

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-502532

(P2011-502532A)

(43) 公表日 平成23年1月27日 (2011.1.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 Z N A A	4 B 0 1 8
C 1 2 N 1/14 (2006.01)	C 1 2 N 1/14 A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 A	4 B 0 6 5
C 1 2 P 17/18 (2006.01)	C 1 2 P 17/18 B	4 C 0 5 0
C 1 2 P 1/04 (2006.01)	C 1 2 P 1/04 A	4 C 0 7 2
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-533956 (P2010-533956)
 (86) (22) 出願日 平成20年10月23日 (2008.10.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年7月9日 (2010.7.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2008/006275
 (87) 国際公開番号 W02009/066876
 (87) 国際公開日 平成21年5月28日 (2009.5.28)
 (31) 優先権主張番号 10-2007-0118544
 (32) 優先日 平成19年11月20日 (2007.11.20)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 507238137
 コリア インスティテュート オブ サイエンス
 エンズ アンド テクノロジー
 大韓民国 136-792 ソウル, ソンブーグ
 ハウルゴードン 39-1
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 ヤン ヒョンオク
 大韓民国 210-740 カンウォンード
 カンヌンーシ チョードン キョンポ
 ヒュンダイ アパートメント ナンバー1
 05-101

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スピンゴモナス属バクテリア菌株とアスペルギルス属カビ菌株の混合培養方法、それに由来した新規な抗癌抗生物質であるグリオニトリン (glionitrins)、及び前記グリオニトリン

(57) 【要約】

本発明は、新規なスピンゴモナス属バクテリア菌株 K M K - 0 0 1 を液体培地で培養して、前記バクテリア菌株の培養液に液体培地で別に培養した新規なアスペルギルス属菌株 K M C - 9 0 1 を加えて混合培養するスピンゴモナスバクテリア - アスペルギルスカビの混合培養法、それから生成された新規なグリオニトリン (Glionitrins)、及び前記グリオニトリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分とする製薬組成物に関するものである。前記グリオニトリンは、癌細胞に対して強い細胞毒性効果があり、スピンゴモナス属新規バクテリア菌株 K M K - 0 0 1 を含む 1 0 種の有害菌に対する抗生効果を示すことから抗癌剤または抗生剤に有用に用いることができる。

【選択図】 図 1



[Fig. 1]

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

受託番号 K C C M 1 0 8 8 8 P で寄託されたスピノゴモナス属バクテリア。

【請求項 2】

受託番号 K C C M 1 0 8 8 9 P で寄託されたアスペルギルス属カビ。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のスピノゴモナス属バクテリア菌株を液体培養した培養液に、別に液体培養した請求項 2 に記載のアスペルギルス属カビ菌株または菌株を含んだ培養液を加えて培養する工程を含む菌複合体の混合培養方法。

【請求項 4】

スピノゴモナス属バクテリア菌株及びアスペルギルス属カビ菌株を 1 0 0 0 : 1 . 0 ~ 1 0 0 0 : 0 . 1 の割合で混合することを特徴とする請求項 3 に記載の混合培養方法。

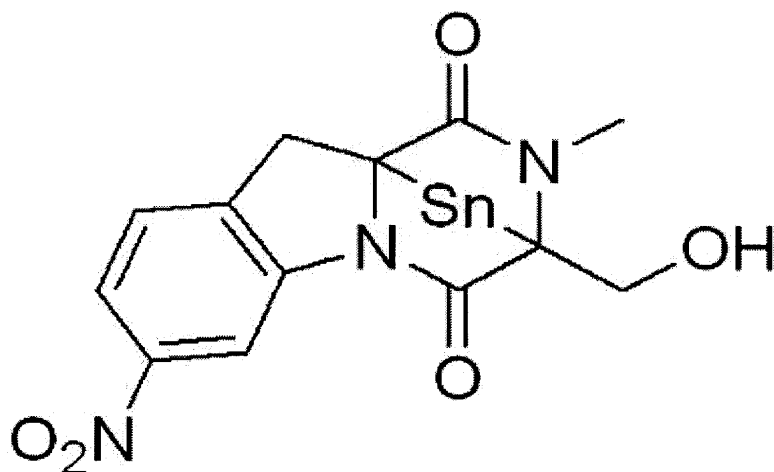
【請求項 5】

請求項 3 に記載の混合培養方法で培養された菌複合体の培養液。

【請求項 6】

請求項 3 に記載の混合培養方法で培養された菌複合体の培養液から分離される下記化学式 1 または化学式 2 で表わされる化合物：

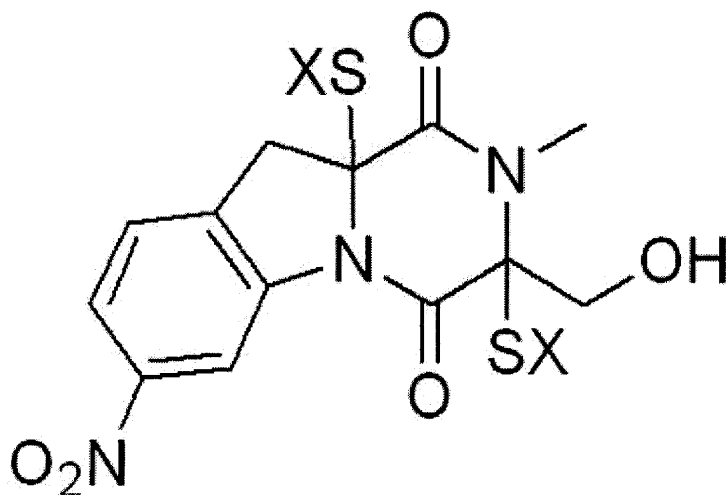
【化 1】



化学式 1

n は、イオウの個数を示し、1 ~ 4 であり、

【化 2】



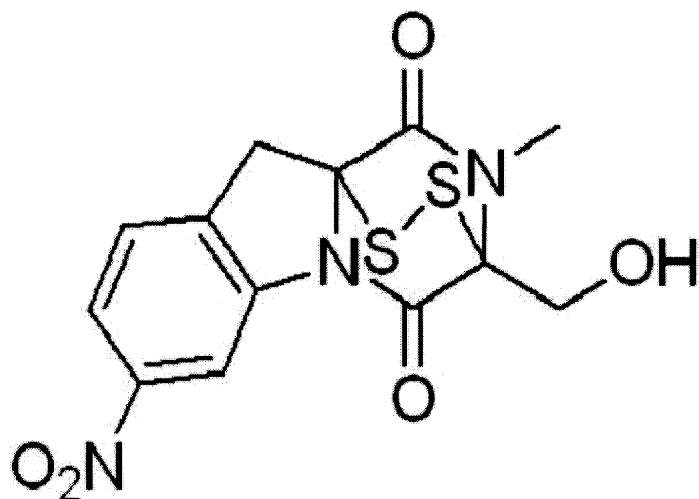
化学式 2

X は水素、または C 1 ~ C 5 アルキル基であり、互いに同じかまたは異なり、すべての非対称炭素での異性体を含む。

【請求項 7】

下記化学式 3 または化学式 4 で表わされることを特徴とする請求項 6 に記載の化合物：

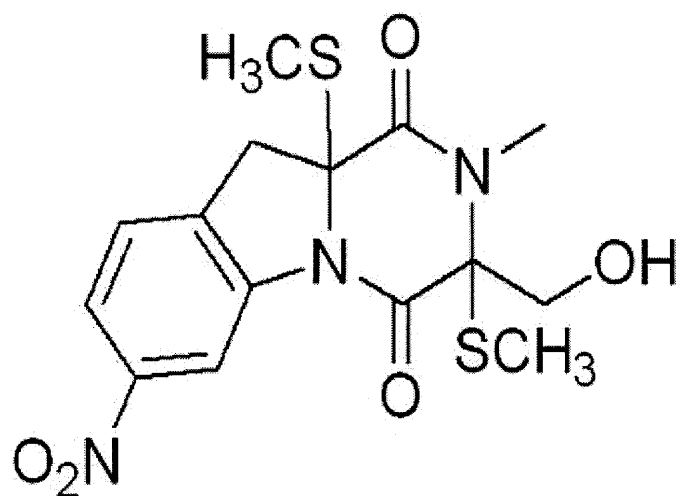
【化 3】



化学式 3

10

【化 4】



化学式 4

20

30

【請求項 8】

n が、3 または 4 であることを特徴とする請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 9】

請求項 5 に記載の培養液、または請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物を含む抗癌剤。

【請求項 10】

癌が、胃癌、肝癌、大腸癌、肺癌または前立腺癌であることを特徴とする請求項 9 に記載の抗癌剤。

40

【請求項 11】

請求項 5 に記載の培養液、または請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物を含む抗菌剤。

【請求項 12】

請求項 1 に記載のスフィンゴモナス属 (*Sphingomonas* sp.) バクテリア、バチルス・サブティリス (*Bacillus subtilis*)、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*)、サルモネラ・ティフィリウム (*Salmonella typhimurium*)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*Methicillin Resistance Staphylococcus aureus*)、アスペルギルス・フミガーツフまたは *T. ルブルム* (*Trichophyton rub*

50

rum) 菌株に対する抗菌効果を示すことを特徴とする請求項 11 に記載の抗菌剤。

【請求項 13】

1) 請求項 1 に記載のスピンゴモナス属バクテリア菌株を液体培養した培養液に請求項 2 に記載のアスペルギルス属カビ菌株または菌株を含んだ培養液を加えて培養する工程を含む菌複合体の混合培養方法によって得た培養液に、有機溶媒または吸着樹脂を加えて抽出する工程；

2) 工程 1) の抽出物を減圧乾燥後、カラムクロマトグラフィーを用いて分画物を得る工程；及び

3) 工程 2) の分画物をカラムクロマトグラフィーを通じて請求項 6 に記載のグリオニトリンを精製する方法。

10

【請求項 14】

請求項 5 に記載の培養液または請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物の抗癌剤の製造における使用。

【請求項 15】

請求項 5 に記載の培養液または請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物を有効成分として含む癌予防用及び健康改善用の健康食品。

【請求項 16】

請求項 5 に記載の培養液または請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物を有効成分として含む癌予防用及び健康改善用の健康食品。

20

【請求項 17】

請求項 5 に記載の培養液または請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物を有効成分として含む菌性疾患予防用及び健康改善用の健康食品。

