

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 4월 4일 (04.04.2019)



(10) 국제공개번호
WO 2019/066446 A2

(51) 국제특허분류:
C12N 9/02 (2006.01) *C12P 7/26* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/011350

(22) 국제출원일: 2018년 9월 27일 (27.09.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0124724 2017년 9월 27일 (27.09.2017) KR

(71) 출원인: 전남대학교산학협력단 (**INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY**) [KR/KR]; 61186 광주시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).

(72) 발명자: 윤철호 (**YUN, Chul-Ho**); 34049 대전시 유성구 엑스포로 448, 105- 602, Daejeon (KR). 응우옌응억안 (**NGUYEN, Ngoc Anh**); 61179 광주시 북구 문화소통로 108번길 64, 3동 328호, Gwangju (KR). 레티엔킴 (**LE, Thien Kim**); 61189 광주시 북구 호동로63번길 25, A동 301호, Gwangju (KR). 강형식 (**KANG, Hyung-Sik**); 62225 광주시 광산구 풍영로170번길 39-26, 507동 2201호, Gwangju (KR).

(74) 대리인: 특허법인 플러스 (**PLUS INTERNATIONAL IP LAW FIRM**); 35209 대전시 서구 한밭대로 809, 10층, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

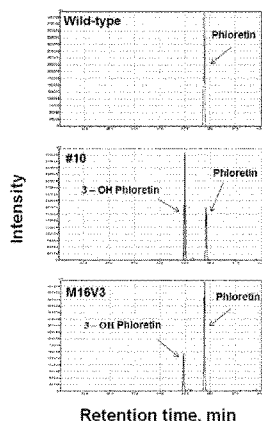
공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION FOR PRODUCING 3-HYDROXY PHLORETIN

(54) 발명의 명칭: 3-하이드록시 플로레틴 제조용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a wild-type CYP102A1 mutant for producing 3-hydroxy phloretin among metabolites of phloretin, and can mass-produce 3-hydroxy phloretin by oxidizing phloretin by using, as catalysts, a point mutant of wild-type CYP102A1 which is a bacterial cytochrome P450 enzyme, CYP102A1 chimera obtained by fusing a heme domain of the point mutant of the wild-type CYP102A1 with a reductase of a natural variant of the wild-type CYP102A1, and a point mutant of the CYP102A1 chimera.

(57) 요약서: 본 발명은 플로레틴의 대사산물 중 3-하이드록시 플로레틴 제조를 위한 야생형 CYP102A1 돌연변이체에 관한 것으로, 박테리아 시토크롬 P450 효소인 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체, 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체의 헴 영역과 야생형 CYP102A1의 자연적 변이체의 환원효소를 융합한 키메라 CYP102A1 및 키메라 CYP102A1의 점 돌연변이체를 촉매로 이용하여 플로레틴을 산화시켜 3-하이드록시 플로레틴을 대량 생산할 수 있다.

WO 2019/066446 A2

명세서

발명의 명칭: 3-하이드록시 플로레틴 제조용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 플로레틴(phloretin)으로부터 3-하이드록시 플로레틴(3-hydroxyl phloretin)을 제조하기 위한 박테리아 시토크롬 P450(cytochrome P450)의 돌연변이체를 포함하는 조성물 및 3-하이드록시 플로레틴을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 자연에서 발견되는 페놀화합물의 한 종류인 디하이드로찰콘(dihydrochalcones)의 한 종류인 플로레틴(phloretin)은 사과나 배에서 다량 포함되어 있고 천연 추출물로서 약제나 화장품 성분으로 사용되고 있다.
- [3] 구체적으로 플로레틴은 항산화, 항암, 항노화, 항염증, 항비만 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 한국 공개특허 제10-2016-0101492호에서 플로레틴을 이용한 항여드름 및 항염증 용도를 개시하고 있다. 그러나, 플로레틴의 대사과정에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없어 플로레틴의 대사경로 및 대사물질에 관한 연구가 필요하다.
- [4] 시토크롬(cytochrome) P450 효소는 고세균에서부터 박테리아, 곰팡이, 식물, 동물 및 포유류에 이르기까지 생물 전반에 존재하는 효소로 다양한 산화반응을 촉진하는 촉매 기능을 수행한다. 시토크롬 P450은 종류가 다양하고 촉매 작용을 할 수 있는 대상 기질의 범위가 넓어 특정 화합물을 생산하기 위한 생물학적 촉매로 널리 이용될 수 있다. 그러나 시토크롬 P450이 촉매 작용을 하는 기질의 범위가 넓어 목적하는 화합물만을 선택적으로 생산하는데 어려움이 있다.
- [5] 본 발명은 플로레틴의 대사물질을 연구하고 플로레틴의 대사산물을 이용한 치료제를 개발하기 위해 플로레틴의 대사산물 중 화학적으로 합성되기 어려운 대사산물을 선택적으로 생산할 수 있는 시토크롬 P450 효소의 변이체 및 이를 응용할 수 있는 기술을 제공한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 플로레틴의 대사산물 중 화학합성이 어려운 3-하이드록시 플로레틴을 대량으로 생산할 수 있는 시토크롬 P450 효소 변이체를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명은 시토크롬 P450 효소 변이체로 CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군 중 적어도 하나 이상의 효소를 포함하는 3-하이드록시 플로레틴 제조용 조성물 및 제조방법을 제공한다.
- [8] 본 발명은 CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군에서 적어도 하나 이상의

효소를 포함하고, 플로레틴으로부터 3-하이드록시 플로레틴을 생성하는 3-하이드록시 플로레틴 제조용 조성물로, CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군은 야생형 CYP102A1의 R47L/F87V/L188Q, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/K59N/F81I/F87V/E143G/L188Q/G240E/E267V/S383R/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/Y334C/A335V/D369G/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/Q206R/E267A/V297A/K336E/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/T152A/L188Q/E267V/Q403R/V413A/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, I39V/R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/N213D/I259T/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E로 구성된 군인 3-하이드록시 플로레틴 제조용 조성물을 제공한다.

- [9] 본 발명은 CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군에서 적어도 하나 이상의 효소를 포함하고, 플로레틴을 기질로 하여 반응시키는 단계를 포함하는 3-하이드록시 플로레틴 생산방법으로, CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군은 야생형 CYP102A1의 R47L/F87V/L188Q, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/K59N/F81I/F87V/E143G/L188Q/G240E/E267V/S383R/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/Y334C/A335V/D369G/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/Q206R/E267A/V297A/K336E/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/

