

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0013141 (43) 공개일자 2014년02월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/341 (2006.01) A61K 31/34 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0077769 (22) 출원일자 2012년07월17일 심사청구일자 2012년07월17일		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인화로 100, 인하대학교 (용현동) (72) 발명자 김웅수 서울특별시 강남구 언주로30길 26 (도곡동) 타워팰리스 G동 5006호 김동주 서울특별시 강남구 학동로87길 9 (청담동, 진흥아파트) 8동 302호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 스트렙토마이세스 속 C K 4 4 1 2 균주를 이용한 신규 토토마이세틴 유도체 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 면역억제제

(57) 요약

본 발명은 스트렙토마이세스 속 CK4412 균주를 이용한 신규 토토마이세틴 유도체 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 면역억제제에 관한 것으로, 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412) 균주의 염색체 DNA에서 *tmcR* 유전자를 결실시키는 것을 특징으로 하는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 제조방법을 제공한다. 상기 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)을 이용하여 기존의 토토마이세틴 보다 면역억제능력은 향상되고 독성은 감소된 개량된 면역억제제로 응용할 수 있다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

나지혜

서울특별시 강서구 방화대로49길 6-16, 중앙하이빌
501호 (방화동)

최시선

인천광역시 부평구 부흥로 246 (부평동, 동아2단
지아파트) 36동 407호

신화성

인천광역시 연수구 먼우금로 126 (동춘동, 현대대
림2차아파트) 215동 102호

데이비드 에이치 쉼먼

미국 미시간주 앤아버 미시간대학 의화학부 생명과
학과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 D00040

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌 리서치 네트워크 프로그램

연구과제명 방선균 유전체 공학을 이용한 면역억제제 및 항암제 폴리케타이드 후보물질 토토마이세틴

의 위치 특이적 재설계

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

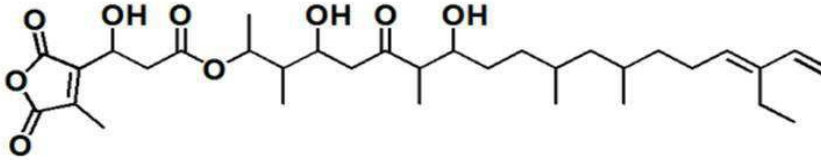
연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412) 균주의 염색체 DNA에서 *tmcR* 유전자를 결실시키는 것을 특징으로 하는 하기 화학식 1로 표시되는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 제조방법.

< 화학식 1 >



청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 *tmcR* 유전자는 토토마이세틴(tautomycetin) 생합성 유전자 중 토토마이세틴의 5번 탄소 위치에 산소를 붙이는 기능을 하는 유전자인 것을 특징으로 하는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 *tmcR* 유전자를 결실시키는 방법은

- (a) 아프라마이신 저항 유전자(*aac(3)IV*)/*oriT* 카세트가 클로닝된 도 2a의 pTMC2290 Δ *tmcR* 플라스미드를 제작하는 단계;
- (b) 대장균 ET12567/pUZ8002를 이용하여 접합(conjugation)을 통해 상기 제작된 pTMC2290*tmcR* 플라스미드를 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412) 균주 내로 도입하는 단계; 및
- (c) 상기 접합된 균주들 중에서 아프라마이신 내성을 가지는 균주를 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin) 제조방법.

청구항 4

제 1 항의 제조방법에 의해 생산되는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)을 유효성분으로 포함하는 면역 억제용 약학 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)은 단백질 포스파타아제 2A(protein phosphatase 2A, PP2A) 또는 타이로신 포스파타아제-2 단백질 포함 Src 유사-2 도메인(Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2; SHP2) 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 면역 억제용 약학 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)은 세포 독성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 면역 억제용 약학 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 세포는 베로 세포(Vero cell)인 것을 특징으로 하는 면역 억제용 약학 조성물.

청구항 8

제 4 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 장기이식 또는 자가면역질환의 면역거부반응을 억제하는 것을 특징으로

하는 면역 억제용 약학 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 자가면역성 당뇨병, 아토피 피부염, 천식 및 크론씨병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 면역 억제용 약학 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 스트렙토마이세스 속 CK4412 균주를 이용한 신규 토토마이세틴 유도체 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 면역억제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412)에서 생산되는 토토마이세틴(tautomycetin; TMC)은 항진균 활성, 면역억제 활성 및 항암 활성을 가지고 있다(Proc Natl Acad Sci USA 99 (2002) 10617-10622; Mol Cancer Ther 5 (2006) 3222-3231; Mol Cancer Ther 9 (2010) 1482). 토토마이세틴은 선형 폴리케타이드와 안하이드라이드(anhydride)로 구성되어 있으며(J Antibiot 42 (1989) 141-144), 자연상태에서 토토마이세틴은 다이애시드(diacid) 형태와 안하이드라이드(anhydride) 형태가 공동으로 존재한다(J Antibiot 42 (1989) 141-144). 토토마이세틴은 단백질 포스파타아제(protein phosphatase) PP1과 PP2A에 대하여 억제 활성을 가지고 있으나, PP2A에 대한 억제활성보다 PP1에 대한 억제활성이 약 40배 더 크게 나타나는 것으로 알려져 있다(Biochem. Biophys. Res. Commun. 287 (2001) 328-331). 특히 토토마이세틴과 안하이드라이드 부분(anhydride moiety)은 같고 선형 탄소 사슬(linear carbon chain) 부분은 다른 토토마이신(tautomycin; TTM) 역시 PP1과 PP2A에 대한 억제활성을 가지고 있으나, 토토마이세틴에 비해 PP1에 대한 선택성이 떨어지고(Transplant Proc. 35 (2003) 547; Chem Asian J 5 (2010) 410-420), 면역억제 활성을 전혀 가지고 있지 않다(Proc Natl Acad Sci USA 99 (2002) 10617-10622). 최근에 보고된 논문에 의하면 T cell 내에 존재하는 타이로신 포스파타아제-2 단백질 포함 Src 유사-2 도메인(Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2; SHP2)에 대한 억제를 통해 토토마이세틴이 면역억제 활성을 가지고, 선형 탄소 사슬(linear carbon chain)의 구조적 차이로 인해 토토마이신은 면역억제 활성을 가지지 못하는 것으로 밝혀졌다(Trends Biochem. Sci. 28 (2003) 284-293; ChemBiol 18 (2011) 101-110). 한편, 본 발명자들은 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412)로부터 토토마이세틴을 생합성하는 유전체를 보고하였다(Microbiology 153 (2007) 1095-1102).

