

스핑고신 키나아제 저해제의 합성과 췌장암 세포에서의 항암활성 연구

박은영 · 백동재*

목포대학교 약학대학

(접수 2022. 1. 20; 게재확정 2022. 2. 11)

Synthesis of Sphingosine Kinase Inhibitors and Its Anticancer Activity in Pancreatic Cancer Cells

Eun-Young Park and Dong Jae Baek*

College of Pharmacy, Mokpo National University, Jeonnam 58554, Korea. *E-mail: dbaek@mokpo.ac.kr

(Received January 20, 2022; Accepted February 11, 2022)

Key words: Sphingosine kinase, Inhibitor, Pancreatic cancer, Derivative

스핑고리피드(Sphingolipid)는 세포막의 구성 성분으로 신호를 전달하는 분자로 사용되며 세포 성장과 억제에 관여한다. 다양하고 복잡한 �핑고리피드 중에서 �핑고신-1-포스페이트(sphingosine-1-phosphate, S1P)는 면역세포와 암세포를 포함한 세포 성장과 억제에 중요한 역할을 한다.¹ 이러한 연구결과는 아주 오래전부터 연구되어 왔으나 이와 관련되어 개발이 완료된 약물은 많지 않다.² 약물 개발이 어려운 이유 중 하나는 �핑고리피드의 역할이 매우 다양하기 때문이다.³ 그럼에도 불구하고 개발된 대표적인 �핑고리피드 조절물질인 Gilenya® (FTY720, Filgotolimod)는 S1P modulator로 다발성 경화증 경구치료제로 개발되어 2010년 FDA에 승인되었다(Fig. 1).⁴ FTY720은 또한 �핑고신 키나아제(Sphingosine kinase, SK) 1을 억제하여 �핑고신(sphingosine)이 S1P로 전환되는 것을 저해한다. SK는 SK1과 SK2 두 가지 isoform이 존재하며 이들 모두 세포 성장을 촉진한다.⁵ 또한 FTY720은 protein phosphatase 2A (PP2A)를 활성화시켜 강력한 항암활성을 보인다.⁶ 하지만 FTY720은 SK2에 의해 FTY720-phosphate(FTY720-P)로 전환되어 직접적으로 항암제로 사용되기 어려운 것으로 알려져 있다.¹ FTY720의 SK1 저해 효과로 인하여 FTY720 유사 구조를 가지고 있는 SK저해제들이 개발되고 있다.² 이러한 FTY720 유사구조들은 일반적인 �핑고리피드 구조에 비해 합성이 용이하다. 그러나 FTY720의 head 구조는 작은 구조적 변화에도 생물학적인 활성에 민감하게 영향을 미친다. 대표적으로 hydroxyl group에 입체선택적으로 monomethylation된 ROME ((R)-FTY720-OMe)은 FTY720과 다르게 SK2를 선택적으로 저해한다(Fig. 1). 이러한 이유로 구조적으로 고정된 다양한 cyclic amine head group 이 사용되

어 SK저해제로 개발되고 있다.²

PF-543은 현재까지 가장 강력하게 SK1을 저해하는 것으로 알려져 있다(IC₅₀ = 3.4 nM) (Fig. 1).⁷ PF-543은 강력한 SK1 저해효과에도 불구하고 몇 가지 암세포에서 항암활성이 좋지 않다.⁸ 하지만 여전히 PF-543은 강력한 SK1 저해제이며 이러한 이유로 PF-543 유도체의 개발이 요구되고 있다. Pfizer는 2017년 PF-543 유도체에 대한 합성과 SK저해효과 결과를 보고하였다.⁹ 이 결과에서 PF-543은 여전히 높은 SK1 저해효과를 보였으며 PF-543의 benzenesulfonyl tail 구조를 변형한 유도체에서는 SK1 저해효과가 낮아지는 결과를 보였다. 이러한 결과는 benzenesulfonyl tail구조가 SK1 저해효과에 중요한 구조적인 역할을 하고 있다는 것을 보여준다. 우리는 이전의 연구를 통해 PF-543이 낮은 metabolic stability(MS)를 가지고 있고 PF-543의 tolyl group이 MS에 영향을 주지 않는다는 것을 보고하였다.¹⁰ 또한 PF-543의 benzenesulfonyl tail구조를 aliphatic tail로 변형했을 때 SK1 저해효과가 유지되는 결과를 보고하였다(Fig. 1).¹¹ 이러한

