

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0175150

(43) 공개일자 2023년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)*A61K 36/47* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)*A61P 35/04* (2006.01) *C07D 311/04* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2023.05)*A23L 33/10* (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0181087(분할)

(22) 출원일자 2023년12월13일

심사청구일자 2023년12월13일

(62) 원출원 특허 10-2020-0102471

원출원일자 2020년08월14일

심사청구일자 2020년08월14일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

남궁완

인천광역시 연수구 원인제로 124, 103동 1905호(동춘동, 한양1차아파트)

김승현

서울특별시 서초구 고무래로 94, 101동 203호(서초동, 서초4차현대아파트)

서요한

전라북도 부안군 부안읍 봉신길 19, 104동 402호(부안현대아파트)

(74) 대리인

특허법인이름리온

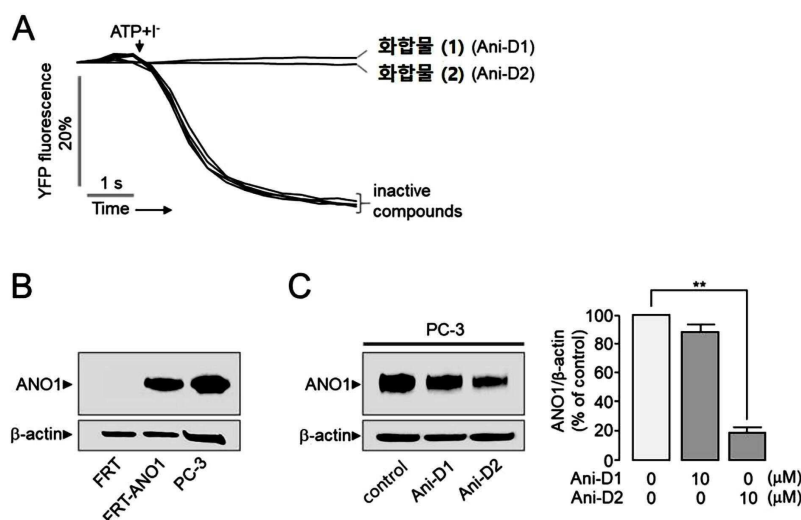
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 신규 ANO1 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암용 또는 암 전이 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명에 따른 항암용 또는 암 전이 억제용 조성물은 신규 ANO1 억제제로서, 말로아펠타 I(Malloapelta I), 말로아펠타 II(Malloapelta II) 또는 말로아펠타 B(Malloapelta B)(바람직하게, 말로아펠타 II(Malloapelta II))를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는바, ANO1 활성을 유의적으로 억제함으로써, 암(바람직하게, ANO1 활성화 환자의 암) 예방, 개선 또는 치료 용도로 혹은 암 전이 억제 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 36/47 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 35/04 (2018.01)

C07D 311/04 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0302371813
과제번호	2018R1A6A1A0302371813
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원사업
연구과제명	난치성 질환 치료를 위한 트랜스포톰 제어 기술 개발(3/3,1단계)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

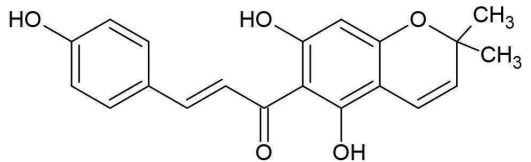
명세서

청구범위

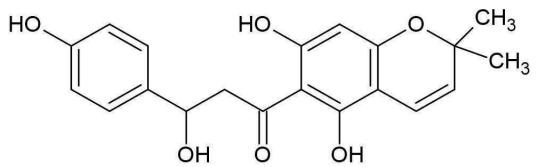
청구항 1

하기 화학식 1 및 2 중 어느 하나로 표시되는 크로멘계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용; 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 아녹타민1(anoctamin1, ANO1) 활성화 환자의 암인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암은 전립선암, 구강암, 유방암, 두경부 편평 세포 암종(HNSCC), 식도 편평 세포 암종(ESCC), 위장관기질 종양(GIST), 대장암, 폐암, 간세포 암종, 위암, 신경교종, 방광암, 흑색종, 난소암, 자궁암 및 췌장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 크로멘계 화합물은 백배엽(*M. apelta*) 유래인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 크로멘계 화합물은 백배엽(*M. apelta*) 메탄올 추출물로부터 분리된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

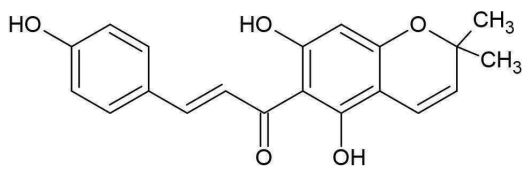
상기 크로멘계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은

- i) ANO1 단백질을 특이적으로 감소시키거나,
- ii) ANO1 염소이온채널 활성을 억제하거나,
- iii) 암 세포의 증식 또는 이동을 억제하거나,
- iv) 암 세포에서 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

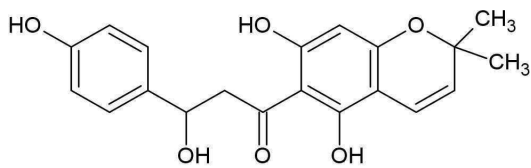
청구항 7

하기 화학식 1 및 2 중 어느 하나로 표시되는 크로멘계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용; 또는 암 전이 억제용 건강기능식품:

[화학식 1]



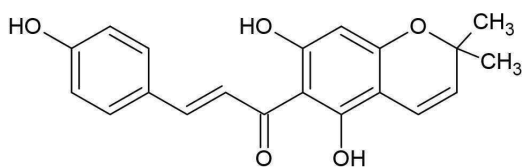
[화학식 2]



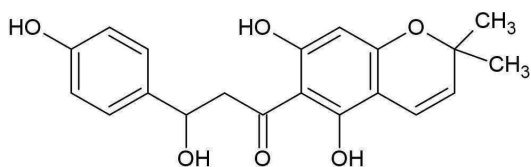
청구항 8

하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 크로멘계 화합물:

[화학식 1]



[화학식 2]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 ANO1 억제제를 유효성분으로 포함하는 항암용 또는 암 전이 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] TMEM16A(transmembrane protein 16A)라고도 하는 아노타민1(Anoctamin1; ANO1)은 칼슘에 의해 활성화되는 염소 이온채널(CaCC)로 알려져 있으며, 상피 세포 분비, 평활근 수축, 세포 성장, 신경 전달 및 세포 전이와 같은 다양한 생리학적 활성을 조절한다. 특히, ANO1은 구강 편평 세포 암종(OSCC), 전립선암, 유방암 및 식도암을 포함한 다양한 암종에서 과발현되며, 암 세포의 증식, 전이 및 침습에 관여한다.

[0003] 근본적인 메커니즘은 불분명하지만, ANO1 억제제의 항암 효과는 종래 연구에서 보고된 바 있다. 전립선암 및 구강암 세포의 세포 증식, 전이 및 침습은 ANO1 채널 기능의 억제 및 ANO1 단백질 수준의 감소에 의해 유의적으로 감소되었다. 또한, ANO1 shRNA의 처리에 의한 ANO1의 하향 조절은 전립선암 이종 이식 마우스 모델에서 종양 성장을 유의하게 감소시켰다. 종래 연구는 ANO1 억제제가 전립선암, 구강암, 및 ANO1을 높은 수준으로 발현하는 다양한 다른 암종을 치료하기 위한 가능한 접근법일 수 있음을 시사한다. 현재까지 CaCC_{inh}-A01, T16A_{inh}-A01, 이 데베논, 탄닌산, Ani9 및 Ani9-5f를 포함하는 여러 ANO1 억제제가 보고되었다. 그러나, 그들의 작용 기전 및 약리학적 특성은 완전히 이해되지 않았으며, 이들 억제제는 약물 발견의 초기 단계에 있다.

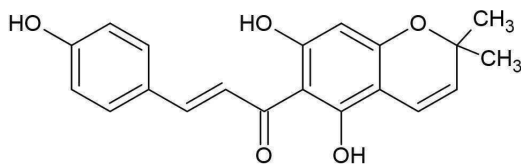
[0004] 천연물은 다양한 암종에서 치료제로서 약리학적 잠재력을 보여준 다양한 의약 제제의 원천이 되었다. *Mallotus apelta*(Lour.) Mull. Arg(대극과(Euphorbiaceae))는 동양 전통의학에서 다양한 질환에 대한 치료제로 사용되어 왔다. *Mallotus* 속으로부터 분리된 화합물들은 항바이러스, 간보호 및 세포독성 활성을 포함하여 많은 흥미로운 생물학적 활성을 나타내었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

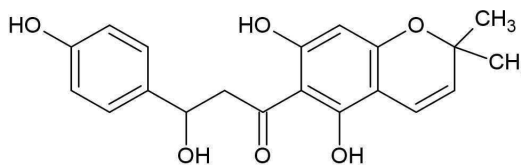
[0006] 본 발명은 ANO1 억제제로서, 하기 화학식 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 크로멘계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암용 또는 암 전이 억제용 조성물 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다:

[0007] [화학식 1]



