

새로운 5-Fluorobenzimidazole 항진균제의 합성과 생물학적 평가

류성렬[†]

대불대학교 보건학부
(2011년 2월 22일 접수 ; 2011년 3월 18일 채택)

Synthesis and Biological Valutaion of New 5-Fluorobenzimidazole Antifungal Agents

Soung-Ryual Ryu[†]

Dept. of Health Science, Dae Bul Univ., Sam Ho. Young Arm, Chonnam Korea
(Received February 22, 2011 ; Accepted March 18, 2011)

Abstract : New type of 5-fluorobenzimidazole derivatives was synthesized through the reaction of 4-fluoro-5-(2,6-dimethylmorpholinyl)-2-aminoaniline with 5-nitro-2-furoic acid and 5-methoxy-3-chlorobenzothiophene-2-carboxylic acid in presence of PPA and treatment of OH⁻. the resulting substituted 5-fluorobenzimidazole derivatives(6), (7) was characterized by high solubility in common polar organic solvents. We considered 5-fluorobenzimidazole derivatives were useful especially for antifungal drugs. These results are discussed from the viewpoints of the chemical and physical structures of the 5-fluorobenzimidazole derivatives.

Keywords : benzimidazole derivatives, antifungals, antibacterial agent, 2-nitofuran

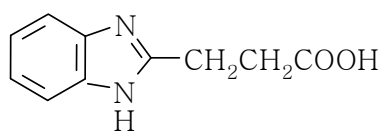
1. 서론

피부질환은 곰팡이(진균 또는 사상균) 감염으로 주로 *dermatophytes*에 속하는(*genus trichophyton*), 소포균속(*genus microsporium*) 그리고 피부균속(*genus epidermaphyton*) 등의 사상균에 대한 감염이다[1,2]. 항진균 치료에는 중전의 polyene계(Amphothercine B, Nystatin)와 Griseofulvin 그리고 Flucytosine이 널리 사용되고 있다. 이러한 제제들은 효모와 같은 곰팡이나 피부 사상균에 대해서도 항진균성을 나

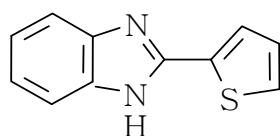
타내며 G(+)균에 대해서도 효과를 나타낸다고 보고되었다[3]. 그래서 Merk,Sharp과 Dohm사에서 발표한 Miconazole은 피부 사상균 등 진균 감염증의 치료에 광범위하게 사용되었다. 또한 Janssen 사에서 개발한 Etonam 은 항진균 범위가 넓은 imidazole유도체로서 우수한 생물학적 활성이 강한 것으로 알려졌다[4-6]. 그리고 1972년 Squibb사에서 개발한 Econazole은 G(+)균에 대하여 우수한 항진균 작용을 나타내었다[7-10]. 그러나 이러한 제제와 Ketoconazole[11]은 인체투여시 혈중농도가 낮거나 오심, 구토 및 면역기능저하 등의 문제가 제기되고 있다. 최근 benzimidazole 화합물들의

[†]주저자 (E-mail : cmtrsr@hanmail.net)

사용범위를 보면 구충제 및 항진균제, 항궤양 치료제 등으로 광범위하게 사용되고 있으며 대표적인 benzimidazole 항진균제는 Thiabendazole로써 이와 유사한 화학구조를 이루고 있다.



Thiabendazole



Procodazole

Procodazole 은 Fernandez이 개발하여 발표한 benzimidazole 유도체 화합물로서 구충제 또는 진균감염 치료에 광범위한 스펙트럼을 갖는 특징이 있다. 이 화합물을 유효성분으로 함유하는 제제는 경구투여시 *Paracoccidido mycoss* 및 *Histoplasmosis* 등을 비롯한 피부진균에 의한 감염에 대해 항진균 효과를 나타낸다[12]. 또한 aryl 기나 heteroarylalkanoic acid를 갖는 benzimidazole 화합물은 nonsteroidal 항염증 치료제로도 개발되었다[13].

