생합성과 유기합성 융합을 통한 천연물 전합성 기술 개발동향



이화여자대학교 윤여준 교수

1. 개요

천연물 전합성(total synthesis)은 의약화학과 매우 밀접한 관계에 있다. 현존하는 대 다수의 약물들이 자연계에 존재하는 화합물의 구조에 기초하고 있으며, 다양한 종류의 미생물 및 식물로부터 새로운 생리활성물질을 찾으려는 노력을 경쟁적으로 진행하고 있다. 그리고 이들을 최종목표인 신약으로 개발하기 위해서는 분자구조와 생활성도와 의 관계(Structure-Activity Relationship; SAR)를 검색하는 과정과 최종 목표화합물 을 저렴하고 대량으로 합성하는 방법의 개발이 필요한데 이 과정에서 천연물 전합성 기술이 핵심적인 역할을 한다.

Epothilone 유도체인 ZK-EPO와 Halichondrin B 유도체인 eribulin은 천연물 전합성 에 의한 대표적인 예라고 할 수 있다 (그림 1). ZK-EPO는 Schering AG(현 Bayer AG)사가 천연 항암물질로 알려진 epothiolone을 기반으로 치료용 항암제 후보물질를 개발하는 전합성 프로그램의 결과물이다 (Kirschning and Hahn, 2012). Eribulin은 Eisai사에 의해 개발되었고, 2010년 말에 말기 유방암 치료제로 미국 FDA에 인증받았 다. 천연물 유도체의 전합성을 통한 치료제 개발이 입증되었음에도 불구하고, 천연물 유래 선도물질의 다양한 유도체를 개발하는데 있어 어려움을 갖고 있다. 주요 원인으 로는 천연물 고유 성분의 복잡한 구조형태로 인해서, SAR 연구를 위한 충분한 양을 공급할 수 있는 전합성을 활용하는데 한계가 있기 때문이다. 천연물과 유도체들의 복 잡한 구조로 인해서, 이들을 합성하는데 있어서 최소 단위의 매우 집약된 합성 경로를 계획하게 된다. 하지만, 이런 전략은 자연(Nature)이 다양한 peptide류, polyketide(PKS)류, 및 terpene류를 만들어왔던 고도의 linear multistep의 생합성과정 과는 극명하게 대비되는 것이다.



그림 1. 대표적인 천연물 의약품인 전합성 유도체 ZK-EPO와 eribulin (Kirschning and Hahn, 2012)

최근 유기합성에 있어서도, miniaturized flow reactors를 포함하는 "연쇄반응방법"이 도입함으로써, 자연계에서처럼 화학양론적으로 분리되지 않는 중간체들을 거쳐 일어나 는 것과 비슷한 '다단계 합성법'을 시도하고 있다. 이와 함께, 복잡한 이차대사산물의 생합성경로에 대한 이해가 깊어지고, 유전자상에서 생합성경로를 다룰 수 있는 분자생 물학 기술 발전으로 인해, 천연물과 그 유도체들에 대한 전합성은 보다 탄력을 받고 있다.

전략적 관점에서, 이런 유기합성(chemical synthesis, CHEM)과 생합성 (biosynthesis, BIO)의 융합은 다양한 천연물과 유도체들을 얻는데 있어서 매우 유연 한 방법을 제시하고 있다. 본질적으로, CHEM-BIO 융합기술을 통한 전합성 방법들은 진화를 통해 발전되어온 자연계 일련의 전략과 매우 유사하다고 할 수 있다.

본 보고서에서는 대표적인 예들을 중심으로 CHEM 및 BIO의 다양한 융합 방식을 통 한 천연물 유도체를 생산하는 전합성 연구동향에 대해 고찰해 보고자 한다.

