(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0093722
(43) 공개일자 2022년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 15/22 (2006.01) *A01N 43/16* (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12P 19/58* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07H 15/22 (2013.01)
A01N 43/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0184742
(22) 출원일자 2020년12월28일
심사청구일자 2020년12월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박제원
경기도 고양시 일산동구 위시티1로 7, 504동 904호 (식사동, 위시티블루밍5단지아파트)
이나준
서울특별시 동대문구 홍릉로17길 31-2 (제기동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

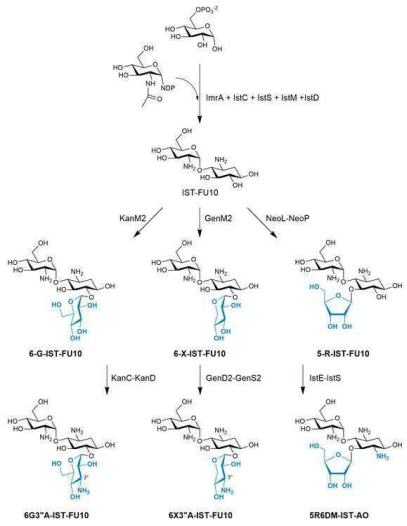
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물, 이의 제조방법, 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물, 및 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 넌센스 돌연변이 관련 유전질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물은 이스타마이신 구조에 반합성법을 적용하여 제조된 신규 화합물로서, 대장균과 녹농균을 포함하는 그람음성 병원균과 아미노글리코사이드계 항생제에 내성을 나타내는 그람음성 내성균에 대한 우수한 항세균 활성을 갖는다. 또한, 본 발명의 상기 화합물은 낭성 섬유증 환자 적출 세포주를 대상으로 한 인비트로(*in vitro*) 실험에서 기존 아미노글리코사이드 대비 상대적으로 향상된 리드 스루(read through) 유도 활성을 갖는다. 따라서 본 발명의 상기 화합물은 항생제 및 넌센스 돌연변이 관련 유전질환 치료제의 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/7048 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 21/00 (2018.01)
C12N 15/70 (2013.01)
C12P 19/58 (2013.01)

(72) 발명자
김혜지
서울특별시 성북구 고려대로13길 18-20 (안암동2가)
위재복
서울특별시 금천구 독산로65길 27 (독산동)
이지윤
서울특별시 강남구 남부순환로381길 15, 101동 903호 (도곡동, 포스코트아파트)
김창래
서울특별시 용산구 이촌로 260, 2동 705호 (이촌동, 삼익아파트)
유휘소
서울특별시 성동구 무학로 33, 112동 1704호 (하왕십리동, 텐즈힐)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395062782
과제번호 PJ013179012020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명 시스템합성생물학 기반 피부미백 당부가 단순 페놀릭 소재 생산 최적화
기 여 율 2/10
과제수행기관명 고려대학교산학협력단
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711111906
과제번호 2020R1A2C2008061
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 아미노글리코사이드 항생제 3′,4′-dideoxy 생합성경로의 규명 및 재설계
기 여 율 8/10
과제수행기관명 고려대학교산학협력단
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

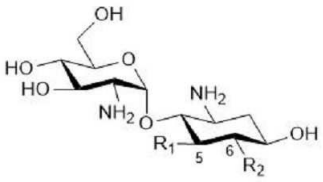
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

<화학식 1>



상기 식에서,

R_1은 OH 또는 라이보스(ribose)이고,

R_2는 OH 또는 NH_2 또는 글루코스(glucose) 또는 자일로스(xylose) 또는 3"-데히드록시(dehydroxy)-아미노(amino)-글루코스 또는 3"-데히드록시(dehydroxy)-아미노(amino)-자일로스이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

i) 6-glucosyl-IST-FU10(6-글루코실-이스타마이신 FU-10; 6-G-IST-FU10);

ii) 6-xylosyl-IST-FU10(6-크실로실-이스타마이신 FU-10; 6-X-IST-FU10);

iii) 5-ribosyl-IST-FU10(5-리보실-이스타마이신 FU-10; 5-R-IST-FU10);

iv) 3"-dehydroxy-amino-6-glucosyl-IST-FU10(3"-데히드록시-아미노-6-글루코실-이스타마이신 FU-10; 6G3"A-IST-FU-10);

v) 3"-dehydroxy-amino-6-xylosyl-IST-FU10(3"-데히드록시-아미노-6-크실로실-이스타마이신 FU-10; 6X3"A-IST-FU-10); 및

vi) 5-ribosyl-6-desmethyl-IST-AO(5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO; 5R6DM-IST-AO)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 항생제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화합물은 그람음성 병원균 및 그람음성 항생제 내성균에 대한 항균활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 항생제 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 그람음성 병원균은 대장균 및 녹농균인 것을 특징으로 하는, 항생제 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 항생제 내성균은 항생제로서 겐타마이신(gentamicin), 이세파마이신(isepacin) 또는 아미카신(Amikacin)에 대한 내성을 갖는 것을 특징으로 하는, 항생제 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 넌센스 돌연변이 관련 유전질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 화합물은 넌센스 돌연변이에 의해 생성된 조기 종결코돈(premature stop codon)의 리드 스루(read through) 유도 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 넌센스 돌연변이 관련 유전질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 유전질환은 낭성 섬유증 (cystic fibrosis), 듀시엔형 근이영양증 (duchenne muscular dystrophy, DMD), 모세혈관 확장성 운동 실조증후군 (ataxia telangiectasia), 헐러 증후군 (hurler syndrome), A형 혈우병 (hemophilia A), B형 혈우병 (hemophilia B), 및 테이-삭스 병 (tay-sachs)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 넌센스 돌연변이 관련 유전질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

1) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s* 및 *kanM2* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC1);

2) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s* 및 *genM2* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC2);

3) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s*, *neoL* 및 *neoP* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC3);

4) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s*, *kanM2*, *kanC* 및 *kanD* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC4);

5) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s*, *genM2*, *genD2* 및 *genS2* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC5); 및

6) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s*, *istE_s*, *neoL* 및 *neoP* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC6)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 제1항의 화합물 생산능을 가지는 재조합 대장균.

청구항 11

a) 제7항의 재조합 대장균 균주의 발효과정을 거쳐 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물을 얻는 단계; 및

b) 상기 화합물을 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography; MPLC) 방법으로 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 제1항의 화합물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물, 이의 제조방법, 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물, 및 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 넌센스 돌연변이 관련 유전질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 넌센스 돌연변이(nonsense-mutation)에 의해 유발되는 유전질환에서, 단백질은 유전자 상의 점 돌연변이(point mutation)에 의해 생성된 조기 종결코돈(premature stop codon)으로 인하여 발현이 억제된다. 넌센스 돌연변이(nonsense-mutation)에 의해 유발되는 유전질환의 예로는 근위축증, 다발성 경화증, 소아신경성지방갈색소증, 알츠하이머병, 테이-삭스병, 신경조직변성, 파킨슨병, 만성 류마티스 관절염, 이식편대숙주병, 관절염, 혈우병, 폰 빌레브란트 병, 모세혈관확장성 운동실조증, 지중해성빈혈, 신장결석, 불완전골생성증, 경화증, 신경섬유종증, 수포성질환, 라이소솜저장병, 헐러병, 가족성 콜레스테롤혈증, 소뇌성 운동실조증, 결절성 경화증, 가족성 적혈구증다증, 면역 결핍증, 신장질환, 폐질환, 낭성섬유증, 가족성 고콜레스테롤혈증, 망막색소변성증, 아밀로이드증, 동맥경화증, 거인증, 왜소증, 갑상선 기능 저하증, 갑상선 기능 항진증, 노화, 비만, 당뇨, 니만-피크병, 마르팡증후군 및 암을 포함한다.

[0003] 예를 들어, 뒤시엔느 근위축증은 횡문근형질막에서의 디스트로핀(dystrophin) 단백질의 결핍으로 인해 야기된다. 이 경우에, X 염색체에 존재하는 근육 이영양 유전자 상의 돌연변이로 인하여 종결코돈(조기 종결코돈)이 생성되고, 돌연변이 위치에서 번역이 방해받거나 종결된다. 따라서 그 결과로서 디스트로핀 및 디스트로핀-관련 단백질들의 정상적인 발현이 억제되고, 상기 질환을 앓는 환자는 디스트로핀 단백질의 결핍을 겪는다.

[0004] 이러한 넌센스 돌연변이(nonsense-mutation)로 유발되는 유전질환을 치료하기 위하여, 리드 스루(read through) 유도 활성을 가지는 물질의 도입이 시도되었다. 리드 스루(read through) 유도 활성이란 특정 물질이 넌센스 돌연변이로 생성된 조기 종결코돈을 가져 특정 단백질이 결핍된 환자에 투여되었을 때, 상기 물질이 라이보솜(ribosome)에 작용함으로써 라이보솜(ribosome)이 종결코돈을 리드 스루(read through)하여 번역을 계속할 수 있도록 유도하는 활성을 말한다. 리드 스루(read through)의 결과로서, 야생형의 정상 단백질이 합성될 수 있다.

[0005] 한편, 아미노글리코사이드(aminoglycoside)계 항생제인 겐타마이신은 이러한 리드 스루(read through) 유도 활성을 가지는 대표적인 물질로 알려져 있다.

[0006] 아미노글리코사이드(aminoglycoside)는 주로 세균성 감염증 처치를 위해 일반적으로 사용되는, 광범위하게 적용 가능한 가장 오래된 역사를 가진 항세균제로 알려져 있다. 크게 두 가지 카테고리로 구분되며, 우선 아미노글리코사이드 화합물의 주요 구조로서 2-데옥시스트렙타민(2-deoxystreptamine)을 함유하는 아미노글리코사이드 계열 항세균제들 중 대표적으로 카나마이신(kanamycin), 겐타마이신(gentamicin) 및 네오마이신(neomycin) 등의 천연 항세균제와 이들 천연 항세균제에 화학적 반합성법(semi-synthetic process)을 적용한 2세대 계열인 아미카신(amikacin), 이세파마이신(isepamicin) 등이 현재 항세균제로 임상 사용 중에 있다. 다음으로, 주요 구조로 스킬로이노사민(scyllo-inosamine)을 함유하는 아미노사이클리톨 계열로는 최초의 결핵제였던 스트렙토마이신(streptomycin) 외에도 포티마이신(fortimicin)과 이스타마이신(istamycin) 등이 있다. 특히, 이스타마이신은 주요 구조인 2-데옥시-스킬로이노사민(2-deoxy-scyllo-inosamine)에 추가적으로 하나의 당이 부가된 의사이당(pseudo-disaccharide)구조로서 2-데옥시스트렙타민 함유 항세균제들에 저항성을 가진 내성세균들에 특이적으로 그 항세균 활성을 유지하고 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 그러나 최근까지 보고된 유기합성이나 생합성 제조방법을 통하여 아미노글리코사이드(aminoglycoside) 구조를 변형한 화합물에 대한 보고들은 모두 감염질환 치료와 관련된 신규 항세균제의 발명 및 그 항세균 활성 이점만을 제시하고 있을 뿐, 이들의 리드 스루(read through) 유도 활성에 대한 연구는 미비한 실정이다.

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 2-데옥시-스킬로이노사민과 2-데옥시스트렙타민을 포함하는 아미노글리코사이드들의 생합성과 관련된 다양한 유전자 조합을 야생균주 유전체로부터 증폭하거나 혹은 이종숙주 발현을 위한 코돈 최적화로 인공 합성하여 이종숙주인 대장균에 도입한 후, 재조합 미생물 세포 공장을 통한 신규 구조의 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물 화합물을 제조하였으며, 이렇게 제조된 신규 화합물이 그람음성 병원성 세균에 대한 우수한 항균활성을 보임과 동시에, 낭성 섬유증 환자 적출 세포주를 대상으로 한 인비트(*in vitro*)로 실험에서 낭포성섬유증 막관통 조절인자(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, 이하 간략하게 'CFTR'라 약칭함)의 리드 스루(read through) 유도 활성을 확인하였다. 따라서 본 발명의 신규 화합물은 그람음성 항세균제 및 유전질환 치료를 위한 의약품 소재로 유용하게 이용할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0123509호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 넌센스 돌연변이 관련 유전질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

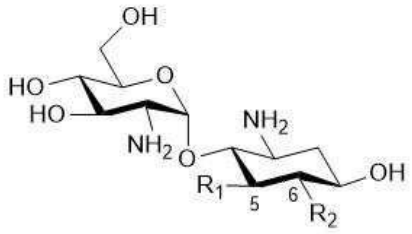
[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물 생산능을 가지는 재조합 대장균을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 대장균을 이용하여 상기 화합물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0016] <화학식 1>



[0017]

[0018] 상기 식에서,

[0019] R1은 OH 또는 라이보스(ribose)이고,

[0020] R2는 OH 또는 NH2 또는 글루코스(glucose) 또는 자일로스(xylose) 또는 3"-데히드록시(dehydroxy)-아미노(amino)-글루코스 또는 3"-데히드록시(dehydroxy)-아미노(amino)-자일로스이다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화합물은 i) 6-glucosyl-IST-FU10(6-글루코실-이스타마이신 FU-10; 6-G-IST-FU10), ii) 6-xylosyl-IST-FU10(6-크실로실-이스타마이신 FU-10; 6-X-IST-FU10), iii) 5-ribosyl-IST-FU10(5-리보실-이스타마이신 FU-10; 5-R-IST-FU10), iv) 3"-dehydroxy-amino-6-glucosyl-IST-FU10(3"-데히드록시-아미노-6-글루코실-이스타마이신 FU-10; 6G3"A-IST-FU-10), v) 3"-dehydroxy-amino-6-xylosyl-IST-FU10(3"-데히드록시-아미노-6-크실로실-이스타마이신 FU-10; 6X3"A-IST-FU-10), 및 vi) 5-ribosyl-6-desmethyl-IST-AO(5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO; 5R6DM-IST-AO)로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는, 항생제 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화합물은 그람음성 병원균 및 그람음성 항생제 내성균에 대한 항균활성을 가질 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 그람음성 병원균은 대장균 및 녹농균일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항생제 내성균은 항생제로서 겐타마이신(gentamicin), 이세파마이신(isepacin) 또는 아미카신(Amikacin)에 대한 내성을 가질 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는, 넌센스 돌연변이 관련 유전질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화합물은 넌센스 돌연변이에 의해 생성된 조기 종결코돈(premature stop

codon)의 리드 스루(read through) 유도 활성을 가질 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전질환은 낭성 섬유증 (cystic fibrosis), 듀시엔형 근이영양증 (duchenne muscular dystrophy, DMD), 모세혈관 확장성 운동 실조증후군 (ataxia telangiectasia), 헐러 증후군 (hurler syndrome), A형 혈우병 (hemophilia A), B형 혈우병 (hemophilia B), 및 테이-삭스 병 (tay-sachs)으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 1) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s* 및 *kanM2* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC1); 2) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s* 및 *genM2* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC2); 3) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s*, *neoL* 및 *neoP* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC3); 4) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s*, *kanM2*, *kanC* 및 *kanD* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC4); 5) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s*, *genM2*, *genD2* 및 *genS2* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC5); 및 6) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s*, *istE_s*, *neoL* 및 *neoP* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC6)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 상기 화합물 생산능을 가지는 재조합 대장균을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 a) 제7항의 재조합 대장균 균주의 발효과정을 거쳐 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물을 얻는 단계; 및 b) 상기 화합물을 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography; MPLC) 방법으로 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 상기 화합물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물은 이스타마이신 구조에 반합성법을 적용하여 제조된 신규 화합물로서, 대장균과 녹농균을 포함하는 그람음성 병원균과 아미노글리코사이드계 항생제에 내성을 나타내는 그람음성 내성균에 대한 우수한 항세균 활성을 갖는다. 또한, 본 발명의 상기 화합물은 낭성 섬유증 환자 적출 세포주를 대상으로 한 인 비트로(*in vitro*) 실험에서 기존 아미노글리코사이드 대비 상대적으로 향상된 리드 스루(read through) 유도 활성을 갖는다. 따라서 본 발명의 상기 화합물은 항생제 및 넌센스 돌연변이 관련 유전질환 치료제의 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명의 신규 구조 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물 6종의 화학적 구조 및 생합성 경로 모식도이다.

