

Hydantoin 및 2-Thiohydantoin 유도체의 합성과 사이클로옥시게나제 활성 검색

신혜순[#] · 최희전 · 권순경

덕성여자대학교 약학대학

(Received February 25, 2004; Revised April 1, 2004)

Synthesis and Screening of Cyclooxygenase Activity of Hydantoin and 2-Thiohydantoin Derivatives

Hea Soon Shin[#], Hee Jeon Choi and Soon Kyoung Kwon

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

Abstract — Selective COX-2 inhibitors were expected to retain anti-inflammatory activity by inhibition of prostaglandin production with reduction of gastric and renal side effect associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. This study reported the syntheses of novel 2-thiohydantoin and hydantoin derivatives which have the structure of 5-membered heterocyclic ring substituted with two aryl groups, phenyl group at 5-position and *p*-sulfamylphenyl or *p*-methoxyphenyl group at 1-position. These synthetic compounds showed significant COX-2 activities *in vitro* screening. Among them, 5-phenyl-2-thiohydantoin and hydantoin substituted with benzyl group at 3-position, compounds **5** and **8**, could be considered as lead compounds with IC₅₀=13.13~18.78 μg/ml for the development of COX-2 inhibitors.

Keywords □ 2-thiohydantoin and hydantoin derivatives, cyclooxygenase-2 inhibitor

사이클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)는 phospholipase, lipoxygenase 등과 같이 염증의 매개체인 eicosanoids의 생합성 과정에 관여한다. COX는 두 종류의 isoform, 즉 COX-1과 COX-2가 존재함이 밝혀졌는데 COX-1은 세포막구성형으로서 house keeping activity의 조절에 필요한 prostanoid를 생성한다. 예를 들면, 혈소판에 의한 thromboxane A₂(TXA₂)의 생성이나, 소화기점막에서의 prostanoid의 생성 및 신장에서의 신혈류 조절작용을 위한 prostanoid의 생성 등이다.¹⁻³⁾ COX-1과 달리 COX-2는 염증성 자극에 의해 단시간에 유도되는 발현현상을 나타내며 각종 cytokine, mitogen, 그람음성균의 세포벽 구성성분인 lipopolysaccharide(LPS) 및 tyrosine kinase 등의 자극에 반응하여 즉각적으로 유도되어진다. 일부 신생조직이나 특히 생리적 환경에 의해 염증부위에서 활성이 증가되어 PG를 생성하며 non-steroidal anti-inflammatory drug(NSAID)으로 억제되므로 해열, 진통, 항염제 등으로 응용된다.^{4,5)}

비스테로이드성 항염증약(NSAID)은 COX-2를 억제함과 동시에 정상조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 담당하는 COX-1과

지도 억제함으로써 위장관 출혈 등의 부작용을 유발시켜 사용이 매우 제한적이다.^{6,8)} 1990년 이후 COX-2 선택성이 밝혀진 DuP 697으로 시작된 diarylheterocycle계나 NS-398과 같은 arylsulfonamide계의 화합물이 항염, 진통작용은 보유했으면서 부작용을 경감시킴이 밝혀져 선택적인 COX-2 저해제의 개발연구가 계속되고 있는 추세이다. 현재 개발 중이거나 이미 활발히 연구되어 임상상에 사용되고 있는 선택적 COX-2 저해제로서 Celebrex와 Vioxx 등이 있으며 이들은 모두 구조적으로 공통된 성질을 지니고 있다.⁹⁻¹³⁾ 이와 같은 연구동향에 맞추어 저자들은 5원환의 heterocycle을 중심으로 평면상 두 개의 aromatic ring을 가지고 있으며 하나의 aromatic ring에는 4번 위치에 sulfonamide 등 산화된 형태의 S를 함유하고 있는 tricyclic system을 기본으로 하는 diarylheterocycle 계열에 착안하여 새로운 약물을 개발하였다.

따라서 본 연구에서는 염증의 매개물질인 eicosanoids의 생합성에 관계된 COX-2의 활성을 억제하여 염증반응을 감소시키는 작용기전에 착안하였다. 새로운 COX-2 저해제 후보물질의 항염 활성을 검색하는 연구로서는 murine macrophage RAW 264.7 세포주와 효소면역분석법(enzyme linked immuno assay, ELISA)를 이용하여 실험실적 세포실험(*in vitro*)으로 평가하기로 하였다. 약물들의 실험모델의 특성 및 처리조건에 따라 서로 다른 선택성의 결과를 나타낼 수 있었으나 PGE₂ 생성량을 정량하여 COX