이러한 약제의 개발은 보다 우수한 nonsteroidal 항염증 약효를 나타낸다는 측면에서 뿐 아니라 항균 및 항진균제로 사용할 수 있는 약제의 선택범위를 넓힘으로써 치료 가능한 진균류의 대상 폭을 넓힐 수 있다는 점에서 커다란 가치를 지니는 것이라 생각된다. 그 결과, 화합물의 구조와 항궤양 및 관절염 치료제, 항진균성 등의 효과와의 관계를 참고하여 새로운 benzimidazole 유도체를(6),(7)을 합성하여 약리효과에 대한 검증실험을 통해 항진균 효과를 확인하고자 하였다. 먼저 합성 하고자 하는 화합물은 Fig 1.에 나타내었으며, 그리고 이들 화합물에 대한 합성 경로는 Scheme 1~2.에 나타내었다.

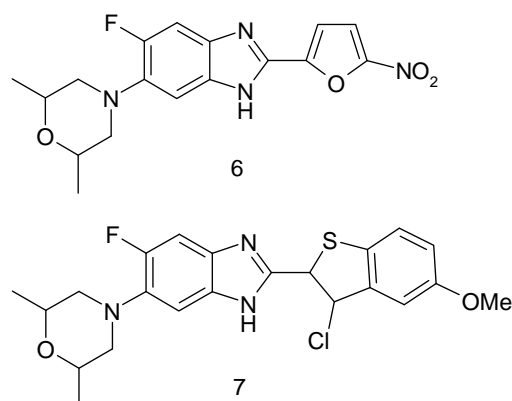
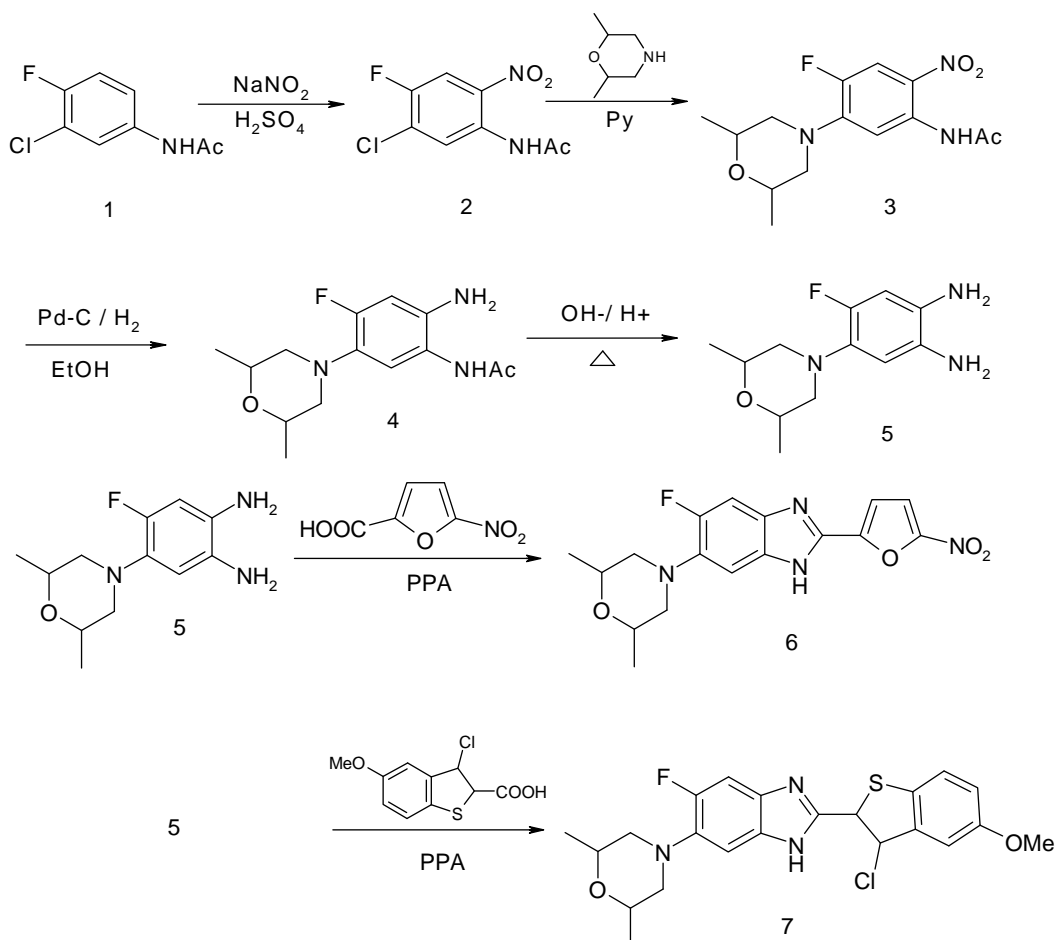


Fig. 1. 5-Fluorobenzimidazole derivative as target molecules.

