	H	31.88±2.38
6 (MHY3658)	H	OH	OMe	H	34.00±1.14
7 (MHY3659)	H	H	OMe	H	17.47±7.72
8 (MHY3660)	H	OMe	OMe	H	3.37±3.86
9 (MHY3661)	OMe	H	OMe	H	17.28±2.62
10 (MHY3662)	H	OMe	OMe	OMe	20.27±1.40
11 (MHY3663)	H	OMe	OH	OMe	16.78±1.80
12 (MHY3664)	H	Br	OH	H	19.46±1.09
13 (MHY3665)	H	Br	OH	Br	35.06±4.05
14 (MHY3666)	H	Me	OH	H	14.78±1.76
15 (MHY3667)	H	Me	OH	Me	4.47±2.17
16 (MHY3668)	H	OMe	F	H	14.42±2.32
17 (MHY3669)	H	F	F	H	3.47±3.09
18 (MHY3670)	F	H	F	H	12.08±2.61
19 (MHY3671)	H	<i>t</i> -Bu	OH	<i>t</i> -Bu	30.51±5.08
Kojic acid					63.35±5.72

Tyrosine inhibition was measured using mushroom tyrosinase and L-tyrosine as the substrate. Results are expressed as percentage of control and each value represents the mean ± S.E.M. Repeated experiments showed the similar results.

Table 2. IC₅₀ values of MHY3655 and kojic acid

Compound	Concentration (μM)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (μM)
MHY3655	0.0625	23.67	0.1456
	0.125	48.04	
	0.25	62.75	
Kojic acid	12.5	38.97	17.20
	25	63.83	
	50	83.22	

IC₅₀ represents 50% inhibitory concentration.

Table 3. Kinetic analysis of MHY3655

Concentration (μM)	Vmax (mM/min)	Km (mM)	Ki (M)
No inhibitor	1.7×10 ⁻²	3.57	-
MHY3655 (0.125)	1.6×10 ⁻²	7.98	2.0×10 ⁻⁶
MHY3655 (0.25)	1.6×10 ⁻²	9.75	1.6×10 ⁻⁶

Data are presented as mean values of 1/V, inverse of the increase in absorbance at a wavelength of 492 nm (ΔA₄₉₂/min), of three independent tests performed using different concentrations of L-DOPA as a substrate. The Lineweaver-Burk plot's equation is: 1/V = Km/Vmax × 1/[S] + 1/Vmax and the modified Michaelis-Menten equation is : 1/Vmax = 1/Km (1+[I]/Ki), where V is the reaction velocity (the reaction rate), Km is the Michaelis-Menten constant, Vmax is the maximum reaction velocity, [S] is the substrate concentration, [I] is the inhibitor concentration, and Ki is the inhibitor constant.

수행하여 결합에너지 값을 구해보았다. 그 결과, MHY3655가 tyrosinase의 ligand binding domain에 직접 결합을 하며(Fig. 3A), 이때 MHY3655의 결합에너지 값이 -8.7 kcal/mol으로 코직산(-5.7 kcal/mol)보다 훨씬 높았다(Fig. 3B). 게다가, MHY3655가 tyrosinase의 어떤 아미노산 잔기와 결합하는지 확인하기 위하여 LigandScout 3.12 프로그램을 사용하여 pharma-

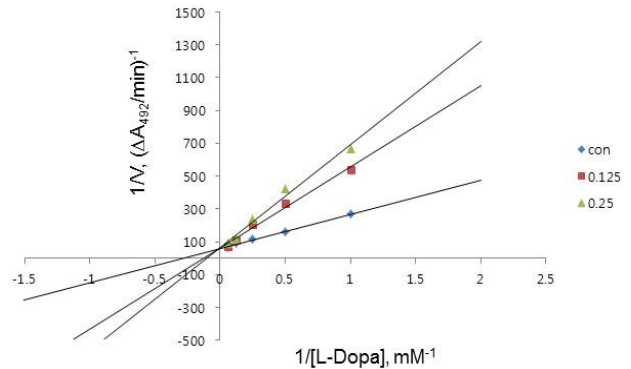


Fig. 2. MHY3655 as a competitive inhibitor of tyrosinase. Lineweaver-Burk plot of MHY3655 on mushroom tyrosinase. Data were obtained as mean values of 1/V, inverse of the increase of absorbance at a wavelength 492 nm per min, of 3 independent tests with different concentrations of L-tyrosine as a substrate.

cophore 분석을 수행하였다. 그 결과, MHY3655는 tyrosinase의 A chain에서 ALA286, VAL283, VAL248, PHE264, MET257 부분과 hydrophobic결합을 하며, ASN260과는 수소결합을 하였다 (Fig. 3C). 따라서, MHY3655가 tyrosinase의 리간드 바인딩 포켓의 결합으로 tyrosinase 저해활성을 나타내리라 사료된다.

