

## 포스페이트 그룹을 가지는 스피고신 키나아제 1 억제제의 개발

박은영 · 백동재\*

목포대학교 약학대학 & 천연약물 연구소  
(접수 2018. 2. 8; 게재확정 2018. 2. 22)

### Development of Sphingosine Kinase 1 Inhibitors Containing Phosphate Group

Eun-Young Park and Dong Jae Baek\*

College of Pharmacy and Natural Medicine Research Institute, Mokpo National University, Jeonnam 58554, Korea.

\*E-mail: dbaek@mokpo.ac.kr

(Received February 8, 2018; Accepted February 22, 2018)

**Key words:** Sphingosine kinase, Inhibitor, Anticancer agent, Phosphate, FTY720

#### 서 론

Sphingosine kinase(SK)는 스피고신(sphingosine)을 인산화시켜 스피고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate, S1P)을 생성한다. S1P는 다섯개의 S1P-특이적 G-protein-coupled receptors(GPCRs)을 통해서 세포 수명(cell survival), 성장(proliferation)과 이동(migration)등을 조절한다. S1P는 암과 알츠하이머를 포함하여 다양한 질병에 연관되어 있어 신약개발의 타겟으로 연구 되어왔다. SK는 SK1 및 SK2의 두 가지 isoform이 있으며 SK1 저해는 다양한 암세포의 성장을 억제한다.<sup>1</sup> 이에 반해 SK2에 대한 기능은 현재까지 명확히 알려져 있지 않으며 histone acetylation 조절을 통해 세포 성장을 억제하는 p21 유전자의 발현을 촉진함이 보고 되었다.<sup>2</sup> 따라서 이런 효능의 차이 때문에 SK1 또는 SK2에 대해 선택성을 보이는 억제제의 개발이 요구되고 있다.

현재까지 개발된 SK 억제제들은 많은 경우에 FTY720의 기본 구조를 가지고 있다(Fig. 1). FTY720은 2010년 미국 FDA에서 승인된 다발성 경화증 경구 치료제이다. FTY720(Fingolimod, Gilenya)<sup>3</sup>은 중국 허브 *Iscaria sinclarii*의 곰팡이 대사 산물인 myriocine의 구조를 기본으로 하여 합성되었으며 구조적, 생물학적으로 스피고신과 유사성을 보인다. FTY720은 SK2에 의해 인산화(FTY720-P)되어면역억제 효과를 보이며 S1P와 결합한다. 또한 FTY720-P는 림프구 표면에 있는 S1P와 결합하여 분해 시킴으로써 림프구를 림프절에 격리시켜 혈액내로 방출되지 못하게 한다.<sup>4</sup> 이로 인해 면역억제 효과를 나타내며 주로 다발성 경화증(multiple sclerosis) 환자에게 효과를 보인다.<sup>5</sup> 또한 FTY720은 SK1을 저해하는 것으로도 알려져 있다.<sup>6</sup> FTY720과 유

