



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0011543  
(43) 공개일자 2017년02월02일

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <i>C12N 9/10</i> (2006.01) <i>A23L 33/10</i> (2016.01)<br/> <i>A61K 31/166</i> (2006.01) <i>C07C 217/14</i> (2006.01)<br/> <i>C12N 15/70</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/> <i>C12N 9/1048</i> (2013.01)<br/> <i>A23L 33/10</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0104325<br/> (22) 출원일자 2015년07월23일<br/> 심사청구일자 2015년07월23일</p> | <p>(71) 출원인<br/> <b>고려대학교 산학협력단</b><br/> 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자<br/> <b>박제원</b><br/> 경기도 고양시 일산동구 위시티1로 7, 504동 904호 (식사동, 위시티블루밍5단지아파트)</p> <p>(74) 대리인<br/> <b>이처영, 장제환</b></p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

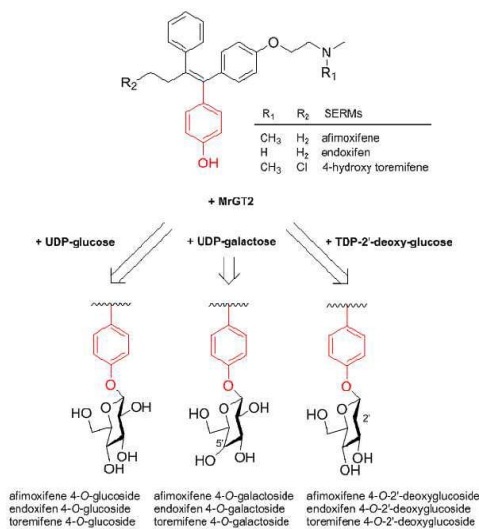
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **당전이 효소를 이용한 당 부가된 에스트로젠 수용체 조절제의 제조방법**

### (57) 요약

본 발명은 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 당전이 효소 및 이를 이용한 기존의 타목시펜 구조 유사체들의 생체이용률을 향상시킬 수 있는 당부가 에스트로젠 수용체 조절제(selective estrogen receptor modulator; SERM)의 생전환(bio-conversion) 방법 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규한 재조합 당전이 효소(MrGT2)를 이용하여 효소적 생전환된 당부가 선택적 에스트로젠 수용체 조절제(SERM)는 ER에 인비트로 길항 활성을 나타내는 동시에 인비보 생체이용률이 향상되므로, 기존 타목시펜의 장기 투여에 의해 발생하는 부작용을 감소시킬 수 있는 유방암의 예방 또는 치료 목적의 신규 의약품으로 유용하다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 31/166** (2013.01)

**C07C 217/14** (2013.01)

**C12N 15/70** (2013.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/308** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|          |                                            |
|----------|--------------------------------------------|
| 과제고유번호   | PJ011066                                   |
| 부처명      | 농촌진흥청                                      |
| 연구관리전문기관 | 시스템합성농생명공학사업단                              |
| 연구사업명    | 차세대바이오그린21                                 |
| 연구과제명    | 생합성 경로공학 기반의 토양 방선균 유전자원 활용 신규 당부가 항생물질 생산 |
| 기 여 율    | 1/3                                        |
| 주관기관     | 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부                    |
| 연구기간     | 2015.03.01 ~ 2017.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업  |
| 과제고유번호   | 20122039424                                |
| 부처명      | 미래창조과학부                                    |
| 연구관리전문기관 | 한국연구재단                                     |
| 연구사업명    | 일반연구자지원사업                                  |
| 연구과제명    | 오믹스기반 아미노당쇄 항생제 생합성 경로공학                   |
| 기 여 율    | 1/3                                        |
| 주관기관     | 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부                    |
| 연구기간     | 2012.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업  |
| 과제고유번호   | 20151002524                                |
| 부처명      | 미래창조과학부                                    |
| 연구관리전문기관 | 한국연구재단                                     |
| 연구사업명    | 중견연구자(핵심)지원사업                              |
| 연구과제명    | 생합성 경로공학화 기반 아미노사이클리톨 신규 항생제 후보물질 디자이너     |
| 기 여 율    | 1/3                                        |
| 주관기관     | 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부                    |
| 연구기간     | 2015.05.01 ~ 2018.04.30                    |

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 당전이 효소(MrGT2).

#### 청구항 2

제1항의 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 균주 유래인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 5

제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

#### 청구항 6

제2항의 폴리뉴클레오티드 또는 제5항의 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물.

#### 청구항 7

제5항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 미생물.

#### 청구항 8

제6항의 미생물을 배양하여 당전이 효소의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 당전이 효소(MrGT2)의 제조방법.

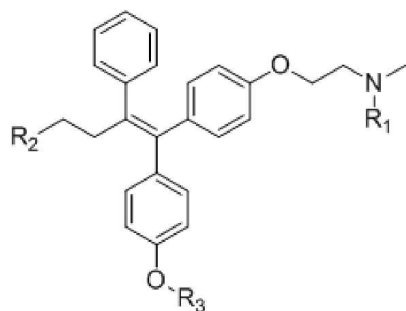
#### 청구항 9

다음 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)의 제조방법:

(a) 제1항의 당전이 효소(MrGT2) 존재하에 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 및 당 공여체를 반응시켜 하기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제를 합성시키는 단계; 및

(b) 상기 합성된 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제를 회수하는 단계;

[화학식 1]



상기 식에서, R<sub>1</sub>은 CH<sub>3</sub> 또는 H이고, R<sub>2</sub>는 H<sub>2</sub> 또는 Cl이며, R<sub>3</sub>는 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose), 알로스(allose), 탈로스(tallose), 자일로스(xylose), N-아세틸글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 락토오스(lactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)는 타목시펜(tamoxifen), 아피목시펜(afimoxifene), 엔독시펜(endoxifene), 라록시펜(raloxifene), 라소폭시펜(lasofloxifene), 토레미펜(toremifene) 및 4-하이드록시-토레미펜(4-hydroxytoremifene)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제의 제조방법.

#### 청구항 11

제9항에 있어서, 상기 당 공여체는 UDP-글루코스(Glc), UDP-갈락토스(Gal), TDP-알로스(allose), UDP-N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine) 및 TDP-2'-디옥시글루코스(deoxy-Glc)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제의 제조방법.

#### 청구항 12

제9항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제는 아피목시펜 4-O-글루코사이드, 엔독시펜 4-O-글루코사이드, 토레미펜 4-O-글루코사이드, 아피목시펜 4-O-갈락토사이드, 엔독시펜 4-O-갈락토사이드, 토레미펜 4-O-갈락토사이드, 아피목시펜 4-O-2'-디옥시글루코사이드, 엔독시펜 4-O-2'-디옥시글루코사이드 및 토레미펜 4-O-2'-디옥시글루코사이드로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제의 제조방법.

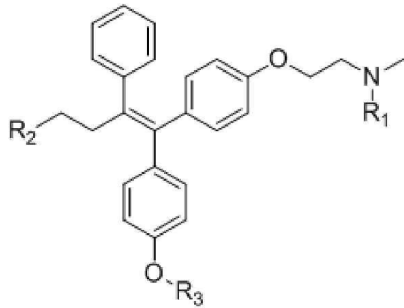
#### 청구항 13

제9항에 있어서, 상기 (b) 단계는 역상 C18 고정상, 메탄올:물:포름산 65:35:0.2(v/v/v) 혼합액 이동상 및 15-19분 유지시간(Retention time) 조건의 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)를 이용하는 것을 특징으로 하는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제의 제조방법.

