

PF-06213-00

암 질환용 식품의약 및 천연물 의약품 개발

Development of Nutraceuticals and Biologically Active
Compounds for Cancer Therapy

한국생명공학연구원

교육과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “암 질환용 식품의약 및 천연물 의약품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010. 03.

주관연구기관명	: 한국생명공학연구원
주관연구책임자	: 권 병 목
연 구 원	: 김 환 목
”	: 한 동 초
”	: 이 수 경
”	: 김 진 아
”	: 유 정 아
”	: 이 창 우
”	: 신 대 섭
”	: 한 영 민
”	: 김 혜 난
”	: 이 유 진

보고서 초록

과제관리번호	PF06213-00	해당단계 연구기간	2006. 05. 01 - 2010. 03. 31	단계 구분	(3단계)/(총3단계)
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	자생식물이용기술개발사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	암 질환용 식품의약 및 천연물 의약품 개발			
연구책임자	권 병 목	해당단계 참여연구원수	총 : 16 명 내부 : 6 명 외부 : 10 명	해당단계 연구비	정부: 1,140,000 천원 기업: 150,000 천원 계: 1,290,000 천원
		한국생명공학연구원 분자 암 연구센터	참여기업명		
연구기관명 및 소속부서명	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
국제공동연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
위 탁 연 구					연구기관명 :
요약 (연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>- 본 연구과제는 천연항암제 개발을 위한 후보물질의 도출과 식품 등의 자원을 활용한 식품의약품을 개발하여 암 환자의 생명을 연장하고 삶의 질을 향상시키는 것을 목표로 한다. 연구결과를 전임상, 기전규명, 항암제 후보물질 순으로 정리하면 다음과 같다.</p> <p>① 계피유래 물질의 전임상 및 IND 신청</p> <p>- 계피유래 물질인 하이드록시시남알데하이드의 유도체 CB-Ph를 대상으로 전임상 관련 연구가 수행되었다. 생체 내에서의 활용성 검증에서 27%정도가 흡수됨을 확인하였고, 각종 장기에서의 CB-Ph의 분포도 확인하였다. 급성심장독성 등의 검증을 위하여 Herg test 등이 완료되어 독성에 문제가 없음을 확인하였다. Beagle dog을 이용한 4주 반복 독성 검증에서 NOAEL 값이 270mg/kg로 나왔으며, 부검 및 혈액 검사를 통하여 특이한 독성이 관찰되지 않았다. 상기의 독성 등의 결과에 근거하여 임상 1상 프로토콜이 작성되었고 IND를 신청한 상태이다.</p> <p>② 천연물 유래 물질의 기전 규명</p> <p>- CB-Ph 및 obovatol의 표적분자를 affinity method에 의해서 각각 규명하여 논문으로 출판하였다. 단삼에서 분리한 cryptotanshinone은 STAT3가 활성화 되어 있는 암 세포에 선택적으로 항암효과가 있고, computer modeling 연구를 통하여 cryptotanshinone은 STAT3의 SH-2 domain에 결합을 통하여 STAT3의 dimerization을 저해함을 확인하였다.</p> <p>③ 천연물 유래 항암제 후보물질</p> <p>- 3단계 연구를 통하여 CB-Ph, obovatol, obovatol-Rd, CB-Pic 등의 항암제 개발을 위한 후보물질을 확보하였다. 이들의 항암효과를 동물에서 검증하였고, rat에서의 단회 독성도 검증하였다.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	항암제, 암전이, 발암유전자, 생약, 식품의약			
	영 어	anti-tumor, metastasis, oncogene, herbal medicine, nutraceutical			

요 약 문

I. 제 목

암 질환용 식품의약 및 천연물 의약품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

암으로 인한 경제적 및 사회적 손실이 년 1조 3천억원을 넘어서고 있으며, 최근에 WHO는 전세계 발암률이 2020년에 50%가 증가할 가능성이 있다고 보고하고 있다. 그리고 "암에 대항하는 파리 헌장" 서명식: (*Reuters Medical News*, 2000년 2월 4일)에 정부 관리, 선도적인 연구자들, 그리고 환자 대변인들로 구성된 한 국제단체가 역사적인 사건을 위해서 모였다. 바로 "암에 대항하는 파리 헌장 (The Charter of Paris Against Cancer)"에 서명하는 일이다. 이것은 암에 대한 국제적인 관심을 고취시키는 선언이다. 서명자 중에는 프랑스의 자크 시라크 대통령, 미국 국립암 연구소장 Richard Klausner 박사 등이 포함되어 있다. 이와 같이 암 정책이 세계적인 관심을 일으키는 것은 암이 생명을 위협하는 가장 무서운 질병 중에 하나이기 때문이다. 통계자료를 보면 암은 국내뿐만 아니라 대부분의 나라에서 사망원인 1-2위이다.

발암 유전자의 활성 조절 및 암전이 억제 식품의약을 개발하여 수술이나 항암제 치료를 받은 환자의 이차 발병을 막아 암 환자의 생명을 연장하고, 삶의 질을 향상시키는 것을 연구목표로 한다.

ras 발암유전자는 (*ras oncogene*) 암 조직이나 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 이루어지고 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 변형과정은 세 단계로 구분되나 첫 단계인 파네실기가 카르복시 말단에서 4번째 위치의 시스테인에 도입되는 과정이 가장 중요한 과정으로 확인되었다. 90년 초부터 다국적 기업을 포함하는 전 세계의 많은 연구팀들이 이 효소의 저해를 통한 항암제 개발 연구를 활발하게 진행하고 있다. 몇 가지의 파네실 전달 효소의 저해제를 이용한 동물실험결과 선택적으로 암세포의 성장을 억제한다는 결과가 발표되었고, 2002년에 발표된 임상 제2상의 결과도 긍정적인 평가가 나왔다 (Jessen, Schering-Plough). 그러므로 이 효소의 억제물질을 함유한 천연자원을 찾아내면 새로운 기능의 생물소재 및 식품의약으로서 개발이 가능하다고 사료된다.

암 전이는 크게 림프성 전이와 혈액성 전이로 구분하고 있는데, 원발 부위에서 먼 장기로의 전이는 대부분 혈액성 전이로 일어난다고 알려져 있다. 혈액성 전이가 일어나기 위해서는 여러 과정이 필요하다. 이중에 대표적인 것이 특정기관 내의 혈관내피세포나 혈소판과의 접착 (cell adhesion), 주변조직으로의 침윤 (invasion), 신생혈관의 생성 유도 (angiogenesis) 등이다. 암 전이에는 매우 다양한 요소들이 관여한다.

이 요소들은 모두가 암전이 억제 신약개발의 표적으로서 많은 연구자들에 의해서 연구가 진행되고 있으며, 몇 가지의 화합물을 대상으로 한 임상시험이 진행되고 있다 (*J. Nat. Cancer Inst.* **1998**, 90, 962).

다양한 표적 단백질 중에서 본 연구팀은 전이성 암에서 과발현되는 것으로 알려진 PRL-3를 표적으로 활성 자원을 탐색하였다. Johns Hopkins Medical Institution의 K. Kinszler와 B. Vogelstein 팀이 2001년 Science에 발표한 전이 관련 유전자에 대한 연구결과는 암 전이에 관심 있는 연구자들에게 매우 고무적인 것이었다. 이들 연구팀은 PRL-3라고 불리는 protein-tyrosine phosphatase (PTPase)가 간(liver)으로 전이된 대장암 세포 내에서 과발현 되었음을 SAGE (serial analysis of gene expression)과 real time PCR을 통해 밝혀냈다. 상대적으로 비전이성 대장종양과 정상 상피조직에서는 그 발현이 극히 적었음을 규명하여 PRL-3 유전자가 전이에 직접 관련이 있음을 확인하였다. 이는 암전이 억제의 좋은 목표점을 제공한 것으로 전이치료제의 개발뿐 아니라 암환자의 상태를 추정하는 직접적이고 효과적인 임상적 지표를 제시하는 것이다.

암전이의 여러 과정에서 필수적인 단계는 암세포에 의한 주위의 건강한 조직이나 기관의 파괴이며, 이 단계에 관여하는 많은 matrix metalloproteinase (MMP) 중에서 본 연구팀은 MMP-2를 표적 단백질로 선택하였다. 이 단백질은 비전이성 암세포보다 전이가 활발한 암세포에서 높게 발현되고 있으며 특히 효소 활성이 높다는 연구결과가 발표되어 있다 (*Cancer Res.* 1988, 48, 5539). 또한 이 효소의 활성을 저해하는 물질이 암전이를 억제한다는 것이 동물모델에서 증명되었다. 앞에서 언급한 각 암세포 성장 및 전이 억제 개발을 위한 target molecule (Ras, heparanase, MMP-2)들은 상호 밀접한 관계를 가지고 암 세포의 성장 및 전이에 관련되어 있으므로 이들의 활성을 조절하는 식품의약의 개발이 필요하다고 생각한다.

세계 식물 및 식물 추출 약물 시장은 향후 5년 간 두 자릿수 성장이 예상된다. 리서치업체인 BCC 리서치사가 최근 발표한 새로운 보고서에 따르면 세계 식물 및 식물 추출 약물 시장은 2008년 195억 달러에서 2013년 329억 달러로 연간 11.0% 성장할 전망이다. 2004년 미국 FDA가 식물 약물의 신약 승인 규정을 만들었으며, 2006년 이 가이드라인에 따라 최초의 천연물 신약을 허가했다 On October 31, 2006, the US Food and Drug Administration (FDA) approved the new drug application (NDA) for marketing of Veregen (extract of green tea leaves), a topical treatment for perianal and genital condyloma. (*Nature biotechnology*, 26, 1077, 2008).

계피유래 물질에서 분리한 물질의 유도체인 CB-Ph는 항암활성이 검증되었고 독성에 문제가 없어 임상 시험을 통하여 항암효과를 검증할 필요가 있다. 이를 위해서 IND 신청에 필요한 GLP 시설에서의 독성 및 독성 동태 등의 전임상 연구가 필요하다. 오보바톨은 일 후박에서 분리한 화합물로 다양한 생리활성을 가지고 있어서 이에 대한 검증 및 기전 규명 연구가 필요하다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

발암유전자의 활성 조절: 인체 암의 30-50%에서 발견되어지는 ras 발

암유전자를 표적으로 하며, Ras 단백질의 활성화에 관여하는 farnesyl transferase를 저해하는 물질로 발굴된 CB-Ph의 기전과 H-ras transgenic mouse와 같은 모델 동물에서의 활성을 검증한다.

암전이 억제: 암 세포의 접착, 침윤 및 신생혈관 형성에 관여하는 PRL-3를 표적으로 하여 확보한 물질의 활성을 세포 수준에서 검증한다.

1-2단계 연구를 통하여 확보한 항암제 후보물질 CB-Ph를 대상으로 전 임상 연구를 수행하여 임상 1상 진입을 위하여 IND 신청서를 식약청에 제출한다.

IV. 연구개발결과

- 기전 규명: 계피 유래물질인 CB-Ph, CB-OH의 항암활성이 미토콘드리아의 cytochrome c의 방출과 Bax 단백질의 기능을 조절하여 세포사멸을 유도함을 확인하였다. 일 후박에서 분리한 오보바톨의 암전이 억제 및 신경 세포에서의 염증 기전을 규명하였다.

- CB-Ph 전임상 결과: 경구로 CB-Ph를 rat, mouse, beagle dog에 투여한 후 약물의 흡수 등을 LC/Ms로 분석하여 생체 흡수가 27% 정도 됨을 확인하였다. 약물 CB-Ph를 esterase에 의해서 CB-OH로 분해되고 oxidase에 의해서 CB-COOH로 변화됨을 확인하였다. 전구물질 CB-OH와 CB-Ph를 대상으로 Herg 및 cytochrome p450 저해활성 검증하여 50% 효소 활성의 저해가 50 μ M 이상임을 확인하였다. CB-Ph는 carboxylesterases (CES)에 의해서 매우 빠르게 CB-OH로 가수 분해됨을 확인하였다. 그리고 CB-Ph는 aldehyde oxidase (AO)에 의해서 Caco-2 cell에서 o-coumaric acid (OCA)로 빠르게 산화됨을 확인하였다. 그러나 알데하이드를 산화 시킨다고 알려져 있는 xanthine oxidase (XO)나 aldehyde dehydrogenase (ALDH)는 관여하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

암수 비글견을 이용하여 시험물질인 CB-Ph를 0(대조군), 30, 90 및 270 mg/kg의 용량으로 캡슐에 충전하여 4주간 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 2주간의 회복 군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하며, 독성동태시험을 통해 약물의 전신 노출률을 모니터

터링하기 위하여 실시하였다. 4주간 반복 경구투여 시 30 및 90 mg/kg의 용량에서는 시험물질에 의한 영향이 관찰되지 않았고, 270 mg/kg의 용량에서는 구토, 설사 및 점액 변 등 증상이 관찰되었으나, 임상병리 및 조직병리학적 변화가 관찰되지 않았고, 본 시험물질이 항암제인 점을 감안하여 암수 beagle dog에 대한 무독성량 (NOAEL)은 270 mg/kg인 것으로 판단된다. 또한, 시험물질의 전신 노출량은 용량 의존적으로 증가하는 경향을 나타내고, 암수 간의 차이 및 축적현상은 관찰되지 않았다. Rat에 복강 투여로 LD₅₀ 값이 763 mg/kg 임을 확인하였다.

2'-Benzoyloxycinnamaldehyde (CB-Ph)를 이용한 천연물 유래 항암제 개발을 위하여 향후 임상 시험을 4주 경구투여 방법으로 수행할 예정이며, 이를 기준으로 전임상 시험이 완료되었다. 전임상 연구를 바탕으로 IND를 신청하였고 향후 국립암센터와 아산병원 임상 약리팀과 공동으로 임상 1상을 수행하고자 한다.

- 동물실험: H-ras, K-ras transgenic mouse를 활용하여 CB-Ph, CB-OH의 암 예방 효과를 검증하였다. H-ras transgenic mouse 실험에서 CB-Ph는 암 조직의 생성을 억제하는 효과와 암 조직의 성장을 억제하는 효과를 관찰할 수 있었다. 그러나 K-ras transgenic mouse에서는 CB-Ph가 암 조직의 형성 및 성장을 억제 효과를 보여줄을 확인하였으나 개체 간의 차이가 매우 커서 신뢰성 있는 효과를 확인할 수 없었다. 일 후박 유래 물질들과 CB-Pic 등의 항암효과를 검증한 결과 신뢰할 수 있는 효과를 확인하였다.

- 생리활성물질: 단삼과 세쿼야 열매로부터 STAT3 저해제 분리하여 기전 등을 규명하였다. 지치와 후박으로부터 PRL-3를 저해하여 세포의 이동을 막는 활성물질을 분리하였다. 주목으로부터 특이적으로 G2 arrest를 유도하는 물질을 분리하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

2'-Benzoyloxycinnamaldehyde (CB-Ph)를 이용한 천연물 유래 항암제 개발을 위하여 임상 시험을 수행하여 긍정적인 결과를 얻으면 제품화를

위한 연구를 기업 주도로 수행하게 될 것이다. 이와 병행하여 물에 대한 용해도 등이 개선된 물질 또는 조성물을 대상으로 전임상 및 임상 연구가 수행될 예정이다.

3단계 연구를 통하여 얻은 후보물질 중 CB-Ph와 CB-Pic 등은 근화제 약과 협력하여 제품화를 위한 후속 연구가 수행될 예정이다. Obovatol, obovatol-Rd 등은 국가 과제 등을 통하여 후속연구를 수행하여 정확한 항암 및 항염증 관련 기전을 규명하고 기업에 기술을 이전하여 제품화될 수 있도록 최선의 노력을 경주할 것이다. 일 후박 열매추출물을 천연물신약으로 개발하기 위해서는 추가적인 동물실험이 선행되어야 하므로 이에 대한 후속 연구과제를 준비하고자 한다.

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.

Tumor growth inhibition activity of derivatives of CB-OH, isolated from cinnamon bark, 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. We assessed in vivo the chemo-preventive effect CB-Ph on H-ras12V-induced hepatocellular carcinoma formation. A mouse model of hepatocellular carcinoma was established by using the transgene of mutated H-ras12V under the regulation of albumin enhancer/promoter. When treated with cinnamaldehyde for 10 weeks, hepatic tumor development was delayed with 2'-benzoyloxycinnamaldehyde (CB-Ph) compared with control hepatocellular carcinoma formation. The number of lesions and the size of each lesion were significantly reduced by CB-Ph. Cell proliferation in the lesion was detected by incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). CB-Ph increased the number of splenocytes, concanavalin A-stimulated splenocyte proliferation and the infiltration of lymphocytes into liver. Data suggest that the delayed hepatic tumor development observed with BCA could be mediated by a long-term immunostimulating effect on T cells.

CB-Ph significantly blocks tumor growth in a nude mouse assay without body weight loss, demonstrating as a good drug candidate for cancer therapy.

However, the precise mechanism including the direct upstream proteins is not yet fully understood. Searching for proteins with high affinity to CB-Ph is very important to understand the molecular and biochemical mechanisms of their antiproliferative activities. To identify a novel molecular target leculaPh, we tried a pull-down assay by biotin-labeled HCA (biotin-HCA) in SW620 cells. We analyzed 11 differential spots of 2-dimensional gel prepared with pull-downed proteins by biotin-HCA. Among them,ongve spots were identified as proteaname subunits. An in vitro 26S proteaname function assay using specific fluorogenic substrates showed that HCA roteanyzed 11 dis L3-likes. To identifthe proteaname. In addition, HCA showed d 11 diory action against shymotrypsin-like, trypsin-like, and PGPH-likes. To idies. DN shicroarray showed that HCA . To identat shock fahily and ERied oge- ogponsgve likes, which reflects thes . cum that HCA .misfolded proteins by proteaname activitie. On western blot analysistarded prconfirmed that HCA . To is llo ose-wed thaed proteinta78akDa (GRP78) and name repr spnidiCA rondopthshic reticulom (ER)ied oge- ogponsgve proteins. Furthermore, HCA ed ogment decreased mdiochondrial memalane roteanamethaed effect of HCA HCcytochrame c and Bax PGPH-lochat HCbetectHC cytosnfiand mdiochondrial memalane d preclarified using western blot analysis. These results suggest that HCA-induced apoptosis is associated with the inhibition of the proteasome activity that leads in turn to the increase of ER stress and mitochondrial perturbation.

Metastasis represents the phase of tumorigenesis that is responsible for the great majority of cancer deaths. Recently it was reported that high expression of phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) may be one of the key alterations contributing to the metastasis of the transformed cells. Isolated PRL-3 inhibitors from plant extracts wer tested the activity in PRL-3 over expressed cell and we found that monomethyl magnolol is one of good PRL-3 inhibitor.

The pharmacokinetics and metabolism of 2'-benzoyloxycinnamaldehyde (CB-Ph) was characterized in male Sprague-Dawley rats as part of the preclinical evaluations for developing this compound as an antitumour agent. CB-Ph was not detected in the plasma following either intravenous or oral dose, whereas its

putative metabolites 2'-hydroxycinnamaldehyde (HCA) and o-coumaric acid were present at considerable levels. In separate pharmacokinetics studies, HCA exhibited a high systemic clearance and a large volume of distribution, whereas both pharmacokinetic parameters were much lower for o-coumaric acid. The terminal half-life of both metabolites was approximately 2 h. CB-Ph was converted rapidly to HCA in rat serum, liver microsomes and cytosol in vitro; HCA was subsequently converted to o-coumaric acid in a quantitative manner only in the liver cytosol. In addition, the formation of o-coumaric acid was inhibited significantly by menadione, a specific inhibitor for aldehyde oxidase. Taken collectively, the results suggest that the rapid systemic clearance of HCA is likely due mainly to hepatic clearance occurring from aldehyde oxidase-catalysed biotransformation to o-coumaric acid.

The transport and metabolism of the antitumour drug candidate 2'-benzoyloxycinnamaldehyde (CB-Ph) was characterized in Caco-2 cells. CB-Ph disappeared rapidly from the donor side without being transported to the receiver side during its absorptive transport across Caco-2 cells. Its metabolites 2'-hydroxycinnamaldehyde (HCA) and o-coumaric acid (OCA) were formed in both the donor and the receiver sides. HCA, in a separate study, also disappeared rapidly from the donor side, mostly being converted to its oxidative metabolite OCA during its absorptive transport across Caco-2 cells. OCA was transported rapidly in the absorptive direction across Caco-2 cells with a $P(\text{app})$ of $25.4 \pm 1.0 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ (mean \pm standard deviation (SD), $n = 3$). OCA was fully recovered from both the donor and the receiver side throughout the time-course of this study. Formation of HCA from CB-Ph was inhibited almost completely by bis(p-nitrophenyl)phosphate (BNPP), a selective inhibitor of carboxylesterases (CES), and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), a broad specificity inhibitor of esterases in Caco-2 cells, suggesting that this hydrolytic biotransformation was likely mediated predominantly by CES. Conversion of HCA to OCA was inhibited significantly by isovanillin, a selective inhibitor of aldehyde oxidase (AO). Inhibitors for xanthine oxidase (XO) and aldehyde dehydrogenase (ALDH), which are known to be involved in the oxidation of aldehydes to carboxylic acids, did not have a significant effect on the

biotransformation of HCA to OCA in Caco-2 cells.

General toxicity studies on CB-Ph were conducted using male and female rats and beagle dogs. In the acute test, the ip LD50 values were 763 mg/kg in rats. In the chronic test, beagle dogs were fed CB-Ph via oral at levels of 0, 30, 90, 270 mg/kg BW/day for 4 weeks. No remarkable changes in the hematological parameters were observed. From the result of the chronic toxicity test, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for CB-Ph was concluded to be 270 mg/kg in beagle dog.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	16
Chapter 2. State of the Art Report	29
Chapter 3. Contents and Results of Research	51
Chapter 4. Accomplishment and Contribution	290
Chapter 5. Future Applications	293
Chapter 6. Collected Information	294
Chapter 7. References	298

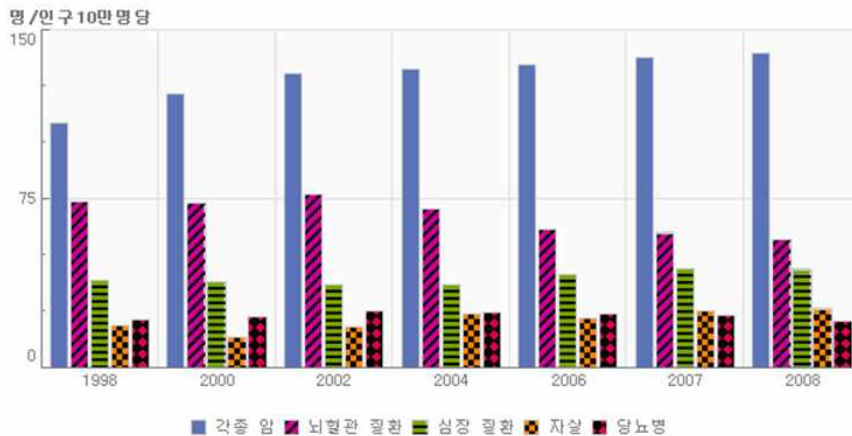
목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	16
제 1 절 천연물 신약개발	
제 2 절 STAT3 저해제 개발	
제 3 절 PRL-3 및 세포주기 저해제 개발	
제 4 절 유전체 수준에서의 기전 규명	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	29
제 1 절 천연물 신약	
제 2 절 STAT3 저해제	
제 3 절 PRL-3 및 세포주기 저해제	
제 4 절 오믹스 기술을 이용한 기전 규명	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	51
제 1 절 CB-Ph의 약물대사 및 약동력학	
제 2 절 CB-Ph의 독성 및 독성 동태	
제 3 절 STAT3 저해제	
제 4 절 PRL-3 활성 저해 물질	
제 5 절 세포주기 조절 물질	
제 6 절 CB-Ph 항암활성 기전 규명	
제 7 절 CB-Pic 항암활성과 CB-Ph의 암 예방 활성	
제 8 절 CB-Ph의 전임상 자료 및 임상 계획	
제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	290
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	293
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	294
제 7장 참고문헌	298

제 1 장 연구개발과제의 개요

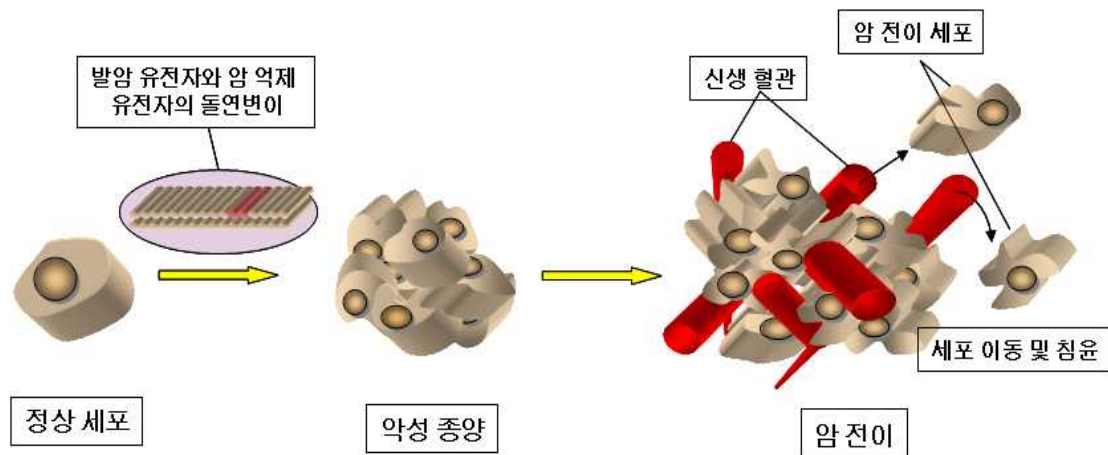
통계청이 발표한 2008년 자료에 따르면 1998년부터 2008년까지 우리나라 주요 사망원인별 사망률의 변화를 보면 부동의 1위가 각종 암으로 나타나고 있다. 한국인의 10대 사망원인 순위는 악성신생물(암), 뇌혈관 질환, 심장 질환, 고의적 자해(자살), 당뇨병, 만성하기도 질환, 운수사고, 간 질환, 폐렴, 고혈압성 질환으로 총 사망자의 70.4%를 차지한다. 전년대비 암, 폐렴, 자살사망률은 증가, 뇌혈관 질환과 당뇨병사망률은 감소 그리고 최근 10년간 주요 사망원인별 사망률 추이를 보면 1998년 대비 암, 자살, 폐렴사망률은 증가, 뇌혈관 질환과 운수사고 사망률은 감소 특히 암 사망률은 30.9명(28.4%) 증가하였다. 이는 진단기술의 발달, 평균수명의 연장, 환경변화 등이 복합적으로 작용하여 기인한 결과이며 현대화, 산업화, 문명화가 진행될수록 발생률이 높아질 수밖에 없는 것이 현실이다.

최근 주요 사망원인별 사망률 변화



사망원인	사망자 (명)	조사망률 (10만명당)
폐암	10,154	(41.6)
간암	8,253	(33.8)
위암	7,183	(29.4)
대장암	3,293	(13.5)
췌장암	1,872	(7.7)
담낭암	1,699	(7.0)
식도암	1,319	(5.4)
전립선암	909	(3.7)
백혈병	797	(3.3)
비호지킨림프종	743	(3.0)

이렇게 우리나라의 사망원인 1순위인 암은 발암 유전자와 암 억제 유전자의 돌연변이 등에 의해 정상세포가 비정상적으로 성장함으로써 생기는 질환이다. 발생한 암은 인접 정상조직을 파괴하고 기계적, 내분비적 또는 화학적으로 장애를 일으키며, 원발 부위에서 다른 부위로 전이해서 증식하는 능력을 가지고 있어 위험성이 매우 큰 질환 군이다.



암을 유발하는 원인은 크게 선천적인 원인과 후천적인 원인으로 구분할 수 있다. 선천적인 것은 유전자의 이상에 기인하며, 대표적인 발암유전자가 바로 만성 골수성 백혈병을 일으키는 필라델피아 유전자이다. 사람의 염색체는 22쌍의 상염색체와 1쌍의 성염색체로 구성되어 있는데 이 중 9번 염색체의 긴 팔과 22번 염색체의 긴 팔의 일부가 각각 교체되어 비정상적으로 그 발현이 증폭되어 암이 발생하게 된다. 이와는 반대로 암 억제 유전자의 결함으로 생기는 선천적인 질환도 있다. 망막 아세포종은 암 억제 유전자 Rb-1의 이상으로 13번 염색체의 q14 밴드에 결함이 발견되는 악성종양이다. 이처럼 발암 과정은 전구발암유전자(proto-oncogene)들의 활성화, 암 억제 유전자들의 소실, 성장인자에 관련되어 있는 여러 가지 유전자들의 제어되지 않는 활성화 등과 같은 많은 다단계적 과정으로 알려져 있다. 전구발암 유전자의 활성화는 유전자의 증폭, 대립유전자의 소실, 전위, 점 돌연변이, 유전자의 재배열 등 여러 가지 기전들에 의하여 유발될 수 있다고 하며 현재까지 50여 종류 이상의 암 유전자들이 확인되었다.

암은 대부분 세포성장의 조절결함이 있는 경우로 정의 되고 있다. 이러한 결함들은 정상적으로 세포성장을 자극하거나 억제하는 유전자 생산물의 기능이나 유전

자들의 발현에 영향을 주는 돌연변이 현상을 통하여 나타난다. 암과 관련이 있는 세포성장의 조절이탈은 정상적으로 세포성장을 자극하는 *c-myc*이나 *ras*와 *sis*유전자들의 불활성이거나 이들 양자의 결과로 유발될 수 있다. 이처럼 암 유발 유전자나 암 억제 유전자 등의 이상으로 인한 것을 선천적인 원인이라고 할 수 있다. 후천적으로는 음식, 환경, 스트레스 등이 발암의 원인이 된다. 이것이 정상세포에 영향을 주어 암세포로 전환될 때는 단순히 하나의 유전자 변이 등에 기인한 것이 아니라 여러 유전자들의 이상이 관여하게 된다. 즉, 여러 단계를 거쳐 종국에는 암화가 된다는 것이다. 초기에 암을 유발시키는 발암인자를 개시인자(initiator)라고 하며 중간에 암화를 촉진하는 인자를 촉진인자(promotor)라고 한다. 발암물질에 최소한으로 노출되는 생활습관을 가지는 것이 바로 암을 예방하는 방법인 것이다.

일반적으로 암이라 함은 악성종양, 즉 무한정으로 증식하는 비정상적인 돌연변이 세포를 의미한다. 정상세포는 세포자살(apoptosis)이라는 과정을 통해 일정 정도 분열하면 증식을 멈추고 사망하는 특징을 가지고 있다. 정상 세포 유전자의 끝에는 telomere가 있어서 세포가 한번 분열할 때 마다 telomere가 점점 줄어들고 따라서 세포가 50~80번 정도 분열하면 telomere가 모두 없어져 더 이상 분열을 못하게 된다. 이를 조절해주는 유전자가 바로 p53, p21, p16 등이다. 그런데 암세포와 같이 지속적인 분열이 필요한 곳에서는 telomerase라는 효소가 분비되어 이 telomere를 줄어들지 못하도록 해 세포가 무한정 분열을 하도록 만들어 암이라는 돌연변이를 탄생시키는 것이다. 무한정 분열한다는 것이 바로 암의 특성이며 이로 인해 암은 생명을 위협하는 무서운 질병으로 자리 잡고 있는 것이다.

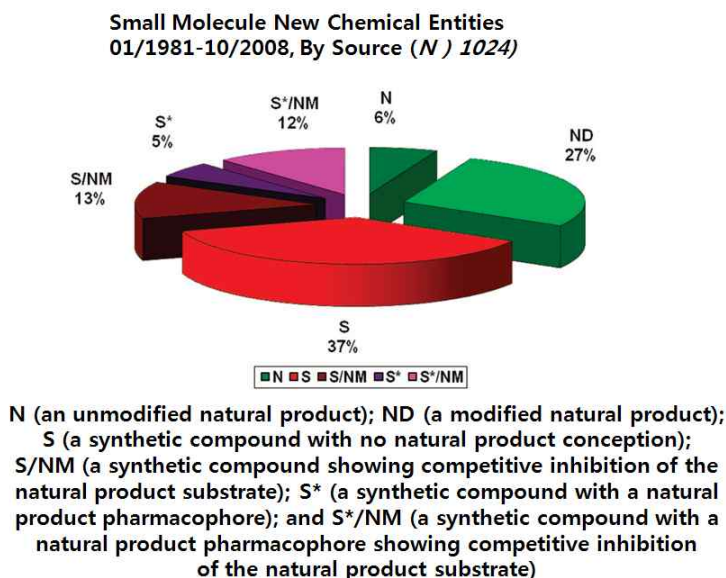
암이 무서운 것은 다른 곳으로 전이한다는 특징을 가지고 있기 때문이다. 전이는 혈관을 따라서 이루어지는 혈행성전이, 임파관을 따라 이루어지는 임파성전이, 복막등에 점점 퍼지는 파종성전이, 시술자의 손 등을 통해 운반되는 이식성전인들이 있다. 전이에 영향을 미치는 대표적인 두 가지 인자는 신생혈관 형성과 면역력 저하이다. 암세포는 다른 곳으로 가기 위해 임파선이나 혈관을 타고 이동을 하게 된다. 이때 필요한 것이 바로 "신생혈관형성 (angiogenesis)"이라는 과정으로 암 덩어리 주변에는 무수히 많은 혈관들이 생성되어져 있다. 암은 이를 통해 영양을 공급받기도 하고 또 다른 곳으로 이동하기 위한 통로로 사용하기도 한다. 이러한 혈관형성을 위해 암세포는 스스로 증식인자 (VEGF, bFGF, PDGF 등)를 배출하기도 하고 기질막 분해효소 (MMP)를 분비하기도 하며 염증반응을 일으키는 등 많은 자생노력을 기울인다. 또 암은 세포들이 무한정 증식하게 되면서 주변 환경을 저산소

상태(hypoxia)로 만드는데 이러한 상태를 극복하려는 노력의 일환으로도 신생혈관 형성이 이용되게 된다.

제 1 절 천연물 신약 개발

1829년, 과학자들에 의해서 버드나무 껍질에서 통증을 완화하는 성분인 “살리신”을 발견하였다. 1915년에 독일 바이엘사가 이 살리신으로 우주인도 휴대한다는 해열진통제 “아스피린”을 개발하였다. 현재 아스피린은 전세계에서 하루에 1억정 정도가 복용되고 있는 약물로 발전하였다. 아스피린이 천연물 유래 최초의 신약이라 할 수 있다. 그 후 1971년에는 미국 국립암연구소에서 주목나무 껍질에서 항암 효과가 매우 우수한 “파크리탁셀”이라는 물질을 분리해내었고, 21년 뒤에 미국의 제약사가 항암제인 “탁솔”을 FDA로부터 허가를 받았다. 이러한 예를 포함하여 수십 년간, 천연물은 의약과 의약선도물질의 보물창고였다.

미국 국립암연구소의 David J. Newman, Gordon M. Cragg 그리고 Kenneth M. Snader 등이 시행한 최근의 조사에 따르면, 전세계적으로 1981-2002년 사이에 도입된 의약품 저분자 신규 화합물 877개 중에서 61%가 천연물과 관련이 있다고 한다 (J. Nat. Prod., 66, 1022, 2003). 이 중에는 천연물(6%), 천연물 유도체 (27%), 천연물 작용기 (pharmacophore)에 근거한 합성화합물 (5%), 그리고 천연물에서 얻은 정보를 바탕으로 설계된 합성물 (즉, 천연물 모사체 mimic; 23%)이 들어 있다. 1981년부터 2008년까지의 new chemical entities (1,024개 분석자료) 자료를 보면 다음과 같다 (Chemical Reviews, 109, 3012, 2009).

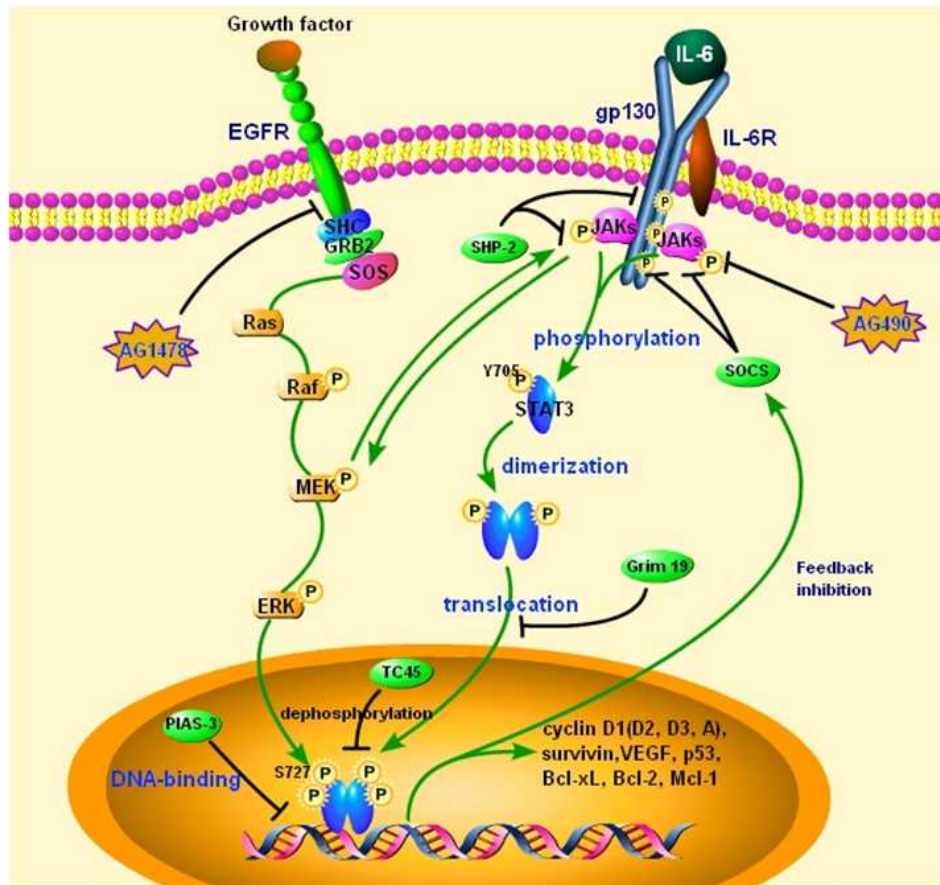


세계 식물 및 식물 추출 약물 시장은 향후 5년 간 두 자릿수 성장이 예상된다. 리서치업체인 BCC리서치사가 최근 발표한 새로운 보고서에 따르면 세계 식물 및 식물 추출 약물 시장은 2008년 195억 달러에서 2013년 329억 달러로 연간 11.0% 성장할 전망이다. 그리고 2004년 미국 FDA가 식물 약물의 신약 승인 규정을 만들었으며 그 규정에 따라서 2006년 최초의 천연물 신약을 허가함으로써 식물 추출물을 이용한 천연물 의약품개발에 새로운 전기가 마련되었다.

2000년대에 들어서면서 조합화학 등의 발전으로 천연물에 대한 관심이 감소하는 듯하였으나, 최근에는 생명공학 기술을 천연물의 다양성 확보에 적용하면서 다시 관심의 대상이 되고 있다 (Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? Science 325, 161, 2009). 향후 생명공학 기술을 이용한 구조 다양성 확보 및 genome-wide 연구를 통한 효과적인 표적 발굴을 한다면 천연물 연구의 새로운 전기가 마련될 것으로 생각된다. 수년간 방치되었던 천연물 신약개발이 다시금 주의를 끌고 있으며 컴백하는 시점에 있다. 제약업계의 생산성은 계속해서 실망적이었다. 이런 상태는 여러 요인에 기인하는데, 그 하나는 천연물 신약개발에 대한 흥미가 줄어들고 대신 조합화학과 같은 유망하고 획기적으로 보이는 신기술에 기업이 매달리던 것도 포함된다. 그러나 이러한 조류는 대략 세 가지 이유에서 변화하고 있다. 첫째, 조합화학을 통해 저분자 의약 후보 물질을 완전 합성하여 의약 개발에 도입하려던 생각이 충족되지 못했다. 둘째, 천연물 의약 개발의 기술적 난제였던 분리기술과 구조 결정의 속도 및 감도가 극복되었다. 그리고 셋째, 의약 선도물질로서 천연물의 고유한 기능에 대한 어쩔 수 없는 사실이 그것이다.

제 2 절 STAT3 저해제 개발

신호전달 및 전사조절 단백질로서, 84~113 kDa의 분자량을 갖는 스탯(STAT)단백질(STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 및 STAT6)은 각각 활성화된 수용체의 세포질 내에 1 또는 2 이상의 인산화 된 티로신 서열을 인식할 수 있는 SH2 도메인을 포함한다. SH2(Src Homology-2) 도메인은 수용체 인식 및 DNA 결합을 조절하는 인산화 의존성 스위치로서의 역할을 수행한다. 그 결과 STAT 단백질이 세포 표면 수용체의 활성을 유전자 조절에 직접적으로 연결시킬 수 있게 한다(Darnell, J. E., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 94:11767-11769 (1997)).



동물세포에서 잠재성 세포질 STAT 분자의 활성화는 사이토카인의 표면 수용체 및 이들과 비공유적으로 연결되어 있고 JAK 키나아제, 또는 고유의 티로신 키나아제 활성을 갖는 성장인자 수용체에 의해 이루어진다. 세포 표면에 동질의 리간드의 결합은 상기 수용체의 세포질 영역 내에 티로신의 인산화를 유발함으로써, STAT SH2 도메인의 결합자리를 만들게 된다. 상기 수용체에 STAT의 결합은 야크 또는 수용체 키나아제에 의한 티로신 상의 인산화를 유발한다. 인산화된 STAT 단백질은 SH2 도메인에 의해 매개되는 이량체 (dimer)를 형성한 후, 핵 내부로 이동하고, 핵 내부에서 이들은 DNA와 결합하고 특정 유전자의 전사개시를 유도한다. 이런 STAT 단백질의 신호체계는 탈인산화 작용 및 단백질 분해에 의해서 정지될 수 있다.

상술한 STAT 단백질 중 세 가지 STAT 단백질, STAT1, STAT3, 및 STAT5는 다양한 암종에서 활성화된 형태가 발견되는데, 특히 STAT3는 백혈병과 같은 혈액암 뿐만 아니라, 유방암, 두부경부암, 흑색종, 난소암, 폐암, 췌장암, 전립선암과 같은 고형암에서 활성화 되어있어서 중요한 항암 목표점을 제시하고 있다 (Hua Yu and

Richard Jove, Nature Review Cancer (2004), 8, 945).

STAT3 억제는 세포사멸, 신생혈관 억제, 면역회피 차단, 복합적 항암 기작을 통해서 종양을 제어함으로써 보다 효과적이고 실질적인 항암제 개발의 원천기술로 중요하며, 기존의 단선적 작용을 하는 항암제에 비해 높은 치료효과를 기대할 수 있다. 또한, STAT 단백질은 종양뿐 아니라 다양한 세포 내 기능에도 관여하므로 이의 저해제 발굴은 면역 억제제 및 당뇨 치료제의 개발에도 파급효과를 갖는 중요한 원천기술로 활용될 수 있다.

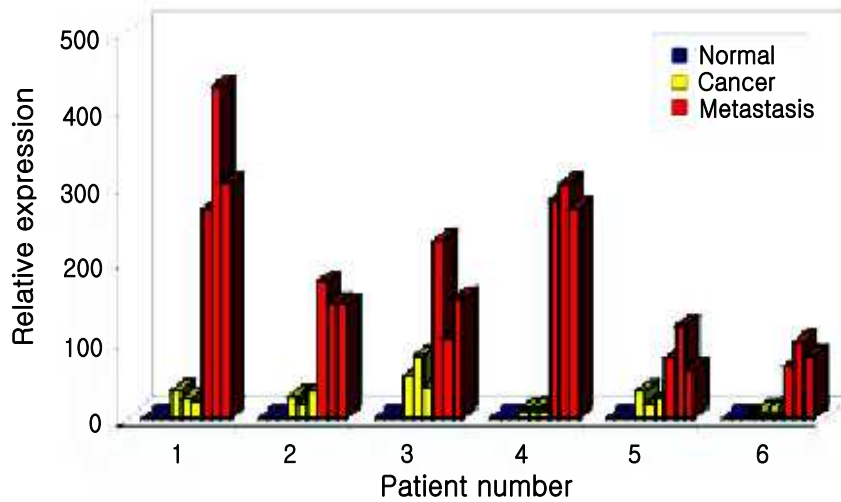
제 3 절 PRL-3 및 세포 주기 저해제 개발

암의 주위 장기 침윤 (invasion) 및 원격 장기로의 전이는 암 치료에 있어서 가장 큰 장애이다. 수술, 항암제 화학요법, 방사선 요법, 면역 요법 등의 진보로 국소 암 (localized cancer)의 치료에서는 큰 성과를 거두었으나 아직까지도 대부분의 암 환자가 전이로 사망한다. 따라서, 암의 무서움은 그 전이성 (metastasis)에 있으며 암으로 인한 사망의 대부분은 암전이로 설명된다. 현재 임상적으로 입증된 보편적 암 치료 방법이 외과 수술이지만, 원발암이 제거되더라도 다른 조직으로 전이된 암 세포에 의해 환자의 치료가 어렵게 된다. 그럼에도 암 전이된 병반에서만 특징적으로 변하는 유전자나 pathway를 설명할 수 있는 연구 결과가 드물었다.³⁵⁾ 그 이유는 전이가 여러 단계의 과정을 거쳐서 이루어지고 각 과정이 암세포와 숙주간의 복잡한 상호 작용에 의해 일어나기 때문이다. 암 전이는 원발암으로 부터의 해리 (detachment), 주위 조직 침윤(invasion), 혈관 내 유입 (intravasation), 순환계내에서의 생존 (survival in the circulation), 혈관의 유출 (extravasation), 표적 기관내 집락 형성 (colonization) 및 성장 (growth)의 복잡한 과정으로 단지 하나의 유전자와 그 발현물을 제어함으로써 완전 해결될 수 있는 것은 아니다.

1976년 암 유전자로 최초 규명된 src의 발견 이후, p53, 종양억제 관련단백질 Rb 등의 결과가 발표되었다. 이러한 유전자적 배경 외에도 또한 MMP에 의한 기저막의 파괴와 침윤과정, hypoxia 조건에서 촉발되는 신생혈관의 형성과 암의 성장 등 암 전이와 관련된 일련의 연구가 있었지만 암 전이와 직접 관련된 유전자의 규명은 미미하였다. 즉, 암 발발의 초기 시점과 관련해서는 다수의 유전자 변화가 보고되었지만 전이와 관련된 것은 거의 없었다.

이러한 측면에서 Johns Hopkins Medical Institution의 K. Kinzler와 B. Vogelstein 팀이 2001년에 발표한 전이 관련 유전자가 큰 관심을 끌고 있다. 이 연구팀은 PRL-3라고 불리는 protein-tyrosine phosphatase (PTPase)가 간 (liver)으로 전이된 대장암 세포 내에서 과발현 되었음을 SAGE (serial analysis of gene expression)과 real time PCR을 통해 밝혀내었다. 이 연구팀이 PRL-3에 집중하게 된 것은 놀라울 정도로 일관되게 모든 전이세포에서 과발현 됨이 관찰되었고 또한, 이 단백질의 구조가 tyrosine phosphatase였기 때문이다. Tyrosine phosphatase는 tyrosine 잔기에서 phosphate 그룹을 제거하는데 이 효소는 세포 활성 조절에 관여하고 있다. PRL-3는 22 kDa의 tyrosine phosphatase를 코딩하며 이 효소는 C-말단의 변화가 없으면 핵에 존재하지만, C-말단이 prenylation 되면 세포막에 존재하여 지질막과 결합되어 있다. 이 PRL-3가 알려진 지는 5년여 밖에 되지 않았고 그 구체적인 기능 규명이 진행 중인데 관련 단백질인 PRL-1과 PRL-2도 세포 성장과 관련이 있다고 한다.

PRL-1은 뇌와 근육에 위치하고 PRL-2는 골격근육에서 발현된다. 반면에, PRL-3는 심장과 골격근육에서 특이적으로 발견되었고 결장암의 간 전이효소에서 높게 과발현되었다. PRL-3의 발현정도는 암의 진행에 따라 증가하는데 정상적 대장 상피세포에서는 그 발현이 나타나지만 비전이성 초기 종양세포에서는 중간정도 발현되며 전이상태의 세포에서는 과발현 되고 있다. 또한, 이것이 환자 개인차에 의한 것이 아니고 오로지 암의 진행에 따라 전이암에서 과다 발현됨을 확인하였다. 따라서, 상대적으로 비전이성 대장종양과 정상 상피조직에서는 그 발현이 극히 적었음을 규명하여 PRL-3 유전자가 전이에 직접 관련이 있음을 확인하였고 전이성 종양에 있어 높은 수준으로 발현된 PRL-3의 억제제가 전이암 치료를 위한 목표점임을 제시하고 있다.



PRL-3 expression in each of six patients by metastasis.

결국, 전이와 직결된 PRL-3 PTPase의 메커니즘 규명은 암진단 지표의 제공과 아울러 PRL-3 단백질 저해활성물질의 발굴을 촉발할 것이며, 이들 물질군은 분자탐침으로서 기초 연구 및 치료제의 개발에 있어서 매우 중요한 역할을 할 것이다.

발암 과정은 전구발암유전자 (proto-oncogene)들의 활성화, 암억제 유전자들의 소실, 성장인자에 관련되어 있는 여러 가지 유전자들의 제어되지 않는 활성화 등에 의한 많은 다단계적 과정으로 알려져 있다. 전구발암 유전자의 활성화는 유전자의 증폭, 대립유전자의 소실, 전위, 점돌연변이, 유전자의 재배열 등 여러 가지 기전들에 의하여 유발될 수 있다고 하며 현재까지 50여 종류 이상의 암 유전자들이 확인되었다. 암은 대부분 세포성장의 조절결함이 있는 경우로 정의되고 있다. 이러한 결함들은 정상적으로 세포성장을 자극하거나 억제하는 유전자 생산물의 기능이나 유전자들의 발현에 영향을 주는 돌연변이 현상을 통하여 나타난다. 암과 관련이 있는 세포성장의 조절이탈은 정상적으로 세포성장을 자극하는 c-myc이나 ras와 sis유전자들의 불활성이거나 이들 양자의 결과로 유발될 수 있다.

포유류 세포는 휴지기나 증식기 상태로 존재할 수 있다. 성장하는 세포들은 G1기, DNA의 합성기인 S기, G2기, 유사분열을 일으키는 M기의 세포주기를 거쳐서 최종적으로 두 개의 낭세포를 형성한다. 세포주기의 진행은 첫째로 G1기에서 S기로의 이행과 둘째는 G2기에서 M기로 이행을 지배하는 두 가지 주요한 조절단계에 의하여 조절된다. 특히, G1기에서 S기로의 이행은 포유류 세포들의 정상적인 성장을 결정짓는 시점이 된

다. 정상적인 세포 성장의 조절은 많은 단계적 변화로 이루어지고 세포 내 많은 인자들의 활성화에 의존하는데 여기에 돌연변이가 유발되어 조절유전자 생산물의 활성화 및 발현에 영향을 주며, 결국 조절 고리에 손상을 주어 탈선적인 세포성장을 유발하여 암을 발생케 한다. 신진 대사, 세포주기, 수용체의 신호 전달을 포함하고 있는 세포 내 여러 과정들은 단백질 인산화에 의하여 조절된다. 1970년대 말에 많은 종양형성 유전자가 tyrosine kinase임이 증명되었고 두 번째로 중요한 kinase로써 serine-threonine kinase가 알려졌다. 그래서 종양 형성 유전자 또는 종양억제 유전자에 종양 발생에 기여하는 단백질 인산화효소 유전자의 연구에 중점을 두고 있다. 하지만 최근 진행되고 있는 연구에서는 종양 형성을 유도하거나 억제하는 phosphatases에 초점을 두고 있다. Phosphatases는 암을 유발할 수 있는 여러 신호-전달 경로를 조절하는 중요한 역할을 하기 때문이다. 신호-전달 경로는 신호-전이 단백질에 있는 tyrosine, serine과 threonine에 대한 phosphate esters의 형성과 가수분해를 통한 포유류 세포 내의 신호전달에 있어 중추적인 메커니즘이다.

저분자 저해제들은 특이적인 세포 내 신호전달체계에 존재하는 여러 다양한 kinases 및 phosphatases의 역할을 조사하기 위한 효과적인 도구로 이용된다. 특히, 저분자 저해제들을 이용한 연구들은 거의 유전적 접근방법과는 다르기 때문에 매우 흥미롭다. 저해제들은 점진적 반응을 갖으며 일반적으로 가역적이고 쉽게 세포 안으로 침투할 수 있다. 단백질 kinase에 대한 저분자 저해제들의 수는 늘고 있다. 하지만, 세포 내 조절 요소로 매우 중요한 단백질 phosphatases에 대한 강력하고 선택적인 저해제들은 많이 알려져 있지 않다. 단백질 phosphatases는 가수분해 되는 amino acid phosphate ester에 따라 분류하고 그것은 serine/threonine-specific protein phosphatases (PS/TPases)분류 tyrosine-specific protein phosphatases (PTPases)의 두 가지 부류로 나뉜다. PS/TPases는 변환된 serine 또는 threonine 잔기의 phosphate ester를 가수분해하는 금속이온 효소이고 PTPases는 변환된 tyrosine 잔기의 phosphate ester를 가수분해하는 특이적인 효소이다. 하중에서 PTPases는 악성 세포에 있어 종종 교란된 가장 기본적인 세포 내 대사과정을 조절하기 때문에 흥미롭다. PTPases는 세포 내 신호-전달 체계에 있어 핵심적인 역할을 하고 세포 성장과 증식, 세포-주기 진행, 세포골격 유지, 분화, 신진대사와 같은 생리화학적 과정들을 조절한다.

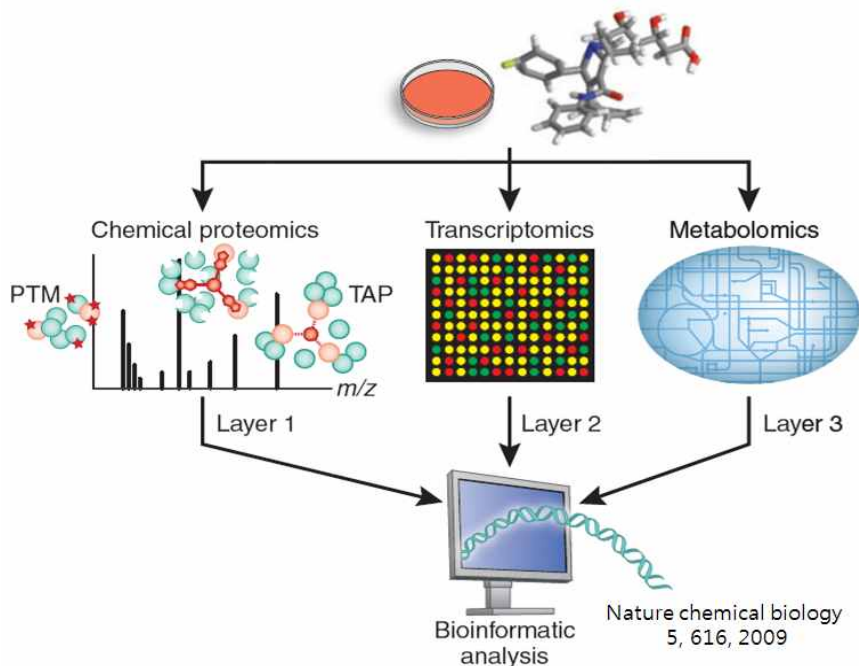
Dual specificity phosphatases (DSPase)는 같은 단백질에 위치한 tyrosine 잔기와 serine 또는 threonine 잔기들이 갖는 phosphate ester bond 둘 다를 특이적으로

가수분해할 수 있는 PTPase 계열의 하위-분류에 속한다. DSPases는 세포 내의 신호-전달 체계에 있어 결정적인 역할을 하여 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달체계와 세포-주기 진행을 조절한다고 잘 알려져 있다. DSPases 중 cell division cycle 25 (Cdc25) 계열은 cyclin-dependent kinases (Cdks)를 탈인산화 하고 활성화 정도에 따라 세포 주기를 조절한다. 비활성 Cdks는 아미노 말단에 근접한 threonine과 tyrosine 잔기가 인산화되어 있고 Cdc25 phosphatases에 의해 그 두 부위가 탈인산화 됨에 활성이 촉진되고 세포-주기 신호 전이를 보급할 수 있도록 Cdks를 허용하게 된다. Cdc25는 transduction, oncogenesis, cell cycle의 조절인자이며 human Cdc25 동족체들에는 Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C가 존재한다. Cdc25A는 Cdk2/cyclin A complex을 탈인산화 하여, G1/S phase 전이에 관여하고 유사분열을 촉진하는 역할을 한다. Cdc25A는 G1/S 전이를 지연시키는 DNA 손상과 관계하여 빠르게 저하된다. Cdc25B는 Cdk2/cyclin A와 Cdk1/cyclin B를 탈인산화 하여 활성화시킴으로써 유사분열을 시발점으로 작용하는 것으로 보고되었다. Cdc25C는 Cdk1/cyclin B mitotic kinase complex를 탈인산화 하고 활성화시킨다. 그로 인하여 유사분열시 세포 유입을 허용하고 또한 S-phase 개시를 조절한다. 게다가, 세포 주기 조절에 있어 그것들의 두드러진 역할로 Cdc25 phosphatases는 신호전달 체계의 유사분열 유전자와 스테로이드 수용체를 구성하고 스트레스에 반응하여 세포 자연사를 일으킨다.

이들 세 human Cdc25 동족체들 중에 Cdc25A와 Cdc25B가 종양적 성질을 보인다. Cdc25A와 Cdc25B는 Ras 종양형성 유전자와 협력하여 또는 Retinoblastoma 종양억제 단백질의 부재로 인하여 세포를 변환하는 것으로 확인되었다. 또한 c-myc 종양유전자의 전사에 있어 표적이다. 그래서 종양에 있어 Cdc25 phosphatases의 과발현은 대사 경로를 조절하는데 있어 결정적인 세포 주기 통제점의 손실에 따른 또는 대사 경로를 신호 전달하는데 있어 일반적인 자연사의 손실에 의한 성장 이점을 제공할 것이다. 그럼으로 Cdc25 phosphatases의 선택적인 세포 활성 저해제를 밝히는 것은 흥미롭다. 이에 따른 새로운 선택적 Cdc25 저해제들에 대한 최근 연구는 *in vitro* 상에서 약제와 같은 성질을 갖는 화합물이 풍부한 여러 종의 화합물 라이브러리에 대한 스크리닝을 통하여 아주 일반적인 접근방법을 수행하는 초기 단계에 있다.

제 4 절 유전체 수준에서의 기전 규명

“생명체가 나타내는 표현형은 단일 분자에 기인하는 것이 아니라 복잡한 네트워크를 통하여 일어난다는 사실”에 근거하여 유전체, 단백질 분석 및 기능 규명 기술을 통합하여 생명체를 이해하려고 하는 연구 분야를 시스템 생물학이라 할 수 있다. 생리활성 물질의 기전 규명에 있어서 최근에는 transcriptomics, proteomics, metabolomics, bioinformatics를 통합하여 이해하고자 하는 노력들이 진행되고 있다. 간단히 도식화 하면 다음과 같다. 향후 이 분야의 연구는 통합적 연구방법으로 발전해갈 것으로 생각된다.



Genome-wide expression profiling 연구 방법을 정리해보면 다음 표와 같다.

Profiling technology	Overview	Advantages	Disadvantages
Complementary DNA microarray	Global measurement of all mRNA levels using microchip format	<ul style="list-style-type: none"> • Highly multiplexed • Established technology 	<ul style="list-style-type: none"> • Small response window • Large inter-experiment variation in signals • Low throughput/High cost
Gene signature	Selective analysis of subsets of signature mRNA levels by multiplexed QPCR or multiplexed ligation-mediated amplification and barcoded bead-based detection	<ul style="list-style-type: none"> • High throughput • Improved S-N ratio • Lower cost than a DNA microarray 	<ul style="list-style-type: none"> • The predefined gene signature may not be closely associated with the relevant biology
Reporter gene	Expression of a reporter enzyme (for example, luciferase and β -lactamase), is driven by a multimer of transcription factor binding sites	<ul style="list-style-type: none"> • Easy adaptation for high throughput • Generally excellent S-N ratio • Hundreds available for multiplexed profiling 	<ul style="list-style-type: none"> • Artificially engineered reporters may not reflect the endogenous regulation
Antibody-based protein detection	Immunoblot, ELISA, antibody or lysate microarrays	<ul style="list-style-type: none"> • Robust/Sensitive detection • Can be multiplexed 	<ul style="list-style-type: none"> • Poor availability of validated reagents
Activity-based protein profiling by mass spectrometry	Global measurement of the binding of proteins in cell lysates to immobilized active compound	<ul style="list-style-type: none"> • Detection of multiple binding targets is important for mechanism of action 	<ul style="list-style-type: none"> • Limited coverage • Low throughput • Requires many cells • High instrumentation cost
Flow cytometry	Single-cell measurement of protein, DNA and ion content	<ul style="list-style-type: none"> • Allows single-cell response to be monitored • High S-N ratio 	<ul style="list-style-type: none"> • Requires many cells • Low throughput, but this can be overcome by an auto-sampler
Automated microscopy	Automated cell image acquisition and analysis	<ul style="list-style-type: none"> • High spatial resolution • High throughput 	<ul style="list-style-type: none"> • Generates a large cellular descriptor data set, which creates challenges in finding biological relevance

Nature Review Drug Discovery 8, 571, 2009

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 천연물 신약

1. 외국의 경우

가. 천연물신약 일반 동향

다국적 제약기업들의 항암제개발의 R&D는 전통적인 화학요법제나 호르몬요법에 비해 혁신적인 약물인 종양표적치료제에 대한 약물들이 주도적으로 연구되고 있으며, 임상 초기단계에서 종양표적치료약물의 개발 비율은 더욱 증대되고 있다. 임상3상에서 연구되는 종양표적치료제 약물이 전체에서 차지하는 비율은 64%이며, 임상 1상에서는 표적치료제 약물의 비율은 92%를 차지하여 더욱 증가되고, 이들 중 신호전달조절물질이 가장 높은 비율을 차지하고 면역조절물질과 혈관신생조절물질들도 활발히 연구되고 있다.

다국적 제약기업들의 신약개발 R&D연구 프로젝트 수는 지속적으로 증가되고 있으며, 신약개발의 비용증가와 생산성의 감소에도 불구하고 human genome project의 완성과 같은 환경변화에 따라 신약개발이 가속화 되고 있고 치료영역별 연구 분야로는 항암제 개발에 가장 큰 관심이 집중되고 있다.

미국 미네소타 대학 호멜연구소의 앤 보드 박사는 피닉스에서 열린 미국암 연구학회 학술회의에서 발표한 연구보고서에서 생강의 주성분인 진저롤 (gingerol)이 대장암 세포의 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 쥐 실험에서 확인되었다고 밝힌 것으로 의학뉴스 전문 통신 헬스데이 뉴스가 보도했다. 보드 박사는 20 마리의 실험실 쥐에 1주일에 3회 진저롤 0.5 mg이 함유된 먹이를 주고 보통 먹이를 준 또 다른 20마리의 쥐와 함께 인간의 대장암 세포를 투입했다. 그 결과 대장암 세포 투입 15일 후 종양이 나타나기 시작했는데 진저롤 그룹은 측정 가능한 크기의 종양이 평균 4개, 비교그룹은 13개가 발견되었다.

바이엘은 최근 비엔나에서 열린 2007 유럽 심장학회에서 심혈관 질환 및 뇌졸중의 1차 발병에 대한 아스피린의 예방 효과를 관찰하는 임상 연구, ARRIVE (Aspirin to Reduce Risk of Initial Vascular Events)를 시작한다고 발표했다. 회사에 따르면 이번에 진행될 연구는 지금까지 아스피린의 효과를 측정하기 위해 실시된 임상들 중 가장 큰 규모에 속한다. 이를 위해 바이엘은 현재 400개가 넘는 연구

센터에서 약 1만 2000명의 환자를 모집하고 있다. 심혈관질환은 인종, 성, 사회 경제적 환경에 국한되지 않고 누구에게나 일어날 수 있는 병으로 이로 인한 경제적인 부담도 매우 커서 2006년 유럽 연합 (EU)에서만 심혈관 질환과 관련한 직간접적 비용이 약 1690억 유로로 추정되고 있다.

현재 임상 시험 중인 육상식물 유래 항암제 후보 물질로는 roscovitine (CYC202), combretastain A₄, flavopiridol 등 3종이 있고, 육상식물 유래 항암제 후보 물질 중 전임상연구 중인 물질로는 bruceantin, pervilleine A, betulinic acid, β -lapachone, 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), thapsigargin, olomucine, maytansine, bromindirubin, oxime of bromindirubin 등이 있다.

즉 외국에서는 대규모 동물 실험 등을 통하여 효능을 평가한 후에 정확한 기전을 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

유럽내 천연물관련 연구는 버드나무로부터 해열진통제인 salicin을 발견하여 이를 선도화합물로 한 Bayer의 아스피린 개발로부터 시작된다. 국화과 식물인 엉겅퀴 (Silybum marianum)로부터 얻은 간보호 작용물질인 Silymarin의 추출을 통해 개발된 간염치료제와 더불어 은행잎의 ginkgo-flavonoid 성분으로부터 개발된 혈액순환 장애 치료제는 독일내 단품목의 연간 매출액이 2억1100만불(1996년)로, 국내 1위인 동아제약 연간 총매출액(약 2억 3600만불)과 유사할 정도로 엄청난 매출을 올리고 있다. 최근 독일에서는 정부주도하에 정부와 민간회사가 공동지원 하는 Natural Product Pool을 1996년에 시작하였으며, 천연물 성분과 유도체들을 수집, 확보하여 대단위 생리활성 검색을 진행함으로써 신의약품/신농약 등을 개발하는 프로그램을 진행 중이다. 유럽의 천연물 신약 개발의 특징은 품질, 효능, 안전성이 확보된 식물 약품의 개발하고 식물약품의 치료효과는, 효능을 결정짓는 특정성분에 의한다는 개발전략을 지켜고 있으며, 전통적인 식물약품에 대해 효능 및 안전성을 인정받았다 하더라도 품질의 표준화는 따로 검정 받아야한다.

나. 식물자원에 대한 동향

세계 주요국가의 식물 연구동향을 살펴보면, 우선 미국은 식물생물자원 국가관리 조직체계 (NPGS)를 구성·운영하여 생물자원의 탐색, 보존, 평가, 이용 등 전반에 대한 조정 기능을 수행하고 있다. 실행 부서로는 국립식물자원연구소 (GRL), 국립생물자원보존센터 (NCGRP), 국립식물자원검역소, 열대농업연구소 (Puerto Rico),

Active Collection 영양체 자원 저장소 (8개소), 주요작물 저장소(대두 등 7개소), Genetic Stocks Center (4개소)등이 있다. 국립생물자원보존센터에서는 자원의 장기보존, 종자활력 및 저장에 관한 연구, 초저온 저장방법을 개발하고 있으며, 국립생물자원연구소는 도입 및 분양자원의 검역, 자원의 보존, 세계 수집종 밀, 보리, 귀리, 호밀을 보존하고 있다.

일본은 국립농업생물자원연구소에서 식물, 미생물, 동물, 수목, 수산생물 및 DNA를 보존, 관리하고 있다. 식물은 농업생물자원연구소, 임목육종센터가 센터뱅크로, 농업연구센터 등 9기관, 임목은 산림종합연구소가 서브뱅크로 지정되어 있다. 연구활동 및 연계망은 중앙단위은행에 수집, 종자보존, 조직, 세포 보존, 포장보존, DNA 보존, 자료관리 및 관련 연구를 하고 있으며 이는 대학, 민간기구, 국립연구기관, 공공기관과 연계되어 있다.

중국은 중국농업과학원 작물생물자원연구소를 중심으로 관리, 운영되고 있다. 국립종자은행은 장기 및 단기보존을 실시하고 국립생물자원포장보존센터 (National Field Gene Bank)를 전국 25개 지역에서 운영하여 영양체자원을 보존하는가 하면, 전국 11개 지역농업과학원에서 종자보존소를 운영하고 있다.

러시아는 바빌로프식물산업연구소 (VIR)를 중심으로 식물자원을 보존관리하고 있는데 식물도입분류과에서는 탐색, 수집, 교환, 검역, 현지보존법 등을 관할하고, 국제협력과는 외국과의 협력과제를 수행한다. 식물자원연구부는 9개 전문 작목별로 단기저장, 평가, 이용, 증식방법, 증식, 전산화, 정리 자원의 종자은행 입고 등을 관리한다. 기초 연구 부서에서는 기내 보존기술 개발, 대량 증식연구, 단백질 핵산 연구, 우량 자원연구, 활성물질 연구, 생리적 유전적 기초연구를 하고 있다. 지역시험장은 12개 기관으로, 자원의 수집, 평가, 단기 보존 및 육종을 담당한다.

인도 식물생물자원관리는 국립식물생물자원국(NBPGR)에서 관리하면서 2개의 Councils 및 4 Committee를 보조기구로 운영하고 있고, 재래자원이 풍부한 국가로서 자원개방을 허용하지 않고 있다. 보존은 197,839 점을 보존하고 있으나 국립종자은행 중심의 장기보존, 최근 백만점 보존규모의 새로운 종자은행 설립하였다. 각 지역시험장별 단기보존, 영양체는 별도보존하고 있으며, 평가는 국가 연구기관, 대학과 공동으로 특성평가하고 있고, 정보관리는 생물자원 평가 부서에서 자료관리를 하면서 협력기관들과의 정보를 공유하고 운영되고 있다.

영국 식물생물자원그룹(UKPGRG)에서 총괄연구 및 관리하고 있으며, 작목별 17개 연구기관에서 품종육성과 연계하여 수집보존소를 운영하여 작목별 Curator 지정운영하고 있다. 보존은 12만 점을 하고 있으며 World Collection에 한하여 장기저장하고 있다. 특성평가는 국가연구기관 및 대학이 공동으로 실시하고 있으며, 특수자원은 직접 보존하고, 자유로운 자원교환을 목적으로 하고 있다.

노르딕연안국 (핀란드, 노르웨이, 스웨덴, 덴마크)인 노르딕 4개국이 생물자원 공동이용체계 구축하는 시스템이며, 종자자원은 스웨덴에서 27천점을 보존하고, 국립작목연구기관과 대학이 공동으로 특성평가하고 있으며, 영양체 생물자원은 핀란드 5개소, 노르웨이 9개소, 스웨덴 11개소, 덴마크 4개소에서 작목 단위별로 연구하고 있는 실정이다. 자원의 접근에 대하여 개방적이며, 자원 수집을 위하여 공동연구 형태로 동남아 및 아프리카 지역 국가들을 지원하고 있다.

나) 신약자원으로서의 식물자원 수집 및 연구 예

NCI는 1960년에 미 농무성과의 협조 하에 식물자원 수집 작업을 시작했다. 그후 20여 년에 걸쳐 12,000에서 13,000종에 이르는 약 35,000점의 식물자원을 수집하였다. 그 중에서 114,000점의 분획물이 추출되어 항암제로서의 가능성에 대한 조사가 진행되었다. 다수의 후보물질들이 선정되었으나 엄격한 임상 및 전임상 조건을 충족하는 신약 후보물질은 극소수에 불과했다. 임상시험에 들어간 후보물질 중에서 가장 대표적인 것은 *Taxus Brevifolia* 땅콩으로부터 추출된 Paclitaxel와 *Camptotheca Acuminata* Decne로부터 추출된 추출물이었다.

NCI는 1986년 이 프로그램을 확대하여 열대 및 아열대 지역의 식물종 자원을 수집하는 방향으로 나아갔으며 1991년에 새로운 협력 파트너와 함께 계약을 갱신해서 계속 추진하고 있다. 이렇게 확대된 프로그램을 확대대한 결과 현재 약 25개 국가에서 식물자원 수집활동이 이루어지고 있는데, 그 방식은 현지 국가의 신뢰성 있는 조직체들과의 긴밀한 협력 하에서 이루어지고 있다. 현지 협력팀들은 자원수집, 허가, 분류, 추출 및 정제, 운송에 이르는 전 과정에 대해 책임을 지고 있으며 NCI는 수집된 식물자원에 대해 각각 일정한 증서를 부여한 뒤, 이 증서에 따라 해당국 조직체에 대한 지원을 진행하는 방식으로 사업이 추진되고 있다.

NCI는 이렇게 수집된 식물자원으로부터 임상에 적용할 수 있는 후보물질이 발견되거나 차후 본격적인 연구개발이 필요하다고 인정되는 식물자원에 대해서는

해당 식물자원을 이용해서 개발된 신약의 특허권자가 식물자원의 출처를 추적해서 해당국가와 평등하고 호혜적인 보상에 관한 협약을 체결하도록 의무화 하고 있다. 현재까지 NCI는 45,000종의 식물표본을 확보하고 있으며 그 중 40,000종으로부터는 약 87,000종의 유기 솔벤트를 추출해 냈다. 이들 추출물들은 각종 암 세포 및 AIDS에 대해 시험이 실시되고 있으며, 그 중에서 약 1%의 추출물들이 암에 대해 유의미한 반응을 보여주고 있는 것으로 나타나 있으며, AIDS에 대해서는 약 10%가 유의미한 실험결과를 보여주는 것으로 나타났다. NCI는 시험에 통과한 유의미한 추출물들에 대해서는 임상시험에 필요한 최소량인 약 5-200kg에 이르는 식물소재를 재수집하고 있는데, 이들 추출물을 완전한 합성물질로부터 얻어내는 것은 불가능할 뿐만 아니라 실제 신약생산에 필요한 대량의 원료를 자원 보유국으로부터 구입하는 것 역시 매우 힘든 것이 현실이다.

따라서 NCI는 경제적으로 경쟁력을 갖는 천연신약을 개발하기 위해 천연식물로부터 얻어진 추출물을 처리해 세포를 배양하는 기법을 추출물 시험 초기단계부터 준비하고 있다.

한편 식물자원의 분류 연구를 위하여 세계 주요 표본관 현황은 영국의 왕립식물원 500만점, 영국박물관 400만점, 자연역사박물관(파리) 350만점, 구소련의 고나노프 식물연구소 300만점 등 100만점 이상의 박물관이 14개소에 있다.

2. 국내의 경우

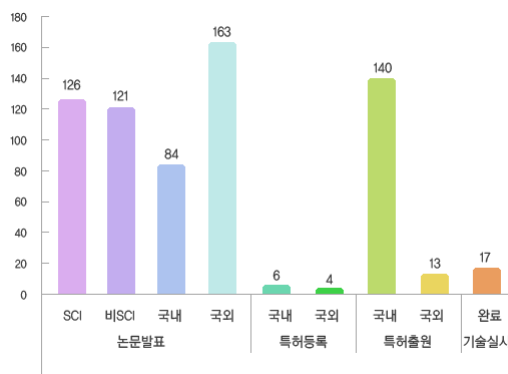
가. 천연물신약 일반 동향

국내에서 가장 활발한 연구를 진행하고 있는 분야는 항암제로서, 전체의 약 29.5%를 차지하고 있으며, 이는 항암제 분야에 First-in-Class 약물 개발의 기회가 많음을 나타내고 있다. 아울러 최근 전세계적으로 새롭게 부각되고 있는 종양표적 치료제의 영향이 큰 것으로 분석되고 있다.

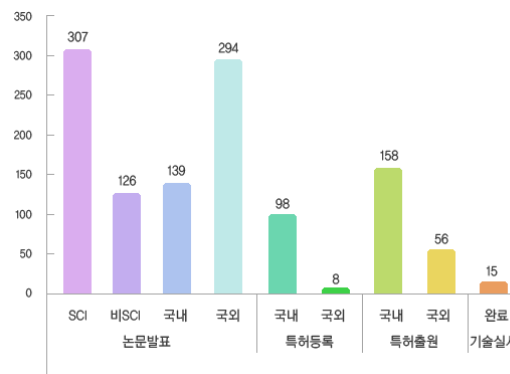
한국은 전통의약에 대한 정보 및 인프라가 풍부하다고 평가되고 있다. 전통의약에 대한 역사가 오래되었고, 우수 연구자들의 노-하우 및 기술, 제약회사의 생산시설 등을 갖추고 있으나 천연물의약품개발에서는 아직 미흡한 상태이다. 최근 전통약물로부터 의약품을 개발하고자 하는 인식 확산으로 천연물에 대한 관심이 집중되고 있지만, 정부 및 민간의 연구개발 투자규모는 미약한 실정이다. 2001년 천연물신약 연구개발 분야 연구개발비는 30억원으로 정부 전체 연구개발비 중 0.07%에 불과

하고, 주요 제약사의 연구개발비 투자는 매출액대비 약 5%수준 (선진국은 15~20%) 이나 절대적으로 투자규모가 작은 편이다.

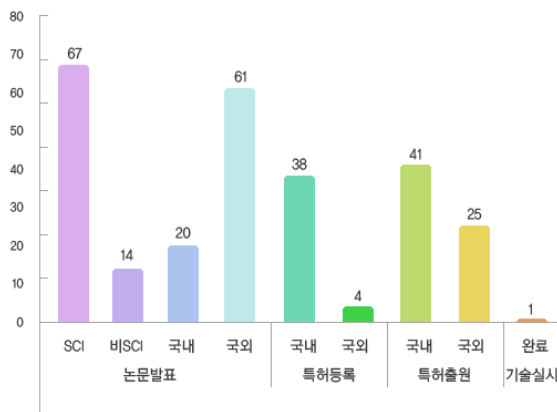
국내의 천연물 관련연구의 활성화는 과기부에서 2000년에 시작한 21세기 프런티어 사업의 일환으로 수행되고 있는 자생식물이용기술사업단의 출범이라 할 수 있다. 그 성과는 다음 그래프에 볼 수 있듯이 논문, 특허, 산업화 등이 매우 빠르게 증가 되고 있다.



1단계 연구 성과 2000. 9- 2003. 6



2단계 연구 성과 2003. 7-2006. 3



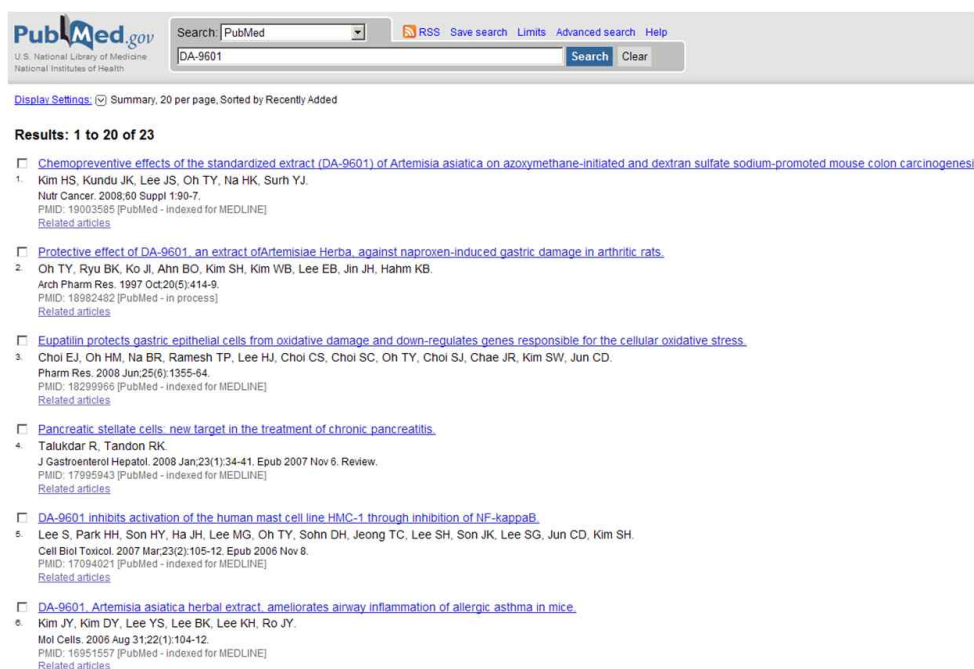
3단계 연구 성과 2006. 4-2007. 3 (1년간의 성과)



산업적 측면에서의 천연물 관련성과는 2002년에 출시되어 첫해에 70억원의 매출을 기록한 동아제약의 스티렌의 성공이라 할 수 있다. 국내 천연물 신약 1호의 성공이 천연물분야 연구에 가장 큰 파급 효과를 나타내었다. 매우 아이러니하게도 국내 신약 15종중에서 천연물 신약이 매출 1위를 기록하고 있다. 스티렌은 국내에도 자원이 풍부한 약쪽으로부터 유효성분을 추출, 분리해 개발했기 때문에, 그간 많은

의약품이 완제 수입품이거나 높은 기술료를 지불하고 외국에서 도입한 제품임을 고려할 때, 자원 활용 면에서나 부가가치 면에서도 높은 평가를 받고 있다. 스티렌은 prostaglandin 생성을 촉진해 점액분비 및 혈류량을 증가시켜 위점막을 보호하고 손상된 세포의 치유를 촉진시키는 것은 물론 HSP, VEGF, EGF 생성을 촉진해 손상된 위 점막조직을 정상조직으로 리모델링한다. 또한 glutathione의 양을 증가시킴으로써 위 자체의 방어기능과 회복기능을 강화하는 장점을 가지고 있으며, NSAIDs, 스트레스 등 외부자극에 의한 위점막 손상도 억제하는 것으로 알려졌다.

- 약쭉 추출물 DA9601로 SCI급 논문 23편이 발표되었다.



스티렌의 성공 원인은 여러 가지로 분석이 가능하다. 특히 국내의 위 염증관련 시장이 크다는 것이 주요 원인일 수도 있다. 그러나 본 연구자는 스티렌도 아스피린과 같이 과학적 증거를 찾는 노력이 개발과정에서 이루어졌다는 것에서 그 요인을 찾고 싶다. 이 후에 국내에서는 제약회사 및 일반 연구자들 모두 제2의 스티렌 만들기에 열을 올리고 있다.

나. 식물자원

국내 생물자원의 연구 및 관리사업을 자원분야별로 검토한다면 우선 식물분야에서 한국의 식물 자원을 분석하면 전체 식물 자원 부존 현황은 8,271종으로 영국

1,550종, 독일 2,600종, 일본 4,700종, 미국 16,302종, 중국 18,000종에 비교하여 결코 적은 종이 아니며, 이 중에 특산식물이 407종, 자생식물은 4,158종이다.

한국에 존재하는 식물은 한반도에 8,271종으로 보고되고 있고 이것은 전체 세계 식물 자원의 약 3%를 차지하는 것이다. 한국에서 보존하고 있는 식물 자원은 식물 종자 및 영양체 2,773종과 삼림 생물자원 3,963종으로 전체 6,736종을 농림부의 소속기관이 대부분을 보존하고 있다. 기타 식물 자원의 관리 및 보유 식물은 환경부, 과기부에서 자연보호지역 및 현지의 보존은행에 있는 야생식물 또는 하등식물이다.

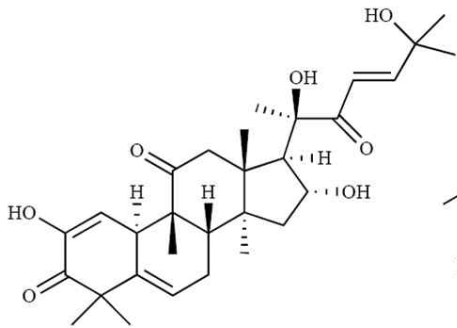
세계 식물생물자원 보존 현황은 미국의 현지의 보존 자원 11,681종 중 한국은 6,736종을 보존하고 있어 미국의 58% 다양성 확보를 하고 있는 실정이다. 전세계의 국토면적과 우리의 연구역량으로 보아 현재 생물자원은 그 확보가 많은 방법을 통해서 그 수집이 되어 왔으나 금후 생물자원 전쟁에 있어서 과거처럼 생물자원을 쉽게 내어줄 국가가 없다. 따라서 한국은 가능한 개도 국가와 공동 또는 협력 연구로 생물자원의 확보에 국가 정책을 두어야 할 것이다.

제 2 절 STAT3 저해제

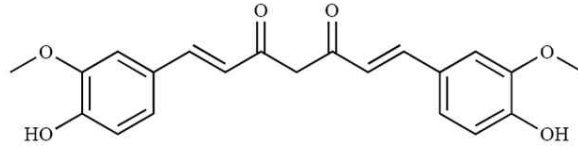
1. 외국의 경우

STAT3 억제제는 세포사멸, 신생혈관 억제, 면역회피 차단, 복합적 항암 기작을 통해서 종양을 제어함으로써 보다 효과적이고 실질적인 항암제 개발의 원천기술로 중요하여 많은 연구자들이 이 단백질의 기능 및 신호전달 과정을 저해하는 물질을 개발하고 있다. STAT3-dimerization을 저해하는 물질로는 SAT 21, NSC 74859, Stattic 등의 화합물들이 보고되어 있다.

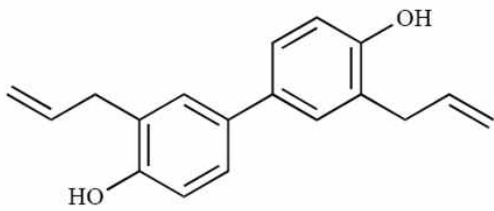
천연물 유래 물질들은 주로 Jak-Stat pathway를 조절하는 물질들이 보고되고 있으며, 이를 정리하면 다음과 같다.



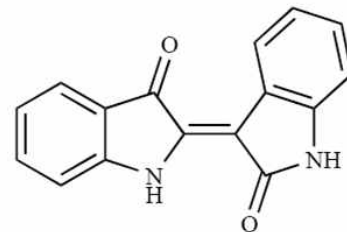
JSI 124 (cucurbiatacin I)



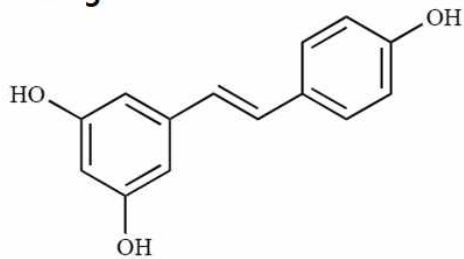
Curcumin



Magnolol



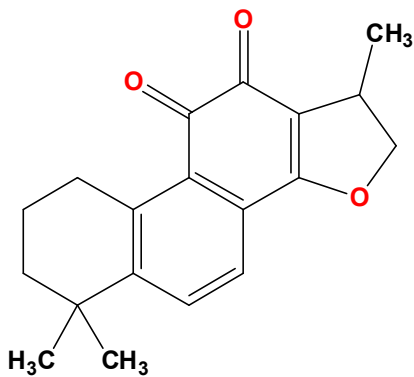
Indirubin



Resveratrol

2. 국내의 경우

STAT3 저해제에 대한 연구는 매우 최근에 시작되었으며, 한국생명공학연구원에게서 발표한 단삼에서 분리한 cryptotanshinone이 유일하게 발표된 저해제이다.

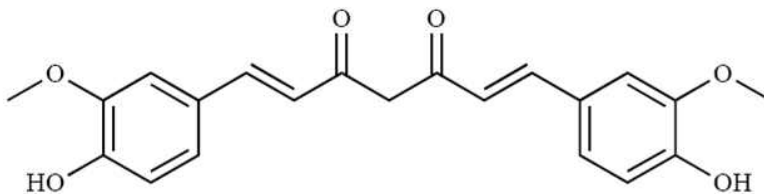
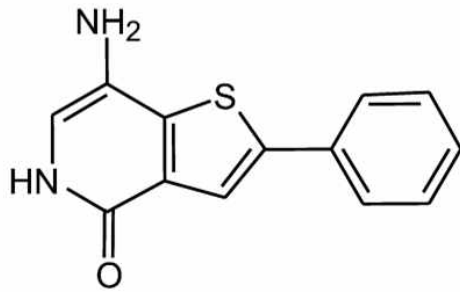


제 3 절 PRL-3 및 세포주기 저해제

1. 외국의 경우

가. PRL-3 inhibitor

2008년에 발표된 thienopyridone이 대표적인 저해제이다. 2009년에 Xu Q 등은 천연물인 curcumin이 PRL-3의 발현을 억제한다는 논문을 발표하였다.



암은 현대의학의 가장 큰 당면과제로서, WHO의 보고에 의하면 환경성 요인으로 인한 발생율이 85%에 달하며, 환경성 발암인자 중 특히 식품이 차지하는 비율이 큰 것으로 알려져 있다. 또한 동물 실험에서도 영양소가 결핍되었을 때 식품 중의 발암성 물질에 의한 암 발생율이 크다고 보고된 바 있어, 식이 요인의 중요성이 지적되고 있다. 이와 관련하여 최근 식이와 관련된 암의 원인물질을 검색하는 연구가 활발히 진행되고 있을 뿐 아니라 일상에서 섭취하는 식품 중에서 항암제로 이용하기 위한 물질이 탐색되고 있다.

나. Cdc25 phosphatases inhibitor

현재 임상에서 널리 사용되고 있는 항암제의 대부분은 합성 물질들로 부작용이 심하여 문제가 되고 있다. 이로 인해 최근 세계적으로 부작용이 적으면서 유효한

항암제를 개발하기 위해 천연물을 대상으로 항암성 물질의 검색이 많이 시도되고 있다. 세포 내에서 일어나는 여러 가지 신호 전달 과정에 있어 단백질의 인산화 (phosphorylation)와 탈인산화 (dephosphorylation)반응의 중요성은 이미 알려져 있고 이러한 과정을 통하여 다양한 생리적 반응을 이끌어 내리함으로서 단백질의 인산화질의 참여하는 효소 (protein kinase)질의 인산화가 지난 20년 동안 활발히 진행되어 왔다. 1970년대 말에, tyrosine kinase가 가장 잘 알려진 종양형성 유전자였고, 그 다음이 serine-threonine kinase였다.

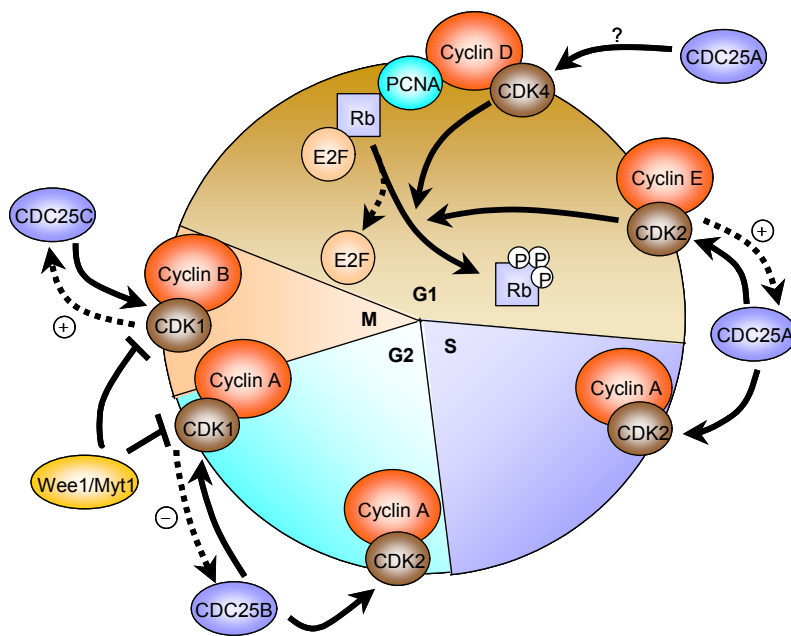
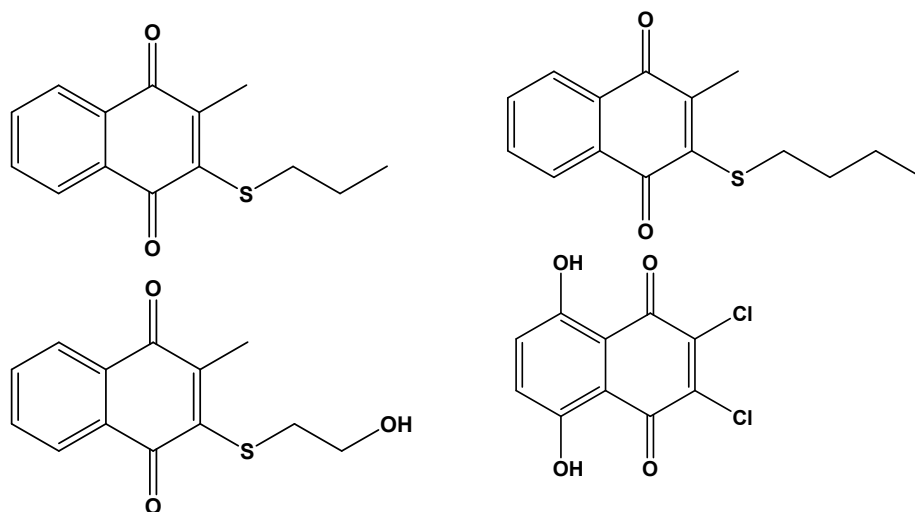


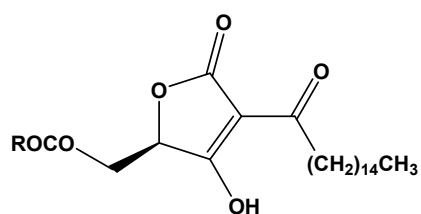
Figure. Cdc25 phosphatases promote mammalian cell-cycle progression

그러나 최근에는 종양형성 유전자 또는 종양억제 유전자로 종양 발생에 기여하는 단백질 탈인산화 효소 유전자 (protein phosphatase) 또한 관심의 대상이 되고 있는 실정이다¹¹⁾. 본 연구에서는 Ras (종양형성 유전자)와 협력하거나 Retinoblastoma (종양억제 유전자)의 손실을 가져와 세포의 변이를 일으켜 종양을 형성하는데 있어 중요한 역할을 수행하는 세포주기 조절과 관련된 Cdc25B phosphatase를 표적 단백질로 하였다. Cdc25B phosphatase는 Cdc2를 탈인산화하여 세포주기 중에서 G2/M기를 조절하는 효소로 종양 세포의 사멸화를 유도할 수 있으므로 항암제 개발을 위한 중요 표적 단백질 중의 하나이다.

현재까지 Cdc25 phosphatase의 저해제에 대한 연구는 크게 천연물, 천연물 유래 화합물, 합성 화합물들이 있다.



