

라스 단백질 활성화 저해제 탐색

권병목 · 이승호

생명공학연구소 항생물질연구실

1. 서론

삶의 질을 향상시키는데 가장 큰 걸림돌 중의 하나가 암이라는 데에는 이론의 여지가 없다. 이를 증명이나 하듯이 국내에서도 가장 큰 사망원인이 암이라는 것이 통계청 자료에 의해서 증명되었다(1997년도 전체사망자의 23%가 암이 원인). 다음 표에서 볼 수 있듯이 암으로 인한 경제적 손실 또한 엄청나다.

항 목(1997년)	경제적 손실(단위: 억)
의료보험 급여	4,000
환자부담 진료비	2,600
환자부담 의료비	3,200
환자 간병비	1,200
생산성 손실	2,000
총 손실	1조 3,150

암이 발병하는 원인은 다양한 각도에서 볼 수 있지만 크게는 환경오염, 유해물질에 대한 노출, 약물의 남용 등과 고령화에 따른 유전자들의 변형 등을 대표적인 원인이라 할 수 있을 것이다. 이런 여러 가지 원인에 의해 암환자가 늘고 있지만, 암을 치료할 수 있는 진정한 의미의 치료제가 없는 실정이다. 암치료제가 있다고 하더라도 세포독성으로 인한 부작용과 항암제에 의한 또 다른 암의 발생등 많은 문제점이 따르고 있다. 이런 문제점들을 해결한 치료제의 개발을 위해서 의과학 관련 학자 및 제약회사들은 독성이 적으며 치료효과가 크고, 암 세포에만 특이적으로 작용하는 치료제의 개발에 노력해왔고, 지금 이 시간에도 많은 연구자들이 암정복을 위한 연구를 수행하고 있다. 지난 20여년 동안 암 연구와 분자생물학의 연계로 암세포의 분화와 성장에 대한 생화화적인 변화들을 더욱 많이 이해하게 됨으로써 최근에는 기존의 세포독성을 이용한 항암제 개발과는 달리 새로운 항암제의 개발에 대한 관심을 갖게 되었다. 이들 중에서 세포내 신호전달에 관련된 단백질들의 저해제, 세포주기 관련 저해제, 신규 혈관형성 저해제, 그리고 핵산의 위상학적 변형 저해제 개발 등이 주요 항암제 개발의 표적이다.

본 장을 통해서 세포내 신호전달과정과 이에 관련된 단백질의 역할 등을 정리하고, 암화 반응과 관련이 깊은 라스 단백질

의 활성조절을 통한 새로운 차원의 항암제 개발 연구 동향, 전망 그리고 탐색법 등을 소개하고자 한다.

1.1 연구의 목적

세포내 신호전달 단백질 중에서 가장 많이 연구되었고 사람의 암과 가장 높은 관련성을 보여주고 있는 라스 단백질의 신호전달과정과 이 단백질의 활성조절물질 탐색을 통한 새로운 항암제 개발 방법 등에 대하여 논하고자 한다.

1.1.1 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), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 섬유아세포 성장인자(FGF) 등이 있으며, 성장을 억제하는 인자로는 종양 괴사인자(TNF), 인터페론 등이 알려져 있다(1).

성장인자가 세포막에 있는 그의 수용체에 결합하면 세포내 부에서는 여러 가지의 결합단백질들과 이차 신호전달 물질들이 상호작용을 하여 순차적으로 세포핵내까지 신호를 전달하게 되고 DNA 복제 및 세포분열을 유도하게 된다. 이 과정 중에서 가장 잘 연구된 상피세포 성장인자로 부터 핵까지의 세포내 신호전달과정을 그림 1에 정리해 보았다. 상피세포 성장 조절 인자가 세포막 표면의 그의 수용체에 결합하면 수용체의 cytoplasmic domains에 타이로신잔기가 인산화 되고, 그 인산화된 타이로신잔기를 인지하는 단백질인 Shc이 결합하게 된다. Shc 단백질도 타이로신잔기에 인산화 반응이 일어나게 되며 인산화된 타이로신잔기는 특이적으로 인산화된 잔기를 인식하는 SH2(src homology) domain을 갖고 있는 연결 단백질(adaptor protein)인 GRB2에 의해서 인식되게 된다(2). 그리고 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 단백질의 GDP를 GTP로 교환시킴으로써 라스 단백질을 활성화시킨다. 활성화된 라스 단백질은 Ser/Thr protein kinase인 라프(Raf) 단백질에 신호를 전달하고 MEK,



그림 1. 상피세포 조절인자로 부터의 라스 단백질 관련 세포내 신호전달 과정.

MAPK를 경유하여 순차적인 단백질 인산화반응의 신호 전달을 시작한다. Cytosol의 단백질 인산화 반응을 통한 정보는 핵막을 통과하여 핵내의 *fos*, *jun*, *myc*와 같은 전사 조절인자를 활성화시키고, 활성화된 조절인자들은 유전자의 전사를 유도하여 세포증식과 분화가 이루어지게 한다(3).

이와 같이 정상 세포에서는 성장이나 억제 신호의 turn-on이나 turn-off가 정교하게 조절되고 있다. 즉, 세포 성장의 신호 전달에 관여하는 단백질들의 활성화 및 비활성화가 조화를 이루고 있다. 그러나 이들 단백질중 하나라도 활성이 지속되거나 또는 비활성화가 지속되면 세포의 성장조절이 깨지면서 암화와 같은 비정상 세포성장을 유도하게 되는 것이다.

1.1.2 라스 단백질과 암화 반응

성장조절인자를 통한 신호전달과정에서 가장 중요한 역할을 하는 단백질은 분자량이 21kDa이고 188-189개의 아미노산으로 구성된 라스 단백질이며, guanine nucleotides(GDP와 GTP)와 결합할 수 있다. 라스 단백질은 *ras* proto-oncogenes에 의해서 발현되며, *ras* gene은 다양한 사람의 종양에서 oncogenic gene으로써 처음 발견된 유전자이고, 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%이상 라스 단백질(H-*Ras*, K-*Ras*, N-*Ras*)의 생물학적 활성이 비정상적으로 변화하는 변형된 *ras* gene을 갖고 있다는 것이 증명되었으며 특히, 췌장암(90%), 직장암(50%), 폐암(50%), myeloid leukemias나 갑상선암(30%) 등은 높은 빈도로 변형된 *ras* gene을 갖고 있음이 확인되었다(4). 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 가수

생물산입

분해를 도와주는 단백질인 GAP(GTPase activating protein)에 의해서 GDP로 가수분해될 때 비활성화(switch “off”)되게 된다.