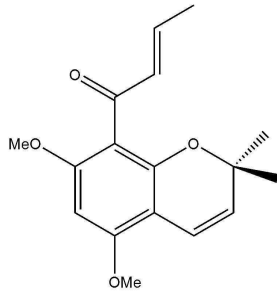
[0008]

[0009] [화학식 2]



[0010]

[0011] [화학식 3]



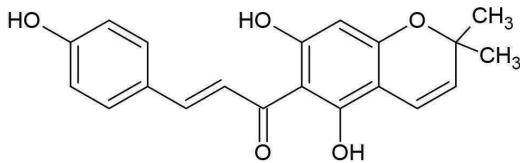
[0012]

[0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

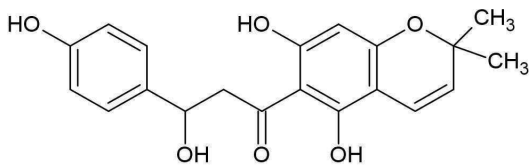
[0015] 본 발명은 하기 화학식 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 크로메네 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용; 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다:

[0016] [화학식 1]



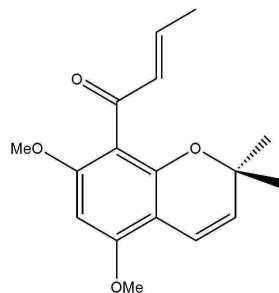
[0017]

[0018] [화학식 2]



[0019]

[0020] [화학식 3]



[0021]

[0022] 상기 암은 아노타민1(anoctamin1, ANO1) 활성화 환자의 암일 수 있다.

[0023] 상기 암은 전립선암, 구강암, 유방암, 두경부 편평 세포 암종(HNSCC), 식도 편평 세포 암종(ESCC), 위장관기질 종양(GIST), 대장암, 폐암, 간세포 암종, 위암, 신경교종, 방광암, 흑색종, 난소암, 자궁암 및 췌장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0024] 상기 크로메네 화합물은 백배엽(*M. apelta*) 유래일 수 있다.

[0025] 상기 크로메네 화합물은 백배엽(*M. apelta*) 메탄올 추출물로부터 분리될 수 있다.

[0026] 상기 크로메네 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 i) ANO1 단백질을 특이적으로 감소시키거나, ii) ANO1 염소이온채널의 활성을 억제하거나, iii) 암 세포의 증식 또는 이동을 억제하거나, iv) 암 세포에서 세포자멸사(apoptosis)를 유도할 수 있다.

- [0027] 본 발명의 일 구현예로, 상기 화학식 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 크로멘계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용; 또는 암 전이 억제용 건강기능식품을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 크로멘계 화합물을 제공한다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명에 따른 항암용 또는 암 전이 억제용 조성물은 신규 ANO1 억제제로서, 말로아펠타 I (Malloapelta I), 말로아펠타 II (Malloapelta II) 또는 말로아펠타 B (Malloapelta B) (바람직하게, 말로아펠타 II (Malloapelta II))를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는바, ANO1 활성을 유의적으로 억제함으로써, 암(바람직하게, ANO1 활성화 환자의 암) 예방, 개선 또는 치료 용도로 혹은 암 전이 억제 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 화합물 (1)-(6)의 참고 화학 구조를 나타낸 것이다.
- 도 2는 화합물 (1) 및 (2)의 주요 HMBC 및 COSY 상관관계를 나타낸 것이다.
- 도 3은 신규 ANO1 억제제, Ani-D2를 확인한 것이다: (A) ANO1 활성화에 대한 화합물 (1)-(6)의 억제 효과는 인간 ANO1 및 돌연변이 YFP를 발현하는 FRT 세포에서 측정되었다. 세포를 20 분 동안 화합물 (1)(Ani-D1) 및 (2)(Ani-D2)로 전처리하였다. ANO1은 100 μ M ATP에 의해 활성화되었다. (B) ANO1 단백질 발현은 FRT, FRT-ANO1 및 PC-3 세포에서 측정되었다. (C) PC-3 세포에서 ANO1의 단백질 발현 수준에 대한 Ani-D1 및 Ani-D2의 효과. PC-3 세포에 24 시간 동안 Ani-D1 및 Ani-D2를 10 μ M 농도로 처리하였다. (오른쪽) 밴드-강도의 요약 (평균 \pm S.E., n=3). ** P < 0.01.
- 도 4는 신규 ANO1 억제제, Ani-D2의 특성을 나타낸 것이다: (A) 내강막(apical membrane) 전류에 대한 Ani-D2의 효과는 ANO1을 발현하는 FRT 세포에서 관찰되었다. Ani-D2는 100 μ M ATP에 의해 ANO1이 활성화되기 20 분 전에 처리하였다. (B) 용량-반응의 요약(평균 \pm S.E., n=3-4). (C) 세포 내 칼슘 농도에 대한 Ani-D2의 효과는 FRT 세포 내 Fluo-4/NW에 의해 측정되었다. 세포는 100 μ M ATP를 처리하기 전에 20 분 동안 Ani-D2 (0, 10, 30 μ M)로 전처리되었다. (D) CFTR 염소이온채널 활성화에 대한 Ani-D2의 효과는 인간 CFTR을 발현하는 FRT 세포에서 관찰되었다. CFTR 활성화에 의한 염소이온 전류는 10 μ M 포스콜린에 의해 활성화되었고, 10 μ M CFTR_{inh}-172에 의해 억제되었다.
- 도 5는 PC-3 및 CAL-27 세포에서 ANO1의 단백질 발현 수준 및 세포 생존력에 대한 신규 ANO1 억제제인 Ani-D2의 효과를 나타낸 것이다: (A, B) ANO1을 발현하는 PC-3 및 CAL-27 세포에서 Ani-D2를 처리하고 측정한 ANO1의 웨스턴 블랏 분석. 24 시간 동안 지시된 농도의 Ani-D2로 세포를 배양하였다. 그리고 CRISPR / Cas9 기술을 사용하여 ANO1 녹아웃(KO) 세포를 확립하였다. (C, D) PC-3, ANO1 KO PC-3, CAL-27 및 ANO1 KO CAL-27 세포에서 세포 생존력에 대한 Ani-D2의 효과. Ani-D2를 72 시간 동안 지시된 농도로 처리하였고, MTS 분석 키트를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다(평균 \pm S.E., n=5). ** P < 0.01, *** P < 0.001.
- 도 6은 PC-3 및 CAL-27 세포에서 세포 이동에 대한 Ani-D2의 효과를 나타낸 것이다: (A, B) PC-3 세포에 일정한 상처를 낸 후 Ani-D2의 세포이동 억제효과 분석을 수행하였다. 세포를 48 시간 동안 Ani-D2로 처리하였고, 상처 후 0 시간 및 24 시간에 대표적인 이미지를 촬영 하였다($\times 10$). (C, D) CAL-27 세포에서 상처 치유 분석을 수행하였다. 세포를 48 시간 동안 지시된 농도에서 Ani-D2로 처리하였고, 상처 후 0 시간 및 24 시간에 대표적인 이미지를 촬영하였다($\times 10$).
- 도 7은 PC-3 및 CAL-27 세포에서 카스파아제-3 활성화 및 PARP의 절단에 대한 Ani-D2의 효과를 나타낸 것이다: (A, B) Ani-D2를 24 시간동안 처리 후 이미지를 촬영 하였다. 카스파아제-3 기질(녹색, 2.0 μ M) 및 Hoechst 33342 (청색, 1 μ M)를 이미지 획득 전에 20 분 동안 처리하였다. 흰색 막대는 200 μ m의 길이를 나타낸다. (C, D) 세포를 지시된 농도의 Ani-D2로 24 시간 동안 배양한 다음, 카스파아제-3 기질 2 μ M를 20 분 동안 처리하였다. 카스파아제-3 활성화는 Ac-DEVD-CHO 10 μ M에 의해 억제되었다(평균 \pm S.E., n=3-4). (E, F) 세포를 24 시간 동안 Ani-D2 10 μ M로 배양하였고, 면역블랏 분석에 의해 PARP, 절단된 PARP 및 β -액틴의 발현 수준을 측정하

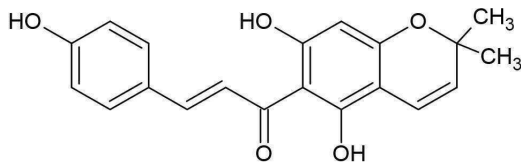
였다(평균±S.E., n=3). *P < 0.05 **P < 0.01, ***P < 0.001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명자들은 *M. apelta*로부터 2개 신규 크로멘 및 4개 공지 화합물을 분리하고, 구조를 설명하였다. 이들 화합물을 대상으로, 세포독성 활성 및 ANO1 억제 효과를 평가하였다. 또한, 본 발명자들은 특히, 말로아펠타 II (Malloapelta II)의 생리화학적 효과 및 전립선암 및 구강 편평암 세포주에서 세포독성 메커니즘을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

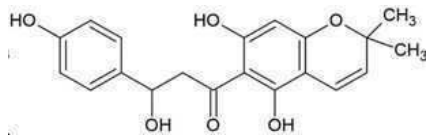
[0035] 본 발명은 하기 화학식 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 크로멘계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용; 또는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다:

[0036] [화학식 1]



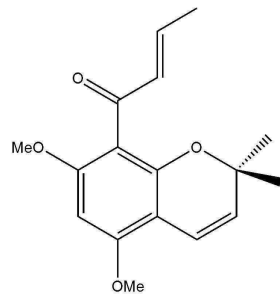
[0037]

[0038] [화학식 2]



[0039]

[0040] [화학식 3]



[0041]

[0042] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 크로멘계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용; 또는 암 전이 억제용 건강기능식품을 제공한다.

