제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “(본과제명)극지유전자원 기반 신규활성 항생제 후보 물질 발굴에 관한 연구”과제의 위탁연구 “(위탁과제명)극지 생물 유래 생리활성 이차대사산물 발굴 에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02.

(본과제) 총괄연구책임자: 이준혁

위탁연구기관명: 충남대학교산학협력단

위탁연구책임자: 나민균

위탁참여연구원: 콩트롱쿠안

“ : 박인화

“ : 팜장남

보고서 초록

위탁연구과제명	극지 생물 유래 생리활성 이차대사산물 발굴				
위탁연구책임자	나민균	해당단계 참여연구원수	4	해당단계 연구비	20,000천원
연구기관명 및 소속부서명	충남대학교 약학대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		

요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)	보고서 면수	

○ 극지생물 12종에 대한 TLC 및 HPLC 분석결과를 근거로 극지생물 1종 선정
- *Monanchora* sp.

○ 극지생물로부터 신규화합물 3종을 포함한 10종의 이차대사산물 분리 및 화학구조 규명
- 신규화합물 3종: alotaketal F (1), 20*E*,23*R*-hydroxy-nor-cholest-4,20-dien-3-one (2), 16β,20*R*-dihydroxy-cholest-4,24-dien-3-one (3)
- 기지화합물 7종: bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (4), (4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)-nonadecapentaenoic acid (5), hexadecanoic acid (6), (23*E*)-cholesta-5,23- dien-3β,25-diol (7), 24(*S*)-cholesta-5,25-diene-3β,24-diol (8), 24-methylenechosterol (9), 5α-cholestan-3β-ol (10)

○ 약리활성 및 기전연구
- 항암활성 및 기전연구: 신규화합물 3종에 대한 대장암세포(SW480, HCT116) 증식저해작용 평가 및 Wnt/β-catenin 신호전달 저해기전 규명

○ 유효(선도)물질 제시: 3종
- 신규화합물 3종: 신규성, 암세포증식(대장암세포 SW480, HCT116) 저해작용, 항암기전(Wnt/β-catenin 신호전달 저해) 규명을 통해 극지생물 유래 신규화합물 3종을 유효(선도)물질로 제시

색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	극지생물, 이차대사산물, 약리활성, 기전연구, 유효물질
	영 어	polar resources, secondary metabolites, bioactivity, mechanism study, hit compounds

KOPRI 극지연구소

요 약 문

Ⅰ. 극지 생물 유래 생리활성 이차대사산물 발굴

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

○ 극지 생물로부터 생리활성을 갖는 원천물질을 발굴하고 효능평가를 통해 글로벌 차세대 항생제 개발에 필요한 유효·선도물질을 도출함

- 극지생물 소재 발굴(1종/년)
- 극지생물 유래 약물-표적 단백질 조절활성을 갖는 활성물질 발굴(10종/년)
- 효능평가 및 기전연구를 통해 차세대 항생제 개발에 필요한 유효·선도물질 도출(1종/년)

2. 연구개발의 필요성

가. 극지 생물 유래 유효·선도물질 개발의 필요성

○ 극지 생물은 극한 환경에 적응하기 위하여 다양한 화학구조의 이차대사산물을 생산하는 보고로 인식됨

→ 극지 생물 유래 새로운 골격의 유효·선도물질 개발은 성공 가능성이 높음

나. 생리활성 물질 개발의 필요성

○ Wnt/β-catenin 신호전달체계는 발생, 분화 및 세포증식에 중요한 역할을 하기 때문에 표적-항암제 개발에 있어서 새로운 기전으로 인식됨

→ 유효성, 안전성이 높은 천연물(극지생물) 유래 단백질 조절물질 개발이 필요함

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
극지생물 소재 발굴	● TLC 및 HPLC 분석을 통한 극지 생물 소재 선정 및 확보
극지생물 추출물 및 용매분획물 제조	● 선정된 극지 생물 추출물 제조 ● 용매분획물 제조
^{1}H-NMR 기반 이차대사산물 분리	● 다양한 크로마토그래피법을 이용하여 이차대사산물 분리
MS, NMR 등 분광학적 분석을	● MS, NMR 등 분광학적 방법을 이용한 화학구조 규명

KOPRI 극지연구소

이용한 화학구조 규명	● ECD, GIAO-DP4분석을 통한 절대구조 결정

Ⅳ. 연구개발결과

연구개발 목표	연구개발 내용 및 결과	달성도 (%)
극지생물 소재 발굴	● 극지생물 소재 조사 및 확보: TLC 및 HPLC 분석을 통해 이차대사산물이 다수 확인되는 극지생물 1종 선정 ● *Monanchora* sp.	100%
극지생물 추출물 및 용매분획물 제조	● 추출물 제조: 메탄올추출물(53.2 g) 제조 ● 용매분획물 제조: MPLC를 실시하여 15개의 분획물(AK49-1 ~ AK49-15) 제조	100%
^{1}H-NMR 기반 이차대사산물 분리	● 신규 화합물 3 종을 포함한 10종의 이차대사산물 분리/정제(순도 95% 이상)	100%
MS, NMR 등 분광학적 분석을 이용한 화학구조 규명	● 신규화합물 3종의 화학구조 결정: alotaketal F (1), 20*E*,23*R*-hydroxy-*nor*-cholest-4,20-dien-3-one (2), 16β,20*R*-dihydroxy-cholest-4,24-dien-3-one (3) ● 이차대사산물 7종의 화학구조 동정: bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (4), (4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)-nonadecapentaenoic acid (5), hexadecanoic acid (6), (23*E*)-cholesta-5,23-dien-3β,25-diol (7), 24(*S*)-cholesta-5,25-diene-3β,24-diol (8), 24-methylenechosterol (9), 5α-cholestan-3β-ol (10) ● ECD, GIAO-DP4분석을 통한 절대구조 결정: 신규 화합물 3종	100%
	● 신규화합물 3종에 대한 항암활성 평가 결과, Wnt/β-catenin 신호전달을 저해함으로써 대장암세포(HCT116, SW480) 증식을 농도-의존적으로 저해함을 밝힘	효능평가 및 기전연구를 수행하여 성과목표를 초과달성

KOPRI 극지연구소

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

○ 극지생물로부터 신규화합물 3종을 포함한 10종의 이차대사산물을 발굴하고 약물-표적 조절 평가를 하였으며, 본 연구결과를 아래와 같이 활용할 계획임

- ● 극지생물 유래의 새로운 화학골격을 제공함으로써 신규 유효·선도물질 개발에 활용
  - ✓ 신규화합물 3종은 Wnt/β-catenin 신호전달을 저해함으로써 대장암세포(SW480, HCT116) 증식저해활성을 갖는 항암 유효·선도물질로 제시
  - ✓ 극지생물 유래 이차대사산물 라이브러리 구축 → 항균활성 효능평가를 통해 신규 항생제 유효·선도물질로 개발
- ● 극지생물 유래 신규 유효·선도물질에 대한 원천기술(논문게재: Marine drug, **16**(9), 297, 2018)을 바탕으로 국내외 신약개발연구에 활용

KOPRI
극지연구소

S U M M A R Y
(영 문 요 약 문)

I. Title

Discovery of bioactive secondary metabolites from polar resources

II. Purpose and Necessity of R&D

1. Purpose

○ The aim of this study is to discover new hit·leads from polar resources for the development of next generation antibiotics

- Selection of polar resources (1 species/year)
- Discovery of polar resources-derived secondary metabolites capable of modulating drug-target protein (10 compounds/year)
- Proposition of new hit·leads through biological test and mechanism study (1 compound/year)

2. Necessity

○ Polar organisms are recognized as natural resources that produce new secondary metabolites of various chemical structures in order to adapt to extreme environment

→ Discovery of new hit·leads with new chemical structure from polar resources is highly important

○ Since Wnt/β-catenin signaling pathway plays a critical role in development, differentiation, and cell proliferation, it is recognized as a new drug-target for the development of anticancer agents

→ It is necessary to discover effective and safe polar resources-derived compounds modulating drug-target protein

III. Contents and Extent of R&D

Purpose	Contents

KOPRI 극지연구소

Selection of polar resources	● Selection of polar resources through TLC and HPLC analysis
Extraction and partition	● Extraction of polar resources ● Preparation of solvent fractions
Isolation of secondary metabolites	● Isolation of secondary metabolites via various column chromatography technic
Determination of chemical structure	● Determination of chemical structure by spectroscopic analysis such as MS, NMR ● Determination of absolute configuration by ECD, GIAO-DP4 analysis

Ⅳ. R&D Results

Purpose	R&D Results	Accomplishment (%)
Selection of polar resources	● Selection of polar resources through TLC and HPLC analysis ● *Monanchora* sp.	100%
Extraction and partition	● Preparation of MeOH extract (53.2 g) ● Preparation of 15 solvent fractions (AK49-1 ~ AK49-15)	100%
Isolation of secondary metabolites	● Isolation of 10 secondary metabolites including 3 new compounds (purity > 95%)	100%
Determination of chemical structure	● Structure of 3 new compounds: alotaketal F (**1**), 20*E*,23*R*-hydroxy-*nor*-cholest-4,20-dien-3-one (**2**), 16β,20*R*-dihydroxy-cholest-4,24-dien-3-one (**3**) ● Structure of 7 compounds: bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (**4**), (4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)-nonadecapentaenoic acid (**5**), hexadecanoic acid (**6**), (23*E*)-cholesta-5,23- dien-3β,25-diol (**7**), 24(*S*)-cholesta-5,25-diene- 3β,24-diol (**8**), 24-methylenechosterol (**9**), 5α-cholestan-3β-ol (**10**) ● Determination of absolute configuration of 3 new compounds via ECD, GIAO-DP4 analysis	100%
	● Evaluation of anti-proliferative activity of 3 new compounds against colorectal cancer cells (HCT116, SW480) via inhibition of Wnt/β-catenin signaling	goal exceeded

KORA 극지연구소

V. Application Plans of R&D Results

○ Ten secondary metabolites including 3 new compounds were isolated from polar resources and their biological activity modulating drug-target protein was elucidated, which will be utilized as follows

- Development of new hit·leads by providing new chemical structures derived from polar resources

✓ Based on the anti-proliferative activity of 3 new compounds via inhibition of Wnt/β-catenin signaling, the polar organism-derived new compounds may serve as new hit·leads or chemical scaffolds for the development of anticancer agent targeting down-regulation of β-catenin expression

✓ Build up of polar organism-derived secondary metabolite library → development of antimicrobial hit·leads through the antimicrobial test

- Providing an original technology regarding polar organism-derived hit·leads (Marine drug, **16**(9), 297, 2018), which will be useful for new drug discovery

KOPRI
극지연구소

목 차

제 1 장 서론 ····· 10

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 22

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 26

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 ····· 38

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ····· 40

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 41

제 7 장 참고문헌 ····· 44

KOPRI 극지연구소

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

○ 극지생물로부터 생리활성을 갖는 원천물질을 발굴하고 효능평가를 통해 글로벌 차세대 항생제 개발에 필요한 유효·선도물질을 도출함

- 극지생물 소재 발굴(1종/년)
- 극지생물 유래 약물-표적 단백질 조절활성을 갖는 활성물질 발굴(10종/년)
- 효능평가 및 기전연구 통해 차세대 항생제 개발에 필요한 유효·선도물질 도출(1종/년)

KOPRI 극지연구소

2. 연구개발의 필요성

가. 극지생물 유래 유효·선도물질 개발의 필요성

○ 천연물은 환경적응 및 방어기작과 관련된 다양한 골격의 이차대사산물을 생산함

○ 극지생물은 극한 환경에 적응하기 위하여 다양한 화학구조의 이차대사산물을 생산하는 보고임

→ 극지생물 유래 새로운 골격의 유효·선도물질 개발은 성공 가능성이 높음

나. 생리활성 물질 개발의 필요성

○ Wnt/β-catenin 신호전달체계는 발생, 분화 및 세포증식에 중요한 역할을 하기 때문에 표적-항암제 개발에 있어서 새로운 기전으로 인식되고 있음

→ 유효성 및 안전성이 높은 천연물(극지생물) 유래 신규 단백질 조절물질 개발이 필요함

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위

극지생물 소재 발굴	● TLC 및 HPLC 분석을 통한 극지 생물 소재 선정 및 확보
극지생물 추출물 및 용매분획물 제조	● 선정된 극지 생물 추출물 제조 ● 용매분획물 제조
^{1}H-NMR 기반 이차대사산물 분리	● 다양한 크로마토그래피법을 이용하여 이차대사산물 분리
MS, NMR 등 분광학적 분석을 이용한 화학구조 규명	● MS, NMR 등 분광학적 방법을 이용한 화학구조 규명 ● ECD, GIAO-DP4분석을 통한 절대구조 결정

○ 연구 내용

- 주관기관의 핵심주제는 극지생물의 새로운 유전자를 이용하여 항생제 내성을 극복할 수 있는 차세대 후보물질을 발굴함에 있음
- 본 위탁연구과제는 극지생물로부터 생리활성을 갖는 원천물질을 발굴하고 효능평가를 통해 글로벌 차세대 항생제 개발에 필요한 유효·선도물질을 도출함을 최종목표로 설정함
- 극지생물 소재 확보 현황

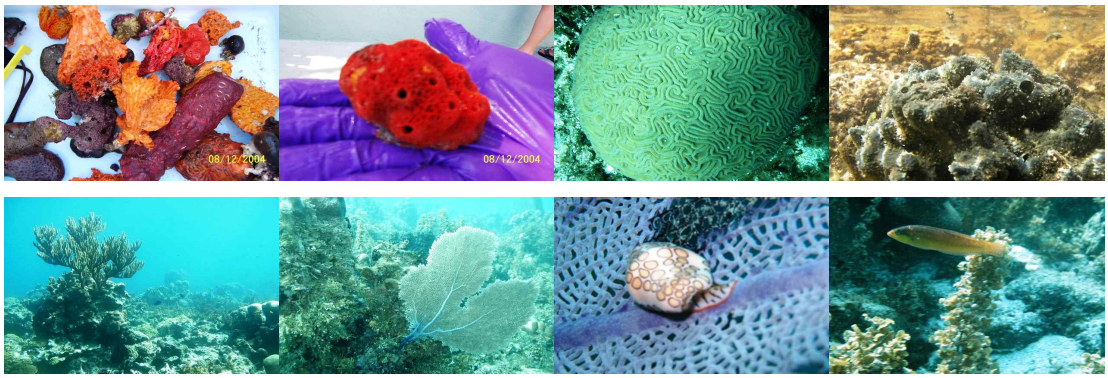
✓ 극지생물의 수집을 위해서는 탐사선 대여를 비롯하여 스쿠버 장비 대여 등 경제적으로 많은 비용이 소요되므로 소규모 연구그룹에서는 극지생물 자원을 확보하는데 어려움이 있음

✓ 또한, 수집한 극지생물을 정확하게 분류, 동정할 수 있는 전문가가 부족하므로 국내 단독연구 그룹에서 극지생물 자원을 확보하는데 한계가 있음

✓ 미국 The Medical University of South Carolina (MUSC)의 Dr. Hamann group (이전 The University of Mississippi)은 미국 알래스카 지역의 극지생물을 수집하여 극지생물은행을 구축하고 있음

✓ Dr. Hamann group으로부터 종의 기원이 확증된 알래스카 해양생물을 제공받아 공동연구를 수행함

KOPRI 극지연구소



Some examples of the marine natural products collected by Dr. Hamann's group

- 미국 MUSC Dr. Hamann group과의 협력체결 현황

  ✓ 본 연구과제의 협력을 위해 미국 MUSC의 Dr. Hamann으로부터 아래와 같이 해양생물 소재를 제공해 준다는 확약을 받음

Mark T. Hamann , Ph.D.
407 Faser Hall
The University of Mississippi, School of Pharmacy
University, MS 38677
Phone: 662-915-5730
Email: mthamann@olemiss.edu

MinKyun Na, Ph.D.
Pharmacognosy Lab 105
Yeungnam University, College of Pharmacy
214-1 Dae-dong, Gyeongsan-si
Gyeongbuk 712-749, South Korea
Phone: +82-53-810-2820
Email: mkna@ynu.ac.kr
May 14, 2010

Dear Dr. Na:

I am very happy to enthusiastically support your application for a domestic research fund regarding the development of anti-cancer and anti-infective leads from marine natural product sources. My research group would be happy to collaborate with you and provide marine natural product samples for you projects. We are working on numerous projects involving marine specimens, and would be happy to provide you with sponge samples from various locations around the United States including the Florida Keys. We are also undertaking a large marine microorganism based project. We have collected samples from the Gulf of Mexico, the Florida Keys, and have plans for collections in the Bering Sea this summer. With all of these varied projects, we should have no problem supplying marine natural product material for your research studies.
I am looking forward to this collaboration effort. I feel that it will produce not only impressive scientific results, but also establish a strong international collaboration between our respective countries.