Synthetic vitamin K derivatives



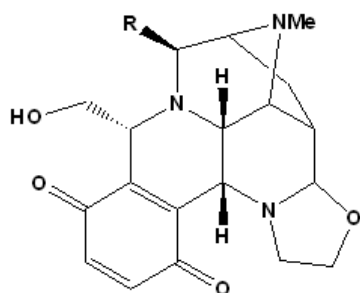
R = C₆H₄-3-COC₆H₅

R = C₆H₄-4-C(-N=N-)CF₃

R = C₆H₄-4-COC₆H₅

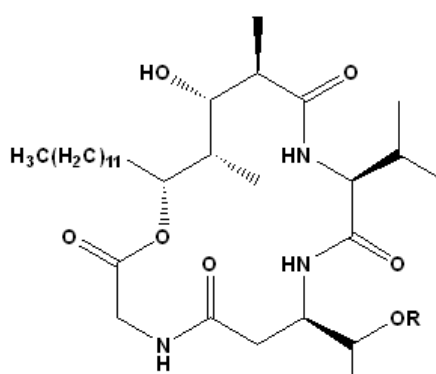
R = C(=N₂)CO₂CH₂CH₃

Synthetic RK-682 derivatives



R = CN
Dnacin A1

R = OH
Dnacin B1



R = SO₃H
Stevastelins A

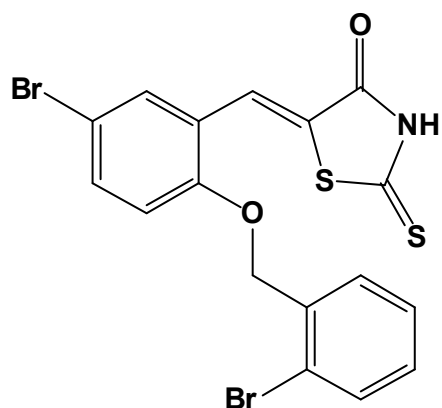
R = H
Stevastelins B

Natural-product analogues as Cdc25B inhibitors.

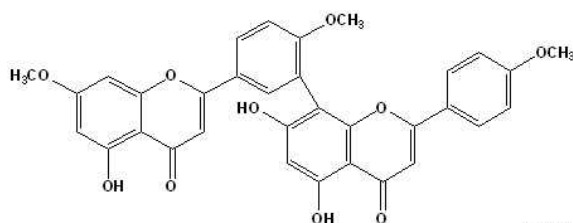
2. 국내의 경우

가. PRL-3 inhibitor

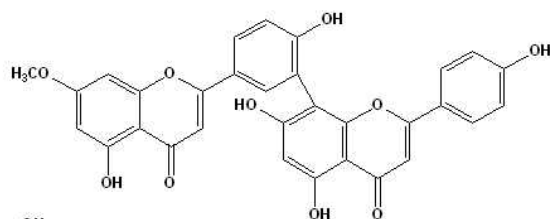
PRL-3 저해제에 대한 연구는 매우 최근에 시작되었으며, 화학연구원에서 발표한 rhodanine 유도체가 유일하게 발표된 저해제이다.



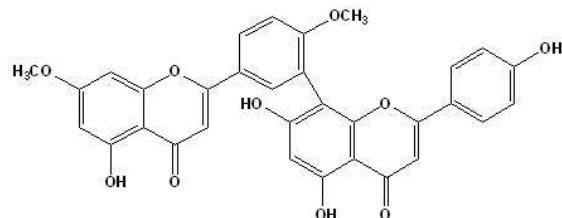
한국생명공학연구원에서 주목으로부터 분리한 다음과 같은 biflavonoid들이 PRL-3의 활성을 저해함을 보고하였다.



**TC-F4 : Sciadopitysin
(240mg)**



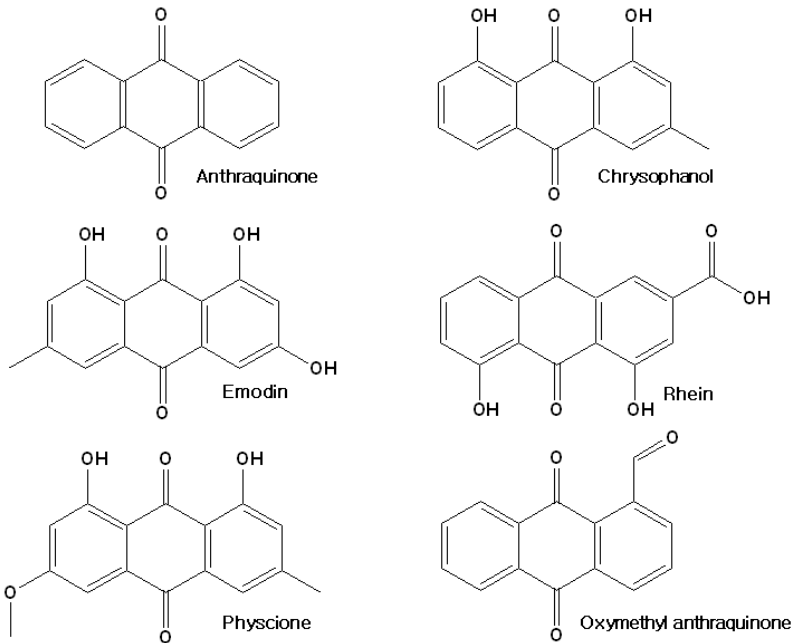
**TC-F5 : Sequoiaflavone
(15mg)**



**TC-F3 : Ginkgetin
(660mg)**

나. Cdc25 phosphatases inhibitor

한국생명공학연구원에서 적하수으로부터 Cdc25 phosphatases inhibitor를 분리하여 보고하였다.



제 4 절 오믹스 기술을 통한 기전 규명연구

인류의 질병을 극복하기 위해서는 생명현상 및 질병 자체에 대한 보다 근본적인 이해가 필요하다. 여기서 질병관련 메커니즘을 이해한다는 것은 질병과 관련된 주요 유전자 등을 발견하는 것 이상을 의미한다. 즉, 생명체가 어떠한 근본원리에 의해 작동되며 다양한 내/외부자극에 대해 어떻게 반응하는지, 그리고 항상성은 어떻게 유지되며 이것이 깨어지는 경우는 무엇인지 등을 유전체, 단백질 및 세포수준에서 이해해야만 하는 것이다. 그러나 지금까지 생명과학계의 주된 연구주제는 생명현상에 관여하는 주요 물질을 발견하고 그 분자적 특징을 규명하는데 초점을 맞추어왔을 뿐 이들이 어떻게 ‘시스템’을 구성하며 그러한 시스템 내에서 각각의 구성체 간에 상호작용이 어떻게 이루어지는지 대해서는 그다지 많은 연구가 수행되지 못했다. 그 이유는 과거에 우리에게 생명체를 총체적으로 분석할 수 있는 기술과 수단이 없었기 때문이었다.

인간 유전체 지도 작성, 유전체 및 단백질 분석 및 기능 규명연구에 투입된 막

대한 연구비 덕분에 이와 관련된 다양한 기술 (genomic, proteomic technology)들이 개발되었다. 이 기술들은 pharmacogenomics, chemical genomics, chemical proteomics, chemical biology와 같은 신생 연구 분야에 응용될 수 있다. 앞에서 언급한 것과 같이 어떤 생물체에 있는 특정한 표적 단백질의 활성을 저해 혹은 촉진하여 나타나는 생물학적 결과는 단순히 하나의 생체분자만이 관여하지 않는다는 사실과 대부분의 약물들이 아직 알려지지 않은 많은 단백질과 결합할 수 있다는 것, 그리고 예상치 못한 저분자 유기물질의 흡수, 분포, 대사, 분비 등의 문제가 있기 때문에 신약개발이 어렵고 성공확률이 매우 낮다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 많은 제약기업과 연구기관들이 전체 생명체 시스템을 이해함으로써 이를 극복하고자 한다. 즉, gene expression-based approach, 모델 생명체의 유전적 검색, 직접적인 저분자/약물과 표적의 상호작용의 특성에 초점을 둔 proteomics-based approach 등이 그것이다.

1. Gene expression-based 표적 및 기전 규명 연구

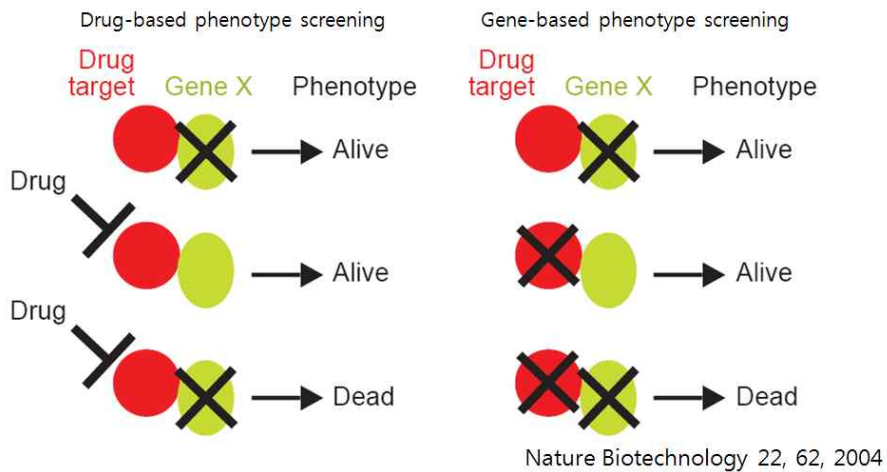
유전자 발현 변화평가와 같은 실험 방법들은 저분자 유기화합물에 의하여 영향을 받는 신호전달 경로를 해독하기 위하여 사용되어 왔다. 이로써 약물의 효과를 분자수준에서 검증하거나 또는 약물에 노출됨으로써 유발되는 표현형의 변화와 관련된 세포내 표적분자들을 발굴할 수 있게 되었다. 이와 더불어 약물 처리군과 비처리군의 비교 유전체 발현 연구들에서는 약물에 대한 새로운 표적들이나 간접적으로 약효에 영향을 미치는 분자들을 조사에 활용한 예도 있다. 유전자 비교 발현분석은 점차적으로 신약개발과 'signature fingerprints'를 확립하기 위한 목적의 개발에 적용되고 있다. 지금까지 조사된 적용들은 세포의 화학적민감성에 영향을 미칠 것 같은 생물학적 과정에 따른 화합물들의 분류, 새로운 후보 약제의 독성 인식, 임상적 약효의 예측을 포함하고 있다. 예를 들어, 미국 NCI는 oligonucleotide 또는 cDNA microarray를 사용하여, 60개 human cancer cell line에 다양한 화합물들을 처리하여 화학요법 민감성과 유전자 발현 양상과의 관계 등을 보고하였다.

천연물과 같이 다양한 활성을 가지고 있는 물질이나 phenotype-based screening으로 찾아진 생리활성물질의 활성 기작(action mechanism)이나 cellular target을 밝히는 연구는 매우 어려운 연구 중에 하나이다. 많은 연구자들의 노력과 최근에 급속도로 발전하고 있는 genome-wide 연구 및 systems biology 덕분에 이 분야 연구에 새로운 전기를 마련해주는 연구 결과들이 발표되고 있다.

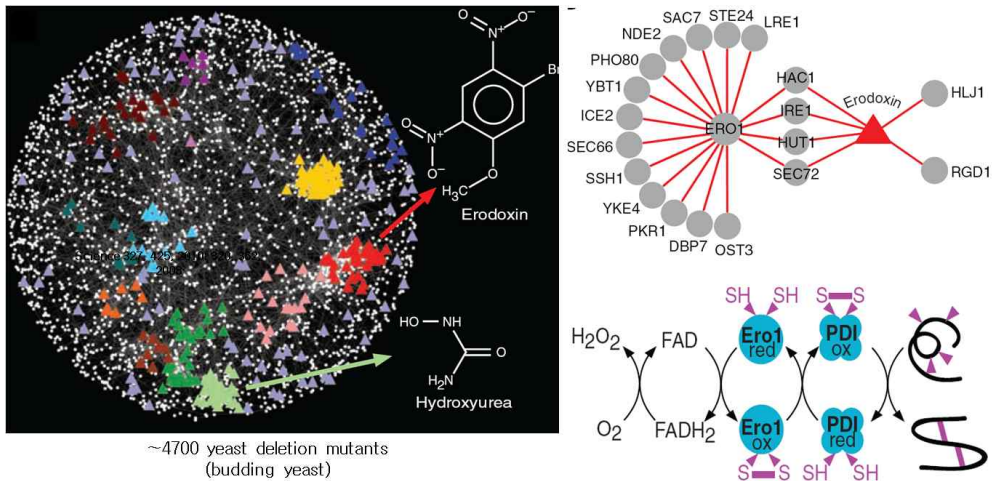
가. Yeast-based genome-wide study

Genome sequencing project에 의해, yeast *saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ~6,000 potential genes이 동정되었는데, ~1000 정도의 essential gene들과 ~5000개 정도의 유전자 조작이 가능한 유전자로 구분된다. 이러한 유전자를 대상으로 yeast deletion mutant들을 만들어 생리활성물질의 표적 발굴 및 기전 규명 연구가 수행되고 있다.

다음 그림과 같이 화합물에 의해서 조절되는 유전자를 찾고 유전자 측면에서 관련된 유전자를 찾아서 화합물의 표적, 활성 기전을 규명하는 연구가 수행되고 있다.

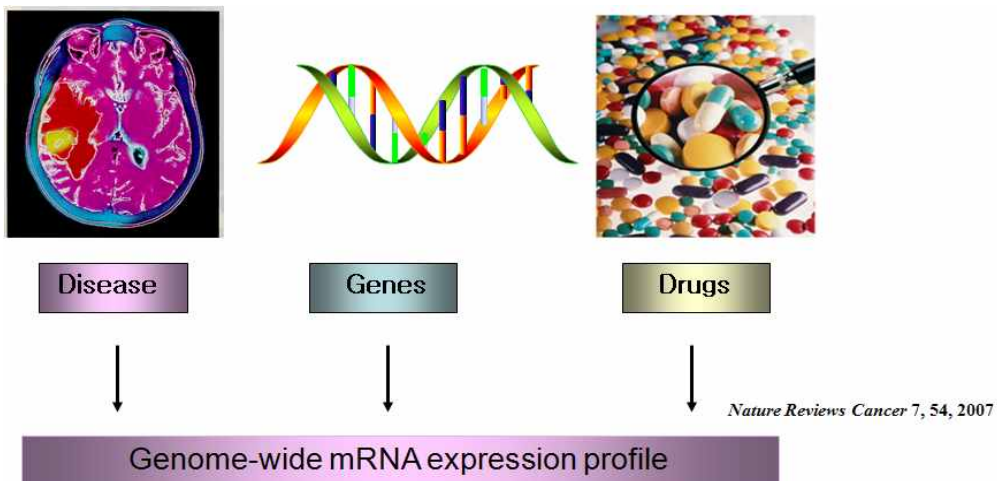


대표적인 관련 연구결과로는 Science 327, 425, 2010에 발표된 결과로서 erodoxin이라는 화합물을 mutant yeast에 처리하여 표적을 발굴하고 네트워크 수준에서 기전을 규명한 연구이다. Erodoxin을 처리하여 반응을 나타낸 유전자들이 *ERO1* 유전자에 의해서 조절되는 유전자와 매우 유사함을 발견하였고 궁극적으로 이 화합물의 표적이 *ERO1* 임과 그 기전을 규명한 연구이다.



나. Microarray-based connectivity map

Microarray를 활용한 생리활성물질의 기전 및 표적 발굴연구는 Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University 에서 연구하고 있는 “The Connectivity Map (Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease)” 구축 연구가 대표적인 예라 할 수 있다. 현재 1,309종의 생리활성물질을 대상으로 6,100 종의 expression profiles이 구축되어 일반 연구자들에게 공개 되고 있다. 이 연구소가 추구하는 궁극적 목표는 다음과 같은 상관관계 지도를 작성하여 보다 빠른 시일 내에 효과적으로 신약이 개발될 수 있게 하자는 것이다. 이들이 구축한 상관관계 지도의 규모가 충분히 커진다면 표적이 불분명한 생약제 등의 표적 발굴 및 기전규명에 많은 도움을 줄 것으로 생각된다.

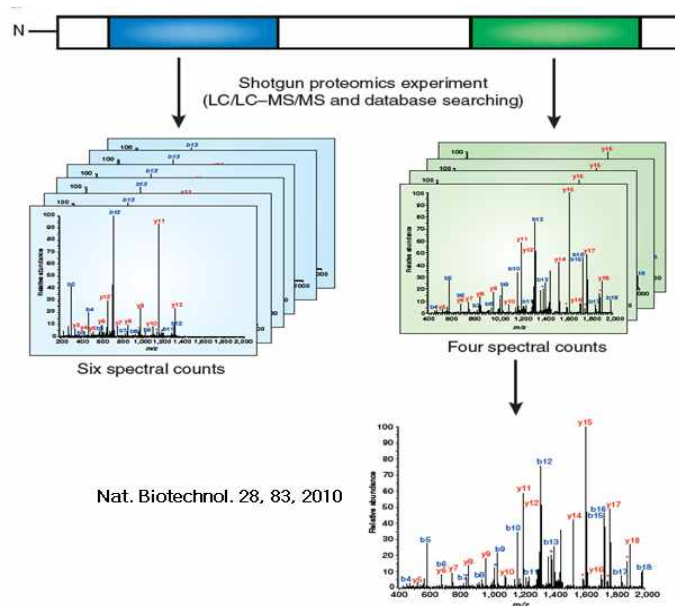


2. Proteomics-based 표적 및 기전 규명 연구

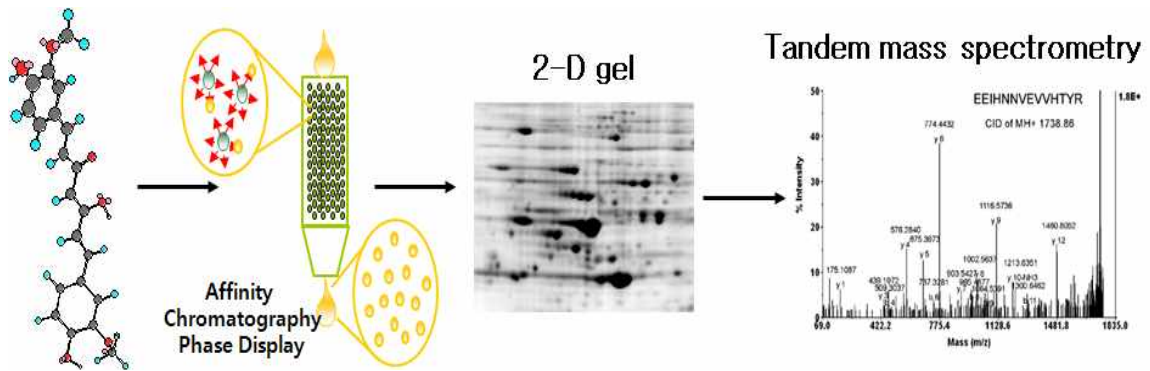
프로테오믹스는 최근에 생물학과 의학의 변화를 위한 희망의 분야로 인식되고 있다. DNA microarray 발현 연구만큼 많은 정보를 주고, mRNA 발현 변화는 단백질 발현 변화와 상관성이 상대적으로 낮아 프로테오믹스 분석연구가 더 각광을 받고 있다. 프로테오믹스 연구가 가지고 있는 가장 큰 문제점은 전체 단백질의 변화를 측정할 방법이 아직 없다는 것이다. 이와 더불어 단백질 기능은 많은 post-transcriptional 및 post-translational에 의해 조절될 수 있는 것이다. 보편적으로 사용되는 기술은 이차원 전기영동으로 대응하는 두 개 다른 시료로부터 단백질을 분고 염색한 후 다르게 발현된 단백질을 수집해 질량분석으로 동정하는 방법과 복잡한 혼합물 안의 단백질에 우선 isotope로 꼬리표를 단 다음 다르게 꼬리표를 단 펩타이드 혼합물을 대상으로 LC-MS/MS로 분석하고 데이터베이스 검색을 통하여 단백질을 동정하는 것이다.

단백질의 정량화를 위해서 지금까지는 isotope 등을 이용한 기술이 주류를 이루고 있었다. 최근에 질량분석기를 통해서 얻을 수 있는 단백질 단편들의 정보 unique peptide number, spectral count, fragment-ion intensity를 통합하여 label-free로 단백질의 발현 변화를 정량적으로 분석할 수 있는 기술이 발표 되었다.

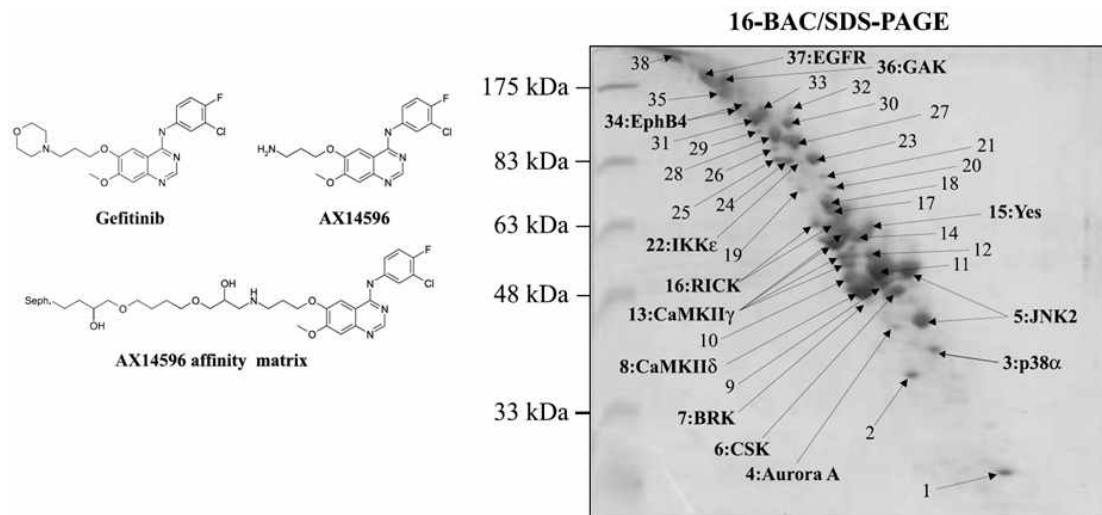
다음은 이를 도식화한 것이다.



활성물질의 표적 발굴 기술로는 affinity-based column 또는 affinity method와 2-D gel 기술을 접목한 방법이 가장 많이 사용되고 있다.

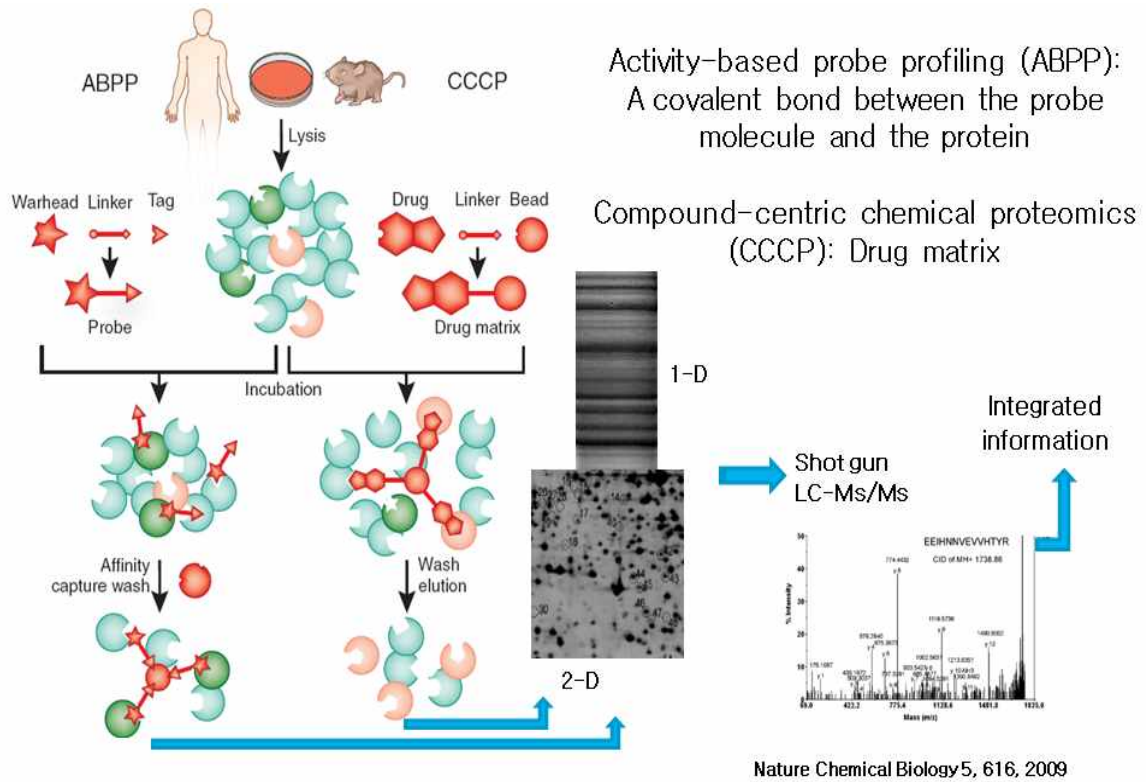


Biotin-compound, Agarose-compound와 같이 활성물질을 고정화 한 후에 cell lysate를 처리하여 결합하는 단백질을 분리하고 분리된 단백질을 동정하는 방법 또는 column을 통과시킨 후에 일정 fraction들을 모아서 2-D gel 방법으로 분리하고 MS/MS로 동정하는 방법 등이 그것이다. EGFR tyrosine kinase inhibitor로 현재 임상에서 사용되고 있는 표적 항암제인 gefitinib의 새로운 표적을 affinity chromatography 방법으로 발굴한 연구 결과가 발표되었다 (Cancer Research 65, 397 2005)



최근에 많은 관심의 대상이 되고 있는 것은 chemical proteomics의 일환으로 개발된 activity-based probe profiling 기술로서 화학 반응성이 높은 그룹을 생리활성

물질에 결합 시킨 후 이들 그룹이 단백질에 공유결합을 형성하여 질량의 차이를 유도하는 방법이다. 도식화 하면 다음과 같다.



아직 많은 기술적인 장애물들이 protein array가 널리 사용되기 위하여 극복되어야 하지만, 대량의 단백질 분석을 위한 최선의 방법이라는 데에는 이론의 여지가 없어 새로운 종류의 고체표면 및 단백질 고정화 기술들이 개발되고 있다. Protein array가 일반적으로 사용되기 위해서는 획기적인 기술적 진보가 이루어져야 하지만, 소규모의 protein array는 항원 검출을 위한 antibody array, 단백질-단백질 상호작용을 분석하기 위한 protein assay, 효소기질 또는 저분자-단백질 상호작용의 확인과 같은 microarray들이 개발되어 실험실 수준에서 활용되고 있다. Microarray는 후보 표적 단백질의 동정을 포함하는 저분자 유기물질의 약리학적 분석을 용이하게 하는 array-based technology를 의미한다. 최근에 42종의 receptor tyrosine kinase (RTK) 인산화에 특이적으로 반응하는 항체 칩을 이용하여 폐암 치료제로 사용되고 있는 이레사(Gefitinib)를 투여했을 때 발생하는 약제내성 기전을 연구한 결과가 발표되었다 (Science 2007 316:1039). 이 보고에 의하면 이레사를 투여에 의해 유발되는 항암제 내성의 약 22%는 c-MET의 과발현에 의한 것 이라는 것을 단백질 칩을

이용하여 발견한 것이다. 선발된 단백질들이 과발현하는 세포를 glass 상에서 배양하여 표지된 화합물의 결합력의 차이를 이용하여 분석하는 방법으로 FKBP12 발현 세포에 FK506 결합을 증명한 연구가 좋은 예이다. 저분자 microarray-based approach들은, 최근 들어, 단백질 기능과 관심대상이 되는 특정한 단백질과 상호작용 할 수 있는 저분자들의 동정을 위하여 적용되었다. Kuruvilla 등은 yeast의 Ure2p를 결합하는 화합물들을 동정하기 위하여 저분자의 고밀도 microarray를 사용하였다. 이러한 연구들은 비록 현재는 특정 화합물에 대한 세포내 밝혀지지 않은 표적을 밝히기 위하여 매우 보편적으로 적용되지는 않지만, 향후 천연물 등의 표적 발굴에 유용하게 사용 될수 있을 것이다.

3. 국내의 연구 동향

국내에서는 한국생명공학연구원 등이 신약 후보물질의 기전 규명연구가 수행되고 있으며, 여러 벤처 기업에서 microarray 이용 유전자 발현 분석 등의 관련 서비스를 수행하고 있다. 기전 및 표적 발굴에 활용 가능한 yeast deletion mutant system은 한국생명공학연구원이 확보하여 관련 기업과 공동으로 활용하고 있다 (관련 논문: Science **322**, 405, 2008).

식약청에서는 한약제의 표준화 작업의 일환으로 4년 동안에 40여종의 사용빈도가 높은 한약제의 추출물과 주요 성분에 대한 유전체 발현 분석을 수행하여 DB를 구축하였다.

본 연구팀은 생체조절물질 사업단에서 확보하고 있는 비만 당뇨 치료제, 골다공증 치료제 후보물질을 대상으로 유전체 발현 분석에 기초한 기전 규명연구를 수행하고 있다. 이 기술의 확립을 위해 수행하였던 farnesyl transferase inhibitors를 이용한 연구 결과를 발표한바 있다. 즉, H-ras가 신생혈관 형성에 중요한 역할을 하는데 다양한 MMPs 중에서 MMP-9, 13이 중요하다는 것을 유전체 발현 변화를 분석하여 찾고 그 기능을 규명한 논문을 발표한바 있다 (Int. J. Cancer, 118, 2172, 2006).

국외에서는 학교나 제약사 모두 genome-wide 연구가 매우 활발하게 수행되고 매우 가치 있는 연구 결과들이 발표되고 있다. 국내에서는 아직도 이 분야의 연구에 대한 인식이 부족하다고 생각된다. 식약청에서 한약제의 표준화 작업의 일환으로 수행되었던 연구도 초기 계획은 10년간 주요 한약제 100종에 대한 분석을 목표

로 시작하였으나, 이 분야에 대한 인식 부족으로 중도에 중단되었다. DB로서 충분한 기능을 하기 위해서는 100종 이상의 한약제에 대한 결과가 축적되어야 하고 이와 더불어 미국 Broad Institute of MIT-Harvard와 같이 다양한 세포에서의 분석도 필요하다고 생각된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

수십 년간, 천연물은 의약과 의약선도물질의 보물창고였다. 미국 국립암연구소의 David J. Newman, Gordon M. Cragg 그리고 Kenneth M. Snader 등이 시행한 최근의 조사에 따르면, 전세계적으로 1981-2002년 사이에 도입된 의약품 저분자 신규 화합물 877개 중에서 61%가 천연물과 관련이 있다고 한다 [J. Nat. Prod., 66, 1022 (2003)]. 이 중에는 천연물(6%), 천연물 유도체 (27%), 천연물 작용기(pharmacophore)에 근거한 합성화합물 (5%), 그리고 천연물에서 얻은 정보를 바탕으로 설계된 합성물 (즉, 천연물 모사체 mimic; 23%)이 들어 있다.

제 1 절 CB-Ph의 약물대사 및 약동력학

1. 개요

계피유래 물질 CB-Ph의 전임상 약물대사 및 약동력학 연구

가. 연구개발 목표

본 연구는 계피에서 분리한 2'-hydroxycinnamaldehyde의 유도체인 2'-benzoyloxycinnamaldehyde (CB-Ph)를 이용한 천연물 유래 항암제 개발을 지원하기 위한 전임상 약동력학 및 약물대사 연구를 수행함을 주목적으로 한다.

나. 연구개발 내용 및 범위

연구내용	연구범위
<i>In vivo</i> pharmacokinetics	- 실험동물(rat 및 dog)에서의 약동력학적 파라미터를 측정하여 CB-Ph 및 CB-OH의 체내동태를 파악하고 이를 통하여 인간에서의 약동력학적 특징을 예측하고자 한다. - HPLC/UV 또는 Applied Biosystems API2000 LC-MS/MS system를 이용하여 CB-Ph, CB-OH, CB-Ph acid 및 CB-OH acid의 정량분석 한다.

연구내용	연구범위
<i>In vitro</i> ADME profiling	<ul style="list-style-type: none"> - CB-Ph의 흡수, 분포, 대사 및 배설과 관련된 다양한 <i>in vitro</i> 시험을 통하여 규명하고 이를 활용하여 인간에서의 약동력학적 특성을 예측하고자 한다. - Caco-2 cell monolayer에서의 투과도를 측정하여 경구투여시의 장관벽 투과도를 예측한다. - CB-Ph 및 CB-OH의 rat, human liver microsome 및 serum에서의 대사안정성을 측정한다. - CB-Ph 및 CB-OH가 reactive metabolite로 작용할 수 있는 가능성을 확인하기 위하여 glutathion과의 반응성을 측정한다. - HPLC/UV 또는 Applied Biosystems API2000 LC-MS/MS system를 이용하여 CB-Ph, CB-OH, CB-Ph acid 및 CB-OH acid의 정량분석을 수행한다.
Metabolism study	<ul style="list-style-type: none"> - Rat에서 생성되는 대사체를 규명하기 위해 <i>in vivo</i> metabolite ID실험을 수행 한다. - HPLC/UV 또는 Applied Biosystems API2000 LC-MS/MS system를 이용하여 CB-Ph, CB-OH, CB-Ph acid 및 CB-OH acid의 정량분석 한다.
분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - HPLC/UV 또는 Applied Biosystems API2000 LC-MS/MS system를 이용하여 CB-Ph, CB-OH, CB-Ph acid 및 CB-OH acid의 정량분석법을 개발한다.

다. 연구개발 방법

(1). *In vitro* ADME profiling

CB-PH의 흡수, 분포, 대사 및 배설과 관련된 특성을 다양한 *in vitro* 시험을 통하여 규명하고 이를 활용하여 인간에서의 약동력학적 특성을 예측하고자한다.

1) 흡수

- Caco-2 cell monolayer에서의 투과도를 측정하여 경구투여시의 장관벽 투과도를 예측함

- 시료 분석은 HPLC/UV 또는 LC-MS/MS system을 사용하여 수행함

2) 분포

- Equilibrium dialysis system을 이용하여 serum protein 및 필요시 기타 tissue에서의 binding 정도를 측정함

- 시료 분석은 HPLC/UV 또는 LC-MS/MS system을 사용하여 수행함

3) 대사

- Liver microsome 및 serum에서의 대사안정성을 측정하고, 생성되는 대사체를 규명하기 위한 metabolite ID 실험을 수행함

- 약물상호작용 가능성에 대한 평가를 위하여 약물대사에 관여하는 주요 cytochrome P450 효소(1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4)에 대한 저해활성을 측정함

- 시료 분석은 HPLC/UV 또는 LC-MS/MS system을 사용하여 수행함

(2). In vivo PK study

실험동물에서의 약동력학적 파라미터를 측정하여 CB-Ph의 체내동태를 파악하고 이를 통하여 인간에서의 약동력학적 특성을 예측하고자 함

1) 설치류

- 마우스 및 랫드에 정맥 및 경구투여 후 CB-Ph 및 대사체의 혈중농도를 측정하고 그 결과를 분석하여 약동력학적 파라미터를 구함

- 분석법 개발을 포함한 시료 분석은 HPLC/UV 또는 LC-MS/MS system을 사용하여 수행함

2) 비설치류

- 비글견에 정맥 및 경구투여 후 CB-Ph 및 대사체의 혈중농도를 측정하고 그 결과를 분석하여 약동력학적 파라미터를 구함

- 분석법 개발을 포함한 시료 분석은 HPLC/UV 또는 LC-MS/MS system을 사용하여 수행함

3) Human PK prediction

- 마우스, 랫드 및 비글견에서의 약동력학적 파라미터를 allometric scaling 방법으로 분석하여 인간에서의 약동력학적 파라미터를 예측하며, 그 결과는 Phase I 임상시험을 위한 투여용량 결정시 활용 가능함

2. Permeability of CB-Ph across Caco-2 cells

가. 연구목표

- Caco-2 cell monolayer에서의 투과도를 측정하여 경구투여시의 장관벽 투과도를 예측하고자 한다.

나. 연구방법

(1) 시험물질

- 충분한 양의 시험물질을 고체상태로 의뢰자로부터 공급받은 후 즉시 자동습도조절 데시케이터에 실온으로 보관하며 필요시 소분하여 사용하였다.

(2) Caco-2 permeability assay

- 10% FBS 및 1% NEAA가 함유된 MEM medium에서 Transwell system을 사용하여 3주간 배양된 Caco-2 cell monolayer에 CB-Ph(100 uM)를 apical side에 가하고 1시간 동안 37°C에서 transport 실험을 수행한 후 apical 및 basolateral side 양쪽에 존재하는 CB-Ph, CB-OH 및 CB-OH acid를 HPLC/UV(Table 3)를 사용하여 정량분석하였다.

(3) data 분석 및 Papp 산출

- 분석 data는 Chemstation software를 사용하여 처리하였으며, Papp는 아래의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$P_{app} = 1 / (A \times C_0) \times dQ / dt$$

dQ/dt: flux across the monolayer determined experimentally by measuring the amount of the compounds transported as a function of time

A: surface area of the insert and

C₀: initial concentration in the donor side.

다. 결과 및 토의

(1) Caco-2 permeability of CB-Ph

- 1시간 동안 지속된 transport 실험 수행 후 donor 및 receiver side 모두에서 CB-Ph의 농도가 정량한계(0.41 uM) 이하인 것으로 나타났다(Table 1). 따라서, CB-Ph는 본 실험조건에서 신속하게 분해되는 것으로 추정되며 그 결과

permeability의 측정이 불가하였다.

(2) Formation of CB-OH and CB-OH acid during CB-Ph permeability assay in Caco-2 cells

- Donor 및 receiver side 모두에서 CB-Ph는 검출되지 않았으나, 시초에 가해진 CB-Ph 총량의 약 3% 정도가 CB-OH로서 검출되었으며 약 63%는 CB-OH acid의 형태로 검출되었다(Table 2). 따라서 CB-Ph는 Caco-2 cell에 의하여 CB-OH 및 CB-OH acid로 변환되는 것으로 추정되며, 경구투여시는 주로 CB-OH 및 CB-OH acid의 형태로 흡수될 것으로 예측된다.

Table 1. Permeability of CB-Ph across Caco-2 cells

Compound	$P_{app} \times 10^6$ (cm/sec)		Comments
	mean	SD	
CB-Ph	ND	-	
Metoprolol	32.3	1.5	High permeability marker
Ranitidine	2.0	0.55	Low permeability marker

1. Papp values were determined in AP-to-BL direction at $1 \mu\text{M}$ in HBSS supplemented with 10 mM HEPES (pH 7.4) (n=2~4)

2. Samples were analyzed by HPLC/UV

ND : not determined

Table 2. Concentration of CB-Ph and its metabolites determined during Caco-2 permeability assay

Compound	Concentration (μM)				Amount (% of initial CB-Ph)			
	Receiver		Donor		Receiver		Donor	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
CB-Ph	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
CB-OH	0.8	0.5	-	-	3.0	2.0	ND	-
CB-OH acid	8.6	1.3	30.9	5.6	32.2	4.8	30.9	5.6

ND: not detected

Table 3. Summary of HPLC analytical method

Analyte	CB-Ph, CB-OH, CB-Ph acid and CB-OH acid
Instrument	Agilent Technologies 1100 HPLC system
Analysis column	Waters, XTerra®MS18 3.5um, 4.6X150mm
Detector	Diode Array Detector, UV 285nm
Mobile phase	Linear gradient from 0.01% TFA/60% acetonitrile/40% DI water to 0.01% TFA/5% acetonitrile/5% DI water.
Flow rate	0.5 ml/min
Injection volume	10 μ l
Column oven temp.	40 °C

Figure 1. Representative HPLC/UV chromatogram

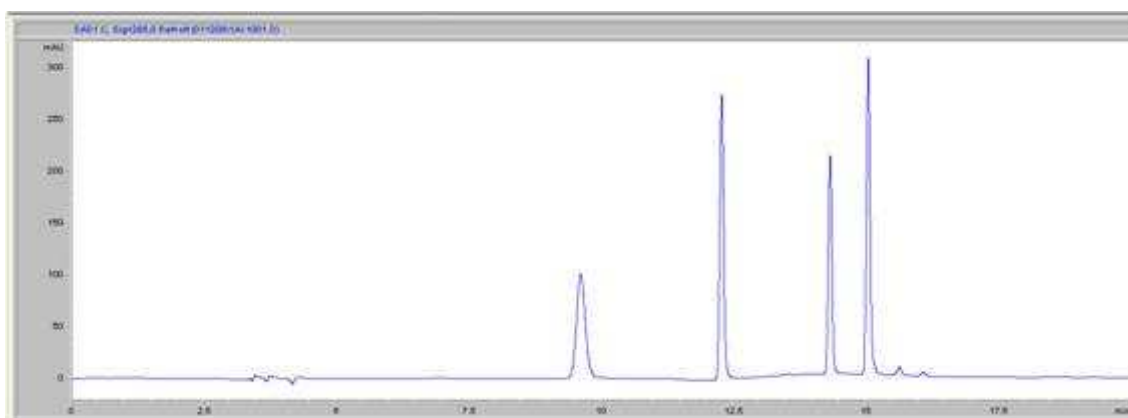
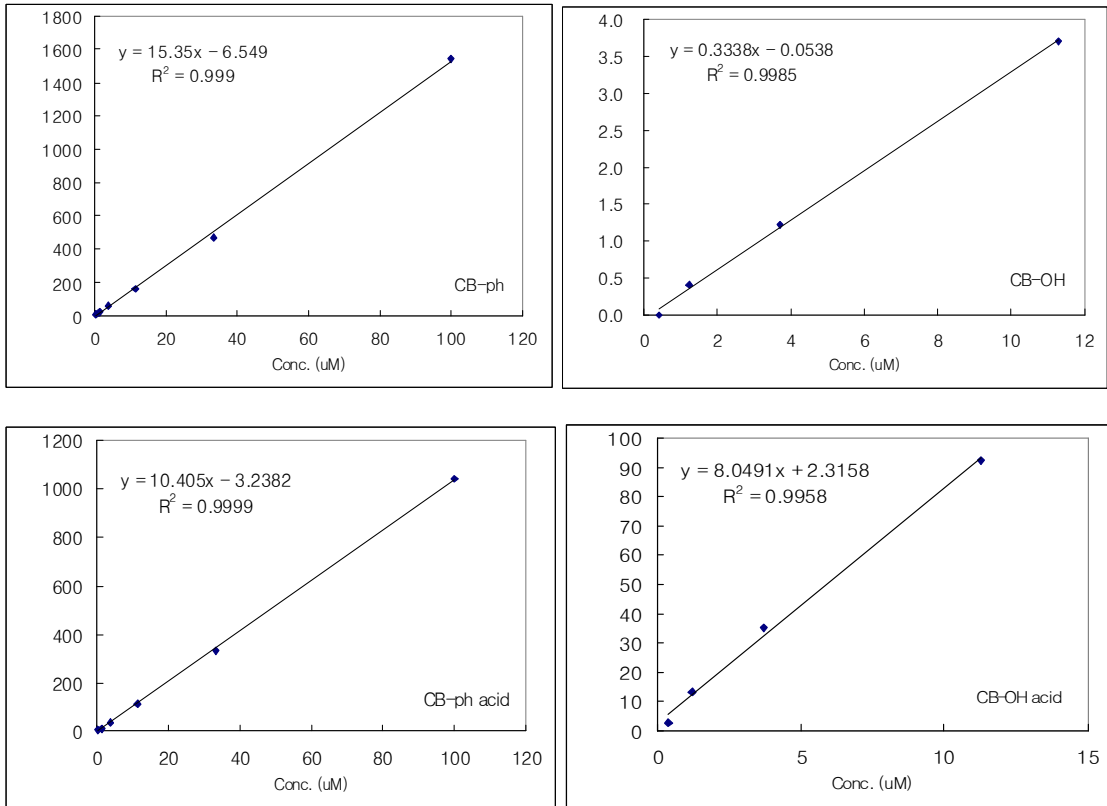


Figure 2. Standard curves



3. Serum stability

가. 연구목표

CB-Ph 및 CB-OH의 rat 및 human serum에서의 대사안정성을 측정하고자 한다.

나. 연구방법

(1) 시험물질

- 충분한 양의 시험물질을 고체상태로 의뢰자로부터 공급받은 후 즉시 자동습도조절 데시케이터에 실온으로 보관하며 필요시 소분하여 사용하였다.

(2) Rat serum stability of CB-Ph

- CB-Ph(100 uM)를 rat serum(100 uL)과 함께 37°C에서 24시간 동안 배양하며 정해진 시간에 추출용액 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v) 300 uL 을 가하여 반응을 종료하였다. 시료를 원심분리하여 단백질 침전을 제거한 후 상등액을

HPLC/UV 방법으로 분석하여 CB-Ph와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-Ph acid 및 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다.

(3) Human serum stability of CB-Ph

- CB-Ph(100 uM)를 human serum(100 uL)과 함께 37°C에서 24시간 동안 배양하며 정해진 시간에 추출용액 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v) 300 uL 을 가하여 반응을 종료하였다. 시료를 원심분리하여 단백질 침전을 제거한 후 상등액을 HPLC/UV 방법으로 분석하여 CB-Ph와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-Ph acid 및 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다.

(4) Rat serum stability of CB-OH

- CB-OH(1.5 uM)를 rat serum (100 uL)과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 정해진 시간에 추출용액 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v) 200 uL 을 가하여 반응을 종료하였다. 시료를 원심분리하여 단백질 침전을 제거한 후 상등액을 LC-MS/MS 방법으로 분석하여 CB-OH 및 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다.

(5) Human serum stability of CB-OH

- CB-OH(1 uM)를 human serum (100 uL)과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 정해진 시간에 추출용액 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v) 200 uL 을 가하여 반응을 종료하였다. 시료를 원심분리하여 단백질 침전을 제거한 후 상등액을 LC-MS/MS 방법으로 분석하여 CB-OH 및 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다.

다. 결과 및 토의

(1) Rat serum stability of CB-Ph

- CB-Ph(100 uM)를 rat serum과 함께 37°C에서 24시간 동안 배양하며 CB-Ph와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-Ph acid 및 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-Ph는 rat serum 내에서 매우 신속히 소실되었으며(half-life < 1 min), 이와 동시에 CB-OH가 소실된 CB-Ph의 양에 비례하여 생성되었다가 약 5분 이후부터 역시 소실되었다(Table 1, Figure 1). CB-OH acid는 5분 이후부터 서서히 생성되기 시작하여 24시간 후에는 소실된 CB-Ph양의 전체가 CB-OH acid로 변환되는 것으로 나타났으나 CB-Ph acid는 거의 생성되지 않았다(Table 1, Figure

1).

(2) Human serum stability of CB-Ph

- CB-Ph(100 uM)를 human serum과 함께 37°C에서 24시간 동안 배양하며 CB-Ph와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-Ph acid 및 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-Ph는 human serum 내에서도 매우 신속히 소실되었으며 (half-life < 1 min), 이와 동시에 CB-OH가 신속히 생성되었다가 약 2분 이후부터 역시 소실되었다(Table 2, Figure 2). 반면, rat serum에서와는 달리 CB-OH acid와 CB-Ph acid는 거의 생성되지 않았다.

(3) Rat serum stability of CB-OH

- CB-OH(1.5 uM)를 rat serum과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 CB-OH와 함께 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-OH 역시 rat serum 내에서 신속히 소실되었으며, CB-OH acid는 약 5분 이후부터 검출되기 시작하였으나 생성된 양은 소실된 CB-OH의 양보다 적었다(Table 3, Figure 3).

(4) Human serum stability of CB-OH

- CB-OH(1 uM)를 human serum과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 CB-OH와 함께 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-OH는 rat serum에서와 유사하게 human serum 내에서도 신속히 소실되었으나, CB-OH acid의 생성은 관찰되지 않았다(Table 4, Figure 4).

Table 1. Stability of CB-Ph in rat serum

Time (min)	% of initial amount of CB-Ph											
	CB-Ph			CB-OH			CB-Ph acid			CB-OH acid		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
0	100.0	13.0	3	6.17	1.6	3	2.10	0.3	3	ND	-	3
1	22.10	0.73	3	75.80	2.6	3	1.73	0.1	3	ND	-	3
2	9.71	0.66	3	81.53	3.6	3	1.70	0.0	3	ND	-	3
5	7.24	1.20	3	92.73	17.2	3	2.03	0.4	3	ND	-	3
10	4.29	0.46	3	84.87	3.4	3	1.93	0.1	3	5.73	0.3	3
15	2.50	0.18	3	70.03	1.7	3	1.63	0.1	3	7.47	0.7	3
30	0.57	0.05	3	58.77	0.9	3	1.20	0.0	3	13.07	0.2	3
60	ND	-	3	26.20	2.1	3	ND	-	3	15.93	1.3	3
1440	ND	-	3	8.23	0.2	3	ND	-	3	121.67	2.7	3
ND: not detected												

Table 2. Stability of CB-Ph in human serum

Time (min)	% of initial amount of CB-Ph											
	CB-Ph			CB-OH			CB-Ph acid			CB-OH acid		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
0	100.0	8.44	3	nd	-	3	nd	-	3	ND	-	3
1	15.00	0.84	3	43.49	3.4	3	1.04	0.1	3	ND	-	3
2	11.60	0.84	3	43.75	1.7	3	1.02	0.0	3	ND	-	3
5	9.27	0.56	3	37.02	1.4	3	1.02	0.0	3	ND	-	3
10	8.07	0.47	3	36.40	1.4	3	1.09	0.0	3	ND	-	3
15	6.79	0.52	3	35.41	0.9	3	1.16	0.0	3	ND	-	3
30	4.07	0.28	3	34.39	0.7	3	1.06	0.0	3	ND	-	3
60	0.69	0.069	3	15.11	0.3	3	0.76	0.0	3	ND	-	3
1440	1.27	0.106	3	20.71	1.4	3	0.95	0.1	3	2.06	0.8	3
ND: not detected												

Table 3. Stability of CB-OH in rat serum

Time (min)	% of initial amount of CB-OH					
	CB-OH			CB-OH acid		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N
0	100.0	2.7	3	ND	-	3
1	65.4	2.0	3	ND	-	3
2	52.5	3.1	3	ND	-	3
5	54.8	1.6	3	1.6	0.3	3
10	48.9	0.7	3	6.7	0.7	3
15	41.9	2.3	3	10.3	0.9	3
30	32.6	0.9	3	17.6	0.8	3
60	22.4	1.1	3	28.5	0.3	3
ND: not detected						

Table 4. Stability of CB-OH in human serum

Time (min)	% of initial amount of CB-OH					
	CB-OH			CB-OH acid		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N
0	100.0	8.1	3	ND	-	3
1	63.89	5.0	3	ND	-	3
2	62.05	3.9	3	ND	-	3
5	57.31	4.2	3	ND	-	3
10	50.02	2.0	3	ND	-	3
15	41.32	1.4	3	ND	-	3
30	29.22	4.3	3	ND	-	3
60	18.97	2.2	3	ND	-	3

ND: not detected

Figure 1. Time course of degradation of CB-Ph in rat serum

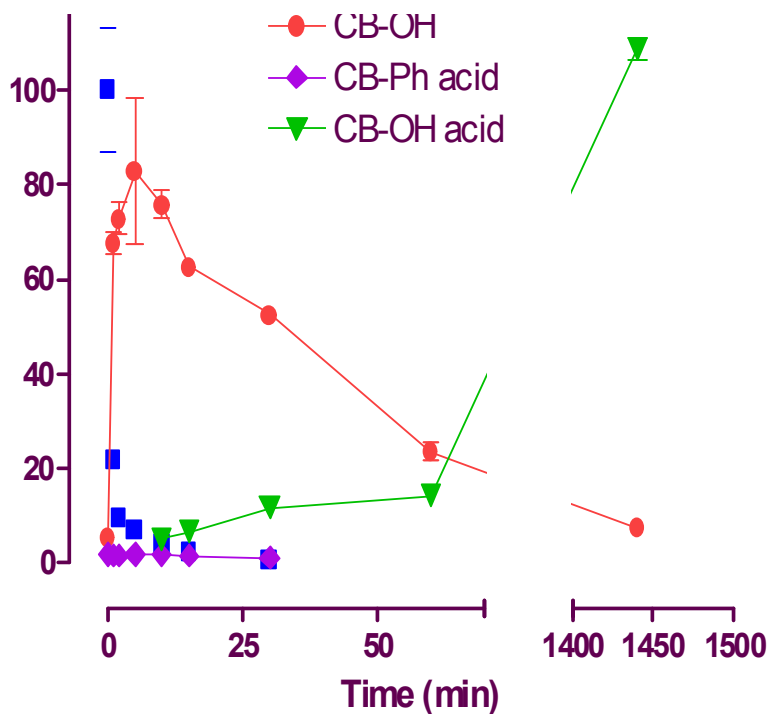


Figure 2. Time course of degradation of CB-Ph in human serum

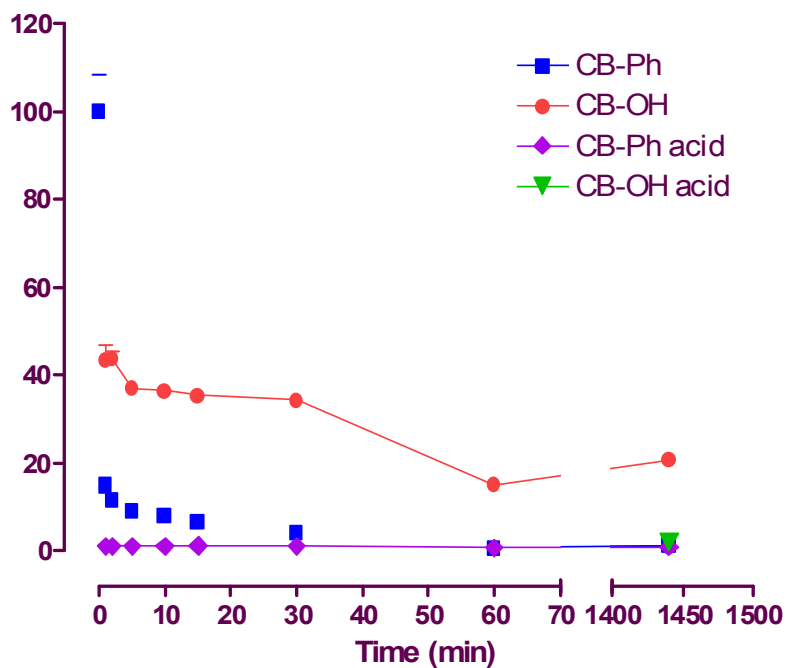


Figure 3. Time course of degradation of CB-OH in rat serum

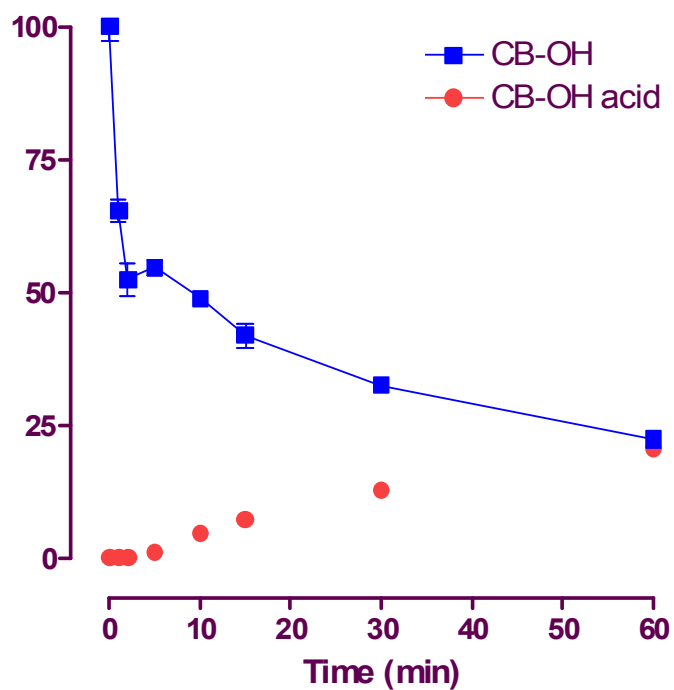


Figure 4. Time course of degradation of CB-OH in human serum

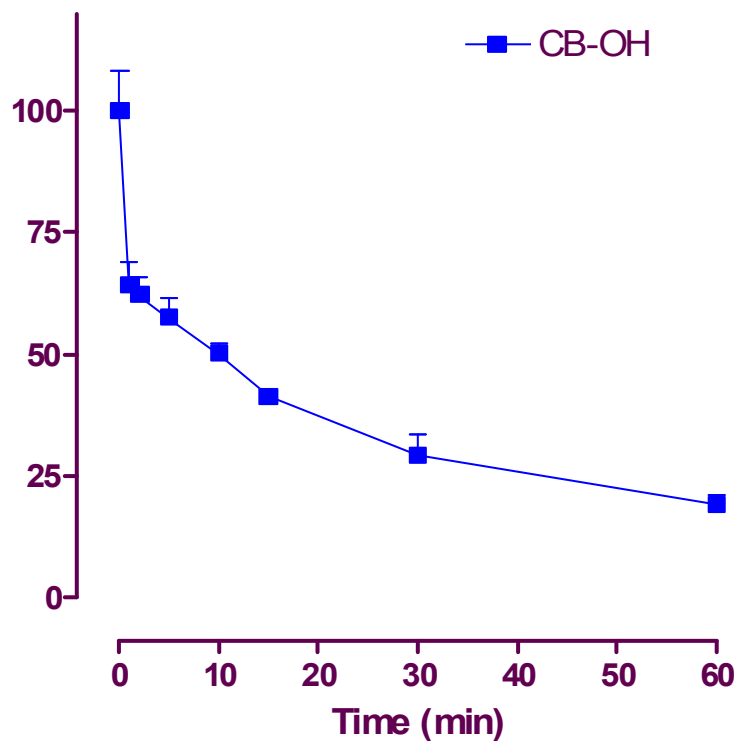


Table 5. Summary of analytical method

a. HPLC/UV

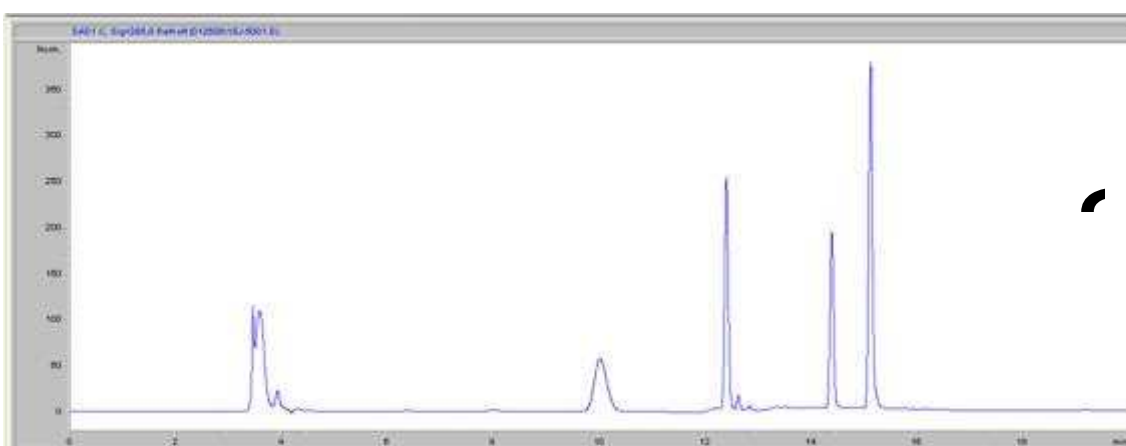
Analyte	CB-Ph, CB-OH, CB-Ph acid, CB-OH acid
Sample conc.	100uM
Instrument	Agilent Technologies 1100 HPLC system
Analysis column	Waters, XTerra® RP18 3.5um, 4.6X150mm
Detector	Diode Array Detector, UV 285nm
Mobile phase	Linear gradient from 0.01% TFA in 40% acetonitrile/60% DI water to 0.01% TFA in 95% acetonitrile/5% DI water.
Flow rate	0.5 ml/min
Injection volume	10 μ l
Column oven temp.	40 °C

b. LC-MS/MS

LC	HPLC system	Agilent 1100 series equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment
	Column	Waters Xterra MS C18 (2.1x50mm, 3.5um)
	Mobile phase	Linear gradient from 0.1% formic acid/5% acetonitrile/95% DI water to 0.1% formic acid/98% acetonitrile/2% DI water.
	Flow rate	0.25 ml/min
MS	MS system	API2000 LC/MS/MS system
	Ion source	Turbo Ion Spray
	Polarity	Negative
	MRM	CB-OH: 147>119 (Ret. Time: 9.17 min) CB-OH acid: 163>119 (Ret. Time: 9.04 min) HBO (IS): m/z 161>119 (Ret. Time: 9.19 min)

Figure 5. HPLC/UV chromatograms

a. Rat serum



b. Human serum

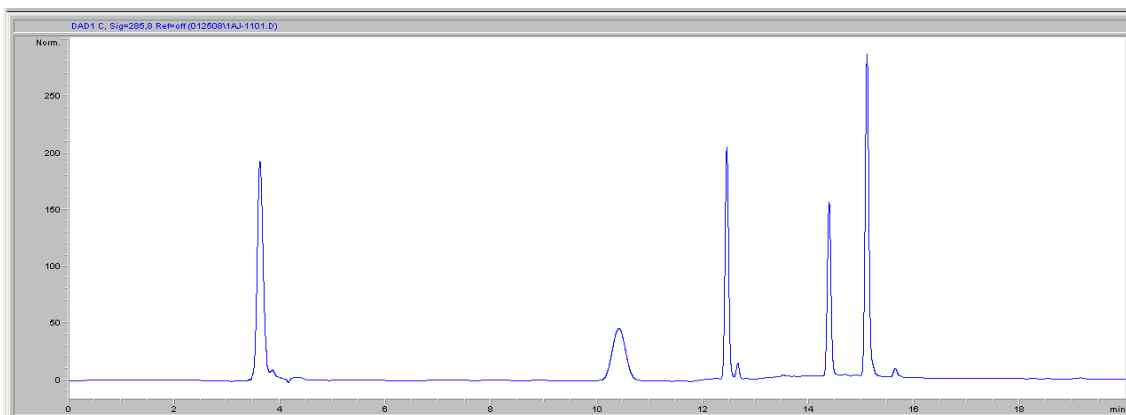
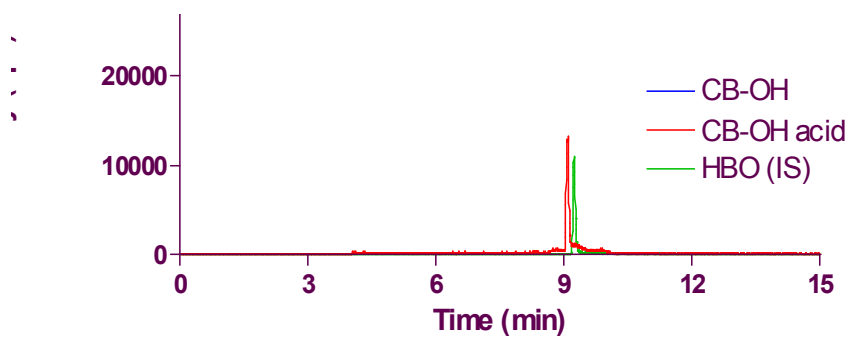


Figure 6. LC-MS/MS MRM chromatograms

a. Rat serum



b. Human serum

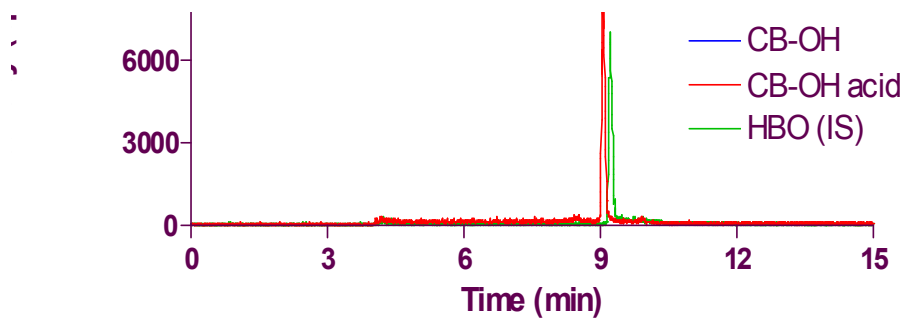
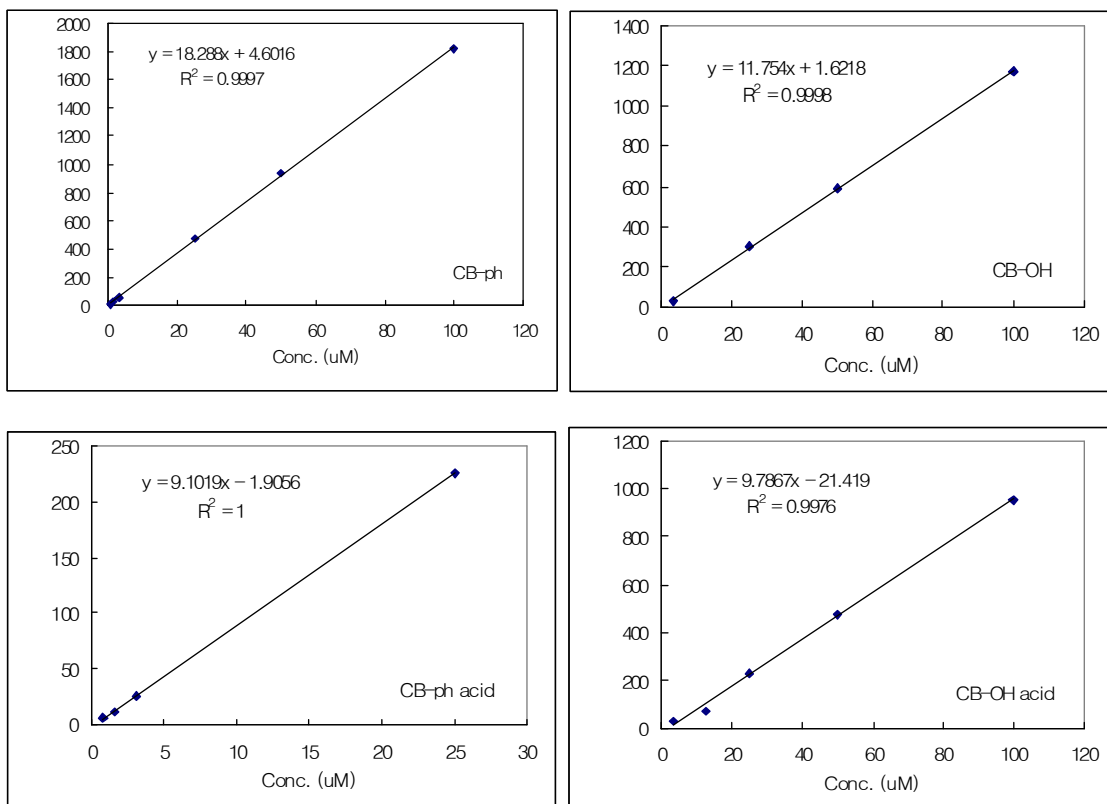
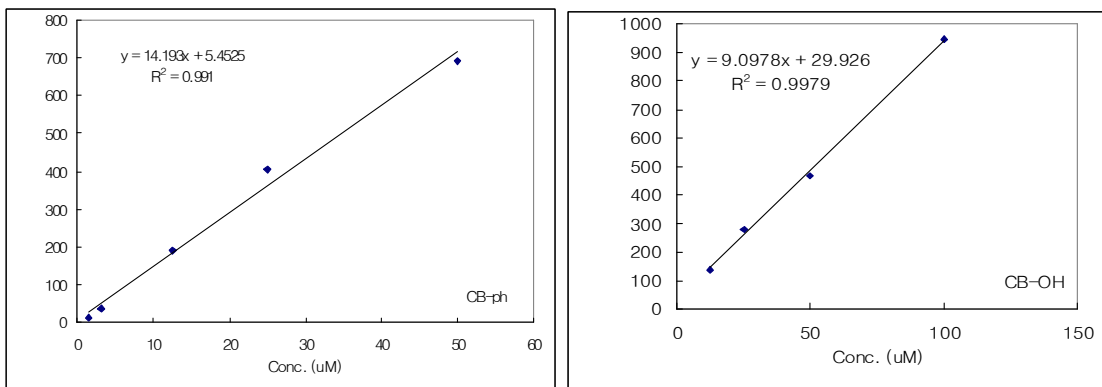


Figure 7. HPLC/UV standard curves

a. Rat serum



b. Human serum



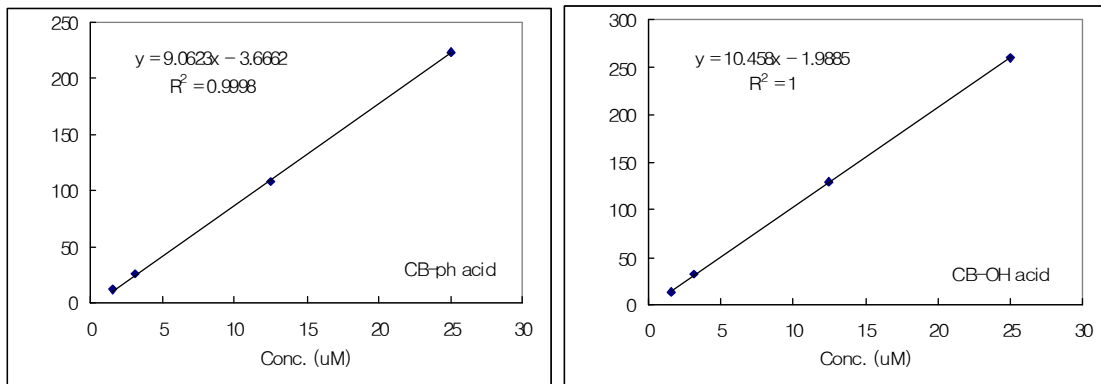
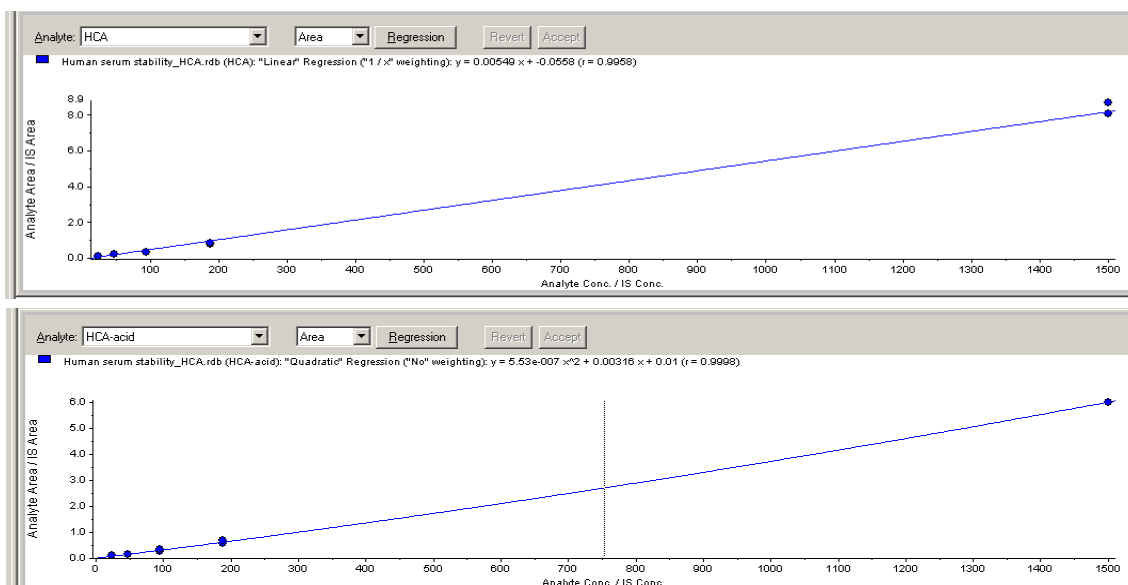
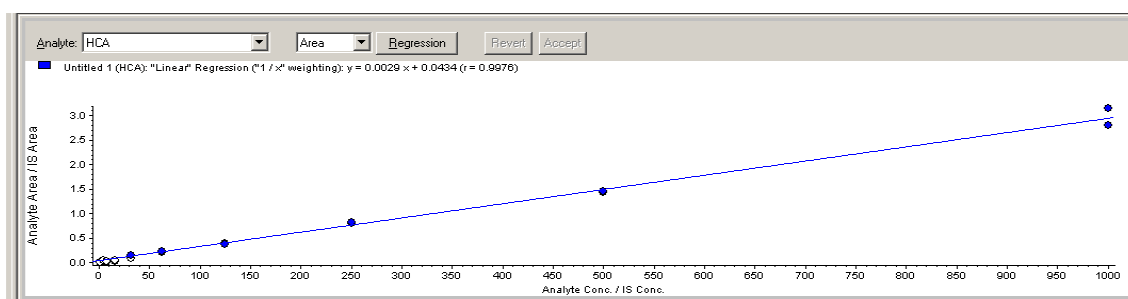


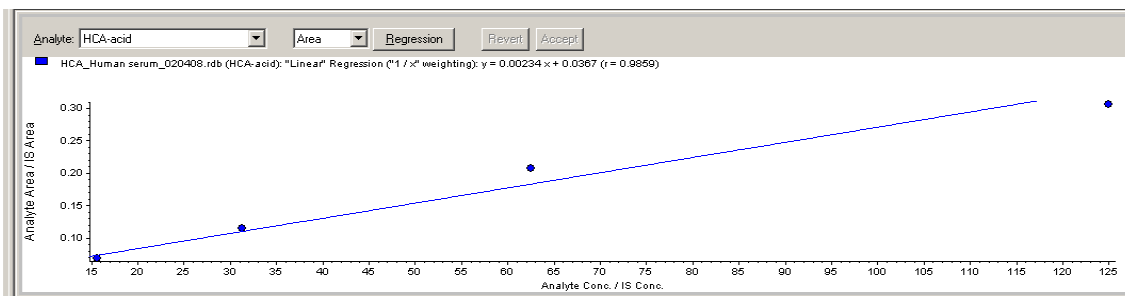
Figure 8. LC-MS/MS standard curves

a. Rat serum



b. Human serum





4. Microsomal stability

가. 연구목표

- CB-Ph 및 CB-OH의 rat 및 human liver microsomes에서의 대사안정성을 측정하고자 한다.

나. 연구방법

(1) 시험물질

- 충분한 양의 시험물질을 고체상태로 의뢰자로부터 공급받은 후 즉시 자동습도 조절 데시케이터에 실온으로 보관하며 필요시 소분하여 사용하였다.

(2) Rat microsomal stability of CB-Ph

- CB-Ph(50 uM)를 pooled rat liver microsome과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 정해진 시간에 추출용액 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v)을 가하여 반응을 종료하였다. 시료를 원심분리하여 단백질 침전을 제거한 후 상등액을 HPLC/UV 방법으로 분석하여 CB-Ph와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-Ph acid 및 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다.

(3) Human microsomal stability of CB-Ph

- CB-Ph(50 uM)를 pooled human liver microsome과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 정해진 시간에 추출용액 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v)을 가하여 반응을 종료하였다. 시료를 원심분리하여 단백질 침전을 제거한 후 상등액을 HPLC/UV 방법으로 분석하여 CB-Ph와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-Ph acid 및 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다.

(4) Rat microsomal stability of CB-OH

- CB-OH(1 uM)를 pooled rat liver microsome과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 정해진 시간에 추출용액 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v)을 가하여 반응을 종료하였다. 시료를 원심분리하여 단백질을 침전을 제거한 후 상등액을 Applied Biosystems사의 API2000 LC-MS/MS system을 사용하여 MRM 방법으로 분석하여 CB-OH와 함께 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다.

(5) Human microsomal stability of CB-OH

- CB-OH(1 uM)를 pooled human liver microsome과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 정해진 시간에 추출용액 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v)을 가하여 반응을 종료하였다. 시료를 원심분리하여 단백질을 침전을 제거한 후 상등액을 Applied Biosystems사의 API2000 LC-MS/MS system을 사용하여 MRM 방법으로 분석하여 CB-OH와 함께 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다.

다. 결과 및 토의

(1) Rat microsomal stability of CB-Ph

- CB-Ph(50 uM)를 pooled rat liver microsome과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 CB-Ph와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-OH acid 및 CB-Ph acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-Ph는 rat liver microsome에 의해서 매우 신속히 CB-OH로 변환되는 것으로 나타났으며 이 반응은 NADPH의 존재유무에 의존적이지 않은 것으로 보아 CYP450 효소에 의해 매개되지 않는 것으로 추정된다 (Table 1, Figure 1). 생성된 CB-OH 역시 신속히 소실되었으나 CB-OH acid로 전환되지 않는 것으로 나타났으며, CB-Ph acid는 검출되지 않았다 (Table 1, Figure 1).

(2) Human microsomal stability of CB-Ph

- CB-Ph(50 uM)를 pooled human liver microsome과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 CB-Ph와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-OH acid 및 CB-Ph acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-Ph는 human liver microsome에 의해서도 매우 신속히 CB-OH로 변환되는 것으로 나타났으며 이 반응은 NADPH의 존재유무에 의존적이지 않은 것으로 보아 CYP450 효소에 의해 매개되지 않는 것으로 추정

된다(Table 2, Figure 2). 생성된 CB-OH는 NADPH 의존적으로 신속히 소실되었으나 CB-OH acid로 전환되지는 않는 것으로 나타났으며, CB-Ph acid는 검출되지 않았다(Table 2, Figure 2).

(3) Rat microsomal stability of CB-OH

- CB-OH(1 uM)를 pooled rat liver microsome과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 CB-OH와 함께 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-OH는 rat liver microsome에 의해 NADPH에 비의존적으로 신속히 소실되었으며 소실된 CB-OH의 일부가 CB-OH acid로 변화되는 것으로 나타났다 (Table 3, Figure 3).

(4) Human microsomal stability of CB-OH

- CB-OH(1 uM)를 pooled human liver microsome과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 CB-OH와 함께 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-OH는 human liver microsome에 의해서도 NADPH에 비의존적으로 신속히 소실되었으며, NADPH가 존재하지 않을 경우에 존재하는 경우에 비하여 CB-OH acid가 더 많이 생성되었다 (Table 4, Figure 4). 이는 CB-OH가 CB-OH acid로 변환되는 대사반응이 NADPH에 비의존적이며 NADPH 존재시에는 이와 구분되는 다른 대사반응이 존재함을 시사한다. Rat microsome에서도 이와 유사한 경향을 보였다.

Table 1. Microsomal stability of CB-Ph in rat

Time (min)	% of initial amount of CB-Ph											
	CB-Ph				CB-OH				CB-OH acid			
	+NADPH		-NADPH		+NADPH		-NADPH		+NADPH		-NADPH	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0	ND	-	ND	-	86.9	5.2	77.2	5.3	ND	-	ND	-
10	ND	-	NA	-	65.8	4.9	NA	-	4.5	2.4	NA	-
30	ND	-	NA	-	33.6	4.5	NA	-	6.5	1.7	NA	-
60	ND	-	ND	-	18.6	2.4	55.5	5.7	6.5	1.1	8.1	0.7

ND: not detected; NA: not applicable

Figure 1. Time course of degradation of CB-Ph by rat liver microsomes

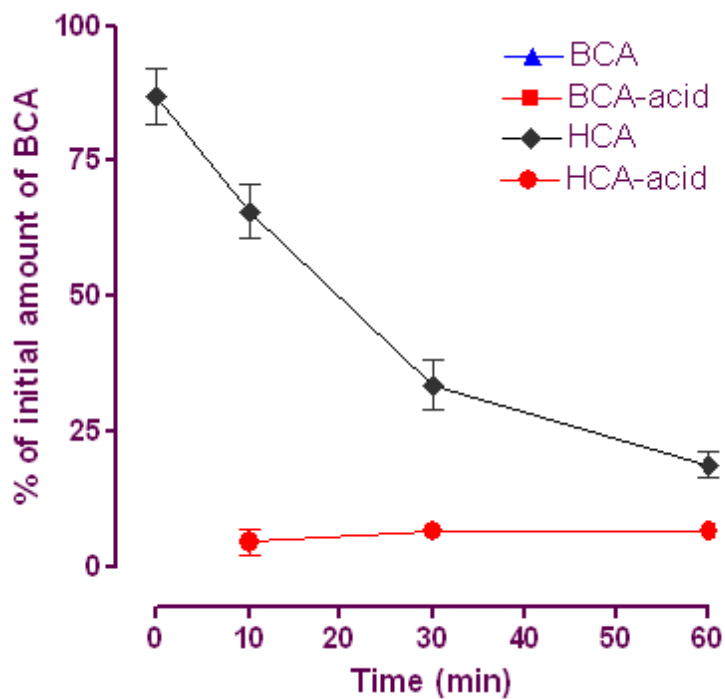


Table 2. Microsomal stability of CB-Ph in human

Time (min)	% of initial amount of CB-Ph											
	CB-Ph				CB-OH				CB-OH acid			
	+NADPH		-NADPH		+NADPH		-NADPH		+NADPH		-NADPH	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0	ND	-	0.8	0.1	55.6	36.2	98.6	9.7	nd	-	ND	-
10	ND	-	NA	-	25.1	3.0	99.9	1.4	4.8	0.8	ND	-
30	ND	-	NA	-	8.1	1.7	86.5	2.0	5.4	0.3	4.2	1.7

ND: not detected; NA: not applicable

Figure 2. Time course of degradation of CB-Ph by human liver microsomes

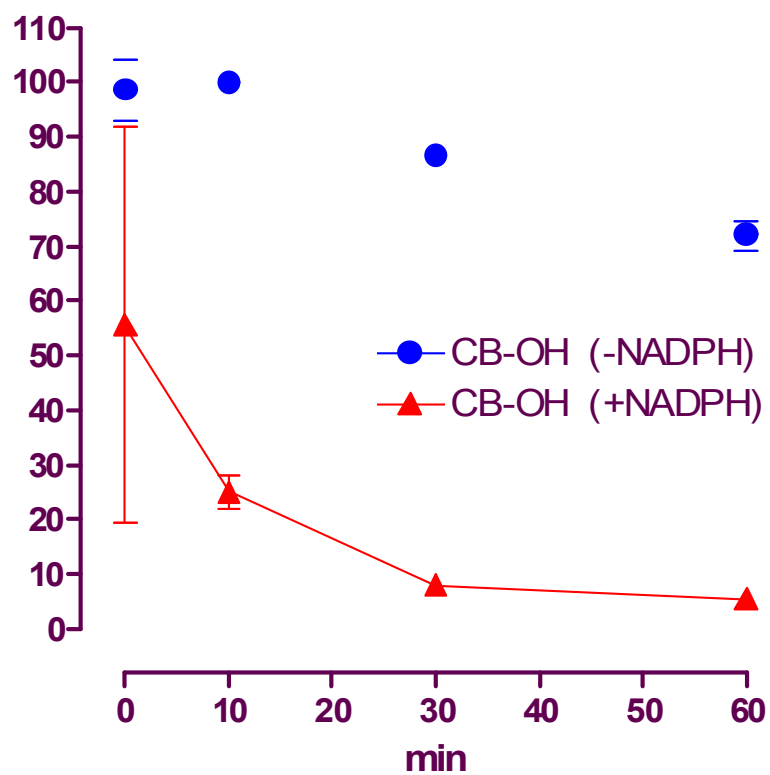


Table 3. Microsomal stability of CB-OH in rat

Time (min)	% of initial amount of CB-OH							
	CB-OH				CB-OH acid			
	+NADPH		-NADPH		+NADPH		-NADPH	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0	58.5	3.5	67.1	4.9	0.5	0.04	1.4	0.3

Figure 3. Time course of degradation of CB-OH by rat liver microsomes

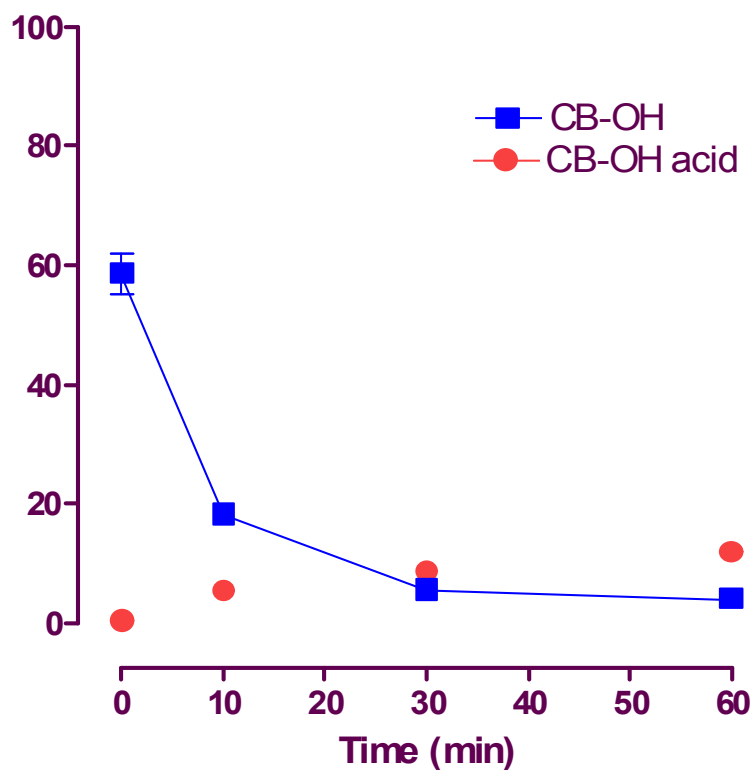


Table 4. Microsomal stability of CB-OH in human

Time (min)	% of initial amount of CB-OH							
	CB-OH				CB-OH acid			
	+NADPH		-NADPH		+NADPH		-NADPH	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0	46.3	1.7	58.9	4.3	1.7	0.06	2.4	0.2

Figure 4. Time course of degradation of CB-OH by human liver microsomes

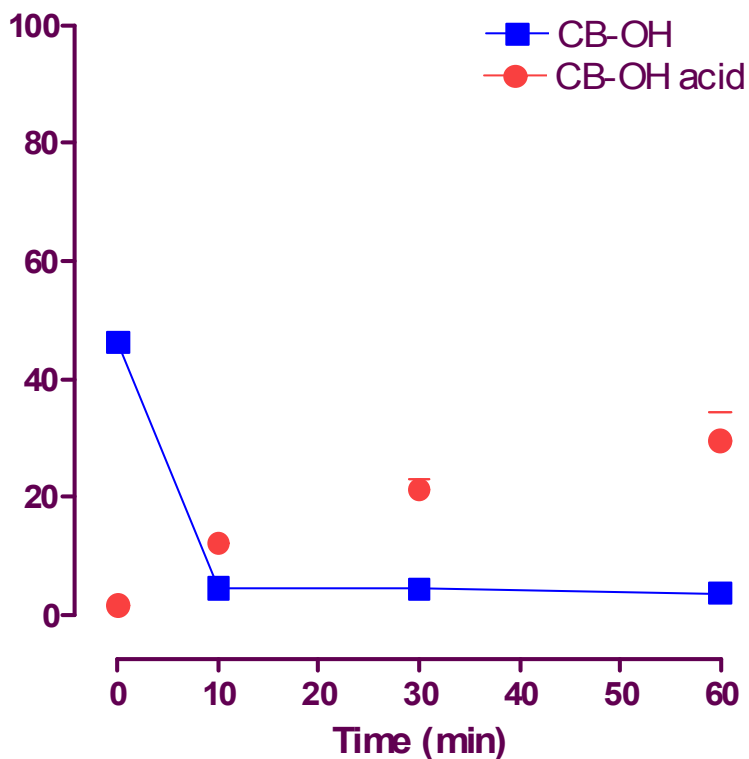


Table 5. Summary of analytical methods

a. HPLC/UV

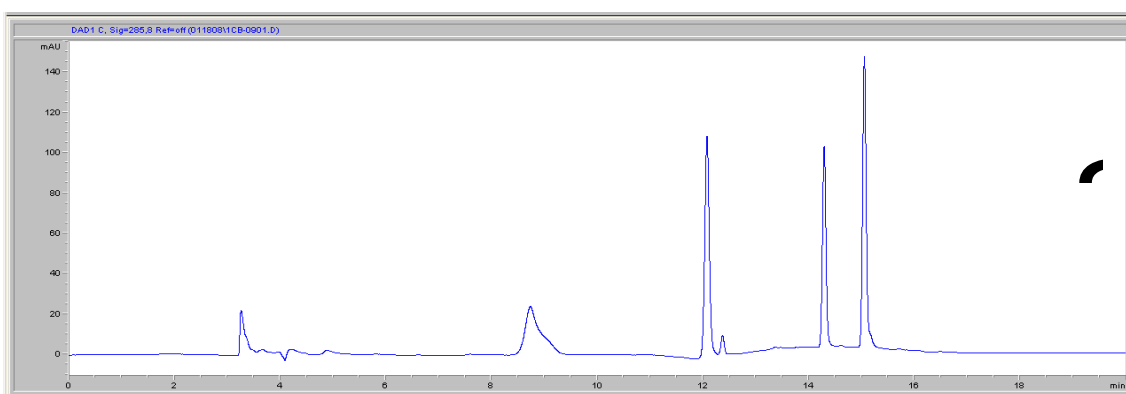
Analyte	CB-Ph, CB-OH, CB-Ph acid and CB-OHacid
Instrument	Agilent Technologies 1100 HPLC system
Analysis column	Waters, XTerra® MS18 3.5um, 4.6X150mm
Detector	Diode Array Detector, UV 285nm
Mobile phase	Linear gradient from 0.01% TFA/60% acetonitrile/40% DI water to 0.01% TFA/5% acetonitrile/5% DI water.
Flow rate	0.5 ml/min
Injection volume	10 μ l
Column oven temp.	40 °C

b. LC-MS/MS

LC	HPLC system	Agilent 1100 series equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment
	Column	Waters Xterra MS C18 (2.1x50mm, 3.5um)
	Mobile phase	Linear gradient from 0.1% formic acid/5% acetonitrile/95% DI water to 0.1% formic acid/98% acetonitrile/2% DI water.
	Flow rate	0.25 ml/min
MS	MS system	API2000 LC/MS/MS system
	Ion source	Turbo Ion Spray
	Polarity	Negative
	MRM	CB-OH: 147>119 (Ret. Time: 8.88 min) CB-OH acid: 163>119 (Ret. Time: 8.75 min) HBO (IS): m/z 161>119 (Ret. Time: 8.9 min)

Figure 5. Representative chromatograms

a. HPLC/UV



b. LC-MS/MS

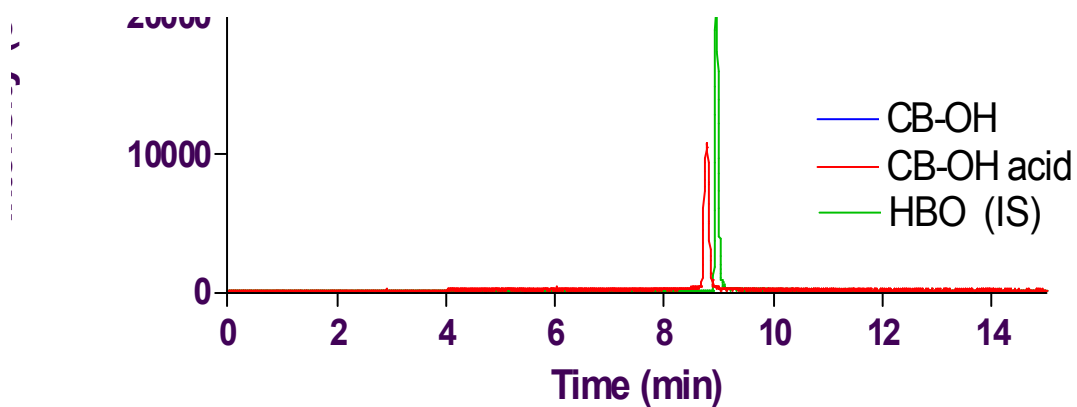
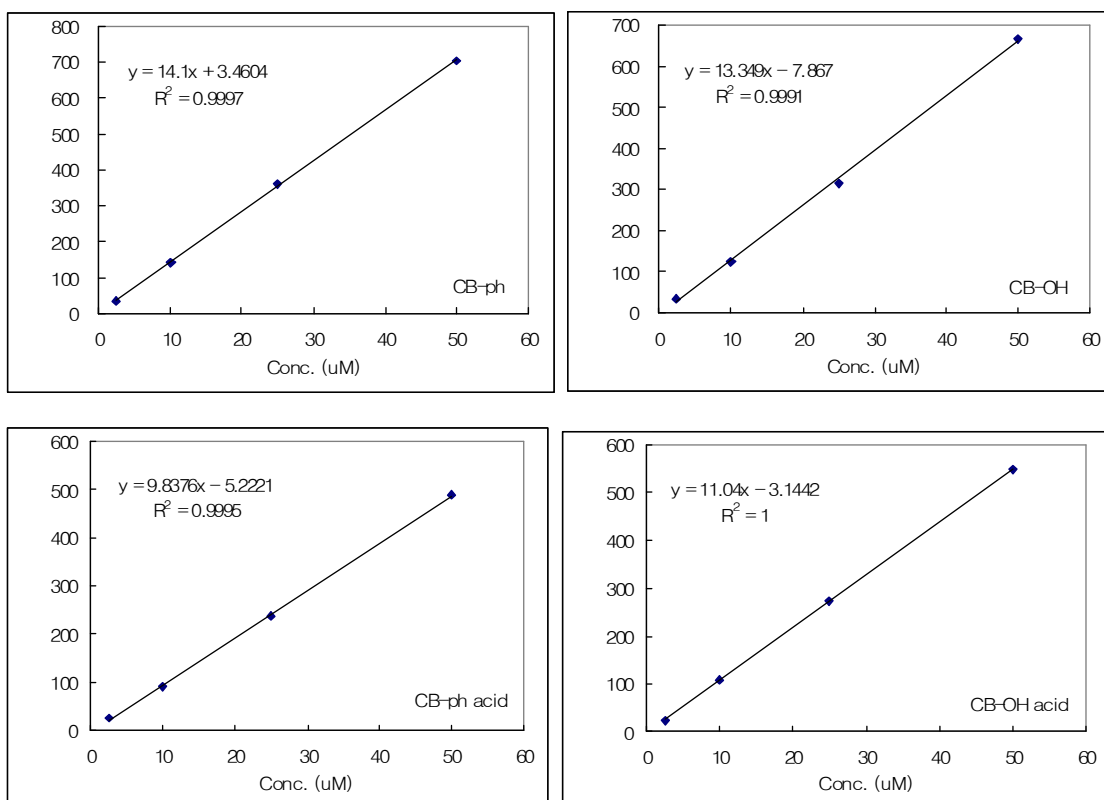
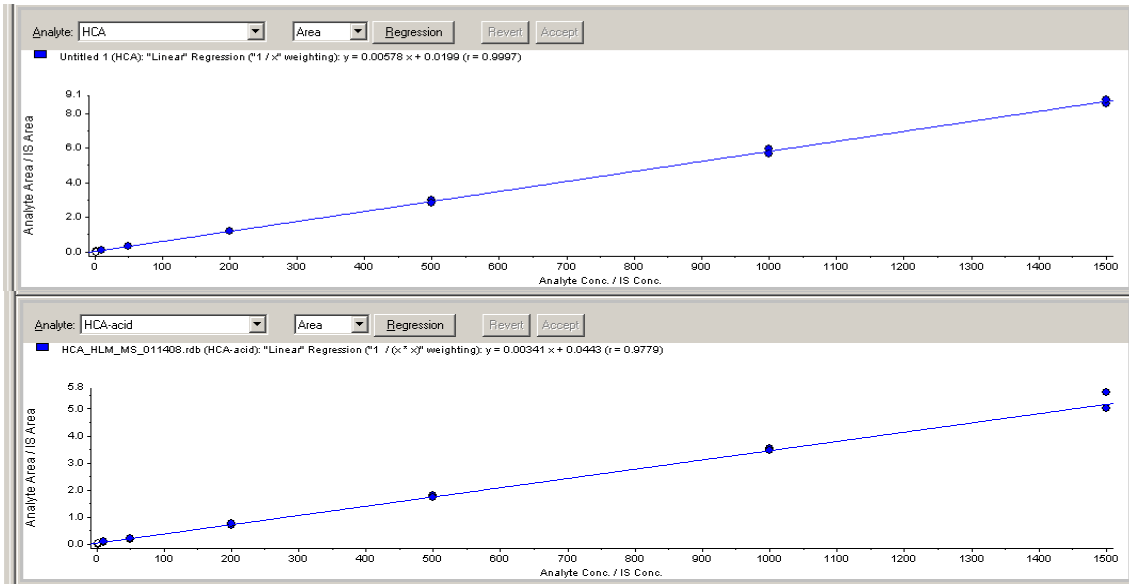


Figure 6. Standard curves

a. HPLC/UV



b. LC-MS/MS



5. Reactivity with glutathione(GSH)

가. 연구개발 목표

- 구조상 α, β -unsaturated aldehyde group의 존재로 인하여 CB-Ph 및 CB-OH가 reactive metabolite로 작용할 수 있는 가능성이 있으므로 이를 검증하기 위하여 이들 두 물질과 glutathione과의 반응성을 평가하고자 한다.

