

## 6-(1-acyloxyalkyl)-5,8-dialkoxy-1,4-naphthoquinone 유도체의 DNA Topoisomerase-I 저해활성에 대한 Parameter Focusing

성낙도\* · 명평근<sup>1</sup>

충남대학교 농과대학 응용생물화학부, <sup>1</sup>충남대학교 약학대학 약학과

(2000년 5월 16일 접수, 2000년 7월 20일 수리)

### 서 론

Naphthoquinone 유도체인 acequinocyl(살웅애제), dithianone(살균제) 및 quinoxaline(제초제) 등은 다양한 용도의 농약으로 활용되고 있는데<sup>1)</sup> 반하여 이들은 인체내 DNA에 의하여 번역, 전사, 감수분열하는 동안에 DNA를 일시적으로 절단하고 재결합시켜 circular DNA의 topographic 구조를 유지하는데 관계되는 DNA 위상 이성질화효소(Topo.I, EC, 5.5.1.2)에 대한 저해제로 알려져 새로운 항암제로 주목받기 시작하였다.

1990년대에 이르러 Topo.I에 대한 저해물질로는 기존에 알려진 comptothecin 이외에 terbenimidazoles, benzophenanthridine alkaloids, indolocarbazoles, flavones, acylshikonin, bulgarein 및  $\beta$ -lapachone 유도체 등이 보고되었다.<sup>2)</sup> 특히, acylshikonin 유도체는 quinone 구조를 가진 화합물로서 Brockman<sup>3)</sup> 등에 의해 *Alkanna tinctoria*에서 최초로 분리되어 보고<sup>4)</sup> 되었으며 Ahn,<sup>5)</sup> 등은 이들 유도체의 유의할 만한 항암작용이 Topo.I에 대한 저해작용일것임을 시사한 바 있다.

본 연구에서는 Topo.I에 대한 acylshikonin 유사체인 6-(1-acyloxyalkyl)-5,8-dialkoxy-1,4-naphthoquinone 유도체(Fig.1)들의 저해활성에 미치는 치환기들의 parameter focusing<sup>6)</sup>에 관하여 검토하였다.

### 재료 및 방법

효소로서 소의 흉선 DNA topoisomerase-I(Topo.I)은 Takara Biochemicals사(Japan)제로 사용 전까지 -20°C에서 보관된 것 0.5 U/ $\mu$ l와 기질로 *E-coli* pBR322 DNA 0.05  $\mu$ g/ $\mu$ l를 반응용액에 가하여 20  $\mu$ l가 되게한 것을 비교군으로 하고 dimethylsulfoxide에 저해물질로 합성된 6-(1-acyloxyalkyl)-5,8-dialkoxy-1,4-naphthoquinone 유도체<sup>5)</sup>를 녹인 것(10  $\mu$ g/mg)을 비교군 조건의 loading buffer에 계열 희석하여 저해제의 농도가 총 반응액 20  $\mu$ l중 6.25~200  $\mu$ g/ml이 함유하도록 제조한 것을 실험군으로 하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이를 전기영동하고<sup>7)</sup> 저해활성(IC<sub>50</sub>) 값( $\mu$ M)은 supercoiled pBR322 DNA의 relaxation

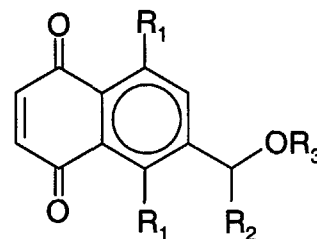


Fig. 1. General structure of 6-(1-acyloxyalkyl)-5,8-dialkoxy-1,4-naphthoquinone derivatives.

을 50% 억제하는 농도를 측정하여 Table 1에 정리 하였다.

