

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0099444
(43) 공개일자 2021년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 5/00 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07K 1/20 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 5/00 (2013.01)

A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0013319

(22) 출원일자 2020년02월04일

심사청구일자 2020년02월04일

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

오동찬

서울특별시 강남구 개포로110길 15, 112동 703호

(일원동, 우성7차아파트)

황성훈

서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 기숙사
903동 707호 (신림동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리앤목특허법인

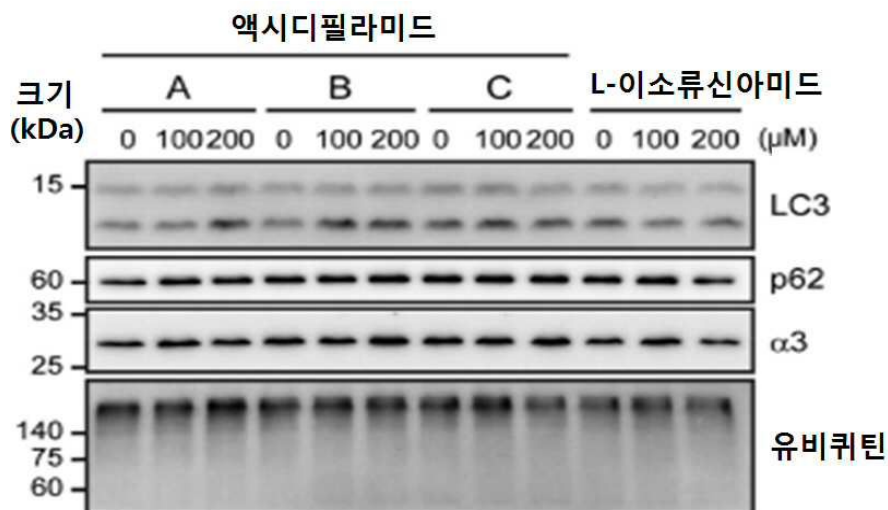
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 펩티드 화합물, 이의 생산 방법, 및 이의 용도

(57) 요약

신규한 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염, 이의 생산 방법, 및 이의 용도를 제공한다. 상기 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 세포의 자가포식(autophagy) 저해 활성을 가지므로, 다양한 종류의 암을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있다. 또한 시험관 내에서 세포의 자가포식 저해하는데 사용할 수 있다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 1/20 (2013.01)

C12N 1/20 (2021.05)

(72) 발명자

이민재

서울특별시 종로구 사직로8길 4, 105동 306호 (사직동, 광화문 푸림스페이스본)

윤예진

서울특별시 동대문구 이문로9길 105-8, 202호 (이문동)

김승범

대전광역시 서구 둔산남로 127, 104동 407호 (둔산동, 목련아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711087511
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	서울대학교 산학협력단
연구사업명	기초연구실지원사업
연구과제명	특이 환경 미생물 유래 생리활성물질 기초연구실
기 여 율	1/2
과제수행기관명	재단법인한국연구재단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711095301
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	서울대학교 산학협력단
연구사업명	이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업
연구과제명	프로테아좀 이질성 연구를 통한 신경질환의 새로운 이해 가능성 탐색
기 여 율	1/2
과제수행기관명	재단법인한국연구재단
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.02.29

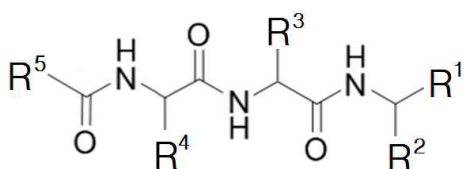
명세서

청구범위

청구항 1

식 1로 표시되는 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염:

[식 1]



상기 식 1에서,

R^1 은 수소, 히드록시기, 카르보닐기, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알콕시기이고,

R^2 및 R^4 는 서로 독립적으로, 수소, 히드록시기, 할로젠기, 시아노기, $-C(=O)R_a$, $-C(=O)OR_a$, $-OCO(OR_a)$, $-C=N(R_a)$, $-SR_a$, $-S(=O)R_a$, $-S(=O)_2R_a$, $-PR_a$, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C_2 내지 C_{20} 의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2 내지 C_{20} 의 알키닐기, C_2 내지 C_{20} 의 알킬렌 옥시드기, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{30} 의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{30} 의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{30} 의 아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{30} 의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합이고, 여기서 R_a 는 수소, C_1 내지 C_{10} 의 알킬기, 또는 C_6 내지 C_{20} 의 아릴기이고,

R^3 은 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알케닐기, 또는 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알키닐기이고,

R^5 는 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알케닐기, 또는 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알키닐기이고,

R^5 가 분지된 알킬인 경우, R^3 은 이소프로필기이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, R^2 및 R^4 중 하나 이상은 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{30} 의 아릴기로 치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기인 것인 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

청구항 2에 있어서, R^2 및 R^4 중 하나 이상은 치환 또는 비치환된 벤질기인 것인 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

청구항 1에 있어서, R^3 은 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기이고 분지된 알킬기인 것인 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

청구항 4에 있어서, R^3 은 2차 부틸(sec-butyl)기 또는 이소프로필(isopropyl)기인 것인 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염.

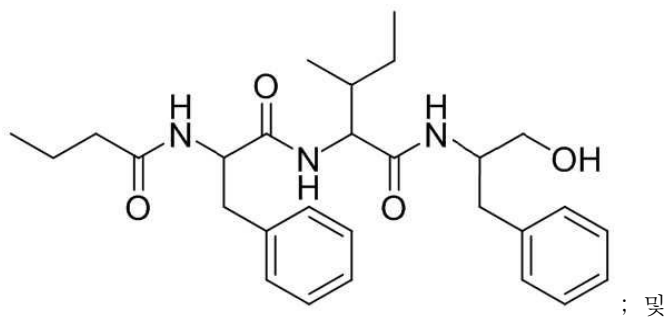
청구항 6

청구항 1에 있어서, R^5 는 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기이고 직쇄 또는 분지된 알킬기인 것인 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 7

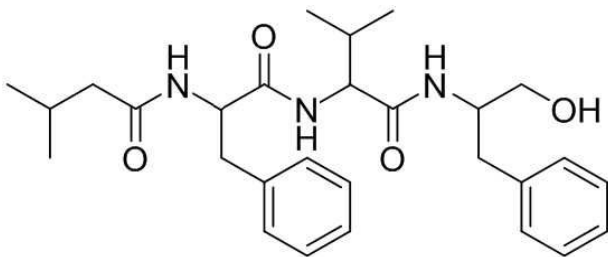
청구항 1에 있어서, 상기 펩티드 화합물은 식 2 또는 식 3으로 표시되는 것인 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염:

[식 2]



; 및

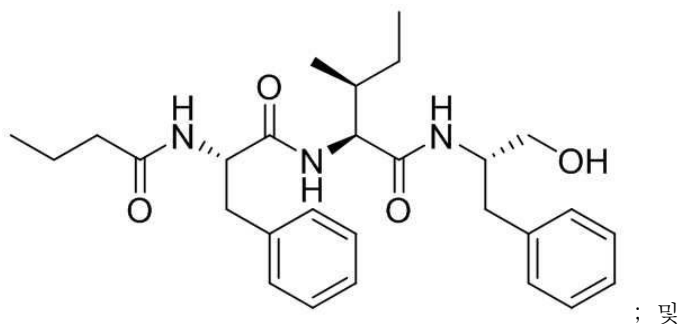
[식 3]



