

쿠마린 유도체의 합성과 그들의 항암효과

이지현 · 이재호* · 김현관* · 김의검 · 신귀남 · 조수현 · 명창선 · 김동희**

윤미영** · 최용석*** · 김성훈*# · 송규용#

충남대학교 약학대학, *경희대학교 동서의학대학원, **대전대학교 한의학과, ***고려대학교 생명과학부

(Received September 22, 2006; Revised October 24, 2006)

Synthesis of Coumarin Analogues and their Antitumor Activity

Jee-Hyun Lee, Jae-Ho Lee*, Hyun-Kwan Kim*, Eui-Geom Kim, Gui-Nan Shen, Soo-Hyun Cho, Chang-Seon Myung, Dong-Hee Kim**, Mi-Young Yun**, Yongseok Choi***, Sung-Hoon Kim*# and Gyu-Yong Song#

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea

*Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, Yongin, Korea

**College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

***College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Korea

Abstract — A novel series of 4-seneciolyloxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin, isolated from *Crinum latifolium*, was prepared by reacting 4-chloromethyl or 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin with various carboxylic acids and examined for their anti-angiogenic activities in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Among them, **4e**, **4f**, **4g** and **4i** with non-cyclic moiety exhibited potent anti-angiogenic activity. However, compounds with cyclic moiety such as phenyl, pyridinyl, thiophenyl and furanyl group did not exhibit any anti-angiogenic activity. Also, compounds **4f** and **4g** which exhibited strong anti-angiogenic activity in a dose-dependent manner showed antitumor activity.

Keywords □ *Crinum latifolium*, coumarin, anti-angiogenesis, antitumor activity

쿠마린은 플라보노이드 계열의 물질과 더불어 식물체 중에 다량 존재하는 물질로서 바이러스 억제효과, 항암 작용, 항균 작용 등과 같은 다양한 생리활성을 나타내는 물질이다.¹⁻⁵⁾ 최근에 인도문주란(*Crinum latifolium*)에서 분리된 쿠마린 계열의 물질인 4-seneciolyloxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin이 사람의 체대로부터 분리한 혈관내피 세포(HUVEC)의 혈관형성을 억제한다는 연구 보고가 있다.⁶⁾ 신생 혈관형성은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 일련의 과정으로 정상 상태에서 상처 치유, 생식, 배아 발생 및 항체발달 등에 중요한 영향을 끼친다.⁷⁾ 반면에 과도한 혈관형성은 관절염, 암의 성장 및 전이의 원인이 되기

도 한다.⁸⁾ 이러한 신생 혈관형성은 생체 내에서 혈관형성의 억제제인 thrombospondin-1, angiostatin, endostatin 등과 활성화제인 VEGF(vascular endothelial growth factor), bFGF(basic fibroblast growth factor), EGF(epidermal growth factor) 등의 균형에 의해 조절되고 있다.⁹⁻¹¹⁾

암조직은 자신들의 생존을 위해 반드시 신생 혈관형성(angiogenesis)이 필요하며, 이 혈관으로부터 산소와 영양분을 공급받지만, 혈관형성 없이 암조직은 1~2 mm 이상 성장할 수 없다. 또한 혈관은 암세포가 다른 부위나 장기로 확산되는 과정에서의 통로로 작용하여 암치료 실패 및 암 환자 사망원인이 된다. 즉 암조직의 전이와 성장은 혈관에 의존적으로 이뤄지기 때문에 혈관형성을 저해함으로써 이를 차단할 수 있으므로 혈관형성 저해제는 좋은 항암제가 될 수 있다.¹²⁻¹⁶⁾ 대부분의 항암제는 암세포에 대해서 직접적으로 작용하여 세포독성을 나타내므로 정상 세포에도 영향을 주는 부작용을 야기한다. 이에 비해서 신생 혈관형성 저해제는 혈관 내피세포를 표적으로 하여 기존의 항암제

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로

1. Gyu-Yong Song

(전화) 042-821-5926 (팩스) 042-823-6566

(E-mail) gysong@cnu.ac.kr

2. Sung-Hoon Kim

(전화) 031-201-2179 (팩스) 031-204-2730

(E-mail) sungkim7@khu.ac.kr

보다 독성이 약하고 내성을 나타나지 않는 장점이 있다.¹⁷⁻¹⁹ 신생 혈관형성 억제제로써 angiostatin과 endostatin이 개발된 이후 Genentech/Roche 사의 Avastin(bevacizumab)이 현재 항암제로 사용되고 있으며 이외에도 폴리펩타이드류, 항생제류, 스테로이드류, 폴리양이온 및 폴리음이온류, 암 억제유전자류, 폴리사카라이드류 등 여러 가지 신생혈관 억제제가 개발되고 있다.

