



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년01월15일
 (11) 등록번호 10-1350891
 (24) 등록일자 2014년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07C 33/048 (2006.01) C08F 38/02 (2006.01)
 A61K 31/23 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0122112
 (22) 출원일자 2011년11월22일
 심사청구일자 2011년11월22일
 (65) 공개번호 10-2013-0056478
 (43) 공개일자 2013년05월30일
 (56) 선행기술조사문헌
 ‘New Bioactive Polyacetylenes from the
 Marine Sponge *Petrosia* sp’, Tetrahedron 54
 (1998) pp. 3151-3158.

(73) 특허권자
 한국해양과학기술원
 경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동, 한국해양연구원)
 (72) 발명자
 이연주
 경기도 과천시 별양로 12, 래미안슈르 319동 160
 2호 (원문동)
 이희승
 서울특별시 광진구 아차산로 552, 7동 1105호 (광
 장동, 극동아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 정종욱, 특허법인 남앤드남, 조현동, 진천웅

전체 청구항 수 : 총 4 항

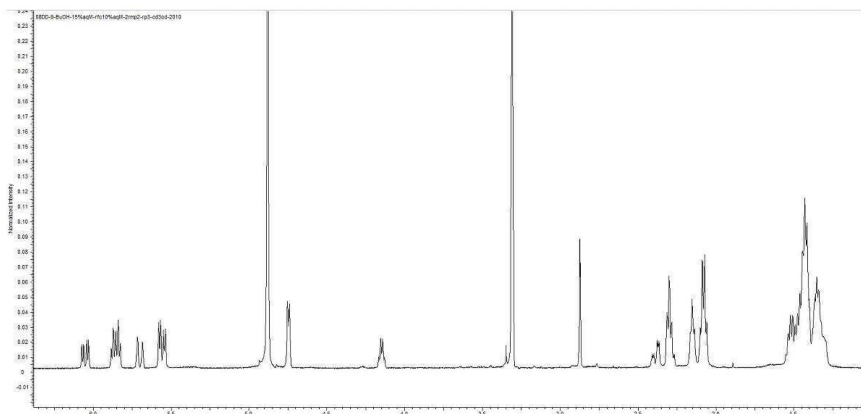
심사관 : 정다원

(54) 발명의 명칭 **폴리아세틸렌 화합물 또는 해면동물 페트로시아 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물**

(57) 요약

본 발명은 폴리아세틸렌 화합물 또는 해면동물 페트로시아(*Petrosia* sp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 신규 화합물 또는 페트로시아 추출물은 다양한 암세포주에 대해 성장 억제 활성 효과를 나타냄을 확인함으로써, 암 질환의 예방 및 치료에 유용한 약학 조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

노현수

경상북도 울진군 죽변면 해양바이오길 48, 동해연
구소

신희재

경기도 수원시 권선구 금호로 45 (금곡동, 삼익1
차아파트 103동 1101호)

이종석

경기도 안양시 동안구 부림로 55 (초원대원아파트
304동 306호)

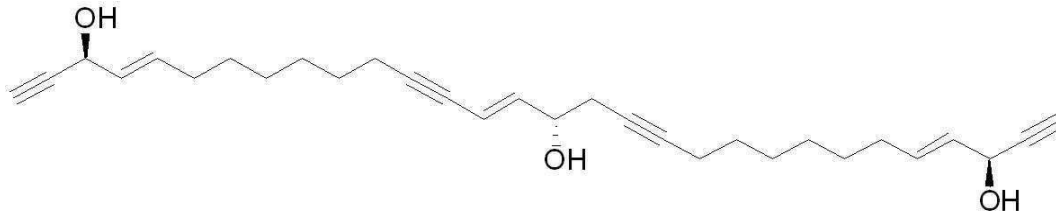
특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표기되는 폴리아세틸렌계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하고,

