



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2009년 2월

석사학위논문

Synthesis and evaluation of
naphthoquinone derivatives

조선대학교 대학원

첨단부품소재공학과

전 종 진

나프토퀴논 유도체의 합성 및 활성평가

Synthesis and evaluation of naphthoquinone
derivatives

2009年 2月

조선대학교 대학원

첨단부품소재공학과

전 종 진

Synthesis and evaluation of naphthoquinone derivatives

지도교수 조 훈

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2009年 2月

조선대학교 대학원

첨단부품소재공학과

전 종 진

전종진의 석사학위논문을 인증함

위원장	조선대학교 교수	유 지 강 (인)
위 원	조선대학교 교수	김 준 섭 (인)
위 원	조선대학교 교수	조 훈 (인)

2008年 12月

조선대학교 대학원

목 차

I. 서론	1
II. 결과	7
1. Synthesis of 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene	7
2. Synthesis of substituted- <i>N</i> -((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)thiazol-2-amine	8
3. Synthesis of naphthoquinone derivatives	8
4. 암세포에 대한 MTT 실험	9
III. 실험	20
1. Synthesis of 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene	20
2. Synthesis of 6(or 2)-((4-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (5~8)	24
3. Synthesis of 6(or 2)-((6-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (9~12)	28
4. Synthesis of 5,8-dimethoxy-6(or 2)-((5-methylthiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (13~16)	31
5. Synthesis of 5,8-dimethoxy-6(or 2)-((5-(methylthio)-1,3,4-thiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (17~20)	34
6. 측정기기 및 시약	37
7. 세포배양	37
8. MTT Assay	38
IV. 결론	39
V. 참고문헌	40

부록 ¹H NMR

감사의 글

List Of Schemes

Scheme 1. Electron transfer mechanism for DNA damage by anthracyclines	4
Scheme 2. Ubiquinones and hydroquinone	5
Scheme 3. 1,4-Naphthoquinone	6
Scheme 4. Synthetic pathway of 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene	7
Scheme 5. Cytotoxicity of 6(or 2)-((4-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl -5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione against AML-2 cells	9
Scheme 6. Cytotoxicity of 6(or 2)-((6-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl -5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione against AML-2 cells	11
Scheme 7. Cytotoxicity of 5,8-dimethoxy-6(or 2)-2-((5-methylthiazol-2- ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione against AML-2 cells	13
Scheme 8. Cytotoxicity of 5,8-dimethoxy-6(or 2)-((5-(methylthio)-1,3,4 -thiadiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione against AML-2 cells	15
Scheme 9. Cytotoxicity of Cisplatin against AML-2 cells	16
Scheme 10. The relationship(ED_{50}) between naphthoquinone derivatives compounds and cisplatin in AML-2 cells	17
Scheme 11. The relationship(ED_{50}) between naphthoquinone derivatives compounds and Vinblastin and Paclitaxel in A549 cells	17

Abbreviation

CAN : Cerium (IV) ammonium nitrate

DMF : *N,N*-Dimethylformamide

LAH : Lithium aluminum hydride

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl
tetrazolium bromide

THF : Tetrahydrofuran

TLC : Thin layer chromatography

DMSO : Dimethylsulfoxide

Abstract

Synthesis and evaluation of naphthoquinone derivatives

Jong Jin Jeon

Advisor : Prof. Hoon Cho

Department of Advanced Parts and
Materials Engineering

Graduate School of Chosun University

Quinone is a common constituent of biologically relevant molecules (e.g. Vitamin K1 is phylloquinone). Others serve as electron accepters in electron transport chains such as those in Photosystems I & II of photosynthesis, and aerobic respiration. They are widely distributed in nature and play an important biological part, but also happen as substances of potential toxicological significance in environmental pollutants, and some are used to anticancer drugs.

The compound which is consisted of a structure of naphthoquinone has an antimicrobial and antitumor activity. The cytotoxicity of these quinone analogues results from the inhibition of DNA topoisomerase-II.

In the study, 20 compounds with a naphthoquinone moiety were designed and synthesized to investigate the cytotoxicity anti-cancer cell activity against AML-2 /WT (leukemia disease) and A549 (lung cancer). 6- and 2-sunstituted naphthoquinone derivatives were prepared and investigated in order to figure out the relation between the position of dione and the cytotoxicity and antitumor activity.

2-Formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphtalene, the key starting material, was

synthesized from 1,5-Dihydroxynaphthalene via four-step reaction which has a methylation, bromination, methoxylation and formylation. The oxidative demethylation of substituted 1,4,5,8-tetramethoxynaphthalenes by chromium (VI) oxide and cerium (IV) ammonium nitrate yielded two different isomers: 6-substituted and 2-substituted 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone derivatives.

Synthesized 6- and 2-substituted 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone derivatives showed a potent anticancer activity in MTT Assay against AML-2/WT and A549 anti-cancer. Most 2-substituted 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone derivatives showed much higher cytotoxicity in antitumor activity than 6-substituted 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone derivatives. We concluded that 1,4-dione functional group should be located at the right rather than the left one for better activities. Moreover, introduction of benzothiazole and thiazole side chain at the C-2 or C-6 position of 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone showed much better anti activity than other 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene and other substituted-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)thiazol-2-amine.

1. 서론

암(cancer)은 개체의 필요에 따라 규칙적이고 절제 있는 증식과 억제를 할 수 있는 정상세포와 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성되어 종괴(腫塊) 또는 종양을 형성하는 것이다. 오늘날 가장 치명적인 질병 중의 하나로서 발병의 직접적인 요인은 암을 유발하는 화학물질, 바이러스, 방사선 등에 의한 것으로 현대사회의 변화로 인한 환경오염과 방사선에의 과다 노출 및 생활습성의 변화로 그 종류와 발생빈도는 날로 증가하고 있는 실정이다. 암이 발생하는 원인은 아직도 정확히 밝혀진 바 없다. 하지만 지금까지 알려진 바에 따르면 정상적인 세포의 유전자나 암 억제 유전자에 돌연변이가 생겨서 나타난다고 알려져 있다. 대표적인 암 억제 유전자인 p53 유전자의 경우는 자연발생적인 원발성 종양(primary cancer)의 약 50%에서 이 유전자의 돌연변이가 관찰되었다. 그러나 특정 유전자 몇 개의 변이로만 암이 일어나는 것이 아닌 것은 확실해 보인다. 유전자 치료를 통해 정상 p53유전자를 암세포에 주입했을 경우 환자의 상태가 호전되지 않는다는 연구가 발표되어 있는 것을 봐도 복잡한 원인에 의해서 발생하는 것으로 사료된다. 다만 몇 가지 발암원(carcinogenesis cancer)을 연구함으로써 그것들의 사용을 금지하고 있다. 폐암(lung cancer)은 지속적인 흡연(간접 흡연 포함), 도시 공해 등이 발암원이라고 추정되며 간암(liver cancer)은 지나친 음주 등이 원인으로 추정된다. 또한 벤젠과 같은 일부 방향족 탄화수소가 강력한 발암원임이 밝혀졌으며 폴리염화비닐을 태울 때 나오는 다이옥신 또한 발암원이다. 암은 최초로 발생한 원발암(primary cancer)과 암세포가 전이되어 발생한 전이암(metastatic cancer)으로 구분할 수 있으며, 혈액이나 임파액이 인근 장기에 접촉함으로써 퍼져나간다. 정상세포는 시간적으로 짧은 세포분열시기 (mitosis)와 긴 휴식기간(interphase)을 거쳐서 성장과 분열을 하게 되는데, 발암물질의 외적자극을 받게 되면, 비정상적인 분열이 시작됨으로써 암이 발생하게 된다. 종래에는 발암물질이 작용하여 정상세포가 암세포화 하는 것으로 알려져 왔으나 최근에는 initiator라고 하는 물질이 세포의 유전자 DNA를 변질시키고, 그 다음 promoter라고 하는 발암 촉진물이 작용하여 암세포화 한다고 알려져 있다. 암은 크게 3가지 증상으로 나눌 수 있다.

국소적 증상: 평상시에 보이지 않는 종류의 종기(종양), 헤모레이지(hemorrhage,

출혈, 아픔이나 궤양이 있다. 주변의 조직을 누르게 되면 황달(jaundice, 눈이나 피부가 노랗게 되는 것)같은 증상이 일어날 수 있다.

전이 증상(퍼지는 증상): 림프절이 커지고 기침, 각혈(hemoptysis), 간 비대(hepatomegaly), 뼈가 아프거나 영향을 받은 뼈의 손상, 신경학적인 증세. 이미 진행된 암이 고통을 유발하기도 하지만 초기 증상은 아닌 경우가 많다.

시스템적인 증상: 체중 감소, 식욕 저하, 피로나 오히려 체중이 늘 수도 체력 감퇴(cachexia, wasting), 과도한 땀흘림, 자면서 식은땀을 흘림, 빈혈, 또는 특정한 전이 현상, 예를 들면 암 활동 중의 호르몬 변화 등이 있다.¹⁻¹²

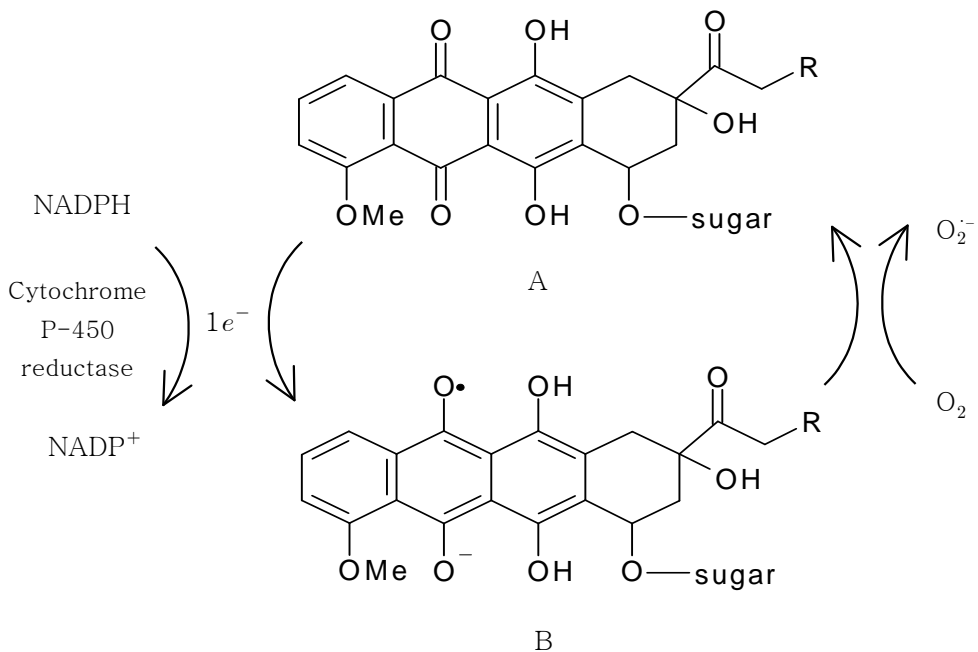
암은 조기에 발견하면 절제 수술만으로 완치가 가능하며 재발율도 낮다. 하지만 전이를 시작한 암은 고치기가 힘들며 말기의 암은 현대의학으로 고칠 수 있는 것이 없으며 다만 몇 가지 항암제에 의존하여 환자의 생을 늘려줄 수는 있다. 위암의 경우는 일부 국가에서 항암 치료제를 개발에 실제 사용되고 있으며, 폐암 등도 연구가 진행 중이다. 한편 여성들 사이에 자주 발생하는 유방암은 조기 발견시 절제 수술만으로 치료가 가능하나 전이가 시작되면 사망율이 매우 높다. 암의 치료법 중 가장 좋은 것은 조기 예방이며 흡연, 음주 등을 피해야 한다. 또한 몇 가지 사례의 경우는 숲속으로 들어가 암이 자연 치유된 경우도 있는데 이는 나무가 내놓는 물질의 역할이 크다고 추정된다. 하지만 아직 정확한 것은 밝혀진 바 없다. 암 치료방법 중에 화학요법(chemotherapy)이 있다. 이는 본래 목적(항암제의 개발)으로서 시작된 것이 아니다. 제1차 세계 대전 때 사용된 머스타드 가스를 제2차 세계 대전 동안 군사적 목적을 위해 연구하던 중 머스타드 가스에 사람이 노출되는 사고가 일어났고 곧이어 그들의 백혈구 수가 감소한 사실이 발견됐다. 과학자들은 머스타드 가스가 비정상적으로 신속하게 분열하는 백혈구와 유사한 암세포에도 유사한 효과를 나타낼 것으로 생각하고 1942년 다수의 림프종 환자에게 머스타드 가스(NH_3 , NH_2)를 정맥에 주사했다. 환자들의 치료에 대한 반응은 일시적이었지만 분명히 효과는 있었다. 이것을 계기로 과학자들은 암에 대해 동일 효과를 지닌 물질을 찾기 시작했다. 종양, 즉 암은 DNA의 손상이 일어난 세포의 무분별한 분열로 발생하며 자가면역질환은 특정 물질이나 자신의 조직에 대한 신체 면역계의 비정상적 반응으로 발생하는 질환이다. 대조적으로, 이식 거부반응은 타인의 조직을 이식받은 사람의 면역계가 공격하는 것으로 지극히 정상적인 면역 반응이지만 그 결과는 치명적

이다. 포괄적으로 말해 화학요법들은 약물마다 암세포를 공격하는 방법이 다른데, 이런 암세포 억제 효과를 통틀어 세포독성(세포독 효과)이라고 한다. 신속하게 분열 과정이 진행되는 세포일수록 이 효과를 더 많이 받는다. 과학자들은 아직 면역계나 화학요법이 종양의 특징을 포착하여 목표로 삼게 하는 것에 성공하지 못했다. 이것은 신속하게 세포분열이 이루어지는 다른 조직, 즉 머리카락이나 위장 상피세포도 정상적인 상태임에도 세포독성효과를 받는다는 것이다. 모든 화학요법은 어린 세포에게 효과적으로 작용한다. 앞서 설명했듯이, 거의 모든 약물들이 세포 성장이 이루어지고 있는 동안 작용하기 때문이다. 종양 세포의 세대가 길어질수록, 즉 미분화가 진행된 세포일수록 화학요법에 대한 감수성이 떨어지게 된다. 고형암(solid tumours)의 경우 암 덩어리의 중앙에 실질적으로 분열하는 세포가 있는데 이 세포가 세포분열을 멈추게 되면 약물이 거의 작용할 수 없게 된다. 또한, 고형암의 커지는 특징이 분열중인 세포에게 약물이 도달하기 어렵게 하여 감수성을 더욱 떨어뜨린다. 이때에는 외과적 처치나 방사능 요법을 사용해야 한다. 화학요법의 약물 종류는 크게 다음으로 나눌 수 있다:알킬화제(alkylating agents), 대사길항제(antimetabolites, 항대사제), 안트라사이클린(anthracyclines), 식물 알칼로이드, 토포아이스머라아제 저해제(topoisomerase inhibitors), 단일클론 항체(monoclonal antibodies), 그리고 그 외 몇 가지 항암제가 있다. 몇몇 신약은 DNA를 직접적으로 손상하지 않는다. 이런 신약 중 가장 대표적으로 이매티닙이 있는데, 티로신키나아제 저해제인 이매티닙 메탄 설펜산을 함유하고 있다. 이 물질은 특정 암에서 보이는 분자차원의 비정상적 동태를 목표로 설정한다. 이런 약물은 표적 치료제로 불리는데, 부작용이 거의 없으면서 뛰어난 치료 효과를 가지고 있다. 호르몬도 화학요법의 하나이다. 호르몬은 종양 세포를 직접적으로 공격하지 않고, 그것들의 세포적 동태를 변화시킨다. 다만, 항암제로서의 호르몬은 보조적 역할만을 수행하며 단일 사용은 효과적이지 않다. 하기의 약물 분류는 국제약물분류체계(Anatomical Therapeutic Chemical Classification System, ATC)를 기반으로 하고 있으며, 기재된 코드는 해당 종류의 약물을 모두 포함한다.¹³⁻²⁵

