(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월12일
(11) 등록번호 10-2109168
(24) 등록일자 2020년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 498/12 (2006.01) *A61K 31/407* (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01) *A61P 31/10* (2006.01)
C12P 17/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 498/12 (2013.01)
A61K 31/407 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0086646
(22) 출원일자 2019년07월17일
심사청구일자 2019년07월17일
(30) 우선권주장
1020180158864 2018년12월11일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
WO2011068341 A2*
WO1991002736 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
인트론바이오테크놀로지
경기도 성남시 중원구 사기막골로 137, 중앙인더스피아 701~704호 (상대원동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
윤여준
서울특별시 강남구 압구정로 113 (압구정동, 미성아파트) 25동 506호
반용선
서울특별시 송파구 올림픽로47길 9 101동 301호 (풍납동,쌍용아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

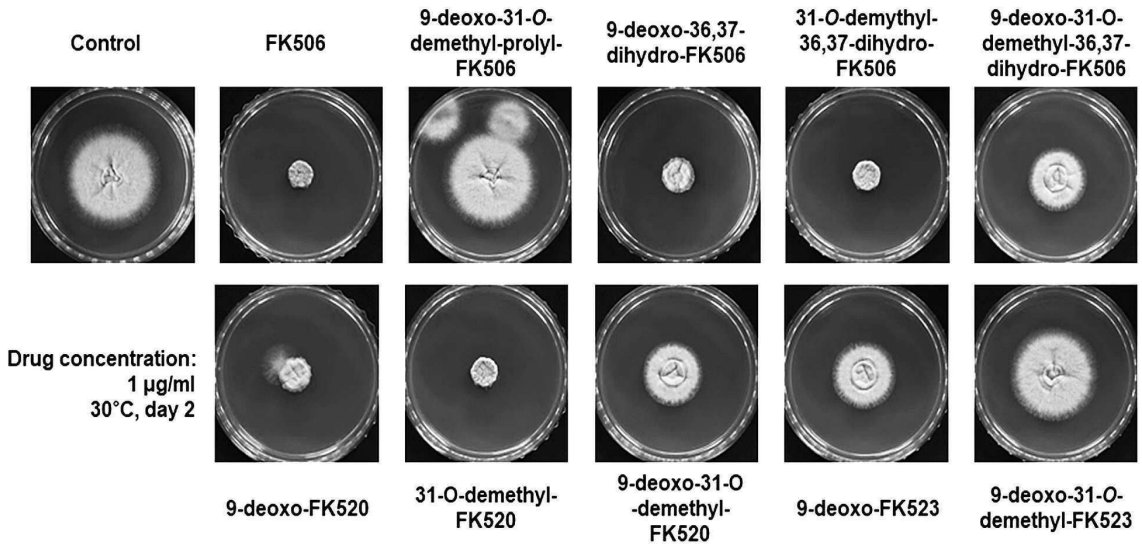
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 **신규 화합물 및 이를 포함하는 진균감염 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 진균감염 치료용 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 항진균 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도56



(52) CPC특허분류
A61K 31/4375 (2013.01)
A61P 31/10 (2018.01)
C12P 17/188 (2013.01)

(72) 발명자
정은지
서울특별시 양천구 목동동로 393 부영그린타운 1차 아파트 801호
윤성준
서울특별시 강남구 선릉로 206, 104동 2302호 (대치동, 동부센트레빌)
강상현
서울특별시 송파구 올림픽로 99, 140동 1602호 (잠실동, 잠실엘스)
전수연
서울특별시 서초구 잠원로8길 35, 103동 902호 (잠원동, 래미안신반포팰리스)
권안성
경기도 광주시 초월읍 현산로 119, 204동 1202호 (우림2차아파트)
유영지
서울특별시 서대문구 독립문로 10, 105동 306호 (삼호아파트)
송명종
서울특별시 영등포구 도림로54길 14, 103동 401호
범지윤
서울특별시 영등포구 당산로 205 해링턴타워 101동 1605호
정진아
서울특별시 노원구 동일로 1009-13 202호 (공릉동,삼성스타빌)
이경태
서울특별시 서대문구 연희로39길 67번지 루미아트 A동 302호
이수정
경기도 용인시 수지구 성복2로 251, 207동 1101호 (성복동, 버들치마을 성복자이2차)
이연선
서울특별시 동대문구 사가정로 65 210동 502호 (전농동,전농래미안크레시티아파트)
황보아름
서울특별시 마포구 신촌로16길 22, 201호
홍주현
서울특별시 서대문구 성산로17길 7-17 오이코스 504호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415156304
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국사업기술진흥원
연구사업명 산업기술혁신사업 -국제공동기술개발사업
연구과제명 구조변형유도체 기반의 신규 항진균제 후보의 산업화 기술 개발
기 여 율 67/100
주관기관 ㈜인트론바이오테크놀로지
연구기간 2017.09.01 ~ 2018.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A2A1A05005078
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 후속연구지원(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 6.6/100
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 6.6/100
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 1.65/100
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 1.65/100
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.30 ~ 2018.12.31

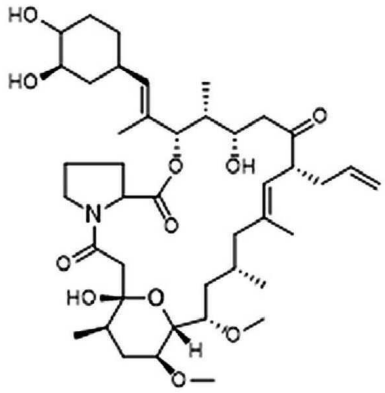
명 세 서

청구범위

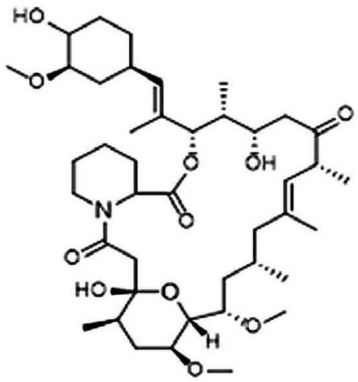
청구항 1

하기의 화학식 1로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506(9-데옥소-31-*O*-디메틸-프롤릴-FK506), 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, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

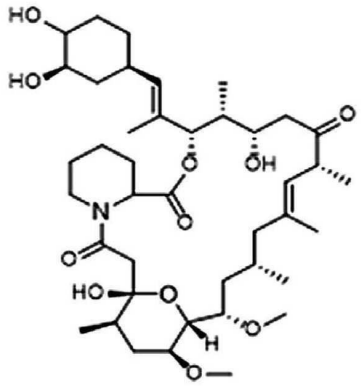
[화학식 1]



[화학식 8]



[화학식 9]



청구항 2

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

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

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

청구항 10

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

청구항 11

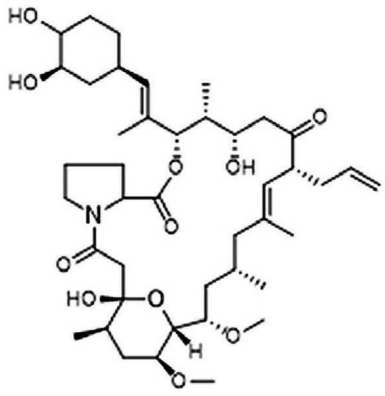
제1항에 있어서, 상기 진균은 크립토콕쿠스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 아스페르길루스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*) 중 하나인 것을 특징으로 하는 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

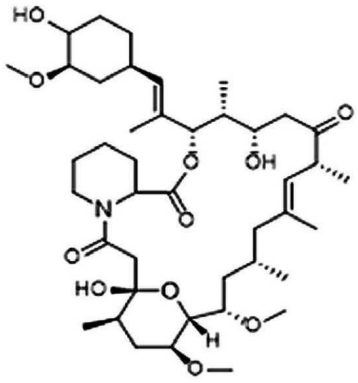
하기의 화학식 1로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506, 하기의 화학식 8로 표시되는 9-deoxo-FK523, 및 하기의 화학식 9로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 진균감염의 예방 또는 치료용

약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 진균감염 치료 방법:

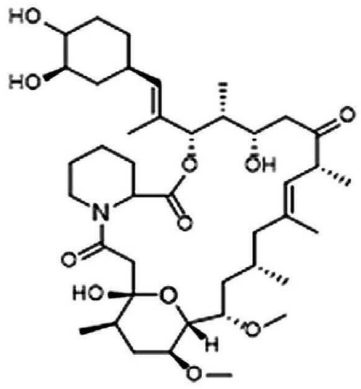
[화학식 1]



[화학식 8]



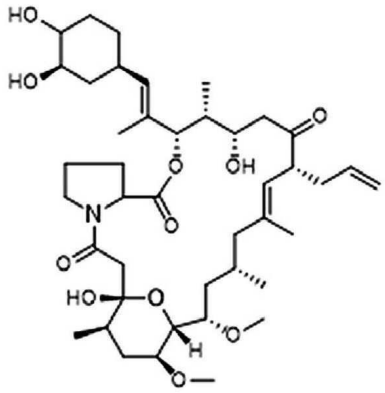
[화학식 9]



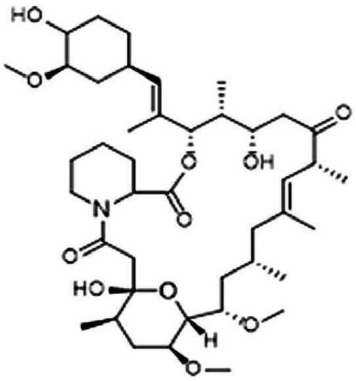
청구항 13

하기의 화학식 1로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506, 하기의 화학식 8로 표시되는 9-deoxo-FK523, 및 하기의 화학식 9로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물:

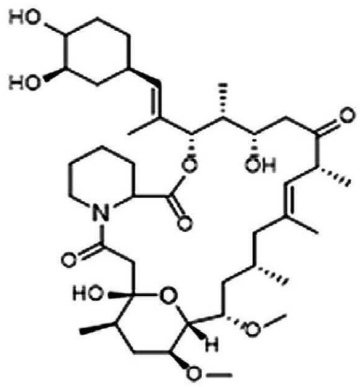
[화학식 1]



[화학식 8]



[화학식 9]



.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 진균은 크립토콕쿠스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 아스페르길루스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*) 중 하나인 것을 특징으로 하는 항진균 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 진균감염의 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), 9-deoxo-FK523(9-데옥소-FK523), 또는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523(9-데옥소-31-*O*-디메틸-FK523)의 제조 및 활용에 관한 것으로, 구체적으로는 상기 신규 화합물, 이의 제조방법, 및 상기 신규 화합물을 유효성분으로 포함하는 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 기회감염성 진균질환은 면역이 억제되거나 저하된 환자에게서 주로 발병하며 치사율이 높다. 최근 고령화로 인하여 면역저하인구의 비중이 높아지고 장기이식 치료방법의 발달에 따른 장기이식 환자의 증가에 따라 병원성 진균증 환자가 매년 급증하고 있다. 전신성 진균증은 건강한 사람에게는 질병을 자주 일으키지 않지만 면역력이 약한 사람에게 기회감염으로 많이 유발되는 질병으로, 그 종류로는 크립토콕쿠스증 (Cryptococcosis), 칸디다증 (Candidiasis), 아스페르길루스증 (Aspergillosis) 등이 있다. 크립토콕쿠스증은 크립토콕쿠스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*)의 감염으로 발병되며 에이즈 (AIDS) 환자와 같이 면역력이 떨어진 환자에게서 피부를 비롯한 인체의 모든 부위에 감염되고, 특히 뇌와 수막에 감염되어 뇌수막염, 뇌농양 및 뇌종양을 일으킨다. 칸디다증은 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*)로 인한 진균증이며, 최초로 아구창 환자에게서 분리되었고 여성의 경우 질염을 일으키고 유아의 기저귀 발진을 유발한다. 아스페르길루스증은 아스페르길루스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*)가 가장 흔한 원인균으로 인체 면역력이 저하된 사람에 주로 감염된다. 감염경로는 환경 중에 존재하는 아스페르길루스의 포자 (분생홀씨)가 호흡 과정을 통해 신체내로 들어와 폐와 부비동, 기관지 등에 주로 감염되어 호흡기 질환을 유발한다.

[0004] 최근에 항암화학요법이나 장기이식 후의 면역억제제 투여로 인한 면역저하 환자나 에이즈 환자의 증가와 함께 전신성 진균 감염증의 발병률은 크게 증가하고 있다. 실제로 암이나 에이즈에 걸린 경우, 환자가 죽는 원인이 병 그 자체보다는 장기나 혈액의 진균감염 때문이라고 알려져 있다. 또한 진균감염의 원인균도 점차 다양해지고 있고 앞으로 더 많은 종류의 진균이 침습성 감염증을 유발할 것으로 예측되고 있다.

[0005] 병원성 진균은 인체와 같은 진핵세포로 이루어져 있어 세포 내 대부분의 생화학적 대사경로가 비슷하기 때문에 숙주를 공격하지 않고 높은 효능을 나타낼 수 있는 진균 특이적 약물이 매우 적다. 현재 가장 널리 사용하고 있는 polyene계 약물 (예, Amphotericin B)과 azole계 약물 (예, Fluconazole)은 각각 신장 독성과 간 독성 등의 심각한 부작용을 나타내고 있어 현재 처방되고 있는 약물들과 비교하여 부작용이나 치료효과 측면에서 보다 개선된 효과를 갖는 항진균 약물의 개발 필요성이 대두되고 있다. 특히, 노령인구의 증가로 인해 고령화 사회로 접어들면서 면역 기능의 저하로 인한 진균류 감염은 점점 더 증가될 것으로 예상되고 있고, 극히 일부 계층에서만 나타났던 감염증이 일반인들에게까지 확산되는 경향이 나타나는 등 향후 진균류에 의한 감염증은 더욱 더 증가할 것으로 전망되고 있기 때문에 새로운 항진균 약물의 개발은 매우 필요하다고 할 수 있다.

[0006] 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 β2-작용제의 신규한 용도를 개시하고 있으나, 본 발명에서 개시하고 있는 FK506 유도체, FK520 유도체 또는 FK523 유도체를 진균 감염을 치료하는 데 적용한 사례는 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자들은 다양한 노력을 한 결과로 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 주요 성분으로 활용이 가능한 신규 화합물9-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 항진균 효과를 규명하고, 이들의 제조공정을 개발하고, 더 나아가 이들을 유효성분으로 활용한 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개발하고, 이 조성물이 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서 효과적으로 활용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 상기 9종 신규 화합물, 이의 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 하나의 목적은 9종 신규 화합물 중 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 9종 신규 화합물의 이성질체 또는 약제학적으로 허용 가능한 염 중 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 9종 신규 화합물 각각의 생물학적 제조방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 9종 신규 화합물의 생물학적 제조공정에 이용될 수 있는 생산 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM (수탁번호 KCTC13581BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsD (수탁번호 KCTC13580BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13584BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13585BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsB (수탁번호 KCTC13579BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13583BP), 및 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13582BP)를 제공하는 것이다.

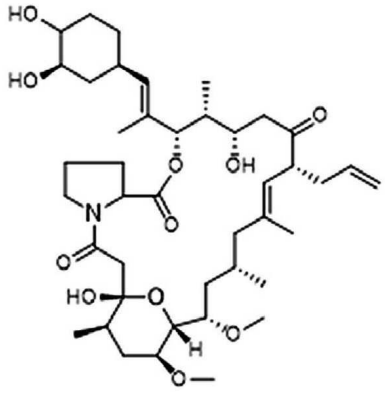
[0020] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 9종 신규 화합물 중 선택된 하나 이상, 이의 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 9종 신규 화합물의 제조공정, 제조공정을 이용하여 제조한 각 신규 화합물을 포함하는 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 항진균 조성물 및 상기 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용한 진균감염 질환에 대한 치료방법을 제공한다.

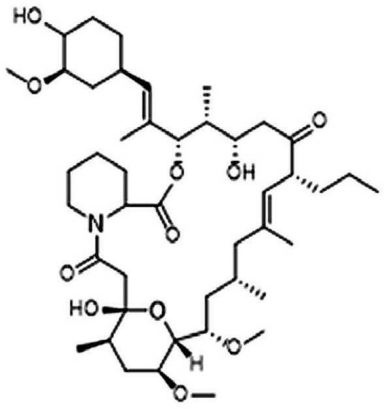
[0023] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 9종 신규 화합물, 하기 [화학식 1]로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506, 하기 [화학식 2]로 표시되는 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506, 하기 [화학식 3]으로 표시되는 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 하기 [화학식 4]로 표시되는 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506, 하기 [화학식 5]로 표시되는 9-deoxo-FK520, 하기 [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 허용 가능한 염을 제공한다.

[0024] [화학식 1]



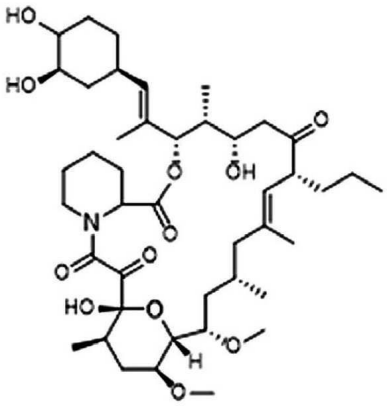
[0025]

[0026] [화학식 2]



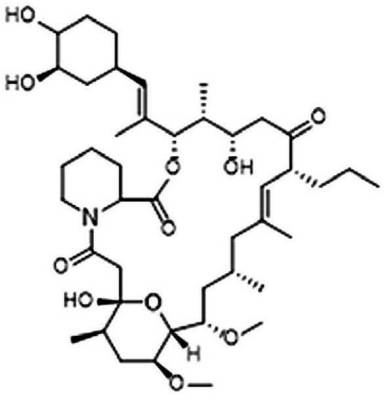
[0027]

[0028] [화학식 3]



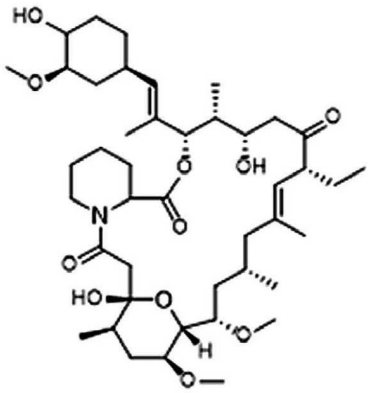
[0029]

[0030] [화학식 4]



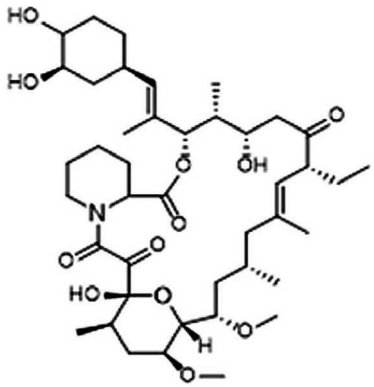
[0031]

[0032] [화학식 5]



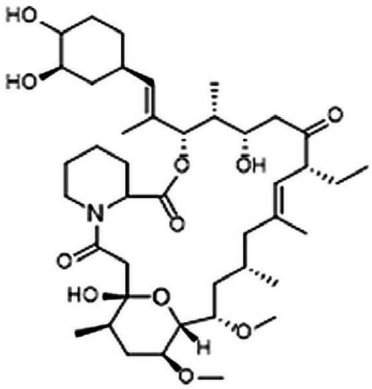
[0033]

[0034] [화학식 6]



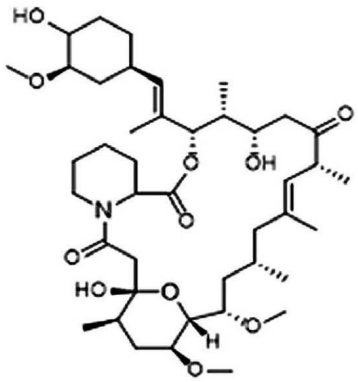
[0035]

[0036] [화학식 7]



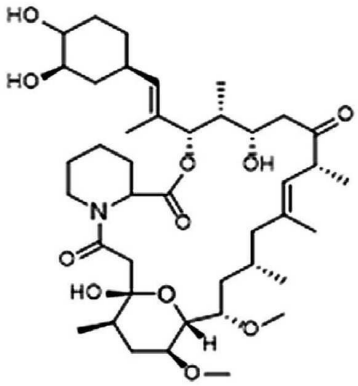
[0037]

[0038] [화학식 8]



[0039]

[0040] [화학식 9]



[0041]

[0042]

[0043] 본 발명에서 사용된 용어, "FK506, 타크롤리무스(tacrolimus) 또는 푸지마이신(fujimycin)"은 다양한 스트렙토마이세스 쯔꾸바엔시스 (Streptomyces tsukubaensis)로부터 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.

[0044] 본 발명에서 사용된 용어, "FK520 또는 아스코마이신(ascomycin)"은 역시 면역억제제로서, 23개의 탄소로 형성되는 매크로리드 구조의 화합물이며, FK506의 C21 위치의 에틸 유사체이다.

[0045] 본 발명에서 사용된 용어, "FK523"는 FK506의 C21 위치의 메틸 유사체이다.

[0047] 하나의 구체예로서, 본 발명의 화합물은 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다.

[0048] 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.

[0049] 약제학적으로 허용 가능한 염은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서, 이 염에 기인한 부작용이 모체 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미할 수 있다. 예를 들어 상기 염은 약학적으로 허용 가능한 유리산 (Free acid)에 의해 형성된 산부가염일 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동 몰량의 화합물 및 물중의 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 허용 가능한 금속염일 수 있다.

[0050] 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.

[0051] 본 발명의 약학적 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있고, 공인된 진균감염 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.

[0052] 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 공계면활성제 (Co-surfactant); 크레모포어 (Cremophor), 트윈 (Tween), 미르지 (Myrj), 폴록사머 (Poloxamer), 플루로닉 (Pluronic), 루트롤 (Lutrol), 임비토르 (Imwitor), 스판 (Span), 라브라필 (Labrafil) 등의 단독 또는 혼합물로 예시할 수 있는 계면활성제 (Surfactant); 미그리올 (Miglyol), 캅텍스 (Captex), 에틸올레이트 (Ethyl oleate) 등의 단독 또는 혼합물로 예시할 수 있는 오일 (Oil); 및, 에리소르빈산 (Erythorobic 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.

[0053] 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.

[0054] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 진균감염 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0055] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 진균감염 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 모든 동물을 의미할 수 있다.

[0056] 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.

[0057] 본 발명의 약학적 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.

[0058] 본 발명의 약학적 조성물은 0.001 ng/ml 내지 2000 ng/ml일 수 있으며, 바람직하게는 10 ng/ml 내지 1000 ng/ml일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 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.

[0061] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0062] 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.

[0064] 본 발명의 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 진균감염의 예방 또는 치료 목적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 진균의 사멸활성을 나타내므로, 진균이 감염된 개체에 투여되어 감염 진행을 감속, 중단(interrupting), 또는 저지(arresting)시킬 수 있다.

[0065] 여기에서 진균 감염은 *Candida*spp.; *Aspergillus*spp.; *Cryptococcus neoformans*; *Sporothrixschenckii*; *Epidermophytonfloccosum*; *Microsporum*spp.; *Trichophyton* spp; *Fusarium*spp.; *Rhizomucor*spp.; *Mucorcircinelloides*; *Rhizopus* spp.; *Malasseziafurfur*; *Acremonium*spp.; *Paecilomyces*; *Scopulariopsis*; *Arthrographis*spp.; *Scytalidium*; *Scedosporium*spp.; *Trichoderma* spp.; *Penicillium*spp.; *Penicilliummarneffei*; 및 *Blastoschizomyces*; 에서 선택되는 어느 하나 이상에 의한 감염일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명의 진균감염 질환은 크립토콕쿠스 속 곰팡이, 칸디다 속 곰팡이 및 아스페르길루스 속 곰팡이에 의한 진균 감염일 수 있다.

[0067] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명의 상기 약학적 조성물을 진균감염 질환의 발병 가능성이 있거나 상기 질환이 의심되는 증상 또는 상태를 가진 개체에게 투여하여 진균감염 질환의 발병 가능성을 낮추거나 상기 증상 또는 상태를 완화하는 행위를 의미한다.

[0068] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 진균감염 질환 발병 의심 개체에 투여하여 진균감염 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[0070] 본 발명의 일 구체예에서는 상기 9종 신규 화합물의 면역억제활성 효과를 인비트로 T세포 활성분석법으로 확인하여 FK506 보다 감소된 면역억제활성을 확인할 수 있었다.

