

GOVP1200101553

660.6  
L 293 L

최종 보고서

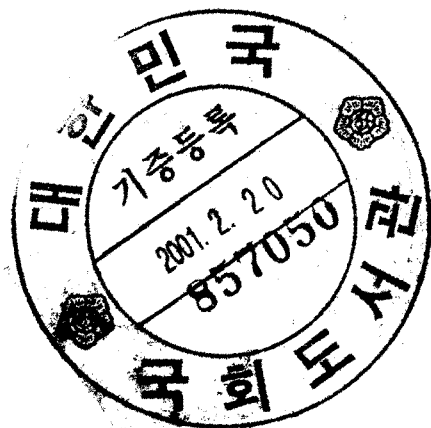
BSAG900M-2000078-2

# 농산자원으로부터 암 예방 및 암 전이 억제 신소재 개발

Development of New Bioproducts for Prevention and  
Treatment of Cancer Disease from Agricultural  
Resources

생명공학연구소

농림부



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산 자원으로부터 암 예방 및 암 전이 억제 신소재 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 12. 27.

주관연구기관명 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 권 병 목

연 구 원 : 손 광 희, 한 미 영

연 구 원 : 이 승 호, 김 혜 경

연 구 원 : 정 하 원, 강 현 미

연 구 원 : 이 준 성, 김 미 정

연 구 원 : 조 영 권, 권 주 영

협동연구기관명 : 충북대학교

협동연구책임자 : 장 수 익

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 백 남 인

# 요 약 문

## I. 제 목

농산 자원으로부터 암 예방 및 암 전이 억제 신소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

암이란 ?

- 개체의 필요에 따라 규칙적이고 절제 있는 증식과 억제를 할 수 있는 정상 세포와는 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성되어 종괴 또는 종양을 형성하는 것
- 궁극적으로는 주위의 정상 조직 또는 기관을 침윤하여 파괴시키고 새로운 성장장소를 만들 수 있어 개체의 생명을 빼앗아 갈 수 있는 질환 군을 총칭

라스 발암유전자는 (*ras oncogene*) 암조직이나 형질 전환된 사람의 세포주에서 거의 공통적으로 발견되는 발암유전자로서, 췌장암(90%), 직장암(50%), 폐암(50%), myeloid leukemias나 갑상선암(30%)등에서 높은 빈도로 관찰되었다. 이와 같은 이유에서 Ras 단백질을 통한 신호전달을 조절함으로써 새로운 항암제를 개발하고자하는 노력이 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 변형과정의 세 단계로 구분되나 첫 단계인 파네실기가 카르복시 말단에서 4번째 위치의 시스테인에 도입되는 과정이 가장 중요한 과정으로 확인되었다. 90년초부터 다국적 기업을 포함하는 전 세계의 많은 연구팀들이 이 효소의 저해를 통한 항암제 개발 연구를 활발하게 진행하고 있다. 몇 가지의 파네실전달 효소의 저해제를 이용한 동물실험결과 선택적으로 암세포의 성장을 억제한다는 결과가 발

포되었고, 1998년 말에 발표된 임상 제1상의 결과도 긍정적인 평가가 나왔다 (Jessen, Schering-Plough, Merck). 그러므로 이 효소의 억제물질을 함유한 천연자원을 찾아내면 새로운 기능의 생물소재로서 개발이 가능하다고 사료된다. 그리고 이들로부터 분리된 물질은 항암제 또는 암 예방제 개발을 위한 선도물질로 활용 될 수 있을 것이다.

세포 외부로부터 전해지는 다양한 신호를 세포핵 내로 전달하는 과정에는 다양한 단백질, 폴리펩타이드 등이 관여하게 되는데, 이 신호전달 과정 중에서 외부신호를 받는 수용체 (EGFR, PDGFR등)는 외부 신호에 의해서 이중복합체로 변화하면서 타이로신 잔기가 인산화 되고 이것을 인지하는 각종 신호전달 단백질들 (PLC, Shc, PI3-K, Grb2등)이 이들 수용체에 결합하게 된다. 이런 단백질의 특징은 인산화된 수용체의 특정 펩타이드를 인지할 수 있는 100개 정도의 아미노산으로 구성되어 있는 domain과 아미노산 50-70개의 domain을 공통적으로 가지고 있다. 이 domains는 cytoplasmic tyrosine kinase c-Src와 유사하여 각각 Src homology 2 (SH2) 그리고 Src homology 3 (SH3) domain이라고 한다. SH2 domain은 인산화된 타이로신 잔기를 포함하고 있는 짧은 아미노산 배열을 인식하고 SH3 domain은 proline과 소수성 잔기를 포함한 아미노산을 인식한다. 신호전달 단백질마다 포함하고 있는 SH domain의 종류와 수는 각기 다르다. 예를 들어서 Ras 단백질 신호전달계의 Grb2는 2개의 SH3 domain과 이 domain에 의해서 연결된 1개의 SH2 domain을 포함하고 있고 phosphatidylinositol 3 kinase (PI3-K)의 p85 subunit 같은 경우에는 2개의 SH2 domain과 1개의 SH3 domain을 포함하고 있다.

최근의 연구 결과에 의하면 Ras 신호 전달계의 상부는 Grb2와 mSOS가 Ras의 활성화에 관여한다는 것이 증명되었다. 앞서서도 언급한 것과 같이 Grb2는 하나의 SH2 domain과 두 개의 SH3 domain을 갖고 있는 연결(adaptor) 단백질이며, 특히 SH2 domain은 외부신호 (성장인자: EGF, TGF, PDGF, NGF, IGF IL등과 환경 인자: UV등)의 자극에 의해 활성화된 수용체의 타이로신 인산화 자리에 결합하고, SH3 domain은 mSos와 결합하여 Grb2-mSOS 복합체를 형성하여, 최종적으로 mSOS는 Ras를 활성화시킨다. 이 신호 전달에 관여하는 mSOS는 구아닌 뉴클레오타이드 교환인자 (GNRF)이고, Grb2 SH2 domain은 100여개의 아미노산으로 구성되어 있는 단백질로서 특이한 아미노산 서열을 가지고 있는 인산화된

펩타이드와 결합하여 수용체가 받은 외부신호를 세포내로 전달하는 역할을 하게 된다. EGF 수용체의 경우는 직접적으로 tyrosine 잔기에 결합할 수도 있지만 활성화된 EGF 수용체에 결합된 Shc를 통해 간접적으로도 결합할 수 있다. 이런 연구결과들은 이 단백질-단백질 상호 작용을 효과적으로 저해하는 물질을 찾아낸다면 새로운 차원의 항암제뿐만 아니라 각종 질병의 예방 및 치료제 개발이 가능하다는 것을 말해준다.

암이 생명에 위협이 되는 가장 큰 원인은 암세포의 전이 능이다. 즉, 어떤 부위에 발생한 암이든지 생성부위만 찾으면 외과적 기술에 의하여 제거하는 것은 어렵지 않다. 그러나 암치료에서 이러한 외과적 치료술이 한계를 가질 수밖에 없는 이유는, 암세포가 원발부위 이외의 여러 곳에 퍼져 나가기 때문에 극히 제한된 초기 시기에만 수술이 완치를 기할 수 있기 때문이다. 최근의 조사에 의하면 수술에 의해서 암조직을 제거 받은 암환자의 50% 이상이 암세포의 전이 때문에 완치를 보지 못하고 있다고 밝혀졌다. 이와 같은 암세포전이에 관한 연구는 많은 연구·노력에도 불구하고 그 동안 적절한 방법론이 결여되어 있었기 때문에 정확한 기전 규명이 미비된 상태였다.

미국의 Folkman등의 노력으로 이러한 암세포 전이과정에 Angiogenesis (신생 혈관유도)가 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀지고, Angiogenesis를 저해하는 Angiogenic factor의 존재도 밝혀졌다. 그리고 Angiogenic factor 중의 하나인 Angiostatin은 폐암세포의 전이와 성장을 막는다는 것이 1994년에 발표되었다. 이와 같은 사실들은 암연구의 초기에는 암세포는 혐기성 호흡을 하는 조직으로서 이해되기도 한 것과는 달리, 암세포의 성장에는 산소와 영양소 공급이 절대적이라는 것을 보여주는 것이다. 한편 생체에는 신생혈관을 유도하는 인자와 저해하는 인자가 있으며 유도인자중 대표적인 Angiogenin은 결장암 세포의 배양액으로부터 분리되었으며 123개의 아미노산으로 구성되어있고, 내피세포와 작용하여 포스포리파제 C (PLC)로 하여금 인지질을 가수분해하여 세포내에 1,2-디아실그리세롤을 증가시킨다는 것이 알려져 있다. 그러나 PLC와 신생혈관유도간의 관계는 불분명한 상태이며, 다만 일반적으로 조직에 손상이 오면 신생혈관이 손상부위에 생겨 자연치유를 증가시킨다. 그리고 angiogenesis를 억제하는 인자인 인터페론 알파는 신생아에 치명적인 허파의 혈관종을 막아주는 치료제로 사용되고 있으며, 종양세포에서는 매우 빠르게 자

라고 정상세포에서는 그렇지 않은 내피세포의 성장을 조절하는 성장인자인 bFGF의 항체가 암세포의 성장을 급격히 감소시킨다는 연구결과가 발표되었다. 위와 같은 연구결과로 보아 정상 세포내에서는 유도인자와 억제인자가 조화를 이루고 있으나 암화 과정에서 이 조화가 파괴된 암세포에서는 신생 혈관 유도인자가 활성화되어 암의 전이가 촉진된다고 할 수 있다. 그러므로 암의 성장과 전이를 저해하기 위해서는 이와 같은 신생혈관의 생성을 억제함으로써 치료효과를 기대할 수도 있다.

본 연구팀은 라스 유전자가 신생혈관 형성과 관련이 있을 것으로 예측하고 파네실 전달효소 억제제를 분리한 후 이들을 대상으로 신생혈관 형성 억제 효과를 관찰하였다. 이러한 본 연구팀의 가설은 1997년 이 분야연구의 대부라 할 수 있는 폴크만 박사 연구팀에서 의해서 증명되었다. 즉, 이 연구팀은 라스 유전자와 신생혈관형성과의 관련성을 동물모델을 이용하여 증명하고 이 결과를 미국 과학 아카데미지에 발표되었다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제는 농산 자원으로부터 항암활성 소재를 개발하고 *in vitro* 및 *in vivo* 활성 검증을 통하여 활성물질을 확보하는 것이 연구의 목표이다. 이를 위하여 다음 표와 같은 연차별 연구 내용을 수행하였다.

구 분	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1995)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 발암유전자 억제 탐색계 연구 (고순도 효소정제등)</li> <li>· 신규혈관 형성 저해제 탐색계 개량 연구</li> </ul>
2차년도 (1996)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 발암유전자 억제 소재 탐색 및 라스 단백질의 생산 및 정제</li> <li>· 신규혈관 형성 저해제 신소재 탐색</li> <li>· 탐색된 신소재로부터 활성 성분 분획 분리 정제 연구</li> </ul>

3차년도 (1997)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 본 연구과제를 위하여 확립된 탐색계를 이용한 신소재 탐색</li> <li>· 세포주를 이용 탐색된 생물소재들의 신기능 이차 활성 검증</li> <li>· 탐색된 신소재로부터 활성 성분 분획 분리 연구 및 분리 정제</li> <li>· 동물모델확립 기초 연구</li> </ul>
4차년도 (1998)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 탐색된 신소재로부터 활성 성분 대량 분리 정제</li> <li>· 활성 분획으로부터 단일 물질 분리 정제 구조 결정 연구</li> <li>· 결장암 및 폐암을 중심으로 연구</li> </ul>
5차년도 (1999)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 단일 활성 물질의 대량 분리 정제</li> <li>· 동물모델 이용 활성 연구</li> <li>· 결장암 (SW620) 및 폐암 (NCI-H23) 세포주를 중심으로 동물실험</li> <li>· 약속으로부터 항암활성 성분분리(경희대)</li> <li>· 항암활성 물질의 신생혈관 억제 실험(충북대)</li> </ul>

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

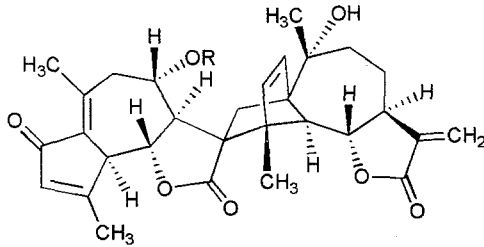
<p>o 연구결과</p>
<p>1. 탐색법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 파네실 전달효소 저해제 탐색법 확보</li> <li>① Scintillation Proximity Assay 방법 확립</li> <li>② Filtration method 확립</li> <li>- Grb2-SH2 domain Antagonist 탐색법 확보</li> <li>① Scintillation Proximity Assay 방법 확립</li> <li>② Filtration method 확립</li> <li>- 수정란을 이용한 신생혈관 형성 억제 활성 탐색법 확보</li> </ul> <p>2. 활성 자원</p> <p>300여종의 농수산자원을 대상으로 하여 활성을 검증하였으며, 이로부터 다음과 같은 유용 자원을 탐색하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식용자원인 계피 및 약속으로부터 활성 물질 분리</li> <li>- 약용자원 송악 및 긴담배풀로부터 활성 물질 분리</li> </ul>



o 연구결과

3. 활성 물질 분리

- 계피유래 활성 물질
- 송악 유래 활성 물질
- 약썩유래 활성 물질



파네실전달효소 저해 활성 물질 (IC<sub>50</sub> = 350 nM)

4. 동물에서 활성을 보여주는 물질 확보

- 계피유래 물질들에 대한 동물실험에서 이들 물질이 대장암에 효과가 있음을 확인하였음
- 약썩의 복합성분 및 단일성분이 동물실험에서 항암활성이 있음을 확인함
- 실험동물의 체중 변화 및 털의 윤기를 관찰을 통하여 급성독성이 없음을 확인함

5. 8건의 국내외 특허 등록 및 출원

- 6편의 논문을 외국 유명잡지에 출판
- 5편의 논문을 국내 전문잡지에 출판

o 연구결과 활용 계획 및 건의

- 본 연구사업을 통하여 얻어진 지적 재산권과 활성 물질은 산업체에 기술이전을 추진 중에 있음
- 약썩관련 연구는 21세기 프론티어 사업의 일환으로 수행되고 있는 자생식물 이용 기술 개발 사업으로 계속 추진되고 있음

o 논문

1. Kwon, B. M., Cho, Y. K., Nam, J. Y., Lee, S. H., Bok, S. H. Chun, S. K., Kim, J. A., and Lee, I. R. "2'-Hydroxycinnamaldehyde from *Cinnamomum cassia* Blume." *Planta Media*, **1996**, 62, 183-184.
2. Kwon, B. M., Lee, S. H., Kim, K. S., Lee, I. R., Lee, U. C., Hong, S. H., Bok, S. H., "Rhombenone: Farnesyl Protein Transferase Inhibitor from the Leaves of *Hedera rhombea* Bean" *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **1997**, 7, 971-974.
3. Kim, K. S., Choi, Y. H., Lee, I. R., Kwon, B. M., Lee, S. H., "A Novel Nortriterpene from *Hedera rhombea*" *Arch. Pharm. Res.* **1997**, 20, 191-193.
4. Kwon, B. M., Lee, S. H., Cho, Y. K., Bok, S. H. So, S. H., Youn, M. R. Chang, S. I. "Synthesis and Biological Activity of Cinnamaldehydes as Angiogenesis Inhibitors" *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **1997**, 7, 2473-2476.
5. Baek, N. I., Kim, Y. H., Ahn, E. M., Bang, M. H., Nam, J. Y., Kwon, B. M. "Isolation of Biologically Active Compounds from the Flower Petals of *Carthamus tinctorius* L." *Agri. Chem. Biotech.* **1998**, 41, 197-200.
6. Lee, S. H., Kim, M. J., Bok, S. H., Lee, H. Kwon, B. M. "Arteminolide, An Inhibitor of Farnesyl Transferase from *Artemisia sylvatica*" *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7111-7113.
7. Jang, D. S., Kwon, B. M., Yang, M. S. "Biological Activities of Sesquiterpene Lactones Isolated from Several Compositase Plants. Part 2. FPTase Inhibitory Activity" *Korean J. Pharmacogn.* **1999**, 30, 70-73.
8. Lee, C. W., Hong, D. H., Han, S. B., Park, S. H., Kim, H. K., Kwon, B. M., Kim, H. M. "Inhibition of Human Tumor Growth by 2'-Hydroxy- and 2'-Benzoxycinnamaldehydes" *Planta Medica*, **1999**, 65, 263-266.
9. Baek, N. I., Hahn, J. T., Ahn, E. M., Bang, M. H., Nam, J. Y., Kwon, B. M. "Isolation of Grb2-Shc Interaction Inhibitory Compounds from the Leaves of *Eucomia ulmoides* O." *Korean J. Pharmacogn.* **1999**, 30, 202-206.
10. Sung, N. D., Yu, S. J., Myung P. K., Kwon, B. M., Lee, S. H. "The Farnesyl Protein Transferase Inhibition Activity of Chalcone Derivatives" *Hanguk Nongwhahak Hoechi*, **1999**, 42, 252-255.
11. Lee, S. H., Kang, H. M., Song, H. C., Lee, H., Lee, U. C., Son, K. H., Kim, S. H., Kwon, B. M. "Sesquiterpene Lactones, Inhibitors of Farnesyl Protein Transferase, Isolated from the Flower of *Artemisia sylvatica*" *Tetrahedron* **2000**, 56, 4711-4715.

o 특허

1. Arteminolide Derivatives and Process for the manufacture thereof: US Patent 5,801,254  
Kwon, B. M., Bok, S. H., Lee, S. H., Kim, Y. K., Kim, M. J., Shin, J. H., Seo, Y., Chang, S. I.  
US Patent Number 5,801,254 Date of Patent September 1, 1998.
2. 8-Acetylarteminolide and process for preparing same  
권병목, 이승호, 정하원, 한미영, 손광희, 김혜경  
US Patent Applied Number 09/596,363
3. 파네실 전이효소 저해제 및 이의 유도체, 이들의 제조방법 및 이들을 함유하는 조성물  
국내특허 번호 176415 등록일 1998년 11월 13일
4. 약속으로부터 추출된 신규 신생혈관유도현상 억제 활성을 갖는 신규 아타노말로이드계 화합물, 이의 추출방법 및 이를 함유하는 조성물  
국내특허 번호 184757 등록일 1998년 12월 21일
5. 약속으로부터 파네실 전이효소 저해 활성을 갖는 신규 아타노말로이드계 화합물 및 이를 함유하는 조성물  
국내특허 번호 0202395 등록일 1999년 03월 19일
6. 신생혈관유도현상 억제활성을 갖는 계피유래의 신남 알데하이드 유도체, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 조성물  
국내특허 번호 0213897 등록일 1999년 5월 17일
7. 신규 림베논 화합물 및 이의 용도 및 제조  
국내특허번호 0218567 등록일 1999년 6월 10일
8. 담배풀로부터 신생혈관 유도현상을 억제하는 세스큐터핀 락톤계 화합물의 제조방법 및 이를 포함하는 조성물  
국내특허 번호 0242240 등록일 1999년 11월 9일

## Summary

### I. Subject

Development of New Bioproducts for Prevention and Treatment of Cancer Disease from Agricultural Resources

### II. Objective and Significance

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.

Activation of Ras is an important convergence point in the mitogenic signaling pathway of receptor tyrosine kinases. The most important components of the Ras signaling pathway consist of Shc, Grb2, and Sos. The Shc proteins containing SH2 domain are cytoplasmic substrates of activated tyrosine kinases. Shc is phosphorylated in response to a variety of receptor tyrosine kinases and also by cytoplasmic tyrosine kinases such as Lck, Src, or Fps. Shc contains a src homology 2 (SH2) domain that binds to either receptor tyrosine kinases upon ligand activation or the phosphotyrosine-containing sequence. Phosphorylated Shc then acts as a linker or adaptor for other SH2 domain-containing proteins. One such protein is a 23-25 kDa Grb2 composed of two SH3 domains and one SH2 domain [9]. The SH2 domain binds to specific phosphotyrosine motifs on receptors or other adaptor proteins such as Shc, whereas the SH3 domains associate with proline-rich motifs in the C-terminal part of SOS, a guanine nucleotide exchange factor for Ras proteins. Recruitment of the Grb2-SOS complexes results in relocalization

of SOS to the membrane, in which the event considered sufficient to induce Ras activation, then the activated Ras in turn leads to Raf and MAP kinase activation. These observations indicate that the Shc/Grb2/SOS pathway plays an important role in the oncogenic signaling pathway of the mutation-activated p185 tyrosine kinase. Moreover, recent studies have indicated that communication from the EGFR to the mitogen-activated protein kinase can be inhibited by blocking protein-protein interaction at the Grb2 SH2 domain binding.

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from an existing vascular bed, is known to be essential for the solid tumor formation as well as wound healing and embryonic development. The inhibition of angiogenesis is therefore emerging as a promising therapy for cancer. Especially, neovascularization is critical for the growth and metastasis of solid tumors. Recent works have shown that potent inhibitors of angiogenesis might be clinically useful as therapeutic agents for these diseases.

### III. Scope of Study

Year	Scope of Study
1st year 1995	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Development of assay system for FPTase and SH2 domain</li> <li>• Development of assay system for Angiogenesis inhibitor</li> </ul>
2nd year 1996	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Screening of FPTase inhibitors, SH2 domain antagonist, and angiogenesis inhibitors from natural sources</li> <li>• Isolation and purification of active compounds</li> </ul>
3rd year 1997	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Structure determination of active compounds</li> <li>• <i>In vitro</i> test</li> </ul>
4th year 1998	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Large scale of isolation and purification of active compounds</li> <li>• <i>In vivo</i> test</li> </ul>
5th year 1999	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Large scale of isolation and purification of active compounds</li> <li>• <i>In vivo</i> test</li> </ul>

#### IV. Results and Prospects for Application

It was developed a high throughput screening method for FPTase inhibitors and screened more than 300 extracts of plants. In the course of our screening for potent inhibitors of FPTase from herbal medicines, we isolated 2-hydroxycinnamaldehyde, rhombenone, and sesquiterpene lactones from *Cinnamomum cassia*, *Hedera rhombea*, and *Artemisia annua* L, respectively. To investigate effects of the FPTase inhibitors in cell-based experiments, we used H- and K-*ras*-transformed NIH3T3 and SW620 cells. Arteminolides were evaluated as inhibitors of Ras processing in the cell lines and it was found that they inhibited Ras processing when tested up to 50 microM.

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

2'-Hydroxycinnamaldehyde and arteminolide, isolated from cinnamon and artemisia, respectively, inhibited the growth of tumor without a loss of body weight in nude mice experiments.

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

여 백

# CONTENTS

## Chapter 1. Introduction

1. Background and Scope of the Research .....	19
---	----

## Chapter 2. Screening System

1. Introduction .....	23
2. Development of Screening System .....	57
3. Screening Methods .....	65
4. Results .....	71

## Chapter 3. Biologically Active Compounds

1. Introduction .....	79
2. Isolation of Cinnamaldehydes .....	84
3. Isolation of Rhombenones .....	85
4. Isolation of Sesquiterpens .....	102
5. Isolation of Arteminolidides .....	104



## Chapter 4. Structure Determination

1. Structure of Cinnamaldehyde .....	107
2. Structure of Rhombenone .....	109
3. Structure of Sesquiterepnes .....	117
4. Structure of Arteminolide .....	120
Chapter 5. Biological Activity .....	133
Chapter 6. References .....	147

# 목 차

## 제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위 .....	19
------------------------	----

## 제 2 장 탐색계 분야

제1절 서 설 .....	23
---------------	----

제2절 탐색계 구축 .....	57
------------------	----

제3절 탐색 방법 .....	65
-----------------	----

제4절 탐색 결과 .....	71
-----------------	----

## 제 3 장 활성물질 분리분야

제1절 서 설 .....	79
---------------	----

제2절 계피 유래물질 분리 .....	84
----------------------	----

제3절 송악 유래물질 분리 .....	85
----------------------	----

제4절 담배풀 유래물질 분리 .....	102
-----------------------	-----

제5절 약쑥 유래물질 분리 .....	104
----------------------	-----

## 제 4 장 활성 물질의 구조

제1절 시남 알데하이드의 구조 ..... 107

제2절 림베논의 구조 ..... 109

제3절 담배풀의 구조 ..... 117

제4절 아테미노라이드의 구조 ..... 120

## 제 5 장 활성물질의 *In vitro* 및 *In vivo* 활성

제1절 계피 유래물질 ..... 133

제2절 약속 유래물질 ..... 140

제 6 장 참고 문헌 ..... 147

## 위탁연구과제

1. 식물자원의 탐색 및 분리정제 ..... 151

2. 신생 혈관 저해제 탐색을 위한 분석 방법의 연구 .... 213

# 제 1 장 서 론

## 제1절 연구개발의 목적과 범위

암은 인간에 있어 가장 치명적인 질병 중에 하나이고 이로 인한 사망은 심혈관질환 다음으로 많으며, 이의 치료를 위해서 많은 항암제들이 개발되었고 지금 이 시간에도 많은 연구자들이 새로운 항종양제 개발을 위한 노력을 계속하고 있다. 그러나 진정한 의미의 치료제로서의 항암제는 없는 상태이고 단지 보조치료제 내지는 단기간의 생명연장을 돕는 정도의 약제밖에는 개발되지 못한 상태이다.

먼저 현재 임상에서 사용되고 있는 40 여 종류의 항암제들을 살펴보면 이들은 대부분 핵산의 합성 저해(5-fluorouracil, cytarabine, pala, pentostatin등) 또는 핵산과 반응하여 (alkylating agents, mitomycin, cisplatin, procarbazine등) 세포 독성을 나타내는 것으로 분류 할 수 있다. 그래서 지금까지는 항암제란 “암세포의 각종 대사경로에 개입하여 주로 DNA와 직접 반응하여 DNA의 복제·전사·번역과정을 차단하거나, 핵산 전구체의 합성을 방해하고 세포분열을 저해함으로써 항암활성, 즉 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 약제를 총칭한다” 라고 일반적으로 정의 내리고 있다. 그러나 이러한 항암제들은 다양한 부작용을 나타내기 때문에 많은 문제를 안고 있으며, 더욱 심각한 문제점은 미국 및 일본의 암 연구진들에 의해서 조심스럽게 발표되고 있는 기존 즉 세포독성을 이용한 항암제들의 부작용 중 가장 심각한 것은 이차암을 발생시킨다는 것이다. 1995년 10월 일본 암학회에서 일본의 의료진들은 기존의 항암제와 방사선 치료를 받은 암환자 중 2%정도가 백혈병에 걸렸다는 충격적인 사실이 발표하였다. 이러한 문제점을 해결한 새로운 암 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있으며 이런 새로운 치료제는 세포독성을 이용한 항암제 개발이 아닌 새로운 기전의 치료제이어야 한다는 것이다.<sup>1</sup>

인류의 숙원인 암 정복의 문제를 어떻게 해결할 것인가? 이 문제를 해결하기 위해서는 먼저 정상세포가 어떻게 암세포로 전환하는가를 알아보고 그에 따른 제어 방법을 강구함으로써 가능하리라 생각된다. 이런 전환을 분자 생물학

적 측면에서 나누어 보면 첫째, 세포의 성장 자극 전달 체계의 이상으로 인한 정상적인 신호전달과 이에 필요한 세포내 물질의 활성화 방해, 둘째, 암 유전자 물질의 활성화에 의한 세포내 성장균형의 파괴, 셋째, 세포주기의 이상으로 인한 세포성장조절의 불균형 등으로 대별할 수 있다. 이들 원인 인자의 연구를 통한 새로운 탐색계의 개발이 선행되어야 새로운 차원의 항암제가 개발될 수 있을 것이다.

암의 발병 기작에 대한 이해와 치료제의 개발을 위한 과학자들의 집요한 노력은 부분적으로 결실을 이루어 왔다. Virus 감염에 의한 동물에서의 암발현 관찰에서 시작한 암의 발병기작에 대한 연구는 1980년대에 들어서면서 분자생물학적 방법의 도입으로 원천적 차원에서 이루어지기 시작했다.<sup>2</sup> 암 유전자 발현 기작에 대한 분자생물학적 연구는 수십 종의 발암 유전자 (Oncogenes)의 발견과 더불어 이들 발암 유전자의 변이 (amplification, point mutation, deletion, and translocation etc.)에 의한 암조직의 형성과 암의 악성화에 대한 이해를 기본적이거나 가능하게 했다. 최근에는 암억제유전자 (tumor suppressor gene)의 발견이 이루어지고 있으며 이들 유전자의 역할이 암 발현 유전자의 기능과 연계되어 이해되고 있다. 암세포의 증식을 돕는 암 발현 유전자의 발견과 이러한 유전자들의 암 활성화 기작들에 대한 이해의 증진은 좀 더 합리적인 항암 치료제나 방법의 고안을 가능케 하고 있다. 현재 개발되고 있는 주요 항암제 표적을 열거하면, 세포내 신호전달에 관련된 단백질들의 저해제 개발, 세포주기 관련 저해제 개발, 신규혈관 형성 저해제 개발, 그리고 핵산의 위상학적 변형 저해제 개발 등이 있다. 이러한 맥락에서 본 과제에서는 발암유전자들의 발현에 관여하는 세포내 신호전달 및 신규혈관 형성을 조절할 수 있는 천연물 탐색 및 개발에 그 목적으로 하고 있다. 그 이유는 첫째, 사람의 유전자 지도작성 연구가 지금과 (1995년 현재 6% 정도) 같은 속도로 진행된다면 2003년경에 완벽한 유전자 지도가 완성될 것으로 추정된다. 따라서 각종 암유전자의 정보도 속속 밝혀질 것이며 이에 따라서 유전자 발현의 시점이 예측 가능하리라 생각된다. 만일 유전자 발현의 시기를 예측할 수 있다면 앞으로 개발 가능한 유전자 발현 억제 물질을 이용한 암예방이 가능할 수 있다. 그리고 이들 억제 물질들은 기존의 세포독성에 의한 암세포의 제거와는 다른 반응기작에 의해 암세포의 성장을 조절함으로써 부작용을 크게 감소시킨 항암제의 개발가능성을 보여주고 있기 때문이다. 둘째, 천연물로부터 분리되거나 또는 분

리된 물질을 lead compound로한 유도체로서 현재 항암치료에 사용되고 있는 것은 vincristine, vinblastine, vindesine, podophyllotoxin, etoposide, taxol, 등이 있으며, 임상실험 중이거나 전임상 단계가 진행중인 것으로는 homoharringtonine, maytansine, bruceantin, indicine-N-oxide, ellipticine, 4- $\beta$ -hydroxywithanolide E, didemnim B 등이 있다. 이 가운데 관심을 끌고 이 는 taxol은 microtubule을 안정화시킴으로서 세포 분열을 막는 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 천연물은 항암제를 개발하는데 중요한 역할을 해왔으며, 앞으로도 부작용이 적고 치료 효과가 좋은 항암제를 개발하는데 있어서, 중요한 역할을 담당하게 될 귀중한 자원이기 때문이다.

여 백

## 제 2 장 탐색계 분야

### 제1절 서 설

#### 1. 세포내 신호전달 과정

세포의 성장과 증식은 세포내외의 조절인자들에 의해서 정교하게 조절되며 이들의 조절인자들에 이상이 생기면 암을 포함한 다양한 질병의 원인이 된다. 세포의 성장을 촉진하는 인자로는 상피세포 성장인자 (EGF), 혈소판유래 성장인자 (PDGF), 섬유아세포 성장인자 (FGF)가 있으며, 성장을 억제하는 인자로는 인터루킨-1 (IL-1), 종양괴사인자 (TNF), 인터페론 등이 알려져 있다. 성장인자가 세포막에 있는 그의 수용체에 결합하면 세포내부에서는 여러 가지의 결합 단백질들과 이차신호전달 물질들이 상호작용을 하여 순차적으로 세포핵 내까지 신호를 전달하게 되고 DNA 복제 및 세포분열을 유도하게 된다. 이 과정 중에서 가장 잘 연구된 상피세포 성장인자로부터 핵까지의 세포내 신호전달과정을 그림 1에 정리해 보았다. 상피세포 성장 조절 인자가 세포막 표면의 그의 수용체에 결합하면 수용체의 cytoplasmic domains에 타이로신 잔기가 인산화 되고, 그 인산화된 타이로신잔기를 인지하는 단백질인 Shc이 결합하게 된다. Shc 단백질도 인산화효소에 의해서 타이로신잔기에 인산화반응이 일어나게 되며 인산화된 타이로신잔기는 특이적으로 인산화된 잔기를 인식하는 SH2 (src homology) domain을 갖고 있는 연결 단백질 (connector protein)인 GRB2에 의해서 인식되게 된다. 그리고 이 연결단백질인 GRB2는 다른 부위에 2개의 SH3 domain을 갖고 있으며, 이 domain들을 통하여 GTP/GDP 교환 인자인 SOS와 결합한다. SOS 단백질은 GDP가 결합되어 있는 비활성형의 라스 단백질로부터 GDP를 떨어져 나가게 하고 GTP를 결합시킴으로써 라스 단백질을 활성화시킨다. 활성화된 라스 단백질은 Ser/Thr protein kinase인 라프 (Raf) 단백질에 신호를 전달하고 MEK, MAPK를 경유하여 순차적인 단백질 인산화반응의 신호 전달을 시작한다. Cytosol의 단백질 인산화반응을 통한 정보는 핵막을 통과하여 핵내의 *fos*, *jun*, *myc*와 같은 전사조절인자를 활성화시키고, 활성화된 조절인자들은 유전자의 전사를 유도하여 세포증식과 분화가 이루어지게 한다. 앞에서 언급한 것과 같이 정상세포에서는 성장이나 억제 신호의 turn-on이나 turn-off가 정교하게



조절되고 있다. 즉, 세포 성장의 신호 전달에 관여하는 단백질들의 활성화 및 비활성화가 조화를 이루고 있다는 것이다. 그러나 이들 단백질 중 하나라도 활성화 또는 비활성화 상태가 지속되면 세포의 성장조절이 깨지면서 암세포와 같은 비정상 세포성장을 유도하게 되는 것이다.

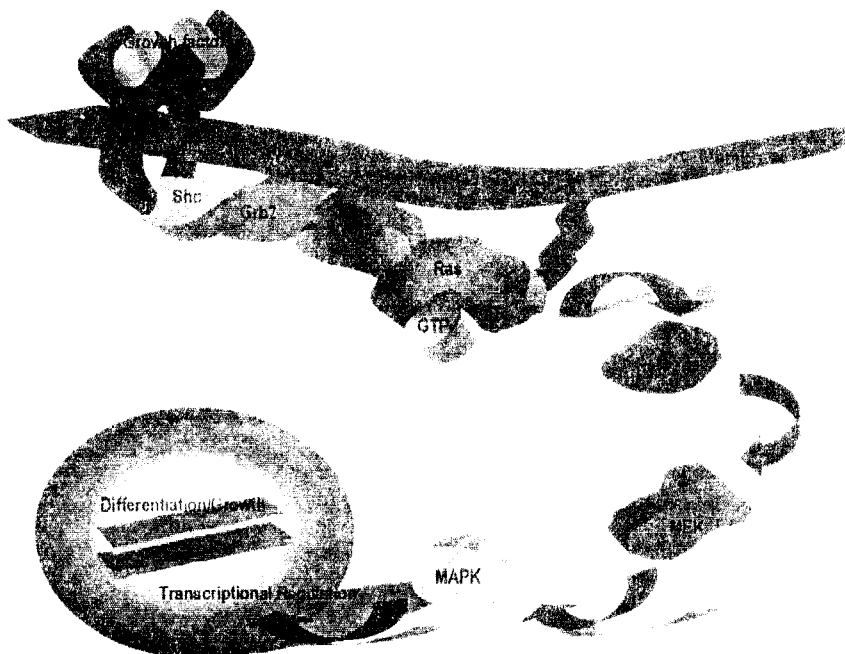


Figure 1. Signal transduction of Ras pathway

미국을 중심으로 하는 선진국에서는 80년대초부터 세포내 신호전달분야에 매우 활발한 연구를 수행하여 지금은 각종 질병과 관련된 표적들을 밝혀내어 선도물질 탐색 및 활성물질을 이용한 새로운 의약품 개발이 활발히 진행되고 있다. 학교를 중심으로 하는 기초연구분야를 제외하고 새로운 연구경향에 비교적 민감한 작은 기업체들을 중심으로 최근 연구 분야와 연구내용분야와 연구내용을 Table 1.에 요약하여 보았다. Table 1.에서와 같이 미국의 많은 제약관련 기업들이 세포내 신호전달 및 발암유전자 분야에 많은 연구를 수행하고 있으며 좋은 결과들을 확보하고 있는 상태이다. 한가지 예로 항암제연구 분야를 살펴보면 기존의 세포독성 등의 방법에 의한 항암제 개발이 아니라 특이표적을 목

표(Specific-target oriented proteins or enzymes)로 하는 분야를 주 연구 대상으로 하고있다는 것을 알 수 있다.

Table 1. 신호전달 관련 연구과제를 수행하는 회사 및 분야

회 사 명	연구 분야	연구내용 및 결과
Affymax	MAP Kinase/SH-2, 3 domain Peptidomimetic chemistry	Lead generation, Cancer
Ariad Pharmaceuticals	Small molecule inhibitors for <i>Srk</i> , <i>src</i> , ZAP-SH-2,3 domain	Asthmas/allergy, osteoporosis, cancer
Cadus	MEK kinase/heterotrimeric G-protein	Inflammation, cardiovascular & cancer, CNS, endocrine
Cell Therapeutics	Small molecule inhibitor for cytokines	Chemotherapy, CT-2584 drug, resistant cancers
Glaxo/Wellcome	Small molecule inhibitors for <i>src</i> , EGF <i>ras/raf</i> related signal blocker	Cardiovascular diseases cancer
ICOS	Phosphodiesterases to control activity of second messenger	Phosphodiesterase V, male erectile disorder
Ligand Pharmaceuticals	Small molecule inhibitors for intracellular signal molecules	Lead generation
Paracelsian	Screening herbal extract as tyrosine phosphorylation inhibitors	Anti-HIV in vitro activity
Oncogene Sciences	Using human cell lines for multiple targets in signalling pathways	Lead generation
Onyx	Small molecule inhibitors for cell cycle regulator & <i>ras</i> signalling	<i>ras</i> lead: cancer therapeutic area: inflammation
Signal Pharmaceuticals	Small molecule inhibitor for transcript factors & regulator enzymes <i>jun</i> kinase	Inflammation, osteoporosis, viral & neuro. diseases
Sugen	Small molecule inhibitors for RTK & Grb2-SH-2 domain	Cancer (HER2, EGF, RTK, SH-2), angiogenesis
Tularik	Small molecule inhibitors for cytokines/atherosclerosis	Autoimmune diseases, allergy, transplantation
Vertex Pharmaceuticals	Structure based drug design Serine/threonine protein phosphatase	FK506/protein interaction/calcineurin

## 2. 라스 단백질관련 신호전달 조절계 (Shc과 Grb2를 연결하는 Grb2의 SH2 domain 결합 저해제)

위와 같은 일련의 세포내 작용들은 대부분의 경우 외부자극에 의해서 이루어지는데, 이런 외부의 신호들은 티로신 인산화 수용체들 [(receptor tyrosine kinases (RTK)], G-protein-coupled receptors, cytokine receptors, ligand-gated ion channels, guanylyl cyclases, serine/threonine kinase receptors 그리고 chemokine receptors에 의해서 세포내로 전달된다. 이 중에서 가장 많은 연구가 진행된 것이 RTK이고 이들과 인체의 각종 질병과의 연관성에 관한 연구 역시 가장 많이 이루어져 있다. 특히 RTKs와 암화와의 관계는 RTKs가 활성화된 암 유전자가 발견되면서 본격적으로 연구되기 시작했으며 그 예는 *erbB* (EGFR), *neis* (HER2), *met* (HGFR), *trk* (neurotrophin receptor) 등이다. 그렇지만 RTKs의 이상은 단지 암에만 관련이 있는 것이 아니며 인슐린 수용체와 관계되는 당뇨병 그리고 EGFR, PDGFR, VEGFR와 관련되는 angiogenesis 등이 있다. 그리고 RTKs의 이상과 항암제 개발을 위한 연구 대상에 대하여는 Table 2.에 정리해 보았다.

Table 2. Receptor Tyrosine Kinases와 암과의 관계

RTK	Disease Association	RTK	Disease Association
EGFR	Squamous carcinoma, head, neck, lung, bladder cancer	CSF1R	Reproductive tract cancers
HER2	Breast, ovarian, gastric, lung, bladder cancer	F1K-1	Angiogenesis, Solid tumors
HER3	Breast, pancreatic cancer	FGFR2	Gastric cancer
HER4	Breast cancer	Met	Thyroid, gastric carcinomas
PDGFR $\alpha$	Ovarian cancer	Ax1	Chronic myelogenous leukemia
		Ret	Medullary thyroid carcinoma

모든 RTKs는 단일 membrane-spanning domain과 세포질 내에 있는 tyrosine kinase domain으로 구성되어 있고 대표적인 RTK로는 상피세포 성장인자 (EGF), 혈소판 유래 성장인자 (PDGF), 섬유아세포 성장인자 (FGF), 혈관 내피세포 성장인자 (VEGF), 간질 세포 성장인자 (HGF), 그리고 neurotrophins에 대한 것들이 있다. 이들 수용체들의 활성화는 ligand가 수용체에 결합함으로써 시작되는데 ligand가 수용체와 결합하면 수용체가 복합체로 변하고 세포내 kinase domain을 활성화시킨다. 각종 kinase에 의해서 인산화가 되면 이것을 인지하는 신호 전달 물질들이 결합하여 세포 신호전달이 연속적으로 일어나게 된다. 정상적인 세포의 성장, 대사, 분열이 일어나기 위해서는 모든 신호전달 과정이 상호 협조가 이루어져야하며 만일 이들 중 어느 한 부위에 이상이 생겨도 각종 질병의 원인이 된다.

세포내 신호전달과정에서 제일먼저 외부신호를 받는 수용체 (EGFR, PDGFR 등)는 외부 신호에 의해서 이중복합체로 변화하면서 타이로신 잔기가 인산화되고 이것을 인지하는 각종 신호전달 단백질들 (PLC, Shc, PI3-K, Grb2등)이 이들 수용체에 결합하게 된다. 이런 단백질의 특징은 인산화된 수용체의 특정 펩타이드를 인지할 수 있는 100개 정도의 아미노산으로 구성되어 있는 domain과 아미노산 50-70개의 domain을 공통적으로 가지고 있다. 이 domain들은 cytoplasmic tyrosine kinase c-Src와 유사하여 각각 Src homology 2 (SH2) 그리고 Src homology 3 (SH3) domain이라고 한다. SH2 domain은 인산화된 타이로신 잔기를 포함하고 있는 짧은 아미노산 배열을 인식하고 SH3 domain은 proline과 소수성 잔기를 포함한 아미노산을 인식한다. 신호전달 단백질마다 포함하고 있는 SH domain의 종류와 수는 각기 다르다. 예를 들어서 Ras 단백질 신호전달계의 Grb2는 2개의 SH3 domain과 이 domain에 의해서 연결된 1개의 SH2 domain을 포함하고 있고 phosphatidylinositol 3 kinase(PI3-K)의 p85 subunit 같은 경우에는 2개의 SH2 domain과 1개의 SH3 domain을 포함하고 있다.

SH2 domain은 receptor 또는 cytoplasmic tyrosine kinase에 의해 활성화되는 신호전달과정의 선택성을 결정하는데 중요한 역할을 하고 있다. 다시 말하면 표적 단백질에 있는 특이 펩타이드를 인식하여 신호전달 단백질들 사이의 상호작용을 유도하는 분자 스위치라 할 수 있다. SH2 domain이 인식하는 것은

짧은 아미노산 배열이고, EGF와 PDGF 수용체의 경우 이 배열은 receptor의 noncatalytic region에 위치하며 그 갯수는 하나 이상일 수도 있다. 물론 인산화된 tyrosine 잔기마다 그 잔기에 대한 특이성을 갖는 서로 다른 신호전달 단백질이 결합하게 된다. EGF receptor의 경우에는 적어도 5개의 인산화된 tyrosine 잔기를 가지고 있고 PDGF receptor의 경우에는 8개가 알려져 있다.

SH2 domain 결합의 특이성은 인산화된 타이로신 잔기 바로 근처에 있는 아미노산 잔기와 SH2 domain과의 상호작용에 근거한다. 여기서 중요한 사실은 SH2 domain을 포함하는 단백질마다 특이성을 갖고 있는 아미노산의 위치가 다르다는 것이다. 이런 특이성은 1993년에 Src SH2 domain의 구조가 X선 구조결정학에 의해 확인됨으로서 보다 더 확실하게 증명되었는데, 이 구조 결정으로 인해 SH2 domain이 인산화된 타이로신 잔기를 인식하는 작용기작이 좀 더 확실해졌다고 말할 수 있다. 이 연구팀에서는 인산화된 타이로신 잔기를 포함한 peptide 혼합물로부터 Src SH2 domain에 결합하는 가장 적절한 phosphopeptide를 골라내서 motif pYEEI를 규명해냈다. 구체적으로 이 motif는 2개의 비염기적인 극성 잔기, glutamic acid와 1개의 커다란 소수성 잔기, isoleucine으로 구성되어 있다. Motif pYEEI를 가지고 있는 peptide를 이용해서 Src SH2 domain과 이 펩타이드와 결합된 형태의 구조를 밝혀냈다. 펩타이드 결합부위는 2개의 나선과 1개의  $\beta$ -sheet 구조로 형성된 평평한 표면이다. 즉, SH2-peptide complex는 마치 2개의 돌출된 플러그가 (phosphopeptide) 2개의 움푹 들어간 소켓 (SH2 domain)에 들어가 있는 것 같다. SH2 domain에 있는 두 개의 구멍은 매우 특이적인 결합 부위이다. 하나는 이온결합, 수소결합, 그리고 소수성 결합으로 인산화된 타이로신과 결합하고 또 하나는 주로 소수성을 갖고 있어서 pYEEI의 isoleucine과 결합한다. SH-2 domain과 peptide간의 'Plug-in-Socket' interaction은 5-6개의 아미노산 잔기를 초과하지 않는 작은 범위에 국한되어 있다. 이렇게 꼭 맞는 결합 작용으로 다양한 결합 부위를 포함하는 수용체와 SH2 domain을 포함하는 서로 다른 단백질들과의 상호작용을 설명할 수 있다.

한편, 최근의 연구 결과에 의하면 Ras 신호 전달계의 상부는 Grb2와 mSOS가 Ras의 활성화에 관여한다는 것이 증명되었다. 앞에서도 언급한 것과 같이 Grb2는 하나의 SH2 domain과 두 개의 SH3 domain을 갖고 있는 연결(adaptor)

단백질이며, 특히 SH2 domain은 외부신호(성장인자: EGF, TGF, PDGF, NGF, IGF II등과 환경 인자: UV등)의 자극에 의해 활성화된 수용체의 타이로신 인산화 자리에 결합하고, SH3 domain은 mSOS와 결합하여 Grb2-mSOS 복합체를 형성하여, 최종적으로 mSOS는 Ras를 활성화시킨다. 이 신호 전달에 관여하는 mSOS는 구아닌 뉴클레오타이드 교환인자 (GNRF)이고, Grb2 SH2 domain은 100여개의 아미노산으로 구성되어 있는 단백질로서 특이한 아미노산 서열을 가지고 있는 인산화된 펩타이드와 결합하여 수용체가 받은 외부신호를 세포내로 전달하는 역할을 하게 된다. EGF 수용체의 경우는 직접적으로 타이로신 잔기에 결합할 수도 있지만 활성화된 EGF 수용체에 결합된 Shc를 통해 간접적으로도 결합할 수 있다. 이런 연구결과들은 이 단백질-단백질 상호 작용을 효과적으로 저해하는 물질을 찾아낸다면 새로운 차원의 항암제 뿐만 아니라 각종 질병의 예방 및 치료제 개발이 가능하다는 것을 말해준다.

Table 3. Grb2 단백질 및 SH2 domain 관련 연구개발 내용

연구자	연구개발내용
Songyang, Schlessinger	SH2 domain binding sequence study
Waksman, Kuriyan	X-ray crystal structure of SH2 domain
Margolis, Schlessinger	Cloning of Grb2-EGF-receptor binding protein
Li, Schlessinger	Grb2 and cancer와의 연관성
Janes, Sutherland	Grb2 and breast cancer 관련에 관한 연구
Pawson	EGFR-Shc-Grb2의 관계연구
Pawson, Schlessinger	Receptor-Grb2-Sos-Ras로 연결되는 신호전달기전
Pendergast, et al.	Chronic myelogenous leukemia (CML)과 Grb2와의 관계
SUGEN, Inc.	1995년 EGFR-Grb2 결합저해제를 개발함

대부분의 신호전달 단백질에 존재하는 SH2 (src homology 2) domain은 최초로 Pawson 그룹에 의해서 그 이름이 알려지게 되었으며 이것이 각종 수용체의 인산화된 타이로신과 결합한다는 사실도 Pawson과 Schlessinger의 공동연구로 이루어 졌다. 이 단백질 분야의 중요 연구 결과 및 연구자를 Table 3.에 정리 하였다.

SH2 domain은 다른 단백질들과 매우 특이적으로 결합하며 결합부위의 한곳의 변화만 있어도 결합정도가 급격히 감소한다는 것이 알려져 있다. 즉, 특이한 결합 부위를 가지므로 많은 SH2 domain이 존재하지만 각각의 단백질에 따라서 선택적인 결합저해제의 개발이 가능하며 이를 이용하면 특정 질병의 치료제 개발이 가능하다는 것이다. 그러므로 국내에서도 이런 분야에 관심을 가지고 목표를 좁게 설정하여 중점적으로 연구를 수행한다면 새로운 의약품의 개발 뿐만 아니라 의과학 분야에도 큰 공헌을 할 수 있으리라 생각된다.

### 3. 라스의 파네실화 저해제(FPTase inhibitor)

성장조절인자를 통한 신호전달과정에서 가장 중요한 역할을 하는 단백질은 분자량이 21 kDa이며 188-189개의 아미노산으로 구성된 라스 단백질로써 guanine nucleotides (GDP와 GTP)와 결합할 수 있다. 라스 단백질은 *ras* proto-oncogenes에 의해서 발현되고 *ras* gene은 다양한 사람의 종양에서 oncogenic gene으로써 처음 발견된 유전자이며 사람의 악성종양과 관련이 있다고 알려져 있다. 이 유전자는 크게 Harvey-*ras* (H-*ras*), Kirsten-*ras* (K-*ras*), 그리고 N-*ras*로 분류된다. 사람에서 발견되는 대부분의 암에서 30 %이상이 라스 단백질 (H-Ras, K-Ras, N-Ras)의 생물학적 활성이 비정상적으로 변화하는 mutation된 *ras* gene을 갖고 있다는 것이 증명되었으며 특히, 췌장암 (90%), 직장암 (50%), 폐암 (50%), myeloid leukemias나 갑상선암 (30%) 등은 높은 빈도로 mutation된 *ras* gene을 갖고 있음이 확인되었다. 라스 단백질은 세포의 증식과 분화를 조절하는 signal transducer이며, 많은 G protein과 마찬가지로 라스 단백질도 GTP-bound form (switch "on")일 때 signal transducer로 작용하며 GTP가 본래의 GTPase activity 또는 GTP 가수분해를 돕는 단백질인 GTPase Activating Protein (GAP)에 의해서 GDP로 가수분해될 때 비활성화 (switch "off")되게 된다.

앞에서 언급한 것과 같이 라스는 GTP를 GDP로 가수 분해시키는 능력을 가지고 있으며 이 가수분해활성 (GTPase activity)은 세포내에 존재하는 분자량이 120 kDa인 GAP에 의해서 활성이 촉진되어진다. 그러므로 GAP은 정상적인 Ras signal에서 switching "off"가 되게 하는 negative regulator 이다. 그러나, oncogenic *ras* mutations에 의해서 12, 13, 59, 또는 61번째의 아미노산이 변화된 라스 단백질에서는 본래의 GTP 가수분해 능력이 200 배정도 감소되어 있을 뿐만 아니라, GAP에 의한 GTPase 활성화 능력이 상실되어서 oncogenic 라스 단백질은 정상적인 라스보다 아주 오랫동안 switch "on" (GTP-bound) 상태로 남아있게 된다. 따라서, 라스에 GTP가 결합된 상태로 존재하는 세포는 외부의 신호없이 계속적으로 세포내의 신호전달 단백질들에 신호를 보내어 세포의 분열과 증식을 촉진시키게 된다. 이런 비정상적인 세포의 분열과 성장은 암화 반응에 필수적인 요소이다. 어떻게 하면 활성화된 라스 단백질을 비활성 즉 switch "off" (GDP-bound) 상태로 변화시킬 수 있을까? 또는 활성화된 라스의



신호를 어떤 방법으로 차단할 수 있을까? 이런 문제점들을 풀기 위해서 다양한 방법론들이 제시되었으며, 본 연구팀은 라스 유전자에 관심을 가지고 연구 및 조사한 결과 라스 유전자의 산물인 라스 단백질이 원형질막에 결합하는 과정이 라스 유전자의 발현에 필수적임을 알 수 있었다.

라스 단백질의 구조 및 생화학적인 연구에서 라스 단백질의 활성화 단계에는 GTP 결합뿐만 아니라, 라스 단백질이 세포막에 위치하는 것이 중요하다는 것이 밝혀졌다. 라스 단백질이 signal transducer로서의 기능을 하기 위해서는 GTP와 결합한 후 원형질막에 위치하여야 하며 이 막에 위치하지 못하고 cytosol 내에 있을 때는 그 활성을 나타내지 못한다는 것이다. 즉, 라스가 생물학적인 활성을 나타내기 위해서는 C-말단이 번역된 후, 원형질막의 cytoplasmic 표면에 부착되어 있어야 한다. 이를 위해서는 라스가 세포질에서 비활성의 전구체로써 생합성된 다음 스테로이드 생합성 과정에서 생성되는 지질과 결합하여야 하며 이러한 일련의 반응을 번역 후 변형과정(post-translational processing)이라 한다 (참조 그림 2). 이러한 신호전달 단백질들의 원형질막과의 결합은 라스 단백질을 포함한 대부분의 G protein들에서 발견되며 이 지질화 반응은 C-말단에 있는 시스테인 잔기에서 일어난다. 이들 단백질은 C-말단에 한 개의 시스테인과 두 개의 aliphatic residue, 그리고 한 개의 carboxyl terminal "X" residue를 포함하는 CAAX motif를 가지고 있다. "X" 위치의 아미노산은 Ser, Ala, Met, Glu 등으로 한정되어 있고, prenyltransferase가 protein substrate를 인식하는데 중요한 잔기이다. 이 잔기의 구성에 따라서 결합되는 지질과 작용하는 효소가 결정된다. 이들 지질화 반응에는 크게 farnesylation과 geranylgeranylation의 두 가지 형태가 있으며, 라스 단백질의 경우에는 farnesylation이 일어나고, 세포내의 지질결합 단백질들은 대부분 geranyl group이 결합한다 (즉, geranylation이 5-10배 정도 더 많이 일어난다). Isoprenylation에 참여하는 isoprenyl group은 2-acetyl-CoA 부터 시작하여 cholesterol을 생합성하는 isoprenoid의 생합성과정에서 생기는 산물이다.

Ras의 번역 후 변형과정을 살펴보면 첫단계로 파네실기가 카르복시 말단에서 4번째 위치의 시스테인에 도입되고, 두번째로 시스테인의 카르복시쪽 3개 아미노산들이 단백질 가수분해 효소의 작용으로 절단되고(proteolytic

cleavage, Figure 2), 마지막으로 카르복시 말단으로 노출된 시스테인에 메틸화 반응이 일어나는 일련의 과정이다.

