



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0019360
(43) 공개일자 2012년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 17/18 (2006.01) C07D 498/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12R 1/465 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0032278
(22) 출원일자 2011년04월07일
심사청구일자 2011년04월07일
(30) 우선권주장
1020100082059 2010년08월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤여준
서울특별시 서초구 신반포로33길 15, 101동 1806호 (잠원동, 동아아파트)
김재중
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 309동 202호 (전민동, 엑스포아파트)
임시규
대구광역시 동구 신암동 신암뜨란채아파트 109동 1901호
(74) 대리인
손민

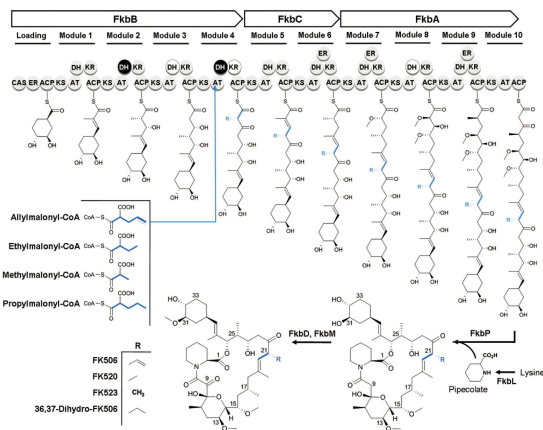
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 신규 타크롤리무스 유도체, 상기 유도체를 포함하는 신경 보호용 조성물, 상기 유도체를 포함하는 면역 억제용 조성물, 상기 유도체의 생산 방법 및 상기 유도체의 생산 균주

(57) 요약

본 발명은 신규 타크롤리무스 유도체, 상기 유도체를 포함하는 신경 보호용 조성물, 상기 유도체를 포함하는 면역 억제용 조성물, 특정 유전자가 결손된 변이주를 이용하여 상기 유도체를 생산하는 방법 및 상기 유도체를 생산하는 변이주에 대한 것이다. 본 발명의 생산 방법을 이용하면 타크롤리무스에 비하여 신경 보호 효과 및 면역 억제효과가 우수한 신규 타크롤리무스 유도체를 효율적으로 생산할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-1370-3

부처명 교육과학기술부

연구사업명 국가지정연구실사업

연구과제명 생합성경로 재설계를 통한 당포함 항생제 및 항암제(glycosylated antibiotic and anticancer)의 유도체 개발

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2010.06.01 ~ 2011.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

tcsB 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 이용하는 타크롤리무스 유도체 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 타크롤리무스 생산 균주인 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 균주는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP, 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamyceticus*) KCTC 9225 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 55098, 방선균 No. 9993(*streptomyces tsukubaensis* No. 9993), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 53770, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 6260, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 49A, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 94128, 스트렙토마이세스 글라우세센스(*streptomyces glaucescens*) MTCC 5115 및 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) BICC7522로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상의 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 방법은 *tcsB* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 배양하는 단계; 및 상기 균주에 4-메틸펜타노익산 또는 4-플루오로크로토닉산을 공급하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 4-할로크로토닉산, 분지된/4-할로부타노익산, 분지된/불포화된/5-할로펜타노익산, 분지된/불포화된 헥사노익산 및 헵타노익산으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 카르복실산을 공급하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

tcsB 유전자가 결손된 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 속 균주.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 균주는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP, 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamyceticus*) KCTC 9225 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 55098, 방선균 No. 9993(*streptomyces tsukubaensis* No. 9993), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 53770, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 6260, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 49A, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 94128, 스트렙토마이세스 글라우세센스(*streptomyces glaucescens*) MTCC 5115 및 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) BICC7522로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상의 균주인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1의 *tcsB* 유전자 중 175 내지 2,262 번째 염기가 결실된 것을 특징으로 하는 균주.

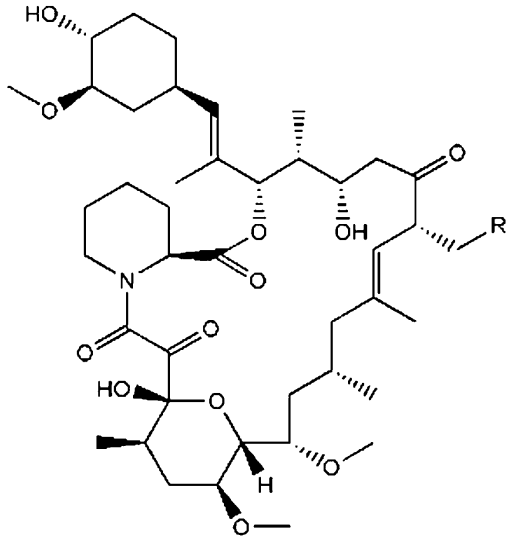
청구항 9

제6항에 있어서, 상기 균주는 기탁번호 KCTC 11879BP로 기탁된 것인, 균주.

청구항 10

하기 화학식 1로 표시되는 타크롤리무스 유도체 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염.

[화학식 1]

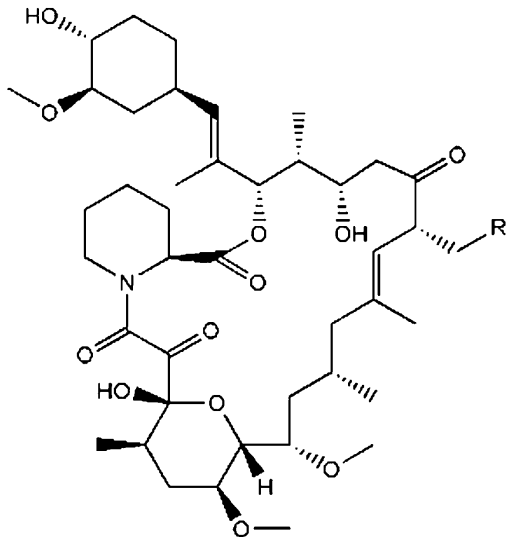


상기 식에서 R은  또는  이다.

청구항 11

하기 화학식 1의 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



상기 식에서 R은  또는  이다. 상기 조성물의 화합물은 R이  인 화합물, R이  인 화합물 또는 이들의 조합이다.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가하는 것을 포함하는 조성물.

는 치료용 조성물, 특정 유전자가 결손된 변이주를 이용하여 상기 유도체를 생산하는 방법 및 상기 유도체를 생산하는 변이주에 대한 것이다.

배경 기술

- [0002] 타크롤리무스(FK506), 라파마이신, 아스코마이신(FK520)을 포함하는 폴리케타이드(polyketide)계열의 화합물은 미생물로부터 생산되는 복잡한 구조의 천연 화합물(natural product)로서, 현재까지 약 10,000 가지 이상의 화합물이 알려져 있다. 이로부터 주로 항암제, 항생제, 고혈압 치료제 및 면역억제제 등이 개발되어 왔으며 현재 사용되고 있는 천연 화합물 유래의 의약품 중 약 50%를 차지하고 있다. 타크롤리무스, 라파마이신, 아스코마이신 등은 유사 구조 부위가 있어 *in vivo* 및 *in vitro*에서 면역세포인 T 세포의 활성화를 억제한다. 이들 화합물은 피라노스-피페콜린 영역(pyrano-sepiocolinyl region)을 가지고 있는데 이는 류신-프롤린 펩타이드(leucine-proline peptide)와 유사한 구조로서, 펩티딜 프롤릴 시스/트랜스 이성화 효소(peptidyl prolyl cis/trans isomerase)의 결합으로 다양한 생리적 활성을 나타낸다고 보고되었다(Rosen M. K. 등, 1990).
- [0003] 이러한 폴리케타이드계 화합물은 폴리케타이드 신타제(polyketide synthase, PKS)라고 하는 거대효소(megasyntase)에 의해 생합성 된다. 이러한 PKS 복합체는 아실코에이(acyl-CoA)의 반복적 축합(claisen condensation) 반응에 관여하는 여러 개의 모듈(한 번의 축합반응을 책임지는 촉매 도메인(catalytic domain)들의 묶음)로 구성되어 있고, 시작 모듈(loading module), 다수의 연장 모듈(multiple extender modules) 및 해리 모듈(releasing module)로 구성된 것이 전형적인 모습이다. 모듈을 구성하는 촉매 도메인들의 구성에 따라 폴리케타이드의 구조가 일대 일로 대응하여 생합성된다. 상기 모듈 중 연장 모듈은 각 카르복실산의 축합반응에 직접 관여하는 아실트랜스퍼라제(acyl transferase, AT), 아실 캐리어 단백질(acyl carrier protein, ACP) 및 베타-케토아실 신타제(beta-ketoacyl synthase, KS) 도메인들과 축합반응의 결과 생성되는 베타-케토 그룹의 환원에 관여하는 케토 리덕타제(keto reductase, KR), 디하이드라타제(dehydratase, DH) 및 에노일 리덕타제(enoyl reductase, ER) 도메인들로 구성되어 있다. 한 번의 모듈의 작용으로 아실 코에이 잔기가 첨가되는데 AT는 아실 잔기(acyl moiety)를 해당하는 ACP로 전달하여 아실-ACP를 생성하게 하고 KS는 앞의 모듈에 의해 첨가된 분자에 생성된 아실-ACP의 아실기를 클라이젠 축합(claisen condensation)을 통해 탄소-탄소 결합을 하도록 하여 점차 탄소 수를 증가시킨다. 즉 이들 세트가 한 번 작용하면 하나의 아실 잔기가 첨가되어 골격 탄소사슬의 탄소수가 2개씩 증가될 수 있다. 이 과정에서 KR, DH, 및 ER이 차례로 작용하여 베타 탄소 위치의 케토기가 알코올기로, 알코올기가 이중결합으로, 이중결합이 포화 단일결합(saturated single bond)으로 변형되기도 한다.
- [0004] 타크롤리무스는 일본 북부지방 쓰꾸바 지역에서 채취된 흙 시료로부터 얻은 미생물인 스트렙토마이세스 쓰꾸바엔시스(*Streptomyces tsukubaensis*)의 발효액에서 발견되었으며, 면역억제 효과를 가지고 있는 마크로라이드(macrolide) 계에 속하는 항생물질이다. 타크롤리무스는 신장 및 간의 이식시, 인체의 거부반응 예방에 사용되는 면역억제제로서, 1993년 미국으로부터 FDA 승인을 받았으며, 1994년부터 후지사와 헬스케어(Fujisawa Healthcare)에서 경구투여제 및 주사제 형태로 프로그래프(Prograf)라는 상품명으로 판매되고 있다.
- [0005] 타크롤리무스는 스트렙토마이세스 쓰꾸바엔시스(*Streptomyces tsukubaensis*) No. 9993(미국 특허 제4,894,366호), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC55098, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) MA 6858(미국 특허등록번호 제5,116,756호), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 53770, 스트렙토마이세스 클라블리제루스(*Streptomyces clavuligerus*) CKD1119(대한민국 특허 10-0485877), 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamyceticus*) KCC S-043(KCTC9225) 등의 균주에서 생산되는 것으로 보고되었다(Muramatsu H. 등, 2005).
- [0006] 생합성의 관점에서 보면, FK506은 FK520와 라파마이신과 비교해서 구조적으로 특이한 특징을 가진다. 즉, FK506은 알릴 결사슬을 가지는 유일한 폴리케타이드이다. 1998년 Motamedi 등에 의해 Eur. J. Biochem. 244,74-80에 FK506의 생합성 유전자의 일부가 보고되었고, 2000년 Wu 등에 의해 Gene, 251,81-90에 FK520 생합성 유전자가 보고된 바 있지만, FK506 유전자 클러스터의 일부분의 서열만이 아주 최근에서야 보고되었기 때문에, FK506에 특이한 알릴 결사슬의 도입에 대한 생합성 메커니즘(mechanism)은 여전히 미해결로 남아있다.
- [0007] FK506의 유사체로서 알려진 것으로는, FK520, 다이하이드로타크롤리무스(dihydrotacrolimus), FK523, FK525 등이 있고, FK520은 23개의 탄소를 형성되는 마크로라이드(23-membered macrolide) 구조의 화합물이며, FK506의 에틸 유사체(ethyl analog)이다(Hatanaka H. 등, 1998). 그리고 다이하이드로타크롤리무스는 FK506 C21 위치의 프로필 유사체(propyl analog)이고, FK523은 FK506 C21 위치의 메틸 유사체(methyl analog)이며, FK525는

FK506의 프롤릴 유사체(prolyl analog)이다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 체계적으로 FK506의 특이한 C21 알릴 결사슬(moiety)을 생성하는 생합성 방법을 밝혀내었다. 그리고 FK506의 특이한 C21 알릴 결사슬(moiety)을 생성하는 것에 관여하는 것으로 밝혀낸 유전자를 결손시켜 신규 타크롤리무스 유도체를 생산하는 방법을 밝혀내었다.

발명의 내용

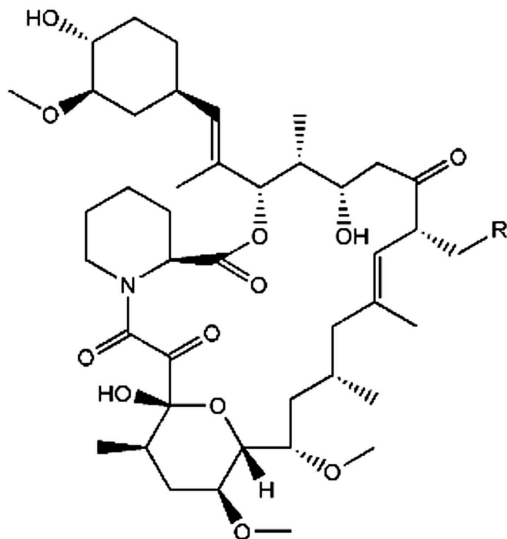
해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 *tcsB* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 이용하는 타크롤리무스 유도체 생산 방법을 제공하고자 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 비활성 *tcsB* 유전자를 가지는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 속 균주를 제공하고자 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 타크롤리무스 유도체 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 제공하고자 한다.

화학식 1



[0012]

[0013]

[0014] 상기 식에서 R은  또는  이다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

[0016] 또한 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 면역과민 반응 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

[0017] 또한, 본 발명은 *tcsA*, *tcsB*, *tcsC* 및 *tcsD*로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 이용하는 타크롤리무스 유도체 생산 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명은 *tcsB* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 이용하는 타크롤리무스 유도체 생산 방법을 제공한다. 상기 스트렙토마이세스 균주는 타크롤리무스 생산 균주인 것이 바람직하다. 본 발명에서 “타크롤리무스 생산 균주”란 타크롤리무스를 생물체 내에서 생산할 수 있는 스트렙토마이세스 속 균주를 말한다. 예를 들어,

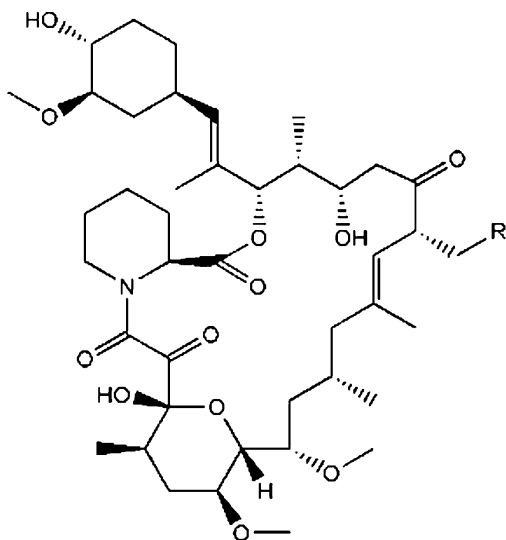
스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP, 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamyceticus*) KCTC 9225 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 55098, 방선균 No. 9993(*streptomyces tsukubaensis* No. 9993), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 53770, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 6260, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 49A, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 94128, 스트렙토마이세스 글라우세센스(*streptomyces glaucescens*) MTCC 5115 및 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) BICC 7522으로 이루어진 군에서 선택되는 1이상의 균주일 수 있으며 이에 한정되지 않고 타크롤리무스를 생산하는 모든 스트렙토마이세스 속 균주를 포함한다.

[0019] 상기 방법은 *tcsB* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 배양하는 단계; 및 상기 균주에 4-메틸펜타노익산 또는 4-플루오로크로토닉산을 공급하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 4-할로크로토닉산, 분지된/4-할로부타노익산, 분지된/불포화된/5-할로펜타노익산, 분지된/불포화된 헥사노익산 및 헵타노익산을 포함하는 카르복실산을 *tcsB* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주로 공급하는 단계를 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명은 *tcsB* 유전자가 결손된 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 속 균주를 제공한다. 상기 스트렙토마이세스 속 균주는 타크롤리무스 생산 균주인 것이 바람직하다. 본 발명에서 “타크롤리무스 생산 균주”란 타크롤리무스를 생물체 내에서 생산할 수 있는 스트렙토마이세스 속 균주를 말한다. 예를 들어, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP, 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamyceticus*) KCTC 9225 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 55098, 방선균 No. 9993(*streptomyces tsukubaensis* No. 9993), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 53770, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 6260, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 49A, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 94128, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) BICC7522으로 이루어진 군에서 선택되는 1이상의 균주일 수 있으며 이에 한정되지 않고 타크롤리무스를 생산하는 모든 스트렙토마이세스 속 균주를 포함한다. 상기 균주는 서열번호 1의 *tcsB* 유전자 중 175 내지 2,262 번째 염기가 결실된 것일 수 있다.

[0021] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 타크롤리무스 유도체 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적 허용가능한 염을 제공한다.

[0022] [화학식 1]



[0023]

[0024]

[0025] 상기 식에서 R은  또는  이다.

[0026] 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 상기 조성물은 화학식 1의 R이 1-propen-2-yl인 화합물, R이 플루오로메틸(fluoromethyl)인 화합물 또는 이들의 조합을 포함한다. 상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가할 수 있다.

