(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0001072
(43) 공개일자 2025년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 235/40 (2006.01) *A61K 31/16* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 235/40 (2013.01)
A61K 31/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0083160
(22) 출원일자 2023년06월28일
심사청구일자 2023년06월28일

(71) 출원인
국립순천대학교산학협력단
전라남도 순천시 중앙로 255(매곡동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김항건
광주광역시 서구 시청로96번길 15 로잔티움파크 1103호
남상집
서울특별시 서대문구
(74) 대리인
정성종

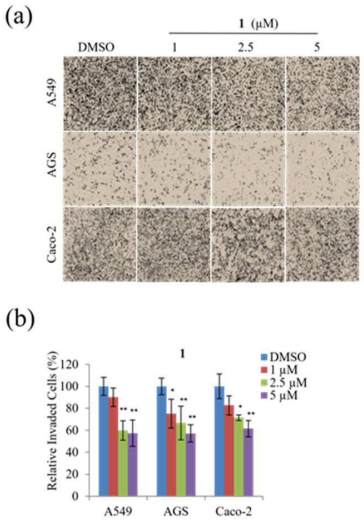
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 마리노바자난 화합물 및 이를 포함하는 암 전이 및 침윤 억제, 또는 암 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 암 세포의 종양 형성 억제, 암 세포의 EMT 마커의 발현 억제, 및 KITENIN의 발현을 억제하고 KAI1의 발현을 증진하는 등 암 세포의 전이 및 침윤을 억제하고 암 세포를 치료 또는 개선하는 신규한 마리노바자난 화합물, 이의 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 염, 및 이들을 포함하는 암 전이 및 침윤 억제용 또는 암 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/04 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345358442
과제번호	2020R1A6C101B194
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국기초과학지원연구원
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	핵심연구지원센터조성지원과제(나노바이오・에너지 소재센터)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

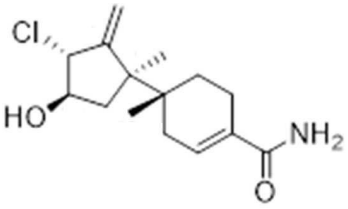
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 마리노바자난(marinobazzanan) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

[화학식 1]



청구항 2

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 암 전이 및 침윤 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 위암, 췌장암, 대장암, 자궁경부암, 유방암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 골육종, 방광암, 두경부암, 신장암, 흑색종, 백혈병 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 암인 것을 특징으로 하는 암 전이 및 침윤 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 위암, 췌장암, 대장암, 자궁경부암, 유방암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 골육종, 방광암, 두경부암, 신장암, 흑색종, 백혈병 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 암인 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항의 화합물 또는 이의 염을 포함하는 암 전이 및 침윤 억제용 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 위암, 췌장암, 대장암, 자궁경부암, 유방암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 골육종, 방광암, 두경부암, 신장암, 흑색종, 백혈병 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 암인 것을 특징으로 하는 암 전이 및 침윤 억제용 식품 조성물.

청구항 8

제1항의 화합물 또는 이의 염을 포함하는 암 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 위암, 췌장암, 대장암, 자궁경부암, 유방암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 골육종, 방광암, 두경부암, 신장암, 흑색종, 백혈병 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 암인 것을 특징으로 하는 암 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 마리노바자난 화합물 및 이를 포함하는 암 전이 및 침윤 억제용 또는 암의 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 암 세포의 운동성 및 진행의 기본 메커니즘인 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition; EMT) 마커를 하향 조절하고, KITENIN의 발현 수준을 낮추고 KAI1의 발현 수준을 높이는 등 암 세포의 운동성 및 종양 형성을 억제하는 신규한 마리노바자난 화합물, 이의 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 염, 및 상기 신규한 마리노바자난 화합물 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 암 전이 및 침윤 억제용 또는 암 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 2020년에 약 1,930만 건의 새로운 암 사례가 있었고 전 세계적으로 거의 1,000만 건의 암 사망이 있었다. 폐암은 암 사망의 주요 원인이며 대장암이 두 번째이다. 또한, 위암은 전 세계적으로 암 사망의 네 번째로 흔한 원인이다. 세계보건기구(WHO)는 2040년까지 전 세계적으로 2,840만 건의 암 사례가 발생할 것으로 추정하였다.

[0003] 전이는 원래 암과 비교하여 신체의 다른 부분에서 발생하는 이차 종양을 말한다. EMT(Epithelial-to-mesenchymal transition)는 전이의 원인 중 하나이다. 고형 종양(solid tumors)의 침윤성(invasiveness)과 전이(metastasis) 가능성은 EMT와 함께 증가한다. EMT 전사 인자인 Snail, Slug 및 Twist는 EMT 프로세스에 의해 촉진된다(비특허문헌 1). 암 세포의 줄기성(stemness), 퇴화(deterioration) 및 전이(metastasis)를 촉진하는 Wnt/β카테닌 경로는 암에 기여하는 또 다른 요인이 될 수 있다. β카테닌은 핵에서 c-Myc 및 CyclinD-1을 포함한 광범위한 발암유전자의 전사를 촉진한다(비특허문헌 2). 몇몇 인간 악성종양(malignancies)은 KAI1(전이성 억제 유전자) 발현이 억제되고 KITENIN이 촉진될 때 증가된 침입 및 전이 능력을 나타낸다. 암 침윤 및 전이는 또 다른 신호 전달 성분인 KITENIN/AP-1 축을 통해서도 매개된다(비특허문헌 3). Notch 신호전달 경로는 광범위한 고형 종양에서 발견되며 EMT를 포함한 세포 증식과 전이 모두에 대한 원인일 수 있다. Notch 리간드는 단일 막관통 단백질(single transmembrane protein)이며 Notch의 활성화는 인접한 세포의 Notch 리간드에 결합할 때 발생한다. HES 유전자의 전사 표적은 또한 Notch에 의해 조절될 수 있다(비특허문헌 4). 따라서 EMT, Wnt/β경로, KITENIN/AP-1 축 및 Notch 신호 경로를 억제하는 것이 항암 치료제 개발의 중요한 목표가 될 것이다.

[0004] 해양 진균의 생물학적 및 지구화학적 역할에 대하여 많은 과학계의 연구자들이 관심을 가졌다. 해양 진균 및 해양 유래 진균은 독특한 화학 구조와 다양한 생물학적 활동을 가진 천연물의 풍부한 공급원으로 간주된다. 따라서 많은 연구 그룹이 새로운 천연물을 발견하기 위해 해양 균류를 배양하는 데 관심을 집중하고 있다. 특히, 해양 유래 속 아크레모니움(*Acremonium*)은 다양한 생리활성을 가진 천연물의 유능한 생산자로서 집중적으로 연구되었다(비특허문헌 5 및 6). 이전에는 아크레모니움(Acremonium) 균주 CNQ-049에서 상처 치유 특성을 가진 고리형 펜타데펩티드(cyclic pentadepsipeptide)인 아크레모나미드(acremonamide)가 분리되었다(비특허문헌 7).

[0005] 해양 유래 미생물에 대한 지속적인 연구 과정에서, 본 발명자들은 남부 캘리포니아 해안에서 수집된 해양 퇴적물에서 파생된 아크레모니움(Acremonium) 균주 CNQ-049의 화학 성분을 조사하다가 새로운 바자난(bazzanane) 유형 세스퀴테르페노이드(sesquiterpenoid)인 마리노바자난(marinobazzanan)을 분리하였으며, 이의 활성이 암 전이 및 침윤 억제에 효과적일 뿐만 아니라 암세포의 사멸에 유효함을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) [1] Ribatti, D.; Tamma, R.; Annese, T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. Transl. Oncol. 2020, 13, 100773-100781.

(비특허문헌 0002) [2] Shang, S.; Hua, F.; Hu, Z.-W. The regulation of βactivity and function in cancer: Therapeutic opportunities. Oncotarget 2017, 8, 33972-33989.

(비특허문헌 0003) [3] Joo, Y.-E.; Ryu, H.-S.; Park, Y.-L.; Park, S.-J.; Lee, J.-H.; Cho, S.-B.; Lee, W.-S.; Chung, I.-J.; Kim, K.-K.; Lee, K.-H.; et al. KITENIN is associated with tumor progression in human gastric cancer. Anticancer. Res. 2010, 30, 3479-3486.

(비특허문헌 0004) [4] Xiao, W.; Zheng, S.; Xie, X.; Li, X.; Zhang, L.; Yang, A.; Wang, J.; Tang, H.; Xie, X. SOX2 Promotes Brain Metastasis of Breast Cancer by Upregulating the Expression of FSCN1 and

HBEGF. Mol. Ther. Oncolytics 2020, 17, 118-129.

(비특허문헌 0005) [5] Abdel-Lateff, A.; Kϕnig, G.M.; Fisch, K.M.; Hϕller, U.; Jones, P.G.; Wright, A.D. New Antioxidant Hydroquinone Derivatives from the Algicolous Marine Fungus Acremonium sp. J. Nat. Prod. 2002, 65, 1605-1611.

(비특허문헌 0006) [6] Julianti, E.; Oh, H.; Jang, K.H.; Lee, J.K.; Lee, S.K.; Oh, D.C.; Oh. K.-B.; Shin, J. Acremostrictin, a highly oxygenated metabolite from the marine fungus Acremonium strictum. J. Nat. Prod. 2011, 74, 2592-2594.

(비특허문헌 0007) [7] Kim, S.; Lee, C.W.; Park, S.-Y.; Asolkar, R.N.; Kim, H.; Kim, G.J.; Oh, S.J.; Kim, Y.; Lee, E.-Y.; Oh, D.-C.; et al. Acremonamide, a Cyclic Pentadepsipeptide with Wound-Healing Properties Isolated from a Marine-Derived Fungus of the Genus Acremonium. J. Nat. Prod. 2021, 84, 2249-2255.

(비특허문헌 0008) [8] Hayashi, S.; Matsuo, A.; Matsuura, T. Bazzanene, a sesquiterpene hydrocarbon of a new carbon skeleton from Bazzania pompeana (Lac.) Mitt. Experientia 1969, 25, 1139.

(비특허문헌 0009) [9] Nagashima, F.; Momosaki, S.; Watanabe, Y.; Takaoka, S.; Huneck, S.; Asakawa, Y. Sesquiterpenoids from the liverworts Bazzania trilobata and Porella canariensis. Phytochemistry 1996, 42, 1361-1366.

(비특허문헌 0010) [10] Asakawa, Y.; Toyota, M.; Nagashima, F.; Hashimoto, T. Chemical Constituents of Selected Japanese and New Zealand Liverworts. Nat. Prod. Commun. 2008, 3, 289-300.