그러므로 GAP은 정상적인 Ras 신호전달 과정에서 switching “off”가 되게 하는 negative regulator 이다. 그러나, oncogenic *ras* mutations에 의해서 12, 13, 59, 또는 61번째의 아미노산이 변화된 라스 단백질에서는 본래의 GTP 가수분해능이 200배 정도 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 신호 전달 단백질들에 신호를 보내어 세포의 분열과 증식을 촉진시키게 된다. 이런 비정상적인 세포의 분열과 성장은 암화 반응에 필수적인 요소이다(5). 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, 이들중 전자의 경우는 GDP가 결합한 라스와 GTP가 결합되었을 때의 라스 단백질의 구조적 차이점을 이용하여 GTP결합을 저해시켜보고자 하는 연구가 미국 캘리포니아 대학 버클리의 연구팀과 프랑스의 제약회사 등이 중심이 되어 연구하고 있다(6).

또한, 활성화된 라스 단백질로부터의 신호를 차단하는 연구는 라스 단백질의 활성화 단계에 GTP 결합 뿐만 아니라 라스 단백질이 세포의 원형질막에 위치하는 것이 중요하다는 것에 착안하여 이루어지고 있다. 즉, 라스 단백질이 signal transducer로서의 기능을 하기 위해서는 GTP와 결합한 후 원형질막에 결합되어 있어야 하며, cytosol 내에 있을 때는 그 활성을 나타내지 못한다는 것이다. 라스 단백질이 생물학적인 활성을 나타내기 위해서는 C-말단이 번역된 후 지질과 결합하여 원형질막의 cytoplasmic 표면에 부착되어야 한다. 이런 일련의 반응을 “번역후 변형과정”이라 하며 그림 2에 요약하였다. 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 carboxy-terminal “X” 잔기를 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 결합

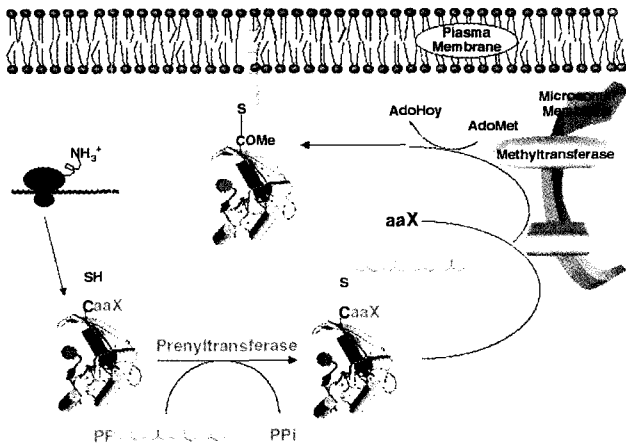


그림 2. 라스 단백질의 번역 후 변형 과정.

한다(즉, geranylation이 5-10배 정도 더 많이 일어난다). Isoprenylation에 참여하는 isoprenyl group은 2-acetyl-CoA부터 시작하여 cholesterol을 생합성하는 isoprenoid의 생합성과정에서 생기는 산물이다(7).

이들 라스 단백질의 번역 후 변형 과정에 참여하는 효소중 파네실 전달 효소에 관한 연구가 가장 활발이 이루어졌으며, 결정구조 및 많은 저해제들이 발표되었다. 최근에 endoprotease와 메틸화 반응 효소의 저해개발을 위한 연구도 진행되고 있으나 우수한 저해제는 아직 발표된 것이 없다.

1.1.3 파네실 전달효소 저해제와 항암활성

라스 단백질의 farnesylation은 farnesyl-protein transferase(FPTase)라는 효소에 의해서 farnesyl pyrophosphate의 farnesyl group을 라스 단백질의 CAAX motif에 있는 cysteine에서 전달하는 반응이다. 이 반응에 관여하는 효소인 FPTase는 49kDa의 α-subunit와 46 kDa의 β-subunit로 이루어진 heterodimer이며, 효소의 활성을 위해서는 두 subunit가 모두 필요하다. 라스 C-말단과의 결합기능은 β-subunit에 있음이 밝혀졌고, α-subunit의 기능은 잘 알려지지 않았으나, farnesyl-pyrophosphate(FPP)의 결합에 중요하리라 생각되고 있다. 이 효소의 활성에는 Zn²⁺, Mg²⁺ 같은 2가 이온들을 필요로 하며, 효소 자체의 구조적인 안정과 촉매작용에 참여한다고 보고되어 있다(8).

이 효소의 저해제 개발을 통한 새로운 차원의 항암제 연구가 있어서 몇 가지의 의문점들이 제시되고 있는데 그 이유는 앞서도 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 살펴보면 다음과 같다.

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

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

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

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

다섯째 : 최근에는 동물실험에서 transgenic mice에 FPTase inhibitor(pro-drug)를 투여했을 때, 어떤 독성의 증거가 없었으며, pro-drug을 계속 투여했을 때 tumor의 성장이 억제되었다(9).

여섯째 : 미국 Schering-Plough가 개발한 화합물 SCH66336를 대상으로한 임상실험 결과 인체 암에서도 우수한 활성을 보여주었다(10).

그러므로 FPTase의 약물학적인 저해는 정상세포에 큰 독성 없이 종양성장을 억제할 수 있다고 보고 있으며, 항암제개발의 표적으로 관심의 대상이 되고 있다.