- [0027] 본 발명의 상기 신경계 질환은 섬망착어, 의식 혼탁, 운동이상증, 삼차신경통, 혀인두신경통, 얼굴마비, 중증근육무력증, 근육퇴행위축, 근위축성 측삭 경화증, 진행근육위축, 유전성 진행 연수근육위축, 추간판탈출증(herniated), 원반탈출증(ruptured), 척추원반탈출 증후군, 경추증, 신경총질환, 흉곽출구과괴증후군, 말초 신경병증, 글루-스니퍼 신경병증(glue-sniffer's neuropathy), 길리안-바르(Guillan-Barre) 증후군, 알쯔하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤 무도병, 다발근육염, 메니에르 질환, 다발신경염, 고립 신경염, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 신경근병증, 당뇨병신경병증, 노인성치매, 혈관치매 또는 다발경화증일 수 있다.
- [0028] 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 면역과민반응 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 면역과민반응 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0029] 상기 면역과민반응 관련 질환은 면역과민반응에 의해 발생하는 질환을 포함하며, 장기이식시의 거부반응, 자가 면역질환 또는 알러지성 질환일 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 *tcsA*, *tcsB*, *tcsC* 및 *tcsD*로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 이용하는 타크롤리무스 유도체 생산 방법을 제공한다. 상기 방법을 이용하여 향상된 면역억제 효과, 신경 보호 효과, 또는 면역억제 및 신경보호 효과를 가지는 타크롤리무스 유도체를 생산할 수 있다.
- [0031] 이하 본 발명을 자세히 설명한다.
- [0032] 본 발명은 *tcsB* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 이용하는 타크롤리무스 유도체 생산 방법을 제공한다.
- [0033] 상기 방법은 *tcsB* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 배양하는 단계; 및 상기 균주에 4-메틸펜타노익산 또는 4-플루오로크로토닉산을 공급하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 4-할로크로토닉산, 분지된/4-할로부타노익산, 분지된/불포화된/5-할로펜타노익산, 분지된/불포화된 헥사노익산 및 헵타노익산을 포함하는 카르복실산을 *tcsB* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주로 공급하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0034] 계놈상에서 목적인 유전자만의 특이적 결손(결실)은 당 분야에서 확립된 방법을 통하여 수행할 수 있으며, 방법은 특별히 제한되지 않으며, 상동 재조합(homologous recombination)법을 사용할 수 있다. 목적인 단백질의 N 말단과 C 말단을 코딩하는 핵산 사이에 선별마커를 포함하는 벡터로 스트렙토마이세스 속 균주를 형질전환시켜 계놈과 벡터 사이에 재조합을 유도하였다. 사용되는 선별마커(selection marker)는 특별히 제한되지 않고, 약물 내성, 영양 요구성, 세포독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 구체적 실시예에서, 세 개의 다른 균주로부터의 FK506의 전체 생합성 유전자 클러스터와 FK520의 그것과 비교함으로써 단지 네 개의 유전자만이 FK506의 독특한 PKS 연장 단위(extender unit), 즉 알릴말로닐-CoA(allylmalonyl-CoA)의 생합성과 관련이 있다는 것을 밝혀내었다. 또한, 인프레임(in-frame) 유전자 결실, 화학적 상보, 및 생화학적 분석을 통하여 비전형적인 알릴말로닐 PKS 연장 단위의 상세한 생합성 경로를 밝혀내었다.
- [0036] 본 발명의 구체적 실시예에서, FK506 합성 스트렙토마이세스 속 균주에서 C21 알릴 결사슬(moiety)을 생성하는 생합성 경로에 관여하는 유전자 및 상세한 생합성 경로를 밝혀내고, 상기 유전자가 결손된 변이주를 제조하여, 변형된 C21 결사슬을 가지는 FK506의 신규 C21 유도체를 돌연변이합성법을 통해 생성하였고, 그들의 생물학적 활성도 평가하였다. 또한, 상기 돌연변이합성법을 이용하여 다양한 FK506 유도체를 효과적으로 생산할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0037] 본 발명의 신규 타크롤리무스 유도체를 생산하기 위한 균주 배양은 통상의 미생물이 사용할 수 있는 영양원을 함유하는 배지에서 배양할 수 있다. 균주의 영양원으로는 당업계에서 통상적으로 사용되는 영양원을 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 종래 스트렙토마이세스 속 박테리아의 배양에 이용되고 있는 공지의 영양원을 사용할 수 있다. 예를 들어, 말로닉산(malonic acid), 에탄올, 메치오닌(methionine), 탄소원 및 질소원을 포함하는 배지에서 이루어지는 것이 바람직하다. 이때, 상기 탄소원은 전분, 포도당, 옥수수기름, 글리세롤, 말토스, 만노스 및 이노시톨로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것이 바람직하며, 전분, 포도당 및 옥수수기름인 것이 가장 바람직하다. 또한, 상기 질소원은 면실밀, 옥수수 침지액, 옥수수 침지분, 대두분, 펩톤 및 효모엑기스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것이 바람직하며, 면실밀 및 옥수수침지액인 것이 가장 바

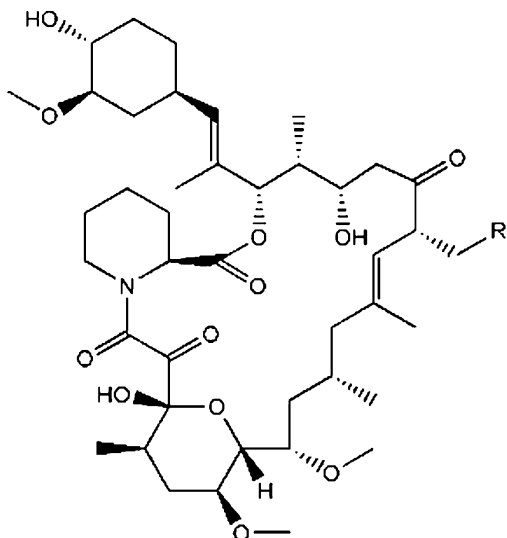
람직하다. 종균배양액을 상기 배양 배지를 포함한 발효조에 식균하여 배양하였다. 배양방법으로는 호기적 조건에서는 진탕배양 혹은 정치배양이 가능하다. 배양온도는 상기의 각 조건들에서 배양할 경우 조건에 따라 약간씩 상이하기는 하나, 보통 20-37℃에서 배양하는 것이 적당하며, 바람직하게는 26-30℃에서 배양할 수 있다. 또한, 배양기간 역시 당업계에서 사용되는 공지의 기간 동안 배양할 수 있으며, 필요에 따라 기간이 조정될 수 있다. 바람직하게 진탕배양, 정치배양의 경우 모두 4일 내지 7일간 배양할 수 있다. 이후, 상기 배양액을 여과 및 추출의 과정을 통해 오일상 잔류물을 수득한 후, 칼럼 크로마토그래피를 통해 목적 화합물을 포함하는 분획을 정제함으로써 정제된 신규 타크롤리무스 유도체를 생산하였다.

[0038] 본 발명의 신규 타크롤리무스 유도체를 생산하기 위하여, *tcsB* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 배양하는 단계; 및 상기 균주에 4-메틸펜타노익산 또는 4-플루오로크로토닉산을 공급하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 4-할로크로토닉산, 분지된/4-할로부타노익산, 분지된/불포화된/5-할로펜타노익산, 분지된/불포화된 헥사노익산 및 헵타노익산을 포함하는 카르복실산을 *tcsB* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주로 공급하는 단계를 포함할 수 있다.

[0039] 또 하나의 양태에서, 본 발명은 상기 *tcsB* 유전자가 결손되어 신규 타크롤리무스 유도체를 생산할 수 있는 균주를 제공한다. 상기 균주는 *tcsB* 유전자가 결손된 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 속 균주이다. 상기 유전자가 결손된 것은 해당 유전자의 전부 또는 일부가 결실되어 해당 유전자의 기능을 잃게 된 것을 의미한다. 상기 균주는 서열번호 1의 *tcsB* 유전자 중 175 내지 2,262 번째 염기가 결실될 수 있다. 상기 균주는 본 발명의 상세한 설명 및 실시예에 기재된 방법에 의하여 제조할 수 있다. 본 발명의 구체적 실시예에서 제조한 *tcsB* 유전자 결손 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2011년 2월 25일자로 기탁번호 KCTC11879BP로 기탁하였다.

[0040] 또 하나의 양태에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 신규 타크롤리무스 유도체 화합물을 제공한다.

[0041] [화학식 1]



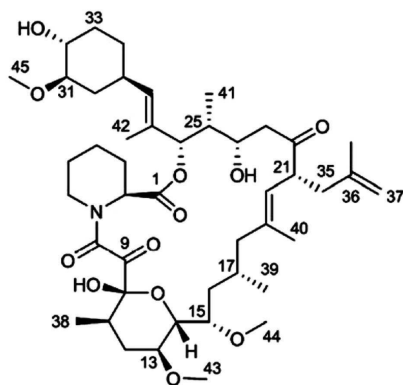
[0042]

[0043]

[0044] 상기 식에서 R은  또는  이다.

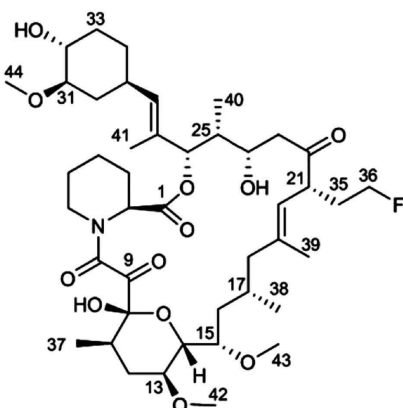
[0045] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 중 R이  (1-propen-2-yl)인 경우는 36-methyl-FK506이고, R이  (fluoromethyl)인 경우는 36-fluoro-FK520이다. 보다 구체적으로, 36-methyl-FK506 및 36-fluoro-FK520은 하기 화학구조를 갖는다.

[0046] [36-methyl-FK506]



[0047]

[0048] [36-fluoro-FK520]



[0049]

[0050] 핵자기공명 스펙트럼을 이용하여 동정한 결과, 상기 화학식 1의 36-methyl-FK506 및 36-fluoro-FK520는 신규 타 크롤리무스 유도체임을 확인하였다.

[0051] 바람직하게 본 발명의 화합물은 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 이성질체란 화학식은 같으나 동일하지는 않은 화합물의 관계를 의미하며, 이러한 이성질체의 종류에는 구조 이성질체, 기하 이성질체, 광학 이성질체 및 기하 이성질체가 있다. 입체이성질체란, 동일한 화학적 구성을 갖지만, 공간 중에서 원자 또는 기의 배열의 측면에서 상이한 화합물 의미하고, 광학 이성질체(거울상이성질체)는 서로 겹치지 않는 거울상을 갖는 한 화합물의 두 입체이성질체를 의미하며, 부분입체이성질체는 둘 이상의 비대칭 중심을 가지고 그것의 분자들이 서로 거울상이 아닌 입체이성질체를 의미한다. 또한 추가로, 본 발명의 화합물은 용매화물 또는 전구약물(pro-drug) 형태일 수 있는데, 이는 본 발명의 범위 내에 포함된다. 용매화물은 바람직하게는 수화물 및 에탄올화물을 포함한다.

[0052] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 화합물의 상대적으로 무독성인 무기 및 유기 산 부가염을 의미한다.

[0053] 상기 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 본 명세서에 사용된 바와 같이 "약학적으로 허용가능한 염"이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1의 화합물의 이로온 효능을 저하시키지 않는 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0054] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0055] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을

사용할 수 있고 유기산으로는 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 아세트산, 트라이플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 석신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0056] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0057] 화학식 1로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 염으로는 하이드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 하이드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 석시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0058] 본 발명의 화합물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 합성할 수 있으며, 바람직하게는 본 발명의 방법을 사용하여 변이주로부터 생산될 수 있다. 바람직하게는 스트랩토마이세스 속 균주 등에서 얻을 수 있으나, 상기 균주들에 의해 본 발명의 화합물을 수득할 수 있는 균주의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0059] 또 하나의 양태에서, 본 발명은 신경계 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서, 상기 화학식 1 화합물의 용도를 제공한다. 바람직하게, 상기 화학식 1의 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 화학식 1의 화합물에는 R이 1-propen-2-yl인 화합물, R이 플루오로메틸(fluoromethyl)인 화합물 또는 이들의 조합을 모두 포함한다.

[0060] 또 하나의 양태에서, 본 발명은 면역과민반응 관련 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서, 상기 화학식 1 화합물의 용도를 제공한다. 바람직하게, 상기 화학식 1의 화합물, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 면역과민반응 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 화학식 1의 화합물에는 R이 1-propen-2-yl인 화합물, R이 플루오로메틸(fluoromethyl)인 화합물 또는 이들의 조합을 모두 포함한다.

[0061] 상기 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 면역과민반응 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에는 화학식 1의 화합물, 그의 이성질체 또는 이들의 염에 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0062] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관, 또는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 화학식 1의 화합물 에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이

외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용 액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0064] 본 발명에서의 용어 "신경계 질환"이란, 신체적 손상(예: 척수 손상 및 외상, 좌골 또는 얼굴 신경 상해 또는 손상, 절단 후 사지 이식), 영양이상, 허혈, 퇴행성 질환, 악성 질환, 감염성 질환, 및 약물상호작용, 암 화학요법(예: 아크릴아미드, 탁솔, 빈카 알칼로이드 및 독소루비신), 독소 또는 독극물에 의해 유발된 말초 신경 및 중추 신경계 상해, 쇠약, 신경 세포 손상 또는 기능장애를 포함하며, 구체적으로는, 뇌수술, 말초신경 손상, 화상, 뇌척수염, HIV, 헤르페스, 암, 방사선 치료, 약물상호작용, 폴산 또는 비타민B-12 결핍, 및 신경독 또는 납과 같은 화학물질의 노출에 의해 유발되는 신경 손상 또는 기능장애를 포함하고, 더욱 구체적으로는, 대뇌 경색, 출혈성 경색 등과 관련되는 섬망착어(allophasia)(예: 발음장애), 의식 혼탁, 운동이상증, 삼차신경통, 허인두신경통, 얼굴마비, 중증근육무력증, 근육퇴행위축, 근위축성 측삭 경화증, 진행근육위축, 유전성 진행 연수근육위축, 추간판탈출증(herniated), 원반탈출증(ruptured), 또는 척추원반탈출 증후군, 경추증, 신경총질환, 흉곽출구과괴증후군, 말초 신경병증, 글루-스니퍼 신경병증(glue-sniffer's neuropathy), 길리안-바르(Guillan-Barre) 증후군, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤 무도병, 다발근육염, 메니에르 질환, 다발신경염, 고립 신경염, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 신경근병증, 당뇨병신경병증, 노인성치매, 혈관치매, 다발경화증을 포함하는 다양한 신경 병리학적 상태 및 신경계 질환을 의미한다.

[0065] 본 발명의 구체적 실시예에서, 상기 화합물은 신경돌기의 길이를 증가시키는 그의 능력을 측정한 결과, 신경돌기 생성을 자극하여 신경 세포 재생 및 기능 회복을 촉진시키는 효과가 타크롤리무스 및 타 유사체와 비교하여 우수함을 확인하였다.

[0066] 본 발명에서 용어 "면역억제"란 대상체 내에서 면역 반응이 감소되거나, 억제되는 경우를 의미한다. 본 발명에 따른 면역억제용 조성물은 면역과민반응 관련 질환의 예방 또는 치료에 사용됨을 특징으로 한다. 면역과민반응 관련 질환이란 면역기능이 비정상적으로 활성화되어 병적인 상태에 이른 것을 말하며, 예를 들면, 이에 한정되는 것은 아니지만, 장기이식시의 거부반응; 루푸스, 류마티스 관절염과 같은 자가면역질환; 비염, 천식, 아토피와 같은 알러지성 질환 등의 피부 과민반응이 포함된다. 이 외에도, 본 발명에 따른 면역 억제용 조성물은 개별적으로 또는 다른 종류의 면역억제제와 혼합하여 투여할 수 있다.

[0067] 본 발명의 구체적 실시예에서, 상기 화합물은 T 세포로부터 분비된 인터루킨-2(interleukin-2)의 수치를 측정한 결과, 대조군의 CD3/CD28에 의해 활성화된 T 세포로부터 얻어진 인터루킨-2 수치보다 유의적으로 낮았음을 확인함으로써 면역억제활성을 확인하였다.

[0068] 본 발명에서의 용어 "예방 또는 치료"란, 질환의 발병을 억제하거나 발병을 지연하는 모든 행위를 말하며, 특히 '치료'란 약리학적 활성 물질에 의해 야기되는 동물, 특히 포유류, 및 더욱 특별히 인간에서의 국소적 또는 전신적인 효과를 가리킨다. 따라서, 상기 용어는 질환의 진단, 치료, 완화, 처치 또는 예방 또는 동물 또는 인간의 원하는 육체적 또는 정신적 발달 및/또는 상태의 향상에 있어서 사용될 의도의 임의의 물질을 포함한다.

[0069] 또 하나의 양태에서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 또는 상기 화합물을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0070] 또 하나의 양태에서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 또는 상기 화합물을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 면역과민반응 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0071] 본 발명의 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 국부, 경구, 비경구, 비내, 정맥내, 근육내, 피하, 안내, 경피 등으로 투여될 수 있고, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다. 바람직한 제형은 주사제이다. 주사는 피하주사, 근육내 주사 및 정맥 주사 등이 가능하다.

[0072] 본 발명의 조성물은 치료학적 또는 예방학적 유효량으로 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 질병 종류 및 중증도, 연령, 성별, 투여방법, 표적 세포, 발현정도 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가

들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

발명의 효과

[0073]

본 발명을 통하여, 타크롤리무스의 생합성 경로를 이해하고, 본 발명의 생산 방법을 이용하여 타크롤리무스에 비하여 신경 보호 효과, 면역억제 효과가 우수한 신규 타크롤리무스 유도체를 효율적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0074]

도 1은 FK506 PKS의 모식도, FK506 및 그의 유도체의 생합성을 나타내는 그림이다. 각 모듈을 포함하는 도메인은 원으로 나타내었다. 검정과 흰 바탕의 원은 각각 최종 구조와 활성 부위 결실로 인해 비기능화된 도메인으로부터 활성화가 될 것임 가리킨다. CAS, CoA 합성효소; KS, 케토아실 합성효소; AT, 아실 전환효소; DH, 탈수소효소; ER, 에노일 환원효소, KR, 케토 환원효소; ACP, 아실 운반 단백질.

도 2는 FK506 및 FK520 생합성 유전자 클러스터의 조직도를 나타내는 그림이다. 각각(a) 스트렙토마이세스 속 KCTC11604BP로부터 FK506 생합성 유전자 클러스터, (b) 스트렙토마이세스 속 ATCC55098(MA6858)로부터 FK506 클러스터, (c) 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 KCTC9225로부터 FK506 클러스터, (d) 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 변종 아스코마이세티쿠스 ATCC 14891로부터 FK520 클러스터를 나타낸다. 연속된 유전자(*tcsA*, *tcsB*, *tcsC* and *tcsD*)의 ORF 배열의 비교는 전형적으로 FK520 클러스터가 아닌 모든 FK506 클러스터에서 나타났다.

도 3은 FK506 PKS에 대한 신규 5-탄소 연장 단위로서의 알릴말로닐-CoA의 생합성 경로를 나타낸다. *TcsA*, *TcsB*, *TcsC* 그리고 *TcsD* 단백질의 기능은 각각 아실 전환효소(AT)와 아실 운반 단백질(ACP) 복합체, β -케토 아실 합성효소(KS), 2-펜텐노일-ACP 카르복실화효소/환원효소, 그리고 아실-ACP 탈수소효소라고 여겨진다. 굵은 선은 인비트로(*in vitro*)에서의 생합성 단계를 나타낸다. 8, 프로필말로닐-CoA; 10, 알릴말로닐-CoA.

도 4는 4가지의 *tcs* 결실 돌연변이를 다양한 아실-SNAC 티오에스테르로 화학적 상보한 결과를 나타낸 것이다. (a) *tcsB* 결실 돌연변이($\Delta tcsB$ 균주), (b) *tcsA* 결실 돌연변이($\Delta tcsA$ 균주), (c) *tcsC* 결실 돌연변이($\Delta tcsC$ 균주), (d) *tcsD* 결실 돌연변이($\Delta tcsD$ 균주)의 배양으로부터 얻은 크로마토그램은 아실-SNAC 싸이오에스테르, 3-옥소펜타노일-SNAC(22), 트랜스-2-펜테닐-SNAC(23), 펜타노일-SNAC(24), 알릴말로닐-SNAC(25) 또는 프로필말로닐-SNAC(26) 중에 하나를 공급하였다. 각 수직 파란 점선은 FK506 유사물(FK523(21), FK520(2), FK506(1), 또는 36,37-디하이드로-FK506(27)) 중에 하나와 일치함을 나타낸다.

도 5는 알릴말로닐 ACP_{tcsA} 생합성 중 중간체의 ESI-MS 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다. 도면 상부에 관심 있는 아실-ACP_{tcsA} 중간물이 나타나 있다. 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 아포-ACP_{tcsA}, 트랜스-2-펜테닐-ACP_{tcsA}, (2E)-2,4-펜타디에닐-ACP_{tcsA}, 프로필말로닐-ACP_{tcsA}, 그리고 알릴말로닐-ACP_{tcsA}을 나타낸다. 각각의 질량 스펙트럼에서 수직 점선은 5 종류의 ACP-연결된 5-탄소 단위(도 3)를 가리킨다. 각각(a) 대조군인 아포-ACP_{tcsA}(계산된 질량: 15,615.85 Da, N-말단 메티오닌 잔기는 제거됐다고 가정함), (b) 트랜스-2-펜테닐-CoA와 아포-ACP_{tcsA}와 Sfp-카르복실화 반응. 트랜스-2-펜테닐-ACP_{tcsA}(계산된 질량: 16,037.95 Da), (c) 트랜스-2-펜테닐-ACP_{tcsA}와 TcsC-카르복실화 반응. 프로필말로닐-ACP_{tcsA}(계산된 질량: 16,083.98 Da), (d) 프로필말로닐-ACP_{tcsA}와 TcsD-카르복실화 반응. 알릴말로닐-ACP_{tcsA}(계산된 질량: 16,081.78 Da), (e) 트랜스-2-펜테닐-ACP_{tcsA}와 TcsD-카르복실화 반응. (2E)-2,4-펜타디에닐-ACP_{tcsA}(계산된 질량: 16,035.75 Da)을 나타낸다.

