

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0072389

(43) 공개일자 2020년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 519/00 (2006.01) A61K 31/407 (2006.01)

A61K 31/4353 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

C12P 17/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 519/00 (2013.01)

A61K 31/407 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0086647

(22) 출원일자 2019년07월17일

심사청구일자 2019년07월17일

(30) 우선권주장

1020180158865 2018년12월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인

주식회사 인트론바이오테크놀로지

경기도 성남시 중원구 사기막골로 137, 중앙인더스피아 701~704호 (상대원동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

윤여준

서울특별시 강남구 압구정로 113 (압구정동, 미성아파트) 25동 506호

정은지

서울특별시 양천구 목동동로 393 부영그린타운 1차아파트 801호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

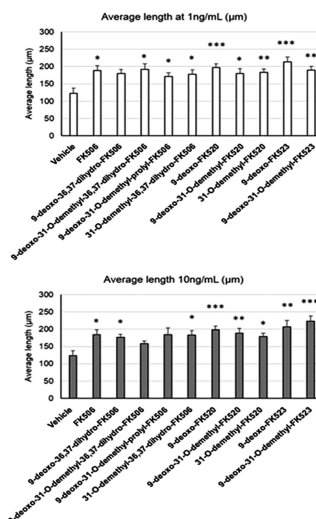
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 신규 화합물 및 이를 포함하는 신경계 질환 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 주요 성분으로 활용이 가능한 신규 화합물 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506, 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506, 31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 9-deoxo-31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 9-deoxo-FK520, 31-O-demethyl-FK520, 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520, 9-deoxo-FK523, 또는 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523의 제조 및 이의 신경계 질환의 예방 또는 치료용도에 관한 것이다.

대표도 - 도56



(52) CPC특허분류

A61K 31/4353 (2013.01)

A61P 25/00 (2018.01)

C12P 17/18 (2013.01)

(72) 발명자

반용선

서울특별시 송파구 올림픽로47길 9 101동 301호
(풍납동, 쌍용아파트)

윤성준

서울특별시 강남구 선릉로 206, 104동 2302호 (대
치동, 동부센트레빌)

강상현

서울특별시 송파구 올림픽로 99, 140동 1602호 (잠
실동, 잠실엘스)

전수연

서울특별시 서초구 잠원로8길 35, 103동 902호 (잠
원동, 래미안신반포팰리스)

권안성

경기도 광주시 초월읍 현산로 119, 204동 1202호
(우림2차아파트)

유영지

서울특별시 서대문구 독립문로 10, 105동 306호 (삼
호아파트)

송명중

서울특별시 영등포구 도림로54길 14, 103동 401호

범지윤

서울특별시 영등포구 당산로 205 해링턴타워 101동
1605호

정진아

서울특별시 노원구 동일로 1009-13 202호 (공
릉동, 삼성스타빌)

이수정

경기도 용인시 수지구 성북동 자이2차 아파트 207
동 1101호

황보아름

서울특별시 마포구 신촌로16길 22, 201호

이경태

서울특별시 서대문구 연희로39길 67번지 루미아트
A동 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2A1A05005078
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 후속연구자지원 (도전)
연구과제명 미생물 유래 천연물의 생합성경로 규명 및 재설계
기 여 율 16.5/100
주관기관 이화여자대학교
연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711077105
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(전략과제)
연구과제명 뇌수막염유발 진균의 뇌 감염 경로와 이를 조절하는 kinase 네트워크의 시스템수준

규명(3/5)

기 여 율 4.95/100
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2018.10.01 ~ 2019.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545017433
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 산업화미생물유전체전략연구
연구과제명 [단위/1세부]농·식품 유용 미생물의 다중오믹스 기반 유용 유전자원 발굴 및 가치제고화

기술 개발(1/4)

기 여 율 4.95/100
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.25 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3C7A1023471
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 한국연구재단-뇌과학원천기술개발사업
연구과제명 자폐 관련 뇌신경회로의 전기생리학적 분석 및 조절 기술 개발
기 여 율 3.3/100
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2018.02.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI18C1664
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구자주도질병극복연구-의료기술심화연구
연구과제명 신규 신경재생 활성의 구조변형 개량신약 개발
기 여 율 67/100
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.30 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B3011098
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 한국연구재단-중견연구자지원사업
연구과제명 시상회로의 신경세포와 글리아세포 상호작용 메커니즘 규명을 통한 수면 조절 연구
기 여 율 3.3/100
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

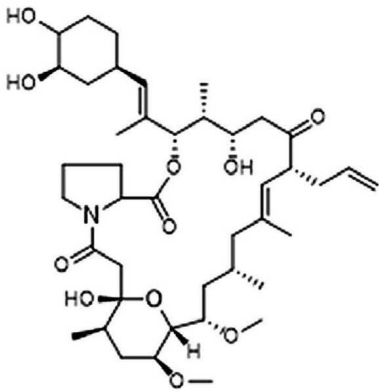
명세서

청구범위

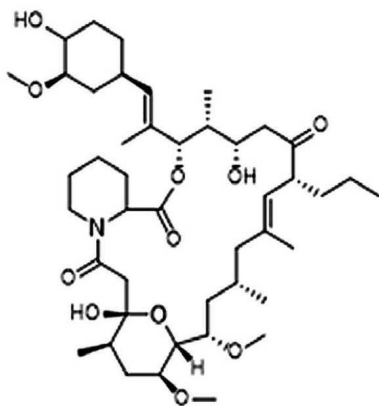
청구항 1

하기의 화학식 1로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506(9-데옥소-31-*O*-디메틸-프롤릴-FK506), 하기의 화학식 2로 표시되는 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506(9-데옥소-36,37-디히드로-FK506), 하기의 화학식 3으로 표시되는 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506(31-*O*-디메틸-36,37-디히드로-FK506), 하기의 화학식 4로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506(9-데옥소-31-*O*-디메틸-36,37-디히드로-FK506), 하기의 화학식 5로 표시되는 9-deoxo-FK520(9-데옥소-FK520), 하기의 화학식 6으로 표시되는 31-*O*-demethyl-FK520(31-*O*-디메틸-FK520), 하기의 화학식 7로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520(9-데옥소-31-*O*-디메틸-FK520), 하기의 화학식 8로 표시되는 9-deoxo-FK523(9-데옥소-FK523), 및 하기의 화학식 9로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523(9-데옥소-31-*O*-디메틸-FK523)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 화합물, 이의 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

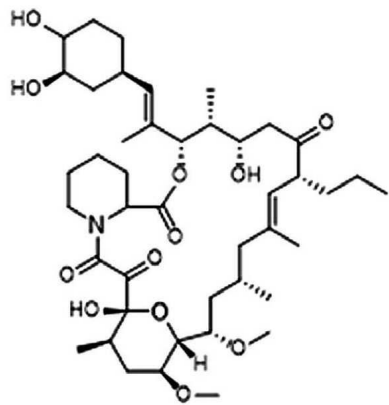
[화학식 1]



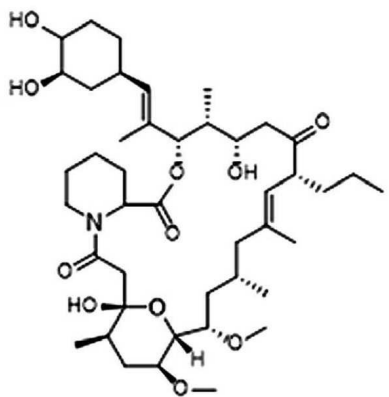
[화학식 2]



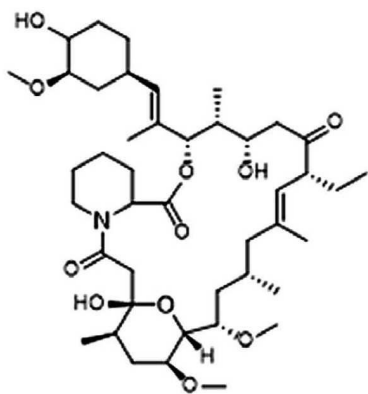
[화학식 3]



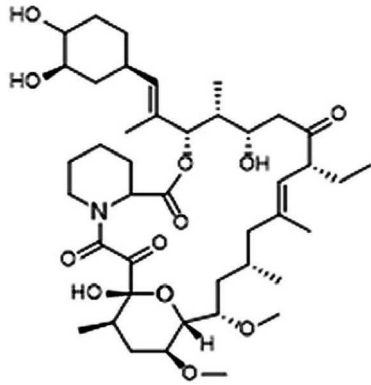
[화학식 4]



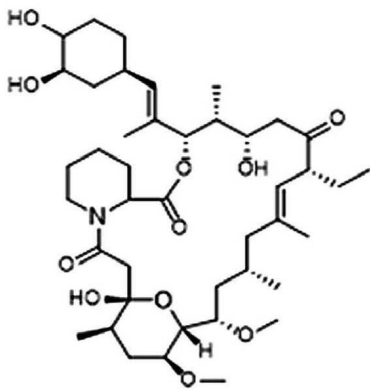
[화학식 5]



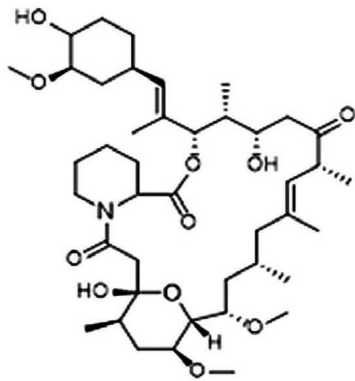
[화학식 6]



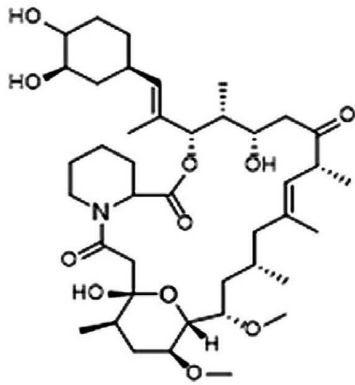
[화학식 7]



[화학식 8]



[화학식 9]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 9-deoxy-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506이 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd-fkbM (수탁번호 KCTC13581BP)을 생산균주로 이용한 배양을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 9-deoxy-36,37-dihydro-FK506이 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd,tcsD (수탁번호 KCTC13580BP)를 생산균주로 이용한 배양을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506이 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd,tcsD (수탁번호 KCTC13584BP)를 생산균주로 이용한 배양을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 9-deoxy-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506이 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd-fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13585BP)를 생산균주로 이용한 배양을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 9-deoxy-FK520이 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd,tcsB (수탁번호 KCTC13579BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd,tcsD (수탁번호 KCTC13580BP)를 생산균주로 이용한 배양을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 31-*O*-demethyl-FK520이 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd,tcsB (수탁번호 KCTC13583BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd,tcsD (수탁번호 KCTC13584BP)를 생산균주로 이용한 배양을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520이 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, tcsB (수탁번호 KCTC13582BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, tcsD (수탁번호 KCTC13585BP)를 생산균주로 이용한 배양을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 9-deoxo-FK523이 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD, tcsB (수탁번호 KCTC13579BP)를 생산균주로 이용한 배양을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

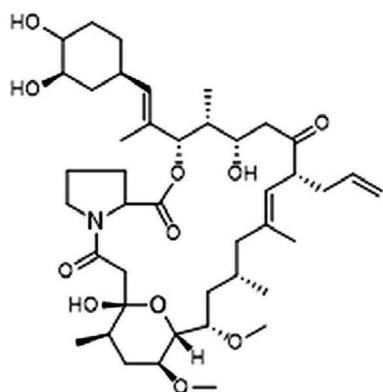
청구항 10

제1항에 있어서, 상기 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523이 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, tcsB (수탁번호 KCTC13582BP)를 생산균주로 이용한 배양을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

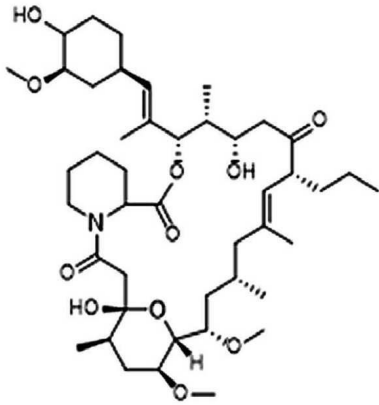
청구항 11

하기의 화학식 1로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506, 하기의 화학식 2로 표시되는 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506, 하기의 화학식 3으로 표시되는 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 하기의 화학식 4로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 하기의 화학식 5로 표시되는 9-deoxo-FK520, 하기의 화학식 6으로 표시되는 31-*O*-demethyl-FK520, 하기의 화학식 7로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520, 하기의 화학식 8로 표시되는 9-deoxo-FK523, 및 하기의 화학식 9로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 화합물, 이의 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 신경계 질환의 예방 또는 치료 방법:

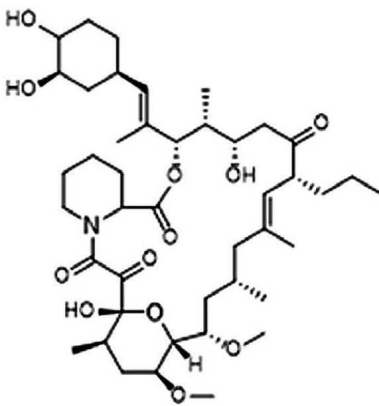
[화학식 1]



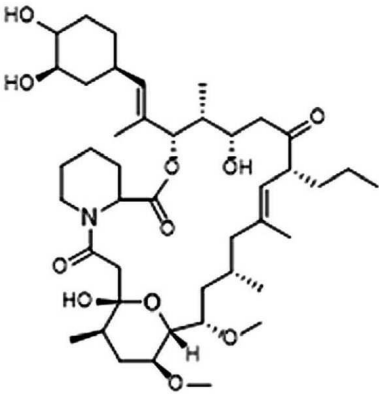
[화학식 2]



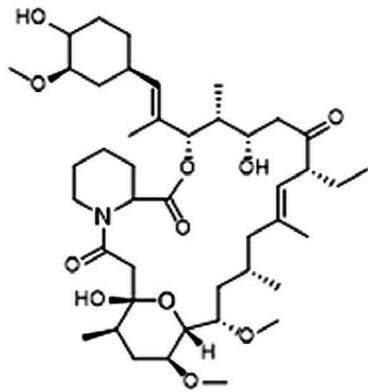
[화학식 3]



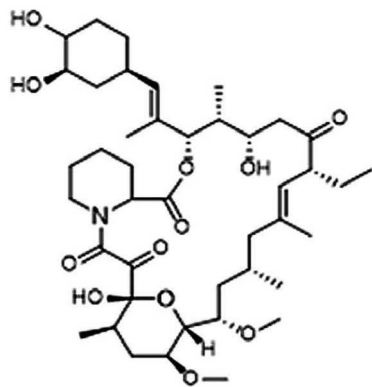
[화학식 4]



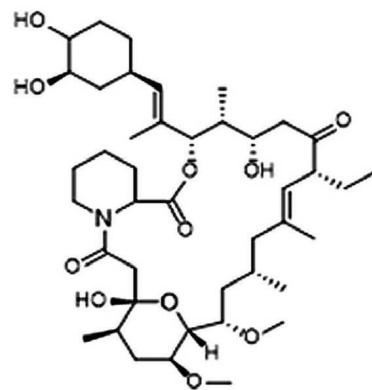
[화학식 5]



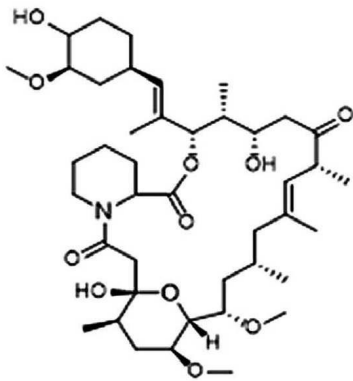
[화학식 6]



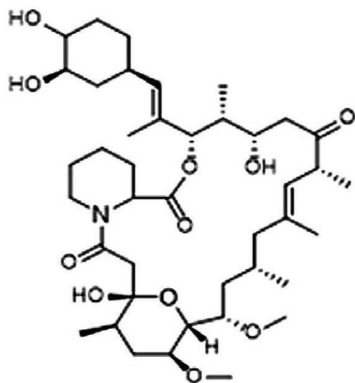
[화학식 7]



[화학식 8]



[화학식 9]



청구항 12

제11항에 있어서, 상기 신경계 질환은 퇴행성 신경질환 (Neurodegenerative disease), 말초신경장애 (Peripheral nerve injury), 외상성뇌손상 (Traumatic brain injury), 뇌졸중 (Cerebral infarction)인 것을 특징으로 하는, 신경계 질환의 예방 또는 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 주요 성분으로 활용이 가능한 신규 화합물 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506(9-데옥소-31-O-디메틸-프롤릴-FK506), 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506(9-데옥소-36,37-디히드로-FK506), 31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506(31-O-디메틸-36,37-디히드로-FK506), 9-deoxo-31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506(9-데옥소-31-O-디메틸-36,37-디히드로-FK506), 9-deoxo-FK520(9-데옥소-FK520), 31-O-demethyl-FK520(31-O-디메틸-FK520), 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520(9-데옥소-31-O-디메틸-FK520), 또는 9-deoxo-FK523(9-데옥소-FK523), 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523(9-데옥소-31-O-디메틸-FK523)의 제조 및 활용에 관한 것으로, 구체적으로는 상기 신규 화합물의 제조방법, 및 상기 신규 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 신경손상은 뇌, 척추, 말초신경 등 다양한 신경계에서 나타날 수 있는데, 그에 따른 질병으로는 신경세포의 손

실로 나타나는 퇴행성 신경질환 (Neurodegenerative disease), 말초신경장애 (Peripheral nerve injury), 외상성뇌손상 (Traumatic brain injury)과 뇌혈관장애로 나타나는 뇌졸중 (Cerebral infarction) 등이 있다. 중추신경계의 신경손상에 의해 나타나는 퇴행성 뇌질환은 치매, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측색 경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis)이 대표적이라 할 수 있다. 퇴행성 신경질환 중에서는 파킨슨병과 알츠하이머병이 대부분을 차지하며, 헌팅턴병과 근위축성 측색경화증은 발생 환자수가 비교적 적다. 말초신경장애는 여러 가지 원인에 의해 말초신경계의 손상으로 발병되는데, 원인의 60%는 당뇨병에 의한 합병증이고 암을 치료하기 위한 화학요법 (Chemotherapy) 중에 말초신경장애 질환을 얻는 경우도 많다. 외상성뇌손상은 교통사고나 낙상 등의 외상으로 인해 뇌조직이 손상을 입은 것으로, 사망환자가 많이 발생되고 신체적 장애가 높은 질환이라 할 수 있다.

[0004] 현재, 이들 신경손상 질환들에 대하여 손상된 신경을 회복시키고 신경세포를 재생시키는 등의 근본적 치료가 실시되지 못하고 통증 완화나 악화 완화 등을 목적으로 한 치료가 행하여지고 있다. 이는 신경손상을 지연시키는 효과를 넘어 신경손상 질환의 치료에 사용될 수준의 신경재생 및 회복 효과를 제공해 주는 약물이 없었기 때문이다. 신경손상에 의한 장애가 발생한 환자는 사회 및 가정에서의 역할에 크게 제한을 받게 되고, 이로 인한 개인적 손실 및 삶의 질 악화 등을 고려할 때, 신경손상에 관련되는 다양한 질환들에 단독 또는 병용 요법으로 활용될 수 있는 신경재생의 효과를 제공해 줄 수 있는 약물의 개발이 절실하다 할 수 있다.

[0005] 또한, 한국공개특허 제10-2005-0071491호(발명의 명칭: 천식의 치료를 위한 베타2-작용제와 배합된 타크롤리무스 유도체의 용도)는 급성 또는 만성 천식을 치료 또는 예방하기 위해 동시적, 분리적 또는 순차적으로 사용하기 위한 의약의 제조를 위한 FK506 유도체 및 β 2-작용제의 신규한 용도를 개시하고 있으나, FK506 유도체, FK520 유도체 또는 FK523 유도체를 신경계 질환을 치료하는 데 적용한 사례는 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 다양한 노력을 한 결과로 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 주요 성분으로 활용이 가능한 신규 화합물 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506, 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506, 31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 9-deoxo-31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 9-deoxo-FK520, 31-O-demethyl-FK520, 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520, 9-deoxo-FK523, 및 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523 (이하 '9종 신규 화합물'로 통칭)의 신경세포 성장 촉진 효과를 규명하고, 이들의 제조공정을 개발하고, 더 나아가 이들을 유효성분으로 활용한 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개발하고, 이 조성물이 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서 효과적으로 활용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 상기 9종 신규 화합물, 이의 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 목적은 9종 신규 화합물 중 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다. 여기서 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 신경 재생 촉진용 조성물을 의미한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 9종 신규 화합물의 이성질체 또는 약제학적으로 허용 가능한 염 중 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다. 여기서 상기 약학적 조성물은 신경 재생 촉진용 조성물로 활용될 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 9종 신규 화합물 각각의 생물학적 제조방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 9종의 신규 화합물의 생물학적 제조공정에 이용될 수 있는 생산 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM (수탁번호 KCTC13581BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD,tcsD (수탁번호 KCTC13580BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13584BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13585BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD,tcsB (수탁번호 KCTC13579BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13583BP), 및 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13582BP)를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

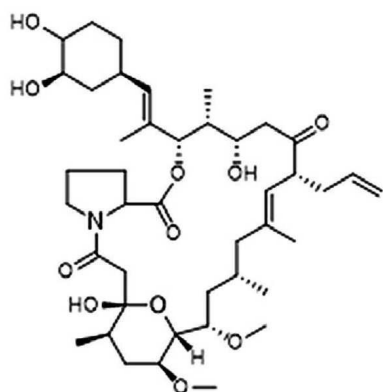
[0020] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[0021] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0023] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 9종 신규 화합물의 제조공정, 제조공정을 이용하여 제조한 각 신규 화합물을 포함하는 신경계 질환 의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 이 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용한 신경계 질환에 대한 치료방법을 제공한다.

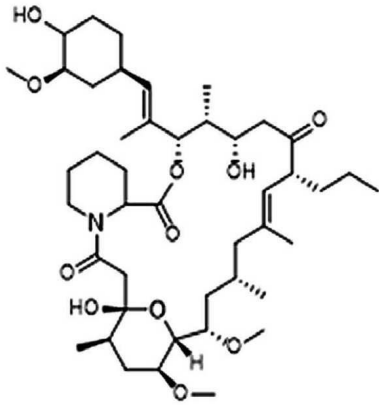
[0024] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 9종 신규 화합물, 하기 [화학식 1]로 표시되는 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506, 하기 [화학식 2]로 표시되는 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506, 하기 [화학식 3]으로 표시되는 31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 하기 [화학식 4]로 표시되는 9-deoxo-31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 하기 [화학식 5]로 표시되는 9-deoxo-FK520, 하기 [화학식 6]으로 표시되는 31-O-demethyl-FK520, 하기 [화학식 7]로 표시되는 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520, 하기 [화학식 8]로 표시되는 9-deoxo-FK523, 하기 [화학식 9]로 표시되는 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0025] [화학식 1]



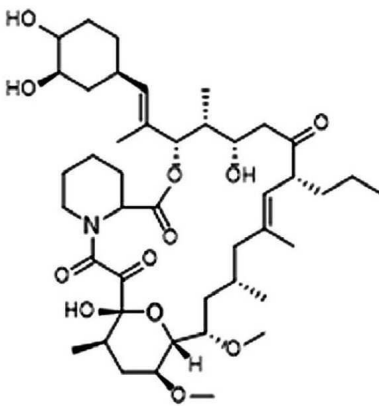
[0026]

[0027] [화학식 2]



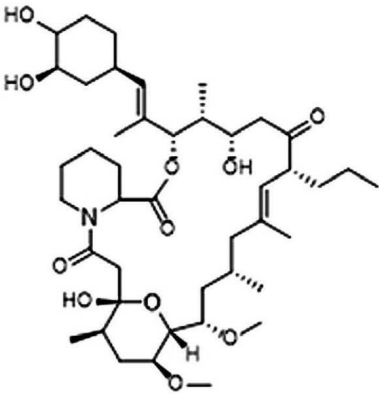
[0028]

[0029] [화학식 3]



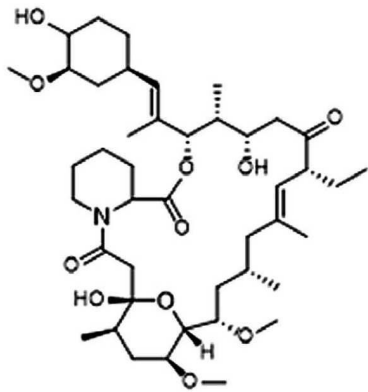
[0030]

[0031] [화학식 4]



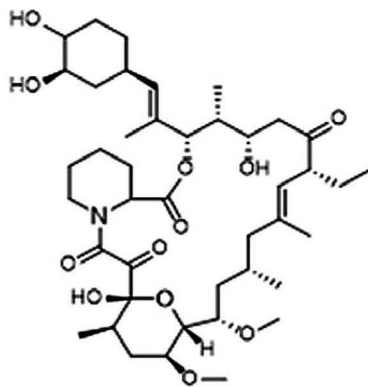
[0032]

[0033] [화학식 5]



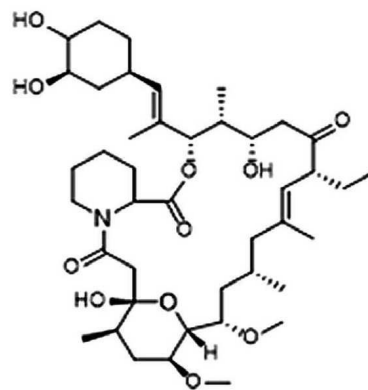
[0034]

[0035] [화학식 6]



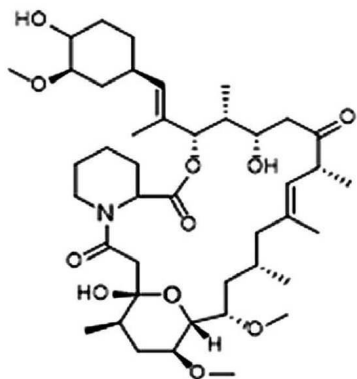
[0036]

[0037] [화학식 7]



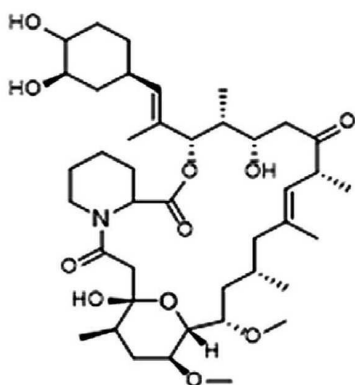
[0038]

[0039] [화학식 8]



[0040]

[0041] [화학식 9]



[0042]

[0044] 본 발명에서 사용된 용어, "FK506, 타크롤리무스(tacrolimus) 또는 푸지마이신(fujimycin)"은 다양한 스트렙토마이세스 쾅쿠바엔시스 (*Streptomyces tsukubaensis*)로 부터 최초로 분리된 면역억제활성을 갖는 물질로 23-원 (23-membered) 폴리케티드(polyketide) 매크롤리드이다. 면역억제작용은 사이클로스포린보다도 강하고, 장기이식시 특히 간을 이식할 때 거부반응을 억제시키기 위해 사용하는 것으로 알려져 있다. 상기 FK506은 PKS/NRPS(polyketide synthase/nonribosomal peptide synthetase) 복합 시스템에 의해 합성될 수 있으나, 본 발명의 FK506 유도체는 스트렙토마이세스 속의 생합성 유전자 결손을 통해 제조된 신규한 균주를 통해 생산된 신규한 화합물일 수 있다.

[0045] 본 발명에서 사용된 용어, "FK520 또는 아스코마이신(ascomycin)"은 역시 면역억제제로서, 23개의 탄소로 형성되는 매크롤리드 구조의 화합물이며, FK506의 C21 위치의 에틸 유사체이다.

[0046] 본 발명에서 사용된 용어, "FK523"는 FK506의 C21 위치의 메틸 유사체이다.

[0048] 하나의 구체예로서, 본 발명의 화합물은 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다.

[0049] 이성질체란 화학식은 같으나 동일하지는 않은 화합물의 관계를 의미하며, 예를 들어 구조 이성질체, 기하 이성질체, 광학 이성질체 (거울상 이성질체), 입체 이성질체, 부분 입체 이성질체를 포함할 수 있다.

[0050] 약제학적으로 허용가능한 염은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서, 이 염에 기인한 부작용이 모체 화합물의 이로온 효능을 저하시키지 않는 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미할 수 있다. 예를 들어 상기 염은 약학적으로 허용가능한 유리산 (Free acid)에 의해 형성된 산부가염일 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동 물량의 화합물 및 물량의 산 또는 알코올 (예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조된 것일 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다.

상기 염은 염기를 사용하여 제조된 약학적으로 허용가능한 금속염일 수 있다.

- [0051] 또 하나의 구체예로서, 본 발명의 화합물은 용매화물 또는 전구약물 (Pro-drug) 형태일 수 있으며, 이는 본 발명의 범위 내에 포함된다. 용매화물은 바람직하게는 수화물 및 에탄올화물을 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약학적 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있고, 공인된 신경계 질환 치료 효과를 가진다고 알려진 약물을 추가로 포함하여 복합제제로 제조하여 사용할 수 있으며, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 트란스큐톨 (Transcutol), 폴리에틸렌글리콜 (Polyethylene glycol), 트리아세틴 (Triacetin) 및 이들의 혼합물로 예시할 수 있는 계면활성제 (Co-surfactant); 크레모포어 (Cremophor), 트윈 (Tween), 미리즈 (Myrj), 폴록사머 (Poloxamer), 플루로닉 (Pluronic), 루트롤 (Lutrol), 임비토르 (Imwitor), 스판 (Span), 라브라필 (Labrafil) 등의 단독 또는 혼합물로 예시할 수 있는 계면활성제 (Surfactant); 미그리올 (Miglyol), 캡텍스 (Captex), 에틸올레이트 (Ethyl oleate) 등의 단독 또는 혼합물로 예시할 수 있는 오일 (Oil); 및, 에리스로빈산 (Erythorbic acid), 구연산 (Citric acid) 등의 단독 또는 혼합물로 예시할 수 있는 유기산류 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0054] 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면 활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.
- [0056] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경계 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 신경계 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 모든 동물을 의미할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양의 9종 신규 화합물 중 선택된 하나 이상, 또는 이것의 이성질체나 염을 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [0059] 본 발명의 약학적 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은 0.001 mg/kg 내지 1000 mg/kg일 수 있으며, 구체적으로는 0.05 mg/kg 내지 200 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg 일 수 있으나 이에 제한 되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 유발을 최소화 하면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0062] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로

를 통하여 투여될 수 있다.

- [0063] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 약학적 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 신경계 질환의 치료 목적으로 사용될 수 있다.
- [0066] 본 발명에서 신경계 질환에는 신경손상질환이 포함되며, 신경손상질환으로는 퇴행성 신경질환 (Neurodegenerative disease), 말초신경장애 (Peripheral nerve injury), 외상성뇌손상 (Traumatic brain injury)과 뇌혈관장애로 나타나는 뇌졸중 (Cerebral infarction) 등이 예시될 수 있으나, 이에 국한되지 않음은 자명하다.
- [0067] 일 예로 상기 퇴행성 신경질환은 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 여러 가지 증상을 유발하는 질환을 의미하는 것으로, 예를 들어 치매, 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨 병 (Parkinson's disease), 진행성 핵상마비 (Progressive supranuclear palsy), 다계통 위축증 (Multiple system atrophy), 감람핵-뇌교-소뇌 위축증 (Olivopontocerebellar atrophy: OPCA), 샤이-드래거 증후군 (Shy-Drager syndrome); 선조체-흑질 퇴행증 (Striatonigral degeneration), 헌팅톤병 (Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 본태성 진전증 (Essential tremor), 피질-기저핵 퇴행증 (Corticobasal ganglionic degeneration), 미만성 루이 소체 질환 (Diffuse Lewy body disease), 파킨슨-ALS-치매 복합증 (Parkinson-ALS-dementia complex of Guam) 또는 픽병 (Pick's disease)일 수 있다.
- [0068] 다른 일 예로 상기 신경손상질환은 간질, 중풍, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 척수 손상 질환, 말초신경질환, 행동장애, 발달장애, 정신 지체, 다운증후군 또는 정신분열증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 또 다른 일 예로 상기 신경손상질환은 신경세포 손상 또는 세포 사멸 등을 원인으로 하는 질환일 수 있다.
- [0071] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 신경계 질환의 발병 가능성이 있거나 상기 질환이 의심되는 증상 또는 상태를 가진 개체에게 투여하여 신경계 질환의 발병 가능성을 낮추거나 상기 증상 또는 상태를 완화하는 행위를 의미한다.
- [0072] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 신경계 질환 발병 의심 개체에 투여하여 신경계 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0073] 본 발명의 일 구체예에서는 상기 9종 신규 화합물의 면역억제활성 효과를 인비트로 T세포 활성분석법으로 확인하여 FK506 보다 감소된 면역억제활성을 확인할 수 있었다.
- [0074] 또한, 본 발명의 다른 구체예에서는 상기 9종 신규화합물의 신경 축삭 생성효과를 확인하여 신경세포 성장촉진 활성능을 확인하였다.
- [0075] 본 발명의 또 다른 구체예에서는 신경을 손상시킨 마우스의 9종 신규화합물을 투여 후 BBB 테스트 및 그리드 워크 테스트에 의하여 상기 9종 신규화합물의 신경계 질환 치료효과를 확인할 수 있었다.
- [0076] 상기 결과는 상기 9종 신규화합물이 면역억제활성에 기인한 부작용 없는 신경계 질환의 치료효과를 확인한 바, 신경계 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0078] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 9종 신규 화합물인 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506, 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506, 31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 9-deoxo-31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 9-deoxo-FK520, 31-O-demethyl-FK520, 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520, 9-deoxo-FK523, 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523의 생물학적 제조공정을 제공한다.
- [0079] 상기 생물학적 제조공정에서는 일반적으로 스트렙토마이세스 속 배양 공정에서 채택되는 배양온도를 사용한다. 본 발명의 구현에 적합한 배양온도로는 바람직하게는 23-30℃를 적용할 수 있고, 보다 바람직하게는 25-28℃의

배양온도를 적용할 수 있다.

- [0080] 또한, 상기 제조공정에서는 배양공정의 pH를 6.5-9 사이로 유지하는데, 바람직하게는 배양 pH를 7-8로 유지한다.
- [0081] 한편, 상기 제조공정에서는 배양액에서의 용존산소 수준을 높게 유지하는 것이 중요한데, 배양 초기의 용존산소 수준을 100%로 하였을 때 배양 종료 시점까지의 용존산소 수준을 30% 이상으로 유지하는 것이 중요하다. 이를 구현하기 위해서는 통상적으로 800-1,500 rpm 수준으로 교반해 주는 것이 바람직하다.
- [0082] 상기 제조공정에서의 배양 세포체로부터의 생산된 9종 신규 화합물의 추출은 1차 추출공정, 2차 추출공정 및 3차 추출공정의 실시를 통하여 달성되는데, 본 발명에서는 1차 추출공정으로 유기용매 추출법을 사용하는데, 이때 사용할 수 있는 용매로는 에틸아세테이트, 메탄올, 아세톤 등이 있을 수 있으나, 에틸아세테이트 또는 메탄올의 사용이 바람직하다. 그리고 2차 추출공정으로 실리카겔 크로마토그래피 (Silica gel chromatography)를 사용하는데, 이때 사용할 수 있는 용매로는 메탄올 (Methanol), 메틸렌클로라이드 (Methylene chloride)가 바람직하다. 그리고 3차 추출공정으로 크로마토그래피를 사용하는데, 이때 사용할 수 있는 용매로는 아세토니트릴, 아세트산암모늄 버퍼, 아세트산, 개미산 등이 있을 수 있으나, 아세토니트릴의 사용이 바람직하다. 이러한 방법의 적용은 9종 신규 화합물의 회수를 용이하게 하며, 또한 수율도 높게 해 준다.
- [0083] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 9종 신규 화합물의 제조에 이용될 수 있는 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM (수탁번호 KCTC13581BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD,tcsD (수탁번호 KCTC13580BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13584BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13585BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD,tcsB (수탁번호 KCTC13579BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13583BP), 및 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13582BP)를 제공한다.