S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E,
 R47L/F81I/F87V/E143G/T152A/L188Q/E267V/Q403R/V413A/A474V/E558D/T664
 A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/
 S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E,
 I39V/R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/N213D/I259T/E267V/A474V/E558D/T664A/P
 675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S95
 4N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E로 구성된 군인 3-하이드록시
 플로레틴 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [10] 본 발명은 시토크롬 P450 돌연변이체를 이용하여 플로레틴 대사산물 중 화학적으로 합성된 바 없는 3-하이드록시 플로레틴(3-OH phloretin)을 선택적으로 대량 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 플로레틴의 구조식(A) 및 NADPH 존재 하에 야생형 CYP102A1의 돌연변이체에 의한 플로레틴으로부터 3-하이드록시 플로레틴의 생산을 보여주는 반응식(A)이다.
- [12] 도 2는 본 발명의 야생형 CYP102A1과 이의 돌연변이체에 의하여 생성된 플로레틴 대사산물의 HPLC 크로마토그램(285nm 에서의 UV 흡광도를 측정)을 보여주는 것이다(피크: 야생형 CYP102A1의 돌연변이체에 의해 생성된 대사산물 피크와 체류 시간을 비교하여 확인한 것, 화살표: 기질인 플로레틴 및 주요 산물인 3-하이드록시 플로레틴을 표시).
- [13] 도 3은 본 발명에 따른 플로레틴 및 야생형 CYP102A1의 돌연변이체에 의하여 생성된 그의 대사산물의 LC-MS 용출 프로파일을 보여주는 것이다[(A): NADPH가 있을 때와 없을 때 야생형 CYP102A1의 돌연변이체 M10을 사용하여 제조한 시료를 LC-MS 방법으로 분석한 Total Ion Chromatogram(TIC), B: 야생형 CYP102A1의 돌연변이체에 의해 NADPH 존재 하에 생성된 산화물의 분자량 측정(M+H: 291), C: 기질(substrate)인 플로레틴의 분자량 측정(M+H: 275)].
- [14] 도 4는 야생형 CYP102A1의 돌연변이체에 의해 생성된 대사산물을 NMR 분석 기법으로 분석한 결과로, 대사산물이 3-하이드록시 플로레틴임을 보여준다(NMR은 Varian VNMRs 600 MHz NMR spectrometer를 이용).
- [15] 도 5는 기질인 플로레틴을 NMR 분석 기법으로 분석한 결과이다(NMR은 Varian VNMRs 600 MHz NMR spectrometer를 이용).
- [16] 도 6은 야생형 CYP102A1(WT) 및 야생형 CYP102A1의 돌연변이체(M10, M16, M16V3, C7, D8, F7, G1, H1)에 의한 3-하이드록시 플로레틴의 생성속도를 보여준다.
- [17] 도 7은 야생형 CYP102A1(WT) 및 야생형 CYP102A1의 돌연변이체(M10, M16, M16V3)에 의한 3-하이드록시 플로레틴의 생성효율을 비교한 속도론적

매개변수 분석 결과를 보여준다(10 μ M에서 80~100 μ M 농도의 플로레틴을 사용하였고, 60분간 반응시켰다).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [18] 이하에서 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다. 본 명세서에서 사용되는 용어는 따로 정의하지 않는 경우 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 내용으로 해석되어야 할 것이다. 본 명세서의 도면 및 실시예는 통상의 기술자가 본 발명을 쉽게 이해하고 실시하기 위한 것으로 도면 및 실시예에서 발명의 요지를 흐릴 수 있는 내용은 생략될 수 있으며, 본 발명이 도면 및 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [19] 본 발명은 플로레틴(phloretin)의 대사산물 중 3-하이드록시 플로레틴(3-hydroxyl phloretin)을 선택적으로 대량 생산할 수 있는 시토크롬 P450(cytochrome) 효소의 돌연변이체를 제공한다.
- [20] 본 발명의 시토크롬 P450 효소의 돌연변이체는 플로레틴을 기질로 하고, 플로레틴의 산화를 매개하여 3-하이드록시 플로레틴을 안정적이며 고효율로 생산할 수 있다.
- [21]
- [22] 본 발명에서 시토크롬 P450 효소의 돌연변이체는 박테리아 시토크롬 P450 BM3인 CYP102A1의 돌연변이체이다.
- [23] 본 발명에서 CYPP102A1 돌연변이체는 야생형 CYP102A1을 기준으로 아미노산의 자연적이거나 인위적인 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입에 의하여 변화된 서열을 가지는 CYP102A1 전체를 의미할 수 있다. 바람직하게는 야생형 CYP102A1의 아미노산 서열을 기준으로 점 돌연변이가 일어난 개체, CYP102A1의 서로 다른 도메인을 융합 키메라를 모두 포함할 수 있다.
- [24] 본 발명에서 CYP102A1 돌연변이체는 공지의 돌연변이 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 결실-돌연변이 방법, PCT 방법, 쿤켈법, 점 돌연변이 방법, DNA 셔플링, StEP(staggered extension process), 오류유발(error-prone) PCR 방법을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [25] 본 발명에서 CYP102A1 돌연변이체는 서열번호 1로 이루어진 야생형 CYP102A1 아미노산 서열과 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [26] 본 발명에서 키메라(chimera)는 서로 다른 두 개 이상의 결합 도메인(domain)을 포함할 수 있다. 두 결합 도메인은 상이한 야생형 단백질 또는 돌연변이체에서 유래할 수 있고, 두 결합 도메인은 동일한 야생형 단백질 또는 돌연변이체에서 유래할 수도 있다. 키메라 CYP102A1은 야생형 CYP102A1 돌연변이체의 헴 영역(heme domain)과 야생형 CYP102A1의 자연적 변형체(nature variants)의 환원효소 영역(reductase domain)을 융합한 CYP102A1 키메라 및 CYP102A1

키메라의 점 돌연변이체를 포함할 수 있다. 자연적 변형체는 자연계에서 채집되어 기탁된 바실러스 종(*Bacillus* sp.)의 CYP102A1 유전자의 염기서열을 확인한 결과 기존에 알려진 CYP102A1 외에 자연계에 존재하는 변이체를 의미한다. 키메라 CYP102A1은 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체들을 대장균에서 대량 발현시켜 돌연변이체들 중 기질(substrate)에 대한 촉매 활성이 큰 것을 선택하고, 선택한 CYP102A1 돌연변이체의 헴 영역과 야생형 CYP102A1의 자연적 변형체의 환원효소 영역을 융합하여 제조할 수 있다. 그리고, 제조한 키메라 CYP102A1의 점 돌연변이체들을 대장균에서 대량 발현시켜 촉매 활성이 큰 것을 선택하여 키메라 CYP102A1의 돌연변이체를 선정할 수 있다.

- [27] 본 발명에서 CYP102A1 돌연변이체는 변이가 일어나기 전 아미노산, 아미노산의 위치, 변이가 일어나 치환된 아미노산으로 표시할 수 있다. 예를 들어, R47L은 야생형 CYP102A1의 아미노산 서열인 서열번호 1의 47번째 아미노산인 아르기닌(R)이 류신(L)으로 자연적 또는 인위적으로 변이 유도에 의해 치환된 CYP102A1 돌연변이체를 의미한다. 돌연변이체에서 변이에 의해 치환된 아미노산이 하나 이상인 경우 '/'로 나타낼 수 있다. 예를 들어, R47L/F87V/L188Q는 서열번호 1의 47번째 아미노산인 아르기닌(R)이 류신(L)으로 치환되고 서열번호 11의 87번째 아미노산인 페닐알라닌(F)이 발린(V)으로 치환되고 서열번호 1의 188번째 아미노산인 류신(L)이 글루타민(Q)으로 치환된 야생형 CYP102A1의 돌연변이체를 의미한다. 이와 같은 표시 방법은 본 발명에서 키메라 CYP102A1 또는 키메라 CYP102A1의 돌연변이체 변이를 나타내는데 사용할 수 있다.
- [28] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 야생형 CYP102A1의 돌연변이체는 야생형 CYP102A1에서 점 돌연변이가 일어난 돌연변이체를 포함할 수 있다. 구체적으로 야생형 CYP102A1의 R47L/F87V/L188Q 또는 R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V이다.
- [29] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 야생형 CYP102A1의 돌연변이체는 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체의 헴 영역과 야생형 CYP102A1의 자연적 변형체의 환원 영역을 융합한 키메라 CYP102A1를 포함할 수 있다. 구체적으로, 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체인 야생형 CYP102A1의 R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V의 헴 영역과 야생형 CYP102A1의 자연적 변형체의 환원 영역이 융합된, 야생형 CYP102A1의 R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E이다.
- [30] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 야생형 CYP102A1의 돌연변이체는 키메라 CYP102A1의 점 돌연변이체를 포함할 수 있다. 구체적으로, 키메라 CYP102A1인 야생형 CYP102A1의

R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E에서 점 돌연변이가 일어난 돌연변이체로, 야생형 CYP102A1의

R47L/K59N/F81I/F87V/E143G/L188Q/G240E/E267V/S383R/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E,

R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/Y334C/A335V/D369G/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E,

R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/Q206R/E267A/V297A/K336E/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E,

R47L/F81I/F87V/E143G/T152A/L188Q/E267V/Q403R/V413A/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E 또는

I39V/R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/N213D/I259T/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E이다. 키메라 CYP102A1 및 이의 점 돌연변이체도 야생형 CYP102A1의 아미노산 서열을 기준으로보면 야생형 CYP102A1의 아미노산에서 치환이 일어난 개체로서 야생형 CYP102A1의 돌연변이체에 포함될 수 있다.