#### 청구항 14

상기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1]



상기 식에서, R<sub>1</sub>은 CH<sub>3</sub>이고, R<sub>2</sub>는 Cl이며, R<sub>3</sub>는 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

#### 청구항 15

제14항의 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제를 유효성분으로 함유하는 유방암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 16

제14항의 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제를 유효성분으로 함유하는 유방암의 예방 또는 개선용 식품.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 당전이 효소 및 이를 이용한 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(selective estrogen receptor modulator; SERM)의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 당전이 효소를 이용하여 기존의 타목시펜 구조 유사체들의 생체이용률을 향상시킬 수 있는 당부가 SERM 화합물들의 생전환(bio-conversion) 방법 및 그 용도에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0003] 선택적 에스트로겐 수용체 조절제는 세포 내 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, 이하 ER)에 작용하며, 적용 조직에 따라서 길항제(antagonist) 혹은 항진제(agonist) 효과를 제공하여 에스트로겐 유사 역할을 저해하거나 활성화 시킨다. 대표적인 SERM들로는 타목시펜(tamoxifen), 라록시펜(raloxifene), 라소폭시펜(lasofoxifene) 및 토레미펜(toremifene) 등이 있으며(Ward *et al.*, *Br. Med. J.* 1:13-14, 1973; Draper *et al.*, *Pharmacology*. 50:209-217, 1995; Ke *et al.*, *J. Am. Aging Assoc.* 25:87-99, 2002; Valavaara *et al.*, *Ann. Clin. Res.* 20:380-388, 1988), 이들 중 타목시펜은 유방조직 ER에 대하여는 길항제로, 뼈와 자궁내막 조직 ER에는 항진제로 작용하는 한편, 라록시펜과 라소폭시펜의 경우에는 유방과 자궁 조직 ER에 길항제로 그리고 뼈 조직 ER에서만 항진제로 작용한다.

[0004] 타목시펜은 ER에 대하여 상대적으로 낮은 친화도를 가지고 있는 프로드럭(prodrug)의 일종으로, 간에서 대사과정을 거쳐 4-하이드록시 타목시펜(4-hydroxytamoxifen, 일명 아피목시펜[afimoxifene])과 N-데스메틸-4-하이드록시 타목시펜(N-desmethyl-4-hydroxytamoxifen, 일명 엔독시펜[endoxifen]) 활성대사체가 되면(Desta *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310:1062-1075, 2004), 타목시펜보다 30~100배 정도 높은 친화도를 가지는 조직 ER에 대한 길항제 역할을 한다(Muerdter *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.* 89:708-717, 2011).

[0005] 그러나, 타목시펜의 장기간 처방은 뼈 조직 ER에 대한 항진효과로 골다공증(osteoporosis)을 야기할 수 있으며, 자궁내막 조직 ER에 대한 항진효과로 자궁암 발병 가능성이 보고된 바 있어서 그 투약기간을 5년 이내로 제한하

고 있다(Vehmanen *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 24:675-680, 2006; Gallo *et al.*, *Semin Oncol.* 24:S1-71-S1-80, 1997). 또한, 타목시펜은 자궁암의 위험도를 증가시키는 것으로 알려진 자궁 상피 세포의 증식을 자극하므로, 미국 암 협회에서는 타목시펜이 유방암 재발 위험도는 낮추는 반면 일부 유형의 자궁암에 있어서는 그 위험도를 높이는 것으로 보고하고 있다. 따라서, 타목시펜의 신규한 유도체의 개발 또는 기존 타목시펜의 생체이용률(bioavailability)보다 높은 생체이용률을 제공하여, 저용량 투약으로 자궁암 발병 위험성을 감소시킬 수 있는 신규한 프로드럭의 개발이 중요하다.

[0006] SERM의 구조적 변형을 통한 신규 유도체의 개발은 개량 신약 및 의약품 전달 시스템(drug delivery system) 개발의 주요 기술로서, 그 중 하나는 화학구조 내 수산기(hydroxy function)에 당 분자를 전이시킬 수 있는 당전이 효소(GT)를 이용한 효소적 제조방법이다. 특히, 타목시펜과 그 구조적 유사 화합물들의 당 전이화는 원래 물질에 비하여 초회 통과(first pass)를 거친 대사(metabolism) 과정에서 혈중 약물 농도를 일정 수준이상으로 유지하여 생체이용률을 향상시킬 수가 있으므로, 의약품의 제형 개량, 신규 제형 개발 및 프로드럭(prodrug)화 등에 유용한 생전환(bio-conversion) 기술이라 할 것이다.

[0007] 타목시펜의 당화와 관련된 보고들의 대부분은 체내 투여 후 간 대사과정을 거쳐 4번 위치에 수산기가 부가된 대사체인 아피목시펜과 엔독시펜으로 활성화되고, 이후 수산기에 글루쿠로닉산(glucuronic acid)이 부가되는 당화과정으로 불활성화되어 배설되는 글루쿠로나이드(glucuronide)화 반응이다(McCague *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 39:1459-1465, 1990; Poon *et al.*, *Drug Metabol. Disposit.* 21:1119-1124, 1993). 그런데, 최근 고감도 질량분석기(mass spectrometry)를 이용한 인간 혈장 내 타목시펜 및 그 관련 대사체들에 대한 정량 모니터링 기법의 개발로 기존에 검출되지 않았던 신규한 대사체들이 확인되었고, 이들 중에는 글루쿠로닉산(glucuronic acid)이 부가되는 대사 과정 외에 글루코스(glucose)가 부가된 신규 글루코사이드(glucoside) 대사체들이 보고되었다(Dahmane *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 406:2627-2640, 2014). 하지만, 효소적 생전환을 통하여 타목시펜과 그 구조 유사 SERM들에 당을 부가한 화합물의 제조는 현재까지 알려진 바가 없다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 당부가 전의 원래 SERM 대비 ER 결합 친화도 및 생체이용률이 현저히 향상된 SERM의 유도체를 개발하고자 예의 노력한 결과, 수산기 부가 SERM을 기질로 하여 당전이 반응을 가능케 하는 신규 당전이 효소를 발견하고 효소적 생전환을 통해 제조한 당부가 SERM 유도체의 ER에 대한 길항활성 및 생체이용률 증가 효과를 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 신규한 당전이 효소(MrGT2), 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터 및 상기 폴리뉴클레오티드 또는 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 미생물을 배양하여 당전이 효소의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 당전이 효소(MrGT2)의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 당전이 효소(MrGT2)를 이용한 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)의 제조방법 및 상기 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)를 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)를 유효성분으로 함유하는 유방암의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품을 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 당전이 효소(MrGT2)를 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

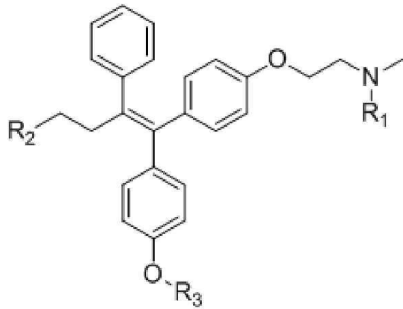
[0017] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 상기 미생물을 배양하여 당전이 효소의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 제조합 당전이 효소(MrGT2)의 제조방법을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한, 상기 당전이 효소(MrGT2) 존재하에 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM) 및 당 공여체를 반응시켜 하기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제를 합성시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제를 회수하는 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)의 제조방법을 제공한다.

