

새로운 피라졸린 화합물의 합성과 구조결정 및 항암효과

고 동 수*

동덕여자대학교 응용화학과

Synthesis and Identification of Novel Pyrazoline and Its Anti-cancer Property

Dongsoo Koh*

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

Received May 31, 2011; Accepted June 4, 2011

Novel pyrazoline (4) was synthesized from chalcone (3) which was prepared from 2'-hydroxy-1'-acetonaphthone (1) and 4-methoxy benzaldehyde (2). Pyrazoline (4) forms resonance assisted hydrogen bond between naphthol hydroxyl group and imine nitrogen in a pyrazoline ring. Pyrazoline (4) shows Poly ADP-ribose Polymerase (PARP) cleavage ability as a proof of apoptosis in cancer cell, which reveals its anti-cancer property.

Key words: anti-cancer, apoptosis, chalcone, hydrogen-bond, pyrazoline

Pyrazoline 계열의 화합물들은 항우울증(antidepressant) [Prasad 등, 2005; Kaplancikli 등, 2010], 항균(antibacterial) [Manna와 Agrawal, 2009; Siddiqui 등, 2011], 항염증(anti-inflammatory) [Joshi 등, 2010], 모노아민산화제 저해(monoamine oxidase inhibitor) [Karuppasamy 등, 2010; Mishra와 Sasmal, 2011] 항암(anticancer) [Havrylyuk 등, 2009; Congiu 등, 2010; Shaharyar 등, 2010] 작용 등 광범위한 생리학적 활성을 나타내는 것으로 보고되어 왔다. 특히 항암작용에 관해서는 다양한 기전으로 pyrazoline 화합물들이 항암작용에 관여 하는 것으로 보고되고 있으므로, 새로운 pyrazoline 화합물을 만들어 새로운 기전의 항암효과를 시험해 보는 노력은 매우 의미 있는 연구라 할 수 있다. 본 연구에서는 새로운 피라졸린 화합물 4를 합성하여 이의 구조를 NMR을 통해 분석하고, 세포자기사멸(apoptosis)을 통한 항암작용을 알아보고자 한다.

세포자기사멸은 Type I (apoptosis)과 Type II (autophagic cell death) 두 종류가 있고, 이중 Type I (apoptosis) 세포자기사멸은 시스테인 단백질 분해효소의 일종인 카스파제(Caspase)의 활성에 의해 유도된다[Nagata 2000]. 활성 카스파제는 세포 활성에 중요한 여러 가지 단백질을 분해 시킴으로써 세포사멸을 유도한다. Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP) 단백질은

크기가 113-kDa인 DNA복구효소인데, Type I 세포자기사멸 과정 중 카스파제에 의해 89-kDa과 24-kDa 크기의 단편으로 잘려지기 때문에, PARP 단백질의 89-kDa과 24-kDa 단편 생성 현상은 Type I 세포자기사멸 과정을 검증하는 주요 생화학적 지표로 간주되어 왔다[Lazebnik 등, 1994]. 본 연구에서는 신규 피라졸린 화합물이 가지는 항암 효능을 알아보기 위하여, 이 화합물을 처리 하였을 때, 암 세포의 세포사멸을 유도하는 효과를 측정하는 수단으로서, PARP 단백질의 89-kDa 단편 생성 정도를 측정 하였다.

Chalcone 3의 합성. Chalcone 3은 2'-hydroxy-1'-acetonaphthone (1)과 4-Methoxy benzaldehyde (2)를 출발물질로 하여 91%의 수율로 합성하였다. 용융점 119-120°C [문헌 값 120°C, Marathey, 1954]. 최근에 이르러 Chalcone 3에 대한 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 자료가 보고되었지만 [Dittmer 등, 2007] 각각의 수소와 탄소에 대한 할당이 이루어 지지 않았으므로, Table 1에 각각의 수소와 탄소를 할당 하였다.