Good luck and best wishes with your application.

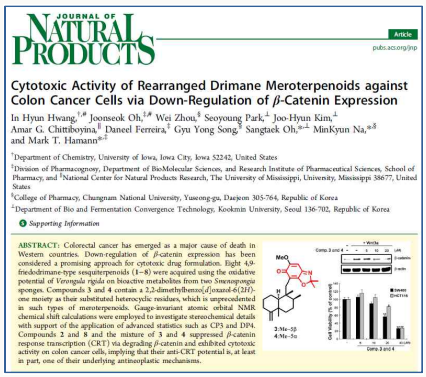
Sincerely,

Mark T. Hamann, Ph.D.
Professor of Pharmacognosy, Chemistry and Biochemistry

● 극지생물 소재의 선행연구

(1) Wnt 신호전달체계를 억제하는 해양천연물 유래 항암 유효·선도물질 발굴

➢ 항암 유효·선도물질: 신규 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids 8종



JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS

Article

pubs.acs.org/jnp

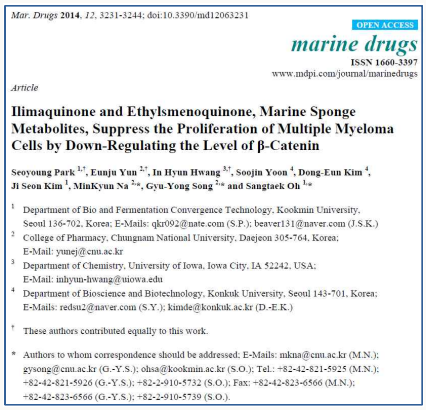
Cytotoxic Activity of Rearranged Drimane Meroterpenoids against Colon Cancer Cells via Down-Regulation of β-Catenin Expression

In Hyun Hwang,[1,#] Joonseok Oh,[1,#] Wei Zhou,[§] Seoyoung Park,[⊥] Joo-Hyun Kim,[⊥] Amar G. Chittiboyina,[∥] Daneel Ferreira,[∥] Gyu Yong Song,[▽] Sangtaek Oh,[#,⊥] MinKyun Na,[*,▽] and Mark T. Hamann[*,∥]

[1]Department of Chemistry, University of Iowa, Iowa City, Iowa 52242, United States
[2]Division of Pharmacognosy, Department of BioMolecular Sciences, and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, and [3]National Center for Natural Products Research, The University of Mississippi, University, Mississippi 38677, United States
[4]College of Pharmacy, Chungnam National University, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Republic of Korea
[5]Department of Bio and Fermentation Convergence Technology, Kookmin University, Seoul 136-702, Republic of Korea

Supporting Information

ABSTRACT: Colorectal cancer has emerged as a major cause of death in Western countries. Down-regulation of β-catenin expression has been considered a promising approach for cytotoxic drug formulation. Eight 4,9-friedodrimane-type sesquiterpenoids (1−8) were acquired using the oxidative potential of *Verongula rigida* on bioactive metabolites from two *Smenospongia* sponges. Compounds 3 and 4 contain a 2,2-dimethylbenzo[*d*]oxazol-6(2*H*)-one moiety as their substituted heterocyclic residues, which is unprecedented in such types of meroterpenoids. Gauge-invariant atomic orbital NMR chemical shift calculations were employed to investigate stereochemical details with support of the application of advanced statistics such as CP3 and DP4. Compounds 2 and 8 and the mixture of 3 and 4 suppressed β-catenin response transcription (CRT) via degrading β-catenin and exhibited cytotoxic activity on colon cancer cells, implying that their anti-CRT potential is, at least in part, one of their underlying antineoplastic mechanisms.



Mar. Drugs **2014**, *12*, 3231-3244; doi:10.3390/md12063231

OPEN ACCESS

marine drugs

ISSN 1660-3397

www.mdpi.com/journal/marinedrugs

Article

Ilimaquinone and Ethylsmenoquinone, Marine Sponge Metabolites, Suppress the Proliferation of Multiple Myeloma Cells by Down-Regulating the Level of β-Catenin

Seoyoung Park [1,†], Eunju Yun [2,†], In Hyun Hwang [3,†], Soojin Yoon [4], Dong-Eun Kim [4], Ji Seon Kim [1], MinKyun Na [2,*], Gyu-Yong Song [2,*] and Sangtaek Oh [1,*]

[1] Department of Bio and Fermentation Convergence Technology, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea; E-Mails: qkr092@nate.com (S.P.); beaver131@naver.com (J.S.K.)
[2] College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea; E-Mail: yunej@cnu.ac.kr
[3] Department of Chemistry, University of Iowa, Iowa City, IA 52242, USA; E-Mail: inhyun-hwang@uiowa.edu
[4] Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea; E-Mails: redsu2@naver.com (S.Y.); kimde@konkuk.ac.kr (D.-E.K.)

† These authors contributed equally to this work.

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: mkna@cnu.ac.kr (M.N.); gysong@cnu.ac.kr (G.-Y.S.); ohsa@kookmin.ac.kr (S.O.); Tel.: +82-42-821-5925 (M.N.); +82-42-821-5926 (G.-Y.S.); +82-2-910-5732 (S.O.); Fax: +82-42-823-6566 (M.N.); +82-42-823-6566 (G.-Y.S.); +82-2-910-5739 (S.O.).

- 해외해양천연물 소재: 해면동물(*Verongula rigida, Smenospongia cerebriformis, Smenospongia aurea*)
- 유효물질 분리 및 화학구조 결정: 8종의 신규 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids 및 ilimaquinone 유도체
- 효능평가: SW480 및 HCT116 대장암세포에 대한 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids의 암세포증식 저해활성 규명, RPMI-8226 multiple myeloma cell에 대한 암세포증식 저해활성 및 G_0/G_1 cell cycle arrest를 유도하여 세포사멸 초래 (※ multiple myeloma는 현재 특이적 항암제가 없음)
- 기전연구: Wnt/β-catenin 신호전달 저해작용에 의한 항암활성 기전을 최초로 규명 → 항암 작용기전이 규명된 유효·선도물질로 제시
- 연구성과: 논문게재 2편

✓ Cytotoxic Activity of Rearranged Drimane Meroterpenoids against Colon Cancer Cells via Down-Regulation of β-Catenin Expression. *J. Nat. Prod.* 78: 453-461 (2015) (IF 3.947)

✓ Ilimaquinone and ethylsmenoquinone, marine sponge metabolites, suppress the proliferation of multiple myeloma cells by down-regulating the level of β-catenin. *Marine Drugs* 12: 3231-3244 (2014) (IF 3.512)

● 본 연구진은 최근 Wnt/β-catenin 신호전달체계를 타겟으로하는 항암 선도물질을 발굴하고 선도물질의 분자 약리 기전과 분자 타겟 발굴에 대한 연구를 지속적으로 진행하고 있음

● Cell-based high throughput screening을 통한 천연물 소재 탐색: 천연물 추출물 및 해양천연물 유래 화합물 100종 활성검색 완료

● 각종 database 검색을 통한 연구 대상 천연물 선정: *Smenosponiga* sp.

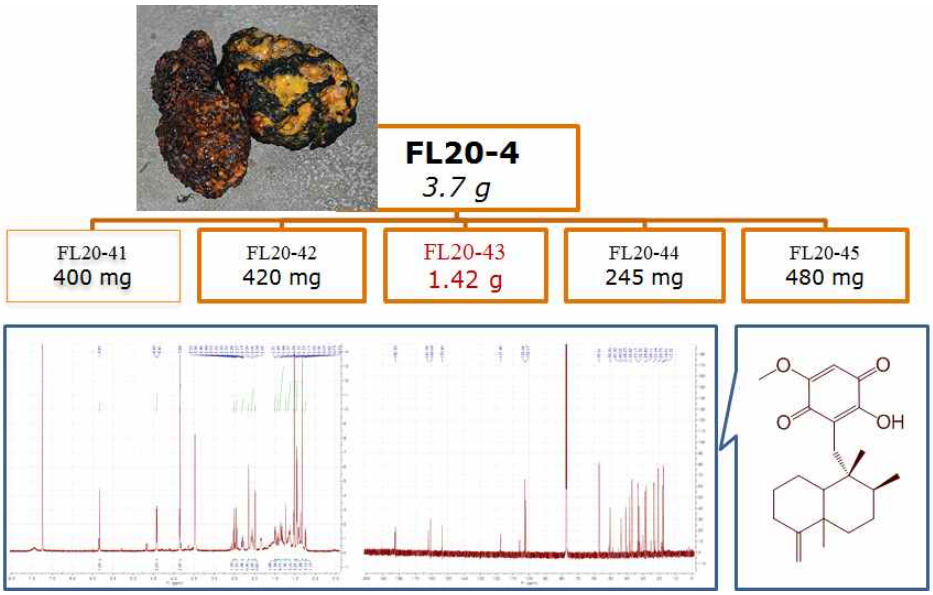
● Bioassay-guided fractionation을 이용한 활성분획물 탐색

● ^{1}H-NMR-guided isolation을 이용한 활성분획물 중 유효성분 예측: sesquiterpene-quinone 계 화합물

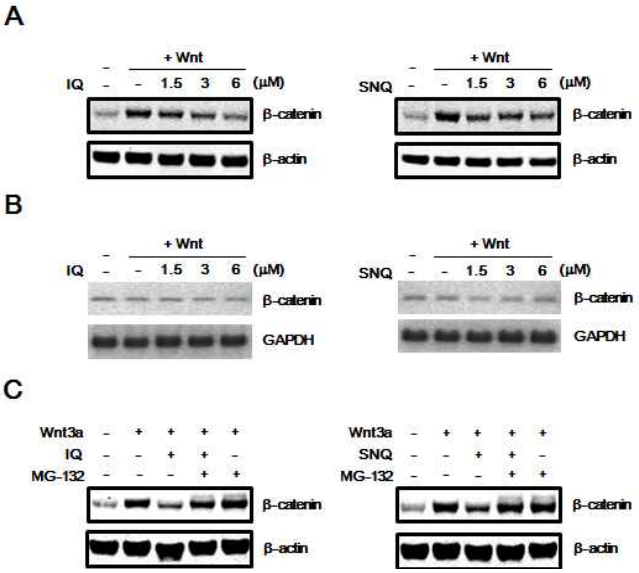
● 고효율 활성물질 분리: ^{1}H-NMR data, LC-MS data 등 분석결과를 바탕으로 유효물질의 화학계열을 예측하고 이에 적합한 컬럼 및 분리방법 설정

● <u>선행연구결과</u>

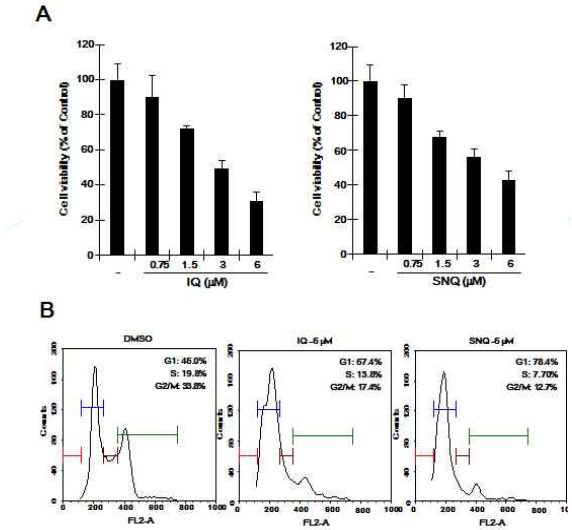
- ✓ Cell-based HTS: Wnt/β-catenin 신호전달을 측정하기 위하여 제작된 세포주(HEK293-TOPFlash)에 Wnt3a와 화합물을 처리하고 firefly luciferase 활성을 측정
- ✓ Screening 결과 및 database 검색결과에 근거하여 해면동물 *Smenosponiga* sp.을 연구소재로 선정
- ✓ 활성-추적 및 NMR-기반 분리방법을 이용하여 유효물질 분리
- ✓ NMR, MS 등 분광학적 방법을 이용한 화학구조 결정: ilimaquinone으로 확인



- ✓ ilimaquinone에 대한 Wnt/β-catenin 단백질 저해활성 평가
- ✓ Wnt/β-catenin 신호전달 조절 기전 규명
- ✓ RPMI8226 multiple myeloma cells에 대한 세포증식 억제활성 평가결과, ilimaquione은 G0/G1 cell cycle arrest를 유발하여 RPMI8226 multiple myeloma cells의 증식을 억제하는 것으로 나타남

