

퀴놀론 유도체의 Topoisomerase II에 대한 효과

연승우* · 백남수 · 김태한 · 김기원

일동제약(주) 중앙연구소

(Received July 22, 1996)

Effects of Quinolone Derivatives on Topoisomerase II

Seung Woo Yeon*, Nam Soo Paek, Tae Han Kim and Kee Won Kim

Research Laboratories, Il-Dong Pharm., Co., Ltd., Kyong-ki Do 456-830, Korea

Abstract—Quinolone derivatives, SJ5b (ethyl 5,12-dihydro-5-oxobenzoxazolo(3,2-a)quinoline-6-carboxylate) and SQ7b (3-fluoro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)-5,12-dihydro-5-oxobenzoxazolo(3,2-a)quinoline carboxylic acid) showed *in vitro* cytotoxicities against various tumor cell lines. SJ5b and SQ7b completely inhibited the DNA relaxation activities of human placental topoisomerase II at the concentration of 15.63 and 1.95 µg/ml, respectively. However, unlike etoposide which stabilize the topoisomerase II-DNA complex, SQ7b did not cause topoisomerase II-mediated DNA cleavage and SJ5b weakly stabilized the topoisomerase II-DNA cleavable complex. Through both experiments, DNA relaxation assay by the increment of topoisomerase II concentration and DNA unwinding assay, it was shown that SJ5b and SQ7b did not interact with topoisomerase II itself but bound to DNA. Therefore, it was concluded that DNA binding of SJ5b and SQ7b caused the inhibition of topoisomerase II related to DNA relaxation but no or very weak stabilization of topoisomerase II-DNA cleavable complex. In addition, SJ5b and SQ7b prevented whole cell nucleic acid syntheses in HL60 cells.

Keywords □ quinolone derivatives, topoisomerase I, II, DNA relaxation

Topoisomerase II는 topoisomerase I과 함께 원핵 생물 및 진핵생물에 모두 존재하는 생체내 필수적인 효소로서 DNA replication, RNA transcription 및 chromosome segregation 등의 세포내 작용시 일어나는 DNA의 overwinding/underwinding 및 catenation/decatenation 등의 위상적인 문제를 해결하는 효소이다¹⁻³⁾. 이러한 생체내 기능을 갖고 있는 topoisomerase를 저해하는 물질이 합성 또는 천연물에서 개발되어 항균제 및 항암제 등의 의약품으로 사용되고 있거나 연구되고 있다. 항암효과를 보이는 저해제들은 상대적으로 topoisomerase의 세포내 발현량이 높은 암세포⁴⁾에 비교적 선택적인 저해 효과를 발휘하여 세포 독성을 보이는 것으로 알려져 있다. 현재 알려져 있

는 topoisomerase II 저해제는 topoisomerase II와 DNA의 cleavable complex를 안정화시키는 m-AMSA, teniposide (VM-26), etoposide (VP-16), genistein⁵⁾, saintopin⁶⁾, doxorubicin 및 그 유도체 등과 topoisomerase II의 ATPase기능을 저해하는 ICRF-193⁷⁾, merbarone⁸⁾ 등이 있다. 이외에 topoisomerase II를 표적으로 하는 quinolone 유도체들이 있다. DNA gyrase 저해제로서 개발된 quinolone 유도체는 항균제로 널리 사용되고 있으며 인체에 대한 독성 및 안전성 측면에서 인체 유래의 topoisomerase II 저해 효과에 대한 조사가 되어 있고⁹⁾ 최근에는 항암제로서의 개발 가능성에 대해 연구 중에 있다¹⁰⁾. 항암효과를 보인다고 알려졌있는 quinolone 유도체는 cleavable complex를 안정화시키는 것과 DNA에 결합하는 것등이 알려져 있다. 현재 이러한 효과를 나타내는 quinolone 유도체들로서는 A-84441¹¹⁾ CP-115, 953¹²⁾

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-745-9342 (팩스) 0334-72-6665

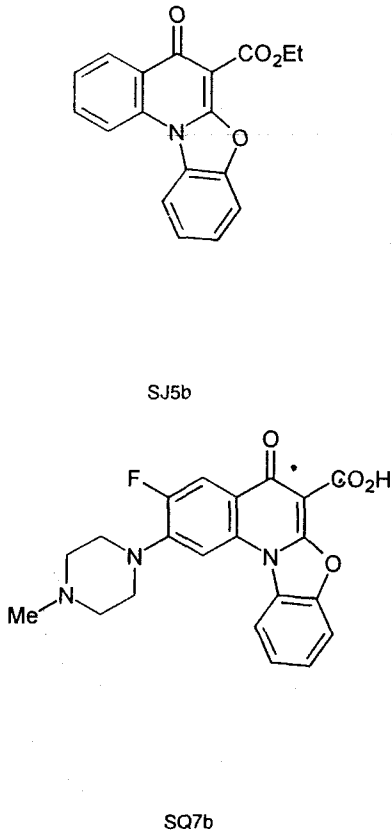


Fig. 1 — Structures of quinolone derivatives.