[0021] [화학식 1]

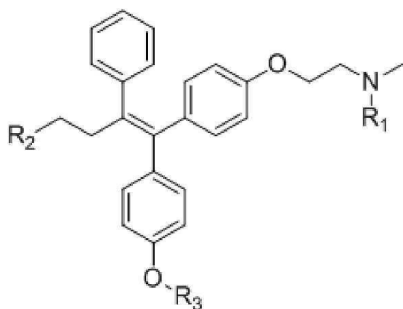


[0022]

[0023] 상기 식에서, R<sub>1</sub>은 CH<sub>3</sub> 또는 H이고, R<sub>2</sub>는 H<sub>2</sub> 또는 Cl이며, R<sub>3</sub>는 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose), 알로스(allose), 탈로스(tallose), 자일로스(xylose), N-아세틸글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 락토오스(lactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

[0024] 본 발명은 또한, 하기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다:

[0025] [화학식 1]



[0026]

[0027] 상기 식에서, R<sub>1</sub>은 CH<sub>3</sub>이고, R<sub>2</sub>는 Cl이며, R<sub>3</sub>는 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

[0028] 본 발명은 또한, 상기 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)를 유효성분으로 함유하는 유방암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명은 또한, 상기 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)를 유효성분으로 함유하는 유방암의 예방 또는 개선용 식품을 제공한다.

### 발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangia*) 방선균 유래의 당전이 효소가 대장균 내에 발현된 신규한 제조합 당전이 효소(MrGT2)를 이용하여 효소적 생전환된 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)는 ER에 인비트로 길항 활성을 나타내는 동시에 인비보 생체이용률이 향상되므로, 기존 타목시펜의 장기 투여에 의해 발생하는 부작용을 감소시킬 수 있는 유방암의 예방 또는 치료 목적의 신규 의약품으로 유용하다.

## 도면의 간단한 설명

[0033]

도 1은 당전이효소 MrGT2 효소 반응을 통한 생전환 모식도이다.

도 2는 당부가 SERM 유도체들과 생전환 전 원래 SERM 화합물들의 에스트로겐 수용체  $\alpha$  (ER  $\alpha$ )에 대한 인비트로 길항 활성을 나타낸 그래프이다.

도 3은 실험동물 혈청 중 SERM 및 그 활성 대사체의 농도를 분석함으로써 당부가 유도체들의 생체이용률 향상 정도를 비교한 그래프이다. 당부가 SERM 유도체들과 생전환 전 원래 SERM 화합물들을 자궁 절제 시술 후 쥐에 일주일 간 하루에 한번 3  $\mu$ mole 수준으로 경구 투여한 다음, 마지막 투여 후 24시간에 채혈하였다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0036]

본 발명에서는 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주의 유전체(genome)로부터 GT 암호화 유전자를 분리하고, 이를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 형질전환 대장균을 제작한 다음, 재조합 당전이 효소(MrGT2)를 제조하였다. 이후, 상기 재조합 당전이 효소에 4번 위치에 수산기가 부가된 SERM 화합물 3종(4-하이드록시 토레미펜, 아피목 시펜, 엔독시펜)을 수용체로 그리고 핵산당인 우리딘 이인산 글루코스(uridine diphosphate glucose; 이하 UDP-Glc), 우리딘 이인산 갈락토오스(uridine diphosphate galactose, 이하 UDP-Gal) 혹은 티미딘 이인산 2 '-디옥시-글루코스(thymidine diphosphate 2 '-deoxy-glucose, 이하 TDP-2 '-deoxy-Glc)를 당 공여체로 반응시켜 당부가 SERM 유도체를 생전환하였다. 그 다음, 질량분석기(mass spectrometry)와 핵자기 공명 스펙트로메트리(nuclear magnetic resonance spectrometry) 기기분석을 통하여 그 구조를 확인하고, 당부가 전의 원래 SERM 들과 그 유도체들의 ER에 대한 인 비트로(in vitro) 길항 활성 비교 및 실험동물을 대상으로 한 생체이용률의 향상을 일부 확인함으로써, 특정 당이 효소적으로 부가된 SERM 유도체들을 제조하였다.

[0037]

따라서, 본 발명은 제1관점에서, 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 당전이 효소(MrGT2)에 관한 것이다.

[0038]

본 발명은 제2관점에서, 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

[0039]

본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오티드는 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 균주 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0040]

본 발명은 제3관점에서, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터에 관한 것이다.

[0041]

본 발명은 제4관점에서, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0042]

본 발명에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043]

본 발명은 제5관점에서, 상기 미생물을 배양하여 당전이 효소의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 당전이 효소(MrGT2)의 제조방법을 제공한다.

[0044]

본원에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단

부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0045] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 칼슘 클로라이드 방법 또는 전기천공법(electroporation) (Neumann, *et al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 등을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현벡터가 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 벡터는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a, pET-22b(+) 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 대장균에 형질전환 가능한 다양한 벡터를 사용할 수 있다.

[0046] 염기서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)" 된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0047] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0048] 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.

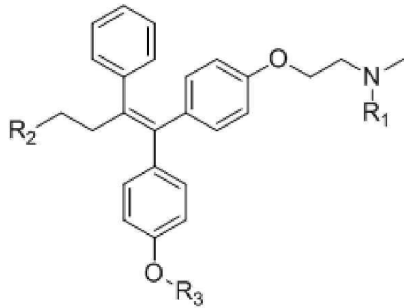
[0049] 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.

[0050] 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기과 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.

[0051] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법들을 들 수 있다.

[0053] 본 발명은 제6관점에서, (a) 상기 당전이 효소(MrGT2) 존재하에 선택적 에스트로젠 수용체 조절제(SERM) 및 당공여체를 반응시켜 하기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로젠 수용체 조절제를 합성시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 당부가 선택적 에스트로젠 수용체 조절제를 회수하는 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로젠 수용체 조절제의 제조방법에 관한 것이다.

[0054] [화학식 1]



[0055]

[0056] 상기 식에서, R<sub>1</sub>은 CH<sub>3</sub> 또는 H이고, R<sub>2</sub>는 H<sub>2</sub> 또는 Cl이며, R<sub>3</sub>는 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose), 알로스(allose), 탈로스(tallose), 자일로스(xylose), N-아세틸글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 락토오스(lactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)는 타목시펜(tamoxifen), 아피목시펜(afimoxifene), 엔독시펜(endoxifene), 라록시펜(raloxifene), 라소폭시펜(lasofloxifene), 토레미펜(toremifene) 및 4-하이드록시-토레미펜(4-hydroxytoremifene)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