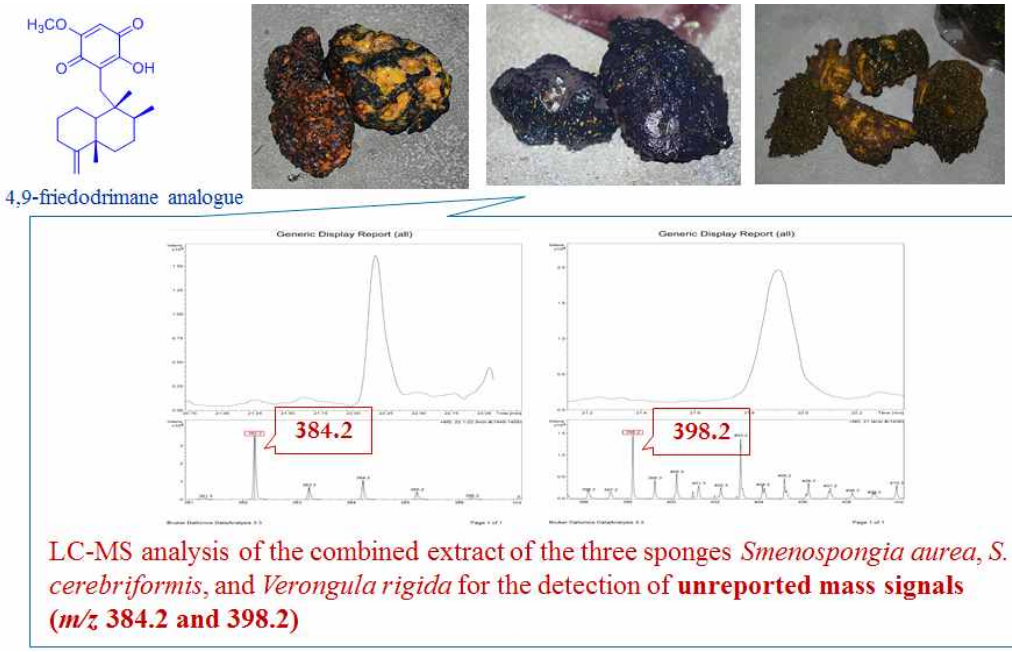


Ilimaquinone에 의한 β-catenin 저해활성



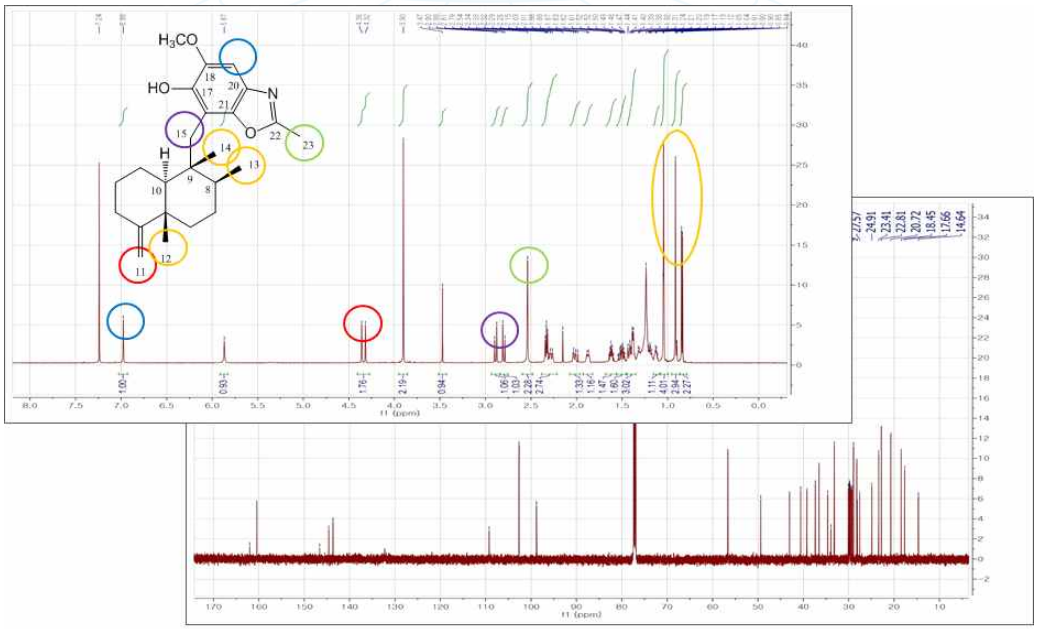
Ilimaquinone에 의한 RPMI8226 MMC
증식억제활성 및 cell cycle arrest

- 해면동물(*Verongula rigida, Smenospongia cerebriformis, Smenospongia aurea*)로부터 신규 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids 분리 및 화학구조 규명
  - ✓ LC-MS 분석결과, 현재까지 보고되지 않은 mass signals이 관찰되어 신규화합물로 추정하고 집중 분리하여 신규 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids을 분리함

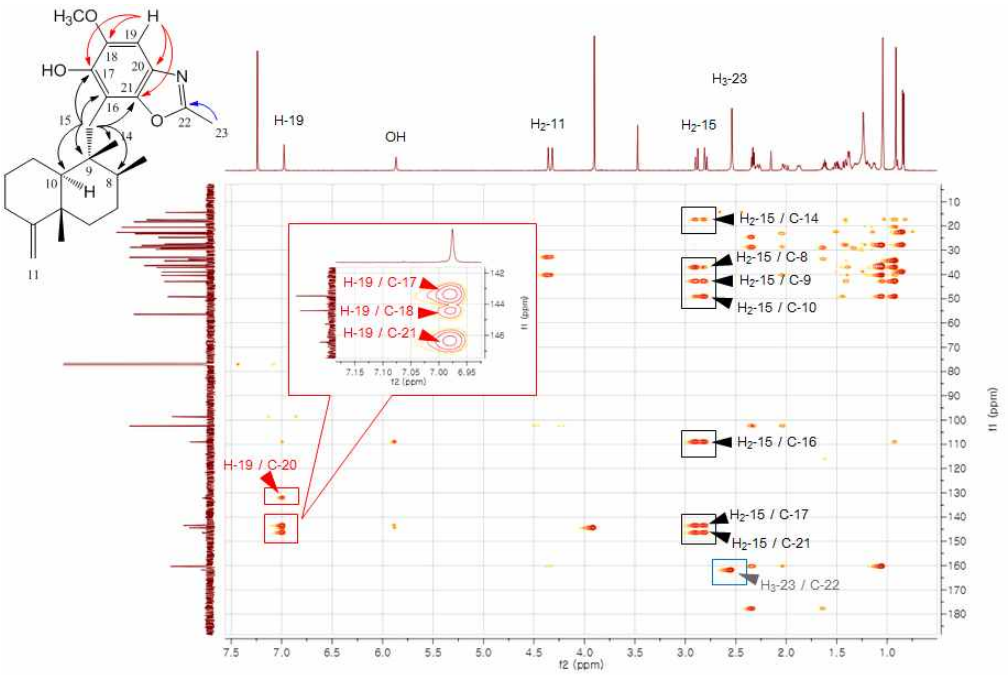


LC-MS analysis of the combined extract of the three sponges *Smenospongia aurea*, *S. cerebriformis*, and *Verongula rigida* for the detection of **unreported mass signals (*m/z* 384.2 and 398.2)**

- 분리된 화합물에 대한 화학구조 결정
  - ✓ 신규화합물 **1**의 화학구조: MS, 1D- 및 2D-NMR 분석결과를 종합하여 화학구조를 결정하고 (-)-nakijinol E로 명명함



^{1}H and ^{13}C NMR spectra of compound **1** in $CDCl_3$ (600, 150 MHz)

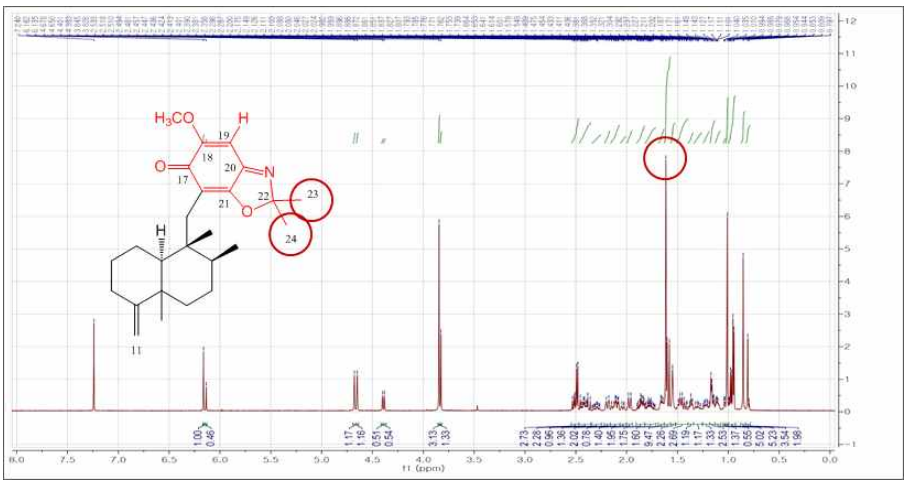


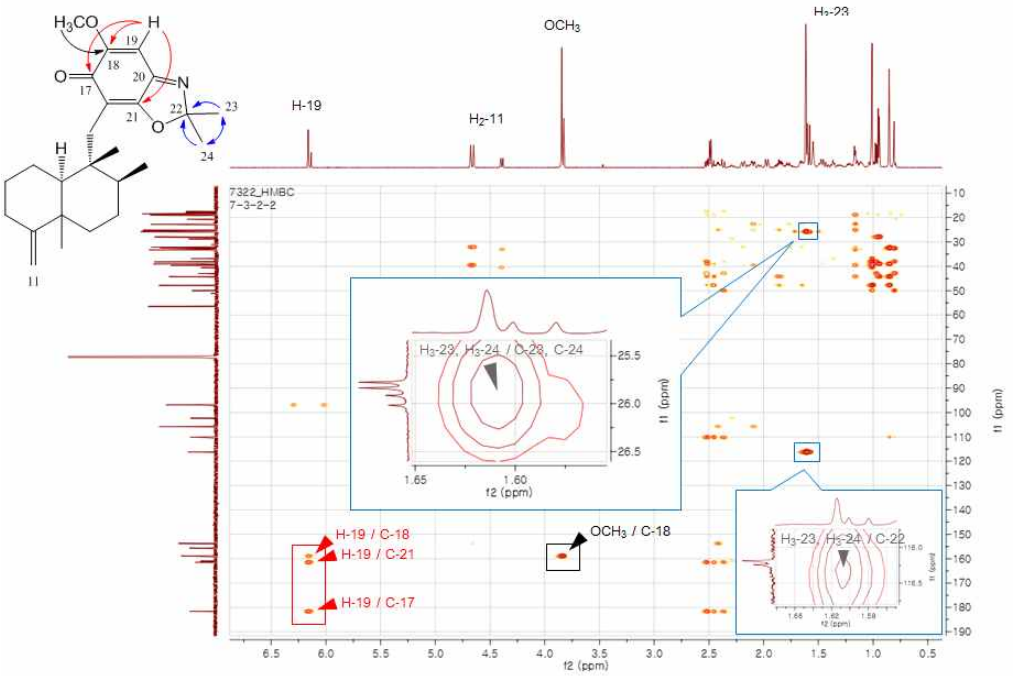
✓ 신규화합물 2의 화학구조 결정: MS, 1D- 및 2D-NMR 분석결과를 종합하여 화학구조를 결정하고 (+)-5-*epi*-nakijinol E로 명명함.

✓ 신규화합물 1과 2의 절대구조 규명: 비선광도 값을 측정하여 아래와 같이 결정함

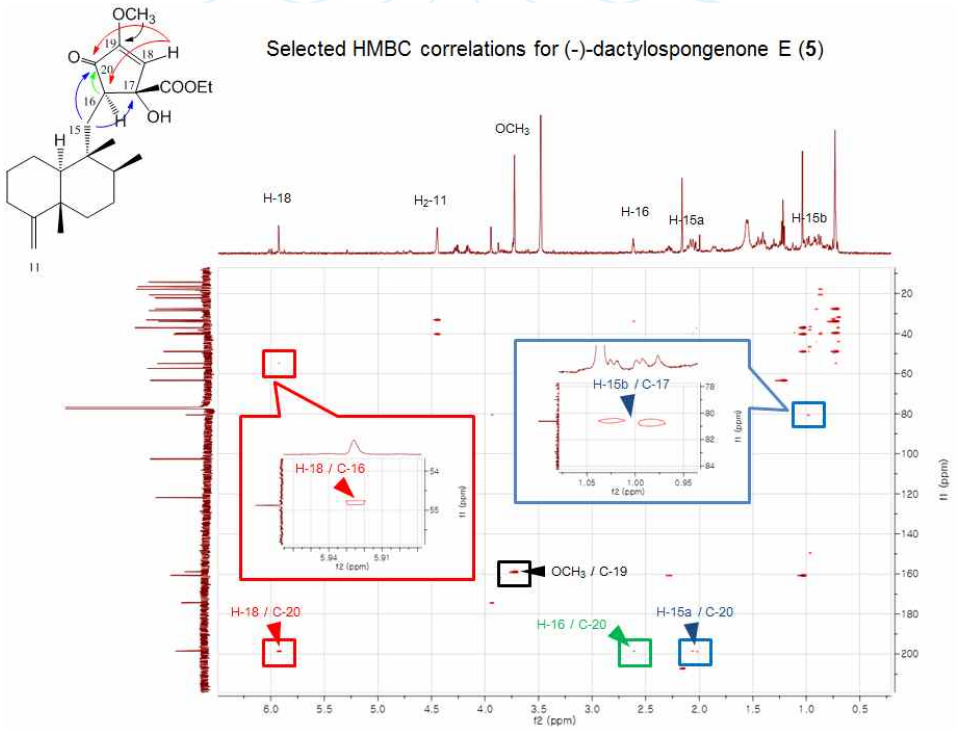
KOPRI
극지연구소

✓ 신규화합물 3 및 4의 화학구조: MS, 1D- 및 2D-NMR 분석결과를 종합하여 화학구조를 결정하고 nakijinone A (**3**) 및 5-*epi*-nakijinone (**4**)로 명명함



