

3,4-디히드로-3-옥소-2H-1,2,4-벤조치아디아진-1,1-디옥사이드 유도체의 합성 및 세포 독성

박혜영[#] · 한윤정 · 이정옥*

이화여자대학교 약학대학, *한국화학연구소 의약품센터

(Received September 27, 1995)

Synthesis and Cytotoxic Properties of 3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides

Hea-Young Park[#], Yunjong Han and Jeongok Lee*

School of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

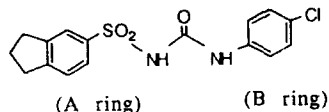
*Korean Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 302-343, Korea

Abstract—A series of 3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides with cytotoxic activity against human solid tumors is described. Synthesized compounds showed mild but broad spectrum cytotoxicity *in vitro*. The lipophilic substituents like alkyl, alkoxy and chloro on benzene ring increased the activity. Also hydrophobic group on 3 or 4 position of benzothiadiazine was important for the activity.

Keywords □ 3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides, 3-aryl-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-oxide, sulofenur, solid tumors, cytotoxicity, SRB assay.

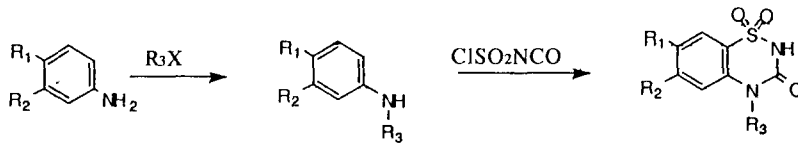
Diarylsulfonylurea 구조를 가진 sulofenur(아래구조)는 최근에 알려진 항암제로서 장암 난소암 등과 같은 고형암에 효과가 탁월한 약물이다.¹⁻²⁾ Sulofenur의 작용기전은 잘 밝혀지지 않았으나 기존의 alkylating agents, DNA intercalators 등의 항암제와는 완전히 달라서, 주로 mitochondria에 작용하는 것으로 추정되고 있으며 약효 및 독성면에서 특이하다. 즉 기존의 항암제가 백혈병 등 혈액암에 효과가 큰 반면에 sulofenur는 혈액암에는 거의 효과가 없고 여러종류의 고형암에 항암성을 나타내었다. 또 DNA, RNA, 단백질 합성 등을 차단하지 않으므로 오심, 탈모 등의 부작용이 나타나지 않고, 다만 과량 사용에 따른 빈혈과 대사물로 생성되는 aniline 유도체에 기인된 약한 신독성이 부작용으로 나타났다. 이와같이 부작용 적고 고형암에 효과

를 보이므로 신약으로서의 개발이 기대되고 있다.³⁻⁵⁾

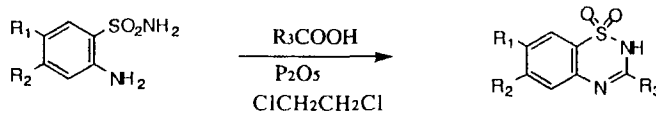


Sulofenur의 작용기전을 이해하고 더 효과있는 약물을 개발하기 위하여는 구조활성관계를 아는 것이 필수적이며, Howbert 등의 보고⁶⁾에 의하면 A ring의 경우 3번이나 4번 위치에 electron-donating group인 methyl, ethyl, methoxy, ethoxy 또는 halogen이 치환된 경우 항암 효과가 좋았으며, B ring의 경우 4번 위치에 chloro기가 치환된 경우 효과가 좋았다. 이밖에도 다양한 치환기를 가진 diarylsulfonylurea에 대한 연구가 진행되었으나⁷⁾ 두개의 aromatic ring의 상대적인 위치에 관한 연구는 거의 없다. 그러므로 본 연구에서는 sulfonylurea기의 conformation을 환으로 고정시킨

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-360-3042 (팩스) 02-360-3051



Scheme I



Scheme II

4-aryl-3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 계열의 물질을 만들어서 (Scheme I) 다양한 치환기를 도입시켰을 때 세포독성을 비교해 보고자 하였다. 또한 B ring의 위치를 질소에서 탄소로 바꾼 3-aryl-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 계열의 화합물도 합성하여 (Scheme II) 그 효과를 비교해 보고자 하였다.