도 6은 돌연변이 합성을 통하여 신규 FK506 유도체를 합성하는 과정을 나타낸 것이다. 각각(a) FK506 유도체 36,37-디하이드로-37-메틸-FK606(32), 36-메틸-FK506(33) 그리고 36-플루오로-FK520(34)의 화학적 구조, (b) 각각 트랜스-2-헥세노익 산(29), 4-메틸펜타노익 산(30), 4-플루로로크로토닉 산(31)을 공급한 FK520-과 FK523-생산하는 KCTC 11604BP($\Delta tcsB$ 균주)의 *tcsB* 결실 돌연변이($\Delta tcsB$ 균주)의 배양으로부터 얻은 HPLC-ESI-MS/MS 크로마토그램을 나타낸다. 각 수직 파란 점선은 FK506 유사물(FK523(21), FK520(2), 또는 FK506(1)) 중에 하나와 일치함을 나타낸다.

도 7은 FK506 유도체의 면역억제 활성 및 신경돌기 증식 활성 분석 결과이다. 메틸-FK506(33)과 36-플루오로-FK520(34) 두 개의 FK506 유도체의 면역억제 특성은 CD3/CD28-자극된 인간 T 림프구로부터 분비된 인터루킨(IL)-2의 양으로 FK506(1)과 FK520(2)의 면역억제 특성과 비교하였다(왼쪽 수평의 막대 그래프). 각각 막대는 CD3/CD28 항체가 없거나(빨강) 또는 있을 때(주황) 또한 두 개의 다른 농도에서(0.1과 1 nM)에서 FK506(어두운

노랑), FK520(녹색), 메틸-FK506(어두운 청록색), 36-플루오로-FK520(파랑)를 처리해 배양된 세포의 결과를 나타낸다. 같은 농도에서 FK506-처리 샘플과 비교했을 때, $*P < 0.001$ 로 같은 농도에서 FK520-처리 샘플과 비교했을 때, $**P < 0.001$ 로 나타낸다. FK506 유도체 36-메틸-FK506(33)과 36-플루오로-FK520(34)의 신경재생 특징은 신경 성장 인자(NGF)-활성화 인간 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y의 신경돌기 길이 측정에 의해서 FK506(1)과 FK520(2)의 신경재생 특징과 비교하였다(오른쪽 수평의 막대 그래프). 각각 막대는 NGF가 없거나(빨강) 있을 때(주황) 또한 1 nM의 FK506(어두운 노랑), FK520(초록), 메틸-FK506(어두운 청록색), 36-플루오로-FK520(파랑)를 처리해 배양된 세포를 나타낸다. 같은 농도에서 NGF-처리 샘플과 비교했을 때, $*P < 0.001$ 로 같은 농도에서 FK506-처리 샘플과 비교했을 때, $**P < 0.001$ 로 나타낸다.

도 8는 SH-SY5Y 신경모세포종 세포에서 FK506 유도체의 신경돌기 증식 활성 결과를 나타낸 사진이다. 96시간 배양 후에 1 nM의 농도에서(a)미처리 세포, (b)NGF 단일 처리 세포, (c)FK506, (d)FK520, (e)36-메틸-FK506, 그리고(f)36-플루오로-FK520이 있을 때 NGF처리 세포. 신경돌기 성장은 FK520을 처리한 세포(d)만 제외하고, NGF 단일처리(b)와 비교해서 다른 것이 처리된 세포에서 길어진다.

도 9는 4-메틸펜타노익산을 공급해서 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP의 *tcsB* 결실 돌연변이로부터 얻은($\Delta tcsB$ 균주) 신규 FK506 유도체인 36-메틸-FK506의 ESI-MS/MS 분석결과를 나타낸다. 각각(a)36-메틸-FK506의 ESI-MS/MS 절편화 형태, (b)36-메틸-FK506의 MS/MS 스펙트럼을 나타낸다.

도 10은 36-메틸-FK506의 1H NMR(900 MHz, CDC13) 스펙트럼을 나타낸 그림이다. “*” 호변체의 공존을 나타낸다. 1, FK506; 33, 36-메틸-FK506.

도 11은 36-메틸-FK506의 ^{13}C NMR(225 MHz, CDC13) 스펙트럼을 나타낸 그림이다. “*” 호변체의 공존을 나타낸다. 1, FK506; 33, 36-메틸-FK506.

도 12는 36-메틸-FK506의 2D 1H - 1H COSY NMR 스펙트럼을 나타낸 그림이다.

도 13은 36-메틸-FK506의 2D HMQC NMR 스펙트럼을 나타낸 그림이다.

도 14는 36-메틸-FK506의 2D HMBC NMR 스펙트럼을 나타낸 그림이다.

도 15는 신규 FK506 유도체인 36-메틸-FK506의 NMR 자료를 나타낸 것이다.

도 16은 4-플루오로크로토익 산을 공급해서 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP의 *tcsB* 결실 돌연변이로부터 얻은($\Delta tcsB$ 균주) 신규 FK506 유도체인 36-플루오로-FK520의 ESI-MS/MS 분석결과를 나타낸다. (a)36-플루오로-FK520의 ESI-MS/MS 절편화 형태. (b)36-플루오로-FK520의 MS/MS 스펙트럼.

도 17은 36-플루오로-FK520의 1H NMR(900 MHz, CDC13) 스펙트럼을 나타낸 그림이다. “*” 호변체의 공존을 나타낸다

도 18은 36-플루오로-FK520의 ^{13}C NMR(225 MHz, CDC13) 스펙트럼을 나타낸 그림이다. “*” 호변체의 공존을 나타낸다

도 19는 36-플루오로-FK520의 2D 1H - 1H COSY NMR 스펙트럼을 나타낸 그림이다.

도 20은 36-플루오로-FK520의 2D HMQC NMR 스펙트럼을 나타낸 그림이다.

도 21는 36-플루오로-FK520의 2D HMBC NMR 스펙트럼을 나타낸 그림이다.

도 22는 36-플루오로-FK520의 ^{19}F NMR 스펙트럼 나타낸 그림이다.

도 23는 신규 FK506 유도체인 36-플루오로-FK520의 NMR 자료를 나타낸 것이다.

도 24는 FK506 유도체의 칼시뉴린-FKBP12 복합체의 결합 자유 에너지를 나타낸다. 결합 자유 에너지는 분자 역학 시뮬레이션을 기초로 하고 있다. 모든 에너지는 kcal/mol의 단위로 주어진다. $\Delta Gelec$, $\Delta Gvdw$, $\Delta G_{nonp}/sol$, $\Delta Gelec/sol$, ΔG_{bind} 는 각각 정전기학(electrostatic), 반 데르 발스(van der Waals), 비극성 용매화(nonpolar solvation), 정전기학 용매화(electrostatic solvation), 그리고 결합 자유 에너지를 나타낸다. 1, FK506; 2, FK520; 33, 36-메틸-FK506; 34, 36-플루오로-FK520.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하

기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

실시예 1: 재료 준비

균주 및 발효

본 발명에서는 FK506과 FK520를 생산하는 균주들로부터 생합성 유전자를 확보하였다. 본 발명에 사용된 박테리아 균주는 FK506의 생산이 보고된 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP, 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamyceticus*) KCTC 9225, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 55098과 FK520의 생산이 보고된 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 변종 아스코마이세티쿠스(*Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus*) ATCC14891이다.

상기 기록한 균주 및 본 발명에 기재된 상기 균주의 돌연변이체 및 형질전환체를 이용한 타크롤리무스 또는 그 유사체의 발효 배양은 아래 조건으로 수행하였다.

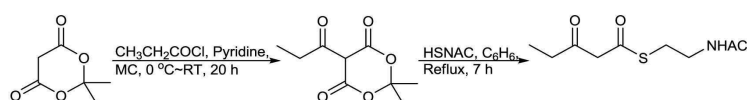
스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP의 포자, 유전자 결실 돌연변이와 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 KCTC 9225는 ISP4 아가 플레이트에서 계대배양하였고 씨드(seed) 배양은 R2YE 배양액에서 준비하였다. 씨드(seed) 배양에서 성장한 50 밀리그램의 성장하는 세포는 250-ml 바플드 플라스크(baffled flask)에 들어있는 50 ml R2YE 배지에 접종하고 오르비탈 셰이커(orbital shaker, 180 rpm 고정)에서 28℃에서 6일 동안 배양하였다. 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 변종 아스코마이세티쿠스 ATCC 14891는 50-ml 바플드 플라스크(baffled flask)에 들어있는 50 ml의 SY 배지에서 배양하였고 오르비탈 셰이커에서 30℃에서 6일 동안 성장하였다.

재조합 TcsD를 제조하기 위해 이중 숙주로 사용된 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*) TK24는 YEME 액체 배지에서 성장했다. 에서리치아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5α는 상용 서브클로닝으로 사용된 반면, 이. 콜라이(*E. coli*) BL21(DE3)과 이. 콜라이 BL21(DE3)pLysS(Novagen) 재조합 TcsC와 ACP_{TCSA}의 발현을 위한 이중 숙주로 사용하였다. 이. 콜라이 ET12567/pUZ8002는 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP 간의 접합(conjugation)을 위한 비메틸화 플라스미드 공여(nonmethylating plasmid donor) 균주였다. 이. 콜라이 균주는 LB, SOB 또는 SOC 액체 배지에서 성장하였다. 엠피실린(Ampicillin, 100 μg/ml), 아프라마이신(apramycin, 50 μg/ml), 클로람페니콜(chloramphenicol, 25 μg/ml), 카나마이신(kanamycin, 50 μg/ml), 싸이오스트렙톤(thiostrepton, 25 μg/ml), 및 날리딕식산(nalidixic acid, 25 μg/ml)은 선택적으로 필요에 의해 성장 배지에 첨가하였다.

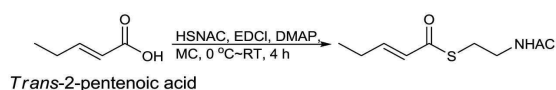
화학 약품

알릴말로닐-CoA(allylmalonyl-CoA), 2-펜테닐-CoA(2-pentenlyl-CoA), 3-옥소펜타노일-SNAC(3-oxopentanoyl-SNAC), 트랜스-2-펜테닐-SNAC(trans-2-pentenyl-SNAC), 펜타노일-SNAC(pentanoyl-SNAC), 알릴말로닐-SNAC(allylmalonyl-SNAC), 프로필말로닐-SNAC(propylmalonyl-SNAC), 및 4-플루오로크로토닉 산(4-fluorocrotonic acid)의 구조 및 화학적 합성은 하기에 기술되었다.

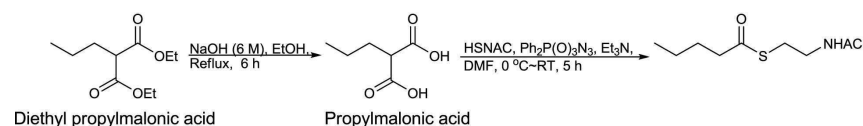
[3-옥소펜타노일-SNAC티오에스테르]



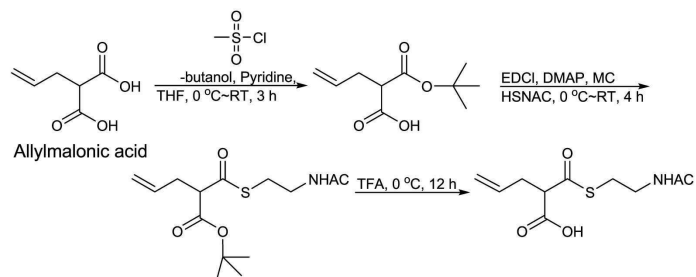
[트랜스-2-펜테닐-SNAC 티오에스테르]



[펜타노일-SNAC 티오에스테르]

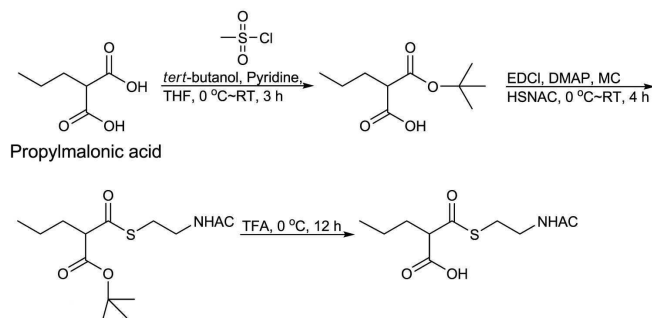


[0090] [알릴말로닐- SNAC 티오에스테르]



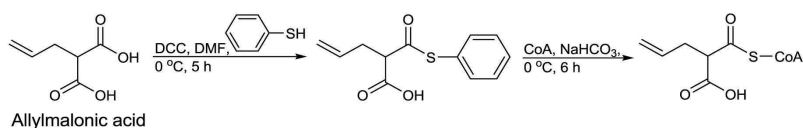
[0091]

[0092] [프로필말로닐- SNAC 티오에스테르]



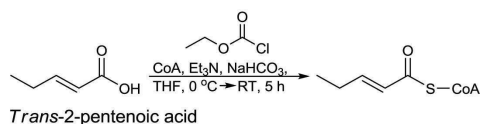
[0093]

[0094] [알릴말로닐-CoA]



[0095]

[0096] [2-펜테닐-CoA]



[0097]

[0098] 실시예 2: FK506 생합성 유전자 클러스터(cluster)의 분석 및 알릴말로닐-CoA(allylmalonyl-CoA) 생합성 경로 분석

[0099] FK506 생합성 유전자 클러스터(cluster)의 분석

[0100] 세 개의 FK506-생산 균주 즉, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) ATCC 55098, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 9225, 및 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP로부터 FK506의 생합성 유전자 클러스터의 대략 100kb와 그들의 인접 부위(flanking region)를 서열분석하였다. 이러한 서열의 분석으로 15개의 유전자는 FK520과 FK506 유전자 클러스터에서 일치되게 조직화되고 잘 유지되는 것을 알 수 있었다(도 2). PKS와 NRPS 유전자(*fkbc*, *B*, *P* and *A*), 메틸톡시말로닐-APC(methoxymalonyl-ACP) 유전자, 31-O-메틸변환효소(31-O-methyltransferase)유전자(*fkbm*), C9 수산화효소(hydroxylase) 유전자(*fkbd*), 조절 유전자(*fkbn*), 및 유형 II 티오에스테라제(thioesterase) 유전자(*fkq*)는 클러스터에 유지되었다. FK520 클러스터(*fkbe*, *S*, 및 *U*)에서 에틸말로닐-CoA(ethylmalonyl-CoA) 생합성 유전자는 FK506 클러스터 전체에서 발견되지 않았다. LysR-군에 속하는 전사 조절자 Tcs7은 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP 균주에서만 *fkq*의 하류에 존재하였다.

[0101] 상기 FK506과 FK520의 클러스터의 비교는 *tcsA*, *tcsB*, *tcsC*, 및 *tcsD*인 4 개의 연속된 유전자가 주로 전체 FK506 클러스터에서 발견되는 것으로 나타났다. 오직 이들 유전자만 FK506의 특이한 알릴 결사슬의 생합성과 관련이 있다는 것을 암시한다. 5개의 다른 유전자(*tcs1*, *tcs2*, *tcs3*, *tcs4*, 및 *tcs5*)는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP에서만 발견되었고, 상기 유전자의 인프레임(in-frame) 유전자 결실 실험은

FK506의 생합성과 관련이 없었다. KCTC 11604BP 균주에서 *tcsA*의 상류와 *tcs7*의 하류 유전자는 FK506 생합성에 서 어떠한 분명한 역할은 없고 전체 서열분석 FK506 클러스터에서 보존되지 않았다.

[0102] *tcsA*와 *tcsB* 유전자의 생성물은 특징적인 비정준(noncanonical) 도메인 구성을 가지는 PKS 시스템을 구성한다. *tcsA* 유전자는 아실트랜스퍼라제(acyltransferase, AT)와 ACP 도메인, 및 *tcsB*는 버콜더리아(*Burkholderia*) 종의 PKS 시스템과 유사한 두 개의 특이한 베타-케토아실 신타제(β -ketoacyl synthase, KS) 도메인을 코딩한다. 특이한 도메인 조직화는 독소루비신(doxorubicin), 프레놀리신(frenolicin), 및 R1128의 생합성 유전자 클러스터에서 보고된 개시 KS(initiating KS, KSIII), AT, 및 ACP를 포함하는 유형 II PKS 프라이밍 시스템과 유사하지만, AT와 ACP 도메인 모두 단일 *tcsA* 유전자에 의해서 코딩되었다는 점에서 특이하다. TcsC는 에틸말로닐-CoA 경로에서 에노일-CoA(enoyl-CoA) 에스테르의 환원적 카르복실화를 촉진하는 것으로 알려진 크로토닐-CoA(crotonyl-CoA) 탈탄산 효소/환원효소와 >60% 동질성을 공유하고 있다. 즉, TcsC는 특이한 기질 특이성을 가진다고 암시된다. TcsD는 계통분류학적으로 FK520 유전자 클러스터의 메틸말로닐-CoA(methylmalonyl-CoA)의 생합성과 관련된 아실-ACP 탈수소 효소인 FkbI와 관련이 있다.

[0103] **알릴말로닐-CoA(allylmalonyl-CoA) 생합성 경로**

[0104] 5-탄소 PKS 연장 단위(extender unit) 프로필말로닐-CoA(propylmalonyl-CoA)는 트랜스-2-펜테닐-CoA(trans-2-pentenyl-CoA)의 환원 카르복실화에 의해서 합성될 수 있고 홀수-사슬 지방산의 베타-산화로부터 유도될 것이라고 제안되었다. 그러나, FK506 클러스터에서 독특한 PKS의 발견은 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)에서 5-탄소 연장 단위(extender unit)는 PKS에 의해 유도된 것이라는 것을 의미하고, 이는 FK506의 5개의 탄소(C20, C21, C35, C36, 및 C37)는 아세테이트와 프로피오네이트(propionate)로부터 유도된다고 알려진 것(Byrne, K.M. et al. Dev. Ind. Microbiol. 32, (1993))과 일치한다. 이들 4개의 특이한 *tcs* 유전자의 서열 분석, 유전자 결실, 화학적 상보, 및 하기에 설명될 생화학적 실험의 상세한 서열 분석을 기본으로, 도 3에 나타난 것처럼 알릴말로닐-CoA(allylmalonyl-CoA)에 대한 생합성 경로를 제안하였다.

[0105] TcsB는 프로피오닐-CoA(propionyl-CoA)에 의해 아실화된 개시(priming) KS로서 기능하고 TcsA 위에 로딩된 말로네이트와의 축합을 촉매하였다. 생성된 ACP-묶인(tethered) 베타-케토 펜타노에이트는 사슬이 더 가공되기 전에 트랜스-2-펜테닐-ACP로 변환되었다. 이러한 환원 과정의 원인인 베타-케토 가공 효소 즉 케토 리덕타제와 디하이드라타제를 암호화하는 유전자는 서열분석된 FK506 클러스터의 어디에서도 발견되지 않기 때문에, 이들의 활성은, 유형 II PKS 개시 모듈의 경우처럼, 숙주의 FAS-유사 효소와 공유한다고 가정하였다. 실제로, 스트렙토마이세스 코엘리콜라(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)의 계놈으로부터의 FabG(지방산 생합성의 베타-케토아실-APC 환원효소) 상동인 SCO1815은 R1128 개시 모듈의 베타-케토아실-ACP 환원효소 성분으로서 기능하는 것으로 나타났다. TcsC는 SalG에 유사한 방법으로, 프로필말로닐-ACP(propylmalonyl-ACP)를 넘겨주는 환원 카르복실화 반응을 촉매하였다. TcsD는 알릴말로닐-CoA를 통해 FK506 PKS의 모듈 4에 로딩되는 알릴말로닐-ACP(allylmalonyl-ACP)로의 반응을 촉매하였다. 대안적으로, TcsD는 트랜스-2-펜테닐-ACP를(2E)-2,4-펜타디에닐-ACP로 변환시킬 수 있고, 이는 TscC에 의해서 알릴말로닐-ACP(allylmalonyl-ACP)로 환원 카르복실화를 차례로 겪는다. TcsD-촉매하는 탈수소화 반응을 생략하는 것은 프로필말로닐-CoA를 생산할 수도 있다. 각각 프로필말로닐- 및 알릴말로닐-ACP의 프로필말로닐-CoA과 알릴말로닐-CoA로의 변환에 필요할 수 있는 ACP:CoA 트랜스아실라제(transacylase)-유사 효소를 암호화하는 유전자는 FK506 유전자 클러스터에 위치하지 않았다.