본 연구실에서는 신생 혈관형성을 억제하여 항암효과를 나타내는 항암제를 개발하고자 인도문주란에서 분리한 4-seneciolyloxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin을 선도물질로 하여 여러 가지 유도체들을 합성하고자 하였다. 즉, 쿠마린 환의 6번과 7번 위치에는 선도물질의 구조와 같이 메톡시 기로 고정시키고 4번 위치에 senecioly 기 대신에 여러 가지 alkyl 기 또는 thiophenyl, pyridinyl, furanyl 및 phenyl 기와 같은 cyclic 형태의 치환기가 도입된 유도체들을 합성하였다. 따라서 본 논문은 쿠마린 유도체의 합성방법과 유도체들의 신생 혈관억제효과 및 *in vivo* 항암 효과에 대해서 기술하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 기기

분석기기로는 ¹H-NMR(400 MHz) & ¹³C-NMR(400 MHz) spectrometer(JNM-AL 400, JEOL Ltd., Japan), Melting pointer (Yamako, MD-S3, Japan), MS(PE SCIX API 2000 MS/MS, Canada)를 사용하였다. 각종 시약들은 Aldrich Chemical Co.의 제품을 사용하였으며 기타 용매는 1급 이상의 시약을 정제하지 않고 사용하였다. 합성한 물질들의 정제를 위하여 Silica gel (Merck, 230~400 mesh)을 사용하였다.

물질 합성

4-Chloromethyl-6,7-dimethoxycoumarin(3)의 합성 - 100 ml 둥근 플라스크에 3,4-dimethoxyphenol(1 g, 6.49 mmol)과 ethyl 4-chloroacetoacetate(1.4 ml, 9.72 mmol)를 넣고 교반하였다. 3,4-dimethoxyphenol이 완전히 용해된 것을 확인 후, 수증빙욕상에서 5 ml의 농황산을 30분에 걸쳐 천천히 적가하면서 교반하였다. 황산 적가 완료 후 수증빙욕 장치를 제거하고 실온에서 1시간동안 교반하였다. 반응용액을 100 ml 가량의 냉수에 넣은 뒤 생성되는 결정을 감압여과 한 후 건조시켜 황색 고체 1.53 g을 얻었다.

Yield : 92.8%, mp 205~206°C, $R_f=0.23$ (*n*-hexane : ethyl acetate=2 : 1), ¹H NMR(CDCl₃) δ 7.018(s, 1H), 6.873(s, 1H), 6.417(s, 1H), 4.627(s, 2H), 3.960(s, 3H), 3.950(s, 3H).

3-Methyl-but-2-enoic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(1) 및 4(a-i)의 합성 - 100 ml 둥근 플라스크에 무수 acetonitrile을 넣은 후 4-chloromethyl-6,7-dimethoxycoumarin(3, 100 mg, 0.39 mmol), 유기산류(1.18~

1.97 mmol) 그리고 triethyl amine(TEA, 1.18~1.98 mmol)를 넣고 용해시켰다. 이 반응플라스크에 환류관을 설치한 다음 60~70°C로 가온하면서 하루 동안 교반하였다. 반응용액을 실온까지 냉각시키고 증류수를 넣은 뒤 디클로로메탄으로 2회 추출하였다. 유기층을 모아 무수망초로 탈수하고 여과하여 얻은 여액을 감압 농축하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통해 물질 1 및 4(a-i)를 얻었다.

3-Methyl-but-2-enoic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(1) - Yield : 71.2%, Yellow solid, mp 169~170°C, $R_f=0.31$ (*n*-hexane : ethyl acetate=2 : 1), ¹H NMR(CDCl₃) δ 6.866(s, 2H), 6.383(s, 1H), 5.811(s, 1H), 5.289(s, 2H), 3.951(s, 3H), 3.917(s, 3H), 1.965(s, 3H), MS (*m/z*) 319(M+H)⁺.

3-(4-Methoxyphenyl)-acrylic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(4a) - Yield 36.9%, White solid, mp 192~193°C, $R_f=0.18$ (*n*-hexane : ethyl acetate=2 : 1), ¹H NMR(CDCl₃) δ 7.762(d, *J*=16 Hz, 1H), 7.515(d, *J*=8.4 Hz, 2H), 6.929(d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.886(d, *J*=5.2 Hz, 2H), 6.456(s, 1H), 6.401(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 5.392(s, 2H), 3.930(s, 3H), 3.883(s, 3H), 3.855(s, 3H), ¹³C MNR(CDCl₃) δ 166.35, 161.85, 161.11, 152.96, 149.71, 149.29, 146.39, 146.32, 130.04, 126.63, 114.45, 113.84, 110.41, 109.61, 103.99, 100.33, 61.15, 56.49, 56.34, 55.40, MS(*m/z*) 397(M+H)⁺.

3-Thiophen-2-yl-acrylic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(4b) - Yield : 75.0%, White solid, mp 201~202°C, $R_f=0.21$ (*n*-hexane : ethyl acetate=2 : 1), ¹H NMR(CDCl₃) δ 7.909(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 7.447(d, *J*=5.2 Hz, 1H), 7.329(d, *J*=3.2 Hz, 1H), 7.095(q, *J*=2.9 Hz, 1H), 6.884(s, 1H), 6.880(s, 1H), 6.455(s, 1H), 6.333(d, *J*=15.6 Hz, 1H), 5.395(s, 2H), 3.963(s, 3H), 3.937(s, 3H), ¹³C MNR(CDCl₃) δ 165.87, 161.05, 152.98, 149.71, 149.10, 146.40, 139.03, 138.93, 131.76, 129.34, 128.27, 115.05, 110.41, 109.54, 103.95, 100.33, 61.26, 56.48, 56.34, MS(*m/z*) 373(M+H)⁺.