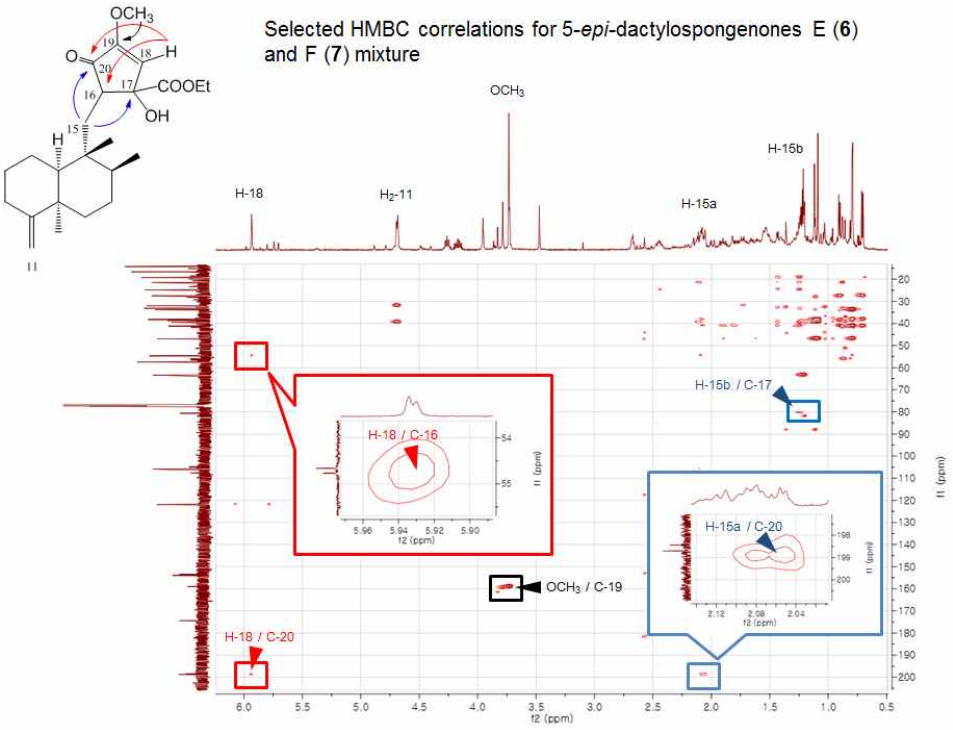


✓ 신규화합물 5의 화학구조: MS, 1D- 및 2D-NMR 분석결과를 종합하여 화학구조를 결정하고 (-)-dactylospongenone E로 명명함



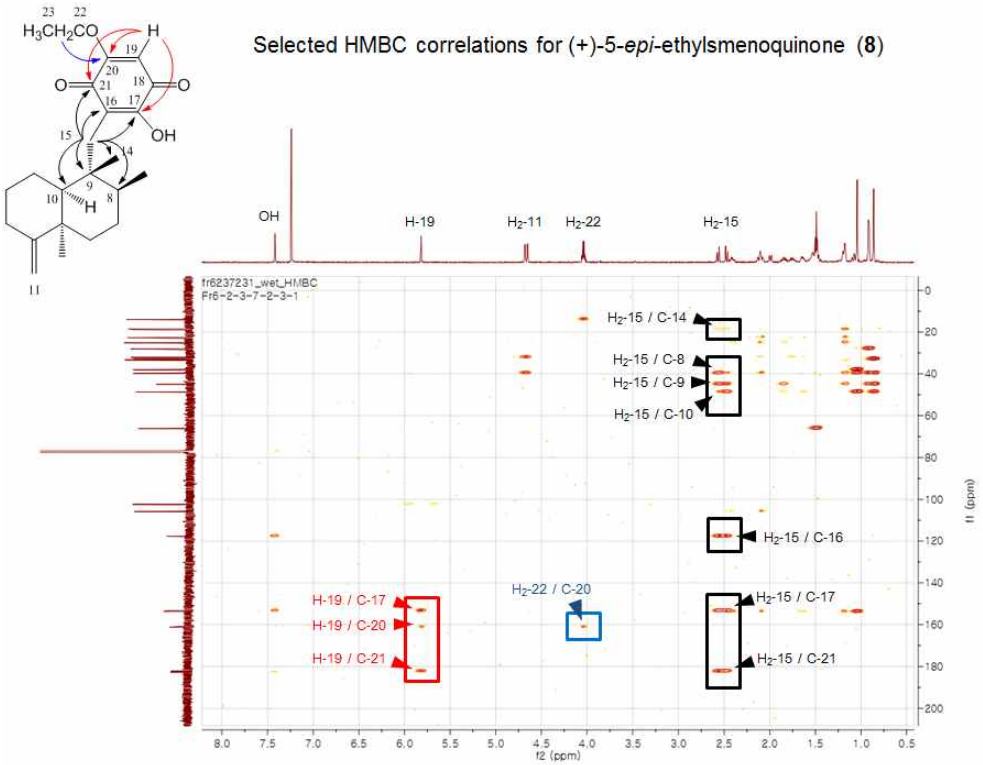
✓ 신규화합물 6 및 7의 화학구조 (2:3 mixture): MS, 1D- 및 2D-NMR 분석결과를 종합하여 화학구조를 결정하고 각각

5-*epi*-dactylospongenone E (**6**) 및 5-*epi*-dactylospongenone F (**7**)로 명명함

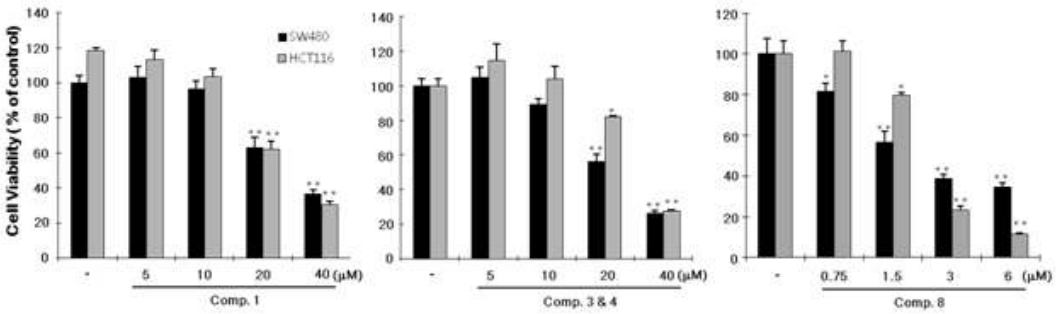


✓ 절대구조 규명: CP3 and DP4 통계분석과 연계한 gauge-invariant atomic orbital (GIAO) NMR chemical shift 계산을 이용하여 신규 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids의 입체 화학구조를 규명함

✓ 신규화합물 8의 화학구조: MS, 1D- 및 2D-NMR 분석결과를 종합하여 화학구조를 결정하고 (+)-5-*epi*-ethylsmenoquinone로 명명함



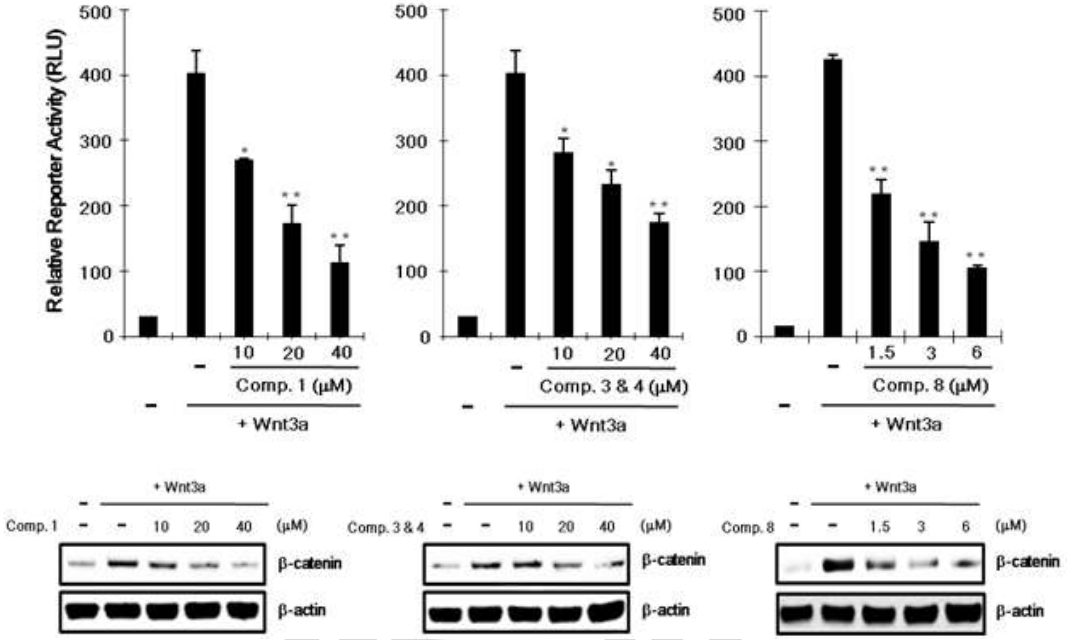
- SW480 및 HCT116 대장암세포에 대한 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids의 암세포증식 저해활성 평가 결과, 신규 화합물 1, 3&4, 8 등이 두 대장암 세포에 대하여 증식을 저해하는 것으로 나타남
- 신규 화합물 1, 3&4는 5 - 40 μM 농도에서 농도-의존적인 대장암세포 증식 저해작용을, 신규 화합물 8은 0.75 - 6 μM 농도 범위에서도 농도-의존적 대장암세포 증식 저해작용을 나타내었음



- 선행연구결과를 바탕으로 대장암세포 증식을 저해하는 신규 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids의 항암활성이 Wnt/β-catenin 신호전달과 관련이 있을 것으로 예측함
- 신규 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids에 대한 항암 기전연구결과 신규 화합물 1, 3&4, 8은 농도-의존적으로 Wnt/β-catenin 신호전달을 저해하는 것으로 나타

남

- 따라서 신규 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids 1, 3&4, 8를 Wnt/β-catenin 신호전달을 저해하는 항암 유효·선도물질로 제시함



극지연구소

제 2 장 국내외 기술개발 현황

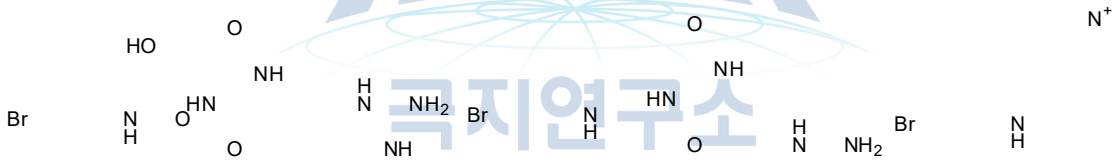
제 1 절 국외 극지생물 기술개발 현황

○ 극지생물 유래 유효물질 발굴

- 극지생물 *Gersemia fruticosa*로부터 항미생물활성을 나타내는 4종의 신규 diterpenes을 발굴(1)

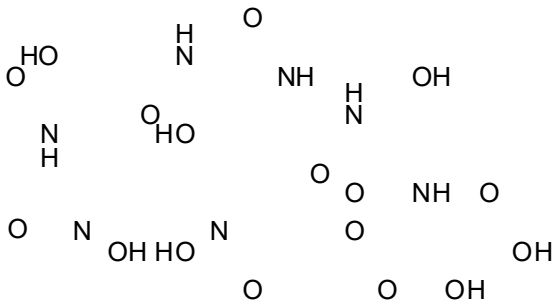
gersemiol A (**1**)　　Eunicellol A (**4**)

- 극지생물 *Geodia barretti*로부터 항염증활성을 나타내는 3종의 신규 6-bromoindole 유도체를 발굴(2)



geobarrettin A (**1**)　　geobarrettin B (**2**)　　geobarrettin C (**3**)

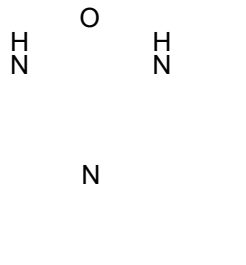
- 극지 박테리아 *Variovorax* sp.으로부터 항균활성을 나타내는 1종의 신규 depsipeptide를 발굴(3)



imaqobactin (**1**)

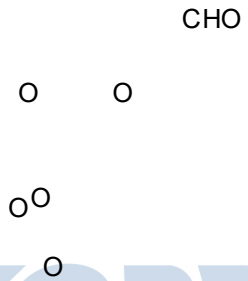
- 극지생물 *Latrunculia biformis*로부터 항암활성을 나타내는 1종의 신규 pyrroloiminoquinone 발굴(4)

KOPRI 극지연구소



16,17-dehydrotsitsikammamine A (**2**)

- 극지생물 *Plumarella delicatissima*으로부터 5종의 신규 furanocembranoid diterpenes 발굴(5)



keikipukalide A (**1**)

○ 항암-표적 Wnt/β-catenin 신호조절물질 연구동향

- Wnt/β-catenin 신호전달체계를 타겟으로 하는 화합물에 대한 연구는 다국적 제약 기업인 Norvartis사와 미국의 Genentech사에서 수행되고 있음.
- Novarivs사의 PKF115-584의 경우 Harvard 대학에서 발굴한 화합물로서 β-catenin과 전사 인자인 TCF-4 사이의 상호 작용을 방해하는 화합물로 대장암을 비롯한 전립선암, multiple myeloma에 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있음
- 미국의 Genentech사는 DVLp_C라는 폴리펩타이드 화합물로 disheveled 단백질의 PDZ 도메인에 리간드로 작용함으로서 Wnt/β-catenin 신호전달체계를 억제하고 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있음
- 2000년대 이후 β-catenin 단백질 저해제 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있지만, <u>아직까지 Wnt/β-catenin 신호전달을 표적으로 하는 항암제 개발은 초기 단계</u>에 머물러 있음
  - ✓ 곰팡이 유래 destruxin B, 식물 유래 hydnocarpin, tussilagone 등이 β-catenin 단백질의 증가를 억제하는 것으로 보고됨
  - ✓ 2-hydroxycinnamaldehyde 및 합성화합물인 LGK974은 breast cancer cell에서 활성을 보이는 것으로 보고됨

- ✓ 식물 유래의 ursolic acid가 prostate cancer cell에서 Wnt signaling을 억제하여 apoptosis를 일으키는 것이 밝혀짐
- ✓ 곰팡이 유래의 PKF115-854 및 CGP049090 화합물이 β-catenin-TCF interaction을 조절하여 colon cancer cell proliferation을 억제하는 것으로 나타남
- ✓ FJ9 화합물이 Dishevelled의 한 domain인 PDZ domain과 Frizzled7 receptor와의 interaction을 저해함으로써 canonical Wnt pathway를 차단시켜 tumor cell growth를 억제시키며 tumor xenograft의 성장도 억제시킨다는 연구보고가 있음
- ✓ IWP (Inhibition of Wnt Protein) 계열 화합물: Wnt 생성에 필수적인 membrane-bound acyltransferase인 Porcupine(Porn)의 활성을 억제
- ✓ IWR (Inhibition of Wnt Response) 계열 화합물: Axin protein의 destruction을 억제
- ✓ XAV939 화합물: TNKS1/2를 타겟
- ✓ Pyrvinium (kinase inhibitor, FDA 승인약물): CK1α를 억제함으로써 Axin을 안정화시켜 β-catenin의 turnover를 촉진
- ✓ ICG-001: CBP를 타겟으로 하는 Wnt inhibitor로서 그 analogue가 현재 임상 1상에 올라 있음

KOPRI 극지연구소

제 2 절 국내 극지생물 기술개발 현황

○ 극지생물 유래 유효물질 발굴

- 극지생물 *Verongula rigida, Smenospongia cerebriformis, Smenospongia aurea*로부터 항암활성을 나타내는 8종의 신규 4,9-friedodrimane sesquiterpenoids 발굴(6)

