



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월16일

(11) 등록번호 10-1512486

(24) 등록일자 2015년04월09일

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07D 493/04</i> (2006.01) <i>A61K 31/4433</i> (2006.01)
 <i>A61P 9/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2013-0083049</p> <p>(22) 출원일자 2013년07월15일
 심사청구일자 2013년07월15일</p> <p>(65) 공개번호 10-2015-0008725</p> <p>(43) 공개일자 2015년01월23일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
 JP08259569 A*
 KR1019990069021 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)</p> <p>(72) 발명자
 김영국
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 김형진
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 손민</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 3 항

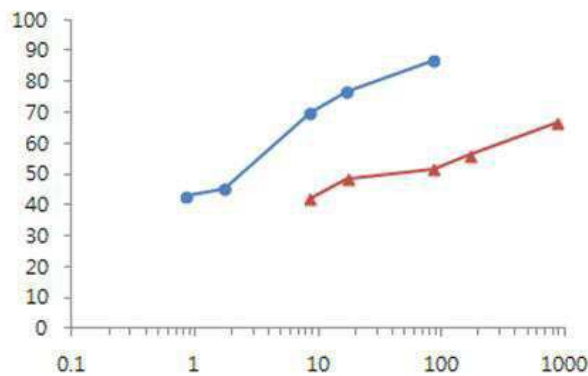
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 피리피로펜 S 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제에 대한 저해활성을 나타내는 신규한 화합물인 피리피로펜 S, 그리세오폴범 F1959 균주를 이용한 상기 피리피로펜 S의 제조방법 및 상기 피리피로펜 S를 포함하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 피리피로펜 S는 ACAT에 대한 저해활성을 나타내어, 동맥경화 병변의 진전에 관여하는 콜레스테롤에 아실기 전이를 억제할 수 있으므로, 동맥경화증, 고지혈증 등의 심혈관계 질환의 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

남주연

서울 양천구 목동동로 100, 1311동 1202호 (신정동, 목동13단지아파트)

배경숙

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

남기환

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

서영원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이기훈

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이성윤

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KGM1221312
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	기초기술연구회
연구사업명	주요사업(연구개발과제)
연구과제명	천연물 유래 의약활성 전임상 소재 개발
기여율	1/1
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

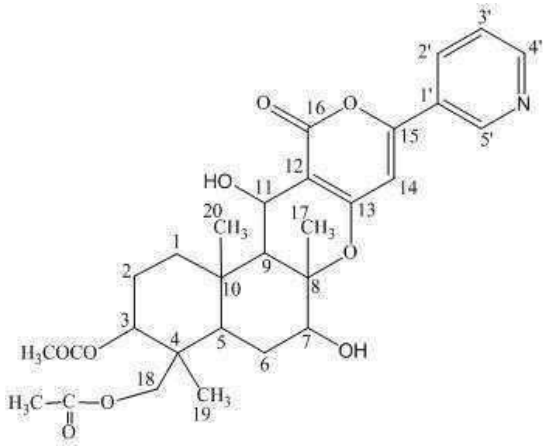
삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

페니실리움 그리세오폴범 F1959(*Penicillium griseofulvum* F1959)(KCTC 0387BP) 균주를 배양하고, 이의 배양물로부터 하기 화학식 (I)로 표시되는 피리피로펜 S를 회수하는 단계를 포함하는 피리피로펜 S의 생산방법.



(I)

청구항 4

제3항에 있어서,

페니실리움 그리세오폴범 F1959 균주의 배양은 회분식 배양방법, 연속식 배양방법 또는 유가식 배양방법에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

페니실리움 그리세오폴범 F1959 균주의 배양은 pH 4 내지 8의 배지 pH, 20 내지 40℃의 배양온도, 50 내지 200 시간의 배양시간, 50 내지 250rpm의 교반조건 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 조건하에서 수행되는 것인 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피리피로펜 S 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제에 대한 저해활성을 나타내는 신규한 화합물인 피리피로펜 S, 그리세오폴범 F1959 균주를 이용한 상기 피리피로펜 S의 제조방법 및 상기 피리피로펜 S를 포함하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 동맥경화는 뇌동맥 또는 관상동맥에서 일어나기 쉬운데, 뇌동맥경화증의 경우에는 두통, 현기증, 정신장애를 나타내고 뇌연화증의 원인이 되며, 관상동맥경화증의 경우에는 심장부에 동통과 부정맥을 일으켜 협심증, 심근경색 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 또한 이로 인해 고혈압, 심장병, 뇌일혈 등이 유발되어, 동맥경화증으로 인한 질병이 남성들에게 가장 큰 사망요인으로 부각되고 있다. 현재 의과학 분야의 발전으로 보건위생의 여건이 좋아지면서 이전보다 전염성 질환은 줄어들었으나 대사성 질환의 발병률은 계속 증가추세에 있으며, 특히 순환기질환은 주로 고지혈증에 의하여 발병되며 이 질환의 사망률은 전체 사망률 중에서 상위를 차지하고 있으므로 의약품의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0003] 현재, 동맥경화의 주요원인으로는 고지혈증이 알려져 있는데, 이러한 임상적으로 사용하고 있는 고지혈증 치료제로는 간장에서 합성되는 콜레스테롤의 생합성을 저해하는 저해제와, 간장에서 분리되어 음식물을 소화시키고 대장에서 재흡수되는 담즙산에 결합하는 음이온 교환체가 임상적으로 콜레스테롤 재흡수 저해제로 사용되고 있으나 임상에 사용시 복용량이 많아 복용에 어려움이 있고, 복용 시 이온교환과 관련된 제한이 있는 의약품과 동시처방에 제한이 되는 경우도 있다.

