



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년12월18일  
(11) 등록번호 10-0785718  
(24) 등록일자 2007년12월07일

(51) Int. Cl.

A61K 31/33 (2006.01)

- (21) 출원번호 10-2000-7012954
- (22) 출원일자 2000년11월17일  
심사청구일자 2004년05월19일  
번역문제출일자 2000년11월17일
- (65) 공개번호 10-2001-0034867
- (43) 공개일자 2001년04월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US1999/011041  
국제출원일자 1999년05월19일
- (87) 국제공개번호 WO 1999/59578  
국제공개일자 1999년11월25일
- (30) 우선권주장  
60/085,997 1998년05월19일 미국(US)  
60/099,066 1998년09월03일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Phytochemistry, Vol. 45, 1997년, pp. 1717~1719

J. Natural Products, Vol. 60, 1997년, pp. 1105~1114

전체 청구항 수 : 총 66 항

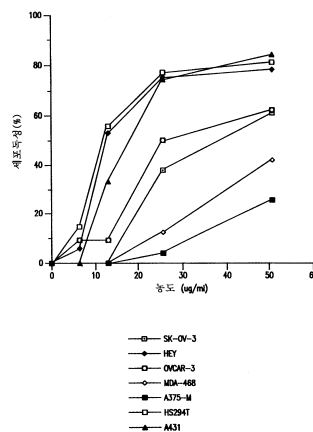
심사관 : 여호섭

(54) 트리테르펜 조성물

(57) 요약

본 발명은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 종으로부터 분리된 신규한 사포닌 혼합물 및 화합물, 및 이의 사용방법을 제공한다. 이들 화합물은 올리고삭카라이드 및 모노테르페노이드 잔기가 결합되어 있는 트리테르펜 잔기, 예를 들면, 아카신산 또는 올레아놀산을 함유할 수 있다. 이 혼합물 및 화합물은 세포의 세포소멸 및 세포독성 조절과 관련된 특성을 가지며, 다양한 종양세포에 대하여 강력한 항종양효과를 나타낸다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**굿터맨 조단 유**

미국 텍사스주 77004 휴스톤 헤르만 #30지 1701

**호프만 조셉 제이**

미국 아리조나주 85716 텍손 이스트 헨드릭 2718

**베일리 데이비드 티**

미국 콜로라도주 80302 보울더 오버룩 레인 328

**자야틸레이크 자미니 에스**

미국 콜로라도주 80020 브룸필드 울프 드라이브  
12347

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 그라나다, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 가나, 감비아, 남아프리카

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 짐바브웨, 감비아, 시에라리온

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

- a) 아카시아 빅토리아에(*Acacia victoriae*)의 꼬투리 또는 뿌리를 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 물, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 용매로 추출함으로써 분리되고;
- b) 1800 내지 2600 amu(atomic mass unit; 원자 질량 단위)의 분자량을 갖는 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 함유하며;
- c) 저켓 세포(Jurkat cell)에서 세포독성을 유도하는 능력이 있고;
- d) 저켓 세포에서 세포소멸을 유도하는 능력이 있음을 특징으로 하는, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 추출물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 저켓 세포에서 0.12 내지 0.40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 으로 세포독성을 유도하는 추출물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 세포소멸이 100 내지 400  $\text{ng}/\text{ml}$ 의 농도로 저켓 세포에 투여하는 경우에 유도되는 추출물.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 세포소멸이 200 내지 400  $\text{ng}/\text{ml}$ 의 농도로 저켓 세포에 투여하는 경우에 유도되는 추출물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 세포소멸이 아넥신 결합에 의한 저켓 세포의 원형질막의 재조직화에 의해 측정되는 추출물.

**청구항 6**

- a) 아카시아 빅토리아에의 꼬투리 또는 뿌리를 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 물, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 용매로 추출함으로써 분리되고;
- b) 1800 내지 2600 amu의 분자량을 갖는 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 함유하며;
- c) 저켓 세포에서 미토콘드리아로부터 시토크롬 c의 방출을 유도하는 능력이 있음을 특징으로 하는, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 추출물.

**청구항 7**

- a) 아카시아 빅토리아에의 꼬투리 또는 뿌리를 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 물, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 용매로 추출함으로써 분리되고;
- b) 1800 내지 2600 amu의 분자량을 갖는 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 함유하며;
- c) 저켓 세포에서 카스파제 3을 활성화시키는 능력이 있음을 특징으로 하는, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 추출물.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 카스파제 활성이 0.3 내지 1.6 형광단위/분/mg인 추출물.

**청구항 9**

- a) 아카시아 빅토리아에의 꼬투리 또는 뿌리를 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 물, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 용매로 추출함으로써 분리되고;

리되고;

b) 1800 내지 2600 amu의 분자량을 갖는 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 함유하며;

c) 저켓 세포에서 PARP[폴리-(ADP-리보즈) 폴리머라제]의 분해를 야기시키는 능력이 있음을 특징으로 하는, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 추출물.

**청구항 10**

a) 아카시아 빅토리아에의 꼬투리 또는 뿌리를 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 물, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 용매로 추출함으로써 분리되고;

b) 1800 내지 2600 amu의 분자량을 갖는 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 함유하며;

c) 저켓 세포에서 포스포이노시티드-3-키나제의 활성을 억제하는 능력이 있음을 특징으로 하는, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 추출물.

**청구항 11**

a) 아카시아 빅토리아에의 꼬투리 또는 뿌리를 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 물, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 용매로 추출함으로써 분리되고;

b) 피부 세포, 결장 세포, 자궁 세포, 난소 세포, 췌장 세포, 전립선 세포, 신장 세포, 폐 세포, 방광 세포 및 유방 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 포유동물 상피세포가 전악성 또는 악성상태로 개시 및 촉진되는 것을 억제하는 능력이 있음을 특징으로 하는, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 추출물.

**청구항 12**

a) 아카시아 빅토리아에의 꼬투리 또는 뿌리를 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 물, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 용매로 추출함으로써 분리되고;

b) 피부암 세포, 결장암 세포, 자궁암 세포, 난소암 세포, 췌장암 세포, 전립선암 세포, 신장암 세포, 폐암 세포, 방광암 세포 및 유방암 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 악성 포유동물 세포에서 세포소멸을 유도하는 능력이 있음을 특징으로 하는, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 추출물.

**청구항 13**

약리학적으로 허용되는 매질 내에 제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항의 추출물을 포함하는 영양학적 조성물.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 약리학적으로 허용되는 매질이 완충제, 용매, 희석제, 불활성 담체, 오일, 크림 또는 식용물질인 영양학적 조성물.

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

- a) 아카시아 빅토리아에 식물로부터 꼬투리 또는 뿌리 조직을 수득하고;
- b) 상기 조직을 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 물, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 용매로 추출하고;
- c) 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 수득함을 포함하여, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 추출물을 제조하는 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 조직이 꼬투리를 포함하는 방법.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 조직이 뿌리를 포함하는 방법.

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

제25항에 있어서, 추출단계 후에 여과에 의해 식물 찌꺼기로부터 추출물을 분리시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 31**

제25항에 있어서, 추출단계 전에 헥산, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 유기 용매로 탈지시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

제25항에 있어서, 수득단계가 크로마토그래피에 의해 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 분리함을 포함하는 방법.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 트리테르펜 글리코시드가 메탄올, 아세토니트릴, 물 또는 이들의 혼합물로 용출시킴으로써 분리되는 방법.

**청구항 35**

제33항에 있어서, 추출물을 액체 크로마토그래피를 사용하여 분리하는 방법.

**청구항 36**

제25항에 있어서, 추출단계 후에 용매를 증발시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 37**

- a) 아카시아 빅토리아에 식물의 꼬투리 또는 뿌리의 세포를 포함하는 조직 배양물을 제조하고;
- b) 상기 배양물로부터 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 물 및 이들의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 용매를 사용하여 트리테르펜 글리코시드 조성물을 추출함으로써 적어도 제1 트리테르펜 글리코시드 화합물을 추출함을 포함하여, 분리된 트리테르펜 글리코시드 조성물을 제조하는 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 조직 배양물이 모발상 뿌리 배양물을 포함하는 방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 조직 배양물이 아카시아 빅토리아에 식물의 꼬투리 또는 뿌리의 세포를 아그로박테리움 리조게네스(*Agrobacterium rhizogenes*) R-1000으로 감염시킴으로써 제조되는 방법.

**청구항 40**

제38항에 있어서, 조직 배양물이 3 내지 4중량%의 슈크로즈를 포함하는 방법.

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

제38항에 있어서, 추출단계 후에 트리테르펜 글리코시드 조성물로부터 식물 찌꺼기를 여과하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 43**

제38항에 있어서, 추출단계 후에 트리테르펜 글리코시드 조성물을 액체 크로마토그래피에 의해 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 44**

제38항에 있어서, 추출단계 후에 용매를 증발시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 45**

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

약리학적으로 허용되는 매질내에 제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 따르는 추출물을 포함하는, 피부암, 결장암, 자궁암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 폐암, 방광암 및 유방암으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 세포 증식성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

제51항에 있어서, 경구 투여용 약제학적 조성물.

청구항 55

제51항에 있어서, 국소 투여용 약제학적 조성물.

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

**청구항 62**

삭제

**청구항 63**

삭제

**청구항 64**

삭제

**청구항 65**

삭제

**청구항 66**

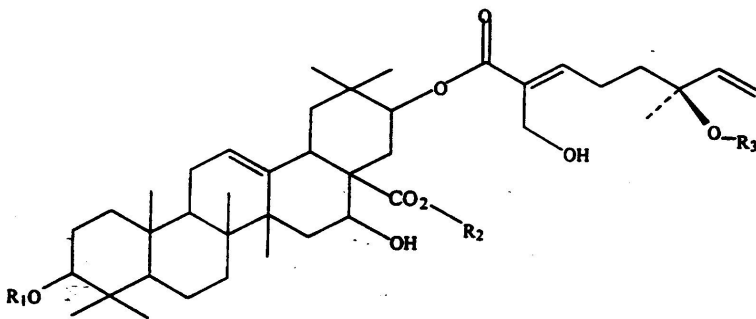
약리학적으로 허용되는 매질내에 제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 따르는 추출물을 포함하는, 염증을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

**청구항 67**

삭제

**청구항 68**

하기 화학식의 모노테르펜 잔기에 결합된 트리테르펜 잔기를 포함하는, 피부암, 결장암, 자궁암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 폐암, 방광암 및 유방암으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 세포 증식성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.



상기 식에서,

- a) R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 및 올리고삭카라이드로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
- b) R<sub>3</sub>은 수소, 하이드록실, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬렌, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 카보닐, 당 및 모노테르펜 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;
- c) 수소, 하이드록실, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬렌, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 카보닐, 당, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 에스테르 및 모노테르펜 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 추가의 R가 R<sub>3</sub>에 결합된다.

**청구항 69**

제68항에 있어서, R<sub>3</sub>이 당인 조성물.

**청구항 70**

제69항에 있어서, 당이 글루코즈, 푸코스, 람노즈, 아라비노즈, 크실로즈, 퀴노보즈, 말토즈, 글루쿠론산, 리보

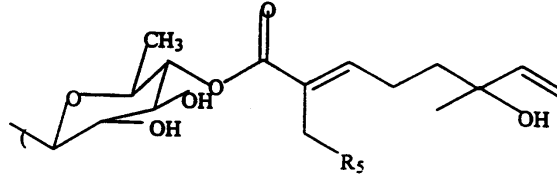


즈, N-아세틸 글루코사민 및 갈락토스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 71**

제70항에 있어서, 당에 결합된 모노테르펜 잔기를 추가로 함유하는 조성물.

**청구항 72**



제71항에 있어서, R<sub>3</sub>이 화학식 [여기서, R<sub>5</sub>는 수소, 하이드록실, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬렌, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 카보닐, 당, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 에스테르 및 모노테르펜 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다]을 갖는 조성물.

**청구항 73**

제72항에 있어서, R<sub>6</sub>가 수소 또는 하이드록실인 조성물.

**청구항 74**

제68항에 있어서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 각각 올리고사카라이드를 포함하는 조성물.

**청구항 75**

제74항에 있어서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 각각 모노사카라이드, 디사카라이드, 트리사카라이드 또는 테트라사카라이드를 포함하는 조성물.

**청구항 76**

제75항에 있어서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>가 각각 글루코즈, 푸코스, 람노즈, 아라비노즈, 크실로즈, 퀴노보즈, 말토즈, 글루쿠론산, 리보즈, N-아세틸 글루코사민 및 갈락토스로 이루어진 그룹으로부터 개별적으로 및 독립적으로 선택되는 당을 포함하는 올리고사카라이드를 포함하는 조성물.

**청구항 77**

제76항에 있어서, 하나 이상의 당이 메틸화된 조성물.

**청구항 78**

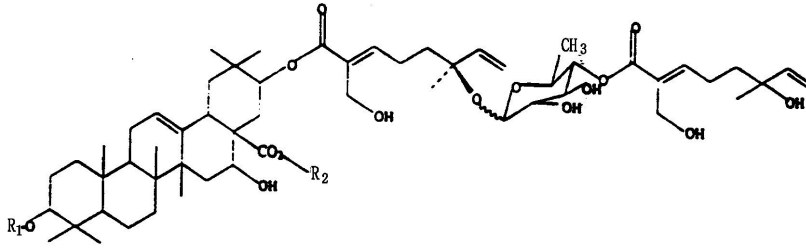
삭제

**청구항 79**

제68항에 있어서, 트리테르펜 잔기가 아카신산(acacic acid) 대신에 올레아놀산인 조성물.

**청구항 80**

하기 화학식을 갖는 트리테르펜 글리코시드를 포함하는, 피부암, 결장암, 자궁암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 폐암, 방광암 및 유방암으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 세포 증식성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

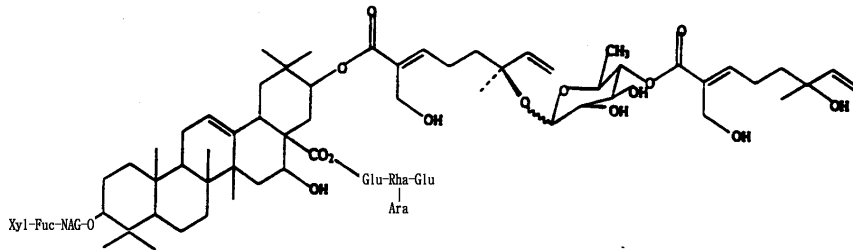


상기 식에서,

- a) R<sub>1</sub>은 N-아세틸 글루코사민, 푸코스 및 크실로즈를 포함하는 올리고삭카라이드이며;
- b) R<sub>2</sub>는 글루코즈, 아라비노즈 및 람노즈를 포함하는 올리고삭카라이드이다.

**청구항 81**

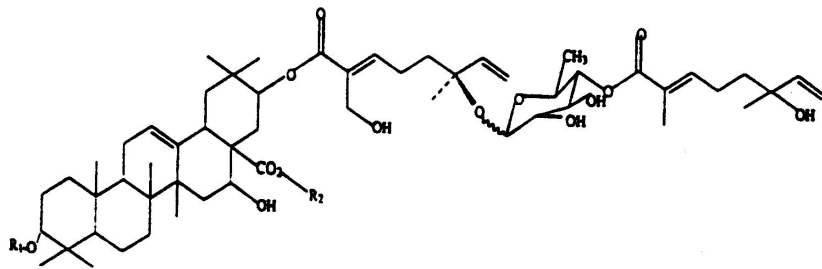
제80항에 있어서, 하기 화학식을 갖는 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 조성물.



상기 식에서, Xyl은 크실로즈를 나타내고, Fuc는 푸코스를 나타내며, NAG는 N-아세틸 글루코사민을 나타내고, Glu는 글루코즈를 나타내며, Rha는 람노즈를 나타내고, Ara는 아라비노즈를 나타낸다.

**청구항 82**

하기 화학식을 갖는 트리테르펜 글리코시드를 포함하는, 피부암, 결장암, 자궁암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 폐암, 방광암 및 유방암으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 세포 증식성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

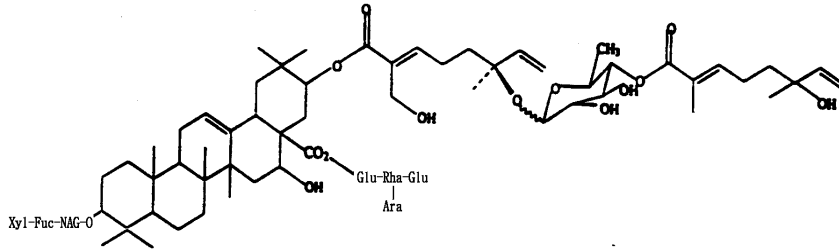


상기 식에서,

- a) R<sub>1</sub>은 N-아세틸 글루코사민, 푸코스 및 크실로즈를 포함하는 올리고삭카라이드이며;
- b) R<sub>2</sub>는 글루코즈, 아라비노즈 및 람노즈를 포함하는 올리고삭카라이드이다.

**청구항 83**

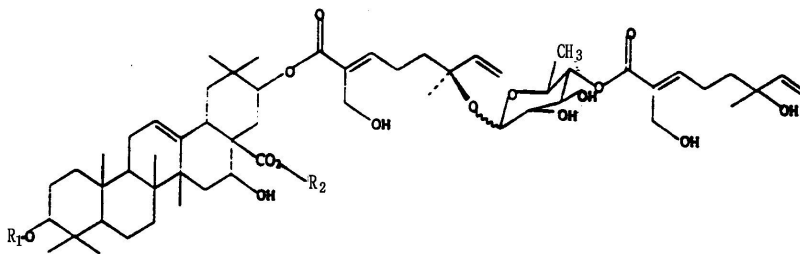
제82항에 있어서, 하기 화학식을 갖는 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 조성물.



상기 식에서, Xyl은 크실로즈를 나타내고, Fuc는 푸코스를 나타내며, NAG는 N-아세틸 글루코사민을 나타내고, Glu는 글루코즈를 나타내며, Rha는 람노즈를 나타내고, Ara는 아라비노즈를 나타낸다.

**청구항 84**

하기 화학식을 갖는 트리테르펜 글리코시드를 포함하는, 피부암, 결장암, 자궁암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 폐암, 방광암 및 유방암으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 세포 증식성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

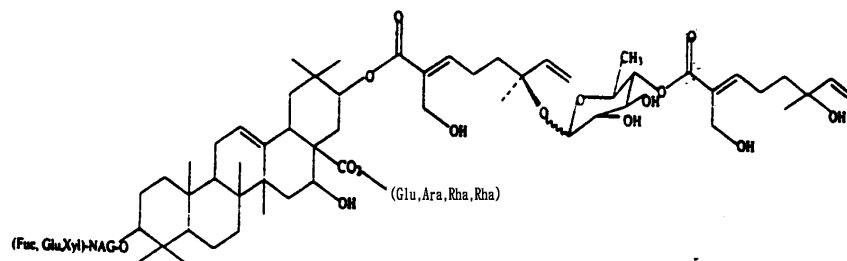


상기 식에서,

- a) R<sub>1</sub>은 N-아세틸 글루코사민, 글루코즈, 푸코스 및 크실로즈를 포함하는 올리고사카라이드이며;
- b) R<sub>2</sub>는 글루코즈, 아라비노즈 및 람노즈를 포함하는 올리고사카라이드이다.

**청구항 85**

제84항에 있어서, 하기 화학식을 갖는 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 조성물.



상기 식에서, (Glu, Ara, Rha, Rha)는 1개의 글루코즈, 1개의 아라비노즈 및 2개의 람노즈로 구성되는 올리고사카라이드를 나타내고; (Fuc, Glu, Xyl)은 1개의 푸코스, 1개의 글루코즈 및 1개의 크실로즈로 구성되는 올리고사카라이드를 나타내며; NAG는 N-아세틸 글루코사민을 나타낸다.

**청구항 86**

삭제

**청구항 87**

아카신산 또는 올레아놀산으로부터 선택되는 트리테르펜 잔기, 올리고사카라이드 및 3개의 모노테르펜 단위를 포함하는, 피부암, 결장암, 자궁암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 폐암, 방광암 및 유방암으로 이루어지

는 그룹으로부터 선택되는 세포 증식성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

**청구항 88**

약리학적으로 허용되는 매질 내에 제68항 내지 제77항, 제79항 내지 제85항 및 제87항 중의 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 피부암, 결장암, 자궁암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 폐암, 방광암 및 유방암으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 세포 증식성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

**청구항 89**

제88항에 있어서, 약리학적으로 허용되는 매질이 완충제, 용매, 희석제, 불활성 담체, 오일, 크림 또는 식용물 질인 약제학적 조성물.

**청구항 90**

제88항에 있어서, 추가로 표적화제(targeting agent)를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 91**

제90항에 있어서, 표적화제가 약제학적 조성물의 암 세포로의 전달을 지시하는 약제학적 조성물.

**청구항 92**

제91항에 있어서, 표적화제가 암 세포에 결합하는 항체를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 93**

삭제

**청구항 94**

삭제

**청구항 95**

삭제

**청구항 96**

삭제

**청구항 97**

제88항에 있어서, 경구 투여용 약제학적 조성물.

**청구항 98**

제88항에 있어서, 국소 투여용 약제학적 조성물.

**청구항 99**

제88항에 있어서, 종양내 주사 투여용 약제학적 조성물.

**청구항 100**

제88항에 있어서, 정맥내 투여용 약제학적 조성물.

**청구항 101**

제88항에 있어서, 에어로졸 흡입 투여용 약제학적 조성물.

**청구항 102**

제88항에 있어서, 암 세포에 X-선, UV,  $\gamma$ 선 또는 극초단파를 조사함을 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 103**

삭제

**청구항 104**

삭제

**청구항 105**

삭제

**청구항 106**

삭제

**청구항 107**

삭제

**청구항 108**

삭제

**청구항 109**

삭제

**청구항 110**

삭제

**청구항 111**

삭제

**청구항 112**

삭제

**청구항 113**

삭제

**청구항 114**

약리학적으로 허용되는 매질 내에 제68항 내지 제77항, 제79항 내지 제85항 및 제87항 중의 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 염증을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

**청구항 115**

삭제

**청구항 116**

제114항에 있어서, 경구 투여용 약제학적 조성물.

**청구항 117**

제114항에 있어서, 국소 투여용 약제학적 조성물.

**청구항 118**

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

## 명세서

<1> 발명의 배경

<2> 1. 발명의 분야

<3> 본 발명은 일반적으로 약품 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 포유 동물에서 치료학적 용도를 갖는 신규한 식물성 화합물을 수득하는 방법에 관한 것이다

<4> 2. 관련 기술의 설명

<5> 식물은 신규한 생물학적 활성분자의 동정을 위한 유용한 공급원이다. 식물에서 동정된 분자들의 한가지 다양한 부류는 사포닌 부류이다. 사포닌은 트리테르펜 또는 스테로이드 아글리콘에 연결된 당 잔기를 갖는 글리코시드를 포함하는 고분자량 화합물이다. 트리테르펜 사포닌은 특히 그들의 생물학적 특성으로 인하여 큰 관심의 대상이 되고 있다.

- <6> 다양한 식물종으로부터 유래한 트리테르펜 사포닌의 살진균, 항바이러스, 항돌연변이, 살정자 또는 피임, 심혈관계 및 소염 활성을 포함한 약리학적 및 생물학적 특성이 연구되어 왔다 (Hostettmann *et al.*, 1995). 사포닌은 혈장 지질과 결합함으로써 콜레스테롤과 복합체를 형성하는 것으로 알려져 있다 (Oakenfull *et al.*, 1983). 사료에 공급된 트리테르펜 글리코시드는 또한 실험동물의 혈액 및 조직에서 콜레스테롤의 양을 저하시키는 것으로 나타났다 (Cheeke, 1971). 사포닌은 다수의 민간요법 치료제 및 더욱 최근에 개발된 식물 약물 중의 일부의 구성성분인 것으로 동정되었다.
- <7> 트리테르펜 글리시레틴산 및 그의 특정한 유도체는 항궤양, 소염, 항알레르기, 간염치료 및 항바이러스 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 특정의 글리시레틴산 유도체는 위궤양을 예방 또는 치료할 수 있다 (Doll *et al.*, 1962). 본 기술분야에서 공지된 이러한 화합물중에는 카르베녹솔론 (미합중국특허 제 3,070,623호), 3' 위치에 치환체를 갖는 글리시레틴산 에스테르 유도체 (미합중국특허 제 3,070,624호), 글리시레틴산의 아미노산염 (일본국특허공보 제 JP-A-44-32798호), 글리시레틴산의 아미드 유도체 (벨기에특허 제 753773호), 및 11-데옥소글리시레틴산의 아미드 유도체 (영국특허 제 1346871호)가 있다. 글리시레틴산은 5-리폭시게나제 활성을 포함하여 류코트리엔 생합성에 관여하는 효소를 억제하는 것으로 밝혀져 있으며, 이것은 보고된 소염활성에 관여하는 것으로 생각된다 (Inoue *et al.*, 1986).
- <8> 펜타사이클릭 트리테르펜인 베틀린산은 nude 마우스 이종조직이식 (xenograft) 모델에서 사람의 흑색종 종양 성장에 대한 선택적 억제제인 것으로 보고되었으며, 세포소멸을 유도함으로써 세포독성을 야기시키는 것으로 밝혀졌다 (Pisha *et al.*, 1995). 쿠쿠르비타세 (Cucurbitaceae) 과의 한의약용 식물로부터 유래한 트리테르펜 사포닌은 항종양 활성을 나타내었다 (Kong *et al.*, 1993). 트리테르펜의 모노글리코시드는 MOLT-4 사람 백혈병 세포에 대하여 강력하며 선택적인 세포독성을 나타내는 것으로 밝혀졌으며 (Kasiwada *et al.*, 1992), 이리다세 (Iridaceae) 과의 특정한 트리테르펜 글리코시드는 종양의 성장을 억제하고 에를리히 (Ehrlich) 복수암이 이식된 마우스의 수명을 연장시켰다 (Nagamoto *et al.*, 1988). 레구미노세 (Leguminosae) 과에 속하는 식물 돌리코스 팔카투스 (*Dolichos falcatus*)로부터 유래한 사포닌 제제는 시험관내 및 생체내에서 육종-37 세포에 대해 효과적인 것으로 보고되었다 (Huang *et al.*, 1982). 역시 레구미노세 과로부터 유래한 대두 사포닌은 다수의 종양에 대해 효과적인 것으로 밝혀졌다 (Tomas-Barbaren *et al.*, 1988). 용혈활성 및 연체동물박멸 활성을 나타내는 올레아놀산 및 집소게닌 글리코시드는 스마르찌아 마다가스카리엔시스 (*Swartzia madagascariensis*) (Leguminosae)의 지상과일 꼬투리 (ground fruit pod)로부터 분리되었다 (Borel and Hostettmann, 1987).
- <9> 콩 산물로부터 분리된 천연적으로 존재하는 이소플라보노이드인 게니스타인은 에스트로젠-포지티브 및 에스트로젠-네가티브 유방암 세포주의 증식을 억제하는 것으로 밝혀진 티로신 키나제 억제제이다 (Akiyama *et al.*, 1987). 식물계에 풍부하며 곡물 및 콩류의 천연 식이성분인 이노시톨 핵사포스페이트 (파이틴산)는 결장암 세포주의 말단분화를 야기시키는 것으로 밝혀졌다. 파이틴산은 또한 생체내에서 실험적 결장 및 포유동물 발암현상에 대해 항종양 활성을 나타낸다 (Yang *et al.*, 1995). 몇가지 트리테르펜 아글리콘은 또한 세포독성 또는 세포증식억제 특성을 갖는 것으로 입증되었는데, 즉 식물 크로소프테릭스 페브리푸가 (*Crossopteryx febrifuga*) (Rubiaceae)로부터의 줄기 껍질은 ng/ml 범위에서 Co-115 사람 결장암 세포주에 대해 세포증식억제성을 나타내는 것으로 밝혀졌다 (Tomas-Barbaren *et al.*, 1988).
- <10> 이전의 보고들은 다양한 용도 중의 어떤 것을 갖는 트리테르펜 화합물을 동정하였지만, 본 기술분야에서는 아직도 신규한 생물학적 활성 트리테르펜 화합물을 동정하고자 하는 큰 필요성이 있다. 이들 화합물은 대부분 정상적인 포유 동물 세포에 대해서 독성이다. 더구나, 이전에 동정된 트리테르펜의 생물학적 활성은 광범하게 변하며, 대부분 소정의 사람 또는 포유 동물 질병의 치료에서 제한되거나 가변적인 정도의 효능을 갖는다. 동정된 상이한 트리테르펜의 매우 큰 다포지티브 및 밀접하게 관련된 트리테르펜 화합물 중에서조차도 관찰되는 생물학적 활성에 있어서의 큰 범위의 차이 및 비예측성으로 인하여 잠재적인 치료제인 트리테르펜을 얻는 데에는 어려움이 있다. 유익한 생물학적 활성을 갖는 신규한 트리테르펜을 동정한다는 어려운 목표를 달성함으로써 현재 치료학적 선택방법이 제한되어 있는 다양한 셋트의 사람의 질병을 치료하기 위한 완전히 새로운 방법이 제공될 수 있었다.
- <11> **발명의 요약**
- <12> 본 발명은 생물학적으로 유용한 신규한 화합물의 분리를 위한 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) (Benth.) (Leguminosae) 꼬투리 (pod) 및 뿌리의 신규한 용도에 관한 것이다. 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 종자는 여러세대에 걸쳐서 오스트레일리아의 원주민들에 의해 식품재료의 공급원으로서 사용되어 왔다 (Lister *et al.*, 1996). 그러나, 꼬투리와 뿌리는 폐기물질로서 버려졌었다. 따라서, 본 발명의 발명자들은

이전에 사용되지 않았던 식물의 부분으로부터 신규한 향암 및 그밖의 다른 생물학적으로 유용한 화합물의 존재를 입증하였다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 신규한 생물학적 활성 사포닌 화합물은 종종 악성세포에 대해 특이적으로 세포독성을 나타낸다.

- <13> 한 양태에서, 본 발명은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 종으로부터 분리될 수 있는 신규한 사포닌 화합물 및 그의 혼합물, 및 이들의 사용방법을 제공한다. 이와 관련하여, 본 발명의 한 양태는 트리테르펜 또는 다른 방향족 테르페노이드 조성을 함유하는 사포닌 조성물을 제공하는 것이다. 본 명세서에 기술된 사포닌은 또한 글리코시드성 그룹을 함유할 수도 있다.
- <14> 사포닌이 트리테르펜 잔기를 함유하는 경우의 바람직한 양태에서, 이 트리테르펜 잔기는 일반적으로 아카신산 (acacic acid) 또는 올레아놀산 또는 그밖의 다른 구조적으로 유사한 트리테르페노이드 잔기이다. 트리테르펜 또는 트리테르펜 글리코시드 조성물은 또한 일반적으로 모노테르펜 잔기 또는 잔기들을 함유할 수 있으며, 본 기술분야에서 숙련된 전문가가 본 명세서에 기술된 사포닌 조성물이 추가로 다른 화학적 작용기에 의해 치환될 수 있음을 인지할 수 있을 것이다. 따라서, 본 명세서에 기술된 사포닌 화합물은 적어도 하나, 바람직하게는 2, 3 또는 그 이상의 모노테르펜 잔기에 결합된 트리테르펜 잔기를 함유할 수 있다. 하나 이상의 모노테르펜 잔기가 존재하는 경우에, 이들 잔기는 각각 (i) 트리테르펜 잔기에 직접 결합될 수 있거나, (ii) 트리테르펜 잔기에 결합된 당 또는 다른 링커 그룹 (linking group)에 결합될 수 있거나, 또는 (iii) 직접 또는 당이나 다른 링커 그룹을 통해서 트리테르펜 잔기에 결합된 모노테르펜 잔기에 결합될 수 있다. 링커 그룹에는 당, 아실, 아미드, 알콕시, 케틸, 알킬, 알킬렌 및 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 명백한 그밖의 다른 유사한 화학적 잔기가 포함된다. 본 명세서에 기술된 트리테르펜 글리코시드는 일반적으로 1800 내지 2600 amu 범위 또는 적어도 1800, 1900, 2000, 2100 amu 내지 약 2200, 2300, 2400 또는 2600 amu 범위의 분자량을 갖는다.
- <15> 본 발명의 중요한 관점은 다음과 같은 특성, 즉 a) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직으로부터 분리할 수 있으며; b) 약 1800 내지 약 2600 amu의 분자량을 갖는 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 함유하고; c) 저켓 세포 (Jurkat cell)에서 세포독성을 유도하는 능력이 있으며; d) 저켓 세포에서 세포소멸을 유도하는 능력이 있음을 특징으로 하는, 하나 이상의 분리된 사포닌 또는 트리테르펜 글리코시드를 함유하는 혼합물의 분리를 제공하는 것이다.
- <16> 본 발명의 특별한 관점에서, 트리테르펜 조성물은 다음과 같은 특성, 즉 약 0.12 내지 약 0.40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 으로 저켓 세포에서 세포독성을 유도하는 능력을 특징적으로 나타낼 수 있다. 본 발명의 다른 양태에서, 세포소멸은 약 100 내지 약 400  $\text{ng}/\text{ml}$ 의 농도로 저켓 세포에 투여하였을 때 유도된다. 본 발명의 추가의 양태에서, 세포소멸은 약 200 내지 약 250, 300, 350 또는 400  $\text{ng}/\text{ml}$ , 또는 약 300 내지 약 350 또는 400  $\text{ng}/\text{ml}$ 의 농도로 저켓 세포에 투여하였을 때 유도된다.
- <17> 본 발명의 또 다른 양태에서, 세포소멸은 아넥신 결합에 의한 저켓 세포의 재조직화 (reorganization)에 의해 측정된다. 이것은 유동세포계산 (flow cytometry)에 의해 측정될 수 있으며, 유도된 세포소멸은 16-18% 일수 있다.
- <18> 본 발명의 또 다른 양태는 다음과 같은 특성, 즉 a) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직으로부터 분리할 수 있으며; b) 약 1800 내지 약 2600의 분자량을 갖는 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 함유하고; c) 저켓 세포에서 미토콘드리아로부터 시토크롬 c의 유리를 유도하는 능력이 있음을 특징으로 하는, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 함유하는 혼합물을 포함한다.
- <19> 또 다른 본 발명의 양태는 다음과 같은 특성, 즉 a) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직으로부터 분리할 수 있으며; b) 약 1800 내지 약 2600의 분자량을 갖는 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 함유하고; c) 저켓 세포에서 카스파제-3을 활성화시키는 능력이 있으며, 여기에서 카스파제 활성은 약 0.3 내지 약 1.6 형광단위/분/mg의 범위임을 특징으로 하는, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 함유하는 혼합물을 포함한다.
- <20> 본 발명의 또 다른 양태에서, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 함유하는 혼합물은 다음과 같은 특성, 즉 a) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직으로부터 분리할 수 있으며; b) 약 1800 내지 약 2600의 분자량을 갖는 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 함유하고; c) 저켓 세포에서 PARP의 분해를 야기시키는 능력이 있음을 특징으로 할 수 있다.
- <21> 본 발명의 추가의 양태에서, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 함유하는 혼합물은 다음과 같은 특성, 즉 a) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직으로부터 분리할 수 있으며; b) 약 1800 내지 약



2600의 분자량을 갖는 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 함유하고; c) 저켓 세포에서 PI-3-키나제의 활성을 억제하는 능력이 있음을 특징으로 할 수 있다.

- <22> 본 발명의 다른 양태에서, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 함유하는 혼합물은 다음과 같은 특성, 즉 a) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직으로부터 분리할 수 있으며; b) 포유 동물 상피세포의 전 악성 또는 악성 상태로 개시되거나 촉진되는 것을 억제하는 능력이 있음을 특징으로 할 수 있다.
- <23> 본 발명의 또 다른 양태에서, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드를 함유하는 혼합물은 다음과 같은 특성, 즉 a) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직으로부터 분리할 수 있으며; b) 악성 포유 동물 세포에서 세포소멸을 유도하는 능력이 있음을 특징으로 할 수 있다.
- <24> 본 발명의 중요한 관점은 완충제, 용매, 희석제, 불활성 담체, 오일, 크림 또는 식용물질과 같은 약제학적으로 허용되는 매질 내에 트리테르펜 글리코시드를 함유하는 영양학적 조성물 (nutraceutical composition)을 제공하는 것이다. 본 발명의 한가지 양태에서, 영양학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 매질 내에 건조 및 분쇄된 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 뿌리, 꼬투리 또는 이들의 배합물을 함유할 수도 있다. 본 명세서에 기술된 영양학적 조성물은 일반적으로 정제, 캡슐제 또는 연고제의 형태일 수 있다.
- <25> 또 다른 관점에서, 본 발명은 a) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 식물로부터 조직을 수득하고; b) 조직을 용매로 추출하여 추출물을 수득하고; c) 추출물로부터 하나 이상의 트리테르펜 글리코시드를 수득함을 특징으로하여, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드의 혼합물을 함유하는 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에서 사용된 조직은 일반적으로 꼬투리, 뿌리, 실생 (seedlings) 또는 이들의 혼합물로 이루어진다. 추출에 사용된 용매는 목적으로하는 사포닌 화합물을 주로 용해시킴으로써 추출할 수 있는 어떠한 유기 용매라도 될 수 있다. 유용한 추출용매는 메탄올, 에탄올, 이소프로필알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트, 물, 글리세롤 및 이들의 혼합물이다.
- <26> 이 방법은 추가의 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이 방법은 추출한 후에 여과함으로써 식물 찌꺼기 (bagasse)로부터 조성물을 추가로 분리시키는 단계를 포함할 수 있다. 추가의 양태에서, 이 방법은 추출하기 전에 유기 용매로 식물조직을 탈지시키는 단계를 추가로 포함한다. 유기 용매는 헥산, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합물과 같이 탈지에 적합한 어떠한 용매라도 될 수 있다. 또 다른 양태에서는, 분리방법이 추출한 후에 용매를 증발시키는 단계를 추가로 포함한다.
- <27> 이 방법은 또한, 적어도 트리테르펜 글리코시드 조성물을 크로마토그래피에 의해 분리시킴으로써 트리테르펜 조성물의 혼합물을 수득하는 것을 포함할 수 있다. 크로마토그래피 기술의 예로는 액체 크로마토그래피, MPLC 또는 HPLC가 포함된다. 크로마토그래피 분리를 위해 사용될 수 있는 용매는 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 명백하겠지만, 용매의 예를들면 메탄올, 아세토니트릴, 물 및 이들의 혼합물이 포함된다.
- <28> 또 다른 관점에서, 본 발명은 a) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 식물의 세포를 포함하는 조직 배양물을 제조하고; b) 용매를 사용하여 세포로부터 트리테르펜 조성물을 추출함으로써 조직으로부터 적어도 제1 트리테르펜 화합물이 추출되도록 함을 특징으로 하여, 하나 이상의 분리된 트리테르펜 글리코시드의 혼합물을 함유하는 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 한가지 관점에서, 조직 배양물은 모발상 뿌리(hairy root) 배양물을 포함한다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 조직 배양물은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 세포를 아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*) R-1000으로 감염시킴으로써 제조된다. 본 발명의 관련된 관점에서, 조직 배양물은 약 3 중량% 내지 약 4 중량%의 슈크로스를 함유하는 배지를 포함한다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 조성물을 추출하기 위해 사용되는 용매는 메탄올, 에탄올, 이소프로필알콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트, 물 또는 이들의 혼합물이다.
- <29> 본 발명의 또 다른 관점에서, 방법은 트리테르펜 혼합 조성물로부터 식물 찌꺼기를 여과하고 트리테르펜 혼합조성물을 액체 크로마토그래피에 의해 분리하고/하거나 추출단계 후에 용매를 증발시키는 것과 같은 추가의 단계를 포함한다.
- <30> 본 발명의 한가지 관점에서는 본 발명의 활성 화합물을 추출해 낼 수 있는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 식물의 조직을 연속적으로 번식시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 한가지 양태에서는, 배양배지 내에서 아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*) R-1000으로 감염된 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 식물의 세포를 포함하는 모발상 뿌리 조직 배양물이 기술되어 있다. 관련된 양태에서, 조직 배양배지는 약 3% 내지 약 4%의 슈크로스를 함유한다.
- <31> 본 발명의 또 다른 관점은 a) 수경성장 시스템 (hydroponic growth system)에서 아카시아 빅토리아에 (*Acacia*

*victoriae*) 식물을 배양하고; b) 식물로부터 연간 약 1 내지 약 4회에 걸쳐 식물을 사멸시키지 않으면서 조직을 수확함을 특징으로 하여 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 식물조직을 연속적으로 수확하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 관련된 양태에서, 성장시스템은 에어로포닉 (aeroponic) 시스템이다. 본 발명의 또 다른 관련된 양태에서, 배양을 위해 사용된 조직은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 뿌리 조직이다.

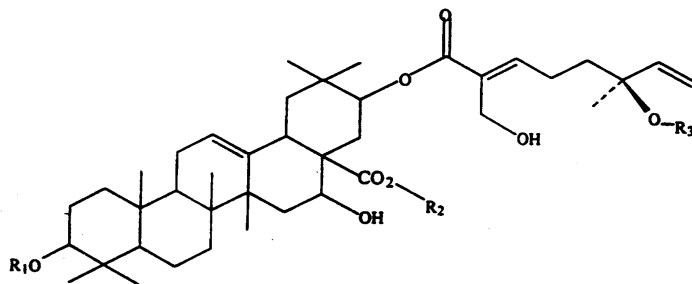
<32> 본 발명의 중요한 관점은 포유 동물 세포에 상술한 영양학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함을 특징으로 하여 포유 동물 상피세포가 전악성 또는 악성 상태로 개시되거나 촉진되는 것을 억제하는 방법을 제공하는 것이다. 한가지 양태에서, 상피세포는 피부세포, 결장세포, 자궁세포, 난소세포, 췌장세포, 전립선세포, 신장세포, 폐세포, 방광세포 또는 유방세포이다. 관련된 양태에서, 포유 동물은 사람이다. 또 다른 관련된 양태에서, 영양학적 조성물의 투여방법은 경구투여이다. 본 발명의 아직도 또 다른 관련된 양태에서, 영양학적 조성물의 투여방법은 국소투여이다.

<33> 본 발명은 또한 상술한 영양학적 조성물의 치료학적 유효량을 세포에 투여함을 특징으로 하여 악성 포유 동물 세포에서 세포소멸을 유도하는 방법을 포함한다. 한가지 양태에서, 세포는 피부세포, 결장세포, 자궁세포, 난소세포, 췌장세포, 전립선세포, 신장세포, 폐세포, 방광세포 또는 유방세포이다. 관련된 양태에서, 포유 동물은 사람이다. 또 다른 관련된 양태에서, 영양학적 조성물의 투여방법은 경구투여이다. 본 발명의 아직도 또 다른 관련된 양태에서, 영양학적 조성물의 투여방법은 국소투여이다.

<34> 본 발명은 또한 상술한 영양학적 조성물의 치료학적 유효량을 포유 동물 세포 또는 포유 동물에 투여함을 특징으로 하여 시험관내에서 또는 포유 동물에서 포유 동물 상피세포의 비정상적인 증식을 예방하는 방법을 포함한다. 한가지 양태에서, 상피세포는 음와세포 (crypt cell)이다. 또 다른 본 발명의 관점에서, 상피세포는 결장세포이다. 본 발명의 관련된 양태에서, 포유 동물은 사람이다. 본 발명의 또 다른 관련된 양태에서, 생체내 적용을 위한 영양학적 조성물의 투여방법은 경구투여이다.

<35> 본 발명은 또한 상술한 영양학적 조성물의 치료학적 유효량을 포유 동물에게 투여함을 특징으로 하여 포유 동물의 염증을 치료하는 방법을 포함한다. 본 발명의 관련된 양태에서, 포유 동물은 사람이다.

<36> 본 발명은 또한 이하의 화학식을 갖는 모노테르펜 잔기에 결합된 트리테르펜 잔기를 함유하는 정제된 트리테르펜 화합물 또는 이의 약제학적 제형을 포함한다:



<37>

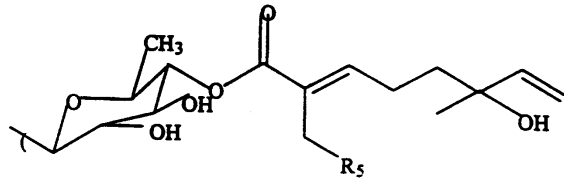
<38> 상기식에서,

<39> a) R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 및 올리고삭카라이드로 구성된 그룹으로부터 선택되고;

<40> b) R<sub>3</sub>는 수소, 하이드록실, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬렌, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬카보닐, 당 및 모노테르펜 그룹으로 구성된 그룹으로부터 선택되며;

<41> c) 화학식은 또한 R<sub>4</sub>를 포함하는데, 여기에서 R<sub>4</sub>는 수소, 하이드록실, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬렌, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬카보닐, 당, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬에스테르 및 모노테르펜 그룹으로 구성된 그룹으로부터 선택되고, R<sub>4</sub>는 트리테르펜 잔기 또는 모노테르펜 잔기에 결합될 수 있다.

<42> 본 발명은 또한, R<sub>3</sub>이 당인 화합물을 대상으로 한다. 본 발명의 관련된 양태에서, 당은 글루코즈, 푸코스, 람노즈, 아라비노즈, 크실로즈, 퀴노보즈, 말토즈, 글루쿠론산, 리보즈, N-아세틸글루코사민 및 갈락토스로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 그밖의 다른 본 발명의 관련된 양태에서, 화합물은 추가로 당에 결합된 모노테르펜

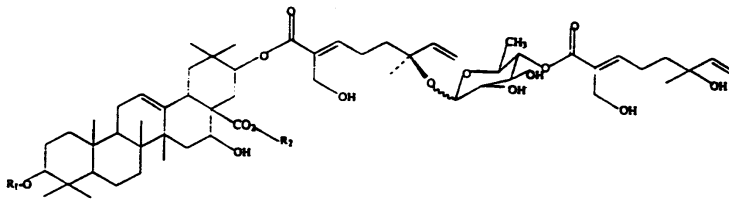


잔기를 함유한다. 본 발명은 또한, R<sub>3</sub>이 하기 화학식 [여기서, R<sub>5</sub>는 수소, 하이드록실, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬렌, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬카보닐, 당, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬에스테르 및 모노테르펜 그룹으로 구성된 그룹으로부터 선택된다]을 나타내는 화합물을 포함한다.

<43> 본 발명의 한가지 양태에서, R<sub>5</sub>는 수소 또는 하이드록실이다. 본 발명의 또 다른 양태에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 올리고삭카라이드로 이루어진다. 또 다른 본 발명의 양태에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 모노삭카라이드, 디삭카라이드, 트리삭카라이드 또는 테트라삭카라이드를 포함한다. 본 발명의 관련된 양태에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 글루코즈, 푸코즈, 람노즈, 아라비노즈, 크실로즈, 퀴노보즈, 말토즈, 글루쿠론산, 리보즈, N-아세틸글루코사민 및 갈락토즈로 구성된 그룹으로부터 별도로 독립적으로 선택되는 당으로 이루어진다. 본 발명의 추가의 관점에서, 하나 이상의 당은 메틸화된다.

<44> 본 발명의 한가지 양태에서, R<sub>4</sub>는 트리테르펜 잔기에 결합된 메틸렌 탄소 중의 하나를 통해서 트리테르펜 잔기에 결합된다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 트리테르펜 잔기는 아카신산 대신에 올레아놀산이다.

<45> 본 발명의 또 다른 양태는 하기 화학식을 갖는 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적 제형에 관한 것이다:



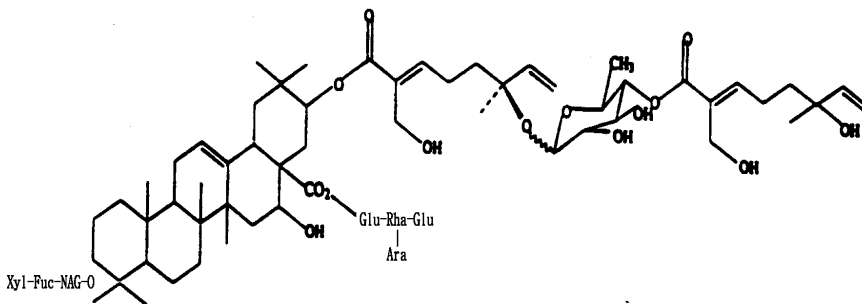
<46>

<47> 상기 식에서,

<48> a) R<sub>1</sub>은 N-아세틸 글루코사민, 푸코스 및 크실로즈로 이루어진 올리고삭카라이드이며;

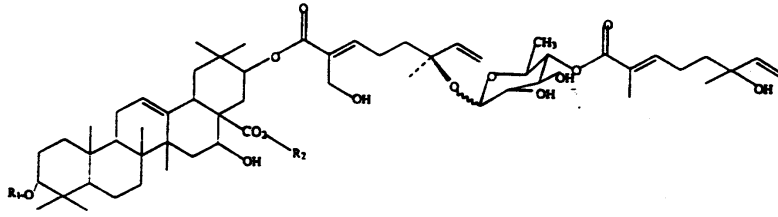
<49> b) R<sub>2</sub>는 글루코즈, 아라비노즈 및 람노즈로 이루어진 올리고삭카라이드이다.

<50> 관련된 양태로는, 하기 화학식을 갖는 화합물 또는 이의 약제학적 제형이 기술되어 있다:



<51>

<52> 본 발명의 또 다른 관점은 하기 화학식을 갖는 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적 제형의 정제방법을 제공하는 것이다:



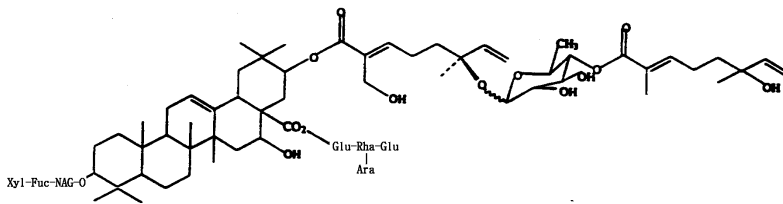
<53>

<54> 상기 식에서,

<55> a) R<sub>1</sub>은 N-아세틸 글루코사민, 푸코스 및 크실로스로 이루어진 올리고삭카라이드이며;

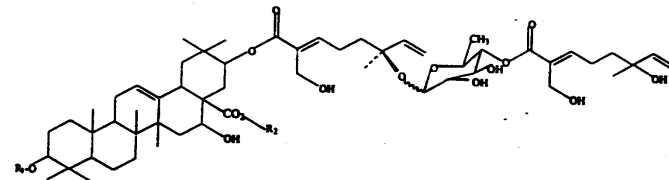
<56> b) R<sub>2</sub>는 글루코즈, 아라비노즈 및 람노즈로 이루어진 올리고삭카라이드이다.

<57> 본 발명의 추가의 관련된 관점은 하기 화학식을 갖는 조성물 또는 이의 약제학적 제형을 정제 및 특정화하는 방법을 제공한다:



<58>

<59> 또한, 본 발명의 또 다른 관점은 하기 화학식을 갖는 트리테르펜 글리코시드를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적 제형의 정제방법을 제공하는 것이다:



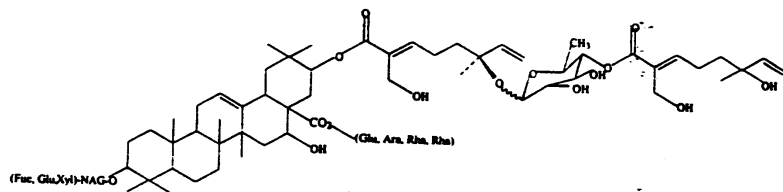
<60>

<61> 상기 식에서,

<62> a) R<sub>1</sub>은 N-아세틸 글루코사민, 글루코즈, 푸코스 및 크실로스로 이루어진 올리고삭카라이드이며;

<63> b) R<sub>2</sub>는 글루코즈, 아라비노즈 및 람노즈로 이루어진 올리고삭카라이드이다.

<64> 본 발명의 관련된 관점은 하기 화학식을 갖는 조성물을 정제 및 특정화하는 방법을 제공한다:



<65>

<66> 본 발명의 또 다른 관점에서는 트리테르펜 잔기, 올리고삭카라이드 및 3개의 모노테르펜 단위를 함유하는 조성물이 제공된다. 한가지 양태에서, 트리테르펜 잔기는 아카신산 또는 올레아놀산이다.

<67> 본 발명의 중요한 관점에는 정제되고 특정화된 화합물의 약제학적 제형이 포함된다. 한가지 양태에서, 약제학적 조성물은 완충제, 희석제, 불활성 담체, 오일, 크림 또는 식용물질을 함유하는 약리학적으로 허용되는 매질

내에서 형성된다. 본 발명의 일부 관점에서, 약제학적 조성물은 추가로 표적화제 (targeting agent)를 함유하도록 구성된다. 본 발명의 관련된 관점에서, 표적화제는 약제학적 조성물의 상피세포에 대한 전달을 지시할 수 있다. 본 발명의 관련된 양태에서, 표적화제는 상피세포에 결합하는 항체로 이루어진다.

<68> 본 발명의 특정한 양태에서, 약제학적 조성물은 적어도, 상피세포를 사멸시킬 수 있는 제 2의 조성물을 함유한다.

<69> 본 발명의 화합물은 발암성 DMBA에 대해 노출된 마우스에서 화학보호효과 (chemoprotective effect)를 나타낸다. 따라서, 본 발명은 포유 동물에게 상술한 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함을 특징으로 하여 포유 동물 상피세포의 전악성 또는 악성상태로의 개시 및 촉진을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명의 한가지 양태에서, 상피세포는 피부세포, 결장세포, 자궁세포, 난소세포, 췌장세포, 폐세포, 방광세포, 전립선세포, 신장세포 또는 유방세포이다. 본 발명의 관련된 양태에서, 포유 동물은 사람이다. 본 발명의 또 다른 관련된 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 경구투여이다. 본 발명의 아직도 또 다른 대체용 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 국소투여이다. 본 발명의 또 다른 대체용 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 중앙내 주사에 의한 것이다. 본 발명의 아직도 또 다른 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 정맥내 투여이다. 본 발명의 추가의 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 에어로졸을 흡입시킴을 포함한다.

<70> 본 발명은 또한, 다른 요법과 조합하여 본 발명의 약제학적 제형을 사용하는 것을 포함한다. 한가지 양태에서, 다른 요법에는 상피세포를 X-선 방사, UV-방사,  $\gamma$ -방사 또는 극초단파 방사에 의해 조사시킴을 포함한다.

<71> 본 발명은 또한 포유 동물에게 본 명세서에 기술된 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함을 특징으로 하여 포유 동물 내의 악성 포유 동물 세포에서 세포소멸을 유도하는 방법을 제공한다. 본 발명의 한가지 양태에서, 세포는 피부세포, 결장세포, 자궁세포, 난소세포, 췌장세포, 폐세포, 방광세포, 전립선세포, 신장세포 또는 유방세포이다.

<72> 한가지 중요한 관점에서, 본 발명은 포유 동물에게 상술한 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함을 특징으로 하여 포유 동물에서 포유 동물 상피세포의 비정상적인 증식을 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명의 한가지 양태에서, 상피세포는 음와세포이다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 상피세포는 결장세포이다. 본 발명의 관련된 양태에서, 포유 동물은 사람이다. 본 발명의 또 다른 관련된 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 경구투여이다. 본 발명의 아직도 또 다른 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 국소투여이다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 중앙내 주사에 의한 것이다. 본 발명의 아직도 또 다른 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 정맥내 투여이다. 본 발명의 추가의 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 에어로졸을 흡입시키는 것으로 이루어진다. 본 발명은 또한, 다른 요법과 조합하여 본 발명의 약제학적 제형을 사용하는 것을 포함한다. 한가지 양태에서, 다른 요법에는 상피세포를 X-선 방사, UV-방사,  $\gamma$ -방사 또는 극초단파 방사에 의해 조사시키는 것으로 이루어진다.

<73> 본 발명은 또한, 포유 동물에게 본 명세서에 기술된 트리테르펜 화합물의 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함을 특징으로 하여 포유 동물의 염증을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 관련된 양태에서, 포유 동물은 사람이다. 본 발명의 또 다른 관련된 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 경구투여이다. 본 발명의 아직도 또 다른 대체용 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 국소투여이다. 본 발명의 추가의 대체용 양태에서, 약제학적 조성물의 투여방법은 에어로졸을 흡입시키는 것으로 이루어진다.

<74> 본 발명의 또 다른 중요한 관점은 포유 동물에게 상술한 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함을 특징으로 하여 포유 동물에서 혈관형성을 조절하는 방법에 있다. 이 방법에서 포유 동물은 사람일 수 있다.

<75> 본 명세서에 기술된 여러가지 방법은 생체내 방법이지만, 생체내에서 트리테르펜 글리코시드 화합물은 유사한 효과를 나타내는 것으로 기대된다.

<76> 본 발명의 화합물을 사용하여 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 이외에, 본 발명자들은 본 발명의 화합물의 다수의 다른 용도를 제공한다. 특히, 본 발명의 화합물은 용매, 항산화제, 항진균제 및 항바이러스제, 피시사이드 (piscicides) 또는 연체동물박멸제, 피임제, 구충제, 혈관형성 조절제, UV-보호제, 거담제, 이뇨제, 소염제, 콜레스테롤 대사의 조절제, 심혈관성 효능제, 항레양제, 진통제, 진정제, 면역조절제, 해열제, 모세관 취약성 저하제, 피부 콜라겐 증진제, 노화 억제제, 음경기능 증진제, 및 인지 및 기억 개선제로서 사용될 수 있다.

**발명의 상세한 설명**



- <128> 본 발명은 신규한 생물학적 활성 트리테르펜 글리코시드 조성물을 제공함으로써 선행기술에서의 한계를 극복하고자 하는 것이다. 특히, 본 발명자들은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 트리테르펜 화합물을 동정하고 정제해 내었다. 동정된 화합물은 정상 사람세포에 대해 세포독성이 거의 또는 전혀 없는 농도에서 강력한 항종양 활성을 나타낸다.
- <129> 본 발명의 트리테르펜 화합물은 건지 및 반건지 지역에 자생하는 선택된 콩과식물 종으로부터 60종의 식물추출물의 표적화된 선별에 의해 동정되었다. 초기 선별에서 UA-BRF-004-DELEP-F001로 지정되고 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) (Benth.) (Leguminosae)로부터 분리된 하나의 추출물은 다양한 사람 종양 세포주에 대하여 강력한 항종양 활성을 나타내었다. 이 추출물을 계속해서 다양한 분획으로 더 정제한다. 2회 째의 정제에서, 정제된 항종양 화합물로 이루어진 추출물이 동정되었다. 이 추출물은 정제된 트리테르펜 글리코시드 사포닌을 함유하는 것으로 확인되었다. 이 방법은 계속해서 활성화합물의 효율적인 분리를 위해서 개발되었다.
- <130> 더 정제된 추출물의 추가의 시험으로 추출물의 생물학적 활성이 추가로 밝혀졌다. 정제된 추출물은 정상 사람 세포에 대해 거의 또는 전혀 독성을 나타내지 않는 농도에서 조추출물에 비해서 증진된 항종양 활성을 나타내었다. 추출물은 또한 발성성 물질에 노출된 마우스에서 화학보호 효과를 가지는 것으로도 또한 나타났다.
- <131> 추출물이 분리되는 식물인 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)는 자연환경 및 종의 제한된 선행기술 연구를 포함한 요인을 기준으로하여 선택되었다. 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)는 오스트레일리아로부터 유래하지만, 세계 전역에 걸쳐서 원예용 품종으로서 소개되었으며, 통상적으로 프리클리워틀 (prickly wattle) 또는 엘레간트워틀 (elegant wattle)로서 알려져 있다. 이 나무는 1년에 60 내지 120 cm의 비율로 성장하며, 느린 건조성 낙엽수이고, 적어도 -15°C에 견딘다. 성숙한 식물은 10-15 피트까지 성장하며, 청록색의 이회우상엽을 갖는다. 미국 남서부에서는, 이 식물이 일반적으로 4 내지 5월에 개화하며, 6월에 꼬투리가 여문다. 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)는 바람막이 (wind breaks), 방풍림 (shelter belts), 식품, 위험지역 안정화를 포함한 다수의 농업용 용도 및 물을 적게 사용하는 관상식물로서의 용도를 갖는다. 다양한 아카시아 종의 종자들이 여러 세대에 걸쳐서 오스트레일리아의 원주민들에 의해서 식품재료의 공급원으로서 사용되어 왔다 (Lister *et al.*, 1996). 아카시아 중에서, 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)는 오스트레일리아 전역에 걸쳐서 존재하는 가장 일반적이며 광범하게 분포되어 있는 종이고, 따라서 가장 광범하게 소비되는 종이다. 통상적으로 워틀시드 (wattleseed)라고 불리우는 아카시아 종자는 페스츄리 및 빵에서 분쇄산물로서 및 또한 디저트, 특히 아이스크림에서 향료로서 사용하기 위한 큰 수요가 있다. 이들은 또한 고급 커피-양 음료를 생산하기 위해 사용되며, 아카시아 종 중에서 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)(Benth.)는 일반적으로 탁월한 향을 갖는 것으로 간주되고 있다 (Lister *et al.*, 1996). 그러나, 이 식물의 꼬투리 및 뿌리의 사용에 대한 기록은 없다.
- <132> 본 발명은 생물학적 활성화합물의 분리를 위한 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 꼬투리 및 뿌리의 신규한 용도에 관한 것이다. 본 발명의 발명자들은 이전에 사용되지 않았던 식물의 부분으로부터 신규한 향암 화합물 및 그밖의 다른 생물학적으로 유용한 화합물의 존재를 입증한다.
- <133> **II. 본 발명의 트리테르펜의 정제 및 동정**
- <134> 식물추출물의 약제학적 제형로서의 용도에 있어서의 중요한 관점은 개개 활성 구성성분의 특정화 및 측정이다. 이것은 또한, 종종 그들의 성분 및 글리코시드의 분리, 구조설명 및 분석을 위한 복잡한 기술을 필요로 하는 트리테르펜 사포닌 제제에 대해서도 해당된다. 순수한 화합물의 생물학적 시험을 수행하고자 하는 경우에는, 이들을 충분한 양 및 순도로 분리하는 것이 필요하다.
- <135> 트리테르펜 및 그밖의 다른 관련된 사포닌은 비교적 큰 분자량을 가지며 극성이 크기 때문에, 이들의 분리는 문제가 있을 수 있다. 순수한 사포닌의 분리에 관련된 문제는 아글리콘 또는 당 부분의 성질 (모노삭카라이드의 성질, 수, 위치 및 결합의 키랄성 (chirality))에 있어서 미묘한 차이가 있는 밀접하게 관련된 화합물의 복잡한 혼합물의 존재이다. 에스테르와 같은 불안정한 치환체로 인해서 또한 어려움에 직면하게 된다. 예를 들어, 주된 진정한 대두 사포닌인  $\gamma$ -파이론 유도체 (BOA)는 단지 실온에서 수성 에탄올에 의해서 추출된다. 가열 (80 °C)에 의한 추출은 에스테르 부분의 분열 및 대두사포닌 I (Bb)의 형성을 유도한다 (Kudou *et al.*, 1992). 식물에서, 사포닌은 페놀성 화합물 등을 포함한, 삭카라이드 및 착색물질과 같은 매우 극성인 물질을 동반하며, 용이하게 결정화되지 않고, 흡습성일 수 있어서 결정을 수득하는 것을 더욱 어렵게 만든다.
- <136> 순수한 사포닌의 특정화는 또한 결정성 물질의 결여로 인한 문제가 있다. 용점이 부정확하며, 종종 분해와 함께 나타난다. 따라서, 샘플 순도의 결정은 일반적으로 단지 용점, 선광도값 또는 또 다른 물리적 상수를 기본

으로 하여서는 이루어질 수 없다. 사포닌의 순도에 대한 보다 나은 시험은, 가능하다면 규정된 샘플을 사용한 공-크로마토그래피에 의하여, TLC 또는 HPLC 검사에 의해 얻어질 수 있다. 적합한 시약을 분무한 후에 TLC 플레이트 상의 스포트의 색상은 잠재적인 개개 성분에 대한 추가의 지표 (indicator)이다. 예를 들어, 본 발명의 트리테르펜 글리코시드 중의 하나인 D1은 15.2분의 HPLC 보유시간을 갖는다. 이것은 또 다른 관련된 화합물인 아르키덴드론 엘립티쿰 (*Archidendron ellipticum*)으로부터 분리 (John Beutler *et al.*, 1997)된 것으로 HPLC 보유시간이 12.5분인 엘립토사이드 E와는 상이하다. 본 발명의 트리테르펜의 추가의 특정화는 보유시간에 있어서의 이러한 차이는 적어도, 키랄성에 있어서의 차이 및 D1의 이중결합 및 엘립토사이드 E의 보고된 특징에 있어서의 차이에 기인하는 것이다.

<137> (i) 화학적 정제

<138> 화학적 정제기술은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 이들 기술에는 한가지 수준에서는 식물추출물을 본 명세서에 기술된 트리테르펜 글리코시드 화합물로 조분획화하는 것으로 이루어진다. 일반적으로 식물 물질로부터 트리테르펜 글리코시드 화합물을 분리시킨 후에, 목적하는 트리테르펜 글리코시드는 본 명세서에 기술된 기술, 예를 들어 크로마토그래피 기술을 사용하여 더 정제함으로써 부분적이거나 완전한 정제 (또는 균질성이 얻어지도록 정제)에 도달할 수 있다. 순수한 트리테르펜 글리코시드 화합물의 제제에 특히 적합한 분석방법은 이하에서 구체적으로 기술한다.

<139> 본 발명의 특정한 관점은 식물 물질로부터 트리테르펜 글리코시드를 정제하는 것, 특정의 양태에서는 실질적으로 정제하는 것에 관한 것이다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 트리테르펜 글리코시드는 레구미노세 (Leguminosae) 과의 식물로부터, 더욱 바람직하게는 아카시아 (*Acacia*) 속으로부터, 가장 바람직하게는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 종으로부터, 더더욱 바람직하게는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) (Benth.) 종으로부터 정제한다. 본 명세서에서 사용된 것으로 용어 "분리된 트리테르펜 글리코시드"는 다른 성분들로부터 분리할 수 있는 조성물을 지칭하고자 하는 것이며, 여기에서 조성물은 천연적으로 수득할 수 있는 상태에 비해서 어느 정도로 정제된다.

<140> 일반적으로, "분리된"은 분획화에 적용하여 다양한 다른 성분들을 제거한 유기분자 또는 유사한 분자의 그룹을 칭하는 것이며, 이 조성물은 실질적으로 실질적으로 그의 발현된 생물학적 활성을 유지한다. 용어 "실질적으로 정제된"이 사용되는 경우에, 이러한 지적은 트리테르펜 글리코시드가 조성물 내의 분자의 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 그 이상을 구성하는 것과 같이 조성물의 주성분을 구성하는 조성물을 칭하는 것이다.

<141> 본 발명의 트리테르펜 조성물이 항상 그들의 가장 정제된 상태로 분리 및 제공되어야 할 일반적인 필요성은 없다. 실제로, 특정의 양태에서는 실질적으로 덜 정제된 생성물이 유용성을 가질 수 있음도 고려된다. 예를 들어, 본 발명자들은 건조된 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 뿌리 및 꺾투리 및 그의 추출물의 영양학적 물질로서의 용도를 제공한다. 정의에 의하면, 영양학적 물질은 건강에 대하여 상승적으로 유익한 효과를 갖는 다양한 생활성 (bioactive) 화합물의 혼합물이다. 본 발명의 영양학적 조성물은 정제 또는 캡슐제의 형태일 수 있고 경구적으로 섭취될 수 있거나, 그 대신에 국소적으로 적용될 수 있는 연고제 내에 식물의 추출물을 함유할 수도 있다. 부분적인 정제는 보다 적은 정제단계를 조합하여 사용하거나, 또는 동일한 일반적 정제방법의 상이한 형태를 이용함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, HPLC 장치를 이용하여 수행된 양이온-교환 칼럼 크로마토그래피는 일반적으로 저압 크로마토그래피 시스템을 사용하는 동일한 기술에 비해서 더 큰 "-배 (fold)" 정제를 유도한다. 더 낮은 정도의 상대적 정제를 나타내는 방법은 생성물의 총회수율이나, 또는 트리테르펜 화합물의 생물학적 활성을 유지시키는 면에서 이점을 가질 수 있다.

<142> (ii) 추출 및 예비 정제

<143> 특정한 사포닌은 수추출 중의 효소적 가수분해, 알콜 처리 중의 산성 사포닌의 에스테르화, 불안정한 에스테르 그룹의 가수분해 및 트랜스아실화를 포함한 변형을 일으킬 수 있기 때문에, 추출과정은 가능한 한 온화하여야 한다. 따라서, 분리과정에서, 예를 들어 박층크로마토그래피에서 각각의 단계를 수행하는데 주의를 기울여야 한다.

<144> 다양한 변형방법이 수행될 수 있지만, 현재 조 사포닌 혼합물을 수득하기 위한 일반적인 방법은 통상적으로는 메탄올, 에탄올, 물 또는 수성알콜에 의한 추출; 일반적으로 석유에테르를 사용하여 추출단계 전에 또는 추출물 그 자체에 대해 수행되는 탈지단계; 물 중에서 추출물의 용해 또는 현탁; 물로 포화된 n-부탄올에 의한 용액 또는 현탁액의 진탕 또는 세척; 및 디에틸에테르 또는 아세톤에 의한 사포닌의 침전 (임의단계)을 포함한다. 당

과 같은 작은 수용성 분자를 제거하기 위해서 투석단계가 또는 포함될 수도 있다 (참조, Zhou *et al.*, 1981; Massiot *et al.*, 1988).

- <145> 건조 식물물질의 가장 효율적인 추출은 메탄올 또는 수성 메탄올을 사용하여 이루어진다. 메탄올은 또한 신선한 식물물질에 대해서도 사용된다. 사포닌에 대해서는 물이 일반적으로 덜 효율적인 추출용매이지만 (구체적으로 수용성 글리코시드를 목적으로하는 경우가 아닌 한), 용이하게 동결건조되고 더 깨끗한 추출물을 제공한다는 잇점을 갖는다. 추출에 사용된 물의 비율에 따라서, 모노데스모시딕 또는 비데스모시딕 사포닌이 수득될 수 있다 (Domon and Hostettmann, 1984; Kawamura *et al.*, 1988). 신선한 식물물질은 활성효소 (에스트라제)를 함유하며, 이것은 용매로 균질화시켰을 때 비데스모사이드를 모노데스모사이드로 전환시킬 수 있다. 건조 물질도 물의 존재하에서 활성화되는 에스트라제를 함유할 수 있다. 모모르딘 I (모노데스모시딕 올레아놀산 사포닌)의 경우에, 모모르딘 II (상응하는 비데스모사이드)로의 전환은 물 및 30% 및 60% 메탄올 용액 중에서 일어나며, 80% 및 100% 메탄올 용액 중에서는 일어나지 않는 것으로 밝혀졌다. 반대로, 메탄올 내의 신선한 뿌리 균질물은 효소활성을 보유한다. 그러나, 효소는 신선한 뿌리를 우선 4% 염산에 침지시킴으로써 불활성화될 수 있었으며, 그후에 비데스모사이드가 주성분으로 나타났다. 따라서, 추출과정의 정확한 선택이 가장 중요한 첫번째 단계임이 명백하다.
- <146> 투석, 이온교환 크로마토그래피 및 크기-배제 크로마토그래피와 같이 단백질을 정제하기 위해 일반적으로 사용된 방법이 수용액 중에서 비-사포닌 성분들로부터 사포닌을 부분적으로 분리하는데 유용하지만, 일반적으로는 사포닌이 혼합미셀을 형성하는 경향으로 인하여 개개 사포닌을 분리하는데는 효과가 없다. 따라서, 효과적인 분리는 일반적으로, 혼합미셀의 형성이 분리를 방해하지 않도록 양친매성 사포닌을 모노머로서 가용화시키는 유기 용매 또는 용매/물 시스템의 사용을 필요로 한다.
- <147> 푸로스탄올 사포닌에 대해 관찰된 공통적인 문제는 메탄올에 의한 추출 중에 22-OCH<sub>3</sub> 유도체가 형성된다는 점이다. 그러나, 진성 22-하이드록시푸로스탄올은 또 다른 용매 (예를 들어, 피리딘)으로 추출하거나, 메톡실화된 인공산물을 비등하는 수성 아세톤으로 처리함으로써 수득될 수 있다 (Konishi and Shoji, 1979).
- <148> (iii) 박층크로마토그래피 (TLC)
- <149> TLC에 의한 트리테르펜 사포닌의 정성적 분석은 사포닌 연구의 모든 관점에서 매우 중요하다. TLC 플레이트 (통상적으로 실리카 겔)는 순수한 사포닌 및 조추출물 둘다를 다룰 수 있고, 저렴하며 신속하게 사용할 수 있고, 전문적인 장치를 필요로 하지 않는다. 플레이트 상에 분무하는데는 다수의 가시화제 (visualization agent)를 이용할 수 있다 (표 2). 가장 통상적인 시약의 제조방법은 다음과 같다:
- <150> ● 바닐린-황산 (고딘 (Godin) 시약): 에탄올 중의 바닐린의 1% 용액을 물 중의 과염소산의 3% 용액과 1:1의 비로 혼합시켜 TLC 플레이트 상에 분무한다. 그후에 에탄올 중의 황산의 10% 용액을 분무하고 110°C에서 가열한다.
- <151> ● 리버만-버차드 (Liebermann-Burchard) 시약: 진한황산 (1 ml)을 무수아세트산 (20 ml) 및 클로로포름 (50 ml)와 혼합시킨다. 85-90°C에서 가열하여 TLC 플레이트 상에 필요한 발색 (coloration)을 제공한다.
- <152> ● 염화안티몬(III): TLC 플레이트에 클로로포름 중의 염화안티몬의 10% 용액을 분무하고 100°C로 가열한다.
- <153> ● 아니스알데히드-황산: 아니스알데히드 (0.5 ml)를 빙초산 (10 ml), 메탄올 (85 ml) 및 진한황산 (5 ml)과 혼합시킨다. 이 용액을 TLC 플레이트 상에 분무한 다음, 플레이트를 100°C로 가열한다.
- <154> 예를 들어, 에탄올 및 과염소산의 존재하에서 바닐린-황산을 분무하면 트리테르펜 사포닌에 의해 청색 또는 보라색 발색을 제공한다. 아니스알데히드-황산의 경우에는 TLC 플레이트를 가열하면 청색 또는 보라-청색의 발색이 나타난다. TLC 플레이트에 황산 중의 황산세륨의 용액을 분무하면 365 nm UV 광선하에서 보라-적색, 청색 또는 녹색의 형광대를 나타낸다 (Kitagawa *et al.*, 1984b). 일부의 경우에, 플레이트에 간단히 물을 분무하는 것으로 존재하는 사포닌을 나타내는데 충분하다. 추가의 분무시약은 예를 들어 문헌 (Stahl, 1969)에서 찾을 수 있다.
- <155> TLC를 위해 가장 빈번하게 사용되는 용매는 클로로포름-메탄올-물 (65:35:10)이지만, 다른 용매도 또한 유용하다. 용매 n-부탄올-에탄올-암모니아 (7:2:5)는 유론산 잔기를 함유하는 글리코시드에 대해, 즉 매우 극성인 혼합물에 대해 특히 유용하다. 그밖에 광범하게 사용되는 용매에는 n-부탄올-아세트산-물 (4:1:5; 상부층) 또는 클로로포름-메탄올-아세트산-물 (60:32:12:8)이 포함된다.