BO-2367¹³⁾ 등이 보고되어 있다. Yamashita 등¹⁰⁾ 과 Chu 등¹⁴⁾ 은 C-6과 C-8 위치에 halogen의 결합이 있고 N-1 위치에 cyclopropyl기가 있는 quinolone이 암세포 mouse의 연명률을 증가시켰다고 보고했다. 이러한 quinolone과 구조적인 차이를 갖고 있는 SQ7b 및 SJ5b (Fig. 1.)¹⁵⁾가 항균제로서의 효과는 약하고 암세포 mouse에 비교적 높은 세포 독성을 보여 이들에 대해 암세포 mouse의 종류를 확대하여 세포 독성 효과, human topoisomerase II에 대한 저해 효과, 암세포의 DNA 및 RNA합성에의 영향 등을 시험하였다.

실험방법

실험재료 및 시약 - SJ5b 및 SQ7b는 포항 공대 화학과 김동한 교수에게서 제공받아 실험에 사용하였다. m-AMSA 및 actinomycin D는 Sigma Co. Ltd., etoposide는 (주) 和光純藥, mitomycin C는 (주) 協化

藥의 제품을 사용하였다. Supercoiled pBR322 DNA 및 T4 DNA ligase는 (주) 寶酒造의 제품을, human topoisomerase I 및 II는 TopoGen Inc.의 인체 태반 유래의 제품을 사용하였다. [³H]-thymidine 및 [³H]-uridine은 DUPONT사의 제품을 사용하였다. Mouse P388 cell line 및 인체 암세포주 G361, HeLa, HepG2, HL60, K562, MKN45 및 WiDR은 일본 오츠카제약에서 제공받아 사용하였다.

세포 배양 - 7종의 인체 유래 암세포주와 1종의 mouse 유래 암세포주를 RPMI-1640 (10% FBS, 20 mM HEPES)에 배양하였다. Anchorage dependent cell은 trypsin 처리하여, suspended cell은 원심 분리하여 새로운 flask에 옮겨 배양하였다.

화합물의 용해 - SJ5b는 8 mg/ml 농도로 100% methanol에 녹여 증류수나 배지에 희석하여 사용하였다. SQ7b는 0.1N NaOH에 녹인 후 0.1N HCl로 중화시키고 증류수를 첨가하여 2 mg/ml 농도로 하여 실험에 사용하였다. m-AMSA 및 etoposide는 세포독성 실험시에는 100% DMSO에 40 mg/ml의 최고 농도로 녹여 증류수나 배지에 희석하여 사용하였고, 이외의 실험에는 10 mg/ml의 농도로 하여 사용하였다. Mitomycin C는 배지로 용해 및 희석하여 사용하였고 actinomycin D는 100% methanol로 용해 후 배지로 희석하여 최고 농도를 1 mg/ml로 하여 사용하였다.

세포 독성 시험 - Wada 등¹⁶⁾에 의해 변경된 MTT assay 방법을 사용하였다. Anchorage dependent cell은 PBS로 1회 washing 후 trypsin 처리하여, suspended cell은 RPMI-1640 배지로 1회 washing 하여, 배지에 현탁시킨 후 cell counting 하였다. 96-well microplate 각 well당 cell을 10⁴ cells/90 μl씩 넣고 CO₂ incubator (5% CO₂, 37°C)에서 1일 배양하였다. 각 화합물을 배지로 2배 연속 희석하여 각 well에 10 μl씩 넣어 CO₂ incubator (5% CO₂, 37°C)에서 3일 배양한 후, MTT 용액 (5 mg/ml in PBS)을 각 well당 10 μl씩 넣어 CO₂ incubator에 3시간 방치하여 tetrazolium이 formazan으로 환원되도록 하였다. 이후 10% SDS (in 0.01N HCl) 용액을 각 well당 100 μl씩 넣어 37°C에서 24시간 반응시켜 세포를 완전히 용해시킨 후 575/665 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Topoisomerase II에 의한 DNA relaxation 및 unwinding assay - TopoGen Inc.의 방법에 의해 실험하였다. 반응액의 조성은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120

mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM ATP, 0.5 mM DTT, 120 g/ml BSA 및 supercoiled pBR322 DNA 0.25 µg이었다. Relaxation assay buffer 5 µl, sample 10 µl 및 topoisomerase II (2 units/µl) 1 µl을 순서대로 섞고 증류수로 전체 부피를 20 µl로 하여 37°C에서 30분 반응하였다. 10% SDS 2.5 µl과 1 mg/ml proteinase K 2.5 µl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 6× loading buffer를 넣고 반응액 전체 부피와 동량의 chloroform을 첨가해 vortex 및 원심 분리하여 상층액을 Tris-acetate EDTA buffer로 전기 영동 (1% agarose gel, 50 V)하였다. 이하의 topoisomerase 및 T4 DNA ligase 반응액도 동일한 방법에 의해 전기영동하였다.

Unwinding assay는 Yoshinari등¹⁷⁾의 방법을 참고하였다. 반응액 조성은 relaxation assay시와 동일하였다. Relaxation assay buffer 5 µl 및 topoisomerase II (2 units/µl) 1 µl을 섞고 증류수로 전체 양을 15 µl로 하여 37°C에서 30분 반응시켜 supercoiled pBR322 DNA를 relaxation시켰다. 시료 5 µl을 첨가하여 다시 37°C에서 30분 반응시킨 후 전기 영동 (1% agarose gel, 50 V)하였다.

Topoisomerase II에 의한 DNA cleavage assay - 반응액의 조성은 30 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 3 mM ATP, 15 mM mercaptoethanol 및 supercoiled pBR322 DNA 0.4 g이었다. Cleavage assay buffer 5 µl, sample 10 µl 및 topoisomerase II (2 units/µl) 2.5 µl을 순서대로 섞고 증류수로 전체 부피를 20 µl로 하여 37°C에서 30분 반응 후 전기 영동(1.2% agarose gel, 30 V)하였다.

Topoisomerase I에 의한 DNA unwinding assay - TopoGen Inc.의 방법에 의해 실험하였다. 반응액의 조성은 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl,

1 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.4 mM spermidine, 4% glycerol 및 supercoiled pBR322 DNA 0.25 g이었다. Unwinding assay buffer 5 µl 및 topoisomerase I (2 units/µl) 2.5 µl을 순서대로 섞고 증류수로 전체 양을 15 µl로 하여 37°C에서 30분 반응시켜 supercoiled pBR322 DNA를 relaxation시켰다. 시료 5 µl을 첨가하여 다시 37°C, 30분 반응 후 전기 영동 (1% agarose gel, 50 V)하였다.

T4 DNA ligase 및 linear pBR 322를 이용한 DNA unwinding assay - Montecucco등¹⁸⁾ 및 Yoshinari등¹⁹⁾에 의한 방법에 따라 실험하였다. 반응액의 조성은 33 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3 mM MgCl₂, 0.35 mM ATP, 5 mM DTT 및 EcoR I로 절편화 시킨 pBR322 DNA 0.4 g이었다. Ligation buffer 10 µl, sample 10 µl을 섞어 실온에서 10분 반응 후, T4 DNA ligase (350 units/µl) 1 µl을 넣고 16°C에서 120분 반응 후 전기 영동(1% agarose gel, 50 V)하였다.

SJ5b 및 SQ7b의 whole cell DNA 및 RNA합성에 대한 효과 - 2×10⁵ cells/well/1.8 ml로 24-well microplate의 각 well에 HL60을 분주한 후, SJ5b 및 SQ7b를 배지로 희석하여 200 µl씩 각 well에 첨가하여 CO₂ incubator에서 3시간 배양하였다. [³H]-thymidine (1 mCi/ml) 및 [³H]-uridine (0.2 mCi/ml)을 각 well에 넣어 CO₂ incubator에 1시간 동안 방치 후 배양액을 원심 분리하여 cell을 모았다. 0.5 ml PBS로 cell을 현탁 후 20% trichloroacetic acid 0.5 ml를 첨가하여 10분 동안 고정시켰다. 0.45 mm nitrocellulose filter로 세포여액을 여과 후, 5% trichloroacetic acid로 filter를 3회 washing 하였다. 완전히 건조시킨 filter를 scintillation vial에 넣고 5 ml scintillation fluor로 완전히 녹인 후 liquid scintillation counter로 방사능 (cpm)을 1분 동안 측정하였다.

