

## 3-(4-Methoxybenzylaminomethylene)-1,3-dihydroindole-2-one(5-108) 화합물의 항콕시디움 효과

여선주 · 김학성\* · 김석\*\* · 이기인\*\*\* · 박현#

원광대학교 의과대학, \*원광대학교 약학대학, \*\*경상대학교 수의과대학, \*\*\*한국화학연구원  
(Received November 11, 2015; Revised November 18, 2015; Accepted November 19, 2015)

### Anticoccidial Effect of 3-(4-Methoxybenzylaminomethylene)-1,3-dihydroindole-2-one(5-108)

Seon-Ju Yeo, Hak Sung Kim\*, Suk Kim\*\*, Kee-In Lee\*\*\* and Hyun Park#

Zoonosis Research Center, Department of Infection Biology, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

\*College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

\*\*College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

\*\*\*Bio-Organic Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, P. O. Box 107, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

**Abstract** — Coccidiosis is induced by *Toxoplasma gondii* and *Eimeria tenella* and novel anticoccidial drugs have been requested. In this study, the anticoccidial effect of 3-(4-methoxybenzylaminomethylene)-1,3-dihydroindole-2-one (5-108) on *T. gondii* and *E. tenella* was evaluated. Novel synthetic derivative 5-108 showed 1.44 fold higher relative selectivity compared to pyrimethamine against *T. gondii* *in vitro* assay. In chicken study, compound 5-108 significantly decreased the number of oocysts of *E. tenella* in feces, obtained from *E. tenella*-infected chickens, by  $33 \pm 2.64\%$  and  $23 \pm 3.60\%$  ( $P < 0.001$ ) at 7<sup>th</sup> day and 9<sup>th</sup> day *p.i.*. Conclusively, compound 5-108 was effective against *T. gondii* and *E. tenella*.

**Keywords** □ *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella*, anticoccidial effect, selectivity, 5-108

*Toxoplasma gondii*와 *Eimeria tenella*를 포함한 콕시디움은 인수 공통 질병을 유발함으로써 가축이나 인간에게 큰 피해를 주고 있다. 콕시디움에 대한 치료 및 예방 목적으로 항생제를 주로 사용하여 왔으나 치료 효율이 비교적 낮고, 항생제 내성원충의 출현 및 잔류독성 문제의 발생으로 인하여 새로운 약제 개발이 요구되고 있다.<sup>1)</sup> 톡소포자충은 임신에 의한 선천성 감염의 중요한 원인 중 하나이며,<sup>2)</sup> 또한 후천성면역결핍증후군(AIDS) 환자에서 톡소포자충성 뇌염을 일으켜 생존율을 감소시킨다.<sup>3,4)</sup> 이러한 임상적인 중요성이 있음에도 불구하고 현재 항톡소포자충제로 사용되는 설파제나 피리메타민(pyrimethamine) 등을 통한 치료는 지속적인 내성 증가라는 어려움에 직면하고 있고 브라디조이트

(bradyzoite) 단계의 톡소포자충에 대해서는 낮은 치료 효과를 보여주고 있다. 그럼에도 불구하고 기존 약물을 대체할 수 있는 약제의 부족으로 톡소포자충의 감염 치료에 일반적으로 pyrimethamine과 sulphonamide를 사용할 수 밖에 없는 현실적인 제약이 있다. 이와 같이 톡소포자충에 의한 감염 치료에 충분한 효과를 보여주는 단일 약제가 없는 상황에서 각종 임상적인 어려움을 극복하기 위해 현재에는 2가지 이상의 화합물의 복합제제를 사용하는 치료가 이루어지고 있다. 따라서 항콕시디움제에 대한 내성기전을 이해하고 내성을 일으키지 않는 화학 구조를 갖는 신규의 항콕시디움제체의 개발이 절실히 요구된다.

이렇듯 신약의 개발이 절실하나 신약개발에 드는 막대한 비용과, 효능 검정에 추가되는 부대비용 등 비용적 측면의 문제와 새로 개발된 약제에 대한 내성 획득 시 또 다른 신약을 재개발해야 하는 어려움으로 인해 유수의 제약회사에서 항콕시디움제체의 개발에 어려움을 겪고 있다. 이런 항콕시디움제체 개발의 문제점에 직면하여 최근의 다수의 연구자들이 내성 획득 문제점을 해결할 수 있는 제제 개발에 연구역량을 집중하고 있는 상태이

#### #Corresponding Author

Hyun Park

Zoonosis Research Center, Department of Infection Biology, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Tel.: 063-850-6768 Fax.: 063-857-0342

E-mail: hyunpk@wku.ac.kr

지만 뚜렷한 개발 성과가 없는 실정이다.