- [31] 이상의 야생형 CYP102A1의 돌연변이체에 대한 설명을 종합하면, 야생형 CYP102A1의 돌연변이체는 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체, 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체의 헴 영역과 야생형 CYP102A1의 자연적 변이체의 환원효소 영역을 융합한 키메라 CYP102A1 및 키메라 CYP102A1의 점 돌연변이체를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 야생형 CYP102A1의 돌연변이체는 서열번호 1로 표시되는 야생형 CYP102A1의 R47L/F87V/L188Q,

R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V,

R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E,

R47L/K59N/F81I/F87V/E143G/L188Q/G240E/E267V/S383R/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E,

R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/Y334C/A335V/D369G/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E,

R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/Q206R/E267A/V297A/K336E/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E,

R47L/F81I/F87V/E143G/T152A/L188Q/E267V/Q403R/V413A/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E,

I39V/R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/N213D/I259T/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

- [32] 본 발명에서 야생형 CYP102A1, 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체, 키메라 CYP102A1 및 키메라 CYP102A1의 점 돌연변이체는 본 발명이 속하는 분야에서 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어 유전공학적 기법, 고체상기술(solid-phase technique)을 사용하는 펩티드 합성방법(Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85 : 2149-2154(1963) 참조) 또는 본 발명의 효소를 적당한 펩티다아제로 절단하는 등의 방법으로 제조할 수 있다.

- [33] 본 발명에서 효소는 천연 단백질로서 제조할 수 있고, 야생형 CYP102A1, 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체, 키메라 CYP102A1 및 키메라 CYP102A1의 점 돌연변이체를 암호화하는 DNA로 형질전환시킨 세포를 배양하여 회수하는 재조합 방법에 의해 제조할 수도 있다. 구체적으로, 본 발명의 효소를 암호화하는 핵산 분자를 적절한 발현 벡터로 삽입하고 발현 벡터를 적합한 세포로 전달하여 만든 형질 전환체를 배양한 후 형질전환체에 의해 발현된 효소를 정제함으로써 본 발명의 효소를 생산할 수 있다.

- [34] 본 발명에서 벡터는 플라스미드(plasmid), 코스미드(cosmid), 바이러스 입자 또는 파지(phage) 형태일 수 있다. 벡터내의 DNA를 클로닝하거나 발현시키기 위한 숙주세포는 원핵세포, 효모, 고등진핵세포를 포함할 수 있다. 배지, 온도, pH 등의 배양 조건은 본 발명이 속하는 분야에서 과도한 실험 없이 적합하게 선택할 수 있다. 예를 들어, 세포배양의 생산성을 최대화 하기 위한 원리, 프로토콜, 테크닉 등은 여러 공지된 방법을 참조할 수 있다.

- [35] 본 발명에서 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로 mRNA 합성을 유도하는 야생형 CYP102A1, 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체, 키메라 CYP102A1 및 키메라 CYP102A1의 점 돌연변이체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하도록 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 숙주세포에 의해 인식되는 다양한 프로모터는 공지되어 있다. 원핵생물 숙주에 사용하기에 적합한 프로모터로 β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리 포스타파제, 트립토판 프로모터 시스템, 하이브리드 프로모터, 예를 들어 tac 프로모터가 있다. 세균 시스템에서 사용되는 프로모터로는 SISP-1을 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노(S.D.) 서열을 포함할 수 있다. 효모 숙주에 사용하기에 적합한

프로모터 서열로는 3-포스포글리세레이트 키나아제 또는 다른 당 분해 효소들이 포함될 수 있다.

- [36] 본 발명은 야생형 CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 효소를 플로레틴을 기질로하여 반응시키는 단계를 포함하는 3-히드록시 플로레틴의 생산방법을 제공할 수 있다.
- [37] 본 발명은 야생형 CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 효소를 플로레틴을 기질로하여 반응시키는 단계를 포함하는 3-히드록시 플로레틴의 생산방법으로, 야생형 CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군은 야생형 CYP102A1의 R47L/F87V/L188Q, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/K59N/F81I/F87V/E143G/L188Q/G240E/E267V/S383R/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/Y334C/A335V/D369G/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/Q206R/E267A/V297A/K336E/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/T152A/L188Q/E267V/Q403R/V413A/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, I39V/R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/N213D/I259T/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E로 구성된 군인 3-하이드록시 플로레틴의 생산방법을 제공할 수 있다.
- [38] 본 발명에서 3-하이드록시 플로레틴의 생산방법은 NADPH-생성 시스템을 더 포함할 수 있다.
- [39] 본 발명에서 NADPH-생성 시스템은 본 발명이 속하는 분야에서 공지된 시스템을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 글루코스 6-포스페이트(glucose 6-phosphate), NADP- 및 효모 글루코스 6-포스페이트 디하이드로게나아제(glucose 6-phosphate dehydrogenase)를 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 본 발명은 CYP102A1 키메라의 돌연변이체로 구성된 군 및 CYP102A1 키메라 중 적어도 하나 이상의 효소; 및 NADPH-생성 시스템을 포함하는 3-하이드록시

플로레틴 제조용 키트를 제공할 수 있다.

[41] 본 발명에 따른 키트는 3-하이드록시 플로레틴을 생산하기 위한 반응을 진행시키는데 필요한 시약을 추가로 더 포함할 수 있다.

[42] 본 발명의 3-하이드록시 플로레틴 제조용 조성물, 키트 및 생산방법은 화학적으로 합성할 수 없는 플로레틴의 대사산물인 3-하이드록시 플로레틴을 경제적이면서 고효율로 대량생산할 수 있어 신약 개발뿐만 아니라 다양한 연구에 유용하게 이용할 수 있다. 그리고, CYP102A1 돌연변이체가 효율적으로 플로레틴으로부터 3-하이드록시 플로레틴 대사산물을 생산할 수 있고, 이러한 대사산물은 나아가 기능성 바이오소재 및 약물의 개발 과정에서 3-하이드록시 플로레틴의 효능, 독성, 약물동력학 등을 평가하기 위하여 사용될 수 있으며, 기능성 소재개발의 리드 화합물이 될 수 있는 대사산물 유도체를 만드는데 사용될 수 있다.

[43]

[44] 이하에서 본 발명을 실시하기 위한 실시예에 대하여 설명한다. 실시예는 본 발명을 실시하기 위한 하나의 예시에 해당하는 것으로서 본 발명이 실시예에 의해 한정 해석되어서는 안된다.

[45]

[46] [실시예 1]

[47] 점 돌연변이 유발에 의한 P450 BM3(CYP102A1) 돌연변이체의 구축

[48] 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체(site-directed mutants) 2 종류를 Kim 등이 제조한 방법과 같은 방법 (Kim DH, Ahn T, Jung HC, Pan JG, Yun CH.(2008) Generation of Human Metabolites of 7-Ethoxycoumarin by Bacterial Cytochrome P450 BM3. Drug Metabolism and Disposition 36(11):2166-2170. 논문의 두번째 page (page 2167) Materials and Methods 의 construction of BM3 Mutants by Site-directed Mutagenesis 참조)으로 제조하고, 각각 M10(서열번호 13) 및 M16(서열번호 14)으로 명명하였다(아래 [표 2] 참조).