(비특허문헌 0011) [11] Nagashima, F.; Toyota, M.; Asakawa, Y. Bazzanane Sesquiterpenoids from the New Zealand Liverwort Frullania falciloba. Chem. Pharm. Bull. 2006, 54, 1347-1349. https://doi.org/10.1248/cpb.54.1347.

(비특허문헌 0012) [12] Zhou, R.; Yang, Y.; Park, S.-Y.; Nguyen, T.T.; Seo, Y.-W.; Lee, K.H.; Lee, J.H.; Kim, K.K.; Hur, J.-S.; Kim, H. The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility and tumorigenesis. Sci. Rep. 2017, 7, 8136.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 EMT 마커를 하향 조절하고 KITENIN의 발현을 억제하고 KAI1의 발현을 증가시켜 암 세포의 운동성 및 종양 형성을 억제하는 신규한 마리노바자난 화합물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 신규한 마리노바자난 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 전이 및 침윤 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

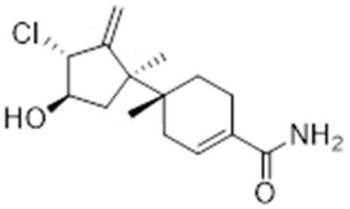
[0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 신규한 마리노바자난 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 신규한 마리노바자난 화합물 또는 상기 화합물의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 전이 및 침윤 억제용, 및 암 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1의 신규한 마리노바자난(marinobazzanan) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 아크레모니움(*Acremonium*) 속의 균주로부터 분리된 최초의 바잔(bazzanane) 유형 세스퀴테르페노이드(sesquiterpenoid)로서, 분자식은 $C_{15}H_{22}{}^{35}ClNO_2$이며, 분자량은 316.04이다.

[0015] 상기 화학식 1로 표시되는 마라노바자난 화합물은 아크레모니움(*Acremonium*) 속의 균주 등과 같은 미생물로부터 추출 및 분리하거나, 화학적으로 합성하는 등의 방법에 의하여 제조할 수 있다.

[0016] 상기 화학식 1로 표시되는 마라노바자난 화합물은 무독성 농도에서 암 세포의 운동성과 종양 형성을 억제하고, 전사 인자 Snail, Slug 및 Twist를 하향 조절함으로써 EMT 이펙터 N-cadherin의 발현을 조절하며, KAI1의 발현 수준을 상향 조절하고 KITENIN의 발현 수준을 하향 조절하며, 암 세포에서 β카테닌 매개 TOPFLASH 활성 및 그 다운스트림 표적을 감소하고 Notch 신호 경로를 억제하므로 암을 개선 또는 치료할 수 있을 뿐만 아니라 암의 전이 및 침윤을 억제할 수 있다.

[0017] 상기 마리노바자난 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 존재할 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 마리노바자난 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0018] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0019] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0020] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0021] 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 마리노바자난 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브롬 화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0022] 본 발명의 마리노바자난 화합물의 염으로는 약학적으로 허용가능한 염으로서, 마리노바자난 화합물과 동등한 약리활성을 나타내는, 예컨대, 암 세포의 이동 및 침윤을 억제시켜 암 세포의 전이에 의한 사망을 지연시키거나 암을 치료하는 마리노바자난 화합물의 염이면 제한없이 모두 사용 가능하다.

[0023] 또한, 본 발명에 따른 상기 마리노바자난 화합물은, 이의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라 이로부터 제조

될 수 있는 가능한 수화물 등의 용매화물 및 가능한 모든 입체 이성질체를 제한없이 포함한다. 상기 마리노바자난 화합물의 용매화물 및 입체이성질체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 마리노바자난 화합물로부터 제조할 수 있다.

[0024] 나아가, 본 발명에 따른 상기 마리노바자난 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 결정 형태로 제조될 경우 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다. 본 발명에서는 상기 마리노바자난 화합물의 화학양론적 수화물뿐만 아니라 다양한 양의 물을 함유하는 화합물이 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 마리노바자난 화합물의 용매화물은 화학양론적 용매화물 및 비화학양론적 용매화물 모두를 포함한다.

[0026] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 마리노바자난 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 전이 및 침윤 억제용, 또는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 마리노바자난 화합물을 아크레모니움(*Acremonium*) 속 균주로부터 분리하여 새로운 바잔(bazzanane) 유형 세스퀴테르페노이드(sesquiterpenoid)인 신규 화합물로 동정하였다. 또한, 새로이 발견된 마리노바자난 화합물의 암 세포 독성 정도, 암 세포의 EMT 마커의 발현 정도, 암 세포의 침윤 및 전이 억제 효과, 복막 암종증 모델에 투여 후의 항암 효과 등을 확인하였다. 그 결과, 본 발명의 상기 마리노바자난 화합물은 암 세포의 종양 형성을 억제하고, 암 세포의 EMT 마커의 발현을 억제하고, 암 세포의 침윤 및 전이를 억제하는 효과가 있어 이를 유효성분으로 포함하는 암의 전이 및 침윤 억제, 및 암 치료에 사용될 수 있다.

[0028] 상기 암은 세포의 사멸 조절과 관련된 질병으로서, 정상적인 세포사멸(apoptosis) 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하게 됨으로써 생기는 질병을 말한다. 이러한 비정상적 과다 증식 세포들은, 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴를 형성하고, 체내의 정상적인 구조를 파괴하거나 변형시키게 되는데, 이러한 상태를 암이라고 한다.

[0029] 상기 암의 종류는 뇌척수종양, 뇌암, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁경부암, 자궁 내막암, 림프종, 백혈병 예컨대 급성 백혈병 또는 만성백혈병, 골육종, 다발성 골수종, 육종, 흑색종, 악성 흑색종 및 피부암 등이 있다. 본 발명의 항암용 조성물은 암의 종류에 제한없이 사용될 수 있으나, 간암, 폐암, 위암, 췌장암, 대장암, 자궁경부암, 유방암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 골육종, 방광암, 두경부암, 신장암, 흑색종, 백혈병 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 암의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 용어 “치료”란 본 발명의 약학적 조성물의 투여로 암 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[0031] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사 용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥내, 복강내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 이러한 조성물에 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토즈, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[0033] 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0034] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 한편, 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제,

방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0035] 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있으며 활성 성분을 의학적 치료, 구체적으로 암의 전이 및 침윤의 억제나 암의 치료에 유효한 양으로 포함한다.

[0036] 이때, 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0037] 예컨대, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물의 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0039] 또 다른 양태로서 본 발명은, 상기 본 발명의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 전이 및 침윤 억제, 또는 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0040] 본 발명의 용어 "개체"란, 암이 전이 및 침윤 가능성이 있거나, 혹은 전이 및 침윤되거나 암이 발병한 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 암의 전이 및 침윤을 억제하거나 암을 효과적으로 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 암 세포의 종양 형성을 억제하고, EMT 마커의 발현 억제 및 KITENIN의 발현을 억제하고 KAI1의 발현을 증가시키는 등 암의 전이 및 침윤을 억제하고 암의 치료 효과를 나타내는 것이므로, 기존의 치료제와 병행하여 투여함으로써 시너지적인 효과를 나타낼 수 있다.

[0041] 본 발명의 용어 "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레졸, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0043] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 마리노바자난 화합물 또는 이들의 식품적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 전이 및 침윤 억제용 또는 암 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0044] 상기 마리노바자난 화합물의 구조, 효능, 용도, 제형 등에 관한 구체적인 내용, 및 암에 대한 구체적인 내용은 상술한 바와 같으므로 이하에서는 생략한다.

[0045] 본 발명의 식품학적으로 허용가능한 염은 식품학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 유용하다. 하나의 예로, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다. 무기산으로는 염산, 황산, 브롬산, 아황산 또는 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 푸마산, 글루콘산, 메탄술폰산 등을 사용할 수 있다. 또한, 금속염으로는 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 사용할 수 있다. 그러나 반드시 이로 제한되지는 않는다.

[0046] 본 발명의 식품 조성물은 상기 마리노바자난 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 그대로 첨가하거

나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0047] 상기 성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 상기 성분은 원료에 대하여 10 중량% 이하, 바람직하게는 5 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0048] 본 발명에 따른 식품 조성물은 마리노바자난 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 성분 이외에 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물은 포도당 및 과당 등의 모노사카라이드, 말토스, 수크로스 및 올리고당 등의 디사카라이드, 덱스트린 및 사이클로덱스트린 등의 폴리사카라이드 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 향미제는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0049] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 성분을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0050] 본 발명의 식품이 음료일 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스와 같은 디사카라이드 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0051] 상기 식품은 상술한 성분 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일쥬스, 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0052] 본 발명에 따른 마리노바자난 화합물은 아크레모니움(*Acremonium*) 속의 균주로부터 분리된 최초의 바잔(bazzanane) 유형 세스퀴테르페노이드(sesquiterpenoid) 화합물로서, 무독성 농도에서 암 세포의 운동성과 종양 형성을 억제하고, 전사 인자 Snail, Slug 및 Twist를 하향 조절함으로써 EMT 이펙터 N-cadherin의 발현을 조절하며, KAI1의 발현 수준을 상향 조절하고 KITENIN의 발현 수준을 하향 조절하며, 암 세포에서 β카테닌 매개 TOPFLASH 활성 및 그 다운스트림 표적을 감소하고 Notch 신호 경로를 억제하므로 암 전이 및 침윤 억제와 암 치료 또는 개선을 위한 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 다양한 농도의 마리노바자난 화합물이 A549, AGS 및 Caco-2의 세포 생존 능력에 미치는 영향을 MTT 분석을 사용하여 측정한 결과이다. 데이터는 평균 ± 표준 편차를 나타낸다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

