

1,3,4-Thiadiazole 유도체의 합성 및 Akt1 카이네이즈 저해 활성

김세영 · 류재천 · 유경호[†]

한국과학기술연구원 생체과학연구본부
(2008년 6월 3일 접수 ; 2008년 9월 18일 채택)

Synthesis and Akt1 Kinase Inhibitory Activity of 1,3,4-Thiadiazole Derivatives

Se-Young Kim · Jae-Chun Ryu · Kyung-Ho Yoo[†]

*Life Sciences Research Division, Korea Institute of Science and Technology,
P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea
(Received June 3, 2008 ; Accepted September 18, 2008)*

Abstract: Akt, a serine/threonine protein kinase as a viral oncogene, is a critical regulator of PI3K-mediated cell proliferation and survival. On translocation, Akt is phosphorylated and activated, ultimately resulting in stimulation of cell growth and survival. As a part of our program toward the novel Akt1 inhibitors with potent activity over PI3K signaling pathway, we found primary hit compound **2** with an IC₅₀ value of 620 μ M from protein kinase focused library. Based on the structural features of **2**, new 1,3,4-thiadiazole derivatives were designed by the introduction of aromatic and heteroaromatic moieties onto thiadiazole nucleus. In this work, a series of 1,3,4-thiadiazole derivatives **1a-1** were synthesized and evaluated for Akt1 inhibitory activity.

Keywords: 1,3,4-thiadiazoles, synthesis, Akt1 kinase, inhibitory activity

1. 서론

모든 암은 단순한 질병이 아니고 통제 불능 상태의 세포분열 성장과 암 발생 기전으로부터 변이세포의 광범위한 확산 등으로 특성화시킬 수 있는 복잡한 질병이다. 정상 세포에서 타이로신 카이네이즈 (tyrosine kinase)에 의한 단백질 카이네이즈 인산화 (protein kinase

phosphorylation)는 세포의 성장과 분화를 통제 하는데 필수적인 요소이며, 이의 적절치 못한 활성화가 세포 증식을 유도하여 암을 유발한다고 보고되고 있다[1,2].

최근 분자 생물학의 발전으로 세포의 증식과 분화 등을 조절하는 신호전달 체계가 많이 연구됨에 의하여 이러한 신호전달 체계를 새로운 표적으로 하여 정상세포와 암세포 사이의 선택성을 나타낼 수 있는 새로운 항암제 개발에 대한 연구가 집중적으로 시도되고 있다. 현재 밝혀진 단백질 카이네이즈류 중 약 20여 가지가

[†] 주저자 (e-mail : khyoo@kist.re.kr)

여러 질병의 신약개발 표적으로 사용되어지고 있으며 포스트 지노믹스 시대의 연구 진행에 따라 향후 신약 표적으로 활용될 단백질 카이네이즈는 100개 이상으로 증가할 것으로 예측된다. 따라서 이를 표적으로 한 신약 기술 개발 및 그 기반 기술의 축적은 생명과학의 연구 지식을 이용하여 신약 후보물질을 개발하는 연구에 필수 불가결한 요소라 할 수 있다.

90년대 들어 의약 합성 측면에서 단백질 카이네이즈 표적의 새로운 경향은 거의 일률적으로 이 효소류의 기질중의 하나인 ATP (adenosine triphosphate) 결합 부위를 표적화한다는 사실이다. 90년대 중반 들어 이와 연관된 신약이 개발되어 상당히 우수한 특이성과 선택성을 보이며 전 임상 단계에서 독성이 큰 문제가 되지 않으며 임상에서도 부작용 없이 성공적으로 개발이 진행되자 현재는 단백질 카이네이즈의 ATP 결합 부위의 표적화가 보편적인 저해제 개발의 방법으로 받아들여지고 있다. ATP 결합 부위에 경쟁적으로 결합하여 인산화를 통한 암 발생 요인을 억제하는 저해제의 경우 ATP를 이용하는 효소들과의 선택성 문제를 내포하고 있음에도 불구하고 이를 표적화한 저해제 개발이 활발히 진행되고 있다[3-5].