(-)-nakijinol E (**1**) (+)-5-epi-nakijinol E (**2**)

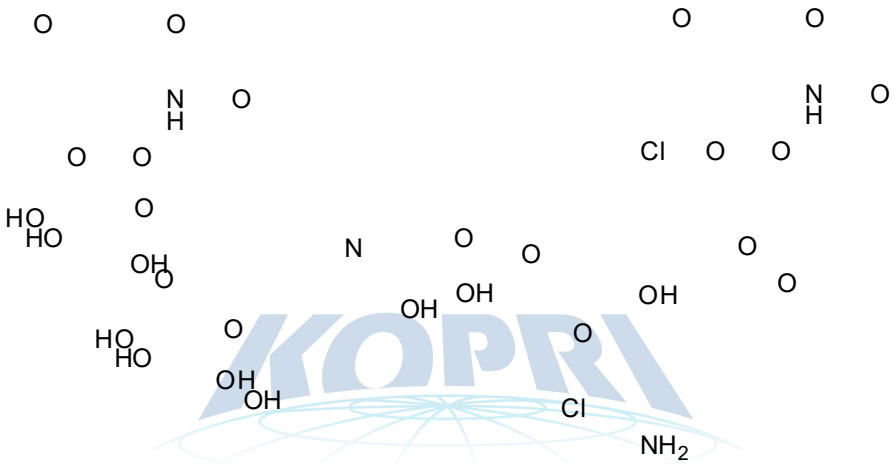
- 극지 방선균 *Streptomyces* sp.로부터 세포독성을 나타내는 1종의 신규 zizaane-type sesquiterpenoid 발굴(7)

NH

COOH

antartin (**1**)

- 극지 방선균 *Streptomyces* strain으로부터 항증식 활성을 나타내는 2종의 신규 화합물 발굴(8)



acticoside (**1**) C-1027 chromophore-V (**2**)

KOPRI 극지연구소

○ 항암-표적 Wnt/β-catenin 신호조절물질 연구동향

- 아직까지 Wnt/β-catenin 신호전달을 표적으로 하는 항암제 개발은 초기 단계에 머물러 있음
  - ✓ CWP291: JW중외제약에서 개발 중인 Wnt inhibitor로서 임상 1상을 완료하였음

○ 현재까지 극지생물 유래 물질을 이용한 신약개발 사례는 없음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구개발 목표 대비 결과(요약)

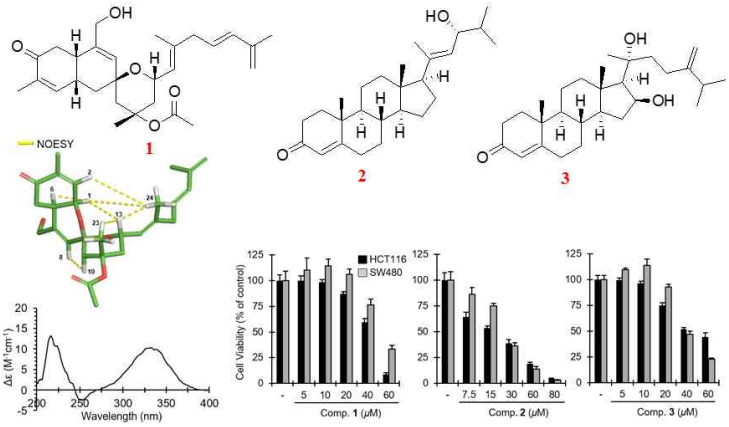
연구개발 목표	연구내용	연구결과
극지생물 소재 발굴	● 극지생물 소재 선정 및 확보	● 현재 보유하고 있는 극지생물 12종에 대한 TLC 및 HPLC 분석결과 특이성분(이차대사산물)이 다수 관찰되는 극지생물 1종 선정 ● 극지생물 기원 확인: 해양생물 전문가인 Michelle Kelly (National Institute of Water and Atmospheric Research, New Zealand), Robert Stone (Alaska Fisheries Science Center, USA), Mark T. Hamann (Medical University of South Carolina, USA)으로부터 종의 기원을 확증 받음 *Monanchora* sp. (~1 kg 확보) (Voucher number: 2010-AK-49)
극지생물로부터 이차대사산물 분리	● 극지생물 추출물 제조 ● 용매·컬럼 분획물 제조	● *Monanchora* sp. (~1 kg)을 세절하고 메탄올을 이용하여 추출함 ✓ 메탄올추출물 53.2 g 제조 ● MeCN-H_2O (40%-100% MeCN, 4L)의 이동상 조건으로 MPLC (Biotage SNAP Cartridge, KP-C18-HS, 120 g)를 실시하여 15개의 컬럼 분획물을 제조함 ✓ 컬럼분획물 AK49-1~AK49-15 제조
^{1}H-NMR 기반 이차대사산물 분리	● ^{1}H-NMR 기반 컬럼크로마토그래피를 이용한 화합물의 분리/정제	● 분획물에 대한 ^{1}H-NMR 분석결과 특징적인 피크가 관찰되는 분획물을 선별하여 컬럼크로마토그래피를 실시함 ● 화합물(이차대사산물) 분리/정제: HPLC (C_{18} column 250 × 21.2 mm, MeCN-H_2O)를 실시하여 화합물을 순수 분리/정제함 ✓ 신규 화합물 3 종을 포함한 10종의 이차대사산물 분리/정제
MS, NMR 등 분광학적 분석을 이용한 화학구조 규명	● 1D-, 2D-NMR 및 MS 등 분광학적인 방법을 이용한 평면화학구조 규명 ● ECD, GIAO-DP4 분석을	● 분리한 화합물 10종에 대하여 NMR, MS 등 분광학적 분석 실시하고 데이터 분석을 통해 화학구조 규명 ● 신규화합물(3종): alotaketal F (**1**), 20*E*,23*R*-hydroxy-nor-cholest-4,20-dien-3-one (**2**), 16β,20*R*-dihydroxy-cholest-4,24-dien-3-one (**3**) ● 이차대사산물(7종): bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (**4**), (4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)-nonadecapentaenoic acid (**5**), hexadecanoic acid (**6**),

	통한 절대구조 결정	(23*E*)-cholesta-5,23- dien-3*β*,25-diol (7), 24(*S*)-cholesta-5,25-diene- 3β,24-diol (8), 24-methylenechosterol (9), 5α-cholestan-3β-ol (10) ● Calculated ECD 및 experimental ECD 비교분석을 통해 신규화합물 1의 절대구조 결정 ✓ 1*R*, 6*R*, 9*S*, 11*R*, 13*S* ● DP4 통계분석과 연계한 GIAO NMR chemical shift계산을 이용하여 신규화합물 2 및 3의 절대구조 결정 ✓ 신규화합물 2: 23*R* ✓ 신규화합물 3: 20*R*

2. 연구개발 내용 및 결과

○ 극지생물(*Monanchora* sp.)유래 이차대사산물 10종(신규 sesterterpenoid 1종, 신규 steroids 2종 포함)

➢ 극지생물 유래 유효·선도물질: 신규화합물 3종 및 이차대사산물 7종



○ 유효·선도물질

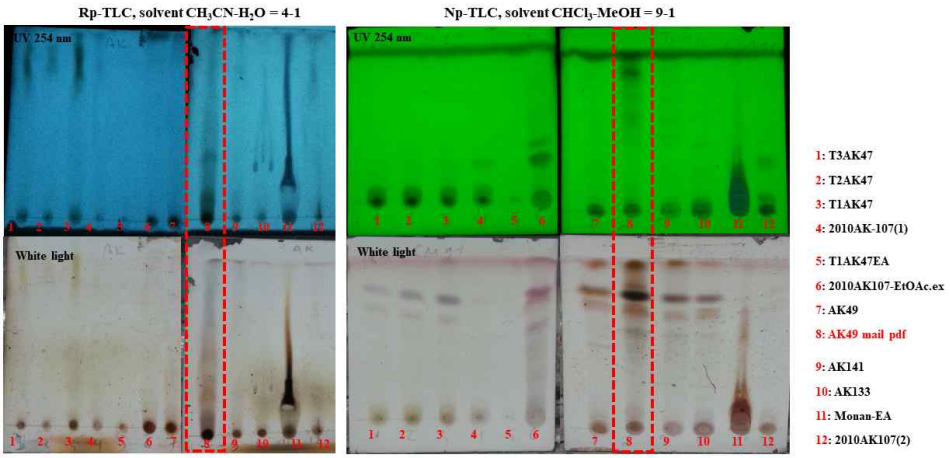
- 신규화합물 3종: alotaketal F (1), 20*E*,23*R*-hydroxy-nor-cholest-4,20-dien-3-one (2), 16*β*,20*R*-dihydroxy-cholest-4,24-dien-3-one (3)
- 이차대사산물 7종: bis-(2-ethylhexyl)terephthalate (4), (4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)-nonadecapentaenoic acid (5), hexadecanoic acid (6), (23*E*)-cholesta-5,23-dien-3β,25-diol (7), 24(*S*)-cholesta-5,25-diene-3*β*,24-diol (8), 24-methylenechosterol (9), 5α-cholestan-3β-ol (10)

○ 절대구조 규명: ECD 및 DP4 분석을 통하여 신규화합물 3종(1-3)의 절대구조 결정

○ 항암활성: 신규화합물 3종(1-3)은 Wnt/β-catenin 신호전달을 저해함으로써

대장암세포(SW480, HCT116) 증식을 저해 ○ 논문게재: Sesterterpenoid and Steroid Metabolites from a Deep-Water Alaska Sponge Inhibit Wnt/β-Catenin Signaling in Colon Cancer Cells. *Marine Drugs.* **16**(9), 297 (2018)

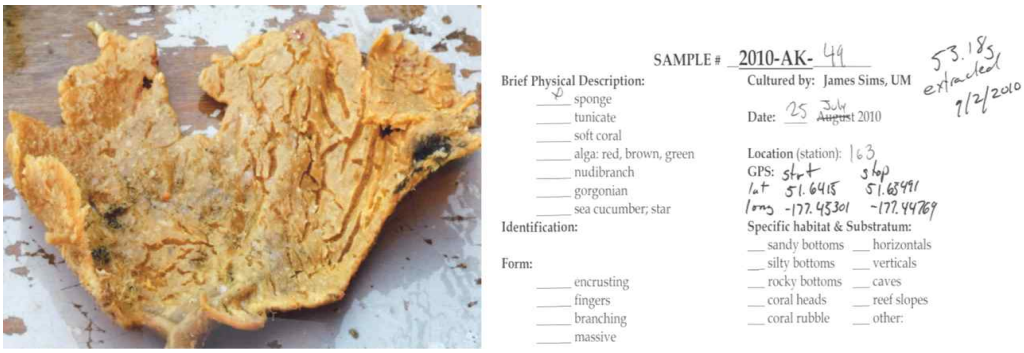
○ 현재 보유하고 있는 극지생물 12종에 대한 TLC 및 HPLC 분석을 실시함



△ 역상/순상 TLC 분석결과

○ TLC 및 HPLC 분석결과를 종합하여 특이성분이 관찰되는 1종 선정

- *Monanchora* sp. (~1 kg)
- 해양생물 전문가인 Michelle Kelly (National Institute of Water and Atmospheric Research, New Zealand), Robert Stone (Alaska Fisheries Science Center, USA), Mark T. Hamann (Medical University of South Carolina, USA)으로부터 종의 기원을 확증 받음



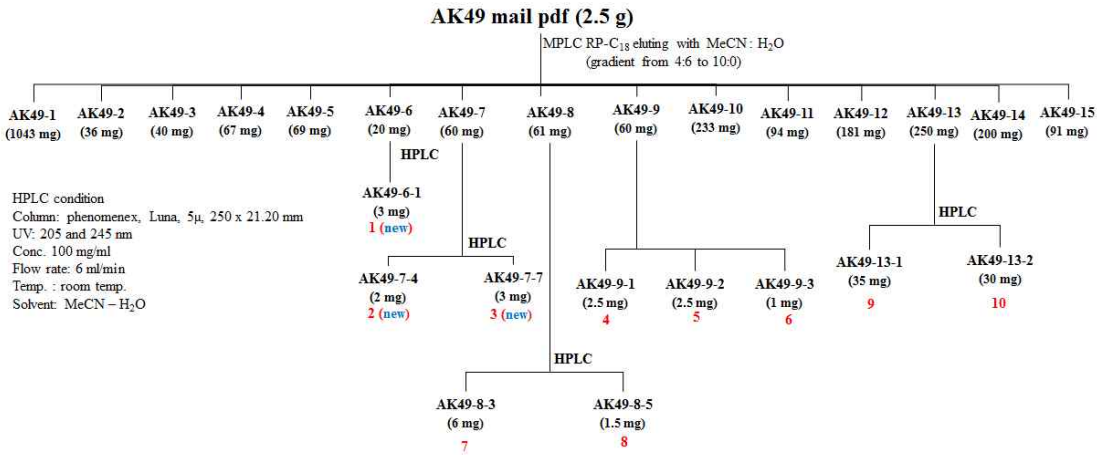
△ *Monanchora* sp.의 채집 직후 사진 및 표본서류

○ 극지생물(*Monanchora* sp.)로부터 신규 sesterterpenoid 1종 및 steroids 2종, 기타 이차대사산물 7종 분리

- 알래스카 해면동물(*Monanchora* sp.) 약 1 kg을 세절하고 MeOH을 이용하여

추출하여 추출물 53.2 g을 얻음

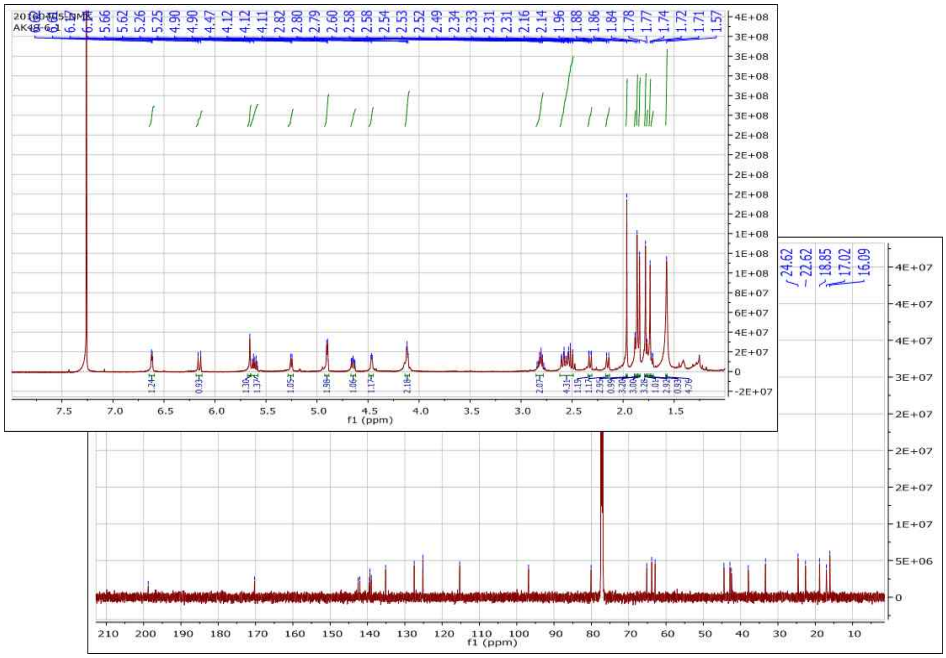
- MeOH추출물(2.5 g)에 대하여 MeCN-H_2O 기울기 용매조건(40%-100% MeCN, 4 L)을 이용하여 MPLC(Biotage SNAP Cartridge, KP-C18-HS, 120 g)를 실시하여 총 15개의 분획물(AK49-1~AK49-15)을 얻음
- AK49-6 (20 mg)에 대한 prep. HPLC를 실시하여 신규 화합물 1을 순수 분리/정제함 [신규 화합물 1 (3 mg)]
- AK49-7 (60 mg)에 대한 prep. HPLC를 실시하여 신규 화합물 2, 3을 순수 분리/정제함 [신규 화합물 2 (2 mg), 3 (3 mg)]
- AK49-8 (61 mg)에 대한 prep. HPLC를 실시하여 화합물 7, 8을 순수분리/정제함 [화합물 7 (6 mg), 8 (1.5 mg)]
- AK49-9 (60 mg)에 대한 prep. HPLC를 실시하여 화합물 4, 5, 6을 순수분리/정제함 [화합물 4 (2.5 mg), 5 (2.5 mg), 6 (1 mg)]
- AK49-13 (250 mg)에 대한 prep. HPLC를 실시하여 화합물 9, 10을 순수분리/정제함 [화합물 9 (35 mg), 10 (30 mg)]



