

6-(1-하이드록시 또는 아실옥시알킬)-5,8-디알콕시-1,4-나프토퀴논 유도체의 합성, DNA Topoisomerase-I에 대한 억제, 세포독성 및 항암활성

김 용 · 최수라 · 명평근 · 안병준[#]

충남대학교 약학대학
(Received November 17, 1999)

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

Yong Kim, Su-La Choi, Pyung-Keun Myung and Byung-Zun Ahn[#]

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract — A new synthetic method of 6-(1-oxyalkyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinones was developed, 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene was oxidized to form 6-formyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ). This was selectively reduced and benzylated to produce 6-formyl-5,8-dimethoxy-1,4-dibenzylloxynaphthalene, to which various alkylmagnesium halide were added, followed by debenylation and oxidation in sequence, yielding 6-(1-hydroxyalkyl)-DMNQ derivatives. 6-(1-hydroxyalkyl)-5,8-diethoxy-1,4-naphthalene (DENQ) derivatives were synthesized by similar procedure. 1'-OH of the naphthoquinone derivatives was acylated with various alkanolic acids to give 6-(1-acyloxyalkyl)-DMNQ or DENQ derivatives. TOPO-I inhibitory activity and cytotoxicity of DENQs were less potent than that of DMNQs. Among the DMNQ and DENQ analogues, the ones with alkyl group being heptyl were most potent in TOPO-I inhibition (IC_{50} : 30.1, 36.4 μ M). DMNQ derivatives with a longer side chain exhibited a weaker cytotoxicity. A correlation between size of the alkyl side chain and cytotoxicity was not observed for DENQ derivatives. Acylation of 1'-hydroxyl group, in general, decreased both TOPO-I inhibitory activity and cytotoxicity. T/C (%) values of the DENQ derivatives on S-180 intraperitoneal tumor were larger than those of DMNQ derivatives. Among the compounds synthesized, 6-(1-hydroxyheptyl)-DENQ and 6-(1-hexanoxyoctyl)-DMNQ showed the highest T/C values of 183% and 182%, respectively.

Keywords □ Naphthoquinones, DNA topoisomerase-I inhibition, antitumor activity, cytotoxicity, structure-activity relationship.

DNA Topoisomerase(TOPO)는¹⁾ DNA의 꼬임상태를 변화시켜 DNA복제, 전사등과 같은 핵산의 기능발휘를 위한 필수적인 효소중의 하나이다. 이 효소는 DNA를 절단하는 방식에 따라 type I, II 두 가지로 분류되는데

type I, II는 각각 duplex DNA에 결합하여 transient single 및 double strand를 절단한다. TOPO는 암세포에 더 큰 활성을 보임으로써 항암제 개발의 표적효소로 적합한 것으로 판명되고 있다. TOPO-I의 활성 저해제로는 camptothecin과 그 유도체, benzimidazole유도체, benzophenanthridine alkaloids, indolocarbazole 유도체, flavones류, shikonin류와, bulgarein 및 β -laphachone등

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5923 (팩스) 042-823-6566

이 있는데²⁾ 이 가운데서 camphothecin유도체는 임상에 사용하고 있다. 안 등³⁾은 자근(*Lithospermi erythrozizon*)으로부터 분리한 shikonin류가 TOPO-I에 대하여 저해작용을 보임을 확인하고 여러가지 acylshikonin유도체들을 합성하여 구조-활성간의 관계를 관찰한 바 있다. 안 등⁴⁾은 또한 shikonin의 유사체인 6-(1-hydroxyalkyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone유도체를 합성하여 TOPO-I에 대한 저해작용을 검토한 바 좋은 효과가 있음을 발표하였다.

본 연구에서는 shikonin보다 acylshikonin유도체가 전반적으로 보다 좋은 저해효과를 보인다는 관찰을 근거로 하여 6-(1-hydroxyalkyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone을 acyl화 하고 이러한 acyl화가 TOPO-I에 대하여 어떠한 영향을 미치는지를 실험하여 보고자 하였으며, 또한 구조중 5,8-dimethoxy부분을 ethoxy기로 변화시켜 이 ethoxy기가 TOPO-I에 대해서 어떠한 영향을 미치는가도 검토해 보고자 하였다. 이러한 유도체들의 TOPO-I에 대한 작용뿐만 아니라 나아가서는 L1210세포에 대한 저해작용 및 S-180암에 대한 항암성간의 연계성을 분석해 보고자 하였다.

실험방법

각종 시약은 알드리치 사에서 구입하여 사용하였으며, 용매는 특급을 사용하였으며 필요에 따라 정제하여 사용하였다. 마우스 백혈병 세포주인 L1210세포는 인삼연초연구소에서 분양 받아 사용하였으며, 세포배양시 사용되는 RPMI1640, fetal bovine serum 및 다른 시약은 Gibco사로부터 구입하여 사용하였다. IR 스펙트라는 Perkin-Elmer 780 분광광도계로 측정하였으며 cm^{-1} 로 표시하였다. 핵자기공명 스펙트라는 JEOL(90 MHz)분광광도계를 이용하여 tetramethylsilane(TMS)을 내부표준물질로 하여 측정하였으며, 화학적 이동(chemical shift)은 δ 단위로 coupling constant는 Hz로 나타내었다. 박층크로마토그래프는 (TLC)는 silica gel(Kieselgel 60F254, Merck)을 사용하였고, 칼럼크로마토그래피는 silica gel (Kieselgel 60, 70~230 mesh, Merck)를 사용하였다.