백혈병(白血病, leukemia)은 혈액 세포, 특히 백혈구가 이상 증식하는 혈액종양의 일종이다. 제대로 성숙하지 못한 백혈구가 대량으로 혈액 속에 존재하므로 백혈병이라 한다(또한 이 백혈구는 정상 백혈구보다 세포 기관을 포함한 세포의 크기가

훨씬 크다). 백혈구의 비정상적인 증식에 비해, 정상적인 혈구 세포의 수는 극히 적어지게 되어 면역기능은 물론 산소 운반이나 영양 공급과 같은 기본적인 혈액의 기능을 수행할 수 없게 된다. 또한 비정상적인 백혈구는 자가 면역 질환과 유사한 반응을 일으켜 정상 조직을 파괴하기도 한다. 현재 만성 골수성 백혈병(CML)에 대하여 우수한 효과를 보이는 글리벡이 출시되어 많은 효과를 거두고 있다.²⁶⁻²⁷

최근의 연구에 의하면 shikonin 유도체들이 혈소판 활성억제에도 효과가 있음이 보고되었다. 이와 같이 shikonin 유도체들이 다양한 실험에서 항암효과 등 약리 활성을 타나냄에 따라 이를 약물로 개발하기 위한 연구가 많은 과학자들에 의해 진행되고 있으며, 조직 배양을 통해 대량생산을 위한 연구가 많이 진행되고 있다.²⁸

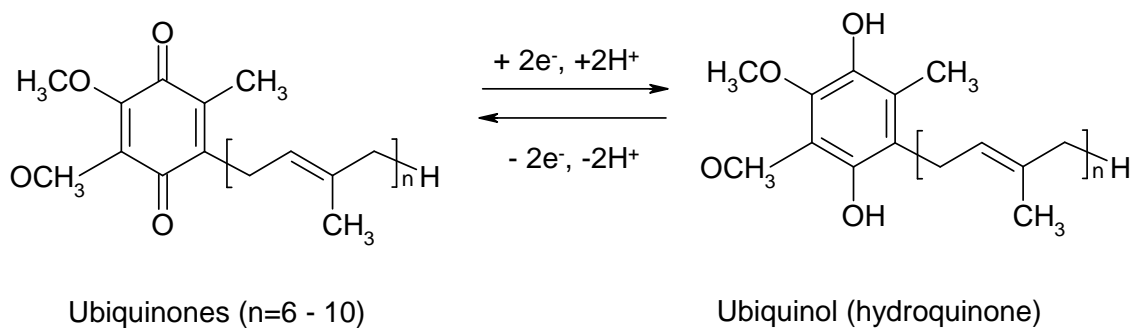


Scheme 1. Electron transfer mechanism for DNA damage by anthracyclines

Shikonin류의 화학적 구조를 보면 naphthoquinone으로 되어 있는 것을 볼 수 있으며 이러한 구조는 anthracycline계 약물에서도 찾아볼 수 있다. Quinone류는 자

연계에 널리 분포하고 있으며 다양한 생물학적 activity를 갖는다. 또한 환경 오염 원이기도 한 몇몇 quinone류는 항암제(anti-cancer drug)로 사용되고 있다. Quinone류는 redox cycling, arylation, intercalation, DNA 손상, free radical 형성, mitochondria 호흡억제 등의 다양한 작용 메커니즘에 의하여 세포독성을 나타낸 것으로 알려져 있다. 특히 quinone류는 'oxidative stress'의 형성을 수반하게 되고, 이어서 flavoenzyme (NADPH-cytochrom-*P*-450 reductase) 과 mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase에 의해 semiquinone free radical이 형성된다. Semiquinone free radical로부터 다시 quinone으로 되돌아가는 과정에서 superoxide를 형성하게 되고 (Scheme 1), superoxide로부터 hydroxyl radical이 생성되는데, 이것은 DNA에 작용하여 세포분열을 억제하게 된다.

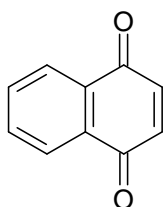
자연은 효소촉매반응에서 한 쌍의 전자를 한 물질로부터 다른 물질로 전달하는데 이와 같은 가역적인 산화-환원반응을 잘 이용한다. 이 점에 있어서 중요한 화합물은 우비퀴논(ubiquinone; ubiquitous + quinone - 이들 퀴논류는 모든 생물세포의 미토콘드리아 막 내부에서 발견된다)이라고 부르는 화합물들이다. 우비퀴논은 보조 효소 Q(CoQ)라고도 부른다. 우비퀴논은 길다란 아이소프린 유도체인 곁사슬을 가지고 있다. 인체의 우비퀴논곁사슬에는 10개의 아이소프린 단위가 있다. 그 구조에서 이 부분은 매우 비극성이며, 우비퀴논을 미토콘드리아 막 내부의 소수성 이중 틈 사이에서 용해시키는데 기여한다.



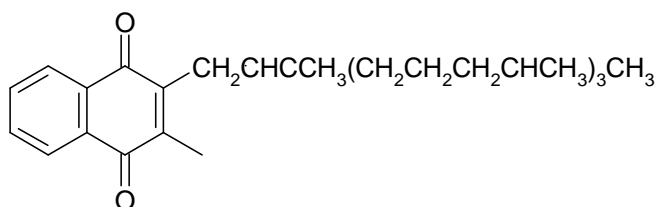
Scheme 2. Ubiquinones and hydroquinone

막의 환경에서 용해도는 전자전달 계통의 한 성분으로부터 다른 성분으로 수평 확산이 일어나는 것을 촉진한다. 전자 전달 계통에서 우비퀴논은 2개의 전자와 2개

의 수소원자를 받아들여 하이드퀴논이 된다. 하이드 퀴논 형태가 전자 2개를 다음 수용체에다 가져다 주는 것이다. [Scheme 2.]



1,4 - Naphthoquinone



Vitamin K₁

Scheme 3. 1,4-Naphthoquinone

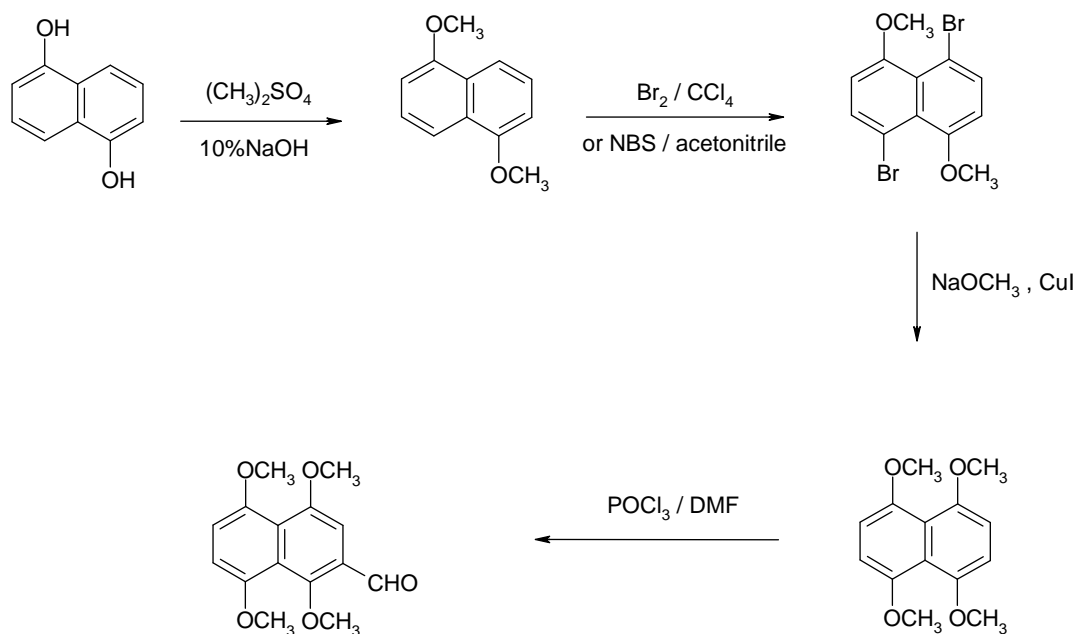
혈액의 응고성을 유지하는 기구로 중요한 영양인자인 비타민 K₁은 1,4-naphthoquinone 구조를 가지고 있다. [Scheme 3.]³⁰

Naphthoquinone 골격을 갖고 있는 anthracycline계 약물들은 redox cycling, intercalation 등의 작용 메커니즘 외에 DNA 복제에 관여하는 topoisomerase에 작용하여 항암효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 shikonin의 모핵인 naphthoquinone의 2번 또는 6번 탄소위치에 여러 가지 관능기를 치환하고, 약효검색을 통하여 암세포에 대한 활성부위를 규명하고, 구조-활성 관계를 정립함으로써 새로운 화학구조를 갖는 항암제를 개발하고자 한다. 최근에는 benzothiazole 골격을 갖는 많은 유도체들이 개발되고 있으며 또한 thiazole을 도입하여 항암효과도 알아보려고 한다. 그래서 aniline 구조를 가진 치환된 4가지 화합물을 선택해서 naphthoquinone의 2번 또는 6번 탄소 위치에 도입함으로써 높은 항암효과를 갖는 새로운 구조의 약물들을 개발하고자 한다.

II. 결과

1. Synthesis of 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene

1,5-Dimethoxynaphthalene (1)을 출발 물질로 하여 methylation, bromination, methoxylation, formylation의 4 단계 반응을 통하여 naphthoquinone 유도체의 합성을 위한 중간물질인 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene을 합성하였다. (Scheme 4.) 4 단계 반응 중 methylation (65.1%), bromination (bromine 사용 시 70%, NBS사용 시 80%), formylation (96%) 수율을 얻었고, methoxylation은 약 55%의 수율로 4단계 반응 중 가장 낮은 반응성을 나타내었다.



Scheme 4. Synthetic pathway of 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene

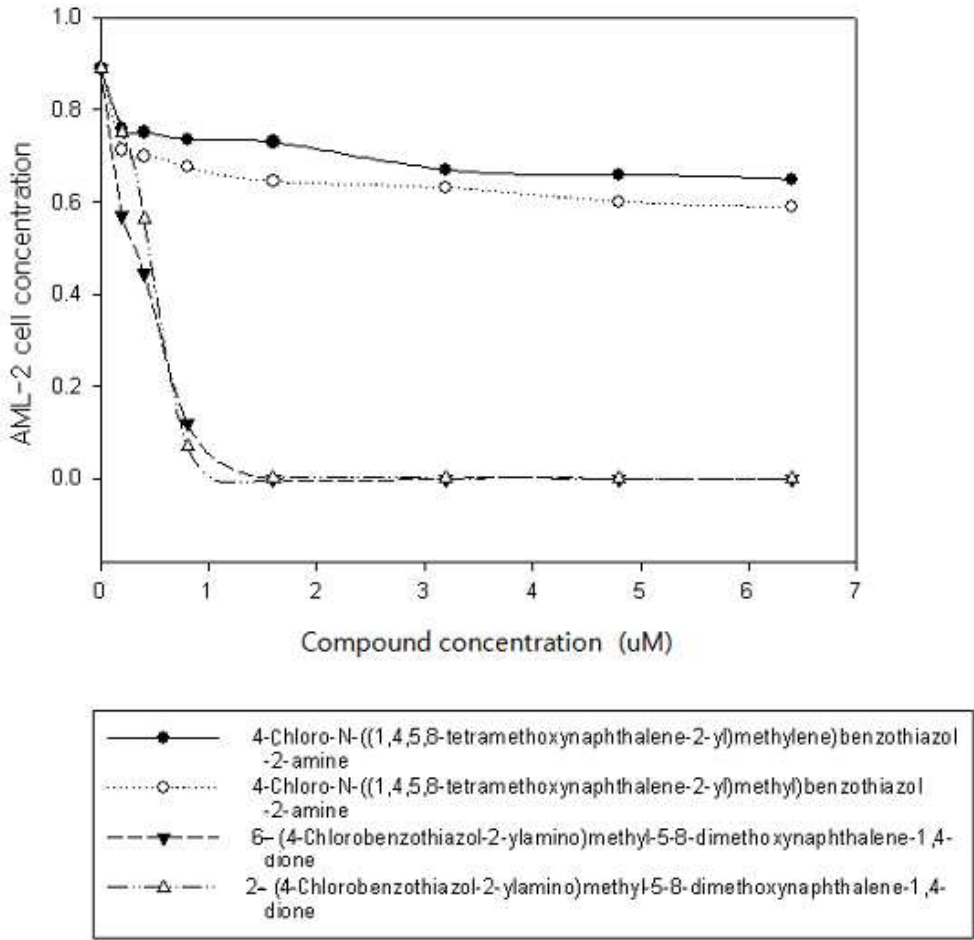
2. Synthesis of substituted-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)thiazol-2-amine

Benzene을 용매로 하여 triethylamine 존재하에서 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxy naphthalene 과 substituted aniline (2-amino-5-methylthiazole, 2-amino-4-chloro benzothiazole, 2-amino-6-chlorobenzothiazole, 2-amino-5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazole)을 반응시켜 약 70% 이상의 수율로 substituted-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)thiazol-2-amine 합성하였다. 이 반응물들은 공비중류에 의해 물이 제거되었다. 이들을 lithium aluminum hydride (LAH)로 처리하고 diethyl ether로 재결정하여 95% 이상의 높은 수율인 결정 Substituted-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)thiazol-2-amine 얻었다.

3. Synthesis of naphthoquinone derivatives

Substituted-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)thiazol-2-amine 으로부터 naphthoquinone 유도체를 합성하기 위해서 산화제로 chrominum (VI) oxide와 cerium (IV) ammonium nitrate (CAN)를 사용하였으며, CrO₃로는 6-치환체, 그리고 CAN으로는 2-치환체를 주생성물로 얻을 수 있었다. 수득율은 6-치환체가 2-치환체보다 약간 높았다.

