

GOVP 12015834

BSKS1370-2000039-3

파네실전달 효소의 저해제 탐색 및
개발에 관한 연구

Screening and Development of Farnesyl Transferase
Inhibitors from Natural Sources

생명공학연구소

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “파네실전달 효소의 저해제 탐색 및 개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2000. 9.

주관연구기관명 : 생명공학연구소

연구책임자 : 권 병 목

참여 연구원 : 손 광 희

” : 강 귀 현

” : 이 승 호

” : 김 혜 경

” : 정 하 원

” : 강 현 미

” : 서 정 민

여 백

요 약 문

I. 제 목

파네실전달 효소의 저해제 탐색 및 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

라스 발암유전자는 (*ras oncogene*) 암조직이나 형질 전환된 사람의 세포주에서 거의 공통적으로 발견되는 발암유전자로서, 췌장암(90%), 직장암(50%), 폐암(50%), myeloid leukemias나 갑상선암(30%)등에서 높은 빈도로 관찰되었다. 이와 같은 이유에서 Ras 단백질을 통한 신호전달을 조절함으로써 새로운 항암제를 개발하고자하는 노력이 이루어 지고 있다. 그 중에서도 Ras 단백질 활성화 단계에 가장 중요한 과정이 카르복시 말단의 번역 후 변형과정(post-translational modification)이며 이 과정을 통하여 Ras 단백질이 원형질막의 안쪽 면에 위치하게 된다. 이러한 번역 후 변형과정은 Ras에 의한 형질전환에 필수적임이 밝혀졌는데, 즉 활성화된 Ras의 카르복시 말단에 변화가 있을 경우 형질을 전환시킬 수 있는 활성을 상실한다는 것이다. Ras의 번역 후 변형과정의 세 단계로 구분되나 첫단계인 파네실기가 카르복시 말단에서 4번째 위치의 시스테인에 도입되는 과정이 가장 중요한 과정으로 확인되었다. 90년초부터 다국적 기업을 포함하는 전세계의 많은 연구팀들이 이 효소의 저해를 통한 항암제 개발 연구를 활발하게 진행하고 있다. 몇 가지의 파네실전달 효소의 저해제를 이용한 동물실험결과 선택적으로 암세포의 성장을 억제한다는 결과가 발표되었고, 1998년 말에 발표된 임상 제1상의 결과도 긍정적인 평가가 나왔다 (Jessen, Schering-Plough, Merck). 그러므로 이 효소의 억제물질을 함유한 천연자원을 찾아내면 새로운 기능의 생물소재로서 개발이 가능하다고 사료된다. 그리고 이들로부터 분리된 물질은 항암제 또는 암 예방제 개발을 위한 선도물질로 활용될 수 있을 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ① Scintillation Proximity Assay (SPA) 방법을 확립하기 위한 연구를 수행, 소의 뇌로부터 파네실전달 효소 분리 ② 2,500여 미생물 발효액 및 400여 천연자원을 대상으로 유용자원을 탐색 ③ FPTase 억제제 탐색 및 활성물질 구조결정 ④ 2'-Hydroxycinnamaldehyde 분리 및 유도체 합성을 통한 구조-활성 관계 연구, 해양자원으로부터 Solandelactones 분리
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ① 이차 검증을 위한 Cell proliferation assay는 H-ras, K-ras 세포주 및 대장암 세포주인 SW-620을 이용하여 MTS/PMS 방법으로 실시함 ② 파네실전달 효소저해 활성 물질 탐색 (SPA 또는 Biotinyl-peptide method) ③ 쥐로부터 유래된 FPTase 및 GGTase I 발현 vector를 baculovirus Sf9 cells를 이용하여 생산, Counter Screening 연구 (GGTase I) ④ 식물체로부터 신규화합물 Arteminolides 및 Sesquiterpene lactones 분리, 송약으로부터 새로운 구조의 Rhombenone 분리 구조 결정
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ① 활성 물질을 처리한 후 membrane fraction을 모아서 anti-K-Ras 또는 anti-H-Ras antibody로 Western Blotting하여 원형질막에 결합된 단백질 양을 측정 ② 동물실험을 위한 활성 물질의 대량 분리정제 ③ 활성물질의 대량 분리 정제 구조 및 변형연구(Arteminolide의 구조변형) ④ 미생물 G80791로부터 활성물질 분리 ⑤ Nude mouse에 대장암 세포주 SW620과 폐암 세포주를 이식하여 실시

IV. 연구개발결과

1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ① 탐색계를 개량하여 저렴한 탐색법 확보 ② 500여 종의 식물자원, 3,000여종의 미생물 자원을 탐색하여 3종의 식물 및 3종의 미생물자원 확보 ③ 국내자생 식물체로부터 2가지의 신규 화합물 분리 (2'-Hydroxy-Cinnamaldehyde, Solandelactones) ④ 해양자원으로부터 신규구조의 활성 물질 분리
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ① 6가지의 신규 화합물 분리 (Rhombenones, Arteminolides) ② Counter Screening을 위한 biotinylated peptide 합성 ③ FPTase 및 GGPTase I의 생산을 위한 Recombinant baculovirus 확보 ④ 동물에서 항암활성을 보여 주는 화합물 확보
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ① 미생물로부터 K-Ras의 원형질막 결합을 저해하는 물질 분리 ② 구조변형을 통한 저독성 물질 창출 ③ 2'-Hydroxycinnamaldehyde 유도체 합성 및 다양한 반응기작 규명 ④ 세포주기 조절 기전 규명 및 라스 단백질의 원형질막 결합 저해활성 검증 ⑤ Arteminolide 혼합물 및 단일성분의 동물실험수행, 항암활성 확인

V. 연구개발결과의 활용계획

- ① 미생물로부터 유래된 K-Ras의 원형질막 결합을 저해하는 물질은 세포수준에서의 연구를 수행한 후 동물에서의 독성과 항암활성을 평가하여 기업화여부 결정
- ② 식물체유래 아테미노라이드는 전합성 및 세포배양 등의 연구 및 대량 분리 정제 후 동물에서의 효능 평가하여 기업화여부 결정
- ③ 계피유래 물질은 암예방제로서의 개발 가능성 평가를 위한 세포수준의 기작 규명연구와 동물실험을 수행하려함

S U M M A R Y

Ras proteins play an important role in intracellular signal transduction pathways involved in cell growth and the mutated *ras* genes have been found in thirty percent of human cancers. Ras proteins (H, K, and N) are small guanine nucleotide binding proteins that undergo a series of posttranslational modifications including the farnesylation onto cysteine 186 at C-terminal of Ras by farnesyl protein transferase (FPTase). This is a mandatory process before anchoring to plasma membrane which is critical for its biological activity, e.g. cell proliferation and tumorigenesis. Recent work has demonstrated that specific inhibitors of the FPTase might be interesting chemical leads to develop effective therapeutic agents for the treatment of cancer.

We have developed a high throughput screening method for FPTase inhibitors and screened more than 2,000 microbial secondary metabolites and extracts of plants. In the course of our screening for potent inhibitors of FPTase from herbal medicines, we isolated 2-hydroxycinnamaldehyde, rhombenone, and sesquiterpene lactones from *Cinnamomum cassia*, *Hedera rhombea*, and *Artemisia annua* L, respectively. Solandelactones were isolated from the Hydroid *Solanderia secunda* as inhibitors of FPTase. Gliotoxin was also isolated from the fermentation broth of *Aspergillus fumigatus* F93. A cyclic peptide, Bacitracine, was isolated from the fermentation broth of *Bacillus licheniformis*.

To investigate effects of the FPTase inhibitors in cell-based experiments, we used H- and K-ras-transformed NIH3T3 and SW620 cells. Arteminolides were evaluated as inhibitors of Ras processing in the cell lines and it was found that they inhibited ras processing when tested up to 50 microM.

2'-Hydroxycinnamaldehyde and its derivatives were synthesized for further investigation of their antitumor effects. We found that 2'-hydroxycinnamaldehyde and 2'-O-benzoylcinnamaldehyde showed strong *in vitro* growth inhibition against 29 kinds of human tumor cells. Tumor growth inhibition activity of the compounds was evaluated in a human tumor xenograft model of nude mice. They strongly inhibited the growth of tumors and also significantly reduced the weight of tumors excised on the final day. These results provide strong evidence that the compounds have the potential for use as antitumor agents.

The other FPTase inhibitors, isolated from natural sources, also are under investigation in cell-based experiments and animal test.

목 차

제 1 장 서 론	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	33
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	131
제 5 장 연구개발의 활용계획	133
제 6 장 참고문헌	135
첨부자료 1.	137
첨부자료 2.	146

여 백

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	13
Chapter 2. State of the Art Report	23
Chapter 3. Contents and Results of Research	33
Chapter 4. Accomplishment and Contribution	131
Chapter 5. Future Application	133
Chapter 6. References	135
Appendix 1.	137
Appendix 2.	146

여 백

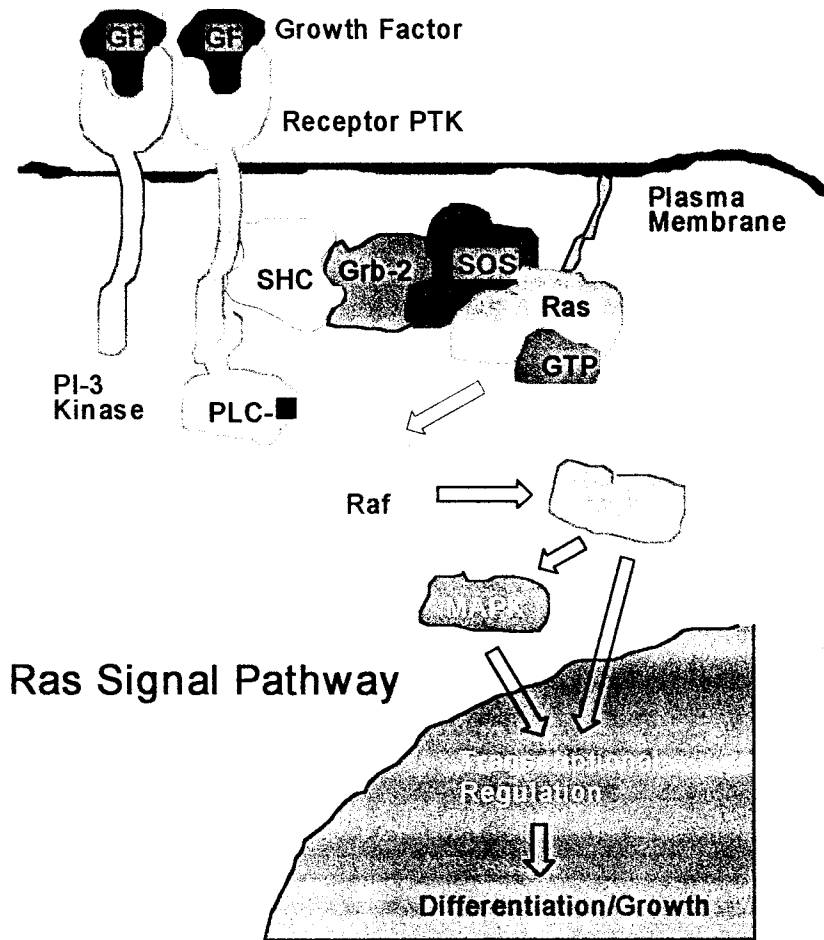
제 1 장 서론

정상세포가 종양세포로 변하여 악성 종양을 유발시키는 과정에는 세포내 여러 인자들이 관여되며 이들 과정에 관련된 각종 단백질의 조절을 통하여 새로운 항종양제 개발을 해보려는 노력이 지난 1980년 초부터 시작되었다. 이러한 연구에 활력을 불어넣은 것은 종양의 발생에 관련이 있는 발암유전자(oncogene)들의 발견이다. 이런 유전자의 발견으로 세포의 성장조절에 관한 많은 연구결과들이 축적되게 되었으며 이로부터 각종 탐색계가 개발되었고 또한 개발되고 있다. 이들 암유전자 중에서 본 연구팀은 라스 유전자에 관심을 가지고 연구 및 조사한 결과 라스유전자의 산물인 라스단백질이 원형질막에 결합하는 과정이 라스유전자의 발현에 필수적임을 알 수 있었다. 이과정을 자세히 살펴보면 다음과 같다 (1-5).

라스발암유전자는 암조직이나 형질전환된 사람의 세포주에서 거의 공통적으로 발견되는 발암유전자로서, 사람의 악성종양과 관련 있는 라스유전자는 크게 3가지 즉 Harvey-*ras* (H-*ras*), Kirsten-*ras* (K-*ras*), 그리고 Neuroblastoma(N-*ras*)로 분류된다. 이들 세종류의 라스유전자는 21kDa 단백질을 만들어 내는데 p21 단백질은 188-189개의 아미노산으로 구성되어 있으며, C-terminal 25개의 아미노산 외에는 거의 동일한 배열을 가지고 있는 단백질로서 세포 증식과 분화에 관여한다. 사람의 종양에서 *ras* 유전자에 변이가 자주 발견되는데, 췌장암(90%), 직장암(50%), 폐암(50%), myeloid leukemias나 갑상선암(30%)등에서 높은 빈도로 관찰되었다 (3).

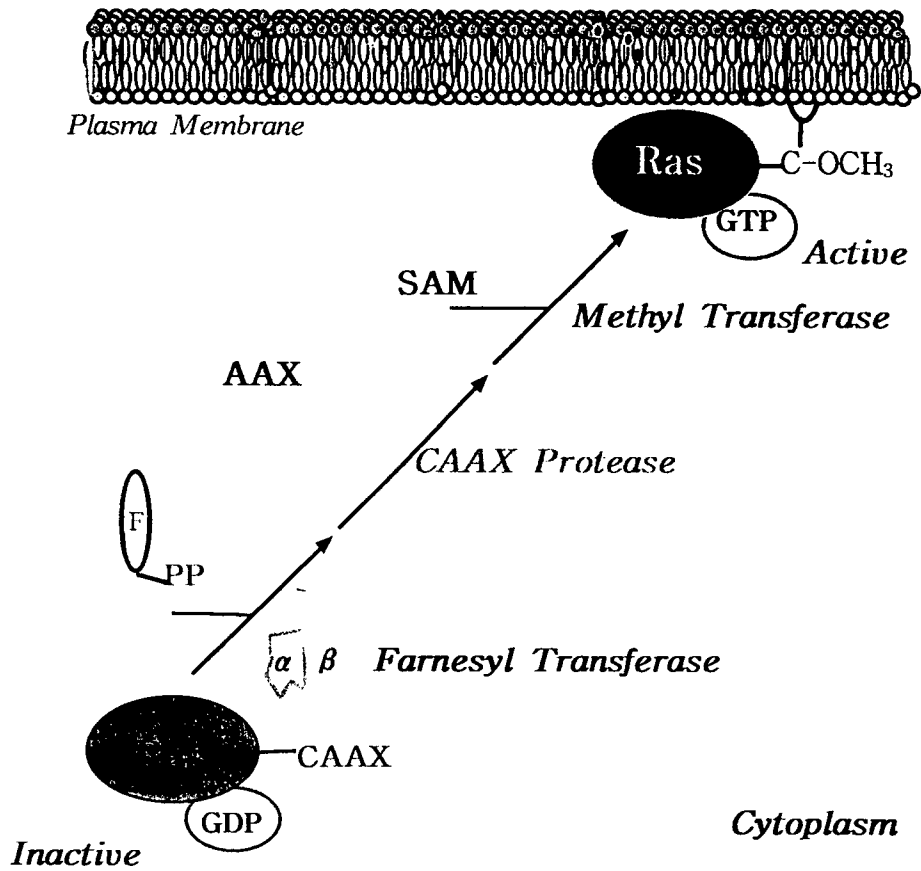
ras 발암 유전자 (v-*ras*)는 정상적인 세포내 유전자 (c-*ras*)의 염기 서열 중 하나의 염기가 다른 염기로 치환된 형태이다. 정상적인 *ras* 유전자는 효모를 포함한 모든 진핵 생물에 존재하는데, 그것이 만들어 내는 단백질은 세포성장, 분화와 같은 여러가지 생리적인 기능의 조절자 역할을 한다. Ras 단백질은 다른 GTP 결합 단백질에서와 마찬가지로 단백질 자체가 지니고 있는 GTPase 활성과 구아닌 뉴클레오타이드와의 결합력에 의해 그 활성이 조절된다. 즉, GDP가 결합되면 생물학적 비활성 상태가 되고 외부 신호에 의해 GTP가 결합되면 생물학적 활성 상태가 된다. 정

상적인 Ras 단백질의 활성화는 GTP-GDP cycle에 의해 조절되는데, 여기에는 구아닌 뉴클레오타이드 교환 인자(GNRF)와 GTPase 활성화 단백질(GAP)이 관여한다. GAP의 작용은 결국 생체 내에서 Ras를 negative regulation하는 것이며, GAP의 활성화 촉진 은 Ras 활성을 감소시키게 된다. 여러 암세포에서 발견되는 돌연변이 Ras 단백질은 GTPase 활성이 크게 감소(200배정도)되어 있을 뿐 아니라, GAP에 민감하게 반응하지 않아 외부 신호 없이도 계속 GTP와 결합된 상태로 존재하여 세포 분열이 조절되지 않고 계속해서 일어나게 한다. 최근 연구결과를 종합해보면 Ras 단백질은 raf 발암 유전자의 단백질 산물인 Raf 단백질에 결합하고 있음이 밝혀졌는데, 이것은 Ras 단백질의 downstream effector로 작용한다. Raf 단백질은 serine-threonine kinase로써, MAP kinase 또는 MEK로 알려진 두번째 kinase를 인산화시킨다. 이러한 kinase와 또다른 downstream kinase는 발암 유전자 산물을 포함하여 여러 전사 인자들을 인산화 시킴으로써 외부신호를 세포 핵 내로 전달하며 궁극적으로 비정상적인 세포성장을 유발한다. 이 과정에는 많은 신호전달 단백질들이 관여하게 되며 매우 복잡한 네트워크를 형성하고 있다. 이러한 복잡한 과정을 라스와 MEK 등을 중심으로 간략하게 그림으로 도식화하면 다음과 같다 (6-10).



위와 같은 Ras 단백질을 통한 신호전달 과정 중에서 가장 큰 관심의 대상은 Ras 단백질 활성화 단계에 가장 중요한 과정인 카르복시 말단의 번역 후 변형과정 (post-translational modification)이며 이 과정을 통하여 Ras 단백질이 원형질 막의 안쪽 면에 위치하게 된다. 이러한 번역 후 변형과정은 Ras에 의한 형질전환에 필수적임이 밝혀졌는데, 즉 활성화된 Ras의 카르복시 말단에 변화가 있을 경우 형질을 전환시킬 수 있는 활성을 상실한다는 것이다. Ras의 번역 후 변형과정을 살펴보면 첫단계로 파네실기가 카르복시 말단에서 4번째 위치의 시스테인에 도입되고, 두번째로 시스테인의 카르복시쪽 3개 아미노산들이 단백질 가수분해 효소의 작용으로 절단되고(proteolytic cleavage), 마지막으로 카르복시 말단으로 노출된 시스테인에 메틸화 반응이 일어나는 일련의 과정이다.

Post-Translational Modifications of Ras



이 과정에 3가지의 효소, 즉 파네실 전달, 펩타이드 가수분해, 그리고 메틸화 반응 효소가 관여하며, 각각의 효소를 효과적으로 저해할 수 있다면 새로운 항암제의 개발이 가능 할 것이다. 이들 효소중 펩타이드 가수분해 효소는 1999년에 정제 되었지만 정확한 반응 기작도 밝혀지지 못한 상태이고, 몇몇 연구그룹들이 이 효소의 저해제 탐색을 위한 탐색계를 연구중인 것으로 알려지고 있다. 이들 세가지 효소중에서 파네실전달 효소의 저해제 탐색을 통한 항암제 개발 연구가 가장 활발히 진행되고 있으며, 몇가지의 파네실전달 효소의 저해제를 이용한 동물실험결과 선택적으로 암세포의 성장을 억제한다는 결과가 발표되고 있어서 항암제 탐색계로서는

가장 주목을 받고 있는 방법이다 (11-14).

이 효소의 저해제개발을 통한 새로운 차원의 항암제 연구에 있어서 몇 가지의 의문점들이 제시되고 있는데 그 이유는 앞서서도 언급한 것과 같이 다양한 단백질들이 세포내에서 지질화반응을 통하여 활성화되기 때문이다. 그러나 몇 가지의 연구 및 실험적 결과들을 종합해 볼 때 FPTase 저해제 개발을 통한 선택적인 pro-drug의 개발 가능성은 매우 높은 편이다. 이들 실험적 증거의 예들을 들어보면 다음과 같다.

첫째: 세포내 단백질의 지질화반응에서 geranylgeranylation은 farnesylation보다 5-10배 정도 더 빈번히 일어난다.

둘째: 몇몇 heterotrimeric G protein의 ν -subunit와 20 kDa의 GTPase protein인 G25K와 K-rev p21은 geranylgeranylation에 대한 substrates이다.

셋째: Geranylgeranylated proteins의 CAAX sequence에서 X는 Leu인 반면, farnesylated protein의 X는 여러 가지 다른 아미노산 들이 될 수 있다.

넷째: Cell culture test에서 FPTase inhibitor 처리시, ras-transformed cells에 대해서 정상세포와 비교하여 선택적인 증식억제를 나타냈다.

다섯째: 최근에는 동물실험에서 transgenic mice에 FPTase inhibitor(pro-drug)를 투여했을 때, 어떤 toxicity의 증거가 없었으며, pro-drug을 계속 투여했을 때 tumor의 성장이 억제되었다.

그러므로 이 효소의 억제물질을 함유한 천연자원을 찾아내면 새로운 기능의 생물소재로서 개발이 가능하다고 사료된다.

지난 수년간 학계 및 제약업계 연구자들은 FPTase를 선택적으로 저해하는 물질을 탐색하고 고안해 왔다. 이들은 peptidomimetic compounds, Farnesylpyrophosphate (FPP)와 bisubstrate analogues, 천연물로 나눌 수 있다.

Peptidomimetic 저해제 고안의 궁극적인 목적은 peptide의 성질은 가지지 않으면서 peptide의 생물학적 효과는 모방할 수 있는 물질을 찾고자 하는 것이다. 이 분야의 획기적인 진전은 Goldstein, Brown등이 FPTase가 CAAX 펩타이드를 특이적으

로 인지하고 파네실화한다는 사실을 밝혀냄으로써 이루어졌다. 하지만 이들 펩타이드들이 *in vitro*에서는 FPTase를 효과적으로 저해하긴 하지만 세포 내로 들어가기 어렵고 세포 내로 들어간다 하더라도 peptidase에 의해 분해되기 쉽다는 문제가 이들을 치료제로 개발하는데 걸림돌이 되어왔다. 이를 극복하기 위해 CAAX내 펩타이드 결합을 다른 형태로 바꾸는 일이 시도되었으며 한 예가 Merck에서 개발된 물질들이다. 그중 L-744,832는 중앙 amide bond가 다른 그룹으로 바뀐 물질로 2-20 μ M의 농도로 모든 인체 암세포주의 70%이상에서 세포성장을 억제하였으며 H-Ras transgenic mouse에서 독성은 나타내지 않으면서 유방암과 salivary 암을 저해하는 것으로 나타났다. Pittsburg대학 팀에서는 CAAX의 A₁A₂를 구조적으로 안정한 소수성 spacer로 바꾸는 시도를 하여 H-Ras 파네실화 저해능력은 지니면서 peptide 특유의 가수분해 성질은 가지지 않은 4-amino benzoic acid spacer 또는 biphenyl spacer를 가진 FTI 시리즈의 여러 물질을 개발하였다. Farnesyl-protein transferase inhibitor (FPTaseI) FTI 276은 nude mouse 모델을 이용한 실험에서 변이 Ras 단백질의 파네실화를 저해하며 tumor의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 최근 Schering-Plough사는 무작위 탐색을 통해 새로운 tricyclic 유도체인 SCH44342를 발견하였다. 이 물질은 -SH기도 -COOH기도 없이 Ras 단백질과 경쟁적으로 작용하여 FTase를 저해하였다. 이는 nonpeptide계 저해물질을 찾는 데 있어 무작위적 탐색법이 얼마나 큰 가능성이 있는지를 보여주고 있다.

Farnesylpyrophosphate (FPP)와 bisubstrate analogues들은 FPTase에 의한 Ras 단백질의 파네실화 반응에는 두 개의 기질인 FPP와 Ras 단백질이 관여한다는 사실에서 시작되었다. 그러므로 Ras 단백질의 CAAX를 모방한 peptidomimetic처럼 FPP 기질을 모방한 물질이 FPTase 저해제로 가능성이 있음은 자명한 사실이다. 그러나 peptidomimetic과는 달리 FPP 유사체는 FTase 저해제로 작용하는데 결정적인 핸디캡을 가지고 있다. FPP가 세포 내에서 squalene synthase와 같은 효소에서 광범위하게 사용되는 대사물질이기 때문에 FPP 유사체가 다른 효소와 비선택적 결합을 할 경우 심각한 부작용을 일으킬 수 있기 때문이다. FPP 유도체 개발은 FPP의 diphosphate의 가수분해되기 쉬운 성질을 개선하는 것으로 시작되었다.

Pyrophosphate를 monophosphate로 대체한 α -hydroxyfarnesyl phosphonic acid와 pyrophosphate의 oxygen을 methylene group으로 치환한 farnesylmethyl hydroxyphosphinyl methyl phosphonic acid는 가수분해되지 않으면서 FPP와 경쟁적으로 반응하여 FPTase를 저해하였다. 이외에 pyrophosphate를 모방한 β -carboxyphosphonic acid를 이용한 화합물들도 개발되었다. Bristol-Myers-Squibb사는 두 기질 복합체의 transition state (전이상태)를 모방한 FPTase 저해제를 고안하였다. 이 그룹은 효소-저해제 간의 hydrophobic interaction을 유지하기 위해 farnesyl기의 소수성 부분을 유지하고 효소의 단백질 인지부위는 tripeptide AAX로 대체시켜 BMS 시리즈의 효소저해물질들을 개발하였다.

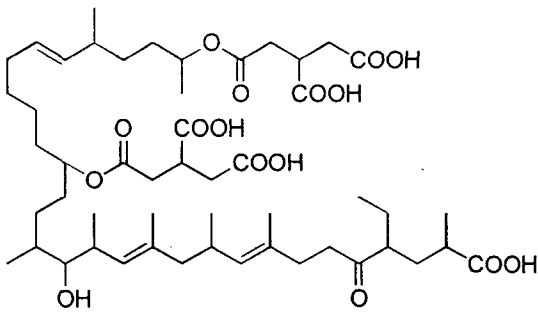
지금까지 무작위 탐색과정을 거쳐 천연물로부터 FPTase 저해능을 가진 많은 물질들이 발견되었다. 화학적 고안(rational chemical design)을 통한 저해제들과는 달리 이들 물질들은 FPP나 CAAX와 구조적 유사성이 없으며 다양한 반응 기작으로 FPTase를 저해한다. 대표적인 화합물들이 Zaragozic acids, actinoplanic acids, chaetomelic acids, fusidienol, cyclindrol A, gliotoxin, acetogliotoxin, andrastins, barceloneic acids, CP-225917, 10'-desmethoxy-streptonigrin, kurasoins, pepticinnamins, preussomerin, SCH58450, valinoctins 등이 있다.

위와 같이 천연물에서는 합성 등의 방법에서 확보한 저해제들과는 구조적으로 전혀 다른 물질을 분리 할 수 있으므로 천연자원으로부터의 FPTase 저해제가 개발된다면 새로운 차원의 항암제 개발을 위한 선도물질로 활용될 수 있을 것이다.

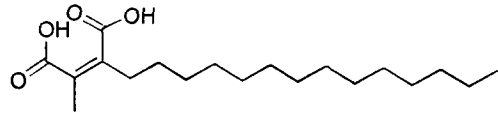
지금까지 개발된 파네실전달 효소 저해제들을 다음 표에 정리하였다.

파네실전달 효소 저해제

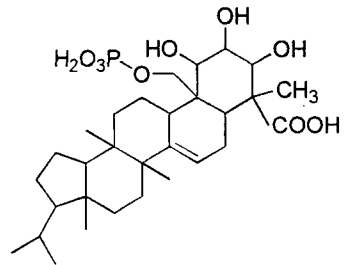
Chemical source	Inhibitors	IC ₅₀ for FPTase(μM)	IC ₅₀ for GGPTase(μM)	Effect on mammalian cells
Natural product	Manumycin	5	180	Active on Cell line
	Glilotoxin	1.1	ND	ND
	Pepticinnamin	0.1	ND	ND
	Chaetomelic acid A/B	0.06/019	92	ND
	Zaragozic acid A	0.22	0.62	ND
	Desmethoxy-streptonigrin	21	ND	ND
	Patulin	290	ND	ND
	Fusidienol	0.3	ND	ND
	RPR113,228	0.83	59	ND
	Cylindrol A	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	ND
CAAX analogue	Tetrapeptide CVFM	0.025	ND	ND
	L-731, 734	0.028	ND	Cell line transgenic mice
	BZA-2B	0.85		"
	CVIM	0.09	35	Cell lines
	B581	0.21	790	"
	FTI-276	0.0005	0.5	"
	SCH 44,342	2.8	>12	"
	Cys-4-ABA-Met	0.05	ND	"
	L-739, 750	0.0018	3	Transgenic mice
	BMS-185,878	0.005	ND	Cell line
	CVWM	0.5	ND	ND
	L-739,787	0.3	ND	ND
	Phosphinyl acid-base Bisubstrate analogues	0.06-0.6	0.05-0.01	ND
Farnesyl pyrophosphate analogues	HFP	0.03	35.8	ND
	HCP	0.083	26	ND
	hydroxy farnesylphosphonate	0.03	67	Ras processing
	Farnesyl diphosphate-based inhibitors	0.075-0.22	ND	"



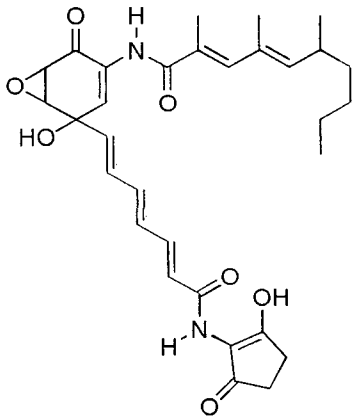
Actinoplanic acid B



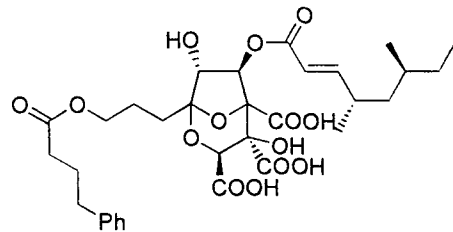
Chaetomelic acid A



RPR113228

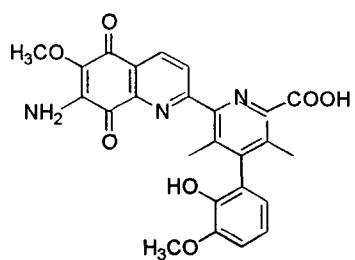


Manumycin

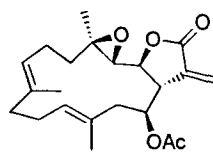


Zaragozic acid A analog

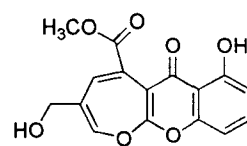
Farnesyl pyrophosphate와 경쟁하는 천연물 유래 저해제



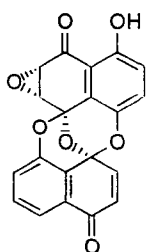
10'-Desmethoxystreptonigrin



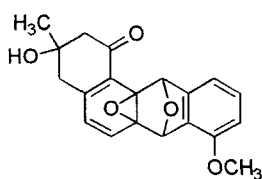
Cembranolide



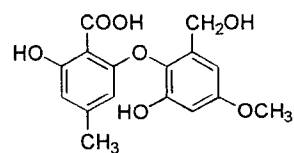
Fusidienol



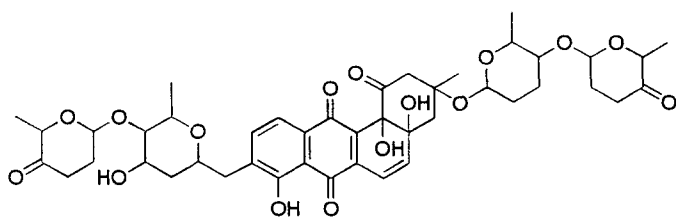
Preussomerin



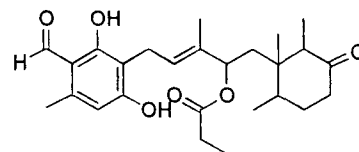
SCH58450



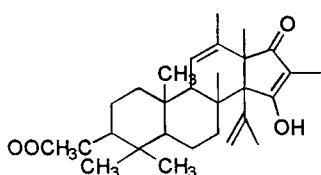
Barceloneic acid A



Saquayamycin C



Cylindrol A



Andrastin C

Farnesyl pyrophosphate와 경쟁하지 않는 천연물 유래 저해제

제 2 장 국내외 기술개발 현황

라스 유전자는 진핵세포에 존재하여 세포 분열에 중요한 역할을 하는 유전자로서 Harvey(1964년)와 Kirsten(1967년)에 의해서 rat sarcoma virus로 부터 발견하였다. 1981년에는 Weinberg group에 의해서 human bladder carcinoma cell로 부터 분리되었고, 그후 다양한 세포주 (Sarcomas등 포함)와 사람의 암세포조직 (leukemias, Neuroblastomas, lymphomas 등)에서도 분리되었다. 많은 발암유전자중에서 라스발암유전자가 (그중에서도 rasH) 가장 먼저 발견되었으며 그정체는 1982년 Weinberg group과 Barbacid group의 연구에 의해서 밝혀졌다. 이어서 이 유전자가 사람의 폐암과 관련이 있고 유사한 유전자인 rasK, rasN가 존재한다는 것이 알려지게 되었다. 그리고 많은 연구그룹의 연구 결과로 이들 유전자의 산물인 라스 단백질의 역할과 구조등이 속속 밝혀졌으며, 라스 발암 유전자(v-ras)는 정상적인 세포내 유전자(c-ras)의 염기 서열 중 하나의 염기가 다른 염기로 치환된 형태임을 알게되었다(Gibbs, 1988, Barbacid, 1987).

Ras 단백질은 다른 구아닌 뉴클레오타이드 결합 단백질에서와 마찬가지로 단백질 자체가 지니고 있는 GTPase 활성과 구아닌 뉴클레오타이드와의 결합력에 의해 그 활성이 조절된다. 즉, GDP가 결합되면 생물학적 비활성 상태가 되고 외부 신호에 의해 GTP가 결합되면 생물학적 활성 상태가 된다. 정상적인 라스 단백질의 활성은 GTP-GDP cycle에 의해 조절되는데, 여기에는 뉴클레오타이드 교환 인자(SOS)와 GTPase 활성화 단백질(GAP)이 관여한다. GAP은 결국 생체 내에서 라스의 활성을 억제하는 작용을한다. 이 단백질이 과잉발현되면, GTP와 결합하고 있는 라스 단백질의 비율을 감소시키고 세포의 성장을 억제시킨다 (Gibbs et al., 1990). 전체 GAP 또는 그것의 카르복시 말단은 정상 라스 유전자가 과잉발현되어 생긴 형질전환을 막거나 정상상태로 되돌릴 수 있다 (De Clue et al., 1991). 여러 암세포에서 발견되는 돌연변이 라스 단백질은 GTPase 활성이 크게 감소되어(200배정도) 있을 뿐 아니라, GAP에 민감하게 반응하지 않아 외부 신호 없이도 계속 GTP와 결합된 상

태로 존재하여 세포 분열이 조절되지 않고 계속진행되어 결국 악성 종양으로 발전시킨다 (Gideon et al., 1992).

라스 단백질의 신호전달과정은 (참조 앞의 그림) 라프 발암 유전자의 단백질 산물이 라스 단백질에 결합하고 있음이 밝혀지면서(Moodie et al., 1993) 매우 활발히 진행되었다. 라프와 라스와의 결합은 결국 라스 단백질의 downstream effector로 작용한다. 라프단백질은 세린 트레오닌 키나아제 (serine, threonine kinase)로써, MAP 키나아제 키나아제 (Hughes et al., 1993), 또는 MEK(Crews, 1992)로 알려진 두번째 키나아제를 인산화시킨다. 이러한 키나아제와 또다른 downstream kinase는 발암 유전자 산물을 포함하여 여러 전사 인자들을 인산화 시킴으로써 외부 신호를 세포 핵 내로 전달한다 (Hunter and Karin, 1992).