[0004] 그러므로 고지혈증 치료제로 사용에 제한사항이 없고, 작용기작이 확실하며 부작용이 적은 새로운 고지혈증 치료제의 개발이 요구되고 있으며 그 중에서도 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase, ACAT) 활성 저해제가 고 콜레스테롤 혈증으로 기인한 심혈관 질환의 예방제 및 치료제로 주목받고 있다. ACAT는 콜레스테롤의 아실화에 관여하여 소장에서 콜레스테롤의 흡수, 간장에서 VLDL(very low density lipoprotein)의 합성, 지방세포와 혈관내벽에 저장형 콜레스테롤의 축적에 관여하는 효소로 알려져 있다. 지금까지 알려진 ACAT 활성 억제 화합물들의 대표적인 핵심구조는 우레아, 티오우레아, 아미드 또는 베타-케토아미드 등이며, 그 중 우레아의 핵심구조를 가지는 물질들이 일반적으로 좋은 활성을 나타낸다고 알려져 있다. 특히, 피리피로펜 A는 지금까지 알려진 ACAT에 대한 저해제 중에서 가장 강력한 저해활성을 나타내는 것으로 알려져 있으나, 피리피로펜 A를 생산하는 것으로 알려진 아스퍼질러스 푸마가투스(Aspegillus fumigatus) 균주는 생체내에서 폐렴을 유발할 수 있다는 위험성이 있을 뿐만 아니라 생산성이 생산배지 리터당 10mg 미만으로 매우 낮기 때문에, 상기 피리피로펜 A를 생산하는 것은 경제성이 낮다는 문제점이 있었다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 보다 경제적으로 생산할 수 있는 ACAT에 대한 저해제를 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 인체에 위험성을 유발하지 않는 것으로 알려진 페니실리움 그리세오폴범 F1959 균주로부터 분리된 신규한 피리피로펜 화합물이 피리피로펜 A와 유사한 수준의 ACAT에 대한 저해활성을 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 신규한 화합물 피리피로펜 S(pyripyropene S) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 제

공하는 것이다.

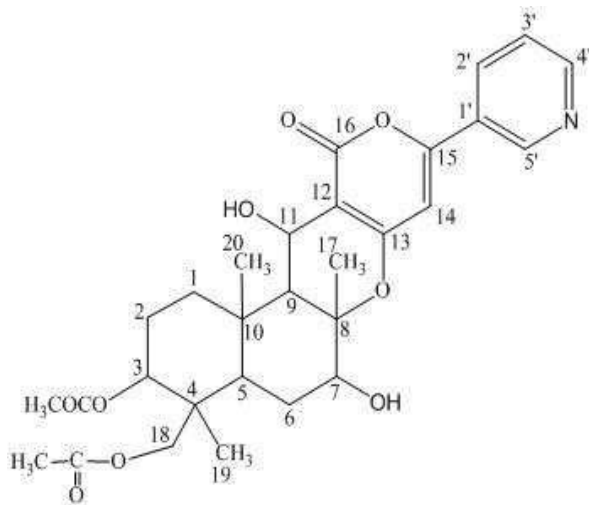
[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 피리피로펜 S의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 피리피로펜 S를 포함하는 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 신규한 화합물 피리피로펜 S(pyripyropene S) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.

화학식 1



[0010]

[0011] 본 발명자들은 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase, ACAT) 활성 저해제의 일종인 피리피로펜 C(pyripyropene C)를 생산하는 것으로 알려진 페니실리움 그리세오폴범 F1959(*Penicillium griseofulvum* F1959)(KCTC 0387BP)(대한민국 특허등록 제399036호)로부터 생성되는 새로운 ACAT 활성저해제를 스크리닝하기 위하여, 상기 균주를 배양하고, 배양된 발효액으로부터 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 저해활성을 나타내는 물질을 분리, 정제한 후 정제된 활성물질의 구조를 결정하기 위하여 자외선-가시광선 분광, 적외선 흡광, 질량분석 및 핵자기공명의 기기분석을 수행하였으며, 분석 결과들을 종합하여 상기 물질이 상기 화학식 I로 표시되는 신규한 화합물임을 확인하고, 이를 "피리피로펜 S(pyripyropene S)"라 명명하였다.

