

## 메소-1,2-디아민을 이용한 Salen-코발트 착화합물의 합성과 항암효과

고 동 수\*

동덕여자대학교 응용화학과

## Synthesis of Salens and Their Cobalt Complexes from Meso-1,2-Diamine and Their Anti-Cancer Property

Dongsoo Koh\*

Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Received March 22, 2010; Accepted April 21, 2010

**New salens (3) and their Cobalt complexes (4) were prepared from meso-1,2-bis(ortho-hydroxyphenyl)-1,2-diaminoethane (1) and substituted salicylic aldehydes (2). In contrast to symmetric structure of salen ligand (3), salen-Co(III) complexes (4) showed dissymmetric molecular structure due to participation of three hydroxyl groups in complex formation. One of the salens (3b) revealed decrease in Cyclin D1 expression, which represents anti-cancer property.**

**Key words:** Cobalt complex, CyclinD1, hydrogen bond, imines, salens

Salen은 1,2-에틸렌디아민과 살리실알데히드와의 반응에 의해 생성되는 salicyl ethylenediimine으로 이를 줄여서 salen으로 불려왔으나 현재는 모든 1,2-디아민과 알파-히드록시 알데히드와의 반응에 의해 생성되는 diimine을 총칭한다. 이러한 salens은 금속과 반응하여 비대칭 촉매를 합성하는 리간드로서 광범위하게 사용되고 있을 뿐 아니라[Baleiza와 Garcia, 2006], salens 자체와[Gao 등, 2007] 그 금속 착화합물들은 항암작용을 비롯한 다양한 생리활성을 보이는 것으로 알려져 왔다[Gust 등, 2004; Ansari 등, 2009].

최근까지 사용된 거의 모든 salens들은 이를 만드는 1,2-디아민으로 1,2-cyclohexyl diamine이나 1,2-diphenylethylenediamine을 사용하였다. 이로 인해서 salen 분자의 윗부분에 대한 변형은 제한적이었고[Konsel 등, 1998; Vijayalakshmi 등, 2006] 대부분의 연구는 salen 분자의 아래부분에 대한 변형을 통해 이루어지었다. 본 연구에서는 salen 분자의 윗부분이 변형된 새로운 salens과 그 착화합물들을 합성하기 위하여 meso-1,2-bis(ortho-hydroxyphenyl)-1,2-diaminoethane(1)을 사용하였고, 이를 통해 합성된 화합물들에 대한 분광학적인 특성과 항암효과를 보고하고자 한다.

항암과정을 설명하는 다양한 메카니즘 연구중에서, 세포주기

조절은 중요한 연구 영역이다. 세포분열 과정에 관여하는 각종 사이클린(Cyclin) 단백질은 사이클린 의존성 키나아제(Cyclin Dependent Kinase, CDK)라고 불리는 인산화 효소와 cyclin/CDK 복합체를 형성하여 세포주기의 단계를 조절한다. 이 중에서도 사이클린 D1(Cyclin D1)은 G1 단계에서 S 단계로 진행하는데 있어 중요한 역할을 하는 단백질이다. 사이클린 D1이 CDK4 혹은 CDK6와 복합체를 이루어 정상세포에서는 세포주기 조절을 정상적으로 하여 세포수를 알맞게 조절하는 반면, 암 세포에서는 비정상적인 세포주기 진행 등의 원인으로 세포의 과도한 증식과 성장을 발생 시킨다. 실제로 몇몇 암세포에서는 사이클린 D1의 유전자 증폭현상이나 단백질의 과발현 상태가 관찰되었다[Cordon-Cardo, 1995]. 따라서, 사이클린 D1의 발현량을 감소시키면, 세포주기가 G1 단계에 머무르게 되어 암세포의 비정상적인 세포분열 및 증식을 막아 암 치료에 적용할 수 있다. 본 연구에서는 합성된 salens과 그 착화합물들을 사용하여 사이클린 D1의 발현량 감소 여부를 확인하고 항암효과를 확인해 보고자 한다.