[0071] 또한, 본 발명의 다른 구체예에서는 상기 9종 신규화합물의 크립토콕쿠스 속 곰팡이, 칸디다 속 곰팡이 및 아스페르길루스 속 곰팡이의 사멸을 확인하여 항진균 활성을 확인할 수 있었다.

[0072] 본 발명의 또 다른 구체예에서는 상기 9종 신규화합물의 진균감염 치료효과를 크립토크립토콕쿠스 속 곰팡이, 칸디다 속 곰팡이에 감염된 질환동물모델의 생존율 증가로 확인할 수 있었다.

[0073] 상기 결과는 상기 9종 신규화합물이 면역억제활성에 기인한 부작용 없는 항진균 효과 및 진균감염의 치료효과를 확인한 바, 진균감염의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0075] 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.

[0076] 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.

[0077] 또한, 상기 제조공정에서는 배양공정의 pH를 6.5-9 사이로 유지하는데, 바람직하게는 배양 pH를 7-8로 유지한다.

[0078] 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.

[0079] 상기 제조공정에서의 배양 세포체로부터의 생산된 9종 신규 화합물의 추출은 1차 추출공정, 2차 추출공정 및 3차 추출 공정의 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.

[0080] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 9종 신규 화합물의 제조에 이용될 수 있는

생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM (수탁번호 KCTC13581BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsD (수탁번호 KCTC13580BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13584BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13585BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsB (수탁번호 KCTC13579BP), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13583BP), 및 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13582BP)를 제공한다.

[0082] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 9종 신규 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 항진균 조성물을 제공한다. 상기 9종 신규화합물, 이성질체, 약제학적으로 허용 가능한 염은 상기 기재와 동일하다.

[0083] 상기 9종 신규화합물, 그의 이성질체, 또는 약제학적으로 허용 가능한 염은 항진균 활성을 발휘할 수 있으므로, 항진균 조성물로 사용될 수 있다.

[0084] 상기에서 진균은 *Candida*spp.; *Aspergillus*spp.; *Cryptococcus neoformans*; *Sporothrixschenckii*; *Epidermophytonfloccosum*; *Microsporum*spp.; *Trichophyton* spp; *Fusarium*spp.; *Rhizomucor*spp.; *Mucorcircinelloides*; *Rhizopus* spp.; *Malasseziafurfur*; *Acremonium*spp.; *Paecilomyces*; *Scopulariopsis*; *Arthrographis*spp.; *Scytalidium*; *Scedosporium*spp.; *Trichoderma* spp.; *Penicillium*spp.; *Penicilliummarneffei*; 및 *Blastoschizomyces*; 에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서 항진균 활성은 크립토콕쿠스 속 곰팡이, 칸디다 속 곰팡이 및 아스페르길루스 속 곰팡이에 의한 항진균 활성일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0086] 본 발명에 따른 9종 신규 화합물 중 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 기존 항진균 약물에 비교하여 다른 작용기전을 제공해 줄 수 있으며, 이에 더하여 보다 우수한 약물 안전성을 제공해 줄 수 있어, 기존 항진균 약물에 의한 치료 효과가 낮은 경우나 기존 항진균 약물에 의한 치료 시에 부작용이 있었던 경우에 대체하여 효과적으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0088] 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}H-NMR) 결과이다.

도 3은 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (^{13}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}H-NMR) 결과이다.

도 9는 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506에 대한 핵자기공명 분석 (^{13}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 (^{1}H-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 (^{1}H-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 (^{1}H-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 (^{1}H-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 (^{1}H-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 (^{1}H-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 (^{1}H-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 아스페르길루스 푸미가투스에 대한 항진균 활성을 조사한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] 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.

[0091] **실시예 1: 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506 제조**

[0092] 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-프래임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbD-fkbM* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM (수탁번호 KCTC13581BP)을 제작하였다.

[0093] 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.

[0094] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프래임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0095] 인-프래임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인프래임 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.

[0096] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)와 31-*O*-메틸변환효소를 함께 제거하기 위한 플라스미드, p△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℃ (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 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 ΔfkbD-fkbM를 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0097] 제작한 *fkbD-fkbM* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM은 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13581BP).

표 1

[0099] 사용한 균주와 플라스미드 정보

Strain/vector	Reievant characteristic
Bacterial strains	
Escherichia coli	
DH5α	Host for general cloning
ET12567/pUZ8002	Donor strain for intergeneric conjugation between *E.coli* and *streptomyces*
Streptomyces	
Streptomyces kanamyceticus	Wild-type FK506 producing strain
△fkbD-fkbM	Mutant of *S. kanamyceticus* with an in-frame deletion of fkbD-fkbM
△fkbD-fkbM,tcsB	Mutant of *S. kanamyceticus* with an in-frame deletion of fkbD-fkbM,tcsB
△fkbD-fkbM,tcsD	Mutant of *S. kanamyceticus* with an in-frame deletion of fkbD-fkbM,tcsD
△fkbD,tcsD	Mutant of *S. kanamyceticus* with an in-frame deletion of fkbD,tcsD
△fkbD,tcsB	Mutant of *S. kanamyceticus* with an in-frame deletion of fkbD,tcsB
△fkbM,tcsD	Mutant of *S. kanamyceticus* with an in-frame deletion of fkbM,tcsD
△fkbM,tcsB	Mutant of *S. kanamyceticus* with an in-frame deletion of fkbM,tcsB
Plasmid	
pKC1139	High-copy-number temperature-sensitive *E. coli* -*Streptomyces* shuttle vector
p△fkbD	Deletion plasmid with in-frame deletion of 51-bp internal fkbD fragment
p△fkbM	Deletion plasmid with in-frame deletion of 507-bp internal fkbD fragment
p△fkbD-fkbM	Deletion plasmid with in-frame deletion of 1100-bp internal fkbDM fragment
p△tcsB	Deletion plasmid with in-frame deletion of 2090-bp internal tcsB fragment
p△tcsD	Deletion plasmid with in-frame deletion of 1154-bp internal tcsD fragment

표 2

[0100] 사용한 프라이머 정보

Primer	Sequence 5' to 3' (Restriction site underlined)	Restriction enzyme
FkbDLF	TATAAAGCTTCGGAGCCCCGGTGGACCT	HindIII
FkbDLR	TTAATCTAGACGTCGCCTCGTCGTCGCT	XbaI
FkbDRF	GTAATCTAGAGTCGGCTACTGCCTCTAC	XbaI
FkbDRR	GAATGAATTCCGACGAACAGCGGTTCCT	EcoRI
FkbMLF	TACGAAGCTTTCTGTTCGGCATCCAGCA	HindIII
FkbMLR	TAGCTCTAGAGTCACCCGGGAGCAGTTC	XbaI
FkbMRF	TATATCTAGAGACACCGAAGGCGCGCTC	XbaI
FkbMRR	TTAAGAATTCGAACACCGAGGCCGTCCA	EcoRI
FkbD-MLF	TATAAAGCTTCGGAGCCCCGGTGGACCT	HindIII
FkbD-MLR	TTAATCTAGACGTCGCCTCGTCGTCGCT	XbaI
FkbD-MRF	TATATCTAGAGACACCGAAGGCGCGCTC	XbaI
FkbD-MRR	TTAAGAATTCGAACACCGAGGCCGTCCA	EcoRI
TcsBLF	GACAAGCTTATGCTGGCGGTGAAGGCG	HindIII
TcsBLR	CCGTCTAGACCAGAAGGAATCGAGCCGGAA	XbaI
TcsBRF	CAGTCTAGAGTGATCCGTGCCCTGCACTCC	XbaI
TcsBRR	GCCGAATTCGATGACGATGTCCGGGTCG	EcoRI
TcsDLF	GCTAAGCTTCTCAGGCGTCTGCGGATGC	HidIII
TcsDLR	ATCGGATCCTTCGCTCACCGGGGCTGCC	BamHI
TcsDRF	AGCAGATCTGGCATGTTCTGGTCAGTCC	BglI
TcsDRR	GTCGAATTCCATGCCACGAACGGGTCGA	EcoRI

[0101] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-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 (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-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 충진된 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.

[0102] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 1]로 표시되는 물질인 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506을 얻을 수 있었다.

[0103] 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 ΔfkbD-fkbM으로부터 9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0105] 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

[0106]

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)

[0107] ^{1}H, ^{13}C-NMR로부터 특징적인 작용기로써 1개의 ketone 탄소(δ_C 214.00)와 2개의 carbonyl 탄소(δ_C 171.99, 170.09), exomehtylene 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_2작용기가 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_2로 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.

[0109] **실시예 2: 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506 제조**

[0110] 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-프래임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbD* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsD (수탁번호 KCTC13580BP)를 제작하였다.

[0111] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *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.

[0112] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프래임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0113] 인-프래임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프래임 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, *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.

[0114] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)를 제거하기 위한 플라스미드, p△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℃ (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 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 ΔfkbD를 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선

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

[0115] 제작한 *fkbD* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD에 p△tcsD를 도입하여 *fkbD* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. ΔfkbD,tcsD는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0116] 제작한 *fkbD*, *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsD는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13580BP).

[0117] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,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, 미량원소 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-36,37-dihydro-FK506을 추출하였다.

[0118] 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 충진된 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.

[0119] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 2]로 표시되는 물질인 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506을 얻을 수 있었다.

[0120] 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 ΔfkbD,tcsD로부터 9-deoxo-36,37-dihydro-FK506이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0122] 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

[0123]

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)

[0124] ^{1}H, ^{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_2작용기(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.

[0126] **실시예 3: 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506 제조**

[0127] 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-프래임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbM* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13584BP)를 제작하였다.

[0128] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *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.

[0129] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프래임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0130] 인-프래임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프래임 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. *fkbM* 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.

[0131] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. 31-*O*-메틸변환효소를 제거하기 위한 플라스미드, pΔfkbM은 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℃ (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 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 ΔfkbM을 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0132] 제작한 *fkbM* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM에 pΔtcsD를 도입하여 *fkbM* 유전자 결

손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. ΔfkbM,tcsD는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0133] 제작한 *fkbM*, *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsD는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13584BP).

[0134] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,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 (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 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506을 추출하였다.

[0135] 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 충진된 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.

[0136] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 3]으로 표시되는 물질인 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506을 얻을 수 있었다.

[0137] 제조한 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506의 확인은 다음과 같이 실시하였다. 구체적으로, 고성능액체크로마토그래피 분석 (High performance liquid chromatography analysis), 질량분석 (Mass spectrometry), 핵자기공명분석 (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 ΔfkbM,tcsD로부터 31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0139] 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

[0140]

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 31-*O*-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)

[0141] ^{1}H, ^{13}C-NMR 및 gHSQC로부터, 총 탄소수 43개로써, ketone 탄소 (δ_C 196.54)가 추가 관측되었고, 2개의 메톡시가 관측되어, ΔfkbM 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.

[0143] **실시예 4: 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506 제조**

[0144] 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-프래임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbD-fkbM* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13585BP)을 제작하였다.

[0145] 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.

[0146] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프래임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0147] 인-프래임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프래임 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.

[0148] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)와 31-*O*-메틸변환효소를 함께 제거하기 위한 플라스미드, p△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℃ (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 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 ΔfkbD-fkbM을 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0149] 제작한 *fkbD-fkbM* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM에 p△tcsD를 도입하여 *fkbD-fkbM* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. ΔfkbD-fkbM,tcsD는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0150] 제작한 *fkbD-fkbM* 및 *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsD는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13585BP).

[0151] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13585BP)의 배양을 통하여 9-deoxo-31-*O*-demethyl-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℃, 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.

[0152] 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 충진된 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.

[0153] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 4]로 표시되는 물질인 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506을 얻을 수 있었다.

[0154] 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 ΔfkbD-fkbM,tcsD로부터 9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0156] 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

[0157]

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-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)

[0158] ^{1}H, ^{13}C-NMR 및 gHSQC로부터, 총 탄소수 43개로 동일한 개수로 이뤄져 있으나, ΔfkbD의 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 ΔfkbD-fkbM 유전자로부터 만들어진 9-deoxo-31-*O*-demethyl-35,37-dihydro-FK506로 구조 결정하였다.

[0160] **실시예 5: 9-deoxo-FK520 제조**

[0161] 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-프래임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbD* 및 *tcsB* 유전자 또는 *fkbD* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-FK520의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsB (수탁번호 KCTC13579BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsD (수탁번호 KCTC13580BP)을 제작하였다.

[0162] 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.

[0163] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프래임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0164] 인-프래임(In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프래임 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.

[0165] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)를 제거하기 위한 플라스미드, p△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℃ (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 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 ΔfkbD를 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0166] 제작한 *fkbD* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD에 p△tcsB 또는 p△tcsD를 도입하여 *fkbD* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsB* 유전자 또는 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. ΔfkbD,tcsB 또는 ΔfkbD,tcsD는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0167] 제작한 *fkbD*, *tcsB* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsB는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였고 (수탁번호 KCTC13579BP), *fkbD*, *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsD도 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁

번호 KCTC13580BP).

[0168] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsB (수탁번호 KCTC13579BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,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 (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-FK520을 추출하였다.

[0169] 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 충진된 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.

[0170] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 5]로 표시되는 물질인 9-deoxo-FK520을 얻을 수 있었다.

[0171] 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 ΔfkbD,tcsB 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsD로부터 9-deoxo-FK520이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0173] 9-deoxo-FK520 (분자식 $C_{43}H_{71}NO_{11}$, 분자량 778.04)에 대한 분석 결과를 하기의 표 7에 나타내었다.

표 7

[0174]

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 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)

[0175] ^{1}H, ^{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.

[0177] **실시예 6: 31-*O*-demethyl-FK520 제조**

[0178] 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-프래임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbM* 및 *tcsB* 유전자 또는 *fkbM* 및 *tcsD* 유전자의 비활성화를 초래하여 31-*O*-demethyl-FK520의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13583BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13584BP)을 제작하였다.

[0179] 구체적으로 설명하면, FK506을 생산하는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 균주에서 *fkbM* 및 *tcsB* 유전자의 결손 돌연변이체 또는 *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.

[0180] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프래임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0181] 인-프래임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프래임 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. *fkbM* 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.

[0182] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. 31-*O*-메틸변환효소를 제거하기 위한 플라스미드, p△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℃ (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 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 ΔfkbM을 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0183] 제작한 *fkbM* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM에 p△tcsB 또는 p△tcsD를 도입하여 *fkbM* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsB* 유전자 또는 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. ΔfkbM,tcsB 또는 ΔfkbM,tcsD는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0184] 제작한 *fkbM*, *tcsB* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsB는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였고 (수탁번호 KCTC13583BP), *fkbM*, *tcsD* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsD도 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13584BP).

[0185] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13583BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,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 (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 31-*O*-demethyl-FK520을 추출하였다.

[0186] 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 충진된 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.

[0187] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 6]으로 표시되는 물질인 31-*O*-demethyl-FK520을 얻을 수 있었다.

[0188] 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 ΔfkbM,tcsB 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbM,tcsD로부터 31-*O*-demethyl-FK520이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0190] 31-*O*-demethyl-FK520 (분자식 $C_{42}H_{67}NO_{12}$, 분자량 777.99)에 대한 분석 결과를 하기의 표 8에 나타내었다.

표 8

[0191]

분석법	분석결과
고성능액체크로마토그래피 분석	HPLC의 이동상은 45-55% 아세토니트릴수용액을 사용하였고 유량은 1 ml/min이었고 205 nm의 UV 검출기로 분석하였다. 이때의 31-*O*-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)

[0192] 분자량 800.4563으로 확인된 6번 화합물은 분자량 800.4924 및 800.4927 매우 유사한 분자량을 보였으나, ^{1}H, ^{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.

[0194] **실시예 7: 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520 제조**

[0195] 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-프래임 (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 ΔfkbD-fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13582BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsD (수탁번호 KCTC13585BP)를 제작하였다.

[0196] 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.

[0197] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프래임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0198] 인-프래임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프래임 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. *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.

[0199] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)와 31-*O*-메틸변환효소를 함께 제거하기 위한 플라스미드, p△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℃ (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 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 ΔfkbD-fkbM을 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0200] 제작한 *fkbD-fkbM* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM에 p△tcsB 또는 p△tcsD를 도입하여 *fkbD-fkbM* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsB* 유전자 또는 *tcsD* 유전자를 결실시켰다. ΔfkbD-fkbM,tcsB 또는 ΔfkbD-fkbM,tcsD는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0201] 제작한 *fkbD-fkbM* 및 *tcsB* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-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 ΔfkbD-fkbM,tcsD도 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13585BP).

[0202] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13582BP) 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-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℃, 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-FK520을 추출하였다.

[0203] 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 충진된 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.

[0204] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 7]로 표시되는 물질인 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520을 얻을 수 있었다.

[0205] 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 ΔfkbD-fkbM,tcsB 또는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsD로부터 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0207] 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

[0208]

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)

[0209] ^{1}H, ^{13}C-NMR 및 gHSQC 데이터로부터, 탄소수가 총 42개로 31-*O*-demethyl-FK520와 유사한 결과를 보였으나, ΔfkbD-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.

[0211] **실시예 8: 9-deoxo-FK523 제조**

[0212] 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-프래임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbD* 및 *tcsB* 유전자 의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-FK523의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsB (수탁번호 KCTC13579BP)를 제작하였다.

[0213] 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.

[0214] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프래임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0215] 인-프래임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프래임 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. 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.

[0216] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)를 제거하기 위한 플라스미드, p△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℃ (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 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 ΔfkbD를 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0217] 제작한 *fkbD* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD에 p△tcsB를 도입하여 *fkbD* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsB* 유전자를 결실시켰다. ΔfkbD,tcsB는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0218] 제작한 *fkbD*, *tcsB* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsB는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13579BP).

[0219] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,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 (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-FK523을 추출하였다.

[0220] 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 충진된 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.

[0221] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 8]로 표시되는 물질인 9-deoxo-FK523을 얻을 수 있었다.

[0222] 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 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD,tcsB로부터 9-deoxo-FK523이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0224] 9-deoxo-FK523 (분자식 $C_{42}H_{69}NO_{11}$, 분자량 764.01)에 대한 분석 결과를 하기의 표 10에 나타내었다.

표 10

[0225]

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)

[0226] 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520 분자량과 동일한 분자량을 갖고 있으며, ^{1}H, ^{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 pipecolyl 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.

[0228] **실시예 9: 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523 제조**

[0229] 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-프래임 (In-frame) 결실 방법을 사용하여 *fkbD-fkbM* 및 *tcsB* 유전자의 비활성화를 초래하여 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523의 생산균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13582BP)를 제작하였다.

[0230] 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.

[0231] 균주제작 방법은 보다 구체적으로 인-프래임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작, 유전자 결실 균주 제작으로 설명할 수 있다.

[0232] 인-프래임 (In-frame) 유전자 결실 플라스미드 (Plasmids)의 제작은 대장균-방선균 셔틀 (*E. coli-Streptomyces shuttle*) 벡터 pKC1139를 인-프래임 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. *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.

[0233] 유전자 결실 균주 제작을 위해 사용한 플라스미드는 표 1에 요약하였다. C9 수산화효소 (Hydroxylase)와 31-*O*-메틸변환효소를 함께 제거하기 위한 플라스미드, p△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℃ (pSG5-기본으로 하는 복제단위 (Replicon)를 위한 비-증식 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 ΔfkbD-fkbM을 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0234] 제작한 *fkbD-fkbM* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM에 p△tcsB를 도입하여 *fkbD-fkbM* 유전자 결손 방법과 동일한 방법을 이용하여 *tcsB* 유전자를 결실시켰다. ΔfkbD-fkbM,tcsB는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고, 그 후에 PCR로 확인하였고, 선택적으로 서던 블록 분석으로 확인하였다.

[0235] 제작한 *fkbD-fkbM* 및 *tcsB* 유전자 결손 균주인 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsB는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2018년 7월 17일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCTC13582BP).

[0236] 상기 제작한 생산균주 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 ΔfkbD-fkbM,tcsB (수탁번호 KCTC13582BP)의 배양을 통하여 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523을 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℃, 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.

[0237] 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 충진된 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.

[0238] 이를 동결건조시켜 분말형태의 [화학식 9]로 표시되는 물질인 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523을 얻을 수 있었다.

[0239] 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 ΔfkbD-fkbM,tcsB로부터 9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523이 생산됨을 확인할 수 있었다.

[0241] 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

[0242]

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-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

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)

[0243] ^{1}H, ^{13}C-NMR 및 gHSQC 데이터로부터, 탄소수가 총 41개로 9-deoxo-FK523와 달리, 메톡시 1개가 부족함을 알 수 있었다. 이와 함께, ΔfkbD-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.

[0245] **실시예 10: 9종 신규 화합물의 면역억제활성 조사**

[0246] 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.

[0247] 6~8주령의 B6J 실험용 쥐의 지라 (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.

[0248] 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

[0250]

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

[0251] 이러한 결과로부터, 본 발명에 따른 9종 신규 화합물들이 FK506에 비교하여 면역억제활성이 크게 감소되었음을 확인할 수 있었으며, 9종의 신규 화합물이 최소 100배 이상의 IC_{50} (ng/ml) 농도를 보임에 따라 면역억제활성이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다. 이로부터 9종 신규 화합물 중 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 진균감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 면역억제활성에 기인한 부작용에 대한 염려 없이 사용할 수 있다고 판단하였다.

[0253] **실시예 11: 9종 신규 화합물의 항진균 활성 조사 (*in vitro*)**

[0254] 본 발명의 신규 화합물 9종의 항진균 활성을 조사해 보았다. 구체적으로, 9종 신규 화합물 각각을 1 ml의 castor oil solution [dehydrated ethanol : PEG40 castor oil (80 : 20, v/v) (Sigma-Aldrich)] 에 녹여 시

험시료를 제조하고, 이를 항진균 활성 조사에 사용하였다. 9종 신규 화합물의 항진균 활성을 확인하는 방법으로는 1) 미량 희석법 (EUCAST broth microdilution assay)과 2) 성장 저해 정도 (Growth inhibition) 확인 시험법이 이용되었다. 상세하게 미량 희석법으로는 크립토콕쿠스 속 곰팡이, 칸디다 속 곰팡이 및 아스페르길루스 속 곰팡이의 사멸 정도를 조사하였고, 성장 저해 정도 확인 시험법으로는 대표적으로 아스페르길루스 속 곰팡이의 사멸 정도를 조사하였다. 한편, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 제형예로 castor oil solution을 사용하였으나, 상기의 제형예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 제형예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0256] **1) 미량 희석법 (EUCAST broth microdilution assay)**

[0257] 30℃의 YPD 아가 배지에서 20시간 동안 자란 크립토콕쿠스 네오포르만스 및 아스페르길루스 푸미가투스 균의 단일 콜로니는 RPMI1640 배지에 현탁하였고, 동일한 조건에서 자란 칸디다 알비칸스 균의 단일 콜로니는 FBS 배지에 현탁하였다. 0.01 OD/ml의 진균을 포함하는 RPMI1640 배지 현탁액 또는 FBS 배지 현탁액을 96-웰 미세 희석 플레이트에 seeding한 다음 여기에 100 μl 부피의 FK506 또는 9종 신규 화합물을 첨가하였다. 96-웰 미세 희석 플레이트를 35℃또는 37℃에서 48 시간 동안 배양한 다음 세포의 성장 정도를 흡광도 (OD_{600})로 측정하여 항진균 활성을 비교 평가하였다. 실험 결과는 표 13과 같았다.

표 13

[0259]

Structural analogs	*Cryptococcus neoformans*	*Candida albicans*	*Aspergillus fumigatus*
	IC_{50} (μg/ml)		
9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506	221.1	3444	> 50
9-deoxo-36,37-dihydro-FK506	0.151	0.817	14.07
31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506	0.033	0.059	0.415
9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506	8.846	4.264	> 50
9-deoxo-FK520	0.355	0.662	7.822
31-*O*-demethyl-FK520	0.027	0.079	12.21
9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520	3.297	2.847	306
9-deoxo-FK523	2.466	6.073	230
9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523	54.54	837	> 50

[0260] 이상의 결과로 9종 신규 화합물이 크립토콕쿠스 네오포르만스, 아스페르길루스 푸미가투스, 칸디다 알비칸스 균의 성장을 매우 효과적으로 저해함을 알 수 있었다.

[0261] **2) 성장 저해 정도 확인 시험법**

[0262] 아스페르길루스 푸미가투스 5,000 포자를 2 μl의 YPD 액체 배지에 현탁시킨 다음, FK506 또는 9종 신규 화합물이 1 mg/L의 농도로 포함된 YPD 아가 배지 위에 상기 2 μl의 현탁액을 떨어뜨려 30℃에서 2일 동안 배양하였다.