[0012] 이어, ACAT에 대한 상기 피리피로펜 S의 효과를 분석한 결과, 피리피로펜 S가 ACAT의 활성을 저해하는 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0013] 지금까지 알려진 ACAT에 대한 저해제 중에서 가장 강력한 저해활성을 나타내는 것으로 알려진 피리피로펜 A는 아스페길러스 푸마가투스(*Aspegillus fumigatus*) 균주로부터 생산되는데, 상기 균주는 생체내에서 폐렴을 유발할 수 있다는 위험성이 있을 뿐만 아니라 생산성이 생산배지 리터당 10mg 미만으로 매우 낮기 때문에, 방호시설의 추가와 생산성 저하라는 원인으로 인하여, 상기 피리피로펜 A의 생산은 경제성이 낮다는 문제점이 있었다.

[0014] 이에 비하여, 본 발명에서 제공하는 피리피로펜 S는 ACAT에 대한 저해활성의 측면에서 볼 때 피리피로펜 A의 것 과 유사한 수준의 저해활성을 나타내면서도, 안전성이 입증된 페니실리움 속 균주에서 생산할 수 있어 방호시설의 설비가 불필요하고, 아스페길러스 푸마가투스를 이용한 피리피로펜 A의 생산성 보다도 약 4배 우수한 생산성을 나타내므로, 경제성의 측면에서 종래의 피리피로펜 A를 대체할 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 상기 피리피

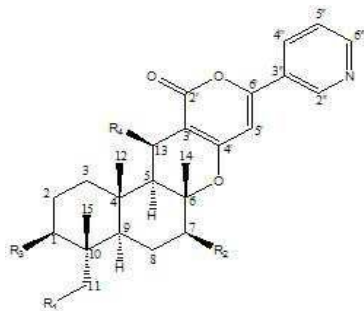
로펜 S는 소장에서 콜레스테롤의 체내 흡수를 저해하여 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시키는데 유효하며, 간장에서 VLDL(Very Low Density Lipoprotein)의 합성을 저해하여 혈중의 LDL 콜레스테롤 저하, 혈관내의 동맥경화 병변에서 동맥경화의 진전에 관여하는 콜레스테롤 아실화를 저해하여, 고 콜레스테롤증에 기인하는 고지혈증, 동맥경화 등 각종 심혈관계질환의 예방 및 치료용 의약품으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명의 용어 "피리피로펜 S(pyripyropene S)"란, 상기 화학식 I로 표시되는 피리피로펜류 화합물의 일종을 의미한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 피리피로펜 S는 ACAT에 대한 저해활성을 나타내고, 종래의 ACAT에 대한 저해활성을 나타내는 피리피로펜 A보다는 ACAT에 대한 낮은 저해활성을 나타내는 반면, 미생물에서의 생산성이 우수하다는 장점이 있어, ACAT가 관여하는 각종 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 경제적인 생산에 활용할 수 있다.

[0017] 본 발명의 용어 "피리피로펜(pyripyropene)"이란, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 의미하는데, 상기 화합물의 치환기에 따라, 다양한 유도체를 생성할 수 있다(표 1).

화학식 2



[0018]

표 1

피리피로펜 유도체 화합물 및 그의 치환기

[0019]

	R1	R2	R3	R4
Pyripyropene A	-OCOCH ₃	-OCOCH ₃	-OCOCH ₃	-OH
Pyripyropene B	-OCOCH ₂ CH ₃	-OCOCH ₃	-OCOCH ₃	-OH
Pyripyropene C	-OCOCH ₃	-OCOCH ₂ CH ₃	-OCOCH ₃	-OH
Pyripyropene D	-OCOCH ₃	-OCOCH ₃	-OCOCH ₂ CH ₃	-OH
Pyripyropene E	-H	-H	-OCOCH ₃	-H
Pyripyropene F	-H	-H	-OCOCH ₂ CH ₃	-H
Pyripyropene G	-H	-H	-OCOCH ₃	-OH
Pyripyropene H	-H	-H	-OCOCH ₂ CH ₃	-OH
Pyripyropene I	-OCOCH ₂ CH ₃	-OCOCH ₂ CH ₃	-OCOCH ₂ CH ₃	-OH
Pyripyropene J	-OCOCH ₃	-OCOCH ₂ CH ₃	-OCOCH ₂ CH ₃	-OH
Pyripyropene K	-OCOCH ₂ CH ₃	-OCOCH ₃	-OCOCH ₂ CH ₃	-OH
Pyripyropene L	-OCOCH ₂ CH ₃	-OCOCH ₂ CH ₃	-OCOCH ₃	-OH
Pyripyropene M	-OCOCH ₃	-OCOCH ₂ CH ₃	-OCOCH ₃	-H

