



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0123211
(43) 공개일자 2018년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
C07C 235/34 (2006.01) C07D 209/14 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) C12P 13/02 (2006.01)
C12P 17/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0071 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0135168(분할)
(22) 출원일자 2018년11월06일
심사청구일자 2018년11월06일
(62) 원출원 특허 10-2017-0030241
원출원일자 2017년03월09일
심사청구일자 2017년03월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박제원
경기도 고양시 일산동구 위시터1로 7, 504동 904호 (식사동, 위시터블루밍5단지아파트)
김별
경기도 안양시 동안구 경수대로883번길 33, 105동 1002호 (비산동, 비산한화꿈에그린아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

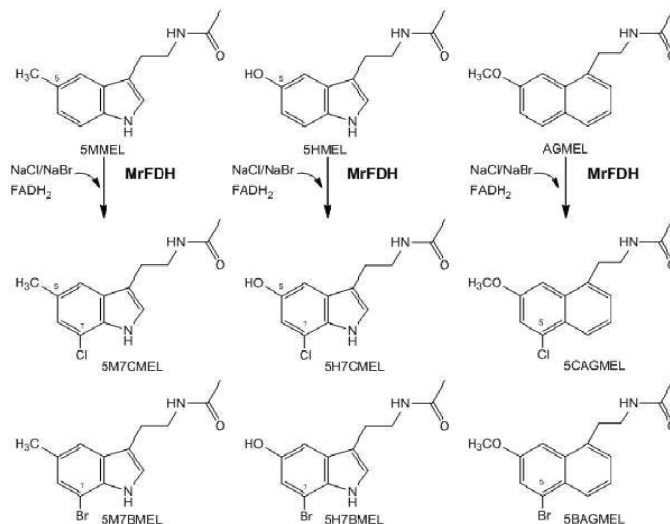
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 플라빈-의존형 할로게나아제 및 이를 이용한 할로젠화 인돌 화합물의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 제조합 플라빈-의존형 할로기나아제(MrFDH)를 이용하여 할로젠화 인돌 화합물의 제조에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 멜라토닌 수용체에 대하여 길항(antagonist) 활성을 가지는 신규한 할로젠화 인돌 화합물의 효소적 제조에 관한 것이다. 본 발명에 따른 제조합 플라빈-의존형 할로게나아제(MrFDH)를 이용하여 효소적 생전환된 할로젠화 인돌 유도체 화합물은 멜라토닌 수용체에 대한 결합력 향상 및 포도막 흑색종에 대한 항종양 활성을 나타내므로, 수면 장애 및 불면증 관련 질환 또는 포도막 흑색종과 같은 희귀성 안암 치료용 의약 조성물로 매우 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07C 235/34 (2013.01)

C07D 209/14 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

C12P 13/02 (2013.01)

C12P 17/10 (2013.01)

(72) 발명자

이재우

서울특별시 은평구 가좌로 344, 113동 1304호 (신사동, 현대아파트)

임주현

경기도 용인시 기흥구 구성로 470, 401동 704호 (청덕동, 물푸레마을4단지경남아너스빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01317901

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청 시스템합성농생명공학사업단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 시스템합성생물학 기반 피부 미백 당부가 단순 페놀릭 소재 생산 최적화

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

5-클로로-아고멜라틴(5-chloro-agomelatine), 5-브로모-아고멜라틴(5-bromo-agomelatine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 2

제1항의 화합물을 유효성분으로 함유하는 수면장애 또는 불면증의 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항의 화합물을 유효성분으로 함유하는 수면장애 또는 불면증의 개선 또는 예방용 식품.

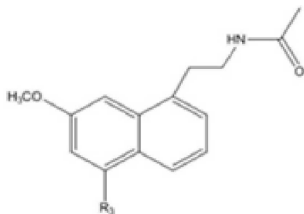
청구항 4

다음 단계를 포함하는 제1항의 화합물의 제조방법:

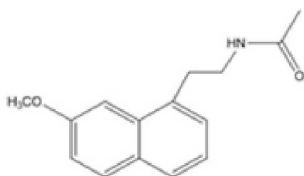
(a) 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 (MrFDH) 존재하에 하기 화학식 4로 표시되는 인돌 화합물과 할로젠 이온 공여체를 반응시켜 화학식 2로 표시되는 할로겐화 인돌 유도체를 생성시키는 단계; 및

(b) 상기 합성된 할로겐화 인돌 유도체를 회수하는 단계.

[화학식 2]



[화학식 4]



상기 식에서, R₃는 클로로 (chloro) 또는 브로모(bromo)이다.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 (b) 단계는 역상 C18 고정상, 아세토니트릴:물:포름 산 75:25:0.1(v/v/v) 혼합액 이동상, 및 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)를 이용하여 15-21분 유지시

간(Retention time) 조건에서 검출하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 인돌 화합물은 AGMEL(agomelatine)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 할로젠 이온 공여체는 염화나트륨 또는 브롬화나트륨인 것을 특징으로 하는 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 재조합 플라빈-의존형 할로게나아제(MrFDH)를 이용하여 할로겐화 인돌 화합물의 제조에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 멜라토닌 수용체에 대하여 길항(antagonist) 활성을 가지는 신규한 할로겐화 인돌 화합물의 효소적 제조에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 할로겐화는 기존 화합물에 신규한 또는 향상된 생물학적 활성 및 약학적 효율을 부가할 수 있을 뿐만 아니라, 이후의 추가적인 유기화학 치환에 대한 실마리를 제공할 수 있다. 할로겐화 유기 화합물들은 현재 화학 및 농업 산업 그리고 제약산업에 널리 활용되고 있으며 특히 금속촉매를 통한 탄소 짝지음 화학반응에 있어서 중요한 구조단위(building block)이다(Frese M *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl.* 54(1):298-301, 2015). 이와 같이 할로겐화 화합물은 유기 합성에서 널리 사용됨에도 불구하고, 복잡한 할로겐화 화합물의 합성은 여전히 쉽지가 않다.
- [0004] 전통적인 유기 화학적 할로겐화는 대체로 환경 친화적이지 않은 유해한 공정으로 격렬한 반응 조건을 요구하는 동시에 독성이 강한 시약 및 용매를 사용한다. 나아가, 이 반응을 통한 생성물의 경우 하나 이상의 이성질체와 원치 않는 부산물이 동시에 생성되어 추가적인 정제 공정이 요구된다(Alonso F *et al.*, *Chem Rev.* 102(11):4009-4091, 2002). 따라서, 유기화학 합성법의 대안일 수 있는 효소적 촉매 즉 생물학적 할로겐화는 그 반응 조건이 생체 반응과 유사한 조건이므로 보다 환경 친화적일 수 있으며, 또한 유기합성법에 비하여 효소가 가진 높은 위치 특이성(regio-specificity)과 입체 특이성(stereo-specificity)은 반응 후 부산물의 생성을 최소화 할 수 있다.
- [0005] 할로겐화를 촉매하는 효소는 크게 2가지 그룹으로 분류될 수 있다(Wagner C *et al.*, *J Nat Prod.* 72(3):540-553, 2009). 우선, 할로페록시다제(haloperoxidase)는 1960년대에 발견된 첫 할로겐화 효소로서 조효소(cofactor)로 과산화수소(hydrogenperoxide)를 이용한다. 반면, 위치 특이적으로 할로겐화 반응을 촉매하는 동시에 조효소로 환원된 형태의 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드(flavine adenine dinucleotide, 이하 FADH₂)를 필요로 하는 플라빈-의존형 할로게나아제(flavin-dependent halogenase, 이하 FDH)가 있다. 특히 아미노산의 일종인 트립토판(tryptophan)을 기질로 하여 할로겐 원소를 부가하는 트립토판 할로게나아제는 FDH 그룹에서 가장 최초로 보고되었고 다양한 미생물에 존재하는 것으로 알려져 있다(Payne JT *et al.*, *Methods Enzymol.* 575:93-126, 2016). 그러나, FDH는 그 활성을 위해 할로겐화 이온과 산소 분자 그리고 조효소로 FADH₂를 필요로 하며, 대체로 위치특이적인 활성을 보이고 있어서 다양한 할로겐화 화합물의 생합성에 활용하기에는 한계가 있다. 따라서, 넓은 범위의 기질에 대하여 할로겐화가 가능한 신규한 FDH의 발견 혹은 기존 FDH를 단백질 공학(protein engineering)화하여 기질에 대한 특이성을 확장시킨 기질 유연성(flexibility)이 있는 FDH가 필요하다.
- [0006] 한편, 트립토판은 그 화학구조가 이환형(hetero-aromatic)의 인돌(indole) 골격(scaffold)을 포함하고 있으므로, 인돌 골격을 지닌 화합물은 FDH 효소의 기질로서 할로겐화될 수 있다. 멜라토닌(N-acetyl-5-methoxy tryptamine 혹은 melatonin)은 인돌 골격을 포함하고 있는 트립토판 유래 신경호르몬(neurohormone)으로 우리