도 2는 본 발명의 신규 구조 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물들의 HPLC-ESI-MS/MS 크로마토그램이다.

도 3은 본 발명의 신규 구조 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물들의 대장균과 녹농균 포함 그람음성 병원균 및 아미노글리코사이드 항세균제에 내성을 나타내는 그람음성 대장균 그리고 아미노글리코사이드 내성 기작을 임의 발현한 재조합 대장균 대상 인 비트로(*in vitro*) 항세균 활성을 비교한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 신규 구조 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 아미노사이클리톨 화합물들의 낭성 섬유증 (cystic fibrosis) 환자 적출 일차 세포주 대상으로 인 비트로(*in vitro*) 리드 스루(read through) 유도 활성을 비교한 그래프이다.

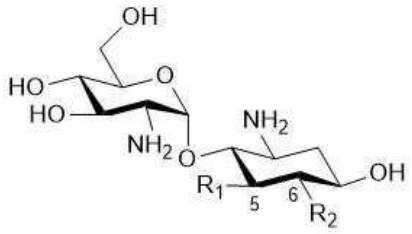
도 5는 pNB181 벡터맵을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0035] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0036] <화학식 1>



[0037]

[0038] 상기 식에서,

[0039] R_1은 OH 또는 라이보스(ribose)이고,

[0040] R_2는 OH 또는 NH_2 또는 글루코스(glucose) 또는 자일로스(xylose) 또는 3"-데히드록시(dehydroxy)-아미노(amino)-글루코스 또는 3"-데히드록시(dehydroxy)-아미노(amino)-자일로스이다.

[0041] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 대표적인 예는 다음과 같다:

[0042] i) 6-glucosyl-IST-FU10(6-글루코실-이스타마이신 FU-10; 6-G-IST-FU10),

[0043] ii) 6-xylosyl-IST-FU10(6-크실로실-이스타마이신 FU-10; 6-X-IST-FU10),

[0044] iii) 5-ribosyl-IST-FU10(5-리보실-이스타마이신 FU-10; 5-R-IST-FU10),

[0045] iv) 3"-dehydroxy-amino-6-glucosyl-IST-FU10(3"-데히드록시-아미노-6-글루코실-이스타마이신 FU-10; 6G3"A-IST-FU-10),

[0046] v) 3"-dehydroxy-amino-6-xylosyl-IST-FU10(3"-데히드록시-아미노-6-크실로실-이스타마이신 FU-10; 6X3"A-IST-FU-10), 및

[0047] vi) 5-ribosyl-6-desmethyl-IST-AO(5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO; 5R6DM-IST-AO)

[0048] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 아세트산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔술폰산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 황산을 사용할 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0050] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 화학식 1의 화합물이 결정 형태로 제조될 경우, 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 항생제 조성물을 제공한다.

[0053] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화합물은 그람음성 병원균 및 그람음성 항생제 내성균에 대한 항균활성을 가질 수 있다.

[0054] 대부분의 세균은 펩티드 결합(peptide bond)으로 연결된 긴 당 사슬의 중합체인 펩티도글라이칸(peptidoglycan)으로 구성된 세포벽에 의해 싸여있으며, 상기 펩티도글라이칸으로 구성된 세포벽의 차이로 그람양성균과 그람음성균을 나눌 수 있다. 그람양성균(Gram-positive)의 경우 이 펩티도글라이칸층의 세포벽이 매우 두껍고, 그람음성균(Gram-negative)은 인지질 이중층 사이에 얇은 세포벽을 가진다. 그람양성균의 두꺼운 펩티도글라이칸은 항생제에 대한 감수성을 가진다. 항생제가 펩티도글라이칸의 합성을 억제하기 때문이다. 그러나 그람음성균의 경우 펩티도글라이칸은 얇고 그보다 바깥쪽에 더 두꺼운 외막과 안쪽의 인지질 이중층이 있어 보다 복잡한 구조를 가지기 때문에 항생제에 대한 내성이 크다.

[0055] 본 발명의 화합물의 경우 그람음성 병원균 및 그람음성 항생제 내성균에 대한 항균활성을 가지는 것을 특징으로 한다. 상기에서 언급한 바와 같이, 그람양성균은 항생제 감수성을 가지는 반면, 그람음성균의 경우 항생제에 대한 내성이 크게 나타나는바, 그람양성균 대비 그람음성균에 대한 항균활성을 갖는 소재가 항생제로 더욱 유용하게 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 그람음성 병원균은 대장균 및 녹농균일 수 있다.

[0057] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 항생제 내성균은 아미노글리코사이드계 항생제에 대한 내성을 갖는 그람음성 내성균으로서, 자세하게는 겐타마이신(gentamicin), 이세파마이신(isepacin) 또는 아미카신(Amikacin)과 같은 항생제에 대한 내성을 가질 수 있다.

[0058] 본 발명의 하기 실험예에서는, 대장균과 녹농균 각각의 기준주(type strain) 2종과 임상분리주(clinical isolate) 2종; 상용 아미노글리코사이드 항세균제인 겐타마이신과 반합성 항세균제인 이세파마이신 및 아미카신에 대하여 내성을 나타내는 대장균 임상분리주 3종; 아미노글리코사이드 내성 기작 중 대표적인 아미노글리코사이드 변형효소 AAC(6')과 AAC(3)를 별도로 이종 발현시킨 아미노글리코사이드 내성의 재조합 대장균 2종과 함께 아미노글리코사이드 표적 16S rRNA 메틸전이효소(methyltrnasferase) 2종에 대한 항세균 활성을 측정하다. 그 결과 본 발명의 화합물의 경우 대장균과 녹농균 각각의 기준주 2종 및 임상분리주 2종과 더불어 상용 아미노글리코사이드 항세균제인 겐타마이신과 반합성 항세균제인 이세파마이신 및 아미카신에 대하여 내성을 나타내는 대장균 임상분리주 3종에 대하여 모두 항균활성이 우수한 것으로 나타났다. 또한, 본 발명의 화합물 중 5-리보실-이스타마이신 FU-10(5-R-IST-FU10) 및 5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO(5R6DM-IST-AO)의 경우 아미노글리코사이드 내성의 재조합 대장균 2종과 함께 아미노글리코사이드 표적 16S rRNA 메틸전이효소(methyltrnasferase) 2종에 대한 항세균 활성도 높은 것으로 나타났다(실험예 1 및 도 3 참조).

[0060] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 넌센스 돌연변이에 기인한 유전질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0061] 상기 유전질환은 인간의 퇴행성 유전질환으로서 근위축증, 다발성 경화증, 소아신경성지방갈색소증, 알츠하이머병, 테이-삭스병, 신경조직변성, 파킨슨병, 만성 류마티스 관절염, 이식편대숙주병, 관절염, 혈우병, 폰 빌레브란트 병, 모세혈관확장성 운동실조증, 지중해성빈혈, 신장결석, 불완전골생성증, 경화증, 신경섬유종증, 수포성 질환, 라이소솜저장병, 헐러병, 가족성 콜레스테롤혈증, 소뇌성 운동실조증, 결절성 경화증, 가족성 적혈구증다증, 면역 결핍증, 신장질환, 폐질환, 낭성섬유증, 가족성 고콜레스테롤혈증, 망막색소변성증, 아밀로이드증, 동맥경화증, 거인증, 왜소증, 갑상선 기능 저하증, 갑상선 기능 항진증, 노화, 비만, 당뇨, 니만-피크병, 마르팡 증후군 및 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환일 수 있으며, 더욱 바람직하게는, 낭성 섬유증, 듀시엔형 근이영양증, 모세혈관 확장성 운동 실조증후군, 헐러 증후군, A형 혈우병, B형 혈우병, 및 테이-삭스 병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환일 수 있다.

[0062] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 넌센스 돌연변이에 기인한 유전질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 넌센스 돌연변이에 기인한 유전질환이 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.

[0063] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 넌센스 돌연변이에 의해 생성된 조기 종결코돈(premature stop codon)의 리드 스루(read through) 유도 활성을 통해, 넌센스 돌연변이에 기인한 유전질환을 예방하거나 치료할 수 있다.

[0064] 본 발명에서, '리드 스루(read through) 유도 활성'이란 특정 물질이 넌센스 돌연변이로 생성된 조기 종결코돈을 가져 특정 단백질이 결핍된 환자에 투여되었을 때, 상기 물질이 라이보솜(ribosome)에 작용함으로써 라이보솜(ribosome)이 종결코돈을 리드 스루(read through)하여 번역을 계속할 수 있도록 유도하는 활성을 의미한다. 리드 스루(read through)의 결과로서, 야생형의 정상 단백질이 합성될 수 있다.

[0065] 본 발명의 하기 실험예에서는, 퇴행성 유전질환자인 낭성 섬유증 유전질환자로부터 적출한 세포주를 대상으로 하여 전 임상 초기 단계라 할 수 있는 생체 외 무의미 통독 활성 검정을 실시하였으며, 그 결과 본 발명의 화합물 중 5-리보실-이스타마이신 FU-10(5-R-IST-FU10) 및 5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO(5R6DM-IST-AO)의

경우 대조구(겐타마이신 대사 중간 유도체들인 G418, 겐타마이신 A2) 대비, 상대적으로 향상된 리드 스루(read through) 유도 활성을 확인하였다(실험예 2 및 도 4 참조).

[0066] 상기 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분(화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염) 이외에 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0067] 상기 약학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0068] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 99 중량%, 더욱 구체적으로는 0.01 중량% 내지 50 중량%를 포함할 수 있다. 한편, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 조성물에 0.1 내지 10000㎛M의 농도로 포함될 수 있다.

[0069] 또한, 본 발명은 넌센스 돌연변이에 기인한 유전질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 상기한 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 넌센스 돌연변이에 기인한 유전질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명은 포유동물에게 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 치료상 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 넌센스 돌연변이에 기인한 유전질환의 예방방법 또는 치료방법에 관한 것이다.

[0071] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0072] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 화합물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.0001㎎/㎏~1000㎎/㎏의 용량으로 투여할 수 있으나, 특별히 그 용량을 한정하는 것은 아니다.

[0073] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 약학적 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0074] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 종래 알려진 넌센스 돌연변이에 기인한 유전질환 치료제를 함께 제제화하거나 병용하여 사용할 수 있다.

[0076] 또한, 본 발명은 아래와 같은 아미노글리코사이드 생합성 관련 유전자 조합 바이오파트(bio-part)들을 내재하고 있는 바이오디바이스(bio-device) 및 상기 바이오디바이스로 형질전환 된 2-데옥시-스킬로이노사민 포함 이스타마이신 화합물들을 생산하는 대장균 재조합 균주들을 제공한다.

[0077] i) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s* 및 *kanM2* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC1)

[0078] ii) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s* 및 *genM2* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC2)

[0079] iii) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s* 및 *neoL*과 *neoP* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC3)

[0080] iv) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s* 및 *kanM2* 그리고 *kanC*와 *kanD* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC4)

[0081] v) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s* 및 *genM2* 그리고 *genD2*와 *genS2* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC5)

[0082] vi) *imrA_s*, *istC_s*, *istS_s*, *istM_s*, *istD_s* 및 *istE_s* 그리고 *neoL*과 *neoP* 외래 유전자 조합 도입된 대장균 균주(EC6)

[0083] 바람직하게는, *imrA*, *istC*, *istS*, *istM*, *istD* 및 *istE* 유전자들은 스트렙토마이세스 텐지마리엔시스(*Streptomyces tenjimariensis*) ATCC 31603 유전체 내 이스타마신 생합성 유전자 집단(GenBank 등록번호 AJ845083)에서 분리되었다.

[0084] 본 발명의 상기 *imrA_s* 유전자는 스트렙토마이세스 텐지마리엔시스(*Streptomyces tenjimariensis*) ATCC 31603 유전체 내 이스타마신 생합성 유전자 집단에서 확보하여 16S rRNA 메틸트랜스퍼라아제(methyltransferase)를 암호화하는 것으로 예측된 *imrA*(GenBank 등록번호 CAH60147) 유전자 산물을 이종숙주인 대장균 내 발현 및 유전자 조작 상 편이성을 위하여 코돈 최적화하여 제작한 인공 합성 유전자로서, 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[0085] 본 발명의 상기 *istC_s* 유전자는 스트렙토마이세스 텐지마리엔시스(*Streptomyces tenjimariensis*) ATCC 31603 유전체 내 이스타마신 생합성 유전자 집단에서 확보하여 2-데옥시-스킬로-이노소스 합성효소(2-deoxy-scyllo-inososе synthase)를 암호화하는 것으로 예측된 *istC*(GenBank 등록번호 CAH60159) 유전자 산물을 이종숙주인 대장균 내 발현 및 유전자 조작 상 편이성을 위하여 코돈 최적화하여 제작한 인공 합성 유전자로서, 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[0086] 본 발명의 상기 *istS_s* 유전자는 스트렙토마이세스 텐지마리엔시스(*Streptomyces tenjimariensis*) ATCC 31603 유전체 내 이스타마신 생합성 유전자 집단에서 확보하여 2-데옥시-스킬로-이노소스 아미노트랜스퍼라아제(2-deoxy-scyllo-inososе aminotransferase)를 암호화하는 것으로 예측된 *istS*(GenBank 등록번호 CAI59976) 유전자 산물을 이종숙주인 대장균 내 발현 및 유전자 조작 상 편이성을 위하여 코돈 최적화하여 제작한 인공 합성 유전자로서, 서열번호 3으로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[0087] 본 발명의 상기 *istM_s* 유전자는 스트렙토마이세스 텐지마리엔시스(*Streptomyces tenjimariensis*) ATCC 31603 유전체 내 이스타마신 생합성 유전자 집단에서 확보하여 글리코실트랜스퍼라아제(glycosyltransferase)를 암호화하는 것으로 예측된 *istM*(GenBank 등록번호 CAI59979) 유전자 산물을 이종숙주인 대장균 내 발현 및 유전자 조작 상 편이성을 위하여 코돈 최적화하여 제작한 인공 합성 유전자로서, 서열번호 4로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[0088] 본 발명의 상기 *istD_s* 유전자는 스트렙토마이세스 텐지마리엔시스(*Streptomyces tenjimariensis*) ATCC 31603 유전체 내 이스타마신 생합성 유전자 집단에서 확보하여 디아세틸라아제(deacetylase)를 암호화하는 것으로 예측된 *istD*(GenBank 등록번호 CAH60149) 유전자 산물을 이종숙주인 대장균 내 발현 및 유전자 조작 상 편이성을 위하여 코돈 최적화하여 제작한 인공 합성 유전자로서, 서열번호 5로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[0089] 본 발명의 상기 *istE_s* 유전자는 스트렙토마이세스 텐지마리엔시스(*Streptomyces tenjimariensis*) ATCC 31603 유전체 내 이스타마신 생합성 유전자 집단에서 확보하여 디하이드로게나아제(dehydrogenase)를 암호화하는 것으로 예측된 *istE*(GenBank 등록번호 CAI59982) 유전자 산물을 이종숙주인 대장균 내 발현 및 유전자 조작 상 편이성을 위하여 코돈 최적화하여 제작한 인공 합성 유전자로서, 서열번호 6으로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을

가질 수 있다.