그러나 Akt1 카이네이즈 저해제를 목표로 한 항암제 개발과 관련된 국외 연구동향은 매우 초기 단계에 있으며, 이에 대한 국내에서의 연구는 미미한 실정이다. 따라서, 저해 화합물 구조가 2003년 말부터 보고되기 시작했으나 우수한 저해 활성을 나타내는 화합물은 아직까지 개발되어 있지 않은 상태이다[6-8]. Akt1 카이네이즈는 Akt family에 속하며[9], 세린/스레오닌 단백질 카이네이즈 (serine/threonine protein kinase) 중의 하나로서 지난 수년 사이 밝혀진 PI3 카이네이즈 신호전달 체계는 암 세포의 성장과 사멸에 대한 많은 이해를 제공하고 있다 [10-12]. PI (Phosphatidyl inositol)의 인산화된

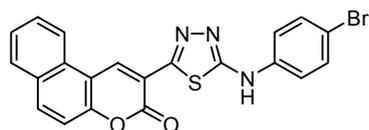
지질이 세포 성장, 사멸 등에 관여한다는 사실은 이미 80년대 PKC (protein kinase C)의 발견과 더불어 많은 연구 결과가 발표되어져 왔다. 즉, 세포성장 신호전달 체계가 PI3 카이네이즈를 활성화시킴에 의하여 인산화된 inositol 지질의 양이 세포막에서 증가되며 이에 활성화된 Akt1 카이네이즈는 NF- κ B의 활성을 촉진 및 Bax 등의 활성을 저해하여 세포 사멸을 억제하는 동시에 cyclin D1 등의 발현을 증가시켜 세포 성장을 촉진하게 된다[13]. 또한 암세포의 혈관생성 (angiogenesis)을 촉진하고 MMP (matrix metalloproteinase) 등의 발현을 증가시켜 세포의 전이 현상을 촉진하게 되는데 이러한 현상은 말기 암의 발생과 성장 유지에 필요한 생화학적 메카니즘들로서 결국 Akt1 카이네이즈의 활성 증가가 암세포의 활동에 필수적 요소임이 입증되었다.

본 연구에서는 Akt1 카이네이즈 저해활성을 통한 항암작용 기전의 우수한 화합물을 개발하기 위하여 단백질 카이네이즈 focusd library로부터 Akt1 카이네이즈 저해 활성 시험을 거쳐 primary hit compound **2**를 확보한 후 분자설계를 통하여 Fig. 1. 에서와 같이 1,3,4-thiadiazole 핵심 골격구조를 유지하면서 C-2 및 C-5 위치에 aromatic, heteroaromatic 및 aromatic amine기를 도입한 2,5-disubstituted 1,3,4-thiadiazole 유도체 **1a-1**를 합성하여 이들에 대한 Akt1 카이네이즈 저해 활성을 시험하였다.

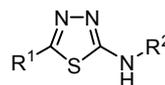
2. 실험

2.1. 기기 및 시약

분석 기기는 NMR spectrometer (Gemini 300, Varian Co., USA) 및 melting point apparatus (MPA 100, Stanford Research



2: IC₅₀=620 μ M



1a-1: R¹=C₆H₅, 3-furyl, 4-OH-7-CF₃-3-quinolinyl
R²=C₆H₅, 3-BrC₆H₄, 4-BrC₆H₄, C₆H₅CH₂

Fig. 1. 2,5-Disubstituted 1,3,4-thiadiazole Derivatives as Targrt Molecules

Systems, Inc., USA)를 사용하여 측정하였으며, Thin layer chromatography (TLC)에는 실리카 겔 60 GF₂₅₄ (0.25 mm, Merck Co., Germany)로 도포되어 있는 유리판을 이용하였으며, 스크리닝은 ELISA plate reader (Spectramax 190, Molecular Device Co., USA)를 사용하였다. 반응에 사용한 시약들은 주로 Sigma와 Aldrich사의 것을 이용하였으며 반응에 이용한 용매는 J. T. Baker사의 것을 정제없이 사용하였다. NMR 용매는 Sigma와 Aldrich사의 DMSO-*d*₆와 CDCl₃를 사용하였으며 시그널의 상대적인 위치는 용매 내에 들어있는 tetramethylsilane (TMS)을 기준으로 하거나 NMR 용매를 기준으로 하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 1,4-Disubstituted

3-thiosemicarbazide 유도체의 합성

Benzoyl hydrazine (4a)

Ethyl benzoate (**3a**) (1.0 g, 6.7 mmol)과 hydrazine monohydrate (0.8 mL, 16.7 mmol)를 ethanol anhydrous (20 mL)에 가한 후 약 78 °C에서 6시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하여 oil 형상의 화합물을 얻었다. Yield 0.90 g (99.3%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.87-7.84 (m, 2H), 7.49-7.41 (m, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.8, 133.6, 131.6, 128.9, 127.7.

3-Furyl-3-carboxylic acid hydrazide (4b)

Ethyl 2-furoate (**3b**) (1.0 g, 7.1 mmol)과 hydrazine monohydrate (1 mL, 21.4 mmol)를 ethanol anhydrous (15 mL)에 가한 후 약 78 °C에서 1시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하여 oil 형상의 화합물을 얻었다. Yield 0.72 g (78.7%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.73 (s, 1H), 7.06 (d, *J*=3.4 Hz, 1H), 6.56 (ddd, *J*=0.6, 1.7, 1.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.4, 147.1, 145.4, 113.7, 112.1.