최근 의약품의 연구동향을 보면 여러 가지 부작용이나 독성 및 내성 등이 심각해지는 상황에서 세계적으로 숙주에 대해서는 독성이 없고 감염원에 대해서 선택적인 살충효과가 높은 것은 물론 내성기생충에 유효한 새로운 항생물질을 연구개발함과 동시에, 병용투여와 같은 방법으로 내성기생충의 출현 및 독성을 감소시키기 위한 연구가 요구되고 있다.

본 연구에서는 *Toxoplasma gondii* 및 *Eimeria tenella*에 대해 *in vitro* 및 *in vivo*에서 억제 효과를 갖는 물질을 개발하던 중 3-(4-methoxybenzylaminomethylene)-1,3-dihydroindole-2-one(5-108) 화합물이 항록시디옴에 대한 뛰어난 효과를 보여주는 것을 확인하였고 이의 효능평가를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약은 Aldrich-Sigma에서 구매하였으며, 추출 및 컬럼크로마토그래피용 용매는 국내 동양화학(주)로부터 구매한 특급용매를 증류와 같은 별도의 정제과정을 거치지 않고 그대로 사용하였다. 무수용매는 특급용매에 대해 별도의 건조 및 증류과정을 적용하여 얻어진 것을 이용하였다.  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$ 은 JEOL ECLITSE-500 Spectrometer( $^1\text{H NMR}$  500 MHz,  $^{13}\text{C NMR}$  125 MHz)를 사용하여 측정하였으며 내부표준 물질로 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다. IR 스펙트럼은 Perkin Elmer Spectrum One FT-IR Spectrometer(Miracle STatr(ZnSe))를 이용하여 얻었다. 분석용 박층 크로마토그래피(TLC)는 Merck 제품인 실리카겔 60F<sub>254</sub>를 사용하였고, 일반 컬럼크로마토그래피는 Merck 제품인 Kieselgel 60(70-200 Mesh)를 사용하였다.

### 화합물 5-108의 합성

**3-Dimethylaminomethylene-1,3-dihydroindole-2-one(2)의 합성** - 500 ml 플라스크에 oxindole(1. 13.3 g, 100 mmol)과 *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal(21.2 ml, 160 mmol)과 chloroform(200 ml)의 반응혼합물을 6시간 동안 가열 환류하였다. 반응혼합물을 실온으로 냉각 후, 감압 증류하여 용매를 제거하고 생성된 고체를 ethyl acetate와 hexane으로 차례로 씻은 후 건조하여, 목적물 3-dimethylaminomethylene-1,3-dihydroindole-2-one(2)을 16.7 g(89% 수율)의 고체로 얻었다. NMR 분석 결과, 이 생성물의 E/Z 이성질체 비율이 1:1로 존재함을 확인하였다.  $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.94~10.02(s, 1H), 7.53(s, 1H, Z-isomer) and 7.40(s, 1H, E-isomer), 7.37~7.39(d, 1H, E-isomer) and 7.24~7.27(d, 1H, Z-isomer), 6.68~6.94(m, 3H), 3.35(s, 3H), 3.29(s, 3H).

### 3-(4-Methoxybenzylaminomethylene)-1,3-dihydroindole-

**2-one(3, 5-108)의 합성** - 500 ml 플라스크에 3-dimethylaminomethylene-1,3-dihydroindol-2-one(2, 1.31 g, 7 mmol), 4-methoxybenzylamine(2.88 g, 21 mmol), 그리고 isopropanol(50 ml)을 가한 후 반응혼합물을 2시간 동안 가열 환류하였다. 반응혼합물을 실온으로 냉각 후, 감압 증류하여 절반 정도의 부피로 용매를 제거한 후 얻어진 흰색 고체를 차가운 isopropanol로 씻은 후 건조하여, 화합물 5-108(3)을 1.67 g(85% 수율)의 고체로 얻었다. NMR 분석 결과, 이 생성물의 E/Z 이성질체 비율이 1:2로 존재함을 확인하였다.  $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.1(s, 1H, Z-isomer) and 9.93(s, 1H, E-isomer), 9.05~8.97(m, 1H, Z-isomer) and 8.03~7.97(m, 1H, E-isomer), 9.04(d, 1H, *J*=6.3 Hz, Z-isomer) and 7.65(d, 1H, *J*=7.2 Hz, E-isomer), 7.48~7.27(m, 3H, respectively), 6.83~6.75(m, 5H, respectively), 4.49 and 4.47(s, 2H, respectively), 3.73 and 3.71(s, 3H, respectively).