[0090] 본 발명의 상기 *kanM2, kanC* 그리고 *kanD* 유전자들은 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamtceticus*) 유전체 내 카나마이신 생합성 유전자 집단에서 분리되었고, GenBank 등록번호 AJ628422 내 오픈 리딩 프레임 SkaJ19.24, SkaJ19.22 그리고 SkaJ19.25 이다. 본 발명의 상기 *kanM2, kanC* 및 *kanD* 유전자는 서열번호 7 내지 9로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[0091] 본 발명의 상기 *genM2* , *genD2* 그리고 *genS2* 유전자들은 마이크로모노스포라 에키노스포라(*Micromonospora echinospora*) 유전체 내 겐타마이신 생합성 유전자 집단에서 분리되었고, GenBank 등록번호 AJ628149 내 오픈 리딩 프레임 MecE04.13, MecE04.12 그리고 MecE04.15 이다. 본 발명의 상기 *genM2* , *genD2* 및 *genS2* 유전자는 서열번호 10 내지 12로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[0092] 본 발명의 상기 *neoL* 및 *neoP* 유전자는 스트렙토마이세스 프라디애(*Streptomyces fradiae*) 유전체 내 네오마이신 생합성 유전자 집단에서 분리되었고, GenBank 등록번호 AJ629247 내 오픈 리딩 프레임 SfrF04.12c와 SfrF04.8 이다. 본 발명의 상기 *neoL* 및 *neoP* 유전자는 서열번호 13 내지 14로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[0093] 본 발명의 각 대장균 재조합 균주의 발효를 통하여 생합성 되는 주요 이스타미이신 화합물은 아래와 같다.

[0094] EC1 균주: 이스타마이신 화합물 6-글루코실-이스타마이신 FU-10(6-G-IST-FU10)

[0095] EC2 균주: 이스타마이신 화합물 6-크실로실-이스타마이신 FU-10(6-X-IST-FU10)

[0096] EC3 균주: 이스타마이신 화합물 5-리보실-이스타마이신 FU-10(5-R-IST-FU10)

[0097] EC4 균주: 이스타마이신 화합물 3"-데히드록시-아미노-6-글루코실-이스타마이신 FU-10(6G3"A-IST-FU-10)

[0098] EC5 균주: 이스타마이신 화합물 3"-데히드록시-아미노-6-크실로실-이스타마이신 FU-10(6X3"A-IST-FU-10)

[0099] EC6 균주: 이스타마이신 화합물 5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO(5R6DM-IST-AO)

[0101] 또한, 본 발명은 상기 재조합 대장균 균주(EC1 내지 EC6로 이루어진 균주로부터 선택되는 1종의 균주)의 발효과정을 거쳐 2-데옥시-스킬로이노사민을 포함하는 이스타마이신 화합물을 얻는 단계를 포함하는, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공한다.

[0102] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 제조 방법은 본 발명의 화합물을 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography; MPLC) 방법으로 분리, 정제, 또는 분리 및 정제하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0104] [실시예]

[0105] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0107] **유전자 제조용 프라이머**

[0108] 재조합 미생물 제조에 사용하기 위해 PCR를 이용하여 하기 표 1의 유전자를 증폭하였다. PCR에 사용한 유전자 선택적인 프라이머(primer) 쌍은 각 유전자 단편의 서브클로닝을 용이하게 하기 위하여 양쪽 말단에 *Xba*I와 *Hind*III 제한 부위를 포함시켜 제작하였다.

표 1

[0110] PCR에 사용한 프라이머 서열

유전자/프라이머	서열 (5'->3')	제한효소	삽입위치	서열번호
kanM2-F	GGTCTAGAACCGAGCCTGCCAAGGGTG	*Xba*I	5'	15

kanM2-R	GGAAGCTTCGAGGAGGACCCTCACAGCCCG	*Hind*III	3'	16
kanC-F	GCCGGATCCTCGGACAAGGGCTATCAGGA	*BamH*I	5'	17
kanC-R	TATCTCGAGTGCCGTCCTGGTGGTAGTAG	*Xho*I	3'	18
kanD-F	ACAGGATCCATGAGCGCACTCGCTCTCGCC	*BamH*I	5'	19
kanD-R	AGTCTCGAGTCAGAGCTCGGCATGGTGCGC	*Xho*I	3'	20
genM2-F	CCGTCTAGACCGATCGTGTCGCACATCTA	*Xba*I	5'	21
genM2-R	AAGAAGCTTAAGTTGTCGGTGACCAGGTG	*Hind*III	3'	22
genD2-F	CAGGGATCCATGAGCACAGCCCAATCCCTC	*BamH*I	5'	23
genD2-R	CCGCTCGAGTCACCATGGTTGGGACTCCATTC	*Xho*I	3'	24
genS2-F	ACGGGATCCAGCTGTTCCACATCACC	*BamH*I	5'	25
genS2-R	GATCTCGAGTGTCCCGGACCTTGACC	*Xho*I	3'	26
neoL-F	TGATCTAGATGAAGCGGAAGTGGTACGTC	*Xba*I	5'	27
neoL-R	TCCAAGCTTTCCGAGATCGAGGCCCTG	*Hind*III	3'	28
neoP-F	CGTGGATCCCGTCCTCTTCGAGCTGCTG	*BamH*I	5'	29
neoP-R	ACCCTCGAGACCGGTGTTGCTGATCTTGA	*Xho*I	3'	30

[0112] **<실시예 1>**

[0113] **6-글루코실-이스타마이신 FU-10의 제조**

[0115] <1-1> 재조합 대장균 EC1 제작

[0116] 대장균 코돈 최적화로 합성한 인공 유전자 5종 *imrA_s*(서열번호 1), *istC_s*(서열번호 2), *istS_s*(서열번호 3), *istM_s*(서열번호 4), *istD_s*(서열번호 5)와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamtceticus*) 유전체를 템플리트로 하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통하여 증폭된 유전자 1종 *kanM2*를 포함하는 총 6종의 외래 유전자 바이오파트 조합을 대장균 발현용 바이오디바이스인 플라스미드 pNB181(pET22B(+) 기반 플라스미드; Amp^R 선택 마커; T7 프로모터/lac 오퍼레이터/라이보솜 결합부위(RBS)/T7 전사 종결자(transcription terminator))에 순차적으로 바이오브릭스(BioBricks) 조립법을 활용하여 조립하였다(도 5 참조). 보편적으로 사용된 모든 제한 효소는 Takara(Kyoto, 일본)에서 구입하였으며, 인공 유전자의 합성 및 서열 분석 등의 서비스는 모두 코스모젠텍(서울, 대한민국)에 의뢰하였다. 증폭된 PCR 산물들은 pGEM-T easy 벡터(Promega, Madison, WI, 미국)를 통하여 대장균 XL1 블루(XL1 blue, Stratagene)에 서브클로닝 후 그 서열을 확인하였다. 증폭 유전자 단편을 *Xba*I와 *Hind*III로 절단하고, 미리 *Spe*I과 *Hind*III 로 절단한 상기 pNB181 바이오디바이스에 연결하였다. 조립된 후, 추가적으로 상이한 유전자 바이오파트를 연결하기 위하여, 다시 *Bgl*II와 *Xho*I으로 절단된 바이오디바이스에 *BamH*I과 *Xho*I으로 절단된 바이오파트 유전자 단편을 연결하였다. 이 경우 *Xba*I과 *Spe*I, 그리고 *Bgl*II와 *BamH*I은 각각 바이오브릭스 자국(scar)으로 그 제한 부위가 사라지게 된다. 상기 총 6종의 유전자를 포함하는 바이오디바이스를 발현용 이종숙주인 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, 미국)에 이염화칼슘($CaCl_2$)를 이용한 열 펄스 형질전환법(heat pulse transformation)으로 도입시켰고, 형질전환체의 선발을 위하여 암피실린 항생제 100 ppm을 사용하여 최종적으로 재조합 EC1 균주를 제작하였다.

[0118] <1-2> 6-글루코실-이스타마이신 FU-10(6-G-IST-FU10) 화합물의 분리, 정제 및 구조 확인

[0119] 상기 재조합 EC1 미생물을 LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후, 37℃에서 배양하였고, 광학농도 0.6 ~ 0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질 발현을 유도시키고자 최종농도 0.3 mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노시드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG, Sigma-Aldrich)를 첨가하였다. 이 후, 20℃에서 20시간 추가 배양하였다. 발효 상층액 pH를 염산 용액을 이용하여 2.5까지 낮추고, 상온 하 실험실 진탕기에서 한 시간 진탕하였다. 냉장 조건으로 약 20000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 균체를 제거한 후, 상등액을 미리 메탄올 3 밀리리터와 10 mM 염산 용액(pH 2.5) 3 밀리리터로 전 처리한 OASIS MCX 고체상추출 카트리지(Waters,

Milford, MA, 미국)에 주입하였다. 이 후, 카트리지를 10 mM 염산 용액 3 밀리리터로 세척하고 약 30초간 대기압을 낮추어서 완전히 건조시켰다. 카트리지 충전재에 흡착된 아미노사이클리톨 화합물들은 5% 메탄올성 수산화암모늄(NH_4OH) 용액(암노니아수/메탄올 = 95:5, v/v) 0.5 밀리리터로 2번에 걸쳐 용출하였고, 용출액은 상온에서 스피드백(SpeedVac, EYELA, Tokyo, 일본)으로 감압 건조하였다.

[0120] 고체상 추출법으로 용출된 아미노사이클리톨 화합물들의 분리 및 정제에는 콤비플래시 Rf MPLC 시스템(CombiFlash Rf MPLC Cystem, Teledyne ISCO, Lincoln, NE, 미국)을 사용하였다. 즉, 정상(normal-phase) 실리카 카트리지에 클로로포름:메탄올:수산화암모늄 1:1:1(v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 8 밀리리터의 속도로 흘러가는 MPLC 시스템에, 동일한 이동상 4 밀리리터에 재 용해시킨 전술한 바 있는 감압 건조 시료를 주입하고, 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분취하였다. 개별 분획을 다시 감압하여 농축한 후, 이온트랩 질량 분석기(LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, San Jose, CA, 미국)로 질량 스펙트럼을 분석함으로써 목적하는 6-글루코실-이스타마이신 FU-10(6-G-IST-FU10) 화합물의 분획을 정제하였다.

[0121] NMR 시료들은 200 마이크로리터의 D_2O에 화합물 2DFU10을 용해시킨 후, 5 밀리미터 시게미 어드밴스드 NMR 마이크로튜브(Shigemi advanced NMR microtube, Sigma-Aldrich)에 상기 용매를 방치시킴으로써 제조하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 배리언(Varian) INOVA 500 분광광도계를 이용하여 298 K에서 획득하였고, 화학적 이동은 내부 준거로서 TMS를 이용하여 ppm으로 기록되었다. 모든 NMR 데이타 산출은 Mnova Suite 5.3.2 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.

[0122] [6-글루코실-이스타마이신 FU-10의 ^{1}H-and ^{13}C-NMR (D_2O) 스펙트럼]

[0123] 2종 아노머(anomer) 시그널: d_H 5.18/d_C 107.8 -C1' 포지션, d_H 5.03/d_C 110.4 -C1" 포지션; 2종 산화 메틸렌(methylene) 시그널: d_H 3.54 & 3.79/d_C 62.2 -C6' 포지션, d_H 3.52 & 3.75/d_C 62.9 -C6" 포지션; 11종 산화 메틴(methine) 시그널: d_H 3.58/d_C 61.4 -C1 포지션, d_H 3.43/d_C 90.3 -C4 포지션, d_H 3.39/d_C 70.1 -C5 포지션, d_H 3.37/d_C 82.6 -C6 포지션, d_H 3.64/d_C 74.0 -C3' 포지션, d_H 3.40/d_C 70.6 -C4' 포지션, d_H 3.76/d_C 78.6 -C5' 포지션, d_H 3.73/d_C 74.1 -C2" 포지션, d_H 3.49/d_C 76.8 -C3" 포지션, d_H 3.42/d_C 71.5 -C4" 포지션, d_H 3.77/d_C 81.5 -C5" 포지션; 2종 질소화 메틴 시그널: d_H 2.64/d_C 48.2 -C3 포지션, d_H 3.13/d_C 55.5 -C2' 포지션; 1종 메틸렌 시그널: d_H 1.24 & 1.86/d_C 31.7 -C2 포지션.

[0124] [6-글루코실-이스타마이신 FU-10의 HR-qTOF-MS 스펙트럼]

[0125] *m/z* 487.2138 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{18}H_{35}N_2O_{13}^+$,487.2134); *m/z* 469.3, 326.2, 308.2, 162.2 그리고 145.1.

[0127] **<실시예 2>**

[0128] **6-크실로실-이스타마이신 FU-10의 제조**

[0130] <2-1> 재조합 대장균 EC2 제작

[0131] 대장균 코돈 최적화로 합성한 인공 유전자 5종 *imrA_s*(서열번호 1), *istC_s*(서열번호 2), *istS_s*(서열번호 3), *istM_s*(서열번호 4), *istD_s*(서열번호 5)와 마이크로모노스포라 에키노스포라(*Micromonospora echinospora*) 유전체를 템플리트로 하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭된 유전자 1종 *genM2*를 포함하는 총 6종의 외래 유전자들을 상기 <실시예 1>에 기재된 것과 동일하게 바이오브릭스(BioBricks) 조립법을 활용하여 조립하였다. 상기 총 6종의 유전자를 포함하는 바이오디바이스를 발현용 이종숙주인 대장균 BL21(DE3)(Stratagene)에 도입시켜서, 최종적으로 재조합 EC2 균주를 제작하였다.

[0133] <2-2> 6-크실로실-이스타마이신 FU-10(6-X-IST-FU10) 화합물의 분리, 정제 및 구조 확인

[0134] 상기 <실시예 1>에 기재된 것과 동일하게 실험하여 EC2 균주의 발효 배양액으로부터 목적하는 6-크실로실-이스

타마이신 FU-10(6-X-IST-FU10) 화합물의 분획을 정제하였다.

[0135] [6-크실로실-이스타마이신 FU-10의 ^{1}H-and ^{13}C-NMR (D_2O) 스펙트럼]

[0136] 2종 아노머 시그널: d_H 5.16/d_C 107.8 -C1' 포지션; d_H 5.19/d_C 106.1 -C1" 포지션; 1종 산화 메틸렌 시그널: d_H 3.53 & 3.80/d_C 62.4 -C6' 포지션; 11종 산화 메틴 시그널: d_H 3.58/d_C 61.4 -C1 포지션, d_H 3.43/d_C 90.2 -C4 포지션, d_H 3.39/d_C 70.3 -C5 포지션, d_H 3.33/d_C 82.5 - C6 포지션, d_H 3.63/d_C 74.0 -C3' 포지션, d_H 3.40/d_C 70.5 -C4' 포지션, d_H 3.75/d_C 78.6 -C5' 포지션, d_H 3.73/d_C 74.4 -C2" 포지션, d_H 3.49/d_C 69.2 -C3" 포지션, d_H 3.47/d_C 72.3 -C4" 포지션, d_H 5.39/d_C 94.9 -C5" 포지션; 2종 질소화 메틴 시그널: d_H 2.62/d_C 48.3 -C3 포지션, d_H 3.12/d_C 55.5 - C2' 포지션; 1종 메틸렌 시그널: d_H 1.24 & 1.86/d_C 31.7 -C2 포지션.

