

말레이미드 유도체의 합성과 신경분화 유도연구

Ravirala Ramu · 김세환 · 강승규 · 강남숙 · 안진희* · 배명애*

한국화학연구원 신물질연구단

(접수 2009. 4. 30; 수정 2009. 5. 25; 게재확정 2009. 6. 9)

Synthesis and Biological Evaluation of Maleimide Derivatives for Neuronal Differentiation

Ravirala Ramu, Se Hoan Kim, Seung Kyu Kang, Nam Sook Kang, Jin Hee Ahn*, and Myung Ae Bae*

Drug Discovery Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Yuseong-Gu,
Daejeon, 305-600, Korea

(Received April 30, 2009; Revised May 25, 2009; Accepted June 9, 2009)

주제어: 줄기세포, 신경분화, 저분자화합물

Keywords: Stem cell, neuronal differentiation, small molecule

서 론

줄기세포(Stem Cell)는 우리 몸을 구성하는 모든 세포나 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있어 이를 이용한 질병 치료에 많은 관심을 받아 오고 있다. 이중 줄기세포의 신경분화는 파킨슨병(Parkinson's diseases), 알츠하이머병(Alzheimer's diseases)과 같은 신경관련 병들의 치료 가능성 때문에 많은 연구자들의 연구대상이 되고 있다.¹ 이러한 줄기세포의 신경분화 연구를 저분자(small molecule)를 이용할 경우 신약으로의 개발 가능성, 그리고 molecular mechanism을 연구하는데 매우 유용하다.^{2,3} 최근에 몇몇 저분자 화합물이 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 것으로 알려져 있다. 레티노익 산(Retinoic acid)⁴ 은 신경분화로 널리 알려진 화합물이나 이는 다면발현성(pleiotropic)이다. 또 다른 저분자 화합물이 배아줄기세포로부터 신경분화를 시킨다는 보고는 있으나 그 분화 효율이 낮다.^{5,9} 신경전구세포(또는 신경줄기세포, hippocampus neural progenitor(HCN) cells)를 이용하여 좋은 효율로 신경분화를 유도한 저분자 화합물이 보고되었다.¹⁰ 신경줄기세포는 신경퇴행 질환을 치료할 수 있는 줄기세포로 관심을 받고

있다. 이로부터 본 연구팀은 신경줄기세포를 이용하여 새로운 구조를 가지는 신경분화유도 저분자 화합물을 발굴하고자 시도하였다.

실 험

시약 및 기기

실험에 사용된 시약은 Aldrich 등의 시약상에서 구입한 것으로 정제 없이 사용하였으며 반응의 진행여부는 Merck사의 thin-layer chromatography (Silica gel 60 F 254 Merk, 25 TLC glass sheet)로 알아보았는데 시료의 존재여부는 UV(254 nm) 램프 또는 착색용액(H₂SO₄ / AcOH / anisaldehyde / EtOH = 1/4/5/95)을 묻힌 후 heat-gun으로 가열하여 spot을 확인하였다. 화합물의 분리는 실리카겔(Merck 70 ~ 230, 40 ~ 70 mash)이 충전된 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 시료를 분리하였다. NMR spectra는 FT-NMR Varian GEMINI-200FT 또는 Bruker AVANCE-300 기종을 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane(TMS)를 사용하여 δ (ppm)값을 표시하였다. 질량분석데이터는 Shimadzu QP5050 spectrograph 기종을 사용하였다.

합성(Synthesis)과 분화 실험

합성은 Scheme 1에 따라서 진행되었다. 상업적으로 구입가능한 3,4-dibromomaleimide를 출발 물질로 하여 benzylation을 시키고 3 과 4 위치의 bromide에 다양한 arylboronic acid와 Suzuki type reaction을 통하여 유도체를 합성하였다.

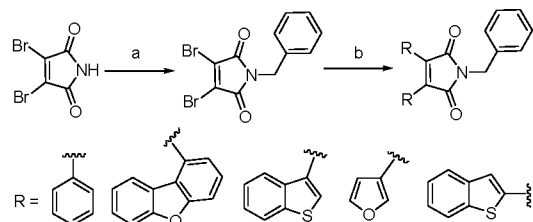
N-benzyl-3,4-dibromomaleimie

3,4-Dibromomaleimide(2.5 mmol)를 acetone(10 mL)에 녹인 후 무수 K_2CO_3 (5 mmol)과 benzyl bromide(3.0 mmol)을 가한다. 반응용액을 실온에서 18시간 반응시킨 후 ethyl acetate와 brine을 가한다. 유기 층을 $MgSO_4$ 로 건조한 후 유기용매를 감압하에서 농축하였다. 잔여물은 column chromatography로 분리하여 순수한 N-benzyl-3,4-dibromomaleimide (77%)를 얻었다.