6-Formyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(I)의 합성

2-Formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene 3 g(10.8

mmole)을 acetonitrile 80 ml에 넣어 녹인 후 cerium ammonium nitrate(CAN) 14.9 g(27.2 mmole)을 증류수 80 ml에 녹인 용액을 30분 동안 적가 하였다. 그 후 다시 1시간 동안 교반한 후 생성되는 황색침전물을 감압 여과후 증류수로 세척, 건조하여 황색 침전물 2.13g을 얻었다. 수득율 : 80%, R_f : 0.56(Hexane : EtOAc=1:2). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 10.49(s, 1H, CHO), 7.76(s, 1H, 7-H), 6.66(s, 2H, 2,3-H), 4.02(s, 3H, OCH_3), 3.99(s, 3H, OCH_3). $\text{IR}_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}(\text{neat})$: 3050, 2930, 1655, 1680.

6-Formyl-5,8-dimethoxy-1,4-dihydroxynaphthalene(II)의 합성

6-Formyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone 1.7 g(6.9 mmole)을 chloroform 100 ml에 넣어 녹인 용액에, 증류수 100 ml에 sodiumhydrosulfite($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)를 포화시킨 용액에 가하여 약 20분 동안 강렬하게 교반하였다. 반응혼액을 chloroform 으로 추출 후 무수망초로 탈수 감압농축하여 목적화합물인 황색 침전물 1.6g을 얻었다. 수득율 : 94.2%, R_f : 0.13(Hexane : EtOAc=4:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 10.45(s, 1H, CHO), 8.95(d, $J=5.8 \text{ Hz}$, 2H, OH), 7.06(s, 1H, 7-H), 6.99(d, $J=0.9 \text{ Hz}$, 2H, 2,3-H), 4.09(s, 6H, OCH_3). $\text{IR}_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}(\text{neat})$: 3360, 3050, 1665, 1510.

6-Formyl-5,8-dimethoxy-1,4-dibenzoyloxyaphthalene(III)의 합성

6-Formyl-5,8-dimethoxy-1,4-dihydroxynaphthalene 1.2 g(4.8 mmole)을 질소가스 존재하에서 탈수된 dimethylformamide 30 ml에 녹이고 무수 potassium carbonate 3.36 g(24.4 mmole)과 benzylchloride 2.82 ml(24.4 mmole)을 넣고 40°C에서 12시간 환류하였다. 반응혼액을 냉수에 가한 후 dichloromethane으로 추출 후 5% 염산 용액 200 ml로 3회 세척 후 다시 증류수로 3회 세척하였다. 그 후 유기용매층을 무수망초로 탈수, 감압농축 후 hexane, ethylacetate 혼합용액으로 재결정하여 황색 침상결정물 1.9 g을 얻었다. 수득율 : 92.5%, R_f : 0.31(Hexane : EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 10.55(s, 1H, CHO), 7.56~7.31(m, 10H, ArH), 7.21(s, 1H, 7-H), 7.02(d, $J=2.9 \text{ Hz}$, 2H, 2, 3-H), 5.15(s, 2H, OCH_2Ar), 5.09(s, 2H, OCH_2Ar), 3.93(s, 3H, OCH_3), 3.78(s, 3H, OCH_3). IR_{max}

cm^{-1} (neat): 3050, 2850, 1670.

6-Formyl-5,8-diethoxy-1,4-naphthoquinone(IV)의 합성

I과 같은 방법으로 하여 황색침전물 1.6 g을 얻었다. 수득율: 71.2%, R_f : 0.58(Hexane:EtOAc=1:2). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 10.48(s, 1H, CHO), 7.73(s, 1H, 7-H), 6.84(d, $J=0.89$ Hz, 2H, 2,3-H), 4.17(m, 4H), 1.53(t, $J=14.0$ Hz, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3050, 2930, 1650.

6-Formyl-5,8-diethoxy-1,4-dihydroxynaphthalene(V)의 합성

II과 같은 방법으로 하여 황색침전물 1.8 g을 얻었다. 수득율: 93.5%, R_f : 0.13(Hexane:EtOAc=4:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 10.37(d, $J=0.89$ Hz, 1H, CHO), 8.96(d, $J=5.7$ Hz, 2H, OH), 7.07(s, 1H, 7-H), 7.00(d, $J=0.8$ Hz, 2H, 2,3-H), 4.27(s, 4H), 1.43(t, $J=14.1$ Hz, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3360, 3050, 1660, 1500.