**Salens(3)의 합성.** Salens(3)의 합성에 사용한 meso-1,2-bis(ortho-hydroxyphenyl)-1,2-diaminoethane(1)은 문헌 방법에 의해서 합성하였다[Vogtle과 Goldschmitt, 1976]. Salens(2)의 합성은 문헌 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 합성하였다[Gust 등, 1990]. Meso-디아민(1, 366 mg, 1.5 mmol)을 30 mL의 에탄올에 녹인 후 온도를 올려 용해 시킨 후, 이 용액에 salicylaldehyde(2a, 366 mg, 3 mmol)을 가하여 상온에서 3시간 교반한다. 형성된 노란색 고체를 감압여과하고 에탄올로 세척

\*Corresponding author

Phone: +82-2-940-4512; Fax: +82-2-940-4193

E-mail: dskoh@dongduk.ac.kr

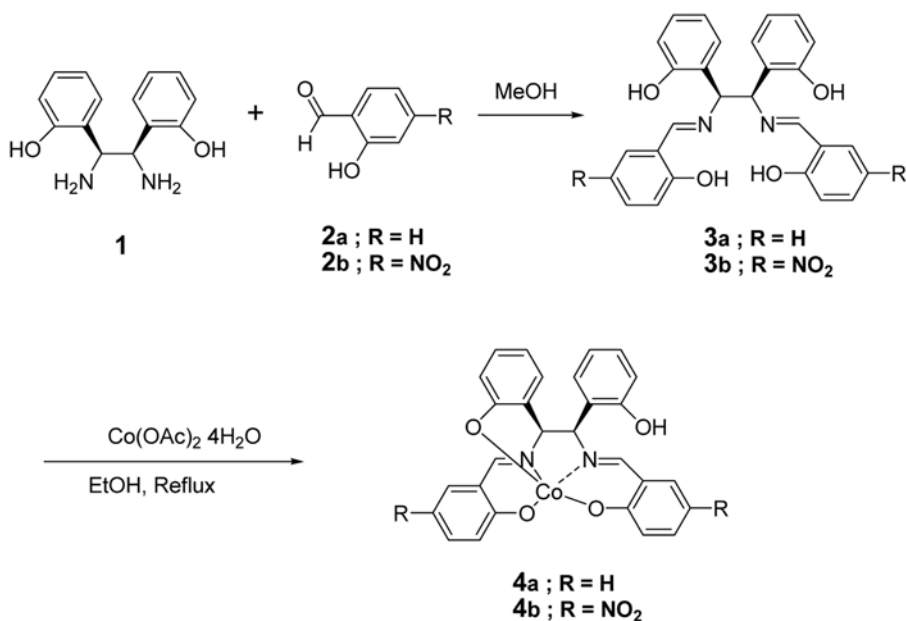


Fig. 1. Synthetic scheme for salens (3) and their cobalt complexes (4).

하여 목적화합물 **3a**(530 mg, 86%)를 얻었다.

**화합물 3a.** mp. 234°C[문헌 값 232°C, Gust 등, 2004]. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.96 (br, 2OH), 9.6 (br, 2OH), 8.35 (s, 2H), 7.31 (dd, *J*=1.5, 7.7 Hz, 2H), 7.28 (m, 2H), 7.26 (m, 2H), 7.02 (td, *J*=1.5, 7.7 Hz, 2H), 6.80 (m, 2H), 6.77 (m, 2H), 6.76 (m, 2H), 5.50 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO) δ 165.1, 160.4, 155.2, 132.2, 131.7, 128.7, 128.2, 126.2, 119.0, 118.7, 118.4, 116.4, 115.3, 70.2. IR (KBr pallet, cm<sup>-1</sup>) 3427, 1630, 1614, 1460, 759.