【請求項 18】

請求項 5 に記載の培養液または請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物の治療的有效量を個体に投与する工程を含む癌の予防及び治療の方法。

【請求項 19】

請求項 5 に記載の培養液または請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物の治療的有效量を個体に投与する工程を含む菌性疾患の予防及び治療の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規なスピンゴモナス属 (Sphingomonas) バクテリア菌株 KMK-001 を液体培地で培養して、前記バクテリア菌株の培養液に、液体培地で別に培養した新規なアスペルギルス属 (Aspergillus) 菌株 KMC-901 を加えて混合培養するスピンゴモナスバクテリア-アスペルギルスカビの混合培養法、それから生合成された新規なグリオニトリン、及び前記グリオニトリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む製薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

天然物から新物質を獲得するために多くの研究が進行されてきているが、基地物質の反覆的な分離による時間と費用、労働力の浪費は、天然物から生理活性を有する新物質開発技術の効率性増進に大きな阻害要因として作用している。新薬開発において非常に重要な要素のひとつである新物質の獲得において、大きく効率性を高めることができると期待される「混合培養法を用いた新物質開発技術」は、最近アメリカのスクリップス海洋研究所において現代科学技術で新しく見直されてペスタロン (pestalone) (Mercedes Cuetto 等, J. Nat. Prod. 2001 年, 第 64 巻, p. 1444 - 1446)、リバテレノン (libertellenone) (Oh, D. - C. 等, Bioorg. Med. Chem. 2005 年, 第 13 巻, p. 5267 - 5273)、エメリセラミド (emerice llamide) (Oh, D, - C. 等, J. Nat. Prod. 2007 年, 第 70 巻, p. 515 - 520) などの新物質を開発するのに成功

40

50

した。これらペスタロン、リバテレノン及びエメリセラミド等は、試験管内で強力な抗癌及び抗菌活性を示すので新しい抗癌及び抗生剤開発に対する可能性を提示している。アメリカスクリップス海洋研究所で開発された混合培養法は、カビの培養液に少量のバクテリア培養液を加えて混合培養する技術であり、本発明で提示するバクテリア培養液に少量のカビ培養液を加える混合培養技術とは大きな差が見られる。

それで、本発明者等は、初めてスピングモナスバクテリアとアスペルギルスカビの混合培養法を開発し、それから産生した新規な化合物であるグリオニトリンが、強力な抗癌及び抗生効果があることを明らかにして本発明を完成した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0003】

本発明の目的は、新規なスピングモナスソックバクテリア、新規なアスペルギルスカビ、前記スピングモナスソックバクテリアとアスペルギルスカビの混合培養法、それから産生した新規な化合物グリオニトリン、及び前記グリオニトリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む抗癌剤または抗菌剤を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

前記目的を達成するために、本発明は、受託番号 K C C M 1 0 8 8 8 P で寄託されたスピングモナス属バクテリアを提供する。

また、本発明は、受託番号 K C C M 1 0 8 8 9 P で寄託されたアスペルギルス属カビを提供する。

20

また、本発明は、前記スピングモナス属バクテリアを液体培養した培養液に別に液体培養した前記のアスペルギルス属カビ菌株または菌株を含んだ培養液を加えて培養する工程を含む菌複合体の混合培養方法を提供する。

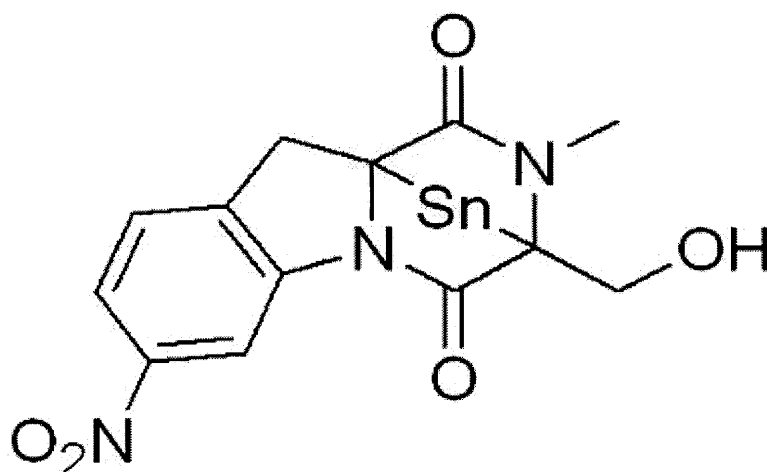
また、本発明は、前記混合培養方法で培養された菌複合体の培養液を提供する。

また、本発明は、前記混合培養方法で培養された菌複合体の培養液から分離される下記化学式 1 または化学式 2 で表わされる化合物を提供する。

【0005】

【化 1】

30



化学式 1

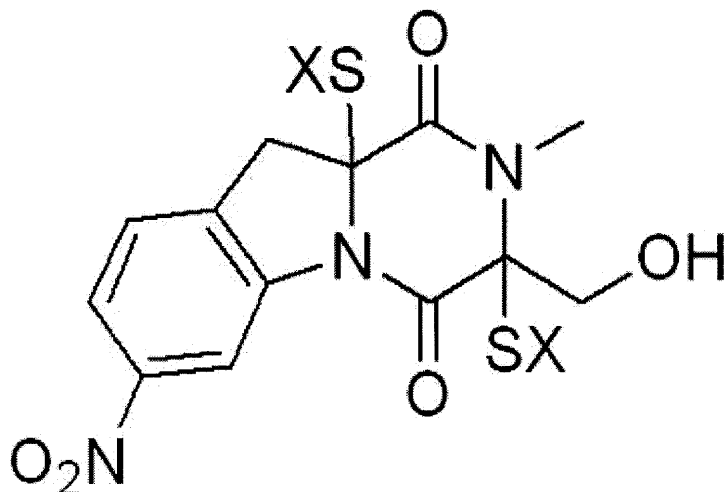
40

【0006】

n は、イオウの個数であり 1 ~ 4 で ; 及び

【0007】

【化 2】



化学式 2

10

【0008】

Xは、水素またはアルキル基であり、互いに同じかまたは異なり、すべての非対称炭素での異性体を含む。

また、本発明は、前記混合培養方法で培養された菌複合体の培養液または前記化合物を含む抗癌剤を提供する。

20

また、本発明は、前記混合培養方法で培養された菌複合体の培養液または前記化合物を含む抗菌剤を提供する。

また、本発明は、前記培養液及びそれから抽出した化合物の抗癌剤の製造における使用を提供する。

また、本発明は、前記培養液及びそれから抽出した化合物の抗菌剤の製造における使用を提供する。

また、本発明は、前記培養液及びそれから抽出した化合物を含む癌予防用及び健康改善用の健康食品を提供する。

また、本発明は、前記培養液及びそれから抽出した化合物を含む菌感染予防用及び健康改善用の健康食品を提供する。

30

また、本発明は、前記培養液及びそれから抽出した化合物の治療的有効量を個体に投与する工程を含む癌治療方法を提供する。

同時に、本発明は、前記培養液及びそれから抽出した化合物の治療的有効量を個体に投与する工程を含む菌感染治療方法を提供する。

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明は、受託番号 K C C M 1 0 8 8 8 P で寄託されたスピングモナス属バクテリア菌株 K M K - 0 0 1 を提供する。

本発明者等は、インコク鉱山内部で酸性度 (pH) 3.0 の水を採取後、遠心分離して沈殿物を得た。前記沈殿物を生理食塩水に懸濁して希釈した後、培地に接種後、培養しながら単一菌株を分離及び選別して液体培地に接種した後、再び培養した。確保された菌株種の分析は、染色体 DNA を分離して下記のような 16S rDNA 塩基配列を分析して決定し、その結果、菌株 K M K - 0 0 1 は、スピングモナス属 (Sphingomonas sp. A1Xxy11-5) と 98.0% の相同性を示すことを確認して、前記 K M K - 0 0 1 がスピングモナス属に属する新規種であることが分かった。K M K - 0 0 1 は、ツアベックドックス培地で黄色粘液性コロニーを形成して、生長のために硝酸塩と硫酸塩を必須的に要求することを確認して、グラム陰性カン菌であることが分かった (図 1 及び図 2 参照)。前記菌株 K M K - 0 0 1 は、韓国微生物保存センターに 2007 年 11 月 7 日付けで寄託した (受託番号: K C C M 1 0 8 8 8 P)。

40

本発明の新規な菌株 K M K - 0 0 1 の 16S rDNA 塩基配列を下記に示す:

AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG AACGAACGCT GCGGCATGC CTAATACATG CAAGTCGAAC GATCACTTCG GTG

50

GTAGTGG CGCACGGGTG CGTAACGCGT GGAATCTGC CCTTGGGTTC GGAATAACAG TTGGAAACGA CTGCTA
 ATAC CGGATGATGA CGTAAGTCCA AAGATTTATC GCCCAAGGAT GAGCCCGCGT AGGATTAGCT AGTTGGTGA
 G GTAAAGGCTC ACCAAGGCAA CGATCCTTAG CTGGTCTGAG AGGATGATCA GCCACACTGG GACTGAGACA C
 GGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATATTG GACAATGGGG GCAACCCTGA TCCAGCAATG CCGC
 GTGAGT GATGAAGGCC TTAGGGTTGT AAAGCTCTTT TACCCGAGAT GATAATGACA GTATCGGGAG AATAAGC
 TCC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGGAGGGAG CTAGCGTTGT TCGGAATTAC TGGGCGTAAA
 GCGCACGTAG GCGGCGATTT AAGTCAGAGG TGAAAGCCCG GGGCTCAACC CCGGAACTGC CTTTGAGACT GG
 ATTGCTAG AATCTTGAG AGGCGGGTGG AATTCCGAGT GTAGAGGTGA AATTCGTAGA TATTCGGAAG AACAC
 CAGTG GCGAAGGCGG CCCGCTGGAC AAGTATTGAC GCTGAGGTGC GAAAGCGTGG GGAGCAACA GGATTAGA
 TA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGATGATA ACTAGCTGCC GGGGCACATG GTGTTTCGGT AGCGCAGCTA
 ACGCATTAAAG TTATCCGCCT GGGGAGTACG GTCGCAAGAT TAAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCTGC ACA
 AGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCGA AGCAACGCGC AGAACCTTAC CAACGTTTGA CATCCCTATC GCGGAT
 CGTG GAGACACTTT CCTTCAGTTC GGCTGGATAG GTGACAGGTG CTGCATGGCT GTCGTCAGCT CGTGTCGTG
 A GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTCGCCT TTAGTTGCCA GCATTTAGTT GGGTACTCTA A
 AGGAACCGC CGGTGATAAG CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TACGCGTTGG GCTA
 CACACG TGCTACAATG GCGACTACAG TGGGCAGCCA CTCCGCGAGG AGGAGCTAAT CTCCAAAAGT CGTCTCA
 GTT CGGATTGTTT TCTGCAACTC AAGAGCATGA AGGCGGAATC GCTAGTAATC GCGGATCAGC ATGCCGCGGT
 GAATACGTTT CCAGGCCCTG TACACACCGC CCGTCACACC ATGGGAGTTG GATTCACCTG AAGGCGCTGC GC
 TAACTCGC AAGAGAGGCA GGCAGCACG GTGGGTTTAG CGACTGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAGCC GTAGG
 GGAAC CTGCGGCTGG ATCACCTCCT T (配列番号 1)