실험방법

시약 및 재료 - 본 실험에 사용된 시약들은 Aldrich 사 및 Janssen사의 것을 사용하였으며 각종 용매는 일제 특급 시약을 사용하였다. IR spectra는 Perkin-Elmer 1420 Infrared spectrophotometer를 사용하여 KBr pellet이나 NaCl cell에 도말하여 측정하였다. NMR spectra는 Bruker AMX 500 NMR spectrometer로 기록하였다. Mass spectra는 Hewlett-Packard 5988 또는 HPLC-MS TS 88X를 사용하였다. 용점은 Thomas capillary melting point apparatus를 사용하였으며 보정하지 않았다. TLC plate는 silicagel Kieselgel 60 F₂₅₄를 사용하였으며, column chromatography에는 Kieselgel 60(70~230 mesh)를 사용하였다.

4-Phenyl-3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 유도체의 일반적인 합성법(화합물 1-3) - 치환된 aniline(0.0768 mol)과 NaNH₂ 2.341 g(0.06 mol)을 15분 동안 가열 환류시켰다. 여기에 bromobenzene 3.14 g(0.02 mol)을 냉각기 끝에서 한 방울씩 적가한 후 2시간 더 환류시켰다. 반응물을 냉각하고 ethyl acetate (15 ml × 3)로 추출한 다음 물로 세척하였다. 유기층을 건조 후 감압증류하였다. 잔사를 판 크로마토그래피(n-hexane : methylene chloride,

2 : 3)하였다. 계속해서 0°C에서 chlorosulfonylisocyanate 0.09 ml (0.001 mol)을 18 ml의 nitromethane에 녹이고 ice-cooling하면서 diarylamine 0.0009 mol을 nitromethane 2 ml에 녹인 용액을 천천히 가한 다음 aluminium chloride 0.149 g(0.0011 mol)을 즉시 가했다. 이 혼합물을 30분 동안 가열 환류시켰다. 반응물을 냉각하고 얼음물에 부은 후 생긴 침전을 여과하여 물로 세척하였다. 침전을 charcoal로 정제한 후 ethanol로 재결정한다.⁸⁾

1: Yield 30%; mp 225°C; IR(KBr) 1700, 1360, 1190 cm⁻¹; ¹H-NMR(acetone-d₆) : δ 6.6~7.9 (m, 9H); MS m/z 274 (M⁺).

2: Yield 11%; mp 142~143°C; IR (KBr) 3500, 1700, 1350, 1190 cm⁻¹; ¹H-NMR(acetone-d₆) : δ 2.7 (s, 3H), 6.4~7.6 (m, 8H); MS m/z 288 (M⁺).

3: Yield 16%; mp 175°C; IR (KBr) 3500, 1700, 1380, 1200 cm⁻¹; ¹H-NMR(acetone-d₆) : δ 2.0 (m, 2H), 3.0 (t, 4H), 7.2~7.5 (m, 7H); MS m/z 314 (M⁺).

4-Benzyl-3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 유도체(화합물 4-10)의 합성 - 치환된 aniline (0.02 mol), K₂CO₃ 4.866 g(0.0352 mol) 및 benzyl bromide 또는 p-chlorobenzyl chloride(0.02 mol)를 acetone 120 ml에 넣고 28시간 가열환류시켰다. 반응액을 식힌 다음 불용성 물질을 여과하고 이를 10 ml의 ethanol로 세척한 후 용매를 감압증발하였다. 잔사를 ethylacetate 50 ml에 녹이고 물로 세척한 후 용매를 제거하여 컬럼크로마토그래피(n-hexane : ethylacetate, 20 : 1) 하였다. 계속해서 chlorosulfonylisocyanate 0.849 ml (9.76 mmol)와 aluminium chloride 1.336 g(10.02 mmol)을 위에서 설명한 방법

과 동일하게 반응시켰다.