발명의 효과

- [0085] 본 발명에 따른 9종 신규 화합물 중 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 적합한 유효 약물이 없었던 신경계 질환의 치료에 효과적으로 활용될 수 있다. 기존 약물 치료에 비교하여 보다 근본적인 치료 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0087] 도 1은 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506에 대한 고성능액체크로마토그래피 분석 결과이다.
- 도 2는 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506에 대한 핵자기공명 분석 ($^1\text{H-NMR}$) 결과이다.
- 도 3은 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506에 대한 핵자기공명 분석 ($^{13}\text{C-NMR}$) 결과이다.
- 도 4는 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (COSY-NMR) 결과이다.
- 도 5는 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (HSQC-NMR) 결과이다.
- 도 6은 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (HMBC-NMR) 결과이다.
- 도 7은 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506에 대한 고성능액체크로마토그래피 분석 결과이다.
- 도 8은 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 ($^1\text{H-NMR}$) 결과이다.
- 도 9는 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 ($^{13}\text{C-NMR}$) 결과이다.
- 도 10은 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (COSY-NMR) 결과이다.
- 도 11은 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (HSQC-NMR) 결과이다.

- 도 12는 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (HMBC-NMR) 결과이다.
- 도 13은 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 고성능액체크로마토그래피 분석 결과이다.
- 도 14는 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (^1H -NMR) 결과이다.
- 도 15는 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (^{13}C -NMR) 결과이다.
- 도 16은 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (COSY-NMR) 결과이다.
- 도 17은 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (HSQC-NMR) 결과이다.
- 도 18은 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (HMBC-NMR) 결과이다.
- 도 19는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 고성능액체크로마토그래피 분석 결과이다.
- 도 20은 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (^1H -NMR) 결과이다.
- 도 21은 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (^{13}C -NMR) 결과이다.
- 도 22는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (COSY-NMR) 결과이다.
- 도 23은 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (HSQC-NMR) 결과이다.
- 도 24는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (HMBC-NMR) 결과이다.
- 도 25는 9-deoxo-FK520에 대한 고성능액체크로마토그래피 분석 결과이다.
- 도 26은 9-deoxo-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (^1H -NMR) 결과이다.
- 도 27은 9-deoxo-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (^{13}C -NMR) 결과이다.
- 도 28은 9-deoxo-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (COSY-NMR) 결과이다.
- 도 29는 9-deoxo-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (HSQC-NMR) 결과이다.
- 도 30은 9-deoxo-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (HMBC-NMR) 결과이다.
- 도 31은 31-*O*-demethyl-FK520에 대한 고성능액체크로마토그래피 분석 결과이다.
- 도 32는 31-*O*-demethyl-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (^1H -NMR) 결과이다.
- 도 33은 31-*O*-demethyl-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (^{13}C -NMR) 결과이다.
- 도 34는 31-*O*-demethyl-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (COSY-NMR) 결과이다.
- 도 35는 31-*O*-demethyl-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (HSQC-NMR) 결과이다.
- 도 36은 31-*O*-demethyl-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (HMBC-NMR) 결과이다.
- 도 37은 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520에 대한 고성능액체크로마토그래피 분석 결과이다.
- 도 38은 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (^1H -NMR) 결과이다.
- 도 39는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (^{13}C -NMR) 결과이다.
- 도 40은 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (COSY-NMR) 결과이다.
- 도 41은 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (HSQC-NMR) 결과이다.
- 도 42는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520에 대한 핵자기공명 분석 (HMBC-NMR) 결과이다.
- 도 43은 9-deoxo-FK523에 대한 고성능액체크로마토그래피 분석 결과이다.
- 도 44는 9-deoxo-FK523에 대한 핵자기공명 분석 (^1H -NMR) 결과이다.

- 도 45는 9-deoxo-FK523에 대한 핵자기공명 분석 (^{13}C -NMR) 결과이다.
- 도 46은 9-deoxo-FK523에 대한 핵자기공명 분석 (COSY-NMR) 결과이다.
- 도 47은 9-deoxo-FK523에 대한 핵자기공명 분석 (HSQC-NMR) 결과이다.
- 도 48은 9-deoxo-FK523에 대한 핵자기공명 분석 (HMBC-NMR) 결과이다.
- 도 49는 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523에 대한 고성능액체크로마토그래피 분석 결과이다.
- 도 50은 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523에 대한 핵자기공명 분석 (^1H -NMR) 결과이다.
- 도 51은 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523에 대한 핵자기공명 분석 (^{13}C -NMR) 결과이다.
- 도 52는 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523에 대한 핵자기공명 분석 (COSY-NMR) 결과이다.
- 도 53은 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523에 대한 핵자기공명 분석 (HSQC-NMR) 결과이다.
- 도 54는 9-deoxo-31-O-demethyl-FK523에 대한 핵자기공명 분석 (HMBC-NMR) 결과이다.
- 도 55는 본 발명의 신규 화합물 9종의 면역억제활성 감소 정도를 조사한 결과이다.
- 도 56은 본 발명의 신규 화합물 9종의 신경세포 성장 촉진능을 조사한 결과이다.
- 도 57은 본 발명의 신규 화합물 9종의 신경계 질환 치료능을 조사한 결과이다 (BBB 테스트).
- 도 58은 본 발명의 신규 화합물 9종의 신경계 질환 치료능을 조사한 결과이다 (그리드 워크 테스트).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0090] 실시예 1: 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506 제조

[0091] FK506을 생산하는 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스에 대하여 Ban, Y. H. 외 (J. Nat. Prod. 2013, 76, 1091-1098)에 기재된 방법에 따라 이중교차 상동 재조합 (Double cross-over homologous recombination)에 의한 인-프레임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbd-fkbM* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd-fkbM (수탁번호 KCTC13581B P)을 제작하였다.

[0092] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *fkbd*와 *fkbM* 유전자의 결손 돌연변이체를 제작하기 위하여 각각의 유전자를 pKC1139 벡터에 클로닝하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002로 옮긴 후, 접합 (Conjugation)을 통해 FK506 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로 형질 전환하였다.

[0093] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프레임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0094] 인-프레임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였다. 플라스미드 (Plasmid) 제작은 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로부터 유래된 포스미드 (Fosmid) DNA로부터 삭제를 위한 표적 유전자의 왼쪽- 및 오른쪽-인접 절편 (Left- and right-flanking fragments)의 PCR 증폭에 의해 실시하였다. *fkbd-fkbM* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbD-MLF/FkbD-MLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbD-MRF/FkbD-MRR을 설계하였다. PCR 절편 모두는 분리하여 HindIII-XbaI 또는 XbaI-EcoRI으로 절단한 후에 pKC1139 벡터에 클로닝 하였다. 본 실시예에서 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머에 대한 정보는 하기 표 1과 표 2에 제시하였다.

[0095] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)와 31-O-메틸변환효소를 함께 제거하기 위한 플라스미드, p Δ fkbd-fkbM는 대장균 ET12567/pUZ8002에 옮긴 후 접합에 의

해 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 내로 도입하여 표적 유전자를 상동 재조합으로 결실시켰다. 결실 플라스미드와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 염색체 사이에서 단일 교차가 일어난 균주는 아프라마이신 (Apramycin)이 있는 37℃ (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-중식 허용온도)에서 아프라마이신-저항성이 있는 피전달접합균주 (Transconjugant)의 배양으로 선택하였다. 이후 확보된 콜로니는 28℃에서 선택 없이 3회 증식을 수행하여 두 번째 교차를 허용하였다. 2개의 달성된 이중 교차 돌연변이, 즉 Δ fkbD-fkbM를 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0096] 제작한 *fkbD-fkbM* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM은 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13581BP).

표 1

[0098] 사용한 균주와 플라스미드 정보

Strain/vector	Relevant characteristic
Bacterial strains	
<i>Escherichia coli</i>	
DH5 a	Host for general cloning
ET12567/pUZ8002	Donor strain for intergeneric conjugation between <i>E.coli</i> and <i>streptomyces</i>
<i>Streptomyces</i>	
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Wild-type FK506 producing strain
Δ fkbD-fkbM	Mutant of <i>S. kanamyceticus</i> with an in-frame deletion of fkbD-fkbM
Δ fkbD-fkbM, tcsB	Mutant of <i>S. kanamyceticus</i> with an in-frame deletion of fkbD-fkbM, tcsB
Δ fkbD-fkbM, tcsD	Mutant of <i>S. kanamyceticus</i> with an in-frame deletion of fkbD-fkbM, tcsD
Δ fkbD, tcsD	Mutant of <i>S. kanamyceticus</i> with an in-frame deletion of fkbD, tcsD
Δ fkbD, tcsB	Mutant of <i>S. kanamyceticus</i> with an in-frame deletion of fkbD, tcsB
Δ fkbM, tcsD	Mutant of <i>S. kanamyceticus</i> with an in-frame deletion of fkbM, tcsD
Δ fkbM, tcsB	Mutant of <i>S. kanamyceticus</i> with an in-frame deletion of fkbM, tcsB
Plasmid	
pKC1139	High-copy-number temperature-sensitive <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> shuttle vector
pΔ fkbD	Deletion plasmid with in-frame deletion of 51-bp internal fkbD fragment
pΔ fkbM	Deletion plasmid with in-frame deletion of 507-bp internal fkbD fragment
pΔ fkbD-fkbM	Deletion plasmid with in-frame deletion of 1100-bp internal fkbDM fragment
pΔ tcsB	Deletion plasmid with in-frame deletion of 2090-bp internal tcsB fragment
pΔ tcsD	Deletion plasmid with in-frame deletion of 1154-bp internal tcsD fragment

표 2

[0099] 사용한 프라이머 정보

Primer	Sequence 5' to 3' (Restriction site underlined)	Restriction enzyme
FkbDLF	TATAAAGCTTCGGAGCCCGGTGGACCT	HindIII
FkbDLR	TTAATCTAGACGTCGCCTCGTCGCT	XbaI
FkbDRF	GTAATCTAGAGTCGGCTACTGCCTCTAC	XbaI
FkbDRR	GAATGAATCCGACGAACAGCGGTTCTT	EcoRI
FkbMLF	TACGAAGCTTCTGTTCGGCATCCAGCA	HindIII
FkbMLR	TAGCTCTAGAGTCACCCGGGAGCAGTTC	XbaI

FkbMRF	TATATCTAGAGACACCGAAGGCGGCTC	XbaI
FkbMRR	TTAAGAATTTCGAACACCGAGGCGGTCCA	EcoRI
FkbD-MLF	TATAAAGCTTCGGAGCCCGGTGGACCT	HindIII
FkbD-MLR	TTAATCTAGACGTCGCCTCGTCGTCGCT	XbaI
FkbD-MRF	TATATCTAGAGACACCGAAGGCGGCTC	XbaI
FkbD-MRR	TTAAGAATTTCGAACACCGAGGCGGTCCA	EcoRI
TcsBLF	GACAAGCTTATGCTGGCGGTGAAGGCG	HindIII
TcsBLR	CCGTCTAGACCAGAAGGAATCGAGCCGGAA	XbaI
TcsBRF	CAGTCTAGAGTGATCCGTGCCCTGCACTCC	XbaI
TcsBRR	GCCGAATTCGATGACGATGTCGGGGTCG	EcoRI
TcsDLF	GCTAAGCTTCTCAGGCGTCTCGGGATGC	HindIII
TcsDLR	ATCGGATCCTTCGCTCACCGGGGCTGCC	BamHI
TcsDRF	AGCAGATCTGGCATGTTCTGGTCAGTCC	BglI
TcsDRR	GTCGAATTCATGCCACGAACGGGTCGA	EcoRI

[0100] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM (수탁번호 KCTC13581BP)의 배양을 통하여 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506을 제조하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 250 ml의 베플 삼각 플라스크 (Baffled flask)에 50 ml의 R2YE 배지 (수크로오스 103 g/L, 글루코오스 10 g/L, 황산칼륨 0.25 g/L, 염화마그네슘 6수화물 10.12 g/L, 카사미노 엑시드 0.1 g/L, 효모 추출물 (10%) 50 ml/L, TES buffer (5.73%, pH 7.2) 100 ml/L, 인산칼륨 (0.5%) 10 ml/L, 염화칼슘 2수화물 (3.68%) 80 ml/L, L-프롤린 (20%) 15 ml/L, 미량 원소 용액 2 ml/L, 수산화나트륨 (1 N) 5 ml/L)를 첨가하고, 여기에 생산균주를 접종한 다음에 회전식 진탕 배양기에서 28℃, 180 rpm 조건에서 이를 동안 전배양을 실시하였다. 그 다음에 1 L의 R2YE 배지가 첨가되어 있는 3 L 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask)에 이를 동안 전배양한 배양액 10 ml를 접종하였다. 접종 후에 28℃, 180 rpm 조건에서 6일 동안 배양을 실시하였다. 6일간 배양 후에 1차 회수 공정을 통해 생산된 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506을 추출하였다. 1차 회수 공정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 배양액에 동량의 메탄올을 첨가하여 30분 동안 혼합해 준 후 원심분리하여 균체를 제거하였고, 균체를 제거한 추출액에 대해서는 회전 증발기 (Rotary evaporator)를 이용한 농축을 실시해 주었다. 그 다음에 농축한 추출액을 물에 용해시키고, 2배 용량의 에틸아세테이트 (Ethyl acetate)를 첨가 후 잘 혼합해 준 다음 층 분리가 될 때까지 방치하였다. 층이 분리된 다음에 위층의 유기용매층을 회수하고 이를 회전 증발기를 이용하여 농축시키고 농축 후의 무게를 측정하였다. 1차 회수 공정을 실시하여 얻어 진 추출액을 실리카겔이 충전된 칼럼을 통과시켜 주었다. 이때 실리카겔의 양은 1차 회수 공정의 추출액 무게의 15배를 사용하였으며, 이동상은 5가지 비율의 메탄올과 메틸렌클로라이드 (분액 1. 0:100, 분액 2. 1:100, 분액 3. 1:10, 분액 4. 1:1, 분액 5. 100:0)를 사용하였다. 분액 3에서 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506이 확인되었다. 이렇게 얻어진 분액 3은 회전 증발기를 이용하여 농축하고 HPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다.

[0101] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학적 1]로 표시되는 물질인 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506을 얻을 수 있었다.

[0102] 제조한 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506의 확인은 다음과 같이 실시하였다. 구체적으로, 고성능액체크로마토그래피 분석 (High performance liquid chromatography analysis), 질량분석 (Mass spectrometry), 핵자기공명 분석 (Nuclear magnetic resonance analysis)을 실시하였다. 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506에 대한 분석 결과는 표 3과 도 1 내지 도 6으로 정리되며, 이러한 결과들로부터 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM으로부터 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0104] 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506 (분자식 $C_{41}H_{57}NO_{11}$, 분자량 749.4714)에 대한 분석 결과를 하기의 표 3에 나타내었다.

표 3

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506의 머무름 시간 (Retention time)은 22분이었다.

질량분석	(ESI-HR-MS) Calcd. for $C_{42}H_{67}NNaO_{11}^+$:784.4606, found: m/z 784.4611		
핵자기공명 분석	번호	carbon (ppm)	proton (ppm)
	1	170.09	
	2	59.06	4.36 (1H, dd, $J=10.5$, 3.5 Hz)
	3	29.35	1.97 (1H, m)2.19 (1H, m)
	4	24.89	1.96 (1H, m)1.98 (1H, m)
	5		
	6	47.61	3.55 (1H, m)3.64 (1H, m)
	7	171.99	
	8	39.34	2.56 (1H, d, $J=15.0$ Hz)2.63 (1H, d, $J=15.0$ Hz)
	9	98.73	
	10	38.72	1.59 (1H, m)
	11	32.86	1.56 (1H, m)1.99 (1H, m)
	12	74.73	3.43 (1H, m)
	13	71.14	3.85 (1H, dd, $J=10.0$, 5.0 Hz)
	14	77.39	3.54 (1H, m)
	15	36.57	1.34 (1H, m)1.47 (1H, m)
	16	25.72	1.61 (1H, m)
	17	49.17	1.70 (1H, m)2.35 (1H, m)
	18	141.22	
	19	122.04	4.99 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	20	53.54	3.38 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	21	214.00	
	22	44.25	2.35 (1H, m)2.67 (1H, m)
	23	69.23	4.04 (1H, br d, $J=10.0$ Hz)
	24	41.26	1.83 (1H, dd, $J=10.0$, 2.0 Hz)
	25	78.28	5.18 (1H, d, $J=2.0$ Hz)
	26	132.64	
	27	129.79	5.01 (1H, d, $J=2.0$ Hz)
	28	35.23	2.35 (1H, m)
	29	39.39	1.14 (1H, m)1.90 (1H, m)
	30	75.81	3.35 (1H, m)
	31	75.28	3.44 (1H, m)
	32	32.29	1.36 (1H, m)1.98 (1H, m)
	33	31.22	1.06 (1H, m)1.61 (1H, m)
	34	35.78	2.25 (1H, m)2.45 (1H, m)
	35	135.80	5.72 (1H, m)
	36	116.84	5.00 (1H, dd, $J=15.0$, 10.0 Hz)5.03 (1H, dd, $J=15.0$, 5.0Hz)
	37	17.20	0.96 (3H, d, $J=5$ Hz)

38	19.10	0.77 (3H, d, $J=5$ Hz)
39	15.90	1.67 (3H, s)
40	10.13	0.90 (3H, d, $J=5$ Hz)
41	14.41	1.65 (3H, s)
42	56.48	3.38 (3H, s)
43	57.98	3.37 (3H, s)

[0106] ^1H , ^{13}C -NMR로부터 특징적인 작용기로써 1개의 ketone 탄소 (δ_{C} 214.00)와 2개의 carbonyl 탄소 (δ_{C} 171.99, 170.09), exomeethylene 골격 (δ_{C} 116.84, 135.80)과 2개의 olefine 골격 (δ_{C} 141.22, 122.04; δ_{C} 132.64, 129.79)이 확인되었고, dioxygenated 4급탄소 (δ_{C} 98.73), oxygenated 메틴탄소 7개 (δ_{C} 78.28, 77.39, 75.28, 75.81, 74.73, 71.14, 69.23), 2개의 메톡시 탄소 (δ_{C} 57.98, 56.48)가 관측되었으며, 5개의 메틸탄소 (δ_{C} 19.10, 17.20, 15.90, 14.41, 10.13)가 관측되었으며, 탄소는 모두 42개로 이루어진 FK506 유도체로 관측되었다. 정확한 구조를 확인하기 위하여, 2D-NMR을 확인하였다. gCOSY로부터 proton의 연결을 확인한 결과, H-2-H-4 사이의 coupling으로부터 본 화합물은 pipecolyl 골격의 FK506이 아닌, CH_2 작용기가 없는 prolyl 골격을 가지고 있음을 확인하였다. gHMBC 데이터로부터 H-9 (δ_{H} 2.56, 2.63)이 C-8 (δ_{C} 171.99), C-10 (δ_{C} 98.73)과 correlation으로부터 본 화합물은 C-9에 ketone이 아닌 CH_2 로 환원된 골격임을 확인하였다. 이와 함께, 2개의 메톡시 작용기가 C-13, C-15에 결합되어 있어, C-31에는 메톡시가 존재하지 않는 구조임을 확인하였다. 이를 종합하여, 본 화합물은 9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506임을 확인하였다.

[0108] 실시예 2: 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506 제조

[0109] FK506을 생산하는 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스에 대하여 Ban, Y. H. 외 (J. Nat. Prod. 2013, 76, 1091-1098)에 기재된 방법에 따라 이중교차 상동 재조합 (Double cross-over homologous recombination)에 의한 인-프레임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkfD* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkfD*, *tcsD* (수탁번호 KCTC13580BP)를 제작하였다.

[0110] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *fkfD* 및 *tcsD* 유전자의 결손 돌연변이체를 제작하기 위하여 각각의 유전자를 pKC1139 벡터에 클로닝하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002로 옮긴 후, 접합 (Conjugation)을 통해 FK506 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로 형질 전환하였다.

[0111] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프레임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0112] 인-프레임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였다. 플라스미드 (Plasmid) 제작은 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로부터 유래된 포스미드 (Fosmid) DNA로부터 삭제제를 위한 표적 유전자의 왼쪽- 및 오른쪽-인접 절편 (Left- and right-flanking fragments)의 PCR 증폭에 의해 실시하였다. *fkfD* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbDLF/FkbDLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbDRF/FkbDRR을 설계하였고, *tcsD* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDLF/TcsDLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDRF/TcsDRR을 설계하였다. PCR 절편 모두는 분리하여 HindIII-XbaI 또는 XbaI-EcoRI로 절단한 후에 pKC1139 벡터에 클로닝 하였다. 본 실시예에서 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머에 대한 정보는 표 1과 표 2에 제시하였다.

[0113] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)를 제거하기 위한 플라스미드, p Δ *fkfD*는 대장균 ET12567/pUZ8002에 옮긴 후 접합에 의해 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 내로 도입하여 표적 유전자를 상동 재조합으로 결실시켰다. 결실 플라스미드와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 염색체 사이에서 단일 교차가 일어난 균주는 아프라마이신 (Apramycin)이 있는 37°C (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 허용온도)에서 아프라마이신-저항성이 있는 피전달접합균주 (Transconjugant)의 배양으로 선택하였다. 이후 확보된 콜로니는 28°C에서 선택 없이 3회 증식을 수행하여 두

번째 교차를 허용하였다. 2개의 달성된 이중 교차 돌연변이, 즉 $\Delta fkbD$ 를 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0114] 제작한 *fkbD* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 $\Delta fkbD$ 에 p $\Delta tcsD$ 를 도입하여 *fkbD* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. $\Delta fkbD, tcsD$ 는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0115] 제작한 *fkbD*, *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 $\Delta fkbD, tcsD$ 는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13580BP).

[0116] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 $\Delta fkbD, tcsD$ (수탁번호 KCTC13580BP)의 배양을 통하여 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506을 제조하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 250 ml의 베플 삼각 플라스크 (Baffled flask)에 50 ml의 R2YE 배지 (수크로오즈 103 g/L, 글루코오즈 10 g/L, 황산칼륨 0.25 g/L, 염화마그네슘 6수화물 10.12 g/L, 카사미노 엑시드 0.1 g/L, 효모 추출물 (10%) 50 ml/L, TES buffer (5.73%, pH 7.2) 100 ml/L, 인산칼륨 (0.5%) 10 ml/L, 염화칼슘 2수화물 (3.68%) 80 ml/L, L-프롤린 (20%) 15 ml/L, 미량 원소 용액 2 ml/L, 수산화나트륨 (1 N) 5 ml/L)를 첨가하고, 여기에 생산균주를 접종한 다음에 회전식 진탕 배양기에서 28°C, 180 rpm 조건에서 이틀 동안 전배양을 실시하였다. 그 다음에 1 L의 R2YE 배지가 첨가되어 있는 3 L 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask)에 이틀 동안 전배양한 배양액 10 ml를 접종하였다. 접종 후에 28°C, 180 rpm 조건에서 6일 동안 배양을 실시하였다. 6일간 배양 후에 1차 회수 공정을 통해 생산된 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506을 추출하였다.

[0117] 1차 회수 공정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 배양액에 동량의 메탄올을 첨가하여 30분 동안 혼합해 준 후 원심분리하여 균체를 제거하였고, 균체를 제거한 추출액에 대해서는 회전 증발기 (Rotary evaporator)를 이용한 농축을 실시해 주었다. 그 다음에 농축한 추출액을 물에 용해시키고, 2배 용량의 에틸아세테이트 (Ethyl acetate)를 첨가 후 잘 혼합해 준 다음 층 분리가 될 때까지 방치하였다. 층이 분리된 다음에 위층의 유기용매 층을 회수하고 이를 회전 증발기를 이용하여 농축시키고 농축 후의 무게를 측정하였다. 1차 회수 공정을 실시하여 얻어 진 추출액을 실리카겔이 충전된 칼럼을 통과시켜 주었다. 이때 실리카겔의 양은 1차 회수 공정의 추출액 무게의 15배를 사용하였으며, 이동상은 5가지 비율의 메탄올과 메틸렌클로라이드 (분액 1. 0:100, 분액 2. 1:100, 분액 3. 1:10, 분액 4. 1:1, 분액 5. 100:0)를 사용하였다. 분액 3에서 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506이 확인되었다. 이렇게 얻어진 분액 3은 회전 증발기를 이용하여 농축하고 HPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다.

[0118] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화합식 2]로 표시되는 물질인 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506을 얻을 수 있었다.

[0119] 제조한 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506의 확인은 다음과 같이 실시하였다. 구체적으로, 고성능액체크로마토그래피 분석 (High performance liquid chromatography analysis), 질량분석 (Mass spectrometry), 핵자기공명 분석 (Nuclear magnetic resonance analysis)을 실시하였다. 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506에 대한 분석 결과는 표 4와 도 7 내지 도 12로 정리되며, 이러한 결과들로부터 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 $\Delta fkbD, tcsD$ 로부터 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0121] 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506 (분자식 $C_{44}H_{73}NO_{11}$, 분자량 792.06)에 대한 분석 결과를 하기의 표 4에 나타내었다.

표 4

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506의 머무름 시간 (Retention time)은 51분이었다.
질량분석	(ESI-HR-MS) Calcd. for $C_{44}H_{73}NNaO_{11}^+$:814.5076, found: m/z 814.5083

핵자기공명 분석	번호	carbon (ppm)	proton (ppm)
	1	169.39	
	2	52.59	4.85 (1H, brd, $J=5.0$ Hz)
	3	26.58	1.70 (1H, m) 2.24 (1H, m)
	4	20.70	1.31 (1H, m) 1.72 (1H, m)
	5	24.42	1.51 (1H, m) 1.68 (1H, m)
	6	42.65	3.19 (1H, m) 3.69 (1H, m)
	7	173.96	
	8	36.25	2.49 (1H, d, $J=15.0$ Hz) 2.66 (1H, d, $J=15.0$ Hz)
	9	98.50	
	10	38.39	1.56 (1H, m)
	11	31.12	1.60 (1H, m) 1.94 (1H, m)
	12	74.33	3.40 (1H, m)
	13	70.6	3.84 (1H, dd, $J=10.0, 5.0$ Hz)
	14	77.11	3.53 (1H, m)
	15	36.57	1.34 (1H, m) 1.47 (1H, m)
	16	25.64	1.50 (1H, m)
	17	48.49	1.65 (1H, m) 2.32 (1H, m)
	18	140.82	
	19	122.20	5.05 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	20	53.45	3.21 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	21	215.35	
	22	41.74	2.21 (1H, br d, $J=15$ Hz) 2.66 (1H, br d, $J=15$ Hz)
	23	69.64	3.97 (1H, m)
	24	40.26	1.87 (1H, m)
	25	76.50	5.19 (1H, br s)
	26	132.42	
	27	128.71	4.97 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	28	34.81	2.35 (1H, m)
	29	34.84	0.93 (1H, m) 2.01 (1H, m)
	30	84.13	3.00 (1H, m)
	31	73.58	3.39 (1H, m)
	32	30.64	1.34 (1H, m) 1.98 (1H, m)
	33	31.15	1.06 (1H, m) 1.61 (1H, m)
	34	33.82	1.42 (1H, m) 1.65 (1H, m)
	35	20.41	1.21 (2H, m)
	36	13.91	0.88 (3H, t, $J=7.5$ Hz)
	37	16.87	0.93 (3H, d, $J=5$ Hz)
	38	18.84	0.76 (3H, d, $J=5$ Hz)
	39	15.45	1.63 (3H, s)

40	10.13	0.90 (3H, d, $J=5$ Hz)
41	13.91	1.66 (3H, s)
42	56.10	3.35 (3H, s)
43	57.64	3.36 (3H, s)
44	56.56	3.39 (3H, s)

[0123] ^1H , ^{13}C -NMR 및 gHSQC로부터 총 탄소수 44개로써, 각각 메톡시 (δ_{H} 3.39, δ_{C} 56.56)1개와 CH_2 (δ_{H} 2.24, δ_{H} 1.70, δ_{C} 20.70)1개가 추가 관측되었고, exomethylene의 작용기는 관측되지 않았으며, triplet coupling으로 관측되는 메틸기 (δ_{H} 0.88, δ_{C} 13.91)와 CH_2 (δ_{H} 1.21, δ_{C} 20.41)가 관측되었다. 정확한 구조를 확인하기 위하여, 2D-NMR을 확인하였다. gCOSY로부터 proton의 연결을 확인한 결과, H-2~H-5사이의 coupling으로부터 본 화합물은 pipecolyl 골격의 FK506인 것을 확인하였고, CH_2 작용기(δ_{H} 2.24, δ_{H} 1.70, δ_{C} 20.70) 1개 pipecolyl 골격에 위치함을 확인하였다. gHMBC로부터 3개의 메톡시 수소(δ_{H} 3.39, 3.36, 3.35)는 각각 C-31 (δ_{C} 77.11), C-15 (δ_{C} 77.11) 및 C-13 (δ_{C} 74.33) correlation된 것을 확인하였고, triplet coupling으로 관측되는 메틸기(δ_{H} 0.88, δ_{C} 13.91)과 CH_2 (δ_{H} 1.21, δ_{C} 20.41)가 C-21/33과 상호 correlation을 확인할 수 있었다. 따라서, *tcsD*가 제거된 균주로부터 만들어진 화합물로서, C-36/37 사이에 존재하던 이중결합이 환원된 형태의 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506으로 구조 결정되었다.

[0125] 실시예 3: 31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506 제조

[0126] FK506을 생산하는 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스에 대하여 Ban, Y. H. 외 (J. Nat. Prod. 2013, 76, 1091-1098)에 기재된 방법에 따라 이중교차 상동 재조합 (Double cross-over homologous recombination)에 의한 인-프레임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkfM* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkfM*, *tcsD* (수탁번호 KCTC13584BP)를 제작하였다.

[0127] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *fkfM* 및 *tcsD* 유전자의 결손 돌연변이체를 제작하기 위하여 각각의 유전자를 pKC1139 벡터에 클로닝하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002로 옮긴 후, 접합 (Conjugation)을 통해 FK506 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로 형질 전환하였다.

[0128] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프레임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0129] 인-프레임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였다. 플라스미드 (Plasmid) 제작은 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로부터 유래된 포스미드 (Fosmid) DNA로부터 삭제제를 위한 표적 유전자의 왼쪽- 및 오른쪽-인접 절편 (Left- and right-flanking fragments)의 PCR 증폭에 의해 실시하였다. *fkfM* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbMLF/FkbMLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbMRF/FkbMRR을 설계하였고, *tcsD* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDLF/TcsDLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDRF/TcsDRR을 설계하였다. PCR 절편 모두는 분리하여 HindIII-XbaI 또는 XbaI-EcoRI으로 절단한 후에 pKC1139 벡터에 클로닝 하였다. 본 실시예에서 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머에 대한 정보는 표 1과 표 2에 제시하였다.

[0130] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. 31-O-메틸변환효소를 제거하기 위한 플라스미드, p Δ *fkfM*은 대장균 ET12567/pUZ8002에 옮긴 후 접합에 의해 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 내로 도입하여 표적 유전자를 상동 재조합으로 결실시켰다. 결실 플라스미드와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 염색체 사이에서 단일 교차가 일어난 균주는 아프라마이신 (Apramycin)이 있는 37°C (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 허용온도)에서 아프라마이신-저항성이 있는 피전달접합균주 (Transconjugant)의 배양으로 선택하였다. 이후 확보된 콜로니는 28°C에서 선택 없이 3회 증식을 수행하여 두 번째 교차를 허용하였다. 2개의 달성된 이중 교차 돌연변이, 즉 Δ *fkfM*을 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선

택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0131] 제작한 *fkbm* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkbm*에 p Δ tcsD를 도입하여 *fkbm* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. Δ *fkbm*, *tcsD*는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0132] 제작한 *fkbm*, *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkbm*, *tcsD*는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13584BP).

[0133] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkbm*, *tcsD* (수탁번호 KCTC13584BP)의 배양을 통하여 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506을 제조하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 250 ml의 베플 삼각 플라스크 (Baffled flask)에 50 ml의 R2YE 배지 (수크로오스 103 g/L, 글루코오스 10 g/L, 황산칼륨 0.25 g/L, 염화마그네슘 6수화물 10.12 g/L, 카사미노 엑시드 0.1 g/L, 효모 추출물 (10%) 50 ml/L, TES buffer (5.73%, pH 7.2) 100 ml/L, 인산칼륨 (0.5%) 10 ml/L, 염화칼슘 2수화물 (3.68%) 80 ml/L, L-프롤린 (20%) 15 ml/L, 미량 원소 용액 2 ml/L, 수산화나트륨 (1 N) 5 ml/L)를 첨가하고, 여기에 생산균주를 접종한 다음에 회전식 진탕 배양기에서 28℃, 180 rpm 조건에서 이틀 동안 전배양을 실시하였다. 그 다음에 1 L의 R2YE 배지가 첨가되어 있는 3 L 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask)에 이틀 동안 전배양한 배양액 10 ml를 접종하였다. 접종 후에 28℃, 180 rpm 조건에서 6일 동안 배양을 실시하였다. 6일간 배양 후에 1차 회수 공정을 통해 생산된 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506을 추출하였다.

[0134] 1차 회수 공정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 배양액에 동량의 메탄올을 첨가하여 30분 동안 혼합해 준 후 원심분리하여 균체를 제거하였고, 균체를 제거한 추출액에 대해서는 회전 증발기 (Rotary evaporator)를 이용한 농축을 실시해 주었다. 그 다음에 농축한 추출액을 물에 용해시키고, 2배 용량의 에틸아세테이트 (Ethyl acetate)를 첨가 후 잘 혼합해 준 다음 층 분리가 될 때까지 방치하였다. 층이 분리된 다음에 위층의 유기용매 층을 회수하고 이를 회전 증발기를 이용하여 농축시키고 농축 후의 무게를 측정하였다. 1차 회수 공정을 실시하여 얻어 진 추출액을 실리카겔이 충전된 칼럼을 통과시켜 주었다. 이때 실리카겔의 양은 1차 회수 공정의 추출액 무게의 15배를 사용하였으며, 이동상은 5가지 비율의 메탄올과 메틸렌클로라이드 (분액 1. 0:100, 분액 2. 1:100, 분액 3. 1:10, 분액 4. 1:1, 분액 5. 100:0)를 사용하였다. 분액 3에서 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506이 확인되었다. 이렇게 얻어진 분액 3은 회전 증발기를 이용하여 농축하고 HPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다.

[0135] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화합식 3]으로 표시되는 물질인 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506을 얻을 수 있었다.

[0136] 제조한 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506의 확인은 다음과 같이 실시하였다. 구체적으로, 고성능액체크로마토그래피 분석 (High performance liquid chromatography analysis), 질량분석 (Mass spectrometry), 핵자기공명 분석 (Nuclear magnetic resonance analysis)을 실시하였다. 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 분석 결과는 표 5와 도 13 내지 도 18로 정리되며, 이러한 결과들로부터 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkbm*, *tcsD*로부터 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0138] 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506 (분자식 $C_{43}H_{69}NO_{12}$, 분자량 792.02)에 대한 분석 결과를 하기의 표 5에 나타내었다.