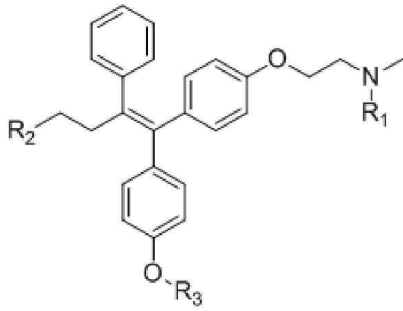
[0058] 본 발명에 있어서, 상기 당 공여체는 UDP-글루코스(Glc), UDP-갈락토스(Gal), TDP-알로스(allose), UDP-N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine) 및 TDP-2'-디옥시글루코스(deoxy-Glc)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 부가되는 당의 종류로는 단당(mono-saccharide)의 경우에는 글루코스, 만노스(mannose), 갈락토스(galactose), 알트로스(allose), 이도스(idose), 프럭토스(fructose) 또는 아라비노스(arabinose)일 수 있으며, 그리고 아미노당으로는 N-아세틸-갈락토사민(N-acetyl-galactosamine), N-아세틸-뉴라민산(N-acetyl-neuraminic acid), 글루코사민(glucosamine) 또는 갈락토사민(galactosamine)일 수 있고, 이당(di-saccharide)의 경우에는 수크로스(sucrose), 셀로비오스(cellobiose), 말토스(maltose), 트레할로스(trehalose), 겐티오비오스(gentiobiose) 또는 멜리비오스(melibiose)일 수 있으며, 삼당(tri-saccharide)의 경우엔 라피노스(raffinose) 또는 겐티아노스(gentianose)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 단당류로 알로스(allose), 탈로스(talose) 또는 자일로스(xylose), 아미노당으로 N-아세틸-글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 이당으로 락토스(lactose)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제는 아피목시펜 4-O-글루코사이드, 엔독시펜 4-O-글루코사이드, 토레미펜 4-O-글루코사이드, 아피목시펜 4-O-갈락토사이드, 엔독시펜 4-O-갈락토사이드, 토레미펜 4-O-갈락토사이드, 아피목시펜 4-O-2'-디옥시 글루코사이드, 엔독시펜 4-O-2'-디옥시 글루코사이드 및 토레미펜 4-O-2'-디옥시 글루코사이드로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 역상 C18 고정상, 메탄올:물:포름산 65:35:0.2(v/v/v/v) 혼합액 이동상 및 15-19분 유지시간(Retention time) 조건의 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)를 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명은 제7관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다.

[0062] [화학식 1]



[0063]

[0064] 상기 식에서, R<sub>1</sub>은 CH<sub>3</sub>이고, R<sub>2</sub>는 Cl이며, R<sub>3</sub>는 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

[0065]

본 발명에 있어서, 상기 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)는 토레미펜 4-O-글루코사이드, 토레미펜 4-O-갈락토사이드 또는 토레미펜 4-O-2'-디옥시-글루코사이드인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0066]

본 발명은 제8관점에서, 상기 당부가 선택적 에스트로겐 수용체 조절제를 유효성분으로 함유하는 유방암의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 유방암의 예방 또는 개선용 식품에 관한 것이다.

[0067]

본 발명에 있어서, 상기 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, 말레인산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

[0068]

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

[0069]

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

[0070]

본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 암 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 유방암 질환 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.

[0071]

본 발명의 상기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 ER에 대한 일부 인비트로 길항 활성을 나타내고 기존 SERM들에 비하여 당부가 SERM 유도체들의 생체이용률이 향상되었으므로, 투여량을 낮출 수 있어 타목시펜 등의 장기간 경구 투여 후 나타나는 골다공증과 자궁암 발병 위험도 등의 부작용을 개선할 수 있는 제형으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0072]

본 발명의 약학적 조성물은 표준 약학적 실시예에 따라 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.

[0073]

본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상 투여시에 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0074]

경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질 캡셀제, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등의 제형일 수 있는데, 이들 제형은 유효성분 외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산의 마그네슘염, 스테아르산의 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는

흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0075] 비경구 투여용 제형으로는 피하 주사, 정맥 주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의할 수 있다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 포함하고, 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하며, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0076] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000mg/일이고, 바람직하게는 0.01 ~ 500mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

# [실시예]

[0079] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명 할 것이다.

## 실시예 1: 마이크로모노스포라 로도랑지아 유전체로부터 GT 암호화 유전자의 분리

[0082] 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주로부터 유래한 당전이 효소를 분리하기 위하여, 우선 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주에서 분리한 유전체를 주형으로 사용하고, 기존 마이크로모노스포라 속에서 보고된 유전체의 염기서열을 기초로 하여 제작한 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머(primer)로 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 다음과 같이 실시하였다. N-터미널 프라이머는 하기 서열번호 1의 서열이고, C-터미널 프라이머는 하기 서열번호 2의 서열이다.

[0083] [서열번호 1] 5'-GGCATATGATCCACGCGCAGACTTCCGGATG-3' (NdeI 제한위치)

[0084] [서열번호 2] 5'-CGCTCGAGATTCGGCCTGCGCCTCCACGTCCA-3' (XhoI 제한위치)

[0085] 상기 균주의 유전체 DNA 및 상기 프라이머들을 Taq DNA 중합효소(Taq DNA polymerase)와 함께 혼합하여 전체 32 사이클의 PCR을 수행하였다(초기 불활성 98℃에서 5분, 52.8℃에서 69.3℃로 기울기 반응 후, 72℃에서 5분 동안 반응 후 종결). PCR 산물을 정제한 후, pGEMR-T 이지 벡터(pGEMR-T easy vector, Promega, Madison, WI, USA)에 접합한 다음, 대장균 XL1 블루(XL1 blue, Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 42℃에서 45초간 열처리한 후, 형질전환을 수행하였다. 선발된 형질전환 대장균으로부터 T-이지 벡터를 분리, 정제한 후 그 염기서열(서열번호 3) 및 이로부터 유추한 아미노산 서열(서열번호 4)을 결정하였다. 전체 ORF의 염기서열은 1146bp이며, 그 번역 후 단백질은 총 381개의 아미노산으로 구성(총 41.1 kDa)되어 있다.

## 실시예 2: 대장균에서 재조합 당전이 효소 MrGT2의 발현

[0088] 상기 실시예 1의 T-이지 벡터를 NdeI과 XhoI 제한효소로 처리한 MrGT2 DNA 절편을, 동일한 제한효소들로 처리한 단백질 발현 벡터인 pET-28(a+)(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입한 후, 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 형질전환시켰다. 이때, 형질전환체의 선발을 위하여 카나마이신 항생제 50 ppm을 사용하였다.

[0089] 상기 재조합 대장균을 전술한 항생제와 최종 농도 1M의 소르비톨(sorbitol) 및 2.5mM 베타인(betaine)이 첨가된 LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후, 30℃에서 배양하였다. 이후, 최종 농도 0.5 mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 광학농도(optical density) 0.6 ~ 0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질 발현을 유도시켜 재조합 대장균 균주를 22℃에서 18시간 추가 배양하였다. 배양 후 배양액을 2000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 50mM 인산나트륨 용균(lysis) 완충용액(300mM NaCl, 10mM imidazole, 10% glycerol, 1% Triton X-100)에 균체를 용

해시키고, 초음파 분해(sonication)를 실시하였다. 그 다음, 12000rpm에서 20분간 냉장 원심분리하고, 상등액을 따로 모아 일부 시료를 12% SDS-PAGE로 분석하여 재조합 당전이 효소 MrGT2의 발현 정도를 확인하였다.

[0090] 발현이 확인된 재조합 단백질을 정제하기 위하여, 전술한 상등액을 50mM 인산 완충용액(0.3M NaCl, 20mM imidazole)으로 평형화된 탈론-금속 친화성 수지(Talon-metal affinity resin, Clontech, Mountain View, CA, USA)와 섞은 후 4℃에서 한 시간 동안 배양하였다. 2000rpm에서 5분간 냉장 원심분리한 후, 수지를 일회용 컬럼에 도입한 후, 수지 10배 용량의 20mM 이미다졸을 포함하는 인산 완충용액으로 세척하였다. 최종적으로 180mM 이미다졸을 포함한 인산 완충용액 3ml로 수지에 결합된 재조합 당전이 효소 MrGT2를 정제하였다.

[0092] **실시예 3: MrGT2 재조합 효소 반응에 의한 SERM 화합물들의 당전이 유도체로의 생전환, 분리 및 정제**

[0093] 본 실시예에서는 기존의 화학적 유기 합성법이 아닌 MrGT2를 이용한 효소적 생전환 방법으로 SERM 화합물들의 당전이 유도체를 제조하였다.