저해활성에 미치는 치환기(R<sub>3</sub>)들의 parameter focusing<sup>6)</sup>에 필요한 물리-화학 파라미터<sup>8)</sup> 중 소수성( $\pi$ )상수는 CLOGP 프로그램<sup>9)</sup>(Ver. 3.53)으로 그리고 분극율(Pol.)과 분자 부피(Vol.) 등은

Table 1. Inhibition activity (IC<sub>50</sub>)<sup>a</sup> against DNA topoisomerase I with (S) derivatives

No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1	OCH <sub>3</sub>	n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	H	73.25
2	OCH <sub>3</sub>	n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	Acetyl	42.31
3	OCH <sub>3</sub>	n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	Propanoyl	42.47
4	OCH <sub>3</sub>	n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	Butanoyl	140.36
5	OCH <sub>3</sub>	n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	Heptanoyl	142.77
6	OCH <sub>3</sub>	n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	Octanoyl	144.38
7	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	72.45
8	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	n-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	H	36.40
9	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	H	28.53
10	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	91.20
11	OCH <sub>3</sub>	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H	42.46

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> is the mean concentration required to inhibit 50% of topoisomerase-I activity.

Table 2. Used physicochemical parameters for R<sub>3</sub>-substituents

No	R <sub>3</sub>	Pol. <sup>a</sup>	$\pi$	L <sup>b</sup>	B <sub>1</sub> <sup>b</sup>	B <sub>5</sub> <sup>b</sup>
1	H	37.24	0.227	2.06	1.00	1.00
2	Acetyl	41.00	-1.144	4.06	1.60	3.13
3	Propanoyl	42.83	-0.615	4.87	1.63	3.45
4	Butanoyl	44.67	-0.086	6.12	1.63	4.50
5	Heptanoyl	50.17	1.501	8.98	1.63	6.35
6	Octanoyl	57.84	2.030	10.23	1.63	7.35

<sup>a</sup>Polarizability-volume dependent, <sup>b</sup>STERIMOL parameter( $\text{\AA}$ ).

찾는말 : 6-(1-acyloxyalkyl)-5,8-dialkoxy-1,4-naphthoquinones, DNA Topoisomerase I Inhibition, Parameter focusing

\*연락처 : Tel: 82-42-821-6737; Fax: 82-42-825-3306

E-mail : ndsung@hanbat.chungnam.ac.kr

SciQSAR 프로그램 (SciVision)<sup>10)</sup>에 적용하여 계산하고 치환기의 길이(L)와 폭(B<sub>3</sub>)<sup>11)</sup>에 관한 STERIMOL 파라미터 등과 함께 Table 2에 수록하였다.

## 결과 및 고찰

Topo.I에 대한 저해활성 시험결과(Table 1)로부터 R<sub>1</sub>~R<sub>3</sub>의 치환체 별, 저해활성은 다음과 같이 설명된다. 먼저 R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>인 R<sub>1</sub>=ethoxy-치환체, 7~9와 R<sub>1</sub>=methoxy-치환체, 10~11은 R<sub>2</sub>의 C수가 2개 증가 할수록 저해활성이 약 2배로 증가하고 그리고 R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>인 1과 9는 R<sub>1</sub>의 C수가 1개 증가시에 저해활성이 3배 이상으로 증가하는 경향을 보임으로서 R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 공통적으로 C수 증가와 더불어 저해활성이 증가하였다. 그러나 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>인 1~6에서 R<sub>3</sub>의 C수가 1~3개로 증가된 2, 3은 1보다 저해활성이 약 2배 가까이 개선되었으나, C수가 4개 이상으로 증가된 4~6보다 약 3.5배 가까이 급히 낮아지는 경향이였다. 이는 R<sub>3</sub>에 의한 저해활성이 특정한 물리-화학 파라미터에 비례하지 않고 적정 수준의 값을 가질 것임을 뜻한다. 특히, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>인 1과 가장 강력한 활성을 보인 9와의 저해활성 차( $\Delta IC_{50}$  = 44.72  $\mu$ M)가 매우 크므로 저해활성에 미치는 영향은 R<sub>2</sub>보다 R<sub>1</sub>이 크며 R<sub>3</sub>=hydroxy-치환체에 의한 수소 결합성이 저해활성을 향상시키는 역할을 하는 것으로 추정된다. 그리고 7~9의 평균 저해활성 ( $IC_{50}$  = 54.20  $\mu$ M)은 acetylshikonin<sup>7)</sup> ( $IC_{50}$  = 58.59  $\mu$ M)과 유사하였다.