표 5

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 31- <i>O</i> -demethyl-36,37-dihydro-FK506의 머무름 시간 (Retention time)은 43분이었다.
질량분석	(ESI-HR-MS) Calcd. for $C_{43}H_{69}NNaO_{12}^{+}$: 814.4712, found: m/z 814.4715

핵자기공명 분석	번호	carbon (ppm)	proton (ppm)
	1	169.35	
	2	56.64	4.58 (1H, brd, $J=5.0$ Hz)
	3	27.92	2.05 (1H, m) 1.90 (1H, m)
	4	21.42	1.38 (1H, m) 1.74 (1H, m)
	5	24.80	1.51 (1H, m) 1.68 (1H, m)
	6	39.58	3.03 (1H, m) 4.44 (1H, m)
	7	165.08	
	8	196.54	
	9	97.42	
	10	35.28	2.32 (1H, m)
	11	33.01	1.52 (1H, m) 2.16 (1H, m)
	12	74.03	3.39 (1H, m)
	13	73.22	3.68 (1H, dd, $J=10.0$, 5.0 Hz)
	14	75.21	3.39 (1H, m)
	15	35.79	1.35 (1H, m) 1.56 (1H, m)
	16	26.67	1.66 (1H, m)
	17	49.02	1.80 (1H, m) 2.17 (1H, m)
	18	138.80	
	19	123.64	5.03 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	20	53.34	3.28 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	21	213.76	
	22	43.64	2.10 (1H, br d, $J=15$ Hz) 2.77 (1H, br d, $J=15$ Hz)
	23	70.36	3.92 (1H, m)
	24	39.97	1.89 (1H, m)
	25	77.82	5.33 (1H, br s)
	26	132.63	
	27	130.03	5.09 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	28	34.93	2.18 (1H, m)
	29	39.36	1.14 (1H, m) 1.91 (1H, m)
	30	75.79	3.59 (1H, m)
	31	75.58	3.36 (1H, m)
	32	32.36	1.35 (1H, m) 1.98 (1H, m)
	33	31.23	1.06 (1H, m) 1.61 (1H, m)
	34	33.34	1.42 (1H, m) 1.66 (1H, m)
	35	20.76	1.27 (2H, m)
	36	14.37	0.90 (3H, t, $J=7.5$ Hz)
	37	16.54	1.00 (3H, d, $J=5$ Hz)
	38	20.75	0.93 (3H, d, $J=5$ Hz)
	39	16.18	1.59 (3H, s)
	40	9.79	0.87 (3H, d, $J=5$ Hz)

41	14.43	1.62 (3H, s)
42	56.64	3.40 (3H, s)
43	57.32	3.30 (3H, s)

[0140] ^1H , ^{13}C -NMR 및 gHSQC로부터, 총 탄소수 43개로써, ketone 탄소 (δ_{C} 196.54)가 추가 관측되었고, 2개의 메톡시가 관측되어, Δ fkbM 유전자로부터 만들어진 31-*O*-demethyl에서 기인한 것임을 유추할 수 있었다. gHMBC로부터 2개의 메톡시 수소(δ_{H} 3.40, 3.30)는 각각 C-15 (δ_{C} 75.21) 및 C-13 (δ_{C} 74.03) correlation된 것을 확인되어, 본 화합물 역시 *tcsD*가 제거된 균주로부터 만들어진 화합물로서, C-36/37 사이에 존재하던 이중결합이 환원된 형태의 31-*O*-demethyl-35,37-dihydro-FK506으로 구조 결정되었다.

[0142] **실시예 4: 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506 제조**

[0143] FK506을 생산하는 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스에 대하여 Ban, Y. H. 외 (J. Nat. Prod. 2013, 76, 1091-1098)에 기재된 방법에 따라 이중교차 상동 재조합 (Double cross-over homologous recombination)에 의한 인-프레임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbD-fkbM* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, *tcsD* (수탁 번호 KCTC13585BP)을 제작하였다.

[0144] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *fkbD-fkbM* 및 *tcsD* 유전자의 결손 돌연변이체를 제작하기 위하여 각각의 유전자를 pKC1139 벡터에 클로닝하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002로 옮긴 후, 접합 (Conjugation)을 통해 FK506 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로 형질 전환하였다.

[0145] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프레임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0146] 인-프레임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였다. 플라스미드 (Plasmid) 제작은 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로부터 유래된 포스미드 (Fosmid) DNA로부터 삭제를 위한 표적 유전자의 왼쪽- 및 오른쪽-인접 절편 (Left- and right-flanking fragments)의 PCR 증폭에 의해 실시하였다. *fkbD-fkbM* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbD-MLF/FkbD-MLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbD-MRF/FkbD-MRR을 설계하였고, *tcsD* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDLF/TcsDLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDRF/TcsDRR을 설계하였다. PCR 절편 모두는 분리하여 HindIII-XbaI 또는 XbaI-EcoRI으로 절단한 후에 pKC1139 벡터에 클로닝 하였다. 본 실시예에서 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머에 대한 정보는 표 1과 표 2에 제시하였다.

[0147] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)와 31-*O*-메틸변환효소를 함께 제거하기 위한 플라스미드, p Δ fkbD-fkbM는 대장균 ET12567/pUZ8002에 옮긴 후 접합에 의해 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 내로 도입하여 표적 유전자를 상동 재조합으로 결실시켰다. 결실 플라스미드와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 염색체 사이에서 단일 교차가 일어난 균주는 아프라마이신 (Apramycin)이 있는 37°C (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 허용온도)에서 아프라마이신-저항성이 있는 피전달접합균주 (Transconjugant)의 배양으로 선택하였다. 이후 확보된 콜로니는 28°C에서 선택 없이 3회 증식을 수행하여 두 번째 교차를 허용하였다. 2개의 달성된 이중 교차 돌연변이, 즉 Δ fkbD-fkbM을 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0148] 제작한 *fkbD-fkbM* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM에 p Δ tcsD를 도입하여 *fkbD-fkbM* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. Δ fkbD-fkbM, *tcsD*는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0149] 제작한 *fkbD-fkbM* 및 *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, *tcsD*는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다

(수탁번호 KCTC13585BP).

[0150] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, tcsD (수탁번호 KCTC13585BP)의 배양을 통하여 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506을 제조하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 250 ml의 배플 삼각 플라스크 (Baffled flask)에 50 ml의 R2YE 배지 (수크로오즈 103 g/L, 글루코오즈 10 g/L, 황산 칼륨 0.25 g/L, 염화마그네슘 6수화물 10.12 g/L, 카사미노 엑시드 0.1 g/L, 효모 추출물 (10%) 50 ml/L, TES buffer (5.73%, pH 7.2) 100 ml/L, 인산칼륨 (0.5%) 10 ml/L, 염화칼슘 2수화물 (3.68%) 80 ml/L, L-프롤린 (20%) 15 ml/L, 미량 원소 용액 2 ml/L, 수산화나트륨 (1 N) 5 ml/L)를 첨가하고, 여기에 생산균주를 접종한 다음에 회전식 진탕 배양기에서 28℃, 180 rpm 조건에서 이틀 동안 전배양을 실시하였다. 그 다음에 1 L의 R2YE 배지가 첨가되어 있는 3 L 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask)에 이틀 동안 전배양한 배양액 10 ml를 접종하였다. 접종 후에 28℃, 180 rpm 조건에서 6일 동안 배양을 실시하였다. 6일간 배양 후에 1차 회수 공정을 통해 생산된 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506을 추출하였다.

[0151] 1차 회수 공정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 배양액에 동량의 메탄올을 첨가하여 30분 동안 혼합해 준 후 원심분리하여 균체를 제거하였고, 균체를 제거한 추출액에 대해서는 회전 증발기 (Rotary evaporator)를 이용한 농축을 실시해 주었다. 그 다음에 농축한 추출액을 물에 용해시키고, 2배 용량의 에틸아세테이트 (Ethyl acetate)를 첨가 후 잘 혼합해 준 다음 층 분리가 될 때까지 방치하였다. 층이 분리된 다음에 위층의 유기용매 층을 회수하고 이를 회전 증발기를 이용하여 농축시키고 농축 후의 무게를 측정하였다. 1차 회수 공정을 실시하여 얻어 진 추출액을 실리카겔이 충전된 칼럼을 통과시켜 주었다. 이때 실리카겔의 양은 1차 회수 공정의 추출액 무게의 15배를 사용하였으며, 이동상은 5가지 비율의 메탄올과 메틸렌클로라이드 (분액 1. 0:100, 분액 2. 1:100, 분액 3. 1:10, 분액 4. 1:1, 분액 5. 100:0)를 사용하였다. 분액 3에서 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506이 확인되었다. 이렇게 얻어진 분액 3은 회전 증발기를 이용하여 농축하고 HPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다.

[0152] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 4]로 표시되는 물질인 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506을 얻을 수 있었다.

[0153] 제조한 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506의 확인은 다음과 같이 실시하였다. 구체적으로, 고성능액체크로마토그래피 분석 (High performance liquid chromatography analysis), 질량분석 (Mass spectrometry), 핵자기공명 분석 (Nuclear magnetic resonance analysis)을 실시하였다. 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506에 대한 분석 결과는 표 6과 도 19 내지 도 24로 정리되며, 이러한 결과들로부터 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, tcsD로부터 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0155] 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506 (분자식 $C_{43}H_{71}NO_{11}$, 분자량 778.04)에 대한 분석 결과를 하기의 표 6에 나타내었다.

표 6

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 9-deoxo-31- <i>O</i> -demethyl-36,37-dihydro-FK506의 머무름 시간 (Retention time)은 34분이었다.
질량분석	(ESI-HR-MS) Calcd. for $C_{43}H_{71}NNaO_{11}^+$:800.4919, found: m/z 800.4924

핵자기공명 분석	번호	carbon (ppm)	proton (ppm)
	1	169.73	
	2	52.59	4.85 (1H, brd, $J=5.0$ Hz)
	3	26.94	1.70 (1H, m) 2.23 (1H, m)
	4	21.03	1.32 (1H, m) 1.72 (1H, m)
	5	24.77	1.52 (1H, m) 1.68 (1H, m)
	6	42.97	3.19 (1H, m) 3.70 (1H, m)
	7	174.37	
	8	37.54	2.49 (1H, d, $J=15.0$ Hz) 2.67 (1H, d, $J=15.0$ Hz)
	9	98.85	
	10	38.78	1.56 (1H, m)
	11	32.86	1.60 (1H, m) 1.94 (1H, m)
	12	74.69	3.40 (1H, m)
	13	70.99	3.84 (1H, dd, $J=10.0, 5.0$ Hz)
	14	77.21	3.53 (1H, m)
	15	36.57	1.34 (1H, m) 1.47 (1H, m)
	16	26.94	1.63 (1H, m)
	17	48.49	1.64 (1H, m) 2.33 (1H, m)
	18	141.15	
	19	122.53	5.05 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	20	53.84	3.20 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	21	215.35	
	22	42.20	2.20 (1H, br d, $J=15$ Hz) 2.64 (1H, br d, $J=15$ Hz)
	23	69.96	3.97 (1H, m)
	24	40.05	1.85 (1H, m)
	25	76.90	5.20 (1H, br s)
	26	132.82	
	27	129	4.97 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	28	35.29	2.32 (1H, m)
	29	39.45	1.12 (1H, m) 1.88 (1H, m)
	30	75.22	3.53 (1H, m)
	31	75.22	3.40 (1H, m)
	32	32.32	1.33 (1H, m) 1.95 (1H, m)
	33	31.19	1.04 (1H, m) 1.59 (1H, m)
	34	34.14	1.46 (1H, m) 1.62 (1H, m)
	35	20.73	1.22 (2H, m)
	36	14.25	0.88 (3H, t, $J=7.5$ Hz)
	37	17.22	0.94 (3H, d, $J=5$ Hz)
	38	19.17	0.76 (3H, d, $J=5$ Hz)
	39	15.82	1.63 (3H, s)

40	10.07	0.85 (3H, d, $J=5$ Hz)
41	14.77	1.65 (3H, s)
42	56.45	3.35 (3H, s)
43	57.99	3.35 (3H, s)

[0157] ^1H , ^{13}C -NMR 및 gHSQC로부터, 총 탄소수 43개로 동일한 개수로 이뤄져 있으나, $\Delta fkbD$ 의 영향으로 인해, 1번, 2번 물질과 같이, ketone대신에 나타나는 CH_2 작용기 (δ_{H} 2.67, 2.49, δ_{C} 37.54)가 관측되었다. 2D-NMR data를 분석한 결과, 4번 화합물은 $\Delta fkbD$ -fkbM 유전자로부터 만들어진 9-deoxo-31-O-demethyl-35,37-dihydro-FK506로 구조 결정하였다.

[0159] 실시예 5: 9-deoxo-FK520 제조

[0160] FK506을 생산하는 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스에 대하여 Ban, Y. H. 외 (J. Nat. Prod. 2013, 76, 1091-1098)에 기재된 방법에 따라 이중교차 상동 재조합 (Double cross-over homologous recombination)에 의한 인-프레임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbD* 및 *tcsB* 유전자 또는 *fkbD* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-FK520의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 $\Delta fkbD, tcsB$ (수탁번호 KCTC13579BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 $\Delta fkbD, tcsD$ (수탁번호 KCTC13580BP)을 제작하였다.

[0161] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *fkbD* 및 *tcsB* 유전자의 결손 돌연변이체 또는 *fkbD* 및 *tcsD* 유전자의 결손 돌연변이체를 제작하기 위하여 각각의 유전자를 pKC1139 벡터에 클로닝하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002로 옮긴 후, 접합 (Conjugation)을 통해 FK506 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로 형질 전환하였다.

[0162] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프레임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0163] 인-프레임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였다. 플라스미드 (Plasmid) 제작은 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로부터 유래된 포스미드 (Fosmid) DNA로부터 삭제를 위한 표적 유전자의 왼쪽- 및 오른쪽-인접 절편 (Left- and right-flanking fragments)의 PCR 증폭에 의해 실시하였다. *fkbD* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbDLF/FkbDLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbDRF/FkbDRR을 설계하였고, *tcsB* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsBLF/TcsBLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsBRF/TcsBRR을 설계하였다. *tcsD* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDLF/TcsDLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDRF/TcsDRR을 설계하였다. PCR 절편 모두는 분리하여 HindIII-XbaI 또는 XbaI-EcoRI으로 절단한 후에 pKC1139 벡터에 클로닝 하였다. 본 실시예에서 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머에 대한 정보는 표 1과 표 2에 제시하였다.

[0164] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)를 제거하기 위한 플라스미드, p $\Delta fkbD$ 는 대장균 ET12567/pUZ8002에 옮긴 후 접합에 의해 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 내로 도입하여 표적 유전자를 상동 재조합으로 결실시켰다. 결실 플라스미드와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 염색체 사이에서 단일 교차가 일어난 균주는 아프라마이신 (Apramycin)이 있는 37°C (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 허용온도)에서 아프라마이신-저항성이 있는 피전달접합균주 (Transconjugant)의 배양으로 선택하였다. 이후 확보된 콜로니는 28°C에서 선택 없이 3회 증식을 수행하여 두 번째 교차를 허용하였다. 2개의 달성된 이중 교차 돌연변이, 즉 $\Delta fkbD$ 를 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0165] 제작한 *fkbD* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 $\Delta fkbD$ 에 p $\Delta tcsB$ 또는 p $\Delta tcsD$ 를 도입하여 *fkbD* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsB* 유전자 또는 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. $\Delta fkbD, tcsB$ 또는 $\Delta fkbD, tcsD$ 는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0166] 제작한 *fkbD*, *tcsB* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 $\Delta fkbD, tcsB$ 는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였고 (수탁번호

KCTC13579BP), *fkfD*, *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkfD*, *tcsD*도 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13580BP).

[0167] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkfD*, *tcsB* (수탁번호 KCTC13579BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkfD*, *tcsD* (수탁번호 KCTC13580BP)의 배양을 통하여 9-deoxo-FK520을 제조하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 250 ml의 베플 삼각 플라스크 (Baffled flask)에 50 ml의 R2YE 배지 (수크로오스 103 g/L, 글루코오스 10 g/L, 황산칼륨 0.25 g/L, 염화마그네슘 6수화물 10.12 g/L, 카사미노 엑시드 0.1 g/L, 효모 추출물 (10%) 50 ml/L, TES buffer (5.73%, pH 7.2) 100 ml/L, 인산칼륨 (0.5%) 10 ml/L, 염화칼슘 2수화물 (3.68%) 80 ml/L, L-프롤린 (20%) 15 ml/L, 미량 원소 용액 2 ml/L, 수산화나트륨 (1 N) 5 ml/L)를 첨가하고, 여기에 생산균주를 접종한 다음에 회전식 진탕 배양기에서 28℃, 180 rpm 조건에서 이틀 동안 전배양을 실시하였다. 그 다음에 1 L의 R2YE 배지가 첨가되어 있는 3 L 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask)에 이틀 동안 전배양한 배양액 10 ml를 접종하였다. 접종 후에 28℃, 180 rpm 조건에서 6일 동안 배양을 실시하였다. 6일간 배양 후에 1차 회수 공정을 통해 생산된 9-deoxo-FK520을 추출하였다.

[0168] 1차 회수 공정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 배양액에 동량의 메탄올을 첨가하여 30분 동안 혼합해 준 후 원심분리하여 균체를 제거하였고, 균체를 제거한 추출액에 대해서는 회전 증발기 (Rotary evaporator)를 이용한 농축을 실시해 주었다. 그 다음에 농축한 추출액을 물에 용해시키고, 2배 용량의 에틸아세테이트 (Ethyl acetate)를 첨가 후 잘 혼합해 준 다음 층 분리가 될 때까지 방치하였다. 층이 분리된 다음에 위층의 유기용매층을 회수하고 이를 회전 증발기를 이용하여 농축시키고 농축 후의 무게를 측정하였다. 1차 회수 공정을 실시하여 얻어 진 추출액을 실리카겔이 충전된 칼럼을 통과시켜 주었다. 이때 실리카겔의 양은 1차 회수 공정의 추출액 무게의 15배를 사용하였으며, 이동상은 5가지 비율의 메탄올과 메틸렌클로라이드 (분액 1. 0:100, 분액 2. 1:100, 분액 3. 1:10, 분액 4. 1:1, 분액 5. 100:0)를 사용하였다. 분액 3에서 9-deoxo-FK520이 확인되었다. 이렇게 얻어진 분액 3은 회전 증발기를 이용하여 농축하고 HPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다.

[0169] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화합식 5]로 표시되는 물질인 9-deoxo-FK520을 얻을 수 있었다.

[0170] 제조한 9-deoxo-FK520의 확인은 다음과 같이 실시하였다. 구체적으로, 고성능액체크로마토그래피 분석 (High performance liquid chromatography analysis), 질량분석 (Mass spectrometry), 핵자기공명 분석 (Nuclear magnetic resonance analysis)을 실시하였다. 9-deoxo-FK520에 대한 분석 결과는 표 7과 도 25 내지 도 30으로 정리되며, 이러한 결과들로부터 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkfD*, *tcsB* 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkfD*, *tcsD*로부터 9-deoxo-FK520이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0172] 9-deoxo-FK520 (분자식 $C_{43}H_{71}NO_{11}$, 분자량 778.04)에 대한 분석 결과를 하기의 표 7에 나타내었다.

표 7

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세트니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 9-deoxo-FK520의 머무름 시간 (Retention time)은 35분이었다.
질량분석	(ESI-HR-MS) Calcd. for $C_{43}H_{71}NNaO_{11}^+$:800.4919, found: m/z 800.4927

핵자기공명 분석	번호	carbon (ppm)	proton (ppm)
	1	169.62	
	2	52.84	4.87 (1H, brd, $J=5.0$ Hz)
	3	26.85	1.71 (1H, m) 2.25 (1H, m)
	4	20.97	1.24 (1H, m) 1.73 (1H, m)
	5	24.69	1.52 (1H, m) 1.71 (1H, m)
	6	42.86	3.19 (1H, m) 3.69 (1H, m)
	7	174.25	
	8	36.25	2.49 (1H, d, $J=15.0$ Hz) 2.66 (1H, d, $J=15.0$ Hz)
	9	98.75	
	10	38.72	1.58 (1H, m)
	11	31.12	1.60 (1H, m) 1.94 (1H, m)
	12	74.62	3.40 (1H, m)
	13	70.92	3.84 (1H, dd, $J=10.0, 5.0$ Hz)
	14	77.32	3.53 (1H, m)
	15	36.57	1.34 (1H, m) 1.47 (1H, m)
	16	25.93	1.63 (1H, m)
	17	48.75	1.68 (1H, m) 2.35 (1H, m)
	18	141.35	
	19	122.25	5.05 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	20	55.65	3.21 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	21	215.46	
	22	42.11	2.21 (1H, br d, $J=15$ Hz) 2.66 (1H, br d, $J=15$ Hz)
	23	69.83	3.97 (1H, m)
	24	40.59	1.87 (1H, m)
	25	76.77	5.19 (1H, br s)
	26	132.68	
	27	128.99	4.97 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	28	35.12	2.27 (1H, m)
	29	35.12	0.95 (1H, m) 2.02 (1H, m)
	30	84.44	3.00 (1H, m)
	31	73.62	3.39 (1H, m)
	32	31.44	1.34 (1H, m) 1.98 (1H, m)
	33	30.92	1.03 (1H, m) 1.61 (1H, m)
	34	25.12	1.52 (1H, m) 1.72 (1H, m)
	35	12.01	0.88 (3H, t, $J=7.5$ Hz)
	36	17.14	0.93 (3H, d, $J=5$ Hz)
	37	19.09	0.78 (3H, d, $J=5$ Hz)
	38	15.76	1.66 (3H, s)
	39	10.02	0.89 (3H, d, $J=5$ Hz)

40	14.75	1.69 (3H, s)
41	56.37	3.37 (3H, s)
42	57.91	3.37 (3H, s)
43	56.81	3.41 (3H, s)

[0174] ^1H , ^{13}C -NMR 및 gHSQC 데이터로부터, 탄소수가 총 43개로 매우 유사한 형태로 확인되었으나, 메톡시 (δ_{H} 3.41, δ_{C} 56.81)가 추가 관측되었고, CH_2 작용기가 한 개가 덜 관측되는 구조 이성질체임을 확인할 수 있었다. gCOSY로부터 proton의 연결을 확인한 결과, H-2~H-5사이의 coupling으로부터 본 화합물은 pipecolyl 골격이 확인되었고, gHMBC로부터 triplet coupling으로 관측되는 메틸기(δ_{H} 0.88, δ_{C} 12.01)와 CH_2 (δ_{H} 1.72, 1.52, δ_{C} 20.41)가 C-21 (δ_{H} 1.72, 1.52, δ_{C} 20.41) 사이에 상호 correlation이 이뤄지는 것으로부터, FK506의 propyl기가 아닌 FK520 형태를 이루는 ethyl가 C-21에 존재함을 확인하였다. 이로부터 5번 화합물은 9-deoxo-FK520으로 구조결정하였다.

[0176] 실시예 6: 31-O-demethyl-FK520 제조

[0177] FK506을 생산하는 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스에 대하여 Ban, Y. H. 외 (J. Nat. Prod. 2013, 76, 1091-1098)에 기재된 방법에 따라 이중교차 상동 재조합 (Double cross-over homologous recombination)에 의한 인-프레임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkfM* 및 *tcsB* 유전자 또는 *fkfM* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 31-O-demethyl-FK520의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkfM*, *tcsB* (수탁번호 KCTC13583BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkfM*, *tcsD* (수탁번호 KCTC13584BP)을 제작하였다.

[0178] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *fkfM* 및 *tcsB* 유전자의 결손 돌연변이체 또는 *fkfM* 및 *tcsD* 유전자의 결손 돌연변이체를 제작하기 위하여 각각의 유전자를 pKC1139 벡터에 클로닝하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002로 옮긴 후, 접합 (Conjugation)을 통해 FK506 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로 형질 전환하였다.

[0179] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프레임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0180] 인-프레임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli*-*Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였다. 플라스미드 (Plasmid) 제작은 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로부터 유래된 포스미드 (Fosmid) DNA로부터 삭제체를 위한 표적 유전자의 왼쪽- 및 오른쪽-인접 절편 (Left- and right-flanking fragments)의 PCR 증폭에 의해 실시하였다. *fkfM* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbMLF/FkbMLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbMRF/FkbMRR을 설계하였고, *tcsB* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsBLF/TcsBLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsBRF/TcsBRR을 설계하였다. *tcsD* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDLF/TcsDLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDRF/TcsDRR을 설계하였다. PCR 절편 모두는 분리하여 HindIII-XbaI 또는 XbaI-EcoRI으로 절단한 후에 pKC1139 벡터에 클로닝 하였다. 본 실시예에서 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머에 대한 정보는 표 1과 표 2에 제시하였다.

[0181] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. 31-O-메틸변환효소를 제거하기 위한 플라스미드, p Δ *fkfM*은 대장균 ET12567/pUZ8002에 옮긴 후 접합에 의해 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 내로 도입하여 표적 유전자를 상동 재조합으로 결실시켰다. 결실 플라스미드와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 염색체 사이에서 단일 교차가 일어난 균주는 아프라마이신 (Apramycin)이 있는 37°C (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 허용온도)에서 아프라마이신-저항성이 있는 피전달접합균주 (Transconjugant)의 배양으로 선택하였다. 이후 확보된 콜로니는 28°C에서 선택 없이 3회 증식을 수행하여 두 번째 교차를 허용하였다. 2개의 달성된 이중 교차 돌연변이, 즉 Δ *fkfM*을 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0182] 제작한 *fkfM* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkfM*에 p Δ *tcsB* 또는 p Δ *tcsD*를 도입하여 *fkfM* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsB* 유전자 또는 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. Δ *fkfM*, *tcsB* 또는 Δ *fkfM*, *tcsD*는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던

블록 분석으로 확인하였다.

- [0183] 제작한 *fkBM*, *tcsB* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkBM*, *tcsB*는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였고 (수탁번호 KCTC13583BP), *fkBM*, *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkBM*, *tcsD*도 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13584BP).
- [0184] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkBM*, *tcsB* (수탁번호 KCTC13583BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkBM*, *tcsD* (수탁번호 KCTC13584BP)의 배양을 통하여 31-*O*-demethyl-FK520을 제조하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 250 ml의 베플 삼각 플라스크 (Baffled flask)에 50 ml의 R2YE 배지 (수크로오스 103 g/L, 글루코오스 10 g/L, 황산칼륨 0.25 g/L, 염화마그네슘 6수화물 10.12 g/L, 카사미노 엑시트 0.1 g/L, 효모 추출물 (10%) 50 ml/L, TES buffer (5.73%, pH 7.2) 100 ml/L, 인산칼륨 (0.5%) 10 ml/L, 염화칼슘 2수화물 (3.68%) 80 ml/L, L-프롤린 (20%) 15 ml/L, 미량 원소 용액 2 ml/L, 수산화나트륨 (1 N) 5 ml/L)를 첨가하고, 여기에 생산균주를 접종한 다음에 회전식 진탕 배양기에서 28℃, 180 rpm 조건에서 이틀 동안 전배양을 실시하였다. 그 다음에 1 L의 R2YE 배지가 첨가되어 있는 3 L 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask)에 이틀 동안 전배양한 배양액 10 ml를 접종하였다. 접종 후에 28℃, 180 rpm 조건에서 6일 동안 배양을 실시하였다. 6일간 배양 후에 1차 회수 공정을 통해 생산된 31-*O*-demethyl-FK520을 추출하였다.
- [0185] 1차 회수 공정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 배양액에 동량의 메탄올을 첨가하여 30분 동안 혼합해 준 후 원심분리하여 균체를 제거하였고, 균체를 제거한 추출액에 대해서는 회전 증발기 (Rotary evaporator)를 이용한 농축을 실시해 주었다. 그 다음에 농축한 추출액을 물에 용해시키고, 2배 용량의 에틸아세테이트 (Ethyl acetate)를 첨가 후 잘 혼합해 준 다음 층 분리가 될 때까지 방치하였다. 층이 분리된 다음에 위층의 유기용매층을 회수하고 이를 회전 증발기를 이용하여 농축시키고 농축 후의 무게를 측정하였다. 1차 회수 공정을 실시하여 얻어 진 추출액을 실리카겔이 충전된 칼럼을 통과시켜 주었다. 이때 실리카겔의 양은 1차 회수 공정의 추출액 무게의 15배를 사용하였으며, 이동상은 5가지 비율의 메탄올과 메틸렌클로라이드 (분액 1. 0:100, 분액 2. 1:100, 분액 3. 1:10, 분액 4. 1:1, 분액 5. 100:0)를 사용하였다. 분액 3에서 31-*O*-demethyl-FK520이 확인되었다. 이렇게 얻어진 분액 3은 회전 증발기를 이용하여 농축하고 HPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다.
- [0186] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 6]으로 표시되는 물질인 31-*O*-demethyl-FK520을 얻을 수 있었다.
- [0187] 제조한 31-*O*-demethyl-FK520의 확인은 다음과 같이 실시하였다. 구체적으로, 고성능액체크로마토그래피 분석 (High performance liquid chromatography analysis), 질량분석 (Mass spectrometry), 핵자기공명 분석 (Nuclear magnetic resonance analysis)을 실시하였다. 31-*O*-demethyl-FK520에 대한 분석 결과는 표 8과 도 31 내지 도 36으로 정리되며, 이러한 결과들로부터 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkBM*, *tcsB* 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ *fkBM*, *tcsD*로부터 31-*O*-demethyl-FK520이 생산됨을 확인할 수 있었다.
- [0189] 31-*O*-demethyl-FK520 (분자식 $C_{42}H_{67}NO_{12}$, 분자량 777.99)에 대한 분석 결과를 하기의 표 8에 나타내었다.

표 8

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 31- <i>O</i> -demethyl-FK520의 머무름 시간 (Retention time)은 34분이었다.
질량분석	(ESI-HR-MS) Calcd. for $C_{42}H_{67}NNaO_{12}^+$:800.4555, found: m/z 800.4561

핵자기공명 분석	번호	carbon (ppm)	proton (ppm)
	1	169.30	
	2	56.64	4.58 (1H, brd, $J=5.0$ Hz)
	3	27.92	2.05 (1H, m) 1.90 (1H, m)
	4	21.42	1.38 (1H, m) 1.74 (1H, m)
	5	24.54	1.51 (1H, m) 1.68 (1H, m)
	6	39.58	3.03 (1H, m) 4.42 (1H, m)
	7	165.03	
	8	196.50	
	9	97.36	
	10	35.28	2.32 (1H, m)
	11	33.01	1.52 (1H, m) 2.16 (1H, m)
	12	73.92	3.39 (1H, m)
	13	73.09	3.68 (1H, dd, $J=10.0$, 5.0 Hz)
	14	75.06	3.42 (1H, m)
	15	35.79	1.35 (1H, m) 1.56 (1H, m)
	16	26.67	1.66 (1H, m)
	17	49.02	1.80 (1H, m) 2.17 (1H, m)
	18	138.99	
	19	123.33	5.01 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	20	53.34	3.28 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	21	213.69	
	22	43.64	2.10 (1H, br d, $J=15$ Hz) 2.77 (1H, br d, $J=15$ Hz)
	23	70.22	3.92 (1H, m)
	24	39.97	1.89 (1H, m)
	25	77.80	5.33 (1H, br s)
	26	132.47	
	27	130.07	5.09 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	28	34.93	2.18 (1H, m)
	29	39.36	1.14 (1H, m) 1.91 (1H, m)
	30	75.64	3.57 (1H, m)
	31	75.50	3.36 (1H, m)
	32	32.36	1.35 (1H, m) 1.98 (1H, m)
	33	31.23	1.06 (1H, m) 1.61 (1H, m)
	34	24.78	1.45 (1H, m) 1.72 (1H, m)
	35	11.91	0.86 (3H, t, $J=7.5$ Hz)
	36	16.41	0.99 (3H, d, $J=5$ Hz)
	37	20.66	0.93 (3H, d, $J=5$ Hz)
	38	16.02	1.59 (3H, s)
	39	9.71	0.90 (3H, d, $J=5$ Hz)
	40	14.20	1.62 (3H, s)
	41	56.55	3.38 (3H, s)

- [0191] 분자량 800.4563으로 확인된 6번 화합물은 분자량 800.4924 및 800.4927 매우 유사한 분자량을 보였으나, ^1H , ^{13}C -NMR 및 gHSQC 데이터로부터, 탄소수가 총 42개로, 메톡시기가 적은 것이 탄소 1개의 차이임을 확인할 수 있었고, ketone 탄소 (δ_{C} 196.50) 관측되었다. 2D-NMR 데이터를 종합한 결과, 31-*O*-demethyl-FK520으로 구조결정되었다.
- [0193] **실시예 7: 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520 제조**
- [0194] FK506을 생산하는 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스에 대하여 Ban, Y. H. 외 (J. Nat. Prod. 2013, 76, 1091-1098)에 기재된 방법에 따라 이중교차 상동 재조합 (Double cross-over homologous recombination)에 의한 인-프레임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbD-fkbM* 및 *tcsB* 유전자 또는 *fkbD-fkbM* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13582BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13585BP)를 제작하였다.
- [0195] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *fkbD-fkbM* 및 *tcsB* 유전자의 결손 또는 *fkbD-fkbM* 및 *tcsD* 유전자의 결손 돌연변이체를 제작하기 위하여 각각의 유전자를 pKC1139 벡터에 클로닝하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002로 옮긴 후, 접합 (Conjugation)을 통해 FK506 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로 형질 전환하였다.
- [0196] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프레임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.
- [0197] 인-프레임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli*-*Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였다. 플라스미드 (Plasmid) 제작은 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로부터 유래된 포스미드 (Fosmid) DNA로부터 삭제체를 위한 표적 유전자의 왼쪽- 및 오른쪽-인접 절편 (Left- and right-flanking fragments)의 PCR 증폭에 의해 실시하였다. *fkbD-fkbM* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbD-MLF/FkbD-MLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbD-MRF/FkbD-MRR을 설계하였다. *tcsB* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsBLF/TcsBLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsBRF/TcsBRR을 설계하였고, *tcsD* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDLF/TcsDLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsDRF/TcsDRR을 설계하였다. PCR 절편 모두는 분리하여 HindIII-XbaI 또는 XbaI-EcoRI으로 절단한 후에 pKC1139 벡터에 클로닝 하였다. 본 실시예에서 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머에 대한 정보는 표 1과 표 2에 제시하였다.
- [0198] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)와 31-*O*-메틸변환효소를 함께 제거하기 위한 플라스미드, p Δ fkbD-fkbM는 대장균 ET12567/pUZ8002에 옮긴 후 접합에 의해 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 내로 도입하여 표적 유전자를 상동 재조합으로 결실시켰다. 결실 플라스미드와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 염색체 사이에서 단일 교차가 일어난 균주는 아프라마이신 (Apramycin)이 있는 37°C (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-중식 허용온도)에서 아프라마이신-저항성이 있는 피전달접합균주 (Transconjugant)의 배양으로 선택하였다. 이후 확보된 콜로니는 28°C에서 선택 없이 3회 증식을 수행하여 두 번째 교차를 허용하였다. 2개의 달성된 이중 교차 돌연변이, 즉 Δ fkbD-fkbM을 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.
- [0199] 제작한 *fkbD-fkbM* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM에 p Δ tcsB 또는 p Δ tcsD를 도입하여 *fkbD-fkbM* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsB* 유전자 또는 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. Δ fkbD-fkbM,tcsB 또는 Δ fkbD-fkbM,tcsD는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.
- [0200] 제작한 *fkbD-fkbM* 및 *tcsB* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM,tcsB는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였고 (수탁번호 KCTC13582BP), *fkbD-fkbM* 및 *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-

fkbM, tcsD도 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13585BP).