Pyripyropene N	-OCOCH ₂ CH ₃	-H	-OCOCH ₂ CH ₃	-OH
Pyripyropene O	-OCOCH ₃	-H	-OCOCH ₃	-H
Pyripyropene P	-OCOCH ₂ CH ₃	-H	-OCOCH ₃	-H
Pyripyropene Q	-OCOCH ₂ CH ₃	-H	-OCOCH ₃	-OH
Pyripyropene R	-OCOCH ₃	-H	-OCOCH ₂ CH ₃	-H
Pyripyropene S	-OCOCH ₃	-OH	-OCOCH ₃	-OH

[0020]

본 발명의 용어 "약학적으로 허용되는 염"이란, 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 통상적으로 금속염, 유기 염기와의 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기 염기와의 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.

[0021]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 종래의 피리피로펜 화합물을 생산하는 것으로 알려진 페니실리움 그리세오폴범 F1959 균주를 배양하고, 상기 배양물로부터 ACAT에 대한 저해활성을 나타내는 새로운 화합물을 분리하였으며(실시예 1), 상기 분리된 화합물을 동정한 결과, 신규한 화합물임을 확인하고, 이를 "피리피로펜 S(pyripyropene S)"라 명명하였다(실시예 2).

[0022]

상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 그리세오폴범 F1959 균주를 배양하고, 이의 배양물로부터 피리피로펜 S를 회수하는 단계를 포함하는 피리피로펜 S의 생산방법을 제공한다.

[0023]

상기 페니실리움 그리세오폴범 F1959 균주는 다양한 방법으로 배양할 수 있는데, 상기 배양방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행됨이 바람직하고, 배양조건은 특별히 이에 제한되지 않으나, 적정 pH(pH 4 내지 8, 바람직하게는 pH 5 내지 7, 가장 바람직하게는 pH 5.8)의 조건, 적정 배양온도(20 내지 40℃, 바람직하게는 25 내지 35℃, 가장 바람직하게는 29℃) 조건, 적정 시간(50 내지 200시간, 바람직하게는 100 내지 140시간, 가장 바람직하게는 120시간) 조건 및 적정 교반조건(50 내지 250rpm, 바람직하게는 100 내지 200rpm, 가장 바람직하게는 150rpm)에서 배양할 수 있다.

[0024]

또한, 사용되는 배양용 배지는 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물(예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방(예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산(예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알콜(예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산(예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물(예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물(예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으며; 인 공급원으로서 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 기타 금속염(예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입할 수도 있다.

[0025]

아울러, 배양물로부터 피리피로펜 S를 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 피리피로펜 S의 회수 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 상기 배양물을 대상으로

원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증방, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 TLC, 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 단독으로 또는 혼합하여 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 상기 배양물을 유기용매 추출 및 컬럼 크로마토그래피에 순차적으로 적용하는 방법을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 상기 배양물을 에틸 아세테이트로 추출하고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 적용한 다음, 고속 액체 크로마토그래피에 적용하는 방법을 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 배양된 페니실리움 그리세오폴범 F1959(KCTC 0387BP)의 배양물에 에틸 아세테이트를 가하고 추출하여 조 추출물을 수득하고, 이를 실리카겔(Merck, 9385) 컬럼 크로마토그래피에 적용하여 ACAT에 저해활성이 있는 분획을 수득한 다음, 이를 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여 피리피로펜 S를 제조하였다. 이때, 피리피로펜 S의 생산성은 배양액 1L 당 3 mg이었다.(실시예 1).

[0027] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 피리피로펜 S를 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0028] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 피리피로펜 S는 ACAT에 대한 저해활성을 나타내므로, ACAT의 관여에 의하여 유발되는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로서 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 용어 "심혈관계 질환(cardiovascular disease)"이란, 심장과 주요 동맥에 발생하는 질환을 의미한다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 심장과 주요 동맥에 발생하는 질환이 될 수도 있고, 바람직하게는 피리피로펜 S에 의하여 예방 또는 치료될 수 있는 심장과 주요 동맥에 발생하는 질환이 될 수 있으며, 보다 바람직하게는 심근장애, 원발성 심장정지, 허혈성 심부전, 고혈압, 허혈성 심장 질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 죽상경화증, 부정맥 등이 될 수 있고, 가장 바람직하게는 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia), 고지혈증(hyperlipidemia), 아테롬성 동맥경화증(atherosclerosis), 동맥경화증(arteriosclerosis), 관상 동맥경화증(coronary arteriosclerosis), 대동맥류(aortic aneurysm) 등이 될 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 에릭슨(Ericson)의 방법을 변형시켜서 ACAT에 대한 피리피로펜 S(실험군)의 활성 저해 효과를 공지된 ACAT 저해제인 피리피로펜 A(대조군)의 것과 비교한 결과, 대조군인 피리피로펜 A의 ACAT의 활성을 50 % 저해하는 IC50값은 0.294 μ M이고, 피리피로펜 S의 ACAT의 활성을 50 % 저해하는 IC50값은 14.25 μ M임을 확인하였다(도 1 및 도 2).