[0263] 그 결과는 도 56에 제시되어 있다. 도 56에서 알 수 있듯이 본 발명의 신규 화합물 9종은 아스페르길루스 푸미가투스 균의 성장을 매우 효과적으로 저해할 수 있었다.

[0264] 이상의 결과로 본 발명의 신규 화합물 9종은 항진균 활성이 우수하다 할 수 있으며, 이러한 결론으로부터 본 발명의 신규 화합물 9종 중에서 하나 이상을 유효성분으로 포함한 진균감염의 예방 또는 치료용 조성물은 진균감염 질환 치료에 효과적으로 활용될 수 있다고 판단하였다.

[0266] **실시예 12: 9종 신규 화합물의 진균감염 치료 효과 (*in vivo*)**

[0267] 본 발명에 따라 제조한 9종 신규 화합물의 진균감염 치료 효과는 질환동물모델을 이용하여 조사하였다. 질환동물모델은 통상의 방법과 같이 7주령의 ICR 마우스에 크립토콕쿠스 속 곰팡이, 칸디다 속 곰팡이를 각각 감염시켜 만들었다 (표 14).

표 14

[0269]

진균	균주	감염경로	감염 세포 수
크립토콕쿠스 속	*Cryptococcus neoformans*	정맥 주사 (Intravenous injection)	1.0×10^6 CFU/head
칸디다 속	*Candida albicans*	정맥 주사 (Intravenous injection)	0.16×10^6 CFU/head

[0270] 질환동물모델에 투여할 9종 신규 화합물은 1 ml의 castor oil solution [dehydrated ethanol: PEG40 castor oil (80 : 20 v/v) (Sigma-Aldrich)]에 녹여 이를 5 mpk의 용량으로 4회 (1일 1회) 정맥 주사하였다. 부형제 대조군으로는 castor oil solution을 투여하였다. 진균감염 치료 효과는 진균감염 이후, 14일 동안 마우스의 생존율을 조사하는 방식으로 조사하였다. 한편, 제형예로 castor oil solution을 사용하였으나 상기의 제형예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 제형예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0271] 9종 신규 화합물의 크립토콕쿠스 속 곰팡이 또는 칸디다 속 곰팡이 균의 감염으로 만든 질환동물모델에서의 항진균 활성은 표 15와 같았다.

표 15

[0273]

진균 감염 모델	균주	투여물질	생존율 (%)	평균 생존일 수 (일)
크립토콕쿠스 속	*Cryptococcus neoformans*	부형제 투여군	20	10.50±0.97
		9-deoxo-31-*O*-demethyl-prolyl-FK506	90	13.40±0.60
		9-deoxo-36,37-dihydro-FK506	80	13.70±0.21
		31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506	80	13.80±0.13
		9-deoxo-31-*O*-demethyl-36,37-dihydro-FK506	80	13.90±0.10
		9-deoxo-FK520	80	13.60±0.50
		31-*O*-demethyl-FK520	90	13.70±0.21
		9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK520	80	13.80±0.13
		9-deoxo-FK523	90	13.40±0.60
		9-deoxo-31-*O*-demethyl-FK523	80	13.80±0.13
칸디다 속	*Candida albicans*	부형제 투여군	10	9.80±0.89
		9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506	80	13.10±0.64
		9-deoxo-36,37-dihydro-FK506	70	11.60±1.33
		31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506	80	13.00±0.20
		9-deoxo-31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506	90	13.90±0.10
		9-deoxo-FK520	80	12.90±0.90
		31-O-demethyl-FK520	80	13.90±0.70
		9-deoxo-31-O-demethyl-FK520	70	11.60±1.58
		9-deoxo-FK523	80	13.60±0.50
		9-deoxo-31-O-demethyl-FK523	80	13.80±0.13

[0274] 이 결과로부터 본 발명의 9종 신규 화합물이 진균감염 치료에 매우 효과적임을 알 수 있었다. 한편, Kaplan-Meier 분석을 통해 9종 신규 화합물 투여 (처치군)가 부형제 투여 (대조군)와 비교하여 통계적으로 유의하게 항진균 효능이 있는지를 조사하였는데, 그 결과 통계적으로 유의한 차이로 치료 효과를 제공하는 것으로 분석되었다. 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

[0276]

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

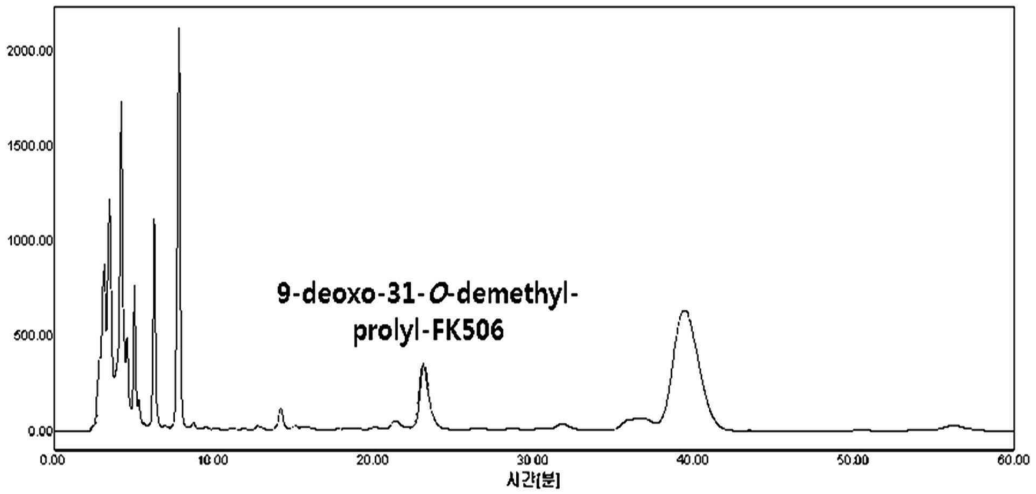
기탁기관명 : 한국생명공학연구원(KCTC)

수탁번호 : KCTC13582BP

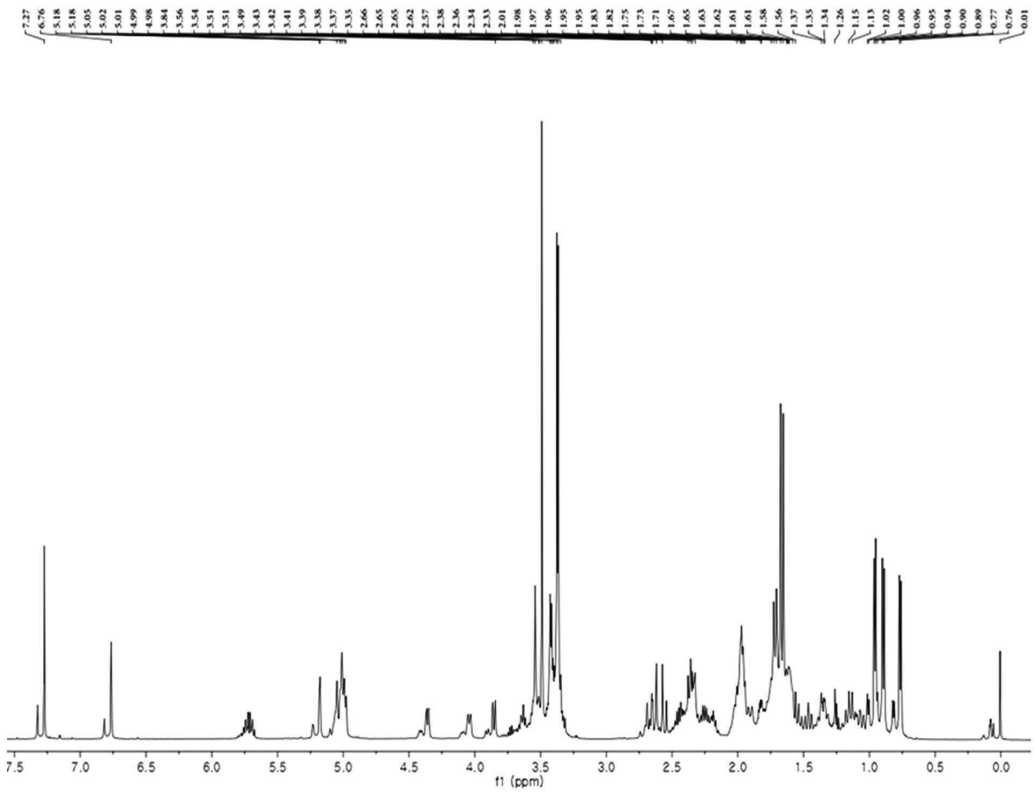
수탁일자 : 20180717

도면

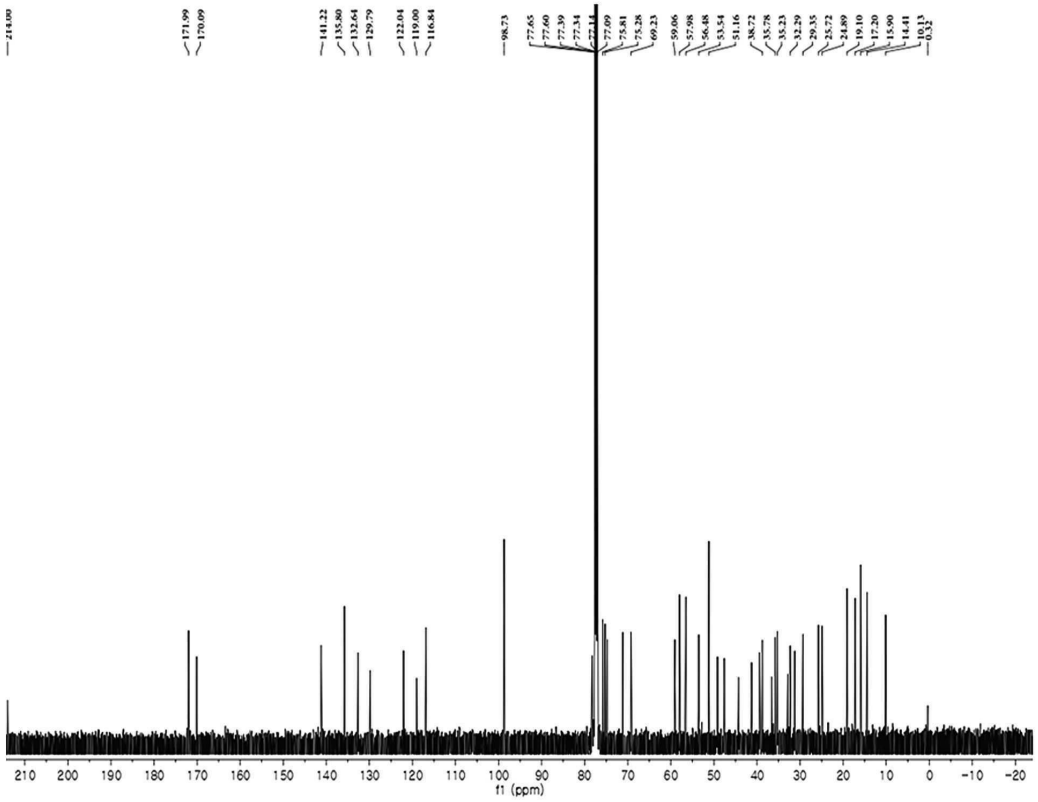
도면1


2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
9-deoxo-31-O-demethyl-
prolyl-FK506
0.00
10.00
20.00
30.00
40.00
50.00
60.00
시간[분]

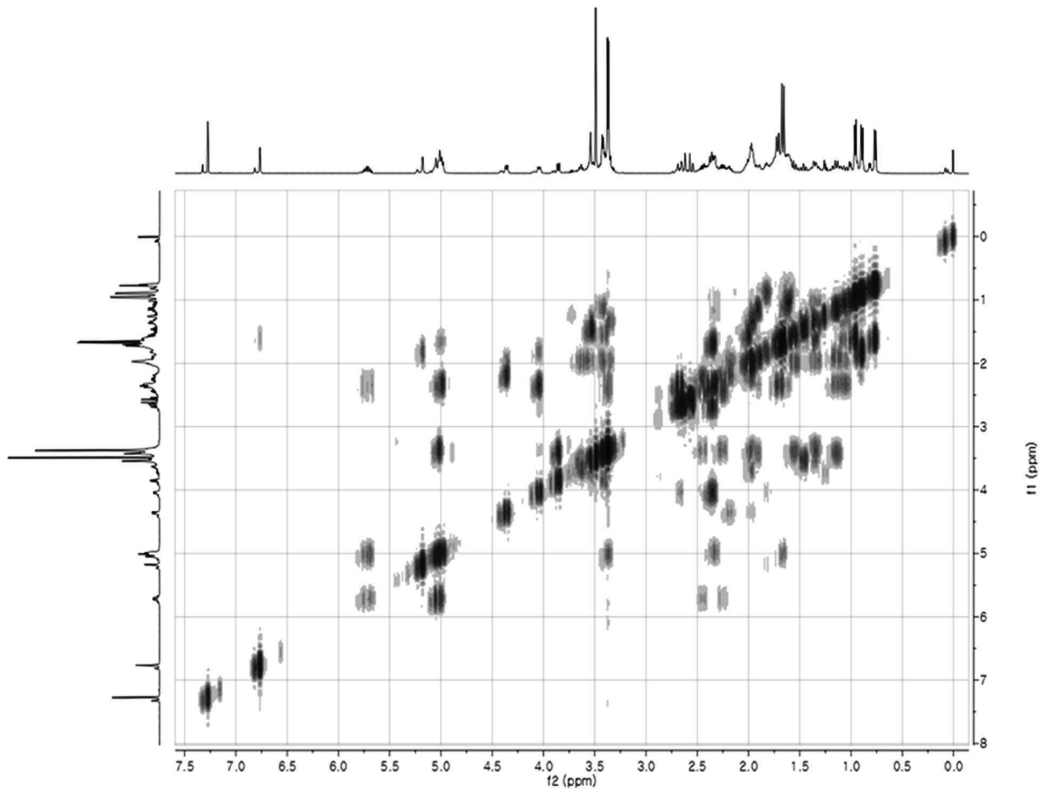
도면2


7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
f1 (ppm)

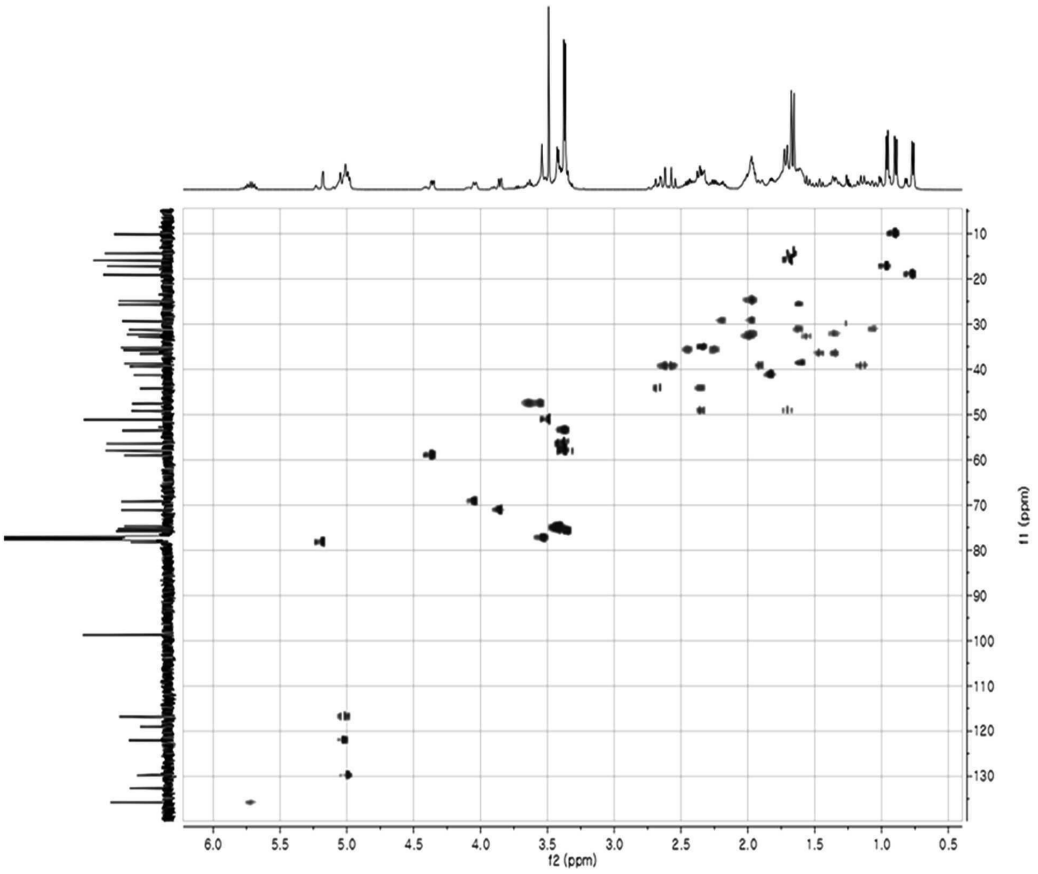
도면3


214.09
171.99
170.09
141.22
135.80
132.64
129.79
122.04
119.00
116.84
98.73
77.65
77.60
77.39
77.34
77.11
77.09
75.81
75.26
69.23
59.06
57.98
56.48
53.54
51.16
38.72
35.78
35.23
32.29
29.35
25.72
24.89
19.10
17.20
15.90
14.41
10.13
10.12
210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10 -20
f1 (ppm)

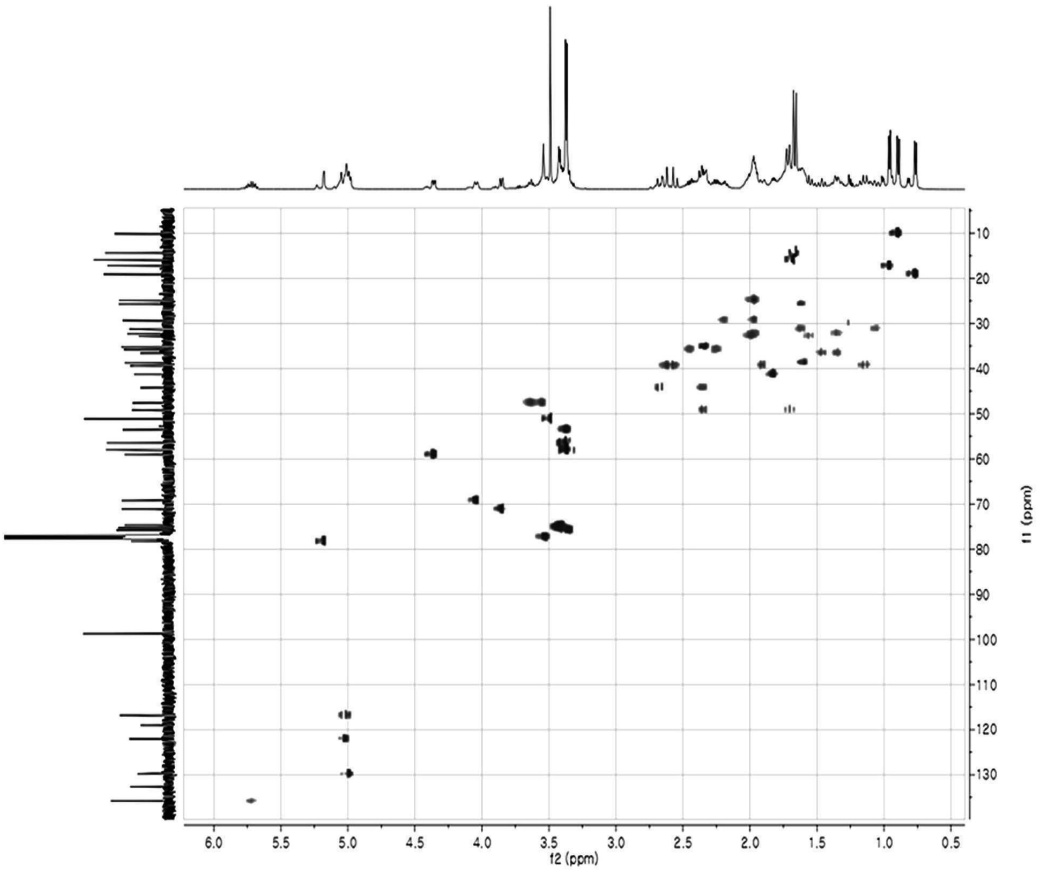
도면4


7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
f2 (ppm)
0 1 2 3 4 5 6 7 8
f1 (ppm)