[0003] 한국등록특허 제0312454호에서는 면역억제제 및 항균제로서 유용한 토토마이세틴을 생산하는 스트렙토마이세스 속 미생물, 전기 미생물로부터 토토마이세틴을 제조하는 방법에 대해 개시하고 있으나, 그 돌연변이 균주나 이로부터 생산되는 토토마이세틴 유도체에 관한 언급은 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412) 균주의 염색체 DNA에서 *tmcR* 유전자를 결실시키는 것을 특징으로 하는 하기 화학식 1로 표시되는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

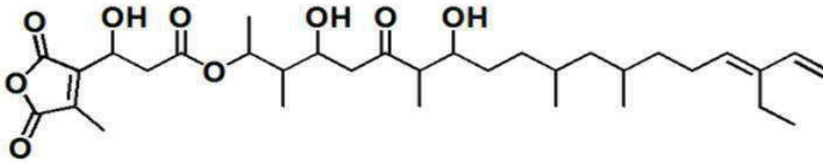
[0005] 본 발명의 다른 목적은 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)을 유효성분으로 포함하는 면역 억제용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 표적 특이적 유전자 결실(target-specific gene disruption)을 통해 사이토크롬 P450(cytochrome P450)의 기능을 하는 *tmcR*을 불활성화하였으며, 그 돌연변이체에서 토토마이세틴 유도체가 생산되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0007] 본 발명은 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412) 균주의 염색체 DNA에서 *tmcR* 유전자를 결실시키는 것을 특징으로 하는 하기 화학식 1로 표시되는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 제조방법을 제공한다.

[0008] < 화학식 1 >



[0009]

[0010] 본 발명의 *tmcR* 유전자는 1,350 bp 크기로서 449개의 아미노산 정보를 가지고 있으며, 사이토크롬 P450 하이드록실라아제(Cytochrome P450 hydroxylase; CYP) 유전자들과 유사성을 가진다. *tmcR* 유전자는 토토마이세틴(tautomycetin)의 5번 탄소 위치에 산소를 붙이는 역할을 한다.

[0011] 상세하게는, 상기 *tmcR* 유전자를 결실시키는 방법은 (a) 아프라마이신 저항 유전자(*aac(3)IV*)/*oriT* 카세트가 클로닝된 도 2a의 pTMC2290*tmcR* 플라스미드를 제작하는 단계; (b) 대장균 ET12567/pUZ8002를 이용하여 접합(conjugation)을 통해 상기 제작된 pTMC2290Δ*tmcR* 플라스미드를 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412) 균주 내로 도입하는 단계; 및 (c) 상기 접합된 균주들 중에서 아프라마이신 내성을 가지는 균주를 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin) 제조방법을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 제조방법에 의해 생산되는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)을 유효성분으로 포함하는 면역 억제용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 상세하게는, 상기 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)은 단백질 포스파타아제 2A(protein phosphatase 2A, PP2A) 또는 타이로신 포스파타아제-2 단백질 포함 Src 유사-2 도메인(Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2; SHP2) 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하고, 상기 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)은 세포 독성을 감소시키는 것을 특징으로 한다. 보다 상세하게는, 상기 세포는 베로 세포(Vero cell)인 것을 특징으로 한다.

[0014] 상세하게는, 상기 약학 조성물은 장기이식 또는 자가면역질환의 면역거부반응을 억제하는 것을 특징으로 하고, 보다 상세하게는, 상기 자가면역질환은 면역 세포가 자신과 외부물질을 구별하지 못하고 자신을 공격하여 발생하는 질병을 통칭하는 질환으로서, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 자가면역성 당뇨병, 아토피 피부염, 천식 및 크론씨병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)은 면역 반응에 의해 매개되는 조직 또는 기관의 면역 거부 반응을 방지하기 위한 면역억제제(immunosuppressant)로서 유용하게 사용될 수 있다. 면역 거부 반응이란 이식되는 생체의 일부로 세포, 조직 또는 장기의 공여자와 수용자간의 유전적 배경이 상이하여 (1) 공여자의 면역세포가 수용자 이식편을 외부물질로 인식하여 공격함으로써 유발되는 질환 및 (2) 수용자가 공여자의 이식편을 외부물질로 인식하여 공격함으로써 유발되는 질환을 포함한다. 거부 반응을 일으키는 이식된 조직 및 기관의 예로서는 심장, 신장, 간, 연골질(medulla ossium), 피부, 각막, 폐, 췌장, 소장(intestinum tenue), 사지(limb), 근육, 신경(nervus), 십이지장, 소장(small-bowel), 췌장 인슐린 생산세포(pancreatic-islet-cell) 및 연골질 이식에 의해 발생하는 질환을 들 수 있다.

[0016] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin) 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는데, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 약품 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 약학적 조성물은 첨가제로서 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0017] 상기 약학적 조성물은 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌척수액 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물 중 유효성분의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 환자의 나이, 성별, 체중 등에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0018] 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때, 제형은 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엘렉시르제, 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 경고제, 로션제, 연고제 등의 형태일 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명자들은 사이토크롬 P450(cytochrome P450) 기능을 하는 *tmcR* 유전자를 비활성화한 스트렙토마이세스 속 CK4412 돌연변이 균주를 제작하고, 이로부터 생산되는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)을 이용하여 기존의 토토마이세틴 보다 면역억제능력은 향상되고 독성은 감소된 개량된 면역억제제로 응용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 토토마이세틴 생합성 기작에 있어서 폴리케타이드 생합성(PKS) 후 개량 단계를 나타낸다. 안하이드라이드 부분은 TmcDEFGHPQ(보라색 화살표)에 의해 합성되고, 선형 폴리케타이드는 TmcAB(갈색 화살표)에 의한 합성 후에 TmcB-TE로부터 유리된다. 안하이드라이드 부분과 선형 폴리케타이드 사이의 에스테르화는 TmcC (노란색 화살표)에 의해 촉진된다. 그 후 탈수(dehydration), 탈카르복실화(decarboxylation) 및 산화(oxidation)와 같은 테일러링 단계(tailoring steps)는 TmcM(녹색 화살표), TmcJK(빨간색 화살표) 및 TmcR(파란색 화살표)에 의해 촉진된다. 빨간색 상자는 TmcR에 의한 C5 산화(C5 oxidation) 기작을 나타낸다.