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-901-8498 (팩스) 02-901-8386
(E-mail) hsshin@duksung.ac.kr

의 활성도를 측정하는 Engelhardt 등의 실험방법에 따라^{14,15)} 우선, COX가 발현되는 세포주에 LPS를 처리한 후 PGE₂ 생합성 변화를 비교하는 induction model로 저해효과를 검색하였으며, 다음 arachidonic acid(AA)로 전처리한 activity model로서 PGE₂ 생합성 변화를 정량하여 효소저해 활성도를 측정하였다. 즉, 선택적 구조로 약물디자인을 시도한 diarylheterocycle 계열의 5-phenyl-2-thiohydantoin 및 hydantoin 유도체들에 대한 COX-2 저해효과를 검색하여 약물구조와 약리활성과의 관계를 분석하고 자 하였다.

실험방법

시약 및 재료

합성 화합물들의 NMR spectrum은 TMS를 표준물질로 하여 300 MHz Gemini Varian NMR spectrometer로 측정하였다. IR spectrum은 Perkin-Elmer FT-IR spectrometer GX로 측정하였으며 GC-MS는 Agilent 6890 GC 및 5973 MS를 사용하였다. 약리활성 측정실험에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium powder, fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin 및 trypsin-EDTA 등은 GIBCO BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. Murine macrophage RAW 264.7 세포주는 한국 세포주은행에서 분양받았으며 PGE₂ 및 PGE₂-acetylcholinesterase tracer는 Cayman Co(Ann Arbor, MI)에서 구입하였다. Aspirin(acetylsalicylic acid), lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* 0111: B4), arachidonic acid, dimethylsulfoxide(DMSO) 등의 시약을 Sigma chemical Co(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며 기타 모든 시약들은 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

화합물의 합성

Methyl α -anilinophenylacetate의 합성 - Methyl α -bromophenylacetate 1.2 ml(7.9 mmol)을 *N,N*-Dimethylformamide 30 ml에 녹인 후, triethylamine 1.1 ml(7.9 mmol), aniline 0.7 ml(7.9 mmol) 순서로 넣어 80°C를 유지하면서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 종결한 후, ethyl acetate 20 ml와 물 20 ml로 추출하고 유기층을 무수 sodium sulfate로 건조시킨 후, 감압농축하였다. Methanol로 재결정하여 미황색결정의 methyl α -anilinophenylacetate를 합성하였다.

Methyl α -anilinophenylacetate- yield : 1.4 g(73.7%), Formula C₁₅H₁₅NO₂ (M.W. 241.2), ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.51(d, *J*=7.8 Hz, 2H, aromatic), 7.37-7.31(m, 3H, aromatic), 7.05(t, *J*=8.4 Hz, 2H, aromatic), 6.67(d, *J*=7.8 Hz, 2H, aromatic), 6.57(t, 1H, aromatic), 6.35(d, *J*=8.1 Hz, 1H, NH), 5.24(d, *J*=8.1 Hz, 1H, CH), 3.63(s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃)

δ 172.37 (C=O), 145.89, 137.55, 128.87, 128.48, 128.31, 127.19, 118.11, 113.38(aromatic \times 2), 60.69(CH), 52.81(CH₃). FT-IR (NaCl) cm⁻¹ 3401(NH), 2951(CH), 1737(C=O), 1174(CO). GC-MS: m/z 241.2(M⁺), 182.2(100.0), 77.2(92.6), 183.2(71.6), 104.2(65.9), 241.2(52.9).