**화합물 3b.** 화합물 **3a**를 얻은 방법으로 89%의 수율로 얻었다. mp. 223°C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 14.79 (br, 2OH), 10.19 (br, 2OH), 8.50 (s, 2H), 8.30 (d, *J*=2.9 Hz, 2H), 8.06 (dd, *J*=2.9, 9.5 Hz, 2H), 7.31 (dd, *J*=1.5, 7.3 Hz, 2H), 7.13 (td, *J*=1.5, 7.3 Hz, 2H), 6.85 (m, 2H), 6.81 (m, 2H), 6.75 (d, *J*=9.5 Hz, 2H), 5.60 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO) δ 172.4, 165.5, 155.1, 136.2, 130.4, 129.5, 129.4, 128.7, 123.2, 120.5, 119.3, 115.7, 115.4, 68.3. IR (KBr pallet, cm<sup>-1</sup>) 3436, 1645, 1614, 1330, 1096, 756.

**착화합물(4a)의 합성.** 위에서 합성한 salene **3a**(226 mg, 0.5 mmol)와 Cobalt(II) acetate tetrahydrate(125 mg, 0.5 mmol)를 에탄올 10 mL에 녹인 후 2시간 동안 환류시킨다. 반응혼합물을 냉각 시킨 후, 생성된 고체를 감압여과 하고 이를 다시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 목적화합물 **4a**(193 mg, 76%)를 얻었다. mp. >300°C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.13 (br, OH), 8.47 (s, 1H), 7.35 (m, 3H), 7.26 (ddd, *J*=1.8, 6.9, 8.5 Hz, 1H), 7.01 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.17 (m, 2H), 7.10 (dd, *J*=1.5, 8.0 Hz, 1H), 6.61 (ddd, *J*=1.7, 7.3, 8.3 Hz, 1H), 6.52 (m, 2H), 6.43 (ddd, *J*=1.8, 6.1, 8.0 Hz, 1H), 6.41 (dd, *J*=1.0, 8.3 Hz, 1H), 6.15 (dd, *J*=1.7, 7.3 Hz, 1H), 5.98 (td, 1.0, 7.3 Hz, 1H), 5.89 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 4.88 (d, *J*=4.1 Hz,

1H). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO) δ 166.4, 166.0, 165.3, 163.8, 161.4, 156.2, 133.5, 133.4, 134.7, 134.2, 129.4, 129.1, 128.6, 127.9, 122.1, 121.9, 120.9, 119.8, 119.5, 118.2, 117.5, 117.2, 115.2, 113.2, 113.1, 111.7, 75.3, 69.2. IR (KBr pallet, cm<sup>-1</sup>) 3429, 1633, 1602, 1450, 752.

**화합물 4b.** 수율 82%; mp. >300°C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.21 (br, OH), 8.76 (s, 1H), 8.53 (d, *J*=2.9 Hz, 1H), 8.49 (d, *J*=2.9 Hz, 1H), 8.16 (dd, *J*=2.9, 9.5 Hz, 1H), 8.11 (dd, *J*=2.9, 9.5 Hz, 1H), 7.72 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 7.45 (d, *J*=9.5 Hz, 1H), 7.23 (d, *J*=9.5 Hz, 1H), 7.21 (m, 1H), 7.03 (d, *J*=7.3 Hz, 1H), 6.67 (td, *J*=1.5, 7.5 Hz, 1H), 6.57 (t, *J*=7.4 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J*=1.5, 7.5 Hz, 1H), 6.23 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 6.22 (m, 1H), 6.08 (td, *J*=1.5, 7.5 Hz, 1H), 5.90 (d, *J*=5.9 Hz, 1H), 4.97 (d, *J*=3.8 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO) δ 166.4, 166.0, 165.3, 163.8, 161.4, 156.2, 133.5, 133.4, 134.7, 134.2, 129.4, 129.1, 128.6, 127.9, 122.1, 121.9, 120.9, 119.8, 119.5, 118.2, 117.5, 117.2, 115.2, 113.2, 113.1, 111.7, 75.3, 69.2. IR (KBr pallet, cm<sup>-1</sup>) 3430, 1638, 1601, 1311, 1100, 756.