- <156> 글리코알칼로이드의 TLC를 위해 사용된 시스템에는 일반적으로 에틸아세테이트-피리딘-물 (30:10:30; 상부상)이 포함된다. 가시화는 스테로이드 시약 (아니스알데히드-황산)을 사용하거나, 또는 알칼로이드 시약 (드라겐도르프 (Dragendorff) 시약, 황산세륨(IV))을 사용하여 행한다. 그밖의 다른 TLC 용매 및 가시화시약은 문헌 (Jadhav *et al.*, 1981 및 Baerheim Svendsen and Verpoorte, 1983)에 제시되어 있다.
- <157> TLC에 의해 다수의 정량적 측정이 가능하다. 예를 들어, 적합한 분무시약에 의해 수득된 스포트의 밀도는 밀도계 (denistometer)를 사용하여 직접 측정할 수 있다. 또한, TLC 분리를 수행하고, 해당하는 밴드 (예를 들어, 요오드 증기에 의해 위치를 확인)를 플레이트로부터 긁어내어 사포닌을 용출시키고, 적합한 시약 (예를 들어, 진한황산)을 첨가한 후에 UV 흡광도를 측정함으로써 정량적 측정이 이루어질 수도 있다.
- <158> 역상 TLC 플레이트는 시판품을 이용할 수 있으며, 실리카 겔 플레이트 상에서의 TLC에 대해 보충적인 것으로 사포닌에 대한 탁월한 분석방법을 제공한다. 역상 플레이트 (예를 들어, 머크 (Merck) RP-8 또는 RP-18 HPTLC 플레이트)를 전개시키기 위해서는 메탄올-물 및 아세토니트릴-물 혼합물이 거의 독점적으로 사용된다. 또한, DIOL HPTLC 유리-매면 플레이트가 사용될 수도 있다. 이들은 정상적인 실리카 겔 TLC-타입 용매와, 또는 RP-TLC를 위해서는 메탄올-물 및 아세토니트릴-물 용매와 함께 사용될 수 있다.
- <159> TLC 검출 및 사포닌의 분광광도 및 비색측정을 위한 시약의 예는 이하의 표 2에 제시한다.
- <160> 1. 원심분리성 (centrifugal) 박층크로마토그래피 (CTLC)
- <161> CTLC 기술은 TLC 플레이트로부터 밴드를 긁어낼 필요가 없는 정제용 박층크로마토그래피 (TLC)에 관련된 평면상 방법이다 (Hostettmann *et al.*, 1980). CTLC는 원형 TLC 플레이트를 가로지르는 이동상 유동을 촉진시키는 원심력의 작용에 의한 것이다. 적합한 흡착제 (sorbent)로 피복된 (1, 2 또는 4 mm 두께) 플레이트를 전기모터에 의해 약 800 r.p.m.으로 회전시키면서 샘플을 중앙에서 도입시키고 용출제는 흡착제를 가로질러서 주입한다. 용매 용출로 플레이트를 가로질러서 동심원성 밴드를 나타낸다. 이들을 가장자리에서 원심력으로 분리하여 TLC 분석을 위해서 수거한다. 2 mm 흡착제 층 상에서 혼합물 50-500 mg을 분리할 수 있다.
- <162> 클로로포름-메탄올-물 (100:30:3)을 사용한 CTLC와 칼럼 크로마토그래피의 조합은 진세노사이드이 분리와 관련하여 기술되어 있다 (Hostettmann *et al.*, 1980). 사포닌도 또한 실리카 겔 플레이트 상에서 클로로포름-메탄올-물 혼합물을 사용하여 수득한다. 엘루테로코쿠스 센티코서스 (*Eleutherococcus senticosus*) 뿌리 (Araliaceae)로부터 유래한 두개의 프로토프리몰라게닌 A 글리코시드는 실리카 겔 상에서의 칼럼 크로마토그래피 및 세파덱스 (Sephadex) LH-20 상에서의 겔여과 후에 CTLC (클로로포름-메탄올-물 65:35:7)에 의해 정제한다 (Segiet-Kujawa and Kaloga, 1991). 과시플로라 쿠아드란굴라리스 (*Passiflora quadrangularis*) (Passifloraceae)로부터 유래하는 사이클로아르테인 글리코시드의 분리를 위해서는 용매시스템 에틸아세테이트-에탄올-물 (8:2:1 또는 16:3:2)을 1 ml/분 (Orsini *et al.*, 1987) 또는 1.5 ml/분 (Orsini and Verotta, 1985)의 유속으로 사용한다.
- <163> 히타치 (Hitachi) 원심분리성 액체크로마토그래프 모델 CLC-5는 사포닌의 분리 시에 사용하는 것으로 기술되어 있다. 크로마토그래피는 용출제로 클로로포름-메탄올-물 (7:3:1 (하부상) → 65:35:10 (하부상))을 사용하여 실리카 겔 플레이트 상에서 이 기계를 사용하여 수행한다. 이 기술을 사용하여 총 1 g의 반정제된 사포닌 분획을 원형 플레이트 상에서 크로마토그래피한다 (Kitagawa *et al.*, 1988; Taniyama *et al.*, 1988).
- <164> (iv) 개방-칼럼 (open-column) 크로마토그래피
- <165> 사포닌의 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피를 위해서 사용된 다수의 고전적인 용매시스템은 이미 기술되어 있으며, 예를 들어 문헌 (Woitke *et al.*, 1970 및 Adler and Hiller, 1985)에서 찾을 수 있다. 개방-칼럼 크로마토그래피는 조 사포닌 혼합물을 위한 제 1 분획화단계로서 종종 사용되지만, 특정의 경우에는 순수한 생성물을 수득할 수 있다. 그러나, 일반적으로 고도로 분리되지는 않으며, 복잡한 혼합물이 단지 부분적으로 분리된다. 그밖의 다른 문제는 비가역적인 흡착으로 인한 물질의 손실 및 분리를 수행하는데 필요한 시간의 길이다.
- <166> 클로로포름-메탄올-물 용출제를 사용하는 실리카 겔 크로마토그래피는 가장 광범하게 적용할 수 있는 기술 중의 하나이다. 이상성 (biphasic) 시스템이 사용되는 경우에는 수-포화된 클로로포름상이 용출제이다. 즉, 클로로포름-메탄올-물의 농도농도구배 (예를 들어, 65:35:5 → 65:40:10)를 실리카 겔 상에서 식물조직의 메탄올 추출물의 초기분리를 위해서 사용할 수 있다. 저압칼럼 상에서의 추가의 크로마토그래피를 사용하여 예를 들어, 연체동물박멸성 모노데스모시딕 사포닌을 수득할 수 있는 한편, 비데스모시딕 사포닌은 아세톤-n-프로판올-물

(35:35:5)과 같은 용매 시스템을 사용한 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 수득할 수 있다 (Borel *et al.*, 1987).

- <167> 트리테르펜 글리코시드의 복잡한 혼합물은 크로코스미아 크로코스미플로라 (*Crocoshia crocosmiiflora*) (Iridaceae)의 구경으로부터 분리된다. 폴리갈락산의 2,9,16-트리하이드록시팔미트산 글리코시드인 이들 중의 3가지는 용출제로서 n-부탄올-에탄올-물 (5:1:4, 상부층) 및 클로로포름-메탄올-물 (60:29:6)을 사용하여 실리카 겔 60 (60-230  $\mu\text{m}$ ) 상에서 조 사포닌 혼합물을 개방-칼럼 크로마토그래피하는 것을 포함하는 방법에 의해 수득한다. 최종 정제는 HPLC에 의해 수행한다 (Asada *et al.*, 1989).
- <168> 실리카 겔 크로마토그래피의 광범위한 사용은 또한 악티노스텨마 로바툼 (*Actinostemma lobatum*) (Cucurbitaceae)로부터 다마레인 글리코시드 악티노스텨모사이드 A-D의 분리를 가능하게 한다. MCI (Mitsubishi Chemical Industries) 폴리스티렌 겔 칼럼 이후에, 다음과 같은 다양한 용매를 사용하여 해당 분획을 크로마토그래피한다: 클로로포름-메탄올-물 (7:3:0.5, 32:8:1), 클로로포름-메탄올 (9:1, 1:1), 클로로포름-에탄올 (17:3), 에틸아세테이트-메탄올 (4:1), 및 클로로포름-메탄올-에틸아세테이트-물 (3:3:4:1.5, 하부층). 이 방법에 의해 순수한 악티노스텨모사이드 C를 수득할 수 있는 반면에, 악티노스텨모사이드 A 및 B은 추가의 저압 LC 단계를 필요로하며, 악티노스텨모사이드 D는 70% 메탄올로 용출되는 C-18 칼럼 상에서의 최종 분리를 필요로 한다 (Iwamoto *et al.*, 1987).
- <169> 특정의 에스테르 사포닌은 2% 붕산으로 함침시킨 실리카 겔 상에서 크로마토그래피시킨다 (Srivastava and Kulshreshtha, 1986; 1988).
- <170> 정상적인 실리카 겔에 추가하여, 현재 사포닌의 개방-칼럼 크로마토그래피에서는 조악한 RP 흡착제를 사용한다. 과립측정 (granulometry)을 지나치게 미세하지 않고 칼럼이 지나치게 길지 않는 한, 중력-공급 칼럼 (gravity-fed column)이 매우 적합하다. RP 크로마토그래피는 일반적으로 초기 실리카 겔 분리단계 후에 도입되며, 분리할 물질에 대한 선택성에 있어서의 변화를 가능하게 한다. 또 다른 가능성은 DCCC 단계 후에 역상 분리를 도입시키는 것이다 (Higuchi *et al.*, 1988).
- <171> 1. 중합체 흡착제를 사용한 개방-칼럼 크로마토그래피
- <172> 세파텍스 칼럼 충전물 내에 존재하는 것으로 텍스트란 지지체의 사용은 수년 동안 통용되어 왔다. 세파텍스 LH-20은 가장 빈번하게 적용되지만, 'G' 시리즈 중합체도 관심의 대상이다.
- <173> 사포닌의 분리에 대한 최근의 연구에서, 새로운 세대의 중합체가 특히 일본에서 개발되었다. 예를 들어, 다이온 (Diaion) HP-20 (Mitsubishi Chemical Industries, Tokyo)은 초기 정제단계를 위해 광범하게 사용되는 고다공성 중합체이다.
- <174> 일반적으로, 중합체성 지지체는 모노삭카라이드, 아미노산과 같은 하전된 소분자, 및 그밖의 고수용성 물질을 용출시키기 위해서 샘플을 부하시킨 후에 물로 세척한다. 그후에, 메탄올-물 농도농도구배 (또는 메탄올 단독)에 의한 용출을 개시하여 사포닌 분획을 수득한다. 그밖의 다른 크로마토그래피 기술이 순수한 사포닌의 분리를 위해서 사용된다.
- <175> 아세톤-물 혼합물에 의한 HP-20 겔의 용출도 보고되었다. 예를 들어, 틀라디안타 두비아 (*Thladiantha dubia*) (Cucurbitaceae)의 껍질로부터 유래하는 퀴라산의 비데스모시딕 글리코시드의 분리에는 메탄올 추출물을 다이온 CHP-20P의 칼럼에 통과시킨 다음 물로 세척한다. 조 사포닌은 40% 아세톤으로 용출시킨다. 추가의 분리에는 실리카 겔 크로마토그래피 (에틸아세테이트-메탄올-물 6:2:1) 및 HPLC가 사용되었다 (Nagao *et al.*, 1990).
- <176> 루파 실린드리카 (*Luffa cylindrica*) (Cucurbitaceae)의 종자로부터 섬유소용해성 사포닌을 분리하기 위해서는 물추출물을 메탄올로 용출되는 앰버라이트 (Amberlite) XAD-2 칼럼 상에서 크로마토그래피시킨 다음, 이어서 40-70% 메탄올로 용출되는 제 2 XAD-2 칼럼에 적용한다. 활성성분은 클로로포름-메탄올-물 (65:35:10, 하부층 → 65:40:10)을 사용하여 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 시킨 후에 순수한 상태로 수득한다 (Yoshikawa *et al.*, 1991).
- <177> (v) 중압 액체 크로마토그래피 (MPLC)
- <178> 비교적 대량의 순수한 사포닌이 필요한 경우에는, MPLC가 매우 유용하다. 시판품으로 이용할 수 있는 LPLC 장치와는 달리, 샘플의 그람 양을 칼럼에 부하시킬 수 있으며, 한편 분리는 40bar 이하의 압력에서 수행한다. 지지체의 과립측정은 25-40  $\mu\text{m}$  범위이며, 분리는 빨라서 개방-칼럼 크로마토그래피에 비해 현저하게 적은 시간이

필요하다. 분리조건을 분석용 HPLC로부터 MPLC로 직접 전위시키는 것은 역상 지지체 상에서 이루어질 수 있으며, 이렇게하여 용매의 선택을 용이하게 한다 (Hostettmann *et al.*, 1986).

- <179> 예를 들어, 쿠소니아 스파키타 (*Cussonia spicata*) (Araliaceae)로부터 유래하는 연체동물박멸성 사포닌은 메탄올-물 (2:1)을 사용하는 C-8 흡착제 상에서의 MPLC에 의해 생물학적 시험에 충분한 양으로 수득되었다 (Gunzinger *et al.*, 1986). 실제로, 이 방법은 줄기껍질의 부단을 추출물로부터 사포닌을 분리시키는데 단지 두단계 (하나는 실리카 겔 지지체 상에서 수행하고, 두번째는 RP 물질 상에서 수행한다) 만이 필요하다.
- <180> 사포닌의 분리는 또한, 예를 들어 메탄올-물 혼합물과 함께 리크로프레프 (LiChroprep) RP-8 (25-40  $\mu\text{m}$ , 46 × 2.6 cm) 칼럼을 사용하는 MPLC와 회전 소방성 역류 크로마토그래피 (rotation locular countercurrent chromatography; RLCC)를 조합하여 이루어질 수 있다 (Dorsaz and Hostettmann, 1986). 또 다른 MPLC 기술은 축방향으로 압축된 (Jobin-Yvon) 칼럼을 사용한다 (Elias *et al.*, 1991).
- <181> 식물추출물로부터 트리테르펜을 분리하는데 유용한 지지체-용매 조합의 예는 이하의 표 1에 제시한다.

표 1a

트리테르펜 사포닌의 분리시에 MPLC의 적용

식물	지지체	용매	참조
쿠소니아 스피카타 ( <i>Cussonia spicata</i> )	실리카 겔	CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O (6:4:1)	Gunzinger <i>et al.</i> , 1986
	C-8	MeOH-H <sub>2</sub> O (2:1)	Gunzinger <i>et al.</i> , 1986
칼렌둘라 아르헨시스 ( <i>Calendula arvensis</i> )	C-8	MeOH-H <sub>2</sub> O (65:35, 73:27)	Chemli <i>et al.</i> , 1987
C. 오피시날리스 ( <i>C. officinalis</i> )	실리카 겔	CHCl <sub>3</sub> MeOH H <sub>2</sub> O (61:32:5)	Vidal-Ollivier <i>et al.</i> , 1989
	C-18	MeOH-H <sub>2</sub> O (60:40, 80:20)	Vidal-Ollivier <i>et al.</i> , 1989
폴리갈라 카마에복서스 ( <i>Polygala chamaebuxus</i> )	실리카 겔	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH H <sub>2</sub> O (80:20:2)	Hamburger and Hostettmann, 1986
	C-8	MeOH-H <sub>2</sub> O (55:45)	Hamburger and Hostettmann, 1986
스워드치아 마다가스카리엔시스 ( <i>Swartzia madagascariensis</i> )	C-8	MeOH H <sub>2</sub> O (65:35)	Borel and Hostettmann, 1987
탈리눔 테투이썬 ( <i>Talinum tenuissimum</i> )	C-8	MeOH-H <sub>2</sub> O (60:40)	Gafner <i>et al.</i> , 1985
세스바니아 세스반 ( <i>Sesbania sesban</i> )	C-8	MeOH-H <sub>2</sub> O (55:45, 60:40)	Dorsaz <i>et al.</i> , 1988
테트라플레우라 테트라프테라 ( <i>Tetrapleura tetraptera</i> )	C-8	MeOH-H <sub>2</sub> O (70:30)	Maillard <i>et al.</i> , 1989
알비찌아 루시다 ( <i>Albizia lucida</i> )	C-8	MeOH-H <sub>2</sub> O (6:4 → 9:1)	Orsini <i>et al.</i> , 1991
	C-18	MeOH-H <sub>2</sub> O (7:3)	Orsini <i>et al.</i> , 1991
파시플로라 콰드랑굴라리스 ( <i>Passiflora quadrangularis</i> )	C-18	MeOH-H <sub>2</sub> O (17:3)	Orsini and Verotta, 1985
헤데라 헬릭스 ( <i>Hedera helix</i> )	C-18	MeOH-H <sub>2</sub> O 구배	Elias <i>et al.</i> , 1991
프리몰라 베리스 ( <i>Primula veris</i> )	C-18	MeOH-H <sub>2</sub> O (5:5 → 7:3)	Calis <i>et al.</i> , 1992

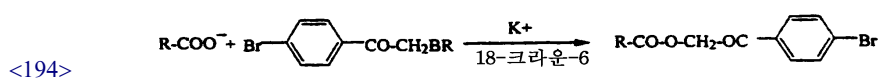
<182>

표 1b

	실리카 겔	CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O(6 1:32:7)	Calis <i>et al.</i> , 1992
스테로이드 사포닌스 ( <i>Steroid saponins</i> )			
발라니테스 아에집티아카 ( <i>Balanites aegyptiaca</i> )	실리카 겔	CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O (80:20:1 → 25:25:2 and 70:30:3)	Hosny <i>et al.</i> , 1992

<183>

- <184> (vi) 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)
- <185> HPLC에 의한 크로마토그래피는 밀접하게 관련된 화합물의 혼합물로부터 수 밀리그램 양으로 사포닌을 수득하는 강력한 기술이며, 이러한 점에서 최종 정제단계로서 매우 빈번하게 사용된다. MPLC는 더 큰 입자 (25-100 μm)를 사용하는 반면에 반정제용 HPLC 흡착제는 5-30 μm 과립측정 범위를 가지며, 따라서 더 높은 분리효율을 허용한다.
- <186> 반정제용 HPLC는 올레아놀산 트리글리세라이드를 그의 부분 가수분해 생성물로부터 분리시키기 위해서 사용한다. 이것은 갈락토즈 잔기가 글루코즈 잔기의 C-3 또는 C-4 위치에 결합되었는지 여부를 결정하기 위해서 필요하다. 이성체성 사포닌의 분리는 아세트니트릴-물 (38:62)을 10 ml/분의 유속으로 사용하여 7 μm 리크로소르브 (LiChrosorb) RP-8 칼럼 (250 × 16 min) 상에서 수행한다. 검출은 206 nm에서 혼합물 50 mg으로부터 이루어졌다 (Decosterd *et al.*, 1987).
- <187> 부플레우룸 팔카툼 (*Bupleurum falcatum*) (Umbelliferae) 뿌리로부터 유래하는 사이코사포닌 a, c 및 d의 대규모 분리는 크기가 100 × 11 cm I.D.인 축방향으로 압축된 칼럼 상에서 이루어졌다. 메탄올 추출물의 예비정제는 용매분배 및 HP-20 중합체 상에서의 크로마토그래피에 의해 수행한다. 정제용 HPLC 칼럼을 C-18 실리카 겔 (20 μm 입자크기; 5 kg)로 충전시키고 수성 아세트니트릴 단계적 농도농도구배를 사용하여 210 ml/분의 유속으로 용출시킨다. 10 g을 충전하면 사이코사포닌 c 400 mg, 사이코사포닌 a 1200 mg 및 사이코사포닌 d 1600 mg을 제공하기에 충분하다 (Sakuma and Motomura, 1987).
- <188> 진세노사이드는 3개의 실리카 겔 카트리지 (300 × 57 min)가 직렬로 배열된 워터스 프레프 (Waters Prep) 500 시스템 (방사상으로 압축된 칼럼) 상에서의 크로마토그래피를 포함한 2-단계 공정에 의해 파낙스 트리폴리우스 (*Panax trifolius*) (Araliaceae)로부터 분리되었다. 용출제는 n-부탄올-에틸아세테이트-물 (4:1:5)이 상부상이었고, 4 g의 충전물이 주입되었다. 아세트니트릴-물 (86:14 또는 80:20)을 사용하는 탄수화물 칼럼 (Waters, 300 × 7.8 mm) 상에서의 반정제용 HPLC는 최종 정제를 위해서 사용한다 (Lee and der Manderosian, 1988).
- <189> HPLC 용출제 성분의 검출에서 유일한 최대의 어려움은 대부분의 사포닌에 UV 검출을 위한 적합한 발색단이 결여되어 왔다는 점이지만, 이것은 일반적으로 굴절률 검출, 질량 검출 및 유도체화 (derivatization)를 포함한 기술을 사용함으로써 극복될 수 있다.
- <190> 그러나, 농도구배 변화가 작다고 가정하여 적절히 순수한 용매를 사용한 203-210 nm 주위에서의 UV 검출이 일반적으로 사용될 수 있다. 성공적인 분리는 또한, UV 검출과 함께 아세트니트릴-물 농도구배를 사용하여 수행한다. 아세트니트릴이 저과장에서 메탄올 보다 바람직한데, 이는 그의 더 작은 UV 흡수 때문이다. 극성 차이가 시험 중인 사포닌 계열 내에서 너무 크지 않다면 (예를 들어, 당쇄 내에서 단지 약간의 변화), 이소크래틱 용출 (isocratic elution)이 가능하다.
- <191> 사포닌의 혼합물을 분리시키는 유용한 방법은 수성 아세트니트릴에 의한 농도구배용출을 사용하여 옥틸-결합된 칼럼 상에서 분리시키는 것으로 이루어진다. 아세트니트릴의 양은 20분에 걸쳐서 30%에서 40%로 증가하며, UV 흡수 하에서 비교적 작은 기준선 변동이 얻어진다. 더 극성인 비데스모시딕 사포닌은 일반적으로 모노데스모시딕 사포닌 보다 훨씬 더 빨리 용출하며, 글루쿠로나이드는 다른 글리코시드 보다 덜 잔류한다. 비극성 옥틸실릴 지지체는 사포닌의 친유성 부분의 검출을 위해서 사용될 수 있다. 이 기술을 사용하여, 헤테라게닌의 글리코시드를 덜 극성인 올레아놀산의 동일한 글리코시드에 앞서서 용출시킨다 (Domoret *et al.*, 1984).
- <192> 1. 유도체화된 트리테르펜의 사용
- <193> 미량의 고 UV-활성물질로부터의 간섭에 의해 야기되는 불안정한 기준선의 문제를 야기시키는 저과장에서의 검출은 유도체화된 트리테르펜을 사용한 HPLC 분석에 의해 개선될 수 있다. 한가지 가능성은 모노데스모시딕 사포닌의 정량적 측정에 대해 보고된 바와 같이 사포닌에 존재하는 유리 카복실 그룹을 작용화시키는 것이다. 중탄산칼륨 및 크라운 에테르의 존재하에서 올레아놀산 글리코시드를 4-브로모펜아실브로마이드로 처리하면 브로모펜아실 유도체가 형성된다. 4-브로모펜아실 유도체는 254 nm에서 강력하게 흡수하며, 검출은 용매로부터의 간섭이 없이 이 과장에서 수행할 수 있다 (Slacaninet *et al.*, 1988). 유도체화는 다음에서 보는 바와 같다.



<195> 대체 측정방법은 카복실산 잔기의 에스테르화에 의해 형광성 쿠마린 유도체를 제조하는 것이다. 이 방법에 의해 내부표준물질로서 안트라센을 사용하여 대두의 다양한 품종 및 다양한 기관에서 대두사포닌을 정량적으로 분석



하고 측정한다 (Kitagawa *et al.*, 1984a; Tani *et al.*, 1985).

<196> 2. 샘플 정제

<197> 종종 고도로 UV-흡수성인 간섭성 물질을 제거하기 위해서, 예비 정제 단계가 필요할 수도 있다. 이는 예를 들어, 셉-팩 (Sep-Pak<sup>®</sup>) C18 (Guedon *et al.*, 1989) 또는 엑스트렐루트 (Extrelut<sup>®</sup>) (Sollorz, 1985) 카트리지를 사용하여 이루어질 수 있다.

<198> 아글리콘 또는 글루쿠론산 잔기 상에 유리 카복실 그룹을 함유하는 것과 같은 이온성 화합물의 경우에, 피크 광범화 (broadening)을 피해야 한다면 이온 형성을 억제하는 몇가지 방법이 필요하다. 이것은 유동상 (fluent)에 인산 또는 트리플루오로아세트산과 같은 저 UV-흡수성 산을 첨가함으로써 이루어질 수 있다. 또 다른 가능성은 이동상에 첨가된 반대이온과 함께 이온-쌍 HPLC를 사용하는 것이다. 이온성 화합물의 용량인자는 짝지음 시약 (pairing reagent)으로 이온 착물을 형성시킴으로써 증가된다. 카복실 그룹의 유도체화 (상기 언급한 바와 같은)는 이동상에서의 첨가제에 대한 대체방법이며, 이것은 피크 분리의 상당한 증가를 야기시킨다.

<199> 측광법과 비교한 정량적 HPLC의 잇점은 혼합물 또는 추출물 내의 개개 사포닌의 양을 결정할 수 있다는 점이다. 대부분의 경우에, HPLC는 비색법, 기체 크로마토그래피 기술 및 TLC-형광측정 기술에 의해 얻어진 것 보다 더 나은 결과를 제공한다.

<200> 역상 HPLC 칼럼 상에서 사포닌 혼합물의 피크 분리가 불충분한 경우에는, 하이드록시아파타이트 칼럼, 화학적으로 개질된 다공성 유리 칼럼, 실리카 겔 칼럼 및 보레이트 착물의 HPLC를 이용하는 것을 포함하는 다수의 다른 방법이 사용될 수 있다.

<201> 3. 하이드록시아파타이트

<202> 하이드록시아파타이트 (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>)는 실리카 겔 보다 더 친수성이며, 간단한 이성분 수성 용매시스템과 함께 사용될 수 있어서 UV에 의한 견출을 용이하게 한다. 이것은 중성 및 알칼리성 매질 내에서 안정하다. 최근에, 고압 (150 kg/cm<sup>2</sup> 이하)에 대해 내성인 하이드록시아파타이트의 경질 구형입자가 제조되어 HPLC의 적용을 확대시킨다. 말단 펜토즈 유닛에서만 상이하며 RP-HPLC에 의해 분리될 수 없는 사포닌은 이 기술을 사용하여 분리할 수 있다 (Kasai *et al.*, 1987b). 파낙스 진생 (*Panax ginseng*) (Araliaceae)로부터 진세노사이드의 분리는 이소크래틱 방식 (아세토니트릴-물, 80:20)으로, 또는 더 좋게는 선형 농도구배 (아세토니트릴-물 70:30 → 90:10)를 사용하여 이루어졌다 (Kasai *et al.*, 1987b). 실리카 겔의 경우에 관찰된 바와 같이, 글리코시드는 극성이 증가하는 순서로, 즉 RP-HPLC의 반대로 용출된다.

<203> 4. 붕산염 이온교환 HPLC

<204> 이 방법은 모노- 및 올리고삭카라이드의 분석에서 적용된다. 이 기술을 사용한 가장 우수한 결과는 75°C에서 20% (v/v) 아세토니트릴 (pH 8) 중의 0.4 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>를 사용하는 음이온 교환칼럼, 예를 들어 아사히팩 (Asahipak) ES-502N<sup>™</sup>, 100 × 7.6 min 칼럼 (Asahi Kasei Kogyo Co.로부터 입수)을 사용하여 수득한다. 크로마토그래피적 특징은 삭카라이드 잔기에서 시스-디올에 의한 붕산염 착물의 형성에 대해 의존적이다. 분리한 후에, 붕산염은 용출물을 메탄올과 함께 반복해서 공증류시킴으로써 휘발성 메틸보레이트로서 제거될 수 있다.

<205> 5. 화학적으로 개질된 다공성 유리

<206> 미공성 유리 (MPG)는 높은 화학적 내성을 가지며 pH 2 와 12 사이에서 안정하다. 옥타데실 다공성 유리 (MPG-ODS)는 역상 HPLC를 위한 충전물로서 제조되었으며, 신속하고 효율적인 사포닌의 분리를 위해서 사용되어 왔다. 예를 들어, 분리를 위해 아세토니트릴-물 (25.5:74.5) 혼합물을 사용하여 인삼과 부플레우름 (bupleurum) 뿌리를 함유하는 배합약제의 추출물로부터 진세노사이드와 사이코사포닌 둘다를 동시에 분리시킬 수 있다 (Kanazawa *et al.*, 1990a). 인삼 추출물의 HPLC 및 진세노사이드의 혼합물을 위한 MPG-ODS 및 실리카-ODS 칼럼의 비교로 보유양식은 유사하지만 용량인자는 MPG-ODS 칼럼 상에서 더 작은 것으로 나타났다. 진세노사이드의 특정 쌍의 분리는 MPG-ODS 칼럼 상에서 더 우수하다 (Kanazawa *et al.*, 1993).

<207> 6. 실리카 겔

<208> 수-함유 이동상의 사용은 사포닌의 분리를 위해서 종종 피할 수 없으며, 실리카 겔 HPLC는 통상적으로 그러한 용출제에 적합하지 않다. 그러나, 칼럼 충전물의 개질은 칼럼의 품질저하 없이 수용성 글리코시드의 분리를 가능하게 만들었다. 그 방법은 우선 칼럼을 메탄올로 세척한 다음 클로로포름-메탄올-에탄올-물 (62:16:16:6) 혼

합물로 세척하고, 마지막으로 분리를 위해 사용될 용매 시스템으로 세척하는 것을 포함한다 (Kaizuka and Takahashi, 1983). 예를 들어 수-함유 용출제인 헥산-에탄올-물 (8:2:0.5)와 함께 5  $\mu\text{m}$  실리카 겔 칼럼을 사용하여, 인삼 사포닌 및 부플레우룸 팔카툼 (*Bupleurum falcatum*)으로부터 유래하는 사이코사포닌의 효율적인 분리를 성취할 수 있었다.

<209> (vii) 그밖의 다른 크로마토그래피 기술

<210> 순수한 사포닌의 분리는 알콜성 또는 수성 식물추출물의 다른 극성 구성성분들을 제거하기 위해서 하나, 또는 더욱 일반적으로는, 하나 이상의 크로마토그래피 분리단계를 필요로 한다.

<211> 다양한 분리기술이 기술되어 있으며, 섬광 크로마토그래피, DCCC, 저압 액체 크로마토그래피 (LPLC), 중압 액체 크로마토그래피 (MPLC), HPLC 및 통상적인 개방-칼럼 크로마토그래피를 포함하여 트리테르펜 사포닌을 분리시키는데 사용될 수 있다 (참조예: Hostettmann *et al.*, 1986, 1991; Marston and Hostettmann, 1991b). 분리조건, 용매 시스템 등의 아이디어는 본 발명의 설명에 비추어 본 기술분야에서 숙련된 전문가가 알 수 있을 것이다. 가장 우수한 결과는 통상적으로 이하에 구체적으로 기술하는 방법과 같은 방법들의 조합을 이용하는 정책에 의해서 성취된다.

<212> 다수의 사포닌은 산성이기 때문에, 염을 형성할 수 있으며, 크로마토그래피의 종료시에 유리 사포닌을 수득하기 위해서 이온교환수지에 의한 처리가 필요할 수도 있다. 적합한 수지의 예로는 다우엑스 (Dowex) 50W $\times$ 8 ( $\text{H}^+$  형태) (Kitagawa *et al.*, 1988; Yoshikawa *et al.*, 1991), 엠버라이트 IRC 84 (Okabe *et al.*, 1989; Nagao *et al.*, 1990) 및 엠버라이트 MB-3 (Mizutani *et al.*, 1984)이 포함된다. 그러나, 분해를 방지하기 위하여 pH의 중성 및 세심한 조절이 필요하다면, 이온교환수지 상에서의 여과를 포함하는 단계는 피해야 한다.

<213> 특정의 경우에, 조 사포닌 분획은 밀접하게 관련된 생성물의 만족스러운 분리를 성취하기 위해서 메틸화된다 (유리 COOH 그룹이 존재하는 것을 가정하여) (Okabe *et al.*, 1989; Nagao *et al.*, 1989, 1990).

<214> 1. 섬광 크로마토그래피

<215> 섬광 크로마토그래피는 통상적인 개방-칼럼 크로마토그래피와 비교하여 상당한 시간절약을 가능하게 하는 정제 용 가압 액체 크로마토그래피 방법이다. 통상적인 유리칼럼을 사용하지만, 용출제는 칼럼의 상부에서 약 2bar의 최대압력에 도달하는 압축공기 또는 질소에 의해 흡착제를 통해서 구동된다. 흡착제의 과압축정은 용매가 가압하에서 구동되기 때문에 다소 감소하며, 따라서 분리능은 더 높다.

<216> 섬광 크로마토그래피는 예비분획화의 개방-칼럼 크로마토그래피 방법에 대한 신속한 대체방법으로서 사용될 수 있다. 이 방법을 사용하여 10 mg 내지 10 g의 샘플의 분리가 짧게는 10 분 내에 이루어질 수 있다. 예를 들어, 이 기술에 의해 연체동물박멸성 및 살진균성 헤테라게닌인 돌리코스 킬리만드스카리쿠스 (*Dolichos kilimandscharicus*) (Leguminosae)의 뿌리로부터 유래하는 바요게닌 및 메티카게닌 글루코사이드를 분리한다. 메탄올 추출물 (3.3 g)을 용매 시스템 클로로포름-메탄올-물 (50:10:1)을 15 ml/분의 유속으로 사용하여 60  $\times$  4 cm 칼럼 내에서 실리카 겔 상에서 분획화시킨다. 이것은 오염물질을 제거하고 두개의 사포닌-풍부 분획을 수득하는데 충분하다. 순수한 트리테르펜 글리코시드는 C-8 지지체 상에서 DCCC 및 LPLC의 조합에 의해 수득되었다 (Marston *et al.*, 1988a).

<217> 대부분의 적용은 실리카 겔 흡착제를 포함하지만, RP 물질 쪽으로 증가하는 경향이 있다. RP 섬광 크로마토그래피는 올리고삭카라이드와 같은 그밖의 다른 더 극성인 성분으로부터 사포닌을 분리시킬 수 있다.

<218> 2. 저압 액체 크로마토그래피 (LPLC)

<219> LPLC는 분리의 속도 및 조작의 용이성으로 인하여 순수한 사포닌의 분리에 유용하다. LPLC는 입자크기가 40-60  $\mu\text{m}$ 인 흡착제를 함유하는 칼럼을 사용한다. 10 바 이하의 압력에서 고유속이 가능하며, 칼럼은 대부분 유리로 만들어진다. 시판품으로 이용할 수 있는 다양한 크기의 전-충전된 칼럼 (예를 들어, 머크 (Merck) 사의 '로바 (Lobar)' 범위)이 50-500 mg 샘플범위에서 사포닌을 정제용 크로마토그래피 하는데 이상적이다. 높고 균일한 충전밀도는 우수한 분리효율을 보장한다. 또한, 흡착제의 화학이 유사하다고 가정하면, 분석용 HPLC 조건을 LPLC 분리에 전위시키는 것은 비교적 용이하다 (Marston and Hostettmann, 1991b).

<220> 대부분의 적용은 메탄올-물 혼합물로 용출되는 RP 흡착제 상에서 수행되어 왔다. 이 경우에는 일반적으로 단지 전-정제된 샘플이 주입된다. LPLC의 좋은 예는 스바르트찌야 마다가스카리엔시스 (*Swartzia madagascariensis*) (Leguminosae)로부터 연체동물박멸성 및 용혈성 올레아놀산 및 집소게닌 글리코시드를 분리하는 것에 의해 제공

된다. 건조하고 분쇄된 과실 꼬투리를 물로 추출하고, 이 추출물을 n-부탄올과 물 사이에 분배시킨다. 유기상의 개방-칼럼 크로마토그래피 후에, 사포닌은 용출제로서 메탄올-물 (75:25)을 사용하여 로바 리크로프레프 (Lobar LiChroprep) C-8 칼럼 (40-63 pro; 27 × 2.5 cm) 상에서 분리시킨다 (Borel and Hostettmann, 1987).

- <221> HPLC 컬럼을 직렬로 결합시키는 것은 부하용량 및/또는 분리력에 있어서의 증가를 허용한다. 이 연구법은 3개의 로바 (Lobar) 27 × 2.5 cm 칼럼이 연결된 경우에, 악티노스텔마 로바타 (*Actinostemma lobata*) (Cucurbitaceae)로부터 다마레인 글리코시드를 분리하는 중에 사용되었다. 용출제는 또한 소량의 물 (에틸아세테이트-n-프로판올-물 20:3:0.3)을 함유한다 (Iwamoto *et al.*, 1987).
- <222> 3. 역류 크로마토그래피
- <223> 액체-액체 분배방법은 사포닌의 분야에 적용하기에 이상적인 것으로 입증되었다. 매우 극성인 사포닌은 특히 역류 크로마토그래피 분리에 적합한데, 이것은 특히 충전물질에 대한 비가역적인 흡착에 의해 물질의 손실이 없기 때문이다. 이러한 관점은 조추출물의 직접적인 분획화를 위한 특별한 용도에 관한 것이다.
- <224> 4. 소적(droplet) 역류 크로마토그래피 (DCCC)
- <225> DCCC는 다수의 수직 유리관 내에 함유된 비혼화성 액체 정지상을 통해서 이동상의 소적을 연속적으로 통과시키는 것으로 이루어진다. 용질은 두개의 상 사이에서 연속적인 분배가 이루어진다. 이동상이 이들 관의 상부에서 도입되는지 하부에서 도입되는지에 따라, 크로마토그래피는 각각 '하행 (descending)' 또는 '상행 (ascending)' 방식이다. DCCC에 의한 밀접하게 관련된 사포닌의 분리 및 순수한 생성물의 분리 까지도 가능하게 되었다 (Hostettmann *et al.*, 1984). 실제로, 액체-고체 크로마토그래피에 의해서는 불가능하였던 특정한 분리가 이 기술에 의해서 성취되었다. DCCC는 당 잔기 상의 아세테이트 그룹의 치환위치에서만 상이한 이성체 사포닌을 분리시킬 수 있었다 (Ishii *et al.*, 1984).
- <226> 다수의 용매 시스템이 사포닌의 DCCC 분리를 위해서 사용되었으며 (참조예: Hostettmann *et al.*, 1986), 이들 중에서 클로로포름-메탄올-물 (7:13:8)의 시스템은 최대 다수의 적용분야에서 사용되었다. 클로로포름-메탄올-물 시스템은 매우 극성인 사포닌에 대해서는 상행방식으로, 또는 하나 또는 두개의 당 및 몇개의 유리 하이드록실 그룹을 갖는 사포닌에 대해서는 하행방식으로 사용될 수 있다.
- <227> 정지상으로 n-부탄올-포화된 물 및 이동상으로서 수-포화된 n-부탄올과 함께 18 칼럼 (30 cm × 10 mm ID.)을 사용하는 예비정제를 위한 대규모 DCCC 방법이 기술되었다 (Komori *et al.*, 1983). 일부의 경우에는, 2회 (또는 그 이상)의 DCCC 분리를 수행하여 순수한 사포닌을 수득한다.
- <228> 5. 원심분리성 분배 크로마토그래피 (CPC)
- <229> CPC의 최근에 도입된 기술은 그의 속도 및 가변성 (versatility)으로 인하여 큰 기대를 모으고 있다 (Marston *et al.*, 1990). CPC는 정지상의 체류를 위한 중력장 보다는 800-2000 r.p.m. 또는 그 보다 빠른 회전에 의해 생성되는 원심력장에 의한 것이다. 이 방법의 원리는 회전코일 또는 카트리지 내에 함유된 두개의 비혼화성 상 사이에서 용질을 연속적으로 비평형적 분배시키는 방법을 포함한다.
- <230> 회전코일을 기본으로하는 기구는 중심축에 대한 행성운동 또는 비행성운동을 포함할 수 있다. 이들 중의 하나인 고속 역류 크로마토그래프 (HSCCC)는 스푼 (spool) 주위를 코일로 감싼 1.6 또는 2.6 mm I.D.의 테플론 튜브로 구성된다. 1, 2 또는 3개의 스푼이 기구의 중심부를 구성한다. 카트리지 기구의 경우에는, 카트리지가 원심분리기 로토 (rotor)의 원주에 위치하며, 그들의 세로축은 원심력의 방향에 대해 평행이다. 카트리지의 수 및 용적은 기구가 투입되는 적용분야에 따라 다양할 수 있다. 분리에 2 일 또는 그 이상이 소요될 수 있는 DCCC 및 RLCC와 비교하여 CPC는 몇 시간이면 동일한 결과를 산출할 수 있다. 회전코일 또는 카트리지를 기본으로하는 기구는 그람 규모까지의 용량을 갖는다. 다층코일 행성기구 (planet instrument)는 예를 들어, 아브루스 프루티쿨로시스 (*Abrus fruticosus*) (Leguminosae)로부터 유래하는 사이클로아르테인 글리코시드의 예비정제를 위해서 사용된다 (Fullas *et al.*, 1990). 헤데라 헬릭스 (*Hedera helix*) (Araliaceae)로부터 유래하는 연체동물박멸성 트리테르펜 글리코시드는 상이한 기구인 산키 (Sanki) LLN 크로마토그래프 (6개의 카트리지; 총 용적 125 ml) 상에서 분리한다. 과일의 메탄올 추출물은 n-부탄올과 물 사이에서 분배되었다. 부탄올 분획은, 이동상으로서 용매 시스템 클로로포름-메탄올-물 (7:13:8)의 하부층을 사용하여 100 mg의 양으로 기구 내에 직접 주입한다.
- <231> 센텔라 아시아티카 (*Centella asiatica*) (Umbelliferae)로부터 유래하는 두개의 주요 사포닌인 아시아티코사이드 및 마데카소사이드는 800 r.p.m.으로 회전하는 66 m × 2.6 mm I.D. 칼럼 (350 ml 용량)이 장착된 이토



(Ito) 다층코일 분리기-압출기 (P.C. Inc.)를 이용하여 분리되었다. 400 mg의 샘플을 용매 시스템 클로로포름-메탄-2-부탄올-물 (7:6:3:4, 이동상은 하부상이다)을 사용하여 분리할 수 있다. 검출은 온-라인 (on-line) TLC를 사용한다 (Diallo *et al.*, 1991). 세사뭉 알라툼 (*Sesamum alatum*) (Pedaliaceae)로부터 트리테르펜 디삭 카라이드를 분리시키는 중에 동일한 기구를 사용한다. 용매 클로로포름-메탄올-*i*-프로판올-물 (5:6:1:4)의 하부상을 이동상으로서 선택하며, 1.25 g의 충전량이 주입된다 (Potterat *et al.*, 1992).

- <232> 6. 방법들의 조합
- <233> 단일의 크로마토그래피 단계로 추출물로부터 순수한 사포닌을 분리시키는데 충분한 경우는 드물다. 일반적으로, 필요한 생성물을 획득하기 위해서는 몇가지 정제기술을 연속하여 사용하는 것이 필요하다. 전통적인 기술 (예를 들어, 개방-칼럼 크로마토그래피) 및 현대식 고분리 방법 (예를 들어 HPLC)의 조합이 다수의 사포닌을 분리하는데 적합한 것으로 입증되었다.
- <234> 예를 들어, 사포닌의 분리를 위해서 실리카 겔 및 RP 물질 상에서의 MPLC, LPLC 및 원심분리성 TLC의 조합이 사용된다 (Hamburger and Hostettmann, 1986). 유사하게, 스마르트찌아 마다가스카리엔시스 (*Swartzia madagascariensis*) (Leguminosae)로부터 5개의 트리테르펜 사포닌을 분리하는데에는 개방-칼럼 크로마토그래피, LPLC 및 MPLC가 필요하다 (Borel and Hostettmann, 1987).
- <235> CPC는 아브루스 프루티쿨로시스 (*Abrus fruticulosus*) (Leguminosae)로부터 트리테르펜 글리코시드를 분리하기 위해서 섬광 크로마토그래피 및 OPLC와 함께 사용한다. 다층코일 기구 (용매 클로로포름-메탄올-물 7:13:8, 이동상으로는 하부상)는 초기정제를 제공하였으며, 반면에 섬광 크로마토그래피 및 OPLC는 순수한 물질을 획득하는데 효과적이었다 (Fullas *et al.*, 1990).
- <236> 비개질된 실리카 겔 상에서의 섬광 크로마토그래피와 RP 물질 상에서의 섬광 크로마토그래피 또는 개방-칼럼 크로마토그래피의 간단한 조합이 때때로 사포닌을 정제하는데 충분리 수 있다 (Schopkæt *et al.*, 1991).
- <237> 또 다른 방법에는 추출물 (예비분배 한 후)을 고다공성 중합체 상에 통과시키고, 이 단계에 이어서 조 사포닌 혼합물을 추가로 분획화시키는 것이 포함된다. 이 연구범은 노토파낙스 델라바이 (*Nothopanax delavayi*) (Araliaceae)로부터 3β-하이드록시올레안-12-엔-28,29-디오산 글리코시드를 분리하는데 사용되었다. 잎과 줄기의 메탄올 추출물을 헥산과 물 사이에 분배시킨다. 수층을 디아이온 HP-20 칼럼 상에서 크로마토그래피시키고, 물, 10% 메탄올, 50% 메탄올, 80% 메탄올, 메탄올 및 클로로포름으로 용출시킨다. 글리코시드는 80% 메탄올 용출물을 에틸아세테이트-에탄올-물 (7:2:1)을 사용하여 실리카 겔 상에서 후속 칼럼 크로마토그래피시킴으로써 획득되었다 (Kasai *et al.*, 1987a). 아칸토파낙스 센티코스 (*Acanthopanax senticosus*) (Araliaceae)로부터 트리테르펜 및 비-트리테르펜 사포닌을 분리하기 위해서는, 과정을 디아이온 HP-20 중합체 상에서 잎의 메탄올 추출물을 분획화시키는 것으로 시작한다. 메탄올로 용출된 분획을 실리카 겔 상에서 크로마토그래피시키고 (클로로포름-메탄올-물 30:10:1), 생성된 분획 모두를 리크로프레프 RP-8 상에서의 칼럼 크로마토그래피에 적용시킨다. 최종정제는 TSK-GEL ODS-120T (300 ×21 min; 메탄올-물 70:30; 6 ml/분; RI 검출) 상에서의 HPLC 또는 하이드록시아파타이트 칼럼 (아세토니트릴-물 85:15) 상에서의 크로마토그래피에 의해 이루어졌다 (Shao *et al.*, 1988).
- <238> 올레안산 글리코시드의 분리를 위한 과정은 세파텍스 LH-20 (메탄올), DCCC (클로로포름-메탄올-물 7:13:8) 및 HPLC (C-18, 메탄올-물 65:35)의 조합을 이용하는 것으로 이루어진다 (De Tommasiet *et al.*, 1991).
- <239> (viii) 발색반응
- <240> 트리테르펜의 정량적 또는 정성적 측정을 위해서 다양한 시약 중의 어느 것과 트리테르펜의 반응을 사용하여 착색된 화합물을 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 황산, 인산 및 과염소산과 같은 강무기산 중의 아니스알데히드 및 바닐린과 같은 방향족 알데히드는 510 내지 620 nm 사이의 최대흡수를 갖는, 아글리콘에 의해 착색된 생성물을 생성시킨다. 이들 반응에서는 탈수가 일어나서 불포화 메틸렌 그룹을 형성시키고, 이것이 알데히드에 의해 착색된 축합생성물을 제공하는 것으로 믿어진다. 바닐린-황산에 의해서 C-23 하이드록실 그룹을 갖는 트리테르펜 사포닌은 460 내지 485 nm 사이에 위치하는 피크를 갖는다 (Hiaiet *et al.*, 1976).
- <241> 불포화 및 하이드록실화 트리테르펜 및 스테로이드는 무수아세트산 및 황산에 의해 적색, 청색 또는 녹색의 발색을 제공한다 (Abisch and Reichstein, 1960). 테르페노이드 사포닌은 분홍색 또는 자주색 색조를 나타내는 경향이 있고 스테로이드 사포닌은 청녹색 발색을 나타내므로, 이 기술을 사용하여 두 부류를 구별할 수 있다.
- <242> 트리테르펜의 검출을 위해 다음을 포함한 대다수의 다른 시약을 사용할 수도 있다: 용액의 보라-적색 발색을

제공하는 황산세륨(IV) 또는 철(III) 염 및 황산과 같은 무기산; 하이드록시트리테르펜 및 하이드록시스테로이드와의 발색반응을 나타내는 무수아세트산-아세트산 시약 중의 염화안티몬(III)의 30% 용액; 스테로이드 글리코시드 (디오스게닌 및 솔라소딘 글리코시드)의 5,6-데하이드로-유도체와 5 $\alpha$ - 또는 5 $\beta$ -H-유도체 (예를 들어, 토마틴)을 구별하기 위해 사용될 수 있는 니트로벤젠-메탄올 중의 염화안티몬(III); 및 보레이트와 진한황산의 존재하에서 유론산의 존재를 지시할 수 있는 카바줄 (Bitter and Muir, 1962).

<243> 사포닌의 검출 및 분광광도적 측정 및 비색측정을 위한 시약의 예는 이하의 표 2에 제시되어 있다.

**표 2**

트리테르펜 사포닌에 대한 가시화 시약

시약	참조
바닐린-황산	Godin, 1954
바닐린-인산	Oakenfull, 1981
리버만-버처드 무수물-황산	(acetic Abisch and Reichstein, 1960 Wagner et al., 1984
10% 황산 중의 1% 황산세륨	Kitagawa et al., 1984b
에탄올 중의 10% 황산	Price et al., 1987
50% 황산	Price et al., 1987
p-아니스알데하이드-황산	Wagner et al., 1984
코마로우스키 (p-하이드록시벤즈알데하이드-황산)	Wagner et al., 1985
염화안티몬(III)	Wagner et al., 1984
혈액	Wagner et al., 1984
물	

<244>

<245> (ix) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 트리테르펜 글리코시드의 분리

<246> 콩과식물 추출물은 아리조나대학 (The University of Arizona, Tucson, AZ)에서 클로로포름:메탄올 또는 디클로로메탄:클로로포름 추출에 의해 제조되었다. 본 발명자들은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) (Benth.) (Leguminosae)로부터 트리테르펜 글리코시드의 혼합물을 분리한다. UA-BRF-004-DELEP-F001의 첫번째 수집은 다음과 같이 수행한다: (1) 윌리밀 (Wiley mill)에서 3 mm 입자크기로 분쇄하고, (2) 2 리터 삼출유닛 (percolation unit)에 충전시키고, (3) 분쇄된 바이오매스 (biomass)를 디클로로메탄:메탄올 (1:1)로 4 시간 동안 추출한 다음, 이어서 밤새 추출하고, 분획을 합하여 진공중에서 건조시켜 UA-BRF-004-DELEP-F001 (52 g)을 생성시킨다. F001 (51.5 g)은 에틸아세테이트로 추출하여 F004로 지정된 활성 불용성 물질 (34.7 g)을 수득한다. 실리카 겔 (Merck, 23-220 마이크론 입자크기) 1.7 kg을 사용하는 섬광 크로마토그래피를 사용하여 F004 (34.2)를 분획화시키고, 디클로로메탄:메탄올 (단계적 농도구배 - 95-0%; 메탄올 5-100%)로 51개의 670 ml 분획을 용출시킨다. 칼럼을 9 리터의 메탄올로 세척하고, 이어서 6 리터의 메탄올:물 (80:20)로 세척한 다음, 1% 포름산이 첨가된 동일한 용출제 6 리터로 세척한다. TLC를 기준으로하여 분획 23-34 및 39-40을 합하여 17.2 g의 F023을 수득한다. 8 g의 F023에 대해서 중압 액체 크로마토그래피 (MPLC, Buchi 632 시스템)를 각각, 아세토니트릴:물 (물중의 아세토니트릴 0, 10, 20, 30, 50%)의 단계적 농도구배를 사용하여 이어서 100% 메탄올 세척을 사용하여 입자크기가 15-25 마이크론인 리크로프레프 C18로 충전된 4.9 × 46 cm 칼럼 상에서 2회 사용한다. 0-20% 아세토니트릴 16 g 중에서, 수율은 불활성인 F027로 7 그램이었다. 나머지 물질을 합하여 30-40% 아세토니트릴을 사용하는 동일한 시스템에서 반복 MPLC를 수행하여 중복을 최소화시키고 분획 F028-F036을

생성시킨다. 이들 분획 중의 대부분은 항중양활성을 나타내었지만, F035 (분획 35) (최고수율 2.19 g)를 추가의 시험 및 평가를 위해서 선택한다.

<247> **II. 트리테르펜의 구조측정**

<248> 트리테르펜 및 그들의 활성의 정성적 및 정량적 측정을 위해서는 다음의 방법들을 포함한 다양한 방법들이 사용될 수 있다: 피시사이드 활성, 중량측정, 분광광도법, TLC, GC, HPLC, HMQC, HMBC, NOESY, COSY, NMR, X-선 결정학 등. 트리테르펜 사포닌의 고전적인 특성 (표면활성, 어독성)을 기준으로한 측정은 대부분 밀도법, 유도체의 비색법과 같은 광도측정법 및, 더욱 최근에는, GC, HPLC 및 특히 NMR에 의해 대체되었다. 분광광도법은 매우 민감하지만, 반응이 특이적이지 않고 파이토스테롤 및 플라보노이드와 같은 트리테르펜을 동반하는 화합물에 의해 착색된 생성물이 형성될 수 있기 때문에 조 식물추출물에서 트리테르펜을 예측하는데는 일반적으로 적합하지 않다. 사포닌에 대한 분석작업의 대부분에서 공통적인 또 다른 문제는 식물물질로부터 그들의 불완전한 추출에 있다. 그러나, 트리테르펜을 정량하는데 적합한 다수의 기술이 광범하게 이용될 수 있다.

<249> 사포닌의 구조적 설명으로 해결될 수 있는 몇가지 기본적인 문제가 있다: 진성 아글리콘의 구조; 탄수화물 잔기에서 성분 모노삭카라이드의 조성 및 서열; 모노삭카라이드 단위가 서로 연결되는 방법; 각각 글리코시드적으로 연결된 모노삭카라이드 단위의 아노머성 배열; 및 아글리콘 상의 탄수화물 잔기의 위치.

<250> 필요한 연구법은 구조에 대한 최종적인 결론에 도달하기 위해서 방법의 조합을 적용하는 것이다. 구조적 연구는 통상적으로 단계적 방법이며, 여기에서 사포닌은 그 자체가 분광학적으로 분석되는 더 작은 단편으로 점차 분해된다. 단편들로부터의 데이터를 적절히 취급함으로써 사포닌의 조성물의 아이디어가 유도된다.

<251> 분리된 순수한 사포닌의 양은 종종 소량이어서, 사포닌의 구조결정을 돕기 위해서는 가능하다면 비분해성인, 매우 민감한 고분리 방법이 바람직하다. NMR 분광학 및 질량분광법 (MS)에 있어서의 혁신은 복잡한 사포닌의 연구를 할 수 있는 필요한 이러한 능력을 제공한다. 이들 및 다른 기술의 조합함으로써, 구조결정이 이루어질 수 있다. 예를 들어, FAB-MS는 분자량 및 대부분의 경우에 당서열에 대한 정보를 제공하는 반면에, 1-D 및 2-D NMR 기술은 당결합의 위치결정을 가능하게 하고 아글리콘의 구조설명에 기여한다. 이러한 구조적 결정 및 화학적 연구는 문헌 (Tanaka and Kasai, 1984)에서 상세히 검토되었다.

<252> (i) 핵자기공명 (NMR)

<253> 올리고삭카라이드 및 글리코시드의 구조설명을 위한 현대의 방법 모두 중에서 NMR 분광법이 선행기술의 구조적인 지식이 있거나 없는 상태에서 가장 완전한 정보를 제공한다 (Agrawal, 1992). 이것은 원칙적으로 다른 방법에 의존하지 않고 완전한 구조를 제공할 수 있는 유일한 연구법이다.

<254> 1. <sup>13</sup>C- 핵자기공명

<255> 사포닌의 구조결정을 위해서 현재 광범하게 사용되고 있는 탄소-13 NMR 분광법은 빠르며 비파괴적인 방법이지만 매우 대량의 샘플 (mg 양)을 필요로한다. 스펙트럼의 분석으로 아글리콘에 대한 글리코시드체의 결합의 위치; 모노삭카라이드의 서열, 성질 및 수; 내부글리코시드 결합의 배열 및 형태; 쇄 내에 아실글리코시드의 존재; 아글리콘의 성질; 및 결합된 에스테르 산의 구조에 대한 결론을 도출해 낼 수 있다.

<256> 화학적 이동을 지정하기 위해서는 관찰된 데이터를 모델 및 관련된 화합물에 대해서 보고된 데이터와 비교하는 것이 도움이 된다. 트리테르펜 사포닌의 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 일반적인 화학적 이동의 일부에 대한 지침으로써, 바요게닌 글리코시드의 공지의 이동을 사용할 수 있다 (Domon and Hostettmann, 1984). 또한, 올레아네인 (Patra *et al.*, 1981; Agrawal and Jain, 1992), 우르세인, 루페인 (Wenkert *et al.*, 1978; Sholichin *et al.*, 1980), 호페인 (Wenkert *et al.*, 1978; Wilkins *et al.*, 1987) 및 라노스테인 (Parrilli *et al.*, 1979) 트리테르펜에 대한 <sup>13</sup>C-NMR 시그날의 지정의 편집이 이루어졌다 (Nakanishi *et al.*, 1983). 다마레인 글리코시드에 대한 적절한 데이터는 문헌 (Tanaka and Kasai, 1984)에 요약되었으며, 사이코게닌 (Tori *et al.*, 1976a) 및 사이코사포닌 (Tori *et al.*, 1976b)의 <sup>13</sup>C-NMR 분광법도 공지되어 있다. 인삼 사포게닌 및 관련된 다마레인 트리테르펜도 또한 연구되었다 (Asakawa *et al.*, 1977). 아카신산의 <sup>13</sup>C-NMR 분석법도 또한 공지되어 있다 (Kinjo *et al.*, 1992).

<257> <sup>13</sup>C-NMR에서 하이드록실 그룹이 유도체화, 즉 글리코실화, 메틸화 (또는 아세틸화)된 경우에는, 당 및 아글리콘 잔기 둘다의 α- 및 β-탄소가 특징적인 이동을 일으킨다. 예를 들어, α-CH 시그날은 다운필드 (downfield)로

이동하는 반면에,  $\beta$ -C 시그널은 업필드 (upfield)로 이동하는데, 여기에서 이동은 일반적인  $\gamma$ -업필드 이동으로부터 야기된다. 따라서, 아글리콘의 글리코실화는  $\alpha$ -탄소는 다운필드 이동을, 인접한 탄소원자는 업필드 이동 (당화 이동)을 야기시킨다 (Torit *et al.*, 1976b; Kasai *et al.*, 1977). 올레아네인에 있어서,  $3\beta$ -OH 그룹의 당화는 약 8.0-11.5 ppm 까지 C-3의 다운필드 이동을 야기시키고, C-2 및 C-4는 +0.9 또는 -0.9 내지 -1.9 ppm 까지 이동시키고, C-23은 0.5-5.1 ppm 까지 업필드 이동시키며, C-24는 -0.2 내지 1.6 ppm 까지 이동시킨다. 28-COOH 그룹의 당화는 업필드 이동 (2.5-5.0 ppm)시키고 C-17 시그널은 다운필드 이동 (1.0-2.5 ppm)시켜 카복실 탄소공명을 야기시킨다(Agrawal and Jain, 1992). 따라서, 아글리콘 및 사포닌의  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터의 비교로 당 결합의 부위가 제공된다 (Seo *et al.*, 1978; Tanaka, 1985).

<258> 유사한 방식으로,  $^{13}\text{C}$ -NMR은 모델 화합물과 비교하였을 때의 화학적이동의 치환을 고려함으로써 내부 글리코시드 결합을 지시할 수 있다 (더 간단한 사포닌에서) (Konishi *et al.*, 1978). 메틸  $\beta$ -D-푸코피라노사이드에 대한 탄소-13 NMR 데이터는 문헌 (Seo *et al.*, 1978)에 표로 나타내어져 있으며, 더 복잡한 당에 대한  $^{13}\text{C}$ -NMR 시그널은 문헌 (Gorin and Mazurek, 1975; 및 Dorman and Roberts, 1970)에 제시되어 있다. 아피오르는 특징적인  $^{13}\text{C}$ -NMR 시그널을 나타내며, 이들은 문헌에 기록되어 있다 (Sakuma and shoji, 1982; Adinolfi *et al.*, 1987; Reznicek *et al.*, 1990).

<259> 2.  $^1\text{H}$ -핵자기공명

<260>  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼 분석 및 시그널 지정이 사포닌의 구조결정에 특히 유용한 과정이 되었지만, 그들의  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼의 완전한 지정도 단지 드물게 보고되었다.  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼은 분석하기에 특징적으로 복잡하며 지루한 것으로 입증되었다. 탄수화물 잔기의 양성자 공명의 대다수는 3.0-4.2 ppm의 매우 작은 스펙트럼 폭에서 나타나서 중복되는 문제가 있다. 이들은 상이한 모노삭카라이드 잔기에서 매우 유사한 화학적이동을 갖는 비-아노머성 당 메틴 및 메틸렌 양성자의 별크로부터 유래한다.

<261> 그러나, 트리테르펜의 메틸 피크는 용이하게 식별할 수 있으며, 올레아넨, 우르센 및 관련된 골격에서 대부분의 양성자 공명 위치는 다양한 기술에 의해서 1960년대 이후에 지정되어 왔다 (Kojima and Ogura, 1989). 예를 들어, 소야사포게놀 B (33)의 완전한  $^1\text{H}$ - 및  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼 지정 및 C4-하이드록시메틸 치환체의 배열은  $^{13}\text{C}$ -DEPT,  $^{13}\text{C}$ -APT, 2-D 상관분광법 (COSY) ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) 및  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (회전프레임에서 2-D 핵 오버하우저 증가 (NOE)) 기술의 조합에 의해 달성될 수 있다 (Baxter *et al.*, 1990). 이 사포게닌에서 4급 탄소 공명의 지정은  $^1\text{H}$ -검출된 헤테로핵 다중결합 (HMBC) 및 단일결합 (HMQC) 분광법에 의해 확인되었다 (Massiot *et al.*, 1991b). 디오스게닌 및 솔라소딘의  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼의 완전한 이해도 또한 이루어졌다 (Puri *et al.*, 1993).

<262> 몇가지 유용한 데이터는 당쇄의 아마노머성 배열 및 결합에 대한  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼으로부터 취득될 수 있다. 예를 들어,  $\alpha$ -결합된 글루코즈 유닛의 C-1 양성자의 커플링상수는 약 3 Hz인 반면에  $\beta$ -결합된 유닛은 6-7 Hz의 커플링상수를 갖는다. 아노머성 당 양성자의 커플링상수에 대한 더 상세한 내용은 다른 곳에서도 찾을 수 있다 (Lemieux *et al.*, 1958; Capon and Thacker, 1964; Kizu and Tomimori, 1982).

<263> 올레아넨 및 우르센 트리테르펜의 C-2, C-3 및 C-23, C-24에서 하이드록실 그룹의 배열을 결정하는데 어려움이 있는 경우에는, 산소-함유 탄소원자 상의 양성자의  $^1\text{H}$ -NMR 시그널 피크를 분석하여 유용한 정보를 얻는다 (Kojima and Ogura, 1989).

<264> (ii) 1-D 및 2-D NMR 기술

<265> 실제로, 특정의  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼은 이동 편각을 기준으로하여 확인되고 지정될 수 있지만, 엄밀한 방식으로 NMR 연구의 결과를 해석하기 위해서는 NMR 스펙트럼을 명확하게 지정하여야 하며, 이것은 어떤 피크가 구조 내의 어떤 탄소 및/또는 수소와 회합하는지를 설정하는 것을 의미한다. 이 정보는 대부분의 경우에 1차원적  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼 데이터로부터는 취득될 수 없으며, 2차원적 연구를 이용하여 더 잘 결정될 수 있다. 이들 연구는 정보를 두개의 주파수 영역으로 전개시키고, 핵 사이의 상호작용을 밝힘으로써 스펙트럼 분석을 단순화시킨다. 다양한 펄스서열이 설정되는 기전이 복잡할 수도 있다는 사실에도 불구하고, 2차원적 NMR 스펙트럼의



해석은 통상적으로 올바르다. 다수의 상이한 2차원적 NMR 연구가 화학적구조를 풀기 위해서 고안되었다. 본 발명의 트리테르펜 사포닌의 화학적 설명에 사용하기 위해 본 발명자들에 의해 구체적으로 고려된 다른 NMR 기술 뿐만 아니라 이러한 기술의 예는 이하 및 표 3에 기술되어 있다.

<266> 1. HMBC, HMQC

<267> HMQC 및 HMBC <sup>13</sup>C 다중-양자 간섭성 스펙트럼의 사용은 아글리콘 지정 뿐만 아니라 당서열 세부사항을 위해서도 유용하다. HMBC 및 HMQC의 사용은 <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 이중핵 상관 분광법 (HETCOR)과 유사하지만, <sup>13</sup>C를 관찰하는 대신에 더 풍부한 <sup>1</sup>H가 검출된다. 예를 들어, 벨리스 페레니스 (*Bellis perennis*) (Asteraceae)로부터 유래하는 벨리스사포닌의 경우에는 2-D <sup>1</sup>H-검출된 HMQC 및 HMBC 스펙트럼과 함께 <sup>13</sup>C-NMR 데이터를 고려함으로써 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서도 모든 화학적이동을 지정할 수 있다. 두개 또는 세개의 결합커플링에 상응하는 교차 피크가 분자 내의 거의 모든 존재가능한 상관관계에 대해서 관찰되었다. 유사하게, HMQC 및 HMBC에서 장기적인 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 상관관계는 당 잔기의 서열 및 결합위치를 결정하기 위해서 사용될 수 있다 (Schopkeet al., 1991).

<268> 2. 2-D-NOESY

<269> 이 기술은 예를 들어, 사이클라미레틴 A 글리코시드 (아르디시아크리스핀 A 및 B)의 당서열 (Jansakul et al., 1987) 및 안드로사케 삭시프라이폴리아 (*Androsace saxifragifolia*) (Primulaceae)로부터 유래하는 삭시프라이폴리아의 모노삭카라이드 서열 (Waltho et al., 1986)을 결정하는데 적용될 수 있다. 칼로파낙스 사포닌 C의 아라비노스 잔기 상의 람노실 및 글루코실 결합의 위치는 페메틸화된 사포닌의 당서열 분석 후에 NOESY에 의해 확인되었다. 교차피크는 람노실 잔기의 H-1과 아라비노실 잔기의 H-2 뿐만 아니라 글루코실 잔기의 H-1 및 아라비노실 부위의 H-3 사이에서 관찰되었다 (Shao et al., 1989b). 발라니테스 에집티아카 (*Balanites aegyptiaca*) (Balanitaceae)로부터 유래하는 푸로스탄올 사포닌의 당 잔기의 구조는 400 MHz NMR 기구 상에서 2-D NOESY를 이용하여 설명되었다 (Kamel et al., 1991).

<270> 2-D NMR 기술의 공동사용으로 사르사사포게닌 글리코시드 3-O-[(α-L-람노피라노실(1→4))β-D-글루코피라노실(1→2)]-β-D-글루코피라노실-(25S)-5β-스피로스탄-3β-올의 올리고삭카라이드 절편에 대한 <sup>13</sup>C 및 <sup>1</sup>H 지정을 완결시킨다. 양성자 스펙트럼의 대혼잡에 의해 야기되는 문제를 해소시키기 위해서 DEPT, HETCOR, 장-범위 HETCOR, 상이한 동중핵 기술, NOESY 및 INEPT를 조합하여 구조설명에 적용한다 (Pantet et al., 1988d).

<271> 블리기아 웰위치 (*Blighia welwitschii*) (Sapindaceae)로부터 유래한 펜타삭카라이드 사포닌 3-O-[β-D-크실로피라노실(1→3)-α-L-아라비노피라노실(1→4)-β-D-글루코피라노실(1→3)-α-L-람노피라노실(1→2)-α-L-아라비노피라노실]-헤테라게닌 내의 당의 확인 및 서열분석은 500 MHz 기구를 사용하는 NMR 기술 만으로 가능하다. 사포닌을 우선 아세틸화시키고, 이어서 DQF-COSY, NOESY 및 ROESY 스펙트럼의 분석하여 구조를 지정할 수 있었다. NOE 데이터로부터 수득한 정보는 당 서열을 설정하는데 가장 도움이 컸다 (Pendersøet et al., 1989).

<272> 솔리다고 기간테아 (*Solidago gigantea*) (Asteraceae)로부터 유래하는 10개의 당잔기를 함유하는 사포닌은 다단계 RCT 연구를 기본으로 하는 NMR에 의해 확인되었다. 이것에는 COSY, 이중핵 COSY, COSY-타입 H-H-C 간섭성 이동 및 2-D NOESY 연구가 포함되었다. 따라서, 광범위한 분해시험은 피하였으며, 구조결정은 생성물 30 mg을 사용하여 가능하다 (Reznicek et al., 1989a; 1989b). 유사한 기술을 또 동일한 식물로부터 유래하는 다른 4개의 글리코시드인 기간테아사포닌 1-4 (9 또는 10개의 당 유닛을 함유하는 바요게닌의 비테스모사이드)의 구조결정을 위해 사용한다(Reznicek et al., 1990a).

<273> 2-D COSY, HMBC 및 ROESY NMR 연구의 조합은 미모사 테누이플로라 (*Mimosa tenuiflora*) (Leguminosae)로부터 유래하는 올레아놀산 사포닌인 미모노사이드 A에서 핵사삭카라이드의 서열 및 결합위치를 제공하기에 충분하다 (Jiang et al., 1991).

<274> 피아세틸화 및 비유도체화된 크리스안텔린 A의 2-D NMR은 양성자의 지정 및 당의 서열분석을 가능하게 한다. 에스테르화된 크실로즈 잔기는 β-형태로 존재하는 것으로 나타났으며 <sup>1</sup>C<sub>4</sub> 배열을 갖는다. 여러 기술 중에서 피아세틸화 유도체에 대해서는 HMQC, HMBC 및 ROESY (또는, 더 정확하게는 CAMELSPIN (고정된 스핀에 의해 예물레이트된 미니분자에 대해 적절한 교차-이완)), 및 천연 사포닌에 대해서는 HOHAHA, TOCSY를 사용한다. ROSEY 연구가 당 서열을 결정하는데 특히 유용하다 (Massiot et al., 1991a).

<275> 해양 유기체로부터 유래하는 트리테르펜 글리코시드의 당의 서열 및 내부글리코시드 결합은 NT<sub>1</sub> 데이터 및 NOESY

연구에 의해 확립되었지만 (Miyamoto *et al.*, 1990), 이 방법은 통상적으로 대다수의 양성자에 대한 NOE의 측정을 방해하는 3-5 ppm 영역에서의  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼의 복잡성으로 인하여 제한을 받는다. 그러나, COSY, NOESY 및 직접 및 XHCORR NMR 분광법의 조합으로 해삼인 홀로투리아 포르스칼리 (*Holothuria forskalii*)로부터 유래하는 펜타삭카라이드 트리테르펜 사포닌의 완전한 시그널 지정 및 구조분석이 가능하다 (Rodriguez *et al.*, 1991).

<276> 남극불가사리 (Antarctic starfish)인 네오스밀라스터 지오르기아누스 (*Neosmilaster georgianus*)로부터 유래하는 아스테로사포닌인 산티아고사이드의 구조결정 시에는, COSY, TOCSY, HMQC 및 ROESY NMR 분광법의 기술이 광범하게 적용되었으며, ROESY 연구는 당의 정확한 서열, 그들의 결합점 및 입체화학을 해결하기 위해서 사용되었다 (Vazquez *et al.*, 1992).

<277> 3. COSY

<278> 여기에는 2-D NMR 분광법의 두가지 기본적인 형태가 있다: 하나의 주파수 축이 스핀커플링 (J)를 함유하고 다른 하나는 화학적이동 정보를 함유하는 J-분리된 분광법, 및 두개의 주파수 축이 모두 화학적이동 ( $\delta$ ) 정보를 함유하는 상관 분광법 (Agrawal, 1992). 2-D 분석의 주된 잇점 중의 하나는 이것이 스펙트럼 크라우딩 (crowding)의 문제를 극복하는 방법을 제공한다는 점이다. 고전기장  $^1\text{H-COSY}$ 에서, 이것은 특히 2.5-4.0 ppm 부분에서 진실이며, 따라서 삭카라이드 양성자의 지정을 단순화시킬 수 있다. 바람직한 조건하에서 소정의 당 잔기 내에 존재하는 모든 양성자들이 확인될 수 있다.

<279> 몇가지 일반적인 결론이 COSY 스펙트럼으로부터 도출될 수 있다. 예를 들어, 모노삭카라이드 단위의 치환위치는 상응하는 하이드록실 양성자의 존재 또는 부재에 의해 결정될 수 있으며; 모노삭카라이드의 환 크기는 직접 측정할 수 있고; 교차-피크의 성질은 커플링상수의 예측치를 제공하는 중복피크의 다중도를 밝힌다.

<280> 특정의 경우에, 사포닌의 구조설명은 그의 당서열과 함께  $^1\text{H-NMR}$  1-D 및 2-D 분광법 만을 사용하여 이루어질 수 있다 (Massiot *et al.*, 1986; 1988b). 사포닌은 우선 피아세틸화되며, 전기장 강도가 충분한 경우에는 (> 300 MHz) 당양성자 공명이 두개의 지역으로 나뉘어진다: 4.75와 5.40 ppm 사이의 하나는 CHOAc로 지정되었으며, 3.0과 4.3 ppm 사이의 다른 하나는  $\text{CH}_2\text{OAc}$ , CHOR 및  $\text{CH}_2\text{OR}$ 로 지정되었다. 에테르 결합의 경우에 또는 에스테르 결합에 대해 5.5 ppm 보다 큰 주파수에서 아노머성 양성자는 이들 두개의 지역 사이에 위치한다.

<281> 피아세틸화는 또한 클로로포름, 벤젠 또는 아세톤에 가용성인 용매를 제공한다. 동등한 과중수소화된 용매 내에서 분자의 이동성은 시그널이 더 명확하게 관찰되고 커플링상수가 높은 정확도를 가지고 측정될 수 있도록 한다. 아세틸화된 알팔파 뿌리 사포닌의 경우에, COSY 및 장-범위 COSY 연구는 구조를  $\text{Ara}^2\text{-Glc}^2\text{-Ara}^3\text{-헤테라게닌}^{28}\text{-Glc}$ 로 확인하기에 충분하다 (Massiot *et al.*, 1986).

<282> 알팔파인 메디카고 사티바 (*Medicago sativa*) (Leguminosae)의 잎 및 트리데스모스테몬 클라에센시 (*Tridesmostemon claessenssi*) (Sapotaceae)로부터 유래하는 추가의 피아세틸화된 사포닌의 구조는 상술한 것과 유사한 기술에 의해 설명되었다. 지정 및 당서열의 동정은 HMQC ( $^1\text{J}$  커플링에 대해서) 및 HMBC ( $^2\text{J}$  및  $^3\text{J}$  커플링에 대해서) 및 동종핵 하트만-한 (Hartmann-Hahn) (HOHAHA) 삼중 릴레이된 COSY 및 ROESY 연구에 의해서 이루어졌다 (Massiot *et al.*, 1990; 1991b). 티. 클라에센시 (*T. claessenssi*)로부터 유래하는 사포닌의 에스테르 당쇄는 특이한  $^1\text{C}_4$  배열에서  $\beta\text{-D-크실로즈}$  잔기를 함유한다 (모든 치환체는 축성이다). 600 MHz에서,  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼은 피아세틸화 없이도 모든  $^1\text{H}$  화학적이동을 지정할 수 있도록 충분히 잘 분리될 수 있다 (Schopke *et al.*, 1991).

<283> 4. 장-범위 COSY

<284> 이 기술은 알리움 비네알레 (*Allium vineale*) (Liliaceae)로부터 유래하는 스테로이드 사포닌에서 당 양성자를 지정하기 위해서 사용되었다 (Chen and Snyder, 1987; 1989). 장-범위  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  COSY는 또한 사이클로아스트라게놀 사포닌에서 아글리콜 구조결정을 위해서 (Wang *et al.*, 1989b), 및 상술한 메디카고 사티바 (*Medicago sativa*) 사포닌의 내부 글루코즈의 아노머성 양성자와 내부 아라비노즈의 H-2 사이의  $^4\text{J}$  당간 커플링의 위치결정을 위해서 사용되어 왔다 (Massiot *et al.*, 1986).

- <285> 5. 이중 양자 여과된 상-민감성 COSY (DQF-COSY, DQ-COSY)
- <286> 이 기술은 알리움 (*Allium*) 스테로이드 사포닌에서 당 양성자의 지정 및 크로소프테릭스 페브리푸가 (*Crossopteryx febrifuga*) (Rubiaceae) 뿌리로부터 유래하는 16 $\alpha$ -하이드록시프로포-바신산 글리코시드에서  $^1\text{H}$  화학적 이동의 지정에 대해 적용한다 (Gariboldi *et al.*, 1990). 동일한 기술을 사용하여 사핀두스 라락 (*Sapindus rarak*) (Sapindaceae) 과실로부터 유래하는 아세틸화된 헤데라게닌 유도체에서 삭카라이드 양성자의 완전한 지정을 제공한다 (Hamburger *et al.*, 1992). 내부글리코시드 결합은 NOE 차등분광법에 의해 정해졌다 (Hamburger *et al.*, 1992).
- <287> 6. HOHAHA
- <288> 집소게닌 및 켈라산 글리코시드의 아글리콘의 양성자 커플링 네트워크는 HOHAHA 연구에 의해 완전히 설명되었다. 이들은 관찰된 상관 교차피크가 일치하는 것을 제외하고는 COSY 연구와 유사하고 (총상관 분광법 - TOCSY와 관련이 있으며), 이렇게함으로써 중복되는 피크의 우발적인 무효화 (nulling)을 방지한다. 탄수화물 쇠의 설명을 위해서는, HOHAHA 연구로부터 도출된 근접한 커플링상수는 각각의 비대칭 중심의 상대적 입체화학을 결정할 수 있도록 하며, 따라서 모노삭카라이드를 동정할 수 있다. 이중핵 H-C 릴레이 연구는 HMBC 스펙트럼으로부터 결정된 삭카라이드 잔기 및 당결합에서의  $^{13}\text{C}$  공명의 지정을 위해서 사용될 수 있다 (Frechet *et al.*, 1991).
- <289> 7. FLOCK. COLOC 및 NOE
- <290> 쌍일차 회전 데커플링펄스를 통합시킨 장-범위 이중핵 상관 분광법은 세사뭉 알라툼 (*Sesamum alatum*) (Pedaliaceae) 으로부터 유래하는 알라토사이드 A에서  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  장거리 커플링의 관찰을 위해서 사용되었다. 따라서, C-18에서의 양성자와 탄소원자 C-13, C-17 및 C-28 사이의 상호작용이 관찰되었다. 장-범위 이중핵  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  상관관계 (XHCORR)와 함께, 신규한 세코-우르센 아글리콘의 구조에 대해서 훨씬 더 많은 정보가 모아졌다 (Potterat *et al.*, 1992).
- <291> 장-범위 커플링을 위해서 최적화된  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  2-D 상관분광법 (COLOC)의 예는 크로소프테릭스 페브리푸가 (*crossopteryx febrifuga*) (Rubiaceae)로부터 유래하는 사포닌의 구조설명에서 찾을 수 있다 (Gariboldi *et al.*, 1990).
- <292> NOE는 사포닌의 구조결정에서, 예를 들어 루페로사이드 I (Okabe *et al.*, 1989) 및 카멜리딘 I 및 II (Nishino *et al.*, 1986)의 삭카라이드 양성자 및 당서열의 지정에 있어서 광범위한 용도를 갖는다. 아라비노즈의 H-2와 람노즈의 아노머성 양성자 사이에서의 NOE는 지지판에서 Rha- $^2$ Ara- 디삭카라이드 결합을 동정하는데 도움을 주었다 (Yoshikawa *et al.*, 1991b). 아노머성 양성자와 결합위치에서의 아글리콘 양성자 사이에서는 연결성이 종종 관찰되기 때문에 이 방법은 넓은 적용범위를 갖는다. 네가티브 NOE는 사이클로아스트라게놀 및 다른 사포닌에서 3-O-글리코시드의 C-3에서의 양성자와 3-O-글리코시드 잔기의 아노머성 양성자 사이에서 관찰되었다 (Wang *et al.*, 1989b).