사한 구조를 가지는 SK 억제제들은 주로 FTY720의 극성 헤드그룹을 변형한 형태이며 매우 독특한 생물학적 효과를 보여준다. 예를 들어 RB-005<sup>7</sup>는 SK1을 선택적으로 억제하며((R)-FTY720-OMe(ROME)<sup>8</sup>의 경우에는 SK2에 대한 선택적인 억제효과를 보인다(Fig. 1). Merck, Pfizer 그리고 Apogee와 같은 제약회사에서는 보유하고 있는 library screening을 통해 스피고리피드와 같은 지질 형태가 아닌 SK 억제제들을 개발하여 왔다. Apogee Biotechnology에서 개발된 4-pyridinemethyl 3-(4'-chlorophenyl)-adamantane-1-carboxamide(ABC294640)은 SK2 저해에 대한 Ki 값이 10 mM로 선택적으로 SK2 억제 효과를 보이며 암세포의 세포내 S1P형성을 억제한다.<sup>9</sup> 또한 임상시험에서 ABC294640은 진행성 고형암(Advanced Solid Tumors) 환자에서 S1P 수준을 낮춰주는 결과를 나타냈다.<sup>10</sup> 현재까지 알려진 가장 강력하고 선택적인 SK1 억제제는 Pfizer에서 개발한 PF-543이다. PF-543은 지질형태를 가지고 있지 않으며 SK1 저해에 대한 Ki 값이 4.3 nM로 나타났으며 SK2에 비해 130배 높은 SK1 선택성을 보인다.<sup>11</sup> FTY720에 입체선택적으로 vinylphosphate를 도입한 (S)-FTY720 vinylphosphate는 SK1에 대한 선택적인 억제효과를 보이는 반면 (R)-FTY720 vinylphosphate에서는 SK 억제 효과를 보이지 않는다.<sup>6</sup> (S)-FTY720 vinylphosphate는 SK1의 proteasomal degradation을 증가시키고 S1P에 의해 활성화되는 actin의 lamellipodia/membrane ruffles 로의 재배열을 억제하여 세포이동을 억제하게 된다. 이러한 결과는 (S)-FTY720 vinylphosphate가 항암활성에 유리한 SK1 억제제임을 보여준다.<sup>12</sup> 하지만 FTY720에 입체선택적으로 vinylphosphate를 도입하기 위해서는 복잡한 합성과정을 가진다.<sup>13</sup> 따라서 간단한 합성 방법으로 phosphate를 도입

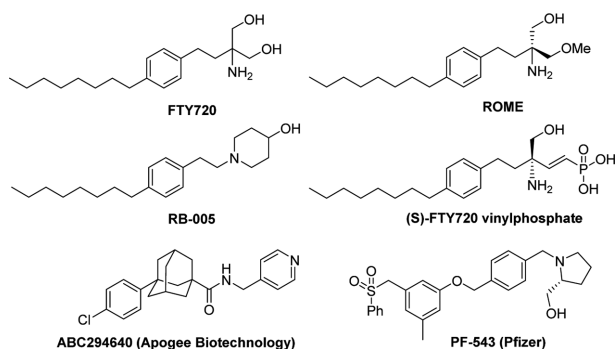


Figure 1. 알려진 sphingosine kinase 억제제들.

하여 신규 SK1 억제제를 개발하고자 하였다.

### 결과 및 고찰

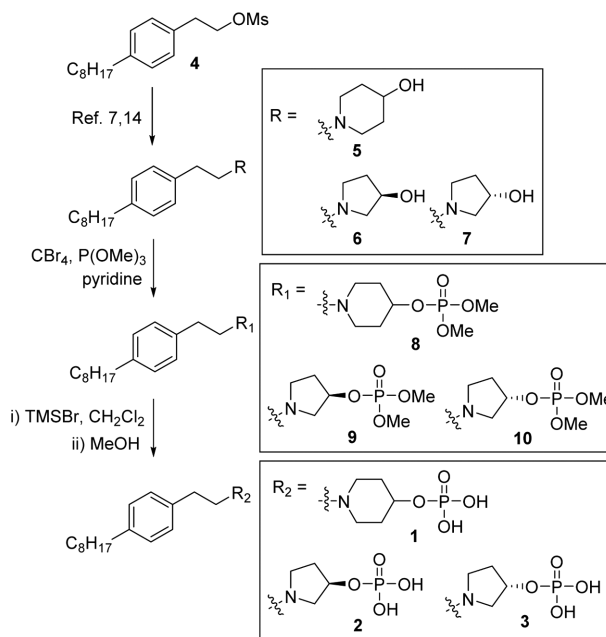
RB-005는 매우 적은 합성단계로 합성되며 SK1에 대한 높은 선택적 억제효과를 가진다. 또한 RB-005의 합성 중간체인 화합물 4를 이용하여 다양한 cyclic amine을 도입하여 쉽게 입체선택적인 헤드 그룹을 도입할 수 있다.<sup>7,14</sup>