나. 연구방법

(1) 시험물질

- 충분한 양의 시험물질을 고체상태로 의뢰자로부터 공급받은 후 즉시 자동습도조절 데시케이터에 실온으로 보관하며 필요시 소분하여 사용하였다.

(2) 실험방법

- CB-Ph(50 μ M) 또는 CB-OH(50 μ M)를 GSH(0.5 mM) 존재하에 0.1 M potassium phosphate buffer 내에서 1시간 동안 37°C로 배양하며 정해진 시간에 반응액과 동량의 추출용액 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v)을 가하여 반응을 종료하였다. HPLC/UV 방법으로 이들 시험물질 및 대사체의 농도를 측정하였다.

(3) 결과 및 토의

1) Reactivity of CB-Ph with glutathione

- CB-Ph(50 uM)를 과량의 GSH(0.5 mM)와 1시간 동안 37°C에서 배양하며 CB-Ph와 CB-OH의 농도변화를 측정하였다. CB-Ph는 반응시간에 비례하여 소실되었으며 1시간 배양 후에 약 30%가 소실되었다(Table 1, Figure 1). 반면, GSH가 존재하지 않을 경우에는 1시간 후에 약 10% 정도가 소실되는 것으로 나타났으나 반응시간에 비례하여 감소하는 양상을 보이지는 않았다(Table 1). GSH가 존재할 경우 1시간 반응 후에 소실된 총량 중 약 20%만이 CB-OH로 변환되는 것으로 확인되었고 나머지 80%는 α,β -unsaturated aldehyde group과 GSH와의 반응에 의하여 소실되었을 것으로 추정된다. 이들 결과를 종합하여 볼 때 CB-Ph는 GSH와 느리게 반응하는 것으로 판단되므로 체내에서 reactive metabolite로서 작용할 가능성이 존재하는 것으로 사료된다.

2) Reactivity of CB-OH with glutathione

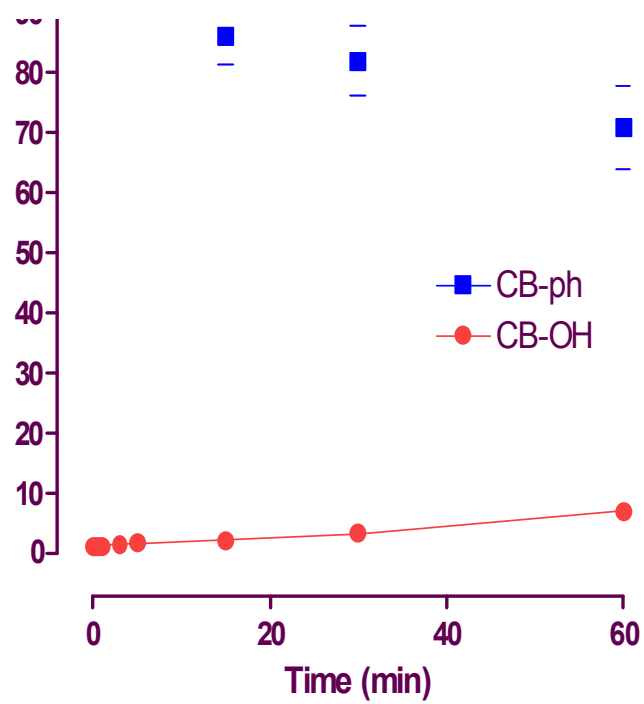
- CB-OH(50 uM)를 과량의 GSH(0.5 mM)와 1시간 동안 37°C에서 배양하며 소실여부를 측정한 결과 소실되지 않는 것으로 나타났다(Figure 2). 따라서, CB-OH는 체내에서 reactive metabolite로서 작용할 가능성이 낮은 것으로 판단된다.

Table 1. Reactivity of CB-Ph with GSH

Time (min)	% of initial amount of CB-Ph											
	+GSH						-GSH					
	CB-Ph			CB-OH			CB-Ph			CB-OH		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
0	100.0	2.1	3	1.0	0.01	3	100.0	5.1	3	1.1	0.06	3
0.5	96.2	3.7	3	1.1	0.07	3	96.7	6.3	3	1.1	0.02	3
1	94.3	2.7	3	1.1	0.06	3	93.5	8.3	3	1.0	0.02	3
3	91.3	2.2	3	1.4	0.11	3	93.0	5.2	3	1.0	0.02	3
5	90.7	1.1	3	1.7	0.20	3	95.3	4.9	3	1.0	0.03	3
15	86.0	4.6	3	2.1	0.34	3	88.6	5.0	3	1.0	0.02	3
30	81.9	5.9	3	3.2	0.75	3	93.3	6.1	3	1.1	0.03	3
60	70.9	6.9	3	6.9	1.38	3	89.2	5.2	3	1.4	0.11	3

Figure 1. Time course of degradation of CB-Ph by GSH

a. +GSH



b. -GSH

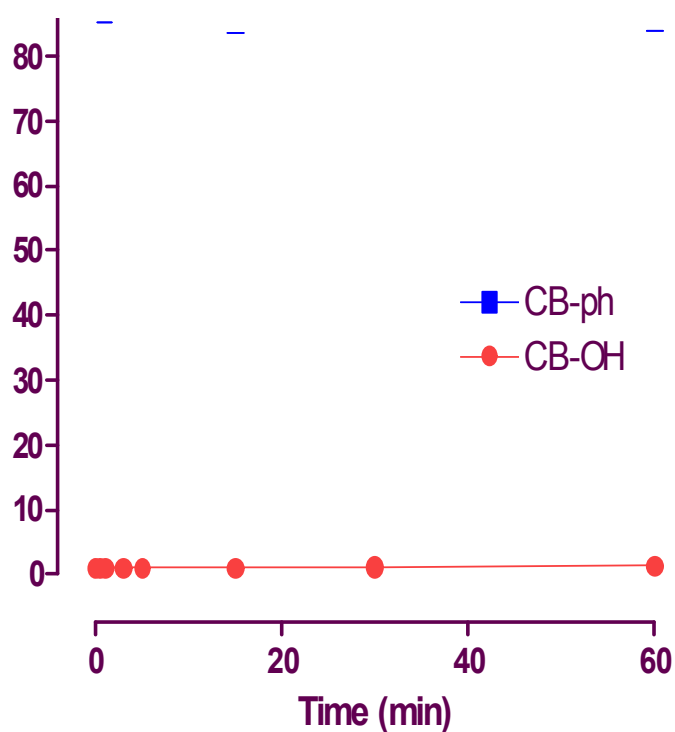


Figure 2. Time course of degradation of CB-OH by GSH

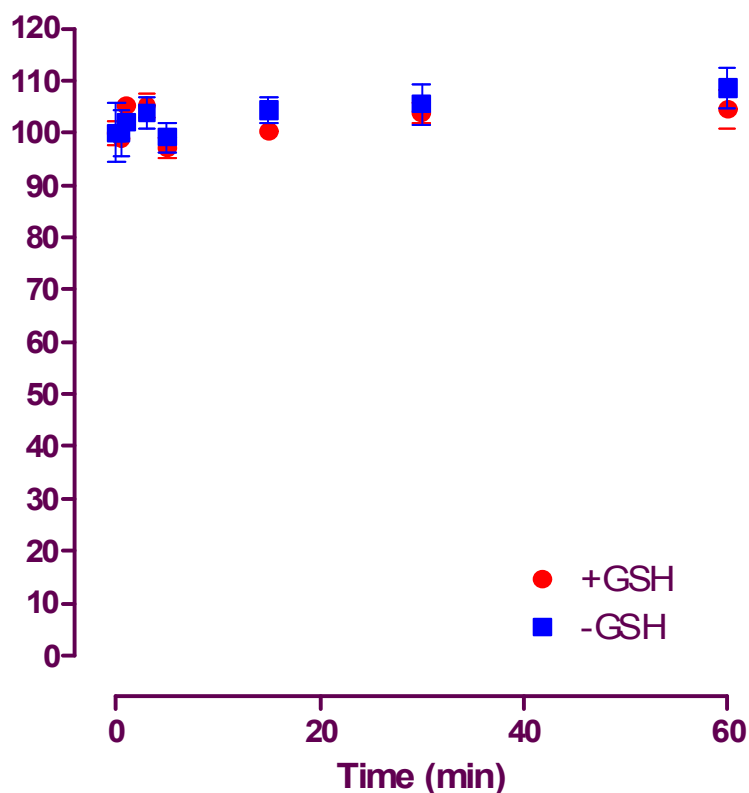


Table 2. Summary of analytical method

Analyte	CB-Ph, CB-OH, CB-Ph acid, CB-OH acid
Sample conc.	50uM
Instrument	Agilent Technologies 1100 HPLC system
Analysis column	Waters, XTerra® RP18 3.5um, 4.6X150mm
Detector	Diode Array Detector, UV 285nm
Mobile phase	Linear gradient from 0.01% TFA in 40% acetonitrile/60% DI water to 0.01% TFA in 95% acetonitrile/5% DI water.
Flow rate	0.5 ml/min
Injection volume	10 μ l
Column oven temp.	40 $^{\circ}$ C

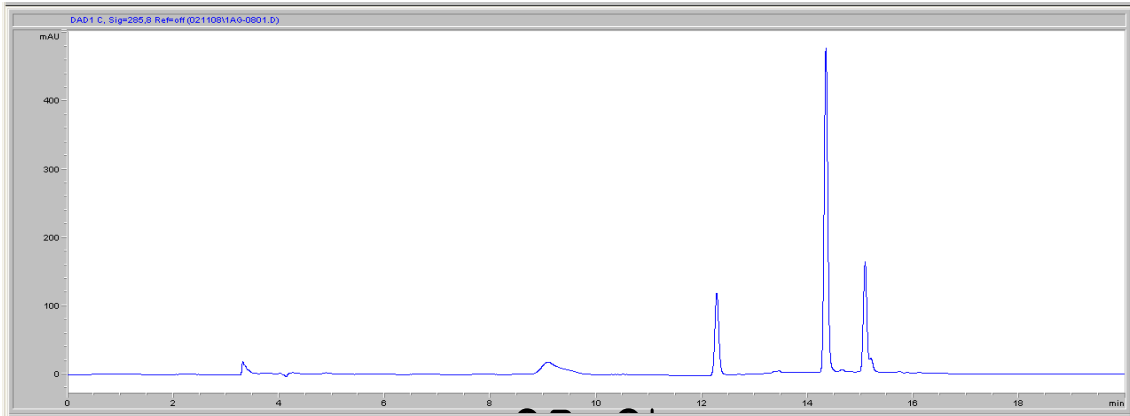


Figure 3. HPLC/UV chromatograms

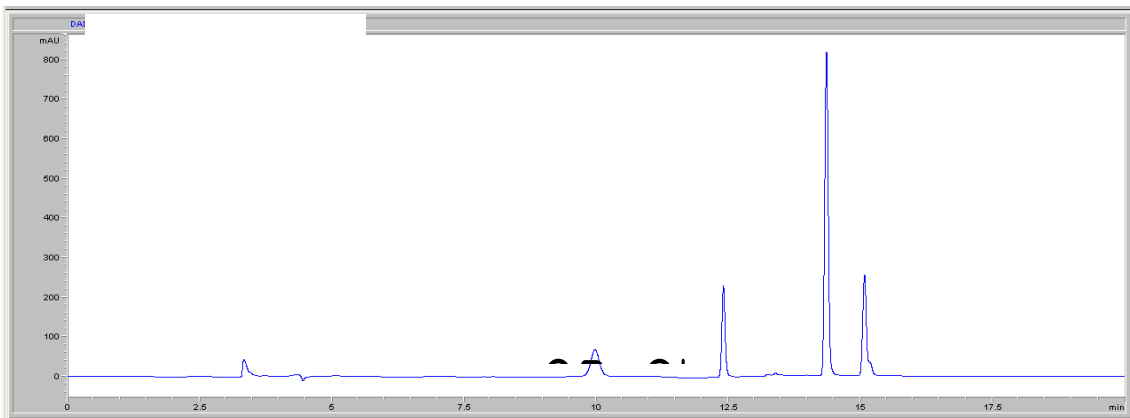
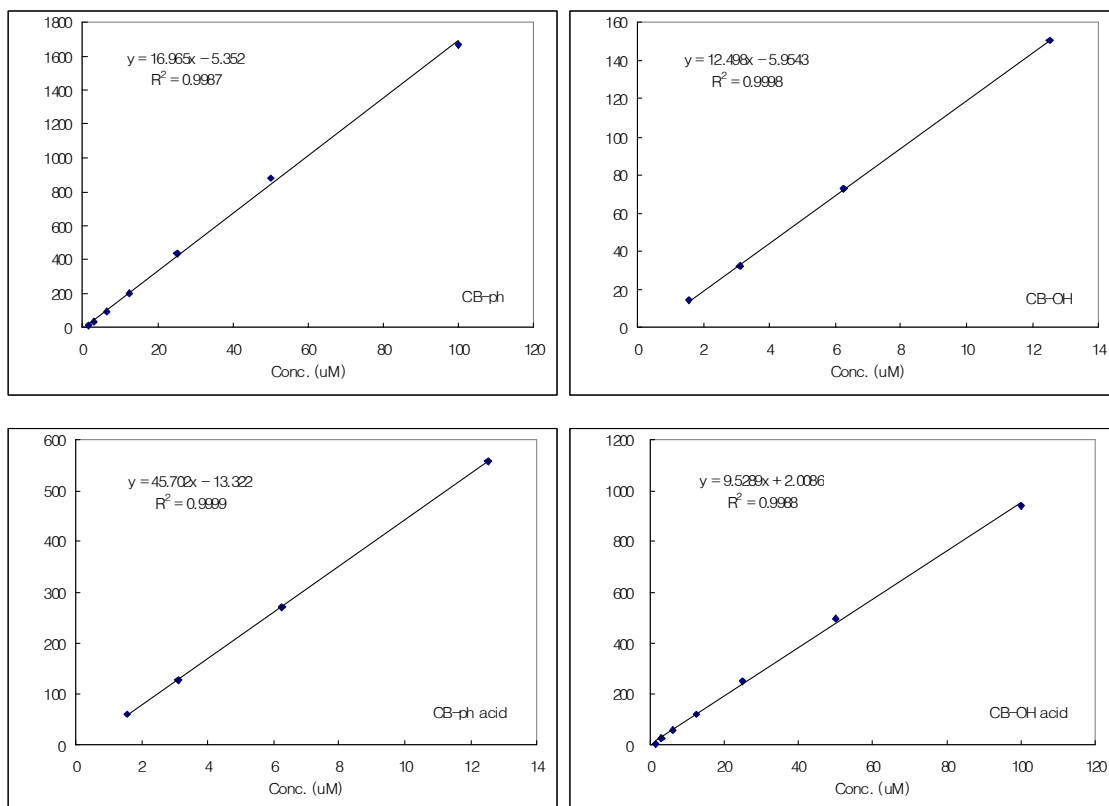
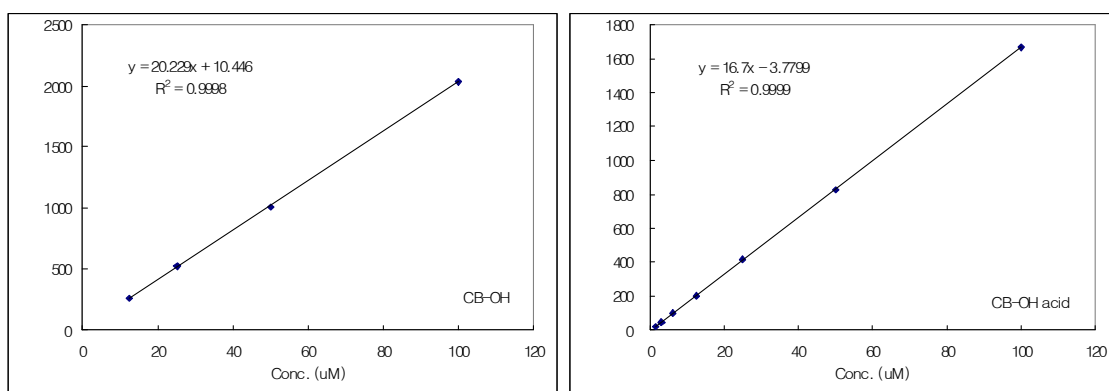


Figure 4. Standard curves

a. CB-Ph study



b. CB-OH study



6. *In vivo* pharmacokinetics

가. 연구개발 목표

- 실험동물에서의 약동력학 파라미터를 측정하여 CB-Ph 및 CB-OH의 체내동태적 특성을 파악하고자 한다.

나. 연구방법

(1) 시험물질

- 충분한 양의 시험물질을 고체상태로 의뢰자로부터 공급받은 후 즉시 자동습도조절 데시케이터에 실온으로 보관하며 필요시 소분하여 사용하였다.

(2) Pharmacokinetic study of CB-Ph in rats

- 우측 jugular vein에 cannulation이 된 male SD rat(n=4/route)에 CB-Ph 용액을 정맥(50 mg/kg, dimethylacetamide/PEG400/DI water=10/60/30 v/v) 또는 경구(100 mg/kg, dimethylacetamide/Labrafil M 1944CS/Olive oil=10/30/60 v/v)로 단회 투여한 후 각각 24시간 동안 jugular vein cannula를 통하여 BD plasma separator 튜브에 혈액을 채취하였다. 혈액시료를 원심분리하여 혈장을 분리한 후 3배 용량의 추출용매(acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v)를 가하고 원심분리하였다. 상기 방법으로 분리된 상등액을 HPLC/UV(CB-Ph 정량) 또는 LC-MS/MS(CB-OH 및 CB-OH acid 정량)를 사용하여 분석하고 그 결과를 Kinetica™ 4.4.1 software를 사용하여 분석하여 PK parameter를 산출하였다.

(3) Pharmacokinetic study of CB-OH in rats

- 우측 jugular vein에 cannulation이 된 male SD rat(n=5/route)에 CB-OH 용액(20 mg/kg, Ethanol/Cremophor EL/PBS=5/10/85 v/v)을 정맥주사로 단회 투여한 후 24시간 동안 jugular vein cannula를 통하여 BD plasma separator 튜브에 혈액을 채취하였다. 혈액시료를 원심분리하여 혈장을 분리한 후 3배 용량의 추출용매(acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v)를 가하고 원심분리하였다. 상기 방법으로 분리된 상등액을 LC-MS/MS 로 분석하여 CB-OH 및 CB-OH acid를 정량하고 그 결과를 Kinetica™4.4.1 software를 사용하여 분석하여 PK parameter를 산출하였다.

(4) Pharmacokinetic study of 2'-hydroxycinnamic acid (CB-OH acid) in rats

- 우측 jugular vein에 cannulation이 된 male SD rat(n=4/route)에 CB-OH acid 용

액 (20 mg/kg, Ethanol/Cremophor EL/PBS=5/10/85 v/v)을 정맥주사로 단회 투여한 후 24시간 동안 jugular vein cannula를 통하여 BD plasma separator 튜브에 혈액을 채취하였다. 혈액시료를 원심분리하여 혈장을 분리한 후 3배 용량의 추출용매 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v)를 가하고 원심분리하였다. 상기 방법으로 분리된 상등액을 LC-MS/MS 로 분석하여 CB-OH acid를 정량하고 그 결과를 Kinetica™ 4.4.1 software를 사용하여 분석하여 PK parameter를 산출하였다.

(5) Pharmacokinetic study of CB-Ph in dogs

-Male beagle dog(n=3/route)에 CB-Ph 용액을 정맥 (20 mg/kg, dimethylacetamide/PEG400/DI water=10/60/30 v/v) 또는 경구 (5 mg/kg, dimethylacetamide/PEG400/DI water=10/60/30 v/v)로 단회 투여한 후 각각 24시간 동안 요측피정맥을 통하여 혈액을 채취하였다. 혈액시료를 원심분리하여 혈장을 분리한 후 3배 용량의 추출용매 (acetonitrile:37% formaldehyde, 90:10, v/v)를 가하고 원심분리하였다. 상기 방법으로 분리된 상등액을 HPLC/UV(CB-Ph 정량) 또는 LC-MS/MS (CB-OH 및 CB-OH acid 정량)를 사용하여 분석하고 그 결과를 Kinetica™ 4.4.1 software를 사용하여 분석하여 PK parameter를 산출하였다.

다. 결과 및 토의

(1) Plasma pharmacokinetics of CB-Ph in rats

- CB-Ph를 male SD rat(n=4)에 정맥 또는 경구로 단회투여 후 24시간 동안 혈장농도를 분석하고 그 결과를 이용하여 PK parameter를 산출하였다. CB-Ph는 정맥투여시 혈중에서 매우 신속히 소실되어 투여 후 최초 time point인 5분부터 그 이후 전 실험과정에서 검출되지 않았으므로 이에 대한 PK parameter를 구하지 못하였다(Table 1). 반면, 대사체인 CB-OH 및 CB-OH acid는 CB-Ph 투여 직후 최초 time point에 최고농도로 검출된 이후 4~8시간 동안 지속적으로 혈중에 존재하며 multi-compartmental disposition의 특성을 나타내는 것으로 확인되었다(Table 1, Figure 1a). 이러한 결과를 바탕으로 CB-Ph는 정맥투여시 매우 신속히 대사되어 CB-OH 및 CB-OH acid로 변환되며, CB-OH 및 CB-OH acid 역시 혈중에서 신속히 소실되는 것으로 보인다. 이러한 실험결과는 앞서 기술된 serum 및 microsomal stability 실험결과와 부합됨을 알 수 있다.
- CB-Ph는 경구투여 시에도 정맥투여의 경우와 유사하게 혈중에서 매우 신속히 소실되어 투여 후 최초 time point인 15분부터 그 이후 전 실험과정에서 검출되지 않았으므로 이에 대한 PK parameter를 구하지 못하였다 (Table 2). 반면, 대사체

인 CB-OH 및 CB-OH acid는 CB-Ph 투여 직후 최초 time point에 최고농도로 검출된 이후 24시간 동안 지속적으로 혈중에 존재하며 multi-compartmental disposition의 특성을 나타내는 것으로 확인되었다 (Table 2, Figure 1b).

(2) Plasma pharmacokinetics of CB-OH in rats

- CB-OH를 male SD rat(n=5)에 정맥주사로 단회투여 후 24시간 동안 혈장농도를 분석하고 그 결과를 이용하여 PK parameter를 산출하였다. CB-OH는 hepatic blood flow를 훨씬 증가하는 높은 systemic clearance를 나타내었으며, 체내에서 매우 신속히 CB-OH acid로 변환되었다 (Table 3, Figure 2). Steady state에서의 분포용적 (V_{ss})이 10 L/kg으로 높아서 CB-OH는 혈관 외로 잘 분포하는 것으로 나타났으며 apparent terminal elimination half-life는 약 2시간으로 비교적 짧은 것으로 나타났다(Table 3).

(3) Plasma pharmacokinetics of 2'-hydroxycinnamic acid (CB-OH acid) in rats

- CB-OH acid를 male SD rat(n=4)에 정맥주사로 단회투여 후 24시간 동안 혈장농도를 분석하고 그 결과를 이용하여 PK parameter를 산출하였다. CB-OH는 hepatic blood flow의 약 10%에 불과한 낮은 systemic clearance를 나타내었으며, apparent terminal elimination half-life는 약 2시간으로 CB-OH와 유사한 것으로 나타났다 (Table 4, Figure 3). Steady state에서의 분포용적(V_{ss})은 0.33 L/kg으로 낮은 편이며 이는 이 화합물이 organic anion의 특징을 지님에 따른 결과인 것으로 추정 된다 (Table 4).

(4) Plasma pharmacokinetics of CB-Ph in dogs

- CB-Ph를 male beagle dog(n=3)에 정맥 또는 경구로 단회 투여 후 24시간 동안 혈장농도를 분석하고 그 결과를 이용하여 PK parameter를 산출하였다. CB-Ph는 정맥 투여시 rat에서의 경우와 유사하게 혈중에서 매우 신속히 소실되어 투여 후 15분까지만 검출되었으며, 따라서 정확한 elimination terminal phase를 구하지 못해 PK parameter를 구하지 못하였다(Table5, Figure 4a). 반면, 대사체인 CB-OH 및 CB-OH acid는 CB-Ph 투여 직후 최초 time point에서 최고농도로 검출된 이후 CB-OH는 24시간, CB-OH acid는 4시간 동안 지속적으로 혈중에 존재하며 multi-compartmental disposition의 특성을 나타내는 것으로 확인되었다(Figure 4a). 이러한 결과를 바탕으로 CB-Ph는 정맥투여시 매우 신속히 대사되어 CB-OH 및 CB-OH acid로 변환되며, CB-OH 및 CB-OH acid 역시 혈중에서 신속히 소실되는 것으로 보인다. 경구투여 시에는 투여 후 최초 time point인 15분부터 그 이

후 전 실험과정에서 검출되지 않았으므로 이에 대한 PK parameter를 구하지 하였다 (Table 6, Figure 4b). 반면, 대사체인 CB-OH 및 CB-OH acid는 CB-Ph 투여 후 약 1시간 후 최고농도로 검출된 이후 4-8시간 동안 지속적으로 혈중에 존재하는 것으로 확인되었다 (Figure 4b).

Table 1. Pharmacokinetic parameters of CB-Ph in rats following a single intravenous injection

Parameter	IV								
	CB-Ph			CB-OH			CB-OH acid		
	mean	SD	N	mean	SD	N	mean	SD	N
Dose (mg/kg)	50		4	NA			NA		
t _{max} (hr)	NA			0.08	0.000	4	0.10	0.04	-
C _{max} (ng/ml)	<100			1727.5	106.9	4	27150.0	3828.4	-
AUC _{last} (ng.hr/ml)	ND		4	736.4	65.91	4	12392.1	1964.0	4
AUC _{inf} (ng.hr/ml)	ND		4	744.7	68.29	4	12456.3	1984.59	4
CL (l/hr/kg)	ND		4	NA			NA		
V _{ss} (l/kg)	ND		4	NA			NA		
V _z (l/kg)	ND		4	NA			NA		
t _{1/2} (hr)	ND		4	1.7	0.50	4	0.6	0.08	4
MRT _{inf} (hr)	ND		4	1.0	0.08	4	0.6	0.01	4
F (%)	NA			NA		-	NA		

1. Pharmacokinetic parameters were obtained by non-compartmental analysis of the plasma concentration-time profiles using Kinetica™ 4.4.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Woburn, MA, USA).

2. NA: not applicable

3. ND: not determined

Table 2. Pharmacokinetic parameters of CB-Ph in rats following a single oral dose

Parameter	PO								
	CB-Ph			CB-OH			CB-OH acid		
	mean	SD	N	mean	SD	N	mean	SD	N
Dose (mg/kg)	100		4	NA			NA		
t _{max} (hr)	ND		4	0.25	0.000	4	0.25	0.000	4
C _{max} (ng/ml)	<100		4	124.3	10.7	4	5475.0	494.1	4
AUC _{last} (ng.hr/ml)	ND		4	736.1	182.5	4	27841.4	8869.1	4
AUC _{inf} (ng.hr/ml)	ND		4	883.4	321.4	2	32893.8	9018.6	3
CL (l/hr/kg)	NA			NA			NA		
V _{ss} (l/kg)	NA			NA			NA		
V _z (l/kg)	NA			NA			NA		
t _{1/2} (hr)	ND		4	10.4	0.48	2	9.6	5.87	3
MRT _{inf} (hr)	ND		4	13.4	0.04	2	10.9	7.03	3
F (%)	ND		4	NA			NA		

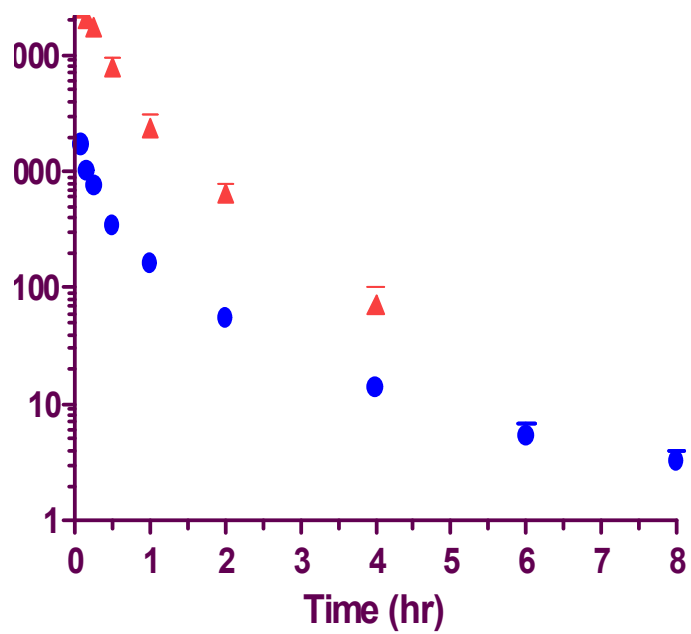
1. Pharmacokinetic parameters were obtained by non-compartmental analysis of the plasma concentration-time profiles using Kinetica™ 4.4.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Woburn, MA, USA).

2. NA: not applicable

3. ND: not determined

Figure 1. Plasma concentration-time profiles of CB-Ph in rats

a. IV



b. PO

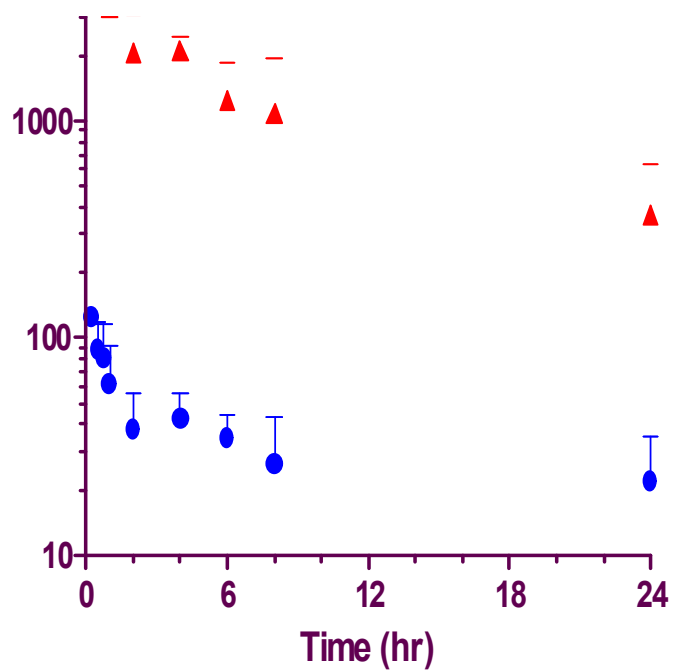


Table 3. Pharmacokinetic parameters of CB-OH in rats following a single intravenous injection

PK parameter	CB-OH			CB-OH acid		
	mean	SD	N	mean	SD	N
Dose (mg/kg)	20			NA		
t_{\max} (hr)	0.08	0.000		0.08	0.000	5
C_{\max} (ng/ml)	3674.0	1665.60		32380.0	4727.26	5
AUC_{last} (ng.hr/ml)	1891.5	706.96	5	15721.9	2011.82	5
AUC_{inf} (ng.hr/ml)	1910.6	710.28	5	15842.8	1985.11	5
CL (l/hr/kg)	11.6	4.00	5	NA		5
V_{ss} (l/kg)	10.0	4.32	5	NA		5
V_z (l/kg)	34.2	10.78	5	NA		5
$t_{1/2}$ (hr)	2.1	0.08	5	0.5	0.12	5
MRT_{inf} (hr)	0.8	0.09	5	0.5	0.04	5

1. Pharmacokinetic parameters were obtained by non-compartmental analysis of the plasma concentration-time profiles using Kinetica™ 4.4.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Woburn, MA, USA).

2. NA: not applicable

Figure 2. Plasma concentration-time profile of CB-OH in rats following a single intravenous injection

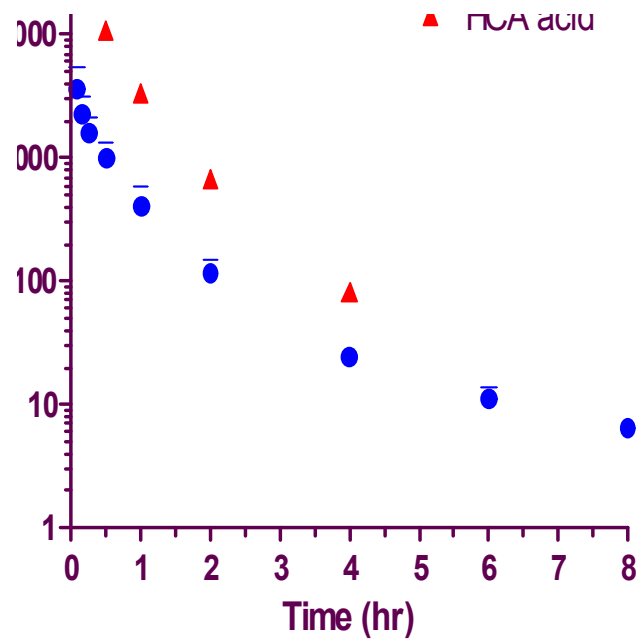


Table 4. Pharmacokinetic parameters of CB-OH acid in rats following a single intravenous injection

PK parameter		CB-OH acid		
		mean	SD	N
Dose	(mg/kg)	20		
t_{max}	(hr)	-	-	
C_{max}	(ng/ml)	-	-	
AUC_{last}	(ng.hr/ml)	37053.3	5075.8	4
AUC_{inf}	(ng.hr/ml)	37314.1	5099.0	4
CL	(l/hr/kg)	0.54	0.08	4
V_{ss}	(l/hr/kg)	0.33	0.02	4
V_z	(l/kg)	1.7	0.70	4
$t_{1/2}$	(hr)	2.2	0.9	4
MRT_{inf}	(hr)	0.6	0.05	4

1. Pharmacokinetic parameters were obtained by non-compartmental analysis of the plasma concentration-time profiles using Kinetica™ 4.4.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Woburn, MA, USA).

Figure 3. Plasma concentration-time profile of CB-OH in rats following a single intravenous injection

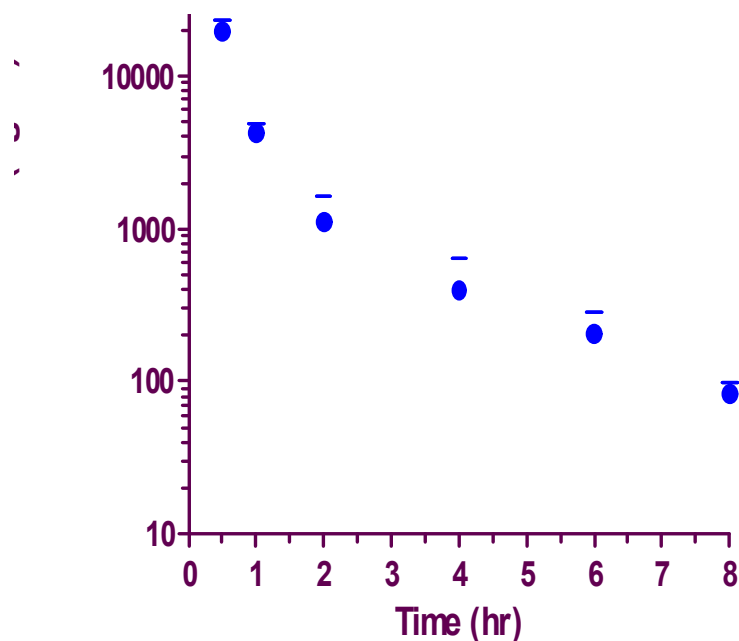


Table 5. Pharmacokinetic parameters of CB-Ph in dogs following a single intravenous injection

Parameter	IV								
	CB-PH			HCA			HCA acid		
	<i>mean</i>	SD	N	<i>mean</i>	SD	N	<i>mean</i>	SD	N
Dose (mg/kg)	20		3	NA			NA		
t_{max} (hr)	-	-	3	0.1	0.0	3	0.1	0.0	3
C_{max} (ng/ml)	-	-	3	4026.7	620.1	3	22733.3	1985.8	3
AUC_{last} (ng.hr/ml)	199.7	71.9	3	1365.7	306.8	3	19617.5	1832.4	3
AUC_{inf} (ng.hr/ml)	215.4	81.1	3	1754.1	237.8	3	19688.9	1850.1	3
CL (l/hr/kg)	NA	-		NA	-		NA	-	
V_{ss} (l/kg)	NA	-		NA	-		NA	-	
V_z (l/kg)	NA	-		NA	-		NA	-	
$t_{1/2}$ (hr)	NA	-	3	27.1	6.3	3	1.4	0.3	3
MRT_{inf} (hr)	NA	-	3	16.9	6.5	3	0.8	0.1	3
F (%)	NA			NA		-	NA		

1. Pharmacokinetic parameters were obtained by non-compartmental analysis of the plasma concentration-time profiles using Kinetica™ 4.4.1

(Thermo Fisher Scientific, Inc., Woburn, MA, USA).

2. NA: not applicable

3. ND: not determined

Table 6. Pharmacokinetic parameters of CB-Ph in dogs following a single oral dose

Parameter	PO								
	CB-PH			HCA			HCA acid		
	<i>mean</i>	SD	N	<i>mean</i>	SD	N	<i>mean</i>	SD	N
Dose (mg/kg)	50		3	NA			NA		
t _{max} (hr)	ND	-	3	0.8	0.1	3	1.1	0.9	3
C _{max} (ng/ml)	<100	-	3	107.2	12.7	3	4973.3	1250.0	3
AUC _{la} _{st} (ng.hr/ml)	ND	-	3	254.7	77.2	3	16028.8	10031.1	3
AUC _i _{nf} (ng.hr/ml)	ND	-	3	401.9	319.0	3	19827.7	16369.3	3
CL (l/hr/kg)	NA	-		NA	-		NA	-	
V _{ss} (l/kg)	NA	-		NA	-		NA	-	
V _z (l/kg)	NA	-		NA	-		NA	-	
t _{1/2} (hr)	ND	-	3	4.5	5.5	3	2.2	2.1	3
MRT _i _{nf} (hr)	ND	-	3	6.2	7.3	3	3.5	2.7	3
F (%)	ND		3	NA			NA		

1. Pharmacokinetic parameters were obtained by non-compartmental analysis of the plasma concentration-time profiles using Kinetica™ 4.4.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Woburn, MA, USA).

2. NA: not applicable

3. ND: not determined

Figure 4. Plasma concentration-time profiles of CB-Ph in dogs

a. IV



b. PO



Table 7. Summary of HPLC/UV method for quantitation of CB-Ph

LC	HPLC system	Agilent 1100 series equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment		
	Column	Waters Xterra MS C18 (4.6x150mm, 3.5um)		
	Column oven temp.	40 °C		
	Detector	Diode Array Detector, UV 285nm		
	Mobile phase	Linear gradient from 1% acetic acid/40% acetonitrile/60% DI water to 1% acetic acid/95% acetonitrile/5% DI water.		
	Gradient program	Time (min)	%B	Flow (ml/min)
		0	40	0.5
		5	40	0.5
		10	95	0.5
		20	95	0.5
Flow rate	0.5 ml/min			
Post time	5 min			
Stop time	20 min			
Injection volume	30 ul			

Table 8. Summary of LC-MS/MS method

a. Simultaneous quantitation of CB-OH and CB-OH acid

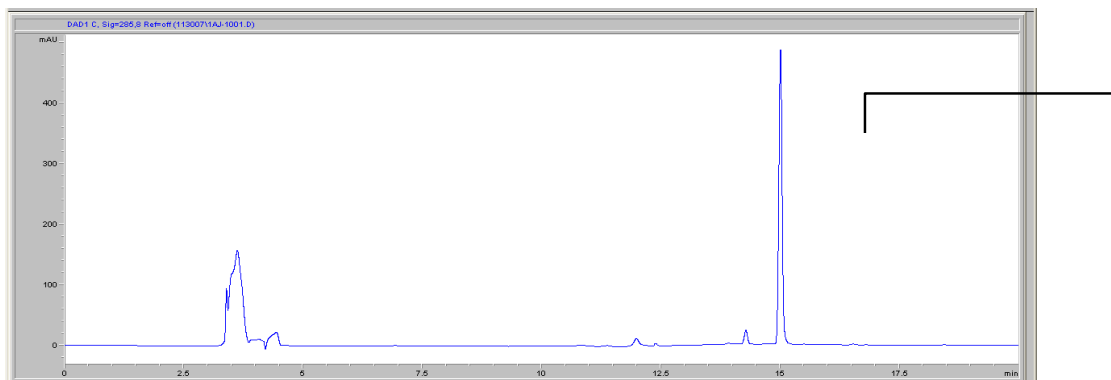
LC	HPLC system	Agilent 1100 series equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment
	Column	Waters Xterra MS C18 (2.1x20mm, 3.5um)
	Mobile phase	Linear gradient from 0.1% formic acid/5% acetonitrile/95% DI water to 0.1% formic acid/98% acetonitrile/2% DI water.
	Flow rate	0.25 ml/min
MS	MS system	API2000 LC/MS/MS system
	Ion source	Turbo Ion Spray
	Polarity	Negative
	MRM	CB-OH: 147>119 (Ret. Time: 8.88 min) CB-OH acid: 163>119 (Ret. Time: 8.75 min) HBO (IS): m/z 161>119 (Ret. Time: 8.9 min)

b. CB-OH acid only

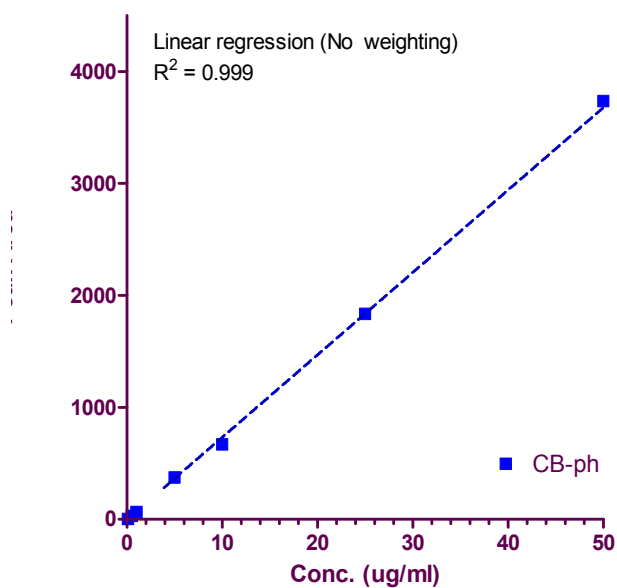
LC	HPLC system	Agilent 1100 series equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment
	Column	Waters Xterra MS C18 (2.1x20mm, 3.5um)
	Mobile phase	Linear gradient from 0.1% formic acid/5% acetonitrile/95% DI water to 0.1% formic acid/98% acetonitrile/2% DI water.
	Flow rate	0.25 ml/min
MS	MS system	API2000 LC/MS/MS system
	Ion source	Turbo Ion Spray
	Polarity	Negative
	MRM	CB-OH acid: 163>119 (Ret. Time: 8.56 min) HBO (IS): m/z 161>119 (Ret. Time: 8.71 min)

Figure 5. Representative chromatograms

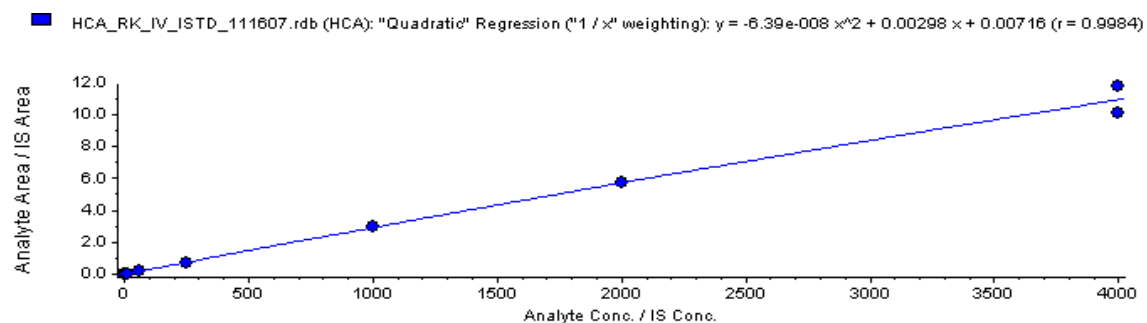
a. HPLC/UV analysis of CB-Ph

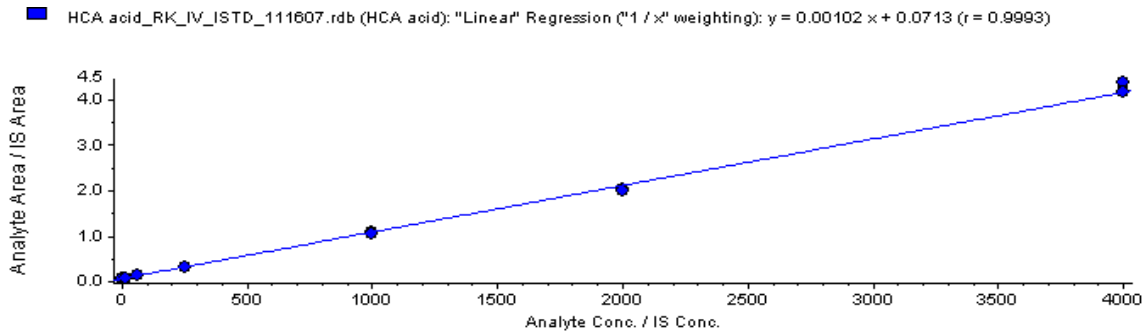


a. HPLC/UV analysis of CB-Ph



b. MRM analysis of CB-OH and CB-OH acid





c. MRM analysis of CB-OH acid

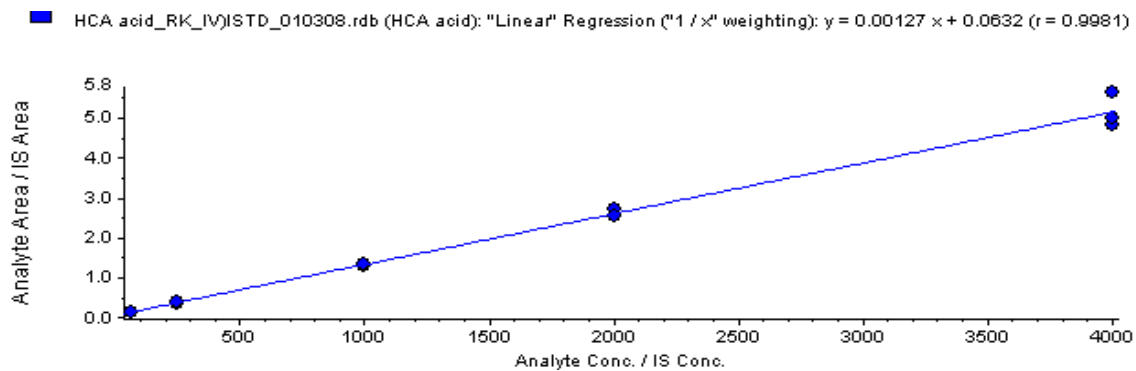


Figure 6. Standard curves(2/2)

7. . In vivo metabolite ID of CB-Ph

가. 연구개발 목표

- CB-Ph는 경구제로 개발하고자 하는 물질이므로 경구투여 후 생성되는 대사체를 찾는 것을 주 목적으로 하여 실험을 수행하였다. 선행된 PK 실험에서 CB-Ph는 경구투여 시 혈중에서 매우 신속히 소실되어 투여 후 최초 time point인 15분부터 그 이후 전 실험과정에서 검출되지 않았고 반면, 대사체인 CB-OH 및 CB-OH acid는 CB-Ph 투여 직후 최초 time point에 최고농도로 검출된 이후 24시간 동안 지속적으로 혈중에 존재하며 multi-compartmental disposition의 특성을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 본 실험에서는 rat와 dog에 경구투여 후 생성되는 대사체를 정성 분석하고자 0분, 15분, 1시간 그리고 6시간에 채취한 시료를 이용하여 구조를 동정하였다.

나. 연구방법

(1) 시험물질

- 충분한 양의 시험물질을 고체상태로 의뢰자로부터 공급받은 후 즉시 자동습도 조절 데시케이터에 실온으로 보관하며 필요시 소분하여 사용하였다.

(2) Metabolite ID in Rat plasma

- 선행된 in vivo rat PK 실험(본 보고서 Part III 참조)을 통하여 채취된 rat plasma 시료를 동일한 방법으로 전처리한 후 Applied Biosystems API2000 LC-MS/MS system을 사용하여 negative mode에서 Q1 scan 및 product ion scan 실험을 통하여 생성된 대사체를 동정하였으며, 분석결과는 Analyst 1.4.1 software를 사용하여 분석하였다.

(3) Metabolite ID in dog plasma

- 선행된 in vivo dog PK 실험을 통하여 채취된 dog plasma 시료를 동일한 방법으로 전처리한 후 Applied Biosystems API2000 LC-MS/MS system을 사용하여 negative mode에서 Q1 scan 및 product ion scan 실험을 통하여 생성된 대사체를 동정하였으며, 분석결과는 Analyst 1.4.1 software를 사용하여 분석하였다.

다. 결과 및 토의

(1) Metabolite ID in rat plasma following a single oral dose of CB-Ph

- 실험결과 rat plasma에서는 Table 1에 요약된 바와 같이 6개의 circulating metabolite가 존재함을 확인하였다. 선행된 in vivo rat PK 실험에서 혈장 시료의 정량분석을 통해 M1(CB-OH) 및 M2 (CB-OH acid) 의 plasma-concentration time profile을 확인하였기 때문에 본 실험에서는 혈장 시료에서 정량하지 못한 다른 대사체, 즉 M3와 M4 (CB-OH glucuronide) 그리고 M5 와 M6(CB-OH acid glucuronide)를 규명하는데 초점을 두어 실험을 수행하였다.
- 경구투여 후 얻어진 혈장시료를 Q1 scan 방법으로 분석하였고 그 결과로부터 이용하여 예측된 대사체 구조의 규명을 위하여 product ion scan 방법으로 각각의 fragmentation pattern을 확인하였다 (Figure 1, 2).

(2) Metabolite ID in dog plasma following a single oral or intravenous dose of CB-Ph

- 경구투여 후 dog plasma에서는 5개의 circulating metabolite가 존재함을 확인하였다 (Table 2). Rat plasma 실험 결과와는 달리 CB-OH acid glucuronide의 경우

한 개의 metabolite만을 확인할 수 있었다 (Table 2). 선행된 *in vivo* dog PK 실험에서 혈장 시료의 정량분석을 통해 M1(CB-OH) 및 M2 (CB-OH acid) 의 plasma-concentration time profile을 확인하였기 때문에 본 실험에서는 혈장 시료에서 정량하지 못한 다른 대사체, 즉 M3 와 M4 (CB-OH glucuronide) 그리고 M5 (CB-OH acid glucuronide)를 규명하는데 초점을 두어 실험을 수행하였다.

- 경구투여 후 얻어진 혈장시료를 Q1 scan 방법으로 분석하였으며 그 결과로부터 예측된 대사체의 구조를 규명하기 위하여 product ion scan방법을 이용하여 각각의 fragmentation pattern을 확인하였다 (Figure 3). 그러나 경구투여 후 얻어진 시료에서는 product ion scan방법을 통한 분석에서 대사체의 fragmentation pattern을 확인하지 못하였다. 이는 본 실험에 사용한 API2000 LC-MS/MS기기 감도의 한계에 기인한 것으로 판단되어 예상된 대사체가 경구투여 시 보다 비교적 고농도로 혈장에 존재할 것으로 예상되는 정맥투여 후 초기(5분)에 얻어진 혈장시료를 이용하여 추가분석을 수행하였다. 분석결과 경구투여의 경우와는 달리 CB-OH glucuronide(M3, M4)는 확인되지 않았으나 CB-OH acid glucuronide 에 해당하는 peak이 Q1 scan 및 product ion scan을 통하여 확인되었다 (Figure 4, 5).
- Retention time 26.37분에 확인된 peak(P1)은 비록 mass 값(m/z 339)이 동일하여 Q1 scan 후 extraction ion chromatogram에서 높은 intensity를 가진 peak으로 확인 되었으나 이 후 product ion scan 방법을 통한 분석 결과 P1은 CB-Ph 로부터 유래한 대사체가 아님을 확인하였다.

3.3 Putative metabolic pathway of CB-Ph

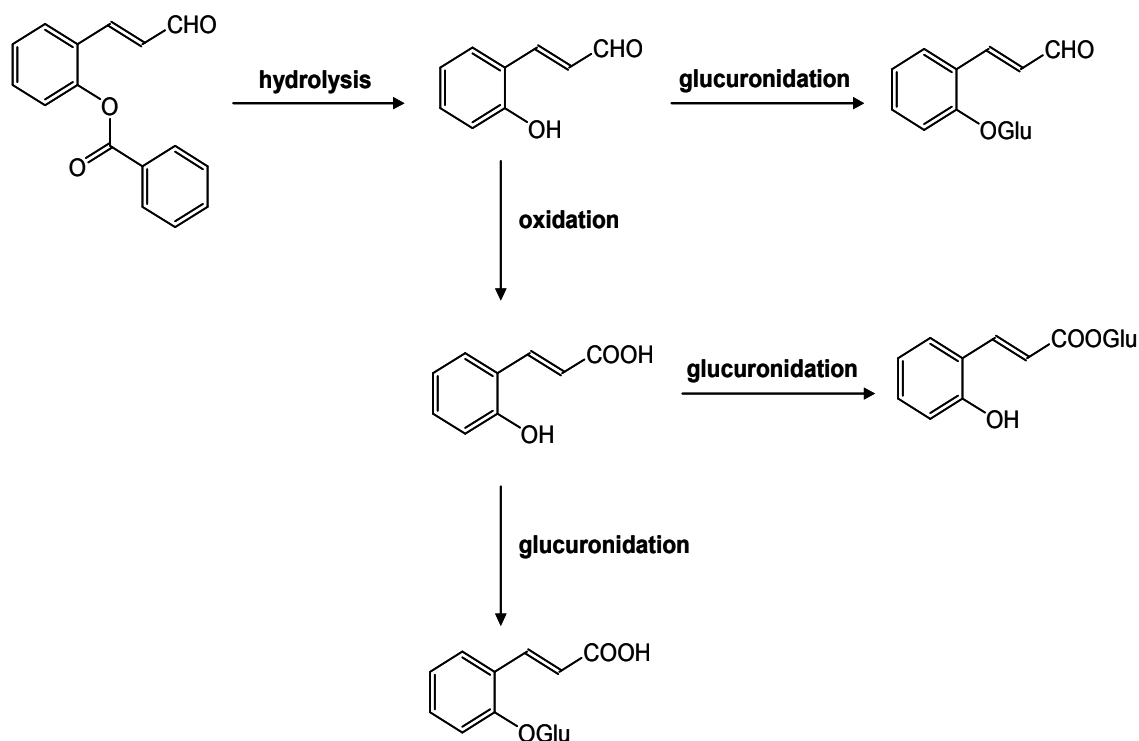


Table 1. Putative metabolites identified in rat plasma following a single oral dose of CB-Ph

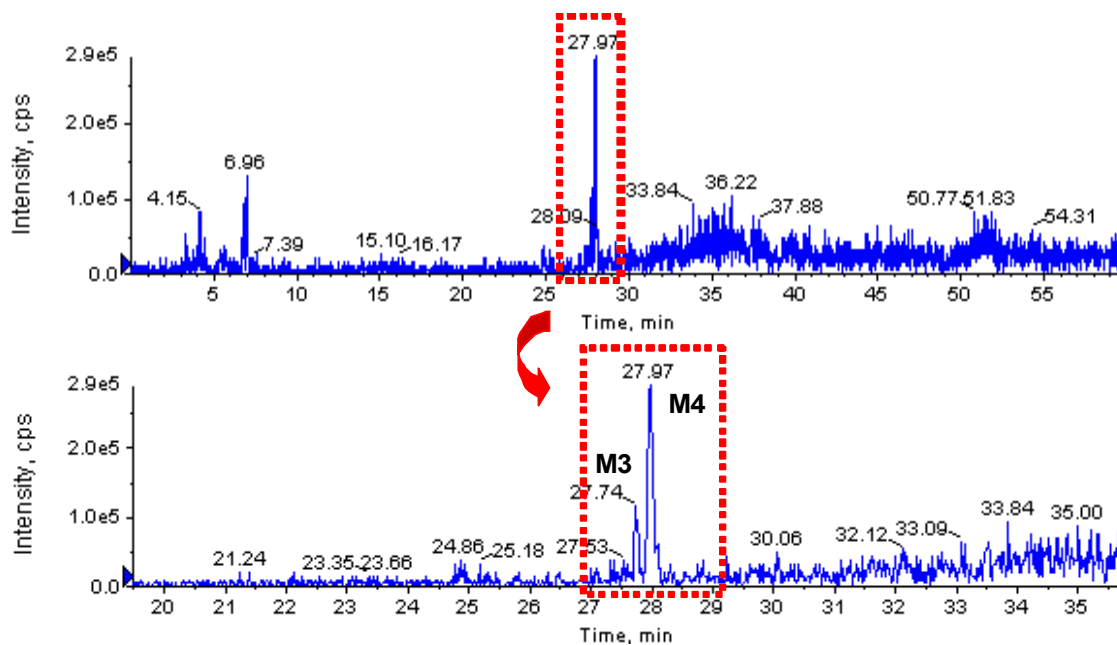
Compound	[M-H] ⁻ (m/z)	Transformation name	Retention time (min)
Parent (CB-Ph)	ND	-	
M1 (CB-OH)	147	Hydrolysis	31.8
M2 (CB-OH acid)	163	Hydrolysis + oxidation	30.5
M3 (CB-OH glucuronide)	323	Hydrolysis + glucuronidation	27.7
M4 (CB-OH glucuronide)	323	Hydrolysis + glucuronidation	28.0
M5 (CB-OH acid glucuronide)	339	Hydrolysis + oxidation + glucuronidation	27.7
M6 (CB-OH acid glucuronide)	339	Hydrolysis + oxidation + glucuronidation	28.3

ND : not detected

CB-Ph is not ionized by electrospray ionization (ESI) source. Therefore, CB-Ph was not detected by LC-MS/MS.

Figure 1. Q1 scan extracted ion chromatograms of CB-Ph metabolites identified in rat plasma following a single oral dose of CB-Ph

a. M3 and M4(CB-OH glucuronide) : m/z 323



b. M5 and M6 (CB-OH acid glucuronide): m/z 339

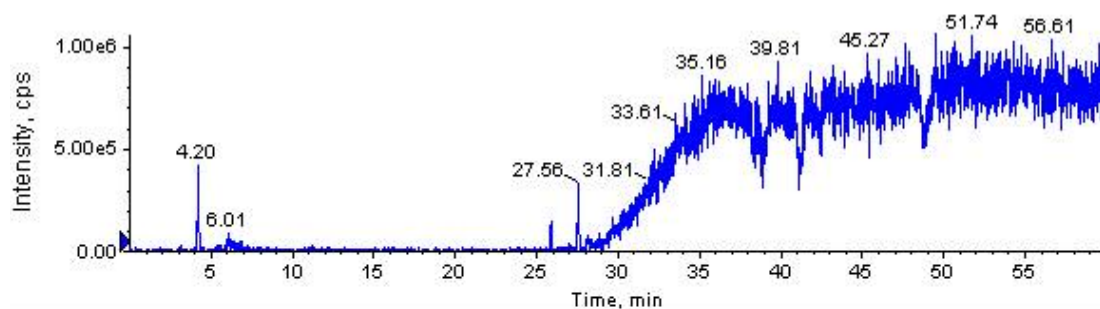


Figure 2. Product ion scan data of CB-Ph metabolites in rat plasma following a single oral dose of CB-Ph (1/2)

a. M3 and M4 (CB-OH glucuronide) : m/z 323

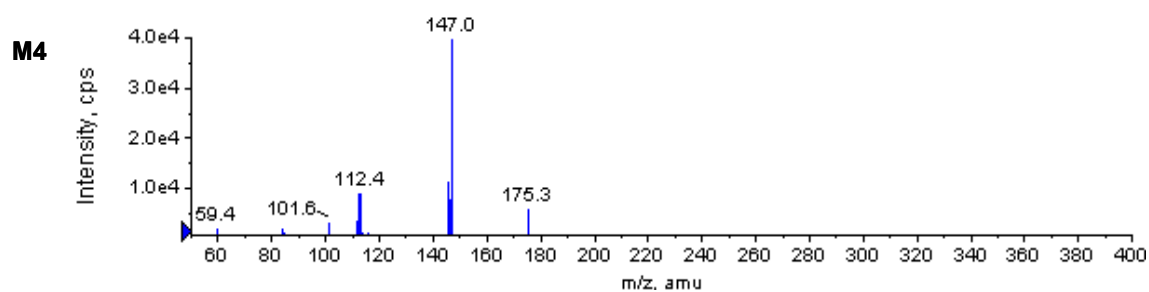
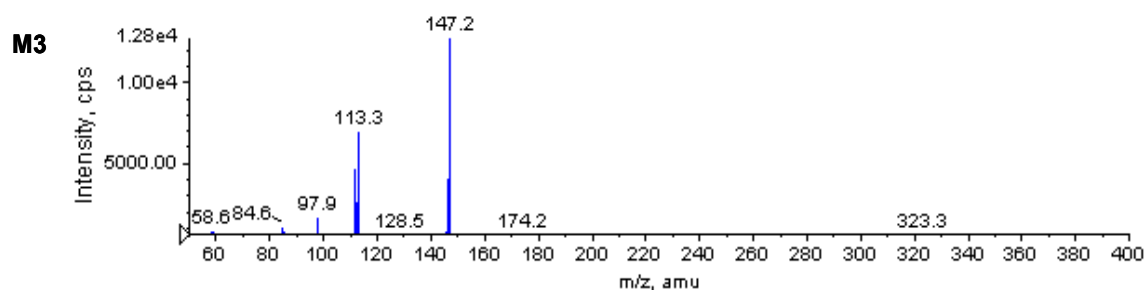
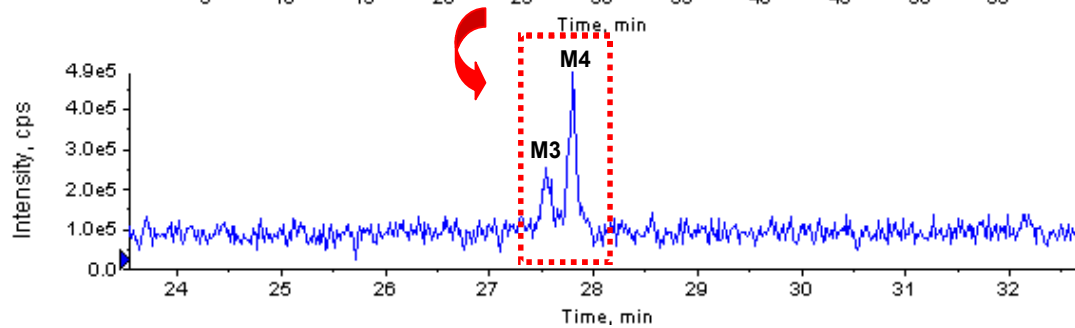
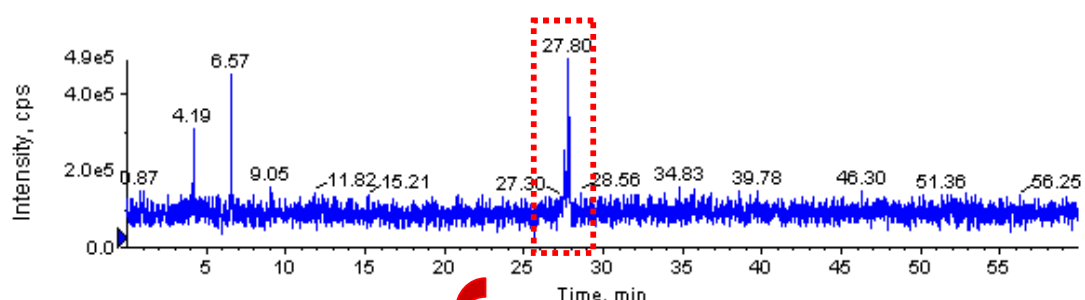
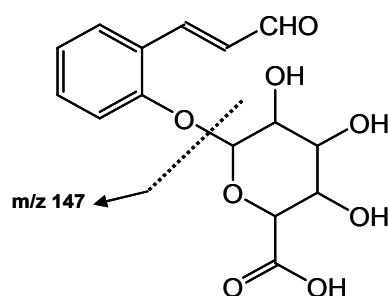


Figure 2. Product ion scan data of CB-Ph metabolites in rat plasma following a single oral dose of CB-Ph (2/2)

b. M5 and M6 (CB-OH acid glucuronide) : m/z 339

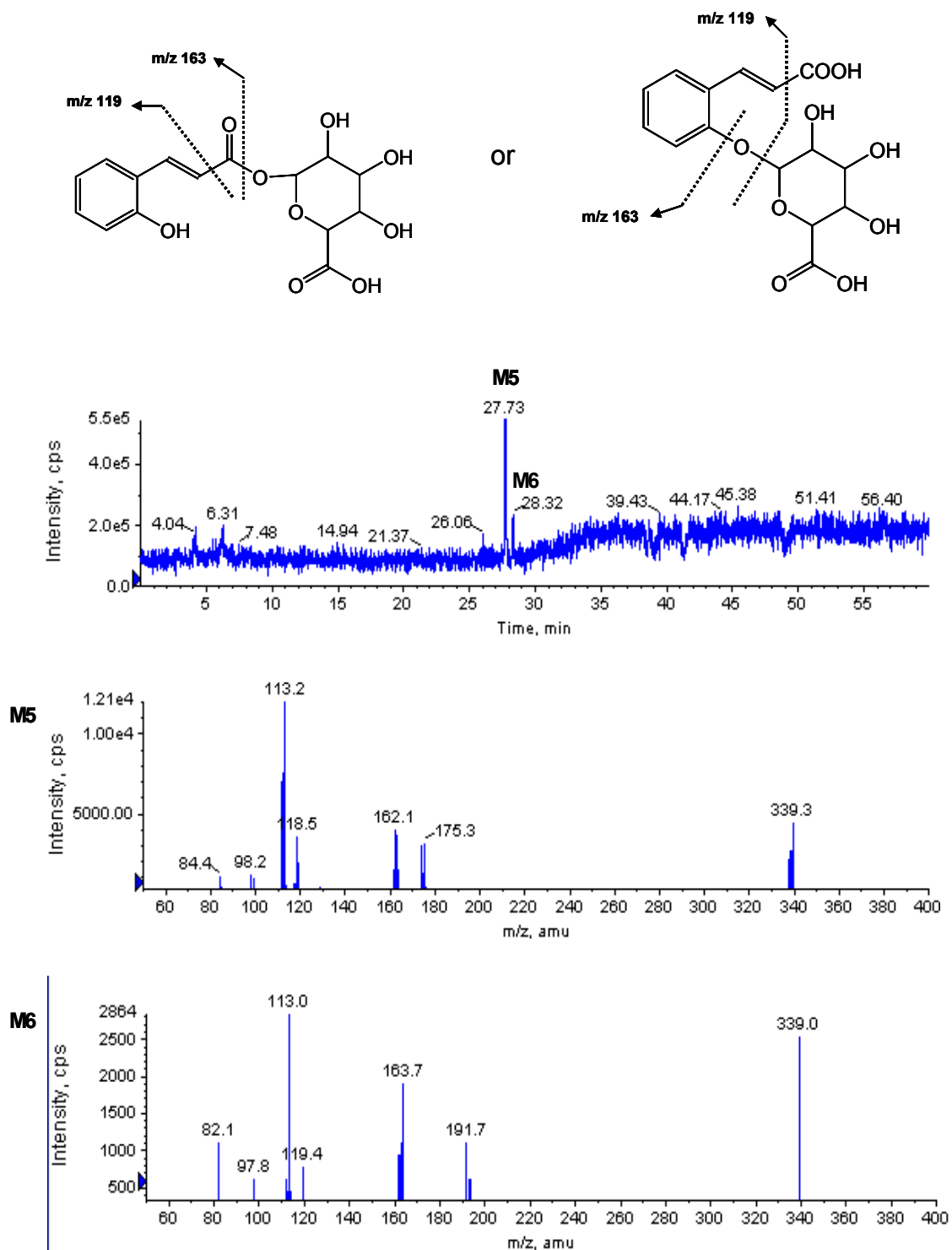


Table 2. Putative metabolites identified in dog plasma following a single oral dose of CB-Ph

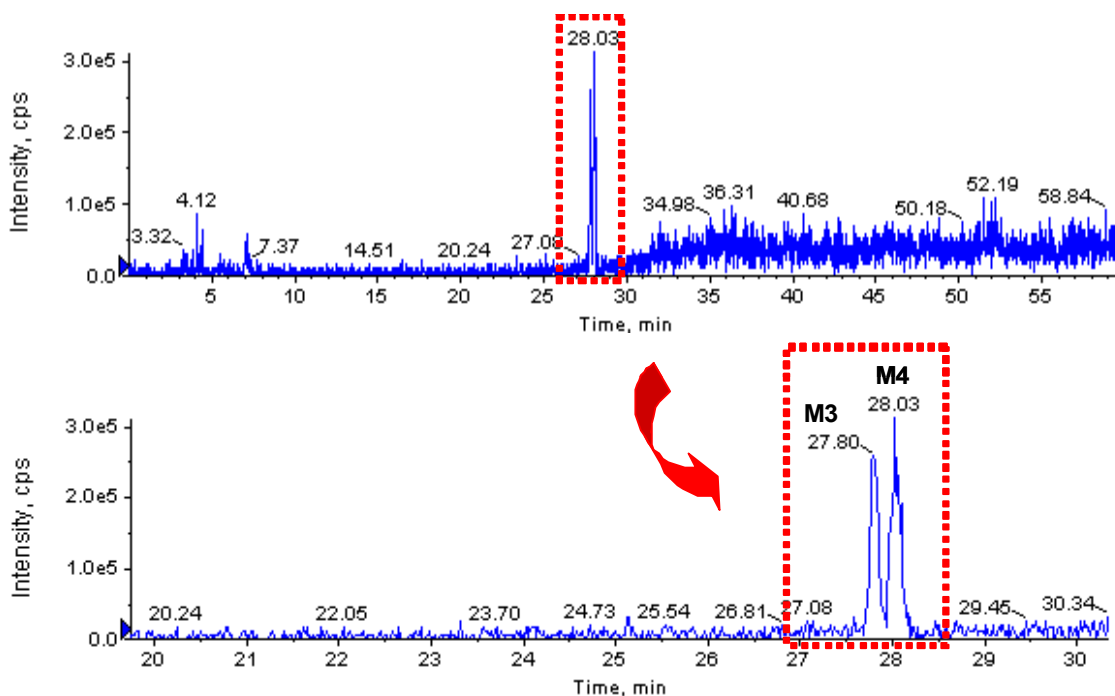
Compound	[M-H] ⁻ (m/z)	Transformation name	Retention time (min)
Parent (CB-Ph)	ND	-	
M1 (CB-OH)	147	Hydrolysis	32.1
M2 (CB-OH acid)	163	Hydrolysis + oxidation	30.7
M3 (CB-OH glucuronide)	323	Hydrolysis + glucuronidation	27.8
M4 (CB-OH glucuronide)	323	Hydrolysis + glucuronidation	28.0
M5 (CB-OH acid glucuronide)	339	Hydrolysis + oxidation + glucuronidation	27.8

ND : not detected

CB-Ph is not ionized by electrospray ionization (ESI) source. Therefore, CB-Ph was not detected by LC-MS/MS.

Figure 3. Q1 scan extracted ion chromatograms of CB-Ph metabolites identified in dog plasma following a single oral dose of CB-Ph

a. M3 and M4 (CB-OH glucuronide) : m/z 323



b. M5 (CB-OH acid glucuronide) : m/z 339

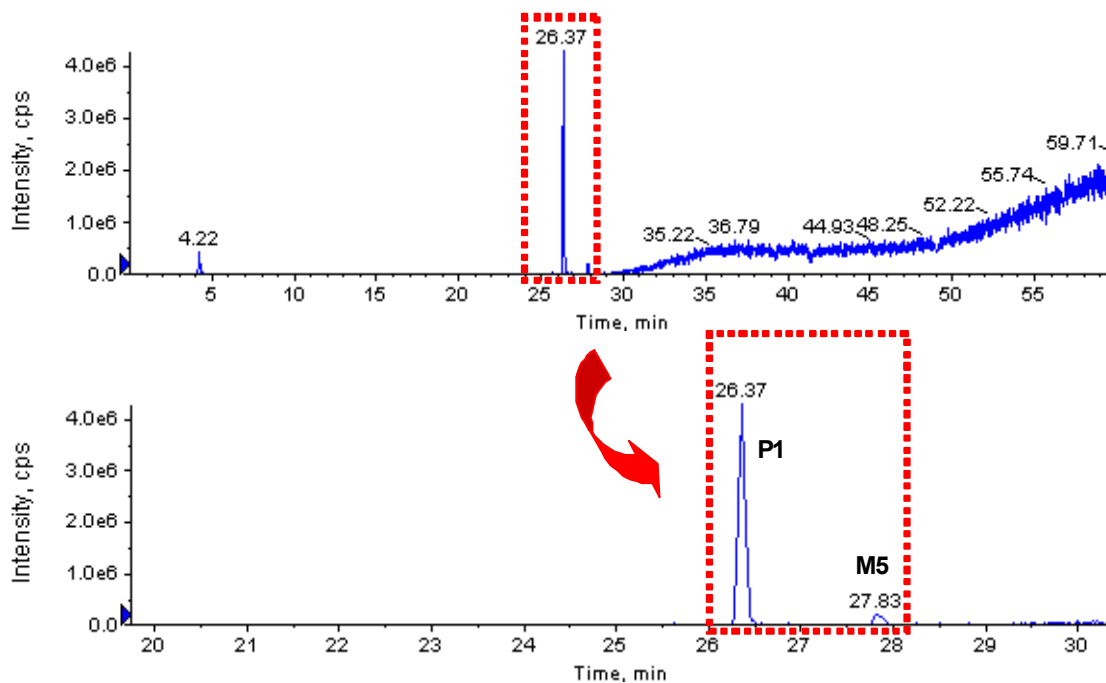
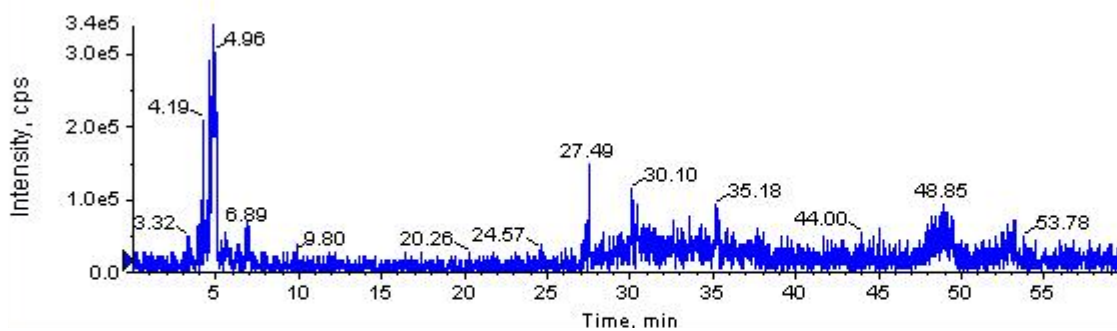


Figure 4. Q1 scan extracted ion chromatograms of CB-Ph metabolites identified in dog plasma following a single intravenous dose of CB-Ph

a. M3 and M4(CB-OH glucuronide) : m/z 323



b. M5 (CB-OH acid glucuronide) : m/z 339

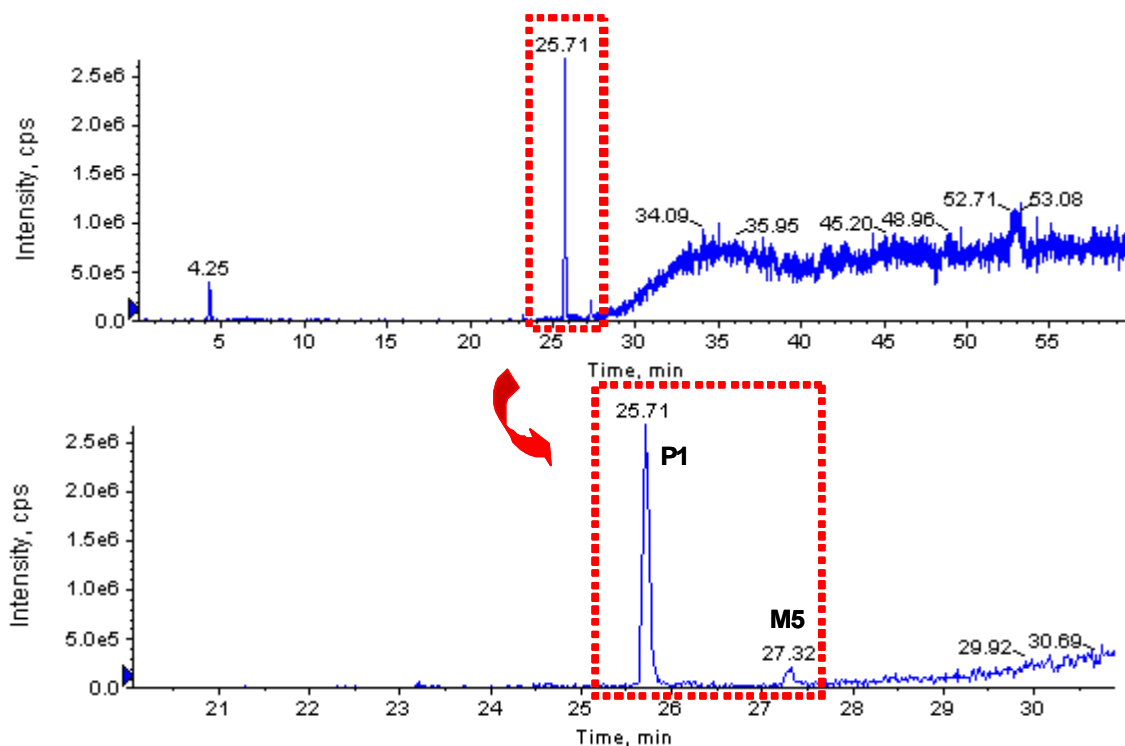


Figure 5. Product ion scan data of CB-Ph metabolites in dog plasma following a single intravenous dose of CB-Ph (1/2)

a. M3 and M4 (CB-OH glucuronide) : m/z 323

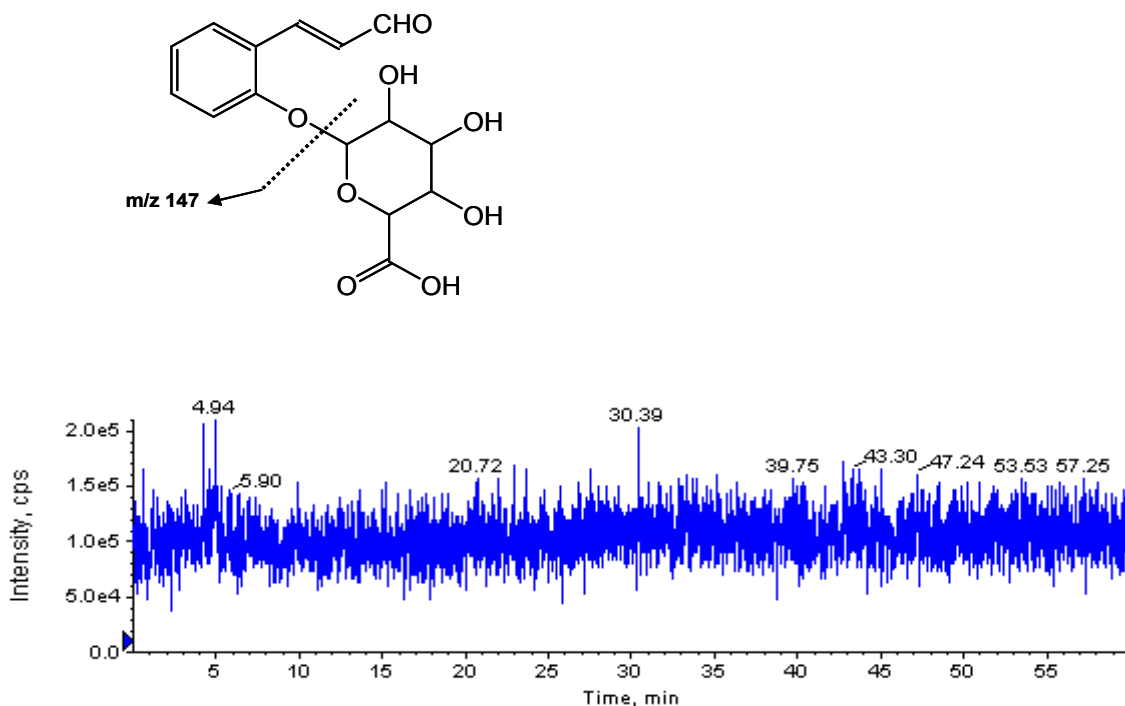
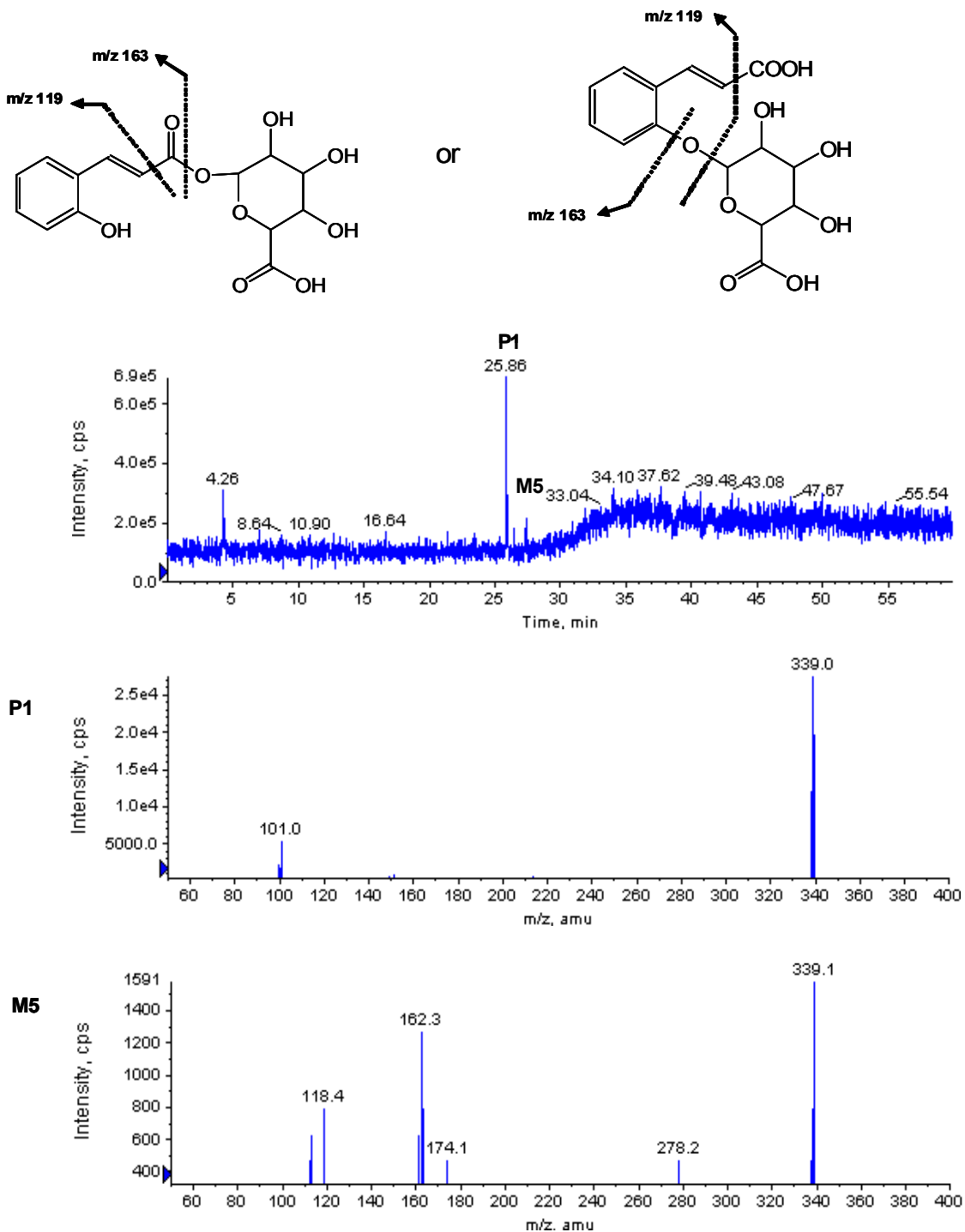


Figure 6. Product ion scan data of CB-Ph metabolites in dog plasma following a single intravenous dose of CB-Ph (2/2)

b. M5 (CB-OH acid glucuronide) : m/z 339

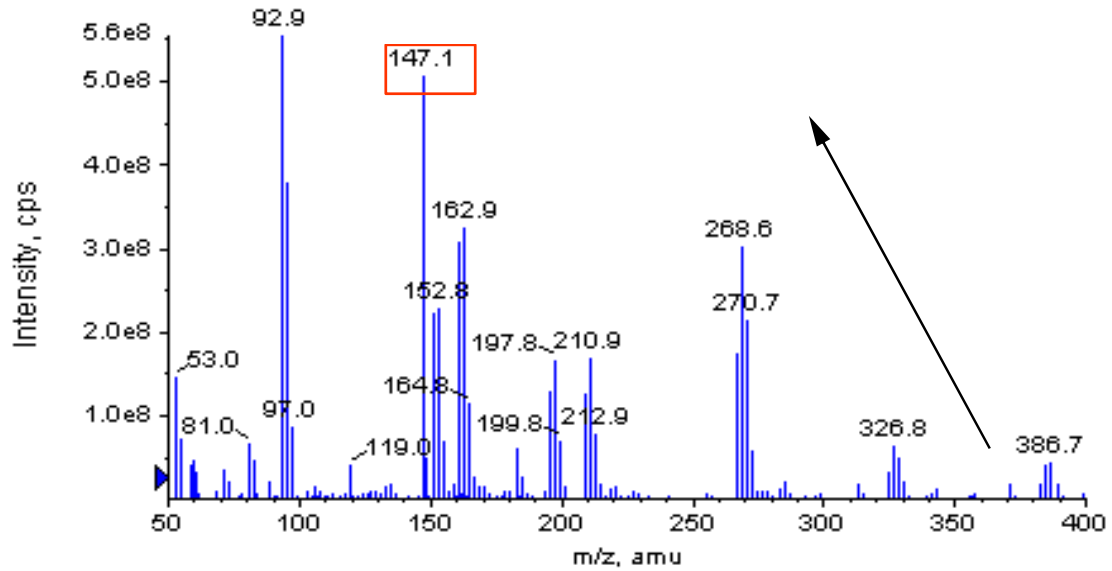


부록: API2000 LC-MS/MS method

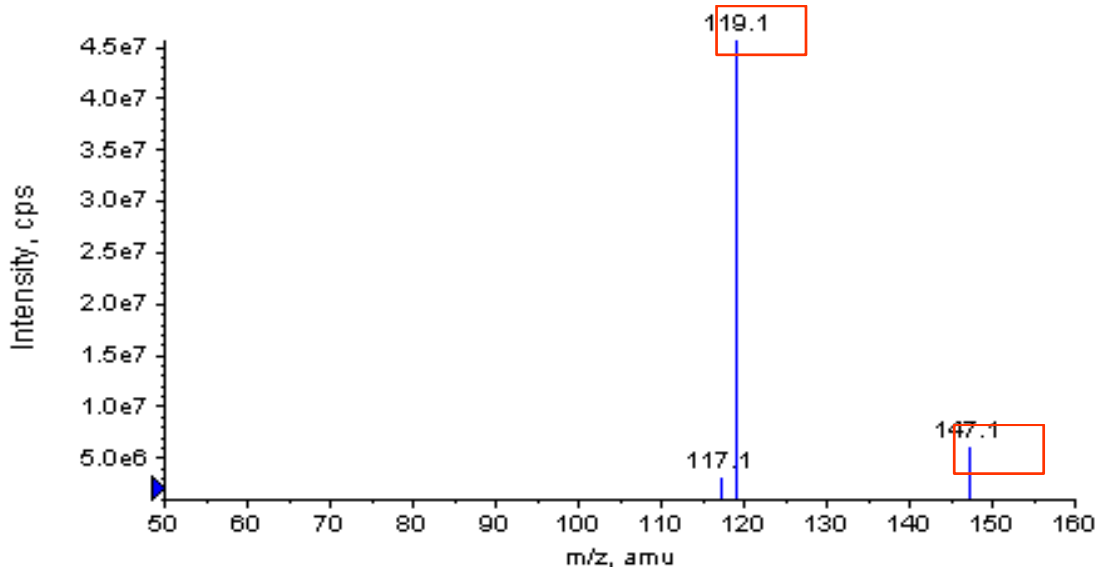
가. MS spectra

a. CB-OH

Q1 scan:

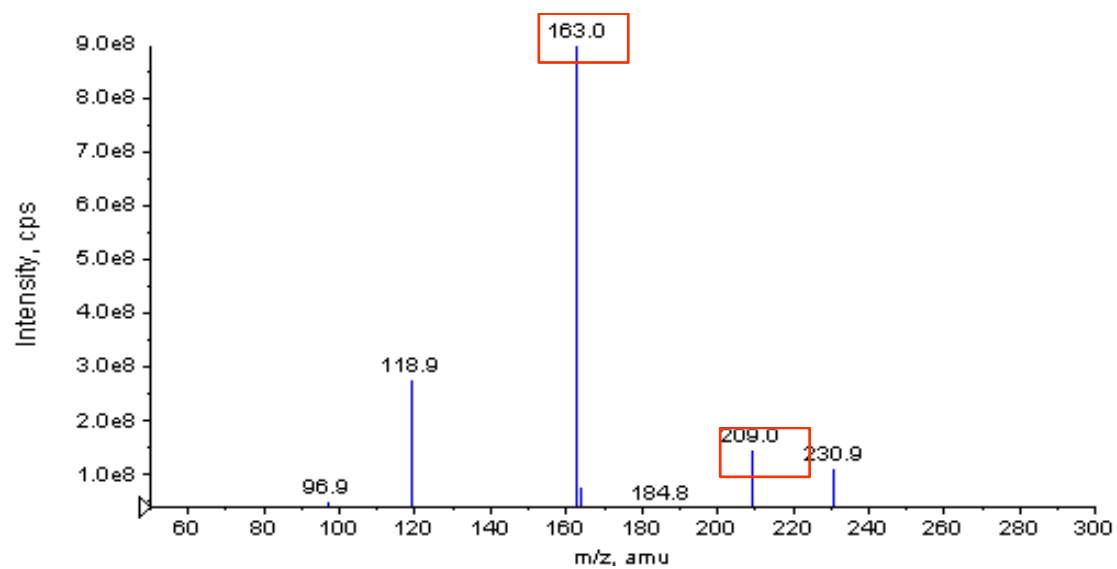


MS/MS product ion scan:

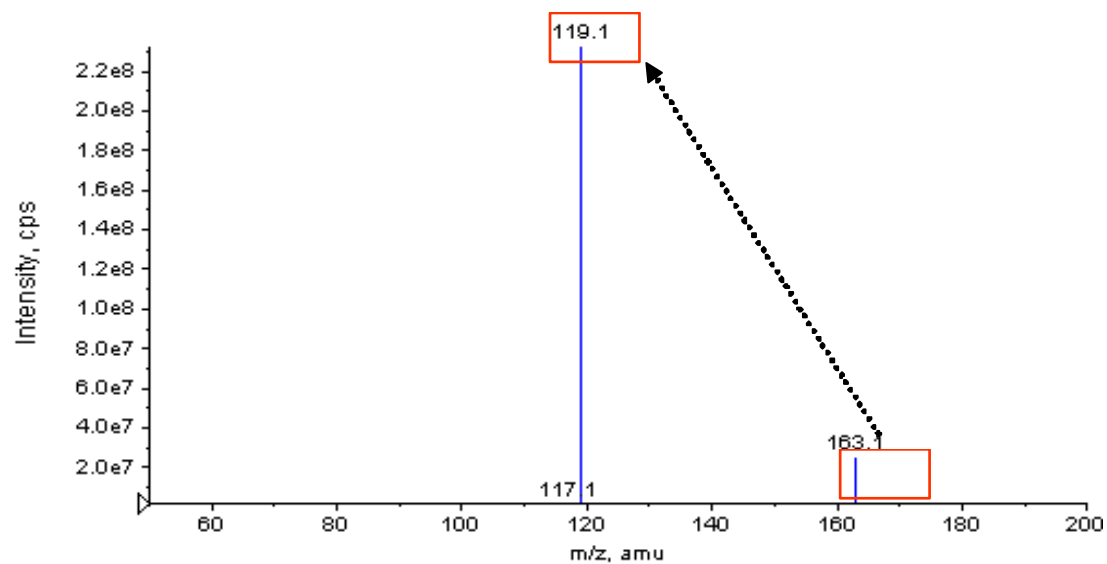


b. CB-OH acid

Q1 scan:

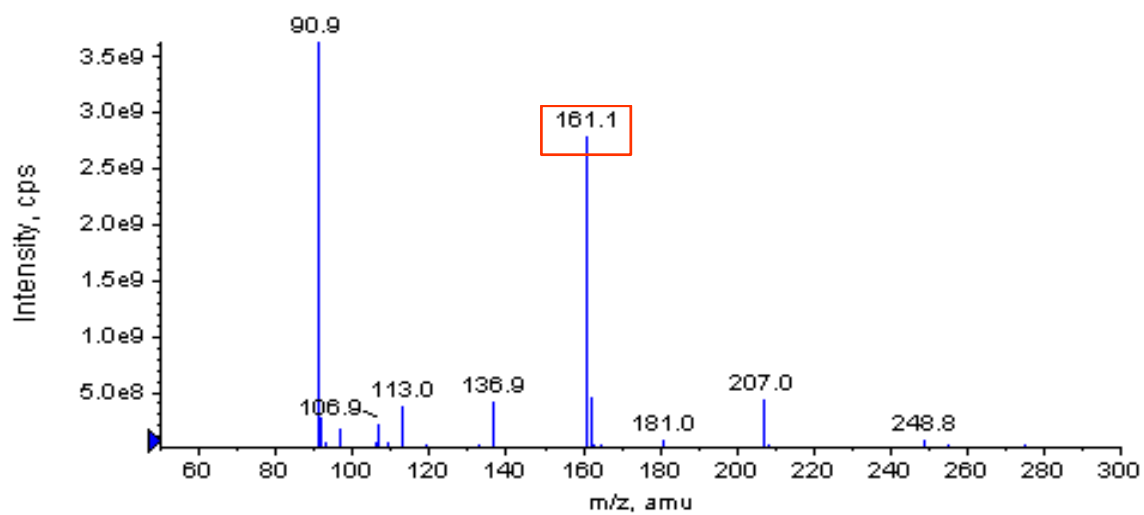


MS/MS product ion scan:

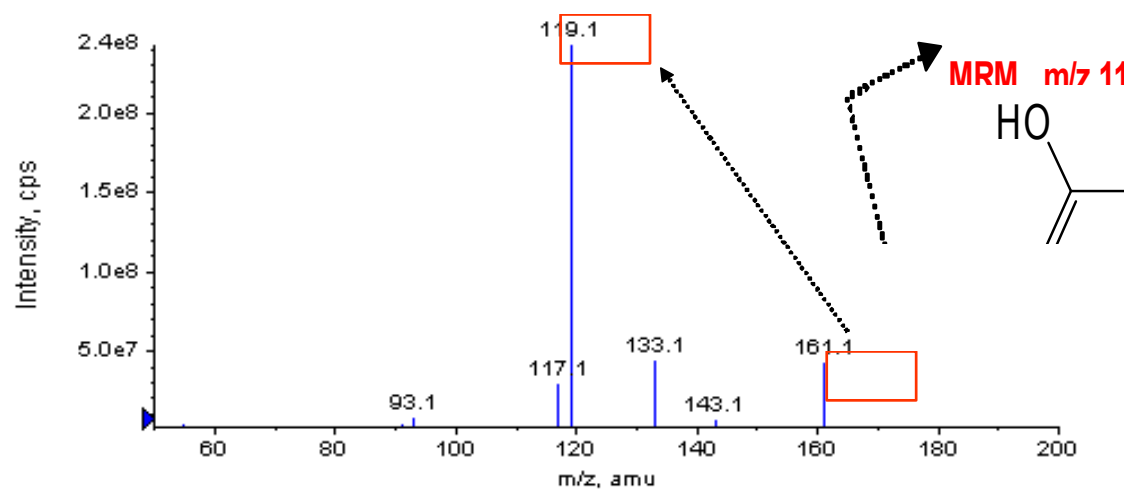


c. HBO(IS)

Q1 scan:



MS/MS product ion scan:



제 2 절 CB-Ph의 독성 및 독성 동태

1. CB-Ph의 조제물의 농도 분석법 validation 및 안정성 확인시험

- 본 시험에서는 HPLC 를 이용하여 CB-Ph 의 조제물의 농도 분석법을 검증하고, 안정성을 평가하였다. 표준용액의 10 µg/mL 을 6 회 반복 측정된 peak area 및 retention time 의 정밀성은 각각 0.19 % 및 0.22 % 로 나타났다. 표준용액의 2 ~ 50 µg/mL 에서 측정된 검량선의 회귀방정식과 상관계수는 판정기준을 모두 만족하였다. 부형제와 시험물질을 혼합하여 조제한 시료는 분석에 충분한 형상을 나타내었으며, 희석용매, 이동상, 부형제가 시험물질의 피크에 영향을 주는 성분은 검출되지 않았다. 조제물의 0.5, 400 mg/mL 의 농도에서 일내 재현성의 정확성 및 정밀성은 96.14, 102.35 % 및 3.49, 2.27 % 로 나타났다.
- 일내 재현성에서 측정한 시료 (0.5, 400 mg/mL)를 autosampler 내에 3 시간 동안 방치 후 분석한 결과 초기 농도에 대한 변동율은 - 0.10, 0.12 % 로 나타났으며, 정밀성은 3.79, 2.02 % 로 나타났다.
- 조제물의 0.5, 400 mg/mL 의 농도에서 상층, 중층 및 하층의 정확성 및 정밀성은 95.56, 101.65 % 및 1.88, 2.26 % 로 나타났다. 조제물의 0.5, 400 mg/mL 의 농도를 실온에서 4 시간 동안 교반 후 분석한 결과 초기농도에 대한 변동율은 - 0.23, 4.23 % 로 나타났으며, 정밀성은 0.46, 1.57 % 로 확인되었다. 조제물의 0.5, 400 mg/mL 의 농도를 냉장에서 7 일간 보관 후 분석한 결과 초기농도에 대한 변동율은 4.93, 9.97 % 로 나타났으며, 정밀성은 0.18, 7.46 % 로 확인되었다. 1 일과 8 일째에 측정된 QC 시료의 정확성 및 정밀성은 100.90, 99.90 % 및 0.40, 0.10 % 로 확인되었다.
- 이상의 결과로부터 CB-Ph 의 조제물의 농도분석을 위한 본 분석법은 적합하며, 0.5 ~ 400 mg/mL 의 조제물은 실온에서 4 시간, 냉장에서 7 일간 안정한 것으로 확인되었다.