도 2는 *tmcR* 유전자의 대체 및 보상을 위한 구조체를 나타낸다. (a) *tmcR* 유전자 및 아프라마이신-저항유전자 (*apr^R*)/*oriT*의 PCR 표적 유전자 대체 결실(PCR-targeted gene replacement disruption)의 도식을 나타낸다. (b) *tmcR* 유전자의 보상 실험을 위한 완성된 플라스미드 구조체를 나타낸다. (c) 완성된 *tmcR* 돌연변이의 확인을 위한 젤 사진이다. Lanes: M, 1kb ladder; 1 및 4, 스트렙토마이세스 속 CK4412 야생형 게놈 DNA; 2 및 3, 스트렙토마이세스 속 CK4412-006 게놈 DNA. 1 및 2, *tmcR* check F 및 R 프라이머(ChTmcR-F 및 R)를 이용한 PCR 결과; 3 및 4, *oriT* 및 *tmcR* check R 프라이머(ChTmcR-R)를 이용한 PCR 결과.

도 3은 스트렙토마이세스 속 CK4412 야생형 및 재조합 균주들로부터 생산되는 중간체 프로파일에 대한 HPLC 결과이다. (a), 스트렙토마이세스 속 CK4412 야생형; (b), CK4412-006; (c), CK4412-006/*tmcR*.

도 4는 LC-MS에 의해 분석된 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 분자량을 나타낸다. 1, 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 다이애시드 형태(diacid form).

도 5는 발현 및 분리된 GST-결합 SHP2의 SDS-PAGE 분석결과를 나타낸다. Lanes: 1, 단백질 마커; 2, 미정제 추출물(crude extracts); 3, 글루타치온-세파로즈(glutathione-Sepharose) 컬럼으로부터 녹인 GST-결합 SHP2.

도 6은 1mM 농도의 TMC 및 TMC 유도체의 항진균 활성을 나타낸 사진이다. (I), 메탄올; (II), TMC; (III), 5-데옥시 TMC; (IV) 및 (V), 다른 TMC 유도체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는

것은 아니다.

[0022] < 실시예 1 > *tmcR* 결실(disruption) 돌연변이 균주, 스트렙토마이세스 속 CK4412-006(*Streptomyces* sp. CK4412-006) 제작

[0023] 1. 균주 및 배양 조건

[0024] 대장균 DH5 α (*Escherichia coli* DH5 α) 균주는 재조합 플라스미드들의 제작을 위한 숙주로서 사용되었다. 대장균 ET12567/pUZ8002(*E. coli* ET12567/pUZ8002)는 접합(conjugation) 실험에서 공여 숙주로서 사용되었다. 모든 대장균 균주들은 필요에 따라 적절한 항생제가 첨가된 루리아 배지(Luria broth) 또는 루리아 아가 배지(Luria Broth agar)에서 37℃에서 배양되었다. 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412)는 토토마이세틴 생산 균주로서 사용되었다(Microbiology 153 (2007) 1095-1102). 토토마이세틴 및 그 유도체 생산을 위해서, 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412) 야생형(wild-type) 및 돌연변이 균주들은 MS 고체 배지에서 6일 동안 배양하였다(Microbiology 153 (2007) 1095-1102).

[0025] 2. *tmcR* 유전자 결실(disruption)

[0026] PCR 표적 유전자 결실 시스템(PCR targeted gene disruption system)을 이용하여, *tmcR* 유전자를 불활성화시켰다(Proc Natl Acad Sci USA 100 (2003) 1541-1546). 간단하게 설명하면, 아프라마이신(apramycin) 저항 유전자(*aac(3)IV/oriT* 카세트는 *tmcR* 유전자의 내부 부위(internal region)를 대체하기 위하여 사용하였다. 상기 카세트들을 pTMC2290 또는 pTMC2982를 포함하고 있는 *E. coli* BW25113/pIJ790로 도입하였고, pTMC2290Δ*tmcR*을 제작하였다. *tmcR* 유전자의 대체는 돌연변이된 pTMC2290의 PCR 결과 분석을 통하여 확인하였다. 돌연변이된 코스미드 pTMC2290Δ*tmcR*은 *E. coli* ET12567/pUZ8002를 이용하여 접합(conjugation)에 의해 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412)로 도입되었다. 발아된 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412) 포자[접합 수여체(conjugation recipient)]를 pTMC2290Δ*tmcR*을 가진 *E. coli* ET12567/pUZ8002[접합 공여체(conjugation donor)]와 함께 섞고, 그 후 개량된 ISP4 배지 플레이트에 스프레딩(spreading) 하였다. 28℃에서 16시간 동안 배양한 후, 각 플레이트는 최종농도 50 ul/ml 및 25 ul/ml 농도의 아프라마이신(apramycin) 및 날리딕산(nalidixic acid)이 포함된 1 ml의 멸균된 물로 오버레이(overlay) 하였다. 접합완료체(exconjugants)가 나타날 때까지 28℃에서 배양을 계속 하였다. 아프라마이신(apramycin) 내성 및 카나마이신(kanamycin) 민감성 표현형(phenotype)으로 선택된 이중 크로스-오버 돌연변이(double cross-over mutants)를 분리하였다. 이는 스트렙토마이세스 속 CK4412-006(*Streptomyces* sp. CK4412-006)으로서 *tmcR*-결실 균주이고, 유전형은 PCR 분석을 통해 확인하였다. 본 발명에 사용한 균주 및 플라스미드는 표 1에 나타났다.

