

4-치환 androst-4-ene 및 6-치환 androstane 유도체 합성과 Aromatase 저해 활성 및 Cytotoxicity

김민우* · 마은숙**#

*식품의약품안전처, **대구가톨릭대학교 약학대학

Synthesis of 4-substituted Androst-4-ene and 6-substituted Androstane Derivatives, Aromatase Inhibitory Activity and Cytotoxicity

Min Woo Kim* and Eunsook Ma**#

*Ministry of Food and Drug Safety

**College of Pharmacy, Daegu Catholic University

(Received November 21, 2020; Revised December 9, 2020; Accepted December 15, 2020)

Abstract The development of potent aromatase inhibitors is an important therapeutic strategy for the treatment of breast cancer in postmenopausal women. Synthesized compounds that act as both an aromatase inhibitor and an anti-breast cancer agent are especially effective. In this study, nine 4-substituted androst-4-ene derivatives were synthesized from dehydroepiandrosterone via Jones oxidation, epoxidation, epoxy ring-opening, and dehydration reactions. Five 6-substituted androstane derivatives were synthesized from dehydroepiandrosterone via epoxidation and epoxy ring-opening reactions. Screening assays were used to assess the synthesized compounds for potential inhibitory effects against aromatase; results showed that compared to other compounds, 2 μ M of 4-azido-17,17-ethylenedioxyandrost-4-en-3-one (**10**) had the greatest inhibitory effect (94.70%) against aromatase activity in human placental microsomes. A 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay was used to analyze the activity of 13 compounds against two human breast cancer cell lines (ER+ T47D and ER MDA-MB-231). Compounds **10** and **12** showed strong cytotoxic activity against MDA-MB-231 (IC₅₀: 25.6 and 32.7 μ M, respectively).

Keywords breast cancer, aromatase inhibitor, cytotoxicity, androstene, androstane

서 론(Introduction)

유방암은 전 세계 여성에게 영향을 미치는 모든 암 중에서 가장 흔한 유형의 암이며 주요 사망 원인 중 하나이다. 폐경 후 유방암은 전체 중의 60-70%를 차지하며 암 발생의 주된 원인은 대부분 aromatase (CYP450, 즉 CYP19A1, estrogen synthetase)의 과발현에 의한 신체의 estrogen 수치 증가이다.¹⁾ Aromatase는 인간에게 존재하는 유일한 효소로, C-19 androgen의 A-ring을 방향화(aromatization)시켜 C-18 estrogen 생성에 관여한다. Estrogen은 여성 생기의 발달 및 유지, 생식 및 다양한 신경 내분비 기능을 포함하여 수많은 생리적 과정에 관여한다. 반면에 estrogen은 유방 상피 세포 및 estrogen 의존성 유방암 세포와 같은 특정 표적 세포의 성장과 증식에도 관여한다.²⁾

유방암에 사용할 수 있는 치료 방법은 호르몬 치료, human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) 표적요법 및 항암화학요법 등이 있다. 폐경 이후 발생한 유방암은 호르몬 치료가 주로 이용된다. 호르몬 치료제는 작용기전에 따라 크게 세 가지로 구분할 수 있다. 첫 번째로 estrogen receptor antagonist로 작용하여 estrogen의 작용을 차단하는 것으로 selective estrogen receptor modulator (SERM)인 tamoxifen, raloxifene, toremifene 등이 있다.³⁾ 이들은 유방 조직에서는 estrogen을 차단하나 자궁과 뼈 조직에서는 estrogen과 같은 작용을 할 수 있다.⁴⁾ 최근에 개발된 fulvestrant는 tamoxifen보다 효과적이며 유방암 세포에서 estrogen수용체 길항제로 작용하지만 estrogen 효능제로서의 작용은 없다.⁵⁾ 두 번째로 progestin이나 고용량 estrogen을 사용하여 치료하는 방법이다. Progestin 제제로 megestrol acetate, medroxyprogesterone acetate⁶⁾ 안드로겐 제제인 fluoxymesterone⁷⁾이 사용될 수 있으며, 고용량 estrogen인 ethynyl estradiol⁸⁾은 피임약으로 사용하며 유방암치료에도 사용된다. 또한 nonsteroidal compound인 diethylstilbestrol⁹⁾이 사용 가능하나 이들 제제는 임상적으로 많이 사용되지는 않는다. 세 번째로 estrone과 estradiol은 aromatase

#Corresponding author

Eunsook Ma, College of Pharmacy, Daegu Catholic University, 13-13 Hayang-ro, Gyeongsan-si, 38430, Korea
Tel: +82-53-830-3621, Fax: +82-53-850-3602
E-mail: masook@cu.ac.kr

에 의해 4-androstene-3,17-dione (4-AD) 및 testosterone으로부터 생합성되므로 이들 생성에 관여하는 효소인 aromatase를 저해하여 유방암을 치료하는 aromatase inhibitor가 사용되고 있다.^{10,11)} 이는 부신피질에서 생성되는 스테로이드에는 영향을 주지 않으면서 생식샘, 지방, 근육, 뇌 등에 존재하는 aromatase를 선택적으로 억제한다. Aromatase inhibitor는 1 또는 2세대인 aminoglutethimide, formestane 및 fadrozole 등이 사용되나 부작용으로 부신부전(adrenal insufficiency)이나 알도스테론 억제를 일으키기도 한다. 현재는 효과가 우수하고 부작용이 감소한 3세대가 주로 사용되고 있으며 anastrozole (Arimidex[®]), letrozole (Femara[®]), formestane 및 exemestane (Aromasin[®]) 등이 해당된다.¹²⁾ Anastrozole과 letrozole은 비스테로이드성 가역적 억제제이고 반면, formestane과 exemestane은 스테로이드성 제제로 비가역적으로 작용한다.¹³⁾ 이러한 aromatase inhibitor는 난소의 기능이 없는 폐경 후 유방암 환자에서는 효과적일 수 있으나 폐경 전 환자에서는 난소의 기능이 유지됨으로 오히려 에스트로겐 생성을 증가시킬 수 있어 사용하기 어렵다. Antiestrogen 및 aromatase inhibitor는 다른 약물보다 내분비 요법의 폭이 넓고 독성이 낮지만 안면홍조 및 관절통을 비롯한 근골격계 증상이 가장 빈번하게 발생되거나 자궁내막암이나 혈전증의 빈도는 타목시펜보다 의미 있게 낮다. 하지만 간혹 골다공증과 골절의 위험이 발생되므로 정기적인 골밀도 측정과 예방적 치료가 필요하다.¹⁴⁾

임상연구에서 호르몬치료제 단독군과 화학요법제/호르몬치료제 병용군을 비교하였을 때 병용군에서 더 효과적인 유방암 치료효과가 있음을 증명하였다. 이처럼 보다 효과적인 유방암 치료제 개발을 위해 aromatase 저해 효과를 가진 steroid골격의 화합물을 유방암 세포에 대한 cytotoxicity를 검토하는 연구가 보고되고 있다. Androstane골격의 화합물 중에서 4-AD의 전구체인 dehydroepiandrosterone (DHEA)는 종양에 대한 chemopreventive 및 anti-proliferative 작용이 있음을 보고하였다.^{15,16)} 6-Hydroxyiminoandrostenedione은 estrogen receptor positive (ER+) 유방암 세포 T47D의 성장을 현저히 감소시키며¹⁷⁾, 6-hydroxyiminocholesterol 유도체는 ER+ 유방암 세포인 MCF-7과 estrogen receptor negative (ER-) 유방암 세포인 MDA-MB-231에 cytotoxic activity¹⁸⁾을 나타냈다. Sadekova 등은 T47D 및 MCF-7에서 aromatase mRNA가 발현됨을 밝혔다.¹⁹⁾ Djurendic 등은 17 α -picolyl- 및 17-picolylidene-androst-5-ene은 MCF-7과 MDA-MB-231에 대한 anticancer 활성 뿐 만 아니라 aromatase 저해활성 측정하였다. 특히 4-hydroxy-17(Z)-picolinylidene-4,6-androstadien-3-one은 MDA-MB-231 유방암세포에 대해 강한 세포 독성 (IC₅₀: 9.3 μ M)을 보였고, 또한 높은 aromatase 저해활성(92 %)을 나타냈다.^{20,21)} Formestane은 MDA-MB-231 (IC₅₀: 53.3 μ M, 48시간 배양)에 대해 cytotoxic activity를 나타내나 MCF-7 세포에는 cytotoxic activity는 없는 것으로 보고되었다.²²⁾ 4-Amino-4,6-androstadiene-3,17-dione유도체는 formestane과는 달리 MCF-7 유방암 세포에 대해 활성을 나타냈다.²⁴⁾ 17번 carbonyl기를 bulky하게 modify한 유도체 중에서 androstene-fused *p*-methoxyphenyl-hydrazoline은 MCF-

