

## Cyclooxygenase-2 저해제로서의 benzothiazine 유도체 합성과 항염작용 평가

신혜순<sup>#</sup> · 박명숙 · 권순경

덕성여자대학교 약학대학

(Received May 18, 2000)

### Antiinflammatory Evaluation and Synthesis of Benzothiazine Derivatives as Cyclooxygenase-2 Inhibitor

Hea Soon Shin<sup>#</sup>, Myung Sook Park and Soon Kyoung Kwon

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul, 132-714, Korea

**Abstract** — The antiinflammatory mechanism of NSAIDs is attributed to the reduction of prostaglandin synthesis by the direct inhibition of cyclooxygenase. Inhibition of prostaglandin production in organs such as stomach and kidney can result in gastric lesions, nephrotoxicity and increased bleeding. In this study, newly designed COX-2 inhibitors, synthesized 1,2-benzothiazine derivatives, were screened *in vitro* for selectivity of COX-1 and COX-2 inhibition properties. Lead compounds in the structure-activity relationship were studied to synthesize new highly selective COX-2 inhibitors. To determine inhibitory effect of COX-2, synthesized 1,2-benzothiazine derivatives were screened with accumulation of prostaglandin by lipopolysaccharide (LPS) in aspirin-treated macrophages and murine macrophage cell. Some of synthesized 1,2-benzothiazine derivatives were shown to be effective as selective COX-2 inhibitory activity. Others exhibited a preferential inhibition of COX-2, although some COX-1 inhibitory activity was still present. As a conclusion, simple monomer derivatives were more active than dimer derivatives. Substitution of halogen (Br, Cl) on the benzothiazine nucleus slightly enhanced inhibition activity.

**Keywords** □ 1,2-benzothiazine derivatives, antiinflammatory, cyclooxygenase.

관절염이나 류마티즘 환자들이 장기간 복용하여야 하는 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal antiinflammatory drug, NSAID)에 위출혈과 같은 위장장애와 간·신기능 장애 등의 증상이 수반된다는 문제점은 신약개발 연구의 절실한 필요성으로 요구되어 왔다. 최근에는 이러한 단점을 개선함과 동시에 소염·진통효과는 더욱 뛰어난 NSAID 계열의 신약을 개발하려는 연구가 부각되어져 왔는데, 그 중에도 염증부위의 cyclooxygenase-2(COX-2) 효소저해에 선택특이성을 가진 약물연구에 많은 노력이 기울여지는 추세이다.<sup>1-3)</sup>

보고된 바에 의하면 NSAID 계열의 항염증효과는

arachidonic acid(AA)로부터 대사되는 eicosanoid류 중 prostaglandin이 생합성되는 경로에서 prostaglandin endoperoxide syntase인 cyclooxygenase(COX) 활성을 억제함으로써 위산 분비억제 및 위점막 보호작용을 통해 위·장관을 보호하는 prostaglandin 생합성이 억제되어 항염증 작용 및 해열·진통작용을 나타낸다.<sup>4,5)</sup> Cyclooxygenase는 2종류의 isoform이 있는데, cyclooxygenase-1(COX-1)은 정상 위점막세포의 prostaglandin 생합성을 억제하지 않아서 위·장관 보호작용이 있는 반면에 COX-2는 사이토카인이나 성장인자에 의하여 유도되며, 염증부위에 작용하여 prostaglandin을 생합성함으로써 염증반응을 나타낸다.<sup>6,7)</sup> 따라서 항염증제의 장기간 복용에 따른 위장장애 등의 독성을 감소시키기 위한 신약개발의 분야에서는 염증

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-901-8498 (팩스) 02-901-8386

부위의 COX-2 효소에만 선택적으로 작용하는 구조특이성을 가진 화합물의 연구가 당면한 과제로 인식되고 있다.<sup>8-9)</sup>

Benzothiazine 유도체는 항염작용이 우수하고 생체 내에서의 생물학적 반감기가 길어서 약효발현시간이 길다는 장점으로 항염증제 시장점유율이 대단히 큰 oxicam 구조를 갖는 약물이다. 이 계열의 항염진통제는 piroxicam, meloxicam, sudoxicam, isoxicam 등으로서 이미 보고된<sup>10-13)</sup> 항염증 선택성에 착안하여 유도체 개발이 시도되었다. 합성방법으로는 benzothiazine 핵의 3-carboxylic group에 heterocyclic amine 등 유도체를 반응시켜 amide group으로 치환하는 것을 들 수 있다. 다른 한편으로는 1,2-benzothiazine 화합물의 구조 중 위장장애 등의 부작용을 유발시키는 것으로 알려진 4-hydroxy를 4-oxo로 전환시키는 방법이나 benzothiazine 고리 두 개가 비대칭적으로 결합된 dimer 화합물의 합성을 시도하는 등 새로운 구조의 선택적 COX-2 저해 후보물질들을 합성한 바 있다.<sup>16-19)</sup>