**표 3**

<293> 트리테르펜 사포닌의 구조확립에 사용하기 위한 선택된 NMR 방법

NMR 시험 (약성어)	주석
결합된 양성자 시험 (APT), 편극전이에 의한 일그러짐 제거 증가 (DEPT), 편극전이에 의한 비민감성 핵증가 (INEPT)	탄소 유형의 구별; 스펙트럼 편집
신뢰할 수 없는 천연적 존재비 이중-양자(Incredible natural abundance double-quantum) 전이시험 (INADEQUATE)	$^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ 연결성, 분자골격의 확립

<sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-COSY a) 정상 b) 지연이 있음 c) 이중-양자 여과된-(DQF)-COSY  d) 배타적 COSY (E. COSY) e) 제미날 COSY (Gem-COSY) f) 삼중-양자 여과된 (TQF)-COSY	동중핵 이동 상관관계 직접적인 커플링의 설명 작은 커플링의 검출 비시날(vicinal) 및 제미날(germinal) 커플링상수의 측정 J의 정확한 결정 제미날 스핀 시스템의 확인 3개 또는 그 이상의 상호 커플링된 스핀 스템의 검출
지연된 일관성 전이(RCT), 총 상관관계(TOCSY), 및 하트만-한 시험 (HOHAHA)	단일 스핀 시스템에 속하는 모든 양성자의 동정; 스칼라 연결성을 가로지르는 간접성 전이 (모노스카라이드 잔기를 동정하는데 특히 유용하다)
동중핵성 핵 오버하우저 및 교환분광법 (NOESY 및 ROESY)	서로의 5Å 내에 존재하는 양성자의 동정 (공간을 통한 <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H 상관관계); 입체화학적 분석 (치환체의 배향); 잔기내 및 잔기간 연결성 (당-아글리콘 결합을 포함한 당 쉘에서의 서열분석)
<sup>1</sup> H{ <sup>13</sup> C}SBC (HETCOR 및 HMQC)	이중핵 이동 상관관계; 직접적으로 결합된 <sup>1</sup> H 및 <sup>13</sup> C 이동의 교차 할당
HMQC-TOCSY 및 HMQC-RELAY	<sup>1</sup> H 및 <sup>13</sup> C 이동의 교차할당
<sup>1</sup> H{ <sup>13</sup> C}MBC (장-범위 HETCOR 및 HMBC)	4급 C의 할당; 2-4 결합 간격의 양성자 공명과 탄소 공명의 상관관계; 잔기내 및 잔기간 할당(글리코시드간 및 당-아글리콘 결합); 분자구조의 동정

<294>

(iii) 구조설명을 위한 분광학적 기술 및 그밖의 다른 기술

<295>

사포닌 및 상응하는 아글리콘의 구조설명은 화학적 방법 뿐 아니라 분광학적 기술 및 관련된 기술, 예를 들어 IR, UV, NMR, MS, 광회전분산 (ORD), 원편광 이색성 (CD) 및 X-선 분석에 의해서도 이루어진다. 이들 기술 중의 몇가지, 가장 특히는 NMR 분광법 및 MS에서의 현대적 진보는 분해반응으로부터의 사포닌 및 그들의 상응하는 단편을 분석하는 업무를 도와줌으로써 정보를 대조하여 해당하는 구조를 결정할 수 있도록 한다. 또한, NMR 분광법은 비-파괴적인 기술이며, NMR 및 MS는 둘다 완전한 사포닌의 검사를 가능하게 한다.

<296>

사포닌 구조를 설명하기 위한 통합된 연구법이 필요한데, 여기에서 다양한 분광학적 기술은 각각 총체적인 데이터에 대해 특정한 기여를 제공한다.

<297>

1. 질량분광법 (MS)

<298>

MS에서 이온화방법의 선택은 분석하고자 하는 화합물의 극성, 성질 (liability) 및 분자량에 따라 좌우된다. 이것은 주로, FAB 및 탈착/화학적 이온화 (D/CI)와 같이 천연적으로 존재하는 글리코시드에 대한 분자량 및 당 서열 정보를 얻기 위해서 사용되는 소위 '소프트 (soft)' 이온화기술이다 (Wolfender *et al.*, 1992). 이들은 유도체화 없이도 글리코시드의 분석을 가능하게 한다. 특정의 경우에, 아글리콘의 단편화가 관찰되지만, 이 목적에는 전자충격 질량스펙트럼 (EI-MS)이 더욱 유용하다.

<299>

2. 고속 원자충격 MS (FAB-MS)

<300>

FAB 연구에 있어서, 원자 (또는 이온)의 가속화된 빔을 분석하고자 하는 샘플을 함유하는 점성액체 ('매트릭스'- 통상적으로는 글리세롤 또는 1-티오글리세롤)가 미리부하된 표적을 향해서 총으로 쏜다 (Barber *et al.*, 1981; 1982). 전자 빔이 매트릭스와 충돌하는 경우, 운동 에너지가 분자 표면에 전달되고, 이러한 분자들의 다수는 액체로부터 고 진공의 이온 공급원으로 스퍼터링된다. 이들 다수의 분자의 이온화는 스퍼터링 동안 발생하여 양이온 및 음이온 둘 다를 제공한다. 양이온은 기구 파라미터를 적합하게 선택하여 기록할 수 있지만, 음이온은 전반적으로 사포닌 작업에 보다 유용한 것으로 입증되었다.

<301>

3. 제2 이온 질량분광법 (Secondary Ion Mass Spectrometry; SIMS)

<302>

이것은 박막의 생분자 표면에 충돌하는 keV 이온이 PD-MS와 동일한 탈착을 유도하는 또 다른 입자-유도된 탈착 기술이다 (Benninghoven and Sichtermann, 1978). 미국대두 종자 (*Glycine max*, Leguminosae)로부터 분리된 3



가지의 새로운 비데스모사이드인 아세틸-대두사포닌 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 및 A<sub>3</sub>의 구조적 연구에서 이 방법의 유용성이 입증되었다. 중요한 단편 이온피크는 모노삭카라이드 단위에서의 아세틸화 방식 및 이들 유니트의 서열에 관한 정보를 제공한다 (Kitagawa *et al.*, 1988).

<303> 4. 레이저 탈착 (LD)

<304> LD에서는 단기간 레이저 펄스 (< 10 ns)에 의한 여기는 PD 및 SIMS와 유사한 탈착된 분자이온의 패턴을 나타내는 것이 증명되었다. 복잡한 글리코시드의 분석에 또한 적합한 기술인 레이저 탈착/푸리에 변환 질량분광법 (LD/FTMS)은 FAB-MS와는 상이하며 그에 대해 보충적인 스펙트럼을 제공한다.

<305> 5. 장 탈착(Field Desorption) MS (FD-MS)

<306> 이 기술은 당잔기의 수, 성질 및 서열과 함께 사포닌의 분자량을 결정하는데 실용적이다 (Komori *et al.*, 1985). 그러나, FD-MS의 실험적 복잡성 및 FAB-MS가 더 장기간 지속하는 스펙트럼을 나타낸다는 사실은 FD-MS 연구법이 최근에 대중성이 저하한다는 것을 의미한다. FD 질량스펙트럼은 이들이 양이온화된 단편의 존재로 인하여 복잡하게 되어 해석을 어렵게 만든다는 추가의 단점을 갖는다. 그럼에도 불구하고, FD-MS는 사포닌의 구조설명에 매우 성공적으로 적용되어 왔다 (Hostettmann, 1980).

<307> (iv) 액체 크로마토그래피 - 질량분광법 (LC-MS)

<308> 질량분광분석을 위한 HPLC 칼럼 유출물의 직접 및 간접 도입을 위한 효율적인 계면의 몇가지 타입이 현재 개발되어 있다. 예를 들어, 조 사포닌 분획의 정량적 분석은 세미-마이크로 HPLC를 플릿 (flit)-고속 원자충격 (FRIT-FAB) 계면과 결합시킴으로써 수행되었다 (Hattori *et al.*, 1988). 이를 위해서는, 옥타데실 실리카 칼럼 보다는 NH<sub>2</sub> 칼럼 (예를 들어, μS-Finepak SIL NH<sub>2</sub>, Jasco; 25 cm × 1.5 mm 내경 (I.D.))이 유출물의 1:20 분열 비 (split ratio) (100 μ/분 → 5 μ/분)로 사용되었다. 1% 글리세롤을 함유하는 아세토니트릴과 물의 선형농도구배를 사용한 용출은 일반적으로 이소크래틱 용출에 의해 수득되는 것보다 더 우수한 피크의 예리함을 제공한다. 분자량 1235 이하의 사포닌에 대하여 네가티브 (negative) FAB 질량스펙트럼이 기록되었다. 유사분자 (pseudomolecular) [M-1]-이온 및 당 잔기의 분해에 기인하는 단편 이온이 이 기술에 의해 관찰되었다 (Hattori *et al.*, 1988).

<309> FRIT-FAB LC-MS 시스템은 또한 로사 루고사 (*Rosa rugosa*) (Rosaceae)로부터 유래하는 이성체 사포닌인 로사멀틴 및 아르주네티 (둘다 분자량이 650)의 혼합물의 분리에 대하여 기술되어 있다. 로사멀틴 (우르세인 글리코시드) 및 아르주네티 (올레아네인 글리코시드)은 둘다 C-28에 단일의 글루코즈 잔기를 가지며, 중성가스로서 크세논을 사용하여 네가티브 및 포지티브 (positive) FAB 모드 둘다에서 분석한다. HPLC는 용매로서 아세토니트릴-물 (7:3, 0.5% 글리세롤 함유)을 1 ml/분의 유속으로 사용하는 옥타데실실리카 칼럼 (250 × 1.5 mm) 상에서 수행한다. 유사분자 [M+1]- 및 [M+1]+ 이온이 네가티브 FAB 질량스펙트럼에서 모 아글리콘에 의해 야기되는 강력한 피크와 함께 관찰되었다 (Young *et al.*, 1988).

<310> 또한, 용출제가 직접 공급원 (source)이 되는 동적 FAB 인터페이싱 (interfacing)과 유사한 기술인 동적 2차가 온 질량분광법 (SIMS)에 의해 사포닌을 검출할 수 있다. 즉, UV (206 nm) 및 SIMS 검출과 조합된 HPLC를 이용하여 하나의 모노- 및 두개의 비데스모시딕 트리테르펜 글리코시드의 혼합물을 분석한다 (Marston *et al.*, 1991).

<311> FRIT-FAB 및 CF-FAB 타입의 계면으로 인한 단점은 저유속이 필요하다는 점이다 (약 1-5 μ/분). HPLC 분리 후에는 유출물의 분열이 필요하다. 그러나, 열분무 (thermospray; TSP) 계면 (Blackley and Vestal, 1983)은 그의 단순성 및 1-2 ml/분의 유속을 처리하는 그의 능력을 특징으로 한다. 이러한 점은 이 기술을 식물 구성성분의 분석을 포함하는 문제들에 대해 더 적합하도록 만든다. TSP 기술의 중심은 화학적 이온화 MS와 유사한 분자의 소프트 이온화이다. 이것은 비휘발성이며 열적으로 불안정한 모노-, 디- 및 트리글리코시드 까지도 분석이 가능하다. 사포닌의 분자량 및 당쇄의 성질 및 서열에 대한 정보가 제공된다. TSP LC-MS는 테트라플레우라 테트라프테라 (*Tetrafleura tetraptera*) (Leguminosae) 과실의 메탄올 추출물에서 연체동물박멸성 사포닌을 분석하기 위해 사용되었다 (Maillard and Hostettmann, 1993). 이온증발 이온화를 위한 휘발성 완충제를 제공하기 위해서 0.5 M 암모늄아세테이트 (0.2 ml/분)의 후-칼럼 첨가에 의해서 TSP LC-MS 총이온전류 (질량범위 450 내지 1000 amu)는 206 nm에서 HPLC-UV 분석과 잘 일치한다. m/z 660, 676, 880 및 822에서 이온 흔적량은 주 사포닌의 유사분자 [M+H]+ 이온을 나타내는 시그널을 제공한다. 추출물 내의 각각의 사포닌에 대해 획득된 TSP 질량스펙트럼은 유사분자 [M+H]+ 이온에 대한 주피크를 나타내었다. 당잔기의 단편화는 주된 연체동물박멸성

사포닌 아리다닌에 대해서 관찰되었으며, 여기에서 N-아세틸글루코실 잔기의 손실은 아글리콘에 대한 [A+H]<sup>+</sup> 피크를 발생시킨다 (Maillard and Hostettmann, 1993).

- <312> GC-MS가 최소의 실용적 용도를 가지고 있고, HPLC 단독으로는 피크의 동일성 만이 그들의 보유시간에 의해 확인 될 수 있기 때문에, 사포닌의 연구에 적용된 LC-MS는 큰 잠재적 유용성을 갖는다. LC-MS는 식물추출물에서 트리테르펜 글리코시드의 분석을 가능하게 할 뿐 아니라, 또한 MS-MS를 경유하여 추출물 내의 개개 사포닌을 구조 결정하는데 유용하다.
- <313> (v) 적외선 분광법 (IR)
- <314> IR의 통상적인 용도와 별도로, 여기에는 사포닌의 구조설명에 특히 적합한 하나 또는 두개의 특징이 있다. 1350과 875 cm<sup>-1</sup> 사이의 몇개의 강력한 밴드가 스피로케탈 측쇄에 대해 특징적인 것이기 때문에, IR은 스테로이드 사포게닌의 특정화에 유용하다(Jones et al., 1953). 4개의 밴드, 즉 980 (A 밴드), 920 (B 밴드), 900 (C 밴드) 및 860 cm<sup>-1</sup> (D 밴드)는 E 및 F 환의 특징으로 지정되었다. 25R-사포게닌의 경우에, B 밴드는 C 밴드 보다 더 강력한 흡광도를 가지지만, 25R-시리즈에서 이 관계는 반전된다. E 및 F 환에 또는 27 위치에 산소 치환체를 갖는 사포게닌에서는 4개의 밴드가 상당히 많이 변화한다 (Takeda, 1972).
- <315> 사포닌 내에 이온화된 카복실 그룹의 존재는 IR 스펙트럼에서 1610 및 1390 cm<sup>-1</sup>에서의 밴드에 의해 동정될 수 있다 (Numata et al., 1987). 분자 내의 카복실 그룹이 이온화되는지 여부를 아는데 중요하기 때문에, 이 정보는 분리과정 중에 유용하다.
- <316> (vi) X-선 결정학
- <317> X-선 결정학은 센텔라 아시아티카 (*Centella asiatica*) (Umbelliferae)로부터 유래하는 트리삭카라이드 트리테르펜 아시아티코사이드의 분자기하학을 설명하기 위해 사용되었다. 결정화는 디옥산으로부터 이루어졌다 (Mahato et al., 1987). X-선 회절분석을 통해 또한 몰산 3-β-D-글루코사이드의 구조를 동정하는데 성공하였다 (Pegel and Rogers, 1985).
- <318> X-선 결정학은 특히 아글리콘의 구조적 문제를 설명하는데 유용하다. 세사뭉 알라툼 (*Sesamum alatum*) (Pedaliaceae)으로부터 유래하는 알라토사이드 A의 아글리콘의 구조를 결정하는데 유용한 정보는 산 가수분해 후에 생성된 인공산물의 결정성 트리아세이트의 X-선 회절분석에 의해 수득되었다 (Potterat et al., 1992). 돌리코스 킬리만드샤리쿠스 (*Dolichos kilimandscharicus*) (Leguminosae)의 껍질로부터 유래하는 메디카젠산 3-O-글루코사이드의 모 아글리콘인 메디카젠산의 X-선 결정학 연구로 분자가 시스-융합된 D 및 E 환을 갖는 것으로 밝혀졌다. 환 C는 약간 비틀어진 소파 형태를 가졌으며, 환 A, B, D 및 E는 의자 형태를 가졌다 (Stoeckti-Evans, 1989).
- <319> (vii) 분해반응
- <320> 트리테르펜 사포닌은 그들의 사이클릭 피라노즈 또는 푸라노즈에서 삭카라이드의 헤미아세탈 하이드록실 그룹이 트리테르펜 또는 스테로이드 잔기와 빌드 (build) 아세탈을 형성하는 글리코시드이다. 헤미아세탈 하이드록실과 트리테르펜 또는 스테로이드 사이의 에테르 결합은 글리코시드성 결합으로 알려져 있다. 올리고삭카라이드의 모노삭카라이드 구성성분도 또한 에테르 결합에 의해 결합된다 (글리코시드간 결합).
- <321> 글리코시드의 가수분해가 완료되면, 글리코시드 결합은 분해되어 성분 모노삭카라이드 및 비-탄수화물 잔기 (아글리콘 또는 케닌)를 유리시킨다. 사포닌의 가수분해로 인하여 생성된 비-탄수화물 부분은 사포게놀 또는 사포게닌이라 부른다. 모든 공지된 사포닌은 에테르 또는 에스테르 결합을 갖는 O-글리코시드이다.
- <322> 다수의 화학적 반응 및 방법이 더 용이한 분석을 위해서 사포닌을 더 작은 유니트로 파괴시키는데 사용되었다 (참조예 Kitagawa, 1981). 이러한 방법은 트리테르펜 사포닌의 구조결정에서 특별한 용도를 찾을 수 있다.
- <323> 1. 산성 가수분해
- <324> 산성 가수분해는 사포닌을 고정된 길이의 시간 동안, 예를 들어 4시간 동안, 2-4 M 염산 중에서 환류시킴으로써 수행될 수 있다. 가수분해 후에 잔류하는 수용액을 디에틸에테르, 클로로포름 또는 에틸아세테이트로 추출하여 아글리콘을 수득한다. 수층으로부터 당의 추출은 용액을 중화시키고 (알칼리 또는 염기성 이온교환수지에 의해서) (Tschesche and Forstmann, 1957; Sandberg and Michel, 1962) 증발건고시킨 후에 피리딘을 사용하여 수행한다. 사포닌은 이 방법에 의해서 그들의 구성성분으로 완전히 분해되어 아글리콘의 동일성 및 존재하는 모노

삭카라이드의 수 및 성질에 대한 정보를 얻는다. 프로사포게닌 (염기성 가수분해에 의해 에스테르 결합을 분해시킨 후에 수득됨)이 산가수분해되면, 아글리콘에 에테르-연결된 당체의 성질이 설정될 수 있다. 수성 반응매질은 알콜 또는 디옥산으로 대체될 수 있다.

<325> 염산 이외에, 황산도 또한 사포닌의 가수분해를 위해서 사용될 수 있다. 황산을 사용하는 경우에는, 분자의 분해 또는 재배열의 가능성은 적지만 에테르 결합의 분해는 효율적이지 않다. 디안투스 (*Dianthus*) 사포닌으로부터 유래하는 집소겐산을 수득하는 편리한 방법은 예를 들어, 디옥산 중의 1 M 황산을 사용한 가수분해를 포함한다 (Oshima *et al.*, 1984). 물 및 물-에탄올 중에서 염산 및 황산에 의한 가수분해조건의 비교연구로 삭카라이드의 최고 회수율이 사포닌을 밀봉된 진공앰플 내에서 5% 황산/물과 함께 2시간 동안 가열함으로써 얻어지는 것으로 밝혀졌다 (Kikuchi *et al.*, 1987). 약간 더 온화한 가수분해는 트리플루오로아세트산을 사용하여, 예를 들어 1 M 트리플루오로아세트산 중에서 3시간 동안 환류시킴으로써 이루어질 수 있다.

<326> 용액 중에서 사포닌을 가수분해시키는 대체방법은 이들을 염산 증기로 처리함으로써 TLC 플레이트 상에서 직접 가수분해시키는 것이다. 일단 산이 증발되면, 존재하는 모노삭카라이드를 동정하기 위하여 TLC 용매에 의한 정상적인 용출이 수행된다 (Kartnig and Wegschaider, 1971; He, 1987). 이 방법에 의해서, 아가베사이드 B의 부분가수분해 후에 말단 당인 크실로스와 갈락토스가 동정되었다. TLC 플레이트는 용매 클로로포름-메탄올-물 (8:5:1)로 전제시키고 아닐린-디페닐아민- $H_3PO_4$ -메탄올 (1:1:5:48)을 이용하여 검출한다 (Uniyal *et al.*, 1990).

<327> 2. 염기성 가수분해

<328> 0-아실글리코시드성 당체의 분해는 일반적으로 0.5 M 수산화칼륨과 함께 환류시킴으로써 염기성 가수분해 조건 하에서 이루어진다. 또한, 수산화칼륨의 1-20% 에탄올성 또는 메탄올성 용액이 사용될 수 있지만, 이 경우에는 특히 트리테르펜 산의 카복실 그룹이 메틸화하는 위험이 있다. 다우엑스 (Dowex) 1과 같은 이온교환제는 온화한 염기성 가수분해조건을 제공한다 (Bukharov and Karlin, 1970). 또 다른 방법은 콜리딘 중의 리튬요오다이드를 사용하는 것이다 (Kochetkov *et al.*, 1964).

<329> 반응조건을 주의해서 조절함으로써, 다양한 에스테르 잔기를 선택적으로 분해시킬 수 있다. 예를 들어, 키주타 (kizuta) 사포닌을 0.5 M 수산화칼륨 중에서 30 분 동안 환류시킴으로써 가수분해시켜 비테스모사이드의 C-28에서 당을 제거한다. 그러나, 사포닌을 0.1 M 수산화칼륨 중에서 20시간 동안 실온에서 교반하면 C-28 에스테르 글리코시드쇄 상의 아세테이트 그룹이 선택적으로 제거되었다 (Kizuet *et al.*, 1985b).

<330> 3. 부분가수분해

<331> 특정의 경우에, 사포닌이 매우 분지되거나 긴 당쇄를 갖는 경우에는, 구조설명에 더 용이한 분획을 수득하기 위하여 부분가수분해를 포함하는 방법이 필요하다. 이것은 산, 또는 추가로 효소를 사용하여 이루어질 수 있다. 올리고삭카라이드 및/또는 잔여 사포닌 부분을 분리한 다음 특정화한다.

<332> 예를 들어, 파이톨라카 도데칸드라 (*Phytolacca dodecandra*) (Phytolaccaceae)로부터 유래하는 사포닌을 0.1 M 염산에 의해 45분 동안 가수분해시켜 3가지 생성물의 혼합물을 수득한다. 이들 화합물을 RP-LPLC에 의해 분리하여 그들의 당 서열은 알디톨 아세테이트의 MS,  $^{13}C$ -NMR 및 GC-MS에 의해 측정한다. 이 정보들을 모두 합하여 화합물인 올레아놀산 유도체에 대한 화학식의 지정을 할 수 있었다 (Dorsaz and Hostettmann, 1986).

<333> 디옥산 내에서의 가수분해는 더 온화한 조건을 제공하며, 부분가수분해가 이루어질 수 있다. 이 실시예에서는, 사포닌을 디옥산-0.1 M 염산 (1:3) 중에서 6시간 동안 환류시킨다 (Ikram *et al.*, 1981). 사포닌을 부분적으로 가수분해시키는 또 다른 방법은 알콜 중의 트리테르펜 글리코시드의 용액을 알칼리금속 (나트륨 또는 칼륨)으로 처리한 다음 흔적량의 물을 첨가하는 것이다 (Ogihara and Nose, 1986).

<334> 4. 수열분해 (hydrothermolysis)

<335> 트리테르펜 글리코시드의 수열분해로 상응하는 아글리콘의 형성이 유도되며, 따라서 구조결정을 도와줄 수 있다. 이 방법은 글리코시드를 샘플에 따라서, 물 또는 물-디옥산과 함께 100°C 내지 140°C에서 10 내지 140시간 동안 가열하는 것을 포함한다. 예를 들어, 트리테르펜 3,28-O-비스글리코시드의 수열분해는 상응하는 3-O-글리코시드를 생성시킨다 (Kim *et al.*, 1992).

<336> 5. 효소 가수분해

<337> 인공산물의 형성 없이 사포닌으로부터 당잔기를 분해시키는 매우 효율적이며 온화한 방법이 효소 가수분해이다.

모든 당에 대해 적절한 하이드롤라제가 시판되고 있지는 않지만, β-글루코시다제에 의한 β-글루코즈 잔기의 분해는 완전히 정확하다. 특이효소에 의한 분해의 추가적인 잇점은 당잔기의 아노머성 배열이 자동적으로 증명된다는 점이다. 트리테르펜 글리코시드의 가수분해에 사용하기 위해 특별히 고려되는 특성의 효소제제는 β-갈락토시다제 하이드롤라제, 셀룰라제, 조 헤스페리디나제, 펙티나제 및 나린기나제이다.

- <338> 헤스페리디나제, 나린기나제, 펙티나제, 셀룰라제, 아밀라제 및 에밀신의 조제를 포함하는 체계적인 연구로 헤스페리디나제, 나린기나제 및 펙티나제가 진세노사이드를 가수분해시키는데 가장 효과적이었음이 밝혀졌다 (Kohda and Tanaka, 1975).
- <339> (vii) 가수분해 후의 아글리콘의 분석
- <340> 일단 가수분해가 완료되면, 아글리콘을 단순히 여과하거나 물-유기 용매 분배시킴으로써 가수분해물로부터 분리시켜 공지의 트리테르펜에 대비하여 분석할 수 있다. 가장 통상적인 방법은 디이소프로필에테르-아세트 (75:30)과 같은 용매를 사용하는 TLC에 의한 것이다. 분무시약은 주로 사포닌의 분석을 위해서 사용된 것들이다 (참조 표 2).
- <341> 기체-액체 크로마토그래피는 트리테르펜의 유도체화를 필요로 한다. 예를 들어, 올레아놀산 및 우르솔산의 메틸에스테르는 30% OV-17 또는 SE-30이 충전된 유리칼럼 상에서 GC에 의해 분리한다 (Fokina, 1979). 트리테르펜은 소야사포게놀 A-E 및 알팔과 내의 메디카게닌산의 경우에서와 같이, N,O-비스(트리메틸실릴)아세트아미드 및 클로로트리메틸실란을 사용한 유도체화 후에 GC에 의해 측정할 수 있다 (Jurzyska and Jurzyska, 1978).
- <342> GC-MS의 기술은 또한 사포게닌의 특정화에도 유용하다. 트리메틸실릴 유도체를 통상적으로 제조한 다음에 분광계에서 분석한다. 예로는 올레아네인- 및 우르세인-타입 트리테르펜의 연구에 적용하는 것이다. 9개의 실릴화된 트리테르펜을 OV-101 충전물 상에서의 GC에 의해 분리하였으며, 그들의 질량스펙트럼 패턴을 조사하였는데, 12-엔 이중결합을 함유하는 것은 특징적인 레트로-디엘스-알더 (retro-Diels-Alder) 반응을 일으켰다 (Burnouf-Radosevich *et al.*, 1985). 이 기술은 또한 감초로부터 유래하는 트리테르펜의 결정을 위해서도 사용되었다 (Bombardelli *et al.*, 1979).
- <343> HPLC 분석은 유도체화가 필요치 않으며, 트리테르펜의 분석에 대해 탁월한 재현성 및 민감성을 나타낸다. 정상-상 (퀴노아 사포게닌의 분석; Burnouf-Radosevich and Delfel, 1984) 및 RP-HPLC (Lin *et al.*, 1981) 둘다가 사용될 수 있지만, RP-HPLC의 단점은 화합물이 수성 이동상 내에 침전하는 경향이 있다는 점이다.
- <344> (ix) 가수분해 후의 당의 분석
- <345> 모노삭카라이드의 분석은 예를 들어, 실리카 겔 플레이트 상에서 에틸아세테이트-메탄올-물-아세트산 (65:25:15:20) 및 n-부탄올-에틸아세테이트-i-프로판올-아세트산-물(35:100:60:35:30)과 같은 용매를 사용하는 TLC에 의해 수행할 수 있다 (Shiraiwa *et al.*, 1991). 검출은 일반적으로 p-아니스딘 프탈레이트, 나프토폰레조르신, 티몰황산 (Kartnig and Wegschaidner, 1971) 또는 트리페닐테트라졸륨클로라이드 (Wallenfels, 1950; Kamel *et al.*, 1991)을 사용한다. 또한, 모노삭카라이드의 정량적 분석이 GC 또는 HPLC에 의해 이루어질 수 있다.
- <346> 다수의 HPLC 방법이 다음을 포함하는 당의 분석에 대하여 보고되었다: 아세토니트릴-물 (75:25)을 사용한 NH<sub>2</sub>-결합된 칼럼 상에서의 분석 (Glombitza and Kurth, 1987); 굴절지수 검출에 의한 C-18 칼럼 (아세토니트릴-물 4:1) 상에서의 분석, 정량적 목적으로 HPLC 피크의 적분값을 표준물과 비교한다 (Adinolfi *et al.*, 1987); 용출제로서 0.005 M 황산 (0.4 ml/분)을 사용하여 아미넥스 (Aminex) 이온배제 HPX-87H 칼럼 (BioRad) 상에서 분석 (Adinolfi *et al.*, 1990); 및 HPLC에 의한 당 p-브로모벤조에이트 (5% 염산-메탄올을 사용한 사포닌의 가메탄올 분해에 이어서 메틸 당의 p-브로모벤조일화에 의해 형성됨)의 분석 및 진성유도체와의 비교에 의한 동정 (Kawai *et al.*, 1988; Sakamoto *et al.*, 1992).
- <347> GC의 경우에는 퍼실릴화된 당을 사용하거나 (Wulff, 1965) 알디톨 아세테이트 유도체의 GC-MS 분석이 수행된다. 적합하게 유도체화된 모노삭카라이드의 GC-푸리에 변형 IR (FTIR) 분석이 대체방법이다 (Chen and Snyder, 1989).
- <348> 가장 통상적으로 존재하는 당은 D-글루코즈, D-갈락토즈, L-아라비노즈, D-크실로즈, D-푸코즈, L-람노즈, D-퀴노보즈, D-글루쿠론산 및 D-리보즈이다.
- <349> **IV. 본 발명의 화합물의 유도체**



- <350> 본 명세서에 상세히 기술한 바와 같이, 특정한 잇점은 트리테르펜 글리코시드를 새로운 특징, 더 긴 생체내 반감기 또는 다른 유익한 특성을 제공하도록 조작함으로써 성취될 수 있는 것으로 생각된다. 이러한 기술에는 트리테르펜 글리코시드 또는 개개 트리테르펜 분자 자체의 조작 또는 변형, 당의 변형 또는 제거, 및 면역글로부린 및 Fc 부분을 포함한 다양한 단백질 또는 비단백질 성분과 같은 불활성 담체에 대한 트리테르펜 화합물의 접합이 포함되나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 더 긴 반감기는 "서방성"으로 사용되는 약제학적 조성물과 동일 개념이 아님을 이해하여야 한다. 서방성 제제는 일반적으로 장기간에 걸쳐서 일정한 약물 수준을 제공하도록 고안된 것이다. 본 발명에 따르는 트리테르펜 글리코시드와 같은 약물의 반감기가 증가하는 것은 투여시에 높은 혈장수준을 제공하고자 하는 것이며, 이 수준은 더 장기간 동안 유지되지만, 일반적으로 화합물의 약력학에 따라 저하된다.
- <351> (i) 트리테르펜 및 연결된 분자의 접합체
- <352> 상술한 바와 같이, 본 명세서에서 동정된 본 발명의 트리테르펜 화합물은 화자에게서 본 발명의 화합물로 치료할 수 있는 질병을 치료할 때에 트리테르펜 글리코시드의 효능을 개선시키기 위해서 특정 분자에 연결될 수 있다. 이러한 분자의 구체적인 예로는 표적화제 및 트리테르펜 화합물의 생체내 반감기를 증가시키는 성분이 포함된다. 트리테르펜 화합물은 각각의 부분이 생물학적 활성, 예를 들어 본 명세서에 기술된 화합물의 항종양활성을 심각하게 손상시키지 않으면서 의도된 기능을 수행하도록 하는 작동적 방식으로 이러한 제 2 분자에 연결될 수 있다.
- <353> 본 발명의 트리테르펜 조성물은 제 2 화합물에 직접 연결될 수 있거나, 링커 그룹을 통해서 연결될 수 있다. 용어 "링커 그룹"은 트리테르펜 화합물 또는 트리테르펜 혼합물을 트리테르펜 화합물의 생물학적 활성을 저해하지 않는 성분에 공유적으로 커플링시키기 위해서 사용될 수 있는 하나 이상의 이작용성 분자를 의미한다. 링커 그룹은 결합이 생물학적 활성, 예를 들어 본 발명의 화합물의 항종양활성을 저해하지 않는 한은 트리테르펜의 어떠한 부분에서나 결합될 수 있다.
- <354> 본 발명의 트리테르펜 화합물을 제 2 성분에 연결시키는 예시적인 양태는 트리테르펜의 활성 에스테르를 제조하고, 이어서 활성 에스테르를 연결시키고자 하는 성분 상의 친핵성 작용그룹과 반응시키는 것이다. 활성 에스테르는 예를 들어, 트리테르펜 상의 카복실 그룹을 디사이클로헥실카보디이미드 (DCC), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 (EDC) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 메티오다이드 (EDCI)와 같은 탈수제의 존재하에서 알콜과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 접합체를 형성시키기 위한 EDC의 사용은 미합중국특허 제 4,526,714 호; PCT 출원공개 제 WO91/01750 호; 및 문헌 (Arnon *et al.*, 1980)에 기술되어 있으며, 이들의 기술내용은 그대로 본 명세서에 참고로 포함되었다). 그후에 트리테르펜에 연결시키고자 하는 성분, 예를 들어 중앙-특이적 항체를 수용액 중에서 활성화된 에스테르와 혼합시켜 접합체를 제공한다.
- <355> 트리테르펜과 성분 사이에 링커 그룹이 필요한 경우에는 트리테르펜 글리코시드의 활성 에스테르를 상술한 바와 같이 제조하여 링커 그룹, 예를 들어 2-아미노에탄올, 알킬렌디아민, 글리신과 같은 아미노산, 또는 글리신 t-부틸 에스테르와 같은 카복시-보호된 아미노산과 반응시킬 수 있다. 링커가 보호된 카복시 그룹을 함유하는 경우에, 보호그룹을 제거하고 링커의 활성 에스테르를 제조한다 (상술한 바와 같이). 그후, 활성 에스테르를 제 2 분자와 반응시켜 접합체를 제공한다. 대체방법으로, 제 2 성분을 석신산 무수물로 유도체화시켜 성분-석시네이트 접합체를 제공할 수 있으며, 이것은 EDC 또는 EDCI의 존재하에서 링커 상에 유리 아미노 또는 하이드록실 그룹을 갖는 트리테르펜-링커 유도체와 축합시킬 수 있다 (참조예 WO91/01750, 이것의 기술내용은 그대로 참고로 본 명세서에 포함되어 있다).
- <356> 유리 아미노 그룹을 갖는 링커를 포함하는 트리테르펜 글리코시드 접합체를 제조하고 유리 아미노 그룹을, 단백질 항원의 설프하이드릴 그룹과 반응하는 설포석신이미딜 4-(N-말레이미도사이클로헥산)-1-카복실레이트와 같은 헤테로이작용성 가교결합체와 가교결합시킬 수도 있다.
- <357> 트리테르펜 글리코시드는 또한, 알데히드 그룹을 아미노 링커와 반응시켜 중간체 이민 접합체를 형성시키고, 이어서 나트륨보로하이드라이드 또는 나트륨시아노보로하이드라이드로 환원시킴으로써 링커 그룹에 커플링시킬 수도 있다. 이러한 링커의 예로는 2-아미노에탄올과 같은 아미노 알콜 및 에틸렌디아민, 1,2-프로필렌디아민, 1,5-헵탄디아민, 1,6-헥산디아민 등과 같은 아미노 알콜이 포함된다. 그후에 트리테르펜 글리코시드는, 우선 석신산 무수물에 의해 석시네이트화된 유도체를 형성시킨 다음 DCC, EDC 또는 EDCI를 사용하여 트리테르펜 글리코시드-링커 접합체와 축합시킴으로써 링커에 커플링시킬 수 있다.
- <358> 또한, 트리테르펜 글리코시드 또는 아글리콘은 펄로오테이트로 산화시킬 수 있으며, 그로부터 생성된 디알데히

드는 이하에 열거되는 아미노알콜 또는 디아미노 화합물과 축합한다. 그후, 링커 상의 유리 하이드록실 또는 아미노 그룹을 DCC, EDC 또는 EDCI의 존재하에서 항원의 석시네이트 유도체와 축합시킬 수 있다. 많은 타입의 링커들이 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 트리테르펜 접합체의 생성에 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 링커의 예는 이하의 표 4에 열거되어 있다.

표 4a

헤테로-이작용성 가교결합제

링커	반응하는 물질	이점 및 용도	스페이서 아암의 길이/가교결합후
SMPT	1급 아민 설프하이드릴	· 높은 안정성	11.2 A
SPDP	1급 아민 설프하이드릴	· 티올화 · 분해될 수 있는 가교결합	6.8 A
LC-SPDP	1급 아민 설프하이드릴	· 연장된 스페이서 아암	15.6 A
설프-LC-SPDP	1급 아민 설프하이드릴	· 연장된 스페이서 아암 · 수용성	15.6 A

<359>

표 4b

SMCC	1급 아민 설프하이드릴	· 안정한 말레이미드 반응성 그룹 · 효소-항체 접합  · 햅텐(Hapten)-운반 단백질 접합	11.6 A
설프-SMCC	1급 아민 설프하이드릴	· 안정한 말레이미드 반응성 그룹 · 수용성 · 효소-항체 접합	11.6 A
MBS	1급 아민 설프하이드릴	· 효소-항체 접합  · 햅텐(Hapten)-운반 단백질 접합	9.9 A
설프-MBS	1급 아민 설프하이드릴	· 수용성	9.9 A
SIAB	1급 아민 설프하이드릴	· 효소-항체 접합	10.6 A
설프-SIAB	1급 아민 설프하이드릴	· 수용성	10.6 A
SMPB	1급 아민 설프하이드릴	· 연장된 스페이서 아암 · 효소-항체 접합	14.5 A
설프-SMPB	1급 아민 설프하이드릴	· 연장된 스페이서 아암 · 수용성	14.5 A
EDC/설프-N HS	1급 아민 카복실 그룹	· 햅텐(Hapten)-운반 단백질 접합	0
ABH	카보하이드레이트 비선택적	· 당 그룹과 반응	11.9 A

<360>

<361>

(ii) 합리적인 약물 디자인

<362>

합리적인 약물 디자인의 목표는 생물학적 활성화합물의 구조적 동족체를 생산하는 것이다. 이러한 동족체를 생

성시킴으로써, 천연분자에 비해서 더 활성이 있거나 안정하거나, 변질에 대해 상이한 감수성을 갖거나, 다양한 다른 분자의 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 형성시킬 수 있다. 한가지 연구범에서는 본 발명의 트리테르펜 화합물 또는 그의 단편에 대해 3차원적 구조를 생성시킬 수 있다. 이것은 X-선 결정학, 컴퓨터 모델링 또는 두가지 방법의 조합에 의해 이루어질 수 있다. 대체연구범에는 트리테르펜 분자 전체에 걸쳐서 작용그룹을 무작위적으로 치환시키는 것이 포함되며, 얻어진 기능에 대한 영향을 측정한다.

<363> 또한, 기능적 시험에 의해 선택된 트리테르펜 화합물 특이항체를 분리시킨 다음 그의 결정구조를 설명할 수도 있다. 일반적으로, 이 연구범에서는 후속 약물 디자인의 기본이 될 수 있는 약제코어 (pharmacore)가 수득된다. 작용적인 약리학적 활성 항체에 대한 항유전형 항체를 생성시킴으로써 전체적으로 단백질 결정학을 우회할 수도 있다. 거울상의 거울상으로서 항유전형의 결합부위는 원래의 항원의 동족체인 것으로 예상될 수 있다. 그후에 항유전형을 사용하여 화학적으로- 또는 생물학적으로-생산된 펩타이드의 은행으로부터 펩타이드를 동정하여 분리할 수 있다. 선택된 펩타이드는 그후에 약제코어로서 작용한다. 항유전형은 항원으로서 항체를 사용하여 항체를 생산하는 본 명세서에 기술된 방법을 이용하여 생성될 수 있다.

<364> 따라서, 출발 트리테르펜 화합물에 비해서 개선된 생물학적 활성, 예를 들어 항종양활성을 갖는 약물을 디자인할 수 있다. 화학적 분리방법 및 본 명세서에서의 설명의 덕택으로, 충분한 양의 본 발명의 트리테르펜 화합물이 생산되어 결정학연구를 수행할 수 있다. 또한, 이들 화합물의 화학적 특성에 대한 지식은 구조-작용 관계를 컴퓨터를 사용하여 예상할 수 있도록 한다.

<365> **V. 본 발명의 트리테르펜 화합물에 의한 암의 치료**

<366> 암의 발생에 있어서, 포유 동물 세포는 비정상적인 증식을 유도하는 유전적으로 결정된 일련의 변화를 거친다. 이것은 일반적으로 (1) 개시 (외부인자 또는 자극이 하나 이상의 세포에서 유전적 변화를 유발시키는 때) 및 (2) 촉진 (염증을 포함할 수 있는 추가의 유전적 및 대사적 변화를 포함)으로 불리우는 단계에서 일어날 수 있다. "촉진단계" 중에, 세포는 세포소멸이 차단되는 세포성장단계로 대사적 전이를 시작한다.

<367> 암세포는 세포주기의 조절단계의 조절의 손실 이외에도 세포소멸 조절의 손실을 특징적으로 나타낸다. 암세포 (악성세포)는 악성의 시작으로 개시 및 촉진단계 중에 일련의 대사적 변화를 통해서 정상적인 성장조절 기전을 피한다. 이들 변화는 세포에서 유전적 변형의 결과이다. 이들 유전적 변형은 (i) 원종양유전자 (protooncogene)의 돌연변이 및/또는 증가된 발현을 활성화시키고/시키거나, (ii) 하나 이상의 종양억제유전자의 돌연변이 및/또는 감소된 발현을 불활성화시키는 것을 포함한다. 대부분의 종양유전자 및 종양억제유전자 생성물은 세포주기 유입 또는 유출을 조절하고, 분화를 촉진하며 DNA 손상을 감지하고, 복구기전을 개시시키고/시키거나 세포사멸 프로그램을 조절하는 시그널 변환경로의 성분이다. 거의 모든 종양은 다수의 종양유전자 및 종양억제유전자에서 돌연변이를 갖는다. 세포성장, 분화, DNA 손상조절 및 세포소멸을 조절하는 다수의 평행기전을 이용하는 것으로 결론을 내릴 수 있다.

<368> 본 발명의 트리테르펜 화합물은 개체를 암으로부터 예방적으로 보호하거나 암의 진단 후에 치료학적으로 치료하기 위해서 그러한 필요가 있는 개체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 암의 개시 및 촉진을 억제하고, 암/악성세포를 사멸시키고, 세포성장을 억제하고, 세포소멸을 유도하고, 전이를 억제하고, 종양 크기를 감소시키고, 종양세포의 악성 표현형을 다른 식으로 역전시키거나 감소시키기 위해서는 일반적으로 "표적"세포를 본 명세서에 기술된 트리테르펜 조성물과 접촉시킬 수 있다. 이것은 종양 또는 종양세포를 본 발명의 트리테르펜 화합물을 포함하는 단일 조성물 또는 약리학적 제제와 접촉시키거나, 종양 또는 종양세포를 하나의 조성물은 본 발명의 트리테르펜을 포함하고 다른 것은 제 2 성분을 포함하는 하나 이상의 별개의 조성물 또는 제제와 동시에 접촉시킴으로써 이루어질 수 있다.

<369> 본 발명으로 치료하기에 바람직한 암세포에는 피부, 결장, 자궁, 난소, 췌장, 폐, 방광, 유방, 신장 및 전립선 종양세포와 같은 상피암이 포함된다. 그밖의 다른 표적 암세포에는 편평상피세포암, 선암, 소세포암, 신경교종, 신경아세포종 등을 포함하여 뇌, 간, 위, 식도, 머리 및 목, 고환, 경부, 림프계, 후두, 식도, 이차선, 담도, 직장, 자궁, 내막, 신장, 방광 및 갑상선의 암이 포함된다. 그러나, 모든 종양세포가 잠재적으로는 본 발명의 트리테르펜 화합물로 치료될 수 있을 것이기 때문에, 이들 열거한 것은 단지 설명을 목적으로 제시된 것이며 제한적인 것은 아니다. 상기 타입의 종양세포 및 그밖의 다른 종양세포를 치료하는데 있어서의 본 발명의 화합물의 상대적 효능을 동정하기 위한 시험방법은 본 명세서에 상세히 기술되어 있으며, 본 발명의 기술내용에 비추어 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 명백할 것이다.

<370> 본 발명의 화합물은 바람직하게는 약제학적으로 또는 약리학적으로 허용되는 희석제 또는 담체를 함유하는 영양



학적 조성물 또는 약제학적 조성물로서 투여된다. 담체의 성질은 용해도 특성을 포함하여 사용된 화합물(들)의 화학적 특성 및/또는 투여방법에 따라 좌우된다. 예를 들어, 경구투여가 바람직하다면 고체담체를 선택할 수 있으며, 정맥내투여의 경우에는 액체용 용액 담체가 사용될 수 있다.

<371> 어구 "약제학적으로 또는 약리학적으로 허용되는"는 필요에 따라 동물 또는 사람에게 투여하였을 때, 분자 자체 및 조성물이 부작용, 알레르기 반응 또는 그밖의 다른 바람직하지 않은 반응을 나타내지 않는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 것으로, "약제학적으로 허용되는 담체"에는 어떠한 용매, 분산매질, 피복제, 향균 및 항진균제, 등장화제 및 흡수지연제 등이라도 모두 포함된다. 약제학적 활성성분을 위한 이러한 매질 및 성분의 사용은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 통상적인 매질 또는 성분이 활성성분과 비상화성이 아닌 한은, 치료학적 조성물에서의 그들을 사용할 수 있다. 추가의 활성성분이 또한 조성물 내에 혼입될 수도 있다.

<372> a. 영양학적 제제 (nutraceuticals)

<373> 영양학적 조성물은 바람직하게는 상승적 천연산물 및 보충성분으로 구성되어 좋은 건강상태를 촉진시키는 다성분 시스템인 천연성분의 제제이다. 영양학적 화합물은 약용식물로부터 유도될 수 있다. 영양학적 조성물을 제조하는데 사용되는 다수의 식물 및 풀에 대한 정보는 영양학적 조성물을 사용하여 다수의 임상실험을 수행한 문헌 [*German Commission E Monographs, Botanical Safety Handbook*, 및 *American Botanical Council*의 연 4회 간행물인 *HerbalGram*을 포함]에 수집되어 있으며 이용될 수 있다.

<374> 다수의 식물에 대한 설명 및 구성성분, 근대적 용도, 투여량 (다양한 형태로), 작용, 배합금지, 부작용, 통상적인 약물과의 상호작용, 투여방법, 적용기간, 조절상태, AHPA 식물 안정성 등급, 및 주석에 대한 정보를 이용할 수 있으며, 이들 중에는 빌베리 (bilberry), 카스카라 (cascara), 고양이발톱 (cat's claw), 고추 (cayenne), 악마의 발톱 (devil's claw), 동쿠아이 (dong quai), 에키나세아 (echinacea), 월견초유 (evening primrose oil), 흰꽃여름국화 (fever few), 마늘, 생강, 은행, 아시아 인삼, 시베리아 인삼, 골든실 (goldenseal), 고투콜라 (gotu kola), 포도 종자, 녹차, 산사나무 (hawthorn), 카바 (kava), 감초 (licorice), 밀크티슬 (milk thistle), 소우팔메토 (saw palmetto), 세인트존스 워트 (St. John's wort) 및 쥐오줌풀 (valerian)이 포함된다.

<375> 이들 영양학적 화합물의 작용은 빠르거나/ 빠르게 단기간일 수 있거나, 장기간 동안 건강상의 목적을 성취하는 것을 도와줄 수 있다. 본 발명은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 유도된 식물의약에 초점을 맞추고 있다. 본 발명은 특히 암의 예방 및 치료를 위한 천연적 방법으로서 약리학적으로 허용되는 매질 내에 건조되고 분쇄된 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 뿌리 및 꼬투리 또는 이들 조직으로부터의 추출물을 함유하는 영양학적 조성물을 포함한다. 영양학적 조성물은 발암현상의 개시 및 촉진을 방지하고, 또한 악성 암세포에서 세포소멸을 유도하기 위해서 사용될 수 있다. 본 명세서에 기술된 영양학적 조성물은 소염, 항진균, 항바이러스, 항돌연변이원, 살정자 또는 피임, 심혈관 및 콜레스테롤 대사조절제로서 사용될 수 있다. 영양학적 조성물은 완충제, 용매, 희석제, 불활성 담체, 오일, 크림 또는 식용물질과 같은 매질 내에 포함될 수 있다.

<376> 영양학적 제제는 경구로 투여될 수 있으며 정제 또는 캡슐제의 형태일 수 있다. 결장암 및 그밖의 다른 장내 종양의 치료를 위해서는 경구섭취가 바람직하다.

<377> 그 대신에, 영양학적 제제는 오일 또는 크림 내에 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 뿌리 또는 꼬리의 추출물을 함유하며 피부에 국소적으로 적용될 수 있는 연고의 형태일 수도 있다. 영양학적 조성물의 이러한 형태는 피부암의 개시를 방지하는데 유용하다. 이들 영양학적 제제의 사용은 치료학적 유효량의 영양학적 조성물을 소정의 포유 동물 세포에 투여함으로써 포유 동물 상피세포가 전악성 또는 악성상태로 개시 및 촉진되는 것을 억제하는 방법을 제공한다. 이것은 특히 피부암과 같은 상피세포암에 대해 유용하다.

<378> b. 약제학적 제형

<379> 본 발명은 추가로, 부분적으로 또는 전체적으로 정제되고 구조적으로 특정화된 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 로부터의 분리된 조성물에 관한 것이다. 이들 트리테르펜 글리코시드 화합물의 정제 및 특정화는 실시예에 상세히 기술되어 있다. D1, G1 및 B1은 전체적으로 정제되고 그들의 구조적 특정화가 거의 완료된 3가지 조성물이다 (도 39, 도 40 및 도 41). 암세포주에 대하여 이들 화합물을 사용하여 수행된 생물학적검정 (bioassay)은 악성세포에서 세포성장억제 및 세포소멸의 유도를 나타내었다 (도 43, 도 44A-E). 또한, 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 로부터 분리된 이들 사포닌의 부분적으로 정제된 조성물도 발암물질 DMBA에 노출된 마우스에서 화학적보호 효과를 나타낸다 (도 8, 9, 11, 12 및 13). 따라서, 이들 조성물은 항암활성을 가지며, 몇가지 기전에 의해 작용하여 암세포에서 세포소멸을 유도한다. 이들 화합물의 약제학적 조성물은 그

자체로, 또는 화학요법, 방사선요법, 수술, 유전자요법 및 면역요법과 같은 다른 형태의 암치료법과 조합하여 사용될 수 있는 강력한 화학요법제인 것으로 기대된다. 조합 치료법은 이하에 상세히 기술한다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가라면 유효용량 및 조합치료 섭생법을 결정할 수 있을 것이다.

<380> c. 투여방법

<381> (i) 비경구적 투여

<382> 본 발명의 한가지 양태는 예를 들어 종양 또는 질병부위에 직접 점적주입하는 것을 포함하여 정맥내, 근육내, 피하 또는 다른 경로를 통해서 주사하도록 제제화된, 트리테르펜 조성물의 비경구적 투여를 위한 제제를 제공하는 것이다. 본 발명의 기술내용에 비추어서 본 기술분야에서 숙련된 전문가라면 트리테르펜 조성물을 함유하는 수성조성물의 제조를 알 수 있을 것이다. 일반적으로, 이러한 조성물은 액체용액이나 현탁액으로서 주사할 수 있도록 제조할 수 있으며; 주사하기 전에 액체를 첨가하여 용액 또는 현탁액을 제조하는데 사용하기에 적합한 고체형태로 제조될 수도 있으며; 제제는 또한 유회될 수도 있다.

<383> 유리염기 또는 약리학적으로 허용되는 염으로서의 활성화합물의 용액은 하이드록시프로필셀룰로즈와 같은 계면활성제와 적합하게 혼합된 물 중에서 제조할 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌글리콜 및 이들의 혼합물 중에서, 및 오일 중에서 제조될 수 있다. 통상적인 저장 및 사용조건 하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위하여 보존제를 함유한다.

<384> 주사용으로 사용하기에 적합한 약제학적 형태에는 멸균 수성 용액 또는 분산액; 참깨유, 낙화생유 또는 수성 프로필렌글리콜을 포함하는 제제; 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉시제조를 위한 멸균분말이 포함된다. 모든 경우에, 제형은 반드시 멸균되어야 하며, 용이하게 주사할 수 있을 정도로 유체이어야 한다. 이것은 제조 및 저장 조건하에서 안정하여야 하며, 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염작용에 대항하여 보존되어야 한다.

<385> 트리테르펜 화합물은 중성 또는 염 형태로 조성물로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염에는 예를 들어, 염산 또는 인산과 같은 무기산 또는 아세트산, 옥살산, 타타르산, 만델산 등과 같은 유기산에 의해 형성되는 산부가염(단백질의 유리 아미노 그룹에 의해 형성됨)이 포함된다. 유리 카복실 그룹에 의해 형성된 염도 또한 예를 들어, 수산화 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 제2철과 같은 무기염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기염기로부터 유도될 수 있다.

<386> 담체는 또한 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리에올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 액체 폴리에틸렌글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및 식물유를 함유하는 용매 또는 분산매질일 수도 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 피복물을 사용함으로써, 분산액의 경우에 필요한 입자크기를 유지시킴으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티머로살 등에 의해 유도될 수 있다. 대부분의 경우에, 등장화제, 예를 들어 당 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 조성물 내에 흡수지연제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용함으로써 유도될 수 있다.

<387> 멸균 주사용 용액은 필요한 양의 활성화합물을 필요에 따라, 상기에 열거한 다양한 다른 성분들과 함께, 적절한 용매 중에 혼합시키고, 이어서 여과멸균함으로써 제조된다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균된 활성성분을 기본 분산매질 및 상기 열거한 것들 중의 필요한 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클 중에 혼합시킴으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액을 제조하기 위한 멸균분말의 경우에, 바람직한 제조방법은 전술한 멸균-여과된 용액으로부터 활성성분과 추가의 목적하는 성분이 배합된 분말을 수득하는 진공건조 및 동결건조이다.

<388> (ii) 그밖의 다른 투여방법

<389> 그밖의 다른 투여방법도 본 발명에 의해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 트리테르펜 화합물은 좌제, 및 일부의 경우에는, 에어로졸 및 비내조성물로 제형화될 수 있다. 좌제의 경우에, 비히클 조성물은 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세라이드와 같은 전통적인 링커 및 담체를 포함한다. 이러한 좌제는 활성성분을 약 0.5% 내지 약 10% (w/w), 바람직하게는 약 1% 내지 약 2%의 범위로 함유하는 혼합물로부터 형성될 수 있다.

<390> 경구용 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환제, 캡셀제, 서방성제제, 또는 분말의 형태로 제조될 수 있다. 이들 조성물은 예를 들어 삼키거나 흡입함으로써 투여될 수 있다. 약제학적 조성물을 흡입시키고자 하는 경우에, 조성물은 바람직하게는 에어로졸로 이루어진다. 본 발명에서 사용하기 위한 수성 에어로졸의 제조를 위한 예시적 방법은 그의 내용이 그대로 본 명세서 구체적으로 포함된 미합중국특허 제 5,049,388 호에서 찾을 수 있다. 건조 에어로졸 제제의 제조는 예를 들어, 그의 내용이 그대로 본 명세서에 구체적으로 포함된 미합중국특허 제

5,607,915 호에 기술되어 있다.

- <391> 본 발명의 화합물은 또한, DMSO와 같은 침투증진제와 함께 경피적 제제로 직접 투여할 수도 있다. 이들 조성물은 유사하게 다른 적합한 담체, 부형제 또는 희석제를 함유할 수 있다. 특정의 질병적응증을 치료하기 위해서는 다른 국소용 제제를 투여할 수도 있다. 예를 들어, 비점막에 자극을 일으키지도 않고 섬모기능에 심각한 장애를 주지도 않는 비히클을 포함하는 비내제제를 제조할 수 있다. 물, 수성식염수 또는 그밖의 다른 공지의 물질과 같은 희석제를 본 발명에서 사용할 수 있다. 비내제제는 또한 클로로부탄올 및 벤잘코늄클로라이드와 같은 보존제를 함유할 수 있으나, 보존제가 이들로 제한되는 것은 아니다. 비점막에 의한 본 발명의 화합물의 흡수를 증가시키기 위하여 계면활성제가 존재할 수도 있다.
- <392> (iii) 제제 및 치료
- <393> 제제화되면, 용액은 투여제제와 상화성이 있는 방식으로 치료학적으로 유효한 양으로 투여된다. 선택된 제제화는 예를 들어, 약제학적 등급의 만니톨, 락토즈, 전분, 마그네슘스테아레이트, 나트륨 사카린 셀룰로즈, 탄산마그네슘 등을 포함한 다양한 부형제를 사용하여 이루어질 수 있다.
- <394> 일반적으로, 본 발명의 화합물은 1% 미만 내지 약 95%, 바람직하게는 약 10% 내지 약 50%의 활성성분을 함유한다. 바람직하게는, 1일에 환자 체중 kg당, 약 10 mg 내지 1일에 환자 체중 kg당, 약 25 mg이 환자에게 투여된다. 투여빈도는 환자의 반응을 기초로하여 제공된 간호에 의해 결정된다. 다른 유효용량은 용량반응곡선을 설정하는 일상적인 실험을 통해서 본 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- <395> 투여방법과는 무관하게, 본 발명에 따르는 적합한 약제학적 조성물은 일반적으로 목적하는 용도에 따라 좌우되는 최종농도의 범위를 제공하기 위해서 멸균수용액과 같은 허용되는 약제학적 희석제 또는 부형제와 혼합된 양의 트리테르펜 조성물을 포함한다. 제조기술은 본 명세서에 그의 내용이 그대로 포함되어 있는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. Mack Publishing Company, 1980]에 예시되어 있는 것으로서 일반적으로 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 내독소 오염은 최소 수준으로, 예를 들어 0.5 ng/mg 단백질 수준으로 최소로 유지시켜야 한다는 점을 인식하여야 한다. 또한, 사람에게 투여하는 경우에, 제제는 FDA[Office of Biological Standards]에 의해 요구되는 것으로서 무균성, 발열성, 일반적 안전성 및 순도표준에 적합하여야 한다.
- <396> 치료학적 유효용량은 본 명세서에 상세히 기술한 연구에서 나타난 바와 같이 동물모델을 사용하여 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들어, 임상적 환경에 적용하기 전에 적절한 치료학적 용량을 최적화하기 위해서 고품종양을 보유하는 실험동물이 빈번하게 사용된다. 이러한 모델은 효과적인 항암전략을 예상하는데 있어서 매우 신뢰성이 있는 것으로 알려져 있다.
- <397> 특정의 양태에서는, 환자에게 치료학적 조성물의 연속 공급을 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 정맥내 또는 동맥내 경로의 경우에, 이것은 적주시스템 (drip system)에 의해 이루어진다. 국소적용의 경우에는, 반복 적용이 이용된다. 다양한 접근법으로, 장기간에 걸쳐 치료제를 제한되었지만 일정한 용량으로 제공하는 서방성제제가 사용될 수 있다. 내부적용을 위해서는, 목적하는 부위의 연속적인 관류가 바람직할 수 있다. 이것은 일부의 경우에는 수술후에 카테터를 장착하고, 이어서 치료제를 연속적으로 투여함으로써 이루어질 수 있었다. 관류를 위한 시간은 개개 환자 및 상태에 따라 임상의들이 선택하지만, 시간은 약 1-2 시간 부터, 2-6 시간 까지, 약 6-10 시간 까지, 약 10-24 시간 까지, 약 1-2 일 까지, 약 1-2 주 까지 또는 그 이상 긴 기간일 수 있다. 일반적으로, 연속적 관류를 통한 치료학적 조성물의 용량은 주사가 투여되는 기간에 따라 조정되는 것으로, 1회 또는 수회 주사하여 제공된 양과 동등하다. 그러나, 관류에 의해서 더 고용량에 도달될 수도 있는 것으로 믿어진다.
- <398> 1. 치료 프로토콜
- <399> 본 발명의 트리테르펜 화합물을 단독으로 또는 조합치료법으로 사용하기 위해서 두가지의 1차적인 접근방법이 본 발명자들에 의해 예상된다. 첫번째는 이전에 화학요법, 방사선요법 또는 생물학적 요법을 받지 않았거나 이전에 치료되지 않은 환자의 전이성 암에서 사용하는 것이다. 환자는 전신적 투여, 즉 정맥내, 피하, 경구투여에 의해 또는 종양내 주사에 의해 치료된다. 투여되는 약제학적 투여량(들)은 바람직하게는 약 13, 16, 19 및 22 mg/kg/일을 포함하여 1일에 환자 체중 kg당, 10 내지 25 mg의 본 발명의 트리테르펜 조성물을 함유할 수 있다. 그 대신에, 환자는 본 발명의 트리테르펜 조성물 약 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80 및 90 mg/kg/일을 포함하여 본 발명의 트리테르펜 조성물 약 1 mg/kg/일 내지 약 100 mg/kg/일을 함유하는 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료할 수 있다.

- <400> 치료과정은 일반적으로 최소 8주 동안 매일 치료하거나, 최소 8주 동안 매주 1회 주사하는 것으로 구성된다. 임상가가 선택하면, 섭생법은 종양이 진행하거나 반응이 없는 것이 관찰될 때 까지 동일한 스케줄로 계속해서 수행할 수 있다.
- <401> 본 발명의 화합물의 또 다른 적용은 수술, 화학요법 및/또는 방사선요법에 의해 임상적 질병이 치료된 환자를 치료하는 것이다. 어쥬번트 요법 (adjuvant therapy)은 병의 재발을 방지하기 위해서 최소 1년 동안 상술한 바와 같은 동일한 섭생법으로 투여된다.
- <402> 2. 본 발명의 화합물에 의한 암의 예방
- <403> 본 발명의 화합물 및 혼합물의 또 다른 적용은 암의 위험이 높은 그룹에서 암을 예방하는 것이다. 이러한 환자 (예를 들어, 유방암, 결장암, 피부암 등과 같은 암에 대해 유전적으로 정의된 소인을 갖는 환자)는 암의 예방을 결정하기 위해서 최소 1년 또는 아마도 더 긴 기간 동안 경구로 (위장관 종양), 피부 상에 국소적으로 (피부) 또는 전신적으로 투여함으로써 치료된다. 이 용도는 환자, 및 결장직장 폴립 또는 피부, 유방, 폐 또는 다른 기관의 전악성 병변과 같은 잘 정의된 전-종포지티브 병변을 포함한다.
- <404> 3. 임상적 프로토콜
- <405> 임상적 프로토콜은 본 발명의 트리테르펜 화합물을 사용하여 암의 치료를 용이하게 하도록 본 발명자들에 의해 디자인되었다. 이 프로토콜에 따르면, 암, 예를 들어 난소암, 췌장암, 신장암, 전립선암, 폐암 또는 방광암의 조직학적 증거를 갖는 환자들을 선택한다. 환자들은 이전에 화학요법, 방사선요법 또는 유전자요법을 받을 수 있지만, 받을 필요는 없다. 최적으로, 환자들은 적절한 골수기능 (> 2,000/mm<sup>3</sup>의 말초 절대과립구수 및 100,000/mm<sup>3</sup>의 혈소판수로 정의됨), 적절한 간기능 (빌리루빈 ≤ 1.5 mg/dl) 및 적절한 신장기능 (크레아티닌 < 1.5 mg/dl)을 갖는다.
- <406> 프로토콜에 따라 종양내 주사를 통해서 환자 체중 kg당, 본 발명의 트리테르펜 화합물 약 10 내지 25 mg을 함유하는 약제학적 조성물을 1회 용량 투여한다. ≥ 4cm의 종양의 경우에, 투여되는 용적은 4-10 ml (바람직하게는 10 ml)일 것이며, < 4 cm 종양의 경우에는 1-3 ml의 용적 (바람직하게는 3 ml)이 사용될 것이다. 약 1 cm 또는 그 이상의 간격을 두고 0.1-0.5 ml 용적으로 수회 주사하여 1회 용량이 전달될 수 있다.
- <407> 치료과정은 2주간에 걸쳐서 전달된 약 6회의 용량으로 구성된다. 임상가에 의해 선택되면, 섭생법은 매 2주 마다 6회 용량씩, 또는 덜 빈번하게 (매월 마다, 2개월 마다, 4분기 마다 등) 계속될 수 있다.
- <408> 환자가 수술절제에 적합한 경우에는, 종양을 상술한 바와 같이 적어도 2회의 연속적인 2-주 치료과정으로 치료한다. 두번째 (또는 그 이상, 예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8번째 등) 과정의 완료의 일주일 이내에 환자는 수술 절제를 받는다. 절개부위를 닫기 전에, 본 발명의 트리테르펜 화합물을 함유하는 약제학적 조성물 10 ml를 수술부위 (수술용 침대)에 전달하여 적어도 60분 동안 접촉하도록 한다. 상처를 닫고 그안에 드레인 (drain) 또는 카테터를 위치시킨다. 수술 후 3일 내에 추가로 약제학적 조성물 10 ml를 드레인을 통해서 투여하여 적어도 2시간 동안 수술용 침대와 접촉하도록 한다. 그후, 흡인에 의한 제거를 수행하고 임상적으로 적절한 시점에 드레인을 제거한다.
- <409> 4. 인공적 및 천연 체강의 치료
- <410> 재발성 암의 주요한 원인 중의 하나는 종양 절제 후에 1차 종양부위에 국소적으로 및 부위적으로 잔류하는 잔류성 현미경적 질환이다. 또한, 천연 체강이 현미경적 종양세포에 의해 접촉되는 경우에 유사한 상황이 존재한다. 이러한 현미경적 질환의 효과적인 치료는 치료학적 섭생법에서 상당한 진보를 나타낸다.
- <411> 따라서, 특정의 양태에서는, 암을 수술절제하여 제거함으로써 "강 (cavity)"을 생성시킬 수 있다. 수술의 시점 및 그후 (주기적으로 또는 연속적으로) 둘다에서 본 발명의 치료학적 조성물을 체강에 투여한다. 이것은 본질적으로강 표면의 "국소적" 치료이다. 조성물의 용적은 강의 전체표면이 발현작용물에 의해 접촉되는 것을 보장하기에 충분하여야 한다.
- <412> 한가지 양태에서, 투여는 간단하게 종양절제에 의해 형성된 강 내로 치료학적 조성물을 주사하는 것을 수반한다. 또 다른 양태에서, 스폰지, 스와브 (swab) 또는 다른 장치에 의한 기계적 적용이 요구될 수도 있다. 이들 접근방법 중의 하나를 종양제거 후에 및 초기수술 중에 사용할 수 있다. 또 다른 양태에서는 카테터를 수술 도입부위를 닫기 전에 강 내에 삽입한다. 그후, 강을 목적하는 기간 동안 연속적으로 관류시킬 수 있다.
- <413> 이러한 치료의 또 다른 형태에서, 치료학적 조성물의 "국소" 적용은 입, 인두, 식도, 후두, 기관, 흉막강, 복막



강, 또는 방광, 결장 또는 다른 내장기관을 포함한 중공 기관의 강과 같은 천연의 체강에 대해 표적화된다. 이러한 상황에서, 강 내에는 유의적인 1차 종양이 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 치료는 강 내의 현미경적 질환을 목표로 하지만, 부수적으로 이전에 제거되지 않은 1차 종양매스 또는 강 내에 존재할 수 있는 전-종양 병소에도 영향을 미칠 수 있다. 또한, 이들 내장기관 또는 강 표면에 "국소" 적용하기 위해서는 다양한 방법이 이용될 수 있다. 예를 들어, 인두 내의 구강에는 구강을 용액으로 간단히 스위싱 (swishing)하거나 가글링 (gargling)함으로써 영향을 미칠 수 있다. 그러나, 후두 및 기관 내의 국소치료는 내시경에 의한 가시화 및 치료학적 조성물의 국소전달을 필요로 할 수 있다. 방광 또는 결장점막과 같은 내장기관은 주입에 의해 카테터를 내재시키거나, 다시 방광경 또는 내시경 기구에 의해 직접 가시화시키는 것이 필요할 수 있다. 흉막강 및 복막강과 같은 강은 카테터를 내재시키거나 이들 영역에 대한 접근을 허용하는 수술방법에 의해 접근할 수 있다.

<414> (iv) 치료학적 키트

<415> 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 트리테르펜 조성물을 함유하는 치료학적 키트를 제공한다. 이러한 키트는 일반적으로 적합한 용기수단 내에 본 발명에 따르는 하나 이상의 트리테르펜 화합물의 약제학적으로 허용되는 제제를 함유한다. 키트는 또한, 트리테르펜 화합물을 치료가 필요한 환자의 정확한 부위에 표적화시키는 성분을 함유하는 제제, 또는 트리테르펜 화합물과 협력하여 작용할 수 있는 하나 이상의 약제의 범위, 예를들면 화학요법제와 같은 다른 약제학적으로 허용되는 제제를 함유할 수 있다.

<416> 키트는 추가의 어떤 성분의 존재 또는 부재하에 트리테르펜 화합물을 함유하는 단일의 용기수단을 가질 수 있거나, 목적하는 약제 각각에 대한 별개의 용기수단을 함유할 수도 있다. 키트의 성분이 하나 이상의 액체용액으로 제공되는 경우에, 액체용액은 수용액이며, 멸균수용액이 특히 바람직하다. 그러나, 키트의 성분들은 건조된 분말(들)로서 제공될 수도 있다. 시약 또는 성분들이 건조분말로서 제공되는 경우에, 분말은 적합한 용매를 첨가함으로써 재구성될 수 있다. 용매는 또한 또 다른 용기수단 내에 제공될 수 있는 것으로 생각된다. 키트의 용기수단은 일반적으로 하나 이상의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 그밖의 다른 용기수단을 포함하며, 여기에 트리테르펜 글리코시드 및 그밖의 다른 목적하는 약제가 존재할 수 있으며, 바람직하게는 적절히 등분될 수 있다. 추가의 성분이 포함되는 경우에, 키트는 또한 일반적으로, 분리된 디자인된 용량의 투여가 가능하도록 이들이 존재하는 제 2 바이알 또는 다른 용기를 함유한다. 키트는 또한 약제학적으로 허용되는 멸균 완충제 또는 그밖의 다른 희석제를 함유하는 제 2/3 용기수단을 포함할 수 있다.

<417> 키트는 또한, 트리테르펜 조성물을 동물 또는 환자에게 투여하기 위한 수단, 예를 들어 이들을 통해서 제제를 동물에게 주사하거나 신체의 질병영역에 적용할 수 있는 하나 이상의 바늘 또는 주사기, 또는 아이드로퍼 (eye dropper), 파이켓 또는 그밖의 유사한 장치를 함유할 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 일반적으로, 예를 들어 목적하는 바이알 및 그밖의 장치가 위치하고 보유되는 사출 또는 중공성형된 플라스틱 용기와 같은 시판목적의 밀폐용기 내에 바이알 또는 그와 유사한 것 및 다른 성분을 함유하는 수단을 포함한다.

<418> **VI. 화학요법적 조합 및 치료**

<419> 본 발명의 특정한 양태에서, 본 발명의 트리테르펜 조성물은 화학요법제, 방사선 및 치료학적 단백질 또는 유전자를 포함한 항종양활성을 갖는 하나 이상의 다른 약제와 배합하여 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 본 발명의 화합물을 단독으로 사용한 치료법에 의해 얻어지는 전체적인 항종양활성을 증진시킬 수 있거나, 또는 다-약물 종양내성을 방지하거나 그에 대항하도록 사용될 수 있다.

<420> 제 2의 화학요법제의 투여와 조합하여 본 발명을 사용하기 위해서는, 트리테르펜 조성물을 제 2의 화학요법제와 배합하여 동물내에서 그들의 조합된 항종양 작용이 일어나도록 하는데 유효한 방식으로 동물에게 간단히 투여한다. 따라서, 이들 약제는 종양 맥관구조 내에서 그들의 조합된 존재 및 종양환경에서 그들의 조합된 작용이 제공되도록 하는데 유효한 양으로 유효한 시간동안 제공된다. 이러한 목적을 성취하기 위해서는, 트리테르펜 조성물과 화학요법제를 단일조성물로 또는 상이한 투여 경로를 이용하는 두개의 별개의 조성물로하여 동시에 동물에게 투여할 수 있다.

<421> 또한, 트리테르펜 조성물 치료를 먼저 수행하고, 다음에 수분 내지 수주의 간격을 두고 화학요법제, 방사선 또는 단백질 또는 유전자 요법 치료를 수행할 수도 있다. 제 2의 약제 및 트리테르펜 조성물을 별도로 동물에게 투여하는 양태에서는, 일반적으로 추가의 약제 및 트리테르펜 조성물이 종양에 대하여 유리하게 조합된 효과를 나타낼 수 있도록 각각의 전달 사이에 상당한 시간이 경과하지 않도록 한다. 이러한 경우에, 서로 약 5분 내지 약 1주일 이내에, 더욱 바람직하게는 서로 약 12-72시간 이내에 두개의 약제가 모두 종양과 접촉하도록 해야 할 것으로 생각되며, 단지 약 24-48 시간의 지연시간이 가장 바람직하다. 일부의 상황에서는 각각의 치료 사이에

수일 (2, 3, 4, 5, 6 또는 7) 또는 수주 까지 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8)의 기간이 경과하는 경우에 치료기간을 현저하게 연장시키는 것이 바람직할 수도 있다. 트리테르펜 글리코시드나 제 2의 약제를 1회 이상 투여하는 것이 바람직할 것으로 생각할 수도 있다. 종양퇴행을 성취하기 위해서는, 두개의 약제를 투여시기와는 무관하게 그의 성장을 억제하는데 효과적인 배합된 양으로 전달한다.

<422> 다양한 약제들이 본 명세서에 기술된 조합치료방법에서 사용하기에 적합하다. 예로서 고려되는 화학요법제에는 예를 들어 에토포사이드 (VP-16), 아드리아마이신, 5-플루오로우라실 (5-FU), 캄프토테신, 악티노마이신-D, 미토마이신 C 및 시스플라틴 (CDDP)이 포함된다.

<423> 본 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가에게 잘 이해되는 바와 같이, 화학요법제의 적절한 용량은 일반적으로, 대략 화학요법제가 단독으로 또는 다른 화학요법제와 배합하여 투여되는 임상적 치료법에서 이미 사용되었던 양이다. 단지 예로서, 시스플라틴과 같은 약제 및 그밖의 다른 DNA 알킬화제가 사용될 수 있다. 시스플라틴은 암의 치료하기 위해서 광범하게 사용되는 것이며, 임상적 적용에 사용되는 유효용량은 총 3 과정 동안 매 3주 마다 5일 동안 20 mg/m<sup>2</sup>이다. 시스플라틴은 경구적으로는 흡수되지 않으며, 따라서 반드시 정맥내, 피하, 종양내 또는 복강내 주사에 의해 전달되어야 한다.

<424> 추가의 유용한 약제에는 DNA 증식, 유사분열 및 염색체 분리를 저해하는 화합물이 포함된다. 이러한 화학요법적 화합물에는 독소루비신으로도 알려져 있는 아드리아마이신, 에토포사이드, 베라파밀, 포도필로톡신 등이 포함된다. 종양의 치료를 위한 임상적 셋팅에서 광범하게 사용되는 이들 화합물은, 아드리아마이신의 경우에 21일 간격으로 25-75 mg/m<sup>2</sup> 내지, 에토포사이드의 경우에 정맥내로 또는 경구로는 정맥내 용량의 배로 35-50 mg/m<sup>2</sup> 범위의 용량을 정맥내로 거환주사 (bolus injection)를 통해서 투여한다.

<425> 폴리뉴클레오타이드 전구체의 합성 및 충실도 (fidelity)를 붕괴시키는 약제도 또한 사용될 수 있다. 광범위한 시험을 수행하였으며 용이하게 이용할 수 있는 약제가 특히 유용하다. 그 자체로, 5-플루오로우라실 (5-FU)와 같은 약제는 종포지티브 조직에 의해 우선적으로 사용되므로, 이 약제는 종양세포에 대한 표적화에 특히 유용하다. 5-FU는 매우 독성이지만, 국소를 포함하여 광범위한 담체 내에서 적용가능하며, 3-15 mg/kg/일 범위의 용량으로 정맥내 투여하는 것이 통상적으로 이용된다.

<426> 조합된 치료와 관련하여 유용한 화학요법제의 예는 표 5에 제시한다. 여기에 열거된 각각의 약제들은 예로 든 것이며 제한적인 의미는 아니다. 이와 관련하여, 숙련된 전문가는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, chapter 33, page 624-652]을 지적한다. 치료할 개체의 조건에 따라 용량에 있어서의 약간의 변이가 필수적으로 일어나게 된다. 여하튼, 투여담당자가 개체에 대해 적절한 용량을 결정할 것이다. 또한, 사람에게 투여하는 경우에 제제는 FDA Office of Biologics 표준에 의해 요구되는 것으로서 무균성, 발열성, 일반적 안전성 및 순도 표준에 적합하여야 한다.