7 (IC₅₀: 2.16 μ M)에 대해 가장 높은 cytotoxic activity을 보였으며, 이는 cisplatin (IC₅₀: 9.63 μ M)보다 우수함이 보고되었다.²⁵⁾

저자 등은 폐경 후 여성 유방암 치료에 효과가 있는 aromatase inhibitor를 개발하고자 2-치환 androstene유도체와 7-치환 androstane 유도체를 합성하고 항암활성 또는 aromatase 저해활성을 검토하였으며²⁶⁾, 또한 steroid sulfatase를 저해함으로써 유방암을 치료할 수 있는 androstane-3-O-sulfonate 또는 -sulfamate유도체의 합성 및 활성을 측정하였다.²⁷⁾ 본 연구에서는 DHEA를 출발물질로 사용하여 formestane 또는 exemestane처럼 C-4 와 C-6 위치에 각각 치환기를 도입한 유도체를 합성하고, human ER+ breast cancer cell T47D와 human ER- breast cancer cell인 MDA-MB-231에 대한 cytotoxic activity 및 aromatase 효소에 대한 저해활성을 각각 측정하였다.

실험 방법(Experimental Methods)

사용기기

실험에 사용한 시약은Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA) 또는 TCI사 (Tokyo, Japan)에서 구매하였다. 용매는 필요한 경우 사용 전에 정제하거나 건조시켜 사용하였다. 녹는점은 Thomas-Hoover melting point apparatus (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA)를 사용하여 측정하였고 별도의 보정은 하지 않았다. ¹H 및 ¹³C NMR spectra 측정은 Varian 400 MHz spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를, 측정용매는 CDCl₃와 DMSO-*d*₆를 사용하였다. Chemical shifts (δ)는 내부 표준 물질로 tetramethylsilane을 사용하여 parts per million (ppm)으로, coupling constants (*J*)는 Hertz로 나타내었다. GC/MS (EI) 측정은 SHIMADZU QP 2010 model (Shimadzu, Kyoto, Japan)을, fraction collector는 EYELA fraction collector DC-1500 (Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)을 사용하였다. TLC는 silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Kenilworth, NJ, USA)을 사용하였고, 분리 용매는 ethyl acetate/*n*-hexane mixtures 또는 methanol/dichloromethane을 사용하였다. Column chromatography는 Merck silica gel 9385 (Merck, Kenilworth, NJ, USA) (230-400 mesh)을 사용하여 분리 정제하였다.

각 화합물의 합성방법

4-Androstene-3,17-dione (1): DHEA (10 g, 35 mmol)를 acetone (200 mL)에 용해시킨 후, 보고된 방법을 응용하여²⁸⁾ Jones 시약(CrO₃+H₂SO₄+H₂O Jones reagent 1.75 mL 당 Cr⁶⁺ 2.67 mmol)를 지속적인 orange 색이 나올 때 까지 가하고 실온에서 12시간 교반하였다. 반응혼합물은 여과하여 침전물을 제거하고 물로 세척한 후 감압 농축하여 acetone을 제거하고 남은 수층을 중화시키고 ethyl acetate (3×70 mL)로 추출하였다. 추출한 유기층은 무수 MgSO₄로 건조, 여과 및 감압 농축하여 crude product를 얻고 이를 column chromatography (ethyl acetate : *n*-hexane = 1:3)를 실시하여 미황색의 순수한 결정으로 얻었다. Yield: 70% (7 g), m.p: 168-170°C (lit. 170°C).²⁹⁾

4 α ,5 α -Epoxyandrostane-3,17-dione (2): 4-Androstene-3,17-dione (1, 2 g, 7 mmol)을 methanol (100 mL)에 용해시킨 후 5% NaOH-MeOH (5 mL)과 30% H₂O₂ (25 mL)를 가하고 실온에서 6시간 반응시켰다. TLC로 반응이 종료됨을 확인하고 여액을 감압 농축한 후 물을 가하고 dichloromethane (3×30 mL)로 추출하였다. 추출액은 무수 MgSO₄를 가하여 건조, 여과 및 감압 농축한 후 column chromatography (ethyl acetate : *n*-hexane = 1:3)를 실시하여 백색의 순수한 결정으로 얻었다. Yield: 73% (1.54 g), m.p: 196-198°C, (lit. 197-198°C).³⁰

4-Phenylthio-4-androstene-3,17-dione (3): Phenyl mercaptan (3 mL, 29.5 mmol)에 4 α ,5 α -epoxyandrostane-3,17-dione (2, 90 mg, 0.3 mmol)을 가하여 용해시킨 후 금속 Na (15 mg)을 넣고 60°C에서 6시간 교반하였다. 반응액을 차가운 물에 가하고 ether (3×30 mL)로 추출하고 추출한 유기층에 무수 MgSO₄를 가하여 건조하였다. 이를 여과하고 여액을 감압 농축한 후 column chromatography (methanol : methylene chloride = 1:49)를 실시하여 미황색의 순수한 결정을 얻었다. Yield: 74% (87 mg), m.p: 174-176°C (lit. 171-172°C).³¹

4-Benzylthio-4-androstene-3,17-dione (4): Benzyl mercaptan (15 mL, 128.2 mmol)에 화합물 2 (300 mg, 1 mmol)을 가하여 용해한 후 금속 Na (100 mg)을 넣고 60°C에서 6시간 교반하였다. 반응혼합물을 차가운 물에 부은 후 ether (3×30 mL)로 추출하고 추출액을 무수 MgSO₄로 건조하였다. 이를 여과하고 감압 농축한 후 column chromatography (methanol : methylene chloride = 1:49)를 실시하여 미황색의 순수한 결정을 얻었다. Yield: 68% (277 mg); m.p: 140-142°C (lit. 137-138°C).³¹

4-Phenylethylthio-4-androstene-3,17-dione (5): Phenylethyl mercaptan (15 mL, 111.7 mmol)에 화합물 2 (300 mg, 1 mmol)을 가하여 용해한 후 금속 Na (100 mg)을 넣고 60°C에서 10시간 교반하였다. TLC로 반응이 종료됨을 확인한 후 반응액을 차가운 물에 부은 후, dichloromethane (3×30 mL)로 추출하고 무수 MgSO₄를 가하여 건조하였다. 이를 여과하고 감압 농축하여 얻은 oily product를 column chromatography (methanol : methylene chloride = 1:49)를 실시하여 미황색의 순수한 결정을 얻었다. Yield: 77% (325 mg); m.p: 139-141°C; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.24-7.28 (2H, m, H-2',6'), 7.18-7.20 (1H, m, H-4'), 7.13-7.15 (2H, m, H-3',5'), 3.70 (1H, dt, *J*=6.8, 14.8 Hz, Ha-6), 2.96-3.02 (2H, m, S-CH₂-CH₂-), 2.76-2.80 (2H, m, S-CH₂-CH₂-), 1.21 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 220.5 (C-17), 195.0 (C-3), 173.6 (C-5), 140.6 (C-4), 129.0, 128.7, 128.6, 126.5, 54.5 (C-9), 51.0 (C-14), 47.7 (C-13), 41.4, 36.8, 36.0, 35.1, 34.9, 34.6, 31.5, 31.0, 30.5, 21.9 (C-15), 21.6 (C-11), 18.3 (C-19), 13.9 (C-18); GC-Mass (EI) *m/z*: 423 (M+1)⁺.