우리는 화합물 4를 알려진 방법으로 합성하고 이를 이용하여 piperidinol과 pyrrolidinol을 도입하였다.<sup>7,14</sup> 합성된 화합물 5-7에 methyl로 보호된 phosphate기를 도입하여 화합물 8-10을 얻었다. 최종적으로 bromotrimethylsilane을 이용하여 methyl 보호기를 제거하고 phosphate가 도입된 신규 화합물 1-3를 얻었다(Scheme 1). 얻어진 화합물의 SK 억제효과를 알아보기 위하여 SPHK assay kit을 사용하여 억제효과를 확인하였다. 실험 결과 pyrrolidinyl이 도입된 화합물 2와 3에서 phosphate의 입체적인 구조와 관계없이 모두 SK1에 대한 억제효과를 보였다. Piperidinyl이 도입된 화합물 1은 SK1을 74% 억제하면서 SK2의 억제효과를 보이지 않아 RB-005(SK2 40% 저해)<sup>7</sup> 보다 SK1에 대한 선택성을 높이는 결과를 보였다(Fig. 2).

### 실 험

#### 시약 및 기기

반응에 이용된 시약들은 상업적으로 구입 가능한 시약을 구입하여 사용되었다. 반응은 질소상태에서 진행되었으며 TLC(silica gel 60 F254)를 이용하여 반응의 진행을 확인하였다. 컬럼크로마토그래피는 silica gel grade 60(230-400 mesh)에서 진행되었다. 반응에 사용된 모든 용매는 상업적으로 판매되는 무수 용매를 사용하였다. <sup>1</sup>H NMR과 <sup>13</sup>C NMR은 Bruker Avance I spectrometer(Billerica, MA, USA)를 사용하였으며 중수소 용매를 사용하여 400과 100 MHz에서



Scheme 1. Synthesis of sphingosine kinase 1 inhibitors 1-3.

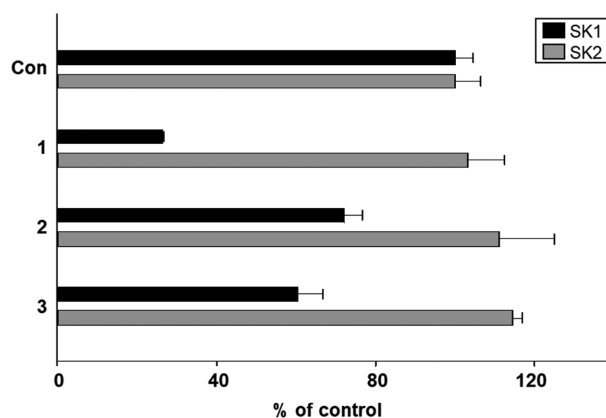


Figure 2. 화합물에 의한 SK1 및 SK2 활성 억제 효과. SK1 및 SK2의 활성은 100 mM sphingosine 및 10 mM의 ATP를 사용하여 측정함. 화합물은 50 mM의 농도로 처리함(n = 3, 결과는 평균억제율 ±SD으로 표시함).

각각 측정하였다. High resolution mass spectra는 electrospray ionization(ESI)를 이용하여 Agilent Technologies G6520A Q-TOF mass spectrometer(Santa Clara, CA, USA) 기기를 사용하여 측정하였다.