**표 5a**

<427> 종양질환에서 유용한 화학요법제

부류	약제 유형	일반명 (기타명칭)	질병
알킬화제	나이트로젠 머스타드 (Nitrogen Mustards)	메클로르에타민 (NH <sub>2</sub> )	호지킨병, 비-호지킨 림프종
		사이클로포스파마이드 이포스파마이드	급성 및 만성 림프구성 백혈병, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신경아세포종, 유방, 난소, 폐, 빌름스종양, 경부, 고환, 연조직 육종
		멜팔란 (L-사르콜리신)	다발성 골수종, 유방, 난소
		클로람부실	만성 림프구성 백혈병, 원발성 마크로글로블린혈증, 호지킨병, 비-호지킨 림프종
	에틸렌이민 및 메틸멜라민	헥사메틸멜라민	난소
		티오테과	방광, 유방, 난소
	알킬설포네이트	부설판	만성 과립구성 백혈병

표 5b

<428> 알킬화제	니트로소 우레아	카르무스틴 (BCNU)	호지킨병, 비-호지킨 림프종, 원발성 뇌종양, 다발성 골수종, 악성흑색종
		로무스틴 (CCNU)	호지킨병, 비-호지킨 림프종, 원발성 뇌종양, 소세포 폐
		세무스틴 (메틸-CCNU)	원발성 뇌종양, 위, 결장
		스트렙토조신 (스트렙토조토신)	악성 췌장 도선종, 악성 카르시노이드
	트리아진	다카바진 (DTIC; 디메틸트리아제노이מיד아졸카복스아미드)	악성흑색종, 호지킨병, 연조직육종
항대사물질	엽산 동족 체	메토틱렉세이트 (아메토프테린)	급성 림프구성 백혈병, 용모암, 균상식육종(mycosis fungoides), 유방, 머리 및 목, 폐, 골원성육종
		플루오로우라실 (5-플루오로우라실; 5-FU) 플록스우리딘 (플루오로디옥시우리딘; FUdR)	유방, 결장, 위, 췌장, 난소, 머리 및 목, 방광, 전악성 피부병변 (국소)
	퓨린 동족 체 및 관 련된 억제 제	시타라빈 (시토신 아라비노사이드)	급성 과립구성 및 급성 림프구성 백혈병
		머캅토피린 (6-머캅토피린; 6-MP)	급성 림프구성, 급성 과립구성 및 만성 과립구성 백혈병
		티오구아닌 (6-티오구아닌; TG)	급성 림프구성, 급성 과립구성 및 만성 과립구성 백혈병
		펜토스타틴 (2-데옥시코포르마이신)	모발세포 백혈병, 균상식육종, 만성 림프구성 백혈병

표 5c

<429> 천연 생성물	빈카 알칼로이드	빈블라스틴 (VLB)	호지킨병, 비-호지킨 림프종, 유방, 고환
		빈크리스틴	급성 림프구성 백혈병, 신경아세포종, 빌름스종양, 횡문근육종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 소세포 폐
	에피포도필로톡신	에토포사이드 터티포사이드	고환, 소세포폐 및 그밖의 다른 폐, 유방, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 급성 과립구성 백혈병, 카포시육종



천연생성물 (계속)	항생제	닥티노마이신 (악티노마이신 D)	융모암, 빌름스종양, 횡문근육종, 고환, 카포시육종
		다우노루비신 (다우노마이신; 루비도마이신)	급성 과립구성 및 급성 림프구성 백혈병
		독소루비신	연조직, 골원성 및 그밖의 다른 육종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 급성 백혈병, 유방, 비노생식기로, 갑상선, 폐, 위, 신경아세포종
		블레오마이신	고환, 머리 및 목, 피부, 식도, 폐 및 비노생식기로, 호지킨병, 비-호지킨 림프종
		피카마이신 (미트라마이신)	고환, 악성 고갈습혈증
		미토마이신 (미토마이신 C)	위, 경부, 결장, 유방, 췌장, 방광, 머리 및 목
	효소	L-아스파라기나제	급성 림프구성 백혈병
생물학적 반응 개질제	인터페론 알파	모발세포 백혈병, 카포시육종, 흑색종, 카르시노이드, 신장세포, 난소, 방광, 비-호지킨 림프종, 균상식육종, 다발성 골수종, 만성 과립구성 백혈병	

표 5d

<430>

기타 약제	백금 배위착물	시스플라틴 (시스-DDP) 카보플라틴	고환, 난소, 방광, 머리 및 목, 폐, 갑상선, 경부, 내막, 신경아세포종, 골원성육종
	안트라센디온	미토크산트론	급성 과립구성 백혈병, 유방
	치환된 우레아	하이드록시우레아	만성 과립구성 백혈병, 진성다혈구증, 본태성 혈소판증가증, 악성흑색종
	메틸하이드라진 유도체	프로카바진 (N-메틸하이드라진, MIH)	호지킨병
	부신피질 억제제	미토테인 (o,p'-DDD)	부신피질
아미노글루테티미드		유방	
호르몬 및 길항제	부신피질스테로이드	프레드니손 (이용가능한 몇가지 다른 등가제제)	급성 및 만성 림프구성 백혈병, 비-호지킨 림프종, 호지킨병, 유방
	프로세스틴	하이드록시프로세스테 론카프로에이트 메드록시프로세스테론 아세테이트 메게스트롤 아세테이트	내막, 유방
	에스트로겐	디에틸stil베스트롤 에티닐 에스트라디올 (기타 이용가능한 제제)	유방, 전립선
	안티에스트로겐	타목시펜	유방
	안드로겐	테스토스테론 프로피오 네이트 플루옥시메스테론 (기타 이용가능한 제제)	유방
	안티안드로겐	플루타미드	전립선
	고나도트로핀-방출 호르몬 동족체	로이프롤라이드	전립선

<431> DNA 손상을 야기시키며 광범하게 사용되어 온 다른 인자들에는 통상적으로  $\gamma$ -선, X-선 및/또는 종양세포에 방사성동위원소의 직접적인 전달로서 공지되어 있는 것이 포함된다. 극초단파 및 UV-조사와 같은 다른 형태의 DNA 손상인자가 포함될 수도 있다. 이들 인자는 모두 DNA에 대해, DNA의 전구체에 대해, DNA의 복제 및 복구에 대해, 및 염색체의 조립 및 유지에 대해 광범위한 손상을 일으키는 것으로 보인다. X-선에 대한 용량범위는 장기간 동안 (3 내지 4주) 50 내지 200 린트겐의 1일 용량으로부터 2000 내지 6000 린트겐의 1회 용량까지의 범위이다. 방사성동위원소의 용량범위는 동위원소의 반감기, 방출된 방사선의 강도 및 형태 및 종양세포에 의한 흡수에 따라 광범하게 변화한다.

<432> **VII. 표적화된 암 치료법**

<433> 본 명세서에 기술된 트리테르펜 화합물은 화합물을 종양세포에 표적화하는 하나 이상의 분자에 연결될 수 있다. 표적화는 약물에 대해 전신적인 노출을 최소화하면서 치료부위, 예를 들어 종양부위에서 약물의 전체적인 수준을 상승시키기 위해서 사용될 수 있다는 점에서 유익하다. 상기 언급한 화학요법제와 마찬가지로, 표적화된 트리테르펜 화합물은 화학요법제와 같은 제 2의 약제와 조합하여 사용될 수 있다. 트리테르펜 및 제 2의 약제는 둘다 종양 환경 내에서 동일하거나 상이한 표적에 대해 지시될 수 있다. 이것은 부가적인, 또는 부가적인 것보다 큰, 또는 훨씬 더 현저한 상승적 결과를 유도한다.

<434> 본 발명의 트리테르펜 화합물과 조합하여 사용되는 표적화제의 예는 종양부위에 트리테르펜 분자를 전달할 수 있는, 즉 종양 잔기 내에 편제시킬 수 있는 표적화제이다. 마찬가지로, 종양부위의 맥관구조를 표적으로 하는 약제도 바람직하다. 트리테르펜 글리코시드 화합물의 표적화는 특히 트리테르페노이드 화합물의 다소 더 광범하거나 전신적인 분포에 의해 관찰될 수 있는 잠재적인 부작용을 최소화하거나 하지 않고 종양부위에 더 큰 유효농도를 제공하는 것으로 생각된다. 특히, 표적화제는 종양세포의 성분; 종양 맥관구조의 성분; 종양세포에 결합하거나, 또는 일반적으로는 종양세포와 회합하는 성분; 종양 맥관구조에 결합하거나, 또는 일반적으로는 종양 맥관구조와 회합하는 성분; 종양 세포의 매트릭스 또는 기질의 성분 또는 거기에 결합한 성분; 및 종양 맥관구조에서 발견되는 세포 타입 까지에 대해 향하게 한다.

<435> i) 종양세포 표적 및 항체

<436> 종양을 구성하는 악성세포는 비교적 특이적인 마커 또는 종양세포의 항원에 결합할 수 있는 부위를 갖는 이종특이성 항체를 사용하여 표적화될 수 있다. 예를 들어 특이적인 종양세포 억제 또는 사멸은 표적 종양세포에 항체-트리테르펜 조성물 접합체를 결합시킴으로써 이루어질 수 있다.

<437> 다수의 소위 "종양 항원"은 공지되어 있으며, 이들 중의 어느 하나가 본 발명의 표적화 관점과 관련하여 표적으로서 사용될 수 있다. 고휘종양-회합된 항체의 다수의 예는 본 명세서에서 이하에 열거한다. 이러한 항원에 대한 항체의 제조 및 용도는 본 분야의 기술에서 잘 알려져 있으며, 본 명세서에 구체적으로 기술되어 있다. 항체의 예로는 부인과적 종양부위로부터 유래하는 것 (참조예 ATCC 카탈로그): OC 125; OC 133; OMI; Mo v1; Mo v2; 3C2; 4C7; ID<sub>3</sub>; DU-PAN-2; F 36/22; 4F<sub>7</sub>/7A<sub>10</sub>; OV-TL3; B72.3; DF<sub>3</sub>; 2C<sub>8</sub>/2F<sub>7</sub>; MF 116; Mov18; CEA 11-H5; CA 19-9 (1116NS 19-9); H17-E2; 791T/36; NDOG<sub>2</sub>; H317; 4D5, 3H4, 7C2, 6E9, 2C4, 7F3, 2H11, 3E8, 5B8, 7D3, SB8; HMF<sub>2</sub>; 3.14.A3; 유방종양부위로부터 유래하는 것 DF3; NCRC-11; 3C6F9; MBE6; CLNH5; MAC40/43; EMA; HMF<sub>1</sub> HMF<sub>2</sub>; 3.15.C3; M3, M8, M24; M18; 67-D-11; D547Sp, D75P3, H222; 안티-EGF; LR-3; TA1; H59; 10-3D-2; HmAB1,2; MBR 1,2,3; 24.17.1; 24.17.2 (3E1.2); F36/22.M7/105; C11, G3, H7; B6.2; B1.1; Cam 17.1; SM3; SM4; C-Mu1 (566); 4D5 3H4, 7C2, 6E9, 2C4, 7F3, 2H11, 3E8, 5B8, 7D3, 5B8; OC 125; MO v2; DU-PAN-2; 4F<sub>7</sub>/7A<sub>10</sub>; DF<sub>3</sub>; B72.3; ccccccCEA 11; H17-E2; 3.14.A3; F023C5; 결장직장 종양부위로부터 유래하는 것 B72.3; (17-1A) 1083-17-1A; C017-1A; ZCE-025; AB2; HT-29-15; 250-30.6; 44X14; A7; GA73.3; 791T/36; 28A32; 28.19.8; X MCO-791; DU-PAN-2; ID<sub>3</sub>; CEA 11-H5; 2C<sub>8</sub>/2F<sub>7</sub>; CA-19-9 (1116NS 19-9); PR5C5; PR4D2; PR4D1; 흑색종 부위로부터 유래하는 것 4.1; 8.2 M<sub>17</sub>; 96.5; 118.1, 133.2, (113.2); L<sub>1</sub>, L<sub>10</sub>, R<sub>10</sub>(R<sub>19</sub>); I<sub>12</sub>; K<sub>5</sub>; 6.1; R24; 5.1; 225.28S; 465.12S; 9.2.27; F11; 376.96S; 465.12S; 15.75; 15.95; Me1-14; Me1-12; Me3-TB7; 225.28SD; 763.24TS; 705F6; 436910; M148; 위장관 종양으로부터 유래하는 것 ID3; DU-PAN-2; OV-TL3; B72.3; CEA 11-H5; 3.14.A3; C COL1; CA-19-9 (1116NS 19-9) 및 CA50; OC125; 폐종양으로부터 유래하는 것 4D5 3H4, 7C2, 6E9, 2C4, 7F3, 2H11, 3E8, 5B8, 7D3, SB8; MO v2; B72.3; DU-PAN-2; CEA 11-H5; MUC 8-22; MUC 2-63; MUC 2-39; MUC 7-39; 및 기타 종양으로부터 유래하는 것 PAb 240; PAb 246; PAb 1801; ERIC.1; M148; FMH25; 6.1; CA1; 3F8; 4F<sub>7</sub>/7A<sub>10</sub>; 2C<sub>8</sub>/2F<sub>7</sub>; CEA 11-H5가 포함된다.

- <438> 종양을 정의하고 표적화하는 또 다른 수단은 세포에 의해 발현된 항원의 생화학적 성질을 기술하는 것이 아니라 종양세포 그 자체의 특징에 관한 것이다. 다수의 예시적인 종양세포주가 공지되어 있으며 표적화제의 제조를 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 공지된 종양세포주로부터 수득한 전체세포 또는 세포균질물을 사용하여 관련된 종양 타입을 표적화하는 항-종양 항체를 제조할 수 있었다. 유사하게, 이러한 종양세포주는 다양한 시험 관내 시험을 수행하는데 있어서의 용도를 가질 수 있다. 이와 관련하여, 숙련된 전문가들은 공공연히 이용될 수 있는 (ATCC 카탈로그로부터) 사람 종양세포주를 예시하기 위한 목적으로 ATCC 카탈로그를 언급한다. 세포주의 예로는 J82; RT4; ScaBER; T24; TCCSUP; 5637; SK-N-MC; SK-N-SH; SW 1088; SW 1783; U-87 MG; U-118 MG; U-138 MG; U-373 MG; Y79; BT-20; BT-474; MCF7; MDA-MB-134-VI; MDA-MD-157; MDA-MB-175-VII; MDA-MB-361; SK-BR-3; C-33 A; HT-3; ME-180; MS751; SiHa; JEG-3; Caco-2; HT-29; SK-CO-1; HuTu 80; A-253; FaDu; A-498; A-704; Caki-1; Caki-2; SK-NEP-1; SW 839; SK-HEP-1; A-427; Calu-1; Calu-3; Calu-6; SK-LU-1; SK-MES-1; SW 900; EB1; EB 2; P3HR-1; HT-144; Malme-3M; RPMI-7951; SK-MEL-1; SK-MEL-2; SK-MEL-3; SK-MEL-5; SK-MEL-24; SK-MEL-28; SK-MEL-31; Caov-3; Caov-4; SK-OV-3; SW 626; Capan-1; Capan-2; DU 145; A-204; Saos-2; SK-ES-1; SK-LMS-1; SW 684; SW 872; SW 982; SW 1353; U-2 OS; Malme-3; KATO III; Cate-1B; Tera-1; Tera-2; SW579; AN3 CA; HEC-1-A; HEC-1-B; SK-UT-1; SK-UT-1B; SW 954; SW 962; NCI-H69; NCI-H128; BT-483; BT-549; DU4475; HBL-100; Hs 578Bst; Hs 578T; MDA-MB-330; MDA-MB-415; MDA-MB-435S; MDA-MB-436; MDA-MB-453; MDA-MB-468; T-47D; Hs 766T; Hs 746T; Hs 695T; Hs 683; Hs 294T; Hs 602; JAR; Hs 445; Hs 700T; H4; Hs 696; Hs 913T; Hs 729; FHs 738Lu; FHs 173We; FHs 738B1; NIH:OVCAR-3; Hs 67; RD-ES; ChaGo K-1; WERI-Rb-1; NCI-H446; NCI-H209; NCI-H146; NCI-H441; NCI-H82; H9; NCI-H460; NCI-H596; NCI-H676B; NCI-H345; NCI-H820; NCI-H520; NCI-H661; NCI-H510A; D283 Med; Daoy; D341 Med; AML-193 및 MV4-11이 포함된다.
- <439> 그밖의 다른 적절한 세포주를 동정하기 위하여 추후 년도의 ATCC 카탈로그도 고려할 수 있다. 또한, 특정한 세포 타입을 필요로 하는 경우에, 이러한 세포를 수득하는 수단 및/또는 그들의 즉시 이용할 수 있는 공급원은 개개의 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지되어 있다. 즉, 과학문헌을 분석하면 표적화되기를 바라는 종양세포 타입을 위한 세포의 적절한 선택이 용이하게 밝혀질 수 있다.
- <440> 상기 설명한 바와 같이, 항체는 종양항원 표적을 인식하는 올바른 수단이다. 고행종양항원에 대해 지향하는 광범위한 수의 항체가 공지되어 있다. 특정의 유용한 항종양 항체는 상기에 열거한다. 그러나, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지된 바와 같이, 열거된 항체 중의 특정의 것은 적절한 생화학적 특성을 갖지 않을 수 있거나, 치료학적으로 사용하기에 충분한 종양특이성이 없을 수도 있다. 예로는 세포질 항원을 인식하는 MUC8-22가 있다. 이들과 같은 항체는 일반적으로 모델 시스템 또는 선별시험에서와 같은 연구방법에서만 사용한다.
- <441> 일반적으로 말하면, 본 발명의 이러한 관점에서 사용하기 위한 항체는 바람직하게는, 세포-표면 상에 접근할 수 있으며, 종양세포에 의해 우선적으로 또는 특이적으로 발현되는 항원을 인식한다. 이러한 항체는 또한, 바람직하게는 < 200 nM, 바람직하게는 < 100 nM의  $K_d$ 를 나타내는 것과 같이 고친화성의 특성을 나타내며, 심장, 신장, 뇌, 간, 골수, 결장, 유방, 전립선, 갑상선, 방광, 폐, 부신, 근육, 신경섬유, 체장, 피부 또는 그밖의 인체내의 다른 생명-지속성 기관 또는 조직과 같은 생명-지속성 정상조직과 유의적인 반응성을 나타내지 않는다. 낮은 반응성의 관점에서 본 발명의 목적에 가장 중요한 "생명-지속성 (life-sustaining)" 조직에는 심장, 신장, 중추 및 말초신경계 조직 및 간이 포함된다. 본 명세서에서 사용된 것으로 용어 "유의적 반응성"은 면역조직화학에 적합한 조건하에서 특정의 조직에 적용하였을 때 대부분의 네가티브 세포의 영역에 산재된 단지 몇개의 포지티브 세포에 의해서 염색을 야기시키지 않거나 또는 무시할 수 있을 정도의 염색을 야기시키는 항체 또는 항체단편을 칭하는 것이다.
- <442> 본 발명에서 사용하기 위해 고려되는 특히 유망한 항체는 고행종양에 대해서 높은 선택성을 갖는 것이다. 예를 들어, 다수의 유방암, 폐암 및 결장직장암의 표면상에서 선택적으로 발견되는 TAG 72 및 HE-2 원종양유전자 (proto-oncogene) 단백질에 결합하는 항체 (Thor *et al.*, 1986; Colcher *et al.*, 1987; Shepard *et al.*, 1991); MOv18 및 OV-TL3 및 우유 무신 코어단백질 및 모유 지방소구에 결합하는 항체 (Miotti *et al.*, 1985; Burchell *et al.*, 1983); 및 고 M<sub>r</sub> 흑색종 항원에 결합하는 항체 9.2.27 (Reisfeld *et al.*, 1982)이 있다. 추가의 유용한 항체는 거의 모든 난소암에서 균일하게 발현되는 것으로 알려져 있는 플레이트-결합 단백질에 대한 항체; 편평세포암 및 대부분의 신경교종에서 과발현되는 발암물질의 *erb* 그룹에 대한 항체; 및 진행중인 전임상 및 임상평가의 대상인 것으로 알려진 그밖의 다른 항체이다.
- <443> 항체 B3, KSI/4, CC49, 260F9, XMMCO-791, D612 및 SM3이 본 기술분야에서 일상적으로 수행되는 표준 전임상시

험에 이어서 임상적 예에서 사용하기에 특히 적합한 것으로 믿어진다. B3 (미합중국특허 제 5,242,813 호; Brinkmann *et al.*, 1991)은 ATCC 기탁번호 HB 10573을 가지며; KS1/4는 미합중국특허 제 4,975,369 호에 기술된 바와 같이 제조할 수 있고; D612 (미합중국특허 제 5,183,756 호)는 ATCC 기탁번호 HB 9796을 갖는다.

- <444> 종양-관련된 표적을 정의하는 또 다른 수단은 세포에 의해 발현된 항원의 생화학적 성질을 기술하는 것이 아니라 종양세포의 특징에 관한 것이다. 따라서, 본 발명자들은 종양세포에 우선적으로 결합하는 항체가 트리테르펜-표적화 접합체의 표적화 성분으로 사용될 수 있는 것으로 생각한다. 우선적인 종양세포 결합은 다시, 상기 정의한 바와 같은 종양세포에 대하여 높은 친화성을 나타내며 생명-지속성 정상세포 또는 조직과는 유의적 반응성을 갖지 않는 항체를 기본으로 한다.
- <445> 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같이 트리테르펜 글리코시드를 종양세포에 대해 표적화시키는데 사용하기 위한 항체를 생성시키는 몇가지 수단을 제공한다. 종양세포-특이적 항체를 생성시키기 위해서는 동물을 종양세포 항원을 함유하는 조성물로 면역시키고, 이하에서 더욱 상세히 기술하는 바와 같이, 적절한 특이성을 갖는 생성된 항체를 선별할 수 있다. 면역화 조성물은 상기 열거된 항원 중의 특정의 것의 정제되거나, 부분적으로 정제된 제제; 상기 열거한 항원 중의 특정의 것이 풍부한 막제제와 같은 조성물; 상기 열거한 세포 중의 특정의 것; 또는 상기 열거한 세포 타입 중의 특정의 것을 포함하는 세포의 혼합물 또는 집단을 함유할 수 있다.
- <446> 물론, 항체의 공급원과는 관계없이, 사람의 치료를 위해 본 발명을 실행하는 경우에는 미리 임상적으로-표적화된 종양이 궁극적으로 선택된 항원을 발현시키는 것이 확실하도록 하는 것이 바람직하다. 이것은 종양조직 샘플, 예를 들어 수술 조직생검을 항원적으로 시험하거나, 또는 아마도 shed (shed) 항원을 순환시키는 것을 시험하는 것을 포함하는 매우 정확한 시험방법을 이용하여 성취된다. 이것은 하이브리도마의 "은행 (bank)"으로부터 입수한 항체의 결합친화성을 종양에 대한 반응성에 대하여 시험하는 ELISA (효소-연결된 면역흡착시험)와 같은 면역학적 선별시험으로 용이하게 수행할 수 있다. 그후에, 본 발명의 이중특이성 항체를 제조하기에 적절한 종양선택성 및 친화성을 나타내는 항체를 선택한다.
- <447> 잘 알려져 있는 교차-반응성의 현상으로 인하여, 유용한 항체는 원래의 항원이 사람 세포로부터 취득된 경우 이외에도 원래 사용된 항원이 마우스 또는 영장류 동물과 같은 동물로부터 유도되는 면역프로토콜로부터 생성될 수 있을 것으로 생각된다. 사람 기원의 항원이 사용된 경우에, 이들은 사람 종양세포주로부터 취득될 수 있거나, 문제의 특정 환자로부터 생물학적 샘플을 취득함으로써 제조할 수도 있다. 실제로, 환자의 종양에 대해 맞춤형 항체를 개발하는 방법은 공지되어 있으며 (Stevenson *et al.*, 1990), 본 발명과 관련하여 사용될 것으로 기대된다.
- <448> 1. 항체생산을 위한 방법
- <449> 지적인 바와 같이, 항체는 본 발명의 특정한 양태에서 용도를 찾을 수 있다. 예를 들어, 환자에서 특정한 잔기 또는 특정한 조직 타입에 대해 특이적인 항체가 생산될 수 있다. 이들 항체는 그후에, 본 발명의 트리테르펜 화합물에 접합체시킴으로써 항체가 지시하는 조직에 대하여 트리테르펜 화합물을 특이적으로 표적화시킬 수 있다. 이러한 항체의 예시적인 양태는 종양세포에 결합하는 것이다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 모노클로날 및 폴리클로날 항체를 제조하고 특정화시키는 수단은 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 이하에 구체적으로 기술되어 있다 (참조에 Howell and Lane, 1988).
- <450> 간략하게, 폴리클로날 항체는 동물을 목적하는 표적항원을 함유하는 면역원으로 면역시키고 그 면역된 동물로부터 항혈청을 수집함으로써 제조된다. 항혈청을 생산하기 위해서 광범위한 동물종이 사용될 수 있다. 일반적으로, 안티-항혈청을 생산하는데 사용된 동물은 토끼, 마우스, 래트, 햄스터, 돼지 또는 말을 포함한 사람 이외의 동물이다. 토끼는 혈액량이 비교적 크기 때문에, 토끼가 폴리클로날 항체의 생산을 위해서 바람직하게 선택된다.
- <451> 항원의 이소형태 (isoform)에 대해 특이적인 폴리클로날 및 모노클로날 항체는 둘다 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 일반적으로 알려져 있는 바와 같은 통상적인 면역화기술을 사용하여 제조될 수 있다. 특정의 세포 타입의 항원 에피토프 또는 그 대신에 본 발명의 화합물을 함유하는 조성물을 사용하여 토끼 또는 마우스와 같은 하나 이상의 실험동물을 면역시킨 다음, 항원에 대해 특이적인 항체를 생산할 수 있다. 항체생성을 위한 시간이 경과한 후에 폴리클로날 항혈청은 동물을 출혈시키고 전혈액으로부터 혈청샘플을 제조함으로써 간단히 취득할 수 있다.
- <452> 본 발명의 모노클로날 항체는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 이외의 종에서 본 발명의 트리테르펜 화



합물의 존재를 선별하기 위해 적용될 수 있는 면역화학적 방법에서, 또는 특정 항원에 대해 특이적인 항체를 이용할 수 있는 다른 방법에서 유용하게 적용될 수 있는 것으로 믿어진다. 언급한 바와 같이, 본 발명에 의한 항체 사용의 예시적인 양태는 종양-특이적 항원에 대해 지향된 항체를 제조하고, 항체를 본 발명의 트리테르펜 화합물에 연결시키고, 사람 환자를 항원-트리테르펜 접합체로 치료함으로써 본 발명의 화합물을 종양세포 또는 본 발명의 트리테르펜 화합물로 치료될 수 있는 질환에 연루되어 있는 다른 세포에 대해 특이적으로 표적화시키는 것으로 이루어진다. 일반적으로, 다양한 항원에 대한 폴리클로날 및 모노클로날 항체는 둘다 본 발명의 다양한 양태에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 이들은 항체친화성 칼럼에서 트리테르펜 화합물을 정제하는데 사용될 수 있다. 이러한 항체를 제조하고 특정화하는 수단은 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어 본 명세서에 그 기술내용이 그대로 참고로 포함되어 있는 문헌 [Harlow and Lane, 1988]에 기술되어 있다.

<453> 본 기술분야에서 잘 알려져 있는 바와 같이, 소정의 조성물은 그의 면역원성에 변화를 줄 수 있다. 따라서, 펩타이드 또는 플라펩타이드 면역원을 담체에 커플링시킴으로써 이루어질 수 있는 것으로 숙주 면역시스템을 추가 자극시키는 것이 필요하다. 바람직한 담체의 예로는 키홀 림펫 헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin; KLH) 및 소혈청알부민 (BSA)이다. 오브알부민, 마우스 혈청알부민 또는 토끼 혈청알부민과 같은 다른 알부민도 담체로서 사용될 수 있다. 플라펩타이드를 담체 단백질에 접합체시키는 수단은 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 글루타르알데히드, m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르, 카보디이미드 및 비스-비아조타이즈화 벤지딘이 포함된다.

<454> 본 기술분야에서 또한 잘 알려져 있는 바와 같이, 특정의 면역원 조성물의 면역원성은 어쥬번트로서 알려져 있는 면역반응의 비특이적 자극제를 사용함으로써 증진될 수 있다. 바람직한 어쥬번트의 예로는 완전 프로인트 보조액 (사멸된 마이코박테리움 튜버클로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*))를 함유하는 면역반응의 비특이적 자극제), 불완전 프로인트 보조액 및 수산화알루미늄 보조액이 포함된다.

<455> 폴리클로날 항체의 생산에 사용된 면역원 조성물의 양은 면역화를 위해 사용된 동물 뿐 아니라 면역원의 성질에 따라 달라진다. 면역원의 투여를 위해서는 다양한 경로 (피하, 근육내, 피내, 정맥내 및 복강내)가 사용될 수 있다. 폴리클로날 항체의 생산은 면역된 동물의 혈액을 면역화시킨 후의 다양한 시점에서 샘플링함으로써 모니터링할 수 있다. 두번째의 추가자극제 주사가 또한 투여될 수도 있다. 추가자극 (boosting) 및 적정 (titering)의 과정은 적합한 역가가 수득될 때 까지 반복한다. 목적하는 수준의 면역원성이 수득되면 면역된 동물을 출혈시킬 수 있으며, 이렇게 하여 분리되고 저장된 혈청 및/또는 동물을 사용하여 mAbs를 생성시킬 수 있다.

<456> MAbs는 그의 기술내용이 그대로 본 명세서에 참고로 포함된 미합중국특허 제 4,196,265 호에 예시된 방법과 같은 잘 알려져 있는 기술을 사용하여 용이하게 제조된다. 일반적으로, 이 기술은 적합한 동물을 선택된 면역원 조성물, 예를 들어 정제되거나 부분적으로 정제된 종양-특이적 항원, 플라펩타이드 또는 펩타이드 또는 종양세포로 면역시키는 것을 포함한다. 면역화 조성물은 항체생성세포를 자극시키는데 유효한 방식으로 투여된다. 마우스 및 래트와 같은 설치류가 바람직한 동물이지만, 토끼, 양 또는 개구리 세포를 사용할 수도 있다. 래트의 사용이 특정한 잇점을 제공할 수 있지만 (Goding, 1986), 마우스가 바람직하며 BALB/c 마우스가 가장 바람직한데 이는 이것이 가장 일상적으로 사용되기 일반적으로 다 높은 안정한 융합율을 제공하기 때문이다.

<457> 면역시킨 후에, mAb 생성 프로토콜에서 사용하기 위해서 항체를 생성하는 가능성을 갖는 체세포, 특히 B-림프구 (B-세포)를 선택한다. 이들 세포는 조직생검된 비장, 편도 또는 림프절로부터, 또는 말초혈액 샘플로부터 수득될 수 있다. 비장세포 및 말초혈액세포가 바람직한데, 전자는 이들이 분열성 형질아세포 단계에 있는 항체-생성세포의 풍부한 공급원이기 때문이며, 후자는 말초혈액을 용이하게 얻을 수 있기 때문이다. 종종, 동물 패널을 면역시키고 최고의 항체역가를 갖는 동물의 비장을 분리하여 주사기로 비장을 균질화시킴으로써 비장 림프구를 수득한다. 일반적으로, 면역된 마우스로부터 얻은 비장은 약  $5 \times 10^7$  내지  $2 \times 10^8$  림프구를 함유한다.

<458> 그후에, 면역된 동물로부터 수득한 항체-생성 B 림프구는 불멸성 골수종 세포의 세포들, 일반적으로는 면역된 동물과 동일한 종의 세포와 융합시킨다. 하이브리도마-생성 융합과정에서 사용하기에 적합한 골수종 세포주는 비-항체-생성성이며, 높은 융합효율을 갖고, 목적하는 융합세포 (하이브리도마) 만의 성장을 지지하는 특성의 선택배지에서 이들이 성장할 수 없도록 효소가 결핍되어 있다.

<459> 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지되어 있는 바와 같이 다수의 골수종 세포 중의 어느 하나가 사용될 수 있다. 예를 들어, 면역된 동물이 마우스인 경우에는 P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 및 S194/5XX0 Bu1을 사용할 수 있으며; 래트인 경우에는 R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 및 4B210을 사용할 수 있고; U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 및 UC729-6은 모두 세포

융합과 관련하여 유용하다 (참조예 Goding 1986; Campbell, 1984; 및 ATCC 카탈로그).

- <460> 항체-생성 비장 또는 림프절과 골수중 세포의 하이브리드를 생성시키는 방법은 일반적으로 체세포를 골수중 세포와 2:1의 비로 혼합시킴으로써 이루어지는데, 이 비는 세포막의 융합을 촉진시키는 성분 또는 성분들 (화학적 및 전기적)의 존재하에서 각각 약 20:1 내지 약 1:1로 변화할 수 있다. 센다이 바이러스 (Sendai virus)를 사용한 융합방법은 공지되어 있고 (Kohler and Milstein, 1975; 1976), 37% (v/v) PEG와 같은 폴리에틸렌글리콜 (PEG)을 사용한 방법은 문헌 [Geftter *et al.*, 1977]에 기술되어 있다. 또한 전기적으로 유도되는 융합방법도 적합하다(Goding, 1986).
- <461> 융합과정은 통상적으로 대략  $1 \times 10^{-6}$  내지  $1 \times 10^{-8}$ 의 낮은 빈도로 생존가능한 하이브리드를 생산한다. 그러나, 생존가능한 융합된 하이브리드는 선택된 배지에서 배양함으로써 융합되지 않은 모세포 (특히, 통상적으로는 계속해서 무한하게 분열하는 융합되지 않은 골수중 세포)로부터 구별되기 때문에 문제가 제기되지는 않는다. 선택배지는 일반적으로 조직 배양배지에서 뉴클레오타이드의 새로운 합성을 차단하는 성분을 함유하는 것이다, 바람직한 성분의 예로는 아마노프테린, 메토틱렉세이트, 및 아자세린이 있다. 아미노프테린 및 메토틱렉세이트는 퓨린과 피리미딘 둘다의 새로운 합성을 차단하는 반면에 아자세린은 퓨린 합성만을 차단한다. 아미노프테린 또는 메토틱렉세이트가 사용되는 경우에, 배지는 뉴클레오타이드의 공급원으로서 하이포크산틴 및 티미딘으로 보충한다 (HAT 배지). 아자세린이 사용되는 경우에는 배지를 하이포크산틴으로 보충한다.
- <462> 바람직한 선택배지는 HAT이다. 뉴클레오타이드 구조경로를 작동시킬 수 있는 세포 만이 HAT 세포에서 생존할 수 있다. 골수중 세포는 구조경로의 주요(key) 효소, 예를 들어 하이포크산틴 포스포리보실 트랜스피라제 (HPRT)가 결여되어 있으며, 이들은 생존할 수 없다. B-세포는 이 경로를 작동시킬 수 있지만, 이들은 배양액에서 제한된 수명을 가지며 일반적으로 약 2주 이내에 사멸한다. 따라서, 선택배지에서 생존할 수 있는 유일한 세포는 골수중 세포와 B-세포로부터 형성된 하이브리드이다.
- <463> 배양은 특이적 하이브리도마이 선택되는 하이브리도마의 집단을 제공한다. 일반적으로, 하이브리도마의 선택은 세포를 마이크로역가 플레이트에서 단일-클론 희석하여 배양하고, 이어서 개개 클론 상등액 (약 2 내지 3 주 후)을 목적하는 반응성에 대하여 시험함으로써 수행된다. 방사선면역측정법, 효소면역검정법, 세포독성시험, 플라그시험, 점면역결합시험 등과 같은 시험방법은 민감하며, 간단하고 신속해야 한다.
- <464> 그후에 선택된 하이브리도마는 연속 희석하여 개개 항체-생성세포주로 클로닝한 다음, 이 클론을 무한적으로 증식시켜 mAbs를 제공한다. 세포주는 두가지의 기본방식으로 mAbs 생성을 위해서 활용될 수 있다. 하이브리도마의 샘플은 원래의 융합을 위한 체세포 및 골수중 세포를 제공하기 위해 사용되었던 타입의 조직적합성 동물에 (종종 복강내로) 주사할 수 있다. 주사한 동물은 융합된 세포 하이브리드에 의해 생산된 특이적 모노클로날 항체를 분비하는 종양을 발생시킨다. 그후에, 혈청 또는 복수액과 같은 동물의 체액을 유출시켜 고농도의 mAbs를 제공할 수 있다. 개개 세포주는 또한 시험관내에서 배양할 수도 있으며, 여기에서 mAbs는 천연적으로 배양배지 내로 분비되고, 이것으로부터 이들을 고농도로 용이하게 수득할 수 있다. 이들 중의 어느 하나의 수단에 의해 생산된 mAbs는 필요에 따라, 여과, 원심분리, 및 HPLC 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 다양한 크로마토그래피 방법을 사용하여 더 정제할 수 있다.
- <465> (iii) 추가의 종양세포 표적 및 결합 리간드
- <466> 항체를 사용하는 이외에, 다른 리간드를 사용하여 본 발명의 트리테르펜 화합물을 종양세포 항원에 결합시킴으로써 종양부위에 지향하도록 할 수 있다. 과발현된 수용체 (예를 들어, 에스트로겐 수용체, EGF 수용체), 또는 돌연변이체 수용체인 종양항원의 경우에, 상응하는 리간드가 표적화제로 사용될 수 있다.
- <467> 내피세포 수용체 리간드와 유사한 방식으로, 여기에는 종양세포에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 성분이 있을 수 있다. 예를 들어, 종양항원이 과발현된 수용체인 경우에, 종양세포는 생체내에서 특이적 리간드에 의해 피복될 수 있다. 따라서, 그후에 리간드는 리간드에 대한 항체에 의해 또는 수용체 자체의 형태로 표적화될 수 있다. 이러한 타입의 표적화제의 구체적인 예로는 TIE-1 또는 TIE-2 리간드에 대한 항체, 혈소판 인자 4에 대한 항체 및 백혈구유착 결합단백질이 있다.
- <468> (iv) 독소
- <469> 특정의 적용을 위해서, 본 명세서에 기술된 트리테르펜 화합물과 배합하여 사용되는 제 2의 치료제는 항체 또는 성장인자에 접합된 약리학적 성분, 특히 내피세포를 사멸시키거나 그들의 성장 또는 세포분열을 억제하는 능력을 갖는 세포독성제 또는 다른 식으로 항-세포성인 성분인 것으로 생각된다. 일반적으로, 본 발명은 본 명세서

에 기술된 트리테르펜 화합물에 대한 추가성분으로, 표적화제, 바람직하게는 항체에 접합될 수 있고, 표적화된 종양세포에 대해 활성형으로 전달될 수 있는 약리학적 성분의 사용을 포함한다. 항-세포성 성분의 예로는 화학요법제, 방사성동위원소 및 세포독소가 포함된다. 화학요법제의 경우에, 본 발명자들은 스테로이드 호르몬; 사이토신아라비노사이드, 플루오로우라실, 메토틱세이트 또는 아미노프테린과 같은 항대사성 성분; 안트라사이클린; 미토마이신 C; 빈카알칼로이드; 데메콜린; 에토포사이드; 미트라마이신; 또는 클로람부실 또는 멜팔란과 같은 항종양 알킬화제 등의 성분이 특히 바람직한 것으로 믿어진다. 다른 양태는 사이토킨, 성장인자, 세균성 내독소 또는 세균성 내독소의 지질 A 잔기와 같은 성분이 포함될 수 있다. 어떤 경우든지, 이들과 같은 성분은 필요에 따라, 공지의 접합 기술을 사용하여 필요로 하는 표적화된 세포의 부위에서 혈액성분에 대한 그들의 표적화, 내재화, 유리 또는 제시가 가능하도록 하는 방식으로 본 발명의 트리테르펜 화합물과 함께 표적화제, 바람직하게는 항체에 성공적으로 연결될 수 있는 것으로 믿어진다 (참조에 Ghose *et al.*, 1983 및 Ghose *et al.*, 1987).

<470> 현재는 다양한 화학요법제 및 그밖의 다른 약리학적 성분이 항체에 성공적으로 접합되어 약리학적으로 기능을 수행하는 것으로 나타났다 (참조에 Vaickus *et al.*, 1991). 연구한 항종양제의 예로는 독소루비신, 다우노루비신, 메토틱세이트, 빈블라스틴 및 그밖의 다양한 성분이 포함된다 (Dillman *et al.*, 1988; Pietersz *et al.*, 1988). 또한, 네오카르지노스타틴 (Kimura *et al.*, 1983), 마크로마이신 (Manabe *et al.*, 1984), 트레니몬 (Ghose, 1982) 및  $\alpha$ -아만틴 (Davis & Preston, 1981)과 같은 다른 성분의 결합도 공지되어 있다. 본 발명의 트리테르펜 화합물과 적절한 표적화 분자 사이의 접합체를 제조하는 특정한 수단은 상기한 본 명세서에서 구체적으로 기술되어 있다.

<471> **VIII. 본 발명의 화합물의 기타의 용도**

<472> 본 발명자들은 구체적으로 암의 치료 또는 예방 이외에 적용의 범위에 대한 본 발명의 화합물의 용도를 고려한다. 특히, 본 발명자들은 본 발명의 트리테르펜 화합물의 용매, 항진균제 및 항바이러스제, 피시사이드 또는 연체동물박멸제, 피임제, 구충제, UV-보호제, 거담제, 이노제, 소염제, 콜레스테롤 대사의 조절제, 심혈관계 효능제, 항궤양제, 진통제, 진정제, 면역조절제, 해열제, 혈관형성 조절제로서, 모세관 취약성 저하제로서, 노화의 영향에 대항하는 약제로, 및 인지 및 기억 개선제로서의 용도를 고려한다.

<473> 본 발명의 화합물은 혈관형성의 조절에 있어서 역할을 담당한다. 혈관형성 또는 혈관신생은 새로운 혈관의 성장으로서 정의된다. 종양 및 암은 혈관형성을 유도하여 종양을 잘 자라게 하는 산소 및 영양소에 대한 생명선을 제공한다. 새로운 혈관의 발생은 악성 암세포를 신체의 다른 부분으로 전파시키는 출구를 제공한다. 따라서, 혈관형성 억제제는 암환자에게 유익한 것이다. 한편, 혈관형성은 창상치유와 같은 시기에는 필요한 것이다. 이들 창상은 사고, 화상, 상처 및 수술로부터 야기되는 외부 창상 또는 내부기관 창상일 수 있다. 따라서, 혈관형성을 촉진시키는 약제는 창상치유를 위한 치료법에서 사용하기 위한 큰 잠재력을 갖는다.

<474> 본 발명의 화합물을 콜레스테롤 대사의 조절을 위해 적용하는 것도 또한 고려된다. 특히, 본 발명의 화합물 및 영양학적 조성물은 사람 환자에게서 혈청 콜레스테롤 수준을 저하시키기 위한 용도에 대해 고려된다. 따라서, 환자를 본 발명의 트리테르펜 화합물로 경구로 또는 정맥내로 치료함으로써 고콜레스테롤 및 관련된 심혈관계 질환과 관련된 이환율이 저하될 수 있는 것으로 믿어진다.

<475> 심혈관계 질환의 치료를 위해서, 본 발명의 화합물은 부정맥 작용의 치료를 위해서 사용될 수 있으며, 또한 혈관확장제로서 사용될 수 있어서 항고혈압 활성을 유도하는 것으로 생각된다.

<476> 본 발명의 화합물에 대해 고려되는 또 다른 특히 유의적인 용도는 소염제로서의 용도이다. 본 발명자들은 본 발명의 활성 트리테르펜 화합물이 염증반응에서 중요한 역할을 하는 전사인자 NF- $\kappa$ B의 강력한 억제제임을 확인한다. 이 발견은 발암작용에 있어서 염증반응의 중심적 역할을 시사하는 증거의 양을 증가시키는 특히 유의적인 것이다. 따라서, 본 발명에서 제공된 트리테르펜 화합물로 환자를 치료하면 종양형성 및 조직손상을 포함하는 염증과 관련된 광범위한 정도의 질병을 잠재적으로 완화시킬 수 있다.

<477> 염증반응의 초기단계는 증가된 혈관투과성 및 히스타민, 세로토닌 및 염기성 폴리펩타이드 및 단백질의 방출 (삼출)을 특징적으로 나타낸다. 이것은 하이퍼레미아 (hyperaemia) 및 부종형성을 동반한다. 이어서, 여기에는 세포침윤 및 새로운 결합조직의 형성이 있다. 본 발명의 화합물에 의한 치료는 이러한 염증의 초기단계를 억제할 수 있고, 이렇게하여 염증성질환과 관련된 부정적효과를 감소시킬 수 있다.

<478> 본 발명의 화합물이 확인되는 식물종인 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)가 부분적으로 선택되었으며, 이것은 이 식물종이 건지성 지역에 자생하기 때문이다. 이들 지역에서 식물대사의 중요한 기능은 자외선 조사



로부터 세포를 보호하는 화합물을 생산하는 것이다. 본 발명자들은 구체적으로, 본 발명의 트리테르펜 화합물이 UV-보호제로서 작용할 수 있는 것으로 생각한다. 따라서, 본 발명의 화합물은 자외선으로부터의 보호가 필요한 분야에서 광범위한 용도를 갖는 것으로 믿어진다. 예를 들어, 적합한 적용분야는 차광제 또는 사람의 피부에 적용하기 위한 그밖의 다른 유사한 로손 내의 성분으로서 사용하는 것을 포함한다.

<479> 이러한 화합물의 잠재적 잇점은 본 명세서에 기술된 화합물에 대해서 입증된 화학요법적 효과에 의해 나타난다. 본 발명의 트리테르펜 화합물을 함유하는 로손 및 차광제는 따라서 다양한 형태의 피부암에 대한 소인을 갖는 사람에게 특히 적합하다. 이러한 사람의 예로는 피부가 흰 사람 및 특히, 피부암에 대한 유전적 소인을 갖는 사람이 포함된다. 이러한 소인에는 유전성 종양유전자 돌연변이, 또는 UV-유도된 손상에 대한 DNA 복구를 매개하는 세포기전에서의 돌연변이가 포함된다. 특히 중요한 것은 유전적 복구기전을 조절하는 유전자에 있어서의 돌연변이, 예를 들어 UV-유도된 티민-티민 다이머의 절제이다. 유사하게, 본 발명의 화합물은 증가된 UV-보호가 필요한 다른 조성물에 첨가될 수도 있으며, 이들 화합물은 UV-보호를 하고자 하는 모든 생물 또는 무생물 개체에 적용될 수 있다.

<480> 트리테르펜 화합물의 그밖의 가능한 적용분야에는 고혈압 또는 아테롬성경화증의 치료를 위한, 중추신경계 손상, 실제로는 기억상실 또는 증진된 인지기능에 있어서의 보호, 항산화제로서의 용도 (산화성 분자의 혈중 수 준을 모니터링), 또는 산화질소 (NO)의 증가를 포함한다. 또한, 본 발명자들은 구체적으로, 증진된 음경기능을 위한 본 발명의 트리테르펜 화합물의 국소적 적용을 고려한다. 또한, 피부 콜라겐을 증가시킴으로써 피부노화의 영향에 대해 대항하도록 하기 위해서 본 발명의 화합물을 국소적으로 투여하는 것도 본 발명자들에 의해서 고려된다.

<481> **IX. 검정 및 활성화합물의 선별방법**

<482> 다수의 시험방법이 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지되어 있으며, 본 발명의 트리테르펜 화합물을 더 정제화하기 위하여 사용될 수 있다. 이들에는 생물학적 활성의 시험방법 및 화학적 특성의 시험방법이 포함된다. 이들 시험방법의 결과는 화합물의 특성에 대한 중요한 추론, 및 사람 또는 다른 포유 동물 환자를 치료하는 그들의 잠재적인 적용을 제공한다. 이와 관련하여 특히 유용한 것으로 생각되는 시험방법은 생물학적 활성의 생체내 및 시험관내 선별 및 면역검정법을 포함한다.

<483> (i) 생체내 시험

<484> 본 발명은 다양한 동물모델의 사용을 포함한다. 여기에서, 사람과 마우스 사이에서 나타나는 동일성은 잠재적인 치료학적 성분, 예를 들어 본 발명의 트리테르펜 화합물의 기능을 검사하는 탁월한 기회를 제공한다. 사람 및 다른 포유 동물에서의 암을 고도로 예견할 수 있는 마우스에서의 암 모델을 이용할 수 있다. 이들 모델은 모의 원발성 및/또는 전이성 암에 대한 종양세포의 동위성 (orthotopic) 또는 전신적 투여를 이용할 수 있다. 또한, 악성 전환 및/또는 종양 진행과 관련된 특징의 상황의 원인이 되는 것으로 알려진 성분을 제공함으로써 동물에서 암을 유도할 수도 있다.

<485> 시험화합물에 의한 동물의 치료는 화합물을 적절한 형태로 동물에게 투여하는 것을 포함한다. 투여는 임상적 또는 비임상적 목적으로 이용될 수 있는 경로중의 어떤 것에 의해서도 이루어질 수 있으며, 경구, 비내, 구강, 직장, 질 또는 국소적 경로가 포함될 수 있으나 이들로 제한되는 것은 아니다. 그 대신에, 기관내 점적주입, 기관지 점적주입, 피내, 피하, 근육내, 복강내 또는 정맥내 주사에 의해서 투여될 수도 있다. 특히, 전신적 정맥내 주사, 혈액 또는 림프 공급을 통한 지역적 투여 및 종양내 주사가 고려된다.

<486> 생체내에서 화합물의 유효성을 측정하는 것에는 다양한 상이한 기준이 포함될 수 있다. 이러한 기준에는 생존율, 종양 무게 및 메스의 감소, 종양 진행의 정지 또는 느린 진행, 종양의 소실, 전이의 억제 또는 예방, 증가된 활성수준, 면역효과제 기능의 개선 및 개선된 식품섭취가 포함되나, 이들로 제한되는 것은 아니다.

<487> 항종양 활성의 생체내 시험방법의 특히 유용한 타입은 마우스 피부모델의 사용을 포함한다. 다단계 발암현상의 가장 잘 이해된 실험모델 중의 하나인 마우스 피부모델은 암의 발생에 있어서의 개시, 촉진 및 진행의 명백한 3 단계의 분리를 가능하게 한다. 악성으로의 세포 진화는 원종양유전자 및/또는 종양억제 유전자의 연속적인 변질을 포함하는 것이 명백하며, 그의 유전자산물은 유전자발현의 시그널 및/또는 조절의 형질도입을 위한 중요한 경로에 참여한다. 피부종양 촉진 및 진행 단계는 선택적이며 지속적인 과형성, 분화 변질, 및 개시된 세포의 유두종 및 암종으로의 특이적 확대를 야기시키는 유전적 불안정성을 특징적으로 나타낸다. 지속적인 과형성의 유도는 포르볼 에스테르, 몇가지 퍼옥사이드 및 크리사보린과 같은 다양한 성분의 피부종양촉진활성과 잘 상관관계를 이루고 있는 것으로 확인되었다. 마우스 피부모델에서는 모든 공지된 발암제 및 종양 촉진제가 지속적

인 표피 과형성을 유도하는 것으로 나타났다. 일반적으로, 이것은 염증성 반응이 선행된다.

- <488> 광범위한 데이터는 발암성과 돌연변이유발성 사이의 우수한 상관관계를 밝혀내었다. 대부분의 종양-개시성분은 세포성 DNA에 공유적으로 결합하는 친전자성 반응물을 생성시키거나 그것으로 대사에 의해 전환된다. 일부의 유리래디칼 및 유리래디칼인 변형된 DNA 염기가 발암현상의 종양개시 및/또는 종양촉진단계에 포함된다. 강력한 증거는 Ha-ras 유전자의 활성화가 마우스 피부 발암현상의 과정에서 초기에 일어나며, 아마도 개시 현상과 동등한 것임을 시사한다. 예를 들어, 7,12-디메틸벤즈[a]안트라센에 의해 유도된 마우스 피부 유두종 및 암종에서 활성화된 c-Ha-ras 유전자의 존재는 높은 빈도의 코돈 61에서의 A-T 전환과 관련되는 것으로 나타났다. 후속연구에서는 이러한 타입의 돌연변이는 화학적 개시체에 대해 의존적이며 프로모터에 대해서는 독립적임을 증명하였으며, 이것은 c-Ha-ras 상의 개시체의 직접적인 효과를 시사하는 것이다. 또한, 바이러스에 의해 활성화된 Ha-ras 유전자 (v-Ha-ras)에 의한 마우스 피부의 감염은 2-단계 발암현상에서도 개시시키는 것으로 작용할 수 있다. 모든 피부 화학적 발암제 및 피부종양 개시체는 Ha-ras 종양유전자에 있어서의 돌연변이를 생성시키는 것으로 나타났음을 강조하여야 한다. 그러나, 피부 종양촉진제는 Ha-ras에 있어서의 돌연변이를 야기시키지 않는다.
- <489> (ii) 생체내에서의 확인시험 및 임상시험
- <490> 본 기술분야에서 숙련된 전문가라면, 본 발명의 트리테르펜 화합물을 포함하는 화학요법제 또는 이것과 추가의 약제의 배합물은 일반적으로 사람 개체에서 사용하기 전에 생체내 셋팅에서 시험되어야 한다는 것을 이해할 것이다. 동물에서의 이러한 전임상시험은 본 기술분야에서 일상적인 것이다. 이러한 확인시험을 수행하기 위하여는, 고품종양을 갖는 동물과 같이 본 기술분야에서 허용되는 문제의 질병의 동물모델 만이 필요하다. 이와 관련하여서는 예를 들어 마우스, 래트, 기니아피그, 햄스터, 토끼, 개, 침팬지 등과 같은 어떠한 동물이라도 사용될 수 있다. 임치료와 관련하여서는 마우스와 같은 작은 동물을 사용한 연구가 사람에서의 임상적 효능의 전조가 되기 때문에 광범하게 채택되며, 따라서 이러한 동물모델은 적어도 다른 실험동물에 비해서는 용이하게 입수할 수 있고 비교적 값이 싸기 때문에 이들이 본 발명과 관련하여 바람직하다.
- <491> 실험동물 시험을 수행하는 방식은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게는 간단하다. 이러한 시험을 수행하기 위해서 필요한 것은 단지 동등한 치료그룹을 설정하고 한 그룹에 시험화합물을 투여하는 것이며, 한편 다양한 대조시험이 나머지 그룹 또는 그룹들의 동등한 동물에 대해 병행하여 수행된다. 시험의 과정 중에 동물을 모니터하고, 최종적으로는 동물을 희생시켜 치료의 효과를 분석한다.
- <492> 본 발명의 가장 유용한 특징은 암의 치료에 적용한다는 것이다. 따라서, 항종양시험을 수행하여 종양 맥관구조에 대한 특이적 효과 및 항종양효과 전반을 측정할 수 있다. 이러한 시험의 일부로서, 동물의 전반적인 건강상태를 포함하여 효과의 특이성도 또한 모니터한다.
- <493> 고품종양의 치료와 관련하여, 본 발명의 트리테르펜 화합물의 유효용량은 일반적으로 종양 내의 적어도 약 10%의 세포가 세포사멸 또는 세포소멸을 나타내도록 하는 양이다. 바람직하게는, 특정한 종양부위에서 적어도 약 20%, 약 30%, 약 40% 또는 약 50%의 세포가 사멸된다. 가장 바람직하게는, 종양부위에서 100%의 세포가 사멸하는 것이다.
- <494> 종양 내에서 세포사멸의 정도는 신체의 면적 전부에서 건강한 조직의 유지에 대비하여 평가한다. 사용된 용량이 동물에서 심각한 부작용 또는 그밖의 다른 바람직하지 않은 반응을 유도하지 않는 한은 적어도 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 까지 및 100%까지의 종양괴사를 유도할 수 있는 양의 본 발명의 화합물을 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 결정은 모두 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해 용이하게 이루어져 적절히 평가될 수 있다. 예를 들어, 간호인, 과학자 및 전문의는 사람치료에 적절한 용량을 최적화하기 위해 실험동물로부터의 이러한 데이터를 이용할 수 있다. 진행된 질병을 갖는 개체에서는 어느 정도의 부작용이 허용될 수 있다. 그러나, 질병의 초기단계에 있는 환자는 부작용의 부재하에서 유의적인 치료학적 효과를 얻기 위해서 더 조절된 용량으로 치료될 수 있다. 이러한 실험동물 시험에서 관찰된 효과는 바람직하게는 대조수준에 비해서 통계학적으로 유의적이어야 하며, 시험때 마다 재현성이 있어야 한다.
- <495> 본 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가라면 추가로, 유효범위의 하한쪽으로 종양-특이적 괴사를 유도하는 본 발명의 화합물의 배합물 및 용량은 그럼에도 불구하고 본 발명과 관련하여 그대로 유용할 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 예를 들어, 활성약제의 지속적인 적용이 고려되는 양태에서는 그럼에도 불구하고 약 10% 괴사 만을 유도하는 초기용량이 유용한데, 이는 특히 이러한 초기감소가 치료의 후속 제작용시에 추가의 파괴적 공격에 대해 종양을 "프라임 (prime)"하는 것으로 관찰되기 때문이다. 어떤 경우든지, 비록 궁극적으로 약 40%

이상의 종양억제에 도달하지 않더라도, 치료 전의 환자의 상태에 비해 진보된 상태를 나타낸다는 점에서 혈전 및 괴사의 유도는 그럼에도 불구하고 유용한 것으로 이해된다. 또한, 전이 또는 드노보 발암현상의 가능성을 예방하거나 감소시키는 본 발명의 화합물의 용량도 또한 치료를 받는 환자에게 치료학적 잇점이 있는 것으로 생각된다.

- <496> 시험관내 시험시스템과 관련하여 상술한 바와 같이, 함께 사용하고자 하는 약제의 배합물도 시험하여 함께 최적화되어야 한다는 것은 당연히 이해될 것이다. 본 발명의 화합물은 하나 이상의 화학요법제, 면역독소, 응혈성리간드 등과 배합하여 간단하게 분석할 수 있다. 이러한 약제의 배합된 효과의 분석은 상술한 가이드라인에 따라서 측정하고 평가한다.
- <497> (iii) 시험관내 검정
- <498> 본 발명의 한 관점에서는, 시험관내에서 식물추출물의 선별을 수행하여 종양세포의 성장을 억제하거나 종양세포를 사멸시킬 수 있는 화합물을 동정한다. 종양세포의 사멸 또는 세포독성은 일반적으로 괴사 또는 세포소멸에 의해 나타난다. 괴사는 외부시그널에 의해 유발되는 비교적 공통적인 경로이다. 이 과정 중에, 세포막과 세포구획들의 일체성이 사라진다. 한편, 세포소멸 또는 계획된 세포사멸은 특이 유전자의 활성화 및 불활성화에 의해 동시에 발생하는 형태학적 사건 들의 고도로 조직화된 과정이다 (Thompson *et al.*, 1992; Wyllie, 1985).
- <499> 세포독성의 시험관내 시험을 위한 효과적인 수단은 선택된 식물추출물에 종양세포의 패널을 체계적으로 노출시키는 것으로 이루어진다. 이러한 시험 및 시험을 수행하기에 적합한 종양세포주는 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 항종양 활성의 시험관내 시험에서 사용하기에 특히 유익한 사람 종양세포주에는 사람 난소암 세포주 SKOV-3, HEY, OCC1 및 OVCAR-3; 저켓 (Jurkat) T-백혈병세포; MDA-468 사람 유방암 세포주; LNCaP 사람 전립선암 세포주, 사람 흑색종 세포주 A375-M 및 Hs294t; 및 사람 신장암 세포주 769-P, 786-O, A498이 포함된다. 대조용으로 사용하기 위한 바람직한 타입의 정상세포주는 사람 FS 또는 Hs27 포피 섬유아세포로 이루어진다.
- <500> 종양세포를 사멸시키는 화합물의 효능의 시험관내 측정은 예를 들어, 세포주기 정지 (p21, p27; 사이클린 의존성 키나제의 억제제) 및 세포소멸 (bcl-2, bcl-x<sub>L</sub> 및 bax)에 포함된 다양한 유전자의 발현 및 유도에 대한 시험에 의해 성취될 수 있다. 이 시험을 수행하기 위하여, 세포를 시험화합물로 처리하고, 용해시키고, 단백질을 분리한 다음, SDS-PAGE 겔 상에서 분리하고 겔-결합된 단백질을 니트로셀룰로즈막에 전이시킨다. 막을 우선 1차항체 (예를 들어 p21, p27, bax, bcl-2 및 bcl-x<sub>L</sub> 등)로 프로브화한 다음, 희석된 호스래디쉬 (horseradish) 퍼옥시다제 접합된 2차항체로 검출하고, 막을 ECL 검출제에 노출시킨 다음 ECL-사진필름 상에 가시화시킨다. 단백질의 상대적 비율의 분석을 통해서 소정의 단계, 예를 들어 G0/G1 상, S 상 또는 G2/M 상에서 세포의 퍼센트에 대한 예측이 이루어질 수 있다.
- <501> 암세포에 대한 화합물의 세포독성은 또한 MTT 또는 크리스탈 바이올렛 염색을 이용하여 시험관내에서 효율적으로 식별될 수도 있다. 이 방법에서는, 세포를 도말하고, 샘플 화합물의 다양한 농도에 노출시키고, 배양한 다음 MTT (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨브로마이드; Sigam Chemical Co.) 또는 크리스탈 바이올렛으로 염색한다. MTT 처리된 플레이트에 용해완충액 (50% DMF 중의 20% 나트륨도데실설페이트)을 가하여 추가의 배양을 수행한 후에 570 nm에서 OD 관독을 수행한다. 크리스탈 바이올렛 플레이트는 소렌슨 완충액 (Sorenson's buffer) (0.1 M 나트륨시트레이트 (pH 4.2), 50% w/w 에탄올)으로 세척하여 염료를 추출하고, 570-600 nm에서 관독한다 (Mujoo *et al.*, 1996). 생성된 세포독성의 척도로서 상대흡광도를 제공한다.
- <502> (iv) 면역검정법
- <503> 면역검정법은 본 발명과 관련하여, 예를 들어 본 발명의 트리테르펜 화합물에 대해 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 이외의 식물종으로부터의 추출물을 선별하는데 이용할 수 있다. 본 발명에 포함되는 면역검정법에는 미합중국특허 제 4,367,110 호 (이중 모노클로날 항체 샌드위치시험) 및 미합중국특허 제 4,452,901 호 (웨스턴 블롯)에 기술된 방법이 포함되나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 다른 시험방법에는 시험관내 및 생체내 모두에서의 표지된 리간드의 면역침강반응 및 면역세포화학이 포함된다.
- <504> 가장 간단하며 직접적인 개념에서의 면역검정법은 결합시험이다. 특정의 바람직한 면역검정법은 본 기술분야에서 공지되어 있는 다양한 타입의 효소 결합된 면역흡착시험 (ELISAs) 및 방사성면역검정법 (RIA)이다. 조직절편을 사용하는 면역조직화학적 검출도 특히 유용하다.
- <505> ELISA의 한가지 예에서는, 안티-트리테르펜 항체를 폴리스티렌 미량역가 플레이트 내의 웰 (well)과 같이 단백



질 친화성을 나타내는 선택된 표면에 고정시킨다. 그 후, 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)와 관련된 식물로부터의 식물추출물과 같이 본 발명의 트리테르펜 화합물을 함유하고 있는 것이 의심스러운 시험조성물을 웰에 가한다. 결합시키고 세척하여 비-특이적으로 결합된 면역 복합체를 제거한 후에, 결합된 항원을 검출할 수 있다. 검출은 일반적으로 목적하는 항원에 대해 특이적이며 검출가능한 표지물이 결합된 또 다른 항체를 첨가함으로써 수행된다. 이러한 타입의 ELISA가 간단한 "샌드위치 (sandwich) ELISA"이다. 검출은 또한 목적하는 항원에 대해 특이적인 2차항체를 가하고, 이어서 2차항체에 대해 결합친화성을 가지며 검출가능한 표지물이 결합되어 있는 3차항체를 가함으로써 이루어질 수도 있다.

- <506> ELISA 기술의 변법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지되어 있다. 이러한 변법의 하나에서는, 목적하는 항원을 함유하는 것이 의심스러운 샘플을 웰 표면 상에 고정시킨 다음에 제조된 항체와 접촉시킨다. 결합 및 적절한 세척 후에, 결합된 면역 복합체를 검출한다. 초기 항원 특이적 항체가 검출가능한 표지물에 결합된 경우에 면역 복합체는 직접 검출할 수 있다. 또 다시, 면역 복합체는 1차 항원 특이적 항체에 대한 결합친화성을 가지며 검출가능한 표지물이 결합되어 있는 2차항체를 사용하여 검출할 수 있다.
- <507> 경쟁적 ELISAs도 또한 가능한데, 여기에서는 시험샘플을 결합에 대해 표지된 항원 또는 항체의 기지의 양과 경쟁시킨다. 미지의 샘플 내의 반응성 성분의 양은 피복된 웰과 함께 배양하기 전 또는 배양하는 중에 샘플을 공지의 표지된 성분과 혼합시킴으로써 측정된다. 샘플내에 반응성 성분이 존재하면 웰에 결합하기 위해 이용할 수 있는 표지된 성분의 양을 감소시키는 작용을 하며, 따라서 궁극적인 시그날을 감소시킨다.
- <508> 사용된 형식과는 무관하게, ELISAs는 공통적으로 피복, 배양 또는 결합, 비-특이적으로 결합된 성분의 제거를 위한 세척, 및 결합된 면역 복합체의 검출과 같은 특징을 갖는다. 이들은 이하에 기술한다.
- <509> 항원 또는 항체도 또한 플레이트, 비드, 덤스틱 (dipstick), 막 또는 칼럼매트릭스 형태와 같은 고체지지체에 결합시킬 수 있으며, 분석하고자 하는 샘플을 고정화된 항원 또는 항체에 적용한다. 항원이나 항체로 플레이트를 피복시키는 경우에는, 일반적으로 플레이트의 웰을 항원 또는 항체의 용액과 함께 밤새 또는 지정된 기간 동안 배양한다. 그 후, 플레이트의 웰을 세척하여 불완전하게 흡착된 물질을 제거한다. 남아 있는 이용가능한 웰의 표면은 그 후에 시험 항혈청과 관련하여 항원적으로 중성인 비특이적 단백질로 "피복"시킨다. 이들에는 소혈청알부민 (BSA), 카제인, 및 분유의 용액이 포함된다. 피복에 의해 고정화 표면 상의 비특이적 흡착 부위를 차단시키고, 따라서 표면 상에서 항혈청의 비특이적 결합에 의해 야기되는 백그라운드 (background)를 감소시킨다.
- <510> ELISAs에서는 아마도 직접적인 과정 보다는 2차 또는 3차 검출수단을 사용하는 것이 더 통상적이다. 즉, 웰에 항원 또는 항체를 결합시키고 비반응성 물질로 피복시켜 백그라운드를 감소시키고, 세척하여 비결합된 물질을 제거한 후에, 고정화 표면을 면역 복합체 (항원/항체) 형성을 수행하는데 유효한 조건하에서 시험하고자 하는 임상적 또는 생물학적 샘플과 접촉시킨다. 그 후, 면역 복합체의 검출은 표지된 2차 결합리간드 또는 항체, 또는 표지된 3차항체 또는 3차 결합리간드와 함께 2차 결합리간드 또는 항체를 필요로 한다.
- <511> "면역 복합체 (항원/항체) 형성을 수행하는데 유효한 조건하"는 조건이 바람직하게는 항원 및 항체를 BSA, 소감마글로불린 (BGG) 및 포스페이트 완충식염수 (PBS)/트윈과 같은 용액으로 희석하는 것을 포함함을 의미한다. 이들 첨가된 항원은 또한 비특이적 백그라운드의 감소에 도움을 주는 경향이 있다.
- <512> 적합한 조건은 또한, 효과적인 결합을 수행하기에 충분한 온도에서 충분한 시간 동안 배양하는 것을 의미한다. 배양단계는 일반적으로 약 1 내지 2 내지 4시간 동안, 바람직하게는 25°C 내지 27°C의 온도에서 수행하거나, 또는 약 4°C 정도에서 밤새 수행할 수도 있다.
- <513> ELISA에서 모든 배양단계를 수행한 후에, 접촉된 표면은 비-복합체화된 물질을 제거하기 위하여 세척한다. 세척은 종종 PBS/트윈의 용액 또는 보레이트 완충액으로 세척하는 것을 포함한다. 시험샘플과 원래 결합된 물질 사이에서 특이적 면역 복합체를 형성시키고, 이어서 세척한 후에, 소량이라도 면역 복합체의 생성이 측정될 수 있다.
- <514> 검출수단을 제공하기 위하여 2차 또는 3차항체는 검출가능한 결합된 표지물을 갖는다. 바람직하게는 이것은 적절한 색소생산성 물질과 함께 배양하면 발색을 일으키는 효소이다. 따라서, 예를 들어 1차 또는 2차 면역 복합체를 추가의 면역 복합체 형성의 발현에 바람직한 조건하에서 그러한 시간 동안, 우레아제, 글루코즈옥시다제, 알칼리성 포스파타제 또는 하이드로겐퍼옥시다제-접합된 항체와 접촉시키고 배양, 예를 들어 PBS-트윈과 같은 PBS-함유 용액 중에서 실온에서 2시간 동안 배양하는 것이 바람직하다.
- <515> 표지된 항체와 배양하고 이어서 세척하여 비결합된 물질을 제거한 후에, 표지물의 양을 예를 들어, 우레아 및

브로모크레졸 퍼플 또는 효소표지물로서 퍼옥시다제인 경우에는 2,2'-아지노-디-(3-에틸-벤즈티아졸린-6-설폰산 [ABTS] 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 색소생산성 기질과 배양함으로써 정량분석한다. 그후에 정량분석은 발색의 정도를, 예를 들어 가시광스펙트럼 분광광도계를 사용하여 측정함으로써 이루어진다. 그 대신에, 표지물은 화학화학발광성 물질일 수도 있다. 이러한 표지물의 사용은 미합중국특허 제 5,310,687호, 제5,238,808호 및 제5,221,605호에 기술되어 있다.

<516> 시험관내 및 동일계 분석을 위한 방법은 잘 알려져 있으며, 조직, 세포 또는 세포추출물에 대한 항원-특이적 항체의 결합을 평가하는 것을 포함한다. 이들은 본 기술분야에서 숙련된 전문가가 잘 이해할 수 있는 통상적인 기술이다. 예를 들어, 종양세포 항원에 대한 항체를 면역조직화학 (IHC)에 의해 연구를 위해 제조된 신선하게 동결된 조직블럭 및 포르말린-고정되고 파라핀-포매된 조직블럭과 병용하여 사용될 수 있다. 각각의 조직블럭은 잔류하는 "분말화된 (pulverized)" 종양 50 mg으로 구성될 수 있다. 이들 미립상 검체로부터 조직블럭을 제조하는 방법은 예를 들어 유방암에서, 다양한 예후적 인자에 대한 이전의 IHC 연구에서 성공적으로 사용되었으며, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다.

<517> 간략하면, 동결된 절편은 동결된 분말화된 종양 50 ng을 실온에서 작은 플라스틱 캡셀 내의 PBS 내에서 재수화시키고; 원심분리에 의해 입자를 펠릿화시키고; 이들은 점성 포매매질 (embedding medium) (OCT) 내에 재현탁시키고; 캡셀을 전환시키고 다시 원심분리하여 펠릿화시키고; -70°C 이소펜탄 중에서 급속동결 (snap-frozen)시키고; 플라스틱 캡셀을 잘라서 조직의 동결된 실린더를 분리시키고; 조직실린더를 저온조 마이크로톰 칩 (cryostat microtome chuck) 상에 고정시키고; 평균 약 500개의 매우 완전한 종양세포를 함유하는 25-50개의 연속절편을 절단함으로써 제조할 수 있다.

<518> 영구-절편은 50 mg 샘플을 플라스틱 마이크로퓨지 튜브 (microfuge tube) 내에서 재수화시키고; 펠릿화하고; 10% 포르말린 중에서 4시간 동안 재현탁시켜 고정시키고; 세척/펠릿화하고; 가온된 2.5% 한천 중에 재현탁시키고; 빙수중에서 냉각시켜 한천을 고화시키고; 튜브로부터 조직/한천 블럭을 분리시키고; 블럭을 파라핀 중에 침윤 및 포매시키고; 50개 이하의 연속 영구절편을 절단하는 것을 포함하는 유사한 방법에 의해 제조할 수 있다.

<519> 본 발명의 기술내용에 비추어, 필수적으로 본 명세서에 기술된 것과 동일한 화학적 특징 및 생물학적 활성을 갖는 화합물을 확인하기 위한 선별시험을 이용할 수 있다. 특히, 본 발명의 기술내용에 의해 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)와 밀접하게 연관된 식물, 예를 들어 아카시아 속의 구성원으로부터 유래하는 생물학적 활성 트리테르펜 글리코시드에 대한 시험방법이 이용될 수 있다. 이들 시험방법은 다양한 상이한 형식을 사용할 수 있으며, 선별이 수행되는 "활성"의 종류에 따라 좌우될 수 있다. 바람직한 시험방법에는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터의 추출물에 대해 본 명세서에 기술된 것과 같이 항종양 활성을 선별하도록 지시된 시험방법이 포함된다. 본 명세서에서 사용된 것으로, "항종양 활성"은 암세포에서 세포-대-세포 시그널 전달, 성장, 전이, 세포분열, 세포유주, 연관전콜로니 형성, 접촉억제, 침습성, 혈관형성, 종양진행 또는 다른 악성 표현형의 억제 또는 세포소멸의 유도를 의미한다. 특히, 항진균제 및 항바이러스제, 피사사이드 또는 연체동물박멸제, 피임제, 구충제, UV-보호제, 거담제, 이노제, 소염제, 콜레스테롤 대사의 조절제, 심혈관계 효능제, 항게양제, 진통제, 진정제, 면역조절제, 해열제, 혈관형성 조절제로서, 모세관 취약성 저하제로서의 본 발명의 화합물의 용도의 측정을 포함하는 기능적 시험방법이 고려된다. 이러한 시험방법은 본 발명의 기술내용에 비추어 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있는 것이다. 활성에 대한 시험관내 및 생체내 직접시험 뿐 아니라, 이들 시험방법은 본 발명의 화합물에 의한 기질, 리간드, 수용체 또는 다른 결합파트너에 대한 결합의 억제력을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

<520> **X. 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 성장 및 조직 배양**

<521> 본 발명의 화합물의 제조에 있어서의 중요한 관점은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직의 이용성이다. 본 발명자들이 본 발명의 화합물이 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 뿌리 및 꼬투리 내에 농축되어 있다는 것을 밝혀내었기 때문에 이들 조직의 이용성이 특히 중요하다. 본 발명자들은 또한, 어린 실생이 본 발명의 화합물을 분리하기 위한 또 다른 공급원임을 밝혀내었다. 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)는 미국의 남서부 및 오스트레일리아에서 성장하며, 따라서 식물조직은 대중적으로 이용할 수 있다. 또한, 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 2500 종자가 본 발명자들에 의해서 ATCC (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)에 1998년 5월 7일에 기탁되어 있다. 이들 기탁된 종자는 ATCC 기탁번호 209835로 지정되어 있다. 기탁은 미생물의 기탁에 관한 부다페스트조약 (Budapest Treaty)의 조건 및 규정에 따라 이루어졌으며, 적어도 30년 및 기탁물의 샘플의 공급에 대한 가장 최근의 요청을 기탁기관이 접수한 후에 적어도 5년의 기간 동안 또는 특허의 유효기간 동안 중의 더 긴 기간 동안

이루어지며, 이 기간 중에 비생존 상태로 되면 대체시킬 수 있다.

- <522> 따라서, 본 발명의 기술내용에 비추어 본 기술분야에서 숙련된 전문가라면 이들 기탁된 종자를 심어서 그로부터 식물을 성장시키고 식물로부터 본 발명의 트리테르펜 화합물 및 영양학적 조성물을 제조하기 위한 조직을 분리시킬 수 있다. 또한, 천연적으로 존재하는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 집단으로부터 조직을 분리할 수도 있다. 그러나, 적합한 배양기술이 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 조직의 증식을 위해서 고안된 경우에는 본 발명의 화합물의 분리를 위한 조직의 제조를 더 용이하게 성취할 수 있다. 조직의 제조를 위한 한가지 선택방법은 식물종의 대규모 배양이다. 그러나, 더욱 바람직한 선택방법은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직 배양 및 에어로pon (aeroponic) 성장시스템의 수행을 포함한다.
- <523> (i) 에어로pon 성장기술
- <524> 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 배양을 위한 에어로pon 시스템을 이용함으로써 다수의 잇점이 실현될 수 있다. 첫째, 식물의 성장율이 통상적인 성장기술에 의해 도달된 것보다 대략 2배이다. 둘째로, 뿌리를 식물을 손상시키지 않으면서 필요에 따라 용이하게 수확할 수 있다. 뿌리의 절단은 추가로 섬유상 뿌리의 광범위한 측생 성장을 유도한다. 따라서, 뿌리를 일년에 여러번 수확할 수 있다. 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 야생집단에서는, 꼬투리의 수집이 일년에 수주일로 제한되고, 식물을 손상시키거나 죽이지 않고 뿌리를 수집한다는 것은 어렵다.
- <525> 에어로pon 성장시스템은 식물 뿌리가 공기중에 현수되어 있고 완전한 영양용액에 의해 안개가 덮여 있는 밀폐된 시스템이다. 뿌리를 때때로 영양용액으로 안개가 덮인 수밀박스 (watertight box)에 넣는다. 영양용액은 식물의 생활주기를 완전하게 하는데 필요한 필수성분을 모두 함유한다. 상이한 식물은 최적의 성장을 위해서 상이한 수준 및 체제를 필요로 한다는 사실에도 불구하고, 전체적으로 단일의 균형잡힌 용액이 만족스러운 결과를 제공한다.
- <526> (ii) 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직 배양
- <527> 조직 배양은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 배양을 위한 또 다른 선택방법이다. 조직 배양물을 생성시키기 위해서는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 종자를 항미생물 비누를 사용하여 수돗물로 철저히 세척하고 시판 표백분의 20% 용액으로 15분 동안 처리한다. 탈이온수 중에서 반복해서 세척한 후에 종자를 비등수로 처리하여 발아를 유도하고 밤새 배양한다. 다음날 아침, 종자를 시판 표백분으로 다시 한번 소독하고, 멸균 탈이온수로 2-3회 세정한다. 그후, 오염제거된 종자를 MS 비타민 및 2% 슈크로즈 (외이식 배양물의 경우에는 3% 슈크로즈가 사용된다)가 보충된 MS 배지 (Murashige *et al.*, 1962) 상에서 배양하고, 배지를 0.7% 찬 또는 0.2% 겔라이트 (gelrite)로 겔화시킨다.
- <528> 배양을 위해 사용된 외이식편 (explant)은 어린싹의 끝부분, 결절성 분절, 배축 및 뿌리 분절을 포함하는 어떠한 조직 타입이라도 잠재적으로 포함할 수 있다. 이 외이식편은 일반적으로 MS 상에서 또는 IAA, NAA, IBA, 2,4-D 및 BAP (각각 단독으로 또는 배합하여)와 같은 성장조절제가 보충된 MS 상에서 배양한다. 배양물은 일반적으로 차가운 백색형광튜브에 의해 생산된 1000 룩스 (lux)에서 16시간 명광주기 (light photoperiod) 하에 25 ± 2°C에서 유지시킨다. 생성된 실생은 온실, 야와 또는 에어로pon 성장시스템에 옮기기 전에 고정시키기 위해서 온실에서 안개가 덮인 상태에서 유지시킨다.
- <529> 본 발명에서는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 모발상 뿌리 배양물이 발생된다. 식물을 아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*) 균주 R-1000으로 감염시켜 식물 계놈 내에서 T-DNA의 통합 및 발현을 유도하여 모발상 뿌리의 발생을 야기시킨다. 모발상 뿌리 배양물은 빠르게 성장하며 플라지오토프 (plagiotropic) 뿌리 성장을 나타내고, 호르몬-비함유 배지 상에서 고도로 분지되며, 또한 고도의 유전적 안정성을 나타낸다 (Aird *et al.*, 1988). 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)에서 유전적 형질전환 및 모발상 뿌리의 유도 및 최적성장조건은 실시예의 항목에서 상세히 기술된다. 모발상 뿌리 배양물은 대규모로 빠른 조직성장을 가능하게 하여 본 발명의 트리테르펜 화합물을 분리하기 위해 사용될 수 있다.
- <530> 조직 배양의 잇점은 본 발명의 화합물을 발현하는 클로날 배양물이 잠재적으로 제조될 수 있다는 점이다. 이들 배양물은 대규모로 성장할 수 있으며, 잠재적으로 트리테르펜 화합물의 분리를 위한 식물조직의 제조를 위한 산업적 용량의 성장시스템으로 확장될 수 있다. 또한, 조직 배양물로부터 재생된 식물은 빈번하게 유의적인 변이를 나타낸다. 따라서, 조직 배양물을 이용하여, 본 발명의 트리테르펜 화합물의 생산과 관련한 "엘리트 (elite)"인 클로날 세포주 또는 이러한 배양물로부터 재생된 식물을 생산할 수 있다. 생산된 식물은 여러 세대에 걸쳐 자가수분될 수 있으며, 각각의 번식세대 (breeding generation)에서 선택하여 순종 엘리트주를 생산한



다.