4: Yield 26%; mp 195~196°C; IR (KBr) 3500, 1700, 1400, 1200cm⁻¹; ¹H-NMR (acetone-d₆) δ 5.4 (s, 2H), 7.3~7.9 (m, 9H); MS m/z 288 (M⁺).

5: Yield 53%; mp 210~212°C; IR (KBr) 3500, 1700, 1400, 1200 cm⁻¹; ¹H-NMR(acetone-d₆) δ 5.4 (s, 2H), 7.3~7.9 (m, 9H); MS m/z 322 (M⁺).

6: Yield 26%; mp 179°C; IR (KBr) 3400, 1670, 1350, 1170 cm⁻¹; ¹H-NMR(acetone-d₆) δ 1.3 (t, 3H), 4.0 (q, 2H), 5.2 (s, 2H), 6.6~7.4 (m, 7H); MS m/z 366 (M⁺).

7: Yield 30%; mp 162~165°C; IR (KBr) 3400, 1680, 1340, 1180 cm⁻¹; ¹H-NMR (acetone-d₆) δ 2.5 (s, 3H), 5.2 (d, 2H), 6.9~7.6 (m, 7H); MS m/z 336 (M⁺).

8: Yield 26%; mp 118°C; IR (KBr) 1700, 1380, 1200 cm⁻¹; ¹H-NMR(acetone-d₆) δ 5.2 (d, 2H), 7.1~7.8 (m, 6 H); MS m/z 356 (M⁺).

9: Yield 11%; mp 266°C; IR (KBr) 3400, 1680, 1330, 1150 cm⁻¹; ¹H-NMR(acetone-d₆) δ 2.0 (m, 2H), 2.8 (t, 4H), 5.2 (s, 2H), 6.6~7.4 (m, 7H).

10: Yield 71%; mp 209~211°C; IR (KBr) 3400, 1660, 1370, 1180 cm⁻¹; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 0.9 (t, 3H), 1.3 (m, 2H), 1.6 (m, 2H), 2.1 (m, 2H), 2.9 (t, 4H), 4.0 (t, 2H), 7.1~7.8 (m, 3H); MS(CI) m/z 295 (M⁺+1).

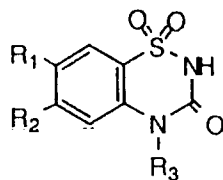
3-Aryl-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide (11-12)의 일반적인 합성법 - Round bottom flask에 P₂O₅ 2.314 g (0.016 mol), 1,2-ethylene dichloride 5 ml, hexamethyldisiloxane 4.3 ml, benzoic acid 또는 phenylacetic acid (0.002 mol) 및 2-amino-benzylsulfonamide 0.344 g(0.002 mol)을 순서대로 가한 후 5시간 가열환류시켰다. 용매를 감압증발한 후 ethanol로 세척 여과하였다.⁹⁾

11: Yield 44%; mp 280°C 이상; IR (KBr) 3300, 1300, 1170 cm⁻¹; ¹H-NMR (acetone-d₆) δ 7.2~7.4 (m, 5H), 7.4~7.9 (m, 5H); MS m/z 258 (M⁺).

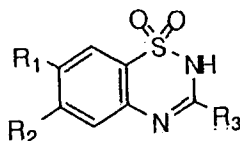
12: Yield 53%; mp 224°C; IR (KBr) 3300, 1280, 1170 cm⁻¹; ¹H-NMR (acetone-d₆) δ 4.2(d, 2H), 7.5~7.6 (m, 5H), 7.7~8.0 (m, 5H); MS m/z 272 (M⁺).