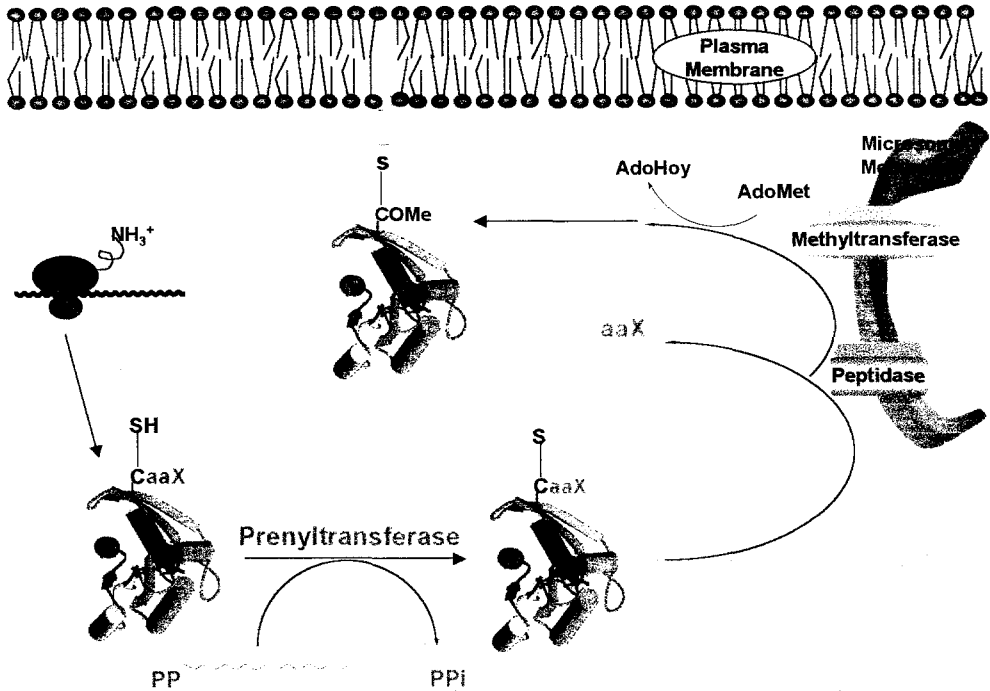


Figure 2. Post-Translational Modifications of Ras

이 과정에 3가지의 효소, 즉 파네실 전달, 펩타이드 가수분해, 그리고 메틸화 반응 효소가 관여하며, 각각의 효소를 효과적으로 저해할 수 있다면 새로운 항암제의 개발이 가능할 것이다. 이들 효소중 펩타이드 가수분해 효소는 1999년에 정제되었지만 정확한 반응 기작도 밝혀지지 못한 상태이고, 몇몇 연구그룹들이 이 효소의 저해제 탐색을 위한 탐색계를 연구 중인 것으로 알려지고 있다. 이들 세 가지 효소 중에서 파네실전달 효소의 저해제 탐색을 통한 항암제 개발 연구가 가장 활발히 진행되고 있으며, 몇 가지의 파네실전달 효소의 저해제를 이용한 동물실험결과 선택적으로 암세포의 성장을 억제한다는 결과가 발표되고 있어서 항암제 탐색계로서는 가장 주목을 받고 있는 방법이다.

이 효소의 저해제 개발을 통한 새로운 차원의 항암제 연구에 있어서 몇 가

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

첫째: 세포내 단백질의 지질화 반응에서 geranylgeranylation은 farnesylation보다 5-10배정도 더 빈번히 일어난다.

둘째: 몇몇 heterotrimeric G protein의  $\gamma$ -subunit와 20 kDa의 GTPase protein인 G25K와 K-Ras p21은 geranylgeranylation에 대한 substrates 이다.

셋째: Geranylgeranylated proteins의 CAAX sequence에서 X는 Leu인 반면, farnesyated protein의 X는 여러 가지 다른 아미노산들이 될 수 있다.

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

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

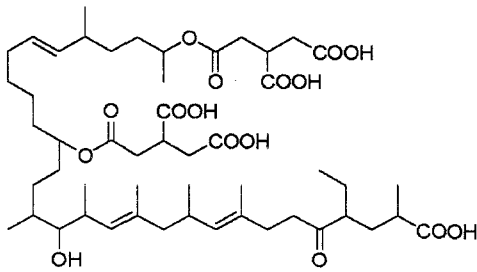
그러므로 이 효소의 억제물질을 함유한 천연자원을 찾아내면 새로운 기능의 생물소재로서 개발이 가능하다고 사료된다. 지난 수년간 학계 및 제약업계 연구자들은 FPTase를 선택적으로 저해하는 물질을 탐색하고 고안해 왔다. 이들은 Farnesylpyrophosphate, peptidomimetic compounds, bisubstrate analogues와 천연물로 나눌 수 있다.

Peptidomimetic 저해제 고안의 궁극적인 목적은 peptide의 성질은 가지지 않으면서 peptide의 생물학적 효과는 모방할 수 있는 물질을 찾고자 하는 것이다. 이 분야의 획기적인 진전은 Goldstein, Brown등이 FPTase가 CAAX 펩타이드를 특이적으로 인지하고 파네실화 한다는 사실을 밝혀냄으로써 이루어졌다. 하

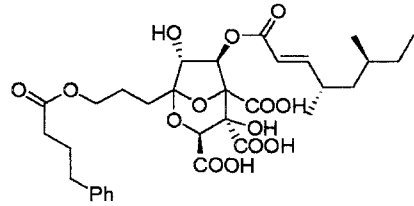
지만 이들 펩타이드들이 *in vitro*에서는 FPTase를 효과적으로 저해하긴 하지만 세포 내로 들어가기 어렵고 세포 내로 들어간다 하더라도 peptidase에 의해 분해되기 쉽다는 문제가 이들을 치료제로 개발하는데 걸림돌이 되어왔다. 이를 극복하기 위해 CAAX내 펩타이드 결합을 다른 형태로 바꾸는 일이 시도되었으며 한 예가 Merck에서 개발된 물질들이다. 그중 L-744,832는 중앙 amide bond가 다른 그룹으로 바뀐 물질로 2-20  $\mu$ M의 농도로 모든 인체 암세포주의 70% 이상에서 세포성장을 억제하였으며 H-Ras transgenic mouse에서 독성은 나타내지 않으면서 유방암과 salivary 암을 저해하는 것으로 나타났다. Pittsburg 대학 팀에서는 CAAX의 A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>를 구조적으로 안정한 소수성 spacer로 바꾸는 시도를 하여 H-Ras 파네실화 저해능력은 지니면서 peptide 특유의 가수분해 성질은 가지지 않은 4-amino benzoic acid spacer 또는 biphenyl spacer를 가진 FTI 시리즈의 여러 물질을 개발하였다. Farnesyl-protein transferase inhibitor (FPTaseI) FTI276은 nude mouse 모델을 이용한 실험에서 변이 Ras 단백질의 파네실화를 저해하며 tumor의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 최근 Schering-Plough사는 무작위 탐색을 통해 새로운 tricyclic 유도체인 SCH44342를 발견하였다. 이 물질은 -SH기도 -COOH기도 없이 Ras 단백질과 경쟁적으로 작용하여 FTase를 저해하였다. 이는 nonpeptide계 저해물질을 찾는 데 있어 무작위적 탐색법이 얼마나 큰 가능성이 있는지를 보여주고 있다.

Farnesylpyrophosphate (FPP)와 bisubstrate analogues들은 FPTase에 의한 Ras 단백질의 파네실화 반응에는 두 개의 기질인 FPP와 Ras 단백질이 관여한다는 사실에서 시작되었다. 그러므로 Ras 단백질의 CAAX를 모방한 peptidomimetic처럼 FPP 기질을 모방한 물질이 FPTase 저해제로 가능성이 있음은 자명한 사실이다. 그러나 peptidomimetic과는 달리 FPP 유사체는 FTase 저해제로 작용하는데 결정적인 핸디캡을 가지고 있다. FPP가 세포 내에서 squalene synthase와 같은 효소에서 광범위하게 사용되는 대사물질이기 때문에 FPP 유사체가 다른 효소와 비선택적 결합을 할 경우 심각한 부작용을 일으킬 수 있기 때문이다. FPP 유도체 개발은 FPP의 diphosphate의 가수분해되기 쉬운 성질을 개선하는 것으로 시작되었다. Pyrophosphate를 monophosphate로 대체한  $\alpha$ -hydroxyfarnesyl phosphonic acid와 pyrophosphate의 oxygen을 methylene group으로 치환한 farnesylmethyl hydroxyphosphinyl methyl phosphonic acid는 가수분해되지 않으면서 FPP와 경쟁적으로 반응하여 FPTase

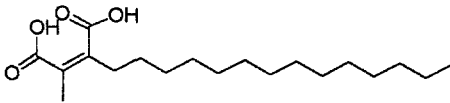
를 저해하였다. 이외에 pyrophosphate를 모방한  $\beta$ -carboxyphosphonic acid를 이용한 화합물들도 개발되었다.



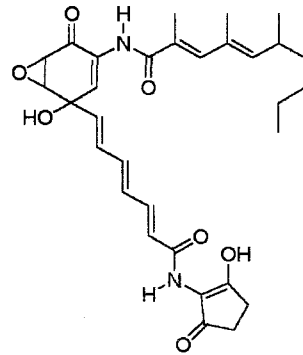
**Actinoplanic acid B**



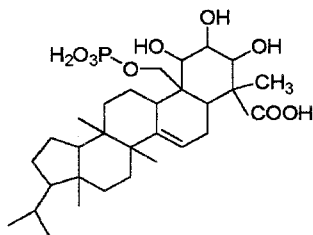
**Zaragozic acid A**



**Chaetomelic acid A**

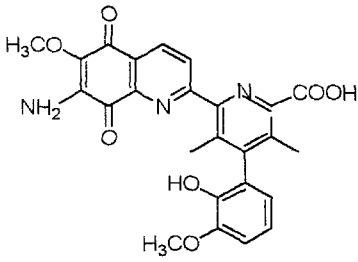


**Manumycin analog**

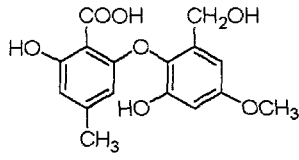


**RPR11322B**

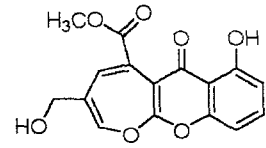
Figure 3. Farnesyl pyrophosphate와 경쟁하는 천연물 유래 저해제



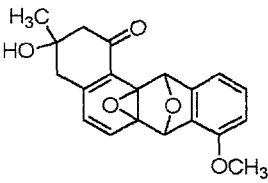
**10'-Desmethoxystreptonigrin**



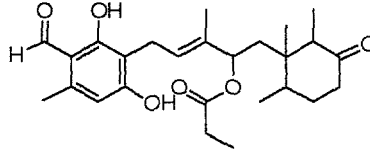
**Barceloneic acid A**



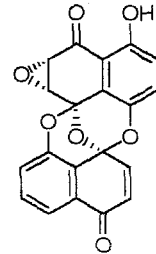
**Fusidienol**



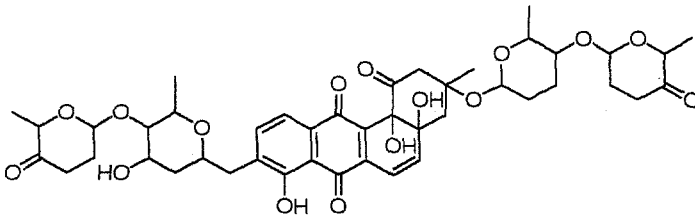
**SCH58450**



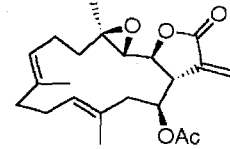
**Andrastin C**



**Preussomerin**



**Saquayamycin C**



**Cembranolide**

Figure 4. Farnesyl pyrophosphate와 경쟁하지 않는 천연물 유래 저해제

Bristol-Myers-Squibb사는 두 기질 복합체의 transition state (전이상태)를 모방한 FPTase 저해제를 고안하였다. 이 그룹은 효소-저해제 간의 hydrophobic interaction을 유지하기 위해 farnesyl기의 소수성 부분을 유지하고 효소의 단백질 인지부위는 tripeptide AAX로 대체시켜 BMS 시리즈의 효소저해물질들을 개발하였다.

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

그림 3과 4에서는 위에서 열거한 것들 중에서 지금까지 천연물에서 개발된 파네실전달 효소 저해제의 구조를 나타내었다. 또한, 지금까지 개발된 파네실 전달 효소 저해제들과 *In vitro* 활성을 Table 4에 정리하였다.

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

Table 4. 파네실 전달효소 저해제들과 *In vitro* 활성

Chemical source	Inhibitors	IC <sub>50</sub> for FPTase(μM)	IC <sub>50</sub> for GGPTase(μM)	Effect on mammalian cells
<b>Natural product</b>	Manumycin	5	180	Active on Cell line
	Gliotoxin	1.1	ND	ND
	Pepticinnamin	0.1	ND	ND
	Chaetomelic acid A/B	0.06/019	92	ND
	Zaragozic acid A	0.22	0.62	ND
	Desmethoxy-streptonigrin	21	ND	ND
	Patulin	290	ND	ND
	Fusidienol	0.3	ND	ND
	RPR113, 228	0.83	59	ND
	Cylindrol A	2.2	ND	ND
	SCH 58, 450	29	740	ND
	Barceloneic acid A	40	ND	ND
Actinoplanic acid A/B	0.23/0.05	1	ND	
<b>CAAX analogue</b>	Tetrapeptide CVFM	0.025	ND	ND
	L-731, 734	0.028	ND	Cell line transgenic mice
	BZA-2B	0.85		"
	CVIM	0.09	35	Cell lines
	B581	0.21	790	"
	FTI-276	0.0005	0.5	"
	SCH 44, 342	2.8	>12	"
	Cys-4-ABA-Met	0.05	ND	"
	L-739, 750	0.0018	3	Transgenic mice
	BMS-185, 878	0.005	ND	Cell line
	CVWM	0.5	ND	ND
	L-739, 787	0.3	ND	ND
	Phosphinyl acid-base Bisubstrate analogues	0.06-0.6	0.05-0.01	ND
<b>Farnesyl pyrophosphate analogues</b>	HFP	0.03	35.8	ND
	HCP	0.083	26	ND
	hydroxy farnesylphosphonate	0.03	67	Ras processing
	Farnesyl diphosphate-based inhibitors	0.075-0.22	ND	"



라스 유전자는 진핵세포에 존재하여 세포 분열에 중요한 역할을 하는 유전자로서 Harvey (1964년)와 Kirsten (1967년)에 의해서 rat sarcoma virus로부터 발견하였다. 1981년에는 Weinberg group에 의해서 human bladder carcinoma cell로부터 분리되었고, 그 후 다양한 세포주 (Sarcomas 등 포함)와 사람의 암 세포조직 (leukemias, Neuroblastomas, lymphomas 등)에서도 분리되었다. 많은 발암유전자 중에서 라스 발암유전자가 (그중에서도 H-ras) 가장 먼저 발견되었으며 그 정체는 1982년 Weinberg group과 Barbacid group의 연구에 의해서 밝혀졌다. 이어서 이 유전자가 사람의 폐암과 관련이 있고 유사한 유전자인 K-ras, N-ras가 존재한다는 것이 알려지게 되었다. 그리고 많은 연구그룹의 연구 결과로 이들 유전자의 산물인 라스 단백질의 역할과 구조등이 속속 밝혀졌으며, 라스 발암 유전자(v-ras)는 정상적인 세포내 유전자(c-ras)의 염기 서열 중 하나의 염기가 다른 염기로 치환된 형태임을 알게되었다.

Ras 단백질은 다른 구아닌 뉴클레오타이드 결합 단백질에서와 마찬가지로 단백질 자체가 지니고 있는 GTPase 활성과 구아닌 뉴클레오타이드와의 결합력에 의해 그 활성이 조절된다. 즉, GDP가 결합되면 생물학적 비활성 상태가 되고 외부 신호에 의해 GTP가 결합되면 생물학적 활성 상태가 된다. 정상적인 라스 단백질의 활성은 GTP-GDP cycle에 의해 조절되는데, 여기에는 뉴클레오타이드 교환 인자 (SOS)와 GTPase 활성화 단백질 (GAP)이 관여한다. GAP은 결국 생체 내에서 라스의 활성을 억제하는 작용을 한다. 이 단백질이 과잉 발현되면, GTP와 결합하고 있는 라스 단백질의 비율을 감소시키고 세포의 성장을 억제시킨다. 전체 GAP 또는 그것의 카르복시 말단은 정상 라스 유전자가 과잉 발현되어 생긴 형질전환을 막거나 정상상태로 되돌릴 수 있다. 여러 암세포에서 발견되는 돌연변이 라스 단백질은 GTPase 활성이 크게 감소되어(200배정도) 있을 뿐 아니라, GAP에 민감하게 반응하지 않아 외부 신호 없이도 계속 GTP와 결합된 상태로 존재하여 세포 분열이 조절되지 않고 계속 진행되어 결국 악성 종양으로 발전시킨다.

라스 단백질의 신호전달 과정은 라프 발암 유전자의 단백질 산물이 라스 단백질에 결합하고 있음이 밝혀지면서 매우 활발히 진행되었다. 라프와 라스의 결합은 결국 라스 단백질의 downstream effector로 작용한다. 라프 단백질은 세린 트레오닌 키나아제 (serine, threonine kinase)로써, MAP 키나아제 키나

아제, 또는 MEK로 알려진 두번째 키나아제를 인산화시킨다. 이러한 키나아제와 또 다른 downstream kinase는 발암 유전자 산물을 포함하여 여러 전사 인자들을 인산화 시킴으로써 외부 신호를 세포 핵 내로 전달한다.

라스 단백질은 세포질에서 합성된 뒤 카르복시 말단에 일련의 번역 후 변형과정 (posttranslational modification)을 거치게 되는데, 이로써 단백질의 친유성을 증가시켜, 원형질막의 안쪽 면에 위치하게 한다. 이러한 번역 후 변형과정은 라스에 의한 형질전환에 필수적임이 밝혀졌는데, 즉 활성화된 라스 단백질의 카르복시 말단에 돌연변이가 있을 경우 형질 전환시킬 수 있는 활성을 상실한다. 이렇게 되면 발암성 Ras 단백질이 세포를 형질전환시킬 수 있는 능력이 크게 떨어지게 된다. 최근에 와서 라스의 번역 후 변형과정이 밝혀지게 되었는데, 첫단계로 파네실기가 카르복시 말단에서 4번째 위치의 시스테인에 도입되고, 두번째로 시스테인의 카르복시쪽 3개 아미노산들이 단백질 가수분해 효소의 작용으로 떨어져 나가고(proteolytic cleavage), 여기서 카르복시 말단으로 노출된 시스테인의 메틸화 반응이 일어난다는 것이다. 이러한 변형과정은 fungal mating factor와 mammalian nuclear lamins에서도 관찰되었다. 파네실화 되는 폴리 펩타이드는 공통적으로 카르복시 말단에 CAAX (C-Cys)라는 서열을 갖고 있는데, 마지막 염기가 세린, 알라닌, 메티오닌, 글루탐산 등으로 제한되어 있다. 그러나 CAAX 서열을 갖는 모든 단백질이 모두 파네실화 되는 것은 아니다. 예를 들어 *G1 $\alpha$*  subunit는 CGLF 서열을 갖고 있으나 변형과정이 일어나지 않으며 G25K나 K-rev p21와 같이 마지막 염기가 루이신인 경우는 파네실기 대신 게라닐게라닐기가 도입된다. 실제로 세포 내에서 파네실화 반응보다는 단백질의 게라닐게라닐화 반응이 5-10배 더 빈번하게 일어난다. 이러한 두 반응은 각각 서로 다른 두 가지 효소, 파네실 전달 효소와 게라닐게라닐 전달 효소에 의해 일어나고 있다. 이 반응에서 파네실기와 게라닐게라닐기를 전달해주는 기질로서 파네실 피로인산과 게라닐게라닐 피로인산이 작용하는데 이들 모두 콜레스테롤이나 유비퀴논의 생합성 과정에서 생성되는 이소프레노이드 유도체들이다. 그러므로 이소프레노이드 생합성의 저해제인 lovastatin, compactin을 이용하면 프레닐화 반응을 막을 수 있다. 그러나 배양된 세포에서 Ras의 프레닐화 반응을 막기 위해 필요한 lovastatin의 농도는 콜레스테롤 생합성을 방해하는 농도보다 100배 더 높다. 이와 같이 높은 농도에서는 세포 자체가 살아남기 힘들 것이라는 사실은 별로 놀라운 일이 아니다. 그러므로 이소

프레노이드 생합성 단계의 일반적인 저해제는 암 치료제로는 사용할 수 없으며, Ras의 번역후 변형과정을 일으키는 효소에 특정한 저해제가 Ras에 의해 형질전환이 일어난 세포에 있어서 독성이 덜하고 선택적으로 이용될 수 있을 것이다. 이러한 목적으로 라스 단백질 변형과정의 첫단계 반응에 관여하는 파네실 전달효소가 널리 연구되고 있는데 효소학적 측면에서 볼 때, 이소프레닐 피로인산과 기질 단백질에 대한 특이성에 관한 연구에 초점이 맞춰지고 있다.

생체 외에서 라스 단백질을 파네실화 시키기 위해 파네실 전달 효소가 소뇌 또는 쥐 뇌에서 분리되었는데, 그 결과, 49 kDa의  $\alpha$  subunit와 46 kDa의  $\beta$  subunit로 이루어진 heterodimer임이 밝혀졌으며, 효소의 활성을 위해서는 두 subunit가 모두 필요함을 알았다. 이 효소의 가장 큰 특징은 파네실화 된다고 알려진 단백질의 카르복시 말단의 4개 아미노산 서열만을 인지한다는 것이다. 이러한 성질을 이용하여 펩타이드 친화성 (affinity) 크로마토그래피에 의해 효소를 정제할 수 있다. 펩타이드와의 결합 기능은 chemical cross-linking 실험으로부터  $\beta$ -subunit에 있음을 알았고,  $\alpha$ -subunit의 경우 정확한 기능이 알려져 있지 않으나 FPP (파네실 피로인산)의 결합에 중요한 역할을 하리라 예상되고 있다. 파네실 전달 효소는 활성을 나타내기 위해  $Mg^{2+}$ 와  $Zn^{2+}$ 를 필요로 하는데, 피로인산이 포함된 기질을 사용하는 다른 효소와 마찬가지로  $Mg^{2+}$ 는 피로인산 부분의 결합에 필요하리라 생각되며,  $Zn^{2+}$ 은 효소 자체의 구성성분으로 보여진다. 이때  $Zn^{2+}$ 은 기질 단백질의 thiol기의 deprotonation과 positioning을 도와 직접 촉매작용에 참여할 가능성이 높다. Steady-state kinetic analysis 결과, 효소에 두 가지 기질이 결합할 때 일정한 순서가 정해져 있지 않다 (Random order mechanism)고 보고되었으나, 효소-FPP 복합체의 형성이 먼저 이루어지는 경로가 실제 세포 내에서 선호된다고 최근 알려졌다.

라스 단백질 관련 분야의 연구는 분자내 신호전달 연구의 한 분야로서 매우 활발히 진행되고 있으며 매년 수 십편의 논문이 발표되고 있다. 라스 발암 유전자의 발현 억제 탐색계 중 파네실 전이 효소억제 물질 탐색의 경우는 구미 선진국에서 1991년부터 Merck Co.와 같은 대형 제약회사와 텍사스 대학의 노벨상 수상자인 Goldstein과 Brown교수 등이 중심이 되어 본격적으로 시작되었으며 몇 가지의 합성 물질 (L-744,832, L-739,750, Benzodiazepine derivatives) 들을 이용한 동물실험이 진행중이다. 그리고 이 분야를 표적으로 하는 항암제

개발연구는 지금 진행되고 있는 여러 가지의 항암제개발 표적 중에서 가장 관심이 집중되고 있는 분야이다. 그 이유는 세포내 신호전달을 조절하는 방법을 통한 항암제의 개발은 최초로 시도되는 것이며 신호전달의 조절은 기존의 항암제개발에서 사용하고 있는 세포독성에서와 같은 부작용이 상당히 감소하거나 거의 없을 것으로 기대되기 때문이다. 이러한 이유로 최근의 암관련 학회에서도 매년 이 분야가 중요 토론과제로 제시되고 있다.

#### 가. 합성에 의한 저해제 개발

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

#### 나. 천연물유래 저해제 개발

효소학적인 탐색법을 이용하여 많은 연구자들이 FPTase 저해제 개발을 위하여 다양한 natural products를 확인하였지만 아직까지는 합성 저해제에 견줄 만한 선도물질은 개발되지 못한 상태이다. 지금까지 20여 가지의 저해제들이 보고되었으며 대부분은 미생물의 2차 대사산물이다. 그리고 어떤 종류의 미생물이 좋은 후보물질을 생산할 것이라든 예측 또한 불가능한 상태이며 이러한 정보가 축적되기 위해서는 더 많은 연구가 요구된다고 할 수 있다. 육상 식물이나 해양생물로부터도 몇 가지의 저해제들을 보고하였으나 크게 관심의 대상이 되는 화합물은 보고되고 있지 않다. 그러나 천연자원의 다양성에 비추어 볼 때 연구자들의 노력여하에 따라서 보다더 활성이 우수한 물질들이 개발 될 것

으로 기대된다.

#### 다. 개발된 탐색법

생리활성물질의 개발을 위해서는 그 활성을 측정할 수 있는 탐색계의 개발이 선행되어야 한다. 다양한 FPTase 저해제 개발을 위한 탐색법이 개발되어 사용되고 있으며, 각각의 탐색법이 장단점을 가지고 있으나 이들 방법 중에서 섬광분석법이 가장 널리 쓰이고 있다. 그 이유는 반응 후에 반응물과 생성물의 분리과정 없이 직접 반응정도를 측정할 수 있어서 대량으로 탐색할 수 있는 장점이 있기 때문이다. 이 방법의 단점은 다른 방법들에 비해서 고가의 SPA bead를 사용해야 한다는데 있다. 여과법이나 분광학적 방법은 저렴하지만 대량의 시료를 처리하는 어려움이 있다. 이러한 방법을 포함하여 대표적인 FPTase 저해제 탐색법을 요약해보면 다음 표와 같다.

Table 5. FPTase 저해제 탐색법

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

**라. 파네실 전달 효소 저해제의 임상실험**

상기 구조를 가지고 있는 미국 Schering-Plough에서 개발한 파네실 전달 효소 저해제를 (*in vitro* assay data: IC<sub>50</sub>= 2 nM) 대상으로 한 1상 임상결과를 발표하였다. 미국 미네소타에 있는 Mayo Clinic에서 20명의 암환자를 대상으로 실시하였으며 350 mg씩 하루에 두 번 경구로 투입되었다.

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

**Table 6. Dose escalation scheme**

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

Table 7. Patient characteristics(n=20)

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

상기 화합물의 임상에서의 우수한 활성은 이 분야의 연구에 활력을 불어넣을 것이다. 한편 국내에서는 생명공학연구소팀이 이 분야의 연구를 최초로 시작하였으며 몇몇 기업과 학교에서 이 분야에 관심을 가지고 연구에 박차를 가하고 있는 상태이다.



#### 4. 신생혈관 형성과정 (Angiogenesis)

암이 생명에 위협이 되는 가장 큰 원인은 암세포의 전이 성질 때문이다. 어떤 부위에 발생한 암이든지 생성 부위만 찾으면 외과적 수술에 의하여 제거하는 것은 어렵지 않다. 그러나 암 치료에서 이러한 외과적 수술에 한계를 가질 수밖에 없는 이유는, 암세포가 원발부위 이외의 여러 다른 곳으로 퍼져 나가기 때문에 극히 제한된 초기 시기에만 수술을 통해 완치를 기대할 수 있다. 최근의 조사에 의하면 수술에 의해서 암조직을 제거 받은 암환자의 50% 이상이 암세포의 전이 때문에 완치가 되지 않는다는 사실이 밝혀졌다.

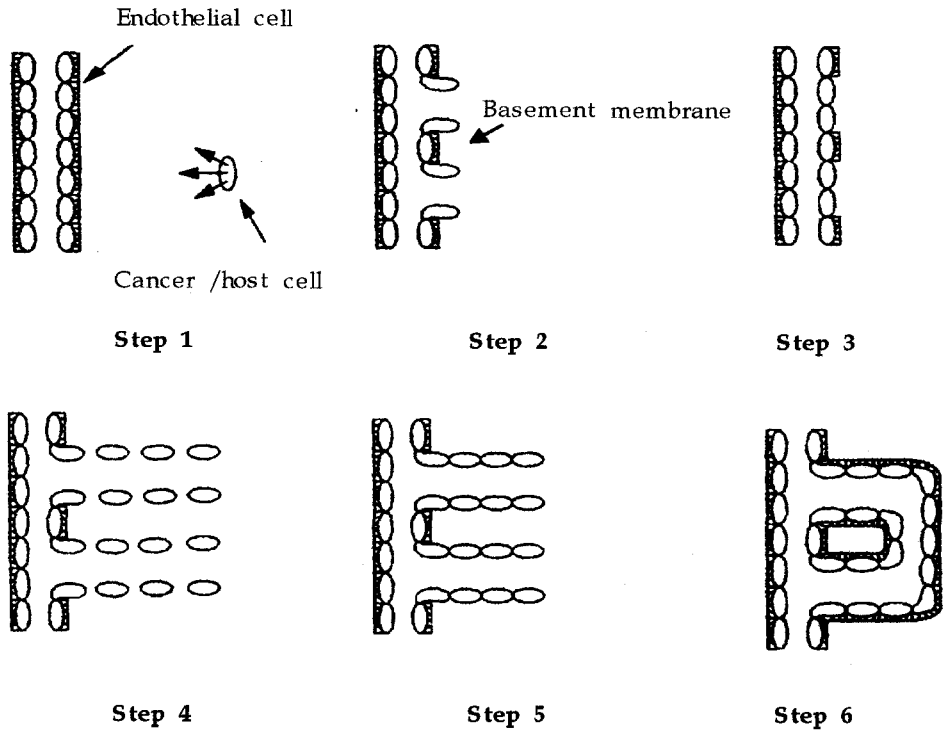
신생혈관형성 과정 (angiogenesis)은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정을 말하며, 정상적인 과정에서는 발생 (embryonic development, female reproductive cycle), 성장 그리고 상처가 치유되는 시기에 일어난다. 이와는 달리 당뇨병성 망막증, 염증, 관절염과 같은 질병에도 관여된다. 특히, 악성종양으로 전개되는 과정 중의 하나인 암의 전이 시에 이러한 신생혈관형성 과정이 필수적으로 동반된다.

암치료 중의 하나인 화학요법은 세포독성 물질에 의한 암치료법으로 부작용 및 후유증이 많으며, 이와 더불어 많은 화학요법제가 다양한 약제 내성 (multi-drug resistance; MDR)을 보여주기 때문에 장기간 투여해야하는 암환자들에게 있어서 큰 문제점으로 대두되고 있다. 기존 항암제들의 이런 단점을 보완할 수 있는 새로운 항암제 개발 방법으로서 angiogenesis 저해제가 주목을 받는데, 이 같은 경우는 세포독성에 대한 후유증이나 MDR에 의한 문제점을 해결할 수 있을 것이라는 연구 결과들 때문이다. 특히, 최근에 들어와서 이 분야 연구의 대가라 할 수 있는 하버드 의대의 Folkman 교수 연구팀이 생체내에 존재하는 신생혈관형성 저해제인 엔지오스테틴 (angiostatin) 및 엔도스테틴 (endostatin)을 이용한 동물실험에서 매우 우수한 항암효과를 관찰했다는 연구 결과를 발표함으로써 전 세계가 초미의 관심을 보이고 있는 연구 분야이다.

1970년대 초, Folkman 박사 연구팀에 의해 암세포가 신생혈관의 형성을 유도하기 위해서 특정 인자를 분비한다는 가설이 제안되었는데, 이후 Folkman 연구그룹이외의 여러 연구팀의 노력으로 이러한 암세포 전이과정에 신생혈관형

성 과정이 중요한 역할을 수행한다는 것이 밝혀지고, 1985년도에는 하버드의대의 벨리 (Vallee) 박사팀에 의해 신생혈관의 형성을 유도하는 인자 중 하나인 angiogenin이 인간의 결장선암세포 (Colon adenocarcinoma HT-29 cell)의 분비액으로부터 최초로 발견되었다. 그리고 고형암은 자기 주위로 유도된 새로운 혈관을 이용하여 영양분을 공급받고 노폐물을 배설함으로써, 계속 성장할 수 있고 또 이 암세포가 순환기에 연결되어 폐, 간 등의 다른 부위로 암이 전이된다는 사실도 밝혀지게 되었다. 그리고 신생혈관형성 과정을 억제하는 angiostatin이 폐암세포의 전이와 성장을 저해한다는 것이 발표되었다. 이와 같은 사실들은 초기의 암연구에서 밝혀진 바와 같이 암세포가 혐기성 호흡을 한다는 것이 사실이 아님을 증명해 줄뿐만 아니라, 암세포의 성장에 있어 산소의 공급이 절대적임을 알 수 있다.

신생혈관이 형성되는 과정을 살펴보면, 어떤 특정 조건에서 암세포는 FGF-2와 같은 신생혈관형성 유도인자 (angiogenic factor)를 방출한다. 방출된 신생혈관형성 유도인자에 의해 자극된 내피 세포들 (endothelial cell)은 단백질 분해 효소를 방출한다. 그중 특히, plasminogen activator와 collagenase와 같은 효소들로 인해 모혈관 (parental blood vessel)과 세포외골격 (extracellular matrix)의 기저막의 지협적인 분해가 일어난다. 그때 내피 세포들은 기저막에 생긴 틈을 통해서 신생혈관형성 유도인자가 방출되는 쪽으로 이동하는데 이 현상은 신생혈관형성 유도인자가 일종의 chemotactic signal로 작용하기 때문이다. 그리고 신생혈관형성 유도인자는 내피 세포들의 증식을 유도한다. 이렇게 증식한 내피 세포들이 서로 연결되어 capillary sprout가 생기고, 내피 세포들의 이러한 배열로 lumen이 형성되고, 마지막으로 두 개의 이웃하고 있는 capillary sprout의 양끝이 연결되어 새로운 capillary loop가 형성되고, 이곳을 통해 혈액이 흐르기 시작한다. 새로 만들어진 모세관 근처에 새로운 기저막의 생성과 pericyte와 다른 perivascular cell들이 축적되어 새로운 혈관 형성이 완성된다 (Figure 5).



**Figure 5. Sequence of events in angiogenesis.**

**step 1** : release of angiogenic stimuli, **step 2** : dissolution of the basement membrane of a vessel and the interstitial matrix, **step 3** : migration of endothelial cells, **step 4** : proliferation of endothelial cells, **step 5** : lumen formation, **step 6** : sprouts form loops

최근 몇몇 연구들은 지난 20여 년전 가설로 설정된 암의 성장이나 전이 모두에 있어 새로운 혈관 형성이 그것을 매개한다는 것을 입증해 주고 있다. 1974년 Folkman 박사는 많은 세포들이 인체내에서 종종 종양을 형성할 수 있다고 보고한 바 있다. 그러나 종양이 감지할 수 있을 정도로 전개되는 것은 아니다. 왜냐하면 암세포들이 빠르게 분화하기 위해서는 적당한 시기에 영양분이나

산소를 공급해 주어야 하는데 이것이 제대로 이루어지지 않기 때문이다. 암세포 자체는 계속해서 분화는 일어나지만, 영양분의 결핍으로 인해 하나의 세포가 분화되면, 그 이전의 것은 퇴화되고 계속해서 이러한 순환이 일어나기에 결코 크기가 증가하지는 않는다. 그러나 암화로의 전개과정 중 알지 못하는 어떠한 결정적인 단계에서 크기가 제한되어 있는 미세종양 (microtumor) 중 일부는 새로운 혈관을 형성할 수 있는 능력을 갖는다. 게다가, 최근 몇몇 연구 결과들은 공격성을 지닌 종양 세포들이 도관을 통해서 종양의 전이를 일으킨다고 보고되었다. 이렇듯 신생혈관형성 과정은 고형암의 성장이나 다른 기관으로의 전이에 필수적인 과정이라 할 수 있다. 그러므로 신생혈관형성 과정의 저해는 암을 효율적으로 치료하기 위한 하나의 발판이 제공된 셈이다.

현재 임상 실험에 들어가 있는 신생혈관형성 저해제들은 새로운 혈관 형성과 관련된 특정 표적 (target)을 바탕으로 고안된 것들이다. 한편 그 밖의 것들은 정확한 작용 기작이 규명되어 있지 않지만 특정 실험실 (*in vitro* and *in vivo*)에서 혈관 형성을 억제하는 효과가 있었다. 일반적으로, 신생혈관형성 저해제를 개발하기 위한 전략들이 Table 1에 잘 나타나 있으며, 이와 같은 전략들을 크게 4 가지로 나누어 보면, (1) 혈관 형성을 자극하는 인자들을 차단하는 방법, (2) 천연물로부터 신생혈관 형성을 저해하는 물질을 찾는 방법 (3) 새로이 형성되는 혈관이 주위의 조직 (extracellular matrix)으로 침투하는데 관여하는 분자들을 저해하는 방법 (4) 기존의 혈관벽으로부터 분리되어 나온 내피 세포들의 분열을 불활성화시키는 방법 등이 있다.

신생혈관을 유도하거나, 억제하기 위한 신물질을 개발하고, 신생혈관형성의 작용기작을 연구하기 위해서는 신생혈관형성을 관찰할 수 있는 *In vivo* assay를 개발 또는 이용하여야 한다. 현재 사용되어지고 있는 *In vivo* assay들을 살펴보면, 1) 닭의 용모막에 시료물질을 처리하여 신생혈관형성을 관찰하는 CAM assay, 2) 닭의 용모막에 시료를 직접 주입하여 신생혈관형성의 변화를 관찰하는 Novel CAM assay, 3) 닭의 용모막에 시료가 첨가된 collagen gel을 뚫고 올라오는 것을 관찰하는 Modified CAM assay, 4) 시료가 첨가된 fibrin gel에서 쥐의 흉부동맥을 배양시키는 동안에 형성되는 모세 혈관을 관찰하는 Mouse aorta ring assay, 5) 내피세포를 microcarrier에 결합시킨 후 시료가 첨가된 fibrin gel에 배양하여 모세혈관의 형성 유무를 확인하는 *in*

*vivo/vitro* assay인 Microcarrier-based angiogenesis 등이 있다.

**Table 8. Antiangiogenic therapeutic strategies** (Hellmut, G. A. 1998)

Substance/approach	Comment
Synthetic/semi-synthetic inhibitors	
Carboxamidotriazole(NCI)	Ca <sup>2+</sup> -channel blocker, Phase I
CM101	Analogue of group B streptococcus toxin (polysaccharide), binds to tumour endothelium, induces inflammation
Marimastat (British Biotech)	Metalloproteinase inhibitor, inhibits endothelial and tumour cell invasion, Phase II (pancreatic, lung, brain)
Pentosan polysulphate	Inhibits heparin-binding growth factors, Phase I
TNP-470(Takeda/Abbott)	Analogue of antibiotic fumagillin, inhibits endothelial cell migration and proliferation, Phase III (breast, Kaposi's sarcoma, cervical)
Thalidomide(EntreMed)	Polycyclic teratogen, antiangiogenic mechanism unknown, Phase II (brain, breast, prostate)
Endogenous inhibitors	
Angiopoietin2(Regeneron)	Interfers with blood vessel maturation
Angiostatin	Plasminogen fragment, antiangiogenic mechanism unknown
Endostatin	Collagen XVIII fragment, antiangiogenic mechanism unknown
IL-12(Roche, Genetis Inst.)	Induces IP-10, Phase I
Interferon $\alpha$	Decreases FGF production, Phase III (infant haemangiomas)
Platelet factor 4	Inhibits endothelial cell proliferation

-continued-

---

## Biological antagonists

---

$\alpha_v/\beta_3$  integrin antagonists      Monoclonal antibodies LM609 and 9G2.1.3, induce endothelial cell apoptosis

---

VEGF inhibitors      Humanized neutralizing antibody, antisense oligonucleotides

---

Soluble receptors      Small receptor tyrosine antagonists

---

VEGF receptor blockers      Angiogenesis inhibition with soluble VEGF-R1 or soluble Tie-2

---

## Vascular targeting

---

Regional TNF- $\alpha$  therapy      Isolated limb perfusion to target in transit metastases

---

Antibody targeting      Use of mono-and bispecific antibodies to target angiogenic endothelial cells (e.g. VEGF receptors, endoglin) to deliver specific angio-and/or tumoricidal activity

---

Vascular gene therapy      Transfer of dominant-negative receptors or suicide genes under the control of angiogenic endothelial cell-specific promoters.

---

The names of the company sponsors of some of the substances are given in parentheses: Phase I, II and III refer to the clinical stage of evaluation with the primary tumour targets given in parentheses. FGF, fibroblast growth factor; IL-12, interleukin 12; IP-10, interferon- $\gamma$ -inducible protein 10; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ ; VEGF, vascular endothelial growth factor.

---

Table 9. Natural product as angiogenesis inhibitor

Compound	Comment
Calhostin C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PKC inhibitor</li> <li>• isolated from <i>Cladosporium cladosporioides</i></li> <li>• blocks angiogenesis potentiated by integrin <math>\alpha_v\beta_5</math>, but not by integrin <math>\alpha_v\beta_3</math></li> <li>• inhibit neovascularisation induced by FGF-2 (100ng/sponge/day), IL-1<math>\alpha</math> (50 ng/sponge/day), TNF-<math>\alpha</math> (50ng/sponge/day) or the PMA(30 <math>\mu</math>g/sponge) in the rat sponge model</li> </ul>
Cytogenin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• a fungal metabolite, isolated from the broth of <i>Streptoverticillium eurocidicum</i></li> <li>• suppresses the angiogenic response induced by malignant tumour cells when administered orally</li> <li>• does not inhibit embryonic angiogenesis</li> <li>• inactive in the CAM-assay but active <i>in vivo</i> models for tumour associated angiogenesis and rheumatoid arthritis</li> </ul>
15 -Deoxyspergualin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• a synthetic analogue of spergualin isolated from the broth of <i>Bacillus laterosporus</i></li> <li>• inhibits angiogenesis in the CAM-assay in a dose-dependent manner (IC<sub>50</sub>-value 480 ng (960 pmol)/egg)</li> <li>• an inhibitor of tyrosine kinase</li> </ul>
Herbimycin A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• an ansamycin antibiotic isolated from <i>Streptomyces hygroscopicus</i></li> <li>• inhibits angiogenesis in the CAM-assay and in the corneal rabbit assay in a dose-dependent manner (ID<sub>50</sub> value - 150 ng (260 pmol)/egg)</li> <li>• an inhibitor of tyrosine kinase, which is part of a domain in receptors of, e.g., FGF-2 or FGF-2</li> </ul>

- continue

<b>Eponemycin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>isolated from the fermentation broth of <i>Streptomyces hydroscopicus</i></li> <li>one of most potent angiogenesis inhibitors in the CAM assay (IC<sub>50</sub>-value 0.1 ng (250 fmol)/egg)</li> <li>inhibits migration and proliferation of endothelial cells</li> <li>shows antitumour activity against various solid tumours, e.g., B16 melanomas</li> </ul>
<b>Erbstatin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a specific tyrosine kinase inhibitor, isolated from <i>Streptomyces</i> sp.</li> <li>inhibits angiogenesis in the CAM-assay in a dose-dependent manner (IC<sub>50</sub>-value 80 ng (450 pmol)/egg)</li> <li>inhibits proliferation of endothelial cells (IC<sub>50</sub>=3.6 μM)</li> </ul>
<b>Fisetin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a plant flavonoid</li> <li>inhibits angiogenesis in the CAM assay at the concentration of 100 ng/egg</li> <li>it shows an anti-angiogenic effect in 43% of the eggs</li> </ul>
<b>Fumagillin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>isolated from <i>Aspergillus fumigatus</i></li> <li>inhibits at the concentration above 2 μg per pellet angiogenesis in the CAM assay</li> <li>suppresses tumour-induced neovascularisation in the mouse</li> <li>But, fumagillin produces excessive toxicity, like severe weight loss</li> </ul>
<b>TNP-470</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>fumagillin derivative</li> </ul>
<b>(AGM-1470)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a more potent, less toxic fumagillin analogue, which after oral administration inhibits growth of solid tumours, e.g., Lewis lung carcinoma in mice</li> <li>selectively inhibits proliferation (IC<sub>50</sub> about 10 pg/ml), migration of endothelial cells (IC<sub>50</sub> about 100 pg/ml) and also inhibits in vitro capillary tube formation at concentrations that were cytostatic</li> </ul>
<b>Genistein</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>isoflavonoid</li> <li>inhibits the FGF-2-induced corneal neovascularisation in NZW rabbits (0.04 mg/day, subconjunctival)</li> <li>inhibits tyrosine kinase, uPA and PAI-1</li> <li>inhibits migration and proliferation of endothelial cells</li> <li>clinical cancer trials are ongoing</li> </ul>



본 연구에서는, 신생혈관형성을 억제시키는 물질을 탐색할 수 있는 *in vivo* 분석방법인 CAM(Chorioallantoic membrane) assay를 이용하여 천연물로부터 신생혈관형성 저해제를 스크리닝 하였다. 신생혈관형성 저해제는 고형암세포의 성장을 다른 부작용없이 억제 할 수 있으리라 기대되며 또한, 천연물로부터의 저해제는 더욱더 부작용이 적고, 새로운 구조를 갖는 제해제를 얻을 수 있으리라 기대되고 있다.

## 제2절 탐색계 구축

### 1. FPTase 탐색계 구축

#### 가. 탐색법

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

[<sup>3</sup>H]으로 표지된 FPP와 Biotin lamin-B peptide가 혼합된 용액에 FPTase를 넣고 반응시킨 후 Streptavidin과 형광 물질이 Coating된 SPA bead를 넣어 준다. 이때 반응이 일어난 것은 Biotin과 Streptavidin이 특이적인 결합을 하게 되고, [<sup>3</sup>H]의 β에너지가 형광 물질에 전달되어, 방출되는 형광을 LSC를 사용하여 검출한다. 반응이 일어나지 않은 경우, β에너지가 형광 물질에 전달되지 않고 수용액 중에 흡수된다.

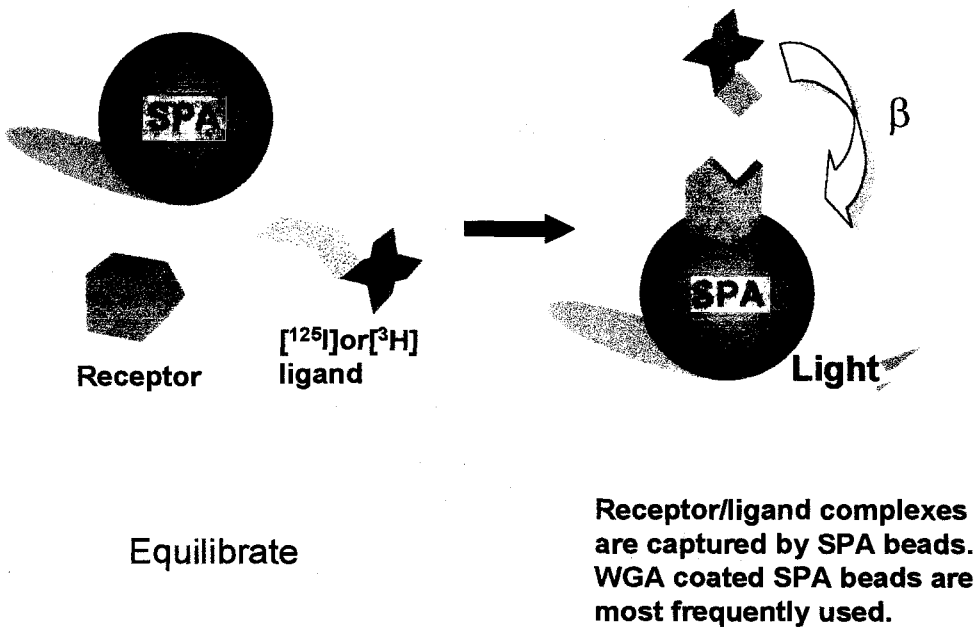
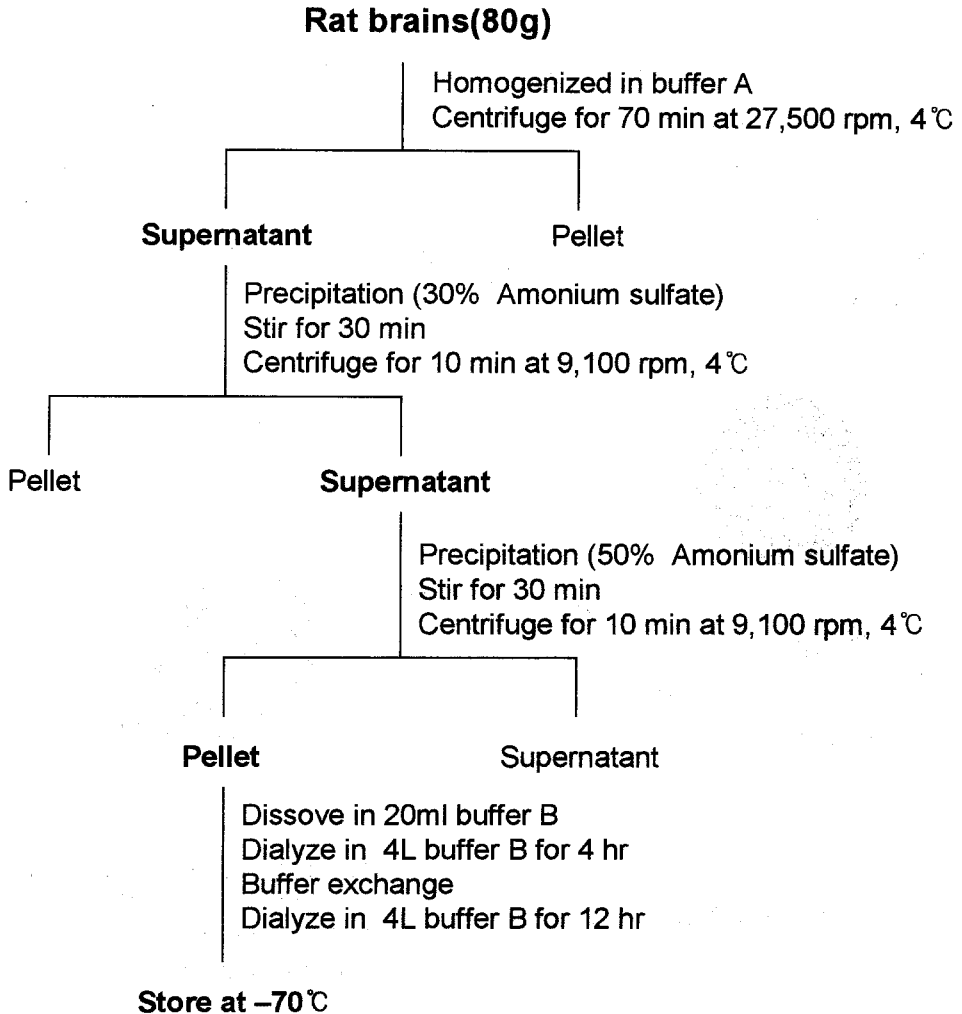


Figure 6. SPA(Scintillation Proximity Assay)의 원리

## 나. 효소의 분리

### 1) FPTase의 부분 정제

Sprague-Dawley rat brain은 1 마리당 몸무게가 135-145 g인 6 주령 된 수컷 20 마리를 생명공학연구소 유전자원센터 동물 실험실로부터 구입 하였다. 부분정제 과정은 아래 Scheme 1과 같다.



Scheme 1. FPTase의 부분 분리 정제과정

효소원으로는 흰쥐 (Male Sprague-Dowley 100-150g)의 뇌를 분리하여 생리 식염수로 세척하고 100 ml의 냉각시킨 완충용액 A (50mM Tris-Chloride, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.1 mM Leupeptin)를 가한 후 얼음 중탕에서 warning blender로 균질화하였다. 균질액을 60,000 g에서 70분동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 30 % ammonium sulfate로 4 °C에서 30분간 염석 후 12,000 g에서 10분동안 원심분리 하였다. 원심분리한 상등액을 50 % ammonium sulfate로 4 °C에서 30 분간 염석 후 12,000 g에서 10 분동안 원심분리하였다. 침전물을 20 ml의 완충액 B (20 mM Tris-chloride, 1 mM DTT, and 20  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, pH 7.5)에 녹여 투석막에 담아 4 l의 완충액 B에서 4시간동안 투석한 후 4 l의 새로운 완충액 B로 12 시간 동안 다시 투석하였다. 투석이 끝난 후 이 용액은 -70 °C에 보관하였다.

**Q-Sepharose( 8ml bed volume)**

Pack Q-Sepharose column  
 Wash Q-Sepharose column with 50ml dH<sub>2</sub>O  
 Equilibrate with 80ml buffer B(50mM NaCl)  
 Load 10ml of sample  
 Wash with 50ml buffer B(50mM NaCl)  
 Elute with 90ml lineal gradient of 50-500 mM NaCl in buffer B  
 (flow rate : 1ml/min)

**Absorbance measurement(280nM)**

**Enzyme assay for monitoring FPTase activity**

**Pool activity fractions**

**Add PMSF 1mM & 0.02% Leupeptin**

**Store in aliquots at -70 °C**

**Scheme 2. Rat brain의 Q-Sepharose 컬럼크로마토그래픽 과정**

이 용액의 일부를 Ion exchange chromatography column을 이용하여 Scheme 2 와 같이 부분정제 하였다. Anion exchanger Q-Sepharose를 column에 채운 후 증류수로 충분히 씻어내고 완충액 C (완충액 B + 50 mM NaCl<sub>2</sub>)를 가하여 평형을 이루게 한 후 정제하고자 하는 단백질을 column에 넣고 NaCl<sub>2</sub>의 농도 기울기를 이용하여 정제하였다. 초기의 NaCl<sub>2</sub> 농도는 50 mM이고 점진적으로 증가시켜 최종적으로 500 mM이 되게 하고 용출액의 용리속도는 분당 1 ml로 고정시켰다. 효소의 활성을 측정하여 0.5-1 mg/ml의 농도로 부분 정제된 효소를 얻었으며 정제된 효소는 분취하여 -70 °C에서 보관하면서 사용하였다. 다음 그림은 각 분획들의 효소 활성을 보여주는 그래프이다.

Q-Sepharose column chromatography of FPTase

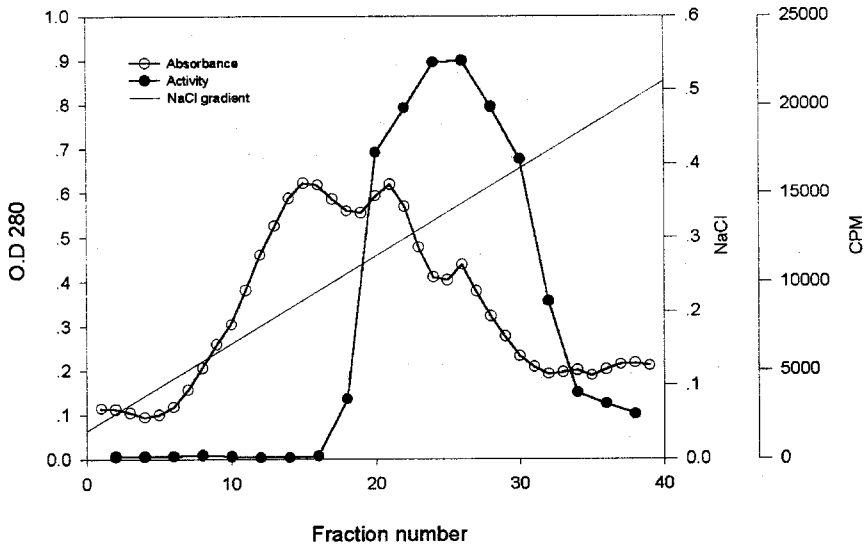


Figure 7. 부분 정제된 FPTase의 흡광도와 활성

## 2) GGPTase I의 분리

GGPTase는 Kohei(Kohei et al.(1993) JBC:4055-4060) 방법에 따라 부분적으로 분리하였으며 모든 단계는 4 °C에서 수행하였다. 20 마리의 rat brain을 100 ml 의 ice-cold buffer A [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM PMSF, 0.1 mM leupeptin]에 균질화하여, 원심분리( 60,000 x g, 70 min )후 상층액을 황산암모늄 (30-50 %) 침전하였다. 침전된 단백질을 20 ml의 buffer B [20 mM Tris-HCl pH 7.5 , 1 mM DTT, 20  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>]에 녹여 투석막에 담아 4 l의 Buffer B에서 4 시간 동안 투석 후 다시 4 l buffer B로 교환 후 12 시간 동안 투석하였다.

증류수로 씻어 낸 후 Buffer C[20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 20  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl<sub>2</sub>]로 평형화시킨 Q-sepharose column에 투석된 약 30 ml의 ammonium sulfate fraction을 loading 하고 50 ml의 Buffer C로 씻어 낸 다음 50 mM-500 mM NaCl gradient로 용출하였다. 1 ml/min의 용출속도로 4 ml씩 분획하였다. GGPTase 활성을 보이는 fraction을 모아 1 mM PMSF와 0.02 %(w/v) leupeptin을 첨가하고 1 ml 씩 분취하여 -70 °C에 저장하며 사용하였다.

