

셀레콕시브 및 그 합성유도체들의 항암활성 스크리닝

박정란 · 강진형¹ · 구효정[†] · 노지영² · 류형철² · 박상욱² · 고동현² · 조일환² · 이주영³ · 황다니엘³ · 김인경

가톨릭의과학연구원, ¹가톨릭암센터, ²CJ(주) 종합기술원, ³캘리포니아대학 (데이비스)

(2003년 3월 4일 접수 · 2003년 4월 7일 재심사 · 2003년 6월 10일 승인)

Screening of Anticancer Potential of Celecoxib and its Derivatives

Jeong-Ran Park, Jin-Hyoung Kang¹, Hyo-Jeong Kuh[†], Ji Young Noh², Hyung-Chul Ryu², Sang-Wook Park², Dong-Hyun Ko², Il Hwan Cho², Joo Y. Lee³, Daniel H. Hwang³ and In-Kyung Kim

Catholic Res Inst of Med Sci, ¹Catholic Cancer Center, The Catholic Univ of Korea, Seoul

²Inst of Sci & Tech, CJ Corp., Ichon, South Korea

³Dept of Nutrition, Univ of California, Davis, and Western Human Nutrition Res Ctr, ARS-USDA, Davis, CA, USA

(Redeived March 4, 2003 · Revised April 7, 2003 · Accepted June 10, 2003)

ABSTRACT—Selective COX (cyclooxygenase)-2 inhibitors including celecoxib have been shown to induce apoptosis and cell cycle changes in various tumor cells. New inhibitors are recently being developed as chemomodulating agents. We evaluated celecoxib and screened 150 synthetic compounds for anti-proliferative activities *in vitro*. Effects of celecoxib on COX activity, cell growth, cell cycle distribution, and apoptosis induction were determined in A549 COX-2 overexpressing human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. The COX inhibition of celecoxib increased with concentration up to 82% at 1 μ M after 24 hr exposure. Forty μ M and 50 μ M of celecoxib induced G₁ arrest, and TUNEL-positive apoptotic cells, respectively. Among 150 compounds, several compounds were selected for having greater COX-2 inhibitory activity and higher selectivity than celecoxib with growth inhibitory activity. Celecoxib showed concentration-dependent COX inhibitory activity, and ability to induce cell cycle arrest and apoptosis in human NSCLC cells *in vitro*. Among synthetic analogues screened, several compounds showed promising *in vitro* activity as COX-2 inhibitory anticancer agents, which warrant further evaluation *in vitro* and *in vivo*.

Key words—Celecoxib, COX-2 inhibitors, Anti-proliferative activity, Cell cycle arrest, Apoptosis

Cyclooxygenase (COX) 단백질은 세포막에서 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)로 전환시키는 효소이며, PGs는 생체 내에서 여러 생리적, 병리적 과정에 중요한 역할을 한다. COX는 인체 내에서 두 가지 isoform으로 존재한다. COX-1은 정상조직 세포에서 발현되어 인체의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 이외는 대조적으로, COX-2는 성장인자(EGF, VEGF, FGF), cytokines(TNF- α , IL- α , IL-1 β), 발암촉진자(v-srg, v-Ha-ras, HER-2/neu, Wnt), 및 염증반응에 의하여 발현된다. 항염증 진통제인 아스피린 등의 비스테로이드 소염제 (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)는 2 가지 COX의 활성을 비특이적으로 억제하기 때문에 체내 COX-1-의존적인 항상성을 파괴하여 위장관 출혈, 신기능 장애 등을 유발한다. 이러한 부작용을 피하기 위해 COX-2의 활성을 선택적으로 억제하는 분자 표적 약물이 개발 되어 왔다.

COX-2와 대장암과의 관련 가능성이 역학조사자료에 의해 처음으로 제시된 이후 COX-2 발현의 증가가 대장암 뿐만 아니라 인체 여러 종양조직에서 관찰되었으며 COX-2와 대장암과의 관련성을 증명하는 실험적 증거들이 보고되었다: (1) COX-2가 과발현되는 장 상피세포는 세포자연사에 대한 저항성이 증가하지만, COX-2 저해제에 의해 세포자연사가 유도된다; (2) APC^{Min} 쥐와 발암물질에 의한 대장암 모델에서 NSAIDs와 선택적 COX-2 저해제가 대장 종양발생을 억제한다; (3) 수 많은 대장 종양이 발생하는 FAP (familial adenomatous polyposis)와 유사한 APC^{A716} 쥐와 COX-2 유전자 파괴 쥐를 교배 시켰을 때 종양의 수와 크기가 상당히 줄어들었다.¹⁾ 최근의 연구들은 COX-2가 암 진행과정에서 VEGF, iNOS, TIE-2, IL-6와 같은 혈관신생촉진인자를 유도하여 종양-특이적 혈관신생을 촉진하고 세포자연사를 억제하여 암전이에도 관여하고 있음을 보여주고 있다.²⁾

선택적 COX-2 억제제의 항증식효과는 세포주기 저해와 세포자연사에 의한 것으로 생각된다. Celecoxib, NS-398 등의 선택적 COX-2 억제제는 HT-29 이외에 여러 대장암 세

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02-590-2422, E-mail : hkuh@catholic.ac.kr

포주에서 G₀/G₁ 주기 축적을 일으키고 Bcl-2 억제제를 통해 세포자연사를 유도하는 반면,³⁾ nimesulide는 비소세포폐암 세포에서 Bcl-2와 Bax 발현에는 변화 없이 세포자연사를 유도한다는 연구결과도 있다.⁴⁾ 이처럼 선택적 COX-2 억제제의 항증식효과의 세부 기전에 대해서는 아직까지 정확한 결론이 없다.