1.1.4 Endopeptidase와 methyl transferase

라스의 파네실화 과정 중에서, 3개의 카르복시 말단잔기는 Ras converting endopeptidase(RCE)에 의해서 단백질 가수분해되고, 지질화된 Cysteine의 말단은 카르복시 메틸 전달효소에 의해서 메틸화 되어진다. RCE에 의한 가수분해는 효모에서 라스의 기능을 바꾸며, 그러므로 RCE는 사람의 종양에서 암화된 라스의 기능을 조절할 수 있는 새로운 표적 일 것이다. RCE가 없는 돌연변이는 성장 또는 생육의 결함이 분명히 없는 반면에, FPT의 돌연변이는 세포를 성장의 결함 또는 죽게 하는 원인이 된다. 만약에, 효모에서의 결과가 사람의 종양세포에서도 일어난다면, RCE의 저해제는 FPTase 저해제 보다 안전한 치료제가 될 것이다.

1.2 연구 동향

파네실전달 효소 저해제 탐색 및 개발의 연구는 크게 두 가지 방향으로 진행되고 있다. 첫째는 C-말단의 펩타이드 또는 파네실 파이로포스페이트 그룹과 유사한 구조를 가지는 화합물들을 합성하여 그들의 효소 저해활성을 측정하는 것이고 다른 하나는 천연자원(미생물의 대사산물, 식물체, 해양생물의 추출물)으로 부터 활성자원을 탐색하여 단일성분의 저해제를 분리 정제하는 것이다. 먼저 이 두 가지의 방법론적인 측면에서의 연구 동향을 기술하고, 탐색방법에 대하여 기술한다.

1.2.1 합성

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 Pittsburg대학 등의 학계를 중심으로 이루어지고 있으며 국내에서는 LG 바이오텍 연구소 및 유한양행 중앙연구소가 중심이 되어 활발히 추진되고 있다(10). 그리고 또하나의 모체가 되는 것은 farnesyl pyrophosphate이다(11). 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 이후로는 FPTase의 기질들과는 관계가 없는 새로운 저해제의 합성 연구가 매우 활발하다(12).

1.2.2 천연물

효소학적인 탐색법을 이용하여 많은 연구자들이 FPTase 저해제 개발을 위하여 다양한 natural products를 확인하였지만 아직까지는 합성 저해제에 견줄만한 선도물질은 개발되지 못한 상태이다. 지금까지 20여가지의 저해제들이 보고되었으며 대부분은 미생물의 2차 대사산물이다(13). 그리고 어떤류의 미생물이 좋은 후보물질을 생산할 것이라든가 예측 또한 불가능한 상태이며 이러한 정보가 축적되기 위해서는 더 많은 연구가 요구된다고 할 수 있다. 육상 식물이나 해양생물로부터도 몇 가지의 저해제들이 보고 된 바 있으나 크게 관심의 대상이 되는 화합물은 보고되고 있지 않다.

1.2.3 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 표 1과 같다(11).

2. 연구방법

FPTase 저해제를 탐색하기 위하여 가장 필요한 것이 효소이다. 먼저 효소의 분리 및 정제법에 대하여 알아보자. 그리고 표 1에서 볼 수 있는 다양한 탐색법들 중에서 침전법을 소개한다.

2.1 효소의 분리 정제

FPTase 저해제로서 사용하는 효소는 일반적으로 동물의 뇌로부터 분리하거나 human recombinant farnesyl-protein transferase를 E. coli에서 과발현시킨 후 크로마토그래피법으로 분리 정제하여 사용한다. 본 장에서는 손쉽게 구할 수 있는 rat brain으로 부터 효소를 분리하는 방법에 대하여 기술한다(14).

2.1.1 실험방법

Rat brain으로 부터 FPTase를 분리하기 위해서는 다음과 같은 완충용액을 준비하여야 한다. 그리고 효소분리 정제 과정은 그림 3에 요약하였다.

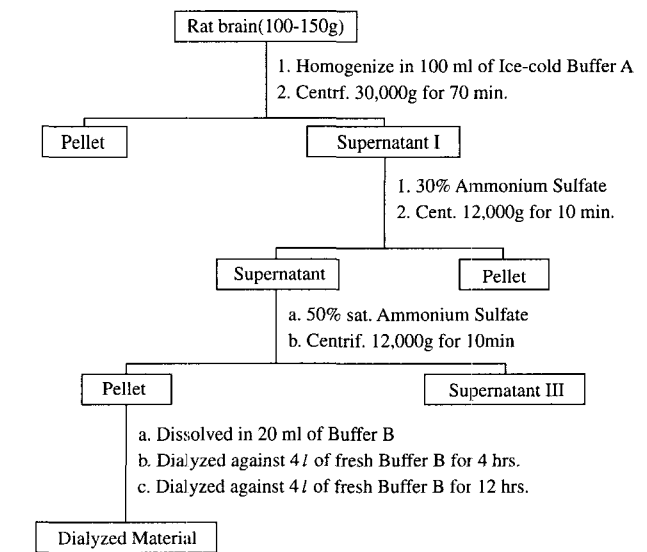


그림 3. FPTase 분리 도식.

표 1. FPTase 저해제 탐색법

Assay method	Comments
1 Gel assay	Substrate : ³ H-FPP/ras protein (-정확한 정량적인 값을 얻을 수 있다.)
2 Filter assay	Substrate : ³ 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 H-FPP/peptide (-정량적 측정에 어려움이 있다.)
5 PVDF membrane assay	Substrate : ³ H-FPP/ras protein (-VacuoSlot 사용)
6 SPA assay	Substrate : ³ H-FPP/biotinylated peptide (-SPA beads, 자동화 가능)

완충용액 A : 50 mM Tris-Chloride(pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM PMSF, 그리고 0.1 mM leupeptin.

완충용액 B : 20 mM Tris-Chloride(pH 7.5), 1 mM DTT, 20 μ M ZnCl₂

다이얼리스가 끝난 후 FPLC(Pharmacia LKB Biotech. Mono Q 10/10)를 사용하여 다음과 같이 부분 정제하였다.

- 1) 0.05M NaCl를 함유한 Buffer B로 컬럼을 평형상태로 만든 후 다이얼리스가 끝난 혼합물을 컬럼에 충전시키고 25ml Buffer B로 닦은 후 0.05M NaCl부터 0.25M 까지 linear gradient로 용액을 흘려준다.
- 2) 0.25M NaCl부터 1M까지 linear gradient로 용액을 흘려주면 NaCl 농도가 0.3~0.4 M 정도의 분획에서 효소의 활성이 강력함을 알 수 있다. 이 활성 분획에 1mM PMSF와 0.02%(w/v) leupeptin을 넣어 -70°C에 보관, 사용하였다.

