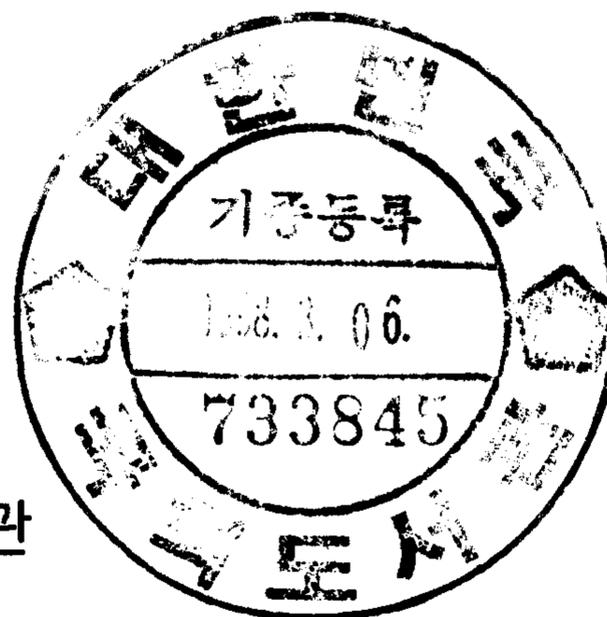


1997 년도
최종 보고서

분자수준화학의 응용기술 개발사업
Studies on Molecular Level Chemistry

RAS INHIBITOR 항암제의 개발

- Research for New RAS Inhibitors -



연구기관

한국화학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과 학 기 술 처 장 관 귀 하

본 보고서를 “분자수준화학의 응용기술 개발사업” 과제 (세부과제명: RAS INHIBITOR 항암제의 개발)의 최종 보고서로 제출합니다.

1998. 1

연구 기관 : 한국화학연구소
총괄연구 책임자 : 최 길 영
세부연구 책임자 : 채 영 복
책임 연구원 : 채 영 복
선임 연구원 : 노 재 성
연구 원 : 송 복 주,
신 찬 재

요 약 문

I. 제 목

RAS INHIBITOR 항암제의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

항암제 개발분야 중 현재 선진 제약업체에서 가장 집중적으로 연구가 진행되고 있는 cell signal transduction pathway에 근거한 FPTase의 억제제 개발은 저독성의 항암제로서 완치를 위한 전략중 가장 희망적인 접근 방법 중 하나라 할 수 있다. 이러한 분야의 연구를 위해 본 연구에서는 Benzodiazepine계열(BZA)의 신규 화합물을 합성하여 활성시험을 통한 새로운 항암 선도화합물의 확보를 그 목적으로 하고 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- BZA유도체의 합성
- 합성화합물의 효소활성 시험
- SAR 연구

IV. 연구개발결과

- 목적하는 Benzodiazepine analogues 합성 방법 확립
- 신규화합물 합성
- FPTase효소억제 시험 중

V. 연구개발결과의 활용계획

FPTase억제 화합물을 합성하여 그들의 구조-활성 상관관계를 연구하여 신약 탐색 도출을 유도한다.

SUMMARY

I. Title

Research for New RAS Inhibitors

II. Justification and Purpose of the Project

One of the promising strategies for ideal anticancer drug development is believed to be the inhibition of cell signal pathways. With the above purpose in mind, worldwide efforts are now in competition and some of the visible compounds appear as results. In this research the purpose for the R&D of ideal anticancer drugs were initiated by the synthesis of Benzodiazepine derivatives targeted for the inhibition of FPTase.

III. Scope and Contents of the Research

- Synthesis of BZA Analogues
- Enzyme Assay for the Synthesized Compounds
- SAR Study

IV. Result of the Research

- Synthetic method for the target compounds was established
- Compounds with Zn^{++} binding groups in the BZA were synthesized.
- Inhibitory activity against FPTase are now under tests.

V. Future Plan Based on the Result

Through the SAR study, new anticancer leading compounds based on FPTase followed by the optimization process are to be carried out for the establishment of the result.

CONTENTS

I. Introduction.....	7
II. State of the Development.....	8
III. Contents and Result of the Research.....	18
IV. Achivement and Contribution of Research Purpose.....	19
V. Future Plan Based on the Result.....	19
VI. References.....	20

목 차

제 1 장	서론.....	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	8
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	18
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도..	19
제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	19
제 6 장	참고문헌.....	20