인체 내 활동일주기(circadian rhythm)의 조절에 관여하는 생체리듬조절제(chronobiotic)로서 수면장애(sleep disorder), 신경변성질환(neurodegenerative disease), 암 및 뇌졸중(stroke) 등의 질환과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Hardeland R *et al.*, *Int J Biochem Cell Biol.* 38(3):313-316, 2006). 또한, 멜라토닌과 그 대사체인 6-히드록시멜라토닌(6-hydroxymelatonin) 그리고 6-클로로멜라토닌(6-chloromelatonin)은 수면 및 불면증 관련 약리적 활성 이외에도 인간 안암(ocular cancer)의 일종인 전이성 포도막 흑색종(uveal melanoma) 세포주를 대상으로 용량 의존적으로 그 성장을 억제하는 항종양 활성이 보고된 바 있다(Hu DN *et al.*, *Melanoma Res.* 8:205-210, 1998). 하지만 멜라토닌은 극단적으로 짧은 생체 내 반감기와 낮은 경구 생체이용률(bioavailability) 그리고 밝혀지지 않은 다양한 기작 때문에 치료제로서의 이용은 제한되고 있으며, 미국과 캐나다 등 일부 국가에서만 식품 보충제로서 판매되고 있다(Altun A *et al.*, *Int J Clin Pract.* 61(5):835-845, 2007).

- [0007] 따라서, 신규한 FDH 또는 다양한 기질에 대한 반응 유연성이 있는 신규한 FDH의 발견은 인돌 골격 포함 화합물을 대상으로 특정 할로젠 원소를 부가하여 신규한 구조의 할로겐화 화합물 라이브러리의 개발할 수 있을 뿐만 아니라, 수면장애와 불면증 등의 치료제 및 전이성 안암 대상 항종양 활성 화합물로 활용되고 있는 멜라토닌 유도체들의 구조적 다양성 제시 및 새로운 생리 활성을 추가적으로 제공할 수 있다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 할로겐화된 신규한 구조의 멜라토닌 유도체 제조 및 그 유도체들의 멜라토닌 수용체에 대한 길항활성을 향상시키고자 예의 노력한 결과, 재조합 FDH 효소를 이용하여 멜라토닌 수용체에 대한 길항활성이 우수한 동시에 포도막 흑색종 세포주를 대상으로 한 항종양 활성을 지닌 신규한 할로겐화 인돌 화합물인 멜라토닌 유도체를 제조할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

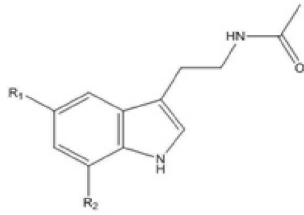
해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 (MrFDH) 및 상기 재조합 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 (MrFDH)의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 (MrFDH)를 이용한 할로겐화 인돌 유도체의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 할로겐화 인돌 유도체 화합물을 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 (MrFDH)에 의해 제조된 할로겐화 인돌 유도체 화합물을 함유하는 수면장애 또는 불면증 치료용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 (MrFDH)에 의해 제조된 할로겐화 인돌 유도체 화합물을 함유하는 포도막 흑색종과 같은 회귀성 안암 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

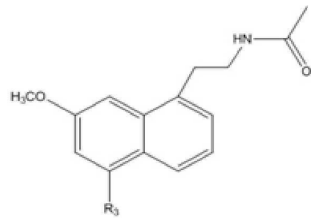
- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 (MrFDH)를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 플라빈-의존형 할로게나아제 효소의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 (MrFDH)의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 할로겐화 인돌 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] [화학식 2]

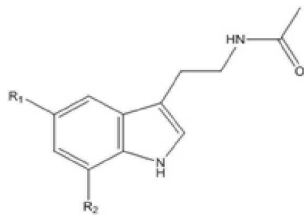


[0024]

[0025] 상기 식에서, R₁은 히드록시(hydroxy), 메틸(methyl) 또는 메톡시(methoxy)이며, R₂와 R₃는 클로로(chloro) 또는 브로모(bromo)이다.

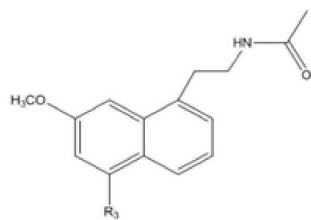
[0026] 본 발명은 또한, 상기 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 (MrFDH) 존재하에 하기 화학식 3 또는 화학식 4로 표시되는 인돌 화합물과 할로젠 이온 공여체를 반응시켜 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 할로겐화 인돌 유도체를 생합성 시키는 단계; 및 상기 합성된 할로겐화 인돌 유도체를 회수하는 단계를 포함하는 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 할로겐화 인돌 유도체의 제조방법을 제공한다.

[0027] [화학식 1]



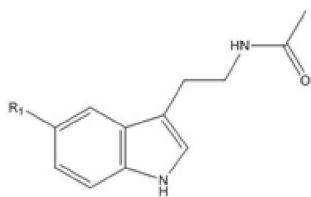
[0028]

[0029] [화학식 2]



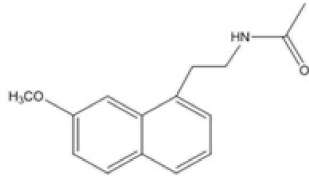
[0030]

[0031] [화학식 3]



[0032]

[0033] [화학식 4]



[0034]

[0035] 상기 식에서, R₁은 히드록시(hydroxy), 메틸(methyl) 또는 메톡시(methoxy)이며, R₂와 R₃는 클로로(chloro) 또는 브로모(bromo)이다.

[0036] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 수면장애 또는 불면증의 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 수면장애 또는 불면증의 개선 또는 예방용 식품을 제공한다.

[0038] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 안암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0039] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 안암의 개선 또는 예방용 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0041] 본 발명에 따른 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 재조합 플라빈-의존형 할로게나아제(MrFDH)를 이용하여 효소적 생전환된 할로겐화 인돌 유도체 화합물은 멜라토닌 수용체에 대한 결합력이 향상 및 포도막 흑색종에 대한 항종양 활성을 나타내므로, 수면 장애 및 불면증 관련 질환 또는 포도막 흑색종과 같은 희귀성 안암 치료용 의약 조성물로 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 재조합 MrFDH 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 반응에 의한 인돌 화합물의 할로겐화 멜라토닌 유도체로의 생전환을 나타낸 것이다.

도 2는 생전환된 할로겐화 인돌 유도체인 할로겐화 멜라토닌 유도체의 멜라토닌 수용체 hMT1에 대한 결합력을 확인한 것이다.

도 3은 생전환된 할로겐화 인돌 유도체인 할로겐화 멜라토닌 유도체의 멜라토닌 수용체 hMT2에 대한 결합력을 확인한 것이다.

도 4는 생전환된 할로겐화 인돌 유도체인 할로겐화 멜라토닌 유도체의 인간 유래 포도막 흑색종 세포주에 대한 항종양 활성을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0046] 본 발명에서는 토양 방선균의 일종인 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주 유전체로부터 유전체(genome)로부터 플라빈-의존형 할로게나아제(FDH) 암호화 후보 오픈 리딩 프레임(open reading frame)들을 분리하고, 스크리닝된 FDH 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 형질전환 대장균을 제작한 다음, 재조합 플라빈-의존형 할로기

나아제 효소 MrFDH를 제조하였다. 이후, 상기 재조합 플라빈-의존형 할로기나아제 효소 MrFDH와 5-데메톡시-5-메틸-멜라토닌(5-demethoxy-5-methyl-melatonin; 5MMEL), 5-데메톡시-5-히드록시-멜라토닌(5-demethoxy-5-hydroxy-melatonin; 5HMEL) 및 아고멜라틴(AGMEL)의 3종의 할로겐화 기질 및 할로겐 공여 이온을 위한 염화나트륨 혹은 브롬화나트륨을 반응시켜 신규한 할로겐화 인돌 유도체인 5-데메톡시-5-메틸-7-클로로-멜라토닌(5-demethoxy-5-methyl-7-chloro-melatonin; 5M7CMEL), 5-데메톡시-5-메틸-7-브로모-멜라토닌(5-demethoxy-5-methyl-7-bromo-melatonin; 5M7BMEL), 5-데메톡시-5-히드록시-7-클로로-멜라토닌(5-demethoxy-5-hydroxy-7-chloro-melatonin; 5H7CMEL), 5-데메톡시-5-히드록시-7-브로모-멜라토닌(5-demethoxy-5-hydroxy-7-bromo-melatonin; 5H7BMEL), 5-클로로-아고멜라틴(5-chloro-agomelatine; 5CAGMEL) 및 5-브로모-아고멜라틴(5-bromo-agomelatine; 5BAGMEL)을 생합성하였다. 이후 질량분석기와 핵자기 공명 스펙트로메트리(nuclear magnetic resonance spectrometry) 기기분석을 통하여 그 구조를 확인하는 한편, 인돌 화합물 구조 골격 내 염소와 브롬 등 할로겐 원소를 부가된 인돌 유도체인 신규한 할로겐화 멜라토닌 유도체들의 멜라토닌 수용체에 대한 향상된 길항활성을 확인하였다.