청구항 8

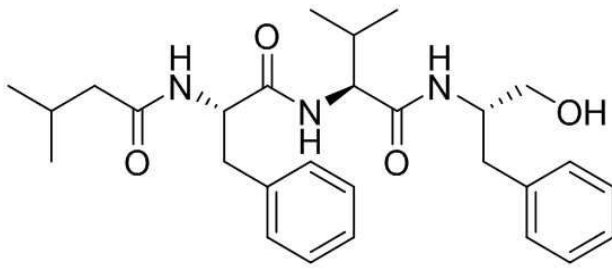
청구항 1에 있어서, 상기 펩티드 화합물은 식 4 또는 식 5로 표시되는 것인 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염:

[식 4]



; 및

[식 5]



청구항 9

스트렙타시디필러스 루고서스(*Streptacidiphilus rugosus*) 균주를 배양하는 단계; 및

상기 배양액으로부터 청구항 1의 펩티드 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 청구항 1의 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 생산하는 방법.

청구항 10

청구항 1의 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 청구항 1의 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 암세포의 자가포식(*autophagy*) 활성을 억제하는 것인 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 1의 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 염을 포함하는 시험관 내(*in vitro*) 세포의 자가포식 저해용 조성물.

청구항 13

청구항 1의 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 신규한 펩티드 화합물, 이의 생산 방법, 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미생물로부터 유래한 생리 활성 물질은 대체로 항박테리아, 항진균, 및 항암제의 원천이었으며 이를 비롯한 다양한 질병 치료를 위한 신약으로 개발되거나 신약 개발의 바탕(*template*)이 되어 왔다. 세균으로부터 유래한 항암제는 예를 들면, 독소루비신(*doxorubicin*), 블레오마이신(*bleomycin*), 미스라마이신(*mithramycin*), 네오카르지노스타틴(*neocarzinostatin*), 펜토스타틴(*pentostatin*), 에포틸론(*epothilone*)이 있다. 이와 같이, 세균 유래 생리 활성 물질의 연구는 항균제, 항진균제, 및 항암제 개발에서 매우 중요하다.

[0003] 세포의 자가포식(*autophagy*)은 세포가 스스로 불필요하거나 기능하지 않는 세포의 구성성분을 자연적으로 분해시키는 기작이다. 자가포식은 세포를 구성하는 요소들을 파괴하거나 재활용함으로써 세포가 생존하는데 필요한 에너지를 제공하는 기능을 한다. 질병과 관련해서, 자가포식은 스트레스에 대하여 적절한 적응과 대응으로 세포의 생존을 증진시키는 것으로 관찰되었다. 이와 반대로 세포의 사멸과 질병을 증진시키는 경우도 확인되었다. 특히, 암 발생과 관련하여, 자가포식을 통해 손상된 세포를 분해하여 암세포가 생기는 것을 막을 수도 있지만 이상 세포가 세포사멸을 회피하게 하여 잠재적으로 암세포의 성장에 기여할 수도 있다. 종양형성 초기에는 종양 억제인자로서 작용하고 종양이 진행된 후기에는 종양촉진인자로 작용한다고 알려져 있다(Cheng, Y. et al.,

Pharmacol. Rev. 2013 Aug 13, 65(4):1162-1197). 따라서, 세포의 자가포식을 억제하는 물질은 항암 효과가 있거나 다른 항암제의 항암 효과를 보완하거나 상승적인 효과가 있을 가능성이 높다.

[0004] 따라서, 미생물로부터 세포의 자가포식을 조절하는 신규한 화합물을 선별할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 신규한 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0006] 상기 화합물을 생산하는 방법을 제공한다.

[0007] 상기 화합물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

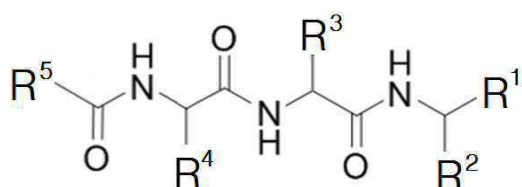
[0008] 상기 화합물을 포함하는 시험관 내(in vitro) 세포의 자가포식 저해용 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 화합물을 이용하여 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 식 1로 표시되는 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0011] [식 1]



[0012]

[0013] 상기 식 1에서, R¹은 수소, 히드록시기, 카르보닐기, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀의 알콕시기일 수 있다. 상기 R¹은 예를 들어 히드록시기이다.

[0014] 상기 식 1에서, R²는 수소, 히드록시기, 할로젠기, 시아노기, -C(=O)R_a, -C(=O)OR_a, -OCO(OR_a), -C=N(R_a), -SR_a, -S(=O)R_a, -S(=O)₂R_a, -PR_a, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C₂ 내지 C₂₀의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₂ 내지 C₂₀의 알키닐기, C₂ 내지 C₂₀의 알킬렌 옥시드기, 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₃₀의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₃₀의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₃₀의 아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₃₀의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 R_a는 치환기를 의미하고, 수소, C₁ 내지 C₁₀의 알킬기, 또는 C₆ 내지 C₂₀의 아릴기일 수 있다. 상기 R²는 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₃₀의 아릴기로 치환된 C₁ 내지 C₂₀의 알킬기일 수 있다. 상기 R²는 예를 들어 치환 또는 비치환된 벤질기이다.

[0015] 상기 식 1에서, R³은 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀ 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀ 알케닐기, 또는 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀ 알키닐기일 수 있다. 상기 R³은 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀의 알킬기이고 분지된 알킬기일 수 있다. 상기 R³은 예를 들어 2차 부틸(sec-butyl)기 또는 이소프로필(isopropyl)기이다.

[0016] 상기 식 1에서, R⁴는 수소, 히드록시기, 할로젠기, 시아노기, -C(=O)R_a, -C(=O)OR_a, -OCO(OR_a), -C=N(R_a), -SR_a, -S(=O)R_a, -S(=O)₂R_a, -PR_a, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀의 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C₂ 내지 C₂₀의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₂ 내지 C₂₀의 알키닐기, C₂ 내지 C₂₀의 알킬렌 옥시드기, 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₃₀의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₃₀의 아릴기, 치

환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{30} 의 아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{30} 의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 R_a 는 치환기를 의미하고, 수소, C_1 내지 C_{10} 의 알킬기, 또는 C_6 내지 C_{20} 의 아릴기일 수 있다. 상기 R^4 는 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{30} 의 아릴기로 치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기일 수 있다. 상기 R^4 는 예를 들어 치환 또는 비치환된 벤질기이다.

[0017] 상기 식 1에서, R^5 는 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알케닐기, 또는 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알키닐기일 수 있다. 상기 R^5 는 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기이고 직쇄 또는 분지된 알킬기일 수 있다. 상기 R^5 는 예를 들어 프로필기 또는 이소부틸기이다.

[0018] 상기 식 1에서, R^5 가 분지된 알킬인 경우, R^3 은 이소프로필기일 수 있다.