GGPTase의 활성도 측정은 Amersham의 SPA (Scintillation Proximity Assay) protocol에 따라 하였으며 원리와 assay 과정은 아래와 같다. [<sup>3</sup>H]으로 label된 GGPP와 Biotin-Y-K-A-S-N-R-S-C-A-I-L에 GGPTase를 넣고 반응시킨 후 streptavidin과 형광 물질이 coating된 SPA bead를 넣어 준다. 이때 반응이 일어난 것은 biotin과 streptavidin이 특이적인 결합을 하게 되고, [<sup>3</sup>H]의  $\beta$ 에너지가 형광 물질에 전달되어 방출되는 형광을 LSC를 사용하여 검출한다. 반응이 일어나지 않은 경우  $\beta$ 에너지가 형광 물질에 전달되지 않고 수용액 중에 흡수된다. Enzyme assay는 1.5 ml eppendorf tube에 20  $\mu$ l의 [<sup>3</sup>H]GGPP(12  $\mu$ M, 3.7 MBq, 100  $\mu$ Ci, 500  $\mu$ l, 20  $\mu$ l의 Biotin-Y-K-A-S-N-R-S-C-A-I-L peptide (0.5  $\mu$ M), 10  $\mu$ l의 sample buffer (MeOH, DMSO), 10  $\mu$ l의 assay buffer(50 mM HEPES, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 5 mM DDT, 0.01 % Triton X-100)를 넣고 37 °C에서 pre-incubation 하였다. 3 분 후에 40  $\mu$ l(1-1.5 mg/ml)의 enzyme을 넣고 37 °C에서 1 시간 동안 incubation 하였다. 반응을 종결하기 위해 150  $\mu$ l의 STOP/bead reagent를 넣고 상온에서 30 분 동안 방치하였다. 반응 종결 후 LSC

를 사용하여 enzyme의 활성을 측정하였다.

### 3) 단백질의 정량

FPTase의 단백질 양은 Bradford 방법을 이용하여 정량하였다.

### 4) SDS-PAGE

Polyacrylamide을 12.5 %로 SDS를 10 %로 하여 Gel을 만들었고, Running 시 전압을 200 V로 하였다. Stain은 Coomassie blue 250으로 하였다.

## 2. SH2 domain 탐색계 구축

### 가. GST-Grb2 재조합 단백질의 발현 및 정제

#### 1) 재조합 단백질의 발현

pGEX2TK-Grb2 재조합 단백질 생산용 플라스미드를 가지고 있는 대장균 균주를 앵피실린 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 들어있는 LB배지 (Luria-Bertani 배지 : 1리터당 박토-트리톤 10 g, 박토-이스트 추출물 5 g, NaCl 10 g)에 접종하여 37 °C에서 16-18시간 정도 진탕배양 후 앵피실린을 포함한 새로운 LB배지에 100배 희석하여 접종한다. 600 nm 파장에서 흡광도가 0.3에 이를 때까지 진탕배양한 후 단백질발현을 유도하기 위하여 1 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 3시간 배양한 균주를 원심 분리하여 세포를 회수하고 재조합단백질의 발현여부를 SDS-전기이동법과 웨스턴블랏법으로 확인하였다.

#### 2) 재조합단백질의 정제

재조합단백질의 정제는 발현균주를 10 mM의 헤미메틸술포닐 플루오라이드를 섞은 완충용액 ( PBS: phosphate buffered saline) 에 섞은 후 초음파 파쇄기로 파쇄후 원심분리하여 상등액을 글루타치온 세파로오즈 4B 비드 (미국 파마시아 바이오텍 제품)에 결합시킨 후 용출완충용액 ( elution buffer : 10 mM 환원된 글루타치온, 50 mM 트리스-염산, pH 8.0)으로 비드에 붙은 단백질을 용출시켰다. 이와같이 흡착 크로마토그래피 방법을 이용하여 회수한 재조합 단백질을 SDS-전기이동법과 웨스턴블랏법으로 확인하였다.

### 나. 방사성 표지된 인산화 펩티드의 제조

#### 1) 인산화 펩티드 서열결정과 합성

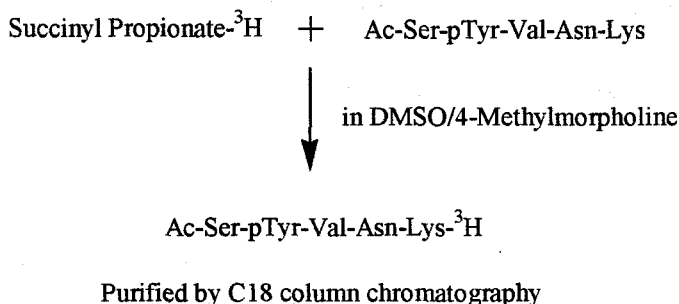
Grb2단백질과 결합하는 아미노산 서열을 정하기 위해 이제까지 연구하여 온 실험결과를 참고로 하였다. 즉 Grb2 단백질과 결합한다고 보고된 Shc, CD28 단백질의 인산화되는 티로신기 주위의 서열로써 Shc 단백질의 경우 317번 티로신기를 포함하는 SpYVNVK (pY는 인산화된 티로신기를 뜻함), CD28단백질의 경우



는 191번 티로신기를 포함하는 DpYMNMTK 서열이다. 이 두 서열에서는 Grb2의 SH2 부위와 높은 친화력이 있는 YXNX 모티프 (YVNV, YNMN)를 갖는다. 반면 결합의 특이성을 확인하기 위한 Grb2단백질과 결합력이 낮은 인산화펩티드로는 혈소판 성장인자 수용체의 1021번 티로신기 주위의 서열인 DpYIIpLPDPK를 선택하였는데 이 모티프는 신호전달과정의 주요 단백질인 포스포리파제 C $\gamma$ 의 SH2 부위와 높은 친화력을 가진다고 보고되어 있다. 또한 SH2 부위와 마찬가지로 인산화티로신기를 인식하여 결합하지만 그 결합특이성을 결정하는 아미노산 서열이 N말단쪽이며 특히 티로신기에서 N말단쪽으로 세 번째에 위치하는 아미노산인 아스파라긴이 매우 중요하다고 알려진 (NXXY) PTB (phosphotyrosine binding domain)가 결합하는 Neu단백질의 1248번 티로신기 주위 서열인 PTAENPEpYLGLK를 실험에 사용하였다.

## 2) 인산화펩티드에 대한 방사성 표식

석시니미딜 프로피오네이트 (N-[propionate-2,3- $^3\text{H}$ ], 17 nmol, NEN제품)를 질소하에서 수분을 증발시킨다. 여기에 무수 디메틸술폭사이드에 녹인 인산화 펩티드 (SpYVNVK, 40 nmol)를 20  $\mu\text{l}$  가해 준다. 반응물의 pH를 4-메틸모포린 2  $\mu\text{l}$ 를 가하여 염기성으로 맞춘 후 실온에서 밤새 반응을 지속시킨다. 이렇게 하여 C말단의 라이신이 동위원소로 표지된 인산화 펩티드를 역상 HPLC에서 아세트니트릴을 30 분간 10 %에서 40 %까지 변화시켜 주는 조건으로 분리 정제한 방사성 인산화펩티드 분획을 모아서 실험하였다.



## 제3절 탐색 방법

### 1. FPTase 저해제의 탐색

#### 가. 천연자원의 탐색

400여 식물체를 수집하여 메탄올로 추출하고 1 mg/ml 농도로 시료를 준비하였다.

#### 나. FPTase의 저해 활성 측정

FPTase 저해활성은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 20  $\mu$ l의  $^3\text{H}$ -FPP, 20  $\mu$ l biotin-lamin B, 10  $\mu$ l 시료용액, 10  $\mu$ l의 assay 완충용액 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM KCl, 5 mM DTT, 5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.01 % Triton X-100)을 넣고 3 분동안 pre-incubation 후 40  $\mu$ l의 FPTase를 넣어주고 37°C에서 1시간 동안 incubation한다. Incubation이 끝난 후 150  $\mu$ l의 SPA bead/stop reagent solution을 넣어주고 vortex한다. 30 분간 상온 방치 후 LSC로 count 하였다. 효소 저해도는 방사능으로 표식한 기질과 효소에 검색시료를 넣어, 반응 생성물의 양을 방사능 측정장치를 사용하여 측정하였고, 다음의 방법으로 저해도를 계산하였다.

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

**Blank 1** : without samples and enzyme

**Blank 2** : with samples and without enzyme

**Control** : without samples and with enzyme

## 2. FPTase 저해제의 이차활성 검색

### 가. 세포 배양

SW620 세포주 (사람의 대장암 세포주)는 10 % fetal bovine serum (FBS)을 포함하는 RPMI1640을 이용하여, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C의 humidified incubator에서 배양하였다. NIH3T3 (mouse fibroblast), K-Ras (K-ras-transformed NIH3T3)와 H-Ras (H-ras-transformed NIH3T3) 세포주는 10 % fetal bovine serum을 포함하는 DMEM을 이용하여, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C의 humidified incubator에서 배양하였다. 저해제를 처리한 후 membrane-enriched fraction을 제조하기 위해 SW620, K-Ras, H-Ras 세포주 모두 seeding한 다음날 media를 제거하고, DMSO에 녹인 저해제를 섞은 신선한 media (0.1 % DMSO가 되도록)를 다시 넣어주어, 48시간 동안 저해제에 지속적으로 노출시켰다.

### 나. Membrane-enriched fraction의 제조

48시간동안 저해제에 노출시킨 세포를 차가운 tris-buffered saline (TBS: 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4)로 두 번 씻어준 후, cell scraper를 이용하여 긁어내어 800 rpm, 4 °C에서 5 분 동안 원심 분리함에 의해 pellet을 모았다. 이 pellet을 0.05% (w/v) saponin을 포함하는 MOPS buffer (20 mM MOPS, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, plus protease and phosphatase inhibitors)에 suspension하여, 얼음에서 30 분동안 둔 후 13,000 rpm, 4 °C에서 10 분간 원심 분리함에 의해 cell ghost (membrane-enriched fraction)를 모았다. Cell ghost를 차가운 TBS로 세 번 씻어준 후 1.0% (w/v) CHAPS를 포함하는 MOPS buffer에 suspension하여 Ras 단백질을 녹여내었다. Insoluble cell debris는 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 제거하였다. 단백질의 농도는 Protein Assay (Bio-Rad) 방법을 이용하여 결정하였다.

### 다. SDS-PAGE와 Western Blotting

저해제를 처리한 시료와 처리하지 않은 시료에서의 Ras processing 정도의 차이를 알아보기 위해, 각 시료의 Ras 단백질이 녹아 있는 단백질 분획을 가지고 SDS-PAGE와 Western Blotting을 실시하였다. Ras 단백질이 녹아있는 단백질

분획을 SDS-PAGE sample buffer와 섞은 후 5분 동안 끓여, SDS-PAGE sample을 만들었다. 이 sample을 12% SDS-polyacrylamide gel에서 분리한 후 PVDF membrane으로 transfer하였다. 이 blot을 blocking solution (Roche Biochemicals)에서 blocking한 후, monoclonal anti-K-Ras (Calbiochem) 또는 anti-H-Ras (Calbiochem)를 붙이고, Tween-20을 포함하는 TBS로 7분 동안 세 번 씻어주고, HRP (Horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Corp.)를 다시 붙인 후 HRP의 chemiluminescence substrate를 이용하여 Ras 단백질의 band를 확인하였다.

#### 라. Cell Proliferation Assay

Cell Proliferation Assay는 WST-1 (Roche Molecular Biochemicals) 방법으로 실시하였다. 80 % confluent하게 성장한 세포들 (NIH3T3, K-Ras, K-Ras, SW620)을 trypsinization하여 microtiter plate의 각 well에 3,000-5,000 cells/well 되게 나누어 넣었다. 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere의 조건에서 24 시간 동안 배양한 후 각 well로부터 media를 제거하였다. 저해제를 DMSO에 녹인 후, media로 working concentration이 되게 희석 (0.1 % DMSO가 되도록)하여, 각 well에 처리하였다. 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere의 조건에서 48 시간 동안 저해제를 처리한 후, cell proliferation assay를 위해 metabolically active cells의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 bioreduction되는 WST-1 (Cell Proliferation Reagent, Roche Biochemicals)을 넣고 1-4 시간 동안 다시 배양한 다음 Microplate reader (Bio-Rad)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 마. 세포주기 분석

세포주기 분석을 위하여 인체 유방암 세포주 MCF-7는 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배지를 이용하여 T25 플라스크 (배양액 7.5ml)에 분주하여 12시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 를 포함한 37 °C 배양기에서 배양하였다. 12시간 배양 후, 대조군 (control)으로 쓰일 세포 배양액에는 DMSO를 최종 농도가 0.1% (7.5 µl)가 되도록 넣어주고, 처리군에는 DMSO에 녹여진 시료 (5 mg/ml, APF)를 배양액에서 DMSO 농도가 0.1% (최종 APF 농도, 5 µg/ml, 7.5 µl)가 되도록 첨가하였다.

DMSO나 시료를 처리한 MCF-7 세포주는 5% CO<sub>2</sub>/37 °C 배양기에서 각기 12 시간, 24 시간, 36 시간동안 배양하여 세포분석을 위해 사용하였다.

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

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

## 2. Grb2-Shc 결합 저해제의 탐색

### 가. 식물자원 탐색

본 실험에 사용된 실험재료들 중에서 한약재는 서울소재 한약 유통과 충남 금산의 한약 건재상에서 구입하였으며 기타 식물체들은 중부지방의 여러 지역에서 채집하였으며 채집된 식물들은 대한 식물도감에서 검증하여 그늘에서 건조 후 잘게 썰어 사용하였다. 채집된 식물들은 100% 메탄올로 5일간 상온에서 방치하여 추출한 후 여과, 농축하여 1 mg/ml의 농도로 만들어 추출물 10 µl 를 활성검정에 이용하여 저해활성을 측정하였다.

### 나. Grb2-Shc 결합 활성 측정

반응은 eppendorf tube (1.5ml)에서 시킨다. 반응액에는 0.3 µg GST-Grb2 단백질 10 µl, SPA PVT antibody-binding bead 10 µl, 0.1 µCi [<sup>3</sup>H]labeled

peptide 10  $\mu$ l, 6  $\mu$ g Anti-GST Rabbit IgG 10  $\mu$ l 그리고 순수 DMSO를 10  $\mu$ l를 넣고 total reaction volume이 200  $\mu$ l가 되게 한다. SH2 buffer의 조성은 20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 0.1 % BSA, pH 7.4이다. 이렇게 섞은 반응액을 살짝 vortexing한 후 실온에서 30-40분 동안 shaking시키면서 반응시킨다. 반응이 끝난후에는 eppendorf tube를 counting rack에 꽂은 다음 Liquid scintillation counter로 방사능을 CPM (count/min) 단위로 읽는다.

## 다. 이차 활성 검증을 위한 세포주 연구

### 1) 세포주 및 세포 배양

NIH3T3 (normal mouse fibroblast), B104-1-1 (*neu\**-transformed NIH3T3), SAA (wild type human EGFR-transfected NIH3T3), K-Ras (K-*ras*-transformed NIH3T3), H-Ras (H-*ras*-transformed NIH3T3) 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS)를 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)을 이용하여, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 humidified incubator에서 배양하였다. Dr. Graham Carpenter (미국 Vanderbilt 대학)로부터 받은 SAA 세포주를 95% confluent하게 성장시킨 후 18 시간동안 serum-starvation을 시켰다. 18 시간중 6 시간이 지난 후 부터 actinomycin D를 처리한 후, EGF (epidermal growth factor)를 이용하여 15 분 동안 자극하였다. PBS (phosphate-buffered saline)으로 두 번 씻은 후 긁어 내어 cell lysates를 만드는 데에 이용하였다. ATCC로부터 구입한 B104-1-1 세포주는 T185 flask에 seeding하고, 24 시간이 지난 후 DMSO에 녹인 저해제를 적당한 농도로 처리하였다. 일정 시간이 지난 후, PBS로 두 번 씻어 준 후 긁어 내어 cell lysates를 만드는 데에 이용하였다.

### 2) Cell Proliferation Assay

Cell proliferation assay는 WST-1 (Roche Molecular Biochemicals) 방법으로 실시하였다. 80% confluent하게 성장한 세포들 (NIH3T3, B104-1-1, K-Ras, H-Ras)을 trypsin 처리하여 flask 바닥으로부터 떼어낸 다음, hemacytometer를 이용하여 세포수를 세어 microtitier plate의 각 well에 3,000-5,000 cells/well 되게 나누어 넣었다. 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere의 조건에서 24 시간동안 배양한 후 각 well로부터 media를 제거하였다. 저해제를

DMSO에 녹인 후, media로 처리하고자 하는 농도가 되게 희석 (0.1% DMSO가 되도록)하여, 각 well에 처리하였다. 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 48 시간 동안 저해제에 노출시킨 후, cell proliferation assay를 위해 metabolically active cells의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 bioreduction되는 WST-1을 넣고 1-4 시간동안 다시 incubation한 다음 ELISA plate reader (Bio-Rad)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) Non-denatured cell lysates의 제조

앞에서 언급한 것과 같이 준비된 세포를 차가운 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 50 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1 mM sodium vanadate, 50 mM NaF, 30 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 5 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin)로 1 시간동안 lysis함에 의해 non-denatured cell lysates를 제조하였다. Cell lysates 내의 cell debris는 12,000 rpm에서 20분동안 원심분리함에 의해 제거하였다. 단백질 정량을 위해 BSA를 표준으로 한 Protein Assay (Bio-Rad) 방법을 이용하였다.

### 4) Immunoprecipitation and Immunoblotting

저해제를 처리한 각 시료로부터 동일한 양의 cell lysates (500 µg)을 취해 anti-Shc antibody (Uptate Biotech, Inc.)로 immunoprecipitation 하였다. Cell lysates에 anti-Shc antibody를 첨가하고 1 시간 동안 4°C에서 incubation한 후, pre-washed Pansorbin (Calbiochem Corp.)을 첨가하고, 다시 1 시간동안 incubation하였다. Pansorbin에 붙은 anti-Shc/Shc 단백질 복합체는 원심 분리에 의해 회수하고, lysis buffer로 세 번 씻어 준 후 SDS-PAGE sample buffer를 첨가하여 끓임에 의해 Pansorbin으로부터 항체-단백질 복합체를 분리하였다. 이렇게 분리된 단백질을 SDS-PAGE하여, PVDF membrane (Bio-Rad)으로 옮겨, 적당한 항체를 이용하여 immunoblotting하였다. PVDF membrane은 0.1% gelatin으로 blocking하고, primary antibody를 붙이고, 다시 peroxidase가 결합된 secondary antibody (Santa Cruz)를 붙여, peroxidase의 chemiluminescence를 내는 기질 (Roche Molecular Biochemicals)을 사용하여 단백질 band를 확인하였다.

## 제4절 탐색 결과

### 1. FPTase의 저해활성

식물체들을 대상으로 활성을 검증한 결과 20여종의 식물체 추출물에서 FPTase 저해활성 (50 %이상)을 관찰할 수 있었다. 그러나 일부 추출물은 분획 후의 이차 활성 검증에서 활성이 저하됨을 알 수 있었다. 이차 활성 검증에서도 우수한 활성을 보여주는 계피, 송악, 담배풀, 산국, 약썩 등을 최종적으로 유용 식물자원으로 분리하였다. 그리고 이들을 유용 식물자원으로부터 활성물질의 분리를 위하여 대량 채집 및 구입을 통하여 자원을 확보한 후 유용물질을 분리 정제하였다.

### 2. Grb2-Shc 결합 저해활성

전통약용식물과 식물체 106종을 수집하여 메탄올로 추출한 후, 여과, 농축하여 1 mg/ml의 농도로 조제하여 Grb2-Shc 결합 저해제 탐색에 사용하였다(Table 10). 탐색결과 계수나무 수피, 대황, 방아풀, 이삭여뀌 뿌리 등이 50 µg/ml의 농도에서 50 %이상의 Grb2-Shc 결합저해활성을 보이고 있다.



Table 10. Inhibitory effect of extracts of plants against Grb2-Shc interaction

시 료	학 명	부 위	활 성(%)
가시오갈피	<i>Acanthopanax senticosus</i>	수피	
감국	<i>Chrysanthemum indicum</i>	꽃	
감나무	<i>Diospyros kaki</i>	잎	
개감수	<i>Euphorbia sieboldiana</i>		
개구리발톱	<i>Aquilegia adoxoides</i>		
개구리발톱	<i>Aquilegia adoxoides</i>	뿌리	
갯방풍	<i>Glehnia littoralis</i>		
겨우살이	<i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i>	잎	
계수나무	<i>Laurus nobilis</i>	잎	
계수나무	<i>Laurus nobilis</i>	수피	55
곤약	<i>Amorphophalus konjac</i>		
괭이쑥	<i>Trichosanthes kirilowii</i>		
광대나물	<i>Lamium amplexicaule</i>		60
괴불나무	<i>Lonicera maackii</i>	잎	
괴불나무	<i>Lonicera maackii</i>	수피	
괴불나무	<i>Lonicera maackii</i>	열매	
굴거리나무	<i>Daphniphyllum macropodum</i>		
긴담배풀	<i>Carpesium divaricatum</i>		
꽃마리	<i>Trigonotis peduncularis</i>		
평의다리	<i>Thalictrum aquilegifolium</i>		
노루발풀	<i>Pyrola japonica</i>		
눈괴불주머니	<i>Corydalis ochotensis</i>		
단풍나무	<i>Acer palmatum</i>	잎	
단풍나무	<i>Acer palmatum</i>	수피	
닭의장풀	<i>Commelina communis</i>		
담쟁이덩굴	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>		
대나무	<i>Phyllostachis bambucoides</i>	잎	
대나무	<i>Phyllostachis bambucoides</i>	가지	
대추나무	<i>Zizyphus jujuba</i>	잎	
대황	<i>Rheum undulatum</i>		68
돈나물	<i>Pittosporum tobira</i>		

시 료	학 명	부 위	활 성(%)
동백나무	<i>Camellia japonica</i>	잎	
동백나무	<i>Camellia japonica</i>	수피	
두충나무	<i>Eucommia ulmoides</i>	잎	
두충나무	<i>Eucommia ulmoides</i>	수피	
만병초	<i>Rhododendron brachycarpum</i>		
망개나무	<i>Berchemia berchemiaefolia</i>	잎	
망개나무	<i>Berchemia berchemiaefolia</i>	수피	
메타세콰이어	<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	잎	
메타세콰이어	<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	수피	
멸가치	<i>Adenocaulon himalaicum</i>		
모감주나무	<i>Koelreuteria paniculata</i>	잎	
모감주나무	<i>Koelreuteria paniculata</i>	수피	
목단피	<i>Paeonia moutan</i>		
무궁화나무	<i>Hibiscus syriacus</i>	잎	
무궁화나무	<i>Hibiscus syriacus</i>	수피	
물봉선	<i>Impatiens texori</i>		
물푸레나무	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	잎	
물푸레나무	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	열매	
미나리아재비	<i>Ranunculus japonicus</i>		
미역취	<i>Solidago virga-aurea</i> var. <i>asiatica</i>		
박주가리	<i>Metaplexis japonica</i>		
반하	<i>Pinellia ternata</i>		
방아풀	<i>Isodon japonicus</i>		86
백당나무	<i>Viburnum sargentii</i>	잎	
백당나무	<i>Viburnum sargentii</i>	수피	
백당나무	<i>Viburnum sargentii</i>	열매	
백선	<i>Dictamnus dasycarpus</i>		
벗나무	<i>Prunus jamasakura</i>	잎	
벗나무	<i>Prunus jamasakura</i>	수피	
벽오동	<i>Firmiana simplex</i>	화서, 열매	
사위질빵	<i>Clematis apiifolia</i>		
산딸나무	<i>Cornus kousa</i>	잎	
산딸나무	<i>Cornus kousa</i>	수피	
산사나무	<i>Crataegus pinnatifida</i>	잎	
산사나무	<i>Crataegus pinnatifida</i>	수피	
산사나무	<i>Crataegus pinnatifida</i>	열매	
산수유나무	<i>Cornus officinalis</i>	잎	
산수유나무	<i>Cornus officinalis</i>	수피	
산수유나무	<i>Cornus officinalis</i>	열매	
살구나무	<i>Prunus armeniaca</i>	잎	
살구나무	<i>Prunus armeniaca</i>	수피	
맥문동	<i>Liriope platyphylla</i>		
생강나무	<i>Lindera obtusiloba</i>	열매	51
서양측백	<i>Thuja occidentalis</i>	잎	
서양측백	<i>Thuja occidentalis</i>	수피	

시 료	학 명	부 위	활 성(%)
서양측백	<i>Thuja occidentalis</i>	열매	
선피막이	<i>Hydrocotyle maritima</i>		
섬노루귀	<i>Hepatica maxima</i>		
섬말나리	<i>Lilium distichum</i>		
섬백리향	<i>Thymus quinquecostatus</i>		
소목	<i>Caesalpinia sappan</i>		
쇠무릎	<i>Achyranthes japonica</i>		
속지황	<i>Rhemantha glutinosa</i>		
취나무	<i>Evodia daniellii</i>	열매	
쑥	<i>Artemisia princeps</i>		
얇은부채	<i>Symplocarpus renifolius</i>		
애기괭이눈	<i>Cyrissosplenium flagelliferum</i>		
애기부들	<i>Typhaceae angustata</i>		
엄나무	<i>Kalopanax pictum</i>		
오갈피나무	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>		
오이풀	<i>Sanguisorba officinalis</i>		
왕호장	<i>Polygonum sachalinensis</i>		
은행나무	<i>Ginkgo biloba</i>	잎	
은행나무	<i>Ginkgo biloba</i>	수피	
이고들빼기	<i>Youngia denticulata</i>		
이삭여뀌	<i>Persicaria filiformis</i>	지상부	
이삭여뀌	<i>Persicaria filiformis</i>	뿌리	54
이팝나무	<i>Chionanthus retusus</i>	잎	
이팝나무	<i>Chionanthus retusus</i>	열매	
인삼	<i>Panax ginseng</i>		
일본붓꽃	<i>Iris japonica</i>		
일후박	<i>Magnolia obovata</i>		
자귀나무	<i>Albizzia julibrissin</i>	잎	
자귀나무	<i>Albizzia julibrissin</i>	수피	
자귀나무	<i>Albizzia julibrissin</i>	열매	
족도리	<i>Asarum sieboldii</i>	뿌리	
줄방제비꽃	<i>Viola acuminata</i>		
주목	<i>Taxus cuspidata</i>	잎	
주목	<i>Taxus cuspidata</i>	수피	
주목	<i>Taxus cuspidata</i>	열매	
중국단풍	<i>Acer buergerianum</i>	잎	
중국단풍	<i>Acer buergerianum</i>	수피	
죽여	<i>Phyllostachys bambucioides</i>		
취뽕나무	<i>Ligustrum obtusifolium</i>	잎, 열매	
지골피	<i>Lycium chinensis</i>		
진범	<i>Aconitum pseudolaeve</i>		
짚신나물	<i>Agrimonia pilosa</i>		
쪽동백나무	<i>Styrax obassia</i>	잎	
쪽동백나무	<i>Styrax obassia</i>	수피	
참소리쟁이	<i>Rumex japonicus</i>		

시 료	학 명	부 위	활 성(%)
참오동나무	<i>Paulownia tomentosa</i>	꽃봉우리	
참오동나무	<i>Paulownia tomentosa</i>	잎	
참취	<i>Aster scaber</i>		
처녀바디	<i>Angelica cartilaginomarginata</i>		
천궁	<i>Cnidium officinale</i>		
천남성	<i>Arisaema amurense</i>	뿌리	
천마	<i>Gastrodia elata</i>		
천문동	<i>Asparagus cochinchinensis</i>		
큰개불알풀	<i>Veronica persica</i>		
택사	<i>Alisma canaliculatum</i>		
파리풀	<i>Phryma leptostachya</i>		
풀솜나물	<i>Gnaphalium japonicum</i>		
해국	<i>Aster spathylifolius</i>		
향부자	<i>Cyperus rotundus</i>		
헛개나무	<i>Hovenia dulcis</i>		
현호색	<i>Corydalis remota</i>		
홀아비꽃대	<i>Chloranthus japonicus</i>		
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>		
화백나무	<i>Chamaecyparis pisifera</i>	잎	
화백나무	<i>Chamaecyparis pisifera</i>	수피	
화백나무	<i>Chamaecyparis pisifera</i>	열매	
회화나무	<i>Sophora japonica</i>	잎	
회화나무	<i>Sophora japonica</i>	수피	

**Table 11. Inhibitory effect of extracts of plants against FPTase**

Code No	ccpm	control	inhibition %	Code No	ccpm	control	inhibition %
KR 001	28401	37082	23.4	KR0047	19182	26857	28.6
KR 002	36170	37082	2.5	KR0048	26605	26857	0.9
KR 003	28047	37082	24.4	KR0049	23890	26857	11.0
KR 004	31787	37082	14.3	KR0051	22683	26857	15.5
KR 005	36809	37082	0.7	KR0052	23619	26857	12.1
KR 006	35651	37082	3.9	KR0053	26654	26857	0.8
KR 007	37035	37082	0.1	KR0054	8184	16450	38.3
KR 008	38474	37082	-3.8	KR0056	22852	26857	14.9
KR 009	11501	16450	30.1	KR0057	24512	26857	8.7
KR 010	29272	37082	21.1	KR0058	26589	26857	1.0
KR 011	11390	16450	30.8	KR0059	20732	26857	22.8
KR 012	39185	37082	-5.7	KR0060	24192	26857	9.9
KR 013	32745	37082	11.7	KR0061	15563	26857	42.1
KR 014	13779	37082	62.8	KR0062	26748	26857	0.4
KR 015	34783	37082	6.2	KR0063	28968	26857	-7.9
KR 016	35696	37082	3.7	KR0064	19866	26857	26.0
KR 017	26711	37082	28.0	KR0065	24859	26857	7.4
KR 018	34900	37082	5.9	KR0066	12971	16450	21.1
KR0019	23253	26857	13.4	KR0067	25150	26857	6.4
KR0020	24075	26857	10.4	KR0068	20107	26857	25.1
KR0021	24408	26857	9.1	KR0069	21851	26857	18.6
KR0022	14061	26857	47.6	KR0071	23722	26857	11.7
KR0023	7120	26857	73.5	KR0072	5537	16450	71.1
KR0024	11068	26857	58.8	KR0073	24329	26857	9.4
KR0025	3844	26857	85.7	KR0074	24061	26857	10.4
KR0026	25849	26857	3.8	KR075	5537	16450	66.3
KR0027	18506	26857	31.1	KR0076	28073	26857	-4.5
KR0028	23326	26857	13.1	KR0077	19255	26857	28.3
KR0029	12875	16450	21.7	KR0078	24698	26857	8.0
KR0030	25281	26857	5.9	KR0079	27222	26857	-1.4
KR0031	11625	16450	29.3	KR0080	26763	26857	0.3
KR0032	16714	26857	37.8	KR0081	13227	26857	50.8
KR0033	16322	26857	39.2	KR0082	23311	26857	13.2
KR0034	26021	26857	3.1	KR0083	21777	26857	18.9
KR0035	26089	26857	2.9	KR0084	1140	4845	33.4
KR0036	22715	26857	15.4	KR0085	3352	4845	30.8
KR0037	24961	26857	7.1	KR0086	1150	4845	76.3
KR0038	25374	26857	5.5	KR0087	1013	4845	19.4
KR0039	25324	26857	5.7	KR0088	669	4845	86.2
KR0040	23539	26857	12.4	KR0090	841	4845	82.6
KR0041	27874	26857	-3.8	KR0091	2251	4845	2.2
KR0042	10927	16450	33.6	KR0092	94	4845	98.1
KR0043	28916	26857	-7.7	KR0093	126	4845	97.4
KR0044	24102	26857	10.3	KR0094	428	4845	91.2
KR0045	23866	26857	11.1	KR0095	425	4845	91.2
KR0046	22610	26857	15.8	KR0096	3582	4845	26.1

Code No	ccpm	control	inhibition %	Code No	ccpm	control	Inhibition %
KR0097	2464	4845	49.1	KR0149	35235	42890	17.8
KR0098	4678	4845	3.4	KR0150	47934	42890	-11.8
KR0099	3471	4845	28.4	KR0151	4443	42890	62.5
KR0101	7835	18000	56.5	KR0152	41494	42890	3.3
KR0102	13822	18000	23.2	KR0153	45779	42890	-6.7
KR0103	16669	18000	7.4	KR0154	37979	42890	11.5
KR0104	8176	18000	54.0	KR0155	44792	42890	-4.4
KR0105	18760	18000	-4.2	KR0156	9075	14967	39.4
KR0106	18986	18000	-5.5	KR0157	43253	42890	-0.8
KR0107	19766	18000	-9.8	KR0158	47092	42890	-9.8
KR0108	12363	18000	31.3	KR0159	11926	14967	20.3
KR0110	13070	18000	27.4	KR0160	40386	42890	5.8
KR0111	12122	18000	32.7	KR0161	41808	42890	2.5
KR0112	16954	18000	5.8	KR0162	45627	42890	-6.4
KR0113	13015	18000	27.7	KR0163	24047	42890	43.9
KR0114	4207	18000	76.6	KR0164	35122	42890	18.1
KR0115	10798	18000	40.0	KR0165	47433	42890	-10.6
KR0116	13078	18000	27.3	KR0166	43998	42890	-2.6
KR0117	7675	14967	23.3	KR0167	37838	42890	11.8
KR0118	16659	18000	7.5	KR0168	20295	42890	52.7
KR 119	9067	18000	9.8	KR0169	36125	42890	15.8
KR 120	7964	18000	55.8	KR0170	35658	42890	16.9
KR 121	18462	18000	-2.6	KR0171	33724	42890	21.4
KR 122	9578	18000	-8.4	KR0172	37473	42890	12.6
KR 123	8721	18000	51.6	KR0173	10472	14967	30.0
KR0124	34259	42890	20.1	KR0174	29511	42890	31.2
KR0125	40939	42890	4.5	KR0175	36857	42890	14.1
KR0126	43594	42890	-1.6	KR0176	26148	42890	39.0
KR0127	34473	42890	19.6	KR0177	31925	42890	25.6
KR0128	49748	42890	-16.0	KR0178	15328	42890	53.9
KR0129	48104	42890	-12.2	KR0179	37128	42890	13.4
KR0130	52702	42890	-22.9	KR0180	40469	42890	5.6
KR0131	9873	14967	34.0	KR0181	12646	14967	15.5
KR0132	21723	42890	49.4	KR0182	13057	42890	40.3
KR0133	51718	42890	-20.6	KR0183	32310	42890	24.7
KR0134	13104	42890	69.4	KR0184	35388	42890	17.5
KR0135	49561	42890	-15.6	KR0185	37115	42890	13.5
KR0136	37170	42890	13.3	KR0186	40809	42890	4.9
KR0137	50234	42890	-17.1	KR0187	41143	42890	4.1
KR0138	38709	42890	9.7	KR0188	43788	42890	-2.1
KR0139	8906	42890	43.2	KR0189	8798	14967	41.2
KR0141	42391	42890	1.2	KR0190	40213	42890	6.2
KR0142	24632	42890	42.6	KR0191	14374	42890	63.6
KR0144	32837	42890	23.4	KR0192	41912	42890	2.3
KR0145	38155	42890	11.0	KR0193	32433	42890	24.4
KR0146	9801	14967	34.5	KR0194	40600	42890	5.3
KR0147	48330	42890	-12.7	KR0195	32051	42890	25.3
KR0148	32947	42890	23.2	KR0196	1125	14967	92.5

Code No	ccpm	control	inhibition %	Code No	ccpm	control	inhibition %
KR0197	34879	42890	18.7	KR 225	17637	29542	40.3
KR0198	35438	42890	17.4	KR 226	24212	29542	18.0
KR0199	19223	42890	55.2	KR 227	11710	29542	42.5
KR0200	36594	42890	14.7	KR 229	25214	29542	14.7
KR0201	33478	42890	21.9	KR 232	16905	29542	42.8
KR0202	37891	42890	11.7	KR 233	12588	29542	33.5
KR0203	33605	42890	21.6	KR 234	20127	29542	31.9
KR0204	33098	42890	22.8	KR 235	19147	29542	35.2
KR0205	32451	42890	24.3	KR 236	18377	29542	37.8
KR0206	37136	42890	13.4	KR 237	21061	29542	28.7
KR0207	33044	42890	23.0	KR 238	23752	29542	19.6
KR0208	40805	42890	14.3	KR 239	26390	29542	10.7
KR0209	18662	42890	31.6	KR 240	23515	29542	20.4
KR0210	42153	42890	1.7	KR 241	25801	29542	12.7
KR0211	28948	42890	32.5	KR 242	23759	29542	19.6
KR0212	33631	42890	21.6	KR 243	17593	29542	26.3
KR0213	37331	42890	13.0	KR 244	20468	29542	30.7
KR0214	30715	42890	28.4	KR 245	21729	29542	26.4
KR0215	40274	42890	6.1	KR 247	16226	29542	45.1
KR0216	40909	42890	4.6	KR 249	23810	29542	19.4
KR0217	35528	42890	17.2	KR 250	31266	42890	27.1
KR0218	39019	42890	9.0	KR 251	27692	29542	6.3
KR0219	17279	42890	30.1	KR 252	26778	29542	9.4
KR 220	21966	29542	25.6	KR 254	21695	29542	26.6
KR 221	23663	29542	19.9	KR 255	11758	29542	51.7
KR 222	20855	29542	29.4	KR 256	11688	29542	55.2
KR 223	22700	29542	23.2	KR 257	22879	29542	22.6
KR 224	22898	29542	22.5	KR 258	23252	29542	21.3

## 제 3 장 활성 물질 분리 분야

### 제1절 서 설

천연물은 역사적으로 중요한 약으로 많이 개발되어진 주형으로써 제공되어져 왔다. 고등 식물은 화학적으로 복잡하고 생물학적으로 활성을 갖는 여러 가지의 대사산물을 생산하며, 이러한 대사산물로부터 유래된 화합물은 인간의 역사에 중심적인 역할을 하여왔다. 최근까지 식물유래 천연물의 가능성을 실현하기 위한 연구는 매우 적거나, 개발 프로그램의 한계가 있었다. 그러나, 생물학적 활성검색 기술의 향상, 분리정제와 구조결정 기술의 향상, 생화학적, 생리학적인 경로 연구의 향상 그리고 바이오테크놀로지의 발전은 천연물 연구와 개발에 주목할만한 발전을 가져 왔다.

식물은 의약품, 살충제, 제초제, 그리고 그 밖의 유용한 물질의 원천으로서 알려져 있다. 이러한 식물로부터 유래된 추출물 또는 순수 화합물은 개발국 뿐만 아니라 선진국의 농업인, 소비자, 그리고 산업에 이익을 주고 있다. 이러한 이익에 대한 예를 살펴보면, 새로운 농작물과 식물의 개발은 첫째, 질병에 대한 약으로써 새로운 산물이 소비자에게 제공 될 것이며, 둘째, 환경적으로 덜 해로운 농약을 제공하고, 셋째, 농업 생산물을 다양화하고 농업 생산의 효율을 증가하고, 넷째, 토양자원의 사용을 향상시킬 수 있고, 다섯째, 농업인의 경제적 안정성의 증가를 제공하고, 농업과 연관된 산업을 창출하거나, 향상시킬 수 있다. 여섯째, 고용의 기회를 향상시킬 수 있으며, 일곱째, 원료를 바꾸고 지속적으로 유지할 수 있는 원천을 산업에 제공한다.

과거에 천연물은 생리활성 화합물의 풍부한 원천이었으며, 새로운 신약 개발에서 가장 중요한 부분이었다. 천연물을 이용한 신약개발 전략의 장점은 구조와 작용 기작이 전혀 다른 새로운 형태의 약을 개발 할 수 있다는 가능성이다. 그러나, 단점은 비슷한 독성과 교차 저항성의 가능성이 있다. 그렇지만, 분명히 천연물은 새로운 형태의 생리활성물질의 풍부한 원천으로 대표되고 있다. 천연물로부터 분리한 화합물이 의약품으로 사용되는 예를 살펴보면, 주목나무로부터 분리된 택솔은 유방암에 탁월한 효과가 있으며, 쪽으로부터 분리된



Table 12. 천연물 의약품과 질병치료

Compound or Class	Bontanical Sources	Therapeutic Category/Use
<b>A. Steroids</b>		
Hormones(derived from diosgenin, hecogenin, and stigmasterol)	Dioscorea spp.(Mexican yams); soybean-derived stigmasterol	Oral contraceptives and other steroid drugs and hormones
Digitals glycosides (digoxin, digitoxin)	Digitalis purpurea L., D. lanata Ehrhart (foxgloves)	Cardiotonic glycosides (cardenolides)
<b>B. Alkaloids</b>		
Belladonna-type solanaceous tropane alkaloids(atropine, I-hyoscyamine, scopolamine)	Atropa belladonna L.(belladonna), Daturametel L., D. Stramonium L.(Jison weed), Hyoscyamus niger L.(henbane), Mandragora officinarum L.(European mandrake), and other solanaceous species	Anticholinergics(parasympatholytics)
Opium alkaloids(codeine, morphine)	Papaver somniferum L.(opium poppy)	Analgesics, antitussive
Reserpine	Rauvolfia serpentina(L.) Bentham ex Kurz(East india snakeroot)	Antihypertensive, psychotropic
Catharanthus(Vinca) alkaloids (vinblastine, vincristine)	Catharanthus reseau(L.) G. Don (Madagascan rosy periwinkle)	Anticancer
Physostigmine	Physostigma venenosum Balfour(Calabar bean)	Cholinergic(parasympathomimetic)
Pilocarpine	Pilocarpus jaborandi Holmes (jaborandi) and related species	Cholinergic(parasympathomimetic)
Cinchona alkaloids(quinine, quinidine)	Cinchona spp.(Cinchona bark)	Antimalarial, cardiac antiarrhythmic
Colchicine	Colchicum autumnale L.(autumn crocus)	Antigout
Cocaine	Erthroxyllum coca Lamarck (coca leaves)	Local anesthetic
d-Tubocurarine	Strychnos toxifera Bentham Chondodendro tomentosum Ruiz et Pavon (curare)	Skeletal muscle relaxant
Taxol	Taxus brevifolia Nutt.(western or Pacific yew)	Anticancer

아데미신은 말라리아 치료제로 쓰이고 있다. 또한, 코카 나무 잎으로부터 분리한 코카인은 국부 진통제로 쓰이고 있다. 그 밖의 여러 가지의 천연물 유래 화합물이 치료제로 사용되고 있는 예는 Table 9. 에 나타내었다.

## 1. 스크리닝

천연물의 분리정제에 있어서 우리가 원하는 화합물을 선택적으로 얻으려면, 생물학적인 활성을 검색할 수 있는 탐색계를 필요로 한다. 좋은 탐색계는 생리활성을 검색할 수 있는 시간이 빨라야 하고, 정확해야 하며, 비용이 적게 들어야 한다. 또한, 적은 양의 시료로 생리활성을 검색할 수 있어야 한다. 생리활성을 갖는 천연물은 식물, 미생물, 곤충, 해양 생물 등 여러 가지의 원천으로부터 얻을 수 있다.

## 2. 대량시료 모음, 추출, 분취 및 분리 정제

천연물은 대량의 시료를 구입 또는 생산을 하여 모을 수 있으며, 모아진 시료는 추출하여, 추출물에서 필요한 부분만을 선택적으로 얻을 수 있다. 시료는 원하는 화합물의 크기, 이온화, 극성, 생물학적 특이성에 따라, Size exclusion chromatography, Ion exchange chromatography, absorption chromatography, affinity chromatography를 이용하여 순수 화합물로 분리할 수 있다.

## 3. 구조의 결정

생리활성이 있는 순수 화합물은 UV spectrophotometer, IR, Mass, NMR, X-ray crystallography를 이용하여 구조를 결정할 수 있으며, 각종 기기를 이용하여, 물리화학적인 특성을 얻을 수 있다.

## 4. 독성과 효능 평가

순수 분리된 화합물은 *in vivo*와 *in vitro* bioassay를 통하여 생체내에서의 독성과 효능을 평가할 수 있고, biological activity의 broad spectrum과 생체에서의 작용 기작에 대한 정보를 얻을 수 있다. 그림8에서는 천연물을 이용한

신약 개발의 일반적인 전략을 나타내고 있다.

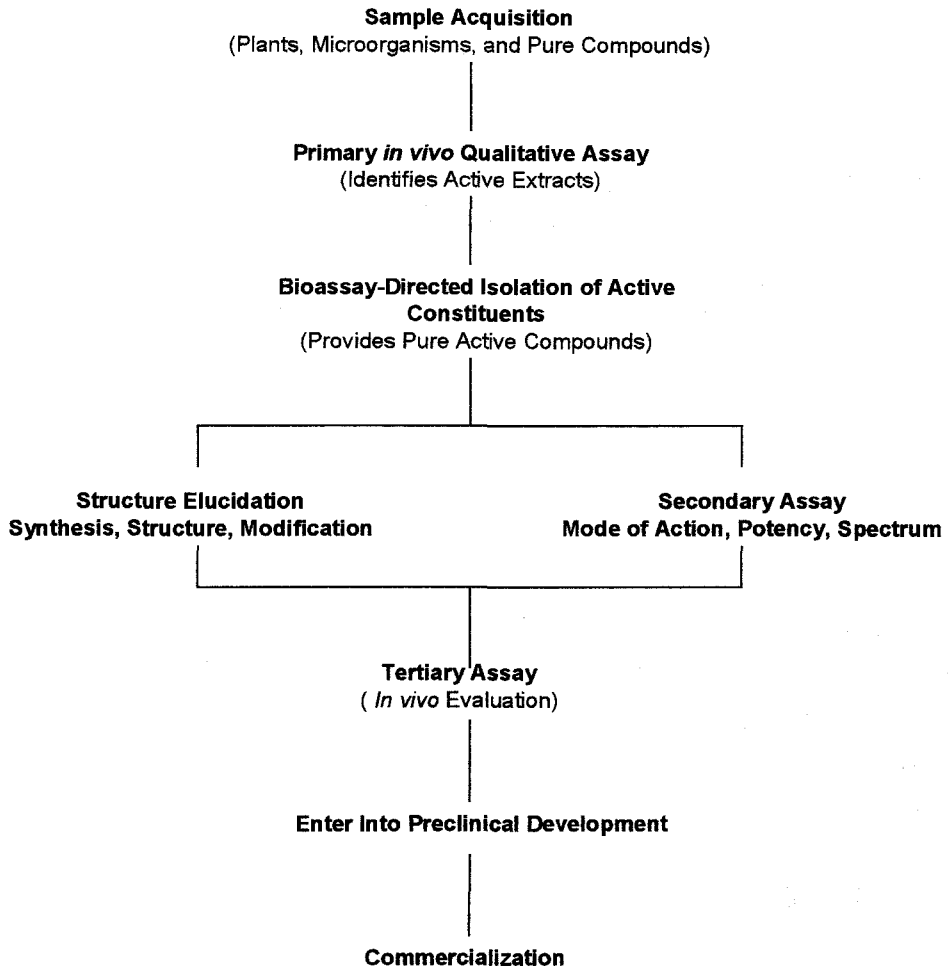


Figure 8. 천연물을 이용한 신약개발의 일반적인 전략

##### 5. 구조 변환 활성의 평가

천연물에서 분리된 신규 화합물이 효능이 약하거나, 높은 독성을 가진 화합물로 판명되었을 때, 신규 화합물의 구조를 부분적으로 변환하거나, 합성하여 생리활성을 높이거나, 독성을 줄일 수 있다.

## 6. 임상 실험

전 임상 실험을 마치고, 효능과 독성이 적은 신규 화합물은 약의 제조 허가 기관에서 요구하는 규정에 따라 임상실험을 수행할 수 있다.

## 7. 상품화

위에서의 과정을 통과한 화합물은 천연물 약품 개발의 마지막 단계인 상품화가 가능하다. 천연물에서의 상품화는 질병의 치료뿐만 아니라, 생산 산업에 생산성을 증가시킬 수 있을 것이다.

천연물은 신약을 개발하는데 중요한 역할을 해왔으며, 앞으로도 부작용이 적고 치료효과가 좋은 신약을 개발하는데 있어서 중요한 역할을 담당하게 될 것이다.

## 제 2절 계피유래 물질 분리

계피 (*Cinnamomum cassia* Blume)는 녹나무과 (Lauraceae)에 속하는 식물로서, 중국 남부 (광둥성, 광서성) 및 북베트남이 주산지이다. 동속식물로는 실론 계피 (*C. zeylanicum* Ness), 자바계피 (*C. burmanni* Bume), 사이공 계피, 일본 계피 (*C. sieboldii* Ness) 등이 있으며 성분과 형상에 차이가 있다. 계피의 효능으로는 cinnamic aldehyde에 의한 하열작용, 중추억제작용, 지속적인 말초혈관 확장작용 및 혈소판 응집억제 작용이 알려져 있다.

또한 최근들어,  $\sigma$ -methoxy cinnamaldehyde에 의한 antifungal 작용, 3-(2-hydroxyphenyl)propanoic acid 및 O-glycosides, cassioside, cinnamoside, 3,4,5-trimethoxyphenol- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1->6)- $\beta$ -D-glucopyranoside 등에 의한 antiulcerogenic 활성, 다당체인 cinnaman AX의 reticuloendothelial systemactivating 작용 등이 보고된 바 있다. 그 외에도 L.F.Berrio 등에 의해서 insulin activity stimulation작용이, K.S.Shin, H.Yamada 등에 의해 anti-complementary activity 등이 증명되었다. 성분은 정유가 주성분으로 약 1.0-3.4 %를 차지하며 이외에도 여러 diterpenoid, alkaloid, tannin, 유기산, 전분, 수지, 점액 등이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>39-40)</sup>

### 1. 물질의 추출 및 분리

계피 1 kg을  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:Acetone (1:1:1)로 3일간 냉침 시킨 후 감압 농축하여 oil 상태의 crude extract를 얻었다. 이 추출액을 hexane:ethyl acetate로 column chromatography를 하여 다음의 물질을 분리하였다.

### 2. 2-hydroxy cinnamaldehyde의 분리

Hexane : ethyle (4:6)의 전개용매로 TLC 한 결과  $R_f=0.67$ 의 반점이 육안으로 노란색으로 보였다. UV lamp로 254nm에서 보이고, 365 nm에서 노란색 형광으로 보이며 anisaldehyde에 노란색으로 발색한다. Hexane:EtoAc (70:30)에서 분리되며, acetone, hexane으로 재결정한 후 황색 침상결정을 얻었다.

### 제 3절 송악 유래 물질 분리

송악 (常春藤) *Hedera rhombea* Bean. (*Hedera rhombea* Sieb et. zucc. 또는 *Hedera tobleri* Nakai.)은 담장나무라고도 불리며, 드릅나무과 또는 인삼으로 잘 알려진 오가피나무과( *Araliaceae*)에 속하는 상록 활엽만목으로 English ivy라고 알려진 *Hedera helix* Linn.와 동속식물이다. 전북 김제군 금구면, 울릉도 및 인천앞 바다까지 올라오는 상록만경으로서 가지에서 잔 뿌리가 나와 다른 식물체에 부착되고 어린 가지는 잎 및 화서와 더불어 15~20개로 갈라진 성상 인모가 있으나 잎의 것은 곧 없어진다. 잎은 난형으로 삼각형과 비슷하고 3-5개로 얇게 갈라진다. 잎자루는 길이 2~5cm이다. 꽃은 산방화서로 10월에 피며 녹색이다. 과실은 구형의 핵과이고 겨울에 검게 익는다. 남부지방에서는 소가 잘 먹으므로 '소밥'이라고도 불리는 이 식물은 주로 관상용으로 알려져 있다.

주로 약용으로 사용하는 부위는 경엽과 과실로써 과실은 진정 작용, 진균생장억제 작용이 있고, 과실은 거풍, 이습, 평간, 해독의 효능이 있으며 류머티스성 관절염, 간염, 목현, 안면신경 마비증, 뇌출혈, 타박상, 광견교상을 치료하고 민간약으로는 지혈, 옥혈, 만성카타르질환, 황달, 결석증, 동맥경화증 등에 이용된다.

송악은 우리나라의 제주, 전남북, 경남북, 충남에 걸쳐서 자생되고, 그 밖의 동속식물은 대만산 *H. rhombea* Bean. var. *formosana* L., 중국산 *H. nepalensis* k. Koch var. *sinensis*가 있으며, 이밖에도 유럽, 아프리카 등에 분포하는 *H. helix*, *H. colchica*, *H. pastuchovii*, *H. canariensis* 등이 있다.

*Hedera* 속 식물성분에 관한 연구로 이집트산 *H. helix*에 대하여는 1974년, Mahran 등이  $\alpha$ -hederin, ederasaponin B, C를 분리한 후 Hillman 등은 그 잎으로부터 abscisic acid를, 1977년 Haas 등은 cuticular wax 중에서 fatty acid 등을 분리 보고하였고 1981년에 Krajewska 등은 rutin을 포함한 4종의 flavanoid를 분리했으며 1982년에 Reynaud 등은 flavone heteroside를 분리 보고한 바 있다. 잎에서 분리된 triterpenes와 triterpenoid 배당체 및 steroid 배당체 및 steroid는 1983년 Pasich에 의해 이루어졌으며 Longnay 등은

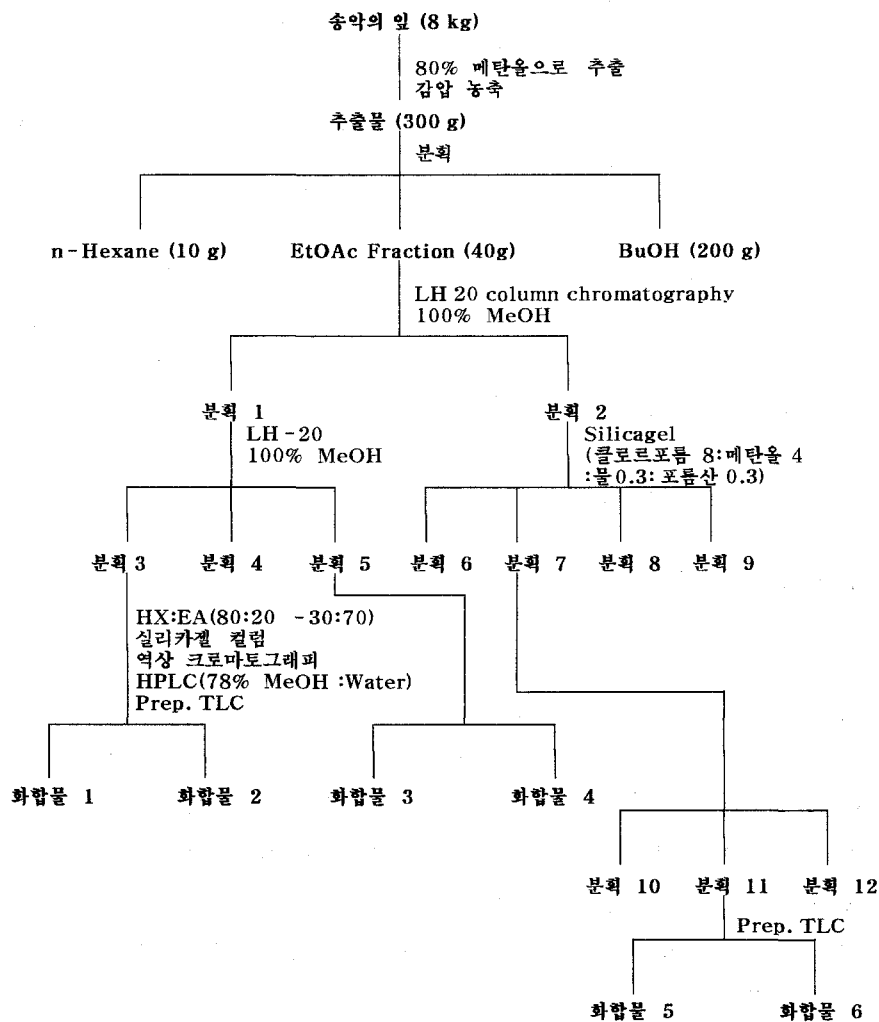
mono-saturated fatty acid에 대한 연구를 하였다. 1987년 Bruhn 등에 의해 falcarinol과 didrhydrofalcarinol 이 *H. canariensis*에서 분리되었다. *H. colchica*로부터 1973년 6종의 triterpenoid saponin을 분리한 후 hederacolchiside D,E,F의 구조를 밝혔고, Iskenderov 등이 *H. pastuchovii*의 열매로부터 1974년 5종의 triterpenoid glycoside를 분리, 그 aglycone이 hederagenin임을 밝혔고, shashkov 등은 *H. taurica* 잎으로부터 tauroside E를, Loloiko 등은 열매로부터 hederoside E<sub>2</sub>를 잎으로부터 tauroside B와 C를 분리했다.