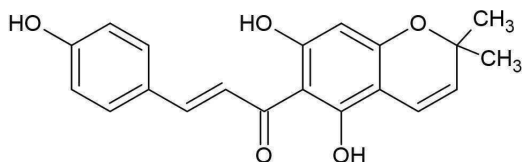
[0044] 본 발명의 크로멘계 화합물은 상기 화학식 1 내지 3 중 어느 하나로 표시될 수 있는데, 상기 화학식 1로 표시되는 크로멘계 화합물은 말로아펠타 I (Malloapelta I) (본 명세서 내 실시예에서 "화합물 (1)" 또는 "Ani-D1"이라고도 표시됨)이고, 상기 화학식 2로 표시되는 크로멘계 화합물은 말로아펠타 II (Malloapelta II) (본 명세서 내 실시예에서 "화합물 (2)" 또는 "Ani-D2"이라고도 표시됨)이며, 상기 화학식 3으로 표시되는 크로멘계 화합물은 말로아펠타 B (Malloapelta B) (본 명세서 내 실시예에서 "화합물 (3)"이라고도 표시됨)인 것으로, 이들 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염은 모두 암 세포에 대한 세포독성 활성을 가진다.

[0045] 그 중에서, 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 크로멘계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 ANO1 활성을 억제할 수 있고, 특히, 상기 화학식 2로 표시되는 크로멘계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 i) ANO1 단백질을 특이적으로 감소시키거나, ii) ANO1 염소이온채널 활성을 억제하거나, iii) 암 세포의 증식 또는 이동을 억제하거나, iv) 암 세포에서 세포자멸사(apoptosis)를 유도할 수 있다.

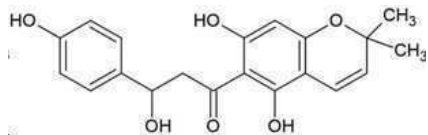
[0046] 본 발명의 크로멘계 화합물은 동일한 효능을 갖는 범위 내에서 이의 수화물, 이의 용매 화합물, 이의 입체 이성질체 등을 포함할 수 있다.

- [0047] 본 발명의 크로멘계 화합물의 수득방법은 특별히 한정되지 않으며, 본 발명의 크로멘계 화합물을 함유하고 있는 식물로부터 분리하거나, 공지된 제법을 사용하여 화학적으로 합성하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 크로멘계 화합물은 백배엽(*M. apelta*) 유래일 수 있고, 백배엽(*M. apelta*) 메탄올 추출물로부터 분리된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 상기 백배엽(*M. apelta*) 메탄올 추출물은 백배엽(*M. apelta*)의 건조된 잎을 메탄올로 추출한 것일 수 있다.
- [0049] 본 명세서 내 "약학적으로 허용가능한 염"은 약학적으로 허용 가능하면서, 본 발명의 크로멘계 화합물이 목적하는 약리학적 활성을 갖는 염을 지칭한다. 이러한 염으로는, (1) 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등에 의해 형성되거나, 유기산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 핵산산, 사이클로펜탄프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 락트산, 말론산, 석신산, 말산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-하이드록시벤조일)벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 1,2-에탄-다이설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 벤젠설폰산, 4-클로로벤젠설폰산, 2-나프탈렌설폰산, 4-톨루엔설폰산, 캄포설폰산, 4-메틸바이사이클로[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카복실산, 글루코헵톤산, 3-페닐프로피온산, 트라이메틸아세트산, 3급 부틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글루탐산, 하이드록시나프트산, 살리실산, 스테아르산, my콘산 등에 의해 형성되는 산 부가 염; 또는 (2) 크로멘계 화합물에 존재하는 산성 양성자가 대체될 경우 형성되는 염이 포함된다.
- [0051] 본 명세서 내 "암 예방 또는 치료용; 또는 암 전이 억제용"은 암 세포의 증식 또는 이동을 억제하거나, 암 세포에서 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 것을 모두 포함하여 의미한다.
- [0052] 바람직하게, 상기 암은 아놀타민1(ANO1)이 과발현된 환자의 암이거나, ANO1에 의해 발달된 암일 수 있다. 구체적으로, 상기 암은 전이성 고형암일 수 있고, 전립선암, 구강암, 유방암, 두경부 편평 세포 암종(HNSCC), 식도 편평 세포 암종(ESCC), 위장관기질종양(GIST), 대장암, 폐암(바람직하게, 소세포성 폐암을 제외한 폐암), 간세포 암종, 위암, 신경교종, 방광암, 흑색종, 난소암, 자궁암 및 췌장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것이 바람직하며, 전립선암 또는 구강암인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 한편, 소세포성 폐암은 ANO1의 발현이 크게 관여하지 않는 것으로 알려져 있다.
- [0054] 상기 조성물이 약학적 조성물인 경우, 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구제 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화되어 사용할 수 있고, 제형화를 위하여 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 담체 또는, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.
- [0056] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.
- [0057] 경구 투여를 위한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 제조할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다.
- [0058] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용하는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.
- [0059] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 사용할 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등을 사용할 수 있다.

- [0060] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서는 1일 0.0001 내지 2,000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 2,000 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어서 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량에 의해서 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0061] 상기 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유 동물에 다양한 경로로 투여할 수 있다. 투여의 모든 방식은 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해서 투여할 수 있다.
- [0063] 한편, 상기 조성물이 건강기능식품인 경우, 상기 건강기능식품에 있어서, 상기 화합물을 건강기능식품의 첨가물로 사용하는 경우 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적절하게 결정할 수 있다.
- [0064] 상기 건강기능식품의 제형은 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.
- [0065] 상기 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다.
- [0066] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 상기 화합물은 원료 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생용 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 또한 본 발명은 천연물질을 이용하는 점에서 안전성 면에서 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.
- [0067] 상기 건강기능식품 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 상기 음료 100 mL당 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g일 수 있다.
- [0068] 상기 외에 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그 밖에 상기 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 대비 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0070] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 항암용 또는 암 전이 억제용 조성물은 신규 ANO 억제제로서, 말로아펠타 I (Malloapelta I), 말로아펠타 II (Malloapelta II) 또는 말로아펠타 B (Malloapelta B) (바람직하게, 말로아펠타 II (Malloapelta II))를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는바, ANO1 활성을 유의적으로 억제함으로써, 암(바람직하게, ANO1 활성화 환자의 암) 예방, 개선 또는 치료 용도로 혹은 암 전이 억제 용도로 유용하게 활용될 수 있다.
- [0072] 한편, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 크로멘계 화합물을 제공한다:
- [0073] [화학식 1]



[화학식 2]



본 발명의 신규 크로멘계 화합물은 본 발명의 크로멘계 화합물 중 신규 화합물을 특정한 것으로서, AN01 활성을 유의적으로 억제함으로써, 암(바람직하게, AN01 활성화 환자의 암) 예방, 개선 또는 치료 용도로 혹은 암 전이 억제 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

본 발명의 신규 크로멘계 화합물은 백배엽(*M. apelta*) 유래일 수 있고, 백배엽(*M. apelta*) 메탄올 추출물로부터 분리된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 상기 백배엽(*M. apelta*) 메탄올 추출물은 백배엽(*M. apelta*)의 건조된 잎을 메탄올로 추출한 것일 수 있다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

재료 및 방법

(1) 일반사항

Bruker 500 MHz 상에서 모든 NMR 스펙트럼을 기록하였다. MestReNova ver. 9.0.1로 데이터 처리를 수행하였다. AGILENT 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 시스템을 사용하여 HRESIMS 스펙트럼을 획득하였다. 실리카겔(Kieselgel 60, 230~400 mesh, Merck) 또는 RP-18 레진(30~50 μ m, Fuji Silysia Chemical Ltd.) 상에서 컬럼 크로마토그래피(CC)를 수행하였다. 박층 크로마토그래피(TLC)를 위해, 사전 코팅된 실리카겔 60 F₂₅₄(0.25 mm, Merck) 및 RP-18 F₂₅₄S(0.25 mm, Merck) 플레이트를 사용하였다.

(2) 식물 재료

2018년 8월 베트남, 빈푹, 폭옌, 녹탄(21° 22' 35.4" N+105° 43' 23.9"E)에서 *M. apelta*(Lour.) Mull. Arg의 잎을 수집하였고, VAST 생태생명자원연구소 Nguyen The Cuong 박사가 감별확인하였다. VAST 생태생명자원연구소에 바우처 표본(MA1808)을 기탁하였다.

(3) 추출 및 분리

*M. apelta*의 건조된 잎(5.0 kg)을 메탄올(각 10L, 4 시간, 50°C)을 용매로 하여 2 회 초음파추출한 후 용매를 진공에서 제거하여 메탄올 추출물(568g)을 수득하였다. 메탄올 추출물을 H₂O(4.0 L)에 현탁한 다음 디클로로메탄으로 분배하여 디클로로메탄(MA1, 250.0 g) 분획물 및 H₂O 분획물(MA2)을 수득하였다.