△ 극지생물(*Monanchora* sp.) 분리 과정

○ 극지생물 유래 이차대사산물 10종에 대한 평면화학구조규명

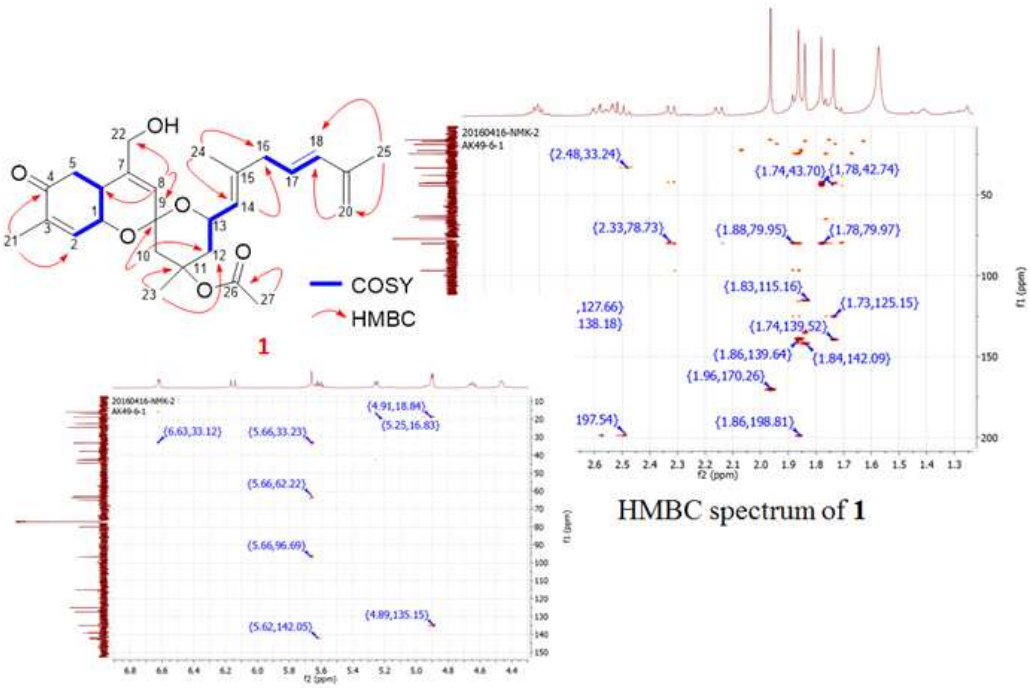
- 신규화합물 1
  - ✓ HRESIMS $[M+Na]^+$ *m/z* 479.2407 (calculated for $C_{27}H_{36}O_6Na$, 479.2410)
  - ✓ ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR에 나타난 특징적인 five tertiary methyl groups, four olefinic groups 등 여러 신호를 통해 sesterterpenoid 타입의 alotaketal C 골격과 유사함을 확인



△ ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra of compound **1** in $CDCl_3$ (600 MHz)

✓ HMBC cross-peak 분석을 통해 spirocyclic ring을 갖는 신규 sesterterpenoid임을 확인

✓ COSY를 포함하는 2D NMR data를 분석하여 평면화학구조를 규명하고 NOESY correlation을 통해 상대구조를 결정함

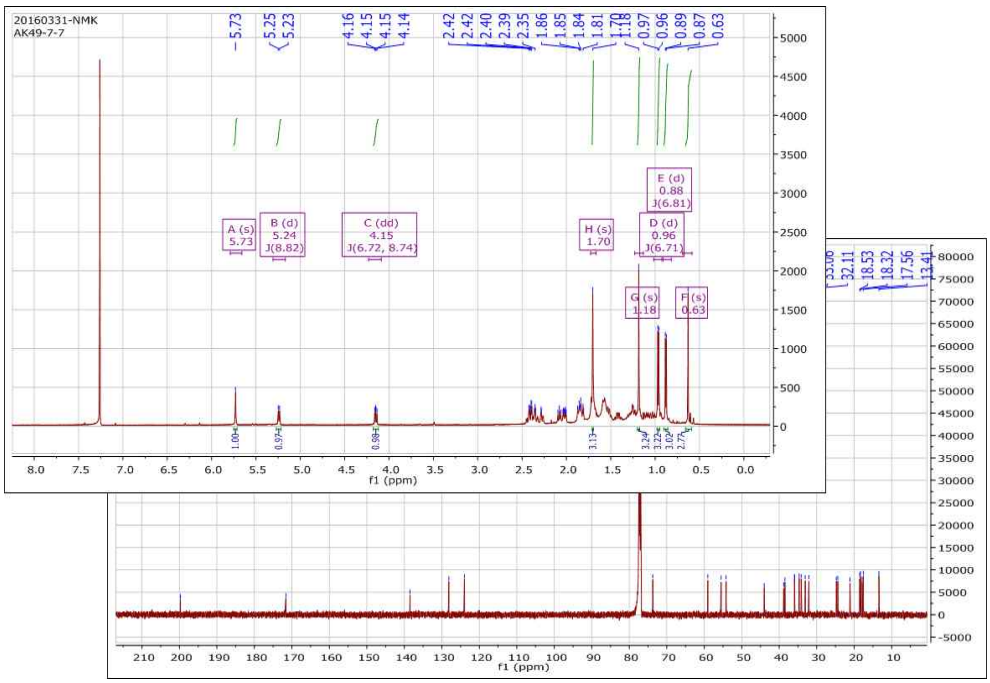


△ HMBC spectra of compound **1** in $CDCl_3$ (600 MHz)

● 신규화합물 2

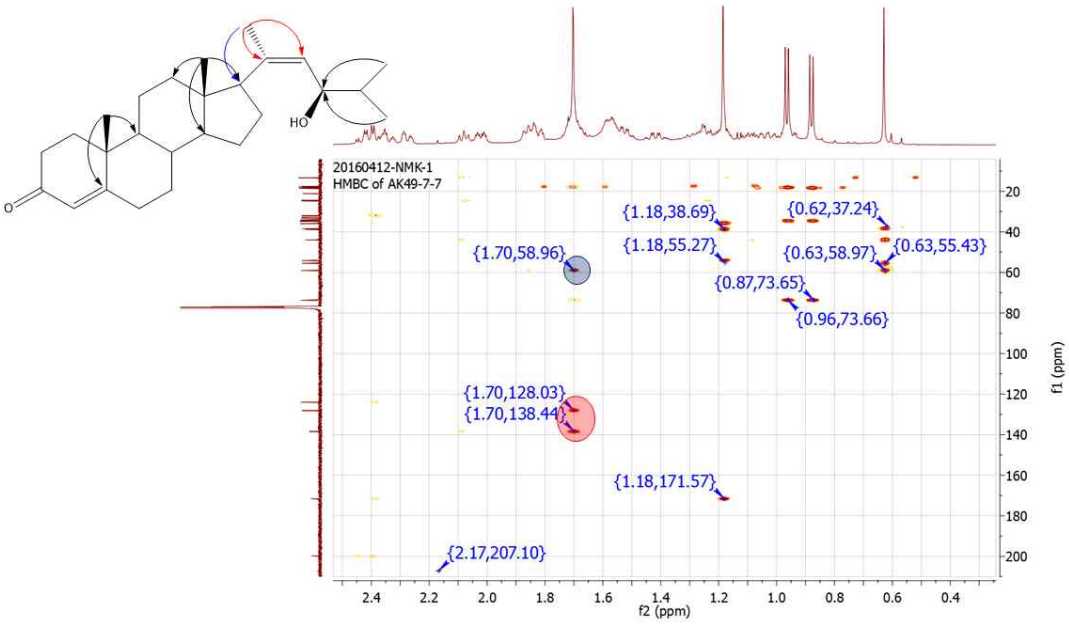
✓ HRESIMS $[M+Na]^+$ *m/z* 407.2926 (calculated for $C_{26}H_{40}O_2Na$, 407.2926)

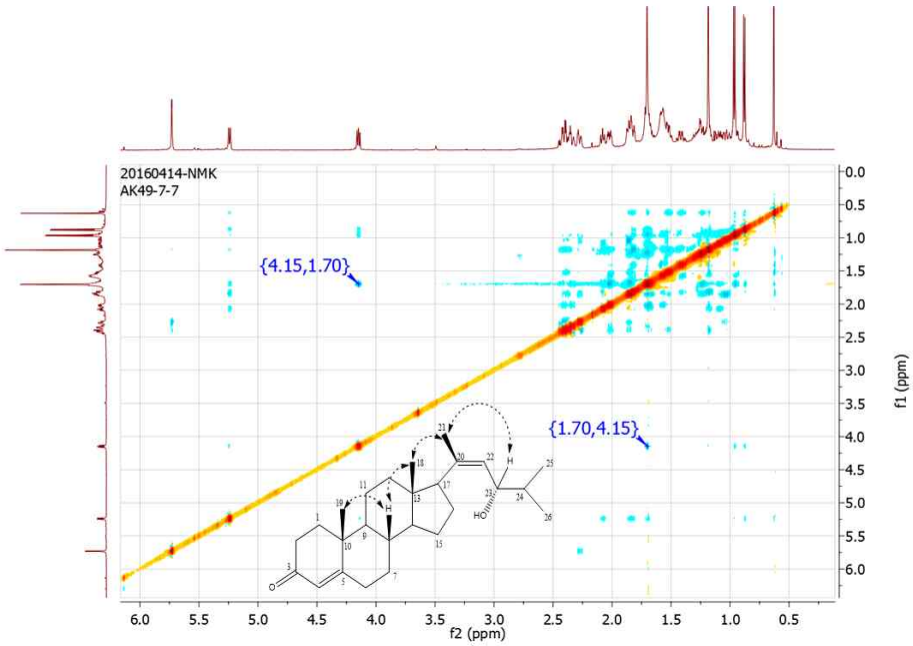
✓ ^{1}H NMR spectrum에서 2개의 olefinic protons [(δ_H 5.73, s), (δ_H 5.24, d, J = 8.8 Hz)], 한 개의 oxygen-bearing proton (δ_H 4.15, dd, J = 8.8, 6.7 Hz), 다섯 개의 methyl protons [(δ_H 0.63, s), (δ_H 0.88, d, J = 6.7 Hz), (δ_H 0.96, d, J = 6.7 Hz), (δ_H 1.18, s), (δ_H 1.70, s)] 신호가 관찰되었고 ^{13}C NMR data에서 ketocarbonyl기(δ_C 199.8)를 포함한 26개의 신호를 통해 cholestane계열의 steroid 유도체로 예측함



△ ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra of compound 2 in $CDCl_3$ (600 MHz)

✓ HMBC 및 COSY cross-peaks를 분석하여 평면구조를 규명하고 NOE correlations을 통해 상대구조를 결정함



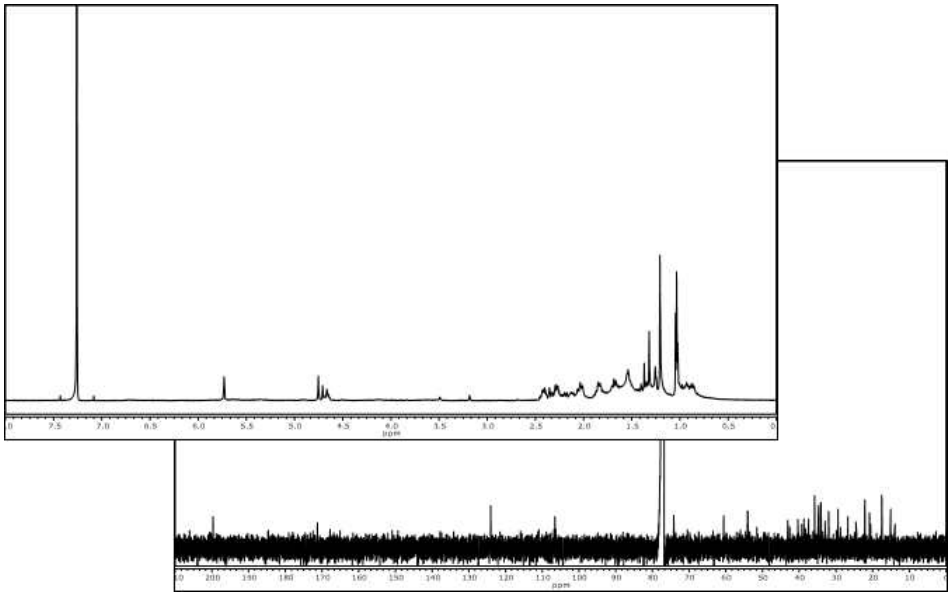


● 신규화합물 3

✓ HRESIMS $[M+Na]^+$ *m/z* 451.3187 (calculated for $C_{28}H_{44}O_3Na$, 451.3188)