제 1 장 서 론

현대인의 약 20% 가 암으로 인해 사망하게 될 것이라는 통계는 전혀 과장이 아니며 (1994년도 전체 사망자의 22%가 암이 원인), 암은 따라서 심장질환 계통의 질병에 의한 사망률에 이어 두 번째 사망의 원인으로 자리하고 있다. 암에 대한 연구는 근세기 약 100년의 역사를 갖고 있으나 현재까지도 그 정확한 원인규명은 이루어지지 않고 있다. 이러한 원인은 근본적으로 암 특이적 현상인 암환자 개인의 세포나 조직 및 기관에 대한 특이성 및 개인과 개인간의 상이성에 의한 것이 제일 큰 원인이라 지목할 수 있다. 이러한 이유로 인해 각종 암의 근본적 치료가 매우 힘든 상황에도 불구하고 전 세계적인 의약품 관련 연구자들의 노력에 의해 그 중 몇몇 암들은 치료율이 매우 높아 조기 발견시 유아성 암, 자궁암, 유방암, 혈구암등은 완치의 효과를 나타내고 있는 상황으로 발전하여 오고 있다. 그러나 대부분의 암치료제들은 진정한 치료제라 할 수 없는 실정이며 이러한 근본적인 원인은 암세포와 정상세포간의 차별성이라는 문제점을 극복하지 못하고 있는 것에 의해 기인된다. 즉, 암세포 자체의 일차 특징인 과대증식의 과정이 정상세포의 개체유지 및 분화를 위한 정상과정과 속도면에서 차이가 있을 뿐 암세포만의 특이적 효소나 수용체들은 발견되고 있지 않다는 사실이 현재까지 이상적 항암제 개발목표를 어둡게 하고 있는 원인이다.

최근 이러한 사실로부터 벗어나, 의약품연구자들은 기존의 독성에 의한 항암제의 개발과정에서 벗어나 새로운 목표를 설정하고 연구개발하고 있으며 이러한 결과들이 이제 가시적으로 우리 앞에 놓이고 있는 실정이다. 이러한 분야들을 종합하면 세포내 신호전달에 관련된 단백질들의 저해제 개발 또는 세포주기관련 저해제 개발

등이라 할 수 있다.

본 연구에서는 이러한 분야중에서도 1990년대 가장 많은 관심과 함께 연구가 진행되고 있는 세포내 신호전달에 관련된 단백질들의 저해제 개발과 관련, 라스단백질의 farnesylation과정에 필요한 farnesyl-protein transferase(FPTase)의 저해제에 관한 연구를 설정, 문헌 조사 후 신규 저해제를 합성하되 기존의 알려진 선도화합물과 비교, 1) 저해활성이 우수하거나 2) pharmacokinetically 또는 pharmacodynamically 우수한 장점을 갖거나 3) 독성면에서 안전한 선도화합물의 확보를 위해 연구를 진행하고 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

Ras는 세포의 성장과 분화를 위한 일련의 신호전달과정 중 extracellular signal을 nucleus에 전달하는 GTP-bound active form과 GDP-bound inactive form cycle에 대한 molecular switch역할을 하고 있는 protein(p21^{ras})으로서 mutated p21 protein은 인간 암의 20 % 정도에서 발견되며 대장암은 50 % 이상, pancreatic carcinoma에는 90 % 이상, 특이적으로 분포되어 있음이 알려졌으며 따라서 항암제 개발을 위한 또 하나의 목표가 되고 있다. Ras는 GTP를 GDP와 phosphate로 가수분해하여 inactive form을 유지하며 이러한 GDP의 GTP로 변환은 guanine nucleotide releasing protein(GNRP)에 의해 GTP의 GDP 변환은 GTPase activating protein(GAP)에 의해 이루어 지고 있다.

상기 Ras는 이 후 일련의 posttranslational modification에

의해 membrane에 association되며 이러한 posttranslational modification도 새로운 항암제 개발을 위한 중요 목표로서 관심이 집중되어 많은 연구가 진행되어 오고 있다. posttranslational modification과정 중 세계적인 관심은 그 중 첫 단계인 farnesyl-protein transferase(FPTase)라는 효소에 의해 farnesyl pyrophosphate의 farnesyl group을 라스단백질의 CAAX motif에 있는 cysteine에 전달하는 반응이다. 이러한 변환은 Ras의 biological function을 위해서 반드시 거쳐야 하는 필수적인 과정이며 FPTase는 heterodimer로서 하나의 α -subunit(49 kDa)와 하나의 β -subunit(46 kDa)으로 이루어졌으며, 효소의 활성을 위해서 두 subunit가 모두 필요하다. Ras C-terminal과의 결합기능은 β -subunit에 있음이 chemical cross-linking studies에 의해 밝혀졌고, α -subunit의 기능은 farnesyl pyrophosphate(FPP)의 결합에 중요하리라 생각되고 있다. 이 효소의 활성에는 Zn^{++} , Mg^{++} 과 같은 2가 이온들을 필요로 하며, Zn^{++} 는 FPTase내에 peptide substrate의 결합에 필수적이며 효소 자체의 안정과 촉매작용에 참여 한다고 보고되어 있다. 몇 가지의 연구 및 실험적 결과들을 종합하여 볼 때 FPTase 저해제 연구를 통한 선택적인 prodrug 개발가능성은 매우 높은 편이라 할 수 있다. 이들 실험적 증거의 예들을 들어보면 다음과 같다. 첫째: 세포내 단백질의 지질화 반응에서 geranyl-geranylation은 farnesylation보다 5-10배 정도 더 빈번히 일어난다. 둘째: 몇몇 heterodimeric G protein의 와 20kDa의 GTPase protein인 G25k와 K-rev p21은 geranylgeranylation에 대한 substrate이다. 셋째: geranylgeranylated protein의 CAAX sequence에서 X는 leu인 반면, farnesylated protein의 X는 여러 가지 다른 아미노산들이 될 수 있다. 넷째: Cell culture에서 FPTase inhibitor 처리시, ras-transformed cells에 대해서 정상세포

와 비교하여 선택적인 증식억제를 나타냈다. 다섯째: 최근에는 동물 실험에서 transgenic mice에 FPTase inhibitor(prodrug)를 투여했을 때 tumor의 성장이 억제되었다. 그러므로 FPTase의 약물학적인 저해는 정상세포에 큰 독성없이 종양성장을 억제할 수 있다고 보고 있으며, 항암제 개발의 표적으로 관심의 대상이 되고 있다. 실제로 외국의 제약회사와 대학의 연구팀들이 몇가지 합성물질과 천연화합물을 이용한 동물실험이 진행되고 있다.