MA1(120.0 g) 분획을 실리카 겔 CC 상에 로딩하였고, n-헥산아세톤(40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 1:1, v/v)의 용매 시스템으로 용리시켜, 각각 MA1A(15.0 g), MA1B(23.0 g), MA1C(15.0 g), MA1D(25.0 g) 및 MA1E(10.0 g)의 5개 보다 작은 분획을 수득하였다. MA1B 분획을 디클로로메탄-아세톤(40:1, v/v)으로 용리시키면서, 실리카 겔 CC 상에서 크로마토그래피를 실시하여, MA1B1(1.0 g), MA1B2(1.0 g), MA1B3 (1.2 g) 및 MA1B4 (1.3 g)의 4개 소분획을 수득하였다. MA1B3 분획에 대해 메탄올-물(3.5:1, v/v)을 용리용매로 사용하여, RP-18 CC 상에 크로마토그래피를 실시하여, MA1B1A (100 mg), MA1B1B (400 mg) 및 MA1B1C (100 mg)의 3개 보다 작은 분획을 수득하였다.

HPLC 시스템(J'sphere 컬럼, ODS H-80, 4 μ m, 150 길이 \times 20 mm ID)에서 3 mL/min의 유속으로 물 내 55% 아세토나이트릴을 이동상으로 사용하여 화합물 (1)을 수득하였다. MA1B3 분획에 n-헥산에틸 아세테이트(4:1, v/v)를 용매로 실리카 겔 CC 상에서 크로마토그래피를 실시하여, MA1B3A(80 mg), MA1B3B(150 mg) 및 MA1B3C(100 mg)의 3개 보다 작은 분획을 수득하였다. 메탄올-물(3.5:1, v/v)을 용리 용매로 사용하여, RP-18 CC 상에서 MA1B3B에 크로마토그래피를 실시하여, 화합물 (2)(14.8 mg) 및 화합물 (3)(6.7 mg)을 수득하였다. Diaion HP-20 컬럼 상에서 물을 용리 용매로 H₂O 분획(MA2)의 크로마토그래피를 실시하여 당 성분을 제거한 다음, 물내 메탄올 농도를 증가시켜(25, 50, 75 및 100 %, v/v), 각각 MA2A, MA2B, MA2C 및 MA2D의 4개 분획을 수득하였다. MA2C 분획을 실리카 겔 CC 상에 로딩하였고 디클로로메탄:메탄올 20:1, 10:1, 5:1, 1:1의 용매 시스템으로 용리하여 MA2C1(500 mg), MA2C2(700 mg), MA2C3 (1.2 g) 및 MA2C4 (1.0 g)의 4 개 보다 작은 분획을 수득하였다. MA2C2 분획을 용리 용매로서, 아세톤-물(1:4, v/v)을 사용하여, RP-18 CC 상에 크로마토그래피하여, MA2C2A(100 mg), MA2C2B(150 mg), MA2C2C(260 mg) 및 MA2C2D(110 mg)의 4개 분획을 수득하였다. 화합물 (5)를 3 mL/min의 유속으로 물 내 22% 아세토나이트릴로 용리하는 HPLC 시스템(J'sphere 컬럼, ODS H-80, 4 μ m, 150 길이 \times 20 mm ID)을 사용하여 MA2C2C로부터 수득하였다. 3 mL/min의 유속으로 물 내 25% 아세토나이트릴을 용리하는 HPLC 시스템(J'sphere 컬럼, ODS H-80, 4 μ m, 길이 150 길이 \times 20 mm ID)을 사용하여 MA2C2D를 정제하여 화합물 (6)(3.0 mg)을 수득하였다. MA2C3 분획을 용리 용매로서, 아세톤-물(1:1.5, v/v)을 사용하여 RP-18 CC 상에 크로마토그래피하여 MA2C3A(120 mg), MA2C3B(150 mg), MA2C3C(300 mg), MA2C3D(50 mg) 및 MA2C3E (150 mg)의 5개 분획을 수득하였다. MA2C3C를 용리 용매로서 메탄올-물(1:1, v/v)을 사용하여 Sephadex LH20 CC 상에 크로마토그래피하여 화합물 (4)(30.4 mg)를 수득하였다.

[0092] - 화합물 (1): 말로아펠타 I (Malloapelta I): 노란색 무정형 분말; C₂₀H₁₈O₅, HR-ESI-MS m/z : 339.1227 [M+H]⁺ (calcd. for C₂₀H₁₉O₅, 339.1232); ¹H (CD₃OD, 500 MHz) 및 ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) 데이터(표 1 참고).

[0093] - 화합물 (2): 말로아펠타 II(Malloapelta II): 노란색 무정형 분말; [α]_D²⁵ 0.0 (c 0.1, CDCl₃); C₂₀H₂₀O₆, HR-ESI-MS m/z : 357.1332 [M+H]⁺ (calcd. for C₂₀H₂₁O₆, 357.1338); ¹H (CDCl₃, 500 MHz) 및 ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) 데이터(표 1 참고).

[0094] (4) 세포 배양

[0095] 종래 알려진 방법으로, ANO1 및 CFTR을 안정적으로 발현하는 피셔 래트 갑상선(FRT) 세포를 배양하였다. FRT 세포를 10% 소 태아 혈청(FBS), 2 mM L-글루타민, 100 units/mL 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토 마이신과 함께 쿤스 변형 F12 배지에서 배양하였다. PC-3 및 CAL-27 세포를 각각 10% FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지 및 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)에서 배양하였다.

[0096] (5) ANO1 녹아웃(KO) 세포의 구축

[0097] (Sigma-Aldrich)으로 선택하였다. ANO1(CCTGATGCCGAGTGCAAGTA)(Clone ID : X35909)을 표적하는 Cas9 및 CRISPR 가이드 RNA를 함유하는 PLentiCRISPRv2 벡터를 Genscript (Piscataway, NJ, USA)로부터 구입하였다. CRISPR 플라스미드 1500 ng, 패키징 플라스미드(psPAX2) 1200 ng 및 엔벨로프 플라스미드(pMD2.G) 400 ng을 6-웰 플레이트에서 HEK293T 세포에 공동-형질 감염시켰다. 렌티바이러스 입자를 함유하는 상등액을 형질감염 48 시간 후 수집하였고, 0.45 μ m 시린지 필터로 여과하였다. 1:1 비의 신선한 배지와 혼합된 렌티바이러스 입자를 12시간 이상 24-웰 플레이트에 배양한 세포에 처리하였다. 그 다음, ANO1 녹아웃 세포를 바이러스 형질도입 72 시간 후 퓨로마이신(Sigma-Aldrich)으로 선택하였다.

[0098] (6) YFP 형광 퀀칭 분석

[0099] YFP 변이체(YFP-H148Q/I152L/F46L) 및 ANO1 모두를 안정적으로 발현하는 FRT 세포를 웰 당 2 \times 10³ 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 배양하였다. 48 시간 세포를 배양한 후, 각 웰을 PBS로 2 회 세척하였다. 그 다음, PBS에 혼합된 시험 화합물을 20 분 동안 처리하였다. 각 웰의 YFP 형광을 FLUOstar Omega 마이크로플레이트 리더로 5 초 동안 0.4 초마다 측정하였다. ANO1-매개 요오드화물 유입을 측정하기 위해, 100 μ M ATP를 가진 70 mM 요오드화물 용액 100 μ l를 측정 개시 1초 후 각 웰에 마이크로플레이트 리더로 자동 주입하였다. ATP 주입 후 형광 감소의 초기 기울기로부터 결정된 ANO1 활성화에 대한 시험 화합물의 억제 효과를 측정하였다.

[0100] (7) 단락 전류

[0101] ANO1 및 CFTR 발현 FRT 세포를 함유하는 스냅웰 삽입물을 Ussing 챔버 (Physiologic Instruments, San Diego, CA)에 장착하였다. 기저측 조(Basolateral bath)를 (mM): 120 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 D-글루코오스, 2.5 HEPES 및 25 NaHCO₃ (pH7.4)를 함유하는 HCO₃⁻ 버퍼 용액으로 채웠고, 내강측 조(apical bath)를 반-Cl⁻ 용액으로 채웠다. 반-Cl⁻ 용액에서, HCO₃⁻ 버퍼 용액 내 65 mM NaCl을 Na-글루코네이트로 대체하였다. 기저측 세포막을 250 µg/mL 암포테리신 B로 투과화시켰다. 세포를 20 분 동안 37°C에서 95% O₂/5% CO₂로 안정화시켰다. ATP를 내강측 조에 투여하여 ANO1을 활성화시키고, 포스콜린을 내강측 조에 투여하여 CFTR을 활성화시켰다. 화합물 (2)를 ANO1 및 CFTR 활성화 20 분 전에 내강측과 기저측 조 용액 모두에 적용하였다. 내강측 전류를 EVC4000Multi-Channel V / I Clamp (FL, Sarasota, World Precision Instruments) 및 Power Lab 4/35(AD Instruments, Castle Hill, Australia)로 측정하였다. Lab chart Pro 7(AD Instruments)을 사용하여 데이터를 분석하였다. 샘플링 속도는 4Hz였다.