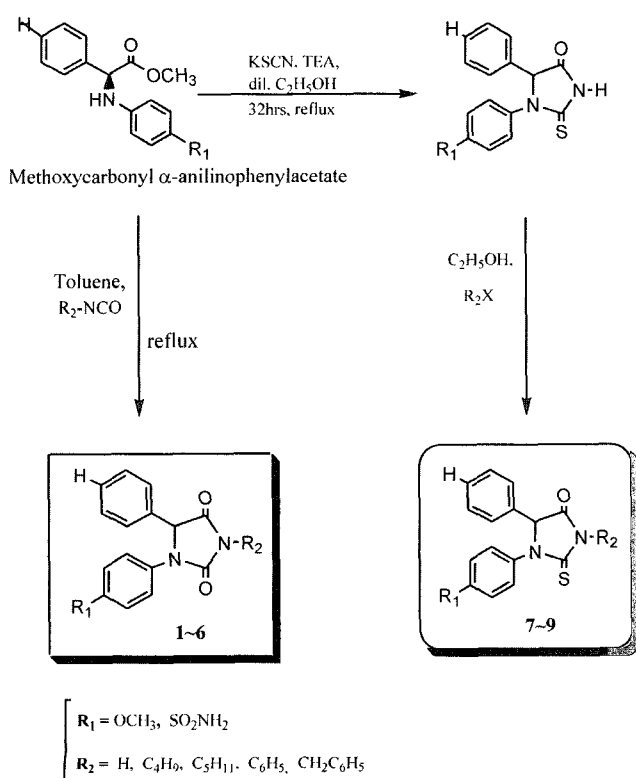
1-(*p*-Methoxyphenyl)-5-phenylhydantoin 화합물 (1-6)의 일반적인 합성 - Ethanol 10 ml에 methyl α -(*p*-methoxyanilino)phenylacetate 1.0 g(3.69 mmol)을 가하여 투명하게 녹인 후 KNCO 0.45 g(5.55 mmol)을 물 5 ml에 녹인 액을 일시에 가하고 8시간 동안 환류하였다. 반응액을 감압농축하고 ice bath 상에서 c-HCl로 pH 1까지 조정하면 회색빛이 도는 분홍색 결정이 석출되었다. Ethanol로 재결정하여 흰색결정의 1-(*p*-methoxyphenyl)-5-phenylhydantoin(1)을 합성하였다. Scheme 1에 나타난 바와 같이 위와 같은 방법으로 butyl isocyanate 0.42 ml(3.68 mmol)를 가하여 3-butyl-1-(*p*-methoxyphenyl)-5-phenylhydantoin(2)을 합성하였다. 또한 pentyl isocyanate 0.47 ml(3.68 mmol)를 가하여 3-pentyl-1-(*p*-methoxyphenyl)-5-phenylhydantoin(3)을 합성하였다. 또한 phenyl isocyanate 0.80 ml(7.38 mmol)를 가하여 3-phenyl-1-(*p*-methoxyphenyl)-5-phenylhydantoin(4)을 합성하였다. 또한 benzyl isocyanate 0.46 ml(3.68 mmol)를 가하여 3-benzyl-1-(*p*-methoxyphenyl)-5-phenylhydantoin(5)을 합성하였다. 그리고 ethanol 10 ml에 methyl α -(*p*-sulfamylanilino)phenylacetate 0.5 g(1.56 mmol) 및 KNCO 0.25 g(3.12 mmol)을 가하여 5-phenyl-1-(*p*-sulfamylphenyl) hydantoin(6)을 합성하였다.

1-(*p*-Methoxyphenyl)-5-phenylhydantoin(1)- yield : 0.81 g(77.9%), Formula C₁₆H₁₄N₂O₃ (M.W. 282.30), ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.50(d, *J*=7.2 Hz, 2H, aromatic), 7.37-7.25(m+d, 3H, aromatic), 6.64(d+d, *J*=9.3 and 9 Hz, 4H, aromatic), 5.01(s, 1H, CH), 3.60(s, 3H, CH₃), 3.40(s, 1H, NH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 173.00(C=O \times 2), 151.04, 140.96, 138.75, 128.26, 127.51, 127.35, 114.27, 114.10(aromatic \times 2), 60.42(CH), 55.09(CH₃). FT-IR (KBr) cm⁻¹ 3402(NH), 1514(CO). GC-MS: m/z 282.30(M⁺), 196.1(100.00), 211.1(88.27), 167.1(21.76), 210.2(15.50), 197.1(15.11).

3-Benzyl-1-(*p*-methoxyphenyl)-5-phenylhydantoin(5)- yield : 0.37 g(55.2%), Formula C₂₃H₂₀N₂O₃ (M.W. 372.42), ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.43-7.29(m+d, 12H, aromatic), 6.87(d, *J*=9 Hz, 2H, aromatic), 6.05(s, 1H, CH), 4.70(s, 2H, CH₂), 3.68(s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.31(C=O \times 2), 156.30, 154.17, 136.25, 133.63, 128.86, 128.64, 128.50, 127.46, 127.30, 123.40, 113.94(aromatic \times 3), 63.82(CH), 55.07(CH₃), 41.79(CH₂). FT-IR (KBr) cm⁻¹ 1777(C=O), 1713(C=O), 1515(CO). GC-MS: m/z 372.42(M⁺), 372.1(100.00), 196.1(38.26), 211.1(28.23), 373.1(26.95), 91.1(25.55).