표 1

균주	특성	출처
<i>Streptomyces</i> sp. CK4412	Wild-type TMC-producing strain	Choi <i>et al.</i> (2007)
CK4412-006	<i>tmcR</i> -disrupted strain (replaced with <i>apr^R/oriT</i>)	본 발명
CK4412-006/ <i>tmcR</i>	<i>Streptomyces</i> sp. CK4412-006 (<i>tmcR</i> -disruptant) containing pSETSPET <i>tmcR</i>	본 발명
플라스미드		
pTMC2290	Cosmid vector including <i>tmcR</i>	Choi <i>et al.</i> (2007)
pTMC2290Δ <i>tmcR</i>	pTMC2290 mutant cosmid vector containing <i>tmcR</i> disrupted with <i>apr^R/oriT</i>	본 발명
pSETSPET <i>tmcR</i>	pSET152-based insertional vector which was replaced the selection marker spectinomycin-resistance(<i>Spe^R</i>) gene including single copy of <i>tmcR</i> and constitutive promoter, <i>ermE*</i>	본 발명

[0028] 3. 결과

[0029] 본 발명자들은 이전에 1,350 bp 크기의 *tmcR* 유전자가 토토마이세틴 특이적인 옥시게나아제(oxygenases) 정보를 가지고 있다고 보고하였으며, 다른 박테리아 사이토크롬 P450 하이드록실라아제(Cytochrome P450 hydroxylase; CYP) 유전자들과 유사하다고 보고하였다. 컴퓨터를 이용한 유전자 서열분석결과, *tmcR* 유전자는 449개의 아미노산 정보를 가지고 있으며, 마이코박테리움 반바알레니(*Mycobacterium vanbaalenii*)의 CYP와 아미노산 서열이 44% 일치하였다. 토토마이세틴 생합성 관련 유전자들과 *tmcR* 유전자의 기능에 대해서는 도 1에 나타났다. 방선균 내에서 *tmcR*의 기능을 검증하기 위해, PCR 표적 유전자 결실 시스템(PCR-targeted gene disruption system)을 이용하여 *tmcR* 유전자를 불활성화시켰다. pTMC2290 플라스미드의 경우, *tmcR* 유전자를 포함한 토토마이세틴 생합성 유전자 중 일부가 들어있는 코스미드이다. 또한 pTMC2290 Δ *tmcR* 플라스미드의 경우, 토토마이세틴 생합성 유전자 중 *tmcR*이 아프라마이신 항생제 내성 유전자로 치환되었다. 이러한 플라스미드들을 스트렙토마이세스 속 CK4412(*Streptomyces* sp. CK4412) 내로 도입하여 토토마이세틴 생합성 유전자 중 *tmcR* 만을 특이적으로 불활성화시킬 수 있다(도 2a). 이렇게 *tmcR*이 불활성화된 돌연변이체가 성공적으로 유전자 변형이 되었음을 PCR을 통해 확인하였다(도 2c).

[0030] < 실시예 2 > 기능적 보상(functional complementation) 실험 및 스트렙토마이세스 속 CK4412-006(*Streptomyces* sp. CK4412-006)에 의해 생산되는 토토마이세틴 유도체의 구조분석

[0031] 1. *tmcR* 유전자의 보상(complementation) 실험

[0032] Δ *tmcR* 돌연변이의 보상(complementation) 실험을 위하여, pTMC2290을 주형 코스미드로 이용하여 PCR을 통해 온전한 *tmcR* 유전자를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 1%(w/v) 아가로스겔로 전기영동하여 분석하였고, DNA 추출 키트를 통해 분리하였고, pGEM[®]-T Easy vector에 연결하였다. 확인을 위하여, 연결된 벡터 전체를 염기서열 분석하였다(마크로젠, 한국). *Bgl*III 및 *Xba*I으로 처리된 *tmcR* 단편은 pSET152로 클로닝하였고(Microbiology 153 (2007) 1095-1102), pSETSPET*tmcR*을 확보하기 위해서, pSET152의 *Bam*HI 및 *Xba*I 제한효소 사이트에 스펙티노마이신(spectinomycin) 저항 유전자를 클로닝하였다. 접합(conjugation)을 통한 돌연변이 균주 CK4412-006 내로 pSETSPET*tmcR*의 도입은 CK4412-006/*tmcR* 균주를 만들어냈다. 이는 *ermE** 프로모터 조절하에서, 기능을 하는 *tmcR*이 일정한 수준에서 발현함으로써 보상이 이루어졌다. 본 발명에 사용된 프라이머는 표 2에 나타났다.

표 2

Primers	서열 (5'-3')	설명
PT <i>tmcR</i> -F ¹	TACGCGCACTACGAGACGATGCGCTCGGACCAGCCCTTCGTCGATTCCGGGGA TCCGTCGACC (서열번호 1)	Forward primer for <i>tmcR</i>
PT <i>tmcR</i> -R ¹	GAGGCAGTAGTGGATGCCAGTCGAGAACGCCAGGTGCTTGTTAGGCTGGAGC TGCTTC (서열번호 2)	Reverse primer for <i>tmcR</i>
CP <i>tmcR</i> -F ²	AGATCTACTTTCCGATCTGGTGA (서열번호 3)	Forward primer for <i>tmcR</i>
CP <i>tmcR</i> -R ²	TCTAGAACGCCTCAGCGACCGGCGT (서열번호 4)	Reverse primer for <i>tmcR</i>
CH <i>tmcR</i> -F ³	TGACCGATCCGTCGGTAC (서열번호 5)	Forward primer for <i>tmcR</i>
CH <i>tmcR</i> -R ³	TCGCCCTCCATCTTGCC (서열번호 6)	Reverse primer for <i>tmcR</i>

[0034] ¹, PCR 표적 시스템을 위한 사용; ², 보상 실험을 위한 사용; ³, 구조체(construct) 확인을 위한 사용

[0035] 2. 균주 배양 및 각 돌연변이로부터 생산되는 토토마이세틴 유도체의 구조 분석

[0036] 토토마이세틴 및 토토마이세틴 유도체에 대한 HPLC 분석을 위하여, 스트렙토마이세스 속 CK4412, CK4412-006 및

CK4412-006/*tmcR* 균주를 MS 고체 배지에 도말하고, 28℃에서 6일 동안 배양하였다. MS 고체 배지는 같은 부피의 증류수(10N HCl로 pH 4.0로 조절)와 혼합하고 원심분리한 후, 같은 부피의 에틸아세테이트로 2번 추출하였다. 혼합된 에틸아세테이트 추출물을 회전 증발 건조기(rotary evaporator)를 이용하여 농축하였고, MeOH에 녹여서 0.2 μ m 필터로 여과하고, HPLC 분석에 사용하였다. 분석용 HPLC는 Genesis C18 5 μ m 컬럼을 사용하고, 유량은 1 ml/min이고, 273nm에서 UV 검출하였다. 야생형 스트렙토마이세스 속 CK4412 및 CK4412-006에 의해 생산되는 토 토마이세틴 및 토토마이세틴 유도체의 확인은 LC-MS를 사용하여 확인하였다. 토토마이세틴 및 토토마이세틴 유도체의 분리를 위하여, 세미-분취 HPLC(semi-preparative HPLC)는 X-bridge C18 5 μ m 컬럼을 사용하고, 유량은 3 ml/min이고, 273nm에서의 UV 검출을 모니터링하면서 수행하였다.