본 연구에서는 선택적 구조를 지닌 새로운 COX-2 저해제 개발을 위한 후보물질을 탐색하는 연구로서 선택적 항염증 효과가 보고된 oxicam 구조를 갖는 1,2-benzothiazine 유도체들을 합성하여 그 효과를 검색하였다. 항염증 효과를 검색하는 방법으로는 약물들의 실험모델의 특성 및 처리조건에 따라 서로 다른 선택성의 결과를 나타낼 수 있겠으나 Lee 등의 실험방법에 따라<sup>14-15)</sup> 진행하였다. 1차적으로 COX 효소가 발현되는 세포주에 bacterial lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 후 prostaglandin 합성능 변화를 비교하는 유도 모델(induction model) 실험으로 효소저해 작용을 검색하였으며, 다음 단계에서는 arachidonic acid로 전처리한 활성모델(activity model) 실험으로서 COX-2 효소로 인한 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생합성 증가량을 정량하여 효소저해 활성도를 측정하였다. 즉, 선택적 구조특이성을 시도한 oxicam 계열의 합성 NSAID 약물들을 대상으로 COX-2 효소저해 효과를 검색하여 화합물의 구조와 생리활성과의 관계를 분석하고자 하였다.

## 실험방법

### 시약 및 재료

Lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* 0111:B4), aspirin, arachidonic acid 등의 시약은 Sigma Chemical(St.

Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Fetal bovine serum(FBS), penicilline-streptomycin 등은 GIBCO BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였고 murine macrophage RAW 264.7 세포주와 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), 그리고 효소 면역분석법(enzyme immunoassay)을 위한 항체는 태평양 기술연구원에서 지원받아 사용하였다. 기타 합성에 필요한 시약은 1급 이상의 시약을 사용하였다.

### 화합물의 합성

**General Preparation of 7-halo-4-hydroxy-2H (or alkyl)-N-(3-aryl-5-methyl-2-thio-1-hydantoinyl)-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide derivatives(1-4)** - Xylene(600 mL) 에 7-halo(or H)-4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid methyl ester 1,1-dioxide(0.04 mol) 및 1-amino-5-methyl-2-thio-3-aryl-4-imidazolone(0.056 mole)을 용해한 후 원통여지에 4Å의 molecular sieve 10 g을 담은 soxhlet 장치 하에서 약 24 시간 동안 환류하며 반응시켰다. TLC로 반응의 진행을 확인하고 반응이 완결된 후 반응액을 차게 식하면 미백색의 침전이 석출되었다. 감압 여과하고 소량의 찬 xylene으로 세척하여 목적 화합물을 얻었다.

Compound 2: Formula C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>(M.W. 458)  
<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.34(d, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.74(s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.55(q, 1H, CH), 7.22(m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.80 (m, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>).

**General Preparation of 7-halo (or H)-3(m or p-methoxybenzoyl)-4-hydroxy-2H-1,2-benzothiazine 1,1-dioxide derivatives(5-10)**<sup>16)</sup> - 무수 methanol(60 mL)에 금속 Na(0.210 mol)을 가한 후 건조한 6-halo(or H)-N-(m- or p-methoxybenzoyl-methyl)-3-oxo-1,2-benzisothiazoline 1,1-dioxide(0.046 mol)을 분말로서 일시에 가한 다음 30분간 환류했다. 환류 직후에 반응액을 진한 염산 용액(50 mL)에 일시에 가했다. 얼음물에서 충분히 교반하면서 냉각한 다음 생성된 결정을 여과하고 methanol/acetone에서 재결정하여 황색 결정을 얻었다.

Compound 5: Formula C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>S(M.W. 331)  
<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 3.86(s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.84(s, 1H, NH), 7.13~8.25(m, 8H, 2ArH).