라스 단백질은 세포질에서 합성된 뒤 카르복시 말단에 일련의 번역 후 변형과정 (posttranslational modification)을 거치게 되는데, 이로써 단백질의 친유성을 증가시켜, 원형질 막의 안쪽 면에 위치하게 한다(Gibbs, 1991). 이러한 번역 후 변형 과정은 라스에 의한 형질전환에 필수적임이 밝혀졌는데, 즉 활성화된 라스 단백질의 카르복시 말단에 돌연변이가 있을 경우 형질 전환시킬 수 있는 활성을 상실한다. 이렇게 되면 발암성 ras 단백질이 세포를 형질전환시킬 수 있는 능력이 크게 떨어지게 된다. 최근에 와서 라스의 번역 후 변형과정이 밝혀지게 되었는데, 첫단계로 파네실기가 카르복시 말단에서 4번째 위치의 시스테인에 도입되고, 두번째로 시스테인의 카르복시쪽 3개 아미노산들이 단백질 가수분해 효소의 작용으로 떨어져 나가고(proteolytic cleavage), 여기서 카르복시 말단으로 노출된 시스테인의 메틸화 반응이 일어난다는 것이다. 이러한 변형과정은 fungal mating factor와 mammalian nuclear lamins에서도 관찰되었다(Glomset et al., 1990; Goldstein and Brown, 1990; Maltese, 1990; Rine and Kin, 1990). 파네실화 되는 폴리펩타이드는 공통적으로 카르복시 말단에 CXXX(C-Cys)라는 서열을 갖고 있는데, 마지막 염기가 세린, 알라닌, 메티오닌, 글루타민 등으로 제한되어 있다. 그러나 CXXX 서열을 갖는 모든 단백질이 모두 파네실화 되는 것은 아니다. 예를 들어 $G\alpha$ subunit는 CGLF 서열을 갖고 있으나 변형과정이 일어나지 않으며 G25K나 K-rev p21(Kamoto et

al., 1990)와 같이 마지막 염기가 루신인 경우는 파네실기 대신 게라닐게라닐기가 도입된다. 실제로 세포 내에서 파네실화 반응보다는 단백질의 게라닐게라닐화 반응이 5-10배 더 빈번하게 일어난다 (Epstein et al., 1990). 이러한 두 반응은 각각 서로 다른 두가지 효소, 파네실 전달 효소와 게라닐게라닐 전달효소에 의해 일어나고 있다(Clarke, 1992). 이 반응에서 파네실기와 게라닐게라닐기를 전달해 주는 기질로서 파네실 피로인산과 게라닐게라닐 피로인산이 작용하는데 이들 모두 콜레스테롤이나 유비퀴논의 생합성 과정에서 생성되는 이소프레노이드 유도체들이다. 그러므로 이소프레노이드 생합성의 저해제인 lovastatin, compactin을 이용하면 프레닐화 반응을 막을 수 있다. 그러나 배양된 세포에서 ras의 프레닐화 반응을 막기 위해 필요한 lovastatin의 농도는 콜레스테롤 생합성을 방해하는 농도보다 100배 더 높다 (Sinensky et al., 1990). 이와 같이 높은 농도에서는 세포자체가 살아남기 힘들 것이라는 사실은 별로 놀라운 일이 아니다. 그러므로 이소프레노이드 생합성 단계의 일반적인 방해제는 암 치료제로는 사용할 수 없으며, ras의 번역후 변형 과정을 일으키는 효소에 특정한 방해제가 ras에 의해 형질전환이 일어난 세포에 있어서 독성이 덜하고 선택적으로 이용될 수 있을 것이다. 이러한 목적으로 라스 단백질 변형과정의 첫단계 반응에 관여하는 파네실 전달효소가 널리 연구되고 있는데 효소학적 측면에서 볼때, 이소프레닐 피로인산과 기질 단백질에 대한 특이성에 관한 연구에 초점이 맞춰지고 있다 (Reiss et al., 1990, 1991a, 1991b; Shaber et al., 1990; Moores et al., 1991).

생체 외에서 라스 단백질을 파네실화 시키기 위해 파네실 전달 효소가 소 뇌 또는 쥐 뇌에서 분리되었는데 (Reiss et al., 1990; Moores et al., 1991), 그 결과, 49kDa의 α subunit와 46kDa의 β subunit로 이루어진 heterodimer임이 밝혀졌으며, 효소의 활성을 위해서는 두 subunit가 모두 필요함을 알았다(Reiss et al., 1990, 1991b). 이 효소의 가장 큰 특징은 파네실화 된다고 알려진 단백질의 카르복시 말단의 4개 아미노산 서열만을 인지한다는 것이다(Reiss et al., 1990). 이러한 성질을 이용하여 펩타이드 친화성(affinity) 크로마토그래피에 의해 효소를 정제할 수 있다. 펩타이드와의 결합 기능은 chemical cross-linking 실험으로부터

β -subunit에 있음을 알았고(Reiss et al., 1991b) α -subunit의 경우 정확한 기능이 알려져 있지 않으나 FPP(파네실 피로인산)의 결합에 중요한 역할을 하리라 예상되고 있다. 파네실 전달 효소는 활성을 나타내기 위해 Mg^{+2} 와 Zn^{+2} 를 필요로 하는데(Reiss et al. 1992), 피로인산이 포함된 기질을 사용하는 다른 효소와 마찬가지로 Mg^{+2} 는 피로인산 부분의 결합에 필요하리라 생각되며(Moomaw et al., 1992), Zn^{+2} 은 효소 자체의 구성성분으로 보여진다(Reiss et al., 1992). 이때 Zn^{+2} 은 기질 단백질의 thiol기의 deprotonation과 positioning을 도와 직접 촉매작용에 참여할 가능성이 높다(Casey, 1992. Steady-state kinetic analysis 결과, 효소에 두 가지 기질이 결합할 때 일정한 순서가 정해져 있지 않다(Random order mechanism)고 보고되었으나(Pompliano et al., 1992), 효소-FPP 복합체의 형성이 먼저 이루어지는 경로가 실제 세포 내에서 선호된다고 최근 알려졌다(Pompliano et al., 1993).

라스 단백질 관련 분야의 연구는 분자내 신호전달 연구의 한분야로서 매우 활발히 진행되고 있으며 매년 수십편의 논문이 [Science 260, 1934, 1937 (1993), Cell 79, 193 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 9141 (1995)] 발표되고 있다. 라스 발암유전자의 발현 억제 탐색계중 파네실 전이 효소억제 물질 탐색의 경우는 구미 선진국에서 1991년 부터 Merck Co.와 같은 대형 제약회사와 텍사스 대학의 노벨상 수상자인 Goldstein과 Brown교수등이 중심이되어 본격적으로 시작되었으며 몇가지의 합성 물질(L-744,832, L-739,750, Benzodiazepine derivatives)들을 이용한 동물실험이 진행중이다 (Drug Devel. Res. 34, 121, 1995). 그리고 이 분야를 표적으로 하는 항암제 개발연구는 지금진행되고 있는 여러가지의 항암제개발 표적중에서 가장 관심이 집중되고 있는 분야이다. 그 이유는 세포내 신호전달을 조절하는 방법을 통한 항암제의 개발은 최초로 시도 되는것이며 신호전달의 조절은 기존의 항암제개발에서 사용하고 있는 세포독성에서와 같은 부작용이 상당히 감소하거나 거의 없을 것으로 기대 되기 때문이다. 이러한 이유로 최근의 암관련 학회에서도 매년 이 분야가 중요 토론과제로 제시되고 있다.

가. 합성에 의한 저해제 개발

저분자의 활성물질 합성연구는 다음 그림 7에서 보여주고 있는 라스 단백질의 C-말단의 펩타이드를 모체로 하는 peptidomimetic이 주종을 이루고 있다. 이 분야의 연구는 Merck & Co, Genentech등의 제약회사와 Pittsburg대학등의 학계를 중심으로 이루어지고 있으며 국내에서는 LG 바이오텍 연구소 및 유한양행 중앙연구소가 중심이 되어 활발히 추진되고 있다(10). 그리고 또하나의 모체가 되는 것은 farnesyl pyrophosphate이다. 이 기질을 모방하여 새로운 형태의 저해제를 합성하는 연구 또한 매우 활발하며 천연자원으로부터도 이와 유사한 구조를 가진 저해제들이 분리되었다. 그러나 1995년에는 미국의 Schering Plough Research Institute에서 구조적으로 전혀 다른 선도물질을 합성하여 발표하였으며 이 후로는 FPTase의 기질들과는 관계가 없는 새로운 저해제의 합성 연구가 매우 활발하다.

나. 천연물유래 저해제 개발

효소학적인 탐색법을 이용하여 많은 연구자들이 FPTase 저해제 개발을 위하여 다양한 natural products를 확인하였지만 아직까지는 합성 저해제에 견줄만한 선도물질은 개발되지 못한 상태이다. 지금까지 20여 가지의 저해제들이 보고되었으며 대부분은 미생물의 2차 대사산물이다. 그리고 어떤류의 미생물이 좋은 후보물질을 생산할 것이라는 예측 또한 불가능한 상태이며 이러한 정보가 축적되기 위해서는 더많은 연구가 요구된다고 할 수 있다. 육상 식물이나 해양생물로부터도 몇 가지의 저해제들이 보고 된 바 있으나 크게 관심의 대상이 되는 화합물은 보고되고 있지 않다. 그러나 천연자원의 다양성에 비추어 볼 때 연구자들의 노력여하에 따라서 보다 더 활서이 우수한 물질들이 개발 될 것으로 기대된다.

다. 개발된 탐색법

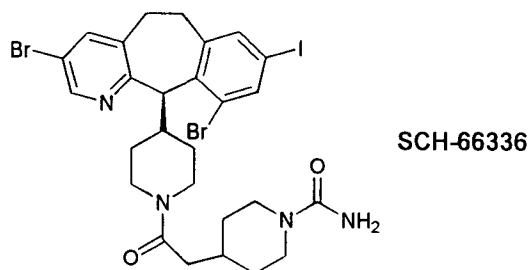
생리활성물질의 개발을 위해서는 그 활성을 측정할 수 있는 탐색계의 개발이 선행되어야 한다. 다양한 FPTase 저해제 개발을 위한 탐색법이 개발되어 사용되고 있으며, 각각의 탐색법이 장단점을 가지고 있으나 이들 방법 중에서 섬광분석법이 가

장 널리 쓰이고 있다. 그 이유는 반응 후에 반응물과 생성물의 분리과정 없이 직접 반응정도를 측정할 수 있어서 대량으로 탐색할 수 있는 장점이 있기 때문이다. 이 방법의 단점은 다른 방법들에 비해서 고가의 SPA bead를 사용해야 한다는데 있다. 여과법이나 분광학적 방법은 저렴하지만 대량의 시료를 처리하는 어려움이 있다. 이러한 방법을 포함하여 대표적인 FPTase 저해제 탐색법을 요약해보면 다음 표와 같다 (16-17).

FPTase 저해제 탐색법

	Assay method	Comments
1	Gel assay	Substrate : ^3H -FPP/ras protein - 정확한 정량적인 값을 얻을 수 있다.
2	Filter assay	Substrate : ^3H -FPP/biotinylated peptide - Streptavidin/자동화에 어려움이 있다.
3	Spectrophotometer assay	Substrate : FPP/dansylated peptide. - Fluorescence shift/방사선 물질을 사용하지 않는 장점.
4	TLC assay	Substrate : ^3H -FPP/peptide - 정량적 측정에 어려움이 있다.
5	PVDF membrane assay	Substrate : ^3H -FPP/ras protein - VacuoSlot 사용
6	SPA assay	Substrate : ^3H -FPP/biotinylated peptide - SPA beads, 자동화 가능

라. 파네실 전달 효소 저해제의 임상실험



상기 구조를 가지고 있는 미국 Schering-Plough에서 개발한 파네실 전달 효소 저해제를 (in vitro assay data: IC50 = 2nM) 대상으로한 1상 임상결과를 발표하였다 (Cancer Research 60, 1871-1877, 2000). 미국 미네소타에 있는 Mayo Clinic에서 20명의 암환자를 대상으로 실시하였으며 350mg씩 하루에 두 번 경구로 투입되었다.

Dose escalation scheme

Level	SCH66336(mg)	No. of patients	NO. of course
1	25	1	3
2	50	1	21
3	100	1	2
4	200	6	19
5	300	3	14
6	350	5	25
7	400	2	8

Patient characteristics(n=20)

No. of course(fully evaluable)	92(92)
Median no. of course/Patient Median age, years(range)	2.5(1-21)
Gender (M:F)	58.5(43-81)
ECOG performance status	12.8
0	6
1	12
2	2
prior chemotherapy regimens	
0	4
1	5
2	11
prior radiation	6
Tumor type	
NSCLC	7
colorectal cancer	5
Gallbladder cancer	2
Renal cancer	2
Sarcoma	1
Pancreatic cancer	1
Prostate cancer	1
Unknown	1

인체내에 많은 파네실화된 단백질이 존재하기 때문에 이 효소의 저해제는 독성의 문제점이 있을 것이라는 우려가 있었지만, 본 임상연구에서는 특별한 독성은 관찰되지 않았다. 주목할만한 사실은 폐에 전이가 일어난 환자에서도 50%이상의 암조직의 수축이 관찰된 사실이다.

상기 화합물의 임상에서의 우수한 활성은 이 분야의 연구에 활력을 불어넣을 것이다.

한편 국내에서는 생명공학연구소팀이 이 분야의 연구를 최초로 시작하였으며 몇몇 기업과 학교에서 이 분야에 관심을 가지고 연구에 박차를 가하고 있는 상태이다.

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 수행 내용

1. 재료 및 방법

가. 시약 및 기기

Q-sepharose는 Pharmacia Biotec.으로부터 구입하였고, Farnesyl transferase [³H]SPA enzyme assay kit은 Amersham으로부터 구입하여 사용하였다. Trisma base, EDTA, EGTA, PMSF, Leupeptin, DTT는 Sigma chemical Co.로부터 구입하였다.

합성에 사용한 시약으로 2-hydroxy cinnamic acid, 3-hydroxy cinnamic acid, 4-hydroxy cinnamic acid, 2-chloro cinnamic acid, 2-carboxy cinnamic acid, diisobutylaluminium hydride(이하 DIBAL-H), manganese oxidase(II)(이하 MnO₂), diazald는 Aldrich사 (U.S.A)에서 구입하였으며, tetrahydrofuran(이하 THF)은 Merck의 것을, 재결정시의 acetone, hexane, methylene chloride는 Baxter사의 것을 사용했다. 그밖의 chloroform, methanol, ethyl acetate, acetone, hexane 등의 용매는 분석용 일급시약을 사용했다. Silica gel은 Merck (Kieselgel 60, 230-400 mesh, Art. 9385)의 것을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Precoated, Merck, Art. 5744, Art. 5715)를 사용하였으며 254nm, 365nm에서 UV lamp로 관찰하였고, 발색시약으로 anisaldehyde를 사용하였다.

용점 측정 기기로는 capillary melting point apparatus (Buchi 535)를 사용하였으며 용점보정은 하지 않았다. UV spectrum은 Shimadzu UV-265로 기록하였다. IR spectrum은 KBr pellet으로 만들거나 NaCl cell에 도말하여 Perkin-Elmer 1420 Infrared spectrophotometer로 기록하였다. Optical rotator (Digital polarimeter DIP-370)를 사용하여 저해제의 분리 및 구조분석을 하였다. NMR spectrum은

Varian 300MHz NMR과 Bruker AMX-500 spectrometer로 기록하였으며, 용매로 사용된 chloroform-d, acetone-d₆는 모두 Aldrich사의 것을 사용하였다. Mass spectra는 Hewlett-Packard 5988(EI)과 VG 2AB-7070(CI)를 사용하였다.

나. 천연자원

천연자원은 3가지의 방법으로 수집하여 사용하였다. 식물자원은 본 연구소 및 약학대학 (충남대, 이화여대)와 공동으로 수집하여 동정한 후 메탄올로 추출하여 사용하였다. 해양자원은 해양연구소에서 수집한 자원을 활용하였다. 미생물자원은 본 연구소에서 수집한 자원을 대상으로 10ml 발효액을 만든 후 동량의 메탄올을 가하여 추출한 시료를 대상으로 활성을 측정하였다.

다. 미생물의 분리

(1) 사용배지

토양으로부터 미생물등을 분리하기 위한 분리용 배지로는 starch-nitrate agar 와 HV agar를 기본배지로 이용하였으며 각각의 조성을 Table 1.에 나타내었다. 또한 선별된 미생물의 항생물질 생산성을 검토하기 위한 발효배지는 가용성 전분과 soytone을 주성분으로 하는 배지를 이용하였으며 그 조성을 Table 2.에 나타내었다 (20-21).

(2) 토양 채취 및 균주분리

지면으로부터 5~10 cm 지점의 토양을 멸균된 vinyl bag에 채취하여 실험실까지 운반한 후 헝겊물을 제거하고 가는 체를 이용하여 일정한 크기의 토양 입자만을 선별하였다. 선별된 토양 1 g에 멸균액(6% yeast extract, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.02% Tween 80) 10 ml을 첨가하여 현탁시킨 후 warning blender로 수십초간 혼합하고 45°C에서 15분간 진탕배양하였다. 다시 혼합액을 멸균된 증류수를 이용하여 일정 비율로 희석시킨 후 분리용 배지에 0.1ml씩 도말하여 27°C에서 4주간 배양하였다. 배

양 후 평판에 나타난 집락을 다시 순수 분리하고 보존용 배지에 이식하여 27℃에서 생육이 왕성한 때까지 배양하고 20% glycerol 용액으로 현탁시킨 후 -70℃ deep freezer에 보존하면서 실험에 이용하였다.

(3)미생물자원

-70℃ deep freezer에 보관중인 1,000(곰팡이 300, 방선균 500, 고초균 200)여 균주를 분리용 배지 10 ml(20×200mm) 접종하여 28℃에서 4일간 진탕배양하였다. 배양액의 동량의 메탄올을 넣고 질척여 20 μl씩 취하여 centrifugal evaporator에서 건조시킨후 DMSO 10 μl에 녹여 확립된 저해활성 측정 방법에 따라 1차 선별을 하였다. 1차 선별한 미생물을 1000 ml 플라스크를 사용하여 발효한 후 발효액을 메탄올로 추출하였다. 추출액을 감압건조시킨 후 메탄올에 용해되는 분획만을 모아서 1mg/ml 농도로 시료를 준비하였다. 준비된 시료를 대상으로 근접섬광 분석법을 이용하여 활성도를 측정하였으며 60% 이상의 결합저해활성을 보이는 4가지의 균주를 활성균주로 분리하였다.

Table 1. Composition of isolation media

Media	Composition
Starch-nitrate agar	Starch 10g, KNO ₃ 2g, NaCl 2g, K ₂ HPO ₄ 2g, Casamino acid 0.3g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01g, CaCO ₃ 0.02g, Cycloheximide 50mg, Nystatin 50mg, Agar 20g, DW 1L pH 7.0
HV agar	Humic acid 1g, Na ₂ HPO ₄ 0.5g, KCl 1.7g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01g, CaCO ₃ 0.02g, B-vitamins* 0.5mg, cycloheximide 50mg, Nystatin 50mg, Agar 20g, DW 1L pH 7.2

* 0.5mg each of thiamine HCl, riboflavin, niacin, pyridoxal-HCl, inositol, Ca-pantothenate, p-aminobenzoic acid and 0.25mg of biotin.

Table 2. Composition of fermentation media for antibiotic production

Actinomyces	Quantities/ liter	Fungi	Quantities/ liter
Starch	20g		
Soytone	4g		
Pharma media	3g	Starch	20g
Polypeptone	2g	Soytone	4g
Yeast extract	1g	Pharma media	3g
K ₂ HPO ₄	1g	K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
NaCl	2g	CaCO ₃	3g
CaCO ₃	3g	NaCl	5g
FeSO ₄	20mg	Trace mineral (Fe, Mn)	Trace
MnCl ₂	10mg		
ZnSO ₄	10mg		
CoCl ₂	5mg		

2. 탐색법

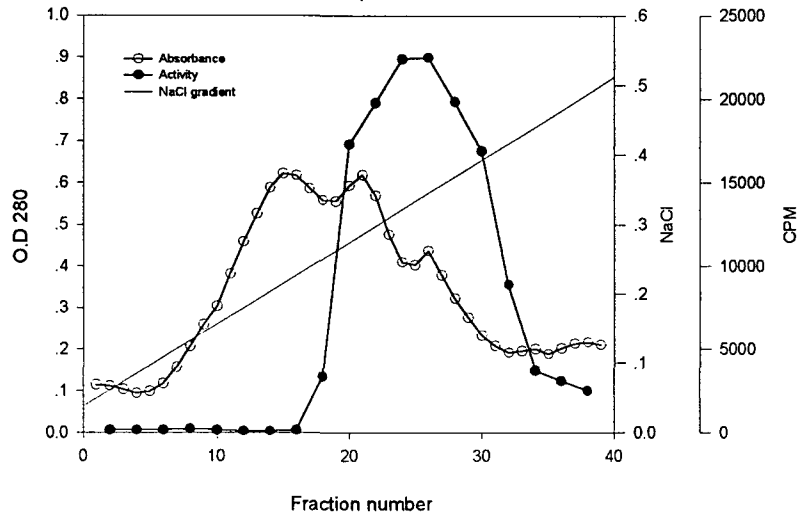
가. 효소의 분리

(1) FPTase의 부분 정제

Sprague-Dawley rat brain은 1 마리당 몸무게가 135-145 g인 6 주령 된 수컷 20 마리를 생명공학연구소 유전자원센터 동물 실험실로부터 구입하였다.

효소원으로는 흰쥐 (Male Sprague-Dawley 100-150g)의 뇌를 분리하여 생리 식염수로 세척하고 100ml의 냉각시킨 완충용액 A (50mM Tris-Chloride, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.1mM Leupeptin)를 가한 후 얼음 중탕에서 warning blender로 균질화하였다. 균질액을 60,000g에서 70분동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 30% ammonium sulfate로 4°C에서 30분간 염석 후 12,000g에서 10분동안 원심분리하였다. 원심분리한 상등액을 50% ammonium sulfate로 4°C에서 30분간 염석 후 12,000g에서 10분동안 원심분리하였다. 침전물을 20ml의 완충액 B (20mM Tris-chloride, 1mM DTT, and 20 μ M ZnCl₂, pH 7.5)에 녹여 투석막에 담아 4L의 완충액 B에서 4시간동안 투석한 후 4L의 새로운 완충액 B로 12시간동안 다시 투석하였다. 투석이 끝난 후 이 용액은 -70 °C에 보관하였다. 이 용액의 일부를 Ion exchange chromatography column을 이용하여 다음과 같이 부분 정제하였다. Anion exchanger Q-Sepharose를 column에 채운 후 증류수로 충분히 씻어내고 완충액 C(완충액 B+50mM NaCl)를 가하여 평형을 이루게 한 후 정제하고자 하는 단백질을 column에 넣고 NaCl의 농도 기울기를 이용하여 정제하였다. 초기의 NaCl 농도는 50mM이고 점진적으로 증가시켜 최종적으로 500mM이 되게 하고 용출액의 용리속도는 분당 1ml로 고정시켰다. 효소의 활성을 측정하여 0.5-1mg/ml의 농도로 부분정제된 효소를 얻었으며 정제된 효소는 분취하여 -70 °C에서 보관하면서 사용하였다. 다음 그림은 각 분획들의 효소 활성을 보여주는 그래프이다.

Q-Sepharose column chromatography of FPTase



(2) GGPTase I의 분리

GGPTase는 Kohei(Kohei et al.(1993) JBC:4055-4060) 방법에 따라 부분적으로 분리하였으며 모든 단계는 4 °C에서 수행하였다.

20마리의 rat brain을 100 ml 의 ice-cold buffer A [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM PMSF, 0.1 mM leupeptin]에 균질화하여, 원심분리(60,000 x g, 70 min)후 상층액을 황산암모늄(30-50 %) 침전 하였다. 침전된 단백질을 20 ml의 buffer B [20 mM Tris-HCl pH 7.5 , 1 mM DTT, 20 μM ZnCl₂]에 녹여 투석막에 담아 4 L의 Buffer B에서 4 시간 동안 투석 후 다시 4 L buffer B로 교환 후 12 시간 동안 투석하였다.

증류수로 씻어 낸 후 Buffer C[20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 20 μM ZnCl₂, 50 mM NaCl]로 평형화시킨 Q-sepharose column에 투석된 약 30 ml의 ammonium sulfate fraction을 loading 하고 50 ml의 Buffer C로 씻어 낸 다음 50 mM-500 mM NaCl gradient로 용출하였다. 1 ml/min의 용출속도로 4 ml씩 분획하였다. FPTase 활성을 보이는 fraction을 모아 1 mM PMSF와 0.02 %(w/v) leupeptin을 첨가하고 1

ml 씩 분취하여 -70 °C에 저장하며 사용하였다.

GGPTase의 활성도 측정은 Amersham의 SPA(Scintillation Proximity Assay) protocol에 따라 하였으며 원리와 assay 과정은 아래와 같다.

[³H]으로 label된 GGPP와 Biotin-Y-K-A-S-N-R-S-C-A-I-L에 GGPTase를 넣고 반응시킨 후 streptavidin과 형광 물질이 coating된 SPA bead를 넣어 준다. 이때 반응이 일어난 것은 biotin과 streptavidin이 특이적인 결합을 하게 되고, [³H]의 β 에너지가 형광 물질에 전달되어 방출되는 형광을 LSC를 사용하여 검출한다. 반응이 일어나지 않은 경우 β 에너지가 형광 물질에 전달되지 않고 수용액 중에 흡수된다. Enzyme assay는 1.5 ml eppendorf tube에 20 μ l의 [³H]GGPP(12 μ M, 3.7 MBq, 100 μ Ci, 500 μ l, 20 μ l의 Biotin-Y-K-A-S-N-R-S-C-A-I-L peptide (0.5 μ M), 10 μ l의 sample buffer(MeOH, DMSO), 10 μ l의 assay buffer(50 mM HEPES, 30 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 5 mM DDT, 0.01 % Triton X-100)를 넣고 37 °C에서 pre-incubation 하였다. 3 분 후에 40 μ l(1-1.5 mg/ml)의 enzyme을 넣고 37 °C에서 1 시간 동안 incubation 하였다. 반응을 종결하기 위해 150 μ l의 STOP/bead reagent를 넣고 상온에서 30 분 동안 방치하였다. 반응 종결 후 LSC를 사용하여 enzyme의 활성을 측정하였다.

나. FPTase의 활성 측정

FPTase 저해활성은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

20 μ l의 ³H-FPP, 20 μ l biotin-lamin B, 10 μ l 시료용액, 10 μ l의 assay 완충용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM MgCl₂, 2 mM KCl, 5 mM DTT, 5 mM Na₂HPO₄, 0.01% Triton X-100)을 넣고 3분동안 pre-incubation 후 40 μ l의FPTase를 넣어주고 37°C에서 1시간 동안 incubation한다. Incubation이 끝난 후 150 μ l의 SPA bead/stop reagent solution을 넣어주고 voltex한다. 30분간 상온 방치 후 LSC로 count하였다.

효소 저해도는 방사능으로 표식한 기질과 효소에 검색시료를 넣어, 반응 생성물의 양을 방사능 측정장치를 사용하여 측정하였고, 다음의 방법으로 저해도를 계산하였다.

$$\% \text{ inhibition} = 100 * \left[1 - \frac{\text{Sample(cpm)} - \text{Blank 2(cpm)}}{\text{Control(cpm)} - \text{Blank 1(cpm)}} \right]$$

Blank 1 : without samples and enzyme

Blank 2 : with samples and without enzyme

Control : without samples and with enzyme

다. 세포 배양

SW620 세포주 (사람의 대장암 세포주)는 10% fetal bovine serum (FBS)을 포함하는 RPMI1640을 이용하여, 5% CO₂, 37°C의 humidified incubator에서 배양하였다. NIH3T3 (mouse fibroblast), K-Ras (*K-ras*-transformed NIH3T3)와 H-Ras (*H-ras*-transformed NIH3T3) 세포주는 10% fetal bovine serum을 포함하는 DMEM을 이용하여, 5% CO₂, 37°C의 humidified incubator에서 배양하였다. 저해제를 처리한 후 membrane-enriched fraction을 제조하기 위해 SW620, K-Ras, H-Ras 세포주 모두 seeding한 다음날 media를 제거하고, DMSO에 녹인 저해제를 섞은 신선한 media (0.1% DMSO가 되도록)를 다시 넣어주어, 48시간동안 저해제에 지속적으로 노출시켰다.

라. Membrane-enriched fraction의 제조

48시간동안 저해제에 노출시킨 세포를 차가운 tris-buffered saline (TBS: 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4)로 두 번 씻어준 후, cell scraper를 이용하여 긁어내어 800 rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리함에 의해 pellet을 모았다. 이 pellet을 0.05% (w/v) saponin을 포함하는 MOPS buffer (20 mM MOPS, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, plus protease and phosphatase inhibitors)에 suspension하여, 얼음에서 30분동안 둔 후 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리함에 의해 cell ghost (membrane-enriched fraction)를 모았다. Cell ghost를 차가운

TBS로 세 번 씻어준 후 1.0% (w/v) CHAPS를 포함하는 MOPS buffer에 suspension하여 Ras 단백질을 녹여내었다. Insoluble cell debris는 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 제거하였다. 단백질의 농도는 Protein Assay^{DC} (Bio-Rad) 방법을 이용하여 결정하였다.

마. SDS-PAGE와 Western Blotting

저해제를 처리한 시료와 처리하지 않은 시료에서의 Ras processing 정도의 차이를 알아보기 위해, 각 시료의 Ras 단백질이 녹아 있는 단백질 분획을 가지고 SDS-PAGE와 Western Blotting을 실시하였다. Ras 단백질이 녹아있는 단백질 분획을 SDS-PAGE sample buffer와 섞은 후 5분 동안 끓여, SDS-PAGE sample을 만들었다. 이 sample을 12% SDS-polyacrylamide gel에서 분리한 후 PVDF membrane으로 transfer하였다. 이 blot을 blocking solution (Roche Biochemicals)에서 blocking한 후, monoclonal anti-K-Ras (Calbiochem) 또는 anti-H-Ras (Calbiochem)를 붙이고, Tween-20을 포함하는 TBS로 7분 동안 세 번 씻어주고, HRP0 (Horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Corp.)를 다시 붙인 후 HRP0의 chemiluminescence substrate를 이용하여 Ras 단백질의 band를 확인하였다.

바. Cell Proliferation Assay

Cell Proliferation Assay는 WST-1 (Roche Molecular Biochemicals) 방법으로 실시하였다. 80% confluent하게 성장한 세포들 (NIH3T3, K-Ras, K-Ras, SW620)을 trypsinization하여 microtiter plate의 각 well에 3,000-5,000 cells/well 되게 나누어 넣었다. 37°C, 5% CO₂ atmosphere의 조건에서 24 시간동안 배양한 후 각 well로부터 media를 제거하였다. 저해제를 DMSO에 녹인 후, media로 working concentration이 되게 희석 (0.1% DMSO가 되도록)하여, 각 well에 처리하였다. 37°C, 5% CO₂ atmosphere의 조건에서 48시간 동안 저해제를 처리한 후, cell proliferation assay를 위해 metabolically active cells의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 bioreduction되는 WST-1 (Cell Proliferation Reagent,

Roche Biochemicals)을 넣고 1-4 시간 동안 다시 배양한 다음 Microplate reader (Bio-Rad)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. 세포주기 분석

세포주기 분석을 위하여 인체 유방암 세포주 MCF-7는 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배지를 이용하여 T25 플라스크(배양액 7.5ml)에 분주하여 12시간 동안 5% CO₂ 를 포함한 37 °C 배양기에서 배양하였다. 12시간 배양 후, 대조군(control)으로 쓰일 세포배양액에는 DMSO를 최종 농도가 0.1%(7.5 μ l)가 되도록 넣어주고, 처리군에는 DMSO에 녹여진 시료(5 mg/ml, APF)를 배양액에서 DMSO 농도가 0.1%(최종 APF 농도, 5 μ g/ml, 7.5 μ l)가 되도록 첨가하였다. DMSO나 시료를 처리한 MCF-7 세포주는 5% CO₂/37 °C 배양기에서 각기 12시간, 24시간, 36시간동안 배양하여 세포 분석을 위해 사용하였다.

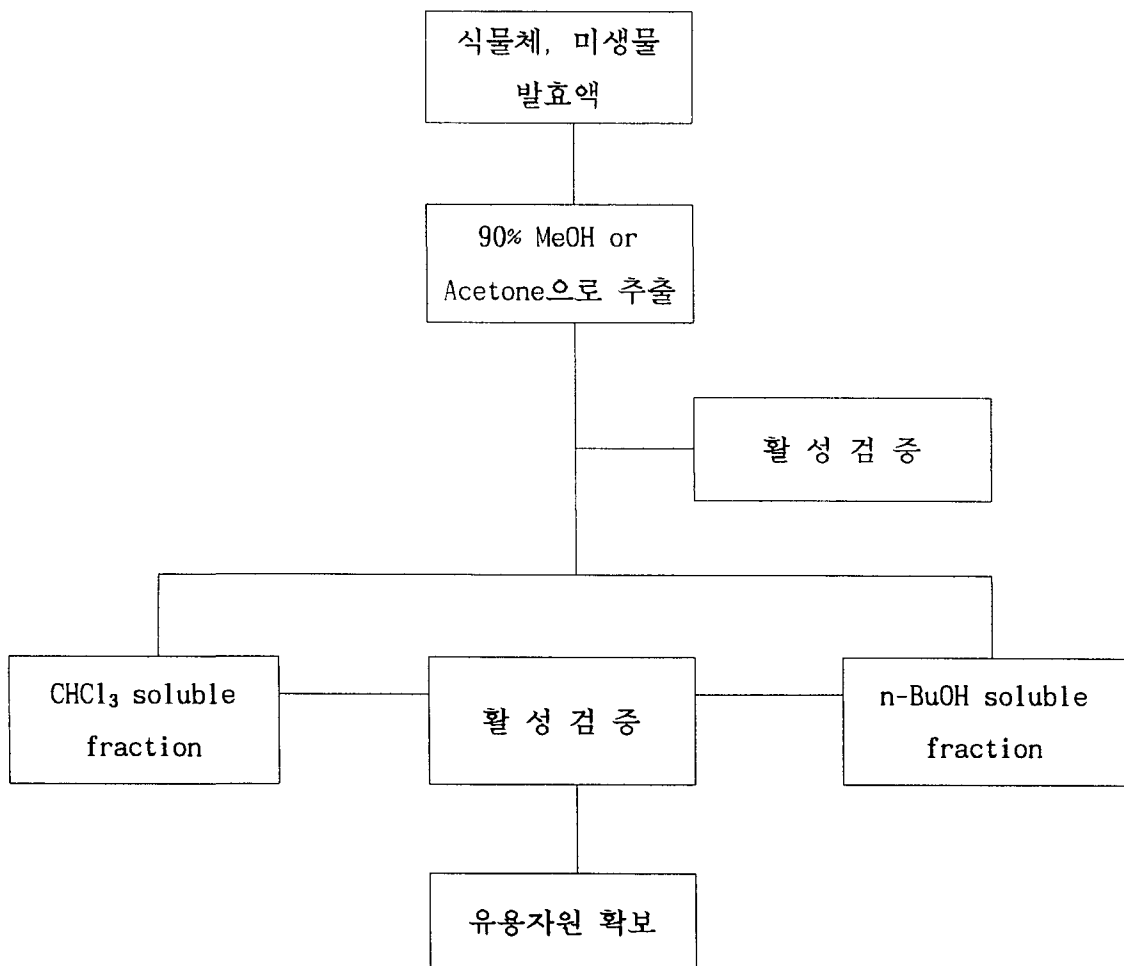
세포주기 분석을 위하여 배양된 세포는 플라스크에서 배지를 제거한 후, 트립신을 이용하여 배양 플라스크에서 분리하여 원심분리(300g, 5분)하였다. 분리된 세포는 phosphate buffer를 이용하여 두 차례 씻어주어 배지 성분을 제거해 준다. 이렇게 준비된 세포에 70% 에탄올 3 ml 을 처리하여 -20°C에서 12시간동안 방치하여 세포를 고정시킨다. 에탄올로 고정된 세포는 원심분리(300g, 3분)한 후, 다시 차가운 PBS로 두 번 세포를 씻어내어 잔여 에탄올을 제거한다. 세포를 500 μ l PBS를 가하여 골고루 섞어 준 후, 100 μ g/ml RNase A를 50 μ l를 처리하여 37°C에서 30분간 방치한 후, 1mg/ml propidium iodide(in PBS), 10 μ l를 처리하여 세포 DNA를 염색하였다.

염색된 세포는 Becton-Dickinson FACS calibur(Becton-Dickinson, San Jose, CA)를 이용하여 20,000개의 세포 주기를 측정하였고, Becton-Dickinson Modifit 세포 주기 분석 프로그램을 이용하여 세포주기의 G1, S, G2+M기에 있는 세포의 양을 백분율로 계산하였다.

3. 활성 자원 연구

가. 활성 자원의 탐색

식물체, 해양자원, 미생물 발효액을 대상으로 다음 도식과 같이 시료를 준비하여 1 mg/ml 농도로 만든 후 탐색계를 활용하여 활성을 검증하였다. 1 mg/ml (최종 농도 100 micog/ml)에서 40-50%의 활성 저해도를 보여주는 자원을 활성자원으로 분리하여 보관하였다.



나. 활성 자원의 분리 정제

상기의 방법에 의해서 확보된 자원을 대량 발효 또는 채집을 통하여 시료를 준비한 후 메탄올 등으로 추출하고 각종 컬럼크로마토 그래피법 (실리카, C18, LH-20, XAD-7)을 이용하여 활성분획을 얻고 prepative TLC 또는 HPLC 방법으로 순수 물질을 분리하였다.

다. 활성 물질의 구조결정

UV 흡광도 분석은 Shimadzu UV-265 spectrophotometer로 측정하였으며, IR 흡광도는 Bio-Rad Digilab Division FTS-80 spectrophotometer로 측정하였고, VG70-SEQ mass spectrometry를 이용하여 High resolution MS를 측정하여 분자량 및 분자식을 결정하였다. 또한 핵자기공명기(Varian 300 MHz, 500 MHz NMR)를 이용하여 ^1H , ^{13}C , Cosy, HMQC, HMBC, NOESY spectrum을 얻었으며, 이들 spectra를 종합적으로 분석하여 구조를 결정하였다.

4. FPTase 저해활성 물질의 분리

가. 곰팡이 F93으로부터 gliotoxin 분리

곰팡이 F93의 발효액을 여과하여 배양액부분과 균체로 분리한 후 균체는 아세톤으로 추출하고, 용액은 에칠아세테이트로 추출하여 모은 후 감압하에서 농축하였다. 농축액을 대상으로 실리카 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 활성 분획을 분리하였다. 부분정제된 활성 분획을 대상으로 C18 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 순수한 물질을 분리하였다.

나. 고초균으로부터 bacitracin의 분리

토양으로부터 분리한 200여개의 고초균의 발효액을 대상으로 FPTase 저해활성을 측정하고 결과 *Bacillus licheniformis*가 FPTase 저해제를 생산함을 확인 할 수 있었으며 10liter 배양기를 사용하여 배양한 후 다음과같은 방법으로 활성물질을 분리하였다 (21).