[0201] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, tcsB (수탁번호 KCTC13582BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, tcsD (수탁번호 KCTC13585BP)의 배양을 통하여 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520을 제조하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 250 ml의 베플 삼각 플라스크 (Baffled flask)에 50 ml의 R2YE 배지 (수크로오즈 103 g/L, 글루코오즈 10 g/L, 황산칼륨 0.25 g/L, 염화마그네슘 6수화물 10.12 g/L, 카사미노 엑시드 0.1 g/L, 효모 추출물 (10%) 50 ml/L, TES buffer (5.73%, pH 7.2) 100 ml/L, 인산칼륨 (0.5%) 10 ml/L, 염화칼슘 2수화물 (3.68%) 80 ml/L, L-프롤린 (20%) 15 ml/L, 미량 원소 용액 2 ml/L, 수산화나트륨 (1 N) 5 ml/L)를 첨가하고, 여기에 생산균주를 접종한 다음에 회전식 진탕 배양기에서 28 °C, 180 rpm 조건에서 이틀 동안 전배양을 실시하였다. 그 다음에 1 L의 R2YE 배지가 첨가되어 있는 3 L 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask)에 이틀 동안 전배양한 배양액 10 ml를 접종하였다. 접종 후에 28°C, 180 rpm 조건에서 6일 동안 배양을 실시하였다. 6일간 배양 후에 1차 회수 공정을 통해 생산된 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520을 추출하였다.

[0202] 1차 회수 공정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 배양액에 동량의 메탄올을 첨가하여 30분 동안 혼합해 준 후 원심분리하여 균체를 제거하였고, 균체를 제거한 추출액에 대해서는 회전 증발기 (Rotary evaporator)를 이용한 농축을 실시해 주었다. 그 다음에 농축한 추출액을 물에 용해시키고, 2배 용량의 에틸아세테이트 (Ethyl acetate)를 첨가 후 잘 혼합해 준 다음 층 분리가 될 때까지 방치하였다. 층이 분리된 다음에 위층의 유기용매층을 회수하고 이를 회전 증발기를 이용하여 농축시키고 농축 후의 무게를 측정하였다. 1차 회수 공정을 실시하여 얻어 진 추출액을 실리카겔이 충전된 칼럼을 통과시켜 주었다. 이때 실리카겔의 양은 1차 회수 공정의 추출액 무게의 15배를 사용하였으며, 이동상은 5가지 비율의 메탄올과 메틸렌클로라이드 (분액 1. 0:100, 분액 2. 1:100, 분액 3. 1:10, 분액 4. 1:1, 분액 5. 100:0)를 사용하였다. 분액 3에서 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520이 확인되었다. 이렇게 얻어진 분액 3은 회전 증발기를 이용하여 농축하고 HPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다.

[0203] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화합식 7]로 표시되는 물질인 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520을 얻을 수 있었다.

[0204] 제조한 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520의 확인은 다음과 같이 실시하였다. 구체적으로, 고성능액체크로마토그래피 분석 (High performance liquid chromatography analysis), 질량분석 (Mass spectrometry), 핵자기공명 분석 (Nuclear magnetic resonance analysis)을 실시하였다. 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520에 대한 분석 결과는 표 9와 도 37 내지 도 42로 정리되며, 이러한 결과들로부터 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, tcsB 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM, tcsD로부터 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0206] 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520 (분자식 $C_{42}H_{69}NO_{11}$, 분자량 764.01)에 대한 분석 결과를 하기의 표 9에 나타내었다.

표 9

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 9-deoxo-31-O-demethyl-FK520의 머무름 시간 (Retention time)은 24분이었다.
질량분석	(ESI-HR-MS) Calcd. for $C_{42}H_{69}NNaO_{11}^+$:786.4763, found: m/z 786.4769

핵자기공명 분석	번호	carbon (ppm)	proton (ppm)
	1	169.65	
	2	52.86	4.87 (1H, brd, $J=5.0$ Hz)
	3	26.86	1.70 (1H, m) 2.23 (1H, m)
	4	20.95	1.32 (1H, m) 1.72 (1H, m)
	5	24.69	1.52 (1H, m) 1.68 (1H, m)
	6	42.97	3.19 (1H, m) 3.70 (1H, m)
	7	174.27	
	8	37.54	2.49 (1H, d, $J=15.0$ Hz) 2.67 (1H, d, $J=15.0$ Hz)
	9	98.76	
	10	38.78	1.56 (1H, m)
	11	32.86	1.60 (1H, m) 1.94 (1H, m)
	12	74.61	3.41 (1H, m)
	13	70.92	3.86 (1H, dd, $J=10.0, 5.0$ Hz)
	14	77.21	3.53 (1H, m)
	15	36.57	1.34 (1H, m) 1.47 (1H, m)
	16	25.93	1.63 (1H, m)
	17	48.49	1.64 (1H, m) 2.33 (1H, m)
	18	141.30	
	19	122.26	5.05 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	20	55.66	3.20 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	21	215.35	
	22	42.20	2.20 (1H, br d, $J=15$ Hz) 2.64 (1H, br d, $J=15$ Hz)
	23	69.82	3.98 (1H, m)
	24	40.05	1.85 (1H, m)
	25	76.90	5.20 (1H, br s)
	26	132.76	
	27	128.90	4.97 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	28	35.29	2.32 (1H, m)
	29	39.45	1.12 (1H, m) 1.88 (1H, m)
	30	75.22	3.53 (1H, m)
	31	75.22	3.40 (1H, m)
	32	32.32	1.33 (1H, m) 1.95 (1H, m)
	33	31.19	1.04 (1H, m) 1.59 (1H, m)
	34	25.13	1.52 (1H, m) 1.68 (1H, m)
	35	12.00	0.88 (3H, t, $J=7.5$ Hz)
	36	17.14	0.95 (3H, d, $J=5$ Hz)
	37	19.09	0.77 (3H, d, $J=5$ Hz)
	38	15.77	1.65 (3H, s)
	39	9.98	0.86 (3H, d, $J=5$ Hz)

40	14.68	1.67 (3H, s)
41	56.37	3.38 (3H, s)

[0208] ^1H , ^{13}C -NMR 및 gHSQC 데이터로부터, 탄소수가 총 42개로 31-*O*-demethyl-FK520와 유사한 결과를 보였으나, Δ fkbD-fkbM 유전자로부터 만들어진 CH_2 작용기 (δ_{H} 2.67, 2.49, δ_{C} 37.54)가 관측되었다. 7번 화합물은 2D-NMR 데이터를 종합한 결과, 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520으로 구조결정되었다.

[0210] 실시예 8: 9-deoxo-FK523 제조

[0211] FK506을 생산하는 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스에 대하여 Ban, Y. H. 외 (J. Nat. Prod. 2013, 76, 1091-1098)에 기재된 방법에 따라 이중교차 상동 재조합 (Double cross-over homologous recombination)에 의한 인-프레임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbD* 및 *tcsB* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-FK523의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD,tcsB (수탁번호 KCTC13579BP)를 제작하였다.

[0212] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *fkbD* 및 *tcsB* 유전자의 결손 돌연변이체를 제작하기 위하여 각각의 유전자를 pKC1139 벡터에 클로닝하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002로 옮긴 후, 접합 (Conjugation)을 통해 FK506 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로 형질 전환하였다.

[0213] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프레임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0214] 인-프레임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli*-*Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였다. 플라스미드 (Plasmid) 제작은 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로부터 유래된 포스미드 (Fosmid) DNA로부터 삭제체를 위한 표적 유전자의 왼쪽- 및 오른쪽-인접 절편 (Left- and right-flanking fragments)의 PCR 증폭에 의해 실시하였다. *fkbD* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbDLF/FkbDLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbDRF/FkbDRR을 설계하였고, *tcsB* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsBLF/TcsBLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsBRF/TcsBRR을 설계하였다. PCR 절편 모두는 분리하여 HindIII-XbaI 또는 XbaI-EcoRI으로 절단한 후에 pKC1139 벡터에 클로닝 하였다. 본 실시예에서 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머에 대한 정보는 표 1과 표 2에 제시하였다.

[0215] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)를 제거하기 위한 플라스미드, p Δ fkbD는 대장균 ET12567/pUZ8002에 옮긴 후 접합에 의해 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 내로 도입하여 표적 유전자를 상동 재조합으로 결실시켰다. 결실 플라스미드와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 염색체 사이에서 단일 교차가 일어난 균주는 아프라마이신 (Apramycin)이 있는 37°C (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-중식 허용온도)에서 아프라마이신-저항성이 있는 피전달접합균주 (Transconjugant)의 배양으로 선택하였다. 이후 확보된 콜로니는 28°C에서 선택 없이 3회 증식을 수행하여 두 번째 교차를 허용하였다. 2개의 달성된 이중 교차 돌연변이, 즉 Δ fkbD를 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0216] 제작한 *fkbD* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD에 p Δ tcsB를 도입하여 *fkbD* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsB* 유전자를 결실시켰다. Δ fkbD,tcsB는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.

[0217] 제작한 *fkbD*, *tcsB* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD,tcsB는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13579BP).

[0218] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD,tcsB (수탁번호 KCTC13579BP)의 배양을 통하여 9-deoxo-FK523을 제조하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 250 ml의 베플 삼각 플라스크 (Baffled flask)에 50 ml의 R2YE 배지 (수크로오스 103 g/L, 글루코오스 10 g/L, 황산칼륨 0.25 g/L, 염화마그네슘 6수화물 10.12 g/L, 카사미노 엑시드 0.1 g/L, 효모 추출물 (10%) 50 ml/L, TES buffer (5.73%, pH 7.2) 100 ml/L, 인산칼륨 (0.5%) 10 ml/L, 염화칼슘 2수화물 (3.68%) 80 ml/L, L-프롤린 (20%) 15 ml/L, 미량 원소 용액

2 ml/L, 수산화나트륨 (1 N) 5 ml/L)를 첨가하고, 여기에 생산균주를 접종한 다음에 회전식 진탕 배양기에서 28 °C, 180 rpm 조건에서 이틀 동안 전배양을 실시하였다. 그 다음에 1 L의 R2YE 배지가 첨가되어 있는 3 L 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask)에 이틀 동안 전배양한 배양액 10 ml를 접종하였다. 접종 후에 28°C, 180 rpm 조건에서 6일 동안 배양을 실시하였다. 6일간 배양 후에 1차 회수 공정을 통해 생산된 9-deoxo-FK523을 추출하였다.

[0219] 1차 회수 공정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 배양액에 동량의 메탄올을 첨가하여 30분 동안 혼합해 준 후 원심분리하여 균체를 제거하였고, 균체를 제거한 추출액에 대해서는 회전 증발기 (Rotary evaporator)를 이용한 농축을 실시해 주었다. 그 다음에 농축한 추출액을 물에 용해시키고, 2배 용량의 에틸아세테이트 (Ethyl acetate)를 첨가 후 잘 혼합해 준 다음 층 분리가 될 때까지 방치하였다. 층이 분리된 다음에 위층의 유기용매 층을 회수하고 이를 회전 증발기를 이용하여 농축시키고 농축 후의 무게를 측정하였다. 1차 회수 공정을 실시하여 얻어 진 추출액을 실리카겔이 충전된 칼럼을 통과시켜 주었다. 이때 실리카겔의 양은 1차 회수 공정의 추출액 무게의 15배를 사용하였으며, 이동상은 5가지 비율의 메탄올과 메틸렌클로라이드 (분액 1. 0:100, 분액 2. 1:100, 분액 3. 1:10, 분액 4. 1:1, 분액 5. 100:0)를 사용하였다. 분액 3에서 9-deoxo-FK523이 확인되었다. 이렇게 얻어진 분액 3은 회전 증발기를 이용하여 농축하고 HPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다.

[0220] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 8]로 표시되는 물질인 9-deoxo-FK523을 얻을 수 있었다.

[0221] 제조한 9-deoxo-FK523의 확인은 다음과 같이 실시하였다. 구체적으로, 고성능액체크로마토그래피 분석 (High performance liquid chromatography analysis), 질량분석 (Mass spectrometry), 핵자기공명 분석 (Nuclear magnetic resonance analysis)을 실시하였다. 9-deoxo-FK523에 대한 분석 결과는 표 10과 도 43 내지 도 48로 정리되며, 이러한 결과들로부터 제작한 생산균주 스트랩토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD, tcsB로부터 9-deoxo-FK523이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0223] 9-deoxo-FK523 (분자식 $C_{42}H_{69}NO_{11}$, 분자량 764.01)에 대한 분석 결과를 하기의 표 10에 나타내었다.

표 10

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 9-deoxo-FK523의 머무름 시간 (Retention time)은 24분이었다.
질량분석	(ESI-HR-MS) Calcd. for $C_{42}H_{69}NNaO_{11}^+$:786.4763, found: m/z 786.4769

핵자기공명 분석	번호	carbon (ppm)	proton (ppm)
	1	169.61	
	2	52.59	4.85 (1H, brd, $J=5.0$ Hz)
	3	26.87	1.70 (1H, m) 2.24 (1H, m)
	4	20.70	1.31 (1H, m) 1.72 (1H, m)
	5	24.42	1.51 (1H, m) 1.68 (1H, m)
	6	42.65	3.19 (1H, m) 3.69 (1H, m)
	7	174.23	
	8	36.25	2.51 (1H, d, $J=15.0$ Hz) 2.70 (1H, d, $J=15.0$ Hz)
	9	98.70	
	10	38.72	1.58 (1H, m)
	11	32.84	1.60 (1H, m) 1.94 (1H, m)
	12	74.60	3.40 (1H, m)
	13	70.90	3.86 (1H, dd, $J=10.0, 5.0$ Hz)
	14	77.11	3.53 (1H, m)
	15	36.48	1.34 (1H, m) 1.47 (1H, m)
	16	26.30	1.50 (1H, m)
	17	48.49	1.65 (1H, m) 2.32 (1H, m)
	18	140.43	
	19	123.48	5.17 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	20	53.45	3.21 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	21	215.35	
	22	41.74	2.21 (1H, br d, $J=15$ Hz) 2.66 (1H, br d, $J=15$ Hz)
	23	69.99	4.01 (1H, m)
	24	40.68	1.90 (1H, m)
	25	76.62	5.22 (1H, br s)
	26	132.71	
	27	128.92	4.98 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	28	35.13	2.35 (1H, m)
	29	35.13	0.93 (1H, m) 2.01 (1H, m)
	30	84.43	3.00 (1H, m)
	31	73.80	3.39 (1H, m)
	32	32.87	1.34 (1H, m) 1.98 (1H, m)
	33	31.44	1.06 (1H, m) 1.61 (1H, m)
	34	17.13	1.18 (3H, d, $J=5$ Hz)
	35	17.13	0.96 (3H, d, $J=5$ Hz)
	36	18.87	0.78 (3H, d, $J=5$ Hz)
	37	16.08	1.63 (3H, s)
	38	10.12	0.90 (3H, d, $J=5$ Hz)
	39	14.79	1.66 (3H, s)
	40	56.38	3.37 (3H, s)
	41	57.90	3.37 (3H, s)

- [0225] 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520 분자량과 동일한 분자량을 갖고 있으며, ^1H , ^{13}C -NMR 및 gHSQC 데이터로부터, 탄소수가 총 42개로 매우 유사한 형태로 확인되었으나, 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520과 달리 메톡시 (δ_{H} 3.41, δ_{C} 56.81)가 추가 관측되었고, CH_2 작용기가 한 개가 덜 관측되는 구조 이성질체임을 확인할 수 있었다. gCOSY로부터 proton의 연결을 확인한 결과, H-2~H-5사이의 coupling으로부터 본 화합물은 pipercolyl 골격이 확인되었고, gHMBC로부터 doublet coupling으로 관측되는 메틸기(δ_{H} 1.18, δ_{C} 17.13)가 C-21 (δ_{H} 3.21, δ_{C} 53.45) 사이에 상호 correlation이 이뤄지는 것으로부터, FK523 형태를 이루는 methyl가 C-21에 존재함을 확인하였다. 이로부터 9-deoxo-FK523으로 구조결정하였다.
- [0227] **실시예 9: 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523 제조**
- [0228] FK506을 생산하는 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스에 대하여 Ban, Y. H. 외 (J. Nat. Prod. 2013, 76, 1091-1098)에 기재된 방법에 따라 이중교차 상동 재조합 (Double cross-over homologous recombination)에 의한 인-프레임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbd-fkbM* 및 *tcsB* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd-fkbM, *tcsB* (수탁번호 KCTC13582BP)를 제작하였다.
- [0229] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *fkbd-fkbM* 및 *tcsB* 유전자의 결손 돌연변이체를 제작하기 위하여 각각의 유전자를 pKC1139 벡터에 클로닝하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002로 옮긴 후, 접합 (Conjugation)을 통해 FK506 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로 형질 전환하였다.
- [0230] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프레임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.
- [0231] 인-프레임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였다. 플라스미드 (Plasmid) 제작은 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스로부터 유래된 포스미드 (Fosmid) DNA로부터 삭제제를 위한 표적 유전자의 왼쪽- 및 오른쪽-인접 절편 (Left- and right-flanking fragments)의 PCR 증폭에 의해 실시하였다. *fkbd-fkbM* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbD-MLF/FkbD-MLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 FkbD-MRF/FkbD-MRR을 설계하였다. *tcsB* 유전자의 결실을 위해서는 왼쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsBLF/TcsBLR, 오른쪽-인접 절편의 프라이머 쌍 TcsBRF/TcsBRR을 설계하였다. PCR 절편 모두는 분리하여 HindIII-XbaI 또는 XbaI-EcoRI으로 절단한 후에 pKC1139 벡터에 클로닝 하였다. 본 실시예에서 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머에 대한 정보는 표 1과 표 2에 제시하였다.
- [0232] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)와 31-*O*-메틸변환효소를 함께 제거하기 위한 플라스미드, p Δ fkbd-fkbM은 대장균 ET12567/pUZ8002에 옮긴 후 접합에 의해 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 내로 도입하여 표적 유전자를 상동 재조합으로 결실시켰다. 결실 플라스미드와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 염색체 사이에서 단일 교차가 일어난 균주는 아프라마이신 (Apramycin)이 있는 37°C (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 허용온도)에서 아프라마이신-저항성이 있는 피전달접합균주 (Transconjugant)의 배양으로 선택하였다. 이후 확보된 콜로니는 28°C에서 선택 없이 3회 증식을 수행하여 두 번째 교차를 허용하였다. 2개의 달성된 이중 교차 돌연변이, 즉 Δ fkbd-fkbM을 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.
- [0233] 제작한 *fkbd-fkbM* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd-fkbM에 p Δ tcsB를 도입하여 *fkbd-fkbM* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsB* 유전자를 결실시켰다. Δ fkbd-fkbM, *tcsB*는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다.
- [0234] 제작한 *fkbd-fkbM* 및 *tcsB* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbd-fkbM, *tcsB*는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다

(수탁번호 KCTC13582BP).

[0235] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13582BP)의 배양을 통하여 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523을 제조하였다. 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 250 ml의 배플 삼각 플라스크 (Baffled flask)에 50 ml의 R2YE 배지 (수크로오즈 103 g/L, 글루코오즈 10 g/L, 황산칼륨 0.25 g/L, 염화마그네슘 6수화물 10.12 g/L, 카사미노 엑시드 0.1 g/L, 효모 추출물 (10%) 50 ml/L, TES buffer (5.73%, pH 7.2) 100 ml/L, 인산칼륨 (0.5%) 10 ml/L, 염화칼슘 2수화물 (3.68%) 80 ml/L, L-프롤린 (20%) 15 ml/L, 미량 원소 용액 2 ml/L, 수산화나트륨 (1 N) 5 ml/L)를 첨가하고, 여기에 생산균주를 접종한 다음에 회전식 진탕 배양기에서 28℃, 180 rpm 조건에서 이틀 동안 전배양을 실시하였다. 그 다음에 1 L의 R2YE 배지가 첨가되어 있는 3 L 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask)에 이틀 동안 전배양한 배양액 10 ml를 접종하였다. 접종 후에 28℃, 180 rpm 조건에서 6일 동안 배양을 실시하였다. 6일간 배양 후에 1차 회수 공정을 통해 생산된 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523을 추출하였다.

[0236] 1차 회수 공정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 배양액에 동량의 메탄올을 첨가하여 30분 동안 혼합해 준 후 원심분리하여 균체를 제거하였고, 균체를 제거한 추출액에 대해서는 회전 증발기 (Rotary evaporator)를 이용한 농축을 실시해 주었다. 그 다음에 농축한 추출액을 물에 용해시키고, 2배 용량의 에틸아세테이트 (Ethyl acetate)를 첨가 후 잘 혼합해 준 다음 층 분리가 될 때까지 방치하였다. 층이 분리된 다음에 위층의 유기용매 층을 회수하고 이를 회전 증발기를 이용하여 농축시키고 농축 후의 무게를 측정하였다. 1차 회수 공정을 실시하여 얻어 진 추출액을 실리카겔이 충전된 칼럼을 통과시켜 주었다. 이때 실리카겔의 양은 1차 회수 공정의 추출액 무게의 15배를 사용하였으며, 이동상은 5가지 비율의 메탄올과 메틸렌클로라이드 (분액 1. 0:100, 분액 2. 1:100, 분액 3. 1:10, 분액 4. 1:1, 분액 5. 100:0)를 사용하였다. 분액 3에서 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523이 확인되었다. 이렇게 얻어진 분액 3은 회전 증발기를 이용하여 농축하고 HPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다.

[0237] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화합식 9]로 표시되는 물질인 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523을 얻을 수 있었다.

[0238] 제조한 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523의 확인은 다음과 같이 실시하였다. 구체적으로, 고성능액체크로마토그래피 분석 (High performance liquid chromatography analysis), 질량분석 (Mass spectrometry), 핵자기공명 분석 (Nuclear magnetic resonance analysis)을 실시하였다. 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523에 대한 분석 결과는 표 11과 도 49 내지 도 54로 정리되며, 이러한 결과들로부터 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 Δ fkbD-fkbM,tcsB로부터 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0240] 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523 (분자식 $C_{41}H_{67}NO_{11}$, 분자량 752.01)에 대한 분석 결과를 하기의 표 11에 나타내었다.

표 11

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 9-deoxo-31- <i>O</i> -demethyl-FK523의 머무름 시간 (Retention time)은 17분이었다.
질량분석	(ESI-HR-MS) Calcd. for $C_{41}H_{67}NNaO_{11}^+$:772.4606, found: m/z 772.4612

[0241]

핵자기공명 분석	번호	carbon (ppm)	proton (ppm)
	1	169.63	
	2	52.83	4.90 (1H, brd, $J=5.0$ Hz)
	3	26.88	1.70 (1H, m) 2.24(1H, m)
	4	20.70	1.31 (1H, m) 1.72(1H, m)
	5	24.70	1.51 (1H, m) 1.68(1H, m)
	6	42.89	3.21 (1H, m) 3.72(1H, m)
	7	174.26	
	8	36.25	2.51 (1H, d, $J=15.0$ Hz) 2.70(1H, d, $J=15.0$ Hz)
	9	98.70	
	10	38.72	1.58 (1H, m)
	11	32.86	1.60 (1H, m) 1.94(1H, m)
	12	74.59	3.40 (1H, m)
	13	70.90	3.86 (1H, dd, $J=10.0$, 5.0 Hz)
	14	77.11	3.53 (1H, m)
	15	36.48	1.34 (1H, m) 1.47(1H, m)
	16	26.30	1.50 (1H, m)
	17	48.37	1.65 (1H, m) 2.32(1H, m)
	18	140.38	
	19	123.50	5.17 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	20	48.04	3.21 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	21	215.35	
	22	41.79	2.21 (1H, br d, $J=15$ Hz) 2.66(1H, brd, $J=15$ Hz)
	23	69.99	4.01 (1H, m)
	24	40.60	1.90 (1H, m)
	25	76.70	5.22 (1H, br s)
	26	132.80	
	27	128.83	4.98 (1H, d, $J=5.0$ Hz)
	28	35.21	2.35 (1H, m)
	29	39.38	1.17 (1H, m) 1.91(1H, m)
	30	75.71	3.43 (1H, m)
	31	75.17	3.36 (1H, m)
	32	32.24	1.34 (1H, m) 1.98(1H, m)
	33	31.20	1.06 (1H, m) 1.61(1H, m)
	34	17.09	1.18 (3H, d, $J=5$ Hz)
	35	17.13	0.96 (3H, d, $J=5$ Hz)
	36	18.86	0.78 (3H, d, $J=5$ Hz)
	37	16.09	1.66 (3H, s)
	38	10.08	0.88 (3H, d, $J=5$ Hz)
	39	14.73	1.67 (3H, s)
	40	56.38	3.37 (3H, s)
	41	57.90	3.37 (3H, s)

[0242] ^1H , ^{13}C -NMR 및 gHSQC 데이터로부터, 탄소수가 총 41개로 9-deoxo-FK523와 달리, 메톡시 1개가 부족함을 알 수 있었다. 이와 함께, Δ fkbd-fkbm 유전자로부터 만들어진 CH_2 작용기 (δ_{H} 2.70, 2.51, δ_{C} 36.25)가 관측되었다. 2D-NMR 데이터를 종합한 결과, 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523으로 구조결정되었다.

[0244] **실시예 10: 9종 신규 화합물의 면역억제활성 조사**

[0245] 9종 신규 화합물의 면역억제활성 감소 정도를 통상의 인비트로 (*In vitro*) T-세포 활성 분석법 (J. Immunol. 143: 718-726, 1989)을 이용하여 조사하였다. CD4+ T 세포가 분열되는 것은 면역반응이 일어나고 있음을 보여주는 지표로 CD4+ T 세포를 Cell Trace™ Violet (CTV)으로 염색하여 세포가 면역반응에 따른 분열을 하여 T 세포가 증식하는 경우에 각 세포의 CTV 보유량이 감소되는 현상이 나타나므로 이를 지표로 이용하여 면역억제활성 정도를 조사하였다.

[0246] 6-8주령의 B6J 실험용 쥐의 비장 (Spleen)로부터 단세포 (Single cell)를 박리하고 MagniSort® Mouse CD4 T cell Enrichment Kit (eBioscience)를 사용하여 CD4+ T 세포를 분리하였다. CD4+ T 세포를 Cell Trace™ Violet (CTV) Cell Proliferation Kit (Molecular Probes)로 염색하고 FK506 또는 9종 신규 화합물을 0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml 농도가 되게 첨가한 다음에 72시간 동안 배양하였다. T 세포의 활성화를 위해 Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28 (Gibco)를 사용하였다. 대조구로는 활성화되지 않은 T 세포를 사용하였다. 배양 후에 유세포 분석기 (flow cytometry)로 CTV 강도 (intensity)를 분석하였다.

[0247] 하기 표 12와 도 55는 유세포 분석기를 이용하여 CTV 강도를 측정한 것으로 T 세포 증식 정도를 보여주어, FK506 및 9종 신규 화합물의 면역억제활성 정도를 보여준다. 하기 표 12와 도 55에 나타난 바와 같이 본원발명에서 제시하고 있는 모든 신규화합물들은 FK506보다 감소된 면역억제활성을 나타내었다.

표 12

Structural analogs	Immunosuppression IC ₅₀ (ng/ml)
FK506	0.027
9-deoxo-prolyl-FK506	268.3
9-deoxo-FK506	0.513
31- <i>O</i> -demethyl-FK506	0.246
9-deoxo-31- <i>O</i> -demethyl-FK506	15.09
9-deoxo-31- <i>O</i> -demethyl-prolyl-FK506	886.5
9-deoxo-36,37-dihydro-FK506	14.1
31- <i>O</i> -demethyl-36,37-dihydro-FK506	1.723
9-deoxo-31- <i>O</i> -demethyl-36,37-dihydro-FK506	45.87
9-deoxo-FK520	24.98
31- <i>O</i> -demethyl-FK520	3.273
9-deoxo-31- <i>O</i> -demethyl-FK520	258.1
9-deoxo-FK523	1985
9-deoxo-31- <i>O</i> -demethyl-FK523	3378

[0250] 이러한 결과로부터, 본 발명에 따른 9종 신규 화합물들이 FK506에 비교하여 면역억제활성이 크게 감소되었음을 확인할 수 있었으며, 9종의 신규 화합물이 최소 100배 이상의 IC₅₀ (ng/ml) 농도를 보임에 따라 면역억제활성이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다. 이로부터 9종 신규 화합물 중 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 면역억제활성에 기인한 부작용에 대한 염려 없이 사용할 수 있다고 판단하였다.

[0252] **실시예 11: 9종 신규 화합물들의 신경세포 성장촉진 활성 조사 (*in vitro*)**

[0253] 9종 신규 화합물의 신경세포 성장 촉진능을 랫드 PC12 세포 (Pheochromocytoma cell)를 이용하여 Mo, S. J. 외 에 의해 보고된 방법 (J. Am. Chem. Soc. 133: 976-985, 2011)에 따라 조사하였다. 구체적으로, 상기 PC12 세포에 신경돌기 증식을 유도하는 신경 성장 인자 (NGF; KOMA Biotech; 10 ng/ml)를 96시간 동안 처리하였는데, 이 처리 시에 FK506 또는 9종 신규 화합물 중 하나를 함께 처리하였고 (처리 농도: 1 ng/ml, 10 ng/ml) 대조군은 아무 처리도 해 주지 않았다. 신경돌기의 길이는 인화된 사진을 이용하여 기존에 보고된 방법 (J. Pharmacol. Exp. Ther. 302: 1278-1285, 2002)에 따라 측정하였다.

[0254] 그 결과를 도 56에 제시하였다. 도 56에서 알 수 있듯이 본 발명의 신규 화합물 9종은 우수한 신경 축삭 생성 (neurite outgrowth) 효과를 나타내었다. 즉, 본 발명의 신규 화합물 9종은 우수한 신경세포 성장 촉진능을 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 처리 농도 1 ng/ml 경우에는 9-deoxo-FK520 및 9-deoxo-FK523의 경우 FK506에 비하여 우수한 신경 축삭 생성효과를 보였으며, 처리 농도 10 ng/ml 경우에는 9-deoxo-FK520, 9-deoxo-FK523 및 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523이 FK506에 비하여 우수한 신경 축삭 생성효과를 보임을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 9종 신규 화합물들은 신경계 질환의 예방 또는 치료 목적으로 사용할 수 있다고 결론지을 수 있었다.

[0256] **실시예 12: 9종 신규 화합물의 신경계 질환 치료 효과 확인**

[0257] 9종 신규 화합물의 신경계 질환 치료 효과 확인은 신경을 손상시킨 랫드에 9종 신규 화합물 각각을 투여한 다음 BBB 테스트 및 그리드 워크 테스트를 수행하여 조사하였다. 구체적으로는 체중 220 g 정도의 2개월령 암컷 랫드 (Sprague-Dawley)에 대하여 신경손상 수술 (Experimental Neurology, 176: 143, 2002)을 실시하였다. 신경손상 수술은 25 mg/ml의 케타민 (Ketamine)과 1.3 mg/ml의 럼폰 (Rompun) 혼합물 2 mg/kg을 투여하여 완전히 마취시킨 랫드에 L2 복부척추후궁절제술 (L2 Ventral Laminectomy)을 실시하는 방식으로 수행하였다. 자세하게는 랫드의 제2요추를 열고 마이크로겸자 (Microrongeur)를 이용하여 정형추궁관 (Arcus Vertebra)의 좌외측 부위에 작은 구멍 (1 mm²)을 낸 다음 이 구멍에 블레이드 홀더 (Blade Holder)의 칼날을 삽입하고 경질막 (Dura Mater)을 지나 정형추궁관의 우외측 부위까지 칼집을 내어 척수의 복부 부위에 외상을 입혔다. 이후, 척수신경손상 부위의 등쪽근육조직 (Dorsal Musculature)을 봉합하고 피부를 수술용 클립으로 결찰시킴으로써 신경손상 수술을 실시하였다. 신경손상 수술을 마친 후 랫드를 따뜻한 톱밥위에 두어 체온을 유지시키고 자율 방광 조절 (Autonomic Bladder Control)이 완전히 회복될 때까지 약 7일간 매일 3 내지 4회씩 복부 아래쪽을 마사지하여 방광의 내용물을 배출시켰다. 수술 시와 수술 이후의 감염예방을 위해 체중 100 g당 5 mg의 항생물질 세팔렉신 (Cefalexin)을 매일 근육 내 주사하였다.

[0258] 신경계 질환 치료 효과 확인을 위한 BBB 테스트와 그리드 워크 테스트는 신경손상 수술 14일 전부터 실시하였고, 수술 3일전에 행동 및 운동기능에 대한 기본 평가를 실시하여 9종 신규 화합물의 투여 후 결과와 비교 분석하였다. BBB 테스트는 랫드를 표면이 거친 투명 플렉시글래스 박스에 넣고 4-5분간 관찰하여 관절운동, 체중 지탱, 앞다리-뒷다리 공조, 꼬리 위치 등과 같은 기준에 따라 점수를 매겨 0점은 뒷다리의 운동능이 없는 것으로 규정하고 최대 21점은 정상적인 보행능을 갖는 것으로 규정하였다. 그리드 워크 테스트는 랫드가 1 m 길이의 금속 평행봉을 걷게 하여 규칙적인 발걸음 능력을 평가하고, 비스듬한 봉을 내려갈 때의 뒷다리에 의한 조절능을 발걸음의 실수 횟수로 계수하여 10회의 실수는 랫드가 규칙적으로 걷지 못할 뿐만 아니라 다리를 자발적으로 조절할 수 없음을 나타내고, 0 내지 1회의 실수는 손상이 없고 정상적인 랫드의 운동능을 나타내는 것으로 규정하였다.

[0259] 신경손상 수술 이후 3일째에 BBB 테스트와 그리드 워크 테스트에서 유사한 점수를 보인 랫드 100마리를 임의 선정하여 이를 총 10개 그룹으로 나누고 서로 다른 처치를 38일간 실시하였다 (G1: 부형제 매일 경구 투여, G2: 5 mg/kg 용량으로 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506 매일 경구 투여, G3: 5 mg/kg 용량으로 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506 매일 경구 투여, G4: 5 mg/kg 용량으로 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506 매일 경구 투여, G5: 5 mg/kg 용량으로 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506 매일 경구 투여, G6: 5 mg/kg 용량으로 9-deoxo-FK520 매일 경구 투여, G7: 5 mg/kg 용량으로 31-*O*-demethyl-FK520 매일 경구 투여, G8: 5 mg/kg 용량으로 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520 매일 경구 투여, G9: 5 mg/kg 용량으로 9-deoxo-FK523 매일 경구 투여, G10: 5 mg/kg 용량으로 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523 매일 경구 투여).