2.2. 침전법(15)

바이오틴과 streptavidin이 잘 결합한다는 성질을 이용한 방법으로 활성물질 탐색에 가장 널리 쓰이는 방법 중에 하나이다.

2.2.1 원리

기본원리는 바이오틴에 효소의 기질로 사용되는 펩타이드를 결합시킨 후 FPTase 존재하에 트리튬을 함유한 farnesyl pyrophosphate와 반응시키고, farnesyl화된 biotinylated-peptide를 streptavidin-agarose를 이용 침전시킴으로써 미반응 방사선 물질과 분리하여 반응정도를 알아보는 방법이다. 그리고 효소 저해제 활성도는 다음의 식을 이용하여 효소저해 퍼센트를 계산할 수 있다.

Blank1 : 완충용액 존재하의 cpm값

Blank2 : 효소는 없고 시료만 있을 때의 cpm값

Control : 기질과 효소존재하의 반응후 cpm값

$$\text{Inhibition(\%)} = 1 \times \frac{\text{Sample cpm value} - \text{Blank2 cpm value}}{\text{Control cpm value} - \text{Blank1 cpm value}} \times 100$$

2.2.2 실험방법

1) Biotinylated-peptide 합성

Solid phase peptide synthesizer로 합성한 solid phase-MIVCSTK-NH₂와 p-nitrophenyl biotin을 diisopropyl ethyl amine 존재 하에 DMF에서 3시간 동안 반응시킨 후 분리하여 solid phase-MIVCSTK-NH₂-biotin을 얻는다. 합성된 펩타이드의 solid phase를 산을 이용하여 제거하고 HPLC를 이용 정

제된 biotinylated-peptide(biotin-CO-NH-KTSCVIM)를 확보한다.

2) Assay Buffer 준비

활성물질의 탐색을 위하여 다음과 같은 탐색용 완충용액을 준비 한다

Peptide buffer : 10mM sodium acetate(pH 3), 1mM DTT, 50% ethanol

Reaction buffer : 50mM Tris-Chloride(pH 7.5), 50 μ M ZnCl₂, 20mM KCl, 1mM DTT, 0.2%(v/v) Octyl- β -glucopyranoside

Stop buffer : 20 mM Tris-Chloride(pH 7.5), 2mg/ml bovine serum albumin, 2% SDS, 150 mM NaCl

Washing buffer : 20mM Tris-Chloride(pH 7.5), 2mg/ml bovine serum albumin, 4% SDS, 150mM NaCl

Bead solution : streptavidin-agarose

3) 펩타이드 용액 준비

0.4 mg의 biotinylated-peptide를 0.6ml의 peptide buffer에 녹여 펩타이드 용액을 만들어 4°C에 보관한다.(최종 농도 : 60 μ M)

4) 시료 준비

본 실험에 사용한 시료들은 메탄올이나 DMSO에 녹여 사용하며 초기농도는 1mg/ml로 한다.

5) 분리된 효소의 활성도 측정

효소 활성도 측정 과정을 간단히 도식화하면 그림 4와 같다. 즉, biotinylated peptide와 ³H-farnesyl-pyrophosphate를 효소(FPTase) 존재하에 반응시킨 후 streptavidin-agarose를 넣어 침전시킨다. 미반응 ³H-farnesyl-pyrophosphate는 washing buffer를 이용, 제거하고 반응한 ³H-farnesyl-pyrophosphate를 scintillation counter를 이용하여 측정함으로써 효소의 활성도를 측정하였다. 비교값으로 Amersham에서 공급하는 Scintillation Proximity Assay(SPA)법을 이용 보고한 값을 사용한다.

6) FPTase assay 과정

FPTase inhibitor assay는 다음과 같은 과정으로 수행하였다. Biotinylated peptide와 트리튬으로 label된 farnesyl-pyrophosphate, 효소(FPTase) 10 μ l를 시료(농도:1mg/ml) 존재하에 반응시킨 후 streptavidin-agarose를 넣어 침전시킨다. 미반응 farnesyl-pyrophosphate와 첨가된 시료는 washing buffer

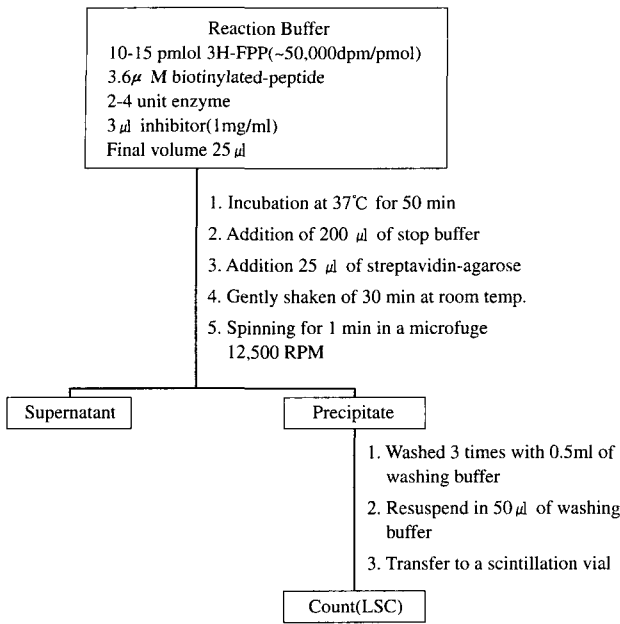


그림 4. FPTase 탐색법.

를 이용 제거하고, 침전물을 washing buffer에 다시 녹인다. 이 반응물을 scintillating vial에 옮긴 후 scintillation counter 용 cocktail solution을 넣고 scintillation counter로 반응 정도를 측정하여 앞에서 보여준 식으로 시료에 의한 FPTase 저해 정도를 측정하였다. 이런 일련의 과정을 그림 4에 요약하였다.

