

Benzimidazole을 함유한 [1,2,4]-Triazole 유도체의 합성 및 생물학적 활성

전재호·임혜원·배애남·이소하[†]

한국과학기술연구원 생체과학연구부
(2006년 5월 30일 접수 ; 2006년 11월 30일 채택)

Synthesis of [1,2,4]-Triazole Derivatives Containing Benzimidazole and Biological Activities

Jae-Ho Jeon · Hye-Won Lim · Ae-Nim Pae · So-Ha Lee[†]

[†]Life Sciences Division, Korea Institute of Science and Technology, P.O.Box 131,
Cheongryang, Seoul 130-650, Korea
(Received May 30, 2006 : Accepted Nov. 30, 2006)

Abstract : [1,2,4]-Triazole derivatives were synthesized by 5 steps. Benzimidazole was refluxed with ethyl chloroacetate to give 1H-benzimidazole-acetic acid ethyl ester (1) over 52% yield. Ester (1) was refluxed with hydrazine hydrate in the presence of ethanol to afford 1H-benzimidazole-1-acetic acid, hydrazide (2). 5-Benzoimidazol-1-ylmethyl-4H-[1,2,4]triazole-3-thiol (4) was made via coupling of compound (2) with methyl isothiocyanate, followed by cyclization of 1H-benzimidazole-1-acetic acid, 2-[(methylamino)thioxomethyl]hydrazide (3) on reflux, and finally the target compounds (6a-6v) were synthesized by general substitution reaction. Compounds (6a-6v) were screened for T-type calcium channel blocker using the fluorescence assay by FDSS6000. All compounds (6a-6v) did not show better activities than control compound, mibefradil.

Keywords : benzimidazole, [1,2,4]triazol, T-type calcium channel blocker, biological activities.

1. 서론

신경세포내 칼슘은 세포 간 신호 전달에 중요한 역할을 하는데, 이의 핵심적인 역할을 하는 단백질이 칼슘 채널이다. 칼슘은 여러가지 유통 경로가 존재하나 말단 자극의 전달 시에는 전압

의존성 칼슘 채널 (voltage-dependent Ca²⁺ channel)이 중요한 역할을 하는데 세포 바깥쪽 으로부터 칼슘이온의 유입을 조절함으로써 근육 수축, 신경세포 발생, 신경전달 물질 및 호르몬 의 분비, 유전자 발현 등의 다양한 세포내 작용 을 조절한다.

전압-의존성 칼슘 채널은 처음에는 채널 개방 의 시간 및 전압 의존도와 약리학적 차단에 대 한 감도를 근거로 저전압 활성화 채널 (주로 T

[†]주저자 (email : LSH6211@kist.re.kr)

형)과 고전압 활성화 채널 (L, N, P, Q 및 R형)로 구분하였고[1], 본 연구에서는 저전압 활성화 채널에 관해서 설명하고자 한다. 현재까지 T-형 칼슘 채널의 알려진 기능은 신경세포의 다발성 발화 (bursting firing), 심장의 페이스 메이커 활동[2], 호르몬 알도스테론 분비 및 수정[3], 특히 최근에는 통증의 완화작용[4]에도 관련이 있음이 밝혀졌다.

현재까지 T-형 칼슘 채널을 억제하는 대표적인 약물은 Hoffman La Roche에 의해서 개발된 미베프라딜 (Mibefradil)[5] 이외에 몇 가지 약물이 있으나 (Fig. 1)[6,7], 이러한 약물들은 시력 불선명, 현기증, 구토 및 진정작용과 같은 각종 CNS 교란은 물론 생명을 위협하는 잠재적인 심부정맥 및 심부전증을 야기할 수 있어서 모두 실제 사용되기에는 많은 어려움이 있어 왔다. 따라서 T-형 칼슘 채널에 선택적이고 부작용이 없는 차단제의 개발은 간질, 고혈압, 통증 관련 질환들의 획기적인 치료제의 개발을 가져올 수 있을 것으로 생각되어 본 연구를 수행하게 되었다.