10

20

また、本発明は、受託番号 K C C M 1 0 8 8 9 P で寄託されたアスペルギルス属 (*Aspergillus*) カビ菌株 K M C - 9 0 1 を提供する。前記菌株 K M C - 9 0 1 は、韓国微生物保存センターに 2 0 0 7 年 1 1 月 7 日付けで寄託した (受託番号: K C C M 1 0 8 8 9 P)。

前記菌株 K M C - 9 0 1 の菌集落は、初期には白色の羊毛模様を帯びながら時間が経つにつれて中央部分の青緑領域が濃くなりながら広くなり、再び灰色の中央部分が形成されて、アスペルギルス - フミガーツフ (*Aspergillus fumigatus*) カビの菌集落と同一な形態を帯びている (図 3 参照) (チョン・ガジン、微生物図鑑、第 3 巻: p. 192 - 194、2007 年)。K M C - 9 0 1 の菌系体は隔壁を有していて、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属カビの特徴的な分生子頭を示した (図 4 参照) (チョン・ガジン、微生物図鑑、2007 年、第 3 巻、p. 192 - 194)。また、K M C - 9 0 1 をツアベックドックス培地で液体培養して産生される二次代謝産物を高速液体クロマトグラフィー質量分析機 (H P L C - M S) 及び核磁気共鳴分光器 (N M R) を用いて分析した結果、アスペルギルス - フミガーツフの特徴的な成分であるグリオトキシン A (*Gliotoxin*) 及びシューロチン A (*Pseurotin A*) の存在が確認された (Igarash, Y. 等, *Journal of Antibiotic*, 2004 年, 第 57 巻, p. 748 - 754)。前記形態学的及び化学的特徴を通じて菌株 K M C - 9 0 1 は、アスペルギルス - フミガーツフに属するカビであると決定し、アスペルギルス - フミガーツフ K M C - 9 0 1 と名付けた。

30

また、本発明は、前記スピンゴモナス属新規バクテリア菌株を液体培養した培養液に別に液体培養されたアスペルギルス属カビ菌株または菌株を含んだ培養液を加えて培養する工程を含む菌複合体の混合培養方法を提供する。

40

前記混合培養方法は、スピンゴモナス属新規なバクテリア菌株及びアスペルギルス属カビ菌株を 1 0 0 0 : 1 . 0 ~ 1 0 0 0 : 0 . 1 の割合で混合することが好ましく、1 0 0 0 : 0 . 5 の割合で混合することがさらに好ましいが、これに限定されない。

本発明者等は、新規バクテリア菌株 K M K - 0 0 1 とカビ菌株 K M C - 9 0 1 は、それぞれ液体培地に接種した後、培養した。スピンゴモナス属菌株 K M K - 0 0 1 の培養液 1 リットルにカビ菌株 K M C - 9 0 1 を含んだ培養液 5 0 0 マイクロリットルを加えて混合培養し、高速液体クロマトグラフィーを用いて混合培養液を分析して新しい化合物の産生有無を確認した。バクテリア菌株 K M K - 0 0 1 及びカビ菌株 K M C - 9 0 1 をそれぞれ 1

50

5日間単一培養した培養液の分析の結果、グリオニトリン等は全く存在しなかったが、KMK-001とKMC-901を15日間混合培養した培養液は、保持時間18.072分のピークでグリオニトリンAを、18.767分のピークでグリオニトリンBを示した。KMK-001とKMC-901の混合培養2日目から隔日で混合培養液を分析した結果、グリオニトリン等は混合培養8日目から産生され始めた。

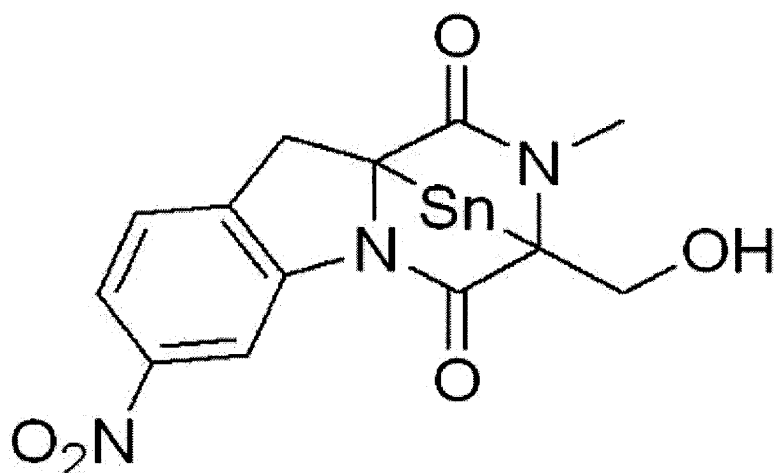
また、本発明は、前記混合培養方法で培養された菌複合体の培養液を提供する。

また、本発明は、前記混合培養方法で培養された菌複合体の培養液から分離される下記の化学式1または化学式2で表わされる化合物を提供する。

前記化合物は、新規な化合物として本発明者によってグリオニトリン (Glionitrins) と命名された。

【0009】

【化3】



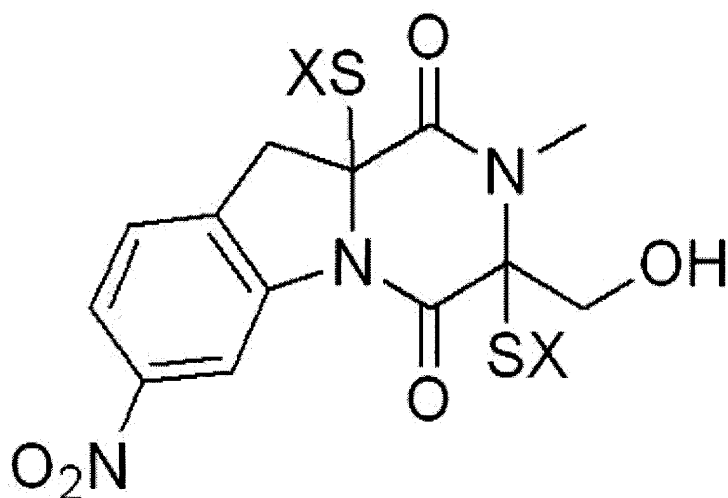
化学式 1

【0010】

n は、イオウの個数を示し、1～4である。

【0011】

【化4】



化学式 2

【0012】

X は、水素、または C₁～C₅ アルキル基であり、互いに同じかまたは異なり、すべての非対称炭素での異性体を含む。

本発明の前記グリオニトリン化合物は、下記の工程を含む方法によって製造される。

1) スピノモナス属菌株 KMK-001 の培養液 1 リットルに 500 マイクロリットルのカビ菌株 KMC-901 を含んだ培養液を加えて混合培養した後、培養液に有機溶媒ま

10

20

30

40

50

たは吸着樹脂を加えて抽出する工程；

2) 工程1)の抽出物を減圧乾燥した後、カラムクロマトグラフィーを用いて分画物を得る工程；及び

3) 工程2)の分画物からさらにカラムクロマトグラフィーを用いて化合物を分離精製する工程。

前記製造方法において、工程1)の混合培養は、10日～20日間培養することが好ましく、12日～18日間培養することがさらに好ましいが、これに限定されない。前記有機溶媒は、酢酸エチル、ブタノール、塩化メチレンまたはクロロホルムを使用することが好ましいが、これに限定されない。前記抽出は、超臨界抽出、高圧抽出または超音波抽出法などの抽出装置を用いた方法、または、XAD及びHP-20を含んだ吸着樹脂を用いる方法に代替可能であるが、これに限定されない。抽出時、溶媒を混合培養液分量の1ないし3倍添加して抽出することが好ましく、2倍添加して抽出することがさらに好ましい。常温で抽出することが好ましいが、これに限定するものではない。併せて、抽出回数は、1～5回が好ましく、3回反覆抽出することがさらに好ましいが、これに限定されるものではない。

前記製造方法において、工程2)の減圧乾燥は、回転真空濃縮機(Rotary Vacuum Evaporator)を使用することが好ましいが、これに限定されない。前記減圧乾燥時の温度は、20～40℃が好ましく、30℃がさらに好ましいがこれに限定されない。

前記製造方法において、工程2)または工程3)のカラムクロマトグラフィーは、シリカゲル、セパデックス、RP-18、ポリアミド、トヨパール(Toyopearl)及びXAD樹脂からなる群から選択された充填剤を用いたカラムを用いたカラムクロマトグラフィーを遂行して活性化化合物を分離及び精製することができる。カラムクロマトグラフィーは、必要に応じて適切な充填剤を選択して数回実施することができ、溶媒にクロロホルム(CHCl_3)・メタノール、エチルアセテート・メタノール、ジクロロメタン・メタノール、メタノール・水またはアセトニトリル・水を用いることができるが、これに限定されない。