[0137] [6-크실로실-이스타마이신 FU-10의 HR-qTOF-MS 스펙트럼]

[0138] *m/z* 473.1981 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{17}H_{33}N_2O_{13}^+$,473.1977); *m/z* 455.3, 312.2, 294.2, 162.2 and 145.1.

[0140] **<실시예 3>**

[0141] **5-리보실-이스타마이신 FU-10의 제조**

[0143] <3-1> 재조합 대장균 EC3 제작

[0144] 대장균 코돈 최적화로 합성한 인공 유전자 5종 *imrA_s*(서열번호 1), *istC_s*(서열번호 2), *istS_s*(서열번호 3), *istM_s*(서열번호 4), *istD_s*(서열번호 5)와 스트렙토마이세스 프라디애(*Streptomyces fradiae*) 유전체를 템플리트로 하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭된 유전자 2종 *neoL*과 *neoP*를 포함하는 총 7종의 외래 유전자들을 상기 <실시예 1>에 기재된 것과 동일하게 바이오브릭스(BioBricks) 조립법을 활용하여 조립하였다. 상기 총 7종의 유전자를 포함하는 바이오디바이스를 발현용 이종숙주인 대장균 BL21(DE3)(Stratagene)에 도입시켜서, 최종적으로 재조합 EC3 균주를 제작하였다.

[0146] <3-2> 5-리보실-이스타마이신 FU-10(5-R-IST-FU10) 화합물의 분리, 정제 및 구조 확인

[0147] 상기 <실시예 1>에 기재된 것과 동일하게 실험하여 EC3 균주의 발효 배양액으로부터 목적하는 5-리보실-이스타마이신 FU-10(5-R-IST-FU10) 화합물의 분획을 정제하였다.

[0148] [5-리보실-이스타마이신 FU-10의 ^{1}H-and ^{13}C-NMR (D_2O) 스펙트럼]

[0149] 2종 아노머 시그널: d_H 5.17/d_C 107.6 -C1' 포지션, d_H 5.19/d_C 113.4 -C1" 포지션; 2종 산화 메틸렌 시그널: d_H 3.53 & 3.77/d_C 62.6 -C6' 포지션, d_H 3.51 & 3.73/d_C 61.9 -C5" 포지션; 10종 산화 메틴 시그널: d_H 3.56/d_C 66.9 -C1 포지션, d_H 3.43/d_C 82.1 -C4 포지션, d_H 3.36/d_C 75.3 -C5포지션, d_H 3.34/d_C 75.0 -C6 포지션, d_H 3.64/d_C 74.1 -C3' 포지션, d_H 3.41/d_C 70.8 -C4' 포지션, d_H 3.75/d_C 78.5 -C5' 포지션, d_H 3.98/d_C 80.3 -C2" 포지션, d_H 4.50/d_C 76.6 -C3" 포지션, d_H 4.38/d_C 84.9 -C4" 포지션; 2종 질소화 메틴 시그널: d_H 2.64/d_C 48.5 -C3 포지션, d_H 3.11/d_C 55.2 -C2' 포지션; 1종 메틸렌 시그널: d_H 1.21 & 1.85/d_C 31.4 -C2 포지션.

[0150] [5-리보실-이스타마이신 FU-10의 HR-qTOF-MS 스펙트럼]

[0151] *m/z* 457.2044 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{17}H_{33}N_2O_{12}^+$,457.2028); *m/z* 439.3, 296.2, 278.2, 162.2 and 145.1.

[0153] **<실시예 4>**

[0154] **3"-데히드록시-아미노-6-글루코실-이스타마이신 FU-10의 제조**

[0156] <4-1> 재조합 대장균 EC4 제작

[0157] 대장균 코돈 최적화로 합성한 인공 유전자 5종 *imrA_s*(서열번호 1), *istC_s*(서열번호 2), *istS_s*(서열번호 3), *istM_s*(서열번호 4), *istD_s*(서열번호 5)와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamtceticus*) 유전체를 템플리트로 하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭된 유전자 3종 *kanM2*, *kanC* 그리고 *kanD*를 포함하는 총 8종의 외래 유전자들을 상기 <실시예 1>에 기재된 것과 동일하게 바이오브릭스(BioBricks) 조립법을 활용하여 조립하였다. 상기 총 8종의 유전자를 포함하는 바이오디바이스를 발현용 이종숙주인 대장균 BL21(DE3)(Stratagene)에 도입시켜서, 최종적으로 재조합 EC4 균주를 제작하였다.

[0159] <4-2> 3"-데히드록시-아미노-6-글루코실-이스타마이신 FU-10(6G3"A-IST-FU-10) 화합물의 분리, 정제 및 구조 확인

[0160] 상기 <실시예 1>에 기재된 것과 동일하게 실험하여 EC4 균주의 발효 배양액으로부터 목적하는 3"-데히드록시-아미노-6-글루코실-이스타마이신 FU-10(6G3"A-IST-FU-10) 화합물의 분획을 정제하였다.

[0161] [3"-데히드록시-아미노-6-글루코실-이스타마이신 FU-10의 ^{1}H-and ^{13}C-NMR (D_2O) 스펙트럼]

[0162] 2종 아노머 시그널: d_H 5.18/d_C 107.8 -C1' 포지션, d_H 5.03/d_C 110.3 -C1" 포지션; 2종 산화 메틸렌 시그널: d_H 3.54 & 3.79/d_C 62.2 -C6' 포지션, d_H 3.52 & 3.75/d_C 61.8 -C6" 포지션; 10종 산화 메틴 시그널: d_H 3.58/d_C 61.4 -C1 포지션, d_H 3.43/d_C 90.3 -C4 포지션, d_H 3.39/d_C 70.1 -C5포지션, d_H 3.37/d_C 82.6 -C6 포지션, d_H 3.64/d_C 74.0 -C3' 포지션, d_H 3.40/d_C 70.6 -C4' 포지션, d_H 3.76/d_C 78.6 -C5' 포지션, d_H 3.88/d_C 72.2 -C2" 포지션, d_H 3.57/d_C 69.0 -C4" 포지션, d_H 3.78/d_C 76.6 -C5" 포지션; 3종 질소화 메틴 시그널: d_H 2.64/d_C 48.3 -C3 포지션, d_H 3.13/d_C 55.3 -C2' 포지션, d_H 2.88/d_C 54.3 -C3" 포지션; 1종 메틸렌 시그널: d_H 1.24 & 1.86/d_C 31.6 -C2 포지션.

[0163] [3"-데히드록시-아미노-6-글루코실-이스타마이신 FU-10의 HR-qTOF-MS 스펙트럼]

[0164] *m/z* 486.2299 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{18}H_{36}N_3O_{12}^+$,486.2294); *m/z* 468.3, 325.2, 307.2, 162.2 and 145.1

[0166] **<실시예 5>**

[0167] **3"-데히드록시-아미노-6-크실로실-이스타마이신 FU-10의 제조**

[0169] <5-1> 재조합 대장균 EC5 제작

[0170] 대장균 코돈 최적화로 합성한 인공 유전자 5종 *imrA_s*(서열번호 1), *istC_s*(서열번호 2), *istS_s*(서열번호 3), *istM_s*(서열번호 4), *istD_s*(서열번호 5)와 마이크로모노스포라 에키노스포라(*Micromonospora echinospora*) 유전체를 템플리트로 하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭된 유전자 3종 *genM2* , genD2 그리고 genS2를 포함하는 총 8종의 외래 유전자들을 상기 <실시예 1>에 기재된 것과 동일하게 바이오브릭스(BioBricks) 조립법을 활용하여 조립하였다. 상기 총 8종의 유전자를 포함하는 바이오디바이스를 발현용 이종숙주인 대장균 BL21(DE3)(Stratagene)에 도입시켜서, 최종적으로 재조합 EC5 균주를 제작하였다.

[0172] <5-2> 3"-데히드록시-아미노-6-크실로실-이스타마이신 FU-10(6X3"A-IST-FU-10) 화합물의 분리, 정제 및 구조 확인

[0173] 상기 <실시예 1>에 기재된 것과 동일하게 실험하여 EC5 균주의 발효 배양액으로부터 목적하는 3"-데히드록시-아

미노-6-크실로실-이스타마이신 FU-10(6X3"A-IST-FU-10) 화합물의 분획을 정제하였다.

[0174] [3"-데히드록시-아미노-6-크실로실-이스타마이신 FU-10의 ^{1}H-and ^{13}C-NMR (D_2O) 스펙트럼]

[0175] 2종 아노머 시그널: d_H 5.16/d_C 107.8 -C1' 포지션, d_H 5.19/d_C 106.1 -C1" 포지션; 1종 산화 메틸렌 시그널: d_H 3.53 & 3.80/d_C 62.4 -C6' 포지션; 10종 메틴 시그널: d_H 3.58/d_C 61.4 -C1 포지션, d_H 3.43/d_C 90.2 -C4 포지션, d_H 3.39/d_C 70.3 -C5 포지션, d_H 3.33/d_C 82.5 -C6 포지션, d_H 3.63/d_C 74.0 -C3' 포지션, d_H 3.40/d_C 70.5 -C4' 포지션, d_H 3.75/d_C 78.6 -C5' 포지션, d_H 3.88/d_C 72.2 -C2" 포지션, d_H 3.65/d_C 74.1 -C4" 포지션, d_H 5.40/d_C 95.6 -C5" 포지션; 3종 질소화 메틴 시그널: d_H 2.64/d_C 48.3 -C3 포지션, d_H 3.13/d_C 55.5 -C2' 포지션, d_H 2.88/d_C 50.2 -C3" 포지션; 1종 메틸렌 시그널: d_H 1.23 & 1.85/d_C 31.7 -C2 포지션.

[0176] [3"-데히드록시-아미노-6-크실로실-이스타마이신 FU-10의 HR-qTOF-MS 스펙트럼]

[0177] *m/z* 472.2140 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{17}H_{34}N_3O_{12}^+$,472.2137); *m/z* 454.3, 311.2, 293.3, 162.2 and 145.1.

[0179] **<실시예 6>**

[0180] **5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO의 제조**

[0182] <6-1> 재조합 대장균 EC6 제작

[0183] 대장균 코돈 최적화로 합성한 인공 유전자 6종 *imrA_s*(서열번호 1), *istC_s*(서열번호 2), *istS_s*(서열번호 3), *istM_s*(서열번호 4), *istD_s*(서열번호 5), *istE_s*(서열번호 6)와 스트렙토마이세스 프라디애(*Streptomyces fradiae*) 유전체를 템플리트로 하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭된 유전자 2종 *neoL*과 *neoP*를 포함하는 총 8종의 외래 유전자들을 <실시예 1>에 기재된 것과 동일하게 바이오브릭스(BioBricks) 조립법을 활용하여 조립하였다. 상기 총 7종의 유전자를 포함하는 바이오디바이스를 발현용 이종숙주인 대장균 BL21(DE3)(Stratagene)에 도입시켜서, 최종적으로 재조합 EC6 균주를 제작하였다.

[0185] <6-2> 5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO(5R6DM-IST-AO) 화합물의 분리, 정제 및 구조 확인

[0186] 상기 <실시예 1>에 기재된 것과 동일하게 실험하여 EC6 균주의 발효 배양액으로부터 목적하는 5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO(5R6DM-IST-AO) 화합물의 분획을 정제하였다.

[0187] [5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO의 ^{1}H-and ^{13}C-NMR (D_2O) 스펙트럼]

[0188] 2종 아노머 시그널: d_H 5.17/d_C 107.6 -C1' 포지션, d_H 5.19/d_C 113.4 -C1" 포지션; 2종 산화 메틸렌 시그널: d_H 3.53 & 3.77/d_C 62.6 -C6' 포지션, d_H 3.51 & 3.73/d_C 61.9 -C5" 포지션; 9종 산화 메틴 시그널: d_H 3.46/d_C 59.3 -C1 포지션, d_H 3.43/d_C 82.1 -C4 포지션, d_H 3.38/d_C 83.2 -C5 포지션, d_H 3.64/d_C 74.1 -C3' 포지션, d_H 3.41/d_C 70.8 -C4' 포지션, d_H 3.75/d_C 78.5 -C5' 포지션, d_H 3.98/d_C 80.3 -C2" 포지션, d_H 4.50/d_C 76.6 -C3" 포지션, d_H 4.38/d_C 84.9 -C4" 포지션; 3종 질소화 메틴 시그널: d_H 2.64/d_C 48.5 -C3 포지션, d_H 3.42/d_C 64.0 -C6 포지션, d_H 3.11/d_C 55.2 -C2' 포지션; 1종 메틸렌 시그널 : d_H 1.18 & 1.86/d_C 32.3 -C2 포지션.

[0189] [5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO의 HR-qTOF-MS 스펙트럼]

[0190] *m/z* 456.2193 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{17}H_{34}N_3O_{12}^+$,456.2188); *m/z* 438.3, 295.2, 277.2, 162.2 and 145.1.

[0192] **<실험예 1>**

[0193] **상기 실시예들을 통해 제조된 본 발명의 2-데옥시-스킬로이노사민 포함 이스타마이신 화합물 6종과 기존 항생제**

의 그람음성 병원균과 내성균 대상 인 비트로(*in vitro*) 항세균 활성 비교

[0194] 상기 <실시예 1> 내지 <실시예 6>에서 얻은 본 발명의 이스타마이신 화합물 6종의 항세균 활성을 알아보기 위해, ATCC(American Type Culture Collection)(Manassas, VA, USA)와 항생제 내성 균주 은행(CCARM, 서울, 대한민국)으로부터 그람 음성 세균류에 속하는 대장균과 녹농균 각각의 기준주(基準株: Type strain) 2종(*E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC27853)과 임상분리주(clinical isolate) 2종(*E. coli* CCARM1A020(GEN^S), *P. aeruginosa* CCARM2206(ISP^S))을 확보하여 인 비트로(*in vitro*) 항세균 활성을 실험하였다.

[0195] 한편, 상용 아미노글리코사이드 항세균제인 겐타마이신과 반합성 항세균제인 이세파마이신 및 아미카신에 대하여 내성을 나타내는 대장균 임상분리주 3종(*E. coli* CCARM1A023(GEN^R), *E. coli* CCARM1A030(AMK^R), *E. coli* CCARM1A040(ISP^R))을 항생제 내성 균주 은행(CCARM, 서울, 대한민국)에서 추가적으로 확보하였다.

[0196] 이 밖에, 아미노글리코사이드 내성 기작 중 대표적인 아미노글리코사이드 변형효소 AAC(6')과 AAC(3)를 별도로 이종 발현시킨 아미노글리코사이드 내성의 재조합 대장균 2종(*E. coli* AAC(6'), *E. coli* AAC(3))과 함께 아미노글리코사이드 표적 16S rRNA 메틸전이효소(methyltrnasferase) 2종 즉, ArmA와 RmtB를 개별적으로 이종 발현시킨 재조합 대장균 2종(*E. coli* ArmA, *E. coli* RmtB)을 자체 제작하여 인비티로 항세균 활성의 비교에 역시 사용하였다.