본 연구에서 추진하고자 하는 FPTase저해제 및 RAS 관련 억제제의 국제적인 연구결과들을 종합하여 다음 표에 나타내었다.

표 1. FPTase 저해제

Chemical source	Inhibitors	IC ₅₀ for FPTase(uM)	IC ₅₀ for GGPTase(uM)	Effect on mammalian cells
Natural Products	Patulin	290	ND	ND
	Fusidienol	0.3	ND	ND
	RPR 113228	0.83	59	ND
	Cyclindrol	2.2	ND	ND
	SCH 58,450	29	740	ND
	Barceloneic acid A	40	ND	ND
	Actinoplanic acid A/B	0.23/0.05	1/0.5	ND
CAAX 유도체	Tetrapeptide CVFM	0.025	ND	ND
	L-731,734	0.028	ND	Cell line transgenic mice
	BZA-2B	0.85		"
	CVIM	0.09	35	"
	B581	0.21	790	"
	SCH 44,342	2.8	>12	"
	Cys-4-ABA-Met	0.05	ND	"
	Cys-3-ABA-Met	6.4	ND	"
	L-739,749/50	0.24/0.0018	>100/3	Cell line transgenic mice
	BMS-185878	0.005	ND	"
CVWM	0.5	ND	ND	
L-739,787	0.3	ND	ND	
Farnesyl 유도체	HFP	0.03	35.8	ND
	FCP	0.083	26	ND
	α -Hydroxy farnesyl phosphonic acid	0.03	67	Block Ras processing
	Farnesyl diphosphate-based inhibitors	0.075-0.22	ND	ND