먼저 배양이 종료된 후 배양액의 온도를 급속히 상온으로 낮춘 후 1/5 volume의 Amberlite XAD-7 resin과 혼합하여 batch type으로 계속 저어면서 4℃에서 6시간 이상 방치하였다. 그 후 resin을 충분히 가라앉히고 상등액은 버린 후 동일 volume의 증류수로 3회 세척하였다. Resin을 10×60 cm(diameter×length) column에 충전시킨 후 다시 bed volume 4배의 증류수로 세척하고 2배 양의 20% MeOH로 washing하였다. 그 후 2배의 60% MeOH로 elution한 fraction을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 40℃에서 완전히 농축하여 7.5 g의 갈색 powder를 얻었는데, 이것을 다시 다음 조건에서 C18 column (6×30 cm) chromatography하였다. 먼저 40% MeOH로 충분히 washing 한 후 100% MeOH로 elution하여 3.5 g의 황갈색 powder를 얻었다. 이것을 LH-20 column(3×70 cm)에 걸어 100% MeOH로 0.5 ml/min의 속도로 elution하면서 한 fraction 당 3 ml씩 total 35 fraction으로 sample을 분리하여 활성을 측정하였다. 그 결과 fraction 19 - fraction 38 사이에서 98 % 이상의 활성이 나타

났으며, 이를 농축한 결과 2 g의 yellow powder를 얻었다. 이 sample을 preparative TLC로 계속 정제하기 위하여 5 mm 두께의 silica gel plate에 loading 한 후 butanol: acetonitrile: water (2: 5: 3 in volume) 의 용매계에서 4시간 정도 전개시켰다. UV하에서 TLC plate의 분획을 나누어 각 sample분획을 긁어내어 회수한 후 활성을 조사하였다. 그 결과 RF 값이 약 0.4 정도에서 활성이 나타났으며 이 sample을 최종적으로 HPLC로 분리하였다. Column은 YMC Pack Pro-C18을 이용하였으며, solvent system으로는 0.05% TFA(trifluoroacetic acid)를 함유한 28% acetonitrile 이 적당하였다. 251nm에서 sample 흡광도를 측정하면서 peak가 나타나는 분획을 모아 농축하여 최종적으로 약 200 mg의 sample을 얻었다.

다. 미생물 G80791로부터 파네실전달 효소 저해제 분리

토양으로부터 분리된 방선균 G80791을 다음과 같은 방법으로 발효하여 활성 물질을 분리하였다.

(1) GSS 배지 1 l / 5 l (×5) 만들기.

- ① soybean meal 25 g 을 증류수 300ml 에 녹인 후, 먼저 autoclave한다.
(soybean meal은 물에 잘 풀어지지 않아서 오염의 위험이 높다.)
- ② beef extract 5.5 g (loss에 대비)을 증류수 50ml에 녹인 후 5개로 각각에 10ml씩 넣는다.
- ③ 나머지 배지성분(깨끗하게 잘 녹는 것들)을 증류수 300ml에 녹인다.
- ④ 증류수 390ml를 가해 1 l 를 만든다.

(2) 접종

1 l / 5 l (×5)의 GSS배지에 seed 30ml(3%)을 접종하여 27℃ shaking incubator에서 배양하였다. (일반적으로 방선균은 28℃에서 배양한다.)

(3) Acetone 1:1 extraction

6일동안 배양한 후 acetone 1:1 extraction하였다.

각각의 flask에 acetone 1 l 씩 가한 후, 저온실에 밤새 보관하였다.

(4) Filtration

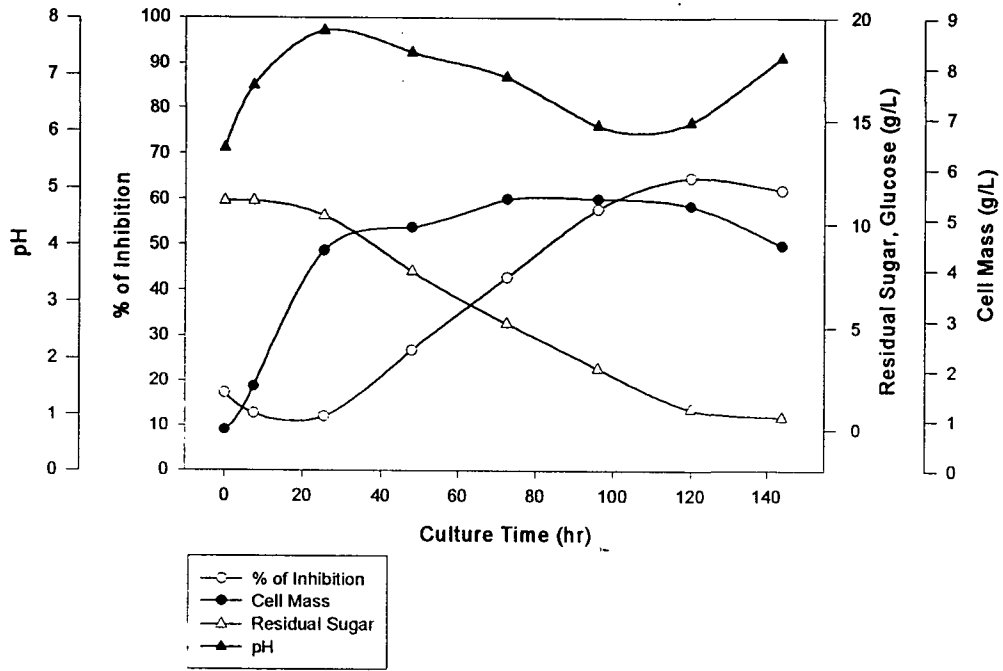
방선균의 끈끈한 액이 filter의 구멍을 막을 수도 있으므로, acetone과 섞은 액을 구조토와 잘 섞어서 부어준다. vacuum을 걸어서 빨리 나올 수 있도록 한다.

(5) 시간에 따른 활성도

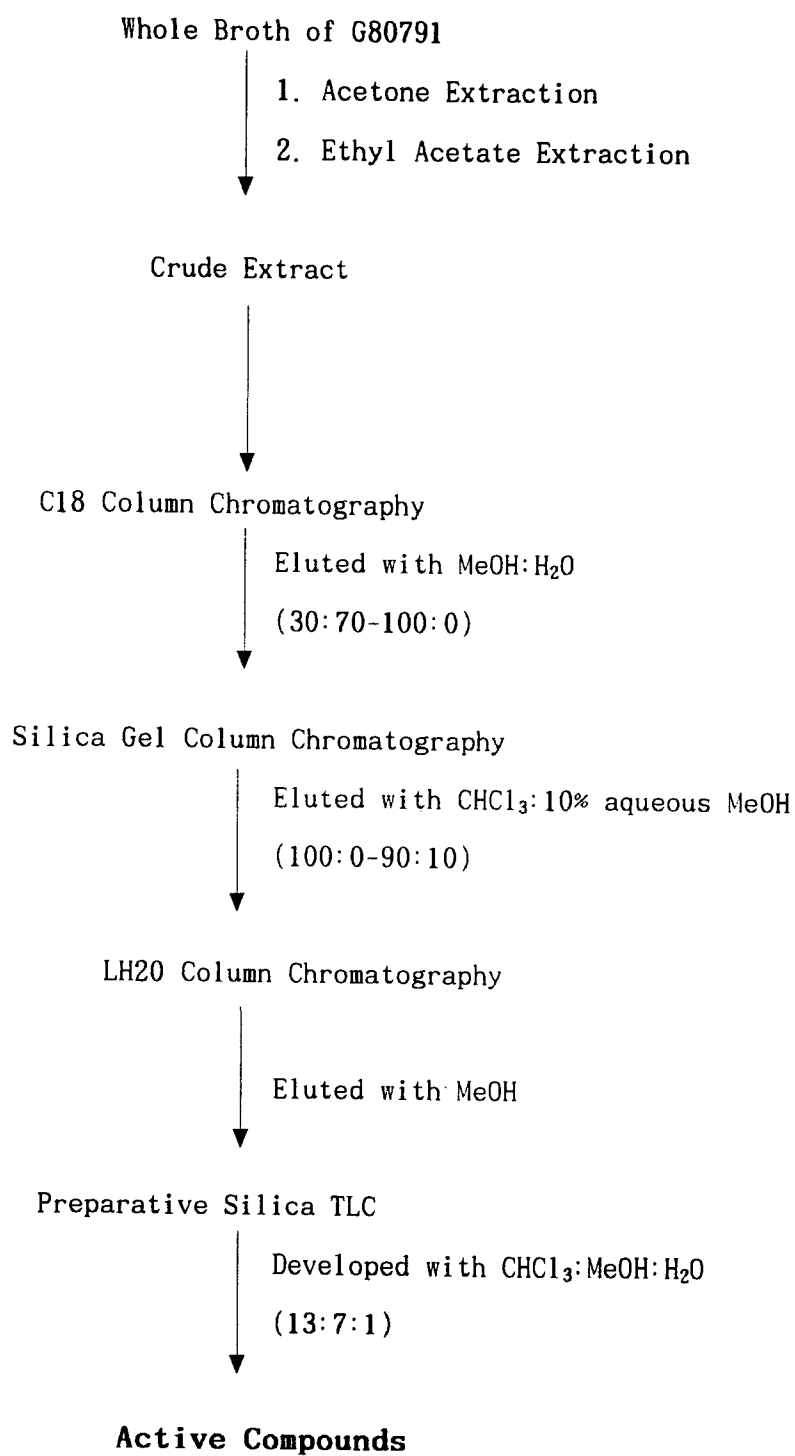
- ① pH를 잰다.
- ② Volume을 잰다.
- ③ 3000rpm에서 15분 centrifuge
- ④ sup. 에서 1ml을 E-tube에 저장한다. (sample 1)
- ⑤ 나머지 sup.을 ethyl acetate를 1:1로 넣고 shaking하여, ethyl acetate에 녹아 나온 것(sample 2)을 저장하고, broth층은 버린다.
- ⑥ pellet은 acetone을 1:1로 넣고 vortex
- ⑦ filtration하여 acetone에 녹아 나온 것(sample 3)을 저장하고, filter paper 에 걸린 것은 oven에 완전히 말린 후 무게를 측정하여 기록한다.

		cpm	% inhibition
Broth (sample 2)	1d(24h)	16177	21.9
	2d(48h)	18927	8.7
	3d(72h)	17660	14.8
	4.5d(108h)	16545	20.2
	6d(144h)	14675	29.2
Cell (sample 3)	1d(24h)	15159	26.9
	2d(48h)	19770	4.6
	3d(72h)	16410	20.8
	4.5d(108h)	13396	35.4
	6d(144h)	12238	41.0

G80791



(6) 활성 물질의 분리과정을 도식화하면 다음과 같다.



다. 계피로부터 시남알데하이드 분리

(1) 2'-Hydroxy cinnamaldehyde의 분리

계피 1 kg을 메탄올에 3일간 냉침시킨 후 감압 농축하여 진한 갈색의 농축액을 얻었다. 이 농축액을 실리카 컬럼 크로마토그래피 (헥산과 에칠아세테이트로 용출)를 수행하여 활성 분획들을 분리하였다. 활성이 가장 우수한 분획은 UV lamp로 254nm에서 보이고, 365nm에서 노란 색 형광으로 보이며 anisaldehyde에 노란 색으로 발색된다. Preparative TLC로 분리 할 경우 Hexane EtOAc (70:30)의 전개 용매에서 Rf 값이 0.67 부분에서 분리되며, acetone/hexane 으로 재결정 한후 황색 침상결정을 얻었다 (15).

mp: 121-122 °C, UV(MeOH, λ_{max}) : 214nm(ϵ 7000), 285nm(ϵ 16000), 337nm(ϵ 5000)

IR(KBr pellet, cm^{-1}): 3000-3500(H-Bonded OH), 1658(C=O), 1612, 1600, 1450 (aromatic C=C), 1253, 1145(C-O)

1H -NMR (Acetone- d_6 , δ): 9.68(1H, d, J=7.8Hz, CHO), 7.89(1H, d, J=16.2Hz, ϕ -CH=CH-), 7.63(1H, dd, J=7.7, 1.5Hz, aromatic 6H), 7.30(1H, td, J=7.7, 1.5Hz, aromatic 4H), 7.00 (1H, d, J=7.8Hz, aromatic 3H), 6.92(1H, td, J=7.5, 1.1Hz, aromatic 5H), 6.84 (1H, dd, J=7.8, 16.2 Hz, ϕ -CH=CH-CHO)

^{13}C -NMR (Acetone- d_6 , ppm): 194.0(CHO), 157.1(aromatic 2C), 148.4(ϕ -CH=CH-), 132.7(aromatic 4C), 129.4(aromatic 6C), 128.9(ϕ -CH=CH-CHO), 121.6(aromatic 1C), 120.2(aromatic 5C), 116.6(aromatic 3C)

MS(CI) : m/z 149([M+H], 100%), 131(35%), 120(15%), 91(35%), 65(8%)

(2) 2'-Methoxy cinnamaldehyde의 분리

2'-Hydroxycinnamaldehyde를 분리하는 과정에서 미약한 활성을 보이는 부분이 확인되어 분리하였다. 이 분획은 Hexane : ethyl acetate (4:6)의 전개용매로 TLC를 한 결과 Rf= 0.81의 반점이 UV lamp로 254nm에서 보이고, 365nm에서 푸른색 형광으로 보이며 anisaldehyde에 의해서 노란색으로 발색된다. Hexane:EtOAc(90:10)에서 분리되었으며, prep TLC (Hx:EtOAc=6:4)로 분리하였다.

mp: 46-47 °C

¹H-NMR (Acetone-d₆, δ): 9.68(1H, d, J=8.1Hz, CHO), 7.88(1H, d, J=16.2Hz, φ-CH=CH-), 7.69(1H, dd, J=7.8, 1.8Hz, aromatic 6H), 7.46(1H, td, J=7.65; 2.1Hz, aromatic 4H), 7.11(1H, d, J=8.1Hz, aromatic 3H), 7.02(1H, t, J=7.5Hz, aromatic 5H), 6.80(1H, dd, J=7.8, 16.2Hz, φ-CH=CH-CHO), 3.94 (3H, s, OCH₃)

¹³C-NMR: 194.6(CHO), 159.3(aromatic 2C), 148.4(φ-CH=CH-), 133.5(aromatic 4C), 130.0(φ-CH=CH-CHO), 129.9(aromatic 6C), 123.7(aromatic 1C), 121.6(aromatic 5C), 112.5(aromatic 3C)

MS:m/z 162(40%), 147(13%), 119(38%), 103(23%), 91(50%), 77 (25%), 65(18%), 63(18%), 51(20%), 39(15%)

라. 약썩으로부터 아테미노라이드 분리

그늘 썩 (*Artemisia sylvatica* MAXIMOWICZ)은 6 월경에 경기도 서해안 일대에서 자생하는 약썩의 줄기와 잎 5 kg을 채취, 음건하여 사용하였다.

음건한 그늘 썩 5 kg을 CHCl₃:acetone (1:1)로 3일간 추출후 감압농축하여 gel상태의 검은색 추출물 300 g을 얻었다.

(1) Silica gel column chromatography

Silica gel (200-400 mesh) 1.5 kg을 Hexane 3 L를 넣어 column (10x60 cm)에 Packing 하였다. Crude extract 300 g을 CHCl₃ 100 mL에 녹여 조심스럽게 loading 하였고 CHCl₃:MeOH (100:0-95:5, 각각 3L)으로 1% 간격으로 단계적 용출을 하여 200 mL씩 분획을 Flask에 받았다. 분획은 1 mg/mL의 농도로 Enzyme inhibition assay을 한 후 저해 활성 분획을 모아 감압농축하여 Brown gel 200 g을 얻었다.

(2) ODS column chromatography

Reverse phase silica gel (RP-C18, 40-63 μm) 200 g을 MeOH : H₂O(50:50) 20 mL에 녹여 Column위에 조심스럽게 Loading 하였고 MeOH:H₂O (50:50-100:0, 각각

800 mL)으로 10% 씩 간격으로 단계적 용출을 하여 100 mL씩 분획을 Tube에 받았다. 10번의 반복적 Column후 저해활성 분획을 모아 감압농축하여 Yellow powder 20 g을 얻었다.

(3) Silica gel column chromatography

Silica gel 200 g은 CHCl₃:EtOAc (80:20) 400 mL을 넣어 Column (5x40 cm)에 Packing하였다. Yellow powder 4 g은 CHCl₃:EtOAc (80:20) 4 mL에 녹여 Column위에 Loading 하였고, CHCl₃:EtOAc (80:20-40:60, 각각 800 mL)으로 10% 간격으로 단계적 용출을 하여 100 mL씩 분획을 Tube에 받았다. 5번의 반복적 Column chromatography를 실시한 후 저해활성 분획을 모아 감압농축 후 Yellow powder 4 g을 얻었다.

(4) Sephadex LH-20 chromatography

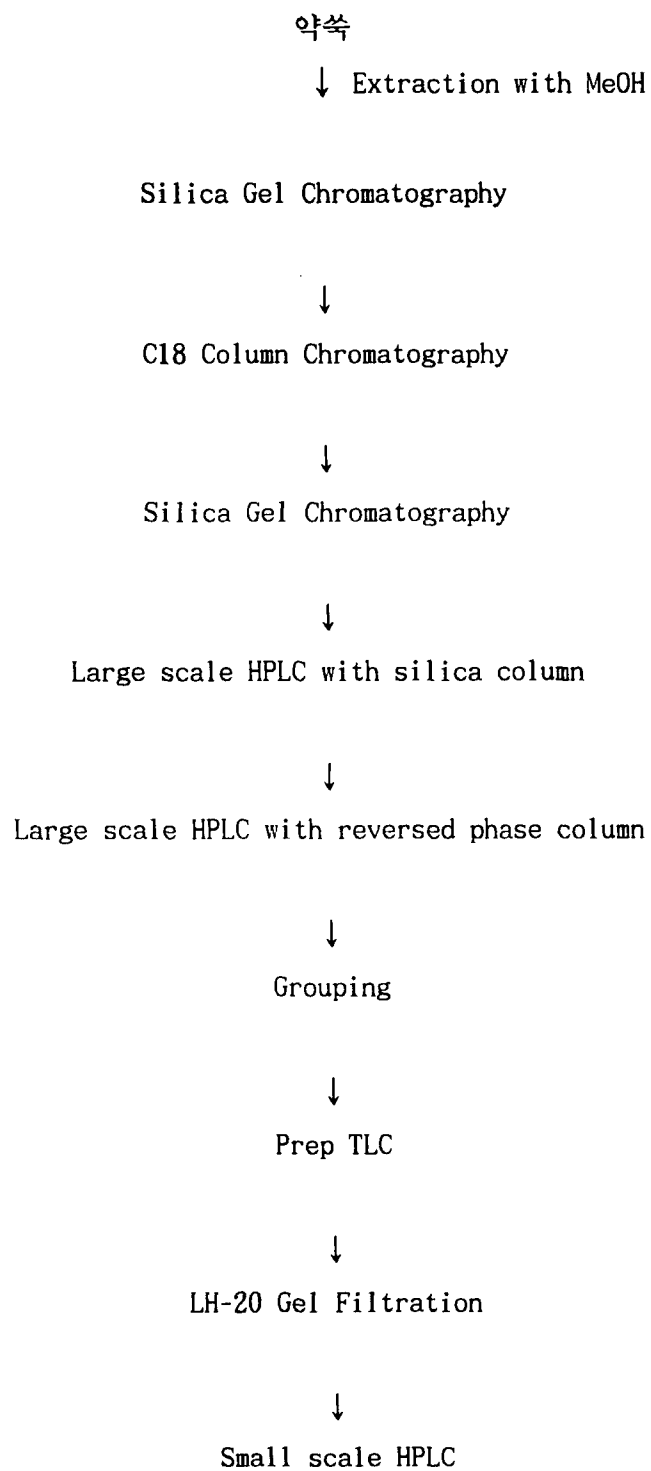
Sephadex LH-20 100 g을 MeOH 200 mL에 넣어 Column (3x60 cm)에 Packing 하였다. Yellow powder 400 mg을 MeOH 4 mL에 녹여 Column위에 Loading하고, MeOH (1 L)로 용출하여 분획을 10 mL씩 Tube에 받았다, 10 번의 반복적 Column후 저해활성 분획을 모아 감압농축하여 Yellow powder 200 mg을 얻었다.

(5) HPLC 조건

부분정제된 물질로부터 HPLC를 이용하여 순수한 아테미노라이드를 분리하였으며, HPLC 조건은 다음과 같다.

Column	YMC - Pack C8, S-8, 120A, 250X20 mm
Detection	254 nm
Flow rate	4 ml/min
Solvent	MeOH : H ₂ O (70:30)
Retention time	40 min

약속으로부터의 물질 분리 도식도



마. 담배풀로부터 FPTase 저해제 분리

담배풀 지상부위 3.5 kg을 채집하여 건조시킨 후 메탄올로 추출하였다. 이 추출액을 여과 후 용액을 감압 농축하여 400g의 농축액을 얻었다. 이 추출물을 Celite에 흡착시킨 다음 유기용매(ether, chloroform, methanol)로 용출시켰다. 각 분획을 대상으로 활성을 검증한 결과 chloroform 분획에 활성이 있음을 확인하였다. 이 분획을 대상으로 실리카 크로마토 그래피를 통하여 세분한 후 활성 검색하고 상대적으로 강한 활성을 보여주는 분획을 대상으로 HPLC를 수행하여 활성 물질을 분리하였다.

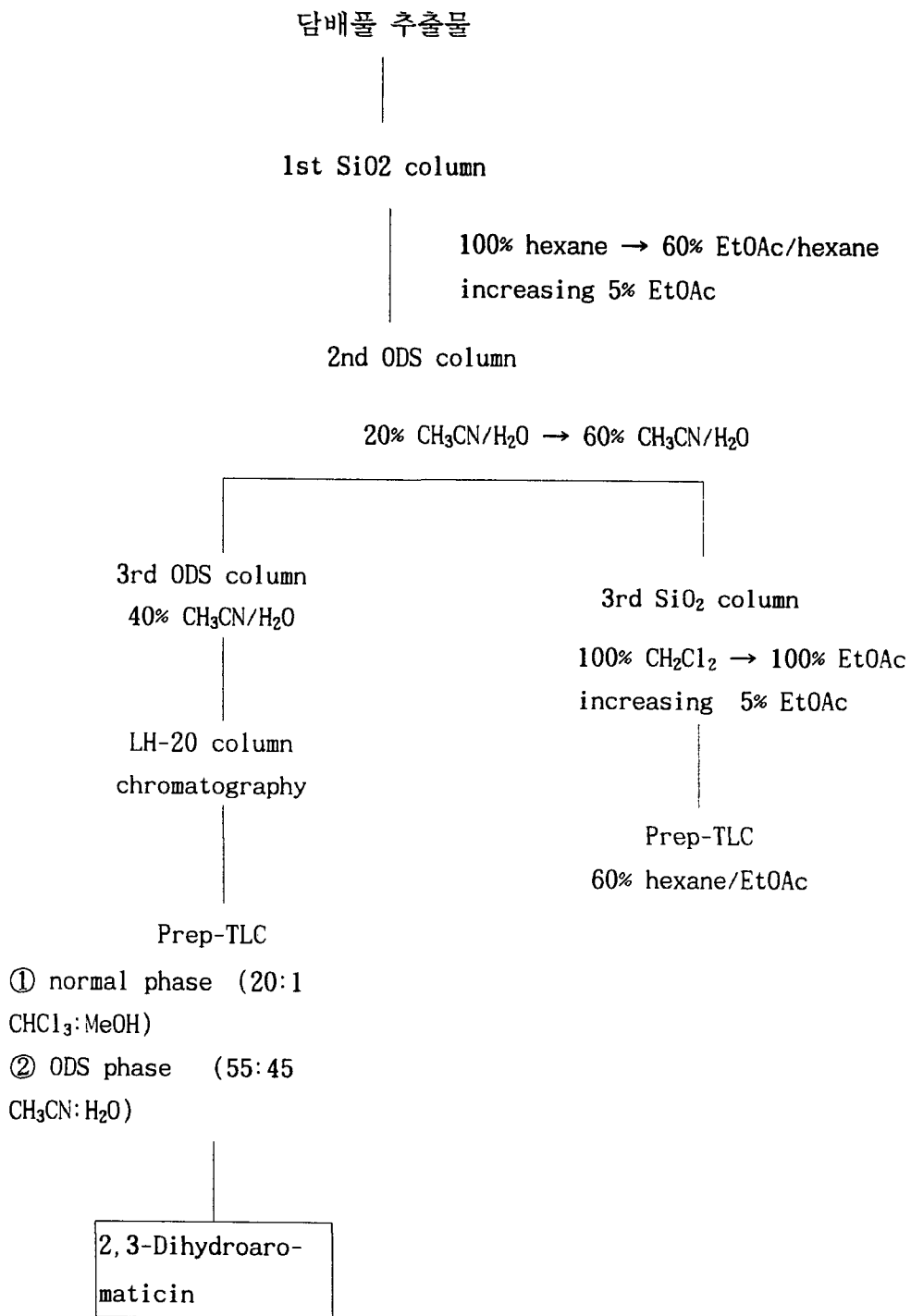
(1) Silica gel column chromatography

Silica gel (200-400 mesh) 1.5 kg을 Hexane 3 L를 넣어 column (10x60 cm)에 Packing 하였다. Crude extract 400 g을 CHCl_3 100 mL에 녹여 조심스럽게 loading 하였고 CHCl_3 :MeOH (100:0-95:5, 각각 3L)으로 1% 간격으로 단계적 용출을 하여 200 mL씩 분획을 Flask에 받았다. 분획은 1 mg/mL의 농도로 Enzyme inhibition assay을 한 후 저해 활성 분획을 모아 감압 농축하였다.

(2) HPLC 조건

부분정제된 물질로부터 HPLC를 이용하여 순수한 화합물을 분리하였으며, HPLC 조건은 다음과 같다.

Column	YMC - Pack C8, S-8, 120A, 250X20 mm
Detection	254 nm
Flow rate	4 ml/min
Solvent	MeOH : H ₂ O (80:20)
Retention time	40 min



바. 해면으로부터 solandelactone의 분리

Hydroid *Solanderia secunda*의 채집은 서귀포 근해 및 거문도 연안 서도와 대삼부도 근해 수심 25-30m에서 SCUBA 다이빙에 의해서 이루어 졌으며 이 시료는 응달에서 완전히 말려 냉동고에 보관하였다. 냉동보관중인 시료(건조무게량: 5 kg)를 잘게 잘라 methylene chloride 2L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었으며 이 과정을 다시 반복한 후에 얻어진 전체 유기조추출물의 양은 10.7g이었다.

이 조추출물을 silica vacuum flash column chromatography로 분리하기 위해 n-hexane과 ethylacetate의 혼합액(5% ethylacetate/n-hexane으로부터 100% ethylacetate까지), acetone, methanol을 순서대로 용출시켰다. 이렇게 얻어진 18개의 분액(fraction, fx)을 각각 용매를 제거한 후 proton-NMR을 측정한 결과 fx-12(55% ethylacetate /n-hexane: 100mg), fx-13(60% ethylacetate /n-hexane: 70mg), fx-14(65% ethylacetate /n-hexane: 170mg), 및 fx-15(70% ethylacetate /n-hexane: 140mg)에 2차대사 물질이 포함되어 있음이 밝혀졌다.

이들 fraction을 각각 50% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 reversed phase HPLC(YMC ODS semi-preparative column, RI detector, 2ml/min)로 분리하여 16mg의 Solandelactone C와 4mg의 Solandelactone D가 분리되었다.

5. 유도체 합성

구조-활성 관계의 연구를 위하여 다음과 같은 방법으로 시남알데하이드 유도체들을 합성하였다.

가. 2'-Hydroxycinnamaldehyde의 합성방법

(1) CH_2N_2 의 제조

Aldrich의 Diazald kit을 이용하여 만들었다. Condenser에 dry ice를 채우고 acetone을 1/3 가량 천천히 가한다. EtOH (95%, 50 ml)를 증류수 40ml에 녹인 KOH (25 g) 용액에 가한 후 반응용기에 넣는다. 65°C가 되었을때 Diazald (25.0g, 23 mmol)를 ether(225 ml)에 녹인 후 separating funnel에 가한다. 이때 condenser에 떨어지는 속도와 diazomethane이 생성되는 속도가 같게 유지시킨다. 이러한 방법으로 얻은 diazomethane은 fume hood 내에서 반응물들과 반응시킨다.

(2) 2'-Hydroxycinnamyl alcohol의 합성

2'-Hydroxycinnamic acid 1g을 HPLC grade MeOH에 녹인 후 CH_2N_2 를 소량씩 가하면서 교반한다. TLC (Hexane : EtOAc= 4:6)로 반응이 완료된 것을 확인한 후 ($R_f=0.29 \rightarrow 0.57$), silica gel column chromatography (Hexane:EtOAc=6:4)를 하고, acetone, hexane으로 재결정하여 백색 분말인 2'-hydroxy cinnamic acid methyl ester를 700mg얻었다.

위의 생성물을 THF에 녹인 후 -40 °C(dry ice / acetonitrile)의 조건에서 DIBAL-H 10ml를 N_2 gas 하에서 서서히 가하며 교반한다. TLC(Hexane:EtOAc=4:6)로 반응이 완료된 것을 확인했다 ($R_f=0.5 \rightarrow 0.3$). 삼각 flask에 증류수 50ml와 NH_4Cl 을 가한 후 여기에 50ml의 EtOAc와 반응물을 가한다. gel이 약간 형성되면 감압여과를 하여 gelate를 제거하고 filtrate를 separating funnel에 가한다. EtOAc로 추출한 후 Na_2SO_4 anhydrous를 충분히 넣어 수분을 완전히 제거한다. 여과한 뒤 여액을 농축하여 silica gel column chromatography (Hexane:EtOAc= 65:35)를 했다. acetone, hexane으로 재결정하여 백색 분말인 2-hydroxy cinnamyl alcohol을 500mg

얻었다. $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ): 7.48(1H, m, aromatic H), 7.40(1H, m, aromatic H), 7.21(2H, m, aromatic H), 6.92(1H, d, $J=13.8\text{Hz}$, $\phi\text{-CH=CH-}$), 6.28(1H, dt, $J=15.9, 5.4\text{Hz}$, $\phi\text{-CH=CH-CH}_2\text{OH}$), 4.69(2H, d, $J=5.4\text{Hz}$, $\phi\text{-CH}_2\text{OH}$).

(3) 2'-Hydroxy cinnamaldehyde의 합성

상기 방법으로 확보한 2'-hydroxycinnamaldehyde 200 mg을 아세톤에 녹인 후 1.5g의 MnO_2 를 가한다. 반응용액을 40-50 $^\circ\text{C}$ 로 가열하면서 1시간 동안 교반한다. 반응이 완료된 후 여과하고 감압농축한다. 농축액은 실리카 크로마토그래피를 사용, 정제하여 순수한 물질을 45% 수율로 얻었다 (18).

나. 3'-Hydroxy cinnamaldehyde의 합성

(1) 3'-Hydroxy cinnamyl alcohol의 합성

3'-Hydroxy cinnamic acid 0.5g을 HPLC grade MeOH에 녹인 후 CH_2N_2 를 소량씩 가하면서 교반한다. TLC(Hexane : EtOAc= 4:6)로 반응이 완료된 것을 확인한 후 ($R_f=0.25\text{-}0.48$), silicagel column chromatography (Hex : EtOAc=6:4)를 한 뒤, acetone, hexane으로 재결정하여 백색 분말인 3-hydroxy cinnamic acid methyl ester 400mg을 얻었다.

위의 생성물을 THF에 녹인 후 -40 $^\circ\text{C}$ (dry ice/acetonitrile)의 조건에서 DIBAL-H 10 ml를 N_2 gas 하에서 서서히 가하며 교반한다. TLC(Hexane:EtOAc=4:6)로 반응이 완료된 것을 확인하였다 ($R_f=0.48\text{-}0.35$). 삼각 flask에 증류수 50ml와 NH_4Cl 을 가한 후 여기에 50ml의 EtOAc와 반응물을 가한다. gel이 약간 형성되면 감압여과를 하여 gelate를 제거하고 filtrate를 separating funnel에 가한다. 방치한 후 EtOAc 층을 모아 Na_2SO_4 anhydrous를 충분히 넣어 수분을 완전히 제거한다. 여과한 뒤 여액을 농축하여 silica gel column chromatography (Hexane : EtOAc= 60:40)를 수행하였다. Acetone과 hexane으로 재결정하여 백색 분말인 3-hydroxy cinnamyl alcohol 150mg을 얻었다.

mp: 87-88 $^\circ\text{C}$ IR(KBr pellet, cm^{-1}): 3500(Free OH), 3100-3400(H-Bonded OH),

1620 (C=C), 1000, 980(C-O)

¹H-NMR (Acetone-d₆, δ): 7.12(1H, t, J= 8.1HZ aromatic 6H), 6.89(1H, d, J=1.5Hz, aromatic 4H), 6.87 (1H, s, aromatic 2H), 6.70(1H, dt, J=8.1, 1.8Hz, aromatic 5H), 6.53(1H, d, J=15.9Hz, φ-CH=CH-), 6.33(1H, dt, J=15.9, 5.1Hz, φ-CH=CH-CH₂OH), 4.21(2H, d, J=3.9 Hz, CH₂OH)

¹³C-NMR (Acetone-d₆, ppm): 158.4(aromatic 3C), 139.6(aromatic 1C), 130.8(φ-CH=CH-), 130.3(aromatic 5C), 130.0(φ-CH=CH-CH₂OH), 118.6(aromatic 6C), 115.2 (aromatic 4C), 113.7 (aromatic 2C), 63.1 (CH₂OH)

MS(EI): m/z 150([M⁺], 94%), 149(25%), 131(20%), 107 (100%), 94(57%), 77(23%)

(2) 3'-Hydroxycinnamaldehyde의 합성

앞에서 합성한 3'-hydroxycinnamyl alcohol 110mg을 acetone에 녹인 후, MnO₂를 2g 가한 뒤 1시간 정도 교반했다. TLC(Hexane:EtOAc=4:6)로 반응이 완료된 것을 확인한 후(Rf=0.3->0.49), 여과하였다. Acetone으로 충분히 washing하고 농축하여 silica gel column chromatography (Hx:EtOAc=70:30)를 했다. Acetone, hexane으로 재결정하여 백색 결정인 3'-hydroxy cinnamaldehyde 50mg을 얻었다.

mp : 118-120 °C, IR (KBr pellet, cm⁻¹): 3000-3500(H-Bonded OH), 1680(C=O), 1600, 1470 (aromatic C=C), 1170(C-O)

¹H-NMR (Acetone-d₆, δ): 9.69(1H, d, J= 7.8 Hz, CHO), 7.60(1H, d, J=15.9Hz, φ-CH=CH-), 7.29(1H, t, J=7.8Hz, aromatic 6H), 7.20(1H, s, aromatic 2H), 7.16 (1H, d, J=2.4Hz, aromatic 4H), 6.96(1H, dd, J=8.25, 2.4Hz, aromatic 5H), 6.69 (1H, dd, J=7.8, 15.9Hz, φ-CH=CH-CHO)

¹³C-NMR (Acetone-d₆, ppm): 194.1(CHO), 158.7(aromatic 3C), 153.5(φ-CH=CH-), 136.6 (aromatic 1C), 130.9 (aromatic 5C), 129.4(φ-CH=CH-CHO), 120.9(aromatic 6C), 119.1 (aromatic 4C), 115.6(aromatic 2C)

MS(EI): m/z 148([M⁺], 100%), 147(36%), 131(30%), 120(38%), 119(22%), 91(48%)

다. 4'-Hydroxycinnamaldehyde의 합성

(1) 4'-Hydroxycinnamyl alcohol의 합성

4'-Hydroxycinnamic acid 1g을 HPLC grade MeOH에 녹인 후 CH_2N_2 를 소량씩 가하면서 교반한다. TLC(Hexane : EtOAc= 4:6)로 반응이 완료된 것을 확인한 후 (Rf=0.3->0.53), silicagel column chromatography (Hexane : EtOAc=6:4)를 하고, acetone, hexane으로 재결정하여 백색 분말인 4-hydroxy cinnamic acid methyl ester를 500mg 얻었다.