- [0047] 본 발명은 인돌 화합물 구조 골격 내 할로겐 원소를 부가할 수 있는 재조합 FDH 효소를 이용하여 인비트로(in vitro) 반응을 실시함으로써 할로겐화 촉매 기능을 확인하고, 나아가 신규 FDH를 활용하여 화학적 유기 합성법이 아닌 효소적 생전환 방법을 통하여 할로겐화된 신규한 멜라토닌 유도체 제조 및 그 유도체들의 멜라토닌 수용체에 대한 길항활성을 비교하였다.
- [0048] 따라서, 본 발명은 일관점에서 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 플라빈-의존형 할로게나아제 효소(MrFDH)에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 균주 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0051] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합 미생물을 배양하여 플라빈-의존형 할로게나아제 효소의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 플라빈-의존형 할로게나아제 효소(MrFDH)의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0055] 본원에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [0056] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 칼슘 클로라이드 방법 또는 전기천공법(electroporation) (Neumann, *et al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 등을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현벡터가 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 벡터는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a, pET-22b(+) 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 대장균에 형질전환 가능한 다양한 벡터를 사용할 수 있다.
- [0057] 염기서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)" 된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식의

로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0058] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합백터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합백터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0059] 상술한 재조합 백터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.

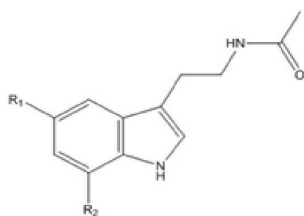
[0060] 물론 모든 백터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 백터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 백터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 백터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 백터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 백터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.

[0061] 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기와 같이 재조합 백터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.

[0062] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작 방법을 사용할 수 있으며, 일례로는 레트로바이러스 백터, 아데노바이러스 백터, 아데노-연관 바이러스 백터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 백터, 폭스바이러스 백터, 렌티바이러스 백터 또는 비바이러스성 백터를 이용하는 방법을 들 수 있다.

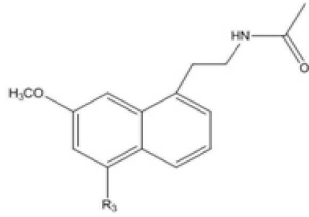
[0064] 본 발명은 또 다른 관점에서, 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 할로젠화 인돌 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다.

[0065] [화학식 1]



[0066]

[0067] [화학식 2]



[0068]

[0069] 상기 식에서, R₁은 히드록시(hydroxy), 메틸(methyl) 또는 메톡시(methoxy)이며, R₂와 R₃는 클로로(chloro) 또는 브로모(bromo)이다.

[0070] 본 발명에 있어서, 상기 할로겐화 인돌 유도체는 5-데메톡시-5-메틸-7-클로로-멜라토닌(5-demethoxy-5-methyl-7-chloro-melatonin), 5-데메톡시-5-메틸-7-브로모-멜라토닌(5-demethoxy-5-methyl-7-bromo-melatonin), 5-데메톡시-5-히드록시-7-클로로-멜라토닌(5-demethoxy-5-hydroxy-7-chloro-melatonin), 5-데메톡시-5-히드록시-7-브로모-멜라토닌(5-demethoxy-5-hydroxy-7-bromo-melatonin), 5-클로로-아고멜라틴(5-chloro-agomelatine) 또는 5-브로모-아고멜라틴(5-bromo-agomelatine)인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

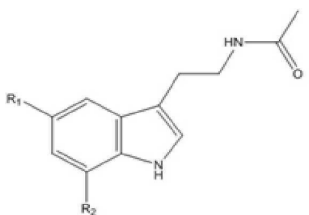
[0071] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1 또는 2의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 아세트산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 황산을 사용할 수 있다.

[0072] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1 또는 2의 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 포함한다.

[0073] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1 또는 2의 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 화합물이 결정 형태로 제조될 경우, 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다.

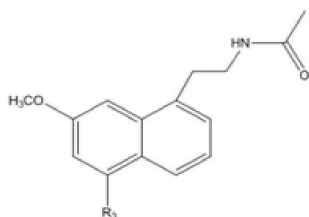
[0074] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 제1항의 플라빈-의존형 할로게나아제 효소(MrFDH) 존재하에 하기 화학식 3 또는 화학식 4로 표시되는 인돌 화합물과 할로젠 이온 공여체를 반응시켜 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 할로겐화 인돌 유도체를 생합성 시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 할로겐화 인돌 유도체를 회수하는 단계를 포함하는 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 할로겐화 인돌 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

[0075] [화학식 1]



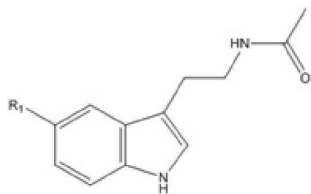
[0076]

[0077] [화학식 2]



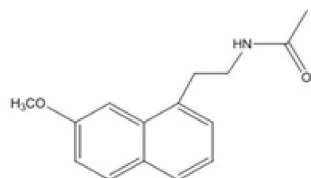
[0078]

[0079] [화학식 3]



[0080]

[0081] [화학식 4]



[0082]

[0083] 상기 식에서, R₁은 히드록시(hydroxy), 메틸(methyl) 또는 메톡시(methoxy)이며, R₂와 R₃는 클로로(chloro) 또는 브로모(bromo)이다.

[0084] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 역상 C18 고정상, 아세토니트릴:물:포름산 75:25:0.1(v/v/v) 혼합액 이동상, 및 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)를 이용하여 15-21분 유지시간(Retention time) 조건에서 검출하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0085] 본 발명에 있어서, 상기 인돌 화합물은 5MME(5-demethoxy-5-methyl-melatonin), 5HME(5-demethoxy-5-hydroxy-melatonin) 또는 AGME(agomelatine)인 것이 바람직하여, 상기 할로겐 이온 공여체는 염화나트륨 또는 브롬화나트륨인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0086] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 (MrFDH)는 분리 정제된 플라빈-의존형 할로게나아제 효소, 즉 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 플라빈-의존형 할로게나아제 효소, 상기 효소를 발현하는 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물 및 상기 재조합 균주의 파쇄물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 상기 파쇄물은 상기 재조합 균주를 파쇄한 파쇄물 또는 상기 파쇄물을 원심분리하여 얻어진 상등액을 의미하는 것으로, 상기 재조합 균주로부터 생산된 효소 단백질을 포함하는 것이다. 본 명세서에 있어서, 별도의 언급이 없는 한, 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 제조에 사용되는 재조합 균주는 상기 균주의 균체, 상기 균주의 배양물 및 상기 균주의 파쇄물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 의미하는 것으로 사용된다.

[0088] 할로겐화(halogenation)는 의약품과 농약 산업의 제조상 중요한 공정 중 하나로서, 이들 중 25% 정도는 할로겐 원자들이 분자 내 부가되어 있다(Herrera-Rodriguez LN *et al.*, *Chem. Today* 29:31, 2011). 또한, 특정 화합물의 할로겐화는 그 화합물의 생물학적 활성에 큰 영향을 줄 수 있으며, 이에겐 항생제(antibiotics), 항암제(anticancer agent) 및 향정신성(psychoactive) 의약품 등이 포함될 수 있다(Williams PG *et al.*, *J Org Chem.* 70(16):6196-6203, 2005; Smith BM *et al.*, *J Med Chem.* 51(2):305-313, 2008; Bunders CA *et al.*, *J Am Chem Soc.* 133(50):20160-20163, 2011).

[0089] 또한, 2010년까지 약 5000 종 이상의 할로겐화 화합물들이 자연계에서 지속적으로 보고되어 있으며(Smith DR *et al.*, *Curr Opin Chem Biol.* 17(2):276-283, 2013), 이와 같은 할로겐화 천연물들의 지속적인 발견은 생합성에 내재된 할로겐화 관련 효소에 대한 관심을 확대시키며, 할로겐화 천연물들은 대부분 할로겐 원소 중 염소(chloride) 혹은 브롬(bromine)을 포함하며 일부의 경우에 요오드(iodine)이나 불소(fluorine)을 포함하는 천연물들이 확인되고 있다.