2.3 Coupled RCE & CMT assay

2.3.1 원리

기본원리는 바이오틴에 효소의 기질로 사용되는 펩타이드를 결합시킨 후 RCE & CMT 존재 하에 트립토판을 함유한 S-Adenosyl-L-Methionine 반응시키고, 메틸화된 biotinylated-peptide를 SPA를 이용 침전시킴으로써 미반응 방사선 물질과 분리하여 반응정도를 알아보는 방법이다.

2.3.2 Microsomes의 분리

Assay에 사용된 효소는 소의 간으로부터 준비하였다(21).

2.3.3 기질의 준비

기질은 Biotin-KKSKTK-C(farnesyl)-VIM-COOH를 사용하였고, 합성 주문 제작하였다.

2.3.4 Buffer의 준비

모든 기질, microsomes, 펩타이드는 RCE buffer(100 mM Tris pH7.4, 1mM EDTA)를 사용하였다.

2.3.5 Assay procedure

반응의 최종 volume은 50 μl 이고, effendorf tube를 사용하여 생물산업

였다.

- 1) Effendorf tube에 화합물 [20 μg/ml(10X), 10%DMSO]을 5 μl를 넣는다.
- 2) 10 μg microsome, 10 μl Biotin-KKSKTK-C(farnesyl)-VIM-COOH(10 μM), 2 μl (~500,000 cpm) [3H]S-Adenosyl-L-Methionine(hot SAM from NEN), 2.5 μM cold SAM을 넣고 buffer로 최종 volume 50 μl를 맞춘다.
- 3) Shaker의 Shaker plate에 넣고 37°C에서 3시간동안 반응시킨다.
- 4) 반응이 끝난 후 tube에 200 μl 반응정지용액(0.06% TX-100, SPA bead)을 넣는다.
- 5) 상온에서 30분방치 후, LSC Counter를 사용하여 활성도를 측정한다.

3. 연구결과

약물학적으로 유용한 화합물들은 분자량이 작은 유기화합물 (< 600 Da)이어야 하고, nonpeptidyl이어야 한다고 알려져 있다. 이러한 조건 외에도 세포막을 통과할 수 있어야 하고, 쉽게 분해되지 않아야 하며, 생리화적인 반감기가 길어야 한다. 위와 같은 조건을 만족시키는 FPTase 저해제 개발을 위해서 전 세계의 연구 기관들(대학, 연구소, 제약 회사등)은 천연물, tetrapeptide mimetics, 그리고 FPP 유사체들의 합성 및 분리 정제에 많은 연구 인력과 연구비를 투입하고 있다. 이러한 노력의 결과로 천연물유래 또는 합성 FPTase 저해제들이 개발되었으며 동물실험에서 좋은 활성을 보이는 물질들도 발표된 바 있다.

3.1 국내

국내의 이 분야 연구는 1990년대 들어와서 생명공학연구소와 서울대에서 처음으로 시작했다 할 수 있으며, 그 후로 유한양행 중앙연구소와 LG 바이오텍이 FPTase저해제 연구에 많은 연구인력을 투입하고 있는 것으로 알려지고 있다. 아직 국내에서는 특이 할만한 연구결과는 발표된 것이 없다. 다만 생명공학연구소에서 천연자원으로부터 몇 가지의 FPTase 저해제를 분리하여 보고한 정도이다(16).

3.2 국외

앞에서 이미 언급한 것과 같이 외국에서는 많은 연구자들이 1990년부터 매우 활발히 연구를 수행하여 다양한 저해제들을 합성하여 발표하였으며 천연물로부터도 20여가지의 저해제들을 분리하여 발표하였다. 이 저해제들을 천연물유래, 라스 단백질의 C-말단 유사화합물 그리고 파네실 유도체 등으로 나누어 정리해보았다(표 2).

3.2.1 Natural product inhibitors(천연물 유래 저해제).

효소학적인 방법에 의해 FPTase를 저해시키는 다양한 natural products를 확인하였는데, 이들의 대부분은 미생물의 2차 대사산물이다. 처음으로 발견된 천연물 유래 저해제는 식물체로부터 분리한 limonene, perillic, dihydroperillic acid등이며 이들 물질들은 Ras-transformed NIH3T3 cell에서 활성이 보인다는 것이 발표되었다. 그리고 미생물유래 저해제는 1992년에 방선균으로부터 분리한 streptonigrin의 유도체인 6'-desmethoxy streptonigrin이 최초의 FPTase 저해제이며 비교적 약하게 억제(IC₅₀=21M)시키는 것이 밝혀졌고 또한, 여러 cell line에 세포독성이 있다고 알려졌다. FPTase 저해활성을 보이는 다른 항생제로는 manumycin 계열의 유도체가 있다. UCF1-C는 manumycin으로 알려져 있을 뿐아니라, 이 계

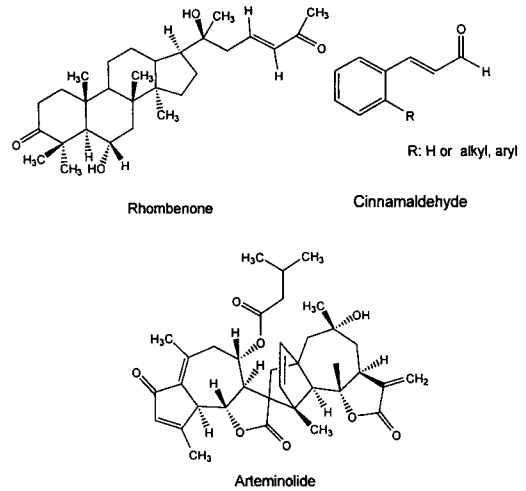


그림 5. 생명공학연구소에서 분리한 FPTase 저해제들.