N-benzyl-3,4-diarylmaleimie

Pressure tube에 1,4-dioxane 용매를 가하고 N-benzyl 3,4-dibromo maleimide(1 mmol), 1,3-bis-(2,6-diisopropylphenyl)imidazolium chloride(10 mol%), CS_2CO_3 (4 mmol), $Pd(OAc)_2$ (5 mol%)과 aryl boronic acid(2 mmol)를 각각 가한 후 $120^\circ C$ 에서 2시간 동안 가열하였다. 온도를 실온으로 낮춘 후에 ethyl acetate와 brine가한 후 유기 층을 분리하였다. 유기 층을 $MgSO_4$ 로 건조한 후 유기용매를 감압하에서 농축하였다. 잔여물은 column chromatography로 분리하여 순수한 bis(aryl)maleimides를 얻었다. 각각의 화합물의 yield와 spectral data는 다음과 같다.

Compound 1: 71% yield, 1H NMR(300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.47-7.25(m, 15 H), 4.80(s, 2 H)$.



Scheme 1. Synthesis of maleimide derivatives. Reagents and conditions: (a) Benzyl bromide, K_2CO_3 , acetone, room temperature, 18 h; (b) R-B(OH) $_2$, $Pd(OAc)_2$, IPrS(1,3-Bis-(2,6-diisopropylphenyl)imidazolium chloride), CS_2CO_3 , 1,4-dioxane, $120^\circ C$, 2 h.

Compound 2: 70% yield, 1H NMR(300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.89(d, J = 6.6 Hz, 2 H), 7.80(d, J = 6.6 Hz, 2 H), 7.75(d, J = 7.5 Hz, 2 H), 7.55(d, J = 6.6 Hz, 2 H), 7.35(m, 5 H), 7.20(m, 4 H), 6.85(d, J = 6.0 Hz, 2 H), 4.94(s, 2 H)$.

Compound 3: 69% yield, 1H NMR(300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.91(d, J = 6.8 Hz, 2 H), 7.76(m, 2 H), 7.54-7.23(m, 10 H), 7.11(m, 1 H), 4.83(s, 2 H)$.

Compound 4: 73% yield, 1H NMR(300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.18(s, 2 H), 7.51-7.23(m, 7 H), 6.65(s, 2 H), 4.78(s, 2 H)$.

Compound 5: 60% yield, 1H NMR(300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.81(m, 3 H), 7.46-7.15(m, 12 H), 4.85(s, 2 H)$.

Rat 해마 신경전구세포(신경줄기세포, neural stem cell) 배양

해마신경전구세포(NPC, neural progenitor cells) 배양을 위해서 임신한 Sprague Dawley rat을 사용하였다(Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN). 임신 16.5일(ED 16.5, embryonic day 16.5)의 Sprague Dawley 배아의 뇌로부터 양쪽 해마를 분리해낸 후 멸균된 pasteur pipette을 이용하여 HBSS buffer (Hank's balanced salt solution without calcium/magnesium, Mediatech, Herndon, VA, USA) 속에서 날개의 세포로 분리하였다. 분리된 세포들은 $15 \mu g/mL$ poly-L-ornithine(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 과 $1 \mu g/mL$ fibronectin(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 로 전처리된 cover glass에 2.5×10^4 cells/cm 2 density로 plating된 후 $37^\circ C$, 95% air/5% CO_2 gas하에 증식배지인 N2 media 11 에서 배양되었다. 분화 유도 전 신경전구세포의 증식을 위해 basic fibroblast growth factor(bFGF, 20 ng/mL, R&D system, Minneapolis, MN, USA)을 3일간 매일 처리하였고 배지는 2일마다 교환하였다. 신경전구세포의 분화 실험을 위해서는 bFGF첨가를 중단하면서 분화배지인 neurobasal(NB) media(Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 0.02% B27 serum-free supplement (Gibco), 75 mmol/L L-glutamine and 0.1% penicillin-streptomycin 에서 신경전구세포를 배양함으로써 분화유도하였다. 약물처리는 분화시작 1일째부터 매일 1회 3일간 $5 \mu M$ 그리고 $10 \mu M$ 의 농도로

처리하였으며 마지막 처리 24시간 후 고정하였다.