1-(*p*-Methoxyphenyl)-5-phenyl-2-thiohydantoin 화합물 (7-9)의 일반적인 합성 - Ethanol 10 mL에 methyl α -(*p*-methoxyanilino)phenylacetate 1.0 g(3.69 mmol)을 가하고 약간 가운하면 서 교반하여 투명하게 녹였다. KNCS 0.72 g(7.38 mol)을 물 5 mL에 녹인 액을 일시에 가하고 triethylamine 1.03 mL(7.38 mmol)를 넣어 16시간 동안 환류하였다. 반응액을 감압농축하고 ice bath 상에서 c-HCl로 pH 1까지 조정하면 분홍색의 결정이 석출되었다. Ethanol로 재결정하여 회색결정의 1-(*p*-methoxyphenyl)-5-phenyl-2-thiohydantoin(7)을 합성하였다. 이와 같은 방법으로 benzyl isothiocyanate 0.98 mL(7.38 mmol)를 가하여 3-benzyl-1-(*p*-methoxyphenyl)-5-phenyl-2-thiohydantoin(8)을 합성하였다. 그리고 ethanol 10 mL에 methyl α -(*p*-sulfamylanilino)phenylacetate 1.0 g(3.12 mmol)과 KNCS 0.61 g(6.24 mmol) 및 triethylamine 0.87 mL(6.24 mmol)를 가하여 5-phenyl-1-(*p*-sulfamylphenyl)-2-thiohydantoin(9)을 합성하였다.

1-(*p*-Methoxyphenyl)-5-phenyl-2-thiohydantoin(7)- yield : 1.02 g (92.7%), Formula $C_{16}H_{14}N_2O_2S$ (M.W. 298.37), 1H -NMR (DMSO- d_6) δ 7.50(d, $J=6.9$ Hz, 2H, aromatic), 7.37-7.28(m+d, 3H, aromatic), 6.64(d+d, $J=9.3$ and 9.3 Hz, 4H, aromatic), 5.01(s, 1H, CH), 3.60(s, 3H, CH_3), 3.36(s, 1H, NH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ 172.96(C=O, C=S), 151.03,



Scheme 1 - Synthesis of 1,3-substituted-5-phenyl-2-thiohydantoin and hydantoin (1-9).

140.98, 138.82, 128.24, 127.48, 127.34, 114.27, 114.09 (aromatic $\times 2$), 60.46(CH), 55.10(CH_3). FT-IR (KBr) cm^{-1} 3403(NH), 1514(CO). GC-MS: m/z 298.37(M^+), 196.1(100.00), 211.1(92.10), 167.1(21.49), 210.2(15.03), 197.1(14.57).

3-Benzyl-1-(*p*-methoxyphenyl)-5-phenyl-2-thiohydantoin(8)- yield : 0.7 g(48.6%), Formula $C_{23}H_{20}N_2O_2S$ (M.W. 388.49), 1H -NMR (DMSO- d_6) δ 7.42-7.22(m+d, 12H, aromatic), 6.89 (d, $J=9$ Hz, 2H, aromatic), 6.12(s, 1H, CH), 5.08(d, $J=3.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.71(s, 3H, CH_3). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ 171.70(C=O, C=S), 158.10, 136.04, 132.82, 129.69, 129.00, 128.47, 128.38, 128.19, 127.78, 127.63, 127.37, 113.86 (aromatic $\times 3$), 68.00(CH), 55.13(CH_3), 44.70(CH_2). FT-IR (KBr) cm^{-1} 1752(C=O), 1513(CO). GC-MS: m/z 388.49(M^+), 388.2(100.00), 212.2(41.03), 387.2(29.02), 389.2(27.82), 91.1 (26.68).

RAW 264.7 세포주의 배양 및 약물처리

COX가 발현되는 세포주인 murine macrophage RAW 264.7 세포를 5% CO_2 , 37°C 배양기에서 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), 100 units/ml penicillin, 100 $\mu g/ml$ streptomycin 및 10% FBS(fetal bovine serum) 배지로 2~3일 간격으로 계대 배양하였으며 2~3회 계대한 세포를 실험에 이용하였다. 바닥에 부착된 세포를 분리할 때는 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 배양기의 부착면으로부터 분리시킨 다음 원심분리하고 3회 세척한 후 FBS가 함유되어 있지 않은 DMEM 배지로 50×10^4 cell/ml 가 되도록 현탁시켰다. 이 현탁액에 아스피린을 최종농도가 500 μM 이 되도록 첨가하여 세포에 잔존하는 COX의 활성을 비가역적으로 저해하였다. 이 현탁액을 96 well 세포배양판의 각 well에 200 μl 를 가하여 5% CO_2 , 37°C에서 4시간 동안 배양하여 세포를 plate의 각 well 바닥에 부착시켰다. 부착된 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척한 후 각 well 표면에 붙어있는 세포를 실험에 사용하였다.