2. CB-Ph의 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여 독성시험, 2주 회복시험 및 독성동태시험

- 본 시험은 CB-Ph의 반복투여에 따른 안전성을 평가하고자, 6주령 (투여개시시) 암수 Sprague-Dawley계 랫드에 시험물질을 500, 1000 및 2000 mg/kg의 용량으로

각 군당 10 마리씩 사용하여 4주간 경구 투여하였다. 대조군은 부형제 (0.5(w/v)% MC 용액)를 투여하였다. 대조군과 시험물질 2000 mg/kg 투여군에 대하여 암수 각 군당 5 마리씩 사용하여 2주간의 회복기간을 설정하였다. 또한, 독성동태시험을 통해 시험물질의 전신노출도를 모니터링하였다.

- 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사, 뇨검사, 혈액 및혈액생화학적 검사, 부검시 장기의 중량측정, 육안적 검사 및 조직병리학적 검사가 수행되었다. 암수 시험물질 투여군에서 사망례 및 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 암수 시험물질 투여군에서 체중 및 사료섭취량의 변화에 있어 시험물질의 영향은 인정되지 않았다. 안과학적검사 결과, 암수 시험물질 투여군에서 시험물질에 기인한 변화는 인정되지 않았다.
- 뇨검사 결과, 주시험군의 암수 모든 시험물질 투여군에서 단백과 수컷 1000 및 2000 mg/kg 투여군 및 암컷 모든 시험물질 투여군에서 케톤체의 증가경향이 관찰되었다. 혈액학적 검사결과, 주시험군 수컷 2000 mg/kg 투여군에서 프로트롬빈 시간의 지연, 수컷 1000 및 암수 2000 mg/kg 투여군에서 부분 활성트롬보플라스틴시간의 지연이 시험물질에 의한 영향으로 인정되었다.
- 혈액생화학적 검사결과, 주시험군의 수컷 1000 및 2000 mg/kg 투여군에서 알라닌 아미노기전이효소의 증가, 수컷 2000 mg/kg 투여군에서 인의 증가, 암컷 2000 mg/kg 투여군에서 알라닌 아미노기전이효소 및 아스파테이트 아미노기전이효소의 증가가 시험물질에 의한 영향으로 인정되었다.
- 장기중량 측정결과, 주시험군 암컷 500 mg/kg 투여군에서 신장과 암수 1000 및 2000 mg/kg 투여군에서 간 및 신장의 절대장기중량, 암수 모든 시험물질투여군에서 간 및 신장의 상대장기중량비의 증가가 시험물질에 의한 영향으로 인정되었다.
- 부검 결과, 주시험군 및 회복군의 암수 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 소견은 관찰되지 않았다.
- 조직병리학적 검사 결과, 주시험군 및 회복군의 암수 2000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 인정되지 않았다.

- 독성동태시험 결과, 시험물질 CB-Ph의 대사물인 CB-OH의 전신노출도 (AUClast 및 Cmax)는 농도 비례적이지는 않지만 용량 의존적으로 증가하였고, 암수 간에 차이는 나타나지 않았다. 반복 투여에 따른 시험물질 투여군의 AUClast 및 Cmax는 투여개시일에 비하여 투여 4주에 약 2배 정도의 높은 경향을 보이며, 암수 2000 mg/kg 투여군 모두에서 혈중 축적현상이 경미하게 나타났다. Tmax는 평균적으로 용량 의존적으로 증가하였으나, T1/2는 산출하지 못하였다.
- 체중변화 : 투여기간 및 회복기간 동안, 암수 시험물질 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 없었다.
- 사료섭취량 : 수컷 1000 및 암수 2000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 투여 전에 사료섭취량이 유의성 있게 증가하였으나, 시험물질 투여전으로 시험물질에 기인한 영향은 아닌 것으로 판단되었다. 투여기간 동안, 수컷 2000 mg/kg 투여군에서 투여 3주 및 4주에 대조군과 비교시 유의성 있게 증가하였으나, 이는 사료 값아 높음에 기인한 것으로 판단되었다. 회복기간 동안, 암수 2000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 사료섭취량의 변화는 없었다.
- 안과학적 검사 : 주시험군 및 회복군의 암수 시험물질투여군에서 특이한 소견은 관찰되지 않았다.
- 뇨검사 : 주시험군의 암수 모든 시험물질 투여군에서 단백, 수컷 1000 및 2000 mg/kg 투여군 및 암컷 시험물질 투여군에서 케톤체의 증가경향이 관찰되었다. 회복군 수컷 2000 mg/kg 투여군에서 케톤체가 1례에서만 검출되었다.
- 혈액학적 검사 : 주시험군의 수컷 1000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 혈소판수, 망상적혈구 및 부분활성 트롬보플라스틴시간이 유의성 있게 증가하였다. 2000 mg/kg 투여군에서는 대조군과 비교시 평균적혈구헤모글로빈농도 및 림프구의 백분율이 유의성 있게 감소하였고, 중성호성백혈구의 백분율, 프로트롬빈시간 및 부분활성 트롬보플라스틴시간이 유의성 있게 증가하였다. 암컷 1000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 프로트롬빈시간이 유의성 있게 감소하였고, 2000 mg/kg 투여군에서 부분활성 트롬보플라스틴시간이 유의성 있게 증가하였다. 회복군의 수컷 2000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 프로트롬빈시간이 유의성 있게 감소하였고, 암컷 2000 mg/kg 투여군에서는 산호성백혈구의 백분율이 유의성 있게 감소하였으며, 림프구의 백분율 및 부분활성 트롬보플라스틴시간이 유의

성 있게 증가하였다. 주시험군의 수컷 1000 mg/kg 투여군에서 혈소판수 및 망상적혈구의 증가, 암컷 1000 mg/kg 투여군에서 프로트롬빈시간의 지연이 인정되었으나 용량의존성이 없었으며, 수컷 2000 mg/kg 투여군에서 평균적혈구헤모글로빈농도의 감소, 중성호성백혈구 및 림프구의 백분율의 증가 또는 감소가 인정되었으나, 경미한 변동으로서 생물학적 변동범위(수컷 MCHC: 32.1~39.9 g/dL, NEU: 6.4~32.5%, LYM: 59.5~90.6%)내에 속하였다. 회복군 수컷 2000 mg/kg 투여군에서 프로트롬빈시간의 감소, 암컷 2000 mg/kg 투여군에서 림프구 및 산호성백혈구의 백분율의 증가 또는 감소가 인정되었으나, 주시험군의 결과와 상반되거나 주시험군에서 영향이 인정된 항목이 아니므로 독성학적 의미는 없다.

- 혈액생화학적 검사 : 주시험군의 수컷 500 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 알칼라인 포스파타제가 유의성 있게 감소하였다. 1000 mg/kg 투여군에서는 대조군과 비교시 알라닌 아미노기전이효소가 유의성 있게 증가하였다. 2000 mg/kg 투여군에서는 대조군과 비교시 알라닌 아미노기전이효소 및 인이 유의성 있게 증가하였고, 알칼라인 포스파타제 및 크레아티닌이 유의성 있게 감소하였다. 암컷 2000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 알라닌 아미노기전이효소 및 아스파테이트 아미노기전이효소가 유의성 있게 증가하였고, 혈당이 유의성 있게 감소하였다. 회복군의 수컷 2000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 인이 유의성 있게 증가하였으나, 암컷 2000 mg/kg 투여군에서는 유의성 있는 항목은 인정되지 않았다. 주시험군 수컷 500 및 2000 mg/kg 투여군의 알칼라인 포스파타제 또는 크레아티닌의 감소가 인정되었으나, 두 항목의 감소는 임상적으로 의미가 없으며, 암컷 2000 mg/kg 투여군의 혈당의 감소는 비교적 경미한 변동으로서 생물학적 변동범위 (암컷 Glu: 96~185 mg/dL) 내에 속하였으므로 독성학적 의미는 없다.
- 절대장기중량 : 주시험군의 수컷 1000 및 2000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 간 및 신장이 유의성 있게 증가하였고, 2000 mg/kg 투여군에서 전립선이 유의성 있게 감소하였다. 암컷 모든 시험물질 투여군에서 대조군과 비교시 신장이 유의성 있게 증가하였고, 1000 및 2000mg/kg 투여군에서 간 및 비장이 유의성 있게 증가하였다. 회복군의 암수 2000mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 각 장기에서 유의성 있는 차이는 없었다.
- 상대장기중량비 : 회복군의 암수 2000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 각 장기에서 유의성 있는 차이는 없었다. 주시험군의 수컷 2000 mg/kg 투여군에서 전립선의 절대장기중량 감소, 암컷 1000 및 2000 mg/kg 투여군에서 비장의 절대

및 상대중량의 증가가 인정되었으나 비교적 경미한 변동으로 생물학적 변동범위 (수컷- prostate: 0.30~0.76g, 암컷- spleen: 0.31~0.76g) 내에 속하였으므로 독성학적 의미는 없다.

- 부검 및 조직병리학적 검사 : 부검결과, 암수 시험물질투여군에서 시험물질 투여에 기인한 소견은 관찰되지 않았다. 그 외, 수컷 주시험군의 500 및 2000 mg/kg 투여군에서 양측 부신의 종대, 비장의 종대, 우측 소형 고환 또는 수컷 회복군의 대조군에서 우측 후지 발가락의 가피가 관찰되었으나, 각 1례씩 우발적으로 분포하여 독성학적 의미는 없다. 조직병리학적 검사 결과, 주시험군 및 회복군의 암수 2000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 부검소견이 관찰된 개체의 조직에 대한 조직병리학적 검사 결과, 부신의 종대는 피질비대, 비장의 종대는 림프구 과다형성을 동반한 급성 염증, 우측 소형고환은 정세관위축, 우측 후지 발가락의 가피는 발톱이 유실된 가피로 확인되었으나, 단발적이며 우발적인 소견으로서 독성학적 의미는 없다. 그 외, 주시험군 및 회복군의 암수 대조군 및 2000 mg/kg 투여군에서 하더리안선의 세포침윤, 심장의 염증세포침윤, 신장의 호염기성 세노관, 단핵성 세포침윤, 림프구성 세포침윤, 무기질침착 및 세노관 확장, 간의 국소성 괴사, 혈관확장 및 염증세포침윤, 뇌하수체 원위부의 낭, 전립선 간질의 림프구성 세포침윤이 관찰되었으나, 모두 자연발생적이거나 우발적인 분포였으므로 독성학적 의미는 없다.
- 이상으로 CB-Ph에 대한 4주 경구 반복투여 독성시험 결과, 암수 시험 물질 투여군에서 노검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사에서 시험물질에 의한 영향이 인정되었다. 따라서, 무독성량 (NOAEL)은 암수 500 mg/kg 미만으로 사료된다. 또한, 2주간의 회복기간 동안 주시험군 암수에서 관찰된 혈액학적 및 혈액 생화학적 검사에서 관찰된 변화가 회복되는 것으로 판단되어, 가역적인 변화로 사료되었다.

3. CB-Ph 의 비글견을 이용한 4 주 반복 경구투여 독성시험, 2 주 회복시험 및 독성동태시험

- 본 시험은 암수 비글견을 이용하여 시험물질인 CB-Ph를 1 차 0(대조군), 50, 150 및 450 mg/kg의 용량으로 0.5% MC에 현탁시켜 1.5 주간 경구투여한 결과 모든 용량에서 구토, 설사 및 점액변 등 증상이 관찰되어, 2.5 주간의 휴약 기간을 거친 후, 2 차 0(대조군), 30, 90 및 270 mg/kg의 용량으로 캡슐에 충전하여 4 주간 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 2 주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하며, 독성동태시험을 통해 약물의 전신노출도

를 모니터링하기 위하여 실시하였다.

- 전 실험기간 중, 암수 모든 시험군에서 사망례는 발생하지 않았다. 그러나, 1 차 투여기간 중, 암수 모든 시험물질 투여군에서 개체간의 차이는 있으나 구토, 연변, 설사 및 점액변 등 증상이 용량 의존적으로 다발하고, 설사 또는 구토물에 혈점이 관찰되었다. 그 후, 2.5 주간의 휴약 기간을 거쳐 모두 회복되었으며, 2 차 투여기간 중에는 암수 30 및 90 mg/kg 투여군에서 연변, 설사, 점액변 및 구토 증상이 산발적으로 간혹 관찰되었으나, 270 mg/kg 투여군에서는 연변, 설사, 점액변 및 구토 증상이 다발적 또는 지속적으로 관찰되었다. 그 외, 90 mg/kg 투여군에서는 간혹, 270 mg/kg 투여군에서는 빈번하게 시험물질혼입변이 관찰되었으며, 회복기간에는 시험물질에 의한 증상이 관찰되지 않았다.
- 체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 심전도검사, 뇨검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사에서는 시험물질의 투여에 의한 변화가 관찰되지 않았다. 또한 주시험군 및 회복군에 대한 부검 및 조직병리학적 검사에서도 시험물질에 의한 병리변화는 관찰되지 않았다.
- 독성동태시험에서 1 차 투여 첫날, 50, 150 및 450 mg/kg 투여군에서 암수 전신 노출도는 용량 의존적으로 증가하고, 암컷은 수컷에 비해 높게 나타났다. 2 차 투여 첫날에는 30, 90 및 270 mg/kg 투여군에서 수컷의 AUClast는 30 및 90 mg/kg 투여군 간에 유사하게 나타났으나, 270 mg/kg 투여군에서는 증가하였다. 암컷은 용량의 증가에 따라 증가하고, 암수 간에 큰 차이는 없었으며, 암수 Cmax 및 Tmax는 용량의 증가에 따라 증가하는 경향을 보였다. 2 차 투여 4 주째에는 암수 AUClast 및 Cmax 모두 용량의 증가에 따라 증가하고, 수컷의 AUClast는 투여 첫날에 비해 경미하게 증가하였으나, 암컷은 투여 첫날과 비슷하게 나타났으며, 암수 모두에서 시험물질의 축적현상은 관찰되지 않았다.
- 체중에서 1, 2 차 투여기간 및 회복기간을 포함한 전 실험기간 중, 이상변화는 관찰되지 않았다.
- 사료섭취량에서 1, 2 차 투여기간 및 회복기간을 포함한 전 실험기간 중, 시험물질의 투여에 의한 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.
- 안과학적 검사에서 시험물질의 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 단, 암컷 대

조군의 1 레에서 선천성 시신경형성부전이 관찰되었다.

- 2 차 투여전의 심전도검사에서는 수컷의 50→30 mg/kg 투여군에서 QRS 가 대조군에 비해 유의성($p<0.05$) 있는 증가를 보이고, 2 차 투여 후 4 주째의 검사에서는 모든 시험물질투여군에서 QRS 가 유의성($p<0.05$ or $p<0.01$) 있는 증가를 보였다. 그러나, 용량의존성은 관찰되지 않았으며, 정상범위내의 변화였다. 그 외, 암컷 50→30 mg/kg 투여군의 1 레에서는 특히, 2 차 투여 후 4 주째의 검사에서 경도의 심박수(HR) 및 QTc 가 증가하고, 전기축(Axis)이 우측편위되어 우심실비대의 소견이 관찰되었다.
- 주1 차 및 2 차 투여 후의 뇨검사에서는 시험물질에 의한 변화가 관찰되지 않았다.
- 1 차 투여 후의 혈액학적 검사에서는 50→30 mg/kg 투여군의 망상적혈구가 대조군에 비해 유의성($p<0.05$) 있는 증가를 보였으나, 그 차이가 경미하고, 용량의존성은 관찰되지 않았으며, 2 차 투여 후 및 회복군의 검사에서는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다.
- 1 차 투여 후의 혈액생화학적 검사에서는 150→90 및 450→270 mg/kg 투여군의 g 투서 알라닌 아미노기전이효소(ALT), 혈액요소질소(BUN), 알부민(Alb), 글로부린알파 1, 알파 2, 베타(Globulin $\alpha 1$, $\alpha 2$, β) 또는 A/G ratio 가 대조군에 비해 유의성($p<0.05$ or $p<0.01$) 있는 증가 또는 감소를 보였으며, 암컷 투여에서는 글로부린 베타만 유의성($p<0.05$) 있는 증가를 보였다. 2 차 투여 전의 검사에서는 수컷의 150→90 mg/kg 투여군에서 알부민, 글로부린베타, A/G ratio 및 나트륨(Na)이 유의성($p<0.05$ or $p<0.01$) 있는 증가 또는 감소를 보였으며, 암컷의 50→30 mg/kg 투여군에서는 총 빌리루빈(T-Bili), 알부민, 글로부린알파 1, A/G ratio 및 칼륨(K), 150→90 mg/kg 투여군에서는 총빌리루빈 및 칼륨, 450→270 mg/kg 투여군에서는 칼륨이 유의성($p<0.05$ or $p<0.01$) 있는 증가 또는 감소를 보였으며, 알라닌 아미노기전이효소의 검사에서는 수컷의 150→90 및 450→270 mg/kg 투여군에서 아미노기전이효소, 혈액요소질소, 알부민, 글로부린 알파 1, 베타 또는 A/G ratio 가 유의성($p<0.05$ or $p<0.01$) 있는 증가 또는 감소를 보이며, 증가 또는 50→30 mg/kg 투여군에서는 알부민, 글로부린 알파 1, 베타 및 A/G ratio 가 유의성($p<0.05$) 있는 증가 또는 감소를 나타냈다.

- 절대 및 상대장기증량에서는 수컷의 50→30 mg/kg 투여군에서 신장의 상대증량이 대조군에 비해 유의성 ($p<0.05$) 있게 감소하였으나, 그 차이 경미하고, 용량의 존성은 관찰되지 않았으며, 그 외의 장기 및 회복군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.
- 부검 주시험군 및 회복군에 대한 부검에서는 암수 모든 시험군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았으나, 암컷 50→30 mg/kg 투여군의 1 레에서 선천성 심실 중격결손으로 인한 우심실비대가 관찰되었다.
- 조직병리학적 검사 : 암수 모든 시험물질투여군에서 시험물질의 투여에 의한 조직병리학적 변화는 관찰되지 않았다. 그러나, 대조군 및 회복군을 포함한 모든 시험군에서 식도 점막밑샘에 단핵성 세포침윤과 림프구성 세포침윤, 신장 유두에 무기질침착, 간의 담관주위에 섬유화, 폐 및 기관지에 단핵성 세포침윤, 부갑상선에 낭, 뇌하수체 원위부 및 중간부에 낭, 악하선에 림프구성 세포침윤, 비장 백수에 마크로파지 침착, 비장에 갠디-감나 소체, 갑상선에 C 세포의 과다형성 등 자연발생적인 변화가 산발적 또는 우발적으로 관찰되었다.
- 독성동태시험 : 시험물질인 CB-Ph 의 대사산물인 CB-OH 를 분석한 결과, 1 차 투여 첫날에는 50, 150 및 450 mg/kg 투여군에서 평균 AUClast 가 수컷은 각각 44.54, 107.82 및 252.99 ng·hr/mL 이고, 암컷은 107.57, 217.07 및 379.08 ng·hr/mL 으로 나타났으며, 평균 Cmax 는 수컷에서 18.40, 45.20 및 59.83 ng/mL 이고, 암컷에서 62.00, 48.85 및 73.22 ng/mL 으로 나타났다. 평균 Tmax 는 수컷에서 0.58, 0.83 및 1.33 hr 이고, 암컷에서 0.83, 1.17 및 1.50 hr 으로 나타났으며, 평균 T1/2 는 수컷에서 1.43, 2.91 및 2.00 hr 이고, 암컷에서 1.54, 1.64 및 4.40 hr 으로 나타났다. 2 차 투여 첫날에는 30, 90 및 270 mg/kg 투여군에서 평균 AUClast 가 수컷은 각각 40.76, 45.99 및 157.20 ng·hr/mL 이고, 암컷은 10.27, 66.31 및 380.83 ng·hr/mL 으로 나타났으며, 평균 Cmax 는 수컷에서 13.76, 20.17 및 21.69 ng/mL 이고, 암컷에서 11.03, 27.13 및 64.29 ng/mL 으로 나타났다. 평균 Tmax 는 수컷에서 3.33, 1.50 및 2.00 hr 으로 나타나고, 암컷에서 1.33, 4.75 및 4.67 hr 으로 나타났다. 2 차 투여 4 주째에는 30, 90 및 270 mg/kg 투여군에서 평균 AUClast 가 수컷은 각각 14.82, 113.02 및 325.36 ng·hr/mL 이고, 암컷은 15.87, 59.00 및 213.94 ng·hr/mL 으로 나타났으며, 평균 Cmax 는 수컷에서 9.37, 20.60 및 49.45 ng/mL 이고, 암컷에서 10.53, 23.23 및 48.02 ng/mL 으로 나타났다. 평균 Tmax 는 수컷에서 5.00, 1.50 및 3.33 hr 으로 나타나고, 암

컷에서 0.83, 2.83 및 2.33 hr 으로 나타났다. 그 외, 2 차 투여 첫날 및 4 주째에는 T1/2 을 산출할 수 없었다.

- 이상의 결과에 의해, 본 시험조건 하에 시험물질인 CB-Ph를 캡슐에 충전하여 4주간 반복 경구투여 시 270 mg/kg의 용량에서는 구토, 설사 및 점액변 등 시험물질에 의한 영향이 관찰되었으며, 시험물질의 전신노출도는 용량 의존적으로 증가하는 경향을 나타내고, 암수 간의 차이 및 축적현상은 관찰되지 않았다. 따라서 암수 비글견에 대한 무독성량(NOAEL)은 270 mg/kg인 것으로 판단된다.

4. CB-Ph의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 복강투여 독성시험

- 본 시험은 시험물질 CB-Ph를 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회 복강투여 하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 실시하였다.
- CB-Ph를 0(vehicle), 250, 500 및 1,000 mg/kg의 용량으로, 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 단회 투여한 후 사망률, 일반증상, 체중 및 부검소견을 관찰하여 부형제
 - ① 사망률 관찰 결과, 1,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1 일째에 암수 전례 사망하였다.
 - ② 일반증상 관찰 결과, 안면부종 및 피모거침이 투여 당일에 1,000 mg/kg 투여군 암수 전례, 투여 후 1 일째에 500 mg/kg 투여군 암수 전례에서 관찰되었다.
 - ③ 체중변화 관찰 결과, 500 및 250 mg/kg 투여군 수컷 및 500 mg/kg 투여군 암컷에서 시험물질 투여 초기에 용량상관성 있는 체중감소 및 체중증가억제를 나타내었다.
 - ④ 부검소견 관찰 결과, 1,000 mg/kg 투여군 사망동물 (암수 각 5 마리)에서 복강내에 복수 및 흰색의 과립상의 물질과 막, 간장의 각 엽간의 유착이 전례에서 관찰되었다.

대조군과 비교하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

- 이상의 결과로 보아, 시험물질 CB-Ph를 Sprague-Dawley 계통의 암수 랫드에 단회 복강투여하였을 때, 일반증상에서 안면부종 및 피모거침, 체중변화에서 체중감소 및 체중증가억제, 부검소견에서 복강내 복수 및 흰색의 과립상의 물질과 막, 간장의 각 엽간의 유착이 1,000 mg/kg 투여군 사망동물 암수 전례에서 관찰되었다. 또한, 1,000 mg/kg 투여군에서 암수 전례 사망하여 본 시험조건하에서 CB-Ph의 반수치사량(Lethal Dose 50, LD₅₀)은 암수 공히 736.4 mg/kg (95% 신뢰구간은 산출되지 않음)으로 판단하였다.

제 3 절 STAT3 저해제

1. 재료 및 실험방법

가. 세포주와 배지 및 배양방법

세포는 Japanese Cancer Research Bank로부터 제공받은 Human fibrosarcoma HT1080 세포주를 사용하였다. 배지는 Gibco社에서 구입한 FBS와 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)으로 10% FBS 첨가된 배지에서 배양하였고, 배양을 위한 CO₂ 배양기를 이용하였다.

나. STAT3 cell-based assay

직장암 세포주 (HCT116)에 STAT3의 활성화에 비례하여 반딧불 루시페라제(Firefly luciferase)의 발현이 증가하는 플라스미드와 STAT3의 활성화와 무관하게 레닐라 루시페라제 (Renilla luciferase)를 발현하는 플라스미드를 동시에 감염시켰다. 플라스미드들이 감염된 직장암세포들은 0.05% 트립신-EDTA (trypsin-EDTA)를 이용하여 떼어내어 96-웰 검정 플레이트의 각각의 웰에 10,000개의 세포를 접종하였다. 10% FBS가 포함된 배지에서 5% 이산화탄소를 포함하는 37 °C 배양기에 3시간 배양하고, 대조군(1% DMSO)과 옥사디아아졸 유래아 (DMSO에 녹인 화합물)을 농도별로 첨가하였다 (1/100배 희석).

STAT3 활성화는 12시간 또는 24시간 경과 후에 반딧불 루시페라제 (Firefly luciferase)와 레닐라 루시페라제 (Renilla luciferase)에 특이적인 별도의 기질 (Beetle luciferin과 coelenterazine)을 순차적으로 첨가한 후 측정하였다. 기질의 분해에 의한 발광 강도는 윌락사의 루미노미터를 이용하여 측정하였다 (Luminometer, Wallac 1420). 측정된 반딧불 루시페라제 활성화는 STAT3의 활성을 비례적으로 반영하며 레닐라 루시페라제는 각각의 실험군에서 발생하는 비특이적인 세포독성 및 내부편차를 보정한다.

다. 물질의 기기분석

분리한 물질을 분석하기 위하여 NMR과 MS 등의 광화학분석기기를 이용하였는데 NMR은 Varian UNITY 300, Varian UNITY 500, Bruker DRX 300 spectrometer, FAB-MS는 Kratosse Concept-1S FAB spectrometer, ESI-MS는 Fison VG Quattro 400 Mass spectrometer를 사용하였다. UV 흡광도를 측정하기 위해서 Pharmacia Biochrom 4060 or Shimadzu를 사용하였고, BIO-RAD의 ELISA 등의 기기를 이용하

였다.

라. Gelatin zymography 분석법

1×10^5 /ml 의 HT1080 인간 섬유육종세포를 10% FBS를 함유한 배지를 이용하여 96-well plate에서 하루 배양한 후, 시료 처리를 하기 전에 무혈청 배지로 바꾸어 주고 시료처리 2시간 후 5 ng/ml의 tumor necrosis factor α (TNF- α) 처리를 하고 16~18시간을 배양하였다. 배양 후 세포의 모양과 세포독성을 확인하고 배양액만을 취하여 sample buffer(5 \times)와 각각 섞어 전기영동 하였고 대조구와 비교하여 활성을 확인하였다. 대조구는 TNF- α 를 암세포를 활성화시켜주는 유도제로 사용하였대조구와 비교구의 유도되는 양상을 확인하였다.

마. WST-1 용액을 이용한 세포독성 시험

시료를 처리한 세포에 대한 생존능력 및 세포독성을 알아보기 위한 실험 방법으로 1×10^5 /ml 의 세포를 10% FBS를 함유한 배지를 이용하여 96-well plate (Falcon社)에서 하루 배양하였다. 시료를 처리를 하기 전에 무혈청 배지로 바꾸어주고 다시 하루 처리한 후, 100 μ l당 Cell proliferation Reagent WST-1 solution(Roche社) 10 μ l을 처리하여 450파장 (ref. 595파장)으로 된 조건의 microplate reader로 각각 흡광도를 읽고, 60분 후에 다시 흡광도를 측정하여 초기값과 반응후의 값을 각각 측정하여 대조구과 시료처리구의 값을 비교·계산하였다.

$$\text{viability (\%)} = \{(A-B)/(C-B)\} \times 100$$

A=시료구 (시료를 처리한 well의 흡광도 수치)

B=비처리구 (세포와 배지를 넣지 않고 plate 자체의 흡광도 수치)

C=대조구 (시료 처리구와 비교하기 위한 시료 미처리구의 흡광도 수치)

바. Northern blotting 분석법

HT1080 인간 섬유육종 세포주를 10% 혈청을 함유한 배지를 이용하여 세포를 60 mm 조직배양플레이트에서 1~2일간 배양한 후, 시료 처리를 하기 전 무혈청 배지로 바꾸어 준 후 각각 농도의 시료를 처리해 주었다. 시료처리 2~4시간 후에 TNF- α 를 처리하고 16~18시간을 배양한 후, 배양한 세포는 TRIZOL reagent (Life technologies, Inc.)를 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 15 μ g/ml의 RNA를 37% formaldehyde와 capill 처y transfer로 transferred Hybond-N mambranes (Amer룻를 m 료를 처리해 주었다. tech) 이 첨가된 1% agarose gels에 전기영동하였다.

Membrane은 optimized UV cross-linking procedure를 이용하여 고정시켰다. Prehybridization과 hybridization은 68°C ExpressHyb hybridization solution (CLONTECH)에서 실행하였다. MMP-9과 GAPDH을 보기 위해 cDNA probes는 random primer kit (Takara, Japan)을 이용하여 [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech)로 제작하였다. Blotting한 다음 25°C에서 0.05% SDS를 함유한 2×SSC (300nM NaCl, 30mM sodium citrate, pH 7.0)로 씻어주고, 5°C에서 0.1% SDS를 함유한 0.1×SSC로 씻어 준 다음 -70°C에서 자동방사선사진법을 이용하였다.

아. 암 세포주에 대한 세포주기 분석

SW620 세포를 100 mm 세포 배양 접시에 2×10^6 cells로 접종하였다. 18시간 후 TC-F3을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하여 48시간 동안 키운 다음, trypsin을 처리하여 세포를 배양 접시에서 떨어뜨린다. PBS (phosphate buffered saline) 5 ml을 넣고 1500 rpm에서 5분 동안 2번 원심분리하여 trypsin을 제거한다. PBS로 2번 세척 후 상층액을 버리고 PBS 1 ml을 넣고 70% 차가운 알코올 3~5 ml을 처리하여 -20°C에서 12시간 동안 세포를 고정시킨다. 알코올로 고정시킨 세포를 1500 rpm으로 5분간 원심분리하여 알코올을 제거하고 PBS로 2번 세척하여 잔여 알코올을 완전히 제거한다. RNase (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 넣고 RNA를 제거하고 PI (propidium iodide, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 DNA를 염색한다. 37°C에서 30분간 방치한 후 20,000개의 세포의 세포 주기를 FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA)로 측정하였고 세포 주기 분석 프로그램인 Modifit's program (Becton Dickinson)을 이용하여 세포 주기의 G₀/G₁, S, G₂/M기에 있는 세포의 양을 백분율로 계산하였다.

차. 분리 정제

-First silica gel chromatography

Silica gel(Merck. Kieselgel 60, 230~460mesh)을 100% n-Hexane으로 충분히 swelling해 준 후 column(5×35cm)에 packing하였다. 여기에 CH₂Cl₂ 층에서 얻은 12g 추출물을 소량의 EtOAc와 n-Hexane에 녹여서 시료를 loading하였다. 시료 loading후 충분히 용출시켜 준 다음 EtOAc를 10-20%로 용출을 하였고, MeOH:CHCl₃=0:100→50:50으로 단계적 용출하여 받았다. Kinase assay를 통하여 활성 분획을 모아 감압 농축하였다.

- Second silica gel chromatography

첫 번째 column에서 활성을 보인 물질을 다시 Silica gel(Merck. Kieselgel 60, 230~460)을 이용하여 분리하였다. 100% n-Hexane으로 swelling해 준 다음

column(4×25cm)에 packing해준다. EtOAc:n-Hexane=0:100→20:80을 용매로 사용하여 받았다. 저해활성 분획을 모아 감압 농축하였다.

- Preparative-TLC 및 Thin Layer chromatography

EtOAc:n-Hexane=30:70 전개용매 하에서 Prep-TLC를 수행하였다. 각 단계에서 TLC를 수행하여 각 분획의 분리 정도를 관찰하였고 전개용매는 normal phase에서 EtOAc:n-Hexane(80:20)을 사용하였다. 각 물질의 검색은 anisaldehyde 염색 용매 (5% H₂SO₄, 2.5% acetic acid, 5% anisaldehyde, 87.5% ethanol)를 사용하여 TLC plate를 hot plate에서 가열하여 발색시켰다. 이상과 같은 방법으로 저해물질을 추출하고 분리정제 하였으며 그 과정을 Fig. 3에 정리하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 활성물질의 분리·정제

단삼(*S. miltiorrhiza*)으로부터 분리한 STAT3 저해물질의 물리·화학적 특성을 Table에 나타내었다. 이 물질은 오렌지색을 띠며 silica gel TLC상에서(30% EtOAc) 0.25의 R_f값을 나타내었으며 UV-visible 흡수 스펙트럼을 측정한 결과 263nm에서 최대 흡수치를 나타내었다. 이 물질의 molar extinction coefficient(ϵ)는 Beer-Lambert 법칙($A = \epsilon lc$)에 의해 계산한 결과 263nm에서 $\epsilon=4.45$ 이었다. 그리고 IR spectrum은 KBr pellet을 이용하여 측정하였다. 1650, 1610, 1580, 1470, 1380, 1260, 1120, 870cm⁻¹에서 peak가 나타났다. 흡수 peak를 분석한 결과 carbonyl group(1650cm⁻¹), olefin bond (1610cm⁻¹), aromatic ring(1580cm⁻¹), saturated bond(1470cm⁻¹), aliphatic CH(1380cm⁻¹), ester bond (C-O, 1260cm⁻¹)의 작용기들이 존재함을 알 수 있었다. 또한 물질의 입체적 배열을 알아보하고자 선광도를 측정하였는데 계산된 값은 $[\alpha]_D^{20}$ (c0.1, CH₂Cl₂)= -78이었다.

화합물의 분자량을 측정하기 위하여 EI mass spectrum을 사용하였다. 측정한 결과 m/z:296(M⁺)이고 분자량이 296이었으며 그 외의 partial 분자량은 268(-CO), 253(-O-CH₂-CH)이었다. 이 mass 결과와 ¹H와 ¹³C NMR spectrum의 결과로부터 본 화합물의 분자식이 C₁₉H₂₀O₃으로 추정할 수 있었다. 유기용매에 대한 용해성을 알아본 결과, 물에는 녹지 않고 대부분의 유기용매 MeOH, BuOH, CHCl₃, EtOAc, CH₂Cl₂에는 잘 용해되었다.

나. 분리화합물의 구조결정

1) $^1\text{H-NMR}$ spectrum

CDCl_3 에 녹인 화합물을 400MHz로 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 측정한 결과 aromatic ring의 2개의 H(7.63d, 7.49d) peak를 확인하였으며 benzene ring의 3개의 H(3.20t, 1.75m, 1.66m) peak가 관찰되었다. 또한 3개의 methyl peak와 1개의 methylene peak를 관찰하였다.

Physico-chemical properties of isolated Cryptotanshinone from *S. miltiorrhiza*

Properties	Cryptotanshinone
Appearance	orange powder
Molecular formula	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$
Molecular weight	296
UV λ_{max}	263nm(log ϵ = 4.45 in CH_2Cl_2)
IR	1650, 1610 cm^{-1} (KBr, disk)
TLC	Rf=0.25 :EtOAc/n-Hexane(30:70) (silica gel plate)
Soluble	MeOH, BuOH, CHCl_3 , EtOAc, CH_2Cl_2
Insoluble	H_2O
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c0.1, CH_2Cl_2)	-78

2) $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum

화합물을 CDCl_3 에 녹인 후 100MHz로 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 측정한 결과 두 개의 carbonyl carbon이 각각 δ 184.57, 176.01에서 관찰되었다. δ 120-152에서 aromatic ring의 carbons이 확인되었고 δ 118.61과 δ 171.12에서 quaternary carbon이 관찰되었다.

3) DEPT spectrum

화합물내의 proton과 결합되어 있는 carbon의 종류를 결정하기 위하여 DEPT

spectrum을 측정한 결과 methyl 3개(δ 19.18, 32.20, 32.25), methylene 4개(δ 19.38, 30.00, 38.10, 81.78), methine 3개(δ 34.90, 122.84, 132.92)가 관찰되었다. 앞의 분자식에서 나타난 결과를 종합해 볼 때 quaternary carbon이 9개임을 알 수 있었다.

^{13}C - ^1H COSY spectrum data of isolated compound

Carbon No.	^{13}C -NMR(δ_{C})	Related proton No.	^1H -NMR(δ_{H})
1(CH ₃)	19.17	3	1.35
2(CH ₂)	19.38	5	1.75
3(CH ₂)	30.00	6	3.20
4(CH ₃)	32.20	1	1.24
5(CH ₃)	32.25	2	1.30
6(CH ₂)	34.91	7	3.58
8(CH ₂)	38.10	4	1.66
11(CH)	122.83	10	7.49
14(CH)	132.91	11	7.63

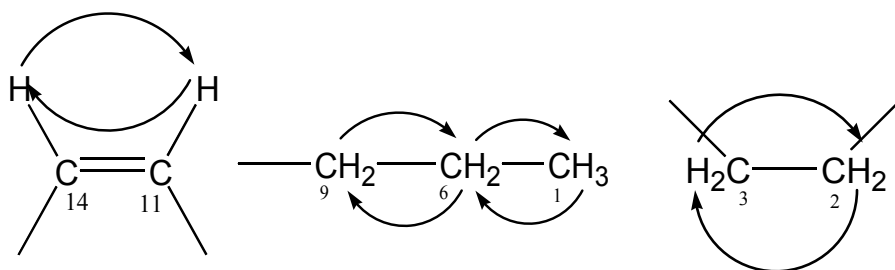
4) ^{13}C - ^1H COSY spectrum

화합물내의 carbon에 직접 결합되어 있는 proton($^1J_{\text{CH}}$)을 알아보기 위하여 ^{13}C - ^1H COSY spectrum을 측정하였다. 편의상 번호를 ppm이 낮은 쪽을 1번으로 정했다. 이후 H의 순서는 ppm과 상관없이 연관된 C의 번호와 동일하게 칭하였다. Correlation이 있는 carbon-proton을 Table에 정리하였다.

C-9(CH₂, δ 81.78)와 H-8,9(4.35, δ 4.85ppm)가 correlation이 있는 것으로 보아 같은 carbon에 결합된 H가 shift되어 peak가 둘로 갈라져 나왔음을 알 수 있었다. 그 외의 carbon은 모두 quaternary임을 확인하였고 이 결과는 DEPT에 나타난 개수와 일치한다.

5) ^1H - ^1H COSY spectrum

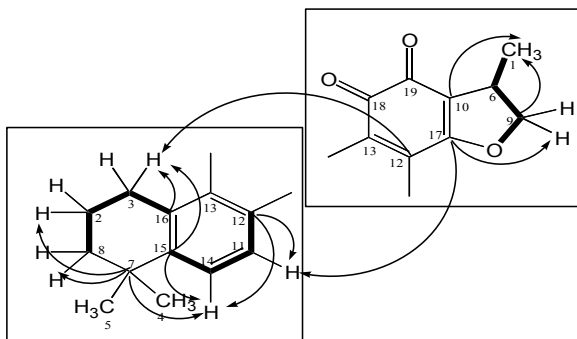
화합물내의 이웃한 proton간의 상관 관계($^3J_{\text{HH}}$)를 알아보기 위하여 ^1H - ^1H COSY spectrum을 측정하였다. ^1H COSY spectrum을 참고하여 3개의 부분 구조를 예측할 수 있었다. H-3(3.20)과 H-2(1.75), H-6(3.58)과 H-9(4.85), H-6(3.58)과 H-1(1.35) 그리고 H-14(7.63)와 H-11 (7.49)이 서로 coupling을 하고 있었다.



Three partial structures of isolated compound

6) HBMC spectrum

특정 proton이 그와 2 혹은 3 결합으로 인접한 다른 carbon과의 상관 관계($^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$)를 알아보기 위하여 HMBC spectrum을 측정하였고 data를 Table에 정리하였다. ^{13}C NMR에서 두 개의 carbonyl carbon을 확인하였고 1 c9, 1 c8에 oxygen이 결합된 것을 알았다. 또한 C-9의 두 개의 의 의shift로 보아 인접부위에 oxygen이 있는 것을 알 수 있었으며 지금까지 의기기 분석 결과를 종합하여 구조를 골격으로 삼아 구조를 예상할 수 있었다.

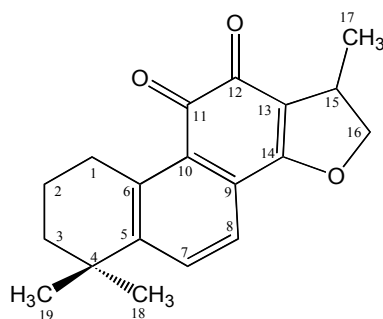


Partial structure from HMBC

7) NOESY sepctrum

수소와 수소의 공간적 근접을 알 수 있는 NOESY(NOE) spectrum 분석에서 C-8과 C-4의 proton이 같은 공간에 배향되었음을 확인하였다.

이상과 같은 기기 분석 결과들을 Table에 정리하였다. 이 결과로부터 database 검색을 실시한 결과 본 화합물이 분자량 296이고, 분자식이 $C_{19}H_{20}O_3$ 인 cryptotanshinone으로 동정할 수 있었다. 그리고 선광도와 문헌을 참고하여 분리된 화합물(cryptotanshinone)의 구조를 나타내었다.



Structure of cryptotanshinone

^1H and ^{13}C NMR spectral data of isolated compound (cryptotanshinone) from *Salvia miltiorrhiza*.

No	$^1\text{H-NMR}(\delta_{\text{H}})$	$^{13}\text{C-NMR}(\delta_{\text{C}})$	HMBC
1	3.20t(6.3)	30.00	2,3,5,9,10
2	1.75m(6.2)	19.38	3
3	1.66m(5.8)	38.10	2,19,18
4		35.16	
5		144.02	
6	7.63d(8.1)	132.91	4,5,7,8
7	7.49d(8.1)	122.83	8,14
8		128.69	
9		126.56	
10		152.69	
11		184.57	
12		176.01	
13		118.61	
14		171.12	
15	3.58(9.5)	34.91	13
16	4.85t(9.5) 4.35dd(9.3)	81.78	14
17	1.35d(6.8)	19.17	13,15,16
18	1.30s	32.25	3,19
19	1.24s	32.20	18

*Measured in CDCl_3 . s; singlet, d; doublet, q; quaterlet

HBMC spectrum data of isolated compound.

Proton No.	¹ H-NMR(δ_H)	Related Carbon No.
1(H ₃)	1.35	9,10
2(H ₂)	1.75	7, 8
3(H ₂)	3.20	2, 8, 13, 15, 16
4(H ₃)	1.24	7, 8, 16
5(H ₃)	1.30	
6(H)	3.58	10
8(H ₂)	1.66	7, 4, 5
9(H ₂)	4.85	17
11(H)	7.49	12, 13, 17
14(H)	7.63	15, 11, 7

3. Cryptotanshinone의 활성

가. 실험 방법

(1) STAT3 knockdown using siRNA

실험에 사용한 인간 유래 STAT3를 발현을 억제하는 siRNA와 음성대조군 siRNA는 바이오니아사에서 구매하였다. 사용한 STAT3 siRNA의 서열은 다음과 같다.

음성대조군 ; sense, 5'-CCUACGCCACCAAUUUCGUdTdT-3';

antisense, 5'-ACGAAAUUGGUGGCGUAGGdTdT-3'

STAT3 siRNA-1 ; sense, 5'-UGUUCUCUGAGACCCAUGAdTdT-3';

antisense, 5'-UCAUGGGUCUCAGAGAACAAdTdT-3'

STAT3 siRNA-2 ; sense, 5'-CUAUCUQAGCCCUAGGUUUdTdT-3';

antisense, 5'-AAACCUAGGGCUUAGAUAGdTdT-3'

siRNA의 암세포로의 감염은, 암세포들을 6-well 세포배양 접시에 8×10^4 이 되도록 배양한 후 진행하였다. 우선 siRNA의 농도가 100 nmol/L가 되도록 OPTI-MEM 배지에서 Invitogen사의 Oligofectamin RNAi Max와 섞고, 20분 동안 상온에서 방

치한 후, 세포에 처리하였다. 세포에 5시간동안 처리한 후, siRNA와 Oligofectamine 혼합액을 제거한 후, 10% FBS를 포함하고 있는 RPMI 1640 배지에 배양하였다.

(2) Western blotting

세포 용해물은 Roche사의 단백질 분해효소 저해제를 함유하는 RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer (50 mmol/L Tris, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 1% Sodium deoxycholic acid, 0.1% SDS, 2 mmol/L PMSF, 30 mmol/L Na₂HPO₄, 50mmol/L NaF, and 1mmol/L Na₃VO₄)를 이용하여 준비하였다. 분리한 단백질들은 40 ug의 단백질을 7.5 또는 10% SDS-PAGE로 분리하였으며, PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane으로 옮겨 다음 과정을 진행하였다. Membrane은 5%의 탈지유를 포함하는 TBS-T (50 mmol/L Tris - HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, and 0.1% Tween 20)로 blocking 한 후, 세시간 동안 일차 항체를 결합시켰다. 그 후 TBS-T로 일차 항체를 씻어낸 후, 한시간 동안 HRP가 재조합된 이차 항체들을 (goat-anti-rabbit or goat-anti-mouse IgG) 결합시킨후, Roche사로부터 구입한 화학적 발광 시약인 POD 시약을 이용하여 특정 단백질을 발색하였다.

(3) Native gel PAGE

Native protein을 함유하는 세포 용해물의 분리를 위하여 등장액 버퍼 (20 mmol/L Tris, pH 7.0, 150 mmol/L NaCl, 6 mmol/L MgCl₂, 0.8 mmol/L PMSF ,and 20% glycerol)를 이용하였다. 용해물은 27-guage 주사기를 이용하여 균질화 한 후, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. Native PAGE 분석은 총단백질량 10 ug을 SDS를 포함하지 않는 6% PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질들은 PVDF membrane으로 옮긴 후, western blotting의 과정과 마찬가지로 특이적 항체를 이용하여 발색하였다.

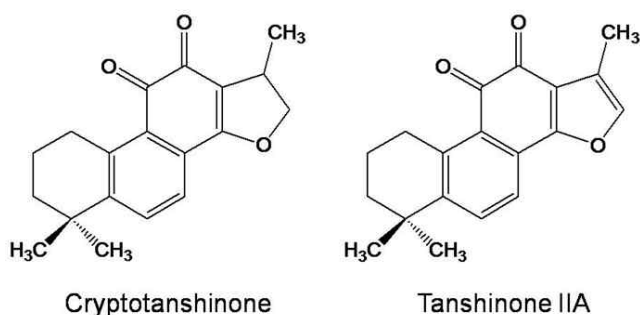
(4) Conforcal laser microscopy

세포 배양을 위한 coverslip은 70% ethanol에서 24시간 동안 담근후, PBS buffer (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na₂HPO₄,1.4 mmol/LKH₂PO₄, pH 7.4)를 이용하여 세척하였다. 6-well 배양접시에 세척한 coverslip을 놓은 후, 각각의 well에 2.5x10⁵개의 세포를 접종한 후 배양하였다. 각각의 처리는 24시간동안 수행하였으며, 그후 PBS buffer로 세포를 세척하고 4% paraformaldehyde로 상온에서 세포를 고정한 후 0.1% Triton X-100으로 세포를 permeabilization하였다. 세포는 1.0% bovine serum albumin을 포함하는 PBS buffer로 한시간 동안 blocking하였고,

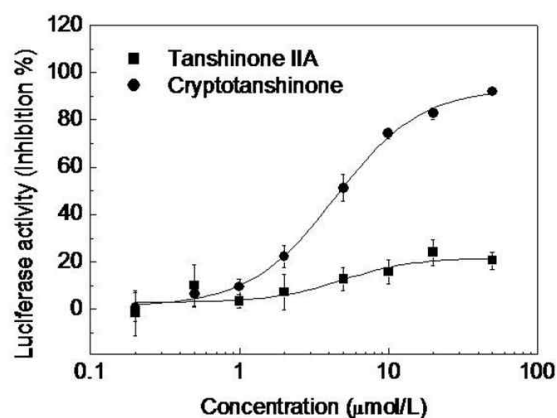
동일한 용액에 p-STAT (Tyr 705) 또는 STAT3 특이적 항체를 세시간 동안 처리하였다. 그후 PBS buffer로 세 번 씻어낸후 FITC가 결합된 이차 goat-anti-mouse IgG 항체를 한시간 동안 처리하였다. 그후 항체용액을 PBS buffer로 세 번 씻어낸 후, 최종적으로 chromosome 염색을 위하여 2 ug/mL의 PI가 함유된 PBS buffer에서 5 분간 처리하였다. Coverslip은 세척 후 slide glass에 올려져 현미경 관찰을 하였다. 세포의 관찰은 Zeiss LSM 510 META 공초점 현미경을 이용하였다.

나. STAT3 의존적 활성

Cryptotanshinone은 HCT116을 세포주에서의 luciferase assay에서 STAT3의 활성을 농도 의존적으로 저해한다. 그리고 유사한 구조의 tanshinone IIA는 STAT3의 활성을 저해하지 않는다. 이 두가지의 화합물로도 기본적인 구조-활성 관계를 검증할 수 있었다.

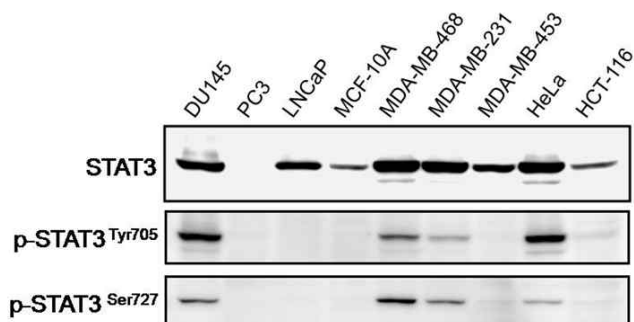


Cryptotanshinone은 HCT116을 세포주에서의 luciferase assay에서 5 $\mu\text{mole/L}$ 농도의 IC_{50} 값으로 STAT3 활성을 저해한다.

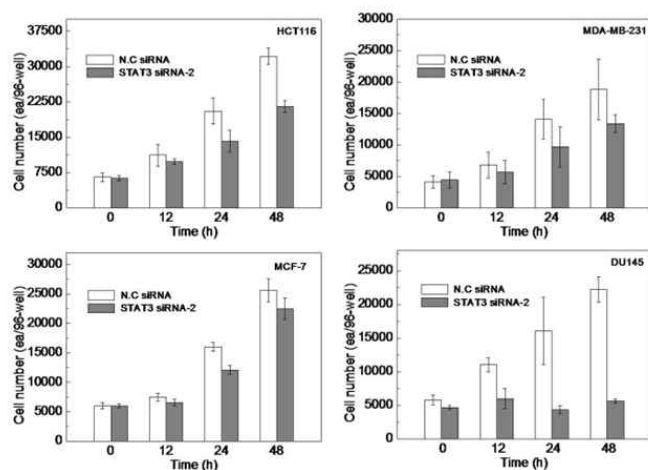


다양한 세포에서 STAT3의 활성과 발현정도를 살펴본 결과 전립선 암세포인 DU145와 유방암세포인 MDA-MB-468 세포에서 STAT3의 발현이 많고 활성도 높은

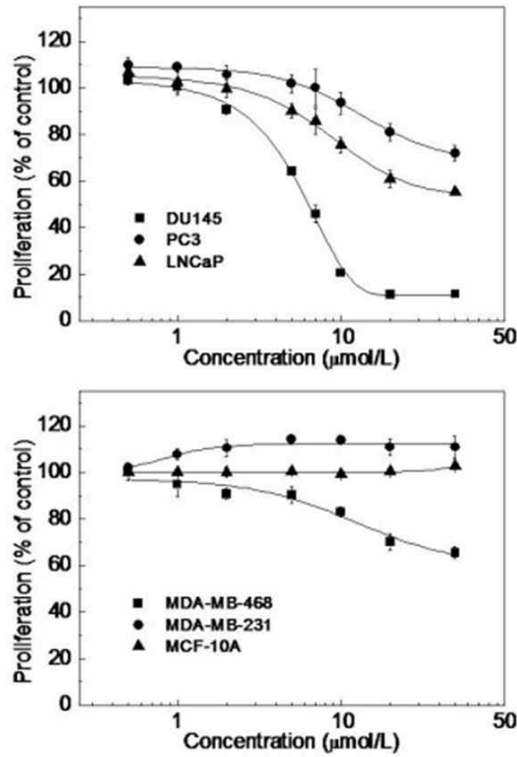
것으로 확인되었다.



다양한 세포에 STAT3의 siRNA를 처리하여 STAT3 의존성을 확인한 결과 전립선 암세포인 DU145가 가장 민감함을 확인하였으며, cryptotanshinone의 세포 성장 억제 효과도 DU145 세포에서 가장 우수함을 확인할 수 있었다. 이로서 cryptotanshinone은 STAT3의 특이적 저해제임을 확인할 수 있었다. 그러나 STAT3의 활성화와 발현정도를 높은 유방암세포인 MDA-MB-468에서는 상대적으로 cryptotanshinone의 활성화가 낮았다. 이에 대한 원인을 찾기 위해서는 후속 연구가 필요하다고 생각된다.

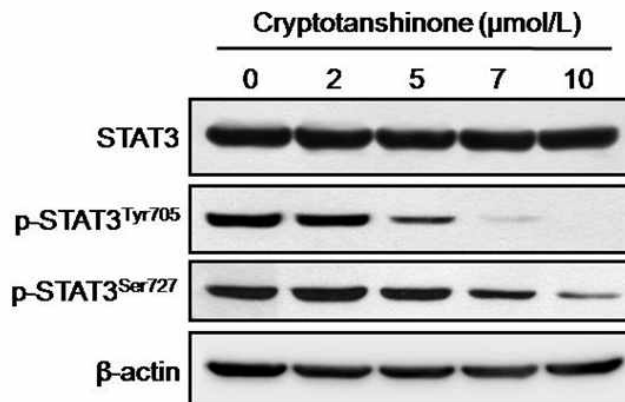


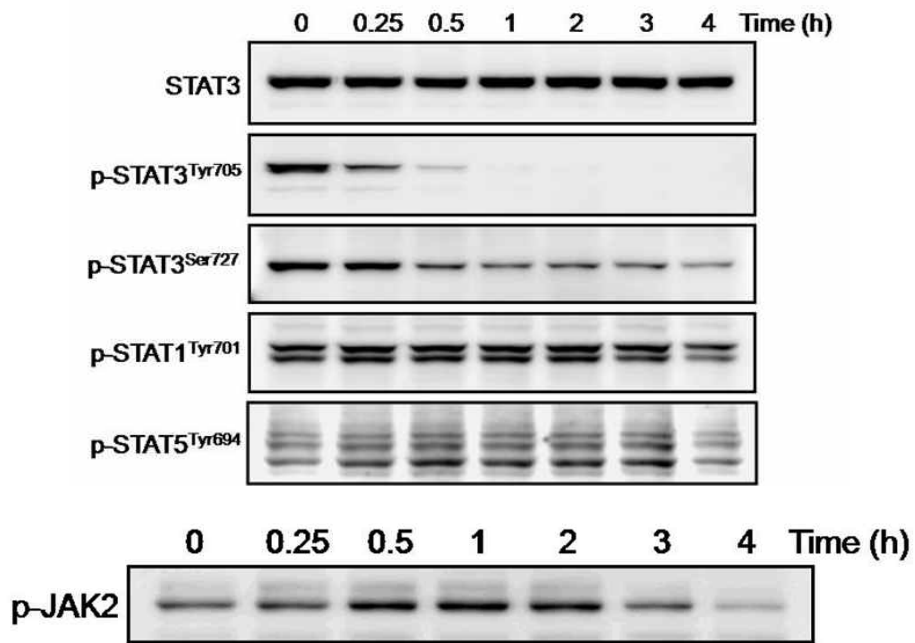
Cryptotanshinone은 STAT3의 활성화에 의존적인 DU145 전립선암 세포를 7 μ mol/L의 GI₅₀ 값을 갖도록 저해한 반면에 STAT3와 무관한 PC3, LNCaP 세포의 성장은 상기 농도에서 거의 저해하지 않았다.



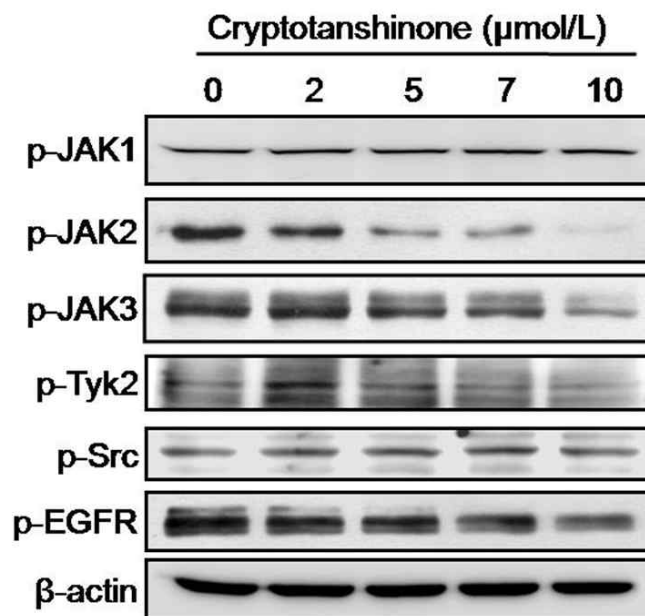
나. STAT3 인산화에 미치는 영향

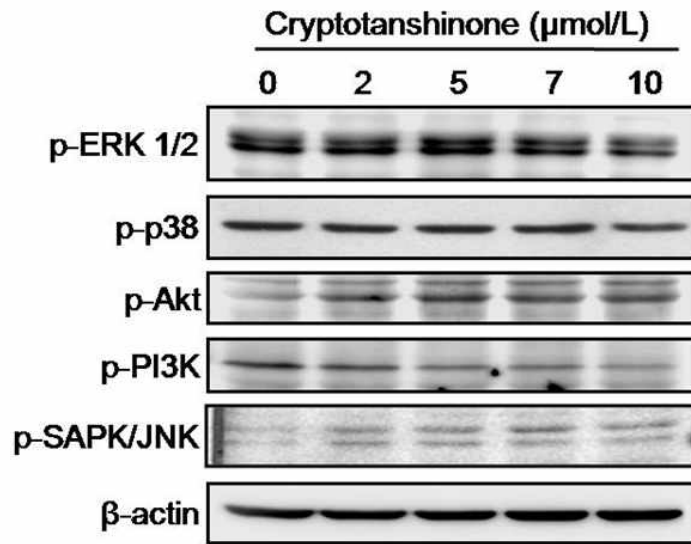
STAT3 활성 조절에 있어서 인산화 정도는 매우 중요한 잣대가 되므로 DU145 세포에 cryptotanshinone을 처리하고 STAT3의 인산화를 농도별, 시간별로 관찰하였다. 그 결과 cryptotanshinone을 5 μmol/L 농도로 처리하면 50% 이상의 인산화가 저해되었고 화합물 처리 후 30분 이내에 STAT3의 인산화가 억제됨을 확인할 수 있었다. STAT3 Tyr705의 인산화억제와 STAT3 Ser727의 인산화 억제를 비교하여 볼 때에 Tyr705의 인산화가 보다 더 선택적으로 저해됨을 확인하였다. 그리고 흥미 있는 것은 STAT3의 인산화는 매우 빠른 시간에 억제되지만 JAK2의 인산화는 3시간 이후에 감소함을 확인할 수 있었다.





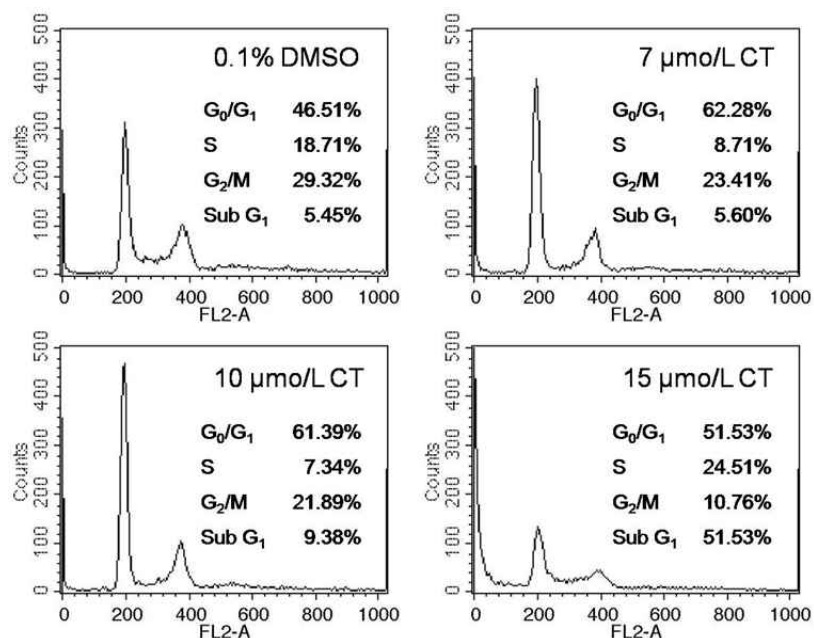
이와 더불어 STAT3의 인산화와 밀접한 관련이 있는 JAK1, JAK2, JAK3, Tyk, Src, EGFR, ERK 1/2, p38, Akt, PI3K, SAPK/JNK 등의 인산화를 측정해본 결과 JAK2의 인산화만이 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었다. 그러나 *in vitro* kinase assay를 통하여 확인한 결과 cryptotanshinone은 JAK2의 kinase 활성을 억제하지 못함을 확인하였다. 이는 cryptotanshinone은 kinase inhibitor가 아니고 다른 기전에 의하여 STAT3의 활성을 조절함을 예측할 수 있었다.

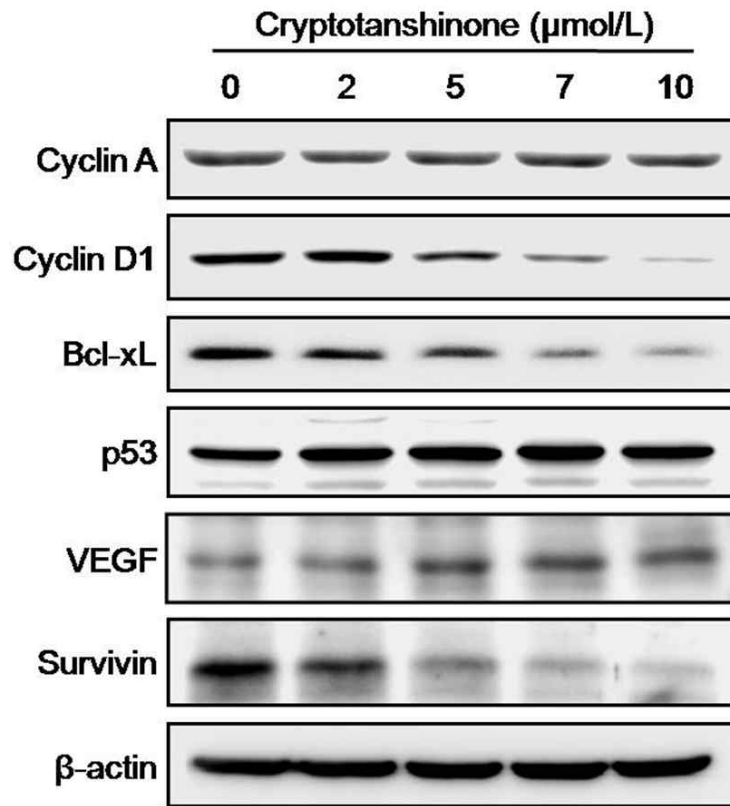




다. STAT3의 표적 유전자들의 영향

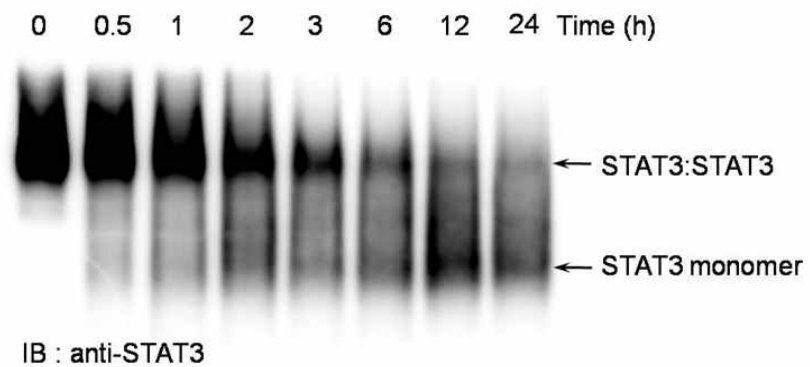
Active STAT3는 다양한 유전자의 발현을 조절하여 세포의 survival, proliferation, angiogenesis 등을 조절한다. 관련 유전자들의 발현을 cryptotanshinone을 처리한 DU145 세포에서 관찰하였다. 화합물을 처리한 세포에서 cyclin D1 (mediating cell cycle progression), Bcl-xL, survivin 등의 발현이 조절됨을 알 수 있었다. FACS analysis를 통하여 cryptotanshinone을 7 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리하면 DU145 세포가 G₀/G₁phase arrest를 유도하고 고농도 15 $\mu\text{mol/L}$ 에서는 52% 정도의 세포가 sub-G₁ 또는 세포사멸이 일어남을 확인하였다.

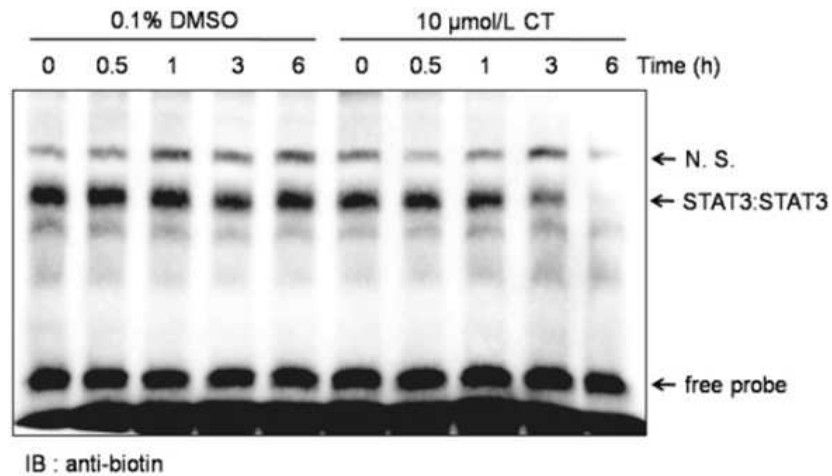




라. Cryptotanshinone은 STAT3의 dimerization을 억제

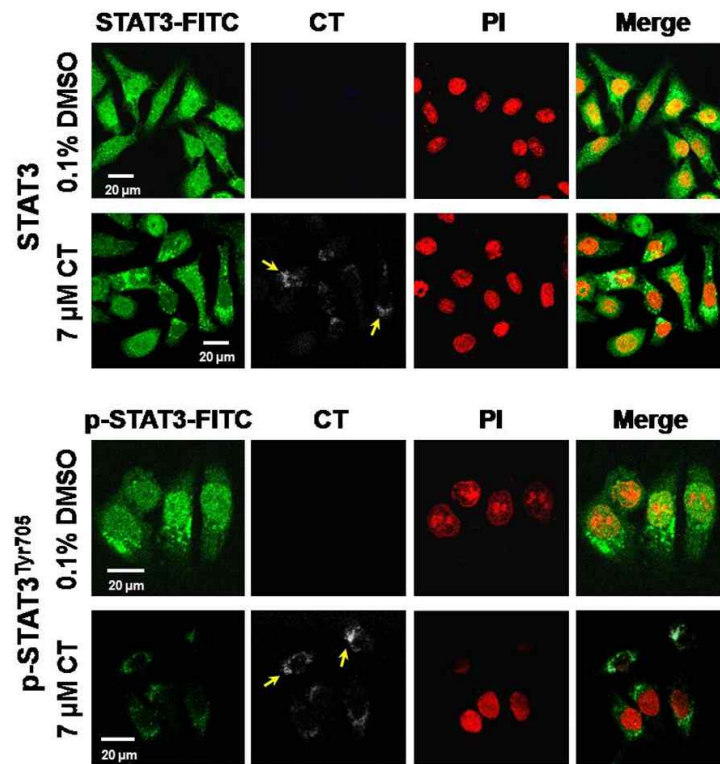
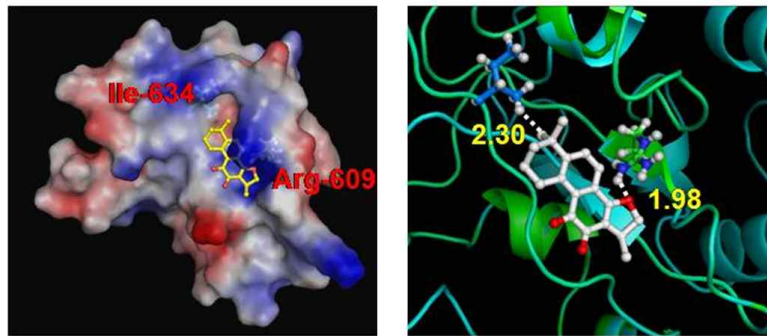
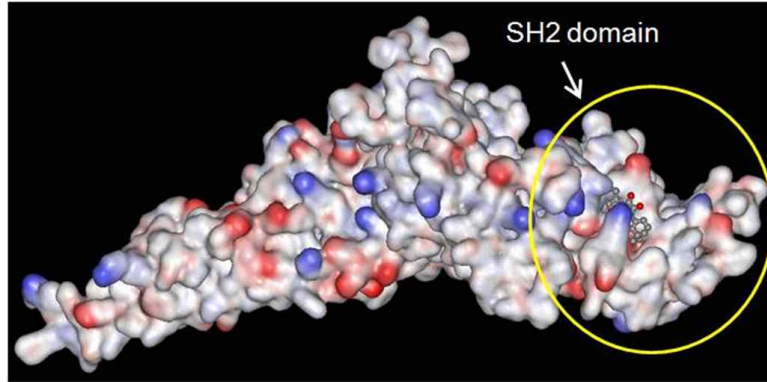
Cryptotanshinone의 활성 기전을 규명하기 위하여 native PAGE와 EMSA를 이용한 실험을 수행하였다.





이 실험을 통하여 cryptotanshinone은 STAT3의 dimerization을 억제함을 확인할 수 있었다. 그리고 confocal 실험을 통하여 dimer를 형성하지 못한 STAT3는 cytosol에 존재하고 인산화되어 dimer를 형성한 STAT3만이 핵내에 존재함을 확인하였다. Cryptotanshinone 처리에 의하여 STAT3의 핵내로의 유입이 저해되었으며, 이때 cryptotanshinone 형광을 관측한 결과 세포질의 STAT3의 분포와 유사하게 분포함을 확인하였다. 이는 cryptotanshinone이 STAT3에 직접 결합함을 가정할 수 있게 하는 결과이다. Computer modeling을 통하여 cryptotanshinone은 STAT3의 SH2 domain에 결합하여 dimer를 형성을 억제할 것이라는 예측을 할 수 있었다.

결론적으로 cryptotanshinone은 STAT3의 SH2 domain에 결합하여 STAT3의 활성을 조절하는 것으로 생각된다.



4. STAT3 pathway 저해제 Sugiol의 활성

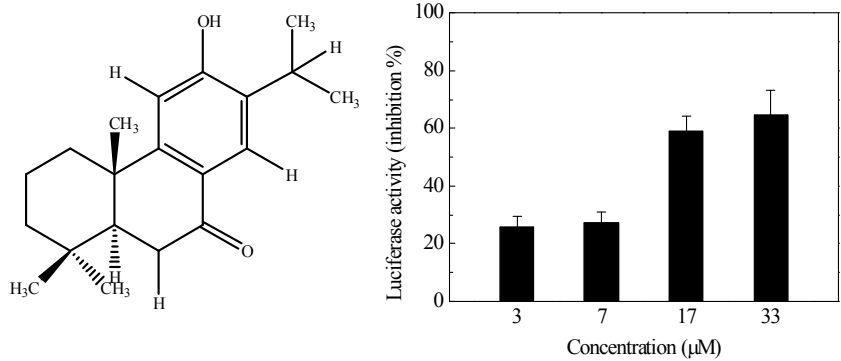
가. Sugiol의 분리

다양한 식물체 추출물로부터 항암화성물질을 탐색하는 과정에서 세쿼야 나무의 열매 추출물이 암세포의 성장을 억제함을 발견하였다. 세쿼야 나무의 열매를 잘게 분쇄하여 메탄올을 넣어 상온에서 48시간 방치한 후 교반하여 여과지를 이용해서 액상과 고체부분을 분리하였다. 액상을 모아서 감압 하에서 농축한 후 메탄올을 가하여 용해시켰다. 활성물질을 함유하고 있는 유기용매 층을 모아 감압 하에 농축하였다. 농축 추출물을 메틸렌클로라이드에 녹인 후 실리카겔 (Merck, Art No. 9385)에 가하여 활성물질을 흡착시킨 다음, 에칠아세테이트와 헥산의 비율을 90 : 10에서 80 : 20으로 변화시키면서 실리카겔 칼럼 크로마토그래피하여 활성분획을 분리하였다. 수득한 분획물을 C18 칼럼에 흡착시킨 다음 메탄올과 물로 용출시켜 부분 정제한 활성 물질을 얻었다. 부분 정제된 화합물을 대상으로 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 순수한 화합물을 얻었다. 최종적으로 열매 2 kg을 메탄올로 추출하여 추출물 90 g을 얻었으며, 이로부터 순수한 화합물 신규화합물 20-hydroxyferruginol (1)과 4종의 known compounds, ferruginol (2), 18-hydroxyferruginol (3), sugiol (4), 6a-hydroxysugiol (5)을 분리하였다.

이들 물질 중에서 직장암 세포주 (HCT116)에 STAT3의 활성에 비례하여 반딧불 루시퍼라제 (Firefly luciferase)의 발현이 증가하는 플라스미드와 STAT3의 활성과 무관하게 레닐라 루시퍼라제 (Renilla luciferase)를 발현하는 플라스미드를 동시에 감염시킨 assay system에서 sugiol이 저해 활성을 나타내었다.

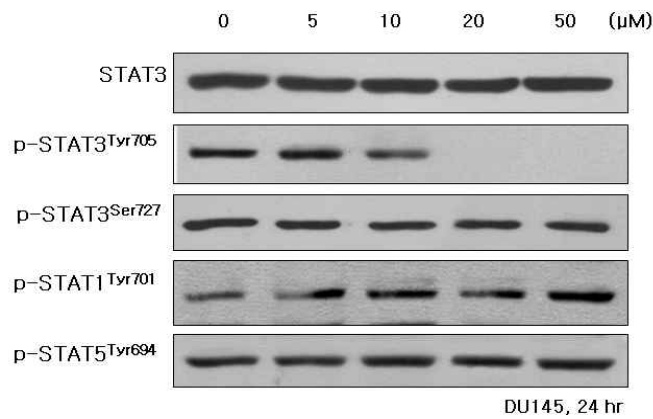
가. STAT3의 활성 측정

STAT3의 활성을 저해하는 저분자 물질을 탐색하기 위하여, cell-based transient dual-luciferase assay를 확립하였다. 간략히 설명하면, 이 방법에서는 STAT3의 활성에 의존적으로 반딧물 루시퍼라제 (firefly luciferase)를 발현하는 플라스미드와, STAT3의 활성과 무관하게 레닐라 루시퍼라제 (Renilla luciferase)를 발현하는 플라스미드를 동시에 HCT-116 직장암 세포에 감염시킨다. 이후 24시간 동안 저분자 물질을 처리한 후 세포를 PLB (passive lysis buffer)로 용해하여, 반딧물 루시퍼라제와 레닐라 루시퍼라제의 기질을 순차적으로 처리하여 세포내에 발현된 각각의 효소 활성을 화학적 발광법 (chemiluminescence)에 의하여 측정한다. 이때, 레닐라 루시퍼라제는 반딧물 루시퍼라제의 활성을 보정하기 위한 대조활성 값으로 이용된다.



나. Sugiol 활성

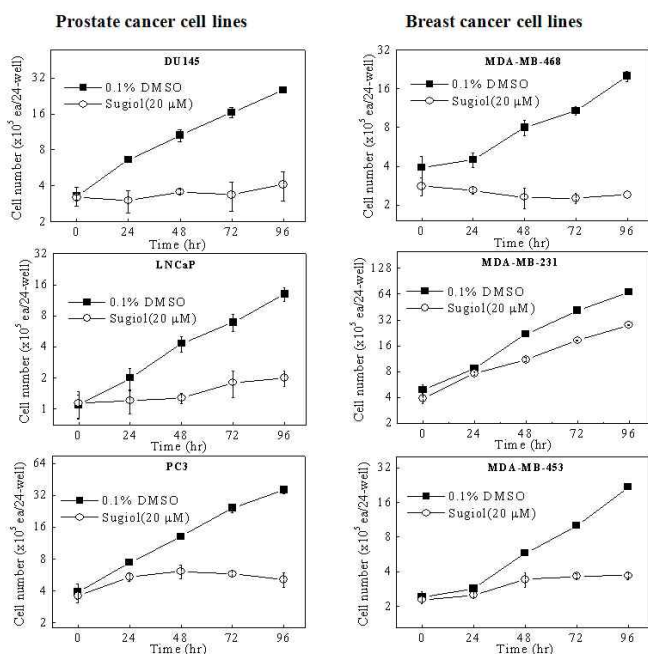
Dual-luciferase assay system에 sugiol을 적용하였을 때, sugiol은 STAT3의 활성을 저해하였다. HCT-116 직장암 세포에 15 μM 이상의 농도로 처리하였을 때, 50% 이상의 STAT3 활성을 저해하였다. 웨스턴 블랏 실험을 통하여 STAT3의 활성화된 형태인 인산화 형태를 조사하였을 때, DU145 전립선 암세포에 20 μM 의 sugiol 처리에 의하여 STAT3의 타이로신 인산화가 특이적으로 저해되었음을 확인하였다.



다. Sugiol 암세포

작용기전 연구에 앞서, 다양한 암세포들을 대상으로 성장률 측정을 실시하였다. DU145 전립선암세포와 MDA-MB-468 유방암 세포는 STAT3의 기전 연구에 가장 일반적으로 사용되는 암세포들이다. Sugiol은 DU145 세포의 성장을 농도, 시간 의존적으로 효과적으로 저해하였다. 한편, sugiol 처리 후에 STAT3의 활성화에 의하여 발현이 조절되는 세포주기 및 세포생존에 관여되는 단백질들을 조사하였을 때, 세포주기에 관여하는 cyclin A와 cyclin D1의 발현이 현저히 감소하였다. 세포주기 조사를 위한 FACS (fluorescence-activated cell sorting analysis) 실험에서 20 μM sugiol 처리에 의하여

DU145 세포의 전개가 G1 또는 G2/M 상에 머물러 있음을 확인하였다.



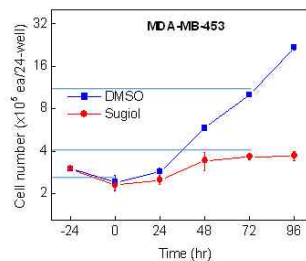
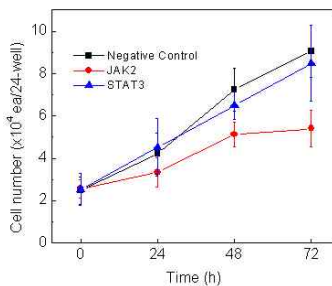
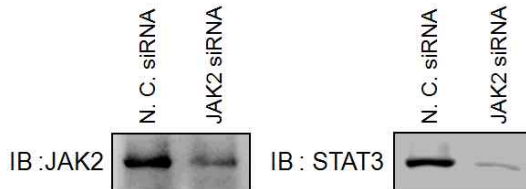
라. Sugiol 기전

Sugiol에 의한 STAT3의 활성화저해 기전을 규명하기 위하여, STAT3의 인산화를 조절하는 인산화 효소들의 활성을 웨스턴 블랏으로 조사하였다. 특이적으로 JAK family 인산화 효소 중 JAK2의 활성이 sugiol의 처리에 의하여 감소하였다. 따라서 JAK2의 활성화 저해에 의하여 STAT3의 인산화가 저해된 것으로 보여진다. 이를 보다 상세히 조사하기 위하여 다양한 암세포에서 JAK2와 STAT3의 활성을 조사하였다. 흥미롭게도 MDA-MB-453 유방암 세포에서는 STAT3의 활성화가 거의 관찰되지 않은 반면, 인산화된 JAK2가 비이상적으로 크게 나타났다. 따라서, Sugiol이 STAT3의 활성화는 무관하게 JAK2의 양적 또는 활성화 저해를 통하여 세포의 성장을 억제하였는지를 조사하기 위하여 MDA-MB-453에서 JAK2 또는 STAT3의 siRNA knockdown 실험을 수행하였다. 그 결과 JAK2의 knockdown에 의하여 MDA-MB-453의 세포 성장이 감소한 반면, STAT3 knockdown에 의한 성장 감소는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 MDA-MB-453에 sugiol 처리에 의한 효과와 유사하였다. 이는 sugiol이 STAT3와는 무관하게 JAK2의 활성 또는 발현을 저해함으로써 세포의 성장을 저해함을 의미한다.

Kinase assay, Sugiol (10 μ M)

Proteins	Conc. of ATP (μ M)	Activity (%)
EGFR(h)	10	102
FGFR1(h)	200	102
FGFR2(h)	90	97
JAK2(h)	45	116
JAK3(h)	10	113
Lyn(h)	70	101
MAPK2(h)	155	105
PDGFR α (h)	120	104
Src(1-530)(h)	45	92

Growth inhibition by JAK2 siRNA in MDA-MB-453



제 4 절 PRL-3 활성 저해 물질

1. PRL-3 저해제 탐색

가. PRL-3 phosphatase의 부분 정제

(1) Expression of PRL-3 in *E. coli*

*E. coli*에서 PRL-3 발현은 3' 말단에 *Xhd* site와 5' 말단에 *Nda* site를 포함한 PRL-3 단편을 PCR로 증폭하여 유도하였다. N말단 primer로는 5' CTA TAC ATA TGG CTC GGA TGA ACC GCC CG3'를 사용하였고, C말단 primer로는 5' GTA ACT CGA GCA TAA CGC AGC ACC GGG TCT TG 3'를 사용하였다. PRL-3단

편은 T4 DNA ligase를 이용하여 pET 30 mammalian expression vector의 *Nde*I site와 *Xba*I site에 삽입하여 증폭하였다. 이렇게 변형된 *E. coli*는 ampicillin이 포함된 LB배지에서 선별하였다. Positive colonies는 plasmid DNA의 제한적 분해 작용에 의해 선별하고 분리하였다.

(2) Purification of PRL-3 from *E. coli* cells.

N-terminal (His)6-tag PRL-3 fusion이 포함된 동결상태의 6.0 g을 1 M NaCl 넣어준 BPER (Bacterial Protein Extraction Reagent, Pierce)시약 50 ml에 용해시킨다. 이 혼합물은 30초 동안 초음파로 분해 후, 4°C에서 15분 동안 20,000×g로 원심분리한다. 상층액은 미리 Buffer A (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole)로 균질화한 8 ml Ni-chelation affinity column에 1 ml/min으로 loading한다. 단백질 혼합액을 loading한 후, column은 50 mM imidazole을 포함한 Buffer A로 washing한다. 이 washing은 endogenous phosphatases를 포함한 비 특이적으로 결합된 단백질을 제거해준다. PRL-3는 400 mM imidazole이 포함된 Buffer A로 용리하여 준다. 이와 같은 방법으로 촉매활성이 불활성화 된 N-terminal (His) 6-tag mutant PRL-3 (C104A)도 정제하였다.

나. PRL-3 phosphatase의 저해활성 측정

(1) DiFMUP PTPase activity assay

이 활성평가는 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM DTT, 0.01% Triton X-100 그리고 4 mM DiFMUP (6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl phosphate)가 포함된 혼합물의 반응을 96 well plates를 사용하여 확인한다. 190 μl 반응 혼합물에 정제된 PRL-3 protein 또는 컬럼 분획물 10 μl을 첨가하여 총 부피 200 μl를 만든다. 이 혼합물은 1시간 실온에서 반응시키고 2 mM sodium orthovanadate를 첨가하여 반응을 멈춘다. 결과는 fluorimeter를 사용하여 excitation/emission 355 ± 38 nm/460 ± 25 nm인 조건에서 확인한다. 최종적으로 저해율은 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

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

Blank 1 : 시료 및 효소가 없을 때 cpm

Blank 2 : 시료는 있으나 효소가 없을 때 cpm

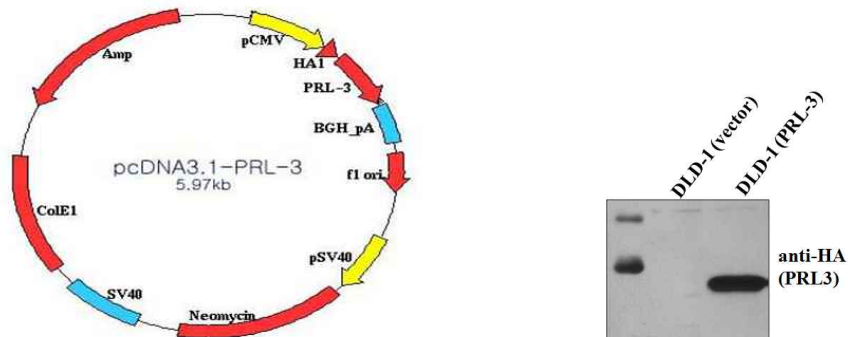
Control : 시료는 없으나 효소가 있을 때 cpm

위의 식으로 각 농도별 저해율을 통하여 50 % 저해활성을 나타내는 몰농도를 구하였다.

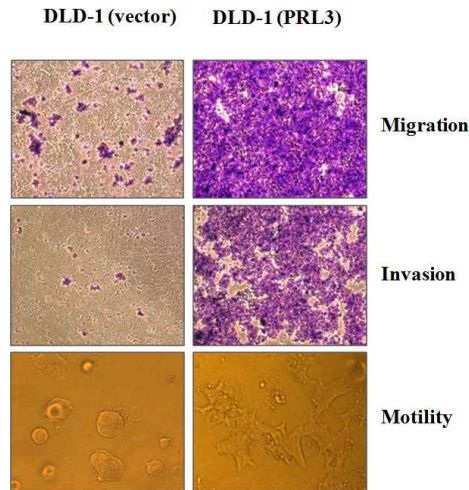
2. PRL-3 세포주 및 세포 이동 실험

가. 세포주 구축

PRL-3의 발현이 적은 인간 대장암세포인 DLD-1에 PRL-3플라스미드를 transfection 하여 PRL-3가 과발현하는 DLD-1세포주가 필요하여 가장 먼저 PRL-3재조합 플라스미드를 제작하였다. 5.4kb의 pcDNS3(HA)플라스미드의 EcoR I 위치를 절단하여 PRL-3유전자를 삽입하였다. 다음에 DLD-1 세포에 재조합된 HA-PRL-3 플라스미드와 transfection agent (transfectine) 를 20분간 실온에서 incubation 한다. 그 후에 Geneticin (1mg/ml)을 2~3주 처리하여 transfection된 세포를 선택하여 stable cell line을 구축하였다.



PRL-3의 발현 유무는 western blotting으로 검증하고 세포의 migration능력의 증가를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 먼저 PRL-3가 과발현하는 DLD-1세포를 배양한다. Trysin -EDTA를 이용하여 세포를 배양 plate에서 떼어낸 후 FBS와 항생제가 들어있지 않은 세포 배양 배지로 2회 wash한다. Pore size가 8micron인 transwell(24well)의 상층부에 FBS가 포함되지 않은 배지로 8×10^4 개의 세포를 200 μ l 부피로 희석하여 넣어준다. 그리고 FBS가 포함된 배지 500 μ l를 transwell의 하층부에 넣어준다. 24시간 incubation 한 후 배지를 제거하여 crystal violet으로 세포를 염색하고 상층부의 세포를 제거한 후 현미경으로 하층부로 이동한 세포의 유무를 확인한다.