2. 유기합성과 생합성 병합을 통한 전합성 전망

2.1. 반합성(semi-synthetic approaches, BIO-CHEM)

BIO-CHEM 합성법은 간단한 반합성으로써, 천연소재(물)나 fermentation으로 얻어 진 물질(BIO, 전구체)을 반합성(CHEM)하여 유도체화하는 것이다. 이 방법의 장점으 로는 천연물의 일반적인 생합성 접근을 통해 밝혀진 특정 작용기전적 골격을 이용할 수 있다는 것이다. 대표적인 예로는 taxol (paclitaxel)의 반합성적 유도체인 taxotere 의 생산이다 (Nicolaou et al, 1994). 또한, 반합성으로 얻어진 생산물을 enzymatic transformation 혹은 fermentation 하는 BIO-CHEM-BIO 방법을 통해 더 변형함으로 써, 새로운 천연물 유도체의 생산이 가능해지고 있다.



그림 2. 대표적인 반합성(BIO-CHEM)에 의한 taxotere (Nicolaou et al, 1994)

2.2. Mutasynthesis & Enzymatic Transformation (CHEM-BIO)

CHEM-BIO는 전형적인 전구체형 생합성(precursor-directed biosynthesis) 또는 mutasynthesis를 의미한다. Mutasynthesis는 가장 근대적인 기술로써, 일정 생합성 구 간이 막힌 돌연변이체에 새로운 유기합성전구체(CHEM)를 넣어주어, 새로운 대사체들 을 만들게 된다. 이에 대한 예로, rhizoxin는 강한 세포독성을 보이는 Burkholderia rhizoxinica에서 만들어지는 PKS-NRPS(nonriboxomal peptide synthase) 기반의 이차 대사산물이다. Hertweck 등은 N-acetylcysteamine(SNAC)의 thiazole 유도체(CHEM) 를 만들어, rhi PKS-NRPS에서 oxazole 형성에 관여하는 rhiA를 지운 돌연변이체 (BIO)에 공급-배양하였다 (Kusebauch et al, 2011). 이를 통해, oxygen/sulfur 치환 된 새로운 rhizoxin화합물인 thiazole 유도체를 얻을 수 있었다 (그림 3).



그림 3. CHEM-BIO의 대표적인 예: oxazole 형성에 관여하는 *rhiA*를 지운 돌연변이 체를 이용하여, thiarhizoxin의 합성 (SNAC=*N*-acetylcysteamine) (Kusebauch et al, 2011)

2.3. 유기합성-생합성-유기합성 (CHEM-BIO-CHEM)



그림 4. CHEM-BIO-CEHM의 모식도 (A=전구체, B=합성전구체, C-E=생 합성중간체, F=천연물 또는 유도체, a-d=효소) (Taft et al, 2008)

Mutasynthesis의 발전된 방법으로, 반합성유도체화를 위한 fermentaion product에 chemical entities를 도입함으로써 다양한 천연물유도체들을 생산할 수 있다.

항종양억제제 Ansamitocin P3 생산균주인 Actinosynnema pretiosum에서 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) 생합성 기능이 소실된 돌연변이체를 이용 한 mutasynthesis를 통해 새로운 유도체를 얻었다. Kirschning 그룹에서는 암세포막의 folic acid receptor를 인지하는 목표 특이적인 Ansamitocin P3를 개발하기 위하여, 3-amino-4-bromobenzoic acid를 합성(CHEM)하여 A. pretiosum 돌연변이체 배양액 에 공급하여 bromo-ansamitocin 유도체를 얻은 뒤(BIO), 이를 Pd 촉매하에 일어나는 Stille-coupling 반응과 Sonogashira-coupling 반응의 cross coupling 기질로 사용 (CHEM)하여 ansamitocin P3의 유도체 "cancer-specific folic acid/ansamitocin conjugate"를 생산하였다 (Kirschning et al, 2008).