표 2. FPTase 저해제

Chemical source	Inhibitors	IC ₅₀ for FPTase(μM)	IC ₅₀ for GGPTase(μM)	Effect on mammalian cells
Natural product	Manumycin	5	180	Active on Cell line
	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
CAAX analogue	Tetrapeptide CVFM	0.025	ND	ND
	L-731, 735	0.018	ND	ND
	L-731, 734	0.028	ND	Cell line transgenic mice
	BZA-2B	0.85		"
	CVIM	0.09	35	Cell lines
	B581	0.21	790	"
	FTI-276	0.0005	0.5	"
	SCH 44,342	2.8	>12	"
	Cys-4-ABA-Met	0.05	ND	"
	L-739, 750	0.0018	3	Transgenic mice
	BMS-185,878	0.005	ND	Cell line
	CVWM	0.5	ND	ND
	L-739,787	0.3	ND	ND
Phosphinyl acid-base Bisubstrate analogues	0.06-0.6	0.05-0.01	ND	
Farnesyl pyrophosphate analogues	HFP	0.03	35.8	ND
	HCP	0.083	26	ND
	hydroxy farnesylphosphonate	0.03	67	Ras processing
	Farnesyl diphosphate-based inhibitors	0.075-0.22	ND	"

열중 저해효과가 가장 큰 저해제이다(IC₅₀=5μM). 이 물질에 대한 반응 속도론적인 분석 결과 FPTase에 대한 경쟁적 저해제이며, protein substrate에 대해서는 비경쟁적임이 밝혀졌다. 또한 gliotoxin은 가장 강한 FPTase inhibitor(IC₅₀=1.1μM)이며, Ras protein에 대해 역시 비경쟁적임이 밝혀졌다(13).

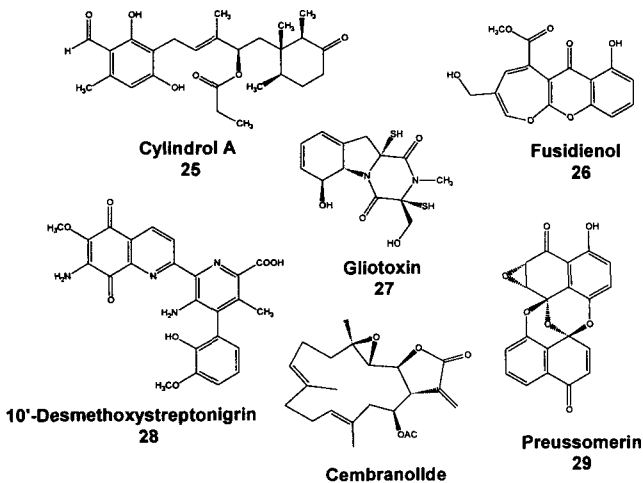
두개의 새로운 dicarboxylic acid 유도체 chaetomelic acid A와 chaetomelic acid B는 *Chaetomella acutiseta*의 발효액 추출물로부터 분리되어 졌고 IC₅₀ 값이 각각 55 nM과 185 nM로 FPTase에 강한 저해제임이 밝혀졌다. 이 화합물들은 반응 속도론적인 분석, 그리고 입체구조의 겹침과 정전기적인 regions의 computer modelling에 의해서 FPP의 효과적인 mimic를 보여주고 있다. Zaragozaic acid A와 B는 squalene synthase의 강력한 inhibitor로 보고되었으며 FPTase에 대해 competitive inhibitor(IC₅₀=216nM)로써 확인되었다. 합성된 유사체는 증가된 FPTase inhibition(IC₅₀=12nM)을 보여주고 GGPTase에 대해 선택성을 보여주고 있다(17). 이 화합물들은 FPP에 대해 competitive inhibitors이고, Ras protein에 대해서는 noncompetitive inhibitors이다. Zaragozaic acid A와 B는 Ras 형성 cell line에서 Ras 과정에 영향이 없는데, cell의 투과력이 부족한 데서 그 원인이 있는 것이다. 이들 이외에도 pepticinnamin등이 FPTase 저해제로 발표되었다. pepticinnamins는 여러 가지의 발효액의 screening에 의해서 분리되어졌다(22). Antibiotic patulin은 mouse cell에서 단백질의 prenylation을 억제하나 FPTase의 억제에서는 약하게 작용한다(IC₅₀=290μM). 그리고 Schering Plough 연구소에서는 방선균으로부터 diepoxybenz[a]anthracene를 함유한 새로운 류의 FPTase 저

해제인 SCH 58450을 발표하였다(12).

3.2.2 CAAX analogues

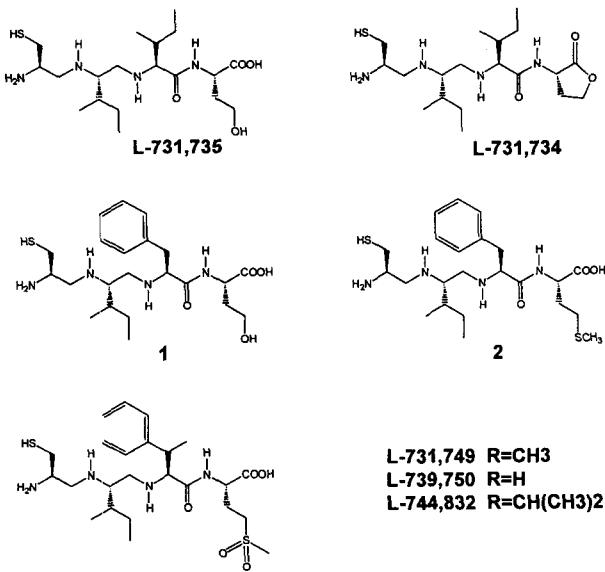
1990년 처음으로 쥐로부터 순수 분리된 FPTase가 라스의 C-말단의 펩타이드와 유사한 구조를 갖고 있는 Cys-AAX류의 화합물들에 의해서 경쟁적으로 저해된다는 사실이 알려지면서 이들 구조를 모방한 저해제들이 합성되기 시작하였으며, CVIM, CIIM, CVVM, CVLS등이 그것이다. 이 후에 새로이 합성된 저해제인 tetrapeptide CVFM은 A₂에 aromatic 잔기를 갖고 있으며 *in vitro*에서 FPTase를 강하게 억제(IC₅₀=25nM) 하지만 *in vivo*에서 farnesylation을 억제하지 못한다. 이외에도 세포 안으로의 이동이 어렵고, 빠르게 가수 분해되어 더 이상의 pro-drug으로 개발이 어렵다는 판단이 대두되기도 하였다. 그러나 미국의 몇몇 제약회사를 중심으로 Cys-AAX motif를 모체로한 다양한 peptidomimetic 유도체들이 개발되고 이들 저해제들이 *in vivo* 실험에서도 긍정적인 결과를 보여주면서 이 분야의 연구는 매우 활기를 띠기 시작하여 지금까지 수십가지의 화합물이 발표되었고 미발표 된 것까지 합한다면 수천가지의 화합물이 합성되었다 할 수 있다. 국내에서도 제약회사를 중심으로 이 분야연구가 매우 활발하다. 이들 peptidomimetic 중에서 Merck사에서 개발한 L-731,734와 L-731,735는 두 N-terminal amide bonds가 줄어든 CIIM 유도체로서 고안되어 졌고, methionine이 homoserine lactone 또는 homoserine으로 바뀌었다. 이러한 변형은 FPTase의 강한 *in vitro* inhibitor(IC₅₀= 282, 18nM)로써 작용하고 있고 *in vivo*에서도 저해활성을 보여 준다. 앞에서 언급한 tetrapeptide CVFM의 체계적인 변형은 B581의 합성을 유도하였으며 *in vitro*에 대한 activity가 두 배 증가하였다. 이 유도체는 *ras*-transformed cell line에서 geranylgeranylated proteins 보다 farnesylated proteins의 과정을 특이적으로 억제한다(10,000 - 100,000배 정도의 차이가 확인됨)(18). CAAX motif에 두개의 aliphatic 잔기 대신에 benzodiazepine을 도입한 BZA류의 유도체들은 Genentech사와 Goldstein group에 의해서 발표되었으며 이들 저해제들은 FPTase를 *in vitro* 뿐만아니라 *in vivo*에서도 강력하게 선택적으로 저해한다. 이 화합물들의 특징은 N-terminal cysteine과 peptide binding site에 있는 Zn²⁺ 이온과 조화를 이루는 C-terminal의 methionine을 갖도록 고안하였다는 것이다. 이 화합물은 Ras, nuclear lamins 그리고 다른 여러 가지의 protein들의 세포내 farnesylation을 막는다.