[0106] TcsC와 TcsD의 정확한 역할을 결정하기 위해서, 생화학적 및 질량 분광 연구가 *in vitro* 알릴말로닐-APC 형성을 재구성하고 측정하는데 이용되었다. 재조합 TcsC와 TcsA의 APC 도메인(APC_{tcsA})은 히스티딘-표지 단백질로서 *E. coli*에서 발현되었고 니켈-친화성 크로마토그래피에 의해서 정제되었다. APC_{tcsA}의 도메인 경계는 선행 문헌에 따라 선택되었다. 가용성 재조합 히스티딘-표지 TcsD가 *Streptomyces lividans* TK24에서 발현에 의해서 얻어졌다. *in vivo* 돌연변이합성 결과에 의하면, TcsC 또는 TcsD의 가장 알맞은 기질은 트랜스-2-펜테닐-APC_{tcsA}이다. *Bacillus subtilis*로부터의 광범위한 특이성을 가진 포스포판테테이닐 트랜스퍼라제(phosphopantetheinyl transferase) Sfp27, 화학적으로 합성된 트랜스-2-펜테닐-CoA를 이용해서, 생화학적으로 apo-APC_{tcsA}을 트랜스-2-펜테닐-APC_{tcsA}로 변환시켰다(도 5a, b). TcsC와 함께 배양으로, 그것의 프로필말로닐-APC_{tcsA}로의 NADPH-의존적 환원성 탈 카르복실화를 ESI-MS로 측정하였다. TcsD에 의해서 촉매 되는 FAD-의존적 탈수소화는 알릴말로닐-APC_{tcsA}의 형성과 일치하는 질량에서의 미세한 변화를 야기했고(도 5d), 이는 HPLC 용출 시간에서 관찰된 변위에 의해서 지지되었다. 대안적으로, TcsD와 함께 트랜스-2-펜테닐-APC_{tcsA}의 배양은 낮은 변환 속도로(2E)-2,4-펜타디에닐-ACP_{tcsA}의 형성과 일치하는 질량을 발생하고(도 5e), 그것의 낮은 수득을 때문에 TcsC와 반응하

지 못하게 한다. 이 결과는 알릴말로닐-APC 및 그에 따른 알릴말로닐-CoA를 생산하는 주요 생합성 경로는 프로필말로닐-APC를 통한다는 것을 암시한다(도 3). 비록 TcsC에 의해 CoA 티오에스테르인 크로토닐-CoA와 트랜스-2-펜테닐-CoA도 에틸말로닐-CoA와 프로필말로닐-CoA로 각각 변환되었지만, 트랜스-2-펜테닐-APC_{tcsA} 과 비교해서 크로토닐-CoA와 트랜스-2-펜테닐-CoA를 향한 상대적으로 낮은 TcsC 활성은, 크로토닐-CoA, 트랜스-2-펜테닐-CoA, 및 트랜스-2-펜테닐-APC_{tcsA} 를 향한 TcsC의 절대 속도 파라미터(kinetic parameters)는 측정되지 않았음에도 불구하고, ACP-연결 기질에 대한 TcsC의 선호를 지지한다. TcsC의 행동은 ACP 대 CoA-결합 기질에 대한 CCR-유사 카르복실라제/리덕타제의 새로운 예를 보여준다. ACP- 기질에 대한 선호는 TcsD에서도 관찰되었다(대안 기질로서 트랜스-2-펜테닐-CoA를 받아들이지 않았다).

[0107] 실시예 3: 플라스미드와 돌연변이체 제작

[0108] *tsc* 유전자는 이중 교차 상동 재조합(double cross-over homologous recombination)에 의한 인프레임(in-frame) 결실에 의해서 FK506-생산 균주 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP에서 비활성화되었다. DNA 분리와 조작, 유전자 결실과 이중 발현에 대한 플라스미드 구조뿐만 아니라 돌연변이 균주 생성에 관한 상세한 기술은 하기에 기술되었다.

[0109] 인프레임(in-frame) 유전자 결실 플라스미드(plasmids)의 제작

[0110] pGEM-T Easy Vector(Promega) 와 Litmus28(New England Biolabs)는 상용 서브클로닝(routine subcloning)을 위해 사용하였다. 이. 콜라이(*E. coli*)-스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 셔틀(shuttle) 벡터 pKC11396는 인프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였다. 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP에서 9개의 *tcs* 유전자(*tcsA*, *tcsB*, *tcsC*, *tcsD*, *tcs1*, *tcs2*, *tcs3*, *tcs4*, and *tcs5*)와 *fkfA*를 결실시키기 위해서, 재조합 플라스미드의 제작은 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP로부터 유래된 포스미드(fosmid, fos1004F01) DNA로부터 왼쪽- 과 오른쪽- 인접 절편(left- and right-flanking fragments)의 PCR 증폭에 의해 실시하였다. 하나의 유전자는 각 반응에서 표적이었다. 프라이머 쌍 TcsALF/TcsALR, TcsBLF/TcsBLR, TcsCLF/TcsCLR, TcsDLF/TcsDLR, Tcs1LF/Tcs1LR, Tcs2LF/Tcs2LR, Tcs3LF/Tcs3LR, Tcs4LF/Tcs4LR, Tcs5LR/Tcs5LF, 및 FkbALF/FkbALR 은 표적 유전자의 왼쪽-인접 절편(left-flanking fragments)의 증폭을 위해서 설계하였고, 반면에 TcsARF/TcsARR, TcsBRF/TcsBRR, TcsCRF/TcsCRR, TcsDRF/TcsDRR, Tcs1RF/Tcs1RR, Tcs2RF/Tcs2RR, Tcs3RF/Tcs3RR, Tcs4RF/Tcs4RR, Tcs5RR/Tcs5RF, and FkbARF/FkbARR 는 오른쪽-인접 절편(right-flanking fragments)을 위한 것이었다. 20 PCR 절편 모두는 분리되어 pGEM-T Easy 벡터에서 클론되었고 서열분석하였다. 적당한 제한효소 반응 후, 절편은 10개의 다른 인프레임 결실 플라스미드를 제작하기 위해서 HindIII-EcoRI 또는 HindIII-XbaI로 절단되어 pKC1139에 클론을 만들었다: pΔTCSA, pΔTCSB, pΔTCSC, pΔTCSD, pΔTCS1, pΔTCS2, pΔTCS3, pΔTCS4, pΔTCS5 and pΔFKBA. 본 실시예에서 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머에 대한 정보는 하기 표에 기재되어 있다. *tscB* 유전자 결손 돌연변이를 제작하기 위해서, *tcsB* 유전자를 사용하고, TcsBLF/TcsBLR, TcsBRF/TcsBRR 프라이머를 사용하였다.

[0111] TcsBLF : GACAAGCTTATGCTGGCGGTGAAGGCG(*HindIII*)(서열번호 2)

[0112] TcsBLR : CCGTCTAGACCAGAAGGAATCGAGCCGGAA(*XbaI*)(서열번호 3)

[0113] TcsBRF : CAGTCTAGAGTGATCCGTGCCCTGCACTCC(*XbaI*)(서열번호 4)

[0114] TcsBRR : GCCGAATTCGATGACGATGTCCGGGTCG(*EcoRI*)(서열번호 5)

[0115] TcsALF : TTTAAGCTTCCGTCGGATCGGGCGGCAG(*HindIII*)(서열번호 6)

[0116] TcsALR : AAAGGATCCGAAGAGGAACGCCACCCAC(*BamHI*)(서열번호 7)

[0117] TcsARF : TTTAGATCTTGATCCGGTCGTGATCTCCC(*BglII*)(서열번호 8)

[0118] TcsARR : AAAGAATTCGTCGCCGGGCAGGTGCGC(*EcoRI*)(서열번호 9)

[0119] TcsCLF : TTTAAGCTTAACAAGTCCCTGCTCGGTCA(*HindIII*)(서열번호 10)

[0120] TcsCLR : AACGGATCCGTCTTCGACGGGGCTCCCGG(*BamHI*)(서열번호 11)

[0121] TcsCRF : AAAAGATCTTCCCGGTCTACCCCTCGA(*BglII*)(서열번호 12)

[0122] TcsCRR : TTTGAATTCCTCACCCAGGCCCTGACGC(*EcoRI*)(서열번호 13)

- [0123] TcsDLF : *GCTAAGCTTCTCAGGCGTCTGCGGATGC(HindIII)*(서열번호 14)
- [0124] TcsDLR : *ATCGGATCCCTCGCTCACCGGGGCTGCC(BamHI)*(서열번호 15)
- [0125] TcsDRF : *AGCAGATCTGGCATGTTCTGGTCAGTCC(BglII)*(서열번호 16)
- [0126] TcsDRR : *GTCGAATTCATGCCACGAACGGGTCGA(EcoRI)*(서열번호 17)
- [0127] Tcs1LF : *TATAAGCTTACTCGTCGCACGCGGCAGC(HindIII)*(서열번호 18)
- [0128] Tcs1LR : *ATATCTAGACTCACCCAGGCCCTGACGC(XbaI)*(서열번호 19)
- [0129] Tcs1RF : *ATATCTAGACCAGTGATGCGAAGGCATG(XbaI)*(서열번호 20)
- [0130] Tcs1RR : *GACGAATTCAGGAGGTTGACGGTGGTT(EcoRI)*(서열번호 21)
- [0131] Tcs2LF : *ATTAAGCTTGGCGAACTCCTCGTTCG(HindIII)*(서열번호 22)
- [0132] Tcs2LR : *ATTTTGGATCCCGCACGAGTCTCGGG(BamHI)*(서열번호 23)
- [0133] Tcs2RF : *GACGGATCCCTCTGAATCGGAGATTCGT(BamHI)*(서열번호 24)
- [0134] Tcs2RR : *TTAGAATTCGTGGCCGTTGGAGATGAA(EcoRI)*(서열번호 25)
- [0135] Tcs3LF : *AGCAAGCTTAGTCCTCTGAGGAGCTGGTAG(HindIII)*(서열번호 26)
- [0136] Tcs3LR : *TCGAGATCTCACGAGGTCTCCTTGAGACA(BglII)*(서열번호 27)
- [0137] Tcs3RF : *AAAGGATCCGTCATCATCGACCCGTAG(BamHI)*(서열번호 28)
- [0138] Tcs3RR : *TTTGAATTCCTTGTCTGGTCTGGACG(EcoRI)*(서열번호 29)
- [0139] Tcs4LF : *TTTAAGCTTCGGCGTGGAGCGTGGTCG(HindIII)*(서열번호 30)
- [0140] Tcs4LR : *AAAGGATCCCGTGAGGCCCTCGGCGACA(BamHI)*(서열번호 31)
- [0141] Tcs4RF : *AAAGGATCCGACGAGGTGGACTCCACG(BamHI)*(서열번호 32)
- [0142] Tcs4RR : *TTTGAATTCACAGACCCTGTCGTCCCG(EcoRI)*(서열번호 33)
- [0143] Tcs5LF : *CCGAAGCTTACAGCACGGGATACTCTG(HindIII)*(서열번호 34)
- [0144] Tcs5LR : *GGATCTAGACAGCCGTTTCGGGATCGCG(XbaI)*(서열번호 35)
- [0145] Tcs5RF : *AAATCTAGAATGCGCTGACGCGGCCCG(XbaI)*(서열번호 36)
- [0146] Tcs5RR : *TTTGGATCCACGGTCGACTCACGCCGCC(BamHI)*(서열번호 37)
- [0147] FkbALF : *GTTACCAAGCTTGTACCGAGGACCAGTAC(HindIII)*(서열번호 38)
- [0148] FkbALR : *GAATCCGGATCCGACCGT TTTGTCCTGTTC(BamHI)*(서열번호 39)
- [0149] FkbARF : *TTTACCGGATTCTTCACCGGCTCCACCGAT(BamHI)*(서열번호 40)
- [0150] FkbARR : *GGGTCCTCTAGAAGAGAGTGTGAGGAGATCG(XbaI)*(서열번호 41)

표 1

Strain/vector	Relevant characteristics	Reference
Bacterial strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Host for general cloning	New England Biolabs
BL21(DE3)	Host for protein expression	Novagen
BL21(DE3)pLysS	Host for protein expression	Novagen
EPI300TM	Host for gene library construction	Epicentre Biotechnol.
ET12567/pUZ8002	Donor strain for intergeneric conjugation between <i>E. coli</i> and <i>Streptomyces</i>	MacNeil, D.J. et al. ¹
BL21 (DE3)pLysS/pTCSA-ACP	Strain for ACP _{TCSA} protein expression	This study
BL21(DE3)pTCSA	Strain for TcsC protein expression	This study
BL21(DE3)pLysS/pSFP	Strain for Sfp (PPTase) protein expression	This study
<i>Streptomyces</i>		
ATCC 55098 (MA6858)	Wild-type FK506 (1)-producing strain	Motamedi, H. et al. ²
KCTC 11604BP	Wild-type 1-producing strain	This study
KCTC 9225	Wild-type 1-producing strain	Muramatsu, H. et al. ³
ATCC 14891	Wild-type FK520 (2)-producing strain	Wu, K. et al. ⁴
ΔtcsA	Mutant of KCTC 11604BP with an in-frame deletion of <i>tcsA</i> , produces 2 & FK523 (21)	This study
ΔtcsB	Mutant of KCTC 11604BP with an in-frame deletion of <i>tcsB</i> , produces 2 & 21	This study
ΔtcsC	Mutant of KCTC 11604BP with an in-frame deletion of <i>tcsC</i> , produces 2 & 21	This study
ΔtcsD	Mutant of KCTC 11604BP with an in-frame deletion of <i>tcsD</i> , produces 2 & dihydro-FK506 (27)	This study
Δtcs1	Mutant of KCTC 11604BP with an in-frame deletion of <i>tcs1</i> , produces 1 & 2	This study
Δtcs2	Mutant of KCTC 11604BP with an in-frame deletion of <i>tcs2</i> , produces 1 & 2	This study
Δtcs3	Mutant of KCTC 11604BP with an in-frame deletion of <i>tcs3</i> , produces 1 & 2	This study
Δtcs4	Mutant of KCTC 11604BP with an in-frame deletion of <i>tcs4</i> , produces 1 & 2	This study
Δtcs5	Mutant of KCTC 11604BP with an in-frame deletion of <i>tcs5</i> , produces 1 & 2	This study
ΔfkbA	Mutant of KCTC 11604BP with an in-frame deletion of <i>fkbA</i> , does not produce 1 or 2	This study
<i>S. lividans</i> TK24	Host for protein expression	Walczak, R.J. et al. ⁵
<i>S. lividans</i> TK24/pTCSA	TK24 mutant, expresses heterologous <i>tcsD</i> using pTCSA	This study
Plasmids		
pCCFOS1 (fosmid)	Vector for genomic library construction	Epicentre Biotechnol.
Litmus 28	Multi-purpose <i>E. coli</i> cloning vector	New England Biolabs
pGEM-Teasy	PCR fragment cloning vector	Promega
pKC1139	High-copy-number temperature-sensitive <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> shuttle vector	Bierman, M. et al. ⁶
pET15b, pET28a	<i>E. coli</i> protein expression vector	Novagen
pGF101	Sfp expression plasmid based on pET30a(+)	Zhou, P. et al. ⁷
pSE34	pWHM3 with P _{trmE} promoter	Yoon, Y.J. et al. ⁸
pATCSA	Deletion plasmid with in-frame deletion of 1,287-bp internal <i>tcsA</i> fragment	This study
pATCSB	Deletion plasmid with in-frame deletion of 2,088-bp internal <i>tcsB</i> fragment	This study
pATCSC	Deletion plasmid with in-frame deletion of 1,041-bp internal <i>tcsC</i> fragment	This study
pATCSD	Deletion plasmid with in-frame deletion of 1,152-bp internal <i>tcsD</i> fragment	This study
pATCS1	Deletion plasmid with in-frame deletion of 1,110-bp internal <i>tcs1</i> fragment	This study
pATCS2	Deletion plasmid with in-frame deletion of 171-bp internal <i>tcs2</i> fragment	This study
pATCS3	Deletion plasmid with in-frame deletion of 1,209-bp internal <i>tcs3</i> fragment	This study
pATCS4	Deletion plasmid with in-frame deletion of 864-bp internal <i>tcs4</i> fragment	This study
pATCS5	Deletion plasmid with in-frame deletion of 666-bp internal <i>tcs5</i> fragment	This study
pAFKBA	Deletion plasmid with in-frame deletion of 18,171-bp internal <i>fkbA</i> fragment	This study
pTCSA	N, C-terminal His ₆ -tagged TcsC expression plasmid based on pET28a(+)	This study
pTCSA-ACP	N-terminal His ₆ -tagged ACP _{TCSA} expression plasmid based on pET15b(+)	This study
pSFP	N-terminal His ₆ -tagged Sfp expression plasmid based on pET15b(+)	This study
pTCSA1	N-terminal His ₆ -tagged plasmid based on pET15b(+), contains <i>tcsD</i> ORF	This study
pTCSA	N-terminal His ₆ -tagged TcsD expression plasmid based on pSE34	This study
Fosmid clones		
<i>From KCTC 11604BP</i>		
fos1004F01	Fosmid clone, contains bases 1-40,366 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study
fos1005D02	Fosmid clone, contains bases 39,116-80,661 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study
fos1006D05	Fosmid clone, contains bases 58,172-97,743 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study
<i>From KCTC 9225</i>		
fos1006G02	Fosmid clone, contains bases 1-35,521 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study
fos1012A09	Fosmid clone, contains bases 31,026-67,758 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study
fos1004E04	Fosmid clone, contains bases 41,430-85,253 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study
fos1010E10	Fosmid clone, contains bases 76,978-111,990 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study
<i>From ATCC 55098</i>		
fos1011B11	Fosmid clone, contains bases 1-41,779 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study
fos1010H09	Fosmid clone, contains bases 9,843-44,811 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study
fos1012B03	Fosmid clone, contains bases 27,398-72,806 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study
fos1001F05	Fosmid clone, contains bases 59,900-95,979 of FK506 biosynthetic gene cluster	This study

[0151]

