

## 천연물로 부터의 Aromatase inhibitors

정혜진

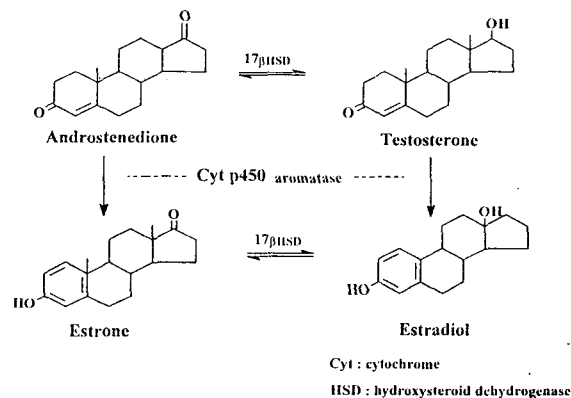
The National Institutes of Health

여성의 breast cancer의 1/3 의 경우가 hormone-dependent에 의한 것이다. 따라서 그 치료의 접근 방법으로써 estrogen receptor에 작용하거나, receptor-mediated gene transcription을 저해하는 antiestrogen을 사용하는 것이 있다. Estrogen은 microsomal cytochrome P-450 enzyme complex system에 의해 androgen으로부터 생합성되는 hormone이며, estrogen product는 steroid product의 biosynthetic sequence의 마지막 단계에서 생산되고, aromatase는 이에 관여하는 enzyme으로써, aromatase를 선택적으로 저해하는 경우에 다른 steroid의 생산에 영향을 미치지 않고 estrogen 생산을 감소시킬 수 있다. 이러한 관점에서, aromatase를 선택적으로 저해하는 것은 hormone-dependent breast cancer를 완화시킬 수 있는 가능성을 가진 cancer chemopreventive agents의 새로운 방법이라 할 수 있다.

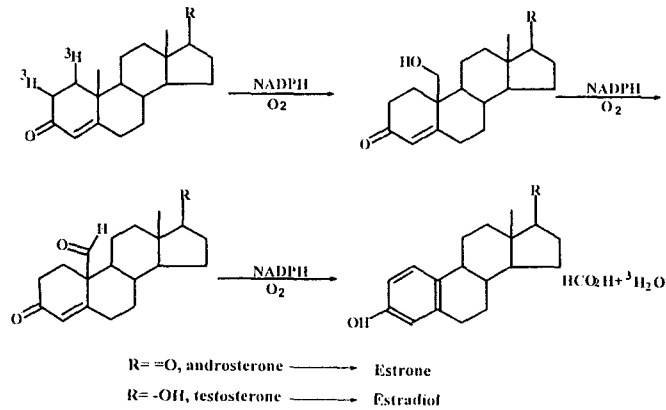
이에 새로운 cancer chemopreventive agent를 개발하기 위하여, 여러 가능성있는 천연물을 screening 한 결과, 우리나라 특산 약품식물인 지리오리방풀(*Isodon excisus* var. *coreanus*)에서 분리한 inflexin, ursolic acid 및, ursolic acid 3-acetate가 현저한 aromatase inhibitory activity를 나타내었으며, 버섯인 *Lepiota americana*에서 분리한 2-aminophenoxazin-3-one 또한 강한 inhibitory activity를 나타내었다. 또한 천연물의 주성분의 한 group인 flavonoid중 임의의 28개를 screening 한 결과, apigenin 과 hesperetin을 비롯한 16개의 flavonoids가 뚜렷한 inhibitory activity를 나타내었기에 천연물로부터 cancer chemopreventive agent를 개발할 가능성을 보여주었다.

또한 melanoma cell 에 선택적인 cytotoxicity를 보였던 butulinic acid의 경우 water solubility가 낮아서 biological efficacy가 낮은 문제점을 가지고 있었다. 이 문제를 개선해 보고자 butulinic acid에 amino acid를 conjugate하므로서 water solubility 및 selective cytotoxicity의 향상을 할 목적으로 실험한 결과 현저히 상승한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