[0019] 상기 "치환 또는 비치환된"에서의 용어 "치환"은 유기 화합물 중의 하나 이상의 수소 원자를 다른 원자단으로 치환하여 유도체를 형성한 경우 수소 원자 대신에 도입되는 것을 말하고, 치환기는 도입된 원자단을 말한다. 상기 치환기는 할로젠원자, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미노기, 아미디노기, 아세트아미노기, 히드라진, 히드라존, 카르복실기, 술폰닐기, 술포모일(sulfamoyl)기, 술폰산기, 인산, C_1 내지 C_5 의 알킬기, C_1 내지 C_5 의 알콕시기, C_2 내지 C_5 의 알케닐기, C_2 내지 C_5 의 알키닐기, C_3 내지 C_{10} 의 시클로알킬기, C_6 내지 C_{10} 의 아릴기, C_6 내지 C_{10} 의 헤테로아릴기, C_6 내지 C_{20} 의 아릴알킬기, C_6 내지 C_{20} 의 헤테로아릴알킬기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0020] 용어 "히드록시(hydroxy)"는 -OH 기능기(수산기)를 말한다.

[0021] 용어 "카르보닐(carbonyl)"은 1개의 산소 원자에 이중결합된 1개의 탄소원자로 이루어진 기능기 즉, $C=O$ 를 나타낸다.

[0022] 용어 "알킬(alkyl)"은 완전 포화된 분지형 또는 비분지형 (또는, 직쇄 또는 선형) 탄화수소를 말한다. 상기 알킬은 C_1 내지 C_{20} , C_1 내지 C_{15} , C_1 내지 C_{10} , 또는 C_1 내지 C_5 인 알킬기일 수 있다. 상기 알킬은 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, 2차 부틸(sec-butyl), n-펜틸, 이소펜틸, 네오펀틸, iso-아밀, n-헥실, 3-메틸헥실, 2,2-디메틸펜틸, 2,3-디메틸펜틸, 또는 n-헵틸이다.

[0023] 용어 "알콕시(alkoxy)"는 산소 원자에 단일 결합된 알킬을 말한다. 상기 알콕시는 예를 들어 메톡시, 에톡시, 또는 부톡시이다.

[0024] 용어 "알케닐(alkenyl)"은 하나 이상의 탄소-탄소 이중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 말한다. 상기 C_2 내지 C_{20} 의 알케닐기는 C_2 내지 C_{15} , C_2 내지 C_{10} , 또는 C_2 내지 C_5 인 알케닐기일 수 있다. 상기 알케닐기는 예를 들어, 비닐, 알릴, 부테닐, 이소프로페닐, 또는 이소부테닐이다.

[0025] 용어 "알키닐(alkynyl)"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 말한다. 상기 C_2 내지 C_{20} 의 알키닐기는 C_2 내지 C_{15} , C_2 내지 C_{10} , 또는 C_2 내지 C_5 인 알키닐기일 수 있다. 상기 알키닐은 예를 들어, 에티닐, 부티닐, 이소부티닐, 또는 이소프로피닐이다.

[0026] 용어 "할로젠(halogen)" 원자는 불소, 브롬, 염소, 요오드 등을 포함한다.

[0027] 용어 "시아노(cyano)"는 탄소 원자와 질소 원자 사이에 삼중결합으로 이루어진 기능기를 말한다.

[0028] 용어 "알킬렌 옥시드(alkylene oxide)"는 하나의 산소 원자와 2 이상의 탄소원자로 이루어진 고리기를 말한다.

[0029] 용어 "시클로알킬(cycloalkyl)"는 포화 또는 부분적으로 불포화된 비방향족(non-aromatic) 모노시클릭, 바이시클릭 또는 트리시클릭 탄화수소기를 말한다.

[0030] 용어 "아릴(aryl)"은 단독 또는 조합하여 사용되어, 하나 이상의 고리를 포함하는 방향족 시스템을 말하고, 방향족 고리가 하나 이상의 탄소 고리에 융합된 그룹도 포함한다. 상기 C_6 내지 C_{30} 의 아릴기는 C_6 내지 C_{15} , 또는 C_6 내지 C_{10} 인 아릴기일 수 있다. 상기 아릴은 예를 들어, 페닐, 나프틸, 또는 테트라히드로나프틸이다.

[0031] 용어 "아릴옥시(aryloxy)"는 산소 원자에 단일 결합된 아릴기를 말한다.

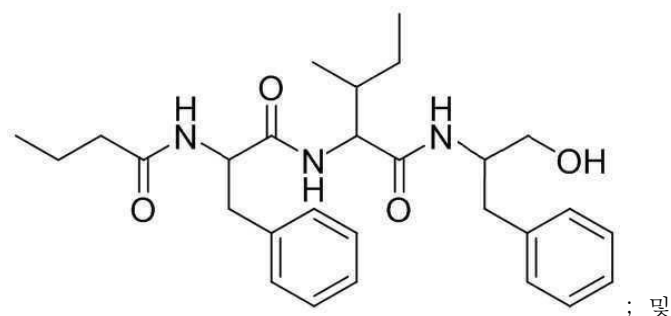
[0032] 용어 "헤테로아릴(heteroaryl)"은 N, O, P 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 나머지 고리원자가 탄소인 모노시클릭(monocyclic) 또는 바이시클릭(bicyclic) 유기 화합물을 말한다. 상기 헤테로아릴기는 1 내지 5개의 헤테로원자를 포함할 수 있고, 5 내지 10 고리 멤버(ring member)를 포함할 수 있다. 상기 S 또는 N은 산화되어 여러 산화 상태를 가질 수 있다.

[0033] 용어 "펩티드 화합물(peptide compound)"은 펩티드 또는 변형된 펩티드 유도체 화합물을 포함하는 화합물을 말한다. 펩티드(peptide)는 두개 이상의 아미노산이 카르복시기와 아미노기 간의 펩티드 결합으로 연결된 형태의 화합물이다. 구성 아미노산의 수에 따라 디펩티드(dipeptide), 트리펩티드(tripeptide), 테트라펩티드(tetrapeptide) 등이라 하고, 약 10개 이하의 펩티드 결합이 있는 것을 올리고펩티드(oligopeptide), 다수의 펩티드 결합이 있는 것을 폴리펩티드(polypeptide)라고 한다. 상기 변형된 펩티드 유도체 화합물은 두개 이상의 아미노산 또는 아미노산 유도체가 펩티드 결합으로 연결된 형태의 화합물을 포함하는 화합물을 말한다. 상기 아미노산은 아민기와 카르복실기를 함유하는 유기 화합물을 말한다. 상기 아미노산 유도체는 아미노산의 기능기가 치환기로 치환되어 변형된 화합물일 수 있다. 상기 치환기는 전술한 바와 같다. 상기 아미노산 유도체는 예를 들어, 페닐알라니놀(phenylalaninol), 부탄산(butanoic acid)으로 치환된 페닐알라닌, 및 3-메틸부탄산(3-methylbutanoic acid)으로 치환된 페닐알라닌이다.

[0034] 상기 펩티드 화합물은 N 말단이 부탄산(butanoic acid)으로 치환된 페닐알라닌(phenylalanine)-이소류신(isoleucine)-페닐알라니놀(phenylalaninol)로 이루어진 화합물일 수 있다. 상기 펩티드 화합물은 N 말단이 3-메틸부탄산(3-methylbutanoic acid)으로 치환된 페닐알라닌-발린(valine)-페닐알라니놀로 이루어진 화합물일 수 있다.