3-Pyridin-2-yl-acrylic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(4c) - Yield : 81.7%, White solid, mp 204.0°C, $R_f=0.072$ (*n*-hexane : ethyl acetate=1 : 2), ¹H NMR(CDCl₃) δ 8.792(s, 1H), 8.651(d, *J*=4.0 Hz, 1H), 7.891(d, *J*=10.0 Hz, 1H), 7.808(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 7.376(dd, *J*=4.8, 8.0 Hz, 1H), 6.884(d, *J*=4.0 Hz, 1H), 6.623(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 5.430(s, 2H), 3.953(s, 3H), 3.940(s, 3H), MS(*m/z*) 368(M+H)⁺.

3-Furan-2-yl-acrylic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(4d) - Yield : 44.3%, Light yellow solid, mp 176~177°C, $R_f=0.15$ (*n*-hexane : ethyl acetate=2 : 1),

^1H NMR(CDCl_3) δ 7.713(s, 1H), 7.709(d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.465(s, 1H), 6.876(d, $J=5.2$ Hz, 2H), 6.629(s, 1H), 6.447(s, 1H), 6.257(d, $J=16.0$ Hz, 1H), 5.388(s, 2H), 3.960(s, 3H), 3.930(s, 3H), MS(m/z) 357(M+H) $^+$.

Pent-2-enoic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(4e) - Yield : 81.7%, Yellow solid, mp 109~110°C, $R_f=0.45$ (n -hexane : ethyl acetate=1 : 1), ^1H NMR(CDCl_3) δ 7.179(m, 1H), 6.871(s, 1H), 6.856(s, 1H), 6.410(s, 1H), 5.932(d, $J=15.6$ Hz, 1H), 5.332(s, 2H), 3.955(s, 3H), 3.921(s, 3H), 2.288(m, 2H), 1.115(t, $J=7.2$ Hz, 3H), MS(m/z) 319(M+H) $^+$.

2-Methyl-acrylic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(4f) - Yield : 65.4%, Yellow solid, mp 129~131°C, $R_f=0.41$ (n -hexane : ethyl acetate=1 : 1), ^1H NMR(CDCl_3) δ 6.872(d, $J=4.4$ Hz, 2H), 6.393(s, 1H), 6.261(s, 1H), 5.714(s, 1H), 5.351(s, 1H), 3.959(s, 3H), 3.924(s, 3H), 2.028(s, 3H), MS(m/z) 305(M+H) $^+$.

2-Methyl-but-2-enoic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(4g) - Yield : 71.3%, Yellow solid, mp 115~116°C, $R_f=0.41$ (n -hexane : ethyl acetate=1 : 1), ^1H NMR(CDCl_3) δ 7.035(m, 1H), 6.900(s, 1H), 6.892(s, 1H), 6.430(s, 1H), 5.369(s, 2H), 3.990(s, 3H), 3.954(s, 3H), 1.947(s, 3H), 1.880(m, 3H), MS(m/z) 319(M+H) $^+$.

But-3-enoic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(4h) - Yield : 54.6%, Yellow solid, mp 136~137°C, $R_f=0.36$ (n -hexane : ethyl acetate=1 : 1), ^1H NMR(CDCl_3) δ 7.126(m, 1H), 6.872(s, 1H), 6.860(s, 1H), 6.391(s, 1H), 5.966(d, $J=15.2$ Hz, 1H), 5.326(s, 2H), 3.953(s, 3H), 3.918(s, 3H), 1.949(d, $J=6.0$ Hz, 3H), MS(m/z) 305(M+H) $^+$.

Pent-4-enoic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(4i) - Yield : 60.2%, Yellow solid, mp 77~78°C, $R_f=0.41$ (n -hexane : ethyl acetate=1 : 1), ^1H NMR(CDCl_3) δ 6.870(s, 1H), 6.844(s, 1H), 6.376(s, 1H), 5.848(m, 1H), 5.278(s, 2H), 5.057(m, 1H), 3.954(s, 3H), 3.920(s, 3H), 2.578(t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.460(m, 2H), MS(m/z) 319(M+H) $^+$.

4-Bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin(5)의 합성

250 ml 둥근 플라스크에 ethyl acetoacetate(10 g, 0.77 mol)을 넣고 초산(50 ml)로 녹인 후 bromine(3.94 ml, 0.77 mol)을 10분에 걸쳐 천천히 적가한 후 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응용액에 증류수를 가한 뒤 디클로로메탄으로 3회 추출하여 얻은 유기층을 무수망초로 탈수한 뒤 여과하였다. 여액을 감압 농축하여 액상의 ethyl 4-bromoacetoacetate(13.4 g, 83.0%)를 얻었다. 100 ml 둥근 플라스크에 앞서 합성한 광량의 ethyl 4-

bromoacetoacetate(8 ml)와 3,4-dimethoxyphenol(2.5 g, 16.2 mmol)을 넣고 교반하였다. 3,4-dimethoxyphenol이 완전히 용해된 것을 확인 후, 수증빙욕상에서 8 ml의 농축황산을 30분에 걸쳐 천천히 적가하면서 교반하였다. 황산적가 완료 후 수증빙욕 장치를 제거하고 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 냉수 200 ml를 가한 뒤 디클로로메탄으로 3회 추출한 후 무수망초로 탈수하였다. 여과한 뒤 여액을 감압농축하였으며 얻은 잔사를 메탄올로 재결정하여 황색 고체 4.77 g을 얻었다.