*Hedera nepalensis*에 대한 연구로는, 1985년 Kizu 등에 의해 잎에서 6종의 saponin이 분리되었다. 한편, 한국산 *Hedera rhombea*에 대해서는 Kivata 등이 1934년 saponin과, Kurono 등이 1954년 지방산을 분리 보고한 후, 1978년 Shimizu 등이 그 줄기와 껍질로부터 4종의 hederagenin glycoside를 분리했다. 그 후, Kizu 등은 1985년 dammarane계 triterpene glycoside 8종과 hederagenin glycoside 2종 등을 분리 보고하였으며, Tomimori 등은 1987년 대만산 *Heder rhombea* Bean var. *formosana* L.의 stem과 bark에서 14종의 saponin을 분리했다. 또한 송악의 약리학적 연구로는 hederagenin의 fungicidal activity가 Timon-David 등에 의해, molluscicidal saponin에 대한 연구가 Hostettman에 의해 이루어졌으며 1988년 대만산 *H. nepalensis* K.Koch 잎에서 pant 등에 의해 nepalin에서 spermicidal activity, 항염작용, 항경련 작용이 보고되었으며 본 실험실에서도 *H. rhombea*의 잎의 진통, 소염생리활성이 보고된 바 있다.

## 1. 물질의 추출 및 분획

### 가. 추출

송악의 건조엽 (8.0 kg)을 80% MeOH로 70 °C에서 3회 추출하여 추출액을 온 시 여과한 후 감압 농축하여 MeOH extract (300 g)를 얻었고 이를 증류수에 현탁한 후 n-hexane으로 5회 추출하고 EtOAc로 5회 추출하여 그 수층을 다시 n-BuOH로 5회 추출하였다. (Scheme 1.)



Scheme 1. 송약으로부터 화합물 1-6까지의 분리정제

## 나. 분획

EtOAc층은 LH20 column chromatography를 실시하여 2개 Fraction으로 분획한 다음 1번 분획을 LH20 column chromatography를 실시하여 3개 분획으로 나누었고 그중 2번 분획을 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:formic acid=8:4:0.3:0.3)으로 silicagel chromatography를 실시하여 4개 분획으로 나누고 다시 7번 분획을 메탄올을 용



때로 하여 reverse phase column chromatography (이하  $C_{18}$ 로 약함)를 실시하여 3개 fraction으로 나누었다 (Scheme 1.)

*n*-BuOH층은 100% MeOH로 LH20 column chromatography를 실시하여 2개 분획으로 나눈 다음 1번 분획에 다시 100% MeOH으로 LH20를 실시한 다음 3개로 분획하였고, 그중 3번 분획을 ( $CHCl_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O=9:3:0.3) 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 3개로 분획 하였고, 1차 LH20를 실시한 2번 분획은 다시 (100% MeOH)로 LH20를 하고 ( $CHCl_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O:formic acid=9:3:0.2:0.1)을 용매로 silicagel로 분획한 다음, 6번 분획을 MeOH:H<sub>2</sub>O를 용매로  $C_{18}$ 를 실시하여 3개로 분획 하였다.

## 2. EtOAc 분획으로부터 성분 분리

### 가. Compound I의 분리

EtOAc 분획을 (100% MeOH)를 용매로 하여 sephadex LH20 column chromatography (이하 H CC로 약함)를 실시하여 얻은 1번 분획으로 다시 LH20 CC를 실시하여 얻은 3번 분획을 (*n*-Hexane:EtOAc=80:20 -▶ 30:70) 용매로 극성을 높이면서 분리하는 gradient silica gel CC를 실시하여 11개의 분획을 얻은 다음 6번, 7번, 8번 분획을  $C_{18}$  CC (MeOH:H<sub>2</sub>O=50:50-▶ 100:0)를 실시하고 그중 70% MeOH 분획을 (MeOH:H<sub>2</sub>O = 78:22) 용매로 HPLC를 실시한 다음 순수하게 분리하기 위해 (*n*-Hexane:EtOAc=4:6)에서 prep. TLC를 하여 백색 분말상의 compound I을 얻었다.

Rf : 0.24 (*n*-Hexane : EtOAc = 4:6 ) mp: 74~77°C

$[\alpha]_D$  : +145° (c=1.00, MeOH) UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  nm(log  $\epsilon$ ) : 225 (4.02 )

IR  $\nu_{max}$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3460 (tertiary OH), 2960 (CH), 1710 (C=O) 1680 ( $\alpha$ ,  $\beta$  -unsaturated C=O).

FAB- MS(m/z): 481 [M+Na]<sup>+</sup>, 455, 411. EI-MS (70eV, m/z) : 440 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$ ( 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 0.68 (3H, S), 0.85 (3H, S), 0.95 (3H, S), 1.11 (3H, S), 1.24 (3H, S), 1.27 (3H, S), 2.19 (3H, S), 2.32 (2H, m), 3.91 (1H, m, CH), 6.04 (1H, D,  $J=15.9\text{Hz}$ , CH, H-24), 6.82 (1H, dt,  $J=15.9\text{Hz}$ , 7.3Hz, H-23)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 16.4 (19-C), 18.2 (18-C), 20.2 (29-C), 22.9 (11-C), 25.5 (12-C), 27.0 (20-C), 27.7 (26-C), 28.0 (16-C), 31.7 (15-C), 32.6 (28-C), 33.6 (2-C), 38.7 (10-C), 40.4 (1-C), 41.6 (8-C), 42.8 (13-C), 44.3 (22-C), 46.0 (7-C), 47.8 (4-C), 49.5 (9-C), 50.7 (14-C), 50.9 (17-C), 59.7 (95-C), 68.3 (6-C), 75.9 (20-C), 134.5 (24-C), 144.9 (23-C), 199.0 (25-C), 219 (3-C).

#### 나. compound II의 분리

EtOAc분획을 LH20 CC (100% MeOH)를 2 회 실시하여 얻은 3 번 분획을 compound I 과 같은 방법으로 silica gel CC (n-Hexane:EtOAc = 80:20-▶),  $\text{C}_{18}$  CC (MeOH:H<sub>2</sub>O=50:50-▶ 100:0), HPLC (78% MeOH)를 실시한 다음 Prep. TLC (n-Hexane:EtOAc)하여 백색 분말상태인 compound II를 얻었다.

R<sub>f</sub> : 0.14 (n-Hexane : EtOAc=4:6). mp : 59~62 °C

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  nm (log  $\epsilon$ ) : 230 (4.02), 281 (4.11), 340 (4.19).

IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3460 (OH), 2960, 1680 ( $\alpha, \beta$ -unsaturated C=O), 1380, 1280.

FAB-MS(m/z): 483 [M+Na]<sup>+</sup>, 460 [M]<sup>+</sup>, 445 [M-15]<sup>+</sup>, 447 [M-17]<sup>+</sup>

HRCI-MS (m/z) : 478 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) : 0.68 (3H, S), 0.85 (3H, S), 0.95 (3H, S), 0.95 (3H, S), 1.11 (3H, S), 1.27 (3H, S), 2.19 (3H, S), 2.32 (2H, M), 3.12 (1H, dd,  $J=8.0\text{Hz}$ , H-3), 4.06 (1Ht), 6.07 (1H, d,  $J=15.9\text{Hz}$ , CH=CH,

H-24), 6.83 (1H, dt, J=15.9Hz, H-23).

#### 다. Compound III 의 분리

EtOAc 분획을 용매 (100% MeOH)로 LH20 CC를 실시하여 얻은 1번 분획을 다시 LH20CC (100% MeOH)를 실시하여 3 개 분획으로 나눈 후 그 중 5번 분획을 silicagelCC (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O=6:2:1 (lower layer))를 실시하고 C<sub>18</sub> CC (MeOH:H<sub>2</sub>O), LH20CC 실시하여 백색 분말인 compound III을 분리하였다.

R<sub>f</sub> : 0.62 (EtOAc:FA:AA:H<sub>2</sub>O=100:11:11:27).

mp: 128~132°C

[α]<sub>D</sub> : +22.3° (c=0.97, MeOH)

IR ν<sub>max</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3400 (OH), 2950 (aliphatic), 1400, 1100 (C-O).

FAB- MS (m/z) : 661 [M+Na]<sup>+</sup>, 413, 329.

<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) : 0.91 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 1.05 (3H, s, H-20), 1.12 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.67 (s, 3H, H-27), 3.13 (1H, dd, J=8.0Hz, H-3), 4.88 (1H, d, J=8.0Hz, anomeric-H), 5.48 (1H, t, H-24).

<sup>13</sup>C-NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) : 132.2 (C-25), 1298.4 (C-24), 103.5 (glc-1), 78.1 (glc-3), 78.6 (C-3), 78.2 (gle-5), 75.2 (C-26), 75.4 (glc-2), 74.1 (C-20), 71.7 (glc-4), 67.8 (c-6), 63.7 (glc-6), 61.9 (C-5), 50.7 (C-9), 50.7 (C-14), 50.4 (C-17), 48.1 (c-7), 42.2 (C-13), 41.8 (C-8), 41.5 (C-22), 40.4 (C-4), 39.5 (C-1), 39.5 (C-1), 39.5 (C-10), 32.0 (C-28), 31.6 (C-15), 28.1 (C-2), 28.1 (C-16), 26.0 (C-30), 25.4 (C-12), 22.9 (C-23), 21.9 (C-11), 17.6 (C-18), 17.3 (C-19), 16.8 (C-30), 16.5 (C-29), 14.2 (C-27)

## 1) compound III의 산 가수분해

Compound III 2 mg을 MeOH 1 ml로 녹인 후, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml를 가해 4시간 환류 냉각시킨 후 CHCl<sub>3</sub>로 분획한 후 물층에 BaCO<sub>3</sub>를 넣어 SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>침전을 제거한 후 농축하여 cellulose plate에서 pyridine:EtOAc:HOAc:H<sub>2</sub>O=5:5:1:3을 전개제로 glucose, rhamnose, arabinose, lactose, fructose의 표준품과 함께 TLC하여 D-glucose (Rf= 0.48)를 확인하였다.

## 라. compound IV의 분리

Compound III과 같이 EtOAc 분획을 LH20 CC를 실시하여 얻은 1번 분획을, 다시 LH20 CC를 실시하여 얻은 5번 분획을 silica gel CC, LH20 CC를 실시하여 백색 분말 상태의 compound IV를 분리하였다.

mp : 181- 185°C.

Rf : 0.54 (EtOAc:EF:AA:H<sub>2</sub>O=100:11:11:27).

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: +79.5 ° (c=1.00, MeOH)

IR  $\nu$  max (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3400 (OH), 2950 (aliphatic-CH), 1700 (C=O), 1100-1000 (C-O).

FAB-MS (m/z) : 675 [M+Na]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm): 0.75 (3H, S), 0.96 (3H, S), 1.05 (3H, S), 1.23 (3H, S), 1.26 (3H, S), 1.72 (3H, S, H-27), 4.84 (1H, J=8.0Hz, anomeric-H), 5.46 (1H, t, H-24)

<sup>13</sup>C- NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm): 219.1 (C-3), 132.2 (C-25), 129.5 (C-24), 103.5 (glc-1), 78.1 (glc-3), 78.2 (glc-5), 75.2 (glc-2), 71.7 (glc-4), 75.2 (C-26), 76.6 (C-20), 66.8 (C-6), 62.8 (glc-6), 59.2 (C-5), 50.4 (C-14), 49.6 (C-9), 47.7 (C-4), 46.1 (C-17), 45.8 (C-7), 41.5 (c-13), 41.2 (C-8), 40.1 (C-1), 38.2 (C-10), 36.2 (C-22), 33.4 (C-2), 33.2

(C-28), 31.7 (C-15), 28.0 (C-16), 26.2 (C-21), 25.4 (C-12), 22.9 (C-23), 22.8 (C-11), 17.8 (C-18), 16.8 (C-30), 16.0 (C-19), 16.5 (C-29), 14.2 (C-27)

#### 따. Compound V 의 분리

EtOAc 분획을 (100% MeOH)를 용매로 LH20 CC를 실시하여 얻은 2번 분획에 대하여 silica gel CC (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O=30:70)를 실시하여 3개로 나누었고 다시 10번 분획을 prep. TLC (benzen:rthylformate:formicacid=1:7:1, 이하 Ben:EF:FA로 약함)를 실시하여 황갈색 형광을 나타내며 FeCl<sub>3</sub> 시약에 초록색으로 발색된다.

Rf : 0.78 (Ben:EF:FA=1:7:1).

mp : 157 °C

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> : -210 ° (c=0.13, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm(log  $\epsilon$ ) : 330, 305 (4.21), 215 (4.05).

IR  $\nu_{\max}$ (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3500~2400 (OH, COOH), 1650 (conj. C=O), 1600, 1520 (olefin aromatic), 1120 (C-O).

EI-MS (70eV, m/z) : 530 [M]<sup>+</sup>, 467, 439.

<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) : 7.52 (1H, d, J=16.0Hz, 3-H), 7.48 (1H, d, J=16.0Hz, 3'-H), 6.98 (1H, d, J=2.0Hz, 5-H), 6.96 (1H, d, J=2.0Hz, 5'-H), 6.88 (1H, dd, J=8.0, 2.0Hz, 9-H), 6.86 (1H, dd, J=8.0, 2.0Hz, 9'-H), 6.70 (1H, d, J=8.0Hz, 8-H and 8'-H), 6.23 (11H, d, J=16.0Hz, 2-H), 6.12 (1H, d, J=16.0Hz, 2'-H), 5.30 (1H, dt, J=13.0, 7.0Hz, 3-H), 5.22 (1H, dd, J=9.0, 3.0Hz, 5-H), 3.89 (1H, dt, J=5.5, 3.0Hz, 4-H), 3.63 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.23 (1H, dd, J=14.0, 6.0Hz, 6-Heq).

<sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) : 175.91 (s, COOCH<sub>3</sub>), 169.23 (s, C-1),

168.74 (s, C'-1), 150.35 (s, C-7' and C-7), 148.43 (d, C-3' and C-3), 147.37 (s, C'-6 and C-6), 128.40 (s, C-4), 128.25 (s, C-4'), 123.90 (d, C-9' and C-9), 116.23 (s, C-8' and C-8), 115.95 (d, C-5' and C-5), 115.43 (d, C-2), 115.28 (d, C-2), 74.20 (d, C-1), 72.96 (d, C-2), 30.68 (t, C-6)

#### 바. Compound VI 의 분리

EtOAc 분획을 compound V와 같이 LH20 CC를 실시하여 얻은 2번 분획을 silica gel CC를 실시하여 구중 7번 분획을 C<sub>18</sub> CC, Prep. TLC (Ben:EF:FA=1:7:1)를 실시하여 황갈색 무정형 분말을 얻었다.

Rf : 0.75 (Ben:EF:FA=1:7:1).

mp : 178°C

$[\alpha]_D$  : -210° (c=0.13, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  nm (log  $\epsilon$ ) : 305 (4.21), 250 (4.12), 215 (4.05)

IR  $\nu_{max}$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3500~2400 (OH), 1650 (conj. C=O), 1600, 1520 (Olefin aromatic), 1120 (C-O), EI-MS (70eV, m/z): 530 [M]<sup>+</sup>, 467, 439.

<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CD<sub>3</sub> OD,  $\delta$  ppm) : 7.50 (1H, d, J=16.0Hz, 3-H), 7.40 (1H, d, J=16.0Hz, 3'-H), 6.92 (1H, d, J=2.0Hz, 5-H), 6.91 (1H, d, J=2.0Hz, 5'-H), 6.81 (1H, dd, J=8.0, 2.0 Hz, 9-H), 6.80 (1H, dd, J=8.0, 2.0Hz, 9'-H), 6.68 (2H, d, J=8.0Hz, 8-H and 8'-H), 6.19 (1H, d, J=16.0Hz, 2-H), 6.08 (1H, d, J=16.0Hz, 2-H), 6.08 (1H, d, J=16.0Hz, 2'H), 5.45 (1H, dt, J=10.0, 5.0Hz, 3-H), 5.02 (1H, dd, J=10.0, 3.0Hz, 4-H), 4.26 (1H, dd, J=10.0, 3.0Hz, 5-H), 3.63 (3H, s, OCH), 2.29 (1H, dd, J=14.0, 3.0Hz, 6-Hax), 2.20 (2H, m, 2H), 2.02 (1H, dd, J=14.0, 6.0Hz, 6-Heq).

<sup>13</sup>C-NMR (100MHz, CD<sub>3</sub> OD,  $\delta$  ppm) : 175.98 (s, COOCH), 169.53 (s, C-1),

168.24 (s, C-1'), 150.75 (s, C-7' and C-7), 149.25 (d, C-3' and C-3), 147.10 (s, C-6' and C-6), 128.25 (s, C-4), 128.25 (s, C-4), 128.25 (s, C-4'), 123.01 (d, C-9' and C-9 and C-9), 116.22 (s, C-8' and C-8), 115.22 (d, C-5' and C-5), 115.15 (d, C-2), 115.15 (d, C-2'), 74.96 (s, C-1), 72.50(d, and C-5), 115.15 (d, C-2'), 74.96 (s, C-1), 72.50 (d, C-4), 72.29 (d, C-3), 70.06 (d, C-5), 53.30 (q, OCH), 37.98 (t, C-2), 30.96 (t, C-6).

### 3. *n*-BuOH 분획으로부터 성분 분리

#### 가. Compound VII 의 분리

*n*-BuOH 분획을 LH20 CC (100% MeOH)를 실시하여 얻은 1번 분획을 다시 LH20 CC (100% MeOH)를 실시하여 2번, 3번, 4번 분획을 얻었고 그중 3번 분획을 silica gel CC (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O=9:3:0.3)을 실시한 다음 다시 LH20 CC를 실시하여 얻었고, 11번 분획을 MeOH/EtOAc로 재결정하여 백색분말이 compound VII을 얻었다.

R<sub>f</sub> : 0.42 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O=15:10:1)

mp : 192~194°C.

[α]<sub>D</sub> : -2.0° (c=2.41, MeOH)

IR ν<sub>max</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3400 (OH), 2950 (aliphatic-CH), 1750 (C=O), 1050(C-O).

FAB-MS (m/z) : 1140 [M+Na+H]<sup>+</sup>, 1138, 818.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) : 0.61 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.68 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.89 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.07(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.20 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.22 (3H d, CH<sub>3</sub>, J=5Hz), 2.0 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 4.22 (H, d, CH, J=5.4Hz), 4.36 (H, d, CH, J=6.7Hz), 5.16 (H, t-like, CH), 5.24 (CH, d, CH, J=5.7Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) : 178.2 (28-C), 172.5 (CH<sub>3</sub>COO), 1449.9 (13-C), 123.7 (12-C), 104.4 (outer glc-1), 104.2 (ara-1), 102.6 (rham-1), 95.8 (Inner glc-1), 83.0 (3-C), 78.3 (Inner glc-3), 78.1 (Inner glc-5), 77.1 (outer glc-4), 77.0 (outer glc-4), 76.5 (outer glc-3), 76.5 (outer glc-4), 75.4 (ara-2), 75.5 (rham-3), 75.4 (rham-4), 74.5 (ara-3), 73.8 (Inner glc-1), 71.1 (rham-2), 70.7 (Inner glc-3), 70.3 (rham-5), 69.5 (ara-4), 63.8 (Inner glc-4), 68.3 (Inner glc-5), 65.2 (ara-5), 64.9 (23-C), 61.5 (outer glc-6), 48.8 (5-C), 48.2 (9-C), 48.1 (19-C), 47.3 (17-C), 43.1 (4-C), 42.5 (14-C), 42.5 (18-C), 39.5 (8-C), 37.8 (1-C), 37.3 (10-C), 34.9(21-C), 33.3 (22-C), 33.3 (29-C), 33.3 (7-C), 31.5(20-C), 28.9 (2-C), 26.4 (15-C), 26.3 (27-C), 24.6 (16-C), 24.1 (11-C), 24.1 (30-C), 20.8 (CH<sub>3</sub>COO), 18.9 (6-C), 18.9 (rham-6), 17.6 (26-C), 16.6 (25-C), 13.4 (24-C).

### 1) Compound VII의 가수분해

Compound I 10 mg 1ml MeOH에 녹인후, 1N HCl을 1 ml 가해 60 분동안 수욕 상에서 환류 냉각하여 가온한 후, CHCl<sub>3</sub> 을 분획했다. 남은 물층을 냉동 건조한 후 silica gel plate에서 n-butanol:acetic acid:ethyl ether:water=9:6:3:1을 전개제로 glucose, galactose, mannose, arabinose, xylose, fructose, rhamnose, ribose 등의 표준품과 함께 TLC를 전개한 후, anisaldehyde 시약으로 발색시킨 결과 glucose, arabinose, rhamnose의 반점을 확인하였다. 또한 분획한 CHCl<sub>3</sub>층을 감압 농축하여 같은 조건으로 TLC를 전개한 후, vanilin-황산 시약으로 발색시킨 결과 hederagenin 표준품과 동일한 반점을 확인하였다.

### 나. Compound VIII의 분리

Compound VII과 같은 방법으로 n-BuOH 분획을 LH20 CC를 2회 실시하고 그중 3번 분획을 silica gel, CC LH20 CC를 실시하여 얻은 12번 분획을 MeOH/EtOAc 로 재결정하여 백색분말인 compound VIII을 얻었다.

Rf : 0.33 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O=9:3:0.3).



mp: 187~191°C

$[\alpha]_D$  : -22.1° (c=1.41, MeOH)

IRv max (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3400 (OH), 2950 (CH-aliphatic), 1750 (C=O), 1050 (C-O).

FAB-MS (M/z) : 1286 [M+Na+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) : 0.61 (3H, S, CH<sub>3</sub>), 0.68 (3H, S, CH<sub>3</sub>), 0.89 (3H, S, CH<sub>3</sub>), 10.7 (3H, S, CH<sub>3</sub>), 1.15 (3H, S, CH<sub>3</sub>), 1.20 (3H, S, CH<sub>3</sub>), 1.22 (3H, CH<sub>3</sub>d, J=5.10Hz), 1.25 (3H, CH<sub>3</sub>d, J=5.0Hz), 2.0 (3H, COCH<sub>3</sub>), 4.22 (CH, d, CH, J=5.4Hz), 4.30 (H, d, CH, J= 6.7Hz), 4.71 (H, t-like, CH), 5.16 (H, t-like, CH), 5.24 (H, d, CH, J=5.7Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm) : 178.2 (28-C), 172.5 (CH<sub>3</sub>COO), 144.9 (13-C), 123.7 (12-C), 104.4 (outer glc-1), 104.2 (ara-1), 102.6 (rham-1), 95.8 (Inner glc), 83.0 (3-C), 78.3 (Inner glc-3), 78.1 (Inner glc-5), 77.1 (outer glc-4), 77.0 (outer glc-4), 76.5 (outerglc-3), 75.6 (outerglc-2), 75.5 (rham-4), 75.4 (ara-2), 75.4 (rham-3), 74.5 (ara-3), 74.1 (rham-4), 73.8(Innerglic-2), 72.9(rham-3), 72.4(rham-2), 71.1(rham-2), 70.7 (Inner glc-4), 70.3 (rham-5), 69.7 (rham-5), 69.5 (ara-4), 68.3 (Innerglic-6), 65.2 (ara-5), 64.9 (23-C), 61.5 (outer glc-6), 48.8 (5-C), 48.2 (9-C), 48.1 (19-C), 47.3 (17-C), 43.1 (4-C), 42.5 (14-C), 42.5 (18-C), 39.5 (8-C), 37.8 (1-C), 37.3 (10-C), 34.9 (21-C), 33.3 (22-C), 33.3 (29-C), 33.3 (17-C), 31.5 (20-C), 28.9 (2-C), 26.4 (15-C), 26.3 (27-C), 24.6 (16-C), 24.1 (11-C), 24.1 (30-C), 20.8 (CH<sub>3</sub>COO), 18.9 (6-C), 18.9 (rham-6), 18.9 (rham-6), 17.6 (26-C), 16.6 (25-C), 13.4 (25-C).

당을 확인하기 위해 Compound VII과 같은 방법으로 가수분해하여 glucose, arabinose rhamnose의 반점을 확인하고, 또한 분획한 CHCl<sub>3</sub>층을 농축하여 TLC를 전개한 후 황산-vanillin시약으로 발색시킨 결과 hederagenin 표준품과 동일한

반점을 확인하였다.

#### 다. Compound IX의 분리

n-BuOH 분획을 LH20 CC를 실시하여 얻은 2번 분획을 LH20 CC, silica gel CC (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O:FA=9:3:0.2:0.1)를 실시하여 6개의 분획을 얻었다. 그중 다시 2번 분획을 C<sub>18</sub> CC를 실시하여 35% (MeOH:H<sub>2</sub>O=35:65)에서 백색 분말 상태의 물질을 얻었다.

R<sub>f</sub>=0.25(Ben:EF:FA=1:7:1).

mp : 208 °C.

[α]<sub>D</sub> : - 35.2° (c=2.8, MeOH)

UV λ<sub>max</sub> nm (MeOH) : 329, 229, 244, 354.

IR ν<sub>max</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3400 (OH), 1650 (conj. C=O), 1520, 1100 (C-O).

EI-MS (70eV, m/z) : 354 [M]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): 7.54 (1H, dJ=16.0Hz, 3-H), 7.02 (1H, dJ=16.0Hz, 5-H), 6.92 (1H, dJ=8.0Hz, 9-H), 6.72 (1H, dJ=8.0Hz, 8-H), 6.23 (1H, dJ=16.0Hz, 2-H), 5.18 (1H, dt=3-H), 4.18 (1H, dt, 5-H), 3.65 (1H, dd, 4-H), 2.29 (2H, m, 2-H), 2.20 (1H, dd, 6-H)

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, MeOH, δ ppm) : 180.10 (s, COOH), 169.38 (s, C-1), 150.21 (s, C-7), 148.55 (s, C-3), 147.21 (s, C-6), 28.32 (s, C-4), 123.55 (d, C-9), 117.15 (s, C-8), 115.65 (d, C-5), 115.11 (d, C-2), 77.99 (s, C-1), 77.52 (d, C-4), 72.05 (d, C-5), 70.55 (d, C-3), 39.25 (t, C-2), 38.55 (t, C-1)

## 라. Compound X의 분리

n-BUOH 분획을 LH20CC (100% MeOH)를 실시하여 2개 분획으로 나누고 그중 2번 분획을 LH20CC (MeOH)를 실시하고, 다시 silicagel CC (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O:FA=9:3:0.2:0.1)를 실시하여 6개 분획으로 나눈 것 중 6번 분획을 C<sub>18</sub>CC (MeOH:H<sub>2</sub>O=30:70 → 100:0)를 실시하여 3개로 나누었다. 그중 14번 분획을 Prep. TLC (Ben:EF:FA=1:7:1)를 실시하여 황갈색 무정형 분말인 Compound X를 얻었다.

Rf: 0.62 (Ben:EF:FA=1:7:1).

mp : 170-173 °C

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> : -198 ° (MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ): 328 (4.22), 242 (4.09), 217 (4.04).

IR  $\nu_{\max}$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3500-2400 (OH, COOH), 1650 (conj., C=O), 1600, 1520 (olefin aromatic).

EI-MS (70eV, m/z) : 516 [M]<sup>+</sup>, 515 [M-1]<sup>+</sup>, 504, 396, 191.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm): 6.98 (1H, d, J=16.0Hz, 3-H), 7.49 (1H, d, J=16.0Hz, 3'-H), 6.98 (1H, d, J=2.0Hz, 5-H), 6.92 (1H, d, J=2.0Hz, 5'-H), 6.88 (1H, dd, J=8.0, 2.0Hz, 9-H), 6.87 (1H, dd, J=8.0, 2.0Hz, 9'-H), 6.72 (1H, d, J=8.0Hz, 8-H), 6.70 (1H, d, J=8.0Hz, 8'-H), 6.23 (1H, d, J=16.0Hz, 2-H), 6.12 (1H, d, J=16.0Hz, 2'-H), 5.32 (1H, dt, J=10.0, 5.0Hz, 3-H), 5.22 (1H, dt, J=3.0, 2.5Hz, 5-H), 3.89 (1H, dt, J=3.0Hz, H-4), 2.29 (1H, dd, J=14.0, 6.0Hz, 6-Heq).

<sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm): 180.10 (s, COOH), 169.55 (s, C-1), 169.23 (s, C-1), 149.75 (s, C-7' and C-7), 147.64 (d, C-3), 147.14 (d, C-3), 147.00 (s, C-6' and C-6), 128.94 (s, C-4), 128.22 (s, C-4'), 123.15 (d,

C-9' and C-9), 116.88 (s, C-8' and C-8), 115.76 (d, C-5' and C-5), 115.16 (d, C-2 and C-2'), 74.02 (s, C-1), 72.73 (d, C-4), 72.25 (d, C-5), 70.42 (d, C-3), 37.42 (t, C-2), 30.29 (t, C-6).

#### 마. Compound XI의 분리

n-BuOH 분획을 Compound X과 같이 LH20 CC를 실시하여 얻은 2번 분획을 LH20 CC, silica gel CC를 실시하여 6 개로 나눈 다음, 6개로 나눈 다음, 6번 분획을 C<sub>18</sub> CC (MeOH:H<sub>2</sub>O)를 한 후 14번 분획을 prep. TLC (Ben:EFLFA=1:7:1)하여 황갈색 무정형 분말을 얻었다.

Rf: 0.38 (Ben:EF:FA=1:7:1).

mp: 142 °C. [

$\alpha$ ] <sub>D</sub>: -170° (MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ): 328 (4.22), 242 (4.09), 217 (4.04).

IR  $\nu_{\max}$  (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3500-2400 (OH, COOH), 1650 (conj. C=O), 1600, 520 (olefin aromatic), 1120 (C-O).

EI-MS (70eV, m/z): 516 [M]<sup>+</sup>, 515 [M-1]<sup>+</sup>, 504, 503.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm): 7.50 (1H, d, J=16.0Hz, 3-H), 7.42 (1H, d, J=16.0Hz, 3'-H), 6.95 (1H, d, J=2.0Hz, 5-H), 6.93 (1H, d, J=2.0Hz, 5'-H), 6.80 (1H, dd, J=8.0, 2.0Hz, 9-H), 6.79 (1H, dd, J=8.0, 2.0Hz, 9'-H), 6.68 (1H, d, J=8.0Hz, 8-H), 6.66 (1H, d, J=8.0Hz, 8'-H), 6.20 (1H, d, J=16.0Hz, 2-H), 6.08 (1H, d, J=16.0Hz, 2'-H), 5.68 (1H, dt, J=10.0Hz, H-5), 5.20 (1H, dd, J=10.0, 3.0Hz, H-4), 4.45 (1H, dt, J=10.0, 5.0Hz, H-3), 2.29 (1H, dd, J=14.0, 3.0Hz, 3-H), 2.20 (2H, m, 2-H), 2.02 (1H, dd, J=14.0, 6.0Hz, 6-Heq)

<sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm): 179.10 (s, COOH), 169.52 (s, C-1), 168.22

(s, C-1), 149.75 (s, C-7), 147.66 (d, C-3), 147.29 (d, C-3), 147.00 (s, C-6' and C-6), 128.22 (s, C-4), 128.10 (s, C-4'), 123.20 (d, C-9' and C-9), 116.22 (s, C-8' and C-8), 115.86 (d, C-5' and C-5), 115.76 (d, C-2 and C-2'), 74.96 (s, C-1), 72.50 (d, C-4), 72.29 (d, C-5), 70.06 (d, C-3), 35.09 (t, C-2), 30.98 (t, C-6).

#### 바. Compound XII 의 분리

n-BuOH 분획을 Compound X과 같이 LH20 CC를 실시하여 얻은 2번 분획을 LH20 CC, silica gel CC를 실시하여 얻은 분획중 6번 분획을 C<sub>18</sub> CC를 실시한 후, 14번 분획을 prep. TLC (Ben:EF:FA=1:7:1)하여 황갈색 무정형 분말을 얻었다.

Rf: 0.26 (Ben:EF:FA=1:7:1).

mp : 178 °C

$[\alpha]_D$  : -218° (c=0.13, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  nm (log  $\epsilon$ ) : 328 (4.22), 242 (4.09), 217 (4.04)

IR  $\nu_{max}$  (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3500-2400 (OH), 1650 (conj., C=O), 1600, 1520 (olefin aromatic), 1120 (C-O)

EI-MS (70eV, m/z) : 516 [M]<sup>+</sup>, 515 [M-1]<sup>+</sup>, 504, 503

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  ppm) : 7.51 (1H, dJ=16.0Hz, 3-H), 7.39 (1H, d, J=16.0Hz, 3'-H), 6.93 (1H, d, J=2.0Hz, 5-H), 6.90 (1H, d, J=2.0Hz, 5'-H), 6.83 (1H, dd, J=8.0, 2.0Hz, 9-H), 6.82 (1H, dd, J=8.0, 2.0Hz, 9'-H), 6.68 (1H, d, J=8.0Hz, 8-H), 6.62 (1H, d, J=8.0Hz, 8'-H), 6.19 (1H, d, J=16.0Hz, 2-H and 2'-H), 5.61 (1H, dt, J=10.0, 5Hz, 3-H), 5.02 (1H, DD, J=10.0, 3.0Hz, 4-H), 4.25 (1H, dd, J=3.0, 2.5Hz, 5-H), 2.29 (1H, dd, J=14.0, 3.0Hz, 6-HAX), 2.20 (2H, m, 2H), 2.02 (1H, dd, J=14.0, 6.0Hz,

6-Heq)

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ ppm): 180.10 (s, COOH), 169.38 (s, C-1), 169.26 (s, C-1), 150.32 (s, C-7' and C-7), 148.37 (d, C-3 and C-3'), 147.46 (s, C-6' and C-6), 128.46 (s, C-4), 128.40 (s, C-4'), 123.87 (d, C-9' and C-9), 117.20 (s, C-8' and C-8), 115.80 (d, C-5' and C-5), 115.43 (d, C-2 and C-2'), 74.96 (s, C-1), 72.50 (d, C-4), 71.45 (d, C-5), 70.11 (d, C-3), 35.05 (t, C-2), 30.48 (t, C-6)

## 제 4절 담배풀 유래 물질

### 1. 담배풀 유래 활성물질

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

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

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

### 2. 추출 및 분획

음건에 의해 충분히 건조시켜 세절한 지상부 6.0 kg을 수욕상에서 메탄올 18 리터로 환류하면서 24 시간씩 3 회 추출하고, 추출액을 여과한 다음 감압 농축하여 메탄올 추출물 700 g을 얻었다. 이 추출물에 celite 2 kg을 가하여 잘 혼합하여 흡착시킨 다음 감압 농축기에서 용매를 유거하고, 칼럼에 충전한 후 석유 에텔, 클로로포름, 메탄올의 순으로 충분히 용출시켜 분획하였다. 용매 분획에 의해 얻은 엑스의 양은 석유 에텔 분획이 105 g, 클로로포름 분획이 87 g 이었다.

### 3. 화합물의 분리

상기 분획 중 세포독성을 나타내는 분획에 대하여 지름 5 cm의 column에 150 g의 silica gel (70-230 mesh)을 충전시켜 벤젠과 에틸 아세테이트 (5:1)의 혼합 용매로 column chromatography를 행하여 TLC로 확인 시 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액에 의해 발색되는 각 반점의 R<sub>f</sub>값 차이에 따라 fr.31에서 fr.34까지의 subfraction으로 나누었다. 그 중 강한 세포 독성을 나타내는 subfraction 32(1.5g)에 대하여 헥산 및 아세톤(5:1)의 혼합용매로 분취용 박층 크로마토그래피를 행하고 최종적으로 HPLC로 정제하여 순수한 compound (62 mg)을 얻었다. 이 때 HPLC 칼럼으로는 MetaChem사의 polygosil 10 $\mu$ m C18 (250 ×10.0 mm)을 사용하였으며, 40% 메탄올 이동상으로 하여 230 nm에서 검출하였다.



## 제5절 약쑥 유래 물질 분리

### 1. 그늘쑥

그늘 쑥 (*Artemisia sylvatica* MAXIMOWICZ)은 국화과 *Artemisia*에 속하는 식물로써, 우리나라 중부 지방에 분포한다. 동속 식물로는 황해 쑥 (*A. argyi* LEVL. et VANT.), 참 쑥 (*A. lavandulaefolia* DC.), 약 쑥 (*A. princeps* var. *orinetalis* (PAMPAN.) 등이 있다. 그리고, 이와 같은 것들은 성분과 형상에는 차이가 있지만, 일반적으로 약 쑥이라고 알려져 있다. 전통적으로 약 쑥은 식용으로는 사용되지 않고, 상처에 지혈을 하거나 종기, 부스럼 그리고 월경불순 등의 부인병 치료에 사용되어 왔다. 약쑥의 주요 약리 성분은 Artanomaloide계의 Sesquiterpene lactone이며, 이 유도체들은 항암 작용, 항균 작용, 혈관의 수축과 확장, 근육 세포의 칼륨통로 길항제로 작용하고 있다.

### 2. 물질의 추출

음건한 그늘 쑥 5 kg을  $\text{CHCl}_3$ :acetone (1:1)로 3일간 추출후 감압 농축하여 gel 상태의 검은색 추출물 300 g을 얻었다.

### 3. Column chromatography

#### 가. silica gel chromatography

Silica gel (200-400 mesh) 1.5 kg은 Hexane 3 l를 넣어 column (10x60 cm)에 Packing 하였다. Crude extract 300 g을  $\text{CHCl}_3$  100 ml에 녹여 조심스럽게 Loading 하였고  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (100:0-95:5, 각각 3 l)으로 1% 간격으로 단계적 용출을 하여 200 ml씩 분획을 Flask에 받았다. 분획은 1 mg/ml의 농도로 Enzyme inhibition assay을 한 후 저해 활성 분획을 모아 감압 농축하여 Brown gel 200 g을 얻었다.

#### 나. ODS Chromatography

Reverse phase silica gel (RP-C18, 40-63  $\mu$ m) 200 g을 MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50) 20 ml에 녹여 Column위에 조심스럽게 Loading 하였고 MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50-100:0, 각각 800ml)으로 10% 씩 간격으로 단계적 용출을 하여 100 ml씩 분획을 Tube에 받았다. 10번의 반복적 Column 후 저해활성 분획을 모아 감압 농축하여 Yellow powder 20 g을 얻었다.

#### 다. Silica gel chromatography

Silica gel 200 g은 CHCl<sub>3</sub>:EtOAc (80:20) 400 ml을 넣어 Column (5x40 cm)에 Packing하였다. Yellow powder 4 g은 CHCl<sub>3</sub>:EtOAc (80:20) 4 ml에 녹여 Column 위에 Loading 하였고, CHCl<sub>3</sub>:EtOAc (80:20-40:60, 각각 800 ml)으로 10% 간격으로 단계적 용출을 하여 100 ml씩 분획을 Tube에 받았다. 5 번의 반복적 Column후 저해활성 분획을 모아 감압농축 후 Yellow powder 4 g을 얻었다.

#### 라. Sephadex LH-20 chromatography

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

#### 마. Thin Layer Chromatography

각 단계에서는 TLC를 하였으며, 전개는 CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5)에서 하였다. Stain은 Anisaldehyde으로 하였고 TLC plate를 가열하여 발색시켰다.

#### 바. HPLC

저해제의 분리 정제를 위하여 HPLC를 수행하였으며, 분리 조건은 다음 Table 13과 같다.

Table 13. HPLC 조건

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

## 제 4 장 활성 물질의 구조

### 제 1절 시남알데하이드 구조

#### 1. 2-hydroxy cinnamaldehyde의 분리 및 구조

Hexane과 ethyl acetate를 용매로 70:30의 배합 하에 silica gel column chromatography를 하고, hexane, acetone으로 재결정하여 나온 compound는 mp 121-122 °C의 미황색 침상결정이며, UV max가 214, 285, 337 nm이다. 이 compound의 IR spectrum을 보면 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$ 에서 hydroxyl 기를, 168  $\text{cm}^{-1}$ 에서 carbonyl기를 확인할 수 있다. 또한 1612, 1600, 1450  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic 이중결합과 1145  $\text{cm}^{-1}$  근처의 ether band가 있음을 알 수 있다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7개의 proton이 있음을 알 수 있고, 그 중 9.68 ppm(1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ )의 peak로 보아 aldehyde 기를 확인할 수 있으며, 나머지 6개의 proton들이 7.89-6.84ppm 사이에 존재하는 것으로 방향족 화합물임을 알 수 있다. DEPT는 이 7개의 proton들이 모두 CH임을 증명해 주며 6.84, 8.01 ppm의 coupling constant가 16.3Hz이므로 olefinic proton이 trans 형임을 알 수 있다. HRCI-MS상에서 149[M+H]<sup>+</sup>의 peak로 보아 이 물질의 분자량은 148임을 확인할 수 있었으며 분자식을  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$ 로 추정할 수 있었다. 이 외에도  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY,  $^{13}\text{C-}^1\text{H}$  COSY, HMBC에 나타난 peak를 assign한 결과 이 compound를 2'-hydroxy cinnamaldehyde로 동정하였다. 이 compound는 이전에 합성품으로 보고된 적은 있으나 천연물에서는 처음 분리되었다.

mp : 121-122°C

UV (MeOH,  $\lambda_{\text{max}}$ ) : 214 nm ( $\epsilon$  7000), 285 nm ( $\epsilon$  16000), 337 nm ( $\epsilon$  5000)

IR (KBr pellet,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3000-3500 (H-Bonded OH), 1658 (C=O), 1612, 16000, 1450 (aromatic C=C), 1253, 1145 (C-O)

$^1\text{H-NMR}$  (Aceton- $\text{d}_6$ ,  $\delta$ ) : 9.68 (1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ , CHO), 7.89 (1H, d,  $J=16.2\text{Hz}$ ,  $\phi$ -CH=CH-), 7.63 1H, dd,  $J=7.7$  1.5Hz, aromatic 6H), 7.30 (1H,

td, J=7.7, 1.5Hz, aromatic 4H), 7.00 (1H, d, J=7.8Hz, aromatic 3H), 6.92 (1H, td, J=7.5, 1.1Hz, aromatic 5H), 6.84 (1H, dd, J=7.8, 16.2 Hz,  $\phi$ -CH=CH-CHO)

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

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

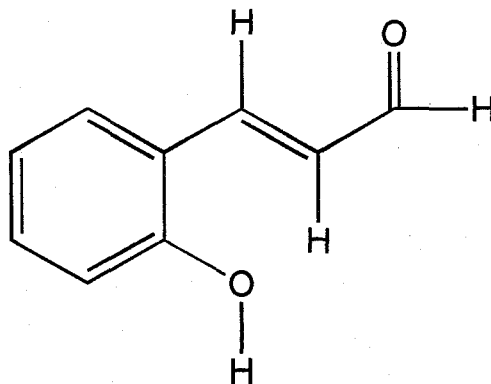


Figure 9. 2'-Hydroxycinnamaldehyde(CB-OH)의 구조

## 제 2절 롬베논

### 1. EtOAc 분획의 성분

#### 가. Compound I의 구조

compound I은  $\text{CHCl}_3$ 에 잘 녹고 anisaldehyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$  시약에 적자색으로 발색하고 UV short wave에서 청록색을 나타내며 long wave에서 형광을 나타내는 mp  $74\sim 77^\circ\text{C}$ 인 백색 분말이다. IR spectrum에서  $3460\text{cm}^{-1}$  (OH),  $1710\text{cm}^{-1}$  (C=O),  $1680\text{cm}^{-1}$   $\alpha$ ,  $\beta$  unsaturated carbonyl이 관찰되고, FAB-MS spectrum에서  $m/z$  481  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , EI-MS spectrum에서  $m/z$  440  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$  ion peak로 보아 분자량이 458임을 알 수 있었다.

Proton-NMR spectrum에서  $\delta$  2.19, 1.27, 1.24, 1.11, 0.95, 0.85, 0.68에 나타나는 singlet으로 7개의  $\text{CH}_3$ 기가 있음을 알 수 있고  $\delta$  3.91 ppm ( $^1\text{H}$ , m)은 3급 hydroxyl기가 있는 탄소에 부착된 1개의 methine임을 확인할 수 있었다. 또한  $\delta$  3.8~4.5 사이에 doublet으로 보이는 anomeric proton이 없는 것과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  100ppm에 anomeric carbon이 없는 것으로 보아 당이 없는 물질임을 알 수 있고,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  219.9, 68.3, 75.9 ppm에서 carbonyl, tertiary, quaternary alcohol peak와 MW 458과 carbon peak수를 봐서 dammarane 골격을 가진 화합물로 추정할 수 있었다.

그리하여 compound I 과 3-oxo-20(S)-dammar-24-ene-6 $\alpha$ , 20, 26 triol의 aglycone part를 가진 Kitzuta saponin K5와  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 비교해 보았을 때 (C-1~ C-21과 C-28~C-30) 대부분 거의 유사한 것을 알 수 있었다. 확인되지 않은  $\delta$  199.0 (C=O), 144.9 (=CH), 134.5 (=CH), 44.3 ( $\text{CH}_2$ ), 27.7 ( $\text{CH}_3$ ) ppm에 나타나는 5개의 carbon peak는  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC spectrum에서 이 carbon signal과 각각의 carbon에 부착된 proton signal을 알 수 있었고, 또한 이 signal들은 C-22 ~ C-26의 terminal part임을 확인할 수 있었다.

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, spectrum에서  $\delta$  6.82 (1H, dt,  $J=15.9\text{Hz}$ ,  $d=7.3\text{Hz}$ , H-23)에 있는 olefin proton signal은  $\delta$  6.04 (1H, d,  $J=15.9\text{Hz}$ , H-24)  $\delta$  2.32 (2H, m,

H-22)에 결합된 것을 알 수 있었다.

위의 proton signal이 부착된 carbon들의 chemical shift는  $\delta$  144.9, 134.5, 44.3 ppm으로 HMQC spectrum에서 확인되었다. 또한  $\delta$  27.7 ppm의 carbon peak는  $^1\text{H-NMR}$ 에서 2.19 (3H, S)에 나타나는 signal과 연결된 것을 알 수 있었고 side chain에 존재하는 한 개의 methylene, 두 개의 olefine, 한 개의 ketone, 한 개의 methyl carbon의 연결관계는 HMBC와 HMQC technique을 이용하여 확인하였다.  $\delta$  144.9 ppm (C-23)과  $\delta$  2.32 ppm (H-22)에 나타난 methylen proton이 연결된 것을 알 수 있었고, 4급 탄소로서  $\delta$  75.9 ppm peak는 hydroxy기가 있는 C-20으로 확인할 수 있었다. 또한  $\alpha$ ,  $\beta$ -understaturated ketone은  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\delta$  199.10 ppm)과 IR spectrum의 ( $1680^{-1}$ )peak로 알 수 있었고 compound I의  $^1\text{H-NMR}$ 에서  $\delta$  6.04, 6.82 ppm에 나타나는 downfield shift한 proton signal로도 확인할 수 있었다. Olefin proton의 stereo chemistry는 ( $J=15.9\text{Hz}$ )이므로 trans form임을 알 수 있으며, 또한 HMBC spectrum에서  $\delta$  199.0 ppm의 carbon signal은 downfield shift되어 나타난  $\delta$  2.19 (H-26)의 methyl proton signal과  $\delta$  6.82 (H-23)의 olefin proton과 인접되어 연결된 것을 알 수 있었다.

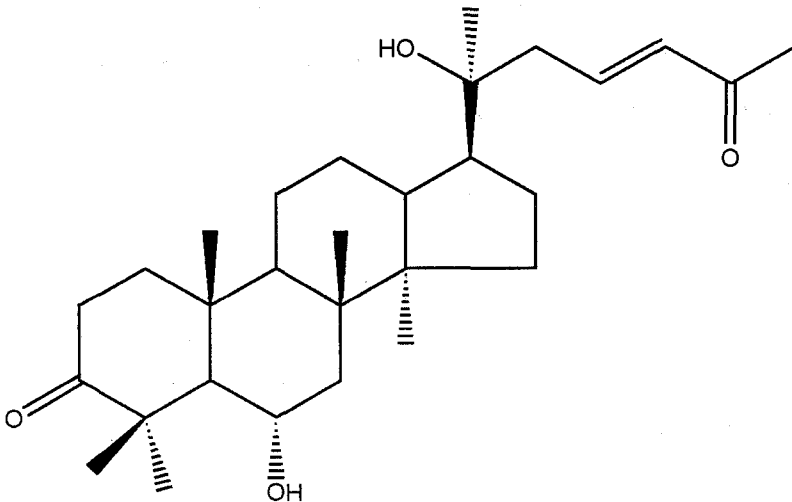


Figure 10. Compound I의 구조

이상의 spectrum을 종합하여 분석한 결과 compound I은 27-demethyl-20 (S)-dammar-23-ene-6 $\alpha$ , 20 diol-3,25 dione으로 해석하고 rhombenone으로 명명하였고, dammarane형의 27-demethyl nortriterpene은 천연에서 처음으로 분리되었다.

Table 14.  $^1\text{H-NMR}$  Spectrum data and MS- data of Compound I, II  
 $^a\text{CDCl}_3$ , 125 MHz,  $^b\text{CDCl}_3$  400MHz

$\delta^{13}\text{C}^a$	Carbon position	
	Compound I	Compound II
C-18 (19.22)	0.68 (3H, s)	0.68 (3H, s)
C-30 (18.18)	0.85 (3H, s)	0.85 (3H, s)
C-19 (17.52)	0.95 (3H, s)	0.95 (3H, s)
C-21 (37.12)	1.11 (3H, s)	1.11 (3H, s)
C-29 (20.25)	1.24 (3H, s)	1.24 (3H, s)
C-28 (34.18)	1.26 (3H, s)	1.26 (3H, s)
C-26 (26.25)	2.19 (3H, s)	2.19 (3H, s)
C-22 (44.31)	2.32 (2H, m)	2.32 (2H, s)
C-2 (34.32)	2.78 (2H, m)	
C-6 (75.93)	3.91 (1H, m)	3.91(1H, m)
C-20 (77.69)		
C-24 (134.55)	6.04 (1H, dJ=15.9Hz)	6.04 (1H, d J=15.9Hz)
C-23 (144.93)	6.82 (1H, dt J=15.9, 7.3Hz)	6.82 (1H, dt J=15.9, 7.3Hz)
*C-3 (219.95)		*3.12 (1H, dd, J=8.0Hz)
C-25 (199.03)		
EI-MS M/Z	440 [M-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	460 [M] <sup>+</sup>
FAB-MS M/Z	481 [M+Na] <sup>+</sup>	483 [M+Na] <sup>+</sup>
HRCI-MS M/Z	476 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	478 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>



Table 15. Physico - chemical properties of Compound I and II

PROPERTIES	COMPOUND I	COMPOUND II
Appearance	White powder	White powder
$[\alpha]_D^{19}(c=1.00, \text{MeOH})$	+145°	
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{meth}}(\text{nm})(\log \epsilon)$	225 (4.02)	230 (4.01), 281 (4.11)
HRCI-MS (m/z) ( II )		
HRCI-MS (m/z) ( I )		
Calcd:	458.7426	478.3893
Found:	458.7345	478.3883
IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})\text{cm}^{-1}$	3460, 2960, 1710, 1680	3460, 2960, 1680
Solubility (Soluble)	MeOH, $\text{CHCl}_3$ , EtOAc	MeOH, $\text{CHCl}_3$ , EtOAc
Insoluble:	n-Hexane	n-Hexane
Color reaction Positive:	50% $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Anisaldehyde	50% $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Anisaldehyde
MP (°C)	74~77 °C	59~62 °C
Rf value (n-Hexane:EtOAc=4:6)	0.24	0.14
Molecular formula	$\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4$	$\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4$

## 나. Compound II의 구조

Compound II는  $\text{CHCl}_3$ 에 잘 녹고 anisaldehyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$  시약에 의해 적자색으로 발색되며, UV short wave에서 흑자색, long wave에서 녹색 형광을 나타내는 mp 59~62 °C인 백색분말이다.

Compound II는 FAB-MS(M/z): 483 [M+23]  $^+$  460 [M]  $^+$  (Fig. 19a. - b.), HRCI-MS(m/z) : 478.3883 [M+NH<sub>4</sub>]  $^+$ 로 봐서, 분자식이  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_4$ 인 분자량 460의 물질임을 알 수 있었고, IR-spectrum에서  $3460\text{cm}^{-1}$  (tertiary OH),  $1680\text{cm}^{-1}$  ( $\alpha, \beta$  unsaturated C=O) 이 관찰되고  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  2.19, 1.27, 1.11, 0.95, 0.85, 0.68ppm에 나타나는 singlet으로 7개의 methyl 기를 확인하였고,  $\delta$  2.32 ppm (2H, m, H-22),  $\delta$  3.91 (1H, m, H-6),  $\delta$  6.02 ppm (1H, d, J=15.9Hz, H-24),  $\delta$  6.82 (1H, dt, J=7.3Hz, H-23)의 side chain 부분이 compound I 과 동일하게 나타났다.

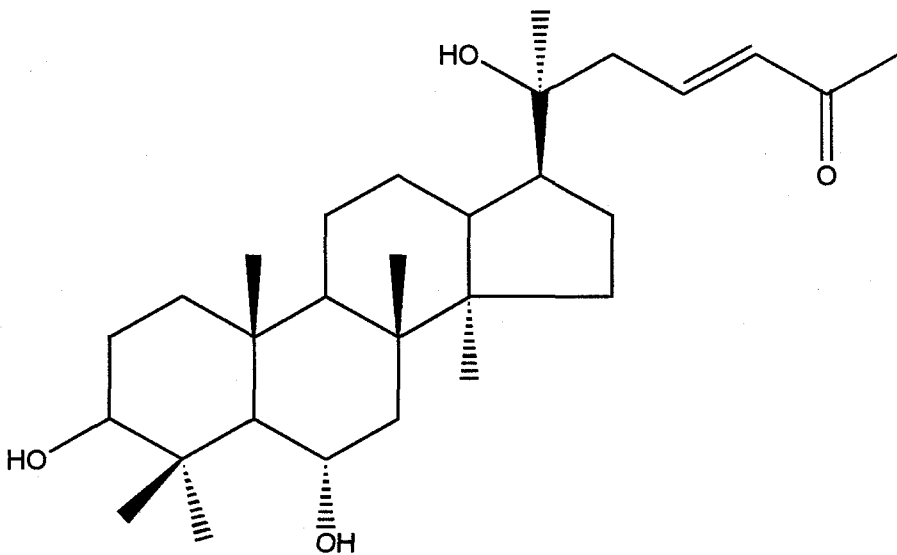


Figure 11. Compound II의 구조

다만, compound II에서는 compound I의 3위치의 carbonyl기에 의한 IR-spectrum 흡수 ( $1710\text{cm}^{-1}$ )가 관찰되지 않았으며,  $^1\text{H-NMR}$ 에서 compound I에서는 볼수 없었던 peak  $\delta 3.12$  ppm (1H, dd,  $J=8.0\text{Hz}$ , H-3)이 관찰되었다. 이는 C3 위치에 hydroxy기가 있는 dammarane type의 compound II에서 나타나는 H-3 peak 와 chemical shift, multiplicity등이 동일하였다. Compound I에서  $\delta 2.72$  ppm (2H, m, H-2)의 peak가 관찰되지 않은 것은 C3위치의 carbonyl기가 hydroxy기로 바뀌면서 upfield shift되어 다른 peak에 겹쳐진 것으로 사료된다.

Compound II에서 수득률이 미량인 관계로  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 찍을 수 없었으나 compound I과 Compound II의 data에서도 비교해 볼 수 있듯이 추정되는 구조로서 compound I의 carbonyl 3위치의 Ketone이 hydroxy기로 바뀐 27-demethyl-20(s)-dammar-23-ene-3 $\beta$ , 6 $\alpha$ , 20-triol-25-one으로 확인하여, 3-dihydrorhombenone으로 명명하였다. Compound I과 compound II는 천연에서 처음으로 분리되는 dammarane 형의 27-demethylnortriterpene 이다.

#### 다. Compound III의 구조

Compound III은  $\text{CHCl}_3$ 에 난용이고 MeOH에 잘 녹는 mp  $128\sim 132^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{25} +22.3$ 인 백색 분말이며 anisaldehyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$  시약에 적자색으로 발색한다.

IR spectrum에서  $3400\text{cm}^{-1}$ 에서 tertiary OH와  $2960$  (aliphatic C-H),  $1100\sim 1000$  (C-O)를 확인할 수 있었으며 compound III은 UV  $\lambda_{\text{max}}$ 에서 특징적인 peak가 없는 것으로 보아 방향족 화합물이 아님을 알 수 있었고, Libermann-Buchard 반응에서 양성으로 나타나서 triterpenoid 물질이 아니라 tetracyclic triterpenoid 물질로 추정할 수 있었고, 또한  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta 76.7$  ppm에 나타나는 4급 탄소는 hydroxy기를 가지고 있는 탄소로 추정되어 compound III은 송악 수피에서 분리된 화합물 중 tetracyclic triterpenoid인 dammarane형 물질로 추정할 수 있었다.