2. 실험

2.1. 재료 및 기기

시약 및 용매는 덕산사 제품을 정제하여 사용하였으며, 합성에 사용된 시약은 일본 Yakuri pure chemical Co와 일본 Kanto chemical Co의 G.R급 시약 그리고 미국 Aldrich사의 G.R급 시약을 각각 사용하였다. 5-methoxy-3-chlorobenzothiophene-2-carboxylic acid는 Ocean Bio Tec사로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 합성한 화합물을 확인하는데 사용한 기기 중 용점 측정은 Thomas Hoover melting point apparatus를 사용하였으며 보정은 하지 않았다. IR 스펙트럼은 Bruker IFS 66 FT-IR S분광계를 사용하여 얻었으며, 표면구조는 Hitachi X-650의 scanning electron microscope를 사용하여 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectra는 Varian T60 과 HA-100 spectrophotometer를 이용하였다. 그리고 T. L. C plate는 Merk DC-Fertig Platten Kieselgel 60F 254를 사용하였고, 미생물 측정기기는 shaking incubator (LMI-3004, PL.Labtec. Co., Korea), Colony counter(CC-109, Dong Yang Sci.Co., Korea)를 각각 사용하였다.



Scheme 1. The Synthetic route of 5-fluorobenzimidazole derivatives.

2-2. 5-Fluorobenzimidazole 유도체의 합성

2.2.1. 5-Chloro-4-flouro-2-nitroacetanilide(2)의 합성

삼구 둥근 플라스크에 H_2SO_4 15 ml를 넣고 이어서 3-chloro-4-flouroacetanilide 0.8 g(0.004 mol)를 넣은 다음 저어 주었다. 그리고 $0^\circ C$ 이하에서 HNO_3 2.4 ml(0.053 mol)을 소량씩 천천히 넣은 후 $0^\circ C$ 에서 4시간 동안 저어주었다. 그리고 혼합물을 실온으로 올린 후, 얼음수 200 ml에 혼합한 다음 생성된 결정화합물을 모아 거르고 수회 증류수로 세척을 하였다. 생성된 고체화합물을 silicagel 60F-254(eluent: $CHCl_3$: MeOH = 90 : 10)로 관크로마토 그래프

하고 정제하여 1.1 g(수율; 85%)를 수득하였다. MP : $171\sim 172^\circ C$

2.2.2. 5-(2,6-Dimethylmorpholinyl)-4-flouro-2-nitroacetanilide(3)의 합성

삼구 둥근 플라스크에 화합물(2) 1 g (0.0043mole), pyridine 25 ml을 넣은 다음 교반하였다. 이 반응혼합물에 2,6-dimethylmorpholine 4.1 g(0.04 mole)를 넣은 후 저어주면서 3시간 동안 환류시킨 다음 실온으로 냉각시켜서 dichloromethane 200 ml를 넣고 층을 분리하였다. 분리된 유기 층을 증류수로 2회 세척한 다음 무수 $MgSO_4$ 로 건조시키고 감압 농축시켰다. 생성된 시럽상 물질에

n-hexane 100 ml를 가하고 실온에서 6시간 동안 저어준 다음 결정 화합물을 거르고 다시 dichloromethane에 녹이고 n-hexane : iso-propylalcohol(1 : 1, v/v)혼합 용매로 재결정하여 백색결정 화합물 1.2 g (수율: 92%)를 수득하였다.