3. 후박으로부터 PRL-3 유도 세포 이동 저해제 분리

가. 후박 잎으로부터 항암활성물질 분리

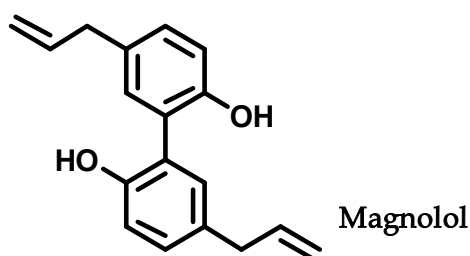
암의 발생률은 문명이 발달됨에 따라 증가하고 있음에도 불구하고 암환자의 치료법은 외과적 수술, 방사선 치료, 40여종의 강한 세포독성을 보이는 항암물질 투여에 의한 화학요법에 의존하고 있는 상태이다. 이들 치료법도 대부분 조기 암환자나 특정 암에만 국한되어 암으로 인한 사망은 계속 증가하고 있는 추세이다. 그리고 암환자의 주된 사망요인은 초기종양에 의한 것이 아니고 암세포의 다른 조직으로의 전이에 의한 것이다. 따라서 암세포의 침윤과 전이의 기작과 이를 억제하는 방법에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 암세포의 전이과정을 살펴보면, 먼저 원발 종양으로부터 전이성암세포가 떨어져 나와 정상조직의 간질과 기저막과 같은 지지구조체로 침윤해 들어가서 다른 목표조직의 모세혈관 벽에 부착하고 세포외기질과 기저막을 분해한 후 모세혈관으로 유출, 새로운 조직에서 혈관 신생이 동반되어 이차종양이 형성되는 것이다. 따라서 전이과정은 접착, 침윤, 혈관신생의 세 가지 중요 단계로 구성되어 있으며, 이 중에서 어느 하나를 막을 수 있다면 암 전이를 억제할 수 있을 것이다. 전이가 잘 되는 암세포는 일반적으로 MMP2나 MMP9의 활성이 높으며 이를 저해하는 물질들이 암 전이를 억제하는 것으로 나타났다.

후박나무(대한민국 중부지방에 자생하는 것을 채취) 잎, 열매 또는 수피를 잘게 분쇄하여 메탄올을 넣어 상온에서 48시간 방치한 후 교반하여 여과지를 이용해서 액상과 고체부분을 분리하였다. 액상을 모아서 감압 하에서 농축한 후 메탄올을 가하여 용해시켰다. 활성물질을 함유하고 있는 유기용매 층을 모아 감압 하에 농축하였다. 농축된 추출물을 메틸렌클로라이드에 녹인 후 실리카겔(Merck, Art No. 9385)에

가하여 활성물질을 흡착시킨 다음, 에칠아세테이트와 헥산의 비율을 90 : 10에서 80 : 20으로 변화시키면서 실리카겔 칼럼 크로마토그래피하여 활성분획을 분리하였다. 수득한 분획물을 C18 칼럼에 흡착시킨 다음 메탄올과 물로 용출시켜 부분 정제한 활성 물질을 얻었다. 부분 정제된 화합물을 대상으로 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 순수한 화합물을 얻었다. 최종적으로 잎 2kg을 메탄올로 추출하여 추출물 120g을 얻었으며, 이로부터 순수한 화합물 오보바톨 (obovitol)과 마그놀롤 (magnolol)을 얻었다.

나. 구조 결정

UV 흡광도 분석, IR (infrared) 흡광도 분석 및 고해상도 질량분석기 분석을 실시하여 상기 순수 정제된 화합물의 분자량 및 분자식을 결정하였다. 구체적으로, UV 흡광도 분석은 시마주사의 UV-265 분광광도계 (Shimadzu UV-265 spectrophotometer)로 측정하였으며, IR 흡광도는 바이오-라드사의 디지랩 디비존 FTS-80 분광광도계(Bio-Rad Digilab Division FTS-80 spectrophotometer)로 측정하였고, 분자량 및 분자식은 VG70-SEQ 질량 분광계(mass spectrometry; MS)를 이용한 고해상도(High resolution) MS를 측정하여 결정하였다. 또한 핵자기공명기(Varian 300 MHz, 500 MHz NMR)를 이용하여 ^1H , ^{13}C -NMR 스펙트럼(spectrum)을 얻었으며, 이들 스펙트럼을 종합적으로 분석하여 구조를 결정하였다.



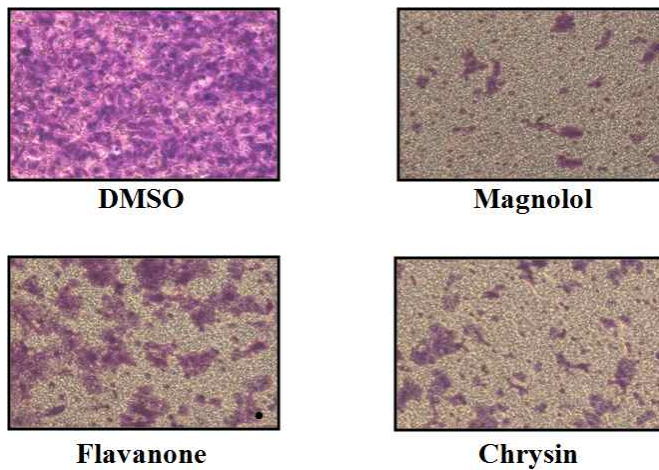
다. 항암활성

상기 화합물의 인간 암세포주 성장 억제를 WST-1을 사용하여 측정하였다. 인간 암세포주를 10% FBS가 포함된 배지에서 37°C, 5% 이산화탄소를 유지하며 배양하였고, 0.05% 트립신-EDTA(trypsin-EDTA)를 이용하여 세포를 떼어내었다. 96 웰 플레이트(96 well plate)의 각 웰에 헤마토사이토미터(hemocytometer)로 계산한 4,000개(A549, MDA-MB-231), 5,000개(HEK293, NCI-H23) 또는 6,000개(HCA-7, HCT116, SW620, DU145)의 세포를 각각 넣었다. 5% 이산화탄소를 포함한 37°C 배양기에서 10% FBS가 포함된 배지에서 배양하고, 24시간 후에 대조군(0.1% DMSO)과 분리 정제한 각각의 화합물을 농도별로 포함(DMSO에 녹인 화합물을 배지로 희

석)한 새로운 배지로 바꾸었다. 48시간동안 처리한 후에 각 웰에 WST-1(Roche) 10 μ l씩을 첨가하고 2시간동안 배양한 다음, ELISA 리더(ELISA Reader, Bio-Rad)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. 세포 이동 저해 활성

세포의 성장을 억제하지 않는 농도에서 PRL-3 overexpressed DLD-1 세포를 대상으로 세포 이동 억제 효능을 검증하였다. 그 결과 알려진 flavonoid 들보다 우수한 활성을 보여 주었다.



4. 지치로부터 PRL-3 저해제 분리

지치(Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc.)는 지치과의 다년생 초본 식물로서 우리나라의 강원도, 제천 등의 야산에 주로 자생하고 지치 뿌리는 예로부터 우리나라, 중국과 일본에서 한약재와 식용색소로 이용되었다. 한방에서 혈액순환 촉진, 해열, 해독 작용에 주로 이용하거나 토혈, 혈뇨, 변비, 화상, 습진, 요로 감염 등을 치료하는데 사용하여왔다 (Lee 등, 1998). 주요성분으로는 acetylshikonin, shikonin, alkannan, isobutyryl-shikonin, β,β -dimethy-acrylshikonin, β -hydroxy isovaleryl shikonin, teracryl shikonin 등의 다양한 shikonin 유도체들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근에는 Arnebia 속의 식물 4종(A. euchroma, A. guttata, A. benthamii, and A. hispidissima)에 함유되어 있는 shikonin 유도체 성분들을 신속하게 동시 정량분석하는 highperformance thin-layer chromatography (HPTLC) 방법에 대한 보고가 있었다. 한편, 중국에서는 Lithospermum 속의 뿌리는 경자초, Arnebia속의 뿌리는 연자초로 유통되고 있는데, 연자초는 껍질이 종이처럼 여러 겹으로 되어 한 장씩 한 장씩 쉽게 벗겨지므로 질이 단단한 경자초와는 쉽게

구분되며, 신강자초(*Arnebia euchroma*)와 내몽자초(*A. guttata*)가 포함된다.

지치의 acetylshikonin 등을 포함한 shikonin 유도체 성분은 항산화활성을 비롯하여, shikonin 유도체 성분의 항염증 활성[Tanaka 등, 1986; Staniforth 등, 2004], 혈전용집 억제활성, 항미생물 효과, 항산화 효과 등이 알려져 있다. 또한 acetylshikonin를 포함한 shikonin 유도체들은 항암효과가 우수한 것으로 보고되었다. 최근에는 acetylshikonin이 cytosolic phospholipase A2(cPLA2) membrane recruitment와 5-lipoxygenase 활성억제를 통해 eicosanoid의 생성을 억제하는 효과가 있음이 보고되기도 하였다.

가. Acetylshikonin의 분리

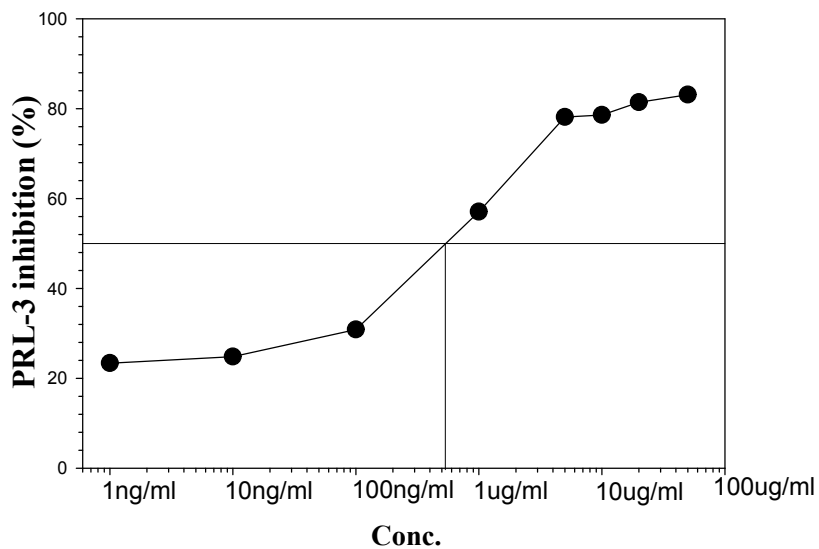
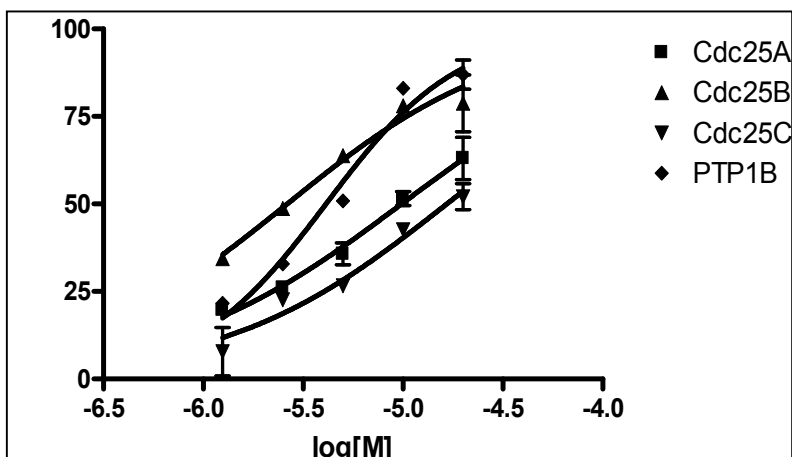
지치뿌리 시료는 1년근 재배 지치를 한국생약협회에서 구입하여 사용하였으며, voucher specimen (MPS000071)은 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 식물표본실에 보관중이다. 지치 뿌리의 분말 시료 3 kg에 헥산 12 L를 넣고 10일 동안 상온에 방치하여 총 4회 동일 방법으로 추출하고, 여과한 후 진공 농축하였다. 5-6회 추출은 남아 있는 시료 잔사에 용매 6 L 정도 추가하여 상온 진탕 추출한 후 여과하여 진공 농축하였다. 총 6회에 거쳐 농축한 헥산 농축액 (Hexane ext., 26 g)은 silica gel이 충전된 column(5×40 cm)에서 column chromatography를 실시하였다. 용출용매로는 Hexane:EtOAc(30:1→1:11) 혼합용매와 EtOAc:MeOH(25:1→1:2) 혼합용매의 기울기 용리로 용출하면서 500 mL씩 분취하여 총 421개 분획을 분취하였다. 각 분취 분획은 UV 검출기 520 nm의 파장에서 HPLC 분석으로 동일성을 확인한 후 유사한 패턴의 분획들은 서로 합쳐 재농축하여 최종 농축 분획 30 개(Fr. 1~30)를 얻었다. 최종 30개의 분획 중 Fr. 6, 7 분획을 MeOH로 침전화하여 compound 1(1.1 g)을 최종 분리, 정제하였다. 분리한 화합물의 구조 동정을 위한 분광학적 분석의 NMR 측정에는 JEOL JNM-LA400 FT-NMR spectrometer(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)가 사용되었고, EI/MS 측정에는 JEOL JMS-AX505WA(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)가 사용되었다.

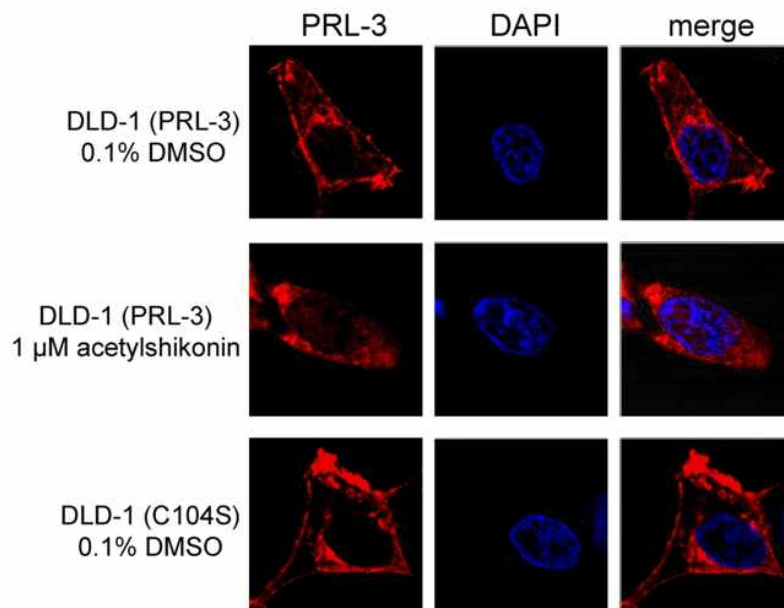
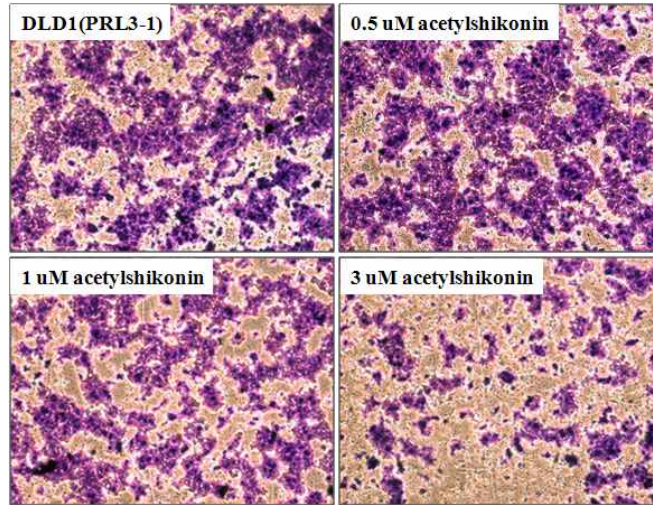
나. Acetylshikonin의 물리화학적 성질

Red brown amorphous powder; EI/MS (positive ion mode) m/z 330.95 [M]⁺
1H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.64 (3H, s, H-15), 1.75 (3H, s, H-16), 2.20 (3H, s, OCOCH₃-18), 2.53~2.66 (2H, m, H-12), 5.18 (1H, m, H-13), 6.08 (1H, m, H-11), 7.05 (1H, s, H-3), 7.24 (2H, s, H-6, H-7), 12.48 (1H, s, OH-5), 12.64 (1H, s, OH-8)

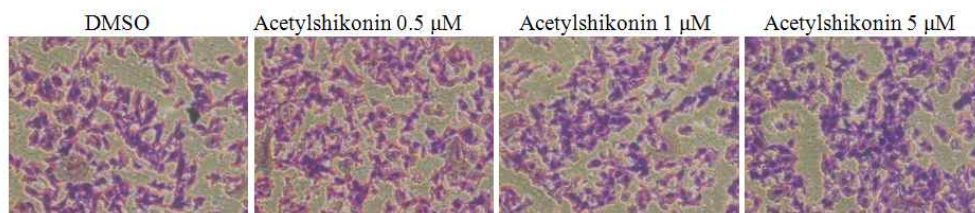
- ¹³CNMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 178.19 (C, C-4), 176.68 (C, C-1), 169.74 (C, C-17), 167.45 (C, C-5), 166.92 (C, C-8), 148.19 (C, C-2), 136.09 (C, C-14), 132.85 (CH, C-6a), 132.69 (CH, C-7a), 131.44 (CH, C-3), 117.65 (CH, C-13), 111.80 (C, C-9b), 111.54 (C, C-10b), 69.50 (CH, C-11), 32.81 (CH₂, C-12), 25.74 (CH₃, C-16), 20.95 (CH₃, C-18), 17.92 (CH₃, C-15) (a,bAssignments with the same superscript may be interchanged.).

다. Acetylshikonin의 PRL-3 저해 활성

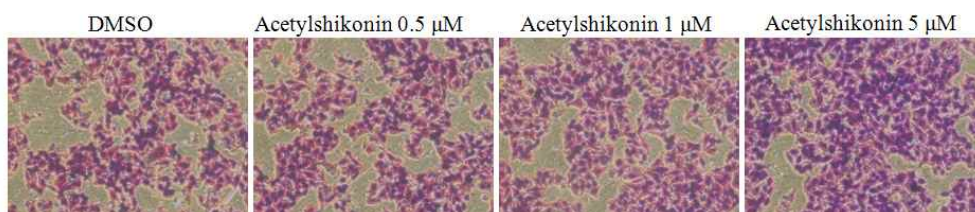


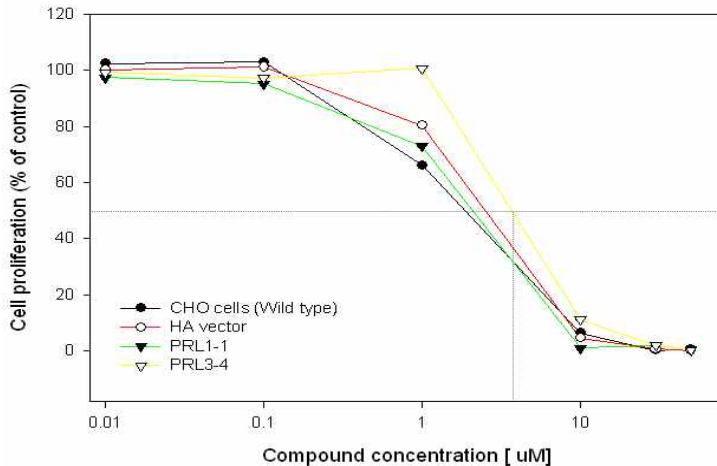


MDA-MB-231 6h



DLD-1 IS 21 h





다. 결론

지치로부터 분리한 acetylshikonin은 PRL-3 phosphatase 저해활성 나타내고 PRL-3 특이적으로 세포의 이동을 저해함을 확인하였다. 암 세포주를 가지고 세포 증식 억제 효능실험을 수행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

제 5 절 세포주기 조절 물질

1. 재료 및 방법

가. 시약 및 재료

은행잎으로부터 세포주기를 조절하는 물질을 분리하였다. 물질 분리 및 정제에 사용된 용매 (Chloroform, Methanol, Ethyl acetate, Acetone, n-Hexane)는 덕산 화학에서 구입한 1급 시약을 사용하였으며, 활성검정을 위한 시료의 조제는 100% DMSO (Sigma 사)를 사용해 조제하였다. 분리과정에 사용된 실리카겔 (Kiesel gel 60, 230-400 mesh, Art. 9385)과 C18 겔 (Lichroprep[®] RP-18, 40 - 63 µm, Art. 13900)은 Merck사 제품을 사용하였다. 그리고 TLC plate는 pre-coating된 Kieselgel 60F₂₅₄ (Art. 1.05715)로 Merck 사 제품을 사용하였으며, 254nm과 365nm에서 UV lamp로 관찰하였다. 발색 시약으로는 Anisaldehyde-sulfuric acid reagent (25 ml anisaldehyde, 5 ml acetic acid, 25 ml sulfuric acid, 450 ml EtOH)를 사용하였다.

나. 기기

분리한 물질을 정제하기 위하여 HEWLETT PACKARD 제품 (Series 1100)의

HPLC를 사용하였다. 구조 분석을 위하여 UV 흡광도 분석은 UV-visible spectroscopy system (Agilent 8453, HEWLETT PACKARD)을 사용하여 측정하였으며 질량 분석기 (Navigator, Finnigan-UK)로 분리된 화합물의 질량을 측정하여 분자량 및 분자식을 결정하였다. 또한, 핵자기공명기 (Varian UNITY 300 MHz, 400 MHz NMR)를 이용하여 ^1H , ^{13}C , HMQC, HMBC등의 스펙트럼을 얻었으며 이들 스펙트럼의 결과를 분석하여 구조를 결정하였다.

다. 은행잎으로부터 활성물질 분리 및 정제

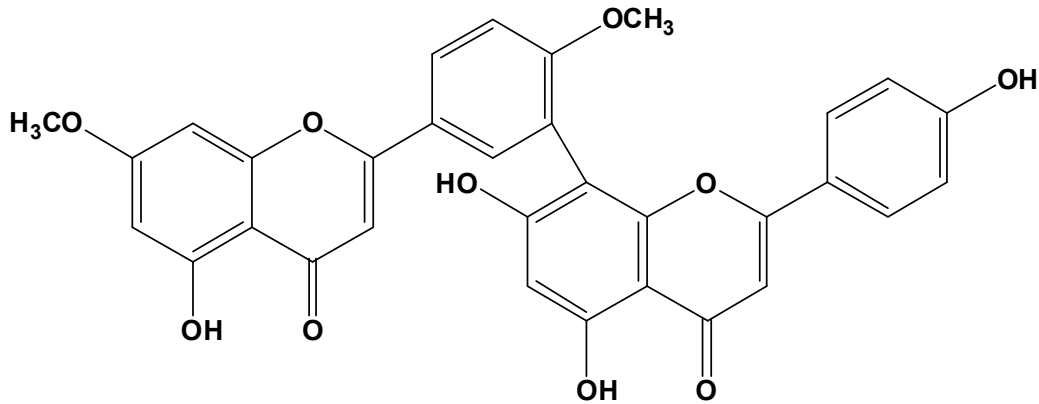
은행잎 2 kg을 100% MeOH로 3일간 실온에서 냉침시킨 후 감압 농축하여 crude extract 73 g을 얻었다. 이 추출액을 n-Hexane/ Ethyl acetate (100% n-Hex \rightarrow 100% EtOAc stepwise)조건 하에서 silica gel column chromatography를 수행하여 분획화한 후, ODS column chromatography와 HPLC를 실시하여 다음의 물질을 분리·정제하였다.

UV(EtOH) λ_{max} 209 nm; MS m/z 566 [M^+]; $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO) δ (ppm): 6.77(H-1, d, $f=2.4\text{Hz}$), 6.34(H-3, d, $f=2.4\text{Hz}$), 6.99(H-8, s), 8.09(H-11, d, $f=2.4\text{Hz}$), 7.34(H-14, d, $f=8.4\text{Hz}$), 8.18(H-15, dd, $f=2.7,2.4$), 6.40(H-18, s), 6.80(H-23, s), 7.48(H-26, H-30, d, $f=8.4\text{Hz}$), 6.70(H-27, H-29, d, $f=8.4\text{Hz}$), 3.81(H-31, s), 3.79(H-32, s)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, DMSO) δ (ppm): 92.61(C-1), 164.97(C-2), 98.04(C-3), 160.91(C-4), 104.64(C-5), 157.14(C-6), 181.81(C-7), 103.71(C-8), 163.43(C-9), 122.22(C-10), 130.76(C-11), 121.51(C-12), 160.44(C-13), 111.62(C-14), 128.15(C-15), 103.46(C-16), 160.38(C-17), 98.46(C-18), 160.86(C-19), 103.49(C-20), 54.12(C-21), 181.72(C-22), 102.45(C-23), 163.33(C-24), 121.07(C-25), 127.85(C-26), 115.68(C-27), 161.51(C-28), 115.68(C-29), 127.85(C-30), 56.00(C-31), 5.88(C-32)

라. Cdc25B phosphatase의 부분 정제

한국화학연구원 생체기능조절물질개발사업단 연구팀으로부터 full-length human Cdc25B의 GST fusion을 포함하고 있는 pGEX2T-KG plasmid를 제공받았고 John S. Lazo et al 방법³¹⁾에 따라 실험을 수행하였다.



(1) Bacterial growth and fusion protein production

E. coli strain BL21은 isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)의 전사 제어를 통한 GST-CDC25B 융합체를 포함하고 있는 플라스미드를 복제하기 위해 이용되었다. *E. Coli*는 처음에 37°C, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin을 함유하고 있는 LB 배지에서 하룻밤 동안 배양했다. 우선 배양균의 4 ml 정도는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin을 함유하고 있는 LB배지 1 l에 접종하기 위하여 이용하였고 그 배양균은 다시 37°C에서 4-5 시간 동안 배양하였다. 그 다음 1 mM 최종 농도인 IPTG를 첨가하고 그 배양균을 37°C에서 3시간 더 배양하였다. 배양 후, 균체들은 4°C에서 10분 동안 3500 \times g의 원심분리를 통하여 얻어졌으며 최종 박테리아 균체들은 추출하기 전까지 -80°C 액체 질소에서 보존하였다.

(2) Purification of GST fusion protein

박테리아 균체들은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AEBSF, 10 mM을 함유하고 있는 4°C의 lysis buffer 내에서 초음파를 통하여 파쇄 하였다. 그 다음, 그 현탁액을 4°C에서 10분 동안 10000 \times g의 원심분리 하였다. 상등액을 즉시 lysis buffer와 균질화한 glutathione beads와 1:1로 섞은 후 1시간 동안 4°C (현탁액 5 vol/ 슬러리 비드 5 vol)에서 섞고 회전시켰다. Glutathione beads는 lysis buffer 10 vol을 가지고 2번 세척한 다음, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AEBSF, 10 mM을 함유하고 있는 2 \times reaction buffer (60 mM Tris, pH8.5, 150 mM NaCl, 1.34 mM EDTA, 0.066% BSA)의 10 vol을 가지고 2번 세척 하였다. 그 fusion protein은 2 \times reaction buffer안에 10 mM glutathione을 가지고 세 번 현탁-분리하여 정제화 하였다. 활성 분획들에 대하여 20% glycerol으로 분주한 다음 -80°C에서 보존하면서 실험에 이용하였다.

마. Cdc25B phosphatase의 저해활성 측정

GST fusion Cdc25B phosphatase 저해활성은 FDP (Molecular probes, Inc., Eugene, OR)를 가지고 측정했다. FDP는 96-well microtiter plates내 기질로 이용되어 형광성의 fluorescein monophosphate에 즉시 민감하게 반응한다. 최종 배양 혼합액 (150 μ l)는 Cdc25B phosphatase에 대하여 30 mM Tris (pH8.5), 75 mM NaCl, 0.67 mM EDTA, 0.033% bovine serum albumin, 1 mM DTT, 20 μ M FDP를 구성하였다. 저해제들을 DMSO에 녹인 후, DMSO의 최종 농도가 7%가 되도록 효소 반응용액에 첨가하였다. 반응은 \sim 0.25 μ g fusion protein의 첨가에 의해 개시되고 Cdc25B에 대하여 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 그 반응물로부터 형광 발산은 multiwell plate reader (Perseptive Biosystems Cytofluor II, Framingham, MA; Excitation filter, 485/20; emission filter, 530/30)를 가지고 측정하였으며 최종적으로 저해율은 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

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

Blank 1 : 시료 및 효소가 없을 때 cpm

Blank 2 : 시료는 있으나 효소가 없을 때 cpm

Control : 시료는 없으나 효소가 있을 때 cpm

위의 식으로 각 농도별 저해율을 통하여 50 % 저해활성을 나타내는 물농도를 구하였다.

바. Ginkgetin의 암세포 성장 억제 효능 측정

암세포 성장 억제 효능 측정은 NCI-H23 (human lung cancer cell), SKOV-3 (human ovarian cancer cell), 고형암 세포주 (solid tumor cell line)인 SW620, HCT116 (human colon cancer cell)과 MDA-MB-231 (human breast cancer cell)을 사용하여 수행하였다. 세포의 배양은 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco BRL)를 포함하는 DMEM 또는 RPMI 1640 배지를 사용하여 5% CO₂ 배양기 (37°C)에서 배양하였다. 계대는 1주일에 2회 실시하였다. PR-F series 3종의 화합물들이 세포의 증식에 미치는 효과를 측정하기 위해 0.5% trypsin 및 5.3 mM EDTA를 PBS에 녹인 용액을 사용하여 부착면으로부터 떼어 낸 세포들을 96-well plate의 각 well에 3×10^3 에서 6×10^3 개의 세포를 각각 seeding 한 후, 5% CO₂ 배양기 (37°C)에서 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 화합물을 적정량의 DMSO에 녹여 최종 DMSO 농도가 0.1%이하가 되도록 새로운 세포 배양액으로 희석하였다. 96-well

plate에서 24시간 배양시킨 각 세포 배양액으로부터 배지를 모두 제거한 후 각각의 농도로 제조한 PR-F series 3종의 화합물들을 포함하는 세포 배양액을 각 well에 100 μ l씩 첨가하였다. 다시 48시간 동안 배양한 후, 세포 증식 측정 시약인 WST-1 (Roche Biochemicals) 을 각 well에 처리하여 5% CO₂ 배양기 (37 $^{\circ}$ C)에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응이 완결되면 ELISA Reader (Bio-Rad)를 이용하여 흡광도 (A₄₅₀-A₆₉₀)를 측정하였다.

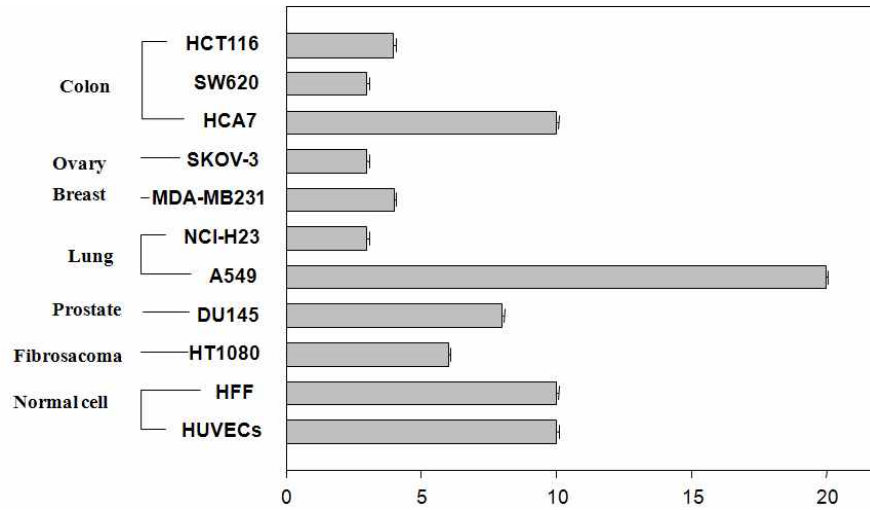
사. 암세포주에 대한 세포주기 분석

HCT116 세포를 100 mm 세포 배양 접시에 2×10^6 cells로 접종하였다. 18시간 후 ginkgetin을 처리하여 48시간 동안 키운 다음, trypsin/ EDTA을 처리하여 세포를 배양 접시에서 떼어낸다. PBS (phosphate buffered saline) 5 ml을 넣고 1500 rpm에서 5분 동안 2번 원심분리 하여 trypsin/ EDTA을 제거한다. PBS로 2번 세척 후 상층액을 버리고 PBS 1 ml을 넣고 70% 차가운 알코올 3~5 ml을 처리하여 -20 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 세포를 고정시킨다. 알코올로 고정시킨 세포를 1500 rpm으로 5분간 원심분리 하여 알코올을 제거하고 PBS로 2번 세척하여 잔여 알코올을 완전히 제거한다. RNase (10 μ g/ml)를 넣고 RNA를 제거하고 PI (propidium iodide, 50 μ g/ml)로 DNA를 염색한다. 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치한 후 20,000개의 세포의 세포 주기를 FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA)로 측정하였고, 세포 주기 분석 프로그램인 Modifit's program (Becton Dickinson)을 이용하여 세포 주기의 G₀/G₁, S, G₂/M기에 있는 세포의 양을 백분율로 계산하였다.

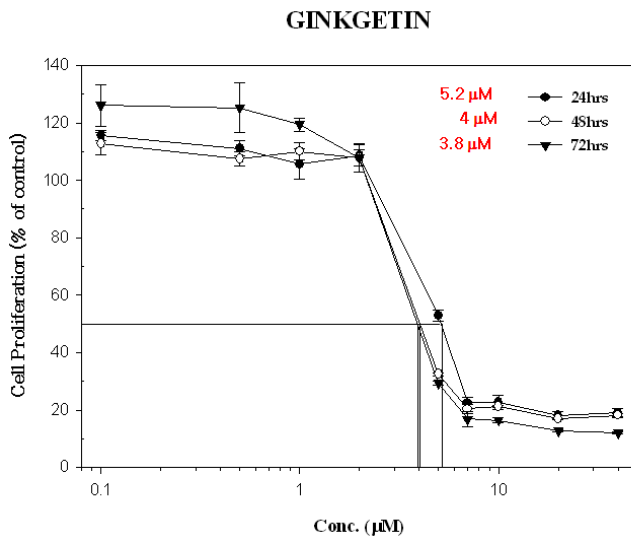
2. 결과 및 고찰

가. Ginkgetin의 항암효과

Ginkgetin의 종양 세포주에 대한 세포 성장 억제 효능을 확인하기 위하여 NCI-H23 (human lung cancer cell), SKOV-3 (human ovarian cancer cell), HCT116, SW620 (human colon cancer cell), DU145과 MDA-MB-231 (human breast cancer cell)을 사용하여 화합물을 처리한 후, 농도에 따른 이들 화합물이 세포 증식에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과, 대장암 세포주인 SW620, HCT116 등에서 우수한 활성을 확인하였다. 폐 암세포에서는 NCI-H23 세포에서 우수한 효과를 보여주었다.

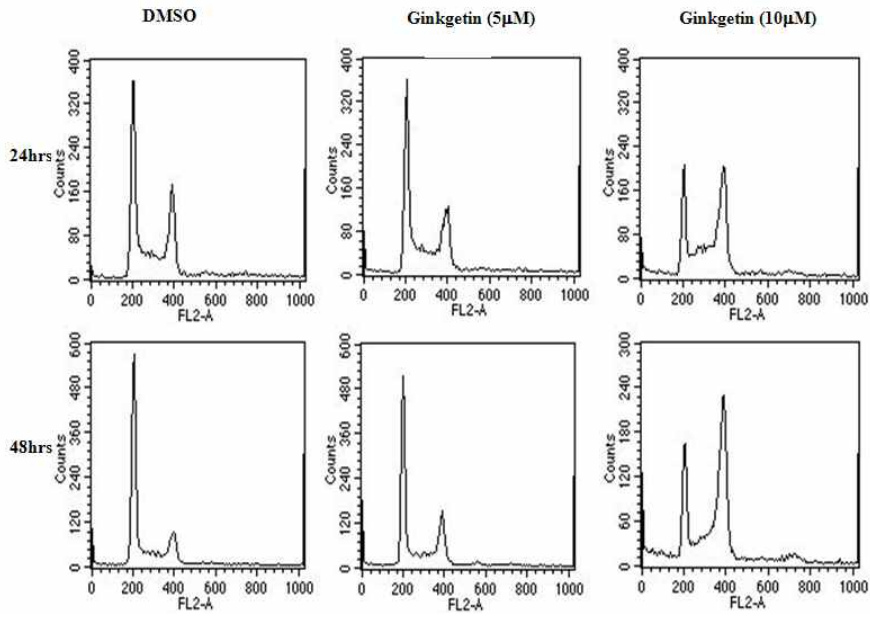


Ginkgetin에 민감한 세포인 HCT11에 농도와 시간에 따른 활성을 검증한 결과 GI50 값이 5 microM이었다.

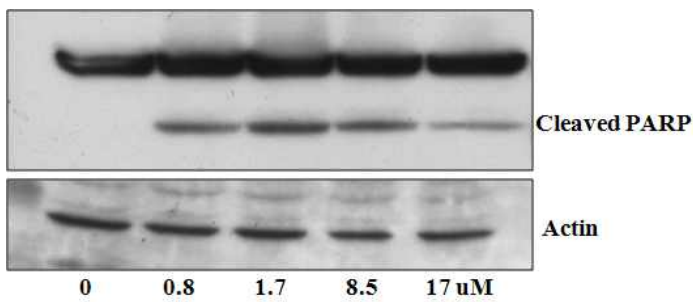
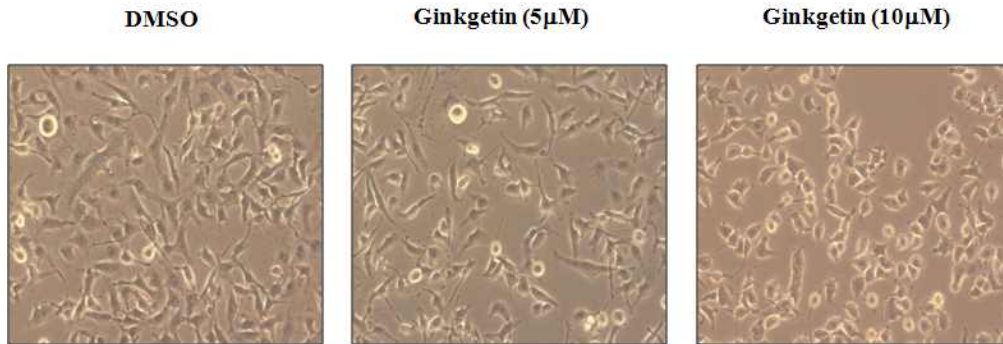


나. 암세포주에 대한 세포주기 분석

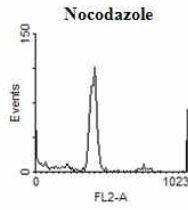
Ginkgetin에 의한 HCT116 세포의 세포 주기 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5, 10 microM을 처리하고 24, 48시간 동안 배양하였다. 10 microM을 처리한 세포에서 세포 주기 내의 G2/M phase의 억류를 현상이 관찰되었다.



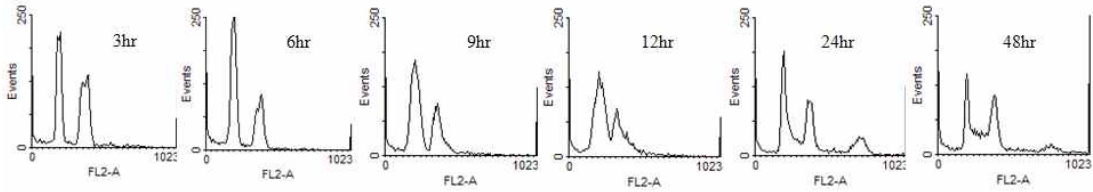
상기의 농도에서 세포의 형태가 변화하여 세포 사멸이 일어남을 확인하였다.



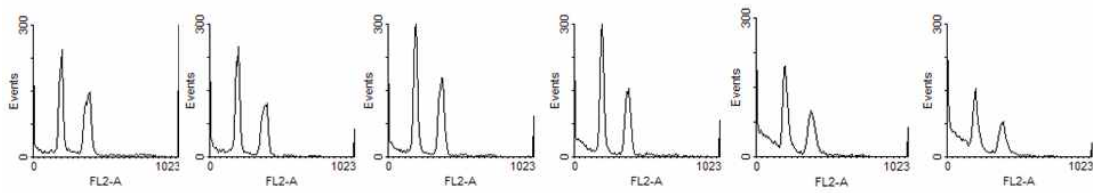
Nocodazol을 이용한 M phase synchronize 실험을 통하여 ginkgetin은 G2 phase를 선택적으로 arrest 함을 확인하였다.



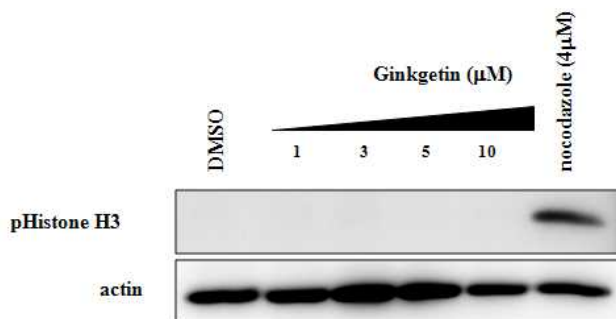
DMSO

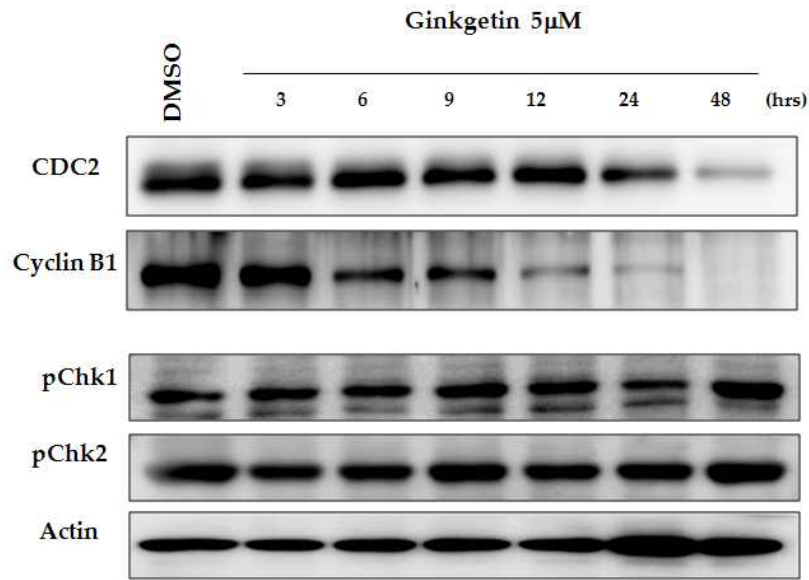


Ginkgetin 10 μ M



다. Ginkgetin의 G2 arrest 기전 규명





3. 결론

은행잎에서 분리한 ginkgetin은 특이적으로 세포 주기의 G2 arrest를 유도하고 이로 인하여 세포사멸을 유도함을 확인하였다. 특히 ginkgetin은 CDC2, Cyclin B1의 발현을 억제하여 G2 arrest를 유도함을 확인하였다.

제 6 절 CB-Ph의 항암활성 기전 규명

1. 서론

2-Hydroxycinnamaldehyde(HCA)는 식용인 *Cinnamomum cassia*의 줄기껍질로부터 추출한 화합물로서 파넬실전달효소에 대한 억제 활성이 보고되었다. 이외에도 HCA는 혈관신생억제, 면역조절, 세포주기조절, 유방암, 혈액암, 폐암, 대장암세포의 성장억제활성 등이 보고되었다. 그러나 HCA에 의한 암세포억제 활성에 관한 자세한 작용기전은 밝혀지지 않았다. 세포독성이 있는 항암제 처리에 의한 항암기전은 세포사멸 유도인자 및 세포신호전달의 인자들을 활성화시킴으로써 야기된다고 알려져 있다. 단백질분해효소인 caspase가 세포사멸의 주요 활성인자이다. 세포사멸은 손상된 정도가 수선을 통해 치유되기에는 너무 심각하게 손상이 일어난 경우에 일어나는 과정으로서 세포의 특이적 형태변화가 관찰된다. 초기에 세포는 수축하게 되고, 수포형태의 세포막분리가 일어나며, 핵 유전체의 응집 및 핵 DNA의 절단이

발생하게 된다. 세포 사멸과정에 결함이 생기면 신경퇴화와 같은 질병부터 악성종양에 이르는 다양한 질병이 발생하게 된다. 1970년대 초에 세포사멸이 악성종양에 영향을 끼친다고 보고되었다. 이어지는 연구들에서는 암조직의 자발적 퇴화 혹은 항암제에 의한 암조직의 퇴화에 세포사멸이 높은 빈도로 발생한다는 것을 보고 하였다.

활성산소는 세포사멸유도에 관여하지만 일반적인 증개요소는 아니다. 활성산소는 TGF β (transforming growth factor- β) 혹은 p53에 의한 세포사멸에 관여한다. 또한 산화적 라디칼-스트레스에 의한 사멸은 부분적으로 Bcl-2 발현에 의해 억제되기도 한다. Bcl-2는 아마도 산화제에 의한 미토콘드리아의 손상을 억제함으로써 활성산소의 증가를 방지하는 것으로 생각된다. 비정상적인 산화환원(redox)상태에 의한 세포사멸은 파킨슨병과 같은 질병에 중요한 원인으로 제안되고 있다. 이렇게 증가될 수 있는 활성산소로부터 세포를 보호하기 위하여 생체는 여러 종류의 항산화물질(환원제)을 함유하고 있으며 이들에 의해 세포는 산화환원상태가 매우 환원된 형태로 유지되고 있다. 글루타사이온(GSH: glutathione)은 모든 진핵세포에 존재하며 가장 중요한 세포내 환원제 이다. 세포내 과산화수소(H₂O₂) 및 다른 과산화물은 글루타사이온 퍼옥시데이즈(GSH peroxidase)에 의해 GSH를 기질로 사용하여 환원된다. 세포내 산화환원상태는 세포의 활성을 조절하는 중요한 요소이다. 세포가 높은 농도의 산화적 스트레스에 놓이게 되면 세포주기가 억제되며, 매우 낮은 정도의 산화적 상태에 놓이게 되면 세포의 분열을 촉진하여 세포성장이 증가하게 된다. 또한 산화적 라디칼 스트레스 정도에 따라 세포사멸이 세포괴사로 변하게 된다.

암세포억제인자 p53은 세포주기 진행 및 세포사멸에 매우 중요한 조절인자이다. 암세포의 절반은 돌연변이로 불활성화된 p53을 갖고 있다. 이러한 매우 높은 돌연변이(50%)는 종양의 진행에 p53이 매우 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. p53은 Bax, CD95, DR5, 활성산소, cytochrome c에 의해 유도되는 사멸과정에 관여한다. p53은 다음의 3단계에 의해 세포사멸을 유도한다. 1) 산화환원상태 관련 유전자의 전사유도 2)활성산소 형성 3)미토콘드리아의 산화적 파괴. p53이 세포사멸에 관여되고 또 암세포의 절반이상에서 p53이 불활성 돌연변이형태로 존재하기 때문에 p53에 비의존적인 세포사멸을 유도할 수 있는 항암제 개발이 중요하다.

본 연구에서는 p53이 불활성화된 암세포주에서 HCA 및 BCA 처리가 암세포의 사멸을 유도하며, 이러한 암세포사멸은 활성산소의 축적이 중요한 매개인자로서 작용한다는 것을 밝혔다. 이것은 활성산소가 p53 비의존적으로 세포사멸을 유도한다

는 것을 의미한다. 또한 누드마우스를 모델동물로 사용한 *in vivo* 실험에서 BCA를 복강투여 혹은 경구투여를 함으로써 BCA에 의한 우수한 항암효과를 확인할 수 있었다.

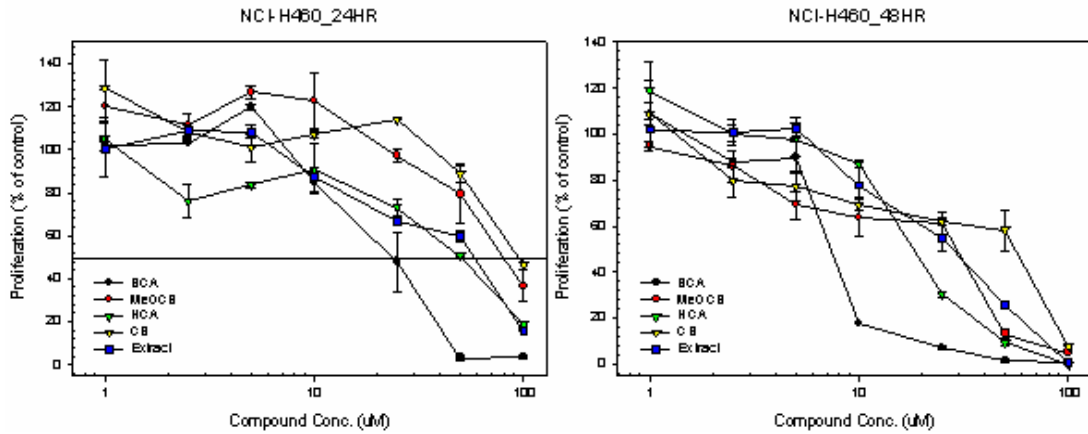
그러나 아직도 정확한 표적을 알 수 없어서 표적 발굴 연구를 위하여 단백질 및 유전체 분석 연구를 수행하였다.

2. 결과

가. 항암효과

인간 폐암 세포주 NCI-H460에서 항암효과를 시간 때 별로 측정하였다. 계지의 항암효과를 측정하기 위해 농도별로 계지물질을 처리해 24, 48시간동안 배양한 다음 cell counting kit -8 을 각 well 마다 10 ul씩 넣고 2시간 37°C에서 반응시켰다. 배지에 첨가된 tetrazolium salt (e.g. WST-1)는 미토콘드리아의 호흡사슬 (respiratory chain)에 존재하며 생존세포에만 활성이 있는 succinate-tetrazolium reductase에 의해 formazan 색소로 변환한다. 생세포수가 증가하면 시료중의 미토콘드리아 탈수소효소 (dehydrogenase)의 전체의 활성이 증가하여 이 효소활성의 증가가 formazan 색소의 생성증가를 유도하기 때문에 formazan색소와 배지중의 대사활성이 있는 세포 수는 직선적인 상관관계를 나타내게 된다. ELISA reader (Bio-Rad)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

계지성분을 24, 48 시간 NCI-H460에 처리 시 성장저해가 저 농도에서 고농도로 갈수록 급격히 증가하였다. 그 중에서도 HCA (GI50 - 20 uM) 가 비교적 저 농도에서 세포 성장저해 효과가 높은 것을 보여 주었고, 추출물과 MeOCB (GI50 - 35 ug/ml, 30 uM) CB (GI50 - 60 uM)는 비교적 고농도에서 성장에 영향을 미쳤다. 세포 형태를 관찰하더라도 HCA와 추출물에서는 모양이 변하는 것을 볼 수 있는 반면 CB는 고농도에서도 거의 변화가 없었다.

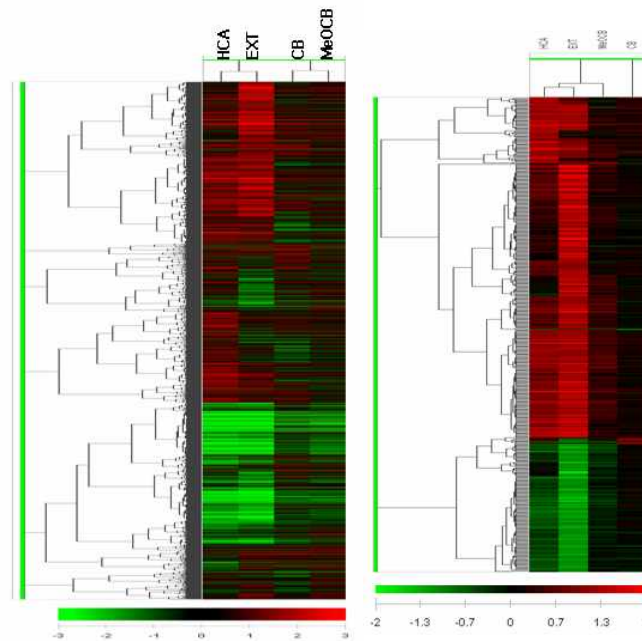


The cell viability in NCI-H460 cells.

나. 계지 성분의 항암 효과에 대한 유전자 칩 분석 실험

24시간 계지물질을 NCI-H460에 처리하여 생리효과를 분자수준에서 규명하기 위해 Illumina 사의 Oligo chip을 사용하였다. 총 세 번 반복으로 실험을 수행하였으며 Welch's T-test 로 선별한 p value 0.05이하인 유의유전자 중 2배 이상 발현이 변화하는 유전자들을 선별하였다. 선별된 유전자의 수 [HCA : +115 (-779), 추출물 : +372 (-828), MeOCB : +16 (-125), CB : +68 (-113)]로 증가한 유전자 보다 감소한 유전자가 많았음을 확인하였다. HCA, Extract에서 유전자 발현변화가 크며, CB, MeOCB는 상대적으로 유전자 발현변화가 적다. 각 시료의 상관관계 또한 HCA, Extract가 유사한 것으로 나타났다. 상관관계가 있는 두 그룹으로 나누어 분석하였다.

48시간 계지물질을 NCI-H460에 처리하여, 생리효과를 분자수준에서 규명하기 위해 Illumina 사의 Oligo chip을 사용하였다. 총 세 번 반복으로 실험을 수행하였으며 Welch's T-test 로 선별한 p value 0.05이하인 유의유전자 중 2배 이상 발현이 변화하는 유전자들을 선별하였다. 선별된 유전자의 수는 [HCA : +165 (-4), 추출물 : +383 (-165), MeOCB : +5 (-5), CB : +5 (-1)]로 나타났다. 24시간 때와는 달리 증가하는 유전자의 수가 감소하는 유전자보다 월등히 많았다. MeOCB, CB는 유전자의 발현변화가 거의 없으며, HCA와 추출물에서 발현변화 유전자가 상대적으로 많았다. 각 시료간의 상관관계 또한 HCA와 추출물이 유사한 것으로 보였다.



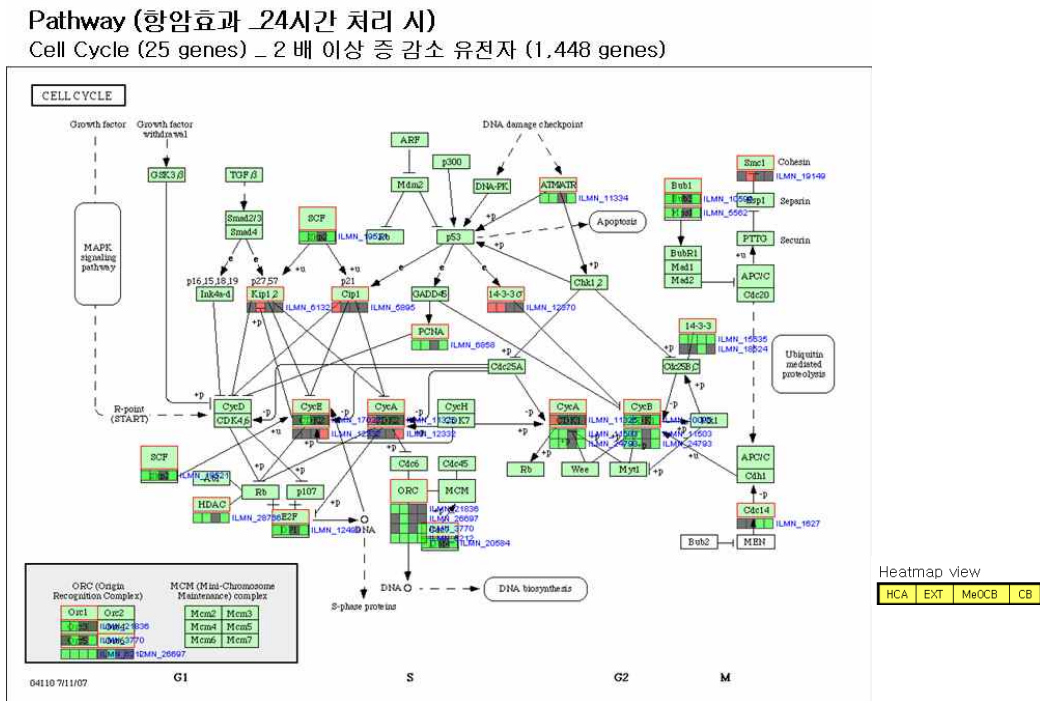
Hierarchical clustering display of data in human lung cancer treated with *Cinnamomum cassia* compounds based on the significant genes(<0.05) (2 fold change). [left : 24 hour treated, right : 48 hour treated]

다. 유전자칩 분석에 의한 계피 성분의 항암 유전자 ontology

24시간 항암효과 측정한 칩실험 결과에서, HCA와 추출물에서 공통적으로 증가하는 유전자73개는 Apoptosis (ATF3, IL1B), Signal transduction (VGF, CTSA, LAMB3, BTG2, SFN, IGFBP4, IL1A, STMN3, RSU1, IL1B, S100A13), Cell proliferation and differentiation (BTG2, SLFN5, CDKN1A, VRK3), Cell cycle (NUB1, SFN) 등에 관련한 유전자가 항암활성과 관련한 유전자로 분석되었다. HCA와 추출물에서 공통적으로 감소하는 유전자는 693개로 Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (THOC3, DNER, HNRPLL, HDAC4, TCEAL8, WDR78, CMPK, NIPBL, CBX1, ZRANB2, BTAF1, CNOT1, OAS1, CDC5L, PCNA, SP3), Cell cycle (HDAC4, WDR78, RBM13, SUMO2, TUBGCP3, CDC2, CDC5L, PCNA, TUBE1, ROCK1), Developmental process (DNER, CLEC2D, E2F3, PMP22, WSB2,) 등의 유전자가 항암활성과 관련된 유전자로 분석되었다. 48시간 항암효과를 측정한 칩데이터에서 HCA와 추출물에서 공통적으로 발현이 증가하는 유전자 120개는 Signal transduction (IL1A, IL12RA2, FABP5, CYFIP2, VGF, STC2, GNG11, CD164, CHML, WSB1, FGF13), Protein metabolism and modification (SUMO2, MMP1, TRIM2, CASP6, HSPA4, CYP51A1, UBE2H), Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (ATF3, TAF9, TSN, PTMA), Oncogenesis (MLF2, CDKN1A) 에 관련한 항암활성과 관련된 유전자로 분석되었다. HCA와 Extract에서 공통적으로 발현

이 감소하는 유전자 4개는 Apoptosis (CASP9), Cell structural and motility (MYOHD1)와 같은 생물학적 기능을 가지고 있으며 이들이 항암활성에 관련한 유전자로 분석되었다.

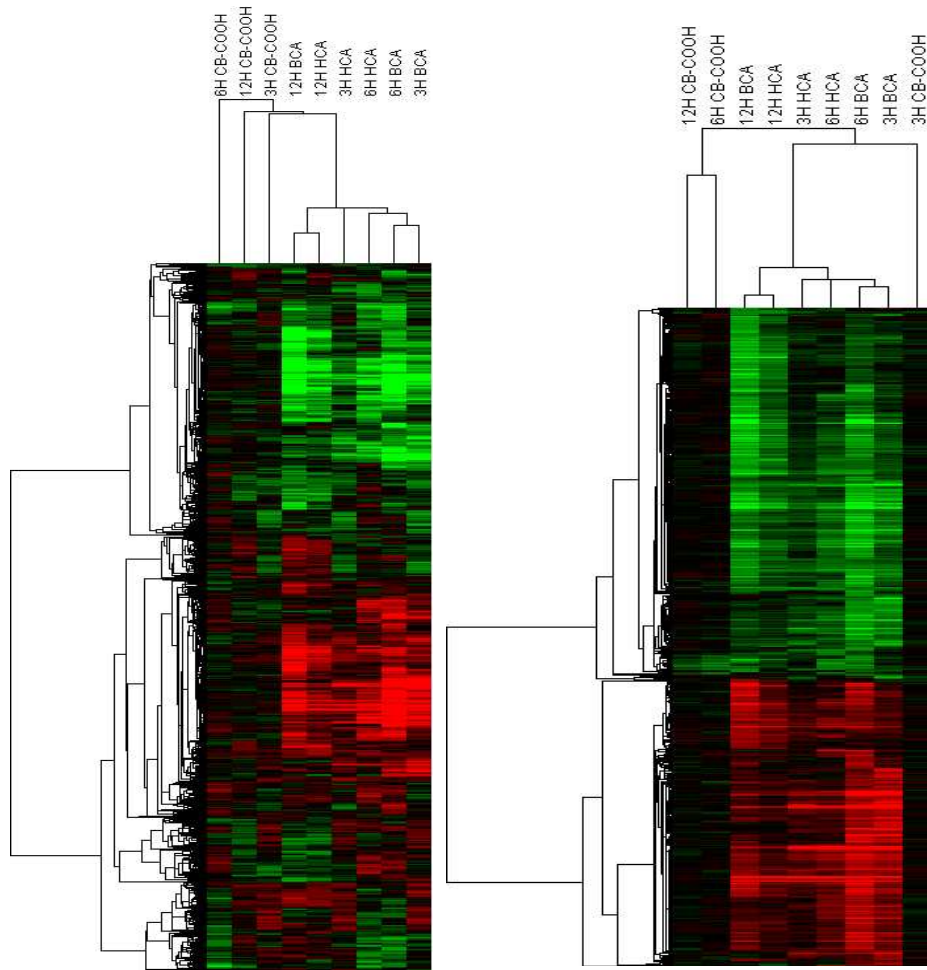
라. 유전자 칩 분석에 의한 세포 성분의 항암 유전자 pathway



가장 항암효과가 좋은 HCA와 Extract에 의한 유전자 변화를 시간별로 관찰하였을 때 24시간에서 감소했던 유전자들이 48시간이 되면서 다시 증가하는 것으로 확인되었다. 24시간에는 감소하다가 48시간에 증가하는 유전자로 Protein metabolism and modification (C1GALTificUMO2, TRIM2, CASP6, DNAJC10, RPL17, RPL27L, HSPA4, CAST, RPL14, TFPI2, RPL7, CYP51A1, ASPH, RPLP1, RPL23, PPIL1)ficignal transduction (CLTC, CD164, CHML, WSB2, COPS2, NTN4, FABP5, WSB1, ZFP36L1, ASPH, FGF13, RPIB, PTPLAD2), Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (S trN, TAF9, UTP11L, AinL1, KLF5, IFI16, BCAS2, TSN, AK3, WDSOF1, PTMA)등으로 이들의 pathway상에서의 메카니즘을 더 분석하여야 할 것이다.

마. 다양한 세포주에서의 유전자 칩 분석

Heirachical model.



p value < 0.05 : 7,179 genes.

p value < 0.05 1.5 fold change : 786 genes.

BCA와 HCA (10 μ M)

3/ 6/ 12hr 에서 공통적으로 1.5배 이상 변화하는 유전자.

3H HCA	3H BCA	3H CB- COOH	6H HCA	6H BCA	6H CB- COOH	12H HCA	12H BCA	12H CB- COOH	NAME
1.044	1.018	0.01983	1.523	1.437	-0.08593	1.554	1.849	0.05497	GCLM
1.337	1.43	-0.06991	1.638	1.574	0.1308	0.5952	0.8067	0.06503	ZNF323
0.6301	2.322	-0.03071	0.9874	2.202	0.03525	0.6622	0.6463	0.07902	ULBP1
0.8585	2.731	0.06599	0.8069	1.953	0.1024	0.6039	0.9416	-0.1042	DDIT3
2.596	2.837	0.06631	2.175	3.237	-0.09492	1.759	2.53	0.01529	OKL38
0.8001	1.359	0.244	1.284	1.419	0.1913	0.804	0.6682	0.05902	EGR1
1.153	1.406	0.009959	1.49	1.933	-0.01054	1.26	1.756	0.1291	SRXN1
3.111	2.994	0.07168	3.237	3.408	0.1132	2.952	3.045	0.1927	HMOX1
1.786	1.993	0.0648	1.59	1.64	-0.06982	0.6385	0.819	0.06548	HSPA1B
3.706	5.968	0.07357	2.289	4.242	0.006112	0.9258	2.26	0.004523	HSPA6
0.8866	1.069	0.02345	1.243	2.243	0.1139	0.9401	1.822	0.004939	CBR3
3H HCA	3H BCA	3H CB- COOH	6H HCA	6H BCA	6H CB- COOH	12H HCA	12H BCA	12H CB-COOH	NAME
-0.7415	-1.195	0.146	-0.64	-1.09	0.06348	-0.595	-0.70	-0.01537	DLX1
-0.59	-0.73	-0.114	-0.86	-0.97	-0.06303	-0.741	-0.77	-0.1094	HLXB9
-0.77	-1.34	0.0406	-1.06	-1.77	0.03326	-1.103	-1.49	-0.00531	EFNA1
-0.58	-1.19	-0.004	-0.86	-1.57	-0.05992	-0.989	-1.81	-0.1349	CCL20

CB family (5)에서 4배 이상 발현이 조절된 유전자 목록, 순서의 기준: CBPh

CBPh	CBOH	CBPh-NHO-Mor	CB-2BD	CB-2Mor	Gene_Symbol
2.2986	3.2717	0.3457	2.1104		AREG
2.1465			0.4298		RGS2
2.1252	0.7984		0.1947	0.3329	APG-1
2.09	2.9124		1.5905		EREG
2.0837	-0.1033	0.0735	-0.0267		H2BFN
2.0742	1.1974	0.3637	0.4467	0.2863	IER5
2.0708	2.2416	1.7268	1.8183	0.9286	DDIT4
2.0389	0.8015				FLJ22595
2.0287	-0.0931	0.3814	-0.4065		ACTL7B
1.964	2.2149	1.5198	1.6749	1.5532	HERPUD1
1.9384	2.7906	0.8296	3.1523	1.4353	ATF3
1.8518	2.2083	1.7471	1.8798		HERPUD1
1.8302	2.6989	1.1587	1.8489		ASNS
1.8187	2.009	0.8702	1.2088	0.8778	HSPA1B
1.766	2.8764	0.4785	1.3542	0.9533	MIG-6
1.6882	0.6987	1.4641	2.0075	0.7029	COPEB
1.6529	1.7271	0.5654	2.0906		HBP1
1.5641	3.4455	2.1287	2.9571	1.626	GDF15
1.5163	2.2744	0.6737	2.0725	1.0537	MGC4504
1.4565	2.0164		1.524		--
1.3243		1.6741	2.3977	0.9161	STC2
1.2272	2.2465	0.4781	0.7598		JAG1
0.9831	2.2822	0.8847	1.5146	0.8746	S100P
0.7384	2.0413	0.235	0.8818	0.6569	ASNS
0.7304	2.6382	0.9788	1.9611	1.257	TRIB3;C20orf97
0.3573	0.0374	2.6498	1.0229	-0.0921	--
0.2985	0.297	2.4797	0.9598	-0.1142	MT1B;MT1A

CBPh	CBOH	CBPh-NHO-Mor	CB-2BD	CB-2Mor	Gene_Symbol
4.3506	1.9726				HSPA7;HSPA6
4.3069	2.5744			0.1301	FOS
4.1622					EGR2
3.4012	1.2355	0.7736	0.4932	0.6792	LOC90637
3.3847	2.9856	0.6768	0.9161	1.6584	DNAJB1
3.0097	0.5356		-0.0985	0.5085	ANXA1
2.9198	1.9342		2.6122		IL8
2.8909	0.954	1.122	1.6243		DUSP1
2.8653	1.2106	0.1874	1.0351	0.2186	DNAJA4
2.8219					HIST1H2BN;H2BFB
2.816	1.5578	0.5724	0.9659	0.5436	DNAJB4
2.7914	0.4347	-0.2189	0.6972		PLK2
2.7432	1.6628	0.0405	0.9773		ARHE
2.666	0.5141		0.8244	0.1694	--
2.6441	2.4637	1.5116	2.5496		SESN2
2.6239	2.4174	0.3844	1.2812	0.8911	HSPA1B
2.5475	2.259				EGR3
2.5127	1.1261	1.3153	1.1524	0.0001	ARRDC3
2.4333					H2BFQ;HIST1H2BN
2.3815	1.202		1.3087	0.4023	ZFP36
2.3674	3.4871		2.9989		--

CBPh	CBOH	CBPh-NHO-Mor	CB-2BD	CB-2Mor	Gene_Symbol
-0.0295	-0.0757	2.9654	1.4151	-0.0533	MT1E
-0.032	-0.0011	2.677	1.1381	0.0647	MT1A;MT1H
-0.0506	0.296	2.1572	0.9969	0.1147	--
-0.1174	0.0828	2.0197	0.6159	0.0753	C20orf127
-0.1353	0.104	2.4956	0.9295	0.1741	MT2A
-0.2143	-0.1301	2.0521	0.4537	-0.0733	MT1X;MT1F
-0.2559	-2.7239	-0.5448		-0.3174	ACBD4
-0.3134	-0.2822	3.1327	1.4628	0.1314	--
-0.4818	-0.2895	2.4936	1.0782		MT1H
-0.6884	-0.3785	2.9885	1.0589		MT1X;MT1L
-1.7407	-1.8641	-1.7563	-2.2563	-1.6239	EEF2
-2.0299	-1.6907	-2.3396	-1.4884		CYFIP1
-2.1993	-2.3076		-2.2411	-1.5783	UBE1
-2.3922					TITF1
-3.4173	-0.3216				RAB4A;SPHAR
-3.8862					VIK
-5.1552			-0.2305		ZNF626
		2.7563	0.6626		MT1G;MT1K

Cell line 별 ER stress 관련 유전자 발현 정도

A549

Gene ID	BCA 1h	BCA 3h	UniGene	Gene
Hs.200526	0.2004	-0.1302	Hs.200526	TRAF2
Hs.181243	0.3585	-0.109	Hs.181243	ATF4
Hs.5813	0.2597	0.157	Hs.5813	ATF6
Hs.82143	0.2155	-0.2219	Hs.82143	ELF2

HepG2				
Gene ID	BCA 1h	BCA 3h	UniGene	Gene
Hs.200526	0.0018	-0.0077	Hs.200526	TRAF2
Hs.78465	-1.7804	0.1089	Hs.78465	JUN
Hs.181243	0.3973	-0.0062	Hs.181243	ATF4
Hs.5813	-0.5802	0.1628	Hs.5813	ATF6
Hs.82143	0.1265	0.0392	Hs.82143	ELF2

MDA-MB231

Gene ID	Gene	MDA_06h	MDA_12h
Hs.200526	TRAF2		-0.1711
Hs.181243	ATF4	0.9054	0.9683
Hs.5813	ATF6	0.2593	0.1463
Hs.82143	ELF2	-0.321	-0.0617

SW 620

Gene ID	UniGene	Gene	SW_06h	SW_12h	SW_0.5h	SW_3h
Hs.200526	Hs.200526	TRAF2	-0.3892	-0.3732	0.072	-0.1272
Hs.181243	Hs.181243	ATF4	0.3879	1.1794	0.2337	1.3586
Hs.5813	Hs.5813	ATF6	0.1586	0.2969	-0.0482	0.0614
Hs.82143	Hs.82143	ELF2	-0.2047	-0.3011	0.109	-0.333

NCI-H23

Symbol	3H HCA	3H BCA	3H COOH	6H HCA	6H BCA
HSPA5	-0.161	-0.107	-0.043	-0.319	-0.297
TRAF2	-0.008	-0.173	-0.033	-0.013	-0.155
MAP3K5	-0.296	-0.482	-0.033	-0.494	-0.754
MAPK10	0.049	-0.046	0.107	-0.111	-0.070
MAPK9	0.069	-0.097	-0.004	0.070	-0.113
MAPK1	-0.050	-0.072	0.023	0.011	0.226
JTV1	0.186	0.145	0.079	0.261	0.264
AHSA1	0.468	0.579	0.185	0.372	0.584
XBP1	0.000	0.609	-0.058	-0.041	0.255
ATF4	0.109	0.279	-0.025	0.212	0.288
ATF6	0.065	0.144	-0.054	-0.004	0.392

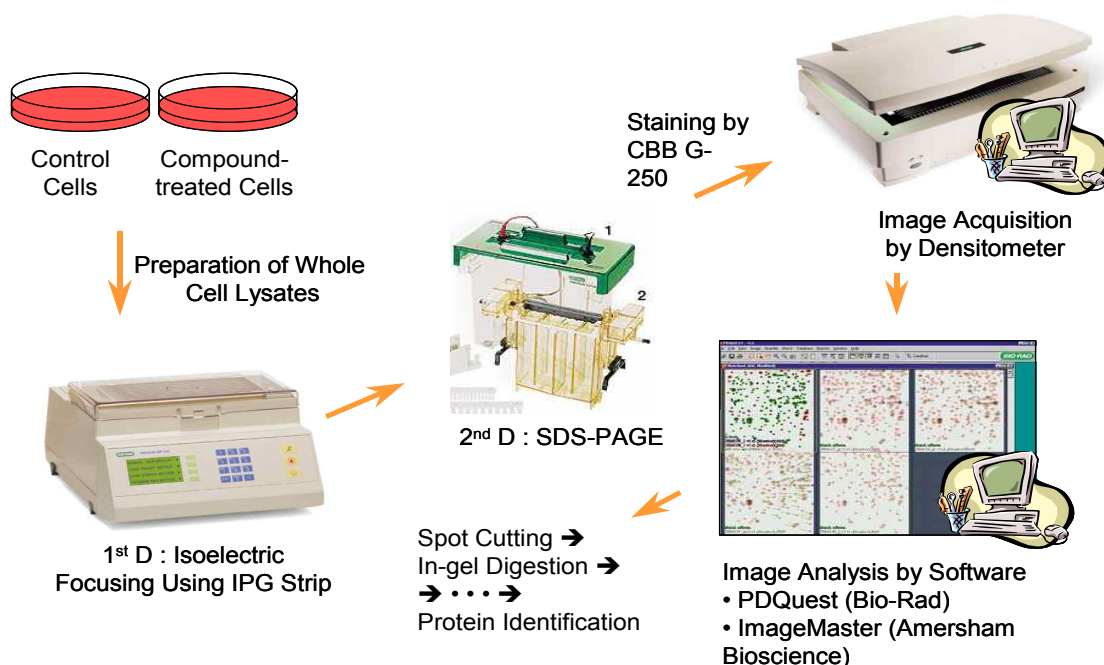
Symbol	6H BCA	12H HCA	12H BCA	12H CB-COOH
HSPA5	0.046	-0.753	-0.821	-0.106
TRAF2	-0.151	0.162	0.313	0.100
MAP3K5	-0.281	-0.406	-0.311	-0.161
MAPK10	-0.190	-0.438	-0.313	-0.320
MAPK9	-0.098	0.005	-0.089	0.021
MAPK1	0.175	-0.119	-0.171	-0.172
JTV1	-0.017	0.200	0.370	0.018
AHSA1	0.033	0.271	0.199	0.015
XBP1	0.018	-0.253	-0.229	-0.094
ATF4	0.054	0.236	0.158	0.001
ATF6	0.037	-0.017	0.355	0.064

Identification of CB-OH-induced genes by DNA microarray analysis

Fold change	Gene Symbol	Title	Biological Process
7.9	DNAJB1	DnaJ homolog subfamily B member 1	protein folding
5.3	HSPA1B	Heat shock 70 kDa protein 1	
4.6	HERPUD1	Homocysteine-responsive ER-resident ubiquitin-like domain member 1	response to unfolded protein
4.1	ASNS	Asparagine synthetase	asparagine biosynthesis
4.0	HSPA1B	Heat shock 70 kDa protein 1	
3.9	HSPA7	Heat shock 70 kDa protein 6	protein folding
3.9	SLC38A2	Amino acid transporter 2	amino acid transport
3.8	HMOX1	Heme oxygenase 1	heme oxidation
3.7	DDIT3	GADD153	
3.6	HSPH1	Heat-shock protein 105 kDa	protein folding
3.2	ARHE	Rho-related GTP-binding protein RhoE	protein transport
3.1	HSPCA	Heat shock protein HSP 90-alpha	mitochondrial transport
3.1	BAG3	BAG-family molecular chaperone regulator-3	protein folding
2.9	DNAJB4	DnaJ homolog subfamily B member 4	protein folding
2.9	HSPA1B	Heat shock cognate 71 kDa protein	protein folding
2.8	HSPCAL3	Heat shock protein 86	
2.5	DNAJB6	DnaJ homolog subfamily B member 6	
2.4	SLC7A5	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	amino acid metabolism
2.4	MTHFD2	Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase	folic acid and derivative biosynthesis
2.4	GARS	Glycyl-tRNA synthetase	glycyl-tRNA aminoacylation
2.4	AARS	Alanyl-tRNA synthetase	alanyl-tRNA aminoacylation
2.3	SUI1	Eukaryotic translation initiation factor 1	protein biosynthesis
2.2	GCLM	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	response to stress cysteine metabolism
2.2	DNAJA1	Heat shock 40 kDa protein 4	--
2.2	SLC7A11	Cystine/glutamate transporter	amino acid transport
2.1	SLC1A4	Neutral amino acid transporter A	dicarboxylic acid transport
2.1	SLC16A6	Monocarboxylate transporter 7	monocarboxylic acid transport
2.0	DNAJA1	Heat shock 40 kDa protein 4	

4. CB-Ph, CB-OH에 의해서 변화되는 단백질분석

다음 도식과 같은 방법으로 세포주에서 활성물질을 처리한 후 변화되는 단백질체의 발현변화를 분석하였다.



(1) 단백질 추출

활성물질을 농도별로 처리하여 회수한 세포주를 lysis buffer (8 M Urea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 40 mM Tris, 75 unit/mL BamHI, 75 unit/mL DNase I, 10 μ g/mL RNase A)에 용해하였다. 세포 용해액은 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 상층액의 단백질 함량은 Bradford 방법에 의해 정량하였다.

(2) 단백질 전기 영동

(가) Isoelectric Focusing

IEF (isoelectric focusing)을 하기 위해 사용된 고정화된 IPG strip은 17 cm narrow ranged ReadyStrip pH 3-6과 5-8 (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하였다. 각각의 gel strip은 반 건조된 상태이기 때문에 focusing에 앞서 gel을 시료와 함께 active rehydration방법으로 gel을 원래의 두께로 만들어 주었다. 1.85 mg의 세포 lysate 추출물을 gel strip이 놓일 focusing tray holder에 분주한 후, gel strip을 올려 놓고 50 V의 전압을 걸면서 20°C에서 12시간 동안 rehydration을 실시하였다.

IEF는 300 V에서 0.5시간, 2,000 V로 10,000 V/h까지 5시간 그리고 10,000 V로 70,000 V까지 6시간의 순으로 진행하였다. Active rehydration과 IEF는 PROTEAN IEF CELL 장비 (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 각각의 시간과 전압을 프로그램화하여 자동적으로 진행할 수 있게 하였다.

IEF시에 첨가한 ampholyte는 사용된 narrow ranged ReadyStrip에 적절하도록 조정하여 넣어 주었다. Focusing이 끝난 후에 각각의 gel strip은 equilibration buffer I (6 M Urea, 0.375 M Tris, 2% SDS, 20% Glycerol 및 2% DTT)로 10분간 두 번 그리고 연이어서 equilibration buffer II (6 M urea, 0.375 M Tris, 2% SDS, 20% Glycerol, 2.5% iodoacetamide)로 20분간 2번씩 충분히 세척하였다.

(나) SDS-PAGE

2차원 전기영동은 large gel용 PROTEAN II xi CELL electrophoresis 장비 (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하였다. 실험에 이용된 gel의 acrylamide의 농도는 Laemmli의 방법에 따라 running gel의 경우 10%로 하였으며 stacking gel은 4%로 하였다. IEF가 끝난 고정화된 IPG strip은 stacking gel 위에 놓고 전기 영동용 running buffer (192 mM Glycine, 25 mM Tris, 0.1% SDS)에 녹인 1% agarose 용액으로 덮어 고정시킨 후, 일정한 전압으로 12시간이상 전기영동을 실시하였다. 전기영동의 종료시점을 첨가된 bromophenol blue(BPB) dye가 gel의 바닥에 도달할 때까지 진행하였다.

(다) Coomassie 염색 및 탈염

전기영동이 끝나면, gel에 남아 있는 SDS를 제거하기 위하여 300 mL의 3차 증류수로 15분씩 4번 세척하여 완전히 제거하고, Coomassie G-250 colloidal stain 용액 (17% ammonium sulfate, 3% phosphoric acid, 0.1% coomassie G-250, 34% methanol)으로 24시간 염색하였다. 과도한 양의 염색성분을 제거하기 위해서는 3차 증류수로 2번 세척한 후, Densitometer (GS-800 series, Bio-Rad, Hercules CA)로 gel의 이미지를 스캔한 후, 이미지 분석을 통해 처리 구간 전개된 단백질 spot의 발현 차이를 살펴보았다.

(3) 펩타이드 분석

(가) Gel 내의 펩타이드 추출

이미지 분석을 통해 발현 차이가 있는 것으로 판명된 단백질 spot들을 gel로부터

터 잘라내었다. 단백질의 육안 관찰을 위해 이용된 Coomassie G-250을 ACN (acetonitril)이 50%가 되게 첨가된 0.2 M NH_4HCO_3 완충용액 50 μl 로 37°C에서 30-60분 가량 2번 배양하여 제거하였다. 탈색된 각각의 gel 조각은 Speed Vac (Thermo Savant, USA)으로 건조시킨 후, 0.1 M의 NH_4HCO_3 완충용액에 4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 용해시킨 Porcine trypsin (modified sequencing grade, Promega) 30 μl 를 첨가하고 37°C에서 15-18 시간동안 spot에 존재하는 단백질을 효소 분해하였다. 트립신 처리에 의한 단백질의 효소 분해 반응을 종료하기 위하여 10% TFA (trifluoroacetic acid, sequencing grade, Sigma) 용액 3 μl 를 첨가하였다. Gel spot에 남아 있는 효소 분해된 단백질 펩타이드는 0.1% TFA가 함유된 50% ACN 용액 50 μl 로 10분간 초음파 처리 (sonication)하여 2번 추출하였다. 얻어진 모든 펩타이드 추출물은 Speed Vac에서 농축, 건조시킨 후 10 μl 의 0.1% TFA 용액에 다시 녹인 후, C_{18} 수지가 부착된 zip-tip으로 탈염과정을 거쳐 트립신에 의해 효소 분해된 펩타이드를 정제, 건조하였다.

(나) MALDI-TOF MS

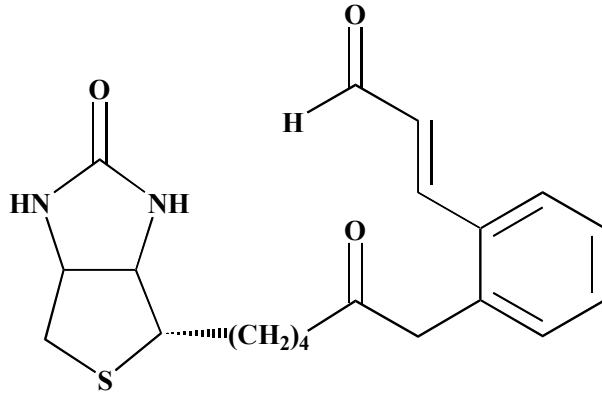
건조된 펩타이드 추출물은 0.1% TFA가 첨가된 50% ACN 용액 5 μl 에 녹여 MALDI-MS 분석용 sample target disk에 옮기고 풍건하였다. 이때 사용된 matrix로는 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid를 이용하였으며 시료에 혼합하여 사용하였다. 또한 시료는 Voyager-DETM STR 장비 (Applied Biosystems, Farmingham MA)를 이용하여 positive reflection mode 상에서 분석을 하였으며 mass spectra의 calibration을 위해서 external standard로 angiotensin I (1296.6853 m/z), ACTH (clip 1-17, 2093.0867 m/z), ACTH (clip 18-39, 2465.1989 m/z)가 함유된 calibration mixture 2 (PE Biosystems, Poster city, CA)를 펩타이드 혼합물에 넣어 정확한 peptide mass를 측정할 수 있게 하였다. MS 분석으로부터 얻어진 시료별 peptide mass들은 monoisotopic mass로써 측정하였다.

(다) 데이터베이스 분석

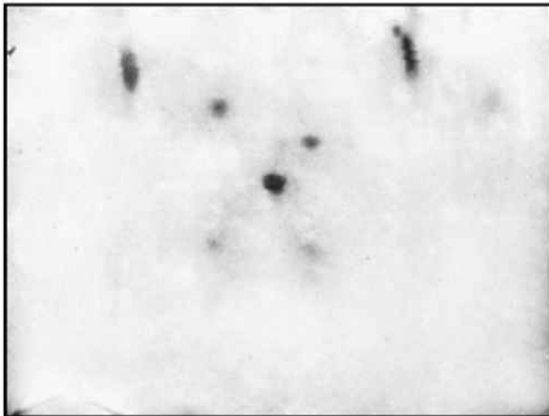
단백질 동정을 위해서, 측정된 시료별 monoisotopic peptide mass는 MS-Fit 탐색 프로그램과 SWISS-PROT 데이터베이스와 GENPEPT 데이터베이스를 이용해서 분석하였다. 데이터베이스 분석을 위해서 사용된 각 peptide mass의 mass tolerance를 50 ppm 이내를 기준으로 하였다.

(4) CB-OH 표적 발굴

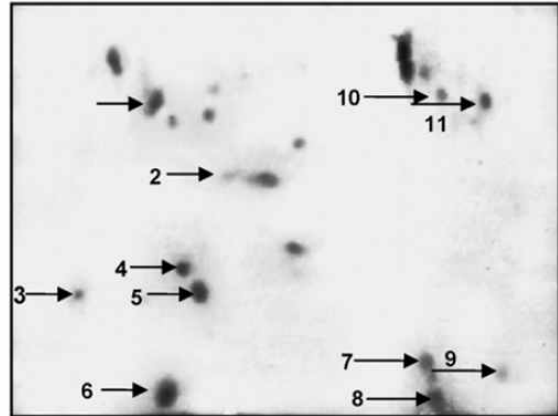
CB-OH의 표적을 발굴하기 위하여 biotinly-CB 화합물을 합성하였다. 2-D gel을 활용하여 CB-OH와 상호 작용하는 단백질을 확인하였다.



(A) DMSO



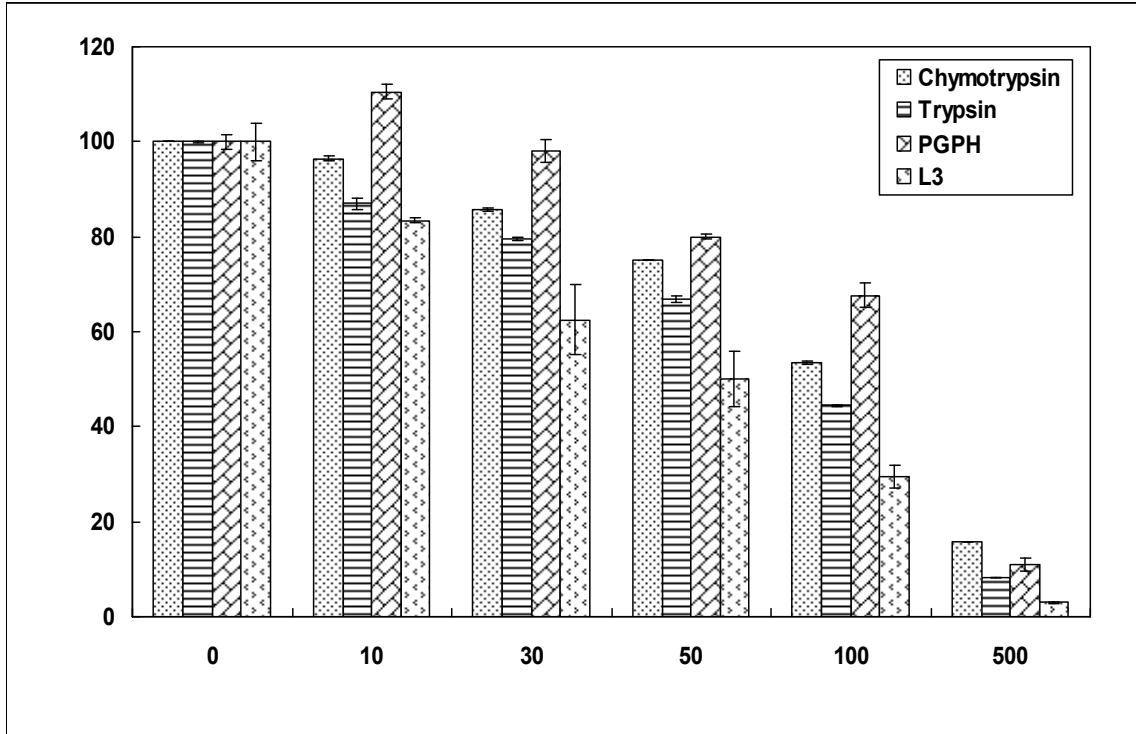
(B) biotin-HCA



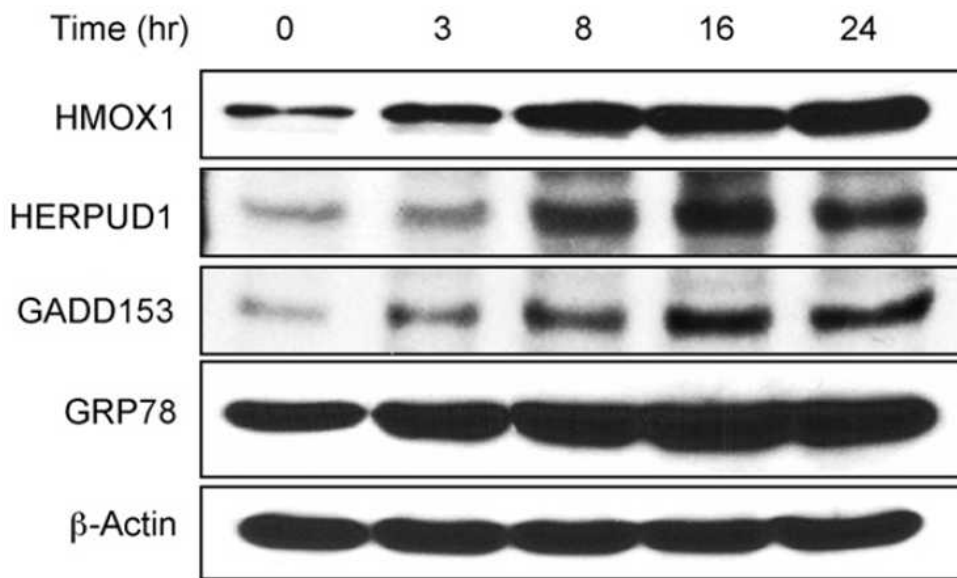
MALDI-TOF analysis of differentially pull-downed proteins by biotin-CB

Spot No	Protein MW (kDa)/pI	Protein Name
3	29.2/5.7	- Proteasome subunit beta type 4 precursor (EC 3.4.25.1) (Proteasome beta chain) (Macropain beta chain) (Multicatalytic endopeptidase complex beta chain) (Proteasome chain 3) (HSN3) (HsBPROS26)
5	29.6/6.1	- Proteasome subunit alpha type 1 (EC 3.4.25.1) (Proteasome component C2) (Macropain subunit C2) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C2) (Proteasome nu chain) (30 kDa prosomal protein) (PROS-30)
6	29.2/5.7	- Proteasome subunit beta type 4 precursor (EC 3.4.25.1) (Proteasome beta chain) (Macropain beta chain) (Multicatalytic endopeptidase complex beta chain) (Proteasome chain 3) (HSN3) (HsBPROS26)
7	29.2/5.7	- Proteasome subunit beta type 4 precursor (EC 3.4.25.1) (Proteasome beta chain) (Macropain beta chain) (Multicatalytic endopeptidase complex beta chain) (Proteasome chain 3) (HSN3) (HsBPROS26)
9	29.6/6.1	- Proteasome subunit alpha type 1 (EC 3.4.25.1) (Proteasome component C2) (Macropain subunit C2) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C2) (Proteasome nu chain) (30 kDa prosomal protein) (PROS-30)

확인된 단백질들이 proteome subunit들이었다. 이를 근거로 proteasome 활성 저해도를 측정하였다. CB-OH는 L3-like activity를 49.8%, chymotrypsin-like activity를 25%, trypsin-like activity를 33%, 그리고 PGPH-like activity를 20.1%로 각각 저해하였다.

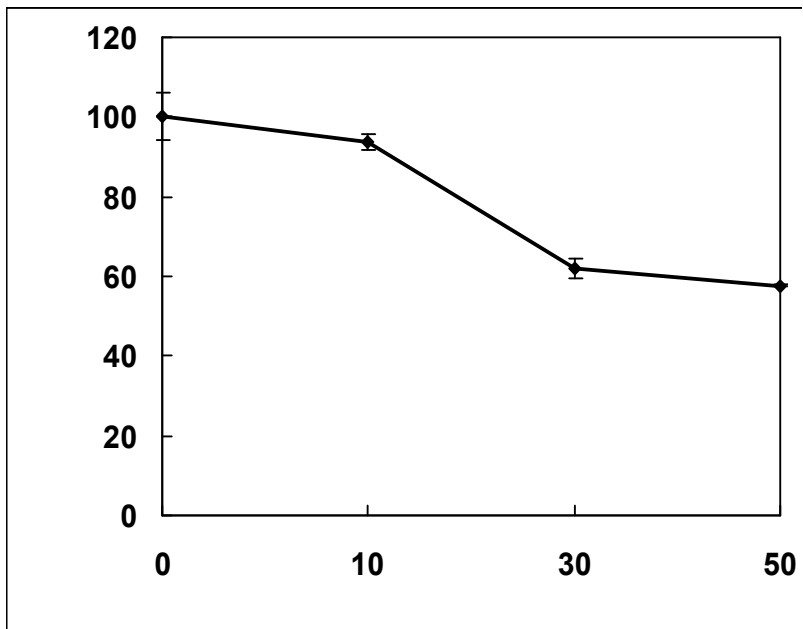
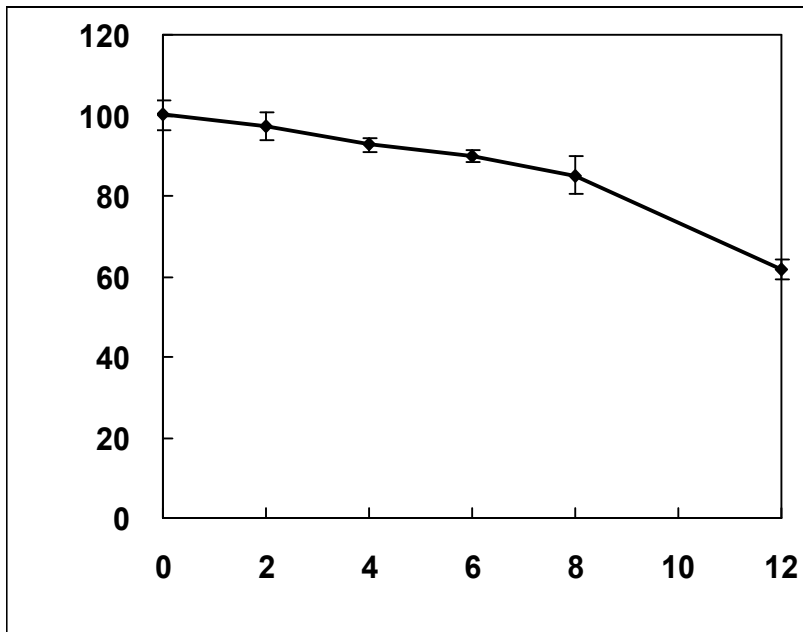


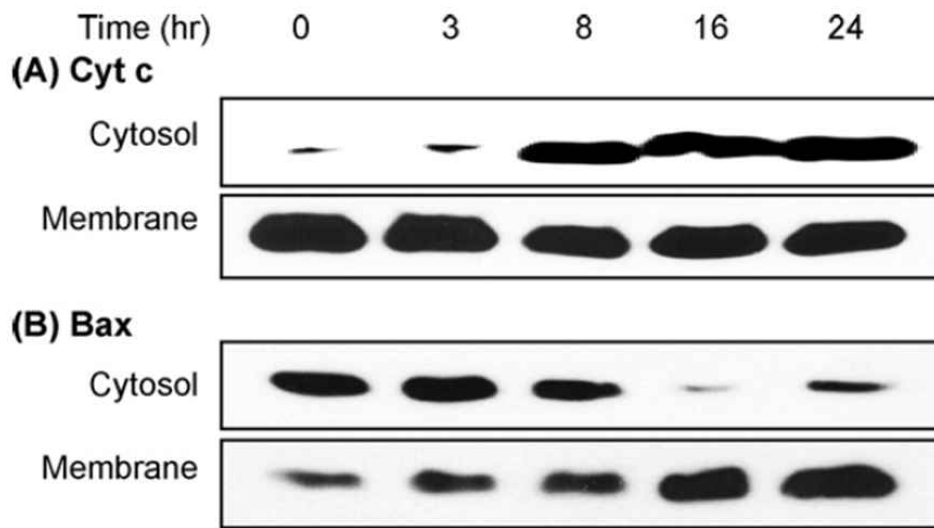
ER stress 관련 단백질들의 발현을 검증한 결과 GADD153, HMOX1, HERPUD1, 그리고 GRP78 genes 등의 발현이 증대되었다.