$^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta 0.91$  (3H, S),  $0.93$  (3H, S),  $0.97$  (3H, S),  $1.05$  (3H, S),  $1.12$  (3H, S),  $1.25$  (3H, S),  $1.67$  (3H, S, H-27)에서 singlet으로 나타나는 4급 탄소에 결합한 7개의 methyl기를 확인할 수 있고,  $\delta 5.48$  (1H,

t, H-24), olefinic proton이 나타나고,  $\delta$  3.13 ppm (dd,  $J=8.0\text{Hz}$ , H-3)으로 보아  $\beta$ 위로 연결된 tertiary hydroxy기를 확인할 수 있었으며,  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  129.4 ppm,  $\delta$  134.2에 나타난 olefinic proton peak를 확인할 수 있었고,  $\delta$  76.7 ppm peak는 4급 탄소로서 hydroxy기가 있는 C-20으로 확인하였고  $\delta$  79.8 ppm,  $\delta$  67.6 ppm peak tertiary hydroxy기와 연결된 carbon peak임을 알 수 있었으며,  $\delta$  102.1 ppm에 나타난 peak는 당이 붙은 anomeric carbon임을 확인하였다.

한편  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 anomeric proton은 4.88 ppm에서 나타났으나  $\text{D}_2\text{O}$  peak와 overlap되어 관찰되었다. 또한 결합된 당의 종류를 확인하기 위해 compound III을 산 가수분해하여 glucose, rhamnose, arabinose lactose, fructose의 표준품과 TLC한 결과 결합된 당은 glucose임을 확인하였고  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 당과 연결된 anomeric carbon peak인 102.6과 75.9, 78.2, 71.7, 77.9 62.8 ppm은 6개로 5탄당이며 이 당은 glucose의  $^{13}\text{C-NMR}$  문헌치와 비교한 결과 일치하므로 Compound III은 glucose, 배당체임을 확인하였다.

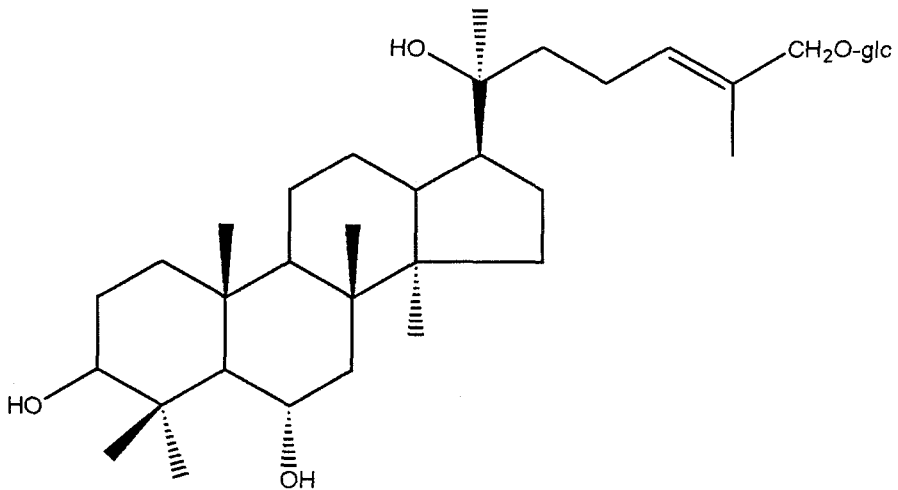


Figure 12. Compound III의 구조

한편 FAB-MS에서  $m/z$  661  $[M+Na]^+$  peak가 나타난 것으로 분자량이 638임을 알 수 있었고  $^{13}C$ -NMR DEPT에서 C, CH,  $CH_2$ ,  $CH_3$  수를 추정해 본 결과 탄소수가 36개로 확인되었고, Compound III은 분자식이  $(C_{36}H_{62}O_9)$ 임을 알 수 있었고,  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR spectrum을 종합하여 문헌치와 비교하여 분석한 결과 20(S)-dammar-24-ene-3 $\beta$ , 6 $\alpha$ , 26triol-26-O- $\beta$ -D-glucopyroside인 Kizutasaponin K<sub>7</sub>로 동정하였다.

### 제 3절 담배풀 유래 화합물의 구조

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

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

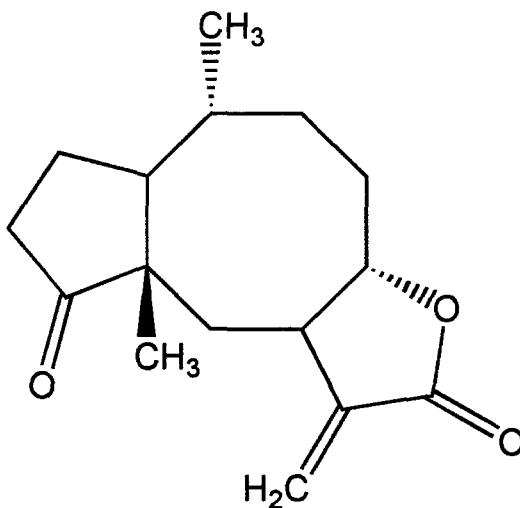


Figure 13. 2,3-Dihydroaromaticin의 구조

$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum를 통해 carbon의 수는 15개로 확인되었고,  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone ring에 기인하는 피크가 45.41 (CH), 81.49 (CH), 120.66 (CH<sub>2</sub>), 140.93 (C) 및 170.45 (O-C=O) ppm에서 관찰되었으며, normal carbonyl에 기인하는 리크가 223.13 ppm에서 관찰되었다.

이상의 data를 토대로 이 활성물질은  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone ring을 가진 sesquiterpene lactone 화합물이며, Home 및 Hetero COSY와 HMBC (참조 Table 9)를 통해 구조를 동정하여 문헌조사를 실시한 결과 2,3-dihydroaromaticin인 것으로 확인되었다. 그리고 이 화합물은 FPTase의 활성을 72  $\mu\text{M}$ 에서 50% 저해를 알 수 있었다.

Table 16. NMR data of 2,3-Dihydroaromaticin (in CDCl<sub>3</sub>)

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



## 제4절 아테미노라이드

### 1. 약속 유래 활성 물질

#### 가. 아테미노라이드의 분리 및 구조결정

약속으로부터 분리된 활성 물질의 이화학적 성질은 다음 표와 같다.

Table 17. 아테미노라이드(Arteminolide)의 이화학적 성질

	A	B	C	D	E
형상	무색고체	무색고체	무색고체	무색고체	무색고체
분자식	C <sub>35</sub> H <sub>42</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub>
분자량					
측정치(M+H)	591.2924	589.2875	589.2791	589.275	591.291
계산치(M+H)	591.2957	589.2801	589.2801	589.2801	591.2957
융점 (℃)	195	198	210		
[α] <sub>D</sub> <sup>CHCl<sub>3</sub></sup>	+25				
가용성	MeOH, Acetone, Chloroform, DMSO				
불용성	Hexane, H <sub>2</sub> O				

Table 17에서 볼 수 있듯이 high resolution Mass Spectrometry로 exact mass가 589.2791 [M+H]<sup>+</sup>이고 이것으로부터 이 화합물의 분자식을 C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub>로 결정하였다. UV 흡광치는 235 nm에서 최대 흡광도를 나타냈으며, IR 스펙트럼에서 3600 (OH), 1758.40 ( $\gamma$ -lactone), 1697.50 (C=C, C=O), 2927 (CH<sub>2</sub>), 1263 (C-O-C) cm<sup>-1</sup> 등의 흡수 띠를 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR 분석에서 40개의 수소 (H)를 확인하였으며,  $\delta$  5.31 (1H)에서 Exocyclic  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone의 특징인 두 개의 doublet signal이 관찰되었다. 또한  $\delta$  2.32 (3H, s),  $\delta$  2.40 (3H, s),  $\delta$  1.48 (3H, s),  $\delta$  1.22 (3H, s),  $\delta$  1.83 (1H, d),  $\delta$  5.83 (1H, d),  $\delta$  6.15 (1H, brdq),  $\delta$  6.19 (1H, dd)는 4개의 olefinic protons으로 확인하였다. <sup>13</sup>C-NMR 분석 결과 35개의 탄소를 갖고 있음을 확인하였다. 아래 Table의 결과와 같이 DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) NMR을 분석하여 CH가 11개, CH<sub>2</sub>가 5개, CH<sub>3</sub>가 6개 그리고 그밖에 사급탄소 13개를 확인할 수 있었다. 이상과 같은 결과를 종합하여 FPTase의 저해제 아테미노라이드는 C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub>의 분자식을 갖는 dimeric sesquiterpene lactone의 물질임을 확인하였다. <sup>1</sup>H-와 <sup>13</sup>C-NMR 그리고 HMBC, NOESY의 분석 결과는 다음 표에 요약하였다.

Table 18. <sup>13</sup>C-NMR and DEPT assignment of Arteminolide A.

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

한 개 또는 두 개의 탄소를 건너서 수소와의 상호작용을 알 수 있는 HMBC 스펙트럼 분석에서 C-3, C-4, 그리고 C-5는  $\delta$  2.32에서의 Methyl proton과 원거리

상호작용을 보여 주었다.  $\delta$ 6.19 (1H, dd)의 Olefinic protons은 C-1, C-2, C-4, C-5와 원거리 상호작용을 보여 주었다. 또한, C-14'의 Methyl proton은 C-11, C-3', C-4', C-5'와 강한 상호작용이 있음을 확인하였다. 위에서 확인된 부분구조를 연결하고 사급탄소를 배치함에 의해서 두 개의 Sesquiterpene lactone이 연결된 구조임을 확인할 수 있었다. 다음 그림은 이를 도식화한 것이다.

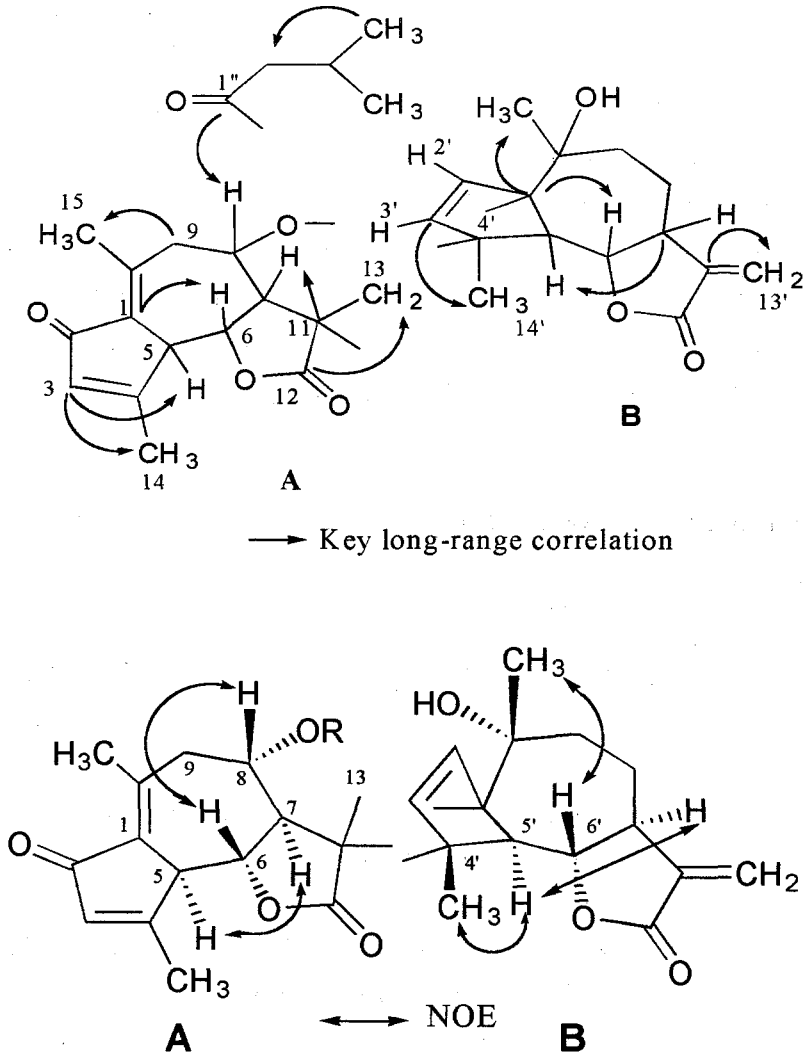
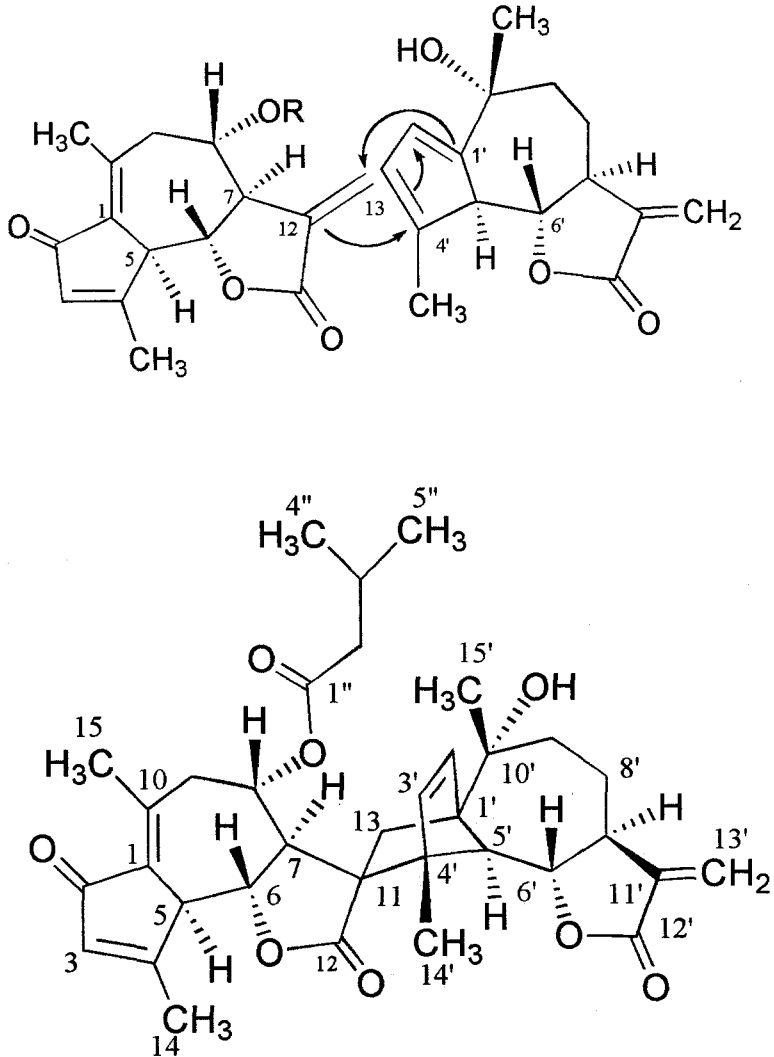


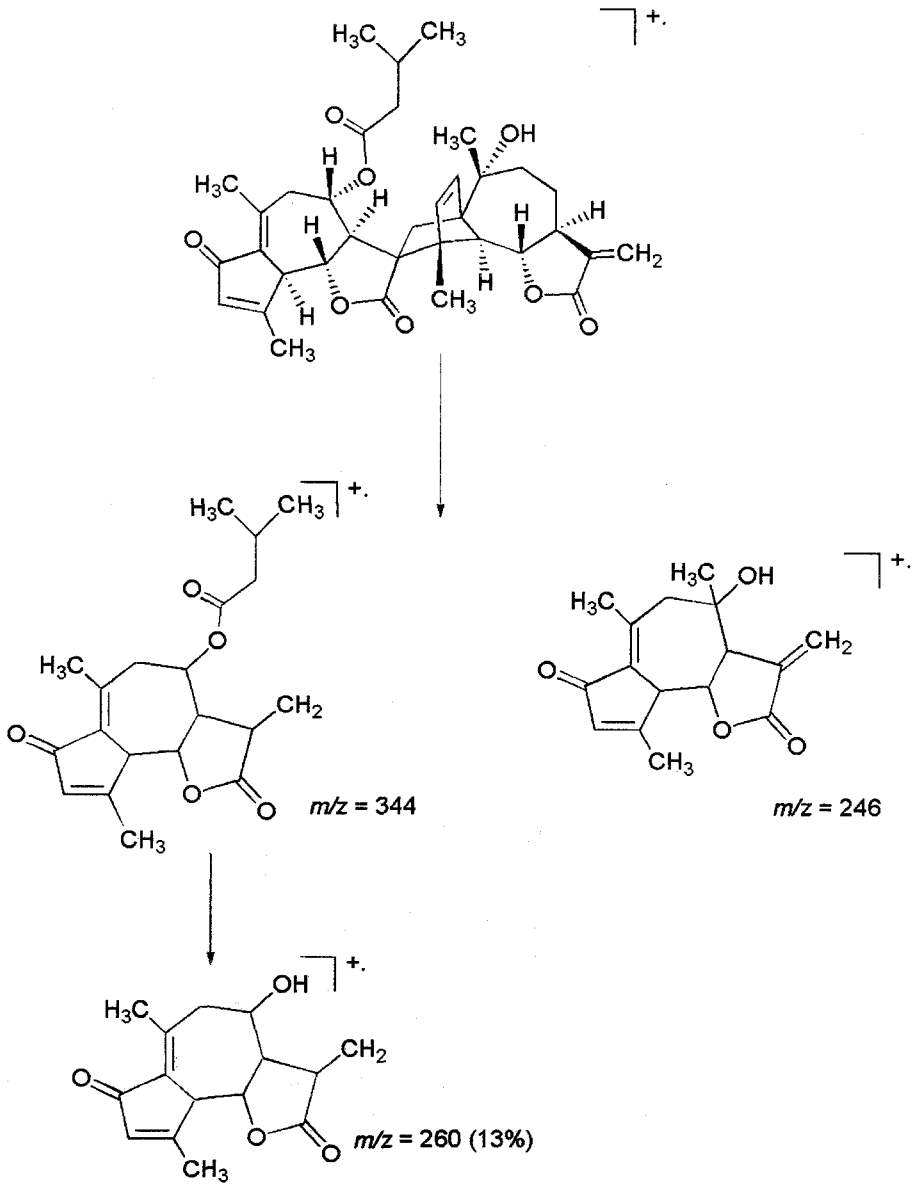
Figure 14. Arteminolide A의 HMBC와 NOE 스펙트럼 분석에 의한 구조

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

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



앞의 구조는 질량분석기의 분석에 의해서도 확인하였다.



약속에서 분리된 활성물질들의 구조는 다음과 같다.

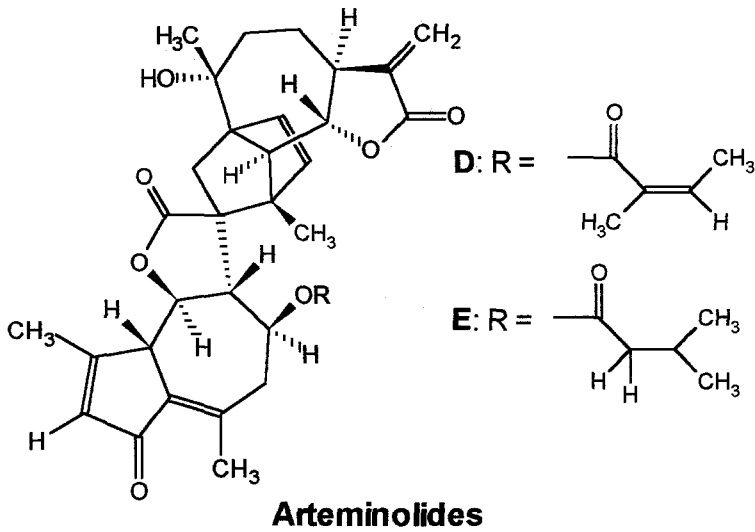
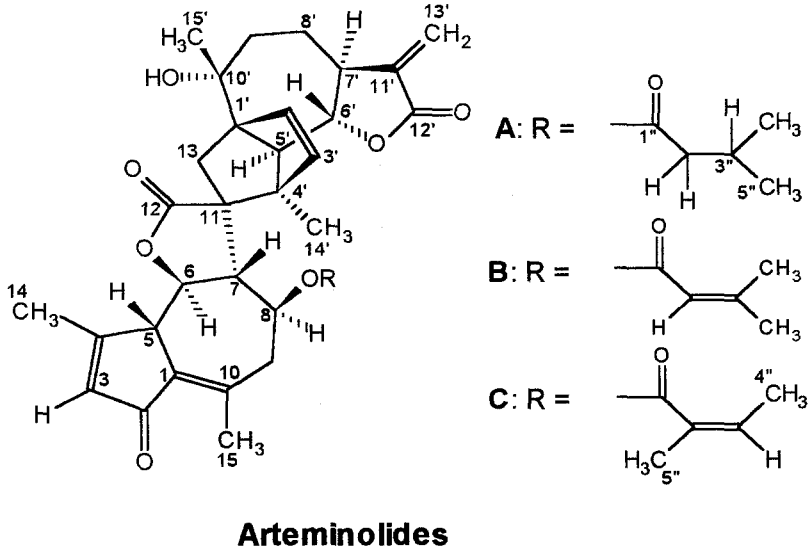


Figure 15. Arteminolides의 최종 구조의 결정

Table 19. NMR Assignments for Arteminolide A

#	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	HMBC	NOESY
1		134.12		
2		194.79		
3	6.19 (dd, J=1.5, 1.0 Hz)	136.21	1, 2, 4, 5	
4		170.05		
5	3.29 (brd, J=10.3 Hz)	51.98	4, 6	7
6	4.04 (dd, J=10.7, 10.3 Hz)	80.25		8
7	2.79 (dd, J=10.7, 10.7 Hz)	59.55	6, 8, 11	5
8	4.87 (ddd, J=10.7, 10.7, 2.4 Hz)	67.81		6
9	2.54 (dd, J=12.7, 10.7 Hz)	44.82	1, 8, 10, 15	
	2.34 (dd, J=13.2, 2.5 Hz)			
10		143.87		
11		61.23		
12		178.50		
13	2.59 (d, J=11.2 Hz)	40.51	12, 1', 2'	
	1.85 (d, J=11.2 Hz)			
14	2.32, s	20.31*	3, 4, 5	
15	2.40, s	20.52*	1, 9, 10	
1'		63.00		
2'	5.65 (d, J=5.9 Hz)	137.68	1', 3'	
3'	5.83 (d, J=5.4 Hz)	136.00	1', 2'	
4'		58.02		
5'	3.06 (d, J=10.3 Hz)	66.64	1', 2', 3', 6', 7'	7', 14'
6'	3.98 (dd, J=9.8, 9.8 Hz)	79.18		
7'	3.28, m	43.13		4', 14'
8'	2.22, m	23.59		
	1.40, m			
9'	1.82, m	34.69		
	1.73, m			
10'		72.58		
11'		140.63		
12'		170.32*		
13'	6.05 (d, J=3.4 Hz)	118.67	7', 12'	
	5.31 (d, J=2.9 Hz)			
14'	1.48, s	17.02	11, 3', 4', 5'	7', 4'
15'	1.22, s	29.69	1', 9', 10'	
1''		165.75		
2''		127.44		
3''	6.15 (brdq, J=1.5, 7.3 Hz)	139.99	1'', 5''	5''
4''	2.03 (dq, J=7.3, 1.5 Hz)	15.99	1'', 2'', 3''	
5''	1.83, (brq, J=1.5 Hz)	20.52	1'', 2'', 5''	3''

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



Arteminolide C

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

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

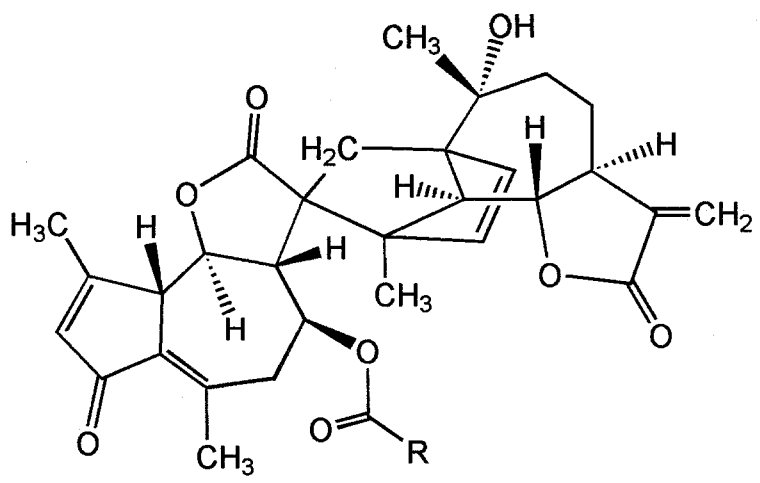
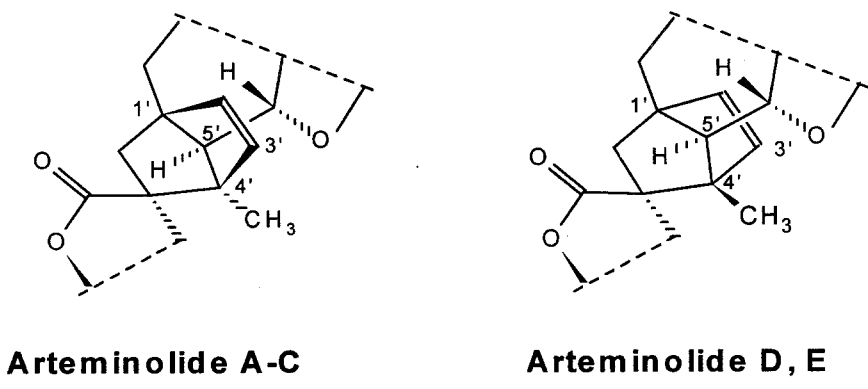


Figure 16. Arteminolide D, E 의 구조

Table 20. NMR Assignments for Arteminolide D,E

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

Arteminolide E

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

여 백

# 제 5 장 활성 물질의 *In vitro* 및 *In vivo* 활성

## 제 1절 계피유래 물질

### 1. 효소저해활성

다음 그림에서 보듯이 파넬실 전달 효소에 대한 저해 활성은 강하지는 않은 것으로 확인되었다. 흥미있는 것은 식용자원에서 항암 활성을 가진 물질이 분리되었다는 것이다.

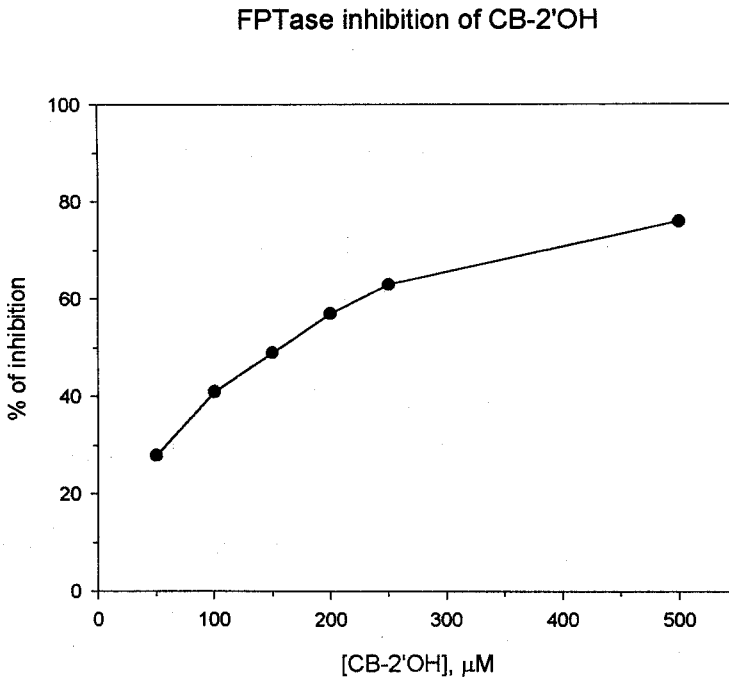


Figure 17. 시남알데하이드의 FPTase 저해 효과

## 2. 암 세포주에서 시남알데하이드의 항암활성

2'-Hydroxycinnamaldehyde 관련 유도체를 lung, ovary, skin, CNS, colon cancer cell line에서 *in vitro* 항암 활성을 검정하였다 (Table 11). 모든 유도체들은 공통적으로 lung cancer cell line에서 ED<sub>50</sub>가 10 µg/ml 이상으로 항암활성이 없었다. 효소 저해활성때와 마찬가지로 2-hydroxy cinnamic acid, 2-hydroxy cinnamic acid methyl ester, 2-hydroxy cinnamic alcohol은 모든 cell line에서 ED<sub>50</sub>가 10 µg/ml 이상으로 항암활성이 없는 것으로 관찰되었다. 2-hydroxy cinnamaldehyde는 lung을 제외한 모든 cell line에서 항암활성을 보였으며, 특히 colon cancer cell line에서 ED<sub>50</sub>가 0.6307 µg/ml로 높은 활성을 보였다.

Table 21. ED<sub>50</sub> of the 2-hydroxy cinnamaldehy dederivatives (µg/ml)

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

2위가 hydroxyl기 (OH), chloro기 (Cl), methylcarboxyl기 (COOCH<sub>3</sub>), methoxy기 (OCH<sub>3</sub>)로 치환된 compound를 비교해 보면 methoxy기 (OCH<sub>3</sub>)로 치환된 compound는 모든 cell line에서 ED<sub>50</sub>가 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상으로 항암활성이 없었고, 2위가 hydroxyl기 (OH)로 치환된 compound가 모든 cell line에서 항암 활성이 가장 높았다.

FPTase 저해 활성에서 3위가 hydroxyl기 (OH)로 치환된 경우 2위가 hydroxyl기 (OH), chloro기 (Cl), methylcarboxyl기 (COOCH<sub>3</sub>)로 치환된 compound에 비해 저해활성이 거의 없는 것으로 나타났으나, skin, colon cancer cell line에서 2위가 chloro기 (Cl)로 치환된 compound와 비슷한 항암 활성을 가진 것이 특징이었다.

### 3. *In vivo* 활성 검증 및 독성

동물에서의 항암활성 효과를 측정하기 위하여 계피 유래 물질인 CB-OH를 대상으로 Nude mice를 이용한 항암 활성 검증하였다.

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

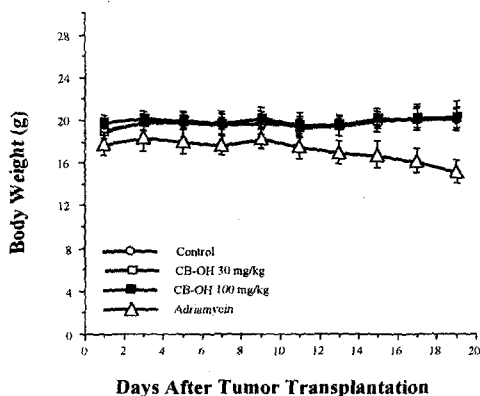
#### 가. CB-OH에 의한 누드마우스 몸무게 변화

NCI-H23 인체 암 세포주를 nude mouse에 이식 한 후 시료와 adriamycin을 처리하였다. 19일 동안 nude mouse의 몸무게 변화를 관찰하였다. 최종일의 결과를 비교하면 양성대조군인 adriamycin에 의해서는 15%의 체중의 감소가 있었으나, CB-OH의 처리에 의해서는 몸무게의 감소가 관찰되지 않았다. 즉, 이를 토대로 하여 이들 물질은 급성 독성이 없는 화합물임을 알 수 있었다.



SW-620 인체 암 세포주를 nude mouse에 이식 한 후 시료와 adriamycin을 처리하였다. 19일 동안 nude mouse의 몸무게 변화를 하루 간격으로 관찰하였다. 최종일의 결과를 비교하면 양성대조군인 adriamycin에 의해서는 14%의 체중의 감소가 있었으나, CB-OH 및 CB-PH의 처리에 의해서는 몸무게의 감소가 관찰되지 않았다. 상기와 같이 체중감소가 없음은 이들 물질이 급성 독성이 없는 화합물임을 증명하는 것이다.

Body weight changes of nude mice xenografted with NCI-H23



Body weight changes of nude mice xenografted with SW620

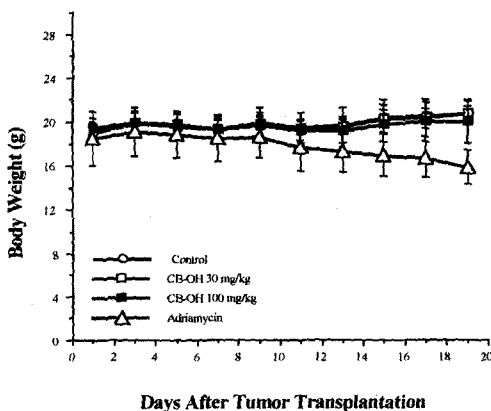


Figure 18. CB-OH에 의한 누드마우스 몸무게 변화

나. CB-OH에 의한 종양크기 변화

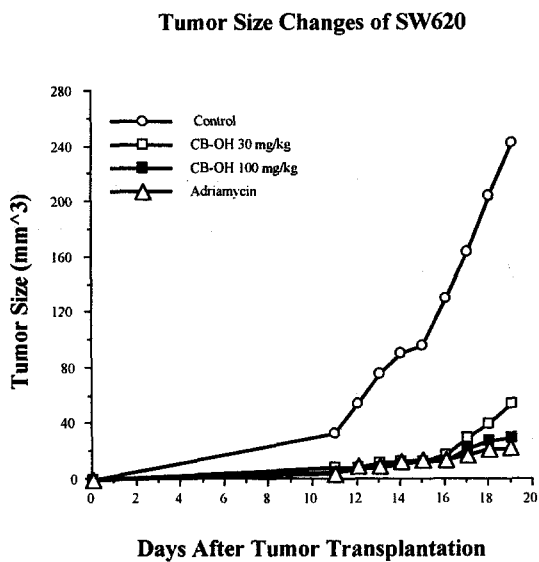
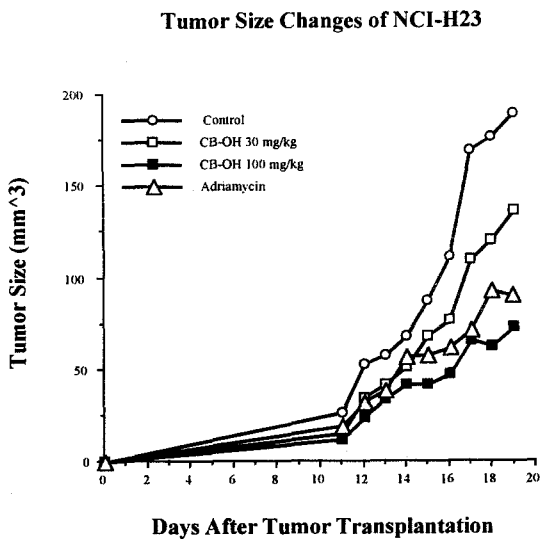


Figure 19. CB-OH에 의한 누드마우스 종양크기 변화

NCI-H23을 이식한 후 11일째부터 종양의 크기변화를 측정하였는데 그 결과는 Figure 19에 나타내었다. CB-OH 시료를 30 mg/kg의 농도로 처리할 경우 NCI-H23 종양의 크기가 29% 감소했으나 통계적으로 유의하지 않았으며, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 49%의 유의성 있는 감소를 나타냈다.

SW620을 이식한 후 11일째부터 종양의 크기변화를 측정하였는데 그 결과는 Figure 19에 나타내었다. CB-OH 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 SW620 종양의 크기가 각각 78%, 88%정도 유의성 있게 감소했다.

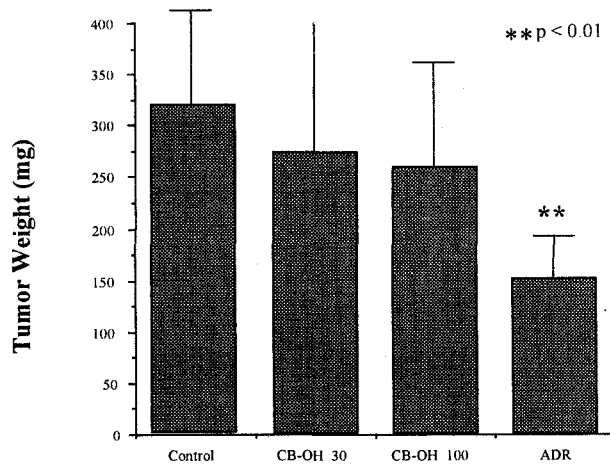
#### 다. CB-OH에 의한 종양무게 변화

종양이식 후 19일째 NCI-H23을 절제하여 그 무게를 측정하였는데 그 결과를 다음 그림에 요약하였다. CB-OH를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 NCI-H23 종양의 크기가 각각 11%, 16% 감소했으나 통계적으로 유의하지 않았다.

CB-OH를 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 종양크기가 감소한 듯 나타났으나, 최종 종양의 무게는 감소하지 않았다. 양성대조물질인 adriamycin 처리군은 통계적으로 유의한 항암효과가 있었는데 약 51% 정도 종양의 성장을 억제했다 ( $p < 0.01$ ).

종양이식 후 19일째 SW620을 절제하여 그 무게를 측정하였는데 그 결과를 다음 그림에 요약하였다. CB-OH 시료를 30, 100 mg/kg의 농도로 처리할 경우 NCI-H23 종양의 크기가 각각 76%, 78% 정도 유의성 있게 감소했다 ( $< 0.001$ ).

### Tumor Weight of NCI-H23 (Day 19)



### Tumor Weight of SW620 (Day 19)

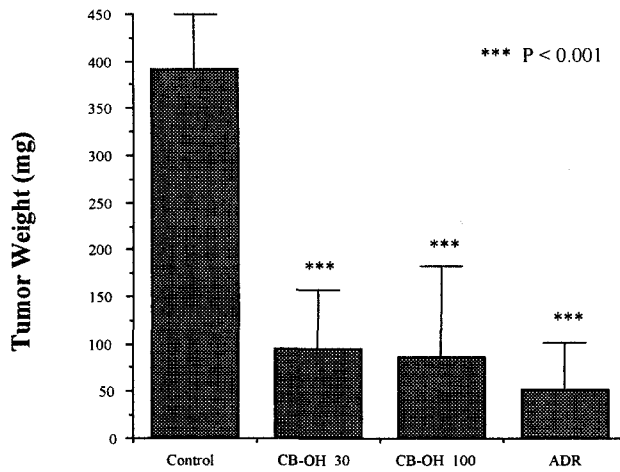


Figure 20. CB-OH에 의한 종양무게 변화

## 제 2절 약속 유래 물질

### 1. 효소 저해 활성

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

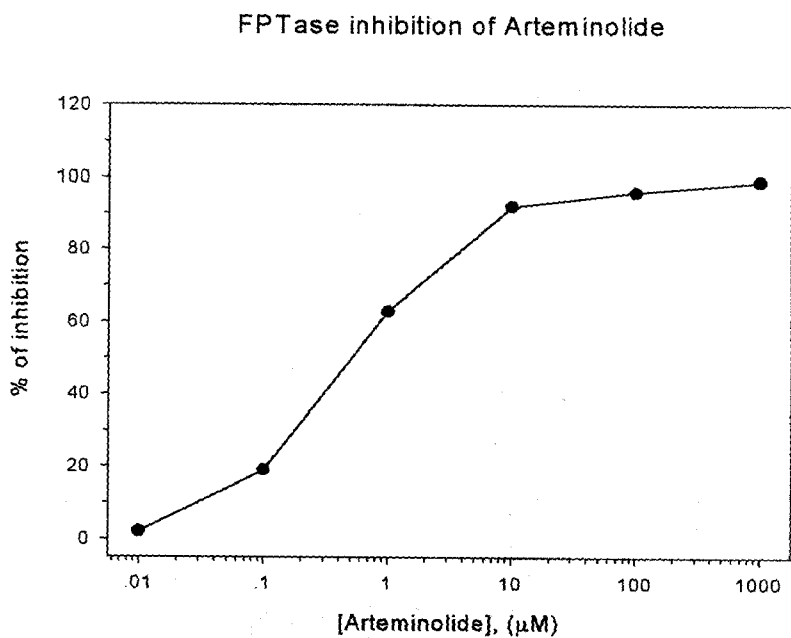


Figure 21. Arteminolide에 의한 FPTase의 저해활성

## 2. Proliferation Assay

아테미노라이드는 다음 그래프에서 볼 수 있듯이 농도에 의존하여 *ras*-transformed cell의 성장을 선택적으로 억제하고 있음을 볼 수 있으며 적은 세포독성을 나타냄을 알 수 있다.

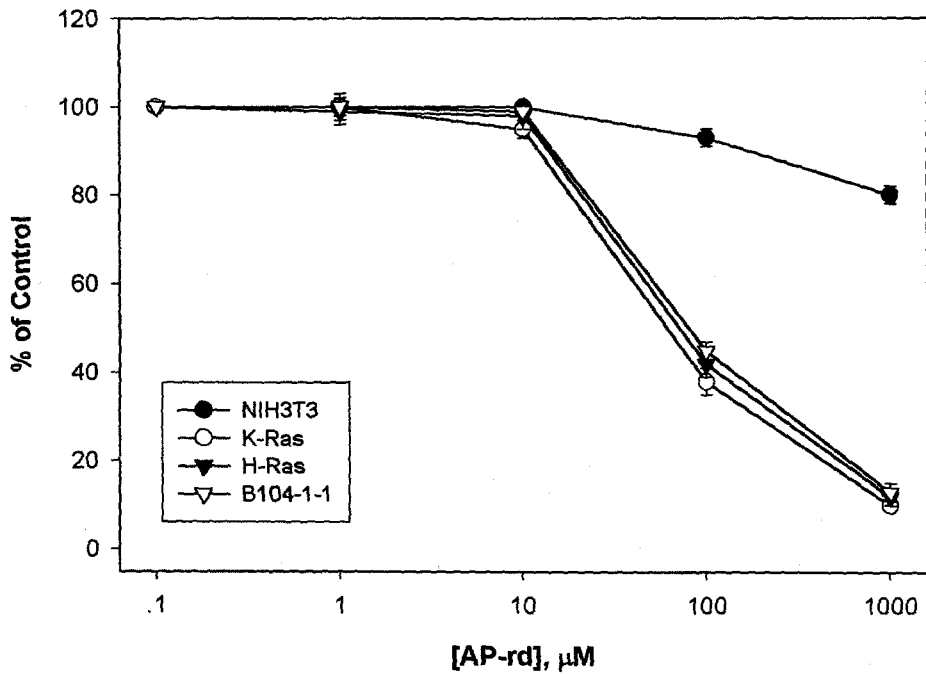


Figure 22. Arteminolide에 의한 *ras*-transformed cell의 성장억제

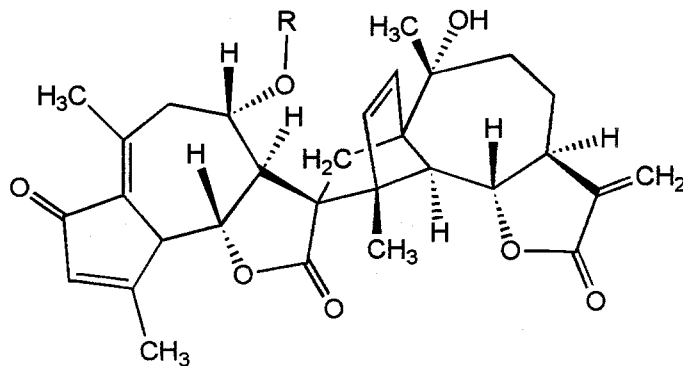
### 3. 아테미노라이드의 항암활성

Table 22. Net Growth as Percent of Control

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

### 4. 라스 단백질의 원형질막 결합 저해활성

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



Arteminolides

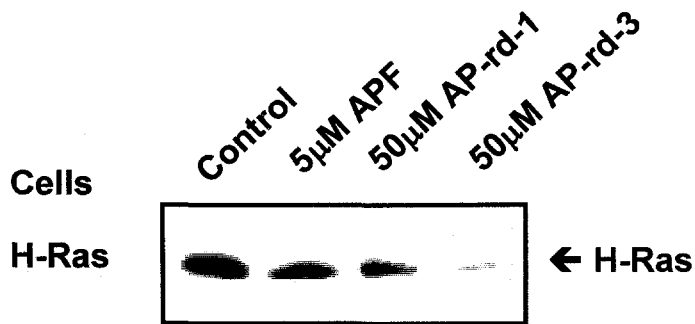


Figure 23. 라스 단백질의 원형질막 결합 저해활성

## 5. Cell Cycle Analysis

Table 23. Effect of Arteminolide on Cell Cycle Progression of MCF-7

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



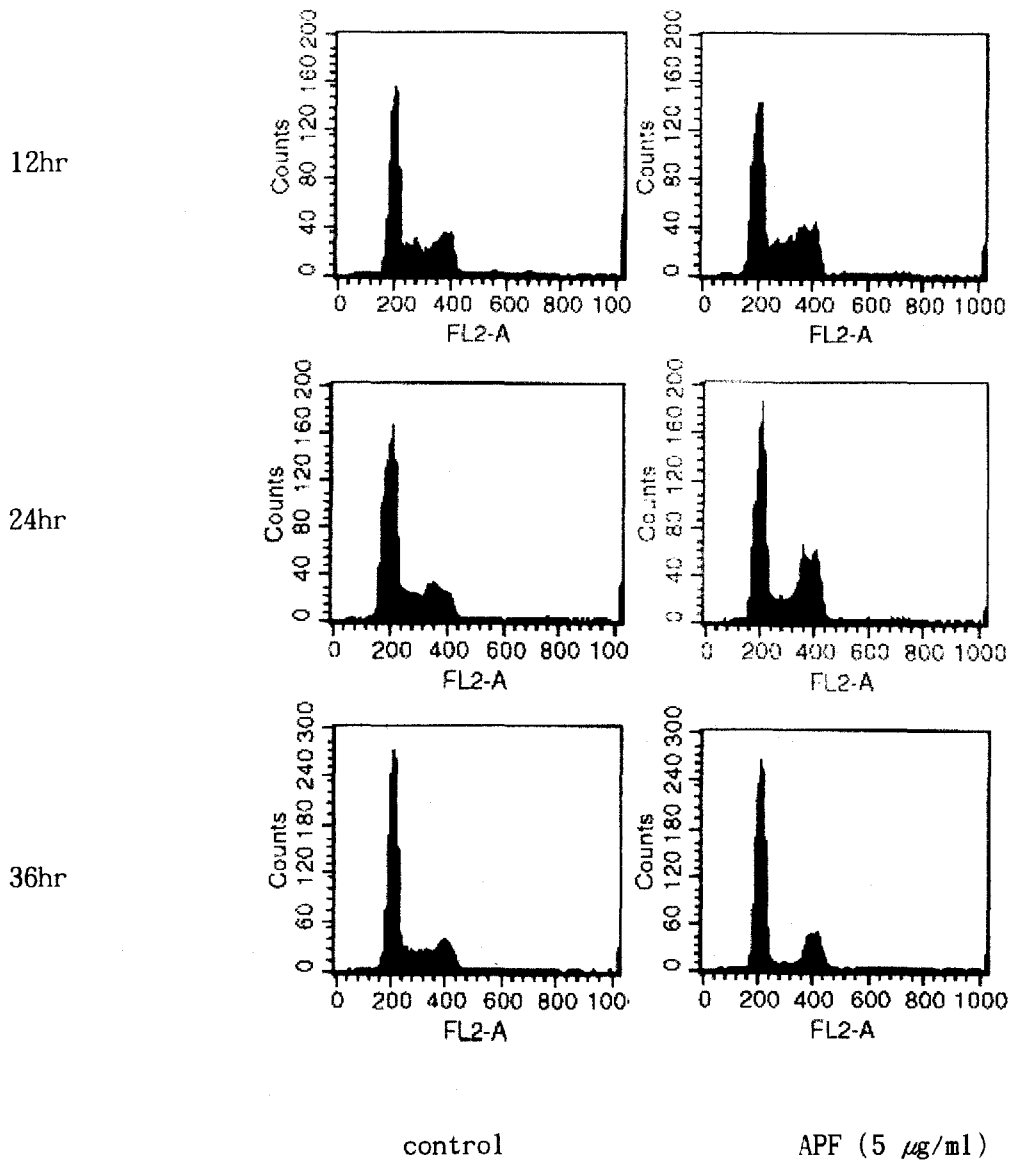


Figure 24. Arteminolide에 의한 MCF-7 cells의 세포주기 저해 활성

## 6. *In vivo* 활성

인체 세포주 중에서 라스가 활성화되어있는 폐암 세포주 NCI-H23 그리고 결장암 세포주 SW-620을 nude mouse에 이식한 후 복합성분의 약썩 추출물 및 단일성분의 아테미노라이드를 복강내 투여하여 항암활성을 관찰한 결과 우수한 활성이 있음을 확인하였다. 그리고 복합 또는 단일성분을 투여했을 때 체중의 감소 또는 특이한 독성은 관찰되지 않았다. 다음 그림은 단일성분에 의한 항암 활성을 요약한 것이다.

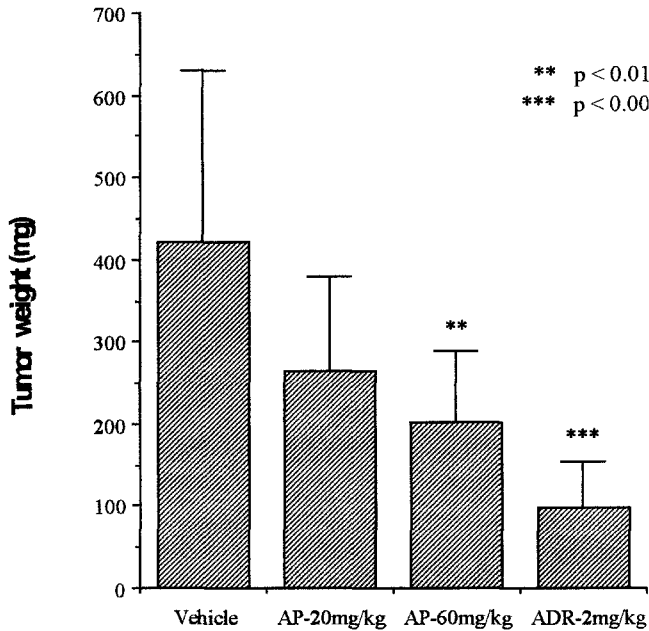


Figure 25. Arteminolides의 *in vivo* 활성 (NCI-H23 tumor)

여 백

## 제 6 장 참고문헌

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

16. Yang, W., Villa, K. D., Urano, J., Mitsuzawa, H., and Tamanoi, F. J. *Cell. Biochem. Supp.* 27, 12-19 (1997).
17. Suzuki, N., Villa, K. D., Tamanoi, F. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10499-10504 (1998).
18. Choi, S. U., Choi, E. J., Kim, K. H., Kim, N. Y., Kwon, B. M., Kim, S. U., Bok, S. H., Lee, S. Y., and Lee, C. O. *Arch. Pharm. Res.*, 19, 6-11 (1996).
19. Seo, Y. W., Rho, J. R., Shin, J. H., Kwon, B. M., Bok, S. H., *Tetrahedron*, 52, 10583-10596 (1996).
20. Son, K. H., Kim, Y. K., Lee, H. W., Lee, W. S., Kim, S. W., Jeong, T. S., Kwon, B. M., Bok, S. H. *Biotechnology Letter*, 18, 1297-1300 (1997).
21. Son, K. H., Hong, S. H., Kwon, Y. K., Bae, K. S., Kim, Y. K., Kwon, B. M., Kim, S. U., Bok, S. H. *Biotechnology Letters*, 20, 149-151 (1998).
22. Sung, N. D., Kwon, B. M., Lim, C. H., Cho, Y. K., *Agric. Chem. Biotechnol.* 41, 218-221 (1998).
23. Lee, S. H., Kim, M. J., Bok, S. H., Lee, H., Kwon, B. M. *J. Org. Chem.* 63, 7111-7113 (1998).
24. Lee, C. W., Hong, D. H., Han, S. B., Park, S. H., Kim, H. K., Kwon, B. M., Kim, H. M. *Planta Medica*, 65, 263-266 (1999).
25. Lee, S. H., Kim, M. J., Bok, S. H., Lee, H., Kwon, B. M. *Tetrahedron*, 56, 4711-4715 (2000).
26. Adjei, A. A., et. al., *Cancer Research*, 60, 1871-1877 (2000).

27. Williams, T.M., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 9, 1263-1280 (1999).
28. Kloog, Y. and Coa, A. D. *Mol. Med. Today* 6, 398-402 (2000).
29. Jansen, B. *et al.*, *J. Mol. Med.* 77, 792-797 (1999).
30. Kloog, Y. *et al.*, *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 8, 2121-2140 (1999).

여 백

## **위탁연구과제**

### **식물자원의 탐색 및 분리정제**

**Isolation and Purification of Biologically  
Active Compounds from Natural Sources**



여 백

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산 자원으로부터 암 예방 및 암 전이 억제 신소재 개발에 관한 연구”과제 (위탁과제 “식물 자원의 탐색 및 분리정제”)의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 12. 27.

위탁연구기관명 : 경희대학교

위탁연구책임자 : 백 남 인

연 구 원 : 방 면 호

연 구 원 : 한 재 택

연 구 원 : 안 은 미

연 구 원 : 장 태 오

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

식물자원의 탐색 및 분리 정제

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근들어 암 발생률이 점점 높아지고 있음에도 불구하고 뚜렷한 치료제가 개발되지 못함에 따라 세계적으로 천연자원으로부터의 항암제 개발에 관한 연구가 대규모로 이루어지고 있다. 현재 약 40여가지의 약제가 항암치료를 위하여 임상에서 사용되고 있는데, 그 중에는 합성에 의한 약제가 주종을 이루고 있으나, vinblastin, vincristine 과 같이 식물로부터 얻어진 알칼로이드나, adriamycin 과 같이 미생물로부터 얻어진 항생제도 항암 치료에 이용되고 있다. 오래 전에 태평양 주목의 수피로부터 분리되었던 diterpene 알칼로이드인 taxol 은 최근에 자궁암에 특히 효과가 있는 것이 밝혀져 임상실험까지 거의 마친 상태이다. 그러나 이러한 약제들은 어느 것이고, 근본적으로 암을 치료한다고 할 수 없으며, 더군다나 두통, 구토, 탈모 등의 부작용을 동반한다. 아직까지는 합성에 의해서건 천연자원으로부터의 분리이건 간에 진정한 의미의 항암제가 개발되어 있지는 않은 상태이다. 따라서 천연 자원으로부터 새로운 골격의 의약품 선도화합물의 개발은 필연적인 시점에 와있다.

천연 식물자원으로부터 새로운 고부가가치를 갖는 기능성 의약품 신물질을 개발하는 일은 국내농업의 새로운 활로를 모색하는 데에 그치는 것이 아니라, 인류의 숙원인 건강한 삶의 실현 및 막대한 경제적 이득을 가져 오게될 것이다. 다행히 우리나라는 국토는 좁지만, 기후적으로나 지형적으로나 식물상이 풍부하여 충분히 항암과 관련된 새로운 기능성을 갖는 식물을

선발할 수 있을 것으로 기대되며, 아울러 효과적인 항암물질의 개발가능성이 높다고 할 수 있다. 또한 본 과제 수행은 여러 다른 분야에도 응용이 가능한 기술의 축적을 가져다 줄 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

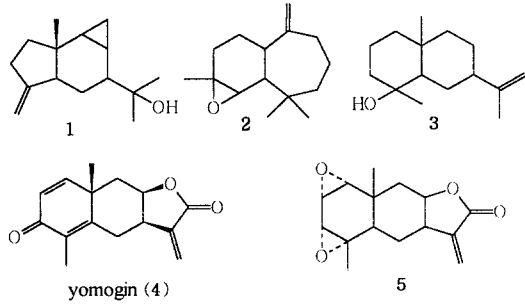
본 연구는 국내산 식물자원에 대하여 항암활성을 검정하고 활성이 확인된 식물자원으로부터 활성물질을 분리하고 구조를 동정함으로써, 부작용이 적으며 효과가 높은 항암제를 개발하기 위하여 계획되었다. 우리 연구팀에서는 400여종의 국내산 식물을 수집하여, 추출물을 제조하였고, 각 추출물에 대하여 항암활성을 검정한 결과 홍화, 두충, 약쑥을 비롯한 수종의 식물에서 유의성 있는 항암활성이 있는 것을 확인하였다. 따라서 각 식물을 대량 추출, 농축, 분획하고, column chromatography하며 활성을 추적함으로써 항암활성물질을 분리, 동정하고자 하였다.

두충잎의 MeOH 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배 추출한 후, Grb2-Shc 결합저해 활성을 측정한 결과 EtOAc 와 *n*-BuOH 분획에서 활성이 인정되었다. EtOAc 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 2종의 화합물을 분리하였고, 각종 spectral data를 해석하여 (-)-olivil 과 quercetin으로 구조를 동정하였다. (-)-Olivil과 quercetin의 Grb2-Shc 결합저해 활성에 있어서의 IC<sub>50</sub>값은 각각 79 와 28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었다.