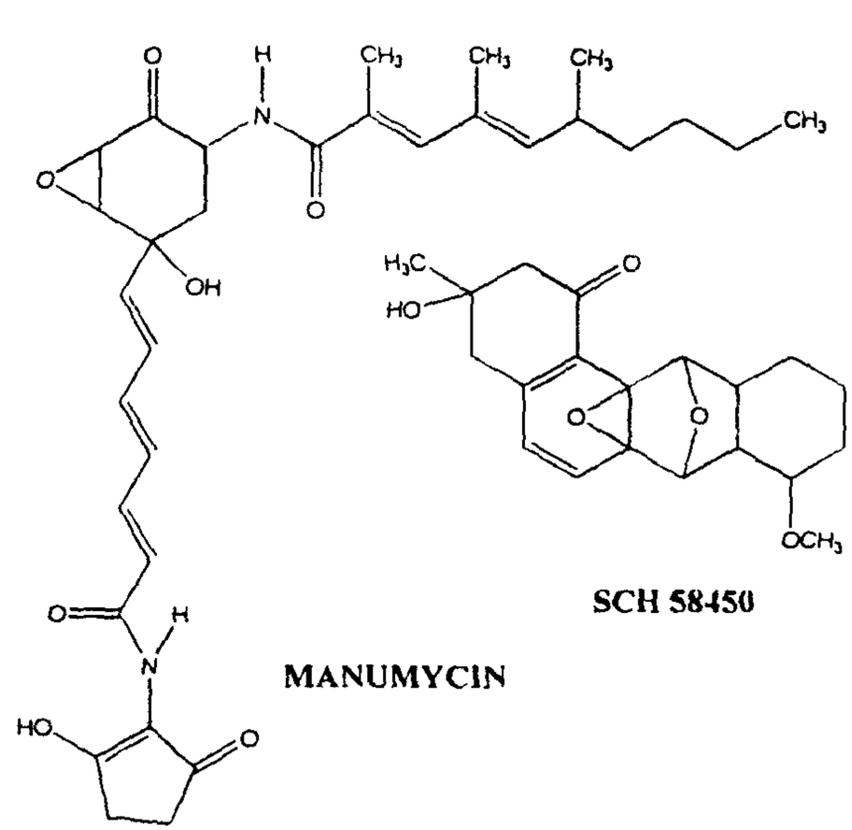


Fig. 1 Natural Products of FPTase Inhibitor

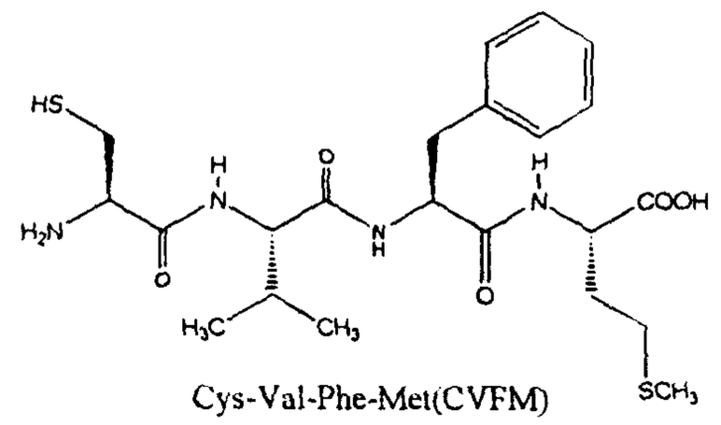
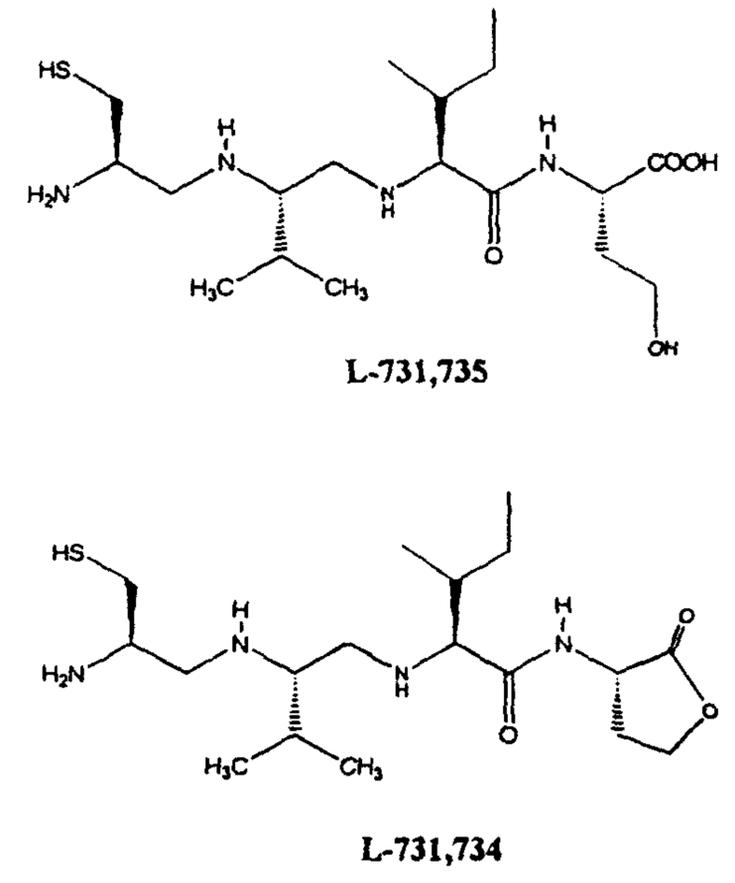