도 2는 A549, AGS 및 Caco-2 세포의 운동성에 대한 화합물 1의 효과를 나타낸 그림이다. (a)는 이동 분석에서 각 삽입물의 대표적인 이미지이고, (b)는 이동된 세포의 상대적 백분율이다. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 3은 A549, AGS 및 Caco-2 세포의 침윤에 대한 화합물 1의 효과를 나타낸 그림이다. (a)는 침윤 분석에서 각 삽입물의 대표적인 이미지이고, (b)는 침윤 세포의 상대적 백분율이다. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 4는 A549, AGS 및 Caco-2 세포의 연한천 콜로니 형성에 대한 화합물 1의 효과를 나타낸 그림이다. (a)는 연한천 분석에서 형성된 콜로니의 대표적인 이미지이고, (b)는 콜로니의 상대 표면적이다. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 5는 A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 EMT 이펙터 및 전사 인자의 발현에 대한 화합물 1의 효과를 나타낸 그림이다. (a)는 EMT 이펙터 N-cadherin 및 E-cadherin의 상대적 mRNA 발현을 나타낸 그림이고, (b) EMT 전사 인자 Snail, Slug 및 Twist의 상대적 mRNA 발현을 나타낸 그림이다. mRNA 수준은 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate

dehydrogenase)에 대해 정규화하였다. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 6은 화합물 1에 의한 HEK293T 세포에서 상대적인 AP-1 활성(a), 3-UTR 루시퍼라제 활성(b), 및 KITENIN 프로모터 루시퍼라제 활성(c)을 나타낸 그림이다. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 7은 A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 화합물 1이 KITENIN의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그림이다. (a)는 KITENIN의 웨스턴 블롯 분석이며, (b)는 KITENIN의 상대적 단백질 수준이다. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 8은 A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 화합물 1에 의한 KITENIN 및 KAI1의 상대적인 mRNA 발현을 나타낸 그림이다. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 9는 β카테닌-매개 TOPFLASH 활성에 대한 화합물 1의 효과를 나타낸 그림이다. (a) HEK293T 세포에서 β카테닌-매개 TOPFLASH 활성; (b) A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 상대적인 β카테닌; (c) A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 β카테닌의 웨스턴 블롯 분석; (d) β카테닌의 상대적 단백질 수준. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 10은 핵 이동(nuclear import) 억제에 의한 β카테닌-매개 TOPFLASH 활성에 대한 화합물 1의 효과를 나타낸 그림이다. (a) A549 세포에서 총 세포질 및 핵 β카테닌의 상대적 단백질 수준. α-Histone 3은 로딩 제어로 공급되었다. (b) A549 세포에서 총 세포질 및 핵 β카테닌의 웨스턴 블롯 분석; (c) 24시간 동안 A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 c-Myc, CD44 및 cyclin-D1의 상대적인 mRNA 수준 및 (d) A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 48시간 동안 c-Myc, CD44 및 cyclin-D1의 상대적 mRNA 수준. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 11. A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 Notch 신호 경로에 대한 화합물 1의 효과를 나타낸 그림이다. (a) HEK293T 세포에서 상대적인 CSL 활성; (b) HEK293T 세포에서의 상대적인 Hes-1 활성; (c) A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 Hes-1의 상대적인 mRNA 발현; (d) A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 절단된 Notch1의 웨스턴 블롯 분석 및 (e) A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 Hes-1의 상대적 단백질 수준. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 3. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

도 12는 위암의 복막 전이에 대한 화합물 1의 효과를 관찰한 그림이다. AGS 세포(마우스당 1 x 10^7개)를 마우스의 복강에 주입하였다. (a) FOBI(Organ Bioimaging Instrument) 시스템에서 얻은 형광 대표 이미지와 AGS 인간 위암 세포의 복강 내 접종으로 확립된 복막 종양의 모습; (b) 각 그룹의 복막 결절의 수; (c) 형광 표지된 FOBI(Organ Bioimaging Instrument) 시스템에서 얻은 이미지의 형광 영역; (d) 대조군 및 화합물 1로 처리된 마우스의 체중. 데이터는 평균 ± 표준 편차이다. n = 5. * $p < 0.05$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0056] **실험 재료 및 방법**

[0057] **1. 일반 실험 절차**

[0058] 5cm 셀이 있는 Kruss Optronic P-8000 편광계를 사용하여 선광도(optical rotation)를 획득하였다. UV 스펙트럼은 Scinco UVS2100으로 메탄올(MeOH)에서 기록되었고, VCD 스펙트럼은 BioTools dualPEM ChiralIR 분광광도계를 사용하여 측정되었다. IR 스펙트럼은 Varian Scimitar Series에서 수집되었다. ^{1}H 및 2D NMR 스펙트럼은 Varian Inova 분광계의 내부 표준으로 Me_4Si를 포함하는 CD_3OD에서 400 및 500MHz로 기록되었다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian Inova 분광계에서 75 MHz에서 획득되었다. 고분해능 질량 스펙트럼은 JMS-700(JEOL) 질량 분석기에서 측정되었으며, 저해상도 LC-MS 데이터는 이화여자대학교 국립연구시설장비센터(나노바이오에너지소재센터)에

서 보유하고 있는 장비, 즉 유속 1.0 mL/min에서 역상 컬럼(Phenomenex Luna C18 (2), 100Å, 50 mm × 4.6 mm, 5 μm)이 있는 Agilent Technologies 1260 사중극자 및 Waters Micromass ZQ LC/MS 시스템을 사용하여 측정되었다. 중압 액체 크로마토그래피(Medium-pressur liquid chromatography, MPLC)는 Biotage SNAP KP-Sil을 사용하여 Biotage Isolera One 시스템(SE-751 03 Uppsala, Sweden)에서 디클로로메탄(DCM)과 메탄올(MeOH)의 단계 구배 용매를 사용하여 수행되었다. 분획을 역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)(Phenomenex Luna C18(2), 100Å, 250nm × 10mm, 5μm)로 정제하였다.

[0060] **2. 균주 CNQ-049의 수집 및 계통발생학적 분석**

[0061] 해양 유래 아크레모니움 속(*Acremonium* sp.) CNQ-049는 남부 캘리포니아 해안에서 수집된 해양 퇴적물에서 분리되었다. 균주 CNQ-049는 18S rRNA 유전자 염기서열 분석(GenBank accession number KP131520.1)을 토대로 아크레모니움 푸시디오데스(*Acremonium fusidiodes*)와 99.4% 유사성을 나타내어 아크레모니움 속(*Acremonium* sp.)으로 동정되었다.

[0063] **3. 발효, 추출 및 분리**

[0064] 균주 CNQ-049는 각각 1L의 배지(10g/L 용해성 전분, 2g/L 효모, 4g/L 펩톤 및 34.75g/L 증류수에 용해된 해염)를 포함하는 80 × 2.5L Ultra Yield 플라스크에서 120 rpm 및 27℃에서 진탕 배양하였다. 배양 7일 후, 브로스(broth)를 에틸 아세테이트(EtOAc)(전체 80L)로 추출하고 가용성 분획을 진공에서 건조하여 조 추출물 5g을 얻었다. 그런 다음 이를 MeOH/DCM(0 ~ 100%)의 단계 구배로 MPLC 실리카겔 컬럼(Biotage® SNAP Cartridge, KP-SIL)에서 분리하여 Q049-1 내지 Q049-10로 표시된 10개의 분획을 얻었다. 분획 Q049-6(762mg)은 37% 수성 아세토니트릴을 사용한 C18 역상 컬럼 크로마토그래피에 의해 Q049-6-A 내지 Q049-6-F로 표시된 6개의 하위 분획으로 분리되었다. 하위 분획 Q049-6-B(221mg)는 38% CH_3CN을 사용하여 역상 HPLC(Phenomenex Luna C18(2), 250 × 100mm, 2.0mL/분, 5μm, 100Å, UV = 210nm)에 의해 추가로 정제되었고, 10.7mg의 마리노바자난(marinobazzanan)(1)을 획득하였다.

[0065] 마리노바자난(1): 담황색 무정형 분말; $[\alpha]_D^{21}$ -29 (c 0.0625, MeOH); UV(MeOH) λ ε 205(3.73) nm; IR(KBr) ν_{max} 3338, 2964, 2935, 2360, 1669, 1373, 1082cm^{-1}; ^1H NMR 및 2D NMR(400MHz 및 500MHz, CD3OD) 표 1 참조; HR-ESI-MS m/z 284.1415 $[M + H]^+$ ($C_{15}H_{22}{}^{35}ClNO_2$에 대한 계산치, 284.1417).

표 1

Position	δ_C, Type	δ_H, Mult [b] (*J* in Hz)	COSY	HMBC
1	27.4, CH_2	1.65, m 1.54, m	2	C-2, 6, 7, 14
2	21.8, CH_2	2.39, m 2.21, m	1	C-1, 3, 4, 6
3	131.3, qC			
4	134.0, CH	6.66, d (4.8)	5	C-5, 2, 6, 12
5	33.0, CH_2	2.21, m 2.05, br. D (18.0)	4	C-1, 3, 4, 6, 14
6	36.8, qC			
7	48.5, qC			
8	153.7, qC			
9	69.2, CH	4.29, dt (10.0, 2.7)	10	C-8, 10, 15
10	75.6, CH	3.86, td (10.0, 7.5)	9, 11	C-9, 11
11	40.5, CH_2	1.87, dd (13.0, 10.0) 1.79, dd (13.0, 7.5)	10	C-6, 7, 8, 9, 10, 13
12	172.2, qC			
13	24.5, CH_3	1.20, s		C-6, 7, 8, 11
14	17.1, CH_3	0.92, s		C-1, 5, 6, 7
15	111.9, CH_2	5.44, d (2.7) 5.21, d (2.7)		C-7, 8, 9

[a] 400 MHz for ^1H NMR and 75 MHz for ^{13}C NMR. [b] Numbers of attached protons were determined by analysis of 2D spectra.

[0066]

[0068] **4. 마리노바자난의 MTPA 에스테르화.**

[0069] (*S*)- 및 (*R*)-MTPA 에스테르를 얻기 위해, 2.0mg의 화합물 1을 고진공 하에서 12시간 동안 완전히 건조시키고 건조된 피리딘(0.6mL)에 용해시켰다. 촉매량의 결정질 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)을 첨가하고 각각 (*R*)- 및 (*S*)-α-메톡시 트리플루오로메틸-페닐아세트산(MTPA) 클로라이드(6 μL)로 처리하였다. 혼합물을 50℃에서 12시간 동안 교반하고 90% 수성 아세토니트릴과 함께 역상 HPLC(Phenomenex Luna C18(2), 250 × 100mm, 2.0mL/분, 5 μm, 100Å)로 정제하여 화합물 1의 (*S*)- 및 (*R*)-MTPA 에스테르를 각각 0.8 mg 및 0.7 mg 얻었다.

[0070] 화합물 1의 (*S*)-MTPA 에스테르: ^{1}H NMR (500 MHz, in $CDCl_3$) δ_H 0.88 (3H, s, H-14), 1.23 (3H, s, H-13), 1.41-1.61 (2H, overlapped, H-1), 1.86 (1H, dd, *J* = 13.0, 10.0 Hz, H-11a), 2.02 (1H, dd, *J* = 13.0, 7.5 Hz, H-11b), 1.99 (1H, m, H-5a), 2.12 (1H, m, H-5b), 2.21 (1H, m, H-2a), 2.29 (1H, m, H-2b), 4.46 (1H, dt, *J* = 10.0, 2.7 Hz, H-9), 5.22 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-15a), 5.24 (1H, dt, *J* = 10.0, 7.5 Hz, H-10), 5.52 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-15b), 6.55 (1H, br. s, H-4); LR-ESI-MS *m/z* 457.3 $[M\ \ CONH_2 + H]^+$.