돌연변이체가 아닌, NRPS의 특이적인 module만을 이용하여 CHEM-BIO-CHEM을 이용하기도 한다. Koketsu 그룹은 saframycin 생합성과정 중, 특이적 NRPS module인 SfmC만을 이용하여, 새로운 saframycin 유도체를 생산하였다. 먼저 필요한 골격의 tyrosin 유도체, dipeptidyl aldehyde를 유기합성(CHEM)하고, 이 두 화합물을 1당량씩 holo-SfmC를 ATP와 NADH와 함께 배양(BIO)하여 "중간체1"를 얻고, 중간체1에 다 시 tyrosin 유도체를 각 1당량씩 넣어, holo-SfmC에서 동일한 조건에서 배양(BIO)하 여 saframycin 전구체를 얻었다. 얻어진 saframycin 전구체는 KCN을 이용한 유기합성 (CHEM)을 통해 니트릴(-CN)로 치환시켜 새로운 saframycin유도체를 합성하였다 (Cuevas et al, 2000). 이 구조는 항종양제인 ecteinascidin 743(ET-743), phthalascidin 650(Pt-650)와 비슷한 중심구조를 갖는 알칼로이드의 구조적인 특징을 가짐으로써, 다양한 관련 유도체를 만드는데 매우 중요한 합성법을 제공한다 (그림 5).



그림 5. 특이적 NPRS 모듈 SfmC을 이용하여, 유기합성된 전구체로부터 saframycin 핵심골격을 생합성 후, 2단계의 Picket-Spengler 연쇄반응을 통해 saframycin 중간체를 합성. (C=condensation domain, A=adenylation domain, PCP=peptidyl carrier protein, R=reduction domain) (Cuevas et al, 2000)

2.4. 생합성-유기합성-생합성 (BIO-CHEM-BIO)

BIO-CHEM-BIO는 발전된 반합성방법으로써, BIO-CHEM(반합성)를 통해 얻어진 천연물유래 반합성 유도체를 전구체로 하여, enzymatic transformation을 시키거나 mutasynthesis를 생합성 유전자에 투입/배양(BIO)하여 새로운 천연물유도체들을 생산 하는 방법이다. 이러한 mutasynthesis에는 '유전자 disruption'과 '유전자 exchange 혹 은 modification'등이 이용된다. '유전자 disruption'의 특징은 적합한 전구체 (BIO-CHEM)에 의해서만 만들어지는 특정 천연물유도체가 만들어지는 반면, '유전자 exchange 혹은 modification'에 의한 결과로는, 전구체로부터 다양한 유도체 군을 형성 할 수 있어, 천연물유도체 라이브러리를 구축할 수 있는 장점이 있다. 또한 이 경우 혼 합물의 형태로 생산되기 때문에, 크로마토그래피를 통해서, 타켓 화합물을 분리해야만 하는 단점도 있다. 유전자 exchange 혹은 modification 접근을 통한 BIO-CHEM-BIO synthesis의 대 표적 예는 avermectin PKS의 loading module을 erythromycin 생산 PKS [6-deoxyerythronolide B synthase (DEBS)]의 첫 번째 multienzyme 구성부분에 접 목시킨 것이다 (그림 6). 자연적으로 매우 큰 유연성을 지닌 avermectin PKS 의 loading module은 40여개 이상의 다른 카르복실산(Carboxylic acid)을 받아들이는 것 으로 알려져 있기에, 이러한 module exchange를 통해 얻은 hybrid system 균주(BIO) 에 적절한 starter acids를 합성(CHEM) feeding하여 새롭고 다양한 erythromycin 유 도체들을 hybrid 균주(BIO)로부터 얻을 수 있었다 (Pacey et al, 1998; Goss and Hong, 2005).



그림 6. BIO-CHEM-BIO를 이용한 erythromycins 생산. Erythromycin 생산 PKS loading 모듈을 대신하여, 자연적으로 매우 큰 유연성을 지닌 avermectin PKS loading 모듈로 치환 후, 다양한 측쇄를 지닌 erythromycin 합성. (Goss and Hong, 2005)

2.5. 조합생합성 (BIO-BIO)

유전자변형된(Engineered) 유기체를 기반으로 하는 조합생합성은, CHEM-BIO와 비 교하여 생합성에 필요한 전구체를 자체 공급하여 천연물 유도체를 생산할 수 있다는 특징이 있다. 조합생합성(BIO-BIO)을 통한 전합성 방법으로는, 다기능성 단백질 (multifunctional proteins)의 enzymatic 도메인들을 재조합 배열하는 방법과 다른 생 합성 경로를 가진 개체로부터 특정 효소를 암호화하는 유전자를 가져와 이종 숙주에 도입하여 생산하는 방법을 사용한다. 단, 도입될 유전자는 발현될 생합성 경로에서도 잘 작동할 수 있는 것이라야 한다.