4-Cyclohexylthio-4-androstene-3,17-dione (6): Cyclohexyl mercaptan (150 mL, 1.23 mol)에 화합물 2 (300 mg, 1 mmol)을 가하여 용해한 후 금속 Na (100 mg)을 넣고 60°C에서 12시간 교반하였다. 반응혼합물을 감압 농축한 후 차가운 물에 가하고 ether (3×30 mL)로 추출하고 무수 MgSO₄를 가하여 수분을 제거하였다. 이를 여과하고 여액을 감압 농축한 후 column chromatography (ethyl acetate : *n*-hexane = 1:1)를 실시하여 미황색의 순수한 액상 물질을 얻었다. Yield: 62% (248 mg); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.83 (1H, dt, *J*=6.4, 14.8 Hz, H-6), 3.02-3.09 (1H, m, H-6), 1.29 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 220.5 (C-17), 195.3 (C-3), 174.6 (C-5), 128.4 (C-4), 54.6 (C-9), 51.0 (C-14), 47.7 (C-13), 45.1, 41.5, 36.0, 35.1, 35.0, 34.6, 33.6, 33.4, 31.5, 31.0, 30.7, 30.0, 26.0, 25.9, 21.9 (C-15), 20.6 (C-11), 18.4 (C-19), 13.9 (C-18); GC-Mass (EI) *m/z*: 400 (M)⁺.

17,17-Ethylenedioxy-3 β -hydroxy-5-androstene (7): DHEA (5 g, 17.4 mmol)를 benzene (150 mL)에 용해시키고 *p*-toluene-sulfonic acid (300 mg, 0.15 mmol)과 ethylene glycol (2 mL)을 실온에서 가한 후 12시간 dean-stark장치에서 환류하였다. 반응혼합물을 실온으로 냉각시킨 후 benzene을 증류시켜 제거하고 소량의 에탄올로 희석시킨 후 물(30 mL)을 가하여 결정을 석출시키고 여과하여 고체 물질을 얻었다. 이를 silica gel column chromatography (ethyl acetate : *n*-hexane = 1:1)로 분리 정제하여 백색의 순수한 결정으로 얻었다. Yield: 86% (3 g); m.p: 168-170°C (lit. 164-166°C).³²

17,17-Ethylenedioxy-4-androsten-3-one (8): 화합물 7 (3.5 g, 10.5 mmol)를 toluene (240 mL)시키고 *N*-methylpiperidone (15 mL, 132.2 mmol)과 aluminium isopropoxide (3.9 g, 18.9 mmol)을 실온에서 가한 후 질소 기류 하에 5시간 가열 환류하였다. 반응혼합물을 냉각시킨 후 toluene을 감압 증류하여 제거한 후 물(80 mL)과 ethyl acetate (50 mL)을 가한 후 실온에서 12시간 교반하였다. 반응혼합물의 수층을 ethyl acetate (3×15 mL)로 추출하였다. 추출액을 5% HCl, 10% NaOH 및 물로 세척한 후 anhydrous MgSO₄로 건조시키고 여과하여 여액을 얻고 이를 column chromatography (ethyl acetate : *n*-hexane = 1:3)로 분리 정제하여 백색의 순수한 결정으로 얻었다. Yield: 93% (2.8 g); m.p: 172-173°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.74 (1H, s, H-4), 3.84-3.93 (4H, m, OCH₂CH₂O), 1.11 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 199.7 (C-3), 171.5 (C-4), 124.2 (C-5), 119.3 (C-17), 65.4 (CH₂O), 64.7 (CH₂O), 53.8 (C-9), 49.9 (C-14), 45.8 (C-13), 38.8, 36.1, 35.9, 34.2, 34.1, 33.1, 31.4, 30.5, 22.8 (C-15), 20.6 (C-11), 17.6 (C-19), 14.4 (C-18); EI-MS (*m/z*): 330 [M]⁺.

4 α ,5 α -Epoxy-17,17-ethylenedioxyandrostane-3-one (9): 화합물

8 (1 g, 3.03 mmol)을 methanol (50 mL)에 용해시키고 5% NaOH (3 mL)와 30% H₂O₂ (14 mL)를 가하고 실온에서 8시간 교반하였다. 반응혼합물을 냉각시킨 후 methanol과 30% H₂O₂를 감압 증류하여 제거한 후 물(20 mL)를 가한 후 ethyl acetate (3×30 mL)로 추출하였다. 유기층을 5% HCl, 10% NaOH 및 물로 세척한 후 anhydrous MgSO₄로 건조, 여과하여 여액을 얻고 이를 column chromatography (ethyl acetate : n-hexane = 1:5)로 분리 정제하여 백색의 순수한 결정을 얻었다. Yield 46% (500 mg); m.p: 124-125°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.88 (4H, m, OCH₂CH₂O), 2.98 (1H, s, H-4), 1.16 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 206.7 (C-3), 119.2 (C-17), 70.4 (C-5), 65.4 (CH₂O), 64.7 (CH₂O), 62.8 (C-4), 49.9 (C-14), 46.5, 46.1, 37.4, 35.4, 34.2, 32.7, 30.3, 29.9, 29.3, 26.8, 22.8 (C-15), 21.1 (C-11), 19.1 (C-19), 14.5 (C-18); EI-MS (*m/z*): 346 [M]⁺.

4-Azido-17,17-ethylenedioxy-4-androsten-3-one (10): 4α,5α-Epoxy-17,17-ethylenedioxyandro stane-3-one (**9**, 200 mg, 0.58 mmol)을 ethanol: water (8:1, 18 mL)에 용해하고 sodium azide (225 mg, 3.46 mmol)과 ammonium chloride (91 mg, 1.71 mmol)을 실온에서 가한 후 5시간 환류 교반하였다. 반응혼합물을 냉각시키고 10% HCl로 중화시킨 후 ethanol을 감압 증류시켜 제거하고 남은 잔액에 물을 가하고 ethyl acetate (3×10 mL)로 추출하였다. 추출액을 무수 MgSO₄로 건조, 여과하고 여액을 감압 농축한 후 column chromatography를 (methanol : methylene chloride = 1:49)를 실시하여 미백색의 순수한 결정을 얻었다. Yield: 52% (100 mg); m.p: 161-163°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.85-3.43 (4H, m, OCH₂CH₂O), 1.18 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 193.4 (C-3), 155.3 (C-5), 128.7 (C-17), 119.3 (C-4), 65.4 (CH₂O), 64.7 (CH₂O), 54.2 (C-9), 49.9 (C-14), 45.8 (C-13), 39.3, 35.7, 34.6, 34.3, 33.9, 30.8, 30.5, 26.3, 22.8 (C-15), 20.6 (C-11), 17.8 (C-19), 14.5 (C-18); EI-MS (*m/z*): 343 [M-N₂]⁺.

4-Azido-17,17-ethylenedioxy-3β-hydroxy-4-androstene (11): **10** (50 mg, 0.13 mmol)를 absolute ethanol (5 mL)에 용해시키고 sodium borohydride (10 mg, 0.26 mmol)을 가하고 실온에서 1시간 교반하였다. 반응혼합물을 감압 농축하여 ethanol을 제거하고 남은 잔류물에 물을 가하여 결정을 석출시켜 얻어진 crude compound를 ethanol과 물로 재결정하여 백색의 순수한 결정으로 얻었다. Yield: 56% (27 mg); m.p: 172-174°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.38-4.46 (1H, m, H-3), 3.89 (4H, m, OCH₂CH₂O), 1.06 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 147.6 (C-5), 123.7 (C-17), 119.5 (C-4), 68.1 (C-3), 65.3 (CH₂O), 64.7 (CH₂O), 53.5 (C-9), 50.1 (C-14), 46.0 (C-13), 38.5, 36.1, 34.3, 33.1, 31.7, 30.7, 29.6, 24.6, 22.8 (C-15), 20.9 (C-11), 19.8 (C-19), 14.5 (C-18); EI-

Mass (EI) *m/z*: 345 [M-N₂]⁺.