홍화 MeOH 추출물의 *n*-BuOH 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 2종의 flavonoid 배당체를 분리, 정제하였다. 화합물의 화학구조를 HMBC를 포함한 NMR, MS, IR과 같은 기기분석 결과와 산가수분해반응을 이용하여 결정, 각각 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-glucopyrano- syl] kaempferol 및 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)

$\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol로 동정하였다. 각 화합물은 Grb2-Shc 결합저해활성 ( $IC_{50}$  : 43, 47  $\mu$ g /ml)을 나타내었다.

약속으로부터 Grb2-Shc interactions 저해활성을 갖는 물질을 분리하기 위하여 용매 추출, 분획 및 column chromatography하여 수종의 sesquiterpene 화합물을 분리, 정제하였으며, 각각을 그림과 같이 그 구조를 동정하였다. 각 화합물은 모두 0.3 nM 이하의 농도에서 Grb2-Shc inhibitory 활성에 대하여  $IC_{50}$  값을 나타내었다.



한편, 국내산 식물자원으로부터 새로운 활성 이차대사산물을 분리하여, 항암을 비롯한 여러 가지 활성을 측정함으로써 천연 의약품, 향장품, 기능성 식품첨가제 및 환경친화형 농업용 화합물 개발 기반을 마련하기 위하여, 식용 식물자원으로부터 이차 대사산물의 분리, 동정 연구를 수행하였다.

고구마 괴근을 MeOH 수용액으로 추출하고, 얻어진 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 용매 분획하였다. EtOAc 분획에 대하여 column chromatography를 반복하여 4종의 화합물을 분리하였다. 각 화합물의 화학구조를 NMR, MS 등 스펙트럼 데이터의 해석 및 가수분해, 메칠화 및 아세틸화반응을 적용하여, 수지 배당체, simonin I,  $\beta$ -sitosterol 및 2종의 불포화지방산 화합물로 규명하였다.

달래를 MeOH로 추출하여 이 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O로 분배 추출하였다. *n*-BuOH층을 silica gel (330g) column chromatography하여 2종의 flavonoid 화합물을 분리하였다. 각 화합물에 대한 분석 data 의 해석 및 화학반응을 적용하여 그 화학구조를 3-O-[ $\beta$

-D-glucopyranosyl(1→2)β-D-glucopyranosyl] kaempferol 및 3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→4)β-D-glucopyranosyl] kaempferol로 결정하였다.

이번에 분리, 동정된 식용식물자원 유래의 이차대사산물들에 대하여는 다양한 생물활성을 검정하여 인체에 부작용이 없는 기능성 신물질의 개발에 응용하고자 한다.

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

식물자원으로부터 다음과 같이 항암활성물질을 분리, 동정하였다.

1) 두충으로부터 (-)-Olivil과 quercetin을 분리, 동정하였다.

2) 홍화로부터 3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→2)β-D-glucopyranosyl] kaempferol 및 3-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→6)β-D-glucopyranosyl] kaempferol을 분리, 동정하였다.

3) 약쑥으로부터 yomogin을 포함한 5종의 sesquiterpene 화합물을 분리, 동정하였다.

또한 식용식물자원으로부터 다음과 같이 이차대사산물을 분리, 동정하였다.

1) 고구마로부터 simonin I, β-sitosterol 및 2종의 불포화지방산 화합물을 분리, 동정하였다.

2) 달래로부터 3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→2)β-D-glucopyranosyl] kaempferol 및 3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→4)β-D-glucopyranosyl] kaempferol을 분리, 동정하였다.

상기 결과는 다음과 같이 학술지에 논문을 게재, 발표하였다.

1) 홍화로부터 활성물질의 분리, 한국농화학회지, 41-2 (1998), 197-200

2) 두충잎으로부터 Grb2-Shc 결합저해 활성물질의 분리, 한국생약학회지,

30-2(1999), 202-206.

3) 식용식물자원으로부터 활성물질의 탐색-I. 고구마 괴근 주요성분의 분리, 한국농화학회지, 40-6 (1997), 583-587.

4) 식용식물자원으로부터 활성물질의 탐색-II. 호박잎으로부터 지방산 및 sterol 배당체의 분리, 한국농화학회지, 42-3 (1999), 267-270.

5) 식용 식물자원으로부터 활성물질의 탐색-III. 달래 (*Allium monanthum* Max.)로부터 flavonoid 배당체의 분리, 한국농화학회지, accepted.

6) Grb2-Shc Inhibitory Sesquiterpenes from *Artemisia princeps* P., JSP-KSP Joint Seminar 2000, Chiba, Japan (한일생약대회), p91.

현재 약속에 대한 결과는 독일에서 발간하는 *Planta Medica* 에 투고하기 위하여 논문 작성 중에 있다.

또한 이번에 얻어진 결과를 활용하기 위한 후속 연구계획을 추진하고 있다.



여 백

## SUMMARY

In the course of search for anticancer compounds from natural sources, more than 300 Korean plants were collected and their MeOH extracts were evaluated for anticancer activities. Among plants exhibiting significant activity, *Carthamus tinctorius*, *Eucommia ulmoides* and *Artemisia princeps* were selected for isolation of anticancer compounds.

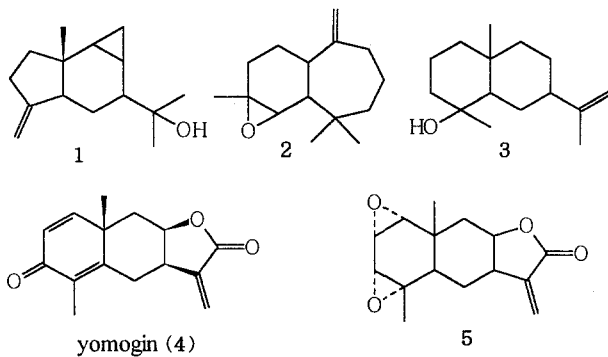
The MeOH extracts obtained from the flower petals of *Carthamus tinctorius* were solvent-fractionated with EtOAc, *n*-BuOH, and H<sub>2</sub>O, successively. From the *n*-BuOH extract 2 flavonoid compounds were isolated through the repeated silica gel column chromatographies. From not only the results of physico-chemical data including HMBC but also the adaptation of acid hydrolysis, the chemical structures of the compounds were determined as 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol and 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol. The compounds exhibited IC<sub>50</sub> values in Grab2-Shc activity to be 43 and 47  $\mu$ g/ml, respectively.

The MeOH extracts obtained from the leaves of *Eucommia ulmoides* were solvent-fractionated with EtOAc, *n*-BuOH, and H<sub>2</sub>O, successively. From the EtOAc extract showing Grab2-Shc inhibitory activity, a flavonol and a lignan compounds were isolated through repeated silica gel column chromatographies. By interpretation of several spectral data and adaptation of acetylation method, the chemical structures of the compounds were determined as 5,7,3',4'-tetrahydroxy- flavonol

(quercetin), and 4,4',8',9-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-cyclo-lignan {(-)-olivil}, respectively. The compounds exhibited IC<sub>50</sub> values in Grb2-Shc inhibitory activity to be 93 and 210  $\mu\text{mole}/\ell$ , respectively.

Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) and Src homologous and collagen (Shc) protein are adaptor proteins containing a Src homology 2 (SH2) domain that mediate the interaction with growth factor receptors or adaptor proteins by binding to specific phosphotyrosine motifs. Grb2 associates with phosphotyrosine sites of the activated receptors or Shc via their SH2 domain to link receptor tyrosine kinases to Ras signalling. This process of activation can lead to run away cell proliferation, differentiation and apoptosis in many kinds of cell types, resulting in diseases including cancer. Thus, blocking of the Grb2-Shc complexes may be led to intervene the oncogenic signal transduction pathways and to develop a new antitumor drug.

*Artemisia princeps* P. (Compositae), exhibiting significant inhibitory activity, was perennial herbaceous plants distributed through all the area of Korea. Its stem and leaves, called as Aeyup in Korean traditional drug prescriptions, has been known to have such effects as antipyretic, analgesic and used for controlling the menstrual irregularity, leucorrhoea, hemoptysis, influenza, bellyache and dyspepsia. Although several sesquiterpenes including yomogin, essential oils composed of monoterpene alcohols, polyenes and phenyl propanoid analogues have been isolated as major components, the



principals manifesting anticancer activity of the drug have not been reported so far. The whole plants (20 kg) were extracted in 80% aqueous MeOH, and

solvent-fractionated using EtOAc, *n*-BuOH and H<sub>2</sub>O. The repeated column chromatographies for EtOAc extracts on silica gel eluting with various solvent systems and acetylation of some fractions resulted in isolation of five sesquiterpenes. Their chemical structures were characterized as figure on the basis of several spectral data including 2-D NMR: HMQC, HMBC and NOESY. Each components were evaluated for Grb2-Shc inhibitory activity to give IC<sub>50</sub>s of smaller than 0.3 mM.

Meanwhile, the development of biological materials from edible plant resources was carried out.

The MeOH extracts obtained from the tuber of *Ipomoea batatas* Lam. were solvent-fractionated with EtOAc, *n*-BuOH, and H<sub>2</sub>O, respectively. From EtOAc fraction four different compounds were isolated through the repeated silica gel column chromatographies. From not only the results of NMR and MS data but also the adaptation of hydrolysis, methylation, and acetylation, the chemical structures of compounds were elucidated as resin glycoside, simonin I,  $\beta$ -sitosterol, and two kinds of unsaturated fatty acids.

From the n-BuOH fractions obtained from MeOH extracts of *Allium monanthum* Max., repeated column chromatographies afforded two flavonoid glycosides. The chemical structures were determined as 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol and 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl], respectively, on the basis of spectral data and chemical reactions. Flavonoid compounds have been reported of several pharmacological activities, and those of *Allium monanthum* may be important principles manifesting useful biological activities.

# CONTENTS

## Chapter 1. Introduction

1. Objective and scope of the research ..... 169

## Chapter 2. Isolation and identification

1. Introduction ..... 173
2. Isolation of Grb2-Shc interaction inhibitors from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. .... 175
3. Isolation and identification of anticancer constituents from the flower of *Carthamus tinctorius*. .... 184
4. Isolation and identification of anticancer constituents from *Artemisia princeps*. .... 190

## Chapter 3. Isolation and identification

1. Introduction ..... 195
2. Isolation of major components from the tuber of *Ipomoea batatas* ..... 197
3. Isolation of flavonoid glycosides from *Allium monanthum* Max. .... 205

여 백

# 목 차

## 제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위 .....	169
--------------------------	-----

## 제 2 장 식물자원으로부터 항암 성분의 분리, 동정

제 1 절 서 설 .....	173
-----------------	-----

제 2 절 두충 잎으로부터 Grb2-Shc 결합저해 활성물질의 분리 .....	175
--	-----

제 3 절 홍화로부터 항암활성 물질의 분리 .....	184
-------------------------------	-----

제 4 절 약쑥으로부터 항암 성분의 분리, 동정 .....	190
----------------------------------	-----

## 제 3 장 식용 식물자원으로부터 활성물질의 분리

제 1 절 서 설 .....	195
-----------------	-----

제 2 절 고구마 괴근의 주요성분의 분리 .....	197
------------------------------	-----

제 3 절 달래로부터 flavonoid 배당체의 분리 .....	205
-------------------------------------	-----



여 백

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 목적과 범위

현대사회에 들어오면서 여러 가지 부정적 요인에 의하여 암 발생률은 점점 높아지고 있으며, 순환기계 질환 다음으로 가장 높은 사망의 요인이 되고 있다. 그럼에도 불구하고 아직도 뚜렷한 치료제나 예방제가 개발되어 있지 못한 상태이다. 몇 가지 암 치료제가 개발되어 사용되고 있으나, 진정한 의미의 치료제라고는 할 수 없고, 다만 치료보조제로서 증상의 완화나 생존기간의 연장효과 정도에 그치고 있다. 게다가 투여에 따르는 여러 가지 부작용이 있어서, 뚜렷한 약효와 적은 부작용을 갖는 암 치료제 및 암 예방제의 개발은 세계적으로도 가장 관심 있는 약제개발의 주제가 되고 있다.

한편, 대부분의 기존 합성의약품은 천연에서 얻어진 물질을 시작으로 하여 만들어지고 있으며, 또한 현재 사용되고 있는 많은 합성의약품에 여러 가지 형태의 부작용이 나타나고 있어서, 천연 자원으로부터 새로운 골격의 의약품 선도화합물의 개발은 필연적인 시점에 와있다.

이미 잘 알려진 바와 같이, UR 발효에 따른 국내 농수산물시장의 개방이 점점 확대되어감에 따라, 정책적 지원에 의존하는 쌀과, 저장 및 유통에 어려움이 있는 몇 가지 채소원예작물을 제외한 거의 모든 농작물은 경쟁력을 기대할 수 없는 실정이다. 특히 80년대말부터 물질 특허 제도가 도입됨에 따라, 물질의 복제가 불허되고, 의약품 원제의 대부분을 외국으로부터의 수입에 의존하는 우리나라의 실정으로서는 천연 자원으로부터 새로운 의약품을 개발하는 일은 절대 절명의 필수과제이다. 항암제의 경우 국내시장 및 세계시장의 규모가 엄청나게 큰 규모를 이루고 있으며, 당분간은 점점 더 확대되어 갈 것임에 틀림이 없다.

따라서 천연 식물자원으로부터 새로운 고부가가치를 갖는 기능성 의약품 신물질을 개발하는 일은 국내농업의 새로운 활로를 모색하는데에 그치는 것이 아니라, 인류의 숙원인 건강한 삶의 실현 및 막대한 경제적 이득을 가져오게 될 것이다. 다행히 우리나라는 국토는 좁지만, 기후적으로나 지형적으로나 식물상이 풍부하여 충분히 항암과 관련된 새로운 기능 성을 갖는

식물을 선별할 수 있을 것으로 기대된다.

기술적으로도 천연자원으로부터 기능성 소재를 개발하기 위하여 유용한 활성검색 방법을 확립하고, 활성물질을 천연자원으로부터 분리하며, 분리된 물질의 분자구조를 밝히는 일은 고도의 기술을 요하는 정밀화학에 속하는 일로, 이러한 첨단기술의 확립은 다른 여러 분야에서도 광범위하게 이용될 수 있을 것이다.

따라서, 식물을 중심으로 천연자원으로부터 새로운 암치료제 및 예방제의 개발은 인류에게 건강하고 질 높은 삶을 제공하고, 농가소득증대의 새로운 방법을 제공하며, 막대한 외화획득을 기대할 수 있는 중요한 과제 중의 하나이며, 여러 다른 분야에도 응용이 가능한 기술의 축적을 가능케 해 줄 것이다.

천연자원으로부터 활성물질의 탐색에 관한 연구는 지금까지는 주로 일본에 의해 주도되어 왔다고 할 수 있으나, 최근 들어 암 발생률이 점점 높아지고 있음에도 불구하고 뚜렷한 치료제가 개발되지 못함에 따라 미국에서도 천연자원으로부터의 항암제 개발에 관한 연구가 NCI 주도하에 대규모로 이루어지고 있다. 현재 약 40 여가지의 약제가 항암치료를 위하여 임상에서 사용되고 있는데, 그 중에는 합성에 의한 약제가 주종을 이루고 있으나, vinblastin, vincristine과 같이 식물로부터 얻어진 알칼로이드나, adriamycin과 같이 미생물로부터 얻어진 항생제도 항암 치료에 이용되고 있다. 오래 전에 태평양 주목의 수피로부터 분리되었던 diterpene 알칼로이드인 taxol은 최근에 자궁암에 특히 효과가 있는 것이 밝혀져 임상실험까지 거의 마친 상태이다. 그러나 이러한 약제들은 어느 것이고, 근본적으로 암을 치료한다고 할 수 없으며, 더군다나 두통, 구토, 탈모 등의 부작용을 동반한다. 아직까지는 합성에 의해서건 천연자원으로부터의 분리이건 간에 진정한 의미의 항암제가 개발되어 있지는 않은 상태이나, 세계 각국에서 수많은 인력과 자금이 투입되어 연구가 이루어지고 있으므로, 가까운 장래에 효과적인 항암제가 개발될 것으로 전망된다.

한편, 지금까지 우리 연구팀에서는 400 여종의 식물에 관하여 항암관련 활성을 검색한 결과, 홍화, 두충을 비롯한 수종의 식물에서 유의성 있는 활성이 있는 것을 발견하였다. 이들 식물로부터 활성을 추적해가며 항암활성물질을 분리, 정제하였으며, NMR, MS 등 기기 데이터의 해석 및 화학반응

을 이용하여 홍화로부터 항암예방 효과를 갖는 flavonoid 배당체를 분리하고 그 구조를 결정하였다. 두층으로부터도 동일한 활성을 갖는 물질을 분리하여 이들 화합물들에 대하여 정확한 활성 및 구조에 관하여 계속하여 연구를 추진중이다. 한편 활성을 가진 것으로 인정된 다른 식물들에 대해서도 활성물질을 추적, 분리 중에 있다.

그러나, 항암제뿐만 아니라 신약을 개발하는 데에는 막대한 자금, 인력과 보통 10여 년 이상의 기간이 소요되어, 일반적으로 1만 번 또는 10만 번의 시도 중에 한 개 정도의 신약이 개발될 수 있다고 한다. 따라서 단기간에 효과를 기대할 수 없기 때문에 그 동안은 우리나라의 연구환경에서는 최종적인 연구성과를 기대할 수가 없었다. 꾸준하고 집중적인 연구투자가 과제성패의 중요한 열쇠라고 할 수 있다.

그럼에도 불구하고 우리나라는 다종다양한 식물자원을 가지고 있으므로 암 질환의 치료제 또는 예방제의 개발에 있어서 유리한 점으로 작용하고 있다. 뿐만 아니라 식물자원의 경우 식용 또는 약용으로 오랫동안 이용되어 왔던 것들이 대부분으로 인체에 독성이나 부작용이 거의 없다고 볼 수 있어 개발에 소요되는 기간이 의외로 단축될 가능성이 충분히 있다. 치료제에 비해 예방제의 경우는 응용의 폭이 넓기 때문에 그보다도 더 기간이 짧아질 수도 있다.

따라서 다음과 같은 내용의 연구를 수행하고자 하였다.

- 국내 식물자원의 수집
- 식물자원의 추출 및 분획물의 제조
- 암치료 및 암예방 물질의 분리
- 암치료 및 암예방 물질의 구조 결정

여 백

## 제 2 장 식물자원으로부터 항암 성분의 분리, 동정

### 제 1 절 서 설

식물자원으로부터 항암물질을 개발하기 위한 연구의 일환으로 국내산 식물 300여종의 MeOH 추출물에 대하여 Grb2-Shc 결합저해 활성을 검색하였다. 활성을 나타낸 식물 중 홍화, 두충 및 약쑥으로부터 Grb2-Shc 결합저해 활성을 가진 flavonoid 화합물을 분리, 동정하였다.

두충 (*Eucommia ulmoides* Oliv.)은 낙엽성 교목으로, 약재로 사용되어 온 부위는 주로 수피인데, 간장과 신장을 좋게 하며, 이뇨작용이 있고, 고혈압에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 혈압강하<sup>3)</sup> 및 이뇨작용<sup>4)</sup>에 관한 연구결과가 보고되어 있고, lignan<sup>5)</sup> 및 iridoid<sup>6)</sup> 화합물이 주요성분으로 분리, 보고되어 있다. 한편 잎은 수피의 대체약물로서의 가능성이 검토되고 있으며, 현재는 차 등 기능성식품의 형태로 소비량이 증가하는 추세이다. 강장, 강정 및 진통효과가 있는 것으로 알려져 있으며,<sup>2)</sup> 강압 및 이뇨작용,<sup>7)</sup> 자양강장<sup>8)</sup> 및 항변이원성<sup>9)</sup>과 관련된 효능연구가 보고되어 있다. 잎으로부터도 iridoid<sup>10)</sup> 화합물 등이 분리되었으나, 이들 성분들의 활성과 관련된 연구는 아직 보고된 것이 없다.

이번에 두충잎으로부터 활성을 추적해가며 Grb2-Shc 결합 저해활성을 갖는 페놀성 화합물을 분리하였고, 화학구조를 구명하였다.

홍화는 1년생 초본식물인 잇꽃 (*Carthamus tinctorius*)의 꽃을 말린 것으로, 예로부터 어혈 등의 치료 및 적황색염료물질의 추출에 이용되어 왔다.<sup>1)</sup> 평활근 수축 및 확장작용, 혈액응고 억제작용 등에 관한 연구보고가 있으며,<sup>1)</sup> 적색물질인 carthamin 관련 화합물,<sup>2,3)</sup> 황색색소인 safflower yellow 관련 화합물<sup>4-6)</sup> 외에도, polyacetylene<sup>7)</sup> 및 steroid<sup>8)</sup> 등이 분리되었다.

홍화로부터 활성본체를 규명하기 위하여 MeOH 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배 추출하였고, 각 분획은 다시 column

chromatography하여 소분획으로 나누었다. 각 분획 및 소분획에 대하여 활성을 추적해가며 column chromatography를 반복하여 2종의 flavonoid 화합물을 분리, 정제하였다. 분리한 물질에 대하여 HMBC와 같은 2D-NMR 기법 등을 포함한 물리화학적 데이터의 해석과 산가수분해 반응을 이용하여 화학구조를 결정하였고, Grb2-Shc 결합저해 활성도 측정하였다.

## 제 2 절 두충 (*Eucommia ulmoides* O.)잎으로부터 Grb2-Shc 결합저해 활성물질의 분리

### 1. 재료 및 방법

활성물질의 분리는 서울 경동시장에서 전남산 두충잎을 구입한 후 풍건한 두충잎 5 kg을 80% MeOH 수용액 7 l로 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 잔사를 같은 방법으로 처리한 후 여액을 합하여 감압 농축하였다. 농축물을 물 (1.2 l)과 EtOAc (1 l x 2)로 분배 추출하였고, 물층은 다시 *n*-BuOH (900 ml x 2)로 분배 추출하였다.

EtOAc 추출물 (EUE)을 silica gel (200 g) column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 15:1→10:1→7:1→5:1)를 실시하여, 45 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 8:1)로 확인하여 유사한 분획끼리 합하고, 농축하여 4개의 분획물 (EUE1~EUE4)을 얻었다. 그 중 2번째 분획 (EUE2)을 다시 silica gel (120g) column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 10:1→7:1)를 이용하여, 4개의 소분획 (EUE2-1~EUE2-4)을 얻었다. TLC 전개 후 황산 분무 가열하였을 때 청회색으로 발색되는 2번째 소분획 (EUE2-2)으로부터 다시 silica gel (50 g) column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 10:1→8:1)하여 lignan 화합물 {1, (-)-olivil}을 763 mg 분리, 정제하였다.

(-)-Olivil (1, 4, 4', 8', 9-Tetrahydroxy-3, 3'-dimethoxy-7, 9'-cycloolignan)  
: A white powder (EtOH), mp 122-123 °C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -24.9° (c=1.12, MeOH), IR  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3370, 1612, 1520, 1280, 1210, pos. FAB/MS (*m/z*) 377 [M+1, C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub> + 1]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>5</sub>-Py..  $\delta$ ) 7.60 (1H, d, *J*=1.7 Hz, H-2), 7.34 (1H, dd, *J*=1.7, 7.9 Hz, H-6), 7.30 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-2'), 7.20 (1H, d, *J*=7.9 Hz, H-5), 7.19 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 7.17 (1H, dd, *J*=1.9, 8.0 Hz, H-6'), 5.30 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-7), 4.34 (1H, d, *J*=9.4 Hz, H-9'a), 4.32 (1H, dd, *J*=6.0, 11.0 Hz, H-9a), 4.24 (1H, d, *J*=9.4 Hz, H-9'b), 4.21 (1H, dd, *J*=6.4, 11.0 Hz, H-9b), 3.82, 3.77 (each 3H, both s, -OMe), 3.54 (1H, d, *J*=13.5 Hz, H-7'a), 3.38 (1H, d, *J*=13.5 Hz, H-7'b), 3.00 (1H, br. d, *J*=5.6 Hz, H-8). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz,



$d_5$ -Py.,  $\delta_c$ ) 148.38 (C-3), 147.92 (C-3'), 147.07 (C-4), 146.19 (C-4'), 135.05 (C-1), 129.67 (C-1'), 123.50 (C-6'), 120.12 (C-6), 115.80 (C-5), 115.68 (C-5'), 114.94 (C-2'), 111.08 (C-2), 84.54 (C-7), 81.76 (C-8'), 77.65 (C-9'), 60.23 (C-9), 55.62, 55.61 (-OMe), 49.58 (C-8), 40.30 (C-7').

또한 TLC 상에서 황산분무 가열하였을 때 황색으로 발색되는 EUE2-3 분획으로부터 silica gel (50 g) column chromatography (*n*-hexane-EtOAc= 1:3)하여 flavonol 화합물 (2, quercetin)을 263 mg 정제하였다.

Quercetin (2, 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavonol : A white powder (CHCl<sub>3</sub>- MeOH), IR $\nu$ (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3425, 1660, 1610, 1505, pos. FAB/MS (*m/z*) 303 [M+1, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub> + 1]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $d_5$ -Py.,  $\delta$ ) 8.54 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-2'), 8.06 (1H, dd, *J*=8.6, 2.4 Hz, H-6'), 7.33 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-5'), 6.70 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.65 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6). <sup>13</sup>C-NMR (100MHz,  $d_5$ -Py.,  $\delta_c$ ) 177.17 (C-4), 165.40 (C-7), 162.32 (C-5), 157.36 (C-9), 147.62 (C-4'), 146.94 (C-2), 146.93 (C-3'), 137.75 (C-3), 123.75 (C-1'), 120.93 (C-6'), 116.50 (x2, C-2',5'), 104.35 (C-10), 99.13 (C-6), 94.19 (C-8).

(-)-Olivil (1)의 아세틸화 - (-)-Olivil (1) 70 mg을 pyridine 5 ml에 녹이고 acetic anhydride 3 ml를 빙냉하에서 적하하였다. 실온에서 15시간 교반시킨 후 반응액을 빙수 (120 ml) 와 EtOAc (100 ml x 3) 로 분배, 추출하였다. EtOAc층을 5% HCl, 포화 NaHCO<sub>3</sub> 및 NaCl 수용액으로 세척하였고, MgSO<sub>4</sub>·anhydrous 로 탈수한 후 여지로 여과하고 감압, 농축하였다. 얻어진 생성물을 silica gel (50 g) column chromatography (*n*-hexane-EtOAc = 1:1) 로 정제하여 (-)-olivil의 triacetate (1a) 91 mg을 정제하였다.

(-)-Olivil-triacetate (1a) : IR $\nu$ (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3502, 1775, 1755, 1615, 1520, EI/MS (*m/z*) 502 [M]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) 7.11 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H-2), 7.00 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5), 6.99 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5'), 6.95 (1H, dd, *J*=8.0, 1.4 Hz, H-6), 6.89 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-2'), 6.82 (1H dd, *J*=8.1, 1.6 Hz, H-6'), 4.75 (1H, d, *J*=6.8 Hz, H-7), 4.39 (1H, dd, *J*=6.2, 11.5 Hz, H-9a), 4.22 (1H, dd, *J*=6.8, 11.5 Hz, H-9b), 3.90 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-9'a), 3.83, 3.82 (each 3H, both s,

-OMe), 3.73 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H-9'b), 3.00 (1H, d,  $J=13.7$  Hz, H-7'a), 2.88 (1H, d,  $J=13.7$  Hz, H-7'b), 2.59 (1H, ddd,  $J=6.8, 6.8, 6.2$  Hz, H-8'), 2.32, 2.31, 2.06 (each 3H, all s, -OAc).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_c$ ) 170.80, 169.11, 169.04 (acetyl-carbonyl), 151.17, 150.95 (C-4, 4'), 140.51, 139.21 (C-3, 3'), 138.77, 135.05 (C-1, 1'), 122.76, 122.57 (C-6, 6'), 122.06, 118.37 (C-5, 5'), 114.29, 110.18 (C-2, 2'), 83.72 (C-7), 81.10 (C-8'), 77.48 (C-9), 62.39 (C-9'), 56.47 (C-8), 55.89, 55.82 (-OMe), 39.55 (C-7'), 20.81, 20.64, 20.64 (acetyl-methyl).

## 2. 결과 및 고찰

Grb2-Shc 결합저해 활성을 보인 두층잎의 MeOH 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배 추출하였다. 각 추출물에 대하여 Grb2-Shc 결합저해 활성을 측정한 결과 EtOAc (EUE) 및 *n*-BuOH (EUB) 분획을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 각각의 저해활성이 73 %와 65 %로 나타났다. (Table I) 활성을 보인 EtOAc 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 TLC상에서 UV를 흡수하며, 황산분무 후 가열하였을 때 청회색으로 발색되는 화합물 1 및 황색으로 발색되는 화합물 2를 분리하였다. 화합물 1은 pyridine 용매하에서 acetic anhydride 로 처리하여 반응시키고, silica gel column chromatography하여 아세틸화합물 1a를 얻었다.

화합물 1은 EtOH로 재결정하였을 때 백색분말로 얻어졌고, IR spectrum (KBr)에서는 수산기 ( $3370\text{ cm}^{-1}$ )와 benzene 환 ( $1612, 1520\text{ cm}^{-1}$ )의 흡수특성을 보였다.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_5$ -pyridine) spectrum에서는 *m, p*-치환기를 갖는 3치환 benzene 환 2개 [ $\delta$  7.60 (d,  $J=1.7$  Hz),  $\delta$  7.34 (dd,  $J=1.7, 7.9$  Hz),  $\delta$  7.20 (d,  $J=7.9$  Hz)],  $\delta$  7.30 (d,  $J=1.9$  Hz),  $\delta$  7.19 (d,  $J=8.0$  Hz),  $\delta$  7.17 (dd,  $J=1.9, 8.0$  Hz)], oxygenated-methylene 2개 [ $\delta$  4.34 (d,  $J=9.4$  Hz),  $\delta$  4.24 (d,  $J=9.4$  Hz)],  $\delta$  4.32 (dd,  $J=6.0, 11.0$  Hz),  $\delta$  4.21 (dd,  $J=6.4, 11.0$  Hz)], oxygenated-methine 1개 { $\delta$  5.30 (d,  $J=8.3$  Hz)}, methoxy 2개 { $\delta$  3.82, 3.77 (each 3H, both s)}가 존재하는 것

이 확인되었다. 또한 1개의 methine { $\delta$  3.00 (br. d,  $J=5.6$  Hz)} 및 geminal coupling 만을 보이는 methylene signal { $\delta$  3.54 (d,  $J=13.5$  Hz),  $\delta$  3.38 (d,  $J=13.5$  Hz)}이 관측되어 이 화합물은 phenol의 dimer 화합물로 추정되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $d_5$ -Py.) spectrum 에서는 모두 20개의 signal이 관측되었는데, 2개의 benzene에서 유래한 12개의 signal이  $\delta_c$  148.38~111.08에서 관측되었고, oxygenated-methine 탄소 1개 ( $\delta_c$  84.54), oxygenated-methylene 탄소 2개 ( $\delta_c$  77.65, 60.23), oxygenated-quaternary carbon 1개 ( $\delta_c$  81.76) 및 methoxy 탄소 2개가 ( $\delta_c$  55.62, 55.61) 관측되었으며, 고자장 영역에서는 methine ( $\delta_c$  49.58) 및 methylene ( $\delta_c$  40.30) 탄소가 각각 1개씩 관측되었다. 따라서 화합물 1은 methoxy를 갖는 phenylpropane 2분자가 결합한 lignan 화합물로 판명되었으며,  $^{13}\text{C}$ - 및  $^1\text{H}$ -NMR의 chemical shift와 coupling pattern을 소상히 검토한 결과 4,4',8',9-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-cycloolignan (olivil)로 화학구조가 결정되었다. 부제탄소인 C-7, C-8, C-8'의 입체배치는  $^{13}\text{C}$ - 및  $^1\text{H}$ -NMR의 chemical shift와 coupling pattern 및 비선광도값 [ $-24.9^\circ$  (MeOH); lit.<sup>11)- $25.2^\circ$  (MeOH), <sup>12)</sup>- $23.9^\circ$  (EtOH)]으로부터 각각 *S*, *R*, *S*로 판명되어 두층의 수피로부터 분리된 (-)-olivil<sup>12)</sup> 또는 *Vladimiria souliei*로부터 분리된 vladinol C<sup>13)</sup>와 동일한 화합물임이 밝혀졌다. (Figure 1)</sup>

(-)-Olivil (1)을 acetic anhydride 로 실온에서 반응시켰을 때 C-8'의 3급 수산기를 제외한 3개의 수산기에 acetyl기가 도입된 화합물 1a가 얻어졌으며, (Figure 1) 이 사실은  $^1\text{H}$ -NMR {400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  2.32, 2.31, 2.06 (each 3H, all s)} 및  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_c$  170.80, 169.11, 169.04, 20.81, 20.64, 20.64)로부터 확인되었고, 그 외의 여러 가지 spectral data도 이 구조를 확인시켜 주었다.

화합물 2는  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 로 재결정하였을 때 백색분말로 얻어졌고, IR spectrum으로부터 수산기 ( $3425\text{ cm}^{-1}$ ) benzene 환 ( $1610, 1505\text{ cm}^{-1}$ ) 및 carbonyl ( $1660\text{ cm}^{-1}$ )의 존재가 확인되었다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (400 MHz,  $d_5$ -Py.)으로부터는 *m*-coupling signal을 갖는 4치환 benzene [ $\delta$  6.70 (d,  $J=2.0$  Hz),  $\delta$  6.65 (d,  $J=2.0$  Hz)]과 *m,p*-치환기를 갖는 3치환 benzene [ $\delta$  8.54 (d,  $J=2.4$  Hz),  $\delta$  8.06 (dd,  $J=8.6, 2.4$  Hz),  $\delta$  7.33 (d,  $J=8.6$  Hz)]이 각각 1개씩 존재하는 것이 판명되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (100 MHz,

d5-Py.)에서 15개의 탄소 signal 이 관측되었는데, 1개의 carbonyl ( $\delta_c$  177.17) 외에 14개의 signal이 모두 olefine 영역 ( $\delta_c$  165.40~94.19) 에서 관측된 점으로부터 flavonol 화합물로 추정되었다. DEPT에서 methine carbon이 5개로 확인되었고,  $^1\text{H-NMR}$ 에서 5개의 수소 signal의 coupling pattern 및 FAB/MS로부터 분자량이 302인 점으로부터 C-5,7,3',4' 에 각각 수산기가 결합한 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavonol (quercetin)으로 구조가 판명되었으며 (Figure 1) 여러 가지 spectral data 가 문헌<sup>14)</sup>과 잘 일치하였다.

화합물 1 및 2에 대하여 Grb2-Shc 결합저해활성을 측정한 결과  $\text{IC}_{50}$  값이 각각 210 와 93  $\mu\text{mole}/\ell$ 로 나타나, 두층을 차로 자주 음용하면 암예방 효과를 기대할 수 있을 것으로 본다.

### 3. 결 론

가. 두층잎의 MeOH 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배 추출한 후, Grb2-Shc 결합저해 활성을 측정한 결과 EtOAc 와 *n*-BuOH 분획에서 활성이 인정되었다.

나. EtOAc 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 2종의 화합물을 분리하였고, 각종 spectral data를 해석하여 (-)-olivil 과 quercetin으로 구조를 동정하였다.

다. (-)-Olivil과 quercetin 의 Grb2-Shc 결합저해 활성에 있어서의  $\text{IC}_{50}$ 값은 각각 79 와 28  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 측정되었다.

여 백

#### 4. 인용 문헌

- 1) Baek, N.-I., Kim, Y.-H., Ahn, E.-M., Bang, M.-H., Nam, J.-Y. and Kwon, B.-M. (1998) Isolation of biologically active compounds from the flower petals of *Carthamus tinctorius* L.. *Agric. Chem. Biotech.* 41:197-200.
- 2) Shanghai Science & Technology Press (1985) Encyclopedia of Chinese Drugs, Vol. 3, 1964-1966, Shogakukan, Tokyo, Japan.
- 3) Chien, T.-H. (1957) Action of the combined administration of *Panax ginseng* var. *notoginseng* Burkill and *Eucommia ulmoides* Oliv. on the blood pressure and respiration of rabbits. *Acta. Scb. Med. Gifu.* 5:480-484.
- 4) 홍남두, 노영수, 원도희, 김남재, 조보선 (1987) 두충나무의 일반약리활성, *생약학회지* 19(2):101-110.
- 5) Deyama, T., Ikawa, T., Kitagawa, S. and Nishibe S. (1987) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. VI. Isolation of a new sesquilignan and neolignan glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* 35:1803-1807.
- 6) Bianco, A., Iavarone, C. and Trogolo, C. (1974) Structure of eucommiol, a new cyclopentenoid-tetrol from *Eucommia ulmoides*. *Tetrahedron* 30:4117-4121.
- 7) Namba, T., Hattori, M., Yie, J.-N., Ma, Y.-H., Nomura, Y., Kaneko, S., Kitamura, Y., Koizumi, T., Katajyama, K. and Lu, W. (1986) Studies on Tu-Chung leaves (I)-Pharmacological effects of the water extracts. *J. Med. Pharm. Soc. Wakan-Yaku* 3:89-97.
- 8) Ma, Y.-H., Yie, J.-N., Hattori, M., Kaneko, S., Nomura, Y., Wakaki, K., Kurashige, Y. and Namba, T. (1987) Studies on Tu-Chung leaves (II)-Effects of long-term administration of the Tu-Chung leaves water extract on rats. *J. Med. Pharm. Soc. Wakan-Yaku* 4:26-34.
- 9) Nakamura, T., Nakazawa, Y., Onizuka, S., Satoh, S., Chiba, A., Sekihashi, K., Miura, A., Yasugahira, N. and Sasaki, Y.F. (1997)

Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extracts of *Eucommia ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice, *Mutation Research* 388:7-20.

10) Bianco, A., Bonini, C., Guiso, M., Iavarone, C. and Trogolo, C. (1978) Iridoids. XXVI. Ulmoside (Aucubigenin-1- $\beta$ -isomaltoside), a new iridoid from *Eucommia ulmoides*. *Gazzetta Chimica Italiana* 108:17-20.

11) Deyama, T., Ikawa, T., Kitagawa, S. and Nishibe, S. (1986) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. III. Isolation and structure of a new lignan glycoside. *Chem. Pharm. Bull.* 34:523-527.

12) Tsukamoto, H., Hisada, S. and Nishibe S. (1984) Lignans from bark of the *Olea* plants. I. *Chem. Pharm. Bull.* 32:2730-2735.

13) Tan, R.X., Jakupovic, J. and Jia, Z.J. (1990) Aromatic constituents from *Vladimiria souliei*. *Planta Med.* 56:475-477.

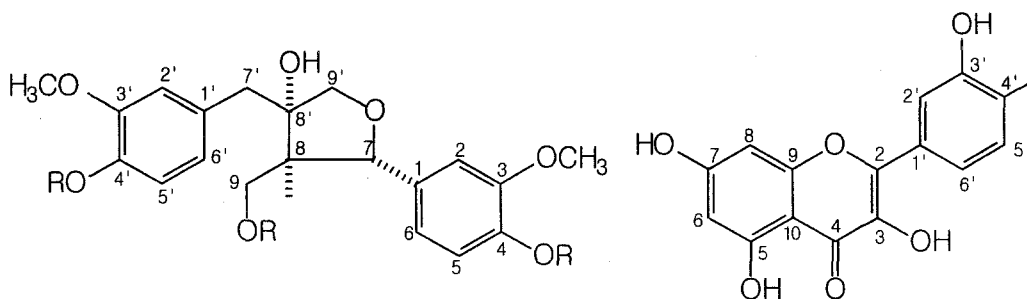
14) Hwang, Y.J., Lee, S.H., Ryu, S.Y., Ahn, J.W., Kim, E.-J., Ro, J.S. and Lee, K.S. (1994) Chemical study on the phenolic compounds from *Gleditsia japonica*. *Kor. J. Pharmacogn.* 25:11-19.

**Table I.** Grb2-Shc interaction inhibitory activity of some fractions obtained from MeOH extracts of *Eucommia ulmoides* leaves

Fractions <sup>a)</sup>	EUE <sup>b)</sup>	EUB <sup>b)</sup>	EUW <sup>b)</sup>
Inhibitory activity (%)	73	65	7

<sup>a)</sup>Concentration of each fraction : 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$

<sup>b)</sup>EUE : EtOAc fraction, EUB : *n*-BuOH fraction, EUW : H<sub>2</sub>O fraction



olivil (1) : R=H

quercetin (2)

olivil triacetate (1a) : R=Ac

**Figure I.** Chemical structures of (-)-olivil (1), its triacetate (1a) and quercetin (2) obtained from the leaves of *Eucommia ulmoides* O.



### 제 3 절 홍화 (*Carthamus tinctorius* L.)로부터 항암활성 물질의 분리

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 활성물질의 분리

경동시장에서 구입한 한국산 (용인) 홍화 3 kg에 80% MeOH 수용액 5 l 를 가하여 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 잔사를 같은 방법으로 처리한 후 여액을 합하여 감압 농축하였다. 농축물을 물 (1 l)과 EtOAc (1 l x 2)로 분배추출하였고, 물층은 다시 *n*-BuOH (700 ml x 2)로 분배, 추출하였다.

*n*-BuOH 추출물을 silica gel (200g) column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = 65:35:10, 아래층)를 실시하여, 7ml 씩 분취하였다. 각 분취액을 TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = 6:4:1) 로 확인하여 유사한 분획끼리 합하고, 농축하여 8개의 분획물을 얻었다. 그 중 5번째 분획을 다시 silica gel (12g) column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = 65:35:10, 아래층)를 이용하여, 5개의 소분획을 얻었다. 2번째 소분획으로부터 silica gel (5g) column chromatography (*n*-BuOH-EtOAc-H<sub>2</sub>O = 15:15:4, 윗층)하여 flavonoid 화합물 (1)을 263 mg 분리, 정제하였다.

Flavonoid 화합물 (1, 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol) : White powder (EtOH-H<sub>2</sub>O), IR<sub>v</sub>(KBr, cm<sup>-1</sup>) 3320, 3025, 2964, 1695, 1630, pos. FAB/MS (*m/z*) 595 [M+1]<sup>+</sup>, HR pos. FAB/MS : Found, 595.1658; Calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>15</sub>, 595.1662, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ) 7.95 (1H x 2, d, *J*=8.9 Hz, H-3',5'), 6.78 (1H x 2, d, *J*=8.9 Hz, H-2',6'), 6.29 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.10 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.03 (1H, d, *J*=8.9 Hz, H-1"), 4.69 (1H, br. s, H-1'"), 3.70-3.18 (sugar moieties), 1.02 (3H, d, *J*=6.2 Hz, H-6'"). <sup>13</sup>C-NMR (100MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_c$ ) 179.68 (C-4), 166.29 (C-7), 163.25 (C-5), 161.77 (C-4'), 159.72 (C-9), 158.81 (C-2), 135.83 (C-3), 132.67 (C-2',6'), 123.04 (C-1'), 116.43 (C-3',5'), 105.96 (C-10), 104.95 (C-1"), 102.71

(C-1''), 100.28 (C-6), 95.23 (C-8), 78.44 (C-3''), 77.49 (C-5''), 76.04 (C-2''), 74.20 (C-4''), 72.60 (C-3''), 72.37 (C-2''), 71.74 (C-4''), 70.01 (C-5''), 68.88 (C-6''), 14.49 (C-6'').

위에서 얻은 4번째 소분획을 다시 silica gel (50 g) column chromatography (*n*-BuOH-EtOAc-H<sub>2</sub>O = 15:15:4, 윗층)를 이용하여 flavonoid 화합물 (2)을 723 mg 분리, 정제하였다.

Flavonoid 화합물 (2, 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol : White powder (EtOH-H<sub>2</sub>O), IR<sub>v</sub>(KBr, cm<sup>-1</sup>) 3325, 3020, 2965, 1699, 1628, pos. FAB/MS (*m/z*) 611 [M+1]<sup>+</sup>, HR pos. FAB/MS : Found, 611.1620; Calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>16</sub>, 611.1611, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ) 7.93 (1H x 2, d, *J*=8.8 Hz, H-3',5'), 6.80 (1H x 2, d, *J*=8.8 Hz, H-2',6'), 6.27 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-8), 6.08 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-6), 5.29 (1H, d, *J*=7.5 Hz, H-1''), 4.67 (1H, d, *J*=7.2 Hz, H-1'''), 3.68-3.20 (sophorosyl moieties). <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_c$ ) 179.94 (C-4), 166.14 (C-7), 163.32 (C-5), 161.78 (C-4'), 159.30 (C-9), 158.74 (C-2), 135.25 (C-3), 132.62 (C-2',6'), 123.11 (C-1'), 116.53 (C-3',5'), 106.10 (C-10), 104.96 (C-1''), 101.42 (C-1'), 100.17 (C-6), 95.04 (C-8), 82.74 (C-2''), 78.45 (C-3''), 78.42 (C-5''), 78.15 (C-3''), 78.09 (C-5''), 75.78 (C-2''), 71.59 (C-4''), 71.38 (C-4''), 62.97 (C-6''), 62.70 (C-6'').

#### 나. 화합물 1 및 2 의 산가수분해

화합물 1 및 2의 각각 10 mg을 3 ml MeOH 에 녹이고 1% HCl/MeOH 1ml 를 가한 후, 2시간 환류하였다. 반응액에 Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 적당량을 가하여 중화시킨 후, 여과하고, 감압 농축하였다. 농축물을 silica gel (50 g) column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 10:1) 로 정제하여 kaempferol을 각각 (3) 3.2 및 3.6 mg 씩 얻었다. 3 : White powder (CHCl<sub>3</sub>-EtOH), <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ) 8.01 (1H x 2, d, *J*=8.5 Hz, H-3',5'), 6.86 (1H x 2, d, *J*=8.5 Hz, H-2',6'), 6.34 (1H, br. s, H-8), 6.17 (1H, br. s, H-6).

다. Grb2-Shc 결합저해 활성 검정

활성검정에 필요한 시약은 Koh<sup>9)</sup> 등의 방법을 따라 제조하였다. Anti-GST 6  $\mu$ g, GST-Grb2 재조합 단백질 1  $\mu$ g, <sup>3</sup>H-phosphopeptide 0.1  $\mu$ Ci, A-SPA bead 10  $\mu$ l, 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4, 250 mM NaCl, 0.1% BSA) 및 5% 활성검정용 시료가 함유된 DMSO 용액을 96-well plate에 가한 후 실온에서 45분간 진탕반응하였다. 반응이 끝난 후, 액체 섬광 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 대조구는 시료 대신에 DMSO 용액만을 가하여 동일한 방법으로 수행하였으며, blank는 GST-Grb2 재조합 단백질을 첨가하지 않고 측정하였다. Grb2-Shc 결합 저해율은 다음과 같이 계산하였다. %Inhibition = 100x[1-{Sample(cpm)-Blank(cpm)} / {Control(cpm)-Blank(cpm)}].

## 2. 결과 및 고찰

천연자원으로부터 항암관련 활성물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 각종 약재의 MeOH 추출물에 대하여 여러 가지 활성을 검색한 결과 홍화의 추출물에서 Grb2-Shc 결합저해 활성이 뚜렷하게 나타났다. 홍화의 MeOH 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배 추출하였고, 그중에서 *n*-BuOH 층에 활성이 집중되었다. *n*-BuOH 추출물을 silica gel TLC 상에서 전개하고 자외선 조사시의 흡수특성과 10% 황산수용액 분무 후, 가열시 황색으로 발색하는 점으로부터 flavonoid 화합물이 주성분인 것으로 판명되었다. 용매를 변화시켜가며 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O, *n*-BuOH-EtOAc-H<sub>2</sub>O) silica gel column chromatography를 반복하여 2종의 flavonoid 배당체인 화합물 1과 2를 분리, 정제하였다.

화합물 2, White powder (EtOH-H<sub>2</sub>O)는 IR spectrum에서 수산기 (3325 cm<sup>-1</sup>) 및 벤젠환 (1628 cm<sup>-1</sup>)의 흡수 peak가 관찰되었다. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)에 있어서 *para*-치환 벤젠환의 특징적인 signal인  $\delta$  7.93 (1H x 2, d, *J*=8.8 Hz),  $\delta$  6.80 (1H x 2, d, *J*=8.8 Hz) 및 *meta*-coupling을 하는 4치환 벤젠의 2개의 proton signal [ $\delta$  6.27 (1H, d, *J*=1.8 Hz),  $\delta$  6.08 (1H, d, *J*=1.8 Hz)]이 관측되어 flavonoid 골격의 존재가 추정되었다. 또한 2개의 anomeric proton signal [ $\delta$  5.29 (1H, d, *J*=7.5 Hz),  $\delta$  4.67 (1H, d, *J*=7.2 Hz)]과  $\delta$  3.68-3.20에서 oxy-methine 또는 oxy-methylene signal 이

다수 관측되어 2분자의 당으로 이루어진 배당체임이 판명되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )에 있어서 비당부 탄소의 chemical shift로부터 flavonol 화합물 중 kampferol인 것으로 판명되었고, 이 사실은 산가수분해 하였을 때 kampferol과 glucose가 얻어진 점으로부터도 확인되었다. 또한 FAB/MS로부터 분자량이 610으로 판명되어 화합물 2는 kampferol에 2분자의 glucose가 결합한 구조로 밝혀졌다. 2분자의 glucose는 chemical shift를 소상히 검토한 결과 sophorose 구조를 갖는 것으로 추정되었다. 한편 HMBC (Fig. 2) spectrum 상에서 peak a (C-3/H-1'')로부터 kampferol의 3번 수산기에 glucopyranose가 결합해 있고, peak b (C-2''/H-1''')로부터 그 당의 2번 수산기에 다른 1분자의 glucopyranose가 결합하고 있는 것을 확인하였다. 2분자의 D-glucopyranose는  $^1\text{H}$ -NMR에서 anomeric signal의 coupling constant가 각각 7.5 Hz 및 7.2 Hz 였으므로 모두  $\beta$ -configuration을 갖는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 화합물 2의 화학구조는 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol로 결정되었다. 화합물 2의  $^1\text{H}$ -NMR 에 있어서의 H-3',5' 와 H-2',6', H-8 과 H-6, H-1'' 과 H-1'''의 판별은 HMBC (Figure 2)로부터 확인하였다.

화합물 1, White powder (EtOH-H<sub>2</sub>O)의 경우도 IR spectrum에서 수산기 ( $3320\text{ cm}^{-1}$ ) 및 벤젠환 ( $1630\text{ cm}^{-1}$ )의 흡수 peak가 관찰되었다.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 및  $^{13}\text{C}$ -NMR (100MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )로부터 비당부는 화합물 2와 유사하였으나 당부분의 signal이 다르게 나타났다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 2개의 anomeric signal [ $\delta$  5.03 (1H, d,  $J=8.9$  Hz),  $\delta$  4.69 (1H, br. s)] 및 doublet methyl signal [ $\delta$  1.02 (3H, d,  $J=6.2$  Hz)]이 관측되어 2분자의 당 중 1개는 6-deoxy당이며, 또한 1C conformation을 취하고 있는 것으로 판명되었다. 산가수분해 했을 때, kampferol 과 glucose 및 rhamnos가 얻어졌고, FAB/MS 로부터 분자량이 594 로 결정되어, 화합물 1은 kampferol에 1분자의 glucose 와 rhamnose 가 결합한 배당체임이 판명되었다. DEPT spectrum으로부터 D-glucopyranose 의 6번 methylene 탄소의 chemical shift가 68.88 ppm으로 확인되어, L-rhamnopyranose가 D-glucopyranose의 6번 수산기에 결합하고 있는 것으로 밝혀졌다. 이상의 결과로부터 화합물 1의 화학구조는 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-glucopyranosyl] kaempferol로 결정되었다.

한편, 화합물 1 및 2에 대하여 Grb2-Shc 결합저해활성을 측정한 결과 IC<sub>50</sub> 값이 각각 43 과 47  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. Nam 등<sup>10)</sup>이 *Streptomyces* 속 으로부터 분리한 actinomycin C<sub>2</sub> 나 VII 에 비하면 활성이 다소 약하였으나, Grb2-Shc 결합 저해활성을 갖는 천연물 유래의 활성물질에 관한 연구 결과가 극히 적은 현 시점에서, 본 연구결과가 관련 연구의 활성화에 기여 하리라고 기대한다.

### 3. 참 고 문 헌

- 1) Shanghai Science & Technology Press (1985) Encyclopedia of Chinese Drugs, Vol. 1, 1360-1362, Shogakukan, Tokyo, Japan.
- 2) Takahashi, Y., N. Miyasaka, S. Tasake, I. Miura, S. Urano, M. Ikura, K. Hikichi, T. Matsumoto and M. Wada (1982) Constitution of two coloring matters in the flower petals of *Carthamus tinctorius* L.. *Tetrahedron Lett.* **23**, 5163-5166.
- 3) Kim, J-B., M.-H. Cho, T.-R. Hahn and Y.-S. Paik (1996) Efficient purification and chemical structure identification of carthamin from *Carthamus tinctorius*. *Agri. Chem. Biotechnology* **39**(6), 501-505.
- 4) Onodera, J-i., H. Obara, M. Osone, Y. Maruyama and S. Sato (1981) The structure of safflomin-A, a component of safflower yellow. *Chem. Lett.*, 433-436.
- 5) Takahashi, Y., K. Saito, M. Yanagiya, M. Ikura, K. Hikichi, T. Matsumoto and M. Wada (1984) Chemical constituent of safflor yellow B, a quinochalcone C-glycoside from the flower petals of *Carthamus tinctorius* L.. *Tetrahedron Lett.* **23**, 2471-2474.
- 6) Onodera, J-i., H. Obara, R. Hirose, S. Matsuba, N. Sato, S. Sato and M. Suzuki (1989) The structure of safflomin C, a constituent of safflower. *Chem. Lett.*, 1571-1574.
- 7) Binder, R. G., R. E. Lundin, S. Kint, J. M. Klisiewicz and C. W. Jr. Anthony (1978) Polyacetylenes from *Carthamus tinctorius*. *Phytochemistry* **17**, 315-317.

- 8) Palter R., R. E. Lundin and G. Fuller (1972) A new steroid from safflower. *Phytochemistry* **11**, 819-822.
- 9) Koh, W.S., S.Y. Yoon, E.K. Lee, B.M. Kwon, J.W. Kim and M.Y. Han (1997) A screening method fo SH2 domain ligands and blockers using a solid phase binding. *Cancer Letters* **120**, 1-7.

## 제 4 절 약쑥 (*Artemisia princeps* P.)으로부터 항암 성분의 분리, 동정

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 약쑥의 용매 추출 및 분획

약쑥 (*Artemisia princeps* P.)을 80% MeOH 수용액으로 실온에서 하루 동안 2회 추출한 뒤, 이 추출물을 여과지로 여과한 후 vacuum evaporator로 45 °C에서 감압 농축하였다. 이렇게 해서 얻은 MeOH 추출물 (2.7 kg)을 *n*-hexane과 H<sub>2</sub>O로 분배 추출하였고, 수층은 다시 EtOAc, *n*-BuOH로 분배 추출하였다. 이렇게 해서 얻어진 각 분획물을 감압 농축하여 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획을 얻었다.

각각의 분획에 대해 준비된 용매가 들어있는 chamber 안에 TLC를 넣어 전개시킨 뒤 전개 된 위치를 연필로 표시하고 건조하여 UV lamp로 형광 또는 흡수가 있는 부분을 표시하였고, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액에 담근 후 건조시켜 알코올 램프로 가열하여 발색되는 양상과 R<sub>f</sub> 값을 확인하였다.

#### 나. EtOAc 분획으로부터 활성물질 분리

EtOAc 분획 (SSE)으로부터 silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 10 : 1 → 8 : 1 → 7 : 1 → 5 : 1 → 3 : 1 → MeOH)하여 분취하였으며 각 분취액을 TLC로 확인하여 유사한 것끼리 합하고 농축하여 8개의 소분획 (SSE-1 ~ SSE-8)을 얻었다.

이들 분획을 TLC로 확인하여 SSE-1, SSE-3,4 분획에 대하여 silica gel column chromatography를 실시하였다.

##### 1) SSE-1분획의 분리

SSE-1 (478 g) 분획에 대하여 CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (15:3:1)를 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 5개의 소분획으로 나누었다. 이

중 첫 번째 화합물을 다시 silica gel column chromatography (*n*-hexane:EtOAc, CHCl<sub>3</sub>:MeOH)와 Acetylation, Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 실시하여 화합물 1, SSE-1-1-1-6-2-Ac-3-1-1 (15 mg), 화합물 2, SSE-1-1-5-4-3-2-2(10 mg), 화합물 3, SSE-1-1-7-1,2-5-1 (13 mg), 화합물 4, SSE-1-1-7-1,2-5-2 (18 mg)을 분리 정제하였다.