本発明者等は、前記酢酸エチル抽出液を減圧乾燥して得た抽出物を逆相カラムクロマトグラフィーを用いて六個の分画に分けた。溶離条件は、水とアセトニトリルを使用し、20%アセトニトリル/水で始めて、20%ずつアセトニトリルの含量を増加させ、100%メタノールを最終流出溶媒に使用した。これから得られた分画物を高速液体クロマトグラフィー法を用いて主成分を分析した結果、60%アセトニトリル/水分画物から新規なグリオニトリンを確認した。前記分画物にさらに酢酸エチル及び塩化メチレンを溶媒に使用して90%塩化メチレン/酢酸エチル及び60%塩化メチレン/酢酸エチルのアイソクラティック溶媒溶離条件で順相液体クロマトグラフィー法を通じて精製した。保持時間10分以下に下記化学式3で表わされるグリオニトリンAと保持時間15分に化学式4で表わされるグリオニトリンBをそれぞれ得た。

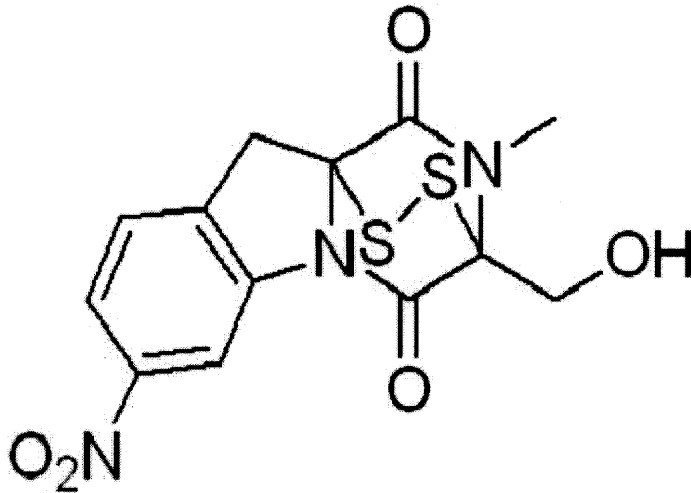
【0013】

10

20

30

【化 5】

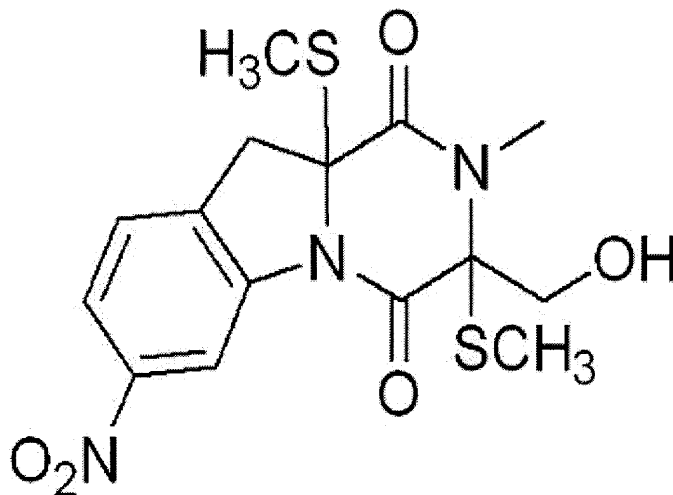


化学式 3

10

【 0 0 1 4 】

【化 6】



化学式 4

20

30

【 0 0 1 5 】

前記分離した化合物は、MS及び核分光器を用いて分析して化学構造を解明し、グリオニトリンAは、分子量353であり、分子式が $C_{13}H_{11}N_3O_5S_2$ の無定形薄黄色粉末状で、グリオニトリンBは、分子量383であり、分子式が $C_{15}H_{17}N_3O_5S_2$ の無色の粘性半固型物質であることを確認した。また、前記グリオニトリンAを水、アセトニトリル水溶液、メタノール水溶液またはDMSO（ジメチルスルホキシド）溶液に室温で放置した時、三硫化物（グリオニトリンC）及び四硫化物（グリオニトリンD）が生成され、これらの化学構造を解明した。

また、本発明は、前記混合培養方法で培養された菌複合体の培養液またはグリオニトリンを含む抗癌剤を提供する。

40

前記癌は、胃癌、肝癌、大腸癌、肺癌または前立腺癌であることを特徴とする。

前記グリオニトリンの癌細胞毒性は、American Type Culture Collection（ATCC, Manassas, VA, 米国）から分譲を受けたAGS（胃癌、ATCC細胞コード - CRL - 1739^{T M}）、Hep G2（肝臓癌、HB - 8065^{T M}）、HCT116（大腸癌、CCL - 247^{T M}）、A549（肺癌、CCL - 185^{T M}）及びDU145（前立腺癌、HTB - 81^{T M}）癌細胞株を使用して評価した。

本発明者等は、グリオニトリンの癌細胞に対する細胞毒性効果を調べるため、試験管内でMTT（3 - [4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル] - 2, 5 - ジフェニルテトラゾ

50

リウムブロミド)分析法を用いて生きている癌細胞量を測定する方法を行なった。前記の結果、グリオニトリンは、胃癌(A G S)、肝癌(H e p G 2)、大腸癌(H C T - 1 1 6)、肺癌(A 5 4 9)及び前立腺癌(D U - 1 4 5)に強力な抗癌効果があることを確認した。したがって、本発明の前記菌複合体の培養液またはグリオニトリンは、抗癌剤に用いられることが分かる。

また、本発明は、前記混合培養方法で培養された菌複合体の培養液またはグリオニトリンを含む抗菌剤を提供する。

前記抗菌剤は、スピノモノナス属バクテリア菌株に対する抗菌効果があることを特徴とする。

本発明者等は、グリオニトリンの抗菌効果を調べるため、ディスク拡散実験を通じてグリオニトリンのバクテリア菌株に対する抗菌効果を確認した。前記菌株を塗抹した寒天培地に試験群であるグリオニトリンと陽性対照群であるアンピシリンをそれぞれ吸収させたディスクを培養した後、観察した。前記結果、グリオニトリンを吸収させたディスクでバクテリアは、黄色を帯びてグリオニトリンによってバクテリアが生長することができない領域がディスク周辺の無色円形で現われ、対照群で使用したアンピシリンと類似の抗菌効果を示すことを確認した。

本発明者等は、グリオニトリンAとBの抗菌効果を調べるため、American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, 米国)から分譲を受けたマイクロコッカス・ルテウス(Micrococcus leuteus) IFC 12708、バチルス・サブティリス(Bacillus subtilis) ATCC 6633、プロテウス・ブルガリス(Proteus vulgaris) ATCC 3851、サルモネラ・ティフィリウム(Salmonella typhimurium) ATCC 14028及び3種のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)であるスタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus) ATCC 43300、スタフィロコッカス・アウレウス(S. aureus) ATCC 700787及びスタフィロコッカス・アウレウス(S. aureus) ATCC 700788に対して評価した。前記の結果、グリオニトリンBはすべての試験群で抗菌作用がない一方、グリオニトリンAは4種の非耐性菌で陽性対照群に使用したアンピシリン(Ampicillin)と類似の強力な抗菌作用を示した。特に、グリオニトリンAは、3種のMRSA菌には、陽性対照群に使用したアンピシリン(Ampicillin)の抗菌作用より15倍以上の強力なメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を示した。また、アスペルギルス・フミガーツフ(Aspergillus fumigatus) HIC 6094とT. ルブルム(Trichophyton rubrum) IFO 9185に対するグリオニトリンAとBの抗真菌作用を評価した結果、前記抗菌作用と類似にグリオニトリンBは抗真菌効果がない一方、グリオニトリンAは抗真菌効果を示した。

したがって、本発明の前記菌複合体の培養液またはグリオニトリンは、抗菌剤に用いられることが分かる(表3及び図6参照)。

本発明の抗癌剤または抗菌剤は、化学式1または化学式2で表わされる化合物に薬学的に許容可能な塩を含むことができる。前記薬学的に許容可能な塩は、遊離酸によって形成された付加塩が有用である。相応しい遊離酸としては、有機酸と無機酸を使用することができ、無機酸としては、塩酸、臭素酸、硫酸及びリン酸などを使用することができ、有機酸では、クエン酸、酢酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、ギ酸、プロピオン酸、シュウ酸、トリフルオロ酢酸、ベンゾ酸、グルコン酸、メタンスルホン酸、グリコール酸、コハク酸、4-トルエンスルホン酸、ガラクトロン酸、エンボン酸、グルタミン酸またはアスパラギン酸などを使用することができる。さらに、薬学的に許容可能な塩だけではなく、通常の方法によって調剤され得るすべての塩、水和物及び溶媒化物をすべて含むことができる。

本発明の抗癌剤または抗菌剤は、化学式1または化学式2で表わされる化合物の中で一つ以上を選択的に含むことができ、前記成分に追加で同一または類似の機能を示す有効成分

10

20

30

40

50

を１種以上含むことができる。

本発明の抗癌剤または抗菌剤は、臨床投与時に経口または非経口で投与が可能で一般的な医薬品製剤の形態で 사용할 ことができる。すなわち、本発明の抗癌剤または抗菌剤は、実際の臨床投与時に経口及び非経口のさまざまな剤形で投与することができ、製剤化する場合には、普通に使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤及び界面活性剤などの希釈剤または賦形剤を使用して調剤できる。経口投与のための固形製剤では、錠剤、丸薬、散剤、顆粒剤及びカプセル剤などが含まれ、このような固形製剤は、本発明の製薬組成物に少なくとも一つ以上の賦形剤例えば、澱粉、炭酸カルシウム、スクロース、ラクトース及びゼラチンなどを混ぜて調剤される。また、単純な賦形剤以外にマグネシウム、スチレート、タルクのような滑剤なども使用できる。経口投与のための液状製剤では、懸濁剤、内用液剤、乳剤及びシロップ剤などが該当し、よく使用される単純希釈剤の水、リキッドパラフィン以外に様々な賦形剤、例えば湿潤剤、甘味料、芳香剤及び保存剤などを含むことができる。非経口投与のための製剤では、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤及び坐薬が含まれる。非水性溶剤と懸濁溶剤では、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物性油、エチルオレイン酸のような注射可能なエステルなどを使用することができる。坐薬の基剤では、ハードファット、マクロゴール、ツイーン６１、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロール及びゼラチンなどを使用することができる。本発明の抗癌剤または抗菌剤は、非経口投与時に、皮下注射、静脈注射または筋肉内注射を用いることができる。

本発明の抗癌剤または抗菌剤の好ましい投与量は、患者の状態及び体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路及び期間によって異なるが、当業者によって適切に選択され得る。また、本発明は、前記培養液及びそれから抽出した化合物の抗癌剤及び抗菌剤の製造における使用を提供する。