[0102] **(8) 세포 내 칼슘 측정**

[0103] FRT 세포를 96-웰 블랙-웰드 마이크로플레이트에서 배양하였고, 제조업체의 프로토콜(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 따라 Fluo4 NW로 로딩하였다. 간략하게, 세포를 Fluo-4 NW를 포함하는 100 µL 분석 버퍼(2.5 mM 프로베네사이드 및 20 mM HEPES를 가진 1× 헝크스 평형 염 용액)과 함께 인큐베이션하였다. 1 시간 인큐베이션 후, 96-웰 플레이트를 형광 분석을 위한 플레이트 판독기로 이동시켰다. Fluo-4 형광은 시린지 펌프 및 맞춤형 Fluo-4 excitation/emission 필터(485/538 nm)가 장착된 FLUO star Omega microplate reader(BMG Labtech)로 측정하였다.

[0104] **(9) 웨스턴 블랏 분석**

[0105] 종래 알려진 방법으로, 샘플을 준비하였다. 단백질 샘플을 4-12% 트리스-글라이신-PAG 프리-캐스트 겔(KOMA BIOTECH)로 분리하였고, PVDF막으로 이동시켰다. 블로킹은 1 시간 동안 0.1% 트윈 20 (TBST)을 가진 트리스-버퍼 식염수 내 5% 소 혈청 알부민(BSA)을 사용하여 수행 하였다. 그 다음, 막을 항-ANO1(Abcam), 항-β-액틴 (Santa Cruz Biotechnology) 및 항-절단 PARP(BD Biosciences) 항체를 포함하는, 상응하는 1차 항체와 함께 인큐베이션하였고, 그 다음, 추가 1 시간 동안 HRP-접합된 항-2차 IgG 항체(Enzo life science)를 인큐베이션하였다. 마지막으로, ECL Plus Western Blotting System(GE Healthcare)을 사용하여 시각화를 수행하였다.

[0106] **(10) 세포 생존력 분석**

[0107] CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit(Promega)를 사용하여 MTS 세포 증식 분석을 수행하였다. PC-3 및 CAL-27 세포를 96-웰 플레이트에서 24 시간 동안 3% FBS가 보충된 배지로 배양하였다. 세포가 약 20% 합류(confluence)에 도달하면, 화합물 또는 대조군을 배지에 처리하였고, 24 시간 마다 새로 교환하였다. 48 시간 처리 후 배지를 완전히 제거하였고, 공급업체의 프로토콜에 따라 MTS 분석을 수행하였다. Infinite M200 마이크로플레이트 리더(Tecan)로 490 nm의 파장에서 포르마잔의 흡광도를 측정하였다.

[0108] **(11) 상처 치유 분석**

[0109] PC-3 및 CAL-27 세포를 96-웰 플레이트에서 배양하여 약 80% 합류(confluence)로 단층을 형성하였다. 96-웰 WoundMaker(Essen BioScience, MI)를 사용하여 상처 부위를 형성하였다. 상처 형성 후, 각 웰을 무혈청 배지로 2 회 세척하고 2% FBS를 함유하는 배양 배지 200 µL와 함께 인큐베이션하였다. IncuCyte ZOOM(Essen BioScience, MI)을 사용하여 상처의 이미지를 촬영하였고, IncuCyte 소프트웨어를 사용하여 상처 봉합의 백분율을 분석하였다.

[0110] **(12) 카스파아제-3 활성 분석**

[0111] PC-3 및 CAL-27 세포를 96-웰 플레이트에서 배양하여 약 30% 합류(confluence)에 도달하였다. 2 및 Ac-DEVD-CHO, 카스파아제-3 억제제를 상응하는 웰로 처리하였다. 24 시간 후, 각 웰을 PBS로 세척하고, NucView 488 카스파아제-3 기질 1 µM을 함유하는 PBS 100 µL와 함께 실온에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 30분 후, 세포를 1 µM Hoechst 33342로 염색하였다. FLUOstar Omega 마이크로플레이트 리더(BMG Labtech)로 NucView 488 및 Hoechst 33342의 형광을 각각 측정하였고, Lionheart FX Automated Microscope(BioTek)를 통해 멀티-컬러 이미지를 촬영하였다.

[0112] **(13) 통계학적 분석**

[0113] 다중 시험에 대한 결과는 평균 \pm S.E로서 제시되었다. 스튜던트 t-검정 또는 분산의 분석을 적절히 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 0.05 미만의 P값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 용량-반응 곡선을 플롯하고 IC₅₀ 값을 계산하였다.

[0115] 실시예 1: 화합물의 분리

[0116] *M. apelta*의 건조된 잎을 메탄올로 초음파 처리하여 메탄올 추출물을 수득하였다. 메탄올 추출물을 물에 현탁시킨 다음 디클로로메탄으로 분배하여 디클로로메탄 분획(MA1) 및 물 분획(MA2)을 수득하였다. 다양한 크로마토그래피 방법을 사용하여, 2개 신규 크로멘 및 4개 공지 화합물을 분리하였다(도 1 참고).

[0118] 실시예 2: 화합물의 구조 설명

[0119] 화합물 (1)을 노란색 분말로 분리하였다. NMR 데이터와 함께, HR-ESI-MS에서 m/z 339.1227[M+H]⁺(C₂₀H₁₉O₅에 대한 계산치, 339.1232)에서 유사-분자 이온 피크에 의해 그의 분자식을 C₂₀H₁₈O₅로 추론하였다. 화합물 (1)의 ¹H-NMR 스펙트럼은 AA'BB' 아조매틱 고리[δ_H 7.52 및 6.86(각각, 2H, d, J = 8.5 Hz)], 2개 트랜스 올레핀성 양성자[δ_H 8.00 및 7.70(각각, 1H, d, J = 15.5 Hz), 2개 시스 올레핀성 양성자[δ_H 6.61 및 5.52(각각, 1H, d, J = 10 Hz)] 및 2개 메틸 그룹[δ_H 1.56(6H, s)]에 상응하는 신호를 나타내었다. 화합물 (1)의 ¹³C-NMR 스펙트럼은 HSQC에 의해 9개 비-양성자화 탄소, 9개 메틴 및 2개 메틸 그룹으로 분류된 20개 탄소 원자의 신호를 나타내었다(표 1). 비-차폐 탄소 신호(δ_C 194.1)는 케톤 그룹에 할당되었다. 화합물 (1)의 HMBC 스펙트럼은 2 개 개별 구조 단편의 H-C 상호작용을 나타내었다. H-3'(δ_H 7.70) 및 C-1'(δ_C 194.1)/C-4'(δ_C 128.4)/C-5'(δ_C 131.2)/C-9'(δ_C 131.2), H-5'(δ_H 7.52)/H-9'(δ_H 7.52) 및 C-7'(δ_C 161.2) 사이의 HMBC 상관관계와 함께 H-2' 및 H-3' 사이의 J 커플링 상수 값(J_{H-2'/H-3'} = 15.5 Hz)은 트랜스-p-쿠마로일 그룹의 존재를 나타내었다. 한편, H-4(δ_H 6.61) 및 C-3(δ_C 125.3)/C-10(δ_C 104.0)/C-5(δ_C 157.7)/C-9(δ_C 161.6), H-8(δ_H 5.93) 및 C-6(δ_C 106.7)/C-7(δ_C 167.5)/C-9(δ_C 161.6)/C-10(δ_C 104.0) 사이의 HMBC 상관관계와 함께 H-3 및 H-4 사이의 J 커플링 상수 값(J_{H-3/H-4} = 10.0Hz)은 2H-크로멘 부분의 존재를 제안하였다. H-11(δ_H 1.56)/H-12(δ_H 1.56) 및 C-2(δ_C 79.1)/C-3(δ_C 125.3) 사이의 HMBC 상관관계는 C-2에서 2 개 메틸 그룹의 존재를 입증하였다. 다른 2개 비-차폐 탄소[C-5(δ_C 157.7) 및 C-7(δ_C 167.5)]에 대한 신호는 C-5 및 C-7에서 하이드록시기의 존재를 제안하였다. 마지막으로, C-6 및 C-1' 사이의 직접 C-C 결합은 화합물 (1)의 분자식으로 구성되었던 C-1'에서 케톤 그룹을 형성하는 것을 제안하였다. 결과적으로, 화합물 (1)의 화학 구조가 확립되었고, 말로아펠타 I(Malloapelta I)으로 명명하였다.