한 예로 R<sub>1</sub>~R<sub>3</sub> 치환기 중에서 R<sub>3</sub>가 저해활성에 기여하는 요소를 알아보기 위하여 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>인 1~6의  $IC_{50}$ 값과 R<sub>3</sub>의 다양한 물리-화학 파라미터들에 대한 parameter focusing<sup>6)</sup>을 검토하였다. 그 결과, 상관성( $r > 0.84$ )을 보인  $\pi$ : B5 및  $\pi$ : L 등, 2개 상수들 사이의 관계에서 무리를 이루며 높은 저해활성을 보이는 치환체들의 상수값 범위는 B<sub>3</sub>가 3.0~3.5Å 그리고  $\pi$ 상수는 -1.0~-0.65이었다. 이 중에서  $\pi$ 와 L상수 사이의 parameter focusing을 Fig. 2에 나타내었다. 이로부터 L은 4.0~5.0Å이고  $\pi$ 상수는 앞서와 같은 범위의 값을 갖는 치환체가 높은 저해활성

을 보일것으로 예측된다.

한편, R<sub>3</sub>의 저해활성과 물리-화학 파라미터들간의 correlation matrix로 부터 독립적인 관계에 있는 가능한 모든 구조-활성 관계식<sup>12)</sup>(SAR)들을 검토하였다. 그 결과 1차식의 변수로는  $\pi > B_3 > Pol.$ 의 순으로  $\pi$ 상수를 포함하는 식이 제일 양호한 상관성( $r > 0.81$ )을 나타내었다. 이는 parameter focusing에서 검토된 바와 같이  $\pi$ 상수가 저해활성에 기여하는 가장 큰 요소중의 하나라는 사실을 잘 설명하고 있다. 따라서  $\pi$ 상수를 변수로 한 식( $IC_{50} = 33.36(\pm 12.08)\pi + 86.96(\pm 14.05)$ ,  $n = 6$ ,  $s = 33.12$ ,  $F = 1.62$  및  $r = 0.81$ )으로 부터는  $\pi$ 상수가 양( $\pi > 0$ )의 값이었다. 그러나 이 식은 저해활성의 변이중 약 65%(100·r<sup>2</sup>)를 설명하는 식 이므로  $\pi$ 상수 이외(1-r<sup>2</sup>)의 요소로 35%의 입체효과(L)와 극성효과( $\sigma^*$ ) 등이 저해활성에 기여하게 되면 R<sub>3</sub>의  $\pi$ 상수는 parameter focusing에서 예측되었던 결과와 같이 음( $0 > \pi$ )의 값을 갖게 될 것이다. 왜냐하면, 생물활성은 소수성과 입체효과 그리고 극성효과 등 3가지 주된 성질의 선형함수로 가정되었기 때문이다.<sup>13)</sup> 그러므로 Topo.I에 대한 저해활성은 주로 소수성이 큰 생체막 통과나 흡수 즉, phase-phase 사이의 수송과 기질-수용체 사이의 소수성 결합에 따른 자유에너지 관계에 의존적일 것임을 설명하고 있다.<sup>14)</sup>

개발 단계에서는 약효보다 그 부작용에 유의하므로 Camptothecin은 저해활성 ( $IC_{50} = 6.25 \mu$ M)<sup>15)</sup>이 강했으나 임상시험에서 심한 설사와 오심, 백혈구 감소증 및 골수에 대한 부작용 때문에 상품화에 이르지 못하였다. 따라서 1~11와 같은 화합물이 임상 적용에 있어서 부작용이 적다면 우수한 항암제로서의 가능성이 있을것으로 보인다.