4-Cyano-17,17-ethylenedioxy-4-androsten-3-one (12): **9** (200 mg, 0.58 mmol)을 ethanol: water (8:1, 18 mL)에 용해시키고 sodium cyanide (130 mg, 2.67 mmol)와 ammonium chloride (85 mg, 1.5 mmol)을 실온에서 가하고 12시간 가열 환류하였다. 반응혼합물을 감압 증류하여 ethanol을 제거하고 물을 가한 후 ethyl acetate (3×15 mL) 추출하고 anhydrous MgSO₄ 건조, 여과하여 여액을 감압 농축하여 crude product를 얻고 이를 column chromatography (methanol : methylene chloride = 1:49)를 실시하여 미백색의 순수한 결정을 얻었다. Yield: 38% (80 mg); m.p: 153-156°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.84-3.42 (4H, m, OCH₂CH₂O), 1.21 (3 H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 185.9 (C-3), 175.3 (C-5), 108.6 (C-4), 113.9 (CN, C-17), 65.4 (CH₂O), 64.6 (CH₂O), 49.9 (C-14), 45.7 (C-13), 43.8, 40.3, 36.1, 34.0, 31.9, 30.8, 30.3, 29.8, 25.5, 22.6, 20.9 (C-11), 18.0 (C-19), 14.3 (C-18); EI-MS (*m/z*): 355 [M]⁺.

4-Cyano-17,17-ethylenedioxy-3β-hydroxy-4-androstene (13): 4-Cyano-17,17-ethylenedioxy-4-androsten-3-one (**12**, 100 mg, 0.28 mmol)을 absolute ethanol (20 mL)에 용해시키고 sodium borohydride (21 mg, 0.56 mmol)을 가하고 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응혼합물을 감압 증류하여 ethanol을 제거하고 물을 가한 후 ethyl acetate (3×20 mL)로 추출하고 anhydrous MgSO₄ 건조, 여과하여 여액을 감압 농축하여 crude product를 얻었다. 이를 column chromatography (methanol : methylene chloride = 1:49)를 실시하여 미백색의 순수한 결정을 얻었다. Yield: 38% (80 mg); m.p: 174-176°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.13 (1H, m, H-3), 3.86-3.43 (4H, m, OCH₂CH₂O), 1.21 (3 H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 171.6 (C-5), 122.6 (C-4), 119.3 (CN, C-17), 65.4 (CH₂O), 64.7 (CH₂O), 60.7 (C-3), 49.9 (C-14), 45.8 (C-13), 43.8, 40.3, 36.3, 34.8, 31.2, 30.8, 30.3, 29.9, 25.5, 22.6, 21.2 (C-11), 19.5 (C-19), 14.4 (C-18); EI-MS (*m/z*): 356 [M-1]⁺.

4-Chloro-4-androstene-3,17-dione (14): **9** (100 mg, 0.32 mmol)을 acetone (2 mL)에 용해시키고 빙욕 중에서 conc. HCl (0.46 mL, mmol)을 가하고 4시간 교반하였다. 반응혼합물을 10% NaOH 용액으로 중화시켜 고체 생성물을 얻고 여과하여 미황색의 결정을 얻었다. 이를 ethyl acetate와 n-hexane으로 재결정시켜 백색의 순수한 결정을 얻었다. Yield: 43% (45 mg); m.p: 177-180°C (lit. 175°C).³³⁾

3β,5α,6β-Trihydroxyandrostan-17-one (16): 5α,6α-Epoxy-3β-hydroxyandrostan-17-one²⁶⁾ (**15**, 100 mg, 0.3 mmol)에 acetone (2 mL)와 HF (0.3 mL, 17.25 mmol)를 가하고 0°C에서 2시간 교반

하였다. TLC로 반응이 종료됨을 확인한 후 10% NaOH로 중화하여 석출된 백색의 침전물을 소량의 물로 세척하면서 감압 여과하여 얻었다. 이를 column chromatography (ethyl acetate : *n*-hexane = 1:5)로 분리 정제하여 백색의 순수한 결정으로 얻었다. Yield: 53% (58 mg); m.p: 298-302°C (lit. 301°C).³⁴⁾

6β-Bromo-3β,5α-dihydroxyandrostan-17-one (18): 5α,6α-Epoxy-3β-hydroxyandrostan-17-one (15, 100 mg, 0.3 mmol)에 acetone (2 mL)와 HBr (0.2 mL, 3.6 mmol)를 가하고 0°C에서 2시간 교반한 후 TLC로 반응이 종료됨을 확인하고 10% NaOH로 중화하였다. 이때 생겨난 백색의 침전물을 소량의 물로 세척하면서, 감압 여과를 통하여 얻은 crude product를 column chromatography (ethyl acetate : *n*-hexane = 1:3)로 분리 정제하여 백색의 순수한 결정으로 얻었다. Yield: 58% (76 mg); m.p: 384-386°C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 4.45 (1H, br s, C₃-OH), 3.26-3.45 (1H, m, H-3), 2.80 (1H, d, *J*=3.6 Hz, H-6), 0.95 (3H, s, H-19), 0.66 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 220.1 (C-17), 67.6, 65.8, 58.5, 51.9 (C-14), 47.6 (C-13), 43.3 (C-9), 35.9, 35.2, 33.0, 31.6, 29.6, 27.9, 21.9 (C-15), 20.2 (C-11), 16.2 (C-19), 13.9 (C-18); GC-Mass (EI) *m/z*: 384 (M-1)⁺.

Aromatase inhibitory assay

Placental microsome의 제조: Yoshida와 Osawa에 의해 보고된 방법³⁶⁾을 토대로 Ceba 등이 modify한 방법³⁷⁾으로 제조하였다. 병원에서 분만 후 얻은 인간 태반은 1% KCl을 함유하는 차가운 67 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)중에서 cotyledon tissue을 분리하고 0.25 M sucrose 및 0.5 mM dithiothreitol (DTT, 1:1 w/v)을 함유하는 67 mM potassium phosphate buffer를 사용하여 homogenize 하였다. Polytron homogenizer를 사용하여 5,000 g에서 30분 동안 원심 분리하고 supernatant를 20,000 g에서 30분 동안, 54,000 g에서 45분 동안 원심 분리하여 microsome pellet을 얻었다. Microsome pellet을 세척하고 0.25 M sucrose, 20% glycerol 및 0.5 mM DTT을 포함하는 67 mM potassium phosphate buffer로 재현탁시켜 -80°C에서 보관해 두고 필요 시에 사용하였다.

Aromatase assay 방법: Aromatase 활성 측정은 Thompson과 Siiteri³⁸⁾ 및 Heidrich 등³⁹⁾이 보고한 방법에 따라 aromatization과정에서 [¹β-³H]androstenedione (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA)로부터 방출된 ³H₂O의 양으로 측정하였다. 모든 화합물을 DMSO에 용해시키고 67 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)로 희석 하였다. 측정 방법을 간단히 요약하면, 20 μg microsome protein (1 mL), 40 nM [¹β-³H]androstenedione (1 μCi) 및 2 μM 농도의 합성한 화합물을 사용하였다. Aromatase 효소 반응은 NADPH (150 μM)를 첨가한 후 37°C에서 15분 동안 shaking water bath에서 배양시킨 후 20% trichloroacetic acid (250 μL)을 첨가하여 종료하였다. 혼합물을 charcoal-

dextran pellet을 함유하는 microcentrifuge tube로 옮기고, vortexing하고 1시간 동안 배양하였다. 14,000 g에서 10분 동안 원심 분리 한 후, supernatant를 새로운 charcoal-dextran pellet으로 옮기고 10분 동안 배양한 후 원심 분리하였다. ³H₂O을 함유하는 supernatant를 liquid scintillation cocktail과 혼합하고 liquid scintillation counter (Beckman LS3801, Irvine, CA, USA)를 이용하여 계수 하였다. 데이터는 ³H₂O의 생산량(%)으로 나타냈으며 저해제가 없는 대조군을 100%로 하여 해당화합물의 저해율(%)를 계산하였다. 모든 실험은 3회 실시하였다. 양성대조물질로 formestane (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

Breast cancer cell 의 배양 및 시료 제조

본 실험에 사용된 유방암 세포주는 human ER+ breast cancer cell line (T47D)와 ER breast cancer cell line (MDA-MB-231)을 사용하였으며 한국세포주은행에서 분양 받아 사용하였다. 세포주의 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 RPMI medium 1640에 penicilline/streptomycin 100 μg/mL를 첨가하여 성장 배지로 사용하고, 37°C, 5% CO₂의 조건을 갖춘 CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포가 증식하여 밀집 상태를 이루면 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척하고 trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 flask바닥으로부터 분리시킨 후, 세포 부유액을 conical tube에 모아 3000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상정액을 제거하고, 성장 배지를 넣어 세포 부유액을 만들어 1:3으로 계대 배양 하였다.

