

극지유전자원 기반 신규활성 항생제
후보물질 발굴

Development of potential candidates as antibiotics
based on polar genetic resources



한 국 해 양 과 학 기 술 원
부 설 극 지 연 구 소

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지유전자원 기반 신규활성 항생제 후보 물질 발굴” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.



연구 책임자 : 이준혁

참여 연구원 : 이형석

“ : 김진형

“ : 윤의중

보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2018. 01. 01. ~ 2019. 12. 31.	단계 구분	(1단계) / (총2단계)
연구사업명	중 사업명	기관고유사업			
	세부사업명				
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	극지유전자원 기반 신규활성 항생제 후보 물질 발굴			
연구책임자	이준혁	해당단계 참여연구원수	총 : 18 명 내부 : 6 명 외부 : 12 명	해당단계 연구비	정부: 3,803,790 천원 기업: 천원 계: 3,803,790 천원
연구기관명 및 소속부서명	극지연구소 실용화연구사업단		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 : 선문대학교		연구책임자 : 오태진		
	연구기관명 : 가피바이오		연구책임자 : 장도연		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)					보고서 면수
95					
<p>1. 항생물질 변형효소 기능별 카달로그 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 재조합 항생물질 변형효소 발현을 위한 벡터 시스템 구축 - 전자동 단백질 정제 시스템 구축 (2년차, AVANT FPLC 연구장비 도입) - Glycosyl transferase, Hydroxylase, Methyltransferase, Sulfotransferase, Isomerase, Acyltransferase 효소로 기능 별 항생물질 변형효소를 나누어 유전자를 찾고 재조합 단백질 대량생산, 생화학적 특성 분석, 삼차구조분석 진행 중 - 저온성 효소 기능별 카달로그가 완성되면 항생제 후보물질 뿐만 아니라 다른 화학 합성이 불가능한 유용물질의 변형체 제작에도 사용 가능 <p>2. 신규 항생물질 변형체 개발 성공</p> <ul style="list-style-type: none"> - Magnolol 과 honokiol 항생물질의 당이 결합된 변형체 개발 - 퀴놀론 계열의 항생물질 변형체 6종 제작 - 마클로라이드 계열의 라파마이신 항생물질 변형체 제작 항균활성 테스트 진행 중 - 퀴놀론 계열의 항생물질 변형체 6종 제작 <p>3. 신규 항생물질 개발 관련 연구 플랫폼 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제약회사 원료 업체인 가피바이오와의 협력체계 구축 - 가피바이오에서 변형을 원하는 퀴놀론계 및 스테로이드계 항생물질의 변형체 제작 성공 - 충남대 약대 연구팀과의 극지 해양생물 유래 천연물의 항균활성 분석 공동연구 - 중앙대 약대 연구팀과의 개발된 항균물질의 항균활성 기작 분석 공동연구 - 선문대학교 제약공학과 연구팀과의 개발된 항생물질의 변형체 구조분석 공동연구 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	극지미생물, 방선균, 변형효소, 생물자원, 유전자, 항생물질			
	영어	Polar microbes, Actinomycetes, Modification enzyme, Bioresources, Gene, Antibiotics			

요 약 문

I. 제 목

- 극지유전자원 기반 신규활성 항생제 후보 물질 발굴

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 새로운 항생제 개발 요구

- 국민 건강을 위협하는 기존 항생제 내성균의 등장에 따른 차세대 항생제 개발 요구
- 기존의 항생제 개발 방법의 한계(배양되는 방선균에서만 연구, 반복적인 동일 물질 발견)를 극복할 수 있는 신종 방선균 또는 새로운 실험적 방법 요구

2. 선진국들은 이미 국가적 수준에서 전략적으로 새로운 항생제를 찾는 연구를 지원하고 있음.