면역형광염색

면역염색을 위해 4% PFA(paraformaldehyde)/0.15% picric acid in PBS solution에 상온에서 20분간 세포를 고정한 후 30분간 blocking solution(10% normal goat serum/3% Triton X-100 in PBS)에서 blocking하였다. Blocking으로 비특이적 반응을 차단시킨 후 1차 항체가 들어간 blocking buffer 속에서 4 °C overnight 반응시켰다. 사용된 1차 항체는 다음과 같다: monoclonal anti-β-tubulin type III (Tuj1, 1 : 1000; Babco, Richmond, CA, USA), 1차 항체를 detection하기 위해 상온에서 형광이 부착된 2차 항체와 함께 2 hr 반응시켰다. 사용된 2차 항체는 다음과 같다: Cy3-conjugated anti-IgG(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), Alexa Fluor 488-conjugated anti-IgG(Molecular Probes, Eugene, OR, USA). 1X PBS로 wash 후, glass slides상에 Vectashield mounting medium(Vector Laboratories)으로 mounting하고 형광현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 이미지를 얻었다.

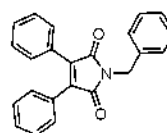
Table 1. Neuronal differentiation of maleimide derivatives in neural stem cell

Entry	Structure	Differentiation Activity ^a
1		+++
2		Not active
3		Not active
4		Not active
5		Not active

^a분화의 정도를 morphology의 변화를 가지고 판단함 (Fig. 1 참조).

결과 및 고찰

새로운 구조의 신경분화 유도 화합물 발굴을 위하여 한국화학물은행의 chemical library를 이용하였다. 한국화학물은행의 대표 화합물 7000 개를 무작위 screening(random screening)하여 신경줄기세포로부터 신경분화가 일어나는 화합물을 발굴하고자 하였다. 먼저 형태(morphology)의 변화를 확인하였다. 줄기세포가 신경세포로 변하면서 신경 특유의 모양의 변화하기 때문에 관찰이 용이하다. 이로부터 새로운 구조인 compound 1 이 신경분화를 유도함을 관찰할 수 있었다.

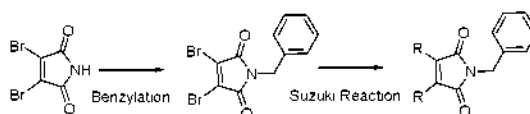


Compound 1

이러한 결과로부터 compound 1을 초기 hit compound로 생각하고 그 유도체 합성을 진행하였다. 유도체의 합성은 maleimide의 골격에 3,4위치를 변형하는 것으로 진행하였다. Compound 1유도체의 합성은 3,4-dibromomaleimide를 출발물질로 하여 N-benylation을 시킨 후 다양한 arylboronic acid를 Suzuki coupling reaction을 통하여 3,4위치에 다양한 aryl group을 도입하였다(Scheme 2).

이처럼 여러 종의 maleimide유도체를 합성하였으나 가장 먼저 합성된 compound 1만이 신경분화 유도효과를 냄을 확인하였다(Table 1).

신경분화의 확인은 형태학적 변화(morphological change)와 신경분화 marker인 beta III tubulin의 면역염색을 통하여 확인하였다. Compound 1의 다양한 농도에서 신경세포 분화 성장을 관찰한 결과 5 μM 농도 하에서 신경세포 분화의 성장이 가장 촉진됨을 관찰할 수 있었다. Figure 1은 5 μM