<531> 그러나, 유의적인 유전적 변이는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 야생집단에서 존재하기 때문에, 엘리트 품종을 반드시 조직 배양물로부터 생성시킬 필요는 없다. 따라서, 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 야생집단에서 발견되는 유전적 변이도 트리테르펜 생성의 내인성 수준을 조절하는 유전자에 있어서의 변이에 포함시키는 것이 본 발명자들에 의해 고려된다. 이렇게하여 야생집단의 다른 구성원에 비해 증가된 수준의 트리테르펜을 생산하는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 집단 of 구성원을 확인할 수 있으며, 본 발명의 트리테르펜 화합물의 분리를 위한 조직을 생산하도록 지시된 성장시스템에서 사용하기 위한 이들 품종을 선택할 수 있다. 성장시스템은 예를 들어, 통상적인 농업, 에어로폰 성장기술, 조직 배양, 또는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 조직의 증식을 위한 그밖의 다른 적합한 기술로 구성될 수 있다. 추가로, 이들 식물은 더욱 엘리트이며 또한 순종인 품종을 생산하기 위한 번식프로토콜에서 사용하기 위해서 선택될 수 있다.

<532> **XI. 정의**

<533> "a"는 "하나 이상"을 의미한다. 따라서, "잔기 (a moiety)"는 하나, 둘, 셋 또는 그 이상의 잔기를 의미할 수 있다.

<534> "활성구성성분 (active constituents)"은 활성을 보유하는 가장 순수한 추출물을 의미한다. 본 발명에서, "활성성분" 또는 "활성화합물"은 본 발명에 의해 확인된 활성 트리테르펜 화합물을 칭하는 것이다. 이들 화합물은 정제되고 예를 들어 분획 UA-BRF-004-DELEP-F094로 확인되었다.

<535> "꼬투리 (pods)"는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 종자꼬투리 (seedpod)로 정의된다.

<536> "세포독성 (cytotoxic)"은 세포사멸로 정의되는 반면에, 용어 "세포성장억제 (cytostatic)"는 세포의 성장 및/또는 증식의 억제로서 정의된다.

<537> "세포소멸 (apoptosis)"은 배형성적 발생 중에 및 조직항상성의 유지 중에 나타나는 계획된 세포사멸의 정상적인 생리적 과정으로서 정의된다. 세포소멸의 과정은 세포소멸성 세포에서의 일련의 대사적 변화에 따라 세분될 수 있다. 몇개의 조절 또는 시그널 형질도입 경로의 각각의 효소적 단계를 시험하여 세포소멸이 세포 또는 세포집단에서 나타나며, 세포사멸의 과정은 암세포에 의해서 붕괴된다는 것이 입증되었다. 세포소멸 프로그램은 또한 원형질막에 있어서의 변화 (예를 들어 비대칭성의 상실), 세포질과 핵의 축합, 및 DNA의 뉴클레오솜간 분해를 포함하는 형태학적 특징에 의해 관찰된다. 이것은 세포가 "세포소멸성 세포"로 변성되는 것으로서 세포사멸로 끝이 난다.

<538> 세포소멸에 포함된 몇개의 효소적 및 시그널 과정을 시험하는 기술은 멀티파라미터 (multiparameter) 세포소멸 연구를 위한 표준프로토콜로서 개발되었다. 세포소멸에 있어서의 초기단계의 한가지 예는 미토콘드리아로부터 시토크롬 c의 유리에 이어서 카스파제-3 경로의 활성화이다 (PharMington, San Diego, CA). 카스파제 (세포질 프로테아제의 계열)의 유도는 세포소멸의 가장 일관되게 관찰되는 특징중의 하나이다. 특히, 카스파제-3은 이 과정에서 중심적인 역할을 한다. 카스파제가 활성화되면, 이들은 표적단백질을 분해시키며, 이들 중의 가장 중요한 것은 PARP (핵 내에 편재하는 단백질인 폴리-(ADP-리보즈)폴리머라제)이다. 따라서, 시토크롬 c의 유리를 검출하고, 카스파제-3 활성을 검출하고 PARP 분해를 검출하는 것이 세포소멸의 효과적인 결정인자이다.

<539> 또한, 악성세포의 미토콘드리아로부터 시토크롬 c의 유리를 야기시키는 성분은 계획된 세포소멸의 세포성 조절의 적어도 몇가지 면을 회복시키는 치료법일 것으로 결론을 내릴 수 있다.

<540> 또 다른 세포소멸시험은 아넥신-V 검출이다 (BioWhitaker, Walkerville, MD). 통상적으로, 포스포티딜세린 (PS)은 원형질막의 내부막 상에 편재된다. 그러나, 세포소멸의 초기단계 중에 PS의 외향화가 일어난다. 아넥신-V는 PS에 결합하는 칼슘 결합 단백질이며, 유동세포계산에 의해서 아넥신-V-FITC 염색으로 관찰될 수 있다 (Martin *et al.*, 1995). 본 발명에서 기술된 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 화합물에 의해 처리된 세포의 아넥신-V에 결합하는 능력은 세포가 세포소멸을 겪었는지의 지표로서 채택된다.

<541> 그밖의 다른 실시예에서, 발명자들은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 분리된 항암화합물의 혼합물로 처리된 세포에서 세포소멸활성을 검출하기 위해서 PI-3-키나제 시험을 사용한다. 세포막 결합된 효소인 포스포이노시티드 3-키나제 (PI3K)는 포스포티딜이노시톨의 이노시톨환의 3-위치를 인산화시킬 수 있으며, 따라서 PI3K가 활성인 세포에서 새로운 지질 시그널 경로를 정의하는 것이다. PI3K가 활성인 경우에, AKT로 불리우는 키나제는 세포막에 동원된다. AKT는 막에 동원된 후에 촉매적으로 활성화된 종양유전자의 생성물이다. 완전히 활성화된 AKT는 세포생존에 있어서 결정적인 역할을 수행한다. PI3K/AKT 경로는 세포가 세포소멸을 모면

하는 기전을 제공한다. 따라서, 악성세포에서 PI3K를 억제하는 수단은 세포소멸의 세포성 조절의 적어도 몇가지 면을 회복시키는 치료법일 것이다.

<542> "비정상적인 증식 (abnormal proliferation)"은 암으로서 공지된 병리학적 상태에서 포유 동물 세포에서 나타나는 유전적으로 결정된 일련의 변화로 정의된다. 이 과정은 결국 암세포에서 세포소멸의 조절상실로 귀결된다. 이것은 일반적으로 (1) 외부인자 또는 자극이 하나 이상의 세포에서 유전적 변화를 유발시키는 단계로서 정의되는 개시, (2) 염증을 포함할 수 있는 추가의 유전적 및 대사적 변화를 포함하는 단계로서 정의되는 촉진으로 불리는 단계에서 나타날 수 있다. "촉진단계" 중에 세포는 세포소멸이 차단되는 세포성장의 단계로 대사적 전이를 시작한다.

<543> "악성세포 (malignant cell)"는 악성의 시작의 개시 및 촉진단계 중에 일련의 대사적 변화를 통해서 정상적인 성장조절기전을 벗어난 암세포로서 정의된다. 이들 변화는 세포 내에서의 (돌연변이 및/또는 원종양유전자이 증가된 발현을 활성화시키고/시키거나, 돌연변이 및/또는 하나 이상의 종양억제유전자의 감소된 발현을 불활성화시키는) 유전적 변질의 결과이다. 대부분의 종양유전자 및 종양억제유전자 생성물은 세포주기 도입 또는 유출을 조절하며 분화를 촉진시키고 DNA 손상을 감지하고 복구기전을 개시시키고/시키거나 세포사멸 프로그램을 조절하는 시그널 형질도입 경로의 성분이다. 세포는 세포성장, 분화, DNA 손상 조절 및 세포소멸을 조절하는 다수의 평등적 기전을 이용한다. 거의 모든 종양 및 악성세포는 다수의 종양유전자 및 종양억제유전자에서 돌연변이를 갖는다.

<544> "추출물 (extract)" 또는 "분획 (fraction)"은 다양한 수단에 의해서 조직으로부터 수집된 연속적인 샘플을 의미한다. 이들 "추출물" 또는 "분획"은 목적하는 항종양 활성에 대해서 분석할 수 있으며, 또한 활성성분에 상응하는 더 순수한 성분을 연속적으로 생산하기 위해서 더 "추출"되거나 "분획화"될 수 있다.

<545> "트리테르펜 또는 트리테르펜 글리코시드"는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 유래하는 본 명세서에 확인된 신규하고/하거나 생물학적으로 활성인 사포닌 화합물을 의미한다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가가 본 발명의 기술내용에 비추어서 관련된 종으로부터 화합물을 분리할 수 있거나 본 명세서에 기술된 트리테르펜 및 트리테르펜 글리코시드의 동족체를 화학적으로 합성할 수 있기 때문에, 트리테르펜 또는 트리테르펜 글리코시드를 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 분리할 필요는 없다. 본 발명의 "트리테르펜"은 적어도 트리테르펜 유니트(들), 및 트리테르펜 글리코시드의 경우에는, 당 또는 삭카라이드를 갖는 본 명세서에 기술된 사포닌 화합물을 포함한다. 이들 용어는 또한, 명세서의 나머지 부분으로부터 명백한 것으로서 모노테르펜을 포함하는 추가의 잔기 또는 화학적 작용기를 함유하는 화합물을 의미하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명의 트리테르펜은 또한 당 유니트의 가수분해에 의해 형성된 아글리콘을 포함하며, 추가로 트리테르페노이드 화합물의 추가의 변형을 포함함으로써 변형이 화합물의 생물학적 활성을 파괴시키지 않는다.

**실시예**

<546> 이하의 실시예는 본 발명의 바람직한 양태를 설명하기 위해 포함되었다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가라면 이하의 실시예에 기술된 기술이 본 발명을 실시할 때 잘 기능을 수행하도록 본 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내며, 따라서 그의 수행을 위한 바람직한 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것을 인식할 수 있다. 그러나, 본 기술분야에서 숙련된 전문가는 본 발명의 기술내용에 비추어서, 기술된 특성의 양태에 많은 변화가 일어날 수 있지만 본 발명의 개념, 취지 및 범주를 벗어나지 없이 같거나 유사한 결과를 얻을 수 있다는 것을 인식할 수 있다. 더욱 구체적으로, 화학적으로 및 생리화학적으로 관련된 특성의 성분을 본 명세서에 기술된 성분에 대신하여 치환시킬 수 있지만 동일하거나 유사한 결과와 수득될 수 있음도 명백하다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 명백한 이러한 모든 유사한 치환 및 변형은 첨부된 특허청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 취지, 범위 및 개념 내에 포함되는 것으로 생각된다.

<547> **실시예 1**

<548> **아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 항종양 활성 구성성분의 예비 선별 및 정제**

<549> 유익한 생물학적 활성을 갖는 신규한 화합물을 확인하기 위한 목표를 가지고 DELEP (the Desert Legume Project)로부터 60종의 식물을 선택한다. DELEP (University of Arizona, Tucson)는 아리조나 대학과 보이스트롬슨 사우스웨스턴 아르보레툼 (Boyce Thompson Southwestern Arboretum) 사이의 공동연구에 의해 개발된 사막의 콩류 식물의 수집물이다. 실험적 필드샘플 (field sample)은 각각의 식물종으로부터 수집하여 3-4일 동안

공기건조시키고, 윌리밀 (Wiley mill) (3 mm 스크린 크기)을 사용하여 3 mm 입자크기로 분쇄하고 디클로로메탄 (DCM)과 메탄올 (MeOH)의 1:1 혼합물을 사용하여 삼출에 의해 2 또는 3회 추출한다. 각각의 삼출추출은 적어도 5시간 동안 진행시켰으며, 종종 밤새 계속한다. 추출된 바이오매스 (biomass)의 대부분은 처음 두번의 삼출로부터 수집한다. 그 후, 바이오매스를 공극용적의 반에 해당하는 용적의 메탄올로 세척하고, 메탄올 분취액에 함유된 조추출물을 분리시킨다. 샘플은 일반적으로 분리하여, 진공에서 메탄올을 제거하고 수성상을 RP-C18 입자를 통과시키고 MeOH 내에서 활성 구성성분을 회수한 다음 MeOH를 회전증발시켜 추출물을 고체로서 수집함으로써 생물학적시험을 위해 준비한다. 그 후, 조추출물을 H<sub>2</sub>O, DMSO 또는 이들의 혼합물에 재현탁시킨다 (덜 극성인 화합물은 DMSO에 재현탁시키는 반면에 극성이 더 큰 화합물은 물 또는 물과 DMSO 혼합물에 재현탁시키고, 아글리콘은 DMSO에 재현탁시킨다).

<550> 그 후 각각의 추출물을 사람 난소암 세포주, T-백혈병 세포, 사람 유표피증 세포, 사람 유방암 세포, 사람 전립선암 세포, 사람 포피섬유아세포, 사람 내피세포 및 사람 신장암 세포를 포함한 사람 종양 및 비종양 세포의 패널에 대하여 선별한다. 세포를 우선 18-24시간 동안 37°C에서 96-웰 플레이트 내에 도말한다. 그 후, 세포를 다양한 농도의 식물추출물에 노출시키고, 72시간 동안 37°C에서 배양하여 4시간 동안 MTT (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움브로마이드; Sigma Chemical Co.)로 또는 실온에서 20분 동안 크리스탈 바이올렛 (Sigan Chemical Co.)으로 염색시킨다. MTT 플레이트에 용해완충액 (50% DMF 중의 20% 나트륨도데실설페이트)을 가하여, 추가로 6시간 동안 배양한 후에 570 nm에서 OD를 관독한다. 크리스탈 바이올렛 플레이트를 세척하고 염료를 3-4시간 동안 소렌슨 완충액 (0.1 M 나트륨시트레이트 (pH 4.2), 50% v/v 에탄올)으로 추출한 다음, 플레이트를 570-600 nm에서 관독한다 (Mujoo *et al.*, 1996). 선별된 추출물의 세포독성은 처리된 배지 단독과 식물추출물로 처리된 세포 사이의 OD 관독치를 비교함으로써 나타내었다. 세포독성은 100 - 대조군의 %로 계산하였으며, 여기에서 대조군의 %는 [((식물추출물로 처리된 세포 (처리 샘플)의 OD)/(배지 단독에 노출된 세포 (비처리 샘플)의 OD))×100]이다.

<551> 초기선별 중에, 하나의 식물추출물이 정상적인 사람 섬유아세포에 대해 거의 독성을 나타내지 않으면서 암세포에 대해 강력한 성장억제를 나타내었다. UA-BRF-004-DELEP-F001로 불리는 이 추출물은 콩과식물인 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 분리되었다. 추출물은 사람 난소암 세포주를 사용하여서는 약 12 µg/ml (SKOV-3), 26 µg/ml (OVCAR-3) 및 13 µg/ml (HEY)에서; 사람 흑색종 세포의 경우에는 50 µg/ml (A375-M) 이상에서 및 약 38 µg/ml (HS294T)에서; 사람 유방암 세포주 MDA-468의 경우에는 50 µg/ml 이상에서 IC<sub>50</sub>을 나타내었다 (도 1) (세포주의 설명에 대하여 실시예 14 참조). 동일한 추출물로 처리한 정상적인 사람 포피섬유아세포 (FS) 및 마우스 섬유아세포 (L929) 중에서는 세포독성이 관찰되지 않았다.

<552> 이 추출물은 TLC에 의해 다수의 구성성분의 혼합물을 함유하는 것으로 나타났다. 따라서, 예비적인 노력은 이 추출물을 정제하여 선택적 세포독성의 원인이 되는 활성 구성성분을 분리시키는데 모아졌다. 활성 구성성분이 풍부한 크로마토그래피 분획을 도 15에 도시된 일반적 식에 따라 원추출물로부터 분리한다.

<553> 원추출물인 UA-BRF-004-DELEP-F001은 상술한 바와 같은 삼출 (2회)에 의해 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터의 식물물질 538 g으로부터 제조한다. 그 후 추출물을 진공중에서 건조시켜 분말 약 52.0 g을 수득한다. 그 후, 건조된 물질 51.5 g을 에틸아세테이트 ("EtOAc") 1 L로 3회 처리한다. EtOAc 가용성 물질 약 15.75 g을 실리카 겔 (1.5 kg) 상에서 칼럼 크로마토그래피시킨다. 헥산, EtOAc 및 MeOH의 증가하는 극성혼합물을 사용하여 54개의 서브-분획 (subfraction) 670 ml를 용출시킨다. 54개의 서브-분획을 13개의 별개의 분획으로 수집하여 UA-BRF-004-DELEP-F006 내지 UA-BRF-004-DELEP-F018로서 표지한다. 이들 분획을 상술한 과정을 사용하여 항종양 활성에 대하여 선별한다. 시험한 분획들 중의 어떤 것도 UA-BRF-004-DELEP-F001에서 관찰된 강력한 항종양 활성을 나타내지 않았다.

<554> EtOAc 불용성 물질 (약 34.7 g)을 또한 실리카 겔 (1.7 kg) 상에서 크로마토그래피시킨다. 51개의 서브-분획 670 ml 및 총 21 L에 달하는 3개의 추가의 분획을 DCM, MeOH 및 물의 증가하는 극성혼합물을 사용하여 용출시킨다. 이들 서브-분획을 표 6에 따라 UA-BRF-004-DELEP-F019 내지 UA-BRF-004-DELEP-F026으로 표지된 8개의 별개의 분획으로 수집한다.

표 6

분획 UA-BRF-004-DELEP-F019 내지 UA-BRF-004-DELEP-F026의 용출

분획 확인번호	서브-분획 <sup>1</sup> 으로부터 수집	총 증량 (mg)	용출액
F019	1-13	1015	5% MeOH/DCM (1-6) 10% MeOH/DCM (7-12) 20% MeOH/DCM (13)
F020	14-16	723	20% MeOH/DCM
F021	17-19	3080	20% MeOH/DCM (17-18) 35% MeOH/DCM (19)
F022	20-22	4618	35% MeOH/DCM
F023	23-34 39-40	17216	35%-50% MeOH/DCM (23-34) 65% MeOH/DCM (39) 100% MeOH (40)
F024	35-38 41-51	3030	65% MeOH/DCM (35-38) 100% MeOH (41-51)
F025	9L 및 6L 서브-분획	3980	MeOH (9L) 20% 물 / MeOH (6L)
F026	6L 서브-분획	4507	MeOH 중의 20% 물 및 1% HCOOH
<sup>1</sup> 각각의 서브-분획은 달리 언급하지 않은 한 670ml로 이루어진다.			

<555>

<556>

그후에 각각의 분획을 조추출물에 대하여 상술한 바와 같이 사람 종양세포의 패널에 대한 항종양 활성에 관하여 선별한다. 분획들 중의 하나인 UA-BRF-004-DELEP-F023은 UA-BRF-004-DELEP-F001의 항종양 활성보다 더 강력한 항종양 활성을 나타내었다. 이들 결과는 분획 UA-BRF-004-DELEP-F023 6 µg/ml이 사람 난소암 세포에 대해 50% (OCC1), 63% (SKOV-3), 85% (HEY) 및 48% (OVCAR-3) 세포독성; 사람 전립선암 세포 (LNCaP)에 대해 약 60% 세포독성; 백혈병 세포 (Jurkat)에 대해 약 92% 세포독성; 및 환자의 복수로부터 분리한 신선한 사람 난소암 세포 (FTC)에 대해 약 73% 세포독성을 나타내는 것을 밝혀내었다. 비-형질전환된 세포의 바이오매스는 FS 세포에 대해 10.6 µg/ml 및 HUVEC 세포에 대해 23 µg/ml의 IG<sub>50</sub>을 나타내었다 (도 2).

<557>

UA-BRF-004-DELEP-F023 내의 생물학적 활성성분(들)은 활성성분(들)의 분리 및 특정화에 도움을 주기 위하여 다수의 역상방식 (RP) 증압 액체 크로마토그래피 (MPLC)에 의해 더 정제한다. 샘플을 다음의 단계에 따라 10%의 4 L 증가량이 되는 물 중의 아세토니트릴 (ACN)의 증가농도의 탈기혼합물로 용출시킨다: 0, 10%, 20%, 30%, 40% ACN/물. 그후, MeOH로 분획 2-4 L를 용출시킨다. 반복된 처리 후에 10개의 분획을 수집하여 표 7에 따라 UA-BRF-004-DELEP-F027 내지 UA-BRF-004-DELEP-F036으로 표지한다.

**표 7**

분획 UA-BRF-004-DELEP-F027 내지 UA-BRF-004-DELEP-F036의 용출

분획 확인번호	총중량 (g)	용출액
F027	6.95	물 중의 0-20% ACN
F028	0.99	물 중의 30-40% ACN
F029	1.46	물 중의 30-40% ACN
F030	0.86	물 중의 30-40% ACN
F031	0.15	물 중의 30-40% ACN
F032	1.01	물 중의 30-40% ACN
F033	0.54	물 중의 30-40% ACN
F034	0.50	물 중의 30-40% ACN
F035	2.19	물 중의 30-40% ACN
F036	1.17	물 중의 30-40% ACN

<558>

이들 분획 중의 몇개는 TLC에 의해 유사한 것으로 나타났다. 수득율이 더 높은 분획중의 하나인 UA-BRF-004-DELEP-F035 (분획 35)는 강력한 항종양 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

<560>

항종양 활성에 대한 UA-BRF-004-DELEP-F035의 선별로 난소암 세포주 HEY, SKOV-3, OVCAR-3 및 C-1 (시스플라틴 내성 OVCAR-3)에 대해서는 각각 3.0, 1.2, 2.0 및 3.5  $\mu\text{g/ml}$ 의  $\text{IC}_{50}$ ; 췌장암 세포 (Panc-1)에 대해서는 2.4  $\mu\text{g/ml}$ 의  $\text{IC}_{50}$ ; 신장암 세포주 769-P, 786-0 및 A498에 대해서는 각각 1.2  $\mu\text{g/ml}$ , 3.0  $\mu\text{g/ml}$  및 3.7  $\mu\text{g/ml}$ 의  $\text{IC}_{50}$ ; 저켓 T-백혈병 세포에 대해서는 130  $\text{ng/ml}$ 의  $\text{IC}_{50}$ ; 및 B-백혈병 세포주 KG1, REH 및 NALM-6에 대해서는 1-3  $\mu\text{g/ml}$  사이의  $\text{IC}_{50}$ 을 나타내었다 (도 3, 도 4). 표 8에서 보는 바와 같이, 조식물추출물의 정제는 생물학적 활성을 극적으로 증가시킨다.

**표 8**

조추출물 대 UA-BRF-004-DELEP-F035의 세포독성

사람 암 세포	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	조 추출물	UA-BRF-004-DELEP-F035
HEY	12	3.0
SKOV-3	25	1.2
OVCAR-3	25	2.0
MDA-468	50	9.0

<561>

<562>

분획 35는 정상적인 사람 FS 세포에 대해 약 4.7  $\mu\text{g/ml}$ 의  $\text{IC}_{50}$  및 정상적인 사람 Hs27 세포에 대해 약 13.3  $\mu\text{g/ml}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 을 나타내었다. 분획 35 (F035)의 효과를 정상적인 사람 적혈구계 및 골수양 콜로니 (골수로부터 분리된 세포)에 대해 평가하였을 때, 3.0  $\mu\text{g/ml}$ 에서 12-18% 억제가 관찰되었다 (표 9).



표 9

적혈구계 및 골수 콜로니에 대한 분획 35의 효과

	적혈구 (콜로니의 #)	억제율(%)	골수 (콜로니의 #)	억제율(%)
미처리	261	—	111	—
F035 (30 µg/ml)	16	94	53	52
F035 (3 µg/ml)	212	18	97	12
F035 (0.3 µg/ml)	248	5.0	119	7 (촉진)

<563>

<564>

분획 35의 강력한 항종양 활성을 시사하는 상기 발견에 비추어서, 생물학적검정을 분획 35를 0.095 µg/ml의 농도로 사용하여 상술한 바와 같이 수행한다. 이 시험에서는 종양 세포주의 확대된 패널에 대하여 다양한 농도의 분획 35를 사용한다. 선별의 결과는 1.56 µg/ml의 농도에서조차도 분획 35는 다수의 세포에 대하여 강력한 항종양 활성을 나타내었음을 시사한다 (표 10).

표 10a

	다양한 종양 세포주에 대한 다양한 농도의 UA-BRF-004-DELEP-F035의 세포독성									
	50 µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ml	6.25 µg/ml	3.12 µg/ml	1.56 µg/ml	0.78 µg/ml	0.39 µg/ml	0.195 µg/ml	0.095 µg/ml
UA-BRF-0	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39 µg/ml	0.195 µg/ml	0.095 µg/ml
04-DELEP	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
-F035										
SKOV-3	94%	83.40%	78.50%	71%	54%	27%	0%	0%	0%	0%
OVCA-R-3	85%	82.80%	91%	87%	79%	46%	9%	21.40	18%	18%
C-1	97%	71%	87%	77%	59%	29%	0%	0%	0%	0%
(OVCA-R-3 VARIANT1)										
HEY	97%	79.10%	53.90%	43.30%	19.20%	0%	0%	0%	0%	0%
C-2(HEY VARIANT1)	98%	83.20%	90.50%	88.90%	86.80%	82.50%	73.40	50%	38.10%	38.10%
A-9(HEY VARIANT1)	97.20%	95.70%	94.80%	89%	75.00%	59.30%	18%	0%	0%	0%
MCF-7	79.70%	23%	5%	3.10%	8.10%	17.20	8.80%	17.40	19.20	19.20
BT-20	83%	90%	0%	4%	12.50%	15.50%	21.30%	24%	34%	34%
MDA-MB-453	98.40%	97.20%	94.80%	89.90%	85.40%	81.80%	65.70%	54.90%	38.50%	38.50%
MDA-468	96.50%	93.80%	82%	65%	39%	8%	8%	8%	8%	8%
SKBR-3	83.90%	62.70%	51.70%	47.80%	45.20%	39.60	35.90%	28.80%	21.80%	21.80%

<565>



표 11에 따라 분획을 수집한다.

**표 11**

분획 F091 내지 F094의 용출

분획 확인번호	수집된 용적(L)	총 중량 (g)	용출액	설명
--	4	--	100% 물	당 및 일부 강력한 RBC 분해 성분
F091	4	~ 40	물 중의 10% ACN	실행 16-29로부터 수득된 19.6g
F092	4	89	물 중의 20% ACN	플라보노이드
F093	4	351	물 중의 30% ACN	가벼운 스펀같은 고체, 약간의 호흡 자극성
F094	1.3	577	100% MeOH	미분, 호흡 자극성

<571>

<572>

그후 각각의 분획은 MeOH를 제거하고 C-18 입자 상에 통과시키고 MeOH 내에 회수하고 진공중에서 고체로서 분리함으로써 건조시킨다. 고체를 물에 재현탁시키고 항증양효과에 대하여 시험한다 (몇개의 덜 극성인 분획의 경우에는 DMSO를 물에 가하였으며, 아글리콘은 DMSO에 재현탁시킨다). 결과는 F094로 지정된 100% MeOH 용출물의 생물학적 활성은 필수적으로 분획 UA-BRF-004-DELEP-F035의 활성과 동등하였음을 시사한다 (표 12). F093은 또한 활성 구성성분을 함유한다. 분획 F094 및 F035의 화학적 유사성은 TLC 및 HPLC에 의해서 확인되었으나, F094는 추가의 성분을 함유하는 것으로 나타났다.

표 12

다양한 종양 세포주에 대한 다양한 농도의 F094의 세포독성

U/A-BRF-004Pod-	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19
DELEP-F094	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
769-P	96.60%	93.30%	92.80%	92.40%	88.30%	63.20%	80%	4.50%	2.10%
PANC-1	97%	93.50%	74.60%	50.60%	21.90%	1.10%	0%	0%	0%
HEY	95%	66.50%	50.10%	17.90%	0%	0%	0%	0%	0%
MDA-MB-453	94.20%	92.80%	87.10%	85%	77.30%	58.50%	47%	47%	26.80%
JURKAT	89.60%	89.80%	89.40%	89.30%	89%	88%	73.80%	65.70%	0%

<573>

<574>

F094는 표 13에 따라 더 분획화시켜 TLC에 의해 분석하였으며, 정제된 활성성분(들)을 수득하기 위해서 생물학적검정을 수행한다. 수득된 분획 (F138-F147)의 다양한 양의 생물학적검정의 결과는 표 14에 제시한다.

표 13

분획 F138 내지 F147의 용출

분획 확인번호	수집된 서브-분획 (ml)	총 중량(g)	용출액
—	1-5 (160)	1	물 중의 60% MeOH
F138	6 (65) 7-8 (50)	13	물 중의 60% MeOH (6) 물 중의 70% MeOH (7-8)
F139	9 (25)	39	물 중의 70% MeOH
F140	10 (20)	93	물 중의 70% MeOH
F141	11 (35)	57	물 중의 70% MeOH
F142	12 (50)	54	물 중의 70% MeOH
F143	13 (55)	62	물 중의 70% MeOH
F144	14 (70)	29	물 중의 70% MeOH
F145	15 (65)	17	물 중의 70% MeOH
F146	16 (80)	54	물 중의 80% MeOH
F147	17 (80) 18 (100)	7	물 중의 80% MeOH(17) 물 중의 100% MeOH(18)

<575>

표 14a

분획 F137, F140, F142, F144 및 F145의 생물학적검정

	50 µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ml
<b>F137</b>			
769-P	81.50	45.50	18.10
Panc-1	74	11	0
HEY	6.2	0	0
MDA-MB-453	76.70	38.80	26.80
JURKAT	67.70	67.50	67.80
<b>F138</b>			
769-P	96.50	95.60	95.30
Panc-1	95.50	93.45	73.50
HEY	65.30	58.30	21.50
MDA-MB-453	96.10	94.20	92.5
JURKAT	87.50	88	87.50

<576>



표 14b

<b>F139</b>			
769-P	97.30	94.20	94.20
Panc-1	96.60	94.10	86
HEY	89.70	65.80	60.50
MDA-MB-453	95	95	91.90
JURKAT	88.50	88.50	88.50
<b>F140</b>			
769-P	91.70	88.90	87.50
Panc-1	95	94.60	92.50
HEY	95.40	72.10	62.80
MDA-MB-453	86.20	80.20	75.20
JURKAT	68.40	67.80	68.10
<b>F141</b>			
769-P	97.80	95.10	95
Panc-1	96.80	95	85.60
HEY	96	68.80	60.6
MDA-MB-453	95	94.50	94
JURKAT	88.50	88.40	88
<b>F142</b>			
769-P	92.50	90.20	88.20
Panc-1	96	93.60	88.60
HEY	98	74.80	66
MDA-MB-453	86.10	75.40	72.90
JURKAT	67.90	67.10	66.30
<b>F143</b>			
769-P	98.30	96.80	98.30
Panc-1	96.70	94.70	85.60
HEY	98.50	73	64
MDA-MB-453	96.70	95	94.10
JURKAT	88.00	88	88

<577>

표 14c

<b>F144</b>			
769-P	89.80	88.60	89.50
Panc-1	96.60	93.80	90.90
HEY	98.50	75.30	62.20
MDA-MB-453	86.70	78.50	75.80
JURKAT	65.70	65.70	65
<b>F145</b>			
769-P	92	90.20	86.30
Panc-1	96.70	91.40	84.80
HEY	97.50	82.30	58.60
MDA-MB-453	85.40	74.40	48.90
JURKAT	67.90	68.40	68.60
<b>F146</b>			
769-P	97.30	97.30	63.30
Panc-1	97	88.90	43.40
HEY	97.60	70.50	22
MDA-MB-453	95	94.80	78
JURKAT	88.60	88.20	88.10
<b>F147</b>			
769-P	44.30	23.40	5
Panc-1	40	11	0
HEY	0	0	0
MDA-MB-453	70	50	57
JURKAT	86.30	84	78.70
성장 억제율(%)			

<578>

<579>

상기의 방법은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 꼬투리로부터 활성 구성성분을 분리하는 방법에 초점을 맞추고 있지만, 활성 구성성분은 또한 뿌리로부터 추출될 수도 있다. 이 경우에는 뿌리를 1/2 시간 동안 분쇄하고 100% MeOH로 더는다. 그후, 혼합물을 여과하고 물 중의 80% MeOH로 희석한다. 대량의 뿌리를 추출하고자 하는 경우에는 그후에 이것을 상술한 바와 같은 삼출을 통해서 추출하는 것이 바람직할 수 있다. 이들 추출 방법에 차이가 있는 이유는 뿌리는 일반적으로 신선하게 추출되는 반면에 꼬투리는 추출하기 전에 종종 건조시키기 때문이다.

<580>

### 실시예 3

<581>

#### 분획 UA-BRF-004-DELEP-F094로부터 활성 구성성분을 제조하는 조제규모의 방법

<582>

분획 UA-BRF-004-DELEP-F094 (F094)로부터 활성 구성성분의 혼합물을 증가된 규모로 제조하기 위해서 변형된 추출/분리 방법을 사용한다. 이 방법을 수회 반복하여 지속적으로 고효율 분획을 수득한다. 일반적으로, F094 또는 그의 등가물 20-25 g을 H<sub>2</sub>O 중의 50% MeOH 150-175 ml에 용해시킨 다음, 칼럼 ((26 mm × 460 mm) + (70 mm × 460 mm)), RP-C18, 40 μm, 1200 g, 60% MeOH/H<sub>2</sub>O로 평형화됨) 상에 흡인시킨다. 분획을 60% MeOH/H<sub>2</sub>O 8 L; 70% MeOH/H<sub>2</sub>O 7.5 L; 및 MeOH 2L로 단계적으로 용출시키고 표 15에서 보는 바와 같이 분획확인물질을 지정한다. 분획 F035-B2는 도 18A-18F에서 보는 바와 같이, F094, F133-136 (분리된 형태 F093) 및 F138-147 (분리된 형태 F094) 내에 함유된 활성성분의 혼합물을 함유한다. F094는 효능에 있어서 1- 내지 2-배 감소가 있는 F035에 대한 허용되는 치환체이며, F035-B2는 F094 보다 작은 효능을 갖는다.

표 15

F035-B2의 분리

분획 확인번호	수집된 용액 (L)	총 중량 (g)	용출액
F237	8	1.8	물 중의 60% MeOH
F238	1	8	물 중의 70% MeOH
F035-B2	3.5	80	물 중의 70% MeOH
F239	3	19	물 중의 70% MeOH
F240	2	20	물 중의 100% MeOH

<583>

<584>

방법은 분획 F035-B2 내의 활성성분을 더 정제하여 UA-BRF-004-DELEP-F035의 분석용 HPLC 특징을 갖는 분획을 제공하기 위해 본 발명자들에 의해 고안된 것이다. 방법은 다음과 같다: 10 미크론 역상 크로마토그래피 칼럼을 사용하여 분획 F035-B2에 대해 추가의 정제용 HPLC를 수행하여 물 중의 26% 아세토니트릴로부터 물 중의 40% 아세토니트릴까지의 아세토니트릴과 물의 단계적 농도구배혼합물로 1-2% 단계농도구배방식으로 용출시킨 다음, 이어서 100% 아세토니트릴로 세척하고 100% 메탄올로 세척하여 F035-B2를 원래의 F035 분획 내에 함유되지 않은 0 내지 20 분 피크 (표준 6 미크론 HPLC RP-18 분석방법 당)를 함유하는 몇개의 분획으로 독특하게 붕괴시킨다 (도 18A). 수득된 나머지 분획들은 F035의 1 내지 3개의 성분 분획화를 제공한다. 상기 시험에 의해 지시되는 바와 같이, 분획 F139-F147은 이들 분획과 유사하며, 특정 암세포주에서는 다른 것에 비해서 어느 정도 증진된 항종양 활성을 갖는다. 분획 F035 내에 존재하는 활성성분의 독특한 혼합물은 전단계의 원래의 조성물에서 용매를 물 중의 16% 내지 26% 아세토니트릴로 변형시키고, 이어서 MPLC 정제하여 UA-BRF-004-DELEP-F035의 등가물을 수그램의 양으로 생성시킴으로써 다량으로 생산될 수 있다.

<585>

본 명세서에 기술된 다른 추출방법 뿐 아니라 상기한 추출방법에 대한 추가의 개선은 아세토니트릴, 메탄올 및 물의 3-용매 혼합물을 사용함으로써 실현될 수 있다. 퍼센트 범위는 표준 크로마토그래피 기술과 친숙한 누구에 의해서나 동적으로 생산되어 최적화될 수 있다. 마찬가지로, 결합된 상실리카는 C-8, CN, 디메틸디올 및 C-18 (이들로 제한되는 것은 아니다)을 포함하는 RP 시스템의 조합을 사용하여 변화시킬 수 있다. 최종단계에서는, 표준 상실리카도 최종 정제과정을 위해서 이용될 수 있다.

<586>

**실시예 4**

<587>

**아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 활성 구성성분을 분리하는 또 다른 방법**

<588>

상술한 바와 같이 분획 F094 (250 g), F035 (50 mg) 및 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 꼬투리 (1 kg) (즉, 종자꼬투리 분말)을 수득한다. 본 실시예에는 분획 F094를 분석하기 위해 사용된 분석적 방법 및 F094의 후속 분획화가 기술되어 있다.

<589>

**4.1 분석 방법**

<590>

농도구배 및 이소크래틱 조건 하에서 다양한 C8 및 C18 칼럼을 포함하는 몇가지 방법이 분획 F094를 분리하기 위해 시도되었다. 모니터에는 220 nm에서의 UV 및 증발성 광산란검출 (evaporative light scattering detection; ELSD) 둘다가 포함된다. 더 우수한 피크 분리는 트리플루오로아세트산 (TFA)을 함유하는 이동상의 경우에 관찰되었다. 본 명세서에서 아카시아 (*Acacia*) 257로 불리우는 방법은 후술한다. 이 방법은 짧은 처리 시간과 함께 우수한 분리를 제공한다.

<591>

HPLC에는 다이오드 배열 검출기 (diode array detector; DAD) 또는 가변성 파장 검출기 (variable wavelength detector) 및 4.6 × 150 mm 인터실 (Intersil) C18 3μ 칼럼 (MetaChem)이 장착되었다. 검출은 220 nm로 설정한다.

<592> 다음과 같은 농도구배가 이루어졌다.

시간(분)	아세트니트릴(%)	TFA 0.1%를 포함하는 H <sub>2</sub> O(%)
0	30	70
36	36	64
42	42	58
42.1	30	70
47	30	70

<593>

<594> 도 25는 이 방법에 의해 수득된 F094의 크로마토그램을 나타낸 것이다. F094는 각 군에서 다수의 피크를 갖는 3개의 그룹 또는 군으로 구성된다: 군-1 (8 내지 20분; 피크 A-D), 군-2 (22 내지 35분; 피크 E-H) 및 군-3 (36 내지 47분; 피크 I-L). 분획 F035도 또한 이 방법에 의해 분석하였으며, 크로마토그램은 도 26에 나타내었다. 첫번째 군의 피크가 더 풍부한 F094에 비해 F035에는 두번째 군의 피크가 더 풍부하다.

4.2. 분획화

<596> 4.2.1. 제 1 분획화

<597> 제 1 분획화는 군-1에서의 피크에 중점을 두었다. 이러한 목적으로 이하에 제시하는 농도구배용출을 이용하는 대칭성 C8 반정제용 (semi-prep) 칼럼 (7.8 × 300 mm, 7 μ) (Waters)을 사용한다. 7개의 서브-분획 단편 (cut)은 도 27에 제시된 바와 같이 제조한다. 마지막 분획 단편 (# 2160-007-31)은 군-2 및 군-3 둘다의 피크를 모두 함유한다. 이들 분획 및 출발물질 (F094)은 생물학적검정을 위해 사용한다.

시간(분)	아세트니트릴(%)	TFA 0.1%를 포함하는 H <sub>2</sub> O(%)
0.0	27	73
38.0	30	70
42.1	90	10
48.0	90	10
49.0	27	73
65.0	27	73

<598>

<599> 4.2.2. 제 2 분획화

<600> 화합물의 제 2 군에서 피크의 분리가 이 분획화의 표적이다. 이것은 동일한 C8 반정제용 칼럼을 이용하여 수행된다. 이동상은 0.1% TFA를 함유하는 물 중의 이소크래틱 (isocratic) 32% 아세트니트릴이었다. 7개의 분획 단편이 만들어졌음을 시사하는 크로마토그래피적 트레이스 (trace)는 도 28에 도시되어 있다. 여기에서 제 1 분획 단편은 군-1에서의 피크를 모두 함유한다.

4.2.3. 생물학적 검정법

<602> 제 1 및 2 분획화로부터 얻은 서브-분획의 생물학적 검정 결과는 각각 표 16 및 17에 나타내었다.

표 16

제 1 분획화로부터 얻은 서브-분획의 저켓 세포에서의 세포독성

분획 번호	중량 (mg)*	세포독성 IC <sub>50</sub> (µg/ml)
2160-007-03	2.7	비활성
2160-007-07	1.9	비활성
2160-007-11	1.3	비활성
2160-007-15	1.6	비활성
2160-007-19 (피크 D1)	1.7	1.2
2160-007-25 (피크 D2)	2.9	5.7
2160-007-31	3.2	1.3
2160-007-34 (F094)	9.3	0.17

\* 중량은 약 ±20%이다.

<603>

표 17

제 2 분획화로부터 얻은 서브-분획의 저켓 세포에서의 세포독성

분획 번호	중량 (mg)*	세포독성 IC <sub>50</sub> (µg/ml)
2160-025-01	7.24	1.2
2160-025-02	4.74	2.8
2160-025-03	3.63	1.0
2160-025-04 (피크 G1)	1.37	0.64
2160-025-05 (피크 G2)	2.07	1.56
2160-025-06	3.64	0.33
2160-007-34 (F094)	12.09	0.17

\* 중량은 약 ±20%이다.

<604>

두개의 정제된 트리테르페노이드 글리코시드, 즉 D1 및 G1을 아카시아 분획 F094로부터 취득한다. D1의 산가수 분해는 아글리콘을 생성한다.

<606>

4.4. D 및 G/H 영역 피크를 취득하기 위한 정제 규모의 분획화

<607>

F094 (2.3 g)를 HPLC 정제용 PFP (펜타플루오로페닐) 칼럼 (50 ×250 mm, 10 µm) 상에서 분획화시킨다. 이동상은 38분에 걸쳐 아세트니트릴 27% 부터 32% 까지의 농도구배방식으로 흐르는 0.1% 트리플루오로아세트산 (TFA)을 함유하는 아세트니트릴/물이었다. 도 29에서 보는 바와 같이, 이 방법은 D 및 G/H 피크를 함유하는 피크를 분리시킨다. 이 정제용 처리물로부터의 분획 단편을 생물학적검정한다. D 및 G/H의 분석적시험은 도 30 및 31에 나타내었다. 여기에서 사용된 방법은 동일한 항목에서 전술한 바와 같은 아카시아 257이다.

<608>

분획 G/H는 우선 PFP 정제용 칼럼에서 더 정제하여 68%의 크로마토그래피적 순도를 갖는 G1을 취득하였으며, 이 물질은 C-18 반정제용 칼럼에서 더 정제하여 순수한 G1을 취득한다.



<609> G/H 혼합물 약 100 mg을 전술한 것과 동일한 PFP 칼럼 상에 부하시킨다. 다음과 같은 농도구배로 처리한다.

시간(분)	아세트니트릴(%)	TFA 0.1%를 포함하는 H <sub>2</sub> O (%)
0	27	73
1	29	71
40	34	66

<610>

5개의 분획이 수집되었다 (G1, G2, G3, H1 및 H2). G1에 대한 분석 (도 32)은 68%의 크로마토그래피적 순도를 나타내었다. 이 분획은 반정제용 칼럼 상에서 더 정제한다.

<612>

YMC C18-Aq 칼럼 (10 ×250 mm, 5 μm)을 사용한다. 이동상은 0.1% TFA를 함유하는 물 중의 31% 아세트니트릴이었다. 최종 G1 생성물은 100%의 크로마토그래피적 순도를 가졌다 (도 33).

<613>

PFP 정제용 칼럼으로부터의 분획 D (45% D1)을 우선 워터스 C-18 칼럼 (25 ×100 mm) 상에서 분획화시킨다. 이동상은 0.1% TFA를 함유하는 물 중의 61% 메탄올이었다. HPLC 분석은 D1이 78% 순수하였으며 (도 34) 이것은 또 다른 피크 (D1.5라 함)를 함유하는 것으로 나타났다. 100%의 크로마토그래피적 순도 (도 35)를 갖는 D1의 샘플은 불순한 D1을 이동상으로서 33% 아세트니트릴/0.1% TFA를 함유하는 물을 사용하여 YMC C18-Aq 칼럼 상에서 더 분획화시킴으로써 생성시킨다. D1은 40°C에서 물 중에서 보다는 묽은 산 용액 중에서 더 안정한 것으로 관찰되었다. 따라서, 0.1% TFA는 D1의 정제 중에 용매에 포함되었다.

<614>

4.4.1. 생물학적검정법

<615>

생물학적검정은 저캣 (Jurkat) 세포주에 대해 수행하였으며, 다양한 서브-분획 및 순수한 D1 및 G1의 효과를 각각 표 18, 19 및 20에 나타내었다. D1 및 G1은 두가지 상이한 pH 값에서 시험한다. 결과는 pH 7.5 에 대비하여 pH 6.5에서 약간 더 높은 활성을 시사한다. 그러나, 세포성장은 낮은 pH 값에서 약 40% 까지 억제되었다.

<616>

4.4.2. D1의 산가수분해

<617>

에탄올 중의 사포닌 D1을 100°C에서 3시간 동안 3 N HCl로 가수분해시킨다. 생성된 아글리콘을 HPLC에 의해 정제한다. 질량스펙트럼 분석은 아글리콘의 분자량이 652인 것으로 나타났다.

**표 18**

정제용 PFP 칼럼으로부터의 세포독성 분획

분획 번호	기술	중량 (mg)*	세포독성 IC <sub>50</sub> (μg/ml)
2160-035-22	피크 D	1.7	0.52
2160-047-01	피크 G/H	1.24	0.12
2160-047-03	피크 I/J/K	1.66	0.19
2160-047-05	피크 L 영역	1.17	0.18
2160-047-07	피크 M	1.72	0.24
2160-007-34	F094		0.21

<618>

**표 19**

G/H 분획화로부터의 세포독성 분획

분획 번호	중량 (mg)*	세포독성 IC <sub>50</sub> (μg/ml)
2160-53-8-G1	1.87	1.23
2160-53-11-G2	0.76	2.2
2160-53-14-G3	0.67	4.35
2160-53-17-H1	0.29	6.25
2160-53-20-H2	0.45	12.8
2160-007-34 (F094)		0.38

<619>

표 20

pH 6.5 및 7.5에서 D1 및 G1의 세포독성

화합물/추출물	중량 (mg)*	세포독성 IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
		pH 6.5	pH 7.5
2160-69-29 (D1)	1.036	1.01	0.98
2160-083-30 (G1)	1.951	0.3	0.49
2160-007-34 (F094)		0.15	0.22

<620>

<621> 실시예 5

<622> D1, G1 및 B1의 구조

<623> 5.1. D1의 구조

<624> D1은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 꼬투리의 주성분이다. 이 화합물의 분석은 이것이 상당한 생물학적 활성을 갖는 것으로 나타났다.

<625> 5.1.1. 전체 분자 D1

<626> D1은 상기의 실시예에 기술된 바와 같이 몇개의 정제용 HPLC 분리를 이용하여 수득된 부분적으로 정제된 추출물 F094로부터 분리된 무색의 무정형 고체로서 분리되었다. MALDI 질량분광법으로부터 얻은 그의 분자량은 2104 amu이며, 이것은 진정한 분자량인 2081의 나트륨 부가물이다. 고분리 FAB 질량분광법은 이 분자량을 확인하였으며 C<sub>98</sub>H<sub>155</sub>NO<sub>46</sub>의 분자식을 제시한다. 이러한 분자는 분광법만을 이용하여서 구조결정을 하기에는 너무 큰 것이며, 따라서 분해프로그램이 도 36에 도시된 반응식 1에서 개략적으로 설명한 바와 같이 수행되었다. 도 36에서, D1은 (1)로 표지된 구조로 나타내었다.

<627> D1의 단백질 및 탄소 NMRs는 트리테르펜, 2개의 모노테르펜 및 약 8개의 당의 존재를 나타내었다 ((1) 하에서의 선택된 <sup>13</sup>C-NMR 지정에 대하여 표 21 참조).

표 21a

D1 (1), G1 (14), B1 (21), 아글리콘 (2) 및 아카신산 (3)의 <sup>13</sup>C NMR (MeOH-d4) 지정  
(괄호안의 숫자, 즉 1, 14, 21, 2 및 3은 각각 도 36, 도 37 및 도 38에 도시된 D1, G1, B1, 아글리콘 및 아카신산의 구조를 의미한다)

탄소 번호	(1)	(14)	(21)	DMSO-d6 중의 (2)	(3)
트리테르펜 부분					
1	36.13	36.13	36.13	36.07	38.90
2	27.15	27.15	27.15	29.28	28.03
3	89.86	89.84		76.78	77.94
4		40.09	39.85	39.71	39.28
5		57.08		54.84	55.78
6		19.34		18.03	18.71
7	34.59	34.59	34.58	34.27	33.51
8		40.82	40.09	40.82	39.79

<628>

표 21b

9		48.08		46.11	47.15
10		37.94	37.94	36.59	37.31
11	24.29	24.54	24.49	26.97	23.77
12	124.04	124.04	124.09	122.04	122.61
13	143.70	143.7	143.68	142.61	144.29
14		42.64	42.63		42.01
15	36.20	36.39	36.51		35.74
16		74.26		72.41	74.22
17		52.29		49.70	51.67
18		41.64	41.60		40.97
19	48.67	48.3		46.85	48.42
20		35.88	35.95		36.64
21		78.61		76.78	73.32
22	39.86	41.7	41.94	38.07	41.97
23	28.62	28.61	28.65	26.60	28.65
24	17.12	17.11	17.11	16.06	15.55
25	16.22	16.22	16.25	15.19	16.47
26	17.73	17.72	18.07	16.78	17.43
27	27.40	27.32	27.40	28.24	27.11
28	173.39	175.34	175.39	176.64	179.14
29	29.41	29.43	29.41	28.77	29.97
30	19.42	19.42	19.53	18.65	18.26
외부 모노테르펜					
1	168.69	168.68	168.74		
2	132.92	132.92	132.82		
3	148.48	148.02			
4	24.49	24.58	24.56		
5	41.95	41.33	40.83		
6	81.01	81.0			
7	145.93	144.01			
8	112.53	112.44	112.53		
9	16.75	16.7	16.74		
10	56.51	12.49			
내부 모노테르펜					
1	168.17	169.01	168.19	164.0	
2	132.49	128.52	132.49	135.20	
3	148.03	145.95		137.05	
4	24.29	24.29	24.30	22.86	
5	41.33	39.86	39.73	76.03	
6		73.61		129.41	
7	144.03	144.43		119.80	
8	116.0	116.0	115.33	11.86	
9	23.76	23.7	24.21	12.81	
10	56.62	56.61		64.28	

<629>

<630>

5.1.2. D1의 격렬한 산가수분해

<631>

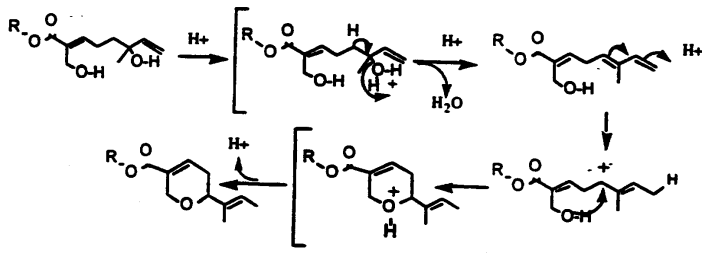
D1을 100℃에서 2시간 동안 2 N HCl 중에서 가수분해시켜 도 36에서 (2)로서 도시된 것으로 질량분광법에 의해 652의 분자량을 갖는 것으로 나타난 "D1 아글리콘"을 생성한다. D1 아글리콘의 NMR은 트리테르펜 및 변형된 모노테르펜의 존재를 나타내었으며, 당은 부재였다. 이 물질을 비누화 (30분 동안, 100℃에서 MeOH 중의 1.3 N NaOH)시킴으로써 더 분해시켜, 이것으로부터 다음과 같은 화합물들을 분리시킨다.

<632>

5.1.2.a. 트리테르펜: 이 물질의 C-13 NMR은 아카신산에 대하여 이전에 보고된 것 (참조 도 36, (3)으로 도시된 구조, (3) 이하에서의 <sup>13</sup>C-NMR 지정에 대하여는 표 21 참조)과 동일하였으며, 질량분광법에서의 그의 분자량인 488은 그의 구조와 일치한다.

<633>

5.1.2.b. 폐환된 모노테르펜: 이 화합물의 분자량 및 NMR은 카복실산, 이중결합에 결합된 두개의 메틸그룹 및 지시된 피란구조로 유도하는 두개의 비닐 양성자의 존재를 지시한다. 도 36에서 (4)로 도시한 이 구조적 유니트는 또한 "D1 아글리콘"에도 존재하였지만, 이것은 모 D1에는 존재하지 않았다. D1은 도 36에서 구조 (5)로 도시한 비사이클릭 모노테르펜을 함유하며, 이 구조는 이하에서 보는 바와 같이 산가수분해 중에 폐환을 일으킨다.



<634>

D1의 원래의 분자량 및 스펙트럼 특징과 함께 이들의 구조는 (2)로 표지된 구조에 의해 도 36에 도시한 D1 아글리콘의 구조와 잘 일치한다. (2) 이하에서의 선택된 <sup>13</sup>C-NMR 지정은 표 21을 참조한다.

<636>

5.1.3. D1의 온화한 비누화

<637>

D1을 실온에서 1시간 동안 0.5 N NH<sub>4</sub>OH로 처리하였을 때, 여기에서는 두개의 새로운 화합물로의 완전한 전환이 있었다.

<638>

5.1.3.a. 모노테르펜: 이 분자는 200의 분자량, 및 의심스러운 분해를 지지하는 아사이클릭 모노테르펜 구조를 갖는 것을 시사하는 NMR을 가졌다. 이 구조는 도 36에 도시하였으며, (5)로 표지한다.

<639>

5.1.3.b. 트리테르펜 모노테르펜 올리고사카라이드: 이 화합물은 D1 보다 더 극성이며, 그의 NMR은 아카신산, 하나의 모노테르펜 및 몇개의 모노사카라이드를 함유하는 이것과 일치한다. 이 구조는 도 36에 도시하였으며, (6)으로 표지한다.

<640>

5.1.4. D1의 당분석

<641>

D1의 격렬한 산가수분해 (100°C에서 2시간 동안 2 N HCl)에 이어서 유도체화 (트리메틸실릴 에테르)하고 GC/MS 분석하여 원래의 분자내에 8개의 당잔기가 존재함을 확인한다: 아라비노즈, 람노즈, 푸코즈, 크실로즈, 6-데옥시글루코즈 (즉, 퀴노보즈), N-아세틸글루코사민 및 2개의 글루코즈 분자.

<642>

5.1.5. 트리테르펜 모노테르펜 올리고사카라이드의 더 격렬한 비누화

<643>

트리테르펜 모노테르펜 올리고사카라이드를 60°C에서 1시간 동안 0.3 N NaOH에 적용시키면 3개의 화합물이 형성되었다.

<644>

5.1.5.a. 올리고사카라이드: 매우 극성인 이 단편의 분리 및 분석은 이것이 올리고사카라이드임을 시사한다. 산가수분해 (100°C에서 2시간 동안 2 N HCl)에 의해 수행된 당분석 및 모노사카라이드의 트리메틸실릴 에테르의 GC/MS 분석으로 올리고사카라이드가 두개의 글루코즈 분자와 아라비노즈 및 람노즈 각각 하나씩으로 만들어진 테트라사카라이드였음을 확인한다.

<645>

5.1.5.b. 모노테르펜 글리코시드: 이 물질은 도 36에 도시된 구조 (8)과 일치하는 NMR을 갖는다. 이 화합물의 산가수분해 (100°C에서 2시간 동안 2 N HCl)로 당은 6-데옥시글루코즈로 확인되었다. 이 모노테르펜 글리코시드를 β-글리코시다제로 처리하면 도 36에 (9)로 도시된 구조를 갖는 모노테르펜이 생성되었으며, 이것은 트랜스-2-하이드록시메틸-6-하이드록시-6-메틸-2,7-옥타디엔산과 일치하는 NMR을 가졌다. "베타"-글리코시다제에 의한 이 결합의 가수분해는 이들 두그룹 사이의 결합이 베타 결합임을 나타낸다.

- <646> 5.1.5.c. 트리테르펜 글리코시드: 이 화합물은 951의 분자량 및 도 36에서 구조 (10b)로 도시된 C-3 위치에 트리삭카라이드를 함유하는 아카신산 락톤과 일치하는 NMR을 가졌다. 이 화합물의 산가수분해 (100°C에서 2시간 동안 2 N HCl)로 트리메틸실릴 유도체로서의 GC/MS에 의해 그의 구성 당성분이 N-아세틸글루코사민, 푸코즈 및 크실로즈인 것으로 확인되었다. 이 분자는 도 36에 (10a)로 표지된 구조로 도시된 열린 산/알콜, 및 도 36에서 (10b)로 표지된 구조로 도시된 닫힌 락톤 형태 둘다로 관찰되었다.
- <647> 단편의 당분석 및 분자량을 전체분자 D1에서의 결과와 비교함으로써 D1의 모든 부분이 도 36에서 (5), (7), (8) 및 (10a)로 표지된 구조로 도시된 단편의 원인이 되는 것을 확인한다.
- <648> 5.1.6. D1의 온화한 산가수분해
- <649> D1의 온화한 산 가수분해 (25°C에서 16시간 동안 1 N HCl)로 두개의 새로운 분자가 형성되었다.
- <650> 5.1.6.a. 모노테르펜 당: 분자량, NMR 스펙트럼 및 당분석은 모노테르펜-6-데옥시글루코즈와 일치한다. 이 분자의 구조는 도 36에서 (11)로 표지된 구조로 도시되어 있다.
- <651> 5.1.6.b. 트리테르펜-모노테르펜-글리코시드: 두번째 분자는 트리테르펜-모노테르펜-글리코시드인 것으로 확인되었으며, 이 분자의 구조는 도 36에서 (12)로 표지된 구조로 도시되어 있다.
- <652> 5.1.7. D1 내에서 서브그룹의 결합
- <653> NMR 연구는 외부 모노테르펜의 카복실산이 6-데옥시글루코즈 (퀴노보즈)의 C-4로 에스테르화됨을 시사한다. NMR 및 가수분해 연구는 퀴노보즈의 아노머성 탄소가 내부 모노테르펜의 C-6 하이드록시 그룹에 결합되는 것을 나타내었다. 퀴노보즈의 아노머성 탄소에서의 입체화학은 "베타" 결합을 나타냈다.
- <654> 가수분해 (100°C에서 2시간 동안 2 N HCl) 및 당 이성체화 연구로 테트라삭카라이드 내의 당은 두개의 글루코즈 분자 및 람노즈 및 아라비노즈 각각 한분자씩임을 나타내었다. 단위는 도 39에 나타낸 바와 같이 트리테르펜의 C-28 카복실산에 직접 에스테르화된다. 철 트랩 (trap) 질량분광연구는 테트라삭카라이드 구조가 도 39에 나타낸 바와 같이 두개의 글루코즈 및 중심 람노즈에 결합된 하나의 아라비노즈를 가짐을 나타내었다. 이들 당의 서로에 대한 결합은 아직 알려지지 않았다.
- <655> NMR 연구는 N-아세틸 글루코사민(NAG)가 트리테르펜의 C-3 탄소에 직접 결합되어 있음을 나타낸다. 부분 가수분해의 LC/MS 연구(50% MeOH 중에서 1시간 동안 60°C에서 1N HCl)에 의해 당 서열의 잔기는 가운데에는 프럭토즈이고 말단에는 크실로즈이다. 이들 당의 서로에 대한 결합은 아직 알려지지 않았다.
- <656> 5.1.8. 엘립토사이드 E
- <657> D1은 다른 아카시아를 포함하는 다른 종으로부터 보고된 사포닌에서 공통적으로 발견되는 트리테르펜 및 두개의 모노테르펜을 함유한다. D1의 구조는 아르키덴드론 엘립티쿰 (*Archidendron ellipticum*)으로부터 보고된 엘립토사이드 E (도 24)와 유사하다 (Beutler *et al.*, 1997). 본 발명에서, D1의 비선광도는  $[\alpha]_D = -30.0^\circ$  으로 측정되었으며, 이것은 엘립토사이드 E에 대해 보고된 값인  $-24.3^\circ$  과는 다르다.
- <658> 문헌 (Beutler *et al.*, 1997)에 기술된 엘립토사이드 E 및 D1은 상이한 HPLC 보유시간을 갖는다 (D1 - 15.2분, 엘립토사이드 E - 12.5분). 따라서, 이들 두개의 분자는 그들의 서브유니트의 특이적 결합과 같은 몇가지 방식에서 또는 광학적 또는 구조적 이성체의 존재로부터 달라야만 한다.
- <659> 본 발명자들은 도 36에서 구조 (9)로 도시된 내부 모노테르펜의 비선광도가 MeOH 내에서는  $+11.2^\circ$  이고 클로로포름 중에서는  $+16^\circ$  임을 관찰한다. 엘립토사이드에서 동일한 이 단편은 클로로포름 중에서  $-9.1^\circ$  인 것으로 보고되었다. 또한, D1의 내부 모노테르펜의 유일한 키랄중심은 엘립토사이드 E에서 발견되는 것과는 반대인 "S" 배열을 갖는 것으로 측정되었다. D1의 외부 모노테르펜의 비선광도는 이 시점에서 구해진다. 또한, 양성자 NMR은 D1 내에서의 모노테르펜 이중결합은 "트랜스"인 반면에, 문헌 (Beutler *et al.*, 1997)에 제시된 바와 같이 엘립토사이드 E에서의 모노테르펜 이중결합은 "시스"임을 나타낸다. 이들 두가지 특징은 D1과 엘립토사이드



드 E 사이에서 발견되는 첫번째 구조적 차이를 구성한다. 특정 당의 효소촉매적 가수분해는 당의 배열이 엘립 토사이드 E에서와 동일함을 나타낸다.

<660> 5.2. G1의 구조

<661> 이 물질의 생물학적 시험은 G1이 D1 보다 생물학적으로 더 활성임을 나타낸다.

<662> 5.2.1. 전체 분자 G1 (14)

<663> 본 발명에서 측정된 두번째 구조는 G1이었다. 이것은 또한 정제용 HPLC에 의해 낮은 화합물 회수율로 F094로부터 분리되었다. G1은 D1 보다 약간 덜 극성이다. MALDI 질량분광법에 의한 분자량은 D1 보다 16 amu 적은 2065의 분자량을 나타내었다. G1의 비선광도는  $-26.9^\circ$  (MeOH)인 것으로 밝혀졌다. 양성자 NMR은 G1도 또한 D1과 매우 유사한 사포닌임을 나타내었으며, 이것은 트랜스-2,6-디메틸-6-하이드록시-2,7-옥타디엔산인 외부 모노테르펜에서 하나 적은 산소를 가짐으로써 D1과 유일한 차이가 있음을 나타내고 있다. 도 37, (14)로 표시된 구조, 및 (14) 하에서의 선택된  $^{13}\text{C}$ -NMR 지정에 대해서는 표 21을 참조한다. G1은 도 37의 반응식 2에 나타낸 바와 같이 분해되었다.

<664> 5.2.2. G1의 온화한 비누화

<665> G1을 실온에서 꼭 수분 동안 0.5 N  $\text{NH}_4\text{OH}$ 로 처리하면, 여기에서는 더 극성인 온화한 비누화 생성물 및 모노테르펜으로의 완전한 전환이 일어났다.

<666> 5.2.2.a. 모노테르펜: 이 물질의 분자량 및 NMR은 이것이 하이드록시메틸이 존재하는 C-2위치에서 메틸그룹을 가지는 것을 나타내었다. 이것은 도 37에서 (15)로 표시된 구조로 도시되어 있다.

<667> 5.2.2.b. 트리테르펜 모노테르펜 올리고삭카라이드: 이 화합물의 NMR은 이것이 HPLC 보유시간에 의해서 및 양성자 NMR에 의해서, D1으로부터 제조된 도 36에서 (6)으로 표시된 구조와 유사한 것으로서 도 37에 도시된 (16)으로 표시된 구조와 동일한 것이며, 이것은 D1에서 보는 바와 같이 아카신산, 하나의 모노테르펜 및 8개의 모노삭카라이드를 함유함을 시사한다. (16)과 (6)의 유사성은 D1 내부 모노테르펜에서 보여지는 유사한 입체화학을 시사한다.

<668> 5.2.3. G1의 당분석

<669> G1의 격렬한 산가수분해 (100°C에서 2시간 동안 2 N HCl)는 D1에 존재하는 것과 동일한 모노삭카라이드를 생성한다: 아라비노즈, 람노즈, 푸코즈, 크실로즈, 6-데옥시글루코즈, N-아세틸글루코사민 및 두개의 글루코즈 분자.

<670> 5.2.4. G1의 산가수분해

<671> 온화한 비누화 생성물의 산가수분해로 D1에서와 같은 방식으로 3개의 분자를 분리시킨다. NMR 및 당분석 (100°C에서 2시간 동안 2 N HCl)을 각각에 대해 수행한다. 이것은 도 37에서 (16)으로 표시된 구조로 도시되어 있다.

<672> 5.2.4.a. 올리고삭카라이드: 이 물질은 두개의 글루코즈 분자 및 각각 하나씩의 아라비노즈 및 람노즈를 함유하였으며, 도 37에서 (17)로 표시된 구조로 도시된다.

<673> 5.2.4.b. 모노테르펜 글리코시드: 이 물질은 아사이클릭 모노테르펜 (도 37에서 (5)로 표시된 구조로 도시됨) 및 6-데옥시글루코즈를 함유하였으며, 전체 구조는 도 37에서 (18)로 표시된 구조로 도시된다.

<674> 5.2.4.c. 트리테르펜 글리코시드: 이 물질은 아카신산 및 각각 하나씩의 N-아세틸글루코사민, 푸코즈 및 크실로즈를 함유한다. 이들 단편에서 당은 D1에서와 동일한 순서로 배열된다. 이 구조는 도 37에서 (19)로 표시된 구조로 도시된다.

5.2.5. 엘립토사이드 A

<676> G1은 엘립토사이드 A와 동일한 테르펜 함량 및 당을 갖는다 (참조 도 24 및 Beutler, 1997). 그러나, 엘립토사이드 A는 현저하게 상이한 HPLC 보유시간 (G1 - 29.09분 및 엘립토사이드 A - 26.04분)을 가지는 것으로 확인되었으며, 이것은 두개의 분자가 이들의 서브 유닛의 특이적인 결합과 같은 몇가지 방식에서 또는 광학적 이성체의 존재에 의해 또는 둘다에 의해 상이하야 함을 시사하는 것이다. G1 및 엘립토사이드 A의 양성자 및 탄소 NMR 스펙트럼의 비교는 또한 화학적 이동에 있어서의 차이를 나타낸다. 이들 화합물의 내부 및 외부 모노테르펜의 비선광도도 또한 다를 수 있을 것으로 생각된다. 도 37의 구조 (14)는 G1의 구조를 나타낸 것이다.

<677> 5.3. B1의 구조

<678> 생물학적활성 데이터는 B1이 D1 또는 G1보다 훨씬 덜 산성임을 시사한다.

<679> 5.3.1. 전체 분자 B1 (21)

<680> B1의 분리는 식물추출 및 C-18 섬광 크로마토그래피에 이어서 C-18 정제용 및 반정제용 크로마토그래피시킴으로써 수행되었다. B1의 NMR은 이러한 사포닌 군 전체에 걸쳐서 나타나는 것과 동일한 트리테르펜/모노테르펜/퀴노보즈/모노테르펜 구조를 시사한다. NMR은 또한 4개의 데옥시당과 하나의 N-아세틸 그룹의 존재를 시사하는데, 이것은 이 분자가 그의 당 부분에서 D1과는 상이하야 함을 시사하는 것이다. (21) 하에서의 특이적인 <sup>13</sup>C-NMR 지정에 대해서는 표 21을 참조한다. 이 분자는 도 38에 나타낸 바와 같이 분해되었다.

<681> 5.3.2. B1의 당분석

<682> NMR 데이터는 6-데옥시메틸 당 (즉, 푸코즈, 람노즈, 6-데옥시글루코즈) 중의 하나의 1 카피 이상의 존재를 시사한다. 가수분해 (100°C에서 2시간 동안 2 N HCl) 후에 전체 분자의 당분석은 9개의 당이 존재함을 시사한다: 각각 하나씩의 푸코즈, 아라비노즈, 크실로즈, 퀴노보즈 및 글루코사민, 및 두개의 글루코즈 및 람노즈 분자. N-아세틸글루코사민의 잔류물인 글루코사민은 원래의 분자에 존재한다. B1의 구조는 도 38에서 (21)의 구조로 도시된다,

<683> 5.3.3. B1의 온화한 비누화

<684> B1을 실온에서 수분 동안이라도 0.5N NH<sub>4</sub>OH로 처리하면, 여기에서는 더 극성인 화합물 및 온화한 비누화 생성물 및 모노테르펜으로 완전한 전환이 일어났다.

<685> 5.3.3.a. 모노테르펜: 이 물질의 분자량 및 NMR은 이것이 도 37에서 (5)로 표시된 구조로 도시된 D1으로부터의 모노테르펜과 동일한 구조를 가짐을 시사하고 있다. 이것은 도 38에서 (22)로 표시된 구조로 도시된다.

5.3.3.b. 트리테르펜 모노테르펜 올리고삭카라이드: 이 화합물의 NMR은 이것이 아카신산, 하나의 모노테르펜 및 몇개의 모노삭카라이드를 함유함을 시사한다. 이것은 도 38에서 (23)으로 표시된 구조로 도시된다.

<687> 5.3.4. 트리테르펜 모노테르펜 올리고삭카라이드의 더 공격적인 비누화

- <688> 온화한 비누화 생성물의 더 공격적인 비누화 (60°C에서 1시간 동안 0.3 N NaOH)는 이전의 D1 및 G1에서와 유사한 방식으로 3개의 분자를 분리시킨다. 각각에 대해 당분석 및 NMR 데이터를 취득한다.
- <689> 5.3.4.a. 올리고삭카라이드: 이 물질은 글루코즈, 아라비노즈 및 두개의 람노즈 분자를 함유한다. 이것은 도 38에서 (24)로 표시된 구조로 도시된다.
- <690> 5.3.4.b. 모노테르펜 글리코시드: 이 물질은 6-테옥시글루코즈 및 모노테르펜을 함유한다. 이것은 도 38에서 (25)로 표시된 구조로 도시된다.
- <691> 5.3.4.c. 트리테르펜 글리코시드: 이 물질은 C-3위치에 결합된 테트라삭카라이드와 함께 아카신산을 함유한다. 테트라삭카라이드는 각각 한분자씩의 N-아세틸글루코사민, 푸코즈, 글루코즈 및 크실로스로 구성된다. 이것은 도 38에서 (26)으로 표시된 구조로 도시된다.

**실시예 6**

<693> **본 발명의 트리테르펜 화합물의 탈에스테르화**

<694> F094를 탈에스테르화시키고, 탈에스테르화된 생성물을 생물학적검정하여 활성성분을 밝혀내었다. 1.00 g의 F094를 H<sub>2</sub>O 100 ml에 용해시키고, 이어서 KOH 1 g을 가하고 1.5시간 동안 환류시킨다. 용액을 실온으로 냉각시키고, 그의 pH를 1 N HCl을 사용하여 7로 조정한다. 다음 헥산 (2 × 50 ml)으로 세척한다. 그 후 수용액을 추가로 단계적 추출하여 분획 159-162를 취득한다. 예를 들어, 용액은 1차적으로 n-부탄올 (2 × 50 ml)로 추출하고 진공중에서 건조시킨 후에 유기용성 고체 (F159) 0.127 g을 취득한다. 수층을 1 N HCl을 사용하여 pH 5로 산성화시키고, EtOAc (2 × 50 ml)로 추출하여 EtOAc 가용성 고체 (F160) 0.397 g을 취득한 다음, n-부탄올 (2 × 50 L)로 추출하여 유기 용매를 제거한 후에 고체 (F161) 0.338 g을 취득한다. 수층을 마지막으로 1 N NaOH를 사용하여 pH 7로 중화시킨다. 최종 수층으로부터 고체 (F162) 1.808 g을 분리시킨다.

<695> 생물학적검정으로 탈에스테르화된 생성물은 거의 또는 전혀 활성이 없는 것으로 밝혀졌다. F159-162를 769-P, Panc-1, HEY, MDA-MB-453 및 저넷 세포주에 대한 세포독성에 관하여 생물학적 검정한다. 확인된 유일한 활성은 F161의 경우에는 50 µg/ml에서 MDA-MB-453에 대해 1.6% 세포독성을 나타내었으며, F159의 경우에는 50 µg/ml, 25 µg/ml 및 12.5 µg/ml에서 저넷 세포에 대해 각각 15.50%, 6.60% 및 3.80%의 세포독성을 나타내었다. 이들 결과는 에스테르 측쇄가 생물학적 활성에 필요함을 시사하는 것이다. 본 발명의 화합물의 에스테르 측쇄는 항종양 활성을 나타내고/거나 본 발명의 화합물의 트리테르펜 골격과 공동으로 작용하여 나타나는 강력한 항종양 활성을 제공하는 것으로 믿어진다.

**실시예 7**

<697> **본 발명의 화합물의 당 가수분해**

<698> F094 내에 함유된 당을 또한 가수분해시켜 활성성분의 특정화를 도왔다. 12 g의 F094를 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 400 ml에 용해시키고 75분 동안 환류시켰으며, 이 시간 동안에 불용성 물질이 형성되었다. 용액을 냉각시키고 소결된 유리틀을 통해서 여과한다. 잔류물을 물로 세척하여 TLC 분석에 의해 측정된 것으로서 아글리콘 (F191) 4.8 g을 취득한다. 짙은 호박색 여액을 KOH 또는 NaOH로 중화시킨다. 백색 침전이 형성되었으며, 수거한다. 호박색 여액에 이소프로판올을 첨가하여 두번째의 백색 침전을 야기시킨다. 용매를 진공중에서 제거하고, 잔류물을 MeOH에 재현탁시켜 백색 침전의 형성을 유도하였으며, 이것은 필시 불꽃색시험에 의해 측정되는 것으로서 설페이트 염에 반응하는 것이었다. 거의 등명한 여액을 진공중에서 건조시키고, 잔류물을 아세틸화시켰으며 HPLC에 의해 17A 및 17B에서 보는 바와 같이 당의 혼합물을 함유하는 것으로 분석되었다. 이 혼합물은 필시 적어도 5개의 삭카라이드를 함유한다. 이들 당은 상기에서 충분히 설명한 바와 같은 GC-MS 특정화를 위한 TMS 유도체의 분리; 종이 크로마토그래피; HPLC 분리 또는 DEPT NMR을 위한 벤질 유도체의 분리; 또는 <sup>13</sup>C NMR에 의해 더 특

정화될 수 있다. 표준 1-D 및 2-D 셀룰로즈, 페이퍼 및 정상상 TLC에 의해, 주된 당은 약간의 소량의 추가의 당 및 아미노 글리코사이드, 특히 아세트아미도 치환된 당에 대한 강력한 잠재성과 함께 글루코즈, 크실로즈, 람노즈 및 아라비노스인 것으로 확인되었다.

- <699> 상이한 당의 수는 수십개의 밀접하게 관련된 화합물의 존재를 나타내는 복잡한 HPLC 스펙트럼을 설명한다. 특히, 몇개의 활성 구성성분은 두개의 상이한 잔기 (알콜 잔기 및 카복실산 잔기)에서 글리코실화되는 것으로 나타난다. 두개의 잔기에 결합된 6개의 당의 조합으로 분리하기가 어려운 밀접하게 관련된 다수의 화합물을 수득한다.
- <700> 그 대신에, 격렬하게 환류하지는 않는 환류시점 까지 온화하게 가열하면서 100% 에탄올 (5% 물과 함께 공비혼합물) 및 0.1 내지 2.0 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (나머지 후처리하는 동일함)에 의해 가동되는 더 온화한 가수분해 조건으로 아글리콘의 유사한 혼합물을 생성시킨다. 몇가지 성분은 소실되는데, 이것은 더 강력한 조건하에서는 약간의 이성화가 일어남을 시사하는 것이다.
- <701> 그후에, 아글리콘 F191 (1 g)을 무수아세톤 (10 ml) 중에서 메틸요오다이드 (1 ml) 및 무수 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 g)와 함께 5-7시간 동안 환류시킴으로써 메틸화시킨다. 이렇게하여 불용성물질 0.315 g 및 F197로 지정된 메틸에스테르 0.54 g을 생성시킨다. 500 mg의 F197을 15 × 460 mm 칼럼 (45 g SiO<sub>2</sub>, 15-25 μm)을 사용하는 MPLC에 의해서 더 분리시켰으며, 여기에서는 샘플을 SiO<sub>2</sub> 1.5 g, 15-25 μm 상에 전흡착시킨다. 화합물을 표 22에 따라서 헥산 중의 7% 이소프로필알콜 (IPA) 790 ml (서브-분획 1-10), 헥산 중의 10% IPA 470 ml (서브-분획 1-14), 20% IPA/헥산 275 ml (서브-분획 14-15), 디클로로메탄 200 ml 및 DCM/MeOH (1:1) 100 ml로 용출시킨다.
- <702> F191 및 F197의 생물학적검정은 표 23에 기재된 상응하는 용량에서 난소암 세포 (세포주 HEY), 신장암 세포 (세포주 769-P), 췌장암 세포 (세포주 Panc-1), 저켓 T-백혈병 세포 및 MDA-MB-453 유방암 세포에 대해 세포독성을 나타내었다.

**표 22**

F197의 분획 F198 내지 F208로의 분획화

분획 확인번호	수집된 서브-분획 (용적 (ml))	총 중량 (mg)	설명
F198	1 (100)	14	
F199	2-3 (120)	126	F209-214로 추가로 분획화함
F200	4 (40)	8	
F201	5-6 (110)	86	F215-219로 추가로 분획화함
F202	7-8 (170)	37	
F203	9-10 (250)	17	
F204	11 (100)	5	
F205	12 (150)	38	
F206	13 (150)	10	
F207	14-15 (345)	86	
F208	16-18 (300)	105	

<703>

**표 23**

분획 F191 및 F197의 생물학적검정

	50 µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ml
<b>F191</b>			
769-P	82.3	56.3	33.7
Panc-1	90	64	40.3
HEY	94.5	71.6	0
MDA-MB-453	53.5	22.3	7.3
JURKAT	69.6	68.6	45.3
<b>F197</b>			
769-P	84.3	61.1	40.5
Panc-1	93.5	84.4	53.8
HEY	94.4	94.7	62.1
MDA-MB-453	76.8	79.2	68.8
JURKAT	70.2	70.6	56.9

<704>

<705> F199 (116 mg)은 F191을 분획화시키는데 사용된 것과 동일한 칼럼에 의해 분획화시키고, 표 24에 따라서 2% IPA/헥산 100 ml, 4% IPA/헥산 525 ml, 및 10% IPA/헥산 250 ml로 용출시킨다.