4-Hydroxy-7-trifluoromethyl-3-quinolinyl-3-carboxylic acid hydrazide (4c)

Ethyl 4-hydroxy-7-trifluoromethyl-3-

quinoline carboxylate (**3c**) (1.5 g, 5.3 mmol)과 hydrazin hydrate (0.75 mL, 15.8 mol)를 ethanol (20 mL)에 가한 후 약 78 °C에서 16시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 1.3 g (90.9%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.56 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.41 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.71 (d, *J*=8.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.4, 164.1, 144.9, 139.3, 132.7, 132.3, 128.6, 127.8, 125.8, 122.2, 120.8, 117.2, 117.1, 111.9.

1-Benzoyl-4-phenyl-3-thiosemicarbazide (5a)

화합물 **4a** (0.3 g, 2.2 mmol)와 phenyl isothiocyanate (0.26 mL, 2.2 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (20 mL)에 용해 후 78 °C에서 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 0.32 g (50%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.5 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 7.95 (d, *J*=7.2 Hz, 2H), 7.58 (t, *J*=7.2 Hz, 1H), 7.51 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.47-7.43 (m, 3H), 7.35-7.30 (m, 2H), 7.15 (t, *J*=7.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.7, 166.5, 139.7, 132.9, 132.3, 128.7, 128.5, 128.3, 126.3, 125.5.

1-Benzoyl-4-(3-bromophenyl)-3-thiosemicarbazide (5b)

화합물 **4a** (0.50 g, 3.7 mmol)와 3-bromophenyl isothiocyanate (0.79 g, 3.7 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (20 mL)에 용해 후 78 °C에서 3시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 0.63 g (46.7%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.57 (s, 1H), 9.88 (bs, 2H), 7.96 (d, *J*=7.3 Hz, 2H), 7.73 (bs, 1H), 7.59 (t, *J*=7.1 Hz, 2H), 7.53-7.48 (m, 3H), 7.33-7.26 (m, 2H); ¹³C

NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 181.4, 173.1, 166.4, 141.4, 132.8, 132.4, 130.3, 128.7, 128.3, 127.4, 125.1, 120.8.

1-Benzoyl-4-(4-bromophenyl)-3-thiosemicarbazide (5c)

화합물 **4a** (0.50 g, 3.7 mmol)와 4-bromophenyl isothiocyanate (0.79 g, 3.7 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (20 mL)에 용해 후 78 °C에서 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 0.68 g (52.9%); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.56 (s, 1H), 9.85 (bs, 2H), 7.95 (s, 2H), 7.60-7.44 (m, 7H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.4, 139.2, 139.1, 132.9, 132.4, 131.6, 131.2, 128.8, 128.7, 128.3, 127.4.

1-Benzoyl-4-benzyl-3-thiosemicarbazide (5d)

화합물 **4a** (0.50 g, 3.7 mmol)와 benzyl isothiocyanate (0.5 mL, 3.7 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (25 mL)에 용해 후 78 °C에서 3시간 동안 가열 환류시킨다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 0.70 g (66.8%); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.41 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.93 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.57 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.51-7.46 (m, 2H), 7.31-7.27 (m, 5H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.5, 139.9, 132.9, 132.3, 128.7, 128.5, 128.3, 127.7, 127.5, 127.0, 47.3.

1-(3-Furylcarbonyl)-4-phenyl-3-thiosemicarbazide (5e)

화합물 **4b** (0.18 g, 1.4 mmol)와 phenyl isothiocyanate (0.17 mL, 1.4 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (18 mL)에 용해 후 78 °C에서 30분 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정

하였다. Yield 0.20 g (53.2%); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.42 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.44 (d, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.34-7.29 (m, 1H), 7.24 (d, $J=3.1$ Hz, 2H), 7.14 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J=1.6$, 3.3 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 186.1, 158.1, 146.8, 146.1, 139.7, 128.4, 126.2, 125.4, 115.3, 112.3.

4-(3-Bromophenyl)-1-(3-furylcarbonyl)-3-thiosemicarbazide (5f)

화합물 **4b** (0.50 g, 4.0 mmol)와 3-Bromophenyl isothiocyanate (0.85 g, 4.0 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (25 mL)에 용해 후 78 °C에서 2시간 동안 가열 환류시킨다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 0.50 g (37.1%); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.46 (s, 1H), 9.87 (d, $J=13.0$ Hz, 2H), 7.91 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.52 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 7.35-7.25 (m, 3H), 6.68 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 158.0, 146.8, 146.1, 141.3, 130.3, 127.9, 124.8, 120.8, 115.4, 112.4.