✓ ^1H 및 ^{13}C NMR spectra를 통해 C28의 cholestane steroid임을 확인

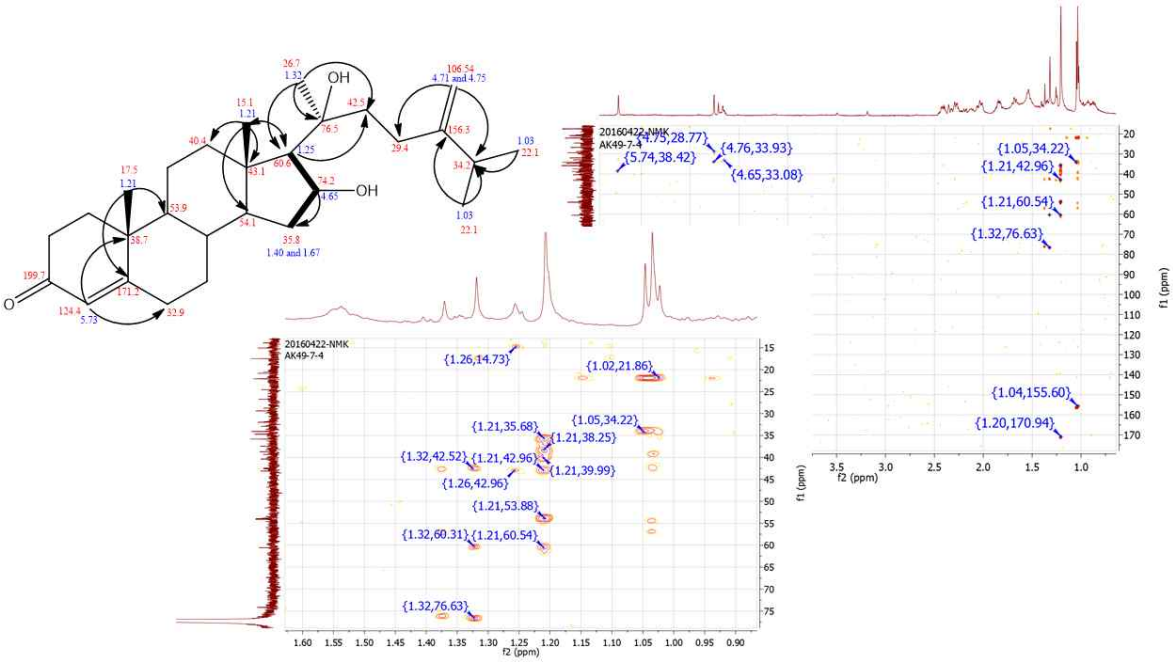
✓ 2번화합물과 다르게 특징적으로 exomethylene protons (δ_H 4.75, 4.68)이 관찰되었고 1개의 oxygenated methine group (δ_H 4.65; δ_C 74.2)이 추가적으로 나타남

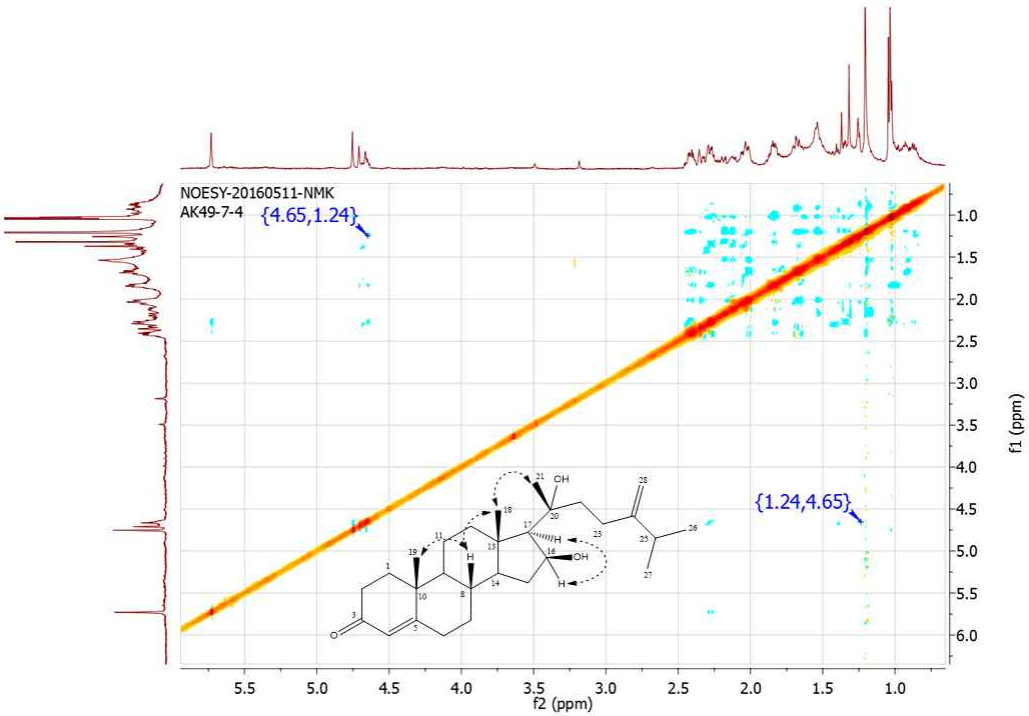


△ ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra of compound **3** in $CDCl_3$ (600 MHz)

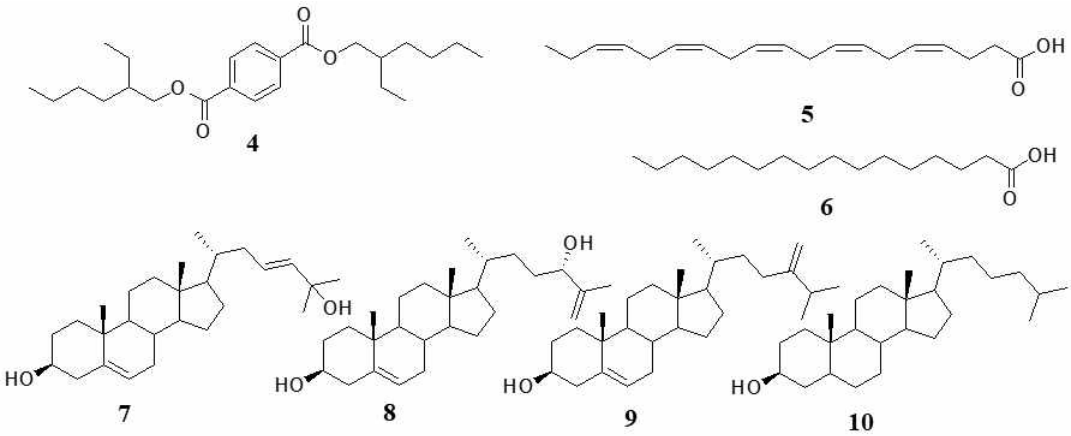
✓ HMBC 및 COSY cross-peaks를 분석하여 평면구조를 규명하고 NOE correlations을 통해 상대구조를 결정함

KOPRI





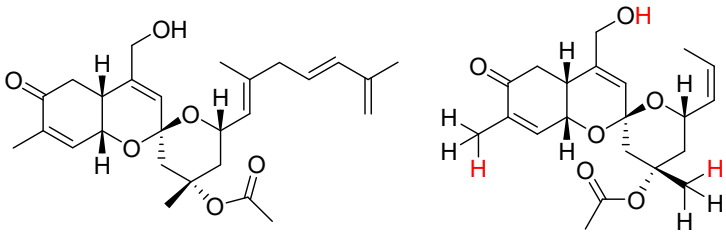
- NMR, MS 등 분광학적 분석을 통하여 이차대사산물 7종의 구조를 동정함: bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (**4**), (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)-Nonadecapentaenoic acid (**5**), Hexadecanoic acid (**6**), (23E)-cholesta-5,23-dien-3β, 25-diol (**7**), 24(*S*)-cholesta-5,25-diene-3*β*,24-diol (**8**), 24-Methylenechosterol (**9**), 5α-cholestan-3β-ol (**10**)



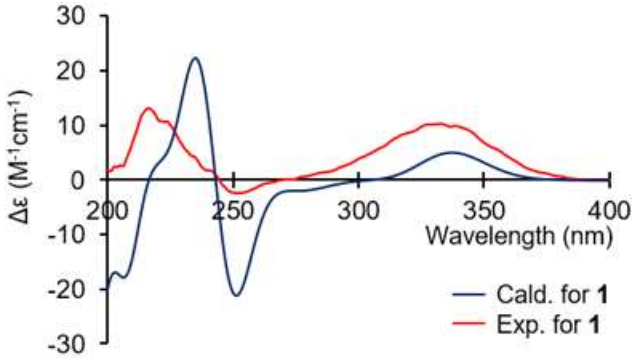
○ 신규화합물 3종의 절대구조 결정

- Supercomputer를 이용한 calculated ECD와 experimental ECD값을 비교하여

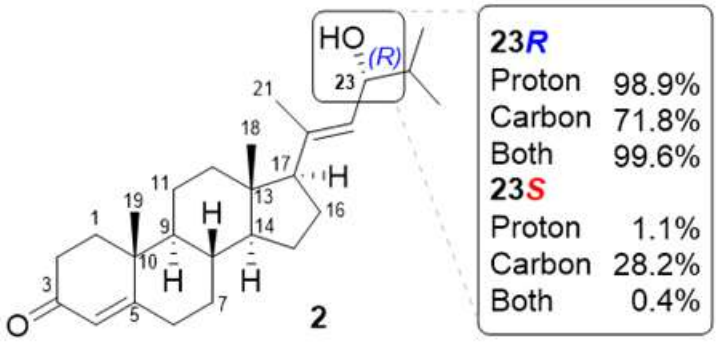
신규화합물 **1**의 절대구조를 1*R*, 6*R*, 9*S*, 11*R*, 13*S*로 결정함



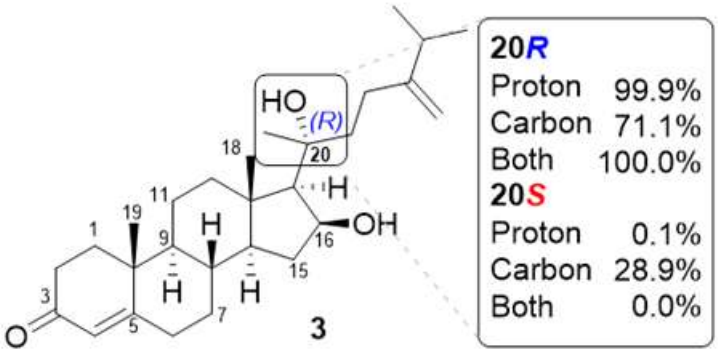
1 **1a**



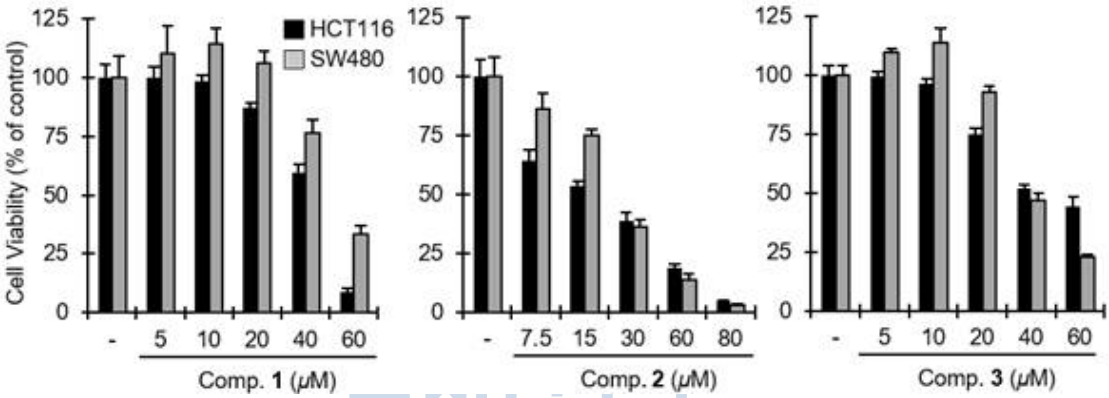
- Gauge-invariant atomic orbital (GIAO) NMR chemical shift 계산 연계 DP4 통계분석을 통해 신규화합물 **2**의 절대구조를 23*R*로 결정하고 화학구조를 20*E*,23*R*-hydroxy-nor-cholest-4,20-dien-3-one으로 결정함



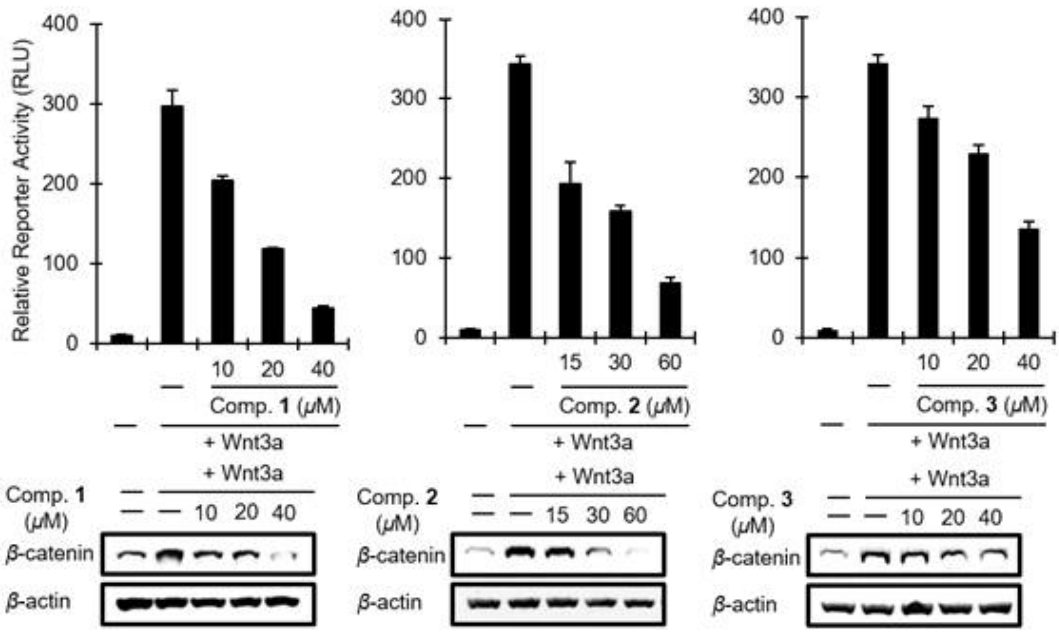
- Gauge-invariant atomic orbital (GIAO) NMR chemical shift 계산 연계 DP4 통계분석을 통해 신규화합물 **3**의 절대구조를 20*R*로 결정하고 화학구조를 16β,20*R*-dihydroxy-cholest-4,24-dien-3-one으로 결정함



○ 신규화합물 3종(1-3)에 대한 항암활성 평가 결과, 19.7 - 54.8 uM 농도에서 농도-의존적인 대장암세포(SW480 및 HCT116)의 증식 저해작용을 나타냄



