

Epi-xanthatin의 Side Chain 변환을 통한 새로운 반합성 유도체들의 합성 및 세포독성

백두종[#] · 안종웅* · 이정옥**

상명대학교 자연과학대학 화학과, *한국해양대학교 해양환경 · 생명과학부

**한국화학연구원 약리활성연구팀

(Received December 13, 2004; Revised January 10, 2005)

Synthesis of New Semisynthetic Analogs of Epi-xanthatin by Modification of the Side Chain and Their Cytotoxic Activity

Du-Jong Baek[#], Jong-Woong Ahn* and Chongock Lee**

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Sangmyung University, 7 Hongji-Dong, Chongro-Gu, Seoul 110-743, Korea

*Division of Marine Environment & Bioscience, College of Ocean Science and Technology, Korea Maritime University, 1 Dongsam-dong, Youngdo-ku, Busan 606-791, Korea

**Pharmaceutical Screening Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, 100 Jang-Dong, Yusong-Gu, TaeJon 305-606, Korea

Abstract — Epi-xanthatin analogs containing hydrophilic substituents such as carboxylic acid, alcohol, morpholine, amino acid, and glucose derivatives were synthesized and their *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* antitumor activity were evaluated. The target compounds were generally cytotoxic against tumor cell lines of human origin with ED₅₀ values of 0.1~30 µg/ml, except the highly hydrophilic analog **6** containing aspartic acid. Contrary to the potent cytotoxicity, weakly hydrophilic analogs **2** and **8** were not active *in vivo*, or even toxic to the test animals. As a result, hydrophilic analog of epi-xanthatin did not show *in vitro* cytotoxicity and hydrophobic analogs did not show *in vivo* antitumor activity, thus it is presumed that amphiphilic analogs or those with medium hydrophilicity would exhibit the antitumor potency *in vivo*.

Keywords □ epi-xanthatin analogs, sesquiterpene, α -methylene- γ -lactone, *in vitro* cytotoxicity, *in vivo* antitumor activity, hydrophilicity

최근 많은 sesquiterpene lactone들이 국화과(Compositae)와 목련과(Magnoliaceae) 식물로부터 추출되었고 여러 세포주에 대해 세포독성이 있음이 알려져 왔으며¹⁾ 이중 일부는 P-388 leukemia 또는 Walker 256 ascites carcinosarcoma 세포주를 사용한 동물실험에서 *in vivo* 항암활성을 보였다.²⁾ 이러한 화합물들의 세포독성 및 항암활성은 α -methylene- γ -lactone ring에 기인한다는 것이 알려졌는데 이 구조를 가진 sesquiterpene lactone의 예로는 helenalin, parthenin, vernolepin 등이 있다(Fig. 1).¹⁾ 본 연구실에서는 국내의 약용식물에 대한 항암효과를 검색하던 중 습지에서 자생하여 다량 발견되는 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.)³⁾에서 항암효과가 우수한 물질을 추출하고 분리

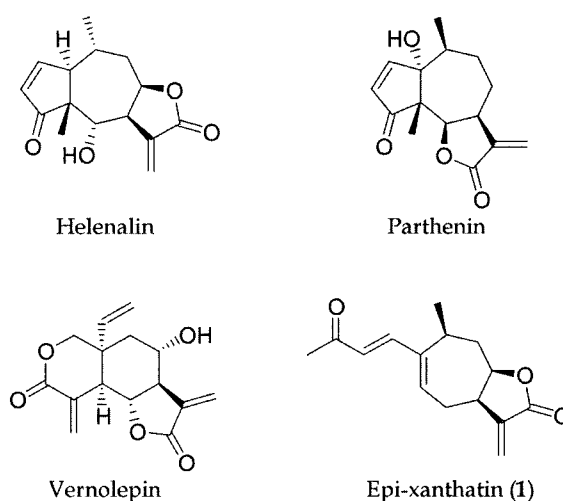


Fig. 1 – Structures of sesquiterpene lactones.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2287-5143 (팩스) 02-396-6133
(E-mail) djbaek@smu.ac.kr

하였는데 그 구조가 sesquiterpene lactone 계열인 epi-xanthatin 임을 밝혔고 이 물질도 또한 α -methylene- γ -lactone ring을 포함하고 있다.⁴⁾ 이 연구에서 *in vitro* 암세포성장 저지활성은 A549(폐암), SK-OV-3(난소암), SK-MEL-2(피부암), XF498(중추신경계암), HCT-15(직장암)의 5개 암세포주를 이용하여 측정하였는 바 이 화합물의 ED_{50} 값은 0.1~1.5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 로써 5-FU 및 adriamycin 과 비교하여 동등이상 250배까지의 높은 효력을 보이고 있는 반면 *in vivo* 항암효과는 나타나지 않았음을 보고하였는데 이것은 화합물의 물에 대한 낮은 용해도와 생체내 대사 때문이라고 판단하였다. 따라서 본 연구에서는 그 문제점을 개선하기 위하여 반합성 방법을 통하여 유도체들을 합성하였고 이러한 유도체들의 약효검색 및 물성검색을 통해 초기 구조-활성 상관관계를 확립하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