**General Preparation of 7,7-halogenized (or**

**H)-4-oxo-2,2'-dialkyl-1,1',2,2'-dibenzothiazine-3,3'-dicarboxylic acid methyl ester-1,1,1',1'-tetraoxide 3,4'-yl ether derivatives (11-16)<sup>17)</sup>**-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 하루이상 건조시킨 후 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 넣고 천천히 증류시킨 acetone 30 mL에 silver(I) oxide(0.004 mole)와 N-substituted 4-hydroxy-2-alkyl-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid methyl ester 1,1-dioxide(0.004 mole)를 가한 후 교반하였다. 흑색의 반응 혼합액을 고무마개로 밀폐한 후 실온에서 교반하였다. 반응액은 반응의 진행에 따라 점차로 회색, 회색 용액으로 변화되었고 용기 벽에 silver mirror의 피막이 생성되었다. TLC로 반응의 종결을 관찰한 후, 반응 혼합액을 celite pad로 여과하여 불용성 물질을 제거하였다. 여액을 감압 농축하여 얻은 수지상 물질을 diethyl ether(20 mL)에 녹이고 물(10 mL×3)로 세척한다. 유기 층을 sodium sulfate로 건조시킨 후 감압 농축시켜 황색의 수지상 잔사를 얻었다. Methanol을 가해 얻은 미황색 침전물을 methylene chloride와 methanol 혼합용액으로 재결정하여 미황색의 투명한 crystal을 얻었다.

Compound 12: Formula C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>(M.W. 536)  
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.99(s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.05(s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.75(s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.88(s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.54(t, 2H, CH×2), 7.67(d, 1H, CH), 7.75(d, 1H, CH), 7.77(t, 1H, CH), 7.82(t, 1H, CH), 7.93(d, 1H, CH), 8.07(d, 1H, CH)

**General Preparation of 4-hydroxy-2H(or alkyl)-N-(3-aralkyl-2-thio-1-hydantoinyl)-1,2-benzothiazine-3-carboxamide 1,1-dioxide derivatives (17-21)<sup>18-19)</sup>**-Xylene(600 mL)에 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid methyl ester 1,1-dioxide(0.04 mol) 및 1-amino-2-thioxo-3-aralkyl-4-imidazolone(0.056 mole)를 용해한 후 원통여지에 4 Å의 molecular sieve 10 g을 담은 soxhlet 장치 하에서 약 24시간 동안 환류하며 반응시켰다. TLC로 반응의 진행을 확인하고 반응이 완결되면 원통 여지 중에 가득히 모인 xylene액이 반응 용기로 빠지지 않도록 가만히 soxhlet 장치를 들어내고 반응액을 차게 식히면 미백색의 침전이 석출되었다. 감압 여과하고 소량의 찬 xylene으로 세척하여 목적 화합물을 얻었다.

Compound 18: Formula C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>(M.W. 444)  
<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>+DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.99(s, 3H, NCH<sub>3</sub>),

4.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.48(s, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.92(s, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 11.3(s, 1H, OH).

#### 세포의 분리 및 배양

Murine macrophage RAW 264.7 세포주는 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM, 1% penicillin-streptomycin(10,000 unit/ml), 10% FBS) 배지로 2~3일 간격으로 계대배양하였으며 plate 바닥에 부착된 세포를 분리할 때는 trypsin-EDTA 현탁되어 있는 현탁액을 원심분리하고 3회 세척한 후 fetal bovine serum(FBS)이 함유되어 있지 않은 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)으로 10<sup>6</sup> cell/ml가 되도록 현탁시켰다. 이 현탁액에 아스피린을 500 M이 되도록 첨가하여 세포에 잔존하는 COX 효소의 활성을 비가역적으로 저해하였다. 이 현탁액을 96 well 세포배양판의 각 well에 100 μl를 가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 2시간동안 배양하여 대식세포를 용기 표면에 부착시켰다. 부착된 대식세포를 PBS로 3회 세척한 후, 각 well 표면에 남아있는 대식세포를 실험에 사용하였다.