Fig. 2 Peptidic FPTase Inhibitor

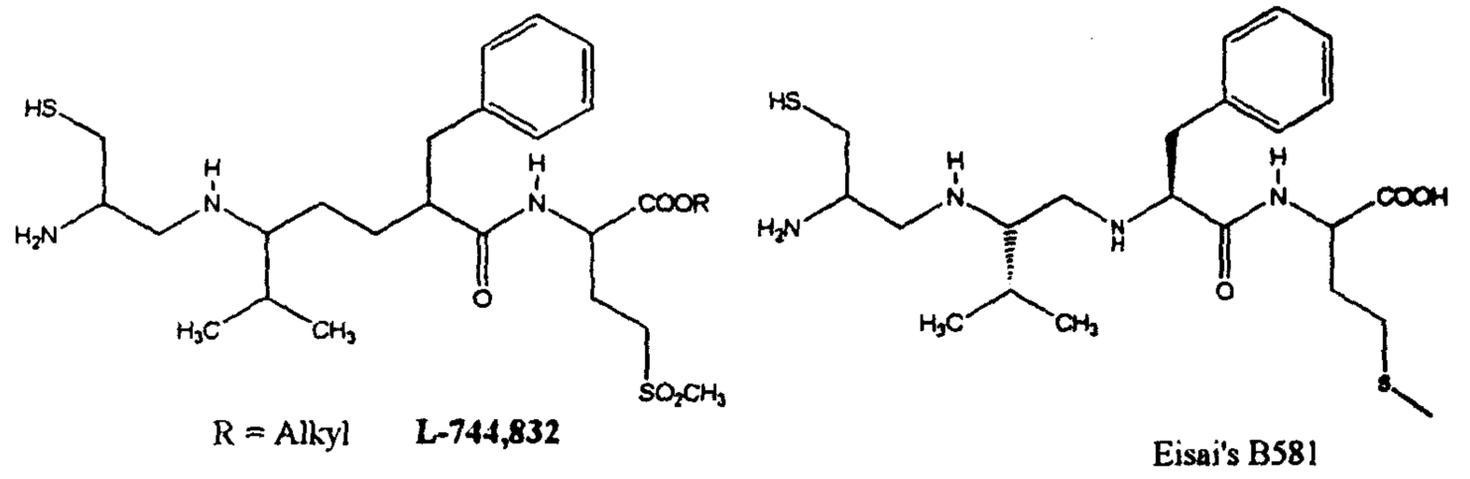


Fig. 3 Peptidomimetic FPTase Inhibitor

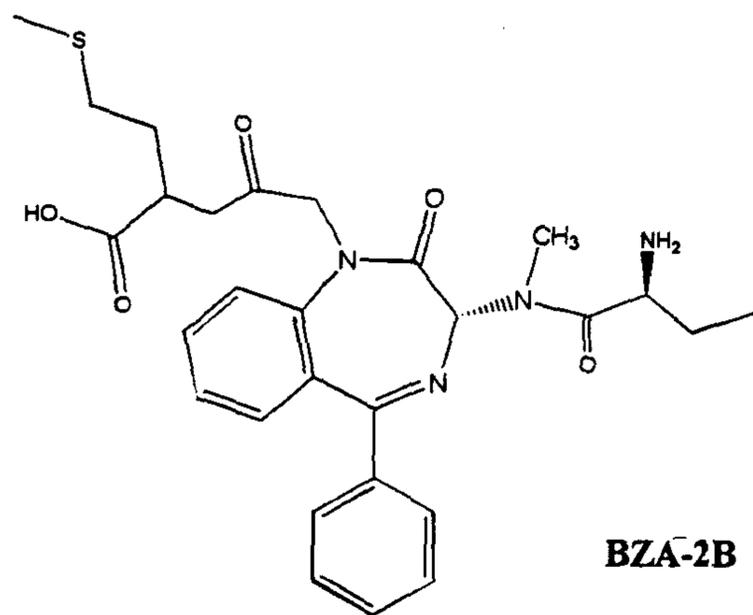
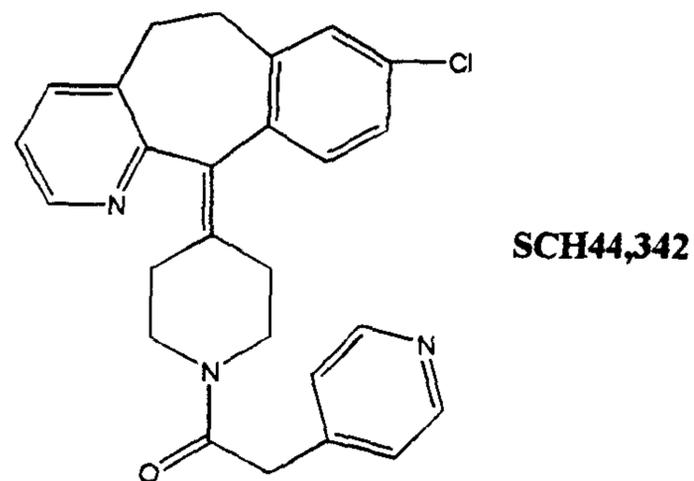


Fig 4. Nonpeptidic Inhibitor

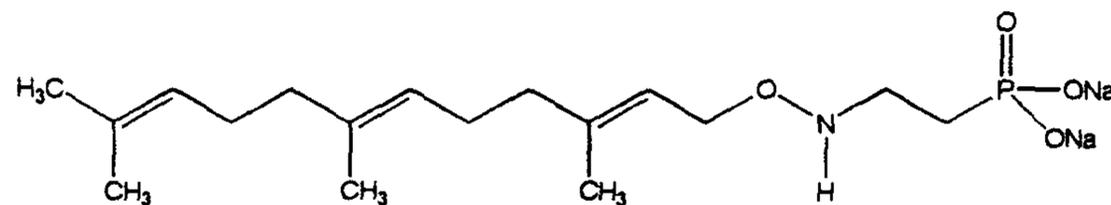
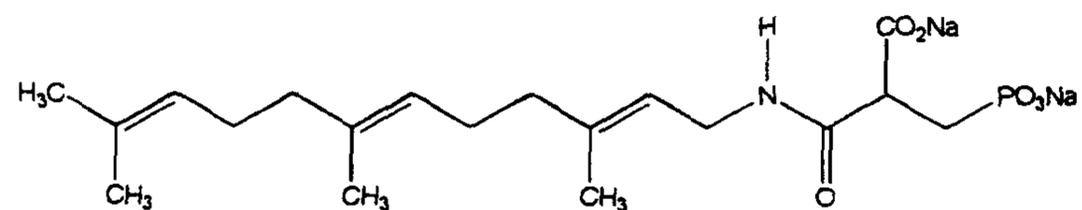


Fig. 5 Farnesyl pyrophosphate analogues

천연물 유래 저해제

처음으로 발견된 천연물 유래 저해제는 식물체로부터 분리한 limonene, perillic, dihydroperillic acid 등이며 이들 물질들은 Ras-transformed NIH3T3 cell에서 활성이 보인다는 것이 발표되었다. 그리고 미생물 유래 저해제는 1992년 방선균으로부터 분리한 Streptonigrin의 유도체인 10'-desmethoxy streptonigrin이 최초의 FPTase 저해제이며 비교적 약하게 억제($IC_{50}=21 \mu M$)시키고 또한, 여러 cell line에 세포독성이 있다고 밝혀졌다. FPTase 활성 저해를 보이는 다른 항생제로는 manumycin 계열의 유도체가 있다. UCF1-C는 manumycin 유도체이고, 이 계열 중 저해효과가 가장 큰 저해제이다($IC_{50}=5 \mu M$). 이 물질에 대한 반응속도론적인 분석결과 FPTase에 대한 경쟁적 저해제이며, 라스단백질에 대해서는 비경쟁적 저해제임이 밝혀졌다. 곰팡이로부터 분리된 FPTase 저해제($IC_{50}=1.1 \mu M$)인 gliotoxin도 라스단백질에 대해 비경쟁적임이 밝혀졌다.