[0197] 구체적으로, 그람음성 검사 세균주를 28℃에서 뮐러-힌턴 브로스(Mueller-Hinton broth, Difco, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에서 배양 및 유지시켰다. 이 후, 상용 아미노글리코사이드 항생제들과 실시예에서 얻어진 이스타마이신 화합물 6종을 배지에 처리하였다. 임상 및 실험 표준화 기관(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)에 의해 권장되는 미량 희석법(microdilution method)을 이용하여, 검사 균주들에 대한 항세균 활성을 측정하였다. 각 처리구의 연속 2배 희석으로 최종 농도가 0.25 - 128 ㎍/ml이 되도록 증류수를 이용하여 수행하였다. 또한, 당전이 반응 전의 이스타마이신 중간 대사체 IST-FU10 의사이당(pseudo-disaccharide)을 비교 대조구로, 반면 임상 이용 중인 상용 아미노글리코사이드 겐타마이신과 반합성 이세파마이신을 각각 양성 대조구로 사용하였다. 한편, 비교구로는 본 발명자의 이전 특허에 기재된 스킬로이노사민을 포함하는 포티마이신 화합물 중 2'-디아미노-포티마이신 FU10(2D-FOR-FU10)과 2'-디아미노-6'-메틸-포티마이신 FU10(2D6M-FOR-FU10) 총 2종을 활용하였다(한국공개특허 제10-2019-0143137호). 세균들의 성장은 랩시스템(Labsystem) 사의 바이오스크린 C(Bioscreen C) 리더기를 이용하여 600 nm에서 모니터하였으며, 시험 미생물의 성장을 억제하는 브로스(broth) 배지에서 희석된 기존 항생제들 및 실시예 화합물의 최저 농도로서 항생제 최소 억제농도(MIC)를 결정하였다. 모든 분석은 적어도 세 번 이상 수행하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0198] 그 결과 도 3 및 하기 표 2 내지 4에 나타난 바와 같이, 이스타마이신 의사이당(pseudo-disaccharide)인 이스타마이신-FU10(IST-FU10)은 그 항세균 활성이 전혀 없는데 비하여, 의사삼당(pseudo-trisaccharide)의 형태로 제조된 본 발명의 실시예 3종의 이스타마이신 의사삼당(pseudo-trisaccharide)들은 기준주와 임상분리주를 대상으로 항세균 활성을 보였다. 반면, 비교구인 스킬로이노사민 포함하는 포티마이신 화합물인 2'-디아미노-포티마이신 FU10(2D-FOR-FU10)과 2'-디아미노-6'-메틸-포티마이신 FU10(2D6M-FOR-FU10) 총 2종의 경우 대상 그람음성 기준주와 임상분리주 뿐만 아니라 아미노글리코사이드 내성 기작을 임의 도입한 그람음성 재조합 대장균들 대상으로도 항세균 활성을 거의 보이지 않았다. 한편, 실시예 화합물들은, 상용 아미노글리코사이드 항세균제에 내성을 보이는 대장균 내성 임상분리주들을 대상으로 상대적으로 낮은 최소 억제 농도 수치를 나타내어 향상된 항세균 활성을 제시하였다. 뿐만 아니라, 대표적인 아미노글리코사이드 내성 기작인 아미노글리코사이드 변형효소와 16S rRNA 메틸전이효소(methyltrnasferase)를 추가적으로 도입한 그람음성 재조합 대장균을 대상으로, 상용 아미노글리코사이드인 겐타마이신과 이세파마이신에 비하여 눈에 띄게 향상된 항세균 활성을 보였다. 특히 5번 포지션에 5탄당인 리보스(ribose)가 부가된 실시예 3번 화합물 5-리보실-이스타마이신 FU-10(5-R-IST-FU10)과 6번 화합물 5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO(5R6DM-IST-AO)은 다른 실시예 화합물 4종과 비교하여 확연히 높은 항세균 활성을 제시한 바, 그람음성 병원균 및 아미노글리코사이드 내성균 감염증 치료에 활용 가능함을 보여주었다.

표 2

[0200] 본 발명의 2-데옥시-스킬로이노사민 포함 이스타마이신 화합물 6종의 그람음성 병원균에 대한 항균 활성

	MIC(μg/ml)			
	Type strain		Clinical isolates	
	E. coli ATCC25922	*P. aeruginosa* ATCC27853	*E. coli* CCARM1A020(GEN^S)	*P. aeruginosa* CCARM2206(ISP^S)
2'D-FOR-FU10	128	128	NA	128
2'D6'M-FOR-FU10	128	128	NA	128
IST-FU10	NA	NA	NA	NA
6-X-IST-FU10	8	4	8	8
6-G-IST-FU10	8	8	4	4
5-R-IST-FU10	4	4	4	4
6X3"A-IST-FU10	4	8	8	4
6G3"A-IST-FU10	4	4	4	4
5R6DM-IST-AO	4	2	4	2
Gentamicin	0.5	8	0.125	2
Isepamicin	1	4	1	0.25

[0201] NA: not applicable

표 3

[0203] 본 발명의 2-데옥시-스킬로이노사민 포함 이스타마이신 화합물 6종의 항생제 내성균에 대한 항균 활성

	MIC(μg/ml)		
	Clinical isolates		
	E. coli CCARM1A023(GEN^R)	*E. coli* CCARM1A030(AMK^R)	*E. coli* CCARM1A040(ISP^R)
2'D-FOR-FU10	NA	64	128
2'D6'M-FOR-FU10	NA	64	128
IST-FU10	NA	NA	NA
6-X-IST-FU10	8	16	8
6-G-IST-FU10	4	16	8
5-R-IST-FU10	1	8	4
6X3"A-IST-FU10	8	16	8
6G3"A-IST-FU10	4	8	8
5R6DM-IST-AO	4	16	8
Gentamicin	NA	NA	NA
Isepamicin	8	16	NA

[0204] NA: not applicable

표 4

[0206] 본 발명의 2-데옥시-스킬로이노사민 포함 이스타마이신 화합물 6종의 재조합 항생제 내성균에 대한 항균 활성

	MIC(μg/ml)			
	Recombinants			
	E. coli AAC(6')	*E. coli* AAC(3)	*E. coli* ArmA,	*E. coli* RmtB
2'D-FOR-FU10	NA	NA	NA	NA
2'D6'M-FOR-FU10	NA	NA	NA	NA
IST-FU10	NA	NA	NA	NA
6-X-IST-FU10	8	64	128	>64
6-G-IST-FU10	8	128	NA	>64
5-R-IST-FU10	4	64	8	2
6X3"A-IST-FU10	8	64	128	>64

6G3"A-IST-FU10	8	64	128	>64
5R6DM-IST-AO	4	64	4	4
Gentamicin	128	128	NA	NA
Isepamicin	NA	16	64	64

[0207] NA: not applicable

[0209] **<실험예 2>**

[0210] **상기 실시예들을 통해 제조된 본 발명의 2-데옥시-스킬로이노사민 포함 이스타마이신 화합물 6종과 기존 아미노글리코사이드 항생제의 낭성 섬유증 환자 적출 세포주 대상 인 비트로(*in vitro*) 무의미 통독 유도 활성 비교**

[0211] 본 발명의 2-데옥시-스킬로이노사민 포함 이스타마이신 화합물 6종에 대하여 낭성 섬유증 환자 적출 기관지 상피 일차 세포주(Asterand Bioscience, Detroit, MI, 미국; p.ΔF508/W1282X) 활용 생체 외(ex vivo) 무의미 통독 유도(nonsense readthrough inducer) 활성 검정방법을 실시하였다. 즉, 퇴행성 유전질환자인 낭성 섬유증 유전질환자로부터 적출한 세포주를 대상으로 하여 전 임상 초기 단계라 할 수 있는 생체 외 무의미 통독 활성 검정을 실시하였다. 우선, 낭성 섬유증 유전질환자 적출 세포주를 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 부가된 RPMI-1640 배지(Invitrogen)에 활성화시켰다. 즉 전 배양시킨 후, 원심 분리하여 T-플라스크에서 본 배양을 5일간 수행하였다. 배양 3일째에 각각의 화합물을 최종 25 마이크로몰(μM) 수준이 되도록 처리한 후, 2일간 추가 배양하였다. 각 처리구와 함께 비교 대조구로서 그 활성이 이미 보고된 바 있는 상기 겐타마이신 대사 중간 유도체들인 G418, 겐타마이신 A2 총 2종을 동일하게 처리하였으며, 비교구로는 본 발명자의 이전 특허에 기재된 스킬로이노사민을 포함하는 포티마이신 화합물 중 2'-디아미노-포티마이신 FU10(2D-FOR-FU10)과 2'-디아미노-6'-메틸-포티마이신 FU10(2D6M-FOR-FU10) 총 2종을 활용하였다(한국공개특허 제10-2019-0143137호). 처리구와 비교구 및 대조구 시료들을 원심 분리한 후 CelLytic NuCLEAR extraction kit(Sigma-Aldrich)를 이용하여 핵내 단백질 분획을 준비하였다. 각 시료들의 농도를 일정하게 보정한 후, 10 마이크로미터의 시료들을 고속액체크로마토그래피-전자스프레이이온화-질량분석기로 분석하였다. 컬럼으로는 MAbPac SEC-1 컬럼(Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, 미국; 4x 300 밀리미터, 5 마이크로미터)이, 이동상으로는 0.05% TFA와 0.1% 개미산이 첨가된 20% 아세토니트릴을 분당 200 마이크로미터로 30분간 흘렸다. 크로마토그램 상에 나타난 피크를 ReSpect 알고리듬을 장착한 Thermo Scientific protein deconvolution 2.0 소프트웨어로 디콘볼루션시켜 그 단백질 크기를 확인하였으며, 절단된 단백질과 완전길이 단백질의 피크 강도를 계측하여 각 화합물들의 무의미 통독 유도 활성을 검정하였다. 각 처리구과 대조구들 간 유의적 차이는 P<0.01로 표현하였으며, 그 결과를 도 4에 나타냈다.

[0212] 그 결과 도 4 및 표 5에 나타난 바와 같이, 동일한 농도(25 마이크로몰) 수준으로 처리한 결과, 대조구로서 G418(평균 0.56), 겐타마이신 A2(평균 0.58)와 비교하여 일부 2-데옥시-스킬로이노사민 포함 이스타마이신 화합물에서 상대적으로 향상된 무의미 통독 유도 활성을 확인할 수 있었다. 즉, 실시예 3번 화합물 5-리보실-이스타마이신 FU-10(5-R-IST-FU10)과 6번 화합물 5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO(5R6DM-IST-AO)는 각각 평균 0.58 및 0.68의 활성으로 대조구 중 가장 높은 무의미 통독 유도 활성을 제시한 겐타마이신 A2 대비하여 그 이상의 무의미 통독 유도 활성을 제시하였다. 한편, 본 발명자의 이전 특허에 기재된 스킬로이노사민을 포함하는 포티마이신 화합물 중 2'-디아미노-포티마이신 FU10(2D-FOR-FU10)과 2'-디아미노-6'-메틸-포티마이신 FU10(2D6M-FOR-FU10)은 비교구로서 각각 평균 0.61 및 0.65의 활성을 보여(한국공개특허 제10-2019-0143137호), 실시예 6번 화합물 5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO(5R6DM-IST-AO) 보다 다소 낮은 무의미 통독 유도 활성을 보였다. 따라서, 실시예 6번 화합물 5-리보실-6-데스메틸-이스타마이신 AO(5R6DM-IST-AO)은 대조구와 비교구 및 처리구 모두를 통틀어서 통계적으로 유의미한 무의미 통독 유도 활성을 제시함은 의미 있는 결과이다.

표 5

[0214] 본 발명의 2-데옥시-스킬로이노사민 포함 이스타마이신 화합물 6종의 낭성 섬유증 환자 적출 세포주 대상 인 비트로(*in vitro*) 무의미 통독 유도 활성 (25μM)

화합물	Full length/truncated ratio
G418	0.56 ± 0.06

GA2	0.58 ± 0.07
2'D-FOR-FU10	0.63 ± 0.04
2'D6'M-FOR-FU10	0.65 ± 0.05
6-X-IST-FU10	0.53 ± 0.05
6-G-IST-FU10	0.52 ± 0.05
5-R-IST-FU10	0.58 ± 0.08
6X3"A-IST-FU10	0.53 ± 0.05
6G3"A-IST-FU10	0.54 ± 0.07
5R6DM-IST-AO	0.68 ± 0.06

[0216] 실시예 신규 구조 이스타마이신 화합물 6종(화합물 1 내지 화합물 6)에 대하여 하기와 같이 제제화 하였다.

[0218] **<제제예 1> 정제(직접 가압)**

[0219] 화합물 1, 5.0 ㎎을 체로 친 후, 락토스 14.1 ㎎, 크로스포비돈(USNF) 0.8 ㎎ 및 마그네슘 스테아레이트 0.1 ㎎을 혼합하고 가압하여 정제로 제조하였다.

[0221] **<제제예 2> 정제(습식 조립)**

[0222] 화합물 1, 5.0 ㎎을 체로 친 후, 락토스 16.0 ㎎과 녹말 4.0 ㎎을 섞었다. 폴리솔베이트 800.3 ㎎을 순수한 물에 녹인 후, 이 용액의 적당량을 첨가하여 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후, 콜로이달 실리콘 디옥사이드 2.7 ㎎ 및 마그네슘 스테아레이트 2.0 ㎎과 섞었다. 미립을 가압하여 정제로 제조하였다.

[0224] **<제제예 3> 분말과 캡슐제**

[0225] 화합물 1, 5.0 ㎎을 체로 친 후에, 락토스 14.8 ㎎, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 ㎎ 및 마그네슘 스테아레이트 0.2 ㎎과 함께 혼합하였다. 상기 혼합물을 캡슐제조기를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

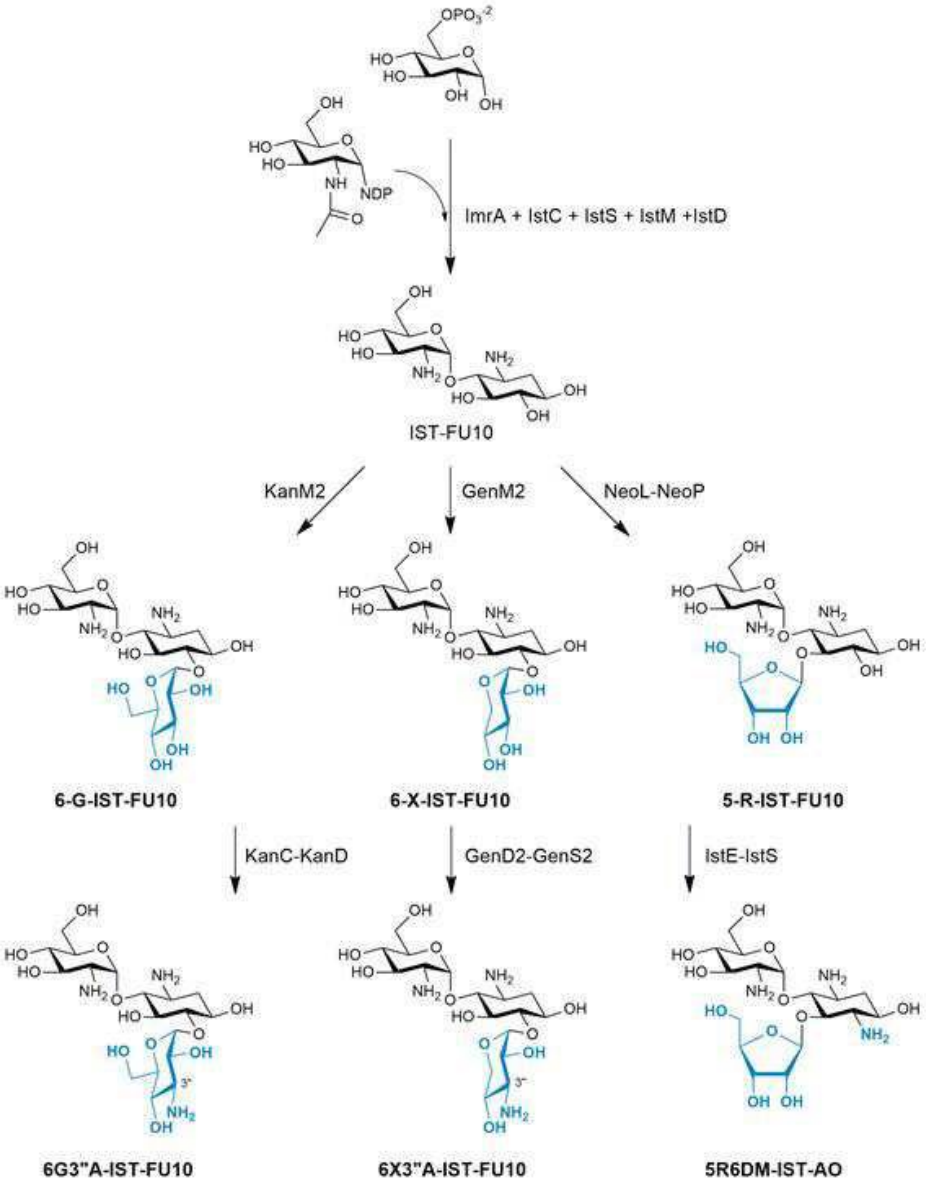
[0227] **<제제예 4> 주사제**

[0228] 활성 성분 100 ㎎에 만니톨 180 ㎎, $Na_2HPO_412H_2O$ 26 ㎎ 및 증류수를 함유시켜 주사제를 제조하였다.