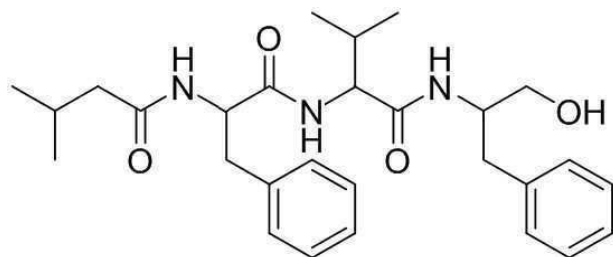
[0035] 상기 펩티드 화합물은 식 2 또는 식 3으로 표시된 화합물일 수 있다:

[0036] [식 2]



[0037] ; 및

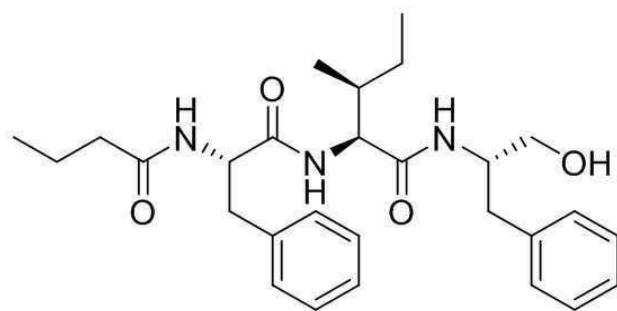
[0038] [식 3]



[0039] .

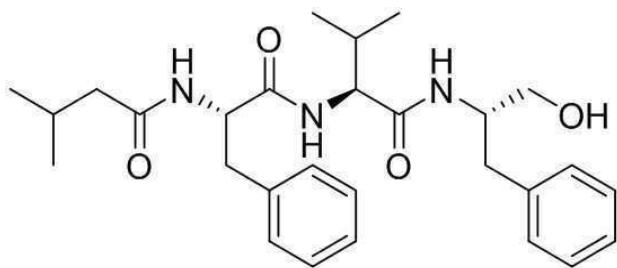
[0040] 상기 펩티드 화합물은 식 4 또는 식 5로 표시된 화합물일 수 있다:

[0041] [식 4]



(액시디필라미드 A); 및

[식 5]



(액시디필라미드 B).

용어 "입체이성질체"의 "이성질체(isomer)"는 분자식은 같지만 분자 내에 있는 구성 원자의 연결 방식이나 공간 배열이 동일하지 않은 화합물을 말한다. 이성질체는 예를 들면, 구조 이성질체(structural isomers), 및 입체이성질체(stereoisomer)를 포함한다. 상기 입체이성질체는 부분입체 이성질체(diastereomer) 또는 거울상 이성질체(enantiomer)일 수 있다. 거울상 이성질체는 왼손과 오른손의 관계처럼 그 거울상과 겹쳐지지 않는 이성질체를 말하고, 광학 이성질체(optical isomer)라고도 한다. 거울상 이성질체는 키랄 중심 탄소에 4개 이상의 치환기가 서로 다른 경우 R(Rectus: 시계방향) 및 S(Sinister: 반시계 방향)로 구분한다. 부분입체 이성질체는 거울상 관계가 아닌 입체 이성질체를 말하고, 원자의 공간 배열이 달라 생기 시스(cis)-트랜스(trans) 이성질체로 나뉠 수 있다.

용어 "용매화물(solvate)"는 유기 또는 무기 용매에 용매화된 화합물을 말한다. 상기 용매화물은 예를 들어 수화물이다.

용어 "염(salt)"은 화합물의 무기 및 유기산 부가염을 말한다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 염일 수 있다. 상기 무기산염은 염산염, 브롬산염, 인산염, 황산염, 또는 이황산염일 수 있다. 상기 유기산염은 포름산염, 아세트산염, 프로피온산염, 젖산염, 옥살산염, 주석산염, 말산염, 말레인산염, 구연산염, 푸마르산염, 베실산염, 캄실산염, 에디실염, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산염, 벤조산염, 글루콘산염, 메탄술폰산염, 글리콜산염, 숙신산염, 4-톨루엔술폰산염, 갈락투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 에탄술폰산염, 벤젠술폰산염, p-톨루엔술폰산염, 또는 아스파르트산염일 수 있다. 상기 금속염은 칼슘염, 나트륨염, 마그네슘염, 스트론튬염, 또는 칼륨염일 수 있다.

다른 양상은 스트렙타시디필러스 루고서스(*Streptacidiphilus rugosus*) 균주를 배양하는 단계; 및 상기 배양액으로부터 일 양상에 따른 펩티드 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매 화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 생산하는 방법을 제공한다.

상기 펩티드 화합물, 입체이성질체, 용매화물, 및 약학적으로 허용가능한 염은 전술한 바와 같다.

상기 방법은 스트렙타시디필러스 루고서스 균주를 배양하는 단계를 포함한다.

상기 스트렙타시디필러스 루고서스 균주는 스트렙타시디필러스 루고서스 종 AM-16 균주일 수 있다.

배양하는 단계는 액체 배지 또는 고체 배지에서 균주를 배양하는 것일 수 있다. 상기 배지는 탄소원으로서는 예를 들어, 글루코스, 쌀, 물엿, 텍스트린, 전분, 당밀, 동물유, 또는 식물유를 포함할 수 있다. 상기기는 질소원으로서는 예를 들면, 효모 추출물, 소고기 추출물, 펩톤, 밀기울, 대두박, 소맥, 맥아, 면실박, 어박, 콘스톱리커, 육즙, 황산암모니움, 질산소다 또는 요소를 포함할 수 있다. 배지는 필요에 따라, 식염, 칼륨, 마그네슘, 코발트, 염소, 인산, 황산 또는 기타 이온 생성을 촉진하는 무기염류를 포함할 수 있다. 상기 배지는 예를 들어, 효

모 추출물, 소고기 추출물, 펩톤, 및 글루코스를 포함한다.