두 개의 새로운 dicarboxylic acid 유도체 chaetomelic acid A와 chaetomelic acid B는 Chaetomella acutiseta의 발효액 추출물로부터 분리되었고 IC_{50} 값이 각각 55 nM과 185 nM로 FPTase에 강한 저해제 임이 밝혀졌다. 이 화합물은 반응속도론적인 분석, 그리고 입체구조의 겹침과 정전기적인 그룹의 computer modeling에 의해서 FPP의 효과적인 mimic를 보여주고 있다. Zaragozic acid A와 B는 squalene synthase의 강력한 inhibitor로 보고되어 있으며 또한, FPTase에 대해 경쟁적 저해제($IC_{50}=216 \text{ nM}$)로써 확인되었다. 합성된 유사체는 증가된 FPTase 저해 활성($IC_{50}=12 \text{ nM}$)을 보여주고 있다. 이 화합물은 FPP에 대해 경쟁적 저해제들이고, 라스단백질에 대해서는 비경쟁적 저해제들이다. Zaragozic acid A와 B는 Ras 형성 cell line에서 Ras경유 신호전달과정에 영향이 없는데, cell투과력

이 부족한데서 그 원인이 있는 것이다. 이들외에도 pepticinnamin 등이 FPTase 저해제로 발표되었다. pepticinnamins는 여러 가지의 발효액의 screening에 의해서 분리되어졌다. Antibiotic patulin은 mouse cell에서 단백질의 prenylation을 억제하나 FPTase의 억제에서는 약하게 작용한다는 것이 밝혀졌다(IC₅₀=290 μM). 그리고 Schering Plough Res. Inst.는 방선균으로부터 diepoxybenz[a]anthracene를 함유한 새로운 종류의 FPTase저해제인 SCH 58,450을 발표하였다.

Peptidic FPTase Inhibitors

1990년 처음으로 쥐로부터 순수 분리된 FPTase가 라스의 C-말단의 펩타이드류와 유사한 구조를 갖고있는 Cys-AAX류의 화합물들에 의해서 경쟁적으로 저해된다는 사실이 알려지면서 이들 구조를 모방한 저해제 들이 합성되기 시작하였으며, CVIM, CIIM, CVVM, CVLS등이 그것이다. 이 후에 새로이 합성된 저해제인 tetrapeptide CVFM은 A2에 aromatic 잔기를 갖고 있으며 *in vitro*에서 protein 자체의 Km value와 비슷한 농도에서 강하게 억제 (IC₅₀=25 nM)하지만 *in vivo*에서 파르네실화를 억제하지 못한다는 것이 밝혀졌다. 이외에도 세포안으로의 이동이 어렵고, 빠르게 가수분해되어지므로 더 이상의 prodrug으로 개발이 어렵다는 판단이 대두되기도 하였다.

Peptidomimetic FPTases Inhibitors

Natural substrate protein의 Cys-AAX 대신 metabolically stable, nonhydrolyzable incorporation isosteric replacement for the amide bonds에 대한 집중적인 연구에 의해 몇 몇 제약회사를 중심으로 Cys-AAX motif를 모체로 한 다양한 peptidomimetic 유도체들이

개발되고 이들 저해제들이 *in vivo* 실험에서도 긍정적인 결과를 보여주면서 이 분야의 연구는 매우 활기를 띠기 시작하여 지금까지 수십가지의 화합물이 연구개발 중이며 국내에서도 제약회사를 중심으로 이 분야의 연구가 활발하다. 이들 peptidomimetics 중에서 Merck Co. 연구소에서 개발한 L-731,735는 두 *N*-terminal amide bonds가 줄어든 CIIM 유도체로서 고안되어졌고, methionine을 homoserine으로 바꾸었다. 이러한 변형은 FPTase의 강한 *in vitro* inhibitor ($IC_{50}=282, 18 \text{ nM}$)로써 작용하고 있고 *in vivo*에서도 저해 활성을 보여준다. 앞에서 언급한 tetrapeptide CVFM의 체계적인 변형은 B581의 합성을 유도하였으며 *in vitro*에서 저해 활성이 모핵과 비교하여 두배 증가하였다. 이 유도체는 ras-transformed cell line에서 geranylgeranylated proteins보다 farnesylated proteins의 과정을 특이적으로 억제함이 밝혀졌다(1,000배 -10,000배 정도의 차이가 확인됨).