각 시료의 제조는 각 화합물 당 0.1 mol에 해당하는 양을 칭량하여 DMSO를 희석 용매로 사용하여 100 μM로 만들었다. 이를 기준으로 하여 DMSO로 희석하여 100, 50, 20, 10, 5, 1 μM을 만들고 희석 시료 4 μL를 196 μL RPMI 1640 (10% FBS)에 희석하여 사용하였다.

Cytotoxicity의 측정

MTT 실험은 보고된 방법³⁵⁾에 준하여 실시하였으며 요약하면 다음과 같다. 96-Well cell culture plate에 대수 증식기의 breast cancer cell을 각 well당 3,000 cell을 넣고, 1열의 well에는 세포 부유액 대신 배지만 넣어 흡광도 측정 시 blank로 사용하였다. 대조물질로는 estrogen antagonist인 tamoxifen (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 positive control로, DMSO를 negative control로 사용하였다. 37°C, 5% CO₂의 조건을 갖춘 CO₂ incubator에서 24시간 배양하고 1, 5, 10, 20, 50, 100 μM 농도의 시료 5 μL/well을 가하였다. 시료를 가하고, 48시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후, 2 mg/mL MTT용액 50 μL/well을 넣고, 다시 4시간 배양하였다. 상정액을 완전히 제거하고, DMSO 150 μL/well을 첨가하고 실온에서 진탕하여 살아있는 세포가 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)와 반응하여 생성된 보라색의 불용성 formazan을 용해시키고 균일하게 만든 후 540 nm에서 흡광도를 7VERSAmass를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰(Results and Discussion)

합성

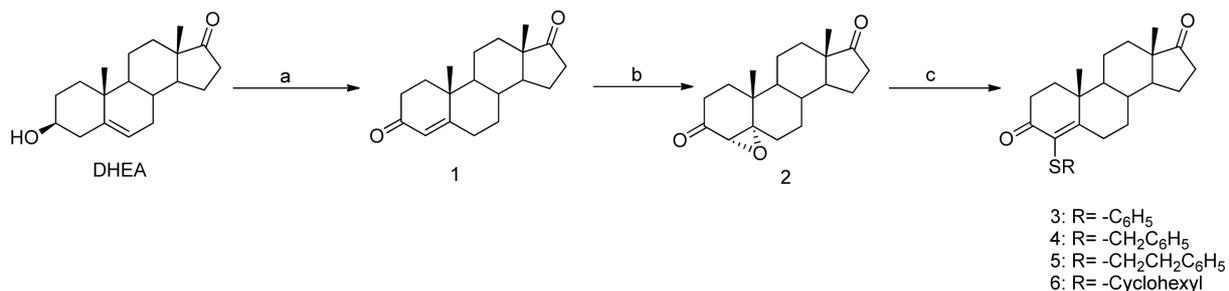
4-치환 androst-4-ene-3,17-dione 유도체 **3-6**의 합성방법은 scheme 1에 제시하였다. DHEA를 출발물질로 사용하여 Jones reagent로 산화반응을 시켜 4-AD (**1**) 합성하였다.²³ 이때 4-androstene-3,6,17-trione가 생성될 수 있기 때문에 6번 위치가 산화되지 않도록 Jones시약의 사용량과 시간 등 반응조건을 조절하였다. 화합물 **1**을 5% NaOH-MeOH의 염기조건에서 30% H₂O₂ 에폭시화시켜 4 α ,5 α -epoxyandrostane-3,17-dione (**2**)를 얻었으며 α -epoxy 고리의 입체 화학에 대해서는 이미 보고한 바 있다.²⁶ 이 epoxidation 결과는 Mann 등이³⁰ 화합물 **1**로부터 4M NaOH 수용액 중에서 30% H₂O₂로 에폭시화시켜 α : β =1:4의 epoxide mixture를 얻은 결과와는 달리 α -isomer를 diastereoselective하게 얻었다. 화합물 **2**와 phenyl mercaptan, benzyl mercaptan, phenylethyl mercaptan, 및 cyclohexyl mercaptan 등을 금속Na 가하고 60에서 반응시켜 epoxy 고리의 개환과 탈수 반응을 거쳐서 4-phenylthio-4-androstene-3,17-dione (**3**)³¹, 4-benzylthio-4-androstene-3,17-dione (**4**)³¹, 4-phenylethylthio-4-androstene-3,17-dione (**5**) 및 4-cyclohexylthio-4-androstene-3,17-dione (**6**)을 합성하였다. 화합물 **5**의 ¹H NMR spectrum의 3.70 ppm에서 downfield shift된 단일결합 proton peak가 double triplet으로 관찰이 되었으며, 이 peak를 HSQC spectrum으로 확인한 결과 2급 carbon의 proton임을 알 수 있었다. 그러므로 해당 proton peak는 C-6의 equatorial proton이 S의 전자 끌게 효과에 의해 downfield shift된 것으로 생각되었다. 이러한 수소 peak 양상은 화합물 **3**, **4** 및 **6**에서 모두 동일하게 관찰되었다. 그리고 ¹H NMR spectrum에서는 이중결합에 해당하는 수소 peak는 보이지 않았으나, ¹³C NMR spectrum에서 140.6 ppm과 173.6 ppm에서 두 개의 이중결합에 해당하는 4번과 5번 탄소 peak가 관찰되므로 화합물 내에 이중결합이 존재함을 알 수 있었다.

보고에 의하면 aromatase 저해 활성을 나타내는데 C-3의 carbonyl기가 필수적이지는 않으며 steroid골격의 A, B ring의 planarity와 5 α -입체 화학이 aromatase의 binding pocket에 요구되며 D ring의 구조도 관계됨을 제시하였다.³⁷ 그러므로 androstene의 4번 위치에 치환기의 도입과 더불어 Frank 등의 보고²⁵에 따라