세포독성검색 - 화합물의 세포 독성 효과는 sulforhodamine B (SRB)법¹⁰⁾을 따랐으며 5가지 암세포 즉 A549 (human lung), SK-OV-3 (human ovarian),

Table I— *In vitro* cytotoxicity of 3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-oxides



Compound	substituent			IC ₅₀ (ug/ml)				
	R ₁	R ₂	R ₃	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT159
Sulofenur				7.50	9.00	8.03	6.75	6.79
1	H	H	Ph	-	-	-	-	-
2	H	Me	Ph	76.77	123.1	16.78	41.98	75.49
3	-CH-CH-CH-		Ph	16.90	23.90	12.80	10.60	12.10
4	H	H	Bz	-	-	96.51	235.49	243.32
5	H	H	p-Cl-Bz	174.64	92.33	10.45	34.59	55.23
6	EtO	H	p-Cl-Bz	12.60	13.70	13.10	10.20	11.20
7	H	Me	p-Cl-Bz	14.92	16.50	13.41	11.65	10.23
8	H	Cl	p-Cl-Bz	19.14	13.96	11.27	10.76	11.10
9	-CH-CH-CH-		p-Cl-Bz	14.04	15.76	12.67	10.32	11.59
10	-CH-CH-CH-		n-Butyl	16.90	17.60	13.50	7.14	12.50

Table II— *In vitro* cytotoxicity of 3-aryl-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides

compound	Substituent			IC ₅₀ (ug/ml)				
	R ₁	R ₂	R ₃	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT159
Sulofenur				7.50	9.00	8.03	6.75	6.76
11	H	H	Ph	12.60	13.70	13.10	10.20	1120
12	H	H	Bz				49.90	-

SK-MEL-2 (human melanoma), XF498 (human CNS), HCT-15 (human colon)에 대하여 억제효과를 측정하였다. 측정치로부터 각물질의 50% Inhibition concentration 값을 계산하여 세포독성 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

Sulfonylurea기를 환으로 고정시킨 다음 A ring에는 alkyl, alkoxy, chloro 등의 치환기를, B ring 위치에는 alkyl, phenyl, benzyl, p-chlorobenzyl기를 도입하여 그효과를 비교한 본연구에서는 먼저 환을 이룬 화합물들의 세포독성이 sulofenur 보다 약 2배~10배 낮았으나 여러종류의 고형암세포에 비슷하게 효과가 있는 것으로 나타났다(Table I 과 II).

A ring의 치환기에 따른 효과를 살펴보면 먼저 화합물 1-3의 효과를 비교해볼 때 치환기가 전혀 없는 화합물 1의 경우 효과가 없었으며 치환기가 하나 있는 화합물 2 보다는 R₁, R₂ 두 위치에 치환되면서 일정한 크기를 가지는 화합물 3의 경우 훨씬 효과가 크게 나타났다. 또 화합물 5~9의 효과를 비교할 때 A ring에 ethoxy, methyl, chloro 등의 치환기가 있는 경우 IC₅₀ 값이 10~15 ug/ml로 비슷하였다. 그러므로 A ring에는 적절한 크기의 치환기가 있어서 지용성을 증가시켜주는 것이 효과적 측면에서 좋을 것이라 예상된다. 이것은 electron donating group, lipophilic group이 효과를 증진시킨 sulofenur의 구조활성관계⁶⁾와도 아주 유사하여서 benzothiadiazine 계열의 물질도 같은 부위에 작용하는 것으로 추정될 수 있겠다.