[0090] 한편, 인돌은 자연계 내 널리 분포되어 있어서, 여러 종의 세균에 있어서는 신호(signaling) 물질로 이용되어 세균의 병원성 및 항생제 내성 등의 메커니즘에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Lee JH *et al.*,

Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends Microbiol.* 23(11):707-718, 2015). 한편, 동 식물에 있어서는 산화적 스트레스(oxidative stress), 장내 염증(intestinal inflammation) 작용 및 호르몬(hormone)으로 작용하고 있다. 일부 식물 유래 Indole-3-carbinol과 3,3-diindolylmethane 등의 인돌 유도체들은 여러 종의 암세포에 대한 항암 활성을 나타내며(Biersack B *et al.*, Indole compounds against breast cancer: recent developments. *Curr Drug Targets.* 13(14):1705-1719, 2012), 특히, 인체 호르몬으로 트립토판 유사체라 할 수 있는 세로토닌(serotonin)과 멜라토닌(melatonin) 역시 주요 골격으로 인돌 구조를 포함하고 있다.

- [0091] 멜라토닌은 인체 내 존재하는 G-단백질 연관 수용체(G-protein coupled receptor)의 일종인 2종의 멜라토닌 수용체 MT1과 MT2에 작용함으로써 생체리듬 조절제로서 기능을 수행하는 것으로 알려져 있으며, 지난 20년 동안 다수의 멜라토닌 수용체 리간드(ligand)와 길항제(agonist)들이 개발되었다(Spadoni G *et al.*, Melatonin receptor agonists: new options for insomnia and depression treatment. *CNS Neurosci Ther.* 17(6):733-741, 2011). 이들은 멜라토닌 수용체에 결합하여 멜라토닌 수용체를 활성화 시키며, 이중 일부는 현재 임상에 이용되고 있다. 가령, 멜라토닌 구조 유도체로 화학 합성된 라멜테온(ramelteon, 브랜드명 Rozerem)은 다케다 제약회사(Takeda Pharmaceutical company)에서 개발되었다(유럽특허 EP 0885210 A1). 멜라토닌에 비하여 이 멜라토닌 유도체는 상기 2종의 멜라토닌 수용체들에 대해 보다 강한 결합력(binding affinity)를 제공하였고, 임상시험을 통하여 수면잠복기(sleep latency)를 낮추고 전체 수면 시간을 늘려주어 2005년에 불면증 치료제로 FDA 승인을 얻었다(Wurtman R. Ramelteon: a novel treatment for the treatment of insomnia. *Expert Rev Neurother.* 6(7):957-964, 2006). 그밖에, 아고멜라틴(agomelatine, 브랜드명 Valdoxan 혹은 Melitor)과 타시멜테온(tasimelteon, 브랜드명 Hetlioz) 역시 임상에 이용 중이며(US 5194614 A; WO 1998025606 A1), 이중 타시멜테온은 맹인 장애인들에게 발생할 수 있는 24시간 비수면 장애 치료제로 사용되고 있다. 최근에는 멜라토닌 수용체 길항제인 TIK-301과 piromelatine 또한 희귀질환치료제 및 후보신약으로 현재 임상시험 중에 있다(Rivara S *et al.*, Therapeutic uses of melatonin and melatonin derivatives: a patent review (2012 - 2014). *Expert Opin Ther Pat.* 25(4):425-441, 2015; Zisapel N. Current Phase II investigational therapies for insomnia. *Expert Opin Investig Drugs.* 24(3):401-411, 2015).
- [0093] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 할로젠화 인돌 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 수면장애 또는 불면증의 개선 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0094] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 할로젠화 인돌 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 안압의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 안압은 포도막 흑색종인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0096] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"이란 증상의 예방, 개선, 치료 또는 이러한 증상의 발현 지연을 포함하는 의미이며, "예방"은, 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 암 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 수면장애 및 불면증 등 질환과 포도막 흑색종과 같은 희귀성 안암 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0097] 본 발명의 상기 화학식 1 또는 2의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 인간 유래 멜라토닌 수용체에 대하여 일부 향상된 결합력을 나타내어, 수면장애 및 불면증 등 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0098] 본 발명의 상기 화학식 1 또는 2의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 인간 유래 포도막 흑색종 세포주에 대한 인비트로 항종양 활성을 나타내어, 포도막 흑색종과 같은 희귀성 안암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0099] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0100] 본 발명의 약학적 조성물은 표준 약학적 실시예 따라 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다. 이들 제

형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.

- [0101] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상 투여시에 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0102] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질 캡셀제, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등의 제형일 수 있는데, 이들 제형은 유효성분 외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산의 마그네슘염, 스테아르산의 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.
- [0103] 비경구 투여용 제형으로는 피하 주사, 정맥 주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의할 수 있다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 포함하고, 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하며, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.
- [0104] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 mg/일이고, 바람직하게는 0.01 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수 회로 분할 투여할 수도 있다.
- [0105] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 할로겐화 인돌 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 수면장애 또는 불면증의 개선 또는 예방용 식품에 관한 것이다.
- [0106] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 할로겐화 인돌 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 안암의 개선 또는 예방용 식품에 관한 것이다.
- [0107] 본 발명에 있어서, 상기 안암은 포도막 흑색종인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0108] 본 발명의 식품은 상기 할로겐화 인돌 유도체 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0109] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스포, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0110] 본 발명에 따른 할로겐화 인돌 유도체 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 할로겐화 인돌 유도체 화합물의 양은 전체 식품중량의 0.01 내지 15중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100ml를 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효 성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0111] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 할로겐화 인돌 유도체 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

- [0112] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0113] 그 밖에 본 발명의 할로겐화 인돌 유도체 화합물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 할로겐화 인돌 유도체 화합물 100중량부에 대하여 0~약 20중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0115] **[실시예]**
- [0116] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0118] **실시예 1: 마이크로모노스포라 로도랑지아 유전체로부터 FDH 암호화 유전자의 분리**
- [0119] 기존에 보고된 FDH들의 아미노산 서열 비교 및 분석을 통하여 상동성이 높은 아미노산 서열 보존부위를 선별한 후, 마이크로모노스포라 유전체의 코돈 이용성(codon usage)을 고려한 역추적(degenerate) 프라이머(primer) 세트(서열번호 1/2)를 제작하였다.
- [0120] 서열번호 1: 5-GGSGTSGGSGARGCSAC-3 (FDH_F)
- [0121] 서열번호 2: 5-GGGATCTYCCASGTCCASCC-3 (FDH_R)
- [0122] 이미 보고되어 있는 토양 방선균의 일종인 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주 유전체의 포스미드(fosmid) 라이브러리(Hoang NH *et al.*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 26(3):477-482, 2016)에서 분리한 유전체를 주형으로 사용하고, 제작된 보존부위 특이적인 서열번호 1(전방 프라이머, FDH_F) 및 서열번호 2(역전 프라이머, FDH_R)의 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였다. 포스미드 라이브러리 DNA 및 프라이머들을 Taq DNA 중합효소(Taq DNA polymerase)와 함께 혼합하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였고, 증폭된 PCR산물을 보인 양성 포스미드 라이브러리들을 일차 선별한 후, 이들 포스미드 내 삽입 서열을 전장 서열 분석하였다.
- [0123] 그 결과, 포스미드 유전체 내 단지 1종의 FDH를 암호화하는 것으로 예측되는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 선별할 수 있었다. 오픈 리딩 프레임을 포함하고 있는 포스미드 라이브러리를 주형으로 하여 상기 오픈 리딩 프레임 특이적인 서열번호 3(전방 프라이머, MRFDH_F) 및 서열번호 4(역전 프라이머, MRFDH_R)의 프라이머 세트를 이용하여 다시 중합효소 연쇄반응을 아래와 같이 실시하였다.
- [0124] 서열번호 3: 5' - GGCATATGGACCTTCAAGAACGTCGCCA - 3' (MRFDH_F, *NdeI* 제한위치)
- [0125] 서열번호 4: 5' - CGCTCGAGCGGGGTGGTGATCAGGTAGA - 3' (MRFDH_R, *XhoI* 제한위치)
- [0126] PCR 산물을 정제한 후, pGEMR-T 이지 벡터(pGEMR-T easy vector, Promega, Madison, WI, USA)에 접합한 다음, 대장균 XL1 블루(XL1 blue, Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 42 °C에서 45초간 열처리한 후, 형질전환을 수행하였다. 선별된 형질전환 대장균으로부터 T-이지 벡터를 분리, 정제한 후 그 염기서열(서열번호 5) 및 이로부터 유추한 아미노산 서열(서열번호 6)을 결정하였다.
- [0127] 그 결과, 전체 오픈 리딩 프레임의 염기서열(서열번호 5)은 1467 bp이며, 그 번역 후 단백질은 총 488개의 아미노산(서열번호 6)으로 구성(총 53.2 kDa)되어 있었다. 상기 단백질의 아미노산 서열을 블라스트(Basic Local Alignment Search Tool, NCBI) 분석한 결과, 트립토판 할로게아나제인 FDH의 공통 보존 부위(conserved domain)들인 NADB-Rossmann superfamily와 게라닐게라닐 리덕타아제(geranylgeranyl reductase) superfamily들을 모두 포함하고 있었다. 한편, NCBI 데이터베이스 중 마이크로모노스포라 종 ATCC 39149 유래 트립토판 할로게아나제 암호화 추정 아미노산 서열(GenBank 수탁번호 WP_007074591)과 약 86%의 가장 높은 상동성을 나타내었고, 6종 이상의 스트렙토마이세스 및 마이크로모노스포라 유래 할로게아나제 혹은 디하이드로게아나제(dehydrogenase) 암호화 추정 아미노산 서열(GenBank 수탁번호 SCF43367, WP_040892142, WP_062150269,

WP_037886771, ELS56116 및 EME97269)들과 60% 이상의 상동성을 보였다.