6-Formyl-5,8-diethoxy-1,4-dibenzyloxynaphthalene(VI)의 합성

III과 같은 방법으로 하여 황색침전물 1.95 g을 얻었다. 수득율: 91.7%, R_f : 0.31(Hexane:EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 10.54(s, 1H, CHO), 7.66~7.35(m, 10H, ArH), 7.22(s, 1H, 7-H), 7.08(d, $J=2.7$ Hz, 2H, 2,3-H), 5.16(s, 2H, OCH_2Ar), 5.10(s, 2H, OCH_2Ar), 4.21(m, 4H), 1.55(t, $J=14.0$ Hz, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3050, 2850, 1670, 1590.

6-(1-Hydroxypentyl)-5,8-dimethoxy-1,4-dibenzyloxynaphthalene(VII)의 합성

마그네슘 0.34 g(14.1 mmole)과 1-bromobutane 1.93 g(14.1 mmole)을 무수 THF 30 ml에 넣고 상온에서 2시간동안 교반하여 Grignard 시약을 만든 후 6-formyl-5,8-dimethoxy-1,4-dibenzyloxynaphthalene 2 g(4.7 mmole)을 무수 THF 40 ml에 녹인 용액을 20분간 적가 후 상온에서 3시간 더 교반 하였다. 10% ammonium chloride 80 ml에 반응혼액을 가하고 dichloromethane으로 추출한 다음 무수망초로 탈수, 여과, 감압농축하여 생성되는 조생성물을 실리카겔 (1.5×15 cm) 컬럼크로마토그래피로 정제하여 미황색

유상물 1.8 g을 얻었다. 수득율: 78.8%, R_f : 0.35(Hexane:EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.73~7.33(m, 10H, ArH), 6.94(s, 1H, 7-H), 6.89(s, 2H, 2,3-H), 5.12(s, 2H, OCH_2Ar), 5.10(s, 2H, OCH_2Ar), 4.93(d, $J=4.6$ Hz, 1H, 1'-H), 3.93(s, 3H), 3.77(s, 3H), 2.25(br s, 1H, 1'-OH), 1.79~1.20(m, 6H), 0.92(t, $J=6.0$ Hz, 3H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3480, 3020, 2950, 1450.

6-(1-Hydroxyhexyl)-5,8-dimethoxy-1,4-dibenzyloxynaphthalene(VIII)의 합성

VII의 방법에 의해 미황색 유상물 1.95 g을 얻었다. 수득율: 83%, R_f : 0.36(Hexane:EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.68~7.35(m, 10H, ArH), 6.98(s, 1H, 7-H), 6.95(s, 2H, 2,3-H), 5.15(s, 2H, OCH_2Ar), 5.13(s, 2H, OCH_2Ar), 4.90(d, $J=4.6$ Hz, 1H, 1'-H), 3.97(s, 3H), 3.77(s, 3H), 3.21(d, $J=3.45$ Hz, 1H), 1.75~1.27(m, 8H), 0.96(t, $J=13.6$ Hz, 3H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3485, 3020, 2950, 1460.

6-(1-Hydroxyheptyl)-5,8-dimethoxy-1,4-dibenzyloxynaphthalene(IX)의 합성

VII의 방법에 의해 미황색 유상물 2.1 g을 얻었다. 수득율: 86.9%, R_f : 0.38(Hexane:EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.71~7.35(m, 10H, ArH), 6.96(s, 1H, 7-H), 6.92(s, 2H, 2,3-H), 5.14(s, 2H, OCH_2Ar), 5.13(s, 2H, OCH_2Ar), 4.95(d, $J=4.6$ Hz, 1H, 1'-H), 3.96(s, 3H), 3.74(s, 3H), 2.19(d, $J=3.45$ Hz, 1H), 1.61~1.07(m, 10H), 0.92(t, $J=13.7$ Hz, 3H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3480, 3020, 2950, 1460.

6-(1-Hydroxyoctyl)-5,8-dimethoxy-1,4-dibenzyloxynaphthalene(X)의 합성

VII의 방법에 의해 미황색 유상물 2.0 g을 얻었다. 수득율: 80.6%, R_f : 0.40(Hexane:EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.70~7.37(m, 10H, ArH), 6.97(s, 1H, 7-H), 6.93(s, 2H, 2,3-H), 5.14(s, 2H, OCH_2Ar), 5.11(s, 2H, OCH_2Ar), 4.92(d, $J=4.6$ Hz, 1H, 1'-H), 3.95(s, 3H), 3.73(s, 3H), 2.30(d, $J=3.20$ Hz, 1H), 1.51~1.21(m, 12H), 0.95(t, $J=13.2$ Hz, 3H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3480, 3015, 2950, 1450.