COX 단백질은 상피 성장인자 부위, 세포막 결합 부위, 그리고 촉매 부위로 구성된다. 두 가지 COX는 촉매작용 활성 부위를 포함하여 75%가 구조적으로 동일하지만, 아미노산 523번 위치가 COX-1은 isoleucine, COX-2는 valine으로 구성되어 있다는 것이 중요한 차이점이다. 아스피린은 serine⁵³⁰에 비가역적으로, NSAIDs는 tyrosine³⁵⁵ 또는 arginin¹²⁰에 가역적으로 결합하는 반면, 선택적 COX-2 억제제의 sulfur-containing side chain (celecoxib의 경우 benzenesulfonamide ring)은 COX-2의 valine⁵²³ side chain에 의해 형성된 포켓에 결합하여 높은 COX-2 선택성을 나타낸다⁵⁾. 이러한 정보들을 바탕으로 항암효과를 가지는 선택적 COX-2 억제제들을 개발하고 이들을 방사선치료나 기존의 항암제와 병용하여 보다 효율적인 암 치료요법에 이용하려는 노력들이 활발하다.

따라서 본 연구는 선택적 COX-2 억제 유도체들을 합성하여 항암효과를 가지는 화합물을 탐색하고자 하였다. 우선, 선택적 COX-2 억제제로서 항암효과가 알려진 celecoxib의 COX-2 저해능과 항암효과의 세부기전인 세포주기 저해효과 및 세포자연사 유도를 분석하고자 하였다. 또한 *in vitro* 스크리닝 체계에서 celecoxib를 대조약물로 사용하여 합성 유도체들의 PGE₂ 생성 억제효과, COX-2 선택성, 그리고 세포 독성 효과를 비교 평가하였다.

실험방법

세포 및 시약

인체 비소세포폐암 세포주인 A549와 인체 대장암 세포주인 HT-29는 한국 세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받았다. A549와 HT-29 세포는 각각 10% FBS (GIBCO BRL, USA), penicillin (100 unit/ml), streptomycin (100 µg/ml)이 함유된 DMEM (GIBCO BRL, USA)과 RPMI 1640 (GIBCO BRL, USA)으로 계대 배양하였다. 배양기에는 5% CO₂와 95% 공기가 공급되었고 36.5°C의 온도와 95%의 습도가 유지되도록 하였다. 합성 유도체들의 COX-2 활성 저해도를 스크리닝하기 위하여, COX-1과 COX-2를 모두 발현하지 않는 인체 대장암 세포주 HCT-116에 COX-1, COX-2 cDNA 각각을 transfection한 subcell lines(HCT-116 vector, HCT-116 COX-1 flag, HCT-

116 COX-2 flag)을 사용하였다. 이들 HCT-116 subcell line 들은 G418 (800 µg/ml) (GIBCO BRL, USA), penicillin (100 unit/ml), streptomycin (100 µg/ml), NaHCO₃ (2.2 g/L) 및 10% FBS를 포함하는 McCoy's 5A 배지 (Sigma Chemical Co., USA)로 계대배양 하였다. 선택적 COX-2 저해제인 celecoxib와 후보 유도 화합물들은 CJ(주) 종합기술원 (Inst of Sci & Tech, CJ Corp., Ichon, Korea)에서 합성되어 제공되었으며, DMSO에 용해하여 사용하였다.

COX 활성도 측정

A549 세포에서 COX-2 활성 저해의 농도의존성을 평가하기 위해 여러 농도의 celecoxib를 첨가한 후 5 µM arachidonic acid (Cayman Chem. Co., USA)를 처리하여 24 hr 동안 배양하는 조건에서 PGE₂ 생성 저해를 측정하였다. 합성 유도체들의 COX-1 및 COX-2 활성 저해는 각각 HCT-116 COX-1 flag 및 COX-2 flag 세포주에서 PGE₂ 생성 저해정도로 측정하였다. HCT-116 COX-1 flag (7,000 cells/well), COX-2 flag (1,000 cells/well)을 96 well plate에서 24 hr 배양 후, 각각 1 µM과 0.1 µM 약물 농도로 처리하고, 1 hr 후에 5 µM arachidonic acid를 가하여 24 hr 동안 배양하였다. 배양액을 원심분리하고 분석 때까지 -20°C 냉동고에 보관한 후, PGE₂ EIA kit (Cayman Chem. USA)로 분석하였다.

세포독성 효과

96 well plate에 각각 2,000개, 5,000개의 A549 또는 HT-29 세포를 분주하여 24 hr 배양 후, 다양한 약물 농도로 처리하여 72 hr 재배양 하였다. 모든 처리 조건의 DMSO 농도는 세포의 성장에 영향을 미치지 않는 0.2%로 일정하게 유지시키고, sulforhodamin B (SRB, Sigma Chemical Co., USA) assay를 사용하여 세포독성을 측정하였다. 간략히 기술하면 약물처리 후 10% trichloroacetic acid 100 µl를 이용하여 4°C에서 1 hr 고정하였다. 0.4% SRB 용액 70 µl로 10 min 동안 염색한 후, 1% glacial acetic acid로 세척하고 건조시킨 후 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 200 µl에 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 및 PGE₂ 생성 저해도는 Emax 모델(Eq. 1)을 이용하여 IC₅₀ 등의 파라미터를 산출하였다.⁶⁾

$$\% \text{ Cell Viability} = (100 - R) \times \left(1 - \frac{[D]^m}{K_d^m + [D]^m} \right) + R \quad (\text{Eq. 1})$$

여기에서 [D]는 약물농도, K_d는 흡광도에서 50%의 감소를 유발하는 약물 농도, (i.e. IC₅₀), m은 Hill-type coefficient, 및 R은 residual unaffected fraction (the resistant fraction) 이다.