[0071] 화합물 1의 (*R*)-MTPA 에스테르: ^{1}H NMR (500 MHz, in $CDCl_3$) δ_H 0.84 (3H, s, H-14), 1.22 (3H, s, H-13), 1.381.60 (2H, overlapped, H-1), 1.67 (1H, dd, *J* = 13.0, 10.0 Hz, H-11a), 2.00 (1H, dd, *J* = 13.0, 7.5 Hz, H-11b), 1.95 (1H, m, H-5a), 2.07 (1H, m, H-5b), 2.18 (1H, m, H-2a), 2.26 (1H, m, H-2b), 4.50 (1H, dt, *J* = 10.0, 2.7 Hz, H-9), 5.20 (1H, dt, *J* = 10.0, 7.5 Hz, H-10), 5.22 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-15a), 5.54 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-15b), 6.52 (1H, br. s, H-4); LR-ESI-MS *m/z* 457.3 $[M\ \ CONH_2 + H]^+$.

[0073] **5. VCD 분석 및 계산**

[0074] 화합물 1의 C-6 및 C-7 위치에 대한 구조 지정(conformational assignment)은 GAFF 포스 필드(GAFF force filed)에서 "혼합 비틀림/저모드 샘플링"을 사용하여 Macromodel 소프트웨어(버전 9.9, Schrodinger LLC.)를 사용하여 수행되었다. 실험은 50 kJ/mol 에너지 윈도우 한계(energy window limit)와 최대 10,000 단계로 기체 상태(gas phase)에서 수행되어 모든 저에너지 순응자(low-energy conformers)를 철저히 조사하였다. Polak-Ribière 켤레 기울기 방법(Polak-Ribière conjugate gradient method)은 10,000 최대 반복 및 평균 제곱근 기울기에서 0.001 kJ(mol Å)-1 수렴 임계값으로 최소화 프로세스에 사용되었다. 화합물 1의 6R, 7R 및 6S, 7S 형태에 대한 각 전체 최소값(global minimum)의 10kJ/mol 이내의 순응자(conformer)는 TmoleX 버전 4.2.1 소프트웨어(COSMOlogic GmbH & Co. KG)를 사용하여 기체 상태에서 B3LYP/6-31 + G(d) 수준으로 기하학적 최적화 없이 게이지 독립 원자 궤도 차폐 상수(gauge-independent atomic orbital shielding constant)를 계산하는 데 사용되었다. 화합물 1(마리노바자난)의 시료(5.0mg)를 $CDCl_3$(150 μL)에 용해하고 경로 길이가 100 μm인 BaF2 셀에 넣고 BioTools dualPEM ChiralIR 분광광도계에서 데이터를 수집하였다. 스펙트럼은 12개 블록에서 수집되었으며 각 블록은 3120 스캔에 대해 수집되었다.

[0076] **6. 세포 배양**

[0077] 인간 암 세포주 A549(폐암), AGS(위암) 및 Caco-2(대장암)를 10% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액이 보충된 RPMI(Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지 또는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지(Gen Depot, Barker, TX, USA)에서 37℃, 5% CO_2 포함 가습 분위기로 배양하였다.

[0079] **7. MTT(Methyl Thiazolyl Tetrazolium) 분석**

[0080] 마리노바자난(Marinobazzanan, 화합물 1)을 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)에

용해하고 4가지 농도(10, 25, 50 및 10μM)로 희석하였다. 세포를 96-웰 플레이트(3×10^3 cells/well)에 12-16시간 동안 접종한 다음 10, 25, 50 및 10 μM의 화합물 1로 48시간 동안 처리하였다. 37℃, 5% CO_2에서 MTT로 4시간 배양한 후 세포를 150 μL의 DMSO(Sigma-Aldrich)로 용해하고 분광광도계(Bio Tek Instruments, Winooski, VT, 미국)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0082] **8. 침윤 분석**

[0083] 암세포의 침윤은 1% 젤라틴으로 코팅된 8 μm 공극이 있는 폴리카보네이트 멤브레인을 포함하는 트랜스웰 챔버(Transwell chambers)(Corning, New York, NY, USA)를 사용하여 측정되었다. AGS(3×10^5), A549(3×10^5) 및 Caco-2(2.5×10^5) 세포를 0.2% 소 혈청 알부민(BSA)이 포함된 배양 배지에 접종하고 1, 2.5 및 5 μM의 화합물 1 또는 DMSO로 24시간 동안 처리하고 배양하였다. 하부 챔버는 화학유인물질로서 0.2% BSA 및 10 μg/mL 피브로넥틴(EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA)을 함유하는 600 μL DMEM/RPMI로 채워졌다. 24시간 배양 후, 침윤 세포를 Diff-Quik 키트(Sysmex, Kobe, Japan)를 사용하여 고정시켰다. 세포수는 Nikon Eclipse 400 형광현미경(Nikon Instech, Co., Ltd., Kawasaki, Japan)과 i-Solution FL Auto Software(IMT i-Solution Inc., Vancouver, QC, Canada; five fields/chamber)를 사용하여 계수하였다.

[0085] **9. 세포이동(migration) 분석**

[0086] 세포이동 분석은 코팅되지 않은 트랜스웰 챔버에서 수행되었다. 챔버의 상부 구획에 0.2% BSA를 함유하는 RPMI 1640/DMEM에 $2.5\text{-}3 \times 10^5$ cells/well의 밀도로 세포를 접종하였다. 하부 챔버는 0.2% BSA 및 화학유인물질로서 피브로넥틴을 함유하는 600 μL RPMI 1640/DMEM으로 채워졌다. 세포를 24시간 동안 화합물 1(1, 2.5 및 5μM)의 부재 또는 존재하에 배양하였고 Diff-Quick 키트를 사용하여 고정하였다. 상부 챔버의 세포는 Nikon Eclipse 400 형광현미경(Nikon Instech, Co., Ltd.) 및 i-Solution FL Auto Software(IMT i-Solution Inc.; five fields/chamber)를 사용하여 계수하였다.

[0088] **10. 연한천 콜로니 형성 분석(Soft Agar Colony Formation assay)**

[0089] 암 세포를 1.0 mL의 연한천(2 × DMEM/RPMI로 2배 희석한 0.35% soft-agar 용액)에 $2.5\text{-}3 \times 10^3$ cells/well의 밀도로 현탁하고 12-웰 플레이트에 있는 1 mL의 soft agar(2×DMEM/RPMI로 2배 희석한 0.5% 아가로스 용액)에 올려놓고 3주간 배양하였다. 세포에 세포 배양 배지, 화합물 1(1, 2.5 및 5μM) 또는 DMSO를 일주일에 두 번 공급하였다. Nikon Eclipse 400 형광 현미경(Nikon Instech, Co., Ltd.) 및 i-Solution FL Auto Software(IMT i-Solution Inc.; five fields/chamber)를 사용하여 웰당 5개 필드에서 콜로니의 표면적을 추정하였다. 세 번의 실험이 수행되었다.

[0091] **11. 정량적 실시간 PCR**

[0092] 제조업체의 지침에 따라 RNAiso Plus(Takara, Otsu, Japan)를 사용하여 A549, AGS 및 Caco-2 세포로부터 전체 RNA를 분리하였다. 몰로니 쥐 백혈병 바이러스(moloney murine leukaemia virus) 역전사 효소(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 1 μg의 RNA를 cDNA로 전환하였다. 상대적인 유전자 발현을 분석하기 위해 염료 SYBR Green(Enzynomics, Seoul, Korea)을 사용하였다. 또한, qRT-PCR 반응 및 분석은 CFX(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.

[0094] **12. 웨스턴 블로팅**

[0095] A549, AGS 및 Caco-2 세포를 화합물 1로 24시간 동안 처리하고 얼음처럼 차가운 인산완충식염수(PBS)로 2회 세척하였다. 추출에는 용해 버퍼를 사용하였다. 일부 실험에서는 NE-PER 핵 및 세포질 추출 키트(Pierce Biotechnology, USA)로 세포질 및 핵 추출물을 분리하고, 추출된 단백질은 SDS-PAGE를 사용하여 분리하였다. 밴

드의 밀도는 Multi Gauge 3.0(Fujifilm, Tokyo, Japan) 소프트웨어를 사용하여 측정하였고, 밴드의 상대 밀도는 각 샘플에 로딩하는 동안 컨트롤 밴드의 밀도를 기반으로 계산하였다.

[0097] **13. 리포터 분석(Reporter assay)**

[0098] HEK293T를 24웰 플레이트에 접종하였다. 부착 후, 세포를 레닐라 루시퍼라제 리포터 플라스미드(pRL-TK)와 함께 TOPFLASH, AP1, KITENIN, CSL, HES, NF-κKITENIN 3'-비번역 영역(3'-UTR) 리포터로 형질감염시켰다. 이들 리포터의 12시간 형질감염 후, 세포를 1 μM, 2.5 μM 및 5 μM의 화합물 1로 처리하였다. 루시페라제 활성은 Dual-Luciferase Reporter Assay(Promega, Wisconsin, USA)를 사용하여 계산하고 레닐라 루시페라제로 정규화하였다.

[0100] **14. 렌티바이러스 형질도입(Lentiviral Transduction)**

[0101] 인간 위암 AGS 세포를 퓨로마이신 용액이 보충된 RPMI(Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지(Gen Depot, Barker, TX, USA)에서 배양하였다. 12시간 후, 렌티바이러스 벡터를 폴리브렌(polybrene)에 의해 인간 위암 세포주에 형질감염시키고, 회수된 세포를 배양하였다. 72시간 후, 단일 세포를 96-웰 플레이트의 개별 웰에 플레이팅하고 7-10일 동안 배양하였다.

[0103] **15. 동물 연구**

[0104] AGS-iRFP 세포 현탁액(마우스당 0.1mL PBS에 1 x 10^7 세포)을 중앙실험동물㈜ (서울, 한국)에서 얻은 수컷 BALB/c 누드 마우스(5주령)의 복강에 주입하였다. 모든 생체 내 실험은 Guiding Principles for the Care and Use of Animals(DHEW 간행물, NIH 80-23)에 따라 수행되었으며 순천대학교 연구 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았다. 마우스는 IP 처리에 의해 대조군, 5 mg/kg 1 및 10 mg/kg의 화합물 1의 세 그룹 중 하나로 무작위로 할당되었다. 모든 동물은 체중 변화를 측정하여 검사하였다. 치료는 AGS-iRFP 세포가 주입된 지 일주일 후에 시작되었다. 종양 접종 후 28일째에 모든 마우스를 희생시켰다. 그런 다음 대표 이미지와 함께 이미지의 형광 영역을 형광 표지 유기체 바이오 이미징 장비 시스템을 통해 얻었다.