MP : 83~84°C

2.2.3. 4-Fluoro-5-(2,6-dimethylmorpholinyl)-2-aminoaniline(5)의 합성

3구 둥근 플라스크 내에서 methanol 50 ml에 합성한 화합물(3) 9.9 g(0.03mol)를 녹인 다음 Pd-C 0.9 g / H₂ 기류 하에서 약 16시간 흔들며 주면서 동안 저어주었다. 혼합물을 거르고 감압 농축하여 생성된 고체를 소량의 dichloromethane에 녹이고 n-hexane : iso-propylalcohol(1 : 1, v/v)혼합 용매로 재결정하여 4-Fluoro-5-(2,6-dimethylmorpholine)-2-aminoacetanilide(4)인 백색결정 화합물 5.6 g (수율: 67%)를 수득한 다음 이어서 화합물(4) 4.4 g(0.02)를 35% NaOH 25 ml에 넣고 가온하여 90°C에서 3시간 반응시킨 다음 실온으로 냉각시키고 이를 2N HCl로 약 20분 동안 저어주면서 중화하고 이어서 CHCl₃ 120 ml를 이용하여 3회 추출한 다음 증류수로 2회 세척하고 유기층을 모아서 무수 MgSO₄로 탈수한 후 감압 농축하여 생성된 결정화합물 3.5 g (수율 : 73%)를 수득하였다.

MP : 110 °C < Dec

2.2.4. 5-Fluoro-6-(2,6-dimethylmorpholinyl)-2-(5-nitro-2-furoyl) benzimidazole(6)의 합성

삼구 둥근 플라스크에 화합물(5) 4.4 g(0.02mole)를 PPA(polyphosphoric acid) 25 ml에 넣고 여기에 5-nitro-2-furoic acid 3.5 g (0.02 mole)를 넣은 후 약 110°C에서 3시간 반응시킨 다음 실온으로 냉각시키고 이를 수산화나트륨 40%용액으로 약 20분 동안 중화하여 CHCl₃ 120 ml를 이용하여 추출한 다음 증류수로 2회 세척한 다음 무수 MgSO₄로 탈수한 후 감압 농축하여 생성된 결정화합물 4.6 g(수율: 64%)를 수득하였다.

MP: 154~157°C

2.2.5. 5-Fluoro-6-(2,6-dimethylmorpholinyl)-2-(5-methoxy-3-chlorobenzothiophen-2-yl)benzimidazole(7)의 합성

삼구 둥근 플라스크에 화합물(5) 4.4 g (0.02mole)를 PPA(polyphosphoric acid) 25 ml에 넣고 여기에 5-methoxy-3-chlorobenzothiophene-2-carboxylic acid 4.4 g (0.02 mole)를 넣은 후 약 110°C에서 3시간 반응시킨 다음 실온으로 냉각시키고 이를 수산화나트륨 40%용액으로 약 20분 동안 중화하여 CHCl₃ 120 ml를 이용하여 추출한 다음 증류수로 2회 세척한 다음 무수 MgSO₄로 탈수한 후 감압 농축하여 생성된 결정화합물 6.1 g(수율: 73.5%)를 수득하였다.

MP: 160~162°C

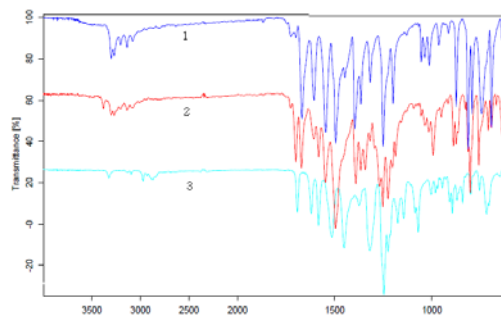


Fig. 2. FT-IR spectra of the compare with No 1,2,3 compounds.

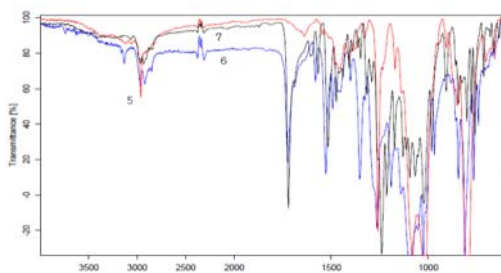


Fig. 3. FT-IR spectra of the compare with No 5,6,7 compounds.