표 2

Primer	Sequence 5' to 3' (restriction site underlined)	Restriction enzyme
TcsALF	TTTAAGCTTCCGTCGGATCGGGCGGCAG	HindIII
TcsALR	AAAGGATCCGAAGAGAACGCCACCCAC	BamHI
TcsARF	TTTAGATCTTGATCCGGTCGTGATCTCCC	BglII
TcsARR	AAAGAATTCTGTCGCCGGCAGGTGCGC	EcoRI
TcsBLF	GACAAGCTTATGCTGGCGGTGAAGGCG	HindIII
TcsBLR	CCGTCTAGACCAAGGAATCGAGCCGGAA	XbaI
TcsBRF	CAGTCTAGAGTGATCCGTGCCCTGCACTCC	XbaI
TcsBRR	GCCGAATTCTGATGACGATGTCGGGTCG	EcoRI
TcsCLF	TTTAAGCTTAACAAGTCCCTGCTCGGTCA	HindIII
TcsCLR	AACGGATCCGTCTTCGACGGGGCTCCCGG	BamHI
TcsCRF	AAAAGATCTTCCGGGTCTACCCCTCGA	BglII
TcsCRR	TTTGAATTCTCACCAGGCCCTGACGC	EcoRI
TcsDLF	GCTAAGCTTCTCAGGCGTCTGCGGATGC	HindIII
TcsDLR	ATCGGATCCCTTCGCTCACC GGCGTCC	BamHI
TcsDRF	AGCAGATCTGGCATGTTCTGGTCAGTCC	BglII
TcsDRR	GTCGAATTCCATGCCACGAACGGGTCGA	EcoRI
Tcs1LF	TATAAGCTTACTCGTCGCACGCGGCAGC	HindIII
Tcs1LR	ATATCTAGACTCACCAGGCCCTGACGC	XbaI
Tcs1RF	ATATCTAGACCAAGTGATGCGAAGGCATG	XbaI
Tcs1RR	GACGAATTCCAGGAGGTTGACGGTGTT	EcoRI
Tcs2LF	ATTAAGCTTGGGCGAACTCCTCGTTCG	HindIII
Tcs2LR	ATTTTTGGATCCCGCAGGATCTCGGG	BamHI
Tcs2RF	GACGGATCCCTCTGAATCGGAGATTCGT	BamHI
Tcs2RR	TTAGAATTCGTGGCCGTTGGAGATGAA	EcoRI
Tcs3LF	AGCAAGCTTAGTCCTCTGAGGAGCTGGTAG	HindIII
Tcs3LR	TCGAGATCTCACGAGGTCTCCTTGGAGACA	BglII
Tcs3RF	AAAGGATCCGTCATCATCGACCCGTAG	BamHI
Tcs3RR	TTTGAATTCTCCTTGTGCTCTGGACG	EcoRI
Tcs4LF	TTTAAGCTTCGGCGTGGAGGCGTGTCG	HindIII
Tcs4LR	AAAGGATCCGTCGAGGCCCTCGGCGACA	BamHI
Tcs4RF	AAAGGATCCGACGAGGTGGACTCCACG	BamHI
Tcs4RR	TTTGAATTCCAGCACCCCTGCTGCCCG	EcoRI
Tcs5LF	CCGAAGCTTACAGCACGGGATCTCTG	HindIII
Tcs5LR	GGATCTAGACAGCCGTTTCGGCGATCGCG	XbaI
Tcs5RF	AAATCTAGAATGCGCTGACGCGGCCCG	XbaI
Tcs5RR	TTTGGATCCACGGTCGACTCACGCCGCC	BamHI
FkbDF	GAGCGGCACGGT(C/G)GGY(C/T)TCG	For fosmid selection
FkbDR	CGGGCAGCATCTCGGACGG	For fosmid selection
FkbOF	TGGGCCCGCACCGN(A/C/G/T)CGACCTGTT	For fosmid selection
FkbOR	GGCGATGTTGTCCAGGGCGACN(A/C/G/T)TCGC	For fosmid selection
FkbALF	GTTACCAAGCTTGTACCGAGGACACGTAC	HindIII
FkbALR	GAATCCGGATCCGACCGT TTTGTCCTGTTT	BamHI
FkbARF	TTTACCGGATTTTACCGGCTCCACCGAT	BamHI
FkbARR	GGGTCCCTAGAAAGAGAGTGTCGAGGAGATCG	XbaI
TcsCF	ATTAAGGATCCATGACCCACGTTTCGCGA	BamHI
TcsCR	TATATACTCGAGCCGGGGCTGCCCTT	XhoI
TcsAF	CATATGACCAAGTGGGGTGGCGTTC	NdeI
TcsAR	GGATCCTCACCGCCGCCCGGA	BamHI
SfpF	ATACATATGAAGATTTACGGAATTTATGGACC	NdeI
SfpR	ATAGGA TCCTTATAAAGCTCTTCGTACGA	BamHI
TcsDF	TTAACCCTATGAGCGAATCCGAACGCC	NdeI
TcsDR	TATTCTGAGCTAGGTACGTTTCGCGGT	XhoI

[0152]

[0153]

단백질 발현 플라스미드(plasmids)의 제작

[0154]

N-말단 His₆-태그(tag)를 포함하는 pET15b(Novagen)가 재조합 ACP_{tcsA}와 Sfp(PPTase)의 발현을 위해 사용하였으나, N, C-말단 His₆-태그된(tagged) pET28a(Novagen)는 TcsC를 위해 사용하였다. tcsC의 증폭은 프라이머 TcsCF와 TcsCR를 사용하여 수행되었다. PCR 산물은 N, C-terminal His₆-태그를 가지는 pTCSC를 생성하기 위해 pET28a내로 클론되었다. tcsA에서 ACP_{tcsA} 도메인을 포함하는 DNA 절편의 증폭은 프라이머 TcsAF와 TcsAR를 사용하여 수행되었다. PCR 산물은 N-말단 His₆-태그를 가지는 pTCSA-ACP을 생성하기 위해 pET15b내로 클론되었다. 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)에서 4'-포스포판테테이닐 트랜스퍼라제(phosphopantetheinyl transferase, PPTase)을 암호화하는 유전자 *sfp*는 pGF1017로부터 프라이머 SfpF 및 SfpR를 이용하여 PCR로 증폭하였다. PCR 산물은 N-말단 His₆-태그를 가지는 pSFP을 생성하기 위해 pET15b내로 클론되었다. tcsD의 증폭은 프라이머 TcsDF와 TcsDR를 이용하여 수행하였다. PCR 산물은 N-말단 His₆-태그를 가지는 pTCS1을 생성하기 위해 pET15b

내에 클론되었다. 이 플라스미드는 XbaI 및 HindIII로 절단하였고, 그 후에 pTCS를 생성하는 pSE34에 클론되었다.

[0155] **유전자 결실**

[0156] 플라스미드는 인프레임 유전자 결실을 위해서 사용하였고 상기 표 1에 요약하였다. 플라스미드는 ET12567/pUZ80021의 접합(conjugation)에 의해 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP 내로 도입되었고 그 후에 표적 유전자를 상동 재조합으로 결실시켰다. 결실 플라스미드와 KCTC 11604BP 염색체 사이에서 단일 교차가 일어난 균주는 아프라마이신(apramycin)이 있는 37℃(pSG5-기본으로 하는 복제단위(replicon)을 위한 비-증식허용온도)에서 아프라마이신-저항성이 있는 피전달접합균주(transconjugant)의 배양으로 선택하였다. 그러한 콜로니는 그 후에 30℃에서 선택 없이 3회 증식을 수행하여 두번째 교차를 허용하였다. 10개의 달성된 이중 교차 돌연변이, 즉 $\Delta tcsA$, $\Delta tcsB$, $\Delta tcsC$, $\Delta tcsD$, $\Delta tcs1$, $\Delta tcs2$, $\Delta tcs3$, $\Delta tcs4$, $\Delta tcs5$, 및 $\Delta fkbA$ 는 아프라마이신-민감성의 발현형질로 선택하였고 그 후에 PCR로 확인하였고 선택적으로 서던 블롯 분석으로 확인하였다. 제조된 *tcsB* 유전자 결손 균주($\Delta tcsB$)는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2011년 2월 25일자로 기탁번호 KCTC 11879BP로 기탁하였다.

[0157] **실시예 4: *tcsA*, *tcsB*, *tcsC*, 및 *tcsD* 결실 돌연변이의 화학적 상보**

[0158] FK506 생합성에서 *tcsA*, *tcsB*, *tcsC*, 및 *tcsD*의 기능에 대한 실험적 증거를 얻기 위해서, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP에서 각 유전자를 인프레임(in-frame) 결실에 의해서 비활성화시켰다. 도 3에서 도시된 상응하는 중간 생성물을 흉내낸 합성 아실-N-아세틸시스테인 티오에스테르(SNACs)가 FK506 합성에서 그들의 효과를 규명하기 위해서 각 결실 돌연변이에 공급되었다(도 4).

[0159] *tcsB*의 결실은 FK520과 비교해서 FK506 생산의 선택적 손실을 야기하였으므로 FK506의 생합성에서 TcsB의 전용(dedicated) 관련성을 확인하였다. 또한 HPLC-ESI-MS/MS 분석에 의해 야생형 균주에서 소량만 발견될 수 있는 FK523(35-desmethyl-FK520)의 생산이 5-탄소 연장 단위(extender unit)의 부재에서 메틸말로닐-CoA(methylmalonyl-CoA)의 잘못된 도입(misincorporation)의 결과로 유의미하게 증가하는 것을 관찰하였다. 두 개의 합성 아실-SNACs(3-옥소펜타노일-SNAC 및 트랜스-2-펜테닐-SNAC)를 보충하는 것은 제안된 경로마다 TcsA 위에 로딩된 후에, *tcsB* 결실 돌연변이($\Delta tcsB$ 균주, KCTC 11879BP)에서 FK506 생산을 회복하였다(도 3). FK506 생산은 또한 아실-CoA 탈수소효소에 의한 트랜스-2-펜테닐-SNAC으로의 베타-산화를 통해 펜타노일-SNAC(pentanoyl-SNAC)에 의해 복구되었다. 마지막으로, 알릴말로닐-SNAC에 의한 FK506 생합성의 복구는 인비보(*in vivo*) 연장 단위(extender unit)는 ACP-연결이 아닌 CoA-연결임을 암시하였다. 비록 FK506의 C36-C37 이중 결합의 형성에 원인인 TcsD는 $\Delta tcsB$ 균주에서 변함이 없지만, 프로필말로닐-SNAC(propylmalonyl-SNAC)은 HPLC-ESI-MS/MS에 의해 결정된 바와 같이 오직 36,37-디하이드로-FK506(36,37-dihydro-FK506)의 생합성을 유지하였다. 상기 결과는 외부에서 공급된 카르복실화된 SNAC 티오에스테르(thioester)는 TcsD의 탈포화 활성화에 필요한 TcsA ACP 도메인 위로 로딩되지 않는다는 것을 의미한다(도 4a).

[0160] FK506 폴리케타이드(polyketide) 사슬로의 온전한 5-탄소 연장 단위(extender unit)의 도입을 확인하기 위해서, $\Delta tcsB$ 돌연변이에 전구물질로 [1-13C]펜타노익산을 제공하였다. 예견된 것처럼, 28-강화된 FK506의 13C NMR 분석은 대략 23% 강화로 C20의 특이한 동위원소 표지를 나타냈다. 도입된 아세테이트의 위치와 상응하는 C8과 C22는 또한 베타-산화에 의한 [1-13C]펜타노익산의 분해로 인해 8-15%의 낮은 퍼센트로 표지 되었다. 이러한 아세테이트-유도된 탄소는 또한 같은 [1-13C]펜타노익산-공급된 $\Delta tcsB$ 돌연변이로부터 정제된 FK520과 FK523에서 강화되었다.

[0161] *tcsA* 결실 돌연변이($\Delta tcsA$ 균주)는 또한 오직 FK520과 FK523을 생산하였다. ACP에 결합된 3-옥소펜타노에이트(3-oxopentanoate) 잔기는 FAS-유사 시스템에 의해 트랜스-2-펜테닐-ACP로 가공된다고 생각되기 때문에(도 3), 3-옥소펜타노일-SNAC는 TcsB의 부재에서처럼 TcsA의 부재에서 FK506 생산을 복구하지 못하였다. $\Delta tcsA$ 균주에 트랜스-2-펜테닐-SNAC과 펜타노일-SNAC의 공급은 36,37-디하이드로-FK506의 소량의 생산을 가져왔지만, FK506 생산은 없었다. 이는 탈수소효소 TcsD는 ACP 결합 기질에 작용한다는 이전 관찰을 지지한다. 더욱이, 이 발견은 환원성 카르복실화효소 TcsC 또한 ACP-연결 기질을 더 선호하지만 이 군(family)의 전형적인 효소인 아실-CoAs와 작동할 수 있다는 것을 암시한다. 예상했던 것처럼, 알릴말로닐-SNAC과 프로필말로닐-SNAC의 첨가는 각각 FK506과 36,37-디하이드로-FK506을 생산하였다(도 4b).

[0162] *tcsC*의 인비보(*in vivo*) 기능을 더 조사하기 위해서, 이 유전자가 비활성화되고, 이는 FK506의 선택적인 손실을 야기했다. 3-옥소펜타노일-SNAC, 트랜스-2-펜테닐-SNAC, 및 펜타노일-SNAC을 이용한 *tcsC* 결실 돌연변이(Δ

tcsC 균주)의 화학적 상보는 FK506 또는 36,37-디하이드로-FK506의 생성을 복구하지 못했고, 이로써, 환원성 카르복실화에 의해 5-탄소 연장 단위(extender unit)을 기능화하는 그것의 중심역할을 확인하였다. 다시, 말로네이트 알릴말로닐-SNAC와 프로필말로닐-SNAC의 첨가는 각각 FK506 또는 36,37-디하이드로-FK506을 생산하였다(도 4c). 프로필말로닐-SNAC을 공급한 Δ tcsC 균주에서 FK506 생산의 결핍은 TcsA ACP 도메인은 프로필말로닐-SNAC으로 아실화되지 못하고 TcsD는 아실-ACP 탈수소효소라는 이전 고찰을 더 지지하였다.

[0163] 마지막으로, tcsD 결실 돌연변이(Δ tcsD 균주)는 FK520과 많은 양의 36,37-디하이드로-FK506를 생산하므로, FK506의 C36/37 올레핀(olefin)의 형성에서 그것의 중심적인 역할을 확인하였다. 외인성의 3-옥소펜타노일-SNAC, 트랜스-2-펜테닐-SNAC, 펜타노일-SNAC 및 프로필말로닐-SNAC은 Δ tcsD 균주의 생산 프로필을 변화시키지 않는 반면, 알릴말로닐-SNAC의 첨가는 FK506 생산을 복구하였다(도 4d). 화학적 상보에 의해 Δ tcsB 와 Δ tcsC 돌연변이 모두에서 생산된 36,37-디하이드로-FK506은 tcsA 와 tcsD의 존재에도 불구하고 FK506으로 더이상 변형되지 못했다. 이는 FK506의 C21 알릴 기의 이중 결합은 후기-PKS 변형을 통해 발생하지 않음을 가리킨다.

[0164] **실시예 5: FK506 유도체의 돌연변이합성**

[0165] **FK506 유도체의 생산**

[0166] 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP의 Δ tcsB 돌연변이는 상기에서 설명대로 배양하였다. 트랜스-2-헥세노익 산(Trans-2-hexenoic acid), 4-메틸펜타노익 산(4-methylpentanoic acid), 및 4-플루오로크로토닉 산(4-fluorocrotonic acid)은 최종 농도 10 mM으로 50-ml 배양에 공급하였다.

[0167] **FK506 유도체들의 분석**

[0168] FK506-생산 균주 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP에 의해 생산되는 FK506-관련된 생합성 중간체와 그들의 유도체, 그것의 결실 돌연변이체, 및 SNAC 티오에스테르(thioesters) 3-옥소펜타노일-SNAC(3-oxopentanoyl-SNAC), 트랜스-2-펜테닐-SNAC(trans-2-pentenyl-SNAC), 펜타노일-SNAC(pentanoyl-SNAC), 알릴말로닐-SNAC과 프로필말로닐-SNAC(propylmalonyl-SNAC) 및 카르복실산이 추가된 결실 돌연변이뿐만 아니라, 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 변종 아스코마이세티쿠스(*Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus*) ATCC14891에서도 발효 배양액으로부터 EtOAc이 추출되었고, 그 후에 HPLC-ESI-MS/MS에 의해 분석하였다. 시료는 0.1 % 아세트산과 10mM 암모늄 아세테이트를 포함하는 40 % (v/v) 수용성 MeCN으로 시작해서 50 분 이상 0.2 ml/min의 유출 비율에서 MeCN의 증감을 사용하여 MS/MS에 의해 Waters/Micromass Quattro micro/MS 기기 추적 이 조정되는 ACQUITY UPLC BEH C18 column(50 × 2.1 mm, 1.7 μ m; Waters)에서 분리되었다. 추적은 암모늄 부가물 같은 모체 이온부터 생성 이온까지 변이를 검출하기 위해서 선택된 분석물을 위한 질량 페어 특성(mass pairs specific)을 선택한 복합적인 반응 모니터링 모드에서 작동되는 MS/MS에 의해 실행되었다. 3 개의 분리된 배양균과 각각의 추출물이 이용되었다.

[0169] FK506 유사체의 생합성은 천연의 연장 단위(extender unit)과의 경쟁이 없으면 더 효과적이기 때문에, 4-할로크로토닉산, 분지된/4-할로부타노익산, 분지된/불포화된/5-할로펜타노익산, 분지된/불포화된 헥사노익산, 및 헵타노익산을 포함하는 일련의 카르복실산이 Δ tcsB 균주로 공급되었다. 새로운 대사산물은 각각 36,37-dihydro-37-methyl-FK506, 36-methyl-FK506, 및 36-fluoro-FK520을 만드는 트랜스-2-hexenoic acid, 4-methylpentanoic acid, 및 4-fluorocrotonic acid의 공급에 의해 생산되었다(도 6). 새로운 유사체 36-methyl-FK506과 36-fluoro-FK520가 NMR에 의해 규명되었다(도 9 내지 22).

[0170] **실시예 6: FK506 유도체의 생물학적 활성 분석**

[0171] **인비트로(In vitro) T-세포 활성 분석**

[0172] FK506과 FK520과 비교해서 36-methyl-FK506과 36-fluoro-FK520인 돌연변이합성 유도체의 관련된 면역억제 특성은 T 림프구(lymphocytes)를 사용하여 결정하였다. 간단히 말해, 인간 T-세포(1×10^6 cells/well)는 CD3/CD28 항체(BD Pharmingen; 각각 0.5 μ g/ml)와 함께 활성화되고, 그 이후에 두 개의 다른 농도의 FK506, FK520, 6-methyl-FK506 및 36-fluoro-FK520을 16-20 시간동안 처리하였다. 기계적으로 원심분리 하여 세포 잔해를 제거한 후, 상층액은 활성화된 T-세포로부터 분비된 인터루킨-2(interleukin-2)의 수치를 정량화하기 위해서 ELISA(R&D Systems)를 실시하였다. 상기의 화합물을 처리하지 않은 CD3/CD28에 의해 활성화된 T-세포로부터 얻어진 인터루킨-2(interleukin-2)의 수치는 대조군으로 사용하였다(도 7). FK506, FK520, 36-methyl-FK506 및 36-fluoro-FK520로 처리된, 활성화된 인간 T 림프구로부터 인터루킨-2(IL-2) 분비의 평가 결과, 36-methyl-FK506의 인비트

로(*in vitro*) 면역억제 활성은 FK506과 FK520에 비해서는 향상되지 않았지만, 대조군에 비해서는 유의적인 면역억제 활성을 보였다. (도 7).

[0173] **인간 신경모세포종 세포를 이용한 인비트로(*in vitro*) 신경돌기 증식 분석**

[0174] FK506과 FK520과 비교해서 36-methyl-FK506과 36-fluoro-FK520인 돌연변이합성 유도체의 관련된 신경 재생 활성은 인간 신경모세포종 세포를 이용하여 결정하였다. 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포를 배양하였고 1nM FK506, FK520, 6-methyl-FK506 및 36-fluoro-FK520의 존재나 부재에서 신경돌기 증식을 유도하는 신경 성장 인자(NGF; KOMA Biotech; 10 ng/ml)를 처리하였다. 배양 96시간 후에, 세포(n=90)는 무작위적으로 사진을 찍었고, 그 후에 증식된 세포의 수를 세었다. 신경돌기 길이는 사진을 현상해서 측정하였다. 이중 웰은 모든 실험에서 진행되었고 전체 실험은 3 번 반복되었다. NGF 단일 처리된 샘플로부터 평가된 신경돌기 길이는 대조군으로 사용하였다(도 7 및 도 8).

[0175] **칼시뉴린(calcineurin)에 FKBP12-36-methyl-FK506/36-fluoro-FK520 복합체의 결합 분석**

[0176] *In silico* 도킹(docking) 실험은 FK506과 FK520에 비해서 칼시뉴린(calcineurin)에 FKBP12-36-methyl-FK506/36-fluoro-FK520 복합체의 결합을 조사하기 위해 수행되었다. FKBP12-36-methyl-FK506- 칼시뉴린(calcineurin) 복합체의 결합 자유 에너지(-7.78 Kcal/mol)는 FKBP12-FK506- 칼시뉴린(calcineurin)(-6.42 Kcal/mol)보다 더 작다(도 24)는 것으로 칼시뉴린(calcineurin)과 FKBP12-36-methyl-FK506-복합체의 상대적으로 더 강한 상호작용이 높은 면역억제 활성을 이끌 수 있다는 것을 암시한다. 대조적으로, FKBP12-36-fluoro-FK520와 칼시뉴린(calcineurin) 사이의 결합 자유 에너지 상대적으로 -5.85 Kcal/mol로 더 높았다. 36-methyl-FK506은 FK506과 비교해서 신경 성장 인자를 처리한 인간 신경모세포종 세포 주 SH-SY5Y의 배양에서 신경돌기 증식에 대하여 약 20% 더 좋은 효과를 가졌다(도 7 및 도 8).