[0106] **<u>실험 결과</u>**

[0107] 마리노바자난(Marinobazzanan)(화합물 1)은 담황색 무정형 분말로 얻어졌다. 화합물 1의 분자식은 고해상도 전자분무 이온화 질량 스펙트럼(HR-ESI-MS)에서 *m/z* 284.1415 $[M + H]^+$ ($C_{15}H_{23}{}^{35}ClNO_2$에 대해 계산됨, 284.1417)에서 양성자화된 부가물(protonated adduct)을 기반으로 $C_{15}H_{22}{}^{35}ClNO_2$로 결정되었으며, 이는 5도의 불포화도를 나타내었다. 화합물 1의 ^1H NMR 스펙트럼은 1개의 올레핀(δ_H 6.66), 2개의 엑소-메틸렌(δ_H 5.44, 5.21), 8개의 메틸렌(δ_H 1.54, 1.65, 1.79, 1.87, 2.05, 2.21, 2.21, 2.39), 2개의 메틴(δ_H 3.86, 4.29) 및 2개의 메틸 단일선(δ_H 1.20, 0.92) 수소를 나타내었다. ^{13}C 및 HSQC NMR 분광 데이터는 1개의 카르보닐(δ_C 172.2), 4개의 4차(quaternary)(δ_C 153.7, 131.3, 48.5, 36.8), 3개의 메틴(δ_C 134.0, 75.6, 69.2), 5개의 메틸렌(δ_C 111.9, 40.5, 33.0, 27.4, 21.8) 및 2개의 메틸 단일체(δ_C 24.5, 17.1) 탄소를 나타냈다(표 1). 분자식과 화합물 1의 HSQC NMR 분광 데이터는 화합물 1이 바이사이클릭 고리 시스템(bicyclic ring system)을 가지고 있음을 시사하였다.

[0108] 2D NMR 스펙트럼의 해석으로 화합물 1에 대한 바자난 유형 세스퀴테르페노이드 프레임워크의 구조를 확정하였다. COSY NMR 교차 피크 [H-9 (δ_H 4.29)/H-10 (δ_H 3.86)/H-11 (δ_H 1.87, 1.79)] and the long-range HMBC correlations from H-9 (δ_H 4.29) to C-8 (δ_C 153.7), C-15 (δ_C 111.9), from exo-methylene H-15 (δ_H 5.44, 5.21) to C-7 (δ_C 48.5), C-8 (δ_C 153.7), and from the methyl singlet H-13 (δ_H 1.20) to C-7 (δ_C 48.5), C-8 (δ_C 153.7), and C-11 (δ_C 40.5)]으로 바자난(bazzanane)의 5원 고리(고리 A)의 구성을 확인하였

다. C-1(δ_C 27.4), C-3(δ_C 131.3), C-4(δ_C 134.0), C-6(δ_C 36.8) 및 C-14(δ_C 17.1)에서 long-range HMBC 상관관계와 함께 COSY 교차피크[H-1(δ_H 1.65, 1.54)/H-2(δ_H 2.39, 2.21) 및 H-4(δ_H 6.66)/H-5(δ_H 2.21, 2.05)], H-5(δ_H 2.21, 2.05)를 분석하여 6원 고리(고리 B)를 확인하였다. 또한, H-4(δ_H 6.66)에서 카르보닐 탄소 C-12(δ_C 172.2)까지의 HMBC NMR 상관관계는 아미드 그룹이 고리 B에 연결되어 있음을 나타내었다. 한편, C-6/C-7의 연결은 H-13(δ_H 1.20)에서 C-6(δ_C 36.8), C-7(δ_C 48.5) 및 H-14(δ_H 0.92)에서 동일한 두 탄소까지의 HMBC 상관 관계를 관찰하였다. 또한, C-10에서 수산기의 부착은 δ_C 75.6에서 탄소 화학적 이동의 존재를 통해 확인되었다. 또한, 저해상도 전자분무 이온화 질량 스펙트럼(LR-ESI-MS)과 같이 화합물 1의 평면 구조를 완성한 염소화 메틴의 δ_C 69.2에서의 화학적 이동에서 두 양성자화 부가물 $[M + H]^+$ 및 $[M + H+2]^+$의 동위원소 비율(3:1)을 고려하여 C-9의 염소 원자를 확립하였다.

[0109] 화합물 1의 상대적인 입체화학(relative stereochemistry)은 NOESY NMR 분광 데이터의 분석에 의해 결정되었다. H-9(δ_H 4.29)와 H-14(δ_H 0.92) 사이의 NOESY 상관관계는 이러한 양성자가 분자의 동일한 면에 위치해야 함을 나타내었다. 한편, H-10(δ_H 3.86)과 H-13(δ_H 1.20) 사이의 NOESY 교차 피크와 결합 상수($^3J_{H-H}$ = 10.0Hz)는 이들의 *syn* 관계를 보여주었다. 따라서 화합물 1의 상대 구성은 6*S**, 7*S**, 9*S** 및 10*S**로 할당되었다.

[0110] 화합물 1의 절대 배열(absolute configuration)은 측정 및 계산된 진동 원편광 이색성(Vibrational Circular Dichroism, VCD) 스펙트럼 사이의 비교와 결합된 수정된 모셔 방법(modified Mosher's method)을 사용하여 설정되었다. 먼저, 화합물 1을 (*R*)- 및 (*S*)-MTPA-Cl(α-methoxy-α-(trifluoromethyl) phenylacetyl chloride)로 에스테르화하여 화합물 1의 (*S*)- 및 (*R*)-MTPA 에스테르를 얻었다. ^{1}H NMR $\Delta\delta_{(S-R)}$ 값의 분석은 일관된 사인 분포를 보여 C-10에서 *R* 구성을 확인하였다. 따라서, 화합물 1에서 고리 A의 3개 키랄 중심의 절대 입체화학은 7*R*, 9*R* 및 10*R*로 결정되었다. C-6의 절대 배열은 실험 및 계산된 VCD 스펙트럼을 비교하여 확인되었다. VCD 스펙트럼은 Gaussian 09 소프트웨어(Gaussian, Inc., Wallingford, CT 06492, United States)를 사용하여 B3LYP/6-31+G(d) 수준에서 밀도 함수 이론(Density functional theory, DFT)을 사용하여 계산되었으며 계산된 VCD 스펙트럼은 (6*R*, 7*R*) 배열은 87%의 신뢰 수준으로 화합물 1의 실험 스펙트럼과 잘 일치하는 것으로 나타났다.

[0111] 바자난형 세스퀴테르펜(bazzanane-type sesquiterpenes)은 바자니아(*Bazzania*) 속을 포함하여 우산이끼(liverwort)에서 주로 발견되었다. 1969년에 바자니아 폼페아나(*Bazzania pompeana* (Lac.) Mitt)로부터 바자넨(bazzanene)의 최초 분리가 보고된 후(비특허문헌 8), 단지 소수의 바자난형 세스퀴테르펜(bazzanane-type sesquiterpenes)만이 보고되었으며, 이는 자연계에서 매우 희귀함을 나타낸다(비특허문헌 9 및 10). 화합물 1과 가장 유사한 화합물은 뉴질랜드 우산이끼(liverwort) 프루라니아 팔시로바(*Frullania falciloba*)에서 분리되었다(비특허문헌 11). 그러나, 이전에 보고된 바자난형 세스퀴테르펜은 화합물 1과 같이 염소화되지도 않았고 분자 내에 아미드 그룹을 보유하지도 않았다. 또한, 화합물 1은 아크레모니움(*Acremonium*) 속의 균주로부터 분리된 최초의 바자난형 세스퀴테르페노이드이며 그 구조에 아미드기가 있는 최초 보고된 염소화된 바자난형 세스퀴테르펜이다.

[0113] AGS(위암), A549(폐암) 및 Caco-2(대장암) 세포의 생존력에 대한 다양한 농도(10, 25, 50 및 100 μM)의 화합물 1 처리 효과를 평가하기 위해 MTT 세포독성 생물검정을 사용하였다. A549의 세포 생존율은 48시간 동안 화합물 1의 10-50 μM으로 처리하는 동안 영향을 받지 않았다. 그러나 도 1과 같이 100 μM의 화합물 1로 처리하는 동안 생존력이 약간 감소하였다. 유사하게 AGS와 Caco-2의 생존력은 10-25 μM의 화합물 1로 처리해도 감소하지 않았지만 50 -100 μM의 농도에서는 약간 감소하였다. 따라서, 이러한 결과는 화합물 1을 사용한 처리가 25 μM 미만의 농도에서 A549, AGS 및 Caco-2 세포에 대해 상대적으로 비독성임을 입증한다.

[0114] 다음으로, 무독성 농도(1, 2.5 및 5 μM)에서 세포 이동 및 침윤 분석을 수행하여 화합물 1이 A549, AGS 및 Caco-2 세포의 운동성을 억제하는지 여부를 확인하였다. 도 2 및 3에 도시된 바와 같이, 화합물 1은 1 내지 5 μM의 농도에서 세 가지 세포 유형 모두의 이동에 대해 용량 의존적 억제 효과를 나타냈고(도 2a 및 2b), 최대 ~ 5 μM 농도에서 45%까지 각 세포 유형에 의한 침윤의 용량 의존적 억제 효과를 나타내었다(도 3a 및 3b).

[0115] 또한, 무독성 농도(1, 2.5 및 5 μM)에 노출된 A549, AGS 및 Caco-2 세포의 연한천 콜로니 형성을 조사하여 화합물 1의 잠재적 항종양 활성을 평가하였다. 도 4a 및 4b에 나타낸 바와 같이, 화합물 1은 용량 의존적으로 A549, AGS 및 Caco-2 세포의 콜로니 형성을 감소시켰다. 더욱이, 도 4b는 5 μM의 화합물 1 처리가 A549, AGS 및 Caco-2 세포의 종양 형성을 유의하게 감소시켰음을 보여주었다. 전반적으로, 이러한 결과는 1, 2.5 및 5 μM 농도의 화합물 1 처리가 A549, AGS 및 Caco-2 세포의 운동성과 종양 형성을 유의하게 억제했음을 보여준다.