상기 폴리아세틸렌계 화합물은 3번, 16번, 28번 위치에 하이드록시기(hydroxy group)를 가지는 것을 특징으로 하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 폴리아세틸렌계 화합물은 3개의 하이드록시기(hydroxy group)를 가지는 것을 특징으로 하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 폴리아세틸렌계 화합물은 페트로시아세틸렌(petrosiacetylene) D인 것을 특징으로 하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 4항에 있어서, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물이 0.1 내지 50% 중량으로 포함된 것을 특징으로 하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 신규한 페트로시아세틸렌 화합물 또는 해면동물 페트로시아 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 현대사회는 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망 원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10만 명이 진단되고, 약 6 만 명이 사망하고 있다. 이러한 암의 유발 인자인 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학 물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 다르다. 현재 치료제로 사용되는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있으며, 암세포만을 선택적으로 제거하지 못하므로, 암의 발생 후 이의 치료뿐 아니라, 암의 발생을 예방하기 위한 독성이 적고 효과적인 항암제의 개발이 절실히 필요하다.
- [0003] 암이란 “제어되지 않은 세포성장” 으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포성장에 의해 종양 (tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투하고 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 한다. 학문적으로는 신생물 (neoplasia)이라고도 불린다. 암은 수술, 방사선 및 화학요법으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고 환자에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환이다. 암의 발생요인으로는 여러 가지가 있으나, 내적 요인과 외적 요인으로 구분하기도 한다. 정상세포가 어떠한 기전을 거쳐 암세포로 형질전환이 되는지에 대해서는 정확하게 규명되지 않았으나, 적어도 80 내지 90%가 환경요인 등 외적인자에 의해 영향을 받아 발생하는 것으로 알려져 있다. 내적 요인으로는 유전 인자, 면역학적 요인 등이 있으며, 외적 요인으로는 화학물질, 방사선, 바이러스 등이 있다. 암의 발생에 관련되는 유전자에는 종양형성유전자 (oncogenes)와 종양억제유전자 (tumor suppressor genes)가 있는데, 이들 사이의 균형이 위에서 설명한 내적 혹은 외적 용인들에 의해 무너질 때 암이 발생하게 된다.
- [0004] 암세포는 정상세포와 많은 면에서 그 성질이 유사하므로 정상세포에는 피해를 주지 않고 암세포만을 제거하는 것은 쉬운 일이 아니다. 그러나 암세포에는 몇 가지 일반 세포와 구분되는 특징이 있는데, 첫째는 암세포는 세포 증식이 조절되지 않는다는 것이고, 둘째는 분화의 특징이 비교적 결여되어 있다는 것이며, 셋째는 주위의 조직에 침투하여 전이를 한다는 것이다. 정상세포는 필요에 따라 성장인자에 의해 신호를 전달받아 증식을 하는 반면 암세포는 성장인자에 대한 의존도가 낮고 주변의 세포와 접촉에 의해 성장이 저해되는 접촉성 저해 (contact inhibition)가 없으며, 안지오제닉 인자 (angiogenic factor)를 분비하여 전이를 활발히 한다. 또한 암세포는 분화가 되지 않고, 세포사멸 (apoptosis or programmed cell death)이 일어나지 않으며, 유전적으로 불안정한 특징이 있다. 암세포의 유전적인 불안정은 암의 진행에 있어서 매우 중요하며 화학요법제에 대한 내성을 유도하기도 하는 것으로 알려져 있다 (Folksman et al., Science, 235, pp. 442-447, 1987).
- [0005] 화학요법제의 가장 큰 문제는 약제 내성으로써, 항암제에 의한 초기의 성공적인 반응에도 불구하고 결국에는 치료가 실패하게 되는 주요 요인이다. 이러한 부작용을 극복하는 문제와 관련지어 최근에는 민간에서 사용되는 천연물에서 그 활성 성분을 찾으려는 노력이 진행되고 있다.

발명의 내용

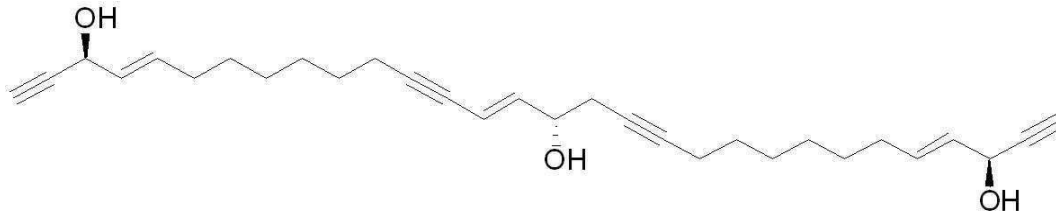
해결하려는 과제

- [0006] 이에 본 발명자들은 신규 폴리아세틸렌 (polyacetylene)계 화합물 또는 해면동물 페트로시아(Petrosia sp.) 추출물이 다양한 암 세포주에 대해 세포성장을 억제하는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 본 발명의 목적은 신규 폴리아세틸렌계 화합물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 폴리아세틸렌계 화합물을 포함하는 암질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 페트로시아(Petrosia sp.) 추출물을 포함하는 암질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표기되는 폴리아세틸렌계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다:

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 상기 화학식의 화합물은 세 개의 하이드록시기(hydroxy group)를 가지는 산소결합 폴리아세틸렌 (oxygenated polyacetylene) 형태의 화합물인 것이 특징이다.