위의 생성물을 THF에 녹인 후 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ (dry ice / acetonitrile)의 조건에서 DIBAL-H 10ml를 N_2 gas 하에서 서서히 가하며 교반한다. TLC(Hx:EtOAc=4:6)로 반응 정도를 확인했다 (Rf=0.53->0.3). 삼각 flask에 증류수 50ml와 NH_4Cl 을 가한 후 여기에 50ml의 EtOAc와 반응물을 가한다. gel이 약간 형성되면 감압여과를 하여 gelate를 제거하고 filtrate를 separating funnel에 가한다. 방치한 후 EtOAc 층을 모아 Na_2SO_4 anhydrous를 충분히 넣어 수분을 완전히 제거한다. 여과한 뒤 여액을 농축하여 silica gel column chromatography (Hx:EtOAc= 60:40)를 했다. acetone, hexane으로 재결정하여 백색 분말인 4'-hydroxy cinnamyl alcohol을 200mg 얻었다.

mp : $124\text{--}126\text{ }^\circ\text{C}$ IR (KBr pellet, cm^{-1}) : 3520(Free OH), 3200-3500(H-Bonded OH), 1640, 1475(aromatic C=C), 1020, 1000(C-O)

$^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ): 7.25(2H, d, $J=8.7\text{Hz}$ aromatic 2H, 6H), 6.78(2H, d, $J=8.7\text{Hz}$, aromatic 3H, 5H) 6.49(1H, d, $J=15.9\text{Hz}$, $\phi\text{-CH=CH-}$), 6.18(1H, dt, $J=15.9, 5.7\text{Hz}$, $\phi\text{-CH=C H-CH}_2\text{OH}$), 4.18(2H, d, $J=5.1\text{Hz}$, CH_2OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , ppm): 157.8(aromatic 4C) 130.1($\phi\text{-CH=CH-}$), 129.8(aromatic 1C), 128.3(aromatic 2C, 6C), 127.8($\phi\text{-CH=CH-CH}_2\text{OH}$), 116.2(aromatic 3C, 5C), 63.4 (CH_2OH)

MS(EI): m/z 150([M+], 93%), 149(26%), 131(20%), 107(100%), 94(57%), 77(23%)

(2) 4'-Hydroxycinnamaldehyde의 합성

앞에서 합성한 4'-Hydroxycinnamyl alcohol 170mg을 acetone에 녹인 후, MnO₂를 2g 가한 뒤 2시간 정도 교반했다. TLC(Hexane:EtOAc=4:6)로 3개의 spot이 생긴 것을 확인했다 (Rf=0.3->0.49). 여과한 후, acetone으로 충분히 washing하고 농축하여 silica gel column chromatography (Hexane:EtOAc=80:20)를 했다. Prep TLC(Hexane:EtOAc=6:4)를 한 후, acetone, hexane으로 재결정하여 백색결정인 4'-Hydroxy cinnamaldehyde 20mg을 얻었다.

mp : 136-138 °C

IR (KBr pellet, cm⁻¹): 3000-3400(H-bonded OH), 1670(C=O), 1600(C=C), 1170(C-O)

¹H-NMR (Acetone-d₆, δ) : 9.63(1H, d, J=7.8Hz, CHO), 7.60(2H, d, J=9, 4.8Hz, aromatic 2H, 6H), 7.58 (1H, d, J=15.9Hz, φ-CH=CH-), 6.92(2H, d, J=8.7, 4.8Hz, aromatic 3H, 5H), 6.60(1H, dd, J=7.8, 15.9Hz, φ-CH=CH-CHO)

¹³C-NMR (Acetone-d₆, ppm): 193.8(CHO), 161.3(aromatic 4C), 153.6(φ-CH=CH-), 131.5(aromatic 2C, 6C), 126.8(aromatic 1C), 126.8(φ-CH=CH-CHO), 116.8(aromatic 3C, 5C). MS:m/z 148([M⁺], 100%), 147(76.8%), 131(21.6%), 120(39.2%), 119(36.8%), 94(24.8%), 65(28.0%).

라. 2'-Chloro cinnamaldehyde의 합성

(1) 2'-Chloro cinnamyl alcohol의 합성

2'-Chloro cinnamic acid 1g을 HPLC grade MeOH에 녹인 후 CH₂N₂를 소량씩 가하면서 교반한다. TLC (Hexane : EtOAc= 4:6)로 반응이 완료된 것을 확인한 후 (Rf=0.33->0.57), silica gel column chromatography (Hx: EtOAc= 6:4)를 하고, oil상태의 methyl chlorocinnamic ester를 얻었다.

위의 생성물을 THF 20-30ml에 녹인 후 -60 - -70 °C(dry ice / acetone)의 조건에서 DIBAL-H 10ml를 N₂ gas 하에서 서서히 가하며 교반한다. TLC(Hx:EtOAc=4:6)로 반응이 완전히 종료된 것을 확인했다 (Rf=0.74->0.53). 삼각 flask에 증류수 50ml 와 NH₄Cl을 가한 후 여기에 50ml의 EtOAc와 반응물을 가한다. gel이 약간 형성되면 감압여과를 하여 gelate를 제거하고 filtrate를 separating funnel에 가한다. 방

치한 후 EtOAc 층을 모아 Na₂SO₄ anhydrous를 충분히 넣어 수분을 완전히 제거한다. 여과한 뒤 여액을 농축하여 silica gel column chromatography (Hex : EtOAc=60:40)를 했다. 농축하여 oil상의 2'-chlorocinnamyl alcohol을 얻었다.

¹H-NMR (Acetone-d₆, δ): 7.62 (1H, dd, J= 7.2, 1.8Hz, aromatic 6H), 7.37(1H, dd, J=7.8, 1.8Hz, aromatic 3H), 7.27(1H, td, J=7.2, 1.5Hz, aromatic 4H), 7.21(1H, td, J=8.7, 1.8 Hz, aromatic 5H), 7.00(1H, d, J=15.6Hz, φ-CH=CH-), 6.43(1H, dt, J=15.9, 4.8 Hz, φ-CH=CH-CH₂OH), 4.15(2H, d, J=4.8Hz, CH₂OH)

(2) 2'-Chloro cinnamaldehyde의 합성

앞에서 합성한 2'-chloro cinnamyl alcohol 400mg을 acetone에 녹인 후, MnO₂를 2g 가한 뒤 2시간 정도 교반했다. TLC(Hexane:EtOAc=4:6)로 4개의 spot이 생긴 것을 확인했다(Rf=0.58->0.75). 여과한 후, acetone으로 충분히 washing했다. 농축하여 silicagel column chromatography (Hex:EtOAc=80:20)를 하여, 황색 결정인 2'-chloro cinnamaldehyde 50mg을 얻었다.

mp : 52-54 °C, IR (KBr pellet, cm⁻¹) : 1680(C=O), 1620, 1440(aromatic C=C)

¹H-NMR (Acetone-d₆, δ) : 9.79(1H, d, J=7.5Hz, CHO), 8.01(1H, d, J=15.9Hz, φ-CH=CH-), 7.91(1H, t, J=7.2Hz, aromatic 6H), 7.54(1H, d, J=7.5Hz, aromatic 3H), 7.48(1H, td, J= 7.2, 1.8Hz, aromatic 4H), 7.42(1H, td, J=7.2, 1.5Hz, aromatic 5H), 6.80(1H, dd, J=7.5, 15.9Hz, φ-CH=CH-CHO)

¹³C-NMR: 192.8(CHO), 146.6(φ-CH=CH-), 139.4(aromatic 2C), 134.2(aromatic 1C), 131.7(aromatic 4C), 130.5(φ-CH=CH-CHO), 129.8(aromatic 3C), 127.9(aromatic 6C), 127.2(aromatic 5C)

6. 이차 활성 검증을 위한 세포주 연구

항암활성 검정은 사람의 종양세포주인 A549(폐암세포주), SKMEL-2(피부암 세포주), HCT-15(결장암 세포주), SKOV-3(자궁암 세포주), XF-498(뇌암 세포주) 등을 10% FBS가 포함된 RPMI 1640배지(Gibco Cat. Nn. 31800; L-glutamine은 포함되고 증조는 포함되지 않음)를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, 계대는 1주일에 2회 실시하였다. 세포들을 부착면으로부터 분리할 때는 0.25% trypsin 및 3mM EDTA(1,2-cyclohexane diamine tetraacetic acid)를 완충액(PBS)에 녹인 용액을 사용하였다. 96well plate(Nunc)의 각 well에 5×10^3 - 2×10^4 개의 각 세포를 가하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. sample을 소량의 디메틸설폭사이드(DMSO)에 녹여 시험에 원하는 농도까지 실험용 배지로 희석하여 최종 DMSO 농도가 0.5% 이하가 되도록 하였다. 이것을 0.22 μ m 한외여과막으로 여과한 후 각 농도 단계별로 희석하였다.

96 well plate에서 24시간 배양시켰던 각 세포배양액으로부터 배지는 모두 제거한 후 각 농도로 제조한 sample을 각 well에 200 μ l씩 가한 후 48시간 배양하였다. sample을 가한 시점에서 Tz(Time zero) plate를 수집하였다.

Tz plate 및 배양이 끝난 뒤 각 plate는 sulforhodamine B(SRB) 분석법에 준하여 Trichloro acetic acid(TCA)에 의한 세포 고정, 0.4% SRB 용액으로 염색, 1% acetic acid로 세척한 후 10mM Tris 용액으로 염료를 추출하여 microplate reader(Dynatech Model MR 700)로 520nm에서 OD 값을 측정하였다.

각종 암세포에 대한 ED₅₀는 다음과 같이 계산하였다. 약물을 가하여 배양을 시작하는 시간에 수집하여 SRB 단백질량을 측정하여 그 값을 time zero (Tz)로 하였다. 즉 초기의 살아있는 세포수를 초기값(Tz)으로 정했다. sample을 처리하지 않고 배양한 OD값을 대조값(control value (C))라 하고 sample을 처리하고 배양한 well의 OD값을 약물처리된 시험값(T)라 하였다. Tz, C와 T로부터 성장자극(growth stimulation), 순 성장 억제(net growth inhibition) 및 순 상실(net killing)등의 sample의 효과를 판단할 수 있었다. 만일 T>Tz인 경우에는 그 cellular response

function은 $100x(T-T_z)/(C-T_z)$ 이며, $T < T_z$ 일 경우에는 $100x(T-T_z)/T_z$ 로서 계산하였다. 대조용 시료로는 cis-platinum을 사용하였다.

7. 동물실험

동물실험용 시료는 0.5% tween80에 녹여서 복강투여했다. 투여량은 30, 100 mg/kg이었으며 18일째 까지 매일 투여했다. 양성대조물질인 adriamycin은 생리식염수에 용해하여 복강투여했으며 1 mg/kg의 농도로 11일 까지, 12일 부터 14일까지는 2 mg/kg의 농도로, 15일 부터 18일까지는 3 mg/kg의 농도로 매일 투여했다. 각 시료는 마우스 몸무게 20 g 당 0.2 ml씩 투여했다.

가. 실험동물 및 세포주

실험동물로는 일본 Charles River 회사의 female nude mice를 사용하였으며 연령은 5주, 체중은 17-20g의 동물이었다. 실험동물은 1주일 이상 무균동물실에서 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 동물실의 온도는 21 ± 2 °C, 습도는 $55 \pm 5\%$ 였고, 명암은 12시간주기로 자동조절하였다. 실험동물용 고형사료(제일제당)는 방사선 멸균제품이었으며 음수는 고압증기멸균기로 멸균하였다. 사료와 음수는 자유섭취시켰다. 세포주는 미국 NCI에서 공급받아 생명공학연구소에서 보존중인 인체 대장암세포주인 SW620과 인체 폐암세포주인 NCI-H23을 사용하였다.

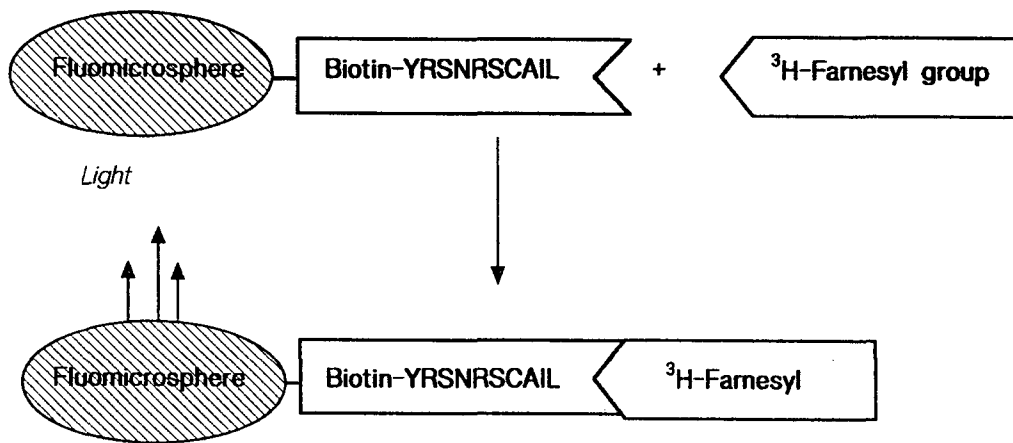
나. 인체암세포주의 nude mouse 이식 시험법

인체암세포종 대장암 유래 암세포인 SW620과 폐암 유래 암세포인 NCI-H23를 nude mouse에 이식하였다. NCI-H23의 경우 3×10^7 cells/ml의 암세포를, SW620의 경우 1×10^7 cells/ml의 암세포를 mouse 당 0.3 ml 씩 피하로 이식하였다. 암세포 이식 후 11일째 부터 종양의 크기는 개체별로 매일 측정했으며, 동물의 체중변화는 첫날부터 하루 간격으로 측정했다. 암세포 이식 후 19일째에 nude mouse을 희생시켜 종양을 분리하고 무게를 측정했다.

제 2절 연구 수행 결과

1. 탐색법

유용자원의 탐색 및 활성 선도물질의 확보를 위하여 다음 도식과 같은 scintillation Proximity Assay (SPA) 방법에 의해 FPTase 저해활성을 측정하였다.



SPA bead 방법은 트리튬으로 표식된 파네실파이로포스페이트가 펩타이드와 결합한 후 SPA bead와 상호작용을 하여 트리튬의 에너지가 SPA bead로 전달되고 이로 인하여 bead에서 발생하는 베타에너지를 측정하는 방법이다. 상기 방법은 Biotin에 결합된 펩타이드의 종류 또는 단백질의 종류에 따라서 다양한 표적물질에 적용이 가능하여 반응용액에서 출발물질과 반응 물질의 분리과정 없이 효소 반응 정도를 측정 할 수 있는 우수한 탐색 방법이다.

상기의 방법과 더불어 쥐 또는 사람의 Ras 단백질을 E. coli에서 생산하여 활성 검증에 사용하였다.

2. 탐색 자원

전국에서 수집한 토양으로부터 분리한 미생물 10,000여 균주 중에서 방선균 1,000, 곰팡이 1,200, 고초균 400 균주를 발효하여 메탄올로 처리한 발효액을 대상으로 활성을 탐색하여 방선균 10종, 곰팡이 25종, 그리고 고초균 5종이 FPTase 저해활성을 보여 줌을 확인하였다. 이들 균주를 100mL flask를 사용하여 발효하고 발효액을 분획하여 활성을 검증하였다. 이를 통하여 방선균 1종, 곰팡이 3종, 그리고 고초균 1종에서 재현성이 있는 활성을 확인하고 이들을 유용 균주로 분리하였다. 그리고 이들 균주를 대량 배양하여 활성 물질을 분리하였다.

400여 식물체를 수집하여 메탄올로 추출하고 1mg/ml 농도로 시료를 준비하였다. 이들을 대상으로 활성을 검증한 결과 20여종의 식물체 추출물에서 FPTase 저해활성 (50%이상)을 관찰할 수 있었다. 그러나 일부 추출물은 분획 후의 이차 활성 검증에서 활성이 저하됨을 알 수 있었다. 이차 활성 검증에서도 우수한 활성을 보여주는 계피, 송악, 담배잎, 산국, 약썩 등을 최종적으로 유용 식물자원으로 분리하였다. 그리고 이들을 유용 식물자원으로부터 활성물질의 분리를 위하여 대량 채집 및 구입을 통하여 자원을 확보한 후 유용물질을 분리 정제하였다.

해양연구소가 확보한 해양자원 100여 종을 대상으로 탐색하였으며, 이 중에서 해면류에서 활성물질을 분리하였다.

3. 생산 조건의 최적화

가. 곰팡이 *Aspergillus fumigatus* F93이 생산하는 FPTase 저해제인 gliotoxin 활성물질의 발효 최적화

곰팡이 *Aspergillus fumigatus* F93에서 FPTase 저해활성 수율을 향상시키기 위해서 통계적인 최적화 실험을 수행하였다. 총 15개의 발효변수를 대상으로 한 16개의 실험구가 Plackett-Burman법에 따라 진행되었다. 실험 결과 glycerol 20g/l, yeast extract 3g/l, NZ-amine 3g/l, soybean meal 3g/l, NaNO₃ 1g/l의 배지 조건과, 초기 pH 7, 배양온도 28°C의 배양 조건이 FPTase 저해 활성물질 생산에 최적의 조건으로 선택되었다.

나. 균주 및 종균

Aspergillus fumigatus F93 는 대한민국 대전 인근의 토양에서 분리되었다. 종균 배양은 냉동보관된 균주(1ml of 20% glycerol solution, 1×10^9 spores/ml, stored in -80 °C)를 50ml의 YM배지(glucose 1.5%, malt extract 0.5%, yeast extract 0.5%, w/v)에서 48시간 활성화 시켜서 준비하였다(28°C, Rotary shaker, Type 7-76, 150 rpm, Dong-Yang Co., Inchon, Korea).

다. FPTase 활성 저해도 정량

A. fumigatus F93 발효액에 대한 FPTase 저해도는 배양액의 ethylacetate 추출물을 scintillation proximity assay (SPA; Amersham TRKQ7010, Buckinghamshire, UK)법으로 조사하였다. 즉, biotinylate peptaide와 tritium-labeled farnesyl-pyrophosphated를 FPTase 및 발효액 추출물 존재 하에 반응시킨 후 SPA bead를 가하여 베타 에너지를 측정하여 활성을 검증하였다.

라. 최적화 설계

모두 16가지의 실험이 (Table-1)에서와 같이 수행되었다(Stowe and Mayer, 1966). 배지성분 9가지와 배양조건 3개의 변수를 선택하였으며 최적화 시간을 단축

하기 위해 변수는 confound된 상태로 사용되었다(Milagres and Lacin, 1991). 사용된 기본배지는 미량 금속염을 포함하며($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1mg), 100ml의 배지를 1000ml의 진탕용기(Bellico™, bottom baffled)에 담아 2 반복으로 실험하였다. 배양온도는 28°C였고 2%(v/v)의 종균을 10초간 Warning blender에서 갈아서 사용하였다. 실험설계의 각 열(column)은 실험구를 나타내며, 각 행(row)은 실험에 적용된 변수를 나타낸다. 실험결과와 통계오차 예측을 위해 3개의 dummy 변수를 도입했으며, 각 변수는 하위값(-)과 상위값(+의 2수준으로 처리하여 실험을 진행하였다.

마. 자료분석

생물활성 FPTi에 대한 각 변수의 효과는 상위값 및 하위값의 변수에 따른 FPTi 활성 차이를 계산하여 결정하였다. 실험 오차는 dummy 변수에서 계산되며, 실험구 간 범위 내에서의 추정되는 변이 정도로 나타냈다. 변수의 효과 분산(V_{eff})과 표준편차(S.E.)는 다음과 같이 계산된다: $V_{eff} = (Ed)^2 / n = (S.E.)^2$. 여기서 Ed는 각 dummy 효과이며 n은 dummy 변수의 개수이다. 각 변수 효과의 유의 수준(Ex)은 Students t test($t = Ex / S.E$)로 계산된다.

Table 3. *A. fumigatus* F93의 발효 최적화를 위한 Plackett-Burman 실험법.

발효변수	하위값	상위값	실험구											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
glucose	0.5	1.0	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
glycerol	1.0	2.0	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
dummy			+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
yeast extract	0.1	0.5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
malt extract	0.1	0.5	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
NZ-amine	0.1	0.5	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
soybean meal	0.1	0.5	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
NaNO ₃	0.05	0.2	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
dummy			-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
culture time	4days	7days	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
temperature	25°C	28°C	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
pH initial	4.0	7.0	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
dummy			+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.05	0.2	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
CH ₃ COONH ₄	0.05	0.2	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-

* concentration was designated as percentage (%).

바. 발효 최적화 결과

최적화 결과는 표로 요약 표시하였다. 곰팡이 F93은 NZ-amine에 의해 유의성 99% 이상의 효과로 FPTase 저해활성 물질을 생산하였다. 실험결과를 확인하기 위해 유의성이 높은 변수에 의한 실험구와 유의성이 낮은 변수의 실험구를 구별하여 각각의 조합구에서 생산되는 FPTase 저해활성을 비교하였다. 7일간의 발효결과 (+)변수를 포함한 발효배지에서는 92.5%의 FPTase 저해활성을 보인 반면 (-)변수를 포함한 경우 저해활성이 검출되지 않았다. 양측 조합 모두 건조중량 기준으로 7g/l의 균체 생산을 보여 균체의 생육은 정상적으로 이루어 졌지만 변수의 선택에 따라 FPTase 저해활성이 뚜렷하게 구분되어 최적화 배지의 조성을 결정할 수 있었다.

Table 4. *A. fumigatus* F93의 발효 최적화 결과

발효변수	FPT 저해활성에 대한 t-값 및 유의성	
	t-Value	유의 수준
glucose	-0.81	
glycerol	1.01	
yeast extract	1.71	
malt extract	-2.07	
NZ-amine	6.22	99%
soybean meal	1.51	
NaNO ₃	1.83	
culture time	1.23	
temperature	0.14	
pH initial	2.65	90%
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.15	
CH ₃ COONH ₄	-1.09	
dummy I	-1.38	
dummy II	0.72	
dummy III	0.56	

*SL : significance level

이상의 통계적 방법의 결과는 FPTase 저해제 이외에도 ACAT, SQS, CS-II의 저해활 성에도 적용시킬 수 있었는데 균주 F23은 FPTi에 가장 반응이 좋아서 초기의 스크리닝 단계에서 F93의 용도를 결정하고 동시에 최적화 할 수 있었다.

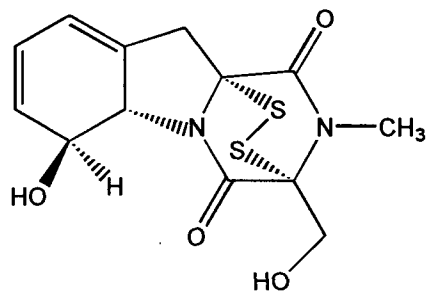
Table 5. Effects of positive and negative variables on the FPTase inhibitory activity of *A. fumigatus* F93.

Parameters	Media for positive variable	Media for negative variables
Culture condition	glycerol	20g/l
	yeast extract	3g/l
	NZ-amine	3g/l
	soybean meal	3g/l
	NaNO ₃	1g/l
	pH initial	7
	temperature	28°C
	Inhibitory activity (%)	92.5

3. 파네실 전달 효소 저해제

가. 미생물유래 FPTase 저해제 Gliotoxin

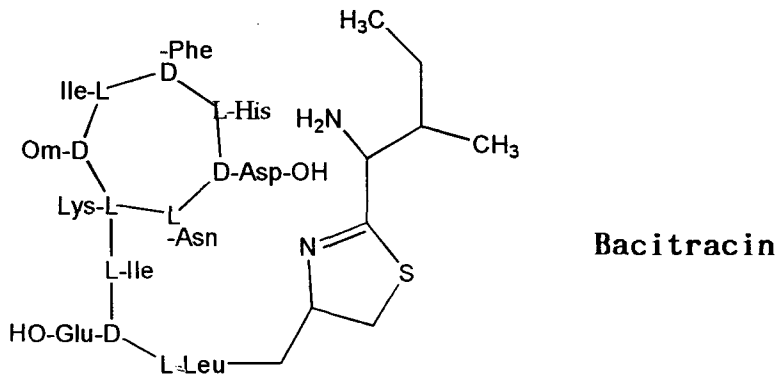
곰팡이로부터 분리한 FPTase 저해제들의 NMR을 분석한 결과 이미 잘 알려져 있는 물질들인 Gliotoxin으로 밝혀졌다. 이 화합물은 각각 1.5 microM에서 50%의 저해 활성을 보여 주었다.



Gliotoxin

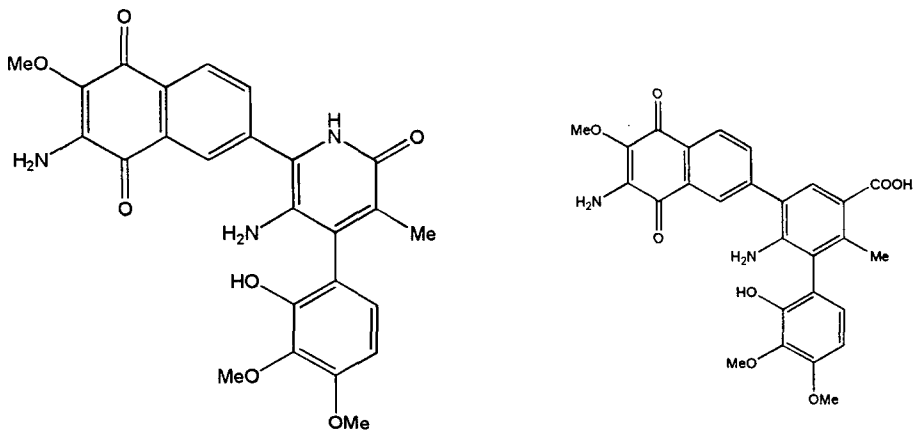
나. 고초균주에서 분리한 Bacitracin

고초균주의 발효액에서 분리한 FPTase 저해제는 Bacitracin으로 규명되었다. 그리고 이 고리형펩타이드 화합물은 3.5 microM 농도에서 FPTase의 활성을 50% 저해한다.



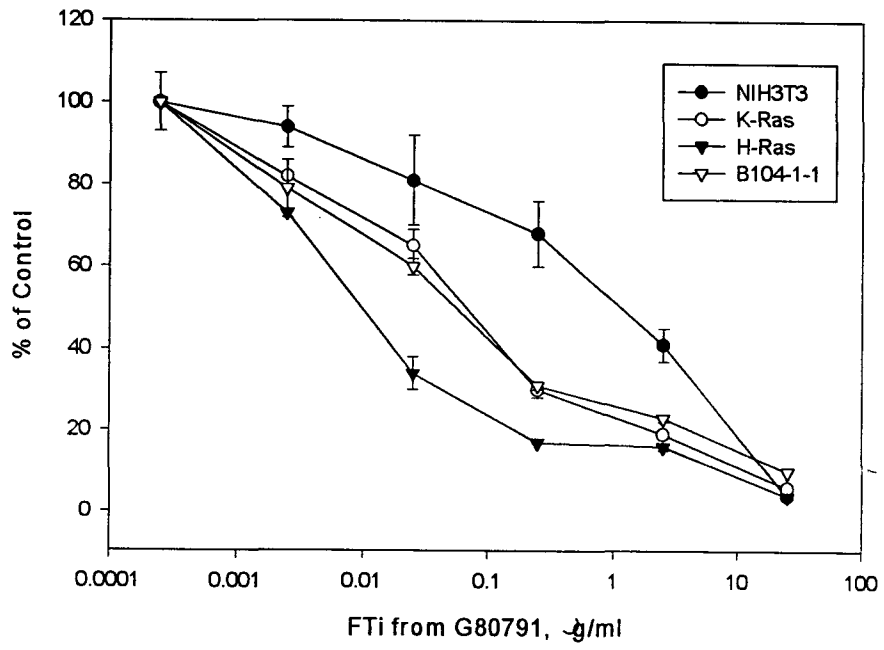
다. 방선균 G80791에서 분리한 FPTase 저해제

방선균에서 분리한 활성물질의 구조는 다음같으며, 20microM에서 FPTase를 50%저해한다.



다음과 같이 세포주의 성장을 억제하였다.

Growth-Inhibition Assay

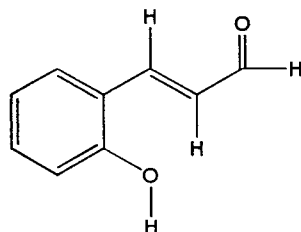


나. 계피유래 활성 물질

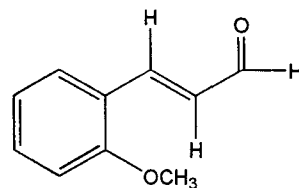
계피(*Cinnamomum cassia* Blume)는 녹나무과(Lauraceae)에 속하는 식물로서 향식료 및 생약으로 사용되고 있으며, 중국 남부 및 북베트남이 주산지이다.

(1) 2'-Hydroxycinnamaldehyde의 분리 및 구조결정

Hexane과 ethyl acetate를 용매로 70:30의 배합 하에 silica gel column chromatography를 하고, hexane, acetone으로 재결정하여 나온 compound는 mp 121-122°C의 미황색 침상결정이며, UVmax가 214, 285, 337nm이다. 이 compound의 IR spectrum을 보면 3000-3500cm⁻¹에서 hydroxyl group을, 1658cm⁻¹에서 carbonyl기를 확인할 수 있다. 또한 1612, 1600, 1450cm⁻¹에서 aromatic 이중결합과 1145 cm⁻¹ 근처의 ether band가 있음을 알 수 있다. ¹H-NMR에서 7개의 proton이 있음을 알 수 있고, 그 중 9.68ppm(1H, d, J=7.8Hz)의 peak로 보아 aldehyde기를 확인할 수 있으며, 나머지 6개의 proton들이 7.89-6.84ppm사이에 존재하는 것으로 방향족 화합물임을 알 수 있다. DEPT는 이 6개의 proton들이 모두 CH임을 증명해주며 6.84, 8.01ppm의 coupling constant가 16.3Hz이므로 olefinic proton이 trans형임을 알 수 있다. HRCI-MS 상에서 149[M+H]⁺의 peak로 보아 이 물질의 분자량은 148임을 확인할 수 있었으며 분자식을 C₉H₈O₂로 추정할 수 있었다. 이 외에도 ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC에 나타난 peak를 assign한 결과 이 compound를 2'-hydroxycinnamaldehyde로 동정하였다. 그리고 이와 더불어 2'-methoxycinnamaldehyde도 분리되었다.



2'-Hydroxycinnamaldehyde(CB-OH)

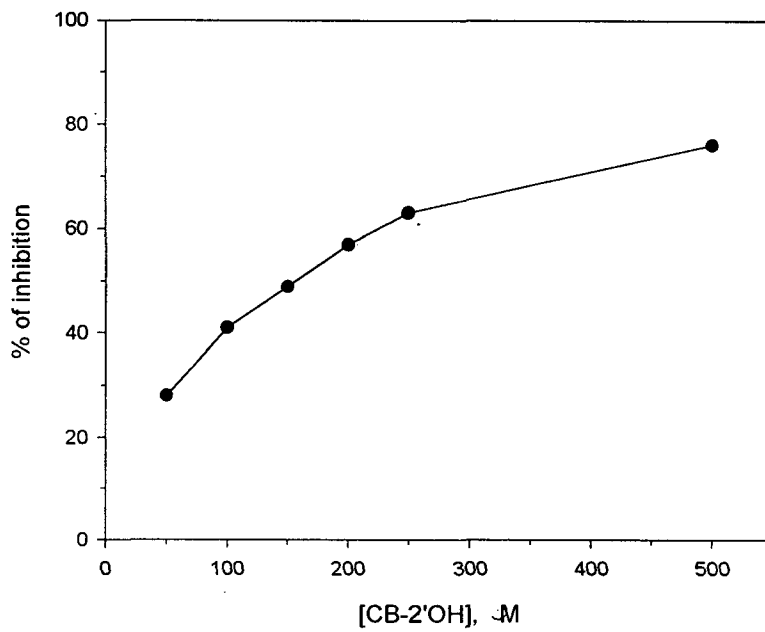


2'-Methoxycinnamaldehyde

(2) 효소저해활성

다음 그림에서 보듯이 파네실 전달 효소에 대한 저해활성은 강하지는 않은 것으로 확인되었다. 흥미 있는 것은 식용자원에서 항암활성을 가진 물질이 분리되었다는 것이다.

FPTase inhibition of CB-2'OH



다. 약썩 유래 활성 물질

(1) 아테미노라이드의 분리 및 구조결정

약썩으로부터 분리된 활성 물질의 이화학적 성질은 다음 표와 같다 (23, 25).

Table 6. 아테미노라이드(Arteminolide)의 이화학적 성질

	A	B	C
외형(appearance)	무색고체	무색고체	무색고체
분자식	$C_{35}H_{42}O_8$	$C_{35}H_{40}O_8$	$C_{35}H_{40}O_8$
분자량			
측정치(M+H)	591.2924	589.2875	589.2791
계산치 (M+H)	591.2957	589.2801	589.2801
융점 (°C)	195	198	210
$[\alpha]_D^{CHCl_3}$	+25		
가용성	MeOH, Acetone, Chloroform, DMSO		
불용성	Hexane, H ₂ O		Hexane, H ₂ O

Table 7. 아테미노라이드(Arteminolide) D, E의 이화학적 성질

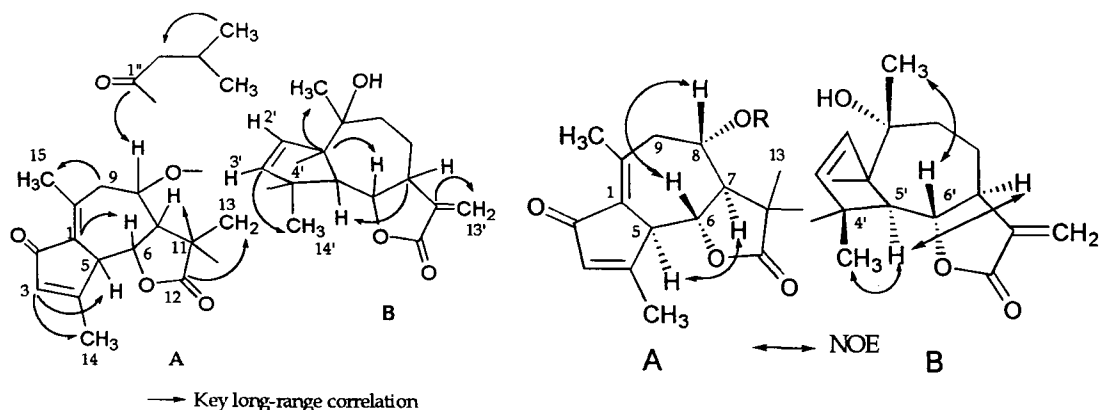
	D	E
외형(appearance)	무색고체	무색고체
분자식	C ₃₅ H ₄₀ O ₈	C ₃₅ H ₄₂ O ₈
분자량		
측정치(M+H)	589.2756	591.2915
계산치 (M+H)	589.2801	591.2957
융점 (°C)		
[α] _D ^{CHCl₃}		
가용성	MeOH, Acetone, Chloroform, DMSO	
불용성	Hexane, H ₂ O	Hexane, H ₂ O

Table 6에서 볼 수 있듯이 high resolution Mass Spectrometry로 exact mass가 589.2791(M+H)이고 이것으로부터 이화합물의 분자식을 C₃₅H₄₀O₈로 결정하였다. UV 흡광치는 235 nm에서 최대 흡광도를 나타냈으며, IR 스펙트럼에서 3600(OH), 1758.40(γ-lactone), 1697.50(C=C, C=O), 2927(CH₂), 1263 (C-O-C)cm⁻¹ 등의 흡수 띠를 할 수 있었다. ¹H-NMR 분석에서 40개의 수소(H)를 확인하였으며, δ 5.31 (1H)에서 Exocyclic α-methylene-γ-lactone의 특징인 두 개의 doublet signal이 관찰되었다. 또한 δ 2.32(3H, s), δ 2.40(3H, s), δ 1.48(3H, s), δ 1.22(3H, s), δ 1.83 (1H, d), δ 5.83(1H, d), δ 6.15(1H, brdq), δ 6.19(1H, dd)는 4개의 olefinic protons으로 확인하였다. ¹³C-NMR 분석 결과 35개의 탄소를 갖고 있음을 확인하였다. 아래 Table의 결과와 같이 DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) NMR을 분석하여 CH가 11개, CH₂가 5개, CH₃가 6개 그리고 그 밖에 사급탄소 13개를 확인 할 수 있었다. 이상과 같은 결과를 종합하여 FPTase의 저해제 아테미노라이드는 C₃₅H₄₀O₈의 분자식을 갖는 dimeric sesquiterpene lactone의 물질임을 확인하였다. ¹H-와 ¹³C-NMR 그리고 HMBC, NOESY의 분석 결과는 다음 표에 요약하였다.

Table 8. ^{13}C -NMR and DEPT assignment of Arteminolide A.

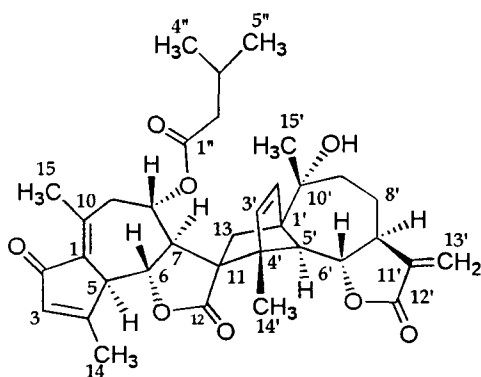
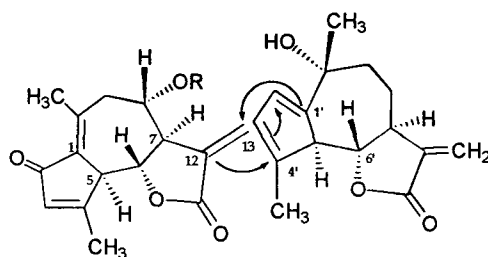
CH	43.132(C-7'), 51.978(C-5), 59.554(C-7), 66.644(C-5'), 67.809(C-8), 79.181(C-6'), 80.248(C-6'), 135.997(C-3'), 136.205(C-3), 137.684(C-2'), 139.993(C-3'')
CH ₂	23.585(C-8)', 34.685(C-9'), 40.509(C-13), 44.815(C-9), 118.669(C-13')
CH ₃	15.950(C-4''), 17.017(C-14'), 20.308(C-14), 20.516(C-15), 29.694(C-15'), 20.52(C-5'')

한 개 또는 두 개의 탄소를 건너서 수소와의 상호작용을 알 수 있는 HMBC 스펙트럼 분석에서 C-3, C-4, 그리고 C-5는 δ 2.32에서의 Methyl proton과 원거리 상호작용을 보여 주었다. δ 6.19(1H, dd)의 Olefinic protons은 C-1, C-2, C-4, C-5와 원거리 상호작용을 보여 주었다. 또한, C-14'의 Methyl proton은 C-11, C-3', C-4', C-5'와 강한 상호작용이 있음을 확인하였다. 위에서 확인된 부분구조를 연결하고 사급탄소를 배치함에 의해서 두 개의 Sesquiterpene lactone이 연결된 구조임을 확인할 수 있었다. 다음 첫번째 그림은 이를 도식화한 것이다.