[0032] 따라서, 본 발명에서 제공하는 피리피로펜 S는 종래의 ACAT의 억제제로 사용된 피리피로펜 A 보다는 ACAT에 대한 활성을 억제하는 수준이 낮지만, ACAT에 대한 활성억제제로서 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0033] 본 발명의 피리피로펜 S를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용

액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에 따른 약학 조성물에 포함된 상기 피리피로펜 S의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 10 중량%의 함량으로 포함할 수 있다.

[0035] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[0036] 본 발명의 약학조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 상기 피리피로펜 S를 포함하는 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 10 내지 100 mg/kg, 보다 바람직하게는 10 내지 30 mg/kg으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 내지 3회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.

[0037] 상술한 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 피리피로펜 S를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 심혈관계 질환이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0038] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 피리피로펜 S는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있으므로, 상기 약학 조성물은 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 심혈관계 질환이 발병될 가능성이 있거나, 또는 발병된 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 심혈관계 질환을 완화 또는 치료할 수 있다.

[0040] 본 발명의 용어 "완화"란, 본 발명에 따른 조성물의 투여로 심혈관계 질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0041] 본 발명의 용어 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0042] 본 발명의 심혈관계 질환을 치료하는 방법에 있어서, 상기 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의

장치에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 피리피로펜 S는 ACAT에 대한 저해활성을 나타내어, 동맥경화 병변의 진전에 관여하는 콜레스테롤에 아실기 전이를 억제할 수 있으므로, 동맥경화증, 고지혈증 등의 심혈관계 질환의 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 전개된 피리피로펜 A와 피리피로펜 S의 반응액을 전개한 TLC를 나타내는 사진이다.
 도 2는 피리피로펜 A와 피리피로펜 S의 처리농도에 따른 ACAT 저해활성의 변화를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 실시예 1: ACAT에 저해활성을 나타내는 활성성분의 생산

[0047] 공지된 방법에 의하여 페니실리움 그리세오폴범 F1959(*Penicillium griseofulvum* F1959)(KCTC 0387BP)를 배양하였다(특허등록 제264392호). 구체적으로, 페니실리움 그리세오폴범 F1959를 돌출판(baffle)이 4개 달린 1 리터 삼각플라스크의 멸균된 100 ml 중균배지(0.5% 포도당, 0.7% 이스트 추출물, 0.1% 인산칼륨, 0.05% 황산마그네슘 칠배결정수, pH 5.8)에 접종하여 29℃에서 48시간 동안 분당 150회전 속도로 진탕 배양하였다. 배양된 중균 20 ml를 돌출판(baffle)이 1개 달린 5 리터 삼각플라스크의 멸균된 1 리터 생산배지(2% 가용성 전분, 0.4% 소이톤, 0.3% 파마미디아, 0.1% 인산칼륨, 0.05% 황산마그네슘 칠배결정수, 0.3% 탄산칼슘, 0.2% 식염, 멸균하기 전 pH 6.0)에 접종하여 29℃에서 120시간 동안 분당 150회전 속도로 진탕 배양하였다.

[0048] 이어, 상기 배양물에 동량의 에틸 아세테이트를 첨가하여 1시간동안 추출하고 유기용매층을 수득한 다음, 이를 감압 농축하여 갈색유상의 조 추출물을 수득하였다.

[0049] 상기 수득한 조 추출물을 실리카겔(Merck, 9385) 컬럼 크로마토그래피에 적용하고, 실리카겔 4배 부피의 클로로포름-메탄올액(99:1, 98:2, 97:3, 95:5, V/V)으로 분액하여 ACAT에 저해활성이 있는 분액의 유기용매층을 얻고 이를 감압 농축하여 유상의 황갈색 물질을 수득하였다.

[0050] 상기 수득한 유상의 황갈색 물질을 고속 액체 크로마토그래피에 적용하였다. 이때, 고속 액체 크로마토그래피 칼럼으로는 와이엠씨(YMC)사의 ODS column(20 x 250 mm)을 사용하였고, 검출기으로는 자외선검출기(322 nm)를 사용하였으며, 용출용매로는 아세토나이트릴/물(55:45, v/v)의 혼합용매를 사용하였고, 용출속도는 분당 6ml이었다. 그 결과, 11.5분 경에 활성성분을 분리하였고, 이를 감압농축하여 무색의 작은 침상 결정의 물질을 수득하였다. 상기 활성물질의 생산량은 배양액 1L 당 3 mg이었다.