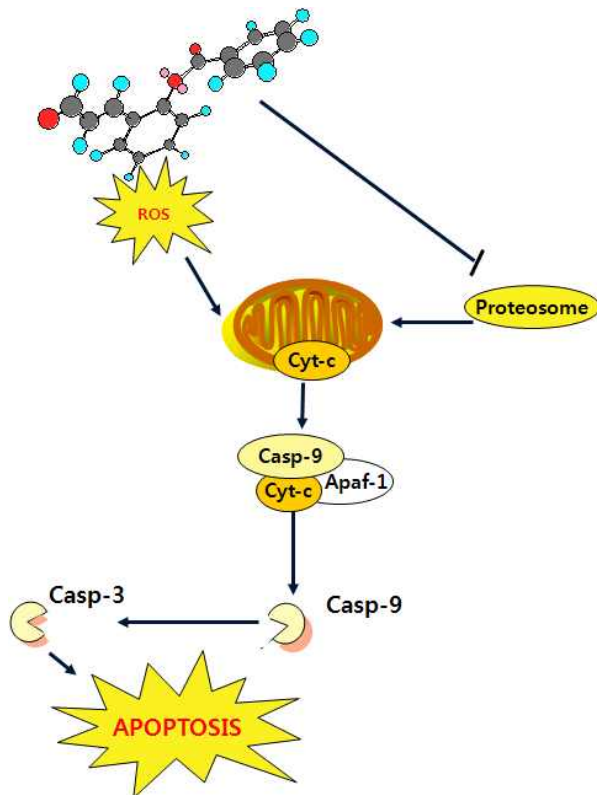
선행연구에서 CB-OH는 ROS를 유도하고 이로 인하여 세포사멸을 유도함을 확인하였다. ROS는 주로 미토콘드리아에서 생성되므로 mitochondrial membrane potential을 측정해 본 결과 다음과 같이 mitochondrial membrane potential이 감소

하였다. 그리고 이러한 원인으로 mitochondrial cytochrome c가 세포질로 방출되고 Bax 단백질이 세포질에서 원형질막으로 이동하게 된다.



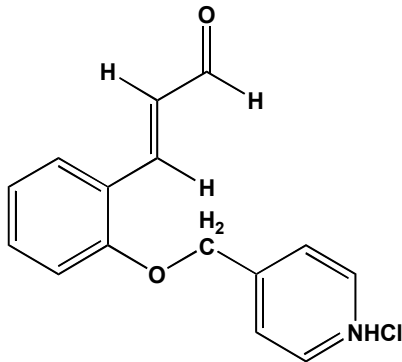


결론적으로 CB-OH는 proteasome의 활성을 저해하여 ER stress를 유도하고 그 결과로 mitochondrial perturbation 일으켜서 궁극적으로 세포의 사멸을 유도하게 된다. 이를 정리하면 다음 그림과 같다.



제 7 절 CB-Pic 항암활성 및 CB-Ph의 암 예방 활성

1. 세포에서의 CB-Pic의 항암효과



신체를 구성하고 있는 세포들의 분열 증식과 분화는 생명 현상의 유지에 기본이다. 정상적인 기능을 이루기 위한 세포의 증식 및 성장은 정교한 세포 내 신호전달 체계에 의해서 조절되며, 이 일련의 과정은 세포가 외부로부터 받은 신호를 여러 단백질들(PLC, PKC, Shc, Grb2, Raf, MAPK, MEK 등)과 분자 매개체들(GTP, cAMP 등)을 통해 핵 내의 세포 시계로 전달시킴으로써 이루어진다. 이러한 일련의 과정 중에서 어느 한 부분에 이상이 발생하게 되면 자체적인 조절 기작에 의해서 균형을 유지하기도 하지만, 많은 경우에는 질병으로 발전하게 된다. 특히, 세포 내 핵에 존재하는 세포주기는 세포들의 생명 유지를 조절하는 중요한 과정 중의 하나이다.

세포주기는 일상적으로 우리가 사용하고 있는 시계가 초침, 분침, 시침으로 구분되듯이 4개의 독특한 단계로 나뉘어진다. 즉, Gap1(G1기), DNA 합성단계(S기, Synthetic phase), Gap2(G2기), 분열기(M기, Mitosis phase) 등이 바로 그것이다. 또한, 세포가 높은 밀도로 존재하거나, 낮은 농도의 성장 인자의 환경에서 장기간 방치되면, 세포는 휴면기라고 불리는 성장 멈춤(G0기) 상태로 접어든다. 이러한 일련의 핵 내 반응을 세포주기라 한다.

시계 내에는 전기적 또는 물리적 힘에 의해서 시계추가 진동하고 이에 따라서 초침, 분침, 시침이 순차적으로 움직임으로써 우리에게 정확한 시각을 알려 주게 된다. 이를 위해서는 시계추에 일정한 힘이 가해져야 하며 이를 조절하는 각종 부속품들이 시계를 구성하고 있다. 이와 마찬가지로 세포주기에도 체크포인트

(checkpoint)라고 불리는 복잡한 네트워크가 있어서 세포시계가 정확히 G1-S-G2-M 기의 순서로 진행되도록 유도해 준다. 체크포인트에서 세포주기의 다음 단계로 넘어가기 위한 조건이 충족되었는지를 확인한 후, 모든 조건이 만족되면 S기 또는 M기가 진행된다. 이런 체크포인트 조절 메커니즘의 결핍은 유전물질의 불안정성을 증가시켜 조절 불가능한 세포 성장을 가져오며, 때로는 암과 같은 무절제한 세포 성장을 일으키기도 한다.

핵 외부로부터의 신호 전달과 영양 상태가 양호하면 G1기의 세포 크기가 커지고, 세포주기로 진입하게끔 해준다. 세포주기 작동은 효모에서는 START, 포유세포에서는 제한점(restriction point)이라고 불리는 G1 체크포인트에서 이루어진다. 이 지점을 지난 후 특별한 제동이 없으면 세포는 자동적으로 4단계의 세포주기를 거쳐서 자신의 게놈을 복제하고 분열하게 된다. 포유세포에서의 이들 단계를 자세히 살펴보면 다음과 같다. 체크포인트가 존재하는 G1기는 새로운 세포를 만들기 위한 준비 단계로서 이때에 성장인자와 충분한 영양이 공급되지 못하면 세포주기는 멈추게 되고, 성장 멈춤기인 G0 상태로 접어들게 된다. 그러나 충분한 영양이 공급되고 다양한 성장 인자들이 준비되면 세포주기는 S기로 진행되게 된다. 이때에 세포는 자신의 게놈을 복제하여 두 개의 복제 염색체 충분히 만들 뿐채분아니라, 두 세포로 분열되기 위해 세포질 내의 여러 인자들이 복제되어 진다. S기가 끝나면 세포는 제2의 체크포인트로 알려진 G2 단계로 진입한다. 이 G2 기간 동안의 주요 메커니즘은 DNA 복제와 완성을 조절하며 분열기로의 진입을 준비한다. 그러므로 세포의 구성에 필요한 다양한 인자들이 이때에 생산된다. 두 세포로 분열되는데 필요한 인자들이 충분히 만들어진 후에 세포의 실질적 분열분열되어나는 분열기인 M기로 진행되며, M기는 시간적으로 가장 짧고 가장 드라마틱한 단계이다. 복제된 게놈이 세포의 양극으로 분리되어 두 개의 딸세포가 만들어지는 단계이기 때문이다. 이런 일련의 과정은 한 세포가 성장하여 두 세포로 분열되기 위해서 모든 세포가 거치는 과정이므로 세포의 생명 유지에 매우 중요한 과정이다. 그러므로 세포주기의 연구와 이들을 조절하는 물질의 개발은 세포성장기작의 연구 및 세포주기이상에서 발생하는 암의 예방, 치료제 개발에 필수적이라 할 수 있다 (Marcos Malumbres and Mariano Barbacid, Nature Review Cancer 2001, 1, 222-231).

상기에서 언급한 것과 같이 포유동물의 세포는 G1기에 존재하는 제1의 체크포인트 또는 G2/M에 있는 제2의 체크포인트를 조절함으로써, 그 성장을 조절할 수 있다. 이 두 체크포인트의 비정상적인 진행이 세포 노화나 암 등의 질병 발생과 연결되어 진다. 이런 체크포인트에서 중요한 역할을 하는 것이 cyclin D(D1, D2, D3

등) 들이다. 이들은 CDK(cyclin dependent kinase) 2, 4 또는 6에 결합하여 이들 효소의 활성을 조절하며, 인산화된 단백질의 인산기를 제거하는 CDC25 등이 세포주기 전체를 조절하는데 있어서 매우 중요한 역할을 하게 된다. 이러한 연구결과들을 바탕으로 다양한 세포주기 조절제들이 종양과 같은 난치성 질병 치료제로 개발되고 있다(Peter L Toogood, Current Opinion in Chemical Biology 2002, 6, 472-278).

신남알데하이드 유도체의 항암활성 등은 이미 보고되어 있으나 물에 대한 용해도가 매우 낮아서 항암제로의 개발에 어려움이 있었다. 예로서 벤조일옥시 신남알데하이드 등은 세포에서의 활성 및 복강 투여 동물에서의 항암 활성은 우수하나 물에 대한 용해도가 매우 낮아서 정맥 투여가 불가능하고 경구 투여시 항암활성이 급격히 감소하는 단점을 가지고 있다 (Han, D. C., et al., *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 6911-6920). 다양한 신남알데하이드 유도체들이 만들어 졌지만 물에 대한 용해도로 인하여 동물에서의 항암효과가 개선되지 못하였다. (Shin D. S. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17 (2007) 5423 - .5427; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (2006) 2498 - .2506; Byoung-Mog Kwon, et al., USA Patent 6,949,682, 2005; 권병목 등 대한민국특허 10-0668171).

상기와 같은 점을 감안하여, 본 발명자들은 암세포의 G2/M기에서 성장을 멈추게 하여 비정상적 성장을 억제시킴으로써 우수한 항암 활성을 나타내는 새로운 신남알데하이드 유도체를 합성하였다.

가. 실험 목적

6종의 서로 다른 장기유래 인체 암세포주에 대한 CBPAL의 1가지 시료의 in vitro 세포 성장 억제 효과를 측정하고자 했다.

나. 실험 방법

(1). 세포배양

실험에 사용한 세포주는 미국의 NCI와 ATCC에서 제공된 것으로, 현재 한국생명공학연구원 에서 보존중인 stock을 사용하였다. 배양액은 10%의 송아지 혈청을 함유한 RPMI1640을 사용하였다.

(2). 세포독성의 측정

세포성장저해효과의 측정실험은 NCI protocol에 따라서 시행하였다. 세포주를 loading하는 농도는 세포주의 성장속도에 따라서 다르게 한다. 각각의 세포주는 0

Day에 loading을 한 후에 약물을 처리하는 날에 Time Zero plate(Tz plate)를 만들어 계산시에 영점으로 계산 한다. 시료는 5가지 dose로 나누어 희석하여 용매의 최종농도가 uM이 되도록 처리한다.

48시간 후에 약물을 처리한 plate를 50% TCA로 50 μ l/well씩을 넣어서 고정을 한다. 고정한 plate는 4 $^{\circ}$ C에서 60분간 방치한 뒤 tap water로 4~5번 정도 세척을 한다. 세척한 plate는 건조한 후, 0.4% SRB(Sulforhodamine B)(0.1% acetic acid로 용해한 용액; 단백질의 염색 시약)을 100 μ l/well을 가한다. 30분정도를 방치한 후에 0.1% acetic acid로 세척을 하여 결합하지 않은 염색시약을 세척한다. 다시, plate를 건조한 후에 10mM Tris Base (pH 10.5)를 100 μ l/well를 가하여 염색시약을 용해시키고, 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 측정한 흡광도는 용매처리군에 대한 백분율로 계산한다.

(3). 시료의 조제

화합물을 10(mg/ml)이 되도록 DMSO를 이용하여 녹인 후 3, 1, 0.3, 0.1(mg/ml)이 되도록 희석한다. 희석된 Stock solution을 culture media를 이용하여 각 dose 100배 희석한다. 각 시료를 final 10, 3, 1, 0.3, 0.1 (ug/ml)이 되도록 처리한다.

다. 결과

6종의 서로 다른 장기유래 인체 암세포주에 대해 CBPAL의 1가지 시료의 in vitro 세포성장 저해효과를 검증하기 위한 목적으로 본 실험을 실시하였다.

실험에 사용한 암 세포주는 다음과 같다. HCT-15 (Colon), PC-3 (Prostate), NCI-H23 (Lung), NUGC-3 (Stomch) MDA-MB-231, (Breast), ACHN (Renal)

다음은 6종의 서로 다른 장기유래 인체 암세포주에 대한 CBPAL의 1가지 시료의 GI₅₀값을 나타낸 표이다. 단위 ug/ml

	CBPAL (CB-Pic acetal form)	CBPAT (CB-Pic)
HCT 15	3.207	3.099
PC-3	2.495	2.188
NUGC-3	2.220	1.716
ACHN	3.439	3.722
MDA-MB-231	5.164	3.489
NCI-H23	3.502	3.589
GI ₅₀	3.338	2.967

2. 동물에서의 CB-Pic의 항암효과

가. 실험목적

본 연구에서는 인체 대장암(HT-29) 세포의 nude mouse xenograft 모델을 통해 이제마 G2의 5종 시료의 경구투여의 반복에 의한 항암활성을 검증 하고자 하였다.

나. 실험재료 및 방법

(1). 실험검체

시험에 사용한 시료는 한국생명공학연구원 세포기능조절연구실로부터 공급받아 사용하였으며, 실험기간 중 냉장 보관했다. 시험물질은 용매 (멸균증류수)에 용해하여 농도 10 mg/kg 로 조제하여 투여하였다. 용매대조물질로는 멸균증류수를 사용하였다. 양성대조물질(ADR)은 생리식염수에 녹여 0.2 mg/ml의 농도로 조제하였다.

(2). 실험동물 및 암세포주

실험동물로는 일본 SLC 회사의 female S.P.F BALB/c nude mice를 사용하였으며, 주령은 6주, 체중은 대략 14.1 - 17.5 g 의 동물이었다. 실험동물은 1주일 이상 무균동물실에서 순화시킨 후, 시험에 사용하였다. 동물실의 온도는 21±2 °C, 습도는 55±5% 였고, 명암은 12시간주기로 자동 조절하였다. 실험동물용 고형사료(폴라스인터내셔널)는 방사선 멸균제품이었으며, 음수는 고압증기멸균기로 멸균하였다. 사료

와 음수는 자유 섭취시켰다. 암세포주는 한국생명공학연구원에서 보존중인 인체 대장암 세포주 HT-29을 사용하였으며, 액체 질소 속에서 냉동보관 중이던 세포를 thawing 한 후 세포 배양을 실시하였다. 암세포주는 CO₂ incubator(Forma, USA) 내에서 온도 37℃와 CO₂ 농도 5%조건으로 적절한 기간 동안 배양하였다. 배양 최종일에 모든 세포를 수거하여 계수하고 생리식염수를 첨가하여 최종 세포농도는 3×10^7 cells/ml로 조절하였다.

(3). 인체암세포주의 nude mouse 이식 시험법

HT-29 암세포주는 3×10^7 cells/ml의 세포농도로 마우스당 0.3 ml 씩 우측의 견갑부와 흉벽사이의 액와부위 피하에 주입하였다. 시료는 이식후 다음날(day1)부터 투여를 개시하여 부검전날까지 매일 1회 경구로 각 농도/10ml/kg의 용량으로 투여를 반복 실시계획 하였다. 동물의 체중변화는 시험기간동안 3회/주정도 측정하여 약물의 투여에 기인한 체중감소와 같은 독성정도를 알아보았다. 암세포 이식 후 6일째부터 18일째까지 총 5회 종양의 크기를 개체별로 측정하였다.

종양의 크기는 verier caliper를 이용하여 3 방향을 측정한 후 다음의 계산식으로 표현하였다.

$$\text{Tumor volume} = (\text{Length} \times \text{Width} \times \text{Height})/2$$

세포 이식 후 18일째에 동물을 희생시켜 종양을 분리한 후에 무게를 측정한 후 디지털 카메라로 사진을 촬영 후 액체질소에 고정하였다.

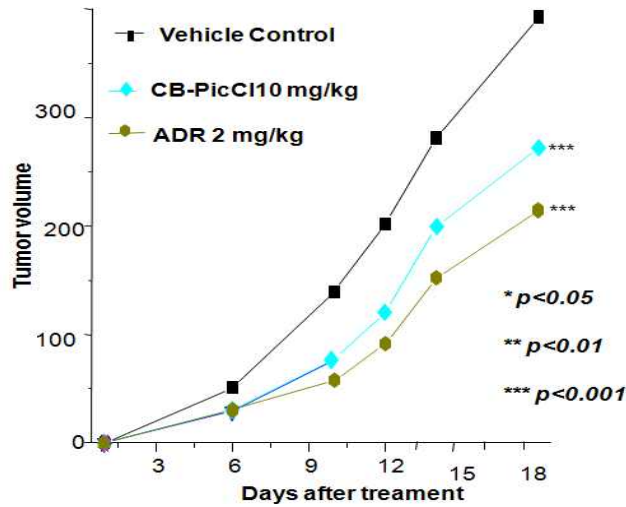
(4). 통계처리

처리군의 실험결과는 t-TEST로 대조군과의 유의성을 검증하였다.

다. 결 과

HT-29 암세포주 이식 nude mouse에 약물투여를 개시한 후 18일간 몸무게 변화를 관찰하였다. 실험 결과를 보면 용매대조군과 비교하여 시료 투여군에서 체중의 감소는 관찰 되지 않았다. 양성대조물질(ADR) 투여군의 경우에는 최종일 10.3%($p < 0.001$)의 통계적으로 유의한 체중감소가 관찰되었다.

HT-29를 이식한 후 6일째부터 종양의 크기를 측정하였는데 그 결과 도표 및 그림 2에 나타내었다. CBOHPicHCl salt 투여군에서 30.7%($p < 0.001$)의 통계적으로 유의한 종양성장억제효과가 관찰 되었다. 양성대조물질(ADR) 투여군의 경우에는 45.4%($p < 0.001$)의 통계적으로 유의한 종양성장억제효과가 나타났다.



약물투여후 18일째 HT-29 tumor를 절제하여 그 무게를 측정된 결과 21.7%($p < 0.05$)의 종양무게 감소가 관찰 되었다. 양성대조물질(ADR) 투여군의 경우에는 21.0%($p < 0.05$)의 통계적으로 유의한 종양무게 감소가 나타났다.

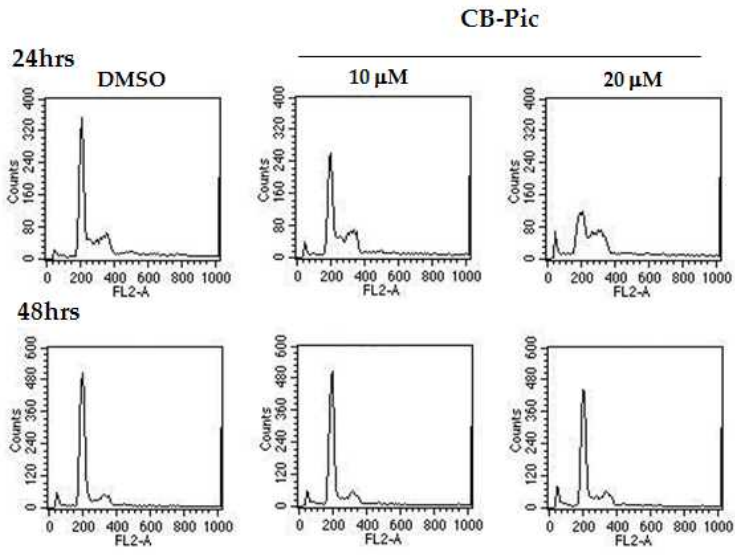
라. 결론

인체대장암세포(HT-29) 이식 누드마우스에서 CBOHPicHCl salt (10mg/kg) 시료를 17일간 반복 경구 투여시 용매대조군과 비교하여 체중감소 없이 30.7%($p < 0.001$)의 통계적으로 유의한 항암효과가 있는 것으로 판단된다.

3. CB-Pic의 항암활성 기전

가. 세포 성장 억제 효과

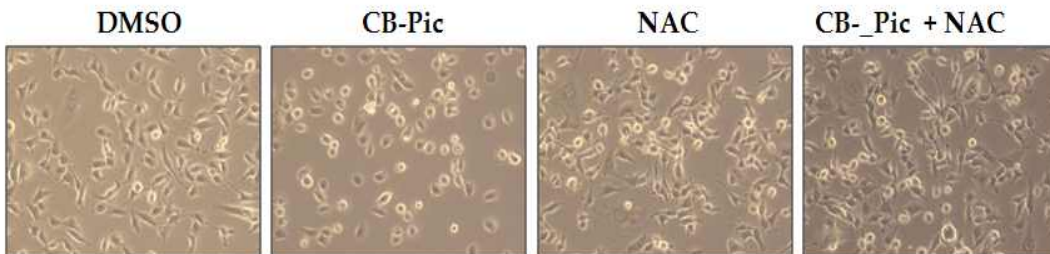
나. 세포주기 변화 분석



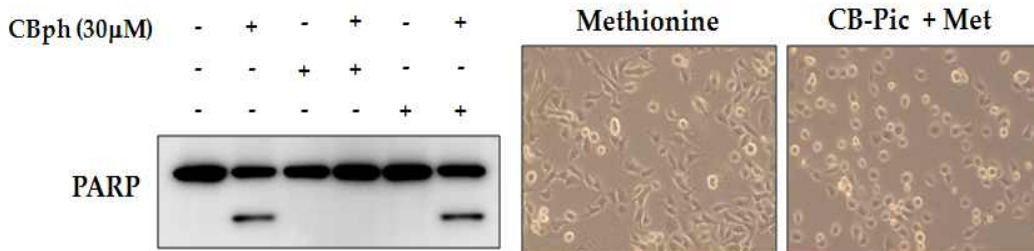
다. ROS 생성과 세포 사멸

cell line ; MDA-MB-231

Time ; 2hrs



Time ; 24hrs



4. CB-Ph의 암 예방 활성

종양은 세포 증식, 신생혈관 형성, 그리고 면역 격리와 같은 과정을 조절하는 숙주와 종양 사이의 복잡한 상호작용을 통해 만들어지고 유지되어 진다 (J. C. Wasson., et al. Oncogene amplification in pediatric brain tumors. *Cancer Res.* **1990**. 50. 2987-2990). 이러한 숙주와 종양 사이의 상호작용의 대부분은 정상 세포를 종양으로 형질전환 시키는데 중요한 역할을 하는 발암 유전자와 종양 억제 유전자에 의해 조절되어진다. 최근 연구에서 H-라스와 같은 특별한 발암 유전자는 고형암의 생성과 유지의 두 가지 모두와 관련 있다는 것을 보여주고 있다 (L. Chin., et al. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature.* **1999**. 400. 468-472).

간암은 전 세계적으로 가장 흔한 암으로, 일반적으로 크게 두 가지로 분류할 수 있다. 간 자체에서 발생한 암으로, 일반적으로 말하는 간암인 원발성 간암과, 다른 장기로부터 전이되어 발생하는 간암이 있는데, 악성 간종양의 대부분을 차지한다. 간암은 전체 암등록 환자의 11.6%를 차지하며, 암으로 인한 사망자중 간암으로 인한 사망자는 17.3%를 차지한다. 특히 미국이나 서구와 달리 아시아와 아프리카 지역에서 많이 발생하는 간암은 심각한 보건 문제를 야기하고 있다. 특히 간암은 남자에서 2번째로 많은 암이며, 여자보다 남자에서 발생률이 4배 높으며, 간 경변이 선행되는 경우가 흔하다. 서구에서는 40대와 50대에서 주로 발생하나 아시아, 아프리카에서는 30대와 40대의 연령에서 주로 발생한다.

H-라스(H-ras)는 간암 등의 조직에 활성화형으로 고빈도로 존재하는 암유전자이다. 따라서, H-라스 유전자를 이용하여 암을 유발하는 형질전환 마우스를 개발하려는 노력이 있었으나 (Sandgren et al., *Oncogene*, 4, 715-724, 1989; Tremblay et al., *Mol. Cell Biol.*, 9, 854-859, 1989; Gilbert et al., *Int. J. Cancer*, 73, 749-756, 1997; *Toxicol. Pathol.*, 26 (4), 556-561, 1998), 조기 사망, 불임 또는 간암유발 능력의 저조함 등의 문제점으로 인하여 신약후보 물질의 약효검정을 위한 동물모델로는 적합하지 않았다.

이에 H-라스 과발현 마우스에 항암활성 가지고 있는 CB-Ph를 투여하여 유의성 있는 간암 발생 지연효과를 보았다. 그리고 이 화합물은 동물실험에서 독성이 없음이 확인되었고 (J. *Toxicol. Pub. Health*, **2003**, 19, 259-266.), 면역세포를 증가시켜서 면역 활성화도 높여줌을 확인하였다. 이러한 효과를 바탕으로 CB-Ph는 암 예

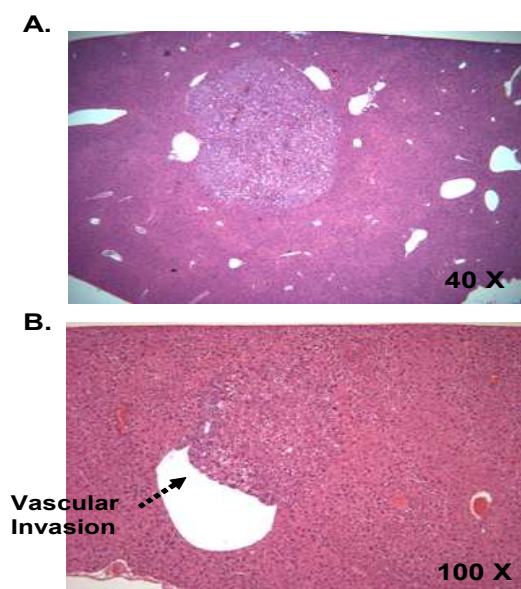
방 활성이 있음을 확인하였다.

가. CB-Ph의 H-라스 과발현 마우스의 간암발생에 대한 효과

생후 4개월령의 H-라스12V 과발현 마우스 (KCTC 10318 BP)에 CB-Ph를 50 mg/kg 용량으로 복강을 통하여 이틀에 한번씩 10주간 투여하였다. 생후 6개월 이후 마우스의 간 조직을 무균 상태에서 적출, 채취하여 포르말데히드 고정액에 고정 후, 파라핀 블록을 만든 후, 마이크로톰 (LEICA 사)을 이용하여 4 μ m 두께로 조직을 절단하여 절단된 절편을 슬라이드위에 부착하였다. 헤마톡실린/에오신 (Hematoxylin/Eosin) 염색법을 이용하여 조직을 염색하고 그 결과를 역상 현미경 (모델명: Bx 50, Olympus 사)하에서 관찰하였다.

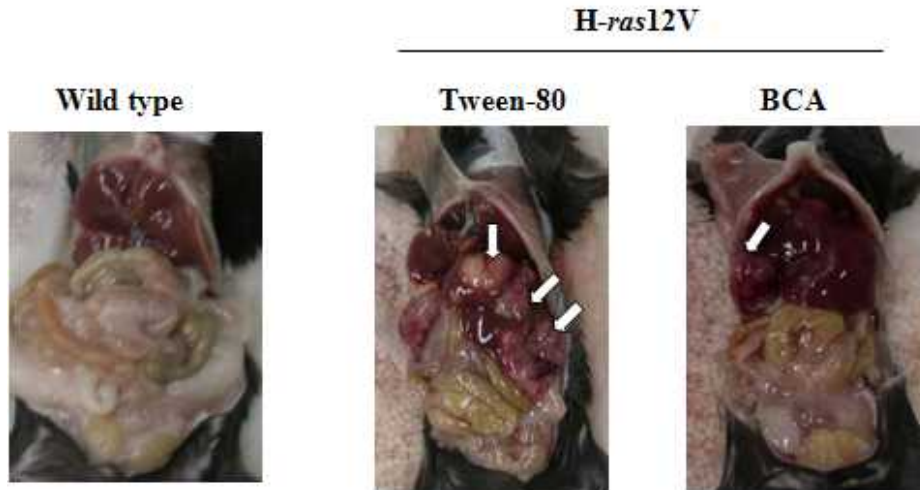
그 결과 CB-Ph를 투여하지 않은 마우스에서는 생후 6개월 이후에 자연 발생적인 간암이 유발되었으나, CB-Ph를 투여한 마우스에서는 다음 그림에서 볼 수 있듯이 간암의 생성이 지연되었고 면역세포가 증가해 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 CB-Ph는 H-라스 과발현 간암 또는 타장기의 암 발생억제제로의 유용성이 증명되었다고 할 수 있다.

6개월령의 H-라스12V 과발현 마우스에서 발생한 간암(A)과 혈관 침투되는 암 (Vascular Invasion)(B)을 나타낸 간 조직사진이며, H-라스12V 과발현 마우스에 발생한 간암이 BCA (2'-Benzoyloxy- cinnamaldehyde) 투여에 의해 암 발생이 지연된 결과(A)와 화살표로 표시된 면역세포의 증가 (B)를 나타낸 간 조직사진이다.



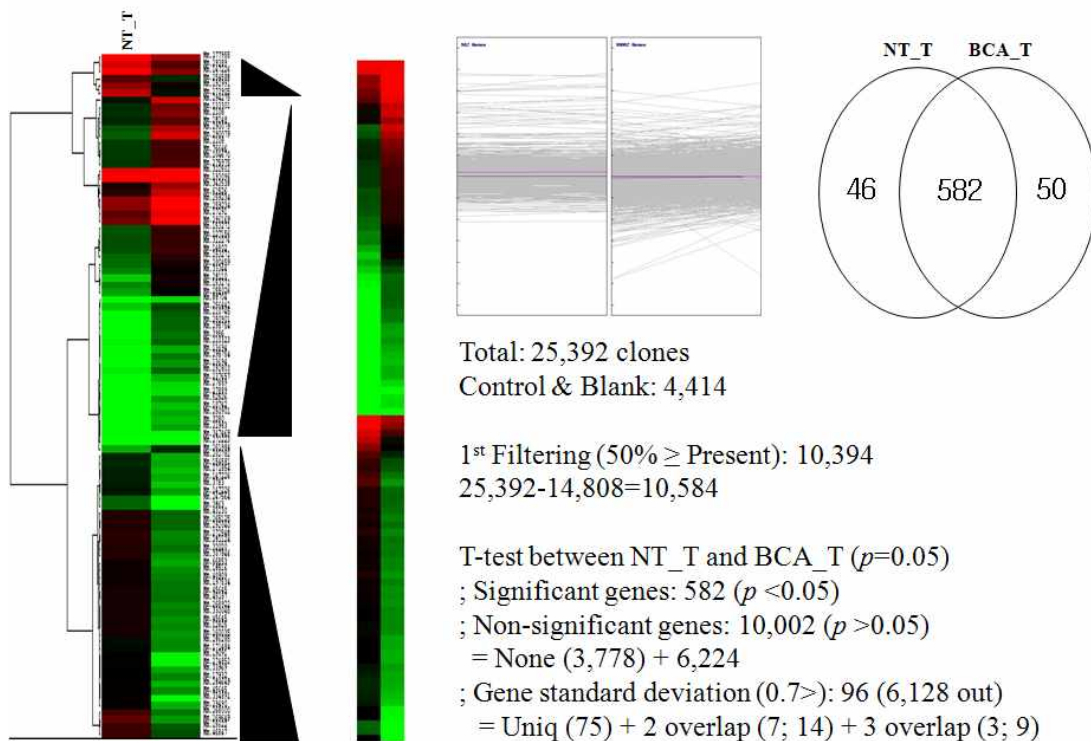
나. CB-Ph의 H-라스 과발현 마우스의 항암효과

다음 그림과 같이 CB-Ph는 H-ras 과발현 마우스에서 간암 조직의 성장을 억제하였다.



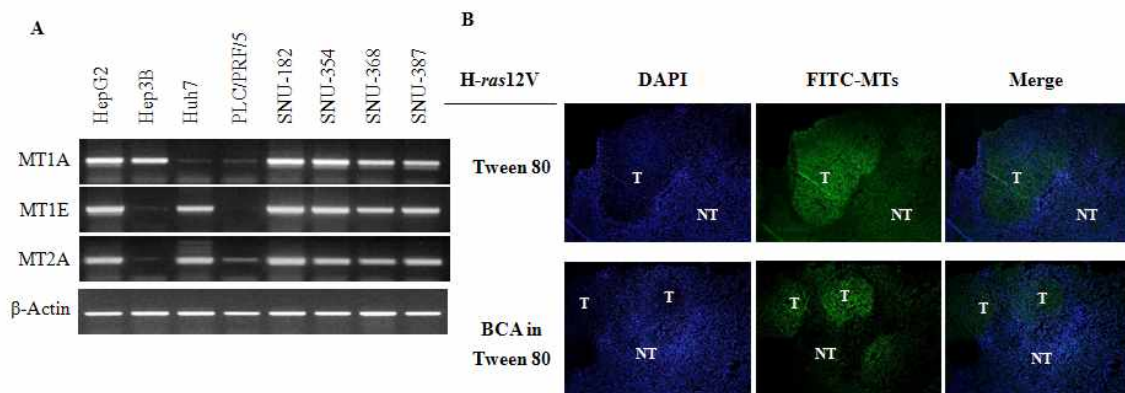
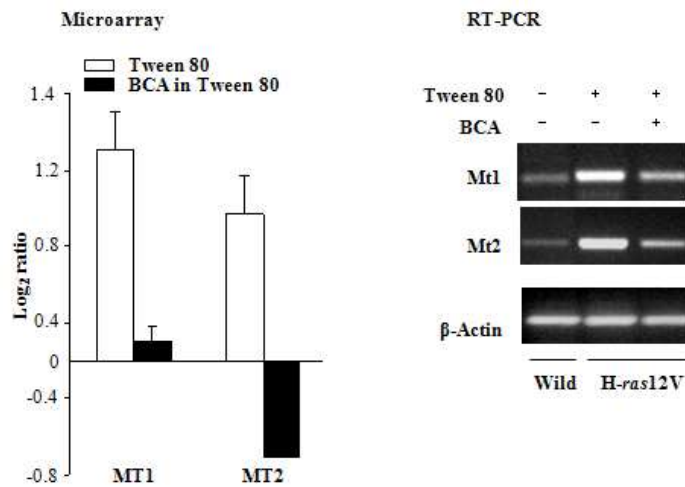
다. 암 예방 효과의 기전 규명

(1) 기전을 규명하기 위하여 암 조직을 대상으로 유전체 발현분석을 수행하였다.



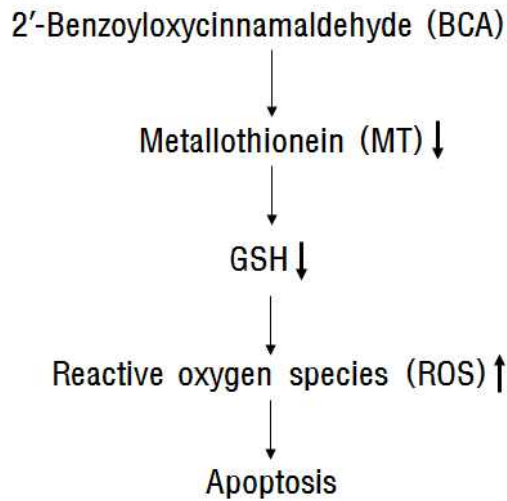
Term	Count	Genes
intracellular signaling cascade	5	Tenc1, Balap2, Nrpb
cellular carbohydrate metabolism	3	Aco2, B4galt1, Pfkf,
cell organization and biogenesis	7	Rpl22, Phf17, Sema6a, H3f3b, Sfrs1, Pex16
carbohydrate metabolism	4	Ggta1, Aco2
transition metal ion homeostasis	2	Mt2, Mt1
organelle organization and biogenesis	5	Rpl22, Sema6a, H3f3b, Pex16, Vim,

유전체 분석을 통하여 얻은 정보를 근거로 Mt1, 2 유전자에 주목하고 이들 유전자의 발현 정도를 RT-PCR로 확인하였다. 아래 그림과 같이 이들 유전자의 발현이 CB-Ph 투여 mouse의 암 조직에서 감소하였다.



상기의 결과를 조합해보면 CB-Ph는 암 조직에서 metallothion (MT)의 발현을

조절하여 항암효과를 나타낸다고 생각되어 진다.



다. 단백질 분석을 통한 기전 규명

GDP/GTP-binding GTPase인 Ras superfamily는 세포 분열, 세포 생존과 사멸, 그리고 분화같은 중요한 생물학적 사건을 조절하는데 관여한다. 또한 이런 GTPase는 병리적 질환과도 직접적으로 연관되어 있다. 예를들어, 암에서 Ras과 Rho 단백질은 악성종양으로의 전환, 침윤과 전이를 조절한다. 비록 Raf, PI3K, AF-6과 Ral GDS 등을 포함하는 Ras signaling의 여러 조절자들이 밝혀져 있지만, 종양의 여러 진행단계에서 oncogenic Ras의 정확한 역할은 완전하게 이해 못하고 있다. H-ras12V transgenic mice에서 BCA 처리를 통해 암 크기를 평균 90% 이상으로 줄임에 따라 BCA는 종양의 퇴행을 유도한다.

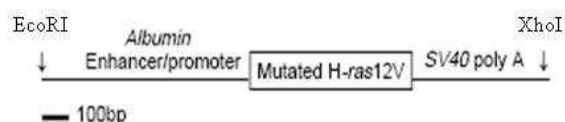
이 연구는 H-ras12V transgenic mice에서 BCA의 항암효과를 밝히기 위해 진행되었다. 더불어 우리는 Ras를 transformation시킴으로써 Ras의 분자생물학적 매커니즘을 증명하였다. 이를 위해 non-transgenic mice의 간조직과 H-ras transgenic mice의 간에서의 암조직과 비암조직을 시료로 사용하여 상대적인 단백질 프로파일링을 실시하였다. 쥐의 간 시료는 우선적으로 170mm X pH 3-13NL IPG를 사용하여 pI에 따라 분리하고, 2차로 10% 2-DE gel에서 분자량에 따라 분리하였다. 이렇게 얻은 2-DE gel 이미지를 PDQuest 이미지 분석 소프트웨어를 사용하여 각 spot의 발현 변화를 분석하였고 vehicle과 BCA 처리한 gel 사이에서 달라지는 발현 패턴을 보이는 spot과 암조직과 비암조직 사이에서 발현이 달라지는 단백질을 MALDI-TOF MS를 사용하여 동정하였다.

(1). 실험 재료

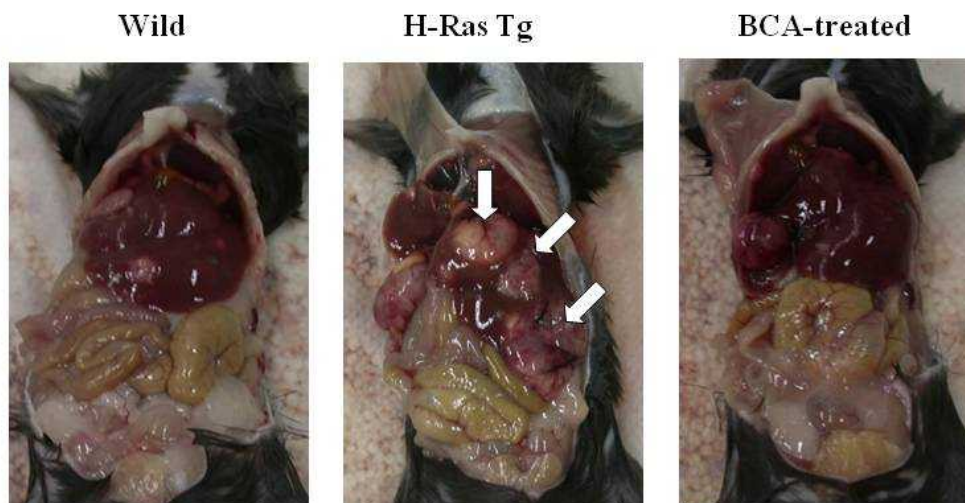
pH 3-10NL Immobilized pH gradient gel(IPG) strip은 Bio-Rad (ReadyStrip, 0.5 x 3 x 170 mm)사에서 구입하였다. Bio-Lyte(pH 3-10)는 Bio-Rad사로부터 구입하였다. Sodium dodecyl sulphate(SDS), Acrylamide/bis-acrylamide Solutions, N,N,N',N'-tetra'-thyl-thyl-nediamine (TEMED), ammonium persulfate, di'-th'-rei'ol (DThy, urea, tris, glycine, glycerol, 3-[(3-Cholamidopropyl)di'-thylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), utoomassie brilliant blue G-250, PROTEAN IEF Cell, Prh'ein Assay^{DC} Reagent는 Bio-Rad사부터 구입하였고, silver nitrate, trichloroacetic acid(TCA), iodoacetamide와 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, formaldehyde는 Sigma에서 구입하였다. Merck사에서 methanol, ethanol, phosphoric acid, acetic acid를 구입하여 사용하였다. 다른 시약은 Sigma사나 Merck사로부터 구입하였다.

(2). H-ras 12V transgenic mice에 BCA 투여

Generation of H-ras12V transgenic mice



- ⇒ Microinjected into fertilized mouse eggs
- ⇒ Male H-ras12V transgenic mice (3.5 months old)
- ⇒ Peritoneum injection of 50 mg/kg BCA for 10 weeks



3.5개월령인 수컷 H-ras12V transgenic mice에 10주동안 50mg/kg의 BCA를 복강에 주사하였다. BCA는 0.5% (v/v) Tween-80 solution에 녹여졌고 하루에 한번, 주 4회 주입하였다. BCA의 독성을 결정하기 위해 주기적으로 쥐의 몸무게를 확인하였다.

(3). 이차원 전기영동

위의 간조직을 일차로 PBS 버퍼로 씻어준 후 1x protease inhibitor가 포함된 HB+버퍼 ((250 mM sucrose, 3 mM imidazole, pH 7.4, 1mM EDTA, 35.5uM cycloheximide)를 조직의 3-5배 넣고 얼음에 박은 후 homogenizer (TISSUE-TEARORTM, model 398, biospec products, inc.)를 이용하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄한 조직은 1000xg, 4°C에서 5분간 centrifuge 하고 분쇄되지 않은 조직과 핵 분획을 버리고 상등액만 새로운 e-tube에 옮긴다. 핵이 제거된 세포액을 100,000g, 30min, 4°C에서 ultracentrifuge하여 soluble protein fraction (상등액)과 membrane protein fraction (침전물)으로 분리하였다.

침전물에는 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 50mM DTT, 40mM tris, 0.2% Bio-Lyte (pH 3/10)가 들어있는 lysis 버퍼를 섞어 용해시키고, 상등액은 -20°C에 보관해 둔 아세톤을 넣고 2시간 이상 방치하여 단백질을 침전시킨 후 원심분리하여 얻은 pellet을 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 50mM DTT, 40mM tris, 0.2% Bio-Lyte (pH 3/10)가 들어있는 lysis 버퍼로 녹인 후 Bio-Rad protein assay solution으로 정량하였고 소혈청 알부민(Sigma, Cat. No. B-4287)을 표준시료로 사용하였다. 단백질 시료는 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

일차원 분리는 protean IEF (Isoelectric focusing) Cell (Bio-Rad)를 사용하였고 IPG (Immobilized pH gradient) strip은 Görg 등과 manufacturer's instructions에 따라 사용되었다. 시료는 analytical gel에서는 60 ug protein을 사용하였고 micropreparative gel에서는 1 mg까지 사용하였다. rehydration solution (7 M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 40mM tris, 0.2% (v/v) pH 3-10 IPG buffer, trace bromophenol blue)과 단백질 시료를 섞어 전체부피가 350 μ l가 되게 하여 strip holder에 넣고 strip의 gel 부분이 아래쪽을 향하도록 하여 넣고, 그 위를 mineral oil로 충분히 덮어주었다. Rehydration 조건은 20°C에서 14시간 동안 수행하였다. 250 V에서 15분 실시 후 10000 V까지 3 시간 동안 gradient로 올린 다음 10000 V로 60 kWh까지 수행하였다. 모든 IEF step은 20°C에서 수행하였다. 일차원 분리 후 strip은 equilibration solution I (6 M urea, 2% SDS, 20% glycerol, 0.375M Tris-HCl, pH 8.8, 130mM DTT)을 넣어 orbital shaker로 50 rpm으로 10분간 반응시킨 후 equilibration solution II (equilibration solution I +135mM iodoacetamide)를 넣어 다시 10분간 반응시킴으로써 이차원 전기영동 gel 상의 vertical streaking의 원인이 되는 잔량의 DTT를 제거해 주었다.

10% gradient polyacrylamide gel slab (185 x 200 x 1.0 mm) 위에 strip을 끼운 다음

0.5% agarose solution으로 overlay 하였다. 이차원 전기영동은 Protean II xi electrophoresis equipment와 SDS가 gel (Tris-HCl, pH8.8, 30% acrylamide, TEMED, 10% APS)을 사용해 실시하였는데 12.5mA/ gel로 bromophenol blue dye가 gel 바닥에 도달할 때까지 수행하였다.

(4). 단백질 염색

Micropreparative gel의 경우 전기영동이 끝난 후 gel을 증류수에 담귀 잔존하는 SDS를 제거한 후 Coomassie Brilliant Blue G-250 염색 용액 (17% ammonium sulfate, 3% phosphoric acid, 0.1% coomassie G250, 34% methanol)을 이용하여 24시간 동안 반응시켰다.

Silver staining은 Blum 등³의 염색 방법을 변형하여 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 analytical gel을 methanol: acetic acid: water (50:12:38)에 1시간 30분 동안 담귀 고정시킨 다음, 50% ethanol로 20분 동안 2회 헹구어 주었다. gel을 0.02% Na₂S₂O₃에서 1분 동안 전처리한 후 3차 증류수로 1분간 세 번 헹구어주었다. 단백질은 0.2% AgNO₃와 0.075% (v/v) formalin (37% formaldehyde in water)가 포함된 용액으로 20분간 염색되고 3차 증류수로 1분간 2회 헹구었다. 마지막으로 gel을 0.06%(v/v) formalin, 2% Na₂CO₃과 0.0004% Na₂S₂O₃에 넣어 발색 시켜 원하는 만큼의 spot intensity가 얻어지면 1% acetic acid를 넣어 발색을 정지시켰다.

(5). 이미지 분석

염색이 끝난 gel들은 scanner (GS-800 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad)를 이용하여 scanning하고 PDQuest software (version 7.1.1; Bio-Rad)를 사용하여 gel image matching을 하였다. Scanned gel image의 background를 제거하고 자동으로 spot을 detection하였다. 모든 spot intensity를 계산하기 위해 normalized value를 사용하였다. 한 gel에서 intensity의 총합을 1,000,000로 하여 각 spot intensity를 normalization하였고 normalized spot intensity는 ppm으로 나타냈다. 이 분석 소프트웨어를 사용해 up-, down-regulation 된 spot을 분석하였다.

(6). In-Gel Digestion

발현이 변하는 단백질 spot을 메스를 이용하여 잘라내어 200mM ammonium bicarbonate, 50% acetonitrile 이 들어있는 용액으로 탈색하였고, silver stained gel의 경

우는 30mM $K_3Fe(CN)_6$ solution 과 100mM $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ solution을 1:1로 mix한 후 첨가 하여 은을 제거한 후 색깔이 없어질 때까지 vortex한 후 SpeedVac concentrator를 이용하여 gel 조각을 건조시켰다. Coomassie나 silver stained gel에서 단백질 spot의 In-gel digestion은 Jensen 등⁴에 따라 수행되었다. 10 mM DTT/0.1 M NH_4HCO_3 로 45분간 56°C에서 reduction하고 용액을 제거 한 후 55mM iodoacetamide /0.1 M NH_4HCO_3 를 첨가해 실온에서 30분 동안 어두운 곳에 방치했다(alkylation). Iodoacetamide 용액을 제거하고 gel 조각을 0.1 M NH_4HCO_3 에서 5분 동안 반응 시킨 후 acetonitrile을 동량으로 첨가해 15분 동안 세척한다. vacuum centrifuge로 말린 후 gel 조각에 digestion buffer (100 mM NH_4HCO_3)와 12.5 ng/ μ l trypsin을 처리한 후 45분간 trypsin이 gel 속으로 들어가도록 얼음에 박아 두었다. 남은 용액은 제거하고 반응하는 동안 gel 조각이 마르지 않도록 20 μ l의 digestion buffer를 넣고 16시간 동안 37°C에서 digestion하였다. 10% trifluoroacetic acid (TFA)로 반응을 정지시키고, 0.1% TFA, 60% Acetonitrile이 들어있는 용액 50ul를 넣고 vortex하여 펩타이드를 추출하였다.

(7). MALDI-TOF MS 분석과 데이터베이스 검색

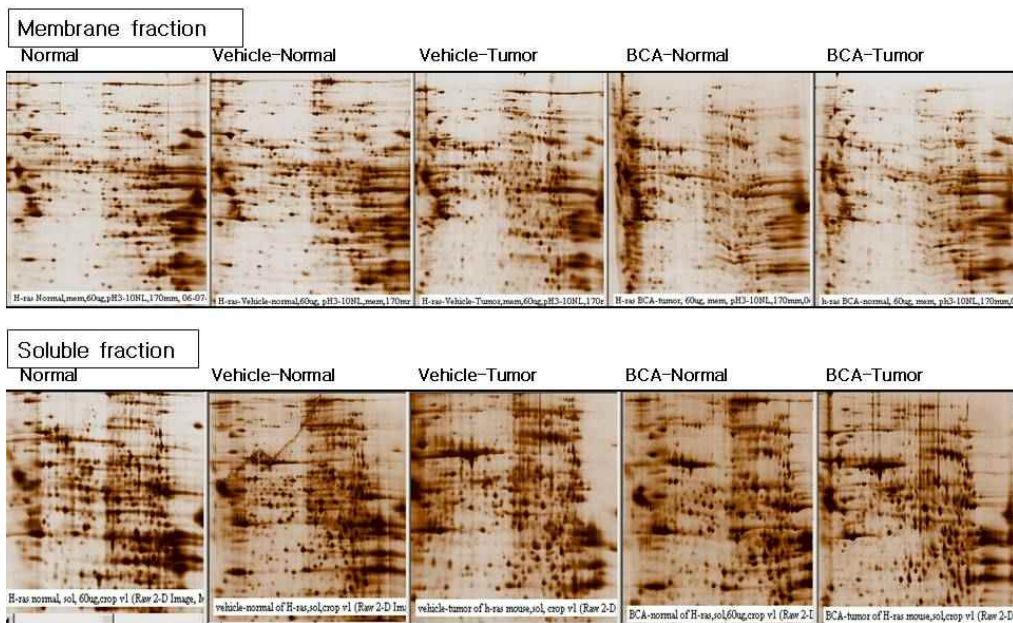
추출된 펩타이드를 SpeedVac concentrator에 넣어 완전히 말린 후, C18 resin이 들어있는 Zip-Tip (millipore Corp.)을 이용하여 추출된 펩타이드를 정제하여 완전히 건조시켰다.

Matrix (40 mg/ml -cyano-4-hydroxycinnamic acid)를 1% TFA가 첨가된 50% acetonitrile 용액에 녹여 정제된 펩타이드 추출물을 혼합하여 Sample loading plate에 loading하여 말렸다. 말린 sample은 5ml의 5% formic acid와 5ml의 D.W로 각각 10초 간 번갈아 세척하였고 말린 다음 Voyager-DE STR MALDI-TOF mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, NA, USA)로 분석하였다. 질량 분석기는 accelerating voltage, 20 kV; grid voltage, 76%; guide wire voltage, 0.01%; a delay of 220 ns로 setting한 reflector ttd와 positive ion ttd에서 작동하였다. 최초 질량 값은 500 m/z로 사용 하였고 질량 값 측정 후에 MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm>)를 이용하여 단백질을 동정하였다. search parameter로는 다음과 같은 것을 적용하였다: SWISS-PROT과 NCBI를 protein sequence database로서 사용하였다 mass tolerance는 50 ppm 이하 이고 cysteine의 alkylation 과 N-terminal acetylation 그리고 N-terminal glutamine의 pyroGlu등의 변형이 고려되었다.

(8). 결과

① 이차원 전기영동 분석

H-ras 형질전환 쥐에 BCA를 처리한 후 얻은 간 조직의 Proteomics 분석은 형질전환을 일으키지 않은 쥐의 간조직, BCA를 처리하지 않은 H-ras 형질 전환 쥐 간의 정상부분과 암부분 조직, 그리고 BCA를 처리한 H-ras 형질 전환 쥐 간의 정상부분과 암부분 조직의 총 5가지 시료를 사용해 진행되었고 시료를 막단백질과 수용성 단백질로 분획하였다. 분획을 하는 이유는 gel 에 load할 수 있는 샘플양의 한계로 양이 적은 단백질은 대부분 다른 단백질과 함께 이동하여 염색되는 경우가 많아 이점을 어느정도 보완하기 위해서이다. 분획한 후에는 pH 3-10 범위의 strip으로 10% 2DE gel을 걸어 분석을 수행하였다. 이차원 전기영동 결과 얻어진 gel은 densitometer를 이용하여 gel 이미지를 디지털화 하였다. 그림에서 볼 수 있는 것과 같이 gel 전반에 걸쳐 단백질 spot들이 잘 분포하고 있으며, 가장 넓은 pI 범위의 단백질을 포함하고 있다. 그러나 pI 쪽 spot의 모양이 끌리는 모양을 하고 있음은, 준비된 이차원 전기영동용 단백질 샘플이 조직 시료이므로 조직의 혈액 같은 방해물질이 포함되어 있어 동물 세포주를 이용할 때보다는 시료가 덜 깨끗한 상태였음을 알 수 있었다.



<그림 2> BCA를 처리한 H-ras 형질전환 쥐의 간조직 2-DE gel 이미지

단백질 분석에서 vehicle이나 BCA 처리한 간조직과 wild type 사이에서 2배이상 발현 수준이 달라지는 98개 단백질을 동정하였다. 대부분의 동정된 단백질은 생물학적 기

준으로 분류할 때 아미노산 대사, 면역과 방어, 전자전달, 단백질 대사와 변형, 신호전달과 수송 등에 관여하는 단백질이었다.

<표 1> BCA 처리에 의해 발현이 변하는 단백질

BCA-tumor에서 증가 (vehicle-tumor에서 감소) sol. frac	BCA-tumor에서 증가 (vehicle-tumor에서 감소) mem. frac
<ul style="list-style-type: none"> - semaphorin IV isoform b, - Atp5b protein, - Protein disulfide-isomerase A6 precursor - heat shock 70 protein, murine valosin-containing protein, - Heat shock protein 4, dopamine receptor regulating factor - Albumin 1 - Formiminotransferase cyclodeaminase - Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1 - cysteine sulfinic acid decarboxylase - Formiminotransferase cyclodeaminase - Arginase 1 - aldehyde reductase, - Betaine--homocysteine - S-methyltransferase - Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 	<ul style="list-style-type: none"> - 78 kDa glucose-regulated protein - Laminin receptor 1, Calreticulin, Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide - Regucalcin, Pyp, gamma-actin, brain and kidney proline oxidase 2 - sulfite oxidase - eIF-3 beta - Tumor rejection antigen gp96 - vacuolar adenosine triphosphatase subunit A - ribosome binding protein 1 isoform 4 - similar to LINE-1 reverse transcriptase homolog - major vault protein, Lactamase, beta 2 - Protein disulfide isomerase associated 3 - 20S proteasome subunit C2 - sterol carrier protein 2 - Sorbitol dehydrogenase - Aldehyde dehydrogenase 1 family member B1 - Glutamate dehydrogenase 1 - Glutamine synthetase - Betaine-homocysteine methyltransferase - 3-ketoacyl-CoA thiolase B, Aco2

BCA-tumor에서 감소(vehicle-tumor에서 증가) sol. frac	BCA-tumor에서 감소(vehicle-tumor에서 증가) mem.frac
<ul style="list-style-type: none"> - similar to tubulin, beta, 2 - Beta crystallin B1 - similar to PTPRF interacting protein - binding protein 1 - eIF2C 1 - Adenosylhomocysteinase - Car1 protein - Transferrin - Dimethylglycine dehydrogenase - sarcolemma associated protein - Aldh2 protein - Aak1 protein, transketolase 	<ul style="list-style-type: none"> - Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha - murine valosin-containing protein - BiP - p66 mot1 - H2-Ke6 protein - ornithine--oxo-acid aminotransferase - Albumin 1 - Krt2-8 protein - dihydrolipoamide S-succinyltransferase - enoyl coenzyme A hydratase 1 - peroxisomal - Aldh7a1 protein - monocyte to macrophag differentiation-associated - Dihydrolipoamide branched chain transacylase E2, Aldh2 protein - Cps1 protein - Fumarylacetoacetate hydrolase - Acyl-Coenzyme A dehydrogenase - Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide - carbonic anhydrase3,3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 - Dimethylglycine dehydrogenase, precursor - Echs1 protein, 3-hydroxybutyrate dehydrogenase - Hadhsc protein, Glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase - 3-ketoacyl-CoA thiolase - 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 - Aldh6a1 protein - 4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1

<표 2> 암조직과 정상조직 사이에서 발현이 변하는 단백질

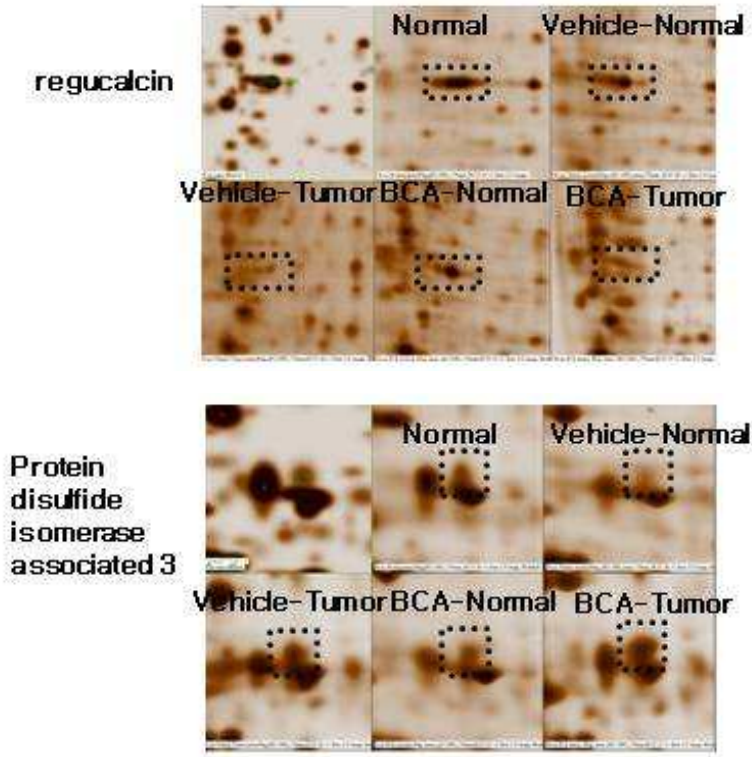
Normal에서 증가	Non-tumor에서 증가 (Normal Tumor)	Tumor에서 증가
<ul style="list-style-type: none"> - Pdhb - regucalcin 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase - Acly protein - Aak1 	<ul style="list-style-type: none"> - Aldehyde dehydrogenase 1 - ornithine-oxo-acid aminotransferase - carbonic anhydrase 3 - hadhsc - eukaryotic translation elongation factor 1alpha1 	<ul style="list-style-type: none"> - Transferrin, protein disulfide isomerase associated 3
Normal에서 감소	Non-tumor에서 감소 (Normal Tumor)	Tumor에서 감소
<ul style="list-style-type: none"> - sorbitol dehydrogenase - Phospholipid transfer protein precursor - Thiopurine S-methyltransferase 	<ul style="list-style-type: none"> - P38-2G4, ribosome binding protein 1 isoform 4 - Annexin A5 -10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase 	<ul style="list-style-type: none"> - sulfite oxidase - glutaryl CoA dehydrogenase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coA synthase2 - glutamate synthetase, rginase1 - Lactamase - regucalcin - Epoxide hydrolase

그리고 3개의 효소단백질이 ROS metabolism에 관여하거나 세포에서 redox 균형을 유지시키는 단백질이 변화되는 것으로 발견되었다 이 단백질 중 GCLM은 GCL modifier subunit이고 포유동물 세포에서 ROS와 Thiol의 수준을 감소시키는 GSH 합성을 이끄는 단백질이다. ROS 수준이 올라가면 미토콘드리아 transmembrane potential이 감소되어 cytochrome C가 방출됨을 통해 세포사멸이 유도된다.

이 실험 결과로 암 조직에서 GCLM의 발현이 증가됨으로 ROS의 감소가 예상된다. ROS 관련 효소의 발현 변화는 H-ras 형질전환과 관련하여 발생한 과도한 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있는 세포내 항산화능이 증가되었다고 볼 수 있다.

H-ras 형질전환 쥐의 암조직에서 해당과정에 관여하는 단백질인 transketolase와

ketohexokinase가 증가되었다. 게다가 암유도인자를 무독화시키는 단백질인, epoxide hydrolase와 항암 단백질인 selenium binding protein 1과 2가 암세포에서 감소하였다. 우리의 결과는 H-Ras 암유도 유전자가 glycolysis 촉진을 야기시킨다.



<그림3> BCA 처리한 H-ras 형질전환 쥐의 주요 단백질의 발현 변화

그리고 H-ras 형질전환이 해당작용과 산화적 대사에 주된 효과를 가진다. semaphorin 4b는 면역반응과 기관 형성에서 중요한 역할을 하는 조절자로 알려져 있다. sema4b는 VEGF-mediated Rac activation과 integrin 독립적인 세포 부착을 억제한다. 그러므로 sema4b는 angiogenesis를 억제한다. 여기서 우리는 semaphorin 4b가 BCA를 처리한 H-ras 형질 전환 쥐의 간 조직에서 감소되는 것을 발견했다. 그리고 gp96, GRP78, CBP-140, protein disulfide isomerase associated 3와 heat shock protein 70-4 같은 heat shock protein이 BCA를 처리한 H-ras 형질전환 쥐에서 증가하였다. 이런 단백질 중에 tumor rejection antigen gp96은 chaperone기능을 가지고 있고 항원을 가진 세포를 활성화 시킨다. gp96의 과발현은 암세포 성장을 심각할 정도로 지연시키는 능력을 유도한다. Anderson의 이전 연구에서 TRAIL 유도 세포사멸은 heat shock protein 70의 발현에 의해 향상된다는 보고가 있었다.

(9). 결론

이 프로테오믹스 실험을 통해 우리는 vehicle과 BCA를 처리한 H-ras 형질전환 쥐의 간 조직에서 발현이 변하는 단백질을 찾았다.

우선 H-ras 종양 유도 유전자에 의해 해당작용이 자극되고 항산화 능력이 증가 되었다. 해당작용에 관여하는 단백질로 transketolase, aldolase 2, B isomerase, ketohexokinase이다. transketolase와 ketohexokinase 단백질을 암조직과 비교하여 암조직에서 공통적으로 증가되었다. 그리고 ROS에 관련된 단백질로 GCLM, sulfite oxidase와 epoxide hydrolase이다. GCLM은 암 조직에서 증가되었고 sulfite oxidase와 epoxide hydrolase는 암 조직에서 감소되었다.

두 번째로 BCA는 세포사멸을 유도하고 angiogenesis를 억제하였다. gp96, GRP78, CBP-140, protein disulfide isomerase associated 3 그리고 heat shock protein 70-4가 BCA를 처리한 H-ras 형질 전환 쥐에서 공통적으로 증가되었다. 그리고 신생혈관 형성을 억제하는 단백질인 semaphorin 4b는 BCA를 처리한 H-Ras 형질전환 쥐 조직에서 감소되었다.

비교 프로테오믹스를 사용하여 우리는 BCA가 H-Ras 형질전환 쥐의 암조직에서 세포사멸을 일으키고 H-ras 암유도 유전자에 의해 암형성이 유도되는 것을 논의 하였다. 이 실험을 통해 찾은 단백질은 BCA에 의한 항암효과와 H-ras 신호 전달 경로에서 분자생물학적 매커니즘을 설명하는 일부분으로 생각된다. 이 연구에서 유전적으로 제한된 종양 모델을 통한 프로테오믹스 분석은 종양 유전자와 관련된 세포내 목표 단백질을 체계적으로 동정할 수 있게 하고 항암제로써 찾아진 BCA 같은 후부물질의 분자생물학적 메커니즘을 지원해줄 수 있는 강력한 실험수단으로써 생각된다.

제 8 절 CB-Ph의 전임상 자료 및 임상 계획

I. 전임상 요약서

- 본 연구는 2'-benzoyloxy-cinnamaldehyde (CB-Ph)를 이용한 천연물 유래 항암제 개발을 위하여 자생식물사업단의 지원으로 1, 2단계로 나누어 전임상 연구를 완료하였다.

- 1단계 전임상 (2007년 9월 - 2008년 3월)

○ 연구목표

- 계피에서 분리한 2'-hydroxycinnamaldehyde의 유도체인 2'-benzoyloxy-cinnamaldehyde (CB-Ph)를 이용한 천연물 유래 항암제개발
- 80%의 전임상이 완료된 CB-Ph의 약동력학을 포함한 전임상 완료

○ 연구내용

- In vitro ADME profiling
- In vivo PK study (mouse, rat, dog)
- Human PK prediction
- 설치류 단회 독성
- 화합물의 물성 측정

- 2단계 (2008년 8월 - 2009년 1월)

○ 연구목표

- 반복 독성 및 독성동태 연구 등을 통한 CB-Ph의 전임상 완료

○ 연구내용

- 비설치류 4주 반복 독성 및 독성동태
- 설치류 4주 반복 독성 및 독성동태
- 설치류에서의 ADME
- 생산공정 확립

II. 임상 1상 과제 요약서

○ 연구 목표 및 목적

- 계피에서 분리한 2'-hydroxycinnamaldehyde의 유도체인 2'-benzoyloxy-cinnamaldehyde (CB-Ph)를 이용한 천연물 유래 항암제개발
- 고형암 환자를 대상으로 임상 1상 수행
- 이 시험은 표준치료에 저항성을 보이는 진행성 고형암 환자에서 CB-Ph의 안전성과 내약성을 평가하고, 단회 및 반복 투여 후 약물의 pharmacokinetics와 독성을 확인하기 위한 제 1상, 공개, 단일기관, 용량 증가 임상시험

○ 연구내용

- 표준 치료에 실패한 진행성 고형암 환자에서 벤조일옥시시남알데하이드 (2'-benzoyloxy-cinnamaldehyde, CB-Ph)의 안전성 및 약동학 평가를 위한 제1상 임상시험 (A phase I clinical trial to determine safety and pharmacokinetics of 2'-benzoyloxy-cinnamaldehyde, CB-Ph) in patients with refractory advanced solid tumors)
- 용량을 500 mg/day, 1,000 mg/day, 1,600 mg/day, 2,400 mg/day 등으로 용량 증가 시험을 실시함
- 고형암 환자를 대상으로 국립암센터에서 임상 1상 수행
- 서울아산병원 임상약리팀에서 환자유래 시료 분석 및 해석
- 근화 제약과 다산 메디캠에서 임상시험용 화합물 생산 및 약물 공급
- 인체에서의 약동력학 검증 및 독성 관찰
- 혈액, 뇨 등의 분석
- 환자의 약물에 대한 효능을 검증하기 위한 검사 (CT 등)

○ 연구개발에 따른 기대성과

- 계피유래 물질 CB-Ph의 임상 시험을 통하여 식용 자원 유래 항암제 개발
- 임상 1상에서 긍정적인 결과를 얻을 경우 임상 2상 진입 및 새로운 제형을 통한 항암효과 검증에 활용
- 임상 2상 이후 기존 약물과의 병용 투여에 의한 항암효과 검증

III. 전임상시험자 자료집

1. 서론

- 미국 국립암연구소가 시행한 최근의 조사에 따르면, 전세계적으로 1981-2007년 사이에 도입된 의약품 저분자 신규 화합물 중에서 60%가 천연물과 관련이 있다고 보고하고 있다. 이는 천연자원 유래 물질들이 신약으로 개발되는 확률이 매우 높음을 말해주고 있는 것이다.

- 계피 (*Cinnamomum cassia* Blume)는 예로부터 소화 불량, 위염, 혈액 순환 장애, 염증 등을 치료하기 위해 사용되어 왔고, 계피의 주요성분인 신남알데하이드에 대한 다양한 생리활성이 보고되었다. 그 중에서도 최근에 발표된 신남알데하이드에 의한 돌연변이 억제활성 및 항균작용과 계피 추출에 의한 혈당강하 효과는 매우 흥미로운 것이다. 2-하이드록시신남알데하이드 (CB-OH)는 계피에 0.002% 미량으로 함유되어 있으며, 본 연구 팀에 의해서 처음으로 계피로부터 분리되었다. 이 화합물이 다양한 인체 암세포주의 성장을 억제함을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 확인하였다. 비글견을 대상으로 한 독성 시험에서 아스피린과 같이 위점막 자극이 발견되어 하드록시 그룹을 벤조일과 결합시켜서 벤조일옥시신남알데하이드(CB-Ph)를 합성하였으며, 예상한 것과 같이 위점막 자극이 없었고 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 항암효과는 계피에서 분리한 2-하이드록시신남알데하이드 (CB-OH)와 유사함을 확인하였다.

- CB-Ph는 암 세포주에서 다양한 활성 기전을 보여주고 있으며, 대표적인 것이 암 세포의 세포사멸을 유도한다는 것이다. 다양한 실험을 통하여 CB-Ph는 세포주기를 G2/M에 억제시키고 활성산소를 발생시켜서 세포사멸을 유도함을 알 수 있었다. 특히 라스 발암유전자를 과발현시킨 유전자 변형 동물 모델에서 활성 산소의 기능을 억제하는 다양한 단백질들의 발현을 억제하여 항암활성을 극대화 하고 있음을 확인하였다. 그리고 라스 발암유전자를 과발현시킨 유전자 변형 동물 모

델에서 암화 과정을 억제시킴을 확인함으로써 CB-Ph는 암의 예방제로서의 개발 가능성도 확인하였다.

- 쥐와 토끼를 대상으로 한 중추신경, 소화기계, 순환기계 등의 일반 약리 실험에서 특이한 현상은 발견되지 않았으며, 흥미 있는 것은 약하지만 진통효과가 있음이 확인되었다.
- 랫드를 대상으로 한 단회 및 반복 독성 시험에서 1,000mg/kg까지 사망한 동물은 없었으며, 혈액학적 소견에서 특이한 독성을 관찰되지 않았다. 비글견을 대상으로 한 독성 시험에서도 경미한 설사 및 연변 등이 관찰되었으나 사망 동물은 없었으며, 혈액학적 소견에서도 270mg/kg를 경구로 투여 했을 때에 특이한 독성은 관찰되지 않았다. 약동력학 실험에서 CB-Ph는 매우 빠르게 CB-OH로 변화됨을 확인하였으며, CB-OH는 혈액내의 효소에 의해서 2-하이드록시시남산 (CB-OH acid)으로 산화됨을 확인하였다.
- 현재 생약 또는 식품으로부터 분리된 항암활성 물질들이 암 세포주에서 활성 산소를 발생 시켜서 암 세포의 세포사멸을 유도한다는 연구 결과들이 발표되고 있고, 최근에는 미국 FDA에서 승인되어 임상에 사용되고 있는 약물(SAHA)이 이와 같은 기전을 통하여 암 세포의 성장을 억제한다는 연구 결과도 있다. 암 세포내에서 활성 산소를 유발하여 세포의 사멸을 유도하는 약물의 개발은 항암제 개발에 있어서 새로운 도전이라 할 수 있다.

가. 천연물 유래 신약

- "만일 의약 개발을 어디서 출발할지 모르겠다면, 자연은 좋은 시발점이 될 것이다. 자연이 당신이 원하는 것과 비슷한 구조를 아직 보여주지 않을 수도 있고, 설사 그 화합물이 식물이나 곰팡이의 정신분열증을 치료하는 것이 아닐지라도 말이다"라고 Caporale은 말한다.
- 수십 년간, 천연물은 의약과 의약선도물질의 보물창고였다. 미국 국립암연구소의 David J. Newman, Gordon M. Cragg 그리고 Kenneth M. Snader 등이 시행한 최근의 조사에 따르면, 전세계적으로 1981-2006년 사이에 도입된 의약용 저분자 신규 화합물중에서 60%가 천연물과 관련이 있다고 한다. 이 중에는 천연물(6%), 천연물 유도체 (27%), 천연물 작용기(pharmacophore)에 근거한 합성화합물 (5%), 그리고 천연물에서 얻은 정보를 바탕으로 설계된 합성물 (즉, 천연물 모사체

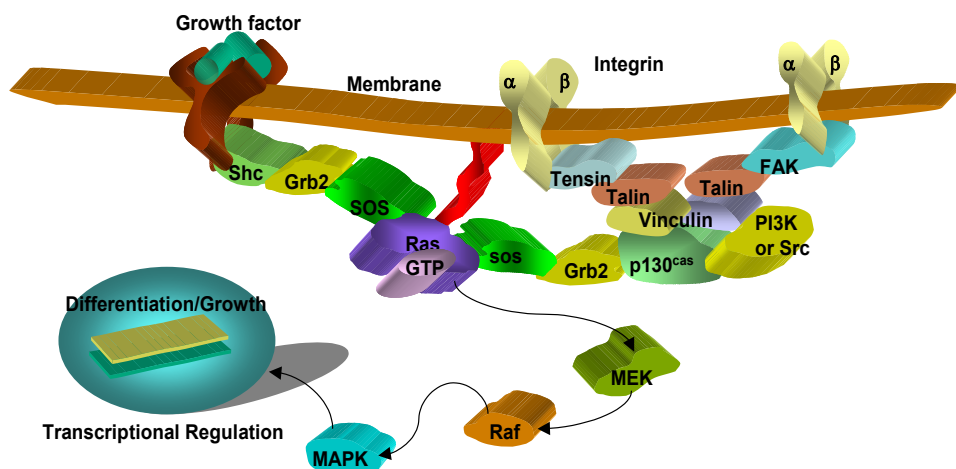
mimic; 23%)이 들어 있다. 최근에 천연물 유래 신약의 숫자가 줄어들고는 있지만 유전체 분석 및 응용 기술의 발전으로 향후 또다시 신약개발의 중요한 자원으로 부가될 가능성이 매우 높다.

- 어떤 치료제 분야에서는 천연물의 생산성이 좀더 높는데, 항 감염제의 78% 그리고 항암제의 74%는 천연물이거나 유도체가거나 천연물 기반의 물질이다. 천연물이 자기 방어를 위해 발전 진화되었다고 가정한다면 항 감염제와 항암제에 있어서 이러한 수치는 그리 놀랄만한 것도 아니다. 그러나 천연물은 콜레스테롤 조절이나, 당뇨, 염증, 우울증과 같은 자기 방어와는 관련이 없어 보이는 치료제 분야에서조차도 뚜렷한 영향력이 있다. 그러므로 식물자원으로부터의 생리활성물질 분리 이를 이용한 식품 또는 천연물 의약품의 개발은 인류의 삶의 질 향상에 크게 공헌할 것이다.

나. 항암제

- 암이란 ? 개체의 필요에 따라 규칙적이고 절제 있는 증식과 억제할 수 있는 정상 세포와는 달리 세포 내에 있는 조절기능이 상실되어 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성된 종괴 또는 종양을 형성하고, 궁극적으로는 주위의 정상 조직 또는 기관으로 침윤하여 파괴시키고 새로운 성장 장소를 만들 수 있어 개체의 생명을 빼앗아 갈 수 있는 질환 군을 총칭한다.
- 발암유전자 (Oncogene) 란? 세포성장과 분화에 중추적 역할을 하는 유전자 중에서 특정 위치의 변이에 의해서 세포를 변형시킬 수 있는 유전자를 말하며 정상 세포의 성장에도 중요한 역할을 한다. 즉, 정상세포의 성장과 분화에도 필요한 발암유전자가 어떠한 환경적 또는 유전적 영향에 의해서 변이 (point mutation, chromosome translocation, rearrangement, amplification 등)라는 과정을 거쳐 무절제한 세포의 성장을 일으키게 된다. 정상세포가 변하여 암세포가 되기 때문에 이 과정의 기전을 정확히 이해하는 것이 바로 암 정복의 중요 열쇠인 것이다. 본 연구팀에서는 다양한 발암유전자 (*erbB*, PDGF, RET, *ras*, *myc*, Bcl, MDM2 등) 중에서 라스 발암유전자 (*ras* oncogene)을 표적으로 하여 천연자원을 대상으로 암 치료용 활성물질을 탐색하였다.
- 라스 발암유전자는 암 조직 (인체 암의 30-50%에서 발견)이나 형질 전환된 사람의 세포에서 거의 공통적으로 발견되는 발암유전자이며, 특히, 췌장암(90%), 직장암(50%), 폐암(50%) 등에서 높은 빈도로 관찰된다.

- 라스 발암유전자 (*ras* oncogen)의 산물인 라스 단백질은 그림에서 볼 수 있듯이 Raf-MAPK로 연결되는 신호전달 과정과 extracellular matrix (cell adhesion, invasion, angiogenesis) 등에 중요한 역할을 함)의 신호를 세포내부로 전달하는 integrin pathway와도 연결되어 있다. 즉, 외부 신호를 세포 핵 내로 전달하며 궁극적으로 비정상적인 세포성장 및 암전이 등을 유발한다.
- 라스 발암유전자 (H-, K-, N-*ras*)들 중에서 K-*ras*는 발암과, H-*ras*는 암세포의 성장 과 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌다. 이와 같이 세포내 신호전달에 중요한 역할을 하는 Ras 단백질이 활성화되기 위해서는 카르복시 말단에 파네실그룹이 결합하여야 하며, 이 단계에 관여하는 효소가 파네실 전달 효소 (farnesyl transferase)이다. 이 효소를 효과적으로 저해할 수 있다면 새로운 항암제의 개발이 가능 할 것이다.



다. 화합물의 발견

- 파네실 전달 효소 저해활성을 가지고 있는 천연자원을 탐색하는 과정에서 계피 추출물이 효과적으로 이 효소의 활성을 저해함을 확인하고 활성물질인 2-하이드록시 신남알데하이드 (2-hydroxycinnamaldehyde; CB-OH)를 처음으로 식용자원인 계피에서 분리하고 보고하였다.

라. 2-하이드록시신남알데하이드 (CB-OH)의 유래

- 계피 (*Cinnamomum cassia* Blume)는 녹나무과 (Lauraceae)의 열대성 식물로서, 중국과 베트남 지역이 주산지이다. 실론계피 (*C. zeylanicum* Ness), 자바계피 (*C.*

burmanni Bume), 일본계피 (*C. sieboldii* Ness)등이 동속식물에 속하며 채집부위, 산지, 종류에 따라 함유성분에 다소 차이가 있다. 예로부터 소화 불량, 위염, 혈액 순환 장애, 염증 등을 치료하기 위해 동양에서 많이 사용되어 왔다. 전세계적으로 계피는 향미 식품으로 오래 전부터 사용하고 있다. 계피의 주성분은 계피유라고 하는 정유 (essential oil)로 신남알데하이드, 캄펜(camphene), 유젠올(eugenol) 등으로 구성되어 있다.

- 이들 성분은 혈액순환 촉진, 소화 흡수 촉진, 방부효과를 나타내며, 계피의 신남알데하이드는 지속적인 말초 혈관 확장 작용(혈압강하) 및 혈소판 응집 억제 작용을 하며 기타 발한작용, 진토작용 등도 있다. 최근의 연구에서는 신남알데하이드에 의한 돌연변이 억제활성, 항균작용, 계피 추출에 의한 혈당강하 효과가 보고되었다. 2-하이드록시신남알데하이드 (CB-OH)는 계피에 0.002% 미량으로 함유되어 있으며, 본 연구 팀에 의해서 처음으로 계피로부터 분리되었다.

마. 2 - 벤조일 옥시신남알데하이드 (CB-Ph)의 유래

- 2-하이드록시신남알데하이드 (CB-OH)는 라스 단백질의 활성화에 필수적인 파네실 전달 효소의 활성을 저해하였으며, 수정란을 이용한 실험에서 신생 혈관 형성을 저해하는 효과를 보였다. 또한 유방암, 백혈병, 자궁암, 폐암, 및 대장암 등 29종류의 인간 암세포의 증식을 억제함을 확인하였다. 그러나 2-하이드록시신남알데하이드는 아스피린과 같이 하이드록시 그룹을 가지고 있어서 위장 점막을 자극하는 성질을 가지고 있음이 확인되어 이러한 이유로 하이드록시 그룹을 벤조일 옥시 그룹으로 치환하였다. 이 화합물을 2-벤조일옥시신남알데하이드 (2-benzoyloxycinnamaldehyde, CB-Ph)로 명명하였다.

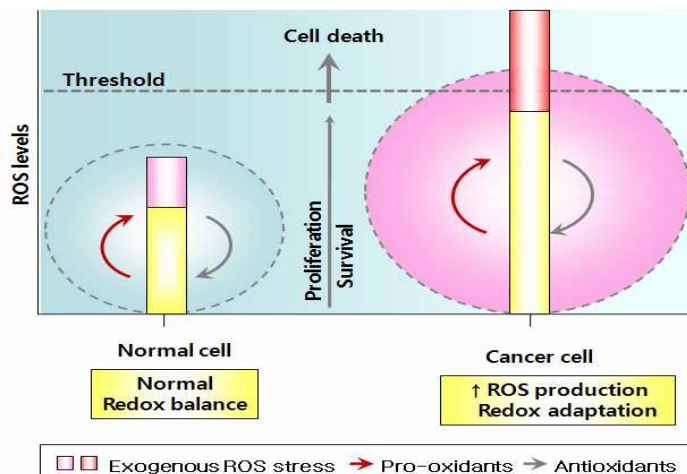
- 이 화합물을 대상으로 인체 암세포주 및 동물에서 항암활성을 검증한 결과 계피에서 분리한 2-하이드록시신남알데하이드와 유사한 항암효과를 가지고 있음을 확인하였다. 그리고 이 화합물은 비글견 (beagle dog) 단회 독성시험에서도 위 점막 자극효과가 없음을 확인하였다.

라. 활성 산소를 표적으로 하는 항암제

- 항암제 개발은 우수한 치료활성 뿐만 아니라 종양 특이적 활성이 매우 중요한 요소이다. 정상세포와 종양세포의 유전적 차이를 이용하여 종양 특이적 항암제들이 많이 보고되고 있다. 글리벡 및 혈썩틴 등이 그 예다. 그러나 이러한 항암제들은 투여 후에 항암제에 저항성을 나타내는 암세포가 유도되는 문제점들이 보고되고

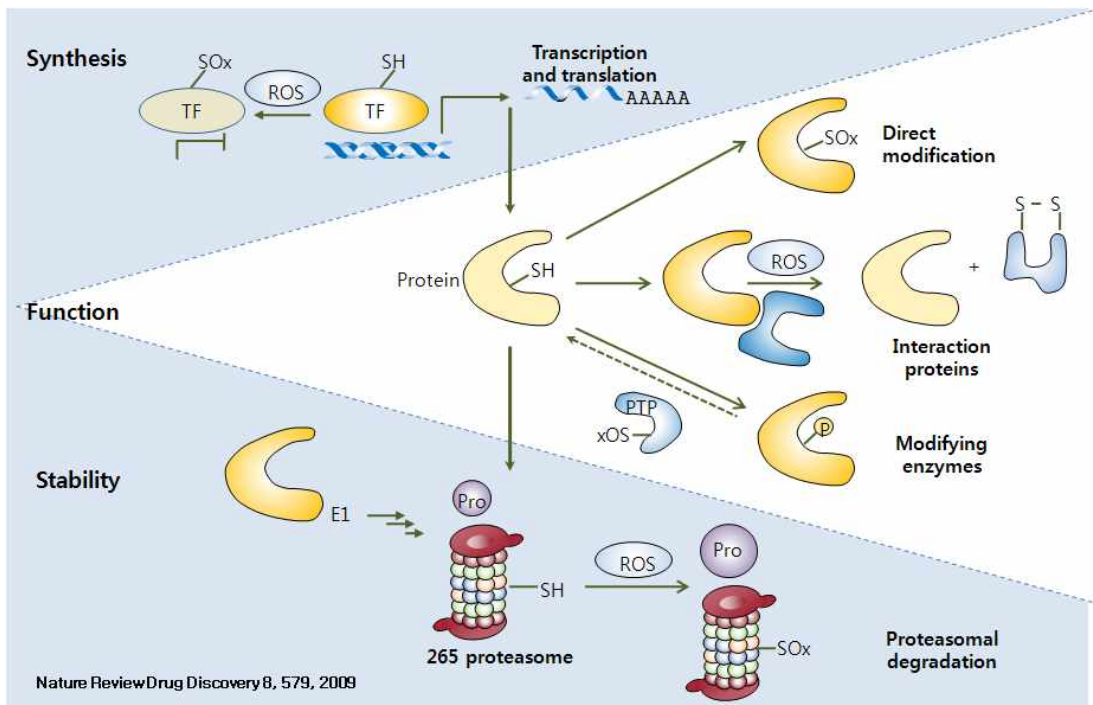
있다. 이러한 문제점들로 인해 여러 항암제들을 복합적으로 처방해야하는 단점이 있다. 따라서 최근에는 암세포의 생화학적 특이성을 표적으로 하는 치료법에 대한 접근법이 시도되고 있다.

- 활성산소는 세포 성장에 필수적인 신호물질이다. 적절한 수준의 활성산소는 세포의 증식 및 분화를 촉진한다. 따라서 적절한 활성산소의 항상성은 정상적인 생명 현상에 필수적인 요소이다. 그러나 과도한 활성산소는 지질, 단백질 및 핵산에 산화적 손상을 야기하여 세포사멸을 유도한다. 활성산소의 농도는 활성산소의 생성 및 제거반응에 의해 조절되며 활성산소의 제거에는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, peroxiredoxin, thioredoxin 등에 의해 이루어진다.
- 정상세포에 비해 종양세포는 활성산소(ROS) 생성이 증가되어 변형된 redox 상태를 갖고 있다. 증가된 활성산소는 초기에 암세포 성장을 촉진하고 암의 진행에 관여한다. 그러나 이러한 산화적 스트레스 특성은 암세포를 특이적으로 제어할 수 있는 수단을 제공할 수 있음을 의미한다. 특히 진행된 암의 경우 여러 돌연변이 유전자들이 갖고 있고 높은 활성산소에 의한 산화 스트레스에 노출되어 있다. 그러므로 이러한 종양세포에 활성산소를 유도하는 항암제를 처리함으로써 추가적인 활성산소를 세포내에서 유도 생성하게 함으로써 암세포의 사멸을 유도할 수 있다. 최근에 활성산소의 생성을 촉진하는 항암제 개발을 위한 임상 시험연구들이 보고되고 있다.
- 아래 그림에서 볼 수 있듯이 활성 산소의 양이 임계점을 지나게 되면 세포의 사멸을 유도하게 된다는 데에 착안하여 암세포에서 특이적으로 활성 산소를 유도하는 물질들에 대한 관심이 증대되고 있다.



- 활성 산소는 다음 그림에서 볼 수 있듯이 다양한 기전으로 단백질들의 기능을 조절하게 된다. 단백질의 발현, 전사 후 번역과정, 단백질의 안정성의 조절 등이 그것이다. 단백질의 생산 단계에는 nuclear factor- κ B (NF- κ B), AP-1, HIF-1 α , p53과 같은 전사 조절인자가 관여하고 이들 조절인자는 cysteine residues의 산화 환원 반응에 의해서 DNA와의 결합이 조절되므로 궁극적으로 활성산소는 단백질의 생산을 조절하게 된다.
- 세포 신호전달과정에 중요한 단백질인 TRX, RAS, Akt 등은 직접적으로 cysteine residues의 산화 환원 반응 영향을 받고 있고 특히 ASK1 - RX, JNK - ST, p53 - NK, Nrf2 - eap1 등의 단백질 상호 작용에는 cysteine residues의 산화 환원 반응이 매우 중요하다. 그리고 Post-translational modifications protein tyrosine phosphatases (PTP) 기능과 단백질 분해에 관여하는 ubiquitin-activating enzyme E, proteasome 26S의 활성도 ROS에 의해서 조절된다.

Regulation of protein functions through redox-mediated mechanisms



- 물론 암세포는 과도한 활성산소에 대응하기 위하여 항산화물질(antioxidant)의 발현을 증가시켜 항암제에 저항성을 갖게 된다. 따라서 활성산소의 제거하는 단계를 저해함으로써 과도한 산화스트레스를 유도할 수도 있고 이에 대한 항암제 개발 연구도 보고되고 있다.

- 다음 표는 관련된 임상 연구를 정리한 것이다.

ROS-modulating agents	Mechanism of action	Current status
<i>Exogenous ROS-generation agents</i>		
Motexafin gadolinium (gadolinium texaphyrin)	<ul style="list-style-type: none"> • Pro-oxidant catalyst that induces intracellular superoxide formation and inhibits TrxR, and preferentially accumulates in tumour cells 	<ul style="list-style-type: none"> • Phase III studies in combination with radiation therapy in brain metastases and chemotherapy in haematological malignancies
β -Lapachone (ARQ 501)	<ul style="list-style-type: none"> • Undergoes futile redox cycles catalysed by intracellular NQO1 	<ul style="list-style-type: none"> • Phase I/II studies in tumours overexpressing NQO1
<i>Inhibitors of the antioxidant system</i>		
Buthionine sulphoximine	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibits GSH synthesis • Enhances As2O3 activity 	<ul style="list-style-type: none"> • Phase I/II studies in combination with As2O3 or melphalan
Imexon	<ul style="list-style-type: none"> • Depletes the GSH pool by binding to thiols 	<ul style="list-style-type: none"> • Phase I/II studies as single agent of in combination with docetaxel and gemcitabine
Phenylethyl Isothiocyanate	<ul style="list-style-type: none"> • Conjugates and exports GSH outside cancer cells. • Inhibits GPx and NF-κB 	<ul style="list-style-type: none"> • Preclinical studies haematological malignancies
Mangafodipir	<ul style="list-style-type: none"> • SOD, catalase and GSH reductase mimetic-increases H2O2 levels in cancer cells but acts as antioxidant in normal cells 	<ul style="list-style-type: none"> • Phase II studies in combination with chemotherapy in liver cancer
2-methoxyestradiol	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibits SOD leading to superoxide accumulation • Inhibits tubulin polymerization 	<ul style="list-style-type: none"> • Phase II studies in prostate, ovary, brain and renal tumours
Tetrathiomolybdate (ATN-224)	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibits cytosolic SOD1 	<ul style="list-style-type: none"> • Phase II studies melanoma, myeloma, prostate and breast carcinoma
<i>Multiple mechanisms of action</i>		
As2O3	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibits GPx and TrxR • Inhibits the mitochondrial respiratory chain 	<ul style="list-style-type: none"> • Approved for the treatment of relapsing acute promyelocytic leukaemia
<i>Unknown mechanism of action</i>		
Elesclomol (STA-4783)	<ul style="list-style-type: none"> • Induces rapid ROS accumulation in cancer cells leading to apoptosis • Enhances paclitaxel activity 	<ul style="list-style-type: none"> • Preliminary evidence of activity in combination with paclitaxel in metastatic melanoma • Phase III study suspended

2. 비임상 시험성적에 관한자료

가. In vitro 항암활성

- 29 종의 인체암유래 암 세포에서 항암활성 검색한 결과 암세포의 성장을 억제시켰다.

Human tumor cell에서의 CB-OH, CB-Ph의 활성 (GI₅₀ microg/mL)

Organ	Cell line	CB-OH	CB-Ph	Adriamycin
Lung	A549	9.39	11.98	0.44
	NCI-H226	3.87	4.48	0.36
	NCI-H23	0.87	1.24	0.17
	NCI-H522	6.83	10.88	0.36
Renal	UO-31	1.15	3.95	0.20
	ACHN	1.13	1.78	0.31
	Caci-1	6.05	0.31	0.49
Colon	Colo205	8.26	7.70	0.19
	HCT15	3.03	3.75	0.84
	HT29	3.28	4.96	0.34
	HCT116	1.31	1.96	0.17
	KM12	2.92	2.41	0.30
	SW620	1.27	1.22	0.14
CNS	SF539	1.09	3.31	0.074
	SNB19	1.76	3.48	0.14
	SNB75	2.19	2.61	0.16
Melanoma	UACC62	0.91	1.80	0.11
	LOX-IMVI	1.19	1.86	0.25
	M14	1.89	1.70	0.059
	SK-MEL-2	2.34	3.56	0.41
Breast	MCF7	1.74	2.90	0.15
	MCF7/ADR	1.61	2.78	0.97
	MDA-MB-231	0.998	2.21	0.27
Leukemia	RPMI8226	1.33	1.87	0.63
	K562	2.96	2.96	0.42
	MOLT-4F	1.83	1.57	0.14
Ovary	SK-OV-3	1.67	8.92	0.13
	OVCAR-4	2.00	4.84	0.48
Prostate	PC-3	1.58	2.37	0.47

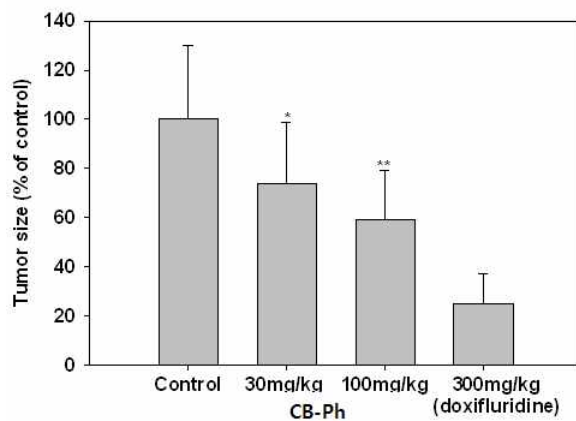
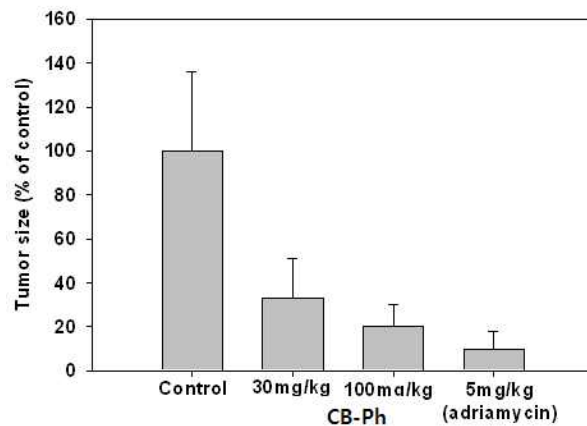
나. In vivo 항암활성

① 복강투여

- 대장암 세포(SW620)를 대상으로 한 항암효과 시험에서 30mg/kg에서 70%의 항암효과가 있음을 확인하였다.