Table I - *In vitro* cytotoxicities against tumor cell lines

cell line	IC ₅₀ (µg/ml)				
	SJ5b	SQ7b	m-AMSA	etoposide	mitomycin C
P388 leukemia	3.38	4.11	0.39)	0.39)	0.04)
K562 leukemia	35.11	16.09	3.57	42.88	0.73
HL60 leukemia	9.18	3.46	0.77	2.31	0.44
MKN45 stomach	12.19	11.27	3.07	3.10	0.29
HepG2 hepatoma	33.87	8.34	2.77	16.54	0.33
WiDr colon	33.47	15.09	2.62	1.94	1.30
G361 melanoma	36.59	20.84	3.61	50.88	0.80
HeLa cervix	29.91	29.65	6.21	1.47	1.93

결 과

암세포에 대한 *in vitro* 세포 독성 - 암세포주에 대한 SJ5b 및 SQ7b의 세포 독성은 전반적으로 대조 약제인

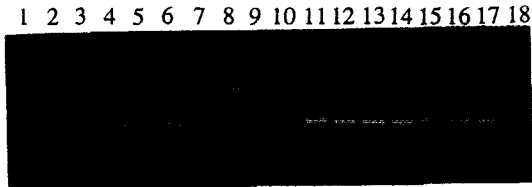


Fig. 2—Effects of SJ5b and SQ7b on the DNA relaxing activity of topoisomerase II. lane 1, no drug control containing supercoiled pBR322 DNA and topoisomerase II only; lane 2, supercoiled pBR322 DNA only; lane 3~10, SJ5b at 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 and 0.98 $\mu\text{g/ml}$; lane 11~18, SQ7b at 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 and 0.98 $\mu\text{g/ml}$.

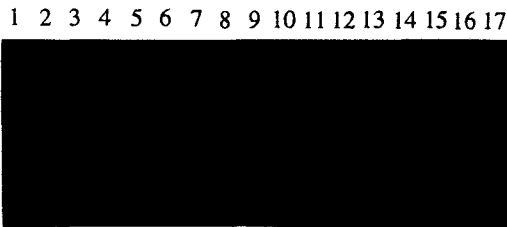


Fig. 3—Effects of SJ5b and SQ7b on topoisomerase II-mediated DNA cleavage. lane 1, supercoiled pBR322 DNA only; lane 2, no drug control containing supercoiled pBR322 DNA and topoisomerase II only; lane 3~5, etoposide at 100, 50 and 10 $\mu\text{g/ml}$; lane 6~8, SJ5b at 100, 50 and 10 $\mu\text{g/ml}$; lane 9~11, SQ7b at 100, 50 and 10 $\mu\text{g/ml}$; lane 12~14, 100 $\mu\text{g/ml}$ etoposide and SJ5b at 100, 50 and 10 $\mu\text{g/ml}$, respectively; lane 15~17, 100 $\mu\text{g/ml}$ etoposide and SQ7b at 100, 50 and 10 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

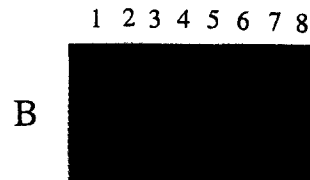
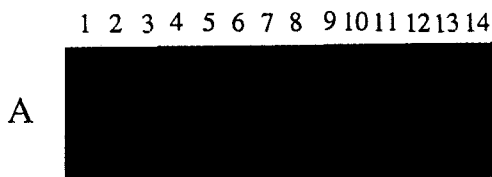


Fig. 5—Effects of SJ5b and SQ7b on the DNA unwinding activity of topoisomerase I. (A) lane 1, supercoiled pBR322 DNA only; lane 2, no drug control containing supercoiled pBR322 DNA and topoisomerase I only; lane 3~8, SJ5b at 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 and 7.81 $\mu\text{g/ml}$; lane 9~14, SQ7b at 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 and 7.81 $\mu\text{g/ml}$ (B) lane 1, supercoiled pBR322 DNA only; lane 2, no drug control containing supercoiled pBR322 DNA and topoisomerase I only; lane 3~8, m-AMSA at 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 and 7.81 $\mu\text{g/ml}$.