CAAX motif에 두 개의 aliphatic 잔기 대신에 benzodiazepine을 도입한 BZA류의 유도체들은 Genentech Inc.와 Goldstein group에 의해서 발표되었으며 이들 저해제들은 FPTase를 *in vitro*뿐 만 아니라 *in vivo*에서도 강력하게 선택적으로 저해한다. 이 화합물들의 특징은 *N*-말단의 시스테인과 peptide binding site에 있는 Zn^{++} 이온과 조화를 이루는 *C*-말단의 methionine을 갖도록 고안하였다는 것이다. 이 화합물은 Ras, nuclear lamins 그리고 다른 단백질의 세포에서의 farnesylation을 막는다. 이들 CAAX motif 유래 저해제들 중에서 Merck Co. 연구소에서 개발한 L-744,822는 아민 대신 에테르 결합을 도입시킨 저해제로써 nude mouse에 H-Ras-transformed cell을 이식하여 유발시킨 종양을 강력하게 억제시킨다는 것이 발표된 바 있다.

Farnesyl pyrophosphate analogues

합성 저해제의 또다른 모체는 farnesyl pyrophosphate라 할 수 있다. 그리고 이를 모체로하여 합성 유도체들 역시 FPTase를 강하게 억제한다는 사실이 발표되었다. 합성된 FPP유도체로는 hydroxyfarnesyl phosphonic acid와 다음 그림 에서와 같은 화합물들이 있다. 그리고 천연물로부터 분리된 manumycin, Chaetomelic acid등도 이런류화합물이라 할 수 있다. 이들 중 compound I, II는 매우 강력하게 FPTases를 저해하고 ($IC_{50}=83, 75$ nM) 세포주를 이용한 활성 검증에서도 좋은 결과를 보여 주지만, 높은 농도로 cell line 처리시 세포독성을 보여준다. Farnesyl amine 과 또 다른 long chain aliphatic amine은 높은 micromolar농도에서 Ras-transformed cell의 파르네실화와 세포성장을 억제함을 보여주었다.

기타저해제

기타의 합성저해제로는 Scherring Plough Res. Inst.에서 발표한 nonpeptide 계열의 tricyclic 화합물인 SCH 44,342가 있으며 이 저해제는 *in vitro*($IC_{50}=250$ nM) 및 *in vivo*(Cos cell)에서 FPTases 저해활성을 보여주고 있다.

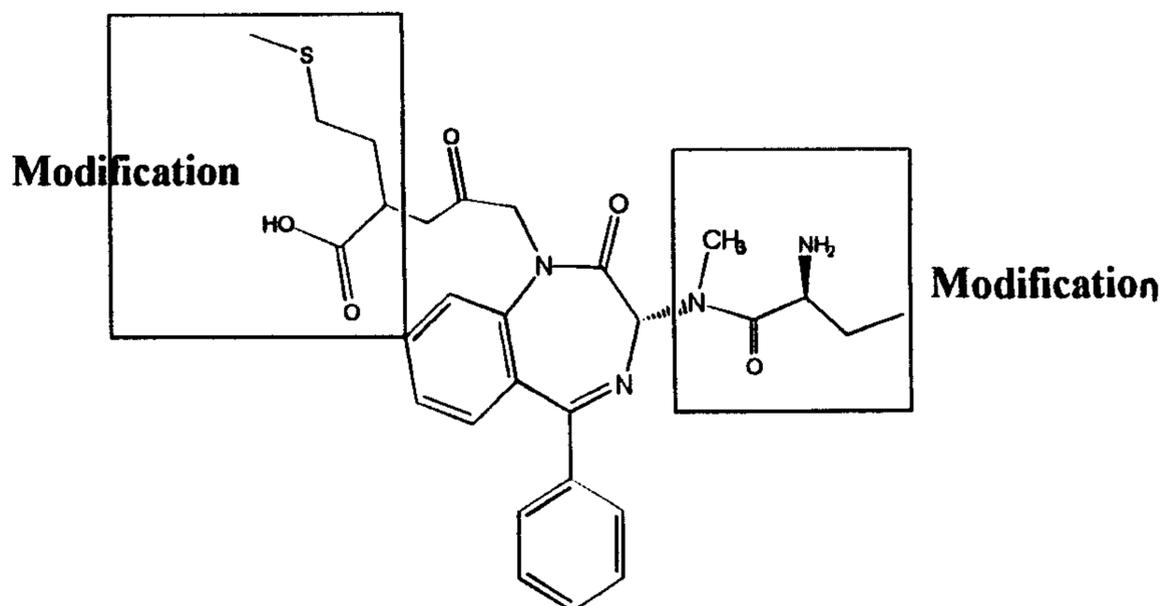
앞에서 설명한 바와 같이 현재 선진국의 Ras 저해제 연구개발과 관련된 분야 중 CAAX motif와 관련, 이 효소의 substrate mimetic으로 개발 중인 peptide mimetic 유도체들이 가장 활발하게 진행되고 있는 상황이다.