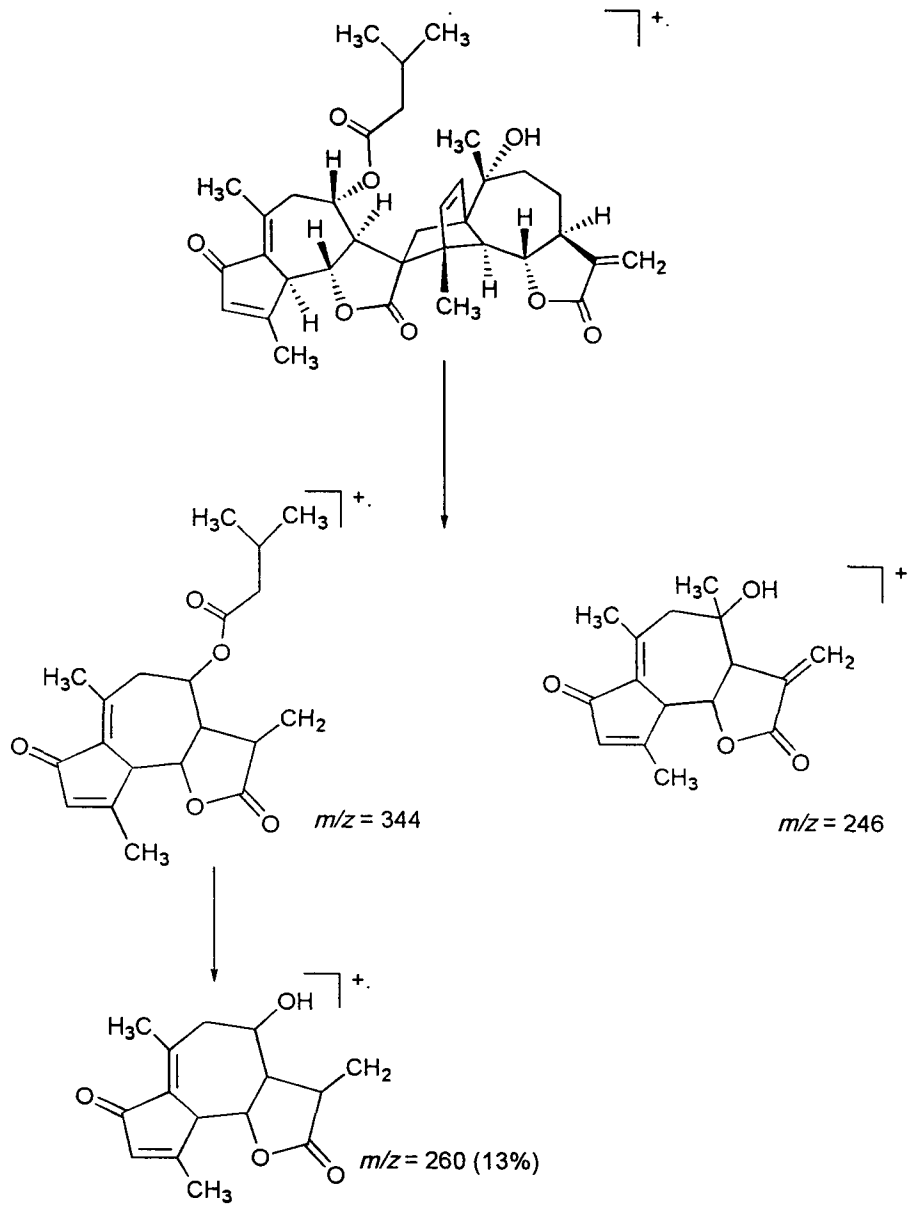
상기의 두 번째 그림과 같이 수소와 수소의 공간적인 근접을 알 수 있는 NOE (Nuclear Overhauser Effect) 스펙트럼분석에서 C-5와 C-7의 Proton이 같은 공간에 배향되었고, C-6와 C-8의 Proton이 같은 공간에 배향됨을 확인하였다. 또한, H-6'와 C-15'의 Methyl proton이 같은 공간에 있음을 확인하였다.

그 외 구조에 대한 상세한 결과는 ^1H - ^{13}C 의 상관관계를 나타내는 여러 가지의 NMR 스펙트럼 분석결과 dimeric sesquiterpene lactone 형태의 구조를 확인하였다.

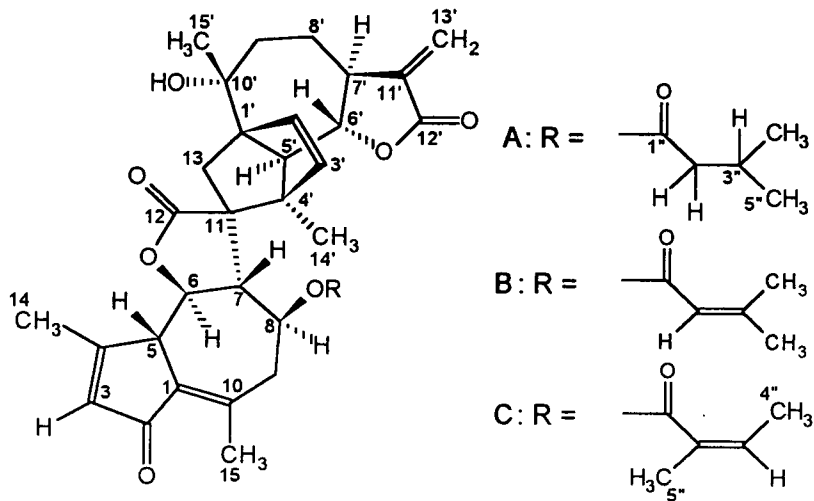


Arteminolide A

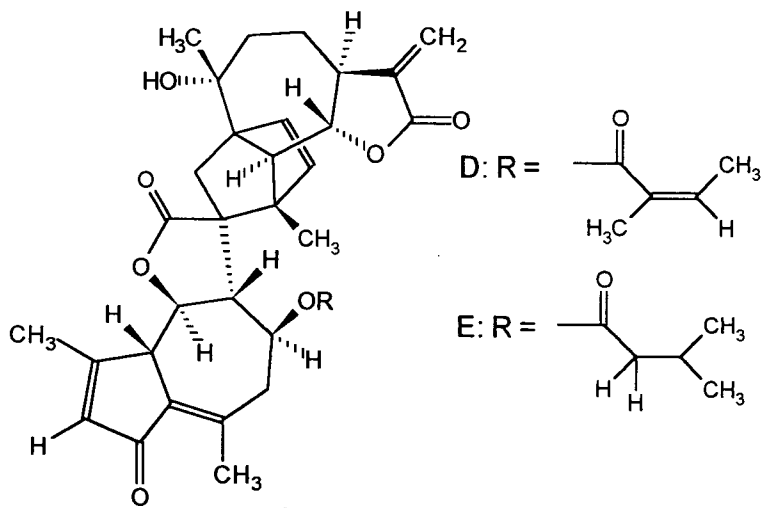
앞의 구조는 질량분석기의 분석에 의해서도 확인하였다.



약속에서 분리된 활성물질들의 구조는 다음과 같다.



Arteminolides



Arteminolides

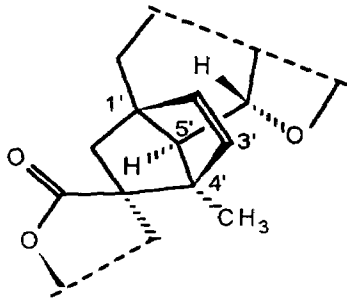
Table 9. NMR Assignments for Arteminolide A

#	¹ H	¹³ C	HMBC	NOESY
1		134.12		
2		194.79		
3	6.19 (dd, J=1.5, 1., 0 Hz)	136.21	1, 2, 4, 5	
4		170.05		
5	3.29 (brd, J=10.3 Hz)	51.98	4, 6	7
6	4.04 (dd, J=10.7, 10.3 Hz)	80.25		8
7	2.79 (dd, J=10.7, 10.7 Hz)	59.55	6, 8, 11	5
8	4.87 (ddd, J=10.7, 10.7, 2.4 Hz)	67.81		6
9	2.54 (dd, J=12.7, 10.7 Hz) 2.34 (dd, J=13.2, 2.5 Hz)	44.82	1, 8, 10, 15	
10		143.87		
11		61.23		
12		178.50		
13	2.59 (d, J=11.2 Hz) 1.85 (d, J=11.2 Hz)	40.51	12, 1', 2'	
14	2.32, s	20.31*	3, 4, 5	
15	2.40, s	20.52*	1, 9, 10	
1'		63.00		
2'	5.65 (d, J=5.9 Hz)	137.68	1', 3'	
3'	5.83 (d, J=5.4 Hz)	136.00	1', 2'	
4'		58.02		
5'	3.06 (d, J=10.3 Hz)	66.64	1', 2', 3', 6',	7', 14'
6'	3.98 (dd, J=9.8, 9.8 Hz)	79.18	7'	
7'	3.28, m	43.13		4', 14'
8'	2.22, m 1.40, m	23.59		
9'	1.82, m 1.73, m	34.69		
10'		72.58		
11'		140.63		
12'		170.32*		
13'	6.05 (d, J=3.4 Hz) 5.31 (d, J=2.9 Hz)	118.67	7', 12'	
14'	1.48, s	17.02		7', 4'
15'	1.22, s	29.69	11, 3', 4', 5'	
1''		165.75	1', 9', 10'	
2''		127.44		
3''	6.15 (brdq, J=1.5, 7.3 Hz)	139.99		5''
4''	2.03 (dq, J=7.3, 1.5 Hz)	15.99	1'', 5''	
5''	1.83, (brq, J=1.5 Hz)	20.52	1'', 2'', 3'' 1'', 2'', 5''	3''

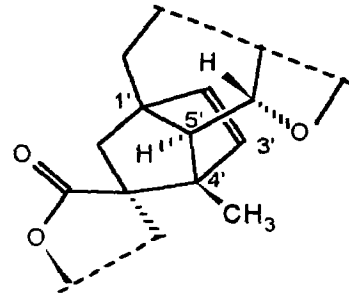
Arteminolide B				
#	H	C	HMBC	NOESY
1		133.96		
2		194.81		
3	6.19, (dd, J=1.5, 1., 0 Hz)	137.64	1, 2, 4, 5, 15	
4		170.06		
5	3.26 (brd, J=10.3 Hz)	52.06	1, 4, 6	7
6	4.03 (dd, J=10.7, 10.3 Hz)	80.21	1	8
7	2.70 (dd, J=11.3, 10.7 Hz)	59.69	5, 6, 8, 11, 4'	5
8	4.77 (ddd, 10.7, 10.7, 2.4 Hz)	67.31		6
9	2.47 (dd, J=13.2, 10.3 Hz)	44.69		
	2.35 (dd, J=13.7, 2.3 Hz)			
10		144.12		
11		61.34		
12		178.46		
13	2.56 (d, J=11.7 Hz)	40.16	11, 12, 1', 2', 10'	
	1.92, (d, J=11.5 Hz)			
14	2.32, s	20.42*		
15	2.42, s	20.63*		
1'		62.91	1, 9, 10	
2'	5.73 (d, J=5.9 Hz)	137.64		
3'	5.82, (d, J=5.4 Hz)	135.93	1', 4', 5'	
4'		58.11	1', 4', 5'	
5'	3.03 (d, J=10.3 Hz)	66.93		7', 14'
6'	3.97 (dd, J=10.3, 9.8 Hz)	79.10	1', 2', 3', 6',	
7'	3.29, m	43.15	7'	4', 14'
8'	2.23, m	23.67	8'	
	1.41, m			
9'	1.83 (ddd, J=15.1, 8.8, 2.0 Hz)	34.72		
	1.74 (ddd, J=15.1, 10.3, 7.8 Hz)			
10'		72.66		
11'		140.63		
12'		170.29*		
13'		118.67		
	6.06 (d, J=3.4 Hz)			
14'	5.32 (d, J=3.4 Hz)	17.03	7', 11'	7', 4'
15'	1.47, s	29.67		
1''	1.26, s	164.28		
2''		115.73	1', 9', 10'	
3''	5.48 (dd, J=1.5, 1.0 Hz)	158.76		
4''		20.32	4'', 5''	
5''	2.21 (d, J=1.0 Hz)	27.51		
	1.90 (d, J=1.1 Hz)		2'', 3'', 5''	
			2'', 3'', 4''	

Arteminolide C				
#	H	C	HMBC	NOESY
1		134.12		
2		194.79		
3	6.19 (dd, J=1.5, 1., 0 Hz)	136.21	1, 2, 4, 5	
4		170.05		
5	3.29 (brd, J=10.3 Hz)	51.98	4, 6	7
6	4.04 (dd, J=10.7, 10.3 Hz)	80.25		8
7	2.79 (dd, J=10.7, 10.7 Hz)	59.55	6, 8, 11	5
8	4.87 (ddd, J=10.7, 10.7, 2.4 Hz)	67.81		6
9	2.54 (dd, J=12.7, 10.7 Hz)	44.82	1, 8, 10, 15	
10	2.34 (dd, J=13.2, 2.5 Hz)	143.87		
11		61.23		
12		178.50		
13		40.51	12, 1', 2'	
	2.59 (d, J=11.2 Hz)			
14	1.85 (d, J=11.2 Hz)	20.31*	3, 4, 5	
15	2.32, s	20.52*	1, 9, 10	
1'	2.40, s	63.00		
2'		137.68	1', 3'	
3'	5.65 (d, J=5.9 Hz)	136.00	1', 2'	
4'	5.83 (d, J=5.4 Hz)	58.02		
5'		66.64	1', 2', 3', 6', 7'	7', 14'
6'	3.06 (d, J=10.3 Hz)	79.18		
7'	3.98 (dd, J=9.8, 9.8 Hz)	43.13		4', 14'
8'	3.28, m	23.59		
	2.22, m			
9'	1.40, m	34.69		
	1.82, m			
10'	1.73, m	72.58		
11'		140.63		
12'		170.32*		
13'		118.67		
	6.05 (d, J=3.4 Hz)		7', 12'	
14'	5.31 (d, J=2.9 Hz)	17.02		7', 4'
15'	1.48, s	29.69	11, 3', 4', 5'	
1''	1.22, s	165.75	1', 9', 10'	
2''		127.44		
3''		139.99		5''
4''	6.15 (brdq, J=1.5, 7.3 Hz)	15.99	1'', 5''	
5''	2.03 (dq, J=7.3, 1.5 Hz)	20.52	1'', 2'', 3''	3''
	1.83, (brq, J=1.5 Hz)		1'', 2'', 5''	

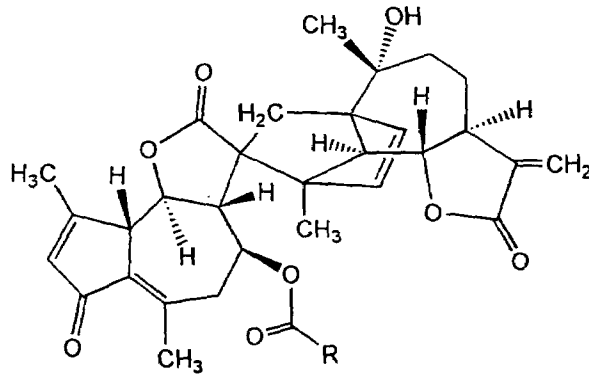
Arteminolide D와 E의 구조는 Arteminolide C와 유사하지만 14'-탄소의 공간적 위치와 탄소 1'-5'로 구성되는 오각형 구조의 공간적 위치가 서로 다를 수 있었다. 이들 차이점을 도식화하면 다음 그림과 같다.



Arteminolide A-C



Arteminolide D, E



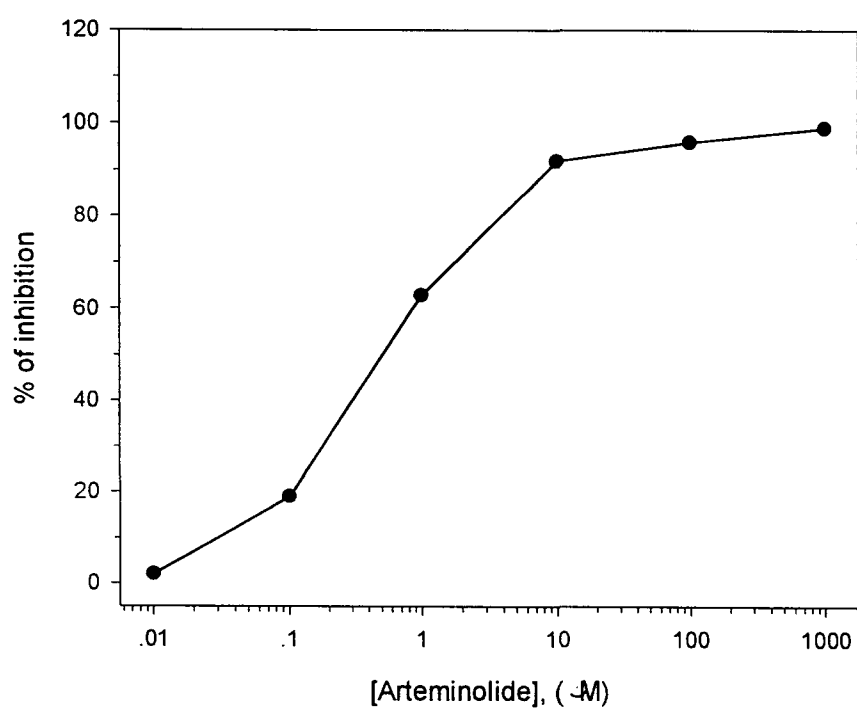
Arteminolide D				
#	H	C	HMBC	
1		134.00		
2		194.83		
3	6.20, br s	136.22	1, 2, 4, 5, 14	
4		170.88		
5	3.52 (d, J=10.3 Hz)	50.46	1, 2, 3, 6, 10, 14	
6	3.73 (dd, J=10.3, 9.8 Hz)	79.26	1, 11	
7	2.98 (dd, J=10.3, 10.3 Hz)	56.37	5, 6, 8, 9, 11,	
8	5.16 (ddd, 10.3, 10.3, 2.0 Hz)	65.71	13, 4'	
9	2.84 (dd, J=13.2, 10.3 Hz)	44.31	7, 9, 10, 11, 1"	
	2.33 (dd, J=13.2, 2.0 Hz)		1, 7, 8, 10, 15	
10		143.98	7, 10	
11		60.12		
12		176.40		
13	2.37 (d, J=11.7 Hz)	36.15		
14	1.53 (d, 11.7 Hz)	20.28	7, 11, 12, 1', 2',	
15	2.32, br s	19.93	10'	
1'	2.42, s	63.52	12, 2'	
2'		131.92	2, 3, 4, 5	
3'	5.80 (d, J=5.7 Hz)	142.45	1, 2, 9, 10	
4'	6.37 (d, 5.7 Hz)	57.26		
5'		66.26	1', 3', 4', 5',	
6'	2.04 (d, J=9.8 Hz)	79.23*	10'	
7'	4.12 (dd, J=9.8, 9.8 Hz)	43.08	1', 2', 4', 5',	
8'	2.90, m	23.73	14'	
	2.19, m			
9'	1.43, m	34.69	11, 13, 1', 2', 3',	
10'	1.80, m	72.50	6', 7'	
11'		141.24	4', 5', 7', 8'	
12'		169.88	5', 6', 8', 11'	
13'	6.05 (d, J=2.9 Hz)	118.33	6', 9'	
	5.32 (d, J=2.9 Hz)		7'	
14'	1.57, s	14.74	1', 7', 8', 10',	
15'	1.29, s	29.73	15'	
1"		166.21	7', 11, 12'	
2"	6.05, m	126.88	7', 12'	
3"	1.91 (brd, J=7.8 Hz)	142.32	11, 1', 3', 4'	
4"	1.92, s	15.92	1', 9', 10'	
5"		20.14		

Arteminolide E				
#	H	C	HMBC	
1		134.17		
2		194.77		
3	6.19, br s	136.16	1, 2, 4, 5, 14	
4		170.87		
5	3.49 (d, J=9.8 Hz)	50.31	1, 2, 3, 4, 6, 7,	
6	3.71 (dd, J=10.3, 9.8 Hz)	79.17	10, 14	
7	2.98 (dd, J=10.3, 10.3 Hz)	56.65	1, 7	
8	5.02 (ddd, J=10.3, 10.3, 2.0 Hz)	65.10	5, 6, 8, 9, 13	
9	2.77 (dd, J=13.2, 10.3 Hz)	43.79	7, 10, 11, 1"	
	2.32 (dd, J=13.2, 2.0 Hz)		1, 7, 8, 10, 15	
10		143.56	1, 7, 8, 10, 15	
11		60.02		
12		176.24		
13	2.34 (d, J=12.0 Hz)	36.53		
	1.56 (d, J=12.0 Hz)		7, 11, 12, 1'	
14	2.31, br s	20.28	12, 2', 10	
15	2.42, s	20.00	2, 3, 4, 5	
1'		63.20	1, 2, 9, 10	
2'	5.80 (d, J=5.7 Hz)	131.77		
3'	6.40 (d, J=5.7 Hz)	142.88	1', 3', 4', 5'	
4'		57.30	1', 2', 4', 5',	
5'	1.98 (d, J=9.8 Hz)	66.34	14'	
6'	4.18 (dd, J=9.8, 9.8 Hz)	79.53		
7'	3.06, m	43.28	11, 13, 1', 2', 3',	
8'	2.19, m	23.70	6', 7'	
	1.46, m		7', 8'	
9'	1.83, m	34.85	6', 8', 11'	
10'		72.56	6', 7', 9', 10'	
11'		140.86	7'	
12'		170.29	1', 7', 8', 10',	
13'	6.11 (d, J=3.4 Hz)	119.34	15'	
	5.38 (d, J=3.4 Hz)			
14'	1.56, s	14.56		
15'	1.29, s	29.80		
1"		172.17	7', 11', 12'	
2"	2.21, m	43.46	11', 12'	
	2.04, m		11, 3', 4', 5'	
3"	2.04, m	25.82	1', 9', 10'	
4"	0.96 (d, J=6.4 Hz)	22.30a		
5"	0.93 (d, J=6.8 Hz)	22.16a	1", 3", 4", 5"	

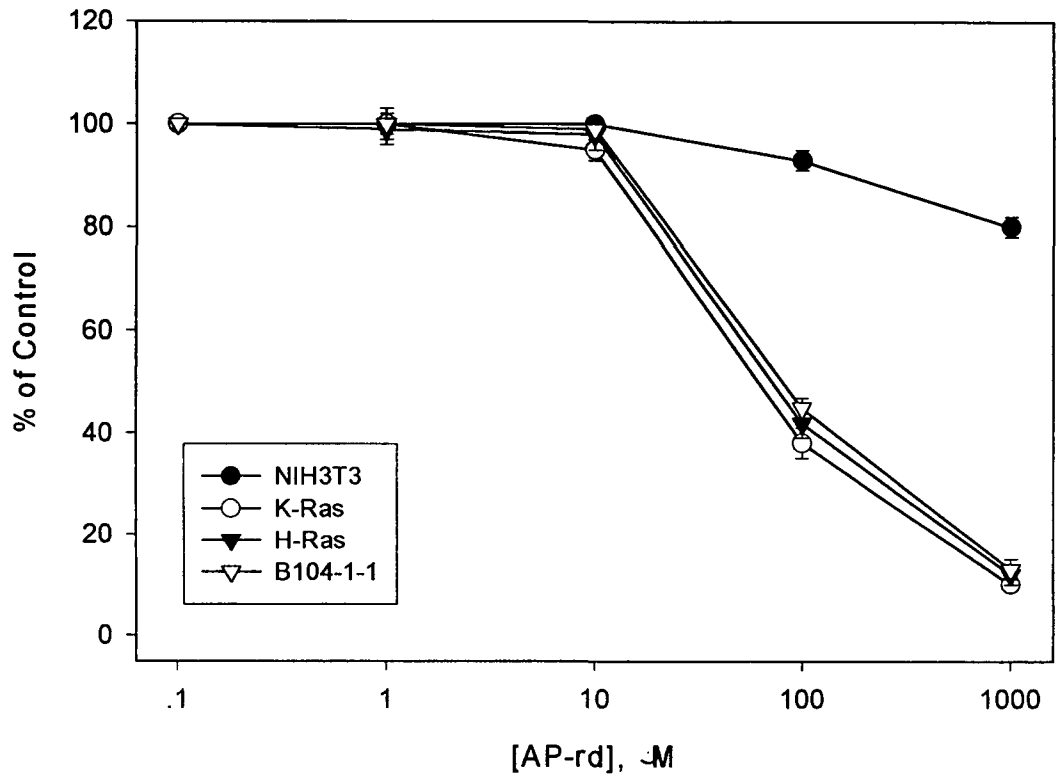
(2) 효소저해활성

아테미노라이드는 다음 그래프에서 볼 수 있듯이 농도에 의존하여 FPTase를 저해하고 있음을 볼 수 있으며 50% 저해농도가 360 nM임을 알 수 있었다.

FPTase inhibition of Arteminolide



(3) Proliferation Assay



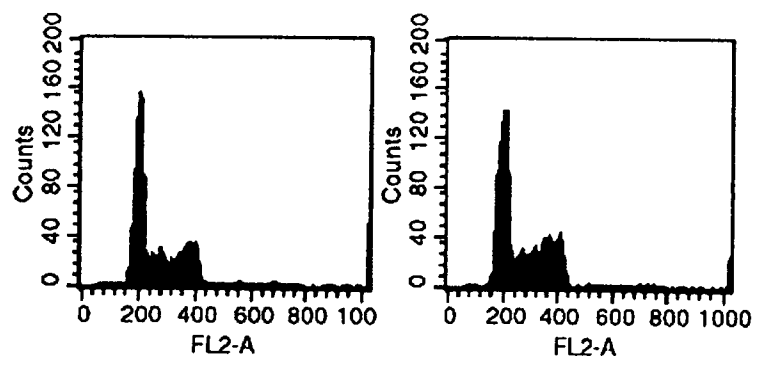
(4) Cell Cycle Analysis

Effect of Arteminolide on Cell Cycle Progression of MCF-7

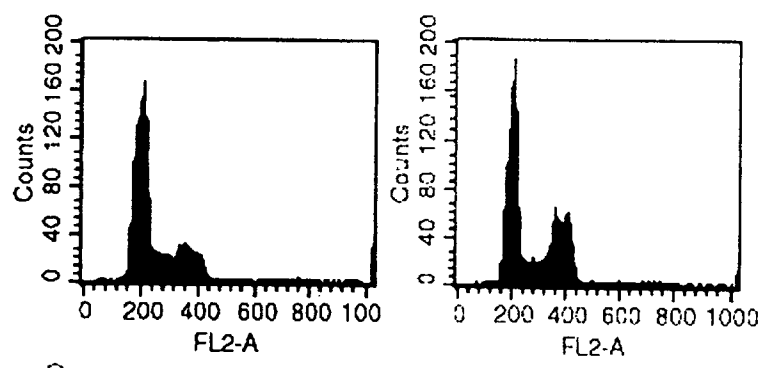
Times (hours)		% of cells		
		G0/G1	S	G2/M
12	Control	48.17	36.29	15.53
	Arteminolide	47.59	34.35	18.06
24	Control	55.06	42.13	2.81
	Arteminolide	47.49	24.54	27.97
36	Control	63.24	26.99	9.76
	Arteminolide	73.2	7.01	19.79

MCF-7 cells

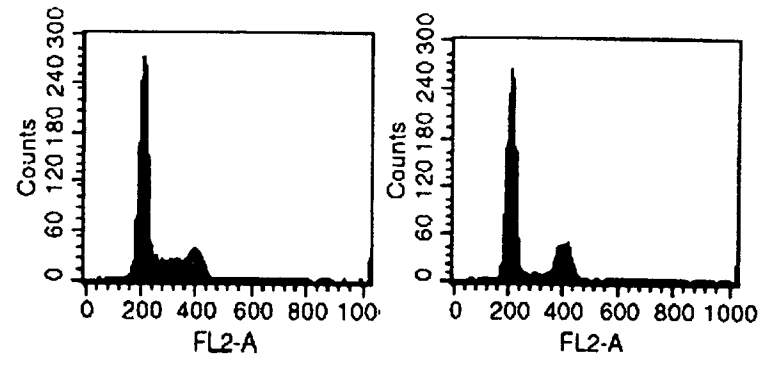
12hr



24hr



36hr



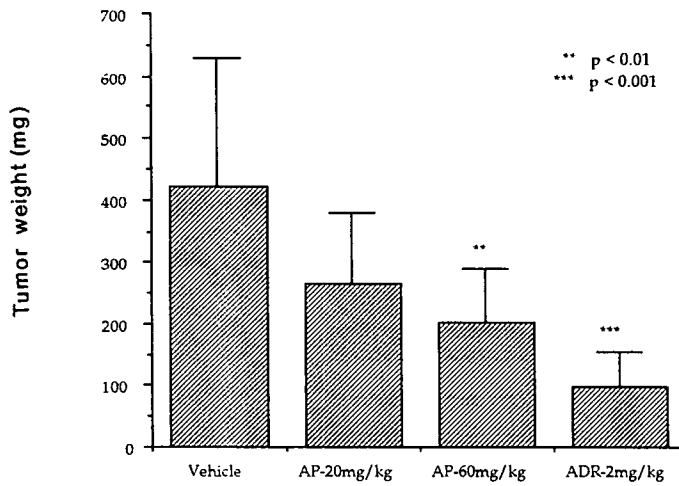
control

APF, 5 µg/ml

(4) In vivo 활성

인체 세포주 중에서 라스가 활성화 되어 있는 폐암세포주 NCI-H23을 nude mouse 에 이식한 후 아테미노라이드를 복강내 투여하여 항암활성을 관찰한 결과 우수한 활성이 있음을 확인하였다.

Arteminolides의 *in vivo* 활성 (NCI-H23 tumor)



라. 담배풀 유래 활성물질

담배풀(*Carpesium abrotanoides* L.)은 국화아강, 국화목, 국화아과, 금불초속에 속하는 *Carpesium*(담배풀)속 식물종의 하나이며, *Carpesium*(담배풀)속 식물은 아시아와 유럽에 수종이 존재한다.

우리나라에는 주로 중부, 남부지방에 걸쳐 7종의 *Carpesium*(담배풀)속 식물이 자생하는데, 한방에서는 담배풀의 뿌리 및 줄기와 잎을 천명정(天名精), 열매를 학슬이라 하여 주로 구충제로 사용하고 있다.

Carpesium(담배풀)속 식물에 대한 성분연구로는 수종의 sesquiterpene lactones 화합물들이 보고 되어 있는데, carpesialactone에 대한 구충효과와 중추신경 억제 효과 등이 보고 되었으며, 1986년과 1987년에 Gaspar 등은 *Geigeria*속 식물에서 분리된 ivalin의 glycolytic enzyme들에 대한 효과와 mast cell degranulation에 대한 영향을 실험하여 보고하였다. 그리고 11,13- dihydroivalin, ivalin, carabrone 등에 대한 cytotoxic activity 및 anti- bacterial activity 등이 보고되었으며, 이 중에서 ivalin이 유의성 있는 cytotoxic activity를 나타냄이 관찰되었다.

담배풀에서 분리된 활성물질은 백색 분말이며, IR spectrum에서는 α -methylene- γ -lactone moiety의 ester carbonyl group에 기인하는 흡수와 또다른 normal carbonyl에 기인하는 피크가 1760과 1725 cm^{-1} 에서 각각 관찰되었다. Mass spectrum을 통하여 이 화합물의 분자량은 248로 확인되었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서도 α -methylene- γ -lactone moiety의 두 methylene protons이 H-7에 allylic coupling하여 나타난 두 개의 doublets가 5.49(1H, d, J=3.1Hz)과 6.81(1H, d, J=3.1Hz)에서 관찰되었고, siglet으로 나타난 한 개의 methyl group{1.08(3H, s)ppm}과 doublet으로 나타난 한 개의 methyl group {1.30(3H, d, J=6.2Hz)ppm}이 관찰되었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum를 통해 carbon의 수는 154로 확인되었고, α -methylene- γ -lactone ring에 기인하는 피크가 45.41(CH), 81.49(CH), 120.66(CH₂), 140.93(C) 및 170.45(O-C=O)ppm에서 관찰되었으며, normal carbonyl에 기인하는 리크가 223.13ppm에서 관찰되었다.

이상의 data를 토대로 이 활성물질은 α -methylene- γ -lactone ring을 가진 sesquiterpene lactone화합물이며, Home 및 Hetero COSY와 HMBC (참조 Table 9)를 통해 구조를 동정하여 문헌조사를 실시한 결과 2,3-dihydroaromaticin인 것으로 확인되었다. 그리고 이 화합물은 FPTase의 활성을 72microM에서 50% 저해함을 알 수 있었다.

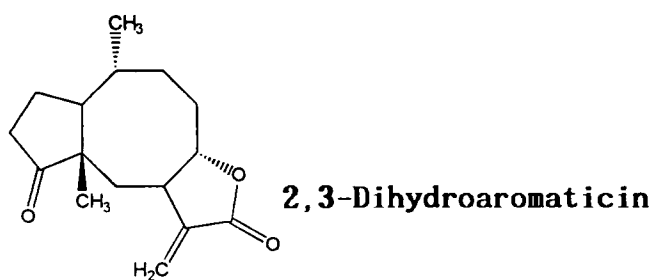


Table 9. NMR data of 2,3-Dihydroaromaticin (in CDCL₃)

Carbon	¹ H-NMR (400MHz, J. in Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹³ C-NMR (100MHz)	HMBC
	CDCL ₃	C ₆ D ₆			
1	1.93(1H, m)	1.01(1H, m)	H-2, H-10	49.34 CH	H-2, H-14
2	2.11(1H, m) 1.60(1H, m)	1.33(1H, m) 0.84(1H, m)	H-1, H-3 H-1, H-3	24.77 CH ₂	H-2
3	2.44(1H, m) 2.16(1H, m)	1.97(1H, m) 1.65(1H, m)	H-2 H-2	35.83 CH ₂	H-3
4				223.13 C	H-3, H-15
5				50.66 C	H-6
6	2.49(1H, m) 1.50(1H, m)	2.13(1H, m) 1.07(1H, m)	H-7 H-7	35.20 CH ₂	H-8, H-15
7	2.79(1H, m)	2.07(1H, m)	H-6, H-8	45.41 CH	H-6, H-9, H-13
8	4.26(1H, ddd, J=3, 6, 12Hz)	3.57(1H, ddd, J=3, 6, 12Hz)	H-7, H-9	81.49 CH	H-6, H-7 H-9
9	1.41(1H, m) 2.42(1H, m)	0.83(1H, m) 1.94(1H, m)	H-8, H-10 H-8, H-10	44.72 CH ₂	H-1, H-6 H-14
10	1.91(1H, m)	1.11(1H, m)	H-1, H-9	30.26 CH	H-9, H-14
11				140.93 C	H-6, H-7 H-13
12				170.45 C	H-13
13	6.81(1H, d, J= 3.1 Hz) 5.49(1H, d, J= 3.1 Hz)	6.06(1H, d, J= 3.6 Hz) 4.91(1H, d, J= 3.6 Hz)	H-7 H-7	120.66 CH ₂	H-7
14	1.30(3H, d, J=6.2 Hz)	0.56(3H, d, J=6.8Hz)	H-1	20.66 CH ₃	
15	1.08	0.48		22.67 CH ₃	H-6, H-10

마. FPTase 저해제 Solandelactone

제주도 서귀포 부근과 거문도 해역에서 SCUBA다이빙을 이용하여 채집한 hydroid *Solanderia secunda*로부터 methylene chloride로 유기물질을 추출한 뒤, silica vacuum flash chromatography, reversed-phase HPLC등의 과정에 의하여 cyclopropane기를 가진 C₂₂ fatty acid lactone계 신물질인 solandelactones C가 분리되었다. 일반적으로 해양생물에서 2차 대사물질로 존재하는 fatty acid 유도체들은 거의 모두가 20개의 탄소로 구성되어 있는데 비하여 이들은 22개의 탄소로 이루어진 점에서 기존의 알려진 물질들과 구분된다. Solandelactones의 구조결정은 아래와 같다 (19).

Solandelactone C는 viscous liquid의 형태로 분리되었다. 이 물질의 ¹³C NMR에서는 모두 22개의 signal들이 발견되었다(Fig. 4). 이들중 δ 176.55에 나타난 quaternary carbon은 esteric carbonyl carbon으로 해석되었으며 3개의 double bonds와 3개의 oxygen-bearing methine carbons 및 1개의 methyl carbon이 발견되었다.

Solandelactone C의 ¹³C NMR상에서 특이한 점은 carbonyl carbon을 제외하고는 quaternary carbon이 없다는 점인데 이것은 이 물질이 long-chain fatty acid 계열에 속하는 것으로 해석되었다. 또한 대단히 upfield region에 3개의 methylene 및 methine resonances { δ 23.04(d), 21.44(d), 7.87(t) }가 발견되었는데 이는 cyclopropane ring의 존재를 나타내는 것으로 추측되었다. ¹³C NMR에서 드러난 이 특징들은 모두 ¹H NMR에서 확인되었다. 많은 proton resonances가 서로 conjugate 되어 있지않아 여러개의 methylene carbon이 allylic position에 존재하는 것을 의미하였다.

Solandelactone C의 구조는 ¹H COSY와 proton decoupling에 의하여 대부분 결정되었다. 즉 이 물질은 quaternary carbon이 없으므로 terminal methyl group으로부터 α -carbonyl methylene에 이르는 protons간의 coupling에 의하여 개략적인 구조의 해석이 가능하였다. Solandelactone C에는 C-7, -11, -14등 세 위치에 oxygen이 결합되어 있으며 C-1은 carbonyl group을 형성하고 있다. 이들이 서로 결합되어

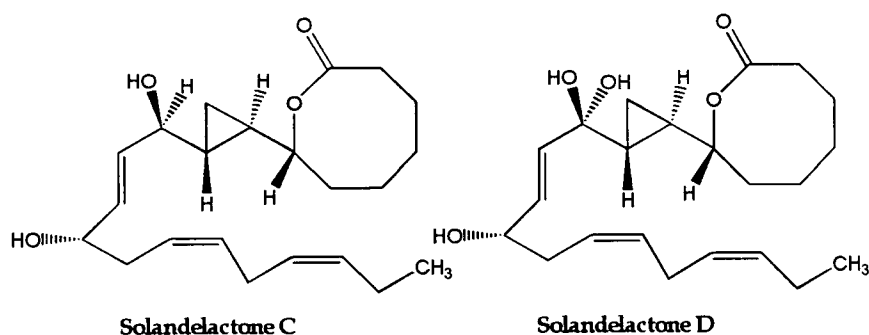
lactone이나 ether의 형태를 이루고 있는지 혹은 free hydroxy group과 carboxylic acid로 존재하는 지의 여부는 Solandelactone C를 acetylation시켜 proton chemical shifts를 비교하여 결정되었다. 즉 C-11과 C-14에 해당하는 protons만 1ppm 이상 downfield로 이동하였으므로 C-1과 C-7이 oxygen-bridge로 연결된 8-membered lactone임이 분명하였다.