[0120] 화합물 (2)를 노란색 무정형 분말로 분리하였다. 화합물 (2)의 HR-ESI-MS 분석은 그의 분자식이 C₂₀H₂₀O₆임을 나타내었고, m/z 357.1332 [M+H]⁺에서 유사-분자 이온 피크(C₂₀H₂₁O₆에 대한 계산치, 357.1338)를 나타내었다. 화합물 (2)의 ¹H-NMR 스펙트럼은 AA'BB' 방향족 양성자 고리[δ_H 7.31 및 6.87(각각, 2H, d, J = 8.5 Hz)], 시스 올레핀성 양성자[δ_H 6.62 및 5.50(각각, 1H, d, J = 10.5 Hz)], 옥시메틴 그룹[δ_H 5.34(1H, dd, J = 3.0 및 13.0 Hz)], 메틸렌 그룹[δ_H 3.07(1H, dd, J = 13.0 및 17.0 Hz) 및 2.78(1H, dd, J = 3.0 및 17.0 Hz)] 및 2 개 메틸 그룹[δ_H 1.44 및 1.43(각각, 3H, s)]의 신호를 나타내었다. 화합물 (2)의 ¹³C-NMR 스펙트럼은 20개 탄소 원자의 신호를 나타내었고 HSQC에 의해 9개 비-양성자화 탄소(δ_C 196.1, 162.5, 162.3, 158.4, 156.2, 130.5, 103.1, 102.8 및 78.4), 8개 메틴 탄소[δ_C 128.0 \times 2, 126.3, 115.7 \times 2, 115.3, 96.3 및 78.9)], 1 개 메틸렌 탄소(δ_C 43.1) 및 2 개 메틸 탄소(δ_C 28.5 및 28.4)로 분류되었다(표 1). 기본적으로, 화합물 (2)의 ¹H- 및 ¹³C-NMR 데이터는 화합물 (1)의 데이터와 매우 유사하였으며 H-2'/C-2' 및 H-3'/C-3'의 신호에서 차이

가 발견되었다. 특히, 화합물 (1)에서 트랜스-이중 결합에 대한 신호는 화합물 (2)에서 옥시메틴 그룹(δ_{H} 5.34 및 δ_{C} 78.9) 및 메틸렌 그룹(δ_{H} 3.07 및 2.78 및 δ_{C} 43.1)의 신호로 대체되었다. H-3'(δ_{H} 5.34) 및 C-1'(δ_{C} 196.1)/C-4'(δ_{C} 130.5)/C-5' /C-9'(δ_{C} 128.0) 사이의 HMBC 상관 관계는 C-3 '에서 하이드록시기의 존재를 나타내었다. 따라서, H₂-2'(δ_{H} 3.07 및 2.78)과 C-4'(δ_{C} 130.5) 사이의 HMBC 상관관계에 의해 메틸렌의 위치를 결정하였다. 화합물 (2)의 광학 회전이 약 0이었기 때문에, 라세미 용액에서 발생하는 것으로 예상되었으며 화합물 (2)의 ECD 스펙트럼에서 코튼 효과가 관찰되지 않았기 때문에 라세미 혼합물임을 확인하였다. 결과적으로, 화합물 (2)의 화학 구조가 확립되었고, 말로아펠타 II (Malloapelta II)로 명명하였다.

[0121]

공지 화합물은 그들의 관찰된 데이터와 종래 물리적 데이터를 비교함으로써, 말로아펠타 B(Malloapelta B)(화합물 (3)), 아피제닌-7-O-β-D-글루코피라노사이드(apigenin-7-O-β-D-Glucopyranoside)(화합물 (4)), 블루메놀 C 글루코피라노사이드(blumenol C glucopyranoside)(화합물 (5)) 및 아칸트리포사이드 E (acantrifoside E)(화합물 (6))으로 밝혔다(도 1).

표 1

[0122]

C	화합물 (1)		화합물 (2)	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a)}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a)}$ (mult., $J = \text{Hz}$)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b)}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b)}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
2	79.1	-	78.4	-
3	125.3	5.52 (d, 10.0)	126.3	5.50 (d, 10.5)
4	118.0	6.61 (d, 10.0)	115.3	6.62 (d, 10.5)
5	157.7	-	162.3	-
6	106.7	-	102.8	-
7	167.5	-	162.5	-
8	96.7	5.93 (s)	96.3	5.95 (s)
9	161.6	-	158.4	-
10	104.0	-	103.1	-
11	28.2	1.56 (s)	28.5	1.44 (s)
12	28.2	1.56 (s)	28.4	1.43 (s)
1'	194.1		196.1	
2'	125.5	8.00 (d, 15.5)	43.1	2.78 (dd, 3.0, 17.0) 3.07 (dd, 13.0, 17.0)
3'	143.7	7.70 (d, 15.5)	78.9	5.34 (dd, 3.0, 13.0)
4'	128.4	-	130.5	-
5' 9'	131.2	7.52 (d, 8.5)	128.0	7.31 (d, 8.5)
6' 8'	117.0	6.86 (d, 8.5)	115.7	6.87 (d, 8.5)
7'	161.2	-	156.2	-

[0123]

^{a)} CD30D에서 기록됨, ^{b)} CDC13에서 기록됨; HSQC, HMBC 및 COSY 실험에 의해 평가됨.

[0125]

실시예 3: PC-3 세포에 대한 화합물의 세포독성 효과

[0126]

모든 화합물을 대상으로, 30 μM 의 농도에서 PC-3 전립선암 세포에 대한 세포독성 활성에 대해 평가하였다. 화합물 (1)-(3)은 양성 대조군인 카페시타빈(IC₅₀ 값 11.2 \pm 1.44 μM)과 비교하여, 각각 8.89 \pm 0.17, 7.29 \pm 0.20 및 1.60 \pm 0.05 μM 의 IC₅₀ 값을 나타내며 세포 생존력을 강력하게 억제하였다.

표 2

[0127]

화합물	세포 생존력 [#]	IC ₅₀ ^{\$} (μM)
화합물 (1)	30.5 \pm 0.28	8.89 \pm 0.17
화합물 (2)	12.0 \pm 0.11	7.29 \pm 0.20
화합물 (3)	1.9 \pm 0.02	1.60 \pm 0.05
화합물 (4)	78.3 \pm 0.72	>30

화합물 (5)	97.4 ± 0.90	>30
화합물 (6)	102.5 ± 0.94	>30
카페시타빈	27.1 ± 0.20	11.2 ± 1.44

[0128] # 화합물은 48 시간 동안 30 μM의 농도에서 처리됨.

[0130] 실시예 4: 신규 ANO1 억제제의 확인 및 특성

[0131] *M. apelta*의 메탄올 추출물로부터 신규 ANO1 억제제를 확인하기 위해 세포 기반 분석을 수행하였다. ANO1 활성화에 대한 화합물 (1)-(6)의 억제 효과를 인간 ANO1을 발현하는 FRT 세포에서 YFP(F46L/H148Q/I152L) 퀀칭 분석으로 측정하였다. 도 3A에 나타난 바와 같이, 화합물 (1)(Ani-D1) 및 화합물 (2)(Ani-D2)는 25 μM의 농도에서 ANO1 활성을 99% 이상 억제하였다. 흥미롭게도, Ani-D2는 PC-3 세포에서 Ani-D1에 비해 ANO1 단백질 수준을 보다 강하게 감소시켰다(도 3B 및 3C). 따라서, 추가 연구를 위해 Ani-D2를 선택하였다.

[0132] ANO1 염소이온채널 활성화에 대한 Ani-D2의 억제 효과를 측정하기 위해, 내강막 전류를 인간 ANO1을 발현하는 피서 래트 갑상선(FRT) 세포에서 측정 하였다. 전처리한 Ani-D2의 IC₅₀ 값이 2.64 μM로서 ATP-활성화된 ANO1 염소이온 전류를 유의하게 억제하였다(도 4A 및 4B). 칼슘 신호전달에 대한 Ani-D2의 효과를 관찰하기 위해, FRT 세포를 형광 칼슘 지시제, Fluo-4로 염색하였다. Ani-D2의 전처리는 세포질 칼슘 농도에서 ATP-유도된 칼슘의 증가를 크게 변화시키지 않았다(도 4C). 다른 염소이온채널 활성화에 대한 Ani-D2의 효과를 조사하기 위해, 본 발명자들은 인간 CFTR을 발현하는 FRT 세포에서 CFTR 염소이온채널의 내강막 전류를 측정하였다. Ani-D2는 ANO1의 완전한 억제를 나타내는 30 μM의 농도에서 CFTR 채널 활성화에 대한 최소 억제 효과를 나타내었다(도 4D).

[0134] 실시예 5: PC-3 및 CAL-27 세포에서 세포 증식 및 이동에 대한 Ani-D2의 억제 효과

[0135] 종래 연구는 ANO1의 약리학적인 차단이 전이성 전립선암 세포의 세포 증식 및 구강암 세포의 전이를 억제한다는 것을 보여주었다. 도 5A 및 5B에 나타난 바와 같이, 흥미롭게도, Ani-D2는 용량-의존적 방식으로 ANO1 단백질 수준의 상당한 감소를 유도하였다. 또한, Ani-D2는 PC-3 및 CAL-27 세포에서 세포 생존력을 유의하게 감소시켰고, ANO1 KO 세포에서 세포 독성 효과는 미미하였다(도 5C 및 5D). 특히, Ani-D2는 ANO1을 발현하는 PC-3 세포에 대한 유의적인 세포독성 효과를 나타내는 3 μM의 농도에서 ANO1 KO PC-3 세포의 세포 생존력에 영향을 미치지 않았다. 또한, Ani-D2는 ANO1 발현 CAL-27에서 세포 생존력을 강하게 감소시켰지만, ANO1 KO CAL-27 세포에서는 그렇지 않았다.