마지막으로, MHY3655가 세포독성을 나타내는지 확인하기 위하여, MHY3655를 농도별(1, 2, 5, 10 μl)로 B16F10 세포에 처리하여 48시간 동안 반응시켰다. 그 결과, 모든 농도에서 B16F10 세포에 대한 독성을 나타내지 않았다(Fig. 4). 따라서, MHY3655은 코직산보다 우수한 tyrosinase 저해활성을 나타낼 뿐더러 세포독성에 영향을 미치지 않는 새로운 합성물질이라 사료되어진다.

본 연구는 기존에 tyrosinase 저해활성제로 알려진 코직산보다 우수한 미백효과를 나타내는 합성물질을 개발하기 위해

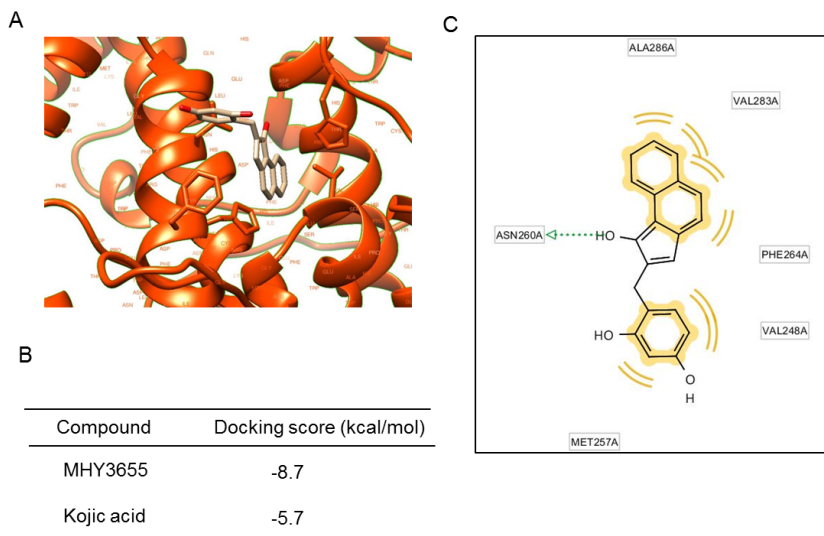


Fig. 3. MHY3655 can directly bind to tyrosinase. (A) Docking simulation was performed to identify interaction between LBD and MHY3655. Docking modes of MHY3655 on the LBD of mushroom tyrosinase. (B) Table shows predicted binding affinity of MHY3655 and kojic acid with tyrosinase. (C) The binding sites of MHY3655 with tyrosinase are shown. LBD, ligand binding domain.

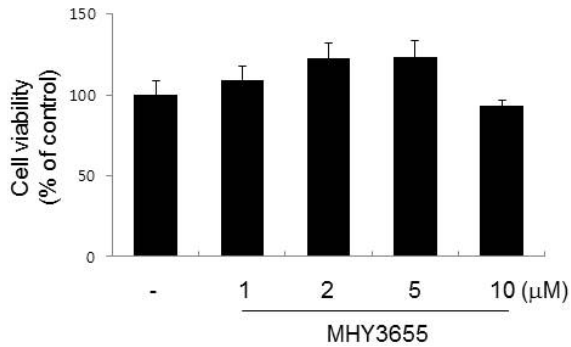


Fig. 4. Effect of MHY3655 on cell viability. B16F10 melanoma cells were treated with various concentrations (1, 2, 5, 10 μ M) of MHY3655 for 48 hr and then EZ-cytox cell viability assay was performed (n=5). Data are expressed as the percent of cell viability compared to DMSO-treated control group.

(E)-2-(substituted benzylidene)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[a]naphthalen-1-one 유도체들을 설계한 뒤 합성하였다. 합성된 화합물은 tyrosinase 저해활성 측정, enzyme kinetic assay, *In silico* protein-ligand docking simulation, 세포 증식 억제 실험을 통하여 우수한 tyrosinase 저해능을 가진 물질임을 확인하였다.