[49] BanHI/SacI 인식부위(restriction sites)를 도입하기 위하여 사용된 프라이머 및 돌연변이를 일으키기 위한 PCR 프라이머(제노텍(XENOTECH), 한국)는 [표 1]과 같다. 아미노산 치환을 위한 코돈은 이탤릭체 및 밑줄로 표시하였다. CYP102A1 돌연변이체를 코딩하는 유전자를 발현벡터 pCWori(Dr. F.W. Dahlquist, University of California, Santa Barbara, CA) 또는 pSE420(Invitrogen)로의 클로닝을 촉진할 수 있도록 설계된 프라이머를 사용하여 PCR 방법으로 pCWBM3로부터 증폭시켰다(Kang JY, Ryu SH, Park SH, Cha GS, Kim DH, Kim KH, Hong AW, Ahn T, Pan JG, Joung YH, Kang HS, Yun CH. (2014) Chimeric cytochromes P450 engineered by domain swapping and random mutagenesis for producing human metabolites of drugs. Biotechnology and Bioengineering 111(7):1313-1322. Page 1315 참조).

[50] [표 1]에 기재된 프라이머를 사용하여 올리고뉴클레오티드 어셈블리를

실시하였다. 증폭된 유전자를 pCWBM BamHI/SacI 벡터의 BamHI/SacI 인식부위로 클로닝 하였다. 이러한 플라스미드로 *Escherichia coli* DH5 α F'-IQ(Invitrogen)을 형질 전환시켰으며, 이는 CYP102A1 돌연변이 단백질을 발현시키기 위해서도 사용하였다. 돌연변이 유발 후, 목적하는 돌연변이가 일어났는지 여부를 DNA 시퀀싱을 의뢰하여(제노텍(XENOTECH), 한국) 확인하였다.

- [51] CYP102A1 돌연변이체의 구축을 위해 사용된 야생형 CYP102A1 아미노산 서열(서열번호 1)은 도 8과 같고, 관례에 따라 첫번째 아미노산 메티오닌(M)은 아미노산 순서에 포함되지 않으며, 트레오닌(T)을 첫번째 아미노산으로 계산한다.

[52]

[53] [표1]

돌연변이체를 제조하기 위해 사용한 프라이머들

프라이머(서열번호)	서열
BamHI forward(서열번호 2)	5'-AGC GGA TCC ATG ACAATT AAA GAA ATG CCT C-3'
SacI reverse(서열번호 3)	5'-ATC GAG CTC GTA GTT TGT AT-3'
R47L(서열번호 4)	5'-GCG CCT GGT CTG GTA ACG CG-3'
F81I(서열번호 5)	5'-GTA CGT GAT ATT GCA GGA GAC-3'
F87V(서열번호 6)	5'-GAC GGG TTA GTG ACA AGC TGG-3'
E143G(서열번호 7)	5'-GAA GTA CCG GGC GAC ATG ACA-3'
L188Q(서열번호 8)	5'-ATG AAC AAG CAG CAG CGA GCA A-3'
E267V(서열번호 9)	5'-T GCG GGA CAC GTG ACA ACA AGT-3'

[54]

[55] [표2]

야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체

야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체	야생형 CYP102A1(서열번호 1)의 아미노산 치환 부위	참고문헌
M10	R47L/F87V/L188Q	van Vugt-Lussenburg BM et al., 2007
M16	R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V	Kim DH et al., 2008

[56]

[57] * 참고문헌 *

[58] : van Vugt-Lussenburg BM, Stjernschantz E, Lastdrager J, Oostenbrink C, Vermeulen NP, Commandeur JN. Identification of critical residues in novel drug metabolizing mutants of cytochrome P450 BM3 using random mutagenesis. J Med Chem 50:455-461, 2007

[59] : Kim DH, Kim KH, Kim DH, Liu KH, Jung HC, Pan JG, Yun CH. Generation of human metabolites of 7-ethoxycoumarin by bacterial cytochrome P450 BM3. Drug Metab Dispos 36:2166-2170, 2008

[60]

[61] [실시예 2]

[62] 키메라 CYP102A1의 구축

[63] 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체의 헴 영역(heme domain)과 야생형 CYP102A1의 자연적 변형체(natural variant V3)의 환원효소 영역(reductase domain)을 융합하여 선택적인 키메라 CYP102A1 단백질(chimeric protein)인 M16V3(서열번호 13, [표 4] 참조)을 구축하였다. 야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체는 M16([표 2] 참조)을 사용하였고, 자연적 변형체는 *Bacillus megaterium* 종의 자연적 변이체([표 3])을 사용하였다.

[64] 헴 영역(heme domain)과 환원효소 영역(reductase domain)을 위하여 BamHI/SacI 과 SacI/XhoI을 사용하여 만들어진 키메라 CYP102A1 M16V3을 발현 벡터 pCW vector로 클로닝하였다([표 4]). 이를 다시 돌연변이 시켜 5종의 키메라 CYP102A1의 점 돌연변이체 C7, D8, F7, G1, H1을 제조하였다([표 5])(Kang JY, Ryu SH, Park SH, Cha GS, Kim DH, Kim KH, Hong AW, Ahn T, Pan JG, Joung YH, Kang HS, Yun CH. (2014) Chimeric cytochromes P450 engineered by domain swapping and random mutagenesis for producing human metabolites of drugs. Biotechnology and Bioengineering 111(7):1313-1322. Page 1315 참조).

[65] 키메라 CYP102A1 및 이의 점 돌연변이체를 코딩하는 유전자를 발현벡터 pCWori(Dr. F.W. Dahlquist, University of California, Santa Barbara, CA) 또는 pSE420(Invitrogen)로의 클로닝을 촉진할 수 있도록 설계된 프라이머를 사용하여 PCR 방법으로 pCWBM3로부터 증폭시켰다. [표 1]에 기재된 프라이머를 사용하여 올리고뉴클레오티드 어셈블리를 실시하였다. 증폭된 유전자를 pCWBM BamHI/SacI 벡터의 BamHI/SacI 인식부위로 클로닝 하였다. 이러한 플라스미드로 *Escherichia coli* DH5 α F'-IQ(Invitrogen)을 형질 전환시켰으며, 이는 야생형 CYP102A1의 돌연변이체 단백질을 발현시키기 위해서도 사용하였다. 돌연변이 유발 후, 목적하는 돌연변이가 일어났는지 여부를 DNA 시퀀싱을 의뢰하여(제노텍(XENOTECH), 한국) 확인하였다.

[66]

[67]

[표3]

본 발명에 사용된 야생형 CYP102A1의 자연적 돌연변이체

Strain	Variant Name	Accession Number		
		Genomic DNA	16S rRNA	16S-23S intergenic
KCCM 11745	102A1.1	(J04832) ^c	FJ917385	FJ969781
IFO 12108	102A1.1	(J04832) ^c	FJ969756	FJ969774
ATCC 14581	102A1.1	(J04832) ^c	FJ969751	FJ969767
KCCM 41415	102A1.1	(J04832) ^c	FJ969762	FJ969792
KCTC 3712	102A1.2	FJ899078	FJ969764	FJ969795
KCCM 12503	102A1.3	FJ899082	FJ969761	FJ969787
ATCC 15451	102A1.4	FJ899085	FJ969753	FJ969768
ATCC 10778	102A1.5	FJ899078	FJ969746	FJ969765
KCCM 11938	102A1.5	FJ899078	FJ969760	FJ969786
KCCM 11761	102A1.5	FJ899078	FJ969757	FJ969783
KCCM 11776	102A1.6	FJ899081	FJ969758	FJ969784
KCCM 11934	102A1.6	FJ899081	FJ969759	FJ969785
ATCC 14945	102A1.7	FJ899084	FJ969749	FJ969766
ATCC 21916	102A1.8	FJ899092	FJ969755	FJ969772
KCTC 2194	102A1.8	FJ859036	FJ969763	FJ969794
ATCC 19213	102A1.9	FJ899091	FJ969754	FJ969769

[68]

[69]

[표4]

키메라 CYP102A1

키메라 CYP102A1	야생형 CYP102A1(서열번호 1)의 아미노산 치환 부위	참고문헌
M16V3	R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V / <u>A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E</u> <u>687A/A741G/K813E/R825S/R836H/</u> <u>E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M</u> <u>967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022</u> <u>E</u>	Kang et al., 2014

[70] * 참고문헌 *

[71] : Kang JY, Ryu SH, Park SH, Cha GS, Kim DH, Kim KH, Hong AW, Ahn T, Pan JG, Joung YH, Kang HS, Yun CH (2014) Chimeric cytochromes P450 engineered by domain swapping and random mutagenesis for producing human metabolites of drugs. Biotechnol Bioeng. 111:1313-1322, 2014.