미국은 2015년 오바마 대통령 주도하에 2020년 내 10개의 신규 항생제를 개발하자는 ‘10×20 프로그램’ 진행 중, 유럽은 EU 주관의 “PharmaSea (2012.10.01.~2016.09.30)” 프로젝트를 수행하여 남극과 북극을 포함한 해양에서 새로운 항생제 및 신약 후보 물질 발굴 수행(13개국에서 24개의 기업 및 연구기관이 참여, 4년간 950만유로 이상의 투자)

3. 국내외 다른 연구자와의 극지생명자원 활용을 위한 중개연구 필요

- 극지 생물의 유전정보를 이용한 항생제 개발 분야에서의 학·연·산 공동연구 필요

4. 현재 알려진 천연 항생물질의 약 64% 정도가 방선균에 의해 생산되었음. 하지만 신규 항생 물질 탐색과정에서 이미 밝혀진 물질들만 재차 분리되는 악순환이 계속되면서, 그 경제성과 효용성이 현격하게 떨어지고 있기 때문에 신규 항생 물질의 탐색을 위해 극지 및 해양에서의 신규 방선균의 유전자 정보 활용 요구

5. 예산 미반영시 항생제 내성균 문제라는 시급한 국가현안에 대한 선제적 대응이 늦추어지고 기존의 모든 항생제에 내성을 가지는 슈퍼박테리아 출현이라는 국가적 재난 발생 가능성 증가 (극지 신규 항생물질 연구개발 파이프라인 구축이 늦어지고, 그로 인한 해외로의 지식재산권 유출 예상)

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 극지유전자원 기반 항생물질 변형효소 선별

- 극지생물 유래 유전자와 단백질 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝
- 변형효소 활성과 항생물질 구조를 고려한 타겟 효소-항생물질 계열 매칭
- 항생물질 변형효소: 항생제의 화학구조를 바꾸어 활성에 영향을 주는 생물 효소. 알려진 것 들로는 Hydroxylase, Glycosyl transferase, Isomerase, Acyltransferase,

methyltransferase, Sulfotransferase 등이 있음

2. 항생물질 변형효소 단백질 생산

- 극지 유래 효소단백질의 발현 증진을 위한 벡터 설계
- 효소단백질 생산성 향상을 위한 숙주 개발과 이를 통한 단백질 생산

3. 항생물질 변형체 제작 및 활성 검증

- 극지생물 유래 변형효소를 활용한 신규활성 항생물질 제작 및 활성 스크리닝
- 공정 최적화를 통한 고효율 항생물질 생산성 개선

4. 신규 항생물질의 작용기전 규명

- 변형효소와 신규활성 항생물질의 구조분석을 통한 활성 및 안정성 개선

5. 항생제 후보물질 상용화

- 최적화된 항생제 후보물질에 대한 특허권 확보
- 기술이전 및 산업화 진행
- 물질의 독성시험 및 임상연구는 항생제 개발경험이 많은 제약회사 또는 임상대행기관(CRO)에 결과물의 기술이전을 통해 수행

IV. 연구개발결과

1. 극지생물 유래 저온성 단백질의 기질 유연성을 이용한 항생물질 변형 가능성 확인

- 다양한 극지생물의 유전자 정보로부터 항생물질 변형효소 유전자 확보
- 6종의 CYP 효소의 구조분석 및 항생물질에 대한 수산화 반응 확인
- 다양한 타입별 CYP 효소는 항생물질의 다른 부위에 수산화 반응성을 가짐
- PbAcE 효소의 항생물질의 특정 acetyl group 제거 활성 확인 (국내특허 출원)

2. 항생물질 변형효소 기능별 카달로그 구축

- 재조합 항생물질 변형효소 발현을 위한 벡터 시스템 구축
- 전자동 단백질 정제 시스템 구축 (2년차, AVANT FPLC 연구장비 도입)
- Glycosyl transferase, Hydroxylase, Methyltransferase, Sulfotransferase, Isomerase, Acyltransferase 효소로 기능 별 항생물질 변형효소를 나누어 유전자를 찾고 재조합 단백질 대량생산, 생화학적 특성 분석, 삼차구조분석 진행 중
- 저온성 효소 기능별 카달로그가 완성되면 항생제 후보물질 뿐만 아니라 다른 화학 합성이 불가능한 유용물질의 변형체 제작에도 사용 가능