6-(1-Hydroxypentyl)-5,8-diethoxy-1,4-dibenzylloxynaphthalene(XI)의 합성

6-Formyl-5,8-diethoxy-1,4-dibenzylloxynaphthalene을 사용하여 VII과 같은 방법으로 하여 미황색 유상물 1.7 g을 얻었다. 수득율 : 75.6%, R_f : 0.36(Hexane : EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.70~7.37(m, 10H, ArH), 6.97(s, 1H, 7-H), 6.93(s, 2H, 2,3-H), 5.14(s, 2H, OCH_2Ar), 5.11(s, 2H, OCH_2Ar), 4.92(d, $J=4.6\text{Hz}$, 1H, 1'-H), 4.20(q, $J=20.8\text{Hz}$, 2H), 4.02~3.79(m, 2H), 2.37(br, 1H, 1'-OH), 1.59~1.43(m, 9H), 1.05(t, $J=14.7\text{Hz}$, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3450, 2950, 1650, 1600.

6-(1-Hydroxyhexyl)-5,8-diethoxy-1,4-dibenzylloxynaphthalene(XII)의 합성

VII의 방법에 의해 미황색 유상물 2.0 g을 얻었다. 수득율 : 86.8%, R_f : 0.40(Hexane : EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.70~7.38(m, 10H, ArH), 6.97(s, 1H, 7-H), 6.92(s, 2H, 2,3-H), 5.13(s, 2H, OCH_2Ar), 5.12(s, 2H, OCH_2Ar), 4.93(d, $J=4.7\text{Hz}$, 1H, 1'-H), 4.21(q, $J=20.7\text{Hz}$, 2H), 4.03~3.77(m, 2H), 2.32(br, 1H, 1'-OH), 1.60~1.40(m, 11H), 1.01(t, $J=14.8\text{Hz}$, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3450, 2950, 1650, 1600.

6-(1-Hydroxyheptyl)-5,8-diethoxy-1,4-dibenzylloxynaphthalene(XIII)의 합성

VII의 방법에 의해 미황색 유상물 2.1 g을 얻었다. 수득율 : 88.4%, R_f : 0.44(Hexane : EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.71~7.36(m, 10H, ArH), 6.97(s, 1H, 7-H), 6.93(s, 2H, 2,3-H), 5.14(s, 2H, OCH_2Ar), 5.11(s, 2H, OCH_2Ar), 4.92(d, $J=4.6\text{Hz}$, 1H, 1'-H), 4.20(q, $J=20.8\text{Hz}$, 2H), 4.02~3.79(m, 2H), 2.37(br, 1H, 1'-OH), 1.59~1.43(m, 13H), 1.05(t, $J=14.7\text{Hz}$, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3450, 2950, 1650, 1600.

6-(1-Hydroxypentyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(1)의 합성

6-(1-Hydroxypentyl)-5,8-dimethoxy-1,4-dibenzylloxynaphthalene 1 g(2.05 mmole)을 무수 THF 20 ml에 녹인 후 5% Pd/C 0.05 g을 넣고 24시간동안 대기압하에서 수소화 시켰다. 반응혼액을 여과하여 감압농축 후 곧 바로 acetonitrile 20 ml에 녹인 후

cerium ammonium nitrate 1.12 g(2.05 mmole)을 가해 10분 동안 교반 하였다. 반응 혼액에 증류수 200 ml를 가해 교반한 다음 dichloromethane으로 추출하고 추출용액을 무수망초로 탈수, 여과, 감압농축하여 생성되는 조생성물을 실리카겔(1.5×15 cm) 컬럼크로마토그래피로 정제하여 적색 유상물 490 mg을 얻었다. 수득율 : 78.6%. 물성 및 구조는 문헌⁴⁾ 참조

6-(1-Hydroxyhexyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(2)의 합성

수득율 : 70.8%. 1의 방법으로 합성하였으며, 물성 및 구조는 문헌⁴⁾ 참조.

6-(1-Hydroxyheptyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(3)의 합성

수득율 : 71%. 1의 방법으로 합성하였으며, 물성 및 구조는 문헌⁴⁾ 참조.

6-(1-Hydroxyoctyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7)의 합성

수득율 : 74%. 1의 방법으로 합성하였으며, 물성 및 구조는 문헌⁴⁾ 참조.

6-(1-Hydroxypentyl)-5,8-diethoxy-1,4-naphthoquinone(4)의 합성

1의 방법에 의해 적색 유상물 470 mg을 얻었다. 수득율 : 72.6%, R_f : 0.38(Hexane : EtOAc=1:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.48(s, 1H, 7-H), 6.74(s, 2H, 2,3-H), 5.10(q, $J=17.4\text{Hz}$, 1H, 1'-H), 4.21(q, $J=21.5\text{Hz}$, 2H), 4.02~3.79(m, 2H), 2.20(d, $J=3.95\text{Hz}$, 1H), 1.71~1.25(m, 13H), 0.99(t, $J=14.6\text{Hz}$, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3475, 2950, 1650, 1460.

6-(1-Hydroxyhexyl)-5,8-diethoxy-1,4-naphthoquinone(5)의 합성

1의 방법에 의해 적색 유상물 470 mg을 얻었다. 수득율 : 71.9%, R_f : 0.39(Hexane : EtOAc=1:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.47(s, 1H, 7-H), 6.74(s, 2H, 2,3-H), 5.04(q, $J=18.8\text{Hz}$, 1H, 1'-H), 4.20(q, $J=20.8\text{Hz}$, 2H), 4.02~3.79(m, 2H), 2.31(d, $J=4.03\text{Hz}$, 1H), 2.01~1.44(m, 11H), 0.91(t, $J=14.4\text{Hz}$, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 3475, 2950, 1650, 1460.