Yield : 98.0%, mp 208~209°C, $R_f=0.43$ (n -hexane : ethyl acetate=1 : 1), ^1H NMR(acetone- d_6) δ 7.361(s, 1H), 6.992(s, 1H), 6.473(s, 1H), 4.834(s, 2H), 3.965(s, 3H), 3.890(s, 3H).

물질 6(a-c)의 합성

100 ml 둥근 플라스크에 무수 acetonitrile을 넣은 후 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin(200 mg, 0.67 mmol), 유기산류(2.00~4.00 mmol) 그리고 triethylamine(TEA, 2.00~4.00 mmol)을 넣고 용해하였다. 이 반응플라스크에 환류관을 설치한 다음 60~70°C로 가온하면서 하루 동안 교반하였다. 반응용액을 실온까지 냉각시킨 후 증류수를 가한 뒤 디클로로메탄으로 2회 추출하였다. 유기층을 모아 무수망초로 탈수하고 여과한 후 여액을 감압농축한 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통해 물질 6(a-c)를 얻었다.

3-p-Tolyl-acrylic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(6a) - Yield : 51.2%, White solid, mp 199~200°C, $R_f=0.56$ (n -hexane : ethyl acetate=1 : 1), ^1H NMR(CDCl_3) δ 7.789(d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.465(d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.227(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.896(s, 1H), 6.885(s, 1H), 6.516(s, 1H), 6.468(d, $J=6.4$ Hz, 1H), 4.403(s, 2H), 3.961(s, 3H), 3.934(s, 3H), 2.395(s, 3H), MS(m/z) 381(M+H) $^+$.

3-(3-Acetoxy-phenyl)-acrylic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(6b) - Yield : 42.7%, light yellow solid, mp 152~153°C, $R_f=0.30$ (n -hexane : ethyl acetate=1 : 1), ^1H NMR(CDCl_3) δ 7.779(d, $J=16.4$ Hz, 1H), 7.458~7.423(m, 2H), 7.305(s, 1H), 7.176-7.148(m, 1H), 6.857(s, 2H), 6.534(d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.450(s, 1H), 5.407(s, 2H), 3.962(s, 3H), 3.934(s, 3H), 2.329(s, 3H), MS(m/z) 425(M+H) $^+$.

3-(3,4-Diacetoxy-phenyl)-acrylic acid 6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl ester(6c) - Yield : 71.9%, White solid, mp 188~189°C, $R_f=0.43$ (n -hexane : ethyl acetate=1 : 2), ^1H NMR(CDCl_3) δ 7.748(d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.456~7.378(m, 2H), 7.273~7.232(m, 1H), 6.884(s, 2H), 6.508~6.373(m, 2H), 5.399(s, 2H), 3.962(s, 3H), 3.933(s, 3H), 2.321(s, 3H), 2.313(s, 3H), MS(m/z) 483(M+H) $^+$.

세포배양

혈관 내피 세포인 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)은 삼성 산부인과에서 공급받아 Jaffe 방법²⁰⁾으로 primary culture한 것을 0.1% 젤라틴이 코팅된 플레이트에서 3 ng/ml bFGF, 5 unit/ml heparin, 20% FBS(fetal bobine serum)가 첨가된 M199 배지에서 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하였다.

HUVECs 세포독성 측정

사람의 제대로부터 분리한 혈관내피 세포(HUVECs)에 대한 세포독성 XTT 방법²¹⁾을 이용하여 측정하였다. 즉, 혈관내피 세포를 0.1% 젤라틴이 코팅된 96 well plate에 HUVECs 0.1% 젤라틴이 코팅된 96 well plate에 well 당 세포수가 1×10⁴이 되도록 분주하였다. 24시간 배양시킨 후 5% heat-inactivated FBS만 첨가된 M199 배지로 물질을 농도별로 희석하여 100 μl씩 첨가하여 24시간 동안 배양시켰다. Phosphate Buffered Saline (PBS)에 1 mg/ml의 농도로 들어있는 1 ml XML Tunneling Technology(XTT) stock solution과 10 μl Phenazine Methosulfate (PMS, 1.53 mg/ml in PBS)를 혼합 후 각 well당 50 μl를 첨가하여 배양한 뒤 microplate reader(Molecular Devices Co.) 450 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교하여 세포의 생존율을 계산하였다.

HUVECs proliferations assay

Proliferation assay는 XTT 방법을 이용하여 실시하였다. 즉, 사람의 제대로부터 분리한 혈관내피 세포를 0.1% 젤라틴이 코팅된 96 well plate에 HUVECs 0.1% 젤라틴이 코팅된 96 well plate에 well 당 세포수가 5×10³이 되도록 분주하였다. 24시간 배양시킨 후 5% heat-inactivated FBS, 10 ng/ml VEGF와 5 units/ml heparin이 첨가된 M199 배지로 물질을 농도별로 희석하여 100 μl씩 첨가하여 48시간 동안 배양시켰다. 1 ml XTT (1 mg/ml in PBS) stock solution과 10 μl PMS(1.53 mg/ml in PBS)를 혼합 후 50 μl를 각 well당 첨가하여 배양한 뒤 microplate reader 450 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교하여 세포의 증식율을 계산하였다.