3. 신규 항생물질 변형체 개발 성공

- Magnolol 과 honokiol 항생물질의 당이 결합된 변형체 개발
- 퀴놀론 계열의 항생물질 변형체 6종 제작
- 마클로라이드 계열의 라파마이신 항생물질 변형체 제작 항균활성 테스트 진행 중
- 퀴놀론 계열의 항생물질 변형체 6종 제작

4. 신규 항생물질 개발 관련 연구 플랫폼 구축

- 제약회사 원료 업체인 가피바이오와의 협력체계 구축
- 가피바이오에서 변형을 원하는 퀴놀론계 및 스테로이드계 항생물질의 변형체 제작 성공
- 충남대 약대 연구팀과의 극지 해양생물 유래 천연물의 항균활성 분석 공동연구
- 중앙대 약대 연구팀과의 개발된 항균물질의 항균활성 기작 분석 공동연구
- 선문대학교 제약공학과 연구팀과의 개발된 항생물질의 변형체 구조분석 공동연구

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 극지 생물자원으로부터 신규 항생물질 탐색연구 추가

- 극지생물 유래 신규 항생물질 백본 도출 필요성 확인
- 극지생물 배양 및 배양액으로부터 신규 항생물질 백본 탐색

2. 극지 방선균 및 해양 미생물의 유전체 분석

- 신규 항생물질을 생산하는 극지 미생물의 유전체 분석
- 항생물질 생합성 경로 유전자 연구

3. 이중숙주 발현을 통한 신규 항생물질 생산연구 추가

- 항생물질 생합성 유전자를 발현이 용이한 이중숙주에 삽입하여 신규 항생물질 백본 대량 확보
- 극지생물 채집을 통한 다량의 항생물질 백본 확보는 한계가 있음

4. 재조합 항생제 변형효소 대량정제 및 생화학적 특성분석

- 기능별 항생물질 변형효소 카달로그 완성
- 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 및 기질특이성 분석

5. 신규 항생물질 변형체 제작 및 활성 검증

- β -락타메이즈 타겟의 신규 저해제 개발로 항생제 내성균 문제 극복
- 신규항생물질 대량생산 공정 수립
- 공정 최적화를 통한 고효성 항생물질 생산성 개선
- 신규 항생물질의 작용기전 규명
- 신규 항진균 물질 CDCA methyl ester 의 대량생산 후 안전성 실험 수행
- PbAcE 항생물질 변형효소의 기술이전 가능성 탐색

6. 해수부 R&D 사업을 통한 기존 연구결과를 이어가는 계속 연구 추진

- 지난 2년간의 주요사업 연구결과를 토대로 향후 해수부 R&D 사업을 통한 항생물질 변형효소 카달로그 완성

- 신규 향생물질 (Magnolol 과 honokiol 향생물질, 퀴놀론 계열의 향생물질, 마클로라이드 계열의 라파마이신 향생물질 변형체, 퀴놀론 계열의 향생물질, 스테로이드 계열의 향생물질)의 구조변형을 통한 최적화 작업 수행
- 신규향생물질 대량생산 공정 수립, 향생물질 변형효소의 반합성을 이용한 신규 향생물질 생산방법으로 지식재산권 확보
- 신규 향생물질의 작용기전 규명
- 신규 향생물질의 안전성 평가 수행
- 분자모델링 기술을 이용한 활성 및 안정성 개선 연구수행

7. 본 사업을 통해 구축된 유용물질개발 관련 연구 플랫폼 활용

- 유용물질 개발연구 단계별로 임무를 나눈 연구소, 학교, 회사 (제약회사연구소, 약학대학 2 곳, 제약공학과) 와의 지속적인 공동연구
- 개발된 유용물질의 다양한 활성 및 적용점 탐색은 대학교에서 수행
- 개발하고자 하는 초기 물질 탐색 및 변형하고자 하는 초기물질 합성은 제약회사 연구소에서 수행
- 유용물질 변형효소 확보와 생화학적 특성연구 및 변형체제작은 극지연에서 수행