[0094] 기질로 사용되는 아피목시펜([Z]-afimoxifene, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국), 엔독시펜([E/Z]-endoxifen hydrochloride hydrate, Sigma-Aldrich) 그리고 4-하이드록시 토레미펜([E]-4-hydroxy toremifene, ~5% Z-isomer, Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, 캐나다)을 20mM 수준으로 디메틸설폭시드(dimethyl sulfoxide; 이하 DMSO)에 용해시켜 반응 완충용액(50mM 인산 완충용액, 10mM 염화마그네슘)으로 최종 1mM의 농도가 되게 각각을 희석한 후, 재조합 당전이 효소 MrGT2 25  $\mu$ M와 핵산당인 UDP-Glc, UDP-Gal 및 TDP-2'-deoxy-Glc 역시 각각 2mM의 수준으로 첨가하여 37℃에서 3시간 동안 당전이 효소 반응을 실시하였다(도 1). 즉, 당 수용체로 수산기 부가 SERM 3종을 그리고 당 공여체로 핵산당 3종을 반응시켜 효소적 생전환 반응 후, 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 6000rpm에서 10분간 원심분리한 후의 상층 유기 용매층만을 모아서 감압건조를 실시하였다. 상기 추출물 내 목적 화합물의 생합성 여부를 확인하기 위하여 HPLC-ESI-MS 분석을 수행 하였다. 이동상으로 메탄올:물:포름산 65:35:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 분당 120  $\mu$ l 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18(Waters, 50 x 1.0mm, 1.7  $\mu$ m; Milford, MA, USA)을 사용하여 분석하였다.

[0095] 한편, 상기 조추출물로부터 목적하는 당부가 SERM 유도체들의 분리 및 정제를 위하여 하기 콤비플래시 Rf MPLC 시스템을 적용하였다. 역상(reverse-phased) C18 카트리지에 메탄올:물:포름산 65:35:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 12ml의 속도로 흘러가는 MPLC 시스템에, 동일한 이동상 4ml에 용해시킨 전술한 조추출물을 주입한 후, 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분취하였다. 개별 분취를 다시 감압하여 농축한 후, 이온트랩 질량 분석기(LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)로 질량 스펙트럼을 분석함으로써 목적하는 당부가 SERM 유도체들을 분리하였다. 기질로 사용된 아피목시펜, 엔독시펜 그리고 4-하이드록시 토레미펜은 MPLC 시스템 상 약 13 ~ 15분의 유지 시간으로 분취되었고, 목적하는 당부가 유도체들은 기질보다 빠른 유지 시간인 10 ~ 12분으로 검출되었다. 이들 정제된 당부가 화합물은 도 1에 나타내었으며, 핵산당으로 UDP-Glc 당공여체를 이용한 생전환 반응의 수율은 적어도 50% 이상으로 반응이 일어났으나, UDP-Gal의 경우엔 30%(당수용체로 4-하이드록시 토레미펜) 내지 47%(당수용체로 엔독시펜) 사이였으며, TDP-2'-deoxy-Glc의 경우엔 그 생전환 수율이 18%(당수용체로 4-하이드록시 토레미펜) 내지 28%(당수용체로 아피목시펜) 수준으로 낮게 나타났다. 특히, 당수용체로 할로젠 기능기가 부가된 토레미펜의 경우에는 그 생전환 수율이 전반적으로 낮게 나타났으며 당공여체로 TDP-2'-deoxy-Glc의 경우에도 그 수율이 다른 당공여체에 비하여 상대적으로 낮게 나타난 바, 이는 당전이 효소의 당수용체 및 당공여체 기질들에 대한 특이성의 차이를 제시하였다.

[0096] NMR 시료들은 200  $\mu$ l의 DMSO-d6에 각 유도체들을 용해시킨 후, 5mm 시게미 어드밴스드 NMR 마이크로튜브(Shigemi advanced NMR microtube, Sigma, St. Louis, MO)에 상기 용매를 방치시킴으로써 제조하였다. <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼은 배리언(Varian) INOVA 500 분광광도계를 이용하여 298K에서 획득하였고, 화학적 이동은 내부 준거로서 TMS를 이용하여 ppm으로 기록되었다. 모든 NMR 데이터 산출은 Mnova Suite 5.3.2 소프트웨어를 이용하여 수행하였고, 당부가 SERM 유도체들의 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼을 기질로 사용한 SERM들과 비교하였다.

[0097] 아피목시펜 4-O-글루코사이드 (AG; 26mg; 생전환율 66%; <sup>13</sup>C NMR [125 MHz, DMSO-d6]  $\delta$  13.3, 27.2, 47.2, 60.5, 62.0, 66.1, 71.5, 73.1, 76.7, 81.3, 108.9, 114.2, 126.6, 127.6, 127.9, 128.5, 129.2, 131.4, 139.5, 156.4, 158.5)

[0098] 엔독시펜 4-O-글루코사이드 (EG, 24.7mg; 생전환율 59%; <sup>13</sup>C NMR [125 MHz, DMSO-d6]  $\delta$  13.3, 27.0, 36.1, 51.8, 62.1, 68.6, 71.4, 73.2, 76.7, 81.3, 190.0, 114.2, 126.6, 127.6, 127.9, 128.5, 129.2, 131.4,

139.4, 156.2, 158.3)