本発明の混合培養方法で培養された菌複合体の培養液またはグリオニトリンは、抗癌剤及び抗菌剤の製造に有用に用いることができる。前記抗癌剤及び抗菌剤は、薬学的に許容可能な塩だけではなく、通常の方法によって製造され得るすべての塩、水和物及び溶媒化物をすべて含むことができる。このような製薬組成物製造に、本発明の前記培養液及びそれから抽出した化合物は、薬理効果を付与する核心組成物として使用される。前述のように、グリオニトリンは、抗癌及び抗菌効果があるので、これを用いて製造した化合物は、抗癌及び抗菌効果を有することを予測することは、当業者に自明である。

また、本発明は、前記培養液及びそれから抽出した化合物を含む癌または菌感染の予防用及び健康改善用の健康食品を提供する。

本発明の混合培養方法で培養された菌複合体の培養液またはグリオニトリンを食品添加物に使用する場合、前記混合培養方法で培養された菌複合体の培養液またはグリオニトリンをそのまま添加するか他の食品または食品成分とともに使用することができ、一般的方法によって適切に使用することができる。一般的に、食品または飲料の製造時に本発明の組成物は、原料に対して０．１～１５重量部、０．１～１０重量部の量で添加することが好ましい。しかし、健康及び衛生を目的にしたりまたは健康調節を目的にしたりする長期摂取の場合には、前記の量は、上記の範囲以下であり得、安全性の面で何らの問題がないので、有効成分は前記範囲以上の量でも使用することができる。

下記の食品種類には、特別な制限はない。本発明の混合培養方法で培養された菌複合体の培養液またはグリオニトリンを添加することができる食品の例としては、肉類、ソーセージ、パン、チョコレート、キャンデー類、スナック類、お菓子類、ピザ、ラーメン、その他麺類、ガム類、アイスクリーム類を含む酪農製品、各種スープ、飲料、お茶、ドリンク剤、アルコール飲料及びビタミン複合剤などがあり、一般的意味での健康食品をすべて含む。

本発明の健康飲料組成物は、通常の飲料のように様々な香味剤または天然炭水化物などを追加成分として含むことができる。上述した天然炭水化物は、ブドウ糖、果糖のような単糖類、マルトース、スクロースのような二糖類、及びデキストリン、シクロデキストリンのような多糖体、キリシトール、ソルビトール、エリトリトールなどの糖アルコールであ

10

20

30

40

50

る。甘味料は、タウマチン、ステビア抽出物のような天然甘味料や、サッカリン、アスパルテームのような合成甘味料などを使用することができる、前記天然炭水化物の割合は、本発明の混合培養方法で培養された菌複合体の培養液またはグリオニトリンが、100 ml 当たり一般的に0.01~0.04 g、好ましくは約0.02~0.03 gである。前記外に混合培養方法で培養された菌複合体の培養液またはグリオニトリンは、様々な栄養剤、ビタミン、電解質、風味剤、着色剤、ペクチン酸及びその塩、アルギン酸及びその塩、有機酸、保護性コロイド増粘剤、pH調節剤、安定化剤、防腐剤、グリセリン、アルコール、炭酸飲料に使用される炭酸化剤などを含むことができる。その他に、本発明の混合培養方法で培養された菌複合体の培養液またはグリオニトリンは、天然フルーツジュース、フルーツジュース飲料及び野菜飲料製造のための果肉を含むことができる。このような成分は、独立的にまたは組み合わせて使用することができる。このような添加剤の割合は、それほど重要ではないが、本発明の混合培養方法で培養された菌複合体の培養液またはグリオニトリン100重量部当たり0.01~1重量部の範囲で選択することが一般的である。

10

同時に、本発明は、前記培養液及びそれから抽出した化合物の治療的有効量を個体に投与する工程を含む抗癌または抗菌治療方法を提供する。

前記対象は、ヒトまたはヒトを除いた哺乳動物であることが好ましく、前記哺乳動物は、マウス、ラット、ギニーピッグ、ブタ、ウサギ、サル及びチンパンジーからなる群から選択することが好ましいが、これに限定されるものではない。

前記投与方法では、経口投与するか非経口投与（例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所に適用）でき、投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与時間、投与方法、排泄率及び疾患の重症度などによってその範囲が多様である。投薬単位は、例えば、個別投薬量の1、2、3または4倍で、または1/2、1/3または1/4倍を含むことができる。個別投薬量は、有効薬物が1回に投与される量を含むことが好ましく、これは通常1日投与量の全部、1/2、1/3または1/4倍に該当する。

20

【発明の効果】

【0016】

本発明の新規なスピンゴモナス属バクテリア-アスペルギルスカビ混合培養法は、新物質を獲得するための非常に有用な技術として期待され、前記混合培養法を通じて産生された新規な化合物であるグリオニトリンは、癌細胞に対する強い細胞毒性効果を示し、菌株KMK-001を含む10種の有害菌株に対する抗菌作用を示すことから、抗癌剤または抗生剤開発のための候補物質として有用に用いることができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】新規なスピンゴモナス属バクテリア菌株のCDA培地での形態を示す写真。

【図2】前記菌株のグラム染色された形態を示す顕微鏡写真。

【図3】アスペルギルス-フミガーツフカビ菌株のKMC-901CDA培地での形態を示す写真。

【図4】前記菌株の隔壁を有する菌糸体及び分生子柄の端の子嚢を示した顕微鏡写真。

【図5】バクテリア菌株KMK-001とカビ菌株KMC-901の混合培養液の菌株をグラム染色した形態を示す顕微鏡写真。

40

【図6】グリオニトリンの前記菌株に対する抗菌作用を示す写真： 左側は、アンピシリンを吸収させたディスク；及び 右側はグリオニトリンを吸収させたディスク。

【図7】バクテリア菌株KMK-001を15日間単一培養した培養液の分析クロマトグラムを示す写真。

【図8】カビ菌株KMC-901を15日間単一培養した培養液の分析クロマトグラムを示す写真。

【図9】KMK-001及びKMC-901を15日間混合培養した培養液の分析クロマトグラムを示す写真。

【発明を実施するための形態】

50

【0018】

以下、本発明を下記実施例及び製剤例によって詳しく説明する。

但し、下記実施例及び製剤例は、本発明を具体的に例示するものであり、本発明の内容が下記の実施例及び製剤例に限定されるのではない。

<実施例1> 混合培養に適用されるバクテリア及びカビ菌株探索及び選別

本発明者等は、江原道江陵市林谷面林谷鉱山内部で酸性度 (pH) 3.0 の水を採取した後、遠心分離して沈殿物を得た。前記沈殿物を生理食塩水に懸濁して希釈した後、YMA 寒天培地 (YMA) とツアベックドックス寒天培地 (CDA) に接種した後、25℃ で10日間培養しながら単一菌株を分離して300余個の菌株を確保した。この中から混合培養に使用する細菌とカビ菌株をそれぞれ選択してツアベックドックス液体培地に接種した後、25℃ 振蕩培養器で5~7日間培養した。確保された菌株種の分析は、染色体DNAを分離して16S rDNA塩基配列を分析して決定し、その結果、菌株KMK-001は、スピングモナス属 (*Sphingomonas* sp. A1XXyl1-5) と98.0%の相同性を示した。これは、KMK-001が、スピングモナス属に属する新規種であることが分かる。KMK-001は、ツアベックドックス培地 (DI water 1L内、サッカロース30g、硝酸ナトリウム3g、リン酸二カリウム1g、硫酸マグネシウム0.5g、塩化カリウム0.5g、硫酸鉄0.01g) で黄色粘液性コロニーを形成して、生長のために硝酸塩と硫酸塩を必要とするグラム陰性カン菌であることを確認した (図1及び図2参照)。前記菌株KMK-001は、韓国微生物保存センターに、2007年11月7日付けで寄託した (受託番号: KCCM10888P)。

また、本発明者等は、江原道太白市チャンソン炭鉱垂直抗道150メートル地下に留まった水と石炭の懸濁液を採取した後、遠心分離沈殿物を得た。前記沈殿物を滅菌精製水に懸濁して希釈した後、ツアベックドックス寒天培地 (CDA) に接種した後、25℃ で14日間培養しながら単一カビ菌株を分離してカビ菌株KMC-901を確保した。単一菌株に分離されたKMC-901を再びツアベックドックス寒天培地 (CDA) で培養して生長形態及び色を観察し、菌糸体、菌糸の隔壁、分生子柄及び子嚢を観察して種を同定した。また、菌株KMC-901が産生する成分の化学的分析の結果を種同定のための資料に使用した。菌株KMC-901の菌集落は、初期には白色の羊毛模様を帯びながら時間が経つほど中央部分の青緑領域が濃くなりながら広まって、再び灰色の中央部分が形成されて、アスペルギルス・フミガーツフカビの菌集落と同一な形態を帯びた (図3参照)。KMC-901の菌糸体は、隔壁を有していて、アスペルギルス属カビの特徴的な分生子頭を示した (図4参照)。また、KMC-901をツアベックドックス培地で液体培養して産生される二次代謝産物を高速液体クロマトグラフィー質量分析機 (HPLC-MS) 及び核磁気共鳴分光器 (NMR) を用いて分析した結果、アスペルギルス・フミガーツフの特徴的な成分であるグリオトキシンA (*Gliotoxin*) 及びシューロチンA (*Pseurotin* A) の存在が確認された。したがって、前記形態学的及び化学的特徴を通じて菌株KMC-901は、アスペルギルス・フミガーツフに属するカビであると決定し、アスペルギルス・フミガーツフKMC-901と名付けた。前記菌株KMC-009は、それぞれ韓国微生物保存センターに、2007年11月7日付けで寄託した (受託番号: KCCM10889P)。

<実施例2> スピングモナス属新規菌株KMK-001とアスペルギルス属菌株KMC-901の混合培養

本発明者等は、新規バクテリア菌株KMK-001とカビ菌株KMC-901をそれぞれツアベックドックス液体培地に接種した後、25℃ 振蕩培養器で3日間培養した。二つの菌株は、大量培養のために1リットル三角フラスコの0.5リットルのツアベックドックス液体培地で培養し、2日経過後、スピングモナス属菌株KMK-001の培養液にカビ菌株KMC-901を250マイクロリットル加えた後、混合培養した。菌株を含んだ混合培養液を顕微鏡で観察して、図5のようにカビの菌糸体周辺に小さなバクテリア菌株と一緒に存在することを持続的に確認した (図5参照)。