- [0053] 배양은 호기성 조건에서 진탕 또는 정치하면서 배양하는 것일 수 있다. 배양 온도는 예를 들어 약 20℃ 내지 약 37℃, 약 25℃ 내지 약 30℃, 또는 27℃일 수 있다. 배양 시간은 예를 들어 1 일 내지 4일, 1 일 내지 8일, 1일 내지 2주, 1일 내지 4주, 1일 내지 2 개월, 1 주 내지 2 개월, 2 주 내지 2 개월, 1 개월 내지 2 개월, 또는 6 주일 수 있다.
- [0054] 상기 방법은 상기 배양액으로부터 상기 펩티드 화합물을 분리하는 단계를 포함한다.
- [0055] 상기 분리하는 단계는 배양액을 농축, 원심분리, 여과, 또는 크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어 상기 배양액을 에틸아세테이트, 물, 또는 이들의 조합에 의해 추출할 수 있다. 수득된 농축물을 고속 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography: HPLC)로 분획할 수 있다. 상기 HPLC는 30% 내지 60% 아세토니트릴 수용액을 이동상으로 하고 역상 반분취 HPLC 칼럼을 이용하여 수행할 수 있다. 분리된 펩티드 화합물은 순도 약 80%, 약 90%, 또는 약 99% 이상으로 수득될 수 있다.
- [0056] 다른 양상은 일 양상에 따른 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0057] 상기 펩티드 화합물, 입체이성질체, 용매화물, 및 약학적으로 허용가능한 염은 전술한 바와 같다.
- [0058] 상기 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 암세포의 자가포식 (autophagy) 활성을 억제할 수 있다. 상기 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 자가포식의 억제에 의해 종양 세포의 사멸을 촉진시킬 수 있다. 따라서, 상기 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 항암제로 사용될 수 있다.
- [0059] 상기 암은 예를 들면 간내 담관암, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 균상식육종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 기저세포암, 난소 상피암, 난소 생식 세포 종양, 남성 유방암, 뇌종양, 뇌하수체선종, 다발성 골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비소세포폐암, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아 뇌종양, 소아 림프종, 소아 백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신경모세포종, 신우요관암, 신장암, 악성 연부 조직 종양, 악성 골종양, 악성 림프종, 악성 중피종, 악성 흑색종, 안종양, 외음부암, 요도암, 원발부위 불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관 간질 종양, 율름종양, 유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신 용모 질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성 뇌종양, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수종양, 청신경초종, 횡장암, 침샘암, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 후두암 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 암은 예를 들어 유방암, 대장암, 선암, 또는 폐암일 수 있다.
- [0060] 용어 "예방"은 조성물의 투여에 의해 질병을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다. 용어 "치료"는 조성물의 투여에 의해 질병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0061] 상기 약학적 조성물은 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 항암 활성을 갖는 공지의 유효 성분을 더 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 담체, 부형제 및 희석제는 예를 들면, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유를 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0064] 상기 약학적 조성물에 있어서, 경구 투여를 위한 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제일 수 있다. 상기 고형 제제는 부형제를 더 포함할 수 있다. 부형제는 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 또는 젤라틴일 수 있다. 또한, 상기 고형 제제는 마그네슘 스테아레이트, 또는 탈크와 같은 윤활제를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 있어서, 경구를 위한 액상

제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 또는 시럽제일 수 있다. 상기 액상 제제는 물, 또는 리퀴드 파라핀을 포함할 수 있다. 상기 액상 제제는 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 또는 보존제를 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 있어서, 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 또는 및 좌제일 수 있다. 비수성용제 또는 현탁제는 식물성 기름 또는 에스테르를 포함할 수 있다. 식물성 기름은 예를 들면, 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 또는 올리브 오일일 수 있다. 에스테르는 예를 들면 에틸올레이트일 수 있다. 좌제의 기제는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 또는 글리세로젤라틴일 수 있다.

[0065] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 상기 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 예를 들면, 약 0.0001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 또는 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 24회, 2일 내지 1주에 1 내지 7회, 또는 1개월 내지 12개월에 1 내지 24 회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 약학적 조성물에서 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 전체 조성물 총 중량에 대하여 약 0.0001 중량% 내지 약 10 중량%, 또는 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%로 포함될 수 있다.

[0066] 투여 방법은 경구, 또는 비경구 투여일 수 있다. 투여 방법은 예를 들어, 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal), 또는 피내 경로일 수 있다. 상기 조성물은 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있고, 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 함께 투여될 수 있다.

[0067] 다른 양상은 일 양상에 따른 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 염을 포함하는 시험관 내(in vitro) 세포의 자가포식 저해용 조성물을 제공한다. 다른 양상은 시험관 내(in vitro)에서 일 양상에 따른 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 염을 세포에 가하여 상기 세포의 자가포식을 저해하는 방법을 제공한다.

[0068] 상기 펩티드 화합물, 입체이성질체, 용매화물, 염, 및 자가포식은 전술한 바와 같다.

[0069] 상기 세포는 암세포일 수 있다. 상기 세포는 자궁경부암 세포, 예를 들어 HeLa 세포일 수 있다.

[0070] 다른 양상은 일 양상에 따른 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0071] 상기 펩티드 화합물, 입체이성질체, 용매화물, 약학적으로 허용가능한 염, 암, 예방, 치료, 및 약학적 조성물은 전술한 바와 같다.

[0072] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 마우스, 래트, 소, 말, 돼지, 개, 원숭이, 양, 염소 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 암을 앓고 있거나, 앓을 가능성이 큰 개체일 수 있다.

[0073] 투여 방법은 경구, 또는 비경구 투여일 수 있다. 투여 방법은 예를 들어, 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal), 또는 피내 경로일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있고, 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 함께 투여될 수 있다.