[0129] 실시예 2: 대장균에서 재조합 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 MrFDH의 발현

[0130] 실시예 1의 T-이지 벡터를 *Nde*I과 *Xho*I 제한효소로 처리한 MrFDH DNA 절편을, 동일한 제한효소들로 처리한 단백질 발현 벡터인 pET-28(a+)(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입한 후, 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 형질전환시켰다. 이때, 형질전환체의 선발을 위하여 카나마이신 항생제 50 ppm을 사용하였다.

[0131] 상기 재조합 대장균을 카나마이신 항생제와 최종 농도 1 M의 소르비톨(sorbitol) 및 2.5 mM 베타인(betaine)이 첨가된 LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후, 30℃에서 배양한 다음, 광학농도(optical density) 0.6 ~ 0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질 발현을 유도시키고자, 최종 농도 0.5 mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하였다. 재조합 대장균 균주를 22℃에서 20시간 추가 배양 후 배양액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음, 50 mM 인산나트륨 용균(lysis) 완충용액(300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, 1% Triton X-100)에 균체를 용해시키고, 초음파 분해(sonication)를 실시하였다. 이후, 12000 rpm에서 15분간 냉장 원심분리하고, 상등액을 따로 모아 일부 시료를 12% SDS-PAGE로 분석하여 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소 MrPT의 발현 정도를 확인하였다.

[0132] 발현이 확인된 재조합 단백질을 정제하기 위하여, 상기 상등액을 50 mM 인산 완충용액(0.3 M NaCl, 20 mM imidazole)으로 평형화된 탈론-금속 친화성 수지(Talon-metal affinity resin, Clontech, Mountain View, CA, USA)와 섞은 후 4℃에서 두 시간 동안 배양하였다. 2000 rpm에서 5분간 냉장 원심분리한 후, 수지를 일회용 컬럼에 도입한 후, 수지 10배 용량의 50 mM 이미다졸을 포함하는 인산 완충용액으로 세척하였다. 최종적으로 180 mM 이미다졸을 포함한 인산 완충용액 3 ml로 수지에 결합된 재조합 플라빈-의존형 할로게나아제 효소 MrFDH를 정제하였다.

[0134] 실시예 3: 재조합 MrFDH 플라빈-의존형 할로게나아제 효소에 의한 인돌 화합물의 할로젠화 유도체로 생전환

[0135] 3-1: 재조합 할로게나아제 효소 MrFDH의 할로게나아제 활성

[0136] 할로젠화 인돌 유도체 생전환 전에, 실시예 2에서 장제한 재조합 할로게나아제 효소 MrFDH의 할로게나아제 활성을 검정하였다. 기존에 트립토판 할로게나아제의 기질로 사용된 것으로 보고된 L-트립토판(Sigma, St. Louis, MO, USA)과 1-아미노안트라센(1-aminoanthracene, Sigma)을 최종 500 μ M 농도의 기질로 하고, 조효소 FADH₂의 생성을 위하여 상용 가능한 재조합 플라빈 리덕타아제(flavin reductase; EC1.5.1.29; Novocib, Lyon, France; #E-Nov8; 10 units)와 카탈라아제(catalase; Sigma; #C9322; 30 units)에 1 mM 농도의 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드(FAD; Sigma)를 첨가하였다. 반응 완충용액(25 mM 인산 완충용액; pH 7.4; 20 mM 염화나트륨)에서 상기 혼합물들과 정제한 재조합 MrPT를 첨가한 후, 30℃로 10시간 동안 효소 반응을 실시하여 할로젠화 반응 여부를 조사하였다. 이후, 반응물을 끓는 물에 5분간 열처리하고 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 반응 산물인 염소가 부가된 할로젠화된 L-트립토판과 1-아미노안트라센의 생성 여부는 HPLC-ESI-MS 분석법으로 확인하였다.

[0138] 3-2: 재조합 MrFDH 할로게나아제 효소에 의한 신규한 할로젠화 인돌 유도체로 생전환

[0139] 신규한 할로젠화 인돌 유도체의 생전환을 위하여, 할로젠화 기질들로 5-데메톡시-5-메틸-멜라토닌(5-demethoxy-5-methyl-melatonin; 이하 5MMEL; Aurora Fine Chemicals LLC, San Diego, CA, USA; #K00.821.433), 5-데메톡시-5-히드록시-멜라토닌(5-demethoxy-5-hydroxy-melatonin; 이하 5HMEL; Sigma; #A1824)와 아고멜라틴(Sigma; 이하 AGMEL; #A1362) 3종을 사용하였으며, 할로젠 공여 이온을 위한 염화나트륨(Sigma) 혹은 브롬화나트륨(Sigma)용액을 최종 20 mM 수준이 되도록 하여 30℃에서 10시간 동안 효소 반응을 실시하였다(도 1). 상기 반응물 내 목적 할로젠화 인돌 유도체들의 생합성 여부를 확인하기 위하여 HPLC-ESI-MS 분석을 수행 하였다. 이동상으로 아세트니트릴:물:포름산 75:25:0.1(v/v/v) 혼합액을 분당 120 μ l 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18(Waters, 50x1.0 mm, 1.7 μ m; Milford, MA, USA)을 사용하여 분석하였다.

- [0140] 다음으로, 상기 조추출물로부터 목적하는 할로겐화 인돌 유도체들의 분리 및 정제를 위해 콤비플래시 Rf MPLC 시스템을 적용하였다. 역상(reverse-phased) C18 카트리지에 아세토니트릴:물:포름산 75:25:0.1(v/v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 15 ml의 속도로 흘러가는 MPLC 시스템을 이용하여, 동일한 이동상 3 ml에 용해시킨 상기 조추출물을 주입한 후 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분취하였다. 개별 분획을 다시 감압하여 농축한 후, 이온트랩 질량 분석기(LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)로 질량 스펙트럼을 분석함으로써 목적하는 할로겐화 인돌 유도체들을 분리하였다.
- [0141] 그 결과, 기질로 사용된 5MMEL(5-demethoxy-5-methyl-melatonin), 5HMEL(5-demethoxy-5-hydroxy-melatonin) 그리고 AGMEL(agonelatine)은 MPLC 시스템 상 약 26 ~ 33분의 유지 시간으로 분취되었고, 목적하는 할로겐화 인돌 유도체들은 기질보다 높은 친수성에 따라서 그 유지 시간이 15 ~ 21분 사이로 검출되었다. 이들 정제된 할로겐화 인돌 유도체들은 도 1에 나타내었다. 할로겐 이온 공여체로 염화나트륨을 이용한 생전환 반응의 수율은 대략 40% 이상으로 반응이 일어났으나, 브롬화나트륨의 경우엔 그 생전환 수율이 25% 이하 수준으로 매우 낮게 나타났다. 이밖에 플루오르화나트륨(NaF)이나 요오드화나트륨(NaI)와 같은 할로겐 이온 공여체들의 경우 생전환 반응 산물이 기기분석으로 검출되지 않았다. 이는 재조합 MrFDH 효소의 할로겐 이온 공여체에 대한 상대적인 특이성을 제시하였다.
- [0143] 3-3: 신규한 할로겐화 인돌 유도체의 NMR
- [0144] NMR 시료들은 200 μ l의 DMSO-d6에 각 인돌 유도체들을 용해시킨 후, 5 mm 시게미 어드밴스드 NMR 마이크로튜브(Shigemi advanced NMR microtube, Sigma, St. Louis, MO)에 상기 용매를 방치시킴으로써 제조하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 배리언(Varian) INOVA 500 분광광도계를 이용하여 298 K에서 획득하였고, 화학적 이동은 내부 준거로서 TMS를 이용하여 ppm으로 기록되었다. 모든 NMR 데이터 산출은 Mnova Suite 5.3.2 소프트웨어를 이용하여 수행하였고, 할로겐화 인돌 유도체들의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 기질로 사용한 방향족 화합물들과 비교하였다. 분리 정제된 할로겐화 인돌 유도체 내 할로겐의 부가 위치는 각각 7번 혹은 5번 위치로 나타났으며, HPLC-ESI-MS 분석 결과, 미량으로 나타난 이중으로 할로겐화된 것으로 추정되는 인돌 유도체들의 경우 분리 및 정제를 실시하지 않았다.
- [0145] 5-데메톡시-5-메틸-7-클로로-멜라토닌(5-demethoxy-5-methyl-7-chloro-melatonine; 5M7CMEL; 생전환율 49%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 21.1, 23.2, 25.5, 41.3, 112.8, 116.2, 119.2, 120.8, 123.1, 128.7, 130.1, 134.9, 170.3)
- [0146] 5-데메톡시-5-메틸-7-브로모-멜라토닌(5-demethoxy-5-methyl-7-bromo-melatonine; 5M7BMEL; 생전환율 25%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 21.0, 23.2, 25.5, 41.4, 99.7, 112.9, 117.0, 123.0, 123.8, 129.6, 131.3, 132.5, 170.4)
- [0147] 5-데메톡시-5-히드록시-7-클로로-멜라토닌(5-demethoxy-5-hydroxy-7-chloro-melatonine; 5H7CMEL; 생전환율 46%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 23.2, 25.4, 41.4, 101.5, 107.2, 113.3, 120.9, 123.1, 130.1, 130.6, 153.6, 170.3)
- [0148] 5-데메톡시-5-히드록시-7-브로모-멜라토닌(5-demethoxy-5-hydroxy-7-bromo-melatonine; 5H7BMEL; 생전환율 23%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 23.2, 25.5, 41.4, 101.4, 102.8, 106.6, 113.4, 123.1, 128.2, 130.9, 154.4, 170.3)
- [0149] 5-클로로-아고멜라틴(5-chloro-agonelatine; 5CAGMEL; 생전환율 41%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 23.2, 33.3, 40.6, 55.6, 109.6, 118.2, 122.5, 124.2, 125.3, 126.2, 133.6, 134.2, 134.9, 157.3, 170.5)
- [0150] 5-브로모-아고멜라틴(5-bromo-agonelatine; 5BAGMEL; 생전환율 20%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 23.2, 33.3, 40.6, 55.8, 110.1, 121.5, 124.1, 124.9, 125.2, 125.9, 127.2, 134.0, 134.5, 157.3, 170.4)
- [0152] 실시예 4: 할로겐화 인돌 유도체의 멜라토닌 수용체에 대한 결합력