Thin layer chromatography(TLC)는 Merck silica gel 60 F-254 glass plate를 사용하였고 자외선, 요오드, phosphomolybdic acid, anisaldehyde로 발색하여 관찰하였다. Flash column chromatography는 Merck silica gel 60(40~63 μm)을 사용하여 Still에 의해 보고된 방법으로 수행하였다.⁵⁾ ^1H NMR 스펙트럼은 Bruker AMX-R300 Spectrometer(300 MHz)에서 CDCl_3 또는 $\text{DMSO}-d_6$ 를 용매로 사용하여 측정하였으며, chemical shift는 δ 척도로서 ppm으로 표기하였고 중첩피크는 다음과 같이 약자로 표기하였다: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broad. Mass Spectrometry(MS)는 Extrel ELQ-400 Mass Spectrometer에서 암모니아를 carrier gas로 사용하여 electrospray ionization으로 측정하였다. 반응에 사용된 용매중 tetrahydrofuran(THF)과 dioxane은 sodium benzophenone ketyl로 건조 증류하였고 dimethylformamide(DMF)는 MgSO_4 로 건조 증류하였으며 dichloromethane은 calcium hydride로 건조시켜 증류하여 사용하였다.

Epi-xanthatinic acid(2)의 합성

Epi-xanthatin(1) 1.0 g(4.00 mmol)을 dioxane 30 ml에 녹인 후 물 15 ml를 더 넣어 교반하면서 0°C에서 12% sodium hypochlorite 수용액 15 ml를 적가하고 실온에서 1시간 더 교반하였다. 산성의 KI 수용액에 반응액을 떨어뜨렸을 때 iodine이 생성되지 않을 때까지 포화 NaHSO_3 수용액을 반응액에 가한 다음 0°C에서 1N 염산 수용액을 적가하여 pH를 3으로 조정하였다. Flash column chromatography(ethyl acetate/hexane 5:1)에 의하여 정제하여 0.72 g(수율 72%)의 흰색 고체인 epi-xanthatinic acid를 얻었다: R_f 0.48(ethyl acetate/ethanol 1:1); ^1H NMR(CDCl_3) δ 1.13(d, $J=6.8$ Hz, 3H), 1.84(q, $J=13.6$ Hz, 1H), 2.10(m,

1H), 2.35~2.60(m, 2H), 2.78(m 1H), 3.32(m, 1H), 4.59(m, 1H), 5.50(d, $J=2.8$ Hz, 1H), 5.78(d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.14(t, $J=6.3$ Hz, 1H), 6.26(d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.18(d, $J=16.5$ Hz, 1H); Mass, m/z 249(M+1).

Epi-xanthatin aldehyde(3)의 합성

THF 3 ml에 epi-xanthatinic acid(2) 50 mg(0.203 mmol)을 녹이고 질소기체 하에 triethylamine 0.070 ml(0.503 mmol)를 가한 다음 0°C에서 oxalyl chloride(2.0 M solution in dichloromethane) 0.10 ml(0.200 mmol)를 적가하여 10°C를 넘지 않는 온도에서 30분간 교반하였다. Sodium borohydride를 DMF/THF 혼합용매(10:1) 5 ml에 녹인 용액에 위 반응용액을 -78°C에서 서서히 적가하고 30분간 교반하였다. 반응용액을 물과 포화식염수로 세척한 다음 MgSO_4 로 건조하고 여과하여 용매를 감압 증류하였다. 얻어진 잔사를 preparatory TLC(ethyl acetate/hexane 3:1)에 의하여 정제하여 16 mg(수율 35%)의 epi-xanthatin aldehyde를 얻었다: R_f 0.59(ethyl acetate/hexane 3:1); ^1H NMR(CDCl_3) δ 1.20(d, $J=6.9$ Hz, 3H), 1.93(ddd, $J=11.6, 12.1, 14.0$ Hz, 1H), 2.20(ddd, $J=2.3, 6.9, 14.1$ Hz, 1H), 2.40~2.79(m, 2H), 2.84(dq, $J=7.0, 18.2$ Hz, 1H), 3.44(ddt, $J=3.2, 8.6, 17.1$ Hz, 1H), 4.67(ddd, $J=2.3, 8.8, 12.2$ Hz, 1H), 5.59(d, $J=3.0$ Hz, 1H), 6.15(dd, $J=7.5, 15.9$ Hz, 1H), 6.28(dd, $J=6.3, 8.9$ Hz, 1H), 6.33(d, $J=3.4$ Hz, 1H), 6.94(d, $J=15.9$ Hz, 1H), 9.56(d, $J=7.5$ Hz, 1H).