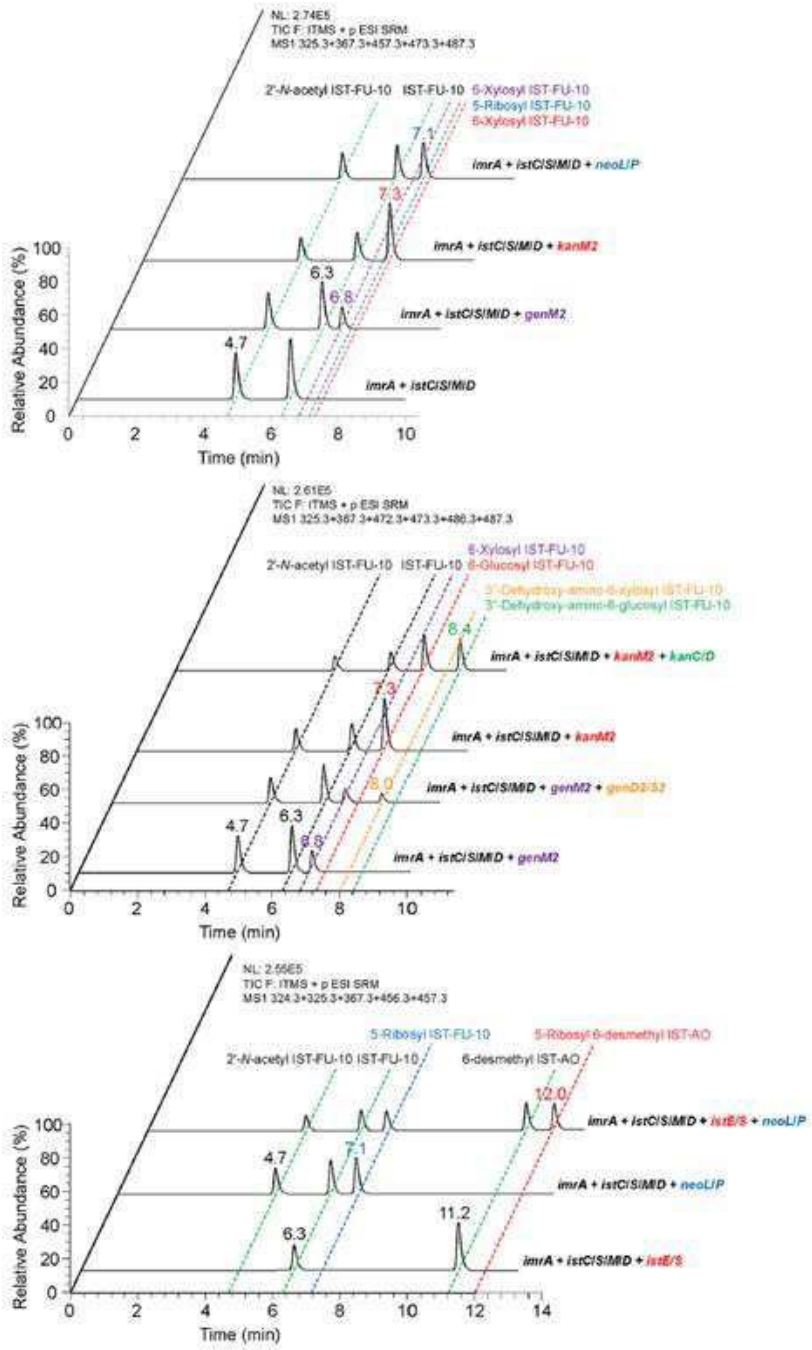
[0230] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1


ImrA + IstC + IstS + IstM +IstD
IST-FU10
KanM2
GenM2
NeoL-NeoP
6-G-IST-FU10
6-X-IST-FU10
5-R-IST-FU10
KanC-KanD
GenD2-GenS2
IstE-IstS
6G3"A-IST-FU10
6X3"A-IST-FU10
5R6DM-IST-AO

도면2


NL: 2.74E5
TIC F: ITMS + p ESI SRM
MS1 325.3+367.3+457.3+473.3+487.3
2'-N-acetyl IST-FU-10
IST-FU-10
6-Xylosyl IST-FU-10
5-Ribosyl IST-FU-10
6-Xylosyl IST-FU-10
7.1
imrA + istC/S/M/D + neoL/P
7.3
imrA + istC/S/M/D + kanM2
6.3
6.8
imrA + istC/S/M/D + genM2
4.7
imrA + istC/S/M/D
Relative Abundance (%)
Time (min)
NL: 2.61E5
TIC F: ITMS + p ESI SRM
MS1 325.3+367.3+472.3+473.3+486.3+487.3
2'-N-acetyl IST-FU-10
IST-FU-10
6-Xylosyl IST-FU-10
6-Glucosyl IST-FU-10
3'-Dehydroxy-amino-6-xylosyl IST-FU-10
3'-Dehydroxy-amino-6-glucosyl IST-FU-10
8.4
imrA + istC/S/M/D + kanM2 + kanC/D
7.3
imrA + istC/S/M/D + kanM2
8.0
imrA + istC/S/M/D + genM2 + genD2/S2
4.7
6.3
8.3
imrA + istC/S/M/D + genM2
Relative Abundance (%)
Time (min)
NL: 2.55E5
TIC F: ITMS + p ESI SRM
MS1 324.3+325.3+367.3+456.3+457.3
5-Ribosyl IST-FU-10
5-Ribosyl 6-desmethyl IST-AO
2'-N-acetyl IST-FU-10
IST-FU-10
6-desmethyl IST-AO
12.0
imrA + istC/S/M/D + istE/S + neoL/P
4.7
7.1
imrA + istC/S/M/D + neoL/P
11.2
6.3
imrA + istC/S/M/D + istE/S
Relative Abundance (%)
Time (min)

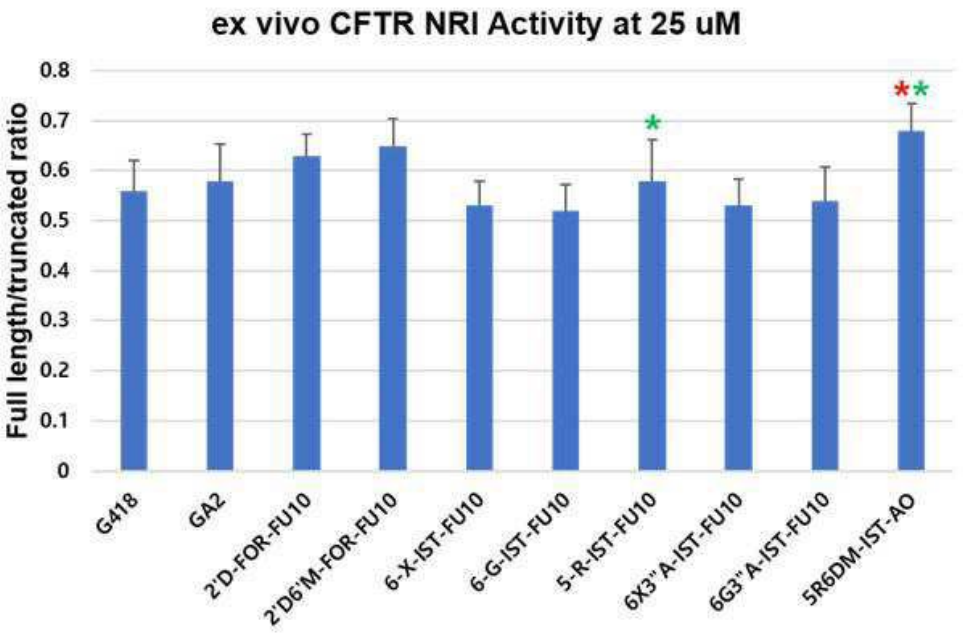
도면3

	MIC (μg/ml)			
	Type strains		Clinical isolates	
	E. coli ATCC25922	*P. aeruginosa* ATCC27853	*E. coli* CCARM1A020 (GEN^S)	*P. aeruginosa* CCARM2206 (ISP^S)
2'D-FOR-FU10	128	128	NA	128
2'D6'M-FOR-FU10	128	128	NA	128
IST-FU10	NA	NA	NA	NA
6-X-IST-FU10	8	4	8	8
6-G-IST-FU10	8	8	4	4
5-R-IST-FU10	4	4	4	4
6X3"A-IST-FU10	4	8	8	4
6G3"A-IST-FU10	4	4	4	4
5R6DM-IST-AO	4	2	4	2
Gentamicin	0.5	8	0.125	2
Isepamicin	1	4	1	0.25

	MIC (μg/ml)		
	Clinical isolates		
	E. coli CCARM1A023 (GEN^R)	*E. coli* CCARM1A030 (AMK^R)	*E. coli* CCARM1A040 (ISP^R)
2'D-FOR-FU10	NA	64	128
2'D6'M-FOR-FU10	NA	64	128
IST-FU10	NA	NA	NA
6-X-IST-FU10	8	16	8
6-G-IST-FU10	4	16	8
5-R-IST-FU10	1	8	4
6X3"A-IST-FU10	8	16	8
6G3"A-IST-FU10	4	8	8
5R6DM-IST-AO	4	16	8
Gentamicin	NA	NA	NA
Isepamicin	8	16	NA

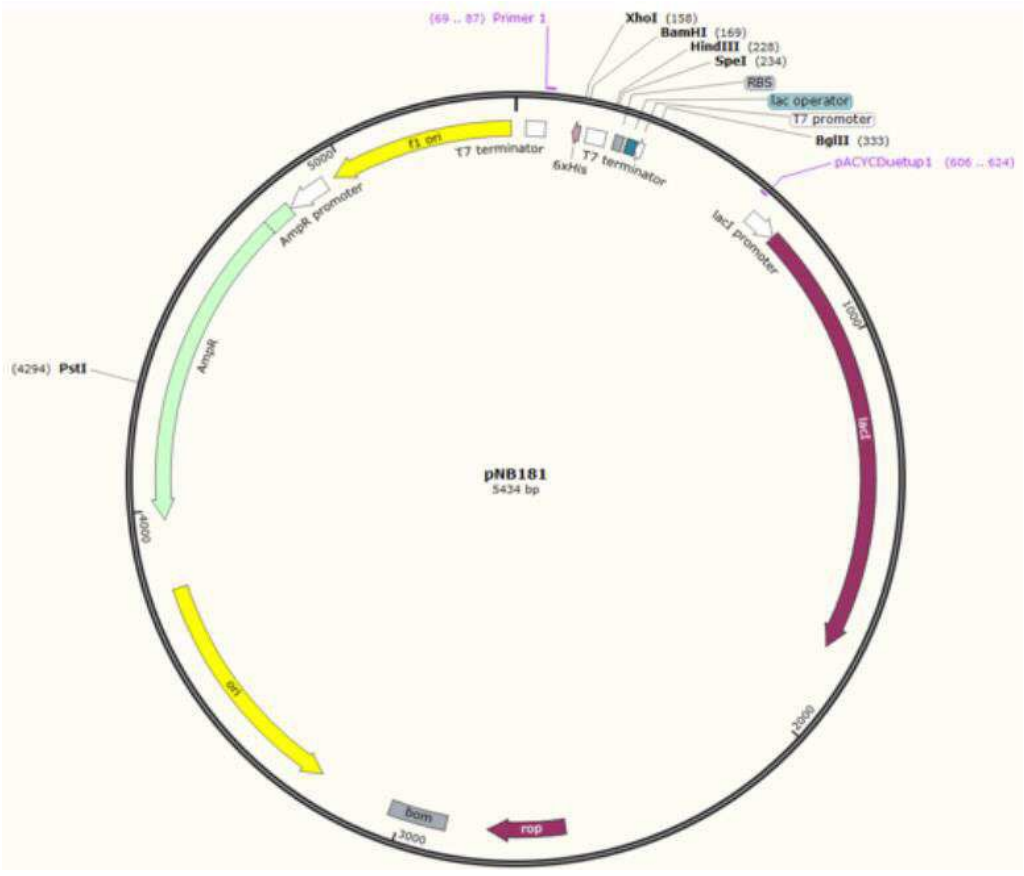
	MIC (μg/ml)			
	Recombinants			
	E. coli AAC(6')	*E. coli* AAC(3)	*E. coli* ArmA	*E. coli* RmtB
2'D-FOR-FU10	NA	NA	NA	NA
2'D6'M-FOR-FU10	NA	NA	NA	NA
IST-FU10	NA	NA	NA	NA
6-X-IST-FU10	8	64	128	>64
6-G-IST-FU10	8	128	NA	>64
5-R-IST-FU10	4	64	8	2
6X3"A-IST-FU10	8	64	128	128
6G3"A-IST-FU10	8	64	128	128
5R6DM-IST-AO	4	64	4	4
Gentamicin	128	128	NA	NA
Isepamicin	NA	16	128	64

도면4



*p<0.05 vs. G418; *p<0.01 vs. series

도면5



서 열 목 록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> 2-Deoxy-scyllo-inosamine containing aminocyclitol compounds, method for the preparation thereof and pharmaceutical compositions comprising the same