#### Lipopolysaccharide(LPS) 로 유도된 COX-2 저해 효과 실험

Hemacytometer로 최종 세포수가 10<sup>6</sup> cell/ml로 조정된 96 well 세포배양판의 각 well에 10 g/ml의 LPS를 처리하고 3%의 FBS가 함유된 DMEM 배지 200 μl를 넣은 직후, 검색시료인 합성 항염증 약물들을 2 μl씩 처리하였다. 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 16시간동안 배양하고 반응 종료 후 일정량의 상층액을 회수하여 효소면역 분석법에 따라<sup>15)</sup> ELISA plate reader를 이용하여 흡광도(504 nm)를 측정하는 방법으로 유리된 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)량을 이용하여 정량하였다. 각 NSAID들의 IC<sub>50</sub>는 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 PGE<sub>2</sub>에 대한, LPS를 처리한 실험군에서 생성된 PGE<sub>2</sub>량의 차이로부터 % 저해능(% inhibition)을 구한 후 계산하였다. 실험군과 대조군은 duplicate로 3회 이상 동일 실험을 실시하였다.

#### Arachidonic acid(AA) 를 처리한 COX-2 저해할 실험

Hemacytometer로 최종세포수가 10<sup>6</sup> cell/ml로 조정된 96 well 세포배양판의 각 well에 10 g/ml의 LPS

를 처리하고 3%의 FBS가 함유된 DMEM 배지 200  $\mu$ l를 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하여 COX-2 활성을 유도시켰다. 16시간동안 배양한 후, PBS로 대식세포를 세척하고 각 well에 FBS가 함유되지 않은 DMEM 배지 200  $\mu$ l를 넣고 검색시료를 2  $\mu$ l씩 처리하여 5~15분간 37°C에서 방치하였다. 최종농도가 10 M이 되도록 arachidonic acid를 처리하고 15~20분간 재배양하였으며 COX-1 분석의 경우 어떤 처리도 하지 않은 대식세포를 사용하였다. 반응 종료 후 일정량의 상층액을 회수하여 효소 면역분석법에 따라<sup>15)</sup> ELISA plate reader를 이용하여 흡광도(504 nm)를 측정하는 방법으로 유리된 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)량을 정량하였다. 각 NSAID들의 IC<sub>50</sub>는 AA를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 PGE<sub>2</sub>에 대한, AA를 처리한 실험군에서 생성된 PGE<sub>2</sub>량의 차이로부터 % 저해능(% inhibition)을 구한 후 계산하였다. 실험군과 대조군은 duplicate로 3회 이상 동일 실험을 실시하였다.

### 실험 결과 및 고찰

기존 NSAID 약물들의 심각한 문제점으로 지적되는 위출혈 등의 위장장애나 신장장애와 같은 부작용을 개선하기 위해서 COX-2 효소를 선택적으로 억제하는 구조특이성을 지닌 항염증 약물을 개발하고자 하였다. 이를 위해 생체 내에서의 생물학적 반감기가 길고 항염증 효과가 탁월한 oxycam 계열 화합물에 착안하여 선택적 구조특이성을 시도하고 합성된 유도체들의 구조적 특성과 COX 효소 저해작용과의 연관성에 관한 연구를 진행하였다.

합성실험의 결과로는 1,2-benzothiazine 핵의 3번과 5-methyl-2-thio-1-hydantoin의 3번 질소가 amide group으로 연결된 1,2-benzothiazine carboxamide 계열의 화합물(1-4)을 얻을 수 있었다. 또한, 1,2-benzothiazine 기본 핵의 3번에 methoxybenzoyl기가 도입된 3-methoxybenzoyl-1,2-benzothiazine 유도체(5-10)를 합성하였으며 Gabriel-Colman 전위반응을 이용하였다. Oxycam 계열의 소염진통제들의 부작용으로 지적되는 위장장애는 1,2-benzothiazine의 4-hydroxy기에서 비롯되므로 이를 경감시키기 위해서 구조변환을 시도하여 4-hydroxy기를 4-oxo로 바꾸고 1,2-benzothiazine의 고리 두 개를 비대칭적으로 결합시킨 dimer 화합물인 2,2'-dibenzothiazine-3,3'-dicarboxylic

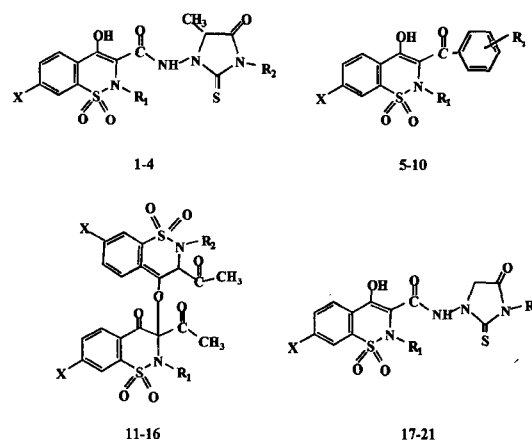


Fig. 1 - Structures of benzothiazine derivatives.