Pyrazoline 4의 합성. Chalcone 3 (608 mg, 2 mmol)을 에탄올 20 mL에 가한 후, 교반을 하면서 *p*-chlorophenyl hydrazine의 염산염 (358 mg, 2 mmol)을 가한 후 약 90°C에서 10시간 환류 한다. 반응 혼합물을 상온으로 냉각 시킨 후 형성된 고체를 여과하고 이를 다시 에탄올에서 재결정하여 76% (650 mg)의 수율로 pyrazoline 4를 얻었다. 용융점 162-163°C. 각각의 수소는 correlated spectroscopy (COSY) 를 통해 할당하였고, 탄소는 heteronuclear multiple bonded connectivities (HMBC) 를 통해 탄소-수소간의 상관관계를 통해 할당하여 Table 1에 나타내었다.

*Corresponding author

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

E-mail: dskoh@dongduk.ac.kr

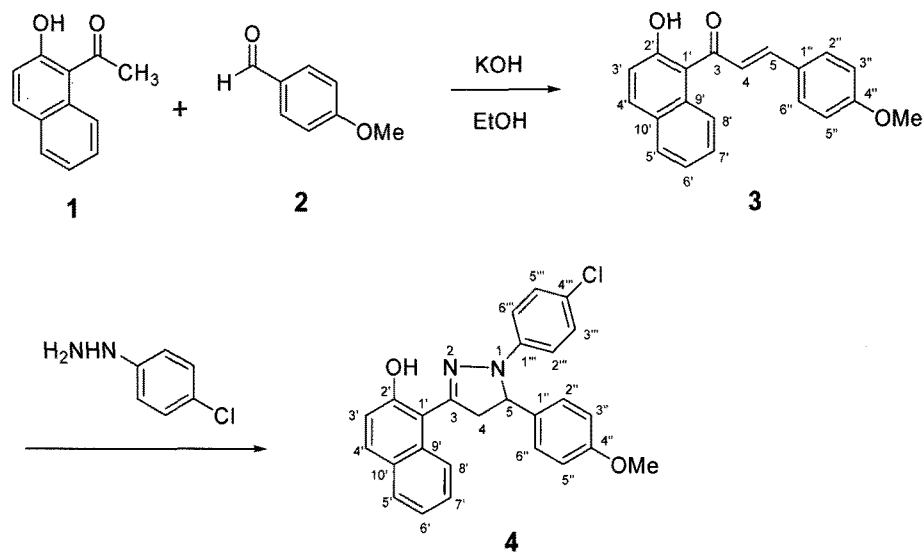


Fig. 1. Synthetic scheme for chalcone (3) and pyrazoline (4).

Table 1. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ assignment of chalcone 3 and pyrazoline 4

No.	Compound 4					Compound 3	
	δ of ^{13}C	δ of ^1H	COSY	NOESY	HMBC	δ of ^{13}C	δ of ^1H
3	150.5	-	-	-	C3-H4	196.3	-
4	48.8	3.68 (dd, 16.7, 7.6) 4.31 (dd, 16.7, 11.3)	H4-H5	H4-H8'	-	126.97	7.17 (d, 16.0)
5	63.8	5.21 (dd, 11.3, 7.6)	H5-H4	H5-H2'' H5-H2'''	C5-H4, H2''	143.5	7.31 (d, 16.0)
1'	109.1	-	-	-	C1'-H3', H8'	120.1	-
2'	157.4	-	-	-	C2'-H4'	161.2	-
3'	119.2	7.27 (d, 9.0)	H3'-H4'	-	-	119.1	7.22 (d, 9.0)
4'	131.9	7.75 (d, 9.0)	H4'-H3'	-	C4'-H5'	131.0	7.84 (d, 9.0)
5'	129.4	7.77 (dd, 8.0)	H5'-H6'	-	C5'-H4', H7'	128.2	7.64 (d, 8.0)
6'	123.1	7.31 (ddd, 8.0, 6.9, 1.0)	H6'-H5' H6'-H7'	-	C6'-H8'	122.8	7.28 (ddd, 8.0, 6.9, 0.9)
7'	126.8	7.4 (ddd, 8.5, 6.9, 1.4)	H7'-H6' H7'-H8'	-	C7'-H5'	126.8	7.4 (ddd, 8.5, 6.9, 1.3)
8'	123.2	7.92 (d, 8.5)	H8'-H7'	H8'-H4	C8'-H6'	123.3	7.82 (d, 8.5)
9'	131.9	-	-	-	C9'-H4', H5', H7'	131.8	-
10'	129.0	-	-	-	C10'-H6', H8', H3'	127.4	-
1''	132.7	-	-	-	C1''-H4, H3''	127.5	-
2''6''	127.2	7.24 (d, 8.8)	H2''-H3''	H2''-H5	C2''-H5	130.4	7.63 (d, 8.8)
3''5''	114.7	6.88 (d, 8.8)	H3''-H2''	H3''-H(4''OMe)	-	114.5	6.95 (d, 8.8)
4''	159.4	-	-	-	C4''-H2'' (H6''), 4''OMeH	154.3	-
1'''	142.6	-	-	-	C1'''-H3'''	-	-
2'''6'''	114.8	6.93 (d, 8.9)	H2'''-H3'''	H2'''-H5	-	-	-
3'''5'''	129.1	7.16 (d, 8.9)	H3'''-H2'''	-	-	-	-
4'''	125.0	-	-	-	C4'''-H2'''	-	-
4''-OMe	55.3	3.78 (s)	-	H(4''OMe)-H3''	-	55.3	3.79 (s)
2'-OH	-	12.11 (s)	-	-	-	-	-