<130> NPDC-90371

<160> 30

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 504

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> imrA_s

<400> 1

tctagaaagg acaacatgcg gaaggtggct accaaggcct cggcgagtcc caacaagggg 60

ggtcttccga atcttcttta tgtatgggct tcggcggagc gtcttcctga agagctgcat 120

ggggtgactg agattcacgt gttaatgcct tggggaagcc ttctgagagg aatgctggga 180

agcgacccca aaatgcttag agatttagca ggtgtttgcg tgccggaggc atctttttg 240

attactttga acttacatgc ctggcgtccc gctgtccccg aagttgggga ccatcccgag 300

cccacccccg agtctgcgat gcgggactta gtccctgcgc tggcccctgg tggctggaga 360

ctggactcgg cggaatatct ggattctgca gcaatagaag ccttggcaac gtcctggact 420

cgcagactta acagcagtcg tgaccagctt gacgttttgg ggcttaccgg cgtgataaac 480

cctggagaaa gtgattgaaa gctt 504

<210> 2

<211> 1227

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> istC_s

<400> 2

tctagaatgc ctggcaacga tgtcgctgcg gtgccggaga accgttggca ggtacgtcag 60

gtaacgattg gcgaccacgg ttacccgtac tattacgggg ctgattgtat ggatttggta 120

ttggaggagt tagcagcctt gcgcgcagac cgttttgtcg tggttactga cgacacggtg 180

ttggctttac atggtcacgc cctgcttagc ggtttgcgtc cgttagcccc ggtcgaactg 240

gtaagtcatc gccctgggga atcaatgaaa accttaccaa cactggcagc cgacattgag 300

cgtgtattgg cagcgggcgc cacacgtaga agtgttgtgg tcgcgctggg cgggggggtg 360

cctgggaacc tggctggagt tatcgcagca ctgcttttta gaggggttcg gctggtccat 420

atccccacca ctacgacggc agctatggac tccgtgcttt cgctgaaaca ggctatcaac 480

agcaacctgg gtaagaacca catcgggaca tacctggccc cacacgccgt cttcacagac 540

gtccgtcttc tggccacgtt gccagagcgg gagttgagaa gtggtctttg cgaagctgct 600

aaaaattgtc ttgccatcag accggacgag cttcctggcc ttcgcagagt gttggcgggt 660

gggcgtttgg ccgatccaga atccctttta tggcttctgg atgcgtctgt tcaggctaag 720

acgtcggtca ctgctagtga tacacgcgaa cagagaacag gactggtttt agagtatgga 780

cataccgtcg gacatgctgt tgaattgtgc gaccatcgta gacgtggtgc cgaaggcttg 840

tcacatggcg aagctatagc atttggcatg gtagtggcag cccggatatc tcatgccaga 900

ggctggttat cagccgaaca cgtcgccttg cacgaagaaa ttgttggtgc gctgggagcg 960

cccgtaagac ttccggccgg tttgtctgtc gacgatgtac ttgaaaccgt ccgtgatgac 1020

aataagagag gctacttgcc gcccgatcct gagtctgtgc cctttgtctt attgcatgac 1080

ctggggaaac ccgcaggcga agcggagttg cctcttgttc aagtcgcatt gaaggagatt 1140

caggccgctc ttgagagtct ggaacctccc gagccccttg aagggccggt tcccgtttca 1200

gtcgaagctg aagcacgctg aaagctt 1227

<210> 3

<211> 1297

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> istS_s

<400> 3

tctagagagg agaacgatgt ccgaattagc cattttgggt ggaacaccgg ctcgtgaccc 60

gcgcccctgg cctgcctggc cgcagtatga tgaggcaacc gaacaacaac tgatagctgc 120

ccttcggagt agacgttggg ctgttagttg gcctaccgat ggcagcccat cacgtgagcg 180

ccggttcgcc gaagcgttcg ctagatacca ccaggcacct cattgtgtct cagtagatca 240

tggcagctca gcactggtgg tcgcgctgga ggcactggac atcgggcccg gcgacgaagt 300

gatcgtaccg gtcatgacct gggtggctcc agtgtcagct gtactgcggg ttggcgctct 360

gccggtggta gtagacgtag atcccgaaac tggctgcatg acgcctgaag ctcttcgtgc 420

tgcggtgagt gaccggacta aagctgccat tgtcgttcac ttggcagcca gcgttgcaga 480

tgtcgacggc atccgtgcgg cggttgatga ggcgggcatt aaacttatag aggattgtgc 540

tcaagcgcac ggggctcgtt ggagaggacg tcctgtagga acctttgggg aattaggcgc 600

tttctctttt caagtcggta aggtcttagc cggaggggag ggtggcgcag tgatcacaag 660

cgaccccggc ttatatagaa gagttcaaca attgcgcgct gatagccgcc gctacccgga 720

cgaacaggtg cctgaaggag gtaacgagct ggtggaggct ggcgaagtta tgggggggtaa 780

ctattgcatg agtgagttaa cggccggtgt tcttttagat caattgccgc gcttggacgc 840

tcaacatgag caccgcgaaa agatggcatt ggagttagag cgcggccttg cggagttggg 900

tggattcgga gcgatcccgc tgccggaagg tgcggaccgt cgctcgattt atgaatatgg 960

catacgtttt cgtcctggta ctttcggcga tgtcccagtt gagcgtgttg cggaagcagt 1020

taccgccgaa ttgggcatgg atgtgtggcc gcctgatctt ccattacatc ggtcagttat 1080

gcttcatccc catactaaaa gacgttttgc tccagtttgg accgaaaagg gtcgcagaag 1140

agcgctggga cgtgagtatc cgggcgccga gcgctatcgt gagactactt tattgtttca 1200

tcacaaagca ttacttggcg aacctgccga catggccgac ctggtagccg ctgtacgcaa 1260

ggtacgggac ggacatgaac gtttacgctg aaagctt 1297

<210> 4

<211> 1296

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> istM_s

<400> 4

atgtctaccg atgtttctac tgatccgagc agcccgtcta accgtccgcc gcacatcctg 60

cgtctgaccc cgcacctgta ctggccgcag ctggcgggcc gctcctggcc ggttcgtttc 120

gatgcgatcg gcggcatgca gagccagatt taccgcctga cccgtcagct ggatgaacgt 180

ggtgtgcgcc agaccgttct gaccctgcgt ctgccgggtg caccgcgccg ttggccgatt 240

agcggtcgca ccgaagtacg cggtgtgcgt atcccggttc tgccgctgcg ttcccgcatc 300

cgtggtatgg tagacctgaa cctggcttgg gcgctgggcg ttgcggcgga cctggtgcgt 360

cgtcgtgagc gtccagacat cctgcacgtt cactgctctg gcgttatcat tccgccgctg 420

ctgggctggc tcctgacgcg tctgctgcgt gtaccgctgg ttctgaccgt gcactgttca 480

atcatcgtta cctatcaccc gatgaaccgt ctggacggca tgttgcagcc gctggcgcgt 540

tggattgaat gccgtgccat ccgtgcttct gcgcgcacca ttaccctgac cccgcgtacc 600

attccgctgc tgacccgtcg taccggcgtt cctaaagaac gtttcgcggt actgccggat 660

gtgattgacg ctgacgcttt tgcggctcgc gcgaccccgg aagcggttcg cgatgctcgc 720

gcggcttggg gcctgccgga aggtcgtccg gtggtgggtt atgttggtcg tatcgcccgt 780

gaaaaaggtt ggccgatcat tctggatatt gccgaagaac tgcgcgatac cgacgttcac 840

tggctgatct gcggtgatgg taacgaacgc gacttattcg aacgtgccgt acgtgaacgt 900

ggtctgaccg gccgcgtaac ggttaccggc tacgttccga acgaagacgt gccggcagcc 960

atgggtgcaa tggatctgct gctgatggcg ccgctgcacg aagaatttgg cagcgtgatg 1020

ctggaagcga tggcgtgtgg tctgccgatt gttgcagttg gtgtcggcgg cgtggctgat 1080

gtgctggaac acggtgaact gggccgtctg gtgccagaac gtaccccggc ggctttcgcg 1140

aaaggcatcc gtgaaagcct ggctgaaccg gaatggcgtg ctgcgaccgc tgaacgcgcg 1200

gcgaaaaccg tgcgcgctcg ctacgatctg ggtcaggttg cggcgcgtac cgcggaagtt 1260

tacgaagaag ttgttcgtgc gcgtcgtcgt ggctaa 1296

<210> 5

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> istD_s

<400> 5

tctagaggga gtgtccccat gccgactcgc gtgttattat tgtcgcccca ccctgacgac 60

atagcatgga gtttaggctg tactgtatcc cgtatgcgtg cggcgggttc agcctccccc 120

catgtagtta ctttttcgc tcggacgcgt tacgcgcctg gtcatgctgc gcatggcagc 180

gaggaggatg cgtctggtgt gcgggcaaga gaagaagcgg actgggcagt tcatgcggga 240

gtgtcccttc acagagagag attgccagac gcgagcttgc ggggctacga cgatgatacg 300

gaaatgggcg caccccctga gccagaagtt gtacgcgaga cggcgcggat tttacgggac 360

gcagtcagac gggttcgtcc atccttcgtc ttagcgccgc ttgcagctgg cggacacgtc 420

gaccatactg ccgtacgtcg tgcagcacgg gaaccgttgc ctgggacgga tgtagtatgg 480

tacgaagacc ttccatatgc agccgaggag gtgccagcgc cggatgggtg cccattggtt 540

gttccagctg atggccattg ggctgcgaaa gaagcgggag ttagacgctt cccgtcccag 600

cagccagaag aagtgcttcc agtcctgcgt agacacgcag aggcggtttc aggggaacgg 660

ctttgggcgt cagatgcgaa agccgcagac cgtatgagat cattgttact gttaagaggg 720

ccaagagcgg cgtgaaagct t 741

<210> 6

<211> 996

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> istE_s

<400> 6

atgacggagg agttgatacg cgcgcttgta gtgagaggcc caaaagagca tgcacttgag 60

agaattccgc ggcccgtccc tgctgacggg gaggctttag tagcggtcac gcacgtcgct 120

atctgcggta ctgacctgcg gcttttgcgc ggaacgttac atgacgcaga ctacccagtt 180

atcccaggtc acgagtgggc gggacgtgtc ttggaagccg cgggtcgtcc tgaacttgta 240

gggcgggcag ttgttggtga aggtataact ccctgccgcc ggtgcgcacg ctgtagagaa 300

ggacgttata atttatgcca ggacctggac gaggtgggct tcacccgggc cggggcgttc 360

gcagatgctt tcacggttcc cgctggtaat cttcgtccat taccgcccgg cctgtccgga 420

gctgagggtt gcttgcttga gccattatgc gtcgcgcttc acgccgtgga aagagcccct 480

gacttagccg gtcgtcgcgt cggggtcatc ggcgccggta cgattggttt attggtcgca 540

caactggcgg cagccgcagg cgctgcagct gtaacacttg ccgacccttc tccgcaccgg 600

cgtggagtag cagcggaatt agggcttggt caccgtgcac gtcttgacga ctgggcggat 660

gatcaacccg aggtcgtatt cgacgctacg ggggttgcag atgtttttcc tcaaggatta 720

gaggcgaccc gtcccggagg tacttacgtg ttagttggct actcaggcga ggaaacaact 780

tcaactgctc ccagcacggt tatgctgcgg gaattaactg ttcgcggagt cttgtccggt 840

tacgatcaga tcgatagagc gctggaggta gtgcagaatg ggtcggttct tctggggccg 900

ttactgggcg caccgattcc tattactgag tacagaacag tgttggaaga acagccagaa 960

ccgccgcttc gctatgtttt tacgacaggt gcttga 996

<210> 7

<211> 1167

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kanM2

<400> 7

atgggcggca tgcacctgct ggtgcgggcc ctggtcgagg agatggcggg ccgcggcgtc 60

ccgcaccggg tcctgacgat gtcaccgccc aaggtgccca aggacatcag gatcgggcag 120

cggatcaagg tgcacgcccg gcggctgccc gtgctgccca tcccctccga cctggagggg 180

tacttcggac tcgtcggcgc ctgggccaag ggcagcctgt tgtgggtgct gcgcaaccgc 240

aagcggctgc gccgggagat cggcgcggtg cacgcgcact gcgacggctc gggcgccgcg 300

gccttctacc cgtatctgat gtcccggatc ctcggcgtgc cgctggtggt ccagatccac 360

tccagccgct atctgagcca gcaccccacc acgctcttcg agcgggtgac cgacccgatc 420

gccaagtggg cggagcggca cgccgtccgc aaggccgccg cggtcctgat gctcaccgac 480

cgggcccgcg acgagatgcg gcgcaaggcc cagctgcccg cggagcgcgt gcaccggctc 540

gcgtacctgg ccagcgacca gttcaaggac gccgacaccg aggcgaggcg ggcggaactg 600

cgggagcgct acggcctcga cgaccgcccg atcgtgctct acgtggggcg gatcgccgcc 660

gagaagggcg tggagtacta catcgaggcc gcggccgaac tgacccgcag gggccgggac 720

tgccagttcg tcatcgccgg ggacggtccc gcccggccgg acctcgaaaa gctgatcggc 780

gcccgcgggc tgcgcgaccg ggtgaccatc acgggcttca tgtcccacga gttcatccca 840

tccatgatct ccctgggcga actcgtggtg ctgccgtccc ggtacgagga gctgggcatc 900

gtcatcctgg agtgcatgac catgcgcagg ccgctggtcg cgcacgacgt gaacggcgtc 960

aacaagctca tcgaggacgg caccaccgga atcgtcgtac ccccgttcag gaccccggag 1020

atggccgacg ccgtcgagcg gctcctcgac gatccggagc tgcgcgagcg gatggcggag 1080

aacgccgccc cgctgcccgc cgccaagtac tcgctctccg cggcgggcga ccaactggcg 1140

ggcatctacc gggagatcgg gctgtga 1167

<210> 8

<211> 1080

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kanC

<400> 8

atgggcgggg tgcacgccga ggtggtggcg gctcatcccg gcgcccggct cgaagcggtg 60

cacgacctcg accccgccgc cgccagggac ctggccgagc ggttccgcgc cgagcgggcc 120

gagccctcct gggcggacct gctcgccgac cccgcgatcg acctgctcat catcaccacg 180

cccaacgggc tgcaccaccg gcaggcggcc gaggcgctgc gggcgggcaa gcacgtactg 240

gtggagaagc cgctcggtgt cacgccggag caggtggccg agctcgtcga actcgccgga 300

cggcacgacc gggtccttgc ccacggaagc aacttcgtgc acagcccgaa gttcgtccgg 360

gcccgtcaac tggtcgcgga caccgaggcg ttcggacggc cgcacctggt ccgggtcgtc 420

ttccgcaact cgggccccga ggccgcctgg gccgcgtcca aggacctcgc gggcggcgga 480

gccctcctgg acctgggctg tcacgcggtg gagctgtgcc ggtggctgct cgacggcgcc 540

gacgtcgagt cggtcagcgc ccgactgcag cgggtgcggc cgccccacga cgccgaagcg 600

gaccgcgcgt ccggcaccgc gggaaccgcg cgggtcgcgc tggaggacca ggcgctgctg 660

gtcatggagt tcgccgacgg cgcggtcggg cagtgcgacg tctcctgggt cacccagggc 720

ggtgagcagg tcaccgcgga gatcatcggc accaagggca gggtcgaggt cgacctgtgg 780

accggcatgg ggctgcgcgc ctactcggac aagggctatc aggacgtctg ggatcccgag 840

cagggctggg tgcatccgga atgggagtgg atccgggcga gcggctacta ccaccaggac 900

ggcaccgtga tcgaggcggt gggccagggc atccccctca cccacggccc cgcggaagcg 960

ctcgcctcgg cccgtgtcct ggccaccggt taccgcagtc acgcggaggg gcgggtactg 1020

cggctgtccg gcgcgccggt cggccctggc gcgtcgacga cggcggcggg ctcggaatga 1080

1080

<210> 9

<211> 1173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kanD

<400> 9

atgggcggca tgcacgtgtt gggccacgcg atcgtgacgg agatgggccg gcggggcttc 60