세포주기 분포

100 mm 원형 세포배양 접시에 1×10^6 개의 세포를 24 hr 선배양한 후 약물에 72 hr 까지 노출시키면서 세포주기 분포의 변화를 측정하였다. 해당 시간에 세포들을 수집하여 50% methanol/PBS 5 ml로 고정한 후 분석시까지 -20°C 냉동고에 보관하였다. 분석 당일 5×10^6 개의 세포들을 37°C , 1 ml boiled RNase A (1 mg/ml) 용액에서 30 min간 반응시키고 얼음에서 2 ml ethidium bromide ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)로 DNA를 염색한 후 유세포분석기 (FACScan™, Becton & Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)와 Modifit® (Verity, Topsham, ME, USA)을 이용하여 분석하였다.

세포자연사멸

100 mm 원형 세포배양 접시에 5×10^5 개 세포를 배양하여 약물에 노출 시킨 후 해당 시간에 세포들을 수집하였다. 세포사멸을 TUNEL assay (APO-Direct™ Kit, Pharmingen Co, CA, USA)를 이용하여 측정하였으며, 회사에서 제공된 프로토콜에 따라 실험하였다. 약물노출 후 수집된 세포를 1% (w/v) paraformaldehyde 5 ml에 첨가하여 15 min 동안 고정한 후, 4°C 의 70% ethanol에 모아 분석시까지 -20°C 에 보관하였다. 분석 당일 70% ethanol을 제거한 후 $50 \mu\text{l}$ 염색시약을 첨가하여 37°C 에서 1 hr 동안 반응시켰다. 그 후 1.0 ml 완충액으로 세척하고, PI/RNase A로 30 min 동안 다시 반응시켜 유세포분석기로 분석하였다.

데이터 분석

합성화합물들의 COX-1 및 COX-2 의 활성저해도는 다음과 같이 계산하였다. % inhibition은 (Eq. 2)과 (Eq. 3)를 이용하여

$$\% \text{ inhibition} = \left(\frac{[\text{PGE}_{2,\text{con}}] - [\text{PGE}_{2,\text{drug}}]}{[\text{PGE}_{2,\text{con}}]} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{IR (Inhibition Ratio)} = \frac{\% \text{ inhibition of a test drug}}{\% \text{ inhibition of celecoxib}} \quad (\text{Eq. 3})$$

$[\text{PGE}_{2,\text{con}}]$ 은 약물을 처리하지 않은 대조 샘플들의 PGE_2 농도이고 $[\text{PGE}_{2,\text{drug}}]$ 은 약물처리된 샘플의 PGE_2 농도이다. 대조약물 celecoxib의 % inhibition을 기준으로 후보 유도체 화합물들의 저해효과를 inhibition ratio (IR)로 비교하였다. COX-1과 COX-2의 IR를 비교하여 COX-2에 대한 선택성을 selectivity ratio (SR)로 평가하였다(Eq. 4).

$$\text{SR (Selectivity Ratio)} = \frac{\text{IR}_{\text{COX-2}}}{\text{IR}_{\text{COX-1}}} \quad (\text{Eq. 4})$$

$\text{IR}_{\text{COX-2}}$ 는 COX-2에 대한 IR 값이고, $\text{IR}_{\text{COX-1}}$ 은 COX-1에 대한 IR값으로 (Eq. 3)에서 얻어진 것이다. SR의 값이 1.0 보다 크면 celecoxib보다 COX-2에 대한 선택성이 높고, 1 보다 작으면 선택성이 낮다는 것을 의미한다.

결 과

Celecoxib의 PGE_2 저해효과

COX-2를 과발현하는 폐암 세포주 A549에서 선택적 COX-2 억제제인 celecoxib의 PGE_2 생성 억제효과의 농도의존성을 살펴보았다(Figure 1). Celecoxib의 농도를 최고 $10 \mu\text{M}$ 까지 다양하게 24 hr 동안 처리하여 PGE_2 억제 효과를 관찰한 결과, 농도 의존적 PGE_2 생성저해를 보였다. 최대 PGE_2 생성저해는 $1 \mu\text{M}$ 에서 82%까지 도달했으며 이후 $10 \mu\text{M}$ 까지 농도를 증가해도 저해도에는 $1 \mu\text{M}$ 과 차이가 관찰되지 않았다.

Celecoxib의 세포독성효과

COX-2를 과발현하는 A549 및 HT-29에서 celecoxib의 세포증식 억제효과를 알아보았다(Figure 2). 이들 세포에서 celecoxib를 72 hr 동안 처리한 결과 $10 \mu\text{M}$ 이상의 농도에서 유의한 세포독성을 관찰할 수 있었다. 두 세포주에서 celecoxib의 세포독성 효과는 유사하였으며, 이들의 IC_{50} 는 A549와 HT-29에서 각각 $23.2 \pm 4.56 \mu\text{M}$, $29.3 \pm 3.44 \mu\text{M}$ 이었다. 다른 선택적 COX-2 저해제인 valdecoxib의 IC_{50} 은 A549와 HT-29에서 각각 $63.9 \pm 1.26 \mu\text{M}$ 과 $41.3 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 의