[72]

[73]

[표5]

키메라 CYP102A1의 점 돌연변이체

야생형 CYP102A1의 점 돌연변이체	야생형 CYP102A1(서열번호 1)의 아미노산 치환 부위	참고문헌
C7	R47L/K59N/F81I/F87V/E143G/L188Q/G240E/E267V/ S383R/ <u>A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K</u> <u>813E/R825S/R836H/</u> <u>E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1</u> <u>008D/H1021Y/Q1022E</u>	Kang et al., 2014
D8	R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/Y334C/A335V /D369G/ <u>A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K</u> <u>813E/R825S/R836H/</u> <u>E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1</u> <u>008D/H1021Y/Q1022E</u>	Kang et al., 2014
F7	R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/Q206R/E267A/V297A /K336E/ <u>A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K</u> <u>813E/R825S/R836H/</u> <u>E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/</u> <u>A1008D/H1021Y/Q1022E</u>	Kang et al., 2014
G1	R47L/F81I/F87V/E143G/T152A/L188Q/E267V/Q403R /V413A/ <u>A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K</u> <u>813E/R825S/R836H/</u> <u>E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/</u> <u>A1008D/H1021Y/Q1022E</u>	Kang et al., 2014
H1	I39V/R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/N213D/I259T/E2 67V/ <u>A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K</u> <u>813E/R825S/R836H/</u> <u>E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/</u> <u>A1008D/H1021Y/Q1022E</u>	Kang et al., 2014

[74] * 참고문헌 *

[75] : Kang JY, Ryu SH, Park SH, Cha GS, Kim DH, Kim KH, Hong AW, Ahn T, Pan JG, Joung YH, Kang HS, Yun CH (2014) Chimeric cytochromes P450 engineered by domain swapping and random mutagenesis for producing human metabolites of drugs. *Biotechnol Bioeng.* 111:1313-1322, 2014.

[76]

[77] [실시예 3]

[78] 야생형 CYP102A1 및 야생형 CYP102A1의 돌연변이체의 발현 및 정제

[79] 야생형 CYP102A1과 야생형 CYP102A1 돌연변이체의 유전자를 포함하는 플라스미드로 *Escherichia coli* DH5 α F'-IQ을 형질전환 시켰다(Kim et al., *Protein Expr Purif.* 57:188-200., 2008). 하나의 콜로니로부터 적정량을 암피실린(100 ug/ml)이 추가된 5 ml Luria-Bertani medium 에 접종하여 37°C에서 배양하고, 이 배양물을 암피실린(100 ug/ml)이 추가된 250 ml Terrific Broth medium에 접종하여 37°C에서 250 rpm으로 흔들며 주며 OD₆₀₀에서 0.8정도 될 때까지 배양하고, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside를 최종 농도 0.5 mM이 되도록 첨가하여 유전자 발현을 유도하였다. δ -Aminolevulinic acid(0.1 mM)을 첨가하였다. 발현이 유도된 후, 30°C에서 추가로 36시간 더 배양하고 원심분리(15분, 5000 g, 4°C)하여 세포를 수확하였다. 세포 펠렛을 TES 완충액(100mM Tris-HCL, pH7.6, 500mM sucrose, 0.5 mM EDTA)에 재현탁시키고 초음파분해로 세포를 용해시켰다(sonicator; Misonix, Inc., Farmingdale, NY). 세포용해물을 100,000 g, 90분, 4°C에서 원심분리한 후, 가용성 시토솔 분액(soluble cytosolic fraction)을 모아 활성을 측정하였다. 시토솔 분액을 50 mM potassium phosphate 완충액(pH 7.4)에서 투석하여 -80°C에서 보관하였으며, 제조 후 1개월 이내의 것을 실험에 사용하였다.

[80] CYP102A1의 농도는 CO-difference 스펙트럼으로부터 결정하였으며, 이때 사용한 ϵ 는 91 mM/cm 이었다(Omura et al. *J Biol Chem* 239:2379-2385, 1964). 야생형 및 돌연변이체 모두 통상적으로 300-700 nM P450을 얻을 수 있었다. 야생형 CYP102A1 및 야생형 CYP102A1의 돌연변이체의 발현정도는 1.0~2.0 nmol P450/mg cytosolic protein의 범위였다. 제조된 야생형 CYP102A1의 돌연변이체들 중에서 사람에게 있어서의 몇몇 기질(substrates)에 대한 촉매 활성이 큰 M16V3 및 이의 점 돌연변이체인 C7, D8, F7, G1, H1을 선택하였다(Kang JY, Ryu SH, Park SH, Cha GS, Kim DH, Kim KH, Hong AW, Ahn T, Pan JG, Joung YH, Kang HS, Yun CH. (2014) Chimeric cytochromes P450 engineered by domain swapping and random mutagenesis for producing human metabolites of drugs. *Biotechnology and Bioengineering* 111(7):1313-1322).

[81]

[82] [실시예 4]

[83] 야생형 CYP102A1 및 야생형 CYP102A1의 돌연변이체에 의한 플로레틴 산화

- [84] 야생형 CYP102A1(BM3 wt) 및 이의 돌연변이체들(M10, M16, M16V3, C7, D8, F7, G1, H1)이 플로레틴을 산화할 수 있는지 확인하였다.
- [85] 100mM potassium phosphate 완충액(pH 7.4) 0.25ml에 CYP102A1 100pmol과 플로레틴(최종농도 200 μ M)을 넣어 전형적인 steady-state 반응을 시켰다.
- [86] 반응을 시작하기 위하여 NADPH-생성 시스템(최종 농도: 1ml 당 10mM glucose 6-phosphate, 0.5mM NADP⁺ 및 1IU yeast glucose 6-phosphate)을 첨가하였다. dimethylsulfoxide로 플로레틴 50mM 용액을 제조하고, 효소 반응액으로 희석하여 최종 유기용매 농도가 1%(v/v) 이하가 되도록 하였다(도 1).
- [87] 반응액을 37°C에서 60분간 반응시키고, 얼음으로 차갑게 한 에틸아세테이트(ethyl acetate) 0.6ml로 반응을 종결시켰다.
- [88]
- [89] **HPLC 분석**
- [90] 반응혼합물을 원심분리한 후, 유기용매 총 180 μ l을 분리하여 질소가스 하에서 증발시키고 HPLC로 분석하였다. 시료(30 μ l)를 Gemini C18 컬럼(4.6mm x 150mm, 5 μ m, Phenomenex, Torrance, CA)에 주입하였다. 이동상 A는 0.1% 개미산, 0.5% 메탄올을 함유하는 물, 이동상 B는 100% 아세토니트릴을 사용하였다. 이동상 A/B(60/40, v/v)를 그래디언트 펌프(LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 1ml·min⁻¹의 속도로 흘려주었다. 용출액을 285nm의 UV로 측정하였다.
- [91] CYP102A1이 플로레틴을 산화할 수 있는지 조사하기 위하여, 야생형 CYP102A1(BM3 wt) 및 이의 돌연변이체들(M10, M16, M16V3, C7, D8, F7, G1, H1)을 이용하여 플로레틴의 산화능을 기질의 농도 200 μ M로 고정시키고 측정하였다.
- [92] 사람 CYP1A2, 박테리아 야생형 CYP102A1 및 이의 돌연변이체들에 의하여 생성된 플로레틴의 대사산물을 HPLC 크로마토그램(285 nm에서의 UV 흡광도를 측정)을 이용하여 조사하였다.
- [93] CYP102A1에 의해 하나의 주요 대사물질이 생성되었다. 주된 대사물질의 화학적 구조를 LC-MS와 NMR 분석하였고, 3-하이드록시 플로레틴(3-OH phloretin)을 생산하는 것을 확인할 수 있었다(도 2).
- [94]
- [95] **LC-MS 분석 및 NMR 분석**
- [96] 야생형 CYP102A1의 돌연변이체로부터 생산된 플로레틴의 대사산물을 동정하기 위하여, 플로레틴 및 대사산물의 LC 프로파일과 프래그멘테이션(fragmentation) 패턴을 비교하여 LC-MS 분석을 하였다.
- [97] CYP102A1 돌연변이체 M10을 200 μ M의 플로레틴과 NADPH-생성 시스템의 존재하에 37°C에서 20분간 반응시켰다. 얼음으로 식힌 2배의 에틸 아세테이트를 가하여 반응을 종결시켰다. 원심분리한 후, 유기용매층을 분리하여 질소가스하에 건조하였다. 반응물을 200 μ l의 이동상에 볼텍스 믹싱으로 재구성시키고 20초간 소니케이션하였다. 제조된 용액의 적정량(10 μ l)을 LC