Epi-xanthatinic acid methyl ester(4)의 합성

Epi-xanthatinic acid(2) 30 mg(0.120 mmol)을 dichloromethane 3 ml에 녹이고 triethylamine 0.020 ml(0.143 mmol), methyl chloroformate 0.010 ml(0.129 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine(DMAP) 3 mg(0.024 mmol)을 가한 다음 실온에서 2시간 교반하였다. Dichloromethane 10 ml를 더 가하고 반응액을 포화 NaHCO_3 수용액, 0.1 N 염산수용액, 포화식염수로 세척한 다음 유기층을 MgSO_4 로 건조하고 여과하여 용매를 감압 증류하였다. 얻어진 잔사를 preparatory TLC(ethyl acetate/hexane 2:3)에 의하여 정제하여 18 mg(수율 57%)의 무색 오일인 epi-xanthatinic acid methyl ester를 얻었다: R_f 0.60(ethyl acetate/hexane 1:1); ^1H NMR(CDCl_3) δ 1.15(d, $J=7.0$ Hz, 3H), 1.82(q, $J=11.5$ Hz, 1H), 2.07(m, 1H), 2.40~2.45(m, 2H), 2.72(m, 1H), 3.30(m, 1H), 3.68(s, 3H), 4.58(m, 1H), 5.51(d, $J=2.9$ Hz, 1H), 5.80(d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.10(t, $J=6.3$ Hz, 1H), 6.24(d, $J=3.4$ Hz, 1H), 7.08(d, $J=16.1$ Hz, 1H).

N-Epi-xanthatinyl morpholine(5)의 합성

무수 DMF 0.5 ml에 epi-xanthatinic acid(2) 50 mg(0.20

mmol)을 가하고 질소기체 하에 triethylamine 0.056 ml(0.40 mmol)를 가하여 녹인 다음 0°C에서 ethyl chloroformate 0.024 ml(0.25 mmol)를 적가하여 5분간 교반하였다. Morpholine 0.018 ml(0.20 mmol)를 0°C에서 위의 반응용액에 서서히 적가한 다음 10분간 교반하였다. 0°C의 묽은 염산용액으로 pH를 2로 조정하고 ethyl acetate로 추출한 다음 유기층을 다시 1 N NaHCO₃ 수용액으로 여러 번 세척하였다. 유기층을 포화식염수로 세척한 다음 MgSO₄로 건조하고 여과하여 용매를 감압 증류하였다. 얻어진 잔사를 flash column chromatography(ethyl acetate/hexane 4 : 1)에 의하여 정제하여 43 mg(수율 68%)의 *N*-epi-xanthatinyll morpholine을 얻었다: R_f 0.30(ethyl acetate/hexane 4 : 1); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.20(d, *J*=6.9 Hz, 3H), 1.91(ddd, *J*=11.6, 12.0, 13.9 Hz, 1H), 2.16(ddd, *J*=2.3, 6.9, 14.0 Hz, 1H), 2.41~2.64(m, 2H), 2.82(m, 1H), 3.40(ddt, *J*=3.3, 8.6, 17.0 Hz, 1H), 3.63(br, 4H), 3.70(br, 4H), 4.65(ddd, *J*=2.3, 8.8, 12.2 Hz, 1H), 5.56(d, *J*=2.9 Hz, 1H), 6.13(dd, *J*=6.3, 8.9 Hz, 1H), 6.23(d, *J*=15.4 Hz, 1H), 6.30(d, *J*=3.3 Hz, 1H), 7.15(d, *J*=15.4 Hz, 1H).

N-Epi-xanthatinyll L-aspartic acid(6)의 합성

무수 DMF 10 ml에 epi-xanthatinic acid(2) 500 mg(2.0 mmol)을 녹이고 triethylamine 0.42 ml(3.0 mmol)를 넣은 다음 질소기체 하에 benzyl chloroformate 0.35 ml(2.42 mmol)를 적가하여 실온에서 10분간 교반하였다. L-Aspartic acid 268 mg(2.0 mmol)과 triethylamine 0.56 ml(4.0 mmol)의 무수 DMF 용액 15 ml를 위의 반응용액에 서서히 적가한 다음 실온에서 4시간 교반하였다. 용매를 감압 증류하여 얻어진 잔사를 preparatory TLC (acetonitrile/methanol/acetic acid 20 : 10 : 1)에 의하여 정제하여 150 mg(수율 21%)의 미황색 고체인 *N*-epi-xanthatinyll L-aspartic acid를 얻었다: R_f 0.52(acetonitrile/methanol/acetic acid 20 : 10 : 1); ¹H NMR(DMSO-*d*₆) δ 1.12(d, *J*=7.4 Hz, 3H), 1.90(m, 1H), 1.97(m, 1H), 2.43~2.56(m, 2H), 2.77(m, 1H), 2.98(d, *J*=6.3 Hz, 2H), 3.42(m, 1H), 4.34(br, 1H), 4.68(m, 1H), 5.70(d, *J*=5.0 Hz, 1H), 6.07(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.10(t, *J*=5.0 Hz, 1H), 6.18(d, *J*=4.7 Hz, 1H), 6.88(d, *J*=15.8 Hz, 1H), 7.92(s, 1H); Mass, *m/z* 364(M+1).