acid 중합체(11-16)를 합성하였다. 그리고 5번 위치에 methyl기가 없는 2-thio-1-hydantoin의 3번 질소와 1,2-benzothiazine 기본 핵의 3번이 amide group으로 연결된 1,2-benzothiazine carboxamide 계열의 화합물(17-21)을 합성하였고 이들 화합물들의 구조를 Fig. 1에 나타내었다. 최근 약물을 docking 시킬 때 COX-1과 COX-2의 active site에서 수소결합을 할 수 있는 위치가 COX-2에 더 많이 있다고 발표한 Rhee 등의 보고와<sup>20)</sup> 관련지어 본다면 수소결합이 가능한 amide기 등을 구조특이성으로 볼 수 있다.

항염증 효과를 검색하는 실험으로는 COX 효소가 발현되는 murine macrophage RAW 264.7 세포주에 bacterial lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 COX-2 효소를 유도한 후, prostaglandin 합성능 변화를 비교하는 유도모델(induction model)법<sup>21)</sup> 이용하

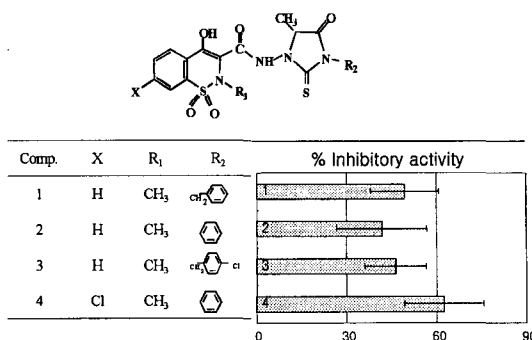


Fig. 2 - % Inhibitory activity of benzothiazine derivative 1-4 on COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cell at 10  $\mu$ g/ml.

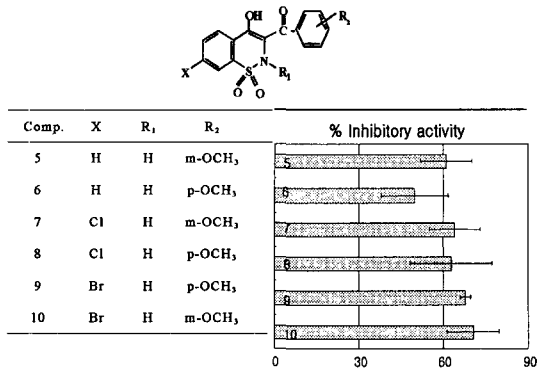


Fig. 3 - % Inhibitory activity of benzothiazine derivative 5-10 on COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cell at 10 µg/ml.

여 효소 저해능(% inhibition)을 산출하였다. 먼저, 2-thio-1-hydantoin기를 amide group으로 연결된 1,2-benzothiazine carboxamide 계열의 화합물(1-4)의 효소저해 효과는 Fig. 2에 정리한 바와 같이 화합물 1은 49.4±37.1(평균값±표준편차) 그리고 화합물 4는 62.6±39.4로 대체로 50% 전후로 COX-2 저해효과를 나타냈다. Methoxybenzoyl 기가 도입된 3-methoxybenzoyl-1,2-benzothiazine 유도체(5-10)의 효소저해 효과는 Fig. 3에 정리한 바와 같이 화합물 7은 64.0±23.4, 화합물 9는 67.8±4.1 그리고 화합물 10은 70.6±26.7로 이 계열의 화합물들은 전반적으로 COX-2 저해효과가 월등한 결과를 나타냈다. 반면에 dimer 화합물인 2,2'-dibenzothiazine-3,3'-dicarboxylic acid 중합체(11-16)의 효소저해 효과는 Fig. 4에 정리한 바와

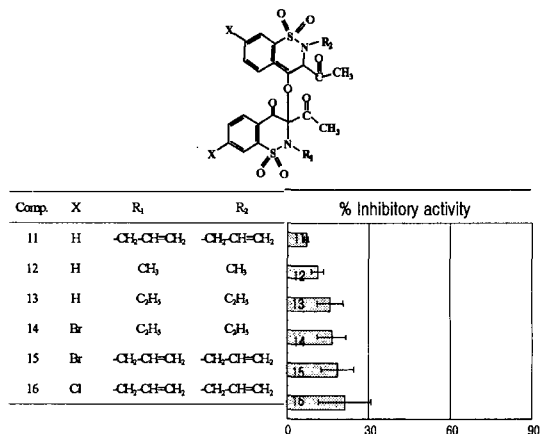


Fig. 4 - % Inhibitory activity of benzothiazine derivative 11-16 on COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cell at 10 µg/ml.