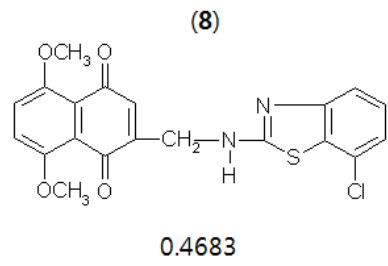
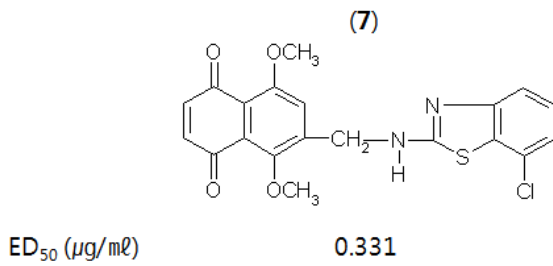
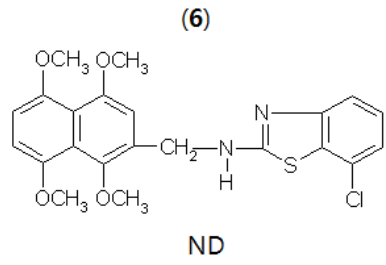
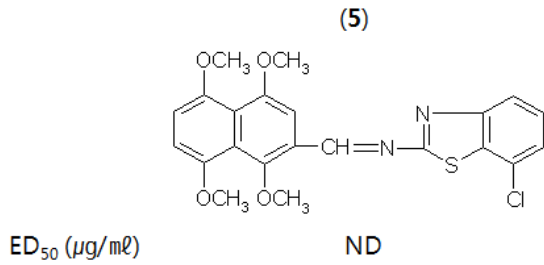
4. 암세포에 대한 MTT 실험

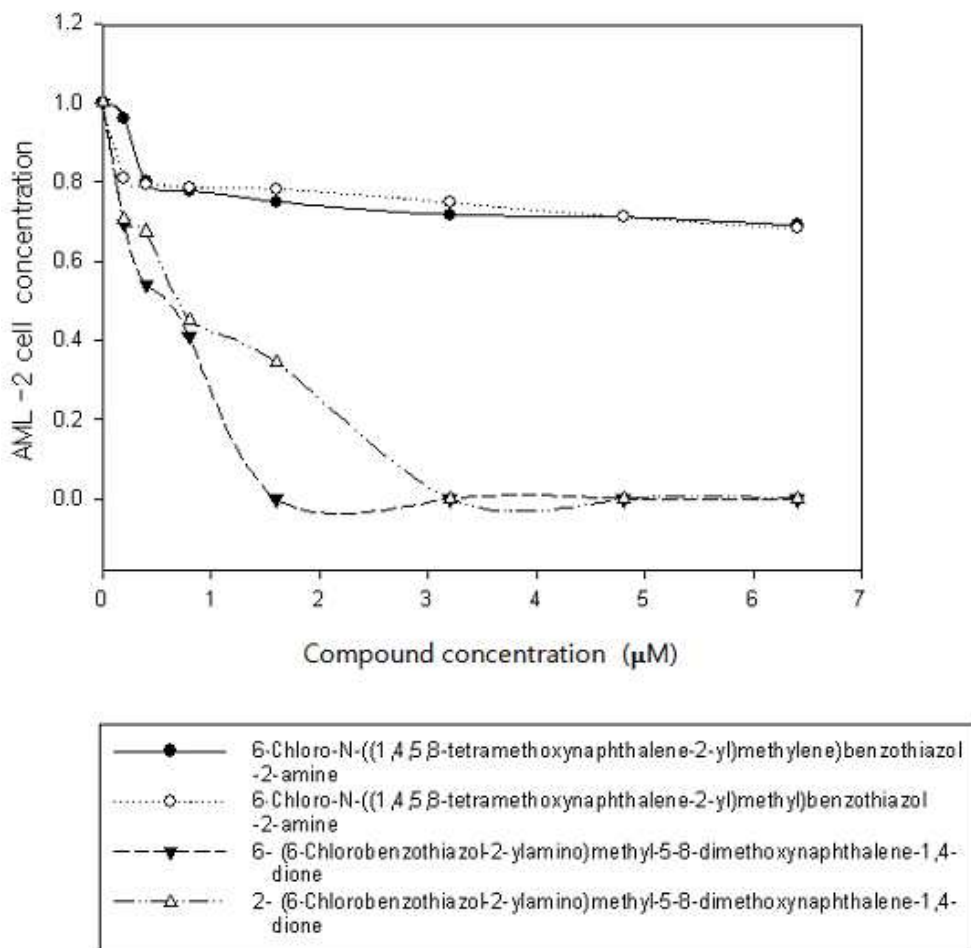


Scheme 5. Cytotoxicity of 6(or 2)-((4-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione against AML-2 cells

6-((4-Chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione
 (7) 화합물이 2-((4-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthal

ene-1,4-dione (8) 화합물보다 AML-2(leukemia 세포) 암세포에 대하여 세포독성이 강하게 나타났다. 반면에 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene부터 합성된 4-chloro-N-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methylene)benzothiazol-2-amine (5) 와 4-chloro-N-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methyl)benzothiazol-2-amine (6) 은 별다른 효과가 없는 것으로 나타났다.

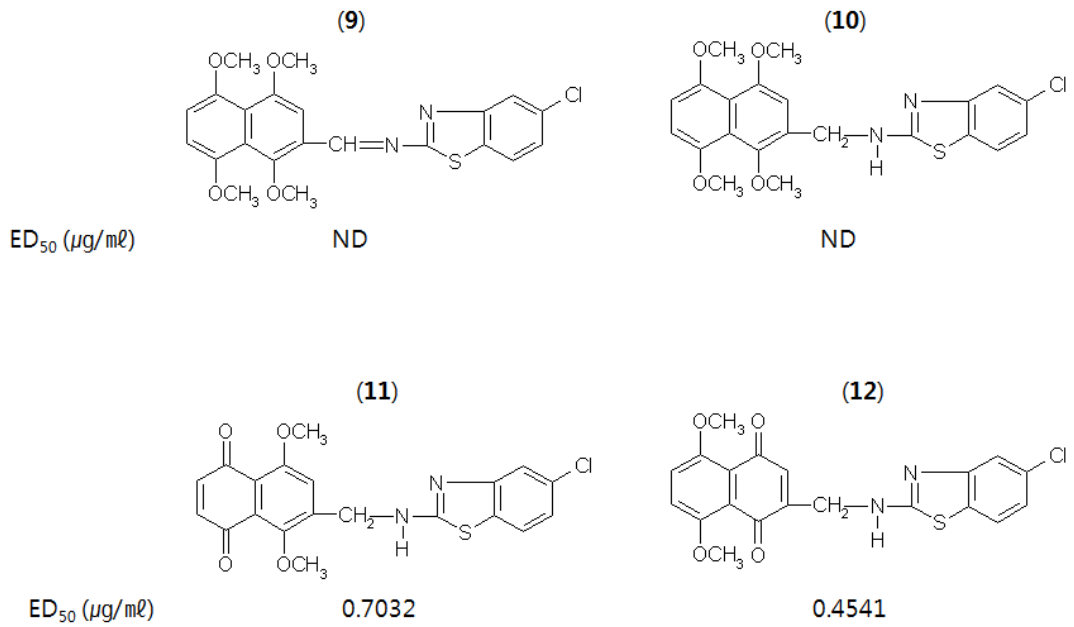


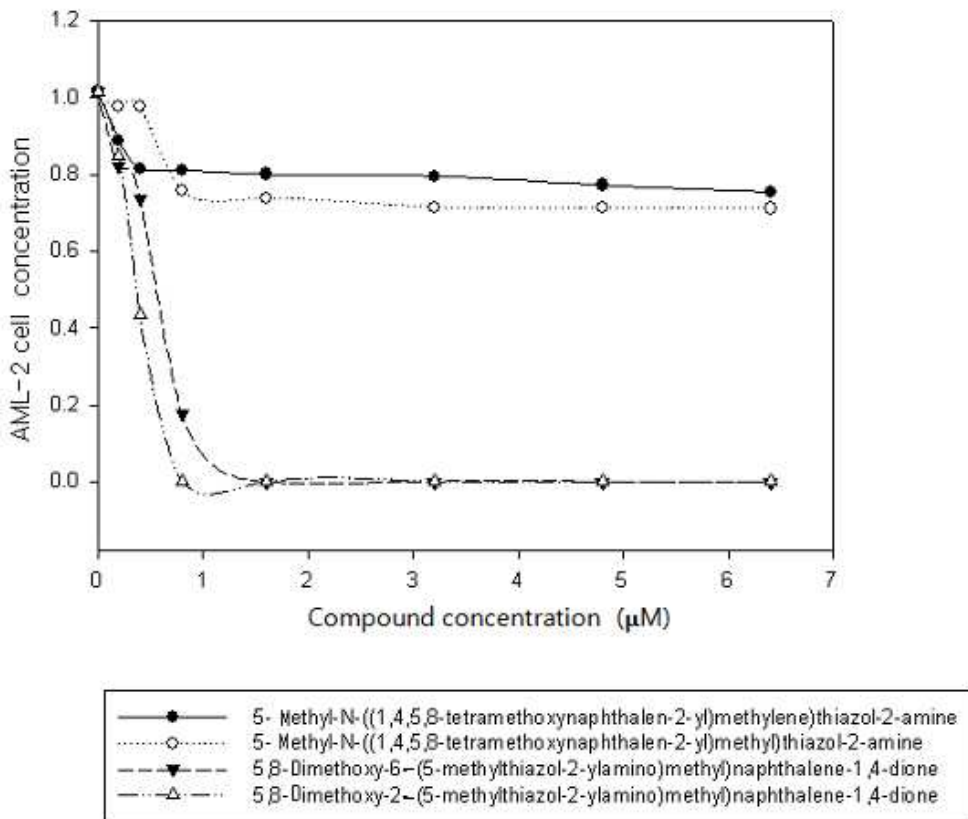


Scheme 6. Cytotoxicity of 6(or 2)-((6-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione against AML-2 cells

2-((6-Chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (**12**) 화합물이 6-((6-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (**11**) 화합물보다 AML-2 (leukemia 세포) 암세포에 대하여 세포독성이 강하게 나타났다. 반면에 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene부터 합성된 6-chloro-N-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)benzothiazol-2-am

ine (9) 와 6-chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methyl)benzothiazol-2-amine (10) 은 별다른 효과가 없는 것으로 나타났다.

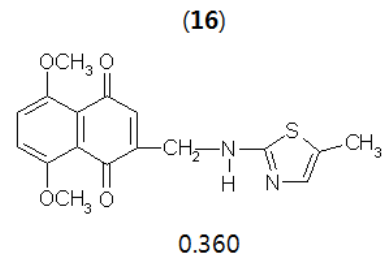
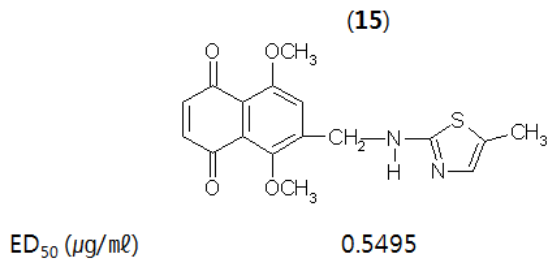
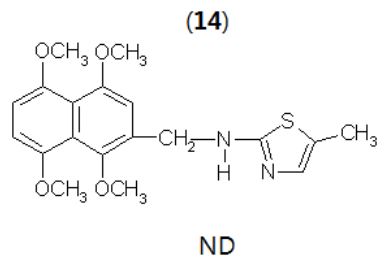
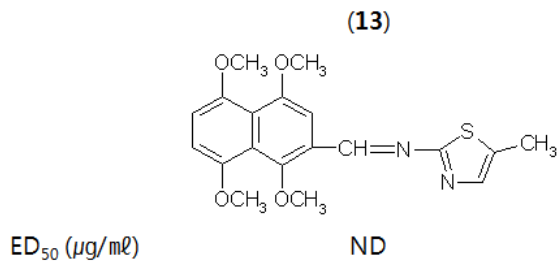


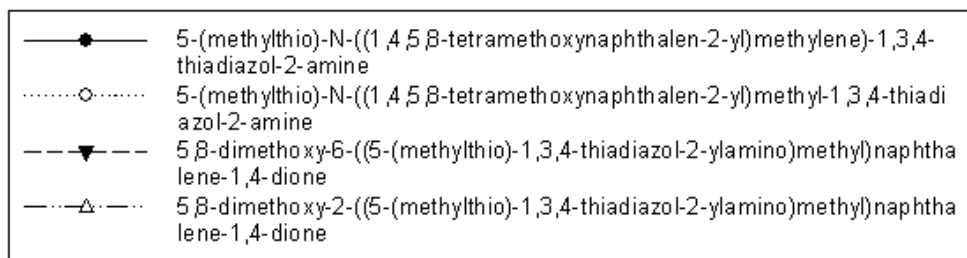
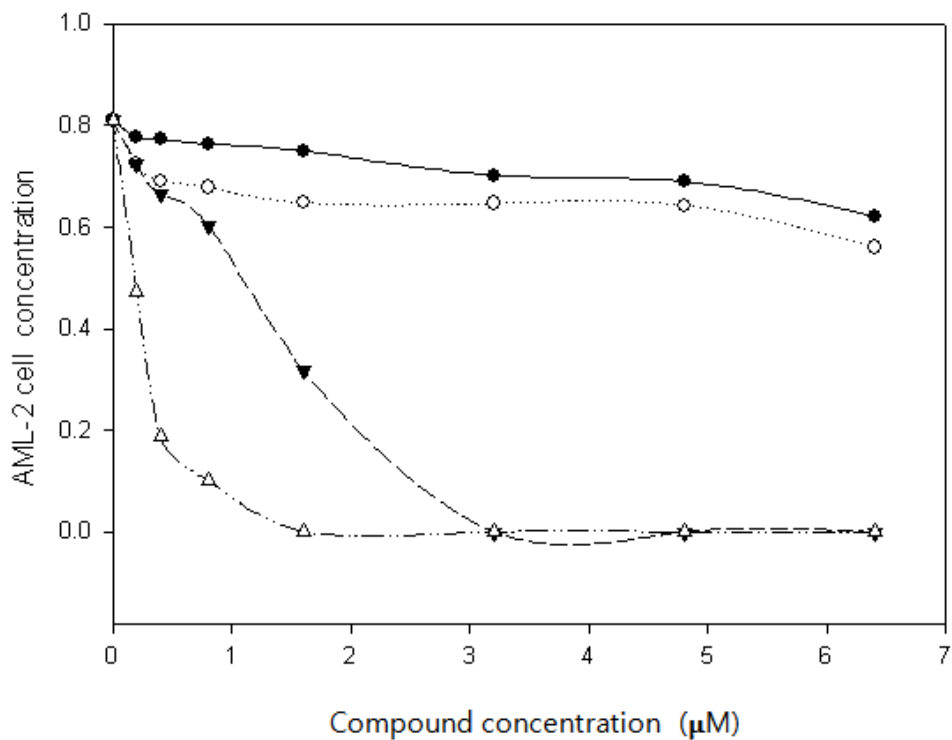


Scheme 7. Cytotoxicity of 5,8-dimethoxy-6(or 2)-2-((5-methylthiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione against AML-2 cells

5,8-Dimethoxy-2-((5-methylthiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (**16**) 화합물이 5,8-dimethoxy-6-((5-methylthiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (**15**) 화합물 보다 AML-2 (leukemia 세포) 암세포에 대하여 세포독성이 강하게 나타났다. 반면에 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene와 2-Amino-5-methylthiazole로 합성된 5-methyl-N-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)thiazol-2-amine (**13**) 와 5-methyl-N-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-

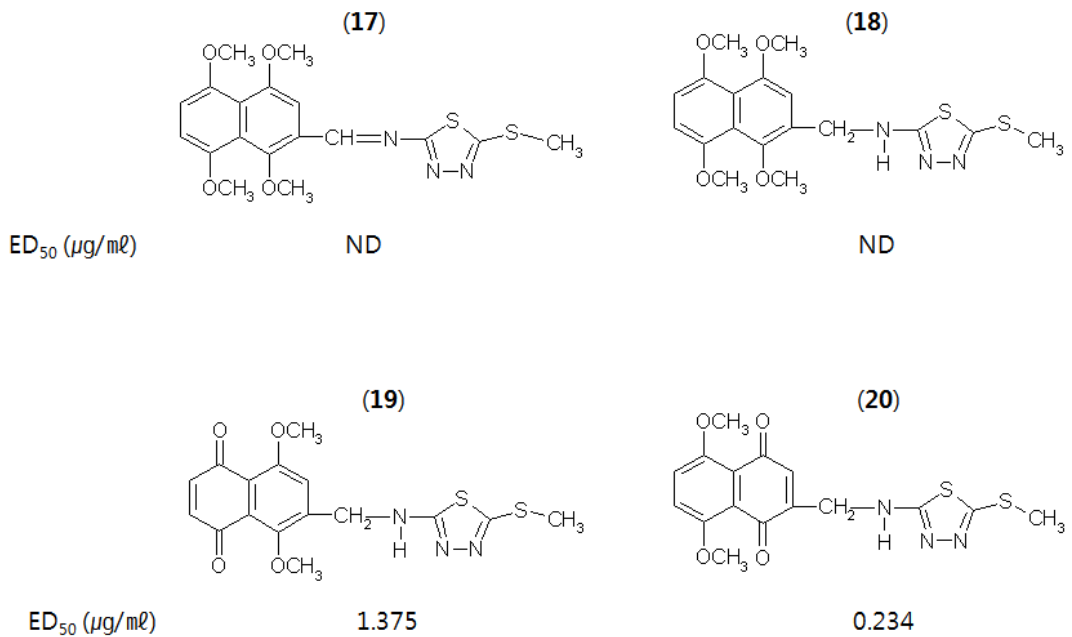
yl)methyl)thiazol-2-amine (14)은 별다른 효과가 없다는 것을 확인하였다.