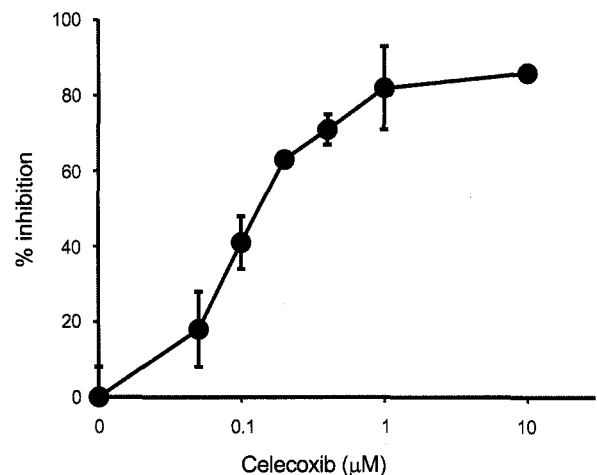


Figure 1—Inhibition of COX activity induced by celecoxib in A549 cells. COX inhibition was determined as reduced production of PGE_2 after exposure to various concentrations of celecoxib up to $10 \mu\text{M}$ for 24 hr. Data were expressed in mean \pm SD of three independent experiments.

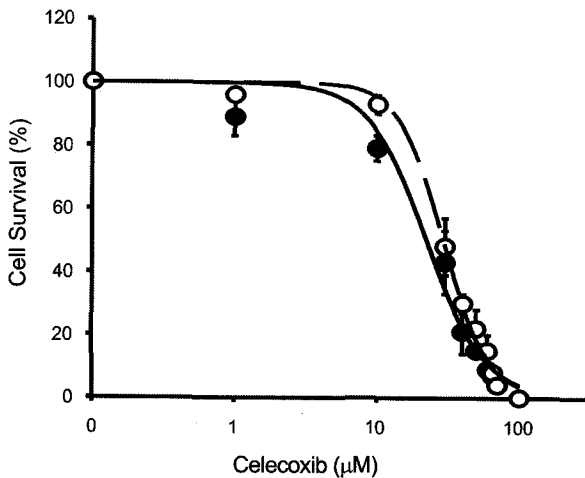


Figure 2—Cytotoxicity induced by celecoxib. A549(●) and HT-29 (○) cells were exposed to celecoxib for 72hr. IC₅₀ was determined from each dose-response curve using E_{max} model(Eq. 1). Data were expressed in mean±SD of three independent experiments.

로 관찰되어 (data not shown) 이 두 세포주에서 celecoxib가 valdecoxib보다 유의하게 높은 세포독성을 가지는 것으로 관찰되었다(P<0.05).

Celecoxib의 세포주기 억제효과

A549 세포에서 celecoxib 40 μM을 72 hr 처리하여 세포주기 분포변화를 알아보았다. 약물처리 전 A549의 세포주기 분포는 G₁은 46.7±0.90%, S는 37.3±1.51%, G₂/M은 15.9±0.61%이었고 celecoxib 40 μM을 72 hr 처리한 경우 G₁이 18.4% 증가하였고 S기는 10.7% 감소하였다(Figure. 3A). HT-29 세포를 40 μM celecoxib에 노출시킨 경우에서도 G₁의 분포는 15.6%가 증가하였으며 16.5%의 S주기 감소를 보여 A549에서와 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 20 μM의 celecoxib는 두 세포에서 모두 유의한 변화를 유발하지 않았다.

세포자연사 유도효과

A549에서 celecoxib 20 μM 처리시 72 hr 까지 세포자연사 유도가 관찰되지 않았고(data not shown), 50 μM 처리 시에는 24 hr 이후 점차 증가하여 72 hr에서 13.1%의 세포사멸이 관찰되었다(Figure 3B).

합성 유도체 스크리닝

HCT-116 유래 세포주가 합성유도체들의 COX 저해 효과 및 세포독성 스크리닝에 적합하지 여부를 결정하기 위해 이들 세포주에서 celecoxib의 PGE₂ 저해 효과와 세포독성을 평가하였다(Table I). 이 세포들에서 celecoxib의 COX 활성

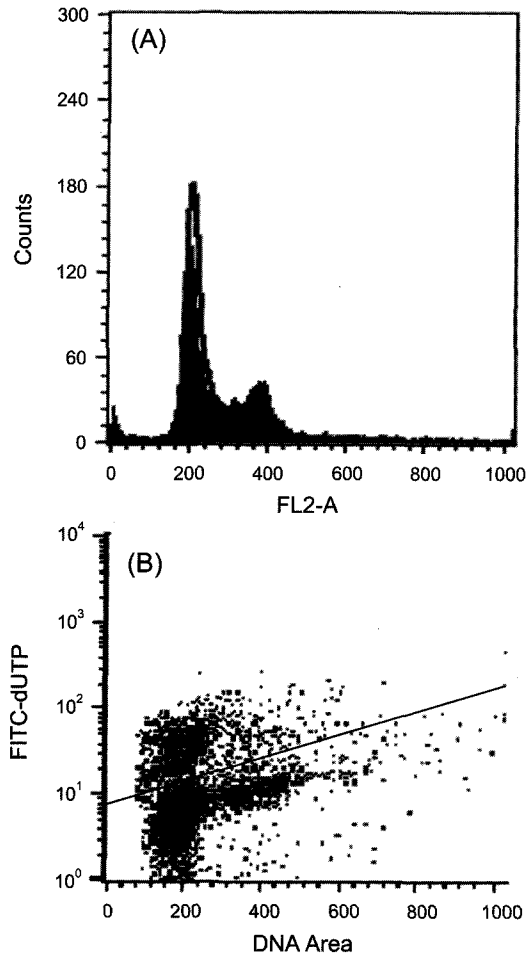


Figure 3—Representative data of cell cycle arrest (A) and apoptosis cells (B) induced by celecoxib in A549 cells. (A) Cells were exposed to 40 μM of celecoxib for 72 hr. Filled area and gray line represents the control and treated cell population, respectively. (B) Cells were exposed to 50 μM of celecoxib for 72 hr and analyzed using flow cytometry with TUNEL/PI staining for simultaneous determination of apoptotic fraction and DNA content. Population above the line represents the apoptotic fraction (13.1%), respectively.