- [0153] 실시예 3-2의 화합물 중 6종의 할로젠화 인돌 유도체들의 2가지 종류의 멜라토닌 수용체에 대한 길항활성을 비교 검토하기 위하여, 인간 유래 멜라토닌 수용체 hMT1과 hMT2를 과발현한 CHO 세포(Chinese hamster ovarian cell)의 막을 포함하고 있는 2종의 상용화된 키트(Chemiscreen Melatonin Receptor Membrane Preparation; Eurofins Scientific, Petaluma, CA, USA; #HTS065M과 #HTS106M)를 사용하였다. 비교군으로는 할로젠화 생전환 이전의 인돌 화합물 3종(5MMEL, 5HMEL, AGMEL)을 이용하였다.
- [0154] 우선, DMSO에 용해시킨 상기 6종의 할로젠화 인돌 유도체들 및 할로젠화 이전의 3종의 인돌 화합물들 그리고 양성 대조군인 멜라토닌을 키트 내 세포막 균질 현탁액 및 0.5 nM(hMT1의 경우) 혹은 0.25 nM(hMT2의 경우)의 2-[¹²⁵I]iodomelatonin과 혼합하여 25℃에서 120분 동안 배양하였다. 이후, TopCount(Perkin-Elmer corp., Boston, MA, USA) 마이크로플레이트 리더를 통하여 그 방사능 강도를 측정하였으며, IC₅₀(50% 저해 농도)은 비직선형 회귀 분석으로 계산하였다. 한편, 상기 멜라토닌 수용체들에 대한 시료들의 해리 상수(dissociation constant, 이하 Ki)는 하기 수식 1에 따라 계산하였다. 여기서, L은 2-[¹²⁵I]iodomelatonin의 사용 농도를 그리고 Kd는 2-[¹²⁵I]iodomelatonin의 친화 상수(affinity constant)를 의미한다. 모든 실험의 반복수는 적어도 3반복 이상으로 실시하여 그 Ki 값을 측정하였다.
- [0155] [수식 1]
- [0156]
$$K_i = IC_{50} / (1 + L / K_d)$$
- [0157] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 양성대조군인 멜라토닌의 경우 hMT1과 hMT2에 대하여 각각 0.28과 0.25 nM의 평균 해리상수를 보여주었으며, 한편 비교대조군들 중 2종의 인돌 화합물 5MMEL과 5HMEL은 0.24에서 0.64 nM 범위로, 반면 임상 사용중인 AGMEL은 hMT1과 hMT2에 대하여 각각 0.06과 0.29 nM의 평균 해리상수를 나타내었다. 할로젠화 인돌 유도체들의 경우엔 대체로 비교군들에 비하여 높은 평균 해리상수를 나타내고 있으며, 이는 이들 유도체들의 멜라토닌 수용체에 대한 길항활성이 감소하였음을 보여준다. 또한, 염소화된 인돌 유도체들에 비하여 브롬화된 유도체들의 경우 평균 해리상수가 눈에 띄게 높아졌으며, 이는 고분자로 할로젠화된 인돌 유도체들의 현저히 낮은 길항활성을 의미한다.
- [0158] 다만, 할로젠화 인돌 화합물들 중 5M7CMEL의 경우엔 hMT1 수용체를 대상으로, 비교군인 5MMEL에 비하여 큰 차이 없는 길항활성을 보이고, 양성 대조군인 멜라토닌에 비교할 시 90% 유의수준 내로 향상된 길항활성을 나타낸다. 또한, 할로젠화된 AGMEL 유도체들(5CAGMEL과 5BAGMEL)의 경우에도 비교군인 AGMEL에 비하여 높은 해리상수 값을 보여주고 있지만 대조군인 멜라토닌과 비교하여 낮은 평균 해리상수를 나타낸다. 즉, 결과적으로 친수성으로 할로젠화된 대부분의 신규 멜라토닌 구조 유사체들은 생전환 전의 화합물보다는 멜라토닌 수용체들에 대하여 낮은 길항활성을 보였으나, 제한된 수의 3종의 유도체(즉, 5M7CMEL과 5CAGMEL 및 5BAGMEL)의 경우엔 멜라토닌에 비하여 인간 유래 멜라토닌 수용체(특히 hMT1)를 대상으로 다소 향상된 길항활성을 보이고 있었다.
- [0160] **실시예 5: 할로젠화 인돌 유도체의 포도막 흑색종에 대한 항종양 활성**
- [0161] 실시예 3-2의 화합물 중 6종의 할로젠화 인돌 유도체들의 전이성 포도막 흑색종 세포주에 대한 항종양 활성을 비교 검토하기 위하여, 포도막 흑색종 환자 유래 종양 세포주 MP41(ATCC, CRL-3297)를 대상으로 하여 처리 전과 후의 세포 수 변화를 측정하였다. 양성 대조군으로는 상기 세포들에 대하여 그 항종양 활성이 보고된 바 있는 멜라토닌을 이용하였다.
- [0162] 상기 전이성 포도막 흑색종 세포주들을 20%의 FBS를 함유하는 RPMI-1640 배지(0.2% sodium bicarbonate, glutamine 4 mM, 스트렙토마이신 100 ppm, 페니실린 10 ppm)에 전 배양시킨 후, 원심 분리하고 24-웰 플레이트(24-well plate, Corning, 뉴욕, 미국)에 각 웰 당 3000개로 개별 분주하여 5% 이산화탄소 대기 내 37℃에서 배양하였다. 배양 하루 후에, 실시예 화합물 6종의 할로젠화 인돌 유도체, 생전환 전 인돌 화합물 및 양성 대조군을 최종 0.1 nM 부터 10 nM의 세 가지 농도 구간이 되도록 처리한 후, 5일 동안 추가 배양을 실시하였고, 필요할 경우 3일 간격으로 배지를 교체하였다. 최종 배양액에서부터 세포들을 티립신-EDTA 처리한 후 그 해리된 세포 수를 측정하였다. 항종양 활성의 정도는 각 화합물 처리 전의 세포 수와 처리 후의 세포 수를 백분율 퍼센티지로 측정하였고, 그 결과를 도 4에 나타냈다.
- [0163] 도 4에 나타난 바와 같이, 할로젠화 이전의 인돌 화합물 비교군들의 경우에 처리 전 대비 최대 약 36%의 항종양 활성을 나타내었다. 반면, 기존에 그 활성이 이미 보고된 양성 대조군 멜라토닌은 검정 농도 구간에서 최대 약