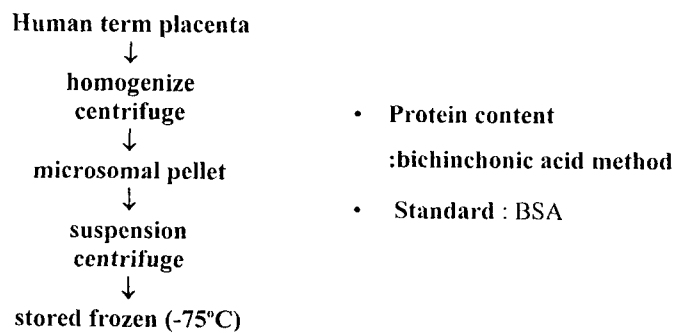
### *Steroid biosynthetic pathway*



## *Biosynthetic pathway of estrogen catalyzed by aromatase*



## *Preparation of purified human placental microsomes*



## *Assay for aromatase activity*

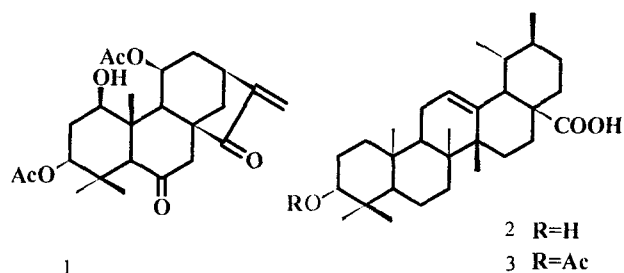
### Reaction mixture

1. placental microsomes
2. [1,2-<sup>3</sup>H]androstenedione
3. unlabelled androstenedione
4. NADPH
5. test sample
6. potassium phosphate buffer (pH 7.4)

### Reaction mixture

- ↓
- incubation (37°C)
- ↓
- centrifuge
- ↓
- aqueous phase
- ↓
- count radioactivity

*Active compounds from I. excisus var. coreanus*

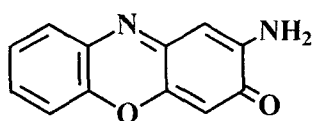


1. inflexin (ent-1a-hydroxy-3b,6a-diacetoxykaur-16-en-11,15-dione)
2. ursolic acid
3. ursolic acid 3-acetate

*Aromatase inhibitory effects of compounds*

Test sample	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Inflexin	9.2
Ursolic acid	14.0
Ursolic acid 3-acetate	42.7
Aminoglutethimide (positive control)	0.2

*Active compound from Lepiota americana  
(Agaricales)*



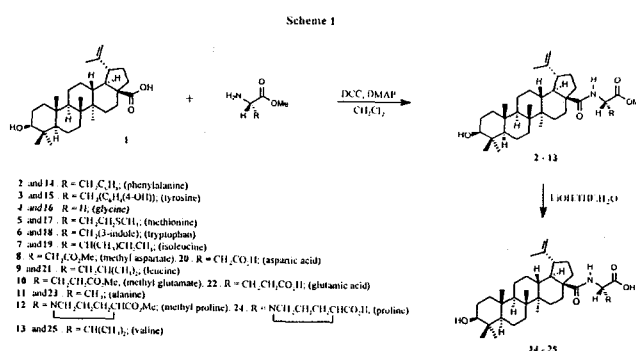
2-aminophenoxazin-3-one

- Aromatase inhibitory activity : IC<sub>50</sub>=1.2 µg/mL  
(Aminoglutethimide : 0.2 µg/mL)

## Inhibitory effects of flavonoids on aromatase activity

Test Compounds	Inhibition (% at 80 µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Acacetin	81.2	18.9
Apigenin	70.6	0.9
Biochanin A	86.9	10.2
Chrysin	77.1	1.1
7,8-Dihydroxyflavone	90.3	2.2
Fisetin	90.8	8.5
Flavanone	88.8	8.7
Hesperidine	79.1	40.9
Hesperetin	90.9	1.0
7-Hydroxyflavone	88.0	30.5
Myricetin	69.3	5.6
Naringin	84.6	1.8
Prunetin	85.8	7.8
Robinetin	57.6	45.7
Silymarin	85.4	6.7
3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone	84.4	3.3

Aminogluthetimide was used as a positive control: 93.1% inhibition at 80 µg/mL  
IC<sub>50</sub> = 0.2 µg/mL.



## Cytotoxicity profile of amino acid conjugates of butulinic acid against MEL-2 and KB cell lines.

compounds	methyl ester			free acid		
	MEL-2 (ED50 = µg/mL)	KB (ED50 = µg/mL)	Water solubility	MEL-2 (ED50 = µg/mL)	KB (ED50 = µg/mL)	Water solubility
betulinic acid				4.2	>20	<<5x
Phe	9.0	>20	5x	>20	>20	
Gly	10.2	>20	50x	4.2	>20	100x
Met	12.8	>20	5x	9.0	>20	5x
Trp	>20	>20		8.6	>20	10x
Leu	6.2	>20	5x	9.0	>20	10x
Ala	3.5	>20	30x	1.5	4.6	50x
Pro	>20	>20		13.1	>20	20x
Val	2.1	>20	5x	9.0	9.0	20x

Note: The assay was performed twice in triplicates.  
The solubility was tested on the compounds that showed cytotoxicity against MEL-2.