Table I—Cytotoxicity and COX Inhibition Induced by Celecoxib in COX-1, COX-2 cDNA Transfected HCT-116 Cell Lines

Cell lines	*IC _{50,COX} (μM)	†IC ₅₀ (μM)
HCT-116 Vector	—	7.26±1.13
HCT-116 COX-1 flag	0.485	6.42±0.45
HCT-116 COX-2 flag	0.039±0.012	6.91±0.02

*IC_{50,COX} of PGE₂ inhibition was determined following drug treatment for 24 hr.

†IC₅₀ of cytotoxicity induced by celecoxib was determined following drug treatment for 72 hr.

저해의 IC₅₀은 HCT-116 COX-1 flag 및 HCT-116 COX-2 flag에서 각각 0.485 μM과 0.039 μM로 나타났다. 따라서 합성유도체들의 COX 활성 억제효과는 각각의 세포에서

Table II—Inhibitory Activity on COX and Cytotoxicity of Some Selected Compounds. The Degree of COX-1, COX-2 Inhibition and COX-2 Selectivity are Expressed Using IR_{COX-1} , IR_{COX-2} and SR, Respectively, and Cytotoxicity Using % Growth Inhibition at Predetermined Concentrations

Compd*	PGE ₂ inhibition			§Cytotoxicity (%)	
	[†] IR_{COX-2}	[†] IR_{COX-1}	[‡] SR	A549	HT-29
Compd 1	0.77	0.59	1.31	48	38
Compd 2	1.57	0.94	1.67	54	62
Compd 9	1.26	0.96	1.31	46	39
Compd 89	1.05	0.97	1.08	—	—
Compd 97	1.00	0.35	2.84	—	—
Compd 99	1.26	0.87	1.44	—	—
Compd 100	1.05	0.41	2.56	—	—
Compd 101	1.04	0.93	1.12	—	—
Compd 102	1.13	1.04	1.08	35	26
Compd 113	0.95	0.04	23.63	24	22
Compd 117	0.76	0.24	3.17	21	18
Compd 130	0.99	0.77	1.28	79	50
Compd 134	0.94	0.39	2.40	—	—
Compd 135	1.08	0.54	1.99	63	52
Compd 136	0.84	0.20	4.18	70	39

[†] IR_{COX-2} , [†] IR_{COX-1} are inhibition ratio for COX-2 and COX-1, calculated as a ratio of % inhibition of COX-2 or COX-1 activity induced by each compound compared to that of celecoxib. The COX-2 and COX-1 activity was measured as PGE₂ production in HCT-116 COX-2 flag and COX-1 flag cell lines at 0.1 μ M and 1.0 μ M of the compound respectively (Eq. 3).

[‡]SR: Selectivity ratio of COX inhibition, calculated as a ratio of IR_{COX-2} to IR_{COX-1} (Eq. 4).

§Cytotoxicity was determined as % growth inhibition in cells exposed to 30 μ M of each compound compared to the control.

*IUPAC names for compounds are 1: 6-(5-p-Tolyl-3-trifluoromethyl-pyrazol-1-yl)-pyridine-3-sulfonic acid amide; 2: 6-(5-(4-Chloro-phenyl)-3-trifluoromethyl-pyrazol-1-yl)-pyridine-3-sulfonic acid amide; 9: 6-(5-(4-Methoxy-phenyl)-3-trifluoromethyl-pyrazol-1-yl)-pyridine-3-sulfonic acid amide; 89: 4-(4-Bromo-phenyl)-5-(4-methanesulfonyl-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione; 97: 5-(4-Methanesulfonyl-phenyl)-4-p-tolyl-[1,2]dithiole-3-thione; 99: 5-(4-Methanesulfonyl-phenyl)-4-(4-methoxy-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione; 100: 5-(4-Methanesulfonyl-phenyl)-4-(2-trifluoromethyl-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione; 101: 4-(4-Chloro-phenyl)-5-(4-methanesulfonyl-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione; 102: 4-(3,4-Dichloro-phenyl)-5-(4-methanesulfonyl-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione; 113: 4-(4-Ethoxy-phenyl)-5-(4-methanesulfonyl-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione; 117: 5-(4-Methanesulfonyl-phenyl)-4-(2-nitro-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione; 130: 4-(2,4-Dichloro-phenyl)-5-(4-methanesulfonyl-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione; 134: 4-(2-Fluoro-phenyl)-5-(4-methanesulfonyl-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione; 135: 4-(2,4-Difluoro-phenyl)-5-(4-methanesulfonyl-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione; 136: 4-(3,4-Difluoro-phenyl)-5-(4-methanesulfonyl-phenyl)-[1,2]dithiole-3-thione.