[0260] 신경손상 수술 후 3일째부터 1주일 간격으로 BBB 테스트 및 그리드 워크 테스트를 수행한 결과가 도 57 및 도

58에 제시되어 있다. 상기 결과는 부형제 투여군에 비하여 9종의 신규화합물 투여군의 점수가 뛰어났으며, 이 결과로부터 9종 신규 화합물 중 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 신경계 질환 치료에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0262]

이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0264]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원(KCTC)

수탁번호 : KCTC13581BP

수탁일자 : 20180717

기탁기관명 : 한국생명공학연구원(KCTC)

수탁번호 : KCTC13580BP

수탁일자 : 20180717

기탁기관명 : 한국생명공학연구원(KCTC)

수탁번호 : KCTC13584BP

수탁일자 : 20180717

기탁기관명 : 한국생명공학연구원(KCTC)

수탁번호 : KCTC13585BP

수탁일자 : 20180717

기탁기관명 : 한국생명공학연구원(KCTC)

수탁번호 : KCTC13579BP

수탁일자 : 20180717

기탁기관명 : 한국생명공학연구원(KCTC)

수탁번호 : KCTC13583BP

수탁일자 : 20180717

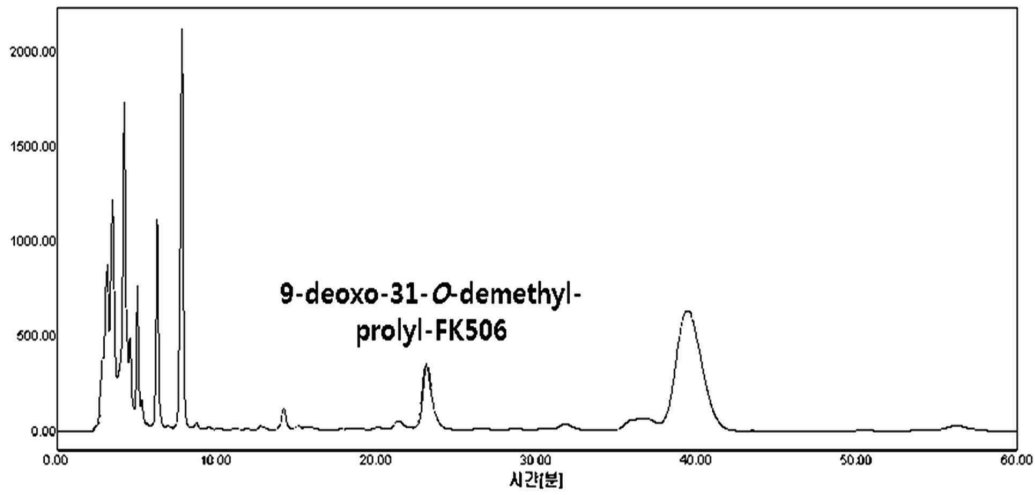
기탁기관명 : 한국생명공학연구원(KCTC)