4-(4-Bromophenyl)-1-(3-furylcarbonyl)-3-thiosemicarbazide (5g)

화합물 **4b** (0.50 g, 4.0 mmol)와 4-bromophenyl isothiocyanate (0.85 g, 4.0 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (20 mL)에 용해 후 78 °C에서 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 0.99 g (73.7%); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.45 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 7.91 (s, 2H), 7.25 (d, $J=2.4$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J=6.7$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J=8.5$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 147.0, 146.6, 146.3, 140.8, 139.1, 132.1, 131.9, 131.4, 129.9, 120.4, 119.2, 117.5, 115.1, 112.7, 112.4.

4-Benzyl-1-(3-furylcarbonyl)-3-thiosemicarbazide (5h)

화합물 **4b** (0.50 g, 4.0 mmol)와 benzyl isothiocyanate (0.50 mL, 4.0 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (25 mL)에 용해 후 78 °C에서 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 0.50 g (45.8%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.31 (s, 1H), 9.44 (d, *J*=11.2 Hz, 1H), 8.61 (d, *J*=26.5 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.34-7.08 (m, 6H), 6.65 (dd, *J*=1.7, 3.4 Hz, 1H), 4.72 (d, *J*=3.1 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.0, 146.8, 146.0, 139.7, 128.4, 127.7, 127.6, 127.0, 115.2, 112.3, 47.3.

1-(4-Hydroxy-7-trifluoromethyl-3-quinolinyl)carbonyl-4-phenyl-3-thiosemicarbazide (5i)

화합물 **4c** (50 mg, 0.18 mmol)와 phenyl isothiocyanate (0.02 mL, 0.18 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (10 mL)에 용해 후 78 °C에서 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 70 mg (93.4%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.06 (bs, 1H), 11.04 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.50 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.81 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 7.43-7.35 (m, 5H), 7.15-7.11 (m, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.4, 145.5, 139.7, 139.2, 132.9, 132.5, 128.6, 127.9, 125.7, 125.0, 123.3, 122.1, 121.2, 117.2, 111.5, 67.6.

4-(3-Bromophenyl)-1-(4-hydroxy-7-trifluoromethyl-3-quinolinyl)carbonyl-3-thiosemicarbazide (5j)

화합물 **4c** (0.3 g, 1.1 mmol)와 3-bromophenyl isothiocyanate (0.24 g, 1.1 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (20 mL)에 용해 후 78 °C에서 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 0.41 g

(75.1%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.66 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 9.96 (bs, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.49 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.79 (d, *J*=8.1 Hz, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.29 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.5, 145.3, 141.1, 138.9, 132.8, 131.1, 130.6, 128.4, 127.8, 125.6, 124.2, 121.9, 121.4, 117.0.

4-(4-Bromophenyl)-1-(4-hydroxy-7-trifluoromethyl-3-quinolinyl)carbonyl-3-thiosemicarbazide (5k)

화합물 **4c** (0.18 g, 0.67 mmol)와 4-bromophenyl isothiocyanate (0.14 g, 0.67 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (15 mL)에 용해 후 78 °C에서 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 170 mg (52.6%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.53 (bs, 1H), 11.39 (bs, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.47 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.78 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 7.50 (s, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.4, 145.6, 139.2, 132.9, 132.6, 131.7, 131.4, 128.6, 127.9, 126.1, 125.7, 125.2, 122.1, 121.2, 117.2, 116.2.

4-Benzyl-1-(4-hydroxy-7-trifluoromethyl-3-quinolinyl)carbonyl-3-thiosemicarbazide (5l)

화합물 **4c** (0.3 g, 1.1 mmol)와 benzyl isothiocyanate (0.15 mL, 1.1 mmol)를 질소 조건 하에서 ethanol (20 mL)에 용해 후 78 °C에서 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 과량의 ethanol을 감압 증류하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 물로 세척하고 여과한 후 감압 건조한 다음 ethanol로 재결정하였다. Yield 220 mg (47.3%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.95 (s, 1H), 8.57 (bs, 1H), 8.48 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.79 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 6.80 (d, *J*=4.2 Hz, 2H), 7.22 (dd, *J*=4.3, 8.8 Hz, 5H), 4.71 (d, *J*=5.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.5, 145.7, 139.7, 139.2, 133.0, 132.6, 128.6, 128.5, 127.9, 127.5, 127.1, 125.7, 122.1, 121.3, 117.2, 111.8, 47.3.

2.2.2. 2,5-Disubstituted 1,3,4-thiadiazole 유도체의 합성

2-Anilino-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole (1a)

Ice bath하에서 화합물 **5a** (0.15 g, 0.55 mmol)에 sulfuric acid (1.5 mL)를 가한 후 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 물을 첨가하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 120 mg (85.7%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.85-7.82 (m, 2H), 7.63 (s, 5H), 7.49 (d, *J*=1.6, 5.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.4, 158.4, 141.6, 141.3, 130.8, 130.6, 129.7, 127.2, 127.1, 117.1.