- [0099] 토레미펜 4-*O*-글루코사이드 (TG, 20.4mg; 생전환율 51%;  $^{13}\text{C}$  NMR [125 MHz, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  35.7, 42.7, 47.1, 60.5, 62.1, 66.2, 71.3, 73.3, 76.7, 81.4, 190.1, 114.3, 126.5, 127.8, 128.3, 129.1, 131.5, 139.4, 156.4, 158.2)
- [0100] 아피목시펜 4-*O*-갈락토사이드 (AGL, 16.8mg; 생전환율 44%;  $^{13}\text{C}$  NMR [125 MHz, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  13.3, 27.2, 47.2, 60.5, 62.3, 66.1, 71.6, 73.1, 76.9, 81.4, 108.9, 114.2, 126.6, 127.6, 127.9, 128.5, 129.2, 131.4, 139.5, 156.4, 158.5)
- [0101] 엔독시펜 4-*O*-갈락토사이드 (EGL, 18.7mg; 생전환율 47%;  $^{13}\text{C}$  NMR [125 MHz, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  13.3, 27.0, 36.1, 51.8, 62.4, 68.6, 71.6, 73.2, 76.9, 81.5, 190.0, 114.2, 126.6, 127.6, 127.9, 128.5, 129.2, 131.4, 139.4, 156.2, 158.3)
- [0102] 토레미펜 4-*O*-갈락토사이드 (TGL, 11.9mg; 생전환율 30%;  $^{13}\text{C}$  NMR [125 MHz, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  35.7, 42.7, 47.1, 60.5, 62.1, 66.2, 71.3, 73.3, 76.7, 81.4, 190.1, 114.3, 126.5, 127.8, 128.3, 129.1, 131.5, 139.4, 156.4, 158.2)
- [0103] 아피목시펜 4-*O*-2 '-디옥시 글루코사이드 (ADG, 11.1mg; 생전환율 28%;  $^{13}\text{C}$  NMR [125 MHz, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  13.3, 27.2, 37.4, 47.1, 60.5, 62.2, 68.9, 71.2, 81.1, 104.5, 114.2, 126.6, 127.6, 127.9, 128.5, 129.2, 131.4, 139.5, 156.4, 158.7)
- [0104] 엔독시펜 4-*O*-2 '-디옥시 글루코사이드 (EDG, 8.9 mg; 생전환율 23%;  $^{13}\text{C}$  NMR [125 MHz, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  13.3, 27.0, 36.2, 37.5, 51.8, 62.2, 68.8, 71.6, 81.2, 104.2, 114.2, 126.6, 127.6, 127.9, 128.5, 129.2, 131.4, 139.4, 156.2, 158.6)
- [0105] 토레미펜 4-*O*-2 '-디옥시 글루코사이드 (TDG, 6.8mg; 생전환율 18%;  $^{13}\text{C}$  NMR [125 MHz, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  35.8, 37.4, 42.7, 47.0, 60.5, 62.1, 66.2, 68.8, 71.3, 81.3, 104.2, 114.3, 126.5, 127.8, 128.3, 129.1, 131.5, 139.4, 156.6, 158.5)
- [0107] **실시예 4: 당전이 SERM 유도체들의 에스트로겐 수용체  $\alpha$  (ER  $\alpha$ )에 대한 결합 친화도 검증**
- [0108] 생전환 된 당전이 SERM 유도체들의 에스트로겐 수용체  $\alpha$  (ER  $\alpha$ )에 대한 결합 친화도(binding affinity)를 검정하기 위하여 NR peptide ER  $\alpha$  ELISA 키트(ActiveMotif, Carlsbad, CA, 미국)를 사용하였으며, 항진(agonist) 활성 및 길항(antagonist) 활성 대조군으로 각각 에스트라디올( $17\beta$ -estradiol)과 타목시펜을 이용하였다. 세부적인 실험 방법은 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. DMSO에 용해된 각 대조구들을 키트 내 포함되어 있는 완충용액으로 희석하여 25  $\mu\text{M}$  수준으로 준비하였고, 96-웰 마이크로플레이트(96-well microplate) 내 각각의 웰 당 키트 제조사의 프로토콜에 따라서 핵 추출물(nuclear extract)을 15  $\mu\text{g}$  수준으로 첨가하였다. 한편, 당부가 유도체들의 경우에도 25  $\mu\text{M}$  수준으로 시료를 준비하였다. 에스트로겐 수용체  $\alpha$  (ER  $\alpha$ )에 대한 활성도는 최종 흡광도 450nm의 마이크로플레이트 리더(microplate reader)로 정량화 하였으며, 모든 검정은 최소 삼 반복의 평균 값 및 표준 편차로 표시하였다.
- [0109] 그 결과, 양성 길항 대조구인 타목시펜은 25  $\mu\text{M}$  수준에서 ER  $\alpha$ 에 대한 길항 활성이 뚜렷이 나타났으며, 당부가 SERM 유도체 총 6종(아피목시펜 및 엔독시펜 당부가 유도체들 [AG, AGL, ADG, EG, EGL 및 EDG])의 경우에 모두 25  $\mu\text{M}$  수준에서 통계적으로 유의한 길항 활성을 보였고, 토레미펜 당부가 유도체 3종(TG, TGL 및 TDG)에 있어서는 타목시펜에 비하여 상대적으로 낮은 길항 활성을 나타내었다(도 2). 이러한 결과는 상기 당부가 유도체들이 검정 시 첨가되는 핵 추출물 내 ER  $\alpha$  외에 존재하는 대사 효소계(즉, 글루코시다아제[glucosidase]나 갈락토시다아제[galactosidase] 등을 포함)의 반응을 통하여 당부가 이전의 4-하이드록시 SERM들로 대사되어 길항 활성을 제공하고 있음을 제시하고 있다. 한편, 토레미펜 당부가 유도체 3종의 경우에는 대사체인 4-하이드록시 토레미펜의 길항 활성이 양성 대조구인 타목시펜의 대사 후 활성 대사체인 아피목시펜과 엔독시펜의 길항 활성보다 낮게 나타나고 있음을 확인하였다.
- [0110] 따라서, 본 발명의 당부가 SERM 유도체들은 에스트로겐 수용체  $\alpha$  (ER  $\alpha$ )에 대하여 모두 일정 수준 길항 활성을

보이고 있으며, 토레미펜 당부가 유도체 3종의 경우에만 양성 대조구인 타목시펜에 비하여 낮은 길항 활성을 나타낸 반면 나머지 아피목시펜 및 엔독시펜 당부가 유도체들의 경우엔 타목시펜과 유사한 길항 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0112] 실시예 5: 당부가 SERM 유도체들의 생체이용률 비교

[0113] 상기 실시예 3에서 생성된 당부가 SERM 유도체들의 생체이용률을 자궁 절개된 실험 쥐 모델을 활용하여 기존 임상 이용 중인 타목시펜과 아피목시펜을 대조구로 하여 비교하고자 하였다. 세부적인 실험은 아래와 같이 진행하였다. 약 150g 정도의 암컷 쥐에 자궁 절개 수술을 행한 일주일 후 본 실험에 활용되었다. 4마리를 각각의 하나의 처리 그룹으로 설계하여 총 열개 그룹(즉, 한 그룹은 플라시보[placebo]이며, 세 그룹은 타목시펜, 아피목시펜 및 엔독시펜 처리 대조 그룹들로, 나머지 여섯 그룹은 각각 AG, EG, AGL, EGL, ADG 및 EDG 처리 그룹)으로 하여 투약 전 체중을 측정하였다. 하루에 한번 3 $\mu$ mole 수준으로 경구 투여로 일주일을 지속한 후, 마지막 투여 후 24시간 이후 각 그룹 내 쥐들의 체중을 측정하는 동시에 채혈을 실시하였다. 채혈 후, 전혈에 동일 부피의 에틸아세테이트로 처리하여 30초간 강하게 혼합한 후, 4000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이후, 유기용매 상층을 분리하여 감압건조한 후 분석 전까지 70℃에 보관하였다. 혈중 활성대사체인 아피목시펜 및 엔독시펜의 정량은 본 발명에서 제시한 HPLC-ESI-MS 기기분석으로 실시하였다.

[0114] 그 결과, 투여 전 쥐의 체중은 모든 그룹에서 동일하게 나타났으나, 마지막 투여를 마친 후 24시간 후에 각 그룹들의 평균 체중을 측정한 바, 플라시보 투여 그룹에서 체중의 증가(약 30~40g 정도)를 확인하였다. 한편, 타목시펜의 활성대사체인 아피목시펜과 엔독시펜의 혈중 농도는 타목시펜 대조 그룹과 비교하여 아피목시펜과 엔독시펜 처리 두 개 대조 그룹과 나머지 당부가 유도체를 투여한 여섯 그룹을 포함한 총 여덟 개 그룹에서 아피목시펜 및 엔독시펜의 혈중 농도가 높게 나타남을 확인 할 수 있었다(도 3). 또한, AG, AGL 및 ADG 처리 세 그룹의 경우 그 대조구인 아피목시펜 처리 그룹과 비교하여 혈중 아피목시펜의 농도가 높게 나타났고, 마찬가지로 EG, EGL 및 EDG 처리 세 그룹의 경우에도 그 대조구인 엔독시펜 처리 그룹에 비하여 혈중 엔독시펜의 농도가 높게 나타났다. 이는 상기 실시예 4의 결과와 마찬가지로 당부가 유도체들이 활성대사체인 아피목시펜과 엔독시펜으로 대사되는 프로드럭의 기능이 가능함을 보여주고 있을 뿐만 아니라, 당부가 유도체들의 경우 활성 대사체의 직접적인 경구 투여보다 혈액 순환계에 상대적으로 오랜 기간 잔존할 수 있음을 시사하고 있는바, 기존 타목시펜의 장기 투여에 따른 부작용을 일부 개선 가능할 수 있을 것으로 기대된다.