### 항톡소포자충 *in vitro* 시험

**톡소포자충의 준비** - 항톡소포자충 실험에 사용된 톡소포자충(RH strain of *Toxoplasma gondii*, ATCC, No. 50174)의 영양형(tachyzoite)은 ICR female mouse에서 얻었다.  $1 \times 10^5$ 개의 톡소포자충의 영양형을 6주령 ICR 마우스 복강에 주입한 뒤, 4일 후 마우스를 경추탈골로 사망시켰다. 그리고 2%의 FBS(GIBCO, Lot No. 1315128)를 함유한 RPMI 1640 media(GIBCO, Lot No. 1346255) 5 ml씩 2번 복강에 주입하고 1분 30초 동안 가볍게 마사지를 하였다. 다시 복강액을 뽑아내고 500 rpm에서 5분 간 원심분리 후, 침전물은 버리고 상층액은 새로운 50 ml tube에 옮겨서 500 rpm에서 5분 간 원심분리하였다. 이렇게 얻은 비교적 순수한 톡소포자충의 영양형을 10%의 FBS를 함유한 RPMI 1640 배지에 재부유시키고 즉시 카운팅하였다. 이중 일부는 실험관 내(*in vitro*) 실험에 사용하고 일부는 또 다시 새로운 ICR 마우스에 주입하여 다음 실험을 위해 유지하였다.<sup>5)</sup>

**HeLa 세포배양** - HeLa 세포는 10% 우태아혈청이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 정처배양 하였다.

**화합물의 항톡소포자충 활성 측정** - HeLa 세포를 96 well에  $2 \times 10^3$ /well씩 배양하고, 6시간 후 2%의 우태아혈청이 함유된 RPMI 1640 배지로 교환하고 이로부터 18 시간 후, 톡소포자충의 영양형을 HeLa 세포수의 5배가 되도록 감염시켰다. 톡소포자충 감염으로부터 24시간 후, 화합물 5-108과 대조군 pyrimethamine을 농도별로 각각 처리하였다. 24시간 배양한 뒤 세포증식분석(cell titer 96 Aqueous one solution cell proliferation assay(PROMEGAL, Lot No.: 22257902))용 시약을 처리하고 2 시간 후 흡광광도계를 이용하여 490 nm에서 흡광도(absorbance)

를 측정하였다. 독소포자충의 증식을 억제하는 각 화합물의 농도(EC<sub>50</sub>; 50% 세포증식억제농도)는 Graphpad Prism으로 산출하였으며 이로부터 약효관정계수 선택성(selectivity)을 구하였다.<sup>6)</sup>

#### 【수학적】

$$\text{선택성(selectivity)} = \frac{\text{HeLa 세포에 대한 EC}_{50}\text{값}}{\text{T. gondii에 대한 EC}_{50}\text{값}}$$

#### 항콕시디움 *in vivo* 시험

**콕시디움 총란(oocysts) 준비** - 콕시디움 총란은 potassium dichromate 보존액에 8.5×10<sup>4</sup>/m<sup>3</sup>의 갯수로 보존되어 있고, 보존액은 유독물질이므로 세척 과정을 실시하였다. 보존액을 버리고 보존액 양만큼 멸균 증류수를 넣어 4,000 rpm에서 25분 동안 원심분리를 3번 실행하였다. 원심분리 할 때마다 상층액을 버리고 동량의 증류수를 넣는 방식의 세척을 한 후 다시 총란을 세어 농도를 결정하였다. 총란이 든 희석액을 먼저 증류수로 20배 희석하고 포화 NaCl 수용액으로 5배 희석한 최종 용액을 ×100 배를 chamber로 counting하여 결정된 총란의 최종 농도는 4.3×10<sup>4</sup>/m<sup>3</sup>이었다.

**콕시디움 경구감염 및 약제투여** - *In vivo* 실험에 사용될 닭에 감염 실시 전 3일 동안 사료 적응을 마친 후, 닭 한 마리당 총란 10<sup>4</sup>/m<sup>3</sup>의 농도로 경구 감염을 실시하였다. 감염시킨 다음날부터 4일 간 약물을 경구 투여하였다. 화합물 5-108을 사용하며, 비감염군, 감염군, 감염군+약물처리군으로 3분류하여 실험을 실시하였다(*n*=10). 4일 동안 경구투여된 약물의 양과 횟수는 5-108 화합물의 경우 100 mg/kg, 1일 2회였으며 sulfadiazine은 50 mg/kg, 1일 1회였다.