N-Epi-xanthatinyll tetraacetyl-D-glucosamine(7)의 합성

무수 THF 3 ml에 epi-xanthatinic acid(2) 56 mg(0.227 mmol)을 녹이고 triethylamine 0.079 ml(0.567 mmol)를 넣은 다음 질소기체 하에 benzyl chloroformate 0.040 ml(0.272 mmol)를 적가하여 0°C에서 10분간 교반하였다. THF 3 ml에 1,3,4,6-tetraacetyl-D-glucosamine 79 mg(0.227 mmol)을 녹인 용액을 위의 반응용액에 서서히 적가한 다음 실온에서 12시간 교반하였다. 반응용액에 ethyl acetate 10 ml를 가하고 물로 3회, 포화식염수로

1회 세척한 다음 유기층을 MgSO₄로 건조하고 여과하여 용매를 감압 증류하였다. 얻어진 잔사를 flash column chromatography (ethyl acetate/dichloromethane 2 : 1)에 의하여 정제하여 33 mg(수율 25%)의 *N*-epi-xanthatinyll tetraacetyl-D-glucosamine을 얻었다: R_f 0.45(ethyl acetate/dichloromethane 2 : 1); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.17(d, *J*=6.9 Hz, 3H), 1.89(dd, *J*=12.0, 25.6 Hz, 1H), 2.14(m, 1H), 2.04(s, 3H), 2.06(s, 3H), 2.10(s, 3H), 2.20(s, 3H), 2.42~2.63(m, 2H), 2.77(m, 1H), 3.39(m, 1H), 4.01(m, 1H), 4.10(m, 1H), 4.28(dd, *J*=4.1, 12.4 Hz, 1H), 4.57(m, 1H), 4.64(ddd, *J*=2.1, 9.2, 11.7 Hz, 1H), 5.26(m, 2H), 5.57(d, *J*=2.8 Hz, 1H), 5.58(m, 1H), 5.68(d, *J*=15.6 Hz, 1H), 6.15(dd, *J*=6.3, 9.0 Hz, 1H), 6.23(d, *J*=3.6 Hz, 1H), 6.31(d, *J*=3.4 Hz, 1H), 7.10(d, *J*=15.6 Hz, 1H).

1-(Epi-xanthatinyll)-2-buten-1-ol(8) [Epi-xanthatin과 crotonaldehyde의 aldol product]의 합성

Epi-xanthatin(1) 42 mg(0.170 mmol)을 dichloromethane 3 ml에 녹이고 질소기체 하에 triethylamine 0.029 ml(0.208 mmol)를 가한 다음 0°C에서 trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate 0.040 ml(0.207 mmol)를 적가하여 10분간 교반하였다. 한편 dichloromethane 3 ml에 crotonaldehyde 0.017 ml(0.205 mmol)와 titanium(IV) chloride 0.022 ml(0.201 mmol)를 녹인 다음 질소기체 하에 위의 silyl enol ether 용액을 -78°C에서 서서히 적가하고 2시간 교반하였다. 반응용액에 dichloromethane 15 ml를 가하고 포화 염화암모늄 수용액으로 물층의 pH가 7이 될 때까지 세척한 다음 포화식염수로 세척하고 MgSO₄로 건조, 여과하여 용매를 감압 증류하였다. 얻어진 잔사를 preparatory TLC (ethyl ether/dichloromethane/hexane 4 : 5 : 2)에 의하여 정제하여 26 mg(수율 48%)의 aldol product를 미색 오일로 얻었다: R_f 0.31(ethyl acetate/hexane 1 : 1); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.18(d, *J*=6.8 Hz, 3H), 1.71(d, *J*=6.3 Hz, 3H), 1.91(q, *J*=11.9 Hz, 1H), 2.18(dd, *J*=7.1, 13.8 Hz, 1H), 2.45~2.67(m, 2H), 3.07(m, 1H), 3.41(m, 1H), 4.58(m, 1H), 4.65(ddd, *J*=2.1, 8.6, 12.4 Hz, 1H), 5.53(dd, *J*=6.3, 15.3 Hz, 1H), 5.58(d, *J*=2.9 Hz, 1H), 5.75(dq, *J*=6.6, 15.2 Hz, 1H), 6.15(d, *J*=16.2 Hz, 1H), 6.23(dd, *J*=6.4, 8.8 Hz, 1H), 6.32(d, *J*=3.3 Hz, 1H), 7.04(d, *J*=16.2 Hz, 1H).