Halogenated 천연물이 조합생합성에 의해 생산된 예가 보고되어 왔다. chlorobiocin 생합성에 기여하는 halogenase 유전자는 원래균주로부터 분리되어, 구조적으로 chlorobiocin과 비슷한 novobiocin 유도체의 생합성에 이용되었다. 그 결과, novobiocin 의 메틸기(-CH₃)가 염소기(-Cl)로 치환된 novclobiocin가 생성되었다. 비슷하게, rebeccamycin로부터의 chlorinase는 revbeccamycin의 구조적 유사체인 staurosporine 에 (-Cl)를 도입하여 chlorinated staurosporine analogue를 생성한 예도 있다 (그림 7) (Olano et al, 2010; Eustáquio et al, 2003).



Clorobiocin R = 5-methyl-1H-pyrrolyl, X = Cl Novobiocin R = NH₂, X = Me Novclobiocin R = NH₂, X = Cl



Rebeccamycin X = Cl, Y = O, R^1 = H, R^2 =

Staurosporine X = H, Y = H₂, R¹-R²=



- chlorinated analogue of staurosporine X = Cl, Y = H₂, R¹ = R² = H
- 그림 7. 조합생합성 (BIO-BIO)을 통한 chlorobiocin halogenase를 이용한 novobiocin 유도체 합성 및 rebeccamycin chlorinase를 이용한 staurosporine 유도체 합성. (Olano et al, 2010; Eustáquio et al, 2003)

한편, Salas 연구팀에서는 특이적 aureolic core를 가지는 비슷한 구조의 대사산물인 chromomycins과 mithromycin이 강한 항암효과를 지님에도 불구하고 부작용을 지녀 널리쓰이지 못함에 착안해, 변형된 alkyl side chain을 가진 유도체들을 조합생합성을 통해 합성하였다 (그림 8). 이들은 모체골격에 비해 강한 DNA 결합 활성을 가짐으로 써 전사인자의 promoter에의 결합을 막아 강력한 항증식 활성을 보이나 독성은 감소 된 것을 보고하였다. 또한, 새로운 유도체들의 DNA의 결합에 관한 분석은, 이 결합과 정이 엔트로피적으로도 우세함을 보여주었다 (Barceló et al, 2010).



그림 8. 조합생합성(BIO-BIO)으로 새로운 mithramycin 및 chromomycin 알킬 유도 체 합성 (MTA=mithramycin, MSK=mithramycin SK, MSDK=mithramycin SDK, MSA=mithramycin SA, CRO=chromomycin, CSK=chromomycin SK, CSDK=chromomycin SDK, CSA=chromomycin SA) (Barceló et al, 2010)

2.6. Chemogenetics (BIO-BIO-CHEM)

CHEM과 BIO의 다양한 조합은 구조적 다양성을 가진 천연물 유도체의 합성을 가능케 하 는데, Kirschning 연구팀에서는 BIO-BIO-CHEM의 관점에서 접근하여 ansamitocin 유 도체를 합성하였다 (그림 9). Chlorinase와 carbamoyl transferase의 기능이 소실되어 모든 post-PKS transformations 기능이 상실된 ansamitocin 생산균주 A. pretiousum 의 fermentation으로부터 생산물인 proansamitocin을 얻었고(BIO), 이를 Hsp90 생산균주로 AHBA 생산이 막힌 돌연변이체인 inhibitor geldanamycin S. hygroscopicus에 투여하였다. 그 결과, C7위치가 carbamoylation된 proansamitocin derivative를 생산하였고(BIO), 이어진 두 스텝의 화학반응을 통해 선택적으로 C3위치 에 isobutyrate를 도입할 수 있었다(CHEM). 이는, 각기 다른 천연물의 생산균주 돌연 변이들조차 특정 천연물 유도체 합성을 위한 새로운 방법으로 사용될 수 있음을 보여

주는 극적인 예이다 (Eichner et al, 2012a; Eichner et al, 2012b).