- 복강 투여와 경구투여의 활성을 비교하면 복강 투여가 활성이 우수함을 확인하였다. 그러므로 항 후 약물의 전달 시스템을 개발하면 보다 우수한 항암제의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

- 복강 및 경구 투여 항암활성 (대장암세포 SW620 이식 nude mouse 실험)



② 경구투여

(가) 인체 대장암 세포 (SW620, HCT116) 이식 nude mouse에서 CB-PH의 경구투

여에 의한 항암효과

- SW620 및 HCT116 인체 대장암 세포에 대한 CB-Ph 시료의 경구 투여시 항암효능 평가를 nude mouse 이식시험법을 이용하여 평가함
- 시료는 0.5% tween80에 녹여서 투여했으며, 투여용량은 30, 100 및 300 mg/kg으로 하여 25일간 매일 경구 투여함
- 독성 정도를 알아보기 위해 26일 동안 nude mouse의 몸무게 변화를 관찰한 결과 계피유래 항암물질인 CB-Ph를 총 25회(SW620), 26회(HCT116) 경구경로로 매일 투여시 모든 용량군에서 체중의 감소는 관찰되지 않았다. 반면에 양성 대조물질인 doxifluridine (300mg/kg) 투여군에서는 최종일 결과를 보면 용매대조군에 비해 SW620 및 HCT116 이식마우스에서 각각 25.0% 및 11.1% 감소함
- 종양 크기 변화에서는 최종일 결과를 보면 SW620 이식 누드마우스에서 CB-PH 30, 100 mg/kg 투여군은 용매대조군에 비해 각각 25.7 (p<0.05), 41.1% (p<0.001)의 억제 효과가 나타났다. 또한 HCT116 이식 누드마우스에서 CB-Ph시료의 모든 투여군에서는 용매대조군에 비해 약한 종양성장억제가 관찰되었으나, 통계적으로 유의하지 않았다. 양성대조물질 doxifluridine (300mg/kg) 투여군에서는 73.5%의 성장억제가 관찰됨
- 최종일 부검을 실시하여 종양무게를 측정된 결과를 보면 SW620 이식 누드마우스에서 CB-Ph 100 mg/kg 투여군에서 용매대조군에 비해 41.3% (p<0.01)의 종양무게감소가 관찰되었으며, 양성대조물질 doxifluridine (300 mg/kg) 투여군에서는 71.2%(p<0.001)의 감소가 나타났다. HCT116 이식 누드마우스에서 CB-Ph시료의 모든 투여군에서는 용매대조군에 비해 유의성 있는 종양무게의 감소는 없었으며, 양성대조물질 doxifluridine (300mg/kg) 투여군에서는 82.4% (p<0.01)의 감소가 관찰됨

(나) 인체 전립선암 세포주 (PC-3) 이식 nude mouse에서 CB-Ph의 경구 투여에 의한 항암효과

- Pc-3 인체 전립선암 세포주에 대한 CB-PH시료의 경구 투여시 항암효능평가를 nude mouse 이식 시험법을 이용하여 평가함
- 시료는 0.5% tween 80에 녹여서 투여했으며, 투여용량은 30, 100 및 300 mg/kg

으로 하여 25일간 매일 경구 투여함

- 독성 정도를 알아보기 위해 17일 동안 nude mouse의 몸무게 변화를 관찰한 결과 용매대조군, CB-Ph의 모든 용량군 및 양성 대조물질인 doxifluridine (300 mg/kg) 투여군에서 첫째날과 비교하여 최종일에 모두 체중의 감소가 관찰되었던바, 이는 PC-3 tumor에서 나오는 악액질과 같은 toxic 한 성분에 기인한 것으로 사료되며, 용매대조군과 비교하여 약물 투여에 의한 체중감소는 관찰되지 않음
- 종양 크기 변화에서는 최종일 결과를 보면 PC-3이식 누드마우스에서 CB-Ph 100, 300 mg/kg 투여군은 용매대조군에 비해 각각 31.9 (p<0.05), 21.7% (p<0.05)의 종양성장억제가 관찰되었으며, 양성대조물질 doxifluridine (300 mg/kg) 투여군에서는 68.2% (p<0.001)의 억제가 나타남
- 최종일 부검을 실시하여 종양무게를 측정한 결과를 보면 PC-3이식 누드마우스에서 CB-Ph 시료의 모든 투여군에서 용매대조군에 비해 약한 종양무게감소가 관찰되었으나, 통계적으로 유의하지는 않았다. 양성대조물질 doxifluridine (300mg/kg) 투여군에서는 54.0% (p<0.001)의 감소가 나타남

(다) 인체폐암 세포주 (NCI-H23) 이식 nude mouse에서 CB-Ph의 경구투여에 의한 항암효과

- NCI-H23 인체 폐암 세포주에 대한 CB-Ph 시료의 경구 투여시 항암효능 평가를 nude mouse 이식 시험법을 이용하여 평가함
- 시료는 0.5% tween 80에 녹여서 투여했으며, 투여용량은 30, 100 및 300 mg/kg 으로 하여 28일간 매일 경구 투여함
- 독성 정도를 알아보기 위해 28일 동안 nude mouse의 몸무게 변화를 관찰한 결과 계피유래 항암물질인 CB-Ph를 총 27회 경구경로로 매일 투여시 모든 용량군에서 체중의 감소는 관찰되지 않았다. 반면에 양성 대조물질인 doxifluridine (300mg/kg) 투여군에서는 24일째 결과를 보면 용매 대조군에 비해 14.7%의 감소가 관찰되었으며, 25일째부터 27일까지 3일간 휴약 후 최종일(28일)결과를 보면 다시 정상으로 체중이 회복됨

- 종양 크기 변화에서는 최종일 결과를 보면 NCI-H23이식 누드마우스에서 CB-Ph 30, 100 및 300 mg/kg 투여군은 용매대조군에 비해 각각 57.7 (p<0.01), 49.7% (p<0.01) 및 43.4% (p<0.01)의 종양성장억제가 관찰되었으며, 양성대조물질 doxifluridine (300 mg/kg) 투여군에서는 99.9% (p<0.001)의 억제가 나타남
- 최종일 부검을 실시하여 종양무게를 측정한 결과를 보면 NCI-H23이식 누드마우스에서 CB-Ph 30, 100 및 300 mg/kg 투여군은 용매대조군에 비해 각각 54.8% (p<0.01), 37.6% 및 33.4%의 종양무게감소가 관찰되었으며, 양성대조물질 doxifluridine (300mg/kg) 투여군에서는 98.5% (p<0.001)의 억제가 나타남
- 대장암 세포 (SW620, HCT-116), 전립선암 세포(PC-3), 폐암 세포(NCI-H23)에 대한 효과를 확인하였으며, 이를 정리하면 다음과 같다 (%) (9).

시험항목	체중변화				종양성장억제 (크기변화)				
	세포주	SW620	HCT-116	PC-3	NCI-H23	SW620	HCT-116	PC-3	NCI-H23
Doxifluridine (300mg/kg)		-25.0	-11.1	-	-14.7	-75.0	-73.5	-68.2	-99.9
30 mg/kg		-	-	-	-	-25.7	-23.5	-28.3	-57.7
100 mg/kg		-	-	-	-	-41.1	-15.0	-31.9	-49.7
300 mg/kg		-	-	-	-	-9.4	-14.1	-21.7	-43.4

* 인체 전립선암, 인체 폐암 세포주에서 유의성 있음

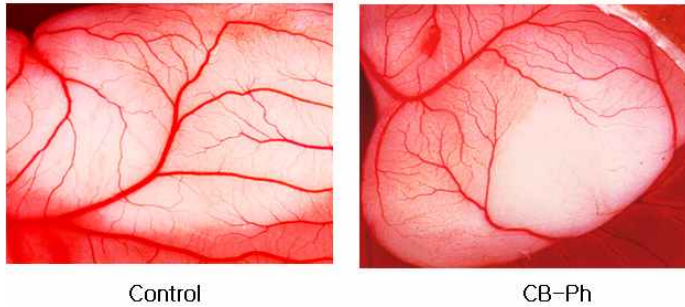
- 인체 폐암 세포주 (NCI-H460, NCI-H226, NCI-H23)에 대한 효과 (%)

시험항목	체중 변화			종양성장억제 (크기변화)			
	세포주	H460	H226	H23	H460	H226	H23
Doxifluridine (100mg/kg)		-3.2	-8.8	-1.2	-67.2	-51.5	-63.5
10 mg/kg		-	-	-			-26.8
30 mg/kg		-	-	-	-29.8	-41.5	-24.4
100 mg/kg		-	-	-	-54.9	-49.4	-46.3

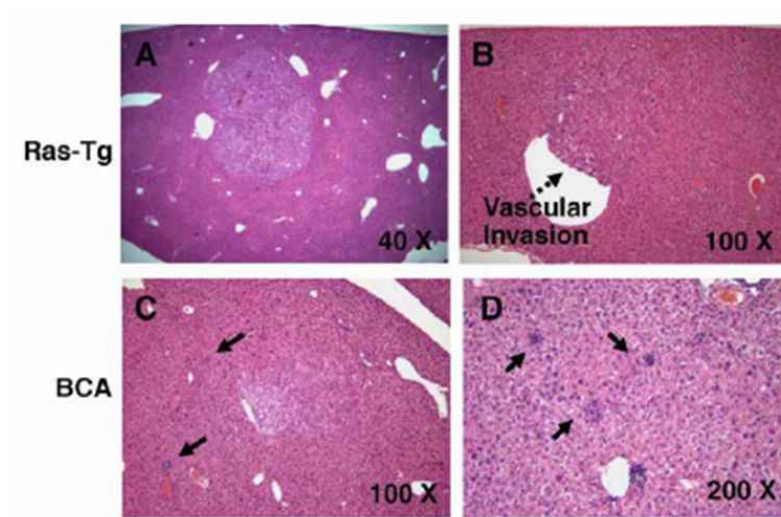
③ 기타 항암효과

- 수정란과 토끼실험에서 신생혈관 억제 효과 확인하였다.

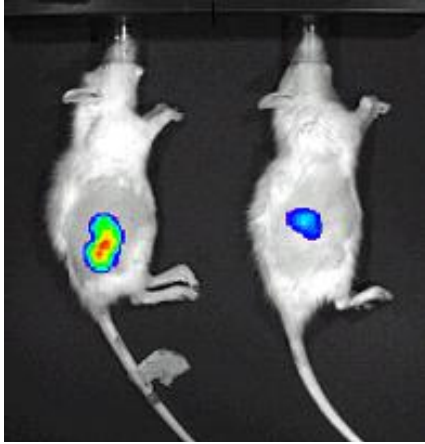
CAM Assay (Angiogenesis Inhibition)



- 라스가 과발현된 쥐 (H-ras transgenic mouse)에서 간암 형성을 억제함을 확인하였다 (12). 암 예방 가능성을 증명한 실험이다.



- 구강암세포 및 라스가 과발현된 쥐 (H-ras transgenic mouse)에서의 항암활성을 검증하였다.



H-Ras Tg

CB-Ph-treated



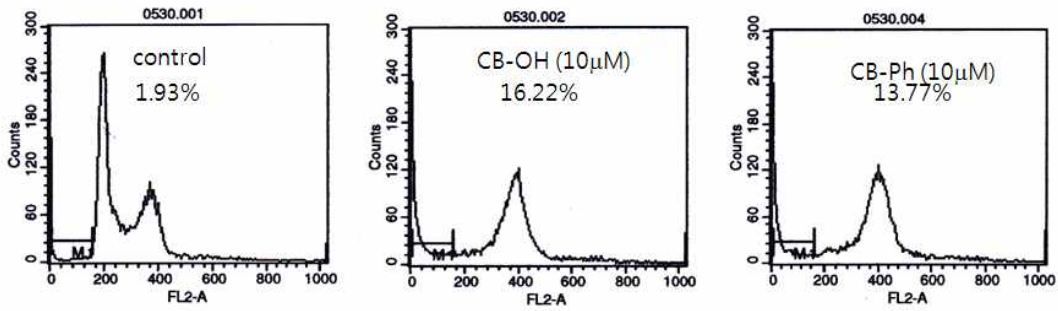
H-Ras-transgenic mouse에서의 효과

- CB-OH와 CB-Ph는 쥐를 이용한 실험에서 림프세포 증식을 억제하고 T-세포의 분화를 촉진하는 활성을 가지고 있어서 향후 항암제로의 유용성이 있을 것으로 판단된다.

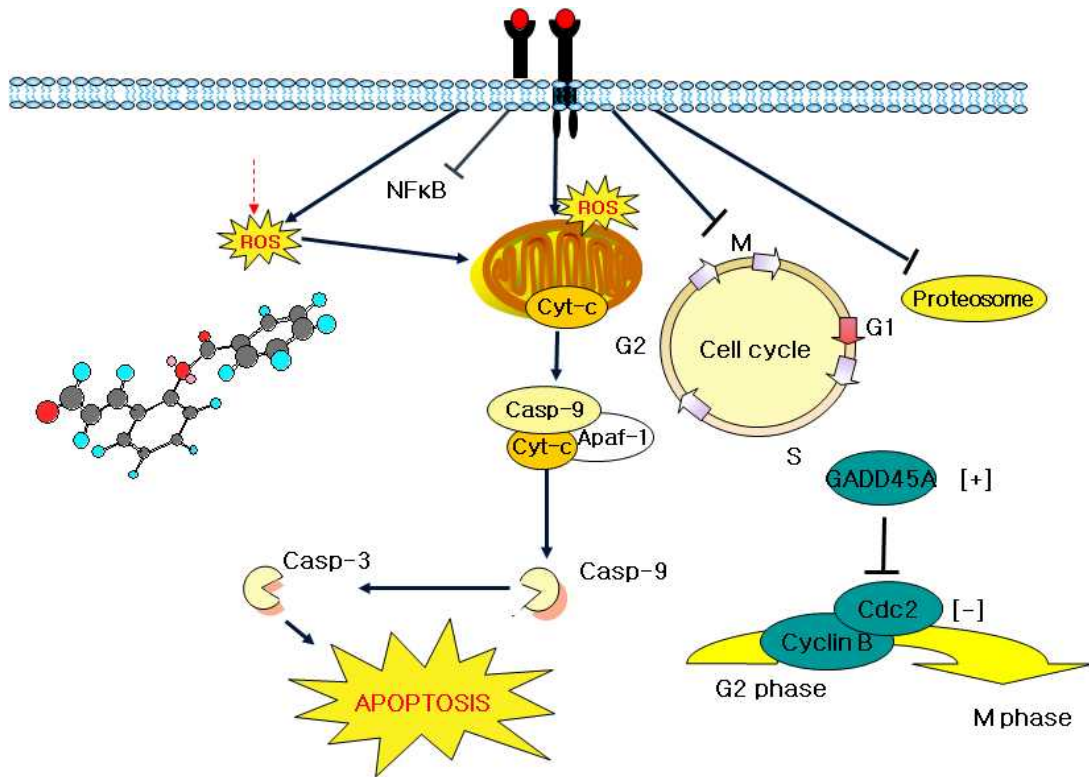
다. 항암효과 관련 분자생물학적 기전 규명

- 대장암 SW620, 유방암 MBA-MD-231, 폐암 NCI-H23 세포주에 CB-Ph를 처리하여 항암활성 기전을 규명 하였다.
- CB-OH와 CB-Ph는 암세포를 세포주기 G2/M 기에 억류하여 세포의 사멸을 유도함을 확인하였다.

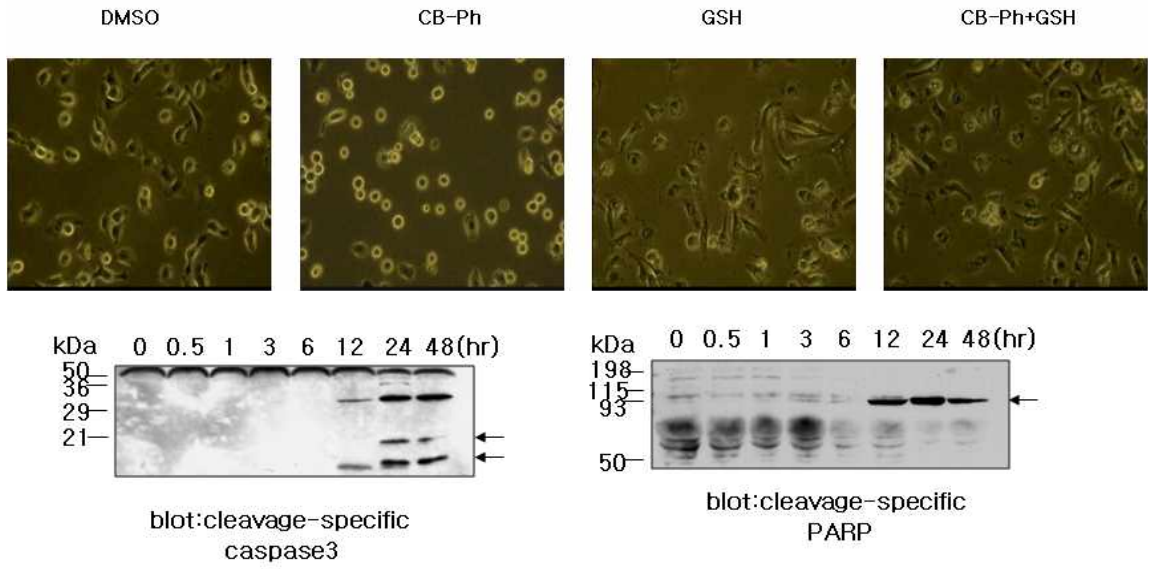
CB-PH는 암세포를 G2/M phase arrest



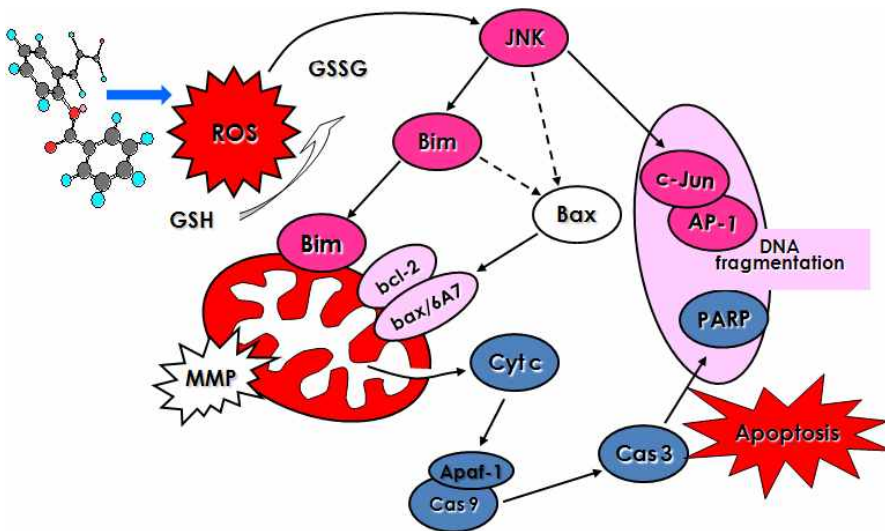
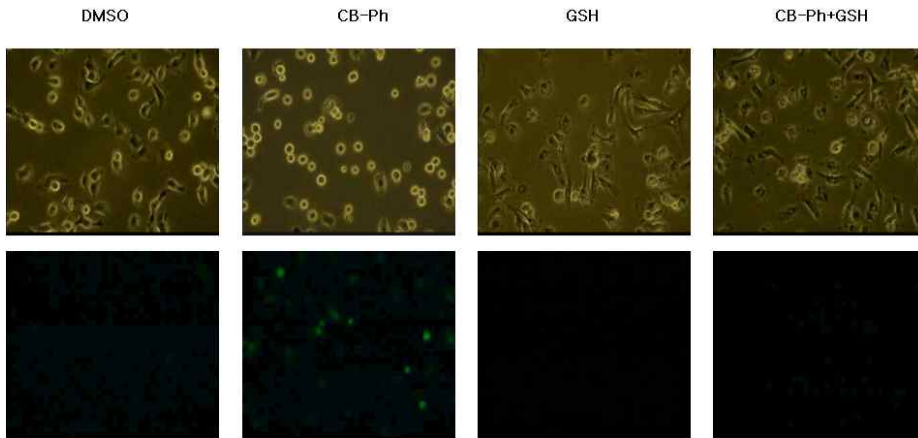
- CB-OH와 CB-Ph는 전사조절인자인 엔네프카파비의 활성 (NF-κB) 또는 프로티오솜 (proteasome)을 저해하여 세포사멸을 유도함을 확인하였다.



- CB-Ph는 암세포내에 활성 산소의 농도를 높여서 항암 활성을 보여주는 것으로 사료된다. 즉, 다음 그림에서 볼 수 있듯이 항산화제와 동시에 처리하면 세포의 모양 등이 변화하지 않는다는 것이 하나의 증거이다. 그리고 세포사멸의 중요한 자인 caspase-3가 활성화되고 PARP가 분해됨을 확인하였다.



- 한편 계피유래 물질들은 다음 그림과 같이 활성산소를 만들어 세포의 형태 변화 및 사멸을 유도함을 활성산소의 발생을 검증하여 확인하였다.

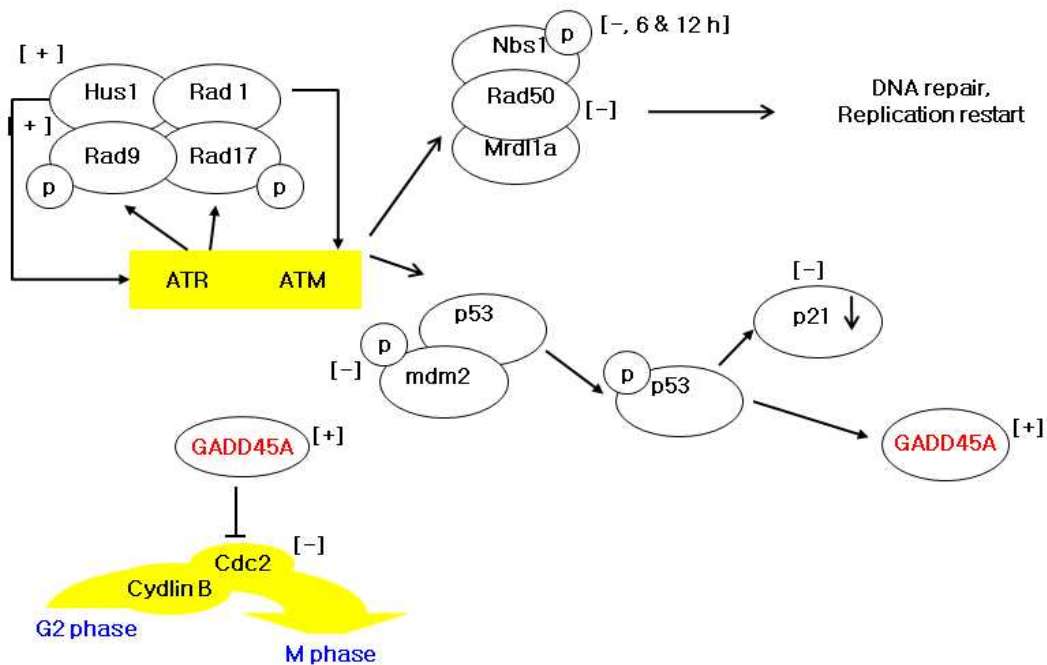


라. 유전체 및 단백질 분석을 통한 항암효과 기전 규명

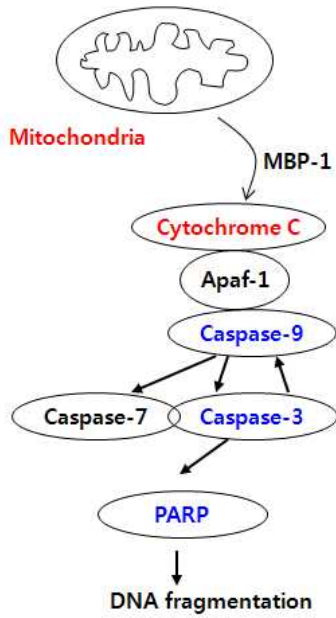
- CB-OH와 CB-Ph는 라스 단백질의 활성 조절, 활성 산소의 생성 촉진, 세포주기 조절, 전사조절인자의 활성 억제 등과 같은 다양한 생리활성을 가지고 있다.
- 일반적으로 천연물들은 다양한 생리활성을 가지고 있고 이들이 서로 상승작용을 하여 동물 또는 인체에서 유용한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, CB-OH와 CB-Ph도 다양한 생리활성을 가지고 있음이 여러 연구를 통하여 밝혀졌다.
- CB-Ph의 항암활성 기전을 규명하기 위하여 유전체 및 단백질 분석 연구가 진행되었고, 현재까지 밝혀진 항암관련 활성과 그 기전은 다음과 같다.

(1). 세포주기 억제

- CB-Ph는 암세포를 G2/M phase arrest시키는 효과가 있으며 이를 통하여 세포를 사멸에 이르게 함을 알 수 있으며 이와 관련된 유전자 및 단백질을 유전체와 단백질 분석에 의해서 확인하였다. 다음 그림은 이를 설명하는 세포내 신호전달 과정이다.



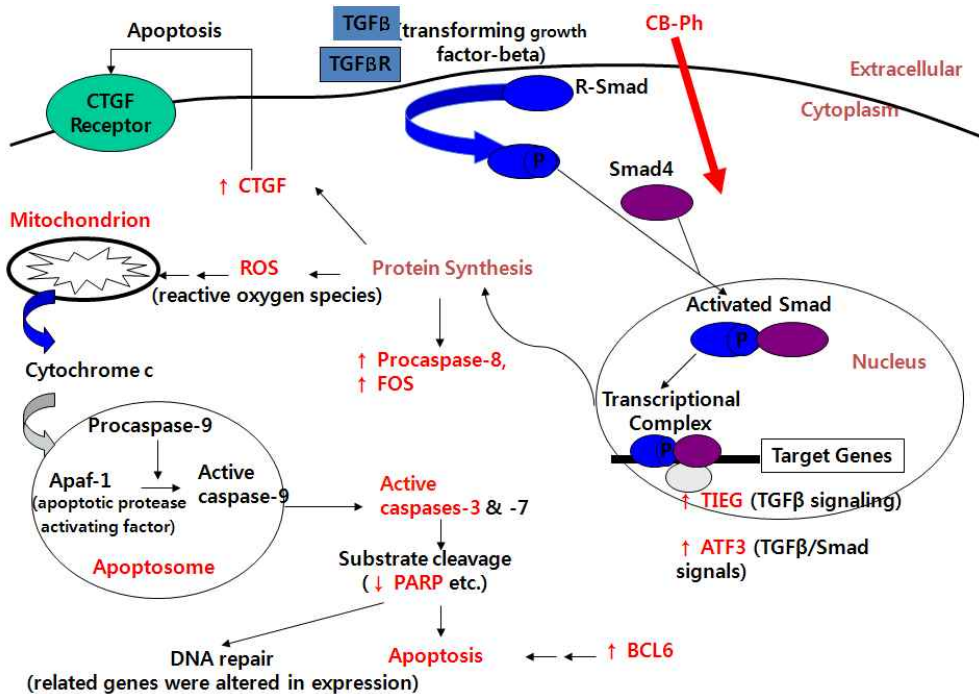
(2). 단백질 분석을 통한 세포사멸 네트워크를 살펴보면 다음과 같다.



- MBP-1 mediated apoptosis involves cytochrome C release from mitochondria.
- VDAC2 : Cytochrome c and other small molecules may pass through the **mitochondrial permeability transition pore** which comprises VDAC in the outer membrane
- TIP49와 MBP-1이 결합하여 oncogene인 c-Myc 전사를 억제
→ TIP49와 MBP-1 complex가 c-Myc P2 promoter에 있는 TATA motif의 minor groove 에 결합하여 c-Myc의 전사 시작 complex 형성을 억제

(3). 총체적 분석을 통한 활성물질의 항암활성 생체분자 네트워크

- 유전체 및 단백질 발현 변화 분석을 토대로 항암관련 생체분자 네트워크를 설정해 보면 다음과 같다.



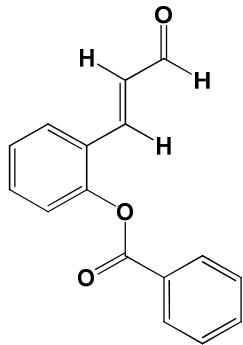
3. 물리, 화학적 특성 및 제형

가. 활성물질

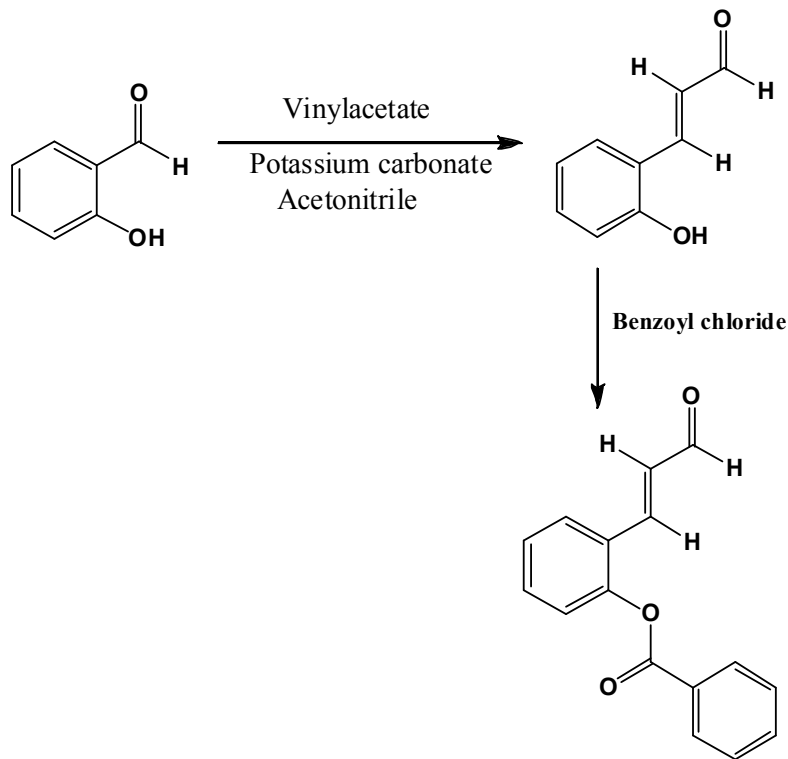
분자식 : $C_{16}H_{12}O_3$

분자량 : 252.26

구조식 :



- 다음과 같은 합성법으로 2-benzoyloxycinnamaldehyde (CB-Ph)를 제조하였다.



나. 화합물의 물성

(1) 성상 및 특성 : 흰색 내지 미황색의 가루로 디클로로메탄 또는 디메틸포름아미드에 섞 잘 녹으며, 아세톤, 아세토니트릴, 초산에틸, 에탄올 또는 2-프로판올에 잘 녹고 초산이소프로필 또는 메탄올에 녹으며 물에 매우 녹기 어렵다.

(2) CB-Ph, CB-OH의 이온화 상수

- CB-Ph 이온화가 일어나지 않으므로 측정 불가
- CB-OH의 pKa는 8.032 ± 0.019 , logP는 2.096 ± 0.017

(3) Stability

- CB-PH는 pH2와 8 사이에서 80 시간 이상 안정

(4) 녹는점

- CB-Ph의 녹는점은 84.94°C
- CB-OH의 녹는점은 134.44°C

(5) hERG test

- 본 시험은 CB-OH의 hERG channel current에 대한 영향을 알아보려고 실시한다.
- CB-OH은 $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ 의 농도에서 hERG current를 각각 6.8, 4.4, 9.7%로 억제했다 (n=3). 이 같은 결과로 볼 때, CB-OH의 IC₅₀ 값 (최대 억제량의 50%를 야기시키는 농도)은 본 시험물질의 최대용해도인 $50\mu\text{M}$ 정도인 것으로 판단된다.

(6) CYP450 inhibition assay

- 약물 상호작용의 가능성을 검토하기 위하여 CYP450 isoform들을 대상으로 저해 활성 검증하였다.
- 다음 표에 정리한 것과 같이 CB-Ph와 그 대사물질은 CB-OH, CB-OH acid 등 모두가 다양한 CYP isoform에 대하여 저해활성을 보이지 않았다.

CYP450	IC ₅₀ (microM)			
	CB-Ph	CB-OH	CB-OH acid	Ketoconazole
1A2	>10	>10	>10	>10
2C9	>10	>10	>10	>10
2C19	>10	>10	>10	>10
2D6	>10	>10	>10	>10
3A4	>10	>10	>10	0.11

- 이 결과로 볼 때에 CB-Ph는 약물 상호작용의 부작용은 없을 것으로 생각된다.

다. 약물 특성

- 주성분 벤조일옥시신남알데히드를 95.0~105.0%를 함유하고 있는 백색의 장방형 정제이다.

마. CB-Ph의 원료 약품 및 분량 (1정 250 mg 중)

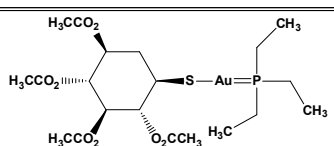
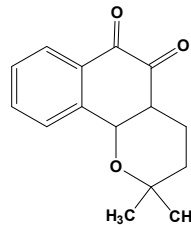
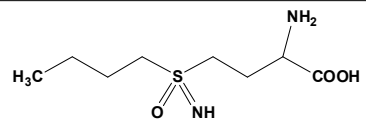
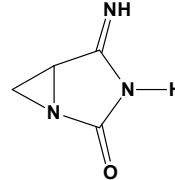
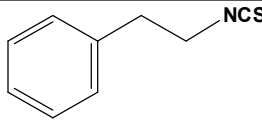
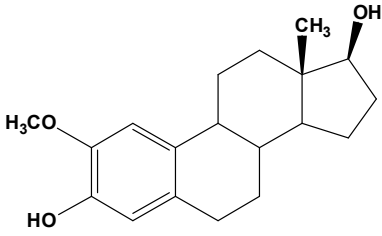
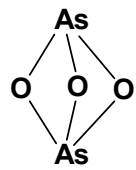
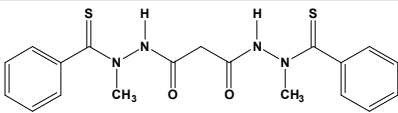
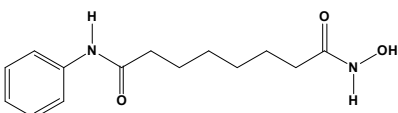
배합목적	원 료 명	용량	단위
주성분	2'- 벤조일옥시신남알데히드	100	mg
부형제	전호화전분	37.5	mg
부형제	유당수화물	47.5	mg
부형제	미결정셀룰로오스	47.5	mg
붕해제	크로스카멜로오스나트륨	12.5	mg
활택제	스테아르산마그네슘	5	mg

바. 이미 알려진 물질과의 구조적 유사성에 대한 설명

(1) 2-벤조일옥시신남알데하이드 (CB-Ph)는 이전에는 전혀 알려져 있지 않았던 물질이다. 상기의 화합물은 기존에 알려져 있는 항암활성 물질들과 구조적으로 전혀 다른 물질이다. 그리고 계피의 주요 성분 중에 하나이고 계피 향의 주요 성분인 시남알데하이드에 대한 연구는 많이 보고되어 있으나 (6), 상기 화합물에 대한 보고는 이전에는 없었다.

(2) 암세포 특이적으로 활성 산소 (reactive oxygen species, ROS)의 생성을 촉진하는 물질에 대한 연구도 최근에 들어와서 연구가 되기 시작하였다. 대표적인 천연물로는 카레에서 분리한 커큐민 (cucumin), 포도주 등에서 확인된 레스베라트롤(resveratrol) 등이 있다. 여러 목적으로 이들에 대한 임상 시험 연구는 여러 연구팀에서 수행되었다.

(3) ROS-modulating agent로서 항암제 개발을 위하여 임상 시험 중인 물질들이 여러 종류가 있다.

Compound	Structure	Mode of Action
Motexafin gadolinium		- Pro-oxidant catalyst - Inhibits TrxR
β -Lapachone (ARQ 501)		- Inhibit NQO1
Buthionine sulfoximine		- Inhibits GSH synthesis
Imexon		- Depletes the GSH pool
Phenylethyl isothiocyanate		- Inhibits GPx and NF- κ B
2-Methoxyestradiol		- Inhibits SOD leading to superoxide accumulation
Arsenic (III) oxide		- Inhibits GPx and TrxR
Elesclomol (STA-4783)		- Induces rapid ROS accumulation
SAHA		- Inhibits TrxR

4. 약동력학

가. 혈중 단백질과의 결합

- (1) CB-Ph는 human serum proteins에 강력히 결합하는 약물이며, albumin이 주요 결합 단백질이고, CB-Ph는 특히 HSA의 site I에 주로 결합하지만, site II binding drugs의 단백질 결합에도 영향을 미친다고 인정된다.
- (2) CB-Ph는 one-class model에 따라 HSA에 결합, affinity binding constant (K_a)는 $55,377M^{-1}$ 이었고, HSA에 CB-Ph의 number of binding site(n)는 Scatchard plots로부터 계산에 의하여 0.6629이다.
- (3) HSA에 대한 CB-Ph의 단백질결합율은 HSA의 농도증가와 더불어 증가하였으나, 온도에는 무관하다.
- (4) CB-Ph와 site- I binding drugs인 warfarin들과 함께 투여시에는 비단백결합율의 증가에 의하여 약효의 상승이 예상됨으로 약물의 양을 조절하는 것이 바람직하다고 판단된다.
- (5) 시험약물인 CB-Ph의 약동학적 시험을 위하여 혈청 단백질과의 결합, 랫드와 토끼에게 정맥 주사한 후 각종 약동학적 파라메트를 구하였다.
- (6) CB-Ph는 물에 난용성이고, 위, 장관으로부터 흡수가 매우 불량하며 또한 흡수된 후 간에서 대사를 매우 빨리 받게 됨으로 혈중에서 소실속도가 매우 빠름을 예측할 수 있었다.

나. In vitro ADME profiling

- CB-Ph의 흡수, 분포, 대사 및 배설과 관련된 특성을 다양한 in vitro 시험을 통하여 규명하고 이를 활용하여 인간에서의 약동력학적 특성을 예측하고자 함

(1). 흡수

- Caco-2 cell monolayer에서의 투과도를 측정하여 경구투여시의 장관벽 투과도를 예측
- ① 1시간 동안 지속된 transport 실험 수행 후 donor 및 receiver side 모두에서 CB-Ph의 농도가 정량한계(0.41uM) 이하인 것으로 나타났다. 따라서 CB-Ph는 본

실험조건에서 신속하게 분해되는 것으로 추정되며 그 결과 permeability의 측정이 분가하였다. 본 실험은 시료 분석은 HPLC/UV 또는 LC-MS/MS system을 사용하여 수행하였다.

- ② Donor 및 receiver side 모두에서 CB-Ph는 검출되지 않았으나, 시초에 가해진 CB-Ph 총량의 약 3% 정도가 CB-OH로서 검출되었으며 약 63%는 CB-OH acid의 형태로 검출되었다. 따라서 CB-Ph는 Caco-2 cell에 의하여 CB-OH 및 CB-OH acid로 변화되는 것으로 추정되며, 경구 투여시는 주로 CB-OH 및 CB-OH acid의 형태로 흡수될 것으로 예측된다.

(2). 대사

- Liver microsome 및 plasma에서의 대사안정성을 측정하고, 생성되는 대사체를 규명하기 위한 metabolite ID 실험을 수행함.

① Rat serum stability of CB-Ph

- CB-Ph(100uM)를 rat serum과 함께 37°C에서 24시간 동안 배양하며 CB-Ph와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-PH acid 및 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-PH는 rat serum 내에서 매우 신속히 소실되었으며(half-life < 1 min), 이와 동시에 CB-OH가 소실된 CB-Ph의 양에 비례하여 생성되었다가 약 5분 이후부터 역시 소실되었다. CB-OH acid는 5분 이후부터 서서히 생성되기 시작하여 24시간 후에는 소실된 CB-PH양의 전체가 CB-OH acid로 변환되는 것으로 나타났으나 CB-Ph acid는 거의 생성되지 않았다.

② Human serum stability of CB-Ph

- CB-Ph(100 uM)를 human serum과 함께 37°C에서 24시간 동안 배양하며 CB-PH와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-PH acid 및 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-PH는 human serum 내에서도 매우 신속히 소실되었으며(half-life < 1min), 이와 동시에 CB-OH가 신속히 생성되었다가 약 2분 이후부터 역시 소실되었다. 반면, rat serum에서와는 달리 CB-OH acid와 CB-Ph acid는 거의 생성되지 않았다.

③ Rat serum stability of CB-OH

- CB-OH(1.5uM)를 rat serum과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 CB-OH와 함께 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-OH 역시

rat serum 내에서 신속히 소실되었으며, CB-OH acid는 약 5분 이후부터 검출되기 시작하였으나 생성된 양은 소실된 CB-OH의 양보다 적었다.

④ Human serum stability of CB-OH

- CB-OH(1uM)를 human serum과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 CB-OH와 함께 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-OH는 rat serum에서와 유사하게 human serum 내에서도 신속히 소실되었으나, CB-OH acid의 생성은 관찰되지 않았다.

(3). Microsomal Stability of CB-Ph

① Rat microsomal stability of CB-Ph

- CB-Ph(50uM)를 pooled rat liver microsome과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 CB-PH와 함께 그 대사체인 CB-OH, CB-OH acid 및 CB-PH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-Ph는 rat liver microsome에 의해서 매우 신속히 CB-OH로 변환되는 것으로 나타났으며 이 반응은 NADPH의 존재유무에 의존적이지 않은 것으로 보아 CYP450 효소에 의해 매개되지 않는 것으로 추정된다. 생성된 CB-OH 역시 신속히 소실되었으나 CB-OH acid로 변환되지 않는 것으로 나타났으며, CB-Ph acid는 검출되지 않았다.

② Rat microsomal stability of CB-OH

- CB-OH(1uM)를 pooled rat liver microsome과 함께 37°C에서 60분 동안 배양하며 CB-OH와 함께 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-OH는 rat liver microsome에 의해 NADPH에 비의존적으로 신속히 소실되었으며 소실된 CB-OH의 일부가 CB-PH acid로 변화되는 것으로 나타났다.

③ Human microsomal stability of CB-OH

- CB-OH(1uM)를 pooled human liver microsome과 함께 37°C에서 60분동안 배양하며 CB-OH와 함께 그 대사체인 CB-OH acid의 시간에 따른 농도변화를 측정하였다. CB-OH는 human liver microsome에 의해서도 NADPH에 의존적으로 신속히 소실되었으며, NADPH가 존재하지 않을 경우에 존재하는 경우에 비하여 CB-OH acid가 더 많이 생성되었다. 이는 CB-OH가 CB-OH acid로 변화되는 대사반응이 NADPH에 비의존적이며 NADPH 존재시에는 이와 구분되는 다른 대사반응이 존재함을 시사한다. Rat microsome에서도 이와 유사한 경향을 보였다.

(4) Reactivity with glutathione(GSH)

① Reactivity of CB-Ph with glutathione

- CB-Ph(50uM)를 과량의 GSH(0.5mM)와 1시간 동안 37°C에서 배양하며 CB-Ph와 CB-OH의 농도변화를 측정하였다. CB-Ph는 반응시간에 비례하여 소실되었으며 1시간 배양 후에 약 30%가 소실되었다. 반면, GSH가 존재하지 않을 경우에는 1시간 후에 약 10%전도가 소실되는 것으로 나타났으나 반응시간에 비례하여 감소하는 양상을 보이지는 않았다. GSH가 존재할 경우 1시간 반응 후에 소실된 총량 중 약 20%만이 CB-OH로 변환되는 것으로 확인되었고 나머지 80%는 α,β -unsaturated aldehyde group과 GSH와의 반응에 의하여 소실되었을 것으로 추정된다. 이들 결과를 종합하여 볼 때 CB-Ph는 GSH와 느리게 반응하는 것으로 판단되므로 체내에서 reactive metabolite로서 작용할 가능성이 존재하는 것으로 사료된다.

② CB-OH의 glutathione (GSH)와의 반응성

- CB-OH(50 uM)를 과량의 GSH(0.5 mM)와 1시간 동안 37°C에서 배양하며 소실여부를 측정한 결과 소실되지 않은 것으로 나타났다. 따라서 CB-OH는 체내에서 reactive metabolite로서 작용할 가능성이 낮은 것으로 판단된다.

다. In vivo PK study

- 실험동물에서의 약동력학적 파라미터를 측정하여 CB-Ph의 체내동태를 파악하고 이를 통하여 인간에서의 약동력학적 특성을 예측하였다.

(1). 설치류

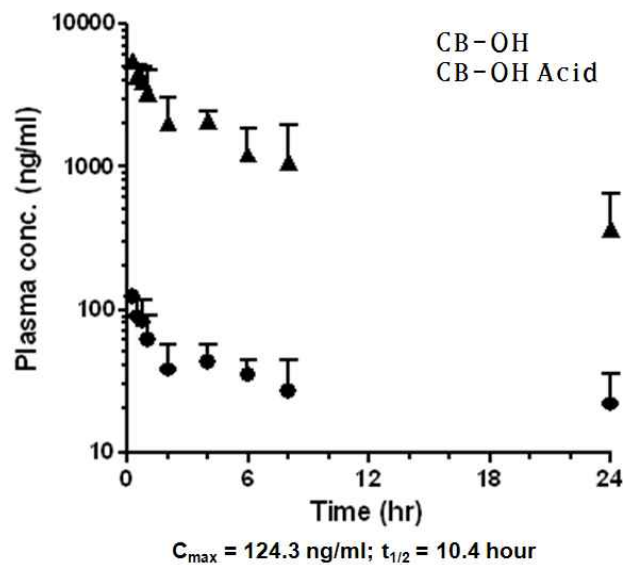
- 마우스 및 랫드에 정맥 및 경구투여 후 CB-Ph 및 대사체의 혈중농도를 측정하고 그 결과를 분석하여 약동력학적 파라미터를 구하였다.
- 분석법 개발을 포함한 시료 분석은 HPLC/UV 또는 LC-MS/MS system을 사용하여 수행하였다.

① Plasma pharmacokinetics of CB-Ph in rats

- CB-Ph를 male SD rat(n=4)에 정맥 또는 경구로 단회투여 후 24시간 동안 혈장농도를 분석하고 그 결과를 이용하여 PK parameter를 산출하였다. CB-Ph는 정맥투여시 혈중에서 매우 신속히 소실되어 투여 후 최초 time point인 5분부터 그 이후 전 실험과정에서 검출되지 않았으므로 이에 대한 PK parameter를 구하지 못

하였다. 반면, 대사체인 CB-OH 및 CB-OH acid는 CB-Ph 투여 직후 최초 time point에 최고농도로 검출된 이후 4~8시간 동안 지속적으로 혈중에 존재하며 multi-compartmental disposition의 특성을 나타내는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 CB-Ph는 정맥투여시 매우 신속히 대사되어 CB-OH 및 CB-OH acid로 변환되며, CB-OH 및 CB-OH acid 역시 혈중에서 신속히 소실되는 것으로 보인다. 이러한 실험결과는 앞서 기술된 serum 및 microsomal stability 실험결과와 부합됨을 알 수 있다. CB-Ph는 경구투여 시에도 정맥투여의 경우와 유사하게 혈중에서 매우 신속히 소실되어 투여 후 최초 time point인 15분부터 그 이후 전 실험과정에서 검출되지 않았으므로 이에 대한 PK parameter를 구하지 못하였다. 반면, 대사체인 CB-OH 및 CB-OH acid 투여 직후 최초 time point에 최고농도로 검출된 이후 24시간 동안 지속적으로 혈중에 존재하며 multi-compartmental disposition의 특성을 나타내는 것으로 확인되었다.

CB-Ph Pharmacokinetics (Oral)



② Plasma pharmacokinetics of CB-OH in rats

- CB-OH를 male SD rat(n=5)에 정맥주사로 단회투여 후 24시간 동안 혈장농도를 분석하고 그 결과를 이용하여 PK parameter를 산출하였다. CB-OH는 hepatic blood flow를 훨씬 증가하는 높은 systemic clearance를 나타내었으며, 체내에서 매우 신속히 CB-OH acid로 변환되었다. Steady state에서의 분포용적(V_{ss})이 10 L/kg으로 높아서 CB-OH는 혈관 외로 잘 분포하는 것으로 나타났으며 apparent terminal elimination half-life는 약 2시간으로 비교적 짧은 것으로 나타났다.

③ Plasma pharmacokinetics of 2'-hydroxycinnamic acid (CB-OH acid) in rats

- CB-OH acid를 male SD rat(n=4)에 정맥주사로 단회투여 후 24시간 동안 혈장농도를 분석하고 그 결과를 이용하여 PK parameter를 산출하였다. CB-OH는 hepatic blood flow의 약 10%에 불과한 낮은 systemic clearance를 나타내었으며, apparent terminal elimination half-life는 약 2시간으로 CB-OH와 유사한 것으로 나타났다. Steady state에서의 분포용적(Vss)은 0.33 L/kg으로 낮은 편이며 이는 이 화합물이 organic anion의 특징을 지녔에 따른 결과인 것으로 추정된다.

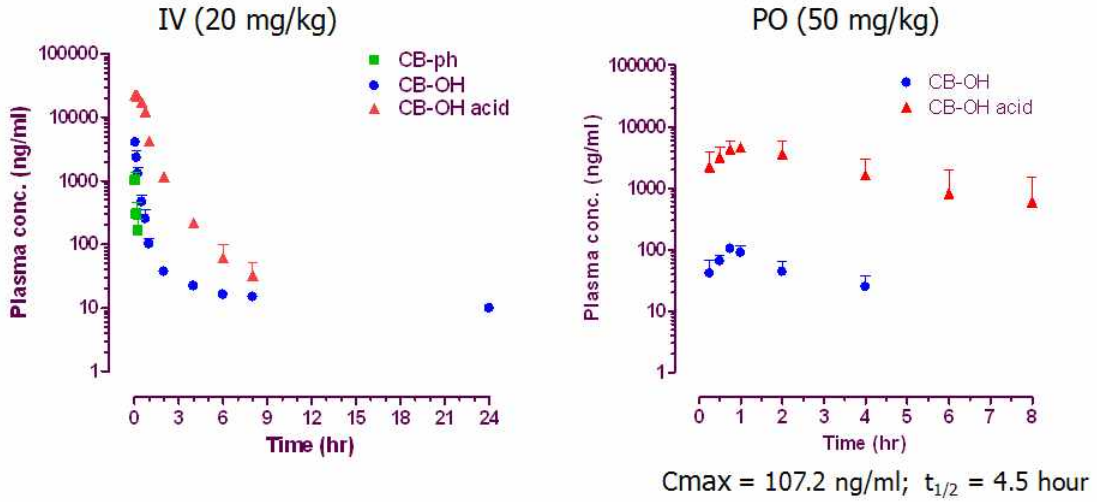
(2). 비설치류

- 비글견에 정맥 및 경구투여 후 CB-Ph 및 대사체의 혈중농도를 측정하고 그 결과를 분석하여 약동력학적 파라미터를 구함
- 분석법 개발을 포함한 시료분석은 HPLC/UV 또는 LC-MS/MS system을 사용하여 수행함

① Plasma pharmacokinetics of CB-Ph in dogs

- CB-Ph를 male beagle dog(n=3)에 정맥 또는 경구로 단회 투여 후 24시간 동안 혈장농도를 분석하고 그 결과를 이용하여 PK parameter를 산출하였다. CB-Ph는 정맥 투여시 rat에서의 경우와 유사하게 혈중에서 매우 신속히 소실되어 투여 후 15분까지만 검출되었으며, 따라서 정확한 elimination terminal phase를 구하지 못해 PK parameter를 구하지 못하였다. 반면, 대사체인 CB-OH 및 CB-OH acid는 CB-PH 투여 직후 최초 time point는 4시간 동안 지속적으로 혈중에 존재하며 multi-compartmental disposition의 특성을 나타내는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 CB-PH는 정맥투여시 매우 신속히 대사되어 CB-OH 및 CB-OH acid로 변환되며, CB-OH 및 CB-OH acid 역시 혈중에서 신속히 소실되는 것으로 보인다. 경구투여 시에는 투여 후 최초 time point인 15분부터 그 이후 전 실험 과정에서 검출되지 않았으므로 이에 대한 PK parameter를 구하지 못하였다. 반면, 대사체인 CB-OH 및 CB-OH acid는 CB-Ph 투여 후 약 1시간 후 최고농도로 검출된 이후 4-8시간 동안 지속적으로 혈중에 존재하는 것으로 확인되었다.

Pharmacokinetics of CB-Ph in dogs



(3). Human PK prediction

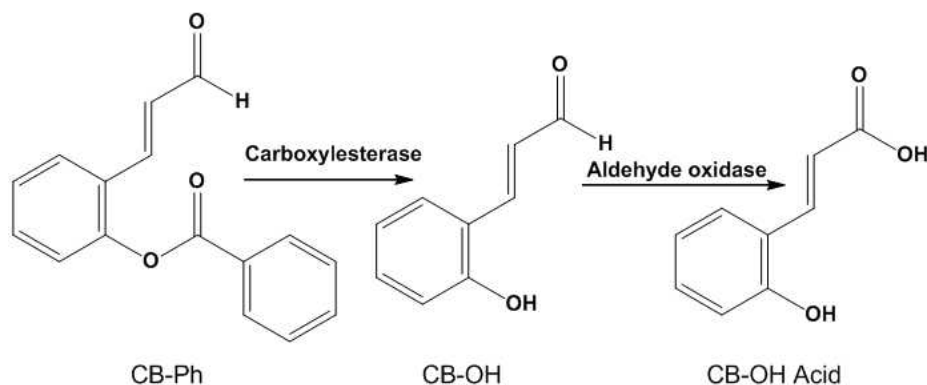
- 마우스, 랫드 및 비글견에서의 약동력학적 파라미터를 allometric scaling 방법으로 분석하여 인간에서의 약동력학적 파라미터를 예측하며, 그 결과는 Phase I 임상 시험을 위한 투여용량 결정시 활용 가능하다.

라. Metabolism Study

(1). In vivo metabolite ID of CB-Ph

- CB-Ph는 경구제로 개발하고자 하는 물질이므로 경구투여 후 생성되는 대사체를 찾는 것을 주 목적으로 하여 실험을 수행하였다. 선행된 PK 실험에서 CB-PH는 경구투여 시 혈중에서 매우 신속히 소실되어 투여 후 최초 time point인 15분부터 그 이후 전 실험과정에서 검출되지 않았고 반면, 대사체인 CB-OH 및 CB-OH acid는 CB-Ph 투여 직후 최초 time point에 최고농도로 검출된 이후 24시간 동안 지속적으로 혈중에 존재하며 multi-compartmental disposition의 특성을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 본 실험에서는 rat에 경구투여로 생성되는 대사체를 정성 분석하고자 0분, 15분, 1시간 그리고 6시간에 채취한 시료를 이용하여 구조를 동정하였다.

In vivo metabolite ID of CB-Ph

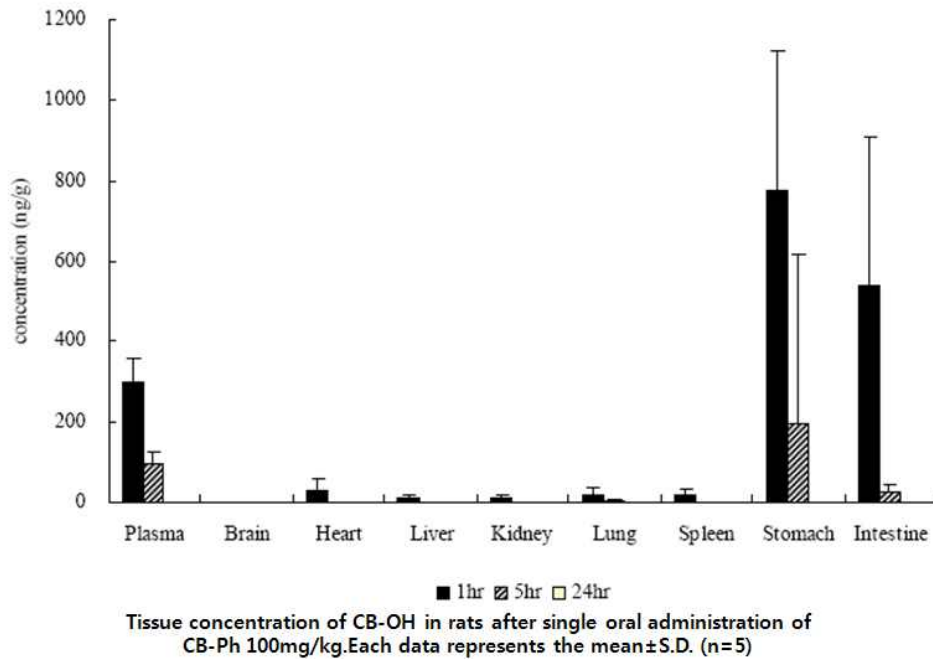


마. In vivo ADME profiling

(1). Rat 장기 중 CB-OH의 분포

- CB-PH는 경구 투여시 매우 빠르게 CB-OH로 가수분해 되므로 장기에서의 분포를 분석하기 위하여 6가지의 주요장기에서 CB-OH의 양을 측정하였다.
- LC/MS/MS를 이용한 랫드 장기 중 CB-OH의 농도 분석법 보증을 위한 Validation 특이성은 랫드 장기 중에서 각각 6 가지 서로 다른 기원의 생체시료를 이용하여 수행한 결과 간섭물질이 검출되지 않았으며, 직선성은 모두 2 ~ 500 ng/mL의 농도범위에서 뇌 에서 직선성은 모두 상관계수가 0.9994 이상으로 나타났다. 심장에서 직선성은 모두 상관계수가 0.9988 이상, 폐에서 직선성은 모두 상관계수가 0.9975 이상, 비장에서 직선성은 모두 상관계수가 0.9983 이상, 간 에서 직선성은 모두 상관계수가 0.9996 이상, 위에서 직선성은 모두 상관계수가 0.9990 이상, 소장 에서 직선성은 모두 상관계수가 0.9986 이상, 신장 에서 직선성은 모두 상관계수가 0.9989 이상으로 나타났다. 그 결과, 랫드 장기에 대한 본 LC/MS/MS 분석법은 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었으며, 랫드 장기 중 CB-OH의 보존기간에 대한 안정성을 확인하였다.
- 15 마리의 랫드 (Sprague-Dawley)에 시험물질인 CB-Ph (2-benzoyloxy-cinnamaldehyde) 100mg/kg를 단회 경구 투여하고. 투여 후 1시간, 5시간, 24시간에 5마리씩 plasma, kidney, heart, lung, intestine, stomach, brain, spleen, liver에서 CB-Ph의 대사체인 CB-OH (2-hydroxycinnamaldehyde)농도를 LC/MS/MS 장치로 분석하였다. CB-OH의 조직 중 농도는 첫 포인트인 투여 후 1시간에 모든 조직에서 최고치에 달하였고 stomach > intestine > plasma >> heart

≡ lung ≡ spleen ≡ kidney ≡ liver 순의 농도를 나타낸 후 신속히 감소하여 GI track 에서 높은 조직 친화도를 나타내었다. 또한 CB-OH는 blood brain barrier (BBB)를 통과하지 못하여 모든 시간 동안 brain 에서는 검출되지 않았다. 24시간째에 대부분의 개체에서 CB-OH가 검출되지 않아 대부분 대사되거나 배설되어 장기내 축적성은 없는 것으로 판단되었다.



(2). CB-Ph의 랫드를 이용한 경구투여 약물동태 배설시험

- 본 시험은 10 마리의 랫드 (Sprague-Dawley)에 시험물질인 CB-Ph (2-benzoyloxy-cinnamaldehyde) 100mg/kg 및 200mg/kg 를 각 5마리씩 단회 경구 투여하고 투여 후 24시간 동안 배설된 뇨와 변을 채취하여 CB-Ph의 대사체인 CB-OH (2-hydroxycinnamaldehyde) 를 LC/MS/MS 장치로 분석하였다. CB-Ph는 혈중 소실속도가 매우 빨라 metabolite인 CB-OH만 측정하였으므로 parent 의 몇 %가 배설되었는지는 알 수 없었지만 뇨와 변 모두 두 투여용량간의 배설양에 있어 유의성 (P<0.05) 있는 차이를 보이며 두 용량 모두 뇨에서 변보다 13배 이상 배설되어 CB-OH의 주된 배설경로는 뇨로 생각된다.

(3). CB-Ph 100mg/kg 투여 후 그 대사체인 CB-OH 의 배설

- CB-Ph 100mg/kg 을 투여 한 후 24시간 동안 1~5 point 의 뇨와 변을 채취하여 그 대사체인 CB-OH를 측정하였다. CB-Ph의 혈중 소실 속도가 매우 빨라 parent 는 측정하지 않고 metabolite인 CB-OH만 측정해서 투여량의 몇 %가 배설되었는

지는 알 수 없었지만 뇨에서 6169.84 ± 1520.69 (ng) 가 배설되었으며, 변에서는 340.35 ± 221.93 (ng)가 배설되었다

(4). CB-Ph 200mg/kg 투여 후 그 대사체인 CB-OH 의 배설

- CB-Ph 200mg/kg 을 투여 한 후 24시간 동안 1~5 point 의 뇨와 변을 채취하여 그 대사체인 CB-OH를 측정하였다. CB-Ph의 혈중 소실 속도가 매우 빨라 parent 는 측정하지 않고 metabolite인 CB-OH만 측정해서 투여량의 몇 %가 배설되었는 지는 알 수 없었지만 뇨에서 16383.42 ± 223.21 (ng) 가 배설되었으며, 변에서는 1247.49 ± 748.84 (ng)가 배설되었다

바. 일반증상 관찰

- 시험물질을 투여한 후 4 시간까지 모든 개체에서 특이할 만한 사항은 관찰되지 않았다.

5. 일반 약리 시험

- 계피에서 분리한 CB-Ph의 생체내 투여시 안전성 여부를 알기 위해 실험동물을 사용하여 중추신경계 및 일반 약리작용을 여러 가지 방법에 따라 검색하였다. 시험된 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 시험물질

- 시료는 부산대학교 약학대학 이치호교수님 연구실에서 공급받아 사용하며 모든 약품과 시약은 특급(grade reagent)의 것을 사용하였다. 시료의 조제는 CB-ph를 식용유를 첨가하여 sonicator에서 용해하여 용량별로 사용하였다.

나. 실험동물

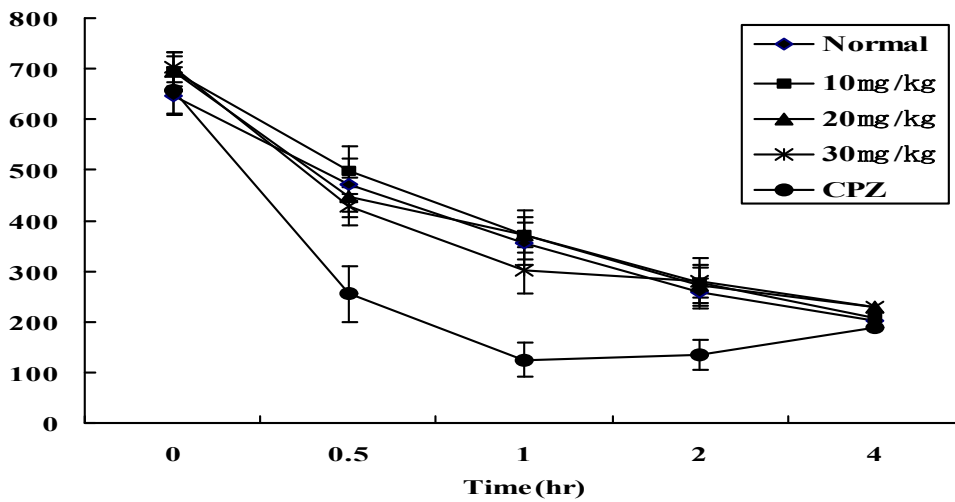
- 실험동물은 (주)대한 BioLink로부터 분양 받아 일정한 조건(온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 3\%$, 명암 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 적응시킨 체중 20 ± 2 g의 수컷 ICR 생쥐, 체중 200 ± 20 g의 SD계 수컷 흰쥐 및 체중 1.5-2.7 kg의 수컷rabbits 를 사용하였다.

다. 중추신경계에 미치는 영향

1). 자발 운동량

- Mouse의 자발운동량에 대하여 CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에서 투여에서 어떠한 영향도 미치지 않았으며, 양성대조물질로 사용한 chlorpromazine 10

mg/kg에서는 복강투여 후 30분부터 2시간까지 유의성 있게 자발운동량의 감소를 나타내었다.



The effect of CB-PH on the locomotor activity in mice

2). 운동기능에 미치는 영향

(1). 현수법(Traction test)

- CB-PH 10, 20, 30mg/kg을 복강내에 투여에서 어떠한 영향도 미치지 않았으며, 양성대조물질로 사용한 chlorpromazine 10mg/kg에서는 복강투여후 30분부터 1, 2, 4시간까지 각각 30, 50, 40, 20%의 실패율을 나타내었다.

Table 1. Influence of CB-Ph on traction test in mice

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	N	Inhibition of performance(%)			
			0.5	1	2	4
Normal		10	0	0	0	0
CB-Ph	10	10	0	0	0	0
	20	10	0	0	0	0
	30	10	0	0	0	0
CPZ	10	10	30	50	40	20

CPZ : Chlorpromazine

(2). 경사판법

- CB-Ph을 복강내에 투여한 후 경사판법에서 시행한 결과 고농도 30mg/kg에서 시

협초기에 억제되는 양상을 보였으나 120분에서는 거의 회복되는 경향을 보였다. 그러나 diazepam은 경사판시험에서 reflex가 현저히 억제되었고 억제기간도 오래 지속되었다.

Table 2. Result on tilted platform test of mice treated with CB-Ph

Time(min)	Normal	CB-Ph			Diazepam
		10	20	30(mg/kg, i.p.)	3.0(mg/kg)
15	6/6	6/6	5/6	3/6	1/6
30	5/6	5/6	5/6	5/6	1/6
60	5/6	3/6	6/6	4/6	2/6
120	6/6	6/6	6/6	5/6	3/6

Indicated values are incidence of reflex(+) mice in each condition

(3). 회전봉법

- CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에 투여에서 어떠한 영향도 미치지 않았으며, 양성대조물질로 사용한 chlorpromazine 10 mg/kg에서는 복강투여후 30분부터 1, 2, 4시간까지 각각 20, 40, 70, 30%의 실패율을 나타내었다.

Table 3. Effect of CB-Ph on the rotarod test in mice

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	N	Inhibition of performance(%)			
			0.5	1	2	4hr
Normal		10	0	0	0	0
CB-PH	10	10	0	0	0	0
	20	10	0	0	0	0
	30	10	0	0	0	0
CPZ	10	10	20	40	70	30

CPZ : Chlorpromazine

3). 수면시간에 미치는 영향

- CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에 투여는 pentobarbital 유발 수면연장작용에

있어 정향반사 소실시간 및 수면시간에 전혀 영향을 나타내지 않았으며, 양성대조물질로 사용한 chlorpromazine 10 mg/kg에서는 유의성 있는 수면연장 작용을 나타내었다.

Table 4. Effect of CB-Ph on pentobarbital induced sleeping time in mice

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	N	Onset time	Duration time
			(min)	(min)
Normal		10	3.40±0.16 ^a	78.12±7.04 ^a
CB-PH	10	10	3.61±0.15 ^a	78.07±5.85 ^a
	20	10	3.47±0.14 ^a	75.92±7.04 ^a
	30	10	3.42±0.22 ^a	91.14±12.60 ^a
CPZ	10	10	2.81±0.23 ^b	177.51±25.26 ^b

CPZ : Chlorpromazine

4). 항경련 작용

(1). 최대 전격 경련

- 전격자극의 유발에 대한 mouse의 강직성 경련에 대하여 CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에 투여는 영향을 미치지 않았다. 양성대조물질로 사용한 phenobarbital의 복강내 투여는 강직성경련 및 사망수를 억제하였다.

Table 5. Effect of CB-Ph on the ECT induced convulsion and death in mice

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	N	Convulsion(%)		Death(%)
			T.E	C.L	
Normal		10	100	20	80
CB-PH	10	10	100	20	80
	20	10	100	40	60
	30	10	100	30	70
PHB	100	10	0	100	

T.E : Tonic extensive convulsion, C.L : Clonic convulsion

PHB : phenobarbital

(2). Pentylenetetrazol 경련

- CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에 투여는 대조군에 비하여 경련발현 시간, 사망률 및 사망시간에 유의한 차를 나타내지 않았다. 그러나 양성대조물질로 사용한 Phenobarbital 100mg/kg의 복강투여에서는 경련발현 시간, 사망률 및 사망시간을 유의적으로 증가시켜 항경련 작용을 나타내었다.

Table 6. Influence of CB-Ph on pentylenetetrazol induced convulsion and death in mice

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Onset		T.E		Death	
		Inci (%)	Latency (sec)	Inci (%)	Latency (sec)	Inci (%)	Latency (sec)
Normal		100	47.8±1.7a	100	164.5±5.9a	100	191.5±5.8a,b
	10	100	54.0±2.8b	100	167.1±7.1a	100	185.3±6.4a,b
CB-PH	20	100	50.6±3.8a, b	100	172.6±6.9a	100	193.8±6.7a
	30	100	46.0±2.2a	100	140.1±11.7 b	100	181.5±7.2b
CPZ	100	0	-	0	-	0	-

T.E : Tonic extensive convulsion

Inci : Incidence

Latency : Latent time from pentylenetetrazol injection

PHB : phenobarbital

5). 정상체온에 미치는 영향

- Rat의 정상체온에 대하여 CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg의 용량에서 4시간까지 대조군에 비하여 영향이 없었으나, 양성대조물질로 사용한 chlorpromazine 5 mg/kg의 용량에서 복강내 투여후 1시간부터 유의한 체온의 저하를 나타내었으며, 4시간까지 지속되었다.

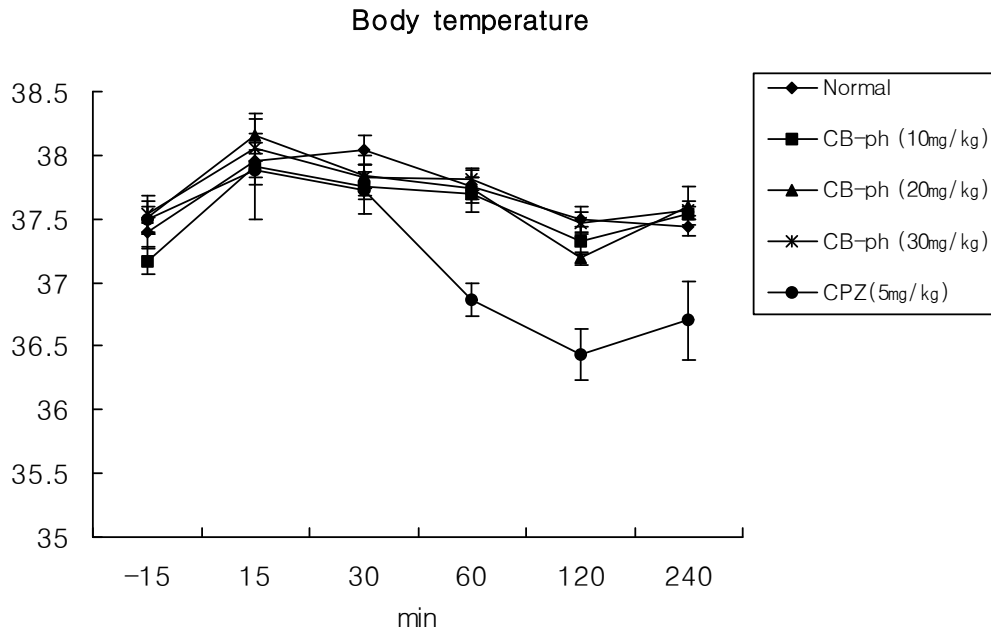


Fig 2. Body temperature

6). 진통작용

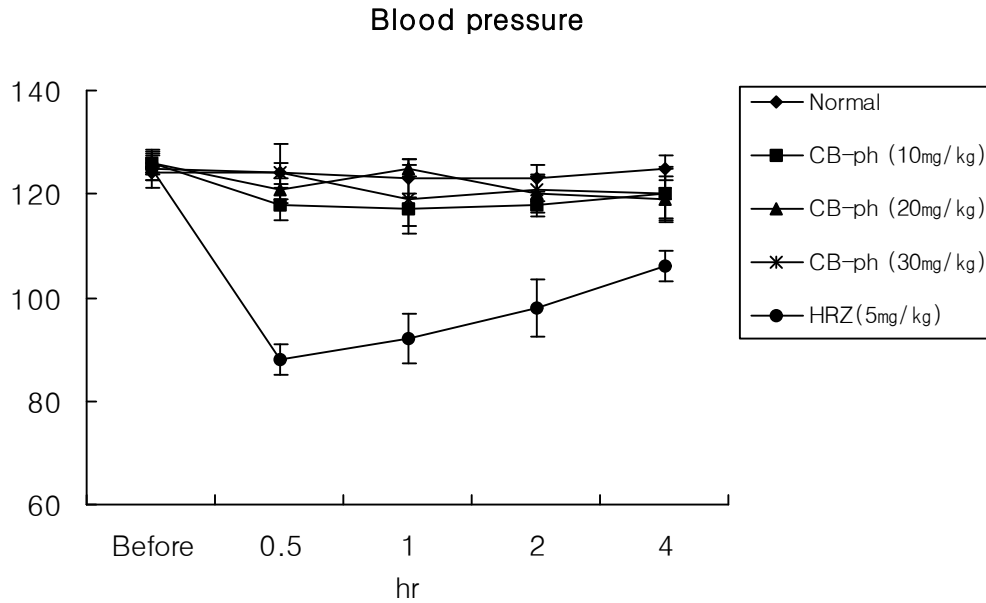
- CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에 투여에서 대조군에 비하여 용량 의존적으로 발현시간 및 writhing 수에 유의성 있게 발현시간 및 writhing 수를 억제하여 진통작용을 나타내었다.

Table7. Effect of CB-Ph on acetic acid-induced writhing syndrome in mice

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Onset time	Duration time
		(min)	(min)
Normal		254.7 ± 17.8 ^{b,c}	58 ± 2.8 ^a
CB-PH	10	216.1 ± 10.5 ^c	52 ± 2.7 ^b
	20	260.7 ± 21.3 ^{b,c}	46 ± 3.3 ^c
	30	300.6 ± 30.2 ^b	40 ± 3.2 ^d
Aspirin	100	402.3 ± 39.6 ^a	19 ± 2.1 ^e

라. 흰쥐의 혈압에 미치는 영향

- CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에 투여에서 대조군에 비하여 영향을 미치지 않았으며, 양성대조물질로 사용한 hydralazine 5 mg/kg의 투여에서는 30분부터 혈압이 저하되어 4시간까지 지속되었다.



마. 소화기계에 미치는 영향

1). 소장 수송 능에 미치는 영향

- CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에 투여에서 대조군에 비하여 유의한 영향을 나타내지 않았다.

Table 8. Effect of CB-Ph on the gastrointestinal motility in mice

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	N	GI motility(%)
Normal		10	53.2 ± 2.96 ^a
CB-PH	10	10	56.2 ± 3.53 ^a
	20	10	54.2 ± 3.26 ^a
	30	10	51.8 ± 4.11 ^a

2). 위액분비에 미치는 영향

- CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에 투여한 다음 1시간 후에 유문결찰에서는 부피, pH 및 총 산도에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내지 않았다.

Table 9. Effect of CB-Ph on gastric secretion in pylorus ligated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Volume	pH	Total acid
		(ml/100g)		(mgEq/100g)
Normal		2.41 ± 0.36 ^a	1.72 ± 0.08 ^a	0.21 ± 0.03 ^a
CB-PH	10	2.20 ± 0.30 ^a	1.70 ± 0.03 ^a	0.20 ± 0.05 ^a
	20	2.10 ± 0.48 ^a	1.68 ± 0.10 ^a	0.18 ± 0.02 ^a
	30	1.79 ± 0.25 ^a	1.71 ± 0.09 ^a	0.19 ± 0.02 ^a

바. 혈액에 미치는 영향

1). 전혈응고능

- 대조군의 전혈액응고시간은 각 동물에서 190~690초로 다양하였다. 그러나 각각의 대조군에서 토끼전혈에 CB-Ph를 첨가한 경우 전혈액응고시간은 대조군과 비교하여 차이가 없었다.

Table 10. Effect of CB-Ph on whole blood coagulation time (unit : sec)

	Normal	CB-Ph(mg/ml)			
		10-5	3 x 10-5	10-4	3 x 10-4
1	190	217(167%)	360(200%)	380(200%)	217(167%)
2	750	780(104%)	780(104%)	750(100%)	600(80%)
3	240	210(88%)	300(125%)	540(90%)	510(85%)
4	600	540(90%)	510(83%)	630(105%)	540(90%)
5	690	660(98%)	600(87%)	450(65%)	420(61%)
Mean± S.D	494.0±260.8a	481.4±258.9 (109%) ^a	510.0±192.1 (119.8%) ^a	546.0±152.1 (112%) ^a	457.4±149.3 (96.6%) ^a

2). 용혈작용

- CB-PH의 각 농도 첨가한 경우 용혈에 영향을 미치지 않았다.

Table 11. Effect of CB-Ph on hemolysis OD at 540nm

	Normal	CB-Ph(mg/ml)			
		10-5	3 x 10-5	10-4	3 x 10-4
1	0.17	0.22	0.20	0.20	0.24
2	0.18	0.18	0.20	0.18	0.22
3	0.17	0.21	0.16	0.11	0.10
4	0.12	0.17	0.10	0.17	0.22
5	0.21	0.17	0.17	0.16	0.21
Mean ± S.D	0.17 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.04 ^a	0.16 ± 0.03 ^a	0.21 ± 0.05 ^a

3). Prothrombin 시간

- CB-Ph 10, 20, 30 mg/kg을 복강 내에 투여시 prothrombin time에 영향을 미치지 않았다.

Table 12. Prothrombin time(sec) in rats treated with CB-Ph

	Normal	CB-Ph(mg/ml)		
		10	20	30
1	13	13	12	13
2	13	14	13	13
3	13	11	14	12
4	12	12	11	12
5	11	13	10	12
Mean ± S.D	12.4 ± 0.89 ^a	12.6 ± 1.14 ^a	12.0 ± 1.58 ^a	12.4 ± 0.55 ^a

4). 칼슘재가 응고시간

- CB-PH 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에 투여시 칼슘재가 응고시간에 영향을 미치지

지 않았다.

Table 13. Recalcification time(sec) in rats treated with CB-Ph

	Normal	CB-Ph(mg/ml)		
		10	20	30
1	85	139	115	145
2	130	110	120	121
3	140	170	170	175
4	160	115	126	96
5	145	98	130	102
Mean ± S.D	132.0 ± 28.4 ^a	126.4 ± 28.6 ^a	132.2 ± 21.9 ^a	128.4 ± 32.0 ^a

사. 기타 약리 작용

1). 백서의 혈액 화학검사치 및 간기능에 미치는 영향

- 각 실험군에서 혈액 화학적 검사에 혈당치 및 유산의 농도에서 CB-PH 10, 20, 30 mg/kg을 복강내에 투여시 유의한 변화를 보이지 않았으며, 간기능의 변화에서 ESP의 소실속도에도 유의적인 영향을 주지 않았다.

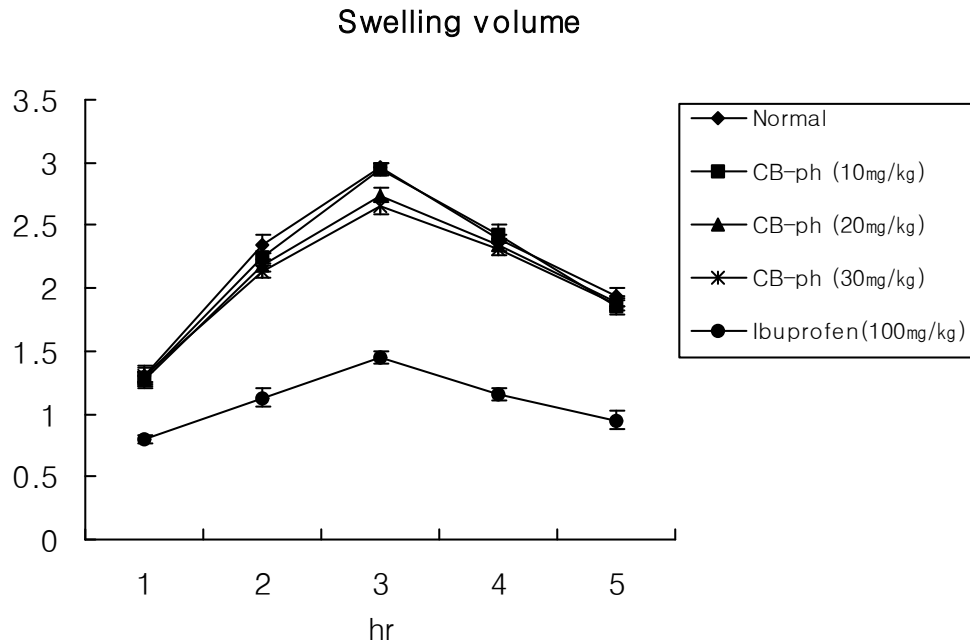
Table 14. Effect of CB-Ph on blood concentration in glucose, lactate and bromosulphophthalein in rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Glucose	Lactate	BSP
		(mg/dl)	(mM)	(mg/dl)
Normal		146.6 ± 20.1 ^a	24.3 ± 8.26 ^a	3.04±0.24 ^a
CB-PH	10	120.9 ± 18.5 ^a	20.5 ± 5.43 ^a	2.79±0.30 ^a
	20	137.4 ± 16.9 ^a	21.2 ± 4.63 ^a	3.12±0.21 ^a
	30	131.8 ± 21.9 ^a	18.8±6.23 ^a	3.26±0.33 ^a

2). 항염증 작용

- CB-Ph의 각 농도에서 1% carrageenin에 의해 유도된 염증에 유의적인 영향을 미치지 않았다. 한편 양성대조물질인 ibuprofen의 투여에서는 시간별로 유의성 있게 항염 작용이 억제되었다.

Fig 4. Swelling volume



아. 평활근에 미치는 영향 및 혈액에 미치는 영향

- In vitro 실험인 전혈응고능, 용혈작용의 data는 제시하나 사용한 CB-Ph가 물에 용해하지 않으므로 결과의 신빙성은 예측이 불가능하다고 생각됨. 적출평활근(적출회장, 적출자궁, 적출기관)의 실험에서도 사용한 CB-Ph가 물에 용해되지 않으므로 magnus관에서 측정이 불가능하였음.
- 이로부터 CB-Ph의 본 실험에서 사용한 용량에서 일반약리 작용을 검토한 결과 진통작용 이외에는 뚜렷한 효과를 관찰할 수 없었으므로 일반약리 실험에서의 안전성에는 별다른 영향이 없는 것으로 사료된다.

6. 독성 시험

가. 단회독성 시험

(1). Benzoyloxycinnamaldehyde (CB-Ph)의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

- 본 시험은 시험물질 benzoyloxycinnamaldehyde (CB-PH)을 Sprague-Dawley (SD) 계통 암수 랫드에 단회 경구투여 하였을 때의 독성을 알아보기 위하여 실시하였다. 암수 공히 시험물질 2,000 및 5,000 mg/kg 투여군과 부형제대조군을 설정하였고, 2주간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였으며, 시험결과는 다음과 같았다.

- 실험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다.

- 일반증상에서 시험물질 투여군에서 투여당일에 설사, 연변, 약물혼입변 및 항문주위의 오염이 관찰되었고, 항문주위의 오염은 투여 후 3~4일째까지 관찰되었다.

- 체중변화에서 5,000 mg/kg 투여군의 수컷에서 투여 후 3일째의 체중 및 암컷에서의 증체량이 부형제대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

- 부검소견에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

- 본 시험조건 하에서 benzoyloxycinnamaldehyde (CB-Ph)의 암수 랫드에 대한 단회 경구투여에서 사망동물은 관찰되지 않았기때문에 시험물질의 최소치사량(MLD : Minimum Lethal Dose)은 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되었다.

(2). Benzoyloxycinnamaldehyde (CB-Ph)의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 복강투여 독성시험

- 본 시험은 시험물질 CB-Ph를 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회 복강투여 하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 실시하였다.

- CB-Ph를 0(vehicle), 250, 500 및 1,000 mg/kg의 용량으로, 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 단회 투여한 후 사망률, 일반증상, 체중 및 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

- ① 사망률 관찰 결과, 1,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1 일째에 암수 전례 사망하였다.
- ② 일반증상 관찰 결과, 안면부종 및 피모거침이 투여 당일에 1,000 mg/kg 투여군 암수 전례, 투여 후 1 일째에 500 mg/kg 투여군 암수 전례에서 관찰되었다.
- ③ 체중변화 관찰 결과, 500 및 250 mg/kg 투여군 수컷 및 500 mg/kg 투여군 암컷에서 시험물질 투여 초기에 용량상관성 있는 체중감소 및 체중증가억제를 나타내었다.
- ④ 부검소견 관찰 결과, 1,000 mg/kg 투여군 사망동물(암수 각 5 마리)에서 복강내에 복수 및 흰색의 과립상의 물질과 막, 간장의 각 엽간의 유착이 전례에서 관찰되었다.

- 이상의 결과로 보아, 시험물질 CB-Ph를 Sprague-Dawley 계통의 암수 랫드에 단회 복강투여하였을 때, 일반증상에서 안면부종 및 피모거침, 체중변화에서 체중감소 및 체중증가억제, 부검소견에서 복강내 복수 및 흰색의 과립상의 물질과 막, 간장의 각 엽간의 유착이 1,000 mg/kg 투여군 사망동물 암수 전례에서 관찰되었다. 또한, 1,000 mg/kg 투여군에서 암수 전례 사망하여 본 시험 조건하에서 CB-Ph의 반수치사량(Lethal Dose 50, LD₅₀)은 암수 공히 736.4 mg/kg (95% 신뢰구간은 산출되지 않음)으로 판단하였다.

(3). CB-OH의 Beagle dog를 이용한 단회 정맥내투여 독성시험

- 시험물질 CB-OH의 비설치류에서의 단회 투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 암수 공히 시험물질을 0,5,15 및 45 mg/kg의 용량으로 각 군별 2마리의 beagle dog에 정맥내 투여하고 2 주간의 사망률 관찰, 일반증상관찰, 체중측정 및 부검소견을 관찰하였다. 이러한 시험의 결과는 다음과 같았다.

- 암수 모두 사망동물은 관찰되지 않았다.

- 일반증상에서는 시험물질의 투여와 관련하여 투여 직후부터 투여 후 5분 후까지 15mg/kg 투여군에서는 혀로 입 주위를 핥는 이상행동이, 45mg/kg 투여군에서는 몸을 비트는 행동, 머리를 땅에 대고 불안하게 기어다니는 행동, 혀로 입 주위를 핥는 등의 이상행동, 비틀거림, 침흘림, 투여부위 통증, 눈의 충혈 등의 증

상이 관찰되었으나 이후에는 회복되었다.

- 체중변화에서는 암수 모두 시험물질의 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
- 부검소견에서 15mg/kg 투여군의 수컷에서 신장의 창백함이 관찰되었으나 시험물질의 투여에 의한 변화는 아닌 것으로 판단되었다.
- 위의 결과에서 CB-OH의 Beagle dog에 대한 단회 정맥내투여 독성시험에서는 사망동물은 관찰되지 않았으나 45mg/kg 투여군에서 투여직후 이상행동, 침흘림, 투여부위의 통증 및 눈의 충혈 증상이, 15mg/kg 투여군에서는 혀로 입 주위를 핥는 이상행동이 관찰되어 일시적인 신경증상을 유발하는 것을 알았다. 한편 본 시험에서의 동물의 사망은 관찰되지 않아 치사량은 암수 모두 45mg/kg을 상회할 것으로 판단되었다.

나. 반복투여독성시험

(1). CB-Ph의 Beagle dog을 이용한 2주간 반복 경구 투여 독성 시험(DRF)

- 시험 물질 CB-PH의 반복투여 독성시험에서의 용량 결정의 일환으로, Beagle dog에 시험물질을 0, 10, 100, 500 및 1,000 mg/kg의 용량으로 2주간 반복하여 경구 적용하고 일반증상관찰, 체중 변화, 혈액학적인 검사, 혈액생화학적인 검사 및 주요장기에 대한 병리조직학적인 검사를 수행하였다. 시험결과는 다음과 같았다.
- 암수 모두 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 시험물질의 투여와 관련된 일반증상은 500 mg/kg 이상의 투여군 암수 모두에서 관찰된 구토, 설사 및 사료섭취불량 이었고, 500 mg/kg 투여군의 암수 각 1마리에서 혈떡거리는 호흡, 후궁반장, 야윽 및 결막충혈이 산발적으로 관찰되었다.
- 체중변화에서는 암컷 500mg/kg 투여군의 1마리에서 체중증가 억제가 관찰되었다.
- 사료섭취량에서는 투여 개시일에 암컷 100 mg/kg 이상의 모든 투여군에서 일시적으로 사료를 남겼고 암컷 500mg/kg 투여군에서는 지속적으로 섭취량 감소가 있었다.
- 안검사 및 요검사에서는 이상소견이 관찰되지 않았다.

- 혈액학적인 검사에서 암수컷 1,000 mg/kg 투여군에서 적혈구수, 헤모글로빈양 및 헤마토크리트 값이 대조군에 비해 낮은 것이 관찰되었다.
- 혈액생화학적인 검사에서는 시험물질의 투여와 관련된 독성학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 부검소견에서는 시험물질의 투여와 관련된 독성학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 다만 폐에서의 다양한 변화가 수컷의 10 및 100 mg/kg 투여군에서, 암컷의 10, 100 및 500 mg/kg 투여군에서 관찰되었으나 용량상관성이 있는 변화는 아니었다.
- 장기 중량에서는 부신의 중량이 수컷에서는 모든 시험물질 투여군에서 증가하는 경향이 암컷의 경우 감소하는 경향이 관찰되었다.
- 병리조직학적인 검사에서는 수컷 10 mg/kg 투여군에서 폐에서 폐포의 기관지내 대식구와 호중구의 침윤, 100 mg/kg 투여군에서 폐포에서 섬유아세포와 호중구의 침윤과 폐포벽의 비후 및 1,000 mg/kg 투여군에서 섬유아세포의 증식을 동반한 폐포벽의 비후가 관찰되었다. 암컷에서는 100 mg/kg 투여군에서 세기관지와 폐포에 호중구와 대식구의 침윤, 실질조직의 육아종형성 및 세기관지 염증이, 500 mg/kg 투여군에서 기관지 및 폐포강내 호중구, 대식구 및 염증산물의 침윤이 관찰되어 폐의 염증선 변화가 용량상관성 없이 관찰되었다. 수컷의 10 mg/kg 이상의 투여군 모두에서 부신의 사구층 세포의 공포화 변성이 용량 의존적으로 관찰되었고 암컷의 100 및 1,000 mg/kg 투여군에서 사구층 세포의 공포화 변성이 관찰되었다.
- 이상의 결과로 보아 CB-Ph의 경구적인 적용은 500mg/kg 이상의 투여군에서 투여 직후의 구토와 설사를 유발하였고 수컷 10mg/kg 이상, 암컷 100mg/kg이 변화는 아닌 것으로 사료되었다. 따라서 CB-Ph의 4주간 이상의 반복투여 독성시험에서의 **최고용량은 100 mg/kg 이상과 500 mg/kg 미만에서 결정하는 것**이 바람직한 것으로 판단되어 200 mg/kg을 최고용량군으로 하고 공비를 5로 하여 40 및 8 mg/kg을 설정하는 것이 적합하다고 판단된다.

(2). CB-Ph의 Beagle dog를 이용한 4주간 반복 경구투여 독성 시험

- 시험 물질 CB-PH의 반복 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 암수 공히 부형제 대조군과 시험물질을 각각 200, 40 및 8 mg/kg의 용량으로 암수 각각 3마리의 Beagle dog에 4주간 반복 경구투여 하였다. 시험결과는 다음과 같았다.
- 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 시험물질의 투여와 관련된 일반증상은 200 mg/kg 투여군의 수컷에서 투여 9일째부터 16일째 사이에 관찰된 연변 또는 설사였다.
- 체중변화에서 시험물질투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
- 사료섭취량에서 시험물질투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
- 안검사에서 암수 모든 투여군에서 이상이 관찰되지 않았다.
- 요검사에서 암수 모든 투여군에서 이상이 관찰되지 않았다.
- 심전도 검사에서 시험물질투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
- 혈액학적 검사에서는 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여에 의한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다.
- 혈액생화학적 검사에서도 시험물질투여와 관련된 독성학적 변화는 관찰되지 않았다.
- 부검소견에서 시험물질투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 장기중량에서 수컷의 200 mg/kg 투여군에서 부신의 중량 증가경향이 관찰되었고 암컷의 200mg/kg 투여군에서 부신의 중량 증가경향이 있었다.
- 병리조직학적인 검사에서 시험물질투여와 관련된 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로 보아 본 시험에서 CB-PH의 Beagle dog에서의 4주간 반복경구투

여에서 200 mg/kg 투여군에서 암수 모두 부신의 중량 증가 경향이 있었으나 조직학적인 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서의 무해용량은 암수 모두에서 200 mg/kg 이상으로 사료 되었고 표적 장기는 관찰되지 않았다.