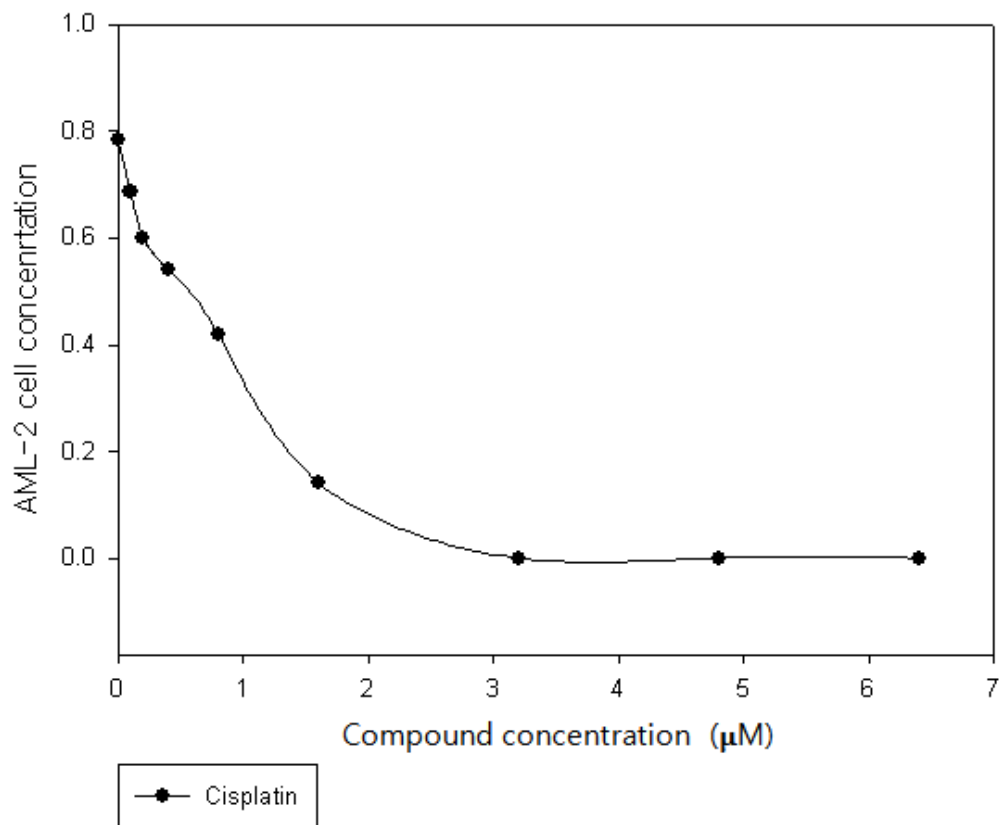




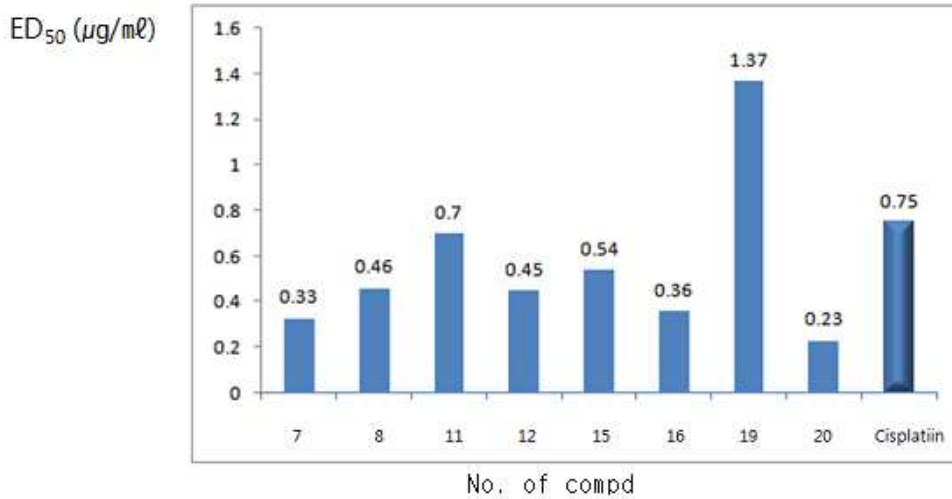
Scheme 8. Cytotoxicity of 5,8-dimethoxy-6(or 2)-((5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione against AML-2 cells

5,8-Dimethoxy-2-((5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (**20**) 화합물은 5,8-dimethoxy-6-((5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (**19**) 보다 AML-2(leukemia 세포) 암세포에 대하여 세포독성이 강하게 나타났다. 하지만 5-(methylthio)-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (**17**) 5-(methylthio)-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (**18**) 은 두 이성질체 보다 별다른 activity가 없는 걸로 확인되었다.



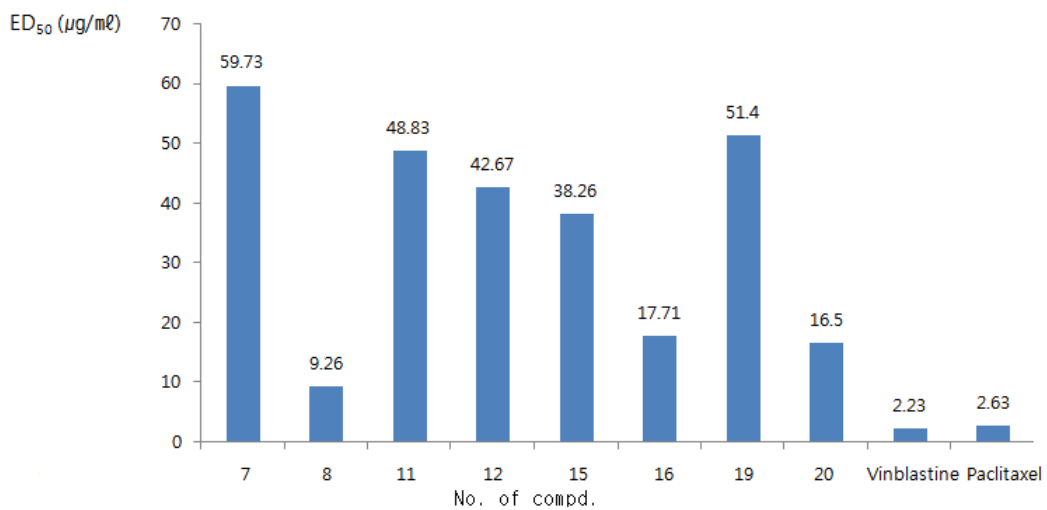


Scheme 9. Cytotoxicity of cisplatin against AML-2 cells



Scheme 10. The relationship(ED_{50}) between naphthoquinone derivatives compounds and cisplatin in AML-2 cells

비교약물인 Cisplatin의 MTT 결과 ED_{50} 값이 $0.756 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. Cisplatin ED_{50} 값은 (19)화합물보다도 강한 세포독성을 보였으며 (11)화합물 ED_{50} 값과 거의 유사한 값을 보여주고 있다. 종합적으로 6-substituted와 2-substituted의 naphthoquinone 유도체 화합물들은 비교약물과 비교하였을 때 AML-2 anti-cancer 세포에 대한 강한 세포독성의 효과를 가졌다. 반면, 폐암 A549 세포에 대한 독성효과는 대체적으로 좋지 못한 결과를 가져왔다. 합성한 naphthoquinone 유도체 화합물들은 비교약물인 Vinblastin과 Paclitaxel 비해 더 높은 ED_{50} 값을 가지어 A546 암세포에 대한 좋은 신약 후보물질로 적합하지 않는다고 생각한다.

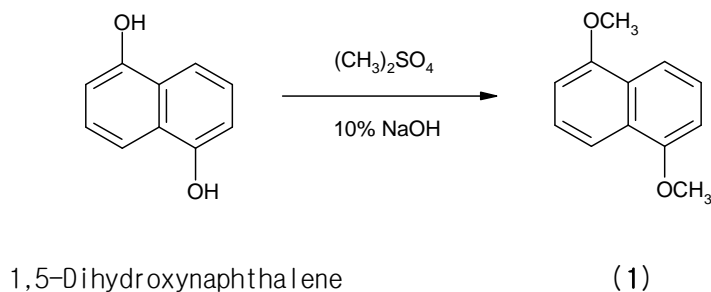


Scheme 11. The relationship(ED_{50}) between naphthoquinone derivatives compounds and Vinblastin and Paclitaxel in A549 cells

III. 실험

1. Synthesis of 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene

1) 1,5-Dimethoxynaphthalene (1)

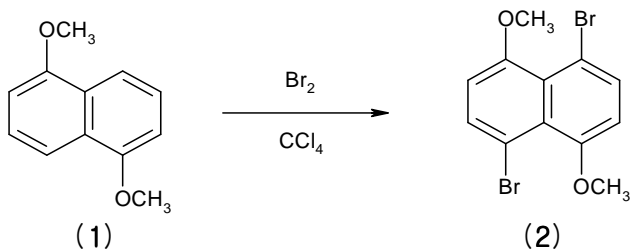


1,5-Dihydroxynaphthalene 100 g (0.62 mol)을 mechanical stirrer로 10% NaOH 수용액 600 ml에 녹이고, dimethyl sulfate 182 ml를 실온에서 약 35분 동안 적가하여 6시간 동안 교반하였다. 생성된 갈색 침전물을 5% NaOH 수용액으로 여러번 세척한 후 약 80 °C에서 12 시간 이상 건조하여 탈수시켰다. 80 °C 오일상태에서 건조물 30 g을 ethyl acetate에 완전히 녹인 다음 여기에 active carbon을 가하여 약 1시간 30분 동안 교반하였다. 이를 Buchner funnel로 여과한 다음 여액을 냉각시켜 노란색의 결정 1,5-dimethoxynaphthalene (1) 23 g (65.1 %) 얻었다.

Yield : 65.1 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.84(2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.37(2H, t, $J = 8.7$ Hz), 6.86(2H, d, $J = 7.8$ Hz), 3.99(6H, s)

2) 4,8-Dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene (2)

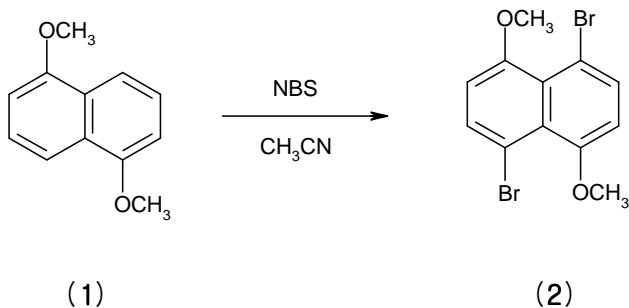


Step 1

4,8-Dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene (2) 합성에 사용되는 모든 초자류는 건조기 100 °C에서 12 시간 이상 건조하여 사용하였다. 1,5-dimethoxynaphthalene (1) 23 g (0.12 mol)을 건조된 three-neck round bottomed flask에 넣고, 사염화탄소 350 ml에 가열하여 녹였다. Bromine 12.6 ml (0.24 mol)를 사염화탄소 38 ml와 혼합하고, 이 혼합 용액을 환류 하에서 45분 동안 적가 하였다. 약 1시간 동안을 더 환류 시킨 후 반응용액을 냉각시키고 여과하였다. 반응물을 TLC로 확인 하였고 미녹색의 결정 4,8-dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene (2) 31.5 g (70 %) 얻었다.

Yield : 70 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.92(2H, d, J = 8.5 Hz), 6.75(2H, d, J = 8.4 Hz), 3.95(6H, s)



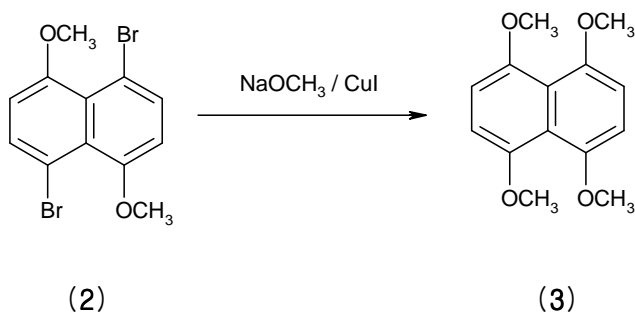
Step 2

1,5-Dimethoxynaphthalene (**1**) 23 g(0.12 mol)을 acetonitrile 용액에 넣은 다음 0 °C 상태에서 NBS(*N*-bromosuccinimide) 45 g을 천천히 넣어 교반하였다. 반응물이 갈색상태의 현탁한 상태에 이르러 여과한 다음 acetonitrile와 methanol로 여러 번 씻어준다. 50 °C에서 건조시켜 백색의 결정 4,8-dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene (**2**) 36 g (80 %) 얻었다.

Yield : 80 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.90(2H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.70(2H, d, $J = 8.4$ Hz), 3.91(6H, s)

3) 1,4,5,8-Tetramethoxynaphthalene (**3**)

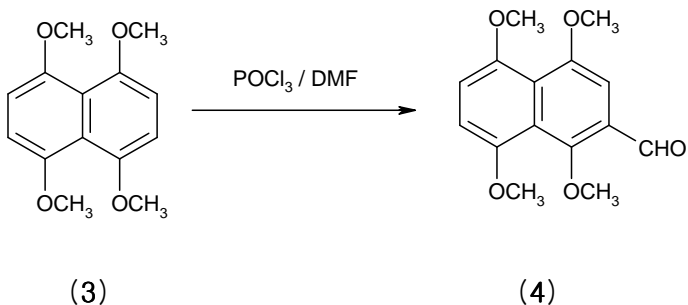


4,8-Dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene (36 g, 0.104 mol), copper(I) iodide (67.6 g, 0.36 mol)과 sodium methoxide (19.3 g, 0.36 mol)을 DMF 50 % methanol 용액 750 ml에 녹이고, 약 28시간 동안 70 °C 상태에서 환류 하였다. 반응 혼합액을 냉각시킨 다음 얼음물을 첨가하여 생성되는 침전물을 여과, 세척하였다. 얻어진 잔사물을 80 °C에서 약 12 시간 이상 건조시킨 후, methylene chloride 1 L에 녹여 불용물을 깨끗이 여과하여 제거한 다음 여액을 감압 농축하여 얻은 생성물을 benzene으로 재결정하여 미갈색의 결정 1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (**3**) 14 g 얻었다.

Yield : 55 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.93(4H, s), 3.98(12H, s)

4) 2-Formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4)



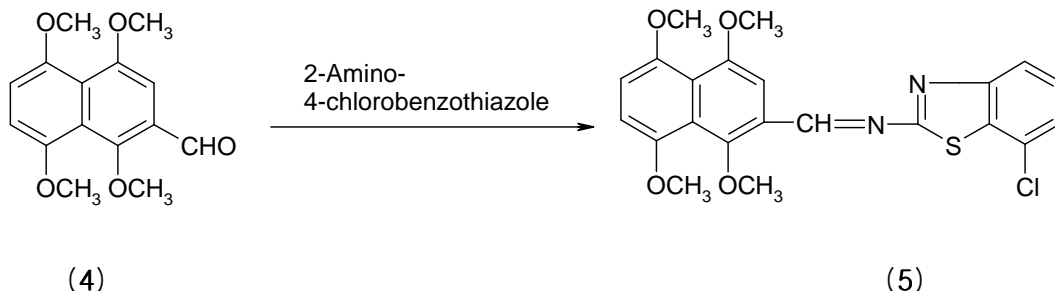
250 ml three-neck round bottomed flask에 DMF (8.15 ml, 0.1 mol)와 POCl₃ (9.78 ml, 0.1 mol)를 넣어 혼합한 다음 여기에 1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4) 5.1 g (0.02 mol)을 chloroform 45 ml에 녹여 20분 동안 서서히 적가한 후 환류 하에서 약 6시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 냉각시킨 다음 얼음물 100 ml를 넣고, methylene chloride로 2~3회 추출하였다. Methylene chloride층을 모아 무수 황산마그네슘으로 물을 제거한 다음 감압건조하고, benzene과 n-hexane으로 재결정하여 형광을 띠는 황색의 결정 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4) 5.3 g (96 %)을 얻었다.