그림 9. BIO-BIO-CHEM 대표적인 예 : 2개의 다른 돌연변이 균주 *A. pretiousum* 와 *S, hygroscopicus*를 순차적으로 배양하여 생합성을 하고, ansamitocin 중 간체 C3위치에 ester 측쇄를 선택적으로 합성/도입하여 ansamitocin P3 유 도체를 합성. (DIC=diisopropylcarbodiimide, DMAP=4-dimethylaminopyridine) (Eichner et al, 2012a)

한편, 2010년 Goss 등은 chemogenetic 접근을 통하여 uridyl peptide 항생제 pacidamycin 유도체를 생산하였다. *Streptomyces coeruleorubidus*로부터 생산되는 pacidamycin은 그람음성균 *Pseudomonas aeruginosa* 에 강한 활성을 가지는 특이구조 의 화합물로, halogenated uridyl peptide 유도체는 자연적으로 존재하지 않는다. Pyrrolnitrin 생합성경로로부터의 tryptophan 7-halogenase gene '*prnA*'을 integration vector에 클로닝하여(**BIO**) *S. coeruleorubidus*에 도입·발현(**BIO**)함으로써, chlorinated pacidamycin을 확보하였다. 형성된 염소기(-Cl)는 추후 다양한 functional group의 특

정위치로의 도입을 위한 handle로 사용될 수 있기에, 추가적 chemical reaction(CHEM)을 통해 결국 다양한 R그룹을 포함한 pacidamycin 를 생산하였다. 이 는 화학적 protecting group의 도입이 필요치 않은 채 효과적으로 선택적 위치에서 천 연물의 modification을 가능하게 하였다 (Deb Roy et al, 2010).



그림 10. BIO-BIO-CHEM을 통한 pacidamycin 유도체 생산. Pyrrolnitrin 생합성경 로로부터의 tryptophan 7-halogenase gene '*prnA*'을 integration vector에 클로닝하여 *S. coeruleorubidus*에 도입·발현하여 chlorinated pacidamycin을 확보. 형성된 염소기(-Cl)에 다양한 functional 그룹을 포함한 pacidamycin 를 생산. (Deb Roy et al, 2010)

3. 고찰

다양한 생리활성을 지니는 천연물 유도체의 생산은, 해당물질의 구조-활성 관계 (SAR) 규명을 비롯하여 천연물과 목표 biomolecule과의 상호작용에 대한 분석을 가능 하게 한다. 한편, 해당 천연물의 활성을 조절하고 생물학적 이용효능을 향상시키기 위 해서도 유용천연물 유도체의 생산은 필수적이다. 유전자 분석 비용과 유전자 분석 시 간의 감소, 빠르고 쉽게 유전자 knock-out을 가능하게 하는 효율적 플라스미 드·inducible promoter·산업균주를 비롯한 새로운 생합성 방법들의 개발은 천연물 생합 성 경로 engineering에 있어서의 진보를 이루었고, 이는 합성화학의 발전과 함께 진행 되었다. 생합성 경로 reprogramming과 효소 remodeling은 신규 유도체 생산의 주요한 방법으로, 지난 수 년간 mutasynthesis와 조합생합성의 중요성이 강조되어 왔다. 생합 성 어셈블리를 이루는 다기능성 효소를 비롯해, 그 생합성 어셈블리에 관한 이해는, 비 교적 낮은 적정농도에서 생산케 했던 새로운 천연물 유도체를 만드는 조합생합성의 효 율성을 크게 증가시켰다. 한편, 효소를 구성하는 도메인들의 배열과 근접성, 단백질들 의 삼차원적 배열에 관한 연구는 효소 도메인들의 절단과 재조합에 있어 효율적인 위 치의 예측을 가능케 했다. 이를 바탕으로한 생합성경로 engineering은, 생합성경로 조 절 극대화를 통해 유용 생리활성 물질의 생산성을 향상시키고 있다. 적절한 CHEM과 BIO의 효과적인 조합과 대사공학연구에 따른 유용천연물의 효율적 고생산을 위한 연 구는 계속 발전할 것으로 전망한다.