이들 CAAX motif 유래 저해제들 중에서 Merck사에서 개발한 L-744,822는 amine 대신 ether 결합을 도입한 저해제로써 nude mouse에 H-Ras-transformed cell를 이식하여 유발시킨 종양을 강력하게 억제시킨다는 것이 발표된 바 있다. 이러한 연구결과들을 종합 해 볼때 기발표된 저해제들을 모체로하여 새로운 저해제를 합성한다면 새로운 항암제의 개발 가능성



IC ₅₀ (nM)			IC ₅₀ (nM)		
Inhibitors	FPTase	GGPTae	Inhibitors	FPTase	GGPTase
25	2,200	not active	28	21,000	not reported
26	300	not active	29	1,200	20,000
27	1,100	not reported	30	300	not reported

그림 6. 천연물 유래 FPTase 저해제.



Inhibitor	IC ₅₀ (nM)	
	FPTase	GGPTase
L-731,735	18	>100,000
L-731,734	282	>100,000
1	40	1600
2	1.9	100
L-739,750	1.8	3,000
L-739,749	240	100,000

그림 7. CAAX motif의 유도체 화합물.

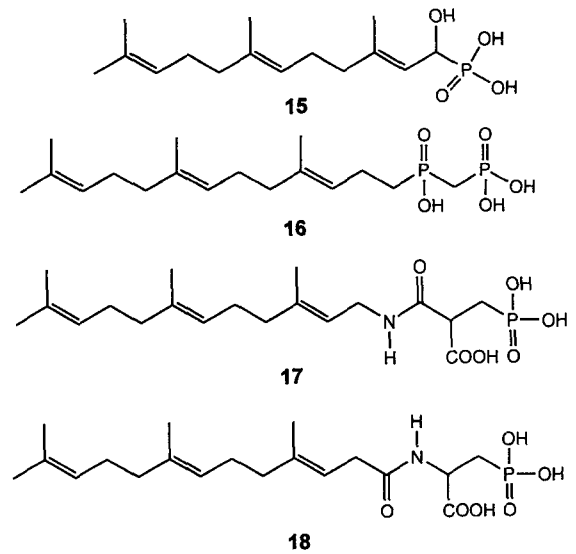
이 매우 높다고 할 수 있다(19).

3.2.3 Farnesyl pyrophosphate analogues

합성 저해제의 또다른 모체는 farnesyl pyrophosphate라 할 수 있다. 그리고 이를 모체로 하여 합성 유도체들 역시 FPTase를 강하게 억제한다는 사실이 발표되었다. 합성된 FPP 유도체로는 hydroxyfarnesyl phosphonic acid와 다음 그림 8과 같은 화합물들이 있다. 그리고 천연물로부터 분리된 manumycin, chaetomelic acid 등도 같은 화합물이라 할 수 있다. 이들 중 compound I, II는 매우 강력하게 FPTase를 저해하고(IC₅₀=83, 75nM) 세포주를 이용한 활성 검정에서도 좋은 결과를 보여주지만, 높은 농도로 cell line 처리시 세포 독성을 보여준다. Farnesyl amine과 또 다른 long chain aliphatic amine은 높은 micromolar 농도에서 Ras-transformed cell의 farnesylation과 성장을 억제함을 보여 준다(20).

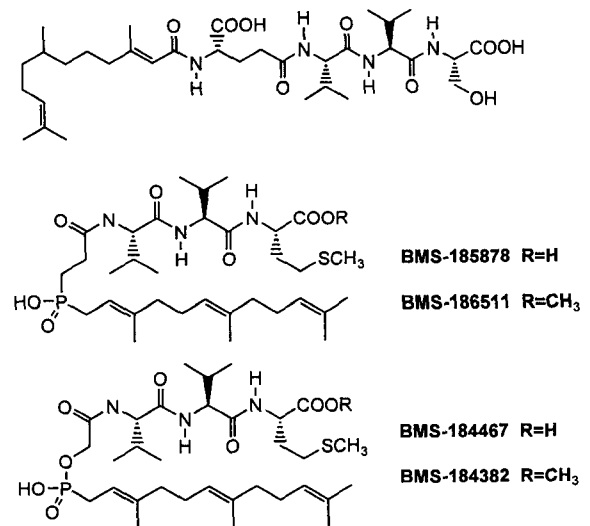
3.2.4 기타 FPTase 저해제

앞에서 언급되지 않은 합성 저해제로는 Schering Plough 연구소에서 발표한 tricyclic 화합물인 SCH 44342가 있으며 이 저해제는 *in vitro*(IC₅₀=250nM) 및 *in vivo*(Cos cell)에서 FPTase 저해활성을 보여 주고 있다. 이 화합물의 특징은 구조



Inhibitors	IC ₅₀ (nM)	
	FPTase	GGPTase
15	30	35,800
17	75	not reported
18	50	not reported

그림 8. Farnesyl pyrophosphate analogues.