[0136] Ani-D2가 암 세포의 이동을 억제하는지 여부를 확인하기 위해, ANO1을 고도로 발현하는 PC-3 및 CAL-27 세포에서 세포 상처 치유 분석을 수행하였다. 1, 3 및 10 μM의 농도에서 Ani-D2는 PC-3 세포에서 각각 31.3, 68.0 및 88.3%로, CAL-27 세포에서 각각 31.8, 64.0 및 87.5%로 이동을 강하게 억제하였다(도 6).

[0138] 실시예 6: PC-3 및 CAL-27 세포에서 Ani-D2에 의한 카스파아제-3 활성화 및 PARP 절단의 증가

[0139] ANO1 단백질의 약리학적인 억제는 다양한 암 세포에서 아포토시스를 일으킨다. Ani-D2가 ANO1을 높은 수준으로 발현하는 PC-3 및 CAL-27 세포에서 아포토시스를 유도하는지 여부를 조사하기 위해, 카스파아제-3 활성화 및 PARP 절단에 대한 Ani-D2의 효과를 이들 세포에서 관찰하였다. 도 7A 및 7B에 나타난 바와 같이, Ani-D2는 PC-3 및 CAL-27 세포 모두에서 카스파아제-3 양성 세포를 강하게 증가시켰다. 카스파아제-3 활성화는 PC-3 및 CAL-27 세포에서 용량-의존적 방식으로 Ani-D2에 의해 유의적으로 증가하였고, 카스파아제-3 활성화에서 Ani-D2 유도된 증가는 AC-DEVD-CHO, 특정 카스파아제-3 억제제에 의해 완전히 억제되었다(도 7C 및 7D). 또한, Ani-D2 처리는 PC-3 및 CAL-27 세포에서 절단된 PARP-1을 유의적으로 증가시켰다(도 7E 및 7F).

[0141] 다양한 암종에서 ANO1 증폭 및 과발현이 보고되었다. 종래 연구는 ANO1이 전립선암, 구강암, 유방암 및 췌장암과 같은 암에 대한 잠재적인 치료 목표임을 제안한다. 본 발명에서, 본 발명자들은 *M. apelta*의 메탄올 추출물로부터 신규 ANO1 억제제를 확인하기 위해 세포 기반 스크리닝을 수행했으며, Ani-D2가 ANO1 억제제라는 것을

발견하였다. 종래 연구는 ANO1 억제제가 다양한 암 세포에서 ANO1의 하향 조절에 의해 암 진행을 조절할 수 있음을 시사한다. ANO1 억제제는 Ca^{2+} /칼모둘린-의존성 단백질 키나제 II(CAMKII)의 활성화 및 표피 성장 인자 수용체(EGFR)의 발현을 억제함으로써, 유방암, 두경부 편평 세포 암종(HNSCC) 및 식도 편평 세포 암종(ESCC)에서 세포 생존력을 감소시켰다. 또한, ANO1의 과발현은 EGFR-매개 AKT/SRC/ERK1/2 신호전달 또는 Ras-Raf-MEK-ERK1/2 신호전달 경로를 활성화시킴으로써 중앙 성장을 촉진한다. 따라서, ANO1은 암 치료를 위한 잠재적인 약물 표적일 수 있고, ANO1 억제제는 암 치료를 위한 치료 가능성을 가질 수 있다.

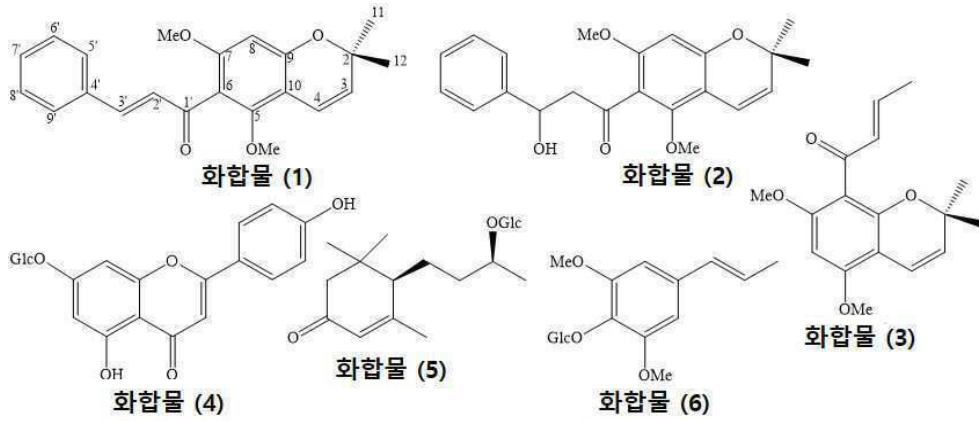
[0142] *M. apelta*는 중국 및 베트남에 널리 분포되어 있으며 전통의학에서 만성 간염, 백혈병 및 대장염을 치료하는 용도로 사용되어 왔다. *M. apelta* 잎으로부터 추출한 플라보노이드는 항산화 활성을 가지고 TGF-beta/Smad 및 NF-kB 신호전달을 조절하여 래트에서 사염화탄소(CCl_4)-유도된 섬유증에서 간섬유증을 억제한다. *M. apelta*의 벤조피란 유도체는 인간 간세포 암종(Hep-2) 및 황문육종(RD) 세포에 대한 세포독성 효과를 보여준다. 이러한 결과는 *M. apelta* 추출물이 암 치료를 위한 잠재적인 제제인 유용한 활성 물질을 함유할 수 있음을 시사한다. 본 발명에서, 본 발명자들은 ANO1의 강력하고 선택적인 억제제를 보여주는 *M. apelta*의 메탄올 추출물로부터, 활성 물질인, Ani-D2를 찾을 수 있었고(도 4), Ani-D2는 ANO1 염소이온채널 활성을 억제할 뿐만 아니라, PC-3 및 CAL-27 세포에서 ANO1의 단백질 수준을 유의적으로 감소시켰다(도 5A-5B). 특히, Ani-D2는 ANO1을 발현하는 PC-3 및 CAL-27 세포의 세포 생존율을 유의적으로 감소시켰지만, 최대 3 μM 의 농도에서 ANO1 KO PC-3 및 CAL-27 세포의 세포 생존력에 대한 최소 억제 효과를 보였다(도 5C-5D). 종래 본 발명자들은 이데베논, 루테올린 및 Ani9-5f가 ANO1 채널 활성화 및 단백질 발현 수준 모두를 유의하게 감소시켰으며, 그들은 ANO1을 높은 수준으로 발현하는 PC-3 세포에서 세포 생존력의 강한 억제를 나타내었음을 보고한바 있다. 그러나, ANO1 단백질 발현 수준에 대한 최소 효과로 ANO1 채널 활성화 만 강력하게 억제하는 캠페롤 및 Ani9는 PC-3 세포의 세포 생존력에 대한 약한 억제 효과를 나타내었다. 이러한 발견은 ANO1의 단백질 발현 수준을 감소시키는 것이 ANO1 채널 활성을 차단하는 것보다 항암 효과를 나타내는데 보다 중요할 수 있음을 나타낸다. 따라서, Ani-D2는 ANO1 채널 활성화뿐만 아니라 ANO1의 단백질 발현 수준을 강력하게 감소시키기 때문에, PC-3 세포의 세포 생존력에 대한 강력한 억제 효과를 가질 수 있다. 또한, Ani-D2는 ANO1을 발현하는 PC-3 및 CAL-27 세포의 세포 이동 속도를 유의적으로 감소시켰고(도 6), 아포토시스의 상징적 마커인 카스파아제-3 활성화 및 PARP 절단을 증가시켰다(도 7). 종합하면, 본 발명에 따른 결과는 Ani-D2가 ANO1의 억제를 통해 부분적으로 세포자멸사(apoptosis)를 유도함으로써, 전립선암 및 구강암 세포에서 세포 독성을 나타냄을 강력하게 시사한다.

[0143] 결론적으로, 2개 신규 크로멘 유도체 및 4개 공지 화합물을 *M. apelta*의 잎으로부터 성공적으로 분리하였다. 2개 신규 크로멘 유도체 중 하나인 Ani-D2는 PC-3 암 세포에서 유의적인 세포 독성 활성화 및 ANO1의 강력한 억제를 나타내었다. Ani-D2는 세포 내 칼슘 신호전달 및 CFTR 염소이온채널 활성화에 영향을 미치지 않으면서 ANO1의 채널 활성화 및 단백질 발현 수준 모두를 유의적으로 감소시켰다. 흥미롭게도, Ani-D2는 ANO1-의존적 방식으로 인간 전립선암 PC-3 세포 및 구강 편평 세포 암종 CAL-27 세포에 대한 세포독성을 나타내었다. 또한, Ani-D2는 ANO1을 고도로 발현하는 PC-3 및 CAL-27 세포에서 카스파아제-3의 활성화 및 PARP의 절단을 통해 세포 이동을 유의적으로 감소시켰고 세포자멸사(apoptosis)를 유의적으로 유도하였다. 따라서, ANO1 억제제인 Ani-D2는 전립선암 및 구강 편평 세포 암종을 포함하는, ANO1을 과발현하는 암의 치료에 유용할 수 있다.