**표 24**

F199의 분획 F209 내지 F214로의 분획화

분획 확인번호	수집된 서브-분획 (용적 (ml))	총 중량 (mg)	설명
F209	1-7 (225)	5	
F210	8 (20)	1	
F211	9 (20)	2	
F212	10-14 (140)	90	F220-F228로 추가로 분획화함
F213	15-17 (220)	17	
F214	18 (250)	10	

<706>

<707> F212 (85 mg)를 워터스 정제용 LC 4000 HPLC에 의해 22 × 500 mm 칼럼 (Alltech Econosil C18, 10 µm, 75% ACN/물로 평형화됨) 상에서 더 분획화시키고, 80% ACN/물로 용출시켜서 220 nm의 검출한계를 위해서 ACN으로 40 ml/분의 속도로 세척한 다음, 표 25에 따라서 서브-분획을 매 30초 마다 (20 ml) 수집한다.

<708> F223은 우선 그의 메틸에스테르 유도체로 정제하여 C-191를 생성시킨다. C-191을 전통적인 아세틸화 공정에 적용한다. 구체적으로, C-191 (47 mg)을 실온에서 아세트산무수물 및 피리딘의 2:1 혼합물 중에서 밤새 교반한다. 반응을 물을 사용하여 중지시키고, 용액을 디에틸에테르와 5 N HCl에 분배시킨다. 그후, 유기층을 중성이 될 때 까지 세척하고, 회전증발시키고, 잔류물을 PTLC에 적용한다 -- 하나의 20 cm × 20 cm 조제용 플레이트를 90:10 헥산:이소프로필알콜로 용출시키고, 이어서 계속해서 PTLC를 디클로로메탄:메탄올 (98:2)로 용출시켜 C-191 아세테이트 (F229, 이것은 C-194로 번호를 매긴다)를 수득한다.



표 25

F212의 분획 F220 내지 F228로의 분획화

분획 확인번호	수집된 서브-분획 (용적 (ml))	총 중량 (mg)	설명
F220	A (940)	12	
F221	1-24	1	
F222	25-27	3	
F223	28-38	55	"C191" - <sup>13</sup> C- 및 <sup>1</sup> H-DEPT NMR, HPLC, RP18 TLC 및 MS 에 의해 이의 아세틸화 유도체로서 특정화하기 위해 표적화됨
F224	39-41	3	
F225	42-54	4	
F226	55-74	1	
F227	75-102	5	
F228	103	2	ACN 세척

<709>

<710>

F201 (85 mg)도 또한 F199를 분획화시키는데 사용된 것과 유사한 칼럼에서 MPLC에 의해 더 분획화시키고, 표 26에 따라 2% IPA/헥산 (120 ml), 4% IPA/헥산 (330 ml), 7% IPA/헥산 (460 ml), 20% IPA/헥산 (150 ml), DCM (50 ml) 및 DCM/MeOH (1:1) (70 ml)에 용출시켜 수집한다.

표 26

F201의 분획 F215 내지 F219로의 분획화

분획 확인번호	수집된 서브-분획 (용적 (ml))	총 중량 (mg)	설명
F215	1-5 (510)	3	
F216	6-10 (175)	54	"Aglyc II 메틸 에스테르" - 또한 특정화하기 위해 표적화됨
F217	11-14 (225)	4	
F218	15 (150)	14	
F219	16 (120)	10	

<711>

<712>

실시예 8

<713>

본 발명의 활성 트리테르펜의 생물학적 특징

<714>

혈관형성 또는 혈관신생은 세포가 종양에 의해 생산된 인자(들)에 의해 동원되어 영포지티브 (nourishing) 혈관 시스템을 갖는 종양을 제공하는 과정이다. 혈관형성을 억제하는 것은 종양에 대한 혈액 공급을 제한함으로써 종양 확대를 억제하는 것이다. 이 기능은 분획 35 (UA-BRF-004-DELEP-F035)로 처리한 세포 상에서 소말초내피 세포 증식시험을 사용하여 검사한다. 시험방법은 다음과 같이 수행한다: 소말초내피세포는 표준방법을 사용하여 수득하고 성장시킨다 (Folkman *et al.*, 1979). 세포를 PBS로 세척하고 0.05% 트립신 용액 내에 분산시킨다. 세포현탁액 (25,000 세포/ml)은 DMEM + 10% BCS + 1% GPS로 제조하여 젤라틴화된 24 웰 배양플레이트에 도말하고 (0.5 ml/웰), 현탁액을 37°C에서 24시간 동안 배양한다. 배지를 DMEM + 5% BCS + 1% GPS 0.25 ml로 대체시키고 다양한 농도의 UA-BRF-004-DELEP-F035를 적용한다. 20분 동안 배양한 후에 배지 및 bFGF를 가하여 0.5

mL의 DMEM + 5% BCS + 1% GPS + 1 ng/mL bFGF의 최종용적을 수득한다. 72시간 후에, 세포를 트립신에 분산시키고 헤마탈 (Hematal; Fischer Scientific, Pittsburg, PA)에 재현탁시켜 쿨터계수기로 계수한다 (O'Reilly *et al.*, 1997).

- <715> 시험의 결과는 기본 섬유아세포 성장인자의 존재 또는 부재하에서 내피세포 증식의 유의적인 억제를 입증한다 (도 5). 이들 결과는 식물추출물의 활성성분이 종종 생체내 혈관생성억제에 대한 전조가 되는 내피세포증식의 강력한 억제제임을 입증한다. 또한, 분획은 말초내피세포의 이동에는 영향이 없었으며, 이는 정상세포에 대한 독성이 없음을 시사하는 것이다 (도 6).
- <716> 스테로이드 사포닌 (즉, 디지토닌 및 잼 (yam)으로부터 유래하는 제닌-디오스게닌)이 겪는 공통적인 문제점은 적혈구의 용해이다. 단순배양관 혈액시험을 사용하여 1 mg/mL의 UA-BRF-004-DELEP-F035 로 처리하면 검출가능한 용해가 거의 없었다. 그 대신에, 디지토닌 10 내지 25 µg/mL는 배양관 혈액시험에서 100% 용해를 야기시킨다.
- <717> 그 다음에, 활성성분이 종양세포를 억제하는 기전을 더 연구하기 위하여 전자인자 NF-KB의 TNF-알파 유도된 활성화를 1-2 µg/mL의 UA-BRF-004-DELEP-F035 및 UA-BRF-004Pod-DELEP-F094로 처리된 저켓 세포 (3 × 10<sup>6</sup>)에서 분석한다. 시험은 다음과 같이 수행한다: 저켓 세포를 1-2 µg/mL의 F035 또는 F094로 37°C에서 15시간 동안 전처리한다. 세포를 수거하여 RPMI 1 mL에 재현탁시키고 TNF-알파 100 pM로 37°C에서 30분 동안 처리한다. TNF-알파 처리 후에, 핵추출물은 문헌 (Schreiber *et al.*, 1989)에 따라 제조한다. 간략하게 설명하면, 세포를 빙냉 PBS로 세척하고 용해완충액 (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM 디티오프레이톨, 0.5 mM PMSF, 로이팍틴 2 µg/mL, 아프로티닌 2 µg/mL 및 벤즈아미딘 0.5 mg/mL) 0.4 mL에 현탁시킨다. 세포를 얼음 위에 15분 동안 정치시키고 25 µL의 10% 노니데트 (Nonidet)-40을 세포에 가한다. 관을 소용돌이 상에서 혼합시키고 30초 동안 마이크로원심분리한다. 핵펠릿을 빙냉 핵추출완충액 (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM 디티오프레이톨, 1 mM PMSF, 로이팍틴 2 µg/mL, 아프로티닌 2 µg/mL 및 벤즈아미딘 0.5 mg/mL) 25 µL에 재현탁시키고, 관을 간헐적으로 교반하면서 얼음 위에서 배양한다. 핵추출물을 4°C에서 5회 동안 마이크로원심분리시키고 상등액은 -70°C에서 저장한다.
- <718> 전기영동이동도 이동시험은 핵추출물 (단백질 7 µg)을 결합완충액 (37°C에서 20분 동안, 25 mM HEPES, pH 7.9, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM 디티오프레이톨, 1% 노니데트 P-40, 5% 글리세롤 및 50 mM NaCl) 중에서 폴리 di-dc 0.5 µg의 존재하에 <sup>32</sup>P-표지된 NF-KB 올리고뉴클레오사이드 (서열 번호:1; NF-KB 동감성 올리고뉴클레오타이드; Santa Cruz Biotechnology)와 함께 배양함으로써 수행한다 (Nabel and Baltimore, 1987; Collart *et al.*, 1990; Hassanain *et al.*, 1993). 형성된 DNA-단백질 복합체를 50 mM 트리스, 200 mM 글리신 및 1 mM EDTA를 함유하는 완충액을 사용하여 5% 천연 폴리아크릴아미드겔 상에서 유리 올리고뉴클레오타이드로부터 분리한다. 겔을 10% 아세트산 중에서 고정시키고 건조시킨 다음, 밴드를 -70°C에서 감도강화스크린을 갖는 자가방사기록을 이용하여 가시화시킨다.
- <719> EMSA의 결과는, 비처리된 세포에서는 NF-KB의 기준수준이 낮으며, 이것은 TNF에 의해 활성화됨을 입증한다 (도 20, 라인 1 및 2). 세포를 1 µg/mL의 F035 또는 F094로 전처리하고 이어서 TNF 활성화시키면 (도 20, 라인 4 및 8) NF-KB 활성화의 억제는 나타나지 않았다. 세포를 2 µg/mL의 UA-BRF-004-DELEP-F035 또는 UA-BRF-004-DELEP-F094로 처리하면 (도 20, 라인 6 및 10), TNF-활성화된 NF-KB의 현저한 억제가 관찰되었다. 이 시험의 결과는 F035 및 F094 둘다가 강력한 소염 반응을 유도할 수 있었음을 시사하는 것이다. 활성 트리테르펜 화합물이 강력한 소염성 화합물이라는 것을 시사하는 이외에, 결과는 특히 발암현상에서 염증이 중심적 역할을 한다는 것을 증명하는 증거를 증가시킨다는 점에서 특히 유의적이다 (Sieweke *et al.*, 1990; Prehn, 1997; Schuh *et al.*, 1990).

<720> **실시예 9**

<721> **시그널 형질도입 경로에 대한 연구: F035**

<722> 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 식물추출물의 활성성분의 분자표적을 더 설명하기 위해서, 포스포티딜 이노시톨 3-키나제 (PI3-키나제) 활성화 및 PI3-키나제의 하류 (downstream) 효과기인 AKT (단백질 키나제 B, 세린-트레오닌 키나제) 활성화에 대한 F035의 효과에 대한 연구를 수행한다. PI3-키나제는 수용체 및 비-수용체 티로신 키나제와 결합함으로써 성장인자 시그널 형질도입에 영향을 미치는 효소이다. 두가지 공지의 PI3-키나제 억제제가 있다: 진균 대사산물인 위트만닌 및 식물 플라보노이드 쿠에르세틴과 구조적으로 유사한 합성화합물

인 LY294002.

<723>

시험은 다음과 같이 수행한다: 저켓 세포 ( $1 \times 10^7$ )를 밤새 굼기고, 37°C에서 다양한 시간 (2-16시간) 동안 다양한 농도 (세포주에 따라 1-8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 F035에 노출시킨다. 다양한 시점이 지난 후에, 세포를 수집하여 2000 rpm에서 10분 동안 PBS로 세척한다. 세포를 4°C에서 30분 동안 1% NP-40 용해완충액에 용해시키고, 15,000 rpm으로 4°C에서 5분 동안 원심분리하여 용해물을 분리시킨다. PI3-키나제의 면역침강을 수행하기 위하여 토끼 안티-p85 항체 (티로신 키나제 수용체 어댑터 단백질; Upstate Biotechnology Inc.) 5  $\mu\text{l}$ 를 세포용해물 1 ml와 함께 4°C에서 90분 동안 배양한다. 면역 복합체를 4°C에서 추가로 90분 동안 20% 단백질 A-세파로즈 비드 100  $\mu\text{l}$  상에서 분리시킨다. 면역침강물을 a) PBS, 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% 트리톤-X 100; b) 100 mM 트리스, pH 7.6, 0.5 LiCl, 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; c) 100 mM 트리스, pH 7.6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 및 d) 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 5mM EDTA, 30 mM NaPPi, 200 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF, 0.03% 트리톤-X 100 내에서 연속적으로 세척한다. 그 후, 면역침강물을 키나제 반응완충액 (33 mM 트리스, pH 7.6, 125 mM NaCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200 mM 아데노신, 20 mM ATP, 30  $\mu\text{Ci}$  [g-32P] ATP) 30  $\mu\text{l}$ 에 재현탁시킨다. 포스포티딜이노시톨 (PI; 50  $\mu\text{l}$ )을 질소가스 하에서 건조시키고 20 mM HEPES, pH 7.5에 2 mg/ml의 농도로 재현탁시키고 얼음상에서 10분 동안 초음파처리한다. PI 현탁액 10  $\mu\text{l}$  및 감마-ATP 10  $\mu\text{l}$ 를 첨가함으로써 PI3-키나제 반응을 개시시킨다. 반응을 실온에서 30분 동안 진행시킨 다음, 이어서 1 N HCl 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응을 종결시킨다. 지질을 클로로포름:메탄올 (1:1) 600  $\mu\text{l}$ 로 추출하여 클로로포름:메탄올: $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (60:47:2:11.3) 중에서 박층크로마토그래피 (TLC)에 의해 실리카 겔 (G60) 상에서 분리한다. 방사성 표지된 포스포티딜이노시톨 포스페이트를 자가방사 기록에 의해 가시화시키고, 스톰 (storm) 시스템에 의해 역제를 정량화한다 (Okada *et al.*, 1994; Vlahos *et al.*, 1994). 결과 (도 21)는 F035 (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 의한 2 및 6시간 후처리로 PI3-키나제 활성이 억제되었음을 나타내었다. 유사하게, 세포를 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 F035에 15시간 동안 노출시켰을 때는 저켓 세포에서의 워트만닌 (진균 대사산물이며 PI3-키나제의 공지의 억제제이다)과 유사하게 95% 억제가 관찰되었다.

<724>

그 다음에, PI3-키나제의 하류 효과기인 AKT에 대한 F035의 효과를 검사한다. 단백질 키나제 B로도 공지되어 있는 AKT는 바이러스성 종양유전자 v-AKT의 세포성 동족체이며 다수의 성장인자에 의해 활성화되고 워트만닌에 대해 민감한 PI3-K 활성화를 포함하는 경로에서 작용을 한다. AKT는 난소암의 12.1% 및 유방암의 2.8%에서 증폭되는 것으로 알려져 있는 세린-트레오닌 단백질 키나제에 대해 코드화한다. AKT는 항-세포소멸성 분자인 배드 (Bad)의 인산화를 통해서 항-세포소멸성 경로에 관여한다. AKT 변이가 있는 난소암 환자는 열등한 예후를 갖는 것으로 나타난다 (Bellacosa *et al.*, 1995). AKT는 부분적으로 p70S6 키나제의 활성화에 의해 세포소멸을 적극적으로 차단하는 것으로 알려져 있다 (Kennedy *et al.*, 1997). p70S6 키나제는 세포성장 및 G1 세포주기 진행에 필요한 마이토젠 활성화된 세린-트레오닌 단백질 키나제이다 (Chou and Blenis, 1996). p70S6 키나제의 활성은 촉매적 및 가기질 (pseudosubstrate) 잔기 내에 위치하는 다수의 인산화 사건에 의해 조절된다 (Cheatham *et al.*, 1995; Weng *et al.*, 1995).

<725>

AKT의 인산화에 대한 F035의 효과는 다음과 같이 분석한다. 저켓세포 ( $5 \times 10^6$ )를 혈청고갈시키고, 37°C에서 15시간 동안 F035에 및 2시간 동안 워트만닌에 노출시킨다. 세포를 cd3XL (cd3 가교결합)로 유도하거나, 37°C에서 10분 동안 유도하지 않은 채로 둔 후에, AKT 용해완충액에 용해시키고, 단백질을 8% DSD-PAGE 겔 상에서 분리하여 포스포-특이적 AKT (Ser 473; New England Biolabs) 및 총 AKT 항체를 사용하는 웨스턴-ECL에 의해 분석한다. p70S6 키나제에 대한 F035의 효과에 대한 시험은 유사하게 수행할 수 있지만, p70S6 키나제 (ser 411, thr 421/ser 424) 인산화의 분석을 위한 포스포플러스 (Phosphoplus) p70S6 키나제 항체키트 (New England Biolabs)를 사용한다. AKT 분석의 결과 (도 22)는 cd3 가교결합이 포스포 AKT를 약간 유도하는 것을 입증한다. 1 및 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 F035에 의한 세포의 후처리는 AKT 인산화 (활성 AKT)의 현저한 억제를 야기시켰으며, 이것은 1  $\mu\text{M}$  워트만닌에 의한 세포의 2시간 처리와 유사한 것이다. 그러나, 총 AKT의 발현에는 변화가 없었다. AKT 인산화의 유사한 억제는 또한 난소암 세포 OVCAR-3 및 C-2 (HEY 변이체)를 사용하여 입증되었으며, 2 내지 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 F094로 처리된 저켓 세포에 의해서도 입증되었다. 이들 발견은 F035가 저켓 세포 및 난소암 세포에서 AKT의 인산화를 억제하는 것을 입증하는 것이다. 이것은 PI3 키나제/AKT 시그널 경로가 항-세포소멸 시그널을 전달하는 것으로 나타났기 때문에 유의적인 것이다 (Kennedy *et al.*, 1997). 이 결과는 F035 및 F094가 PI3-K 시그널 경로의 억제를 통해서 종양세포의 세포소멸을 매개한다는 것을 시사한다.

<726>

**실시예 10**

<727> **세포주기 분석 및 세포소멸을 검출하기 위한 아넥신-V 결합시험**

<728> 식물추출물의 활성화합물의 성장억제 및 세포독성의 기전을 더 특정화하기 위하여, 약  $1 \times 10^6$  OVCAR-3 종양세포를 60 mm 디쉬 (dish)에 도말하고 다양한 농도의 UA-BRF-004-DELEP-F035로 처리한 다음, 37°C에서 18-24시간 동안 배양한다. 세포를 수거하여 PBS로 2회 세척하고  $1 \times 10^6$  세포/ml로 재현탁시킨다. 온화하게 소용돌이를 일으키는 세포에 파라포름알데히드 (최종농도 1%)를 적가한다. 얼음 상에서 15분 동안 배양한 후에, 세포를 다시 PBS로 세척하고, 펠릿을 70% 빙냉 에탄올에 재현탁시켜 밤새 -20°C에서 배양한다. 마지막으로, 에탄올을 PBS로 한번 세척하여 제거하고, 세포를 0.1% RNase를 함유하는 프로피듐요오다이드 (Sigma Chemical Co.) 10  $\mu\text{g/ml}$ 에 재현탁시킨다. 세포를 다시 한번 실온에서 30분 동안 배양한 다음, 4°C로 옮겨서 18시간 후에 유동세포계산 (Pallavicini, 1987)에 의해서 분석한다. 결과는, 세포를 UA-BRF-004-DELEP-F035로 처리하기 전에 세포의 48%는 G0/G1 상에 있었고 세포의 36%는 S 상에 있었으며, 세포의 7%는 G2/M 상에 있었음을 나타내었다. 그러나, OVCAR-3 세포를 F035로 48시간 후처리하면 세포의 ~58%는 G1 상에 있고 단지 27%만이 세포주기의 S 상에 있었으며, 이것은 G1 에서의 세포가 8% 증가하고 세포주기의 S 상에서 세포가 ~10% 감소한 것을 시사한다 (도 19A, B). 이 결과는 OVCAR-3 사람 난소암 세포의 명백한 G1 정지를 를 입증하는 것이다.

<729> 사람 유방암 세포의 세포주기 프로필에 대한 F035의 영향도 또한 검사한다. MDA-MB-435 및 MDA-MB-453 유방암 세포를 다양한 농도의 F035에 노출시키고 72시간 후에 상술한 바와 같은 세포주기분석에 의해 분석한다. 결과는 F035가 Sub G0 피크의 출현에 의해 MDA-MB-453 세포의 세포소멸을 유도함을 입증한다 (표 27). 또한, 세포주기 조절은 또한 세포주기의 S 및 G2/M 상에서 세포의 비율이 감소하는 것으로도 관찰된다.

**표 27**

MDA-MB-435 유방암 세포의 세포주기 분석: F035에 의한 후처리

	대조군	F035 (6 $\mu\text{g/ml}$ )	F035 (3 $\mu\text{g/ml}$ )	F035(1 $\mu\text{g/ml}$ )
Sub G0	0.82%	16.0%	12.7%	0.90%
G1	52.0%	50.0%	50.3%	51.0%
S	35.0%	26.0%	26.0%	36.0%
G2/M	16.0%	10.0%	2.0%	14.0%

<730>

<731> MDA-MB-453 세포를 사용한 결과는 F035가 F035에 의한 72시간 후처리에 의해 G1 상에서의 세포를 ~10% 증가시키고 세포주기의 S 상에서의 세포를 4-10% 감소시킴으로써 G1 세포주기 정지를 유도함을 입증한다 (표 28). 이들 결과는 식물추출물에 의해 유도된 세포주기정지 및 종양세포의 세포소멸을 입증하는 것이다.

**표 28**

MDA-MB-453 유방암 세포의 세포주기 분석

	대조군	F035 (6 $\mu\text{g/ml}$ )	F035 (3 $\mu\text{g/ml}$ )	F035 (1 $\mu\text{g/ml}$ )
Sub G0	0.96%	2.2%	1.8%	1.5%
G1	62.0%	72.0%	71.0%	69.0%
S	26.0%	19.0%	16.3%	21.0%
G2/M	12.5%	8.5%	10.4%	10.0%

<732>

<733> 저넷 세포 ( $1 \times 10^6$ )를 다양한 농도의 UA-BRF-004-DELEP-F035 (50-1000 ng/ml)로 37°C에서 18시간 동안 처리한다. 세포를 PBS로 1회 세척하고, 아넥신-V-FITC 접합체 (Biowhittaker, Walkersville, MD) 5  $\mu\text{l}$ 를 함유하는 결합완충액 (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ )에 재현탁시키고, 암소에서 10분 동안 배양한다. 세포를 세척하고 20  $\mu\text{g/ml}$  프로피듐요오다이드 (Sigma Chemical Co.) 10  $\mu\text{l}$ 를 함유하는 결합완충액에 재현탁시키고, 형광활성화세포분류기 (FACS) 분석에 의해 분석한다 (Martinet *al.*, 1995).

<734> 결과는 정제된 활성화합물이 저켓 세포에서 세포소멸을 유도할 수 있었음을 입증한다. 이 발견은 추가로 세포가 세포소멸을 겪고 있음을 시사하는 아넥신-V에 결합하는 세포의 능력에 의해 확인되었다 (표 29). 통상적으로, 포스포티딜세린 (PS)은 원형질막의 내부막 상에 편재된다. 그러나, 세포소멸의 초기단계 중에는 PS의 외향화가 일어난다. 아넥신-V는 PS에 결합하는 칼슘 결합 단백질이며, 유동세포계산에 의해서 아넥신-V-FITC 염색으로 관찰될 수 있다 (Martin *et al.*, 1995).

**표 29**

다양한 농도의 UA-BRF-004-DELEP-F035로 처리된 저켓 세포에서 아넥신-V 결합에 의해 측정된 세포소멸

**UA-BRF-004-DELEP-F035 (µg/ml)     아넥신-V 포지티브 세포(%)**

미처리	6
Anti-Fas( 포지티브 대조군)	20.0
1 µg/ml	16.0
2 µg/ml	18.0

<735>

<736> **실시예 11**

<737> **화학요법제로서 UA-BRF-004-DELEP-F035**

<738> UA-BRF-004-DELEP-F035의 효과는 센카 (SENCAR) 마우스에서 다단계 피부 발암현상 모델로 검사한다. 동물은 피부에 아세톤을 발라서 처리하고, 발암성 DMBA (7,12-디메틸벤즈[a]안트라센), DMBA + UA-BRF-004-DELEP-F035 및 DMBA + 분획 60 (네가티브 대조군)을 식물추출물의 저용량 (마우스당, UA-BRF-004-DELEP-F035 또는 분획 60 100 µg) 및 고용량 (마우스당, UA-BRF-004-DELEP-F035 또는 분획 60 500 µg)으로 4주 동안 일주일에 2회씩 투여한다. UA-BRF-004-DELEP-F035 또는 대조물질은 DMBA를 적용하기 5분 전에 마우스의 피부에 적용한다. 동물은 유두종의 형성에 대하여 관찰하였으며, 계속해서 희생시켜 조직학에 의해 조직을 분석한다 (도 9A-도 9F). 분석의 결과는 도 10A, 도 10B, 도 11A, 도 11B, 도 12 및 도 13에 요약되어 있다.

<739> 이들 실험의 8주 후에, DMBA로 처리된 마우스의 그룹은 마우스당 8개의 유두종을 가진 반면에, DMBA와 UA-BRF-004-DELEP-F035로 처리한 그룹은 마우스당, 0.66개의 유두종을 가지고 DMBA 및 분획 60으로 처리한 그룹 (네가티브 대조군)은 마우스당, 6.9개의 유두종을 가졌다. 이들 결과는, 종양에 대한 UA-BRF-004-DELEP-F035의 유의적인 보호효과를 시사하였으며, 분획 60은 실질적으로 보호효과가 없었다.

<740> 쥐에 대한 추가의 생체내 시험에서는 UA-BRF-004-DELEP-F035가 ras 종양유전자의 돌연변이를 방지함으로써 발암제-유도된 종양에 대한 화학보호제임을 입증한다. 마우스 피부에서 발암현상의 개시단계는 직접-작용성 발암제 (즉, DMBA)에 의해 이루어지며, 필수적으로 비가역적인 단계이다. 발암현상의 억제는 DMBA에 의해 유도된 유두종의 형성에 있어서의 감소에 의해 8주 후에 증명되었다. 처리된 피부의 분자분석은 UA-BRF-004-DELEP-F035가 ras 종양유전자를 돌연변이시키는 DMBA의 능력을 방해하는 것을 입증한다 (이하의 실시예 14, 15 및 16 참조).

<741> **실시예 12**

<742> **아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)에서 활성 트리테르페노이드의 검출방법**

<743> 식물조직 샘플에서 활성 트리테르펜을 효율적으로 검출할 수 있는 방법이 이용되었다. 이 방법은 다음과 같이 수행한다: 잎과 잔가지 약 5 g을 가위를 사용하여 작은 조각으로 절단하거나, 또는 그 대신에 뿌리 샘플을 칼로 절단하여 작은 절편을 생성시킨다. 식물물질을 소형 혼합기에서 처리하여 80% 메탄올 (v/v) 약 25 ml와 혼합시키고 매 1시간 마다 진탕하면서 적어도 2시간 동안 정치시킨다. 불용성 물질을 10,000 g에서 원심분리하여 제거한다. 그후, 추출물을 RP 플레이트 (알루미늄 TLC 시트, RP-C18 F<sub>254S</sub>) 및 40% 아세토니트릴 (v/v)를 사용하는 박층크로마토그래피에 사용한다. TLC 플레이트를 0.1% 바닐린 (4-하이드록시-3-메톡시벤즈알데히드)/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 분무에 노출시키고 70°C에서 15 내지 30분 동안 구운 후에 활성 트리테르페노이드 화합물은 갈적색 스폿트로서 볼 수 있었다 (R<sub>f</sub> = 0.2-0.3).

<744> **실시예 13**



<745> 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 식물 내에서 트리테르펜 화합물의 위치결정

<746> 초기연구에서, 식물의 건조한 지상부위를 추출을 위해서 초여름에 수거한다. 이후에 가을에 다시 수거한 것은 활성이 없었다. 그후에 체계적인 연구를 수행하여 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 식물의 다양한 부분에서 활성 트리테르펜 화합물의 상대적인 존재 또는 부재를 측정한다. 식물의 화학을 모니터링한 후에, 식물의 지상부위 내의 활성성분은 거의 모두 꼬투리, 뿌리 및 실생에 농축되었으며, 가지, 나무껍질, 잎 및 종자에는 거의 또는 전혀 존재하지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 활성수거기간은 꼬투리 형성의 시작으로부터 열개할 때 까지의 단지 약 3주 동안만 계속된다. 또한, 식물의 뿌리는 활성화합물에 대한 당의 비가 변동적인 동일한 활성물질을 생산하는 것으로 입증되었다. 후자의 특징은 정상적인 식물발육을 유지하면서 격렬한 뿌리성장을 가능하게 하는 에어로포닉이 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)에 매우 적합할 수 있음을 시사하는 것이다.

<747> 실시예 14

<748> 종양세포주 및 그의 성장

<749> 다음과 같은 사람 암세포주를 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)로부터 입수한다: SK-OV-3 및 OVCAR-3 (난소), 저켓 (T-세포 백혈병), U-937 (조각구성 림프종), MDA-MB-468, MDA-MB-453, MDA-MB-435, SK-BP-3, MCF-7, MDA-MB-231, BT-20 (유방), LNCaP, PC-3, DU145 (전립선), 769-P, 786O, A498 (신장) 및 PAMC-1 (췌장). HEY 및 Dov-13 (난소) 세포주는 앤더슨암센터 (M.D. Anderson Cancer Center)로부터 입수한다. 다음과 같은 비형질전환된 사람 세포주 MCF-10A 및 10F (유방 상피)는 앤더슨암센터 (M.D. Anderson Cancer Center)로부터 입수한다. Hs 27 (사람 포피섬유아세포) 및 L929 (마우스 섬유아세포)는 ATCC로부터 입수한다. SK-OV-3, MDA-MB-468, Hs 27, L929는 최소필수배지에서 성장한다. OVCAR-3, 저켓, U-937, LNCaP, DU-145, PC-3, HEY, Dov-13, PANG-1, MCF-10A, MCF-10F 및 나머지 유방암 세포주는 RPMI 1640에서 성장하였으며, F-1 배지를 사용하여 769-P, 786-O 및 A498을 성장시킨다. 사용된 모든 배지는 10% 태아 소 혈청, 200 mM 글루타민 및 0.05% 겐타마이신을 보충한다.

실시예 15

<751> 돌연변이 특이적 프라이머 (MSP)를 사용한 마우스 Ha-ras 코돈 61 CAA → CTA 돌연변이의 증폭

<752> 이 프로토콜은 문헌 (Nelson *et al.*, 1992)으로부터 유도되었다. 3MSP61mut로 지정된 역배향 프라이머는 Ha-ras의 코돈 61에서 CAA→CTA 염기전환의 중간 뉴클레오타이드 (밑줄)를 갖는 3' 말단 뉴클레오타이드 (A) 염기쌍이 후술하는 조건하에서 돌연변이된 DNA를 선택적으로 증폭시키도록 고안되었다. 시험은 Taq 폴리머라제와 3' 엑소뉴클레아제 활성이 결여되어 있으며, 따라서 어닐링된 프라이머의 3' 말단에서 매스매치 (mismatch)를 복구할 수 없다는 사실을 기초로 한다. 시험의 조건은 연장이 일어나지 않도록 야생형 서열에 충분히 연결되지 않는 역배향 프라이머에 따라 좌우된다. 동일한 정배향 프라이머를 사용하여, 하나의 반응은 역배향 미스매치 프라이머 (3MSP61mut)에 의해 수행하고, 다른 반응은 역배향 야생형 프라이머 (3MSP61wt)에 의해 수행된다. 이 프로토콜은 단지 CAA→CTA 염기전환 만을 검출하지만, 이들 돌연변이는 코돈 61 점돌연변이에서 가장 우세한 것이다. Xba I RELP 잔기 (T/CTAGA)는 이러한 염기전환으로 생긴것이다. 돌연변이는 증폭된 DNA를 Xba에 의한 증폭된 DNA의 제한 절단또는 <sup>32</sup>P 말단 표지된 5MSP61 프라이머를 사용한 직접 DNA 서열분석에 의해 증명될 수 있다. 미스매치 생성물을 함유하는 반응액은 후속 정제 및 서열분석을 위해서 2% 저융점 아가로스 상에서 처리한다. 사용된 프라이머 5MSP61, 3MSP61mut 및 3MSP61wt의 서열은 이하 및 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 및 서열 번호: 4에 각각 제시되었다.

<753> 5MSP61 (23-mer) 5'-CTA AGC CTG TTG TTT TGC AGG AC-3' (서열 번호:2)

<754> 3MSP61mut (20-mer) 5'-CAT GGC ACT ATA CTC TTC TA-3' (서열 번호:3)

<755> 3MSP61wt (20-mer) 5'-CAT GGC ACT ATA CTC TTC TT-3' (서열 번호:4)

<756> 3MSP61wt의 서열은 N-ras 및 K-ras 서열로부터 각각 2 또는 3개가 불일치하고, 단편 크기는 110 bp이다. 주형 DNA 및 증폭시약은 다음과 같다:

- <757> DNA (포지티브 대조군) OR 1.0  $\mu$ g
- <758> DNA (네가티브 대조군, 즉 야생형) OR 1.0  $\mu$ g
- <759> DNA (샘플, 즉 파라핀 블럭) OR 5.0  $\mu$ l
- <760> DNA 없음 (즉, H<sub>2</sub>O) 5.0  $\mu$ l
- <761> Rxn 완충액 (10 $\times$ ) (10 $\times$ =500 mM KCl, 100 mM 트리스, 5.0  $\mu$ l
- <762> pH 8.3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)
- <763> dNTP 혼합물 @ 각각 500  $\mu$ M (최종농도 = 20  $\mu$ M) 2.0  $\mu$ l
- <764> [<sup>32</sup>P]dCTP, 3000 Ci/mmol, 5 uCi, 1.7 pmol, 0.034  $\mu$ M 0.50  $\mu$ l
- <765> 5' 프라이머 (10 pmol/ $\mu$ l), 7.5 pmol (최종농도 0.15  $\mu$ M) 0.75  $\mu$ l
- <766> 3' 프라이머 (10 pmol/ $\mu$ l), 7.5 pmol (최종농도 0.15  $\mu$ M) 0.75  $\mu$ l
- <767> Taq 폴리머라제 (5 U/ $\mu$ l, 3.0 U) 0.60  $\mu$ l
- <768> 50.0  $\mu$ l 까지의 H<sub>2</sub>O 50.0  $\mu$ l
- <769> 광유 2방울

<770> 퍼킨엘머 열순환기 (Perkin Elmer thermocycler)를 사용하는 증폭사이클 조건은 다음과 같다:

<771>

95 $^{\circ}$ C로 열순환기 예열			
파일 512-21	95 $^{\circ}$ C	1분 30초	1 사이클
파일 512-22	95 $^{\circ}$ C	60초	
	57 $^{\circ}$ C	60초	
	72 $^{\circ}$ C	60초	30 사이클
파일 512-10	4 $^{\circ}$ C에서 침지		

<772> 시험방법의 정당성은 다음과 같은 대조군을 가동시킴으로써 이루어졌다: 야생형 (WT), 야생형 돌연변이체 (MUT), 및 네가티브 대조군 (H<sub>2</sub>O). 플라스미드 pHras61mut로부터의 MUT DNA를 포지티브 대조군 샘플로서 사용한다. 플라스미드 pHras61은 센카 마우스 종양으로부터 유래하는 클로닝된 엑손 2 Ha-ras DNA를 함유한다. 클로닝된 돌연변이는 DNA 서열 분석에 의해 확인되었다. 돌연변이는 코돈 61에 Ha-ras 돌연변이를 함유하는 종양 선암으로부터 유래하는 DNA의 샘플인 마우스 Ha-ras 유전자의 코돈 61 (엑손 2에 위치함)에서 CA  $\rightarrow$ CTA 염기전환이다 (도 14 참조).

<773> **실시예 16**

<774> **마우스 H-ras 코돈 12/13에 대한 가열 PCR<sup>TM</sup>/RELP 돌연변이 검정**

<775> 이 시험은 코돈 12의 3 bp와 코돈 13의 첫번째 bp 에 걸쳐 있는 천연적으로 존재하는 MnlI 부위 (GGA GGC, 래트 및 마우스 Ha-ras 코드화 서열에서 뉴클레오타이드 34-37)의 파괴를 기본으로 한다. MnlI에 대한 인식부위는 N7GGAG이다. 이들 4개의 위치 중의 어느 것에서의 돌연변이는 이들 부위를 함유하는 PCR<sup>TM</sup> 단편을 절단하는데 있어서의 MnlI의 실패를 야기시킨다. 시험의 단점은 MnlI에 의해 불완전한 분해가 발생한다는 점이다. 이러한 사건은 분해에 대해 내성인 야생형 DNA의 작은 비율과 진성 돌연변이의 낮은 수준 사이의 구분을 하기가 어렵도록 만든다. 이것은 때때로 공급원 DNA가 야생형과 돌연변이 DNA의 혼합물을 함유하는 경우 및 시험이 감도를 증가시키기 위한 단편 표지를 위해서 <sup>32</sup>P를 사용한 경우에 관찰된다. 시험을 위해서 사용된 PCR<sup>TM</sup> 프라이머 셋트는 이하 및 서열 번호: 5 및 서열 번호:6에 제시한다. H-ras 12 증폭 생성물 크기는 214 bp이다.

<776> 프라이머 #3 (5'): 5'-CCTTGGCTAAGTGTGCTTCTCATTTGG-3' (서열 번호:5)

- <777> 프라이머 #6 (3'): 5'-ACAGCCACCTCTGGCAGGTAGG-3' (서열 번호:6)
- <778> 프라이머 #6은 다음과 같은 반응조건을 사용하여 55℃에서 서열분석을 하기 위해 사용된다:
- <779> Rxn 완충액 (10×) 1.0 μl
- <780> (10×= 500 mM KCl, 100 mM 트리스, pH 8.3, 15 mM)
- <781> MgCl<sub>2</sub>
- <782> dNTP 혼합물 @ 각각 0.5 mM 1.0 μl
- <783> 5' 프라이머 6 pmol
- <784> 3' 프라이머 6 pmol
- <785> <sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mMol) 0.5 μl
- <786> Taq 폴리머라제 (5 U/μl, 0.65 U) 0.13 μl
- <787> H<sub>2</sub>O 10.0 μl이하
- <788> DNA (포지티브 대조군) > 200.0 ng
- <789> DNA (네가티브 대조군, 즉 야생형) > 200.0 ng
- <790> DNA (샘플, 즉 파라핀 ब्ल럭) 5.0 μl
- <791> DNA 없음 (즉, H<sub>2</sub>O) 5.0 μl
- <792> 광유 2방울
- <793> 퍼킨엘머 (Perkin Elmer) PCR™ 키트를 사용하는 증폭사이클 조건은 다음과 같다:

<794>

94℃로 열순환기 예열			
파일 512-87	94℃	2분	1 사이클
파일 512-88	94℃	30초	8 사이클
	68℃	30초	
	72℃	1분	
파일 512-89	94℃	30초	32 사이클
	60℃	30초	
	72℃	1분	
파일 512-10	4℃에서 침지		

<795> **실시예 17**

<796> **시험결과: c-Ha-ras 돌연변이의 검출**

<797> DMBA, 식물추출물 및 대조군의 마지막 투여후 4일 쯤에, 각 군당, 5 마리의 마우스의 신선하게 동결된 조직으로부터 분리된 DNA를 코돈 12 및 13에서의 돌연변이에 대해서, 및 PCR™ 분석에 의해서 c-Ha-ras의 코돈 61을 분석한다. 본 발명자들은 이 분석을 위해서 4-일 검체를 사용하였으며, 그 이유는 2-일 DNA의 일부는 파괴되었고 따라서 Ha-ras 분석에 부적합하였기 때문이다. 코돈 12 및 13에는 야생형 서열내의 코돈 12의 3개의 뉴클레오타이드와 코돈 13의 첫번째 뉴클레오타이드 사이에 걸쳐 있는 MnlI 제한부위가 있다. 이들 염기에서의 돌연변이는 MnlI 부위의 결손을 야기시킨다. 본 발명자들은 퍼킨-엘머 열순환기를 사용하여 게놈 DNA로부터 c-Ha-ras 유전자의 엑손 1 (코돈 12 및 13을 함유)을 증폭시킨다. 반응액을 페놀-CHCl<sub>3</sub>로 추출하고 DNA를 에탄올로 침전시킨다. 그후, SNA를 효소완충액에 재현탁시키고, PCR™ 생성물을 MnlI로 제한 절단하여 분해물을 8% 비변성된 폴리아크릴아미드겔 상에서 전기영동한다. MnlI 제한 절단 부위가 손실되지 않은 것으로 관찰되었으며, 결론적으로 시험물질에서는 코돈 12와 13에서 돌연변이가 없었다. Ha-ras 분석을 위한 DNA도 또한 최종투약 2일 후에

수집된 샘플로부터 파라핀-포매된 절편의 8 μ 절단물로부터 수득한다. 각각의 파라핀 블록으로부터 25개의 절편을 마이크로퓨지 (microfuge) 관에 넣고 크실렌 및 에탄올로 파라핀을 제거한 다음, 원심분리하고 프로테이나제 K를 함유하는 5% 켈렉스 (chelex)에 재현탁시킨다.

<798> Ha-ras 코돈 61에 대해 사용된 첫번째 방법은 문헌 (Nelson *et al.*, 1992; 상기 실시예 15) 로부터 유도되었다. 동일한 정배향 프라이머를 사용하여, 하나의 반응은 역배향 미스매치 프라이머 (3MSP61mut)를 사용하여 수행하였으며, 또 다른 반응은 역배향 야생형 프라이머 (3MSP61wt)를 사용하여 수행한다. 이 프로토콜은 코돈 61 점돌연변이에서 가장 우세한 것인 CAA →CTA 염기전환 돌연변이만을 검출한다. 이 염기전환에서 XbaI RELP 부위 (T/CTAGA)가 생성된다. 미스매치 생성물을 함유하는 반응은 후속 정제 및 서열분석을 위해서 2% 저용점 아가로스 상에서 수행한다. 비절단물 (돌연변이된 DNA)에 대한 절단물 (야생형 DNA)의 양의 비는 에티뎀브로마이드 염색강도 또는 <sup>32</sup>P 표지를 정량함으로써 측정한다. 플라스미드 pHras61mut로부터의 DNA를 포지티브 대조군 샘플로서 사용한다. 플라스미드 pHras61은 센카 마우스 종양으로부터 유래하는 클로닝된 엑손 2 Ha-ras DNA를 함유한다. 클로닝된 돌연변이는 DNA 서열분석에 의해 증명되었다. 돌연변이는 마우스 Ha-ras 유전자의 코돈 61 (엑손 2에 위치함)에서 CAA →CTA 염기전환이다. 반응조건은 실시예 15에 기술한 바와 같다.

<799> **실시예 18**

<800> **아족시메탄으로 처리된 F344 랫트에서 이상 음와 (Aberrant Crypts)의 억제에 대한 F035의 영향**

<801> 찰스리버 (Charles River, Raleigh, NC)로부터 6주령의 수컷 래트 (Fishcer, 3444)를 입수한다. 래트에게는 다이에즈 인코포레이티드 (Dyets Inc., Bethlehem, PA)로부터 구입한 AIN-76A 음식물(diet)을 무제한 공급한다. 음식물은 20% 카제인, 0.3% DL-메티오닌, 15% 옥수수전분, 50% 슈크로스, 5% 옥수수유, 5% 셀룰로즈, 3.5% AIN-76 염혼합물, 1% AIN-76 비타민 혼합물 및 0.2% 콜린 비타트레이트로 구성되었다. 동물에게는 또한 수돗물을 무제한 제공한다. 래트에서 이상 음와를 유도하는 아족시메탄 (AOM)은 시그마 케미칼 컴퍼니 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)로부터 구입한다. 동물에게는 격리된 채로 3일 동안 래트 먹이를 공급하였으며, 그후에 이들에게 7주령이 될때 까지 AIN-76A를 공급한다. 동물을 무작위적으로 3개의 치료군 (10 마리/군)으로 나누었다. 그룹 1의 동물에게는 AIN-76A 음식물 만을 공급하였으며, 그룹 2의 동물에게는 AIN-76A 음식물 + 5 mg/kg의 F035를 투여하였고, 그룹 3의 동물에게는 AIN-76A 음식물 + 10 mg/kg의 F035를 공급한다 (표 30).

**표 30**

아족시메탄을 사용한 F344 랫트에서 이상형 음와의 억제에 대한 F035의 영향에 대한 연구를 위한 치료 그룹

그룹	# 동물	F035 투여량 (mg/음식물 kg )
1	10	0
2	10	5
3	10	10

<802> 급식한 지 1주일 후에, 모든 동물에게는 AOM을 복강내 주사한다 (15 mg/체중 kg). 두번째 AOM 주사는 1주일 후에 한다. 시험 중에 매주 마다 동물의 체중을 측정한다. 동물은 4주 동안 사육한다. 31일 후에, 동물을 CO<sub>2</sub> 질식시켜 희생시킨다. 결장을 절제하여 냉 PBS로 씻어내고 세로 중심축을 따라 절단하여 여과지 상에 놓고 70% 알콜로 적어도 24시간 동안 고정시킨다. 결장을 메틸렌블루 (PBS 중의 0.25%)로 약 1분 동안 염색한다. 이상 음와 병소는 20 배율의 해부용 현미경 하에서 평점을 매겼다. 이상 음와는 그들의 증가된 크기, 현저히 증가된 내강과 세포의 기저표면 사이의 간격 및 확대된 음와주위 영역에 의해서 주변의 정상적인 음와로부터 구별되었다. 모든 검체에 코드를 붙였으며 두명의 채점자에 의해 맹검적으로 평점을 매겼다. 통계학적 유의성은 그룹들 간의 차이를 하나의 방법 ANOVA를 사용하여 검사함으로써 측정한다. 차이가 발견되면, 본페로니 (bonferroni) t-시험을 사용하여 대조군에 대한 F035의 두가지 용량의 다중비교를 시험한다. 클론의 평점은 두명의 채점자에 의해 매겨졌으며, 이들은 각각 그들이 채점을 하는 실험군에 대해서 모르고 있었다. 두명의 채점자의 결과는 서로 잘 일치한다.

<804> F035는 음식물의 kg 당, 10 mg의 F035를 첨가한 경우에는 이상 음와 병소의 총수를 현저히 감소시켰으며, 이것은 체중 kg 당, 1 mg의 F035를 매일 섭취하는 것과 대략 동등한 것으로 밝혀졌다 (표 31, 표 33). 동일한 용량

은 또한 단일 및 이중 카테고리에서의 이상 음와의 수를 현저하게 저하시킨다 (표 32, 표 34). 음식물의 kg 당, 5 mg의 저용량의 F035 (체중 kg 당, 500 mg의 F035를 매일 섭취하는 것과 대략 상응함)는 총, 단일 및 이중 카테고리에서 이상 음와 병소의 감소를 야기시켰지만, 감소는 대조군의 값과 유의적인 차이가 없었다 (표 32, 표 34). 연구의 과정에 걸쳐서 실험군과 대조군 사이에서 체중증가에 있어서는 차이가 없었다 (표 35, 표 36, 표 37).

**표 31**

AOM-처리된 래트에서 이상 음와/결장의 수에 대한 F035의 영향

F035 투여량 (g/식사 kg)	이상 음와/결장, 채점자 1&2의 평균			
	평균 ± SEM	대조군(%)	결과	설명
0	86 ± 5	100		
0.005	73 ± 5	85	-	C
0.01	43 ± 4	50	+	C

- = 대조군과 유의하게 상이하지 않음  
 + = 대조군과 유의하게 상이함(p<0.05)  
 C = 결정적인 연구

<805>

**표 32**

AOM-처리된 래트에게서 병소 당, 음와의 수에 대한 F035의 영향

		병소당 이상 음와의 갯수(스코어 1 및 2의 평균)					
		1		2		≤3	
시약 & 투여량 (g/음식물 kg)		평균 ± SEM %	평균 ± SEM %	평균 ± SEM %	평균 ± SEM %	평균 ± SEM %	평균 ± SEM %
분획 35	0	66 ± 5	100	17 ± 1	100	3 ± 1	100
분획 35	0.005	56 ± 4	85	15 ± 1	88	3 ± 0	100
분획 35	0.01	34 ± 3*	52	8 ± 1*	47	1 ± 0	33

\* 대조군과 유의하게 상이함 (p < 0.05)

<806>

**표 33**

AOM 처리된 래트에서 결장 당, 이상 음와의 평균에 대한 F035의 영향의 분석으로부터의 원 데이터의 요약

병소당 이상 음와 갯수의 평균값 ± SEM

n	AOM	제제	투여량 (g/음식물 kg)	채점자 1	채점자 2	합친 경우 (combined)
10	+	발암 물질만 사용 (4주) <sup>a</sup>	0	76 ± 4	95 ± 9	86 ± 5
10	+	F035	0.005	67 ± 4	80 ± 8	73 ± 5
10	+	F035	0.01	34 ± 3 <sup>c</sup>	51 ± 7 <sup>c</sup>	43 ± 4 <sup>c</sup>

a = AOM 주사한 래트 시험 제제 사용하지 않음  
 b = 4주 시점에서 풀링된(poolled) AOM 주사한 래트의 평균값(n=10)  
 c = 대조군과 유의하게 상이함(p<0.05)

<807>



표 34

AOM 처리된 래트에서 병소당 이상 음와 갯수에 대한 F035의 효과 분석으로부터 데이터 요약

병소당 이상 음와 갯수의 평균값 ± SEM						
제제	투여량	채점자	1	2	3	전체
F035	5 mg	채점자 1	49 ± 4	15 ± 2	2 ± 0	67 ± 4
		채점자 2	63 ± 7	15 ± 1	3 ± 1	80 ± 8
		합친 경우	56 ± 4	15 ± 1	3 ± 0	73 ± 5
	10mg	채점자 1	27 ± 3*	7 ± 1*	0 ± 0*	34 ± 3*
		채점자 2	41 ± 5*	8 ± 1*	3 ± 1	51 ± 7*
		합친 경우	34 ± 3*	8 ± 1*	1 ± 0	43 ± 4*
대조군	NA	채점자 1	57 ± 4	17 ± 1	3 ± 1	76 ± 4
		채점자 2	75 ± 8	18 ± 2	3 ± 1	95 ± 9
		합친 경우	66 ± 5	17 ± 1	3 ± 1	86 ± 5

\* 대조군 값과 유사하게 상이함 (p < 0.05)

<808>

표 35

F035 공급된 AOM-처리된 래트의 동물체중, 5 mg/kg 음식물

래트 #	1주	2주	3주	4주	5주
1	154.4	198.2	215.0	219.7	235.8
2	149.8	195.1	210.6	210.6	232.9
3	154.1	200.7	228.1	228.1	248.0
4	154.1	199.8	216.2	220.8	242.9
5	158.0	208.4	228.4	231.5	256.8
6	154.8	196.0	208.3	213.4	230.2
7	164.2	210.1	224.4	225.5	246.8
8	161.7	202.3	218.8	220.4	237.8
9	153.0	199.7	217.0	218.1	238.1
10	158.8	198.5	212.8	212.3	231.6
평균	156.3	200.9	218.0	220.0	240.1
SEM	1.4	1.6	2.2	2.2	2.7

<809>

표 36

F035 공급된 AOM-처리된 래트의 동물체중, 10 mg/kg 음식물

래트 #	1주	2주	3주	4주	5주
1	148.6	187.1	201.9	205.6	224.8
2	148.3	189.9	196.0	199.0	220.8
3	149.0	197.7	211.2	216.2	237.2
4	146.2	189.1	206.1	209.2	230.0
5	151.9	197.2	214.9	218.6	241.2
6	152.2	190.0	205.2	208.1	226.6
7	136.1	187.8	211.8	216.2	241.2
8	157.4	207.1	224.1	224.8	246.0
9	141.9	187.8	207.7	211.1	235.6
10	155.7	185.9	196.4	194.9	213.9
평균	148.7	192.0	207.5	210.4	231.7
SEM	2.0	2.1	2.7	2.9	3.2

표 37

AOM-처리된 래트의 동물체중

래트 #	1주	2주	3주	4주	5주
1	149.3	195.2	203.2	214.4	240.6
2	166.6	213.8	229.8	231.8	250.7
3	158.6	195.8	209.0	211.2	226.8
4	156.4	200.3	214.3	216.9	231.2
5	151.2	194.7	205.2	207.4	228.5
6	157.3	203.9	217.2	217.8	237.0
7	146.7	192.1	216.6	217.1	235.2
8	145.5	190.3	203.8	204.7	220.3
9	158.1	197.4	212.3	211.3	231.2
10	157.7	201.8	217.9	219.2	240.8
평균	154.7	198.5	212.9	215.2	234.2
SEM	2.0	2.2	2.6	2.4	2.7

실시예 19

아글리콘의 항중량 활성

코어 트리테르펜 분자로부터 당을 제거하면 생물학적 활성의 유의적인 손실이 야기되기 때문에 본 연구는 생물학적 활성에 대한 당의 중요성을 확인하는 것이다. 표 38에서 보는 바와 같이, UA-BRF-004Pod-DELEP-F164 (결합된 에스테르를 갖는 UA-BRF-004Pod-DELEP-F094로부터 당을 가수분해시킴으로써 생성됨) 및 UA-BRF-004Pod-DELEP-F245 (UA-BRF-004Pod-DELEP-F94의 가수분해 생성물의 메틸에스테르 혼합물)는 중앙 세포주의 패널에 대하

여 항종양 활성의 현저한 손실을 나타낸다. 유사하게, UA-BRF-004Pod-DELEP-C194 (아글리콜 1의 정제된 아세테이트)는 트리테르펜 글리코시드 분획 35의 데이터와 비교하여 중앙 세포주의 패널에 대한 항종양 활성의 요점을 나타낸다. 따라서, 본 명세서에 기술된 트리테르펜 글리코시드로부터 당 단위를 가수분해시키면 생물학적 활성의 현저한 손실이 있다.

**표 38**

분획 F164, F245 및 C194의 생물학적검정

	50 µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ml	6.25 µg/ml	3.12 µg/ml
<b>F164</b>					
769-P	45	20	0	0	0
Panc-1	57	27	13	0	0
Dov-13	80	56	16	12	10
MDA-MB-453	66	30	13	0	0
JURKAT	93	86	55	39	16.5
<b>F245</b>					
769-P	26	14	14	7	0
Panc-1	49	26	4	0	0
Dov-13	91	90	25	28	13
MDA-MB-453	90	75	8	8	0
JURKAT	93	89	64	23	0
<b>C194</b>					
769-P	13	6	0	0	0
Panc-1	6	9	0	0	0
Dov-13	3	0	0	0	0
MDA-MB-453	16	0	0	0	0
JURKAT	34	18	9	2	0

<815>

<816> **실시예 20**

<817> **콜레스테롤 대사에 대한 F035의 효과의 분석**

<818> 이 시험의 목적은 심혈관질환의 예방에 대한 본 발명의 생물학적 활성 트리테르펜 글리코시드의 효과를 분석하기 위한 것이다. 이 시험의 장기적인 목적은 사람을 포함한 포유 동물의 음식물에 첨가된 트리테르펜 화합물이 혈청 콜레스테롤을 감소시킨다는 것을 입증하기 위한 것이다. 시험을 위해 선택된 고지혈증 햄스터 모델은 다른 모델과는 달리 콜레스테롤 함량에 대한 반응으로 LDL 수용체 및 사람 혈장 지단백 변화 모두를 근접하게 모사한 설치류의 모델이다(Spady et al., 1993).

<819> 트리테르펜 글리코시드는 음식물의 칼슘, 칼륨, 인 또는 그밖의 다른 필수성분의 수준은 변화시키지 않고 정제된 햄스터 음식물에 두가지 상이한 농도로 투여된다. 트리테르펜 글리코시드 보충의 두가지 상이한 수준은 용량-의존적 관계를 보여주기 위한 것이다. 동물에게 1% 콜레스테롤을 사용하거나 사용하지 않고 NRC 추천(Reeves et al., 1993)에 따라 조제된 다이어트(Dyets) 정제된 햄스터 음식물을 마음대로 먹도록 공급한다(Davis et al., 1989). 콜레스테롤을 함유하는 다이어트 정제된 햄스터 음식물은 이하에 지정된 농도를 사용하여 트리테르펜 글리코시드에 의해 개질된다. 펠릿화된 시험용 및 대조용 음식물은 칼슘, 인 또는 다른 필수미량영양소의 함량을 변화시키지 않고 다이어트 인코포레이티드(Dyets, Inc., Bethlehem, PA)에 의해 제조된다. 동물은 매주 마다 음식물 섭취 및 체중증가에 대해 모니터한다. 사용된 동물은 4주령의 이계교배되고 바이러스를 갖지 않는 수컷 골덴 시리안(Golden Syrian) 햄스터이다(Charles River Laboratories, Wilmington, MA). 동물은 스타트뷰(Statview) 프로그램에서 무작위 수발생기(random number generator)를 사용하여 중량에 따라 무작위로 분류하여 1일에 12시간 조명을 하며 온도가 22°C ± 1.0°C로 유지되는 방에서 케이지당, 3마리씩 수용한다.

<820> 트리테르펜 글리코시드를 함유하거나 함유하지 않는 그들의 각각의 음식물에 대해 0, 4 및 8주 후에 그룹당 12마리를 무작위로 선별하여 오전 9-11시에 치사시킨다. 간 및 신장을 절제하여 평량하고 처리하여 추후의 시험을 위해서 -70°C에서 저장한다. 혈액은 치사시킬 때 간 및 신장을 절제하기 전에 심장천자에 의하여 수득하여 지질 프로필에 대해 분석한다. 혈액 혈청지질 프로필은 치료군과 대조군 사이에서 분석한다. 여기에서는 두개의 대조군 (1 및 2군) 및 두개의 치료군 (3 및 4군)이 있다. 모든 군들에게는 2-주의 검역기간 중에 NRC 햄스터 음식물을 공급한다. 1군에게는 시험이 끝날 때 까지 NRC 음식물을 계속 공급한다. 2-4군에게는 추가의 2-주의 기간 동안에 1% 콜레스테롤이 첨가된 NRC 음식물을 공급하여 고콜레스테롤혈증을 유발시킨다. 그후, 2군에게는 시험이 끝날 때 까지 이 음식물로 계속하는 한편, 3 및 4군에게는 트리테르펜 글리코시드 (예를 들어, F035 또는 F094)가 보충된 동일한 음식물을 제공한다. 치료군의 요약은 이하의 표 39에 제시한다.

**표 39**

식사 개질 방식

그룹 번호	초기 햄스터의 수	기호	식사 개질제 농도
1	24 + 12 <sup>a</sup>	없음	-
2	24 + 12 <sup>a</sup>	Chol <sup>b</sup> +	1% Chol
3	24	Chol <sup>b</sup> +TG <sup>c</sup>	1% Chol + 0.003% TG
4	24	Chol <sup>b</sup> +TG <sup>c</sup>	1% Chol + 0.075% TG

<sup>a</sup> 트리테르펜 글리코시드 공급 개시시 사망시킴

<sup>b</sup>Chol = 콜레스테롤

<sup>c</sup>TG = 트리테르펜 글리코시드

<821>

<822> 트리테르펜 글리코시드를 함유하거나 함유하지 않는 그들 각각의 음식물을 공급한지 0 (대조군 만), 4 및 8주 후에, 그룹당 12마리의 동물을 무작위로 선택하여 오전 9-11시에 치사시킨다. 햄스터의 간 및 신장을 절제하여 평량하고 존재가능한 비정상에 대해 처리한다. 비정상을 나타내는 각 기관의 부분을 조직학적 분석을 위해 준비하는데, 예를 들어 파라핀 절편 및 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 절편의 경우에는 동결시킨다. 혈액은 치사시킬 때 간 및 신장을 절제하기 전에 심장천자에 의해 수득한다. 혈청을 제조하여 지질 프로필 분석을 위해서 -20°C에서 유지시킨다. 햄스터는 치사시키기 전에 밤새 절식시킨다. 데이터는 이하의 표 40에 제시한다.

<823> 이 시험의 과정에서 수집된 혈액샘플은 로쉬 바이오케미칼 래보라토리즈 (Roche Biochemical Laboratories, Burlington, NC)에서 총콜레스테롤, 트리글리세라이드, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤과 VLDL-콜레스테롤의 측정을 위해 사용한다 (Mackness and Durrington, 1992). 데이터의 통계학적 분석은 분산, p값 및 선형회귀의 일방향 분석을 위한 매킨토시 (Macintosh) 소프트웨어를 사용하여 파워 매킨토시 9600 컴퓨터에서 수행한다 (Armitage, 1971). 특히, 각 음식물/약물군에서의 지질 프로필의 데이터 분석은 뉴만-케울스 평균분리 (Newman-Keuls mean separation)를 사용한 분산의 분석에 의해 수행한다 (Steel and Torries, 1980).

표 40

6주 동안 햄스터에 대한 트리테르펜 글리코시드 (TG)의 연속적인 공급의 효과

식사 그룹	총 콜레스테롤 (mg/dL)		트리글리세라이드 (mg/dL)		HDL 콜레스테롤 (mg/dL)		LDL 콜레스테롤 (mg/dL)	
	변화율(%)	평균	변화율(%)	평균	변화율(%)	평균	변화율(%)	평균
대조군	141	—	133	141	—	0	—	—
콜레스테롤	341	—	247	281	—	31	—	—
0.015% TG	329	-3.5	260	5.3	250	-11	36	16.1
0.03% TG	303	-11.1	236	-4.4	246	-12.4	15	-51.6

그룹당 12마리의 햄스터에 정제된 햄스터 식사와 1% 콜레스테롤이 공급됨

<824>

<825> 실시예 21

<826> 분획 35에 의한 UVB-유도된 발암현상에 대한 예방에 관한 시험

<827> 본 시험은 마우스 피부모델에서 본 발명의 활성 트리테르펜 글리코시드에 의한 UVB-유도된 발암현상의 예방에 중점을 두고 있다. 본 시험의 장기적인 목적은 마우스 피부모델에서 트리테르펜 글리코시드가 UVB-유도된 병변을 예방할 것임을 입증하는 것이다. 마우스 실험모델이 사용되는데, 그 이유는 이 모델이 사람의 상황과 매우 유사하기 때문이다. 본 시험에서 본 발명자들은 UVB에 의해 조사된 SKH-1 무모마우스의 배면 피부에 아세톤 내의 본 발명의 활성 트리테르펜 화합물을 국소적으로 적용하면 UVB에 의해 야기된 피부병변이 예방된다는 것을 입증하고자 한다.

<828> 본 시험에서는, SKH-1 무모 마우스에게 UVB 방사선을 15분 이하 동안 1.8 kJ/m<sup>2</sup>의 용량으로 조사한다. 마우스를 두가지 상이한 용량의 F035 (용량 당, 2 mg 및 4 mg) 및 네가티브대조물 (F060 또는 아세톤 단독)로 전처리한다. 통계학적으로 의미가 있는 결과를 얻기 위해서는 그룹당, 최소 10 마리의 마우스가 필요한 것으로 믿어진다. 각 시험화합물은 6-10 주 이하의 기간 동안 주당, 3회씩 조사하기 전에 국소적으로 10 분 동안 적용한다. 본 시험은 화합물의 예방적 효과를 평가하기 위하여 단기간 동안 수행한다. 규정된 시간 한계 내에서는 UVB 만으로 처리한 경우에서조차도 가시적인 종양 및 단지 피부 병변이라도 관찰될 것으로는 예상되지 않는다. 조사한 지 다음 날에 사라지는 미약한 홍반 (피부의 미소한 적열상태)이 관찰될 수 있다.

<829> 사용된 UV 기구는 8개의 웨스팅하우스 (Westinghouse) FS40 선램프, IL-1400A 선량계 (radiometer)/광량계 (photometer), 및 SEL 240/UVB-1/TD 검출기를 갖는 결합된 IL-1403 UVB 광선요법 선량계를 가졌다. 증양 부분에는 몇개의 챔버를 가지는데, 이들은 각각 개개의 마우스를 보유한다. 챔버의 내부에는 마우스를 조사할 동안에 적절한 환기를 위한 구멍이 있다. 챔버는 각각의 마우스가 UVB 광선에 균일하게 노출되도록 조사하는 중에 원형운동으로 회전시킨다. 이 장치에는 UVB 램프가 켜져 있는 동안에는 밀폐되는 문이 있어서 UVB 광선이 장치의 내부에 포함된다. UVB 노출의 양은 UVB 선량계를 사용하여 측정한다. 마우스는 10 내지 15분 이하의 시간 동안 챔버 내에 머무르도록 한다.

<830> 본 시험의 목적은 마우스 피부에서 UVB 손상에 대한 광보호효과를 설정하기 위한 것이다. UVB는 세포 DNA에 의해 직접 흡수되며 표적유전자(들)에서 돌연변이를 야기시킬 수 있고, 궁극적으로는 암을 유발시키는 병소를 발생시킨다. 이들 병소의 조기검출 및 이러한 병소의 예방이 화학보호효과를 시사할 수 있다 (Berton *et al.*, 1997; Chatterjee *et al.*, 1996; Youn *et al.*, 1997; Shirazi *et al.*, 1996; Baba *et al.*, 1996; Takema *et al.*, 1996).



**표 41**

UVB-조사 방식

<b>UVB 단독</b>	마우스 10마리/그룹
<b>아세톤 /UVB</b>	마우스 10마리/그룹
<b>F035 (2 mg/투여량) 5 내지 10분 후 UVB</b>	마우스 10마리/그룹
<b>F035 (4 mg/마우스) 5 내지 10분 후 UVB</b>	마우스 10마리/그룹
<b>F060 (2 mg/마우스) 5 내지 10분 UVB</b>	마우스 10마리/그룹
<b>F060 (4 mg/마우스) 5 내지 10분 UVB</b>	마우스 10마리/그룹

<831>

<832> 시험을 위한 처리군은 표 41에서 지시된 바와 같다. 그룹의 크기는 소정의 그룹에서 피부과형성 (skin hyperplasia) 및 피부염증에 있어서의 차이, 표피 두께에 있어서의 동물간의 차이 및 동일한 연령 및 동일한 발육 단계에 있는 동물에서의 피부염증을 조절하기에 충분한 것으로 생각된다. 과형성 및 피부염증은 본 시험에서 측정되는 주된 파라미터이다. 나머지 피부는 변형된 DNA 염기 (8-OH-dG) 및 종양유전자 발현 (Ha-ras 종양유전자)와 같은 다른 바이오마커 (biomarker)의 측정을 위해서 보존된다.

<833> 동물은 시험의 전과정 중에 펠릿화된 음식물 및 음료수를 마음대로 먹게 한다. 동물은 매주 마다 음식물 섭취 및 체중증가에 대해 모니터한다. 사용된 동물은 7주령의 이계교배되고 바이러스를 갖지 않는 암컷 SKH-1 무모 마우스이다 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). 동물은 스타트뷰 프로그램에서 무작위 발생기 (random generator)를 사용하여 중량에 따라 무작위로 분류하여 1일에 12시간 조명을 하며 온도가 22°C ± 1.0°C로 유지되는 방에서 게이지당, 3마리씩 수용한다.

<834> 데이터의 통계학적 분석은 분산, p값 및 선형회귀의 일방향 분석을 위한 매킨토시 소프트웨어를 사용하여 파워 매킨토시 G3 컴퓨터에서 수행한다 (Armitage, 1971). 특히, 각 약물군에서 표피두께의 데이터 분석은 분산의 분석에 의해서 수행한다 (Armitage, 1971).

**<835> 실시예 22**

**<836> 세포주기 정지 및 세포소멸에 포함된 단백질의 발현에 대한 생물학적 활성 트리테르펜의 효과**

<837> 세포소멸은 배형성적 발생 중에 및 조직항상성의 유지 중에 나타나는 계획된 세포사멸의 정상적인 생리적 과정으로서 정의된다. 세포소멸의 과정은 세포소멸성 세포에서의 일련의 대사적 변화에 따라 세분될 수 있다. 몇 개의 조절 또는 시그널 형질도입 경로의 각각의 효소적 단계를 시험하여 세포소멸이 세포 또는 세포집단에서 나타나거나, 세포사멸의 과정은 암세포에 의해서 붕괴된다는 것이 입증될 수 있다. 세포소멸 프로그램은 또한 원형질막에 있어서의 변화 (예를 들어 비대칭성의 상실), 세포질과 핵의 축합, 및 DNA의 뉴클레오좀간 분해를 포함하는 형태학적 특징에 의해 관찰된다. 이것은 세포가 "세포소멸성 바다"로 변성되는 것으로서 세포사멸로 끝이 난다.

<838> 세포소멸에 포함된 몇 개의 효소적 및 시그널 과정을 시험하는 기술은 멀티파라미터 세포소멸 연구를 위한 표준 프로토콜로서 개발되었다. 세포소멸에 있어서의 초기단계의 한가지 예는 미토콘드리아로부터 시토크롬 c의 유리에 이어서 카스파제-3 경로의 활성화이다 (PharMington, San Diego, CA). 카스파제 (세포질 프로테아제의 계열)의 유도는 세포소멸의 가장 일관되게 관찰되는 특징중의 하나이다. 특히, 카스파제-3은 이 과정에서 중심적인 역할을 한다. 카스파제가 활성화되면, 이들은 표적단백질을 분해시키며, 이들 중의 가장 중요한 것은 PARP (핵 내에 편재하는 단백질)이다. 따라서, 시토크롬 c의 유리를 검출하고, 카스파제-3 활성을 검출하고 PARP 분해를 검출하는 것이 세포소멸의 효과적인 결정인자이다.

<839> 또한, 악성세포의 미토콘드리아로부터 시토크롬 c의 유리를 야기시키는 성분은 계획된 세포사멸의 세포성 조절의 적어도 몇가지 면을 회복시키는 치료법일 것으로 결론을 내릴 수 있다.

<840> 또 다른 세포소멸시험은 아넥신-V 검출이다 (BioWhitaker, Walkerville, MD). 통상적으로, 포스포티딜세린 (PS)은 원형질막의 내부막 상에 편재된다. 그러나, 세포소멸의 초기단계 중에 PS의 외향화가 일어난다. 아넥신-V는 PS에 결합하는 칼슘 결합 단백질이며, 유동세포계산에 의해서 아넥신-V-FITC 염색으로 관찰될 수 있다

(Martin *et al.*, 1995). 본 발명에서 기술된 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 화합물에 의해 처리된 세포의 아네신-V를 결합시키는 능력은 세포가 세포소멸을 겪었는지의 지표로서 채택된다.

<841> 그밖의 다른 실시예에서, 본 발명자들은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 분리된 항암화합물로 처리된 세포에서 세포소멸활성을 검출하기 위해서 PI-3-키나제 시험을 사용한다. 세포막 결합된 효소인 포스포이노시티드 3-키나제 (PI3K)는 포스파티딜이노시톨의 이노시톨환의 3-위치를 인산화시킬 수 있으며, 따라서 PI3K가 활성화인 이들 세포에서 새로운 지질 시그널 경로를 정의하는 것이다. PI3K가 활성화인 경우에, AKT로 불리는 키나제는 세포막에 동원된다. AKT는 막에 동원된 후에 촉매적으로 활성화된 종양유전자의 생성물이다. 완전히 활성화된 AKT는 세포생존에 있어서 결정적인 역할을 수행한다. PI3K/AKT 경로는 세포가 세포소멸을 모면하는 기전을 제공한다. 따라서, 악성세포에서 PI3K를 억제하는 수단은 세포소멸의 세포성 조절의 적어도 몇 가지 면을 회복시키는 치료법일 것이다.

<842> **실시예 23**

<843> **세포주기 분석**

<844> 세포주기 분석은 몇가지 변형을 한 표준방법으로 유동세포계산에 의해 수행한다. 간략하게 설명하면,  $1 \times 10^6$  세포를 60- $\mu\text{m}^2$  디쉬에 도말하고 37°C에서 72시간 동안 다양한 농도의 F035에 노출시킨다. 세포를 PBS에서 세척하고  $1 \times 10^6$  세포/ml의 농도로 재현탁시킨다. 세포를 우선 1% 파라포름알데히드로 고정시키고, 이어서 빙냉 70% 에탄올로 고정시킨다. 그후에 세포를 0.1% RNase (Sigma)를 함유하는 프로피듐요오다이드 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)로 실온에서 30분 동안 염색하고, 벡톤디킨슨 (Beckton Dickinson) FAC SCAN 상에서 분석한다.

<845> **실시예 24**

<846> **아넥신 V-플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) 결합시험**

<847> 암세포에서 세포소멸의 유도는 아넥신 V-FITC 결합시험에 의해 연구한다. 저켓 세포 ( $1 \times 10^6$ )를 다양한 농도의 트리테르펜 글리코시드 (F035) 및 순수한 추출물 D1 및 G1의 혼합물 (0.5-2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 37°C에서 18시간 동안 처리한다. 세포를 PBS로 세척한 후에, 이들을 아넥신-V-FITC 접합체 (Bio Whittaker, Walkersville, MD) 5  $\mu\text{l}$ 를 함유하는 결합완충액 (10 mM HEPES/1NaOH, 140 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ )에 재현탁시키고, 암소에서 10분 동안 배양한다. 세포를 다시 프로피듐요오다이드 (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 염색하고 유동세포계산에 의해 분석한다 (Martin *et al.*, 1995).

<848> **실시예 25**

<849> **포스파티딜이노시톨 3-키나제 (PI3-키나제) 시험**

<850> 혈청을 근절시킨 저켓 세포를 37°C에서, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 F035로 2-15시간 동안 또는 워트만닌으로 0.5시간 동안 처리한다. PI3-키나제 활성화는 문헌 (Whitman *et al.*, 1985; Royal and Park, 1995)에 기술된 바와 같이 측정한다. PI3-키나제를 토끼 안티-p85 항혈청 5  $\mu\text{l}$ 를 사용하여 4°C에서 90분 동안 세포성 단백질 1 mg으로부터 면역침강시킨다. 면역 복합체를 4°C에서 90분 동안 20% 단백질 A-세파로즈 비드 상에서 수집한다. 그 다음에, 면역침강물을 키나제 반응완충액 (33 mM 트리스, pH 7.6, 125 mM NaCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200 mM 아데노신, 20 mM ATP, 30 uCi [g-32P] 아데노신 트리포스페이트 ATP) 30  $\mu\text{l}$ 에 재현탁시킨다. PI 현탁액 10  $\mu\text{l}$  및 감마-ATP 10  $\mu\text{l}$ 를 첨가함으로써 PI3-키나제 반응을 개시시키고, 실온에서 30분 동안 반응을 진행한다. 1 N HCl 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응을 종결시킨다. 지질을 클로로포름:메탄올 (1:1)을 사용하여 반응혼합물로부터 추출하여 실리카 겔 G60 플레이트 상에서 클로로포름:메탄올: $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (60:47:2:11.3) 중에서의 박층크로마토그래피 (TLC)에 의해 분리한다. 방사성 표지된 포스파티딜이노시톨 (PI) 포스페이트를 자가방사기록에 의해 가시화시키고, 스톰 (Storm) 860 시스템 (Molecular Dynamics)을 사용하여 억제를 정량화한다.

**실시예 26**

<852> **총 AKT 및 인산화된 형태의 AKT의 분석**

<853> 총 및 인산화된 형태의 AKT의 발현은 웨스턴 블롯 분석에 의하여 측정한다. 0.5% FBS를 함유하는 배지에서 배양된 저켓 세포를 F035 및 순수한 추출물 D1 및 G1 (2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 37°C에서 15시간 동안 처리한다. 세포를 AKT 용해완충액 (20 mM 트리스-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% 트리톤 X-100, 2.5 mM 나트륨피로포스페이트, 1 mM 8-글리세롤포스페이트, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 ml 로이펙틴, 1 mM PMSF pH 7.5)에 용해시킨다. 세포성 단백질 (40  $\mu\text{g}$ )을 8% SDS-폴리아크릴아미드겔 상에서 분리하여 니트로셀룰로즈막 상에 전기이동시킨다. 막을 우선 포스포특이적 AKT (Ser 473) 또는 AKT 항체로 프로브하고, 이어서 호스레디쉬 퍼옥시다제에 접합된 염소 안티 토끼 항체로 프로브한다. 단백질은 화학발광에 의해서 검출한다 (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL).

<854> **실시예 27**

<855> **전기영동적 이동도 이동시험 (EMSA)**

<856> TNF (Genetech, Inc.) 유도된 NF-KB에 대한 조추출물 (F035) 및 순수한 추출물 D1 및 G1의 효과를 시험하기 위한 EMSA는 전술한 바와 같이 수행한다. 저켓 세포 ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ )를 다양한 농도의 조추출물 및 순수한 추출물로 37°C에서 15분 동안 처리한다. 그후, 세포를 37°C에서 TNF 100 pM에 15분 동안 노출시킨다. 핵추출물은 전술한 바와 같이 제조한다. 핵추출물을 폴리 (dI-dC) 2  $\mu\text{g}$ 의 존재하에 37°C에서 사람 면역결핍 바이러스 긴 말단 반복단위 5'-TTGTTACAAGGGACTTTCGCTGGGGACTTTCAGGGAGGCTGG-3' (서열 번호.9)로부터 유래한  $^{32}\text{P}$ -말단 표지된 45-mer 이중나선 NF-KB 올리고뉴클레오타이드와 함께 15분 동안 배양한다. DNA 단백질 복합체를 7.5% 천연 폴리아크릴아미드겔 상에서 유리 올리고뉴클레오타이드로부터 분리한다. 건조된 겔로부터 방사활성 밴드를 이미지퀀트 (ImageQuant) 소프트웨어를 사용하여 포스포이미저 (Phosphoimager; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)에 의해 가시화시키고 정량한다.

<857> **실시예 28**

<858> **유도성 산화질소 신타제 (iNOS)의 유도 및 분석**

<859> U-937 및 저켓 세포를 iNOS의 시험을 위해서 사용한다. U-937 세포는 이들을 37°C에서 PMA (100 nM)과 함께 72시간 동안 배양함으로써 마크로파아지로 분화시킨다. 분화된 세포를 F035 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 15시간 동안 처리하고, 이어서 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 4시간 동안 처리하여 iNOS를 유도한다. 저켓 세포에서 iNOS는  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  세포를 PHA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 PMA (10 ml)로 37°C에서 24시간 동안 처리함으로써 유도한다. 세포용해물은 RIPA 완충액 (PBS 중의 1% NP-40, 0.5% Na 데옥시콜레이트, 0.1% SDS) 중에서 반복해서 동결 및 해동시킴으로써 제조한다. 세포성 단백질 (200  $\mu\text{g}$ )을 7.5% SDS-폴리아크릴아미드겔 상에서 분리하고 니트로셀룰로즈막 상에 전기적 이동시켜 토끼 안티-iNOS 항체로 프로브한 다음, 이어서 호스레디쉬 퍼옥시다제에 접합된 염소 안티-토끼 항체로 프로브한다. 단백질 밴드는 화학발광성에 의해 검출한다 (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL).