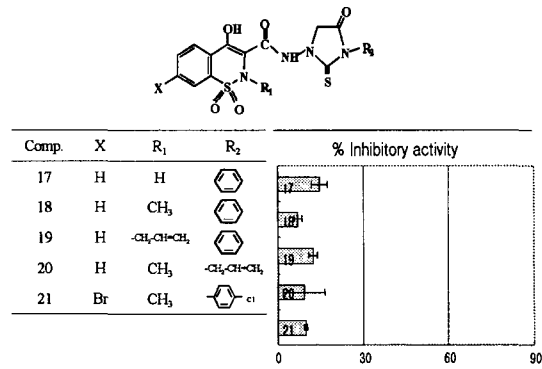


Fig. 5 - % Inhibitory activity of benzothiazine derivative 17-21 on COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cell at 10 µg/ml.

같이 화합물 14는 16.4±9.5, 화합물 15는 18.6±10.5 그리고 화합물 16은 21.3±16.0으로 약한 정도의 활성이 나타났다. 또한, methyl 기가 없는 2-thio-1-hydantoin 기를 amide group으로 연결된 1,2-benzothiazine carboxamide 계열의 화합물(17-21)의 효소저해 효과는 Fig. 5에 정리한 바와 같이 화합물 17은 14.7±6.4 그리고 화합물 19는 12.3±4.5로 합성된 4 종류의 계열들 중 가장 미약한 억제효과를 나타냈다.

위의 유도모델 방법으로 측정된 prostaglandin의 생성량 중에는 LPS에 의하여 유도된 COX-2 이외에도 다른 경로에 의하여 생성된 prostaglandin 량도 포함될 수 있다고 밝혀진 바 있다.<sup>22)</sup> 따라서 COX-2 효소에 대해 직접적인 저해활성을 갖는가를 판단하기 위하여 다음 단계의 실험을 진행하였다. 대식세포(macrophage cell)에 COX-2 효소를 유도시킨 후 arachidonic acid(AA)를 전처리함으로써 유리된 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생합성 증가량을 enzyme immunosorbent assay(ELISA) 방법으로 정량하는 활성모델(activity model)<sup>23)</sup>법을 설정하였다. 이 실험방법을 통해 효소 저해능(% inhibition)을 산출한 결과는 먼저, 1,2-benzothiazine carboxamide 계열의 화합물들(1-4)의 효소저해 효과는 화합물 1은 6.0±7.4(평균값±표준편차) 그리고 화합물 4는 4.8±1.7로 COX-2 활성저해 효과보다는 COX-1 % 저해능이 상대적으로 훨씬 높게 나타나서 COX-1 효소에 대한 저해작용이 더 큰 것으로 나타났다(자료생략). 3-Methoxybenzoyl-1,2-benzothiazine 유도체(5-10)의 활성저해 효과는 화합물 6은 73.1±5.7, 화합물 7은 50.1±10.2, 화합물 8은 54.1±1.2, 화합물 9는 53.6±25.7 그리고 화합물 10

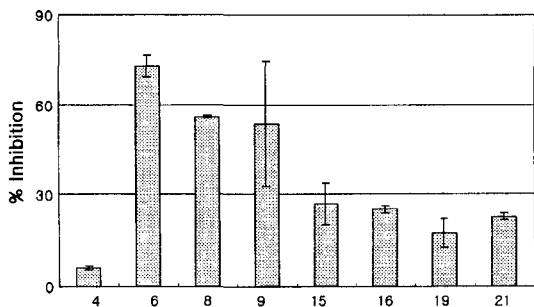


Fig. 6 - % Inhibitory activity of benzothiazine derivatives on COX-2 in LPS-stimulated murine macrophage cell with 10  $\mu$ M arachidonic acid.