#### Sphingosine kinase 억제제의 합성

중간체 1-(4-octylphenethyl)piperidin-4-ol (5), (R)-1-(4-octylphenethyl)-pyrrolidin-3-ol (6)과 (S)-1-(4-octylphenethyl)pyrrolidin-3-ol (7)은 문헌에 알려진 방법으로 합성하였다.<sup>7,14</sup>

**Dimethyl (1-(4-octylphenethyl)piperidin-4-yl) phosphate (8)의**

**합성:** 상온에서 화합물 5(70 mg, 0.22 mmol)을 pyridine(3 mL)에 녹이고 여기에 CBr<sub>4</sub>(91 mg, 0.28 mmol)을 넣어 0 °C로 냉각하며 교반하였다. 여기에 trimethyl phosphite(38 mg, 0.31 mmol)을 넣고 상온으로 온도를 올리고 12시간 교반하였다. 반응물에 1M HCl을 넣고 ethylacetate로 반응물을 추출한 후 MgSO<sub>4</sub>로 건조하였다. 반응 혼합물은 컬럼 크로마토그래피(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=10:1)로 분리하여 48%의 수율로 화합물 8를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.10 (s, 4H), 4.50–4.42 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 2.91–2.72 (m, 4H), 2.66–2.50 (m, 4H), 2.43–2.32 (m, 2H), 2.08–2.00 (m, 2H), 1.95–1.78 (m, 2H), 1.58 (dt, *J*=14.8, 7.2 Hz, 2H), 1.28 (d, *J*=15.5 Hz, 10H), 0.87(t, *J*=6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 140.8, 137.2, 128.9, 60.4, 54.2, 50.3, 35.6, 33.2, 32.2, 31.6, 29.5, 29.4, 29.3, 22.7, 14.1; ESI-HRMS (M+H)<sup>+</sup> *m/z* calcd for C<sub>23</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub>P 426.2773, found 426.2788.

**(R)-Dimethyl (1-(4-octylphenethyl)pyrrolidin-3-yl) phosphate**

**(9)의 합성:** 화합물 9의 합성법과 같은 방법으로 화합물 6을 이용하여 58%의 수율로 화합물 9를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.10 (s, 4H), 5.02–4.90 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 2.93–2.84 (m, 2H), 2.76 (dd, *J*=14.4, 3.1 Hz, 4H), 2.56 (t, *J*=7.5 Hz, 2H), 2.28 (dd, *J*=14.4, 5.5 Hz, 1H), 2.04 (dd, *J*=11.1, 7.3 Hz, 1H), 1.97–1.83 (m, 2H), 1.65–1.53 (m, 2H), 1.35–1.22 (m, 10H), 0.87 (t, *J*=6.7 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 140.2, 137.5, 128.5, 58.5, 54.4, 52.5, 35.8, 34.4, 33.8, 31.7, 29.7, 29.5, 29.3, 22.7, 14.1; ESI-HRMS (M+H)<sup>+</sup> *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>P 412.2617, found 412.2654.

**(S)-Dimethyl (1-(4-octylphenethyl)pyrrolidin-3-yl) phosphate**

**(10)의 합성:** 화합물 9의 합성법과 같은 방법으로 화합물 7을 이용하여 52%의 수율로 화합물 10을 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.10 (s, 4H), 3.78 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 2.87 (t, *J*=8.2 Hz, 2H), 2.76 (dt, *J*=15.2, 6.5 Hz, 2H), 2.61–2.52 (m, 2H), 2.26 (dq, *J*=14.2, 7.1 Hz, 1H), 2.13–2.00 (m, 1H), 1.62–1.55 (m, 2H), 1.33–1.28 (m, 10H), 0.87 (t, *J*=6.4 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 140.8, 137.0, 128.5, 60.9, 58.0, 54.4, 52.5, 33.0, 31.9, 31.6, 30.3, 29.5, 29.4, 22.7, 14.1; ESI-HRMS (M+H)<sup>+</sup> *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>P 412.2617, found 412.2691.