[0074] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내 일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0075] 신규한 펩티드 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 세포의 자가포식 저해 활성을 가지므로, 다양한 종류의 암을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있다. 또한 시험관 내에서 세포의 자가포식 저해하는데 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0076] 도 1은 스트렙타시디필러스 루고서스(*Streptacidiphilus rugosus*) AM-16 균주를 배양한 배지의 사진이다.
- 도 2a 내지 도 2c는 엑시디필라미드 화합물을 HeLa 세포에 4시간(도 2a), 8시간(도 2b), 및 12시간(도 2c) 동안 처리한 경우 면역블로팅을 수행한 이미지이고, 도 2d는 엑시디필라미드 화합물의 처리 시간에 따른 suc-LLVY-AMC의 가수분해 수준(상대적 형광 단위(relative fluorescence unit: RFU))을 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 엑시디필라미드 화합물과 바필로마이신 A1을 동시처리하거나 아미노산 결핍의 조건에서 엑시디필라미드 화합물을 처리한 경우 면역블로팅을 수행한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0077] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0078] **실시예 1. 엑시디필라미드의 분리 및 구조의 확인**
- [0079] **1-1. 엑시디필라미드 생산 균주의 분리**
- [0080] 호산성 토양 세균인 AM-16 균주를 산성화된 소나무 숲의 토양에서 분리하였다. 균주 분리에는 다양한 종류의 분리배지가 사용되었으며, AM-16 균주는 pH 4.5로 산성화된 modified Bennett 고체배지(1 g의 효모 추출물, 2 g의 소고기 추출물, 1 g의 펩톤, 10 g의 글루코스, 20 g의 한천 분말/ 1L의 멸균된 증류수(HCl로 산성화됨))로 분리하였다.
- [0081] 16S rDNA 염기서열 분석 결과에 기반하여, 해당 균주는 기존에 밝혀지지 않은 새로운 종의 균주임을 확인하였다(도 1). 이 균주를 스트렙타시디필러스 루고서스(*Streptacidiphilus rugosus*) 종 AM-16 균주로 명명하였다.
- [0082] **1-2. 스트렙타시디필러스 루고서스 AM-16 균주의 배양**
- [0083] 스트렙타시디필러스 루고서스 종 AM-16 균주를 pH 4.5로 산성화된 modified Bennett 고체배지(1 g의 효모 추출물, 2 g의 소고기 추출물, 1 g의 펩톤, 10 g의 글루코스, 20 g의 한천 분말/ 1L의 멸균된 증류수(HCl로 산성화됨))에 도말하고 30℃에서 약 4주간 배양하였다.
- [0084] 배양된 AM-16 균주의 포자를 150 mL 부피의 pH 4.5로 산성화된 modified Bennett 액체배지(1 g의 효모 추출물, 2 g의 소고기 추출물, 1 g의 펩톤, 10 g의 글루코스/ 1L의 멸균된 증류수(HCl로 산성화됨))에 접종하고, 200 rpm으로 진탕하면서 30℃의 온도에서 4일간 배양하였다. 이후, 10 mL의 배양액을 1 L의 pH4.5 산성화된 modified Bennett 액체배지에 접종하고, 170 rpm으로 진탕하면서 30℃에서 4일간 배양하였다.
- [0085] **1-3. 엑시디필라미드의 분리 및 정제**
- [0086] 실시예 1-2에서 배양된 AM-16 균주는 에틸 아세테이트(EtOAc)를 사용하여 유기추출하였다. 구체적으로, 스탠드에 거치된 분별깔때기에 1 L의 AM-16 균주 배양액과 1 L의 EtOAc(대정화금주식회사)를 넣어 준 뒤 마개를 막고 상하좌우로 1분간 흔들어 1차 추출을 진행하였다. 이후, 다시 스탠드에 거치하여 물 층과 EtOAc 층이 완전히 나누어진 후 분별깔때기의 밸브를 열어 물 층을 제거하였다. 물층에 새로운 EtOAc를 첨가하고, 같은 방식으로 반복 추출을 진행하였다. EtOAc 층은 깨끗한 플라스크에 따로 받아 보관하였고, 무수 소듐 술페이트를 첨가하여 여분의 물을 제거하였다. 물기가 제거된 EtOAc 층을 다시 3 L 부피의 둥근 플라스크로 옮겨 담은 후, 감압건조기를 이용하여 감압 건조하였다. 총 72 L의 균주를 배양하여 약 10 g의 조(crude) 추출물을 얻었다.
- [0087] 얻어진 조 추출물을 충분한 양의 메탄올(MeOH)로 녹이고, 시린지 필터(ADVANTEC, 25HP045AN)를 사용하여 고형 불순물을 제거하였다. 반분취(semi-preparative) HPLC를 이용하여 정제 과정을 진행하였다. 정제를 위해, 역상 컬럼(YMC-Triart C₁₈ 250 × 10 mm)을 사용하고, 분리 용매로 30%(v/v) 내지 60%(v/v)의 아세토니트릴(acetonitrile: ACN)/수용액(0.1%(v/v) 포름산)으로 40분간 농도구배 조건(유속: 2 mL/분, 검출: UV 230 nm)을 사용하였다. 분획물의 조성 확인은 아질런트(Agilent technologies)사의 1200 시리즈 LC와 6130 시리즈 질량분석기를 연결한 LC/MS를 사용하였다. 이와 같은 조건에서, HPLC 주입 후 약 38분경에 신규한 물질인 엑시디필라미드 A와 B가 동시에 용출되는 것을 LC/MS 분석을 통하여 확인하였다.
- [0088] 엑시디필라미드 A와 B를 각각의 순수한 물질로 정제하기 위하여 분리 조건을 수정하여 추가적인 분리실험을 진행하였다. 두번째 정제 조건은 동일한 역상 HPLC 컬럼을 사용하고, 메탄올/수용액 70%(v/v)(0.1%(v/v) 포름산)

용매의 등용매(isocratic) 조건(유속: 2 mL/분, 검출: UV 230 nm)으로 분리하였다. HPLC 주입 후 약 31분에 순수한 엑시디필라미드 A, 약 34분에 순수한 엑시디필라미드 B가 각각 용출되었다. 반복 실험을 통하여, 10 g의 추출물로부터 약 8 mg의 엑시디필라미드 A와 9 mg의 엑시디필라미드 B를 확보할 수 있었다.

1-4. 엑시디필라미드의 물리화학적 특성 분석

(1) 엑시디필라미드의 물리화학적 특성 확인

엑시디필라미드의 구조는 1D 및 2D 핵자기 공명 스펙트럼(nuclear magnetic resonance: NMR) 스펙트럼을 기반으로 확인하였다. 핵자기 공명 스펙트럼 (^1H NMR, ^{13}C NMR)은 브루커(Bruker)사의 500 MHz NMR을, 용매는 MeOD- d_3 를 사용하였다.

핵자기공명 스펙트럼에 의한 엑시디필라미드 A 및 B의 구조 위치 지정을 각각 표 1 및 2에 나타내었다.

[엑시디필라미드 A (acidiphilamide A)]

(1) 분자식: $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_4$

(2) 분자량: 481

(3) 색깔: 백색

(4) ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): 표 1 참조

(5) ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz): 표 1 참조

표 1

위치	δ_c	유형	δ_H	mult (Hz 중 J)
1a	62.4	CH_2	3.32	m
1b			3.24	m
1-OH		OH	4.79	br s
2	52.1	CH	3.92	m
2-NH		NH	7.84	d (8.5)
3a	36.3	CH_2	2.87	dd (14.0, 5.5)
3b			2.61	dd (14.0, 8.5)
4	139.0	C		
5, 9	129.0	2CH	7.20	d (7.0)
6, 8	128.1	2CH	7.23	dd (7.0, 7.0)
7	125.8	CH	7.14	dd (7.0, 7.0)
10	170.3	C		
11	57.0	CH	4.10	dd (9.0, 8.0)
11-NH		NH	7.82	d (9.0)
12	36.9	CH	1.64	m
13a	24.2	CH_2	1.37	m
13b			1.0	m
14	11.0	CH_3	0.78	t (7.5)
15	15.2	CH_3	0.74	d (7.0)
16	171.1	C		
17	53.6	CH	4.54	ddd (10.0, 8.5, 4.0)
17-NH		NH	8.07	d (8.5)
18a	37.2	CH_2	2.93	dd (14.0, 4.0)
18b		CH	2.70	dd (14.0, 10.0)
19	138.0	C		
20, 24	129.1	2CH	7.24	d (7.0)

21, 23	127.9	2CH	7.22	dd (7.0, 7.0)
22	126.1	CH	7.16	dd (7.0, 7.0)
25	172.0	C		
26	28.3	CH ₂	1.98	td (7.5, 2.0)
27	18.6	CH ₂	1.37	m
28	13.4	CH ₃	0.68	t (7.5)

[0100] [엑시디필라미드 B (acidiphilamide B)]

[0101] (1) 분자식: C₂₈H₄₀N₃O₄

[0102] (2) 분자량: 481

[0103] (3) 색깔: 백색

[0104] (4) ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): 표 2 참조

[0105] (5) ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz): 표 2 참조

표 2

[0106]

위치	δ _c	유형	δ _H	mult (Hz 중 <i>J</i>)
1a	62.4	CH2	3.32	m
1b			3.24	m
1-OH		OH	4.80	br s
2	52.2	CH	3.92	m
2-NH		NH	7.83	d (8.5)
3a	36.4	CH2	2.86	dd (14.0, 5.5)
3b			2.61	dd (14.0, 8.5)
4	139.1	C		
5, 9	129.1	2CH	7.20	d (7.0)
6, 8	128.1	2CH	7.23	dd (7.0, 7.0)
7	125.9	CH	7.14	dd (7.0, 7.0)
10	170.3	C		
11	57.8	CH	4.09	dd (9.0, 8.0)
11-NH		NH	7.81	d (9.0)
12	30.9	CH	1.89	m
13	19.1	CH3	0.78	d (7.0)
14	18.1	CH3	0.78	d (7.0)
15	171.3	C		
16	53.7	CH	4.56	ddd (10.0, 8.5, 4.0)
16-NH		NH	8.07	d (8.5)
17a	37.1	CH2	2.94	dd (14.0, 4.0)
17b			2.71	dd (14.0, 10.0)
18	138.2	C		
19, 23	129.1	2CH	7.25	d (7.0)
20, 22	127.9	2CH	7.23	dd (7.0, 7.0)
21	125.9	CH	7.15	dd (7.0, 7.0)
24	171.5	C		
25	44.5	CH2	1.88	d (6.5)
26	25.6	CH	1.81	m
27	22.2	CH3	0.73	d (7.0)
28	22.1	CH3	0.65	d (7.0)

[0107] (2) 액시디필라미드의 입체구조 확인

[0108] 액시디필라미드 A의 절대 입체구조를 규명하기 위해서 마피(Marfe) 방법을 이용하였다(Fujii, K. et al., Anal. Chem. 1997, 69, 5146-5151).