In vivo 항암효과 측정

Teruhiro의 방법²²⁾으로 Lewis lung carcinoma cell을 마우스 당 1×10⁶ cells/ml의 농도가 되도록 세포 부유액을 만들고 이 부유액을 BDF1 마우스의 왼쪽 겨드랑이에 이식하였다. 이식 후 24시간부터 각 군을 6마리로 배정하였다. 대조군은 생리식염수 0.2 ml을, 실험군은 일정농도의 약물을 생리식염수에 현탁시킨 용액 0.2 ml을 마우스에 매일 1회 복강 주사하였다. 약물투여는 대조군의 tumor volume이 약 2 cm³가 될 때까지 투여하였으며(14

일), tumor 크기를 측정한 다음 아래의 계산식으로 tumor 면적을 구하여 inhibition ratio of tumor volume을 측정하였다.

$$TV(cm^3) = \frac{L(cm) \times W^2(cm^2)}{2}$$

Mean of TV of control group

$$IRTV(\%) = \frac{\text{Mean of TV of treated group}}{\text{Mean TV f control group}} \times 100$$

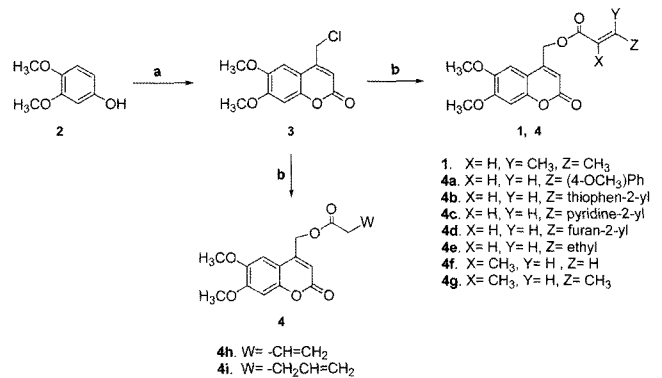
TV : Tumor volume, L: Tumor length, W : Tumor width

IRTV : Inhibition ratio of tumor volume

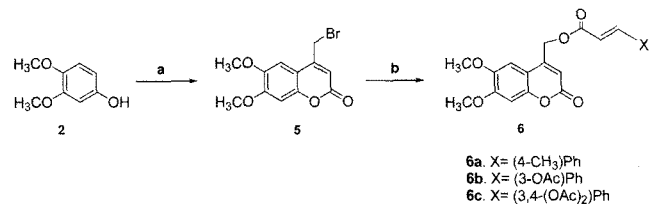
결과 및 고찰

합성

Pechman condensation 방법²³⁾으로 쿠마린환인 4-chloromethyl 또는 4-bromo-methyl-6,7-dimethoxycoumarin(**3**, **5**)을 합성하였으며, 이에 유기산을 도입하여 목적하는 쿠마린 유도체 13종을 합성하였다(Scheme 1, 2). 즉, 과량의 황산 존재 하에서 3,4-dimethoxyphenol(**2**)과 ethyl 4-chloroacetoacetate를 반응시켜 98%의 높은 수율로 4-chloromethyl-6,7-dimethoxycoumarin(**3**)를 합성한 후 이에 다양한 구조를 지닌 유기산들을 도입하여 목적하는 4-seneciolyoxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin(**1**)과 이들의 유도체(**4a-i**)를 합성하였다. 또한 ethyl acetoacetate를 브롬화



Scheme 1 – (a) Ethyl 4-chloroacetoacetate, concentrated H₂SO₄ (excess); (b) Carboxylic acids, TEA, dry CH₃CN.



Scheme 2 – (a) Ethyl 4-bromoacetoacetate, concentrated H₂SO₄ (excess); (b) Carboxylic acids, TEA, dry CH₃CN.

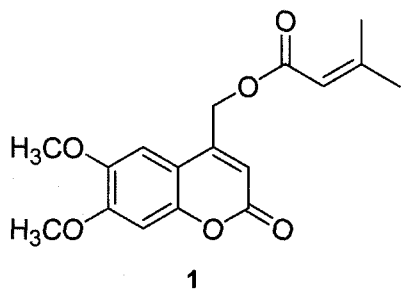


Fig. 1 – Structure of 4-seneciolyoxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin (1).

하여 얻은 ethyl 4-bromoacetoacetate²⁴⁾를 3,4-dimethoxyphenol (2)와 반응시켜 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin(5)를 합성한 후 이에 다양한 구조를 지닌 유기산들을 도입하여 목적하는 쿠마린 유도체(6a-c)를 합성하였다.

쿠마린 유도체들의 HUVECs 세포에 대한 세포독성

혈관내피세포를 이용하여 합성한 쿠마린 유도체들의 세포독성을 살펴본 결과 200 μ M의 농도에서 독성을 전혀 나타내지 않았다. 따라서 세포독성이 없는 200 μ M 이하의 농도에서 쿠마린 유도체들의 HUVECs 세포 증식 억제효과를 측정하였다.