Scheme 2. Synthetic scheme of maleimide derivatives

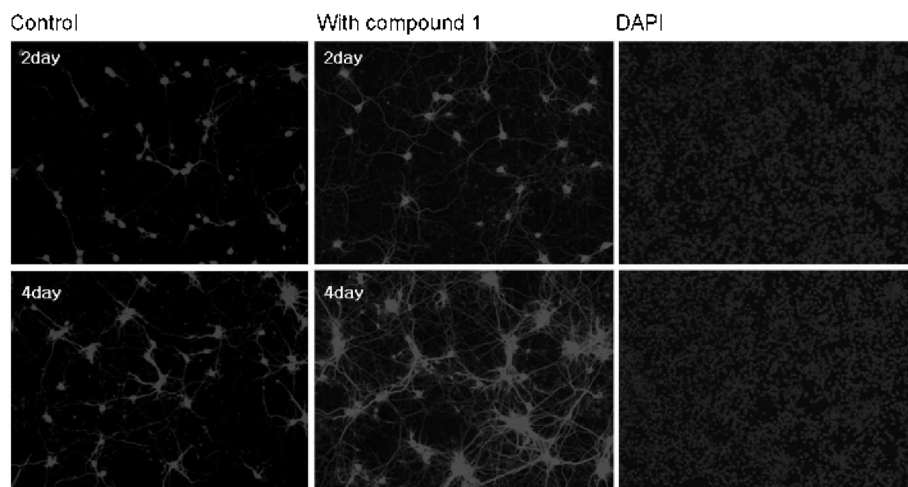


Fig. 1. **Immunocytochemistry.** Cells were stained by anti-beta III tubulin and DAPI after 2 or 4 day with or without compound 1 (5 μ M).

농도로 compound 1을 처리한 후 날짜별로 신경세포 분화 정도를 관찰한 결과이다. DAPI는 핵을 염색한 것으로 일정한 세포의 개수를 확인해 주고 있다. 같은 배양 조건으로 compound 1 처리군과 처리하지 않은 군을 2일과 4일 후에 각각 beta III tubulin 항체의 염색을 통하여 분화의 정도를 확인하였다. 그 결과 화합물을 처리하지 않은 control 군의 경우 분화가 거의 진행되지 못하였으나 저분자 화합물(compound 1)을 처리한 경우 신경돌기가 길게 뻗어나고 그 수가 증가하여 신경세포 분화를 촉진함을 관찰할 수 있었다. 특히 4일 후에 compound 1을 처리한 경우 신경 돌기들이 눈에 두드러지게 나타남을 확인하였다.

본 연구를 요약하면, 새로운 구조를 가지는 줄기세포 신경분화 유도 저분자 화합물을 발굴하고자 하였고, *N*-benzyl-3,4-diphenylmaleimide(compound 1)이 신경 줄기 세포로부터 신경분화를 유도함을 확인하였다. 분화의 정도를 확인하는 방법은 형태학적(morphology) 변화와 신경 marker인 Tuj1의 면역 염색을 통하여 확인하였다. 새로운 유도체의 합성 및 더 좋은 분화 유도 화합물 발굴 연구와 다른 줄기세포에서 신경분화 유도 가능성에 대한 연구를 현재 진행 중에 있다. 이러한 연구는 줄기세포 기초연구뿐 아니라 신약개발로의 응용 가능성을 가지고 있다.

Acknowledgments. This research was supported by the Center for Biological Modulators of the 21st Century Frontier R&D Program, Ministry of Education, Science and Technology, Korea.

REFERENCE AND NOTES

- Kim, J. H.; Auerbach, J. M.; Rodriguez-Gomez, J. A.; Velasco, I.; Gavin, D.; Lumelsky, N.; Lee, S. H.; Nguyen, J.; Sanchez-Pernaute, R.; Bankiewicz, K.; McKay, R. *Nature* **2002**, *418*, 50-56.
- Ding, S.; Schultz, P. G. *Nat. Biotech.* **2004**, *22*, 833-840.
- Chen, S.; Hilcove, S.; Ding, S. *Mol. BioSyst.* **2006**, *2*, 18-24.
- Emre, N.; Coleman, R.; Ding, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 252-258.
- Schugar, R. C.; Robbins, P. D.; Deasy, B. M. *Gene Therapy* **2008**, *15*, 126-135.
- Xu, Y.; Shi, Y.; Ding, S. *Nature*, **2008**, *453*, 338-344.
- Wichterle, H.; Lieberam, I.; Porter, J. A.; Jessell, T. M. *Cell* **2002**, *110*, 385-397.
- Ding, S.; Wu, T. Y. H.; Brinker, A.; Peters, E. C.; Hur, W.; Gray, N. S.; Schultz, P. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7632-7637.
- Hwang, K. C.; Kim, J. Y.; Chang, W.; Kim, D. S.; Lim, S.; Kang, S. M.; Song, B. W.; Ha, H. Y.; Huh, Y. J.; Choi, I. G.; Hwang, D. Y.; Song, H.; Jang, Y.; Chung, N.; Kim, S. H.; Kim, D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7467-7471.

10. Warashina, M.; Min, K. H.; Kuwabara, T.; Huynh, A.; Gage, F. H.; Schultz, P. G.; Ding, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 591-593.
 11. Kim, J. H.; Lee, J. H.; Park, J. Y.; Park, C. H.; Yun, C. O.; Lee, S. H.; Lee, Y. S.; Son, H. *J. Neurochem.* **2005**, *94*, 417-424.
-