また、持続的に高速液体クロマトグラフィー法を用いて混合培養液から新しい化合物の産

生有無を分析した。分析条件〔器機：Agilent 1100 LC/MS system；溶出速度：0.7 ml/分；溶出液：10%アセトニトリル/水から100%アセトニトリルまで30分間アセトニトリルの組成を増加させる；カラム：Phenomenex Luna 5u C18(2)4.6×150分；検出機：DAD紫外線検出機(254 nm)〕の高速液体クロマトグラフィーの分析結果、図7ないし図9にみられるように、バクテリア菌株KMK-001及びカビ菌株KMC-901をそれぞれ15日間単一培養した培養液ではグリオニトリン等は全く存在しなかったが、KMK-001及びKMC-901を15日間混合培養した培養液では、保持時間18.072分のピークであるグリオニトリンAと18.767分のピークであるグリオニトリンBを示した。KMK-001及びKMC-901の混合培養日2日目から隔日で混合培養液を分析した結果、グリオニトリン等は、混合培養8日目から産生され始めた。

10

<実施例3> グリオニトリンの分離精製方法

本発明者等は、前記<実施例2>で獲得した培養液を酢酸エチルを用いて培養液から有機化合物等を抽出した。抽出液を回転真空濃縮機(Rotary Vacuum Evaporator)を使用して30で減圧乾燥して得た抽出物を逆相カラムクロマトグラフィーを用いて六個の分画に分けた。溶離条件は、水とアセトニトリルを使用し、20%アセトニトリル/水から始めて20%ずつアセトニトリルの含量を増加させ、100%メタノールを最終流出溶媒に使用した。前記高速液体クロマトグラフィー法を使用して得られた分画物の主成分を分析した結果、60%アセトニトリル/水分画物で混合培養を通じて新たに産生された新規物質グリオニトリンの存在が確認された。前記分画物を酢酸エチルと塩化メチレンを溶媒に使用して90%塩化メチレン/酢酸エチル及び60%塩化メチレン/酢酸エチルのアイソクラティック溶媒溶離条件を有して順相液体クロマトグラフィー法を通じて精製して保持時間10分にグリオニトリンAと保持時間15分にグリオニトリンBを得た。

20

<実施例4> グリオニトリンの器機分析

本発明者等は、器機分析を用いてグリオニトリンAとグリオニトリンBを化学式を決定した。分離したグリオニトリンAを水またはDMSO溶液上で室温に放置する時、三硫化物(グリオニトリンC)と四硫化物(グリオニトリンD)が生成され、それらの化学構造を下記のようなMS資料及び核磁気分光機資料を分析して解明した。前記水素と炭素核磁気分光機スペクトルは、それぞれ500 MHzと125 MHzで測定され、グリオニトリンAはクロロホルム-d溶媒で測定され、グリオニトリンBはメタノール-d₄溶媒で測定された。

30

【0019】

【表 1】

グリオニトリンAとBの構造に対する¹Hと¹³C NMRの化学的移動値

グリオニトリンA					グリオニトリンB				
位置	δ _H	Mult (J Hz)	δ _C		位置	δ _H	Mult (J Hz)	δ _C	
1			165.5	C	1			166.1	C
2-NMe	3.30	s	27.8	CH ₃	2-NMe	3.20	s	28.1	CH ₃
					3-SMe	2.36	s	12.2	CH ₃
3			76.7	C	3			72.4	C
3a α	4.34	dd(12.5, 10.0)	60.9	CH ₂	3aA	4.39	d(12.0)	63.9	CH ₂
3a β	4.52	dd(12.5, 6.0)			3aB	3.98	d(12.0)		
3a-OH	3.42	dd(10.0, 6.0)			3a-OH				
4			161.4	C	4			163.0	C
5-N					5-N				
5a			139.2	C	5a			141.9	C
6	8.75	d(2.5)	111.4	CH	6	8.83	d(2.5)	112.2	CH
7			148.9	C	7			148.0	C
8	8.14	br dd(8.5, 2.5)	121.7	CH	8	8.14	br dd(8.5, 2.5)	121.2	CH
9	7.53	br d(8.5)	126.0	CH	9	7.62	br d(8.5)	125.9	CH
9a			135.3	C	9a			137.3	C
10 α	3.44	d(19.0)	36.8	CH ₂	10A	3.73	br s	39.2	CH ₂
10 β	4.40	br dd(19.0, 1.0)			10B				
					10a-SMe	2.27	s	13.2	CH ₃
10a			74.4	C	10a			71.8	C

10

20

【0020】

30

< グリオニトリン C >

ESI-MS: m/z 386 [M+H]⁺;

¹H NMR(500 MHz, CDCl₃): 3.40 (3H, s), 3.46(1H, dd, J=19.0, 1.0 Hz), 4.29(1H, dd, J=19, 1.0 Hz), 4.42(1H, br d, J=12.5 Hz), 4.80(1H, br d, J=12.5 Hz), 7.44(1H, br d, J=8.5 Hz), 8.10(1H, dd, J=8.5, 2.0 Hz), 8.89(1H, d, J=2.0 Hz).

< グリオニトリン D >

ESI-MS: m/z 440 [M+Na]⁺;

¹H NMR(500 MHz, CDCl₃): 3.21(3H, s), 3.48(1H, br dd, J=18.5, 1.0 Hz), 4.02(1H, br dd, J=18.5, 1.0 Hz), 4.12(1H, br d, J=12.5 Hz), 4.40(1H, br d, J=12.5 Hz), 7.52(1H, br d, J=8.5 Hz), 8.18(1H, dd, J=8.5, 2.0 Hz), 9.18(1H, d, J=2.0 Hz).

40

< 実施例 5 > グリオニトリンの癌細胞に対する細胞毒性効果とバクテリア菌株 K M K - 001 に対する抗菌効果測定

本発明者等は、グリオニトリンの癌細胞に対する細胞毒性評価は、試験管内で MTT (3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド) 分析法を用いて生きている癌細胞の量を測定する方法を行なった。グリオニトリンの癌細胞毒性は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, 米国) から分譲を受けた AGS (胃癌、ATCC 細胞コード - CRL - 1739^{T M})、Hep G2 (肝臓癌、HB - 8065^{T M})、HCT 116 (大腸癌、CCL - 247^{T M})、A549 (肺癌、CCL - 185^{T M}) 及び DU145 (前立腺癌、HTB - 81^{T M}) 癌細胞株を用いて評価した。96 ウェルプレ

50

ートに胃癌（AGS）、肝癌（HepG2）、大腸癌（HCT-116）、肺癌（A549）及び前立腺癌（DU-145）細胞株をそれぞれ 1×10^4 細胞程度100マイクロリットルずつ加えて37℃で24時間CO₂培養器で培養する。以後、既存の培地を除去後、グリオニトリンと混合した新しい培地に入れ替えて37℃で培養する。24時間後、MTT溶液を10マイクロリットルずつ入れて、37℃で1時間培養した後、生きている細胞内で還元酵素によって形成されたホルマゾン量を450nmで吸光度を測定した。

【0021】

【表2】

試験管内で6個の癌細胞株に対するグリオニトリンA及びBの細胞毒性効果

癌細胞株	IC ₅₀ 値 (mM)	
	グリオニトリンA	グリオニトリンB
AGS	0.45 ± 0.11	1.25 ± 0.2
DU-145	0.24 ± 0.02	2.29 ± 0.14
HCT-116	0.82 ± 0.11	3.28 ± 0.55
A549	0.55 ± 0.07	2.25 ± 0.25
HepG2	2.28 ± 0.3	> 2 μM
MCF-7	> 2 μM	> 2 μM

10

【0022】

前記結果、表2にみられるようにグリオニトリンAまたはBは、前記癌細胞株に対して高い細胞毒性効果があることが分かる。

20

また、本発明者等は、グリオニトリンA及びBのKMK-001菌株に対する抗菌効果を、ディスク拡散実験を通じて確認した。KMK-001をツアベックドックス寒天培地に塗抹した後、グリオニトリンを吸収させた滅菌ディスクを同じ培地に乗せた後、25℃で5日間培養した。陽性対照群にグリオニトリンの代わりにアンピシリンを吸収させた滅菌ディスクを前記のような条件で培養した。前記結果、グリオニトリンは、アンピシリンと類似の抗菌効果を示すことを確認した（図6参照）。

また、本発明者等は、グリオニトリンAとBの抗菌効果をAmerican Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, 米国) から分譲を受けたマイクロコッカス・ルテウス (Micrococcus leuteus) IFC 12708、バチルス・サブティリス (Bacillus subtilis) ATCC 6633、プロテウス・ブルガリス (Proteus vulgaris) ATCC 3851、サルモネラ・ティフィリウム (Salmonella typhimurium) ATCC 14028及び3種のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) であるスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) ATCC 43300、スタフィロコッカス・アウレウス (S. aureus) ATCC 700787及びスタフィロコッカス・アウレウス (S. aureus) ATCC 700788に対して評価した。グリオニトリンBはすべての試験群で抗菌作用がない一方、グリオニトリンAは4種の非耐性菌で0.78 - 3.13 μg/mlの最小抑制濃度 (MIC) で陽性対照群に使用したアンピシリンと類似の強力な抗菌作用を示した。特に、グリオニトリンAは、3種のMRSA菌には、0.78 μg/mlのMIC濃度で陽性対照群に使用したアンピシリンの抗菌作用より15倍以上の強力なメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を示した（表3参照）。前記7種のバクテリア菌株に対するグリオニトリンの最小抑制濃度を測定するために前記7種のバクテリアを標準培地 (Standard Methods Broth) (Difco) で24時間培養した。以後、既存の培地を除去した後、各々の菌株を 10^5 のコロー形成単位 (cfu) / mlを含んだ培地を100マイクロリットルずつ取って96ウェルプレートに加え、グリオニトリンを濃度別に希釈して加えた後、37℃で24時間培養した。24時間後、600nmで光学密度 (Optical density) を測定した。

30

40

また、本発明者等は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, 米国) から分譲を受けたアスペルギルス - フ