(3a*R*, 9*S*, 10a*R*)-2,3,3a,4a,7,9,10,10a-octahydro-7-(1-Hydroxy-1-ethyl)-5,6-di(methoxycarbonyl)-9-methyl-3-methylene-2-oxo-4*H*-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-*b*]furan(9) [epi-xanthatinol과 dimethyl acetylenedicarboxylate의 Diels-Alder adduct]의 합성

Epi-xanthatinol - Epi-xanthatin(1) 370 mg(1.49 mmol)을

methanol 40 ml에 녹이고 2N 염산 수용액을 가하여 pH를 3~4로 조정한다. 다음 sodium cyanoborohydride 220 mg(3.52 mmol)을 실온에서 서서히 가하고 20분 더 교반하였다. 반응용액을 농축하여 dichloromethane에 녹이고 포화식염수로 세척한 다음 MgSO₄로 건조하고 여과하여 용매를 감압 증류하였다. 얻어진 잔사를 flash column chromatography(ethyl acetate/hexane 1:2)에 의하여 정제하여 275 mg(수율 75%)의 epi-xanthatinol을 얻었다: R_f 0.25(ethyl acetate/hexane 1:2); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.17(dd, J=2.9, 6.9 Hz, 3H), 1.30(dd, J=1.6, 6.4 Hz, 3H), 1.59(br, 1H), 1.86(dt, J=11.9, 13.7 Hz, 1H), 2.12(ddd, J=2.2, 7.0, 13.9 Hz, 1H), 2.31~2.57(m, 2H), 2.79(ddq, J=1.7, 6.8, 17.7 Hz, 1H), 3.37(ddt, J=3.2, 8.6, 17.1 Hz, 1H), 4.35(m, 1H), 4.65(ddd, J=2.3, 8.8, 12.2 Hz, 1H), 5.54(d, J=3.0 Hz, 1H), 5.66(dd, J=6.4, 16.0 Hz, 1H), 5.76(dd, J=6.2, 8.9 Hz, 1H), 6.02(d, J=16.0 Hz, 1H), 6.28(d, J=3.4 Hz, 1H).

Diels-Alder adduct(9) - 무수 toluene 3 ml에 epi-xanthatinol 134 mg(0.54 mmol)을 녹이고 정제된 dimethyl acetylenedicarboxylate 0.20 ml(1.62 mmol)를 가한 후 밤새 환류 교반하였다. 반응용액을 농축하여 얻은 잔사를 preparatory TLC(ethyl acetate/hexane 2:1)에 의하여 정제하여 73 mg(수율 35%)의 Diels-Alder adduct를 얻었다: R_f 0.50(ethyl acetate/hexane 2:1); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.24(d, J=6.5 Hz, 6H), 1.54~1.68(m, 2H), 2.02~2.09(m, 1H), 2.17(m, 1H), 2.28(dd, J=5.4, 14.1 Hz, 0.5H), 2.39(dd, J=5.5, 14.0 Hz, 0.5H), 2.95(dq, J=4.1, 12.6 Hz, 1H), 3.31~3.36(m, 1H), 3.54(m, 1H), 3.76~3.83(m, 1H), 3.80(t, J=2.6 Hz, 6H), 4.05(br, 1H), 4.90(ddd, J=3.1, 8.8, 11.9 Hz, 1H), 5.46(d, J=4.7 Hz, 0.5H), 5.53(dd, J=2.8, 6.0 Hz, 1.5H), 6.26(dd, J=3.2, 7.1 Hz, 1H); Mass, m/z 391(M+1).

In vitro 활성 측정(SRB Assay)

활성측정은 NCI에서 개발한 sulforhodamine B(SRB) assay법을 사용하였다.⁶⁾ 실험에 사용한 세포들은 모두 미국 국립암연구소(NCI)로부터 분양받은 인체유래 암세포주들로 37°C 항온 항습 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하였고 배양액으로는 5% fetal bovine serum으로 보강된 RPMI 1640 medium을 사용하였다. 먼저 계대중인 세포들을 trypsin-CDTA(trans-1,2-diaminocyclohexanetetraacetic acid) 용액을 사용하여 부착면으로부터 분리시키고 96-well flat bottom microplate에 well당 세포수가 5,000(A549, HCT-15) 10,000(SK-MEL-2, XF498), 20,000(SK-OV-3)이 되도록 분주한 다음 CO₂ incubator 내에서 24시간 배양하여 분주된 세포들을 바닥에 부착시켰다. 약물을 6 농도의 log dose로 medium에 희석한 다음 세포가 부착된 well에 각각 3배수로 넣어주고 48시간 배양하였다. 약물 용해를 위하여 필요에