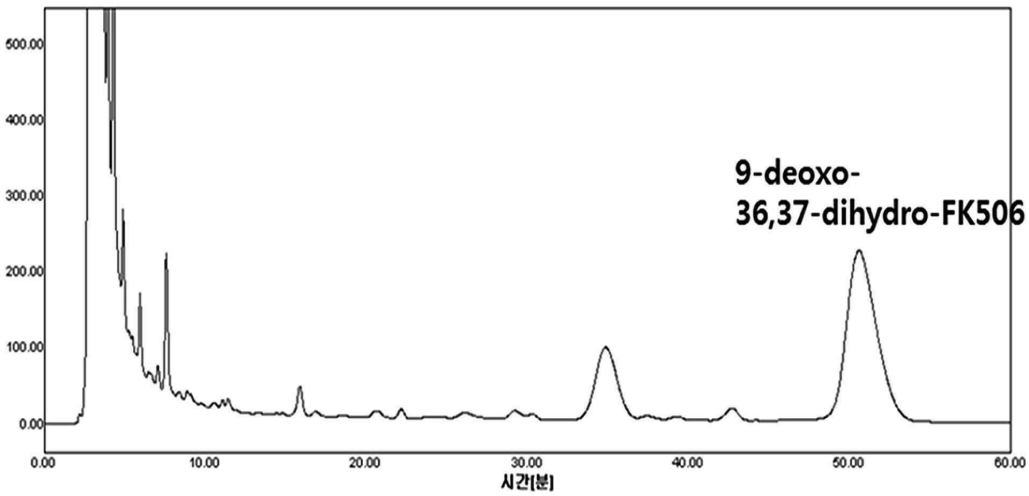
도면5



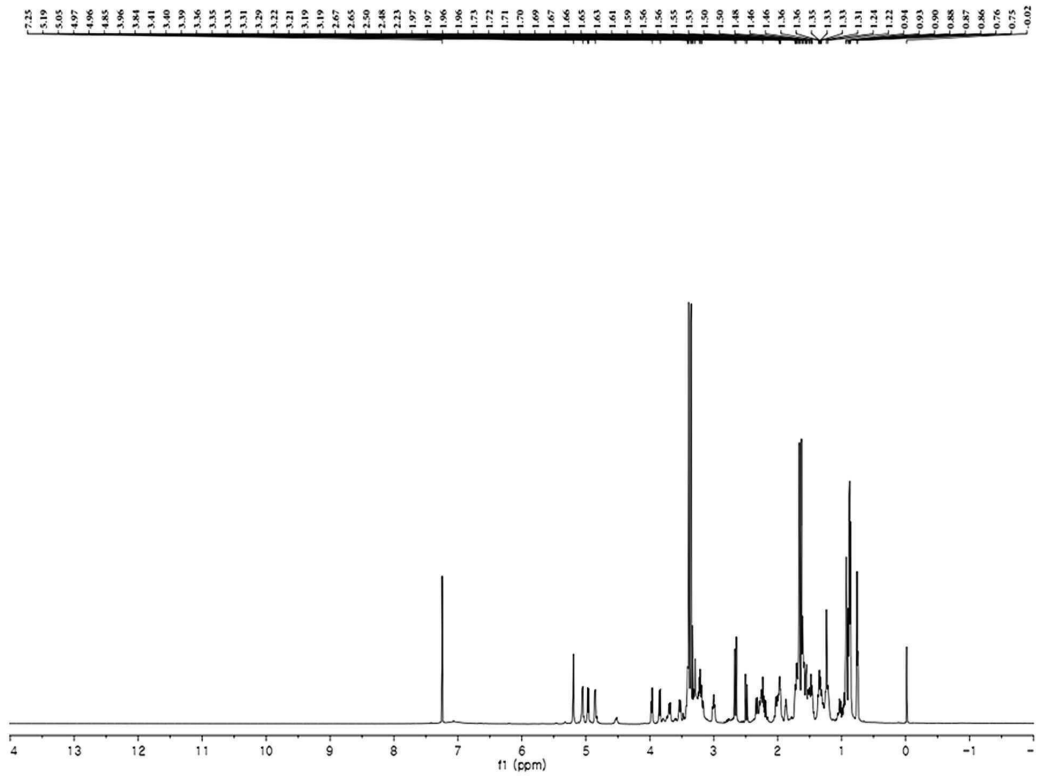
도면6



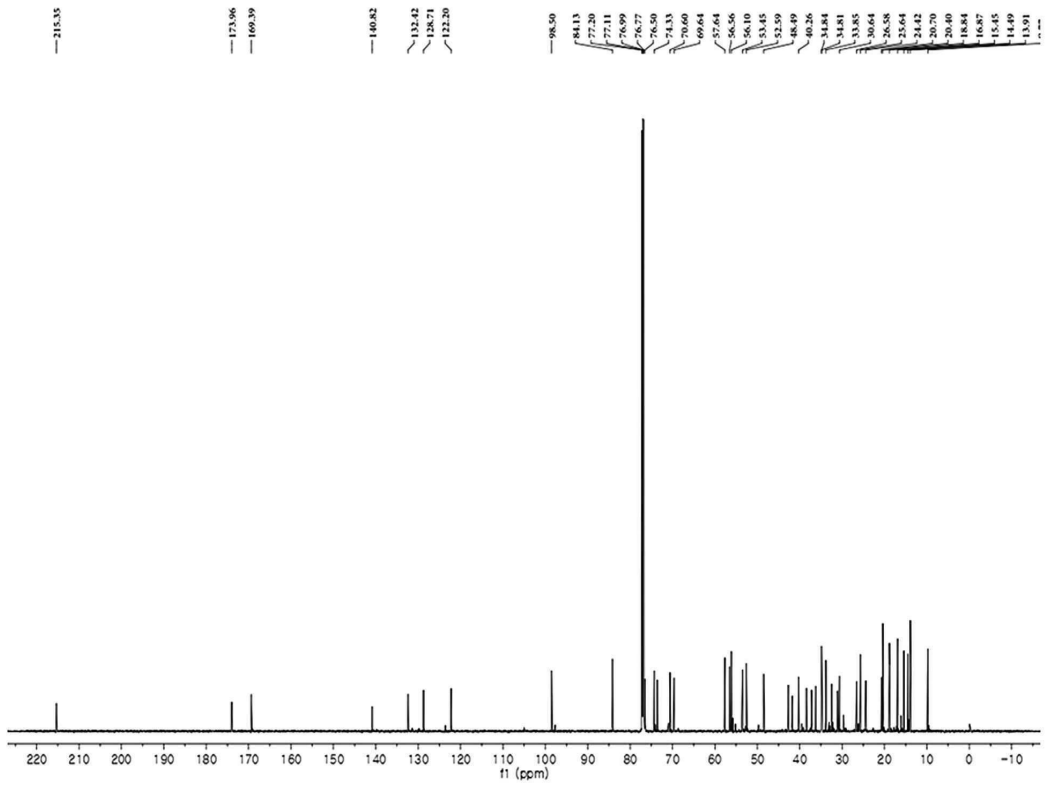
도면7



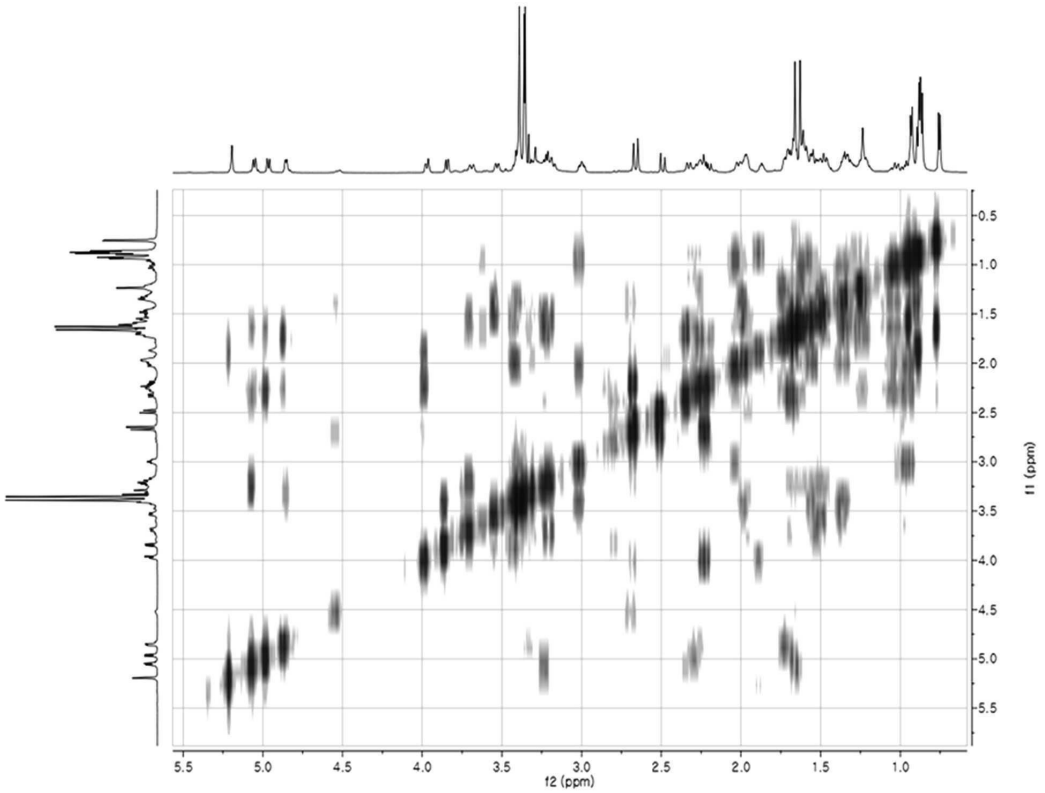
도면8



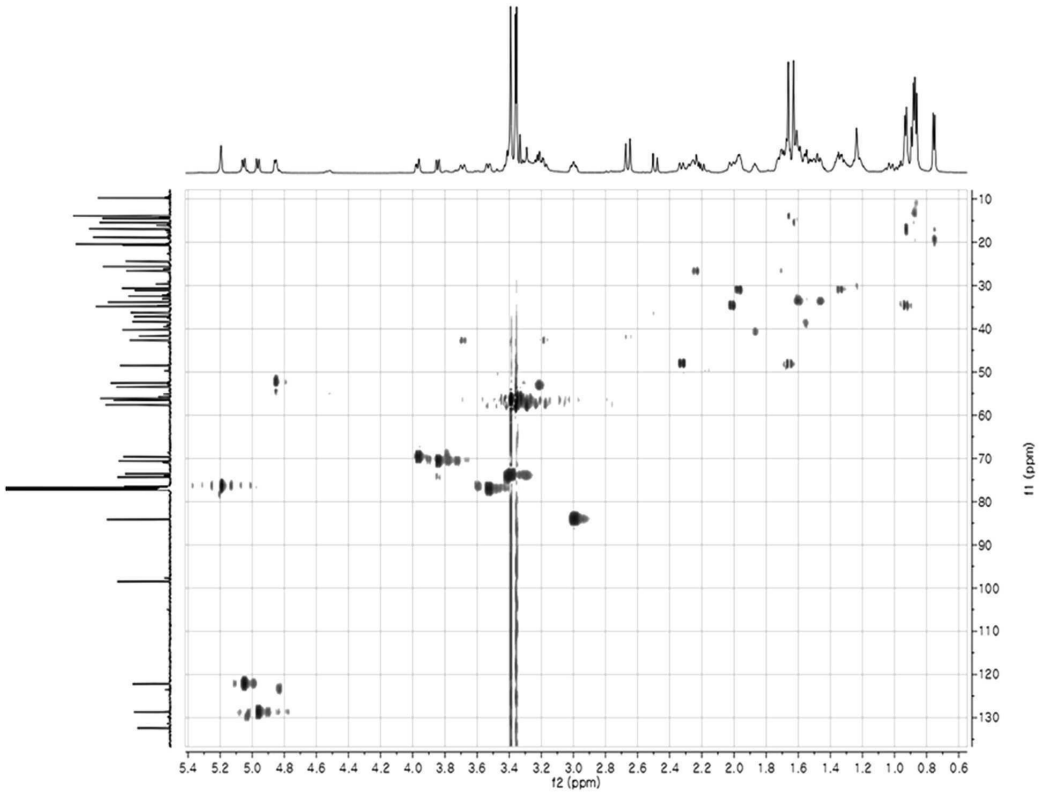
도면9



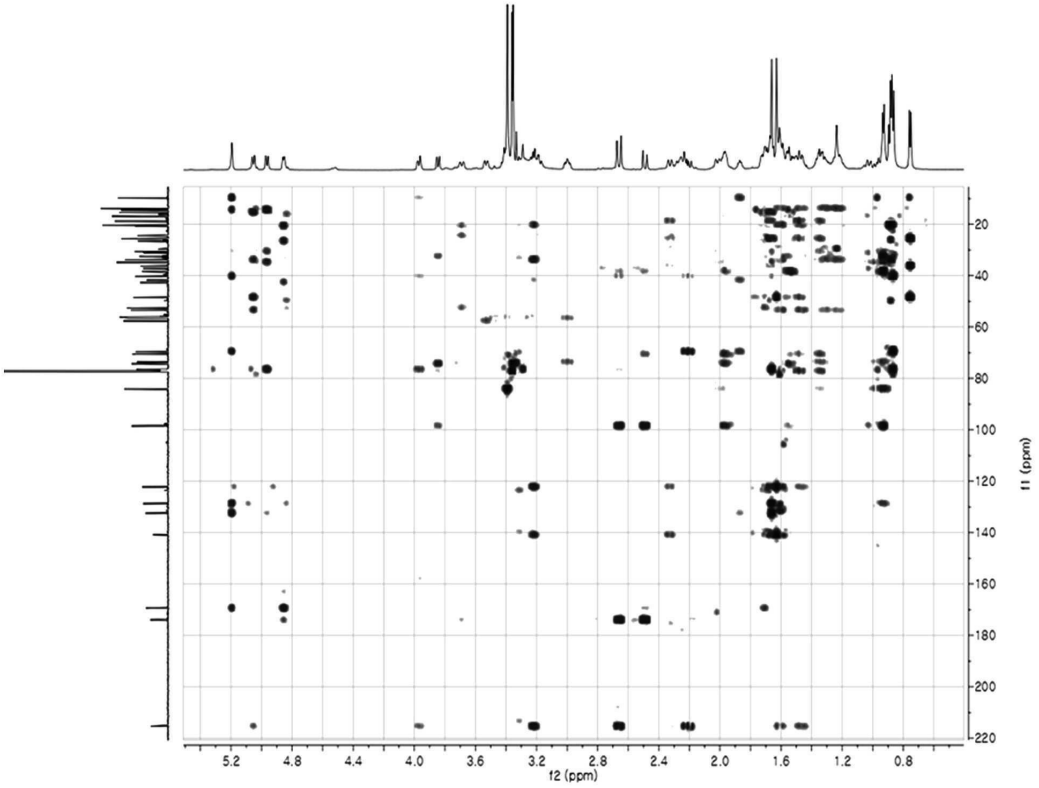
도면10


5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
f2 (ppm)
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
f1 (ppm)

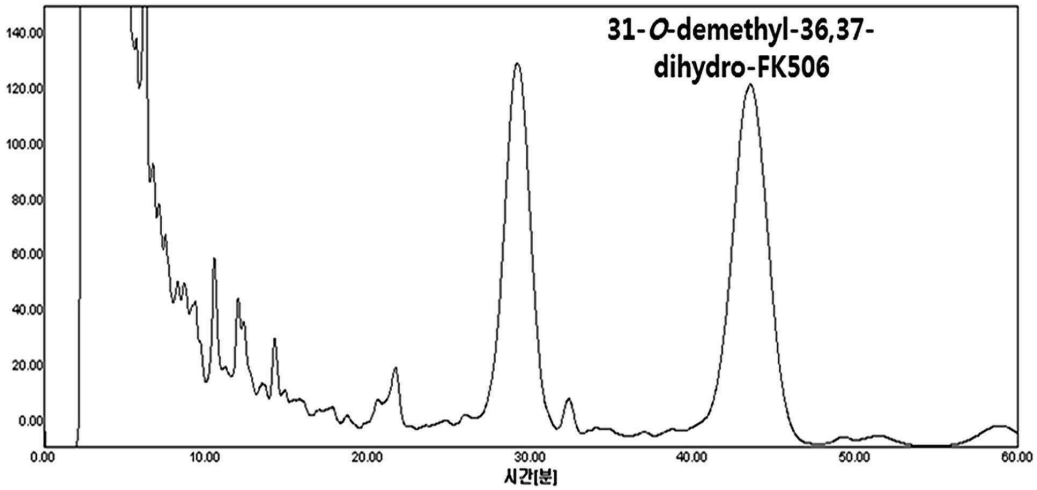
도면11


5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2 1.0 0.8 0.6
f2 (ppm)
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
f1 (ppm)

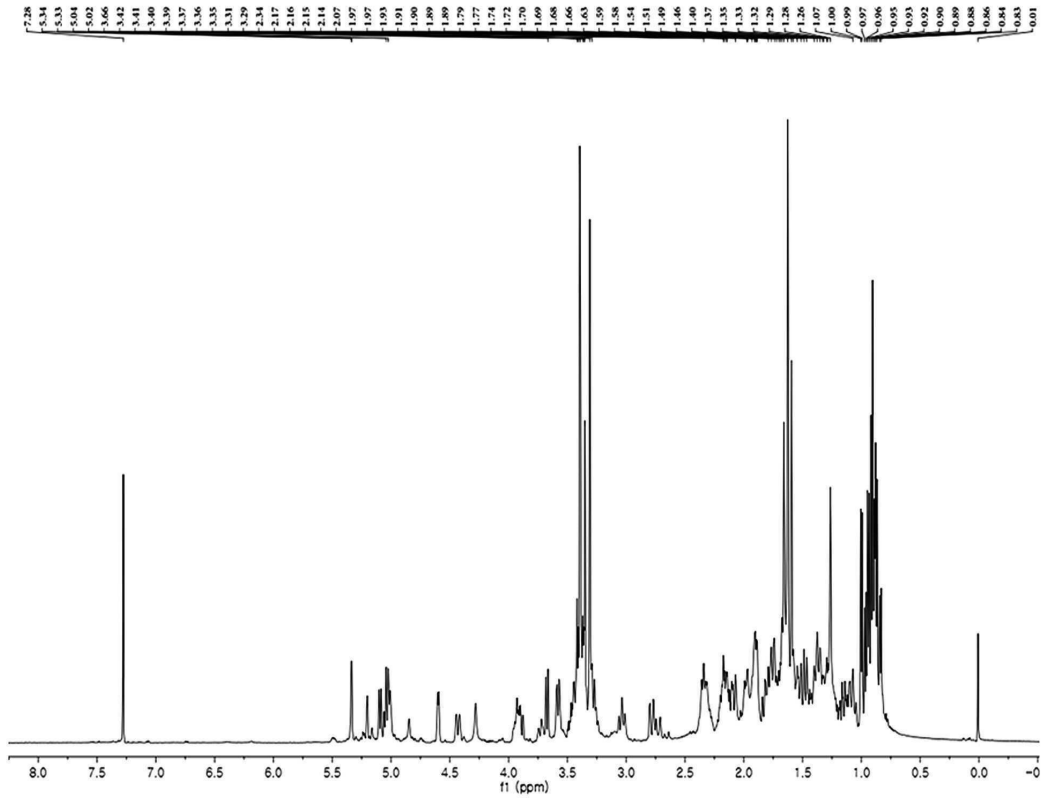
도면12



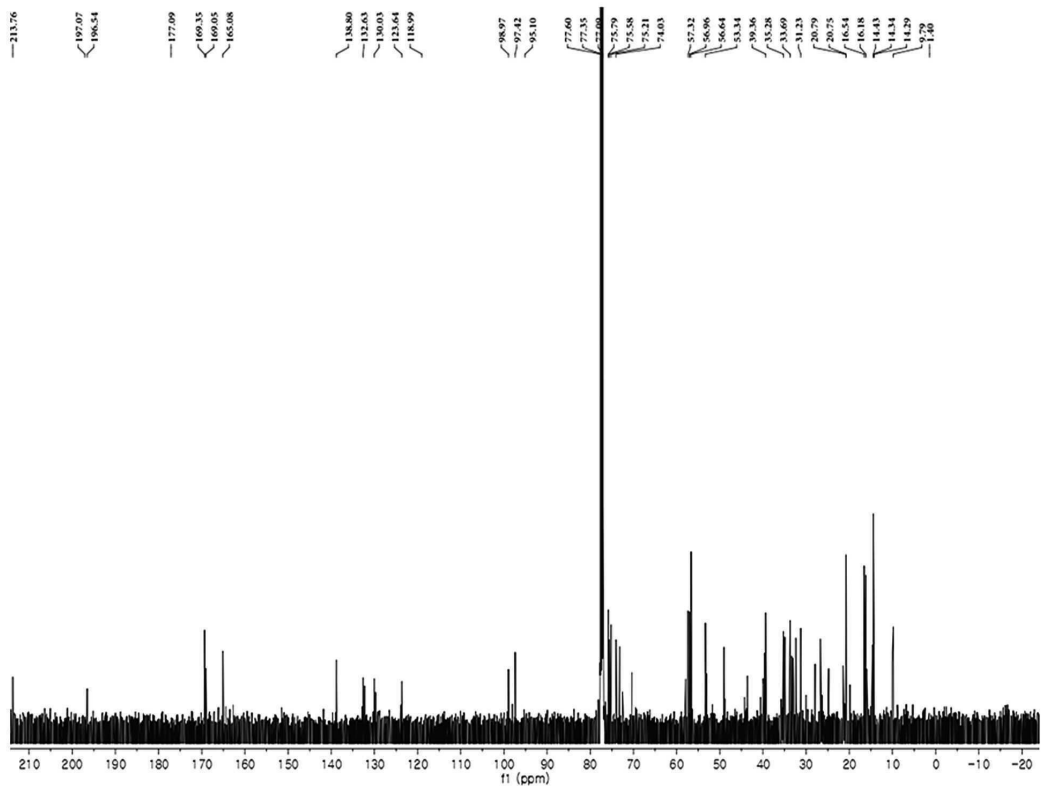
도면13



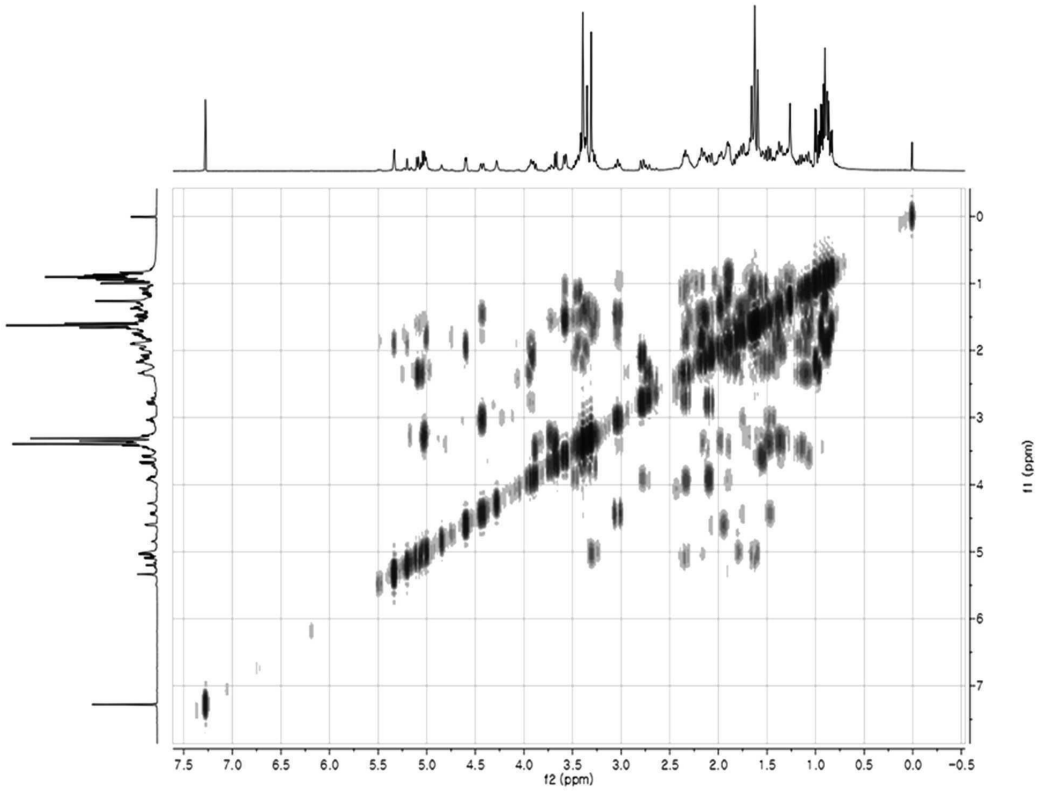
도면14



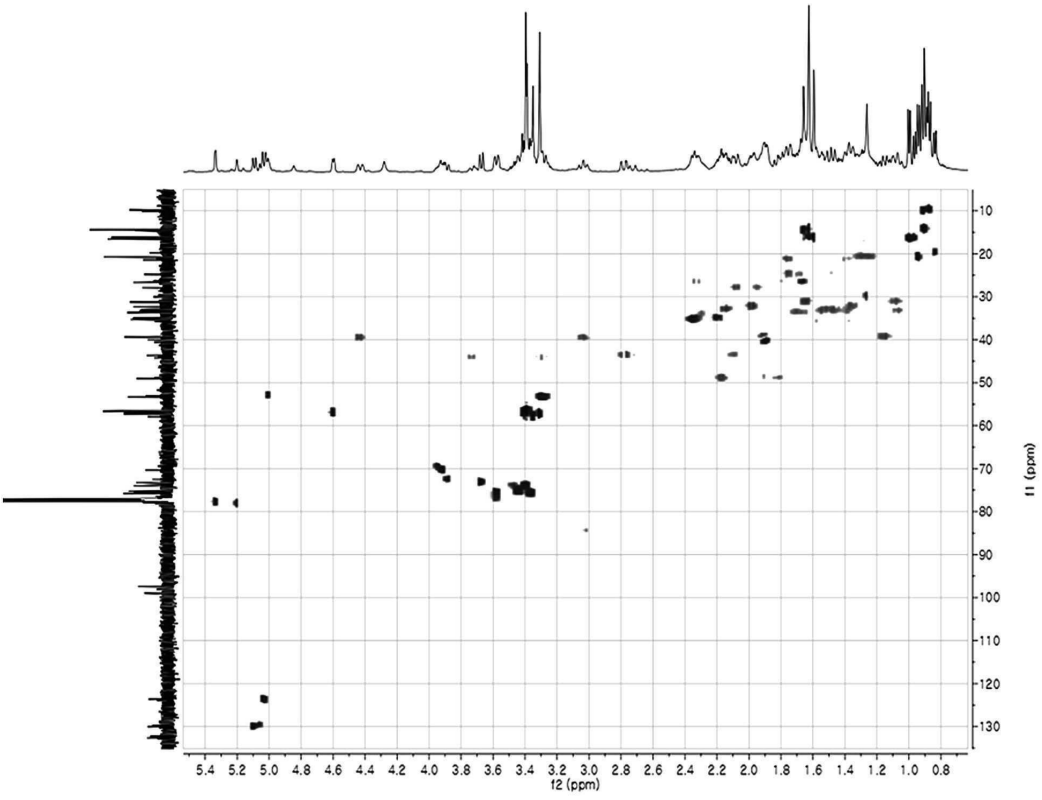
도면15



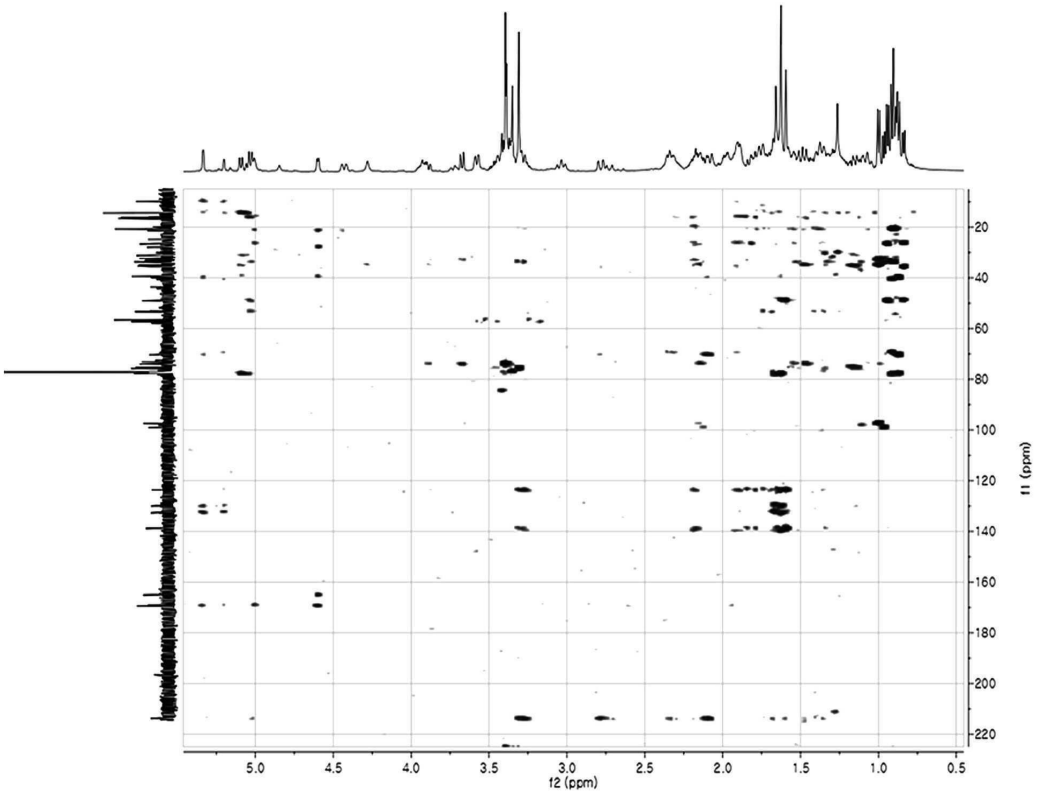
도면16


7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5
f2 (ppm)
0 1 2 3 4 5 6 7
f1 (ppm)