[0116] 화합물 1의 존재 하에서 A549, AGS 및 Caco-2 세포 운동성 및 종양형성의 억제가 상피-중간엽 전이(Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)를 수반하는지 여부를 결정하기 위해 EMT 이펙터(effectors) 및 전사 인자의 발현을 조사하였다. 도 5a에 도시된 바와 같이, 화합물 1은 중간엽 마커 N-cadherin의 mRNA 발현을 감소시켰지만 세 가지 세포 유형 모두에서 상피 마커 E-cadherin의 mRNA 발현을 증가시켰다. 또한 화합물 1은 도 5b와 같이 세 가지 세포 유형 모두에서 EMT 전사 인자인 Snail, Slug 및 Twist의 mRNA 발현을 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 화합물 1이 전사 인자 Snail, Slug 및 Twist를 하향 조절함으로써 EMT 이펙터 N-cadherin의 발현을 조절한다는 것을 나타낸다.

[0117] 화합물 1의 존재 하에 A549, AGS, Caco-2 세포 운동성 및 종양형성 억제가 KITENIN 및 AP-1과 관련이 있는지 알아보기 위해 KITENIN 및 AP-1의 단백질 및 mRNA 발현 수준과 그 활성을 조사하였다. 표피 성장 인자는 KITENIN 매개 AP-1 활성을 증가시키며, KAI와 KITENIN 사이에는 역의 관계가 있다(비특허문헌 12). 도 6a에 나타낸 바와 같이, 5μM의 농도에서 화합물 1은 AP-1 활성을 억제하였다. 도 6b 및 6c는 화합물 1이 KITENIN 3'-UTR의 활성을 억제한 반면, KITENIN 프로모터는 유의미한 변화를 나타내지 않았음을 보여준다. 도 7a 및 7b는 화합물 1의 처치 중 A549, AGS 및 Caco-2에서 KITENIN의 단백질 수준이 감소했음을 나타낸다. KITENIN의 mRNA 발현 수준은 A549, AGS 및 Caco-2에서도 억제된 반면, KAI1의 mRNA 수준은 화합물 1에 의해 증가하였다(도 8 참조). 그 결과, 화합물 1은 KAI1의 발현 수준을 상향 조절하고 KITENIN의 발현 수준을 하향 조절함으로써 세포 운동성을 감소시켰다.

[0118] TOPFLASH 리포터 분석을 수행하여 화합물 1 처리가 β카테닌 매개 및/또는 KITENIN 매개 신호 활성을 조절하는지 여부를 조사하였다. 5 μM의 화합물 1로 처리하면 HEK293T에서 β카테닌 매개 TOPFLASH 활성이 30% 감소하였다(도 9a). 또한 도 9b 내지 9d는 화합물 1 처리가 AGS 및 Caco-2 세포에서 mRNA 발현 및 β카테닌의 단백질 수준을 감소시킴을 보여주었다. 그러나, 화합물 1 처리는 A549 세포에서 mRNA 발현 및 β카테닌의 단백질 수준에 유의한 영향을 미치지 않았다.

[0119] 전체, 세포질 및 핵 β카테닌의 단백질 수준을 조사하여 화합물 1이 A549 세포에서 β카테닌의 핵/세포질 분포에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다. 도 10a 및 10b에서 볼 수 있듯이 5μM의 화합물 1 처리는 총 β카테닌 수준에 영향을 미치지 않은 반면, DMSO와 비교하여 A549 세포에서 β카테닌 핵 대 세포질 비율을 현저하게 감소시켰다. βn의 다운스트림 표적 유전자 수준에 대한 화합물 1의 효과를 추가로 테스트하기 위해 qRT-PCR 분석을 수행하였다. 도 10c에서 볼 수 있듯이 5μM의 화합물 1로 24시간 동안 처리하면 A549에서 cyclin-D1과 Caco-2에서 CD44의 mRNA 발현이 억제되는 반면, 5μM의 화합물 1로 24시간 동안 처리하면 AGS 세포에서 c-Myc와 CD44의 mRNA 발현이 억제되었다. 또한 c-Myc, CD44 및 cyclin-D1을 포함한 β카테닌 다운스트림 표적 유전자는 48시간 동안 5 μM의 화합물 1로 처리하는 동안 AGS 세포에서 억제되었다(도 10d). 5 μM의 화합물 1 처리는 A549에서 cyclin-D1과 CD44의 mRNA 발현을 억제한 반면, 5 μM의 화합물 1은 Caco-2 세포에서 CD44의 mRNA 발현을 48시간 동안 억제하였다(도 10d). 이러한 결과는 화합물 1이 3개의 암세포에서 β카테닌 매개 TOPFLASH 활성 및 그 다운스트림 표적을 감소시켰음을 보여준다.

[0120] A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 Notch 신호 경로에 대한 화합물 1의 효과를 조사한 결과 화합물 1의 5μM 처리가 HEK293T 세포의 상대적 CSL 활성을 약 20%까지 유의하게 감소시키는 것을 발견하였다(도 11a). 또한 HEK293T의 상대적인 Hes-1 활성과 AGS, A549 및 Caco-2 세포에서 Hes-1의 mRNA 발현은 도 11b 및 11c와 같이 5μM으로 처리하는 동안 감소하였다. HES의 발현 수준은 NICD 및 CSL과 관련이 있다. 화합물 1로 처리하면 A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 절단된(Cleaved) Notch1의 수준이 감소하였다(도 11d 및 11e). 이 결과는 화합물 1이 A549, AGS 및 Caco-2 세포에서 Notch 신호 경로를 약간 억제했음을 나타낸다.

[0121] 복막암종증(Peritoneal carcinomatosis)은 위암이 복막강으로 전이될 때 발생한다. 복막 암종증은 진행된 복막 종양 진행의 특징이며 위암에서 복막 재발은 화학 요법에 대한 내성으로 인해 발생한다. AGS-iRFP의 접종 후 28일째에, 10 mg/kg의 화합물 1 처리는 대조군과 비교하여 장간막에서 종양 결절(tumor nodules)의 수의 3개의 상이한 범주를 상당히 감소시켰다(도 12). 도 12b에서 볼 수 있듯이 10mg/kg의 화합물 1 처리는 다른 그룹과 비교하여 직경 >1인 결절의 수를 감소시켰다(대조군, 8.4 ± 1.67 및 5mg/kg의 화합물 1 그룹, 8.2 ± 1.92 대

10mg/kg의 화합물 1 그룹, 5 ± 2.35, $p < 0.05$). 10mg/kg의 화합물 1 그룹에서 직경 1~5mm 미만의 결절의 수도 다른 군(대조군 8.4 ± 1.67, 5 mg/kg의 화합물 1 그룹, 8.2 ± 1.92 대 10 mg/kg의 화합물 1, 5 ± 2.35, $p < 0.05$)에 비하여 또한 감소하였다. 그 결과, 정량적 데이터는 대조군에 비해 10 mg/kg의 화합물 1을 처리한 마우스에서 전이성 결절의 총 수가 유의하게 감소함을 보여주었다(도 12c).

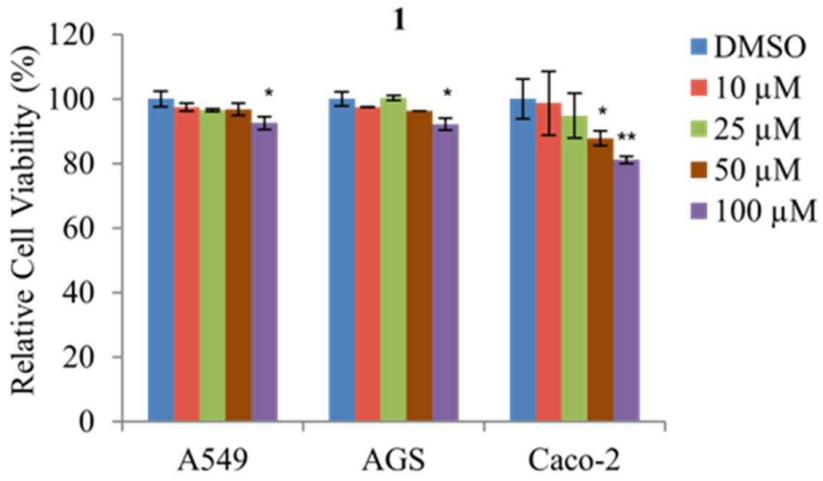
[0123] 이상의 결과는 다음을 시사한다.

[0124] 아크레모니움(*Acremonium*) 속의 새로운 바잔(bazzanane) 유형 세스퀴테르페노이드(sesquiterpenoid)인 마리노바자난(marinobazzanan)(화합물 1) 화합물은 염소화 및 아민화와 같은 화학 구조 변형으로 분리된 최초의 아크레모니움(Acremonium) 유래 바잔 유형의 세스퀴테르페노이드(bazzanane-type sesquiterpenoid)이다.

[0125] 마리노바자난(1)은 1, 2.5 및 5μM의 무독성 농도에서 암세포 이동 및 침윤을 억제하였고 전사 인자 Snail, Slug 및 Twist를 하향 조절하는 것으로 나타났다. 또한 마리노바자난(1)은 KITENIN의 발현 수준을 낮추고 KAI1의 발현 수준을 높임으로써 세포 운동성을 감소시켰다. 또한, 마리노바자난(1)은 다운스트림 표적 유전자를 하향 조절함으로써 β카테닌의 발현을 조절하였다. 마리노바자난(1)은 또한 복강내 이종이식 마우스 모델에서 전이성 결절의 수를 감소한 것으로 나타났다. 이러한 발견은 마리노바자난 화합물이 암세포에 대한 강력한 항암 활성을 나타내고 생체내 복막 암종증 모델에 대한 항암 활성을 나타낸다는 것을 시사한다.