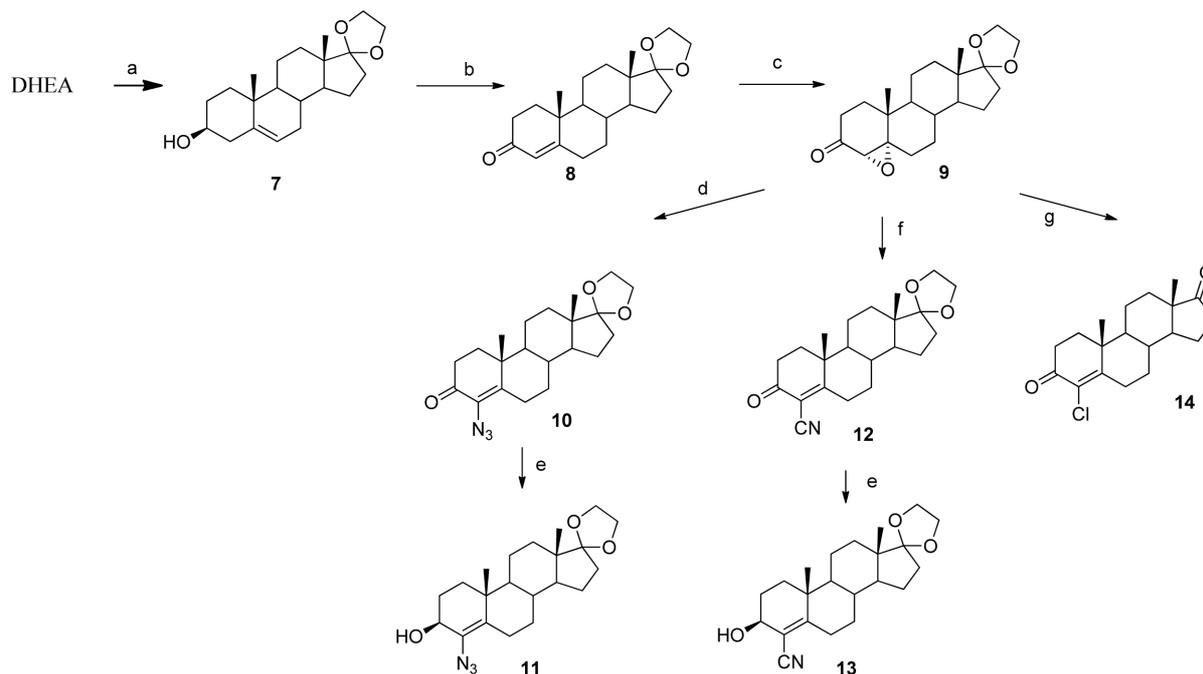
D ring의 17번 carbonyl기를 ethylenedioxy ring으로 modify한 유도체를 합성하였다. Scheme 2에 4-azido- 및 4-cyano group가 치환된 17,17-ethylenedioxy-4-androstene유도체 **10-13**과 17번의 ethylenedioxy고리가 개환된 4-chloro-4-androstene-3,17-dione (**14**)의 합성 방법을 제시하였다.

DHEA를 출발 물질로 사용하여 ethylene glycol과 반응시켜 ethylenedioxy 화합물 **7**을 합성하고 *N*-methylpiperid-4-one존재 하에서 aluminium isopropoxide로 산화시켜 17,17-ethylenedioxy-4-androsten-3-one (**8**)을 얻고 이를 30% H₂O₂와 반응시켜 4 β ,5 β -epoxy-17,17-ethylenedioxy-androstan-3-one (**9**)를 합성하였다. 화합물 **9**를 NaN₃ 및 NaCN을 EtOH:H₂O (8:1) 용매 중에서 반응시킨 결과 4-azido- 및 4-cyano-17,17-ethylenedioxy-androstan-3-one (**10**과 **12**)을 합성하고 이를 NaBH₄로 환원시켜 3 β -hydroxy유도체 **11**과 **12**을 얻었다. 화합물 **9**를 conc. HCl과 반응시킨 결과 화합물 **10**과 **12**과 달리 17번의 ethylenedioxy고리가 가수 분해된 생성물인 4-chloro-4-androstene-3,17-dione (**14**)가 얻어졌다.

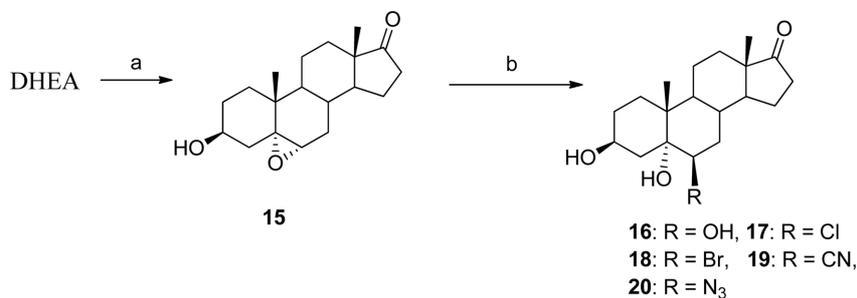
Estrone 3-*O*-sulfate에 steroid sulfatase가 작용하여 생성된 estrone으로 포함한 estrogen이 폐경 후 여성 유방암의 주 원인이 되므로 steroid sulfatase저해제의 개발은 유방암치료에 유용하다. 그러므로 저자 등²⁷이 steroid sulfatase 저해제 개발을 위하여 합성한 6-치환 androstane-3-*O*-sulfonate 및 -sulfamate 유도체가 효소 작용에 의해 생성될 수 있는 전구 물질인 3-hydroxy 유도체들의 aromatase에 대한 저해 활성과 유방암세포에 대한 cytotoxicity를 검토하고자 하였다. 6 β -치환-3 β ,5 α -dihydroxyandrostane-17-one유도체의 합성 방법을 Scheme 3에 제시하였다. C-6번 위치에 치환기를 도입하기 위하여 먼저 3-hydroxyandrost-5-ene (DHEA)를 30% H₂O₂로 반응시켜 이중결합에 diastereoselective하게 5 α ,6 α -epoxidation된 3 β -hydroxy-5 α ,6 α -epoxyandrostane-17-one (**15**)를 합성하였으며 5 α ,6 α -epoxy 고리의 입체화학은 이미 보고되었다.²⁶ 화합물 **15**를 HF, conc. HCl, HBr, sodium cyanide 및 sodium azide와 반응시켜 3 β ,5 α ,6 β -trihydroxyandrostane-17-one (**16**)³⁴, 6 β -chloro-3 β ,5 α -dihydroxyandrostane-17-one (**17**)²⁷, 6 β -bromo-3 β ,5 α -dihydroxyandrostane-17-one (**18**), 6 β -cyano-3 β ,5 α -dihydroxyandrostane-17-one (**19**)²⁷, 6 β -azido-3 β ,5 α -dihydroxyandrostane-17-one (**20**)²⁷를 얻었으며 합성 과정은 다른 방법으로 합성한 화합물 **16**과 신규화합물인 **18**만 제시하였다. 화합물 **17,19**



Scheme 1. Synthesis of 4-substituted 4-androstene-3,17-dione derivatives 3-6. Reagents and conditions: a. Jones reagent (CrO₃+ H₂SO₄ + H₂O), Acetone, RT, 6 h; b. 30% H₂O₂, 5% NaOH-MeOH, RT, 2 h; c. RSH, Na metal, 60°C, 6-12 h.



Scheme 2. Synthesis of 4-substituted 17,17-ethylenedioxy-4-androstene-3-one and -3-ol derivatives 10-14. Reagents and conditions: a. *p*-Toluenesulfonic acid, Ethylene glycol, Reflux, 12 h; b. Aluminium isopropoxide, *N*-Methylpiperidone, Toluene, Reflux, 5 h; c. 30% H₂O₂, 5% NaOH-MeOH, MeOH, RT, 2 h; d. NaN₃, NH₄Cl, EtOH:H₂O (8:1), Reflux, 5 h; e. NaBH₄, EtOH, RT, 1 h; f. NaCN, NH₄Cl, EtOH:H₂O (8:1), Reflux, 6 h; g. conc. HCl, Acetone, RT, 4 h.



Scheme 3. Synthesis of 6-substituted 3,5-dihydroxyandrostane-17-one derivatives 16-20. Reagents and condition: a. 30% H₂O₂, 5% NaOH-MeOH, MeOH, RT, 8 h; b. 16: HF, Acetone, 0°C, 2 h, 17: conc. HCl, Acetone, 0°C, 2 h, 18: HBr, Acetone, 0°C, 2 h, 19: NaCN, NH₄Cl, EtOH:H₂O (8:1), Reflux, 24 h, 20: NaN₃, NH₄Cl, EtOH:H₂O (8:1), Reflux, 24 h.

및 20의 6β에 해당하는 입체 구조는 이미 보고되었으며 새로이 합성된 6-hydroxy- 및 β-bromo-치환 유도체 16과 18도 1D-와 2D-NOESY spectra 등의 같은 방법으로 β-configuration임을 확인하였다.^{27,34)}

Aromatase 저해 활성

13종의 합성한 화합물의 aromatase 저해 활성을 screening하였고 그 결과를 Table 1에 제시하였다. [1β-³H]androstenedione 40 nM과 human placental microsome 단백질 20 μg과 화합물 2 μM 농도에서 효소 반응으로 생성된 ³H₂O의 양으로 aromatase 저해율(%)을 측정하였으며 양성 대조물질로는 formestane을 사용하였다.