[0014] 상기 화학식의 화합물은 페트로시아세틸렌(petrosiacetylene) C와 비교하여 하나의 하이드록시기를 더 가지는 물질로서, 구조적 계통성에 따라 페트로시아세틸렌 D로 명명될 수 있다. 페트로시아세틸렌 C는 -20 °C에서 보관하는 경우 변성이 일어나 화합물의 안정성에 문제가 있지만, 본 발명에 따른 화합물은 -20 °C에서 보관하더라도 변성이 되지 않는 우수한 안정성을 가지고 있다.

[0015] 폴리아세틸렌 화합물들은 대표적인 해면유래 2차 대사산물의 하나로, 다양한 길이와 치환기를 가지는 물질들이 발견되었다. 이 물질들은 세포독성, 항암작용, 항바이러스작용 등을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 몇몇 물질들은 방오효과 (antifouling activity)나 변태촉진 효과 (metamorphosis inducing activity)를 나타내는 것으로 알려져 있어, 환경적인 면에서도 중요한 물질로 평가되고 있다. 본 발명에 따른 상기 화학식의 화합물 역시 암세포에 대해 상당한 독성을 나타내는 바, 항암제로 활용 가능할 것으로 기대된다.

[0016] 상기 화학식 1로 표기되는 본 발명의 신규 화합물은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조될 수 있다.

[0017] 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산 (free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 같은 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올 (예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0018] 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 구연산 (citric acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.

[0019] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0020] 상기 화학식 1로 표기되는 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 화학식 1 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트 (메실레이트) 및 p-톨루엔설포네이트 (토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

- [0021] 본 발명은 상기 화학식 1로 표기되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 치료를 위한 약학조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 암 질환은 결장암, 전립선암, 폐암, 신장암, 피부암, 위암, 유방암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종, 바람직하게는 결장암, 전립선암, 폐암, 신장암, 피부암 또는 위암을 포함한다.
- [0023] 이하, 본 발명의 화합물을 수득하는 방법을 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명의 화합물은, 건조된 페트로시아(*Petrosia* sp.)를 세절하여 건조 중량의 약 2 내지 6 배, 바람직하게는 4 배의 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 디클로로메탄, 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합 용매, 바람직하게는 메탄올 및/또는 디클로로메탄 용매로 10℃ 내지 35℃, 바람직하게는 24℃에서 약 10 내지 48시간, 바람직하게는 약 24시간 동안 수회, 바람직하게는 2회 또는 1회 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류 추출 등의 추출방법, 바람직하게는 냉침추출 방법을 이용해서 감압 농축하여 조추출물을 수득하는 제 1단계; 상기 조추출물을 물과 부탄올과 같은 극성 용매를 이용하여 분배한 후, 유기 층을 감압 건조하고, 이것을 다시 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 디클로로메탄, 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합 용매, 바람직하게는 물 : 메탄올(1:1(v/v))의 혼합 용매와 헥산으로 극성에 따라 분배하는 제 2단계; 상기 제 2단계의 극성 용액 층에 용해된 물질을 취하여 감압 건조한 후, 이것을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 디클로로메탄, 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합 용매, 바람직하게는 물 : 메탄올(70:30 부터 0:100 까지 순차적으로)의 혼합 용매로, 농도 구배 역상 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 극성에 따라 5개의 분획으로 나누는 제 3단계; 상기 제 3단계의 각 분획 중, 극성 용매, 바람직하게는 50% 및 30% 메탄올 용매 각각으로 용리한 분획을 이동상의 용매 조건인 물 : 메탄올 용액으로 역상 고효율 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 본 발명의 화합물을 수득할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 상기 제조방법으로 얻어지는 상기 화학식 1로 표기되는 신규 폴리아세틸계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 얻어지는 페트로시아 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 추출물은 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 디클로로메탄, 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합 용매, 바람직하게는 메탄올 및 디클로로메탄의 혼합용매, 보다 바람직하게는 메탄올로 2회, 디클로로메탄으로 1회 추출한 추출물을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 암 질환의 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물 또는 추출물을 0.1 내지 50% 중량으로 포함한다. 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 화합물 또는 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 화합물 또는 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 화합물 또는 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되