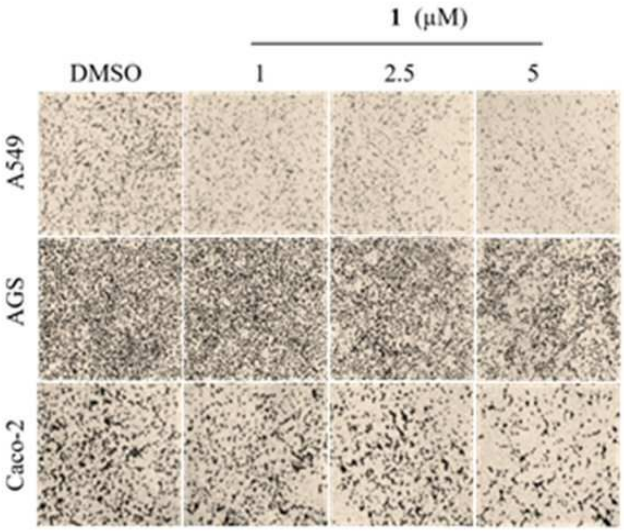
도면

도면1

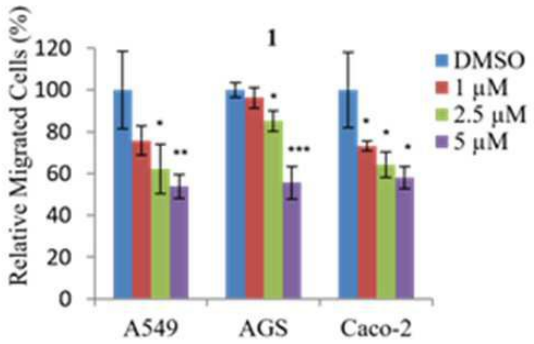


도면2

(a)

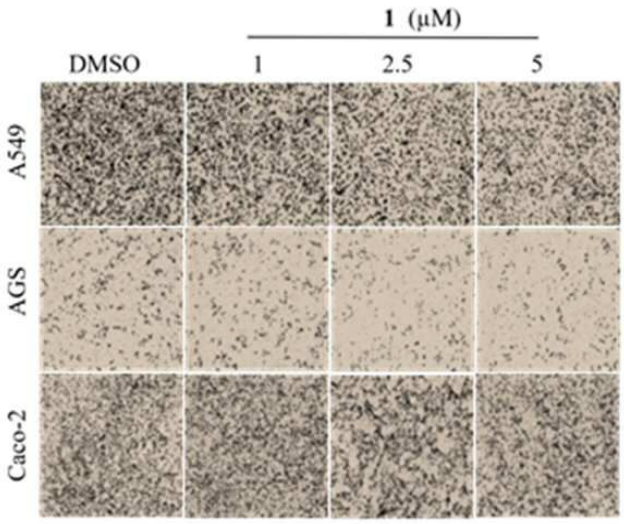

1 (μM)
DMSO
1
2.5
5
A549
AGS
Caco-2

(b)

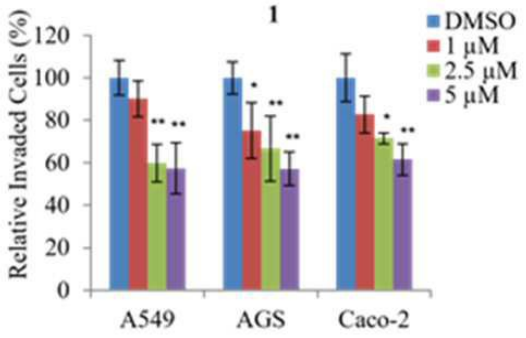

1
Relative Migrated Cells (%)
120
100
80
60
40
20
0
DMSO
1 μM
2.5 μM
5 μM
A549
AGS
Caco-2

도면3

(a)

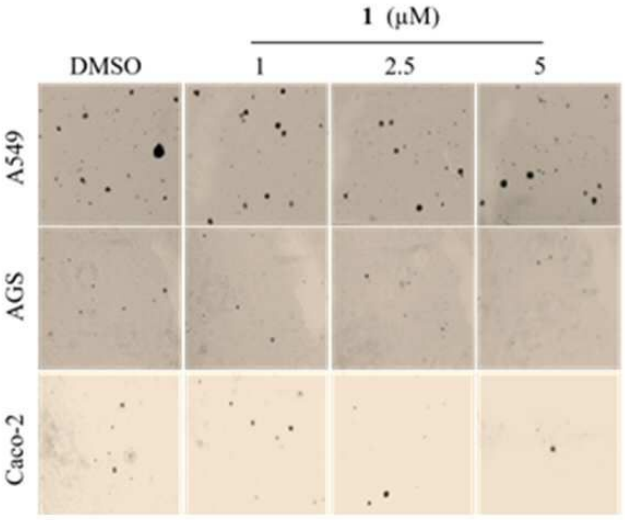

1 (μM)
DMSO
1
2.5
5
A549
AGS
Caco-2

(b)

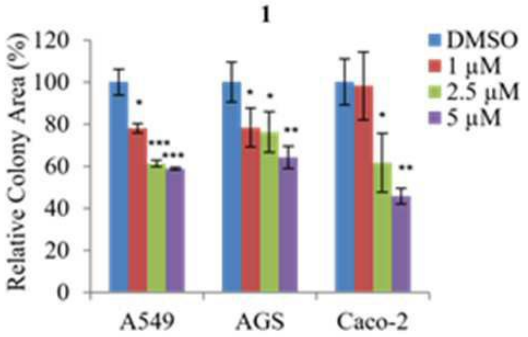

1
Relative Invaded Cells (%)
120
100
80
60
40
20
0
DMSO
1 μM
2.5 μM
5 μM
A549
AGS
Caco-2

도면4

(a)

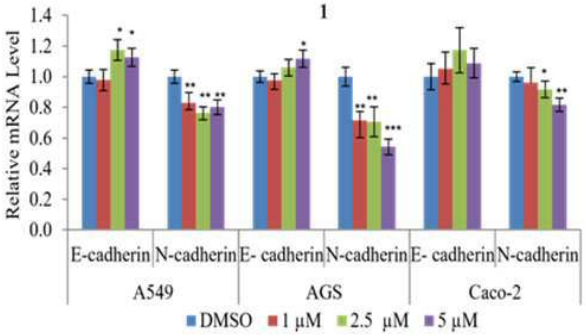

1 (μM)
DMSO
1
2.5
5
A549
AGS
Caco-2

(b)

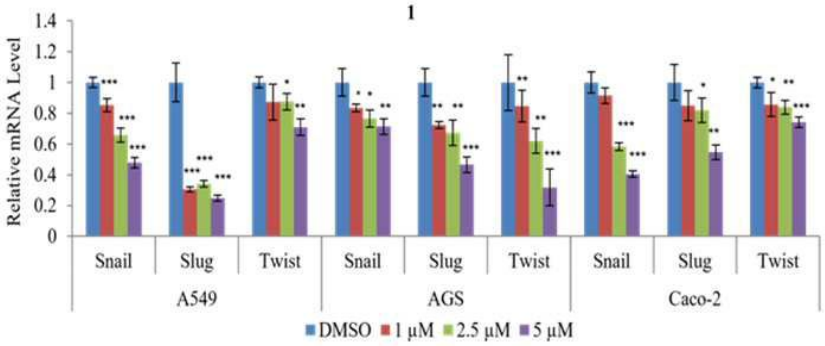

1
Relative Colony Area (%)
120
100
80
60
40
20
0
DMSO
1 μM
2.5 μM
5 μM
A549
AGS
Caco-2

도면5

(a)

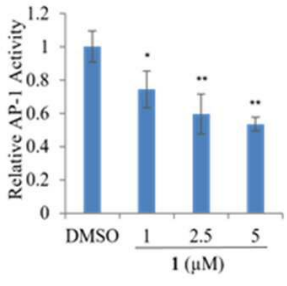


(b)

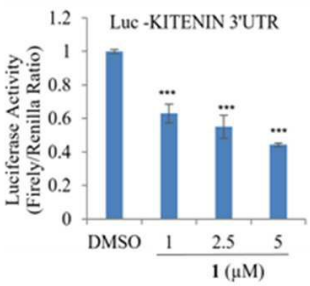


도면6

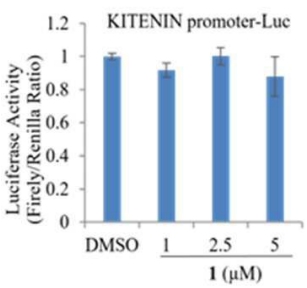
(a)



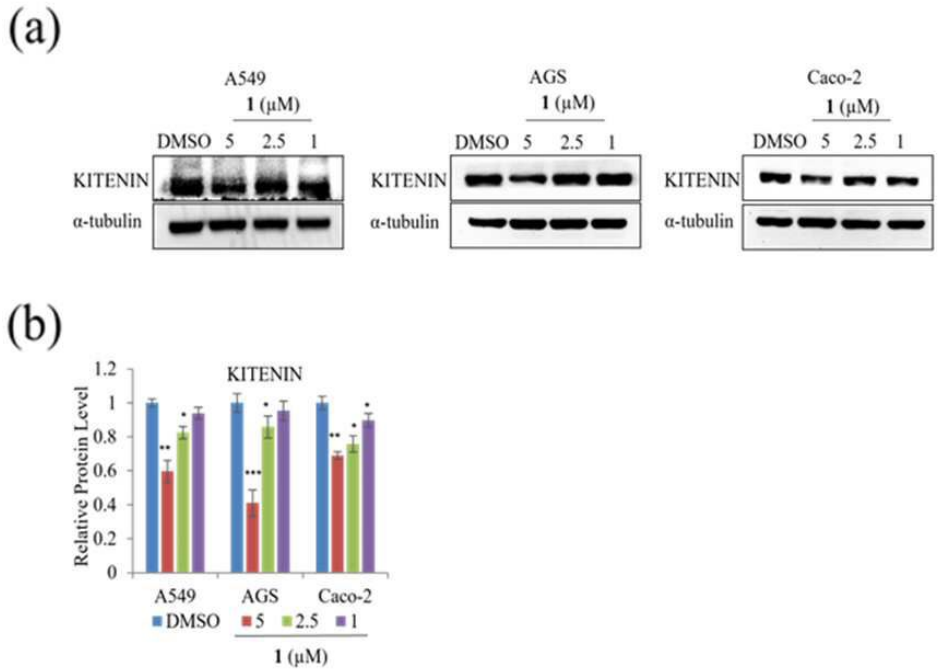
(b)