**분변수거 및 분변 속 총란 검사** - 약물투여기간이 끝난 다음 날 닭장의 분변을 모두 제거하고, 그 다음날부터 5일 동안 매일 분변을 수거하였고 희석과정을 통해 각 분변 샘플 내의 총란 개수를 세었으며 그 과정은 다음과 같다. 먼저 증류수로 1000배로

1차 희석한 후 균질화 되면 포화 NaCl 수용액으로 총란이 부유되도록 5배 희석하여 얻은 최종 용액을 ×100 배를 chamber로 counting하였다.

#### 통계 분석

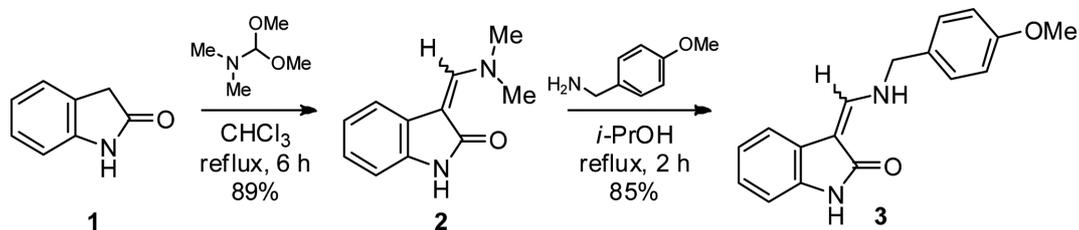
실험결과에서 얻은 모든 값은 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 통계적 유의성은 One-way ANOVA를 수행하여 처리하였다.

### 실험 결과 및 고찰

Scheme 1에 3-(4-methoxybenzylaminomethylene)-1,3-dihydroindole-2-one(3, 5-108)의 합성과정이나 나타나 있다. 출발물질인 oxindole(1)을 dimethylformamide dimethyl acetal과 클로로포름 용매에서 가열 환류 조건으로 축합하여 이성질체 혼합물 3-dimethylaminomethylene-1,3-dihydroindole-2-one(2)을 89%의 수율로 합성하였다(E/Z=1:1, 이성질체의 비율은 proton NMR로 확인하였다). Isopropanol을 용매로 하여 enamine(2)와 4-methoxybenzylamine를 축합하여 원하는 목적물질인 5-108(E/Z=1:2, 이성질체의 비율은 proton NMR로 확인하였다)을 85%의 수율로 얻었으며 isopropanol에서 재결정하여 *in vitro*, *in vivo* 실험에 적용할 수 있는 높은 순도의 최종목적물을 얻었다.

합성유도체인 5-108의 항콕소포자충 활성을 측정하고자 HeLa 세포와 *T. gondii*에 24시간 동안 5-108 및 pyrimethamine을 각각 처리한 후, 세포증식분석으로 선택성을 조사한 결과, 5-108은 HeLa 세포에서 현재 사용 중인 항콕소포자충 약물인 pyrimethamine보다 1.44배 더 높은 선택성을 보여주었다(Table I).

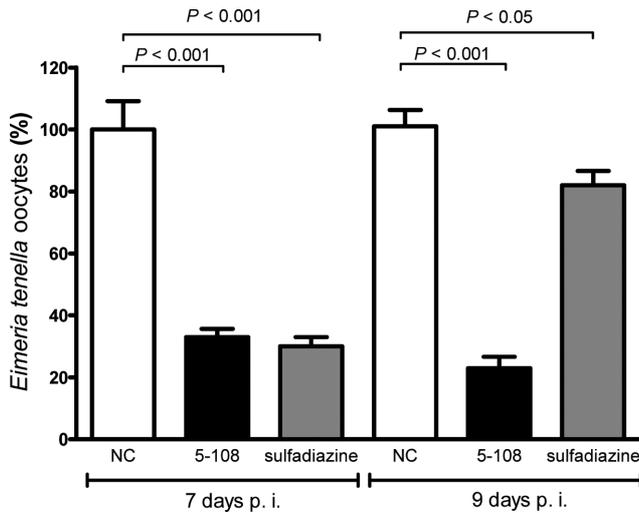
5-108의 *in vivo* anticoccidial 효과를 검증하기 위해 닭에 *Eimeria tenella*를 경구 감염시키고, 다음 날부터 4일 간 5-108 및 sulfadiazine을 각각 경구 투여하였다. 이후 분변에 잔류하는



Scheme 1 - Synthesis of 3-(4-methoxybenzylaminomethylene)-1,3-dihydroindole-2-one(5-108).