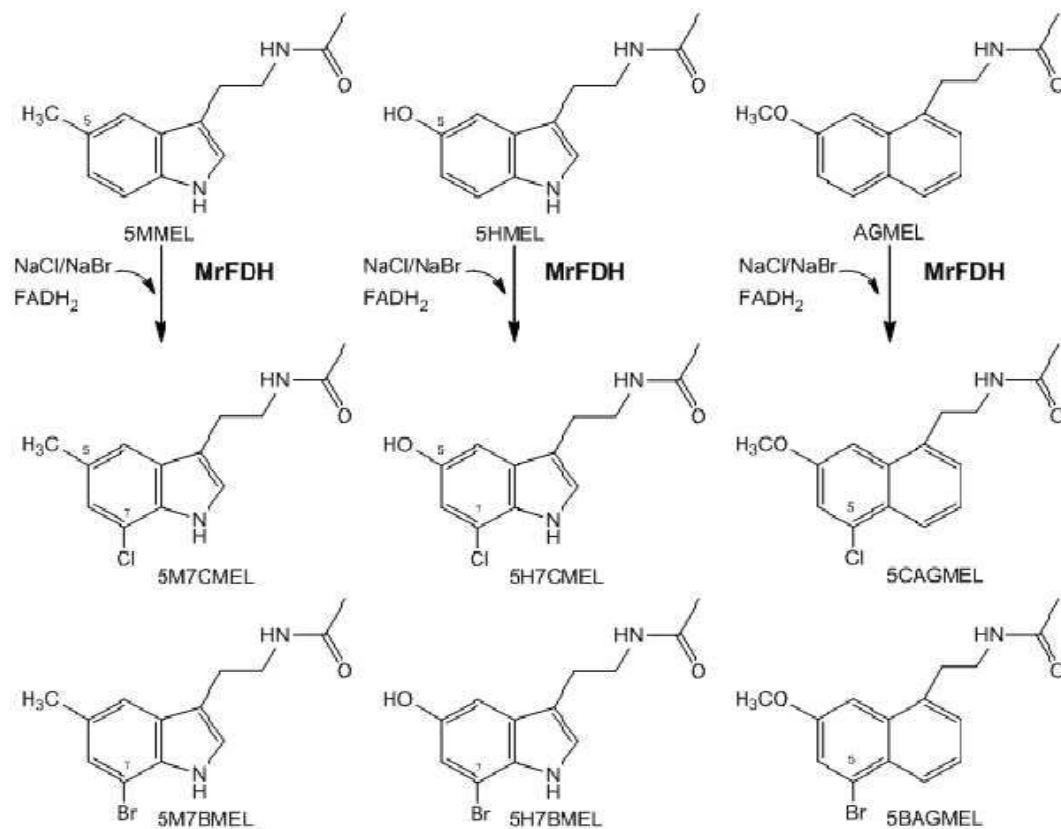
44%의 항종양 활성을 제시하였으며, 실시예 화합물 중 6종의 할로젠화 인돌 유도체들의 경우엔 최대 약 62%의 퍼센티지를 제시하였다. 비교군 중 AGMEL 화합물과 그 할로젠화 유도체들인 5CAGMEL과 5BAGMEL 2종은 도2에 나타난 멜라토닌 수용체들에 대한 우수한 길항활성과는 다르게, 포도막 흑색종 세포주를 대상으로 하는 항종양 활성은 전혀 나타나지 않았다. 그에 비하여, 5MMEL의 할로젠화된 유도체들인 5M7CMEL과 5M7BMEL은 실시예 화합물들 중 1 nM 농도에서 각각 최대 62%와 58%의 항종양 활성을 나타내고 있다. 즉, 친수성의 할로젠화된 멜라토닌 유도체들은 원래 물질인 생전환 전의 멜라토닌 구조 유사체들 보다 향상된 전이성 안암의 일종인 포도막 흑색종 관련 항종양 활성을 보이고 있으며, 역시 양성 대조구인 멜라토닌에 비교하여 눈에 띄게 향상된 항종양 활성을 제공하고 있는 바, 그 약학적 활용 잠재성을 보여주는 것이다. 반면, AGMEL과 그 관련 할로젠화 유도체들의 경우엔 포도막 흑색종 세포주 대상으로 항종양 활성이 전혀 나타나지 않은 바, 상기 멜라토닌 수용체에 대한 길항 활성과 포도상 세포주에 대한 항종양 활성은 서로 기작 상 연관성이 없는 것으로 추정된다.

[0165]

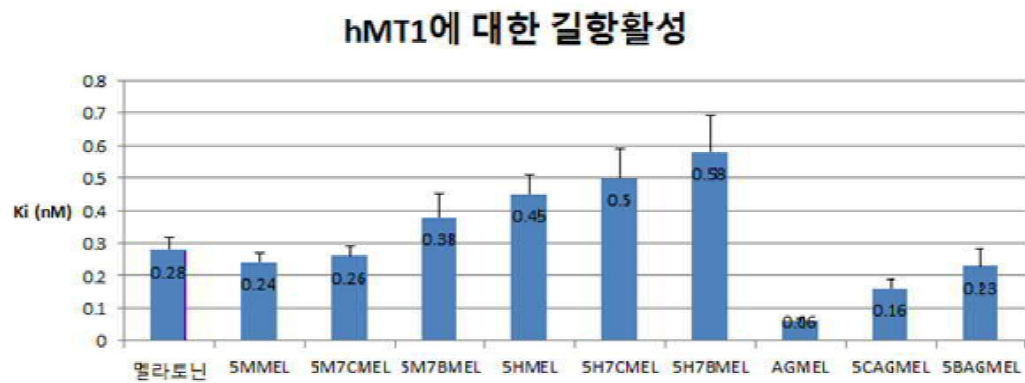
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

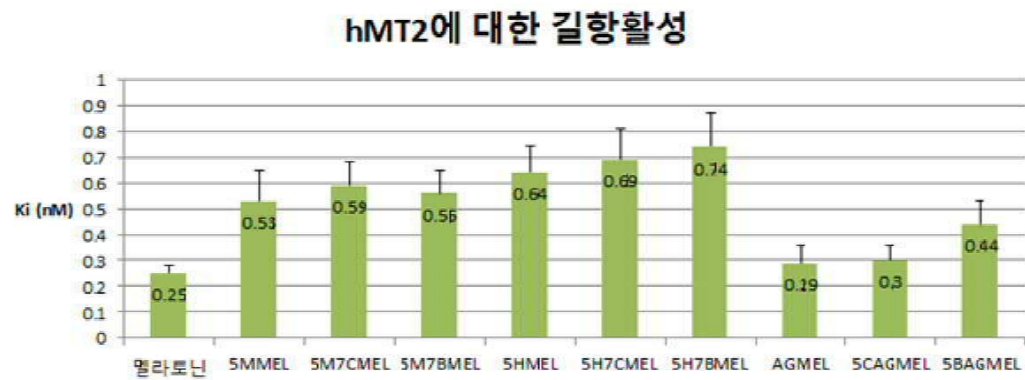
도면1



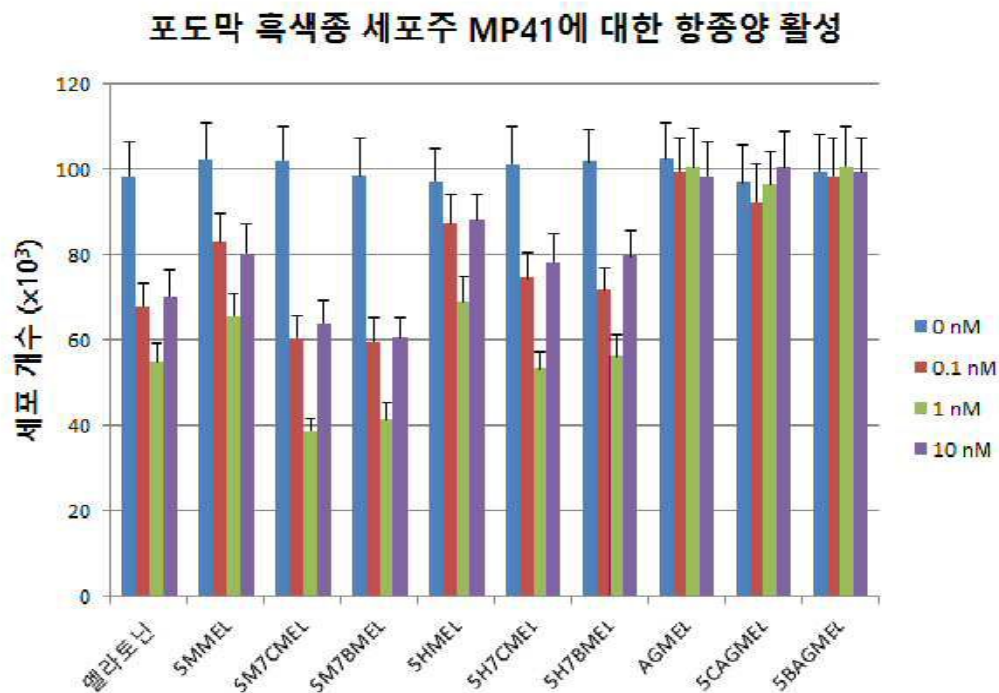
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110>	Korea University Research and Business Foundation	
<120>	Flavin-Dependent Halogenase and Method for Preparing Halogenated Indole Compounds Using the Same	
<130>	P16-B291	
<160>	6	
<170>	KoPatent In 3.0	
<210>	1	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FDH_F	
<400>	1	
	ggs g t s g g s g a r g c s a c	17
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FDH_R	
<400>	2	
	g g g a t c t y c c a s g t c c a s c c	20
<210>	3	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MRFDH_F	
<400>	3	
	g g c a t a t g g a c c t t c a a g a a c g t c g c c a	28
<210>	4	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MRFDH_R	
<400>	4	