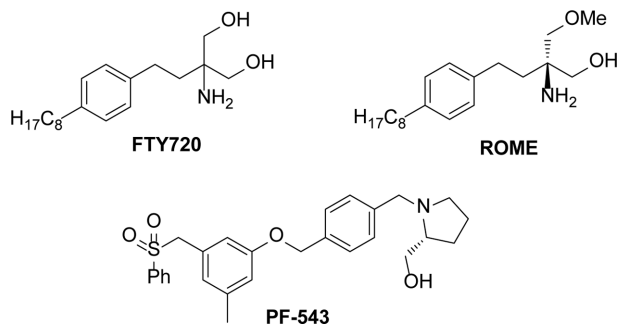


Figure 1. Structure of SK inhibitors and FTY720.

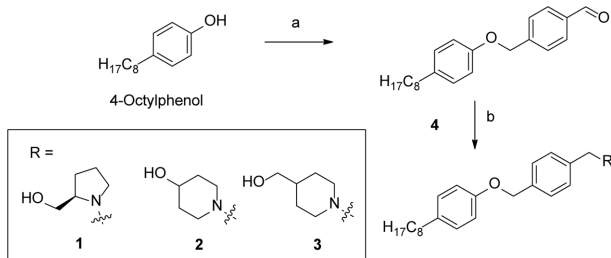
결과를 토대로 PF-543의 backbone구조에 FT720의 tail구조를 도입한 신규 화합물을 합성하여 SK저해효과와 췌장암세포에서의 세포독성 효과를 알아보고자 하였다.

결과 및 고찰

우리는 4-octylphenol을 출발물질로 사용하여 aldehyde 중간체 **4**를 합성하였다. 여기에 reductive amination을 사용하여 cyclic amine head group이 도입된 신규 유사체 3종을 합성하였다(Scheme 1).

PF543과 유도체 **1-3**의 항암활성을 비교하기 위해서 췌장암 세포주인 MIAPaCa 2 세포를 사용하여 세포사멸 효능을 비교 평가하였다(Fig. 2). 비교물질로 FTY720을 사용하였다. PF-543과 유도체 **1-3**은 각각 20과 40 μM 의 농도를 사용하여 비교하였다. 세포사멸 효과는 새롭게 합성한 화합물 **1-3**모두 PF-543보다 개선되었음을 알 수 있었으며 특히 화합물 **3**에서 세포사멸 효과가 다른 화합물과 비교하여 증가되었음을 알 수 있었다.

이러한 세포사멸효과가 세포자멸사(apoptosis)를 매개로 하는지 알아보기 위해 Annexin-V를 이용하여 PF-543과 유도체 **1-3**의 활성을 측정하였다(Fig. 3). 실험결과 유도



Scheme 1. Synthesis of sphingosine kinase inhibitor. Reagents and condition: a) 4-(bromomethyl)benzaldehyde, K₂CO₃, THF, rt, 12 h; b) cyclic amine, NaBH(OAc)₃, 1,2-dichloroethane, rt, 12 h.