[0116] 상기 실시예 3에서 생전환된 당부가 SERM 유도체들은 실시예 4 및 5에서 확인한 바와 같이, ER에 대한 일부 인 비트로(in vitro) 길항 활성을 보이는 동시에, 당 부가 전 원래 화합물들과 비교 시 한정된 실험동물을 대상으로 생체이용률이 향상됨을 확인할 수 있던 바, 유방암 예방 및 치료 목적의 의약품으로 응용화가 가능한 동시에 기존 SERM 특히 타목시펜의 장기 투여에 따라 발생하는 골다공증 및 일부 자궁암의 발병 위험성 등의 부작용을 감소시킬 수 있는 신규 의약품 제형으로 활용이 가능할 것이다. 따라서, 기존 건강기능성 및 약리 활성 화합물의 당 전이에 의한 구조 변경을 통하여 기존 화합물을 개량할 수 있으며, 이러한 개량화로서 기존 약물의 대체 가능한 프로드럭화 및 신규 제형(dosage form)으로의 응용 가능성을 포함하는 다양한 건강기능식품 혹은 의약품 원료로서의 활용 잠재성을 확인할 수 있었다.

[0117] 이에, 상기 실시예에서 생성된 화합물에 대하여 하기와 같이 제제화하였다.

[0119] 제제예 1 : 정제 (직접 가압)

[0120] 화합물 5.0mg을 체로 친 후, 락토스 14.1mg, 크로스포비돈(USNF) 0.8mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.1mg을 혼합하고 가압하여 정제로 제조하였다.

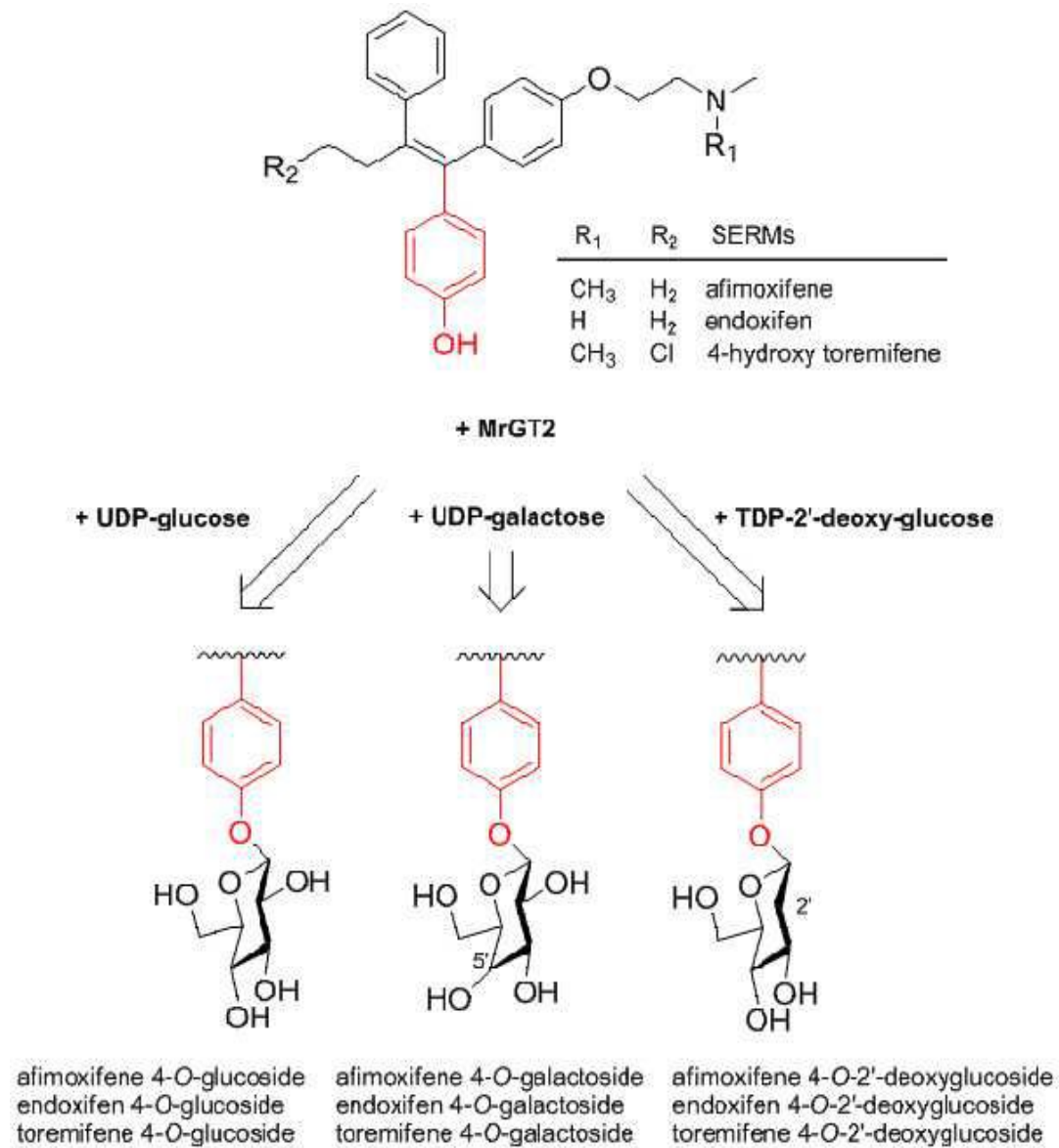
[0122] 제제예 2 : 정제 (습식 조립)

[0123] 화합물 5.0mg을 체로 친 후, 락토스 16.0mg과 녹말 4.0mg을 섞었다. 폴리솔베이트 800.3mg을 순수한 물에 녹인 후, 이 용액의 적당량을 첨가하여 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후, 콜로이달 실리콘 디옥사이드 2.7mg 및 마그네슘 스테아레이트 2.0mg과 혼합하였다. 상기 혼합물을 가압하여 정제로 제조하였다.

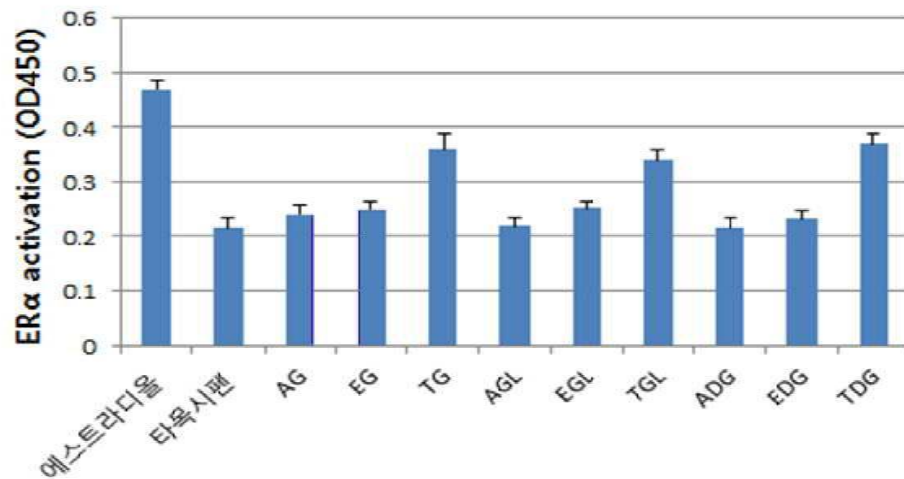
- [0125] 제제예 3 : 분말과 캡슐제
- [0126] 화합물 5.0mg을 체로 친 후에, 락토스 14.8mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.2mg과 함께 혼합하였다. 상기 혼합물을 캡슐 제조기를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.
- [0128] 제제예 4 : 주사제
- [0129] 활성 성분 100mg에 만니톨 180mg,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  26mg 및 증류수 2974mg을 함유시켜 주사제를 제조하였다.
- [0131] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