0.1 μ M 또는 1 μ M를 24 hr 처리 후 측정하였다. Celecoxib에 의해 유도되는 세포독성은 HCT-116 vector 세포, HCT-116 COX-1 flag, 및 HCT-116 COX-2 flag세포에서 6.42-7.26 μ M 사이의 유사한 IC_{50} 을 나타내어 COX-2 발현 정도와 세포독성간의 상관성을 보이지 않았다. 따라서 합성유도체들의 세포독성은 COX-2를 과발현하는 A549세포와 HT-29 세포에서 측정하였다.

합성화합물들의 COX-2 활성 inhibition ratio (IR)가 0.7 이상 일 때 유의적이라고 결정하였고, COX-1 활성 억제효과와 비교한 selectivity ratio (SR)>1.0 일 때 유의한 화합물로 분류하였다. Table II는 150개의 합성유도체들 중 주요 15개 화합물의 PGE₂ 생성 억제 효능과 세포독성 효과를 나타낸 것이다. 화합물 113의 IR_{COX-1} 이 0.04로 매우 낮은 값을 나타내어 높은 COX-2 선택성(SR)을 보였다. 화합물 97, 100, 117, 134, 136은 2.0<SR<5.0이었고, 그 밖의 화합물들

Table III—Activity Profile of Four Selected Compounds

	COX-2 inhibition		Cytotoxicity
	* IC_{50} (μ M)	[†] Ratio of IC_{50}	[‡] IC_{50} (μ M)
Celecoxib	0.048±0.046	1.00	23.15±4.56
Compd 130	0.052±0.021	0.92	9.42±5.05
Compd 135	0.030±0.001	1.60	18.38±4.34
Compd 136	0.058±0.030	0.83	26.07±5.40

* IC_{50} is the concentration of each compound that inhibits 50% of PGE₂ production compared to no treatment condition. Determined in HCT-116 COX-2 flag cells after 24 hr exposure.

[†]Ratio of IC_{50} is the relative ratio of IC_{50} of each compound to that of celecoxib. Calculated as $IC_{50,celecoxib}/IC_{50,compound}$, hence, numbers over 1.0 indicate greater activity of the test compound.

[‡] IC_{50} is the concentration of compound that kills 50% of cells compared to the control after 72 hr of continuous exposure. Determined in A549 cells.

은 celecoxib와 유사한 선택성 (SR≈1.0)을 보였다. 30 μ M 농도에서 화합물들의 세포독성 효과를 확인하였고 화합물 1,

2, 9, 130, 135, 136이 50% 이상의 세포독성을 나타내어 유의한 것으로 분류하였다. 그러나 화합물 1, 2, 9는 돌연변이 유발 시험결과 양성을 보여 이후 시험에서는 배제되었다 (data not shown). 따라서 최종 선택된 화합물 130, 135, 136의 PGE₂ 저해 IC₅₀ 농도와 세포독성 IC₅₀을 구하여 그 결과를 Table III에 정리 하였다.

고 찰

정상상태에서 COX-2의 발현은 낮게 유지되지만 다양한 조직 손상이나 자극에 의해 그 발현이 유도되는 proinflammatory immediate-early response gene(염증 전단계 즉시-조기 반응 유전자)이며 prostaglandins 생성을 통해 세포사멸 (apoptotic signaling) 또는 증식(survival signaling)에 관여한다.⁷⁾ COX-2의 발암기전 연관성은 대장암에서 간접적인 역할 조사자료들과 직접적인 실험 증거들에 의해 처음 제시되었고 이후 여러가지 다른 암종의 발생기전에도 연관되는 것으로 보고되었다. 대장암 환자의 병소와 실험동물의 대장 종양에서 COX-2의 지속적인 과발현은 대장암의 발생/진행 과정에 중요한 역할을 하는 APC나 Ras 유전자와 관련이 있음이 보고된 바 있다.⁸⁾ 또한 최근 연구에서 세포내 DNA가 손상될 때 wild-type p53-매개 Ras/Raf/ERK cascade에 의해 발현된 COX-2가 p53-매개 세포자연사에 길항적으로 작용함이 관찰되었다.⁹⁾ 한편, COX-2 저해제들이 대장암을 비롯한 여러 암종의 실험 모델에서도 세포의 증식을 저해하고 세포자연사를 유도한다는 연구결과들이 발표됨에 따라 이들 COX-2 저해제들을 암예방제로 뿐 아니라 항암제로 개발하려는 노력들이 본격화되고 있다. 본 연구는 COX-2 저해 합성유도체들을 스크리닝하여 항암제로 개발가능성이 있는 화합물들을 탐색하고자 하였다. 우선 선택적 COX-2 저해제로서 항암효과를 가지는 celecoxib의 COX-2 저해능과 세포독성, 세포주기 저해 및 자연사 유도를 평가하고 celecoxib를 기준하여 유도체들의 활성을 비교 평가하였다.