며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 진분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 화합물 또는 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물 또는 추출물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 신규 폴리아세틸계 화합물 또는 페트로시아 추출물은 다양한 암세포주에 대한 성장 억제 활성 효과를 나타냄을 확인함으로써, 암 질환의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 수소 핵자기 공명 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.
 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 탄소 핵자기 공명 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.
 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 Mosher 분석 결과를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시 예를 가질 수 있는 바, 특정 실시 예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에서 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0036] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0037] 실시예 : 페트로시아세틸렌계 화합물의 분리

[0038] 실시예 1 : 페트로시아(*Petrosia* sp.) 조추출물의 제조

[0039] 동결 건조된 해면동물 *Petrosia* sp.(동해안 독도 인근 해역에서 채집)을 99% 메탄올과 디클로로메탄로 각각

2회, 1회, 상온에서 24시간 동안 냉침추출한 뒤, 추출액을 여과 후 감압 농축하여 조추출물 200g을 얻었고, 하기 실시예 1-2에서 사용하였다.

[0040] 실시예 2 : 화합물의 분리

[0041] 상기 실시예 1에서 수득한 조추출물을 물과 노르말부탄올로 분배한 후, 노르말부탄올층을 다시 감압 건조하였고, 이것을 다시 물과 메탄올(1:1(v/v))의 혼합 용매와 노르말헥산으로 극성에 따라 분획하였다.

[0042] 그리고, 상기 물과 메탄올의 혼합 용매층에 용해된 물질을 취하여 감압 건조한 후, 이것을 물과 메탄올(70:30 부터 0:100 까지 순차적으로)의 혼합 용매를 이용한 농도 구배 역상 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 6개의 분획(메탄올 % = 50, 60, 70, 80, 90, 100)으로 나누었다.

[0043] 각각의 분획을 물과 메탄올을 용매로 사용한 역상 고효율 컬럼 크로마토그래피로 정제 화합물을 얻을 수 있었고, 90% 메탄올 분획으로부터 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻었다. 다른 5개의 분획물에서는 상기 90% 메탄올 분획물과는 완전히 상이한 인돌(indole) 형태의 물질들이 발견되었고, 특히 메탄올 비율이 낮은 분획에서는 뉴클레오사이드(nucleoside)와 같은 일반적인 1차 대사산물만이 얻어졌다.

[0044] 분리된 화합물들의 구조는 ¹H NMR, ¹³C NMR, 2D NMR, HRMS 및 IR을 통해 동정 및 확인하였다. 그 결과는 도 1 ~ 도 2 및 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

표 1

[0045]

position	¹³ C ^{a,b}	¹ H ^a (mult, J in Hz)	HMBC	COSY
1	74.6	2.87 (t, 0.8)	3	
2	84.8			
3	63.2	4.75 (d, 6.5)	1, 2, 4, 5	4
4	130.7	5.56 (dd, 6.5, 15.5)	2, 3	3, 5
5	134.1	5.86 (dt, 6.5, 15.5)	3	4, 6
6	32.9	2.08 (q, 6.5)	4, 5, 8	7
7	29.8	1.44 (m)		6
8	30.1	1.35 (m)		9
9	29.7	1.42 (m)	8	8
10	29.7	1.50 (m)	11	11
11	20.0	2.28 (t, 7.5)	9, 12, 13	10
12	91.6			
13	79.6			
14	111.9	5.70 (dd, 1.5, 16.0)		15
15	144.0	6.05 (dd, 6.0, 16.0)	13, 16	14, 16
16	71.8	4.15 (q, 16.0)	14, 17, 18	15
17	28.3	2.39 (dd, 6.0, 16.5), 2.30 (m)	16, 18,	
18	76.9			
19	83.2			
20	19.4	2.15 (t, 6.5)	18, 19, 22	21
21	29.7	1.50 (m)		20
22	30.0	1.42 (m)		
23	30.0	1.35 (m)	22	
24	29.8	1.44 (m)		25
25	33.0	2.08 (q, 7.0)	26, 27	24, 26
26	134.1	5.86 (dt, 6.5, 15.5)		25, 27
27	130.7	5.56 (dd, 6.5, 15.5)	28, 29	26, 28
28	63.2	4.75 (d, 6.5)	26, 27, 29, 30	27
29	84.8			
30	74.6	2.87 (t, 0.8)	28	