Yield : 96 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.89(1H, s), 7.26(1H, s), 7.05(1H, d, J = 8.7 Hz), 6.94(1H, d, J = 8.7 Hz), 4.0(3H, s), 3.99(3H, s), 3.92(3H, s) 3.91(3H, s)

2. Synthesis of 6(or 2)-((4-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (5~8)

1) 4-Chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methylene)benzothiazol-2-amine (5)

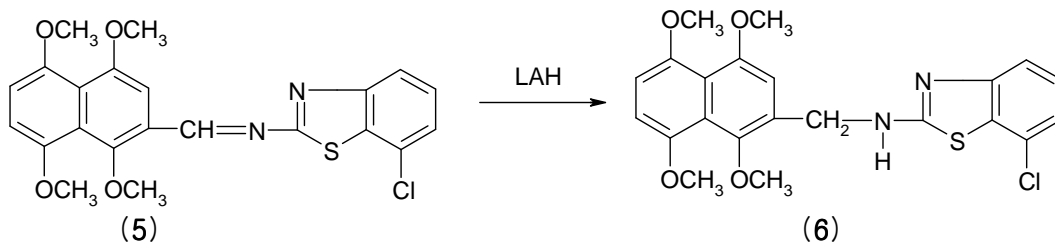


Dean-Stark trap이 장착된 100 ml 둥근 플라스크에 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4) 2 g (7.25 mmol)과 2-amino-4-chlorobenzothiazole (1.34 g, 7.25 mmol)을 넣고, 이를 benzene 20 ml에 녹인 다음 여기에 triethyl amine 1.03 ml (7.25 mmol)를 넣고, acetic acid 약 300 μ l로 pH 4~5가 되도록 맞추는 다음 약 24 시간 동안 환류 하였다. 반응이 진행 정도는 TLC로 확인하였다. 반응이 더 이상 진행 진행되지 않으면 반응물을 실온으로 냉각시킨 다음 형성된 침전물을 감압 여과하여 회수하고, 여액은 감압 증류한 다음 methanol로 재결정하여 적색의 결정 4-chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methylene)benzothiazol-2-amine (5) 2.2 g (69 %) 얻었다.

Yield : 69 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 9.43(1H, s), 7.74(1H, dd, $J = 8.0$ and 1.0 Hz), 7.65 (1H, s), 7.49(1H, dd, $J = 7.8$ and 1.0 Hz), 7.04(1H, t, $J = 7.9$ Hz), 7.03 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.94(1H, d, $J = 8.7$ Hz), 4.04(3H, s), 4.00(3H, s), 3.93(3H, s), 3.92(3H, s)

2) 4-Chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methyl)benzothiazol-2-amine (6)



4-chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methylene)benzothiazol-2-amine (5) 2.17 g (4.90 mmol)과 THF(tetrahydrofuran) 30 ml를 100 ml 둥근 flask에 넣고 교반하면서 LiAlH₄ (195.7 mg, 4.90 mmol)을 서서히 가한 후 실온에서 약 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 methylene chloride층을 무수 황산마그네슘으로 수분을 제거한 다음 감압증류하고, Diethyl ether로 재결정하여 연한 살색의 결정 4-chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methyl)benzothiazol-2-amine (6) 1.93 g (89 %)을 얻었다.

Yield : 89 %

¹H NMR(300 MHz, DMSO) δ 7.43(1H, dd, *J* = 7.8 and 0.6 Hz), 7.29(1H, dd, *J* = 8.0 and 0.6 Hz), 7.18(1H, s), 6.96(1H, t, *J* = 8.2 Hz), 6.96(1H, s), 6.82(2H, s), 4.70(2H, d, *J* = 5.8 Hz), 3.94(3H, s), 3.86(3H, s), 3.80(3H, s), 3.78(3H, s)

3) 6-((4-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (7)

4-chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methyl)benzothiazol-2-amine (6) 861.1 mg(1.95 mmol)을 acetone 20 ml 및 물 4 ml와 혼합한 다음 교반하면서 4 °C 이하에서 CrO₃ 203.2 mg (1.95 mmol)을 넣어 녹이고, 이어서 H₂SO₄ 164

μl (2.93 mmol)를 서서히 적가한 후 계속하여 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응의 진행정도를 TLC로 확인하여 출발물질이 더 이상 나타나지 않게 되면 반응물을 methylene chloride로 추출하고, 유기용매 층을 물로 세척한 후 무수 황산마그네슘으로 수분을 제거하여 감압증류 하였다. 얻어진 물질은 acetone과 diethyl ether로 재결정하여 주황색의 결정 6-((4-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (**7**) 600 mg (75 %) 얻었다.

Yield : 75 %

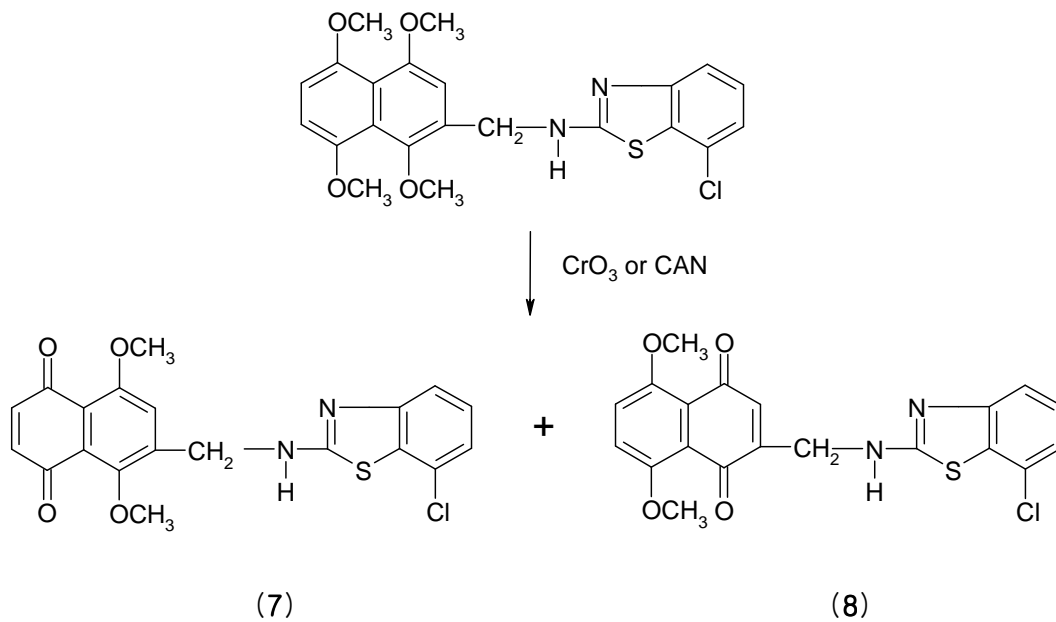
^1H NMR(300 MHz, DMSO) δ 8.86(1H, t, J = 5.8 Hz), 7.69(1H, s), 7.66(1H, d, J = 7.8 Hz), 7.30(1H, d, J = 7.8 Hz), 7.00(1H, t, J = 8.0 Hz), 6.81(2H, s), 4.70 (2H, d, J = 5.8 Hz), 3.85(3H, s), 3.82(3H, s)

4) 2-((4-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (**8**)

4-chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methyl)benzothiazol-2-amine (**6**) 861.1 mg (1.95 mmol)을 acetonitrile 15 mL와 혼합한 다음 교반하면서 4 °C 이하에서 CAN(ammonium cerium (IV) nitrate) (2.72 g, 4.87 mmol)을 물 3.5 mL에 녹인 용액을 서서히 적가 하였다. 반응의 진행정도를 TLC로 확인하여 출발물질이 더 이상 나타나지 않게 되면 반응물을 methylene chloride로 추출하고, 유기용매 층을 물로 세척한 후 무수 황산 마그네슘으로 탈수하여 감압증류 하였다. 얻어진 반응물을 acetone과 n-hexane로 재결정하여 연한 빨간색 고체의 결정 2-((4-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (**8**) 490 mg (61 %) 얻었다.

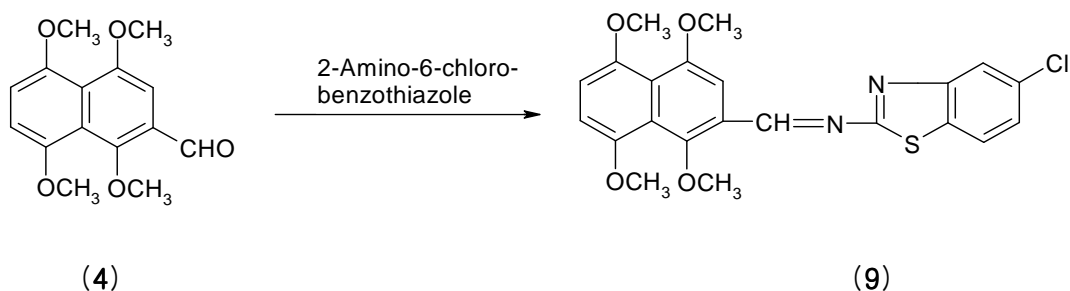
Yield : 61 %

^1H NMR(300 MHz, DMSO) δ 8.64(1H, t, J = 6.0 Hz), 7.66(1H, d, J = 7.7 Hz), 7.55(2H, s), 7.30(1H, d, J = 7.9 Hz), 7.03(1H, t, J = 7.9 Hz), 6.63(1H, s), 4.47(2H, d, J = 6.0 Hz), 3.85(3H, s), 3.82(3H, s)



3. Synthesis of 6(or 2)-((6-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (9~12)

1) 6-Chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methylene)benzothiazol-2-amine (9)

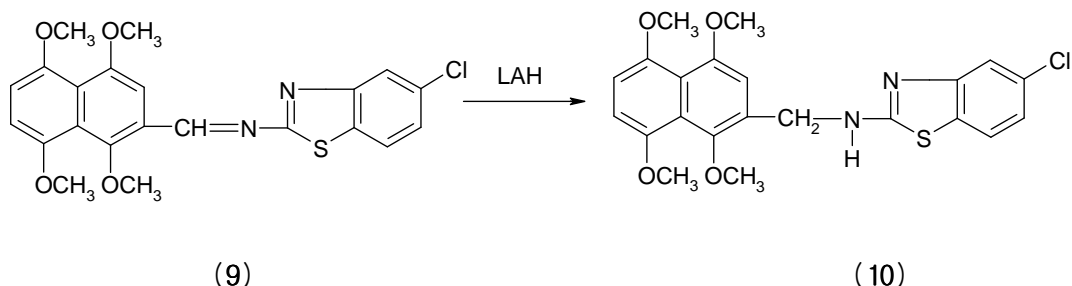


2-Formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4) 2 g (7.25 mmol) 과 2-amino-6-chlorobenzothiazole 1.34 g (7.25 mmol)을 화합물 5의 합성법과 같은 방법으로 반응시켜 주황색의 결정 6-chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methylene)benzothiazol-2-amine (9) 2.96 g (93 %) 얻었다.

Yield : 93 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 9.45(1H, s), 7.90(1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.81(1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.63(1H, s), 7.43(1H, dd, $J = 8.6$ Hz and 2.0 Hz), 7.04(1H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.94(1H, d, $J = 8.7$ Hz), 4.04(3H, s), 4.00(3H, s), 3.93(3H, s), 3.92(3H, s)

2) 6-Chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methyl)benzothiazol-2-amine (10)



6-Chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methylene)benzothiazol-2-amine (9) 2.17 g (4.90 mmol)을 화합물 6의 합성법과 같은 방법으로 환원시켜 미백색의 결정 6-chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methyl)benzothiazol-2-amine (10) 2.03 g (93.7 %) 얻었다.

Yield : 93.7 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.52(1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.40(1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.20(1H, dd, $J = 8.4$ and 2.0 Hz), 6.91(1H, s), 6.85(2H, s), 6.18(1H, s), 4.81(2H, d, $J=4.8$), 3.96(3H, s), 3.87(3H, s), 3.87(3H, s), 3.83(3H, s)

3) 6-((6-Chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (11)

6-Chloro-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methyl)benzothiazol-2-amine (10) 867.1 mg (1.95 mmol)을 화합물 7의 합성법에 따라 반응시켰으며 acetone과 *n*-hexane으로 재결정하여 노란색의 결정 6-((6-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (11) 571.3 mg (71%) 얻었다.

Yield : 71 %

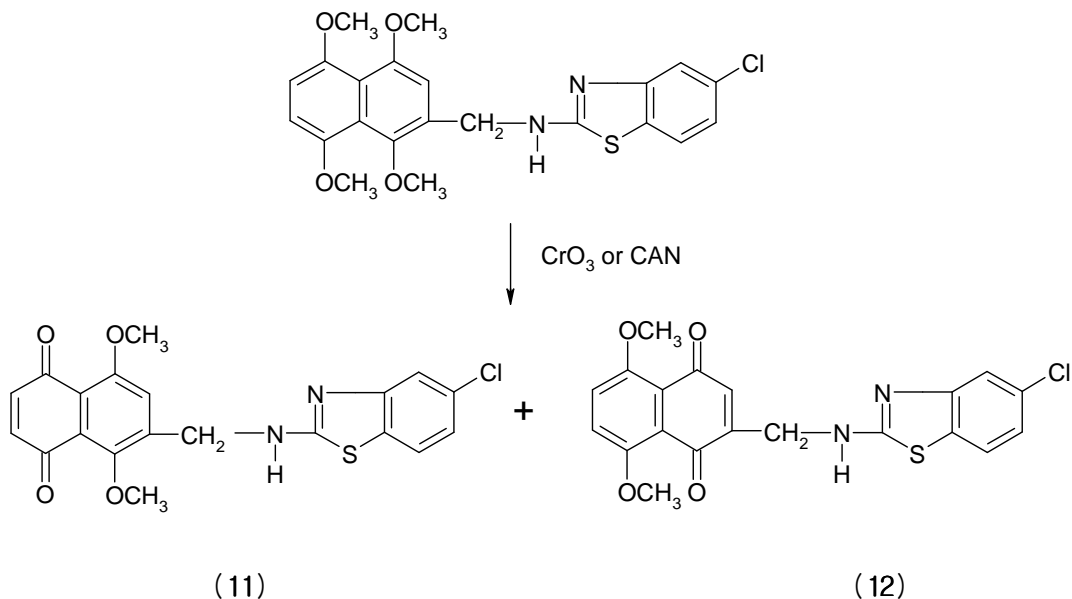
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.29(1H, t, $J = 6.0$ Hz), 7.45(1H, d, $J = 3.0$ Hz), 7.24(1H, s), 7.02(1H, d, $J = 9.0$ Hz), 6.88(1H, dd, $J = 8.6$ Hz and 2.0 Hz), 6.46(2H, s), 4.35(2H, d, $J = 6.0$ Hz), 3.46(3H, s), 3.42(3H, s)

4) 2-((6-Chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (12)

6-Chloro-N-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-yl)methyl)benzothiazol-2-amine (10) 867.1 mg (1.95 mmol)을 화합물 8의 합성법에 따라 반응시켰으며 acetone 과n-hexane으로 재결정하여 갈색의 결정 6-((6-chlorobenzothiazol-2-ylamino)methyl)-5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (11) 486.3 mg (61%) 얻었다.