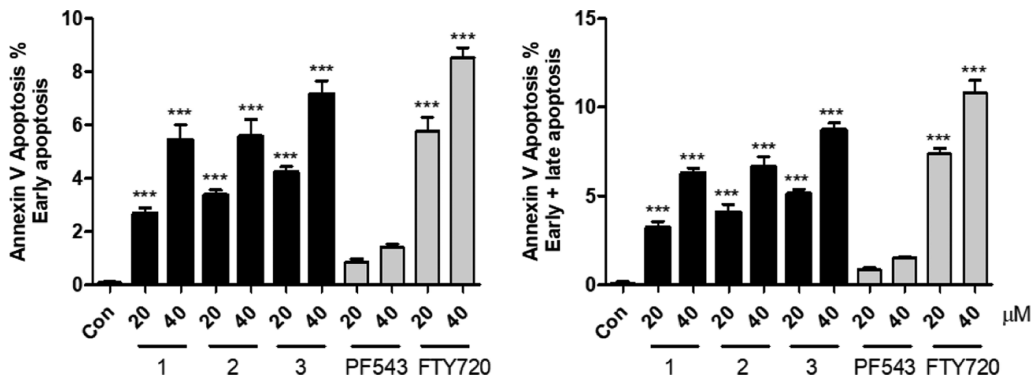


Figure 3. Apoptosis effects of compounds in pancreatic cancer cells. The MIAPaCa2 cells were treated with compounds **1-3**, PF-543, and FTY720. Cell apoptosis assay was determined by annexin-V assay and presented as early (left) and early+late (right) apoptosis.

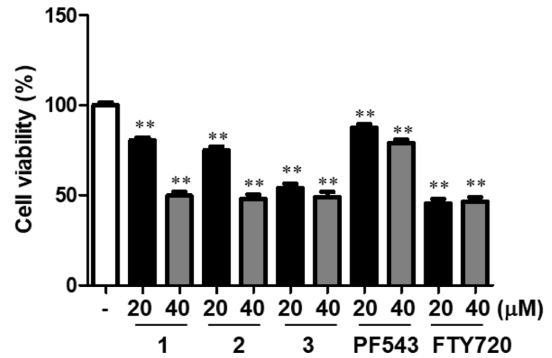


Figure 2. Cytotoxic effects of compounds in pancreatic cancer cells. The cell viability of MIAPaCa2 with treatment of compounds **1-3** for 24 h was measured by MTT cell viability assay.

체 **1-3**모두 췌장암세포에서의 세포사멸 효과가 PF-543에 비해 개선되었다. 화합물 **3**은 20과 40 μM 의 농도에서 모두 다른 화합물에 비해 초기 및 후기 세포사멸능을 증가시키는 것으로 관찰되었다. 이 결과는 세포사멸 실험에서 화합물 **3**이 화합물 **1** 및 **2**에 비해 낮은 농도에서 효과를 나타냈던 것과 일치하는 결과이다. 따라서 본 실험결과 새롭게 합성된 화합물은 세포사멸사를 통해 세포사멸 효과를 나타내고 화합물 **3**의 효과가 가장 우수함을 알 수 있었다.

PF-543과 FTY720의 유사체인 화합물 **1-3**이 스피핑고신 키나아제 활성에는 어떠한 영향을 미치는지 검증하였다. 화합물 **1** 및 **2**는 SK1에 대한 선택성을 나타냈으며 각각 약 84% 및 51% SK1의 활성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 세포사멸 효과에서는 강력한 효과를 나타내었던 화합물 **3**은 스피핑고신 키나아제 억제 효능이 나타나지 않았다. 따라서 화합물 **3**의 효능은 SK억제능 외의 다른 경로를 통해 세포사멸 효능을 가질 수 있음을 시사한다.

FTY720은 스피핑고신 키나아제를 매개로한 암세포 사멸

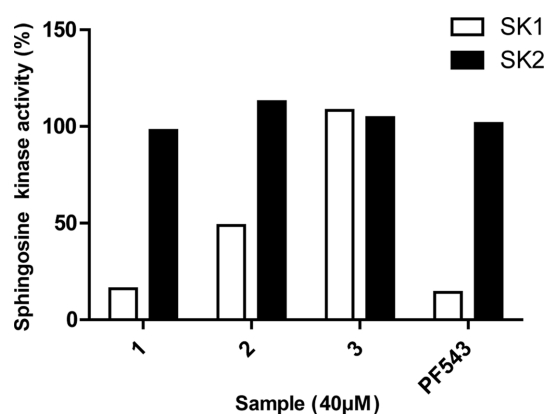


Figure 4. SK1 and SK2 activity of compounds 1–3 and PF-543.