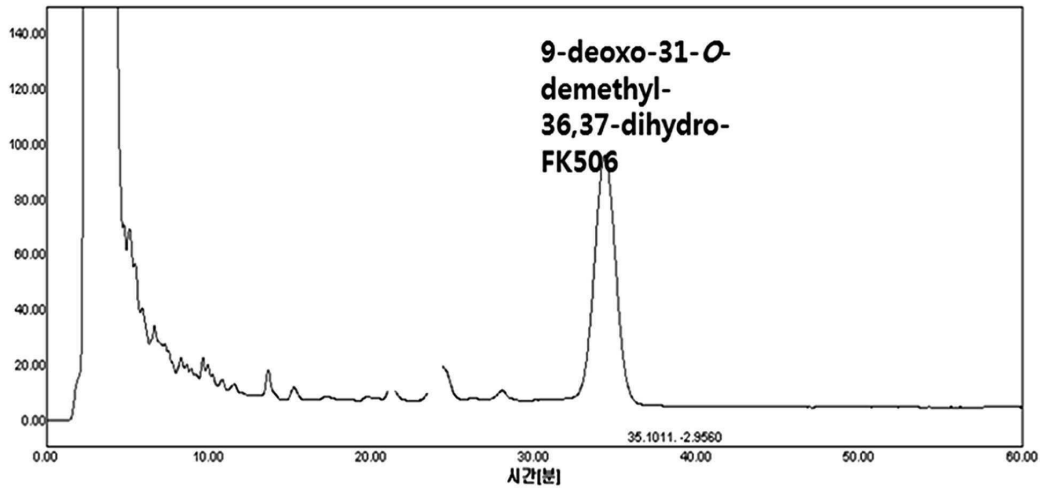
도면17


5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2 1.0 0.8
f2 (ppm)
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
f1 (ppm)

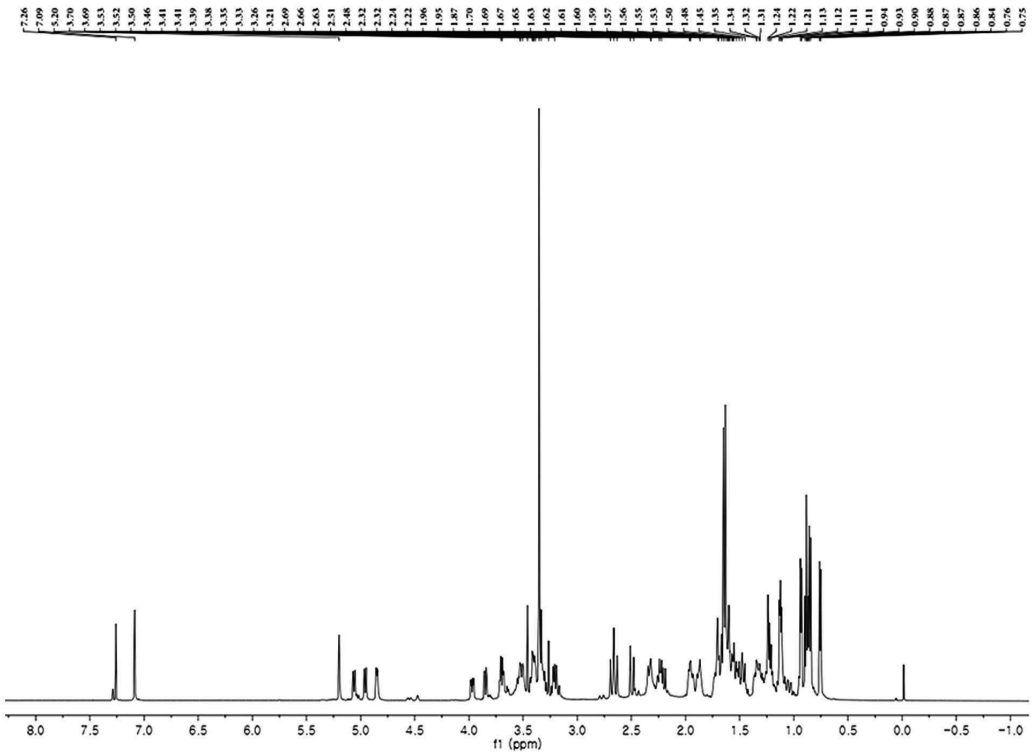
도면18


f2 (ppm)
f1 (ppm)

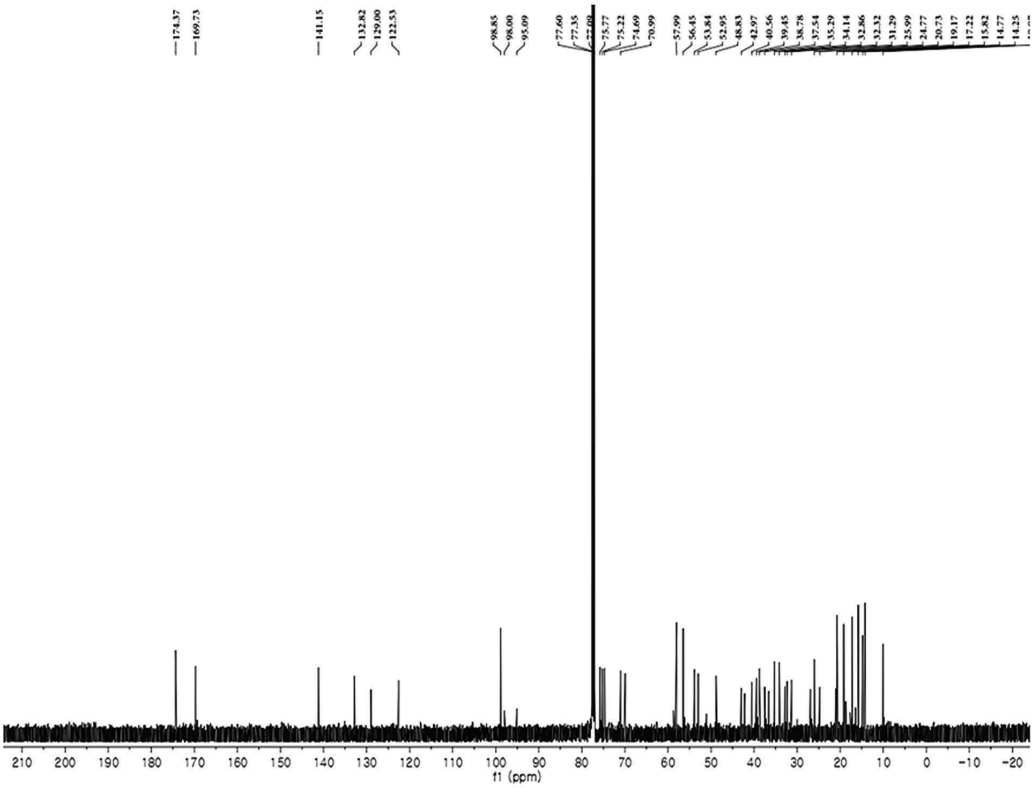
도면19


9-deoxo-31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506
35.1011, -2.9560
시간[분]

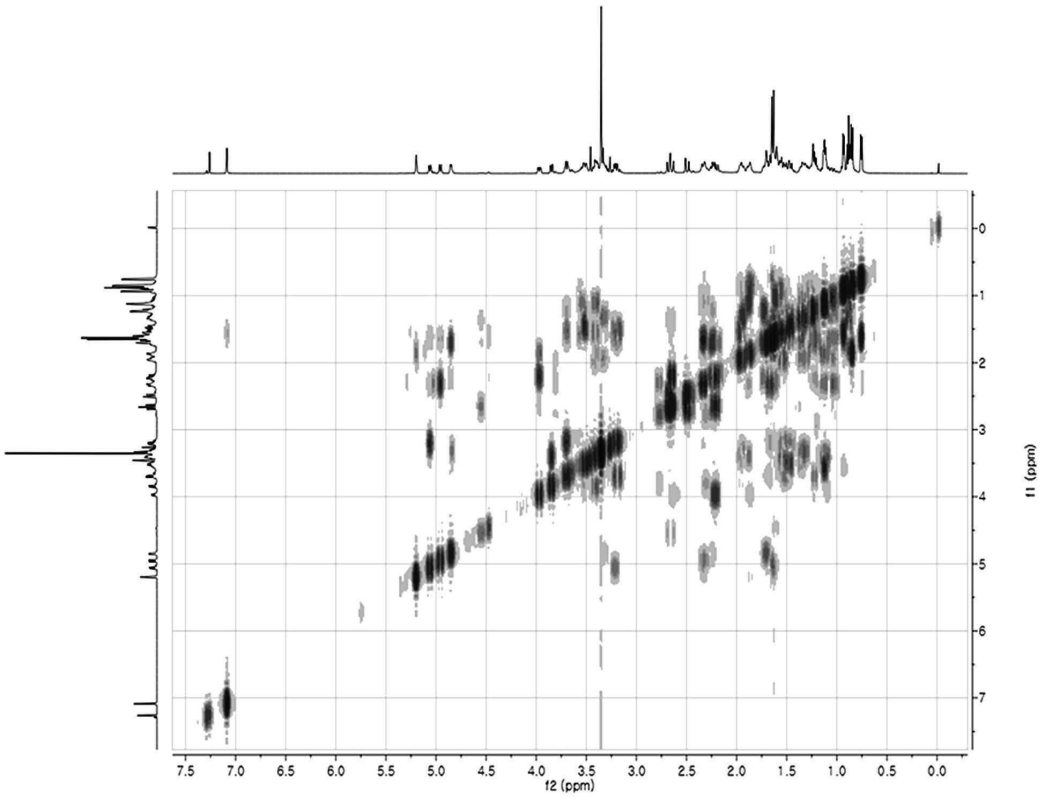
도면20



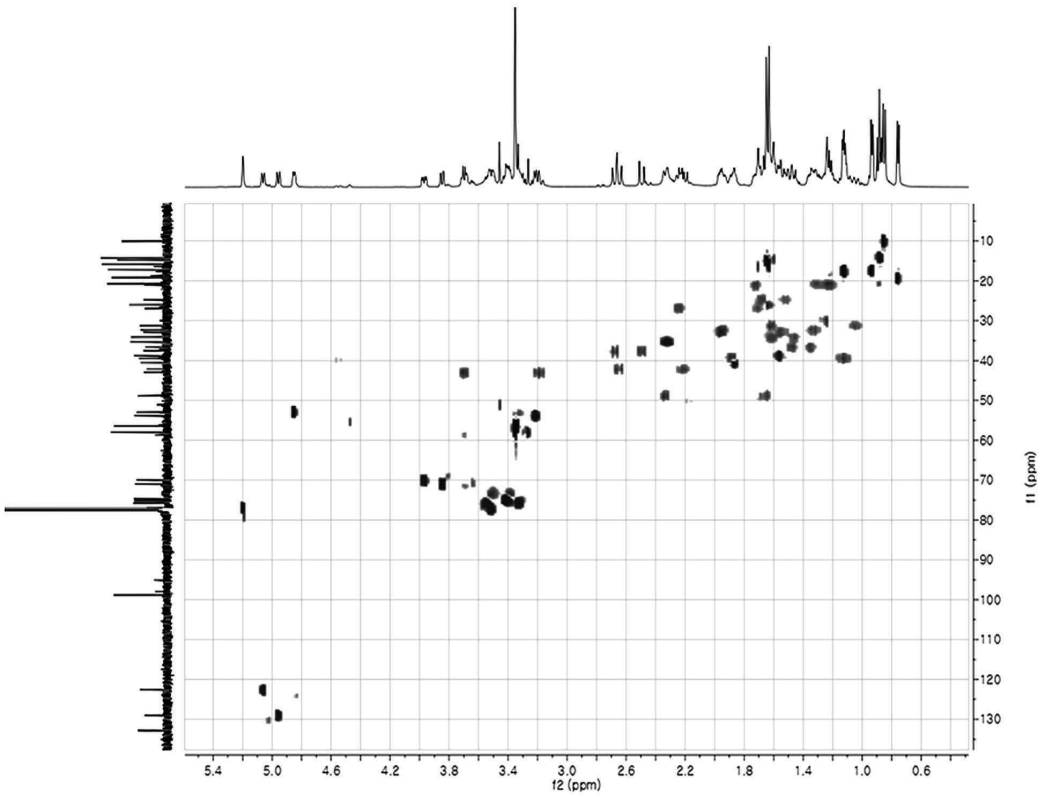
도면21



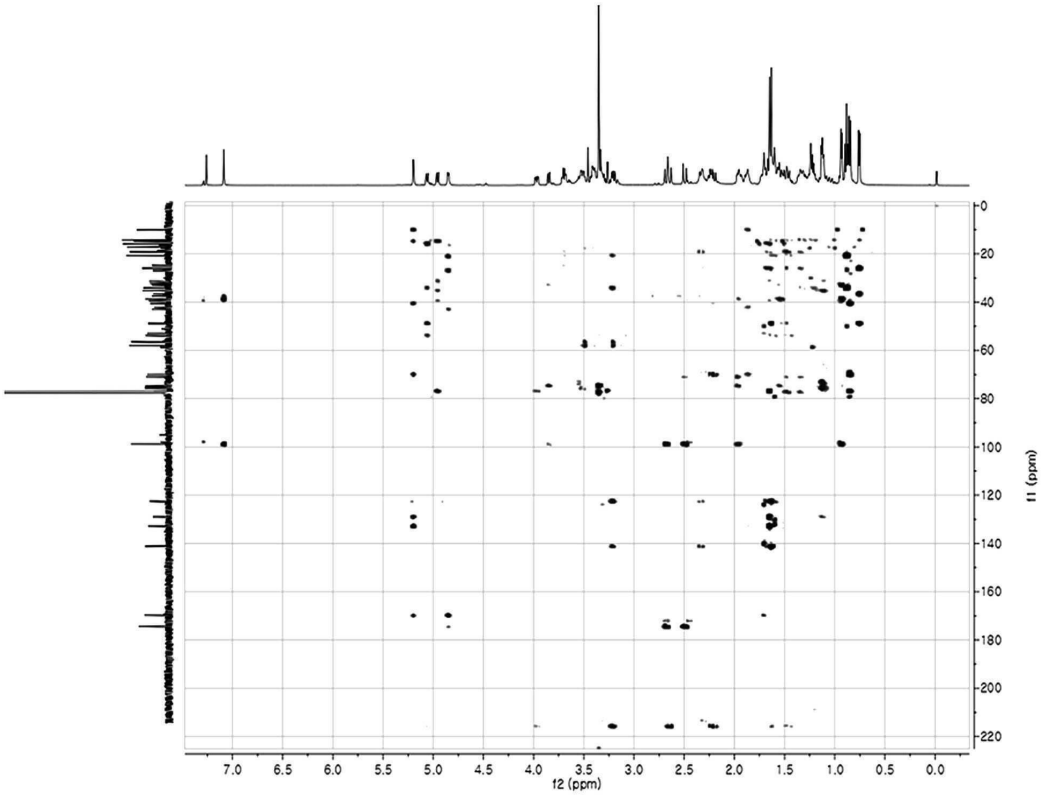
도면22


7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
f2 (ppm)
0 1 2 3 4 5 6 7
f1 (ppm)

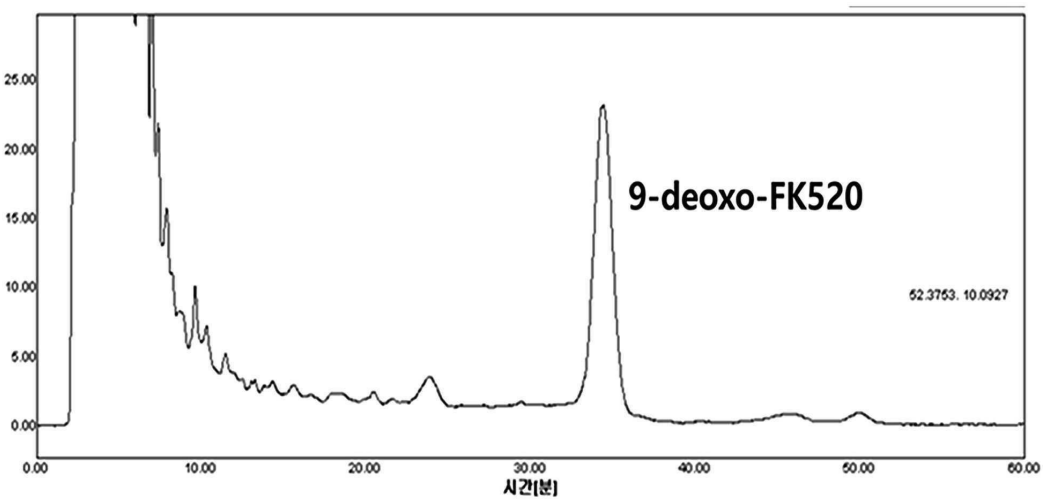
도면23


5.4 5.0 4.6 4.2 3.8 3.4 3.0 2.6 2.2 1.8 1.4 1.0 0.6
f2 (ppm)
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
f1 (ppm)