<860> **실시예 29**

<861> **혼합물 및 순수한 트리테르펜 글리코시드에 의해 유도된 종양세포 세포독성**

<862> 암세포 및 비형질전환된 세포의 패널의 생존도에 대한 트리테르펜 글리코시드의 혼합물 (F035)의 효과를 방법 항에서 기술한 바와 같이 시험한다. 도 42에서 보는 바와 같이, 저켓 세포 (T-세포 백혈병)는 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 으로 F035에 대해 매우 민감하다. 유사하게, F035는 암세포에 대해서 1.7-2.8 (난소), 2.0-3.3 (신장), 0.93 (췌장), 1.2-6.5 (전립선), 및 0.72-4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (일부의 유방) 범위의 억제농도  $\text{IC}_{50}$ 으로 다수의 암세포주의 성장을 억제한다. 그러나, 나머지 유방암 세포주는 F035의 세포독성에 대하여 내성이 있었다. 도 42의 마지막 4개의 막대는 비형질전환된 (사람 및 마우스 섬유아세포 및 불멸화된 유방상피) 세포의 50%를 사멸시키는데 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 F035가 필요하였음을 나타내는 것이며, 이것은 F035가 암세포에 대해 특이적으로 세포독성이 있음을 시사하는 것이다.

<863> 또한, 두개의 순수한 트리테르펜 글리코시드 D1 및 G1도 5가지 세포주에 대한 세포독성을 시험한다. 도 43은 D1이 3개의 세포주 (769-P, MDA-MB-453, 및 MDA-MB-231)에서 F035와 동등한  $\text{IC}_{50}$ 을 가지는 것을 나타낸다. C-2 (HEY 변이체) 및 저켓 세포에서, D1은 F035보다 2배 더 강력하다. 그러나, G1은 시험한 대부분의 세포에서 F035 및 D1보다 유의적으로 더 세포독성이었으며, 이것은 G1이 추출물 D1보다 덜 극성이기 때문이다 (도 43).

<864> 실시예 30

<865> 트리테르펜 글리코시드의 혼합물에 의한 세포주기 정지 및 세포소멸의 유도

<866> 세포주기에 대한 F035의 효과를 시험하기 위해서, 암세포주 MDA-MB-453 및 MDA-MB-435를 다양한 농도의 F035로 처리한다. 표 42는 G1에서의 세포수의 증가 (7-10%) 및 S 상에 있어서의 세포의 비율 (%)에 있어서의 동반 감소 (6-10%)를 나타내었으며, 이는 MDA-MD-453 세포에서의 G1 정지를 시사하는 것이다. 또한, F035에 의한 후처리 72시간 후에 MDA-MB-435 세포 (또 다른 유방암 세포주)의 16%가 세포주기의 SubG<sub>0</sub> 상에 있는 것으로 나타났으며, 이것은 세포가 세포소멸을 겪었음을 시사하는 것이다. 이 관찰결과는 TUNEL 시험에 의해 세포소멸을 시험함으로써 더 확인되었다.

표 42

F035 처리된 세포의 세포주기 분석

세포주	F035 (µg/ml)	세포 주기 단계 (세포의 백분율)			
		SubG <sub>0</sub>	G1	S	G2/M
MDA-MB-453	0	1.0	62	26	13
	1	1.5	69	21	10
	3	1.8	71	16	10
	6	2.2	72	19	9.0
MDA-MB-435	0	1.0	52	35	16
	1	1.0	51	36	14
	3	13	50	26	12
	6	16	50	26	10

<867>

<868> MDA-MB-453 및 MDA-MB-435 세포는 다양한 농도의 F035로 37°C에서 72시간 동안 처리한다. 세포주기 분석은 방법 항에서 기술한 바와 같이 프로피듐요오다이드 염색한 후에 수행한다.

<869> F-35 유도된 세포사멸의 근간이 되는 기전을 이해하기 위해서 본 발명자들은 F035, D1 및 G1 처리된 저켓 세포를 사용하여 아넥신 V-FITC 결합시험을 수행한다. 표 43은 1 ml의 F035, D1 및 G1로 처리된 세포 (15-17%)에 대한 아넥신 V의 결합을 나타내며, 따라서 세포소멸 경로는 세포사멸을 유도하는 것을 시사한다.

표 43

저켓 (T-세포 백혈병), 72시간 세포독성 검정

D1 대조군, D1 아글리콘, D1 w/o 모노테르펜 & 모노테르펜-당					
투여량 µg/ml	D1 대조군	D1 아글리콘	모노테르펜을 제외한 D1	둘 다의 모노테르펜을 제외한 D1	모노테르펜-당
25.000		100	56	7	6
12.500		100	55	4	6
6.250	62	86	54	3	3
3.125	62	0	43	5	2
1.562	61	0	9	7	1
0.781	61	0	1	4	2
0.391	57	0	4	4	1
0.195	32	0	1	4	0
0.097	15	0	1	1	0
0.048		0	0	0	0
0.000		0	0	0	0
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	0.329	3.634	5.787	> 25.000	> 25.000

<870>

<871> **실시예 31**

<872> **트리테르펜 글리코시드의 혼합물에 의한 PI3-키나제 활성의 억제**

<873> F035의 분자표적을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 PI3-키나제 시그널 경로를 검사한다. 안티-p85 항체 (어댑터 단백질) 프로브를 사용한 면역침강 및 후속 지질 키나제 시험의 결과는 F035가 저켓 세포에서 PI3-키나제의 활성을 억제함을 나타내었다. 도 45A는 F035에 의한 처리 후 2시간에 PI3-키나제 활성의 약 50-70% 억제를 나타내고 있다. 6시간 까지 PI3-키나제 활성의 92-95% 억제가 관찰되었으며, 이것은 처리 후 15시간 까지 지속한다. 공지의 PI3-키나제 억제제인 워트만닌 [1  $\mu$ M, 30분 후처리]은 저켓 세포에서 효소활성의 유사한 억제를 나타내었다 (도 45A).

**실시예 32**

<875> **트리테르펜 글리코시드, D1 및 G1의 혼합물에 의한 AKT의 인산화의 억제**

<876> 본 발명자들은 세린 트레오닌 키나제 및 PI3-키나제 시그널 전달 경로의 하류 효과기인 AKT에 대한 F035 및 순수한 추출물의 효과를 측정한다. PI3-키나제 활성의 신속한 억제와는 반대로, AKT 인산화의 억제는 처리 후 15시간이 될 때 까지 나타나지 않았다. 그러나, 이 처리는 또한 도 45B에서 볼 수 있는 바와 같이, 총 AKT 단백질 수준의 저하를 유도한다. 본 발명자들은 순수한 트리테르펜 글리코시드에 의한 AKT 활성의 억제를 확인한다. 순수한 트리테르펜 글리코시드 D1 및 G1 (2  $\mu$ g/ml)도 또한 AKT 인산화 및 총 AKT 단백질 발현을 억제한다 (도 45B). LY 294002 및 워트만닌 (공지의 PI3-키나제 억제제)에 의한 저켓 세포의 처리는 AKT 인산화의 억제를 나타내었다.

<877> **실시예 33**

<878> **트리테르펜 글리코시드, D1 및 G1의 혼합물에 의한 TNF 유도된 NF- $\kappa$ B의 억제**

<879> 세포소멸 경로의 매개인자를 더 연구하기 위하여, 본 발명자들은 세포소멸에 포함되는 것으로 알려져 있는 전사 인자 NF- $\kappa$ B에 대한 F035, D1 및 G1의 효과를 평가한다. 도 46A에서의 결과는 저켓 세포에서 F035는 용량-의존적 방식으로 NF- $\kappa$ B의 TNF-의존적 활성화를 억제하였음을 보여준다. 비처리된 세포 및 F035 만으로 처리한 세포는 NF- $\kappa$ B의 활성화를 나타내지 않았다. 또한 본 발명자들은 순수한 추출물 D1 및 G1을 사용하여 이들 결과를 확인한다. 2 ml의 G1 및 D1에 의한 세포의 전처리는 각각 NF- $\kappa$ B 수준에서 54% 및 87% 감소를 유도한다 (도 46B). D1 또는 G1 단독으로 처리된 세포는 NF- $\kappa$ B의 활성화를 나타내지 않았다 (도 46B). 최근에 PI3-키나제는 NF- $\kappa$ B를 조절하는 것으로 확인되었기 때문에 워트만닌 (1  $\mu$ M)에 의한 세포의 전처리는 TNF-유도된 NF- $\kappa$ B 거의 전부를 억제한다.

<880> **실시예 34**

<881> **F035에 의한 iNOS의 억제**

<882> iNOS의 전사는 NF- $\kappa$ B에 의해 조절되기 때문에, 본 발명자들은 iNOS의 유도에 대한 F035의 영향을 조사한다. 마크로파아지로 분화된 U-937 세포에서 본 발명자들은 LPS에 대한 반응으로 iNOS를 유도한다 (도 46C). F035 (1  $\mu$ g/ml)에 의한 이들 세포의 전처리는 iNOS의 유도를 전체적으로 차단한다. 워트만닌도 또한 이들 세포에서 LPS 유도된 iNOS에 대해 유사한 효과를 나타내었다.

<883> 또한, 본 발명자들은 저켓 세포에서의 iNOS 유도에 대한 F035의 효과를 조사하였다. 방법 항목에 기재된 바와 같이 PHA 및 PMA를 사용하여 iNOS를 유도시킨다. 결과에 의하면, F035로 저켓 세포를 예비처리하면 iNOS의 유도가 차단된다(도 46D).

<884> **실시예 35**

<885> **PARP 분해의 면역블롯 분석**

<886> F035 및 D1에 의해 유도된 세포소멸은 폴리 (ADP-리보즈) 폴리머라제 (PARP)의 단백질분해적 분해에 의해 검사한다. 저켓 세포 (2  $\times 10^6$ /ml)를 다양한 시간 동안 F035 (2  $\mu$ g/ml) 및 D1 (2  $\mu$ g/ml)로 처리한다. 세포용해물



을 20 mM HEPES, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% NP-40, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  로이웹틴, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  아프로티닌, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  벤즈아미딘, 1 mM DTT 및 1 mM PMSF를 함유하는 완충액 중에서 제조한다. 세포성 단백질 (60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 7.5% SDS 폴리아크릴아미드겔 상에서 분리시켜 니트로셀룰로즈막 상으로 전기적이동시킨다. 막을 우선 모노클로날 안티-PARP 항체 (Pharmingen)로 프로브한 다음, 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRPO)에 접합된 안티-마우스 항체로 프로브한다. 단백질 밴드는 화학발광성에 의해서 검출한다 (ECL, Amersham). 116-kDa PARP의 85-kDa 및 41-kDa 웹타이드 생성물로의 분해의 정도를 세포소멸의 척도로서 사용한다 (Tewari *et al.*, 1995).

<887> **실시예 36**

<888> **카스파제-3 프로테아제에 대한 검정**

<889> 카스파제-3 활성은 몇가지 변형을 하여 전술한 바와 같이 (Enari *et al.*, 1995) 측정한다. 간략하게 설명하면, 저켓 세포 ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ )를 다양한 시간 동안 F035, D1 및 G1으로 처리한다. 세포질 추출물은 추출완충액 (12.5 mM 트리스, pH 7.0, 1 mM DTT, 0.125 mM EDTA, 5% 글리세롤, 1  $\mu\text{M}$  PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  로이웹틴, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  웹스타틴 및 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  아프로티닌) 300  $\mu\text{l}$  중에서 반복해서 동결 및 해동시킴으로 제조한다. 세포용해물을 ICE 완충액 (50 mM 트리스, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 4 mM DTT 및 20% 글리세롤)으로 1:2 희석하고, 카스파제 3 기질 (아세틸-Asp-Glu-Val-Asp-아미노메틸쿠마린) 20  $\mu\text{M}$ 과 함께 37°C에서 배양한다. 카스파제-3 활성은 플루오로스칸 (Fluoroscan) II (Labsystems, Helsinki, Finland)을 사용하여 여기 355 nm, 방출 460 nm에서 측정하는 형광성 아미노메틸쿠마린의 생성에 의해 모니터링한다.

<890> **실시예 37**

<891> **미토콘드리아로부터 시토크롬 C 유리의 검출**

<892> F035에 의한 처리에 대한 반응으로 미토콘드리아로부터 시토크롬 c의 유리를 웨스턴 블롯팅 (western blotting)에 의해 검출한다. 저켓 세포 ( $10 \times 10^6$ )를 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 F035로 37°C에서 4 및 6시간 동안 처리한다. 세포 펠릿을 슈크로즈 완충액 (0.25 M 슈크로즈, 30 mM 트리스, pH 7.7, 1 mM EDTA) 중에서 세척한다. 세포 펠릿에 1  $\mu\text{M}$  PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  로이웹틴, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  웹스타틴 및 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  아프로티닌을 함유하는 슈크로즈 완충액 20  $\mu\text{l}$ 를 가한다. 세포를 B 유봉 (pestle) (Kontes Glass Company)를 사용하여 콘테스 다운서 (Kontes douncer) 0.3 ml 중에서 120회 다운싱시킴으로써 파괴시킨다. 세포성 단백질 (60  $\mu\text{g}$ )을 15% SDS-폴리아크릴아미드겔 상에서 분리하고 니트로셀룰로즈막 상에 전기적이동시킨다. 막을 우선 모노클로날 안티-시토크롬 c 항체 (Pharmingen)로 프로브한 다음, 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRPO)에 접합된 안티-마우스 항체로 프로브한다. 단백질 밴드는 화학발광성에 의해 검출한다 (ECL, Amersham).

<893> **실시예 38**

<894> **F035 및 D1에 의한 PARP 절단의 유도**

<895> F035 및 D1은 시간-의존적 방식으로 저켓 세포에서 PARP의 분해를 유도한다. 도 47의 결과는 F035 및 D1은 둘 다 4시간 전에 PARP의 분해를 유도하기 시작하였으며 완전한 분해의 완료는 6-8시간 까지 일어나는 것을 나타내었다. 이것은 카스파제의 역할 및 따라서 세포소멸이 F035 및 D1에 의해 유도된 세포사멸에 관련된 기전임을 시사하는 것이다.

<896> **실시예 39**

<897> **F035 유도된 세포사멸에 대한 z-vad fmk의 영향**

<898> F035 매개된 세포사멸에서 카스파제의 역할을 확인하기 위하여 본 발명자들은 F035에 의해 처리된 세포에 대한 z-vad fmk 및 카스파제의 억제제의 효과를 조사한다. 저켓 세포를 z-vad fmk 100  $\mu\text{M}$ 로 37°C에서 1시간 동안 전처리하면 PARP의 F035 유도된 분해는 완전히 반전되었다 (도 48).

<899> **실시예 40**

<900> **F035에 의한 카스파제 3의 활성화 유도**

<901> 본 발명자들의 결과는 지금까지는 F035 유도된 세포소멸에 있어서의 카스파제의 역할을 시사한다. 본 발명자들



은 다음에 F035, F094, D1 및 G1 처리된 세포에서 카스파제 3의 활성화를 시험하였으며, 그 이유는 이들 프로테아제가 시간-의존적 방식으로 카스파제 3에서 PARP의 바로 상부에 존재하기 때문이다 (도 49). 활성화는 모든 증례에서 처리 후 4시간에 시작하고 6-8시간 후에 최고에 달한 후에 감소한다.

<902> **실시예 41**

<903> **F035에 의한 미토콘드리아로부터의 시토크롬 C 유리**

<904> 시토크롬 c의 유리는 몇가지 세포소멸 경로에서 카스파제 3 활성화의 원인이 되는 것으로 간주된다. F035 유도된 세포소멸에서 이것이 사실인지 여부를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 F035 처리된 세포의 세포질 추출물에서 시토크롬 c의 수준을 관찰한다. 본 발명자들은 이들 세포의 미토콘드리아로부터 시간-의존적 방식으로 시토크롬 c가 유리되는 것을 발견한다 (도 50). 본 발명자들은 F035에 의해 처리한 지 4시간 후에 시토크롬 c의 유리를 관찰하였는데, 이것은 카스파제 3의 활성화 및 PARP의 분해가 시작되는 시간과 일치한다. 더 빠른 시점은 시토크롬 c 유리가 카스파제 3의 활성화에 선행하는지 여부를 확인하기 위하여는 시토크롬 c 유리에 대하여 조사하는 것이 필요하다.

<905> **실시예 42**

<906> **에어로포닉 성장시스템**

<907> 본 발명의 트리테르펜 화합물이 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 식물의 뿌리 및 꼬투리에 농축되어 있다는 사실에 비추어, 화합물이 분리될 수 있는 적합한 조직을 증식시키는 창출하는 것이 바람직하다. 이러한 목적을 달성하기 위하여, 에어로포닉 성장시스템이 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 뿌리의 배양을 위해서 고안되었다. 에어로포닉 시스템은 식물 뿌리가 공기중에 현탁되고 완전영양용액이 안개로 덮여 있는 밀폐된 시스템이다. 8 × 4 × 3.5 ft 크기의 박스를 나사로 서로 고정시킨 3/4 인치 합판 시트로 만들어서 유리섬유 시트로 라이닝을 대어 방수 박스를 제조한다. 박스의 상부는 2 개 (2 × 8 ft)의 스티로폼 시트로 덮고 12개의 원형 구멍을 모든 길이 통하도록 뚫었지만, 불투명한 동시압출된 흑상백 (white-on-black) 폴리에틸렌으로 덮인 PVC-피복된 가금용 철망 (poultry wire)이 통합된 새로운 고안이 미래의 작업을 위한 챔버덮개로서 고려될 수도 있다. 프로그램-반복 타이머를 사용하여 12초의 기간 동안 매 4.5초 마다 뿌리에 분무한다.

<908> 에어로포닉 챔버를 위한 플럼빙 (plumbing) 시스템 디자인은 6개의 회전-젯트 (whirl-jet) 중공 콘 (cone) 폴리프로필렌 분무노즐을 갖는 3/4 인치 PVC로 조립된 밀폐시스템이다. 영양용액 720 리터의 저장소는 챔버의 바닥에 유지시키고, 외부펌프를 사용하여 하부로부터 식물의 뿌리에 분무한다. 사용된 펌프는 리틀 자이언트 (Little Giant) 4-MD 3250 RPM, 1/12 hp 펌프이다.

<909> 펌프는 매 4.5분 마다 분무용 30초 간격으로 설정한 토크 반복타이머에 (Tork repeating timer) 의해 조절한다. 온도는 테일러 (Taylor) 전자 실내/실외 최소/최대 온도계로 모니터하여 손으로 기록한다. 두개의 비지-덤 (Visi-therm) 300W 액침가능한 수족관 히터 (aquarium heater)를 사용하여 겨울기간 중에는 영양소 용액을 가열하였으며, 이것은 텍손 (Tucson, Arizona)에서 난방 및 냉방을 하지 않는 실외의 그늘집 (shade-house)에서 주변의 공기를 가열하지 않고 식물이 활동적인 성장을 유하도록 하는데 충분하다.

<910> 영양용액은 식물이 그의 생활주기를 완료하는데 필요한 모든 필수 성분을 함유한다. 상이한 식물은 최적성장을 위해서 상이한 수준 및 상이한 제제를 필요로 한다는 사실에도 불구하고, 전체적으로 단일의 균형을 이룬 용액이 만족스러운 결과를 제공한다. 용액의 조성은 이하의 표 44에 제시한다.

**표 44**

에어로포닉 영양용액

화합물	원소	농도 (ppm)
질산 칼슘	<b>N</b>	<b>150</b>
질산 칼륨	<b>Ca</b>	<b>146</b>
질산 칼륨	<b>K</b>	<b>200</b>
모노칼륨 포스페이트	<b>P</b>	<b>90</b>
황산마그네슘	<b>Mg</b>	<b>50</b>
	<b>S</b>	<b>134</b>
10% Fe- 킬레이트	<b>Fe</b>	<b>5</b>
황산구리	<b>Cu</b>	<b>0.07</b>
염화망간	<b>Mn</b>	<b>0.8</b>
몰리브데산나트륨	<b>Mo</b>	<b>0.03</b>
붕산	<b>B</b>	<b>0.3</b>
황산아연	<b>Zn</b>	<b>0.1</b>

<911>

<912>

그후, 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 종자를 난절하여 50% 초탄 및 50% 버미큘라이트로 조성된 무토양 혼합물에 파종한다. 실생에는 하루에 두번씩 관수하고 단일용량의 오스마코트 (osmacote)로 비료를 주었다. 실생이 통상적으로 3-4 개월 후에 도달하는 15-20 cm 사이의 길이가 되면, 뿌리 볼 (ball)을 철저히 세척하여 잔여량의 초탄과 버미큘라이트를 모두 제거한다. 그 다음에, 뿌리를 스티로폼판 (Styfoam board) 내의 구멍을 통해서 미끄러트려서 넣고, 실생의 상단은 온실구조로부터 내려오는 끈실로 위로부터 지지한다. 포음의 7.0 cm 관상조각을 실생의 크라운 (crown) 주위에서 감싸서 잎과 주변영역에 연무가 덮이는 것을 방지한다. 그 후, 박스를 약 30 cm의 영양용액으로 충전하고 펌프를 가동시킨다.

<913>

일단 실생이 적소에 놓여지고 연무가 끼면, 플라스틱 클립을 사용하여 성장하는 실생이 끈실을 따라서 뻗어오르게 하고 영양용액을 10 cm 이하로 저하된 수준로 다시 보충한다. 실생이 온실 내에서 성장하는 동안에 영양용액의 온도조절은 필요가 없었다. 그러나, 에어로포닉 박스가 주위환경조건에 적용되는 경우에는, 식물이 겨울 기간 중에 동면하지 않도록 영양용액의 온도를 70°F로 상승시키도록 한다.

<914>

뿌리를 수확하기 위해서는, 단일 식물의 뿌리 매스를 에어로포닉 박스 내에서 직접 물로 세정하고 뿌리 매스를 분무기 몇 인치 위치에서 가위로 절단한다. 과잉의 물은 종이타올을 사용하여 가볍게 두르려서 건조시킴으로써 제거하고, 이어서 샘플을 칭량한다. 그후, 뿌리 매스를 가위를 사용하여 3-4 인치 절편으로 절단하고 상술한 바와 같이 화학적 추출한다. 또 다른 방법으로, 뿌리의 연속적 수확을 위해서는 펌프를 잠그고 뿌리를 성장하는 뿌리 매스로부터 잘라 낸다. 그후, 이들 뿌리를 3-4 인치 절편으로 절단하고 상술한 바와 같이 추출한다. 수확하지 않은 뿌리는 손상되지 않도록 주의하여야 한다.

<915>

에어로포닉 시스템에서 식물을 성장시킴으로써 다수의 잇점이 실현되었다. 첫째, 식물의 성장이 통상적인 성장 기술에 의해 성취된 것보다 대략 2배 였다. 둘째, 식물에 손상을 주지 않으면서 뿌리를 필요에 따라 쉽게 수확할 수 있다. 이러한 뿌리의 절단은 또한 섬유상 뿌리의 광범위한 측생을 야기시킨다. 따라서, 뿌리를 일년에 여러번 수확할 수 있다. 또한, 에어로포닉 시스템에서 성장한 식물은 실외에서 성장하는 식물이 3-5년이 걸리는데 비해서 그들의 성장 첫해에 개화한다.

<916>

**실시예 43**

<917>

**아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 조직 배양 및 발아**

<918>

종자/기질: 종자를 아리조나대학의 캠퍼스 어그리컬처럴 센터 (Campus Agricultural Center, University of Arizona, Tucson, Arizona)에서 성장하는 식물로부터 수확한다. 종자를 항미생물 비누 (Vionex, Viro

Research International Inc., USA Durango, Colorado)를 사용하여 수돗물로 철저히 세척한 다음, 시판 표백분 20% (v/v)로 15분 동안 처리한다. 탈이온수로 반복해서 세척한 후에, 이들은 비등수 (종자 100개 당, 약 200 ml)로 처리하고 밤새 냉각시킨다. 그후, 이들을 20% (v/v) 시판 표백분으로 20분 동안 처리하고, 멸균 탈이온수로 2-3회 세정한 다음 MS (Murashige and Skoog, 1962) 및 1/2 역가의 MS 배지 상에서 배양한다. 배지를 MS 비타민, 2% (w/v) 슈크로스로 보충하고, 0.7% 한천 또는 0.2% 겔라이트로 겔화시킨다. 한시험에서는, 종자를 진한 황산을 사용하여 난절하고, 멸균수로 세정한 다음, 배지 상에서 배양한다. 모든 배지는 121°C에서 15분 동안 고압멸균시킨다. 배양물은 차가운 백색형광튜브로부터 생산된 1000 룩스에서 16시간 명광주기 하에 25±2 °C에서 유지시킨다. 각각의 시험은 18개의 복제물을 함유한다.

<919> 증식: 3주된 실생으로부터 절제된 어린싹의 끝부분 및 결절성 분절을 MS 배지 단독 및 옥신 (auxin) 0.1 mg/L (IAA, NAA 또는 IBA) 및 BAP (0.1, 0.3, 0.5, 1.0 및 1.3 mg/L)를 각각 별도로 또는 배합물로 보충한 MS 상에서 배양한다. 어린싹의 뿌리형성에 대해서는 IAA (0.1 mg/L), IBA (0.1 및 0.6 mg/L) 및 NAA (0.1 및 0.2 mg/L)를 시험한다. 토양에 옮기기 위해서, 묘목을 배양튜브로부터 꺼내어 뿌리를 수돗물로 세척하여 뿌리에 결합되어 있는 영양분을 제거하고 사막형 토양을 으로 충전된 포트에 옮겼다. 식물을 마젠타 (Magenta) 박스로 덮어서 습도를 유지시키고 3주 동안 연무 및 저광도 하에서 유지시킨다. 3주 후에, 마젠타 박스를 치우고 식물을 연무 상태로부터 온실 내의 고광도로 옮겼다.

<920> 유합조직의 유도: 유합조직은 시험관내에서 발아된 3주 된 실생으로부터 절제된 배축 및 뿌리 분절로부터 유도한다. 외이식편을 2,4-D ( 1 mg/L), NAA (0.5 및 1 mg/L), IAA (0.2 및 1 mg/L), 티디아주론 (0.2 mg/L), 디캄바 (0.2 및 2 mg/L), BAP (0.3 mg/L) 및 KN (0.5 및 3 mg/L)을 각각 개별적으로 또는 배합물로 보충한 MS 배지 상에서 배양한다.

<921> 종자 발아: 열수로 처리된 식물은 3-4일 내에 소근의 출현으로 발아하였으며, 완전한 묘목은 1주일 이내에 수득한다. 열수처리를 하지 않고 배양한 종자는 발아하지 않았다. 한천 (0.7%)에 비해서 겔라이트 (0.2%) 로 고화된 배지 상에서 더 높은 비율의 종자가 발아한다. 최고발아율 88.7%는 겔라이트로 고화된 1/2 역가의 MS 배지 상에서 관찰되었다. 다양한 배지 상에서의 발아반응은 표 45에서 요약한다.

**표 45**

아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 종자발아

배지	배양된 종자의 수	발아된 종자의 수 <sup>a</sup>
MS(고화된 한천)	42	36 (85.7)
MS(고화된 한천) (황산으로 코팅제거함)	41	24 (58)
1/2 강도(strength) MS(고화된 한천)	60	48 (80)
1/2 강도(strength) MS(고화된 겔트라이트(Geltrite))	133	118 (88.7)

<sup>a</sup> 괄호 속의 숫자는 발아율(%)이다.

<922>

<923> 이식가능한 실생은 3-4주 이내에 수득한다. 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 종자는 높은 수준의 종자 동면으로 인하여 낮은 발아율을 가졌다 (Kaul and Ganguly, 1965; Grice and Westoby, 1987). 동면을 극복하기 위하여, 종자껍질은 날카로운 기구로 흠을 내거나, 산으로 난절하거나, 떠는 비등수로 덮어서 밤새 물 중

에서 냉각하도록 하여야 한다. 본 발명자들은 발아율은 비등수 처리 및 후속단계로 종자를 0.2% 젤라이트로 겔화된 1/2 MS 배지상에서 배양함으로써 88.7% 까지 증가시킬 수 있음을 발견한다. 라르센 (Larsen, 1964)에 따르면, 비등수로 처리된 생체내 조건하의 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 종자는 36% 까지 발아를 증가시킬 수 있다. 전처리가 없는 경우에, 발아율은 19.4%이다 (Kaul and Ganguly, 1965). 또한, 소근이 출현하는데는 12일이 걸렸으며, 완전한 실생은 79일 후에 복구되었다. 본 발명자들의 프로토콜에서, 발아율은 증가하였으며 (88.7%) 이식가능한 실생은 3-4주 이내에 수득할 수 있었다.

<924>

어린싹 말단(Shoot tip)의 배양: 어린싹의 증식을 조사하기 위하여 어린싹의 말단(길이 약 1.0 cm)을 MS 배지 단독 및 BA 및 IAA와 배합된 BA가 보충된 MS 상에서 배양한다. MS 만을 사용한 경우에는 어린싹이 활력이 없고 불량한 뿌리 성장 (1-3 뿌리/배양)이 있었다. BA (1.3 mg/L)를 함유하는 배지 상에서는 어린싹의 말단이 다수의 어린싹 (평균 3.94 어린싹/배양)를 생산한다. 다수의 어린싹 중에서 하나 또는 두개의 어린싹을 신장시켜 높이가 4주에 8.6 cm가 되었다. BA와 IAA의 배합물도 또한 다수의 어린싹을 유도하는데 바람직한다. 이 반응은 표 46에 요약한다.

**표 46**

아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)에서 다수의 어린싹을 유도하는데 대한 다양한 수준의 BA 및 IAA (0.2 mg/L)의 영향

배지 * BA (mg/L)	IAA (mg/L)	발아 말단당 어린싹의 평균 수	어린 싹의 길이 (cm)
1.3	0	3.94+1.846	8.6+3.0258
0.1	0.2	1.6+0.599	6.8+3.002
0.3	0.2	1.9+0.7071	5.8+2.794
0.5	0.2	2.8+1.1659	5.1+2.501
1.0	0.2	4.9+2.075	3.2+1.468

\*MS. 데이터는 18회 반복시의 평균 + SE를 나타낸다.

<925>

<926>

BA 고농도 (1.0 및 1.3 mg/L)에서는 어린싹의 수가 증가한다. BA (1 mg/L) + IAA (0.2 mg/L)의 배합물은 어린 싹 증식에 더 좋은 것으로 발견되었다. 유합조직은 BA-IAA 배합물 모두에서 절단된 말단부에서 관찰되었다. 카우르 (Kaur) 등 (1998)은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)에서 어린싹 발아의 유도에 대한 BA-NAA의 상승적 효과를 보고하였으며, 더 고농도의 NAA (1-2 mg/L)는 유의하지 않았다. 이들은 또한, IAA가 어린싹 발아 형성을 증진시키는데는 효과가 없었지만, 대신에 유합조직은 외이식편의 기저로부터 생산되었다고 언급한다.

<927>

뿌리형성을 조사하기 위해서, 시험관내에서 발생된 어린싹을 정제하여 IAA, NAA 또는 IBA를 함유하는 배지에 옮겼다. 반응은 표 47에 요약하여 나타내었다. 시험된 처리 중에서, 1/2 MS + NAA (0.2 mg/L)이 뿌리 형성에 더 우수한 것으로 나타났다. 어린싹은 거의 100% 뿌리를 생성한다. 어린싹은 4주에 키가 9-11 cm에 도달한다. 아카시아 카테쿠 (*Acacia catechu*) (Kaur et al., 1998)에서는 뿌리와 어린싹의 접합부에서 간헐적인 유합조직 형성이 보고되었으며, 이들은 유합조직을 조절하기 위해서 3%에서 1.5%로 저하된 슈크로즈 수준을 사용한다. 유사한 결과가 또한 웨로니아 리모니아 (*Feronia limonia*) (Purohit and Tak, 1992) 및 아카시아 아우리클리포르미스 (*Acacia auriculiformis*) (Das et al., 1993)에서도 보고되었다. 본 조사에서는 미약한 유합조직 형성이 또한 3% 슈크로즈에서 보고되었으며, 2% 슈크로즈에서 최소화되었다. 뿌리가 생성된 어린싹을 온실에 옮겼다. 옮긴 후의 생존율은 100%였다. 식물을 3주 동안 연무하에서 적응시키고, 그후에 식물을 정규 온실에서 성장시킨다.

표 47

아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 어린싹의 뿌리형성에 대한 IAA, NA 및 IBA의 영향

배지	배양된 어린 싹의 수	뿌리를 형성한 어린 싹의 수 <sup>a</sup>	배지당 어린 싹의 평균 수
MS	14	6 (42.8)	2+0.816
MS+IAA (0.1)	12	8 (66.6)	3.6+ 1.316
MS+IBA (0.1)	10	6 (60)	3+ 0.816
MS+IBA (0.6)	14	8 (57)	1.6+ 1.111
MS+NAA (0.1)	10	6 (60)	2.16+ 1.067
1/2MS+ NAA (0.2)	14	14 (100)	3.07+ 1.032

<sup>a</sup> 괄호 속의 숫자는 뿌리 형성율(%)이다.

<928>

<929>

결절성 분절 배양: 시험관내에서 발아된 실생으로부터 유래하는 결절성 분절 (자엽성 결절)을 0.1 mg/L IAA, NAA 또는 IBA가 보충된 MS 배지 상에서 배양한다. 외이식편 당, 단지 하나 또는 두개의 보조 어린싹이 발생한다. 그러나, 이들 어린싹의 성장은 느렸다. 따라서, 결절성 외이식편은 추가의 시험에 대해서는 사용하지 않았다.

<930>

배축 및 뿌리 절편으로부터 유합조직의 유도: 유합조직은 시험관내에서 발아된 3주된 실생으로부터 절제된 배축절편으로부터 유도되었다. 2,4-D (1 mg/L), 티디아주론 (0.2 mg/L), 디캄바 (0.2 mg/L) 상에서 발생한 유합조직은 녹색을 띠었으며, 치밀하고 단단하다. 발생한 유합조직의 양은 시험한 대부분의 농도에서 보통이었다 (표 51). 2,4-D (4 mg/L) + IAA (1 mg/L) + NAA (1 mg/L)이 보충된 MS 배지 상에서는 풍부한 유합조직 발생이 관찰되었다.

<931>

시험관내에서 발아된 3주된 실생으로부터 절제된 뿌리 절편을 2,4-D (1 mg/L) 이 단독으로 및 2,4-D가 KN (0.5 mg/L)과의 배합물로 보충된 MS 배지 상에서 배양하였으며, 밝은 황색의 연한 유합조직을 나타내었으며, 몇개의 뿌리가 유합조직으로부터 발생한다. 유합조직 형성은 배양물의 100%에서 관찰되었다. 흰빛을 띠는 연하고 무른 풍부한 유합조직의 형성은 BA (0.3 mg/L) + IAA (0.2 mg/L)이 첨가된 배지 상에서의 뿌리 절편으로부터 관찰되었다. 밝은 황색을 띤 풍부한 유합조직 형성은 각각 1 mg/L 씩의 IAA 및 NAA와 배합된 2,4-D (4 mg/L)가 첨가된 배지 상에서 배양된 뿌리 절편에서 관찰되었다. 유사한 형태의 유합조직 형성이 티디아주론 (0.2 mg/L) + 디캄바 (2 mg/L) 및 IAA (0.1 mg/L)에서 관찰되었다. 디캄바 (2 mg/L) + IAA (0.1 mg/L) 이 첨가된 배지 상에서 배양된 뿌리 절편은 밝은 녹색의 치밀하고 단단한 유합조직을 형성한다. 유합조직으로부터 묘목을 재생시키고자하는 시도는 성공하지 못한다. 유합조직 유도와 관련한 외이식편 간의 변이는 알비지아 레벡 (*Albizia lebeck*) (Lakshmana Rao and De, 1987) 및 로니세라 야포니카 (*Lonicera japonica*) (Georges *et al.*, 1993) 와 같은 몇가지의 나무 종에서 보고되었다. 본 발명자들의 연구에서, 이들은 또한 동일한 배지 상에서 발생한 배축- 및 뿌리-유도된 유합조직 사이에 차이가 있음을 발견한다. BA-IAA 배합물 상의 배축으로부터 발생한 유합조직은 밝은 녹색을 띠며 단단하고 치밀하였으며, 그 반면에 뿌리 절편으로부터의 유합조직은 흰빛을 띠우며 연하고 물렸고 또한, 일부의 배합물에서는 유합조직으로부터 뿌리 분화가 나타났다. 달베르기아 라티폴리아 (*Dalbergia latifolia*)에 소 재생배지 상의 유합조직은 치밀하고 단단하며 짙은 녹색이 되었으며 어린싹 발아는 분화되었다 (Pradhan *et al.*, 1998). 본 발명자들의 연구에서는 유사한 타입의 유합조직 발생이 관찰되었지만, 이러한 유합조직은 재생되지 못한다. 본 연구에서, 발명자들은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)가 어린싹 끝부분으로부터 시험관내에서 증식될 수 있음을 확인한다. 표준화된 기술이 불균질한 실생집단으로부터



검출된 엘리트 개체의 마이크로증식 (micropropagation) 및 추후의 연구를 위한 엘리트 주의 유지에 유용하다.

**표 48**

아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 배축 및 뿌리 절편으로부터 유합조직의 발생

배지 *	유합 조직의 성질	
	배축	뿌리
1. MS+2.4-D(1)	적당함, 녹색	적당함, 황색
2. MS+TD(0.2)	부족함	부족함
3. MS+ 디카바 (2)	적당함, 치밀함, 녹색	적당함, 연질, 황색
4. MS+2.4-D(1)+KN(0.5)	부족함, 녹색	부족함, 연녹색
5. MS+KN(3)+NAA(0.5)	적당함, 백색	부족함, 연녹색
6. MS+TD(0.2)+	적당함, 연녹색	적당함, 연질, 황색
7. MS+ 디카바 (2)+ IAA(0.2)	부족함, 치밀함, 황색	부족함, 연녹색
8. MS+2.4-D(4)+ IAA(1)+NAA(1)	많음, 녹색, 치밀함, 경질	적당함, 황색, 연질
9. MS+BA(0.3)+IAA(0.2)	적당함, 치밀	많음, 백색

\* 괄호 숫자는 mg/L을 단위로 한다.

**실시예 44**

**항암화합물의 생산을 위해 아카시아 빅토리아에 *Acacia victoriae*로부터 모발상 뿌리의 유도**

아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*)에 의한 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 감염으로 식물 계놈내에서 T-DNA의 통합 및 발현을 유도하여 모발상 뿌리 표현형의 발생을 야기시킨다 (Grant *et al.*, 1991). 모발상 뿌리 배양물은 빠르게 성장하며 플라지오토르픽 뿌리 성장을 나타내고, 호르몬-비함유 배지 상에서 고도로 분지되며, 또한 고도의 유전적 안정성을 나타낸다 (Aird *et al.*, 1988). 다수의 쌍자엽식물은 아그로박테리움 리조게네스 (*A. rhizogenes*)에 대해 감수성이 있으며, 식물은 다수의 종에서 모발상 뿌리 배양물로부터 재생되었다 (Christey, 1997).

유전적 형질전환 및 모발상 뿌리의 유도는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 활성 트리테르펜의 생성을 위한 방법으로서 본 발명자들에 의해 수행되었다. 숙주식물 유전자에 유전자를 형질전환시키는 토양세균 아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*)의 천연의 능력은 감염의 부위에서 뿌리의 형성을 야기시키며, 이것은 모발상 뿌리 배양물을 생성시키기 위해서 사용된다. 모발상 뿌리는 시험관내의 호르몬-비함유 배지상에서 성장을 계속하는 다수의 빠르게 성장하는 고도로 분지된 우생의 뿌리라는 특징을 갖는다.

본 발명자들은 아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*) 균주 R 1000 (아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*) 플라스미드 pRiA<sub>4</sub>가 삽입된 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 균주의 조작된 균주, ATCC 번호 43056)을 사용하여 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 모발상 뿌리의 유도를 입증한다. 모발상 뿌리에서 목적하는 화합물의 생성은 HPLC에 의해서 확인되었다. 모발

상 뿌리의 유도는 다음과 같이 수행한다. 우선, 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 종자를 투손 (Tucson, Arizona)에서 자생하는 식물로부터 수집한다. 종자 위에 비등수를 붓고 밤새 담가두어 물을 냉각시키고, 30분 동안 15% 시판 표백분에서 표면을 멸균시킨다. 멸균수에서 반복해서 세척한 후에 종자를 배지 50 ml를 함유하는 250 ml 코니칼 플라스크 (conical flask) 내에서 MS 비타민 및 2% 슈크로스가 보충된 액체 MS 배지 (Murashige and Skoog, 1962) 상에서 배양한다. 배양을 암소에서 25 ± 2°C의 성장실에서 회전진탕기 (gyratory shaker) 에서 유지시킨다. 4일 동안 배양한 후에 배아-축을 발아한 싹으로부터 절제하여 아그로인펙션 (agroinfection)을 위해서 사용한다.

<938> 아그로인펙션시키기 전에, 아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterim rhizogenes*) 균주 R1000을 YENB 배지 상에서 밤새 성장시킨다. YENB 배지는 효모추출물 7.5 g/L 및 영양육즙 8 g/L을 첨가함으로써 제조한다 (Difco Laboratories, Detroit, MI). 외이식편의 배아-축을 세균용액에 담그었던 미세한 스테인레스 강철 바늘을 사용하여 감염시킨다. 감염시킨 후에, 외이식편의 표면 상에 세균현탁액 (MS 배지로 1:20) 1적을 가한다. 그후, 외이식편을 공동배양을 위해서 MS 배지 및 아세트시린곤 (100 μM) (3,5-디메톡시-4-하이드록시-아세트페논, Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI)을 함유하는 MS 배지 상에 옮겼다. 공동배양은 암소에서 3일 동안 수행한다. 공동배양 3일 후에, 외이식편을 MS + 세포탁심 (500 mg/L, Agrio-Bio, North Miami, FI)에 옮겨 세균의 과도한 성장을 조절한다. 뿌리 개시는 3-4일 만에 배아-축으로부터 발생하는 어린 잎으로부터 대부분 감염부위에서 관찰되었다. 4주 후에, 뿌리를 따라서 외이식편을 MS 배지 만으로 된 배지상에 옮기고 모발상 뿌리의 발생을 위해서 암소배양을 계속한다. 추가로 8주 후에 모발상 뿌리의 발생이 관찰되었다. 이렇게하여 발생된 모발상 뿌리는 계대배양함으로써 MS 배지 상에서 일상적으로 증식시킨다. 모발상 뿌리의 형질전환 유전자 (transgene) 성질은 rol B 유전자의 일부분을 증폭시키기 위한 프라이머 셋트를 사용하여 PCR™에 의해 확인되었다. 사용된 프라이머는 다음과 같았다:

<939> 1) 5' GAGGGGATCCGATTTGCTTTTG 3' [서열 번호. 7]

<940> 2) 5' CTGATCAGGCCCCGAGAGTC 3' [서열 번호. 8]

<941> 50 μl PCR™ 반응혼합물은 프라이머 (각각 최종농도 1 μM), Taq 폴리머라제 (1.0 U), 각각의 dNTP 125 μM, 1 × PCR™ 반응완충액, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 분리된 DNA 300 ng을 함유한다. 사용된 PCR™ 조건은 5분 동안 92°C 초기 변성에 이어서 92°C 50초의 35 사이클, 어닐링을 위한 55°C 1분, 연장을 위한 72°C 1.5분 및 최종 연장을 위한 72°C 7분이었다. 645 bp 단편이 증폭되었다.

<942> 액체배지에서 모발상 뿌리의 배양: 성장을 위한 조건을 최적화하기 위하여, MS 반고형 배지 상에서 성장하는 모발상 뿌리를 절제하여 20, 50, 100 및 400 ml 배지를 각각 함유하는 다양한 용량의 플라스크 (각각 125, 250, 500 및 1000 ml) 내의 MS 액체배지에서 배양한다. 초기 모발상 뿌리의 접종은 6 gm/L이었다. 모발상 뿌리의 성장은 또한 다음과 같은 기초배지에서 시험한다: MS 닛쉬 및 닛쉬 (Nitsch and Nitsch; N and N) (1969), 쉐크 및 힐데브란트 (Schenk and Hildebrandt; SH) (1872) 및 목질 식물 (Woody Plant Medium; WPM) (Lloyd and McCown, 1981). 모발상 뿌리 성장에 대한 다양한 탄소공급원의 효과를 시험하기 위하여 다음과 같은 각각의 성분 2% (w/v)를 MS 배지에 가한다: 슈크로즈, 글루코즈, 프럭토즈 및 만노즈. 모발상 뿌리 성장에 대한 지베렐린산 (0.1, 0.5 및 1 mg/L)의 영향은 필터-멸균된 용액을 고압멸균한 후의 MS 배지에 가함으로써 시험한다.

<943> 감염부위에서의 뿌리의 시작은 3-4주 만에 관찰되었다. 4개의 독립적으로 형질전환된 모발상 뿌리 클론을 아세트시린곤 (100 μM)의 존재하에서 R1000 균주으로 감염된 배아축으로부터 설정한다. 아세트시린곤의 부재하에서 아그로박테리움 리조게네스 (*A. rhizogenes*)와 함께 공동배양된 배아축은 모발상 뿌리를 발생하지 않았다 (표 54). 아세트시린곤의 존재하에서 3일의 공동배양이 모발상 뿌리의 유도를 위해 최적인 것으로 밝혀졌다. 아세트시린곤의 촉진효과는 살비아 밀리티오리자 (*Salvia miltiorrhiza*)에서 보고되었다 (Hu and Alfermann, 1993). 결과는 아그로박테리움의 vir 유전자의 활성화제인 아세트시린곤이 형질전환 빈도를 증가시켰음을 나타내었다. 유사하게, 이 시험에서 아세트시린곤은 모발상 뿌리의 유도에 필요하다.

<944> 뿌리의 형질전환된 성질은 rol B 유전자의 일부분을 증폭시키기 위한 프라이머의 셋트를 사용하여 PCR™ 증폭에 의해 확인되었다. 645 bp의 진단적 단편이 시험한 4개의 모발상 뿌리 클론에서 증폭되었다.

<945> 액체배지 상에서 성장하는 모발상 뿌리는 격렬하게 발생한다. 시험한 다양한 기초배지 중에서는 MS 배지가 최상의 모발상 뿌리 성장을 나타내었다 (표 56). 125 ml 플라스크에서 4주 만에 성장이 268배 증가한다. WPM 및 N&N 배지의 경우에는 각각 254배 및 196배의 증가가 있었다. B<sub>5</sub> 및 SH 배지는 모발상 뿌리의 최적성장에는 바람직하지 않았다. 모발상 뿌리는 이들 두가지 배지 상에서 서서히 갈색으로 변하기 시작했다. 한시험에서, 모

발상 뿌리는 20, 50, 100 및 400 ml의 MS 배지를 각각 함유하는 다양한 용량의 플라스크 (각각 125, 250, 500 및 1000 ml)에서 성장시킨다. 성장 동력학은 표 55에 요약한다. 초기에, 모발상 뿌리의 성장은 격렬하였으며, 초기집중물 150 mg를 갖는 125 ml 플라스크 내에서 4주 만에 25.77배의 증가를 획득한다. 플라스크 용량이 증가함에 따라 뿌리의 성장은 약간 감소한다.

<946> 모발상 뿌리의 성장은 배지조성, 특히 무기이온 및 탄소공급원에 대해 민감할 수 있다 (Wysokinska and Chmiel, 1997). 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 경우에, 5개의 상이한 기본배지 (MS, N&N, SH, WPM 및 B<sub>5</sub>)를 모발상 뿌리 성장에 대한 영향에 대하여 시험한다. MS 배지가 최고의 성장을 나타내었다. 사사키 (Sasaki) 등 (1998)은 다양한 영양배지 상에서 콜레우스 포르스크홀리 (*Coleus forskohlii*) 모발상 뿌리의 성장을 비교하였으며, WPM이 모발상 뿌리 성장에 최고였음을 확인한다.

<947> 본 시험에서, 슈크로즈는 다른 탄소공급원 (프럭토즈, 글루코즈 및 만노즈)에 비해 모발상 뿌리의 성장에 바람직하다. 최고성장 (24.52배 증가)은 슈크로즈-함유 배지에서 나타났다. 글루코즈-함유 배지는 성장에 대해 약간 억제성이었으며, 만노즈는 성장을 완전히 억제한다 (표 57). 카타란투스 로세우스 (*Catharanthus roseus*)에서, 카타란틴 생산은 배지에서 탄소공급원으로서 프럭토스를 사용함으로써 2배가 될 수 있었다. 그러나, 저자들은 프럭토스의 사용이 슈크로즈에 비해 성장에 있어서 약 40% 감소를 유도한다고 보고한다 (Jung et al., 1992).

<948> 모발상 뿌리는 지속적인 성장을 위한 외인성 성장조절제의 첨가를 필요로 하지 않으며, 그 이유는 옥신에 대한 감수성 증가가 Ri 플라스미드에 존재하기 때문이다 (Wysokinska and Chmiel, 1997). 그러나, 외인성 호르몬이 성장을 촉진한다는 보고는 이용할 수 있다. 본 발명자들은 모발상 뿌리 성장에 대한 지베렐린산 (0.1, 0.5 및 1.0 mg/L)의 영향을 시험한다. 모발상 뿌리의 성장은 GA<sub>3</sub>-함유 배지 (15.77배 증가)에 비해 GA<sub>3</sub>를 함유하지 않는 배지에서 가장 우수하다. 다양한 수준의 GA<sub>3</sub>는 성장에 현저한 영향을 미치지 않았다 (표 58). 아르테미시아 (*Artemisia*)에서 GA<sub>3</sub>는 전체적인 바이오매스 축적을 증가시키지 않았지만, GA<sub>3</sub>를 함유하지 않는 배지상에서 성장하는 배양물에 비해 더 빨리 정지상에 도달하는 것을 촉진시킨다 (Smith et al., 1997). 로데스 (Rhodes) 등 (1994)은 GA<sub>3</sub>에 대한 브라시카 칸디다 (*Brassica candida*)의 모발상 뿌리의 반응이 검사된 클론에 매우 의존적이었음을 확인한다. 그러나, 이들은 일반적으로 GA<sub>3</sub>는 성장에 대해 포지티브 효과를 나타내었으며, 알칼로이드 축적에 있어서의 감소는 생산패턴에 있어서의 변화와 같이 나타났음을 관찰한다. 오카와 (Ohkawa et al., 1989)는 10 ng/L 및 1 mg/L 농도에서 GA<sub>3</sub>는 다투라 이녹시아 (*Datura innoxia*) 모발상 뿌리에서 성장을 가속화시키고 신장을 증진시키며 가지의 측생을 증가시킨다고 보고한다. 조벨 (Zobel, 1989)은 GA<sub>3</sub>가 뿌리 성장에 대해 CO<sub>2</sub> 동축체로서 작용한다고 시사한다. 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*) 모발상 뿌리의 경우에, GA<sub>3</sub>는 성장을 촉진시키지 않았으며, 이것은 다양한 유전자형에 대해 상이한 반응을 시사하는 것임이 틀림없다.

<949> 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 모발상 뿌리 배양물의 사용은 분리된 혼합물 또는 개개의 정제된 혼합물을 포함하는 본 발명의 트리테르펜 글리코시드 조성물이 분리될 수 있는 식물조직의 균일한 배양을 위한 적합한 수단을 제공한다.

**표 49**

<950> 모발상 뿌리 생성을 위한 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 배아축의 아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*) 균주 R1000 감염

처리	공-배양용 배지*	감염된 배아축의 수	뿌리가 발달된 이 식편의 수 <sup>a</sup>	모발상 뿌리 형상을 갖는 뿌리의 수
대조군 (감염되지 않은 경우)	MS	20	-	-
	MS+Aceto.	21	-	-
감염된 경우	MS	33	5(15)	
	MS+Aceto.	38	9(23)	4(17.3)

\* 아세토시린곤(100 μM)을 오토클레이브 처리후에 공-배양용 MS 배지에 가한다.

<sup>a</sup>괄호 속의 숫자는 백분율을 나타낸다.

표 50

<951> 아카시아 빅토리아에(*Acacia victoriae*)의 모발상 뿌리의 성장에 대한 다양한 플라스크 크기의 영향

플라스크 크기 (ml)	초기 배양물 중량(fresh weight) (mg)	4주후의 배양물 중량 (mg) <sup>a</sup>	증가 배수
125	150	3866±0.569	25.77
250	300	6903±0.344	23.01
500	1200	11817±0.998	9.84
1000	2400	40080±3.479	16.70

<sup>a</sup>데이터는 6회 반복한 경우의 평균±S.E.를 나타낸다. 125, 250, 500 및 1000ml 용량의 플라스크에 25, 50, 100 및 400ml의 MS 배지를 넣음.

표 51

<952> 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 모발상 뿌리의 성장에 대한 다양한 기본 배지 및 플라스크 크기의 영향

배지 <sup>a</sup>	플라스크 크기 <sup>b</sup> (ml)	초기 배양물 중량(mg)	4주후의 배양물 중량(mg)	증가 배수
MS	125	10	2681	268
B <sub>5</sub>	125	10	1933	193
N 및 N	125	10	196	196
SH	125	10	170	170
WPM	125	10	2549	254
MS	250	300	751	25
B <sub>5</sub>	250	300	57	19
N 및 N	250	300	591	19.7
SH	250	300	54	18
WPM	250	300	659	21

<sup>A</sup>MS=무라쉬게 및 스쿠그(Murashige and Skoog); B<sub>5</sub>=갬보그(Gamborg's); N 및 N=닛쉬 및 닛쉬(Nitsch and Nitsch); SH=셴크 및 힐더브란트(Schenk and Hilderbrandt); WPM=목질 식물 배지.  
<sup>b</sup>125 및 250ml 플라스크에 25 및 50ml 배지를 넣음.

표 52

<953> 아카시아 빅토리아에(*Acacia victoriae*)의 모발상 뿌리의 성장에 대한 MS 배지 중의 다양한 탄소공급원의 영향

탄소 공급원 <sup>a</sup> (2%W/V)	4주후의 배양물 중량 (gm) <sup>b</sup>	증가 배수
수크로즈	7.356±0.543 <sup>c</sup>	24.52
글루코즈	2.87±0.53	9.56
프럭토즈	5.85±1.55	19.5
만노즈	0.305±0.065	1.01

<sup>a</sup> 2%(w/v) <sup>b</sup> 각각의 처리에 대한 초기 F.W.는 300mg이다. <sup>c</sup> 데이터는 6회 반복한 경우의 평균±S.E.를 나타낸다.
--

**표 53**

<954> 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)의 모발상 뿌리의 성장에 대한 GA<sub>3</sub>의 영향

GA <sub>3</sub> (mg/ℓ)	4주후의 배양물 중량 (gm) <sup>a</sup>	증가 배수
0	6.512±1.569 <sup>b</sup>	21.70
0.1	4.732±0.086	15.77
0.5	4.634±0.088	15.44
1	4.310±0.344	15.44

<sup>a</sup>각각의 처리에 대한 초기 F.W.는 300mg이다.  
<sup>b</sup>데이터는 6회 반복한 경우의 평균±S.E.를 나타낸다.

<955> 다양한 배지를 모발상 뿌리의 성장에 대하여 시험한다. 최상의 성장은 2% 슈크로스를 함유하는 MS 배지 상에서 수득된다. 다양한 플라스크 용량 및 지베렐린산의 영향을 모발상 뿌리의 성장에 대하여 시험한다. 모발상 뿌리는 또한 20 ml 배지를 함유하는 125 ml 코니칼 플라스크 내에서 회전진탕기 상의 MS 액체배지 상에서 성장시킨다. F035에서 확인되는 것에 상응하는 트리테르펜 사포닌의 생성은 표준 진성샘플을 사용하여 HPLC에 의해 확인한다.

<956> 본 명세서에 기술되고 청구된 모든 조성물 및 방법은 본 발명의 기술내용에 비추어 과도한 실험이 없이 이루어 지고 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법을 바람직한 양태와 관련하여 기술하였지만, 본 발명의 개념, 의의 및 범주를 벗어나지 않고 본 명세서에 기술된 조성물 및 방법에 및 방법의 단계들에 또는 방법의 단계들의 순서에 변화가 적용될 수 있다는 것은 본 기술분야에서 수련된 전문가에게 명백할 것이다. 더욱 구체적으로, 동일하거나 유사한 결과에 도달하면서 화학적 및 생리학적 둘다로 관련되어 있는 특정의 성분을 본 명세서에 기술된 성분들에 대해 치환시킬 수 있음은 명백할 것이다. 본 기술분야에서 수련된 전문가에게 명백한 이러한 모든 치환 및 변형은 청구범위에 정의된 본 발명의 의의, 범주 및 개념에 포함되는 것으로 간주된다.

**참고문헌**

<958> 다음의 참고문헌들은 본 명세서에 기술된 것에대한 예를 제공하거나 그밖의 상세한 것을 보충하는 정도로 본 명세서에 참고로 구체적으로 포함된다.



- Aerts *et al.*, *Plant J.*, 5:635-643, 1994.
- Agrawal, "NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides," *Phytochemistry*, 31:3307-3330, 1992.
- Aird, Hamill, Rhodes, "Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*," *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 15:47-57; 1988.
- Akiyama *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262:5592-5595, 1987.
- Allen *et al.*, "Leguminosae, A source book of characteristics uses and nodulation," The University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, 1981.
- Armitage, *In: Statistical Methods in Medical Research*, Wiley and Sons, New York, NY, p 205, 1971.
- Aron, R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:6769-6772 1980.
- Baba, Hanada, Hashimoto, "The study of ultraviolet B-induced apoptosis in cultured mouse keratinocytes and in mouse skin," *J. Dermatol. Sci.*, 12:18-23, 1996.
- Baxter, Price, Fenwick. "Sapogenin structure: analysis of the <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR spectra of soyasapogenol b," *J. Nat. Prod.*, 53:298-302, 1990.
- Bellacosa, Feo, Godwin, Bell, Cheng, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 64:280-285, 1995.
- Berton, Mitchell, Fischer, Lochniskar, "Epidermal proliferation but not the quantity of DNA photodamage is correlated with UV-induced mouse skin carcinogenesis," *Invest. Dermatol.*, 109:340-347, 1997.
- Beutler, Kashman, Pannell, Cardellina, Alexander, Balaschak, Prather, Shoemaker, Boyd, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 5:1509-1517, (1997).
- Boll and von Philipshorn, "NMR studies and the absolute configuration of *Solanum* alkaloids (spiroaminoketalalkaloids), *Acta Chem. Scand.*, 19:1365-1370, 1965.
- Brinkmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88(19):8616-8620, 1991.
- Burchell *et al.*, *J. Immunol.*, 131(1):508-513, 1983.

- Campbell. in *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam. Elsevier. 1984.
- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977.
- Capon and Thacker, "The nuclear magnetic resonance spectra of some aldofuranosides and acyclic aldose acetals," *Proc. Chem. Soc. Lond.*, 369, 1964.
- Chatterjee, Agarwal, Muhtar, "Ultraviolet B radiation-induced DNA lesions in mouse epidermis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 229:590-595, 1996.
- Cheatham *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:11696-11700, 1995.
- Cheeke. *Can. J. Animal Sci.*, 51:621-632. 1971.
- Chen and Snyder, "Diosgenin-bearing, molluscicidal saponins from *Allium vineale*: an NMR approach for the structural assignment of oligosaccharide units," *J. Org. Chem.*, 54:3679-3689, 1989.
- Chen and Snyder, "Molluscicidal saponins from *Allium vineale*," *Tetrahedron Lett.*, 28:5603-5606, 1987.
- Cho, Widholm, Tanaka, Nakanishi, Murooka, "*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus sinicus* (Chinese milk vetch)," *Plant Science*, 138:53-65;1998.
- Chou and Blenis, *Cell*, 85:573-583, 1996.
- Christey, "Transgenic crop plants using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation," Doran, P.M., (ed.) *Hairy roots: Culture and applications*, Harwood, Amsterdam, 99-111, 1997.
- Colcher *et al.*, *Cancer Res.*, 47:1185 and 4218, 1987.
- Coliart, Baeuerle, Vassalli, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1498-1506, 1990.
- Creelman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4938-4941, 1992.
- Davis & Preston *Analytical Biochemistry*, 116(2):402-407, 1981.
- Davis, Sinensky, Junker, *Pharmac. Ther.*, 43:221-36, 1989.
- Defago, *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, 87:79-132, 1977.
- Dillman *et al.*, *Antibody Immunocon. Radiopharm.*, 1:65-77, 1988.
- Doll, R. *et al.*, *Lancet* 1:793, 1962.
- Enari, Hug, Nagata, *Nature*, 375:78-81, 1995.

- Folkman, Haudenschild. Zetter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5217-5221, 1979.
- Franceschi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:6745-6749, 1991.
- Frechet, Christ. du Sorbier, Fischer, Vuilhorgne. "Four triterpenoid saponins from dried roots of *Gypsophila* species," *Phytochemistry*. 30:927-931, 1991.
- Gamborg, Miller, Ojima. "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells," *Exp. Cell Res.*, 50:151-158; 1968.
- Gariboldi, Verotta, Gabetta. "Saponins from *Crossopteryx febrifuga*," *Phytochemistry*, 29:2629-2635, 1990.
- Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3: 231-236, 1977.
- Ghose *et al.*, *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 3:262-359, 1987.
- Ghose, *et al.*, *Meth. Enzymology*, 93:280-333, 1983.
- Goding, 1986, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Academic Press, Orlando, Fla., pp. 60-61, and 71-74, 1986.
- Grant, Dommissie, Christey, Conner, "Gene transfer to plants using *Agrobacterium*," In: Murray, D.R., (ed.) *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*, CAB International, Wallingford. 1991:50-73.
- Gundalch *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2389-2393, 1992.
- Hamburger, Slacanin, Hostettmann, Dyatmiko, Sutarjadi. "Acetylated saponins with molluscicidal activity from *Sapindus rarak*: unambiguous structure determination by proton nuclear magnetic resonance and quantitative analysis," *Phytochem. Anal.*, 3:231-237, 1992.
- Hansen, Nielsen, Berg, *J. Immunological Methods*, 119:203-210, 1989.
- Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Harwood, Chandler, Pellarin, Bangerter, Wilkins. Long, Cosgrove, Malinow, Marzetta, Pettini, Savoy, Mayne, "Pharmacologic consequences of cholesterol absorption inhibition: alteration in cholesterol metabolism and reduction in plasma cholesterol concentration induced by the synthetic saponin  $\beta$ -tigogenin cellobioside (CP-88,818; tiqueside), *J. Lipid. Res.* 34:377-395, 1993.
- Hassanain, Dai, Gupta. *Anal. Biochem.*, 213:162-167, 1993.

- Hostettmann *et al.*, "Chemistry and pharmacology of natural products." In Saponins, Cambridge University Press, pp. 1-548, 1995.
- Hu, Alfermann, "Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*," *Phytochemistry*, 32(3):699-703; 1993.
- Huang *et al.*, *Zhongguo Yaoii Xuebao*, Chemical abstract No. 98100885, 3:286-288, 1982.
- Ikeda, Fujiwara, Kinjo, Nohara, Ida, Shoji, Shingu, Isobe, Kajimoto. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 68:3483-3490 (1995).
- Inoue, H., *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 6) 2:897-901, 1986.
- Jansakul, Baumann, Kenne, Samuelsson, "Ardisiacrispin A and B, two utero-contracting saponins from *Ardisia crispa*," *Planta Medica*. 53:405-409, 1987.
- Jiang, Massiot, Lavaud, *et al.*, "Triterpenoid glycosides from the bark of *Mimosa tenuiflora*," *Phytochemistry*, 30:2357-2360, 1991.
- Jung, Kwak, Kim, Lee, Choi, Lin, "Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source," *Biotech. Lett.*, 14:695-700; 1992.
- Kamel, Ohtani, Kurokawa, *et al.*, "Studies on *Balanites aegyptiaca* fruits, an antidiabetic Egyptian folk medicine," *Chem. Pharm. Bull.*, 39:1229-1233, 1991.
- Kasiwada *et al.*, *J. Org. Chem.*, 57:6946-6953, 1992.
- Kelly and Tsai, "Effect of pectin, gum arabic and agar on cholesterol absorption, synthesis and turnover in rats," *J. Nutr.*, 108:630-639, 1978.
- Kennedy, Wagner, Conzen, Jordan, Bellacosa, Tsihliis, Nissam, *Genes and Dev.*, 11:701-713, 1997.
- Kimura *et al.*, *Immunogenetics*, 11:373-381, 1983.
- Kinjo, Araki, Fukui, Higuchi, Ikeda, Nohara, Ida, Takemoto, Miyakoshi, Shoji, *Chem. Pharm. Bull.* 40(12):3269-3273 (1992).
- Kizu and Tomimori, "Studies on the constituents of *Clematis* species. V. On the saponins of the root of *Clematis chinensis* OSBECK," *Chem. Pharm. Bull.*, 30:3340-3346, 1982.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.

- Kohler and Milstein. *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Kojima and Ogura. "Configurational studies on hydroxy groups at C-2, 3 and 23 or 24 of oleanene and ursene-type triterpenes by NMR spectroscopy," *Phytochemistry*, 28:1703-1710, 1989.
- Kong *et al.*, *Phytochemistry*, 33:427-430, 1993.
- Konoshima and Sawada. *Chem. Pharm. Bull.*, 30:2747-2760, 1982.
- Kutney, "Nuclear magnetic resonance (N.M.R.) study in the steroidal sapogenin series. Stereochemistry of the spiro ketal system," *Steroids*, 2:225-235, 1963.
- Lemieux, Kullnig, Bernstein, Schneider, "Configurational effects on the proton magnetic resonance spectra of six-membered ring compounds," *J. Am. Chem. Soc.*, 80:6098-6105, 1958.
- Lister, P.R., P. Holford, T. Haigh, and D.A. Morrison. *Acacia in Australia: Ethnobotany and potential food crop*. p. 228-236. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Alexandria, VA, 1996.
- Lloyd, McCown, "Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture," *Comb. Proc.Intl.Plant Prop.Soc.*, 30:421-427; 1981.
- Mackness, Durrington, Converse, Skinner (Eds.), *In: Lipoprotein Analysis: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, p 1, 1992.
- Mahato, Pal, Nandy, *Tetrahedron*. 48:6717-6728 (1992).
- Manabe *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 104(3):445-454, 1984.
- Martin *et al.*, *J. Exp. Med.*, 182:1545-1556, 1995.
- Martin, Reueelingsperger, McGahon, Rader, van Schie, Laface, Green, *J. Exp.Med.*, 182:1545-1556, 1995.
- Massiot, Lavaud, Besson, Le Men-Olivier, van Binst, "Saponins from aerial parts of alfalfa (*Medicago sativa*)," *J. Agric. Food Chem.*, 39:78-82, 1991b.
- Massiot, Lavaud, Delaude, van Binst, Miller, Fales. "Saponins from *Tridesmostemon claessenssi*," *Phytochemistry*, 29:3291-3298, 1990.
- Massiot, Lavaud, Guillaume, Le Men-Olivier, van Binst, "Identification and sequencing of sugars in saponins using 2D <sup>1</sup>H NMR spectroscopy," *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1485-1487, 1986.



- Massiot, Lavaud, Le Men-Olivier, van Binst, Miller, Fales, "Structural elucidation of alfalfa root saponins by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance analysis," *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1:3071-3079, 1988.
- Massiot, Lavaud, Nuzillard, "Révision des structures des chrysantélines par résonance magnétique nucléaire," *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 127:100-107, 1991a.
- Miotti *et al.*, *Cancer Res.*, 65:826, 1985.
- Miyamoto, Togawa, Higuchi, Komori, Sasaki, "Six newly identified biologically active triterpenoid glycoside sulphates from the sea cucumber," *Cucumaria echinata. Annalen*, 453-460, 1990.
- Monk, "Variegation in epigenetic inheritance", *TIG*, 6:110-114, 1990.
- Mujoo, Maneval, Anderson, Gutterman, *Oncogene*, 12:1617-1623, 1996.
- Murashige, Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassay of tobacco tissue culture," *Physiol. Plant.*, 15:473-482; 1962.
- Murashige, T and Skoog, F. "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures," *Physiologia Plantarum* 15: 473-497, 1962.
- Nabel and Baltimore, *Nature* 326:711-713, 1987.
- Nagamoto *et al.*, *Planta Medica.*, 54:305-307, 1988.
- Nagao, Hachiyama, Oka, Yamauchi, "Studies on the constituents of *Aster tataricus* L. f. II. Structures of aster saponins isolated from the root," *Chem. Pharm. Bull.*, 37:1977-1983, 1989.
- Nelson, Futscher, Kinsella, Wymer, Bowden, "Detection of mutant Ha-ras genes in chemically initiated mouse skin epidermis before the development of benign tumors," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (14):6398-6402, 1992.
- Nishino, Manabe, Enoki, Nagata, Tsushida, Hamaya, "The structure of the tetrasaccharide unit of camellidins, saponins, possessing antifungal activity," *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 720-723, 1986.
- Nitsch, Nitsch, "Haploid plants from pollen grains," *Science*, 163:85-87, 1969.
- O'Reilly, Boehm, Shing, Fukai, Vasios, Lane, Flynn, Birkhead, Olsen, Folkman, *Cell*, 88:277-285, 1997.
- Oakenfull *et al.*, *Atherosclerosis*, 48:301 (1983).
- Ohkawa, Kamada, Sudo, Harada, "Effects of gibberellic acid on hairy root growth in *Datura innoxia*," *J. Plant Physiol.*, 134:633-636; 1989.

- Okabe, Nagao, Hachiyama, Yamauchi. "Studies on the constituents of *Luffa operculata* COGN. II. Isolation and structure elucidation of saponins in the herb," *Chem. Pharm. Bull.*, 37:895-900, 1989.
- Okada, Koyama, Takahashi, Okuyama, Shibata. *Planta Med.* 40:185-192. (1980).
- Okada, Sakuma, Fukui, Hazeki, Ui, *J. Bio. Chem.*, 269:3563-3567, 1994.
- Pallavicini. In: *Techniques in Cell Cycle Analysis*, Gray and Parzynkiewicz (Eds.), Humana Press Inc., Clifton, NJ, pp. 139, 1987.
- Pant, Panwar, Negi, Rawat, Morris, Thompson, "Structure elucidation of a spirostanol glycoside from *Asparagus officinalis* fruits by concerted use of two-dimensional NMR techniques." *Mag. Reson. Chem.*, 26:911-918, 1988.
- Penders, Delaude, Pepermans, van Binst. "Identification and sequencing of sugars in an acetylated saponin of *Blighia welwitschii* by N.M.R. spectroscopy," *Carbohyd. Res.*, 190:109-120, 1989.
- Pietenpol *et al.*, *Cancer Res.*, 55:1206-1210, 1995.
- Pieterez *et al.*, *Antibody Immunoconj. Radiopharm.*, 1:79-103, 35, 1988.
- Pisha *et al.*, *Nature Medicine*, 1:1046-1051, 1995.
- Polyak *et al.*, *Genes Dev.*, 8:9-22, 1994.
- Potterat, Hostettmann, Stoeckli-Evans, Saadou, "Saponins with an unusual secoursene skeleton from *Sesamum alatum* THONN., *Helv. Chim. Acta*, 75:833-841, 1992.
- Prehn. "Regeneration versus neoplastic growth," *Carcinogenesis*, 18(8):1439-1444, 1997.
- Puri, Wong, Puri, "Solasodine and diosgenin:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments by two-dimensional NMR spectroscopy," *Mag. Res. Chem.*, 31:278-282, 1993.
- Reeves, Nielson, Fahey, *Am. Inst. Nutr.*, 1939, 1993.
- Reisfeld *et al.*, *Melanoma Antigens and Antibodies*, p. 317, 1982.
- Reznicek, Jurenitsch, Kubelka, Michl, Korhammer, Haslinger, "Isolierung und Struktur der vier Hauptsaponine aus *Solidago gigantea* var. *serotina*," *Annalen*, 989-994, 1990.
- Reznicek, Jurenitsch, Michl, Haslinger. "The first structurally confirmed saponin from *Solidago gigantea*: structure elucidation by modern NMR techniques," *Tetrahedron Lett.*, 30:4097-4100, 1989b.

- Reznicek, Jurenitsch, Robien, Kubelka, "Saponins in *Cyclamen* species: configuration of cyclamiretin C and structure of isocyclamin." *Phytochemistry*, 28:825-828, 1989a.
- Rhodes, *et al.*, "Influence of exogenous hormones on the growth and secondary metabolite formation in transformed root cultures." *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 38:143-151; 1994.
- Rodríguez, Castro, Riguera, "Holothurinosides: new anti-tumour non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Holothuria forskalii*," *Tetrahedron*, 47:4753-4762, 1991.
- Royal I and Park M, *J. Biol. Chem.* 270:27780-27787, 1995.
- Sasaki, Udagawa, Ishimaru, Hayashi, Alfermann, Nakanishi, Shimomura, "High forskolin production in hairy roots of *Coleus forskohlii*," *Plant Cell Reports* 17:457-459, 1998.
- Sashida, Kawashima, Mimaki, "Novel polyhydroxylated steroidal saponins from *Allium giganteum*," *Chem. Pharm. Bull.*, 39:698-703, 1991.
- Schenk, Hilderbrandt, "Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures," *Can. J. Bot.*, 50:199-204; 1972.
- Schöpke, Wray, Rzazewska, Hiller, "Bellissaponins BA<sub>1</sub> and BA<sub>2</sub>, acylated saponins from *Bellis perennis*," *Phytochemistry*, 30:627-631, 1991.
- Schreiber, Matthias, Muller, Schaffner, *Nucleic Acids Res.* 17:6419, 1989.
- Schuh *et al.*, "Obligatory wounding requirement for tumorigenesis in *v-jun* transgenic mice," *Nature*, 346:756-760, 1990.
- Shao, Kasai, Xu, Tanaka, "Saponins from roots of *Kalopanax septemlobus*. (THUNB.) KOIDZ., Ciqiu: structures of kalopanaxsaponins C, D, E and F," *Chem. Pharm. Bull.*, 37:311-314, 1989.
- Shayesteh, Lu, Kuo, Baldocchi, Godfrey, Collins, Pinkel, Powell, Mills, Grey, *Nat. Gent.*, 21:99-102, 1999.
- Shepard *et al.*, *J. Clin. Immunol.*, 11:117-127, 1991.
- Shirazi, Liu, Trott, "Exposure to ultraviolet B radiation increases the tolerance of mouse skin to daily X-radiation," *Rad. Res.*, 145:768-775, 1996.

- Sieweke *et al.*, "Mediation of wound-related rous sarcoma virus tumorigenesis by TGF- $\beta$ ," *Science*, 248:1656-1660, 1990.
- Smith, Weathers, Cheetham, "Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: growth and artemisinin production," *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 33:75-79, 1997.
- Spady, Wollett, Dietschy, *Annu. Rev. Nutr.*, 13:355, 1993.
- Steel and Torrie, *In: Principals and Procedures of Statistics*, 2nd Ed., McGraw-Hill, New York, p 383, 1980.
- Stevenson *et al.*, *Chem. Immunol.*, 48:126-166, 1990.
- Takema, Fujimura, Ohsu, Imokawa, "Unusual wrinkle formation after temporary skin fixation followed by UVB irradiation in hairless mouse skin." *Exp. Dermatol.*, 5:145-149, 1996.
- Tewari, Quan, Rourke, Zeng, Beidler, Salvesan, Dixit, "Yama/PPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase," *Cell*, 81:801, 1995.
- Thompson *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarker Prevent.*, 1:597- 602, 1992.
- Thor *et al.*, *Cancer Res.*, 46:3118, 1986.
- Tomas-Barbaren *et al.*, *Planta Medica.*, 54:266-267 (1988).
- Tori and Aono, *Ann. Rept. Shionogi Res. Lab.*, 14:136, 1964.
- Vaickus *et al.*, *Cancer Invest.*, 9:195-209, 1991.
- Vazquez, Quinoa, Riguera, San Martin, Darias, "Santiagoside, the first asterosaponin from an Antarctic starfish (*Neosmilaster georgianus*)," *Tetrahedron*, 48:6739-6746, 1992.
- Vlahos and Matter, *FEBS Lett.*, 309:242-248, 1992.
- Vlahos, Matter, Hui, Brown, *J. Bio. Chem.*, 269:5241-5248, 1994.
- Waltho, Williams, Mahato, Pal, Barna, "Structure elucidation of two triterpenoid tetrasaccharides from *Androsace saxifragifolia*," *J. Chem. Soc., Perkin* 1:1527-1531, 1986.
- Wang, He, Ling, Li, "Chemical study of *Astragalus* plant. II. Structures of aernestioside A and B, isolated from *Astragalus ernestii* COMB. *Huaxue Xuebao*, 47:583-587, *Chem. Abstr.*, 1989.
- Weng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:5744-5748, 1995.

<967>

White, *Genes Dev.*, 10:1-15, 1996.

Whitman M. Kaplan D.R., Schatthausen B. Cantley L. C. and Roberts, T. M. *Nature*, 315: 239-242, 1985.

Willker and Leibfritz, "Complete assignment and conformational studies of tomatine and tomatidine." *Mag. Res. Chem.*, 30:645-650, 1992.

Wyllie, *Anticancer Res.*, 5:131-136, 1985.

Wysokinska, Chmiel. "Transformed root cultures for biotechnology," *Acta Biotechnol.*, 17:131-159; 1997.

Yang et al., *Anticancer Res.*, 15:2479-2488, 1995.

Yoshikawa, Shimono, Arihara, "Antisweet substances, jujubasaponins I-III from *Zizyphus jujuba*. Revised structure of ziziphin," *Tetrahedron Lett.*, 32:7059-7062, 1991.

Yoshikawa, Suzaki, Tanaka, Arihara, Nigam, *J. Nat. Prod.*, 60:1269-1274 (1997).

Youn, Park, Chung, Lee, *Photodermatol Photoimmunol. Photomed.*, 13:109-114, 1997.

Yukimune et al., *Nature Biotech.*, 14:1129-1132, 1996.

Zobel, "Study-state control and investigation of root system morphology," In: Torrey J.G., Winship, L.J. (eds.) *Applications of continuous and steady-state methods to root biology*, Kluwer, Amsterdam, 165-182, 1989.