m-AMSA, etoposide, mitomycin C보다 약했다 (Table I). SJ5b 및 SQ7b는 P388 및 HL60세포에 대한 세포 독성이 다른 조직 암세포주들의 세포 독성보다 높았다. P388에 대한 IC_{50} 은 SJ5b가 3.38 $\mu\text{g/ml}$, SQ7b가 4.11 $\mu\text{g/ml}$ 이었고, HL60에 대해서는 SJ5b가 9.18 $\mu\text{g/ml}$, SQ7b가 3.46 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. SQ7b의 경우, K562에 대해 16.08 $\mu\text{g/ml}$, HepG2에 대해 8.34 $\mu\text{g/ml}$, G361세포에 대해 20.84 $\mu\text{g/ml}$ 의 IC_{50} 을 보여 각 세포에 대해 42.88 $\mu\text{g/ml}$, 16.54 $\mu\text{g/ml}$, 50.88 $\mu\text{g/ml}$ 의 IC_{50} 를 보인 etoposide 보다 높은 세포 독성을 보였다.

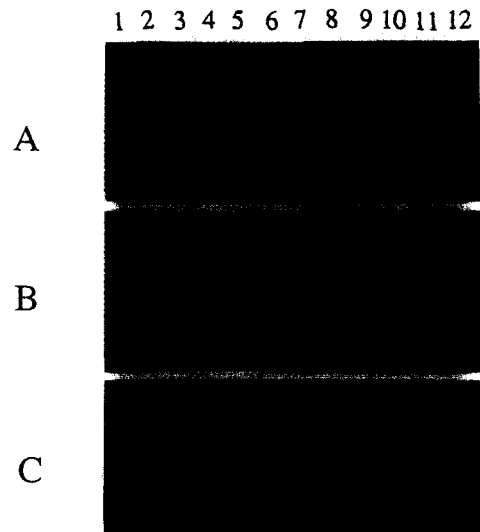


Fig. 4—Inhibitory effects of SJ5b and SQ7b against 0.5(A), 1(B), and 5(C) units of topoisomerase II (A), (B), (C) lane 1, supercoiled pBR322 DNA only; lane 2, no drug control containing supercoiled pBR322 DNA and topoisomerase II only; lane 3~5, etoposide at 250, 125 and 62.5 $\mu\text{g/ml}$; lane 6~9, SQ7b at 7.81, 3.91, 1.95 and 0.98 $\mu\text{g/ml}$; lane 10~12, SJ5b at 62.5, 31.25 and 15.63 $\mu\text{g/ml}$.

SJ5b 및 SQ7b의 topoisomerase II에 대한 효과 -

SJ5b 및 SQ7b의 topoisomerase II에 대한 저해 효과를 DNA relaxation 및 cleavage assay에 의해 평가하였다. Relaxation 저해 효과 및 cleavable complex의 안정화 등의 결과를 종합해 보면, topoisomerase II의 활성에 대한 저해 효과는 SJ5b는 15.63 µg/ml부터, SQ7b는 1.95 µg/ml부터 relaxation 활성을 완전히 저해하였다(Fig. 2). SJ5b는 10 µg/ml 농도까지 cleavable complex를 약하게 안정화시킨 반면 SQ7b는 cleavable complex를 안정화시키지는 않았다(Fig. 3).

SJ5b 및 SQ7b에 의한 topoisomerase II의 relaxation 활성 저해가 topoisomerase II의 직접 저해에 의해 일어나는 결과인지를 확인하고자 효소 농도 변화에 의한 relaxation 활성 저해 효과를 시험하였다. Topoisomerase II의 농도를 0.5, 1 및 5 units로 하여 relaxation 실험을 한 결과(Fig. 4), SJ5b 및 SQ7b는 topoisomerase II의 농도 변화에 의한 저해 농도가 변하지 않고 각각 15.63 µg/ml, 1.95 µg/ml의 농도에서 완전히 relaxation을 저해하였다. 반면 etoposide는 topoisomerase II의 농도 증가에 반비례하여 저해 효과가 약해지는 것이 관찰되었다. 이러한 결과를 보면 SJ5b 및 SQ7b는 topoisomerase II를 직접 저해하는 물질은 아닌 것으로 판단되었다.

DNA unwinding assay - SJ5b 및 SQ7b가 DNA에 결합하는 성질이 있는가를 DNA unwinding assay에 의해 실험하였다. Topoisomerase I를 이용한 DNA unwinding assay 결과(Fig. 5), SJ5b는 최고 측정 농도인 250 µg/ml에서 supercoiled pBR322 DNA를 완전히 unwinding 시킨 반면, SQ7b는 250 µg/ml에서

도 unwinding 효과가 없었다. 한편, intercalating agent인 m-AMSA는 15.63 µg/ml부터 DNA unwinding 효과가 있었다.