Pyrazoline 4의 구조 분석. Chalcone 3과 pyrazoline 4의 $^1\text{H-NMR}$ 을 비교 하면 chalcone 3에 존재하던 4번 탄소-5번 탄소 간의 *trans* 이중 결합을 나타내는 H4 (7.17 ppm, d, 16 Hz)와 H5 (7.31 ppm, d, 16 Hz)가 pyrazoline 4를 형성함에 따라 없어지고, 4번 탄소- 5번 탄소 간의 단일결합을 형성하면서 H4 (3.68 ppm, dd, 16.7 Hz, 7.6 Hz; 4.51 ppm, dd, 16.7 Hz,

11.3 Hz)와 H5 (5.21 ppm, dd, 11.3 Hz, 7.6 Hz)의 3개의 수소를 pyrazoline 4에서 보인다.

주목할 만한 사실은 12.15 ppm에서 나타나는 naphthol의 OH 수소로 새로 형성되는 pyrazoline의 C=N 이중 결합과 강한 resonance assisted hydrogen bonding을 형성한다[Chin 등, 2004; Koh, 2005]. Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 pyrazoline 4

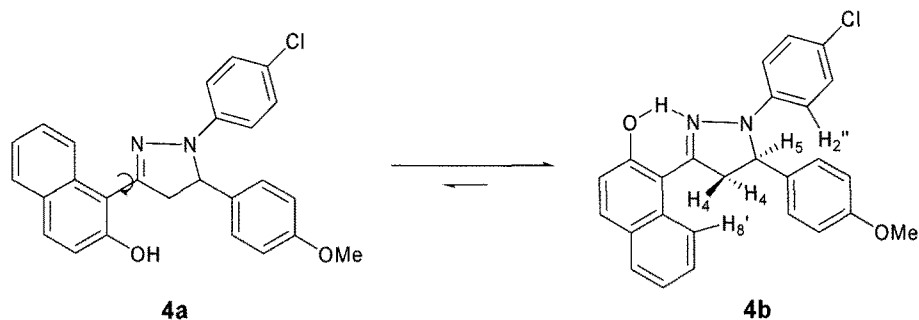


Fig. 2. Two plausible conformations of 4. Free rotation through C3-C1' single bond would generate two conformers 4a and 4b. Resonance assisted hydrogen bond makes conformer 4b more stable than conformer 4a.