본 연구에서는 Genentech Inc. 및 Goldstein group에서 CVFM의 β -turn mimetics에 근거하여 개발 중인 Benzodiazepine

을 도입한 BZA화합물에 초점을 맞춰 새로운 화합물의 합성을 계획하였다. 이 화합물은 CaaX 의 dipeptide (aa) portion을 3-amino-1-carboxymethyl-5-phenyl-benzodiazepine-2-one (BZA) 를 nonpeptidic scaffolds로서 변환한 화합물이며 N-terminal amide bond를 methylation하여 얻은 BZA-2B ($IC_{50}=0.85$ nM)는 non-methylated analogue보다 400배 이상의 potency를 나타내고 있다. 이러한 이유로서 N-methylation된 화합물들의 conformational rigidity 및 hydrophobicity가 증가된 것에 기인한다고 추정되고 있다. BZA-2B는 FPTase 저해농도보다 ($IC_{50}=35$ nM) 40배 높은 농도에서 GGPTase를 억제하고 있다. 그러나 COOH-terminal methionone을 포함하고 있는 BZA-2B와 같은 위치에 leucine을 포함하고 있는 BZA-4B는 FPTase의 저해활성이 같음으로 인해 benzodiazepine-containing peptide는 상기 두가지 효소에 대해 선택성이 없는 것으로 나타났다. 또한 효소와의 결합을 결정하는 두가지 요소는 cysteine과 benzodiazepine substituents인 것으로 알려지고 있다. 대조적으로 GGPTase는 leucine-terminated inhibitor(BZA-4B)[$IC_{50}=7$ nM]에 대해 BZA-2B보다 5배 정도의 증가된 sensitivity를 나타내고 있다.

본 연구과 관련, 국내의 몇몇 제약업체에서도 FPTase의 억제제 개발에 목표를 두고 연구개발이 진행 중에 있으나 대부분 peptidomimetic 분야에 집중되어 있는 상황이다. 전 세계적으로도 Ras inhibitor 연구분야에서 FPTase억제제 연구 분야는 가장 큰 관심과 투자가 진행되고 있으며 상기에서 예시한 바와 같이 그 결과가 가시적으로 나타나고 있는 상황이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과



BZA유도체들의 특징인 *N*-말단의 시스테인과 benzodiazepine moiety는 peptide binding site에 있는 Zn^{2+} 이온과 조화를 이루며 이 계열의 화합물들이 활성을 갖는 가장 중요한 pharmacophore이지만 실제로 thiol group을 포함하고 있는 화합물의 경우 pharmacokinetically 또는 Pharmacologically 부정적 결과를 나타내는 사례가 의약 연구개발 상 자주 보고되고 있다. 따라서 본 연구는 cystein의 thiol group 대신, Zn^{++} 와의 binding 을 강력하게 유도하는 새로운 ligands를 benzodiazepine moiety에 삽입하여 그 저해활성의 증가를 이룩하기위한 기본전략을 수립, 목표 화합물의 합성에 대한 연구를 시작하였다. 그러나, 각각의 합성화합물의 구조 및 합성 방법은 본 연구의 진행 및 비밀보장의 이유로 인해 본 보고서에서는 생략하기로 하며 추후 선도화합물의 확보 및 특허권의 확립 후 상세한 설명을 하기로 한다. 현재까지 합성된 화합물은 enzyme inhibition활성 시험 중에 있으며 그 결과가 알려지는 대로 구조-활성상관 관계를 조사 연구하여 추후의 연구진행 방향을 보완 또는 수정 할 계획이다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

본 연구는 일차년도 연구이며 그 연구내용 중 문헌정보 수집, 목표화합물의 설계는 계획하였던 바와 같이 수행되었으나, 합성방법의 확립은 목표화합물의 합성진행 중 두가지 합성단계에서 어려움에 봉착했다. 첫 번째 단계는 너무 낮은 수율로 인해 출발물질의 확보 상 어려운 점이 많았으며 두번째 어려운 단계는 반응이 일어나지 않아 예상하지 못했던 어려움에 직면하였다. 이러한 합성 상의 문제점 해결을 위해 많은 시간이 소요되었으며 새로운 방법에 의한 목표화합물 합성방법의 시도로 인해 현재까지 다양한 유도체의 확보는 이루어지지 않았다. 또한, 현재 추진 중인 8단계의 합성법도 역시 몇몇 단계에서 낮은 수율을 나타내고 있으며 추후 개선의 요지가 많이 남아 있는 실정이다. 이러한 이유로 인해 목적하였던 다양한 유도체의 확보가 어려웠으며 이러한 이유로 인해 최근 합성이 완료된 화합물들의 효소활성 시험이 미완료되어 현재까지 일차년도의 목표인 합성화합물들의 구조-활성 상관 관계의 일차분석 결과를 확립할 수 없었다. 또한 본 연구는 추후 활성시험을 위한 위탁연구의 추진이 원활해져야 과제가 순조롭게 진행되리라 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획.

현재까지의 연구는 일차 효소억제 시험의 결과가 알려지는 대로 분석하여 다음 연구계획의 토대로 마련 할 것이나 과제 제안 과정에서 설정하였던 가정들이 분석결과와 맞지않는다면 추후 과제의 계속적 진행여부를 고려할 것이다.

제 6 장 참고문헌

1. M. Barbacid, *Annu. Rev. Biochem.*, 56, 779 (1987)
2. J. B. Gibbs, *Cell*, 65, 1 (1991)
3. Y. Reiss et al., *Cell*, 62, 81 (1990)
4. S. A. Armstrong, et al., *J. Biol. Chem.* 270, 7864 (1995).
5. M. S. Marshall, *Trends Biochem. Sci.*, 18, 250 (1993)
6. G. L. James, J. L. Goldstein et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9141 (1994).
7. G. L. James et al. *Science*, 260, 1937 (1993)
8. G. James et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 6221 (1995)
9. G. James et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4454 (1996)