은  $48.4 \pm 1.1$ 로 COX-2 활성저해 선택성이 월등히 높은 결과가 확인되었다. 2,2'-Dibenzothiazine-3,3'-dicarboxylic acid 중합체(11-16)의 효소저해 효과는 화합물 14는  $15.7 \pm 15.5$ , 화합물 15는  $26.9 \pm 9.3$  그리고 화합물 16은  $25.0 \pm 2.1$ 로 유도모델실험의 결과와 유사하게 약한 정도의 COX-2 활성저해 결과를 나타냈다. Methyl 기가 없는 2-thio-1-hydantoin 기가 연결된 1,2-benzothiazine carboxamide 계열의 화합물(17-21)의 효소저해 효과는 화합물 19는  $17.3 \pm 7.5$  그리고 화합물 21은  $22.6 \pm 2.6$ 으로 역시 유도모델실험의 결과와 같은 미약한 정도의 COX-2 활성저해 결과를 나타냈다. 이들 유도체 중 대표화할 수 있는 정도의 효소 활성 저해효과를 보인 4, 6, 8, 9, 15, 16, 19 및 21의 8개 화합물에 대한 COX-2 활성저해 실험결과를 비교하여 Fig. 6에 나타내었다.

새로운 COX-2 저해제 개발을 위한 선택적 구조특이성을 시도한 목적화합물들은 반응 생성물 자체의 화합물 구조상 간단한 구조의 화합물인 경우에 효소저해 실험에서 더 좋은 결과를 보였으며 대체적으로 대조화합물로 비교한 celecoxib나 indometacin에 비해 10-100배 정도 적은 활성을 나타내었다. 정상 위점막세포의 COX-1 효소에는 작용하지 않고 염증부위의 COX-2 효소에만 특이적으로 작용하는 측면에서 본다면 합성된 benzothiazine 유도체 화합물들 중 가장 우수한 항염 활성을 보이는 화합물은 methoxybenzoyl이 도입된 3-methoxybenzoyl-1,2-benzothiazine 계열의 유도체(5-10)들이었다. 같은 계열의 유도체 중에서도 Br이나 Cl와 같은 할로겐 치환기를 도입했을 경우에 약한 정도로 저해 효과를 증가시킬 수 관찰할 수 있었다. 그러나 질소에 존재하는 알킬 또는 아릴 치환기에 따른

COX-2 억제 작용의 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 또 다른 구조특이성의 현저한 차이로 1,2-benzothiazine carboxamide 유도체(1-4)의 경우에는 COX-2 선택성보다는 COX-1에 대한 저해작용이 더욱 강한 결과를 보였다. 이 계열의 화합물들은 LPS로 유도된 실험모델에서 효소저해 효과가 강한 결과로 나타났으나 활성모델 실험에서는 약한 정도 결과를 나타냈고, COX-1 저해활성을 나타내어 COX-2 보다 오히려 더 강한 COX-1 선택성에 기인하는 것으로 확인되었다. 유사한 구조로 methyl 기가 없는 2-thio-1-hydantoin 기를 amide group으로 연결한 benzothiazine carboxamide 유도체(17-21)의 경우에는 LPS로 유도된 실험모델의 COX-2 저해효과에서도 약한 결과가 나타났다. 1,2-Benzothiazine 구조 두 개를 비대칭으로 연결시킨 dimer 중합체 화합물(11-16)은 대체로 낮은 COX-2 저해능을 나타내는 것으로 보아 bulky 화합물의 특성상 구조가 불안정하여 분해가 빠르게 일어나서 두분자의 benzothiazine으로 전환되는 것으로 추정된다. 이와 같이 복잡한 치환체보다는 간단한 치환기를 도입한 화합물의 경우에 강한 저해 효과를 나타냄을 알게 되었다. 위의 결과로 3-methoxybenzoyl-1,2-benzothiazine 계열이나 3-thiohydantoinyl-1,2-benzothiazine carboxamide 계열 등의 몇몇 화합물들은 COX-2 효소에 대한 선택적인 저해활성을 갖고 있음이 밝혀졌으므로 위장장애가 적은 항염증 신약개발을 위한 기초연구로서 한 단계 진전된 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 덕성여자대학교 약학연구소 연구비 지원으로 이루어졌기에 감사드립니다. 실험에 도움을 주신 태평양 연구원의 이우영 소장님과 노민수 연구원에게 깊은 감사를 드립니다.