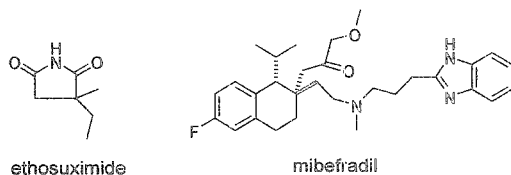


Fig. 1. The compounds developed as T-type calcium channel blocker

2. 실험

2.1. 기기 및 시약

분석기기는 NMR spectrometer (model No. Gemini 300, Varian Co., USA), IR spectrophotometer (model No. Spectrum GX, Perkin-Elmer, USA), 녹는점 측정장치 (model No. MPA 100, Stanford Research Systems, Inc., USA)를 사용하여 측정하였고, 스크리닝은 fluorescence drug screening system (model No. FDSS 6000, Hamamatsu Photonics, Inc., 일본)을 각각 사용하였다. 화합물 합성을 위하여 DMF, DMSO 및 hydrazine hydrate (Sigma-Aldrich Co., Korea)를 각각 사용하였고,

benzimidazole (TCI Co., Japan)을 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 1H-Benzimidazole-acetic acid ethyl ester (1)

2구 플라스크에 수산화나트륨 (14.9g, 371.9mmol)과 ethyl chloroacetate (51.5mL, 483.5mmol)를 600mL의 dimethylsulfoxide에 녹인 용액에 benzimidazole (21.96g, 186mmol)을 서서히 실온에서 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 약 30분간 교반 후 70°C에서 약 3시간 반응시켰다. 천천히 실온에서 식한 다음 증류수를 넣고 1.5L의 CH₂Cl₂로 추출하였다. CH₂Cl₂를 회전식 감압증발기로 농축 후 5% 메탄올을 사용, 실리카겔 컬럼으로 분리하여 순수한 목적 화합물을 얻었다 (19.73g).

수율 : 52%, mp:61-61.5°C, 61-62°C (literature)[8].

2.2.2. 1H-Benzimidazole-1-acetic acid, hydrazide (2)

2구 플라스크에 1H-benzimidazole-acetic acid ethyl ester (1) (13.85g, 67.9mmol)을 넣고 에탄올 200mL를 넣은 뒤 hydrazine monohydrate (4.35g, 135.7mmol)을 넣고 6시간 동안 환류시켰다. 실온으로 서서히 냉각시킨 후 얻어지는 갈색 고체를 에탄올로 재결정하여 순수한 목적 화합물을 얻었다 (10.4g).

수율 : 81%, mp:232°C, IR (KBr):3436, 3311, 1680, 1662, 1498 cm⁻¹, ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆):89.52 (s, 1H), 8.16 (s 1H), 7.64 (dd, J = 8.1, 1.2Hz, 1H), 7.52 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.28-7.17 (m, 2H), 4.86 (s, 2H).

2.2.3. 1H-Benzimidazole-1-acetic acid, 2-[(methylamino)thio(methyl)hydrazide (3)

2구 플라스크에 1H-benzimidazole-1-acetic acid, hydrazide (2) (6.36g, 33.5mmol)를 넣고 무수 에탄올 120mL를 넣은 뒤 질소 분위기 하에서 methyl isothiocyanate (2.5mL, 36.5mmol)을 적가 갈때기를 통해 천천히 넣고 약 3시간 환류시켰다. 실온으로 온도를 낮춘 후 생성되는 갈색 고체를 에탄올과 물로 재결정하여 순수한 목적 화합물을 얻었다.

수율 : 86%, mp:209°C, IR (KBr):3327, 3133, 1699, 1558 cm^{-1} , ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 10.2 5(bs, 1H), 9.36 (bs, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.11 (bs, 1H), 7.64 (dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 1H), 7.28-7.17 (m, 2H), 5.01 (s, 2H), 2.96 (s, 3H).

2.2.4. 5-Benzoimidazol-1-ylmethyl-4H-[1, 2, 4]triazole-3-thiol (4)

2구 플라스크에 1H-benzimidazole-1-acetic acid, 2-[(methylamino)thioxomethyl]hydrazide (3) (3.0g, 11.4mmol)을 에탄올 50mL에 녹인 다음, 1N 수산화나트륨 수용액 (1.74mL, 17.1mmol)을 서서히 실온에서 적가한다. 약 8시간 동안 환류시키고 실온으로 천천히 냉각시킨 후 에탄올을 회전식 감압 증발기로 제거한다. 얼음 중탕 하에서 반응 플라스크를 냉각 후 2N 염산 수용액을 천천히 적가하여 반응물의 수소이온 지수가 약 산성이 되도록 조절한다. 생성된 갈색 고체를 여과 후 증류수로 수 차례 세척하였다. 진공 건조 후 에탄올로 재결정하여 순수한 목적 화합물을 얻었다 (1.1g).