**1-(4-Octylphenethyl)piperidin-4-yl dihydrogen phosphate**

**(1)의 합성:** 상온에서 화합물 8(63 mg, 0.15 mmol)를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL)에 녹인 후 bromotrimethylsilane (113 mg, 0.74 mmol)을 천천히 넣었다. 상온에서 1시간 교반하고 감압 건조하였다. 여기에 MeOH(3 mL)를 넣고 상온에서 1시간 교반하였다. 용매를 감압 건조한 후 hexane:ethylacetate=1:1의 용매로 washing하여 화합물 1을 89%의 수율로 얻었다. <sup>1</sup>H NMR

(400 MHz, MeOD) δ 7.24 (d, *J*=7.9 Hz, 2H), 7.17 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 4.69–4.65 (m, 1H), 3.71 (dd, *J*=9.7, 7.1 Hz, 2H), 3.55 (dd, *J*=19.8, 7.5 Hz, 2H), 3.41–3.30 (m, 4H), 3.15–3.06 (m, 2H), 2.66–2.54 (m, 2H), 2.22 (t, *J*=15.7 Hz, 2H), 1.68–1.54 (m, 2H), 1.35–1.25 (m, 10H), 0.91 (t, *J*=6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) δ 143.1, 135.3, 130.0, 129.8, 68.3, 58.9, 36.5, 33.0, 32.8, 30.6, 30.4, 30.3, 23.8, 14.5; ESI-HRMS (M+H)<sup>+</sup> *m/z* calcd for C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>4</sub>P 398.2460, found 398.2431.

**(R)-1-(4-Octylphenethyl)pyrrolidin-3-yl dihydrogen phosphate**

**(2)의 합성:** 화합물 1의 합성법과 같은 방법으로 화합물 9를 이용하여 91%이 수율로 화합물 2를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.23 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.17 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 3.78 (s, OH), 3.76 (s, OH), 3.55 (t, *J*=11.6 Hz, 1H), 3.37 (dd, *J*=6.9, 5.2 Hz, 2H), 3.24 (t, *J*=11.5 Hz, 2H), 3.11 (dt, *J*=8.1, 5.0 Hz, 2H), 2.64–2.57 (m, 2H), 2.32 (d, *J*=13.2 Hz, 2H), 2.10 (dd, *J*=23.4, 11.3 Hz, 2H), 1.61 (dd, *J*=13.6, 6.8 Hz, 2H), 1.38–1.26 (m, 10H), 0.91 (t, *J*=6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) δ 143.2, 134.7, 130.0, 129.8, 72.2, 59.5, 36.9, 36.5, 33.0, 32.7, 31.1, 30.6, 30.4, 30.3, 23.7, 14.5; ESI-HRMS (M+H)<sup>+</sup> *m/z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub>P 384.2304, found 384.2364.

**(S)-1-(4-Octylphenethyl)pyrrolidin-3-yl dihydrogen phosphate**

**(3)의 합성:** 화합물 1의 합성법과 같은 방법으로 화합물 10을 이용하여 91%이 수율로 화합물 3를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.06 (d, *J*=7.6 Hz, 2H), 7.01 (d, *J*=7.6 Hz, 2H), 3.65–3.62 (m, 1H), 3.38–3.28 (m, 4H), 3.20–3.18 (m, 2H), 2.91–2.84 (m, 2H), 2.43 (t, *J*=7.5 Hz, 2H), 2.19–2.10 (m, 2H), 1.45–1.41 (m, 2H), 1.20–1.12 (m, 10H), 0.73 (t, *J*=6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) δ 143.6, 132.6, 129.2, 74.3, 57.9, 36.9, 32.9, 30.9, 30.3, 23.6, 14.2; ESI-HRMS (M+H)<sup>+</sup> *m/z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub>P 384.2304, found 384.2312.

**화합물 1–3의 sphingosine kinase 억제효과 측정**

화합물 1–3을 50 mM로 처리하고 sphingosine kinase 1 및 sphingosine kinase 2를 처리하여 Echelon's Sphingosine Kinase Activity Assay kit에서 제시한 방법에 따라 억제능을 측정하였다.