## 문헌

- 1) Wong, E., DeLuca, C., Boily, C., Charleson, S., Cromlish, W., Denis, D., Kargman, S., Kennedy, B. P., Ouellet, M., Skorey, K., O'Neill, G. P. and Riendeau, D. : Characterization of autocrine inducible prostaglandin H synthase-2 (PGHS-2) in human osteosarcoma cells. *Inflamm. res.* 46, 51 (1997).

- 2) Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C. and Seibert, K. : Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3228 (1994).
- 3) Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K. M., Hauser, S. D., Masferrer, J. L., Perkins, W., Lee, L. and Isakson, P. C. : Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammatory and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12013 (1994).
- 4) Michell, J. A., Akaraserenont, P., Thiernemann, C., Flower, R. J. and Vane, J. R. : Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11693 (1994).
- 5) Vane, J. K., Bakhle Y. S. and Botting, R. M. : Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 97 (1998).
- 6) Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van de putte L. B. A. and Lipsky, P. E. : Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB. J.* **12**, 1063 (1998).
- 7) Smith, W. L. : Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. *Amer. Physiol. Soci.* **92**, F181 (1992).
- 8) Dewitt, D. and Smith, W. L. D. : Yes, but do they still get headaches? *Cell.* **83**, 345 (1995).
- 9) Smith, W. L., Garavito, R. M. and DeWitt, D. L. : Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **271**, 33157 (1996).
- 10) Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Rogers, R. S., Rogier, D. J., Yu, S. S., Anderson, G. D., Burton, E. G., Cogburn, J. N., Gregory, S. A., Koboldt, C. M., Perkins, W. E., Seibert, K., Veenhuizen, A. W., Zhang, Y. Y. and Isakson, P. C. : Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: Identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-benzenesulfonamide(SC-58635, Celecoxib). *J. Med. Chem.* **40**, 1347 (1997).
- 11) Lazer, E. S., Sorcek, R., Cywin, C. L., Thome, D., Possanza, G. J., Graham, A. G. and Churchill, L. : Antiinflammatory 2-benzyl-4-sulfonyl-4H-isoquinoline-1,3-diones: novel inhibitors of COX-2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1181 (1998).
- 12) Chang, H. and Jahang Y. : Selective cyclooxygenase-2 inhibitors as anti-inflammatory agents. *Kor. J. Med. Chem.* **8**, 48 (1998).
- 13) Masaki, M., Matsushita, M. and Wakitani, K. : Inhibitory effects of JTE-522, a novel prostaglandin H synthase-2 inhibitor, on adjuvant-induced arthritis and changes in rats. *Inflamm. Res.* **47**, 187 (1998).
- 14) Lee, S., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D. and Hwang, D. : Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **267**, 25934 (1992).
- 15) Dray, F., Mamasd, S. and Bizzini B. : Problems of PGE antisera specificity *Meth. Enzymol.* **86**, 258 (1982).
- 16) Kwon, S. K. and Park, M. S. : Synthesis of Methoxybenzyl-benzisothiazine derivatives by Gabriel-Colman rearrangement reaction. *J. Kor. Chem. Soc.* **40**, 678 (1996).
- 17) Park, M. S. : Synthesis and crystal structure of asymmetric dimer of 1,2-benzothiazine derivatives using silver oxide. *J. Kor. Chem. Soc.* **42**, 657 (1998).
- 18) Kwon, S. K. and Park, M. S. : Synthesis of 1,2-benzothiazine-3-carboxamidylhydantoin derivatives and their antiinflammatory and with analgesic activities. *Arch. Pharm. Res.* **15**, 251 (1992).
- 19) Kwon, S. K. and Park, M. S. : Some new 1,2-benzothiazine derivatives with analgesic and anti-inflammatory activities. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **46(II)**, 966 (1996).
- 20) Rhee, J., Doh, S. and Koo, B. : Docking mode of 4,5-diarylpyrroles into cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Yakhak Hoeji* **43**, 776 (1999).
- 21) Noh, M., Ha, J., Lee, C., Lee, W., Lee, S. and Lee, J. : Inhibitory activities of natural products on lipopolysaccharide induced prostaglandin production in mouse macrophages. *Yakhak Hoeji* **42**, 558 (1998).
- 22) Herschman, H. R. : Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta* **1299**, 125 (1996).
- 23) Moon, T., Chang, K., Son, K., Kim, H., Kang, S. and Chang, H. : Screening of cyclooxygenase-2 inhibitors from natural products. *Yakhak Hoeji* **42**, 214 (1998).