Table I – Inhibitory effect of coumarin analogues on proliferation of HUVECs

Compounds	Concentration (μ M)	R	Potency
1	100	-CH=C(CH ₃) ₂	NA ^a
4a	100	-CH=CH-(<i>p</i> -OCH ₃)Ph	NA
4b	100	-CH=CH-thiophe-2-yl	NA
4c	100	-CH=CH-pyridine-2-yl	NA
4d	100	-CH=CH-furan-2-yl	NA
4e	100	-CH=CHCH ₂ CH ₃	++ ^c
4f	100	-C(CH ₃)=CH ₂	+++ ^d
4g	100	- <i>trans</i> -C(CH ₃)=CHCH ₃	+++
4h	100	-CH ₂ CH=CH ₂	NA
4i	100	-CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂	+ ^b
6a	100	-CH=CH-(<i>p</i> -CH ₃)Ph	ND ^e
6b	100	-CH=CH-(<i>m</i> -OAc)Ph	NA
6c	100	-CH=CH-(<i>m,p</i> -diOAc)Ph	ND

^anot active, ^bmoderate, ^cstrong, ^dvery strong, ^enot determined due to poor solubility in DMSO.

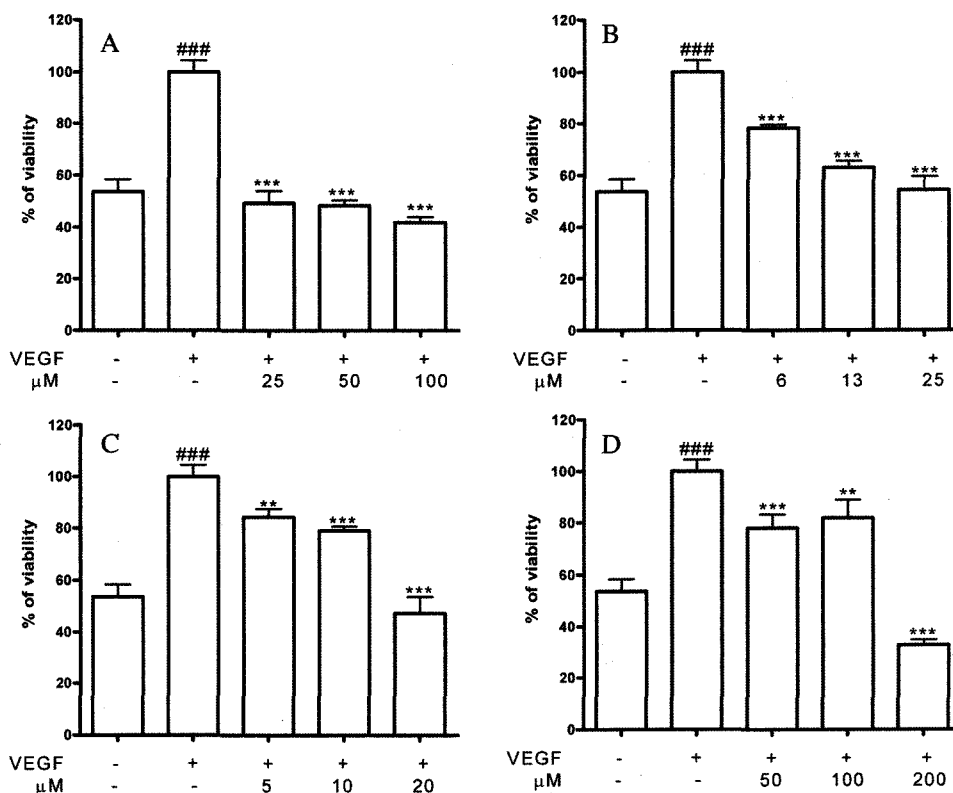


Fig. 2 – Effect of coumarin analogues on VEGF-induced proliferation of HUVECs. HUVECs were exposed to coumarin analogues in M199 containing 5% fetal bovine serum in the presence or absence of heparin and growth factor VEGF (10 ng/ml) for 48 h, and then proliferation was assessed by XTT. All data were expressed as means±S.D. of triplicates. A; 4e, B; 4f, C; 4g, D; 4i, ###p<0.001 compared with negative control, **p<0.01, ***p<0.001 compared with VEGF-treated group (positive control).

쿠마린 유도체들의 HUVECs 증식 억제 효과 및 항암효과

bVEGF는 강력한 혈관형성 촉진제로서 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 많이 사용되어지고 있는 물질이다.^{25,26} 본 실험에서도 bVEGF를 처리하여 혈관내피세포의 증식을 유도한 후 합성한 쿠마린 유도체들을 처리한 결과 총 13종의 유도체들 중 **4e**, **4f**, **4g**, **4i**와 같이 4종의 물질이 bVEGF에 의해서 유도된 혈관내피세포의 증식을 강하게 억제하였다(Table I, Fig. 2). 그러나 서론에서 설명한 바와 같이 인도문주란에서 분리된 신생혈관 억제효과를 있다고 알려진 4-seneciolyxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin(**1**)은 본 실험에서 혈관내피세포의 증식을 억제하지 않았다. 흥미로운 사실은 물질 **1**과 이중결합에 결합되어 있는 메틸의 위치만 다른 구조 이성질체인 물질 **4f**가 합성된 유도체들 중 가장 강한 혈관내피세포의 증식을 억제한다는 것이다. 물질 **4f**는 농도 의존적으로 혈관내피세포의 증식을 억제하였으며, 특히 25 μ M 농도에서 bVEGF를 처리하지 않은 수준까지 혈관내피세포의 증식을 강하게 억제하였다. 반면에 cyclic 형태의 물질인 phenyl, thiophenyl, pyridinyl 및 furanyl와 같은 치환체가 도입된 물질 **4a**, **6b**, **4b**, **4c** 및 **4d**는 혈관내피세포의 증식을 억제하지 않았다. 이러한 결과는 혈관내피세포의 증식을 억제하기 위해서는 쿠마린 환의 4번 위치에 cyclic 형태 보다는 non-cyclic 형태의 치환체가 도입되어야 함을 의미하며 향후 추가적인 연구가 필요하리라 판단된다. 한편, non-cyclic 형태의 유도체 중 쿠마린환의 4번 위치에 carbonyl 기의 β -탄소 및 γ -탄소에 이중결합이 도입된 **4h**와 **4i**는 혈관내피세포의 증식 억제효과가 나타나지 않거나 미약하였다. 이러한 결과는 신생혈관 억제효과를 나타내기 위해서는 **4e**, **4f** 및 **4g**와 같이 carbonyl 기의 α -탄소에 이중결합이 도입되어야 함을 의미한다.