2-(3-Bromoanilino)-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole (1b)

Ice bath하에서 화합물 **5b** (0.26 g, 0.74 mmol)에 sulfuric acid (2 mL)를 가한 후 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 물을 첨가하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 0.24 g (97.2%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.86-7.82 (m, 4H), 7.50-7.46 (m, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.9, 159.0, 141.9, 140.2, 130.9, 130.2, 129.8, 127.4, 127.3, 122.3, 120.5, 115.7.

2-(4-Bromoanilino)-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole (1c)

Ice bath하에서 화합물 **5c** (0.14 g, 0.34 mmol)에 sulfuric acid (1.5 mL)를 가한 후 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 물을 첨가하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 130 mg (97.7%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.83 (s, 1H), 7.65 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 7.55-7.49 (m, 7H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.2, 140.2, 132.2, 130.8, 130.6, 129.8, 127.3, 119.9, 119.4, 113.8.

2-Benzylamino-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole (1d)

Ice bath하에서 화합물 **5d** (0.1 g, 0.35 mmol)에 phosphorous oxychloride (1.7 mL)를

가한 후 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 얼음물을 첨가하면서 교반시킨 다음 ammonium hydride 용액을 첨가하여 반응 혼합물을 중화하였다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 90 mg (95.7%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.73 (bs, 1H), 7.79-7.77 (m, 2H), 7.51-7.28 (m, 8H), 4.69 (s, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.0, 156.4, 137.3, 131.5, 129.8, 129.0, 128.3, 128.1, 128.0, 127.1, 49.1.

2-Anilino-5-(3-furyl)-1,3,4-thiadiazole (1e)

Ice bath하에서 화합물 **5e** (0.1 g, 0.38 mmol)에 sulfuric acid (1.5 mL)를 가한 후 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 물을 첨가하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 50 mg (53.8%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.89 (s, 1H), 7.67 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.53-7.46 (m, 1H), 7.42-7.34 (m, 2H), 7.04-6.97 (m, 2H), 6.69 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.8, 145.5, 145.4, 140.9, 130.1, 129.7, 129.5, 123.8, 122.5, 118.9, 117.9, 112.9, 110.6.

2-(3-Bromoanilino)-5-(3-furyl)-1,3,4-thiadiazole (1f)

Ice bath하에서 화합물 **5f** (0.13 g, 0.38 mmol)에 sulfuric acid (1.5 mL)를 가한 후 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 물을 첨가하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 58 mg (47.8%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.17 (bs, 1H), 8.00 (d, *J*=1.5 Hz, 1H), 7.91-7.81 (m, 1H), 7.53-7.44 (m, 1H), 7.37 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.26 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.12 (d, *J*=7.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.4, 156.4, 145.5, 140.3, 140.2, 132.2, 119.9, 119.8, 113.7, 113.5, 112.9, 110.8.

2-(4-Bromoanilino)-5-(3-furyl)-1,3,4-thiadiazole (1g)

Ice bath하에서 화합물 **5g** (0.12 g, 0.35 mmol)에 sulfuric acid (1.5 mL)를 가한 후 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후

물을 첨가하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 120 mg (quant.); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.14 (bs, 1H), 7.88 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 7.81-7.72 (m, 1H), 7.49-7.41 (m, 1H), 7.36 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.10 (d, $J=7.6$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 156.2, 140.6, 139.6, 132.4, 132.2, 120.2, 120.1, 119.5, 113.1, 112.9.

2-Benzylamino-5-(3-furyl)-1,3,4-thiadiazole (1h)

Ice bath하에서 화합물 **5h** (0.1 g, 0.36 mmol)에 phosphorous oxychloride (1.8 mL)를 가한 후 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 얼음물을 첨가하면서 교반시킨 다음 ammonium hydride 용액을 첨가하여 반응 혼합물을 중화하였다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 76mg (81.7%); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.76 (s, 1H), 7.56 (d, $J=8.0$ Hz, 3H), 7.29 (d, $J=7.7$ Hz, 5H), 4.51 (s, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.3, 159.9, 144.9, 137.5, 128.9, 128.9, 128.4, 128.0, 112.8, 109.7, 48.1.

2-Anilino-5-(4-hydroxy-7-trifluoromethyl-3-quinolinyl)-1,3,4-thiadiazole (1i)

Ice bath하에서 화합물 **5i** (0.11 g, 0.27 mmol)에 sulfuric acid (1.5 mL)를 가한 후 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 물을 첨가하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 130 mg (quant.); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.07 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.45 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.77 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.59 (s, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172.3, 164.9, 151.1, 141.9, 141.2, 139.5, 138.9, 127.7, 127.3, 127.1, 120.9, 117.3, 117.1, 112.1.