- [0046] ^a NMR 측정 시 용매로 CD₃OD를 사용.
- [0047] ^b HSQC correlation peak의 chemical shifts
- [0048] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화합물은 무정형의 노란색 고체로 얻어졌고, High-resolution FAB mass spectroscopy를 통해 C₃₀H₄₀O₃의 분자량을 지니는 것을 확인할 수 있었다. ¹H NMR 및 ¹³C NMR 스펙트럼, 2D NMR 스펙트럼 (HMBC, HSQC, COSY) 분석을 통해 상기의 구조가 확인되었다. 또한, 본 발명의 화합물의 3번, 16번, 28번의 stereochemistry는 MTPA를 이용하는 Mosher 분석법을 사용하여 모두 R의 configuration을 가지는 것이 확인되었다(도 3). 기존의 페트로시아세틸렌은 탄소 30개를 가지는 폴리아세틸렌으로써 3번과 28번 위치에 하이드록시기를 가지는데, 상기와 같이 확인된 본 발명에 따른 화합물은 여기에 더하여 16번 위치에도 하이드록시기를 더 가지는 것이 특징이다.
- [0049] :white amorphous solid, [α]_D²⁵ +18.6 (c 0.55, MeOH); UV (MeOH) _{max} 240, 216 nm; IR (KBr) _{max} 3374, 2927, 2210, 1588, 1426, 1098, 962, 476 cm⁻¹; HRMS (ESI): [M+Na]⁺ calculated for C₃₀H₄₀O₃Na: 471.2878, found: 471.2875.
- [0050] **실험예 : 암세포 성장 억제 활성 측정**
- [0051] 실험예 1 : 세포 배양
- [0052] 인체 암세포주에 대해 세포성장억제효과를 측정하기 위해 6종의 human cancer cell (National Cancer Institute, USA)를 사용하였으며, 배양액은 10%의 송아지 혈청을 함유한 RPMI1640을 첨가하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 사용된 6종의 cancer cell의 종류는 다음과 같다. MDA-MB-231(breast cancer), HCT-15(colon cancer), PC-3(prostate cancer), NCI-H23(lung cancer), NUGC-3(stomach cancer), ACHN(renal cancer).
- [0053] 실험예 2 : 암세포 성장 억제 활성 측정
- [0054] 암세포성장저해활성 측정은 national cancer institute (USA)의 방법에 따라서 시행하였다. 각각의 세포주를 96-well plate에 접종한 후, 화합물의 최종농도가 각각 30, 10, 3 ppm이 되도록 처리하였다. 이를 48시간 배양한 후 50% TCA를 50 μl/well 씩 넣어서 고정하였다. 이를 4°C에서 60분간 방치한 뒤, tap water로 4-5 회 세척하였다. 세척한 plate는 건조한 후 SRB solution (0.4 % sulforhodamine B in 1% acetic acid)을 100 μl/well 씩 가한 후 30분 방치하였다. 결합하지 않은 염색시약은 0.1% acetic acid로 세척하였으며, 다시 건조한 후에 10mM Tris Base (pH 10.5)를 100 μl/well 씩 가하여 염색시약을 용해시킨 후, 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 Versa max microplate reader (Molecular Device)를 사용하여 540 nm에서 측정하였으며, 측정된 흡광도는 용매처리군에 대한 백분율로 계산하였다. 화합물의 GI₅₀ 값은 Graphed prism v 4.0 software를 이용하여 계산하였다.
- [0055] 실험결과, 본 발명의 화합물은 아래 표 2에 정리한 바와 같이 암세포주에 유효한 항암 활성을 가지는 것으로 확인되었다.
- [0056] 즉, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화합물은 HCT-15, ACHN, NUGC3, PC-3 등의 암세포에 대하여 현재 항암제로 쓰이고 있는 의약품인 아드리아마이신 (Adriamycin)보다 훨씬 낮은 활성을 갖고 있다. 아드리아마이신의 GI₅₀값은 0.26, 0.93, 0.22, 0.38, 0.28, 0.93이다.