컬럼에 주입하였다.

- [98] LC-MS 분석은 LCMS 소프트웨어를 장착한 쉬마쯔 LCMS-2010 EV 시스템 (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 electro spray ionization(positive) mode에서 실시하였다. Shim-pack VP-ODS 컬럼(250mm x 2.0mm i.d.; Shimadzu co., Japan)에서 0.1% 트리플루오로아세트산을 함유하는 물과 아세토니트릴(70:30, v/v)로 0.2 ml/min의 유속으로 분리하였다. 대사산물을 확인하기 위하여, mass 스펙트라를 electro spray ionization(positive) mode 및 SIM mode에서 기록하였다. 인터페이스와 디텍터 볼트는 각각 4.4 kV 및 1.5 kV 이었다. 네블라이제이션 가스 속도는 1.5ml/min으로 설정하였으며, 인터페이스, curve desolvation line(CDL) 및 히트블록 온도는 각각 250, 230 및 200°C로 하였다.
- [99] 그 결과, 반응샘플의 mass spectra은 39.7 min(3-하이드록시 플로레틴), 42.2 min(플로레틴)에서 피크를 나타냈다. 야생형 CYP102A1 돌연변이체(M10)에 의해 생성된 대사체 및 기질인 플로레틴의 mass spectrum은 [M+H]⁺로 계산하였을 때 각각 291 및 275로 관찰되었다(도 3).
- [100] 반응혼합물의 LC-MS 분석에 의하여 키메라 CYP102A1에 의한 3-하이드록시 플로레틴의 생산이 확인되었다.
- [101] 야생형 CYP102A1 돌연변이체 M10에 의하여 생성된 대사산물의 화학구조를 확인한 결과 생성된 산물은 NMR분석 기법을 통하여 분석한 결과 3-하이드록시 플로레틴인 것을 확인하였다(Huang AC, Wilde A, Ebmeyer J, Skouroumounis GK, Taylor DK. Examination of the Phenolic Profile and Antioxidant Activity of the Leaves of the Australian Native Plant Smilax glyciphylla. J. Nat. Prod. 76: 19301936, 2013. Supporting Information p.13)(도 4, 도 5, 표 6).
- [102]
- [103]

[표6]

주요 대사 산물 (3-OH phloretin)의 ^1H 및 ^{13}C NMR 케미컬 시프트(chemical shift)

*Position	$\delta_{\text{C}}^{13}\text{C}(\delta)$, ppm	$\delta_{\text{H}}^1\text{H}(\delta)$, ppm
1	134.9	
2	116.7	6.666 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, partially overlapped with a wing of 5'-H proton doublet)
3	146.3	
4	144.5	
5	116.4	6.662 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$)
6	120.8	6.541 (1H, dd, $J=2.0\text{Hz}$, 8.0 Hz)
1'	105.4	
2', 6'	166.0	
3', 5'	95.9	5.807 (2H, s)
4'	166.3	

[104] *Position은 도1A에 나타난 탄소의 번호임

[105]

[106] 분자촉매활성(turnover number)의 결정

[107] 야생형 CYP102A1의 돌연변이체들(M10, M16, M16V3, C7, D8, F7, G1, H1)에 의한 플로레틴 산화물의 생성속도를 알아보기 위하여 200 μM 의 플로레틴을 사용한 반응에서 분자촉매활성(turnover number)을 결정하였다. 플로레틴의 생성속도를 위에 기재한 바와 같이 HPLC로 결정하였다.

[108] 플로레틴의 산화(산물의 생성)에 대한 8종의 돌연변이체(M10, M16, M16V3, C7, D8, F7, G1, H1)의 분자촉매활성은 넓은 범위에서 다양하였다. 반면 야생형 CYP102A1의 촉매활성을 보이지 않았다. 야생형 CYP102A1의 돌연변이체 중 M16, C7, G1은 낮은 활성을 보였으며, 상기 8종의 돌연변이체중 M10은 다른 돌연변이체에 비해 2~3배 높은 활성을 나타내었다(도 6).

[109] CYP102A1 돌연변이체 3종류(M10, M16, M16V3)의 효소를 선택하여 대사산물을 생성하는 효율을 속도론적 매개변수를 이용하여 비교하였다(도 7, [표 7]).

[110]

[111]

[표7]

야생형 CYP102A1 돌연변이체의 속도론적 매개변수

CYP102A1	Formation of 3-OH phloretin		
	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} / K_m ($\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)
M10	20 ± 1	59 ± 8	0.34 ± 0.13
M16	6.5 ± 0.8	65 ± 16	0.10 ± 0.05
M16V3	6.9 ± 0.4	38 ± 6	0.18 ± 0.07

[112]

서열목록 Free Text

- [113] 서열목록은 서열목록파일에 별도로 첨부하였다.
- [114] 서열번호 1은 wild type CYP102A1 amino acid sequence이다.
- [115] 서열번호 2는 BamH I forward primer이다.
- [116] 서열번호 3은 Sac I reverse primer이다.
- [117] 서열번호 4는 R47L primer이다.
- [118] 서열번호 5는 F81I primer이다.
- [119] 서열번호 6은 F87V primer이다.
- [120] 서열번호 7은 E143G primer이다.
- [121] 서열번호 8은 L188Q primer이다.
- [122] 서열번호 9는 E267V primer이다.
- [123] 서열번호 10은 wild type CYP102A1 DNA sequence이다.
- [124] 서열번호 11은 wild type CYP102A1 mutant M16 DNA sequence이다.
- [125] 서열번호 12는 wild type CYP102A1 mutant M16V3 DNA sequence이다.
- [126] 서열번호 13은 wild type CYP102A1 mutant M10 amino acid sequence이다.
- [127] 서열번호 14는 wild type CYP102A1 mutant M16 amino acid sequence이다.
- [128] 서열번호 15는 wild type CYP102A1 mutant M16V3 amino acid sequence이다.