따라 DMSO를 사용하고 이때 DMSO의 농도는 0.5% 이하가 되도록 하였다. 배양 후 10% trichloroacetic acid(TCA)를 가하고 4°C에서 1시간 동안 방치하여 세포들을 plate에 고정시킨 다음 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하고 30분간 세포를 염색하였다. 10 mM Tris base(unbuffered) 용액을 가하여 titer plate shaker로 10분간 shaking하여 염색시약을 용출시킨 후 microplate reader를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포들에 대한 약물의 효과를 계산하기 위하여 약물을 가하기 전의 세포수(Tz)와 약물이 들어있지 않은 medium을 가하여 48시간 배양했을 때의 세포수(C) 및 각 농도의 약물과 함께 48시간 배양했을 때의 세포수(T) 등을 측정하여 다음의 수식에 의해 항암활성을 계산하였다: Tz>T 인 경우 [(T-Tz)/(C-Tz)]×100; Tz<T 인 경우 [(T-Tz)/Tz]×100. 각 농도에서 이렇게 얻은 값으로부터 약물이 세포의 성장을 50% 억제하는 농도인 ED₅₀ 값을 계산하였다.

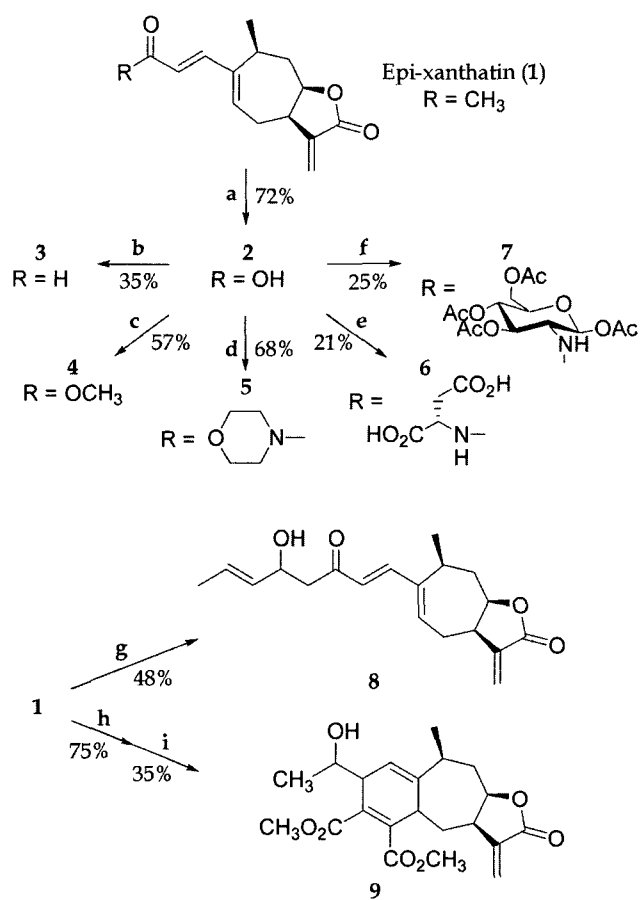
In vivo 항암활성 측정

마우스 유래 leukemia L1210을 세포주로 사용하고 BDF₁ 마우스를 사용하여 항암활성을 측정하였다.⁷⁾ 6주령 BDF₁ 마우스 8마리를 한 실험군으로 하여 DBA/2 마우스에서 계대중인 L1210 세포를 각각의 마우스에 1×10⁵ cells/0.1 ml씩 복강 내로 이식하였다. 시험약물은 1~10일에 각각의 농도로서 복강내 투여하였다. 마우스를 매일 관찰하면서 생존일수를 측정하고 각 실험군의 평균생존일로부터 대조군(C)에 대한 투여군(T)의 평균생존일의 증가된 비율인 T/C%를 계산하여 항암효과를 판정하였고 125 이상의 T/C%를 보인 결과를 유의성 있는 항암활성으로 판단하였다.

결과 및 고찰

합성

본 연구에 사용한 epi-xanthatin 유도체들은 Scheme 1에 따라 합성하였다. 화합물 2는 친수성 치환기인 carboxylic acid가 도입된 유도체로서 epi-xanthatin(1)의 terminal methyl ketone이 sodium hypochlorite를 사용한 haloform reaction에 의해 carboxylic acid로 변환되었다. Aldehyde 3은 carboxylic acid 2를 oxalyl chloride와 반응시켜서 acid chloride를 만들고 이것을 곧바로 sodium borohydride로 환원시켜서 합성하였다. 또한 carboxylic acid를 촉매량의 DMAP와 함께 methyl chloroformate와 반응시켜서⁸⁾ methyl ester 4를 합성하였고, heterocycle의 영향을 알아보기 위하여 ethyl chloroformate의 존재 하에 morpholine을 결합시켜서 amide 5를 합성하였다. 이와 유사하게 aspartic acid와 tetraacetylglucosamine을 각각 결합시켜 화합물 6 및 7을 합성하였다. 이러한 유도체화는 용해도 증가와 독성 감



Scheme 1 – Synthesis of epi-xanthatin analogs.