[0037] 3. 결과

[0038] *tmcR* 유전자가 토토마이세틴 생합성에 관여하는지 확인하기 위해, 본 발명자들은 *tmcR* 유전자가 불활성화된 스트렙토마이세스 속 CK4412-006에 상시발현 프로모토인 *ermE**를 이용하여 *tmcR* 유전자를 보상해 주었다(도 2b). 유전자 보상을 하기 위해, 본 발명자들은 방선균 삽입 벡터인 pSET152 내에 *tmcR* 유전자를 클로닝하였으며, 그 결과 pSETSPET*tmcR*을 제작하였다. 보상 돌연변이 선별을 위해, pSET152의 아프라마이신(apramycin) 저항 유전자를 스펙티노마이신(spectinomycin) 저항 유전자로 치환하였다. HPLC 측정결과, pSETSPET*tmcR* 플라스미드로 *tmcR* 유전자를 보상한 스트렙토마이세스 속 CK4412-006의 경우 토토마이세틴을 생합성 하는 것으로 확인하였다(도 3a).

[0039] 토토마이세틴 유도체 생산을 위해, *tmcR* 유전자를 불활성화한 스트렙토마이세스 속 CK4412-006을 배양하여 분석한 결과, 토토마이세틴은 생합성 하지 않았지만, 토토마이세틴과 유사한 스펙트럼을 보이는 토토마이세틴 유도체를 확인하였다 (도 3b). 또한 LC-MS 분석결과, 상기 토토마이세틴 유도체가 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)이라는 것을 확인하였다(도 4). 이러한 토토마이세틴 유도체의 구조는 스트렙토마이세스 속 CK4412 균주에서 *tmcR* 유전자가 토토마이세틴 생합성 과정 중 5번 탄소에 특이적인 CYP 효소임을 보여준다.

[0040] < 실시예 3 > 스트렙토마이세스 속 CK4412-006 균주에서 생산되는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 생물학적 활성

[0041] 1. GST-결합 SHP2 촉매 도메인(catalytic domain)의 발현 및 분리

[0042] SHP2의 촉매 도메인(잔기 246-547)은 합성하였다(Cosmogenetech, 한국). 합성된 SHP2 촉매 도메인 단편은 *Bam*H1 및 *Xho*1로 처리하고, pGEX-4T3(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) 박테리아 발현 벡터의 동일한 사이트에 클로닝하였다. 글루타치온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST)-결합 SHP2의 구조체는 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환되었고, 1mmol 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노사이드(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)로 20℃에서 16시간 동안 과발현시켰다. 세포 펠렛은 20ml PBS 완충액(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4)에 현탁시켰다. 상기 현탁액은 10초 동안 10번씩 짧게 초음파 처리하였는데, 냉각을 위하여 30초의 간격을 두었다. 세포 찌꺼기는 4℃, 15000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 제거하였다. GST-결합 SHP2는 글루타치온-세파로즈 컬럼(glutathione-Sepharose column)(GE healthcare)으로 분리하였다. 마지막으로, 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아마이드(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide) 젤 전기영동에 의해 순도를 확인하였다(도 5).

[0043] 2. 단백질 포스파타아제(protein phosphatase) 억제 활성 측정

[0044] 단백질 포스파타아제 억제 활성은 96-웰 멀티웰 플레이트(multiwell plates)에서 측정하였다. 분석에는 샘플(TMC 및 TMC 유도체), 양성대조군 및 음성대조군(blank)을 포함하는 3개의 그룹이 포함되었고, 각각의 측정은 2번 수행하였다. 반응액은 30ul H₂O, 10ul PMP 완충액(New England BioLabs), 10ul 1mM MnCl₂ 및 4ul PP1 효소(반응 당 0.1IU, cat. no. P0754S, New England BioLabs) 또는 PP2A 효소(반응 당 0.1IU, cat. no. 14-111, Millipore) 또는 GST-결합 SHP2(반응 당 0.1IU, *E. coli* BL21에서 발현)을 함유하고, 이를 96-웰 플레이트에 첨가하고, 37℃에서 10분 동안 미리 따뜻하게 하였다. 1mM MnCl₂은 PP1 및 PP2A 억제 실험에서만 사용하였고, 효

소 대신에 효소 저장 완충액을 음성대조구(blank) 웰에 첨가하였다. 그 후, 메탄올에 희석한 다양한 농도의 TMC 및 TMC 유도체 10 μ l를 각 웰에 첨가하였다. 양성대조구 및 음성대조구(blank) 웰에는 억제제 대신에 10 μ l 메탄올이 첨가되었다. 반응은 기질[최종농도 100 μ M의 플루오레세인 다이포스페이트(fluorescein diphosphate)]의 첨가로 시작되었는데, 이는 37 $^{\circ}$ C에서 반응 혼합액과 함께 미리 따뜻하게 하였다. 그리고 같은 온도에서 1시간 동안 반응시켰다. FDP의 가수분해는 마이크로플레이트 리더(TECAN, Switzerland)를 이용하여 492nm에서 형광 검출을 통해 측정하였다. 시험 샘플들의 억제활성은 샘플과 대조구의 활성 비율에 의해 측정하였고, 백분율(%)로 표시하였다. 농도에 따른 TMC 및 TMC 유도체의 활성 백분율을 토대로 상관곡선(correlation curves)을 그렸다. 효소 활성의 50%를 억제하기 위해 필요한 농도(IC₅₀)를 계산하였다(Toxicon 37 (1999) 909-922).