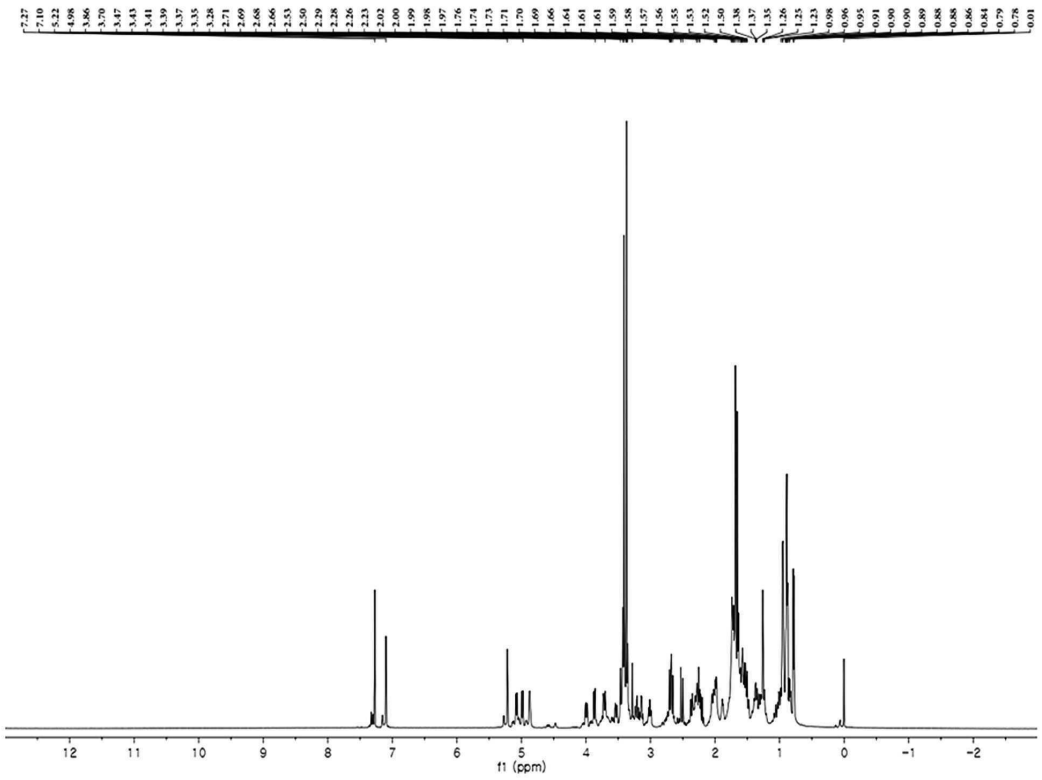
도면24



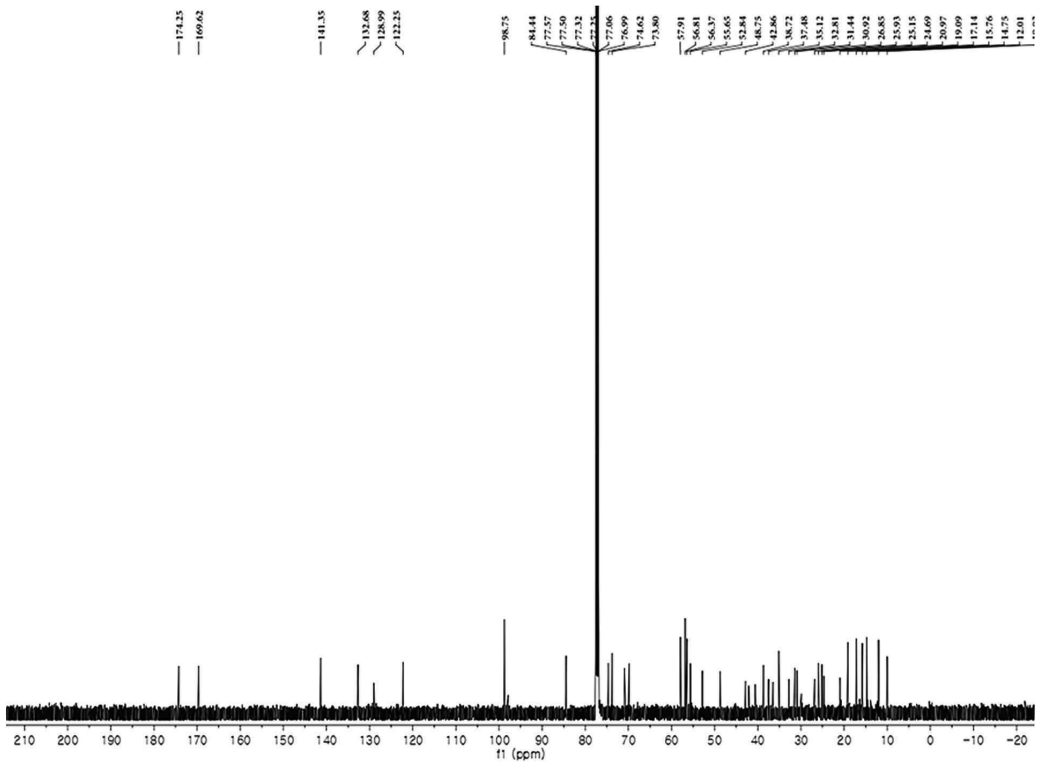
도면25



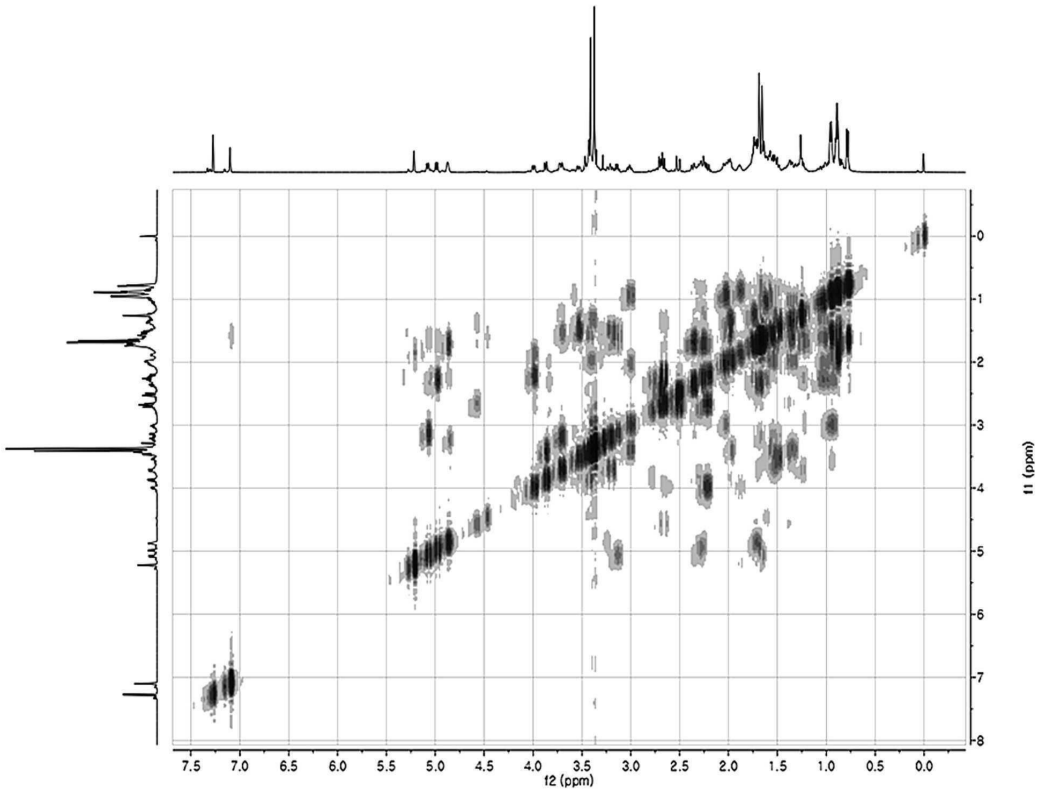
도면26



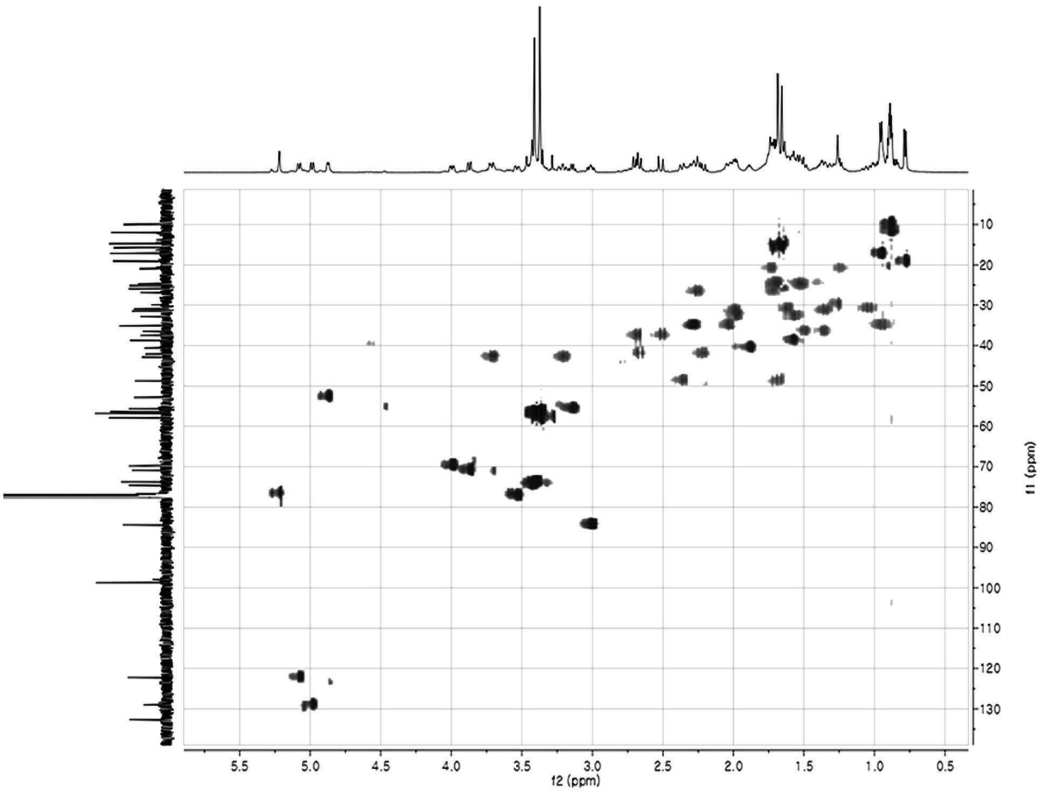
도면27



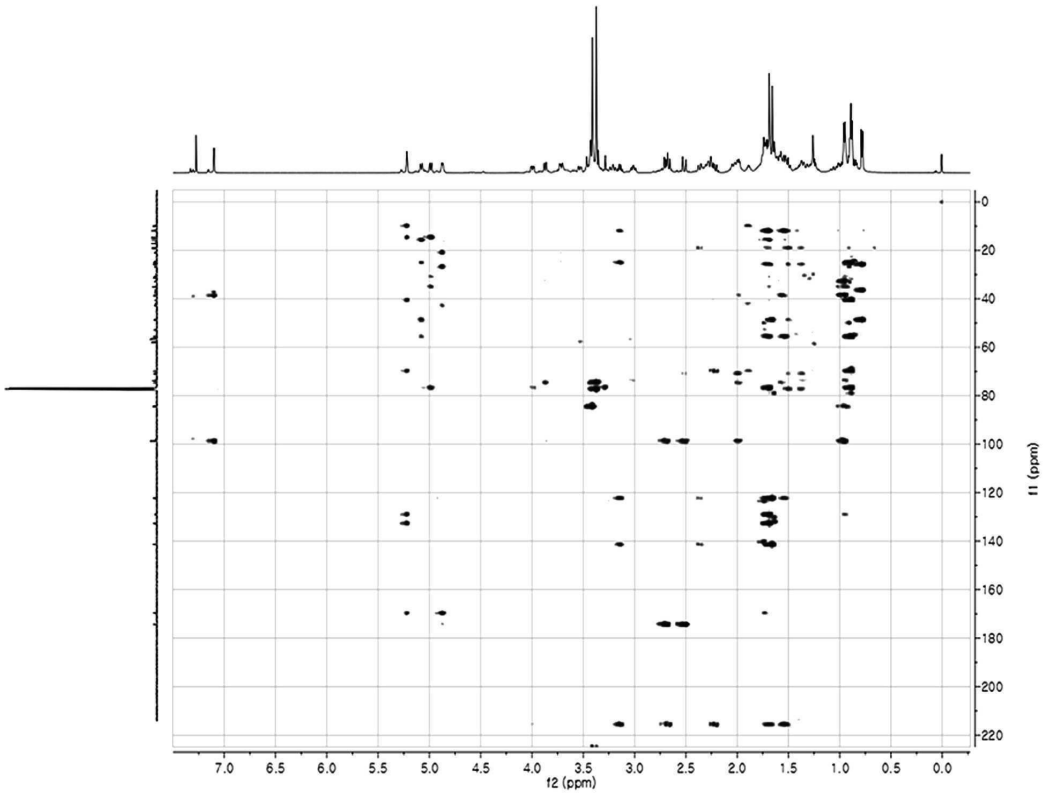
도면28


7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
f2 (ppm)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
f1 (ppm)

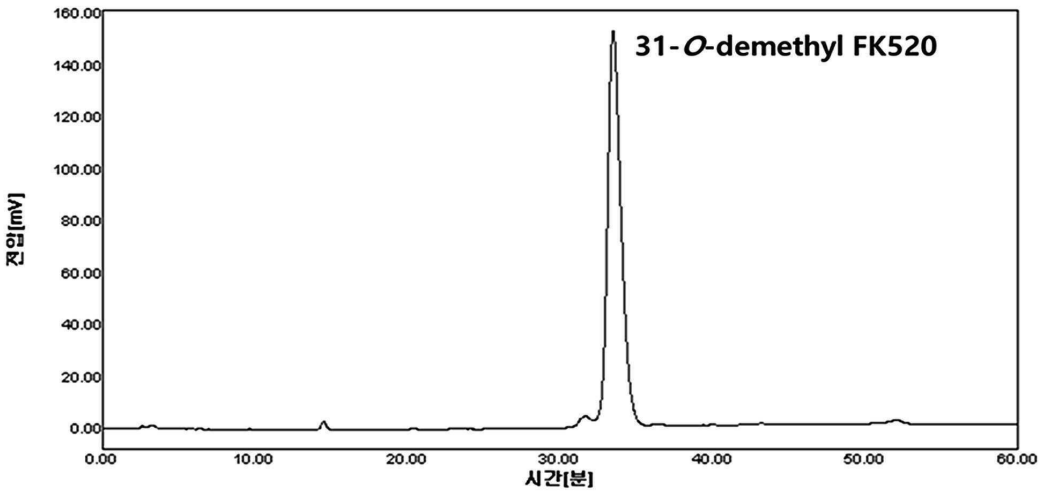
도면29


5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
f2 (ppm)
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
f1 (ppm)