수탁번호 : KCTC13582BP

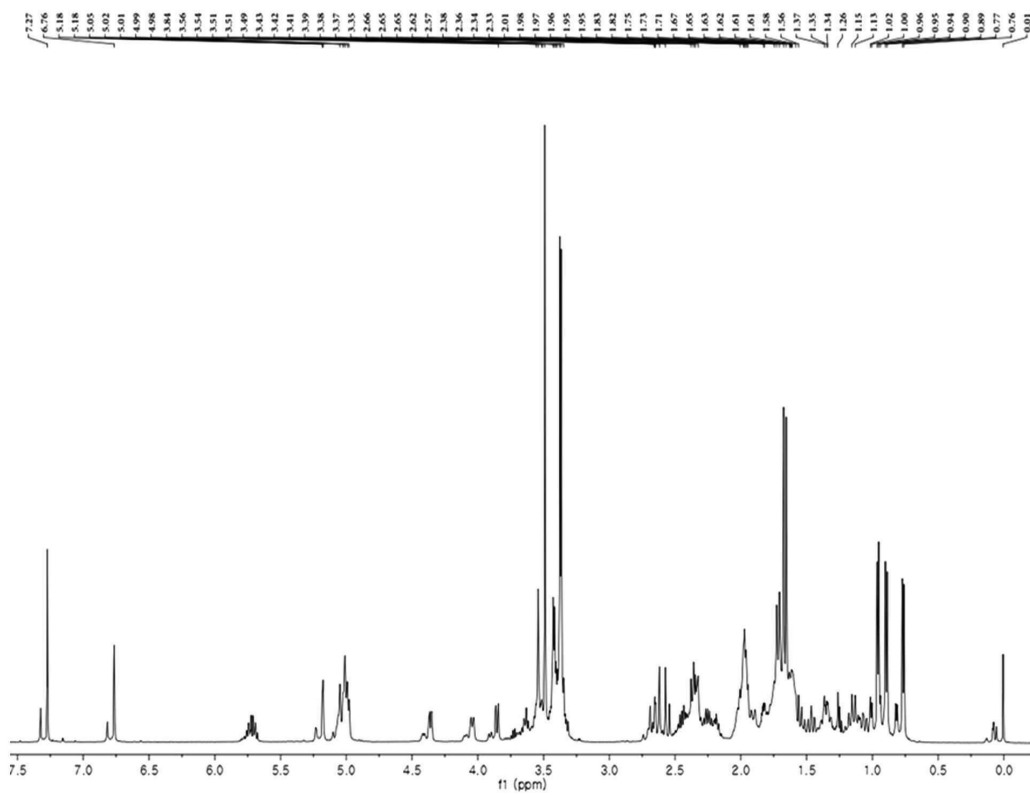
수탁일자 : 20180717

도면

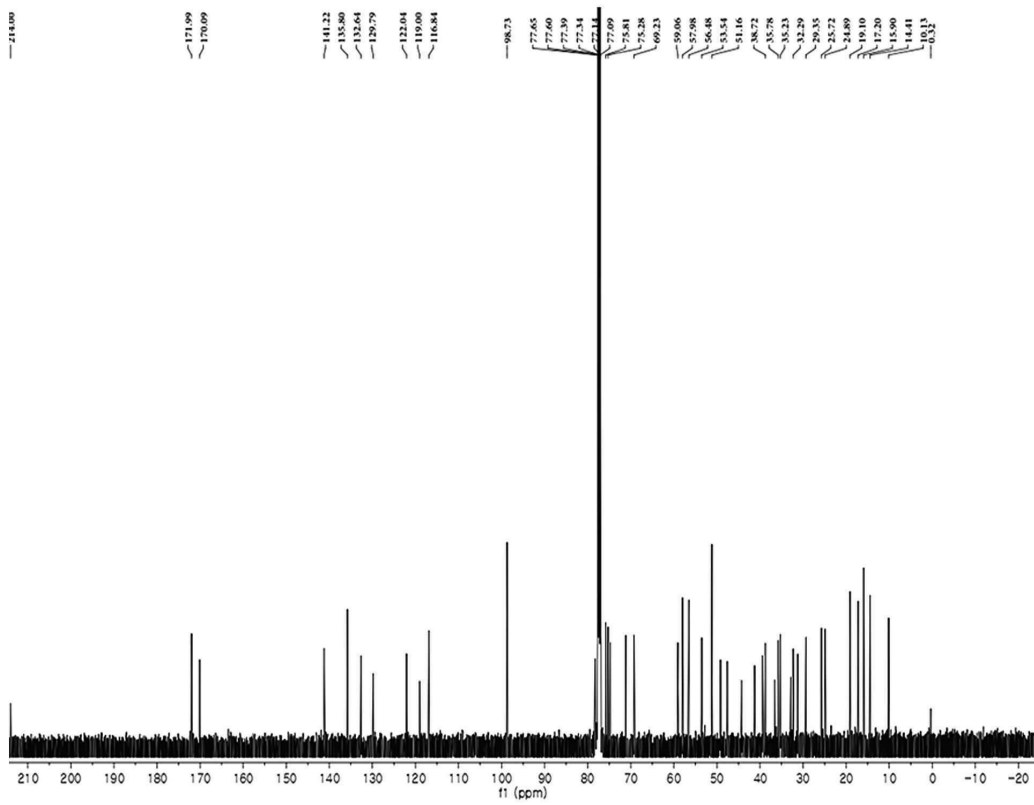
도면1



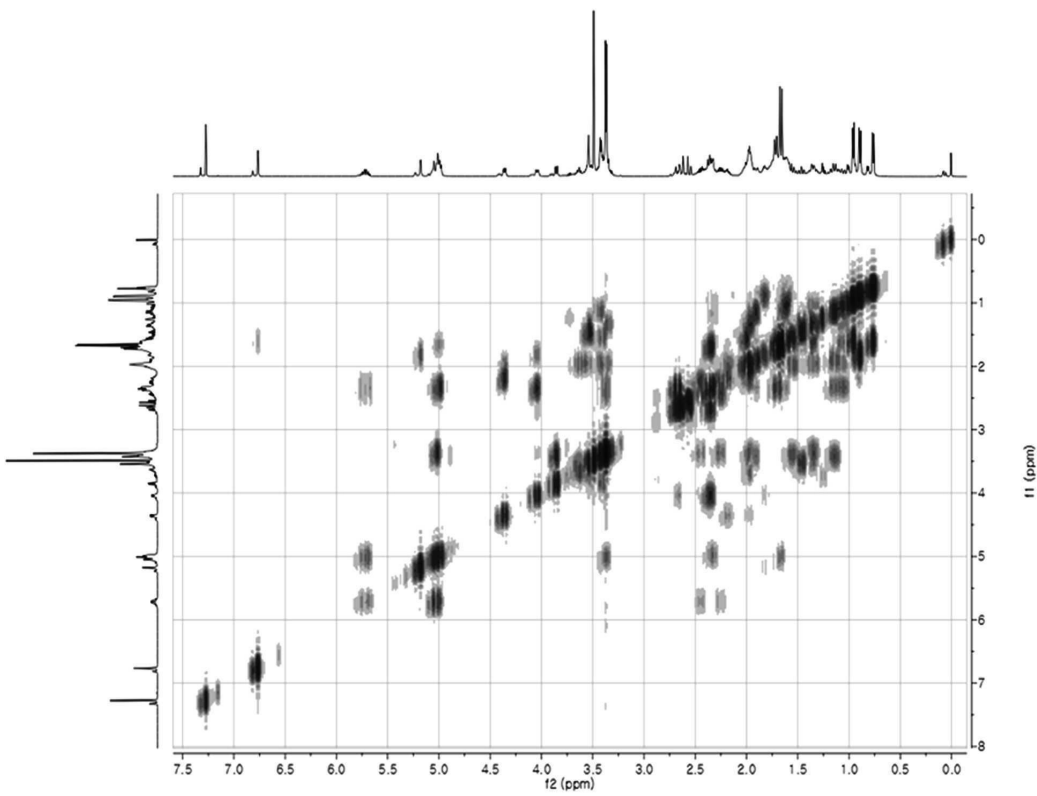
도면2



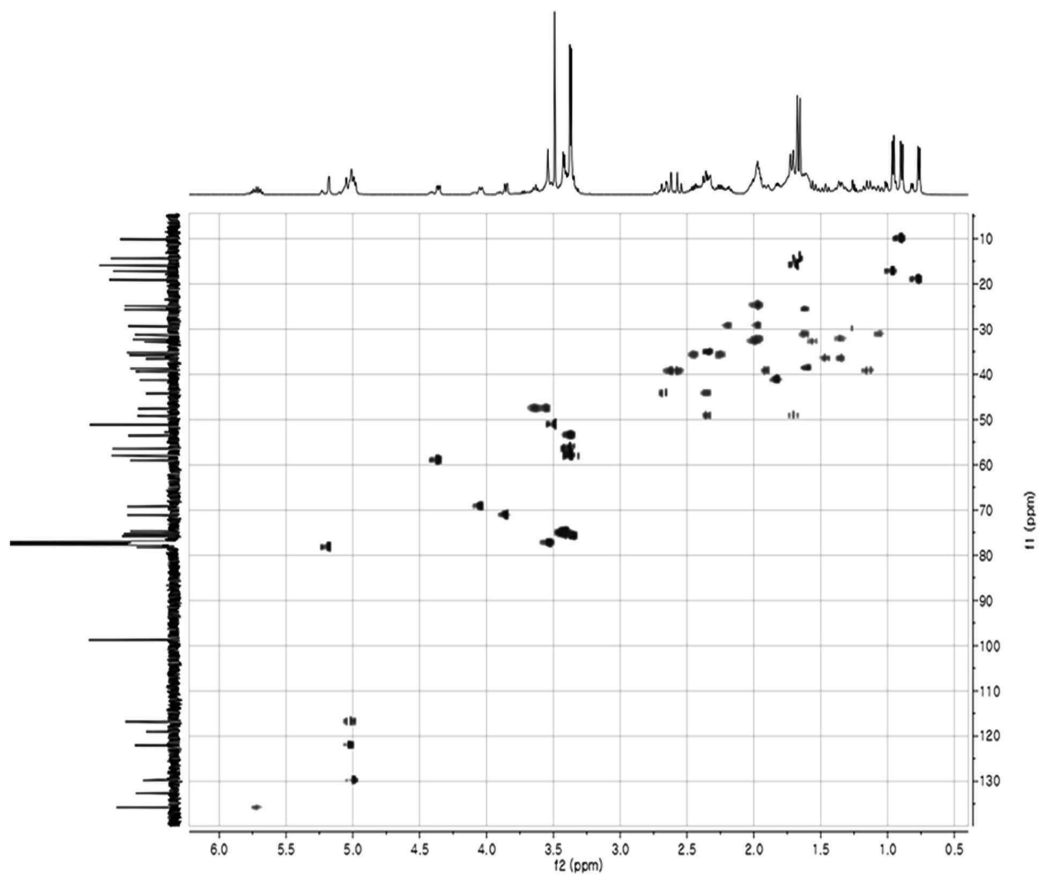
도면3



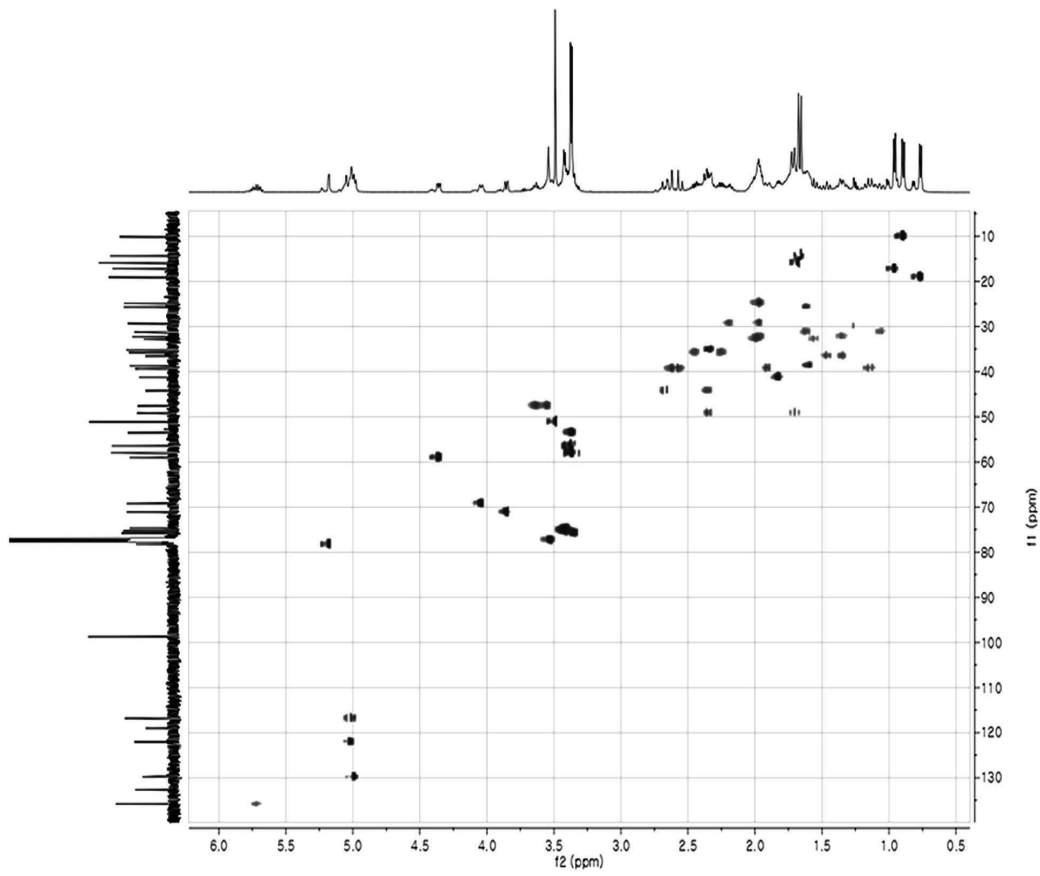
도면4



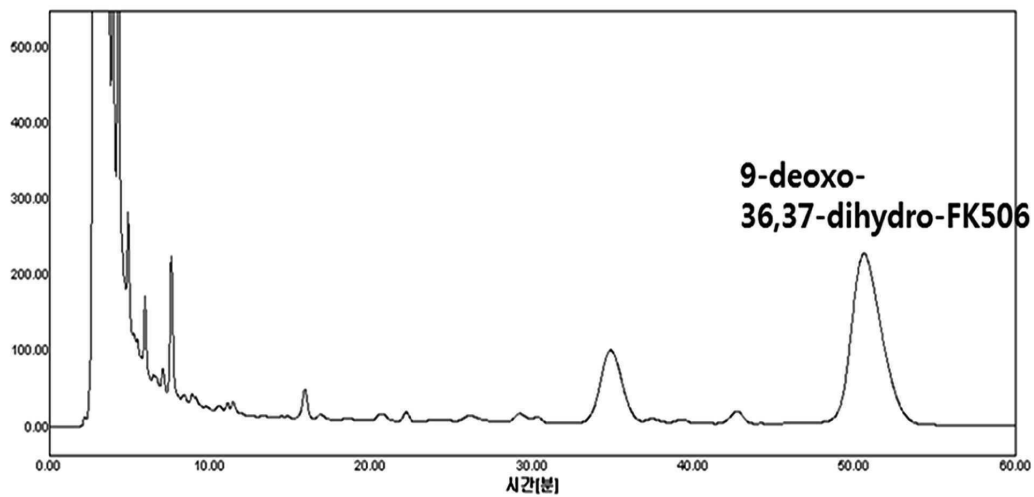
도면5



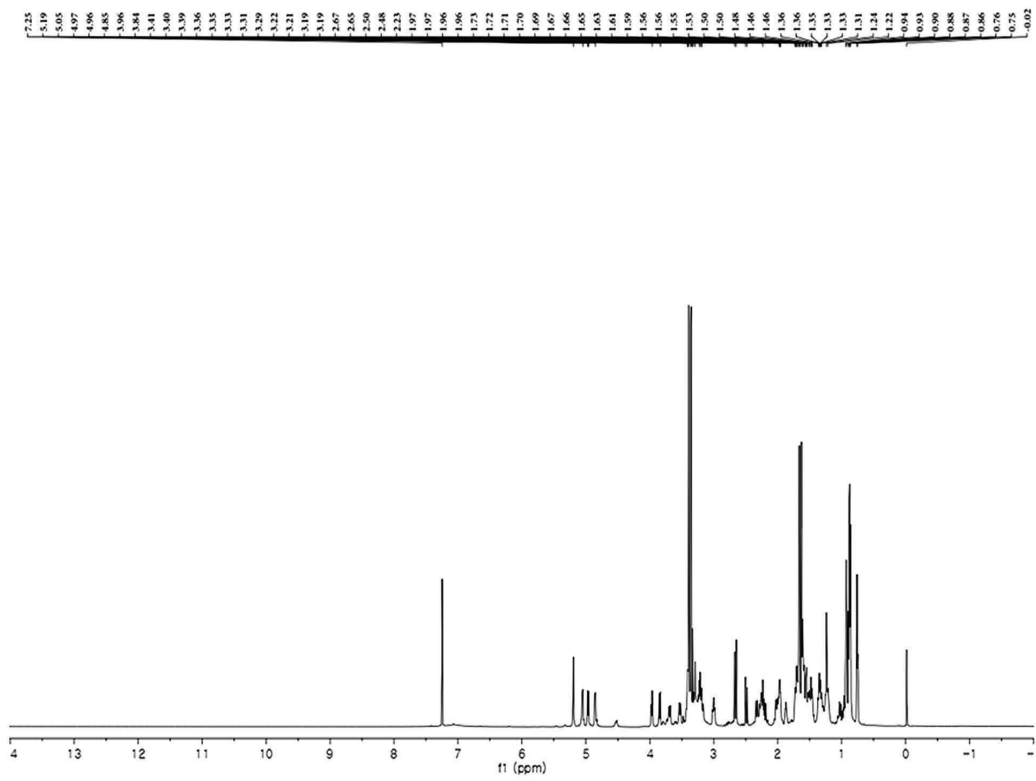
도면6



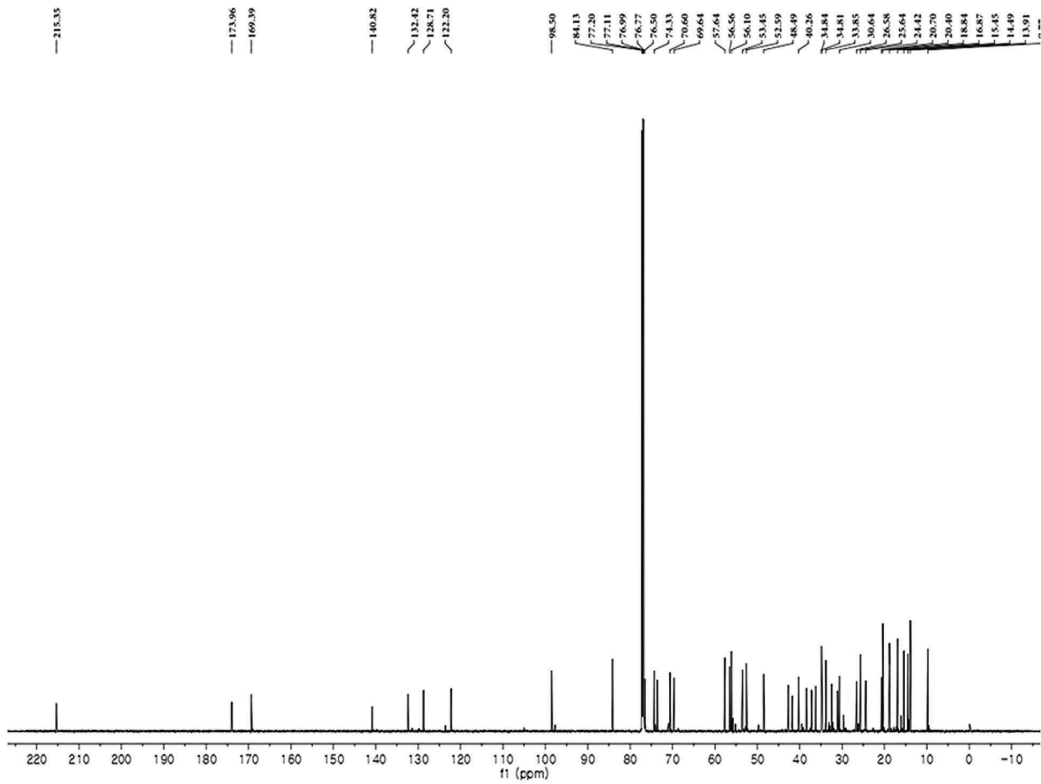
도면7



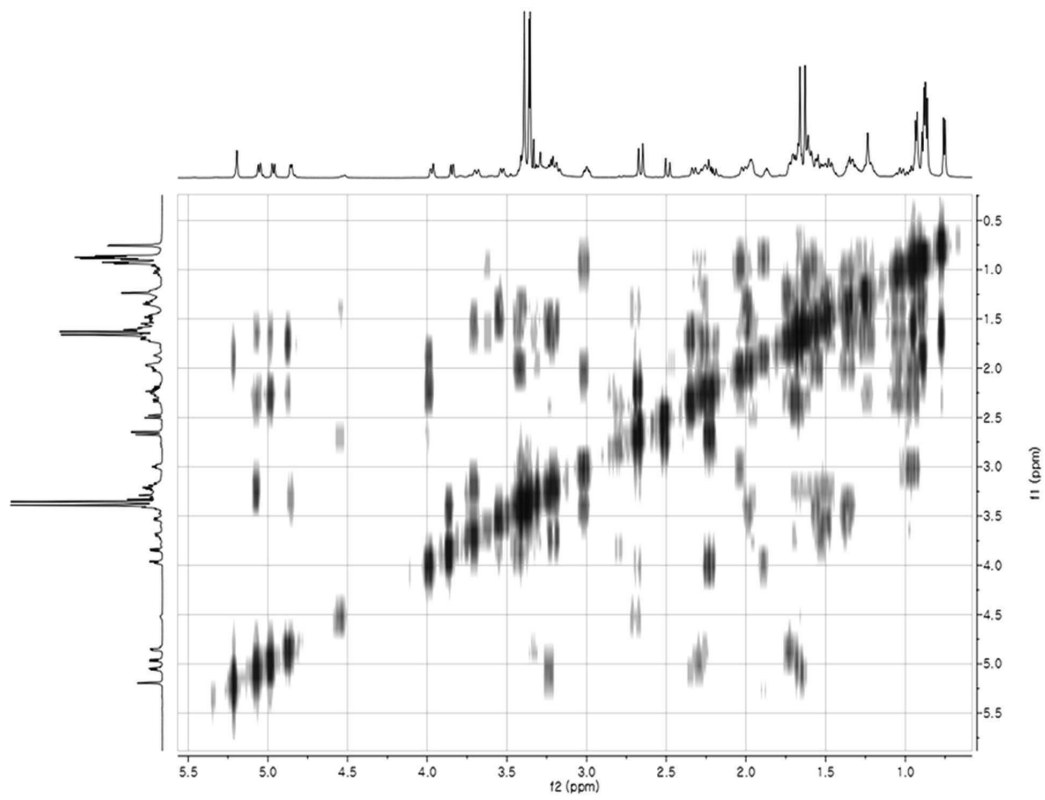
도면8



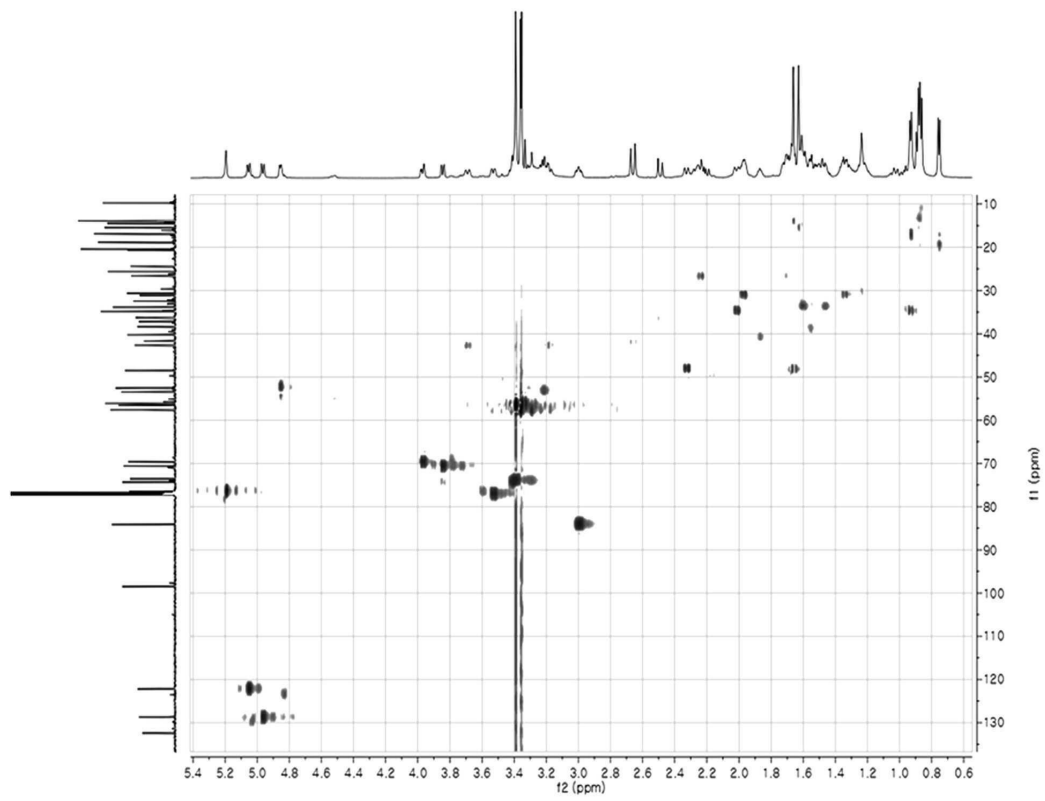
도면9



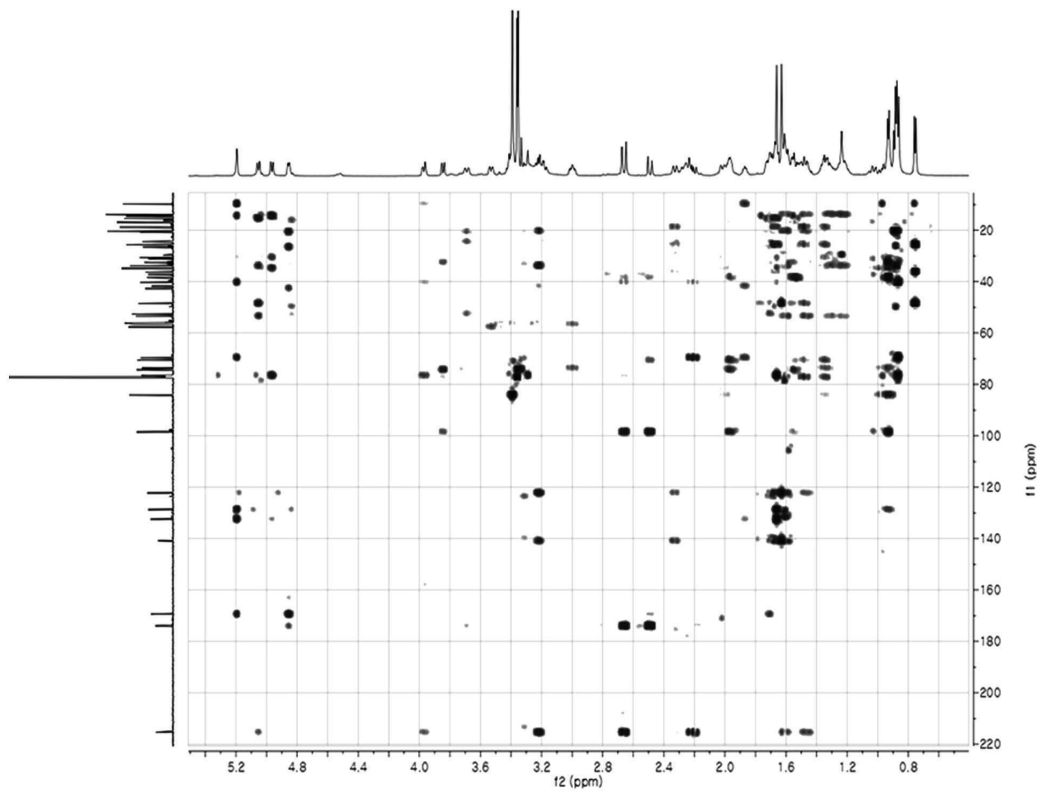
도면10



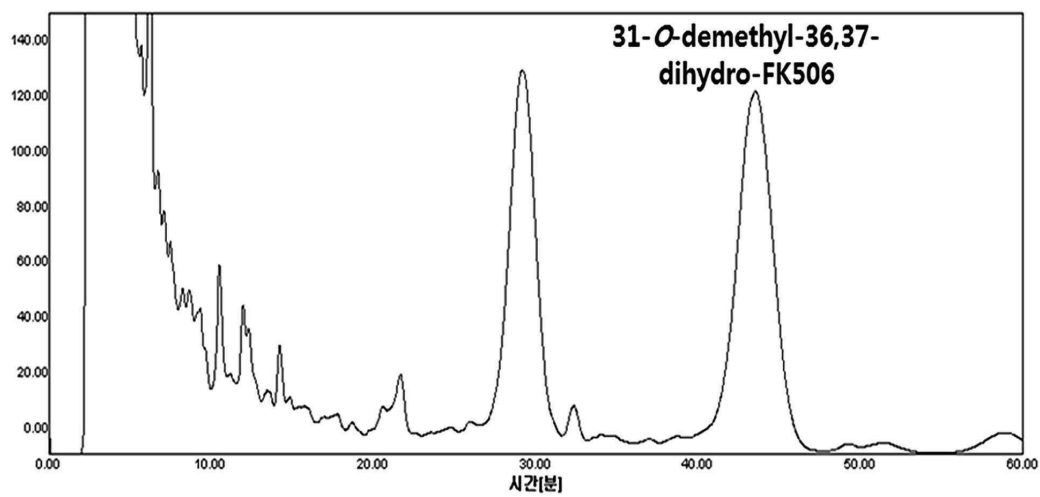
도면11



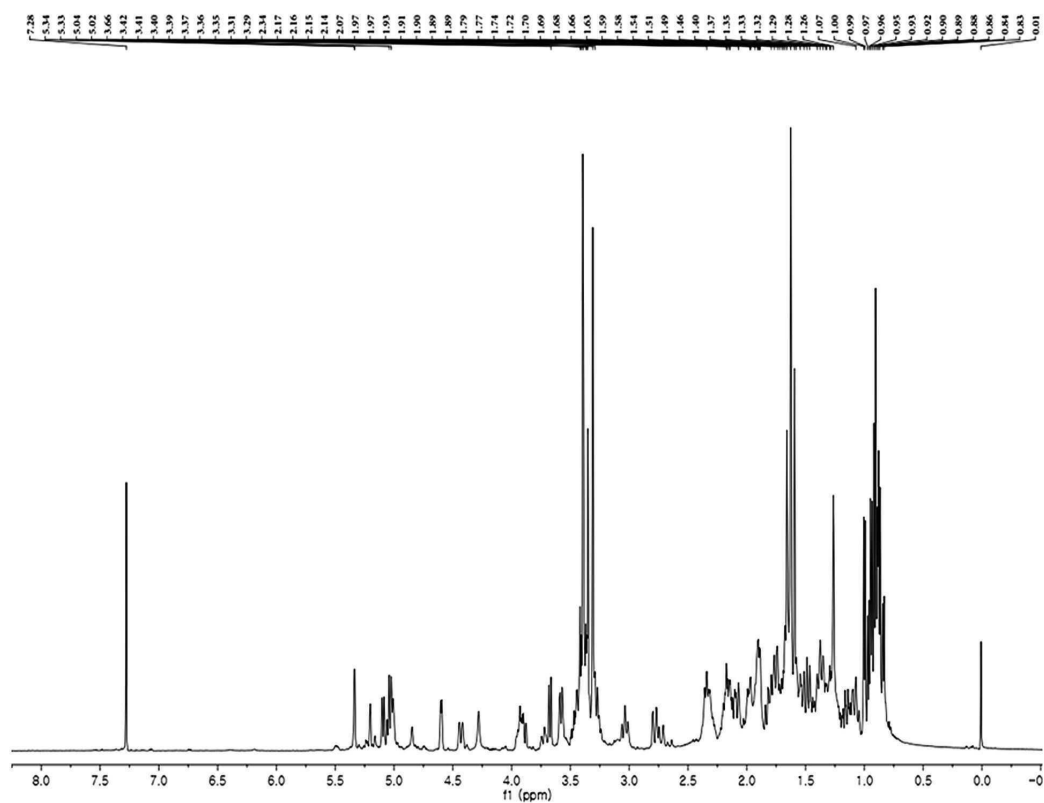
도면12



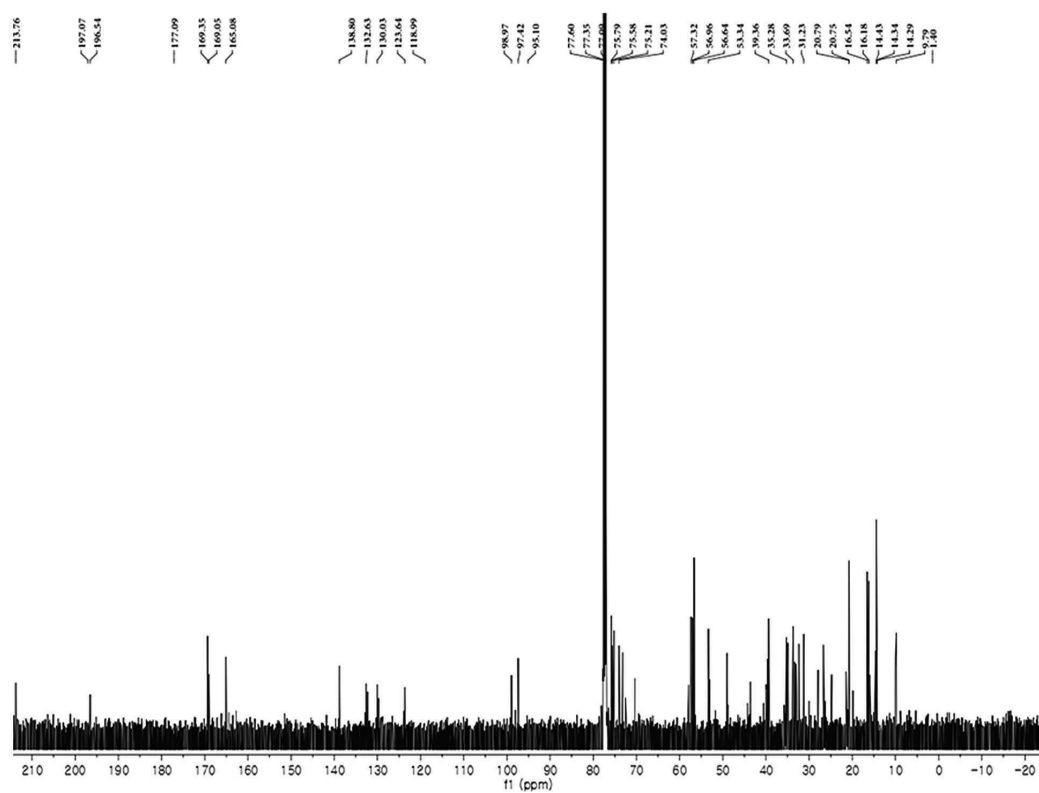
도면13



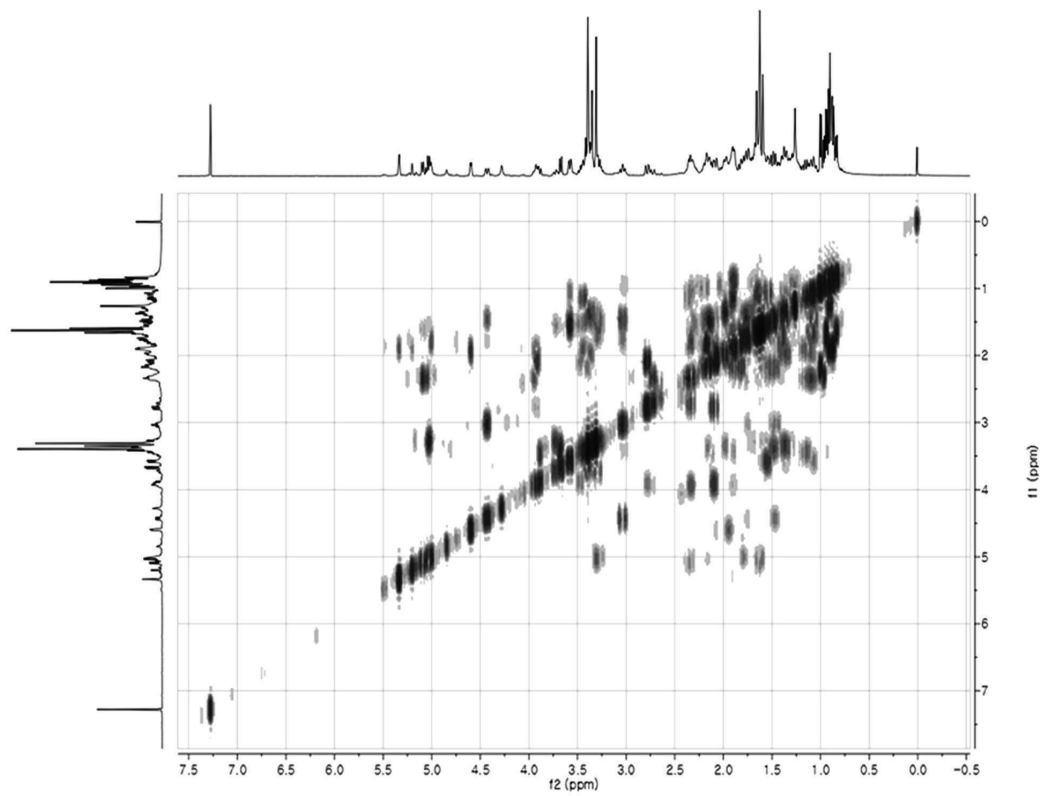
도면14



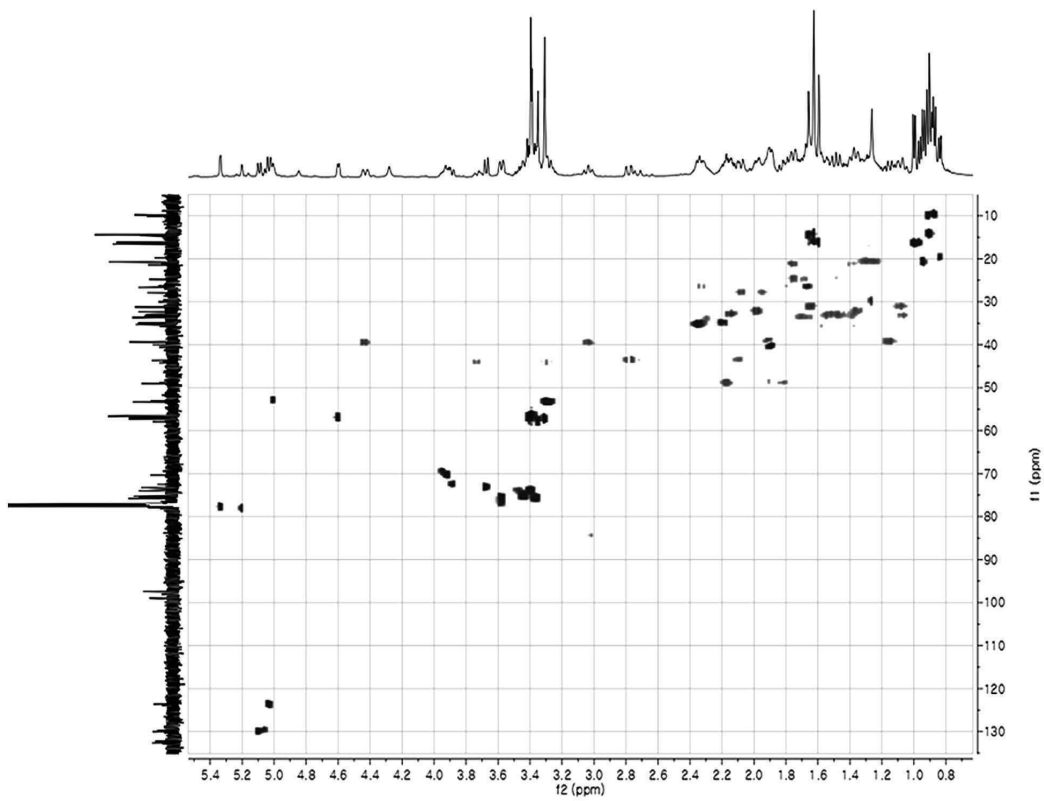
도면 15



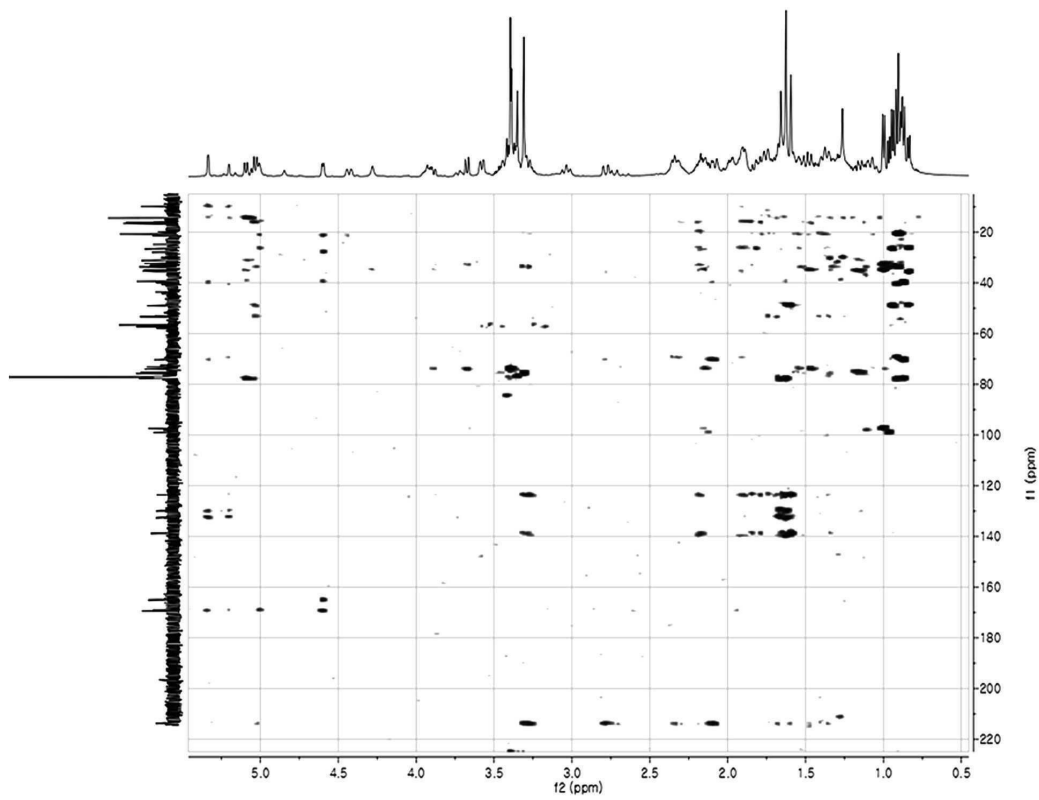
도면16



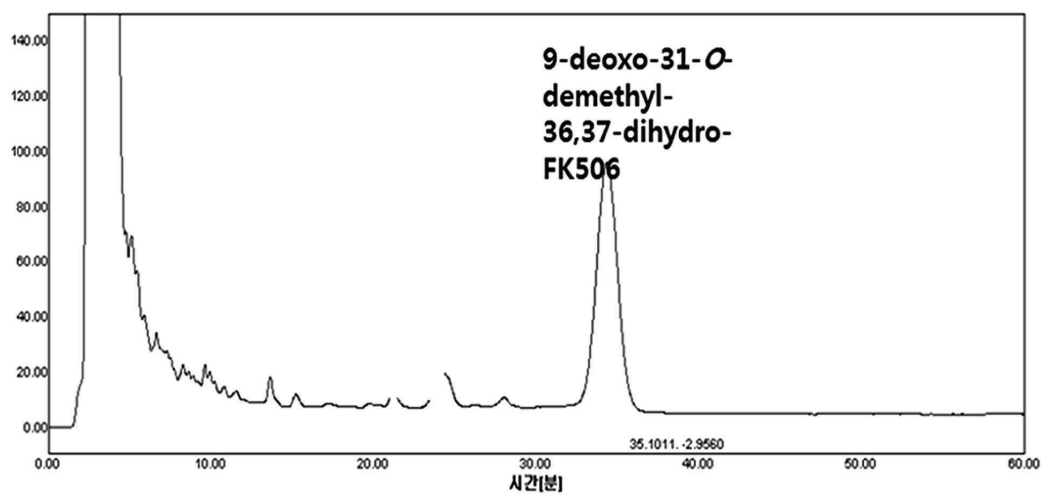
도면17