**핵자기공명 스펙트럼.** 화합물 **3b**는 DMSO-d<sub>6</sub>를 용매로 사용한 수소 핵자기공명에서 11개의 피크를 나타냈다. 이 화합물의 분자식에서 22개의 수소 피크가 예상되지만 분자의 대칭 구조 때문에 수소 피크의 수가 반으로 줄어들었다. 특이할 만한 peak로는 10.17 ppm과 14.79 ppm에서 나타나는 두 개의 페놀 -OHb 피크인데, 매우 낮은 14.79 ppm에서 나타나는 피크는 이 수소가 분자 내에서 강한 resonance assisted hydrogen bonding[Bertolasi 등, 1991]을 하고 있는 분자의 아래쪽 hydroxy기로, 10.17 ppm에서 나타나는 일반적인 페놀의 OHa 피크와 확연히 구별되었다.

이 화합물이 cobalt와 착화합물을 형성하여 만들어진 화합물

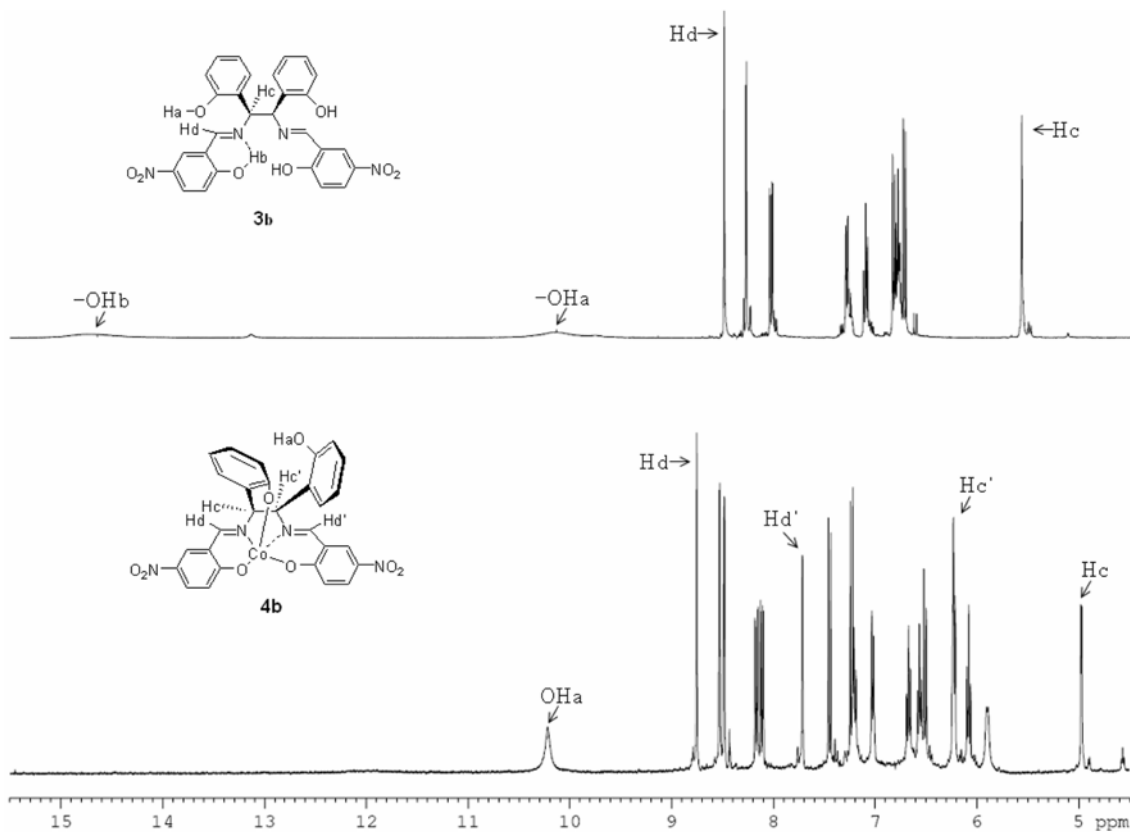


Fig. 2. Comparison  $^1\text{H-NMR}$  of salen (**3b**) with that of salen-Co(III) complex (**4b**).