cgctcgagcg gggtggatg caggtaga	28
<210> 5	
<211> 1467	
<212> DNA	
<213> Micromonospora rhodorangea	
<400> 5	
atggtctcca ccgtcctggt catcgccggc ggcccggccg gcgccaccgc cgccgcctg	60
ctggcccgt cggcctgtc cgtcaccctg ctggagaagg agaccttccc gcgtaccac	120
atcggcgagt ccgtcgctc ctctgccgc accatcgtcg acttcgtcgg cgccctggac	180
gaggtcgact cccgcggcta cccgcaggag aacggcgctc tgctgcgtg gggcaacaag	240
gactggctca tcgactgggc caagatcttc ggcccgggca tccgtctctg gcaggtcgac	300
cgcgacgact tcgaccacat cctgctgaac aactccggca agcagggcgc caagatcatc	360
cagggcgccg ccgtcgagcg cgtcctgttc gacggcgagc gcgccaccga ggccgagtgg	420
ttcgaccgg agtcggcga ggctccgacc atcgacttcg actacatcat cgactcctec	480
ggccgcgccc gcctgatccc gtcccagcac ttcaagcacc gccgcccgc caagaccttc	540
aagaacgtcg ccatctgggg ctactggcag ggcggtctcc tgctgccgaa ctccccgtcc	600
ggcgccatca acgtcatcg cgcgccggac ggctggtaact ggatcgtccc gctgcgcggc	660
gaccgctacg ccatcggtt cgtctgccac cagtcccgt tcctggagcg ccgcgaggag	720
cacgcctccc tggaggacat gctggcctcc ctggtccagg agtccccgc cgtccgcggc	780
ctgacctcca acggcaccta ccagccgggc gtccgcgtca agcaggactt cgcctacgtc	840
tccgactcct tctgcggccc gggctacttc gccgccggcg actccgcctg ctctctggac	900
ccgtctgtgt ccaccggcgt ccacctggcc ctgtactccg gcatgctggc ctccgcctec	960
atcctggcca ccatccacgg cgacgtcacc gaggaggagg cccgcgcctt ctacagttcc	1020
ctgtaccgca acgcctacca gcgcctgttc tacctggtcg ccggcgtcta ccagcagcag	1080
gccggccgcc gcgcctactt cggcctgccg gaggccttgg tcggcgactc cggcgacacc	1140
gagtacaagg aggtcgacgg cgcgccccc ttcgcccgagc tggctctcca cctggccgac	1200
ctggacgagg ccgccgagg ccgccacgac tccccggcgg ccgccgccac cgcccgccag	1260
gagaactcca tccgccagct gttcttgccc ccgcgcgagg cccgcaagat ggccgacacc	1320
cgccggggt ccgccggcat ctccgaggcc ccggcgagc tggactccgg cgacctgttc	1380
gagtcgccc cgacgtcta cctgatcacc accccgcgca tcggcgctcg ccgccggag	1440
accgccgaca cccagtcgc ctctga	1467

<210> 6
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Micromonospora rhodorangea
 <400> 6

Met Val Ser Thr Val Leu Val Ile Gly Gly Gly Pro Ala Gly Ala Thr

1	5	10	15
Ala Ala Ala Leu Leu Ala Arg Ser Gly Leu Ser Val Thr Leu Leu Glu			
	20	25	30
Lys Glu Thr Phe Pro Arg Tyr His Ile Gly Glu Ser Val Ala Ser Ser			
	35	40	45
Cys Arg Thr Ile Val Asp Phe Val Gly Ala Leu Asp Glu Val Asp Ser			
	50	55	60
Arg Gly Tyr Pro Gln Glu Asn Gly Val Leu Leu Arg Trp Gly Asn Lys			
65	70	75	80

Asp Trp Ser Ile Asp Trp Ala Lys Ile Phe Gly Pro Gly Ile Arg Ser			
	85	90	95
Trp Gln Val Asp Arg Asp Asp Phe Asp His Ile Leu Leu Asn Asn Ser			
	100	105	110
Gly Lys Gln Gly Ala Lys Ile Ile Gln Gly Ala Ala Val Glu Arg Val			
	115	120	125
Leu Phe Asp Gly Glu Arg Ala Thr Glu Ala Glu Trp Phe Asp Pro Glu			
	130	135	140
Ser Gly Glu Val Arg Thr Ile Asp Phe Asp Tyr Ile Ile Asp Ser Ser			

145	150	155	160
Gly Arg Ala Gly Leu Ile Pro Ser Gln His Phe Lys His Arg Arg Pro			
	165	170	175
Thr Lys Thr Phe Lys Asn Val Ala Ile Trp Gly Tyr Trp Gln Gly Gly			
	180	185	190
Ser Leu Leu Pro Asn Ser Pro Ser Gly Gly Ile Asn Val Ile Ala Ala			
	195	200	205
Pro Asp Gly Trp Tyr Trp Ile Val Pro Leu Arg Gly Asp Arg Tyr Ala			

210					215					220									
Ile	Gly	Phe	Val	Cys	His	Gln	Ser	Arg	Phe	Leu	Glu	Arg	Arg	Glu	Glu				
225					230					235					240				
His	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Met	Leu	Ala	Ser	Leu	Val	Gln	Glu	Ser	Pro				
245					250					255									
Thr	Val	Arg	Gly	Leu	Thr	Ser	Asn	Gly	Thr	Tyr	Gln	Pro	Gly	Val	Arg				
260					265					270									
Val	Lys	Gln	Asp	Phe	Ala	Tyr	Val	Ser	Asp	Ser	Phe	Cys	Gly	Pro	Gly				
275					280					285									
Tyr	Phe	Ala	Ala	Gly	Asp	Ser	Ala	Cys	Phe	Leu	Asp	Pro	Leu	Leu	Ser				
290					295					300									
Thr	Gly	Val	His	Leu	Ala	Leu	Tyr	Ser	Gly	Met	Leu	Ala	Ser	Ala	Ser				
305					310					315					320				
Ile	Leu	Ala	Thr	Ile	His	Gly	Asp	Val	Thr	Glu	Glu	Glu	Ala	Arg	Ala				
325					330					335									
Phe	Tyr	Glu	Ser	Leu	Tyr	Arg	Asn	Ala	Tyr	Gln	Arg	Leu	Phe	Tyr	Leu				
340					345					350									
Val	Ala	Gly	Val	Tyr	Gln	Gln	Gln	Ala	Gly	Arg	Arg	Ala	Tyr	Phe	Gly				
355					360					365									
Leu	Pro	Glu	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Ser	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Lys	Glu				
370					375					380									
Val	Asp	Gly	Ala	Arg	Pro	Phe	Ala	Gln	Leu	Val	Ser	His	Leu	Ala	Asp				
385					390					395					400				
Leu	Asp	Glu	Ala	Ala	Glu	Gly	Arg	His	Asp	Ser	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala				
405					410					415									
Thr	Ala	Arg	Gln	Glu	Asn	Ser	Ile	Arg	Gln	Leu	Phe	Leu	Ala	Pro	Arg				
420					425					430									
Glu	Ala	Arg	Lys	Met	Ala	Asp	Thr	Arg	Pro	Gly	Ser	Ala	Gly	Ile	Ser				
435					440					445									
Glu	Ala	Pro	Gly	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Leu	Phe	Glu	Ser	Ala	Pro				
450					455					460									

His Val Tyr Leu Ile Thr Thr Pro Arg Ile Gly Val Arg Arg Pro Glu
465 470 475 480
Thr Ala Asp Thr Gln Ser Ala Ser
485