효소면역분석법(ELISA)을 이용한 PGE₂의 측정

세포가 부착되어 있는 각 well에 1 $\mu g/ml$ 의 LPS를 함유한 10% FBS-DMEM을 200 μl 씩 넣었다. 이때 대조군에는 LPS가 없는 배지만을 넣었다. LPS가 포함된 배지로 교환한 후 DMSO에 녹인 검색시료를 적정량 처리하고, 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 18 시간 배양하여 그 상층액을 회수하여 유리된 PGE₂량을 효소면역분석법을 사용하여 정량하였다.¹⁶⁾ 항체가 부착되어 있는 plate의 각 well에서 회수한 상층액과 함께 PGE₂-acetylcholinesterase tracer를 넣어 상온에서 18시간 배양한 후, well에 남아있는 용액을 털어내고 0.05% Tween 20-PBS로 각 well을 5회 세척하고 Ellman 시약 160 μl 를 각 well에 넣은 후 7시간 배양하

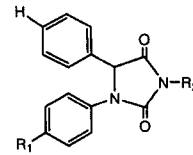
여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. PGE₂ 표준품으로 검량선을 작성하여 각 시료를 처리한 배양액 중의 PGE₂ 생성량을 구하였다. PGE₂의 정량은 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포 배양액에 함유된 PGE₂의 함량을 계산하였다. 실험군들은 LPS만 가한 대조군은 100% 활성 유발군, LPS와 ASA 등 약물을 가하지 않은 군은 0% 활성 유발군으로 나누었다. 100% 활성은 LPS를 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 생성된 PGE₂의 차이를 기준으로 하여 각 시료의 %저해값을 구하였다. 실험군과 대조군은 duplicate로 3회 이상 동일 실험을 진행하였다.

ELISA를 이용한 COX-2의 저해활성 측정

COX-2 유도발현은 배양된 최종세포수가 5×10^6 cell/ml로 조정된 96 well 세포배양판의 각 well에 10 µg/ml의 LPS를 처리하고 3%의 FBS가 함유된 DMEM 배지 200 µl를 넣고 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 COX-2와 COX-1 활성을 유도시켰다. 16시간 동안 배양한 후, PBS로 세포를 세척하고 각 well에 FBS가 함유되지 않은 DMEM 배지 200 µl를 넣고 검색시료를 적정량 처리하여 5~15분간 37°C에서 방치하였다. 최종농도가 10 µM이 되도록 AA를 처리하고 15~20분간 재배양하였으며 COX-1 활성 유도의 경우, 어떤 처리도 하지 않은 대식세포를 사용하였다. 반응 종료 후 일정량의 상층액을 회수하여 효소 면역분석법에 따라¹⁶⁾ ELISA plate reader를 이용하여 흡광도 504 nm를 측정하는 방법으로 유리된 PGE₂를 정량하였다. PGE₂의 정량은 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포 배양액에 함유된 PGE₂의 함량을 계산하였다. 각 화합물들의 IC₅₀는 AA를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 PGE₂에 대한, AA를 처리한 실험군에서 생성된 PGE₂량의 차이로부터 %저해값을 구한 후 산출하였다. 실험군과 대조군은 duplicate로 3회 이상 동일 실험을 진행하였다.

실험결과 및 고찰

비 스테로이드성 소염진통제의 문제점을 해결하기 위하여 salicylate 유도체로부터 시작된 NSAID 연구는 계속해서 pyrazolone 유도체와 diarylpyrazole 유도체 등으로 구조변환을 모색하며 신약개발을 시도하였다. Diarylheterocycle 구조에서 중앙에 위치하는 heterocycle은 pharmacophore이기보다는 단지 이중결합을 제공하는 역할을 하며 다양하게 변환을 시도할 수 있는 공간을 제공한다.^{17,18)} 이같은 연구추세에 맞추어 저자들은 heterocycle로 hydantoin ring을 선택하였고 그 주위에 2개의 aromatic ring을 갖는 목적화합물을 고안하였으며, 특히 1번 aromatic ring의 *p*위치에 electron donating group인 methoxy group을 도입하거나 electron withdrawing group이면서 약효에



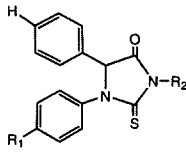
Comp.	R ₁	R ₂	Inhibition (%)
1		H	79.4 ± 47.5
2		C ₄ H ₉	86.8 ± 13.4
3	OCH ₃	C ₅ H ₁₁	70.6 ± 42.6
4		C ₆ H ₅	73.8 ± 23.7
5		CH ₂ C ₆ H ₅	85.6 ± 25.3
6	SO ₂ NH ₂	H	76.3 ± 35.7

Fig. 1 - % Inhibitory activity of 1,3-substituted-5-phenylhydantoin derivatives (1-6) on COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cell at 10 µg/ml.