**결론**

알려진 SK1 억제제는 다양한 암을 억제하는 결과를 보이고 있으며 Merck, Pfizer 그리고 Apogee를 포함한 제약사들이 연구 중이며 현재까지 동물실험 단계에 머무르고 있어 다양한 구조를 가지는 억제제의 개발이 필요한 타

켓이다. 본 연구에서 acetic acid-2-phenylethyl ester를 출발 물질로 하여 총 7단계의 합성으로 phosphate 헤드 그룹을 가지는 신규 SK1 저해물질 1-3을 14-19%의 수율로 합성하였다. 합성된 화합물은 헤드 그룹의 입체적인 구조와 관계없이 SK1에 대한 선택적인 억제효과를 보였으며 특히 화합물 1은 74%의 SK1 억제효과를 보이면서 SK2를 전혀 저해하지 않는 높은 선택성을 보였다. 이러한 결과에 따라 합성된 화합물을 이용하여 추가적인 항암활성 연구 등을 진행하고 알려진 다른 SK1 억제제와 다른 생물학적 활성을 보이는지 연구하고자 한다.

**Acknowledgments.** 본 논문은 2016학년도 목포대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## REFERENCES

- Pitman, M. R.; Costabile, M.; Pitson, S. M. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 1349.
- Hait, N. C.; Allegood, J.; Maceyka, M.; Strub, G. M.; Hari-kumar, K. B.; Singh, S. K.; Luo, C.; Marmorstein, R.; Kordula, T.; Milstien, S.; Spiegel, S. *Science* **2009**, *325*, 1254.
- Brinkmann, V.; Billich, A.; Baumruker, T.; Heining, P.; Schmouder, R.; Francis, G.; Aradhye, S.; Burtin, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 883.
- Ingwersen, J.; Aktas, O.; Kuery, P.; Kieseier, B.; Boyko, A.; Hartung, H. P. *Clin. Immunol.* **2012**, *142*, 15.
- Chun, J.; Hartung, H. P. *Clin. Neuropharmacol.* **2010**, *33*, 91.
- Tonelli, F.; Lim, K. G.; Loveridge, C.; Long, J.; Pitson, S. M.; Tigyi, G.; Bittman, R.; Pyne, S.; Pyne, N. J. *Cell. Signal.* **2010**, *22*, 1536.
- Baek, D. J.; MacRitchie, N.; Pyne, N. J.; Pyne, S.; Bittman, R. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2136.
- Lim, K. G.; Sun, C.; Bittman, R.; Pyne, N. J.; Pyne, S. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 1590.
- French, K. J.; Zhuang, Y.; Maines, L. W.; Gao, P.; Wang, W.; Beljanski, V.; Upson, J. J.; Green, C. L.; Keller, S. N.; Smith, C. D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *333*, 129.
- Britten, C. D.; Garrett-Mayer, E.; Chin, S. H.; Shirai, K.; Ogretmen, B.; Bentz, T. A.; Brisendine, A.; Anderton, K.; Cusack, S. L.; Maines, L. W.; Zhuang, Y.; Smith, C. D.; Thomas, M. B. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 4642.
- Schnute, M. E.; McReynolds, M. D.; Kasten, T.; Yates, M.; Jerome, G.; J. Rains, W.; Hall, T.; Chrencik, J.; Kraus, M.; Cronin, C. N.; Saabye, M.; Highkin, M. K.; Broadus, R.; Ogawa, S.; Cukyne, K.; Zawadzke, L. E.; Peterkin, V.; Iyanar, K.; Scholten, J. A.; Wendling, J.; Fujiwara, H.; Nemirovskiy, O.; Wittwer, A. J.; Nagiec, M. M. *Biochem. J.* **2012**, *444*, 79.
- Lim, K.G.; Tonelli, F.; Li, Z.; Lu, X.; Bittman, R.; Pyne, S.; Pyne, N. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 18633.
- Lu, X.; Sun, C.; Valentine, W. J.; E, S.; Liu, J.; Tigyi, G.; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3192.
- Baek, D. J.; MacRitchie, N.; Anthony, N. G.; S. Mackay, P.; Pyne, S.; Pyne, N. J.; Bittman, R. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9310.