(3). CB-Ph의 랫드를 이용한 13주간 반복 경구투여 독성 시험 및 4주 회복시험

- 본 시험은 시험 물질 CB-PH의 13주 반복 경구투여에 의한 독성 및 회복성 여부를 조사하기 위하여 실시하였다. Sprague-Dawley (SD) 계통 암수 랫드에 시험물질 63, 250 및 1,000 mg/kg을 투여하는 시험물질 투여군을 설정하여 부형제 대조군과 비교하였다. 각 군별 동물 수는 주요군으로 각 군당 암수 각각 10마리 및 회복군으로 부형제 대조군과 최고용량군 암수 각각 5마리로 하였다. 시험항목으로는 13주간 반복투여 및 4주 회복에 의한 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 뇨검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검 소견 및 병리조직학적 소견을 관찰하였다. 시험결과는 다음과 같다.

- 시험물질의 독성과 관련된 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 시험물질의 투여에 의한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다.
- 체중의 변화에서 시험물질 투여에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 사료 섭취량 관찰 결과 본 시험물질 투여와 관련된 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 물섭취량 관찰 결과 본 시험물질 투여와 관련된 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 안검사 결과 본 시험물질 투여와 관련된 독성학적 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 뇨검사 결과 수컷 중간 용량군 및 최고 용량군에서 요 pH가 통계학적으로 유의하게 낮았으나 독성학적으로 해로운 변화로 판단하지는 않았다.
- 혈액학적 검사 결과 본 시험물질 투여와 관련된 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 혈액생화학적 검사 결과 본 시험물질 투여와 관련된 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

- 장기중량 측정결과 수컷 중간 용량군 및 최고 용량군에서 신장과 간장중량의 증가가 관찰되었다. 암컷 중간 용량군 및 최고 용량군에서는 간장 중량의 증가, 최고 용량군에서는 신장중량의 증가가 관찰되었다.
- 육안적인 부검소견에서 본 시험물질 투여와 관련된 독성학적 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 조직병리학적 관찰 결과 본 시험물질 투여와 관련된 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 CB-PH의 랫드에 대한 13주 반복 경구 투여 및 4주 회복시험에서 수컷 중간 용량군 및 최고 용량군에서 요 pH 감소와 암수 중간 용량군 및 최고 용량군에서 간장과 신장 장기중량의 증가가 인정되었으나 조직학적인 변화가 동반되지 않았고 회복군에서는 관찰되지 않은 가역적인 변화로 외인성 물질에 의한 적응성변화로 판단하였다. 따라서 본 시험조건에서 무독성량(NOEL)은 1,000 mg/kg으로 판단되었다.

(4). CB-Ph의 비글견을 이용한 4주 반복 경구투여 독성시험, 2주 회복시험 및 독성 동태시험

- 본 시험은 암수 비글견을 이용하여 시험물질인 CB-Ph를 1차 0(대조군), 50, 150 및 450 mg/kg의 용량으로 0.5% MC에 현탁시켜 1.5주간 경구 투여한 결과 모든 용량에서 구토, 설사 및 점액변 등 증상이 관찰되어, 2.5주간의 휴약기간을 거친 후, 2차 0(대조군), 30, 90 및 270 mg/kg의 용량으로 캡슐에 충전하여 4주간 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 2주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하며, 독성동태시험을 통해 약물의 전신 노출도를 모니터링하기 위하여 실시하였다.
- 전 실험기간 중, 암수 모든 시험군에서 사망례는 발생하지 않았다. 그러나, 1차 투여기간 중, 암수 모든 시험물질투여군에서 개체간의 차이는 있으나 구토, 연변, 설사 및 점액변 등 증상이 용량 의존적으로 다발하고, 설사 또는 구토물에 혈점이 관찰되었다. 그 후, 2.5주간의 휴약기간을 거쳐 모두 회복되었으며, 2차 투여기간 중에는 암수 30 및 90 mg/kg 투여군에서 연변, 설사, 점액변 및 구토 증상이 산발적으로 간혹 관찰되었으나, 270 mg/kg 투여군에서는 연변, 설사, 점액변 및 구토 증상이 비교적 높은 빈도로 관찰되었다. 그 외, 90 mg/kg 투여군에서는

간혹, 270 mg/kg 투여군에서는 빈번하게 시험물질혼입변이 관찰되었으며, 회복 기간에는 시험물질에 의한 증상이 관찰되지 않았다.

- 체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 심전도검사, 뇨검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사에서는 시험물질의 투여에 의한 변화가 관찰되지 않았다. 또한, 주시험군 및 회복군에 대한 부검 및 조직병리학적 검사에서도 시험물질에 의한 병리변화는 관찰되지 않았다.
- 독성동태시험에서 1차 투여 첫날, 50, 150 및 450 mg/kg 투여군에서 암수 전신 노출도는 용량 의존적으로 증가하고, 암컷은 수컷에 비해 높게 나타났다. 2차 투여 첫날에는 30, 90 및 270 mg/kg 투여군에서 수컷의 AUC_{last}는 30 및 90 mg/kg 투여군 간에 유사하게 나타났으나, 270 mg/kg 투여군에서는 증가하였다. 암컷은 용량의 증가에 따라 증가하고, 암수 간에 큰 차이는 없었으며, 암수 C_{max} 및 T_{max}는 용량의 증가에 따라 증가하는 경향을 보였다. 2차 투여 4주째에는 암수 AUC_{last} 및 C_{max} 모두 용량의 증가에 따라 증가하고, 수컷의 AUC_{last}는 투여 첫날에 비해 경미하게 증가하였으나, 암컷은 투여 첫날과 비슷하게 나타났으며, 암수 모두에서 시험물질의 축적현상은 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과에 의해, 본 시험조건 하에 시험물질인 CB-Ph를 캡슐에 충전하여 4주간 반복 경구투여 시 30 및 90 mg/kg의 용량에서는 시험물질에 의한 영향이 관찰되지 않았고, 270 mg/kg의 용량에서는 구토, 설사 및 점액변 등 증상이 관찰되었으나, 임상병리 및 조직병리학적 변화가 관찰되지 않았고, 본 시험물질이 항암제인 점을 감안하여 암수 비글견에 대한 무독성량(NOEL)은 270 mg/kg인 것으로 판단된다. 또한, 시험물질의 전신 노출도는 용량 의존적으로 증가하는 경향을 나타내고, 암수 간의 차이 및 축적현상은 관찰되지 않았다.

다. 유전독성시험

(1). CH-Ph의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험

- CB-PH의 배양 포유동물 세포에 있어서의 돌연변이 유발설을 검색하기 위하여 염색체이상 유발성을 검색하기 위하여 염색체이상 유발성 여부를 지표로 하여 시험하였다. 이를 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용하여 대사활성제 (S-9 mix) 적용(+S) 및 비적용(-S)하에 염색체이상 시험을 수행하였다.

- 시험물질 처리 농도는 세포 증식 50% 억제를 기준으로 결정하였으며, 시험물질 농도 30, 60 및 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (-S, 6시간 처리), 1.125, 2.25 및 4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (-S, 24시간 처리)와 음성대조군 및 양성대조군으로 시험군을 설정하여 처리한 후 염색체이상을 계수하였다.
- 그 결과, 대사활성계 적용 6 시간 처리 최고농도(120 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 대사활성계 비적용 6 시간 처리 최고농도(6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 대사활성계 비적용 24시간 처리 최고농도 (4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 모두에서 염색체이상을 가진 중기상의 출현비도 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화가 없었다.
- 따라서 CB-Ph는 본 시험조건 하에서 사용한 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

(2). CB-Ph의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

- CB-PH의 유전독성 평가를 위해 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 투여 최고용량은 예비시험(04-MG-093P)에서 투여일 포함 4일간 관찰한 결과 사망동물이 나타나지 않아, 의약품등의 독성시험기준에 따라 단회투여 독성시험의 최고용량인 2000 mg/10ml/kg/day 2회 투여로 하였다.
- 약 7주령의 수컷 ICR 마우스에 시험물질 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg의 용량을 1일 1회 2일간 경구투여하고, 최종 투여로부터 약 24시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였다.
- 개체당 2000개의 다염성적혈구(Polychromatic Erythrocyte, PCE)를 계수하면서 이중 소핵을 가진 다염성적혈구(Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, MNPCE)의 수를 계수한 결과 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가가 나타나지 않았으며, 총 적혈구 중 다염성적혈구 비율에서도 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 감소가 나타나지 않았다.
- 이상의 결과 CB-PH는 위 시험조건에서, 본 시험에 사용한 수컷 ICR 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

(3). CB-OH의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

- 시험물질 CB-OH의 유전독성 평가를 위해 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 투여 최고용량(동일조건의 예비시험에서 결정)은 투여일 포함 5일간 관찰한 결과 동물이 사망하지 않는 범위 내에서 최대한 높은 용량으로 추정되는 300mg/10ml/kg/day 2회 투여로 하였다.
- 약 7주령의 수컷 마우스에 시험물질 0, 75, 150 및 300 mg/kg의 용량을 1일 1회 2일간 복강내 투여하고, 최종 투여로부터 약 24시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였다.
- 개체당 2000개의 다염성적혈구(Polychromatic Erythrocyte, PCE) 중에 나타나는 소핵을 가진 다염성적혈구(Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, MNPCE)의 수를 계수한 결과 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가가 나타나지 않았으며, 총 적혈구 중 다염성적혈구 비율에서는 150mg/kg/day 용량 2회 투여군에서 유의한 감소를 나타내었다.(P<0.01)
- 일반 증상에서도 입모, 활동력 감소, 설사혼적 등이 관찰되었다.
- 부검시 체중에 있어서는 시험물질 최고용량군에서 유의한 감소가 관찰되었다.
- 따라서 CB-OH는 위 시험조건에서, 본 시험에 사용한 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

(4). CB-Ph의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

- 시험물질 CB-PH의 세균에서의 돌연변이 유발성 검색을 위하여 Salmonella typhimurium의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개 균주와 대장균 Escherichia coli의 트립토판 요구성 균주인 WP2 uvrA를 이용해 복귀돌연변이시험을 실시하였다.
- 시험물질은 Dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해하여 처리하였다. Salmonella typhimurium의 경우 대사활성계 적용시 0, 63, 125, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 미적용시 0, 31, 63, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, Escherichia coli의 경우 대사 활성계 적용시 0, 63, 125, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 미적용시 0, 31, 63, 125, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 범위를 설정하고 각각 음성 및 양성 대조군으로 시험균을 구성해 본시험을 실시하였다.

- 시험 결과 모든 균주에서 항균성이 관찰되는 농도에 이르기까지 집락 수의 일관성 있는 증가는 나타나지 않았다.
- 이상의 결과를 종합할 때, 시험물질 CB-PH는 본 시험조건 하에 사용한 시험균주들에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

(5). CB-OH의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

- CB-OH의 세균에 있어서 돌연변이 유발성을 검색하기 위해 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개 균주와 대장균 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 *uvrA*를 이용해 복귀돌연변이시험을 실시하였다.
- 시험물질은 dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해하여 처리하였다. 대사활성계 적용(+S)시는 모든 균주에 대해 8.2, 24.7, 74.1, 222.2, 666.7, 2000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 범위를 대사활성계 미적용(-S)시는 2.7, 8.2, 24.7, 74.1, 222.2, 666.7 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (살모넬라)와 8.2, 24.7, 74.1, 222.2, 666.7, 2000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (E.coli)의 범위를 설정하고 각각 음성 및 양성대조군으로 시험균을 구성해 본시험을 실시하였다.
- 시험 결과 TA1535(+S) 및 TA1537(+S)에서 집락수가 약간 증가하였으나 일시적인 현상인 것으로 판단되었다. 모든 균주에서 항균성이 관찰되는 농도에 이르기까지 집락수의 일관성있는 증가는 나타나지 않았다.
- 이상의 결과를 종합할 때, 시험물질 CB-OH는 본 시험조건 하에 사용한 시험균주들에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

라. 생식 발생독성시험

(1). CB-Ph의 랫드를 이용한 수태능 및 초기배 발생시험

- 본 시험은 CB-PH의 경구투여에 의한 수태능 및 초기배 발생독성을 조사하기 위하여 실시하였다. 실험방법으로는 암수 공히 부형제 대조군과 시험물질을 각각 111, 333 및 1,000 mg/kg의 용량으로 SD 계통 수컷 랫드에 4주간, 암컷 랫드에 2주간 경구투여 한 후 교배시켜 임신 6 일까지 투여한 후 임신 15일째 부검하여 부형제 투여군과 비교하였다.

- 시험물질의 투여와 관련된 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 시험물질의 투여에 의한 유의한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다.
- 체중의 변화에서 수컷 최고용량군에서 유의한 체중증가의 억제가 관찰되었다.
- 사료 섭취량에서 시험물질 투여에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 암컷의 성주기에서 시험물질 투여에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 교미율, 수태율 및 임신율에서 시험물질 투여에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 수컷의 정자 검사 및 호르몬 검사에서 시험물질 투여에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 모동물의 부검시 관찰한 착상 전 후 배자 사망률에서 시험물질 투여에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 부검 소견에서 시험물질 투여에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 장기중량 측정결과 수컷 중간 용량군 및 최고 용량군에서 신장 및 간장의 상대 및 절대중량의 유의한 증가가 관찰되었다. 암컷에서는 최고 용량군에서 신장 상대중량의 유의한 증가가 관찰되었다.
- 고환, 난소 및 이상장기의 병리조직학적 검사에서 시험물질 투여에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로 보아 CB-PH의 경구투여는 수컷 최고용량군에서 체중증가의 억제, 수컷 중간용량 군 및 최고용량 군에서 신장 및 간장의 상대적 및 절대적 중량의 증가가 관찰되었고, 암컷 최고용량 군에서는 신장의 상대중량의 증가가 관찰되었으나 생식기능과 관련된 이상변화는 관찰되지 않았다.
- 따라서, 수태능 및 초기배 발생독성시험에서의 무독성량은 암수 모두에서 1,000

mg/kg 이상인 것으로 판단되었다.

마. CB-Ph의 단회 경구투여에 의한 랫드의 호흡기계에 미치는 영향 평가시험

- 6주령의 수컷 SD 랫드에 시험물질인 CB-Ph를 단회 경구투여하고, 무마취·무구속 상태 하에서 호흡기계 parameters (분당호흡수 (respiratory rate), 1 회 호흡량 (tidal volume) 및 분당호흡량 (minute volume))를 측정하여 호흡기계에 미치는 영향을 평가하였다. 군구성은 대조군과 500, 1000 및 2000 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 총 4 군으로 설정하여 각 군당 6 마리씩 투여하였고, 대조군은 부형제인 0.5% MC 용액을 투여하였다. 호흡기계 parameters는 whole body plethysmography system으로 측정하였고, 투여 전 (0 시간), 투여 후 0.5, 1, 2 및 4 시간째에 평가하였다. 500, 1000 및 2000 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 분당호흡수, 1 회 호흡량 및 분당호흡량은 모든 측정시점에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 결론적으로 랫드를 이용한 단회 경구투여에서, 시험물질인 CB-Ph는 2000 mg/kg 용량 이하에서 호흡기계에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

바. 기타 독성시험

(1). CB-Ph의 마우스를 이용한 항원성 시험 (아나필락시스 쇼크반응 시험)

- 본 시험은 CB-PH의 마우스에서의 아나필락시스 쇼크반응을 알아보기 위해 Balb/c계 수컷 마우스를 부형제 대조군(G1), 저용량군(G2, 10mg/kg), 고용량군(G3, 100mg/kg), Adjuvant 혼합군(G4, 100mg/kg + Alum) 및 양성대조군(G5, OVA + Alum)으로 설정하였다. 투여경로 및 투여기간은 예상되는 면역반응을 고려하여 복강내로 주 1회, 2주간 총 2회 투여하여 감작시켰고, 최종 감작 후 14 일째에 야기항원액을 마우스의 미정맥 내로 투여하고 30분간 전신의 증상을 관찰한 후 부검하여 아나필락시스 쇼크반응의 유무를 확인하였다. 시험결과는 다음과 같다.

- 시험 기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다.

- 일반증상 관찰결과 시험물질투여에 의한 이상은 관찰되지 않았다.

- 체중 변화를 관찰한 결과 시험물질 투여에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

- 아나필락시스 쇼크반응 판정 결과 부형제 투여군 및 시험물질 투여군에서는 아무

런 증상이 관찰되지 않았다. 양성대조군에서는 머리 주위를 부비는 증상, 눈 또는 입주위 부종, 현저한 움직임 저하, 노력성 호흡 및 청색증이 관찰되어 강한 아나필락시스 반응이 나타났다.

- 부검결과 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 CB-PH는 100 mg/kg 까지는 항원성이 없는 것으로 판단되었다.

(2). CB-Ph의 마우스-랫드계를 이용한 수동 피부 아나필락시스 반응시험

- 본 시험은 CB-PH의 마우스-랫드계를 이용한 수동 피부 아나필락시스 반응을 알아보기 위해 ICR계 수컷 마우스를 부형제 대조군(G1), 저용량군(G2, 10 mg/kg), 고용량군(G3, 100 mg/kg), Adjuvant 혼합군(G4, 100 mg/kg + Alum) 및 양성대조군(G5, OVA + Alum)으로 설정하였다. 투여 경로 및 투여기간으로는 복강내로 주 1회, 2주간(총 2회) 투여하여 감작시켰다. 채혈은 최종 감작 후 12일째 실시하였으며 피검혈청은 10배에서 최종 5120 배까지 희석하여 개체별로 PCA(수동 피부 아나필락시스, Passive cutaneous anaphylaxis) 반응을 실시하였다.
- 시험 기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 일반증상에서 시험물질투여에 의한 이상은 관찰되지 않았다.
- 체중의 변화에서 시험물질 투여에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- PCA 반응 결과 부형제 대조군, 저용량군, 고용량군 및 Adjuvant 혼합군에서는 항체반응이 모두 음성으로 나타났다. 그러나 양성대조군에서는 10배에서 40배 희석된 혈청에까지 양성 반응이 나타나 양성 대조물질에 대한 항체가 형성되었음을 보여 주었다.
- 이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 CB-Ph는 100 mg/kg 까지는 항원성이 없는 것으로 판단되었다.

IV. 임상 시험

1. 서론

- 표준 치료에 실패한 진행성 고형암 환자에서 벤조일옥시시남알데하이드 (2'-benzoyloxycinnamaldehyde, CB-Ph)의 안전성 및 약동학 평가를 위한 제1상 임상시험 (A phase I clinical trial to determine safety and pharmacokinetics of 2'-benzoyloxycinnamaldehyde, CG-Ph) in patients with refractory advanced solid tumors).

2. 임상시험 조정자: 김 철

국립암센터 임상시험센터

경기도 고양시 일산동구 일산로 323번지

3. 공동연구자:

서울아산병원 임상약리학 교실	:	임형석
서울아산병원 임상약리학 교실	:	정진아
국립암센터 폐암센터	:	이진수
국립암센터 유방암센터	:	노정실
국립암센터 임상시험센터	:	남병호

4. 임상시험 의뢰자: 한국생명공학연구원, (주) 근화제약

5. 임상시험 기관 및 계획한 환자 수

- 1개의 시험기관(국립암센터)에서 진행될 것이며 약동학적 분석은 서울아산병원에 서 실시한다. 실제로 모집되는 환자 수는 용량 증가 횟수에 달려있지만 최소 2명 에서 최대 약 40명은 넘지 않을 것으로 예상된다.

6. 임상시험 단계 및 디자인

전향적, 단일기관, 공개, 제 1상 임상시험

7. 임상시험 기간

- 첫번째 환자 등록 예정일 2010년 2사분기

- 최종 환자 완료 예정일 2011년 3사분기

8. 목적

- 이 시험은 표준치료에 저항성을 보이는 진행성 고형암 환자에서 CB-Ph의 안전성과 내약성을 평가하고, 단회 및 반복 투여 후 약물의 약물동태학을 확인하기 위한 제 1상, 공개, 단일기관, 용량 증가 시험이다.

일차적 목적	결과 변수
<ul style="list-style-type: none"> - 표준치료에 실패한 고형암 피험자에서 CB-Ph의 안전성과 내약성 평가 (MTD 결정 포함) 	<ul style="list-style-type: none"> - 이상 반응의 발생율과 중증도 (CTC AE 버전 4.0), 활력 징후, ECG, 임상 화학검사, 혈액학적 검사 및 뇨검사, 및 신체 검사.
이차적 목적	결과 변수
<ul style="list-style-type: none"> - 표준 항암치료에 저항성을 보이는 고형암 피험자에서 CB-Ph의 단회 및 반복 경구 투여 후 CB-Ph의 약동학적 특성 평가. - 대상 환자에서 종양 크기 평가에 의해 항종양 활성에 대한 임시 평가 - 탐색적 연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 데이터가 허용하는 경우, 단회 투여 및 반복 투여 약동학 변수를 계산한다. 여기에는 다음이 포함될 수 있다 (단, 이에 국한되지 않음) - 단회 및 반복 투여시의 약물농도-시간 곡선하 면적 (AUC_{0-last}, AUC_{0-inf}), 최고혈중농도 (C_{max}), 최고혈중농도 도달시간 (T_{max}), 청소율 (CL/F), 분포용적 (V_z/F), 혈중반감기 ($t_{1/2}$), 평균체류시간 (MRT_{last}) - 계측가능한 질환이 있는 환자에서 객관적 반응율 및 질병안정화비율 (disease control rate) - Serum thiol & cystine concentration

9. 임상시험 설계 및 대상 환자

가. 임상설계 및 용량 설정 근거

- 본 임상시험은 표준치료에 실패한 진행성/전이성 고형암 환자를 대상으로 하는 공개, 단일기관, 전향적 제1상 임상시험이다. 피험자는 각 용량 수준의 코호트 별로 최소 1명에서 최대 6명이 등록되어 최대내약용량(maximum tolerated dose, MTD)이 결정될 때까지 진행되며 대상환자군에서 CB-Ph의 안전성, 내약성 및 약동학적 특성을 평가하기 위해 설계되었다. 대상 환자는 각 코호트별로 정해진 용량의 CB-Ph를 제1일에 1회 복용하며 48시간 후부터는 매일 1일 1회 복용하여 단회 및 반복 약동학 검사를 진행한다. 본 임상시험의 개시용량은 CB-Ph 500mg 1일 1회 경구복용이며 이는 다음과 같은 근거로부터 산정되었다.
- 진행한 비임상 독성시험에서 가장 예민한 결과를 보인 비글견의 4주 반복 경구투여 독성시험 (2008-2009년 바이오 텍스텍에서 실시) 결과 결정된 무독성용량(no adverse effect level, NOAEL) 270mg/kg를 건강한 성인 자원자에서 치료제에 대한 최초의 임상시험에서 안전한 최대 개시용량 추정에 대한 FDA 지침 (FDA Guidance for industry on estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, July 2005)에 따라 환산계수와 1/10의 안전 계수 (safety factor)를 적용하여 인체 동등 용량(Human equivalent dose, HED)을 구하면 약 540mg/m²이 되어 이보다 낮은 CB-Ph 500mg 1일 1회를 개시용량으로 설정하게 되었다.

나. 대상 환자군

- 임상시험 참여 시점에서 표준 치료법이 없는 진행성/전이성 고형암 환자

(1). 선정기준

다음의 기준에 모두 해당되는 환자가 본 임상시험에 참여할 수 있다.

- ① 본 임상시험 참여에 자발적으로 동의하고 피험자 동의서에 서명한 피험자
- ② 만 20세 이상, 75세 이하
- ③ 조직병리검사나 세포학검사로 확진된 진행성/전이성 고형암 환자

- ④ 항암화학요법, 표적치료제, 방사선치료를 포함하여 지금까지 알려진 일반적인 표준치료에도 질병의 진행이 있거나 기존 치료방법으로 효과적인 치료나 생존 기간 연장을 기대할 수 없는 환자
- ⑤ 일상생활 수행능력 (ECOG 수행상태) 0-2
- ⑥ 12주 이상의 잔여생존기간이 예측되는 경우
- ⑦ 첫 시험약 투여일(D1)을 기준으로 이전 항암화학요법, 생물학적요법, 방사선 치료의 마지막 날로부터 최소 4주 이상 경과되고 관련 급성독성이 모두 없어진 경우 (단, nitrosoureas, mitomycin은 6주 이상)
- ⑧ 아래 열거한 실험실 수치로 판단되는 적절한 기관 기능
 - i. Absolute neutrophil count (ANC) $\geq 1,500/\text{mm}^3$
 - ii. Hemoglobin $\geq 10.0\text{g/dL}$
 - iii. Platelet $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - iv. AST(SGOT), ALT(SGPT), ALP \leq 정상상한치 X 3이고 total bilirubin $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$ (간전이 동반시에는 AST/ALT/ALP를 정상상한치의 5배 이하로, 골전이 동반시에는 ALP를 5배 이하로 한다)
 - v. 혈청 크레아티닌 $\leq 1.5 \text{ mg/dL}$ 또는 creatinine clearance (Ccr, 측정 혹은 Cockcroft-Gault 법에 따라 계산) $\geq 50 \text{ mL/min}$
- ⑨ 폐경 후 상태, 영구적/외과적 불임 상태, 또는 가임 여성 환자에서는 혈청 또는 소변 임신 검사 결과 음성의 증거. 임신의 가능성이 있는 남성과 여성은 임상시험 기간 동안 및 임상시험 마지막 투여 후 6개월 간 의학적으로 승인된 피임법을 사용하여야 한다

다. 제외기준

- 다음의 모든 사항 중 하나라도 해당되는 환자는 임상시험에서 제외 된다.

- ① 백혈병 등의 혈액종양 환자
- ② 활성 척수 또는 뇌 전이 (연수막 전이 포함). 단 이전의 중추신경계 전이에 대한 치료 (정위 방사선 치료 혹은 수술 등)를 받은 이후 스테로이드 등의 지속

적 치료가 필요하지 않으며 인지능력 저하, 일상생활 장애 등의 후유증이 남지 않은 경우는 제외

- ③ 복막과종에 의한 장폐색 증상, 염증성 장질환과 같은 만성 위장관 질환, 광범위 장절제, 위절제/위소장문합술 등에 의해 경구제 복용 및 흡수에 유의한 장애가 있는 경우
- ④ 최근 6개월 이내에 경험한 아래와 같은 중증 심장질환
 - i. 관상동맥 우회술이나 혈관성형술, 혈관스텐트
 - ii. 급성 심근경색 (acute MI)
 - iii. 협심증
 - iv. 울혈성 심부전 (NYHA class 2 이상)
 - v. 조절되지 않는 고혈압 (최대 약물 관리에도 불구하고 BP > 150/90 mmHg)
 - vi. 조절되지 않는 심실위 부정맥 또는 지속적인 치료를 요하는 심실 부정맥
 - vii. 뇌졸중 (출혈성 또는 혈전성 - 일과성 허혈 발작 포함)
- ⑤ 치매를 포함하여 정신과적 또는 신경과적 병력으로 인하여 본 임상시험의 지시사항을 따르기 힘든 피험자
- ⑥ 조절되지 않는 감염성 질환 또는 환자가 임상시험에 참여하는 것이 바람직하지 않는 불안정 또는 비보상성 (uncompensated) 전신질환 (예, 일상생활에 장애가 되는 만성 폐쇄성 폐질환, 조절되지 않는 당뇨병 등)
- ⑦ 기타 임상시험 참여 및 준수사항이나 추적조사 지침을 따르기 힘든 의학적, 심리적, 사회적, 지리적 여건

라. 대상피험자수

- 등록 예정 피험자수는 각 용량 단계별로 1명에서 최대 6명으로 6개의 용량단계를 고려할 때 최소 2명에서 최대 36명을 넘지 않을 것으로 예상된다.

10. 임상시험용 의약품

- 근화제약(주)에서 벤조일옥시시남알데하이드(2'-benzoyloxycinnamaldehyde, CB-Ph) 시험약을 공급한다. 벤조일옥시시남알데하이드(2'-benzoyloxycinnamaldehyde,

CB-Ph)는 100mg과 500mg의 정제 형태로 공급된다.

가. 임상시험용 의약품

- ① 제품명 및 제조사:
- ② 제형 및 성상:
- ③ 성분 및 함량:
- ④ 저장방법:
- ⑤ 사용기간:

나. 생산, 포장, labeling 및 저장

- 임상시험용 의약품은 의약품임상시험관리기준 (식품의약품안전청고시 제2007-34호, 2007.5.31) 제36조 및 제37조의 규정에 따라 임상시험의뢰자가 제조(또는 구입) 후, 임상시험기관의 관리약사에게 공급하여야 한다.
- 임상시험용의약품 라벨의 기재은 약사법 시행규칙 제71조 6항에 준하여 아래와 같이 기입한다.

*** 임상시험용 의약품 ***

- 제품의 코드명: 100mg : CB-Ph100
- 성상: 미백색의 원형 정제
- 제조번호 :
- 유효기간: 년 월 일까지
- 저장방법 : 밀폐용기, 실온(1~30℃)보관
- 의약품 제조업자 : 근화제약 주식회사
- 임상시험 이외의 목적으로 사용할 수 없음.

*** 임상시험용 의약품 ***

- 제품의 코드명: 500mg : CB-Ph500
- 성상: 백색 내지 미색의 장방형 정제
- 제조번호 :
- 유효기간: 년 월 일까지
- 저장방법 : 밀폐용기, 실온(1~30℃)보관
- 의약품 제조업자 : 근화제약 주식회사
- 임상시험 이외의 목적으로 사용할 수 없음.

다. 임상시험용 의약품 관리

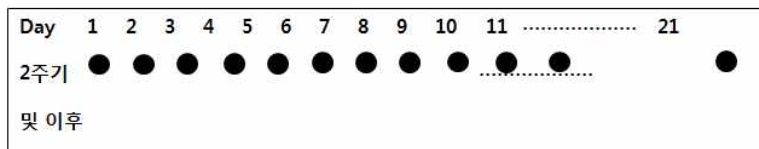
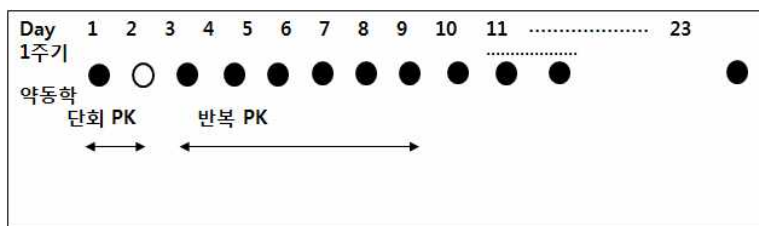
- 임상시험용 의약품은 임상시험기관의 관리약사에 의해 관리 되어야 한다. 관리약사는 시험전에 공급받은 모든 시험약에 대하여 인수증을 발행하고 기록한다. 임상시험을 관할하는 연구자와 근화제약(주)는 관리약사와의 원활한 의사소통과 주기적인 모니터링을 통하여 필요한 시기에 적절한 수량을 공급할 수 있도록 한다. 관리약사는 임상시험용 의약품에 대해 인수, 재고관리, 피험자별 투약 등의 업무

를 수행하고, 관리대장에는약품명 및 용량, 사용일 및 사용량 등을 기록하고 관리기록을 유지한다. 시험종료 후에 사용수량 등을 확인하고 미사용약은 관련규정에 따라 반납 혹은 폐기한다.

11. 임상시험 방법

가. 피험자 등록과 임상시험 진행

- 모든 임상시험 관련 절차가 시작되기 전, 환자로부터 임상시험 참여를 위한 서면 피험자 동의서가 취득되어야 한다. 스크리닝을 통해 선정/제외기준에 맞는 것으로 판단된 피험자는 등록번호를 부여 받은 후 시험약물 투여를 시작한다. 피험자 동의를 받은 순서대로 일련번호(screening number)를 부여하며 screening number는 세자리 숫자로 S001부터 시작한다. 스크리닝 과정을 통해 임상시험 피험자로 선정되면 등록번호를 부여한다. 등록번호(enrollment number)는 E0101부터 시작하며 앞의 두자리 "01"은 용량단계를, 뒤의 두자리 "01"은 각 용량단계에서 참여한 피험자의 순서를 의미한다. 제1일에 최초용량을 복용한 뒤 단회 투여 약동학 검사를 시행하며 제3일째부터 21일간 같은 용량을 중단 없이 매일 1회 시험약을 복용하며 반복 투여 약동학 검사를 진행하게 된다. 한 cycle은 21일간 매일 1회 복용으로 정의되며 제1 cycle은 제3일부터 21일간으로 정의하고 그 이후는 매 21일을 한 cycle로 정의한다. 임상시험 기간 중 안전성 및 내약성에 관련된 자료는 지속적으로 수집되며 DLT의 결정은 첫 주기에서만 이루어지게 된다.



나. 임상시험용 의약품의 투여

- CB-Ph의 초기 용량은 500 mg/day으로 체중이나 체표면적에 상관없이 경구로 1일 1회 같은 시간에 (편의를 위하여 아침 식전) 충분한 물과 함께 복용한다. 음식물 섭취에 따른 CB-Ph의 흡수에 대한 자료는 없으나 표준화하기 위하여 복용 전

후 1시간은 음식물의 섭취를 제한한다.

다. 용량제한독성 (dose-limiting toxicity, DLT)의 정의

- 임상시험의 대상 질환 혹은 그 질환과 관련된 검사에 의한 것이 아니고 임상적으로 관련 있는 이상 반응으로서 제1주기 이내에 시작하고 NCI CTCAE v4.0 (http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.02_2009-09-15_QuickReference_8.5x11.pdf)에 의해 정의된 grade ≥ 3 기준에 부합하는 비혈액학적 독성 또는 실험실적 이상 (alopecia 제외. 오심, 구토, 설사는 항구토제나 지사제 등으로 보존적 치료를 최대한 하였음에도 불구하고 발생하는 grade 3 이상의 증상)
- 혈액학적 독성
 - 7일 이상 지속되는 grade 4 neutropenia
 - Grade 4 thrombocytopenia
 - Febrile neutropenia: grade 4 neutropenia와 동반된 grade 2($>39^{\circ}\text{C}$) 이상의 열
 - Neutropenic infection: grade 4 neutropenia와 동반된 grade 3 (IV antibiotic, antifungal, 또는 antiviral 제제의 투여가 필요하거나 방사선학적/수술적 조치가 필요한 경우) 이상의 infection

라. 용량증대 및 MTD의 결정

(1) 단계별 용량

용량단계	mg/day
Level 1	500
Level 2	1000
Level 3	1600
Level 4	2400
Level 5	3000
Level 6	4000

(2) 최대 용량(MTD)의 결정

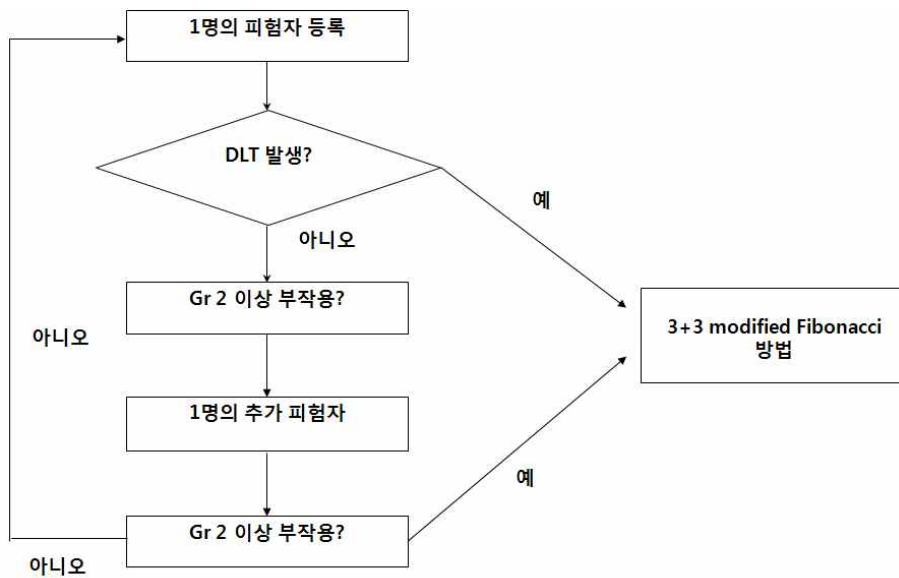
- 용량 증가시 모집 환자수는 용량제한독성 (dose-limiting toxicity, DLT)가 나타나기 전까지 혹은 코호트당 최소 2명의 피험자가 2도 (grade 2) 이상의 부작용을 경험하기 전까지는 각 용량단위 당 1명의 피험자를 대상으로 하며, 그보다 높은 용량 (escalated phase)에서는 코호트당 최소 3 명 및 최대 6 명의 환자를 대상으로 평가하는 modified Fibonacci 방법을 적용한다.
- MTD는 각 단계의 피험자 6명 중 1명 이하에서 DLT가 관찰되는 가장 높은 용량을 의미한다. 한 용량 단계에서 2명 이상의 DLT가 관찰되면, 그 아래 단계의 용량이 잠정적으로 MTD가 되고, 더 이상의 용량 증가는 시행하지 않는다. 2명 이상의 DLT가 나타난 용량의 한 단계 아래 용량에서 3명의 피험자가 등록되었다면 3명의 피험자를 추가로 더 등록하여 최종적으로 6명 중 1명 이하에서 DLT가 관찰되는 경우 MTD로 최종 결정하며 이미 6명이 등록되었다면 더 이상의 피험자를 추가하지 않고 이 한 단계 아래 용량이 MTD로 결정된다. 즉, 어떤 코호트에서 DLT가 발생하면 2건의 DLT가 발생하기 전까지 최대 6명의 피험자가 모집되며 그 결과 6명 중 1명이 DLT를 나타내면 (1/6) 그 다음 단계로 증량하며 6명 중 2명이 DLT를 나타내면 (2/6) 한 단계 아래 용량으로 내려가서 최종적으로 6명의 평가 가능한 피험자에서 2건 이상의 DLT가 발생하는지 확인한다. (그림 1)
- 단, 2명 이상의 DLT가 나타난 용량과 잠정적으로 MTD로 결정된 용량 사이에 50% 이상의 용량차이가 나서 (level 3과 4 혹은 그 이전의 단계) 두 단계 사이의 중간 용량 단계를 더 정밀히 시험해 보아야 할 필요성이 발생하면 DMC에서 그때까지 수집된 안전성 및 약동학 자료를 바탕으로 하여 추가 단계의 시험여부를 결정한다.

(3) 평가 가능한 환자

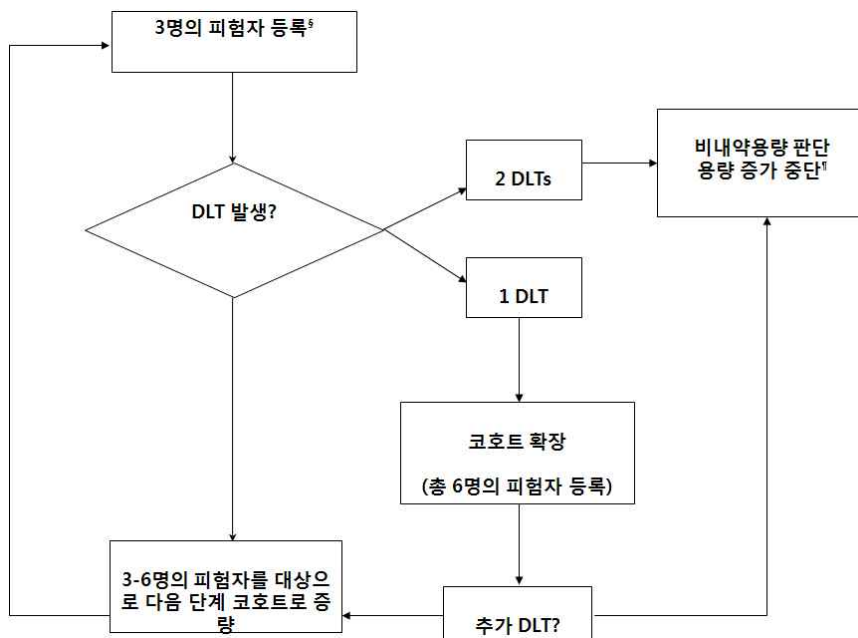
- 제 1주기의 80% (18일) 이상 시험약을 복용하여 안전성 자료가 충분하며 DLT를 평가할 수 있는 환자 혹은 DLT가 발생한 환자를 말한다. 만약 한 코호트에 모집된 피험자가 이 정의에 들지 못하면 대체 환자를 모집하여야 한다.
- 첫 주기에 DLT가 발생한 경우는 시험약 투여를 중지하나 시험약 투여가 임상적으로 명백히 효과가 있는 것으로 판단되는 상황에서 DLT 정의에 부합하는 부작용이 발생한 경우는 한 단계 아래 용량으로 감량하여 시험약을 지속할 수 있다.

그림 1. 임상시험 흐름도

A. Accelerated dose titration phase



B. Modified Fibonacci method



§ 피험자는 평가 가능한 환자를 말한다. 평가 가능한 환자란 제 1주기의 80% (18일) 이상 시험약을 복용하였고 안전성 자료가 충분한 환자 혹은 DLT를 겪은 환자로 정의된다.

¶ 비내약 용량 미만의 최종 용량 코호트가 평가 가능한 6명의 피험자 중 1명에서

DLT가 발생한 경우는 그 용량을 MTD로 하고 3명만 포함되어 있을 경우는 추가 3명의 피험자를 더 평가한다. MTD는 6명의 피험자 중 0 또는 1명의 환자에서 DLT가 발생한 용량을 의미한다.

12. 임상시험의 변수의 측정 및 평가

가. 일차적 변수

- 스크리닝 당시와 치료기간 동안 수집된 자료를 바탕으로 안전성과 내약성을 평가한다. 안전성 평가 변수는 이상 반응(NCI CTCAE v4.0에 따라)의 발생을 및 중증도, 활력 징후, 신체 검사, ECG 및 심장초음파, 혈액학적 검사, 혈청 생화학검사 및 뇨검사를 포함한다. NCI CTCAE 기준에 따라 등급을 매길 수 없는 이상 반응은 경증, 중등증, 중증으로 분류한다.
- 경증 (mild): 증상 또는 증후를 지각할 수 있으나 쉽게 참거나 견딜 수 있는 정도의 이상반응. 처치가 필요하지 않고 피험자의 정상생활(기능)을 크게 저해하지 않는 경우
- 중등증 (moderate): 일상 생활을 방해할 만큼 불편하거나 처치가 필요하거나 처치 후 회복된 경우
- 중증 (severe): 정상적인 일상 생활을 수행 할 수 없을 정도. 심한 이상반응으로 고도의 처치가 필요하거나 후유증이 남는 경우

나. 스크리닝 및 인구통계학적 자료

- 임상시험에 등록하기 전, 각 환자는 visit2 (제1일, Day 1) 전 2주 이내에 스크리닝 검사를 실시한다. 그 내용은 다음과 같다.

- ① 서면 피험자 동의서 제공
- ② 기왕력과 신체 검사
 - 선정/제외 기준에 대한 평가
 - 이전의 암 치료력 (수술, 항암치료, 방사선치료 등)
 - 인구통계 자료 (생년월일, 성별, 인종 등)
 - 흡연 및 음주력
 - 표준 내과 및 외과적 병력

- 병용 약물 기록
- 활력 징후
- 신체 검사
- ECOG 수행 상태

③ 임상적 검사

- 일반혈액학적검사 (Complete blood count with differential count)
- 혈청 생화학검사: glucose, BUN, creatinine, uric acid, cholesterol, total protein, albumin, total bilirubin, alkaline phosphatase, calcium, phosphorus, AST, ALT, gamma GT, LDH, magnesium, triglyceride, electrolyte (sodium, potassium, chloride, total CO₂)
- 요검사: specific gravity, pH, albumin, glucose, bilirubin, urobilinogen, ketone, RBC, WBC
- 요검사 dipstick에서 단백뇨 1+ 이상인 경우는 24시간 소변 단백검사
- 혈액응고검사: 프로트롬빈 시간, 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간
- 폐경 전 여성에서는 임신검사 (소변)
- ECG 및 심장초음파
- 헤모글로빈 A_{1c}

④ 종양 평가

- RECIST 평가를 위한 CT 및/또는 MRI 스캔
- 기타 종양의 상태를 파악하는데 도움이 되고 향후 반응 평가를 위해 필요한 검사

다. 약동학적 평가 및 변수

(1) 약동학 평가 항목

- 약동학적 특성 평가는 정해진 일정 및 측정 방법에 따라 분석된 피험자별 혈중 CB-Ph, CB-OH, CB-OH acid, α -coumaricacid를 통해 평가한다.
- 약동학적 특성 분석 시 채혈 시각은 각 피험자에 따라 실제 채혈 시각을 사용하여 분석한다. 측정된 농도가 최소정량한계(LLOQ) 미만이거나, 실제 채혈을 시행하지 않았거나(not applicable) 또는 검체가 누락된 경우(missing data)에는 혈중 약물 농도 자료에 각각 "<LLOQ", "NA", "MD" 로 기입한다.

- 혈중 농도-시간 양상은 각 피험자에서 linear 또는 log/linear 형태의 그래프로 나타나고, 처치군에 따라 평균 혈중 농도-시간 곡선도 같은 방법으로 나타낸다.
- 얻어진 자료는 약동학적 평가를 위하여 비구획 분석 방법 (non-compartmental analysis)에 의하여 다음의 약동학적 파라미터를 구한다.
 - 약물농도-시간 곡선하 면적(AUC_{0-last}, AUC_{0-inf})
 - 최고혈중농도(C_{max})
 - 최고혈중농도 도달시간(T_{max})
 - 청소율 (CL/F)
 - 분포용적(V_z/F)
 - 혈중반감기(t_{1/2})
 - 평균체류시간(MRT_{last})
 - 기타
- 각 약동학적 변수들의 정의는 다음과 같다.
 - T_{max} 단회 투여 후 최고 혈중 농도 도달시간
 - C_{max} 단회 투여 후 최고 혈중 농도
 - AUC_{last} LLOQ 이상의 농도값을 가지는 마지막 시간 (t_{last})까지의 혈중 농도-시간 곡선하 면적. 혈중 농도 상승 기간은 linear trapezoidal summation에 의하여 계산하고 혈중 농도 감소 기간은 log/linear trapezoidal summation에 의하여 계산한다.
 - AUC_{0-inf} Terminal phase의 plot으로 외삽하여 구한 0에서 무한대 시간까지의 AUC % AUC_{extrapol} 최종 측정까지 계산한 AUC와 무한대까지 외삽으로 얻은 AUC의 비율로 다음과 같이 계산한다.
 - % AUC_{extrapol} = (AUC_{0-∞} - AUC_{last}) / AUC_{0-∞} * 100
 - t_{1/2} α 초회 투여후 혈중 농도-시간 profile의 terminal phase의 log-linear plot에서 직선회귀분석으로부터 얻은 소실속도상수(l_z)와 ln(2)/l_z의 계산으로부터 얻은 최종소실반감기.
 - CL/F 청소율 CL = Dose/AUC_{0-∞}
 - V_z/F terminal phase에 근거한 분포용적. V_z=CL/l_z
 - MRT_{last} t_{last}까지의 평균잔존시간(mean residence time). MRT_{last} = AUMC_{last}/AUC_{last}
 - C(t)=시간 t에서의항체활성도일때, AUMC_{last}= $\int_0^{t_{last}} C(t)dt$

- 최고혈중농도(C_{max})와 최고혈중농도 도달시간(T_{max})은 내삽법(intrapolation)을 사용하지 않고 관측된 값을 사용한다. $C_{max}, AUC_{last}, AUC_{0-inf}$ 는 각 투여 용량으로 보정한 값도 구한다. AUC(area under the curve)를 구하는 데는 사다리꼴 공식을 사용한다. 약동학적 파라미터 (raw and dose-normalized data)는 평균, 중앙값, 표준편차, 표준오차, CV(coefficient of variation), 최소값, 최대값 등을 표기한다.
- 약물 농도 데이터와 약동학적 파라미터는 각 치료군의 피험자별 수치를 구한 후 이들을 기술통계학적으로 분석하며, 투여 용량에 따른 각종 약동학적 성상의 dose-proportionality를 조사한다.
- 이상의 약동학적 계산은 WinNonlin[®](Pharsight,CA,USA)등을 사용하여 수행한다.

(2). 검체의 수집과 분석

- 모든 검체 채취 시간은 예정된 시각이 아닌, 실제시각을 증례기록서에 기록한다. 또한 증례기록서에 투여시작 실제시각, 투여완료 실제시각을 기록한다. 검체 채취는 모든 피험자에서 계획서에 정해진 시간 및 방법에 따라 측정한다.

① 혈액의 채취와 처리

- 혈중 약물농도 분석을 위해 약물 투여 후 Heparin을 함유한 10ml Vacutainer tube를 이용하여 약 6ml의 혈액을 정맥 내 카테터를 통하여 채취한다. 혈액 채취 시간은 다음과 같다.
 - i. 단회투여: 약물 투여 전(0 hr), 약물 투여 후 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 hr (총 14회)
 - ii. 반복투여: 단회 투여 후 분석 결과에 근거하여 설정 한다.
- 상기 일정에 따라 채취한 혈액은 채취 후, 30분 이내에 냉장(4℃) 원심분리기에 서1,800g로 8분간 원심 분리하여 혈장을 취하고, 이를 라벨이 붙은 2개의 opaque polyethylene tube 에 각각 1mL 씩 옮긴 후 -20℃ 이하에서 냉동보관 하고 수일내에 -70℃ 이하로 옮겨 약물 농도를 측정할 때까지 냉동보관한다. 원심분리를 위해 대기 중인 혈액은 어두운 곳에서 냉장보관 한다. 검체 보관 후 약물농도 측정 완료 시까지는 3개월을 경과하지 않도록 한다.

② 소변의 채취와 처리

- 뇨로의 배설 양상을 알고자 CB-Ph 투여 후 polyethylene container를 이용하여 채뇨하고, 각 채뇨 간격 동안 채뇨한 container는 어두운 곳에서 냉장 보관한다. 뇨 채취 시간은 다음과 같다.

- i. 약물 투여 전 -12~0 hr
- ii. 약물 투여 후 0~6 hr, 6~12 hr, 12~24, 24~48 hr

- 각 채뇨 기간 동안 얻어진 뇨의 용적을 메스실린더로 측정하여 증례기록서에 기록하고 실제 수집 시간을 기록한다. 얻어진 뇨를 잘 혼합한 후, 약 20ml을 취해 2개의 opaque polyethylene tube에 각각 10ml 씩 옮긴 후 -20℃ 이하에서 냉동보관하고 수일내에 -70℃ 이하로 옮겨 약물 농도를 측정할 때까지 냉동보관한다. 검체 보관 후 약물농도 측정 완료 시까지는 3개월을 경과하지 않도록 한다.

③ 농도 분석

- 약동학 분석 계획서에 따라서 분석 한다.

④ 약동학 자료분석 software

- WinNonLin[®] 5.2.1(Pharsightcorporation)
- R (The R Foundation for Statistical Computing)

(3). 종양반응 평가

- RECIST 지침에 따른 종양반응을 평가한다. CB-Ph 투여 후 2 주기가 끝나면 RECIST 지침에 따른 첫 번째 종양반응을 평가하며 그 이후는 2 cycle마다 (PR 혹은 CR의 반응을 보이는 경우는 4주 후 확인 평가를 실시) 종양평가를 실시한다. 만약 피험자가 2주기의 치료를 마치지 못하고 시험 종료 되는 경우는 1 cycle 이상 투약한 환자를 대상으로 시험 종료 사유가 발생한 시점에서 종양평가를 실시하여 유효성 평가의 자료로 이용한다.

13. 임상시험의 종료 및 중지/탈락 기준

- MTD가 결정되면 본 임상시험은 종료된다. 그 외 예상하지 못한 심각한 부작용의

발생, 약동학적 특성 분석에서 임상시험을 지속하는 것이 적절치 못하다고 판단되는 경우도 종료 사유가 된다.

- 단, 임상시험 종료시점에서 객관적 종양반응의 근거가 있거나 시험자가 시험약의 투여가 피험자에게 이롭다고 판단하고 피험자가 원하는 경우, DLT가 있는 경우가 아니라면 시험약을 계속 투여할 수 있다.
- 임상시험에 참여한 모든 피험자는 시험약을 중단하고 시험을 종료하는 시점에서 추적관찰의 실패, 사망 등의 사유가 아니라면 가능한 한 최종 방문 (end-of-treatment visit)을 하고 최종 방문 시점에 실시하도록 되어있는 모든 평가를 수행한다. 필요한 경우 종양반응 평가도 포함한다.
- 피험자의 임상시험 중지/탈락의 사유는 다음과 같으며 그 내용을 증례기록지에 기록하여야 한다.
 - DLT를 포함한 이상반응
 - 비정상적인 실험실 수치 또는 검사결과
 - 병의 진행
 - 임상시험계획서의 중대 위반
 - 피험자의 동의 철회
 - 추적조사 실패
 - 행정적 문제
 - 사망
 - 지속적 치료나 정기적 검진을 수행할 수 없는 다른 질병에 이환된 경우
- 만약 이상반응으로 중지/탈락한 피험자의 경우, 가능한 그 이상반응이 시험약 투여 이전의 수준 또는 기준으로 회복될 때까지 혹은 시험책임자가 정상화 되었다고 판단할 수 있을 때까지 혹은 더 이상의 관찰이 불필요하다고 판단될 때까지 추적조사 한다.

14. 임상시험의 관리

가. 이상반응의 정의 및 보고

- 이상반응 (Adverse event, AE) - 이상 반응이란 약물과의 인과 관계에 상관없이, 의약품에 노출되는 동안이나 노출된 후에 바람직하지 않은 의학적 상태의 발생

이나, 기존 증상이 악화되는 것을 말한다. 바람직하지 않은 의학적 상태는 증상 (예: 오심, 흉부 통증), 징후 (예; 빈맥, 간 비대), 검사 결과의 이상(예, 실험실 소견, 심전도)이 될 수 있다.

- 중대한 이상반응 (Serious adverse event, SAE) - 중대한 이상 반응 (SAE)이란, 어느 임상시험 단계 (즉, run-in, 치료, washout, 추적 관찰) 중, 시험약의 모든 용량에서 발생하는 이상 반응으로, 다음 기준 중 하나 이상을 충족하는 것을 말한다.

- 사망을 초래하거나 즉각적으로 생명을 위협하는 경우
- 입원을 요하거나 입원 기간의 연장을 요하는 경우
- 지속적이거나, 유의한 장애나 불능을 초래하는 경우
- 선천적 이상 또는 기형을 초래하는 경우
- 기타 환자를 위험에 빠뜨리거나, 위의 결과를 예방하기 위하여 의학적 조치를 요하는 중요한 의학적 사건

- 시험자는 중대한 이상 반응 발생을 알게 되었을 때 이의 인과 관계 (즉, 시험약과의 관련성)와 관계없이 이를 의뢰자에게 24시간 이내에 보고하도록 한다. 의뢰자는 기타 관련된 시험자, 임상시험 심의위원회, 및 식품의약품안전청장에게 중대하고 예상하지 못한 모든 이상약물반응을 식품의약품안전청고시 제2007-34호 (2007.5.31) '의약품임상시험관리기준' 제40조와 '임상시험 이상반응 보고지침' 의 약 65625-13553호(2000.12.29)에 따라 보고하여야 한다.

- 시험자는 이후 서면으로 충실한 내용의 보고서를 작성하여 의뢰자와 심의위원회에 보고하도록 한다. 이상반응 증상이 호전되거나 비정상적 실험실수치가 회복될 때까지 추적 관찰해야 하며 이상반응의 진행 경과에 대한 보고서를 작성하여 의뢰자와 심의위원회에 보고한다. 연구가 종료된 후라도 연구과정과 연관된 이상반응이라고 생각되면 보고하도록 한다.

나. 임상시험 자료의 주기적 검토

- 임상시험을 수행하는 시험자, 시험약물의 개발자인 화학자, 약물농도 분석을 맡은 약동학자, 통계학자로 구성된 자료모니터위원회(data monitoring committee)는 특별한 안전성 정보가 부각되지 않더라도 정기적으로 자료 분석을 통해 임상시험의 적절성에 안전성에 대한 결정을 한다. 채취된 샘플의 분석이 최대 3개월을

넘지 않아야 하므로 위원회의 주기적 자료 검토는 3개월 이내의 간격으로 수행된다. 점검되는 자료는 환자의 병력, 약동학적 분석 내용, 안전성, 치료효과 등을 포함한다.

15. 통계학적 방법

- 이 임상시험의 일차적인 목적에 대해서는 공식적인 통계학적 분석을 실시하지 않는다. 자료를 열거 및 요약한다. 본 임상시험에서 체내 약동학적 양상을 파악하기 위한 자료 분석의 원칙은 탐색적 자료 분석법이다. 그러나 약동학적 자료 분석에서 주로 사용하는 통계치는 평균, 표준편차 등이며 phase I 자료 분석에서 사용되는 중위수, 분위수, 범위 등도 함께 구하여 비교해 볼 수 있다. 이에 따라 본 임상시험의 각 처치군에 따라 피험자의 약동학 평가 항목들의 관찰치를 표의 형태로 제시하고, 시간에 따른 농도 변화를 그림으로 제시한다. 또한 각 용량 단계에서 평균 농도의 시간에 따른 변화 양상을 관찰하여 약동학적 파라미터 분석 시에 최적 모델을 적합시키고 반감기를 계산한다. 용량의 증가에 따른 농도곡선 하면적 및 최고농도의 변화 양상을 그림으로 나타내고 회귀직선을 적합시켜 각

각의 상관계수를 구한 후 선형성에 대하여 탐색적으로 관찰한다.

- 이 외에도 각 용량 단계에서의 청소율과 분포 용적 등에 대한 분포표와 그림 등을 제시하고 그 결과를 탐색적으로 서술한다. 종양반응을 평가할 수 있는 환자군에서는 객관적 반응을(RECIST 기준에 의해 평가)을 제시하고 그에 대한 신뢰구간이 계산된다. RECIST 기준에 따른 PR 혹은 CR에 해당하지 않는 환자들도 한번 이상의 종양반응 평가를 시행했다면 baseline으로부터 종양크기의 변화를 백분율로 제시한다(Waterfall plot).

16. 윤리적 고려

가. 임상시험의 윤리적 수행

- 본 임상시험은 헬싱키 선언에 기초하고 대한민국 관련법안 (약사법, 의교기기법, 생명윤리 및 안전에 관한 법률, 관련 식품의약품안전청 고시) 및 International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use-Good Clinical Practice (ICH GCP)의 윤리적 원칙에 부합하도록 계획되고 수행된다. 식품의약품안전청과 임상시험 심사위원회(IRB)의 승인을 받은 후 실시되며 주요한 변경사항이 발생할 경우도 마찬가지로 식품의약품안전청과 임상시험 심사위원회(IRB)의 승인을 받아야 한다.

나. 피험자 동의

- 임상시험책임자는 모든 환자가 임상시험의 성격, 목적, 잠재적 위험 및 이점에 관하여 충분한 구두 및 서면 정보를 얻도록 해야 한다.
- 환자들은 또한, 어느 시기에든 임상시험을 자유롭게 중단할 수 있음을 알아야 한다. 환자에게는 질문 기회와, 제공한 정보를 생각할 시간을 주어야 한다.
- 임상시험을 위한 절차를 수행하기 전에, 환자가 서명하고 일자를 기입한 서면 동의를 얻어야 한다. 시험책임자는 서명한 피험자 동의서 원본을 보관하며 서명한 피험자 동의서의 사본은 반드시 환자에게 주어야 한다. 서명 및 날짜가 기입된 두 가지 피험자 동의서의 사본은 환자에게 제공되어야 하고 원본은 시험기관에 보관되어야 한다.
- 시험책임자는 동의가 자유롭게 제공되며 환자가 언제든지 임상시험의 선택적인 부분을 자유롭게 중단할 수 있다는 사실을 이해하도록 할 책임이 있다.

다. 피해의 보상

- 임상 시험자는 피험자를 등록하기 전에 각 피험자들의 건강상태를 면밀히 확인하고 임상시험에 참여할 수 있는 상태인지를 확인하여야 한다.
- 또한 시험자는 임상시험 과정에 대하여 충분히 숙지하여 피험자의 안전이 보장될 수 있도록 최선을 다하여야 한다.
- 그럼에도 불구하고 이상반응의 발생에 따른 피험자 손해가 생겼을 경우 피험자가 회복될 때까지 적절한 의료조치가 취해지고 피해자 보상규약에 따라 보상될 것이다. 이를 위한 보험가입이 이루어질 것이다 (별도의 규정 설정).

17. 치료 기간

- 모든 피험자는 단회 투여시의 약물통태학 파악을 위해 제 1일 1회 복용 후 제 3일부터 23일까지 21일 동안 같은 용량을 매일 1회 반복 투여하며 이후부터는 21일을 1주기로 하여 투약한다. 임상시험 기간 내내 환자는 치료가 계속 유익하다고 판단되면 질병의 진행 또는 견딜 수 없는 약물 관련 독성을 경험할 때까지 CB-Ph를 계속 복용할 수 있다.

18. CB-Ph와 매우 유사한 기전의 카래에서 분리한 cucumin의 임상 1상

- 아래 표에서 볼 수 있듯이 cucumin의 경우도 용량을 증가시키면서 (Dose Escalation method) 실험을 수행하였다 (16, 17).

Patient characteristics at baseline

구 분	DL 1 (n = 3) (450 mg daily)	DL 2 (n = 3) (900 mg daily)	DL 3 (n = 3) (1.8 g daily)	DL 4 (n = 6) (3.6 g daily)
Sex				
Male	0	1	1	3
Female	3	2	2	3
Age (years)				
Mean	69	68	65	56
Range	68-70	66-70	55-74	50-64
Sites of disease				
Colorectum	1	0	0	1
Liver	3	3	3	6
Lung	1	1	1	2
Peritoneum	1	0	0	0
other	0	1	2	1
Previous chemotherapy				
5-Flurouracil	3	3	3	6
Irinotecan	1	2	2	4
Oxaliplatin	0	1	1	3
Other	1	2	1	4
Previous radiotherapy	1	1	0	3
Previous surgery	3	3	3	6
NSAID stopped for trial	1	1	0	1
CEA > 9 microg/L	2	3	2	6
CEA > 500 microg/L	1	2	1	4
A 19.9 > 37 ku/L	2	3	2	5
CA 125 > 35 iu/L	0	0	1	1

Abbreviations: NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; CEA, carcinoembryonic antigen; DL, dose level

부록

약어 목록

약어	설명
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion 흡수, 분포, 대사, 배설
AE	Adverse event 이상반응

ALP	Alkaline phosphatase	알카리포스파타제
ALT	Alanine transaminase	알라닌 아미노전이효소
ANC	Absolute neutrophil count	절대호중구수
AST	Aspartate transaminase	아스파테이트 아미노전이효소
AUC _{0-inf}	Area under the plasma concentration-time curve from zero to infinity	0에서 무한대까지 혈중 농도-시간 곡선하 면적
AUC _{0-last}	Area under the plasma concentration-time curve from zero to last measurable time point	0에서 마지막 시간까지의 혈중 농도-시간 곡선하 면적
BBB	Blood brain barrier	뇌혈관장벽
BP	Blood pressure	혈압
BUN	Blood urea nitrogen	혈중요소질소
CB-OH	2'-Hydroxycinnamaldehyde	2-하이드록시시남알데하이드
CB-Ph	2'-Benzoylcinnamaldehyde	2-벤조일옥시시남알데하이드
Ccr	Creatinine clearance	크레아티닌 청소율
CL/F	Total apparent drug clearance	총 겐보기 약물청소율
C _{max}	Maximum drug concentration	혈장내 최대 약물농도
CR	Complete response	완전관해
CTC AE	Common terminology criteria adverse event	NCI 이상반응에 대한 일반 용어 기준
CV	Coefficient of variation	표준오차
DLT	Dose limiting toxicity	용량제한독성
DMC	Data monitoring committee	자료검토위원회
ECG	Electrocardiogram	심전도
ECOG	Eastern cooperative oncology group	
FDA	Food and drug administration	미식품의약품안전청
GCP	Good clinical practice	의약품 임상시험관리기준
HED	Human equivalent dose	인체동등용량
HPLC	High performance liquid chromatography	고속액체크로마토그래피

약어	설명	
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectroscopy	액체크로마토그래피-질량분석기
PK	Pharmacokinetics	약동학
IRB	Institutional review board	임상시험심사위원회

LDH	Lactate dehydrogenase	젖산 탈수소효소
MI	Myocardial infarction	심근경색
MRT _{last}	Mean residence time to last measurable timepoint	마지막측정가능시간까지의 평균잔존시간
MTD	Maximum tolerated dose	최대내약용량
NCI	National Cancer Institute	미국립암센터
NOAEL	No adverse effect level	무독성용량
NYHA	New York Heart Association	뉴욕심장협회
PR	Partial response	부분관해
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumor	고형암반응평가기준
SAE	Serious adverse event	중대한이상반응
t _{1/2}	Half life	반감기
T _{max}	Time to reach maximum plasma concentration	최대혈장농도에 도달하는데 걸리는 시간
V _{ss}	Volume of distribution at steady state concentration	정상상태에서의 분포용적
V _z /F	Volume of distribution base on terminal phase	최종기에 근거한 분포용적

[부록 A] ECOG 일상생활 수행능력 평가

등급	ECOG 상태
0	- 완전히 활동적, 아무런 제한 없이 모든 질병 전 활동의 수행이 가능
1	- 육체적으로 심한 활동은 제한되지만, 보행이 가능하고 가벼운 작업 또는 정적인 성질의 작업은 수행 가능 (예: 가벼운 집안일, 사무실 근무)
2	- 보행이 가능하며 스스로를 돌볼 수 있으나 작업 활동의 수행은 불가능. 깨어있는 시간의 50% 이상 활동 가능
3	- 제한된 자기 관리가 가능하며, 깨어있는 시간의 50% 이상을 침대 또는 의자에서 보냄
4	- 완전한 무능력. 자기 관리의 수행 불가능. 침대나 의자에서 모든 시간을 보냄
5	사망

[부록 B] 임상시험 일정 및 평가

시험주기	Screening	Cycle 1											
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D12	D16	D23
시험일	-14 ~ 0												
방문	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
시험자동의서	✓												
병력/치료력 조사	✓												
선행/병용 약물 조사	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
선정/제외 기준 검토	✓												
등록번호 부여	✓												
신장/체중 측정	✓	✓		✓						✓			✓
약물투여		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
안전성 평가													
이상반응/독성평가	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
활력징후	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CBC	✓	✓		✓			✓			✓	✓	✓	✓
Chemistry	✓									✓		✓	✓
기타 실험실검사	✓									✓		✓	✓
뇨검사	✓									✓		✓	✓
심전도	✓	✓	✓	✓	✓					✓			✓
신체검사, 수행능력	✓	✓		✓						✓		✓	✓
심장조음파	✓												✓
약동학 평가													
채혈		✓	✓							✓			
채뇨		✓											
유효성 평가													
중앙반응평가	✓												

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 과제의 연구팀은 자생식물 이용 프론티어 사업 3 단계의 연구를 통해 아래

와 같은 년차별 연구목표를 가지고 암세포 성장 및 암전이의 억제에 탁월한 식물자원과 활성물질을 확보하고, 이들의 항암활성을 동물실험을 통하여 규명하였다.

계피유래 물질 CB-Ph에 대한 전임상연구를 완료하고 현재 임상 시험을 위하여 IND가 신청 중에 있다.

연차	연구계획서상의 연구목표	연구 결과
1년차	<ul style="list-style-type: none"> - 후박유래 물질 성분의 <i>in vivo</i> 활성 규명 - 계피유래 BCA 전임상 연구 - 계피유래 BCA kg 단위 생산연구 - 국외 특허 출원 	<ul style="list-style-type: none"> - 후박 유래 오보바틀의 <i>in vivo</i> 항암 활성 검증 - 전임상을 위한 단회 독성 규명 연구 - 계피유래 BCA kg 단위 생산 연구 및 국내 특허 등록 - 2건의 국외 특허 출원
2년차	<ul style="list-style-type: none"> - BCA 유도체 및 물에 녹는 새로운 조성물 전임상 - <i>In vivo</i> 활성이 검증된 항암활성 물질의 기전 - 암전이 억제물질의 유전체, 단백질 수준에서의 기전 규명 - 계피유래 CB-Ph 전임상 연구 	<ul style="list-style-type: none"> - Labrafac CC 및 Tween 20 을 혼합하여 가용성 조성물 제조 - 인체 결장암 세포주를 nude mouse에 이식 경구로 투여하여 항암활성 검증 - DNA chip 분석을 통하여 얻은 결과를 각각의 유전자를 대상으로 PCR을 수행하여 검증 - 암전이 억제물질 처리한 세포주 및 PRL-3 과발현 세포주 등에서 mRNA를 분리하여 DNA chip으로 유전자 발현변화 비교 분석 - 경구로 CB-Ph를 rat, mouse에 투여한 후 약물의 흡수 등을 LC/Ms로 분석 - 약물의 흡수도, 반감기 등 측정 (논문 출판) - 약물의 대사물질 확인 및 검증 - 전구물질 CB-OH와 CB-Ph 를 대상으로 Herg 및 cytochrome p450 저해활성 검증 여부

연차	연구계획서상의 연구목표	연구 결과
3년차	<ul style="list-style-type: none"> - CB-Ph의 dog에서의 4주 반복 독성 및 독성동태, 대사물질의 분석 - 물에 녹는 CB-OH 유도체 활성 기전 및 PK 실험 - Obovatol 유도체의 기전 규명 - PRL-3 활성 조절물질과 CB-OH의 유전체, 단백질 수준에서의 기전규명 - 천연물의 기전 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - CB-Ph의 활성 성분인 CB-OH의 분석법 검증 연구 완료 - Rat에서의 뇨 및 변에서의 CB-OH 함량 분석 - CB-Ph의 dog에서의 4주 반복 독성 및 독성동태, 대사물질의 분석 등 수행; NOAEL 값 270mg/kg - CB-Ph의 대사경로에 관여하는 효소확인 (논문 출판) - 물에 녹는 CB-OH 유도체의 항암활성 및 rat에서의 PK 실험 - Obovatol의 항암기전 규명 (PCT출원) - Obovatol-Biotin 이용 표적 분석 (논문 출판) - CB-linker-Biotin을 이용하여 29개의 표적 후보 단백질 확보 - 암전이 억제 monomethylmagnolol 유도체에 의해서 조절되는 유전체 분석
4년차	<ul style="list-style-type: none"> - CB-Ph 전임상 정리 및 IND 신청/ CB-Ph 전임상 정리 및 IND 신청 	<ul style="list-style-type: none"> - IND 추가 자료로 복강 투여에 의한 rat에서의 단회 독성 - 임상용 약물의 안정성 검증 (6개월) - IND 신청을 위한 CB-Ph 관련 독성, 일반약리, 생산 공정 등 자료 정리 완료 - 임상 1상 및 시료 분석 프로토콜 작성 (임상 주관: 국립 암센터, 임상 시료분석: 아산병원 연구팀 참여) - IND 신청서 제출 - 임상 1상 시험용 과제 계획서 제출

연차	연구계획서상의 연구목표	연구 결과
4년차	<ul style="list-style-type: none"> - CB-OH, obovatol의 표적 분자 발굴 - Water soluble CB-derivative 의 항암활성 검증 - 후박 열매 추출물의 항암, 항염증활성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> - Rat에서 CB-Ph를 복강으로 투여하여 LD₅₀가 736mg/kg임을 확인 - 유전체 발현분석에 근거하여 CB-OH 표적 발굴을 위한 연구 수행 - 후보 표적 ATF3, ERG1 등을 대상으로 SiRNA로 상화작용 분석, 기능 검증 및 세포 사멸관련성 규명 - Obovatol의 항염증관련 표적 발굴 - Water soluble CB-derivative CB-Pic의 다양한 염을 대상으로 세포에서 항암활성 규명 - CB-Pic도 CB-OH와 같이 ROS에 의한 세포사멸 유도 확인 - CB-Pic은 CB-OH, CB-Ph의 backup compound로 가치가 충분함을 증명 - 일 후박 열매 추출물의 항염증 및 항암활성 그리고 대사성 질환 관련성 규명 (PCT 출원)
최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> - 천연물 항암제 후보 2종 이상 확보 - 천연물 항암제 임상 시험 및 기술 이전 1건 이상 - 미국을 포함한 국외 특허 2건 이상 등록 	<ul style="list-style-type: none"> - 천연물 항암제 후보 물질로 CB-Ph, Obovatol, CB-Pic, Obo-Rd 등 4종을 확보 - 이들 4종은 최소한 rat에서의 PK 및 단회독성까지 검증 함 - NOAEL 값이 270mg/kg로 확정 - CB-Ph를 대상으로 전임상 완료 - CB-Ph 임상 1상 수행을 위한 임상 프로토콜 작성 및 IND 제출 - 기술이전 근화제약과 협의 중에 있음 (임상 1상 시점에 이전 기술이 이루어 질 것으로 생각됨) - 미국 7건, PCT 4건의 특허 출원 이중에서 2건은 2006년 미국에 출원 2010년에 등록가능성 매우 높음 (미국 심사가 매우 늦어지고 있음)

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

본 연구로부터 얻은 결과를 중심으로 암 환자의 생명을 연장하기 위한 식품의약 개발을 위해서는 계피, 대추, 후박이 후보 자원들이며, 이들에서 분리한 활성물질과 추출물을 대상으로 한 연구가 충분히 이루어 졌다고 판단되어 기술이전을 통한 상품화에 활용하고자 한다.

천연물 신약 후보 물질인 CB-Ph는 임상시험을 수행하여 항암활성을 검증한 후 상품화하고자 한다. 현재 임상 1상 연구를 위한 IND가 제출된 상태 이다. 계피 유래물질은 2010년 상반기에 임상1상을 시작하여 하반기에는 임상 1상 완료를 목표로 하고 있다.

후박 열매 추출물에는 매우 단순한 화합물들이 있고 70% 이상이 obovatol로 확인이 되어 향후 부분 정제된 혼합물을 이용한 천연물 의약품으로 개발하고자 한다.

유전체 발현 분석을 통한 기전 규명연구 방법은 향후 다양한 활성을 가지고 있는 천연물들의 기전 규명에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 과학기술정보

1. 천연물관련 뉴스: 세계 천연약물 시장 고성장 전망

세계 식물 및 식물 추출 약물 시장은 향후 5년 간 두 자릿수 성장이 예상된다. 리서치업체인 BCC 리서치사가 최근 발표한 새로운 보고서에 따르면 세계 식물 및 식물 추출 약물 시장은 2008년 195억 달러에서 2013년 329억 달러로 연간 11.0% 성장할 전망이다 (고재구 기자 news@pharmstoday.com).

2004년 미국 FDA가 식물 약물의 신약 승인 규정을 만들었으며, 2006년 이 가이드라인에 따라 최초의 천연물 신약을 허가했다. On October 31, 2006, the US Food and Drug Administration (FDA) approved the new drug application (NDA) for marketing of Veregen (extract of green tea leaves), a topical treatment for perianal and genital condyloma. (Nature biotechnology, 26, 1077, 2008)

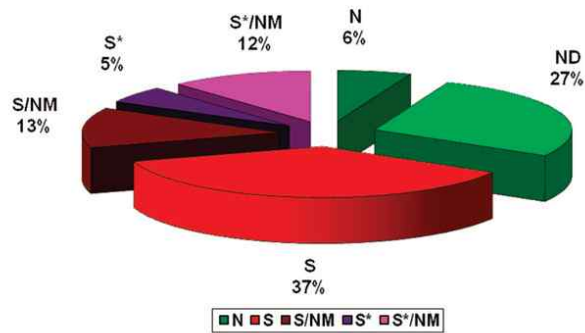
2009-01-06 오전 6:05: **인체 노화 막을 수 있는 성분 찾았다.** 레드 와인 속에 풍부한 레스베라트롤과 칼로리섭취 제한에 의해 자극되는 '시르투인(sirtuins)'이라는 유전자 그룹이 노화와 건강에 있어서 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다.

생강이 대장암의 진행을 억제하는데 상당한 효과가 있다는 연구결과가 나왔다. 미국 미네소타 대학 호멜연구소의 앤 보드 박사는 28일 피닉스에서 열린 미국 암 연구학회 학술회의에서 발표한 연구보고서에서 생강의 주성분인 진저롤(gingerol)이 대장암 세포의 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 쥐 실험에서 확인되었다고 밝힌 것으로 의학뉴스 전문 통신 헬스데이 뉴스가 보도했다.

보드 박사는 20 마리의 실험실 쥐에 1주일에 3회 진저롤 0.5 mg이 함유된 먹이를 주고 보통 먹이를 준 또 다른 20마리의 쥐와 함께 인간의 대장암 세포를 투입했다. 그 결과 대장암 세포 투입 15일 후 종양이 나타나기 시작했는데 진저롤 그룹은 측정이 가능한 크기의 종양이 평균 4개, 비교그룹은 13개가 발견되었다.

가. 신약의 보고 천연자원: 1981년부터 2008년까지의 new chemical entities (1,024개 분석 자료) 자료를 보면 다음과 같다 (Chemical Reviews, 109, 3012, 2009).

Small Molecule New Chemical Entities
01/1981-10/2008, By Source (N) 1024



N (an unmodified natural product); ND (a modified natural product); S (a synthetic compound with no natural product conception); S/NM (a synthetic compound showing competitive inhibition of the natural product substrate); S* (a synthetic compound with a natural product pharmacophore); and S*/NM (a synthetic compound with a natural product pharmacophore showing competitive inhibition of the natural product substrate)

나. 바이엘, 아스피린 효능 재조명 임상 시작

바이엘은 최근 비엔나에서 열린 2007 유럽 심장학회에서 심혈관 질환 및 뇌졸중의 1차 발병에 대한 아스피린의 예방 효과를 관찰하는 임상 연구, ARRIVE (Aspirin to Reduce Risk of Initial Vascular Events)를 시작한다고 발표했다. 회사에 따르면 이번에 진행될 연구는 지금까지 아스피린의 효과를 측정하기 위해 실시된 임상들 중 가장 큰 규모에 속한다.

이를 위해 바이엘은 현재 400개가 넘는 연구 센터에서 약 1만 2000명의 환자를 모집하고 있다. 심혈관질환은 인종, 성, 사회 경제적 환경에 국한되지 않고 누구에게나 일어날 수 있는 병으로 이로 인한 경제적인 부담도 매우 커서 2006년 유럽 연합 (EU)에서만 심혈관 질환과 관련한 직간접적 비용이 약 1690억 유로로 추정되고 있다.

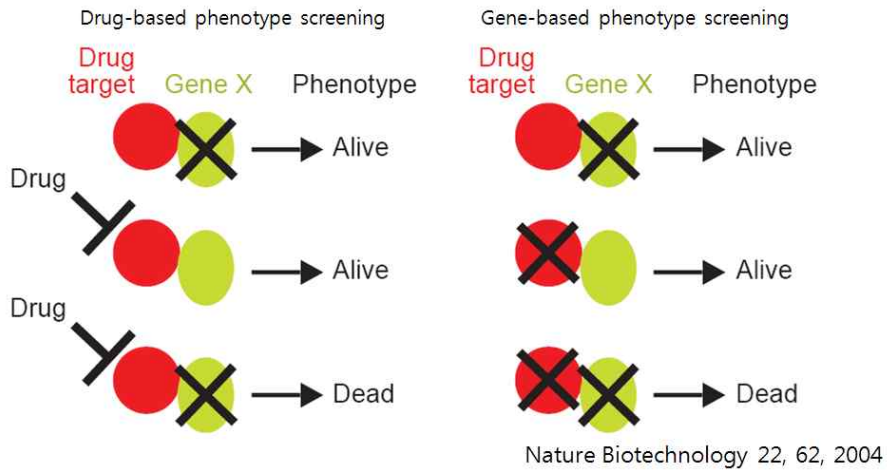
2. 표적을 모르는 물질의 표적 발굴 연구

가. Yeast-based genome-wide study and target discovery

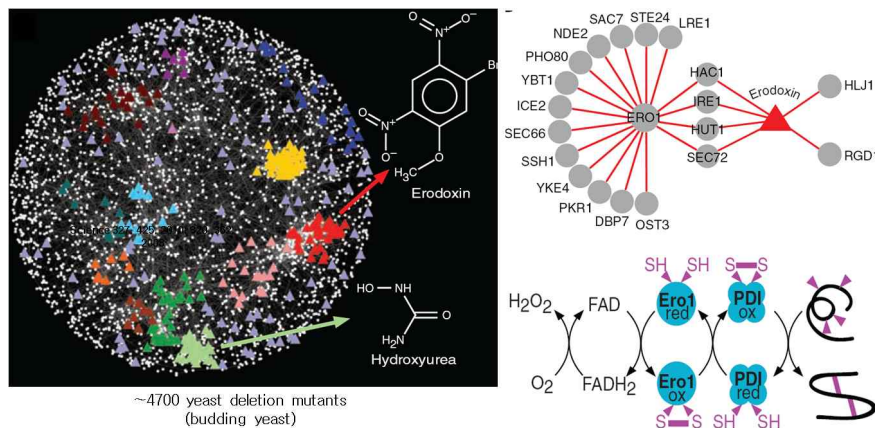
Genome sequencing project에 의해, yeast *saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ~6,000 potential genes이 동정되었는데, ~1000 정도의 essential gene들과 ~5000개 정도의 유전자 조작이 가능한 유전자로 구분된다. 이러한 유전자를 대상으로 yeast deletion mutant들을 만들어 생리활성물질의 표적

발굴 및 기전 규명 연구가 수행되고 있다

다음 그림과 같이 화합물에 의해서 조절되는 유전자를 찾고 유전자 측면에서 관련된 유전자를 찾아서 화합물의 표적, 활성 기전을 규명하는 연구가 수행되고 있다.



대표적인 관련 연구결과로는 Science 327, 425, 2010에 발표된 결과로서 erodoxin이라는 화합물을 mutant yeast에 처리하여 표적을 발굴하고 네트워크 수준에서 기전을 규명한 연구이다. Erodoxin을 처리하여 반응을 나타낸 유전자들이 *ERO1* 유전자에 의해서 조절되는 유전자와 매우 유사함을 발견하였고 궁극적으로 이 화합물의 표적이 *ERO1* 임과 그 기전을 규명한 연구이다.

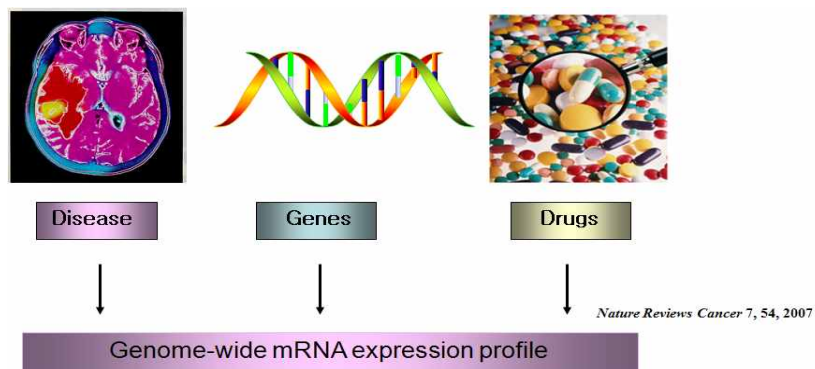


나. Microarray-based connectivity map

Microarray를 활용한 생리활성물질의 기전 및 표적 발굴연구는 Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University 에서 연구하고

있는 “The Connectivity Map (Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease)” 구축 연구가 대표적인 예라 할 수 있다. 현재 1,309종의 생리활성물질을 대상으로 6,100 종의 expression profiles이 구축되어 일반 연구자들에게 공개 되고 있다.

- 이 연구소가 추구하는 궁극적 목표는 다음과 같은 상관관계 지도를 작성하여 보다 빠른 시일 내에 효과적으로 신약이 개발될 수 있게 하자는 것이다. 이들이 구축한 상관관계 지도의 규모가 충분히 커진다면 표적이 불분명한 생약제 등의 표적 발굴 및 기전규명에 많은 도움을 줄 것으로 생각된다.



제 7 장 참고문헌

제 1 절 Oncogen ras 관련 논문

1. Barbacid, M. 1987. Ras genes. *Annu.Rev. Biochem.* 56. 779-827
2. Bos, J. L. 1989. Ras oncogenes in human cancer : a review. *Cancer Res.* 49. 4682-4689
3. Sheilds, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A and Der, C. J. 2000. Understanding Ras; 'it ain't over'. *Trends Cell Biol.* 10. 147-154
4. Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J. and Der, C. J. 1998. Increasing complexity of Ras signalling. *Oncogene.* 17. 1395-1413
5. Wittinghofer, A. 1998. Signal transduction via Ras. *Biol. Chem.* 379. 933-937
6. Kwon, B. M., Y. K. Cho, S. H. Lee, J. Y. Nam, S. K. Chun, J. A. Kim, I. R. Lee. 1996. 2-Hydroxycinnamaldehyde from stem bark of cinnamomum cassia. *Planta Med.* 62; 183-184.
7. Omura, S., H. Takeshima. 1994. Farnesyl-protein transferase inhibitors. *Drugs of the Future* 19; 751-755.
8. Buss, J. E., J. C. Marsters, JR. 1995. Farnesyl transferase inhibitors: the successes and surprises of a new class of potential cancer chemotherapeutics. *Chemistry and Biology*, 2, 787-791.
9. Seung-Ho Lee, Byoung-Mog Kwon. Arteminolide, an inhibitor of Farnesyl Transferase from *Arteminolide sylvatica*. *The Journal of Organic Chemistry* 63(20) 7111-7113 1998
10. Gibbs, J. B., Oliff, A. The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics. 1997. *Ann. Rev. Toxicol.* 37; 143-166.
11. Gibbs, J. B., A. Oliff, N. E. Kohl. 1994. Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell*, 77; 175-178.
12. Kohl, N. E., C. A. Omer, M. W. Conner, R. P. Gometz, J. B. Gibbs, A. Oliff. 1995. Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nature Med* 1; 792-797.
13. Manne, V., N. Yan, J. M. Carboni, A. V. Tuomari, C. S. Ricca, J. G. Brown, C. J. Der, A. D. Cox, J. T. Hunt, B. Seizinger. 1995. *Oncogene* 10; 1763-1779.
14. Doll, R. J. Kirschmeier, P. Bishop, W. R. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2004, 7, 478.
15. Lee, S. H.; Kim, H. K.; Kang, H. M.; Seo, J. M.; Son, K. H.; Lee, H. S.; Kwon, B. M. *J. Org. Chem* 2002, 67, 7670.
16. Lee, S. H.; Lee, M. Y.; Kang, H. M.; Han, D. C.; Son, K. H.; Yang, D. C.; Sung, N. D.;

- Lee, C. W.; Kim, H. M.; Kwon, B. M. *Bioorg. Med Chem* **2003**, *11*, 4545.
17. Seo, J. M.; Kang, H. M.; Son, K. H.; Kim, J. H.; Lee, C. W.; Kim, H. M.; Chang, S. I.; Kwon, B. M., *Planta* **2003**, *69*, 218-222.
18. Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. *J. Natur.l Prod* **2003**, *66*, 1022.
19. Aoyama, Y.; Konoike, T.; Kanda, A.; Naya, N.; Nakajima, M. T. *Bioorg. Med Chem Lett*. **2001**, *11*, 1695.
20. Yuan-Wah Leong, Leslie J. Harrison, Graham J. Bennett, Azizol A. Kadir, Joseph D. Connolly. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 891.
21. Ng, S.; Lee, H. H.; Bennett, G. J. *Magn. Reson. Chem* **1990**, *28*, 337.
22. Min, B. S.; Bae, K. H.; Kim, Y. H.; Shimotohno, K.; Miyashiro, H. Hattori, M. *Nat. Prod. Sci.* **1998**, *4*, 241.

제 2 절 STAT3

1. Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS, et al. *Ann N Y Acad Sci* **2006**, 1091, 151.
2. Guschin D, Rogers N, Briscoe J, et al. *EMBO J* **1995**, *14*, 1421.
3. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science* **1997**, *277*, 1630.
4. Simon AR, Vikis HG, Stewart S, Fanburg BL, Cochran BH, Guan KL. *Science* **2000**, *290*, 144.
5. Berishaj M, Gao SP, Ahmed S, et al. *Breast Cancer Res* **2007**, *9*, R32.
6. Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, et al. *Science* **1995**, *269*, 81.
7. Zhang Y, Turkson J, Carter-Su C, et al. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 24935.
8. Garcia R, Bowman TL, Niu G, et al. *Oncogene* **2001**, *20*, 2499.
9. Wen Z, Darnell JE, Jr. *Nucleic Acids Res* **1997**, *25*, 2062.
10. Sartor CI, Dziubinski ML, Yu CL, Jove R, Ethier SP. *Cancer Res* **1997**, *57*, 978.
11. Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. *Mol Cell Biol* **1997**, *17*, 6508.
12. Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. *Curr Opin Oncol* **1999**, *11*, 490.
13. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. *Blood* **2003**, *101*, 1535.
14. Braunstein J, Brutsaert S, Olson R, Schindler C. *J Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34133.
15. Mora LB, Buettner R, Seigne J, et al. *Cancer Res* **2002**, *62*, 6659.
16. Yu H, Jove R. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 97.
17. Siddiquee K, Zhang S, Guida WC, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 7391.

제 3 절 PRL-3 및 세포 주기

1. Zucker, S., Vacirca, J., Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Rev.*, **23**, **2004**, 101 ~117

2. Le, Q-T., Denko, N. C, Giaccia, A. J., Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer and Metastasis Rev.*, 23, 2004, 293~310
3. Kinzler, K. Vogelstein, B., Bardelli, A., A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science*, 294, 2001, 1343~1346
4. Zeng, Q., Si, X., Pallen, C. J, Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1,2 and -3 with the plasma membrane and the early endosome. *J Biol Chem*, 275, 2000, 21444~21452
5. Crowell, P. L., Werner, S. R., Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21^{Cip1/Waf1} by PRL tyrosine phosphatases. *Cancer Letters*, 203, 2003, 201~211
6. Cheon, C., Jeon, Y. H., Kim, K. A., Structure of human PRL-3, the phosphatase associated with cancer metastasis. *FEBS Letters*, 565, 2004,181~187
7. Newman, D. J., Cragga, G. M., Snaderb, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep*, 17, 2000, 215~234
8. Nicolaous, K. C., Die, W-M.,Guy, R. K., Chemistry and biology of taxol. *Angew Chem Int Ed*, 33, 1994, 15~44
9. Vlahos, C. J., Kadambi, V., Matter, W. F., Role of PRL-3, human muscle-specific tyrosine phosphatase, in angiotensin-II signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 283, 2001, 1061~1068
10. Sun, X. L., Li, X., Onda, M., Conformational analysis of C3'-C8 connected biflavones. *J Heterocyclic Chem*, 32, 1995, 1531~1535
11. Parmar, V. S., Vardhan, A., Taneja, P., A rare biflavone from *Taxus baccata*. *Indian J Chem*, 32B, 1993, 601~603
12. Parmar, V. S., Jha, A., Olsen, C. E., Constituents of the yew trees. *Phytochem*, 50, 1999, 1267~1304
13. Alitalo, K., Schwab, M., Oncogene amplications in tumor cells. *Adv Cancer Res*, 47, 1986, 235~281
14. Bishop, M., The molecular genetics of cancer. *Science*, 235, 1987, 305~311
15. Liu, H., Dibling, B., Spike, B., Dirlam, A., Macleod, K., New roles for the RB tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev.* 14, 2004, 55~64.

제 4 절 오믹스 이용기술

1. Corson et al., Molecular Understanding and Modern Application of Traditional Medicines: Triumphs and Trials, *Cell*, 130, 768, 2007.
2. Lamb, J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research, *Nature Review Cancer* 7, 54, 2007.
3. Kennedy, et al., A midlife longevity drug? *Nature*, 460, 331, 2009.

4. Costanzo, et al., The Genetic Landscape of a Cell, *Science* 327, 425, 2010.
5. MacDonald, et al., Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells, *Nature Chemical Biology*, 2, 329, 2006.
6. Aggarwal, et al., Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochem. Pharm.* 72, 1605, 2006.
7. Parsons, et al., Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways, *Nature Biotech.* 22, 62, 2004.

제8절 임상 시험관련 참고 문헌

1. Kim, J. H. et al. *One-Step Synthesis of ortho-Hydroxycinnamaldehyde* *Syn. Comm.* 34, 1223 (2004).
2. David J. Newman and Gordon M. Cragg. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* 70, 461 (2007).
3. Cragg, G. M. et al. *Impact on Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents.* *Chem. Rev.* 109, 3012 - 3043 (2009).
4. Jesse W.-H., et al. *Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier?* *Science* 325, 161 (2009).
5. Ann M. Winter-Vann and Patrick J. Casey. *Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis.* *Nature Rev. Cancer* 5, 405 (2005).
6. Cocchiara, J., et al. *Fragrance material review on cinnamaldehyde.* *Food and Chemical Toxicology* 43, 867, (2005).
7. Kwon, B. M. et al. *2'-Hydroxycinnamaldehyde from Cinnamomum cassia Blume.* *Planta Medica*, 62, 183 (1996).
8. Lee, C. W. et al. *Inhibition of Human Tumor Growth by 2'-Hydroxy- and 2'-Benzyloxy- cinnamaldehydes.* *Planta Medica*, 65, 263 (1999).
9. Han, D. C. et al. *2-Benzoyloxy cinnamaldehyde induces apoptosis in Human carcinoma via reactive oxygen species.* *J. Biol. Chem.* 279, 6911 (2004).
10. Lee, S. H. et al. *Inhibitory effect of 2-hydroxycinnamaldehyde on nitric oxide*

- production through inhibition of NF- κ B activation in RAW264.7 cells.* Biochem. Pharm. 69, 791 (2005).
11. Lee, J. J. et al. *Effect of 2-benzoyl-oxycinnamaldehyde on RPE cells in vitro and experimental proliferative vitreo retinopathy model.* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43, 3117 (2002).
 12. Moon, E., Y. et al. *Delayed occurrence of H-ras 12V-induced hepatocellular carcinoma with long-term treatment with cinnamaldehydes.* Eur. J. Pharm. 530, 270 (2006).
 13. Koh, W. S. et al. *Cinnamaldehydes Inhibit Lymphocyte Proliferation and Modulate T Cell Differentiation.* Int. J. Immunopharm. 20, 643 (1998).
 14. Hong, S. H. et al. *Apoptosis induction of 2'-hydroxycinnamaldehyde as a proteasome inhibitor is associated with ER stress and mitochondrial perturbation in cancer cells.* Biochem. Pharm. 74, 557 (2007).
 15. Trachootham, D. et al. *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* Nature Review Drug Discovery, 8, 579 (2009).
 16. Sharma, R. A. et al., *Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin: Biomarkers of Systemic Activity and Compliance.* Clinical Cancer Research, 10, 6847 (2004).
 17. Dragovich, T. et al. *Phase I Trial of Imexon in Patients With Advanced Malignancy.* J. Clinical Oncology 25, 1779, (2007).

주 의

1. 이 보고서는 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.