또한 *in vitro* 실험에서 혈관내피세포의 증식억제 효과가 가장 강한 **4f**와 **4g**를 선정하여 *in vivo* 항암실험을 측정하였다. 실험결과 **4f**와 **4g**는 각각 26, 22%의 항암효과를 나타내었으며, 이는 기존의 항암제인 탁솔(41.1%)에 비해 다소 약한 항암효과를 보이지만 체중 감소와 같은 부작용은 나타나지 않았다(Table II).

Table II - Antitumor activity of **4f** and **4g** on BDF1 mice bearing Lewis lung carcinoma cells

Compound	Dose (mg/kg/day)	Tumor volume (mm ³)	% of inhibition
Control	-	2,548.8±86.3 ^a	-
4f	25	1,887.2±62.9*	26 ^b
4g	25	1,992.4±59.4*	22
Taxol	12.5	1,501.4±64.1**	41.1

^aMean±S.E. ^bThe antitumor activity was determined as inhibition ratio (%) in comparison with untreated control group. Taxol was used as a positive control. *Statistically significant value compared with control data (**p<0.01, *p<0.05).

결 론

부작용이 적은 항암제를 개발하고자 신생 혈관형성을 억제하는 인도문주란에서 분리된 4-seneciolyxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin(**1**)을 선도물질로 하여 여러 가지 유도체들을 합성한 후 그들의 활성을 검토하였다. 합성화합물 13종에 대한 혈관내피세포의 증식억제 효과 실험에서 쿠마린 환의 4번 위치에 non-cyclic 치환체를 지닌 **4e**, **4f**, **4g**, **4i**와 같은 4종의 물질이 강한 활성을 나타내었다. 특히 **4f**, **4g**는 농도의존적으로 혈관내피세포의 증식을 억제하였으며 25 μ M 농도에서 bVEGF를 처리하지 않은 수준까지 혈관내피세포의 증식을 강하게 억제하였다. 그러나 phenyl, thiophenyl, pyridinyl 및 furanyl 기와 같은 cyclic 치환체를 지닌 유도체들은 혈관내피세포의 증식을 억제하지 않았다. 또한 물질 **4f**, **4g**는 *in vivo* 항암실험에서도 체중감소와 같은 부작용을 나타내지 않고 각각 26 및 22%의 항암효과를 나타내었다. 이상의 결과로부터 쿠마린 유도체가 신생 혈관형성을 억제함으로써 항암효과를 나타낸다는 것을 확인하였다. 항 후 Matrigel assay 및 CAM assay와 같은 *in vivo* 신생혈관 억제실험과 보다 구체적인 작용메카니즘 연구 및 다양한 유도체들을 합성할 필요가 있다고 판단된다.

감사의 말씀

이 논문은 2004년도 충남대학교 학술연구비의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사합니다.

문 헌

- 1) Khatib, A., Kim, M. Y. and Chung, S. K. : Anti-inflammatory activities of Cinamomum burmanni Bl. *Food Science and Biotechnology* 14(2), 223 (2005).
- 2) Marques, A. D. S. and Lin, C. T. : Molecular complexes of IQ and 4-hydroxy-coumarin : a mutagen- anti-mutagen system. *J. Photochem. Photobiol.* 74(2), 63 (2004).
- 3) Suzuki, M., Nakagawa, K., Nakamura, S., Tokuda, H., Morris-Natschke, S., Kozuka, M., Nishino, H. and Lee, K. H. : Cancer preventive agents. Part 5. Anti-tumor-promoting effects of coumarins and related compounds on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Pharm. Biol.* 44(3), 178 (2006).
- 4) Lin, C. M., Huang, S. T., Lee, F. W., Kuo, H. S. and Lin, M. H. : 6-Acyl-4-aryl/alkyl-5,7-dihydroxycoumarins as anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem.* 14(13), 4402 (2006).
- 5) Chimenti, F., Bizzarri, B., Bolasco, A., Secci, D., Chimenti, P., Carradori, S., Granese, A., Rivanera, D., Lilli, D., Scaltrito, M. M. and Brenciaglia, M. I. : Synthesis and *in vitro* selective