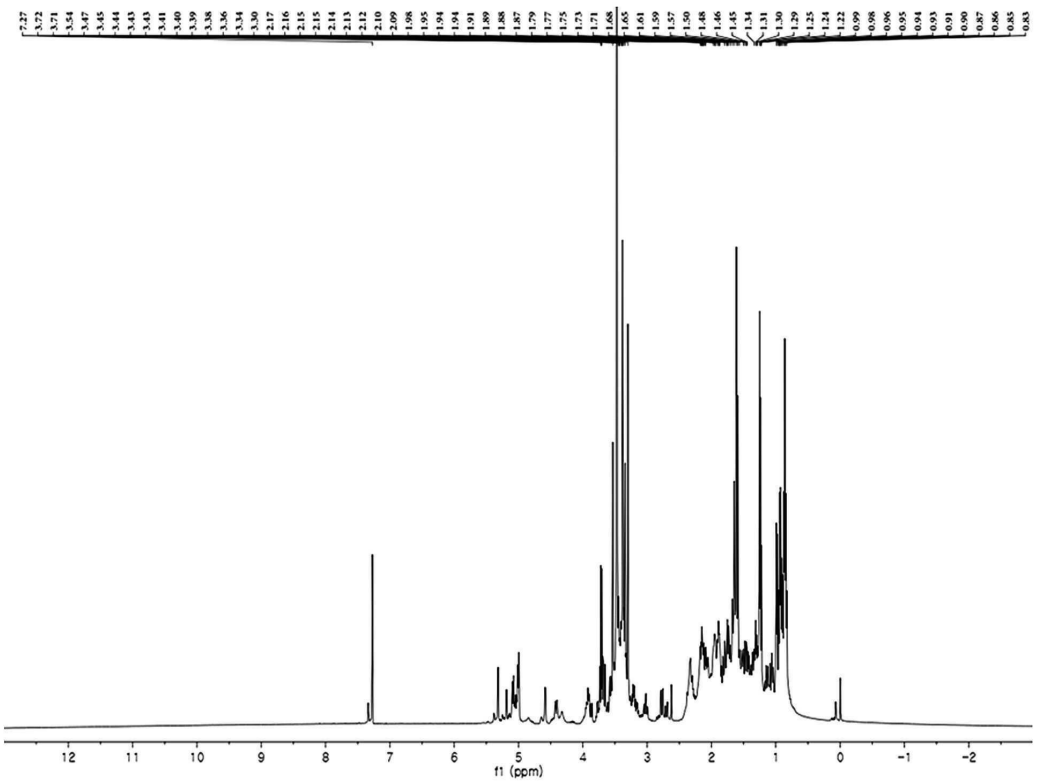
도면30



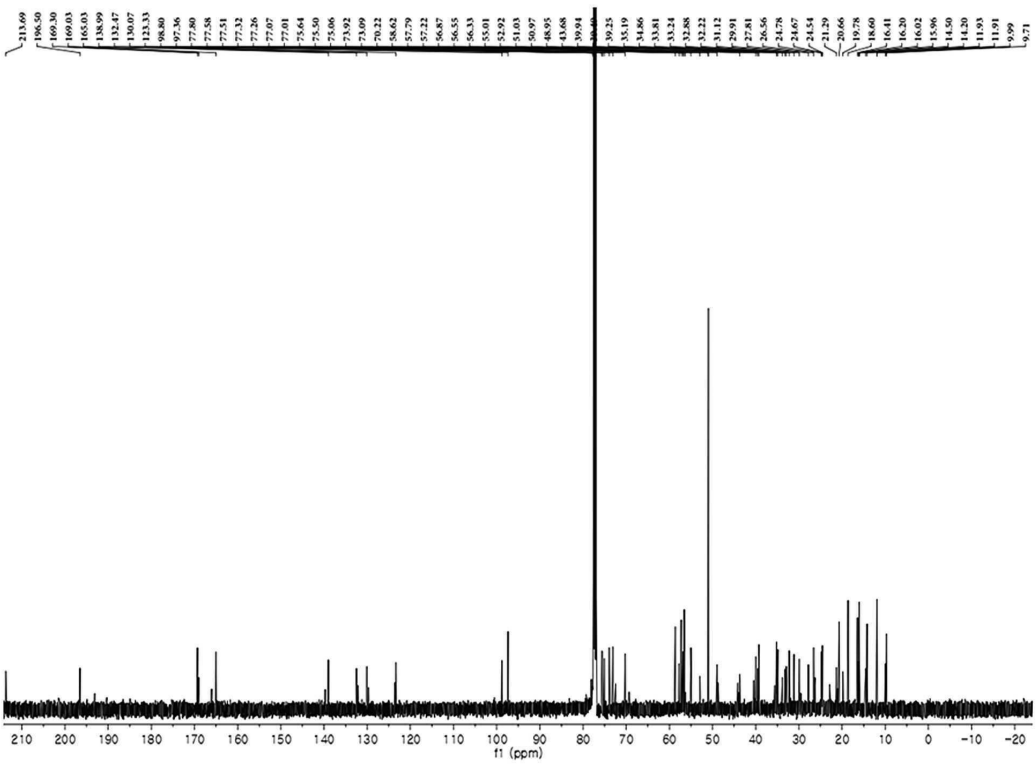
도면31



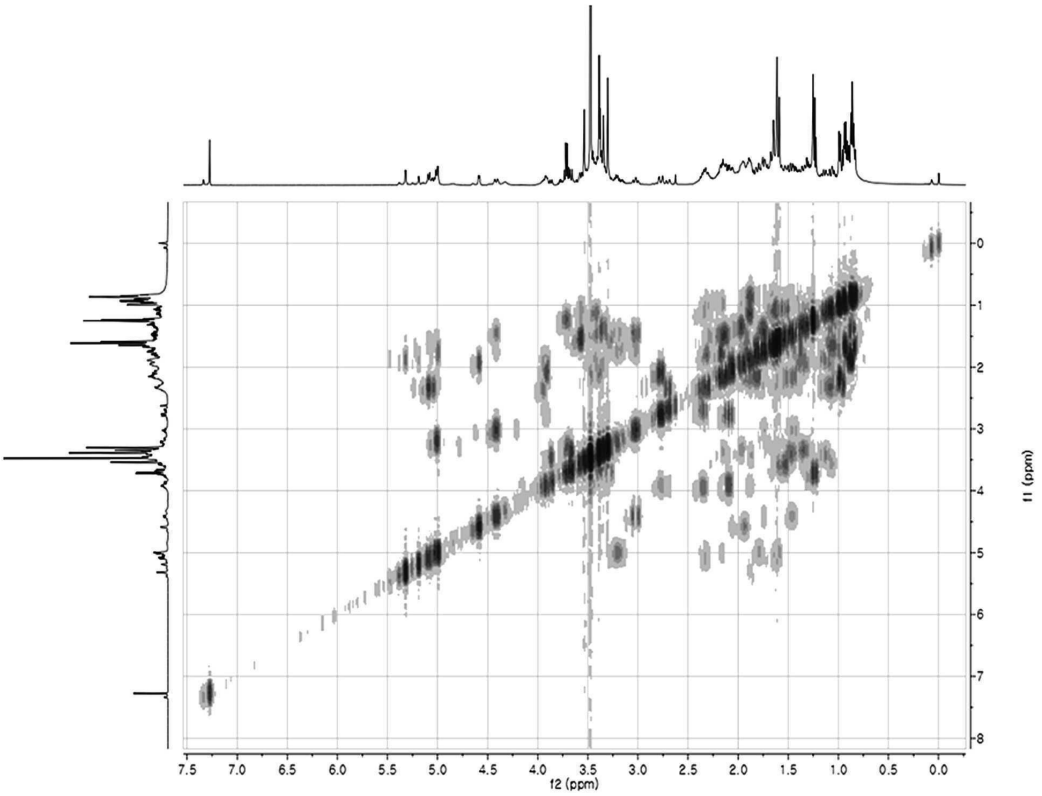
도면32



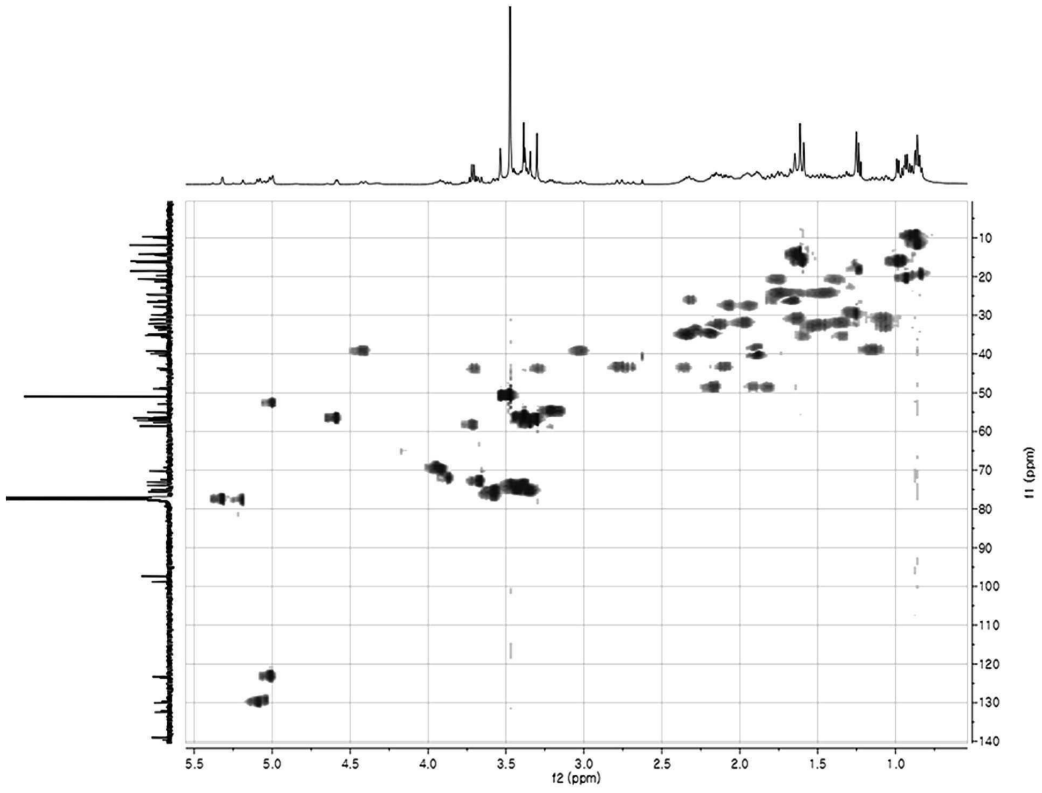
도면33



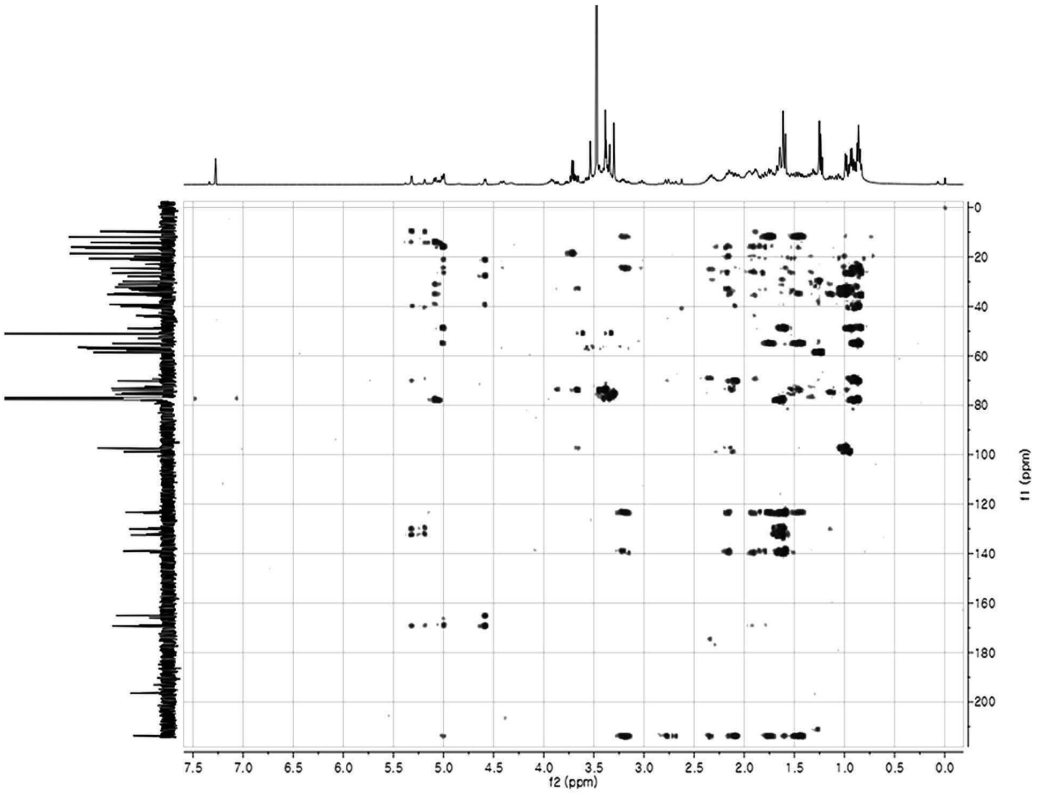
도면34



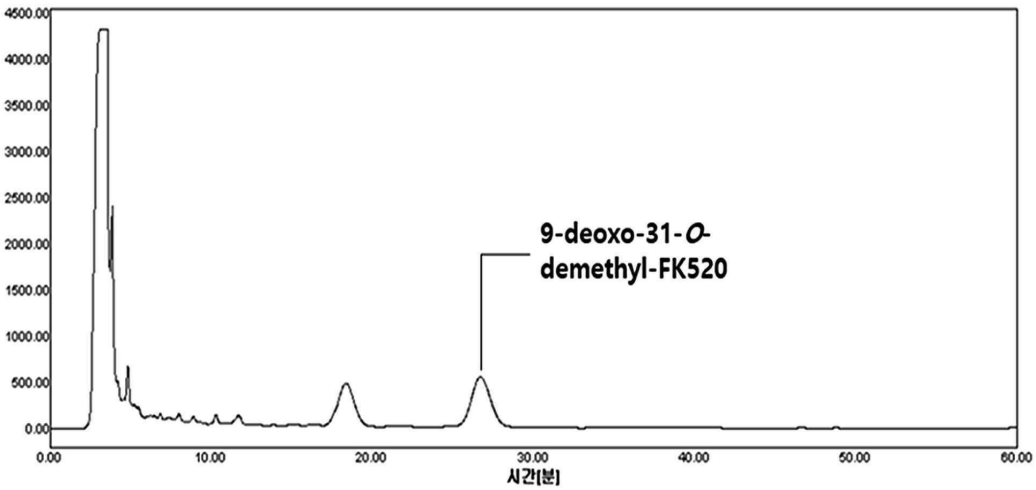
도면35



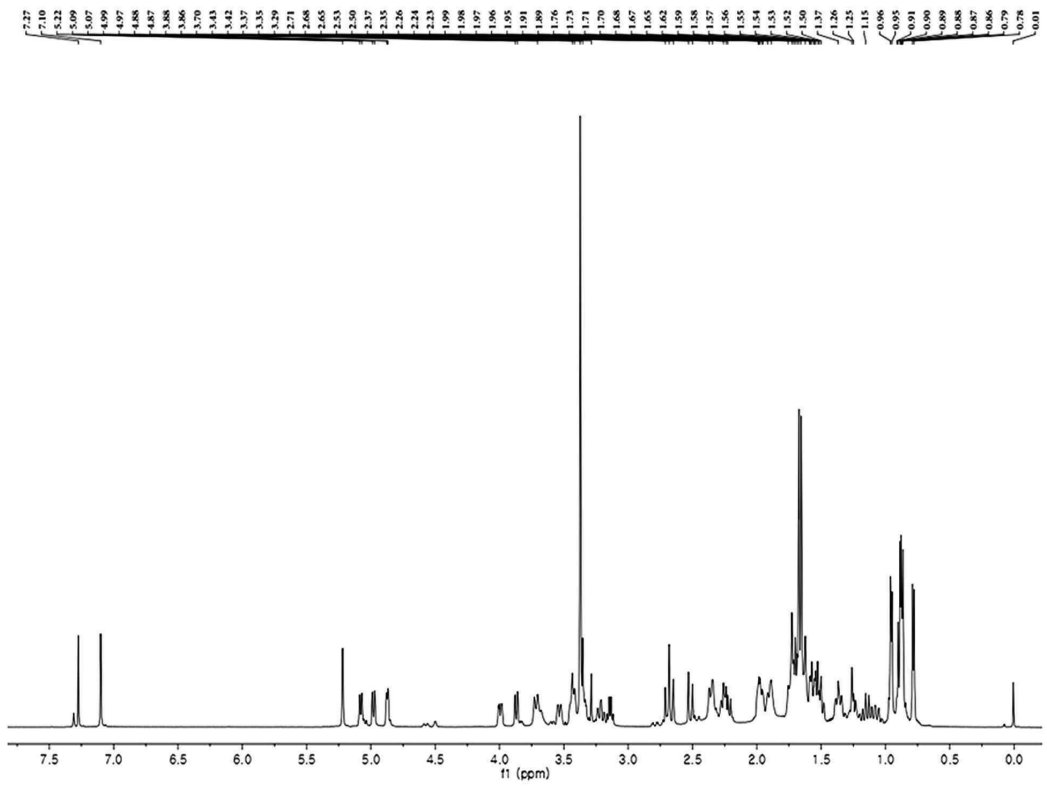
도면36



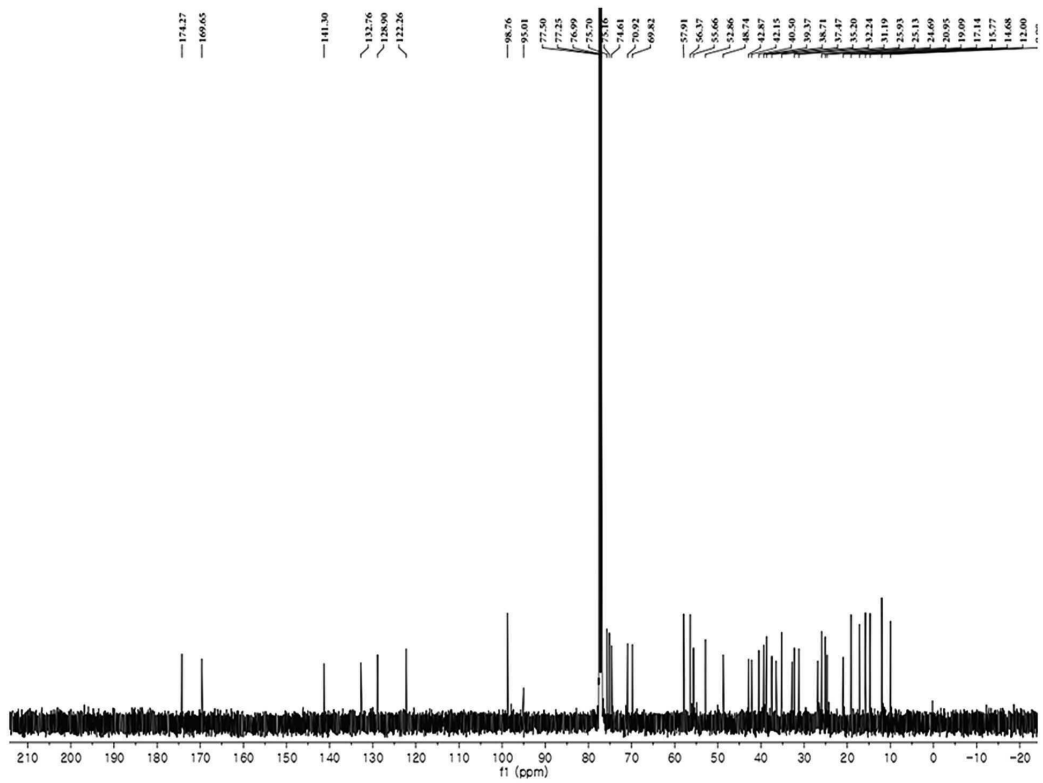
도면37



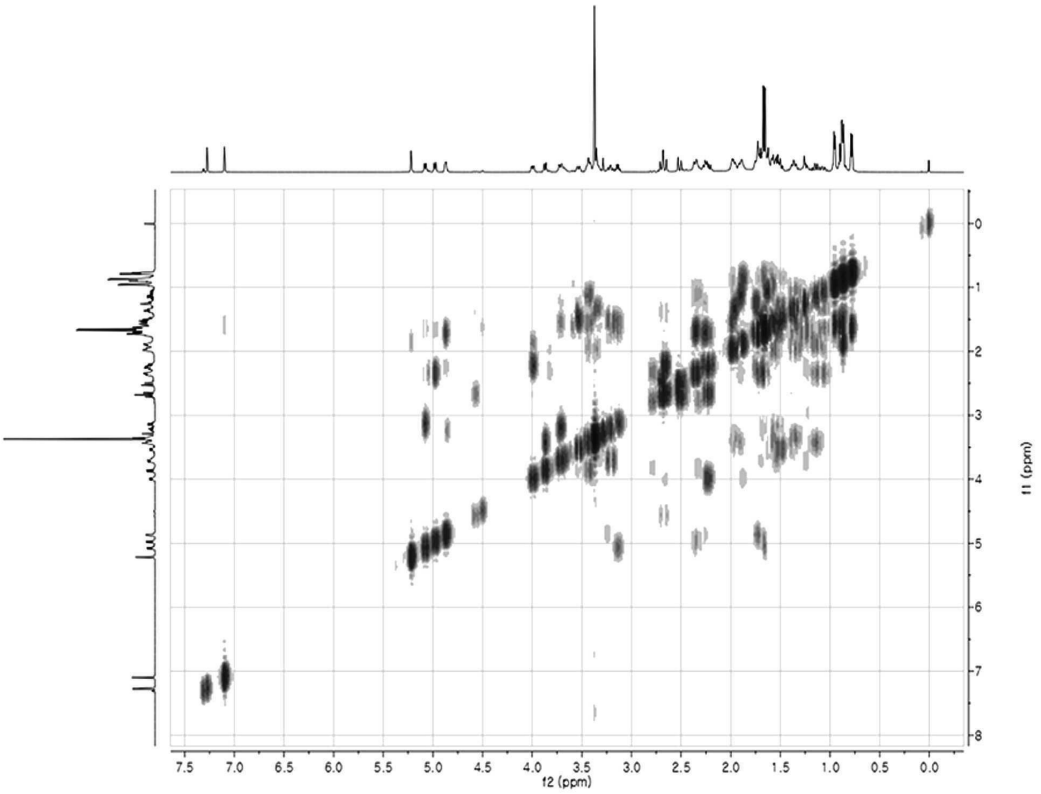
도면38



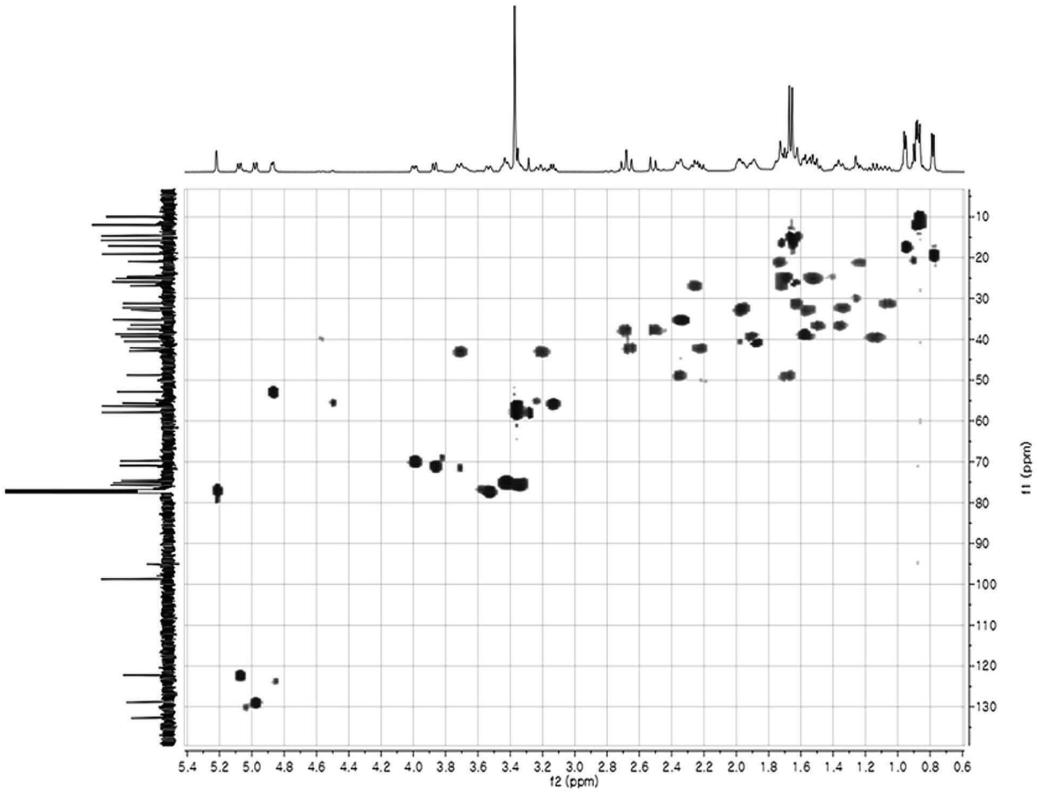
도면39



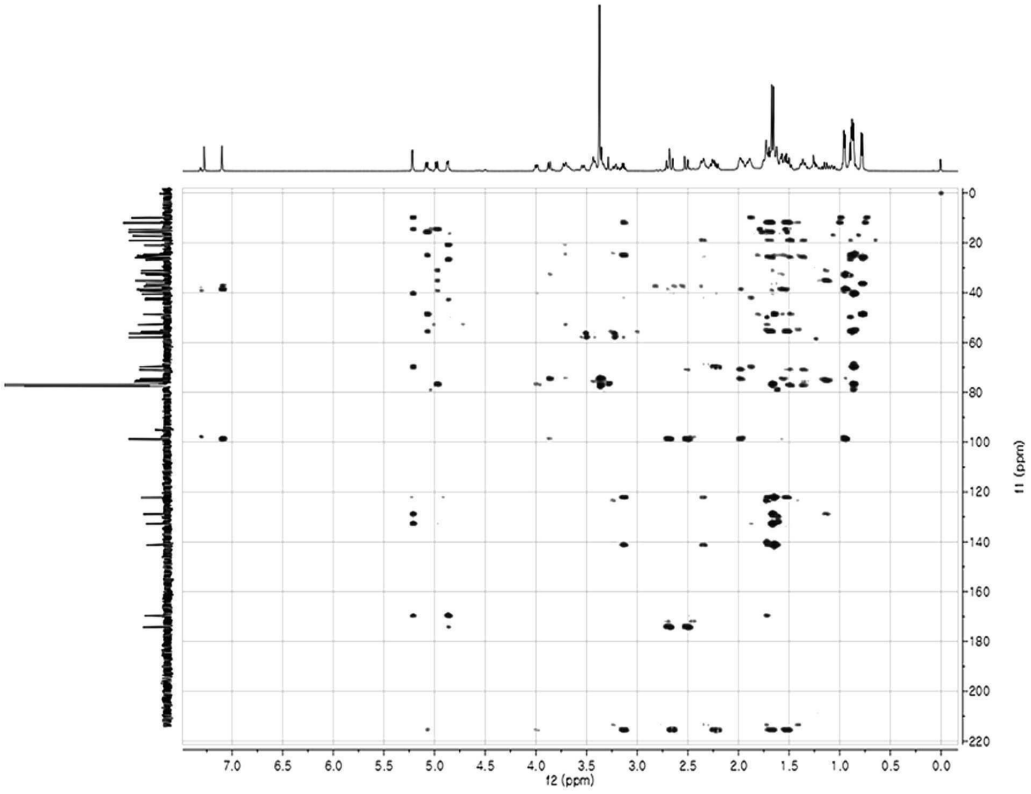
도면40



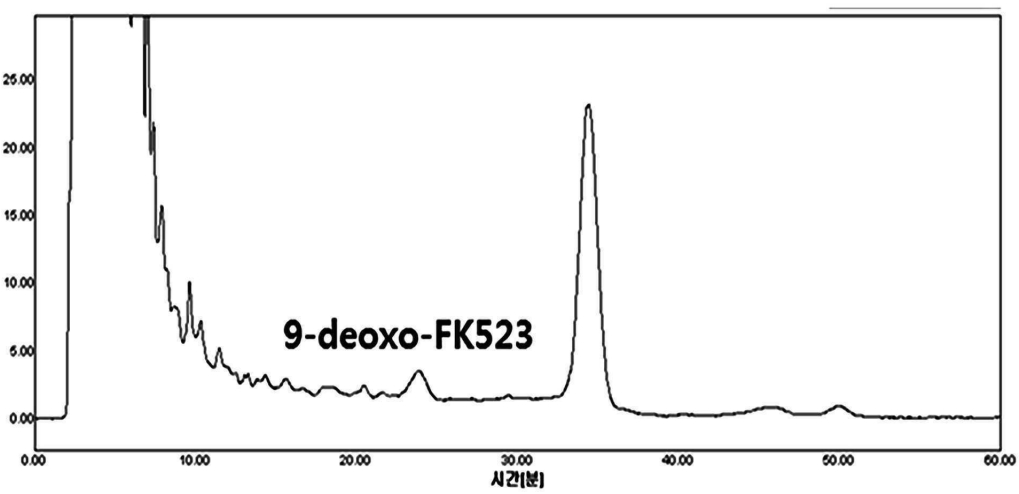
도면41



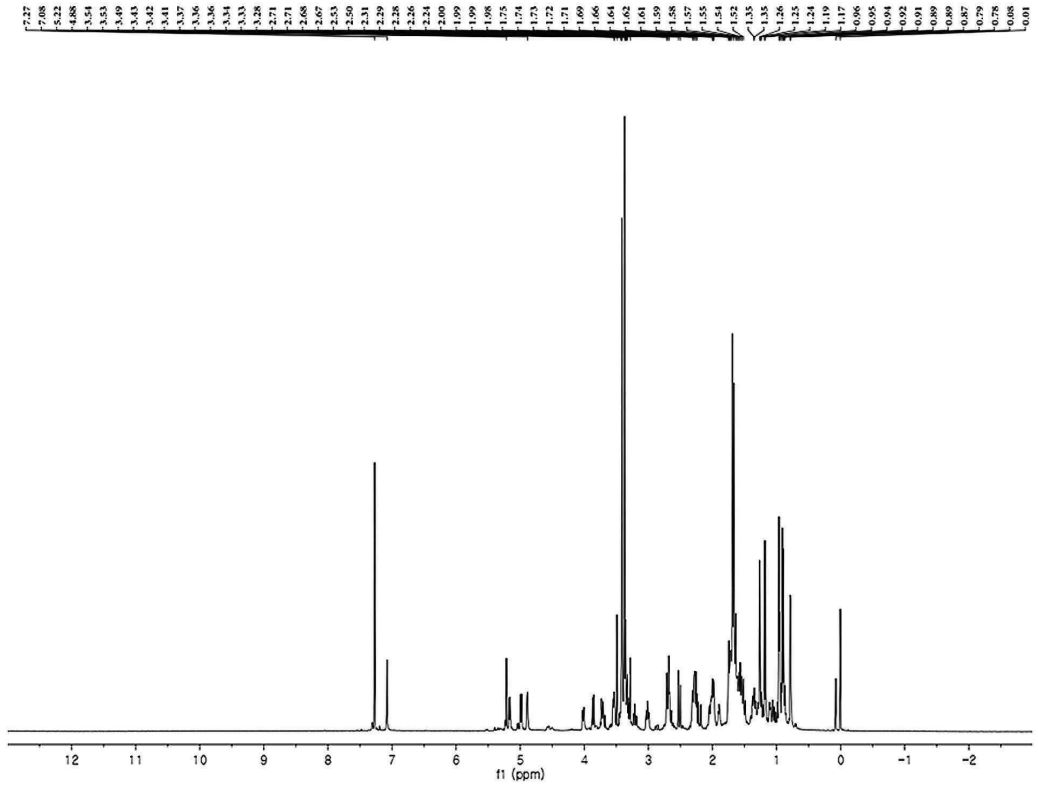
도면42



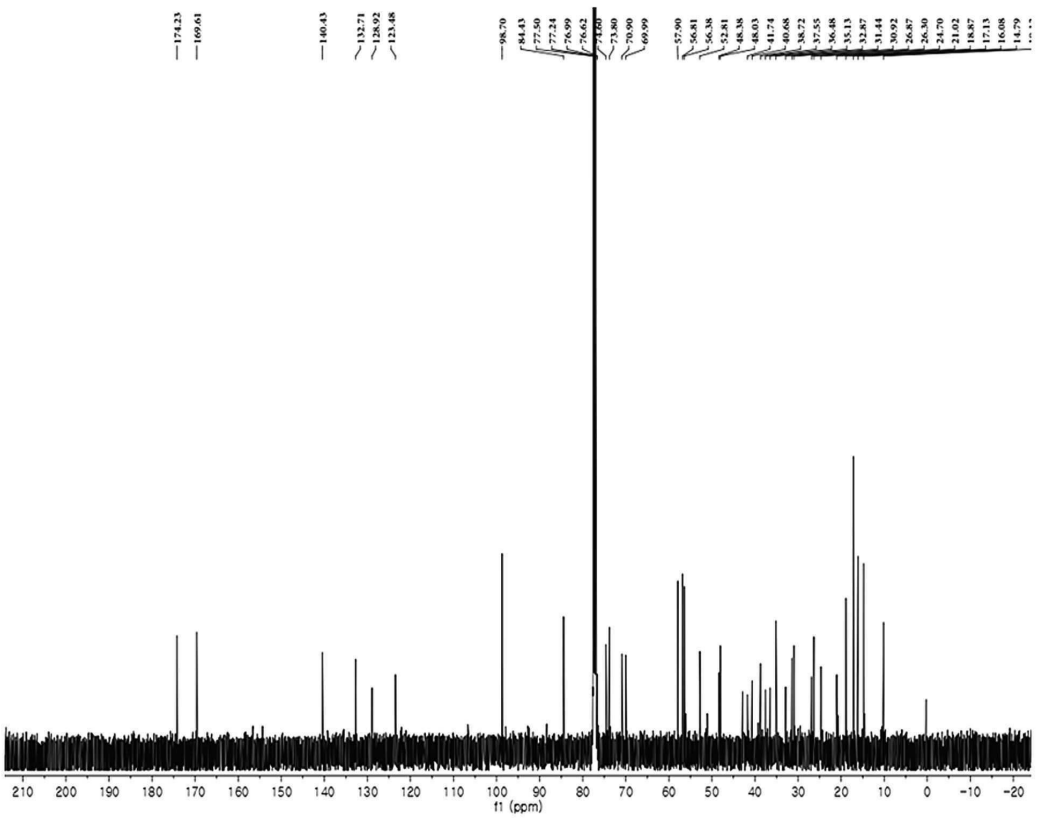
도면43



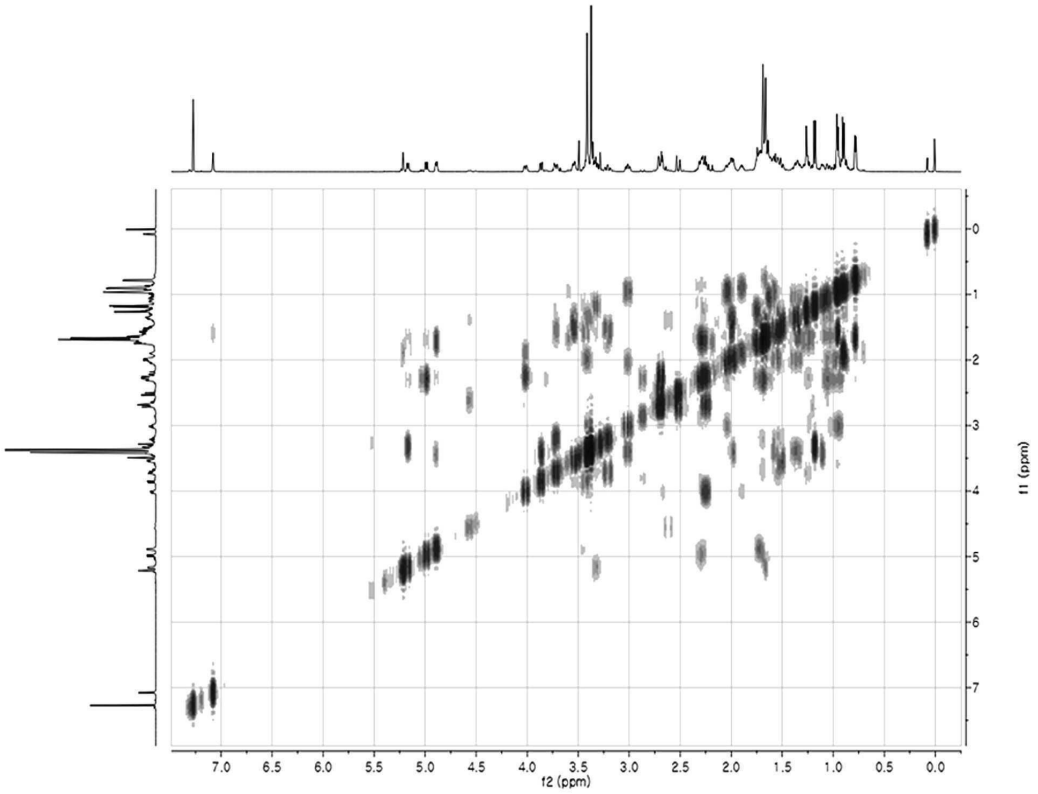
도면44



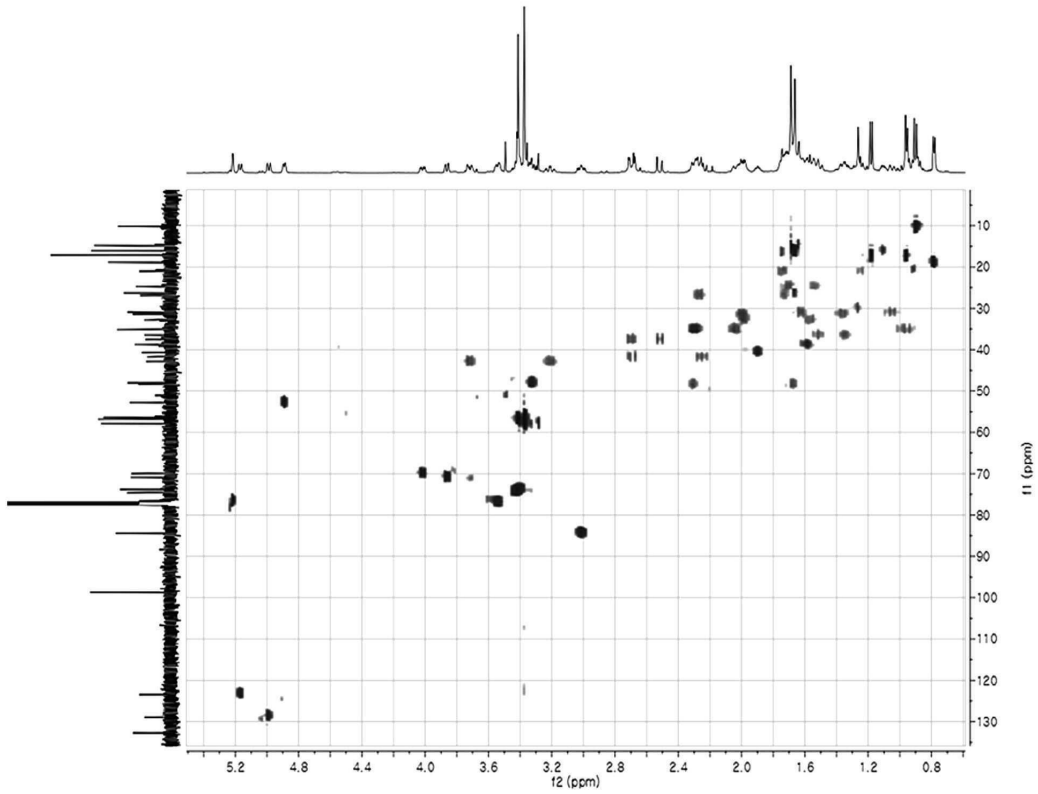
도면45



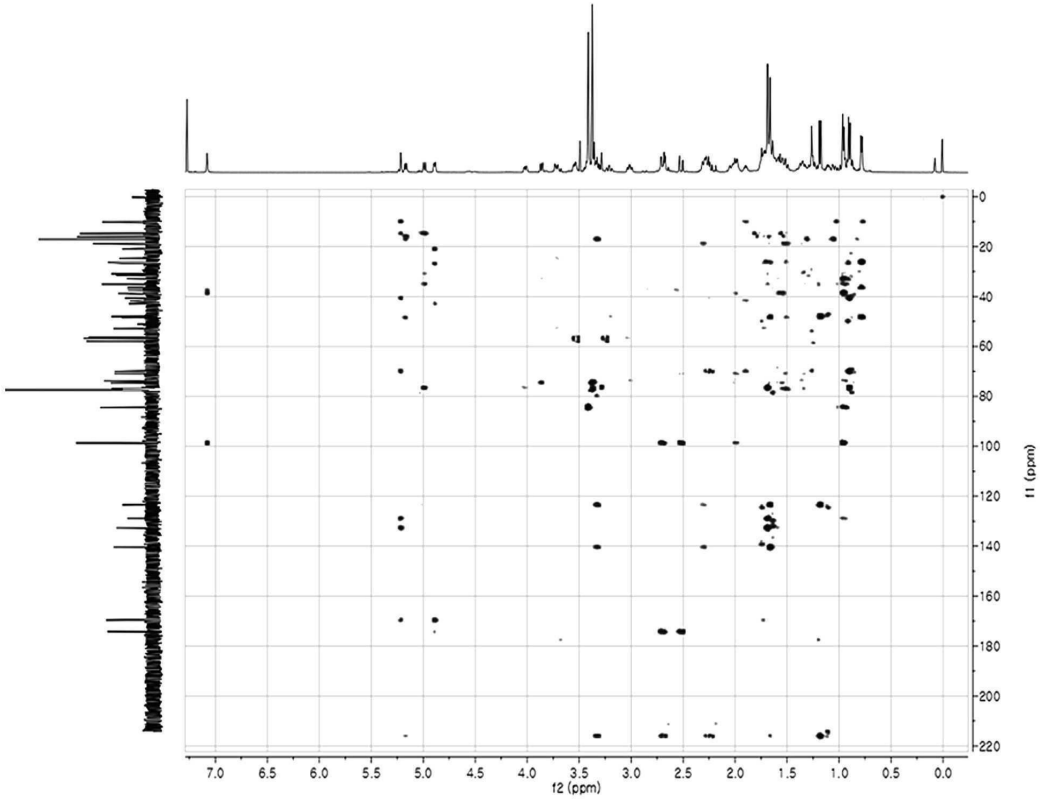
도면46



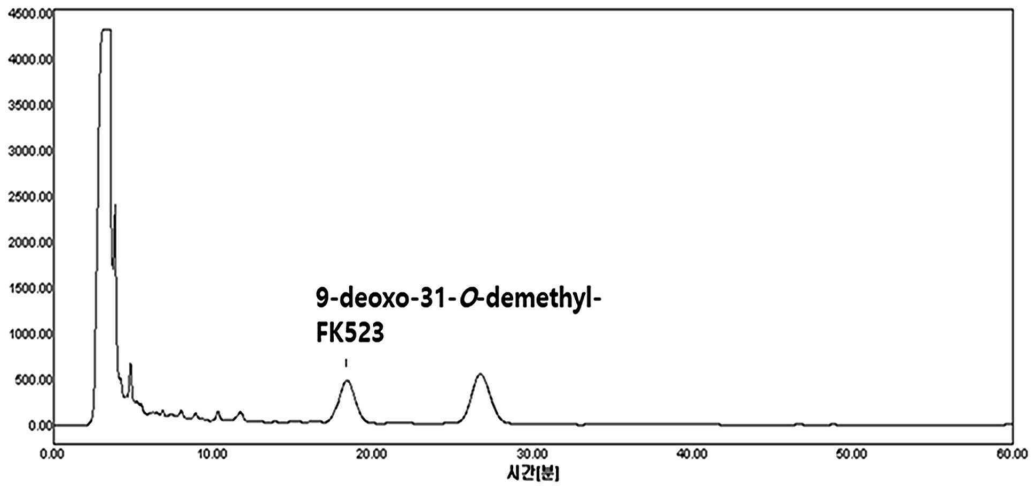
도면47



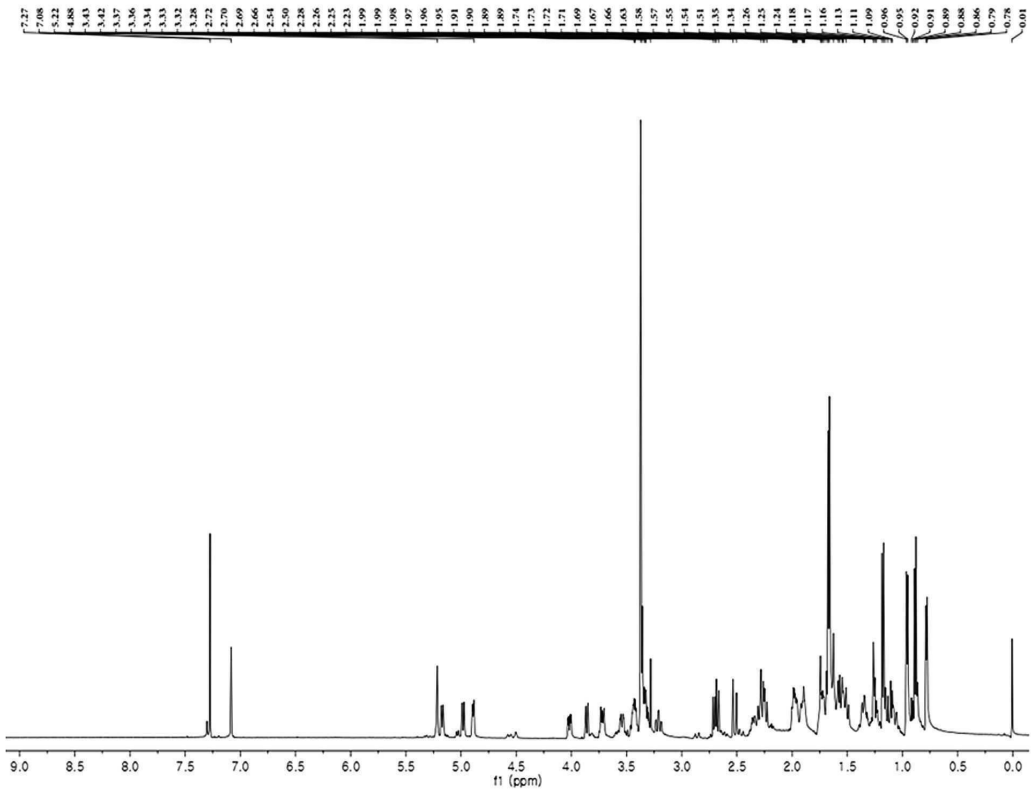