Topoisomerase II를 이용한 DNA unwinding assay에서는 SJ5b는 15.63 µg/ml부터, SQ7b는 최저 측정 농도인 7.81 µg/ml에서도 unwinding 효과가 있었다(Fig. 6). m-AMSA는 15.63 µg/ml부터 unwinding 효과가 있었다.

T4 DNA ligase를 이용한 DNA unwinding assay는 m-AMSA는 15.63 µg/ml부터 supercoiled pBR322 DNA를 형성시켰을 뿐 아니라 ligation의 저해도 보였다(Fig. 7). SJ5b 및 SQ7b는 31.25 µg/ml부터 supercoiled DNA를 형성시켰으며 또한 약하게 ligation의 저해도 보였다.

SJ5b 및 SQ7b의 etoposide에 대한 antagonistic effect - SJ5b나 SQ7b를 etoposide와 함께 처리한 반응액은 etoposide를 단독 처리한 반응액보다 생성된

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



Fig. 6 - Effects of SJ5b and SQ7b on the DNA unwinding activity of topoisomerase II. lane 1, supercoiled pBR322 DNA only; lane 2, no drug control containing supercoiled pBR322 DNA and topoisomerase II only; lane 3~7, SQ7b at 125, 62.5, 31.25, 15.63 and 7.81 µg/ml; lane 8~12, SJ5b at 125, 62.5, 31.25, 15.63 and 7.81 µg/ml; lane 13~17, m-AMSA at 31.25, 15.63, 7.81, 3.90 and 1.95 µg/ml.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

A



1 2 3 4 5 6 7 8 9

B



Fig. 7 - Effects of SJ5b and SQ7b on the DNA unwinding activity of T4 DNA ligase. (A) lane 1, EcoRI digested pBR322 DNA only; lane 2, supercoiled pBR322 DNA only; lane 3, no drug control containing EcoRI digested pBR322 DNA and T4 DNA ligase; lane 4~10, SQ7b at 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5 and 125 µg/ml; lane 11~17, SJ5b at 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5 and 125 µg/ml (B) lane 1, EcoRI digested pBR322 DNA only; lane 2, supercoiled pBR322 DNA only; lane 3, no drug control containing EcoRI digested pBR322 DNA and T4 DNA ligase; lane 4~9, m-AMSA at 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5 and 125 µg/ml.

Table II— Inhibitory effects of SJ5b and SQ7b on the whole cell DNA and RNA syntheses of HL60 cell

compound	IC ₅₀ (μg/ml)		
	thymidine (A)	uridine (B)	(A)/(B)
SJ5b	9.31	6.75	1.38
SQ7b	5.44	4.44	1.22

linear DNA양이 감소됨을 관찰할 수 있었다. 또 SJ5b 및 SQ7b의 농도 증가에 따라 etoposide에 의해 생성된 linear DNA의 양도 감소하였다(Fig. 3).

SJ5b 및 SQ7b의 DNA 및 RNA 합성에의 영향

SJ5b 및 SQ7b는 DNA에 결합하는 물질이기 때문에 세포의 DNA 및 RNA합성에 영향이 있을 것으로 판단되었다. SJ5b 및 SQ7b의 처리 농도 증가에 따라 DNA 및 RNA 합성의 감소가 보였다(Table II). DNA 합성 저해의 IC₅₀은, SJ5b가 9.31 μg/ml, SQ7b가 5.44 μg/ml이었다. RNA 합성 저해의 IC₅₀은, SJ5b가 6.75 μg/ml, SQ7b가 4.44 μg/ml이었다. SJ5b 및 SQ7b 모두 DNA보다 RNA의 합성을 약간 더 저해하였으나 그 차이는 크지 않았다.

고 찰

SJ5b 및 SQ7b는 topoisomerase II의 relaxation 활성을 저해하였다. SQ7b는 topoisomerase II와 DNA의 cleavable complex를 안정화시키지 않았으나 SJ5b는 약하게 안정화시키는 것이 관찰되었다. Topoisomerase II의 농도 변화에 의한 relaxation 실험에 의해 SJ5b 및 SQ7b는 topoisomerase II에 직접적인 저해 효과를 보이지 않는다는 것을 알았다. 한편, DNA unwinding 실험에 의해 SJ5b 및 SQ7b가 DNA에 결합하는 물질이라는 것을 확인하였으나 각 unwinding assay의 결과에 차이를 보였다. Permana²⁰⁾ 및 Fan²¹⁾은 Mg²⁺ ion이 quinolone의 C-3위치의 carboxyl기와 C-4위치의 ketone기와 함께 작용하여 quinolone의 DNA 결합을 촉진 및 안정화시킨다고 보고하였다. 따라서 SQ7b는 carboxyl기와 ketone기를 갖고 있어 Mg²⁺ ion 농도의 영향을 받았을 것으로 판단되어진다. SJ5b는 C-4위치에 carboxyl기 대신 carboxyethyl기를 갖고 있지만 Mg²⁺ ion의 영향을 받는 것으로 추정된다. SJ5b 및 SQ7b가 DNA에 결합하는 성질을 갖지만 DNA에 intercalation하는지 또는 DNA의 major groove나 minor groove에 결합하