화합물 3-6은 phenylthio-가 치환된 화합물 3이 높은 저해율 75.34%를 나타냈으며 이 결과로 미루어 4번 위치에 bulky하지

않은 치환기가 저해 활성에 적합한 것으로 보였다. 위 결과를 반영하여 androst-4-ene의 4번 위치에 N₃, CN 및 Cl로 치환시키고 17번 위치를 modify한 4-치환 17,17-ethylenedioxy-4-androstene-3-one (10, 12 및 14)과 화합물 10과 12를 NaBH₄로 환원시켜 얻은 3β-hydroxy 유도체 11과 13의 aromatase 저해율(%)을 측정하였다. 4-Azido-17,17-ethylenedioxyandrost-4-en-3-one (10)이 합성한 화합물 중 가장 높은 저해율 94.70%를 나타냈으며 formestane (99.45%)와 유사하였다. 4-chloroandrost-4-ene-3,17-dione (14)은 92.85%의 저해율을 나타냈으며, 6-치환 3β,5α-dihydroxyandrostane 유도체 17-20의 저해율 측정 결과는 6-chloro- 및 6-bromo유도체 (17 및 18)가 각각 88.33% 및 90.49%의 저해율을 보였다.

Table 1. Aromatase inhibition of synthesized compounds at 2 μ M in human placental microsomes

Compounds	Aromatase inhibition (%) \pm SEM ^a
3	75.34 \pm 2.12
4	12.13 \pm 0.19
5	7.87 \pm 0.11
6	21.44 \pm 1.07
10	94.70 \pm 3.21
11	61.34 \pm 2.15
12	78.55 \pm 2.20
13	70.23 \pm 2.23
14	92.85 \pm 3.18
16	NT
17	88.33 \pm 3.28
18	90.49 \pm 3.79
19	65.33 \pm 2.16
20	45.35 \pm 2.11
Formestane	99.45 \pm 1.15

^aConcentration of 40 nM (1β -³H)androstenedione, 20 μ g of protein from human placental microsomes, 2 μ M of the synthesized compounds, and 15 min of incubation were used. The experiments were done in triplicate. The results represent the mean \pm SEM of three different experiments. NT: No test

Table 2. *In vitro* cytotoxic activity of the synthesized compounds against human breast cancer cell lines T47D and MDA-MB-231

Compound No.	IC ₅₀ (μ M) ^a	
	T47D	MDA-MB-231
3	81.3	75.2
4	>100	>100
5	>100	>100
6	>100	>100
10	89.1	25.6
11	57.4	54.3
12	90.6	32.7
13	48.2	67.1
14	>100	41.8
16	NT	NT
17	>100	>100
18	>100	>100
19	>100	>100
20	>100	>100
Tamoxifen	9.75	13.7

^aSeven different concentrations (0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) of the compounds and 48 h of incubation were used. NT: No test

Cytotoxic Activity

폐경 후 유방암 환자에게 aromatase 저해제를 투여하는 것은 화학요법제 투여에 비교하여 발생하는 부작용이 적은 편이다. 그러므로 aromatase 저해제로 작용하면서 cytotoxic activity를 갖는 화합물을 얻기 위해 cytotoxicity를 측정하고자 하였다. 4-치환 androst-4-ene 및 6-치환 $3\beta,5\alpha$ -dihydroxyandrostane유도체 13종과 양성 대조 물질로 tamoxifen을 사용하여 두 cell line (T47D 및 MDA-MB-231)에 대하여 48시간 배양 후 MTT test를 실시하고 그 결과를 Table 2에 제시하였다.

SERM으로 작용하는 non-steroid구조의 tamoxifen은 T47D cell (IC₅₀ 9.75 μ M) 및 MDA-MB-231 cell (IC₅₀ 13.7 μ M)에 대하여 우수한 항암 효과를 나타냈다. 보고에 의하면 formestane은 T47D cell에는 cytotoxic activity가 없으나 MDA-MB-231 cell에는 약한 세포독성 효과(IC₅₀ 53.3 μ M)²²⁾를 나타냈다. 활성을 측정한 모든 화합물은 tamoxifen보다 cytotoxic activity가 낮았다. 4번 위치에 thio의 치환기를 가진 화합물 3-6의 T47D와 MDA-MB-231 cell에 대한 cytotoxicity 측정 결과 화합물 3이 IC₅₀ 81.3 및 75.2 μ M의 값을 보였다. 4-치환 4-androstene유도체 10-14의 실험 결과를 보면 4-azido- 및 4-cyano-17,17-ethylenedioxyandrost-4-en-3-one (10 및 12)가 T47D에는 낮은 cytotoxicity (IC₅₀ 89.1 및 90.6 μ M)를 보이나 MDA-MB-231 cell에 대하여 각각 IC₅₀ 25.6 및 32.7 μ M의 활성을 나타내어 formestane보다 좋은 세포독성 효과를 보였다. 6-치환 $3\beta,5\alpha$ -dihydroxyandrostane유도체 17-20는 cytotoxic activity를 나타내지 않았다.

결론(Conclusion)

폐경 후 estrogen 의존성 유방암 치료제 개발을 목적으로 4-치환 androst-4-ene유도체 및 6-치환 $3\beta,5\alpha$ -dihydroxyandrostane유도체를 합성하고 효소 aromatase에 대한 저해율과 human ER+ 및 ER breast cancer cell line인 T47D 및 MDA-MB-231에 대하여 cytotoxic activity를 측정하였다. 4-Azido-17,17-ethylenedioxyandrost-4-en-3-one (10)가 가장 높은 aromatase 저해율 94.70%을 보였으며, 화합물 14와 18은 92.85%과 90.49%의 저해율을 나타냈다. 두 유방암 세포주에 대한 cytotoxic activity는 모든 화합물이 양성대조물질로 사용한 tamoxifen보다 낮았다. 4번 위치에 thio기를 보유한 치환기를 가진 4-ene-3,17-dione 계열의 화합물 3-6 중에는 phenylthio기가 치환된 화합물 3이 81.3 및 75.2 μ M의 값을 보였다. 17,17-ethylenedioxy ring을 가진 4-치환 4-en-3-one system과 3 β -hydroxy-4-ene system을 가진 화합물 (10-13) 중에서 10과 12가 MDA-MB-231 cell 높은 cytotoxicity (IC₅₀ 25.6 및 32.7 μ M)를 나타냈다. 6-치환 $3\beta,5\alpha$ -dihydroxy system을 가진 화합물 (17-20)은 두 유방암 세포 모두에 cytotoxic activity가 없었다.

Conflict of Interest

모든 저자는 이해 상충을 가지고 있지 않음을 선언한다.