[0177] **통계 분석**

[0178] 특별히 T-세포 활성화와 신경돌기 증식 분석 모두에서 그룹간 차이를 통계학적으로 비교하기 위해서, 정량화된 자료는 통계 프로그램(SigmaStat, Jandel Scientific; version 3.1)을 이용해서 피셔의 티-테스트에 의해 수행되는 일원배치 분산분석(ANOVA)에 의해 분석되었다.

수탁번호

[0179]

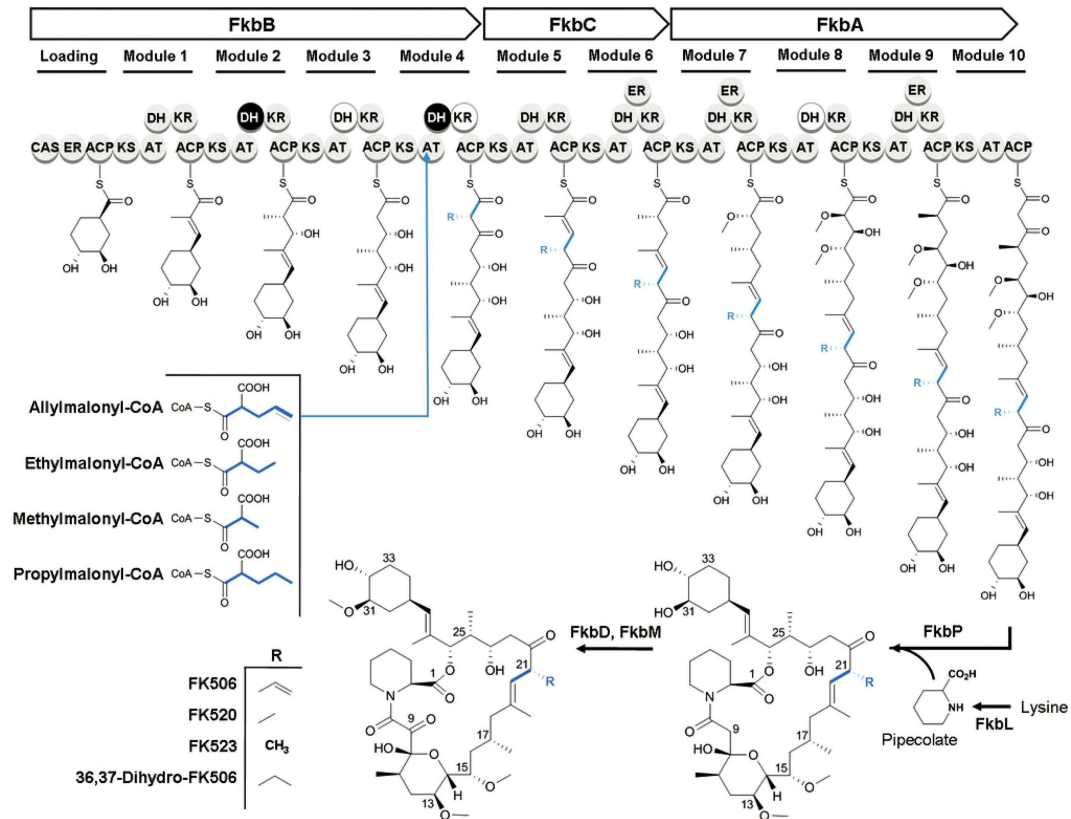
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11879BP