2-(3-Bromoanilino)-5-(4-hydroxy-7-trifluoromethyl-3-quinolinyl)-1,3,4-thiadiazole (1j)

Ice bath하에서 화합물 **5j** (0.15 g, 0.31 mmol)에 sulfuric acid (0.15 mL)를 가한 후 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후

물을 첨가하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 109 mg (76.3%); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.07 (bs, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.39 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J=14.2$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J=5.9$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172.3, 164.4, 151.8, 142.2, 139.8, 139.4, 138.8, 132.1, 130.2, 127.7, 127.2, 125.7, 122.3, 120.9, 120.5, 117.3, 115.6, 111.9.

2-(4-Bromoanilino)-5-(4-hydroxy-7-trifluoromethyl-3-quinolinyl)-1,3,4-thiadiazole (1k)

Ice bath하에서 화합물 **5k** (0.1 g, 0.21 mmol)에 sulfuric acid (1.5 mL)를 가한 후 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 물을 첨가하면 고체 화합물이 생성된다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 88 mg (91.7%); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.99 (s, 1H), 10.45 (bs, 1H), 9.07 (d, $J=4.1$ Hz, 1H), 8.40 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.71 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.6 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J=8.6$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172.2, 164.6, 151.2, 140.6, 139.3, 138.8, 132.1, 127.7, 127.2, 125.8, 122.2, 120.8, 119.7, 117.2, 113.2, 112.3.

2-Benzylamino-5-(4-hydroxy-7-trifluoromethyl-3-quinolinyl)-1,3,4-thiadiazole (1l)

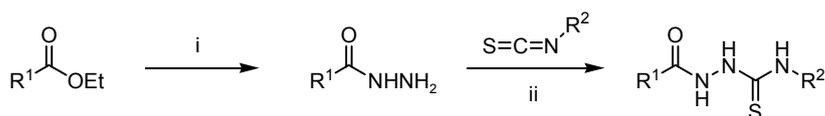
Ice bath하에서 화합물 **5l** (0.1 g, 0.24 mmol)에 phosphorous oxychloride (1.2 mL)를 가한 후 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응 완결 후 얼음물을 첨가하면서 교반시킨 다음 ammonium hydride 용액을 첨가하여 반응 혼합물을 중화하였다. 생성된 고체 화합물을 여과한 후 감압 건조하였다. Yield 90 mg (91.8%); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.56 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.49-8.42 (m, 3H), 8.04 (d, $J=6.6$ Hz, 2H), 7.41-7.27 (m, 4H), 4.60 (d, $J=3.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 171.1, 151.2, 149.7, 146.6, 138.6, 137.0, 130.9, 128.9, 127.9, 127.7, 127.6, 127.1, 126.9, 124.9, 124.4, 122.1, 48.5.

2.2.3. Akt1 카이네이즈 저해 활성 시험

분리한 Akt 1을 이용하여 기질로 Histon H2B와 10 μ M ATP, 2 μ Ci p32-ATP, 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)를 이용하여 30 °C에서 20분간 반응하여 기질인 Histon H2B의 인산화를 유도하였다. 20분간 반응시 GSK 3 beta 활성은 선형성 (linearity)을 유지하였다. 반응 후 1/2 부피의 30% 인산 용액을 가하여 반응을 종결하였다. 반응액을 p81 paper에 spotting한 후 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl 용액으로 10분씩 5번 씻어서 미 반응의 p32-ATP를 제거하였다. 반면에 Histone 단백질은 p81 paper에 부착되어 유지되었다. p81 paper를 말린 후 BAS phosphoimager (Kodak)를 이용하여 Histone 단백질의 인산화 정도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서의 최종 목적물인 2,5-disubstituted 1,3,4-thiadiazole 유도체 **1a-1**의 합성에 핵심 중간체로 사용되는 1,4-disubstituted 3-thiosemicarbazides **5a-1**은 다음의 Scheme 1에서와 같은 일련의 경로를 통하여 합성하였다.