Inhibitors	IC ₅₀ (nM)	
	FPTase	GGPTase
BMS-185878	6	21,000
BMS-184467	6	10,000

그림 9. Bisustrare Inhibitors.

에서 보듯이 nonpeptidic 이라는데 있으며 이를 모체로하는 새로운 물질의 합성에 활용이 가능할 것으로 생각된다(12). FPP와 peptide를 결합시킨 형태의 저해제가 있으며, *in vitro*에서 강한 활성을 보여주고 있다.

3.2.5 RCE & CMT 저해제

RCE & CMT 저해제는 펩타이드를 모방한 것들이 주로 있으며, 천연물로부터 분리된 화합물은 아직 드물다.

4. 참고문헌

- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell. 1995. "Molecular Cell Biology", Scientific American Books, New York.
- Prendergast, G. C., J. B. Gibbs. 1993. Pathways of Ras function: connections to the actin cytoskeleton. *Advances in Cancer Research*, **62**: 19-64.
- Bogusk, M. S., F. McCormick. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, **366**: 643-654.
- Khosravi-Far, R. and C. J. Der. 1994. The Ras signal transduction pathway. *Cancer and Metastasis Rev.* **13**: 67-89.
- Der, C. J., A. D. Cox. 1991. Isoprenoid modification and plasma membrane association: critical factors for Ras oncogenicity. *Cancer Cells*, **3**: 331-340.
- Milburn, M. V., L. Tang, A. M. DeVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S. H. Kim. 1990. Molecular switch for signal transduction structural differences between active and inactive forms of protooncogenic Ras proteins. *Science*, **247**, 939-945.
- Hancock, J. F. 1993. Anti-Ras drugs come of age. *Current Biology*, **3**: 770-779.
- Pompliano, D. L., E. Rands, M. D. Schaber, S. D. Mosser, N. J. Anthony, J. B. Gibbs. 1992. Steady-state kinetic mechanism of Ras farnesyl:protein transferase. *Biochemistry*, **31**: 3800-3807.
- Kohl, N. E., F. R. Wilson, S. D. Mosser, R. P. Gometz, J. B. Gibbs, A. Oliff. 1994. Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 9141-9145.
- Adjei, A. A., C. Erlichman, J. N. David, D. L. Cutler, J. A. Sloan, R. S. Marks, S. H. Kaufmann. 2000. A Phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH 66336: Evidence for Biological and clinical. *Cancer Res.* **60**: 1871-1877.
- Yimin, Y., S. M. Sebti, A. D. Hamilton, 1997. Farnesyltransferase as a target for antitumor drug design. *Biopoly* **43**: 25-41.
- Gibbs, J. B., Oliff, A. The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics. 1997. *Ann. Rev. Toxicol.* **37**: 143-166.
- Bishop, W. R., R. Bond, J. Petrin, L. Wang, R. Doll, G. Njoroge, J. Catino, R. Syto, L. James, P. Kirschmeier. 1995. *J. Biol. Chem.*, **270**: 30611-30616.
- Omura, S., H. Takeshima. 1994. Farnesyl-protein transferase inhibitors. *Drugs of the Future*, **19**: 751-755.
- Reiss, Y., J. L. Goldstein, M. C. Seabra, P. J. Casey, M. S. Brown. 1990. Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell*, **62**: 81-88.
- Reiss, Y., M. C. Seabra, J. L. Goldstein, M. S. Brown. 1990. Purification of ras farnesyl:protein transferase. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, **3**: 241-245.
- Kwon, B. M., Y. K. Cho, S. H. Lee, J. Y. Nam, S. K. Chun, J. A. Kim, I. R. Lee. 1996. 2-Hydroxycinnamaldehyde from stem bark of cinnamomum cassia. *Planta Med.*, **62**: 183-184. 권병목, 복성해, 이승호, 신중현, 서영완. 1996. 약썩으로부터 신규FPTase 저해제, 대한민국 특허출원.
- Buss, J. E., J. C. Marsters, JR. 1995. Farnesyl transferase inhibitors: the successes and surprises of a new class of potential cancer chemotherapeutics. *Chemistry and Biology*, **2**, 787-791.
- Gibbs, J. B., A. Oliff, N. E. Kohl. 1994. Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell*, **77**: 175-178.
- Kohl, N. E., C. A. Omer, M. W. Conner, R. P. Gometz, J. B. Gibbs, A. Oliff. 1995. Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nature Med.* **1**: 792-797.
- Manne, V., N. Yan, J. M. Carboni, A. V. Tuomari, C. S. Ricca, J. G. Brown, C. J. Der, A. D. Cox, J. T. Hunt, B. Seizinger. 1995. *Oncogene*, **10**: 1763-1779.
- Walter, p. & Blobel, G.(1983) *Methods Enzymol.* **96**, 84-93.
- Seoung-Ho Lee, Byoung-Mog Kwon. Arteminolide, an inhibitor of Farnesyl Transferase from *Arteminolide sylvatica*. *The Journal of Organic Chemistry* **63**(20) 7111-7113 1998
- Seoung-Ho Lee, Byoung-Mog Kwon. Sesquiterpene Lactones, Inhibitors of Farnesyl Protein Transferase, Isolated from the Flower of *Artemisia sylvatica*. *Tetrahedron* **56**(27) 4711-4715, 2000.
- Adjei, A. A., et al. *Cancer Reserarch*, **60**, 1871-1877, 2000.
- Williams, T.M., Exp. Opin. Ther. Patents, **9**, 1263-1280, 2000.
- Jansen, B. et al., *J. Mol. Med.* **77**, 792-797, 1999.