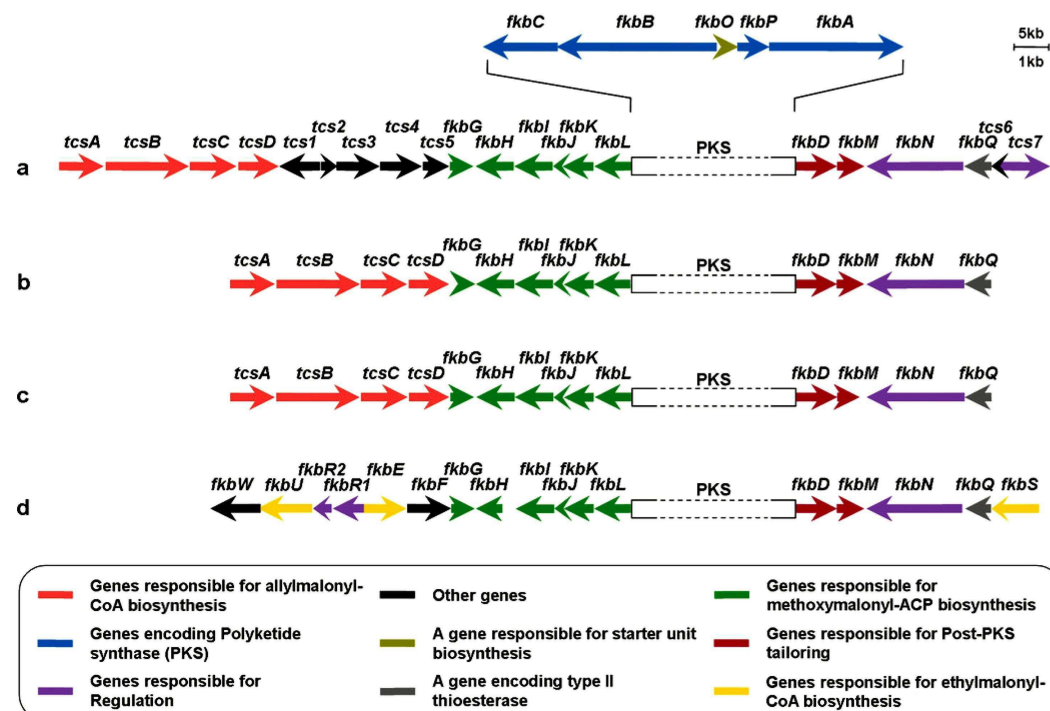
수탁일자 : 20110225

도면

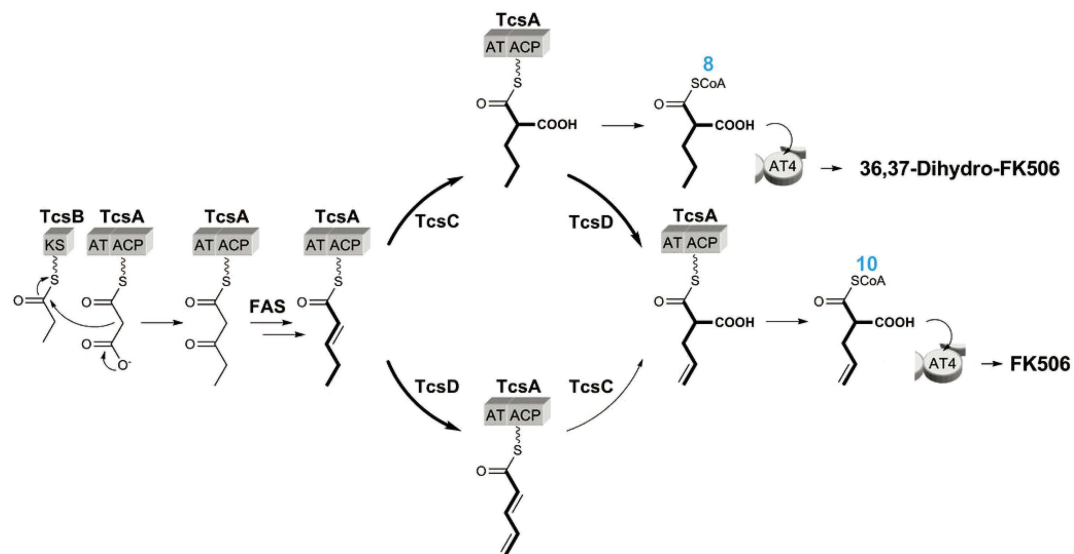
도면1



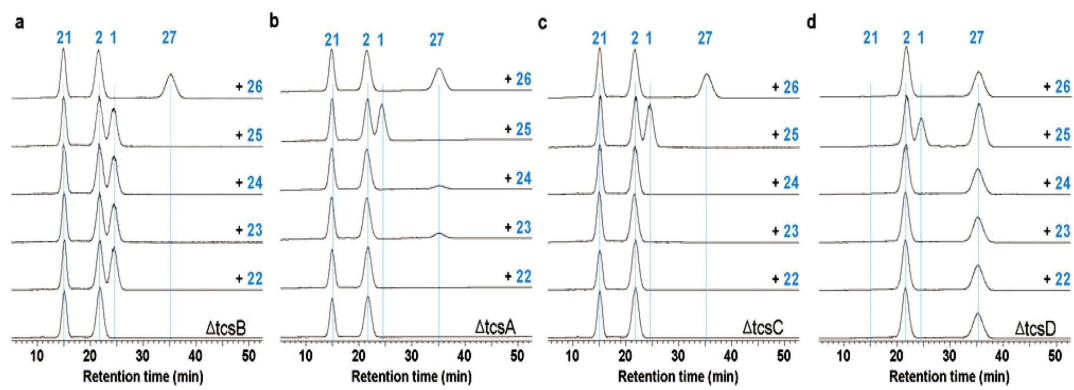
도면2



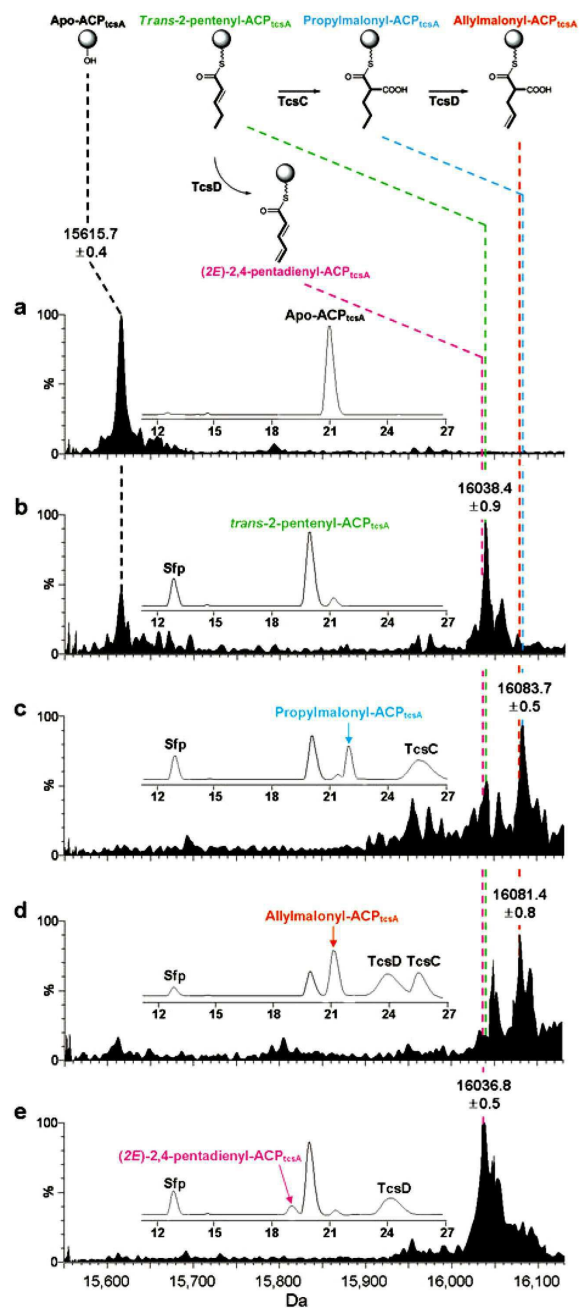
도면3



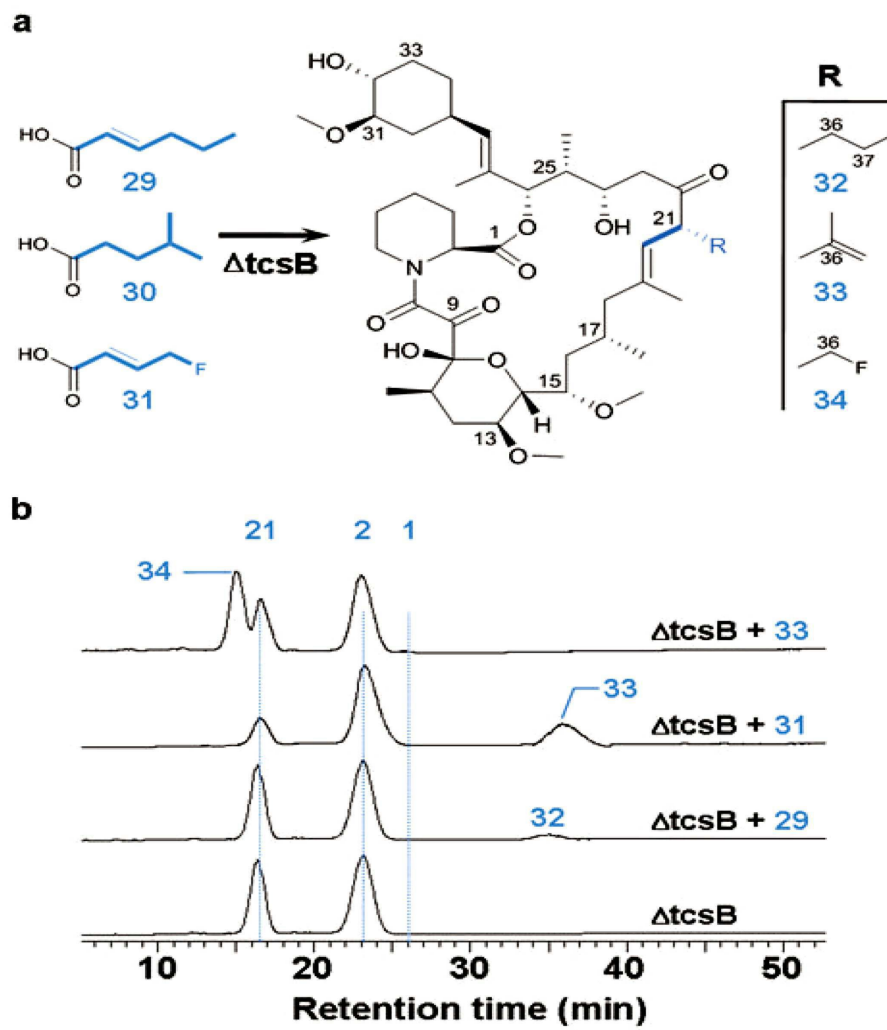
도면4



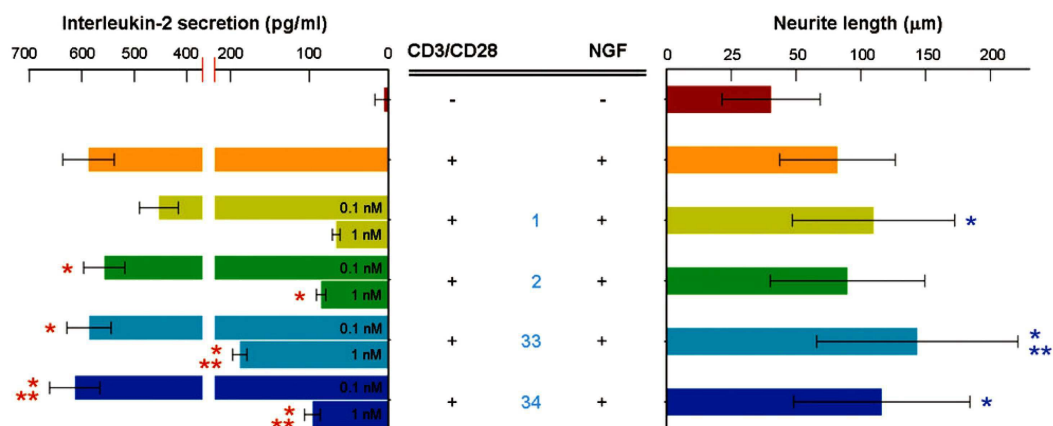
도면5



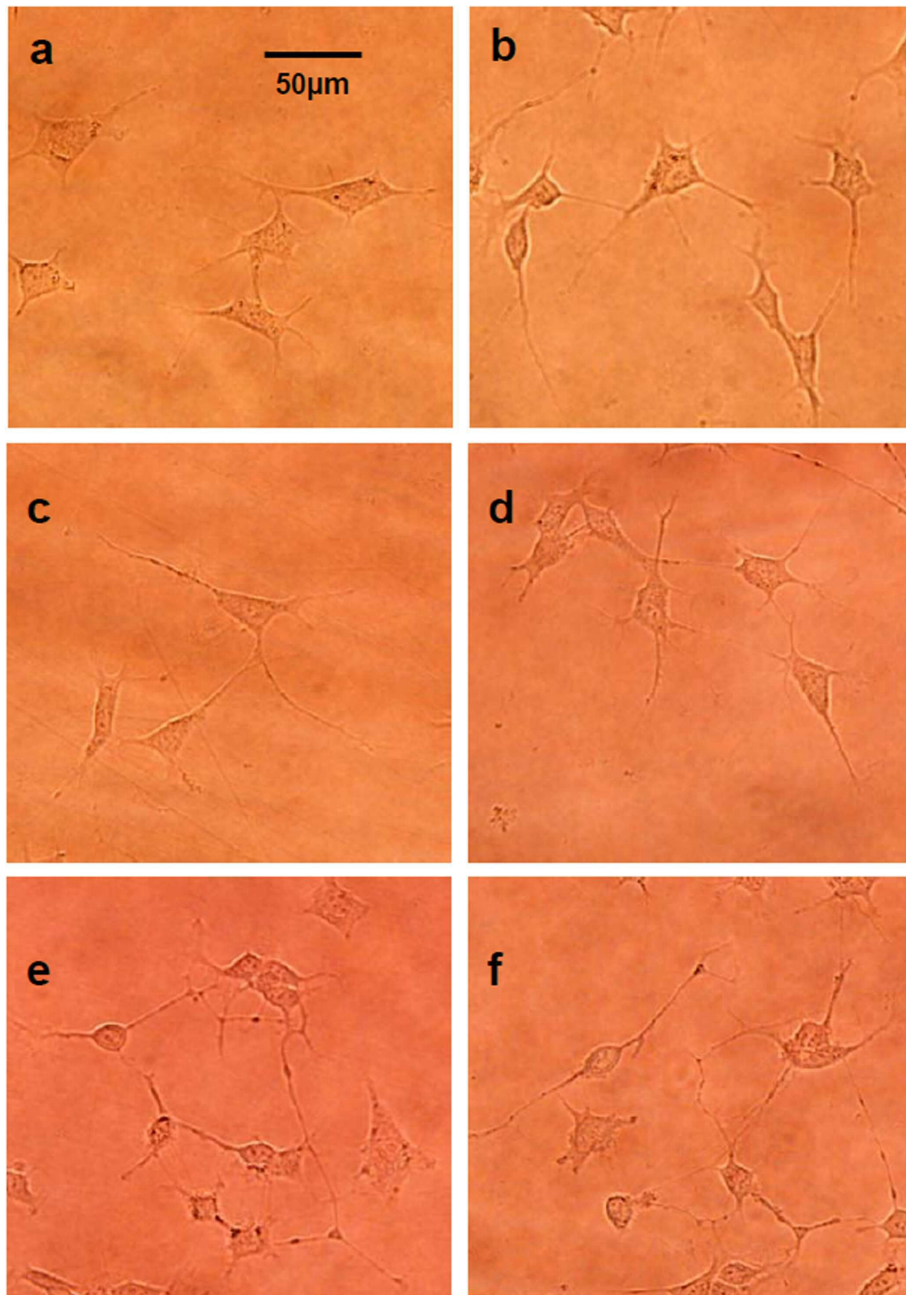
도면6



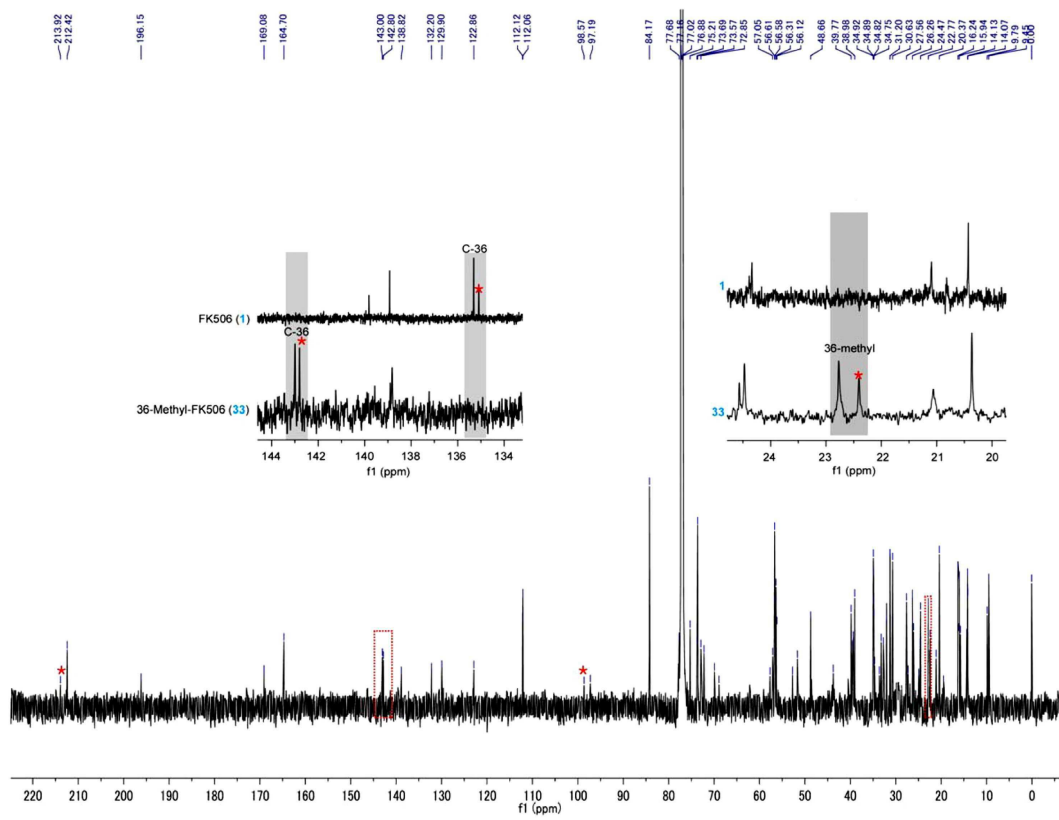
도면7



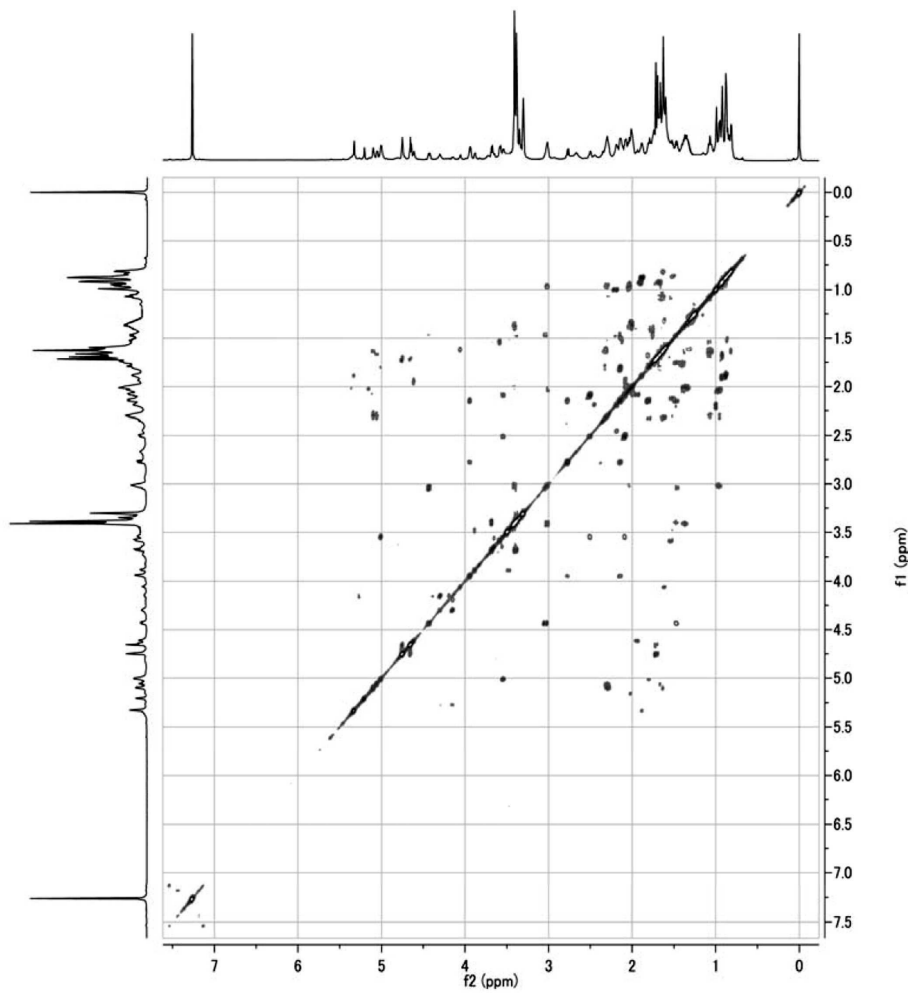
도면8



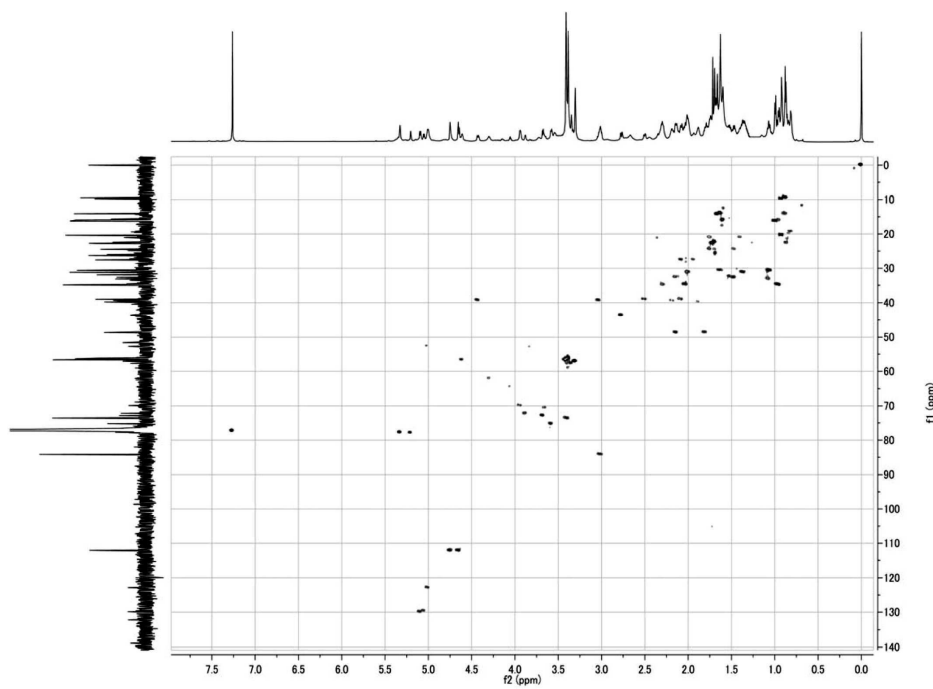
도면11



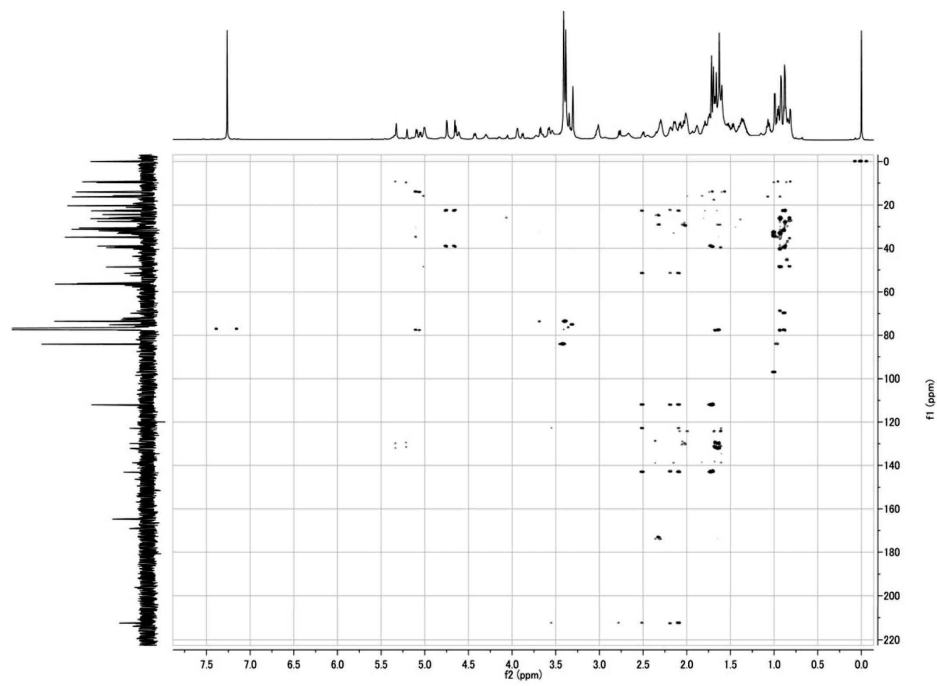
도면12



도면13



도면14

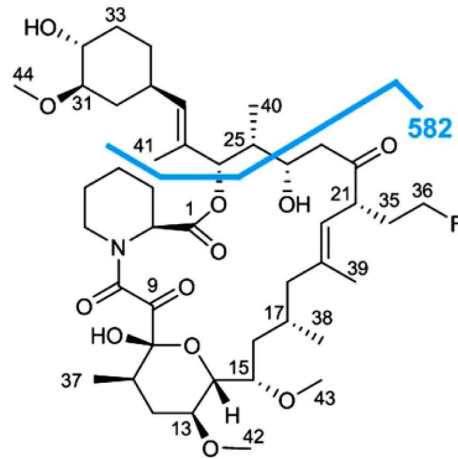


도면15

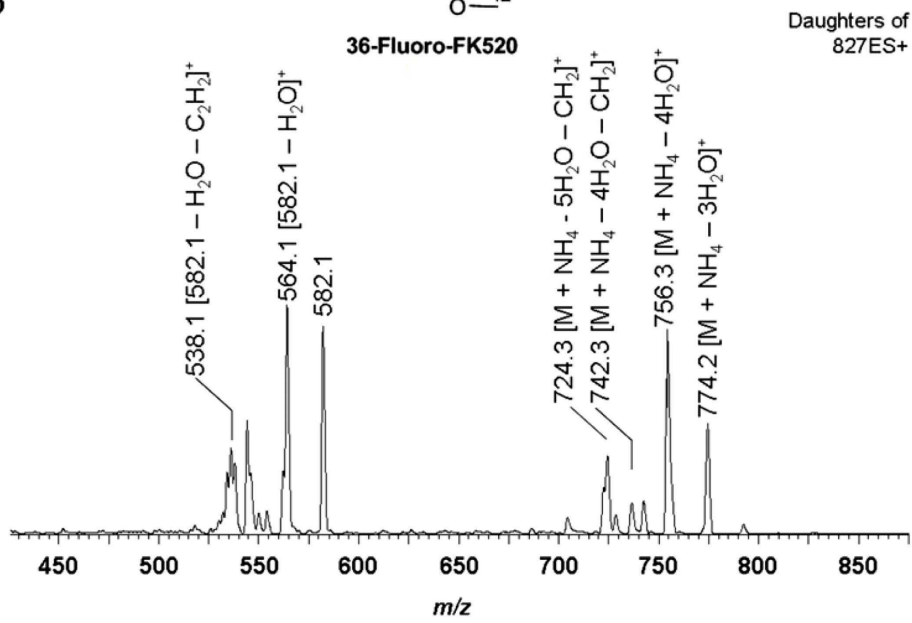
Position	δ_C	δ_H	COSY correlations	HMBC correlations
1	169.08	-		
2	56.62	4.61	H-3b	C-1, 3, 4
3	27.56	2.08	H-3b	
		1.94	H-4b	
4	21.06	1.75	H-4b	C-3, 6
		1.39		
5	24.47	1.75	H-5b	C-3, 6
		1.47	H-4b	
6	39.30	4.43	H-5a/b, H-6b	C-2, 4, 5, 8
		3.03	H-5a/b	C-2, 8
7	-	-		
8	164.70	-		
9	196.14	-		
10	97.19	-		
11	34.60	2.19	H-12b, 38	
12	32.68	2.14		C-13
		1.47		C-11, 13
13	73.57	3.40	H-12a/b	
14	72.85	3.68	H-13, 15	C-10, 12, 13, 15
15	75.21	3.58	H-16a/b	
16	33.15	1.53	H-16b	
		1.07		
17	26.00	1.68	H-16a/b, 39	C-19
18	48.66	2.14	H-17, 18b	C-16, 17, 19, 20, 39, 40
		1.80		C-16, 17, 19, 20, 39, 40
19	138.82	-		
20	122.86	5.02	H-21	C-18, 21, 35, 40
21	51.61	3.55	H-35a/b	C-19, 20, 22, 35, 36
22	212.42	-		
23	43.69	2.78	H-23b	C-22, 24, 25
		2.16		C-21, 22
24	69.89	3.95	H-23a/b, 25	C-26
25	39.77	1.89	H-41	C-24, 41
26	77.68	5.33	H-25	C-24, 25, 27, 28, 41, 42
27	132.19	-		
28	129.90	5.10	H-29	C-26, 29, 30, 34, 42
29	34.89	2.31	H-30b, 34a	
30	34.82	2.02		C-28, 31
		0.96		C-28, 29, 31, 32, 34
31	84.17	3.02	H-30a/b	C-32, 45
32	73.69	3.42	H-31, 33b	C-31, 33
33	31.20	2.02	H-33b, 34a	
		1.37	H-34b	C-32
34	30.63	1.64		C-28, 29, 30
		1.08		
35	38.98	2.50		C-36methyl, 20, 21, 22, 36, 37
		2.09		C-36methyl, 20, 21, 22, 36, 37
36	143.00	-		
37	112.06	4.76		C-36
		4.66		
38	16.24	1.00		C-10, 12
39	20.37	0.93		C-16, 17, 18
40	15.94	1.61		C-18, 19, 20
41	9.45	0.88		C-24, 25, 26
42	14.13	1.64		C-26, 27, 28
43	56.31	3.42		C-13
44	57.06	3.31		C-15
45	56.58	3.42		C-31
36-methyl	22.77	1.72		C-36