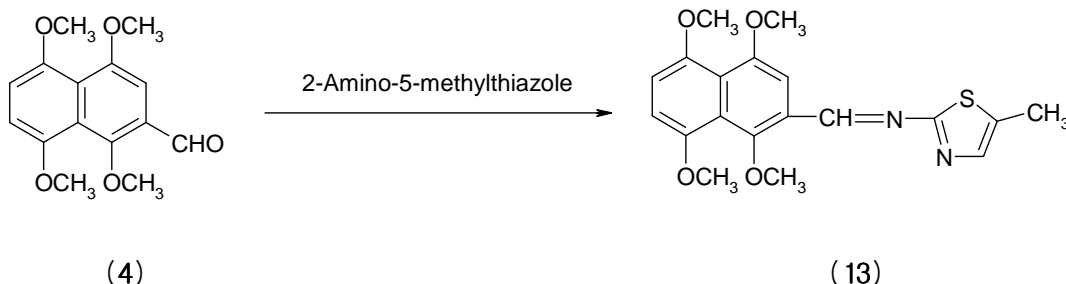
Yield : 61 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.53(1H, t, $J = 6.8$ Hz), 7.81(1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.55 (2H, s), 7.36(1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.23(1H, dd, $J = 6.9$ and 1.8 Hz), 6.56(1H, s), 4.45(2H, d, $J = 5.1$ Hz), 3.86(3H, s), 3.82(3H, s)



4. Synthesis of 5,8-dimethoxy-6(or 2)-((5-methylthiazol-2-yl amino)methyl)naphthalene-1,4-dione (13~16)

1) 5-Methyl-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)thiazol-2-amine (13)

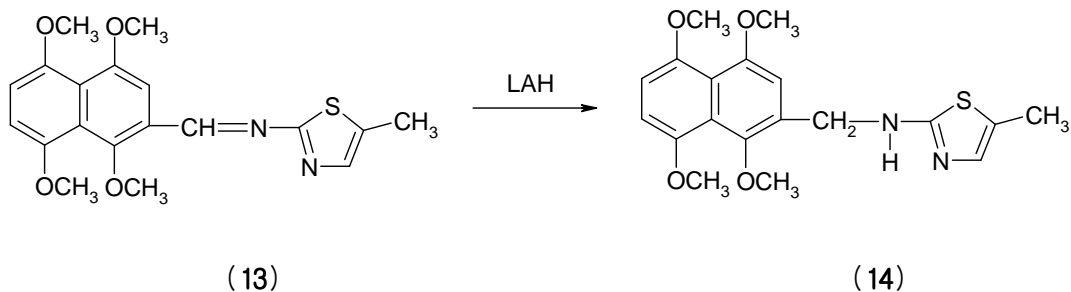


2-Formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (**4**) 2 g (7.25 mmol) 과 2-amino-5-methylthiazole 827.7 mg (7.25 mmol)을 화합물 5의 합성법과 같은 방법으로 반응시켜 녹색의 결정 5-methyl-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)thiazol-2-amine (**13**) 2.47 g (91.2 %) 얻었다.

Yield : 91.2 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 9.28.(1H, s), 7.45(1H, s), 7.38(1H, s), 7.10(2H, d, J = 4.2 Hz), 3.90(3H, s), 3.88(3H, s), 3.79(3H, s), 3.76(3H, s), 2.46 (3H, s)

2) 5-Methyl-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)thiazol-2-amine (14)



5-Methyl-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)thiazol-2-amine (**13**) 1.82 g(4.90 mmol)을 화합물 **6**의 합성법과 같은 방법으로 환원시켜 연한 녹색의 결정 5-methyl-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)thiazol-2-amine (**14**) 1.69 g (91.7 %) 얻었다.

Yield : 91.7 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.73(1H, t, $J = 6.0$ Hz), 6.96(1H, s), 6.92(1H, d, $J = 9.0$ Hz), 6.85(1H, d, $J = 9.0$ Hz), 6.65(1H, s), 4.53(2H, d, $J = 6.0$ Hz), 3.83(3H, s), 3.74(3H, s), 3.73(3H, s), 3.65(3H, s), 2.17(3H, s)

3) 5,8-Dimethoxy-6-((5-methylthiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (**15**)

5-Methyl-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)thiazol-2-amine (**14**) 730.2 mg(1.95 mmol)을 화합물 **7**의 합성법에 따라 반응시켰으며 acetone 과 dimethyl ether 으로 재결정하여 짙은 오렌지색의 결정 5,8-dimethoxy-6-((5-methylthiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione 423.1 mg (63 %)얻었다.

Yield : 63 %

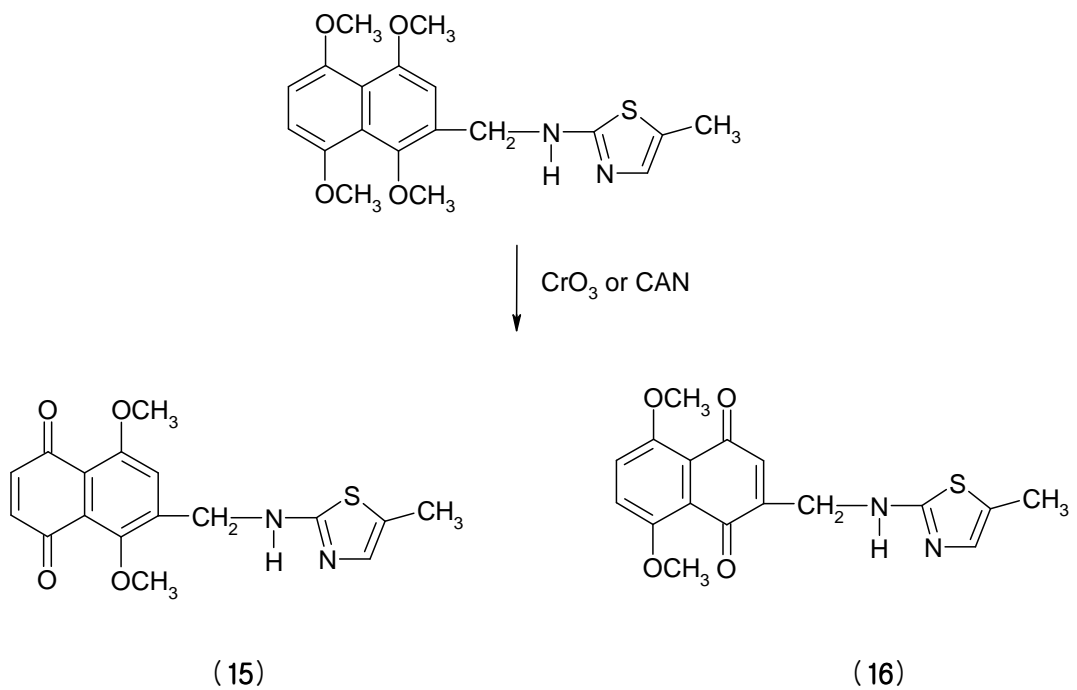
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.83(1H, t, $J = 6.0$ Hz), 7.57(1H, s), 6.80(2H, s), 6.65 (1H, s), 4.52(2H, d, $J = 5.7$ Hz), 3.79(3H, s), 3.73(3H, s), 3.18(3H, s)

4) 5,8-Dimethoxy-2-((5-methylthiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (**16**)

5-Methyl-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)thiazol-2-amine (**14**) 730.2 mg(1.95 mmol)을 화합물 **8**의 합성법에 따라 반응시켰으며 acetone 과 dimethyl ether 으로 재결정하여 짙은 주황색의 결정 5,8-dimethoxy-2-((5-methylthiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione 396.3 mg (59 %)얻었다.

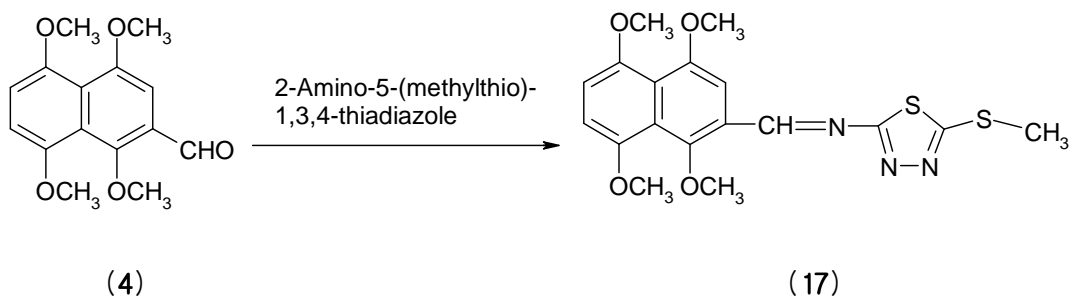
Yield : 59 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 9.72(1H, t, $J = 6.0$ Hz), 7.57(2H, s), 7.08(1H, s), 6.58(1H, s), 4.40(2H, s), 3.86(3H, s), 3.84(3H, s), 2.23(3H, s)



5. Synthesis of 5,8-dimethoxy-6(or 2)-((5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (17~20)

1) 5-(Methylthio)-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (17)

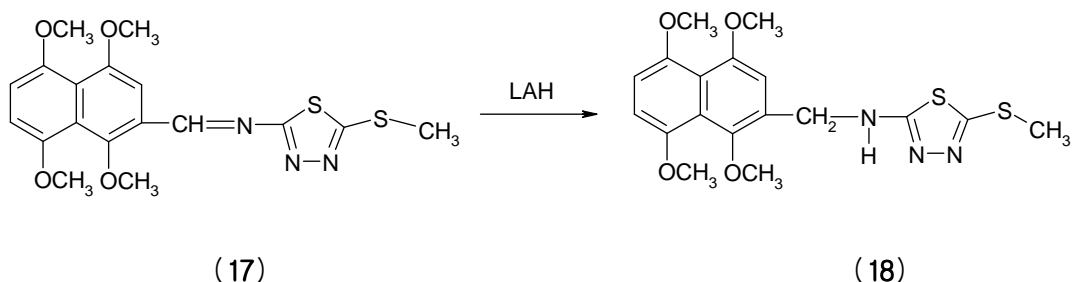


2-Formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4) 2 g (7.25 mmol) 과 2-amino-5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazole 1.06 g (7.25 mmol)을 화합물 5의 합성법과 같은 방법으로 반응시켜 주황색의 결정 5-(methylthio)-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (17) 2.76 g (93.9 %) 얻었다.

Yield : 93.9 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 9.07 (1H, s), 7.36 (1H, s), 7.14 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 4.02 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.81(3H, s), 2.78(3H, s)

2) 5-(Methylthio)-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (18)



5-(Methylthio)-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methylene)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (**17**) 1.99 g (4.90 mmol)을 화합물 **6**의 합성법과 같은 방법으로 환원시켜 미백색의 결정 5-(methylthio)-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (**18**) 1.76 g (88.1 %) 얻었다.

Yield : 88.1 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.18(1H, t, $J = 6.0$ Hz), 6.95(1H, s), 6.91(2H, d, $J = 11.4$ Hz), 4.59(2H, d, $J = 6.0$ Hz), 3.83 (3H, s), 3.76 (3H, s), 3.75 (3H, s), 3.64(3H, s), 2.64(3H, s)

3) 5,8-Dimethoxy-6-((5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (**19**)

5-(Methylthio)-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (**18**) 793.6 mg (1.95 mmol) 화합물 **7**의 합성법에 따라 반응시켰으며 acetone 과 dimethyl ether 으로 재결정하여 짙은 노란색의 결정 5,8-dimethoxy-6-((5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione 512.3 mg (69.6 %) 얻었다.

Yield : 69.6 %

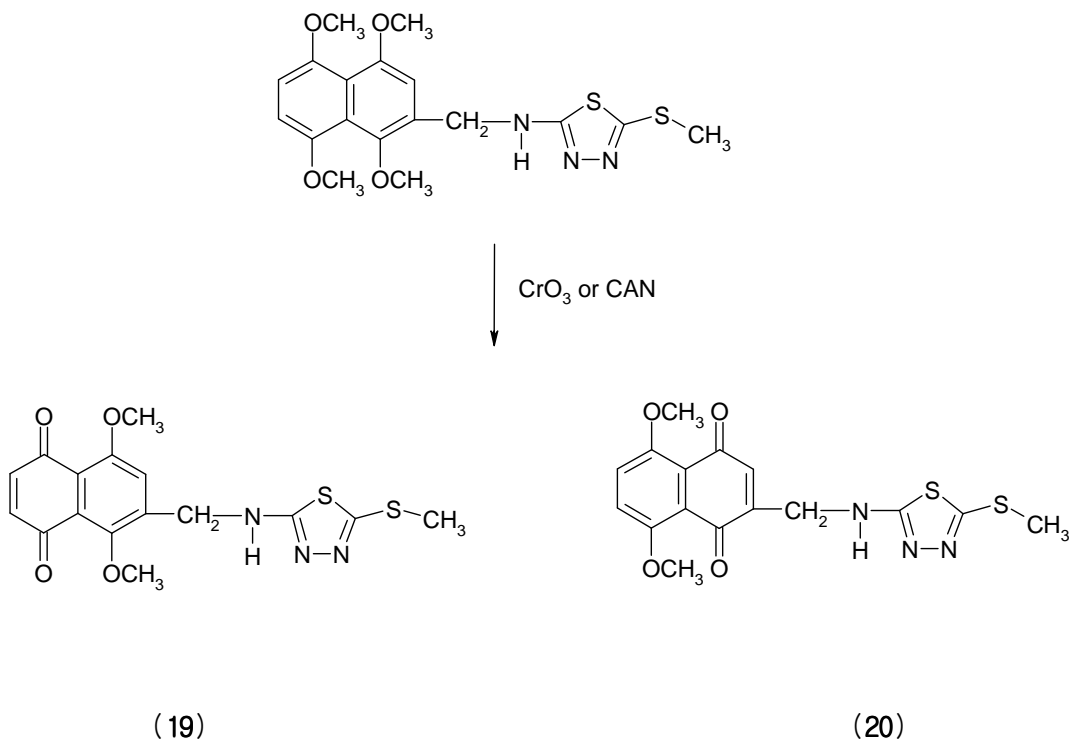
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.27.(1H, t, $J = 6.0$ Hz), 7.52(1H, s), 6.81 (2H, s), 4.59 (2H, d, $J = 5.4$ Hz), 3.82 (3H, s), 3.74 (3H, s), 2.57(3H, s)

4) 5,8-Dimethoxy-2-((5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (20)

5-(Methylthio)-*N*-((1,4,5,8-tetramethoxynaphthalen-2-yl)methyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (18) 793.6 mg (1.95 mmol) 을 화합물 8의 합성법에 따라 반응시켰으며 acetone 으로 재결정하여 빨간색의 결정 5,8-dimethoxy-2-((5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione 488 mg (60 %) 얻었다.

Yield : 60 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.09(1H, t, $J = 6.0$ Hz), 7.54(2H, s), 6.53(1H, s), 4.32 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 3.84 (3H, s), 3.82 (3H, s), 2.50(3H, s)



6. 측정기기 및 시약

합성화합물의 확인 실험에 사용한 핵자기공명 분광기 (^1H NMR)는 JEON-jNM-AL300 (300 MHz)을 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)을 사용하여 δ (chemical shift) 값으로 표시하였다. 반응의 진행을 확인하기 위한 TLC plate 는 Silica gel 60F 254(Merck, 25 TLC plastic sheets) 및 RP-18F 254S (Merck, 40 ~ 63 μm)을 사용하였다. 세포독성실험에 사용한 기기로는 CO_2 incubator (NUAIRE), Deep freezer(IIshin), Nitrogen freezer (MVE, XC34/14), Elisa reader (Molecular devices, spectra MAX 340), Microscope (Olimpus, CK2), 96 well (Falcon), Conical tube (Falcon) 등이 사용되었다.

실험에 사용한 대부분의 시약은 Acros와 Aldrich 제품을 사용하였고, 모든 용매 는 시약 급을 사용하였다. FBS (Fetal bovin serum), RPMI medium 1640, DMEM medium, Antibiotic-antimycotic, HEPES, L-Glutamine, D-PBS (Dulbeco's phosphate buffer solution), HBSS (Hanks' balanced salt solution), Trypsin-EDTA solution 등은 Gibco 제품을 사용하였으며, DMSO, 0.4% Trypan blue solution 등 Sigma 제품을 사용하였다.