50

ミガーツフHIC6094とT.ルブルム(Trichophyton rubrum)IFO9185に対するグリオニトリンAとBの抗真菌作用を評価した。前記の抗菌作用と類似にグリオニトリンBは抗真菌効果がない一方、グリオニトリンAは、12.5 μ g/mlの最小抑制濃度(MIC)を示した(表3参照)。前記2種の真菌に対するグリオニトリンの最小抑制濃度を測定するために、前記2種の真菌の胞子を各々1ミリリットル当たり 10^5 の胞子数になるように滅菌蒸留水に懸濁してサブロー・グルコース(Sabouraud glucose)液体培地(Difco)を用いてミリリットル当たり 10^3 の細胞数になるようにした。以後、96ウェルプレートに 10^2 の細胞数程度100マイクロリットルずつ加えてグリオニトリンを濃度別で加えた後、48時間28℃で培養した。カビの成長が観察されないグリオニトリンの濃度を最小抑制濃度とした。

【0023】

【表3】

試験管内での9種の有害菌に対するグリオニトリンA及びBの抗菌作用

有害菌	グリオニトリンA MIC (μ g/ml)	グリオニトリンB MIC (μ g/ml)	抗菌対照群アンピシリン MIC (μ g/ml)	抗真菌対照群アムホテリシンB MIC (μ g/ml)
マイクログコッカス・ルテウス IFC 12708 [G(+)]	0.78	>100	0.78	—
バチルス・サブティリス ATCC 6633 [G(+)]	6.25	>100	3.13	—
プロテウス・ブルガリス ATCC 3851 [G(-)]	3.13	>50	1.56	—
サルモネラ・ティフィリウム ATCC 14028 [G(-)]	3.13	>50	12.5	—
スタフィロコッカス・アウレウス ATCC 4330 (MRSA)	0.78	>50	12.5	—
スタフィロコッカス・アウレウス ATCC 700787 (MRSA)	0.78	>50	12.5	—
スタフィロコッカス・アウレウス ATCC 700788 (MRSA)	0.78	>50	25.0	—
アスペルギルス・フミガーツフ HIC 6094	12.5	>50	—	1.56
T.ルブルム IFO 9185	12.5	>50	—	1.56

【0024】

前記結果、表3に見られようにグリオニトリンAは、前記有害菌に対して高い抗菌効果があることが分かる。

下記に本発明組成物のための製剤例を例示する。

<製剤例1> 散剤の製造

化学式3または化学式4の化合物

乳糖

タルク

前記成分を混合して気密包に充填して散剤を製造する。

20mg

100mg

10mg

10

20

30

40

50

< 製剤例 2 > 錠剤の製造

化学式 3 または化学式 4 の化合物

1 0 m g

とうもろこし澱粉

1 0 0 m g

乳糖

1 0 0 m g

ステアリン酸マグネシウム

2 m g

前記成分を混合した後、通常の錠剤の製造方法にしたがって打錠して錠剤を製造する。

< 製剤例 3 > カプセル剤の製造

化学式 3 または化学式 4 の化合物

1 0 m g

結晶性セルロース

3 m g

ラクトース

1 4 . 8 m g

ステアリン酸マグネシウム

0 . 2 m g

通常のカプセル剤の製造方法によって前記の成分を混合してゼラチンカプセルに充填してカプセル剤を製造する。

< 製剤例 4 > 注射剤の製造

化学式 3 または化学式 4 の化合物

1 0 m g

マンニトール

1 8 0 m g

注射用滅菌蒸留水

2 9 7 4 m g

 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

2 6 m g

通常の注射剤の製造方法によって 1 アンプル当たり (2 m l) 前記成分含量で製造する。

< 製剤例 5 > 液剤の製造

化学式 3 または化学式 4 の化合物

2 0 m g

異性化糖

1 0 g

マンニトール

5 g

精製水

適量

通常液剤の製造方法によって精製水にそれぞれの成分を加えて溶解させて、レモン香を適量加えた後、前記の成分を混合した後、精製水を加えて全体を 1 0 0 m l に調節した後、茶色ビンに充填して滅菌して液剤を製造する。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 2 5 】

本発明の新規なスピンゴモナス属バクテリア - アスペルギルスカビ混合培養法は、新物質を獲得するための非常に有用な技術として期待される。前記混合培養法を通じて産生された新規な化合物であるグリオニトリンは、癌細胞に対する強い細胞毒性効果を示し、菌株 K M K - 0 0 1 を含む 1 0 種の有害菌株に対する抗菌作用を示している。ゆえに、グリオニトリンとその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む製薬組成物は、抗癌剤または抗生剤開発のための候補物質として有用に用いることができるので、産業的に非常に価値ある発明として用いることができる。

【受託番号】

【 0 0 2 6 】

K C C M 1 0 8 8 8 P

K C C M 1 0 8 8 9 P

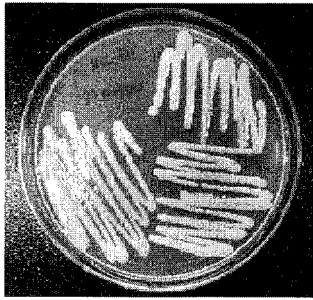
10

20

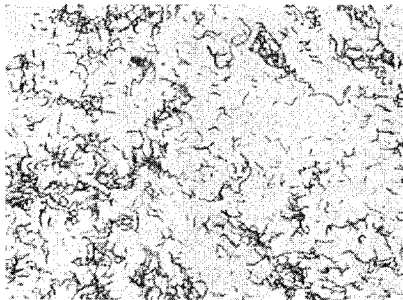
30

40

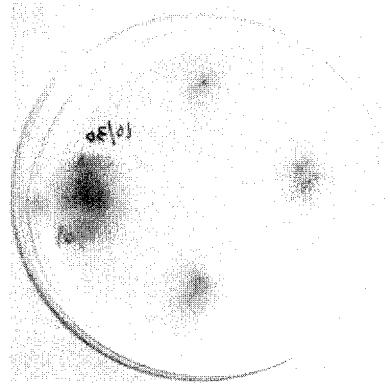
【図 1】



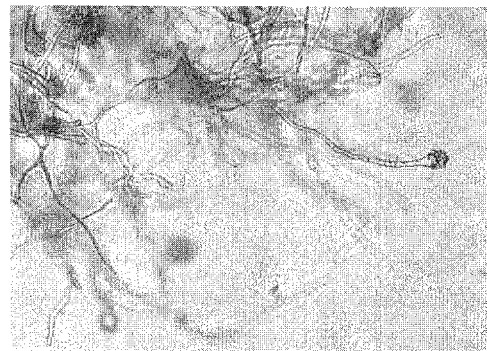
【図 2】



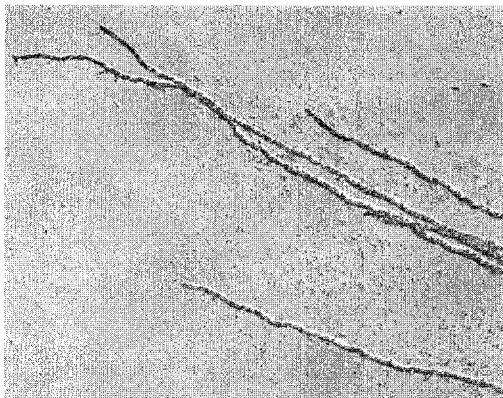
【図 3】



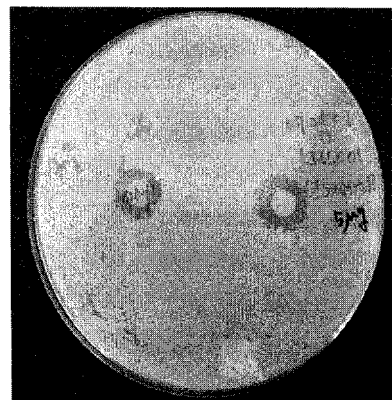
【図 4】



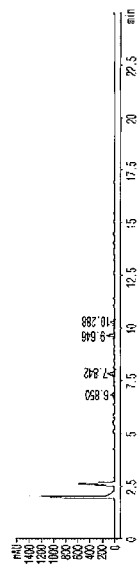
【図 5】



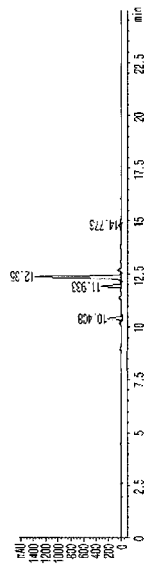
【図 6】



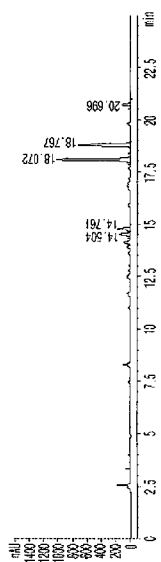
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2011502532000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年7月14日(2010.7.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

受託番号 K C C M 1 0 8 8 8 P で寄託されたスピングモナス属バクテリア。

【請求項2】

受託番号 K C C M 1 0 8 8 9 P で寄託されたアスペルギルス属カビ。

【請求項3】

請求項1に記載のスピングモナス属バクテリア菌株を液体培養した培養液に、別に液体培養した請求項2に記載のアスペルギルス属カビ菌株または菌株を含んだ培養液を加えて培養する工程を含む菌複合体の混合培養方法。

【請求項4】

スピングモナス属バクテリア菌株及びアスペルギルス属カビ菌株を 1 0 0 0 : 1 . 0 ~ 1 0 0 0 : 0 . 1 の割合で混合することを特徴とする請求項3に記載の混合培養方法。