- anti-Helicobacter pylori activity of N-substituted-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxamides. *Eur. J. Med. Chem.* **41**(2), 208 (2006).
- 6) Nam, N. H., Kim, Y., You, Y. J., Hong, D. H., Kim, H. M. and Ahn, B. Z. : Preliminary structure-antiangiogenic activity relationships of 4-seneciolyxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**(17), 2345 (2002).
 - 7) Fryer, B. and Field, J. : Rho, Rac, Pak and angiogenesis : Old roles and newly identified responsibilities in endothelial cells. *Cancer Letters* **229**(1), 13 (2005).
 - 8) Plate, K. H., Breier, G. and Risau, W. : Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathology* **4**(3), 207 (1994).
 - 9) Kim, K. S., Kim, D. S., Chung, K. H. and Park, Y. S. : Inhibition of angiogenesis and tumor progression by hydrodynamic cotransfection of angiostatin K1-3, endostatin, and saxatilin genes. *Cancer Gene Therapy* **13**(6), 563 (2006).
 - 10) Warejcka, D. J., Vaughan, K. A., Bernstein, A. M. and Twining, S. S. : Differential conversion of plasminogen to angiostatin by human corneal cell populations. *Molecular Vision* **11**, 859 (2005).
 - 11) Ichinose, K., Maeshima, Y., Yamamoto, Y., Kitayama, H., Takazawa, Y., Hirokoshi, K., Sugiyama, H., Yamasaki, Y., Eguchi, K. and Makino, H. : Antiangiogenic endostatin peptide ameliorates renal alterations in the early stage of a type 1 diabetic nephropathy model. *Diabetes* **55**(9), 2665 (2006).
 - 12) Verhoef, C., de Wilt, J. H. W. and Verheul, H. M. W. : Angiogenesis inhibitors: perspectives for medical, surgical and radiation oncology. *Current Pharmaceutical Design* **12**(21), 2623 (2006).
 - 13) Kim, K. S. and Park, Y. S. : Antitumor effects of angiostatin K1-3 and endostatin genes coadministered by the hydrodynamics-based transfection method. *Oncology Research* **15**(7/8), 343 (2005).
 - 14) Daniel, K. G., Kuhn, D. J., Kazi, A. and Dou, Q. P. : Anti-angiogenic and anti-tumor properties of proteasome inhibitors. *Curr. Cancer Drug Targets* **5**(7), 529 (2005).
 - 15) Matsubara, K., Matsumoto, H., Mizushina, Y., Mori, M., Nakajima, N., Fuchigami, M., Yoshida, H. and Hada, T. : Inhibitory effect of glycolipids from spinach on *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis. *Oncology Reports* **14**(1), 157 (2005).
 - 16) Dreves, J., Konerding, M. A., Wolloscheck, T., Wedge, S. R., Ryan, A. J., Ogilvie, D. J. and Esser, N. : The VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, ZD6474, inhibits angiogenesis and affects microvascular architecture within an orthotopically implanted renal cell carcinoma. *Angiogenesis* **7**(4), 347 (2005).
 - 17) Yamaguchi, K., Ogawa, K., Katsube, T., Shima, K., Konno, S., Shimakawa, T., Yoshimatsu, K., Naritaka, Y., Yagawa, H. and Hirose, K. : Platelet factor 4 gene transfection into tumor cells inhibits angiogenesis, tumor growth and metastasis. *Anticancer Research* **25**(2A), 847 (2005).
 - 18) Griffioen, A. W. and Molema, G. : Angiogenesis : potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews* **52**(2), 237 (2000).
 - 19) Kumar, C. C. and Armstrong, L. : Tumor-induced angiogenesis : a novel target for drug therapy?. *Emerging Drugs* **2**, 175 (1997).
 - 20) Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C. R. : Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**, 2745 (1973).
 - 21) Jost, L. M., Kirkwood, J. M. and Whiteside, T. L. : Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J. Immunol. Methods* **147**, 153 (1992).
 - 22) Kim, Y., Kim, S. B., You, Y. J. and Ahn, B. Z. : Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana*. *Planta Med.* **68**(3), 271 (2003).
 - 23) Patell, J. and Usgaonkar, R. N. : 3,4-Coumarinopyrones. III. Pechman condensation of 4-hydroxycoumarin with ethyl acetonedicarboxylate. *J. Indian Chem. Soc.* **43**(12), 768 (1966).
 - 24) Choi, H. Y. and Chi, D. Y. : Nonselective bromination-selective debromination strategy; Selective bromination of unsymmetrical ketones on singly activated carbon against doubly activated carbon. *Organic Letters* **5**(4), 411 (2003).
 - 25) Huh, J. E., Lee, E. O., Kim, M. S., Kang, K. S., Kim, C. H., Cha, B. C., Surh, Y. J. and Kim, S. H. : Penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses tumor growth via inhibition of angiogenesis and stimulation of apoptosis: roles of cyclooxygenase-2 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Carcinogenesis* **26**(8), 1436 (2005).
 - 26) Hasan, J., Shnyder, S. D., Clamp, A. R., McGown, A. T., Bicknell, R., Presta, M., Bibby, M., Double, J., Craig, S., Leeming, D., Stevenson, K., Gallagher, J. T. and Jayson, G. C. : Heparin octasaccharides inhibit angiogenesis *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* **11**(22), 8172 (2005).