7. 세포배양

세포독성능 측정에 사용된 부유세포인 AML-2/WT은 위에서 제조한 세포배양배지를 사용하여 세포의 지수적 성장 (exponential growth)을 유지하도록 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 incubator에서 2~3일간 배양한 후 conical tube (Falcon)에 옮겨 1,500 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포침전물을 다시 D-PBS에 부유시켜 원심 분리한 다음 상등 액을 제거하여 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후 일부를 취하여 0.4 % trypan blue를 가하여 염색되지 않은 살아 있는 세포를 haemocytometer로 세어 5×10^5 cells/ml의 농도가 되도록 새로운 배 지에 부유시켜 배양하였다. 부착 세포인 A549는 위에서 제조한 세포배양배지를 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 incubator에서 monolayer가 형성될 때까지 배양시킨 후 배

양배지는 버리고 부착된 세포에 잔류한 세포배양배지를 제거하기 위하여 D-PBS로 2회 세척한 다음 Trypsin-EDTA solution (0.05 %, 0.53 mM EDTA · Na)으로 처리하고, D-PBS 적량을 가하여 단일 세포로 부유시킨 다음 conical tube에 옮겨 1,500 rpm으로 5분간 원심 분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포침전물을 다시 D-PBS에 부유시켜 원심분리하고, 상등 액을 제거하여 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후 일부를 취하여 0.4 % trypan blue를 가하여 염색되지 않은 살아있는 세포를 haemocytometer로 세어 5×10^5 cells/ml의 농도가 되도록 새로운 배지에 부유시켜 배양하였다.

8. MTT Assay

Naphthoquinone 유도체의 암세포에 대한 세포독성능 측정은 MTT[3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] colorimetric 검정법으로 실험하였다. 암세포에 대한 세포독성능을 측정하기 위해 백혈병세포(AML-2/WT)와 폐암 세포(A549 cell)를 counting한 다음 원하는 양 만큼 AML(2×10^5 / ml), A549(6×10^3 / 100 μ l)되게 media로 희석해서 96 well flat bottom microtiter의 각 well에 90 μ l/well씩 접종하고, 각각의 검체를 단계 희석하여 10 μ l/well씩 접종 한다. control은 검체대신 PBS[Ca²⁺, Mg²⁺(+)] 넣어주고 blank는 검체대신 PBS[Ca²⁺, Mg²⁺(+)] 넣어주고 cell대신 media를 넣어준 후 37 °C, CO₂ incubator에서 3일간 배양하였다. 배양이 끝난 후에 PBS로 5 mg/ml의 농도가 되도록 희석한 MTT 용액을 10 μ l씩 각 well에 첨가하여 37 °C, CO₂ 조건하에서 4시간 동안 배양한 후 형성된 cell을 깨기 위하여 acid-isopropylalcohol에 HCl 용액을 넣어 0.04N이 되게 한다. 만들어진 acid-iso를 각 well에 100 μ l씩 넣은 후 잘 pipetting 하여 Elisa reader (Molecular devices, spectra MAX 340)로 흡광도 (O.D 540nm)를 측정하여 ED₅₀값을 구하였다. 비교약물은 AML 경우 cisplatin (TCI), A549는 Vinblastine와 Paclitaxel을 각각 사용하였으며 각 실험은 3회 이상 반복하여 그 평균값을 구하였다. ED₅₀값은 대조군의 50% 수준으로 암세포의 성장을 억제하는 약물의 농도 (ug/ml)로 주어지며, 미국 암연구소 (NCI ; National Cancer Institute, USA)의 manual 방법에 의해 결정하였다

IV. 결 론

본 연구에서는 1,5-dimethoxynaphthalene부터 5가지의 aniline 구조를 가진 신규 유도체를 합성하였으며 전합성을 통하여 총 8가지의 C-2 또는 C-6 위치를 갖는 naphthoquinone 유도체를 합성하였다. 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene에 여러 가지 치환체를 도입하였고, 이를 산화제인 CrO₃ 또는 CAN으로 처리하여 6(or 2)-substituted-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone류의 두 이성질체를 합성하였다. 이때 CrO₃를 사용하였을 경우에 두 이성질체의 생성비율은 6-substituted가 약 1.0 ~ 1.44 배정도 더 많은 양이 생성되었으며, CAN을 사용하였을 경우에 치환체에 따라 약간 차이를 보였다. 합성한 화합물에 대해서 기초적인 항암시험을 하였다. 약효 검색을 통하여 사람유래인 암세포인 백혈병(AML-2/WT)과 폐암(A549)세포에 대한 active site를 규명하고, 구조-활성 관계를 정립함으로써 새로운 화학구조를 갖는 항암제를 개발하고자 세포독성 MTT Assay 을 측정하였다.

2-substituted 가 6-substituted 보다 비교적 암세포의 성장을 억제하는 약물의 농도 (ug/ml)가 1.5배 줄았으며 (**12**, **16**), 약 5.95배가 높은 naphthoquinone 유도체 (**20**)도 있다. 반면 6-substituted가 2-substituted보다 약 1.4배 만큼 좋은 효과를 가져왔다. 합성한 naphthoquinone 유도체 중 7개 화합물이 비교약물 Cisplatin 보다 효과가 훨씬 좋았으며 특히 5,8-dimethoxy-2-((5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)methyl)naphthalene-1,4-dione (**20**)가 AML-2 세포의 성장을 억제하는 가장 좋은 naphthoquinone임을 보여주었다.

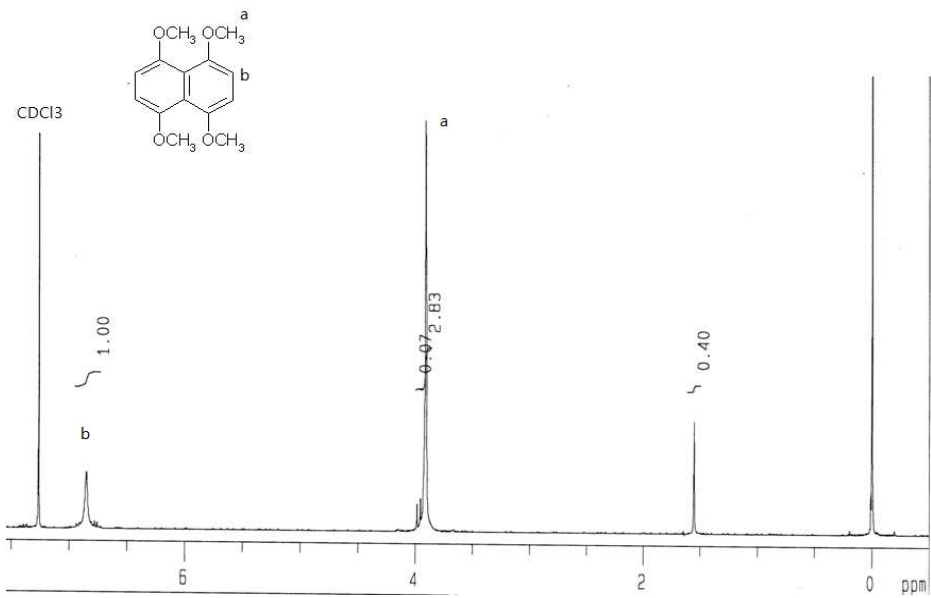
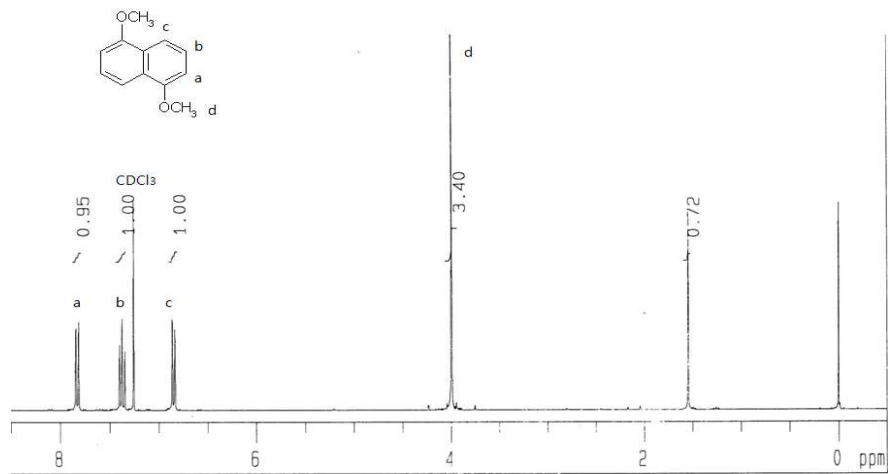
V. 참고문헌

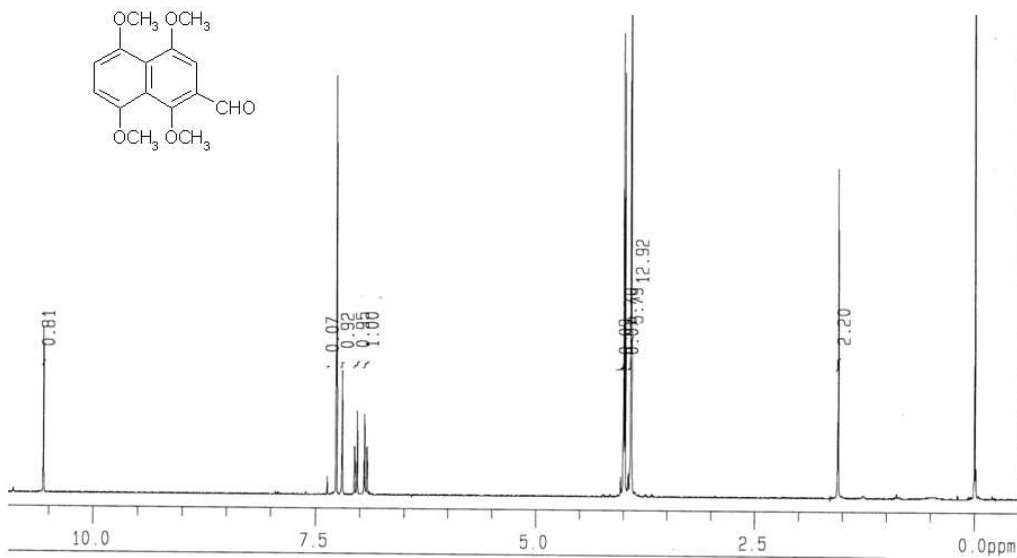
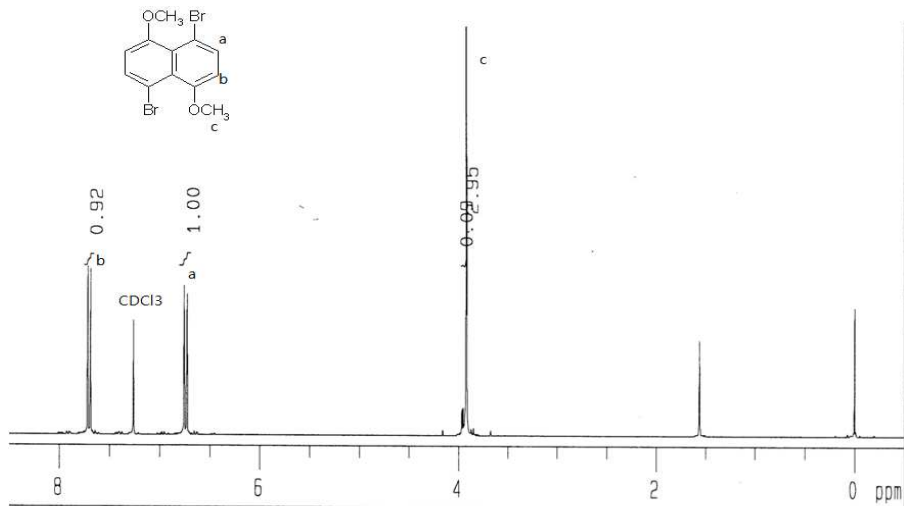
1. Ohkawa, T; Imanaka, H. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **1991**, 3, 163.
2. Gimbrone, M. A.; Jr., R. S.; Cotran, S. B.; Folkman, J. J. Natl. Cancer Inst., **1974**, 52, 413.
3. Hsu, H. -Y.; Peacher, W. G. "Chinese Herb Medicine and Therapy," Aurora Publishers Inc., Nashville, Tennessee, **1976**, 150.
4. Suzuki, T.; Abe, S. JP 61130233 A2.
5. Suzuki, T.; Abe, S. JP 61130234 A2.
6. Sankawa, U.; Ebizuka, Y .; Miyazaki, T.; Isomura, Y.; Otsuka, H.; Shibata, S.; Inomato, M.; Fukuoka, F. *Chem. Pharm. Bull.*, **1977**, 25(9), 2392-2395.
7. Sankawa, U.; Otsuka, Y.; Kataoka, Y . A.; Hoshi, A.; Kuretani, K. *Chem. Pharm. Bull* ., **1981**, 29(1), 116-122.
8. Shukla, Y. N.; Tandon, J. S.; Bhakuzi, D. S.; Dhar, M. M. *Phytochemistry*, **1971**, 10, 1909-1915.
9. Kim, H.; Ahn, B. Z. *Yakhak Hoeji* , **1990**, 34(4), 262-266.
10. Kim, S. H.; Song, G. Y.; Jin, G. Z.; Ahn, B. Z. *Arch. Pharm. Res.*, **1996**, 19(5), 416-422.
11. Ko, F. N.; Lee, Y. S.; Kuo, S. C.; Chang, Y. S.; Teng, C. M. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1995**, 1268(3), 329-334.
12. Zee-Cheng, R. K. Y.; Cheng, C. C. *J. Med. Chem.*, **1978**, 21, 291.
13. Cheng, C. C.; Zee-Cheng, R. K. Y.; Narayanan, V. L.; Ing, R. B.; Paull, K. D. *Trends Phamacol. Sci* ., **1981**, 2, 223.
14. Zee-Cheng, R. K. Y.; Cheng, C. C. *J. Pharm. Sci* ., **1982**, 71, 708.
15. Johnson, R. K.; Zee-Cheng, R. K. Y.; Lee, W. W.; Acton, E. M.; Henry, D. W.; Cheng, C. C. *Cancer Treat. Rep.*, **1979**, 63, 425.
16. Tewey, K. M.; Rowe, T. C.; Yang, L.; Halligan, B. D.; Liu, L. F. *Science*(Washington DC), **1984**, 226, 466-468.