는지는 더 조사해 보아야 할 것이다.

ICRF-193⁷⁾, merbarone⁸⁾, fostriecin²²⁾, aclarubicin²³⁾ 등의 topoisomerase II 저해제는 topoisomerase II에 의한 cleavable complex를 안정화시키는 저해제 (m-AMSA, etoposide, teniposide 등)와 함께 반응시키면 cleavable complex의 형성을 억제한다고 보고되어 있다. 이들 저해제들은 topoisomerase II의 반응 단계를 설명한 two gate model³⁾에서 cleavable complex를 형성하기 전후 단계에서 작용하여 cleavable complex의 형성을 저해한다고 알려져 있다. Etoposide와 함께 처리시 SJ5b 및 SQ7b도 이러한 효과를 보임을 확인하였다. 그러나 cleavable complex 형성을 저해하기보다는 DNA에 결합하여 위상적 변화를 일으켜 topoisomerase II가 DNA에 결합하는 것을 어렵게 하여 일어난 현상으로 볼 수 있다. SJ5b 및 SQ7b는 topoisomerase II 농도 변화에 따른 relaxation 정도에 차이가 없고 unwinding assay에 의해 DNA에 결합하는 물질이라는 것이 이를 뒷받침한다. SJ5b 및 SQ7b가 이 DNA에 결합하여 topoisomerase II의 relaxation 활성 저해, 핵산합성저해 및 항암효과를 보이는 quinoxaline 구조의 A-62176²⁰⁾이 이미 보고되어 있다.

결과적으로 SJ5b 및 SQ7b는 Mg²⁺ ion의 존재 하에 DNA에 결합하여 DNA replication, RNA transcription, DNA ligation 등 핵내 DNA와 관련된 기능을 저해하며 또한 세포 독성을 보이는 물질로 사료된다.

SJ5b 및 SQ7b가 mitomycin C, m-AMSA 및 etoposide 등의 대조군보다 세포 독성이 약하고 topoisomerase II의 cleavable complex 형성을 안정화시키는 효과가 미약하거나 없지만 이들의 작용기작을 기초로 보다 우수한 세포 독성 및 topoisomerase II 저해 효과를 보이는 quinolone 유도체의 개발에 기여할 수 있을 것으로 보여진다.