수율 : 68%, mp:242°C, IR(KBr):3077, 1552, 1492, 1441 cm^{-1} , ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 13.83 (bs, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.03-8.00 (m, 1H), 8.00-7.89 (m, 1H), 7.62-7.59 (m, 2H), 6.09 (s, 2H), 3.57 (s, 3H).

2.2.5. 2-(5-Benzoimidazol-1-ylmethyl-4-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-(phenyl)acetamide (6a)

2구 플라스크에 5-benzoimidazol-1-ylmethyl-4H-[1,2,4]triazole-3-thiol (4) (510mg, 2.1mmol)과 2-chloro-N-phenylacetamide (0.39g, 2.3mmol)를 무수 DMF (8mL)에 녹이고 무수 탄산칼슘 (440mg, 3.2mmol)을 넣고 70°C에서 6시간 질소 분위기 하에서 반응시킨다. 반응 후 회전식 감압 증발기로 DMF를 농축 후 메탄올 2mL에 반응 혼합물을 용해시킨 다음 얼음물을 천천히 적가하였다. 생성된 갈색 고체를 여과하여 에탄올과 물로 재결정 후 목적 화합물 (6a)를 얻었다 (508mg).

수율 : 64%, mp:190°C, IR (KBr):3302, 1689, 1598, 1561, 1494, 1173 cm^{-1} , ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 8.35 (s, 1H), 7.68-7.02 (m,

9H), 5.74 (s, 2H), 4.04 (s, 2H), 3.56 (s, 3H).

2.2.6. 2-(5-Benzoimidazol-1-ylmethyl-4-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-(2-chlorophenyl)acetamide (6l)

화합물 6l은 화합물 6a의 합성과 같은 방법에 의해 합성되었다.

수율 : 61%, mp:196°C, IR (KBr):1687, 1592, 1543, 1497, 1443 cm^{-1} , ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 9.87 (bs, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.68-7.46 (m, 4H), 7.30-7.18 (m, 4H), 5.75 (s, 2H), 3.61 (s, 2H), 3.57 (s, 3H).

2.2.7. 2-(5-Benzoimidazol-1-ylmethyl-4-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-(4-bromophenyl)acetamide (6m)

화합물 6m은 화합물 6a의 합성과 같은 방법에 의해 합성 되었다.

수율 : 58%, mp:190°C, IR (KBr):1687, 1609, 1548, 1490, 1459 cm^{-1} , ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 10.38 (bs, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.68-7.47 (m, 6H), 7.47-7.20 (m, 2H), 5.73(s, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.43 (s, 3H).

2.2.8. 2-(5-Benzoimidazol-1-ylmethyl-4-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-(2-chloro-4-trifluoromethylphenyl)acetamide (6n)

화합물 6n은 화합물 6a의 합성과 같은 방법에 의해 합성되었다.

수율 : 55%, mp:211°C, IR (KBr):1696, 1612, 1593, 1538 cm^{-1} , ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 10.00 (bs, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.10-8.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.70-7.62 (m, 2H), 7.47-7.46 (m, 1H), 7.18-7.15 (m, 2H), 5.56 (s, 2H), 4.14 (s, 2H).

2.3. T-형 칼슘 채널 활성 검색방법

활성 검색 12-24 시간 전에 폴리-L-라이신 (0.05mg/ml)으로 처리된 96-웰 플레이트에 96-웰 세포 분배기 (Titertek 제품)를 이용하여, α_{1G} T-형 칼슘채널과 Kir2.1이 안정적으로 발현되어 있는 HEK293 세포주 (α_{1G} 세포주 : KCTC