표 2

	HCT-15	NCI-H23	ACHN	MDA -MB-231	NUGC-3	PC-3
GI ₅₀ (ppm)	13.5	< 3.00	10.3	< 3.00	11.1	3.71

[0057]

[0058]

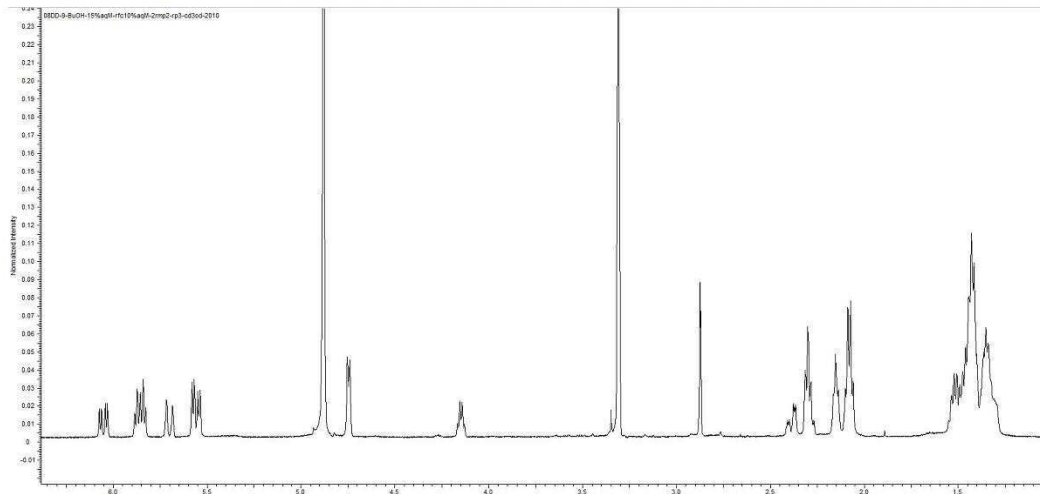
다만, NCI-H23, MDA-MB-231에 대한 본 발명에 따른 화합물의 GI₅₀ 값은 일단은 3 미만으로 표시하였는데, 이는 GI₅₀값이 기준값인 3 보다 많이 낮아서 추가적인 실험 없이는 정확한 값을 알아내기 힘들다는 의미이며, 아드리아마이신과 비슷한 독성을 나타내는 것으로 예상할 수 있다. 그래서, lung cancer나 breast cancer에 대해서도 기존의 항암제 만큼의 효과를 나타낼 수 있는 가능성을 가진다.

[0059]

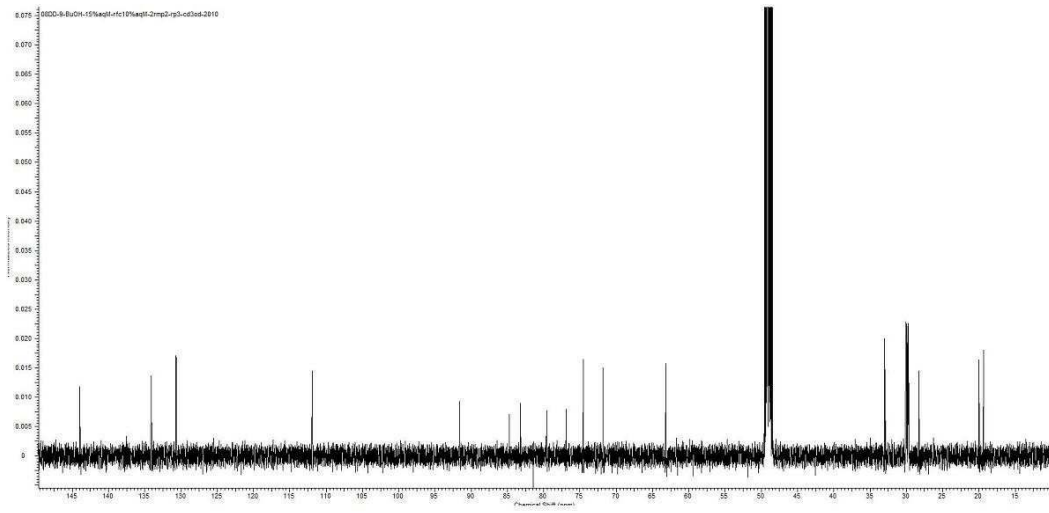
한편, 상기에서는 본 발명을 특정의 바람직한 실시예에 관련하여 도시하고 설명하였지만, 이하의 특허청구범위에 의해 마련되는 본 발명의 기술적 특징이나 분야를 이탈하지 않는 한도 내에서 본 발명이 다양하게 개조 및 변화될 수 있다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명백한 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