3a: R¹=C₆H₅

3b: R¹=3-Furyl

3c: R¹= 4-OH-7-CF₃-3-quinolinyl

4a-c

5a: R¹=C₆H₅, R²=C₆H₅

5b: R¹=C₆H₅, R²=3-BrC₆H₄

5c: R¹=C₆H₅, R²=4-BrC₆H₄

5d: R¹=C₆H₅, R²=C₆H₅CH₂

5e: R¹=3-Furyl, R²=C₆H₅

5f: R¹=3-Furyl, R²=3-BrC₆H₄

5g: R¹=3-Furyl, R²=4-BrC₆H₄

5h: R¹=3-Furyl, R²=C₆H₅CH₂

5i: R¹=4-OH-7-CF₃-3-quinolinyl, R²=C₆H₅

5j: R¹=4-OH-7-CF₃-3-quinolinyl, R²=3-BrC₆H₄

5k: R¹=4-OH-7-CF₃-3-quinolinyl, R²=3-BrC₆H₄

5l: R¹=4-OH-7-CF₃-3-quinolinyl, R²=C₆H₅CH₂

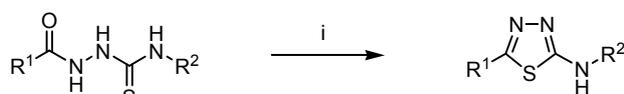
Scheme 1. *Reagents and reaction conditions:* (i) hydrazine monohydrate, ethanol, reflux, 1–16 h; (ii) ethanol, reflux, 30min–3 h.

Aromatic 및 heteroaromatic의 R¹ 치환기를 가지는 ethyl ester 구조의 commercially available한 출발물질 **3a-c**와 hydrazine monohydrate를 ethanol 용매내에서 가열 환류시켜 carboxylic acid hydrazide 화합물 **4a-c**를 합성한 후[14], 화합물 **4a-c**를 R² 치환기를 가지는 aryl isothiocyanate와 ethanol 용매내에서 가열 환류시켜 1,4-disubstituted 3-thiosemicarbazides **5a-1**을 합성하였다[15].

최종 목적물인 2,5-disubstituted 1,3,4-thiadiazoles **1a-1**은 Scheme 2에서와 같이 핵심 중간체인 1,4-disubstituted 3-thiosemicarbazides **5a-1**로부터 산 조건하에서 고리화 반응을 통하여 합성하였다.

위의 반응에서 C-5의 위치의 치환기가 benzyl기인 경우 황산과 같은 강한 산 조건에서는 debenzyltion 반응이 일어나기 때문에 phosphorus oxychloride를 사용하여 C-5의 위치가 benzylation된 화합물 **1d**, **1h** 및 **1i**를 얻을 수 있었다[16].

Fig. 2에서와 같이 본 연구에서 합성한 일련의 최종 목적물 1,3,4-thiadiazole 유도체 **1a-1**에 대하여 Akt1 카이네이즈 저해 활성을 시험한 결과 primary hit compound **2**와 유사한 정도의 약한 Akt1 카이네이즈 저해 활성을 나타내었다.

**5a-l****1a:** R¹=C₆H₅, R²=C₆H₅**1b:** R¹=C₆H₅, R²=3-BrC₆H₄**1c:** R¹=C₆H₅, R²=4-BrC₆H₄**1d:** R¹=C₆H₅, R²=C₆H₅CH₂**1e:** R¹=3-Furyl, R²=C₆H₅**1f:** R¹=3-Furyl, R²=3-BrC₆H₄**1g:** R¹=3-Furyl, R²=4-BrC₆H₄**1h:** R¹=3-Furyl, R²=C₆H₅CH₂**1i:** R¹=4-OH-7-CF₃-3-quinoliny, R²=C₆H₅**1j:** R¹=4-OH-7-CF₃-3-quinoliny, R²=3-BrC₆H₄**1k:** R¹=4-OH-7-CF₃-3-quinoliny, R²=3-BrC₆H₄**1l:** R¹=4-OH-7-CF₃-3-quinoliny, R²=C₆H₅CH₂

Scheme 2. Reagents and reaction conditions: (i) sulfuric acid, rt, 24 h (for **1a-c,e-g, i-k**), phosphorus oxychloride, reflux, 1-2 h (for **1d,h,l**).

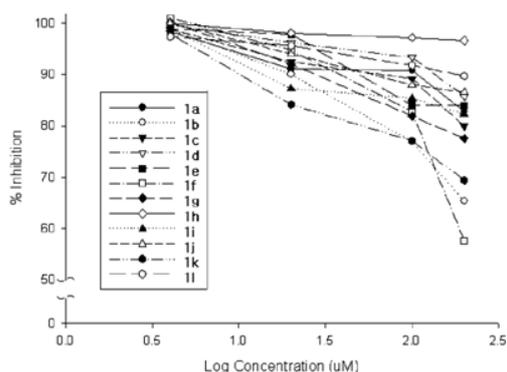


Fig. 2. Inhibitory activity for Akt1 kinase of 1,3,4-thiadiazole Derivatives

4. 결론

본 연구에서는 단백질 카이네이즈 focused library를 통하여 확보한 primary hit compound **2**의 구조를 기반으로 하여 핵심 골격구조 1,3,4-thiadiazole의 C-2 및 C-5 위치에 다양한 치환기를 도입하여 최종 목적물인 2,5-disubstituted 1,3,4-thiadiazole 유도체 **1a-l**를 합성하였다. 최종 목적물들에 대하여 Akt1 카이네이즈 저해 활성을 시험한 결과 primary hit compound **2**에 비교하여 의미있는 저해 활

성의 증가를 나타내지는 못 하였으나 최근의 신약 개발 후보물질 도출의 전형적인 접근방법 및 전략을 제시하였다고 할 수 있다.