(a) i. NaOCl, dioxane-H₂O, 0°C, 1 h; ii. HCl; (b) i. (COCl)₂, Et₃N, THF, 0~10°C, 30 min; ii. NaBH₄, DMF-THF, -78°C, 30 min; (c) ClCO₂CH₃, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, r.t., 2 h; (d) ClCO₂Et, Et₃N, Morpholine, DMF, 0°C, 10 min; (e) ClCO₂CH₂Ph, Et₃N, L-Asp, DMF, r.t., 4 h; (f) ClCO₂CH₂Ph, Et₃N, 1,3,4,6-Tetraacetyl D-glucosamine, THF, r.t., 12 h; (g) i. Et₃N, TMSOTf, CH₂Cl₂, 0°C, 10 min; ii. crotonaldehyde, TiCl₄, CH₂Cl₂, -78°C, 2 h; (h) Na(CN)BH₃, CH₃OH, r.t., 20 min; (i) CH₃O₂C-C≡C-CO₂CH₃, toluene, reflux (overnight).

소가 목적이었는데 아미노산이 결합된 천연물 유도체의 예로서 vinriptol과 vinleucinol이 있는데 이들은 각각 tryptophan ethyl ester와 isoleucine ethyl ester가 결합된 vinblastin 유도체로서 골수억제와 신경독성이 5배 이상 감소되었음이 보고된 바 있으며,⁹⁾ 아미노산 대신 glucose가 결합된 예로서 etoposide, teniposide 등이 podophyllotoxin 유도체로서 수용성이 증가하고 위장독성이 크게 감소되었음이 보고되었다.¹⁰⁾

또한 epi-xanthatin의 methyl ketone을 TMS triflate와 반응시켜서 enol silyl ether를 만들고 이것을 titanium tetrachloride 존재 하에 crotonaldehyde와의 Mukaiyama reaction¹¹⁾에 의해서 aldol product **8**을 합성하였다. 그리고 Fig. 1에 나타난 바와 같이 tricyclic 구조를 가지고 있는 sesquiterpene lactone들이 강한 *in vitro* 및 *in vivo* 활성을 보이는 점에 주목하여 epi-xanthatin

의 tricyclic 유도체 **9**를 합성하였는데 epi-xanthatin의 ketone을 sodium cyanoborohydride로 환원하여 얻은 epi-xanthatinol을 dimethyl acetylenedicarboxylate와 Diels-Alder reaction 시켜서 합성하였다.

In vitro 세포독성 및 *In vivo* 항암활성

In vitro 활성은 인체유래 5개 암세포주를 이용하여 세포성장 저지농도(ED₅₀)를 측정하였다. 합성된 유도체들의 *in vitro* 활성은 Table I에 정리하였고 cisplatin과 epi-xanthatin(**1**)을 대조물질로 사용하여 활성을 비교하였는데 이 대조물질들은 5개 암세포주에서 ED₅₀ 값이 0.10~1.6 µg/ml로서 0.9 µg/ml의 평균값을 보이고 있다.

이와 비교하여 화합물 **8**은 ED₅₀ 값이 0.10~0.51 µg/ml로서 0.3 µg/ml의 평균값을 보이고 있으며 각 세포주별로 대조물질 대비 동등 내지 7배 증가된 *in vitro* 활성을 나타냈다. 화합물 **2**, **3**, **4**, **5**, **9**는 ED₅₀ 값이 0.3~10 µg/ml로서 *in vitro* 활성이 동등 또는 약간 낮게 나타나고는 있으나 그 활성이 일정 수준에서 유지되고 있음을 보여주고 있다. 한편 화합물 **6**의 경우는 ED₅₀ 값이 10~>100 µg/ml로서 *in vitro* 활성이 크게 감소하였는데, 이것은 친수성이 매우 큰 aspartic acid가 결합돼 있어서 물에 대한 용해도가 지나치게 높아졌기 때문이라고 여겨진다. 이러한 친수성-낮은 활성의 상관관계는 glucosamine 유도체를 가진 화합물 **7**의 경우 친수성은 많이 감소한 반면 ED₅₀ 값이 2~30 µg/ml로서 *in vitro* 활성은 어느 정도 유지되고 있는 점에서 이러한 유추가 가능하다.