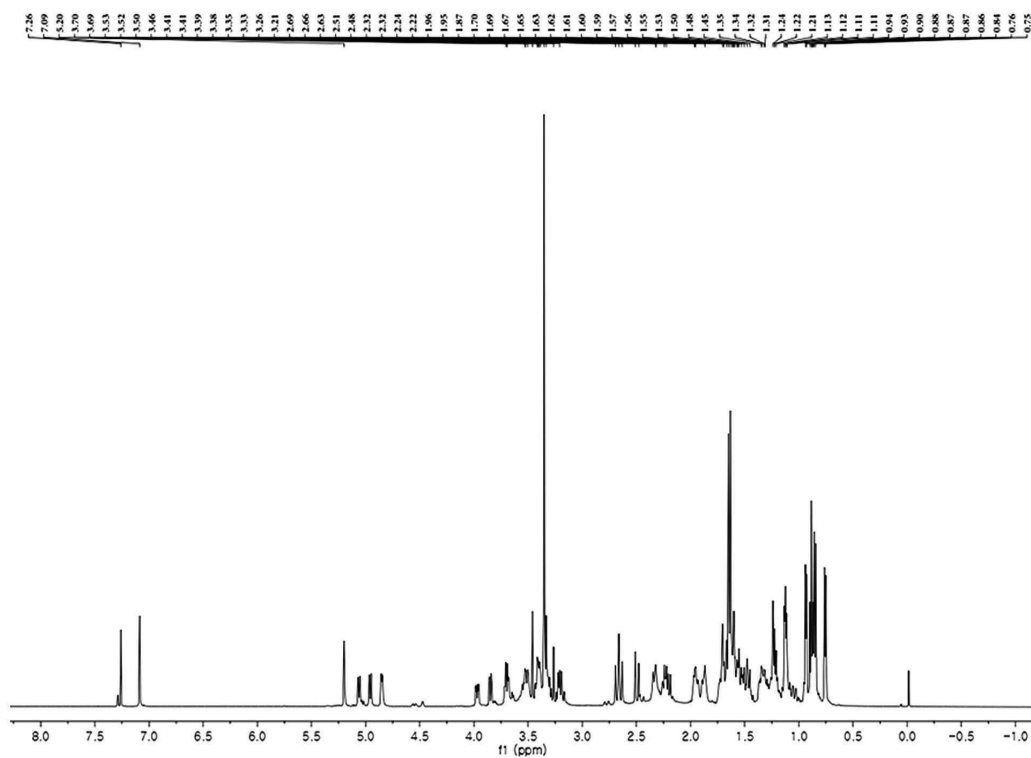
도면18



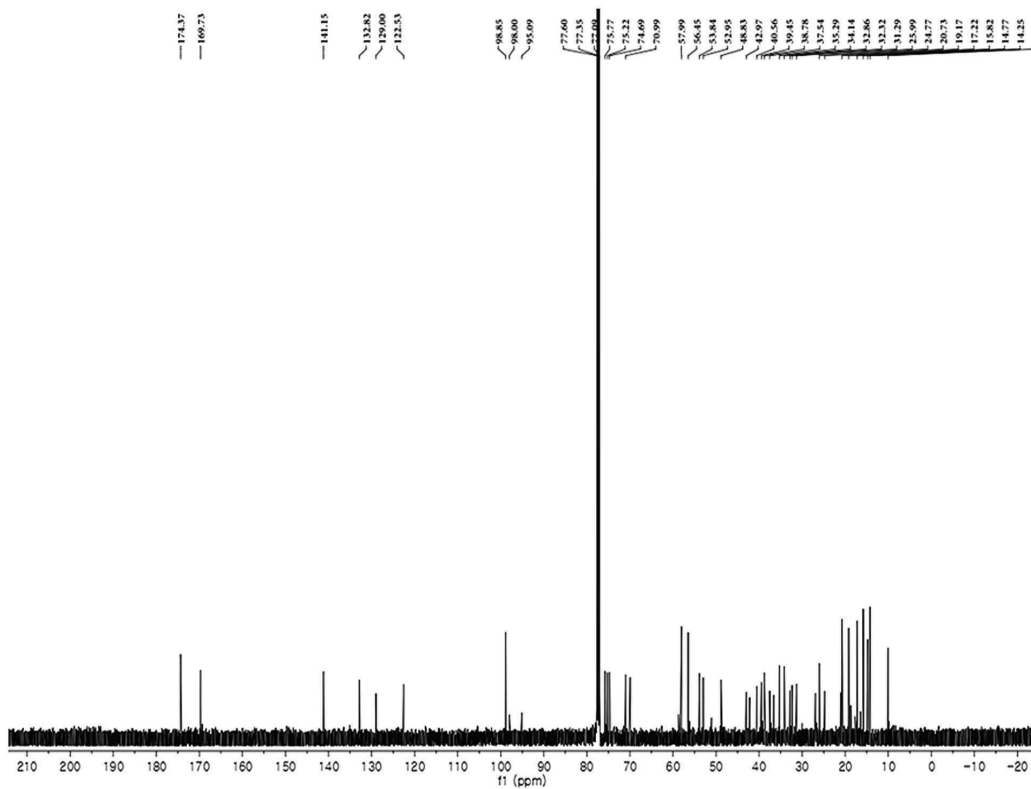
도면19



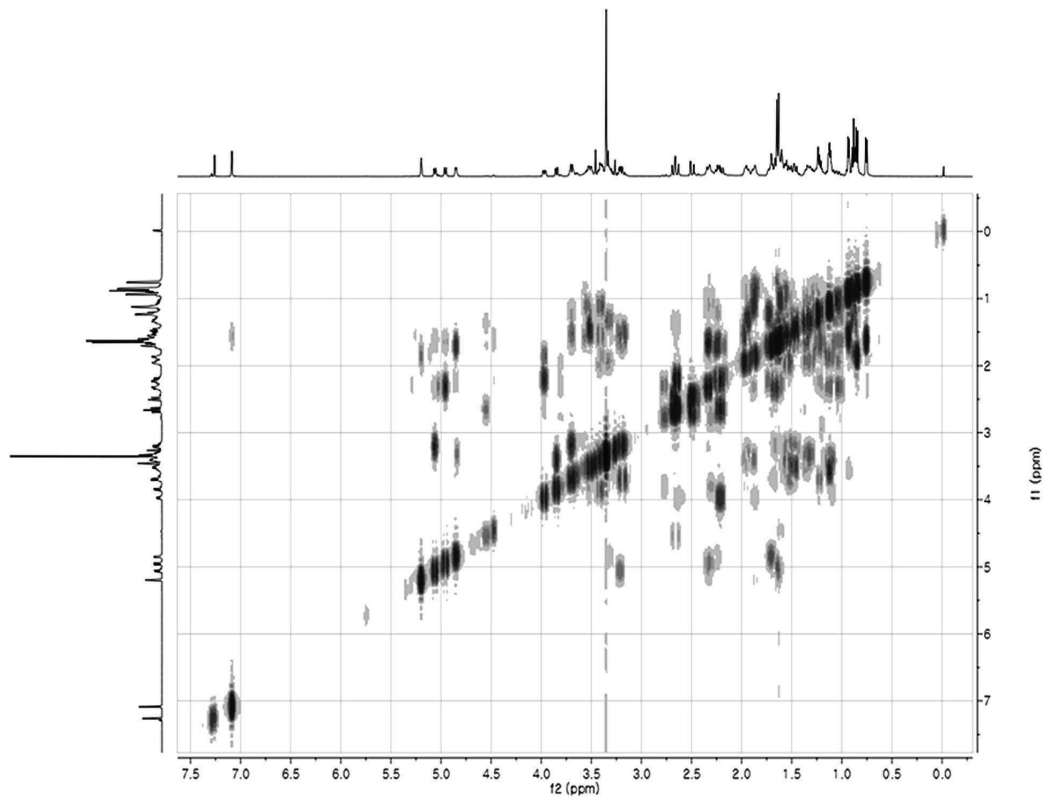
도면20



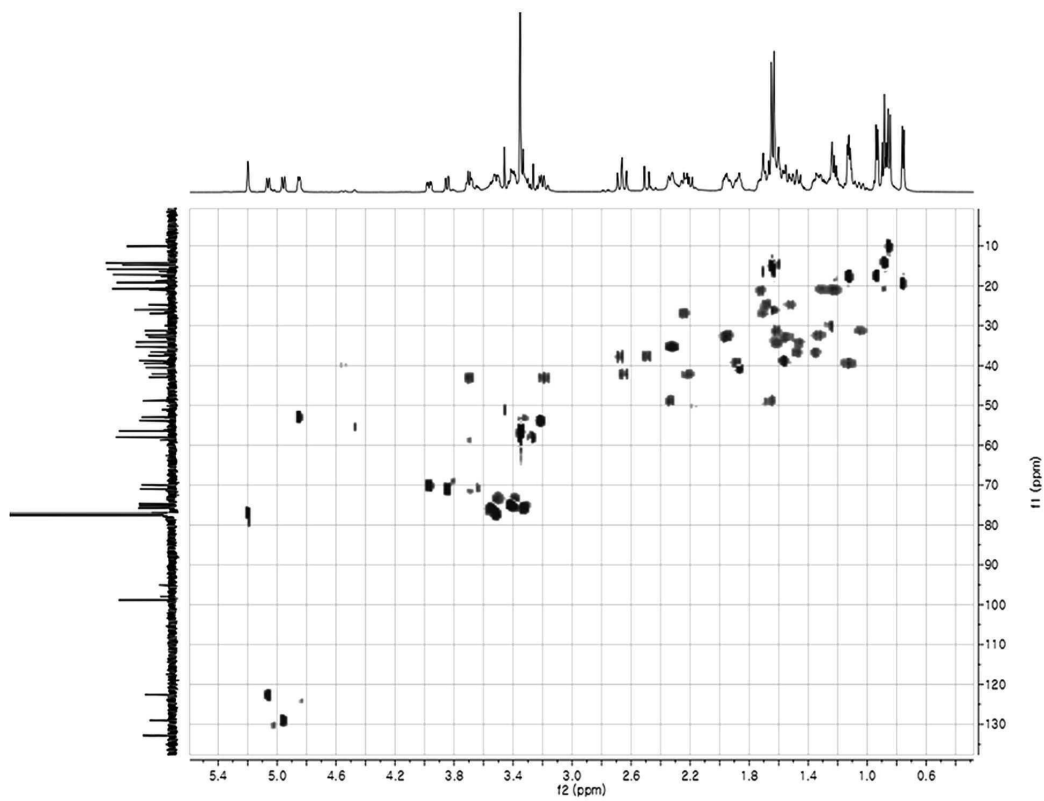
도면21



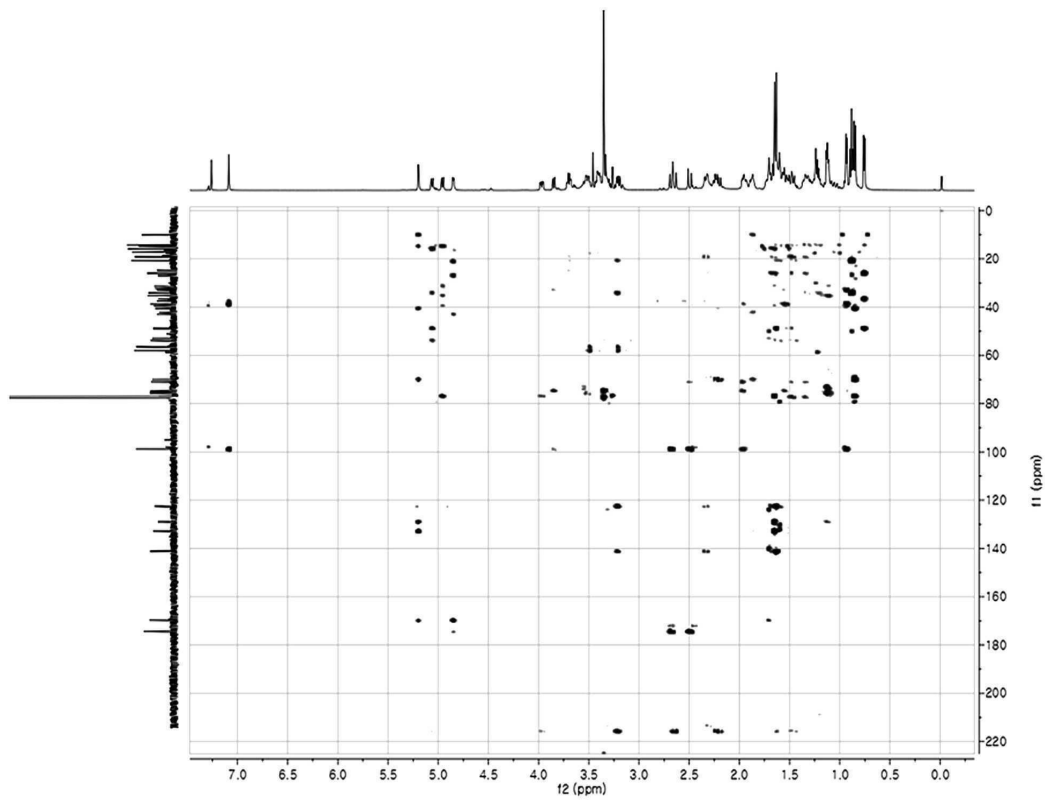
도면22



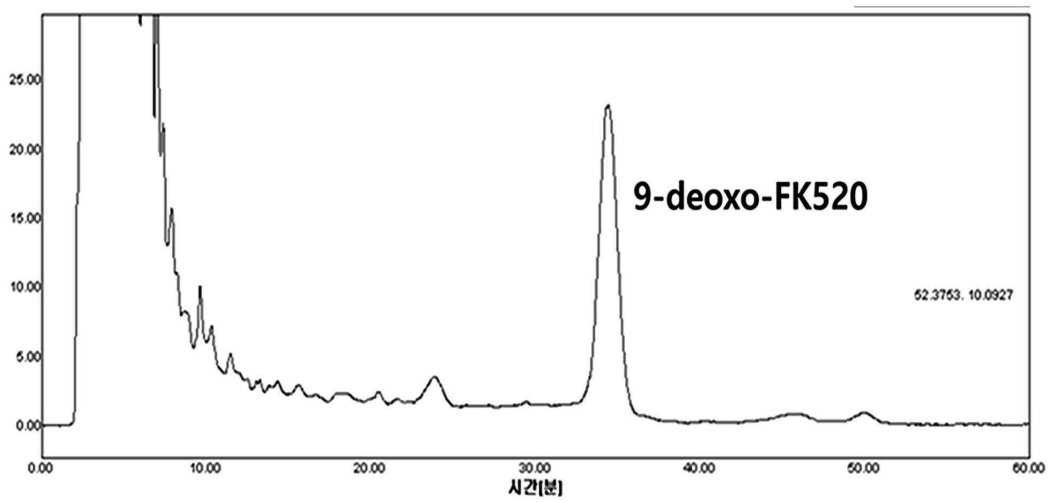
도면23



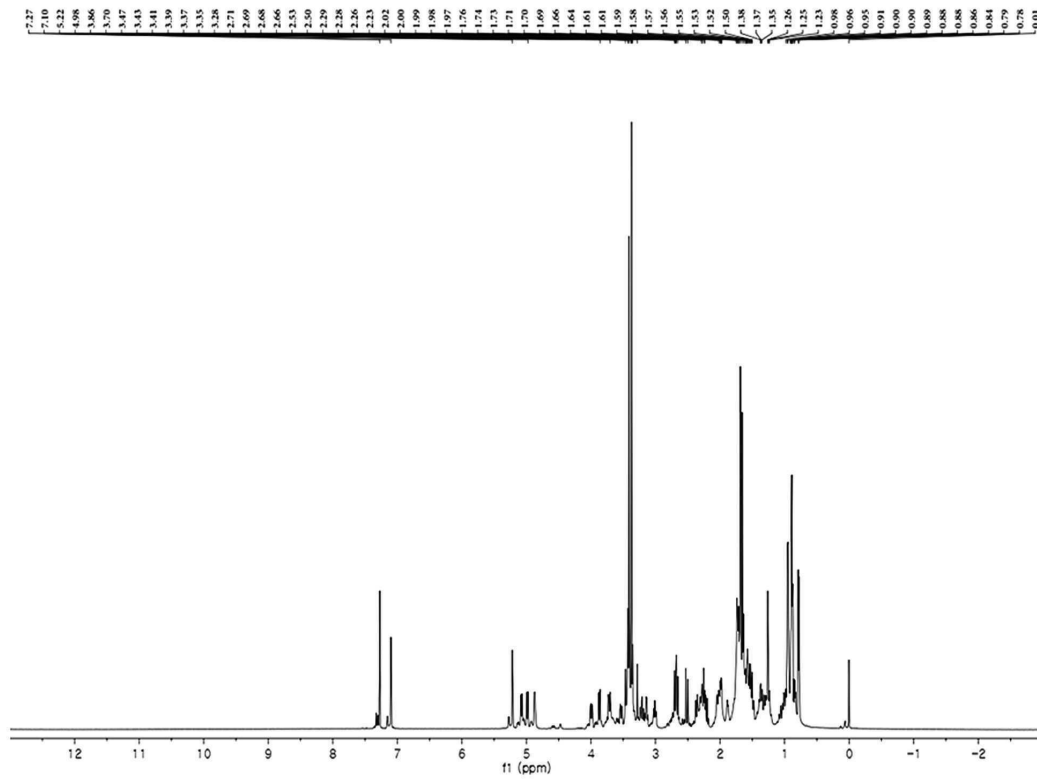
도면24



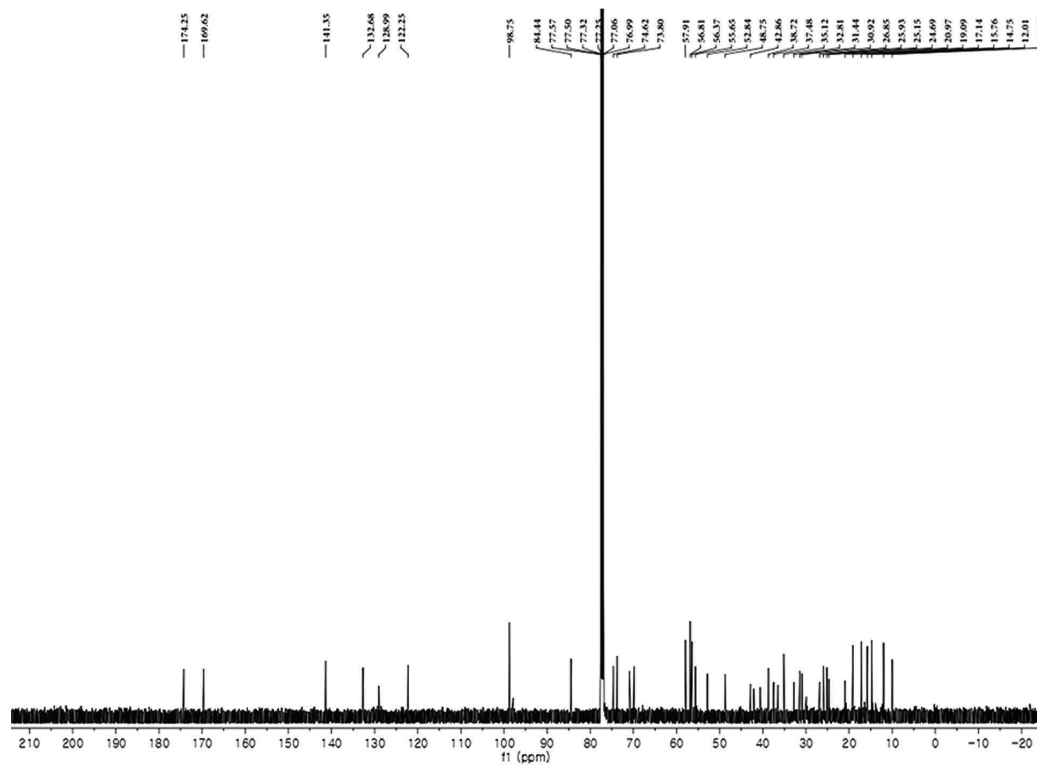
도면25



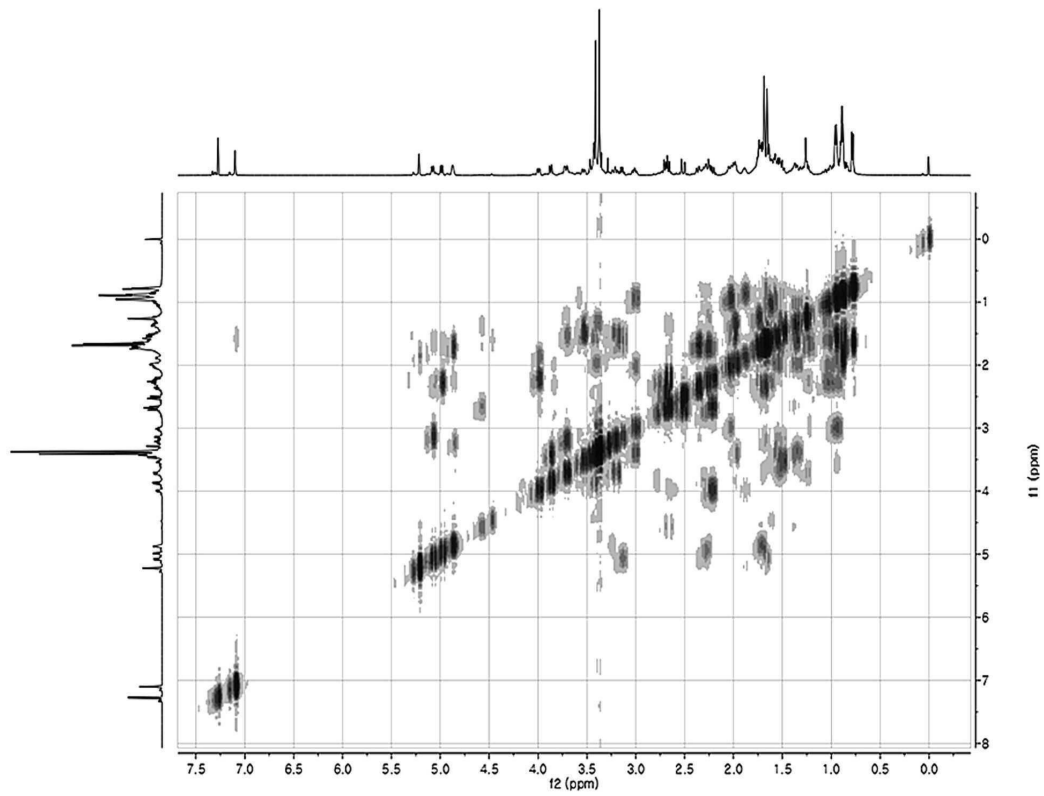
도면26



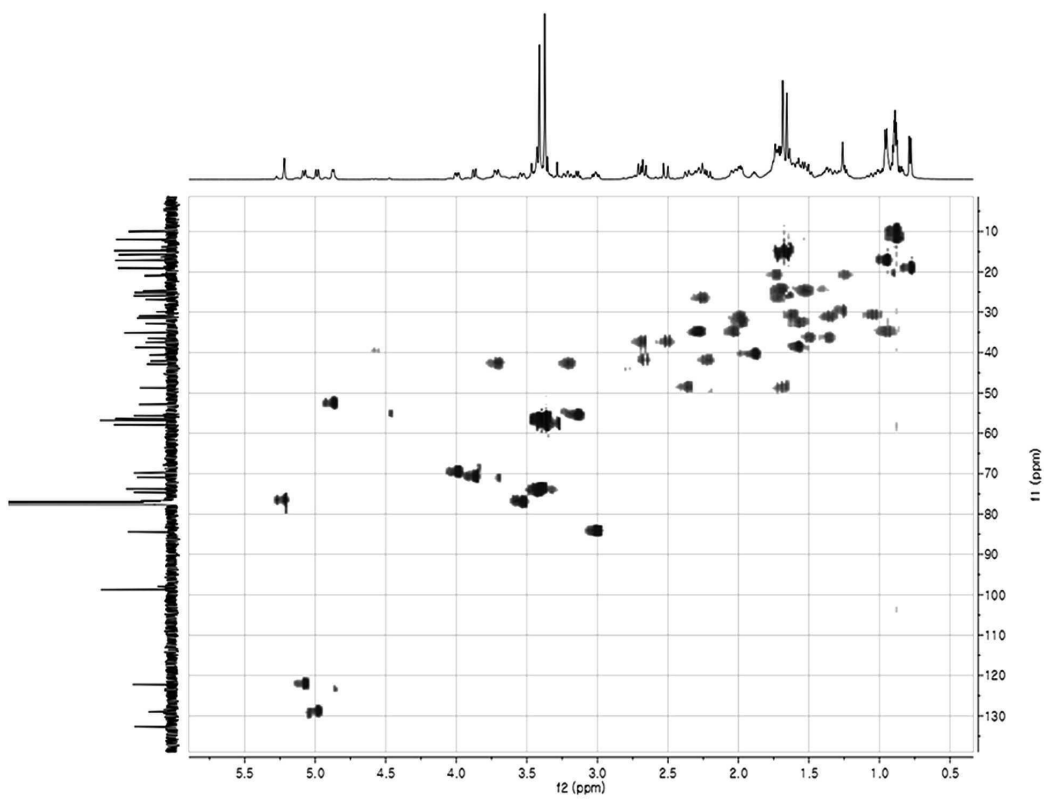
도면27



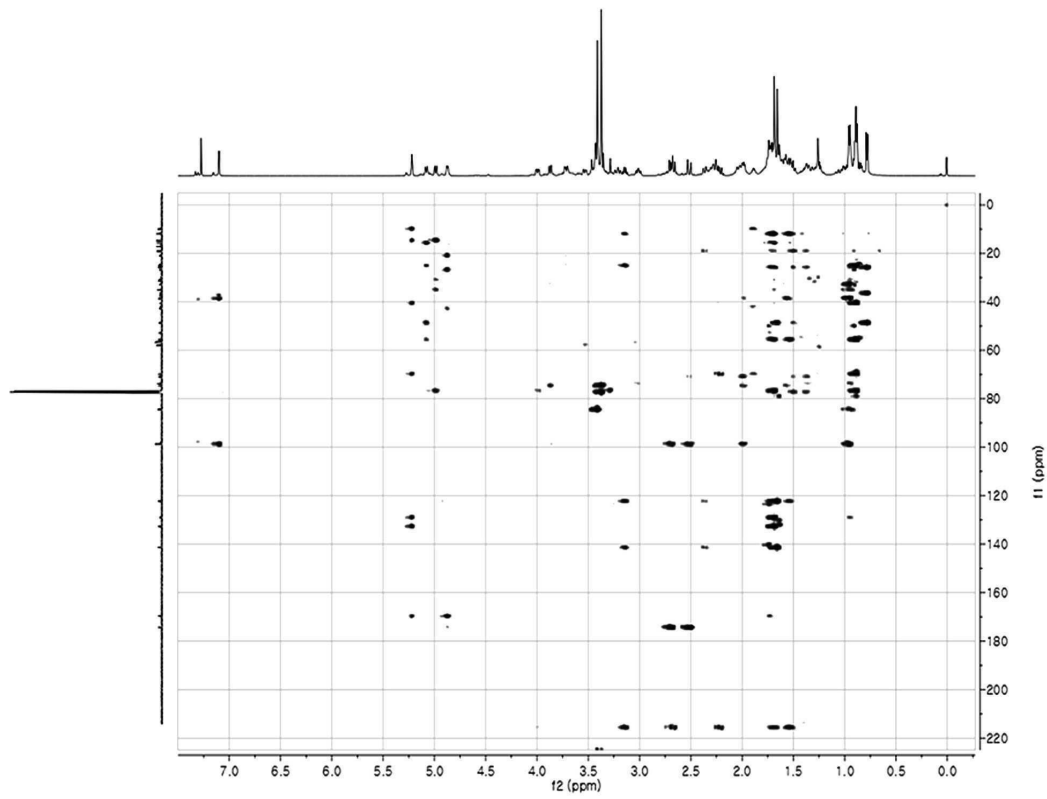
도면28



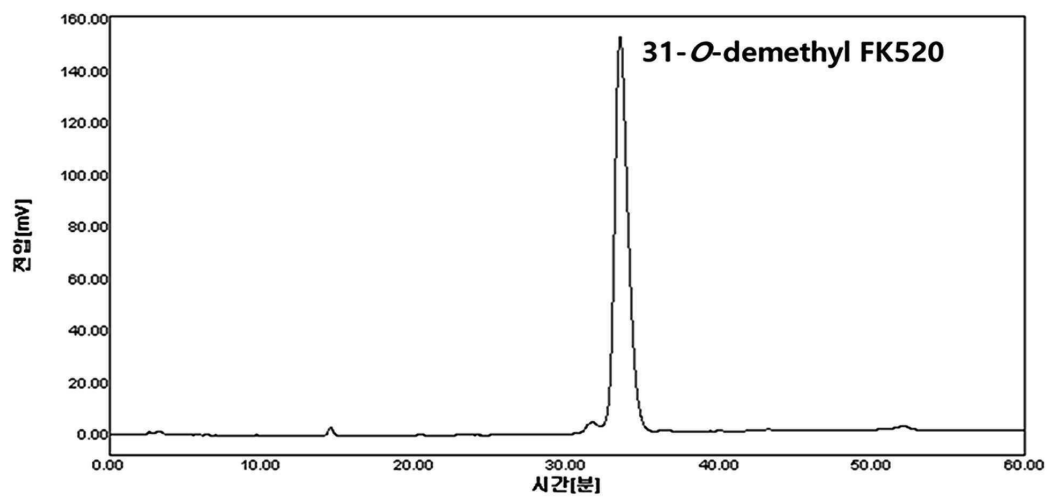
도면29



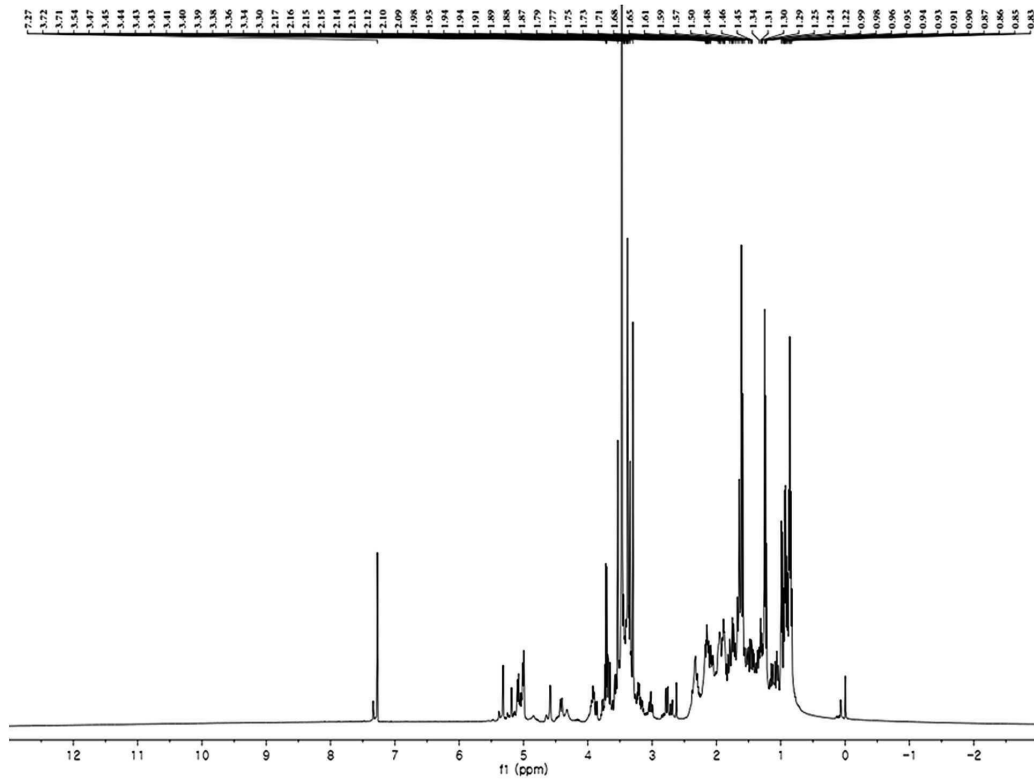
도면30



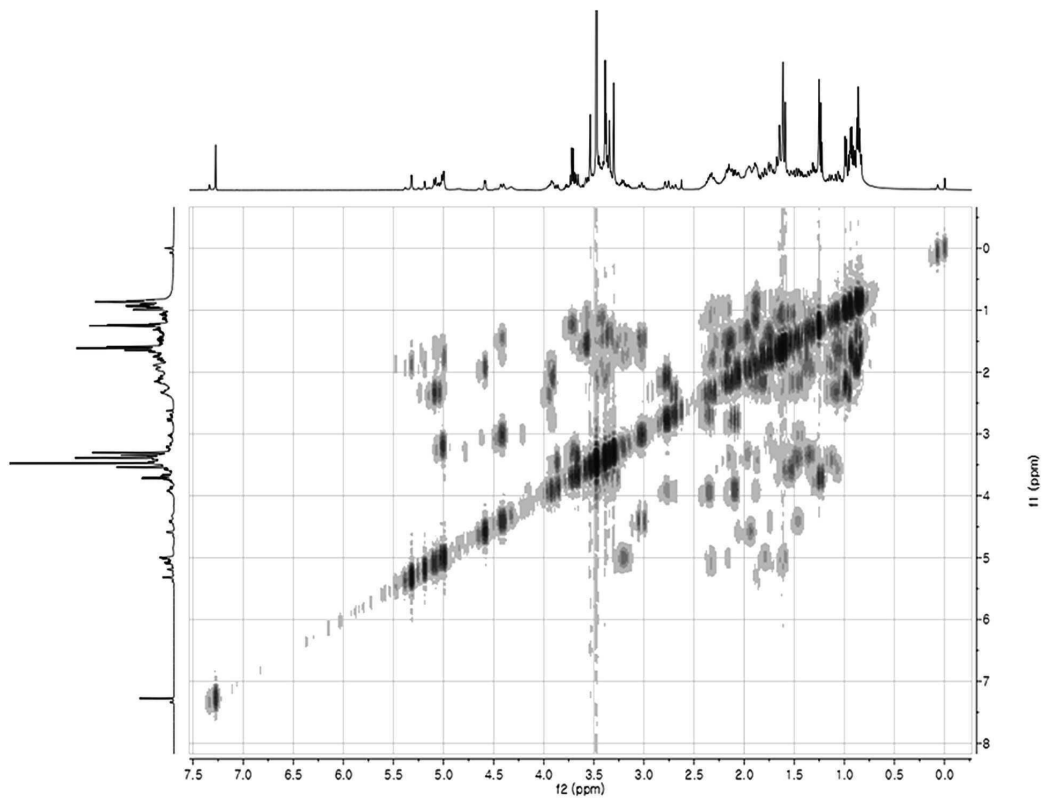
도면31



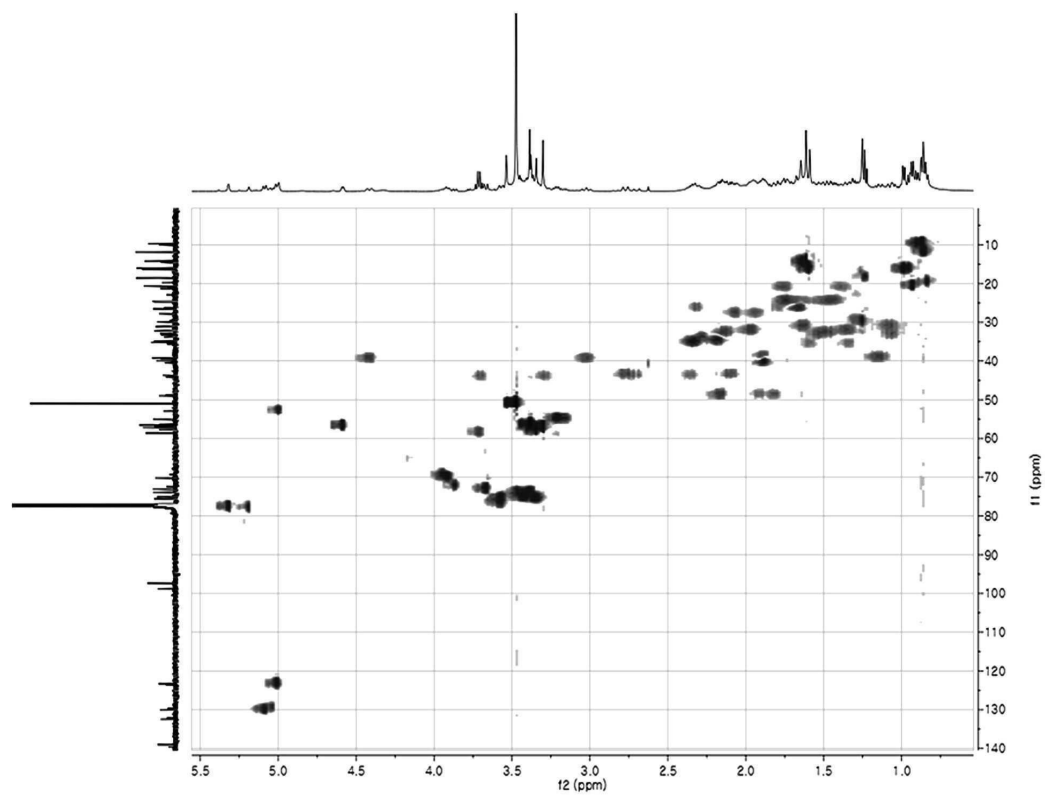
도면32



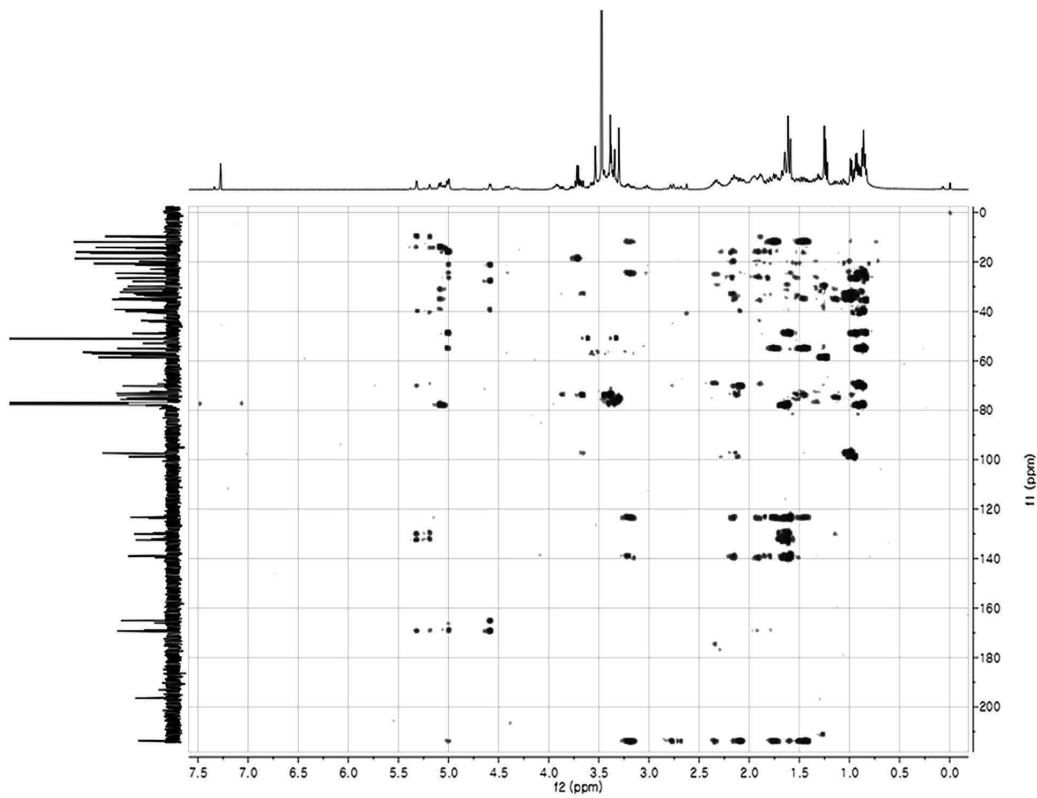
도면34



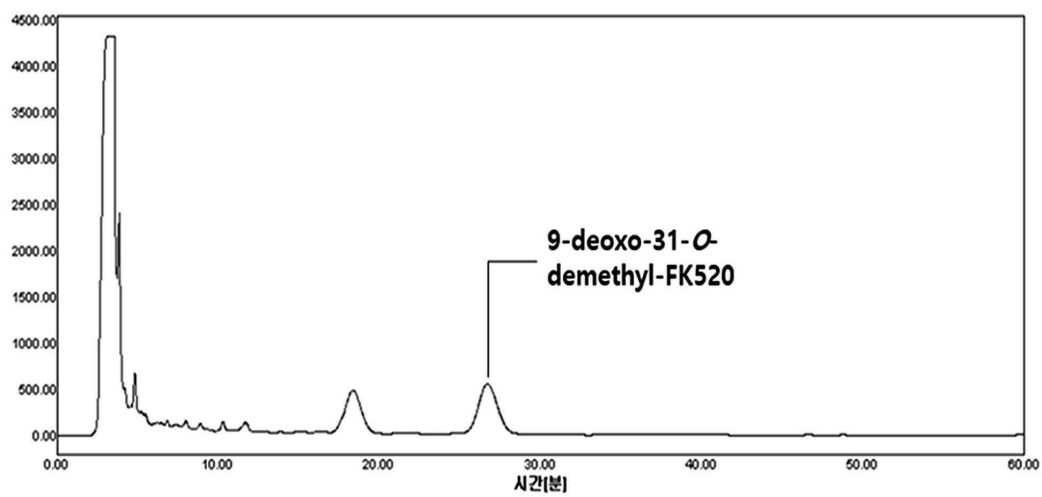
도면35



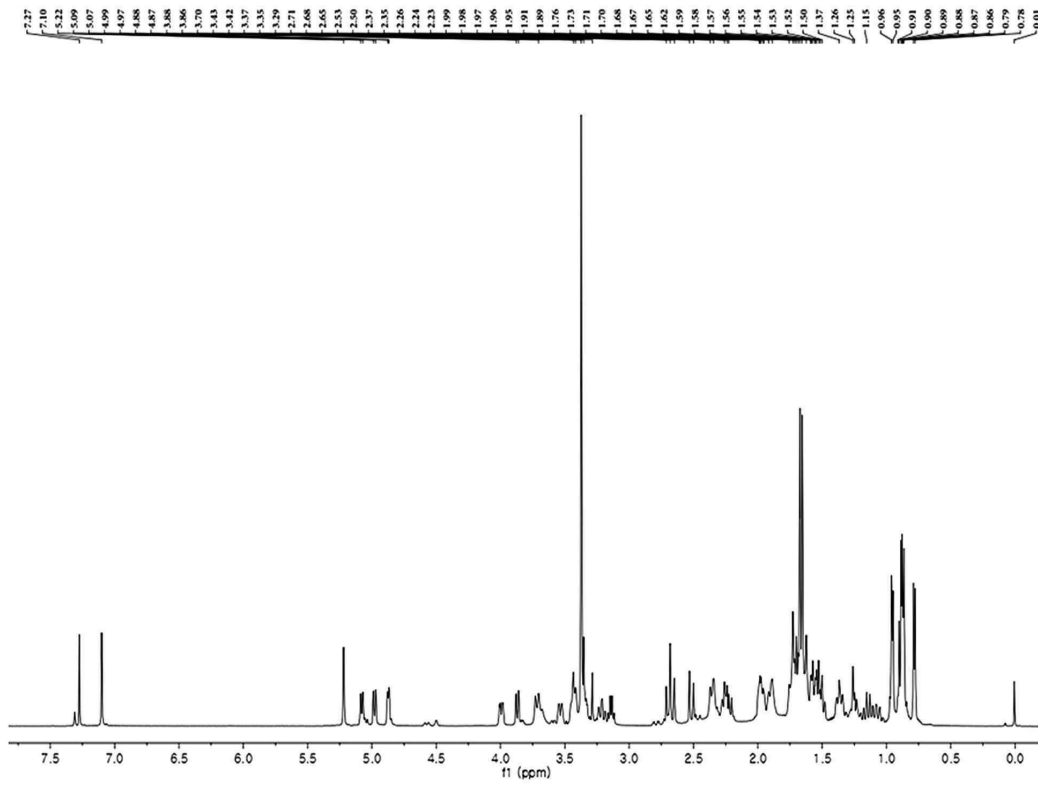
도면36



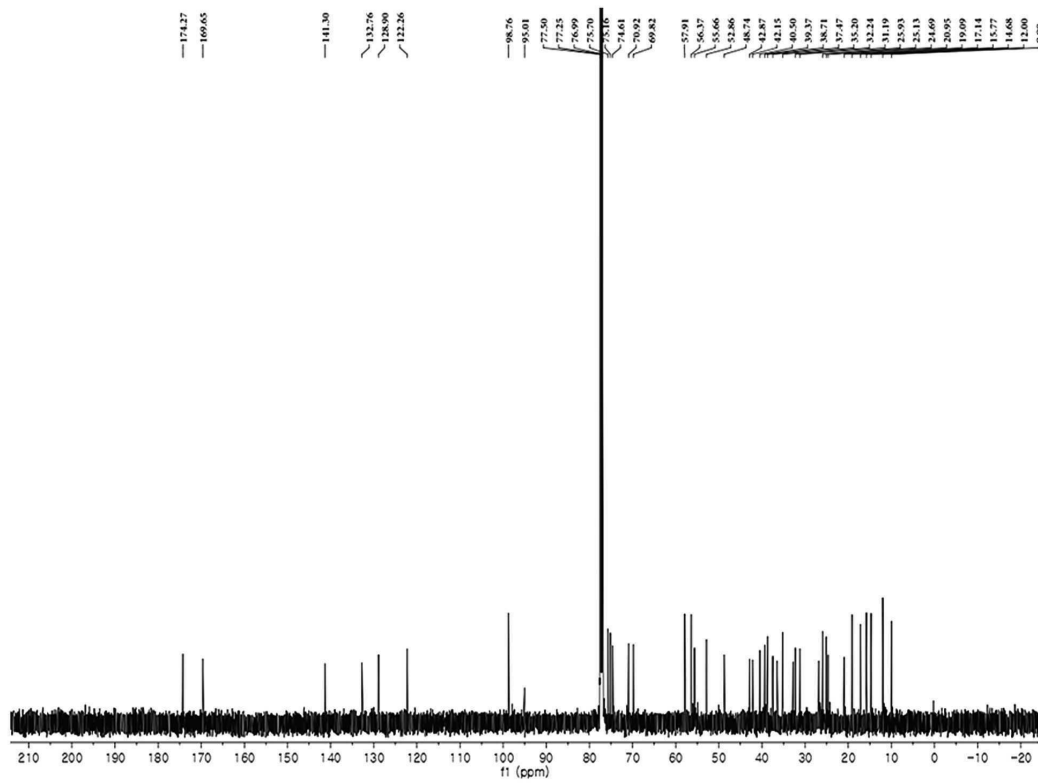
도면37