참고문헌

- Barceló F, Ortiz-Lombardía M, Martorell M, Oliver M, Méndez C, Salas JA, and Portugal J. DNA Binding Characteristics of Mithramycin and Chromomycin Analogues Obtained by Combinatorial Biosynthesis. Biochemistry, 2010, 49: 10543-10552.
- Cuevas C, Pérez M, Martín MJ, Chicharro JL, Fernández-Rivas C, Flores M, Francesch A, Gallego P, Zarzuelo M, de La Calle F, García J, Polanco C, Rodríguez I, and Manzanares I. Synthesis of Ecteinascidin ET-743 and Phthalascidin Pt-650 from Cyanosafracin B. Org Lett, 2000, 2: 2545-2548.
- Deb Roy A, Grüschow S, Cairns N, Goss RJ. Gene Expression Enabling Synthetic Diversification of Natural Products: Chemogenetic Generation of Pacidamycin Analogs, J. Am. Chem. Soc, 2010, 132: 12243-12245.
- Eichner S, Knobloch T, Floss HG, Fohrer J, Harmrolfs K, Hermane J, Schulz A, Sasse F, Spiteller P, Taft F, and Kirschning A. The Interplay between Mutasynthesis and Semisynthesis: Generation and Evaluation of an Ansamitocin Library. Angew. Chem. Int. Ed, 2012a, 51: 752-757.
- Eichner S, Knobloch T, Floss HG, Fohrer J, Harmrolfs K, Hermane J, Schulz A, Sasse F, Spiteller P, Taft F, and Kirschning A. The Interplay between Mutasynthesis and Semisynthesis: Generation and Evaluation of an Ansamitocin Library. Angew. Chem., 2012b, 124: 776 - 781
- Eustáquio AS, Gust B, Luft T, Li SM, Chater KF, Heide L. Clorobiocin Biosynthesis in Streptomyces; Identification of the Halogenase and Generation of Structural Analogs. Chem. Biol., 2003, 10: 279-288.
- Goss RJ and Hong H. A novel Fluorinated Erythromycin Antibiotic. Chem. Commun, 2005, 31: 3983-3985.

- Kirschning A and Hahn F. Merging Chemical Synthesis and Biosynthesis: A New Chapter in the Total Synthesis of Natural Products and Natural Product Libraries. Angew. Chem. Int. Ed, 2012, 51: 4012-4022.
- Kusebauch K, Brendel N, Kirchner H, Dahse H-M, and Hertweck C. Assessing Oxazole Bioisosteres as Mutasynthons on the Rhizoxin Assembly Line. ChemBioChem 2011, 12: 2284-2288.
- Nicolaou KC, Dai WM, and Guy RK. Chemistry and Biology of Taxol. Angew. Chem. 1994, 106: 38-69.
- Olano C, Méndez C, and Salas JA. Post-PKS Tailoring Steps in Natural Product-Producing Actinomycetes from the Perspective of Combinatorial Biosynthesis. Nat Prod Rep, 2010, 27: 571-616.
- Pacey MS, Dirlam JP, Geldart RW, Leadlay PF, McArthur HA, McCormick EL, Monday RA, O'Connell TN, Staunton J, and Winchester TJ. Novel Erythromycins from a Recombinant Saccharopolyspora erythraea Strain NRRL 2338 pIG1. I. Fermentation, Isolation and Biological Activity. J Antibiot, 1998, 57: 1029–1034.
- Taft F, Brünjes M, Floss HG, Czempinski N, Grond S, Sasse F, and Kirschning A. Highly Active Ansamitocin Derivatives: Mutasynthesis Using an AHBA-Blocked Mutant. ChemBioChem, 2008, 9: 1057-1060.