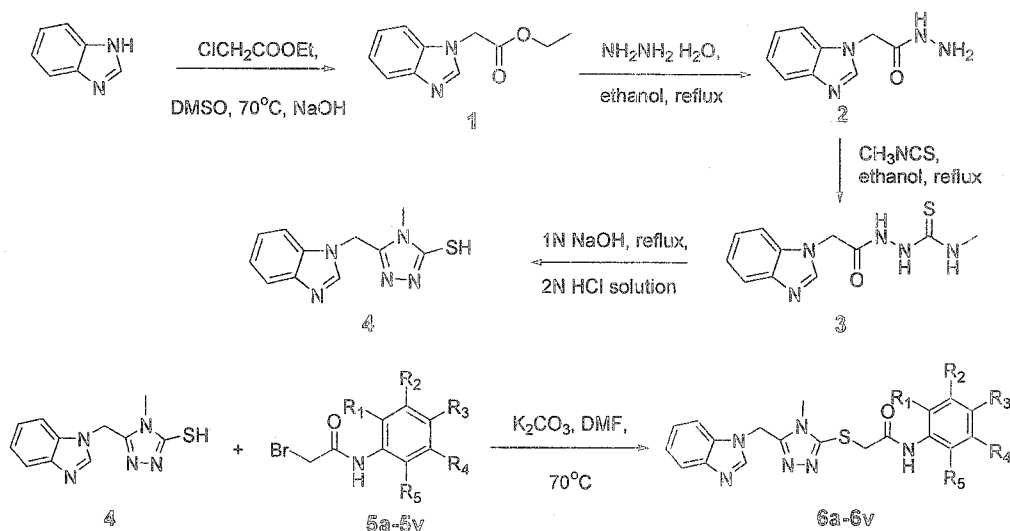
10519BP, 한국 생명공학 연구원 유전자 은행)의 세포를 한 웰당 4×10^4 밀도로 분주해 주었다. 실험 당일 96-well 플레이트에 부착된 세포들은 96-well 플레이트 자동 세척기기 (Bio Tek)를 이용하여 HEPES 완충용액 (단위 mM : 150 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 글루코스, pH 7.4)으로 3회 세척한 후 5 μ M 플루오-3/AM과 0.001% 플루로닉 (Pluronic) F-127을 포함하는 HEPES 완충용액의 실온 조건에서 1 시간 반응시켜 형광 염료로 표지한 후 HEPES 완충용액으로 다시 2회 세척하였다. 그 후 FDSS6000 기기 측정 10분 전에 10 mM CaCl₂을 포함하는 HEPES 완충용액으로 1회 씻고 최종 부피를 81 μ L로 조정하였다. 세포가 준비된 96-웰 플레이트와는 별도로 T-형 칼슘 채널을 활성화시킬 KCl (최종농도 75mM)과 차단제 약물을 포함할 2개의 96-well 약물 플레이트를 준비하였다. 대부분 세포기반 HTS 기기의 경우 약물 주입에 필요한 액체 애플리케이션 시스템은 있지만 액체 흡입 시스템은 없기 때문에 검색하고자 하는 차단제 약물 및 KCl을 5 배의 고농도로 10 mM CaCl₂ HEPES 완충용액에 27 μ L씩 준비하여 세포 플레이트의 최종 부피인 135 μ L에서 1/5로 희석되어 측정되어 진다. 구체적인 FDSS6000 측정조건으로는 20초의 기준 수치를 기록하고, 75초간의 약물 전처리 후 KCl 투여에 의해 변화되는 세포 내 칼슘농도 변화를

측정한 것으로 시험물질을 처리하지 않은 대조군에서의 340/380 비율값의 면적을 100%로 잡고, 시험물질의 억제 효과에 대한 백분율(%) 억제효과를 구하였고, 항상 10 μ M의 미베프라딜을 대조약물로 사용하였다.

자세한 칼슘 영상화 기술로는 FDSS6000에 장착된 크세논 램프 4개의 광원을 비추어 컴퓨터 제어 필터 휠 (computer-controlled filter wheel)에 의해 여기 파장 (340nm 및 380nm)을 선택적으로 세포에 노출시켰다. 매 1.23초 간격으로 데이터를 얻었으며 515 nm 고대역 통과 여과기 (long-pass filter)를 통과하여 들어온 방출 형광 (emitter fluorescence light)은 기기 안에 내장된 냉각 CCD 카메라 (Charge coupled device camera)를 지나 디지털 형광 분석기에 의해 96-웰 상에서의 웰 각각에 대해 평균 340/380의 비율값을 얻었다. 모든 영상 데이터와 분석은 하마마쯔 포토닉스 (Hamamatsu Photonics)에서 제공된 FDSS6000 전용 프로그램을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

Benzimidazole 함유 triazole 유도체 (6a-6v)는 benzimidazole을 시작물질로 사용하여 Scheme1과 같은 방법으로 합성하였고, 첫번째