Solandelactone C에 존재하는 3개의 double bonds의 configuration은 proton coupling constants의 측정(15Hz 이상)과 decoupling 실험에 의하여 모두 *E*로 결론 내었다. Cyclopropane ring에 존재하는 두 asymmetric carbon centers(C-8, -10)의 stereochemistry는 C-9 methylene protons의 coupling constants- δ 0.68 (8.8, 5.4, 5.4Hz), 0.60 (8.8, 5.4, 5.45Hz)-로부터 trans, trans로 결정되었다. 따라서 Solandelactone C는 C₂₂ fatty acid에 기원한 8-membered lactone으로 구조가 결정되었다.

이와 함께 Solandelactone C와 유사한 구조를 가지고 있는 Solandelactone D도 분리되었다.

생리활성도 측정에 의하면 Solandelactone C와 D는 항바이러스, 세포독성, brine shrimp 독성등의 효과가 전혀없음이 밝혀졌다. 그러나 이들은 FPT (Farnesyl Protein Transferase)에 대한 저해 활성이 관찰되었다.

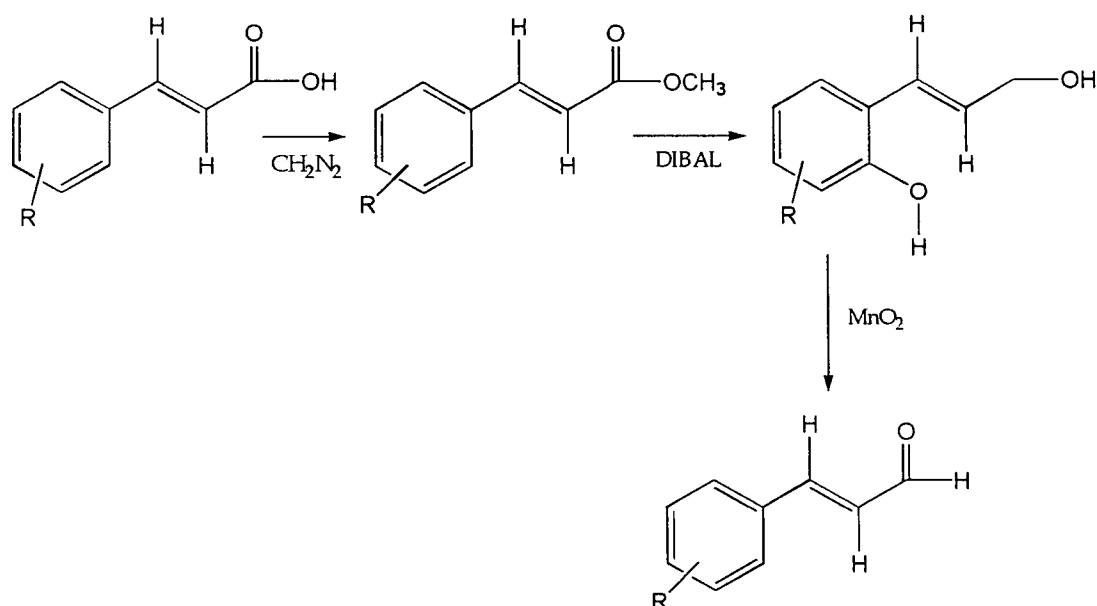
효소 저해 활성(at 100 microg/ml): Solandelactone C (69%), Solandelactone D (89%).



4. 구조활성 연구

구조활성 관계를 보기 위하여 다음과 같은 방법으로 cinnamaldehyde 유도체를 합성하였다. 2,3,4에 치환기가 결합된 시남익 산을 출발물질로하여 카복실 그룹을 디아조메탄으로 에스테르화한 후 환원과 산화 반응을 통하여 목표한 유도체들을 합성하였다.

합성된 시남알데하이드들 중에서 하이드로시 그룹을 함유한 물질들을 대상으로 몇 가지의 유도체들이 합성 되었으나 FPTase 저해활성이 매우 약함을 확인하였다.



위와 같이 합성한 2-hydroxy cinnamaldehyde 관련 유도체들에 대하여 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 FPTase 저해 활성을 측정한 결과, cinnamic acid 유도체, cinnamic acid methyl ester 유도체, cinnamyl alcohol 유도체들은 저해활성이 없거나, 모두 10%이하의 매우 약한 억제효과를 갖는 것으로 보인다. 반면 cinnamaldehyde 유도체들은 상대적으로 저해활성을 나타내었으므로, aldehyde기(CHO)가 효소 저해에 중요한 관능기로 작용함을 추정할 수 있었다.

Cinnamaldehyde 유도체들을 2, 3, 4위 치환형으로 구분하여 저해효과를 보면 3위나 4위가 hydroxy기(OH)로 치환된 것은 각각 25%, 10%인데 비하여 2위가 formyl기(CHO), hydroxyl기(OH), chloro기(Cl), methylcarboxyl기(COOCH₃)로 치환되는 경우는 11.8%, 76%, 52%, 60%로 formyl기(CHO)로 치환된 경우만을 제외하고는 모두 상당히 높은 억제효과를 나타내므로 2위치의 치환형이 효소 활성 억제에 중요하리라고 사료된다 (참조 Table 10).

Table 10. FPTase Inhibition Activity at 100 microg/ml

Compound	Inhibition(%)
2-hydroxy cinnamic acid	6.2%
2-hydroxy cinnamic acid methyl ester	5.4%
2-hydroxy cinnamic alcohol	9.0%
2-hydroxy cinnamaldehyde	76%
2-hydroxy cinnamaldehyde(cis form)	12%
3-hydroxy cinnamic acid	-
3-hydroxy cinnamyl alcohol	4%
3-hydroxy cinnamaldehyde	25%
4-hydroxy cinnamic acid	3.3%
4-hydroxy cinnamyl alcohol	7%
3-hydroxy cinnamaldehyde	10%
2-chloro cinnamic acid	-
2-chloro cinnamyl alcohol	2%
2-chloro cinnamaldehyde	52%
2-carboxy cinnamic acid	-
2-methylcarboxy cinnamyl alcohol	-
2-hydroxymethyl cinnamyl alcohol	-
2-methylcarboxy cinnamaldehyde	60%
2-formyl cinnamaldehyde	11.8%
2-methoxy cinnamaldehyde	21%

5. 세포주를 이용한 활성 검증

가. 시남알데하이드의 항암활성

2'-Hydroxycinnamaldehyde 관련 유도체를 lung, ovary, skin, CNS, colon cancer cell line에서 *in vitro* 항암 활성을 검증하였다(Table 11). 모든 유도체들은 공통적으로 lung cancer cell line에서 ED₅₀가 10 μ g/ml 이상으로 항암활성이 없었다. 효소 저해활성때와 마찬가지로 2-hydroxy cinnamic acid, 2-hydroxy cinnamic acid methyl ester, 2-hydroxy cinnamic alcohol은 모든 cell line에서 ED₅₀가 10 μ g/ml 이상으로 항암활성이 없는 것으로 관찰되었다. 2-hydroxy cinnamaldehyde는 lung을 제외한 모든 cell line에서 항암활성을 보였으며, 특히 colon cancer cell line에서 ED₅₀가 0.6307 μ g/ml로 높은 활성을 보였다.

2위가 hydroxyl기(OH), chlorogi(Cl), methylcarboxyl기(COOCH₃), methoxy기(OCH₃)로 치환된 compound를 비교해 보면 methoxy기(OCH₃)로 치환된 compound는 모든 cell line에서 ED₅₀가 10 μ g/ml 이상으로 항암활성이 없었고, 2위가 hydroxyl기(OH)로 치환된 compound가 모든 cell line에서 항암활성이 가장 높았다.

FPTase 저해활성에서 3위가 hydroxyl기(OH)로 치환된 경우 2위가 hydroxyl기(OH), chlorogi(Cl), methylcarboxyl기(COOCH₃)로 치환된 compound에 비해 저해활성이 거의 없는 것으로 나타났으나, skin, colon cancer cell line에서 2위가 chlorogi(Cl)로 치환된 compound와 비슷한 항암활성을 가진 것이 특징이었다.

Table 11. ED₅₀ of the 2-hydroxy cinnamaldehy dederivatives(microg/ml)

Compound	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
2-hydroxy cinnamic acid	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
2-hydroxy cinnamic acid methyl ester	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
2-hydroxycinnamyol	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
2-hydroxycinnamaldehyde	>10.0	1.8288	1.6315	3.0390	0.6307
3-hydroxycinnamaldehyde	>10.0	9.1741	3.2868	5.1183	3.4028
2-chlorocinnaldehyde	>10.0	4.8514	3.1256	3.9714	3.3083
2-methoxycinnamaldehyde	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
2-methylcarboxy cinnamaldehyde	>10.0	3.2848	0.9310	3.2733	1.4401

나. 아테미노라이드의 항암활성

앞에 기술한 방법으로 아테미노라이드의 항암활성을 측정하였다.

Table 12. Net Growth as Percent of Control

CONC. (microg/ml)	Cells				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
0.03	100.87	103.10	99.55	100.41	99.58
0.10	97.57	105.20	100.00	97.93	103.36
0.30	97.98	103.77	99.43	98.34	100.91
1.00	94.60	96.95	85.30	92.03	81.22
3.00	66.63	57.23	8.43	53.03	11.83
10.00	-68.28	-94.56	-92.26	-96.90	-98.32
ED ₅₀	3.14	3.02	1.70	3.00	1.66

6. *In vivo* 활성 검증

동물에서의 항암활성 효과를 측정하기 위하여 계피 유래물질인 CB-OH와 CB-Ph를 대상으로 Nude mice를 이용한 항암활성 검증하였다.

상기 두 화합물 CB-OH, Ph를 대상으로 하여 인체 결장암 세포주인 SW-620을 nude mouse에 이식한 후 시료와 adriamycin을 처리하였다. 19일 동안 nude mouse의 몸무게 변화를 관찰하였다. 최종일의 결과를 비교하면 양성대조군인 adriamycin에 의해서는 15%의 체중 감소가 있었으나, CB-OH 및 CB-Ph의 처리에 의해서는 몸무게의 감소가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터 상기의 화합물들은 비교적 저독성의 항암활성 물질임을 알 수 있었다. CB-OH를 처리한 동물의 체중 변화를 다음 그림에 표기하였다 (24).

가. CB-OH, CB-PH 시료에 의한 누드마우스 몸무게 변화

NCI-H23 인체 암세포주를 nude mouse에 이식 한 후 시료와 adriamycin을 처리하였다. 19일 동안 nude mouse의 몸무게 변화를 관찰하였다 (Figure 1-1, 1-2). 최종일의 결과를 비교하면 양성대조군인 adriamycin에 의해서는 15%의 체중의 감소가 있었으나, CB-OH 및 CB-PH의 처리에 의해서는 몸무게의 감소가 관찰되지 않았다.

Figure 1-1. Body weight changes of nude mice xenografted with NCI-H23

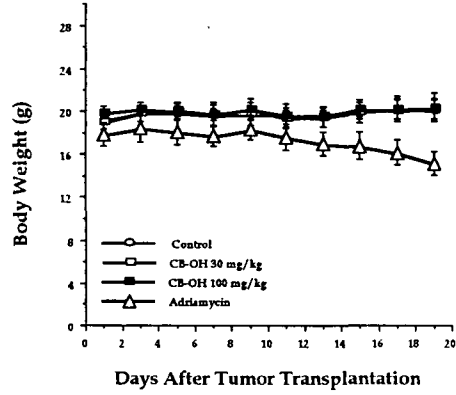
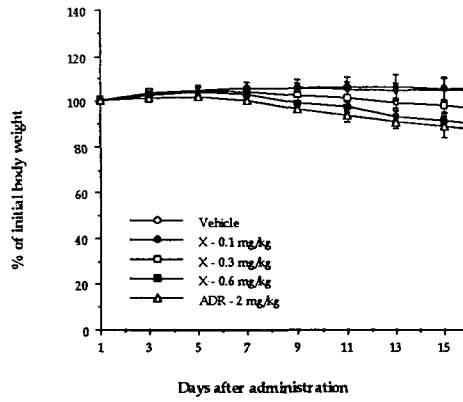


Fig. 1-2. Body weight changes of SW620 xenografted - nude mice treated with 11-OH-X



SW-620인체 암세포주를 nude mouse에 이식 한 후 시료와 adriamycin을 처리하였다. 19일 동안 nude mouse의 몸무게 변화를 하루 간격으로 관찰하였다 (Figure 1-3, 1-4). 최종일의 결과를 비교하면 양성대조군인 adriamycin에 의해서는 14%의 체중의 감소가 있었으나, CB-OH 및 CB-PH의 처리에 의해서는 몸무게의 감소가 관찰되지 않았다.

Figure 1-3. Body weight changes of nude mice xenografted with SW620

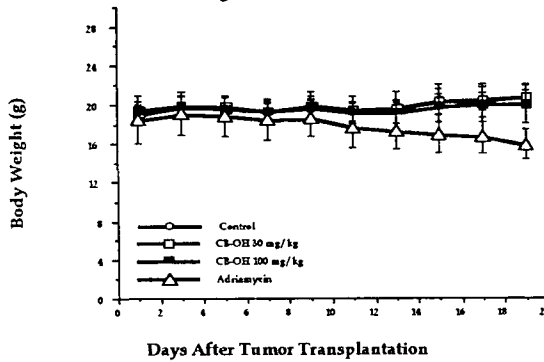
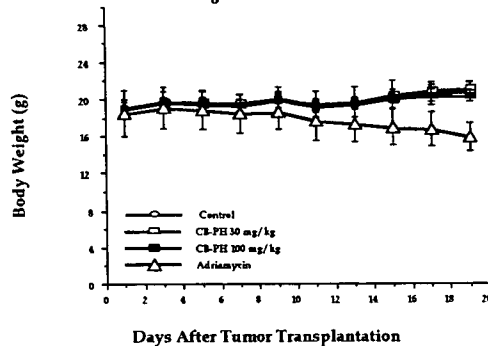


Figure 1-4. Body weight changes of nude mice xenografted with SW620



나. CB-OH, CB-PH 시료에 의한 종양크기 변화

NCI-H23을 이식한 후 11일째 부터 종양의 크기변화를 측정하였는데 그결과는 Figure 2-1, 2-2에 나타내었다. CB-OH 시료를 30 mg/kg의 농도로 처리할 경우 NCI-H23 종양의 크기가 29% 감소했으나 통계적으로 유의하지 않았으며, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 49%의 유의성있는 감소를 나타냈다 (Figure 2-1, $p < 0.01$). CB-PH 시료를 30 mg/kg의 농도로 처리할 경우 NCI-H23 종양의 크기가 20% 감소했으나 통계적으로 유의하지 않았으며, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 47%의 유의성 있는 감소를 나타냈다 (Figure 2-2, $p < 0.05$). 양성대조물질인 adriamycin처리군은 통계적으로 유의한 항암효과가 있었는데 약 66% 정도 종양의 성장을 억제했다 ($p < 0.01$).

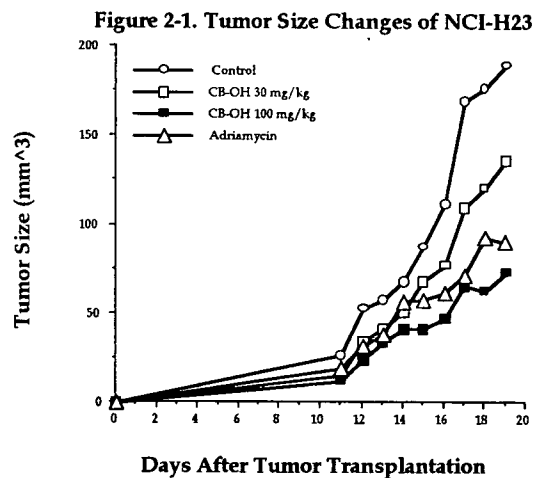
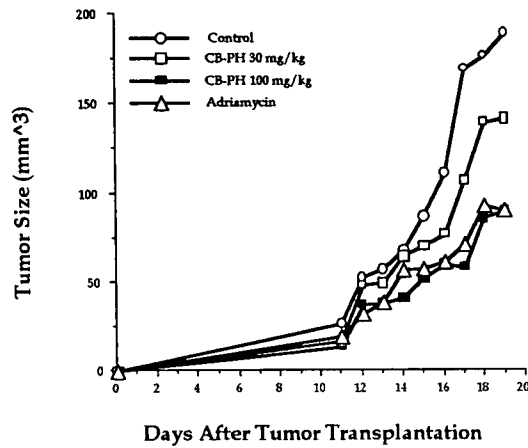


Figure 2-2. Tumor Size Changes of NCI-H23



SW620을 이식한 후 11일째 부터 종양의 크기변화를 측정하였는데 그결과는 Figure 2-3, 2-4에 나타내었다. CB-OH 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 SW620 종양의 크기가 각각 78%, 88%정도 유의성있게 감소했다 (Figure 2-3, $p < 0.001$). CB-PH 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 SW620 종양의 크기가 각각 69%, 82% 정도 유의성있게 감소했다 (Figure 2-4, $p < 0.001$). 양성대조물질인 adriamycin처리군은 통계적으로 유의한 91%의 강력한 항암효과를 나타냈다 ($p < 0.001$).

Figure 2-3. Tumor Size Changes of SW620

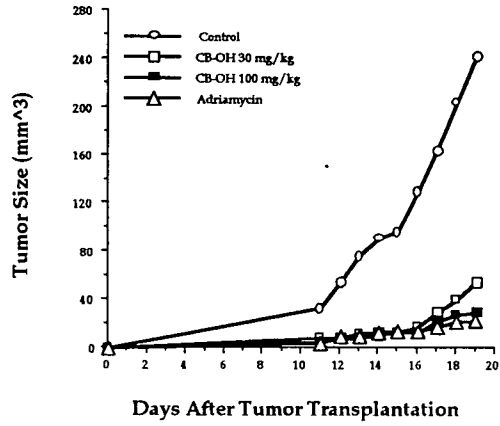
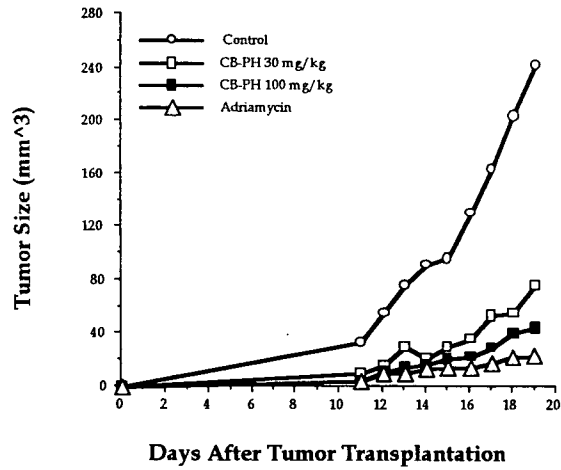


Figure 2-4. Tumor Size Changes of SW620



다. CB-OH, CB-PH 시료에 의한 종양무게 변화

종양이식 후 19일째 NCI-H23을 절제하여 그 무게를 측정하였는데 그 결과를 Figure 3-1, 3-2에 요약하였다. CB-OH 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 NCI-H23 종양의 크기가 각각 11%, 16% 감소했으나 통계적으로 유의하지 않았다. CB-PH 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우에도 NCI-H23 종양의 크기가 각각 7%, 20% 감소했으나 통계적으로 유의하지 않았다.

Figure 3-1. Tumor Weight of NCI-H23 (Day 19)

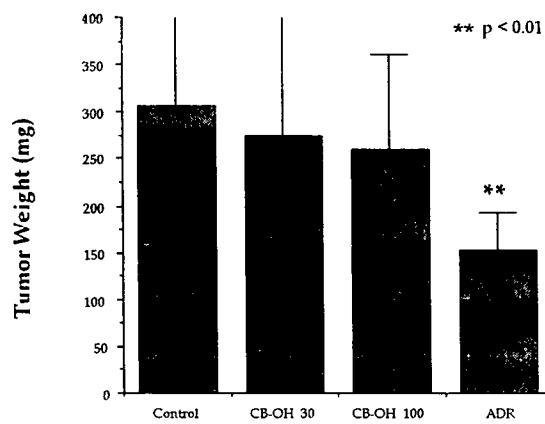
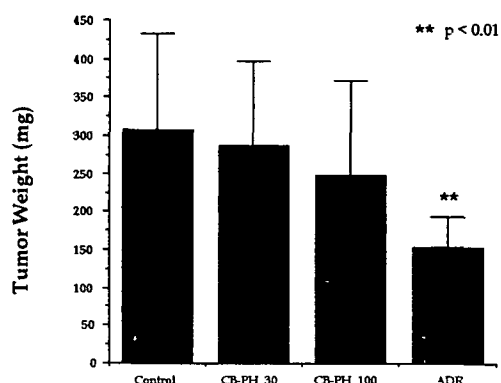


Figure 3-2. Tumor Weight of NCI-H23 (Day 19)



CB-OH, CB-PH 시료를 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 종양크기가 감소한 듯 나타났으나(Figure 2-1, 2-2), 최종 종양의 무게는 감소하지 않았다. 양성대조물질인 adriamycin처리군은 통계적으로 유의한 항암효과가 있었는데 약 51% 정도 종양의 성장을 억제했다 ($p < 0.01$).

종양이식후 19일째 SW620을 절제하여 그 무게를 측정하였는데 그 결과를 Figure 3-3, 3-4에 요약하였다. CB-OH 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 NCI-H23 종양의 크기가 각각 76%, 78% 정도 유의성있게 감소했다 (Figure 3-3, $p < 0.001$). CB-PH 시료를 30 mg/kg의 농도로 처리할 경우, NCI-H23 종양의 크기가 58% 정도 유의성있게 감소했으며 ($p < 0.01$), 100 mg/kg의 처리에 의해서도 75%의 유의성있는 감소를 나타냈다 (Figure 3-4, $p < 0.001$). 양성대조물질인 adriamycin처리군은 통계적으로 유의한 87%의 항암효과를 나타냈다 ($p < 0.01$).

Figure 3-3. Tumor Weight of SW620 (Day 19)

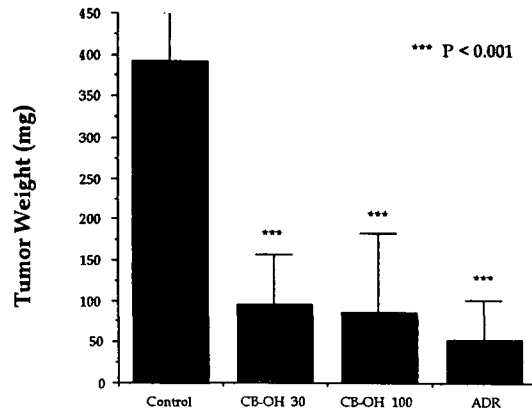
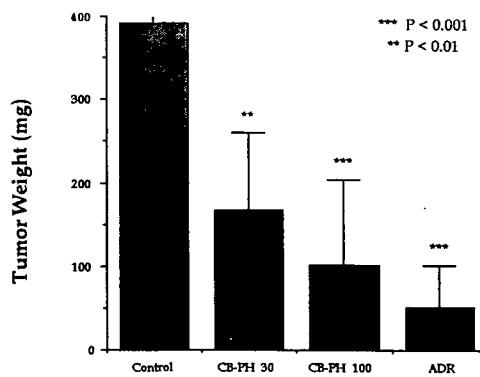


Figure 3-4. Tumor Weight of SW620 (Day 19)



라. CB-OCH₃, CB-ACETAL 시료에 의한 nude mouse 몸무게 변화

NCI-H23 인체 암세포주를 nude mouse에 이식 한 후 시료와 adriamycin을 처리하였다. 19일 동안 nude mouse의 몸무게 변화를 관찰하였다 (Figure 1-1, 1-2). 최종일의 결과를 비교하면 양성대조군인 adriamycin에 의해서는 5%의 체중의 감소가 있었으나, CB-OCH₃ 및 CB-ACETAL의 처리에 의해서는 몸무게의 감소가 관찰되지 않았다.

Figure 1-2. Body weight changes of nude mice xenografted with NCI-H23

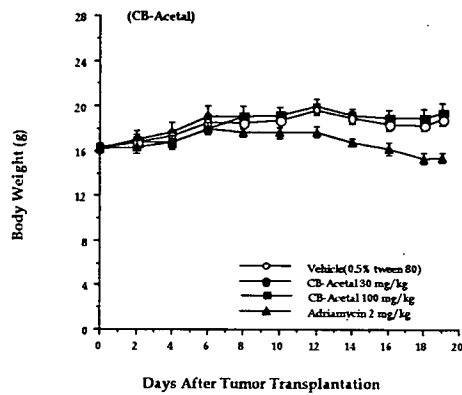
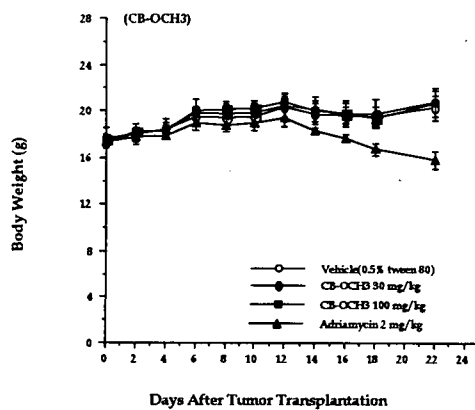
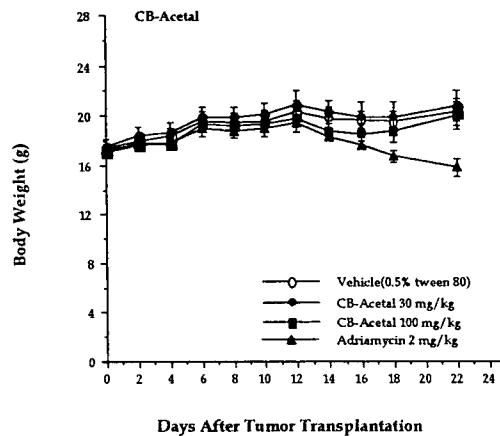


Figure 1-3. Body weight changes of nude mice xenografted with SW620



SW-620인체 암세포주를 nude mouse에 이식 한 후 시료와 adriamycin을 처리하였다. 22일 동안 nude mouse의 몸무게 변화를 하루 간격으로 관찰하였다 (Figure 1-3, 1-4). 최종일의 결과를 비교하면 양성대조군인 adriamycin에 의해서는 8%의 체중의 감소가 있었으나, CB-OCH₃ 및 CB-ACETAL의 처리에 의해서는 몸무게의 감소가 관찰되지 않았다.

Figure 1- 4. Body weight changes of nude mice xenografted with SW620



마. CB-OCH₃, CB-ACETAL 시료에 의한 종양크기 변화

NCI-H23을 이식한 후 11일째 부터 종양의 크기변화를 측정하였는데 그결과는 Figure 2-1, 2-2에 나타내었다. CB-OCH₃ 시료를 30 mg/kg, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 용매 대조군과 비교하여 유의성 있는 성장 억제는 관찰되지 않았다 (Figure 2-1). CB-ACETAL 시료를 30 mg/kg, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 용매 대조군과 비교하여 유의성 있는 성장 억제는 관찰되지 않았다 (Figure 2-2). 양성 대조물질인 adriamycin처리군은 통계적으로 유의한 항암효과가 있었는데 약 69% 정도 종양의 성장을 억제했다 ($p < 0.001$).

SW620을 이식한 후 10일째 부터 종양의 크기변화를 측정하였는데 그결과는 Figure 2-3, 2-4에 나타내었다. CB-OCH₃ 시료를 30 mg/kg, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 용매 대조군과 비교하여 유의성 있는 성장 억제는 관찰되지 않았다 (Figure 2-3). CB-ACETAL 시료를 30 mg/kg, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 용매 대조군과 비교하여 유의성 있는 성장 억제는 관찰되지 않았다 (Figure 2-4). 양성 대조물질인 adriamycin처리군은 통계적으로 유의한 78%의 강력한 항암효과를 나타냈다 (p<0.001).

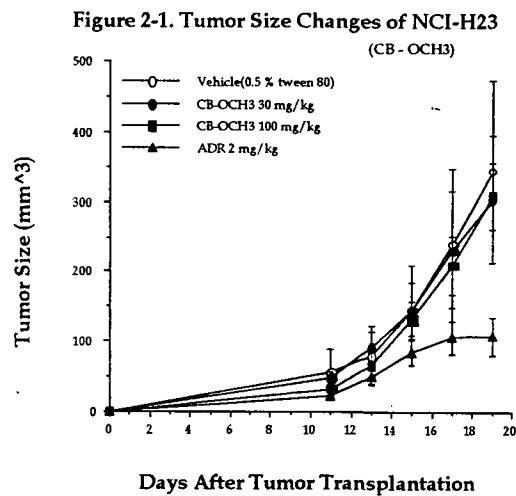


Figure 2-3. Tumor Size Changes of SW620
(CB - OCH3)

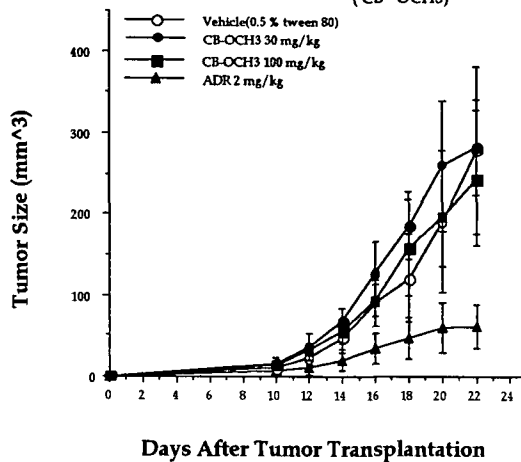
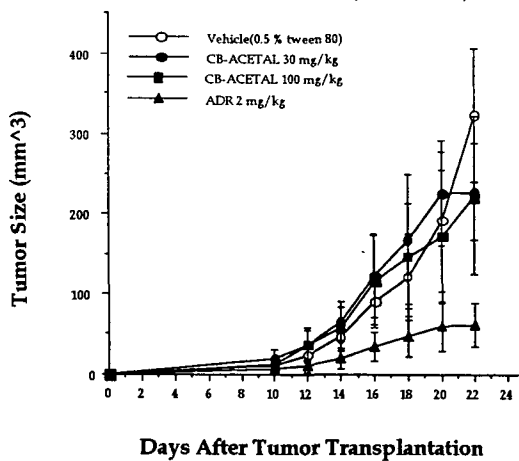


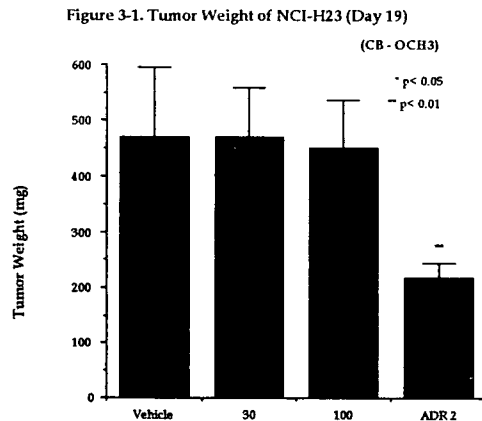
Figure 2-4. Tumor Size Changes of SW620
(CB - ACETAL)



바. CB-OCH₃, CB-ACETAL 시료에 의한 종양무게 변화

종양이식 후 19일째 NCI-H23을 절제하여 그 무게를 측정하였는데 그 결과를 Figure 3-1, 3-2에 요약하였다. CB-OCH₃ 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 종양 무게의 유의성 있는 감소는 없었다. CB-ACETAL 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우에도 NCI-H23 종양 무게의 유의성 있는 감소는 없었다. 양성대조물질인 adriamycin처리군은 통계적으로 유의한 항암효과가 있었는데 약 54% 정도 종양의 성장을 억제했다 ($p < 0.01$).

종양이식후 22일째 SW620을 절제하여 그 무게를 측정하였는데 그 결과를 Figure 3-3, 3-4에 요약하였다. CB-OCH₃ 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 종양 무게의 유의성 있는 감소는 없었다 (Figure 3-3). CB-ACETAL 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우에도 SW620 종양 무게의 유의성 있는 감소는 없었다 (Figure 3-4). 양성대조물질인 adriamycin처리군은 통계적으로 유의한 71%의 항암 효과를 나타냈다 ($p < 0.01$).



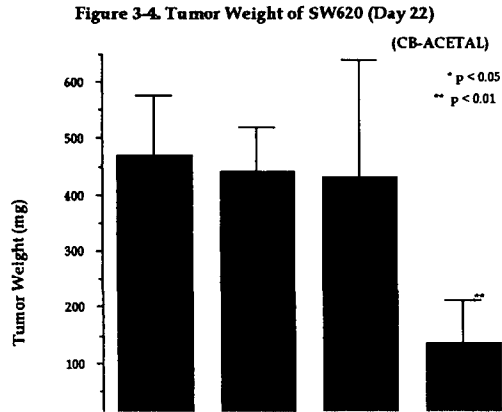
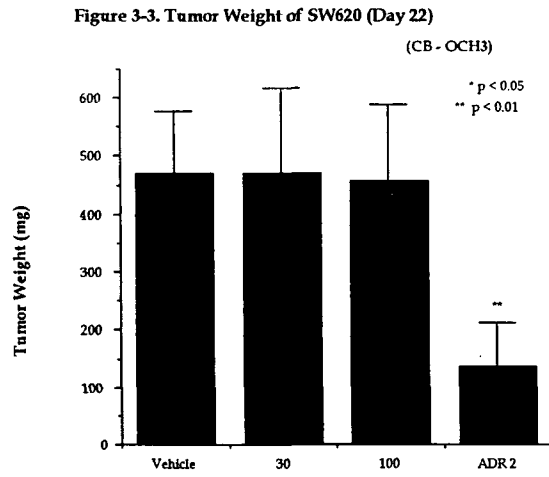


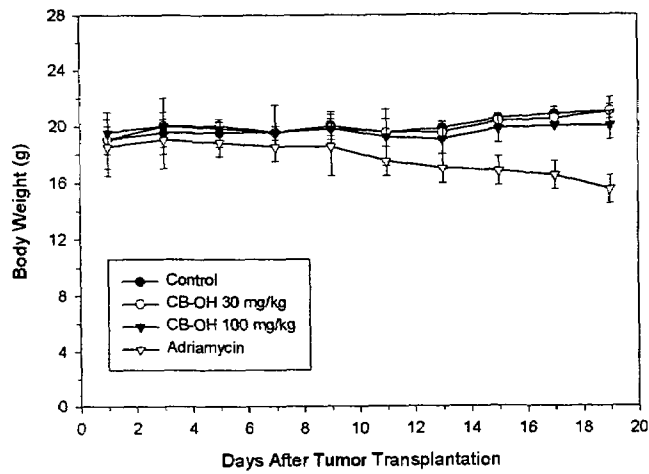
Figure 3-2. Tumor Weight of NCI-H23 (Day 19)



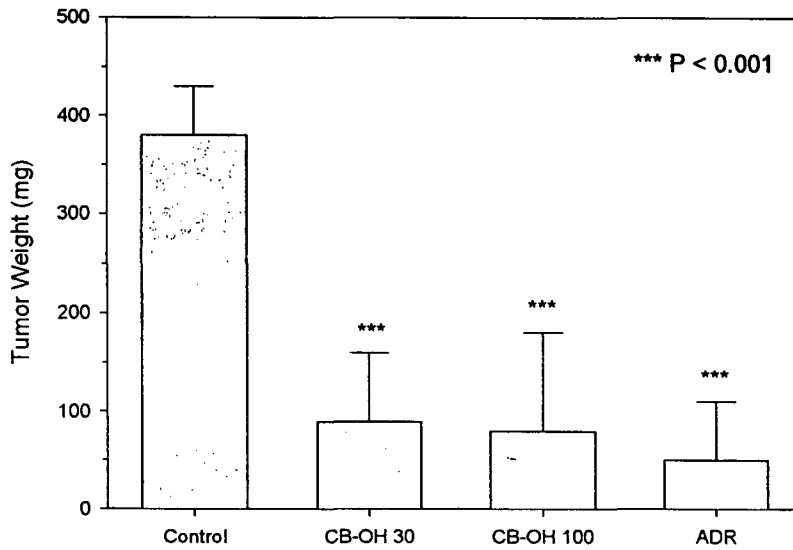
아래 그림과 같이 CB-OH 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 체중의 감소 없이 SW620 종양의 크기가 각각 78%, 88%정도 유의성 있게 감소했다($p < 0.001$).

양성대조물질인 adriamycin처리군은 통계적으로 유의한 91%의 강력한 항암효과를 나타냈다. ($p < 0.001$).