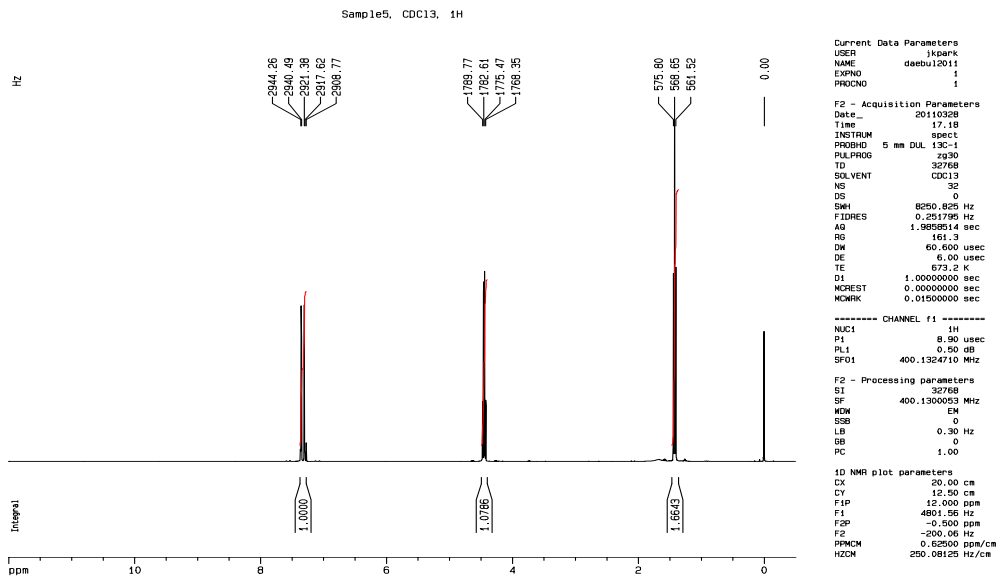


Fig. 7. $^1\text{H-NMR}$ spectra of 5-fluoro-6-(2,6-dimethylmorpholinyl)-2-(5-nitro-2-furoyl)benzimidazole.

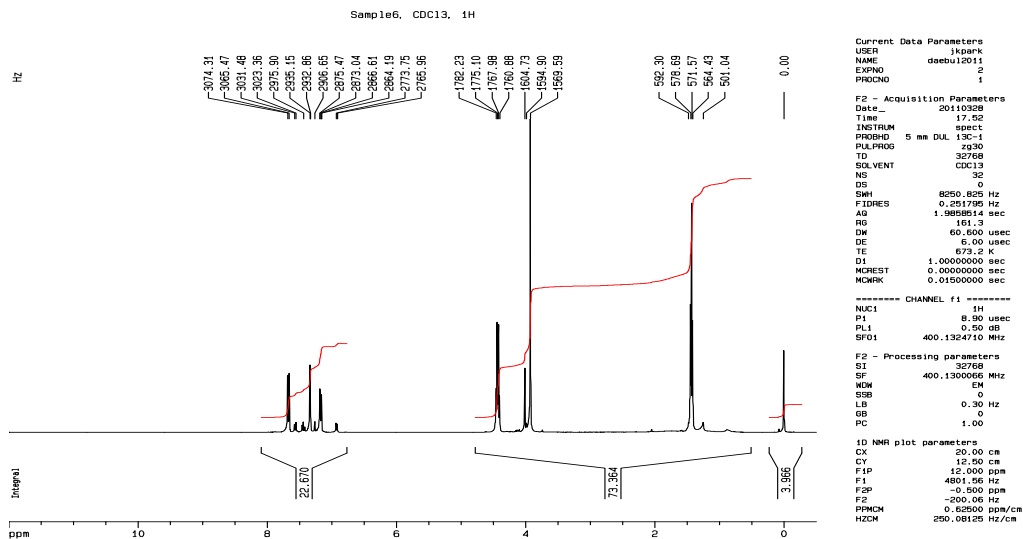


Fig. 8. $^1\text{H-NMR}$ spectra of 5-fluoro-6-(2,6-dimethylmorpholinyl)-2-(5-methoxy-3-chlorobenzothiophen-2-yl)benzimidazole.

2.3. 항진균력 시험

새로 합성한 5-fluorobenzimidazole 유도체인 화합물 (6)과 (7) 화합물의 항진균성 효과 검증에 *C. albicans* (ATCC 10231), *A. niger* (ATCC 16404) 및 *S. cerevisiae* (ATCC 9763)의 균류를 사용하였고, 배지로는 박테펩톤 20

g, 효모추출물 10 g, 염화나트륨 20 g, 증류수 21 ml의 조성으로 이루어진 LB 배지(pH 7.3)를 사용하였다.