도면48



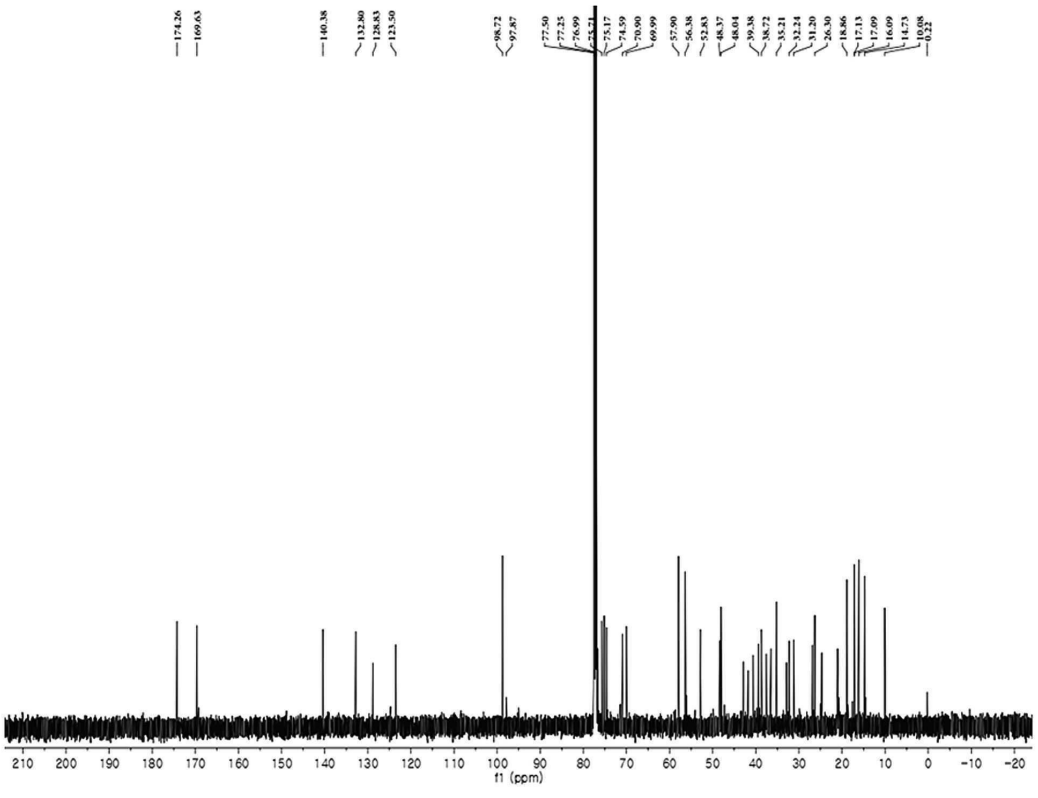
도면49



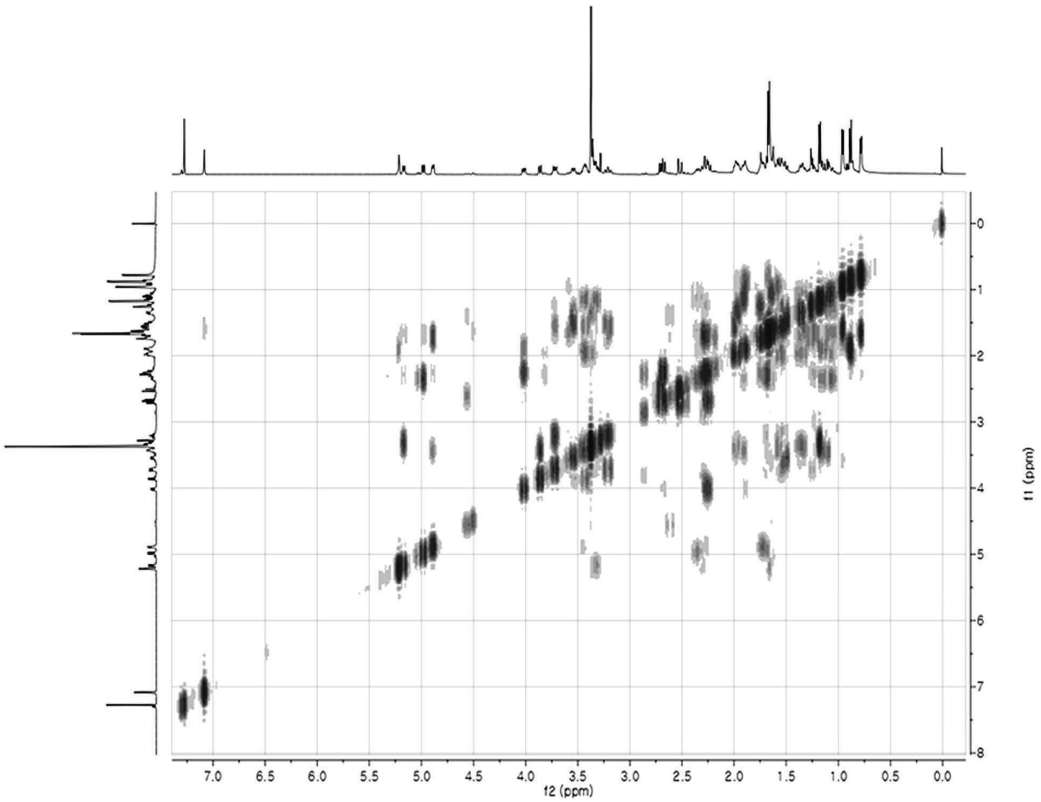
도면50



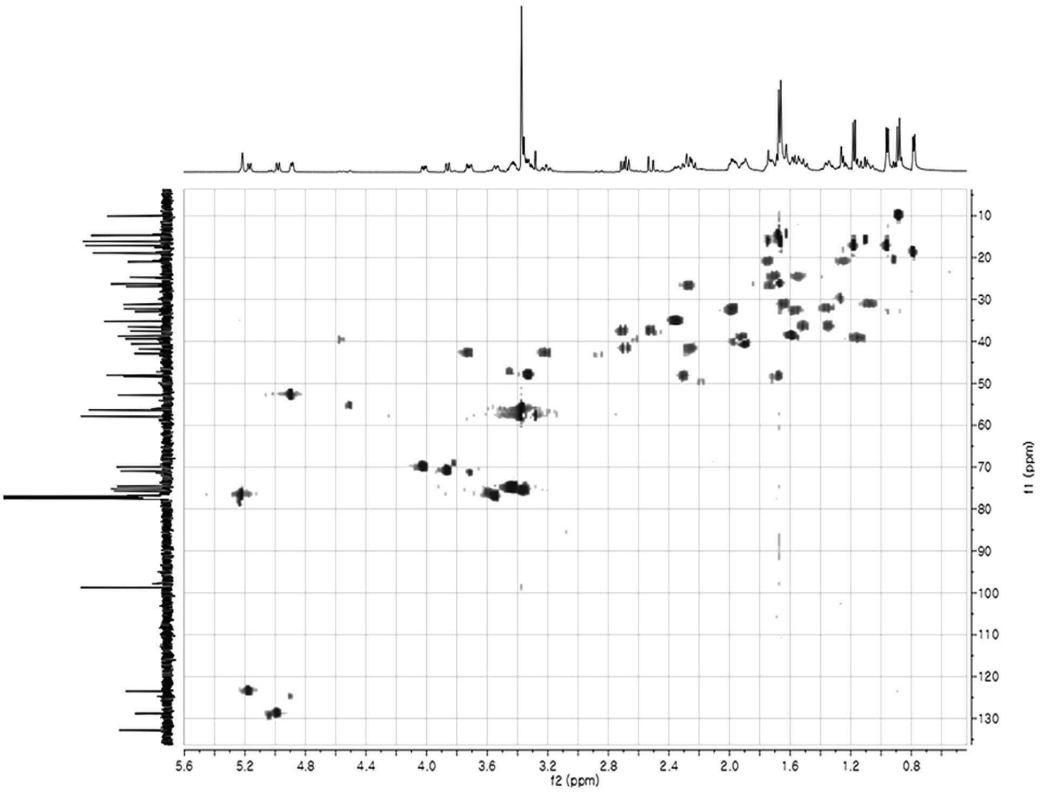
도면51



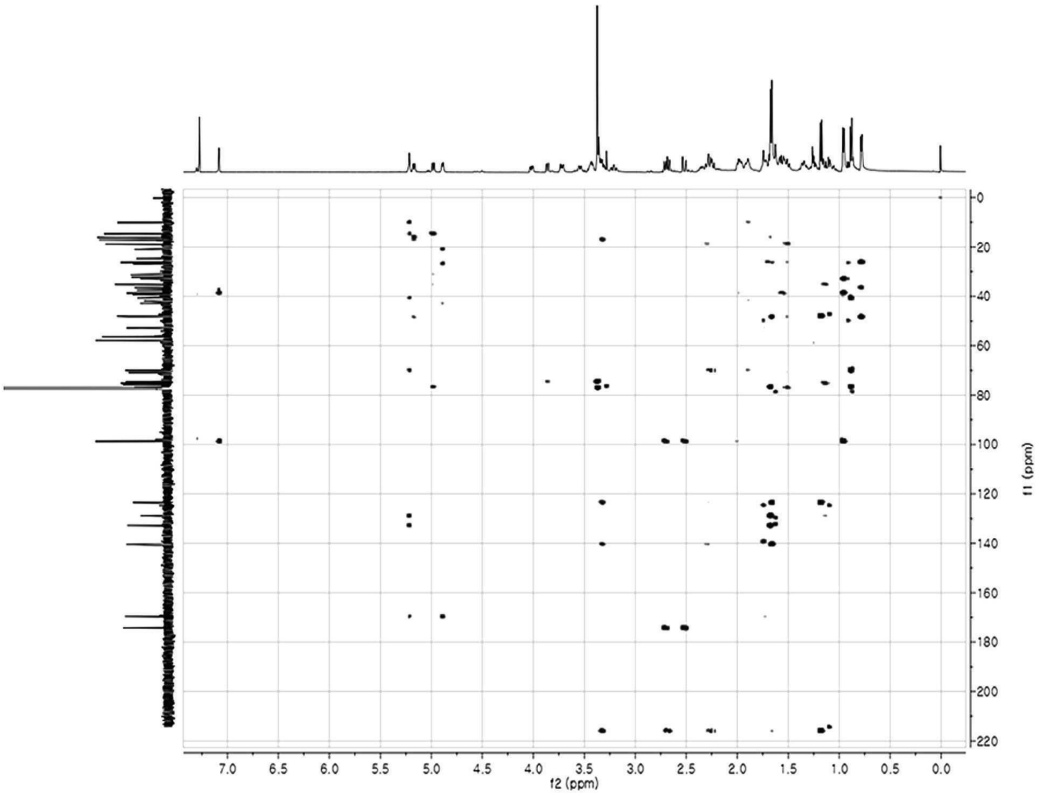
도면52



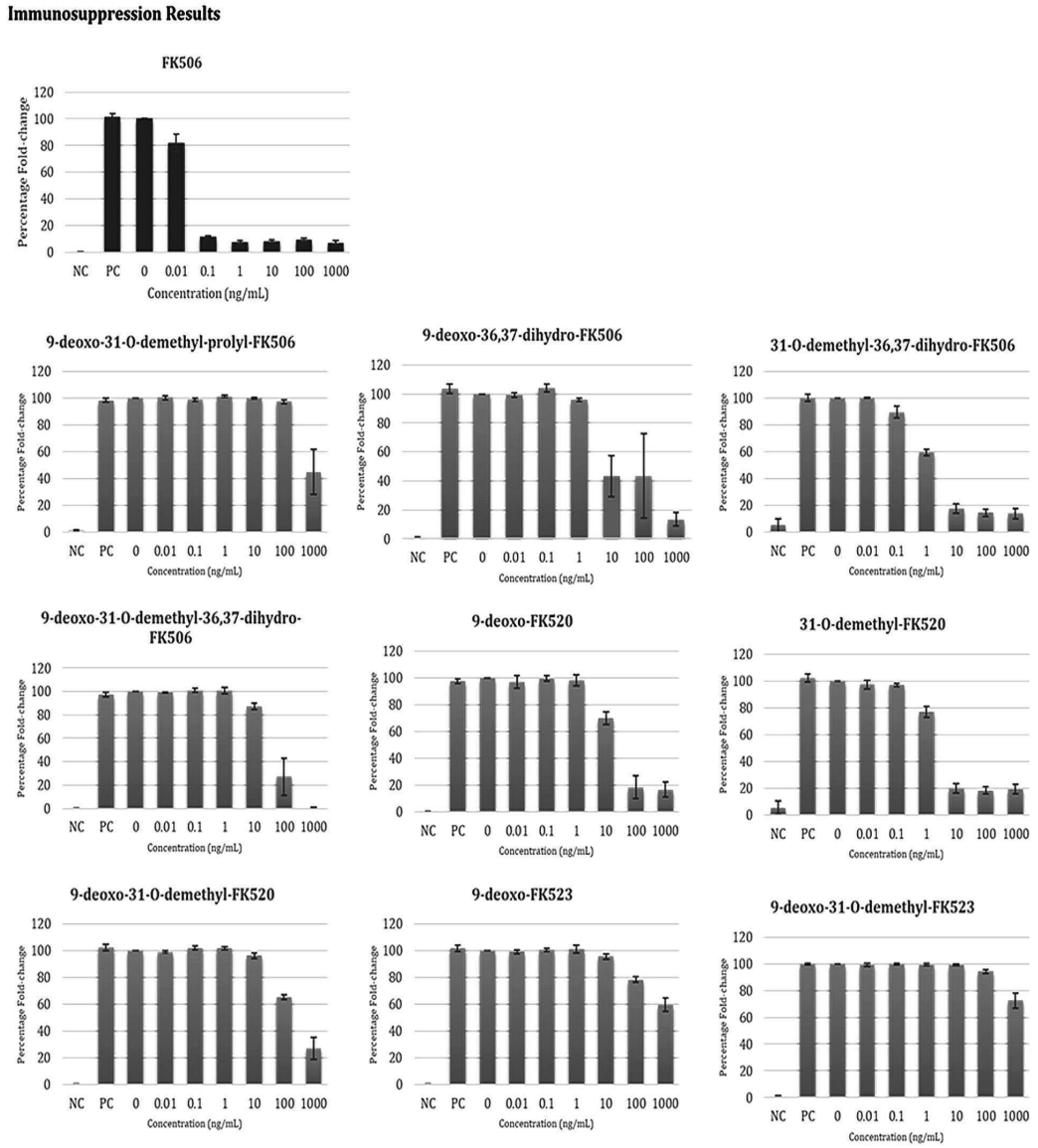
도면53



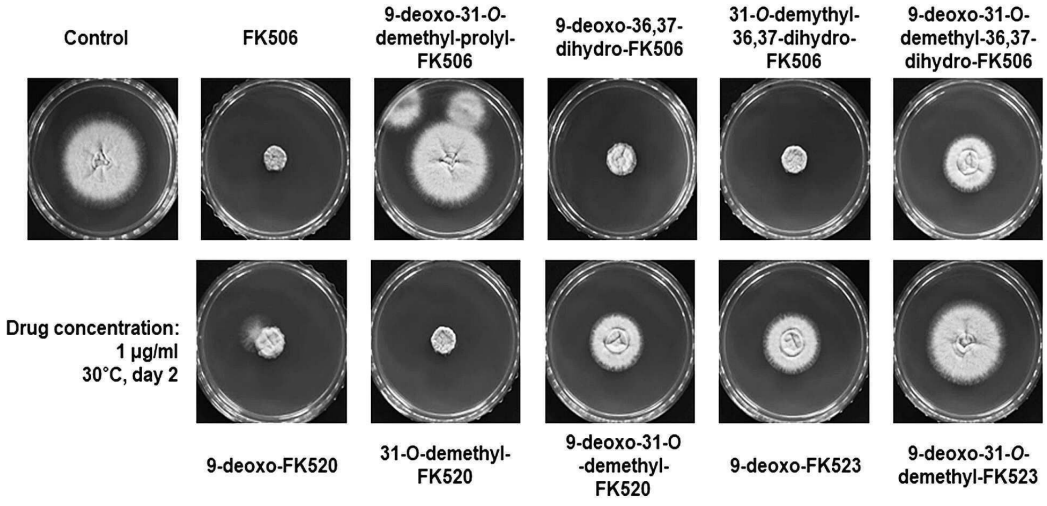
도면54


0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
f1 (ppm)
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
f2 (ppm)

도면55


Immunosuppression Results
FK506
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-FK523
Percentage Fold-change
Concentration (ng/mL)
NC PC 0 0.01 0.1 1 10 100 1000

도면56


Control
FK506
9-deoxo-31-O-demethyl-prolyl-FK506
9-deoxo-36,37-dihydro-FK506
31-O-demythyl-36,37-dihydro-FK506
9-deoxo-31-O-demethyl-36,37-dihydro-FK506
Drug concentration:
1 μg/ml
30°C, day 2
9-deoxo-FK520
31-O-demethyl-FK520
9-deoxo-31-O-demethyl-FK520
9-deoxo-FK523
9-deoxo-31-O-demethyl-FK523