References

- Miller, W. R. and O'Neill, J.: The importance of local synthesis of estrogen within the breast. *Steroids* **50**, 537 (1987).
- Chumsri, S., Howes, T., Ba, O. T., Sabnis, G. and Brodie, A.: Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **125**, 13 (2011).
- Powles, T. J., Ashley, S., Tidy, A., Smith, I. E. and Dowsett, M.: Twenty-year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 283 (2007).
- Johnston, S. R.: Endocrine manipulation in advanced breast cancer: recent advances with SERM therapies. *Clin. Cancer Res.* **7**, 4376s (2001).
- Addo, S., Yates, R. A. and Laight A.: A phase I trial to assess the pharmacology of the new oestrogen receptor antagonist fulvestrant on the endometrium in healthy postmenopausal volunteers. *Br. J. Cancer* **87**, 1354 (2002).
- Kvinsland, S. and Utaaker, E.: Oral high-dose progestins as treatment for advanced breast cancer. *Acta. Oncol.* **28**, 811 (1989).
- Kennedy, B. J.: Fluoxymesterone therapy in advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **259**, 673 (1958).
- Herjan, J. T., Bennink, C., Verhoeven, C., Dutman, A. E. and Thijssen, J.: The use of high-dose estrogens for the treatment of breast cancer. *Maturitas* **95**, 11 (1917).
- Noller, K. L. and Fish, C. R.: Diethylstilbestrol usage: Its interesting past, important present, and questionable future. *Med. Clin. North Am.* **58**, 793 (1974).
- Brueggemeier, R. W., Hackett, J. C. and Diaz-Cruz, E. S.: Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr. Rev.* **26**, 331 (2005).
- Sikora, M. J., Condero, K. E., Larios, J. M., Johnson, M. D., Lippman, M. E. and Rae, J. M.: The androgen metabolic 5-androstane-3,17-diol (3-Adiol) induces breast cancer growth via estrogen receptor; implication for aromatase inhibitor resistance. *Breast Cancer Res. Treat.* **115**, 289 (2009).
- Smith, I. E. and Dowsett, M.: Aromatase inhibitors in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2431 (2003).
- Lumachi, F., Luisetto, G., Basso, S. M., Basso, U., Brunello, A. and Camozzi, V.: Endocrine therapy of breast cancer. *Curr. Med. Chem.* **18**, 513 (2011).
- Mouridsen, H. T.: Incidence and management of side effects associated with aromatase inhibitors in the adjuvant treatment of breast cancer in postmenopausal women. *Curr. Med. Res. Opin.* **22**, 1609 (2006).
- Schulz, S., Klann, R. C., Schonfeld, S. and Nyce, J. W.: Mechanisms of cell growth inhibition and cell cycle arrest in human colonic adenocarcinoma cells by dehydroepiandrosterone: Role of isoprenoid biosynthesis. *Cancer Res.* **52**, 1372 (1992).
- Boros, L. G., Puigianer, J., Cascante, M., Lee, W. N., Brandes, J. L. and Bassilian, S.: Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibits the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Res.* **57**, 4242 (1997).
- Gerrais, M. and Tan, L.: 6-Hydroxyiminoandrostenedione, a new specific inhibitor of estrogen biosynthesis and its effect on T47D human breast cancer cells. *Anticancer Res.* **13**, 383 (1993).
- Poza, J., Rega, M., Paz, V., Alonso, B., Rodriguez, J. and Salvador, N.: Synthesis and evaluation of new 6-hydroxyimino steroid analogues as cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 4722 (2007).
- Sadekova, S. I., Tan, L. and Chow, T. Y.: Identification of the aromatase in the breast carcinoma cell lines T47D and MCF-7. *Anticancer Res.* **14**, 507 (1994).
- Djurendić, E., Daljeu, J., Sakaè, M., Èanadi, J., Šanta, S. J., Andrija, S., Klisurija, O., Kojić, V., Bogdanovića, G., Djurendić-Brenesel, M., Novakovića, S. and Gaši, K. P.: Synthesis of some epoxy and/or N-oxy 17-picolyl and 17-picolinylidene-androst-5-ene derivatives and evaluation of their biological activity. *Steroids* **73**, 129 (2008).
- Djurendić, E. A., Ajdukovića, J. J., Sakaè, M. N., Èanadi, J. J., Kojić, V. V., Bogdanovića, G. M. and Penov Gaši, K. M.: 17-Picolylidene-substituted steroid derivatives and their antiaromatase and cytotoxicity activity. *ARKIVOC* xiii, 311 (2009).
- Jakinov, D. S., Kojić, V. V., Aleksija, L. D., Bogdanovića, G. M., Ajdukovića, J. J., Djurendić, E. A., Penov Gaši, K. M., Sakaè, M. N. and Jovanovića-Šanta, S. S.: Androstane derivatives induce apoptotic death in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **25**, 7189 (2015).
- Bansal, R. and Guleria, S.: Synthesis of 16E-[3-methoxy-4-(2-aminoethoxy)benzylidene]androstene derivatives as potent cytotoxic agents. *Steroids* **73**, 1391 (2008).
- Sharma, S. K., Zheng, W., Joshua, A. V., Abrams, D. N. and McEwan, A. J. B.: Synthesis and evaluation of novel 4-amino-4,6-androstadiene-3,17-dione: An analog of formestane. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 5563 (2008).
- Frank, E., Musci, I., Zupkó, I., Réthy, B., Falkay, G., Schneider, G. and Wolfling, J.: Efficient approach to androstene-fused arylpyrazolines as potent antiproliferative agents. Experimental and theoretical studies of substituent effects on BF₃-catalyzed intramolecular [3+2]cycloadditions of olefinic phenylhydrazones. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 3894 (2009).
- Ma, E. and Kim, E.: Epoxidation and reduction of DHEA, 1,4,6-androstatrien-3-one and 4,6-androstadien-3β,17β-diol. *Molecules* **10**, 572 (2005).
- Park, J.-H. and Ma, E.: Synthesis and steroid sulfatase inhibitory effect of androstane-3-O-sulfonate and -sulfamate derivatives. *Yakuh Hoeji* **62**, 401 (2018).
- Hunter, A. C. and Priest, S.-M.: An efficient one-pot synthesis generating 4-ene-3,6-dione functionalised steroids from steroidal 5-en-3β-ols using a modified Jones oxidation methodology. *Steroids* **71**, 31 (2006).
- Jasuja, R., Ramaraj, P., Mac, R. P., Singh, A. B., Storer, T. W., Artaza, J., Miller, A., Singh, R., Taylor, W. E., Lee, M. L., Davidson, T., Singh-Hikim, I., Gonzalez-Cadavid, N. and Bhasin, S.: Δ⁴-Androstene-3,17-dione binds androgen receptor, promotes myogenesis in vitro and increases serum testosterone levels, fat-free mass, and muscle strength in hypogonadal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 855 (2005).
- Mann, J. and Pietrzak, B.: The synthesis of 4-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione and other potential aromatase inhibitors. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 2681 (1983).
- Abul-Hajj, Y. J.: Synthesis and evaluation of 4-(substituted thio)-4-androstene-3,17-dione derivatives as potential aromatase inhibitors. *J. Med. Chem.* **29**, 582 (1986).
- Criton, M., Gloux, D. and Montero, J.-L.: Novel methods for the preparation of DHEA derivatives. US patent 0032462 A1. 08. Feb. (2007).
- Camerino, B.: US Patent 2,953,582, 4-Chloro-androsterone, Sept. 20. (1960).
- Andrade, L. C. R., de Almeida, M. J. B. M., Paixao, J. A., Carvalho, J. F. S. and Sa de Melo, M. L.: 3β,5α,6β-Trihydroxyandrostane-17-one. *Acta. Crystallographica Section E* **167**, o1056 (2011).
- Cheng, L., Shi, L., Wu, J., Zhou, X., Li, X., Sun, X., Zhu, L.,

- Xia, T.-S. and Ding, Q. : A hederagenin saponin isolated from *Clematis ganpiniana* induces apoptosis in breast cancer cells the mitochondrial pathway. *Oncology Lett.* **15**, 1737 (2018).
36. Yoshida, N. and Osawa, Y. : Purification of human placental aromatase cytochrome P-450 with monoclonal antibody and its characterization. *Biochemistry* **30**, 3003 (1991).
37. Cepa, M. D. S., Tavares-da-Silva, E. J., Correia-da-Silva, G., Roleira, F. M. F. and Teixeira, N. A. A. : Structure-activity relationships of new A,D-ring modified steroids as aromatase inhibitors: Design, synthesis, and biological activity evaluation. *J. Med. Chem.* **48**, 6379 (2005).
38. Thompson, E. A. and Siiteri, P. K. : Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *Biol. Chem.* **249**, 53 (1974).
39. Heidrich, D., Steckelbroeck, S. and Klingmuller, D. : Inhibitor of human cytochrome P-450 aromatase activity by butylins. *Steroids* **66**, 763 (2001).

Authors' Positions

Min Woo Kim : Graduate student

Eunsook Ma : Professor