[0051] 실시예 2: 활성성분의 동정

[0052] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 수득한 ACAT 활성저해물질을 동정하기 위하여, 자외선-가시광선 분광, 적외선 흡광, 질량분석, 핵자기공명의 기기분석을 수행하였다.

[0053] 먼저, 자외선-가시광선 흡광도 분석은 완전히 정제된 활성물질을 100% 메탄올에 녹여 자외선-가시광선 분광기

(Shimadzu사, UV-265)를 이용하여 흡수과장을 분석함으로써 수행하였다. 그 결과, 메탄올 용액에서 UV 극대값이 238nm(208,000) 및 322nm(137,000)의 극대 흡광치를 나타냄을 확인하였다.

[0054] 다음으로, 적외선(IR)흡광도 분석은 활성물질 시료 2 mg을 클로로포름에 녹여 AgBr 창에 바른 후 건조하여 비올 기록 적외선 분광기(Bio-Rad Digilab Division, FTS-80)로 분석함으로써 수행하였다. 그 결과, 1740cm⁻¹와 1702cm⁻¹에서 흡수피크가 관찰되었으므로 분자구조에 COO그룹의 존재를 추정할 수 있었다.

[0055] 또한, 질량 분석은 VGZAB-7070 질량분석기를 이용하여 수행하였다. 그 결과, 활성물질의 분자량은 541이고, 분자식은 C₂₉H₃₅NO₉인 것으로 추정되었다.

[0056] 아울러, 핵자기공명(NMR) 분석은 활성물질 시료 10 mg을 완전히 건조시킨 후 CDCl₃에 녹여 5 mm NMR 튜브에 넣고 핵자기공명 분석기(Varian Unity-400)에 적용하여 수행하였다. 이때, ¹H-NMR은 400 MHz로, ¹³C-NMR은 100 MHz로 측정하였다.

[0057] 끝으로, DEPT와 HMQC 스펙트럼으로 수소와 연결된 탄소의 형태와 위치를 부분적으로 추정하였고, ¹H-¹H COSY실험을 통하여 물질의 부분구조를 추정하였으며 HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Correlation) 시험을 통하여 물질구조 중의 다른 탄소와 수소결합 형태를 추정하였다.

[0058] 상기 각각의 분석결과를 종합하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다:

[0059] 활성물질의 구조에는 수소가 35개, 탄소가 29개의 존재가 추정되었으며, DEPT실험에서 구성된 탄소들은 5개의 메틸, 5개의 메틸렌, 1개의 옥시메틸렌, 2개의 메틴, 4개의 옥시메틴, 3개의 쿼터너리 탄소, 5개의 sp² 메틴, 4개의 sp² 쿼터너리 탄소, 3개의 카르보닐의 형태로 추정되었다.

[0060] ¹H-NMR결과에서 δ 7.41 (dd), δ 8.10 (ddd), δ 8.69 (dd) and δ 9.00 (d)구조에서 전형적으로 나타나는 존재로 물질구조 중에 피리딘 환곳이 치환된 부분구조의 존재가 추정되었다. δ 4.79(1-H)와 δ 1.84, (2-Ha) δ 1.187(2-Hb)와 δ 1.26(3-Ha), δ 2.15 (3-Hb)와 연관이 있는 것으로 나타났으며, δ 1.62 (8-Ha), δ 1.84 (8-Hb)와 δ 3.82 (7-H)와 δ 1.50 (9-H)연관이 있는 것으로 나타났으며, δ 1.46(5-H)와 δ 4.98(13-H)가 연관있는 것으로 나타났다.

[0061] ¹H-NMR을 측정한 결과 고 자장영역(δ 1.10 - 1.90)에서 많은 신호들이 서로겹쳐진 상태로 나타나 나타난 그대로는 각각의 위치들이 어디에 연결된 상태인지 추정할 수 없어 DSPDS(differential selective proton decoupling spectra)로 양자의 연결 상태를 추정하였는데 δ 4.79 (1-H)와 δ 2.15 (3-Hb)을 조사하면 δ 1.36 (3-Ha)과 δ 1.84 (2-Ha), δ 1.87 (2-Hb)의 신호가 관련되는 것으로 보아 물질구조 중에 O-CH-CH₂-CH₂-의 부분구조가 추정되었고, δ 1.46 (5-H)와 δ 2.19 (13-OH)을 조사하면 δ 4.98 (13-H) 신호가 관련되는 것으로 보아 물질구조 중에 -CH-CH-OH의 부분구조가 추정되었으며, δ 1.62 (8-Ha)와 δ 1.84 (8-Hb)을 조사하면 δ 3.82 (7-H)과 δ 1.50 (9-H)의 신호가 관련되는 것으로 보아 물질구조 중에 O-CH-CH₂-CH-의 부분구조가 추정되었다. 부분구조들의 연결상태를 알아보기 위하여 HMBC시험을 통하여 물질구조 중의 다른 탄소와 수소결합 형태를 추정하였는데 δ 6.50 (5'-H)의 메틴양자(methine proton)가 δ 103.14 (C-3'), δ 127.19 (C-3''), δ 157.42 (C-6'), δ 162.26 (C-4')의 네 탄소와 관련이 있는 것으로 나타났고, 이로부터 두 위치가 치환된 6-(3-pyridyl)-α-pyrone의 존재가 추정되었다.