○ 항암 기전연구결과 신규화합물 1-3은 농도-의존적으로 Wnt/β-catenin 신호전달을 저해하는 것으로 나타남



○ 따라서 신규화합물 1-3을 Wnt/β-catenin 신호전달을 저해하는 항암 유효·선도물질로 제시함

○ 본 연구결과는 신규성 및 진보성이 인정되어 아래와 같이 논문게재 성과를 얻음

- 논문제목: Sesterterpenoid and Steroid Metabolites from a Deep-Water Alaska Sponge Inhibit Wnt/β-Catenin Signaling in Colon Cancer Cells
- 저널명: *Marine Drugs* 16(9), 297 (2018). (Impact Factor: 4.379, 상위 10%)

marine drugs MDPI

Article

Sesterterpenoid and Steroid Metabolites from a Deep-Water Alaska Sponge Inhibit Wnt/β-Catenin Signaling in Colon Cancer Cells

Hyun Bong Park [1,2,†], Nguyen Quoc Tuan [3,4,†], Joonseok Oh [1,2], Younglim Son [5], Mark T. Hamann [6], Robert Stone [7], Michelle Kelly [8], Sangtaek Oh [5,*] and MinKyun Na [3,*]

1 Department of Chemistry, Yale University, New Haven, CT 06520, USA; hyunbong.park@yale.edu (H.B.P.); joonseok.oh@yale.edu (J.O.)
2 Chemical Biology Institute, Yale University, West Haven, CT 06516, USA
3 Department of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea; quoctuan3012@naver.com
4 Phúthọ College of Pharmacy, Viettri City, Phúthọ Province 293500, Vietnam
5 Department of Bio and Fermentation Convergence Technology, BK21 PLUS program, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea; wwt245@naver.com
6 Department of Drug Discovery and Biomedical Sciences, Medical University of South Carolina, Charleston, SC 29425, USA; hamannm@musc.edu
7 Auke Bay Laboratories, Alaska Fisheries Science Center, NOAA National Marine Fisheries Service, Juneau, AK 99801, USA; bob.stone@noaa.gov
8 Coast and Oceans National Centre, National Institute of Water and Atmospheric Research, Auckland Central 1149, New Zealand; Michelle.Kelly@niwa.co.nz
* Correspondence: ohsa@kookmin.ac.kr (S.O.); mkna@cnu.ac.kr (M.N.); Tel.: +82-2-910-5732 (S.O.); +82-42-823-6566 (M.N.)
† These authors contributed equal to this work.

Received: 18 July 2018; Accepted: 23 August 2018; Published: 27 August 2018

check for updates

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

제 1절 연구개발 목표 및 달성도

성과목표	세부목표		평가의 착안점 및 척도	달성도 (%)
1. 극지생물 소재 발굴	1-1	극지생물 소재 조사 및 확보	● 기원이 확인된 극지생물소재 확보(1종)	100%
2. 극지생물로부터 이차대사산물 분리	2-1	극지생물 추출물 및 용매분획물 제조	● TLC, HPLC 및 ^{1}H NMR 분석결과 기반 극지생물 추출물 및 분획물 제조	100%
	2-2	^{1}H-NMR 기반 이차대사산물 분리	● ^{1}H-NMR 기반 컬럼크로마토그래피를 이용한 이차대사산물 분리(10종) ● 이차대사산물 순도 확인(95% 이상)	100%
	2-3	MS, NMR 등 분광학적 분석을 이용한 화학구조 규명	● MS, 1D-, 2D-NMR 등 분광학적 분석방법을 이용한 이차대사산물 화학구조 규명(10종)	100%
			● 신규화합물 3종에 대한 항암활성 평가 결과, Wnt/β-catenin 신호전달을 저해함으로써 대장암세포(HCT116, SW480) 증식을 농도-의존적으로 저해함을 밝힘	효능평가 및 기전연구를 수행하여 성과목표를 초과달성함

KOPRI 극지연구소

제 2절 대외기여도

○ 극지 생물 이용에 관한 원천기술 개발

Wnt/β-catenin 신호전달을 저해하는 신규화합물 3종 최초로 규명

- 근거성과
  - ✓ 논문제목: Sesterterpenoid and Steroid Metabolites from a Deep-Water Alaska Sponge Inhibit Wnt/β-Catenin Signaling in Colon Cancer Cells
  - ✓ 저널명: *Marine Drugs* 16(9), 297 (2018). (Impact Factor: 4.379, 상위 10%)

○ 신규화합물 분리 및 분석에 관한 기술개발 향상

- HPLC를 이용한 극지 생물 성분분석기술
- 1D- 및 2D-NMR를 이용하여 신규화합물 3종을 포함한 이차대사산물 10종의 화학구조 규명
- ECD 및 GIAO-DP4 분석을 이용하여 신규화합물 3종의 절대구조 확립

KOPRI
극지연구소

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용계획

○ 극지생물로부터 신규화합물 3종을 포함한 10종의 이차대사산물을 발굴하여 라이브러리를 구축하였으며, 본 연구결과를 아래와 같이 활용할 계획임

- Wnt/β-catenin 신호전달을 저해함으로써 대장암세포(SW480, HCT116) 증식저해활성을 갖는 극지 생물 유래 이차대사산물 라이브러리 구축 → 항생제 및 항암 유효·선도물질로 제시
- 극지 생물 유래의 새로운 화학골격을 제공함으로써 신규 유효·선도물질 개발에 활용
- 신규 유효·선도물질에 대한 원천기술을 바탕으로 국내외 신약개발연구에 활용

제 2 절 기대효과

1. 학술적 파급효과

○ 극지생물 유래 항생제 및 항암 유효·선도물질 도출에 관한 기초·원천기술 제고

- 극지생물의 탐색, 이차대사산물 분리, 분석, 화학구조 규명
- 극지생물 유래 이차대사산물의 항생제 및 항암 활성평가

○ 극지생물 유래 유효물질을 이용한 분자 약리 기전 및 타겟 단백질 규명이라는 새로운 연구 방향의 제시

○ 극지생물 유래 유효물질의 작용기전 연구를 통한 신호전달체계 사이의 상호작용 및 네트워크 규명

○ 학술지 논문, 학회 발표, 지적 재산권 확보

2. 경제적 파급효과

○ 항생제 내성을 갖는 슈퍼박테리아의 출현에 대응한 극지생물 유래 항생제 유효물질 제공

○ 국내에서 체계적인 타겟 단백질 발굴기술을 확립함으로써 국제경쟁력 있는 신약의 국내개발을 지원하여 제약산업의 선진화 이룩 → 글로벌 신약 강국 실현

○ 신약개발 원천기술 확보를 통한 첨단 융합산업 분야 성장 견인

○ 극지생물자원 이용에 관한 원천기술 확보 → 나고야의정서 발효에 따른 생물자원주권 확보

KOPRI 극지연구소

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 극지 생물 유래 유효물질 발굴

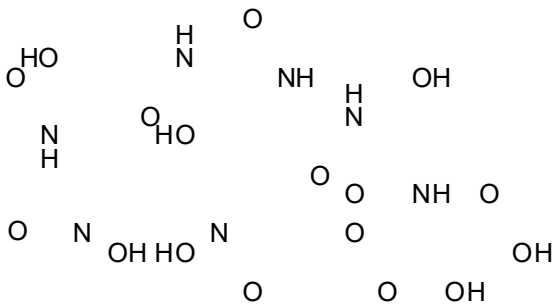
- 극지 생물 *Gersemia fruticosa*로부터 항미생물활성을 나타내는 4종의 신규 diterpenes을 발굴(1)

gersemiol A (**1**)　　Eunicellol A (**4**)

- 극지 생물 *Geodia barretti*로부터 항염증활성을 나타내는 3종의 신규 6-bromoindole 유도체를 발굴(2)

geobarrettin A (**1**)　　geobarrettin B (**2**)　　geobarrettin C (**3**)

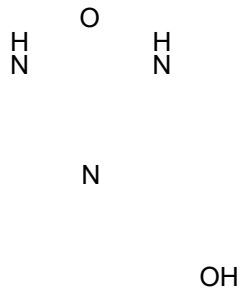
- 극지 박테리아 *Variovorax* sp.으로부터 항균활성을 나타내는 1종의 신규 depsipeptide를 발굴(3)



imaqobactin (**1**)

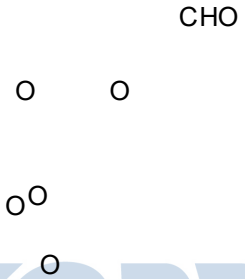
- 극지 생물 *Latrunculia biformis*로부터 항암활성을 나타내는 1종의 신규 pyrroloiminoquinone 발굴(4)

KOPRI 극지연구소



16,17-dehydrotsitsikammamine A (**2**)

- 극지 생물 *Plumarella delicatissima*으로부터 5종의 신규 furanocembranoid diterpenes 발굴(5)



keikipukalide A (**1**)

KOPRI 극지연구소

○ 항암-표적 Wnt/β-catenin 신호조절물질 연구동향

- Wnt/β-catenin 신호전달체계를 타겟으로 하는 화합물에 대한 연구는 다국적 제약 기업인 Norvartis사와 미국의 Genentech사에서 수행되고 있음.
- Novarivs사의 PKF115-584의 경우 Harvard 대학에서 발굴한 화합물로서 β-catenin과 전사 인자인 TCF-4 사이의 상호 작용을 방해하는 화합물로 대장암을 비롯한 전립선암, multiple myeloma에 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있음
- 미국의 Genentech사는 DVLp_C라는 폴리펩타이드 화합물로 disheveled 단백질의 PDZ 도메인에 리간드로 작용함으로서 Wnt/β-catenin 신호전달체계를 억제하고 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있음
- 2000년대 이후 β-catenin 단백질 저해제 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있지만, <u>아직까지 Wnt/β-catenin 신호전달을 표적으로 하는 항암제 개발은 초기 단계</u>에 머물러 있음
  - ✓ 곰팡이 유래 destruxin B, 식물 유래 hydnocarpin, tussilagone 등이 β-catenin 단백질의 증가를 억제하는 것으로 보고됨
  - ✓ 2-hydroxycinnamaldehyde 및 합성화합물인 LGK974은 breast cancer cell에

서 활성을 보이는 것으로 보고됨

- ✓ 식물 유래의 ursolic acid가 prostate cancer cell에서 Wnt signaling을 억제하여 apoptosis를 일으키는 것이 밝혀짐
- ✓ 곰팡이 유래의 PKF115-854 및 CGP049090 화합물이 β-catenin-TCF interaction을 조절하여 colon cancer cell proliferation을 억제하는 것으로 나타남
- ✓ FJ9 화합물이 Dishevelled의 한 domain인 PDZ domain과 Frizzled7 receptor와의 interaction을 저해함으로써 canonical Wnt pathway를 차단시켜 tumor cell growth를 억제시키며 tumor xenograft의 성장도 억제시킨다는 연구보고가 있음
- ✓ IWP (Inhibition of Wnt Protein) 계열 화합물: Wnt 생성에 필수적인 membrane-bound acyltransferase인 Porcupine(Porn)의 활성을 억제
- ✓ IWR (Inhibition of Wnt Response) 계열 화합물: Axin protein의 destruction을 억제
- ✓ XAV939 화합물: TNKS1/2를 타겟
- ✓ Pyrvinium (kinase inhibitor, FDA 승인약물): CK1α를 억제함으로써 Axin을 안정화시켜 β-catenin의 turnover를 촉진
- ✓ ICG-001: CBP를 타겟으로 하는 Wnt inhibitor로서 그 analogue가 현재 임상 1상에 올라 있음

KOPRI 극지연구소

제 7 장 참고문헌

(1) Angulo-Preckler, C., Genta-Jouve, G., Mahajan, N., de la Cruz, M., de Pedro, N., Reyes, F., Iken, K., Avila, C., Thomas, O, P. Gersemiols A-C and eunicellol A, diterpenoids from the arctic soft coral *Gersemia fruticosa*. *J. Na.t Prod.* 2016, **79**(4), 1132-6

(2) Di, X., Rouger, C., Hardardottir, I., Freysdottir, J., Molinski, T, F., Tasdemir, D., Omarsdottir, S. 6-Bromoindole Derivatives from the Icelandic Marine sponge *Geodia barretti*: Isolation and anti-inflammatory activity. *Mar. Drugs*. 2018, **16**(11), 437-54

(3) Robertson, A, W., McCarville, N, G., MacIntyre, L, W., Correa, H., Haltli, B., Marchbank, D, H., Kerr, R, G. Isolation of Imaqobactin, an Amphiphilic Siderophore from the Arctic Marine Bacterium *Variovorax* Species RKJM285. *J. Nat. Prod.* 2018, **81**(4), 858-65.

(4) Li, F., Janussen, D., Peifer, C., Pérez-Victoria, I., Tasdemir, D. Targeted Isolation of Tsitsikammamines from the Antarctic Deep-Sea Sponge *Latrunculia biformis* by Molecular Networking and Anticancer Activity. *Mar. Drugs.* 2018, **16**(8), 268-85.

(5) Thomas, S, A, L., von Salm, J, L., Clark, S., Ferlita, S., Nemani, P., Azhari, A., Rice, C, A., Wilson, N, G., Kyle, D, E., Baker, B, J. Keikipukalides, Furanocembrane Diterpenes from the Antarctic Deep Sea Octocoral Plumarella delicatissima. *J. Nat. Prod.* 2018, **81**(1), 117-23.

(6) Hwang, I, H., Oh, J., Zhou, W., Park, S., Kim, J, H. Chittiboyina, A, G., Ferreira, D., Song, G, Y., Oh, S., Na, M., Hamann, M, T. Cytotoxic activity of rearranged drimane meroterpenoids against colon cancer cells via down-regulation of β-catenin expression. *J. Nat. Prod.* 2015, **78**, 453-61.

(7) Kim, D., Lee, E, J., Lee, J., Leutou, A, S., Shin, Y, H., Choi, B., Hwang, J, S., Hahn, D. Choi, H., Chin, J., Cho, S, J., Hong, Y, D., Ko, J., Seong, C, N., Maloney, K, N., Oh, D, C., Yang, I., Hwang, H., Nam, S, J. Antartin, a Cytotoxic Zizaane-Type Sesquiterpenoid from a *Streptomyces* sp. Isolated from an Antarctic Marine Sediment. *Mar. Drugs*. 2018, **16**(4), 130-40.

(8) Moon, K., Ahn, C, H., Shin, Y., Won, T, H., Ko, K., Lee, S, K., Oh, K, B., Shin, J., Nam, S, I., Oh, D, C. New benzoxazine secondary metabolites from an arctic actinomycete. *Mar Drugs.* 2014, **12**(5), 2526-38.

KOPRI 극지연구소

뒷 면

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서 입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.