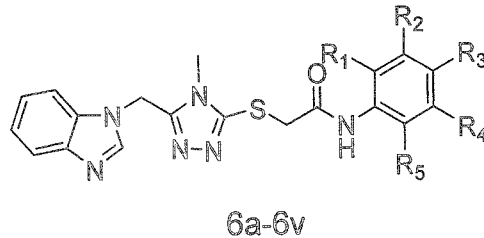
Scheme 1. Syntheses of target compounds

스텝은 acetonitrile하에서 ethyl-chloro acetate와의 환류 반응으로 에스테르 화합물(1)을 합성하였고[8], 화합물(1)은 hydrazine과의 transamination 반응에 의해 hydrazine 화합물(2)을 높은 수율로 합성하였다[9].

또한 hydrazine 화합물(2)는 methylisothiocyanate와의 환류반응에 의한 coupling으로 화합물(3)을 합성하였고, 이 화합물은 염기 존재 하에서 메틸 아미노 그룹의 N이 화합물 내의 카르보닐기를 공격하여 분자내 고리화 반응이 일어나 thiol 화합물(4)을 높은 순도와 수율로 합성할 수 있었다[10,11]. 화합물(4)는 화합물(5a-5v)과의 일반적인 친핵성 치환 반응에 의해 목표 화합물(6a-6v)를 합성할 수 있었다[12-15].

이 화합물들을 사용하여 앞에서 설명한 T-type Ca^{2+} channel 저해 활성 검색 방법을 사용하여 생물학적 활성을 조사하였고, 이의 결과를 Table1에 나타내었다. 벤젠기 내의 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 및 R_5 치환기를 수소, 메틸, 메톡시, 에톡시, 트리플루오르메틸, 니트로, 클로로, 브로모기등으로 치환한 화합물들을 합성하였는데, R_1 기를 클로로, R_3 를 트리플루오르메틸기로 바꾼 화합물 6n은 55.9%의 저해활성을 나타내어 스크리닝을 수행한 화합물 중에서 가장 좋은 결과를 나타내었고, R_3 기를 니트로기로 바꾼 화합물 6f는 21.52%, 브로모기로 치환한 화합물 6m은 27.80%의 저해 활성을 각각 나타내었다. 전체적으로 대조약제인 mibefradil 보다는 활성이 좋지는 않았으나, 10 μ M 농도에서 화합물 6m와

Table 1. Screening Result of Compounds (6a-6v)



entry	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	FDSS6000 (% inhibition, 10 μ M)
6a	H	H	H	H	H	17.42
6b	OCH ₃	H	H	H	H	4.19
6c	H	CF ₃	H	H	H	19.06
6d	H	H	CO ₂ Et	H	H	8.45
6e	H	H	OCH ₃	H	H	8.63
6f	H	H	NO ₂	H	H	21.52
6g	H	H	CH ₃	H	H	7.31
6h	H	H	OEt	H	H	-7.09
6i	H	CO ₂ Et	H	H	H	0.54
6j	H	CH ₃	H	H	H	9.59
6k	H	Cl	H	H	H	9.24
6l	Cl	H	H	H	H	15.89
6m	H	H	Br	H	H	27.80
6n	Cl	H	CF ₃	H	H	55.9
6o	CH ₃	CH ₃	H	H	H	5.50
6p	H	NO ₂	CH ₃	H	H	9.78
6q	CH ₃	H	NO ₂	H	H	10.82
6r	Cl	H	H	CF ₃	H	12.96
6s	CH ₃	H	H	H	CH ₃	-1.98
6t	H	Cl	CH ₃	H	H	26.63
6u	CH ₃	Cl	H	H	H	16.59
6v	OEt	H	H	OEt	H	23.59
Mibefradil						78.95

6t은 25% 이상의 우수한 저해작용을 나타내었고, 나머지 화합물들은 5-25% 이내의 저조한 활성을 나타내었다.