[0045] 3. 세포독성 및 항진균 활성 측정

[0046] 세포 생존력은 NCI-H1229 인간 폐암 세포주 및 베로 세포주(Vero cell lines)를 사용하여 측정하였다. 각 세포주는 전-배양하였고, 그 후 4000개의 세포가 각각 96-웰 플레이트에 놓였다. 그 후, 세포들이 웰에 붙게 하기 위해서, 5% CO₂ 대기 하에서 세포들을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였다.

[0047] TMC 및 TMC 유도체들은 DMSO에 녹여서 각 웰에 첨가하였고, 세포들은 같은 조건에서 2일 동안 배양하였다. (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT) 용액을 배양된 세포를 함유하고 있는 각 웰에 첨가하였다. 4시간 동안의 배양 후에, 용해 완충액(lysis buffer)을 각 웰에 첨가하였다. 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540nm에서 포르마잔(formazan)의 흡광도를 측정하였다. 상기의 측정은 2번 반복하였다. TMC 및 TMC 유도체들의 항진균 활성의 측정은 아가 디스크 확산 방법에 의해 수행하였다. 디스크(6 mm 지름)를 메탄올에 용해된 15 μ l의 추출물로 흠뻑 적시고, 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)로 접종된 ME 배지에 올려놓았다. 플레이트들은 30 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 배양하였다. 균주가 생산하는 화합물의 확산에 의해 나타나게 되는 디스크 주위에 억제된 부위의 지름을 측정하였다.

[0048] 4. 결과

[0049] 토토마이세틴 생합성에 최적화된 배지에서 스트렙토마이세스 속 CK4412와 CK4412-006을 배양하여, 그 배양액으로부터 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 이용하여 토토마이세틴과 토토마이세틴 유도체를 추출하였고, 토토마이세틴 유도체인 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)을 사용하여 항진균 활성을 측정하였다. 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 곰팡이 균주를 이용한 항진균 활성 측정 결과, 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)은 토토마이세틴에 비해 항진균 활성이 감소하였음을 확인할 수 있었다(도 6).

[0050] 토토마이세틴의 경우, PP1에 대한 저해활성이 PP2A 보다 약 40배 정도 높은 것으로 알려져 있다. 스트렙토마이세스 속 CK4412-006에서 생산되는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 생리활성을 측정하기 위해, PP1 저해능력을 검증해 보았다. 토토마이세틴과 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 PP1에 대한 IC₅₀ 값은 각각 0.003 μ M 과 0.010 μ M이다(표 3). IC₅₀ 값은 표적 효소의 활성이나 세포의 성장을 50%로 억제하는데 필요한 저해제의 농도로서, 토토마이세틴 유도체인 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 경우 토토마이세틴 보다 약 3.3배 저해활성이 감소하였다. 한편, NCI-H1229 인간 폐암 세포주를 이용한 항암 활성 측정 결과, 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin) 유도체가 토토마이세틴 보다 항암 활성은 약 7배 감소했다.

[0051] 하지만, 면역 억제 활성에 있어서 가장 중요한 지표인 SHP2 저해활성의 경우에는 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin) 유도체가 토토마이세틴 보다 약 3.5배 그 활성이 뛰어난 것으로 밝혀졌다(표 3). 또한 토토마이세틴과 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin)의 세포독성 측정 결과, 베로 세포(Vero cell)에 대한 독성은 약 3배 감소하였다(표 3). 이러한 결과는 5번 탄소 위치에 특이적으로 변형된 5-데옥시 토토마이세틴(5-deoxy tautomycetin) 유도체가 면역 억제 능력이 향상되고, 독성은 감소된 새로운 면역억제제로서의 가능성을 가진다고 판단된다.

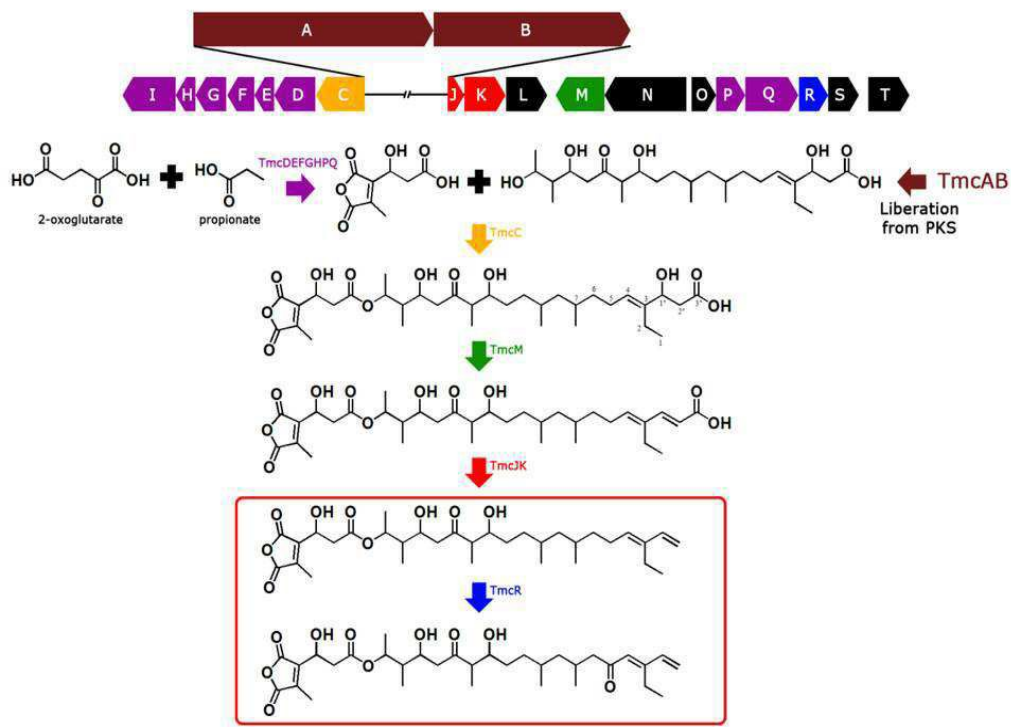
[0052]