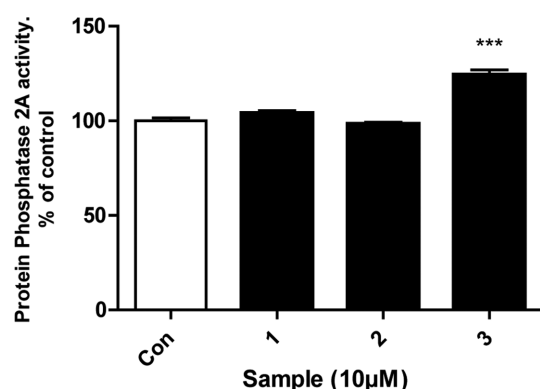


Figure 5. Effect of compound 1–3 on PP2A activity.

효과와는 별개로 PP2A를 매개로 항암활성이 있음이 잘 알려져 있다. PP2A의 활성증가는 암세포의 사멸을 촉진하는 것으로 알려져 있으며 따라서 본 실험에서는 화합물 3종의 PP2A 활성을 관찰하였다(Fig. 5). 본 실험결과 화합물 3에서 PP2A 활성이 증가하였다. 따라서 화합물 3에 의한 세포사멸 효과는 스팅고신 키나아제를 매개로 하는 것이 아니라 PP2A 활성을 매개로 나타남을 알 수 있었다.

실 험

시약 및 기기

상업적으로 구입 가능한 시약을 이용하여 반응을 진행하였다. 반응의 진행은 TLC (silica gel 60 F254)를 이용하여 확인하였다. Column chromatography는 silica gel grade 60 (230–400 mesh)에서 진행되었다. 생성물의 구조 확인을 위해 ^1H NMR과 ^{13}C NMR은 JEOL ECZ500R (JEOL Co., Tokyo, Japan)를 사용하였으며 중수소 용매를 사용하여 500과 125 MHz에서 각각 측정하였다. 췌장암 세포주인 MIA PaCa2는 한국세포주 은행에서 제공받았다. SK활성

은 Echelon Biosciences로부터 구입했다. EZ-CYTOX kit는 두젠바이오에서 구입했으며 Multiskan GO 장비를 이용하여 측정하였다. DMEM, trypsin-EDTA 0.25% 및 penicillin-streptomycin(PS)은 GE Healthcare Life Sciences Hyclone Laboratories에서 구입했다. ApoScan™ annexin V-FITC는 BioBud에서 구입했다. PP2A activity kit은 Millipore Corporation에서 구입했다.

FTY720 유도체의 합성

4-((4-Octylphenoxy)methyl)benzaldehyde (4). 50 mL 둥근바닥플라스크에 4-octylphenol (500 mg, 2.42 mmol)을 넣고 여기에 THF (20 mL)과 K_2CO_3 (1.0 g, 7.27 mmol), 4-(bromomethyl)benzaldehyde (578 mg, 2.90 mmol)를 순서대로 넣고 상온에서 12시간 동안 교반하였다. H_2O , ethyl acetate로 반응을 종결하고 brine과 MgSO_4 로 건조하고 용매를 감압 건조하였다. 반응물을 column chromatography (*n*-hexane: EtOAc=5:1)로 분리하여 화합물 4 (557 mg, 71%)를 얻었다. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.99 (s, 1H), 7.86 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.76 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.50 (s, 2H), 2.55–2.48 (m, 2H), 1.62–1.51 (m, 2H), 1.36–1.20 (m, 10H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 192.1, 153.6, 144.5, 136.1, 135.2, 130.4, 129.8, 129.5, 115.2, 35.2, 32.1, 32.0, 31.9, 29.6, 29.4 (2C), 22.8, 14.2.