**4b**는  $^1\text{H-NMR}$ 에서 19개의 수소 피크를 나타낸다. 이는 코발트 착화합물 **4b**가 더 이상 대칭 구조를 가지지 않고 각각의 수소가 서로 다른 화학적 환경에 놓여 있음을 의미한다. 몇 가지 중요한 수소 피크에 대해 살펴보면, 리간드 화합물인 **3b**에 존재하는 두 종류의 -OH기가(14.79, 10.17 ppm) 착화합물에서는 10.17 ppm 한곳에서만 나타난다. 이는 resonance assisted hydrogen bonding하고 있던 아래쪽 두 개의 OHb기 모두가 코발트와 착화합물을 형성하는데 사용되었음을 나타낸다. 또한 윗부분의 두 OHa수소 중 하나가 착화합물을 형성하는데 사용되어 전체적으로 착화합물 **4b**가 뒤틀린 구조를 가지는 비대칭성을 나타나게 하고, 착화합물에 사용되지 않은 OHa' 수소는 10.17 ppm에 나타난다. 이와 같은 비대칭성은 착화합물 **4b**와 유사한 화합물에 대해 보고된 바가 있다[Chin 등, 2007]. 착화합물 **4b**의 비대칭성에 때문에 salene **3b**의 경우 imine수소 Hd는 8.3 ppm에서 단일 피크로 나타나지만, 착화합물 **4b**에서는 7.72 ppm (Hd)과 8.60 ppm(Hd')에서 두 개의 서로 다른 피크로 나타났다. 또한 salene **3b**의 경우 5.6 ppm에서 단일선으로 나타나던 두 개의 aminobenzyl 수소 Hc는 착화합물에서 각각 두 개의 이중선으로 6.23 ppm(Hc)과 4.97 ppm(Hc')으로 분리되었다. 비슷한 현상이  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서도 관찰되는데 salene **3b**의 경우 분자의 대칭성으로 인해 14개의 탄소 피크를 나타내지만, 착화합물 **4b**에서는 비대칭성 때문에 28개의 모든 탄소 피크가 나타난다.

**자외선스펙트럼.** 디아민 **2**가 살렌 **3**을 형성하면 새로 imine (C=N) 결합이 생겨 자외선 스펙트럼에서 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$  부근에

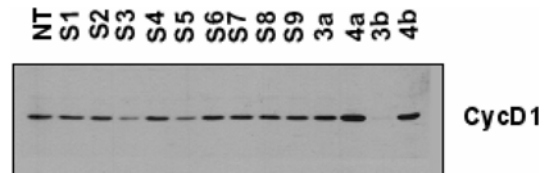


Fig. 3. Effect of salen **3b** on decreasing Cyclin D1 expression. NT: Not treated. S1-S9: Commercially available salen derivatives. Their structures are not shown because they did not show activity.

서 강한 피크를 보인다. 특히 살렌 화합물의 경우 두 개의 imine 결합 때문에 C=N 결합의 대칭과 비대칭 신축진동이 나타난다. 합성된 살렌 **3a**와 **3b**의 경우에도 각각 1630, 1614  $\text{cm}^{-1}$ 와 1645, 1614  $\text{cm}^{-1}$ 에서 강한 두개의 피크를 보인다. 또한 이들 살렌 **3**이 착화합물 **4**를 형성하면 대부분의 자외선 스펙트럼 피크가 낮은 에너지 쪽으로 이동한다[Eshtiaq-Hosseinia 등, 2008]. 착화합물 **4b**의 imine피크의 경우도, **3a**의 imine피크 1645, 1614  $\text{cm}^{-1}$ 에서 1638, 1601  $\text{cm}^{-1}$ 로 이동 되어 관찰 되었다.