중요한 역할을 할 것으로 여겨지는 sulfonamide group을 도입한 새로운 화합물을 개발하였다.

선택적 COX-2 저해제 후보약물의 약리활성을 검색하는 연구로는 COX가 발현되는 murine macrophage RAW 264.7 세포주에 LPS를 처리하여 COX-2를 유도한 후, 약물투여 후의 PG 생성량 변화를 비교하는 induction model¹⁴⁾ 이용하여 %저해값을 산출하였다. 먼저, 1,5-diarylhydantoin의 R₁이 methoxy group이나 sulfamyl group으로, R₃가 alkyl group으로 치환된 hydantoin 계열의 화합물들(1-6)의 효소저해 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 화합물 1은 79.4 ± 47.5(평균값 ± 표준편차), 화합물 2는 86.8 ± 13.4로, 화합물 3은 70.6 ± 42.6로, 화합물 4는 73.8 ± 23.7로, 화합물 5는 85.6 ± 25.3로, 그리고 화합물 6은 76.3 ± 35.7의 %저해값으로서, 화합물 2와 5는 매우 탁월한 COX-2 저해효과를 나타냈다. 그리고 R₁이 methoxy group이나 sulfamyl group으로, R₃가 alkyl group으로 치환된 2-thiohydantoin 계열의 화합물들(7-9)의 효소저해 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 화합물 7은 84.4 ± 33.8, 화합물 8은 78.8 ± 24.5 및 화합물 9는 66.3 ± 12.1의 %저해값으로 이 계열의 화합물들은 대체적으로 강한 COX-2 저해효과를 나타내었다.

이와 같은 효소유도 방법으로 측정된 PG 생성량 중에는 LPS에 의하여 유도된 COX-2 저해효과 이외에도 다른 경로에 의하여 생성된 PG량도 포함될 수 있다는 O'Banion 등의 보고에 따라¹⁹⁾ 합성화합물들이 COX-2에 대해 직접적인 저해활성을 갖는가를 판단하기 위하여 다음 단계의 실험을 진행하였다. 대식세포(macrophage cell)에 COX-2를 유도시킨 후 AA를 직접 전처리함으로써 약물투여 후에 유리된 PGE₂ 생성량 변화를 ELISA



Comp.	R ₁	R ₂	Inhibition (%)
7	H	H	~85
8	OCH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	~75
9	SO ₂ NH ₂	H	~65

Fig. 2 - % Inhibitory activity of 1,3-substituted-5-phenyl-2-thiohydantoin derivatives (7-9) on COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cell at 10 μ g/ml.

로 정량하는 activity model¹⁵⁾을 설정하였다. 이 실험방법을 통해 IC₅₀를 산출한 결과는 먼저, 1,5-diarylhydantoin의 R₁이 methoxy group이나 sulfamyl group으로, R₃가 alkyl group으로 치환된 hydantoin 계열의 화합물들(1-6)의 효소활성 저해도는 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 화합물 1의 IC₅₀ 값은 22.65 μ g/ml로, 화합물 2는 19.34 μ g/ml로 계산되었고, 화합물 3과 4는 %저해율이 50% 이하로 나타났기 때문에 IC₅₀ 값은 구할 수 없었다. 화합물 5는 13.13 μ g/ml로, 화합물 6은 28.43 μ g/ml로서 예상했던 결과대로 효소저해 활성도 평가에서도 화합물 5가 탁월한 선택적 COX-2 저해효과를 나타냈다. 그리고 R₁이 methoxy group 나 sulfamyl group으로, R₃가 alkyl group으로 치환된 2-thiohydantoin 계열의 화합물들(7-9)의 효소활성 저해도는 화합물 7의 IC₅₀ 값이 25.76 μ g/ml로, 화합물 8은 18.78 μ g/ml로, 그리고 화합물 9는 29.48 μ g/ml로서 COX-2 활성저해 선택성이 잠