이들 중 *in vitro* 활성이 증가되거나 일정 수준 유지되고 있는

Table I – *In vitro* cell growth inhibition data for epi-xanthatin analogs in comparison with cisplatin and epi-xanthatin (ED₅₀, µg/ml)

Entry	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT-15
Cisplatin	1.0	1.0	0.73	0.36	1.4
1	1.1	1.6	0.24	1.3	0.10
2	8.1	6.8	1.5	4.1	7.3
3	3.9	1.1	0.34	1.0	0.58
4	2.3	4.6	1.2	2.4	4.5
5	9.7	5.6	3.5	3.4	3.1
6	>100	>100	67	10	>100
7	25	13	2.4	5.8	30
8	0.35	0.51	0.10	0.31	0.33
9	8.7	9.3	3.0	3.0	4.1

Table II – *In vivo* antitumor activity of epi-xanthatin analogs on BDF₁ mice implanted with L1210 mouse leukemia (T/C, %)

Entry	Dose (mg/kg)			
	10	25	50	200
2	100	96	105	Toxic
8	98	98		

화합물 중에서 물에 대한 용해도가 개선된 carboxylic acid 2와 aldol product 8에 대해 그 *in vivo* 활성을 측정하였고 이를 Table II에 나타냈는데 높은 농도(200 mg/kg)에서는 독성을 나타내었고 낮은 농도(10, 25, 50 mg/kg)에서는 활성을 거의 관찰할 수 없었다.

결 론

본 연구실에서는 5종의 암세포주에 대한 epi-xanthatin의 ED₅₀가 0.1~1.5 µg/ml로서 *in vitro* 효과는 우수한 반면 *in vivo* 효과는 나타나지 않았음을 보고하였는데 이것은 화합물의 물에 대한 낮은 용해도와 생체내 대사 때문이라고 판단하였다.⁴⁾ 따라서 본 연구에서는 epi-xanthatin에 친수성 치환기를 도입하여 물에 대한 용해도를 높이고 그러한 시도 하에 *in vitro* 활성을 유지하면서 *in vivo* stability 및 efficacy를 증가시키고자 하였는데, 친수성 치환기로는 carboxylic acid, alcohol, morpholine, amino acid, glucose 유도체등을 도입하였다. 그 결과 화합물 8은 ED₅₀ 값이 0.1~0.5 µg/ml로서 대조물질 대비 동등 내지 7배 증가된 *in vitro* 활성을 나타냈고 기타 6종의 유도체에서는 활성이 약간 낮기는 하지만 일정 수준에서 유지되고 있었으나, 물에 대한 용해도가 지나치게 높은 화합물 6은 거의 활성을 보이지 않았다. *In vivo* 활성은 약한 친수성을 가진 2종의 유도체에서 측정하였는데 높은 농도(200 mg/kg)에서는 독성을 나타내었고 낮은 농도(10~50 mg/kg)에서는 활성이 없었다.

결론적으로 지나친 친수성은 *in vitro* 활성을 크게 감소시켰고 극단의 소수성은 *in vivo* 활성발현에 장애가 되고 있다. 따라서 *in vivo* 활성을 위해서는 친수성 기와 소수성 기를 같이 가지고 있거나, 중간정도의 친수성을 보이는 유도체가 최적이라고 사료되고, 이러한 용해도-활성 상관관계는 앞으로 유수분배계수(log P)를 측정하여 정량적으로 접근해볼 필요가 있다고 여겨진다.

문 헌

- 1) Lee, K.-H., Huang, E.-S., Piantadosi, C., Pagano, J. S. and Geissman, T. A. : Cytotoxicity of sesquiterpene lactones. *Cancer Res.* **31**, 1649 (1971).
- 2) Lee, K.-H., Ibuka, T., Kim, S.-H., Vestal, B. R., Hall, I. H. and Huang, E.-S. : Antitumor agents. 16. Steroidal α -methylene- γ -lactones. *J. Med. Chem.* **18**, 812 (1975).
- 3) 육창수 : 원색한국약용식물도감, 아카데미서적, 서울, p. 553 (1989).
- 4) Ahn, J.-W., No, Z., Ryu, S. Y., Zee, O.-P. and Kim, S.-K. : Isolation of cytotoxic compounds from the leaves of *Xanthium strumarium* L. *Natural Product Sciences* **1**, 1 (1995).
- 5) Still, W. C., Kahn, M. and Mitra, A. : Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **43**, 2923 (1978).
- 6) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).
- 7) Goldin, A., Venditti, J. M., McDonald, J. S., Muggia, F. M., Henney, J. G. and Devita, V. T. : Current results of the screening program at the division of cancer treatment, national cancer institute. *Europ. J. Cancer* **7**, 129 (1981).
- 8) Kim, S., Lee, J. I. and Kim, Y. C. : A simple and mild esterification method for carboxylic acids using mixed carboxylic-carbonic anhydrides. *J. Org. Chem.* **50**, 560 (1985).
- 9) Vintriptol mesylate. *Drugs of the Future* **17**, 569 (1992).
- 10) Etoposide. *Drugs of the Future* **16**, 113 (1991).
- 11) Mukaiyama, T., Banno, K. and Narasaka, K. : New cross-aldol reactions. Reactions of silyl enol ethers with carbonyl compounds activated by titanium tetrachloride. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 7503 (1974).