감사의 글

이 연구는 한국과학기술연구원 기관고유사업의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. A. C. Porter and R. R. Vaillancourt, Tyrosine Kinase Receptor-activated Signal Transduction Pathways Which Lead to Oncogenesis, *Oncogene*, **17**, 1343 (1998).
2. P. Blume-Jensen and Tony Hunter, Oncogenic Kinase Signalling, *Nature*, **411**, 355 (2001).
3. M. W. Deininger and B. J. Druker, Specific Targeted Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib, *Pharmacol Rev.*, **55**, 401 (2003).
4. D. Raben, B. A. Helfrich, D. Chan, G.

- Johnson, and P. A. Bunn, Jr., ZD1839, A Selective Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Alone and in Combination with Radiation and Chemotherapy as a New Therapeutic Strategy in Non-small Cell Lung Cancer, *Semin. Oncol.*, **29** (Supplement 4), 37 (2002).
5. R. Pérez-Soler, A. Chachoua, L. A. Hammond, E. K. Rowinsky, M. Huberman, D. Karp, J. Rigas, G. M. Clark, P. Santabarbara, and P. Bonomi, Determinants of Tumor Response and Survival with Erlotinib in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer, *J. Clin. Oncol.*, **22**, 3238 (2004).
 6. S. A. Thomas, T. Li, K. W. Woods, X. Song, G. Packard, J. P. Fisher, R. B. Diebold, X. Liu, Y. Shi, V. Klinghofer, E. F. Johnson, J. J. Bouska, A. Olson, R. Guan, S. R. Magnone, K. Marsh, Y. Luo, S. H. Rosenberg, V. L. Giranda, and Q. Li, Identification of a Novel 3,5-Disubstituted Pyridine as a Potent, Selective, and Orally Active Inhibitor of Akt1 Kinase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 3740 (2006).
 7. Z. Zhao, W. H. Leister, R. G. Robinson, S. F. Barnett, D. Defeo-Johns, R. E. Jones, G. D. Hartman, J. R. Huff, H. E. Huber, M. E. Duggan, and C. W. Lindsley, Discovery of 2,3,5-Trisubstituted Pyridine Derivatives as Potent Akt1 and Akt2 Dual Inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 905 (2005).
 8. S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, K. M. Haskell, H. E. Huber, D. D. Nahas, C. W. Lindsley, Z. Zhao, and G. D. Hartman, Method of Treating Cancer, *WO 084473* (2003).
 9. K. Nakatani, D. A. Thompson, A. Barthel, H. Sakaue, W. Liu, R. J. Weigel, and R. A. Roth, Up-regulation of Akt3 in Estrogen Receptor-deficient Breast Cancers and Androgen-independent Prostate Cancer Lines, *J. Biol. Chem.*, **274**, 21528 (1999).
 10. S. F. Barnett, M. T. Bilodeau, and C. W. Lindsley, The Akt/PKB Family of Protein Kinases: A Review of Small Molecule Inhibitors and Progress towards Target Validation, *Curr. Top. Med. Chem.*, **5**, 109 (2005).
 11. A. Bellacosa, C. C. Kumar, A. Di Cristofano, and J. R. Testa, Activation of AKT Kinases in Cancer: Implications for Therapeutic Targeting, *Adv. Cancer. Res.*, **94**, 29 (2005).
 12. C. S. Mitsiades, N. Mitsiades, and M. Koutsilieris, The Akt Pathway: Molecular Targets for Anti-cancer Drug Development. *Curr. Cancer Drug Targets*, **4**, 235 (2004).
 13. P. Blume-Jensen and T. Hunter, Oncogenic Kinase Signalling, *Nature*, **411**, 355 (2001).
 14. J. Chattopadhyaya and S. K. Basu, Synthesis and Antibacterial Activity of Some Quinoline and 1,8-Naphthyridine Derivatives, *Indian J. Chem.*, **29B**, 98 (1990).
 15. J. R. Maxwell, D. A. Wasdahl, A. C. Wolfson, and V. I. Stenberg, Synthesis and Evaluation of Furan, Thiophene, and Azole Bis[(carbamoyloxy)methyl] Derivatives as Potential Antineoplastic Agents, *J. Med. Chem.*, **27**, 1565 (1984).
 16. Y. Kihara, S. Kabashima, K. Uno, T. Okawara, T. Yamasaki, and M. Furukawa, Oxidative Heterocyclization Using Diethyl Azodicarboxylate, *Synthesis*, 1020 (1990).