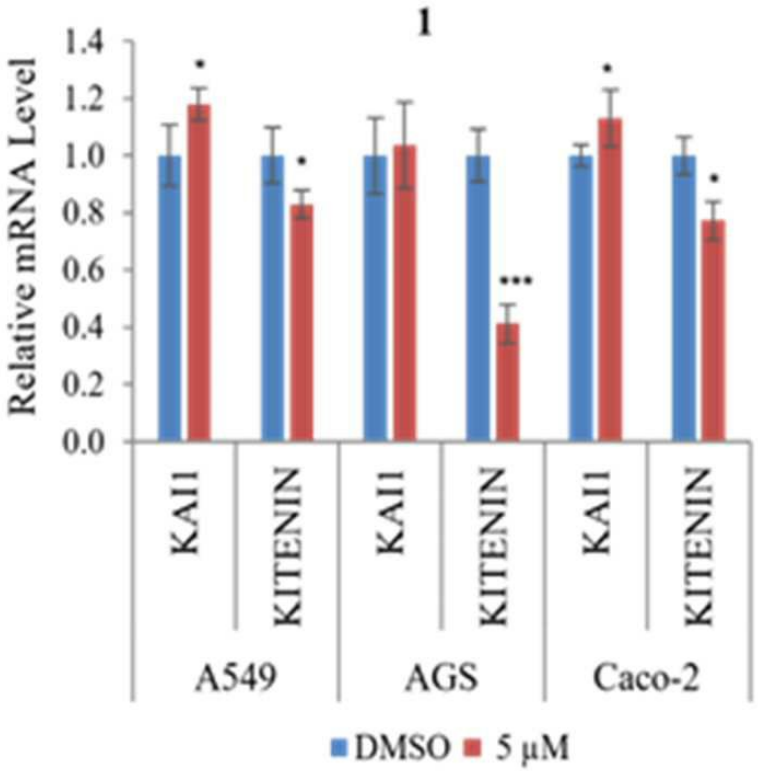
(c)



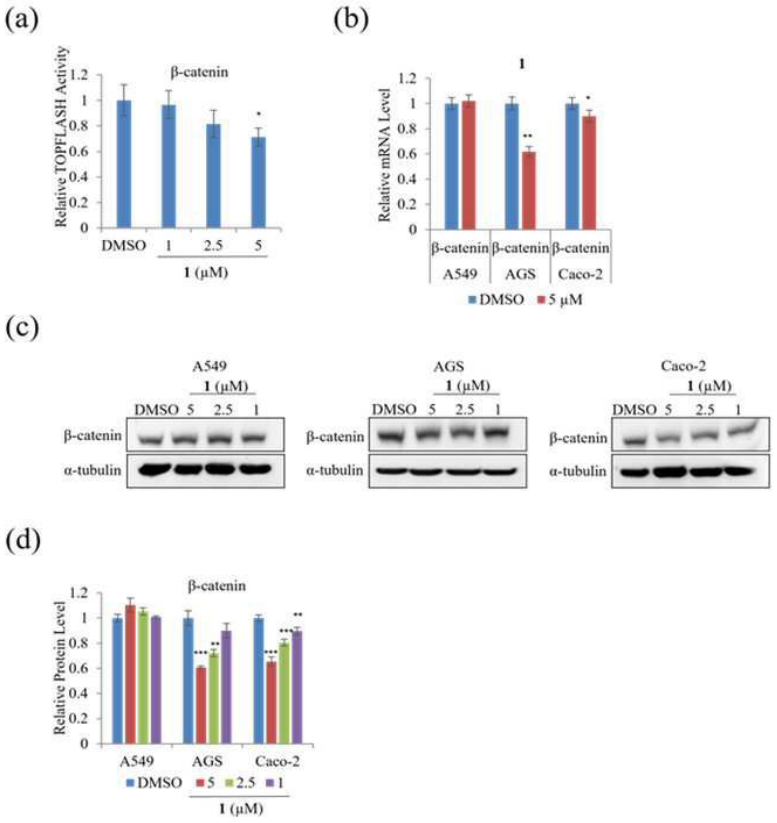
도면7


(a)
A549
1 (μM)
DMSO 5 2.5 1
KITENIN
α-tubulin
AGS
1 (μM)
DMSO 5 2.5 1
KITENIN
α-tubulin
Caco-2
1 (μM)
DMSO 5 2.5 1
KITENIN
α-tubulin
(b)
KITENIN
Relative Protein Level
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
A549
AGS
Caco-2
DMSO 5 2.5 1
1 (μM)

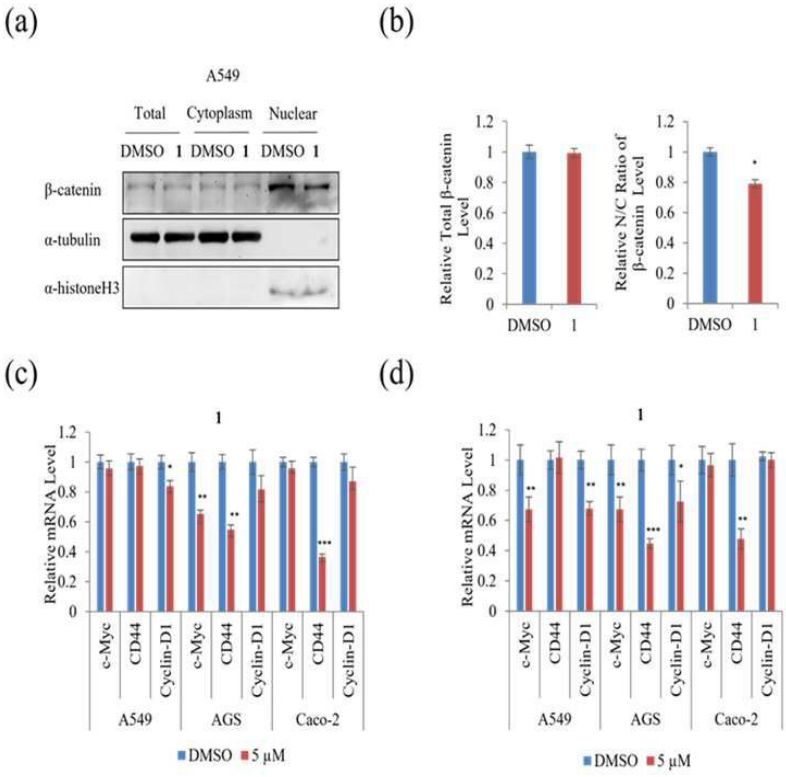
도면8


1
Relative mRNA Level
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
KAI1
KITENIN
KAI1
KITENIN
KAI1
KITENIN
A549
AGS
Caco-2
DMSO 5 μM

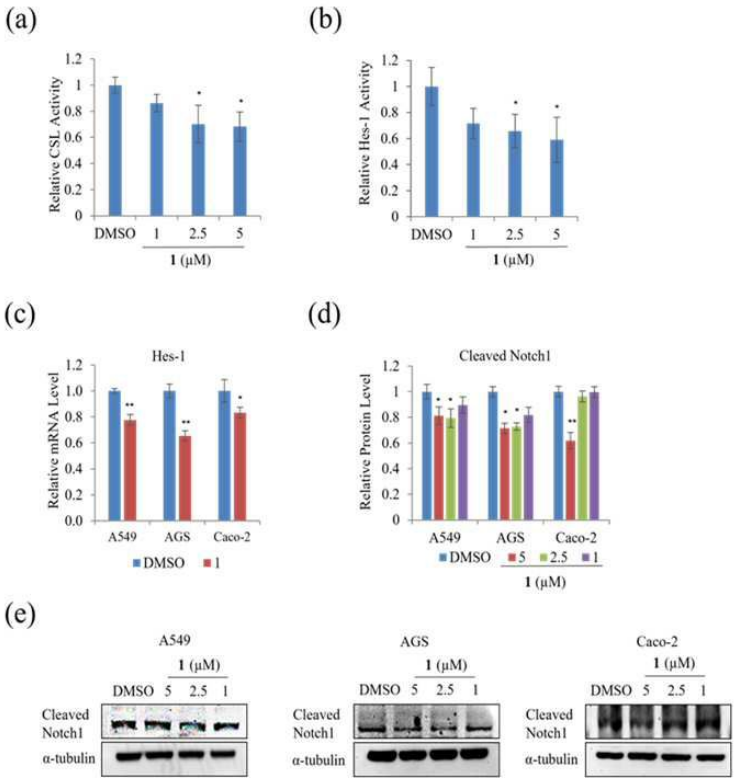
도면9


(a)
β-catenin
Relative TOPFLASH Activity
DMSO 1 2.5 5
1 (μM)
(b)
1
Relative mRNA Level
β-catenin β-catenin β-catenin
A549 AGS Caco-2
DMSO 5 μM
(c)
A549
1 (μM)
DMSO 5 2.5 1
β-catenin
α-tubulin
AGS
Caco-2
(d)
β-catenin
Relative Protein Level
A549 AGS Caco-2
DMSO 5 2.5 1
1 (μM)

도면10

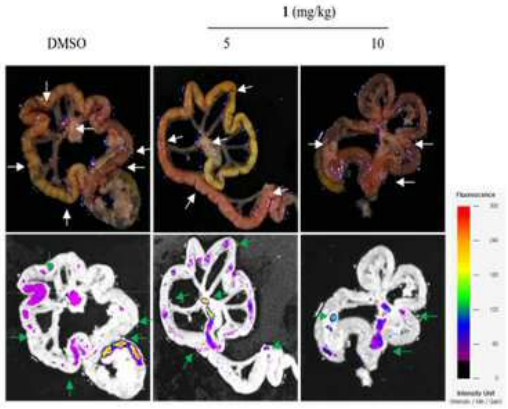

(a)
A549
Total Cytoplasm Nuclear
DMSO 1 DMSO 1 DMSO 1
β-catenin
α-tubulin
α-histoneH3
(b)
Relative Total β-catenin Level
Relative N/C Ratio of β-catenin Level
DMSO 1
(c)
1
Relative mRNA Level
c-Myc CD44 Cyclin-D1
A549 AGS Caco-2
DMSO 5 μM
(d)
1
Relative mRNA Level
c-Myc CD44 Cyclin-D1
A549 AGS Caco-2
DMSO 5 μM

도면11


(a)
Relative CSL Activity
DMSO
1
2.5
5
1 (μM)
(b)
Relative Hes-1 Activity
(c)
Hes-1
Relative mRNA Level
A549
AGS
Caco-2
DMSO
1
(d)
Cleaved Notch1
Relative Protein Level
5
2.5
(e)
Cleaved Notch1
α-tubulin

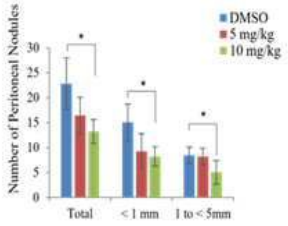
도면12

(a)

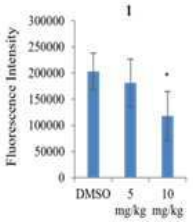


(b)

	n	Total number of peritoneal nodules	Number of nodules diameter < 1 mm	Number of nodules diameter 1 to < 5mm
DMSO	5	22.8 ± 5.13	15 ± 3.67	8.4 ± 1.67
5 mg/kg	5	16.4 ± 3.67	9.2 ± 3.56	8.2 ± 1.92
10 mg/kg	5	13.2 ± 2.39	8.2 ± 1.92	5 ± 2.35



(c)



(d)