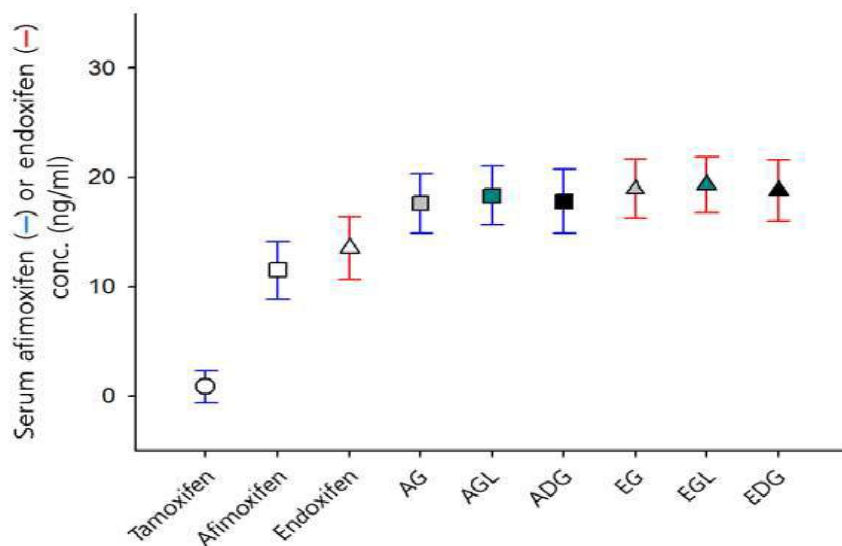
도면1



도면2



도면3



## 서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Preparing Glycosylated Estrogen Receptor Modulators  
Using Glycosyltransferase
- <130> P15-B199
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 32
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P1

<400> 1

ggcatatgat ccacgcgcac gacttccgga tg 32

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2

<400> 2

cgctcgagat tcggcctgcg cctccacgt cca 33

<210> 3

<211> 1146

<212> DNA

<213> Micromonospora rhodorangea

<400> 3

atgcgcaccc tcagcgccac cgccggcccg cggggcgacg gggccccgta caccggccgc 60

ggcgcgggccc ggcgggcgcg ggggcacgac gtggccgtcg ccacgaccga cacgtcggcc 120

cgagtggtec gggagccccg gccagggttc cgggccctcc cggccgacca ccgcgcgcac 180

gcgggctggc ggccccaccg cgaggtcgtg cgcgcggccg gcgggcaccg cggaactccg 240

ccagccgttc gccgacgcgc cgtctcggag ggcacggacc tccggcccg gccgacgacc 300

accgcgcgcg tcgggtggct cagcggcgag gcgacggccc cccgggacct ccggcgcgac 360

caccagccca ccgccaccac cgccgacggc ccgccggtcg tcaccggcg gcgtccctg 420

ggcgggcccc gcaaccgcac ggccggccgc ctggccctgc gcatggccga ccggatctac 480

gccgaggccg tcgcgcgcct gcgggagcgg ctgtgcctgc cggcgctgtc cgcggcccg 540

atgccggcg ggagggagcg ggccggctgg ccgtctctgc acggcttcgg cacggccctc 600

gtcccggcg cgccgactg gcgccccggc ctcgaggtcg tcgggcccgt gtggccgcac 660

cacgacgccg gcgagcgct gccctcggaa ctcgaggact tcctggacgc gggaccgcgg 720

ccggtcctgg tcgcttcgg cagcatggcc gcccggcacg gcgagcggct cagcgaactg 780

gcggtgcgcg cgtgcgcgc cgccggcctc cggggcatcc tccagtccgg caacgcctgc 840

ctcgcgccgg agggcgacga cgtcctgacg gtccggcgacg tccccacgc ctcctgttc 900

ccccggtcg cggcgggtgt gcaccacgc cgccggcacc agcggccga ccctgcgggc 960

ggccgtaccc tcggtggcgg tcccggtagac cgccgaccag agccgttctg ggccggccgg 1020  
ctggcgcgga tccggggcgc ccagccccg gtcccttca cgtcgtcggc gacgaggcgt 1080  
acgcgcgggc ccctgggccc cgccgccccg gacctggccg cggaggacgg cgccgcgcgc 1140

gtgtga 1146

<210> 4

<211> 381

<212> PRT

<213> Micromonospora rhodorangea

<400> 4

Met Arg Thr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Pro Arg Gly Asp Gly Ala Pro

1 5 10 15

Tyr Thr Gly Arg Gly Ala Ala Arg Arg Arg Ala Gly His Asp Val Ala

20 25 30

Val Ala Thr Thr Asp Thr Ser Ala Arg Val Val Arg Glu Pro Gly Pro

35 40 45

Gly Phe Arg Ala Leu Pro Ala Asp His Arg Ala His Ala Gly Trp Arg

50 55 60

Pro His Arg Glu Val Val Arg Ala Ala Gly Gly His Arg Gly Thr Pro

65 70 75 80

Pro Ala Val Arg Arg Arg Ala Val Ser Glu Gly Thr Asp Leu Arg Pro

85 90 95

Arg Pro Thr Thr Thr Ala Pro Leu Arg Trp Leu Ser Gly Glu Ala Thr

100 105 110

Ala Pro Arg Asp Leu Arg Arg Asp His Gln Pro Thr Ala Thr Thr Ala

115 120 125

Asp Gly Pro Pro Val Val Thr Gly Ala Arg Ser Leu Gly Arg Pro Gly

130 135 140

Asn Arg Thr Ala Gly Arg Leu Ala Leu Arg Met Ala Asp Arg Ile Tyr

145 150 155 160

Ala Glu Ala Val Ala Arg Leu Arg Glu Arg Leu Cys Leu Pro Pro Leu

165 170 175

Ser Ala Ala Ala Met Pro Ala Arg Gln Glu Arg Ala Gly Trp Pro Val

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Leu His Gly Phe Gly Thr Ala Leu Val Pro Arg Pro Ala Asp Trp Arg |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Pro Gly Leu Glu Val Val Gly Pro Trp Trp Pro His His Asp Ala Gly |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Glu Arg Leu Pro Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Asp Ala Gly Pro Arg |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Pro Val Leu Val Arg Phe Gly Ser Met Ala Ala Arg His Gly Glu Arg |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| Leu Ser Glu Leu Ala Val Arg Ala Leu Arg Arg Ala Gly Leu Arg Gly |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| Ile Leu Gln Ser Gly Asn Ala Cys Leu Ala Ala Glu Gly Asp Asp Val |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| Leu Thr Val Gly Asp Val Pro His Ala Leu Leu Phe Pro Arg Leu Ala |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| Ala Val Val His His Ala Arg Arg His Gln Arg Arg Asp Pro Ala Gly |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Gly Arg Thr Leu Gly Gly Gly Pro Gly Asp Arg Arg Pro Glu Pro Phe |     |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |     |
| Trp Ala Gly Arg Leu Ala Arg Ile Arg Ala Ala Pro Ala Pro Val Pro |     |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |     |
| Phe Thr Ser Ser Ala Thr Arg Arg Thr Arg Gly Pro Leu Gly Arg Arg |     |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |     |
| Arg Pro Asp Leu Ala Ala Glu Asp Gly Ala Ala Arg Val             |     |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |     |