6-(1-Hydroxyheptyl)-5,8-diethoxy-1,4-naphthoquinone(6)의 합성

1의 방법에 의해 적색 유상물 480 mg을 얻었다. 수득율 : 72.1%, R_f : 0.40(Hexane : EtOAc=1:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.48(s, 1H, 7-H), 6.73(s, 2H, 2,3-H), 5.04(q, $J=18.9\text{Hz}$, 1H, 1'-H), 4.23(q, $J=20.8\text{Hz}$, 2H), 4.03~3.80(m, 2H), 2.33(d, $J=4.11\text{Hz}$, 1H), 1.96~1.41(m, 13H), 0.90(t, $J=13.7\text{Hz}$, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat) : 3475, 2950, 1650, 1460.

6-(1-Acetoxyoctyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(8)의 합성

6-(1-Hydroxyoctyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone 346 mg(1mmole), 4-dimethylaminopyridine 61 mg(0.5 mmole), dicyclohexylcarbodiimide 206 (1 mmole)을 2부 flask에 넣고 탈수된 dichloromethane 10 ml에 녹였다. 0°C, 질소가스 존재 하에서 초산 60.3 mg(1 mmole)을 넣어준 다음 30분간 교반한 후 상온에서 3시간 더 교반하였다. 반응 혼합액에 헥산 30 ml를 넣어주고 10분간 상온에서 교반한 후 생성되는 불용물을 여과 제거한 다음 여액을 무수망초로 탈수, 여과, 감압농축하여 생성되는 조생성물을 실리카겔(1.5×15 cm) 컬럼으로 정제하여 적색 유상물 295 mg을 얻었다. 수득율 : 76%, R_f : 0.12(Hexane : EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.23(s, 1H, 7-H), 6.75(s, 2H, 2,3-H), 6.13(t, $J=12.7$, 1H, 1'-H), 3.96(s, 3H), 3.90(s, 3H), 2.11(s, 3H, OCOCH_3), 1.62~1.18(m, 12H), 0.88(t, $J=10.9\text{Hz}$, 3H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat) : 2950, 1740, 1660, 1460.

6-(1-Propanoyloxyoctyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(9)의 합성

8의 방법에 의해 적색 유상물 189 mg을 얻었다. 수득율 : 47%, R_f : 0.17(Hexane : EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.24(s, 1H, 7-H), 6.75(s, 2H, 2,3-H), 6.09(t, $J=12.5\text{Hz}$, 1H, 1'-H), 3.97(s, 3H), 3.88(s, 3H), 2.39(q, $J=23.1\text{Hz}$, 2H), 2.06~1.29(m, 12H), 0.84(t, $J=11\text{Hz}$, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat) : 2950, 1740, 1660, 1460.

6-(1-Butanoyloxyoctyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(10)의 합성

8의 방법에 의해 적색 유상물 200 mg을 얻었다. 수득율 : 48%, R_f : 0.28(Hexane : EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.27(s, 1H, 7-H), 6.79(s, 2H, 2,3-H), 6.13(t, $J=12.7\text{Hz}$, 1H, 1'-H), 3.97(s, 3H), 3.93(s, 3H), 2.39(q, $J=14.9\text{Hz}$, 2H), 1.88~1.17(m, 14H), 0.95(t, $J=12.2\text{Hz}$, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat): 2950, 1730, 1660, 1460.

6-(1-Hexanoyloxyoctyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(11)의 합성

8의 방법에 의해 적색 유상물 218 mg을 얻었다. 수득율 : 49.1%, R_f : 0.31(Hexane : EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.26(s, 1H, 7-H), 6.78(s, 2H, 2,3-H), 6.12(t, $J=12.8\text{Hz}$, 1H, 1'-H), 3.97(s, 3H), 3.93(s, 3H), 2.39(t, $J=13.4\text{Hz}$, 2H), 1.72~1.31(m, 18H), 0.89(t, $J=12.2\text{Hz}$, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat) : 2950, 1730, 1660, 1460.

6-(1-Heptanoyloxyoctyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(12)의 합성

8의 방법에 의해 적색유상물 147 mg을 얻었다. 수득율 : 32%, R_f : 0.35(Hexane : EtOAc=3:1). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.25(s, 1H, 7-H), 6.78(s, 2H, 2,3-H), 6.11(t, $J=13.1$, 1H, 1'-H), 3.96(s, 3H), 3.92(s, 3H), 2.39(t, $J=13.9\text{Hz}$, 2H), 1.80~1.03(m, 20H), 0.92(t, $J=12.0\text{Hz}$, 6H). $\text{IR}_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ (neat) : 2950, 1730, 1660, 1450.