Body weight changes of nude mice xenografted with SW620



Tumor Weight of SW620 (Day 19)

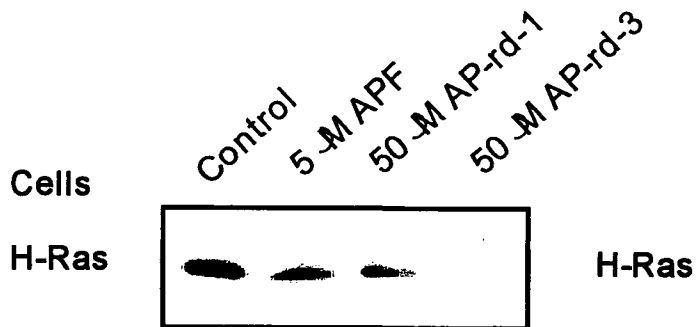
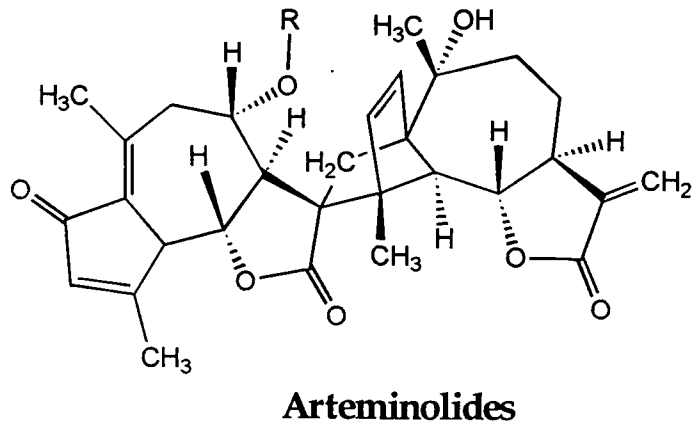


그러나 CB-OCH₃ 또는 CB-acetal과 같은 화합물은 동물실험에서 항암활성이 없음이 증명되었다. 이는 이들 화합물의 aldehyde group이 매우 중요함을 증명해주는 것이다.

7. 라스 단백질의 원형질막 결합 저해활성

라스 단백질의 활성을 조절하기 위해서는 이 단백질이 원형질막에 결합하는 것을 저해하여야 한다. 본 연구에서 분리한 두 가지의 물질은 라스단백질의 원형질막 결합을 효과적으로 저해한다는 것을 확인하였다.

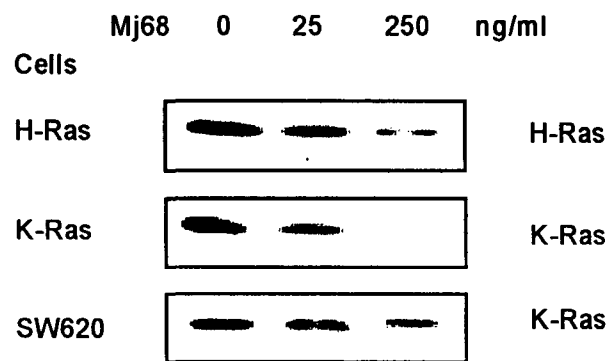
가. 약속에서 분리한 아테미노라이드



나. 미생물 G80791에서 분리한 MJ68

이 화합물은 H-Ras 및 K-Ras의 processing을 효과적으로 저해한다

Effect of MJ68 on Ras Processing



8. 연구결과의 종합

가. 유용 활성 자원

탐색 대상체	유용 활성 자원
미생물 자원 (방선균, 곰팡이, 박테리아)	① 방선균 3,000 여 균주 (2) ② 곰팡이 2,000 여 균주 (3) ③ 박테리아 1,000 여 균주 (1) ④ Endophytic bacteria 500 여 균주 (2)
식물 자원	① 생약제 300여 종 (2) ② 자생생물 200여 종 (2)
해양 생물자원	① 해양 식물 50여 종 (1) ② 해양 동물 20여 종 (1)

나. 활성 물질

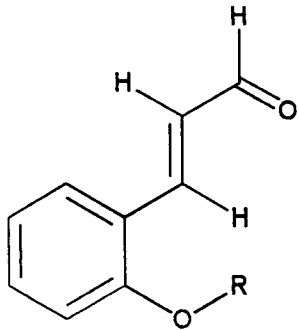
- 미생물 유래 활성 물질

1. Gliotoxin (곰팡이)
2. CBR004 (박테리아): Cyclic peptide
3. MJ68 (방선균): Naphtaquinone Moiety

- 식물 유래 활성 물질

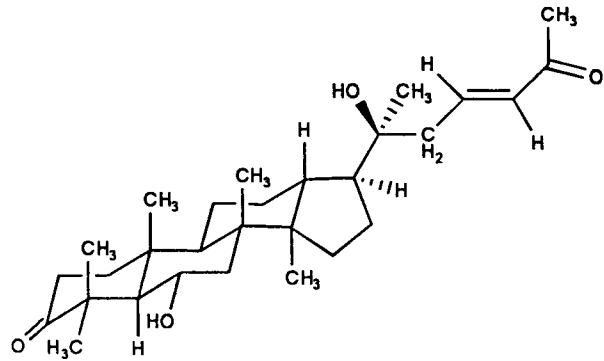
Cinnamaldehydes

계피로부터 분리



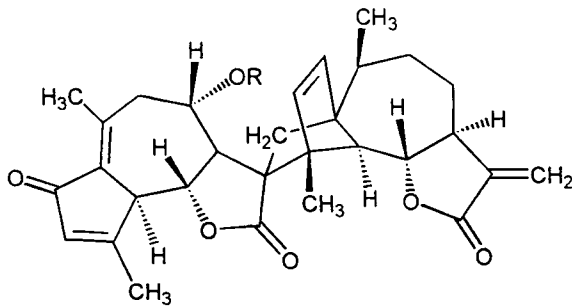
Rhombenone

송악으로부터 분리



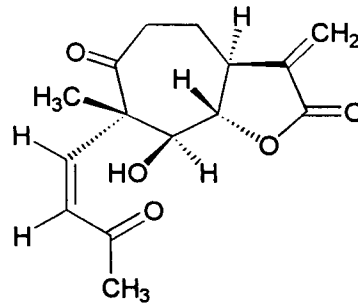
Arteminolides

쑥으로부터 분리



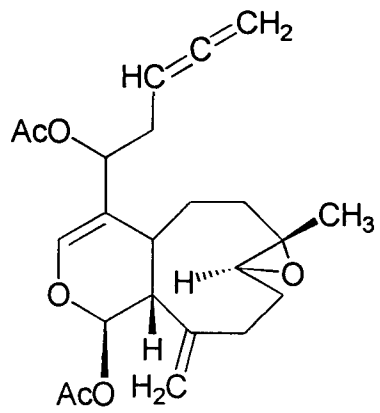
Arteminones

쑥으로부터 분리

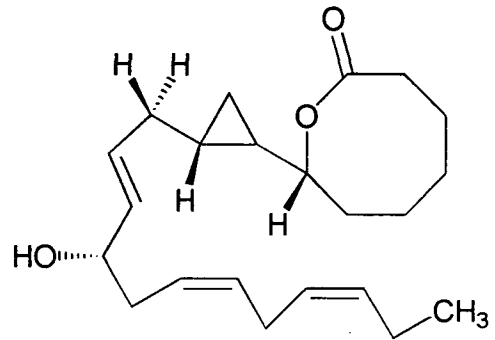


- 해양 자원유래 활성 물질

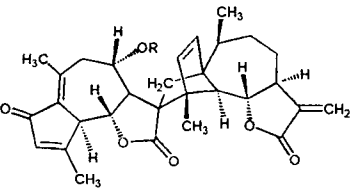
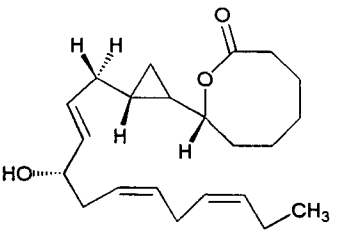
Acalycixeniolides



Solandalactone



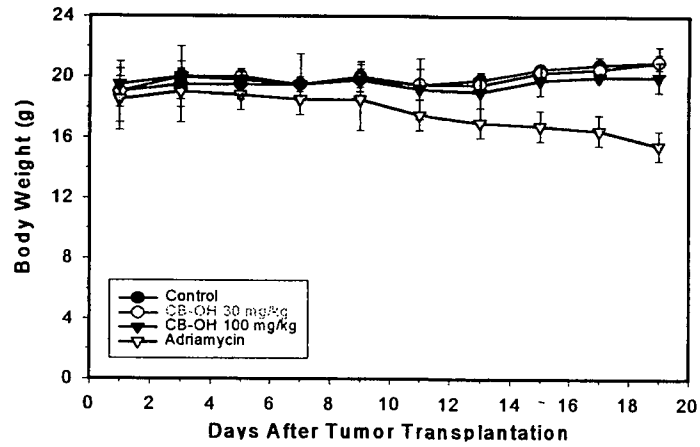
다. *In Vitro* Data

활성 물질	<i>In Vitro</i> 활성
<p>MJ68(방선균): Naphthaquinone Moiety</p>	<p>① FPTase : 18 μM ② GGPTase : <200 μM ③ Cell lines : 100 nM (K-Ras processing block)</p>
<p>Arteminolides</p> 	<p>① FPTase : 350 - 500 nM ② GGPTase : <200 μM ③ Cell lines : 5 μM (H-Ras processing block) ④ Cell Cycle : G2/M phase arrest</p>
<p>Solandalactone</p> 	<p>① FPTase : 50 μM ② GGPTase : <200 μM</p>

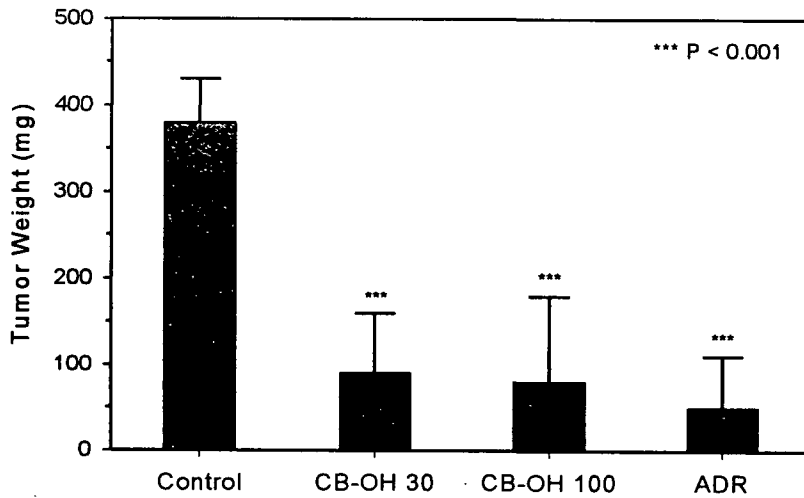
4. In Vivo Data

- CB-OH의 *in vivo* 활성

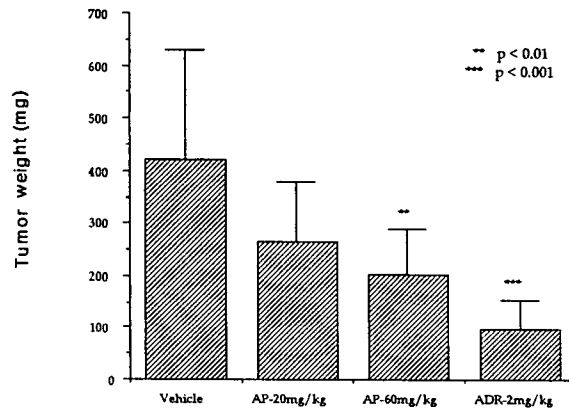
Body weight changes of nude mice xenografted with SW620



Tumor Weight of SW620 (Day 19)



Arteminolides의 *in vivo* 활성 (NCI-H23 tumor)



제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

년차	연구개발목표	달성 내용	달성도
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 효율적인 탐색계 확립 - 탐색자원 확보 - 활성 물질 분리 	<ul style="list-style-type: none"> -SPA 법을 확립하여 유용자원 탐색 -미생물, 식물, 해양자원을 확보함 -해양 자원 및 식물체로부터 2가지의 활성 물질 분리 	100
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 신규 활성물질 확보 여부 - Counter Screening 확보여부 - 이차 활성 검증법의 확립여부 	<ul style="list-style-type: none"> - 약속으로부터 6가지의 신규화합물을 분리 정제하여 각화합물들의 구조를 결정 - Counter screening을 위하여 geranylgeranyl transferase를 분리하였으며 이 효소의 기질 펩타이드를 합성 - 이차 활성 검증을 위하여 세포주 (H-ras 및 K-ras cell lines) 및 neu*-transformed 세포주를 확보 	100
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 구조활성 연구 여부 - 세포주 이용 활성 검증여부 - 실험동물을 이용한 활성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> - 약속유래 물질과 시남알데하이드의 구조 활성 관계 연구를 수행함 - 이차 활성 검증을 위하여 세포주 (H-ras, K-ras cell lines, neu*-transformed) 및 대장암 세포주인 SW620를 사용하여 활성을 검증함 - 라스 단백질의 원형질막 결합 저해활성 검증 - 약속 유래 복합 및 단일 활성 성분의 실험동물 (nude mouse)을 수행하여 <i>in vivo</i> 활성을 검증함 - 시남알데하이드 유도체들을 대상으로 <i>in vivo</i> 활성 검증 	100

본 과제 수행을 통하여 얻은 결과들은 타분야의 연구 특히 특이 표적을 목표로 하는 활성 물질의 탐색 및 개발 등에 기여 할 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 식용자원 유래 물질인 시남알데하이드 유도체들은 독성이 적고 특이 표적을 목표로 하는 항암제로 개발 될 수 있을 것으로 사료된다. 더 나아가서 본 연구를 통하여 얻어진 신규 구조의 천연물질들은 앞으로 부가될 reverse genetics 연구의 좋은 자료로 활용 도리 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 항암제 개발을 위한 선도물질로의 활용

식물체유래 아테미노라이드는 구조적으로 지금까지 밝혀진 FPTase 저해제들과 전혀 상이하므로 이를 바탕으로한 화학적 전합성 및 세포배양 등의 연구를 수행하여 다양한 화합물을 얻은 후 구조-활성 관계를 연구 할 수 있을 것이다. 이런 연구의 결과들을 바탕으로 새로운 항암제 개발을 추진한다면 성공 가능성이 매우 높다고 사료된다 (26-30).

이미 동물실험에서 우수한 항암활성을 보여주고 있는 계피유래물질인 시남알데하이드 유도체들은 독성검사 등을 실시한 후 산업화를 고려할 만하다고 사료된다.

2. Reverse Genetics 연구용 재료로서의 활용

동물에서 강한 항암활성을 나타내는 계피유래 물질의 반응 기작 규명연구 수행을 통하여 새로운 항암제 개발을 위한 표적 물질의 탐색에 활용 될 수 있을 것이다. 이와 같이 화학물질을 이용한 세포수준에서의 연구를 chemical biology라하며 이런 연구들은 국내의 생물학 및 화학분야의 연구에 새로운 장을 열어 주리라 사료된다. 이러한 chemical biology 연구를 통하여 새로운 단백질의 발견 또는 기능의 규명이 이루어질 것으로 사료되며, 이것이 바로 21세기를 주도할 유전체 기능연구이며 이를 reverse genetics 연구라 명명하고 있다.

천연물 유래 특이 구조의 화합물들은 유전체의 기능연구에 매우 좋은 도구로 사용될 수 있을 것이다. 그러므로 본 연구에서 얻어진 물질들의 활용가치는 매우 크다고 할 수 있다.

여 백

제 6 장 참고문헌

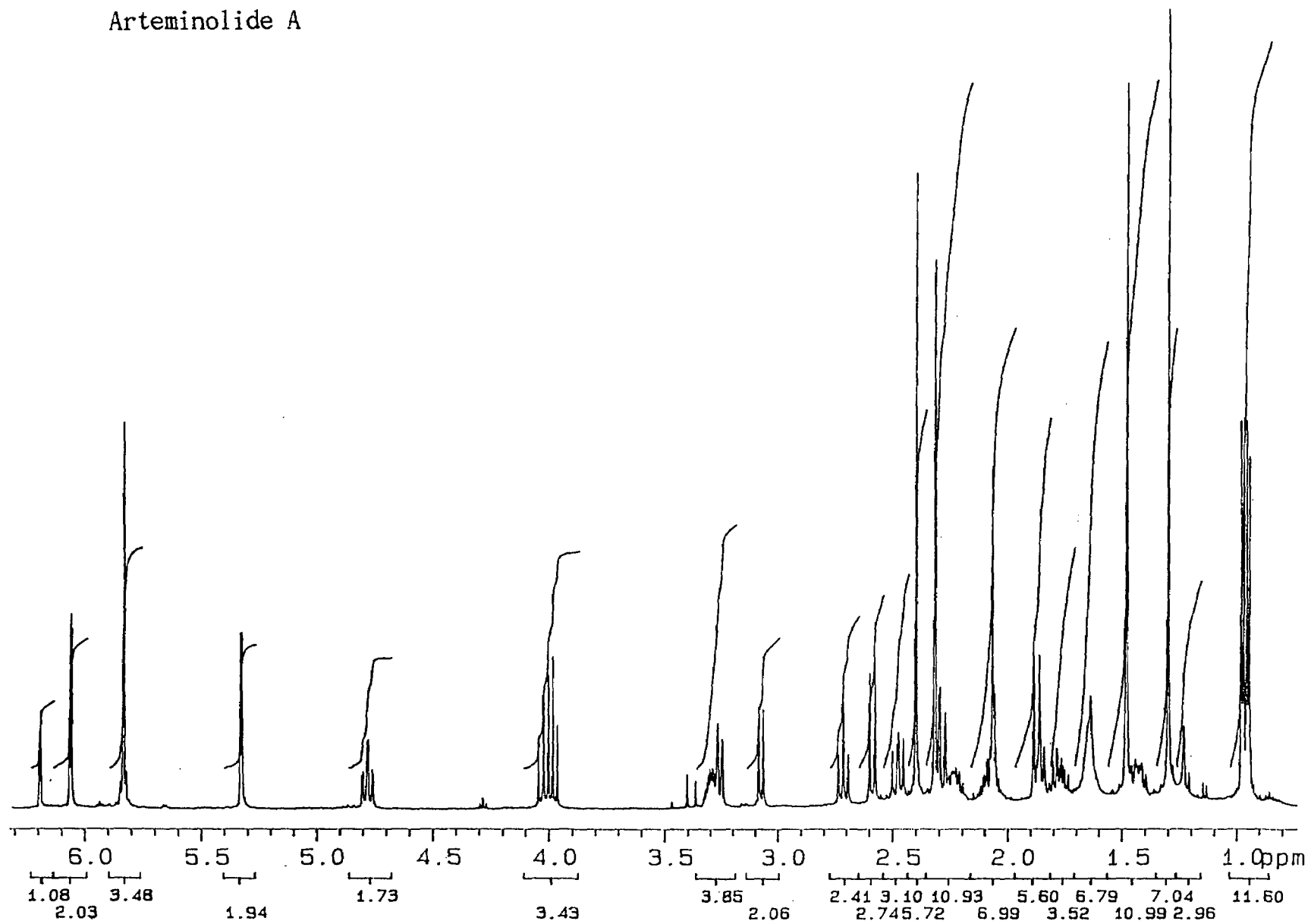
1. Alexander, L. and Gazit, A., *Science*, 267, 1782-1788 (1995).
2. Plowman, G.D., Ullrich, A., and Shawver, L. K., *DN&P* 7, 334-339 (1994).
3. Beutler, B. and Cerami, A., *Ann. Rev. Biochem.* 57, 505-518 (1988).
4. Pawson, T., *Nature*, 373, 573-580 (1995).
5. Superti-Furga, G. and Courtneidge, S.A., *BioEssays*, 17, 321-330 (1995).
6. Mahadevan, D. *et al.*, *Biochemistry*, 34, 2095-2106 (1995).
7. Blumer, K. J. and Johnson, G. C., *Tips* 19, 236-240 (1994).
8. James, G. L. *et al.*, *Science*, 260, 1937-1942 (1993).
9. Brugge, J. S., *Science*, 260, 918-919 (1993).
10. Omer, C. A. *et al.*, *Biochemistry*, 32, 5167-5179 (1993).
11. Gibbs, J. B. and Oliff, A., *Cell*, 79, 193-198 (1994).
12. Kohl, N. E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9141-9145 (1994)
13. Gibbs, J. B., Oliff, A. and Kohl, N. E. *Cell*, 77, 175-178 (1994).
14. Moodie, S. A. and Wolfman, A., *TIG*, 10, 44-48 (1994).
15. Kwon, B. M., Cho, Y. K., Nam, J. Y., Lee, S. H., Bok, S. H. Chun, S. K., Kim, J. A., and Lee, I. R. *Planta Medica*, 62, 183-184 (1996).
16. Yang, W., Villa, K. D., Urano, J., Mitsuzawa, H., and Tamanoi, F. J. *Cell. Biochem. Supp.* 27, 12-19 (1997).
17. Suzuki, N., Villa, K. D., Tamanoi, F. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10499-10504 (1998).

18. Choi, S. U., Choi, E. J., Kim, K. H., Kim, N. Y., Kwon, B. M., Kim, S. U., Bok, S. H., Lee, S. Y., and Lee, C. O. *Arch. Pharm. Res.*, 19, 6-11 (1996).
19. Seo, Y. W., Rho, J. R., Shin, J. H., Kwon, B. M., Bok, S. H., *Tetrahedron*, 52, 10583-10596 (1996).
20. Son, K. H., Kim, Y. K., Lee, H. W., Lee, W. S., Kim, S. W., Jeong, T. S., Kwon, B. M., Bok, S. H. *Biotechnology Letter*, 18, 1297-1300 (1997).
21. Son, K. H., Hong, S. H., Kwon, Y. K., Bae, K. S., Kim, Y. K., Kwon, B. M., Kim, S. U., Bok, S. H. *Biotechnology Letters*, 20, 149-151 (1998).
22. Sung, N. D., Kwon, B. M., Lim, C. H., Cho, Y. K., *Agric. Chem. Biotechnol.* 41, 218-221 (1998).
23. Lee, S. H., Kim, M. J., Bok, S. H., Lee, H., Kwon, B. M. *J. Org. Chem.* 63, 7111-7113 (1998).
24. Lee, C. W., Hong, D. H., Han, S. B., Park, S. H., Kim, H. K., Kwon, B. M., Kim, H. M. *Planta Medica*, 65, 263-266 (1999).
25. Lee, S. H., Kim, M. J., Bok, S. H., Lee, H., Kwon, B. M. *Tetrahedron*, 56, 4711-4715 (2000).
26. Adjei, A. A., et. al., *Cancer Research*, 60, 1871-1877 (2000).
27. Williams, T.M., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 9, 1263-1280 (1999).
28. Kloog, Y. and Coa, A. D. *Mol. Med. Today* 6, 398-402 (2000).
29. Jansen, B. et al., *J. Mol. Med.* 77, 792-797 (1999).
30. Kloog, Y. et al., *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 8, 2121-2140 (1999).

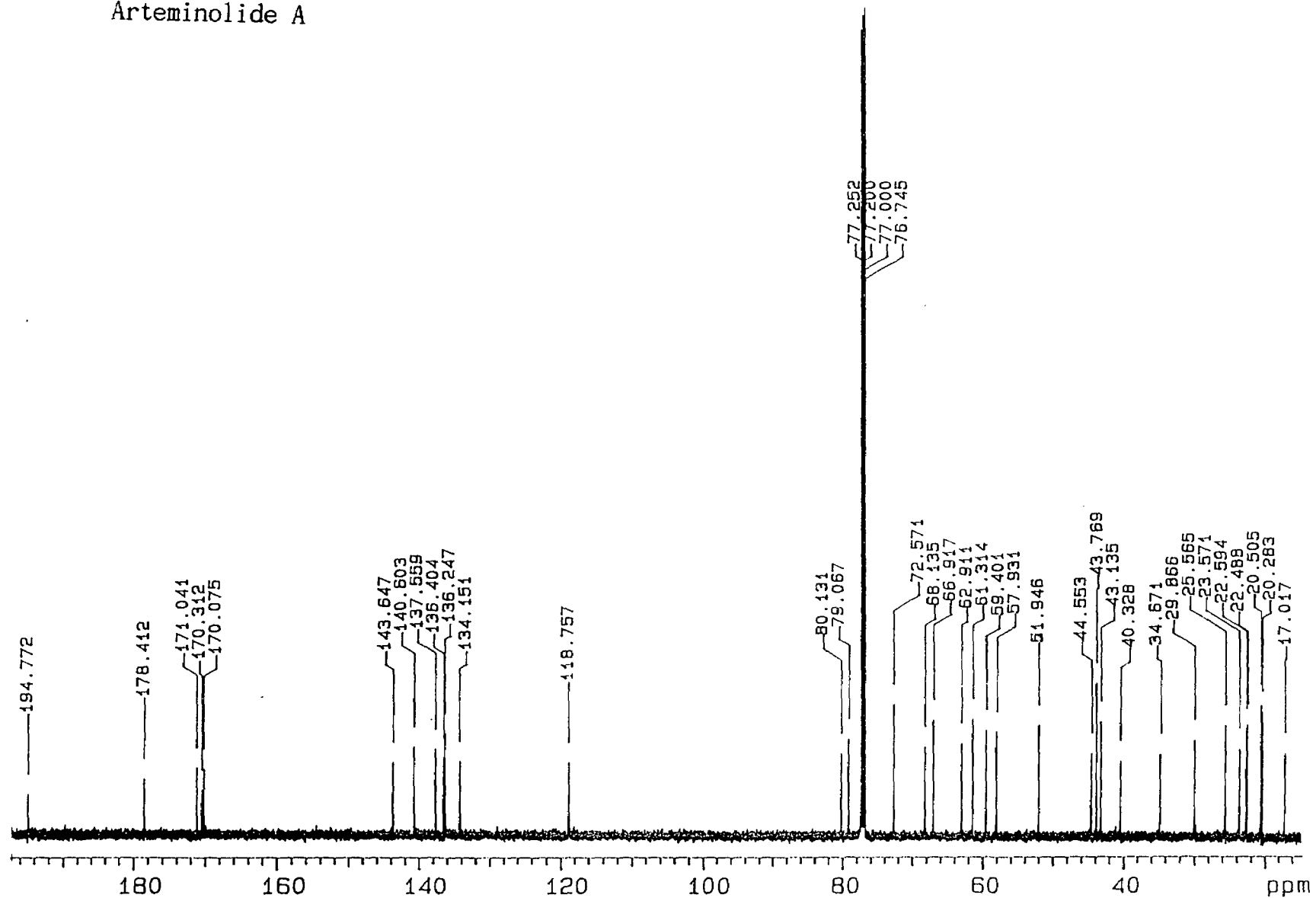
첨부자료 1. NMR Spectra of Arteminolide A

1. Proton NMR spectrum of Arteminolide A
2. Carbon spectrum of Arteminolide A
3. DEPT spectrum of Arteminolide A
4. HMQC spectrum of Arteminolide A
5. HMBC spectrum of Arteminolide A
6. HMBC spectrum of Arteminolide A
7. HMBC spectrum of Arteminolide A
8. NOSEY spectrum of Arteminolide A

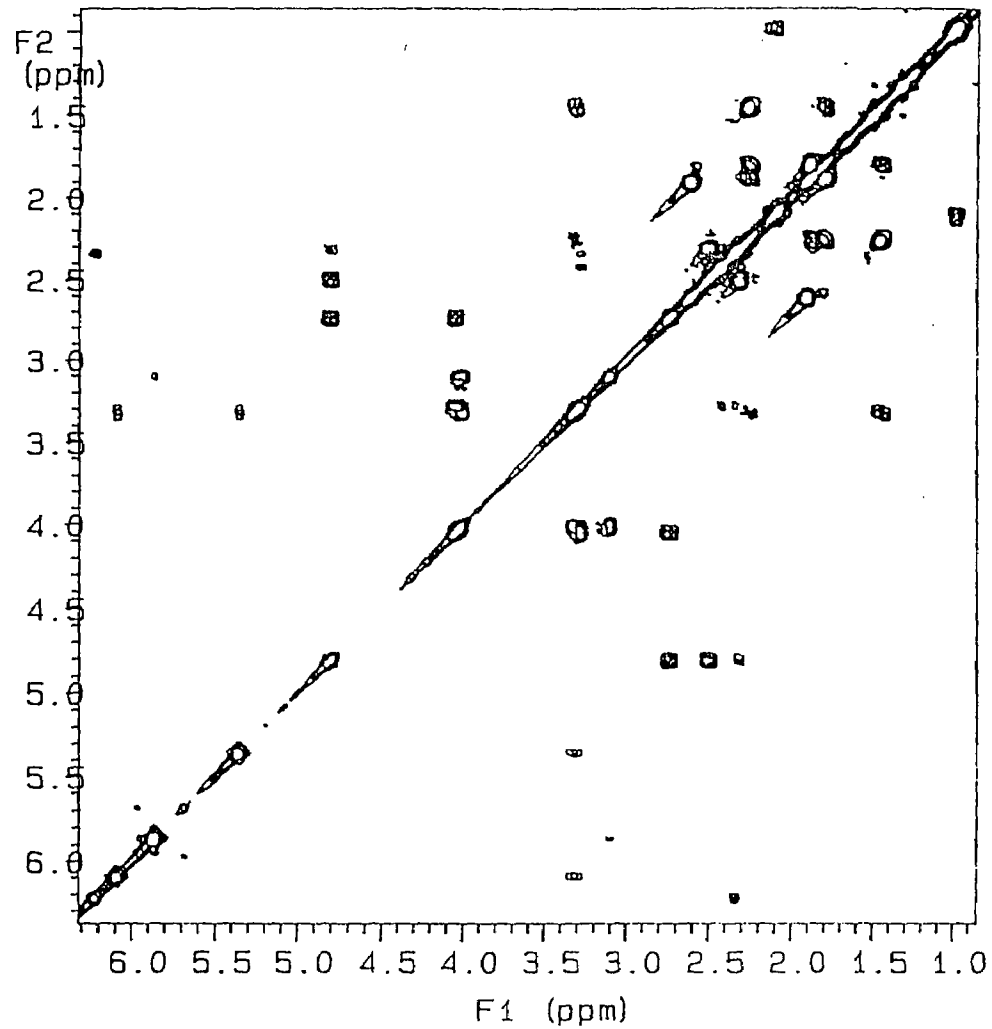
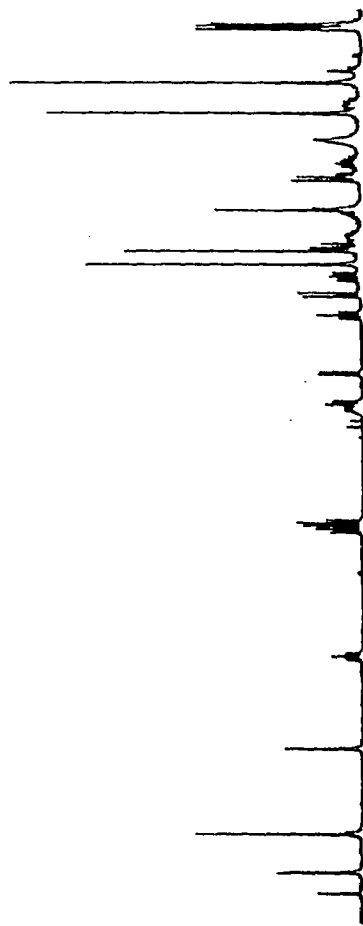
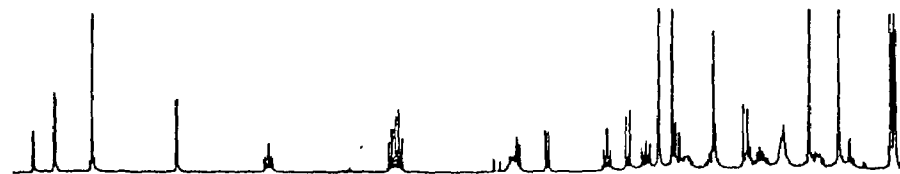
Arteminolide A



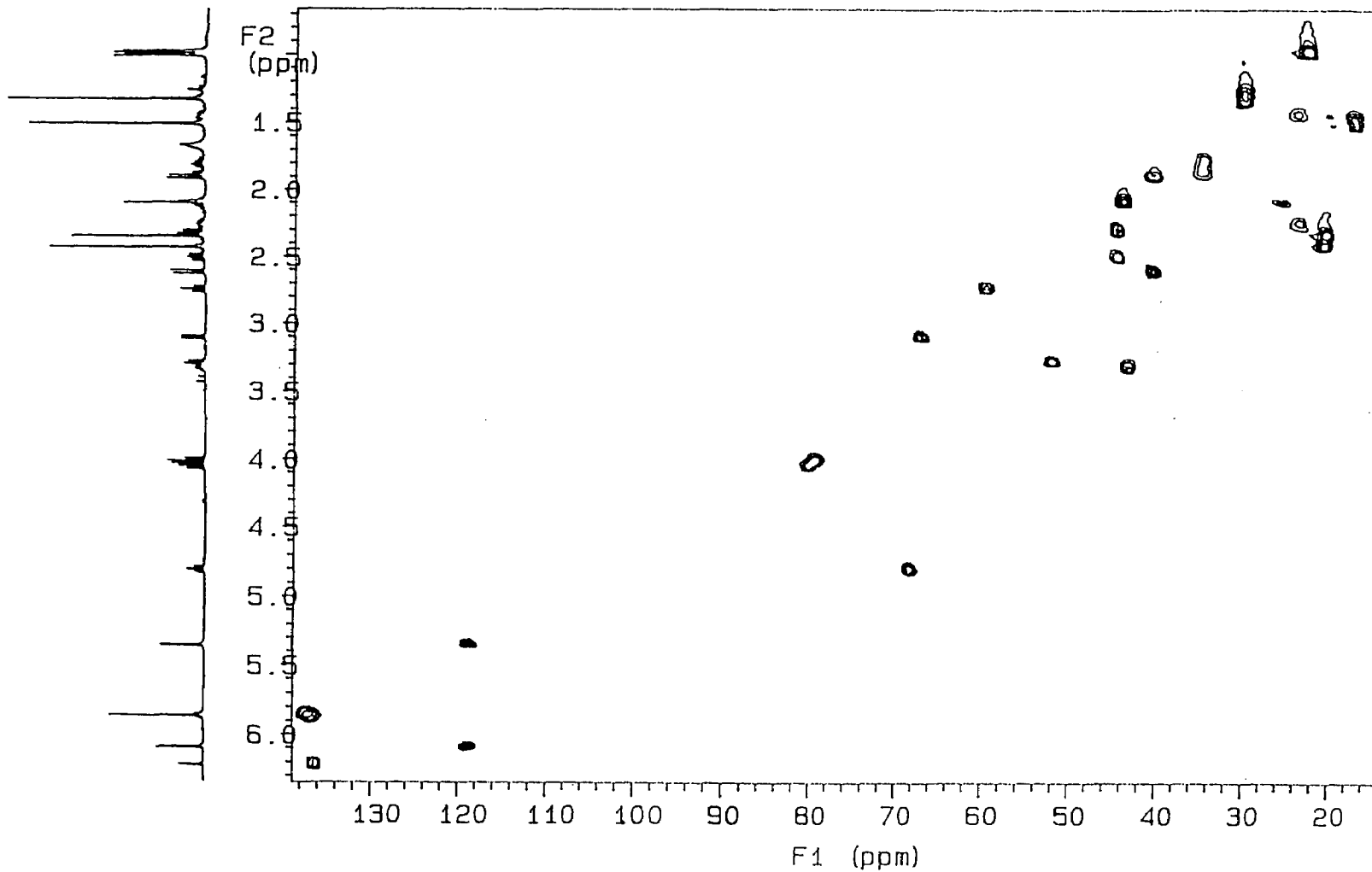
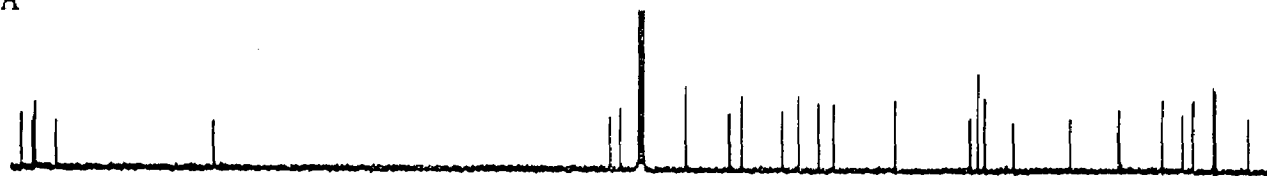
Arteminolide A