결론적으로 naphthoquinone 유도체의 Topo.I에 대한 저해활성은 R<sub>1</sub> > R<sub>2</sub> ≥ R<sub>3</sub>의 순으로 R<sub>1</sub>의 구조변화와 R<sub>3</sub>=hydroxy-치환체에 의한 수소 결합성에 민감하였다. 그리고 R<sub>3</sub>에 대한 parameter focusing을 검토 한 결과, 주로 소수성( $\pi$ )이 저해활성에 가장 큰 영향을 미쳤으며 그 이외의 요인으로는 입체효과(L 및 B<sub>3</sub>)와 극성효과(Pol.)인 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Tomlin, C. D. S. Ed., (1977) The Pesticide Manual. (11th ed.), British crop protection council, Farnham, Surrey, UK.
- Hsiang, Y-H., Robert, H., Hecht, S. and Liu, F. L. (1985) Comptotecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA Topoisomerase-I. *J. Biol. Chem.* **260**, 14873-14878.
- Brockmann, H. (1936) The constituents of alkarin, shikonin and alkanan. *Liebigs Ann. Chem.* **521**, 1-47.
- Sankawa, U., Ebizuka, Y., Miyazaki, T., Isomura, Y., Otsuka, H., Shibata, S., Inomoto, M. and Fukoka, F. (1977) Antitumor activity of shikonin and its derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 2932-35.
- Kim, Y., Choi, S. L., Myung, P. K. and Ahn, B. Z. (2000) 6-(1-hydroxy or acyloxyalkyl)-(5,8-dialkoxy-1,4-naphthoquinones: synthesis, evaluation of cytotoxic activity, antitumor activity and inhibitory effect on DNA Topoisomerase-I. *Yakhak Hoeji* **44**, 141-148.

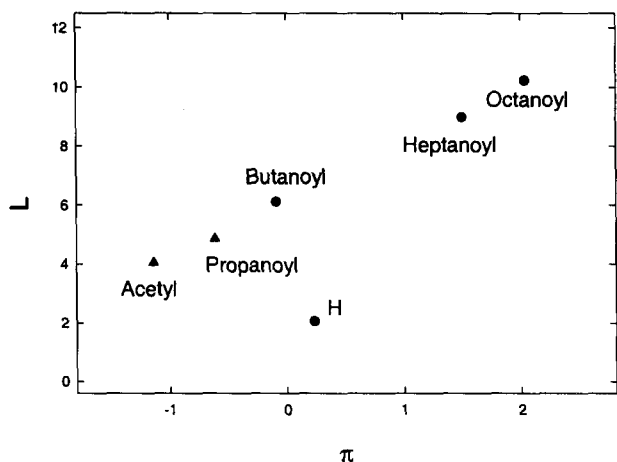


Fig. 2. Parameter focusing between hydrophobicity ( $\pi$ ) and length (L) constant in inhibition activity of 1-6 against DNA topoisomerase-I. (▲ : Active compound).

6. Magee, P. S. (1983) IUPAC Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment, Vol. I, pp. 251-260, Pergamon Press, Oxford and New York.
7. Liu, L. F., Rowe, T. C., Yang, L., Tewey, K. M. and Chen, G. L. (1983) Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* **258**, 15365.
8. Hansch, C., Pomona College, Medical chemistry project (1987) Datacorp. (Micro fiche), California USH.
9. CLOGP, LogP, Calculation algorithm, Pomona college, Medicine chemistry project, Claremont, CA.
10. Scivison, 128 Spring st. (1995) Lexington, MA. 2173, WA.
11. Verlog, P. A., Hoogenstraten, W. and Tripker, J. (1976) Drug Design, Vol. VII, 165-206, Academic Press, New York.
12. Hansch, C. and Leo, A. (1995) Exploring QSAR Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology. Ch.9., ACS professional reference book. ACS, Washington, DC.
13. Hansch, C. and Fujita, T. (1964) A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1616-1626.
14. Pennistone, J. T., Beckett, L., Bently, D. L. and Hansch, C. (1969) Passive permeation of organic compounds through biological tissue; A none steady state theory. *Mol. Pharmacol.* **5**, 333-341.
15. Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S. and Liu, L. F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA Topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**, 14873-14878.

---

**Parameter Focusing on the Topoisomerase-I Inhibition Activities of 6-(1-acyloxyalkyl)-5,8-dialkoxy-1,4-naphthoquinone Derivatives**

Nack-Do Sung\* and Pyung-Keun Myung<sup>1</sup>(\*Division of Applied Biology & Chemistry, College of Agriculture, Chungnam National University, 305-764; <sup>1</sup>College of Pharmacy, Chungnam National University, 305-764, Korea)

---

Key words : 6-(1-acyloxyalkyl)-5,8-dialkoxy-1,4-naphthoquinones, DNA Topoisomerase I Inhibition & Parameter focusing

\*Corresponding author