(R)-1-(4-((4-Octylphenoxy)methyl)benzyl)pyrrolidin-2-yl)methanol (1). 50 mL 둥근바닥플라스크에 화합물 4 (50 mg, 0.15 mmol)를 넣고 1,2-dichloroethane (8 mL)에 녹인 후 sodium triacetoxyborohydride (65 mg, 0.31 mmol)를 넣었다. 여기에 (R)-(-)-prolinol (46 mg, 0.45 mmol)을 넣고 상온에서 12시간 교반하였다. H_2O , Ethyl acetate로 반응을 종결하고 brine과 MgSO_4 로 건조하고 용매를 감압 건조하였다. 반응물을 column chromatography (dichloromethane: MeOH=10:1)로 분리하여 화합물 1 (41 mg, 67%)을 얻었다. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.49 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.86 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.41 (dd, J = 13.1, 2.9 Hz, 2H), 3.97–3.90 (m, 1H), 3.85–3.78 (m, 1H), 3.63–3.55 (m, 2H), 2.94 (tt, J = 11.2, 8.3 Hz, 1H), 2.54–2.49 (m, 2H), 2.08–1.93 (m, 4H), 1.57–1.51 (m, 2H), 1.32–1.18 (m, 10H), 0.85 (t, J = 7.0 Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 156.6, 139.7, 138.2, 135.8, 131.7 (2C), 129.4, 128.9, 128.2, 114.6, 69.3, 65.5, 62.9, 60.8, 53.9, 35.1, 31.9, 31.8, 29.6, 29.4 (2C), 26.5, 22.8, 14.2.

1-(4-((4-Octylphenoxy)methyl)benzyl)piperidin-4-ol (2). 화합물 1과 같은 합성방법으로 같은 출발물질과 4-

hydroxypiperidine을 사용하여 화합물 **2** (50 mg, 82%)를 합성하였다. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.61 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.66–3.57 (m, 1H), 3.24–3.05 (m, 4H), 2.55–2.49 (m, 2H), 1.95–1.82 (m, 4H), 1.60–1.49 (m, 2H), 1.29–1.20 (m, 10H), 0.86 (t, $J=7.0$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 156.6, 138.3, 135.8, 133.7, 131.5, 129.4, 128.1, 126.3, 114.6, 69.4, 67.3, 64.7, 43.0, 36.7, 35.2, 34.6, 33.4, 31.9 (2C), 29.6, 29.4 (2C), 22.8, 14.2.

(1-(4-((4-Octylphenoxy)methyl)benzyl)piperidin-4-yl)methanol (3). 화합물 **1**과 같은 합성방법으로 같은 출발물질과 4-piperidinmethanol을 사용하여 화합물 **3** (49 mg, 77%)을 합성하였다. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.08 (s, 2H), 3.54 (d, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.45–3.36 (m, 2H), 2.68–2.55 (m, 2H), 2.55–2.48 (m, 2H), 1.99–1.83 (m, 4H), 1.55 (dt, $J=15.0, 7.5$ Hz, 2H), 1.30–1.22 (m, 10H), 0.86 (t, $J=7.0$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 156.6, 135.8, 131.6, 130.3, 129.4, 128.2, 122.0, 114.6, 69.4, 65.6, 64.7, 54.3, 35.2, 31.9, 31.8, 29.6, 29.4 (2C), 26.2, 22.8, 14.2.

세포배양 및 사멸 관찰

쥐장암 세포주인 MIAPaCa 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin 및 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin 가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 배양하였다. 세포 사멸 실험을 위해 3000개의 세포를 96 wells plate에 100 μl 씩 첨가하였다. 세포에 화합물 **1**, **2** 및 **3**과 대조군 PF-543 및 FTY720을 20 및 40 μM 의 농도로 첨가한 후 24 h 후 EZ-CYTOX kit을 이용하여 세포 사멸 여부를 관찰하였다.

세포 사멸능 관찰

MIAPaCa 세포에 약물을 처리하고 12 h 후 세포를 추출한 후 세척하고 annexin-V-FITC 및 propidium iodide를 첨가하여 상온에서 배양한 후 염색된 세포를 Macs Quanta Analyzer 10 이용하여 측정하고 MACSQuantify™ version 2.8 software를 이용하여 분석하였다.