그리고 항진균제인 ketoconazole을 대조약제로 하여 이들을 각각 함유하는 검정배지를 제조하였다. 즉, DMF 0.3%(v/v)을 함유하는 인산

완충액(1.0% w/w, pH 6.0) 1 ml에 각 화합물을 첨가하여 이를 LB 배지와 혼합하였을 때, 항진균제의 최종 농도가 100 $\mu\text{l/ml}$ 가 되도록 하였다. 그리고 이를 2배씩 희석 시켜 0.05 $\mu\text{l/ml}$ 까지 농도가 다른 12개씩의 용액을 제조하였다. 한편, 균체 액은 LB배지로 ml당 10개의세포가 포함되도록 제조하여 사용하였으며, 균체 액의 농도는 1.20% LB 아가지에서 측정된 CFU(Colony Forming Unit)에 따라서 결정하였으며 진균은 36°C에서 48시간 동안 미리 진탕 배양한 것을 사용하였다.

균체액과 항진균제 용액을 20000 : 1(v/v)의 비율로 혼합한 다음 각 화합물에 따라서 45시간까지의 범위에서 매 5부 마다 670nm에서의 광학밀도 (Optical Density)를 측정하였다. 광학밀도에 의거하여 균류의 증식곡선을 작성하고, 증식곡선으로부터 최소 억제농도(Minimum Inhibitory Concentration : MIC)를 결정하여 하기 표1의 결과를 얻었다.

Table 1. Antibacterial activity of 5-fluorobenzimidazole derivatives (MIC : $\mu\text{l/ml}$)

No of Compd.	(6)	(7)	Ketoconazole
<i>S. cerevisiae</i> (ATCC 9763)	0.46	1.8	2.5
<i>A. niger</i> (ATCC 16404)	1.2	2.73	3.4
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	0.42	2.23	2.8

ATCC is an abbreviation for American Type Culture Collection.

3. 결과 및 고찰

5-Fluorobenzimidazole 유도체인 항진균제 화합물 (6)과 화합물 (7)의 합성 경로는 Scheme 1과 2에 나타냈다. 즉 본 연구에서는 Goro Tsukamoto등이 보고한 방법을¹³⁾ 수정하여 중간체 화합물인 (5)와 5-nitro-2-furoic acid와 5-methoxy-3-chlorobenzothiophene-2-carboxylic acid를 이용하여 고리 화 반응을 시도한 합성과정에서 PPA를 사용하여 110°C에서 3시간 이상 반응시켜 새로운 항진균제 화합물(6)과

(7)을 각각 64%와 73.5%의 수율로 합성하였다. 특히 최종화합물인 5-fluorobenzimidazole 유도체인 항진균제 화합물 (6)과 화합물 (7)을 합성하는 과정에서 중간체 화합물인 (4)을 얻기 위해서 중간체 화합물 (3)을 이용하였다. 이 과정에서 환원 반응을 시도하기 위해서 Pd-C 촉매를 이용하여 H₂(g) 2 Psi압력 하에서 반응을 시도하였다. 이때 반응과정에서 화합물의 nitro기가 amine기로 치환된 생성된 화합물은 액상 시럽형태를 이루고 있어서 화합물의 물리적 특성상 불안정하고 불순물 정제가 매우 어려웠다. 그러나 이 화합물을 n-hexane : isopropylalcohol(1:1, v/v)혼합 용매로 진개시켜서 isopropyl과 acetonitrile용매로 결정 화합물을 분리할 수 있었다. 이 결과 ethylalcohol 보다는 isopropyl을 사용했을 때 결정 화합물이 쉽게 석출하였으며 이는 diamine 화합물의 화학구조상 수소결합에 따른 극성 용해도가 증가되어 결정이 쉽게 생성되지 않음을 확인하였다. 그리고 화합물의 최소 발육 저지 농도(MIC)에 대한 결과를 조사하여 다음 결과를 얻었다. 5-fluorobenzimidazole 유도체인 항진균제 화합물 6과 화합물 (7)에서는 *Candida adlicans*와 *Saccharomyces cerevisia*에 대해 0.42와 2.23으로 케토코나졸 보다 *Candida adlicans*는 각각 약 6배와 1.2 배 이상 우수하고 *Saccharomyces cerevisia* 는 각각 약 5배와 1.1배로 활성도가 나타났다. 그리고 화합물 (6)과 화합물(7)에 대한 활성을 측정한 결과 Table 1.에서 나타난 바와 같이 예상했던 것과는 달리 오히려 전반적으로 기존 약제인 ketoconazole 보다 항진균 활성 효과가 우수하게 나타났다. 그러나 *Apergillus niger*균류 경우 합성한 화합물 (6)의 경우 1.2로 화합물 (7)의 2.23보다 오히려 약간 더 우수하였다. 그러나 전반적으로 ketoconazole 보다 대등하거나 2배가량 활성이 우수하였다. 이러한 결과는 5-fluorobenzimidazole 유도체인 항진균제 화합물의 활성도를 검토한 연구경험을 바탕으로 볼 때 치환체에 2-nitrofuryl치환기가 결합한 최종 생성물이 더 활성이 강한 것으로 예상된다.