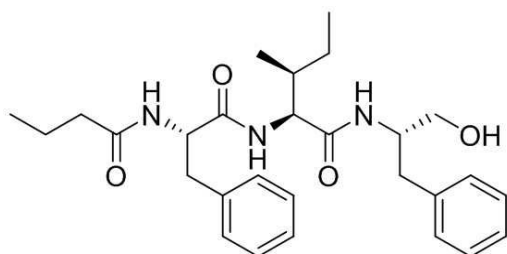
[0109] 우선, 물질의 아미드 결합을 파괴하여 각각의 아미노산으로 나누기 위해 산 가수분해를 진행하였다. 2 mg의 액시디필라미드 A를 6 N의 염산을 가하고 120℃에서 2시간 동안 인큐베이션하여 가수분해를 진행하였다. 가수분해 반응을 종료하고 가수분해 물질을 동결건조시켜서 잔류하는 염산을 완전히 제거하였다. 물질을 두 개의 바이알에 나눠 담고 마피 방법을 진행하였다. 200 μ l의 1 N NaHCO₃에 가수분해 산물을 녹이고, 각 바이알에 100 μ l씩 가하였다. L-FDAA (N-(5-플루오로-2,4-디니트로페닐)-L-알라닌 아미드)를 아세톤 용매에 녹여 10 mg/mL의 L-FDAA를 준비하고, D-FDAA(N-(5-플루오로-2,4-디니트로페닐)-D-알라닌 아미드) 시약도 같은 방법으로 준비하였다. 100 μ l의 L-FDAA 용액 및 100 μ l의 D-FDAA 용액을 각 바이알에 가하였다. 바이알을 약 80℃에서 흔들어주면서, 약 3분간 반응시켰다. 그후, 100 μ l의 2 N 염산을 바이알에 각각 넣고 중화반응을 진행하고, 각각의 반응물에 300 μ l의 50%(v/v) 아세토니트릴/수용액을 첨가하여 반응물을 희석시켰다. 이 반응물을 LC/MS와 Phenomenex C18(2) (Luna, 100 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 칼럼과 역상 농도구배 조건(유속 0.7 mL/분, UV 파장 340 nm, 10%(v/v) 내지 60%(v/v) 아세토니트릴/수용액, 포름산 0.1%(v/v) 조건으로 50분 이상)으로 분석하였다. 반응물 분석 결과, 액시디필라미드 A를 구성하는 아미노산인 페닐알라닌, 아이소류신, 페닐알라니놀은 L-FDAA 유도체에서 31.4분, 30.5분, 및 30.7분에 검출되었고, D-FDAA 유도체에서 34.2분, 34.4분, 및 33.7분에 검출되었으므로, 각각 L, L, 및 S 형태의 입체구조라는 것을 확인하였다.

[0110] 이소류신의 베타 위치 절대 입체구조를 결정하기 위해, GITC 유도체화 반응을 진행하였다. 마피 반응과 같은 조건으로 산 가수분해를 진행하여 아미드 결합을 파괴하였다. 그후, 100 μ l의 1%(w/v) GITC (2,3,4,6-테트라-O-아세틸- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate) 아세톤 용액과 200 μ l의 6%(v/v) 트리에틸아민 용액을 첨가하여 15분 가량 25℃에서 흔들어주어 반응을 진행하였다. 반응물에 200 μ l의 아세트산을 첨가하여 반응을 종료시키고, 20 μ l의 반응물을 LC/MS에서 분석하였다. 분석 조건은 역상 농도구배 조건으로 Phenomenex C18 Gemini, 250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m 칼럼과 유속 0.3 mL/분, UV 254 nm로 30%(v/v) 내지 55%(v/v) 아세토니트릴/수용액, 포름산 0.1%(v/v) 용매의 조건으로 약 80분간 분석하였다. L-이소류신에 GITC가 붙은 반응물은 약 57.15분에 용출되며 표준 L-이소류신에 GITC를 붙인 반응물은 약 57.2분, 그리고 표준 L-알로-이소류신에 GITC를 붙인 반응물은 약 56.6분에 각각 용출되었다. 따라서, 액시디필라미드 A의 이소류신의 베타 위치 절대 입체구조는 S 형태임을 확인하였다.

[0111] 액시디필라미드 B의 경우, 액시디필라미드 A와 동일한 과정을 통해 마피 반응을 진행하였고, 결과적으로 동일하게 페닐알라닌, 발린, 페닐알라니놀이 각각 L, L, 및 S 형태의 입체구조를 가진다는 것을 확인하였다. 또한, 액시디필라미드 B의 경우, 이소류신 대신 발린이 존재하므로, 베타 위치의 절대 입체구조를 규명할 필요가 없었기 때문에 추가적인 GITC 반응은 진행하지 않았다.

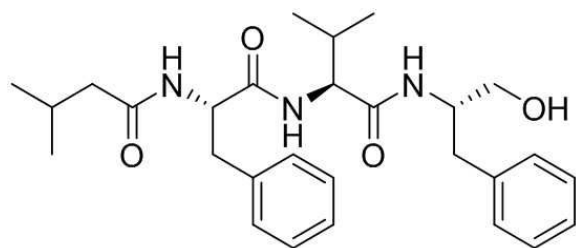
[0112] 핵자기공명 스펙트럼 자료 및 입체구조 분석 결과로부터 분석된 액시디필라미드 A(화학식 1) 및 B(화학식 2)의 화학구조식을 하기에 나타내었다.

[0113] [화학식 1(액시디필라미드 A)]



[0114]

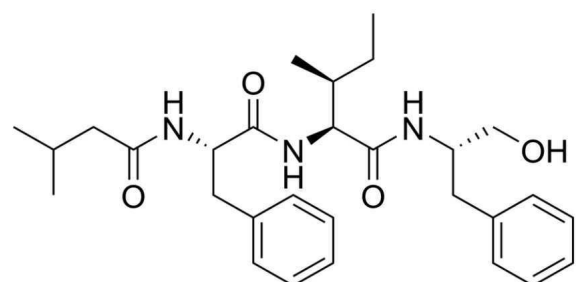
[0115] [화학식 2(엑시디필라미드 B)]



[0116]

[0117] 한편, 엑시디필라미드 A 및 엑시디필라미드 B와 화학구조가 유사한 엑시디필라미드 C도 분리되었고, 엑시디필라미드 C의 화학식은 다음과 같다.