도면16

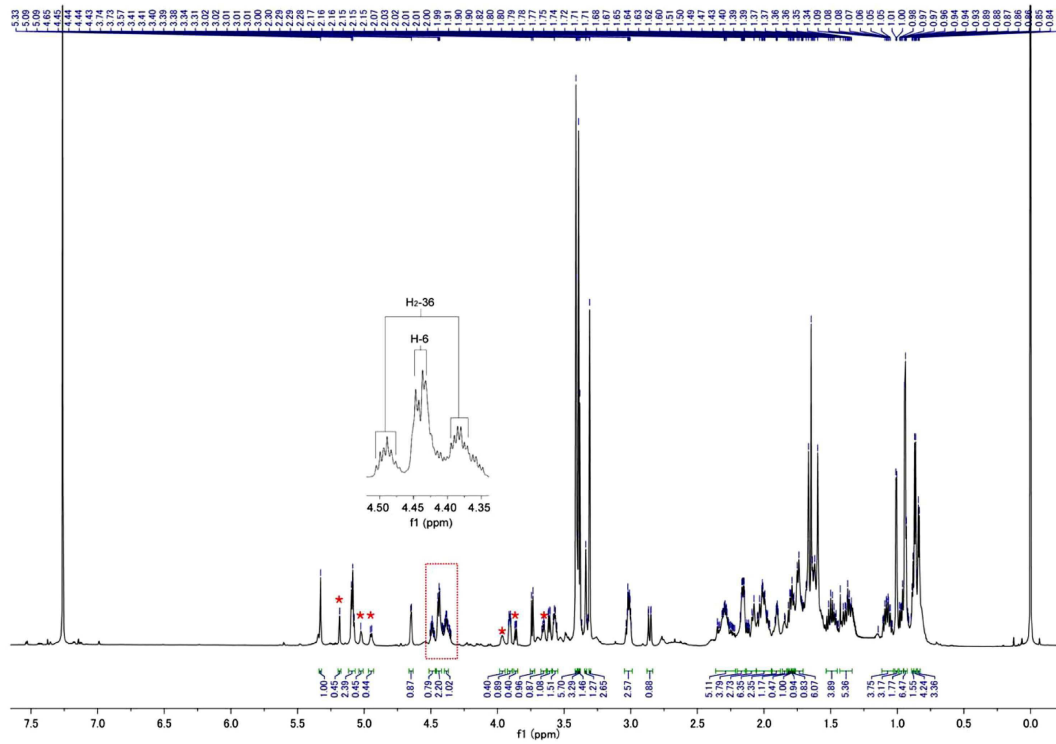
a



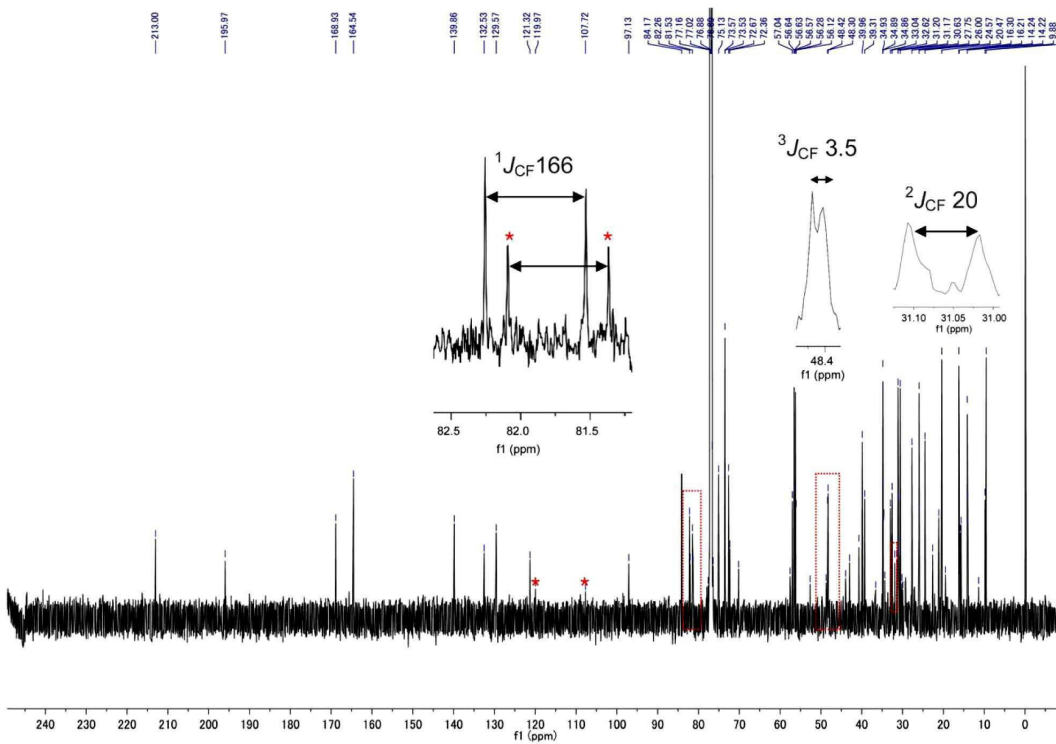
b



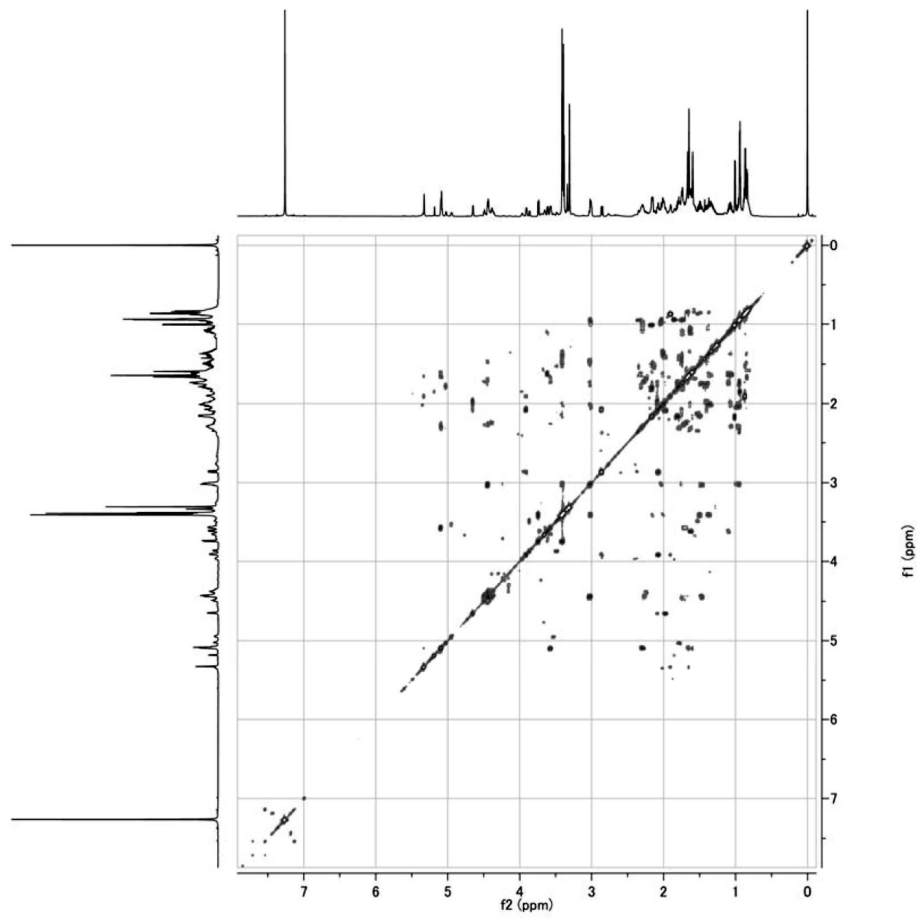
도면17



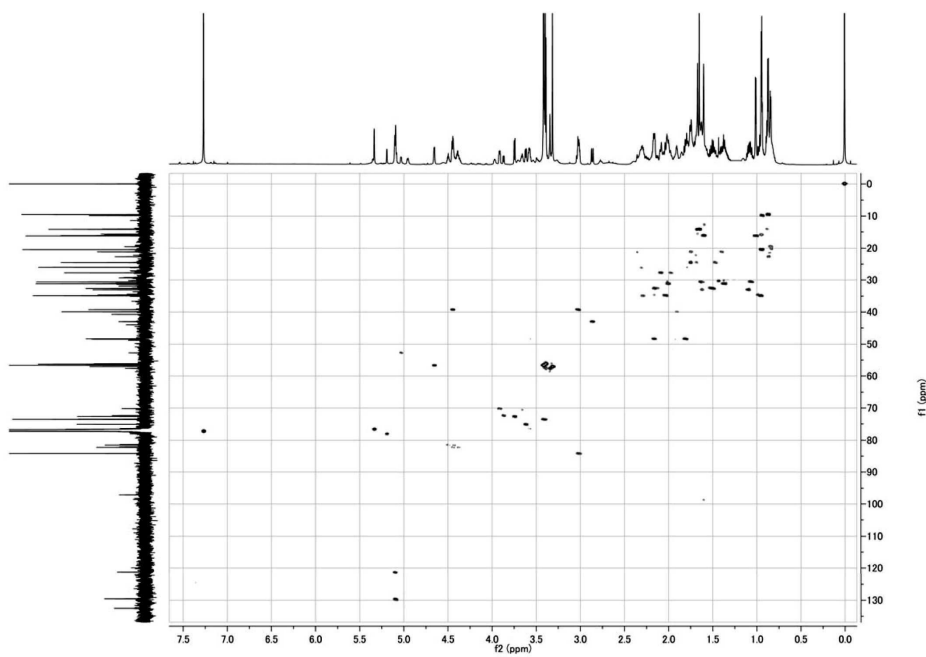
도면18



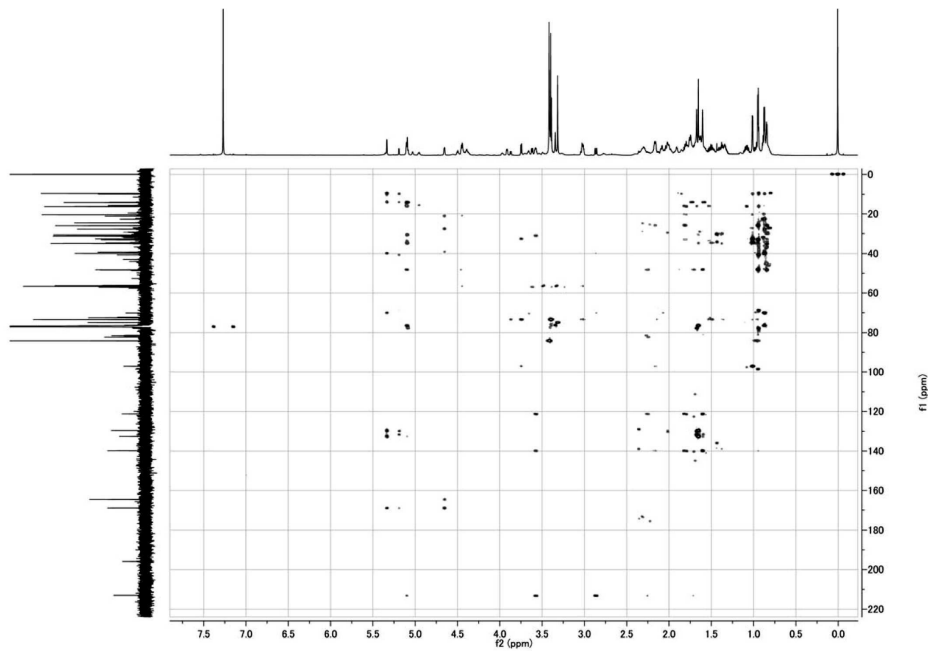
도면19



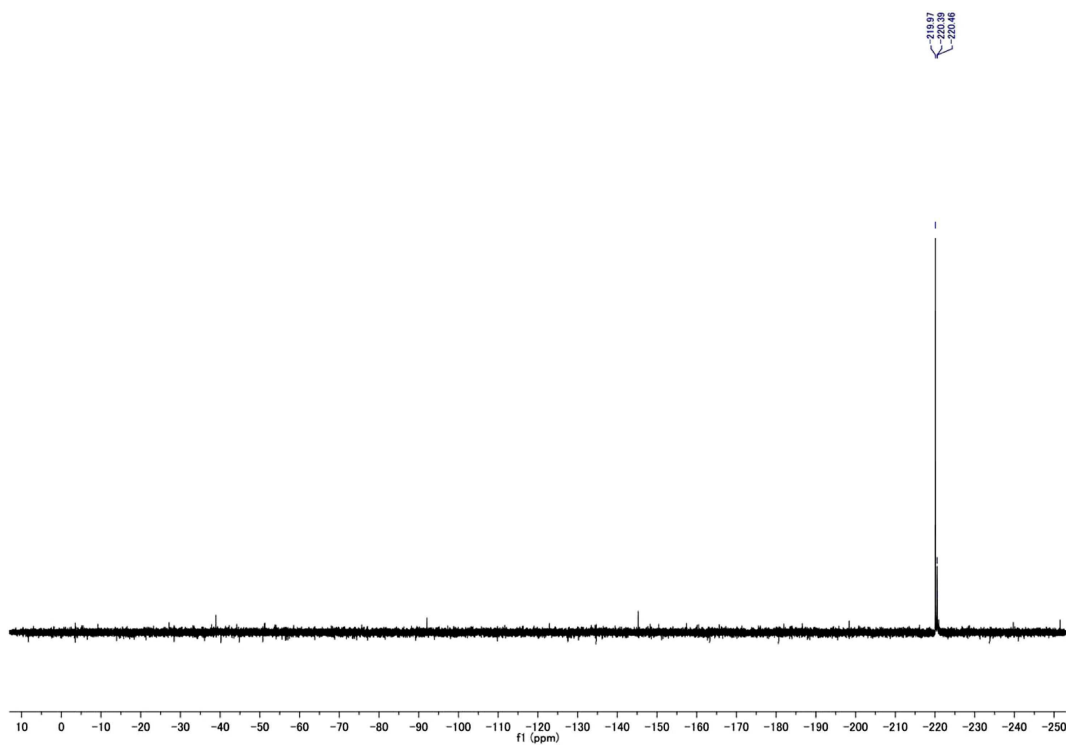
도면20



도면21



도면22



도면23

Position	δ_C	δ_H	COSY correlations	HMBC correlations
1	168.84	-	-	
2	56.61	4.65	H-3a/b	C-1, 3, 4, 6, 8
3	27.71	2.09	H-2, 3b, 4a	
		1.98	H-2, 4a/b	C-1, 2
4	21.15	1.75	H-3a, 4b, 5b	C-2, 3, 6
		1.40	H-3a/b, 4a, 5a/b	
5	24.55	1.75	H-4b, 5b, 6a/b	C-3, 6
		1.47	H-4a, 5a, 6a/b	
6	39.29	4.45	H-5a/b	C-2, 8, 4, 5
		3.02	H-5a/b	C-2, 8
7	-	-		
8	164.45	-		
9	195.88	-		
10	97.04	-		
11	34.63	2.16	H-12b	C-10
12	32.60	2.16		C-13
		1.50		C-11, 13
13	73.55	3.41	H-12a/b	
14	72.65	3.75	H-13, 15	C-10, 12, 13, 15
15	75.12	3.62	H-16a/b	C-16
16	33.02	1.63	H-16b	C-14
		1.10		C-14, 15, 17
17	25.98	1.79		C-16, 19, 38
18	48.23	2.16	H-17	C-17, 19
		1.81		C-16, 17, 19, 20, 39, 38
19	139.77	-		
20	121.23	5.10	H-21	C-18, 21, 22, 35, 39
21	48.40	3.58	H-20, 35	C-19, 20, 22, 35, 36
22	212.91	-		
23	43.02	2.86	H-23b, 24	C-22, 24, 25
		2.08	H-23a, 24	C-22, 24
24	70.19	3.91	H-23a/b, 25	C-26
25	39.94	1.90	H-24, 26	C-24, 40
26	76.67	5.34	H-25	C-24, 25, 27, 28, 40, 41
27	132.44	-		
28	129.48	5.10	H-29	C-26, 27, 29, 30, 34, 41
29	34.87	2.29	H-30a/b, 34a/b	
30	34.84	2.04	H-29, 31	
		0.97	H-29, 30a, 31	C-28, 29, 31, 32, 34
31	84.15	3.02	H-30a/b, 32	C-32, 44
32	73.51	3.41	H-31, 33a/b	C-31
33	31.18	2.00	H-32, 33b, 34a	
		1.38	H-32, 33a, 34a/b	C-29, 32, 34
34	30.62	1.64	H-29, 33a/b, 34b	C-28, 29, 30
		1.06	H-29, 33a/b	
35	31.05	2.25	H-36	C-20, 21, 22, 36
36	81.57	4.42	H-35	C-21
37	16.28	1.01	H-11	C-10, 11, 12
38	20.45	0.95	H-17	C-16, 17, 18
39	15.95	1.60		C-18, 19, 20
40	9.56	0.87	H-25	C-24, 25, 26
41	14.20	1.65		C-26, 27, 28
42	56.27	3.40		C-13
43	56.61	3.32		C-15
44	56.60	3.42		C-31

도면24

Compound	ΔG_{elec}	ΔG_{vdw}	$\Delta G_{nonpol, sol}$	$\Delta G_{elec, sol}$	-TAS	ΔG_{bind}
1	-11.83±0.12	-25.08±0.09	-2.93±0.01	21.53±0.09	12.61±0.41	-6.42±0.05
2	-14.36±0.13	-23.53±0.10	-3.03±0.01	23.13±0.06	11.76±0.56	-6.03±0.05
33	-12.20±0.12	-25.45±0.09	-2.90±0.01	20.40±0.08	12.37±0.54	-7.78±0.04
34	-11.75±0.07	-24.78±0.09	-3.05±0.01	21.45±0.08	12.31±0.56	-5.82±0.09

서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Novel tacrolimus derivative, neuroprotective composition

comprising the same, immunosuppressive composition comprising the same, method of manufacturing the same and strain for

manufacturing the same

<130> PA110016/KR

<150> KR10-2010-0082059

<151> 2010-08-24

<160> 41

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 2391

<212> DNA

<213> Streptomyces sp.

<400> 1

gtgatctccc gtgctccgga cggggaggagg ccgcacgacg acagggtcgc cgtcgtcggg 60

atgggtgtcg ccgtgccggg cgcctgcgac ccggaggagc tgtggaagct gctgtgcggt 120

gacagacccg tgttcgatga gccgtcggac cgtttccggc tcgattcctt ctggtccgcg 180

gatccggccg ccgaggaccg cggctatgtc cgcacttcgg gttttctgca cgacttcgt 240

ccgcaccccg cactggcccg ggagatcgcg gccggaacgc tctcggccgc cgcgcagaac 300

ccggtctggc tgcggcactg cctgtctgag gcgcgggaca ccgtcaccgc ccgcagcacc 360

gaccgatacg cctaccacgt cgggaccagc gccctggtcg gccagcgcac cgacgaggcg 420

gtgctggccg agtgcgttcc ccgggccgtc gccgagcggc tgcaccgca cgagcccgcc 480

cggtatggccg aggccgaggc acggctgcgc gccctgtga gaagccacca cgggtacggc 540

gccgaagagc cgcgggacac actgcccac cgggtcgtac gggccgcggc ggccggactg 600

ttaccgcagc actgcgagtt ctccgtggc gacgggcct gctcgtcctc gctgtacgcg 660

atcggctcgg gtgtcgcgag cctgtcggcg ggccgctcg atatcgcta ctgcggcggg 720

gtgtcgggag tgacgcccg ttacaacgtc acgtttcca aactgcacgg gctgagcccc 780

agcggcgacg tccgcgcgtt cgacgacgac gccgacggaa cgtgtttctc ggacggagcg 840

ggcgttgtcg cgtgaagcg cctggaccgg gccgtcgagg acggggaccc ggtgttcggc 900

gtcctcgtgg gattcggcgg gtctcggac ggccggggaa cggcgatcta ccccccaac 960

cccgtcggtc agcgcgcgtg cctggaccgc gcccggcagg catcgggtct cacggcggac 1020

gatgtcgact gggcatcgc gcacgggacg ggacggccg tcggtgacgc ggtcgagctg 1080

cggaccctcg ccgccccac cgatccgggc agcgtctggt gcggatccaa caagtccttg 1140

ctcggtcata ccgggtggag ctccggagt gtctcggtcg tccaggccct cacggcgtg 1200

cggcagggca cgataccggc acagcgacgc ttcaccgtc ccgggctcac cgcgcagacc 1260

ggcgaccggg tacgcatacc ttccggcgac gttccctggc atgcgggagg ccggcggtcc 1320

aggaccgcag gcgtctccgc ctccggcttc ggcggcacca acgcccattc gctgatacc 1380

gaccgagagc ccgtgaggac gggcccgccg ccgcccgcga ccggggccga tccggtggtc 1440

gtcctcgctt ggaccgcga cctgcccggc gaccccgcc ccgaggcgac ggagcggtg 1500

ctgcgcgaag gccgcatccc gggggccggt accttcggcc cccgctatcc ggcgccccg 1560

tttcggagc tccgtctccc tccgcccacc gtacgggtcca cggacgcggg ccagctcatg 1620

gccctgcggg tggcgggcct gttcgccgc gaacacggtg agctgtgggc gccggtacgg 1680

gcgaccaccg ggggtcttcg ggccgccacc ggtccgcgc cgtcctccat ggatcatctg 1740

gtgcgtgtc atgccgcga cgtacaccgc attctcgacg aaccgcaccg gacggcggtc 1800

accgaatggc tcgccacct gcgggccacg accccggcga ccaccaagga cacgtgccg 1860

gggctgctgc ccaacatcat cccggcgct atcgccaacc gctacacct gggcgcccc 1920

accatgctgg tcgacacggg caccaccagc gggtcaccg ccgtgcacac gccgtccgc 1980

caactggcgg ccggtgccgt cgacatggcg ctgctctcg gtgtcagcg gaccggccga 2040

cccagttcg ccgcttcat gggcgctcg gcgagcgga tcgaggagg ggcgttctc 2100

ctcgcgctga gtcgcgagtc cgtcgccctc gcgcacggcc tgacccccct cgtccgcctc 2160

cgcacggact ggaccggcag ccctcaggcg tctgcggatg ccgtccccg gggccccgt 2220

gcggcggagg acaccttct cggcgccgac ggctctctg ccgtgatccg tgccctgcac 2280

tccaccgct ccggcgtcac cgtgggacc gcggacggcg aaccgggccc ggtgatcacc 2340

ctctccccg ccgacggctc acctcttcg cagacaagga ccagccgatg a 2391

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

gacaagctta tgctggcggg gaaggcg 27

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400>	3	
ccgtctagac cagaaggaat cgagccggaa		30
<210>	4	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
cagtctagag tgatccgtgc cctgcactcc		30
<210>	5	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
gccgaattcg atgacgatgt ccgggtcg		28
<210>	6	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	6	
tttaagcttc cgtcggatcg gggcggcag		29
<210>	7	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	7	
aaagatccg aagaggaacg ccacccac		29
<210>	8	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 8
 tttagatctt gatccggtcg tgatctccc 29

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 aaagaattcg tcgccgggca ggtgcgc 27

<210> 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 tttaagctta acaagtcctt gctcgtca 29

<210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 aacggatccg tcttcgacgg ggctcccgg 29

<210> 12
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 aaaagatctt cccgggtcta cccctcga 29

<210> 13
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 tttgaattcc tcacccaggc cctgacgc 28
 <210> 14
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 gctaagcttc tcaggcgtct gcggatgc 28

 <210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 atcggatcct tcgctcacgc gggctgcc 28
 <210> 16
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 agcagatctg gcatgttctg gtcagtcc 28
 <210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 gtcgaattcc atgccacgaa cgggtcga 28

<210> 18
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 tataagctta ctcgtcgac gcggcagc 28
 <210> 19
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 atatctagac tcaccaggc cctgacgc 28
 <210> 20
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 atatctagac cagtgatgcg aaggcatg 28

 <210> 21
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 gacgaattcc aggaggttga cggtgggtt 28
 <210> 22
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22

attaagcttg ggcgaactcc tcgttcg	27
<210> 23	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 23	
atttttggat cccgcacgag tctcggg	27
<210> 24	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 24	
gacggatcct ctgaatcgga gattcgt	27
<210> 25	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 25	
ttagaattcg tggccgttgg agatgaa	27
<210> 26	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 26	
agcaagctta gtcctctgag gagctggtag	30
<210> 27	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 27
 tcgagatctc acgaggtctc cttggagaca 30
 <210> 28
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 28
 aaaggatccg tcatcatcga cccgtag 27
 <210> 29
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 29
 tttgaattct ccttgctggt ctggacg 27
 <210> 30
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 30
 tttaagcttc ggcgtggagg cgtggtcg 28
 <210> 31
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 31
 aaaggatccc gtgaggccct cggcgaca 28
 <210> 32
 <211> 28
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 32
 aaaggatccg acgaggtgga ctcccacg 28

<210> 33
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 33
 tttgaattcc cagcacccctg tcgtcccg 28

<210> 34
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 34
 ccgaagctta cagcacgggg atactctg 28

<210> 35
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 35
 ggatctagac agccgttcgg cgatcgcg 28

<210> 36
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 36
 aaatctagaa tgcgctgacg cggccccg 28

<210> 37

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 37
 tttagatcca cggtagactc acgccgcc 28
 <210> 38
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 38
 gttaccaagc ttgtaccgag gaccacgtac 30

 <210> 39
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 39
 gaatccggat ccgaccgttt tgtctgttc 30
 <210> 40
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 40
 tttagcgat tcttcaccgg ctccaccgat 30
 <210> 41
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 41
 gggtctctta gaagagagtg tcgaggagat cg 32