4. 결 론

본 연구에서는 T-type Ca^{2+} channel에 저해작용을 하는 화합물들을 5단계로 다수 합성하였다. 이들 화합물을 이용하여 T-type Ca^{2+} channel에 저해작용을 나타내는 생물학적인 활성을 조사하였으나 대조약제인 mibefradil 보다 좋은 활성을 보여주지는 않았지만, 합성 화합물 중에 화합물(6n)은 55.9%의 활성을 보여주어 고무적인 결과를 얻은 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 KIST 비전 21 프로그램의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. R. W. Tsien, D. Lipscombe, D. V. Madison, K. R. Bley, and A. P. Fox, Multiple Types of Neuronal Calcium Channels and Their Selective Modulation, *Trends in Neurosci.*, **11**, 431 (1998).
2. Z. Zhou and S. L. Lipsius, T-Type Calcium Current in Latent Pacemaker Cells Isolated from Cat Right Atrium, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **26**, 1211 (1994).
3. C. Arnoult, R. A. Cardullo, J. R. Lemos, and H. M. Florman, Activation of Mouse T-type Ca^{2+} Channels by Adhesion to the Egg Zona Pellucida, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 13004 (1996).
4. S. R. Ikeda, Calcium Channels-link Locally, Act Globally, *Science*, **294**, 318 (2001).
5. J. Bradbury, Posicor Withdrawn Voluntarily from Market by Roche, *Lancet*, **351**, 1791 (1998).
6. R. Felix, A. Sandoval, D. Sánchez, J. C. Gómora, J. L. Dela-Vega-Beltrán, C. L. Treviño, and A. Darszon, ZD7288 Inhibits Low-threshold Ca^{2+} Channel Activity and Regulates Sperm Function, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 187 (2003).
7. D. A. Coulter, J. R. Huguenard, and D. A. Prince, Specific Petit Mal Anticonvulsants Reduce Calcium Currents in Thalamic Neurons, *Neurosci. Lett.*, **98**, 74 (1989).
8. E. Cuevas-Yañez, J. M. Serrano, G. Huerta, J. M. Muchowski, and R. Cruz-Almanza, Copper Carbenoid Mediated N-alkylation of Imidazoles and Its Use in a Novel Synthesis of Bifonazole, *Tetrahedron*, **60**, 9391 (2004).
9. K. Sung and A.-R. Lee, Synthesis of [(4,5-Disubstituted-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio]alkanoic Acids and Their Analogues as Possible Antiinflammatory Agents, *J. Heterocyclic Chem.*, **29**, 1101 (1992).
10. J. R. Maxwell, D. A. Wasdahl, A. C. Wolfson, and V. I. Stenberg, Synthesis of 5-Aryl-2H-tetrazoles, 5-Aryl-2H-tetrazole-2-acetic Acids, and [(4-Phenyl-5-aryl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio]acetic Acids as Possible Superoxide Scavengers and Antiinflammatory Agents, *J. Med. Chem.*, **27**, 1565 (1984).
11. M. Y. Mhasalkar, M. H. Shah, S. T. Nikam, K. G. Anantanarayanan, and C. N. Deliwala, 4-Alkyl-5-aryl-4H-1,2,4-triazole-3-thiols as Hypoglycemic Agents, *J. Med. Chem.*, **13**, 672 (1970).
12. L. A. Gabriela, I. Alessio, P. Luca, M. Gheorghe, B. Stefania, S. Ioana, S. Andrea, and T. S. Claudiu, Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of the Cytosolic and Tumor-associated Carbonic Anhydrase Isozymes I, II, and IX with a Series of 1,3,4-Thiadiazole- and 1,2,4-Triazole-thiols, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 2347 (2005).
13. S. S. Surendra, A. K. Gupta, H. H. Singh, and T. K. Gupta, Benzimidazolyl-1,2,4(H)-triazoles as Central Nervous System Depressants, *J. Med. Chem.*, **15**, 999 (1972).

14. K. Zamani, K. Faghihi, M. R. Sangi, and J. Zolgharnein, Synthesis of Some New Substituted 1,2,4-Triazole and 1,3,4-Thiadiazole and Their Derivatives, *Turk. J. Chem.*, **27**, 119 (2003).
15. I. G. Abramov, A. V. Smirnov, L. S. Kalandadze, N. P. Gerasimova, N. A. Nozhnin, and V. N. Sakharov, Synthesis of 3-Aryl[1,2,4]triazolo-[3,4-b]benzothiazole-6,7-dicarbonitriles from 5-Aryl-4H-triazole-2-thio's and 5-Bromo-5-nitrophthalonitrile, *Chem. Heterocycl. Comp.*, **41**, 238 (2005).