[0062] 9-H 에서 11-H 수소들은 ¹H-¹H COSY에서 5-H (δ 1.45)의 신호들과 원거리에서 관련 신호가 나타났고, C-11 (δ

60.27)은 δ 54.27 (C-9)과 연결 관련신호가 나타났으므로 탄소의 위치가 인접해 있는 것으로 나타났다. $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 원거리 관련 실험에서 11-H (δ 4.99)는 C-13 (δ 162.28), C-16 (δ 164.00), C-12 (δ 103.17)와 관련신호가 나타났으므로 메틸렌 탄소가 C-12 탄소에 결합되어 있는 형태로 이는 물질의 부분구조 중에 테르펜(terpene)구조와 α -피론(α -pyrone)이 결합된 형태의 존재가 추정되었다. ^1H -1H COSY 와 HMBC결과에서 C-9탄소는 $\text{>C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ 의 부분과 결합하고 있는 것으로 추정되었다.

[0063]

그리고, δ 0.91 (15-H3)의 methyl기는 δ 40.44 (C-10), δ 45.28 (C-9) δ 65.09 (C-8), δ 73.51 (C-1)탄소와 관련있는 것으로 나타났고, δ 1.41 (12-H3)의 methyl기는 δ 36.11 (C-3) δ 38.05 (C-4), δ 54.28(C-5), δ 45.28 (C-9) 탄소와 관련있는 것으로 나타났으며, δ 1.45(14-H3)의 methyl기는 δ 54.28 (C-5), δ 77.63 (C-7) δ 85.46 (C-6)탄소와 관련있는 것으로 나타 있는 것으로 부터 물질구조에 sesquiterpene의 존재가 추정되었다. 그리고 HMBC에서 δ 4.98 (13-H)의oxymethine은 δ 164(C-2'), δ 103.14 (C-3'), δ 162.26 (C-4') 관련있는 것으로 나타나 구조 중에 알파 피론과 세스키테르펜의 구조를 갖는 것으로 추정되었다. 그 결과들을 표 2에 나타내었고 이상의 결과와 활성물질의 수소-수소 연관관계, 수소-탄소 연관관계, HMBC결과들을 종합하여 활성물질의 구조를 결정하였다.

[0064]

본 발명의 활성물질은 공지된 피리피로펜 류 화합물(Tomoda H. et al., J. Antibiotics. 1996, 49, 3. 292-298)의 구조와 유사하여 활성물질 구조에 피리딘(pyridine), α -피론(α -pyrone) 및 세스키테르펜(sesquiterpene)으로 이루어져 있으며 여러 가지 기기분석 결과와 수소-탄소 연관관계와 HMBC결과들을 종합하여 활성물질의 구조를 결정하고 구조 중에 피리딘기와 피론과 테르펜으로 이루어졌으므로 화합물을 "피리피로펜 S(pyripyropene S)"라고 명명하였다.

표 2

[0065]

NMR 분석결과(^1H 400MHz, ^{13}C 100MHz)

	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
C-1	73.51	4.79 (1H, dd)
C-2	22.69	1.84, 1.87 (2H, m)
C-3	36.11	1.36, 2.15 (2H, m)
C-4	38.05	
C-5	54.28	1.46 (1H, m)
C-6	85.46	
C-7	77.63	3.82 (1H, m)
C-7-OH		3.48
C-8	27.40	1.62, 1.84 (2H, m)
C-9	45.28	1.50 (1H, m)
C-10	40.44	
C-11	65.09	3.78, 3.80(2H, d)
C-12	17.58	1.42 (3H, s)
C-13	60.28	4.98 (1H, m)
C-13-OH		2.91 (1H, br.s)
C-14	15.39	1.66 (3H, s)
C-15	13.09	0.90 (3H, s)
1-O-CO-CH ₃	20.89	2.04 (3H, s)
1-O-CO-CH ₃	170.55	
11-O-CO-CH ₃	21.15	2.05 (3H, s)
11-O-CO-CH ₃	170.55	
C-2'	164.00	
C-3'	103.14	

C-4'	162.26	
C-5'	99.31	6.50 (1H, s)
C-6'	157.42	
C-2"	146.79	9.00 (1H, d)
C-3"	127.19	
C-4"	132.89	8.10 (1H, ddd)
C-5"	123.69	7.41 (1H, dd)
C-6"	151.59	8.69 (1H, dd)