스핑고신 키나아제 억제효과 측정

SK 활성은 제공자의 설명에 따라 Echelon SK activity kit를 사용하여 측정하였다.

PP2A 활성 측정

PP2A 활성 측정은 판매회사에서 제시하는 방법대로

측정하였다. 간단하게 설명하면 세포추출액에 PP2A 항체와 protein A agarose를 넣고 2시간 동안 4 °C에서 반응시켰다. Phosphopeptide 용액을 넣고 30 °C에서 10분간 반응시킨 후 원심분리 한 후 상층액을 얻어 malachite green phosphate 용액을 동량 넣는다. 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결론

보고된 다른 SK 저해제에 비해 상대적으로 높은 SK1 저해효과를 보이는 PF-543은 낮은 항암활성에도 불구하고 신규 SK 저해제를 개발하는데 구조적인 활용가치가 높은 물질이다. FTY720은 SK1 저해효과를 나타내고 있으나 SK2에 의해 FTY720-P로 변형되어 직접적으로 항암제 개발되기 어려운 물질로 알려져 있다. 우리는 이번 연구에서 PF-543과 FTY720의 구조를 모두 활용하여 매우 간단한 합성방법으로 신규한 유도체 **1-3**을 합성하였다. 합성된 화합물은 모두 쥐장암세포에서의 PF-543의 낮은 항암활성을 개선하였다. 화합물 **1**과 **2**는 SK1 저해효과를 나타냈으나 화합물 **3**은 SK 저해효과를 보이지 않았으며 다른 화합물과 다르게 PP2A를 활성화 시켰다. 이는 화합물이 SK1을 저해하고 PP2A를 활성화 시키는 FTY720 구조 backbone을 가지고 있음에도 head group의 작은 구조적 차이에 따라 SK 저해효과와 PP2A 활성화변화에 큰 차이가 있음을 보여준다. FTY720과 ROME이 head group의 작은 구조 차이에도 SK1/2의 선택성에 큰 영향을 미치는 것과 유사한 결과이며 FTY720 유사체 설계에 있어서 head group의 변화에 따라서 다양한 생물학적 결과를 얻을 수 있음을 보여준다.

Acknowledgments. 본 논문은 2019학년도 목포대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Ogretmen, B. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 33.
- Sanllehi, P.; Abad, J. L.; Casas, J.; Delgado, A. *Chem. Phys. Lipids* **2016**, *197*, 69.
- Maceyka, M.; Harikumar, K. B.; Milstien, S.; Spiegel, S. *Trends Cell Biol.* **2012**, *22*, 50.
- Patmanathan, S. N.; Wang, W.; Yap, L. F.; Herr, D. R.; Paterson, I. C. *Cell. Signal.* **2017**, *34*, 66.
- Chan, H.; Pitson, S. M. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1831*, 147.
- White, C.; Alshaker, H.; Cooper, C.; Winkler, M.; Pchejetski, D. *Oncotarget* **2016**, *7*, 23106.
- Schnute, M. E.; McReynolds, M. D.; Kasten, T.; Yates,

- M.; Jerome, G.; Rains, J. 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.
8. Pitman, M. R.; Costabile, M.; Pitson, S. M. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 1349.
9. Schnute, M. E.; McReynolds, M. D.; Carroll, J.; Chrencik, J.; Highkin, M. K.; Iyanar, K.; Jerome, G.; Rains, J. W.; Saabye, M.; Scholten, J. A.; Yates, M.; Nagiec, M. M. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2562.
10. Kim, S. B.; Lee, T.; Moon, H. S.; Ki, S. H.; Oh, Y. S.; Lee, J.-Y.; Kim, S.-B.; Park, J.-E.; Kwon, Y.; Kim, S.; Baek, D. J.; Park, E.-Y. *Molecules* **2020**, *25*, 2484.
11. Kim, S. W.; Lee, T.; Oh, Y. S.; Shin, S. M.; Lee, J.-Y.; Kim, S.; Baek, D. J.; Park, E.-Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2019**, *67*, 599.
-