In vitro 세포독성 검색 - 마우스 백혈병 세포주인 L1210세포는 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI1640배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하여 실험에 사용하였다. 실험방법은 Thayer의 방법에 따랐다.⁵⁾ 세포수는 haemocytometer를 사용하여 세었으며, ED_{50} 값은 음성대조군에 대한 생존율이 50%되는 약물의 농도로 정하였다.

In vivo 항암활성 검색 - 항암활성의 측정은 미국국립암연구소(NCI)의 방법에 따랐다.⁶⁾ 실험에 사용된 시료는 5% Tween80에 녹여서 4°C에서 보관하였다. Sarcoma180 cell은 7×10^6 cells/ml의 농도로 생리식염수에 현탁시켜 수컷마우스에 0.2 ml씩 복강으로 접종하였다. 시료는 암접종24시간 후에 마우스를 각각6 마리씩 그룹으로 나눈 후 복강으로 주사하였다. 생존율(T/C, %)은 다음과 같은 식에 따라 계산하였다.

$$T/C(\%) = \frac{\text{처치군의 평균생존일수}}{\text{대조군의 평균생존일수}} \times 100$$

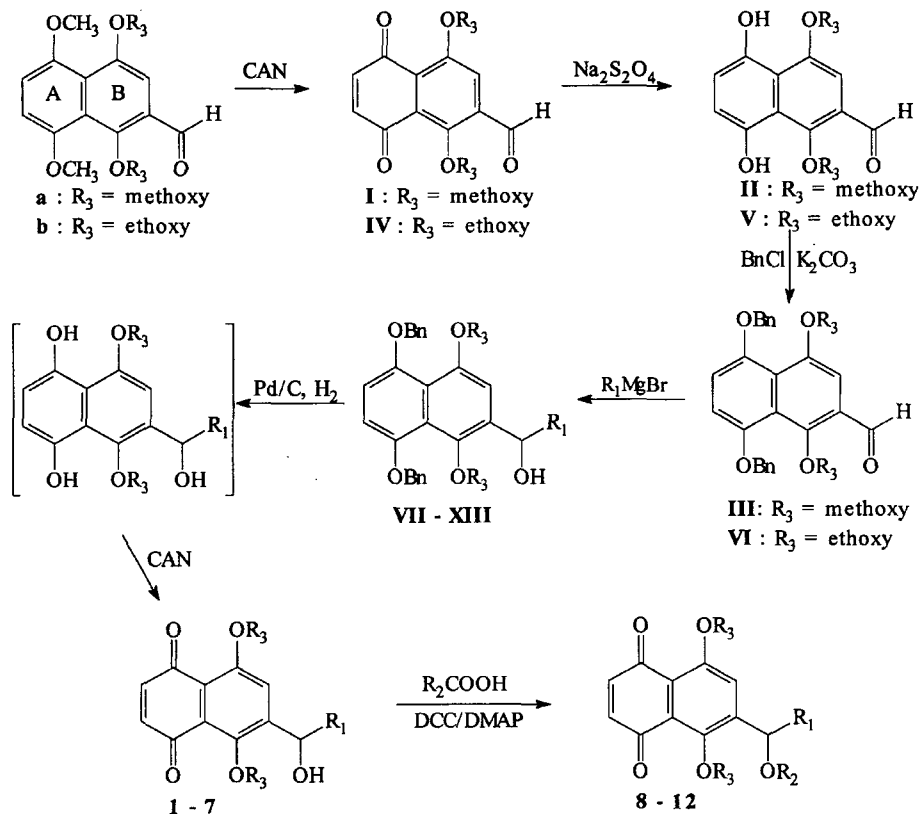
DNA Topoisomerase-I 활성측정^{7,8)} - 효소활성은 DNA unwinding assay를 사용하여 분석하였다. 송아지 흉선 DNA Topoisomerase-I(TOPO-I) 1 unit와 *E-coli* pBR322(TAKARA Co. Ltd.) 0.5 µg을 시료 존재 또는 부재 하에서, 72 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5.0 mM dithiothreitol, 5 mM spermidine and 0.01% bovine serum albumin이 포함된 20 µL 5 mM Tris-HCl(pH 8.0)에서 37°C에서 30분간 배양하였다. 반응은 2% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.05% bromophenol blue로 이루어진 stop solution 5 µL를 가하여 종결 시켰다. 전기영동

은 TBE buffer(50 mM Tris base, 50 mM boric acid and 2.5 mM EDTA)상에서 1% agarose gel plates를 사용하여 전개 시켰다. 전기영동 후에 0.5 µg/mL ethidium bromide solution을 사용하여 gel plates를 염색하였다. IC₅₀값은 supercoiled pBR322 DNA의 relaxation을 50%억제하는 농도로 정하였으며, 각각의 실험에서 양성대조군은 camptothecin(CPT)을 사용하였다.