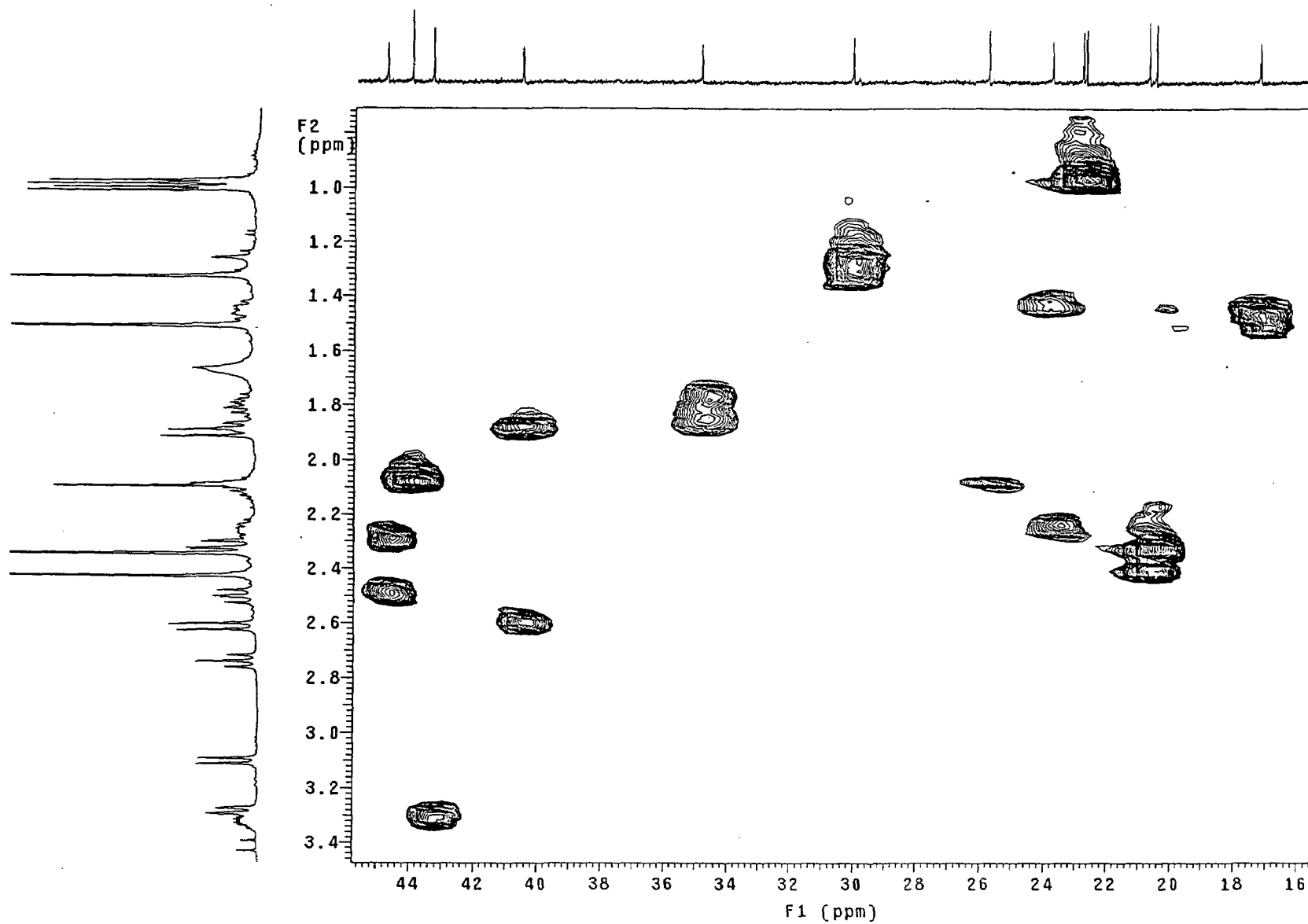
Arteminolide A



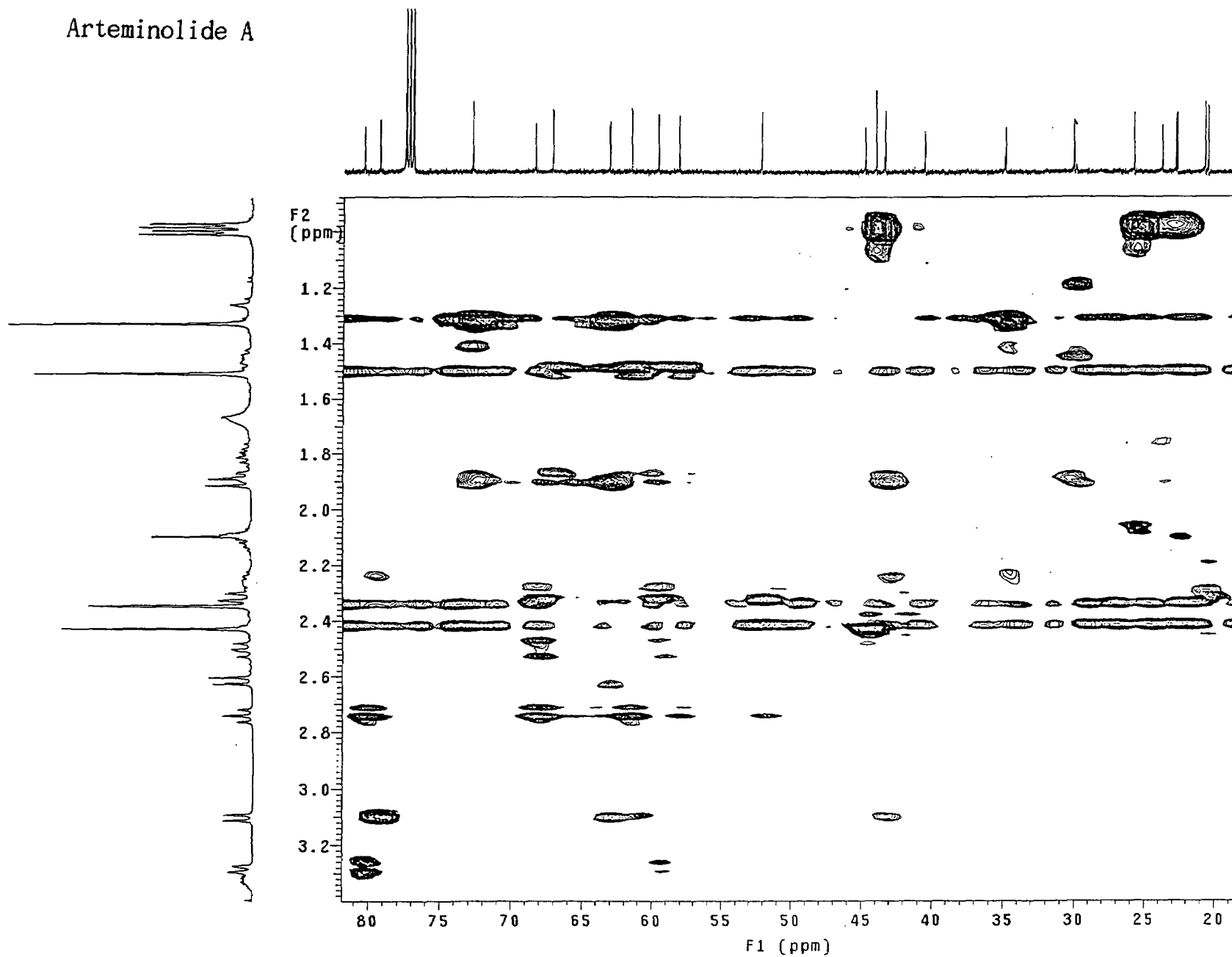
Arteminolide A



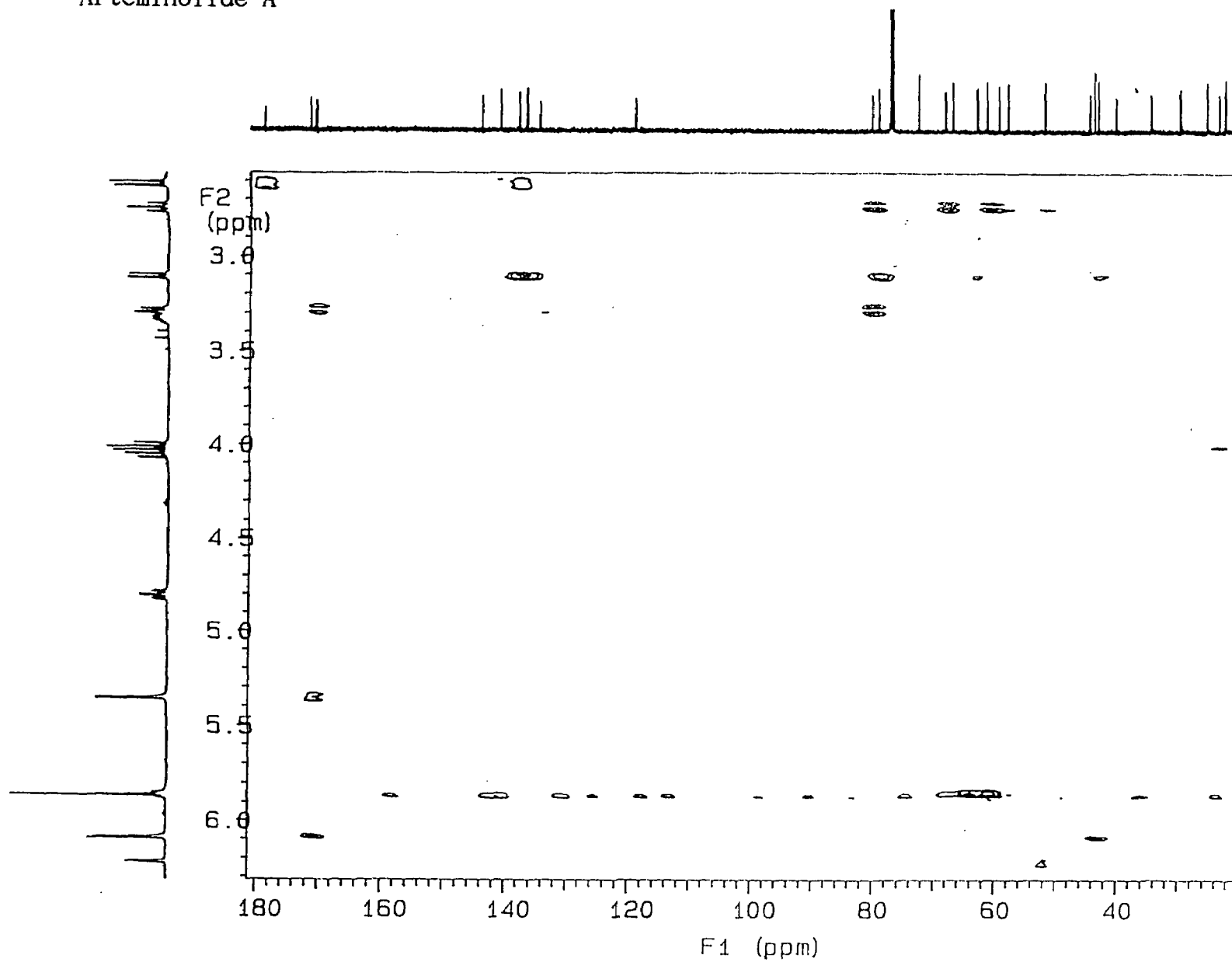
Arteminolide A



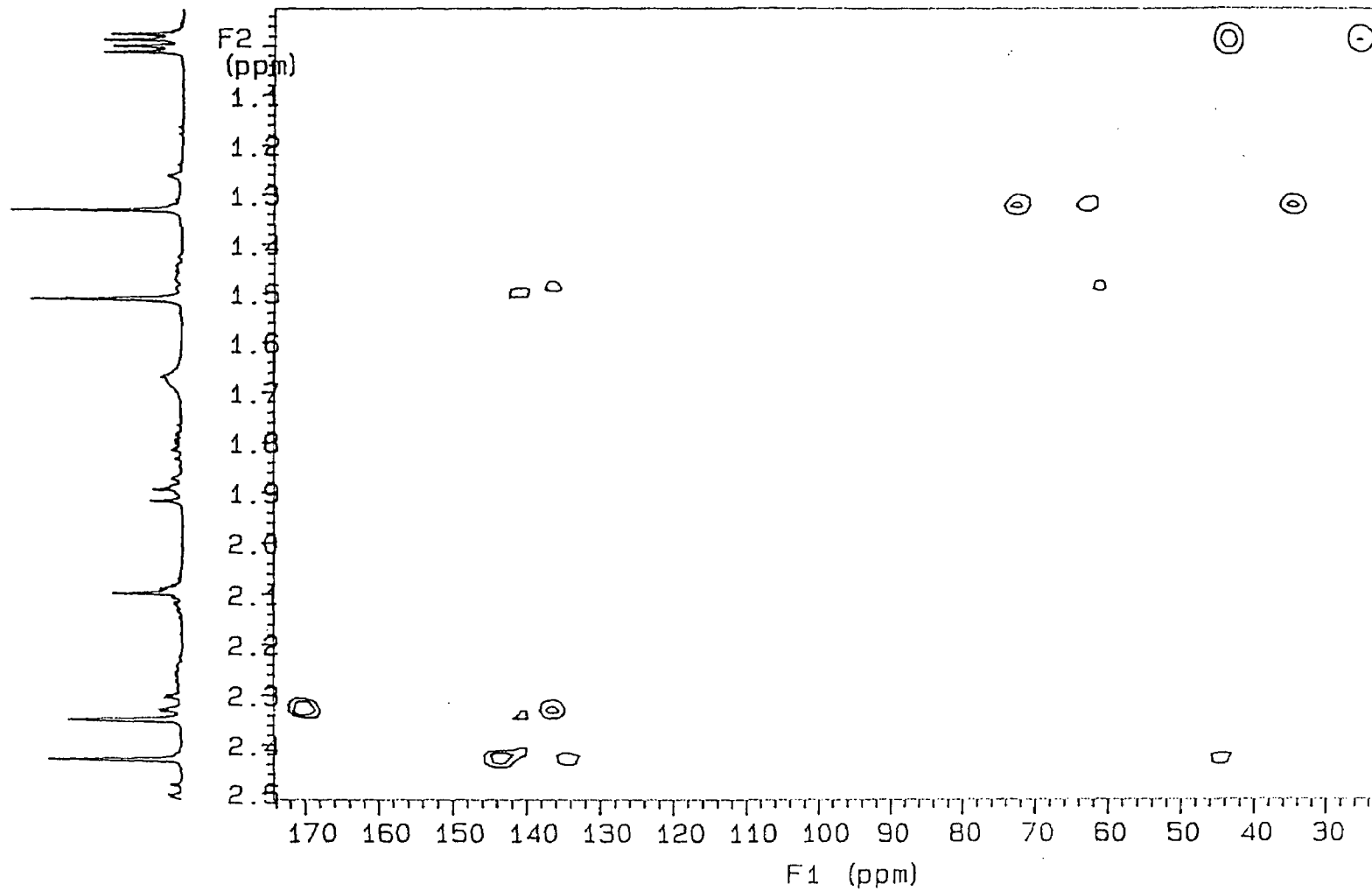
Arteminolide A



Arteminolide A



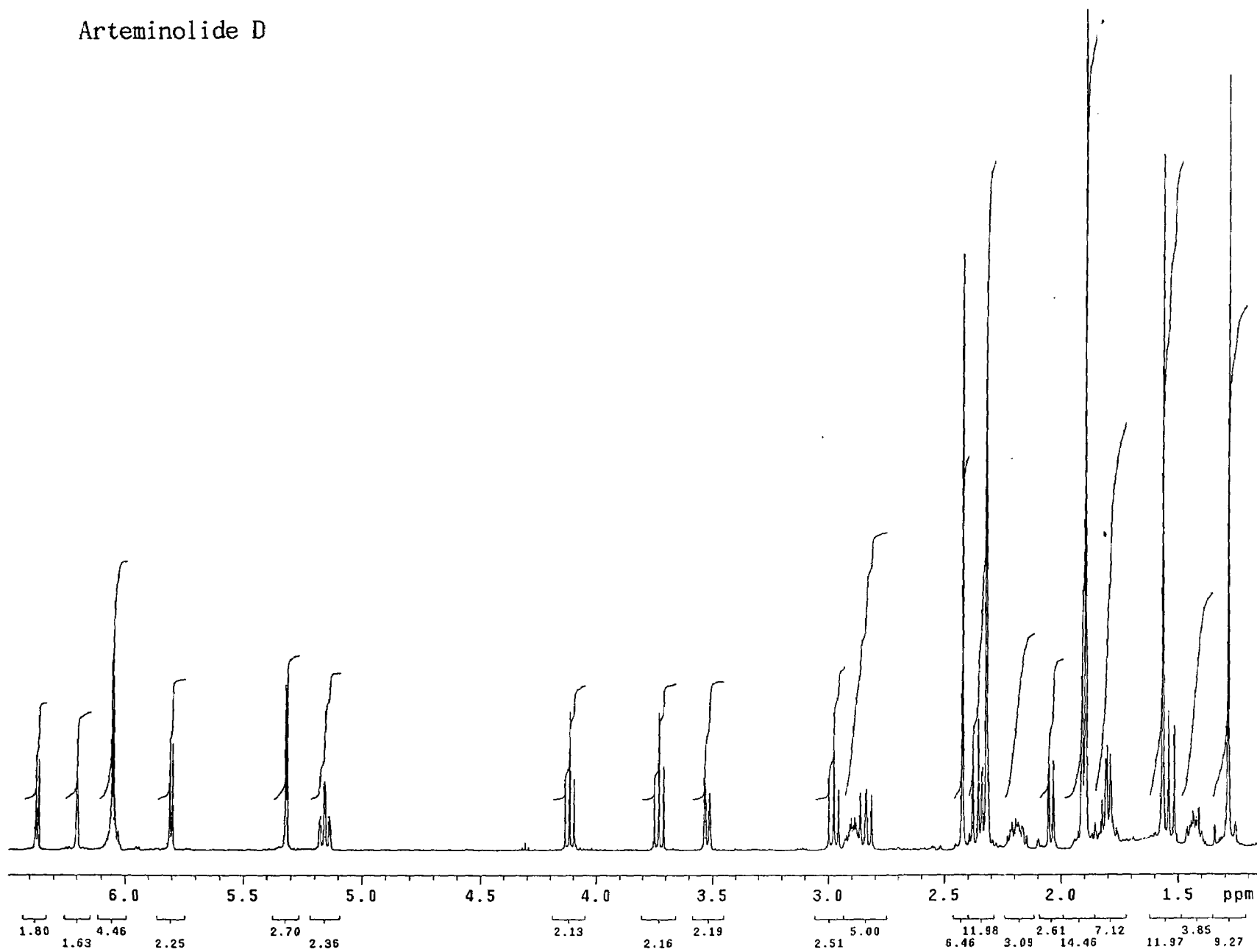
Arteminolide A



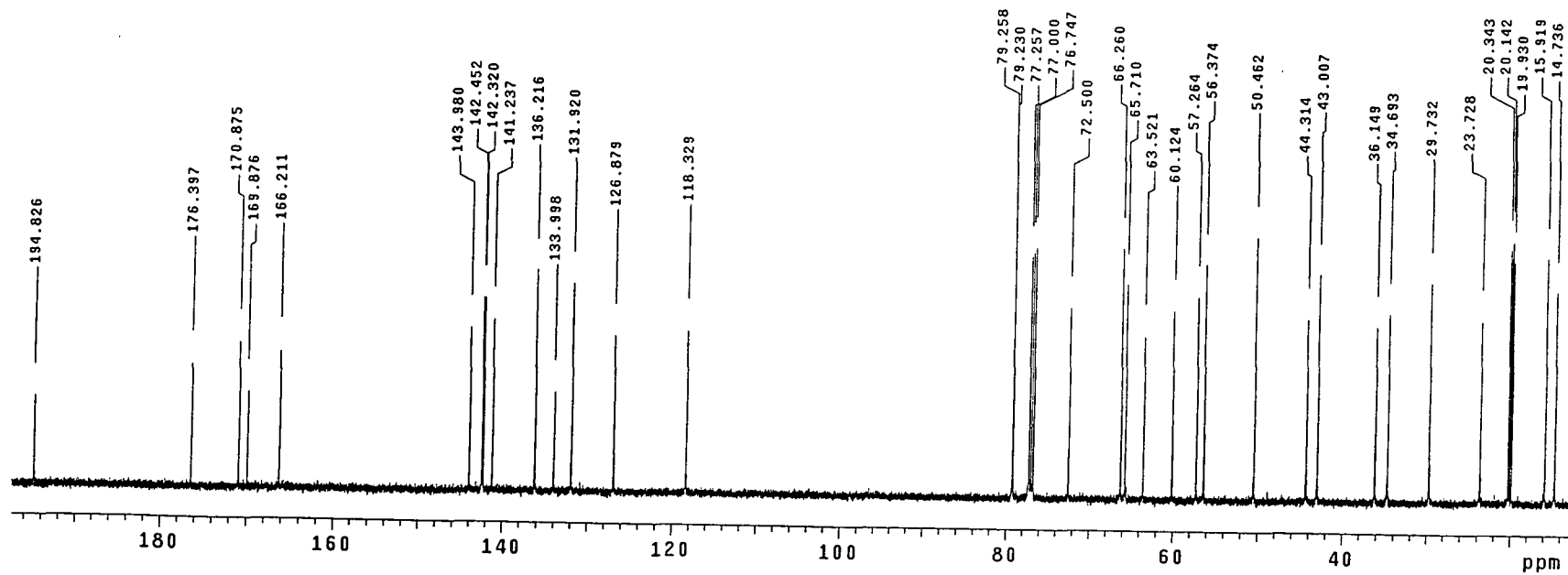
첨부자료 2. NMR Spectra of Arteminolide D

1. Proton NMR spectrum of Arteminolide D
2. Carbon spectrum of Arteminolide D
3. DEPT spectrum of Arteminolide D
4. COSY spectrum of Arteminolide D
5. HMQC spectrum of Arteminolide D
6. HMBC spectrum of Arteminolide D
7. HMBC spectrum of Arteminolide D
8. NOSEY spectrum of Arteminolide D

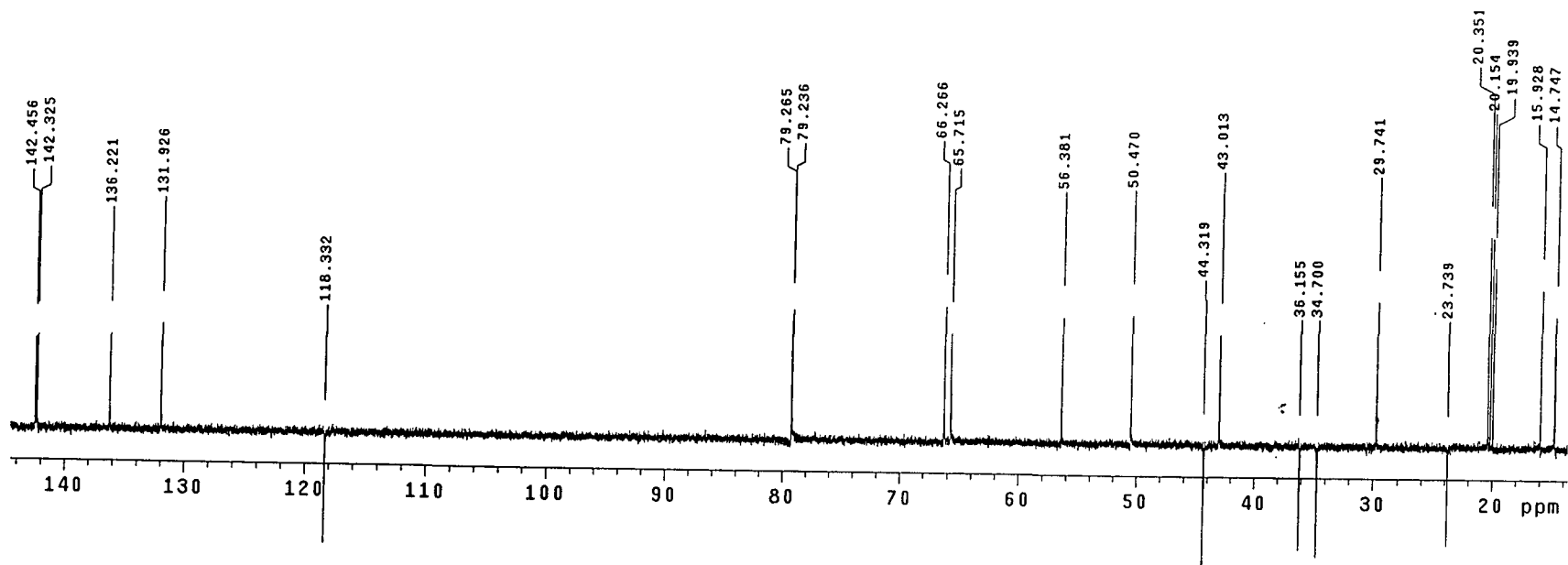
Arteminolide D



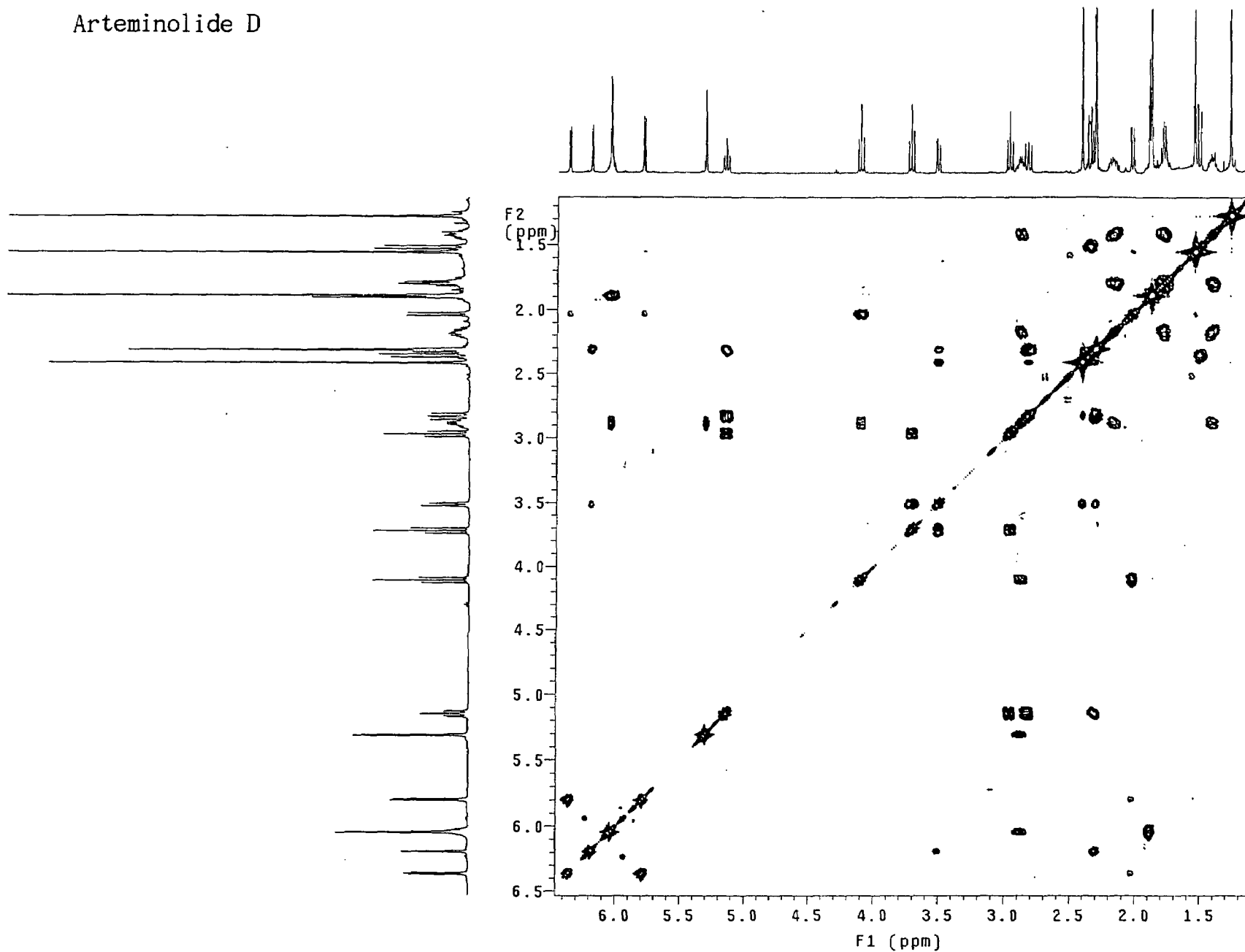
Arteminolide D



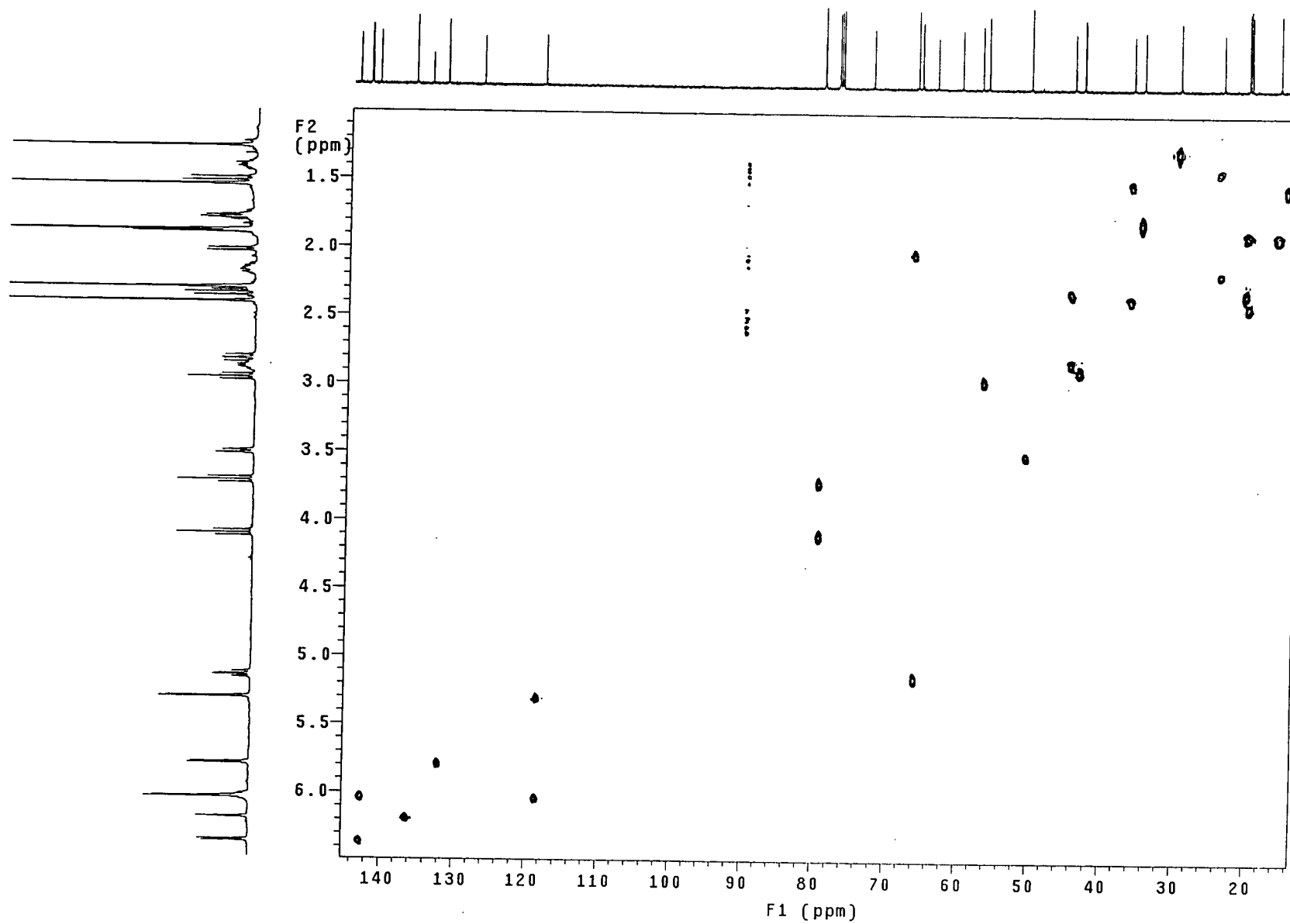
Arteminolide D



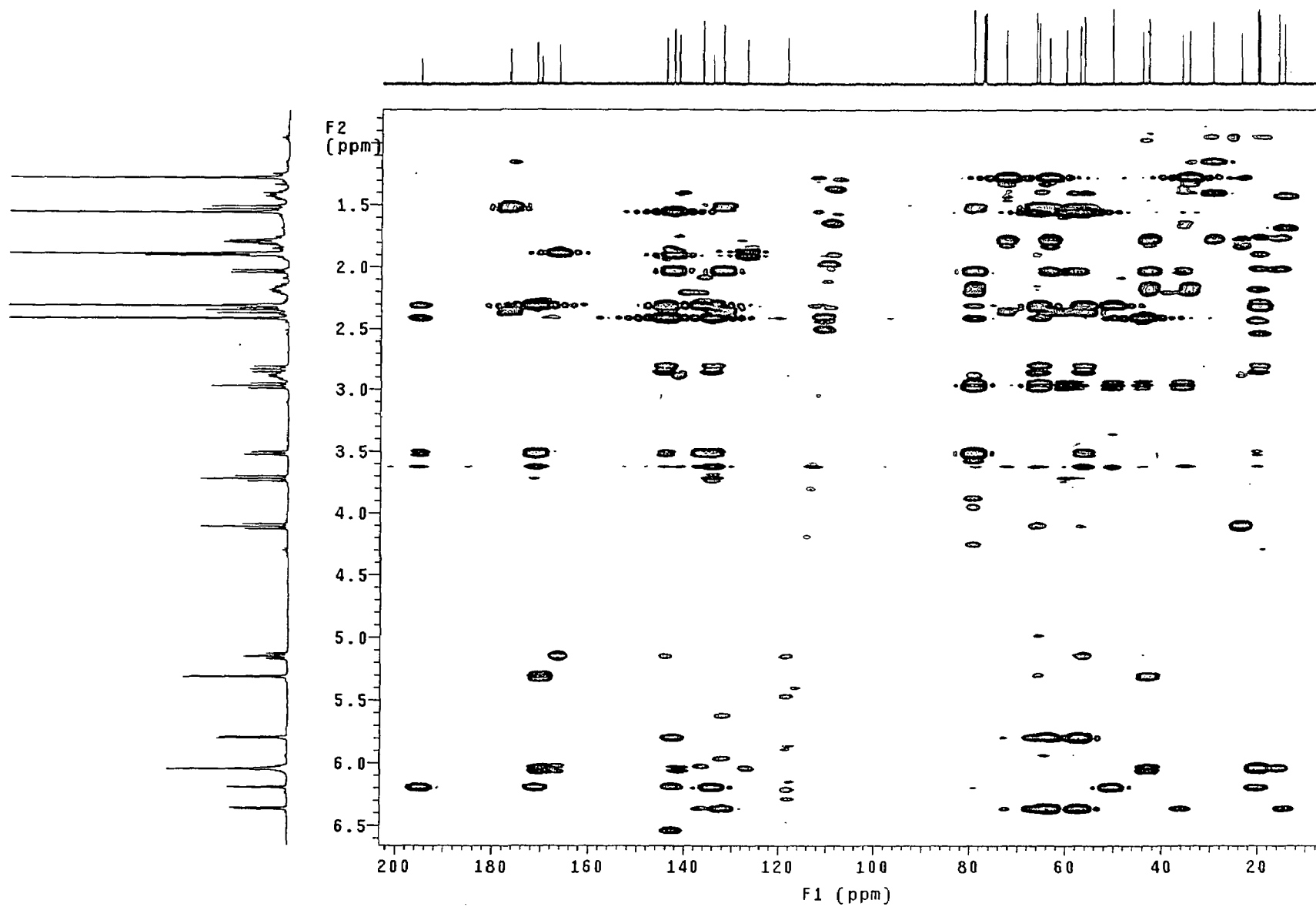
Arteminolide D



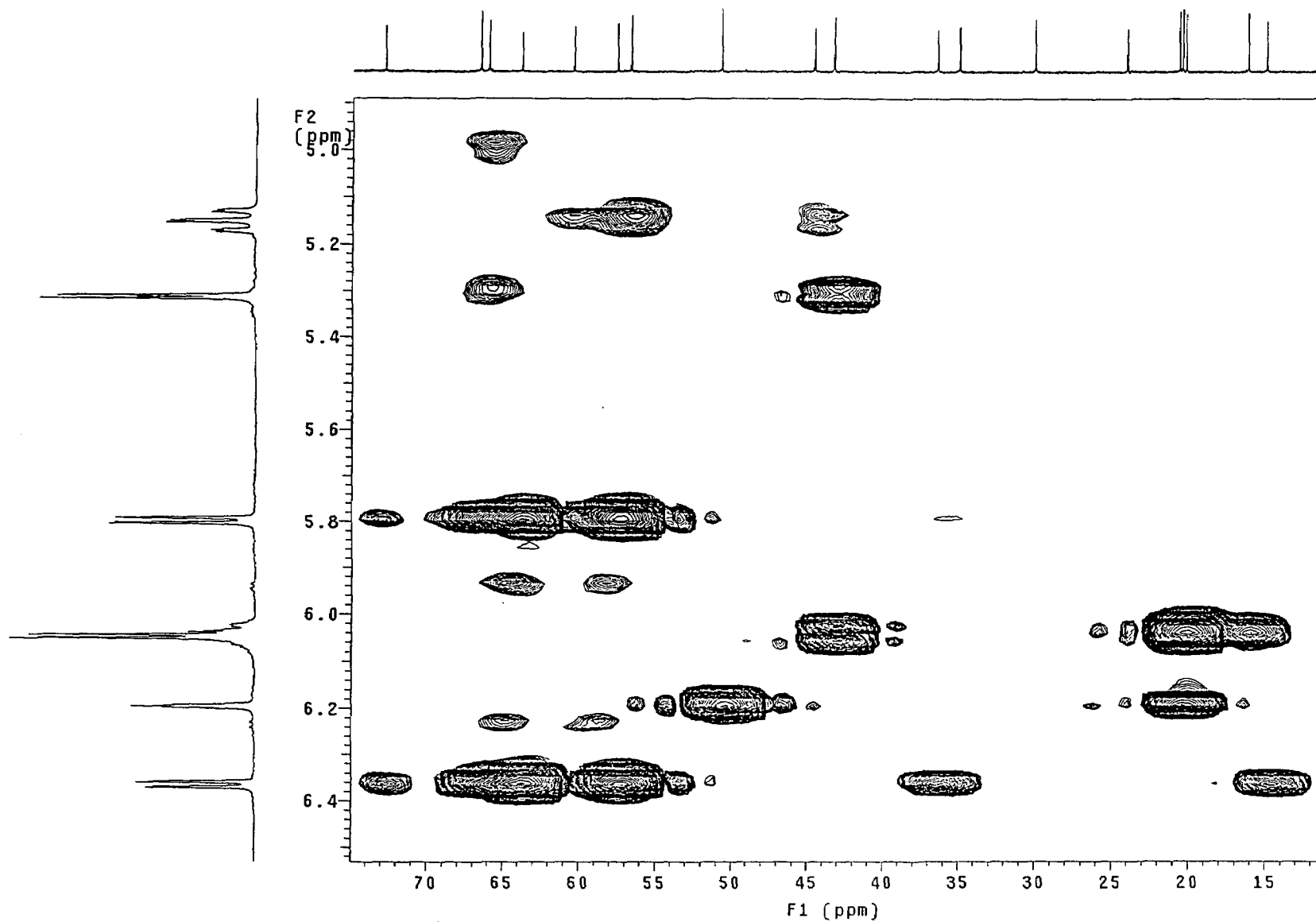
Arteminolide D



Arteminolide D



Arteminolide D



Arteminolide D