4. 결론

5-Fluorobenzimidazole 유도체인 항진균제의

개발은 보다 우수한 약효를 나타낸다는 면에서 뿐 아니라 앞으로 항진균제 이상의 사용할 수 있는 약제의 선택 범위를 넓힘으로써 치료 가능한 진균류와 항균제 그리고 항바이러스제 등의 활성범위의 폭을 넓힐 수 있다는 점에서 커다란 가치를 지니는 것이라 생각되었다. 본 연구에서는 2-nitrofuranyl이 항균제 중간체로 널리 쓰이고 있는 점을 주목하였다. 그 결과, 화합물의 구조와 항균 및 항진균성 등의 효과와의 관계를 참고하여 새로운 화학구조를 갖는 화합물 (6)과 별도로 (7)의 화합물을 개발하였으며, 약리효과에 대한 몇 가지 검증실험을 통해 그의 항진균 효과를 확인하게 되었다. 또한, 합성한 화합물(6)에 5-nitro-2-furoic acid 치환기를 도입함으로써 해서 항진균 효과를 나타내는 것과 유사하게, 구충제인 furoconazole과도 유사한 구조를 갖기 때문에 구충제나 비 스테로이드형 관절염 치료제로 이용될 수 있다고 예상된다. 따라서 앞으로 각종 실험을 통한 약리학적 효과를 확인함으로써 피부질환용 항진균제로 사용될 수 있으리라 생각되며, 이들 화합물에 대한 다양한 항진균성 실험 등을 실시하고 화학구조 변화에 따른 약효검색을 실시하여 멀지 않은 시일 내에 보고하고자 한다.

참고문헌

1. Beneke, E. S. and Rogers, A. L. : *Medical Mycology* 4th. Ed., Burgess Pub. Co., p.1~8(1980).
2. Finegold, S, M. and Baron, E. J. : *Baily and Scotts Diagnostic Mincrobiology* 7th Ed., The C.V. Mosby Co., p.678~774 (1986).
3. R. J. Holt, *Drugs*, **9**, 401(1972).
4. E.P. Goderfori, P. A. J. Janssen, C. A. M. Van Der Eyckem, A. H. M. T. Van Heertum, and C. J. E. Niemegeers, *J. Med. Chem.*, **8**, 220(1965).
5. E. P. Goderfroi, J. Van Custsem, C. A. M. Van Der Eyckem, and P. A. J. Janssen, *J. Med. Chem.*, **10**, 1160(1967).
6. R. Vanbreusegham, J. Van Cutsem, and D. Thienpont, *Chemotherapy.*, **12**, 107 (1967).
7. J. Van Cutsem and D. Thienpont, *Chemotherapy.*, **17**, 392(1972).
8. J.E. Bennett, *Ann. Intern. Med.*, **73**, 653 (1970).
9. K. H. Buchel, W. Draber, E. Regel, and M. Plempel, *Arzeim-Forsch.*, **22**, 1260 (1972).
10. R. J. Holt, *Drugs.*, **9**, 401(1975).
11. Heeres. R. J., Backy, J. J., Mostmans, J. H. and Van Gutsem, J : Antimycotic imidazole IV. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new ptent orally active broad-spectrum antifungal agent. *J. Med. Chem.* **22**, 1003(1979).
12. J. Van Cutsem and D. Thienopont, Preclinical Research Report R41 400/1. Janssen Pharmaceutica, Beerse, *Belgium* (1977).
13. Goro Tsukamoto, Koihiro Yoshino, Toshihiko Kohno, *J. Med. Chem.* **23**, 734 ~738(1980).