화합물 1 : <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 4.71 (2H), 1.74 (3H), 1.11 (3H), 0.88 (3H). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 150, 108.12, 72.20, 46.33, 44.65, 43.35, 41.07, 34.60, 26.85, 26.02, 22.69, 21.04, 20.11, 18.67

화합물 2 : <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 6.18, 4.83, 3.71, 3.48, 3.40, 2.72, 2.50, 2.4 4(3H), 2.40, 2.37 (3H), 2.11 (3H), 1.34 (3H). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 195.07, 176.64, 169.66, 169.48, 144.94, 135.88, 133.21, 81.04, 70.30, 59.08, 51.54, 44.69, 40.65, 21.33, 21.09, 19.86, 14.55

화합물 3 : <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 6.81, 6.27 (2H), 6.25, 5.76, 4.51, 3.12, 3.01, 2.45, 2.30, 1.98 (3H), 1.70, 1.35 (3H), 1.35( 3H). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 185.59, 169.65, 155.24, 154.45, 140.38, 131.18, 126.40, 121.97, 75.34, 41.90, 38.96, 38.56, 29.96, 25.67, 10.79

화합물 4 : SSE-3, 4-6-3-3-1 6.16, 5.64, 4.49, 3.49 (6H), 3.09, 2.97, 2.83, 2.24, 1.88, 1.87, 1.41, 1.20 (3H), 1.06 (3H). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 170.16, 141.40, 120.82, 75.88, 60.56, 56.04, 53.43, 48.02, 40.48, 37.23, 36.24, 33.49, 25.75, 19.51, 17.30

## 2) SSE-3,4 분획의 분리

TLC 결과 SSE-3 분획이 SSE-4 분획과 거의 동일 하므로 둘을 더한 SSE-3,4 (167 g) 분획에 대해 *n*-hexane:CHCl<sub>3</sub> (1:1)의 용매를 사용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 8개의 소분획으로 나누었다. 이중 0번째 소분획과 6번째 소분획을 다시 silica gel column chromatography (*n*-hexane : CHCl<sub>3</sub>:MeOH, *n*-hexane:EtOAc, CHCl<sub>3</sub>:MeOH)와, Acetylation을 실시하여 화합물 5, SSE-3,4-0-1-6 (785 mg), 화합물 6, SSE-3,4-0-3-2-1-4-Ac-3 (20 mg), 화합



물 7, SSE-3,4-0-3-2-4-2-1 (39 mg), 화합물 8, SSE-3,4-6-3-1-1 (18 mg) 및 화합물9, SSE-3,4-6-3-3-1 (87 mg)을 분리 정제하였다.

화합물 5 :  $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 151.93, 113.00, 63.69, 59.70, 51.06, 48.98, 40.02, 39.46, 34.21, 30.50, 30.17, 30.11, 27.51, 21.93, 17.28

화합물 7 :  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 170.92, 139.36, 125.53, 80.63, 70.67, 51.96, 48.78, 47.75, 47.11, 45.26, 39.40, 39.00, 36.37, 35.49, 32.71, 31.56, 29.95, 29.85, 29.70, 28.02, 26.75, 26.43, 25.94, 25.76, 25.38, 21.28, 20.86, 20.08, 19.23, 18.25, 17.98, 15.11

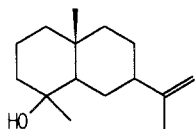
화합물 8 :  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 7.28 (2H), 6.85, 6.34 (2H), 3.85 (3H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 184.05, 166.23 (2C), 158.60, 154.47, 150.83, 146.86, 132.74, 123.60, 120.26, 116.69, 114.09, 105.66, 103.33, 95.23, 61.1

화합물 9 :  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 5.29, 4.52, 3.42, 0.92 (3H), 0.85 (3H), 0.77 (3H), 0.76 (3H), 0.74 (3H), 0.60 (3H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 140.29, 122.15, 99.59, 80.04, 72.85, 71.62, 71.41, 68.44, 62.04, 56.70, 55.98, 50.09, 45.77, 42.27, 39.67, 38.86, 37.14, 36.67, 36.09, 33.87, 31.89, 31.80, 29.39, 29.06, 28.21, 25.95, 24.25, 23.00, 20.99, 19.80, 19.32, 18.98, 18.73, 11.94, 11.81

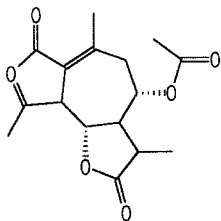
## 2. 결과 및 고찰

약속의 MeOH 추출물로부터 Grb2-Shc 결합을 저해하는 항암 활성이 확인되어 MeOH 추출물을 극성에 따라 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배 추출하였고, EtOAc 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 9종의 화합물을 분리하였다. DEPT,  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $^1\text{H}$ -NMR과 2D-NMR (HMOC, HMBC, COSY)을 이용한 Data 분석을 통해 9종의 화합물의 구조를 동정하였다. 이 중 5종은 sesquiterpene인데 sesquiterpene 화합물 중 3과 4는 FPTase inhibition assay 가 각각 46%, 34%로 나타났다.

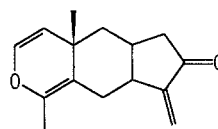
1



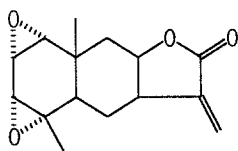
2



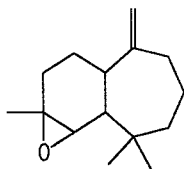
3



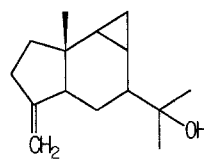
4



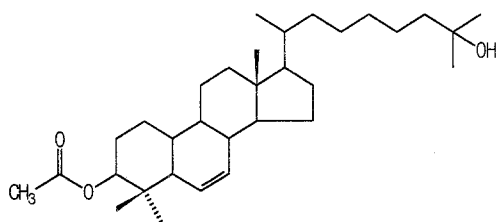
5



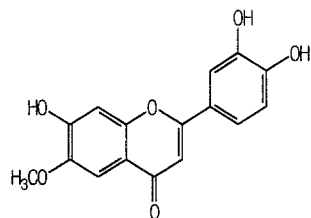
6



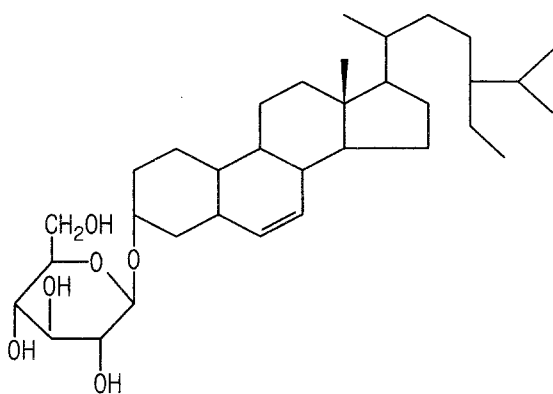
7



8



9



# 제 3 장 식용 식물자원에서부터 활성물질의 분리, 동정

## 제 1 절 서 설

농산물시장이 개방됨에 따라 우리나라 농업의 입지는 심각하게 위협받고 있다. 저임금 또는 대량기계화생산에 의한 값싼 농산물들이 중국, 미국 등지로부터 유입됨에 따라, 그동안 국내에서 재배되던 농작물들 중 전략작물인 쌀이나, 수송 및 저장이 어려운 몇가지 채소를 제외하고는 대부분이 경쟁력을 상실하였다. 그외의 작물들에 대하여는 무공해 재배, 또는 기능성을 첨가하거나 하여 품질을 고급화시킴으로서 그 활로를 모색하고 있다.

한편, 우리가 일상적으로 섭취하는 식품 중에는 영양적인 면에서의 효용뿐만 아니라 인체기능을 향상시키거나 약리화적인 활성을 가지고 있는 것들이 많이 있는 것으로 알려져 있다. 버섯<sup>1)</sup>, 녹황색 야채<sup>2)</sup> 등 몇 가지 식품에 대하여는 그 활성의 본체가 소상히 밝혀진 것도 있으나, 대부분의 식품에 대하여는 영양학적인 가치 이외에는 아직 밝혀진 바가 전무한 실정이다. 따라서 이러한 식품들의 인체에 대한 여러 가지 활성이 밝혀짐에 따라 수요층이 더욱 확대되고, 부가가치가 높아져 농업에 있어서의 주요한 소득작물로 자리잡을 수 있을 것이다.

이러한 관점에서 우리 일상에서 흔히 식용으로 이용되고 있는 식물자원에서부터 활성물질을 탐색하여 새로운 고부가가치의 작물을 개발하기 위한 연구의 일환으로, 고구마로부터 활성물질의 분리를 시도하였다.

중앙아메리카의 열대지방이 원산지인 고구마는 메꽃과(Convulvulaceae)에 속하는 다년생 초본식물로서, 영양소를 괴근의 형태로 저장하며, 줄기는 포복성 덩굴로 되어 있다.<sup>3)</sup> 우리나라에서의 생산량은 약 300만톤 정도로 전라남북도에서 대부분이 생산된다.<sup>4)</sup> 고구마는 식용으로 뿐만 아니라 공업원료나 사료용으로도 쓰이며, 약리활성에 관하여는 체내의 수분을 배설하는 작용이 있어 만성 신염의 증상개선효과가 있고, 백혈병, 당뇨병, 고혈압 등에 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.<sup>5)</sup> 고구마는 전분이 주요성분이나, 활성과 관련있는 2차 대사산물로 지금까지 고구마로부터 분리된 화합물로는

furanosesquiterpenoid 화합물<sup>6)</sup>, carotene계 화합물, resin glycoside<sup>5)</sup> 등이 보고되어 있으나, 활성과 관련지어 연구 보고된 예는 아주 적다. 고구마로부터 활성물질을 분리하기 위하여 고구마 괴근을 MeOH 수용액으로 추출, 농축한 후, 용매 분획하였고, 얻어진 EtOAc분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 4종의 화합물을 분리, 정제하였다. 각 화합물에 대하여 NMR, MS data의 해석과, 가수분해반응, 메칠화 및 아세틸화반응을 적용하여 resin glycoside인 simonin I, oxy-불포화 지방산, 불포화 지방산 ester 및  $\beta$ -sitosterol로 화학구조를 구명하였다.

달래는 백합과 (lillium)에 속하는 다년생 알뿌리 식물로 우리나라 전지역의 산과 들에 자생하고 있다.<sup>1)</sup> 최근에는 특유의 풍미가 있는 향신 채소로서 뿐만 아니라 영양이 풍부한 무공해 자연식품으로 겨울부터 봄철에 걸쳐 수요가 급증하고 있으며, 농가의 소득을 높일 수 있는 새로운 채소로서 각광을 받고 있다. 본 연구는 이러한 관점으로 우리 일상에서 흔히 이용되는 식용식물자원으로부터 활성물질을 탐색하여 부가가치가 높은 농가의 주요한 소득 작물로 자리잡을 수 있도록 하기 위해 실시하였다.

달래는 식용으로 뿐만 아니라 약용으로도 많이 이용되고 있고, 주요 약효로는 살균, 지혈 등이 알려져 있다.<sup>2)</sup> 주요 성분으로는 항균 활성이 있는 것으로 알려진 alliin, methyl alliin, scorodose가 보고되어 있고,<sup>2)</sup> 그 외의 성분에 대해서는 보고된 바가 없기에 달래로부터 2차 대사산물을 분리하여 그것들의 활성을 규명하고자 본 실험을 실시하였다.

## 제 2 절 고구마 (*Ipomoea batatas* Lam.) 괴근의 주요 성분의 분리

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 활성물질의 분리

전라남도 해남에서 생산된 생고구마 괴근 5 kg을 물로 씻은 후 세절하였다. 80% MeOH 수용액 5 l를 가하여 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 잔사를 같은 방법으로 처리한 후 여액을 합하여 감압 농축하였다. 농축물을 물 (1.2 l)과 EtOAc (1 l x 2)로 분배추출하였고, 물층은 다시 *n*-BuOH (800 ml x 2)로 분배, 추출하였다.

EtOAc 분획을 silica gel (13g) column chromatography 하였는데, 용매의 극성을 높여가며 (*n*-hexane-EtOAc=5:1 → 2:1 → 1:2 → CHCl<sub>3</sub>-MeOH=15:1 → 10:1 → 7:1) 용리하였고, 10ml씩 분취하였다. 분취액을 TLC로 확인하여 18개의 분획으로 나누었다. 그중 1번 분획을 다시 silica gel (50 g) column chromatography (*n*-hexane-EtOAc=30:1)하여 지방산 화합물 (1)을 1.72 g 얻었다.

지방산 화합물 (1) : Pale yellow oil, GC/MS : Mass spectrometer - JEOL JMS-AX505WA, Gas chromatography - HP 5890 GC, Column - DB-5 capillary column, Initial temp. - 50°C, Increasing rate - 10°C/min, Final temp. - 280°C(10 min), Injector temp. - 200°C, Separator temp. - 250°C, Ion source temp. - 200°C, Carrier gas - He, Split ratio - 15:1, Rt (Molecular weight, %) - 5' 29" (158, methyl octanoate, 2.5), 15' 28" (270, methyl hexadecanoate, methyl palmitate, 96.8), 15' 50" (294, methyl-3,6-octadecadienoate, 2.4), 17' 5" (294, methyl-9,12-octadecadienoate, methyl linoleate, 100), 17' 29" (298, methyl octadecanoate, methyl stearate, 12.2), 18' 49" (326, methyl arachidate, 6.1). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) 5.26 (3H, m, olefine), 3.58 (3H, s, methyl ester), 2.72 (2H, t-like, *J*=6.4 Hz), 2.22 (2H, dd, *J*=7.6, 7.6 Hz), 1.97 (2H, q, *J*=6.8 Hz), 1.54 (2H, br. t, *J*=6.6 Hz), 1.23-1.18 (methylene), 0.81 (3H, t, *J*=6.8 Hz, terminal methyl). <sup>13</sup>C-NMR

(100MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_c$ ) 173.97 (ester-carbonyl), 129.95, 129.79, 127.88, 127.75 (olefine), 51.17 (methyl ester), 33.90, 31.81, 31.40, 29.59, 29.48, 29.15, 28.98, 28.96, 22.57, 22.45 (methylene), 13.95, 13.90 (terminal methyl).

위에서 얻은 7번 분획을 다시 silica gel (50 g) column chromatography (*n*-hexane-EtOAc=7:2)하여 지방산 화합물 (2, 33 mg) 및  $\beta$ -sitosterol (3, 150 mg)을 분리하였다.

지방산 화합물 (2) : White powder (CHCl<sub>3</sub>-EtOH), mp 83-84°C, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) 5.23-5.34 (4H, m, olefine), 4.08 (1H, dd, *J*=4.4, 11.9 Hz), 4.03 (1H, dd, *J*=5.8, 11.9 Hz, oxy-methine), 2.70 (2H, br. t, *J*=6.5 Hz), 2.28 (2H, dd, *J*=7.6, 7.6 Hz), 1.97 (2H, br. q, *J*=6.8 Hz), 1.56 (2H, m), 1.24-1.18 (methylene), 0.81 (3H, t, *J*=6.8 Hz, terminal methyl). <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_c$ ) 173.90 (carboxyl), 130.19, 129.98, 127.86, 127.72 (olefine), 68.34, 65.02 (oxy-methine), 34.08, 31.90, 31.49, 29.49, 29.25, 27.39, 25.85, 22.63 (methylene), 14.09 (terminal methyl).

$\beta$ -sitosterol (3, 150 mg) : White powder (EtOH), mp 140-141°C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -33° (c=1.2, CHCl<sub>3</sub>), <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) 5.27 (1H, br. d, *J*=5.1 Hz, H-6), 3.45 (1H, m, H-3), 0.94 (3H, s), 0.84 (3H, d, *J*=6.6 Hz), 0.77 (3H, t, *J*=6.8 Hz), 0.76 (3H, d, *J*=6.7 Hz), 0.73 (3H, d, *J*=6.8 Hz), 0.61 (3H, s, methyl). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_c$ ) 140.72 (C-5), 121.67 (C-6), 71.74 (C-3), 56.73 (C-14), 56.03 (C-17), 50.10 (C-9), 45.79 (C-24), 42.29 (C-4), 42.25 (C-13), 39.74 (C-12), 37.23 (C-1), 36.47 (C-10), 36.12 (C-22), 33.91 (C-20), 31.88 (C-8), 31.87 (C-7), 31.60 (C-2), 29.11 (C-25), 28.22 (C-16), 26.04 (C-23), 24.27 (C-15), 23.03 (C-28), 21.06 (C-11), 19.80 (C-26), 19.37 (C-19), 19.01 (C-27), 18.75 (C-21), 11.95 (C-29), 11.83 (C-18).

11번 분획을 다시 silica gel (100 g) column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-EtOH=7:1 → 13:2 → 11:2 → 4:1)하여 11개의 소분획을 얻었으며, 그중 6번째 소분획에 대하여 다시 silica gel (50 g) column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-MeOH=6:1)하여 수지배당체인 simonin I (4, 41 mg)

을 분리, 정제하였다.

Simonin I (4) : White powder (MeOH-H<sub>2</sub>O), mp 118-119°C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -19° (c=1.1, MeOH), <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>5</sub>-Py.,  $\delta$ ) 7.75 (1H, d,  $J$ =16.1 Hz, cinnamoyl-7), 7.64 (2H, m), 7.55 (1H, m), 7.34 (2H, m, cinnamoyl-2,3,4,5,6), 6.46 (1H, d,  $J$ =16.1 Hz, cinnamoyl-8), 6.24 (1H, dd,  $J$ =1.5, 3.1 Hz, H-2'''), rhamnosyl-2), 6.19 (1H, d,  $J$ =1.5 Hz, H-1'''), 6.04 (1H, dd,  $J$ =1.7, 3.6 Hz, H-2''), 6.03 (1H, d,  $J$ =1.7 Hz, H-1''), 5.95 (1H, dd,  $J$ =1.8, 3.0 Hz, H-2''), 5.85 (1H, dd,  $J$ =10.5, 10.5 Hz, H-4'''), 5.50 (1H, d,  $J$ =1.8 Hz, H-1''), 4.73 (1H, d,  $J$ =6.8 Hz, H-1', fucosyl-1), 3.80 (1H, m, H-11, jalapinoloyl-11), 2.44 (2H, ddd,  $J$ =3.5, 7.5, 7.5 Hz, decanoyl-2<sub>a</sub>), 2.30 (2H, ddd,  $J$ =3.0, 7.5, 7.5 Hz, decanoyl-2<sub>b</sub>), 1.73 (3H, d,  $J$ =5.9 Hz, H-6''), 1.68 (3H, d,  $J$ =6.1 Hz, H-6'''), 1.57 (3H, d,  $J$ =5.8 Hz, H-6'''), 1.50 (3H, d,  $J$ =6.5 Hz, H-6'), 0.86 (3H, t,  $J$ =6.9 Hz, H-16). <sup>13</sup>C-NMR

#### 나. 지방산 화합물 (2)의 아세틸화

화합물 2 (3 mg)을 1 ml의 pyridine에 녹인 후, 빙냉하에서 acetic anhydride 1 ml를 적하하였다. 실온에서 10시간 교반시키고 반응액을 EtOAc (10 ml x 3)와 빙수 (15 ml)로 분배 추출하였다. 유기층을 4% HCl 수용액, 포화 중조 및 염수로 세척한 후, 무수 MgSO<sub>4</sub>로 탈수하고 여과, 농축하였다. 농축물을 silica gel (20 g) column으로 chromatography (*n*-hexane:EtOAc=9:1)하여 화합물 2의 아세틸화물 (2a, 2.3 mg)을 정제하였다.

화합물 2a : White powder, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.35-5.23 (4H, m, olefine), 4.25 (1H, dd,  $J$ =4.4, 12.0 Hz), 4.07 (1H, dd,  $J$ =5.9, 12.0 Hz, oxy-methine), 2.70 (2H, br. t,  $J$ =6.6 Hz), 2.25 (2H, dd,  $J$ =7.4, 7.4 Hz), 2.01 (3H, s), 1.97 (2H, br. q,  $J$ =7.2 Hz), 1.54 (2H, m), 1.32-1.19 (methylene), 0.82 (3H, t,  $J$ =7.2 Hz, terminal methyl).

#### 다. 지방산 화합물 (2)의 메칠 에스터화

화합물 2 (5 mg)를 무수 MeOH (1 ml)에 녹인 후 Dowex 50W (H<sup>+</sup> form)를



소량 가하고 20 분간 교반하였다. 여지로 여과한 후 여액에  $\text{CH}_2\text{N}_2/\text{Et}_2\text{O}$ 를 적당량 가하고 실온에서 하룻밤 방치하였다. 반응액을 감압농축하여 얻어진 메칠화물 (2a)를 질량분석용 시료로 하였다. EI/MS ( $m/z$ , %) : 298 ( $M^+$ , 2.2), 270 (16.9), 223 (10.2), 149 (100), 83 (39.4).

#### 라. Simonin I (4) 의 알칼리 가수분해

Simonin I (4, 10 mg)을 3 ml MeOH 에 녹이고 10% KOH 수용액 0.3 ml를 가한 후, 2시간 환류하였다. 반응액에 Dowex 50w ( $H^+$  form)을 적당량 가하여 중화시킨 후 여과하고 감압농축하였다. 농축물을 silica gel (15 g) column chromatography ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ =9:3:1, 아래층) 하여 glycosidic acid (4a, 3.2 mg)를 정제하였다. 4a : White powder,  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) 5.60 (1H, br. s, H-1"), 5.24 (1H, br. s, H-1''), 5.21 (1H, br. s, H-1'''), 4.32 (1H, d,  $J=7.7$  Hz, H-1'), 3.99 (1H, m, C-11), 2.34 (2H, t,  $J=7.3$  Hz, C-2), 1.24 (3H, d,  $J=6.1$  Hz, H-6''), 1.21 (3H, d,  $J=6.1$  Hz, H-6"), 1.16 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-6'''), 1.13 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-6'), 0.89 (3H, t,  $J=7.1$  Hz, H-16).

## 2. 결과 및 고찰

우리 주변에서 식용으로 빈번히 이용되고 있는 식물자원으로부터 활성물질을 탐색하기 위하여 고구마의 활성물질을 분리하고자 하였다. 고구마는 찌거나 구워서 간식으로 먹는 것 외에는 식용으로서의 수요가 많지 않고, 사료 또는 주정 제조용 원료로 이용되고 있기는 하나 더 값이 싼 녹비 작물이나 당밀 등이 그 용도를 대체하고 있어, 수요가 확대되지 않고 있다. 하지만 고구마로부터 인체에 유용한 활성이 기대되는 물질을 분리하고 분자구조 및 활성을 구명하게 된다면 고구마의 식용으로서의 수요는 획기적으로 증대하게 될 것이며, 고부가가치를 갖는 새로운 작목으로 자리할 수 있을 것이다.

고구마는 전분이 주요 성분이고<sup>4)</sup>, 이차 대사산물로서는 sesquiterpenoid<sup>6)</sup>, 수지배당체<sup>5)</sup> 등 주로 비극성 물질이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있으나, 함유성분 전체를 탐색하기 위하여 80% MeOH 수용액

을 추출 용매로 사용하였다. 이 용매를 사용하여 추출할 경우 전분, 단백질 등과 같은 거대분자 물질이나 전하를 띠고 있는 이온성 물질 이외의 거의 대부분의 함유성분이 추출되어 너무 많은 물질이 존재하게 되므로 추출물을 극성의 차이에 따라 분획하고자 용매 계통분획하였다. EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O을 이용하여 분배 추출하였으며, 각 분획은 silica gel TLC (Thin Layer Chromatography)를 이용하여 함유성분을 추정하였다. 그중 TLC 상에서 발색반응에 의하여 활성물질이 함유되어 있을 것으로 추정된 EtOAc 분획으로부터 물질분리를 시작하였다. EtOAc 분획을 silica gel column을 이용하여 chromatography 하였는데, *n*-hexane-EtOAc (5:1)부터 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (7:1)까지 용매의 극성을 높여가며 용출하였다. 용출액은 TLC로 확인하여 유사한 성분끼리 모아서 감압농축하여 모두 18개의 분획을 얻었다. 다시 1번, 7번, 11번 분획에 대하여 용매를 바꾸어가며 silica gel column chromatography를 반복하여 4종의 화합물을 분리하였다.

화합물 1은 미황색 oil 상의 물질로서, <sup>1</sup>H-NMR에 있어서 olefine 유래의 methine ( $\delta$  5.26)과 methyl ester ( $\delta$  3.58, 3H, s)signal이 관측되었으며, 많은 methylene signal 이  $\delta$  2.72-1.18에서 관측되었고, 쇠상 화합물의 말단 methyl signal ( $\delta$  0.81, 3H, t, *J*=6.8 Hz)이 관측되어 불포화 지방산의 methyl ester로 추정되었다. <sup>13</sup>C-NMR에 있어서도, carbonyl ( $\delta_c$  173.97), 4개의 olefine methine ( $\delta_c$  129.95, 129.79, 127.88, 127.75), methyl ester의 methyl ( $\delta_c$  51.17), 2개의 말단 methyl ( $\delta_c$  13.95, 13.90) 및 많은 methylene ( $\delta_c$  33.90-22.45) signal들이 주요 peak로 관측되었고, 작은 peak들도 다소 관측되었다. 따라서 화합물 1은 지방산 methyl ester의 혼합물인 것으로 판명되었다. 구성 지방산의 종류 및 조성비를 결정하기 위하여 GC/MS로 분석한 결과, methyl linoleate (45.5%)와 methyl palmitate (44.0%)가 대부분을 차지하였고, methyl octanoate (1.2%), methyl 3,6-octadecadienoate (1.1%), methyl stearate (5.5%) 및 methyl arachidate (2.8%)가 소량 함유되어 있는 것으로 판명되었다.

화합물 2 {백색분말 (CHCl<sub>3</sub>-EtOH), mp 83-84°C}는 <sup>1</sup>H-NMR 에 있어서 4개의 olefine ( $\delta$  5.23-5.34), 2개의 oxy-methine ( $\delta$  4.08, 4.03), 1개의 쇠상 구조의 말단 methyl ( $\delta$  0.81) 및 3개의 allyl methylene ( $\delta$  2.70, 2.28, 1.97)을 포함한 많은 methylene ( $\delta$  1.56-1.18) signal이 관측되어 2쌍의 2

중 결합 및 2개의 oxy-methine을 가지고있는 지방산 화합물인 것을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR에서도 1개의 carboxyl ( $\delta_{\text{C}}$  173.90), 4개의 olefine methine ( $\delta_{\text{C}}$  130.19, 129.98, 127.86, 127.72), 2개의 oxy-methine ( $\delta_{\text{C}}$  68.34, 65.02), 1개의 말단 methyl ( $\delta_{\text{C}}$  14.09) 및 8개의 methylene ( $\delta_{\text{C}}$  34.08-22.63) signal들이 관측되어, 16개의 탄소로 이루어지고 2쌍의 2중 결합과 2개의 수산기를 가진 지방산화합물로 판명되었다. 화합물 2를 diazomethane으로 methyl화하여 측정한 EI/MS 에서도 분자이온 peak ( $M^+$ )가 298에서 관측되어 위의 사실을 확인할 수 있었다. Acetic anhydride/pyridine으로 acetyl화하여 얻어진 화합물 2a 의  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 화합물 2와 다르게 나타난 것은 1개의 acetyl signal ( $\delta$  2.01, 3H, s)이 새로이 관측된 것과 1개의 oxy-methine signal ( $\delta$  4.25)이 acetylation효과에 의해 0.17 ppm 저자장으로 이동되어 관측된 것이었다. 본래 secondary alcohol 이라면 위의 조건으로 acetyl화하면 2개 모두 acetyl기가 도입되는 것이 보통이나 이번의 경우 1개는 입체적인 장애 때문에 도입되지 않은 것으로 추정되었다. 따라서 화합물 2는 2쌍의 2중 결합과 2개의 수산기를 가진 C16 지방산화합물로 2중 결합 및 수산기의 결합 위치는 추후 판명코자 한다.

화합물 3 {백색분말 (EtOH) mp 140-141 $^{\circ}\text{C}$ } 은  $^1\text{H}$ -NMR 에 있어서 olefine ( $\delta$  5.27) 및 oxy-methine ( $\delta$  3.45) signal이 1개씩 관측되었고, 6개의 methyl signal 중 singlet이 2개 ( $\delta$  0.94, 0.61), doublet이 3개 ( $\delta$  0.84, 0.76, 0.73) triplet이 1개 ( $\delta$  0.77) 관측되어 sterol 화합물로 추정되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR에 있어서는 2개의 olefine ( $\delta_{\text{C}}$  140.72, 121.67)과 1개의 oxy-methine signal을 포함하여 모두 29개의 signal이 관측되었다. 또한 DEPT 측정결과와  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 문헌<sup>7)</sup>과 비교함으로써 화합물 3은  $\beta$ -sitosterol로 동정되었다.

백색분말로 얻어진 화합물 4 {백색분말 (MeOH-H<sub>2</sub>O) mp 118-119 $^{\circ}\text{C}$ }는  $^1\text{H}$ -NMR에 있어서  $\delta$  7.75-7.34에서 관측된 다수의 signal로부터 방향족 고리를 갖고 있음이 확인되었다. 또한  $\delta$  6.24-3.80에서 다수의 signal이 관측되어 당이 존재함을 알 수 있었다. 특히 그중 8개는 oxy-methine으로서는 비교적 저자장인  $\delta$  6.24-4.73에서 관측되었는데, 4개는 doublet으로 관측되어 당의 anomer수소에서 연유한 것을 알 수 있었으며, 각각의 coupling

constant로부터 3개는  ${}^1C_4$  conformation ( $J=1.5, 1.7, 1.8$  Hz)을 갖는 당으로, 1개는  ${}^4C_1$  conformation ( $J=6.8$  Hz)을 갖는 당으로 판명되었다. 다른 4개의 signal들은 그 coupling pattern으로부터 당의 수소 signal인 것으로 추정할 수 있었는데, 저자장으로 이동되어 관측된 점으로부터 당에는 4개의 ester 결합이 존재함을 알 수 있었다. 또한 allyl methylene을 비롯한 많은 methylene signal 및 triplet 으로 관측된말단 methyl signal로부터 지방산의 쇠상구조의 존재도 추정되었다. Doublet으로 관측된 4개의 methyl signal은 4개의 당이 6-deoxy당인 것을 시사했다. 이상의 결과로부터 추정되는 구조는 수지배당체의 전형적인 구조로, oxy-지방산의 hydroxyl 기에 rhamnose나 fucose와 같은 6-deoxy 당이 결합하고 있고, 몇 개의 유기산 및 지방산의 carboxyl 기가 당의 수산기와 ester 결합하고 있는 구조이다.  ${}^{13}C$ -NMR에서도 4개의 ester-carbonyl ( $\delta_c$  173.72-167.24), 8개의 olefine ( $\delta_c$  149.54-118.54), 4개의 anomer ( $\delta_c$  104.71-98.41), 다수의 당부 유래 oxy-methine ( $\delta_c$  81.27-68.25), 다수의 methylene ( $\delta_c$  41.89-22.86) 및 5개의 methyl ( $\delta_c$  19.29-14.34) 탄소 signal들이 관측되어 위의 사실을 확인할 수 있었다.

화합물 4의 ester 결합을 분해하기 위하여 KOH로 처리하였더니 모든 ester 결합이 가수분해된 배당산인 4a<sup>5)</sup>가 얻어졌다. 4a의  ${}^1H$ -NMR 에 있어서,  ${}^1C_4$  conformation을 갖는 3개의 당의 anomer signal ( $\delta$  5.60, 5.24, 5.21)이 broad singlet 으로 관측되었고,  ${}^4C_1$  conformation을 갖는 1개의 당의 anomer signal ( $\delta$  4.32)이 doublet ( $J=7.7$  Hz)으로 관측되었다. 또한 allyl methylene ( $\delta$  2.34), 4개의 doublet methyl ( $\delta$  1.24, 1.21, 1.16, 1.13) 과 1개의 triplet methyl ( $\delta$  0.89) signal이 관측되어, 화합물 4a 는 oxy-지방산에 4개의 6-deoxy당이 결합한 구조로 확인되었다.

이상의 결과를 문헌<sup>5)</sup>과 비교 종합한 결과, 화합물 4는 jalapinoic acid 의 11번 수산기에 1분자의 D-fucose가  $\beta$  결합하고, D-fucose의 2번 수산기에 3분자의 L-rhamnose가 각각  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 결합하고 있으며, 1분자의 cinnamic acid 및 2분자의 decanoic acid가 C-2''', C-2'' 및 C-4''' 수산기와 각각 ester 결합하고 있으며, jalapinoic acid 의 carboxyl 기는 C-2' 수산기와 ester 결합하여 18원의 lactone 환을 형성하고 있는 구조인 simonin I 으로 결정되었다.

*n*-BuOH 분획은 TLC 상에서 뚜렷이 확인되는 성분이 관찰되지 않았고, 수층의 경우에는 거의 대부분이 당인 것으로 판명되었다. 따라서 이번에 분리한 4종의 화합물은 고구마 괴근에 함유되어 있는 이차 대사산물 중 가장 주요한 성분이라고 할 수 있다. 각각의 물질에 대하여 인체의 기능성 향상 또는 질병 예방과 관련된 활성을 검정할 예정이다. 특히 수지배당체중에는 항세로토닌 활성<sup>8)</sup> 및 ionophore 활성<sup>9)</sup>이 높은 것이 다수 보고되어 있어, 고구마의 수지 배당체에 관해서도 유사한 활성을 검정코자 한다.

### 3. 참 고 문 헌

1. 문익재, 정시련, 전경희 (1995) 표고버섯 렉틴의 자극 분열 및 암세포 응집 효과, 약학회 지 **39**(3), 260-267.
2. 정보섭, 신민교 (1990) 향약대사전, 영림사, p. 883 삼화정보사, 서울.
3. 한인규 (1993) 사료작, 향문사, p. 397 선진문화사, 서울.
4. 조재영 (1976) 전작, 향문사, p. 329-351 선진문화사, 서울.
5. Noda, N., S. Yoda, T. Kawasaki and K. Miyahara (1992) Resin-Glycoside from the roots of *Ipomoea batatas*, *Chem. Pharm. Bull.* **40**(12), 3163-3168.
6. Burka, L. T., (1978) 1-(3'-Furly)-6,7-dihydroxy-4,8-dimethylnonan-1-one, a stress metabolite from sweet potatoes. *Phytochemistry* **17**, 317-318.
7. 김진숙, 김년태, 김정숙 (1996) 황기 뿌리의 성분연구(1), 생약학회지 **27**(4), 336-341.
8. Kitagawa, I., H. Shibuya, Y. Yokokawa, N.-I. Baek, K. Ohashi, M. Yoshikawa, A. Nitta and H. Wiriadinata (1988) Structures of merremosides B and D, new antiserotonic resin-glycoside from the tuber of *Merremia mammosa*, an indonesian folk medicine. *Chem. Pharm. Bull.* **36**(4), 1618.

# 제 3 절 달래 (*Allium monanthum* Max.)로부터 flavonoid 배당체의 분리

## 1. 재료 및 방법

### 가. Flavonoid 배당체의 분리

수원 농수산물 시장에서 구입한 달래 생체 18kg을 100% MeOH (18ℓ × 2)를 가하여 실온에서 2회 추출한 후 여과지로 여과하여 감압 농축하였다. 농축물을 물 (1ℓ)과 EtOAc (1ℓ × 2)로 분배 추출하고, 물층을 다시 *n*-BuOH (800 ml × 2)로 분배, 추출하였다.

*n*-BuOH층을 silica gel (330 g) column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 10:1 → 7:1 → 5:1 → 3:1)를 실시하여 70 ml씩 분취하였다. 이 분취액을 TLC로 확인하여 유사한 분획끼리 모아 농축하여 모두 16개의 분획물 (AMB-1 ~ AMB-16)을 얻었다. 그 중 12번째 분획 (AMB-12)을 다시 silica gel (150 g) column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O=65:35:10, 아래층)하여 flavonoid 화합물 1 (AMB-12-5, 103 mg) 및 flavonoid 화합물 2 (AMB-12-6, 152 mg)를 분리하였다.

Flavonoid 화합물 1 (3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→4) β-D-glucopyranosyl] kaempferol) : Pale yellow crystals (MeOH); mp 194-196 °C, IR<sub>v</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3320, 3027, 2960, 1690, 1635; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ) 8.04 (1H × 2, d, J=8.1 Hz, H-2', 6'), 6.91 (1H × 2, d, J=8.1 Hz, H-3', 5'), 6.41 (1H, br. s, H-8), 6.25 (1H, br. s, H-6), 5.02 (1H, d, J=7.8 Hz, H-1'''), 4.40 (1H, d, J=7.6 Hz, H-1''), 3.92-3.27 (sugar moieties); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>c</sub>) 178.82 (C-4), 165.42 (C-7), 162.20 (C-5), 160.97 (C-4'), 158.95 (C-2), 157.85 (C-9), 135.23 (C-3), 131.88 (×2, C-2', 6'), 121.97 (C-1'), 115.76 (×2, C-3', 5'), 105.23 (C-10), 104.47 (C-1'''), 104.01 (C-1''), 99.85 (C-6), 94.73 (C-8), 80.08 (C-4''), 77.39, 77.11 (C-3'', 3'''), 77.11, 76.01 (C-5'', 5'''), 74.59, 74.07 (C-2'', 2'''), 70.62 (C-4'''), 63.95, 61.86 (C-6'', 6''').

Flavonoid 화합물 2 (3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→2) β

-D-glucopyranosyl] kaempferol) : Yellow needles (MeOH); mp 195-197 °C, IR<sub>v</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3327, 3023, 2960, 1695, 1624; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ) 7.94 (1H×2, d, J=8.6 Hz, H-2', 6'), 6.8 1(1H×2, d, J=8.6 Hz, H-3', 5'), 6.28 (1H, br. s, H-8), 6.08 (1H, br. s, H-6), 5.28 (1H, d, J=7.3 Hz, H-1'''), 4.68 (1H, d, J=7.1 Hz, H-1''), 3.79-3.10 (sophorosyl moieties): <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>c</sub>) 179.60 (C-4), 165.81 (C-7), 162.95 (C-5), 161.46 (C-4'), 158.97 (C-2), 158.38 (C-9), 134.92 (C-3), 132.32 (×2, C-2', 6'), 122.72 (C-1'), 116.23 (×2, C-3', 5'), 105.74 (C-10), 104.59 (C-1'''), 104.11 (C-1''), 99.89 (C-6), 94.76 (C-8), 82.32 (C-2''), 78.10, 78.05 (C-3'', 3'''), 77.77 (×2, C-5'', 5'''), 75.43 (C-2'''), 71.61, 70.97 (C-4'', 4'''), 62.48, 62.32 (C-6'', 6''').

#### 나. 화합물 1, 2의 아세틸화

화합물 1 (20 mg)과 2 (30 mg)을 6 ml의 pyridine에 녹인 후, 빙냉하에서 acetic anhydride 6 ml를 적가하였다. 실온에서 10시간 교반시키고 반응액을 EtOAc (70 ml×3)와 빙수 (100 ml)로 분배 추출하였다. 유기층을 5% HCl 수용액, 포화 중조 및 염수로 세척한 후, 무수 MgSO<sub>4</sub>로 탈수하고, 여과 농축하였다. 농축물을 silica gel (70 g) column chromatography (*n*-hexane:EtOAc)하여 화합물 1, 2의 아세틸화합물 1a (17 mg)과 2a (28 mg)을 정제하였다.

화합물 1a : <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) 8.01 (1H×2, d, J=8.8 Hz, H-2', 6'), 7.29 (1H, d, J=2.2 Hz, H-8), 7.21 (1H×2, d, J=8.8 Hz, H-3', 5'), 6.83 (1H, d, J=2.2 Hz, H-6), 5.52 (1H, d, J=7.8 Hz, H-1'''), 4.43 (1H, d, J=7.8 Hz, H-1''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>c</sub>) 171.87 (C-4), 170.53, 170.26, 170.12, 170.00, 169.66, 169.33, 169.28, 168.94 (×2), 167.97(each acetyl-carbonyl), 156.60 (C-7), 155.37 (C-5), 153.90 (C-4'), 152.45 (C-2), 150.21 (C-9), 136.48 (C-3), 130.46 (×2, C-2', 6'), 127.12 (C-1'), 121.42 (×2, C-3', 5'), 115.02 (C-10), 113.45 (C-1'''), 108.94 (C-1''), 100.72 (C-6), 98.55 (C-8), 76.16 (C-4''), 72.92, 72.76 (C-3'', 3'''), 72.16, 71.95 (C-5'', 5'''), 71.75, 71.51 (C-2'', 2'''), 67.73 (C-4'''), 61.49, 61.07 (C-6'', 6'''), 21.19 (×

2), 21.12, 20.86, 20.72, 20.68, 20.49, 20.54 ( $\times 3$ )(each acetyl-methyl)

화합물 **2a** :  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) 8.01 (1H $\times 2$ , d,  $J=8.8$  Hz, H-2', 6'), 7.28 (1H, br. s, H-8), 7.24 (1H $\times 2$ , d,  $J=8.8$  Hz, H-3', 5'), 6.84 (1H, br. s, H-6), 5.76 (1H, d,  $J=7.0$  Hz, H-1''), 4.92 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1'');  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_c$ ) 172.15 (C-4), 170.64, 170.41, 170.36, 169.94, 169.78, 169.33, 169.29 ( $\times 2$ ), 168.92, 167.98 (each acetyl-carbonyl), 156.61 (C-7), 155.38 (C-5), 153.86 (C-4'), 152.49 (C-2), 150.24 (C-9), 136.36 (C-3), 130.35 ( $\times 2$ , C-2', 6'), 127.88 (C-1'), 121.56 ( $\times 2$ , C-3', 5'), 115.15 (C-10), 113.48 (C-1''), 108.92 (C-1''), 99.99 (C-6), 99.03 (C-8), 77.94 (C-2''), 74.50, 73.14 (C-3'', 3''), 71.90, 71.49 (C-5'', 5''), 71.39 (C-2''), 68.48, 68.17 (C-4'', 4''), 61.56, 61.49 (C-6'', 6''), 21.21, 21.18, 21.10, 20.85, 20.68, 20.62 ( $\times 2$ ), 20.58, 20.52, 20.50 (each acetyl-methyl)

다. Flavonoid 배당체의 산가수분해

화합물 **1** 및 **2**를 각각 12 mg을 4 ml MeOH에 녹이고 5% HCl/MeOH 1 ml를 가한 뒤 3시간 정도 환류하였다. 이를  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ 를 적당량 가하여 중화시킨 뒤 여과하고 감압 농축하였으며, 이 농축물을 silica gel column chromatography( $\text{CHCl}_3$ -MeOH=10:1)로 정제하여 kaempferol(**3**)을 각각 3.5 및 3.9 mg씩 얻었다.

화합물 **3** (Kaempferol): White powder( $\text{CHCl}_3$ -EtOH);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) 7.98 (1H $\times 2$ , d,  $J=8.3$  Hz, H-2', 6'), 6.82 (1H $\times 2$ , d,  $J=8.3$  Hz, H-3', 5'), 6.29 (1H, br. s, H-8), 6.14 (1H, br. s, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_c$ ) 177.83 (C-4), 165.74 (C-7), 162.61 (C-5), 161.29 (C-4'), 157.90 (C-9), 149.54 (C-2), 137.15 (C-3), 131.33 ( $\times 2$ , C-2', 6'), 123.47 (C-1'), 117.34 ( $\times 2$ , C-3', 5'), 105.22 (C-10) 99.83 (C-6), 95.28 (C-8).



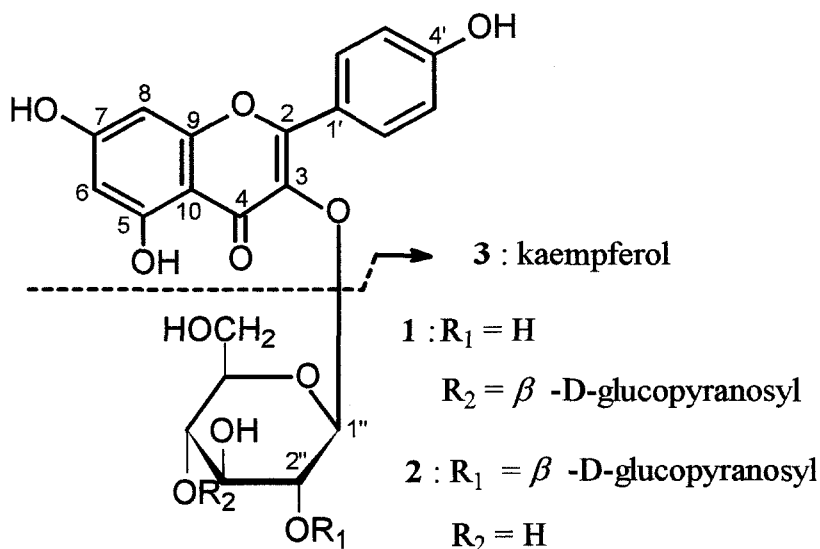
## 2. 결과 및 고찰

식용 식물자원으로부터 활성물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 달래를 MeOH로 추출하여 이 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O로 분배 추출하였다. 각 분획을 silica gel TLC를 이용하여 함유성분을 추정하고 그 중 자외선 조사와 10% 황산으로 발색하여 *n*-BuOH 분획에 flavonoid 화합물이 함유되어있는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 *n*-BuOH 분획을 silica gel column chromatography를 반복하여 2종의 flavonoid 배당체인 화합물 1과 2를 각각 0.00057%와 0.00084%의 수율로 분리, 정제하였다.

화합물 2, yellow needles (MeOH), mp 195-197 °C, IR spectrum에서 수산기 (3327 cm<sup>-1</sup>) 및 벤젠환 (1624 cm<sup>-1</sup>)의 흡수 peak가 관찰되었다. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)에서는 *para*-치환 벤젠환의 특징적인 signal인 δ 7.95 (1H × 2, d, *J*=8.6 Hz), δ 6.81 (1H × 2, d, *J*=8.6 Hz) 및 벤젠의 2개의 proton signal이 δ 6.28과 δ 6.08에서 관측됨에 따라 flavonoid 골격의 존재가 추정되었다.<sup>3-6)</sup> 또한 δ 5.28 (1H, d, *J*=7.3 Hz), δ 4.68 (1H, d, *J*=7.1 Hz)에서 두 개의 anomeric proton signal과 δ 4.30-δ 3.10사이에서 oxy-methine와 oxy-methylene signal이 다수 관측됨에 따라 당 두 분자를 가진 배당체임을 확인 할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)에서 비당부의 chemical shift를 조사한 결과 flavonoid 화합물 중 kaempferol인 것으로 판명되었고,<sup>7)</sup> 이는 화합물 1, 2를 산 가수분해 하였을 때 kaempferol과 glucose가 얻어진 점등으로도 확인하였다. 당부의 chemical shift로부터 2분자의 glucose가 존재함을 확인 할 수 있었고, 2분자의 glucose는 chemical shift를 조사한 결과 glucose의 2번 탄소가 저자장으로 shift됨이 관측됨에 따라 2분자의 당이 (1→2) 결합한 sophorose임을 추정할 수 있었다.<sup>8)</sup> Kaempferol과 glucopyranose의 결합은 glycosylation의 효과에 의해 kaempferol의 3번 탄소가 고자장으로 2.2 ppm shift되고 2번 탄소와 4번 탄소는 저자장으로 각각 1.8과 9.4 ppm으로 shift 되는 것이 관측됨에 따라 3번 수산기에 glucopyranose가 결합하고 있는 것으로 확인되었다.<sup>7)</sup> 2분자의 glucopyranose는 <sup>1</sup>H-NMR에서의 anomeric proton의 coupling constant가 7.3 Hz와 7.1 Hz로 이들 당은 모두 β-configuration을 갖는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 화합물 2의 화학구조는 3-O-[β

-D-glucopyranosyl(1→2) β-D-glucopyranosyl] kaempferol로 결정하였다. <sup>3,7,8,10</sup>)

화합물 1, pale yellow crystals (MeOH), mp 194-196 °C의 경우에도 IR spectrum에서 수산기 (3320 cm<sup>-1</sup>) 및 벤젠환 (1635 cm<sup>-1</sup>)의 흡수 peak가 관측되었다. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 및 <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)의 signal들은 화합물 2와 유사하게 관측되었고, 이로부터 kaempferol과 2분자의 glucose로 이루어진 flavonoid 배당체임을 확인할 수 있었다. 당부의 signal을 조사한 결과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 당의 4번 탄소가 저자장으로 shift됨이 관측됨에 따라 2분자의 당이 (1→4)결합함을 확인할 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR에서 anomeric proton의 coupling constant가 각각 7.8과 7.6 Hz로 관측됨에 따라 당은 모두 β-결합하고 있는 것을 알 수 있었고, 이상의 결과로부터 화합물 1의 화학구조는 3-O-[β-D-glucopyranosyl (1→4) β-D-glucopyranosyl] kaempferol로 결정하였다.



Chemical structures of flavonoids isolated from the *Allium monanthum* Max.

한편, 화합물 2에 대해서는 Baek 등<sup>3)</sup>이 Grb2-Shc 결합저해활성을 갖는 것으로 보고한 바 있으며, flavonoid 배당체 중에는 혈소판 응집억제 작용 등의 여러 활성을 갖는 화합물 등이 보고된 바 있다.<sup>11)</sup> 따라서 달래로부터 이러한 2차 대사산물을 분리하고 이들 화합물들에 대한 활성을 검증함에 따라 달래는 기능성 작물로서 충분히 이용가치가 있을 것으로 본다.

### 3. 참고 문헌

1. Ahn, S. D., Jang, B. H., Lee, M. S., Kwon, B. S. and Kim, M. N. (1996) 'Introduction of Resource Plant', p. 192, Sun Jin Mun Hwa Sa, Seoul, Korea.
2. Shanghai Science & Technology Press (1985) In 'Encyclopedia of Chinese Drugs', p.226, Shogakukan, Tokyo, Japan.
3. Baek, N. I., Kim, Y. H., Ahn, E. M., Bang, M. H., Nam, J. Y. and Kwon, B. M. (1998) Isolation of biologically active compounds from the flower petals of *Carthamus tinctorius* L. *Agric. Chem. & Biotechnol.* **41**, 197-200.
4. Harborne, J. B and Mabry, T. J. (1982) In The flavonoids: Advances in Research', Chap. 2, Chapman and Hall, London, U.S.A.
5. Agrawal, P. K and Bansal, M. C. (1989) In 'Carbon-13 NMR of Flavonoids', Chap. 6, Elsevier science Inc., New York, U.S.A.
6. Morita, N., Arisawa, M., Nagase, M., Hsu, H. Y. and Chen, Y. P. (1977) Studies on the constituents of formosan leguminosae. I. The constituents in the leaves of *Clitoria ternatea* L., *Yakugaku Zasshi* **97**, 649-653.
7. Markham, K. R., Ternal, B., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T. J. (1978) Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III, *Tetrahedron* **34**, 1389-1397.
8. Baek, N. I., Lee, M. J., Park, J. D., Kim, H. Y. and Kim, S. I. (1997) Preparation of sophorose-II. Preparation of sophorose from the culture broth of *torulopsis bombicola* and the pod of *sophora japonica*,

*Agric. Chem. & Biotechnol.* **40**, 163-166.

9. Yoshizaki, M., Fujino, H., Masuyama, M., Arisawa, M. and Morita, N. (1987) A chemotaxonomic study of flavonoids in the leaves of six trichosanthes species, *Phytochemistry* **26**, 2557-2558.

10. Nohara, T., Ito, Y., Seike, H., Komori, T., Moriyama, M., Gomita, Y. and Kawasaki, T. (1982) Study on the constituents of *Paris quadrifolia* L. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 1851-1856.

11. Carotenuto, A., Feo, V. D., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Magno, S. and Cicala, C. (1996) The flavonoid of *Allium ursinum*. *Phytochemistry* **41**, 531-536.

여 백

## 위탁연구과제

신생 혈관 저해제 탐색을 위한 분석 방법의 연구  
Study of Screening Systems for Searching of  
Antiangiogenic Compounds

여 백

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산자원으로부터 암 예방 및 암 전이 억제 신소재 개발에 관한 연구”과제 (위탁과제 “신생 혈관 저해제 탐색을 위한 분석 방법의 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 12. 27.

위탁연구기관명 : 충북대학교

위탁연구책임자 : 장 수 익

연 구 원 : 연 미 란

연 구 원 : 최 창 기

연 구 원 : 황 호



여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

신생혈관 저해제 탐색을 위한 분석 방법의 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구과제의 최종 목표는 신생혈관형성(Angiogenesis)을 관측할 수 있는 *in vivo* 및 *in vitro* angiogenesis assay를 구축하고, 이후 구축된 assay를 이용하여 신생혈관형성 저해제를 탐색함으로써 신소재를 개발한다.

본 연구에서 개발되는 신소재는 신생혈관형성에 연유한 여러 질병을 치료하는데 활용될 수 있기 때문에 중요하다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 먼저 신생혈관 저해제를 탐색하기 위해 닭의 용모막을 이용한 *in vivo* CAM assay 및 내피세포를 이용한 *in vitro* angiogenesis 실험법을 구축하였다. 이후, 개발된 *in vivo* CAM assay를 이용하여 천연물로부터 신생혈관형성 억제제를 탐색하였다. 탐색된 물질 중 대표적인 두 개의 물질을 선택하고, 이의 활성을 *in vivo* 및 *in vitro* angiogenesis assay를 통하여 보다 자세히 연구하였고 또 이를 통해 이의 작용 메커니즘을 규명하고자 하였다.

## IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

천연물로부터 신생혈관형성 억제제를 탐색하여 신생혈관형성 억제 효과를 갖는 CB 2'-OH, QUE와 아테미노라이드를 찾을 수 있었다. 천연물로부터 탐색된 CB 2'-OH에 대한 유도체인 CB 2'-Ph은 닭의 용모막을 이용한 *in vivo* assay에서 CB 2'-OH와 유사한 활성을 보였다. CB 2'-Ph는 bFGF에 의해 유도되는 *in vivo* 및 *in vitro* angiogenesis를 억제하였다. QUE는 bFGF에 의해 유도되는 *in vitro* angiogenesis 및 내피세포의 cell cycle을 arrest하였다.

이러한 연구결과는 CB 2'-Ph 및 QUE가 신생혈관형성에 연유하는 여러 질병 예를 들어 당뇨병성 망막증, 류마치스성 관절염, 암등의 치료에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

여 백

## SUMMARY

In the course of a screening for new inhibitor of angiogenesis among herbal medicines, we isolated 2'-hydroxycinnamaldehyde (CB 2'-OH) from the stem bark of *Cinnamomum cassia* Blume (Lauraceae) and QUE. CB 2'-OH appeared to be a more potent angiogenesis inhibitor in a chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay than genistein and AGM-1470 (TNP-470). 2'-OH related analog, 2'-O-benzoylcinnamaldehyde (CB 2'-Ph), was synthesized, and we examined its antiangiogenic activity in chick CAM. It was found that 0.5, 1, 2, 5, and 10  $\mu$ g of CB 2'-Ph/embryo inhibited angiogenesis in 40, 56, 59, 78, and 91% of eggs, respectively. In addition, 1, 5, and 10  $\mu$ g of QUE/embryo inhibited angiogenesis in 40, 67, and 61% of eggs, respectively. To understand the mechanism of action of these angiogenesis inhibitors, effects of these inhibitors on basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced in vivo and in vitro angiogenesis and in vitro endothelial cell cycle. CB 2'-Ph inhibited bFGF-induced angiogenesis in chick CAM and endothelial cell migration. QUE inhibited bFGF-induced endothelial cell migration and arrested its cell cycle. These results suggest that CB 2'-Ph and QUE could be used as therapeutic agents for treating angiogenesis-dependent pathological diseases such as diabetic retinopathy, rheumatoid arthritis and cancer.