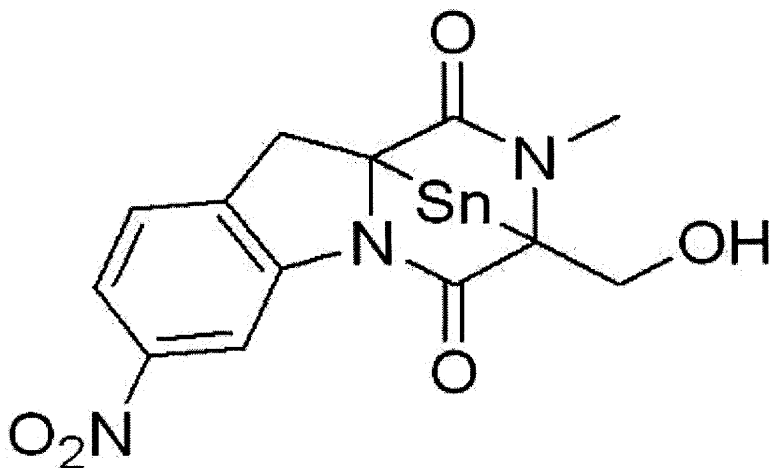
【請求項5】

請求項3に記載の混合培養方法で培養された菌複合体の培養液。

【請求項6】

請求項3に記載の混合培養方法で培養された菌複合体の培養液から分離される下記化学式1または化学式2で表わされる化合物：

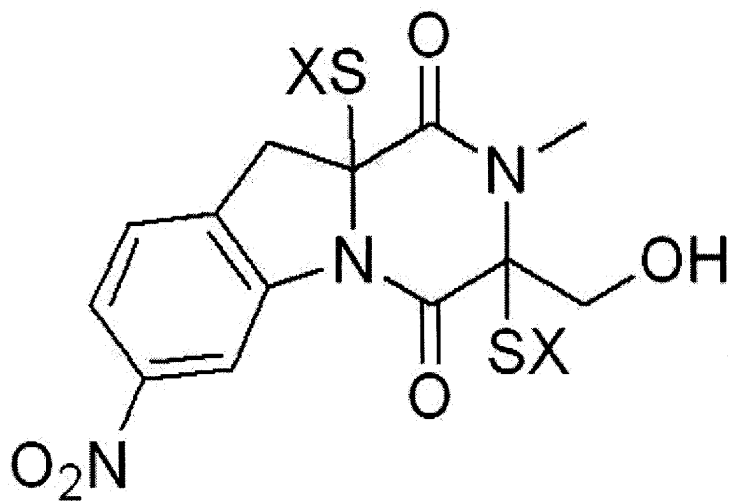
【化1】



化学式1

n は、イオウの個数を示し、1～4であり、

【化 2】



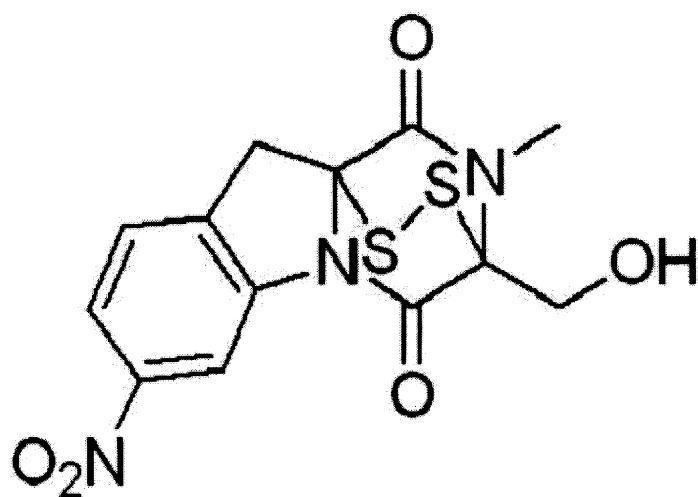
化学式 2

X は水素、または C 1 ~ C 5 アルキル基であり、互いに同じかまたは異なり、すべての非対称炭素での異性体を含む。

【請求項 7】

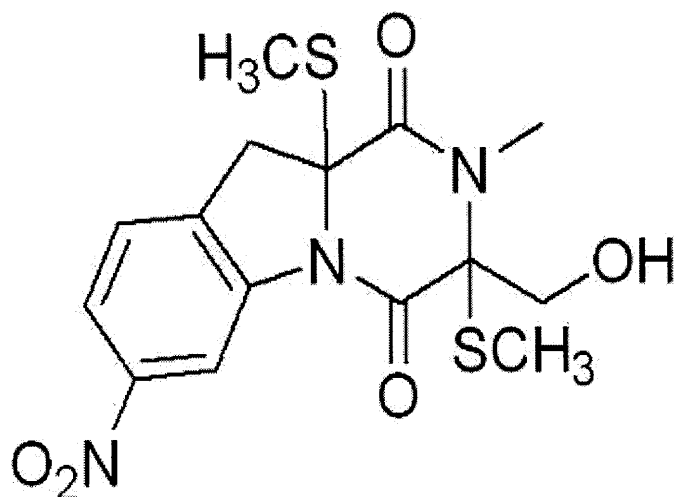
下記化学式 3 または化学式 4 で表わされることを特徴とする請求項 6 に記載の化合物：

【化 3】



化学式 3

【化 4】



化学式 4

【請求項 8】

n が、3 または 4 であることを特徴とする請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 9】

請求項 5 に記載の培養液、または請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載の化合物を含む抗癌剤。

【請求項 10】

癌が、胃癌、肝癌、大腸癌、肺癌または前立腺癌であることを特徴とする請求項 9 に記載の抗癌剤。

【請求項 11】

請求項 5 に記載の培養液、または請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載の化合物を含む抗菌剤。

【請求項 12】

請求項 1 に記載のスフィンゴモナス属 (*Sphingomonas* sp.) バクテリア、バチルス・サブティリス (*Bacillus subtilis*)、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*)、サルモネラ・ティフィリウム (*Salmonella typhimurium*)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*Methicillin Resistance Staphylococcus aureus*)、アスペルギルス - フミガーツフまたは *T. ルブルム* (*Trichophyton rubrum*) 菌株に対する抗菌効果を示すことを特徴とする請求項 11 に記載の抗菌剤。

【請求項 13】

1) 請求項 1 に記載のスフィンゴモナス属バクテリア菌株を液体培養した培養液に請求項 2 に記載のアスペルギルス属カビ菌株または菌株を含んだ培養液を加えて培養する工程を含む菌複合体の混合培養方法によって得た培養液に、有機溶媒または吸着樹脂を加えて抽出する工程；

2) 工程 1) の抽出物を減圧乾燥後、カラムクロマトグラフィーを用いて分画物を得る工程；及び

3) 工程 2) の分画物をカラムクロマトグラフィーを通じて請求項 6 に記載のグリオニトリンを精製する方法。

【請求項 14】

請求項 5 に記載の培養液または請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載の化合物を有効成分として含む癌予防用及び健康改善用の健康食品。

【請求項 15】

請求項 5 に記載の培養液または請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載の化合物を有効成分として含む菌性疾患予防用及び健康改善用の健康食品。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2008/006275
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 1/20(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 8 C12N 1/20		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) NCBI PubMed, NCBI GenBank, eKIPASS, "co-culture, Sphingomonas, Aspergillus, glionitrin, anticancer, antibacterial, etc."		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NCBI GenBank Accession No.EU219973, Sphingomonas sp.KMC001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (12 November 2007)	1
X A	Yasuhiro Igarashi, et al., 'Directed biosynthesis of fluorinated pseurotin A, synerazol and gliotoxin', In: The Journal of Antibiotics, November 2004, Vol.57(11), pp.748-754 cited in the application - see the whole document, especially Fig.1.	2 3-17
X A	Seung-Beom Hong, et al., 'Polyphasic taxonomy of Aspergillus fumigatus and related species', In: Mycologia, 2005, Vol.97(6), pp.1316-1329 - see the whole document, especially Figures 1-3; Table II.	2 3-17
A	Meenal Kulkarni & Ambalal Chaudhari, 'Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview', In: Journal of Environmental Management, October 2007, Vol.85(2), pp.496-512 - see the whole document.	3-17
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 JUNE 2009 (17.06.2009)		Date of mailing of the international search report 17 JUNE 2009 (17.06.2009)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer SHIN, Kyeong A Telephone No. 82-42-481-5589 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2008/006275

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☐ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in the international application as filed
☒ filed together with the international application in electronic form
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2008/006275

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 18, 19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 18 and 19 are directed to a method for treating a subject comprising the step of administering to said subject, which is a therapeutic method to treat human body. These fall into the category of methods for treatment of the human body by surgery or therapy as well as diagnostic methods. [Article 17(2)(a)(i), Rule 39.1(iv) PCT]
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 P 1/02 (2006.01)	C 1 2 P 1/02 A	4 C 0 8 7
C 0 7 D 487/04 (2006.01)	C 0 7 D 487/04 1 4 0	
C 0 7 D 513/18 (2006.01)	C 0 7 D 513/18 C S P	
A 6 1 K 31/548 (2006.01)	A 6 1 K 31/548	
A 6 1 K 31/4985 (2006.01)	A 6 1 K 31/4985	
A 6 1 K 36/06 (2006.01)	A 6 1 K 35/70	
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74 F	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 クウォン ハクチョル
大韓民国 2 1 0 - 1 2 0 カンウォン - ド カンヌン - シ チョダン - ドン セヤンチョンマル
アパートメント ナンバー 1 0 3 - 5 0 4

(72) 発明者 バク ヒョン - ボン
大韓民国 4 8 3 - 7 0 5 キョンギ - ド トンドウチョン - シ チハン - ドン チハンジョゴン
アパートメント ナンバー 2 0 5 - 8 0 4

(72) 発明者 ユ ジ - ヘ
大韓民国 1 5 2 - 7 5 4 ソウル クロ - グ ケボン - 2 ドン ヒュンダイホームタウン ナン
バー 2 0 7 - 2 5 0 2

F ターム(参考) 4B018 LB08 MD80 MD85 ME08 ME09 MF01 MF13
4B064 AE57 CA02 CA05 CC01 CE08 CE10 DA03 DA05 DA10
4B065 AA01X AA60X AC14 BA23 BC01 BC50 BD16 CA15 CA16 CA18
CA34 CA41 CA44
4C050 AA01 AA07 BB04 CC08 EE02 FF02 GG03 GG04 GG06 HH01
4C072 AA03 AA06 BB03 BB06 CC02 CC17 EE15 FF03 GG01 GG06
GG07 JJ01 UU01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 CB05 CB29 GA17 MA01 MA04 MA52
NA14 ZB26 ZB35
4C087 AA01 AA02 BC06 BC30 CA11 CA40 MA02 NA14 ZB26 ZB35

(54) 【発明の名称】 スピンゴモナス属バクテリア菌株とアスペルギルス属カビ菌株の混合培養方法、それに由来した新規な抗癌抗生物質であるグリオニトリン (g l i o n i t r i n s)、及び前記グリオニトリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む製薬組成物