**항암효과 측정.** 위에서 합성한 살렌 유도체(**3**, **4**)들이 미치는 Cyclin D1 발현량 감소 효과를 관찰하기 위해 웨스턴 블롯 (Western blot assay)을 수행하였다. 세포의 단백질은 20 mM HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 완충용액+1% Triton X-100+10% 글리세롤+150 mM NaCl+10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Leupeptin+1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)

완충용액에 용해시킨 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물들을 분리하여 동량의 단백질을 에스디에스-폴리아크릴아미드 겔 (SDS-polyacrylamide gel) 전기영동으로 분리하였으며, 분자량별로 분리된 단백질은 니트로셀룰로오스 필터(nitrocellulose filter)로 옮겨서 CycD1 단백질에 대한 항체를 사용하여 증강화학발광(enhanced chemiluminescence) 감지 시스템으로 CycD1의 발현량을 측정하였다.

본 연구에서 합성한 4가지 살렌 유도체(3a-4b)와 시중에서 시료로 구할 수 있는 살렌 유도체(S1-S9)들에 대하여 CycD1의 발현량을 측정된 결과, 3b로 처리한 실험군에서 CycD1의 발현량이 큰 폭으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 사이클린 D1 단백질의 발현량을 감소시킴으로써 암 세포의 증식을 억제할 수 있는 물질을 찾고자 노력한 결과, 새로운 살렌 유도체 3b가 사이클린 D1 단백질의 발현량을 감소시키는 것을 확인하였다.

### 감사의 글

이 논문은 2008-9년도 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

### 참고문헌

- Ansari KI, Grant JD, Kasiri S, Woldemariam G, Shrestha B, and Mandal SS (2009) Manganese (III)-salens induce tumor selective apoptosis in human cells. *J Inorg Biochem* **103**, 818-826.
- Baleiza C and Garcia H (2006) Chiral salen complexes: An overview to recoverable and reusable homogeneous and heterogeneous catalysts. *Chem Rev* **106**, 3987-4043
- Bertolasi V, Gilli P, Ferretti V, and Gilli GJ (1991) Evidence for resonance-assisted hydrogen bonding. 2. Intercorrelation between crystal structure and spectroscopic parameters in eight intramolecularly hydrogen bonded 1,3-diaryl-1,3-propanedione enols. *J Am Chem Soc* **113**, 4917-4925.
- Chin J, Chong YS, Bobb R, Studnickia L, and Hong JI (2007) Imprinting and locking chiral memory for stereoselective catalysis. *Chem Commun* 120-122.
- Cordon-Cardo C (1995) Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* **147**, 545-560.
- Eshtiagh-Hosseinia H, Housaindokhta MR, Beyramabadia SA, Beheshtia S, Esmailib AA, Khoshkholghb MJ, and Morsalic A (2008) Synthesis, experimental and theoretical characterization of tetra dentate *N,N*-dipyridoxyl (1,3-propylenediamine) salen ligand and its Co(III) complex. *Spectrochimica Acta Part A* **71**, 1341-1347.
- Gao J, Liu YG, Zhou Y, and Zingaro RA (2007) Chiral salicyl diamines: Potent anticancer molecules. *Chem Med Chem* **2**, 1723-1729.
- Gust R, Burgemeister T, Mannschreck A, and Schoenenberger H (1990) Aqua [1-(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-phenylethylenediamine] (sulfato) platinum (II) complexes with variable substituents in the 2-phenyl ring. 1. Synthesis and antitumor and estrogenic properties. *J Med Chem* **33**, 2535-2544.
- Gust R, Ott I, Posselt D, and Sommer K (2004) Development of cobalt(3,4-diarylsalen) complexes as tumor therapeutics. *J Med Chem* **47**, 5837-5846.
- Konsel RG, Karl J, and Jacobsen EN (1998) Cooperative asymmetric catalysis with dimeric salen complexes. *J Am Chem Soc* **120**, 10780-10781.
- Vijayalakshmi R, Kanthimathi M, Parthasarathi R, and Nair BU (2006) Interaction of chromium (III) complex of chiral binaphthyl tetradentate ligand with DNA. *Bioorg Med Chem* **14**, 3300-3306
- Vogtle F and Goldschmitt E (1976) Die Diaza-Cope-Umlagerung. *Chem Ber* **109**, 1-40.