실시예 3: ACAT 저해효과 분석

피리피로펜 S의 ACAT에 대한 활성 저해 효과를 에릭슨(Erickson)의 방법을 변형시킨 방법에 의하여 분석하였다 (Erickson, S. K., et al., J. Lipid Res, 1980, 21, 930-9418). 구체적으로, ACAT 효소원으로서 흰쥐의 간으로부터 부분 정제한 마이크로솜을 수득하고, 상기 마이크로솜, 아세톤에 용해시킨 콜레스테롤 및 아세톤에 용해시킨 트리톤(Triton) WR-1339의 혼합물을 물에 가하여 현탁시켰으며, 이에 질소가스를 가하여 상기 현탁액으로부터 아세톤을 제거하였다. 이어, 상기 현탁액에 칼륨-인산 완충액(K-phosphate buffer, pH 7.4, 최종농도 0.1 M)과 30 μM 소 혈청단백질(BSA)을 첨가하고, DMSO에 용해시킨 피리피로펜 A(대조군) 또는 피리피로펜 S(실험군)를 10 μl 가한 다음, 37°C에서 30분 동안 흔들어주면서 1차 반응시켰다. 상기 1차 반응시킨 반응물에, 기질인 0.04 μCi의 [1-14C]올레오일-코에이(oleoyl-Coenzyme A)를 가하고, 37°C에서 30분 동안 흔들어주면서 2차 반응시킨 다음, 상기 반응물에 이소프로판올-헵탄(isopropanol-heptane) 1 ml를 가하여 반응을 정지시켰다.

상기 반응이 정지된 반응물에 노말 헵탄 0.6 ml와 KPB 완충액 0.4 ml를 가하고, 혼합 및 정치시켜서, 상층액을 분액시키고, 이로부터 상층액을 수득하였다. 상기 수득한 상층액을 실리카겔 TLC판에 점적하고, 전개용매(페트롤리움, 에틸-에틸 및 에틸-초산, 90:10:1)를 사용하여 TLC를 전개시켰으며, 상기 TLC에 전개된 콜레스테릴 에스터의 양을 Bio imaging analyzer(Fuji BAS-8000)를 사용하여 측정하였다. 상기 측정된 콜레스테릴 에스터의 양을 분석하여 피리피로펜 A(대조군) 또는 피리피로펜 S(실험군)의 ACAT 저해활성을 분석하였다(도 1 및 도 2).

도 1은 전개된 피리피로펜 A와 피리피로펜 S의 반응액을 전개한 TLC를 나타내는 사진이고, 도 2는 피리피로펜 A와 피리피로펜 S의 처리농도에 따른 ACAT 저해활성의 변화를 나타내는 그래프로서, (●)는 피리피로펜 A를 나타내고, (▲)는 피리피로펜 S를 나타낸다. 도 1 및 2에서 보듯이, 대조군인 피리피로펜 A의 ACAT의 활성을 50% 저해하는 IC50값은 0.294 μM이고, 피리피로펜 S의 ACAT의 활성을 50% 저해하는 IC50값은 14.25 μM임을 확인하였다.

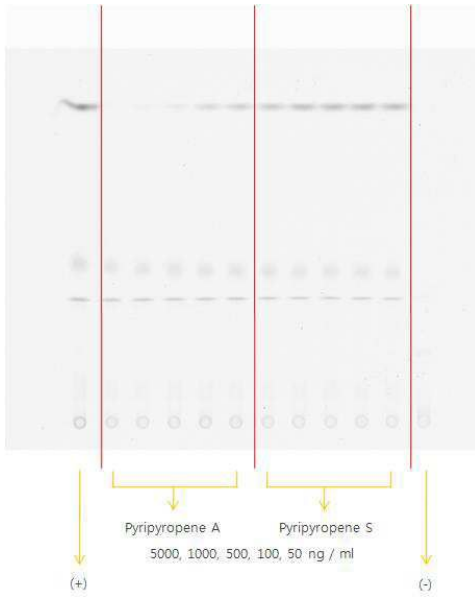
실시예 4: 급성독성 시험

피리피로펜 S의 in vivo 급성독성 실험을 수행하였다.

구체적으로, 피리피로펜 S를 각각 체중이 25 g 정도의 ddY 마우스의 복강에 200 mg/kg 용량으로 주사한 결과, 투여 30분이 경과된 시점에서는 활동량이 조금 감소하였으나, 투여 2시간이 경과된 시점에서는 이런 증상이 나타나지 않았고, 투여 7일이 경과된 시점까지 사망한 개체가 발생되지 않았으므로, 피리피로펜 S에 대한 급성독성은 200 mg/kg 용량까지는 없는 것으로 판단되었다.

도면

도면1



도면2