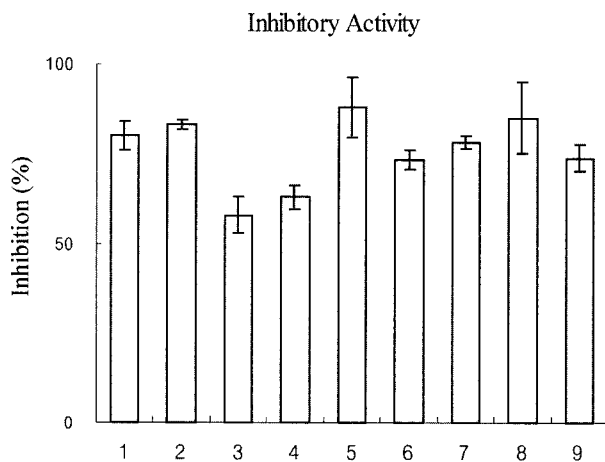


Fig. 3 - % Inhibitory activity of 1,3-substituted-5-phenyl-2-thiohydantoin and hydantoin derivatives (1-9) on COX-2 in LPS-stimulated murine macrophage cell with 10 μ M arachidonic acid.

재하는 결과가 확인되었다. 대부분의 화합물들의 결과에서 효소 유도 실험과 유사한 결과로 COX-2 활성저해 효과를 보여 실험의 신뢰도가 높은 것으로 나타났다. 위 실험의 대조약물인 Celecoxib의 IC₅₀은 동일농도에서 약 0.001 μ M이었으므로 가장 효과가 우수했던 화합물 5와 비교해 보았을 때에도 약 100배 정도의 차이가 있었다.

위와 같은 실험결과를 통하여 hydantoin ring의 1번 위치에 phenyl group보다는 *p*-methoxyphenyl group이 치환되어 있을 때와 3번 위치에 수소가 아닌 aralkyl group으로 치환되어 있을 때 그 효과가 좀 더 우수함을 알 수 있었다. 즉 1,5-diarylhydantoin의 R₁이 methoxy group으로, R₃가 benzyl group으로 치환되어있는 화합물 5가 가장 우수한 효과를 나타내었다. 한편 hydantoin ring이 형성되지 않은 화합물들은 약효검색 실험에서 %저해율이 50%에 미치지 않는 결과(자료생략)를 나타낸 것으로 미루어 보아 tricyclic system이 약효에 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 한편, 1,5-diaryl-2-thiohydantoin의 경우에도 R₁이 methoxy group으로, R₃에 aralkyl group 치환시 pentyl기나 phenyl기보다는 benzyl group으로 치환된 화합물 8이 강한 효과를 보였으며, 또한 위에 언급한대로 thiohydantoin의 S와 hydantoin의 O의 구조적 차이는 효소저해효과에서 뚜렷한 차이를 나타내지 않는 것으로 보아 중앙의 heterocycle 핵이 약리활성관계에는 중요하지 않음을 확인할 수 있었다. Kalgutkar 등에 의하면 Aspirin과 Indometacin은 COX-2보다 COX-1에 더욱 특이성이 있는데 Aspirin은 살리실산에서 COX-1, COX-2 활성자리의 serine 잔기로 acetyl group을 이동시켜 이들 효소를 비가역적으로 저해시키며, Indometacin은 초기에는 COX-1, COX-2에 가역적인 비공유성 결합을 일으키나, 곧이어 이들 효소의 구조적 변화를 야기시켜 비가역적 결합을 하게 되는 것으로 알려져 있다.²⁰⁾ 이러한 화합물의 구조와 약리활성과의 관계는 COX-1과 COX-2의 활성부위 아미노산 잔기와의 상호작용이 강한 이온결합이므로 선택성에 필요한 상호작용을 조절할 수 있게 되는 것이다. 이는 COX-2의 활성부위에서 수소결합을 할 수 있는 위치가 COX-1보다 더 많다는 Khanna 등의 보고와²¹⁾ 관련지어 본다면 수소결합이 가능한 선택적 구조특이성의 구조활성관계로 볼 수 있다.