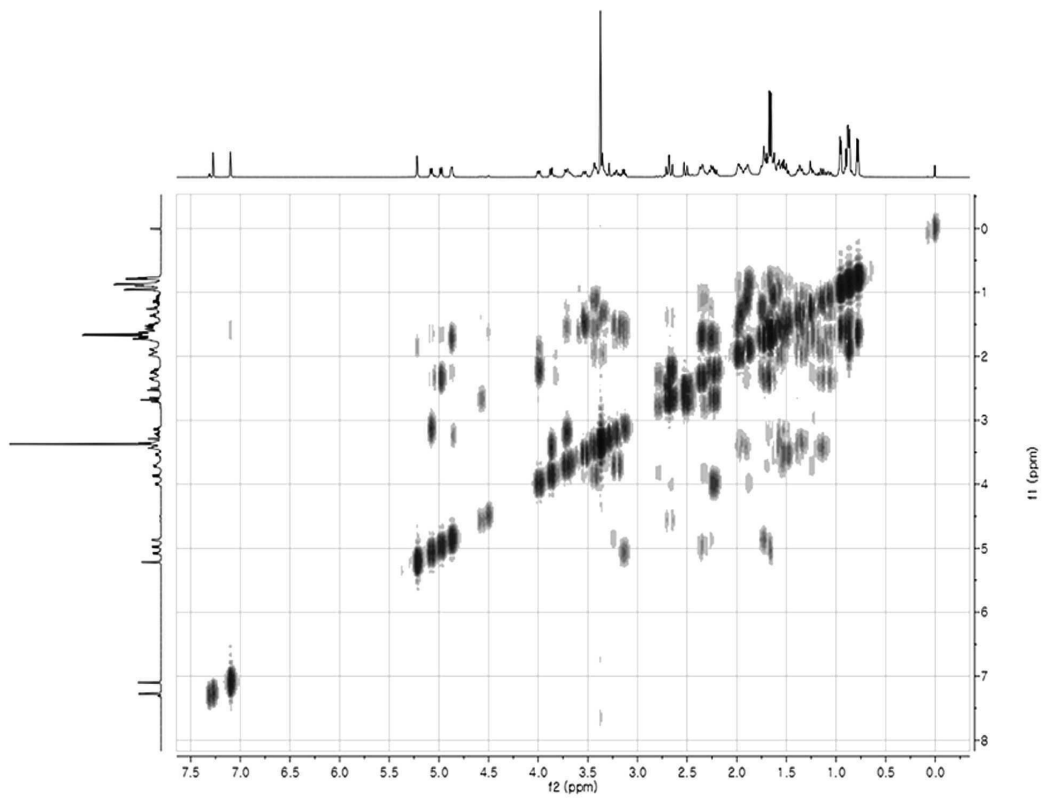
도면38



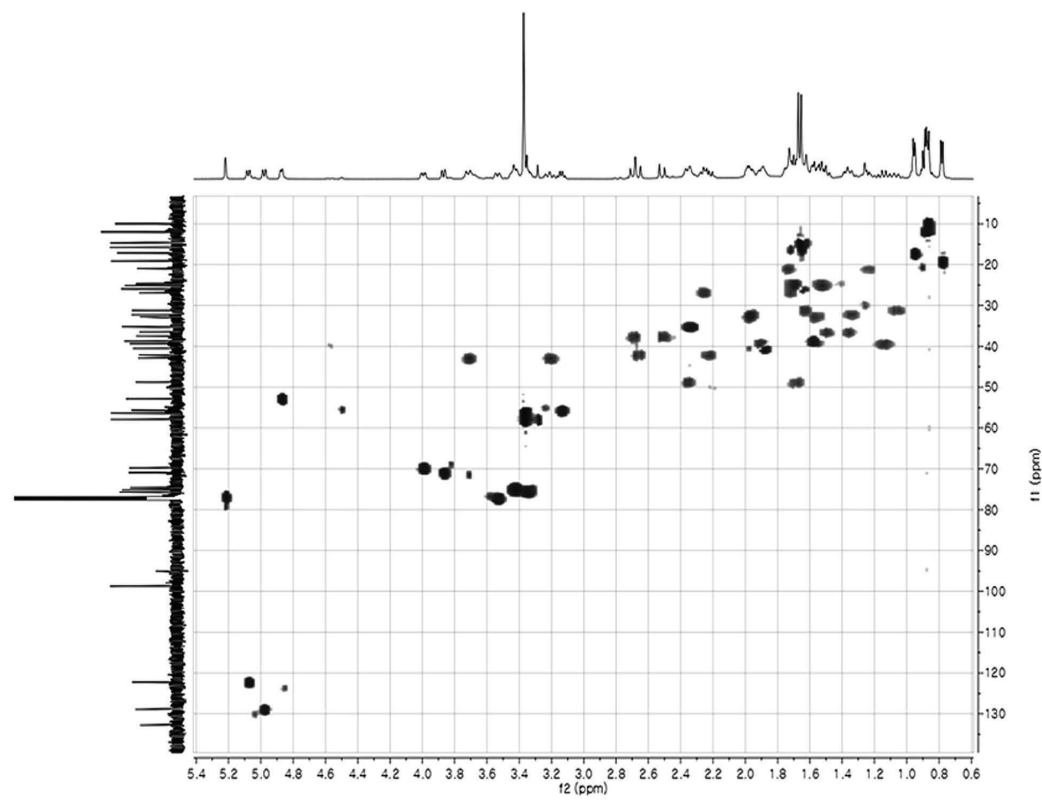
도면39



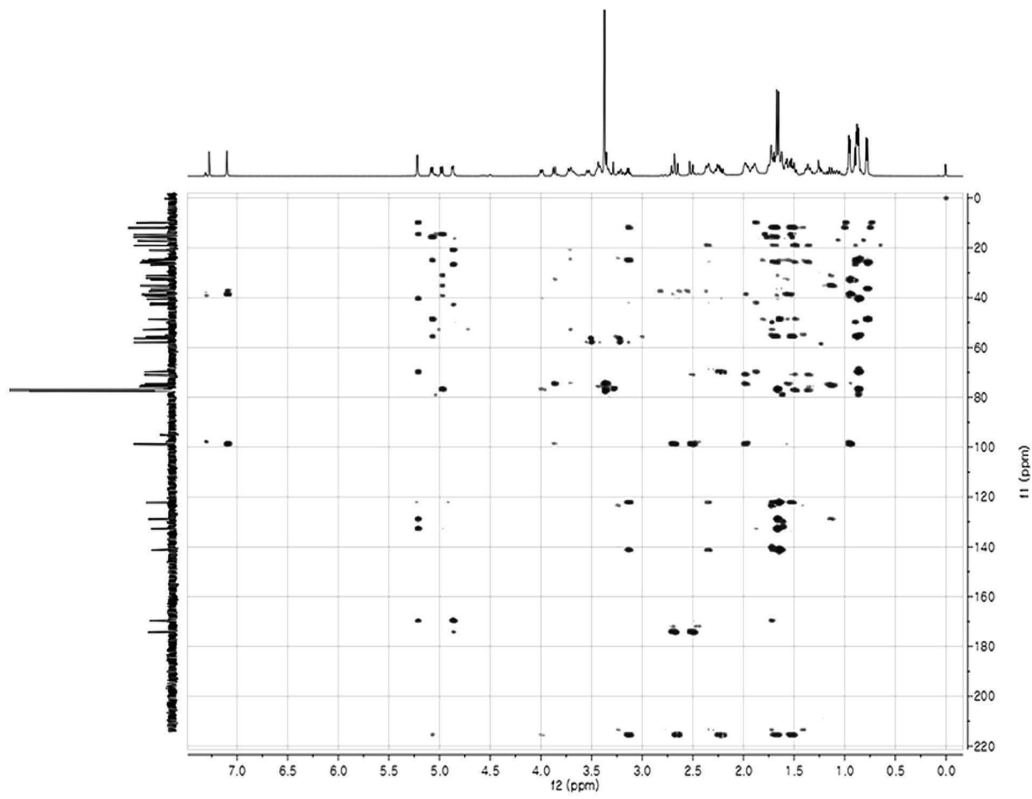
도면40



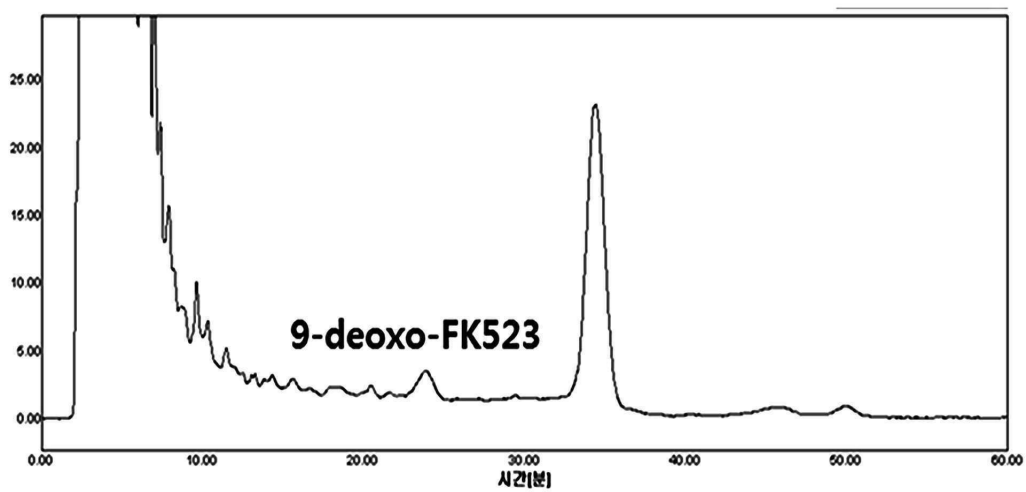
도면41



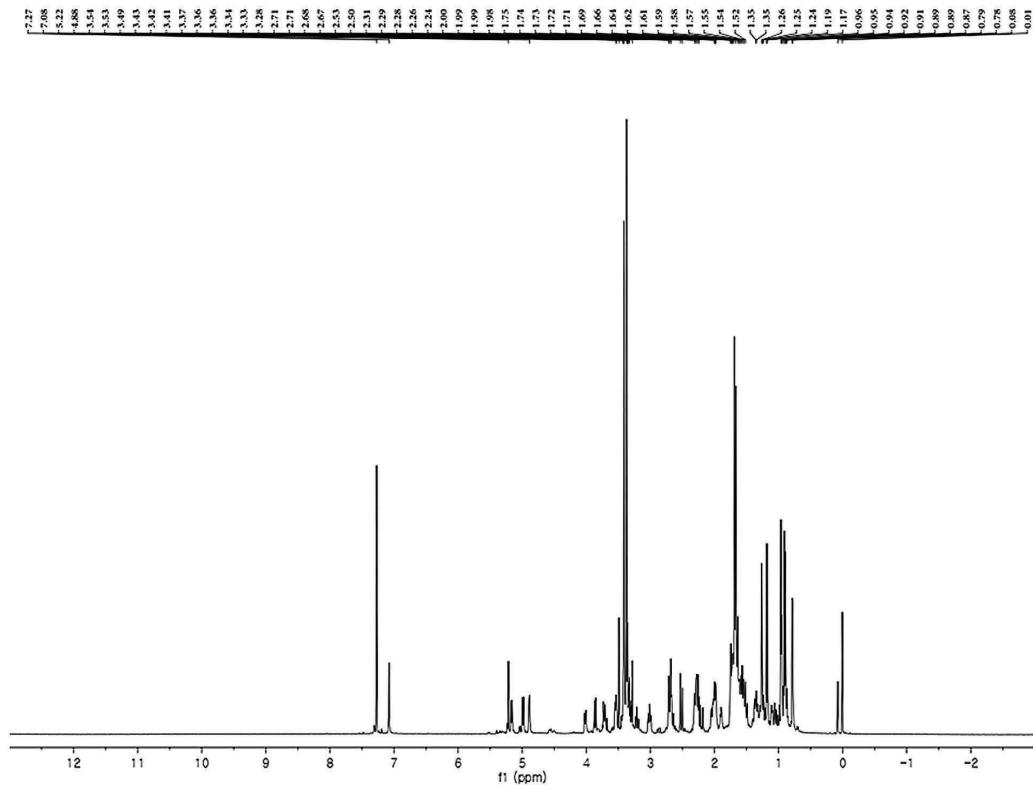
도면42



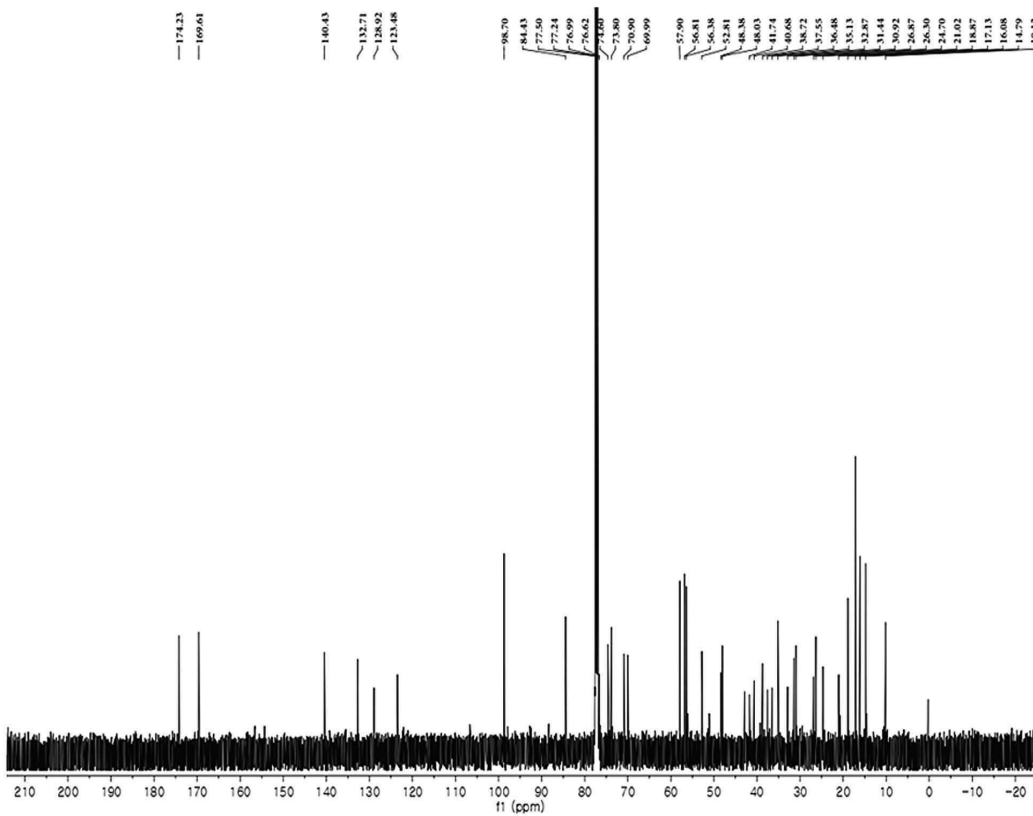
도면43



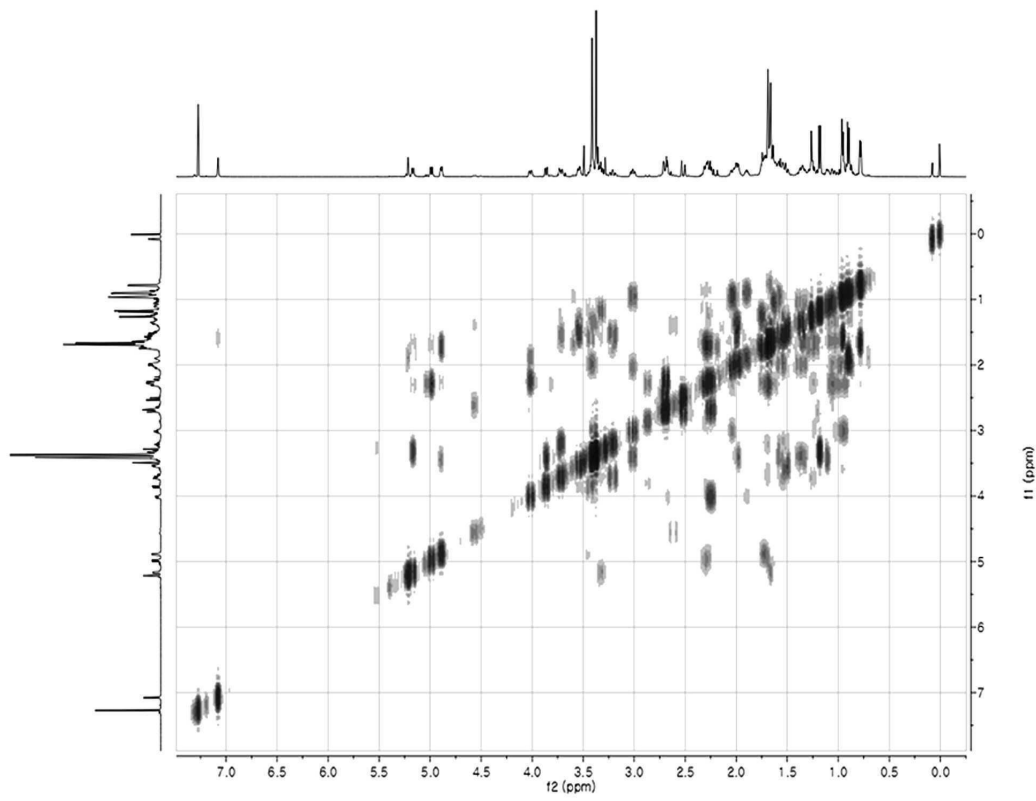
도면44



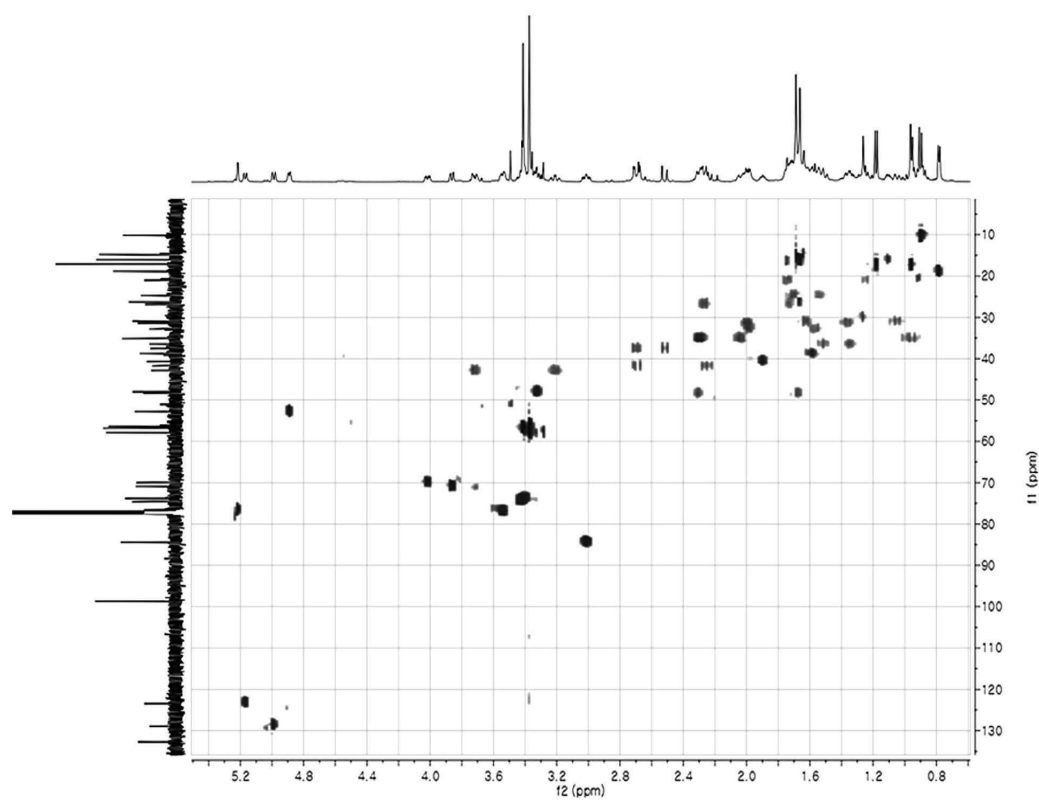
도면45



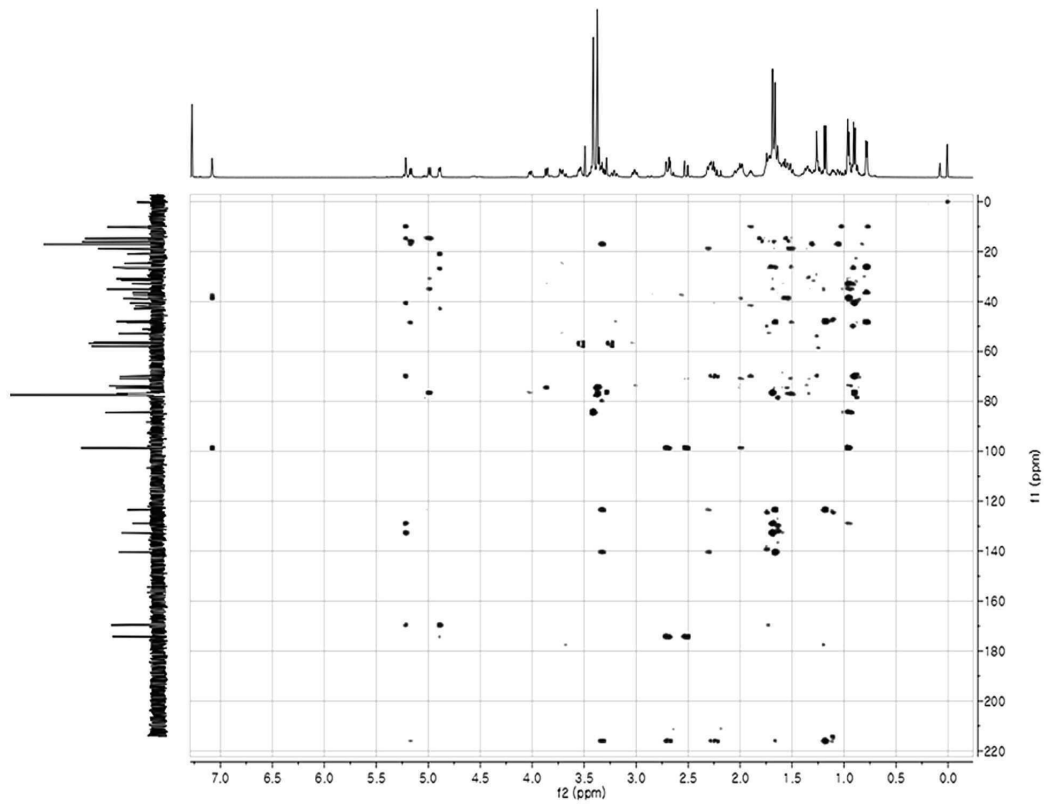
도면46



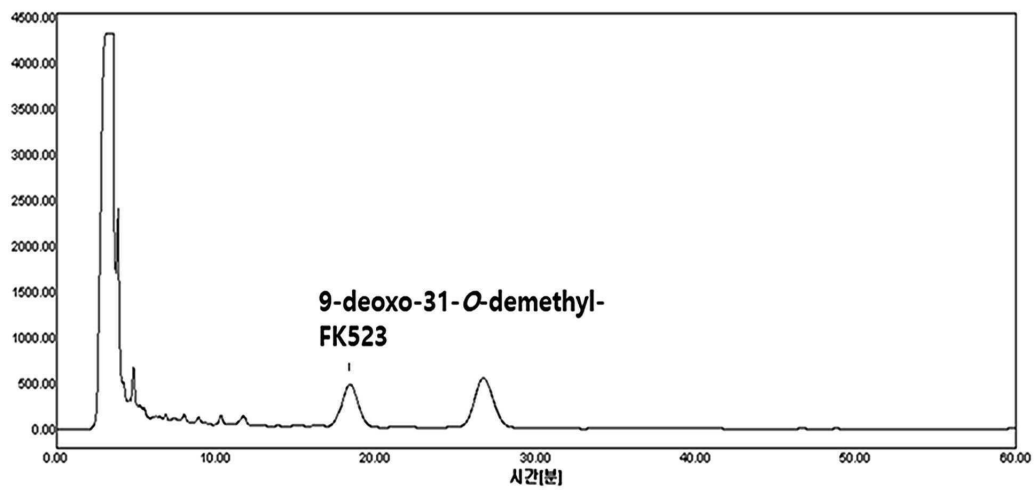
도면47



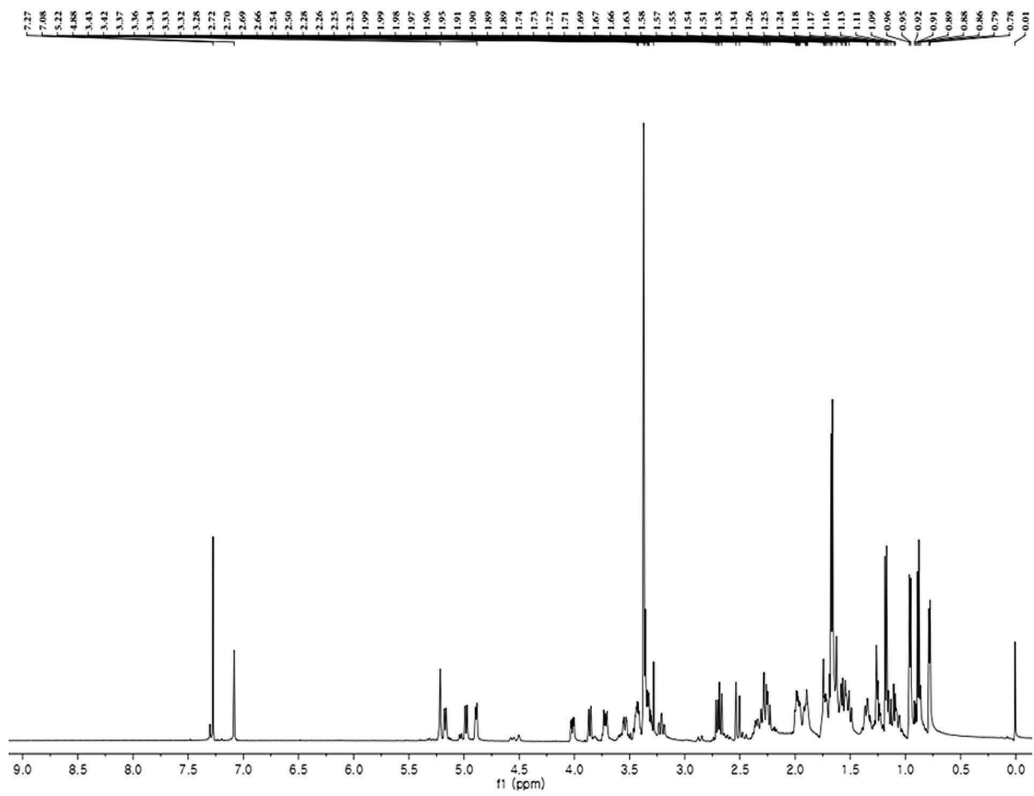
도면48



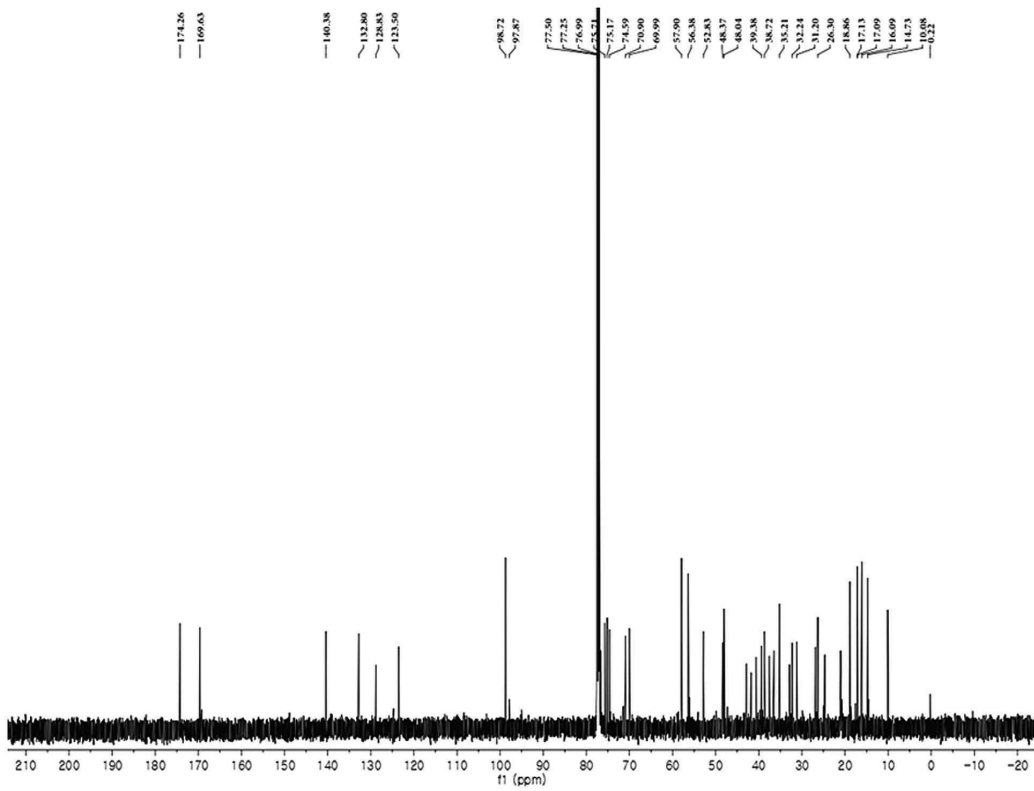
도면49



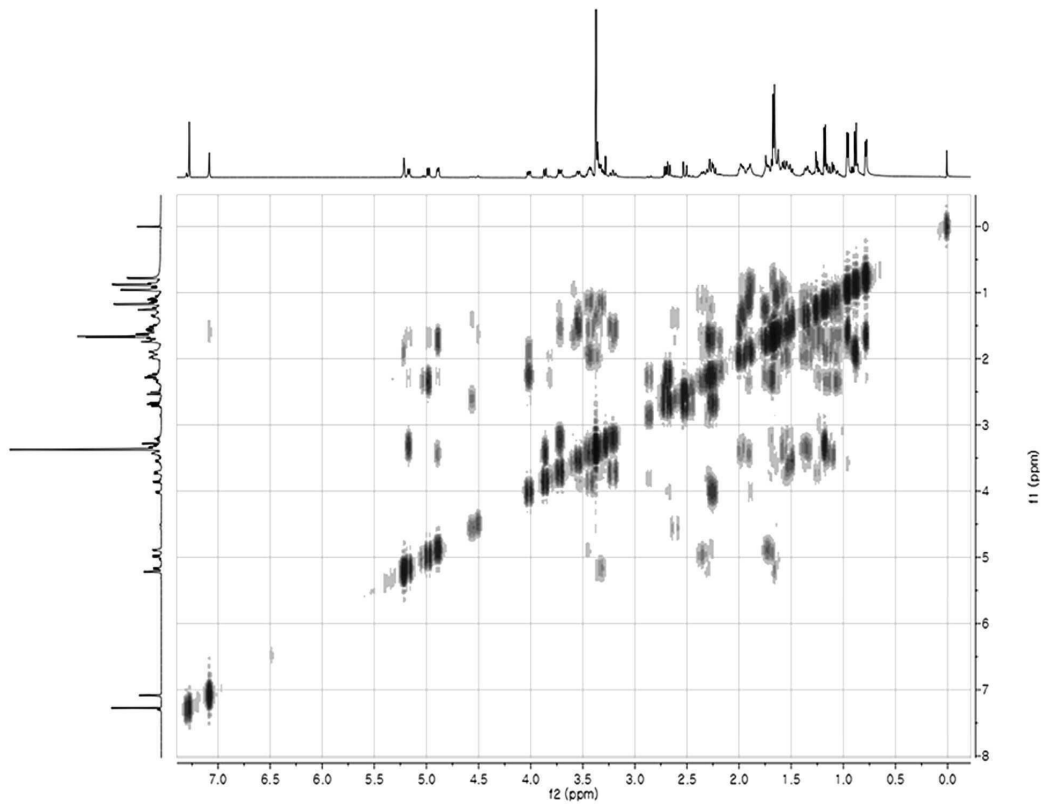
도면50



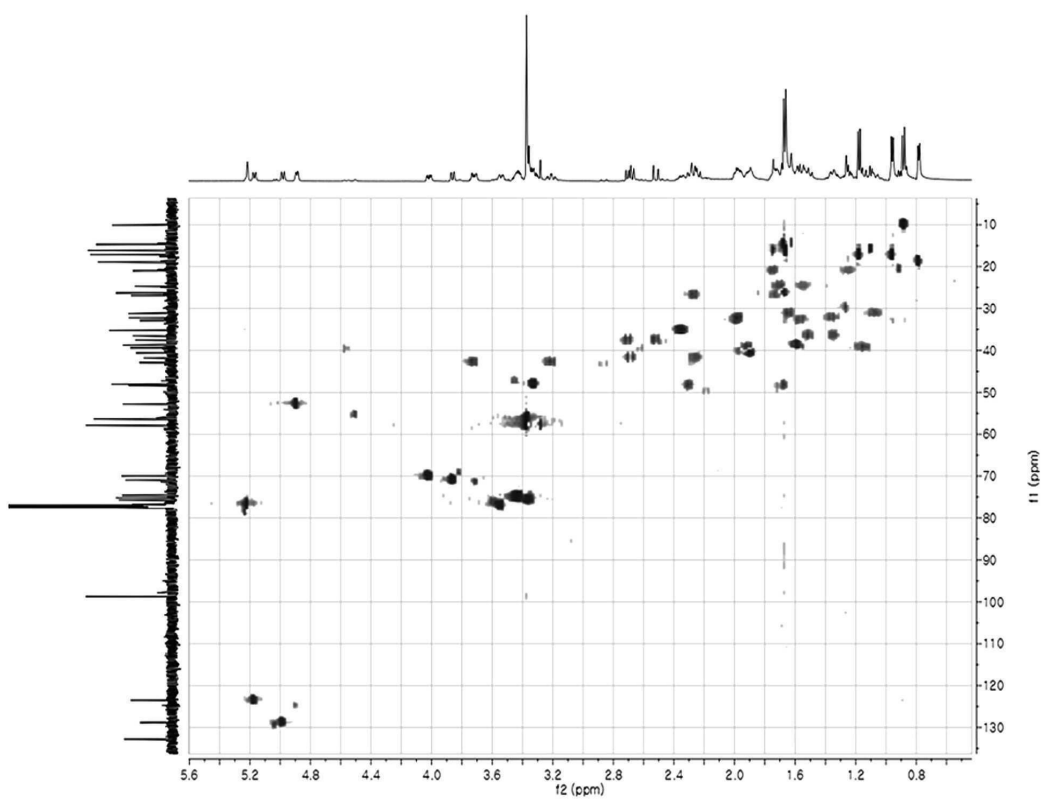
도면51



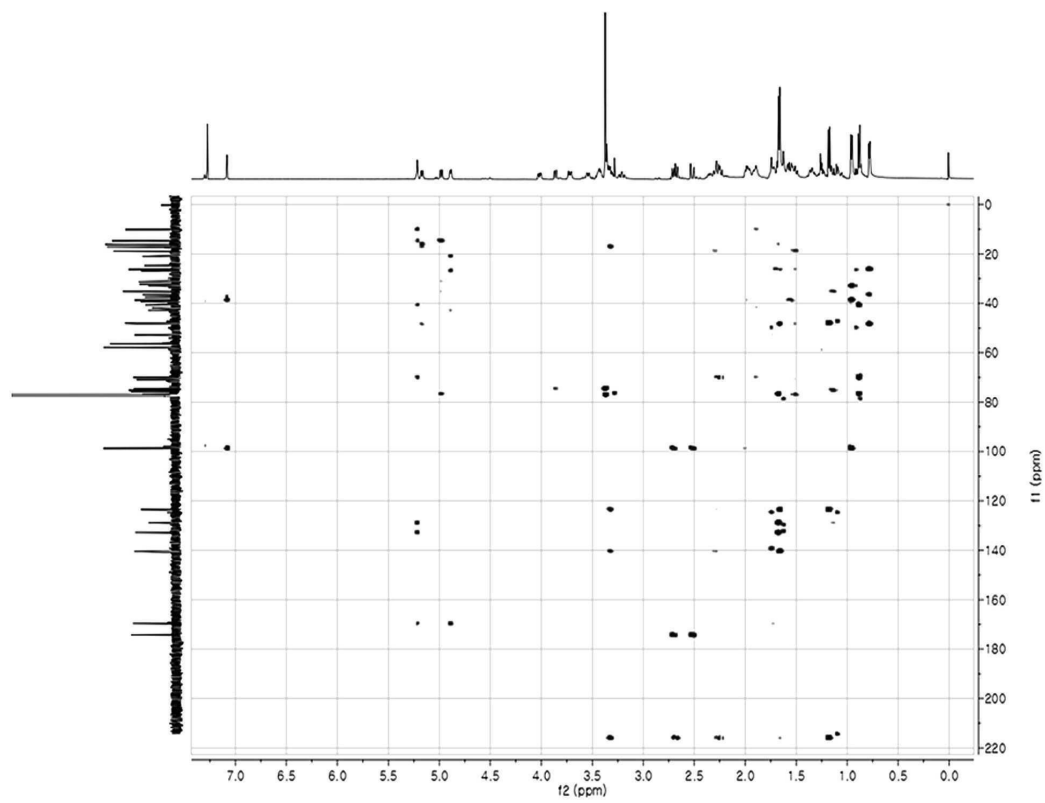
도면52



도면53

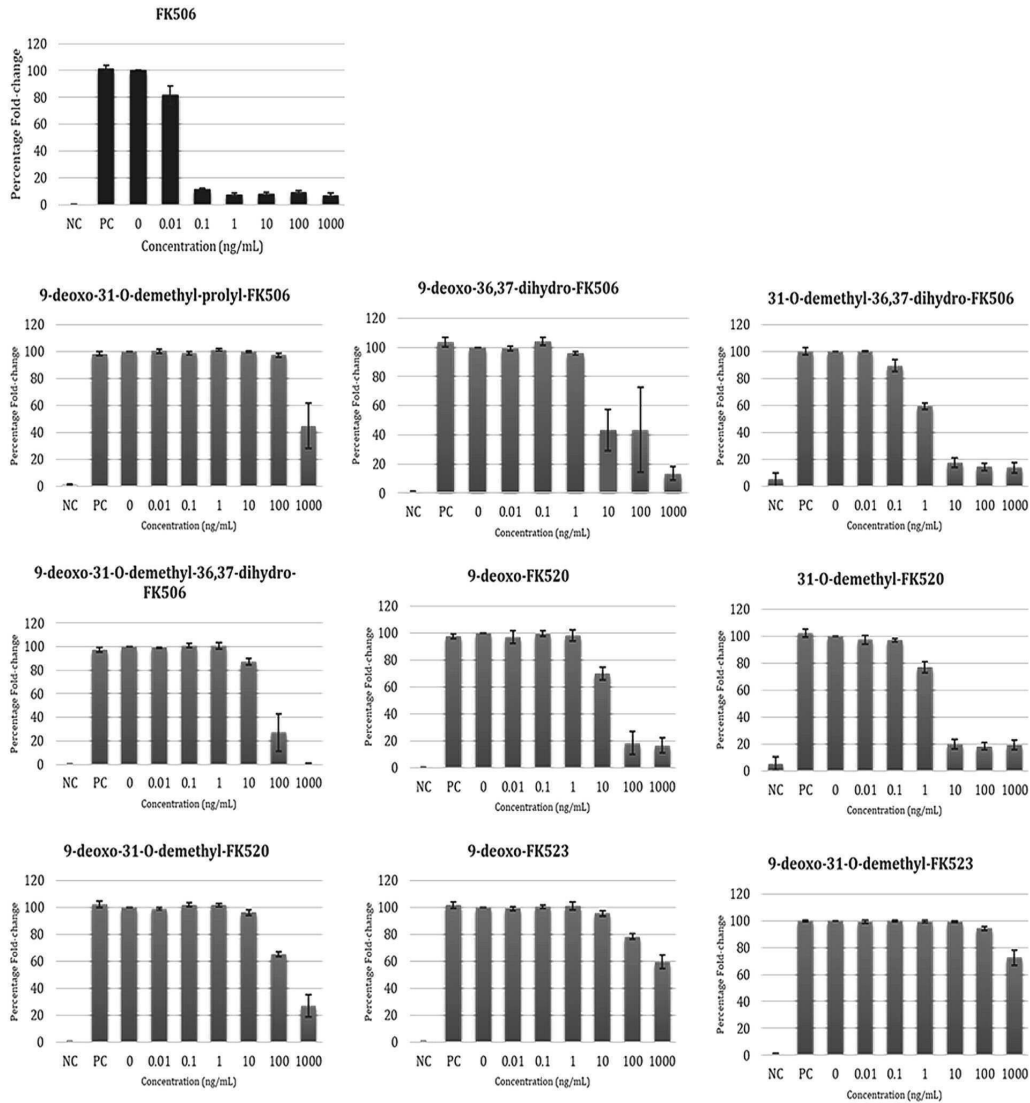


도면54

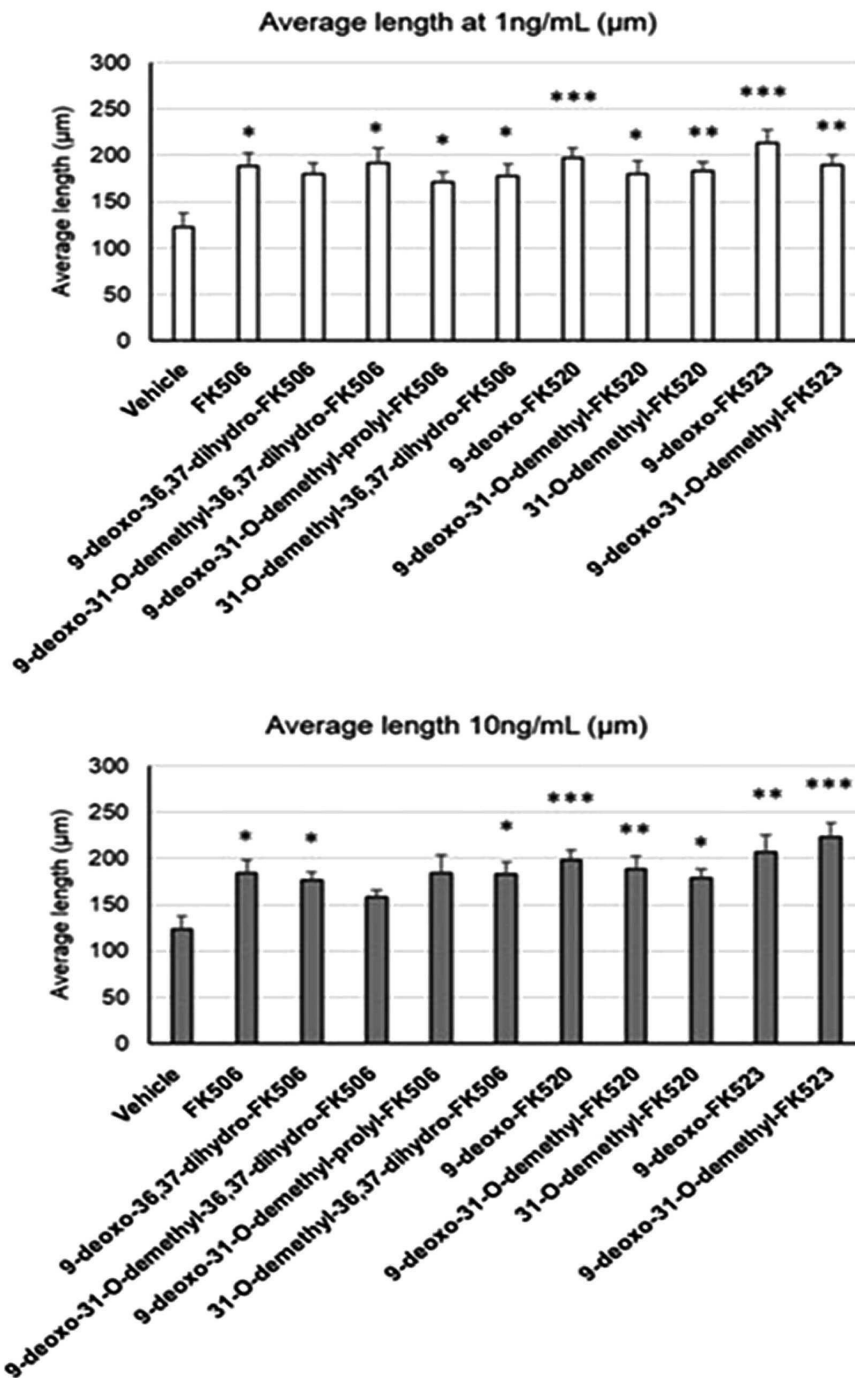


도면55

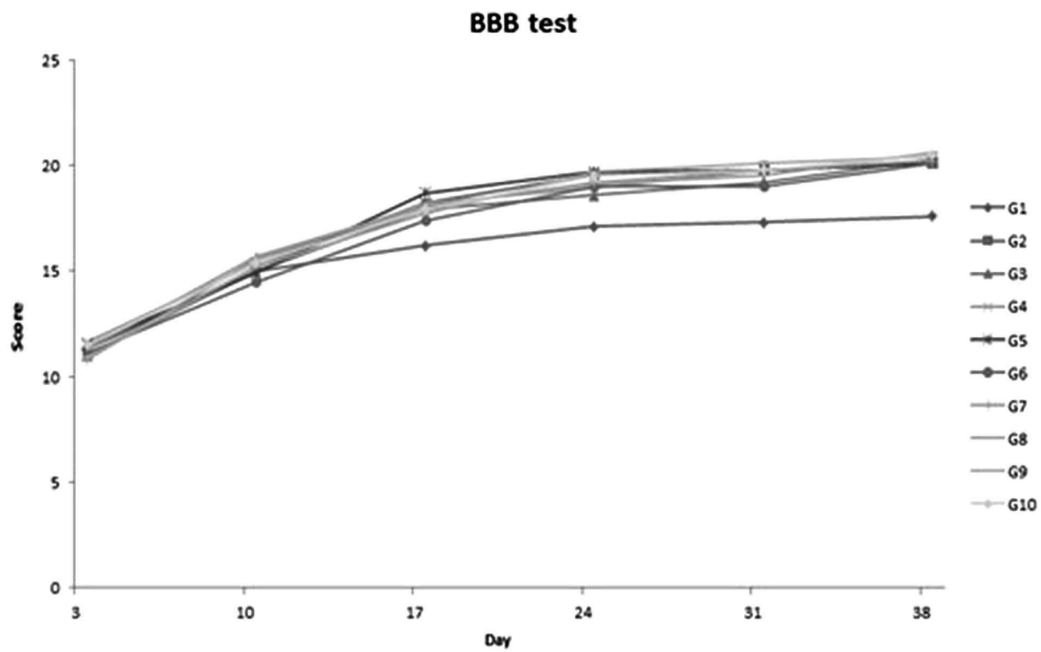
Immunosuppression Results



도면56



도면57



도면58