[0118] [화학식 3(엑시디필라미드 C)]



[0119]

[0120] 실시예 2. 엑시디필라미드의 활성의 확인

[0121] 2-1. 엑시디필라미드 A 및 B의 세포 내 자가포식 억제 활성

[0122] 엑시디필라미드 A 및 B가 세포의 자가포식(autophagy) 활성을 억제하는지 여부를 확인하였다.

[0123] HeLa 세포에 다양한 농도의 엑시디필라미드 A, B, 및 C를 가하였다. 엑시디필라미드 화합물을 4시간(도 2a), 8시간(도 2b), 및 12시간(도 2c) 동안 처리하였다. 비교군으로 L-이소류신아미드(isoleucinamide)와 엑시디필라미드 C를 사용하였다. 자가포식 활성의 대표적 마커인 LC3-II의 양적 변화를 면역블로팅으로 측정하고, 그 결과를 도 2a, 도 2b 및 도 2c에 나타내었다. 면역블로팅을 위해, 항-LC3 항체(Sigma-Aldrich), 항-Ub 항체(Santa Cruz Biotechnology), 항- α 3 항체(Enzo), 및 항- β -액틴 항체(Sigma)를 사용하였다..

[0124] 도 2a, 도 2b 및 도 2c에 나타난 바와 같이, L-이소류신아미드와 엑시디필라미드 C는 LC3-II의 양을 변화시키지 않았다. 그러나, 엑시디필라미드 B의 자가포식 변화 효과는, 특히 12 시간 처리시, 엑시디필라미드 A에 비해 매우 높게 나타났다.

[0125] 한편, 프로테아좀 기질인 suc-LLVY-AMC(숙시닐-Leu-Leu-Val-Tyr-(amino-4-methylcoumarin))의 가수분해 정도(상대적 형광 단위(relative fluorescence unit: RFU))를 확인한 결과, 엑시디필라미드 A, B, 및 C는 프로테아좀의 활성에는 전혀 영향을 끼치지 않았다는 것을 확인하였다(도 2d).

[0126] 2-2. 엑시디필라미드 A 및 B의 세포내 자가포식 억제 기전의 확인

[0127] 실시예 2-1에 기재된 바와 같이, 세포 내 자가포식의 흐름(autophagic flux)이 변화된 원인을 찾기 위해, HeLa 세포에 200 μ M의 엑시디필라미드 A 또는 B를 자가포식의 후반부 기전 억제제인 바필로마이신(bafilomycin) A1(100 nM)과 동시처리하거나, 또는 200 μ M의 엑시디필라미드 A 또는 B를 자가포식을 활성화하는 아미노산 결핍 조건(아미노산 결핍, Earle's Balanced Salt Solution(EBSS) 배지) 하에서 8 시간 동안 처리하였다. LC3-II의 양적 변화를 면역블로팅으로 측정하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

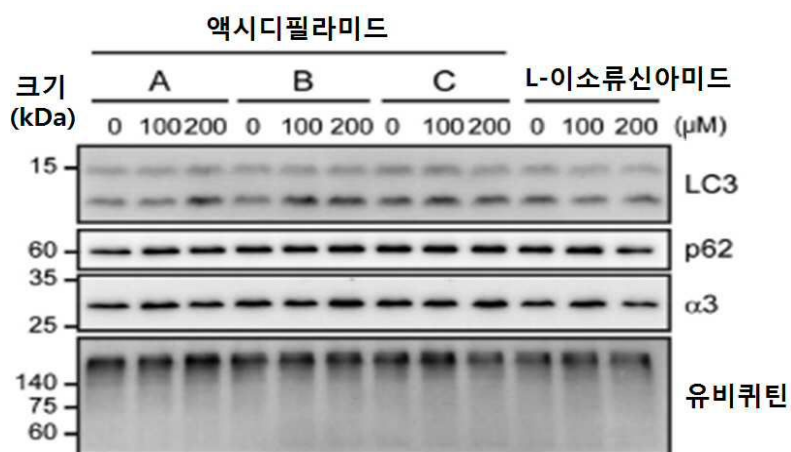
[0128] 도 3에 나타난 바와 같이, 엑시디필라미드 A와 B를 바필로마이신 A1과 동시 처리한 경우, LC3-II의 양이 변화하지 않았다. 반면에, 아미노산 결핍 조건에서 엑시디필라미드 A와 B를 처리한 경우, LC3-II의 양이 증가하는 경향이 나타났다. 따라서, 엑시디필라미드 A와 엑시디필라미드 B가 프로테아좀의 활성을 직접적으로 증가시키지 않고, 자가포식 기전의 후반부를 저해하는 것으로 확인되었다.

도면

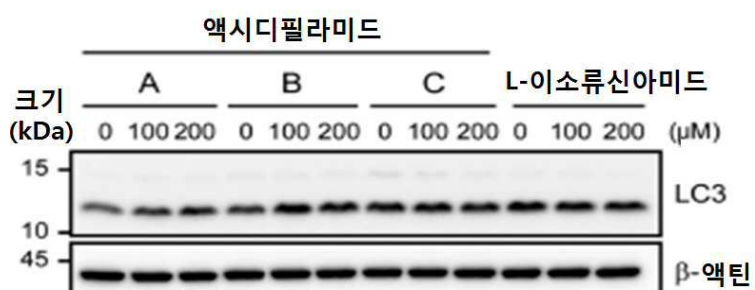
도면1



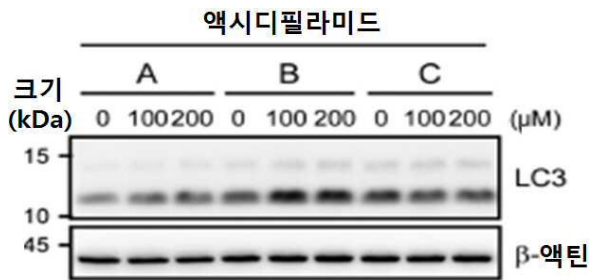
도면2a



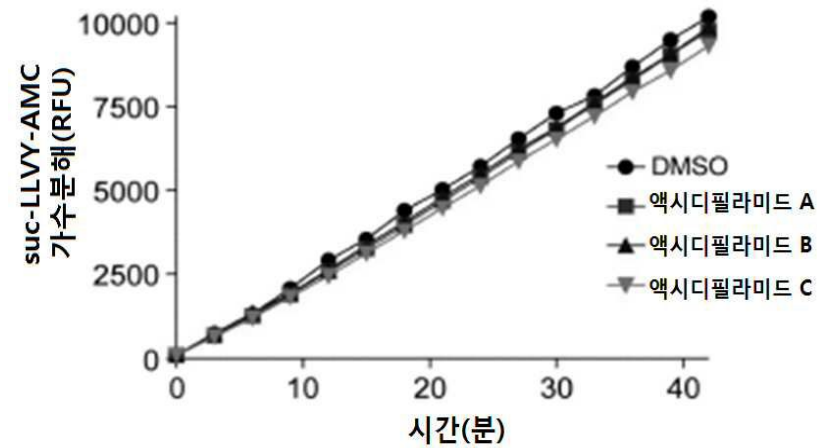
도면2b



도면2c



도면2d



도면3