청구범위

- [청구항 1] CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군에서 적어도 하나 이상의 효소를 포함하고, 플로레틴으로부터 3-하이드록시 플로레틴을 생성하는 3-하이드록시 플로레틴 제조용 조성물로, 상기 CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군은 야생형 CYP102A1의 R47L/F87V/L188Q, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/K59N/F81I/F87V/E143G/L188Q/G240E/E267V/S383R/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/Y334C/A335V/D369G/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/Q206R/E267A/V297A/K336E/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/T152A/L188Q/E267V/Q403R/V413A/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, I39V/R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/N213D/I259T/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E로 구성된 군인 3-하이드록시 플로레틴 제조용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, NADPH-생성 시스템을 더 포함하는 3-하이드록시 플로레틴 제조용 조성물.
- [청구항 3] CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군에서 적어도 하나 이상의 효소를 포함하고, 플로레틴을 기질로 하여 반응시키는 단계를 포함하는 3-하이드록시 플로레틴 생산방법으로, 상기 CYP102A1의 돌연변이체로 구성된 군은 야생형 CYP102A1의 R47L/F87V/L188Q, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/K59N/F81I/F87V/E143G/L188Q/G240E/E267V/S383R/A474V/E558D/

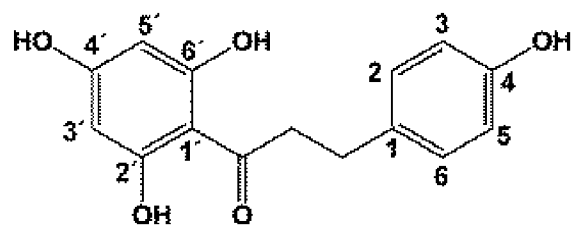
T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V/Y334C/A335V/D369G/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/Q206R/E267A/V297A/K336E/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, R47L/F81I/F87V/E143G/T152A/L188Q/E267V/Q403R/V413A/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E, I39V/R47L/F81I/F87V/E143G/L188Q/N213D/I259T/E267V/A474V/E558D/T664A/P675L/A678E/E687A/A741G/K813E/R825S/R836H/E870N/I881V/E887G/P894S/S954N/M967V/Q981R/A1008D/H1021Y/Q1022E로 구성된 군인 3-하이드록시 플로레틴 생산방법.

[청구항 4]

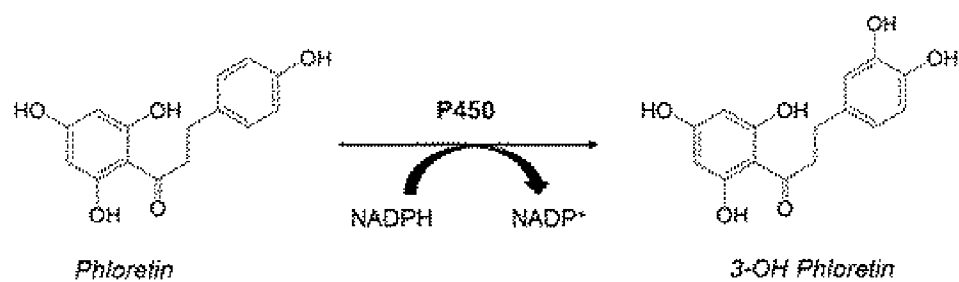
제3항에 있어서,
NADPH-생성 시스템을 더 포함하는 3-하이드록시 플로레틴 생산방법.

[도 1]

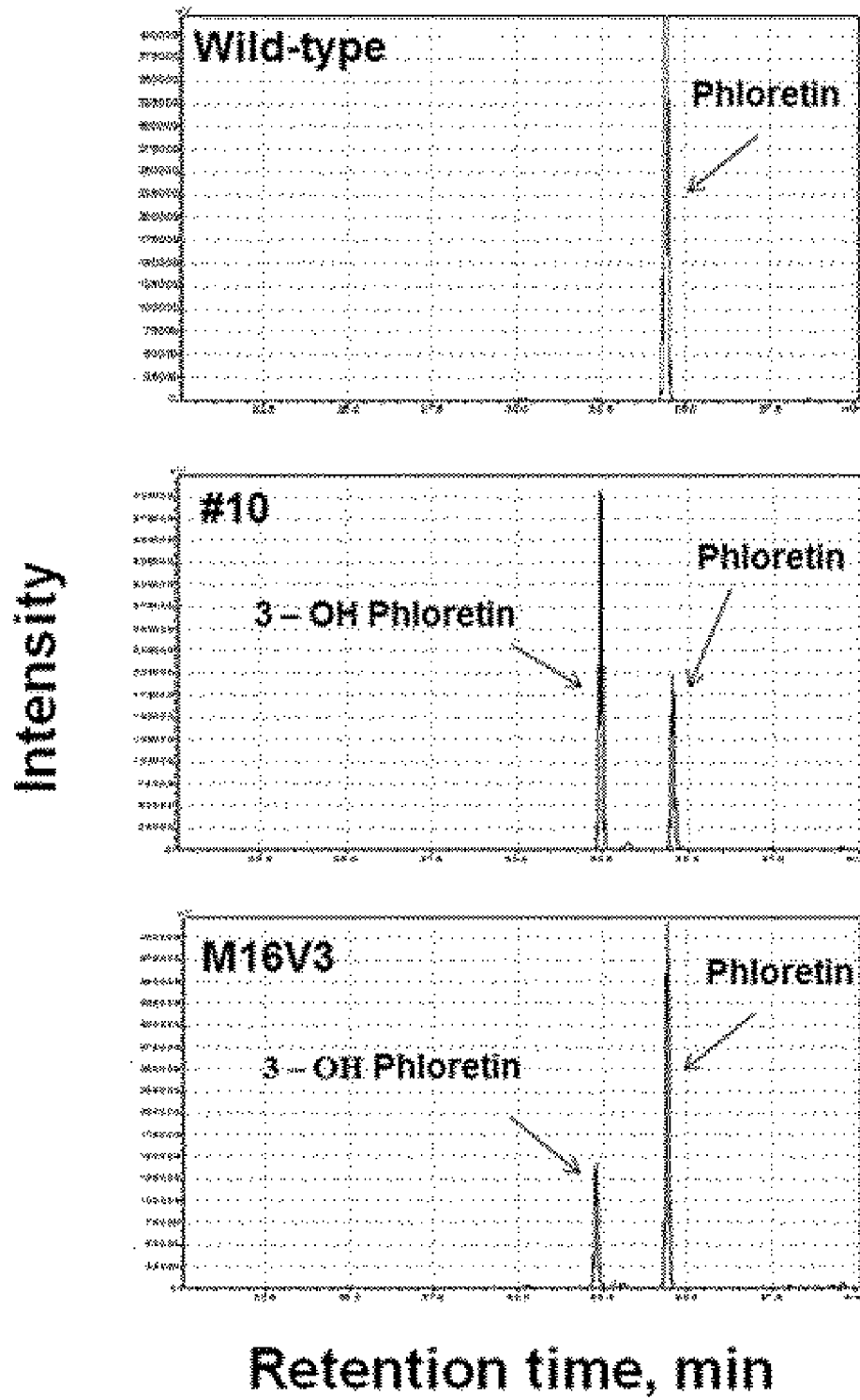
(A) Chemical structure of phloretin



(B) 3-Hydroxylation of phloretin by CYP102A1 mutants

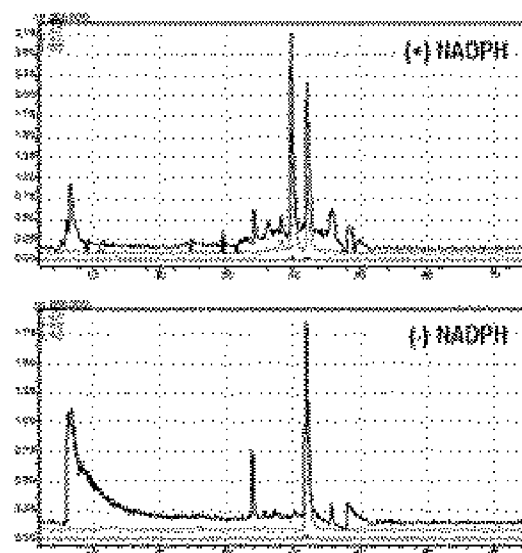


[도2]