본 연구에서 선택적 COX-2 저해제인 celecoxib가 A549 세포에서 COX-2 활성을 저해하는 농도 (>0.1 μM 24 hr 노출 시)와 세포증식을 억제하는 농도 (>55.0 μM 24 hr 노출 시) 간에 큰 차이가 관찰되었고 세포증식을 억제하는 농도 범위에서는 G₁-S 주기 진행저해와 세포자연사 유도가 관찰되었다. 유도체들의 활성을 평가하기 위해 사용한 HCT-116 유래 세포주들에서도 COX-2의 발현수준 차이와 이에 따른 PGE₂ 농도 차이에도 불구하고 celecoxib에 의한 세포증식억제 IC₅₀에는 차이가 없었다(Table I). Grösch 등은 대장암 세포의 증식 억제를 위해 요구되는 농도 (50–100 μM)가

COX-2 활성 억제농도 (0.87–6.7 μM) 보다 최고 110배 까지 높다고 보고하면서 celecoxib의 세포증식 억제효과는 세포자연사 유도와 G₀/G₁ 세포주기 저해가 가장 중요한 요인이지만 이러한 효과가 COX-2 발현 여부와 관계없이 관찰된다고 주장하였다.³⁾ 이러한 결과들은 celecoxib에 의한 세포증식억제효과가 COX-2 활성저해와는 관련이 없음을 시사한다. 최근 다른 연구들도 celecoxib나 선택적 COX-2 저해제 (NS-398 등) 및 NSAIDs의 항암효과가 COX-2 비의존적 경로에 의해 매개된다고 보고하고 있다.^{10,11)} 또한 Song 등은 celecoxib 유도체를 합성하여 그들의 화학구조-활성 상관관계(SAR)를 분석하여 COX-2 활성 억제 능력과 세포자연사 유도 능력간에는 상관관계가 없음을 주장하였고, 세포자연사 유도와 관련이 있는 분자구조를 확인하였다.¹²⁾ 아스피린과 NSAIDs에 의한 세포증식억제효과는 NF-κB, AP-1, MAP kinase, PPARγ, δ의 억제 또는 활성화에 의해 일어나는 한편, cyclin, p21, p27, p70s6 kinase와 같은 세포주기조절 단백질들의 변화에 의해서도 유발된다.^{3,7,10)} 최근 몇몇 NSAIDs가 대장암을 비롯한 여러 암세포에서 pro-apoptotic gene인 NAG-1(NSAID-activated gene-1)의 발현을 유도함이 확인되어, 세포자연사가 COX-비의존성 경로에 의해 유도될 가능성이 제시되었다.^{13,14)} Celecoxib의 직접적인 세포내 타겟은 아직 확실치 않다. 하지만, p21, cyclin A, B와 같은 세포주기 조절단백질은 p53, AP-1, NF-κB와 같은 스트레스 관련 전사인자의 타겟 유전자이므로 celecoxib의 의한 세포주기 차단 효과는 부분적으로 서로 다른 전사조절 물질들의 활성화에 의한 결과로 생각된다. 또 다른 연구에서는 고농도의 celecoxib 처리시 NF-κB가 활성화되거나, 전립선암세포에서는 Akt/PKB의 경로 억제에 의해,¹⁵⁾ HT-29 세포에서는 PDK-1의 활성이 억제되어 세포자연사가 유도됨이 보고되었다.¹⁶⁾

NSAIDs의 COX-1과 COX-2에 대한 억제능력을 비교분석하기 위하여 다양한 *in vitro* assay 시스템이 사용되고 있으며, COX-1 억제도와 COX-2 억제도의 비, 즉 COX selectivity가 중요한 파라미터로 간주되고 있다. 본 연구에서는 합성유도체들의 COX 저해 효과를 평가하기 위해 COX-1과 COX-2를 transfection한 세포주들을 이용하였다. 이러한 cell-based 실험계는 cell-free 실험계나 whole blood assay에 비해 초기 스크리닝에서 암세포 내 유입/대사에 문제가 있는 화합물을 배제할 수 있기 때문에 생체내에서 보다 효과적인 화합물을 선별할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 본 연구는 COX 저해효과에만 이 세포주들을 이용하였고 증식 억제 효과 평가에는 사용하지 않았다. 전술한 바와 같이 celecoxib의 세포독성이 이 세포주들간에 차이가 없었기 때문에 유도

체들의 세포증식저해 효과 스크리닝에는 적합하지 않다고 판단되었다. 대신에 COX-2를 과발현하는 인체 비소세포 폐암 세포주 A549를 이용하였다. 초기 실험에는 대표적인 COX-2 과발현 직장암 세포주 HT-29도 사용하였으나 HT-29 세포 내 COX-2는 catalytic activity가 없고 이를 다른 세포로 transfection시에는 활성이 회복된다는 보고에 따라¹⁷⁾ HT-29 세포내에는 COX-2 활성 저해인자가 있다고 사료되어 본 시험에서 배제하였다.

Nimesulide는 cisplatin, docetaxel 및 방사선 조사를 병용한 경우 부가적인 혹은 상승적인 효과를 나타내었으며,^{4,18)} sulindac sulfide는 cisplatin이나 paclitaxel과 병용시 상승적인 효과를 보였다¹⁹⁾. 일본에서 개발중인 JTE-522 는 celecoxib 보다 COX-2 저해 IC₅₀은 높지만(15.1 μM vs 4.35 μM) COX-2 선택성이 높은 (411 vs 187) 화합물로서 *in vitro* 및 *in vivo* 실험계에서 docetaxel, vinorelbine 및 5-FU와 폐암 및 방광암에서 항암효과의 상승을 나타내어,^{20,21,22)} 선택적 COX-2 저해제의 병용치료제로서의 가능성을 보여주었다. 임상에서 FAP 환자에서 폴립의 증식을 억제하는 celecoxib의 용량은 관절염 환자에서 항염증효과 목적의 투여량(200-400 mg/d) 보다 높은 800 mg/d이었으며, 이 때 혈중농도는 3-5 μM로 보고되었고, 이 수준의 혈중 농도를 유지시킨 실험동물에서도 항암효과를 관찰할 수 있었다.³⁾ 따라서 합성유도체들의 *in vivo* 평가에서는 혈중 유효농도가 분석되어야 하고 이는 개발가능성 평가에 중요하다. 본 연구에서 현재까지 탐색된 화합물은 3가지로서(Table III) 이 중 화합물 136은 다른 화합물들에 비하여 용해성이 좋지 않았다. 화합물 130 및 135는 celecoxib보다 우수한 COX 저해능 및 세포독성을 보였으며 항암기전에 대한 세부 연구가 진행 중에 있다. 또한 실험동물에서 이들의 항암효능 및 혈중 농도를 확인할 예정이며 *in vivo* 항암효과가 확인되는 화합물에 대해 기존의 항암제와의 병용가능성 연구도 진행할 예정이다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업 (01-PJ1-PG3-21700-0007)과 가톨릭암센터에 의해 지원되었습니다.