단백질 포스파타아제(protein phosphatase) 억제 활성 및 세포독성 측정 결과

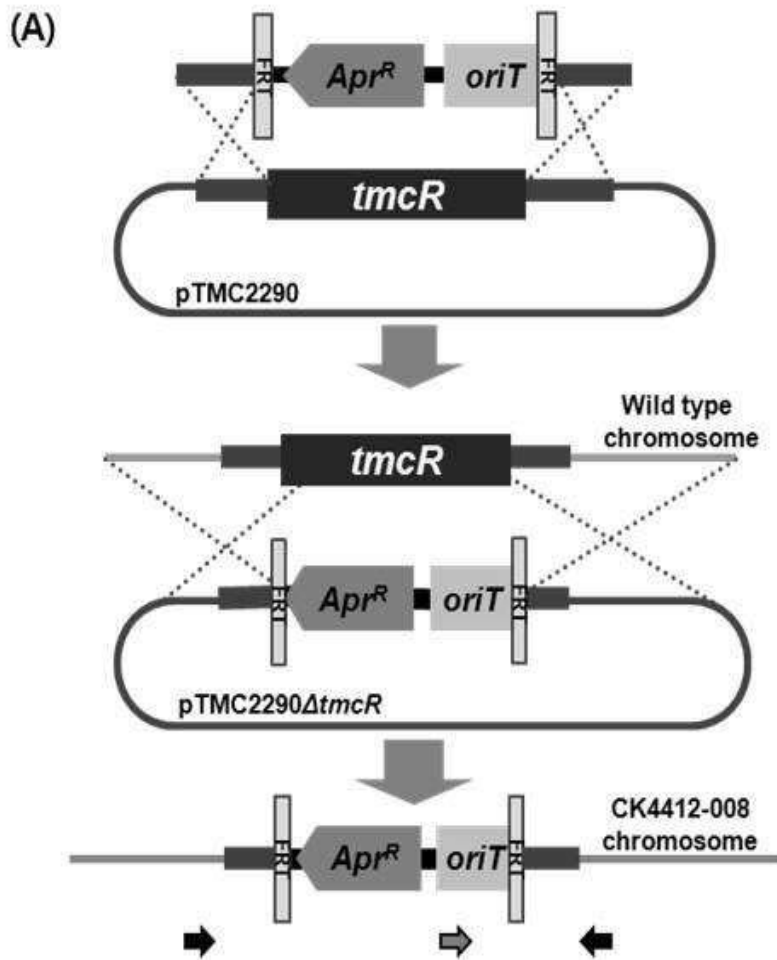
	TMC	5-deoxy TMC	TMC/5-deoxy TMC
PP1	$3.2 \pm 0.3 \times 10^{-3}$	$10.2 \pm 0.4 \times 10^{-3}$	1:3.18
PP2A	$136.5 \pm 0.8 \times 10^{-3}$	$38.3 \pm 0.5 \times 10^{-3}$	1:0.28
SHP2	3.23 ± 0.03	0.9 ± 0.07	1:0.27
NCI-H1299	4.04 ± 0.06	28.7 ± 0.03	1:7.10
Vero	0.68 ± 0.01	2.01 ± 0.02	1:2.95

도면

도면1

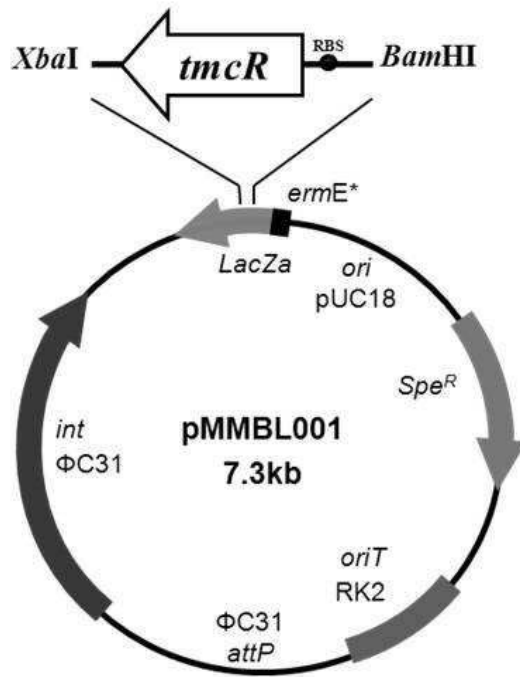


도면2a



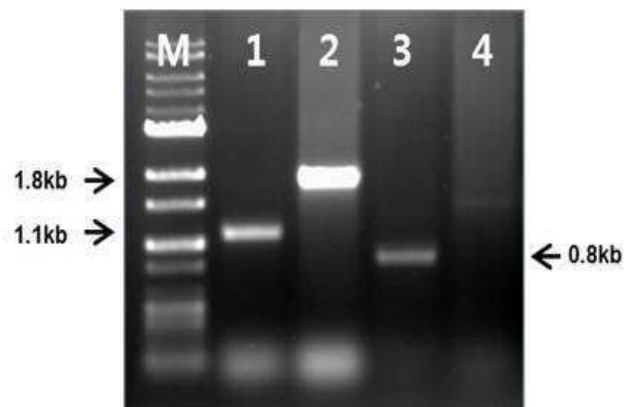
도면2b

(B)