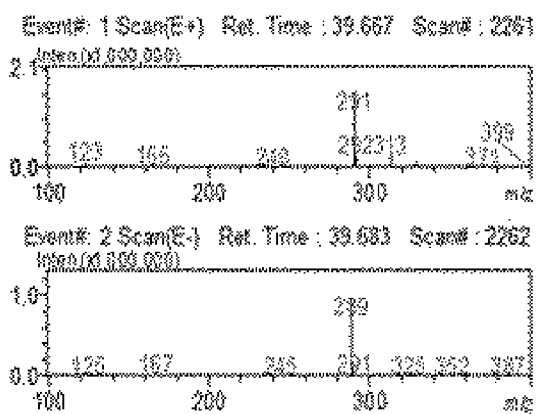


[도3]

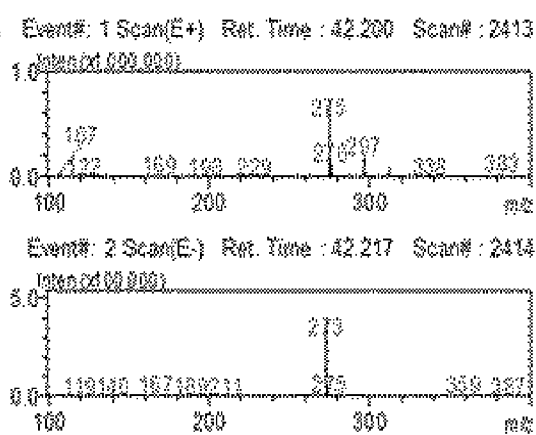
(A) TIC



(B) Product

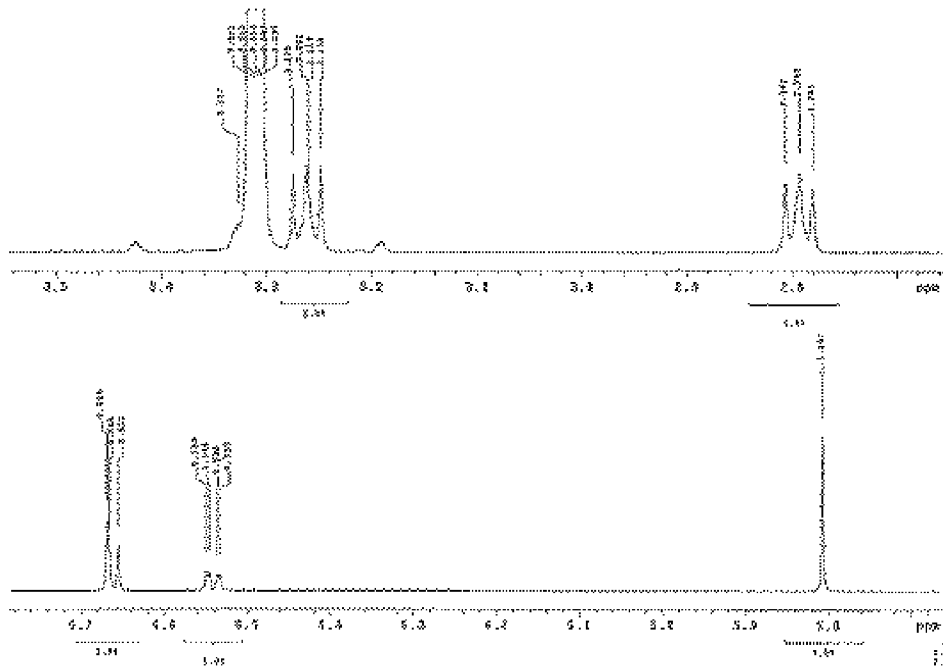


(C) Substrate



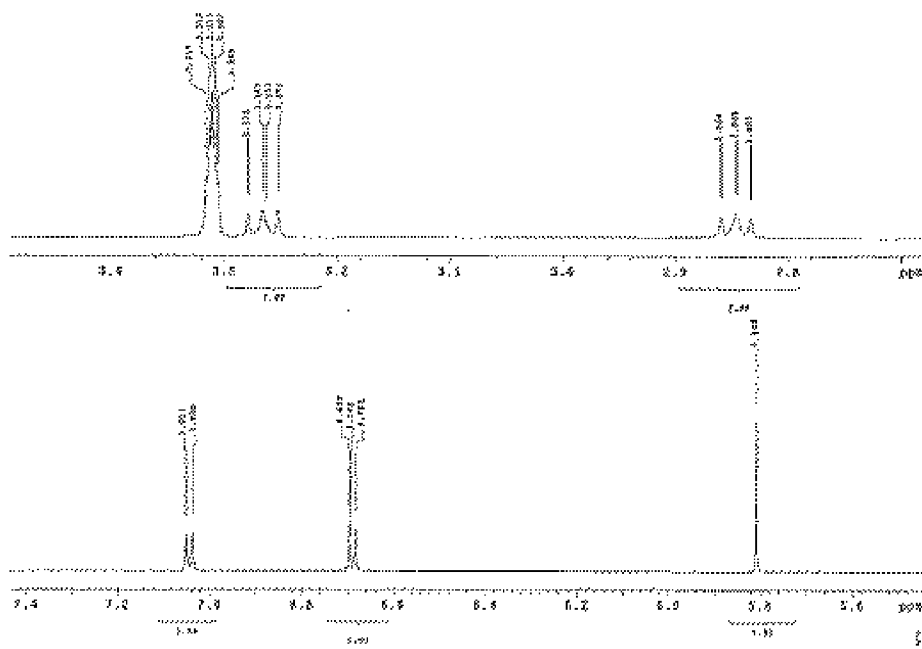
[도4]

3-OH Phloretin

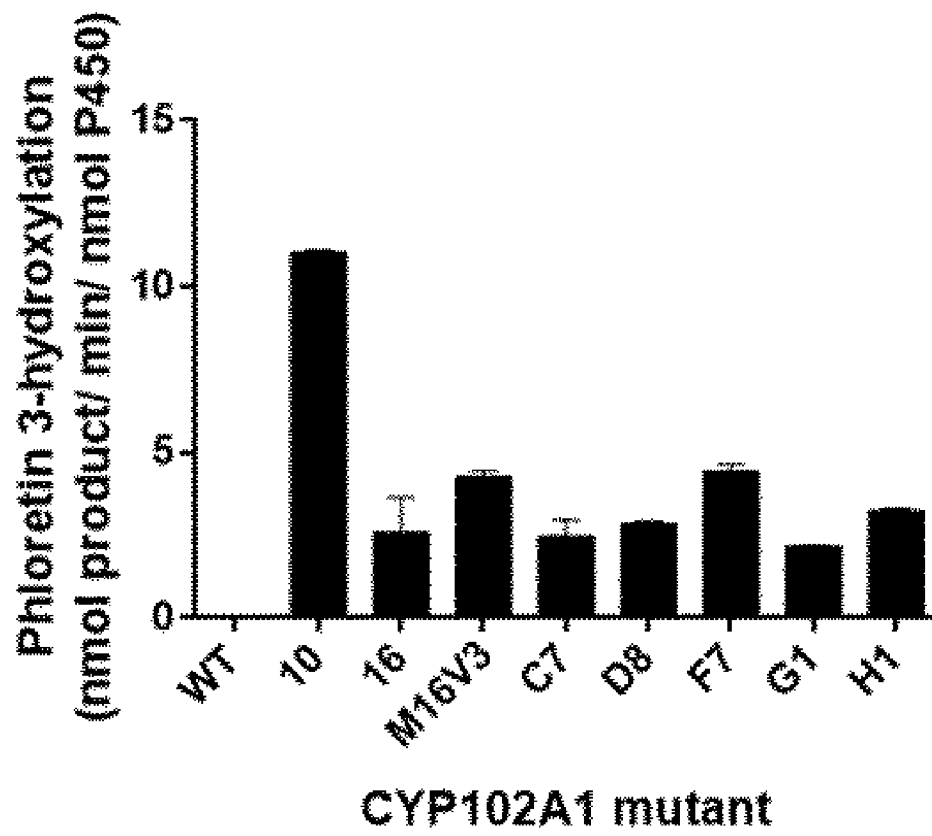


[도5]

Phloretin



[도6]



[도7]