ccgcaacggg tcctcaccat ggccccgccc ggcgtcccga aggacctcca gatcgccccg 120

aacgtcaccg tgcacgcccg gcgactgccg gtgctgccga tcccgtccaa gctggagggt 180

tacttcggcc tggtcggggc atgggcgaag gccagcctgc tctacgtgat gcgcaacaag 240

gagcagctca agcgcgagat cggaatcgtg cacgcgcact gcgacggttc cggatccgcc 300

ccggcgtacg cgtacgccgc ggcgcaggtg ctcgacgtgc cgatcgtgtc gcacatctac 360

tcctgccggt cgctcaccca gcacccgacc acggtgttcg agcgggtggt cgacccggtg 420

gcgaagtcgg cggagaagta cgtcatccag cactccggcg ccgtgctcac cctcagcgac 480

aaggtgcgcg agcggatccg ggacgaactg cacgtgccgg acgacaaggt gcaccggctg 540

gcgcacctgg tcaccgacaa cttcgtcggg cacgacaccc cggagcgccg ggaggaactg 600

cggcagcggt tcgggctgac cgacgacaag ccgaccgtcc tctacgtcgg ccggatctcg 660

tccgagaagg gcgtggactg gttcgtcaag gccgccgccg aggtcgcgaa gcggcgcgac 720

tgccggttcc tgatcgccgg ggacggccca cagcgcggcg acatcgaggc gctggcccgc 780

cagctcggcg tcgccgacaa gctggtcatc accggcttcc tgctccccga gtacatcccg 840

tcgatcatct cgctctcgac gctggccgtc ctgccctcgc agtacgagga actgggcgtc 900

gtcgtcctgg agtacatgat gatgaagcgc ccggtcgtgg cgcacgacgt cagcggcgtc 960

cacaagctgg tcgaccacat gaagaccggc gtcctggtgc cgcccttcga ccctccgaag 1020

ctcgccgatg ccatcgagat ggttctcgac gatccggacc tggcccgtcg cctcgcggag 1080

aacgccgaac cgattcccca gcgggagtac tcgctggcct cggccggtga acgcctcgag 1140

gcgatctacc tatccctcat ggaggagtcc tga 1173

<210> 10

<211> 1173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> genM2

<400> 10

atgggcggca tgcacgtgtt gggccacgcg atcgtgacgg agatgggccg gcggggcttc 60

ccgcaacggg tcctcaccat ggccccgccc ggcgtcccga aggacctcca gatcgccccg 120

aacgtcaccg tgcacgcccg gcgactgccg gtgctgccga tcccgtccaa gctggagggt 180

tacttcggcc tggtcggggc atgggcgaag gccagcctgc tctacgtgat gcgcaacaag 240

gagcagctca agcgcgagat cggaatcgtg cacgcgcact gcgacggttc cggatccgcc 300

ccggcgtacg cgtacgccgc ggcgcaggtg ctcgacgtgc cgatcgtgtc gcacatctac 360

tcctgccggt cgctcaccca gcacccgacc acggtgttcg agcgggtggt cgacccggtg 420

gcgaagtcgg cggagaagta cgtcatccag cactccggcg ccgtgctcac cctcagcgac 480

aaggtgcgcg agcggatccg ggacgaactg cacgtgccgg acgacaaggt gcaccggctg 540

gcgcacctgg tcaccgacaa cttcgtcggg cacgacaccc cggagcgccg ggaggaactg 600

cggcagcggt tcgggctgac cgacgacaag ccgaccgtcc tctacgtcgg ccggatctcg 660

tccgagaagg gcgtggactg gttcgtcaag gccgccgccg aggtcgcgaa gcggcgcgac 720

tgccggttcc tgatcgccgg ggacggccca cagcgcggcg acatcgaggc gctggcccgc 780

cagctcggcg tcgccgacaa gctggtcatc accggcttcc tgctccccga gtacatcccg 840

tcgatcatct cgctctcgac gctggccgtc ctgccctcgc agtacgagga actgggcgtc 900

gtcgtcctgg agtacatgat gatgaagcgc ccggtcgtgg cgcacgacgt cagcggcgtc 960

cacaagctgg tcgaccacat gaagaccggc gtcctggtgc cgcccttcga ccctccgaag 1020

ctcgccgatg ccatcgagat ggttctcgac gatccggacc tggcccgtcg cctcgcggag 1080

aacgccgaac cgattcccca gcgggagtac tcgctggcct cggccggtga acgcctcgag 1140

gcgatctacc tatccctcat ggaggagtcc tga 1173

<210> 11

<211> 1026

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> genD2

<400> 11

atggttgagc gcctgggcgt cgccgtagtc ggcggcgggt tcatgggtgg cgtgcacgcc 60

gaggtcctga ccgccgatcc ccgagtggat ctgcggtggg tggtggaccg cgacgagcgc 120

gtcggcacgg acctggccac ccggttcggc gcacgcgtca ccacgaccct cgacgaggcg 180

ctggctgacg acacggtccg gttcgtggtg gtggccactc cggccgccac ccacgagccg 240

atcgcggcac aggtcatcgc cgccggccgg aacgtcctgg tggagaagcc gctcgtgctc 300

tccaccgggc acgcccggca actcgccgcc gcggcccacg aacgcggggt ggtcctcgcg 360

cacggtggca acttcgtcta cgccccgaag ttcgtccggg ctcacgagct cgcggccgac 420

cgggaagcac tgggcaccgt ccactccgtc cgggtagcct tccggacgtc cggaccggac 480

accgactggt tccggtcgaa ggcgaccgcc ggtggtggcg ccctgaccga cctcggctgg 540

cacgcggtcg agctgtgccg ctggatgctc ggcaagccgg ccatccgcgc ggtcaccgcc 600

tgcacccggc agctcagtgc cgccggggac gtcgaggacc agggtgtcgt cctgatcgag 660

ttcgccgacg gcgcgatcgg tcagtgcgac gtctcctggg cctgccccgg cggtgagcag 720

ctcaccgtcg aggtgatcgg cacggagggc ctggtcaccg ccgatctctg gcagggcatg 780

ggggtcgagg cctacaccaa caccaagttc ggcgcggtgt gggagcccaa ccagggatgg 840

ctgcgccccg agtgggagtg gatccgcaac agcggatacg tgcaccagga ccgtcaggtc 900

gtggacgcgg tgctcgacgg gcggcccatg acgcacaccc cggacgacgc cgtcgcggtc 960

gtcgaaacgc tcgaagcggc gtaccgcagc gcggccgacg ggcggaaagt ggagatgaat 1020

gcctga 1026

<210> 12

<211> 1257

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> genS2

<400> 12

atgacgcaga aactggccat cctcggtggc gaccccgtcc ggacccggcc ctggcccgag 60

tggccgcacg tcggcccgga ggacgtggat cggctgcgga ccgtcatcga gagccgcaac 120

ctcggcggca tccccttccc gaacaccatg caccagcagt tcgccgagcg gttcaccgcc 180

aagctcgggg cgaagtacgg cctcctggcg accaacggca cggtgaccct ctcgatggcg 240

ctgcgcgcgc tcgggatcca tgccggtgac gaggtgatca ccaccgcctt cacctgggtc 300

gggacggtcg ccggcatcgt gcacgtcaac gccgtgccgg tgctggcgga catctccgac 360

gacaactggt gcatcgaccc ggtgaaggtc gaggaggcga tcaccgaccg gaccagggcg 420

atcatggtgg tgcacctggg caaccaggtc gccgacatgg acgcgctgct ggacatctgc 480

cgccggcaca acctgctgct catcgaggac tgcgcgcacg cgcacttcgc ggagtggcgg 540

ggccggtgcg tcggcaccat cggcgacgcc ggcagctaca gcttcgagac cagcaagatc 600

atgacctcgg gcgagggtgg cttcctggtc accgcaaccg aggaggcgtt ccaccgggcg 660

atgtccctgg cgcacgtcgg ccgcaaggag gccccgtacg acaggttccc gggccgggtc 720

ttcggctgga accaccgggc caccgagatg caggcggccg tcctgctggg gcagctcgac 780

cggtacgacg ccctcgacaa gcagcggacc gcgatggcgg agatgctgac ccaggggctg 840

gtcgagatcg gcggcttcaa gccgctggcg gaggaccccc gggtcacccg ccggcagcgt 900

tacgagctgc tcttccggtt cgacaccgag gcctgggacg ggctccaccg ggacaaggtg 960

ctggaggcga tcctcgccga gggcgtcgag ttcgagggga acaccttcta cccgccgatg 1020

caccgcgacg agctgttcca catcaccgcc gacgactggc cggcgatccg ggagcgctac 1080

ggcgagaaga tcgagccgga cgcgttccac ctgccggtgg cggagcgggt ggccttcgac 1140

gaagcggtgt ggatccacca ctccctgctg tcggtggagc cggaggacgt acaggacatg 1200

ctggatgcgg tggtcaaggt ccgggacaat ctgggggcgc tgaagaagag cctatga 1257

<210> 13

<211> 1983

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> neoL

<400> 13

gtggtgacga ccggcgtggc actgccagcc ctgcaccgtg ctttcgtgga gaccgtccgg 60

cgggacggcg gcgcggccgc cctgcacgcc tgcgcctgct tcgcggagca gttgctcgcc 120

gacgccgccg cggcgcaccg ggaggccgcg cccggaccgg acgaggacgg gaccggcgcc 180

cgactcgccg catccgtggt ccggctgagg gagctgtgca ccggactcgc ccgcgagatg 240

gccgcttccg ccgatgccgc cgagcccgcg tggagcggcc gggccgccgc tgccgccgct 300

cccgacggcg ccgagcggcg gatcgccgtc gtggaggacg cgctcgtgct cgccaccgcc 360

gtgacgggcg cgctgtgggg atcggccgcg gcccggcggg accagcgcac cgccgccctg 420

ctgcgccgcg ccgccgactg gaagaccccg gagtgctacg gctacgacct ggccgatccc 480

gagctctgct acggccaggc cgccgaacgc ctctccgccc ggtcccggcg ggcgcccgtg 540

ctcgtcgtgg gcatacggac gggcggctcg tacctggcgc cgttctggca ggccgccgcc 600

gaggacgccg gggtcgcggc ggggccctgg cacagcgtcc gccccgtacg cggcggcgcc 660

ggcatcaccc tgccgggctc cgagatcgag gccctgccgc gccgcctgcc gcccggtgcg 720

gcgctggtcc tggtggacga ccagccggac accggtgcca ccgccctcgc cgtgcgcgac 780

cgggtcgccc ggcgctatcc gggcgtgcgg gacgtcgtcc tggccgcgcc gggtcggctc 840

tacgacctga gcggcccggc cgtccgcccg ctggccgagc ggccggtcgt ccgcccggcg 900

gcccgcctgt ggcagctcgc cggcacgggc ggcgccgccg cgctcgcggc ccgcgcacgg 960

gcggcgggcg tgcccctcgc accgggcgcc gcccaccgcg tggagccgtt ccggggcccc 1020

ttcctcgcgg agtacgggcc gggcaccgcc ccgcgcgggg gcgccgccgg cgcgcgcggg 1080

agcggcgcgg cccgccgcct cgatccccgc aaccggccct tctccctggt cgccggtgcg 1140

acgggcgcgg gcacgagcgg cggtacgggc gccccggaga cgtaccactt ccgcttcatc 1200

ggcaccggac cgcacggcct ccactgccac caggccctgc gcgccctggg ggacctgctc 1260

ccgcccggcc acgtcttcgc cgacggctac ctggtgaccc gccacgagca cgggctgcgc 1320

ccgctgcgcg cggtactgcc ggagctggag gagccgcggc ggcgccgcgt actgctcgcg 1380

gtcgccgagt cctgggccgc gctgcgccgc gtcggcgagc tgggccgtcc gggcgcgggc 1440

gccgggtacg agccgcgggc ccggctcgac ggggcgctgc ggcgactgcg cgagcgcatg 1500

ggccggcccc tgcccgtcga cggcgcctgg acggcccggc acgtgccgga gcggatgccc 1560

ctcgggggcg ccgacggggt gctgctgcgc accccgcttc catacgggca cgggtactgg 1620

cactggcagc tcgcggacac cggccagggg ggcgcgggtc ccgcgggcgg cggcgccccg 1680

gttctgcggc ggttcgggct ggactggatc tggggcggcg gcggctgcct ggagagcgag 1740

atcgcctcct tcgtcgtcga gaaccggctc ggcgcccatg accgggacct gctgcgggag 1800

gccgtcgccg cggcctgcgg cggtacgcgc gccttcgacg ccgggctgcg gctggcgggc 1860

gaggcgctgt tctggaacgc caagacgtgg ctgcggcgct gcccggtcgt cacgccgccc 1920

accgccgacc ggatcgaggc ggagctggcc gcccaggccg cgtacgtcgc cgcactggcc 1980

tga 1983

<210> 14

<211> 702

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> neoP

<400> 14

atgacggccg cccagcggtt cgtgctggtc cggcacgccg aggcgagcct gaacgtgctg 60

cgcgacgacg acgtcatgcc gggcttcgac ccgcatgccg ggctgacgcc gctcggcgag 120

cggcaggcgc gggcgctcgc cgagcacctg cccggcgacc cggcggtagg cccgccgggt 180

cccgccccgg ccccgcggcc cggtccgggc tcggggcccc gccctgccgt gcgggtgtac 240

tccagcccgc agcggcgggc cgcccgcacc gccgaggtgc tggccgccgc gctgggcgtg 300

cccgtcctgg cggacggccg gctggcggag ctccgggcgc cgcgcgcctt cccccggccc 360

atgacggtcc gccagtggga cgccgtgctg gaggaccggc tgcggcgccc ggcggccgag 420

ccggcggggg tggagagctg ggcggcgcag cggcggcgcg tccgggagtt cctggactcc 480

cgctgcccgg tcggcgccga cggggcgcgg tgggtgctcg tgtcgcactc cgagacgctg 540

caggccgtcc tcttcgagct gctggggctg gaggacgcgc tgctgcaccg cacccgtttc 600

aagatcagca acaccggtgt gttcatcgtg gacaggacgg aggacggatg cgcttccctg 660

gtggtggcga acagcaagac gcacctggcc aggacggcat ga 702

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kanM2_F

<400> 15

ggtctagaac cgagcctgcc aagggtg 27

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kanM2_R

<400> 16

ggaagcttcg aggaggaccc tcacagcccg 30

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kanC_F

<400> 17

gccggatcct cggacaaggg ctatcagga 29

<210> 18

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kanC_R

<400> 18

tatctcgagt gccgtcctgg tggtagtag 29

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kanD_F

<400> 19

acaggatcca tgagcgcact cgctctcgcc 30

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kanD_R

<400> 20

agtctcgagt cagagctcgg catggtgcgc 30

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> genM2_F

<400> 21

ccgtctagac cgatcgtgtc gcacatcta 29

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> genM2_R

<400> 22

aagaagctta agttgtcggt gaccaggtg 29

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> genD2_F

<400> 23

cagggatcca tgagcacagc ccaatccctc 30

<210> 24

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> genD2_R

<400> 24

ccgctcgagt caccatggtt gggactccat tc 32

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> genS2_F

<400> 25

acgggatcca gctgttccac atcacc 26

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> genS2_R

<400> 26

gatctcgagt gtcccggacc ttgacc 26

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> neoL_F

<400> 27

tgatctagat gaagcggaag tggtacgtc 29

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> neoL_R

<400> 28

tccaagcttt ccgagatcga ggccctg 27

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> neoP_F

<400> 29

cgtggatccc gtcctcttcg agctgctg 28

<210> 30

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> neoP_R

<400> 30

accctcgaga ccggtgttgc tgatcttga 29