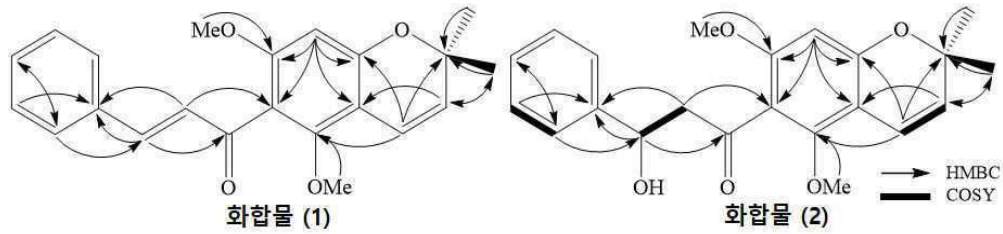
[0145] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

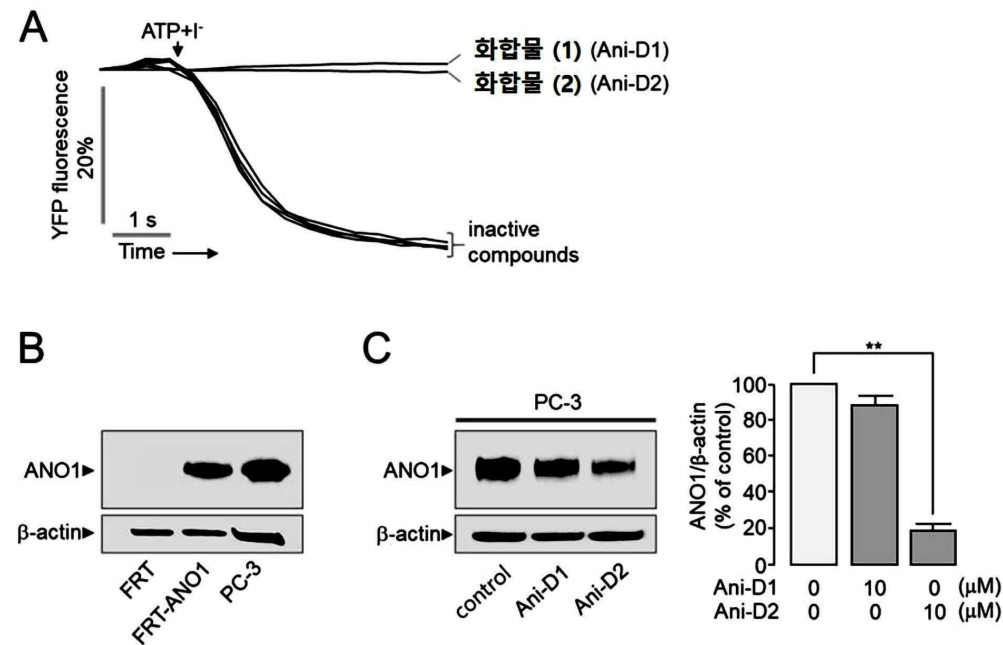
도면1



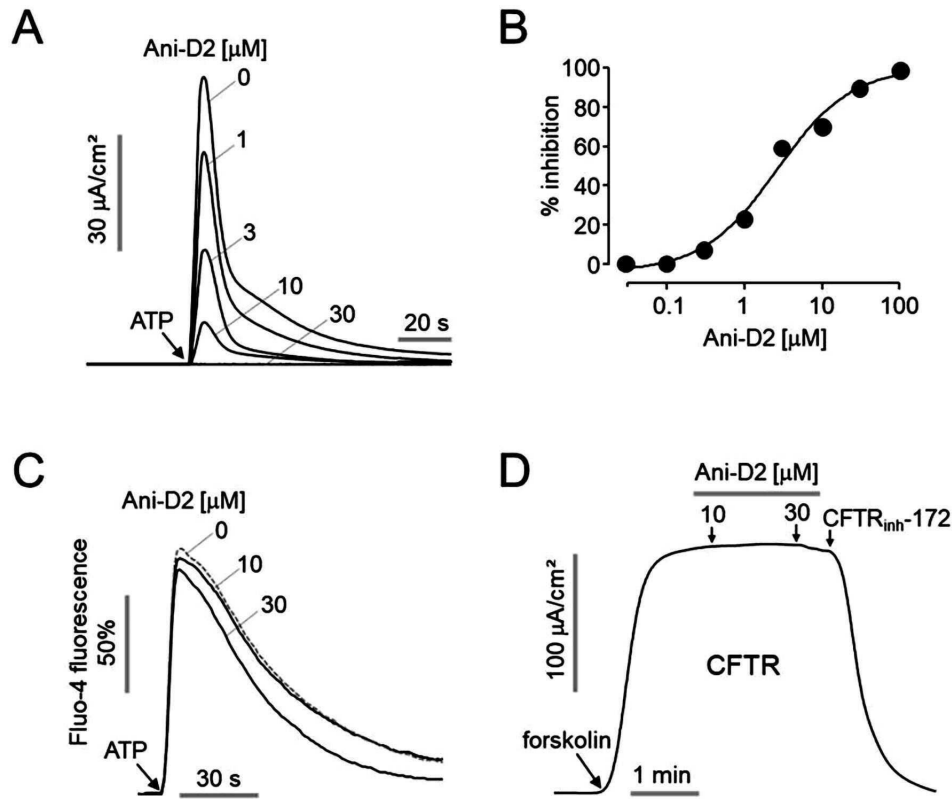
도면2



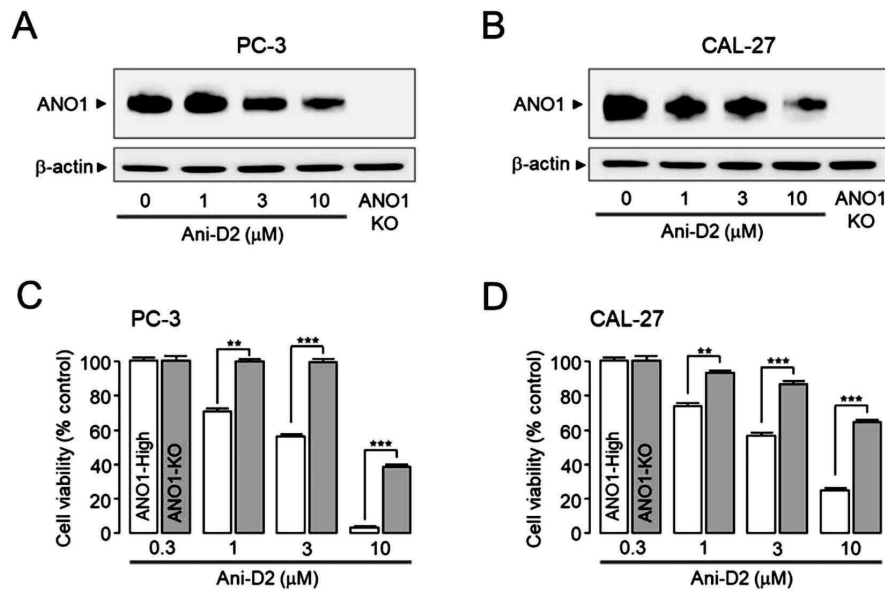
도면3



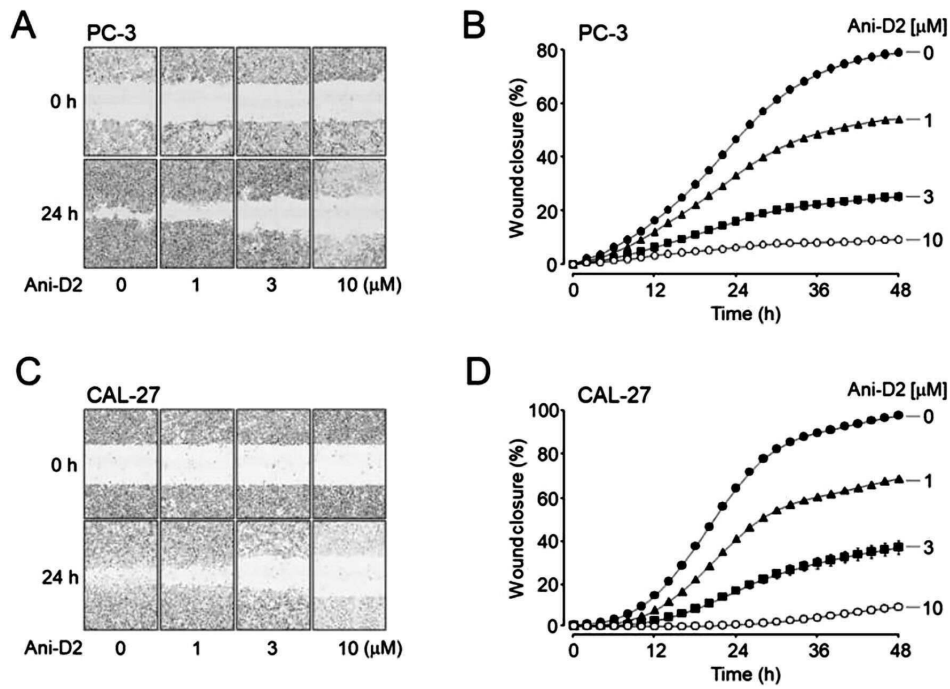
도면4



도면5



도면6



도면7