문헌

1) R.E. Harris, Cyclooxygenase-2, prostaglandins, and colorectal carcinogenesis. *In COX-2 Blockade In Cancer Prevention and Therapy*, Humana Press., pp. 160-164 (2003).
 2) A.T. Koki and J.L. Masferrer, Celecoxib, a specific COX-2 inhibitor with anticancer properties, *Cancer Control.*, **9**, 28-

35 (2002).
 3) S. Grösch, I. Tegeder, E. Niederberger, L. Brautigam and G. Geisslinger, COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.*, **15**, 2742-2744 (2001).
 4) T. Hida, K. Kozaki, H. Muramatsu, A. Masuda, S. Shimizu, T. Mitsudomi, T. Sugiura, M. Ogawa and T. Takahashi, Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2006-2011 (2000).
 5) M.M. Goldenberg, Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin. Ther.*, **21**, 1497-1513; discussion 1427-1428 (1999).
 6) N.H. Holford and L.B. Sheiner, Kinetics of pharmacologic response. *Pharmacol. Ther.*, **16**, 143-166 (1982).
 7) W.C. Hung, H.C. Chang, M.R. Pan, T.H. Lee and L.Y. Chuang, Induction of p27(KIP1) as a mechanism underlying NS398-induced growth inhibition in human lung cancer cells. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 1398-1403 (2000).
 8) Y. Araki, S. Okamura, S.P. Hussain, M. Nagashima, P. He, M. Shiseki, K. Miura and C.C. Harris, Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the wnt and ras pathways. *Cancer Res.*, **63**, 728-734 (2003).
 9) J.A. Han, J.I. Kim, P.P. Ongusaha, D.H. Hwang, L.R. Ballou, A. Mahale, S.A. Aaronson and S.W. Lee, p53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53-or genotoxic stress-induced apoptosis. *EMBO J.*, **21**, 5635-5644 (2002).
 10) J. Cheng, H. Imanishi, Y. Amuro and T. Hada, NS-398, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, inhibited cell growth and induced cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer.*, **99**, 755-761 (2002).
 11) D.H. Hwang, V. Fung and A.J. Dannenberg, National Cancer Institute workshop on chemopreventive properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: role of Cox-dependent and -independent mechanisms. *Neoplasia.*, **4**, 91-97 (2002).
 12) X. Song, H.P. Lin, A.J. Johnson, P.H. Tseng, Y.T. Yang, S.K. Kulp and C.S. Chen, Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **94**, 585-591 (2002).
 13) S.J. Baek, K.S. Kim, J.B. Nixon, L.C. Wilson and T.E. Eling, Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol. Pharmacol.*, **59**, 901-908 (2001).
 14) S.J. Baek, L.C. Wilson, C.H. Lee and T.E. Eling, Dual function of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): inhibition of cyclooxygenase and induction of NSAID-activated gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 1126-1131 (2002).
 15) A.L. Hsu, T.T. Ching, D.S. Wang, X. Song, V.M. Rangnekar and C.S. Chen, The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J. Biol. Chem.*,

- 275, 11397-11403 (2000).
- 16) S. Arico, S. Pattingre, C. Bauvy, P. Gane, A. Barbat, P. Codogno and E. Ogier-Denis, Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J. Biol. Chem.*, **277**, 27613-27621 (2002).
- 17) L.C. Hsi, S.J. Baek and T.E. Eling, Lack of cyclooxygenase-2 activity in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, **256**, 563-570 (2000).
- 18) L. Milas, K. Kishi, N. Hunter, K. Mason, J.L. Masferrer and P.J. Tofilon, Enhancement of tumor response to gamma-radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme. *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**, 1501-1504 (1999).
- 19) A.F. Soriano, B. Helfrich, D.C. Chan, L.E. Heasley, PA. Jr. Bunn and T.C. Chou, Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, **59**, 6178-6184 (1999).
- 20) T. Hida, K. Kozaki, H. Ito, O. Miyaishi, Y. Tatematsu, T. Suzuki, K. Matsuo, T. Sugiura, M. Ogawa, T. Takahashi and T. Takahashi, Significant growth inhibition of human lung cancer cells both *in vitro* and *in vivo* by the combined use of a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, JTE-522, and conventional anticancer agents. *Clin. Cancer Res.*, **8**, 2443-2447 (2002).
- 21) K. Wakitani, T. Nanayama, M. Masaki and M. Matsushita, Profile of JTE-522 as a human cyclooxygenase-2 inhibitor. *Jpn. J. Pharmacol.*, **78**, 365-371 (1998).
- 22) Y. Mizutani, K. Kamoi, O. Ukimura, A. Kawauchi and T. Miki, Synergistic cytotoxicity and apoptosis of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, and 5-fluorouracil against bladder cancer. *J. Urol.*, **168**, 2650-2654 (2002).