<968>

**도면의 간단한 설명**

- <77> 이하의 도면은 본 명세서의 일부분을 구성하며, 본 발명의 특정한 관점을 추가로 설명하기 위해 포함된다. 본 발명은 본 명세서에 제시된 구체적인 양태의 상세한 설명과 함께 이들 도면 하나 이상을 참고로하여 더 잘 이해될 수 있다.
- <78> 도 1은 사람 종양세포주에 대한 UA-BRF-004-DELEP-F001의 효과를 나타낸 것이다. 도 1은 콩과식물 조 추출물로 처리된 난소 (SK-OV-3, HEY, OVCAR-3), 유방 (MDA-468), 흑색종 (A375-M, Hs294t) 및 사람 유포피종 (A431) 세포주에 의해 나타나는 성장 억제를 설명하는 것이다.
- <79> 도 2는 형질전환 및 비형질전환된 세포주에 대한 UA-BRF-004-DELEP-F023 (분획 23)의 효과를 나타낸 것이다. 도 2는 난소 (SK-OV-3, OCC1, HEY, OVCAR-3), T-세포 백혈병 (Jurkat), 전립선 (LNCaP), 신선한 사람 난소종양 세포 (FTC), 사람 섬유아세포 (FS) 및 내피 (HUVEC) 세포에 대해 분획 23에 의해 나타나는 세포독성을 설명하는 것이다. 종양 세포의 경우 50 내지 95%의 세포독성이 나타나는 반면, 비형질전환된 세포에 대해서는 단지 15 내지 17%의 세포독성이 나타난다.
- <80> 도 3은 사람 종양세포주에 대한 분획 35 ("UA-BRF-004-DELEP-F035" 또는 "F035")의 효과를 나타낸 것이다. 도 3은 분획 35 처리된 사람 난소 (HEY, OVCAR-3, C-1, SK-OV-3), 췌장 (PANC-1) 및 신장 (769-P, 786-O, A498) 세포주에 의해 나타나는 세포독성을 설명하는 것이다. 세포주에 대한 IC<sub>50</sub>은 1-6 µg/ml의 범위이다.
- <81> 도 4는 백혈병 세포주에 대한 분획 35의 효과를 나타낸 것이다. 도 4는 분획 35가 저켓 (Jurkat; T-세포 백혈병) 세포에 대해서는 130 ng/ml의 IC<sub>50</sub>으로, REH, KG-1 및 NALM-6 (B-세포 백혈병) 세포에 대해서는 1-3 µg/ml 범위의 IC<sub>50</sub>으로 강력한 세포독성을 나타냄을 보여준다.
- <82> 도 5는 내피세포 증식에 대한 분획 35의 효과를 나타낸 것이다. 도 5는 분획 35가 bFGF에 의한 자극이 있거나 없는 상태에서 내피세포 증식의 강력한 억제제임을 나타낸다.
- <83> 도 6은 모세혈관 내피세포의 유주 (migration)에 대한 분획 35의 효과를 나타낸 것이다. 도 6은 모세혈관 내피세포의 유주에 대한 영향이 없음을 나타내며, 이것은 독성이 없음을 시사하는 것이다.
- <84> 도 7은 실생 및 유합조직 추출물의 박층크로마토그래피를 나타낸 것이다. 라인 1, BA-IAA 배지 상에서 발육한 줄기 유합조직; 라인 2, BA-IAA 배지 상에서 발육한 뿌리 유합조직; 라인 3, 배축 (hypocotyl) 유합조직; 라인 4, 반고형 배지 상에서 메틸자스모네이트 (100 µM)로 처리된 실생; 라인 5, 반고형 배지 상에서 성장하는 대조

용 실생; 라인 6, 표준 F023; 라인 7, BA 배지 상에서 발육한 어린싹 (shoot); 라인 8, 50  $\mu\text{M}$  메틸자스모네이트로 처리된 실생; 라인 9, 100  $\mu\text{M}$  메틸자스모네이트로 처리된 실생; 라인 10, 200  $\mu\text{M}$  메틸자스모네이트로 처리된 실생; 라인 11, 대조용 실생; 및 라인 12, 표준 F023.

- <85> 도 8은 좌측에는 센카 (SENCAR) 마우스의 사진을 나타내었으며, 우측에는 센카 및 C57B1의 교잡종 (cross)의 사진을 나타내었다. 두가지 모두 8주 동안 반복적인 100 nmoI DMBA 투여량으로 처리한다. 15주 짜에, 둘다 다수의 유두종을 가졌지만, 센카와 C57B 마우스의 교잡종은 더 소수의 더 작은 유두종을 나타내었다. C57B1 균주는 발암성에 대해서 저항성이 있으며, 종양을 발생시키지 않는다.
- <86> 도 9A 내지 도 9F는 아세톤, DMBA 또는 DMBA + UA-BRF-004-DELEP-F035로 처리된 마우스의 표피 절편을 나타낸 것이다. 도 9A: 아세톤 처리 4주 짜. 도 9B: 아세톤 처리 8주 짜. 도 9C: DMBA 처리 4주 짜. 도 9D: DMBA 처리 8주 짜. 도 9E: DMBA + UA-BRF-004-DELEP-F035 처리 4주 짜. 도 9F: DMBA + UA-BRF-004-DELEP-F035 처리 8주 짜.
- <87> 도 10A, 10B는 4주 후에 UA-BRF-004-DELEP-F035의 DNA에 대한 항산화효과를 나타낸 것이다. 도 10A는 저농도의 UA-BRF-004-DELEP-F035 (0.1 mg/0.2 ml)로 처리한 후의 항산화효과를 나타낸 것이다. 도 10B는 고농도의 UA-BRF-004-DELEP-F035 (0.3 mg/0.2 ml)로 처리한 후의 항산화효과를 나타낸 것이다.
- <88> 도 11A, 11B는 DMBA 및 UA-BRF-004-DELEP-F035로 처리한 지 4주 후의 표피 두께를 나타낸 것이다. 도 11A는 저농도의 UA-BRF-004-DELEP-F035 (0.1 mg/0.2 ml)로 처리한 후의 표피 두께에 대한 효과를 나타낸 것이다. 도 11B는 고농도의 UA-BRF-004-DELEP-F035 (0.3 mg/0.2 ml)로 처리한 후의 표피 두께에 대한 효과를 나타낸 것이다.
- <89> 도 12는 UA-BRF-004-DELEP-F035의 저농도 (0.1 mg/0.2 ml) 또는 고농도 (0.3 mg/0.2 ml)에서 DMBA로 처리한 지 4주 후의 표피 두께에 있어서의 증가율을 나타낸 것이다.
- <90> 도 13은 UA-BRF-004-DELEP-F035의 저농도 (0.1 mg/0.2 ml) 또는 고농도 (0.3 mg/0.2 ml)에서 DMBA로 처리한 지 8주 후의 유두종에 있어서의 감소율을 나타낸 것이다.
- <91> 도 14는 마우스 H-ras 코돈 61 돌연변이의 증폭을 나타내는 PCR 반응의 자가방사기록 (autoradiograph)을 나타낸 것이다.
- <92> 도 15는 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 생물학적 활성 트리테르펜 화합물을 정제 및 분리하는데 사용된 초기방법을 나타낸 것이다.
- <93> 도 16은 아카시아 빅토리아에 (*Acacia victoriae*)로부터 활성 구성성분을 정제, 분리 및 특정화하기 위한 일반적인 개선된 방식을 나타낸 것이다.
- <94> 도 17A, 17B에서 도 17A는 분획 94 ("UA-BRF-004Pod-DELEP-F094" 또는 F094)에서 동정되는 가수분해된 활성 구성성분으로부터 분리된 아실화된 당의 HPLC 스펙트럼을 나타낸 것이며, 도 17B는 F094에서 동정된 가수분해된 활성 구성성분으로부터 분리된 아세틸화된 당의 HPLC 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- <95> 도 18A 내지 18F에서 도 18A는 UA-BRF-004-DELEP-F035 및 F035-B2의 HPLC 스펙트럼을 나타낸 것이며; 도 18B는 UA-BRF-004Pod-DELEP-F094의 HPLC 스펙트럼을 나타낸 것이며; 도 18C는 F140의 HPLC 스펙트럼을 나타낸 것이고; 도 18D는 F142의 HPLC 스펙트럼을 나타낸 것이며; 도 18E는 F144의 HPLC 스펙트럼을 나타낸 것이고; 도 18F는 F145의 HPLC 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- <96> 도 19A, 19B는 분획 35에 의한 전 및 후처리 (48시간)된 OVCAR-3 세포의 세포주기 (cell cycle) 분석을 나타낸 것이다. 도면에서는 분획 35에 의해 후처리된 세포주기의 G1 단계에서는 세포의 수가 약 8% 증가하고 S 단계에서는 약 10% 감소가 있었으며, 이것은 G1 정지를 나타내는 것이다. 도 19A는 비처리된 OVCAR-3 종양세포의 세포주기 분석을 나타낸 것이고, 도 19B는 분획 35로 처리된 OVCAR-3 종양세포의 세포주기 분석을 나타낸 것이다.
- <97> 도 20은 UA-BRF-004-DELEP-F035 및 UA-BRF-004Pod-DELEP-F094에 대한 세포의 노출에 의한 TNF 활성화된 NF-KB의 현저한 억제를 입증하는 EMSA를 나타낸 것이다. 처리는 다음과 같이 한다: 라인 1, 비처리; 라인 2, TNF (100 pM); 라인 3, UA-BRF-004-DELEP-F035 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 라인 4, TNF + F035 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 라인 5, F035 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 라인 6, TNF + F035 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 라인 7, F094 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 라인 8, TNF + F094 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 라인 9, F094 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 라인 10, TNF + F094 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).
- <98> 도 21은 UA-BRF-004-DELEP-F035 및 워트만닌 (wortmannin)에 의한 PI3-키나제의 억제를 입증하는 지질 키나제



검정을 나타낸 것이다.

- <99> 도 22는 포스포-특이적 AKT 및 총 AKT 항체를 사용하여 웨스턴-ECL에 의해 분석된 SDS-PAGE 겔을 나타낸 것이다. UA-BRF-004-DELEP-F035 1 및 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 세포를 후처리하면 AKT 인산화 (활성 AKT)의 현저한 억제기가 야기되었으며, 이것은 워트만닌 1  $\mu\text{M}$ 에 의한 세포의 2시간 처리와 유사하다.
- <100> 도 23은 4개의 독립적으로 형질전환된 뿌리 염색체로부터 유래한 *rol B* 유전자의 일부분의 PCR™ 증폭을 설명하는 것이다. 레인, L-R, 1: Kb 래더 (ladder), 2: 포지티브 대조군 (R1000 균주로부터 유래한 플라스미드 DNA), 3: 네가티브 대조군 (비형질전환된 뿌리로부터 유래한 DNA), 4-7: 4개의 독립적으로 형질전환된 뿌리 염색체. 포지티브 대조군 및 형질전환된 뿌리에서 645 bp 단편의 증폭이 나타난다.
- <101> 도 24는 엘립토사이드 (Elliptoside) A 및 엘립토사이드 B의 구조를 나타낸 것이다 (Beutler, 1997).
- <102> 도 25는 F094의 구성성분의 HPLC 분리를 나타낸 것이다.
- <103> 도 26은 F035의 구성성분의 HPLC 분리를 나타낸 것이다.
- <104> 도 27은 F094의 반-정제용 (semi-prep) HPLC에 의한 제 1 분획화를 나타낸 것이다.
- <105> 도 28은 F094의 반-정제용 HPLC에 의한 제 2 분획화를 나타낸 것이다.
- <106> 도 29는 F094의 예비-분획화를 나타낸 것이다.
- <107> 도 30은 예비-분획 D의 분석을 나타낸 것이다.
- <108> 도 31은 예비-분획 G/H의 분석을 나타낸 것이다.
- <109> 도 32는 2차 PFP 칼럼 정제 후의 화합물 G1을 나타낸 것이다.
- <110> 도 33은 최종 C-18 정제 후의 화합물 G1을 나타낸 것이다,
- <111> 도 34는 워터스 (Waters) C-18 칼럼 정제 후의 화합물 D1을 나타낸 것이다.
- <112> 도 35는 최종 C-18-Aq 정제 후의 화합물 D1을 나타낸 것이다.
- <113> 도 36은 화합물 D1의 분해로부터 유래한 화합물을 도시한 것이다.
- <114> 도 37은 화합물 G1의 분해로부터 유래한 화합물을 도시한 것이다.
- <115> 도 38은 화합물 B1의 분해로부터 유래한 화합물을 도시한 것이다.
- <116> 도 39는 트리테르펜 글리코시드 D1의 구조이다.
- <117> 도 40은 트리테르펜 글리코시드 G1의 구조이다.
- <118> 도 41은 트리테르펜 글리코시드 B1의 구조이다.
- <119> 도 42는 암 및 정상 세포주의 트리테르펜 글리코시드의 혼합물 (F035)의 효과를 나타낸 것이다. F035는 실시예에 기술된 방법에 의하여 세포독성에 대하여 평가한다. F035의 활성은 도면에 도시된 암 및 정상 세포주의 판넬 상에서 검사한다. 암 세포주에 대한 IC<sub>50</sub>은 0.2-5.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  범위이다. 정상 및 불멸화된 (immortalized) 세포주에 대해 유의적인 세포독성은 관찰되지 않았다 (IC<sub>50</sub> 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  내지 > 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).
- <120> 도 43은 사람 암 세포주에 대한 정제된 트리테르펜 글리코시드 D1 및 G1의 세포독성 프로필을 나타낸 것이다. 정제된 추출물은 다음과 같은 사람 암 세포주에 대한 그들의 활성에 대하여 평가한다: 저켓 (T-세포 백혈병), C-2 헤이 (Hey) 변이체 (난소), 769-P (신장), MDA-MB-231, MDA-MB-453 (유방). 결과는 평균+SEM으로 나타내었다.
- <121> 도 44A 내지 44E는 세포소멸에 대한 정제된 화합물 D1 및 G1 및 트리테르펜 글리코시드의 혼합물 (F035)의 효과를 나타낸 것이다. 세포소멸은 세포를 아넥신 V-FITC로, DNA 함량에 대해서는 프로피듐요다이드 (PI)로 염색하고 유동 세포계산을 사용하여 분석하는 아넥신 V 결합시험을 이용하여 측정한다. 세포는 추출물 0.5-1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 함께 16시간 동안 배양한다. 처리한 지 16시간 후에, 세포의 3개의 집단이 관찰되었다: 사멸하였거나, 세포소멸의 최종단계에 있는 세포 (아넥신 V-FITC 및 PI 포지티브), 세포소멸이 진행중인 세포 (아넥신 V-FITC 포지티브 및 PI 네가티브) 및 생존하고 세포소멸이 진행되지 않은 세포 (아넥신 V-FITC 및 PI 네가티브; 좌하단의

사분면).

<122> 도 45A, 45B는 PI3-키나제 활성화 및 AKT 인산화의 억제를 나타낸 것이다. 포스파티딜이노시톨 (PI)을 인산화시키는 능력은 세포 용해물로부터의 p85 단백질 면역침강물에 대해서 측정한다. 시험관내 키나제 측정시험의 자가방사기록은 저켓 세포를 사용한 p85 면역침강물에 대한 박층크로마토그래피 상에서 분리한다. 도 45B는 조약한 트리테르펜 글리코시드 및 순수한 트리테르펜 글리코시드에 의한 Ser-473 및 Thr-308 상에서의 AKT 인산화의 억제를 나타낸 것이다. 저켓 세포는 D1 및 G1의 조 추출물 (F035) 및 정제된 추출물과 함께 37°C에서 16시간 동안 배양한다. 세포 용해물을 9% SDS-PAGE 상에서 분리하고 프로브로서 안티 Ser-473, Thr-308 및 총 AKT 항체를 사용한 웨스턴 블롯-ECL 분석에 의해 분석한다.

<123> 도 46A 내지 46D는 트리테르펜 글리코시드에 의한 TNF-유도된 NF-KB의 억제 및 iNOS의 유도를 나타낸 것이다. 저켓 세포는 다양한 농도의 F035 (1-4 µg/ml; 도 46A) 및 순수한 추출물 2 µg/ml (D1 및 G1; 도 46B)에 16시간 동안 노출시키고 NF-KB를 TNF 100 pM으로 37°C에서 15분 동안 활성화시킨다. DNA-단백질 복합체를 7.5% 천연 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리시키고, 방사성 밴드를 포스포이메저 (PhosphoImager)로 가시화시키고 정량한다. NOS는 방법 항에서 기술하는 바와 같이 U-937 (도 46C) 및 저켓 (도 46D)에서 유도한다. 세포성 단백질을 SDS-PAGE 상에서 분리하여 안티-iNOS 항체를 사용한 웨스턴 블롯-ECL을 이용하여 분석한다.

<124> 도 47은 저켓 세포에서 PARP의 분해에 대한 F035 및 D1의 영향을 나타낸 것이다.

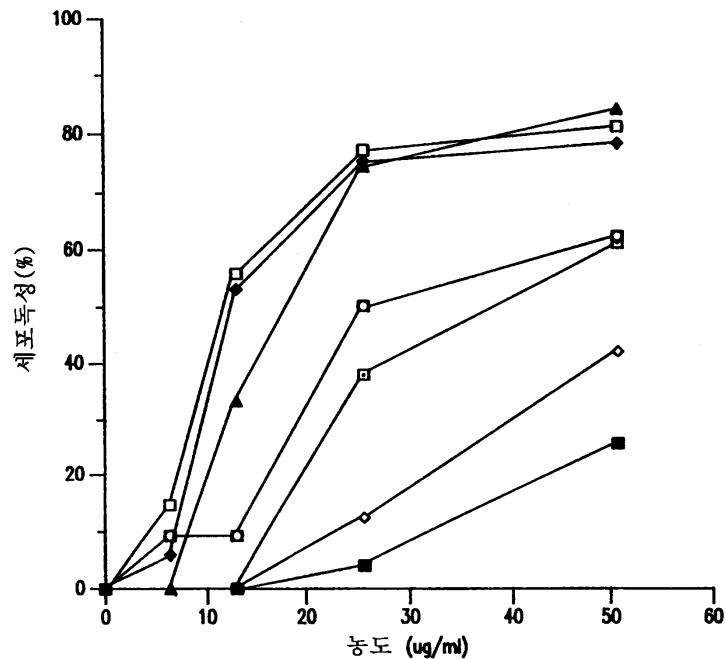
<125> 도 48은 저켓 세포에서 F035 유도된 PARP의 분해에 대한 z-vad fmk의 영향을 나타낸 것이다.

<126> 도 49는 저켓 세포에서 카스파제 활성화에 대한 F035, F094, D1 및 G1의 영향을 나타낸 것이다.

<127> 도 50은 저켓 미토콘드리아로부터의 시토크롬 C 유리에 대한 F035의 영향을 나타낸 것이다.

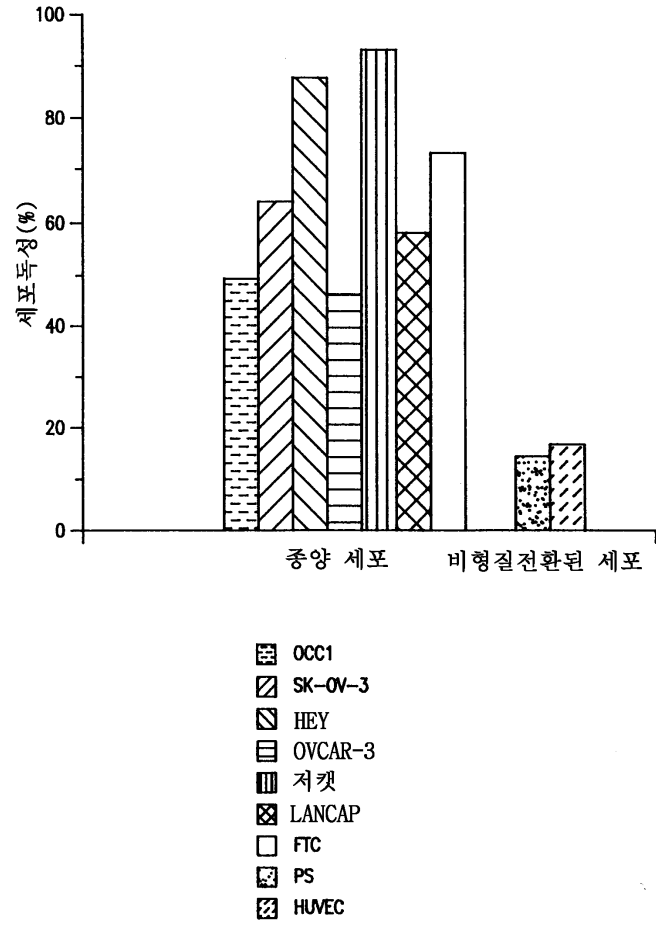
도면

도면1

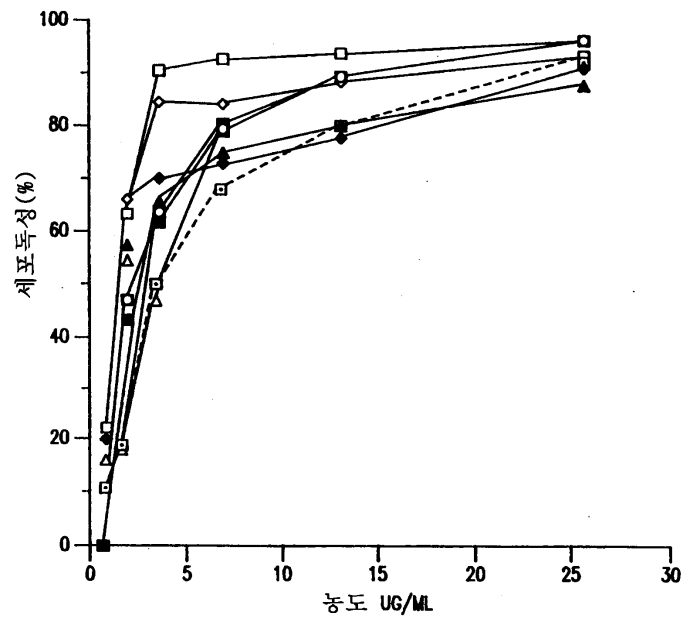


- SK-OV-3
- ◆— HEY
- ◻— OVCAR-3
- ◇— MDA-468
- A375-M
- ◻— HS294T
- ▲— A431

도면2

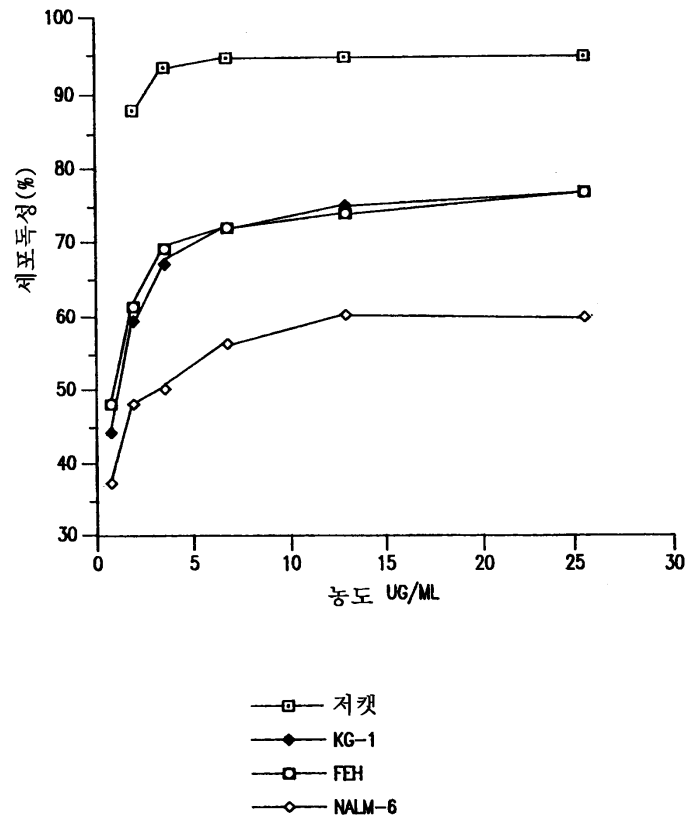


도면3

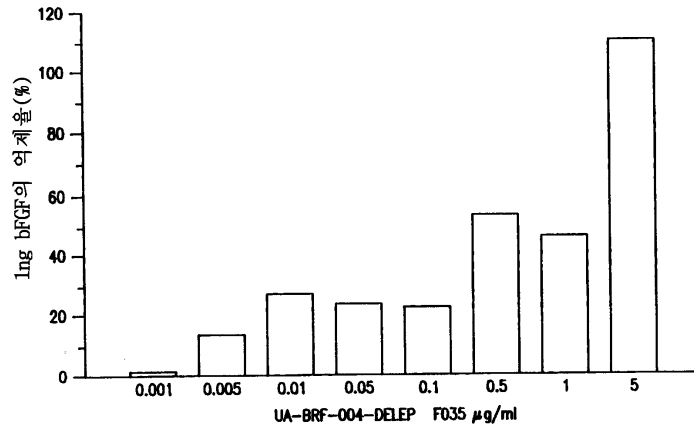


- HEY
- ◆— OVCAR-3
- C-1
- ◇— SKOV-3
- PANC-1
- 769-P
- ▲— 786-O
- △— A498

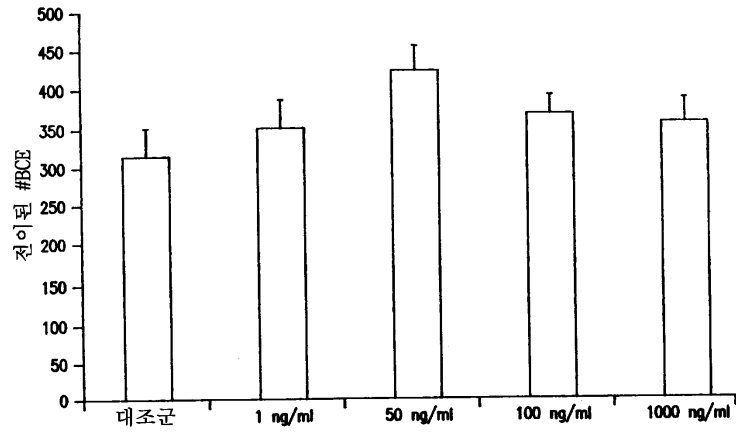
도면4



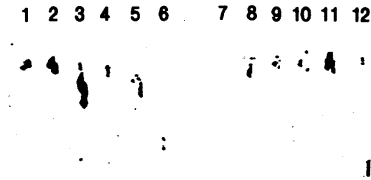
도면5



도면6



도면7



도면8





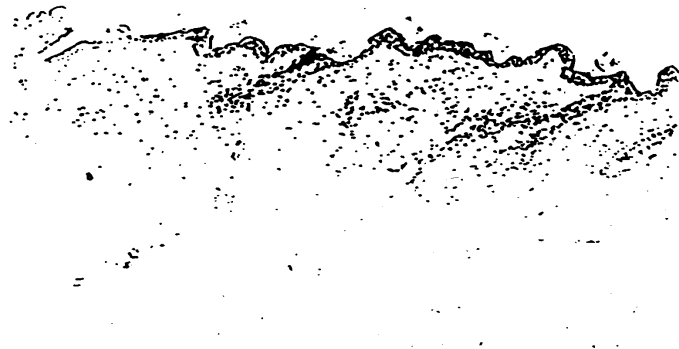
도면9A

투여량: 0.2ml      아세트 4주      마우스 # 133



도면9B

투여량: 0.2ml      아세트 8주      마우스 # 150



도면9C

투여량: 100nmol      DMBA 4주      마우스 #130



도면9D

투여량: 100nmol      DMBA 8주      마우스 #149



도면9E

투여량: 0.3mg      화합물 #35 4주      마우스 #136

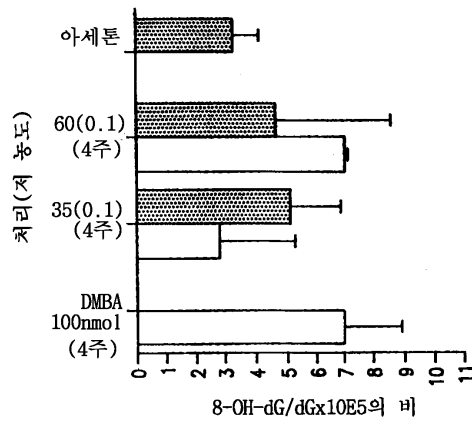


도면9F

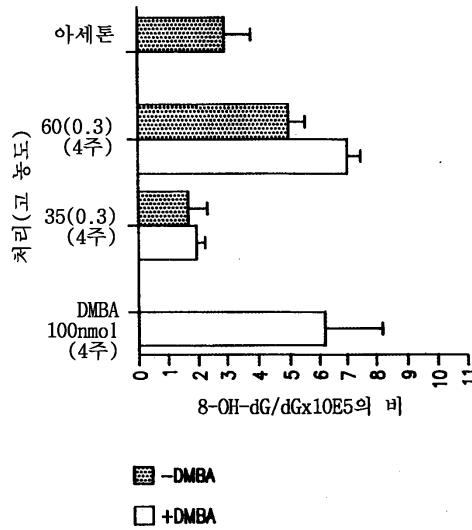
투여량: 0.3mg      화합물 #35 + DMBA 8주      마우스 #140



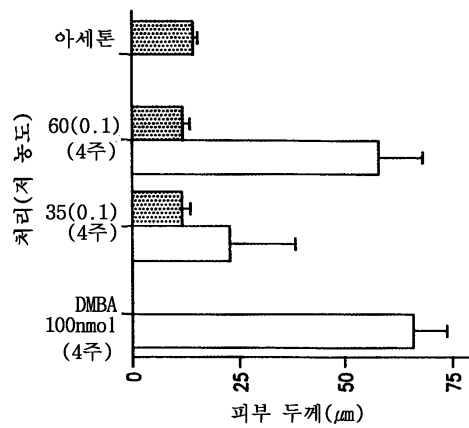
도면10A



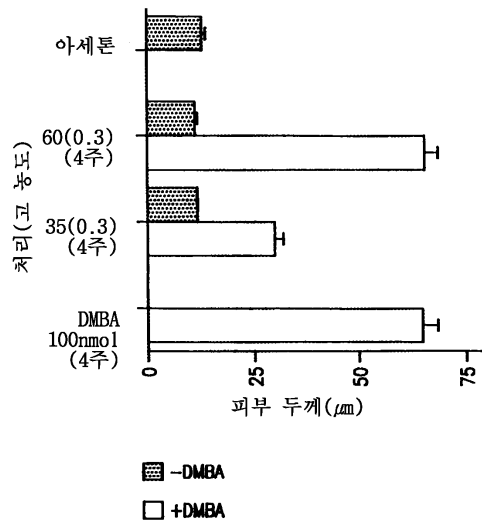
도면10B



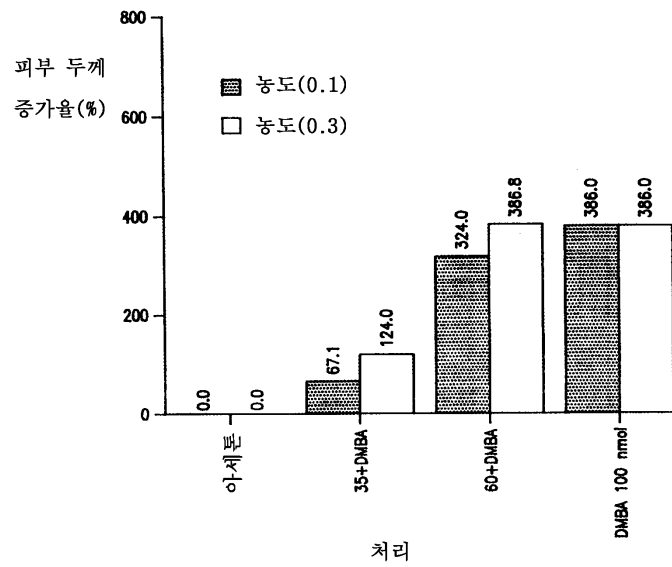
도면11A



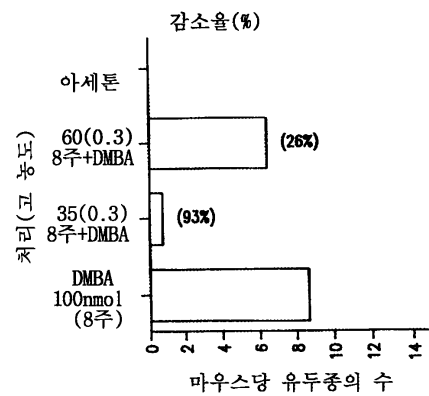
도면11B



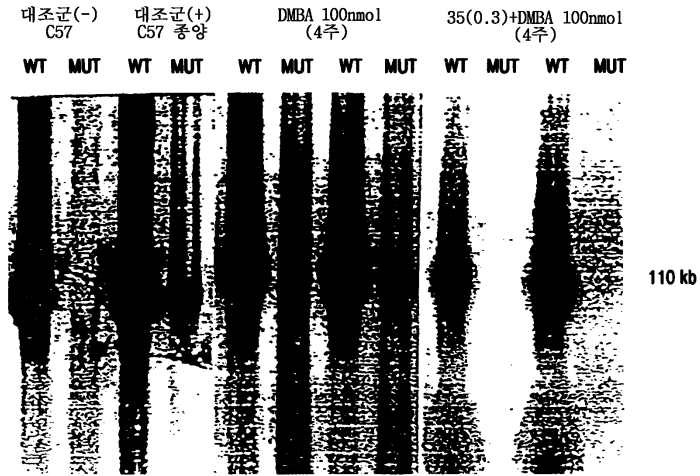
도면12



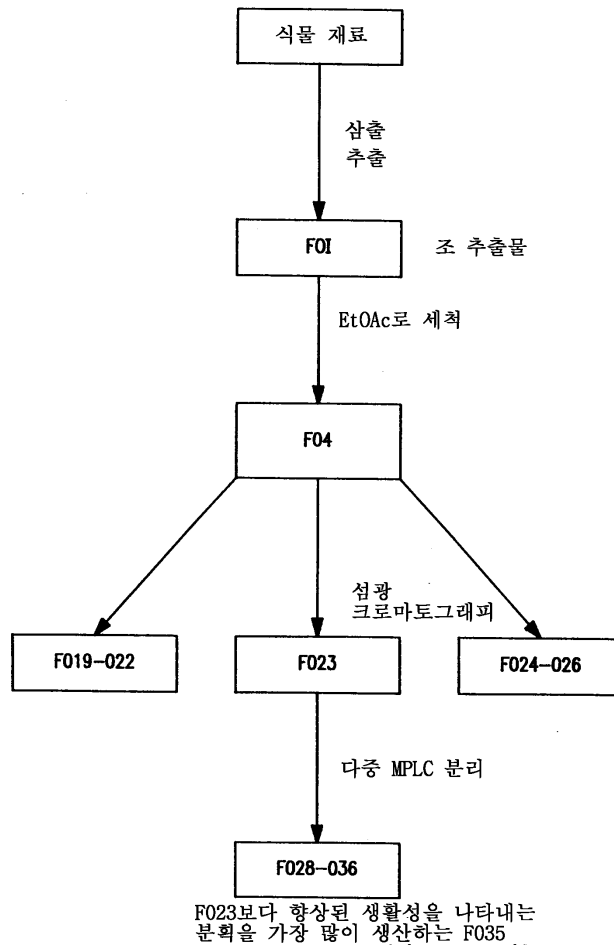
도면13



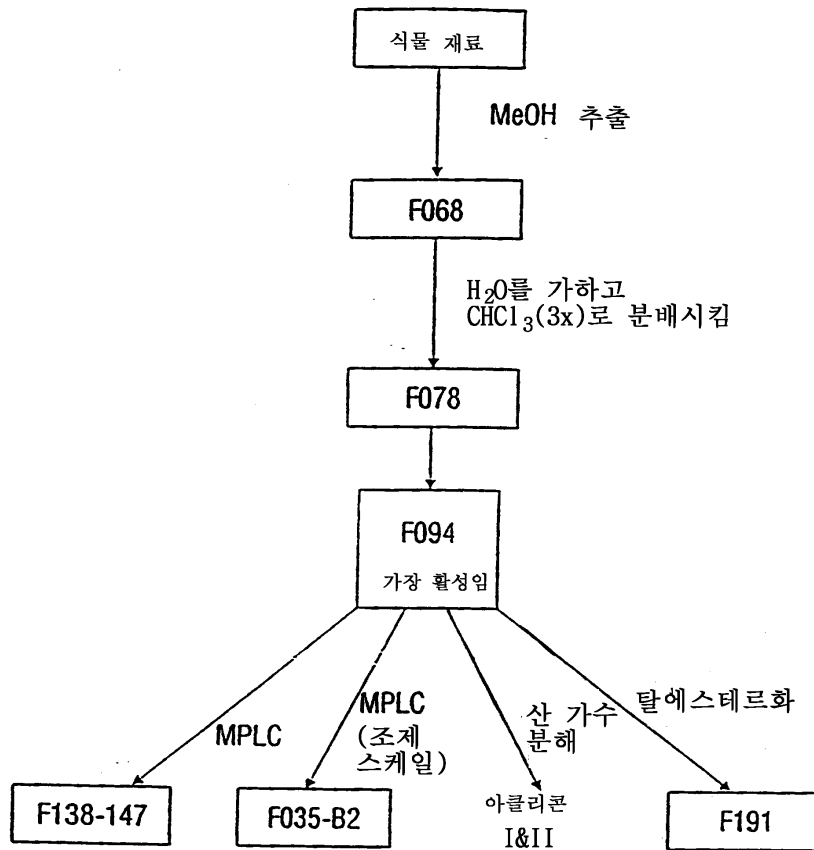
도면14



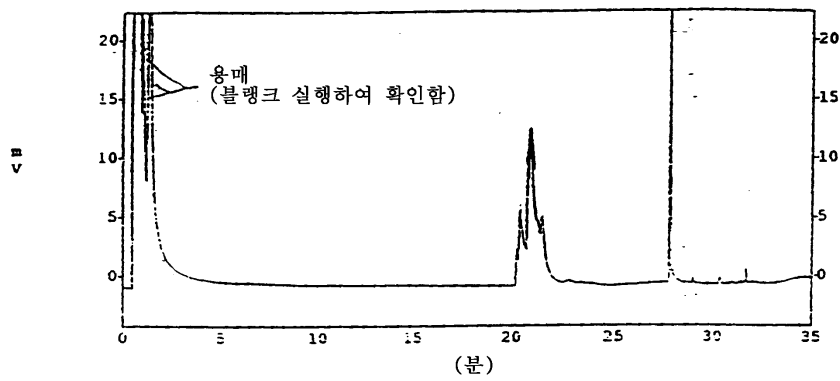
도면15



도면16

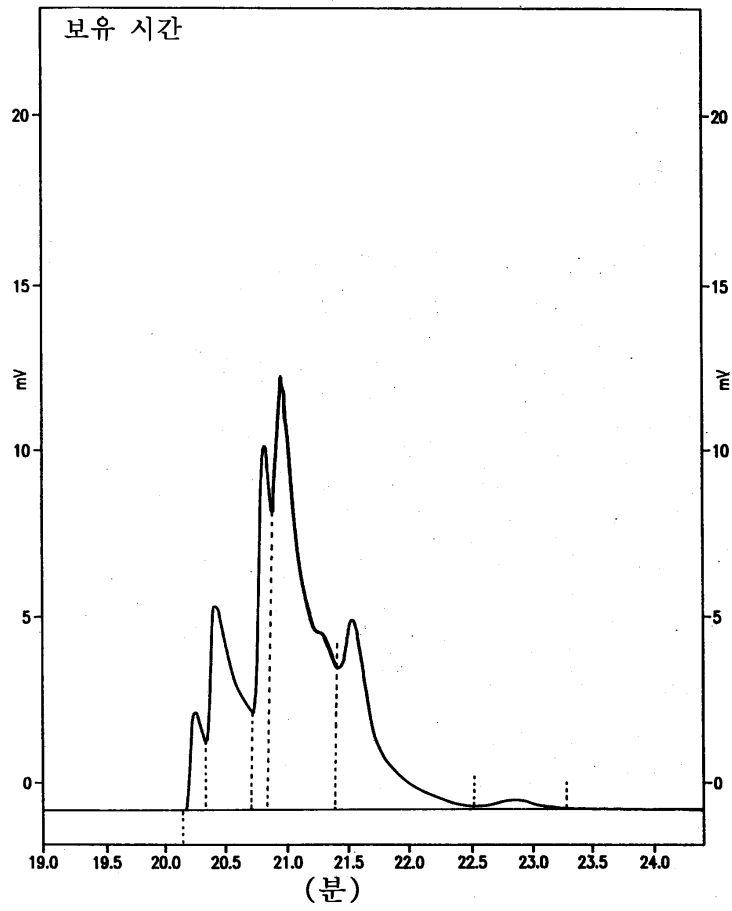


도면17A

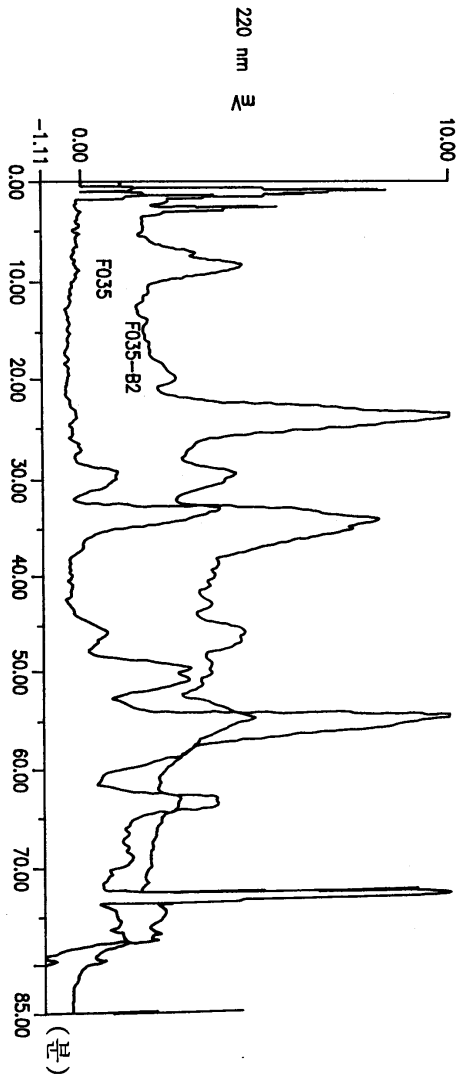




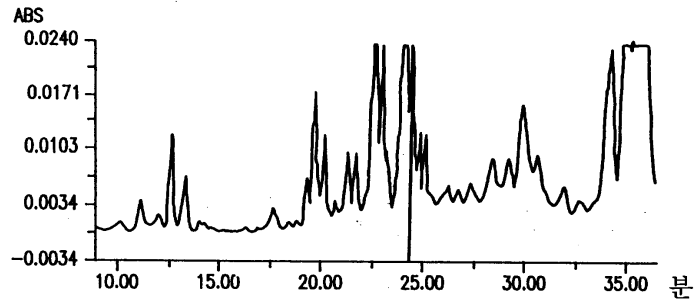
도면17B



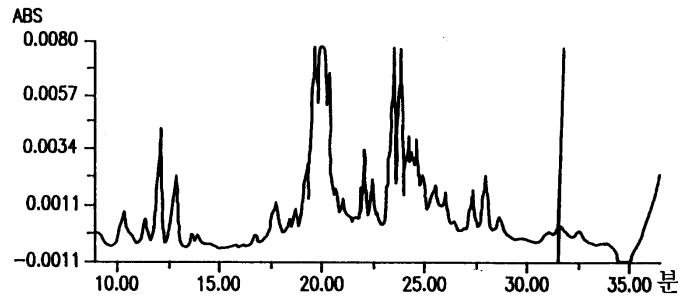
도면18A



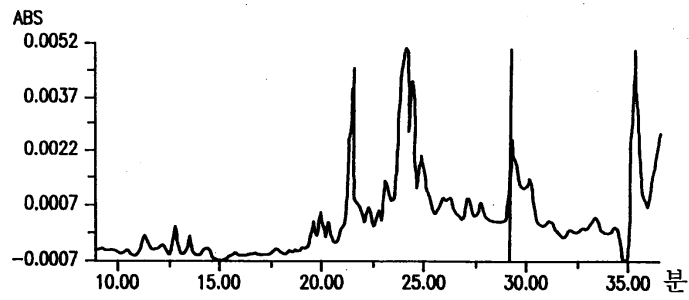
도면18B



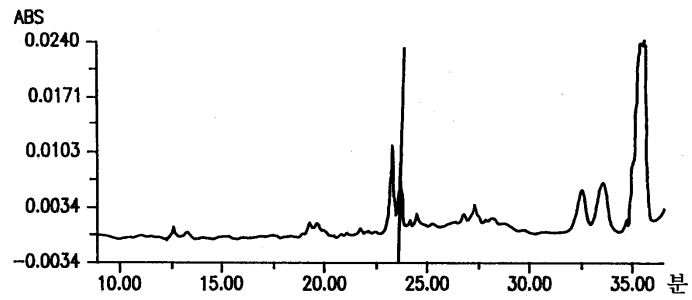
도면18C



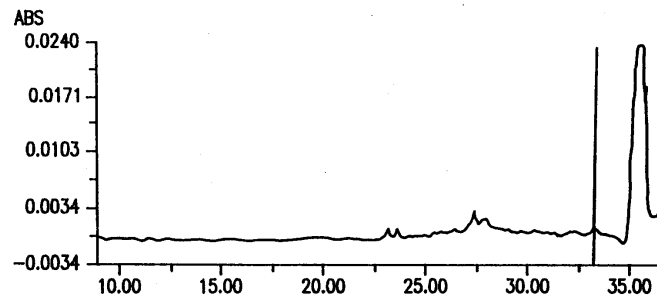
도면18D



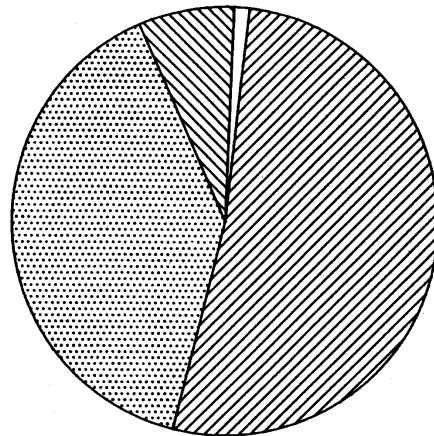
도면18E



도면18F

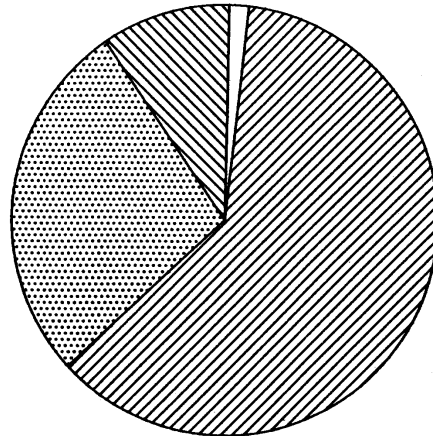


도면19A



- SUB G-0 (0.9%)
- ▨ G-1 (47.9%)
- ▩ S (36.1%)
- ▧ G-2 + M (6.8%)

도면19B



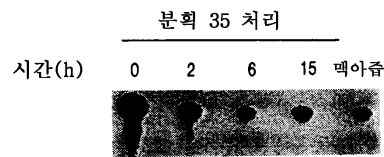
- SUB G-0 (1.6%)
- ▨ G-1 (57.4%)
- ▩ S (26.8%)
- ▧ G-2 + M (8.8%)

도면20

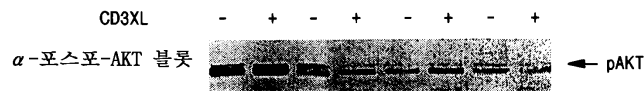


- 1: 미처리
- 2: TNF (100pM)
- 3: F035 (1μg/ml)
- 4: TNF + F035 (1μg/ml)
- 5: F035 (2μg/ml)
- 6: TNF + F035 (2μg/ml)
- 7: F094 (1μg/ml)
- 8: TNF + F094 (1μg/ml)
- 9: F094 (2μg/ml)
- 10: TNF + F094 (2μg/ml)

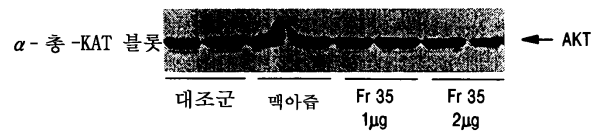
도면21



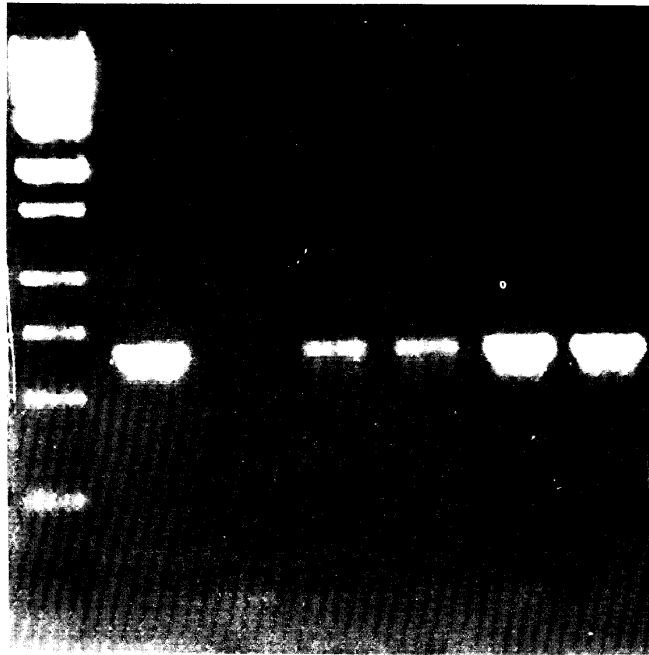
도면22A



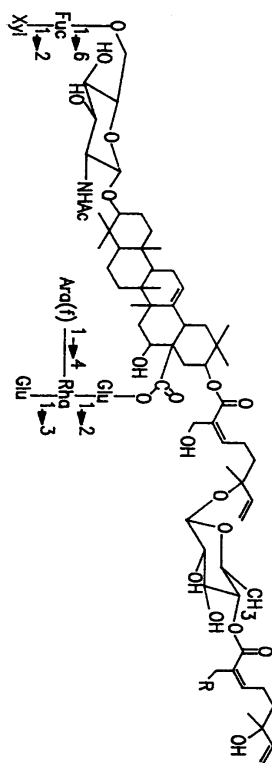
도면22B



도면23



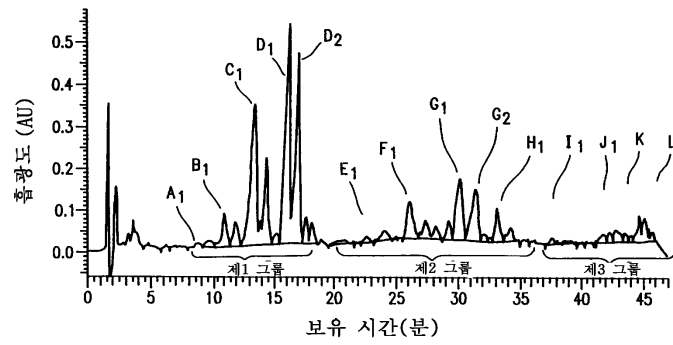
도면24



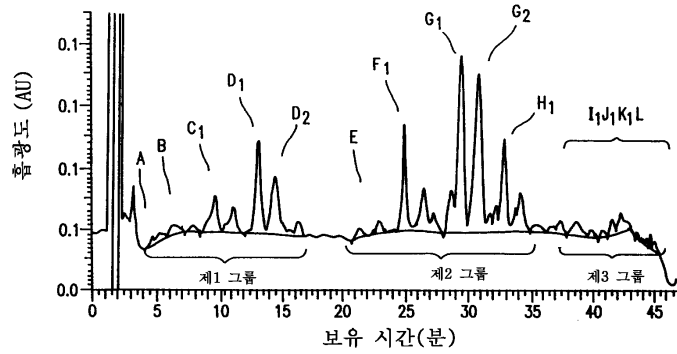
엘립토시드의 화학식:  
 R=OH인 경우, 엘립토시드 R이고  
 R=H인 경우, 엘립토시드 A이다.



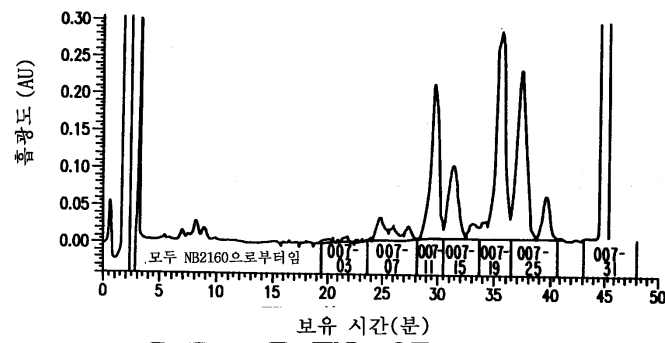
도면25



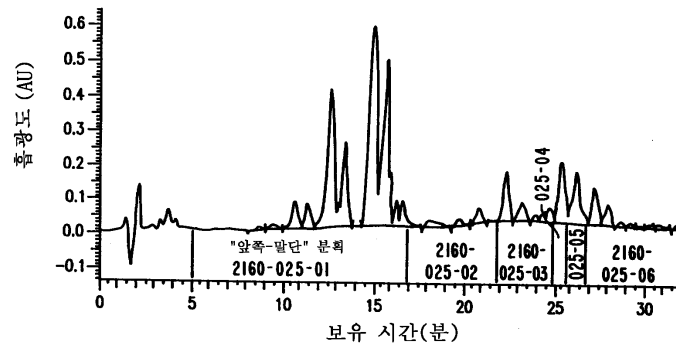
도면26



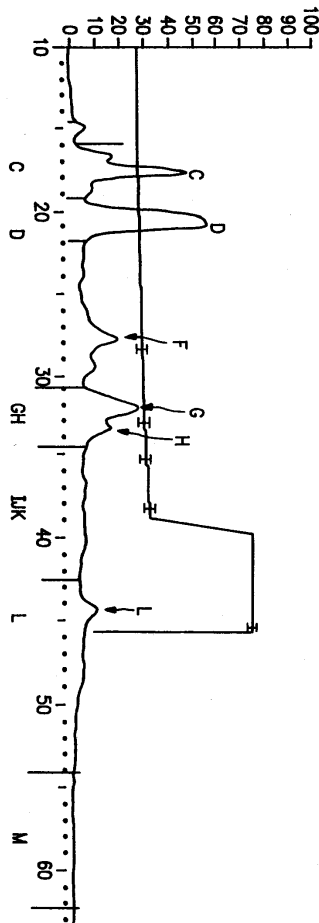
도면27



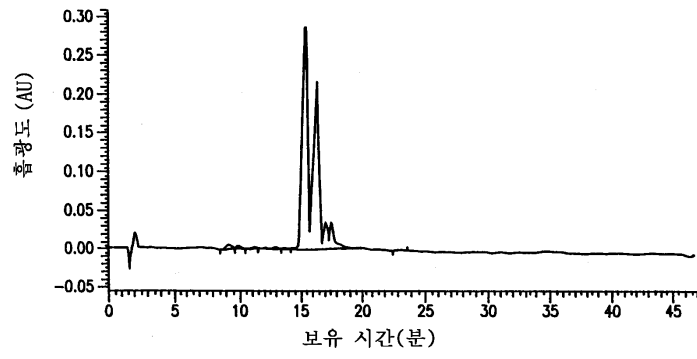
도면28



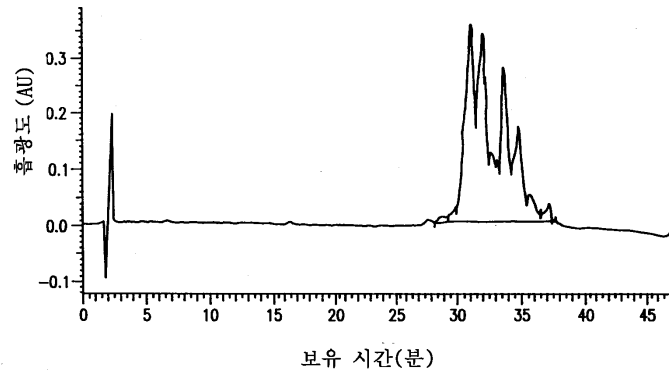
도면29



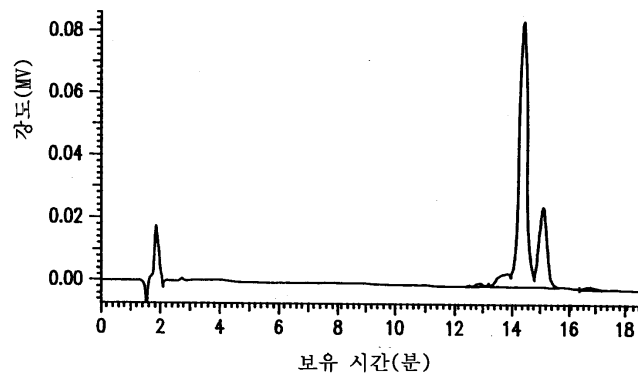
도면30



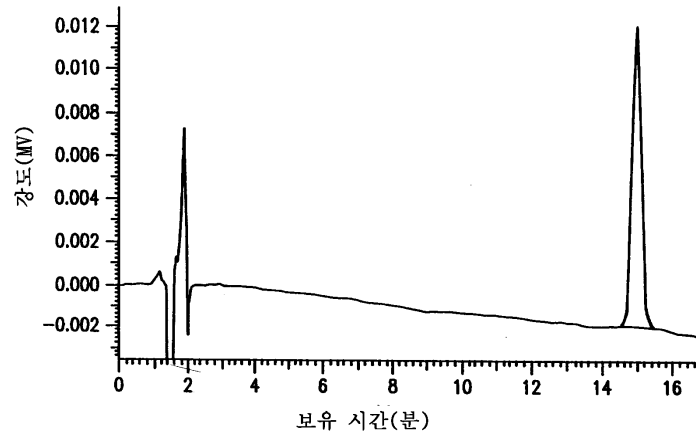
도면31



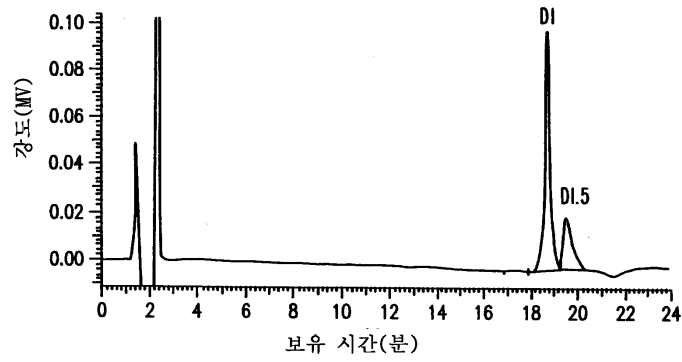
도면32



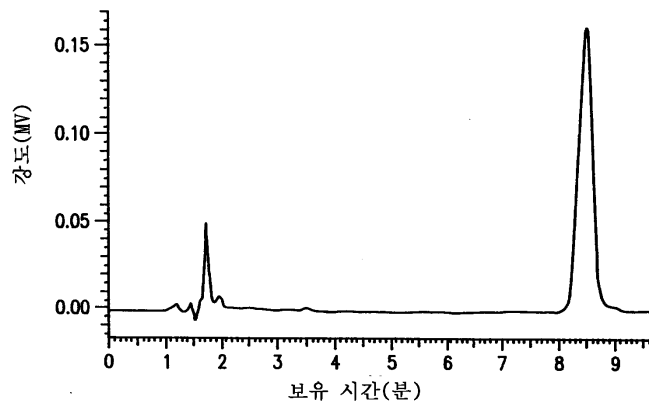
도면33



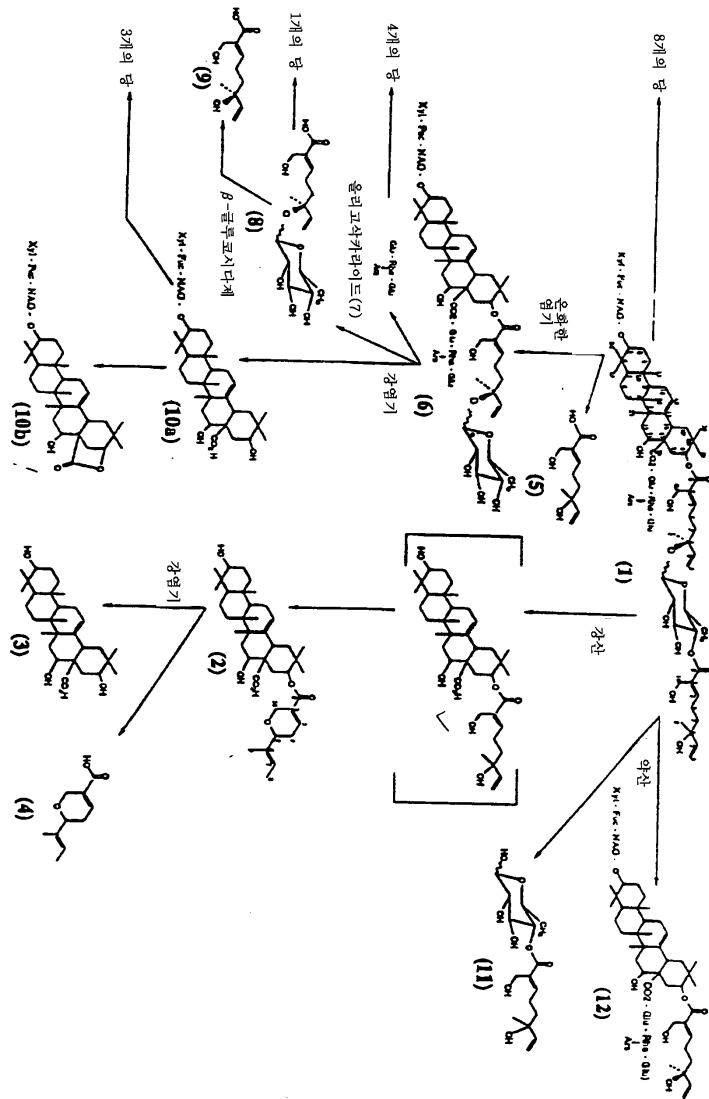
도면34



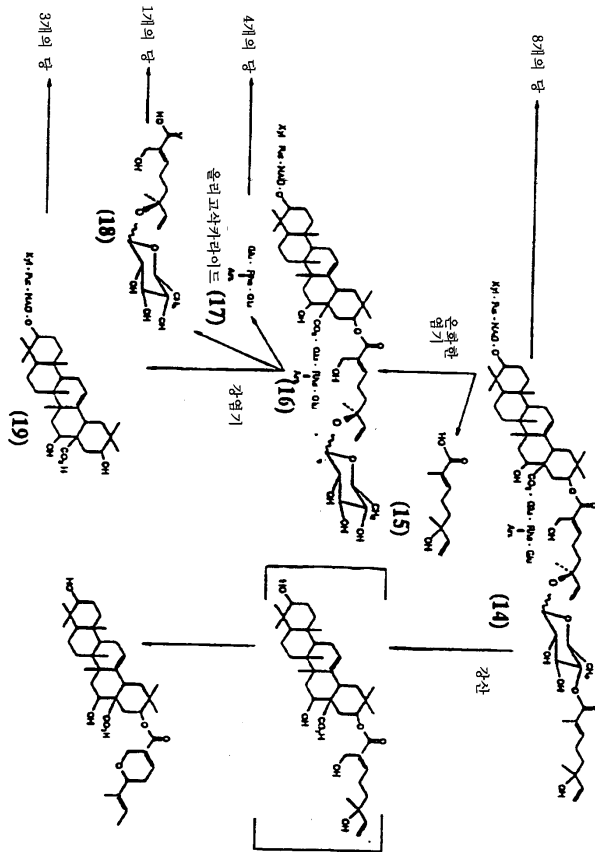
도면35



도면36

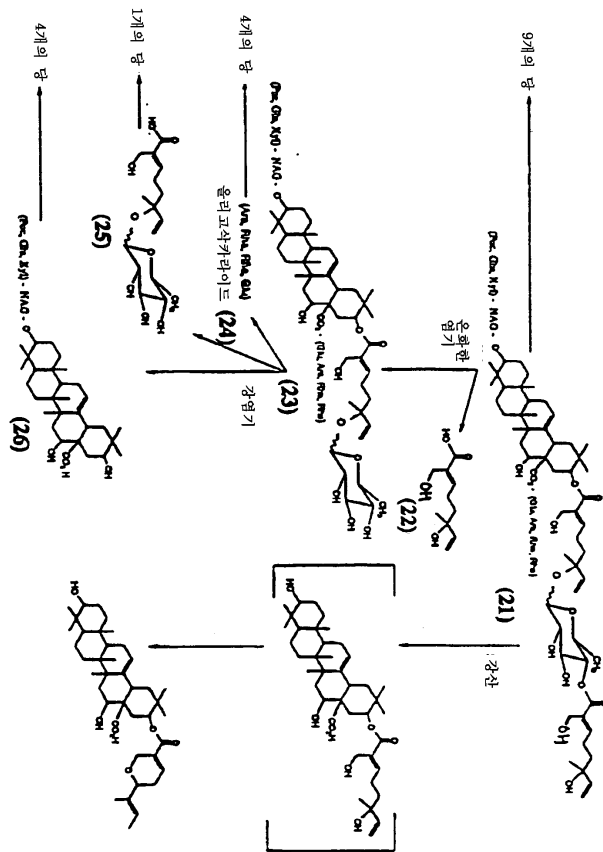


도면37

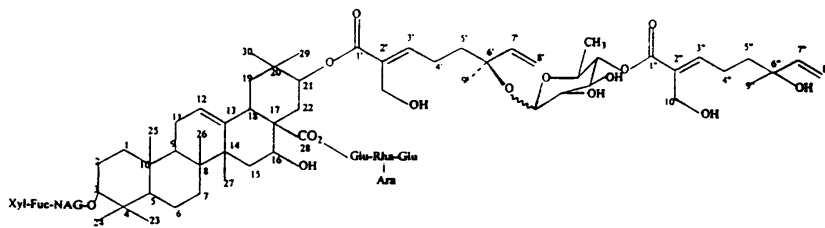




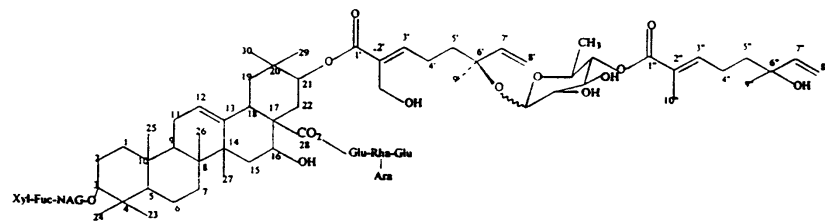
도면38



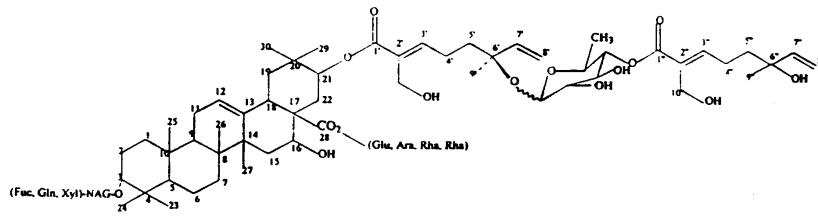
도면39



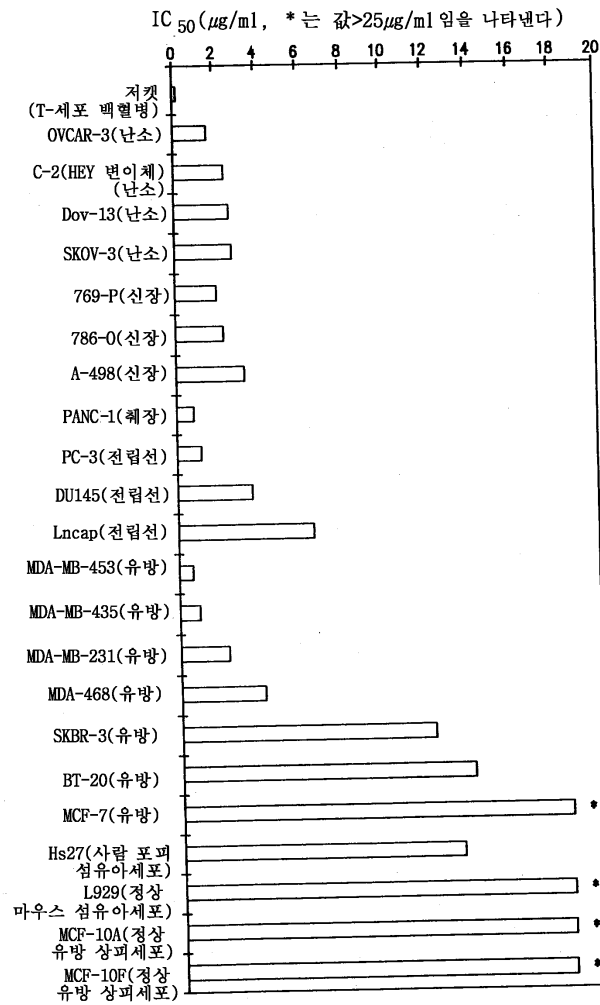
도면40



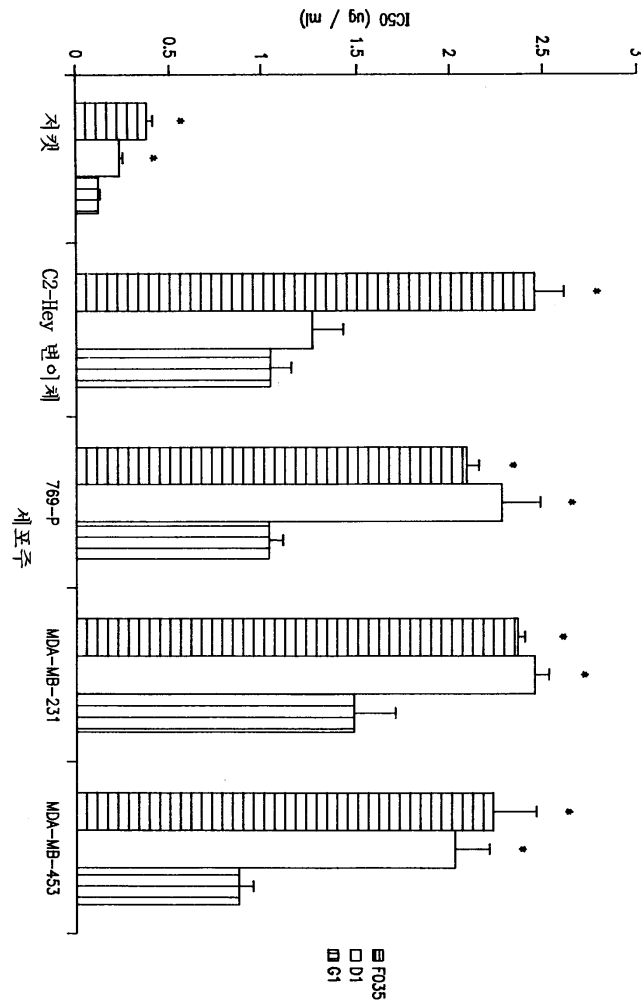
도면41



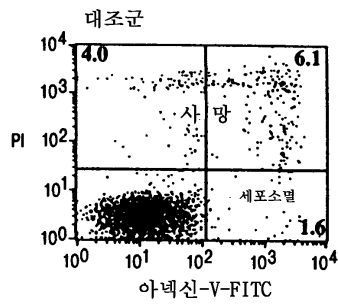
도면42



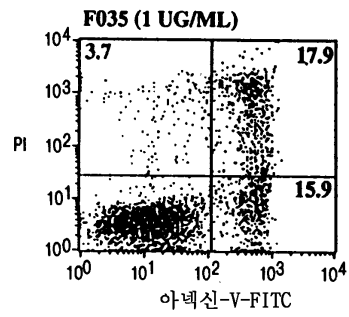
도면43



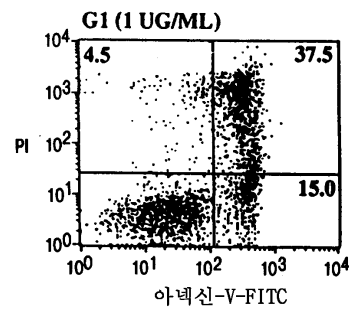
도면44A



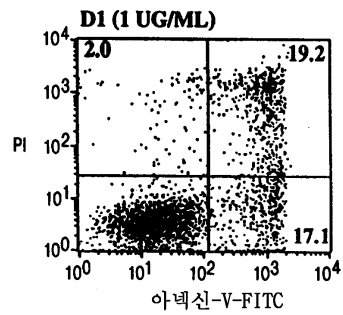
도면44B



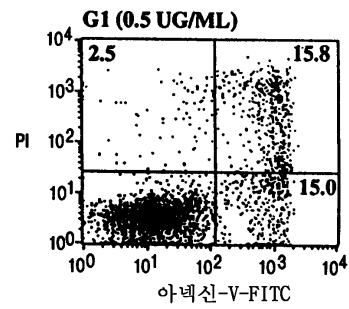
도면44C



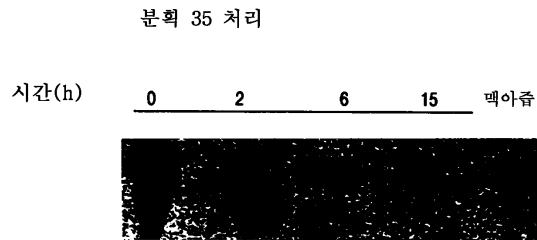
도면44D



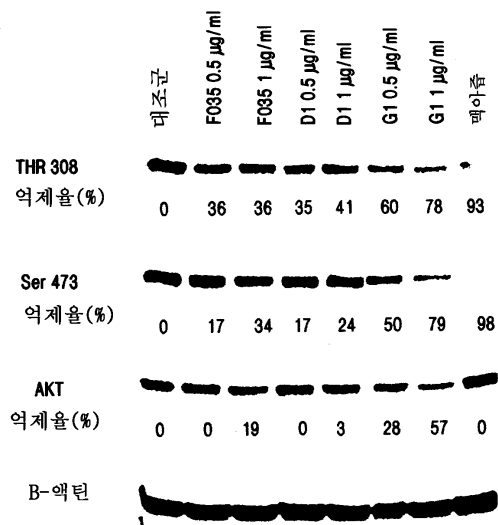
도면44E



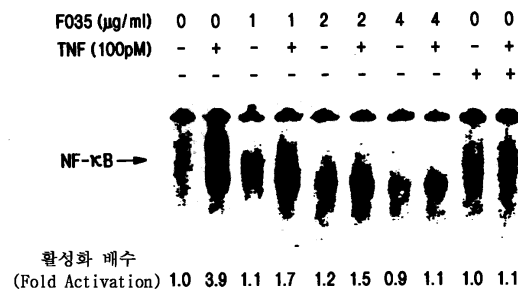
도면45A



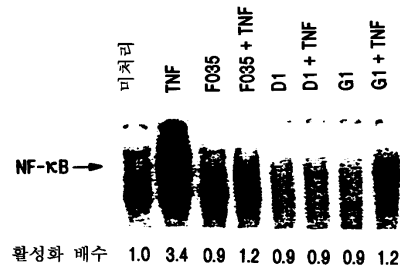
도면45B



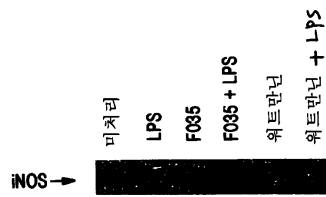
도면46A



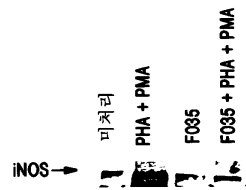
도면46B



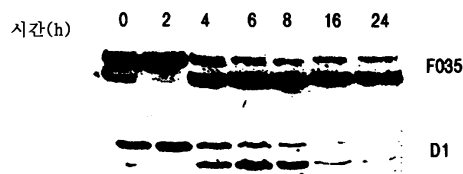
도면46C



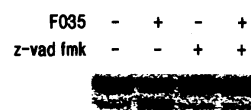
도면46D



도면47

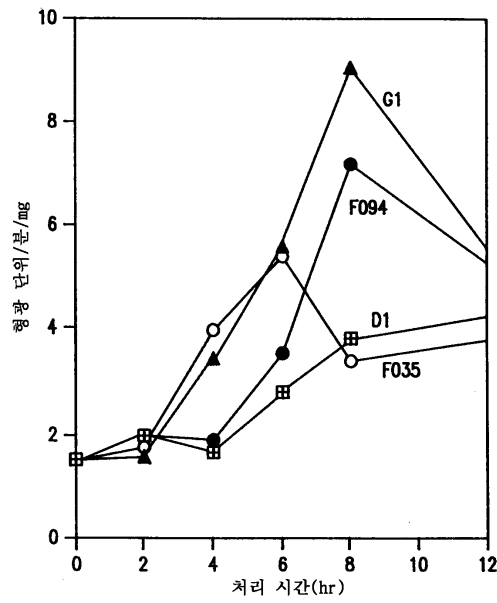


도면48

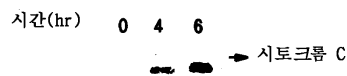




도면49



도면50



서열목록

- <110> RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION
- <120> Triterpene compositions and methods for use thereof
- <130> 5-1998-0645794
- <150> US 60/085,997
- <151> 1998-05-19
- <150> US 60/099,066
- <151> 1998-09-03
- <160> 9
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC PRIMER

<400> 1  
 agttgagggg actttcccag gctcaactcc cctgaaaggg tccg 44

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> SYNTHETIC PRIMER

<400> 2  
 ctaagcctgt tgttttgcag gac 23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> SYNTHETIC PRIMER

<400> 3  
 catggcacta tactcttcta 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> SYNTHETIC PRIMER

<400> 4  
 catggcacta tactcttctt 20

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> SYNTHETIC PRIMER  
  
 <400> 5  
 ccttggttaa gtgtgcttct cattgg 26  
  
 <210> 6  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> SYNTHETIC PRIMER  
  
 <400> 6  
 acagcccacc tctggcaggt agg 23  
  
 <210> 7  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> SYNTHETIC PRIMER  
  
 <400> 7  
 gaggggatcc gatttgcttt tg 22  
  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> SYNTHETIC PRIMER  
  
 <400> 8  
 ctgatcaggc cccgagatc 20  
  
 <210> 9  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> SYNTHETIC PRIMER

<400> 9

ttgttacaag ggactttccg ctggggactt tccaggagg ctgg

44