코직산은 미백성분으로서 그 탁월함이 인정되어 화장품에 지속적으로 사용되어 왔으나 안전성에 대한 문제로 2003년도에 판매 금지가 된 물질이다[12]. 하지만, 2005년 11월, 일본 후생노동성은 코직산의 유해성 시험을 실시한 결과, 안전성에 특별한 문제가 없음을 확인하고 화장품에 코직산 사용을 허용한 상태이나 여전히 논쟁의 여지가 있는 부분이다[3]. 게다가, 코직산은 유용성(oil soluble)이 아니며 장기간 보관시 고온에 불안정하여 oil을 기본으로 하는 화장품에 첨가하지 못하는 단점이 있다[7]. 따라서, 우리가 합성한 신물질 MHY3655는 코직산보다 우수한 미백제로서의 가능성이 있음을 시사하며 앞으로 세포나 인공피부실험을 통하여 코직산보다 멜라닌 생성억제 효과가 크게 나타나는지 그리고 안전성 평가에 대한 깊이 있는 실험이 요구된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Alaluf, S., Heath, A., Carter, N., Atkins, D., Mahalingam, H., Barrett, K., Kolb, R. and Smit, N. 2001. Variation in melanin content and composition in type V and VI photoexposed and photoprotected human skin: The dominant role of DHI. *Pigment Cell Res.* **14**, 337-347.
- Battaini, G., Monzani, E., Casella, L., Santagostini, L. and Pagliarin, R. 2000. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 262-268.
- Cheng, S. L., Huang, L. R., Sheu, J. N., Chen, S. T., Sinchaikul, S. and Tsay, G. J. 2006. Toxicogenomics of kojic acid on gene expression profiling of a375 human malignant melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 655-669.
- Draeos, Z. D. 2007. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatol. Ther.* **20**, 308-313.
- García-Gavín, J., González-Vilas, D., Fernández-Redondo, V. and Toribio, J. 2010. Pigmented contact dermatitis due to kojic acid. A paradoxical side effect of a skin lightener. *Contact Derm.* **62**, 63-64.
- Hamilton, A. J. and Gomez, B. L. 2002. Melanins in fungal pathogens. *J. Med. Microbiol.* **51**, 189-191.
- Kvam, E. and Tyrrell, R. M. 1999. The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet a irradiation of DNA or melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 209-213.
- Lajis, A. F., Hamid, M. and Ariff, A. B. 2012. Depigmenting effect of Kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 952452.
- No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Yokozawa, T. and Chung, H. Y. 1999. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci.* **65**, PL241-246.
- Sturm, R. A., Box, N. F. and Ramsay, M. 1998. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays* **20**, 712-721.
- Trott, O. and Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455-461.
- Warwick, L. and Morison, M. D. 1985. What is the function of melanin? *Arch. Dermatol.* **121**, 1160-1163.
- Wei, C. I., Huang, T. S., Fernando, S. Y. and Chung, K. T. 1991. Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicol. Lett.* **59**, 213-220.
- Wolber, G. and Langer, T. 2005. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model* **45**, 160-169.

초록 : (E)-2-(substituted benzylidene)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[a]naphthalen-1-one 유도체들의 tyrosinase 활성억제 효과

이은경 · 김주현 · 문경미 · 하수경 · 노상균 · 김대현 · 이봉기 · 김도현 · 김수정 · 올리솔탄 · 문형룡 · 정해영*
(부산대학교 약학대학)

본 연구에서는 (E)-2-(substituted benzylidene)-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[a]naphthalen-1-one 유도체들을 합성했으며, 합성된 유도체들이 멜라닌 생성과정의 주요 효소인 tyrosinase 활성을 저해할 수 있는지에 대하여 확인하였다. 19종류의 유도체들의 tyrosinase 저해활성을 측정해본 결과, MHY3655 ($IC_{50} = 0.1456 \mu M$)가 가장 큰 저해활성을 나타냈으며 이는 대조군인 코직산($IC_{50} = 17.2 \mu M$) 보다 큰 효능을 보였다. 게다가, Lineweaver-Burk 분석법을 이용하여 MHY3655가 경쟁적 저해 기전으로 tyrosinase 활성을 저해하였고, docking simulation으로 MHY3655가 tyrosinase에 직접 결합함을 재확인하였다. 마지막으로, B16F10 melanoma 세포에서 MHY3655의 세포독성을 평가한 결과 1-20 μM 사이의 MHY3655는 세포독성을 나타내지 않았다. 이상의 결과에서, 신물질 MHY3655은 우수한 tyrosinase 저해활성을 나타내며, 이는 미백 화장품 소재로서 활용할 가치가 있으리라 사료된다.