여 백

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	225
Chapter 2. Contents and Results of Research	
1. Materials .....	233
2. Methods .....	234
Chapter 3. Results	
1. Screening of Angiogenesis Inhibitors .....	241
2. Antiangiogenic Effects of Cinnamaldehydes .....	243
3. Antiangiogenic Effects of CB-Ph .....	246
4. Antiangiogenic Effects of QUE and Arteminolide .....	252

여 백

# 목 차

## 제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 필요성 ..... 225

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용 ..... 230

## 제 2 장 연구수행 내용

제 1 절 실험 재료 ..... 233

제 2 절 실험 방법 ..... 234

## 제 3 장 연구 결과

제 1 절 천연물로부터 신생혈관형성 억제제 탐색 ..... 241

제 2 절 Cinnamaldehyde 유도체의 합성 및 신생혈관형성억제  
효과 조사 ..... 243

제 3 절 CB 2'-Ph의 활성화연구 ..... 246

제 4 절 QUE의 활성화연구 ..... 252



여 백

# 제 1 장 서론

## 가. 기술적 측면

새로운 혈관이 형성되는 현상 (Angiogenesis)은 배발생 및 발육과 같은 정상상태에서 일어날 뿐만 아니라, 악성종양, 류마티스성 관절염, 만성염증, 당뇨병성 망막증, 혈관종 등의 병리학적 상태에서도 일어난다. 정상상태에서는 새로운 혈관형성이 자율적으로 조절되는 반면, 병리학적 상태에서는 이것이 자율적으로 조절되지 않기 때문에 위에서 언급한 여러 질병이 발생하는 것이다. 이중에서 고형암 (Solid tumor)은 자기 주위로 유도된 새로운 혈관을 이용하여 영양분을 공급받고 노폐물을 배설함으로써, 계속 성장할 수 있고 또 이 암세포가 순환기에 연결되어 폐, 간 등의 다른 부위로 암이 전이된다. 1970년대 초, 하버드의대의 Folkman박사에 의해 암세포가 신생혈관을 유도하기 위해서 특정인자를 분비한다는 가설이 제안되었으며, 1985년도에는 하버드의대의 Vallee 박사팀에 의해 신생혈관유도인자, Angiogenin이 인간의 결정선 암세포의 분비액으로부터 최초로 발견되었다. 새로운 혈관의 형성을 억제할 수 있는 물질 (Angiogenesis Inhibitor)은 불필요한 새로운 혈관의 형성에 기인하는 여러 질병 특히, 악성종양의 치료에 이용될 수 있으므로, 이에 대한 연구 및 개발은 매우 중요하다고 하겠다.

1993년, 독일 과학자는 신생 혈관의 유도를 저해하는 화학물질을 콩에서 분리하였다고 발표하였다. 이 물질은 genistein이라고 명명되었는데, 작은 악성종양이 크게 자라는 것을 억제할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 일본인의 경우, 콩을 많이 섭취하므로 prostate cancer를 갖는 빈도가 서구인에 비해 매우 낮다. 그러나, 일본인이 서구로 이민간 후 단 몇 년 동안이라도 콩을 많이 먹지 않으면, prostate cancer를 갖는 빈도가 급격히 증가한다고 보고되고 있다. 1995년, 미국 미네소타 대학의 Faith M. Uckun 박사팀은 인간 B-cell precursor (BCP) cell에 결합하는 단일항체에 genistein을 가교 결합시켰다. 이렇게 genistein이 연결된 conjugate drug은 쥐에 이식된 인간 BCP leukemia

cell을 99.999% 죽인다고 보고되었다 (*Science*, 267, 886 (1995)).

이러한 점은, 새로운 기능을 탐색할 수 있는 방법을 우리가 도입한다면, 국내에서 생산되는 농산물에서 신기능을 부여할 수 있음을 제시하고 있다. 따라서, 위에서 언급한 바, 신생 혈관 저해제의 개발은 항암 및 암예방에 중요하므로 1) 신생 혈관의 유도를 억제하는 활성을 쉽게 확인할 수 있는 *in vivo* 및 *in vitro* assay를 개발하는 것이 필요하고, 이후 2) 이 assay를 이용하여 국내에서 생산되는 농산물로부터 신기능 소재를 개발하는 것이 요청된다고 사료된다.

#### 나. 경제적 관점

새로운 혈관의 형성을 억제하는 물질 (Angiogenesis Inhibitor)의 발견은 암의 성장 기작을 밝히는 단서가 되고, 암의 조기진단 및 예방, 치료에 응용될 수 있다. 이런 이유로 인해, 그동안 선진국의 학계 및 산업계는 이것에 대해 계속적으로 관심을 두고 연구 및 개발에 노력을 하고 있었다. 그 결과, 일본을 비롯한 각국의 제약회사들이 신생혈관 유도억제제의 개발 및 발견에 투자를 하기 시작하면서 현재 많은 특허가 출원되고 있는 실정이다. 참고로, 일본 Takeda 회사와 하버드 의과대학이 공동 개발한 신생혈관 유도억제제의 하나인 AGM-1470 (아래 참고)은 다양한 악성종양에 대한 효과를 보기 위해 Phase I의 임상실험이 현재 미국에서 진행되고 있다. 이와는 대조적으로, 국내에서는 현재 이에 대한 연구가 외국에 비해볼 때 거의 전무한 실정이라고 사료된다. 만약, 그동안 연구 및 개발에 투자해온 선진국에서 Angiogenesis Inhibitor를 개발한 뒤, 신 항암제로서 그 효과가 검증되면 현존하는 항암제 시장은 이것에 의해 잠식되고 따라서 이에 따른 경제적 손실도 매우 클 것으로 예상된다.

한편, 새로운 혈관이 형성되는 현상은 위에서 언급한 악성종양에서만 일어나는 것이 아니라, 류마티스성 관절염, 만성염증, 당뇨병성 망막증, 혈관 종 등의 병리학적 상태에서도 일어난다. 따라서 개발되는 Angiogenesis Inhibitor는 Angiogenesis에 연유된 여러 질병의 치료에 광범위하게 사용될 것이므로 큰 부가가치를 창출하게 될 것으로 사료된다. 특히, 본 연구로 인해 특정 농산물

및 기존의 생약자원에서 신생 혈관 저해제가 발견된다면, 농가에서는 이것을 육성하여 농가소득의 증대를 기할 수 있을 것이다.

## 다. 사회적 관점

최근, 암의 이환율이 계속적으로 증가하고 있다. 이는 그동안 식생활이 개선되고 또 양질의 의료혜택을 받음으로 인해, 국민의 평균수명이 연장되어 암이 발생할 수 있는 연령층이 늘어났기 때문이다. 한국에서는 연간 약 5만여 명이 암으로 사망하고 있고, 이것은 전체 사망 원인의 2번째를 차지하고 있는 실정이다. 이에, 사회의 구성원인 국민들은 점차 암에 대한 불안감을 갖고 심리적으로 위축되어 국가 경제활동에도 지장을 초래할 수 있다. 더 나아가, 선진국의 암치료율에도 미치지 못하는 빈약한 국내 암치료 기술에 대한 불만 그리고 새로운 치료법 및 신 항암제 사용에 대한 욕구가 계속 높아질 것으로 예상된다. 따라서, 암의 조기 진단 및 예방, 암치료에 대한 연구 및 투자가 절실히 필요하다고 사료된다.

특히, 현재 자국에서 생산되는 농산물과 대부분의 약용식물은 중국 등으로부터 저가격으로 국내시장을 침투하는 타국가에 의해 가격면에서 경쟁력을 상실하고 있다. 이에 따라, 농민들은 농작 및 재배에 대한 의욕을 잃고 또 이농 현상이 더욱 더 증가될 것으로 예상된다. 이런 이유로, 농민의 사회적 불안감은 점차 높아 갈 것으로 기대되지만, 이들에게 자신이 재배하는 농산물 그리고 약용식물이 신기능 소재로써 사용될 수 있음을 알려주면 이들이 느끼는 사회적 불안감은 어느 정도 해소될 것으로 사료된다.

## 2. 지금까지의 연구개발 실적

그동안 국외에서 발견 및 개발된 Angiogenesis inhibitor를 간단히 나열하면, 혈소판인자-4 (Platelet factor-4, PF-4)와 이의 합성펩티드, 푸마길린 (Fumagillin)과 이의 유도체 (AGM-1470), 연골에서 유도된 억제제 (Cartilage-derived inhibitor, CDI), 합성 라미닌펩티드 (Synthetic laminin peptide), 금속함유단백분해효소의 조직억제제-2 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2), 황화 치틴유도체, 박테리아의 세포벽복합체, 에포네마이신 (Eponemycin), Streptomyces에서 분리된 화합물 (TAN-1323C와

TAN-1323D), 17a,21-dihydroxypregna-4,9(11)-diene-3,20-diones과 이의 유도체, 올리고마이신-엔티마이신-피리시딘 (Oligomycin-antimycin-piericidin) 혼합물, Tetrahydrothienopyridines, 테트라시클린 (Tetracycline) 등이다. 이 중에서 푸마길린, 에포네마이신, TAN-1323C, TAN-1323D 은 미생물에 의해 생성되는 물질로서 내피세포의 성장을 억제하는 활성을 갖는다. AGM-1470은 푸마길린의 유도체로서 푸마길린보다 독성이 적고 역가도 훨씬 높다. 그리고 이것이 콜라겐에 의해 유도되는 관절염 (Collagen-induced arthritis)을 억제시킨다. 박테리아의 세포벽복합체인 Sulfated polysaccharide-peptidoglycan은 카포시육종의 치료에 사용될 가능성이 높다. TIM-2은 Type IV 콜라제나제 (Collagenase)와 결합하여 콜라겐 붕괴를 억제하므로 암세포가 전이되는 것을 방지할 수 있다. 참고로, 현재 1단계 임상실험중인 AGM-1470은 수용액속에서 빨리 붕괴되며 독성이 강한 단점이 있다.

Angiogenesis inhibitor의 발견 그리고 이용은 위에서 언급한 바와 같이 많은 응용성이 있으므로, 국내에서도 이쪽 분야에 많은 연구 및 관심이 요청되지만 현재까지는 큰 성과가 없다.

Angiogenesis inhibitor를 탐색 및 연구하기 위해서는 이를 Assay할 수 있는 방법이 먼저 구축되어야 한다. 본 연구팀은 용모막을 이용한 *in vivo* assay와 microscopy를 이용한 *in vitro* assay를 그동안 구축하였고 이의 내용을 한국생화학회의 춘계학술대회기간 중 (1995. 5.12-13), “산학연 심포지움: 신물질 창출을 위한 생물활성 연구법”에 발표하였다. 또 Angiogenin을 우유에서 분리하고 이의 항체를 생산하여 면역학적 assay 방법을 구축하였으며, 이의 결과를 1994년 인도에서 열린 국제생화학 및 분자생물학회의에서 발표한 바 있다.

### 3. 문제점 및 전망

현재까지 사용하고 있는 항암제는 암세포에만 작용하는 것이 아니라 정상 세포에도 작용함으로 인해 심각한 부작용을 암환자에게 주고 있다. 이것은 그동안 개발된 항암제가 암세포를 죽이고자 하는 목적에서 개발되었기 때문이다. 그러나 불행하게도 이 항암제는 암세포에만 특이적으로 반응하지 않는다는 것

이다. Angiogenesis가 암세포의 성장 및 전이에 필수적이라는 사실에 기초한 항암제 또는 암예방제는 기존의 항암제와는 그 접근법이 근본적으로 다르다. 따라서, 부작용도 적고 훨씬 효과적으로 작용할 것으로 기대된다. 더 나아가, 개발하고자 하는 물질은 현재 식용으로 사용하는 농작물 및 생약자원에서 개발할 것이므로 지속적으로 섭취시, 암예방의 효과도 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

특히, 본 연구로 인해 국내에서 생산되는 부존 천연자원 및 기존의 생약 자원에 새로운 기능이 부여되면, 농촌에서는 이를 고부가 자원으로 활용할 수 있게됨으로써 농가소득이 증대되어 농촌경제에도 큰 도움이 될 것이다. 이와 더불어, 일반 국민은 자국 농산물의 이용에 더욱 관심을 갖게되고, 이를 섭취함으로써 개인의 건강 증진도 갖게될 것으로 전망된다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발의 최종목표

첫째로, Angiogenesis를 관측할 수 있는 *in vivo* 및 *in vitro* angiogenesis assay를 구축한다.

둘째로, 위에서 구축된 assay를 이용하여 신생 혈관 저해제를 탐색함으로써 신소재를 개발한다.

### 2. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발내용 및 범위
제 1차년도 (1995)	<i>in vivo</i> 및 <i>in vitro</i> Angiogenesis assay	1) <i>in vivo</i> Angiogenesis assay 구축 2) <i>in vitro</i> Angiogenesis assay 구축 3) 신생혈관 저해물질 활성검색
제 2차년도 (1996)	<i>in vivo</i> 및 <i>in vitro</i> Angiogenesis assay	신생혈관 저해물질 활성검색
제 3차년도 (1997)	<i>in vivo</i> 및 <i>in vitro</i> Angiogenesis assay	신생혈관 저해물질 활성검색
제 4차년도 (1998)	<i>in vivo</i> 및 <i>in vitro</i> Angiogenesis assay bFGF이용법 도입	신생혈관 저해물질 활성검색
제5차년도 (1999)	<i>in vivo</i> 및 <i>in vitro</i> Angiogenesis assay -cell cycle assay 도입 -apoptosis assay 도입 -cell proliferation assay 도입	신생혈관 저해물질 활성검색



여 백

## 제 2 장 연구수행 내용

### 제 1 절 실험 재료

#### 1. 시약 및 물질

CAM assay와 novel CAM assay를 위한 수정란은 (주)플무원에서 구입하였다. 시료 처리를 위한 Thermanox coverslip은 Nunc사에서, 관찰시 필요한 10 % intralipose (Fat emulsion)와 1 mL, 5 mL syringe는 (주)녹십자사 제품을 구입하여 사용하였다. bFGF는 가톨릭 의대에서, CB 2'-Ph등의 시료는 KIST 생명공학연구소로부터 공급받았다.

내피세포배양에 필요한 Hanks' balanced salt solution (HBSS), serum-free media 그리고 antibiotics는 Gibco에서, fibrinogen, thrombin 그리고 aprotinin은 Sigma사에서 구입하였다. 또한 48-well plate는 Nunc사에서, disposable 기구들은 Falcon에서 구입하였다.

#### 2. 사용 기기

CAM assay와 novel CAM assay에 필요한 실험 기자재는 수정란을 부화시키기 위해 90% 습도와 37°C 온도를 유지시켜줄 수 있는 incubator, 수정란의 감염을 방지하기 위한 Clean bench, 그리고 결과의 관찰 및 촬영을 위해서 필요한 camera가 장착된 copy stand이다. 또한 CAM 상에서 새롭게 형성된 혈관을 관찰하기 위해서 현미경에 카메라를 연결하여 근접촬영을 하였다.

## 제 2 절 실험 방법

### 1. CAM assay를 이용한 CB 2'-Ph의 신생혈관형성 억제활성조사

#### 가. 시료 준비

CB 2'-Ph는 2.5 mg/mL이 되도록 ethanol에 녹인 후 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

#### 나. 수정란의 배양

수정란이 산란되어 18℃ 이하에서 보관된 지 3-4일 이내의 것을 0 일배로 하여 이것을 37℃, 습도는 9 %이상 유지되도록 하였다. 습도는 적당한 크기의 용기에 증류수를 채워 incubator 안에 넣어줌으로서 유지시켰다. 증류수는 이러한 조건 하에서 쉽게 오염이 되기 때문에 3-4 일에 한 번씩 갈아준다.

#### 다. Ovalbumin 추출

3 일배에 window를 낼 경우 공간을 만들어 주기 위해서 배양시킨 후 2 일배에 수정란의 뾰족한 부분에 칼로 흠집을 낸 다음, 수평으로 누어 놓고 5 mL syringe로 구멍을 낸 후 ovalbumin을 3-4 mL 정도 뽑아낸다. 수정란이 건조되지 않도록, 또 감염되지 않도록 유리테이프를 봉한 후, 구멍이 아래로 향하도록 놓고 다시 배양시킨다.

#### 라. Window 내기

3 일배에 수정란의 air sac이 있는 쪽 (주사기 구멍의 반대쪽)으로 직경 2-3 cm 크기의 원형 window를 내고 수정란으로 확인된 것만 넓은 유리테이프를 막고 다시 배양시킨다. 원형 window를 내는 방법은 날카로운 칼로 수정란의 껍질 위에 흠을 내며 원형을 그리면서 수정란을 돌리면 원형의 껍질이 떨어지게 된다. 껍질을 제거한 후 나타나는 내부의 막들은 핀셋을 이용하여 제거한다. 이때 껍질 가루가 안쪽으로 떨어지지 않도록 주의하며, 모든 사용되는 도구는 70% ethanol에 소독한 후 사용한다. 수정란은 window를 냈을 때 십자가형의 가

는 혈관이 있는 지로 확인한다. 이 단계에서는 수정란이 오염되지 않도록 clean bench 안에서 실험한다.

#### 마. Thermanox coverslip 준비

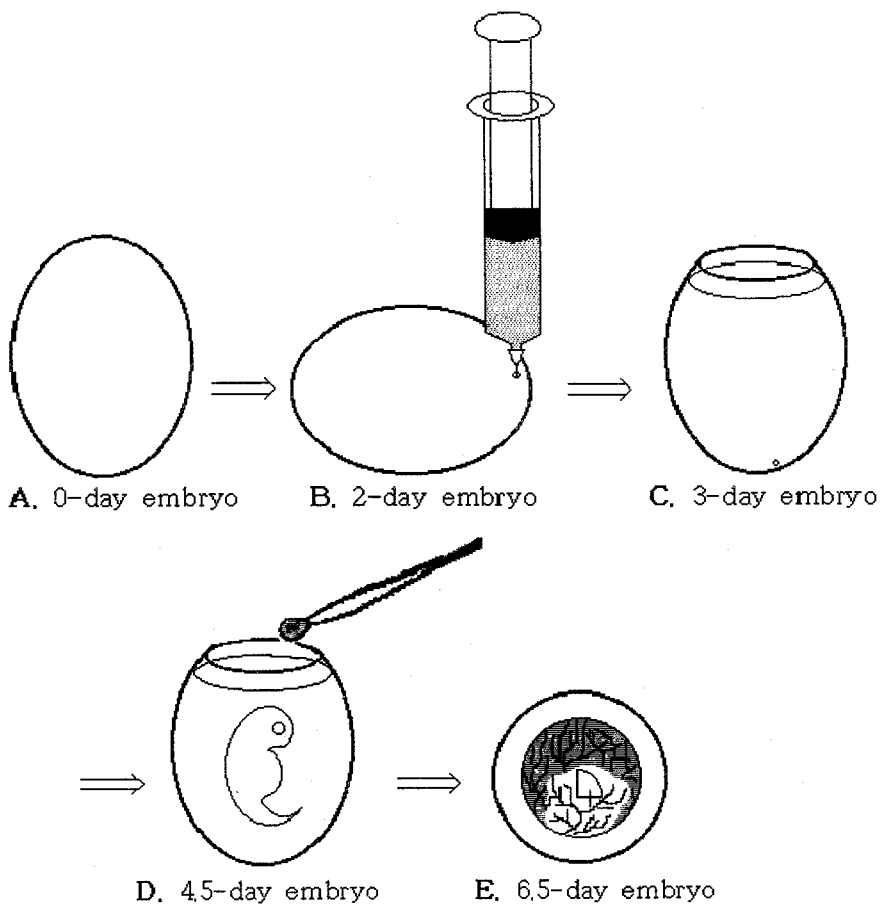
Thermanox coverslip은 멸균시키기 위하여 70% ethanol에 소독한 핀셋과 가위를 이용하여 4 등분한 후 24-well plate 뚜껑을 뒤집어 well 당 하나씩 놓고 clean bench의 UV 아래서 overnight시키거나 4시간 이상 방치한다.

#### 바. 시료의 처리

신생혈관형성 억제제 검색 방법 (Fig. 1)에서 시료를 처리하는 시간은 4.5 일배이다. 시료가 단백질일 경우 멸균수에 녹이고, 유기물질일 경우는 ethanol에 녹여 4등분된 thermanox에 위에 적당한 부피 (2-10  $\mu$ l)로 떨어뜨린다. 시료의 부피는 용매가 멸균수일 때, 그리고 ethanol일 때 모두 적은 부피를 사용하는 것이 좋다. 용매가 멸균수일 경우에는 잘 마르지 않기 때문에, 그리고 ethanol일 경우에는 표면 장력이 약해 시료가 thermanox 밖으로 흐를 수 있기 때문이다. 시료물질이 마르면 시료가 처리된 thermanox를 뒤집어 CAM 위에 올려놓는다. 억제제 검색의 경우, 시료를 4.5 일배에 처리하는데 이때는 CAM이 직경 2-5 mm정도로 생성되며, CAM 성장 속도가 빠른 시기이다. 시료를 처리한 후 수정란을 유리테이프로 막는다. 이때 thermanox가 움직이지 않도록 수정란 내부의 수분을 제거하는 것이 중요하며, 사용되는 가위, 칼, 핀셋 등은 70 % ethanol로 소독하여 사용하고, 핀셋은 시료를 하나하나 처리할 때마다 소독하여 사용한다. 기타 실험기구들도 수정란이 감염되지 않도록 주의하면서 사용한다.

#### 사. 관찰 및 촬영

억제제 검색의 경우 관찰하는 시간은 6.5 일배이다. 유리테이프를 칼로 뜯어낸 다음, 5 mL syringe로 intralipose를 취해 기포를 제거한 뒤 CAM에 주입하면 흰색 바탕에 뚜렷한 혈관을 관찰할 수 있다. Syringe로 intralipose를 주입할 때는 혈관이 다치지 않도록 주의한다. Intralipose가 주입된 수정란은 camera로 근접 촬영한다.



**Fig. 1. Method of CAM assay for angiogenesis inhibitors.** A : Incubation of fertilized eggs at 37 °C. B : Extraction of ovalbumin (3-4 mL). C : Making a window. D : Implantation of Thermanox disk treated with inhibitor sample. E : Injection of fat emulsion and observation

## 아. 결과 해석 및 처리

혈관형성 억제제에 대한 결과의 해석은 각각의 대조시료, 즉 시료를 녹인 용매만을 처리했을 때와 비교하고, 활성화 정도는 양성으로 나타나는 것만 counting하여 시료 처리한 전체 개수에 대한 비율로 나타내었다.

## 2. CAM assay를 이용한 bFGF의 신생혈관형성 유도활성조사

신생혈관형성 촉진제 검색은 앞에서 서술한 CAM assay 방법과 거의 동일하다. 단지, 시료를 처리하는 시기와 관찰하는 시기가 다르다.

### 가. 시료 준비

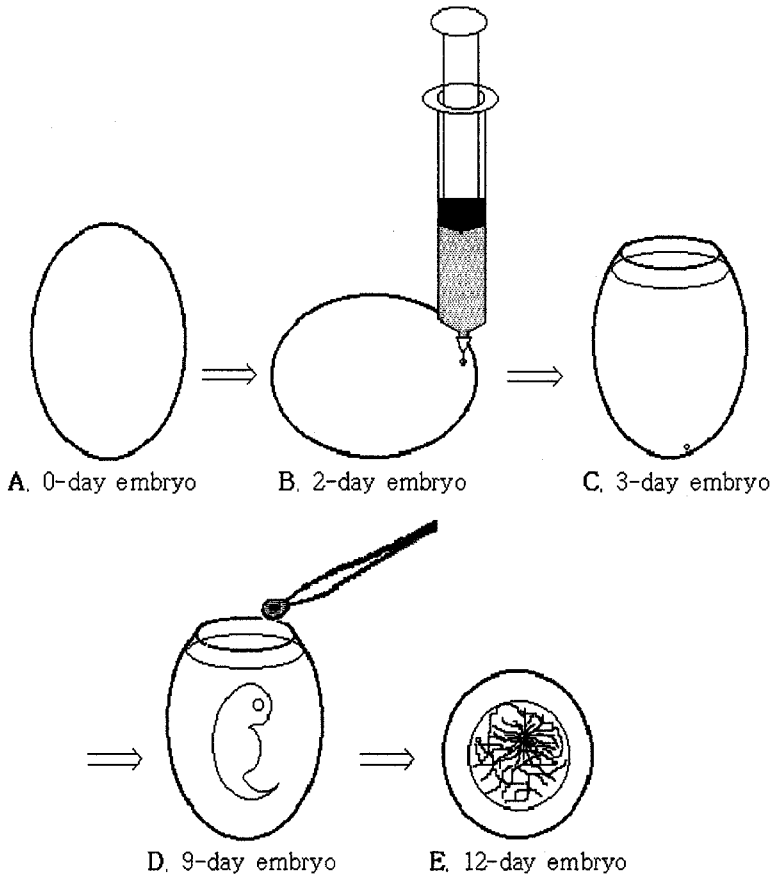
bFGF는 멸균수에 녹여 각각 50 ng/ml로 준비한다.

### 나. 시료의 처리

신생혈관형성 촉진제 검색 (Fig. 2)에서 시료를 처리하는 시간은 9 일배이다. 용매에 녹아 있는 시료를 4등분된 thermanox에 위에 적당한 부피 (2-10  $\mu$ l)로 떨어뜨린다. 9 일배가 되면 window 안의 ovalbumin이 많이 달라 있어 감염에 민감함으로 반드시 clean bench 안에서 실험해야 한다. 이 시기에는 CAM이 완전히 형성되고 혈관이 많이 분포되어 있어 window 내에서 CAM을 찾는다는 어려움이 없다. 그러나 모세혈관 위에서 혈관형성이 유도되는 것을 관찰하는 것이 용이하기 때문에 가능한 한 굵은 혈관은 피해서 시료가 처리된 thermanox를 뒤집어 CAM 위에 올려놓고 다시 유리테이프로 막는다. 이때 사용되는 가위, 칼, 핀셋 등은 70% ethanol로 소독하여 사용하고, 핀셋은 시료를 하나하나 처리할 때마다 소독하여 사용한다. 기타 실험기구들도 수정란이 감염되지 않도록 주의하면서 사용한다.

### 다. 촬영 및 결과 해석

신생혈관형성 촉진제 검색의 경우 관찰하는 시간은 12 일배이다. 촬영 및 결과 해석은 억제제 검색의 경우와 동일하다.



**Fig. 2. Method of CAM assay for angiogenic factors.** A : Incubation of fertilized eggs at 37 °C. B : Extraction of ovalbumin (3-4 mL). C : Making a window. D : Implantation of thermanox disk treated with activator sample. E : Injection of fat emulsion and observation

### 3. CB 2'-Ph와 bFGF간의 상호작용을 통한 신생혈관형성 억제활성조사

## 가. CAM assay를 이용한 CB 2'-Ph와 bFGF간의 상호작용

CAM assay 방법은 위의 방법과 동일하다. CB 2'-Ph가 growth factor인 bFGF에 의해 유도되는 신생혈관형성을 억제하는지 알아보기 위하여 일정한 bFGF 농도 150 ng/egg에 CB 2'-Ph 농도를 0, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{egg}$ 을 준비하여 9 일배의 CAM에 처리한 후 12 일배에 촬영하였다. bFGF는 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도를 준비하여 5  $\mu\text{l}$ 를 사용하였고, CB 2'-Ph는 1과 2.5 mg/ml을 준비하여 각각 5  $\mu\text{l}$ 와 4  $\mu\text{l}$ 를 사용하였다. CB 2'-Ph는 ethanol에 녹아있기 때문에 ethanol에 대한 영향을 최소로 하기 위해 멸균수로 희석하여 처리하였다.

## 나. Novel CAM assay를 이용한 CB 2'-Ph와 bFGF간의 상호작용

### 1) 수정란 배양

수정란을 90% 습도가 유지되는 37°C incubator에서 배양한 후 2 일배에 albumin을 추출하였다. 3 일 배에 air sac 부분에 window를 낸 후 7 일배까지 incubator에서 배양하였다.

### 2) 시료 준비

고농도의 bFGF와 ethanol에 녹아 있는 CB 2'-Ph를 멸균수로 희석하여 0.15 mg/ml bFGF와 1 mg/ml의 CB 2'-Ph를 준비하였다.

### 3) 시료 주입

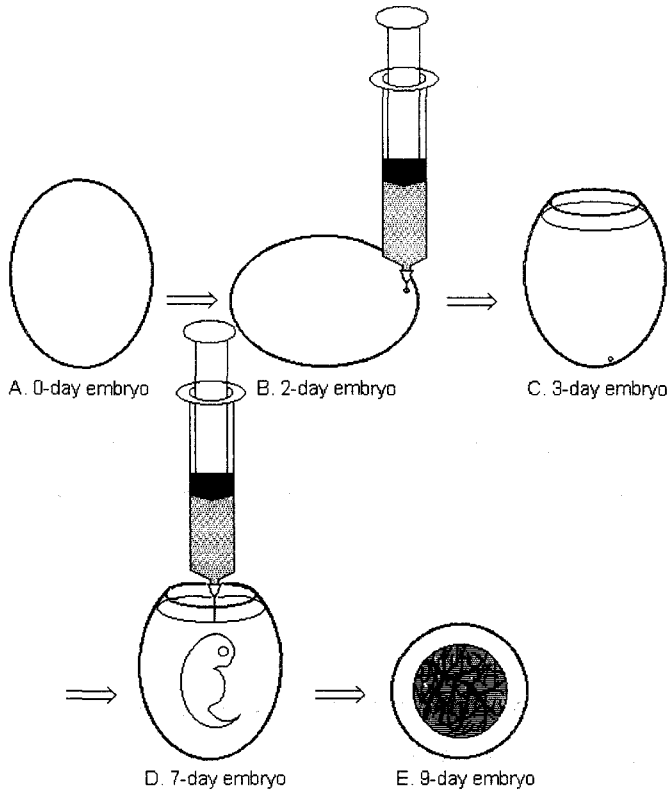
각각 100  $\mu\text{l}$ 씩 섞어 15  $\mu\text{g}/\text{CAM}$  bFGF와 100  $\mu\text{g}/\text{CAM}$  CB 2'-Ph가 되도록 200  $\mu\text{l}$ 를 7 일배의 CAM에 1 ml syringe를 이용하여 주입하였다. 굵은 혈관을 피해 혈관에 손상을 주지 않도록 주의하면서 시료를 주입한 후 유리테이프로 봉한다.

### 4) Embryo 고정 및 관찰

37°C에서 48시간 배양 후, embryo를 고정액 (fixing solution)인 10% formaldehyde로 고정하였다. 5분 후에 해부현미경에 연결된 color CCD 카메라



를 이용하여 영상을 획득하였다. 신생혈관형성 촉진제와 억제제, 그리고 대조 시료에 대해 각각 10개 이상의 수정란을 시험하여 재현성을 확인하였다.



**Fig. 3. Method of Novel CAM assay.** A : Incubation of fertilized eggs at 37 °C. B : Extraction of ovalbumin (3-4 mL). C : Making a window. D : Injection of test samples on the CAM with 1 ml syringe. E. Fixing of the CAM and observation.

### 제 3 장 결 과

#### 제 1 절 천연물로부터 신생혈관형성 억제제 탐색

천연물로부터 신생혈관형성 억제제를 탐색하기 위해, 각 시료를 10  $\mu\text{g}/\text{egg}$ 의 농도를 처리한 후 각각의 신생혈관형성억제 효과를 알아보았다 (Table 1). 본 탐색을 통해 신생혈관형성억제 효과를 갖는 CB2'-OH (1a)과 QUE를 찾을 수 있었다 (Table 1, Fig. 4).

Table 1. Antiangiogenic activity of samples in a CAM assay.

Compound	No. (%) of CAM avascular/total	Compound	No. (%) of CAM avascular/total
CB2'-OH	16/17(94)	QUE	11/18(61)
AFPL-3	5/18(27)	VK3	4/18(22)
HN	5/15(33)	NA	7/23(30)
UM	2/18(11)	EtOH(control)	29/82(35)

A 10  $\mu\text{g}$  dose for each compound was used.

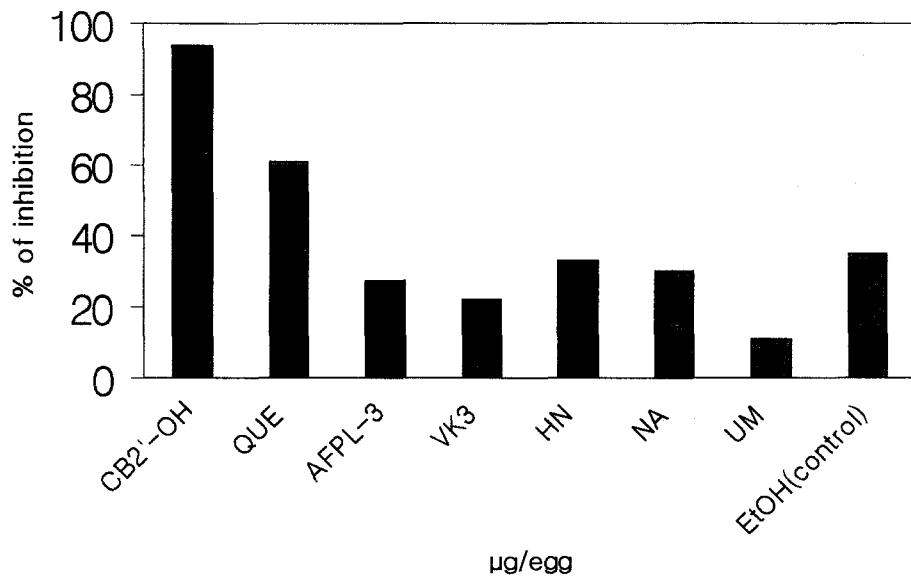
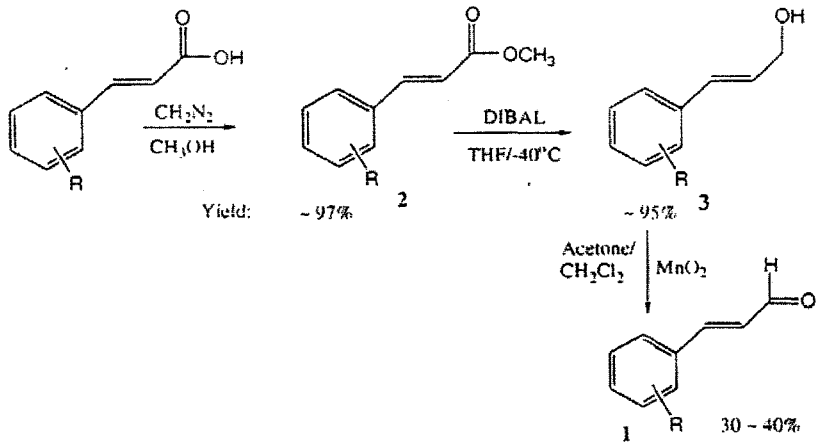


Fig. 4. Antiangiogenic activity of samples in a CAM assay.

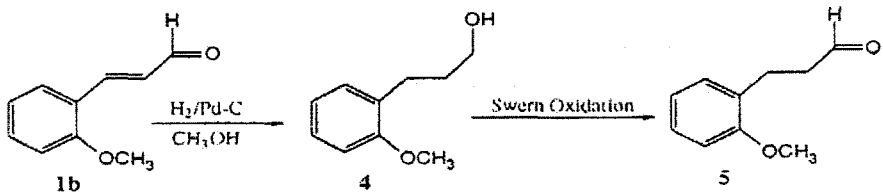
## 제 2 절 Cinnamaldehyde 유도체의 합성 및 신생혈관 형성억제효과 조사

천연물로부터 탐색된 CB2'-OH에 대한 여러 Cinnamaldehyde 유도체를 그림 5와 같은 방법으로 합성하였다. 이것을 통해 총 14개의 물질을 합성한후, 10  $\mu$ g/egg의 농도를 처리하고 각각의 억제효과를 조사하였다. 그 중에서도 1e는 Cinnamaldehyde(1a)와 비슷한 신생혈관형성억제활성을 보였다 (Table 2, Fig. 6).

Scheme 1



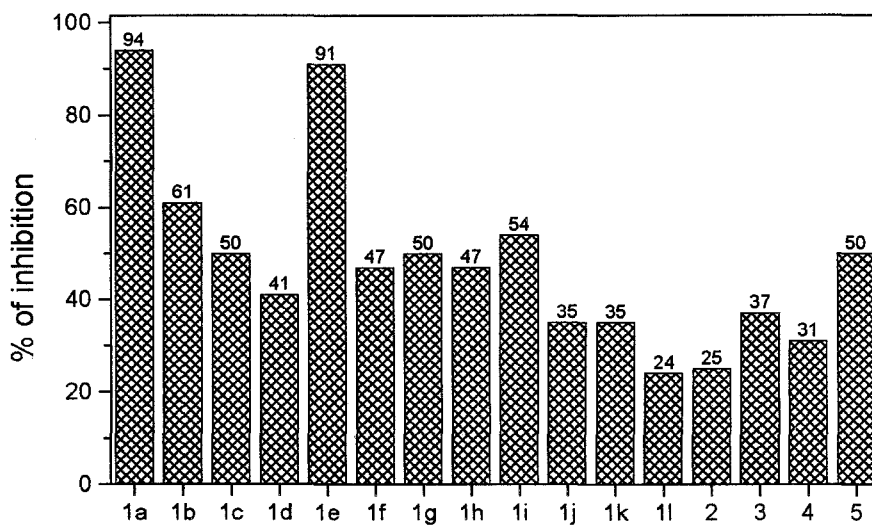
Scheme 2



**Table 2. Antiangiogenic activity of cinnamaldehydes and analogs in a CAM assay.**

Compound	No. (%) of CAM avascular/total	Compound	No. (%) of CAM avascular/total
1a (2'-OH)	16/17(94)	1b	20/33(61)
1c (2'OC(O)CH <sub>3</sub> )	10/20(50)	1d (2'OC(O)C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	7/17(41)
1e (2'OC(O)Ph)	15/17(91)	1f (2'-C(O)OCH <sub>3</sub> )	14/30(47)
1g (3--OH)	8/16(50)	1h (2'-OCH <sub>2</sub> Ph)	14/30(47)
1i (2'-Acrylate)	12/22(54)	1j (2'-p-methylbenzoate)	6/17(35)
1k (2'-o-methylbenzoate )	6/17(35)	1l (2'-o-Methoxybenzoate)	5/21(24)
2 (2'-OH)	4/16(25)	3 (2'-OH)	6/16(37)
4 (2'OCH <sub>3</sub> )	5/16(31)	5 (2'-OCH <sub>3</sub> )	10/20(50)

A 10  $\mu$ g dose for each compound was used.



**Fig. 6. Antiangiogenic activity of cinnamaldehydes and analogs in a CAM assay.**

### 제 3 절 CB 2'-Ph의 활성연구

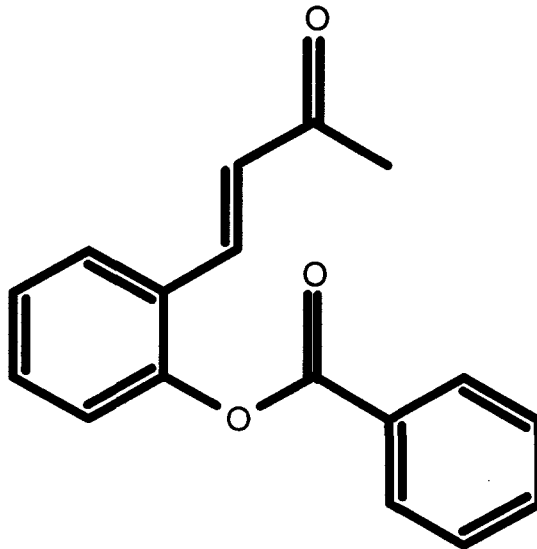
#### 1. CAM assay를 이용한 CB 2'-Ph의 신생혈관형성 억제효과

천연물 탐색으로부터 발견된 CB 2'-OH의 유도체인 CB 2'-Ph의 혈관형성 억제효과를 알아보기 위해, 0.2, 1, 2, 5, 그리고 10  $\mu\text{g}/\text{egg}$ 의 농도를 처리한 결과 각각 40, 58, 59, 78, 그리고 91%의 억제효과를 보았다 (Fig. 7). 따라서 소유기분자인 CB 2'-Ph는 혈관형성에 대한 억제제로서 사용되어질 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

#### 2. CAM assay를 이용한 bFGF의 신생혈관형성 활성효과

bFGF가 혈관형성 활성을 가지고 있는지 확인하기 위해 CAM assay를 수행하였다. bAng은 bFGF는 egg당 50, 100, 150, 그리고 200 ng을 처리한 결과 각각 64, 58, 67, 그리고 92 %의 혈관형성 활성효과가 나타났다 (Fig. 8).

A



B

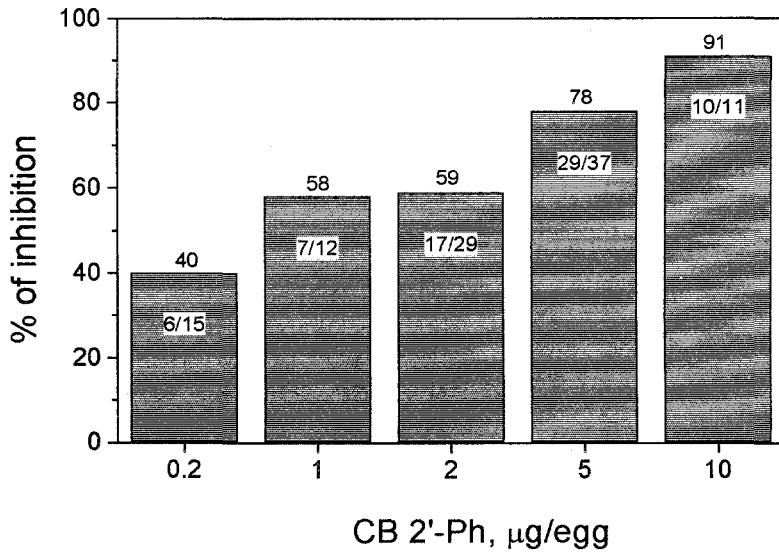


Fig. 7. Structure (A) and antiangiogenic activity (B) of CB 2'- Ph in the CAM assay.

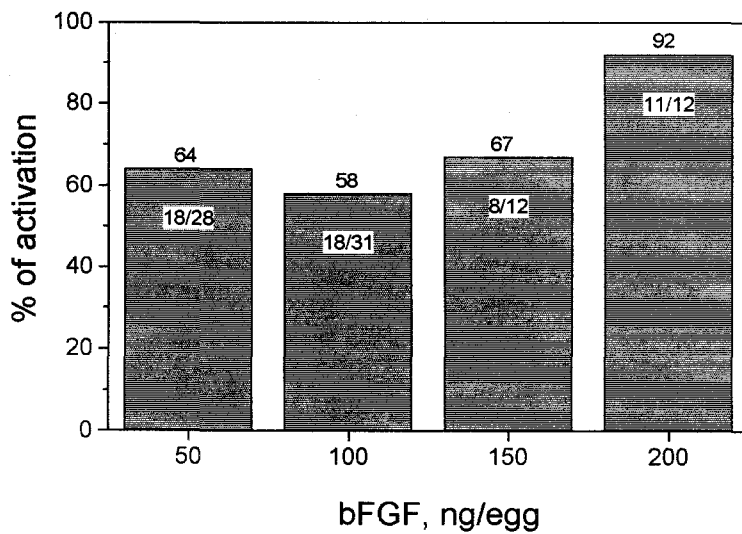


Fig. 8. Angiogenic activity of bFGF in the CAM assay.

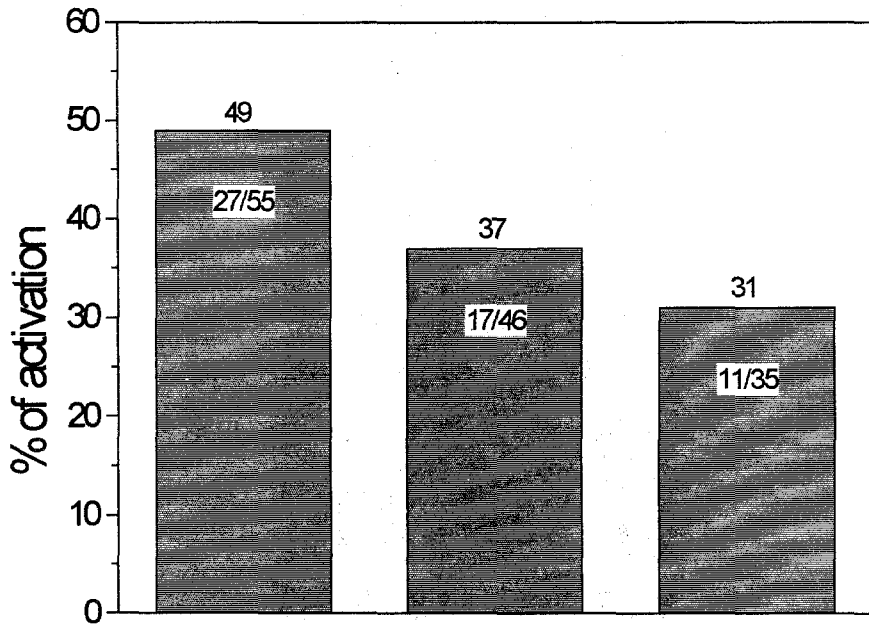


### 3. CB 2'-Ph와 bFGF간의 상호작용을 통한 신생혈관형성 억제활성효과

신생혈관형성 억제제로 보여준 CB 2'-Ph가 growth factor인 bFGF에 의해 유도되는 신생혈관형성을 억제하는지 알아보기 위하여 CAM assay를 수행하였다. 일정한 bFGF 농도 150 ng/egg에 CB 2'-Ph 농도를 0, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{egg}$ 를 처리한 결과, 각각 49, 37, 31 %의 혈관형성 효과를 보았다 (Fig. 9). 다른 방법인 novel CAM assay를 이용하여 15  $\mu\text{g}/\text{CAM}$  bFGF와 100  $\mu\text{g}/\text{CAM}$  CB 2'-Ph가 되도록 200  $\mu\text{l}$ 를 7 일배의 CAM에 주입한 결과 9 일배의 CAM에서 시료를 처리하지 않은 CAM과 bFGF를 처리한 CAM에 비교하여 보았을 때 CB 2'-Ph를 처리한 CAM은 모세혈관이 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 10). 이러한 결과들은 CB 2'-Ph가 배성장에 관련된 정상적인 신생혈관형성을 억제할 뿐만 아니라, bFGF에 의해 유도되는 신생혈관형성도 억제한다는 능력이 있음을 보여주었다.

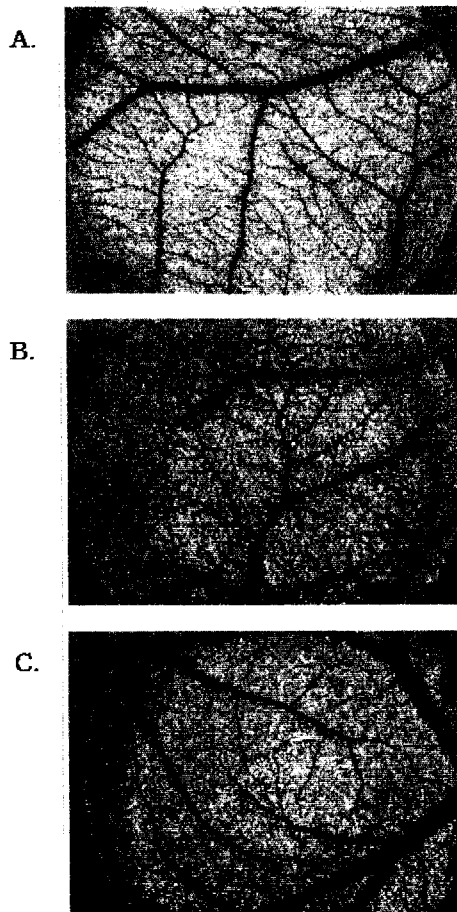
### 4. 내피세포 migration assay를 이용한 CB 2'-Ph의 신생혈관형성 억제활성

신생혈관형성 억제제로 보여준 CB 2'-Ph가 growth factor인 bFGF에 의해 유도되는 신생혈관형성을 억제하는지 알아보기 위하여 내피세포 ECV 304 cell를 이용한 세포의 migration assay를 수행하였다. bFGF에 의해 stimulation된 내피세포는 CB 2'-Ph의 농도가 증가함에 따라 내피세포의 migration이 저해되었다. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CB 2'-Ph를 넣었을 때 migration이 80% 이상 저해되었고, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CB 2'-Ph를 넣었을 때, 93% 이상 저해되었다 (Fig. 11).

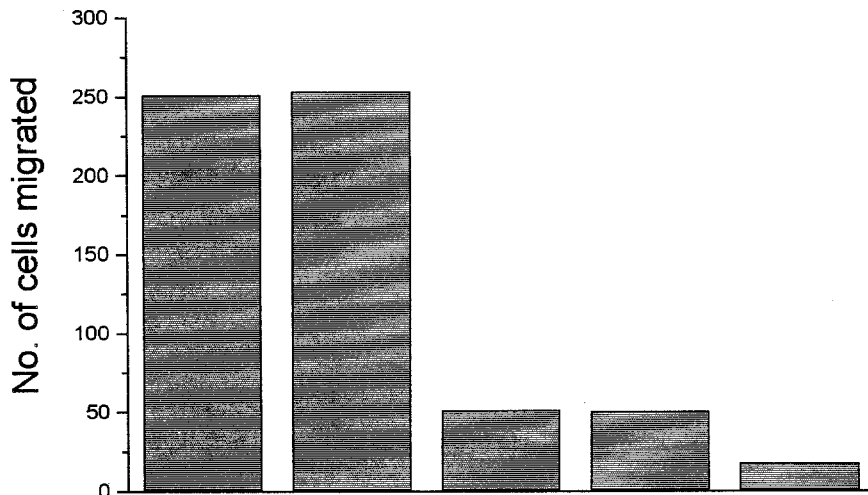


bFGF (150ng)	+	+	+
CB 2'-Ph (μg)	-	5	10

**Fig. 9.** Effects of CB 2'-Ph on angiogenic activity of bFGF in the CAM assay.



**Fig. 10. Angiogenic development of the arterial endpoint in the CAM is stimulated by bFGF and inhibited by CB 2'-Ph on the angiogenic activity of bFGF-induced angiogenesis.** Native (A), bFGF (B), or mixture of bFGF and CB 2'-Ph (C) was applied at E7 to the CAM of embryos. One application of bFGF at 15  $\mu\text{g}/\text{CAM}$  stimulated an increased angiogenic response by 48 h (relative to native control). One application of mixture of bFGF (15  $\mu\text{g}/\text{CAM}$ ) and CB 2'-Ph (100  $\mu\text{g}/\text{CAM}$ ) inhibited angiogenic development after 48 h.



bFGF (3 ng/ml)	+	+	+	+	+
CB2'-Ph (ug/ml)	-	1	5	10	20

**Fig. 11.** The cell migration assay was performed on human ECV304 cells in the presence of 3 ng/ml bFGF with or without CB 2'-Ph.

A dose dependent inhibition of migration was observed. The anti-migratory effect of CB 2'-Ph on bFGF-induced endothelial cell migration was detected with 80 % and 93 % inhibition at a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  and 20  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.

## 제 4 절 QUE 및 약쑥유래 물질의 활성화

### 1. CAM assay를 이용한 QUE 및 약쑥유래 물질의 신생혈관형성 억제효과

천연물 탐색으로부터 발견된 QUE 및 약쑥 유래 물질의 혈관형성억제효과를 알아보기 위해 1, 5, 그리고 10  $\mu\text{g}/\text{egg}$  농도를 처리한 결과 각각 40, 67, 61%의 억제효과를 보았다 (Table 3, Fig. 12).

### 2. 내피세포 *in vitro* migration assay를 이용한 QUE의 신생혈관형성 억제효과

신생혈관형성 억제제로 보여준 QUE가 growth factor인 bFGF에 의해 유도되는 신생혈관형성을 억제하는지 알아보기 위하여 내피세포 ECV 304 cell를 이용한 세포의 migration assay를 수행하였다. bFGF에 의해 stimulation된 내피세포는 QUE의 농도가 증가함에 따라 내피세포의 migration이 저해되었다 (Fig. 13).

### 3. 내피세포 *in vitro* cell cycle arrest assay를 이용한 QUE의 신생혈관형성 억제효과

ECV cell을 이용한 QUE의 cell cycle arrest analysis 결과는 bFGF (3 ng/ml)로 내피세포를 stimulation 한 후, QUE의 농도가 증가함에 따라 S phase의 cell의 percentage가 줄어들었다. (Fig. 14).

Table 3. Angiogenesis Inhibitory effects of QUE 물 arteminolide in different doeses in a CAM assay.

Dose( $\mu$ g/egg)	No.(%) of CAM, avascular/total
10	11/18
5	14/21
1	6/15

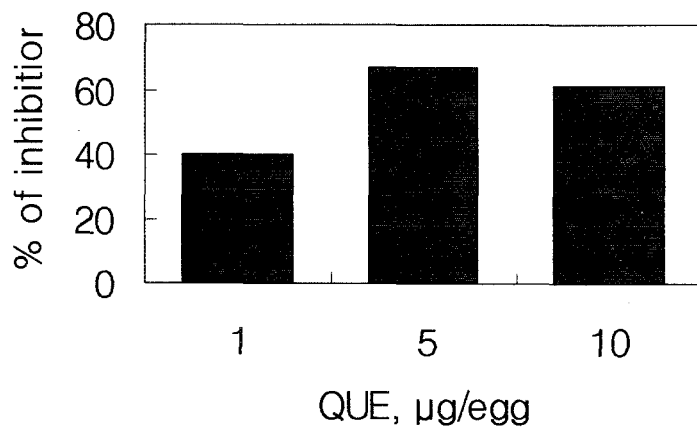
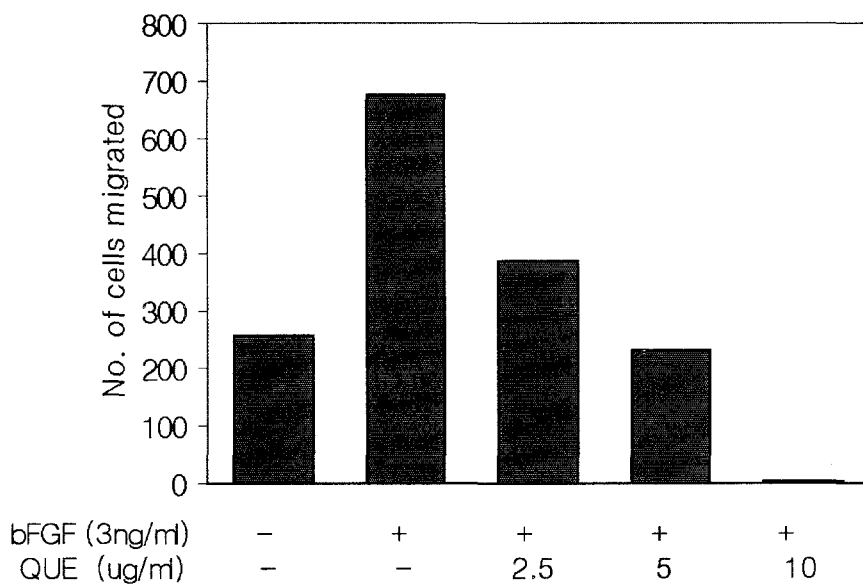
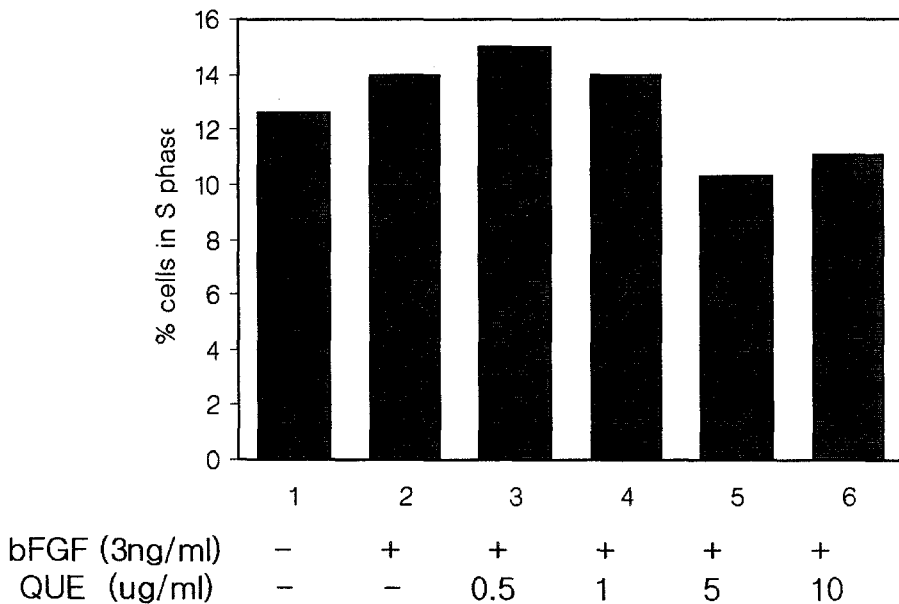


Fig. 12. Structure (A) and antiangiogenic activity (B) of QUE in the CAM assay.



**Fig. 13. Inhibition of bFGF stimulated endothelial cell migration by QUE.** This assay was performed on human ECV304 cells in the presence of bFGF (3ng/ml) with/without QUE.



**Fig. 14. FACS analysis of endothelial cell cycle arrest caused by QUE.** This assay was performed on endothelial cell . ECV304 . After stimulating with bFGF (3ng/ml) in the presence of 1% FBS with or without QUE for 16h hours, samples were prepared and analyzed by FACS . The percentage of cells in S-phase was plotted for various treatments.