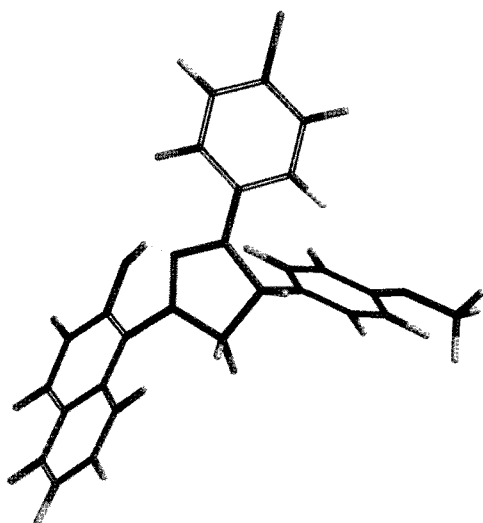


Fig. 3. Energy minimized 3-dimensional conformation of pyrazoline 4 predicted by Spartan.

는 C3-C1'의 단일 결합을 통해 자유회전이 가능하므로 4a나 4b의 구조가 가능하지만, 강한 수소 결합이 이 자유회전을 방해하기 때문에 pyrazoline의 오각고리와 naphthol 고리가 수소결합을 통해 하나로 연결된 4b와 같은 큰 고리 구조를 형성하고 있다.

실제로 4b가 형성된다면 H4와 H8' 사이의 거리가 가까워져서 NMR 상에서 nuclear overhauser enhancement (NOE) 관찰이 가능할 것이고, 화합물 4b에 대한 nuclear overhauser enhancement spectroscopy (NOESY) 스펙트럼 분석 결과 H4와 H8' 사이에 NOE를 관찰할 수 있었다. Pyrazoline 4에 대한 에너지상으로 안정한 3차원 구조를 Spartan 프로그램을 이용하여 Fig. 3에 나타내었다. NMR실험과 Spartan을 통한 이론적 예측 모두 naphthol의 OH 수소와 pyrazoline의 C=N 이중 결합 사이에 강한 수소 결합을 보여주고 있다. 3차원 구조를 통해 얻은 H4와 H8' 사이의 거리는 2.07Å으로 매우 가까운 것으로 예측되었다. 한편 H5와 H2''도 2.37Å으로 측정되었고 실제 NOESY 스펙트럼 분석 결과도 H5와 H2'' 사이에서 NOE를 관찰할 수 있었다.

세포자기 사멸 유도효과 측정. 인간 자궁 암세포주(HeLa)를 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양 받아 세

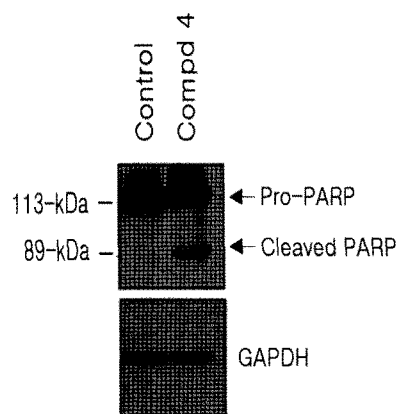


Fig. 4. Effect of pyrazoline 4 on cleavage of PARP. Treatment with pyrazoline 4 induced fragmentation of 89-kDa PARP, but control remain PARP untouched. Neither control and nor pyrazoline 4 changed GAPDH, which showed selectivity of pyrazoline 4 in PARP cleavage.

포배양접시에 분주한 후 5% CO₂가 공급되는 37°C 세포배양기에서 24시간 배양하고, 피라졸린 4를 20 μM 농도로 처리하였다. 24시간 경과 후 세포를 수확한 후, 20 mM 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.2), 1% Triton X-100, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 10 μg/mL leupeptin 및 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)이 함유되어 있는 세포 용해액 200 μg를 첨가하여 세포를 용해시키고, 원심분리 하여 상층의 세포 용해액을 수확하였다. 20 μg의 단백질이 포함하도록 제조된 시료를 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)을 실시하여 세포에 존재하는 단백질들을 분리하였다. 전기영동으로 분리된 단백질을 폴리스틸렌 막(polystyrene membrane)으로 옮긴 후 토끼 항 PARP 항체(rabbit anti-PARP antibody)와 horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 항 토끼 이차항체(anti-rabbit secondary antibody)를 표준 방법으로 반응시킨 후, 화학형광감지 시스템(chemiluminescence) 키트를 이용하여 PARP 단백질이 89-kDa 크기로 잘려나가는 정도를 측정하였다. 실험 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이 HeLa 암세포에 아무 처리도 하지 않은 대조군 세포에서는 PARP 단백질이 113-kDa 크기로 관찰되었으나, 피라졸린 4를 처리하였을 때는 89-kDa 크기의 PARP 조각 단편이 생성되었다. 이때 약물반응에 의해 발현 변화가 나타나지 않는 glyceraldehyde 3-

phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 두 세포 그룹 간의 양적 변화가 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과로 피라졸린 **4**는 HeLa 암세포에서 Type-I 세포자기 사멸을 유도하는 효과가 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2010-11년도 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

참고문헌

- Chin J, Kim DC, Kim HJ, Panosyan FB, and Kim KM (2004) Chiral shift reagent for amino acids based on resonance-assisted hydrogen bonding. *Org Lett* **6**, 2591-2593.
- Congiu C, Onnis V, Vesce L, Castronia M, and Pisano C (2010) Synthesis and *in vitro* antitumor activity of new 4,5-dihydroxypyrazol derivatives. *Bioorg Med Chem* **18**, 6238-6248.
- Dittmer C, Raabe G, and Hintermann L (2007) Asymmetric cyclization of 2'-hydroxychalcones to flavanones: Catalysis by chiral Bronsted acids and bases. *Eur J Org Chem* 5886-5898.
- Havrylyuk D, Zimenkovsky B, Vasilenko O, Zaprutko L, Gzella A, and Lesyk R (2009) synthesis of novel thiazolone-based compounds containing pyrazolone moiety and evaluation of their anti-cancer activity. *Eur J Med Chem* **44**, 114-119.
- Joshi RS, Mandhane PG, Diwakar SD, Dabhade SK, and Gill GH (2010) Synthesis, analgesic and anti-inflammatory activities of some novel pyrazoline derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 3721-3725.
- Kaplancikli ZA, Ozdemir A, Turan-Zitouni G, Altintop MD, and Can OD (2010) New pyrazoline derivatives and their antidepressant activity. *Eur J Med Chem* **45**, 4383-4387.
- Karuppasamy M, Mahapatra M, Yabanoglu S, Ucar G, Sinha BA, Basu A, Mishra N, Sharon A, Kulandaivelu U, and Jayaprakash V (2010) Development of selective and reversible pyrazoline based MAO-A inhibitors: Synthesis, biological evaluation, and docking studies. *Bioorg Med Chem* **18**, 1875-1881.
- Koh D (2005) Application of multicomponent reactions in synthesis of diimines as salen analogue. *Agric Chem Biotechnol* **48**, 105-107.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, and Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347.
- Manna K and Agrawal YK (2009) Microwave assisted synthesis of new indophenazine 1,3,5-trisubstituted pyrazoline derivatives of benzofuran and their antimicrobial activity. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 2688-2692.
- Marathe MG (1954) Synthesis of dihydroflavonols and flavonols. *J Org Chem* **20**, 563-571.
- Mishra N and Sasmal D (2011) Development of selective and reversible pyrazoline based MAO-B inhibitor: Virtual screening, synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 1969-1973.
- Nagata S (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**, 12-18.
- Prasad YR, Rao AL, Prasoona L, Mutali K, and Kumar PR (2005) Synthesis and antidepressant activity of some 1,3,5-triphenyl-2-pyrazolines and 3-(2"-hydroxynaphthalene-1"-yl)-1,5-diphenyl-2-pyrazolines. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 5030-5034.
- Shaharyar M, Abdullah MM, Bakht MA, and Majeed J (2010) Pyrazoline bearing benzimidazoles: Search for anticancer agent. *Eur J Med Chem* **45**, 114-119.
- Siddiqui ZN, Musthafa TNM, Ahmad A, and Khan AU (2011) Thermal solvent-free synthesis of novel pyrazolyl chalcones and pyrazolines as potential antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 2860-2865.