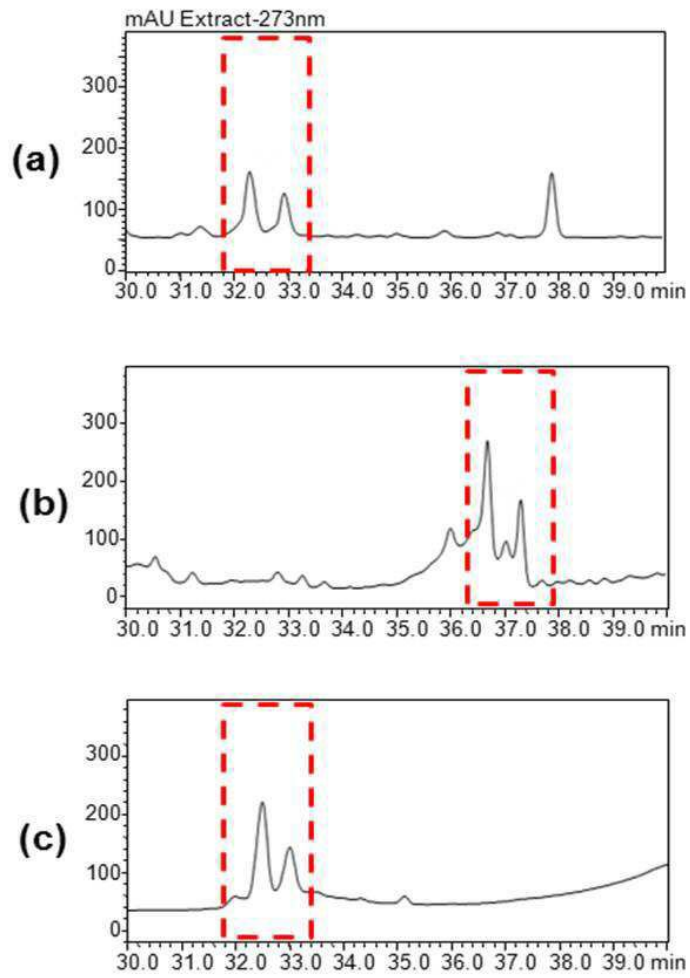


도면2c

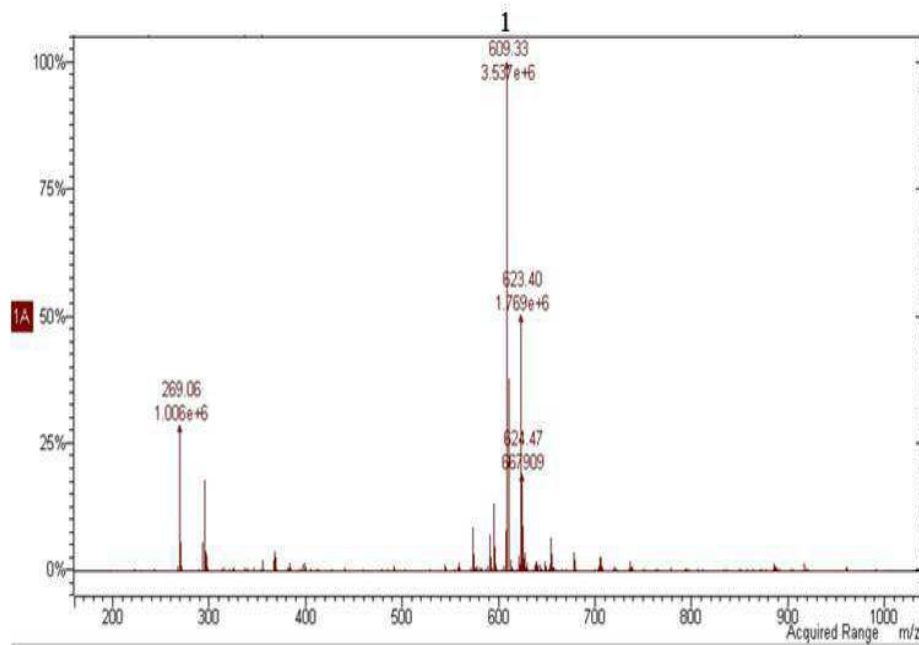
(C)



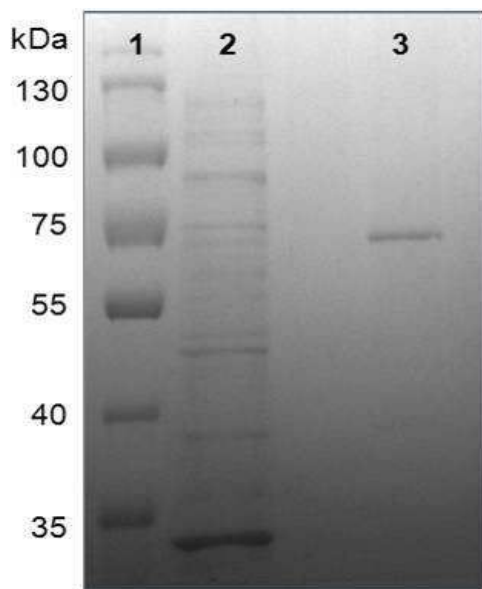
도면3



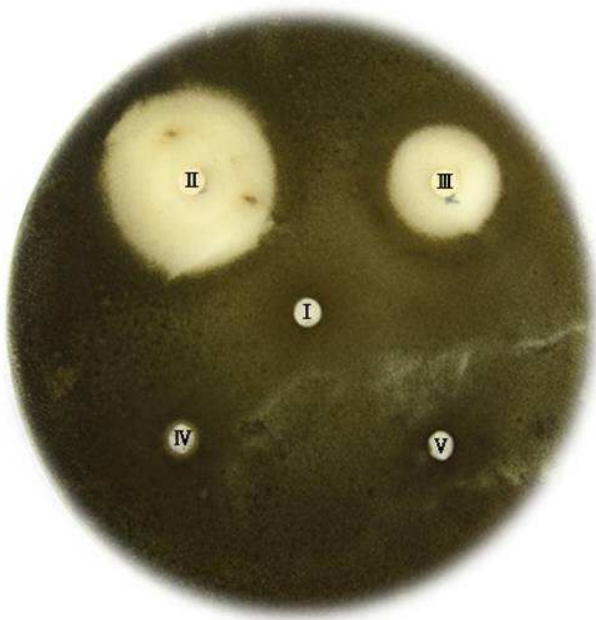
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Preparation method for new tautomycetin analogue with
Streptomyces sp. CK4412 strain and immunosuppressant comprising
tautomycetin analogue as active ingredient
- <130> DP-2012-0362

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for tmcR(PTtmcR-F1)

<400> 1

tacgcgcact acgagacgat gcgctcggac cagcccttcg tcgattccgg ggatccgctg 60

acc 63

<210> 2

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for tmcR(PTtmcR-R1)

<400> 2

gaggcagtag tggatgccag tcgagaacgc caggtgcttg tgtaggctgg agctgcttc 59

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for tmcR(CPtmcR-F2)

<400> 3

agatctactt tccgatctgg tga 23

<210>

> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for tmcR(CPtmcR-R2)

<400> 4

tctagaacgc ctcagcgac cggcgt 26

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for tmcR(CHtmcR-F3)

<400> 5

tgaccgatcc gtcggtac 18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for tmcR(CHtmcR-R3)

<400> 6

tcgccctcca tcttggcc 18