감사의 말씀

이 연구는 일본 오츠카제약(주)의 지원으로 이루어졌

기에 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Wang, J. C. : DNA topoisomerase. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 665 (1985).
- 2) Liu, L. F. : DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 351 (1989).
- 3) Roca, J. : The mechanisms of topoisomerases. *TIBS*, **20**, 156 (1995).
- 4) Husain, I., Mohler, J. L., Seigler, H. F. and Besterman, J. M. : Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein and catalytic activity in human tumors : Demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **54**, 539 (1994).
- 5) Yamashita, Y., Kawada, S. and Nakano, H. : Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 737 (1990).
- 6) Yamashita, Y., Saitoh, Y., Ando, K., Takahashi, K., Ohno, H. and Nakano, H. : Saintopin, a new antitumor antibiotic with topoisomerase II dependent DNA cleavage activity, from *Pae-cilomyces*. *J. Antibiotics* **43**, 1344 (1990).
- 7) Tanabe, K., Ikegami, Y., Ishida, R. and Andoh, T. : Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer Res.* **51**, 4903 (1991).
- 8) Drake, F. H., Hofmann, G. A., Mong, S., Bartus, J. O., Hertzberg, R. P., Johnson, R. K., Mattern, M. R. and Mirabelli, C. K. : *In vitro* and intracellular inhibition of topoisomerase II by the antitumor agent merbarone. *Cancer Res.* **49**, 2578 (1989).
- 9) Barrett, J. F., Gootz, T. D., McGuirk, P. R., Farrell, C. A. and Skolowski, S. A. : Use of *in vitro* topoisomerase II assays for studying quinolone antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1697 (1989).
- 10) Yamashita, Y., Ashizawa, T., Morimoto, M., Hosomi, J. and Nakano, H. : Antitumor quinolones with mammalian topoisomerase II mediated DNA cleavage activity. *Cancer Res.* **52**, 2818 (1992).
- 11) Clement, J. J., Burren, N., Jarvis, K., Chu, D. T. W., Swiniarski, J. and Alder, J. : Biological characterization of a novel antitumor quinolone. *Cancer Res.* **55**, 830 (1995).
- 12) Elsea, S. H., McGuirk, P. R., Gootz, T. D., Moy-nihan, M. and Osheroff, N. : Drug features that contribute to the activity of quinolones against mammalian topoisomerase II and cultured cells : Correlation between enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage *in vitro* and cytotoxic potential. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2179 (1993).
- 13) Yoshinari, T., Mano, E., Arakawa, H., Kurama, M., Iguchi, T., Nakagawa, S., Tanaka, N. and Okura, A. : Stereo(C7)-dependent topoisomerase II inhibition and tumor growth suppression by a new quinolone, BO-2367. *Jpn. J. Cancer Res.* **84**, 800 (1993).
- 14) Chu, D. T. W., Hallas, R., Clement, J. J., Alder, J., McDonald, E. and Plattner, J. J. : Synthesis and antitumor activities of quinolone antineoplastic agents. *Drug Exp. Clin. Res.* **18**, 275 (1992).
- 15) Kim, D. H., Jung, S. J. and Yeon, S. W. : 3-Fluoro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)-5, 12-dihydro-5-oxobezoxazolo(3,2-a)quinoline-6-carboxylic acid : Synthesis and *in vitro* cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 1953 (1995).
- 16) Wada, Y., Tomiyoshi, Y., Fujimaru, J., Ogura, M., Yoshida, S. and Takeda, Y. : Sensitivity test of anti-tumor agents. : 2. Application of MTT assay. *Jpn. J. Cancer Chemother.* **18**, 1587 (1991).
- 17) Yoshinari, T., Okada, H., Yamada, A., Uemura, D., Oka, H., Suda, H. and Okura, A. : Inhibition of topoisomerase II by a novel antitumor cyclic depsipeptide, BE-22179. *Jpn. J. Cancer Res.* **85**, 550 (1994).
- 18) Montecucco, A., Pedrali-Noy, G., Spadari, S., Zanolin, E. and Giovanni : DNA unwinding and inhibition of T4 DNA ligase by anthracyclines. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3907 (1988).
- 19) Yoshinari, T., Matsumoto, M., Arakawa, H., Okada, H., Nokuchi, K., Suda, H., Okura, A. and

- Nishimura, S. : Novel antitumor indolocarbazole compound 6-N-formylamino-12,13-dihydro-1, 11-dihydroxy-13-(β -D-glucopyranosyl)-5H-indolo [2, 3-a] pyrrolo [3,4-c] carbazole-5,7(6H)-dione(NB-506) : Induction of topoisomerase I-mediated DNA cleavage and mechanisms of cell line-selective cytotoxicity. *Cancer Res.* **55**, 1310 (1995).
- 20) Permana, P. A., Snapka, R. M., Shen, L. L., Chu, D.T. W., Clement, J. J. and Plattner, J. J. : Quinobennoxazines: A class of novel antitumor quinolones and potent mammalian DNA topoisomerase II catalytic inhibitors. *Biochemistry* **33**, 11333 (1994).
- 21) Fan, J., Sun, D., Yu, H., Kerwin, S. M. and Hurely, L. H. : Self-assembly of a quinobenoxazine-Mg²⁺ complex on DNA: A new paradigm for the structure of a drug-DNA complex and implications for the structure of the quinolone bacterial gyrase-DNA complex. *J. Med. Chem.* **38**, 408 (1995).
- 22) Boritzki, T. J., Wolfard, T. S., Besserer, J. A., Jackson, R. C. and Fry, D. W. : Inhibition of type II topoisomerase by fostriecin. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 4063 (1988).
- 23) Jensen, P. B., Sørensen, B. S., Demant, E. J. F., Sehested, M., Jensen, P. S., Vinde ϕ , L. and Hansen, H. H. : Antagonistic effect of aclarubicin on the cytotoxicity of etoposide and 4'-(9-acridinylamino)methanesulfonamide in human small cell lung cancer cell lines and on topoisomerase II-mediated DNA cleavage. *Cancer Res.* **50**, 3311 (1990).