실험결과 및 고찰

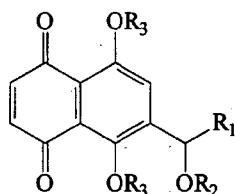
합성

6-(1-Oxyalkyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ)의 합성법은 Terada,⁹⁾ 백¹⁰⁾등에 의하여 보고



Bn : Benzyl
 CAN : Cerium(IV) ammonium nitrate
 DCC : Dicyclohexylcarbodiimide
 DMAP : 4-Dimethylaminopyridine
 R₁ : Butyl - Heptyl,
 R₂ : Acetyl - Butanoyl, Hexanoyl, Heptanoyl

Scheme 1 - Synthetic pathway of 6-(1-hydroxy or acyloxyalkyl)-5,8-dialkoxy-1,4-naphthoquinone derivatives.

Table I – Cytotoxicity and antitumor activity of 6-(1-hydroxy or acyloxyalkyl)-5,8-dialkoxy-1,4-naphthoquinones and their inhibitory effect on DNA Topoisomerase-I

Compounds	R ₁	R ₂	R ₃	TOPO-I IC ₅₀ (μM)	L1210 ED ₅₀ (μM)	T/C (%)
1	Butyl	H	Methoxy	83.14	0.19	141(0/6)
2	Pentyl	H	"	39.00	0.21	110(0/6)
3	Hexyl	H	"	30.10	0.66	119(0/6)
4	Butyl	H	Ethoxy	72.45	0.6	152(1/6)
5	Pentyl	H	"	42.31	0.57	N.T.
6	Hexyl	H	"	36.40	0.55	183(1/6)
7	Heptyl	H	Methoxy	73.25	0.55	130(0/6)
8	Heptyl	Acetyl	"	42.31	0.48	N.T.
9	Heptyl	Propanoyl	"	42.47	0.39	N.T.
10	Heptyl	Butanoyl	"	140.36	0.8	N.T.
11	Heptyl	Hexanoyl	"	142.77	0.83	182(2/6)
12	Heptyl	Heptanoyl	"	144.38	1.08	N.T.
Camptothecin				6.25		
Adriamycin						192(4/6)

(X/6)=survival rate; the number of mice survived for more than 50 days from 6 test mice

된 바 있으나 그들의 방법에서는 2-(1-oxyalkyl)-DMNQ유도체가 주로 생성되고 6-치환체는 부산물로 얻어진다. 본인 등은 6-치환된 DMNQ유도체의 합성법을 개발하여 여러 가지 물질을 제조하였다. 제조 방법은 Scheme 1에 나타내었다. 출발물질 a, b는 Terada⁹ 및 백¹⁰의 방법에 따라 합성하였다. 출발 물질 a를 CAN으로 산화시킨결과 산화 기전에 따라 전자 밀도가 보다 큰 A환이 쉽게 산화되어 물질 I(6-formyl-DMNQ)가 80%의 수율로 합성되었다. 이 물질에 alkylmagnesium halide를 formyl기에 선택적으로 부가하여 목적 물질을 얻으려 하였으나 부반응 때문에 성공하지 못하였다. 그러므로 다음과 같은 우회 경로를 선택하지 않으면 안되었다. 물질 I을 sodium hydro-sulfite로 quinone부분을 선택적으로 환원하여 물질 II(6-formyl-1,4-dihydroxy-5,8-dimethoxynaphthalene)를 얻고 이를 benzyl화하여 물질 III을 얻었다. 물질 b로부터 같은 과정을 통하여 물질 VI를 합성하였다. 이들 각각에 여러가지 alkylmagnesium halide와 작용시켜 물질군 VII~XIII을 합성하고 이를 H₂/Pd에서 접촉환원시키고 이어 CAN으로 산화시킴으로써 작용물질군 6-(1-hydroxyalkyl)-DMNQ 유도체를 합성하였다, 이들을 백

의 방법³)으로 acyl화하여 6-(1-acyloxyalkyl)-DMNQ 유도체를 얻었다. 물질군 VII~XIII에서 작용물질 1~7에 이르는 평균 수율은 70.8%~74.9%로 대체로 높은 편이었다.

DNA Topoisomerase-I의 저해효과 및 항암 활성

유도체들의 TOPO-I에 대한 억제효과, 세포독성 그리고 항암활성을 Table I에 나타내었다. 전체적으로 보면 이들 물질의 저해효과는 이미 알려진 acylshikonin 유도체의 40~250 μM 보다 강함을 알 수 있다.³ 각 소물질 군별로 보면, R₃=methoxy 인 물질 1, 2, 3의 저해효과를 비교해 보면 R₁의 길이가 길어지면 저해효과가 증가되는 현상을 볼 수 있는데 이는 R₃가 ethoxy인 물질 군에서도 마찬가지였다(1<2<3 및 4<5<6). R₃가 ethoxy기인 물질 4, 5, 6은 methoxy기인 1, 2, 3에 비하여 약한 저해작용을 보인다. R1 크기의 영향을 보면 물질 3, 6에서 볼 수 있는 바와 같이 hexyl일때 효소에 대한 저해효과가 가장 강하였다(IC₅₀, 30.1, 36.4 μM). Shikonin 유도체로부터 기대하였던 것과 같이 1'-OH를 acyl화하면 물질 그 효과가 강해졌으나 acyl기의 길이가 길어지면 저해효과

는 약해짐을 관찰 할 수 있었다. 물질 7에 acetyl 기 및 propanoyl기를 부착하여 얻어진 물질 8과 9는 IC₅₀기준으로 계산하면 각각 1.8배나 강한 저해효과를 보인다. Butanoyl이상의 acyl기에서는 저해작용이 대폭 감소한다.