Table I - Selectivity of compound 5-108 against *T. gondii*

Compound	Cytotoxicity		Selectivity		Relative selectivity
	EC <sub>50</sub> (μM) against HeLa cell	EC <sub>50</sub> (μM) against <i>T. gondii</i>	EC <sub>50</sub> (μM) HeLa cell/EC <sub>50</sub> (μM) <i>T. gondii</i>	EC <sub>50</sub> (μM) <i>T. gondii</i>	
5-108	353.3	269.2	1.3		1.44
Pyrimethamine	760.0	850.0	0.9		1



**Fig. 1** – Evaluation of anticoccidial effect of 5-108 and sulfadiazine on *Eimeria tenella* in chicken. Chicken was challenged by oral inoculation with *Eimeria tenella* ( $10^4$  oocytes). From the next day of the inoculation, 5-108 (100 mg/kg twice daily) and sulfadiazine (50 mg/kg once daily) were orally administrated for 4 days, respectively. At 7<sup>th</sup> day and 9<sup>th</sup> day p.i., the oocyte numbers of *Eimeria tenella* in feces were calculated by direct microscopic counting ( $\times 100$ ). Each data point represents mean  $\pm$  SD ( $n = 10$ ), one-way ANOVA (Turkey's Multiple comparison Test). NC: negative control, p.i.: post-infection.

*Eimeria tenella*의 총란수를 계량한 결과, 감염 후 7일째에 5-108 화합물 처리군의 *Eimeria tenella* 총란수가 약물처리하지 않은 음성 대조군에 비해  $33 \pm 2.64\%$  ( $P < 0.001$ )였고, sulfadiazine 처리군의 총란수는  $30 \pm 3.00\%$  ( $P < 0.001$ )로 비슷한 양상을 보여주었다. 감염 후 9일째에는 5-108 화합물 처리군의 *Eimeria tenella* 총란수가 음성대조군에 비해  $23 \pm 3.60\%$  ( $P < 0.001$ )였고, sulfadiazine 처리군은  $82 \pm 4.58\%$  ( $P < 0.05$ )임을 관찰하였다. 관찰결과를 정리하자면 *Eimeria tenella* 감염 후 9일째에서 일반적으로 사용되는 항콕시디움제인 sulfadiazine의 경우 항콕시디움 효과가 크게 감소했지만 5-108 화합물은 7일째 및 9일째까지 *Eimeria tenella* 감염에 대한 높은 항콕시디움 효과를 지속적으로 보여주는 것으로 나타났다(Fig. 1).

**결 론**

3-(4-Methoxybenzylaminomethylene)-1,3-dihydroindole-2-

one(5-108)은 *Eimeria tenella*로 감염된 닭에서 감염 후 7일째는 물론 9일째까지 지속적인 항콕시디움 효과를 보여주었으며 9일째에도 *Eimeria tenella* 총란수가 음성 대조군에 비해 여전히 23% 정도로 낮게 나타나 항콕시디움 효과가 매우 우수하다는 것을 보여주었다. 본 연구에서 보여준 합성유도체의 구조 및 *in vitro*, *in vivo* 평가 기술을 기초로 하여 향후 강력하고 지속적인 항콕시디움 효과를 나타내는 새로운 최적의 화합물의 개발을 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

**감사의 말씀**

이 논문은 2013년 원광대학교 교비 지원에 의해서 수행되었고 이에 감사드립니다.

**References**

- 1) Dalloul, R. A. and Lillehoj, H. S. : Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines* **5**, 143 (2006).
- 2) Dubey, J. P., Lindsay, D. S. and Speer, C. A. : Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 267 (1998).
- 3) Luft, B. J. and Remington, J. S. : Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 211 (1992).
- 4) Petersen, E. : Toxoplasmosis. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **12**, 214 (2007).
- 5) Jin, C., Kaewintajuk, K., Jiang, J., Jeong, W., Kamata, M., Kim, H. S., Wataya, Y. and Park, H. : *Toxoplasma gondii*: A simple high-throughput assay for drug screening *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **121**, 132 (2009).
- 6) Park, H., Kim, M. S., Jeon, B. H., Kim, T. K., Kim, Y. M., Ahn, J. H., Kwon, D. Y., Takaya, Y., Wataya, Y. and Kim, H. S. : Antimalarial activity of herbal extracts used in traditional medicine in Korea. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1623 (2003).