A ring에 치환기가 없는 화합물 1, 4, 5의 경우 모두 효과가 저조하게 나타났으며 B ring은 phenyl < ben-

zyl < p-chlorobenzyl의 순서로 효과를 나타낸 것을 알 수 있었다. 그러나 A ring이 indane인 화합물 3, 9, 10의 경우에는 B ring 치환기가 phenyl, P-chlorobenzyl 및 butyl로 바뀌었을 때 커다란 차이를 볼 수 없었다. 또한 B ring의 위치를 N4에서 바로 옆의 C3로 옮긴 화합물 11, 12의 경우 phenyl기를 가진 11은 효과가 좋았으나 benzyl기를 가진 12는 전혀 효과가 없었다. 여기에서 sulfonylurea기의 carbonyl 산소가 꼭 필요한 것은 아니라는 것과 B ring의 위치가 중요함을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 유도체와 작용하는 부분에 3가지 결합부위가 있을 것으로 추정된다. 즉 A ring과 결합하는 hydrophobic pocket(S1), sulfonylurea의 질소와 수소결합하는 부위, B ring과 hydrophobic결합하는 부위(S2)로서, S1에는 indane인 경우, S2에는 chlorobenzyl인 경우가 크기, 지용성 등이 잘 맞아서 hydrophobic 결합이 강하게 이루어지는 것으로 생각된다. 그러나 S1과 S2의 거리 및 각도가 중요하며, S2는 비교적 수소결합부위와 비교적 가까운 곳에 존재하여서 N4에 benzyl 또는 chlorobenzyl이 치환된 경우에 거리 및 각도가 잘 맞으나, C3에 치환기가 있는 경우에는 benzyl기 보다 길이가 탄소하나 짧은 phenyl기가 잘 맞는 것으로 추정된다.

결 론

Sulfonylurea의 conformation을 환으로 고정시킨 3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide 계열 물질은 sulofenur와 비교할 때 약효는 약하지만 여러종류의 고형암세포에 세포독성을 나타내

었다. A ring에 cyclopropyl, methyl, methoxy, chloro 등 적절한 크기 및 지용성을 갖는 치환기가 존재할 때 효과가 크게 나타났다. B ring의 경우에도 p-chlorobenzyl기처럼 지용성을 갖는 치환기가 적절하였다. 또 benzothiadiazine의 3번 탄소에 B ring이 있는 경우에는 benzyl보다 phenyl기로 치환된 화합물이 더 효과가 좋았으므로 A ring과 B ring사이의 거리 및 각도가 약효에 중요한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 이화여자대학교 교수연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Grindey, G. B.: Identification of diarylsulfonylureas as novel anticancer drugs. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **535** (1988).
- 2) Grindey, G. B.: Current status of cancer drug development: failure or limited success? *Cancer Cells* **2**, 163 (1990).
- 3) Thakar, J. H., Chapin, C. and Houghton, P. J.: Effect of antitumor diarylsulfonylureas on *in vivo* and *in vitro* mitochondrial structure and functions. *Cancer Res.* **51**, 6286 (1991).
- 4) William, J. E.: Metabolism and disposition of the anticancer agent sulofenur in mouse, rat, monkey and human. *Drug Metab. dispos.* **19**, 370 (1991).
- 5) Howbert, J. J.: Sulofenur. *Drug of the future.* **16**, 517 (1991).
- 6) Grossman, C. S., Howbert, J. J., Crowell, T. A., Rieder, B. J., Harper, R. W., Kramer, K. E., Tao, E. V., Aikins, J., Poore, J. A., Rinzel, S. M., Grindey, G. B., Shaw, W. H. and Todd, G. C.: Novel agents effective against solid tumors: the diarylsulfonylureas. Synthesis, activities, and analysis of quantitative structure activity relationships. *J. Med. Chem.* **33**, 2393 (1990).
- 7) Border, B. B., Ehlhardt, W. J., Grindey, G. B. and Houghton, P. J.: Discovery of novel antineoplastic sulfonylureas. *Drug of the future* **17**, 1111 (1992).
- 8) Yves, G. and Atkinson, J.: A new synthesis of 1,2,4-benzothiadiazines and a selective preparation of o-aminobenzenesulfonamides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans* **1**, 1043 (1979).
- 9) Jiang, J. B., Hessen, D. D., Dusak, B. A., Dexter, D. L., Kang, G. J. and Hamel, E.: Synthesis and biological evaluation of 2-styrylquinazolin-4(3H)-ones, a new class of antimitotoxic anticancer agents which inhibit tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* **33**, 1721 (1990).
- 10) Monks, A., Scudiero, D., Srehan, P., Shoemaker, R., Kenneth, P., David, V., Hose, C., Langley, J. and Cronise, P.: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 757 (1991).