L1210세포에 대한 세포독성도 전반적으로 높은 편이다. R₃이 methoxy인 물질군이 ethoxy인 물질군 보다 강한 세포독성을 보였으며 R₁의 길이가 길어질수록 작용이 약화됨을 볼 수 있다. 이는 TOPO-I의 저해작용과 반대되는 현상이다. 이와 같은 현상은 추측 하건대 긴 알킬기의 효소 단백질에 대한 친화력 증가와 L1210세포의 세포막 투과력 감소에 의한 것으로 해석할 수 있을 것이다. R₃이 ethoxy인 물질은 R₁의 길이에 상관없이 작용의 평균화를 나타내었다. Acyl화의 영향을 보면 TOPO-I의 경우와 마찬가지로 acetyl화(물질 8) 및 propanoyl화(물질 9)는 세포독성을 강화시키는 경향을 보이고 있는 반면 이들 보다 큰 acyl기는 약화시킴을 볼 수 있다.

위에서 본 바와 같이 물질의 구조, TOPO-I 억제와 세포독성과의 사이에 엄격한 상관성을 관찰 할 수 없었음에도 불구하고 전체적으로 보아 좋은 효소저해효과와 강한 세포독성을 보이고 있다는 사실 만으로도 TOPO-I의 저해가 하나의 세포독성 기전이라고 판단 된다.

S-180세포에 대한 수명연장효과를 살펴보면 methoxy기를 가진 물질 1, 2, 3 중 T/C=141%인 물질1을 제외하고는 효과가 없었다. 이는 TOPO-I의 효과와는 상반되는 것이다. Ethoxy기를 갖는 물질군은 측정되지 않는 물질 5를 제외하더라도 물질 4, 6 모두 높은 T/C값을 보인다. Acyl화한 물질군(8~12)중 물질11 [T/C, 182(2/6)]은 acyl화 하지않은 물질인 7 [T/C, 130(0/6)]에 비해 보다 높은 T/C값을 나타내었다. 이는 알킬측쇄의 탄소수의 증가로 인해 그 지용성이 생체막투과를 위한 적정 치에 도달하여 생체 이용률이 증가되었기 때문으로 생각된다. 특히 물질 11의 경우 T/C(%) 값이 182(2/6)으로 양성대조군으로 사용한 adriamycin과 대등한 효과를 나타내었다. 특기 할 수 있는 것은 이 물질은 50일 생존율 2/6을 보인다는 것이다. 암에 걸린 6마리의 실험동물에 투약한 결과 2마리가 50일 이상 생존하였다는 뜻이다.

현재 다양한 길이의 알킬측쇄에 여러가지 acyl기를

도입하여 그들의 TOPO-I에 대한 억제 작용 뿐만 아니라 세포독성 그리고 수명연장효과의 검토가 현재 진행중이다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단(KOSEF)의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다

문 헌

- 1) Wang, Y., Kang, H., Susan, L. and Lee, K. H. : Recent advances in the discovery and development of Topoisomerase inhibitors as antitumor agent. *Medical Res. Rev.* **17**(4), 367 (1997).
- 2) Hsiang, Y. H., Herzberg, R., Hecht, S., and Liu, L. F. : Camptothecin induced protein-linked DNA breaks via mammalian DNA Topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**(27), 14873 (1985).
- 3) Ahn, B. Z., Baik, K. U., Kweon, G. R., Lim, K. and Hwang, B. D. : Acylshikonin Analogues: synthesis and inhibition of DNA topoisomerase-I. *J. Med. Chem.* **38**(6), 1044 (1995).
- 4) Song, G. Y., Kim, Y., Zheng, X. G., You, Y. J., Sok, D. E. and Ahn, B. Z. : Naphthazarin derivatives(II) : formation of glutathione conjugate and inhibition of DNA topoisomerase-I and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 2407 (1999).
- 5) Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watt, G. L. : *Cancer Chemother. Rep.*, **2**, 1 (1971).
- 6) National Cancer Institute, USA, *Cell culture technical procedures* (1972).
- 7) Liu, L. F. and Miller, K. G. : Two Forms of DNA Topoisomerase from HeLa cell Nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3487 (1981).
- 8) Liu, L. F., Rowe, T. C., Yang, L., Tewey, K. M. and Chen, G. L. : Cleavage of DNA by mammalian DNA Topoisomerase-II. *J. Biol. Chem.* **258**(24), 15365 (1983).
- 9) Terada, A., Tanoue, Y., Hadata, A. and Sakamoto, H. : Synthesis of Shikalalin (± Shikonin) and related analogues. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**, 203 (1987).
- 10) Baik, K. U. : *Doctor Thesis*, Chungnam Nat'l. Univ. (1994).