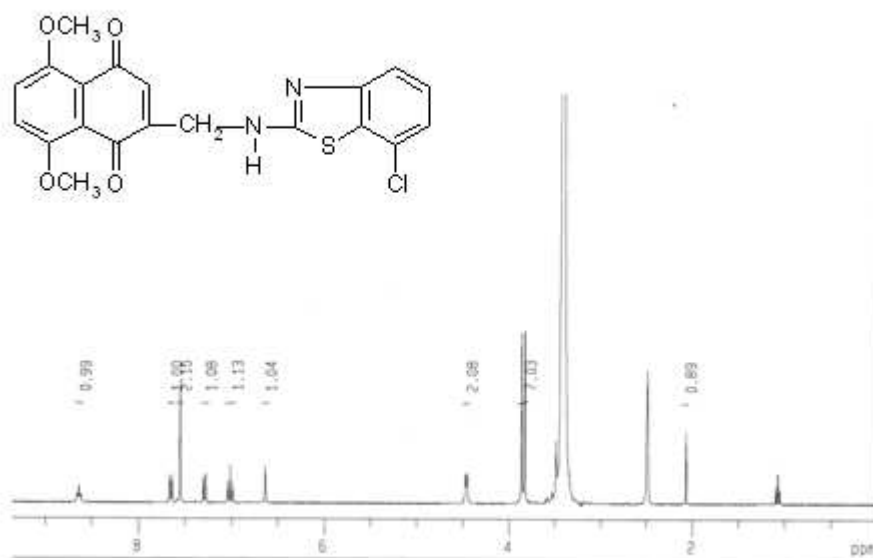
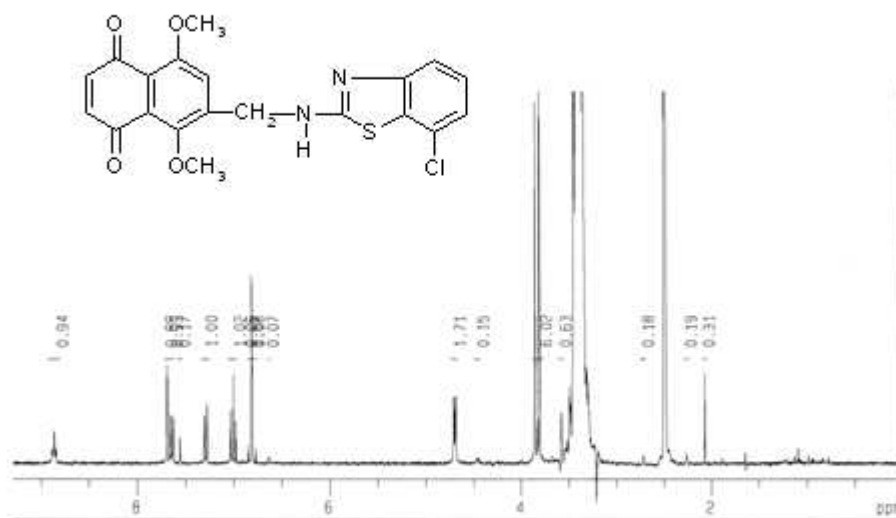
17. Pommier, Y.; Minford, J. K.; Schwartz, R. E.; Zwellling, L. A.; Kohn, K. W. *Biochemistry*, **1985**, 24, 6410–6416.
18. Chen, G. L.; Yang, L.; Rowe, T. C.; Halligan, B. D.; Liu, L. F. *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 13560–13566.
19. Chow, K. C.; MacDonald, T. L.; Ross, W. E. *Mol. Pharmacol.*, **1988**, 34, 467–473.
20. Akiyama, T.; Ishida, J.; Nakagawa, S.; Ogawara, H.; Fukami, Y. *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262, 5592–5595.
21. Okura, A.; Arakawa, H.; Oka, H.; Yoshinari, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 157, 183–189.
22. Markovits, J.; Linossier, C.; Fosse, P.; Coupries, J.; Pierre, J. *Cancer Res.*, **1989**, 49, 5111–5117.
23. Foye, W. O. "Cancer Chemotherapeutic Agents" American Chemical Society: Washington, DC, **1995**, 250–260.
24. Brewer, A. D.; Minatelli, J. A.; Plowman, J.; Paull, K. D.; Narayanan, V. L. *Biochem. Pharmacol.*, **1985**, 34, 2047.
25. Cooney, D. A.; Covey, J. M.; Kang, G. I.; Dalal, M.; McMahon, J. B.; Johns, D. G. *Biochem. Pharmacol.*, **1985**, 34, 3395.
26. Lesca, P.; Leconte, P.; Pelaprat, D.; Paoletti, C.; Mansuy, D. *Biochem. pharmacol.*, **1980**, 29, 3231.
27. Tunac, J. B.; Graham, B. J.; Dobson, W. E. *J. Antibiot.* **1983**, 36, 1595.
28. Stampwala, S. S.; Bunge, R. H.; Hurley, T. R.; Willmer, N. E.; Blankiewicz, A. J.; Steinman, C. E.; Smitka, T. A.; French, J. C. *J. Antibiot.* **1983**, 36, 1601.
29. Leopold, W. R.; Shillis, J. L.; Mertus, A. E.; Nelson, J. M.; Roberts, B. J.; Jackson, R. C. *Cancer Res.*, **1984**, 44, 1928.
30. Craig B. Fryhle "Solomons Organic Chemistry", 8th, **2005**, 870

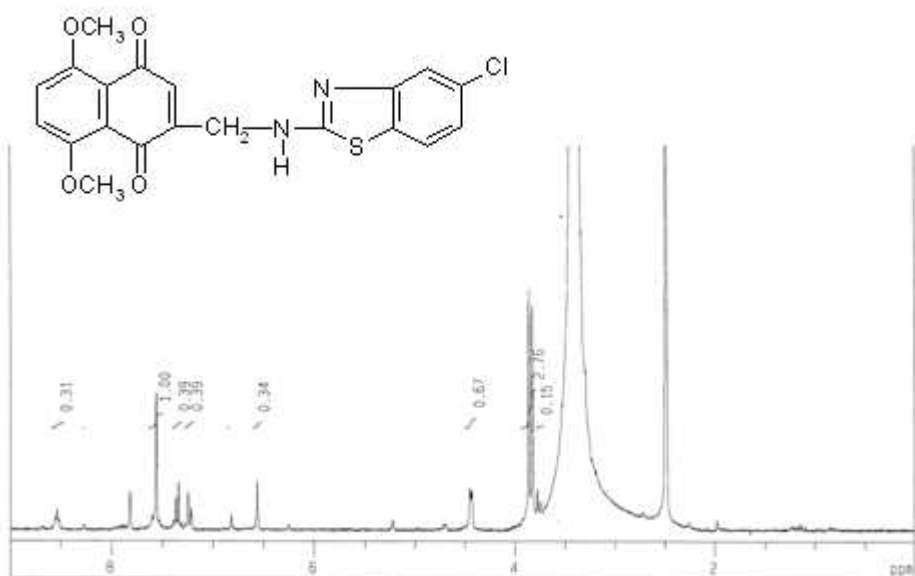
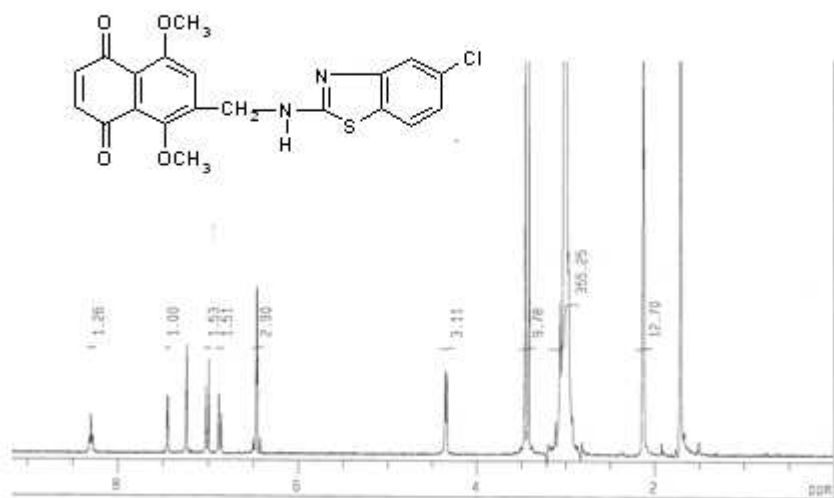
부 록

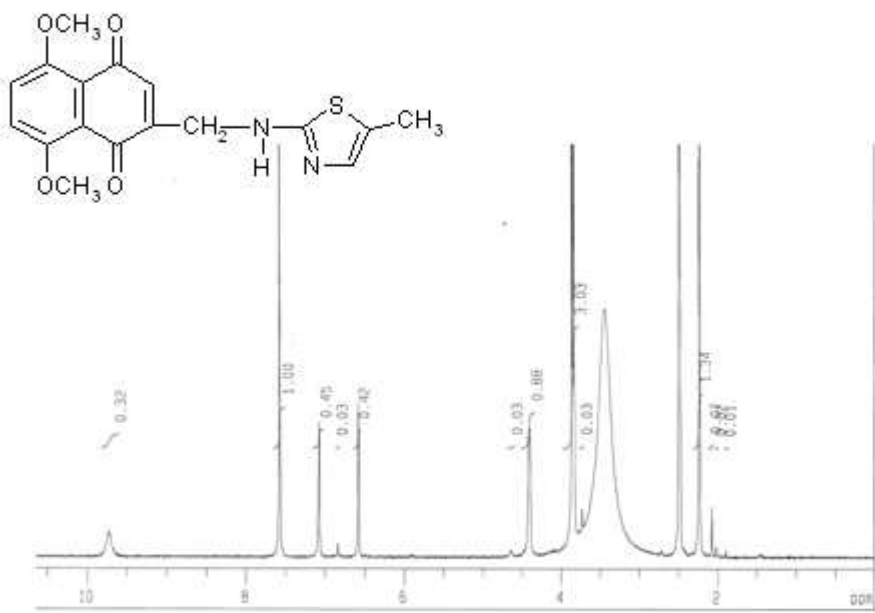
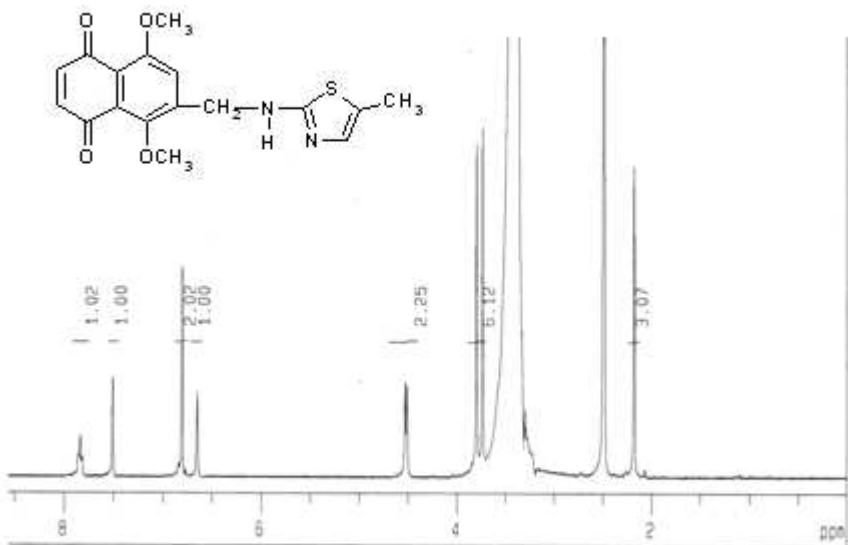
^1H NMR Spectra

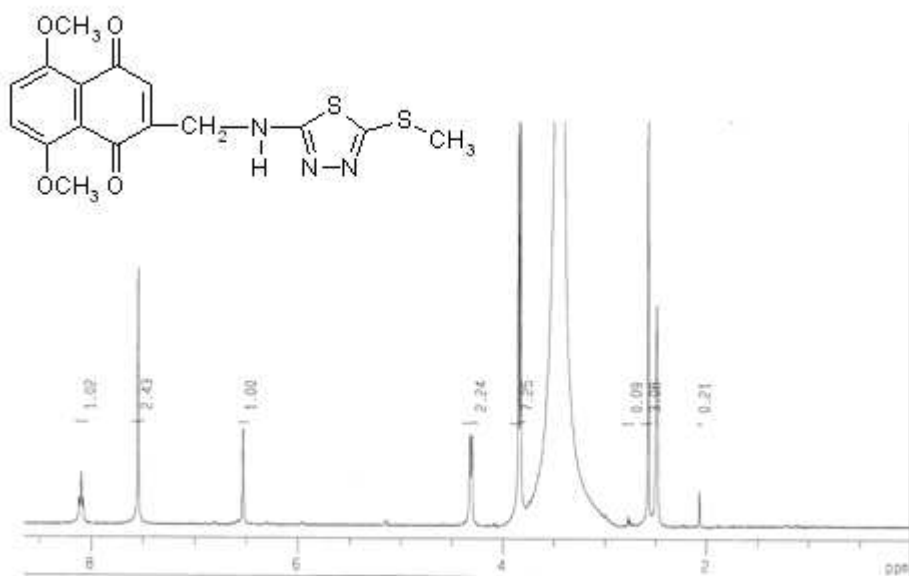
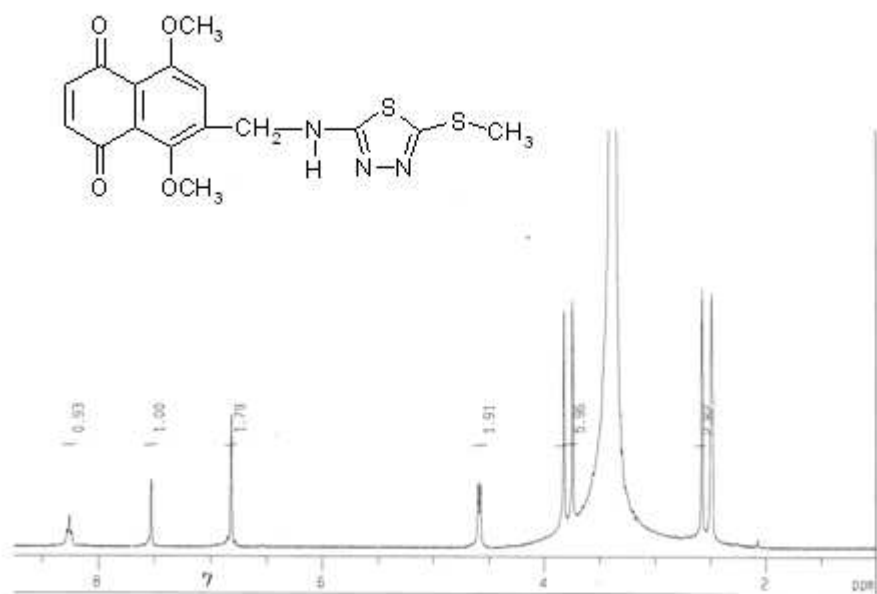












감사의 글

대학원 생활 2년 동안 많은 일이 있었습니다. 아픈 몸을 이끌고 많은 배움과 여러 번의 실패 끝에 소중한게 얻은 유기합성 실험테크닉은 저에게 있어서 가장 큰 보물이었습니다. 힘든 나날 속에 자신과의 싸움은 참 어려웠습니다. 하지만 포기하지 않았고 아무것도 모르는 상태에서 시작한 끝에 드디어 이 논문이 나왔습니다.

첫 번째로 어려움 속에서 언제나 제 곁에 있어준 가족에게 사랑한다는 말을 진심으로 전해드리고 싶습니다. 여러모로 이 논문을 관심 깊게 지도해주신 조훈 교수님, 학부 1학년부터 격려와 도움을 주신 김준섭 교수님, 언제나 강의를 열정적으로 몸소 실천해 주신 유지강 교수님, 수업시간외에 다양한 면에서 지식을 얻어야 한다고 말씀해 주신 최재곤 교수님, 학교생활뿐만 아니라 사회생활의 중요성을 가르쳐 주신 홍진후 교수님, 힘들더라도 열심히 하라고 조언해주신 김현경 교수님, 실험조교하면서 고생한다고 격려의 메시지를 주신 이창훈 교수님께 깊이 감사드립니다. 고분자 합성실험실을 방문할 때 마다 반가운 목소리로 받아주신 윤두수 박사님께도 감사의 말을 전해드리고 싶습니다.

실험실 식구들, 특히 부족한 제 실력을 많이 향상시켜준 박사과정 친구 무영이한테는 정말로 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 실험하면서 장난삼아 티격티격 싸우며 마지막으로 웃음을 같이한 흥선이, 살면서 인생의 좋은 말씀을 해주신 옥란 누나, 2년 넘게 웃고 떠들고 때로는 많은 일을 스스로 도맡아서 저를 도와준 다은, 희라에게 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 공부뿐만 아니라 자기 일에 최선을 다하는 모습을 보여준 미선이 에게도 고마운 마음을 표현합니다.

응용화학소재공학과 선배님과 동기 그리고 후배님들에게도 대학원 생활이 힘들더라도 여러 위로의 말씀과 소중한 격려의 메시지를 해주신 광환이형, 찬덕이, 희선이, 창호, 환석이, 춘희 누나, 종원이, 구환이, 황우 그리고 막동이 수진이 까지 고맙다는 말을 술자리에서 하고 싶습니다. 그리고 NZ 11 기수와 푸른 학당 식구들, 토로몽 스터디 그룹식구들, 고등학교 친구 경식 이와 대학 동기 친구들에게도 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 끝으로 어려운 환경 속에도 열심히 살아가는 제 주위 분들에게도 고맙다는 말을 전하며 이 조그마한 결실을 함께 나누고자 합니다.

2009년 2월 전 종 진

저작물 이용 허락서

학과	첨단부품소재공학	학 번	20077278	과 정	석사
성명	한글 전 종 진 한문 田 鍾 振 영문 JEON JONG JIN				
주소	전남 광양시 마동 송보파인빌 1046번지 101동 702호				
연락처	E-mail : jjj9801@naver.com				
논문제목	한글 : 나프토퀴논 유도체의 합성 및 활성평가				
	영문 : Synthesis and evaluation of naphthoquinone derivatives				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(0) 반대()

2009년 2월

저작자: 전 종 진 (인)

조선대학교⁵⁰ 총장 귀하