정상조직 위점막세포의 COX-1에는 작용하지 않고 염증부위의 COX-2에만 특이적으로 작용해야 하는 선택적 측면에서 본다면 합성된 화합물들 중 가장 우수한 항염활성을 보이는 약물은 1,5-diarylhydantoin 계열의 유도체 중 1-methoxy기와 3-benzy기를 도입한 화합물 5와 1,5-diaryl-2-thiohydantoin 계열의 유도체 중 1-methoxy기와 3-benzy기를 도입한 화합물 8이 효소유도 실험과 활성저해도를 평가하는 실험 모두에서 탁월한 COX-2 저해활성을 나타내었고, 탁월한 COX-2 선택성을 보유하는 선도약물로 가능할 것임이 확인되었다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R04-2003-000-10138-0) 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Vane, J. R. : Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature (New Biol.)* **231**, 232 (1971).
- 2) 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).
- 3) Smith, W. L., Garavito, R. M. and DeWitt, D. L. : Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **271**, 33157 (1996).
- 4) Herschman, H. R. : Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta* **1299**, 125 (1996).
- 5) Chang, H. and Jahang, Y. : Selective cyclooxygenase-2 inhibitors as anti-inflammatory agents. *Kor. J. Med. Chem.* **8**, 48 (1998).
- 6) Michell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J. and Vane, J. R. : Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11693 (1994).
- 7) Allison, M. C., Howatson, A. G., Torrance, C. J., Lee, F. D. and Russell, R. G. : Gastrointestinal damage associated with the use of non-steroidal antiinflammatory drugs. *N. Engl. J. Med.* **327**, 749 (1992).
- 8) Clive, D. M. and Stoff, J. S. : Renal syndromes associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N. Engl. J. Med.* **310**, 563 (1984).
- 9) Gans, K. R., Galbraith, W., Roman, R. J., Harber, S. B., Kerr, J. S., Schmidt, W. K., Smith, C., Hewes, W. E. and Ackerman, N. R. : Antiinflammatory and safety profile of DuP 697, a novel orally effective prostaglandin synthesis inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**, 180 (1990).
- 10) Futaki, N., Yoshikawa, K., Hamasaka, Y., Arai, I., Higuchi, S., Iizuka, H. and Otomo, S. : NS-398, A novel non-steroidal antiinflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. *Gen. Pharmacol.* **24**, 105 (1993).
- 11) Penning, T. D., Talley, J. J. and Bertenshaw, S. R. *et al.* : 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).
- 12) Talley, J. J., Brown, D. L., Carter, J. S., Graneto, M. J., Koboldt, C. M., Masferrer, J. L., Perkins, W. E., Rogers, R. S., Shaffer, A. F., Zhang, Y. Y., Zeifel B. S. and Seibert, K. : 4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]benzenesulfonamide, Valdecoxib: A potent and selective inhibitor of COX-2. *J. Med. Chem.* **43**, 775 (2000).
- 13) Prasit, P., Wang, Z., Brideau, C., Chan, C. C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J. F., Ford-Huchinscn, A. W., Gauthier, J. Y., Gordon, R., Guay, J., Gresser, M., Kargman, S., Kennedy, B., Leblanc, Y., Leger, S., Mancini, J., O'Neil, G. P., Ouellet, M., Percival, M. D., Perrier, H., Reindeau, D., Rodger, I., Tagari, P., Therian, M., Vickers, P., Wong, E., Xu, L. J., Visco, D. and Patrick, D. : The discovery of Rofecoxib. MK-996, Vioxx, 4-(4-Methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone]. An orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1773 (1999).
- 14) Lee, S., Soyoola, E., Channugam, 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) 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. *Yak'hak Hoeji* **42**, 558 (1998).
- 16) Dray, F., Mamasd, S. and Bizzini B. : Problems of PGE antisera specificity. *Meth. Enzymol.* **86**, 258 (1982).
- 17) Xie, W., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L. and Simmons, D. L. : Expression of a mitogen-response gene encoding prostaglandin synthetase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3917 (1992).
- 18) Tsuji, K., Nakamura, K., Konishi, N., Tojo, T., Ochi, T., Senoh, H. and Matsuo, M. : Synthesis and pharmacological properties of 1,5-diarylpyrazoles and related derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 987 (1997).
- 19) O'Banion, M. K., Sadowski, H. B., Winn, V. and Young, D. A. : A serum and glucocorticoid regulated 4 kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase related protein. *J. Biol. Chem.* **266**, 23261 (1991).
- 20) Kalgutkar, A. S., Marnett, A. B., Crews, B. C., Rummel, R. P. and Marnett, L. J. : Ester and amide derivatives of the nonsteroidal antiinflammatory drugs, Indomethacin, as selective cyclooxygenase-2 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **43**, 2860 (2000).
- 21) Khanna, I. K., Yu, Y., Huff, R. M., Weier, R. M., Xu, X., Koszyk, F. J., Collins, P. W., Cogburn, J. N., Isakson, P. C., Koboldt, C. M., Masferrer, J. L., Perkins, W. E., Seibert, K., Veenhuizen, A. W., Yuan, J., Yang, D. C. and Zhang, Y. Y. : Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: Heteroaryl modified 1,2-diaryl-imidazoles are potent, orally active antiinflammatory agents. *J. Med. Chem.* **43**, 3168 (2000).