S U M M A R Y

I . Title

- Development of potential candidates as antibiotics based on polar genetic resources

II. Purpose and Necessity of R&D

1. Needs to develop new antibiotics

- Needs to develop next-generation antibiotics in response to the emergence of existing antibiotics that threaten public health
- Needs new anti-corrosion or new experimental methods that can overcome the limitations of existing antibiotic development methods (researching only on cultivated antibacterial bacteria, finding the same repeated)

2. Developed countries are already supporting research to find new antibiotics strategically at national level. In 2015, the U.S. was in the midst of the “10×20 Program” under President Obama to develop 10 new antibiotics within 2020, while Europe conducted the EU-sponsored “PharmaSea (2012.10.01.-2016.09.30) project to conduct the discovery of new antibiotics and new drug candidates in the oceans, including Antarctica and the Arctic, investing more than 9.5 million euros for 13 countries.

3. Brokerage research is needed for utilization of polar life resources with other researchers at home and abroad

- Joint academic, annual, and acid research in the field of antibiotic development using genetic information of polar organisms

4. Approximately 64% of the known natural antibiotics have been produced by the bacteria. However, as the vicious circle continues to separate only the substances that have already been identified during the search for new antibiotics, the economy and effectiveness of the bacteria are falling dramatically, so the use of genetic information of new bacteria in the polar and ocean is required to search for new antibiotics.

5. Pre-emptive response to urgent national issues such as antibiotic-resistant bacteria is delayed and the emergence of super bacteria resistant to all existing antibiotics increases the possibility of national disaster (the establishment of new antibiotic R&D pipelines is delayed and the outflow of intellectual property rights to foreign countries is expected).

III. Contents and scope of R&D

1. Screening of antibiotic strain enzymes based on polar genetic resources
 - Screening of a strain enzyme based on information of the genes derived from polar life and proteins.
 - Match target enzyme-antibiotic series considering strain enzyme activity and antibiotic structure
 - Antibiotics modified enzyme: A biological enzyme that changes the chemical structure of antibiotics and affects their activity. Known things include Hydropsylase, Glycosyl Transferase, Isomerase, Acyltransferase, methyltransferase, and Sulfotransferase.
2. Producing antibiotic modified enzyme protein
 - Vector design for enhancing the expression of polar-derived enzyme protein
 - the development of host for enhancing the productivity of enzyme protein and the production of protein through it.
3. Fabrication of antimicrobial strain and verification of activity
 - Producing and screening new active antibiotics using a strain enzyme derived from polar life
 - Improving the productivity of highly active antibiotics by optimizing the process
4. Identify the working conditions of new antibiotics
 - Improving activity and stability through structural analysis of modified enzymes and new active antibiotics
5. Commercialization of antibiotic candidate materials
 - Securing patent rights for optimized antibiotic candidate materials
 - Technology transfer and industrialization progress
 - Toxicity testing and clinical research of substances are carried out through technology transfer of results to pharmaceutical companies or clinical agencies (CROs) that have many experience developing antibiotics.

IV. R&D Result

1. Verifying the possibility of antibiotic deformation using substrate flexibility of cryogenic protein derived from polar organisms
 - Securing antibiotic modified enzyme genes from genetic information of various polar organisms
 - Analyze the structure of six types of CYP enzymes and check the hydroxide reaction of antibiotics
 - Various types of CYP enzymes have hydroxyl reactivity in different parts of antibiotics
 - Verification of the activity of removing certain acetyl group of antibiotics in the PbAcE enzyme (Application for domestic patent)
2. Establishing a catalog by function of antibiotic strain enzymes
 - Vector system for the expression of the re-combined antibiotic strain enzyme

- Establishment of an electro-magnetic protein refining system (second year, introduction of AVANT FPLC research equipment)
- Using glycosyl transferase, hydroxylase, methyltransferase, sulfotransferase, Isomerase, and Acyltransferase enzymes to find genes, re-combined protein mass production, biochemical properties analysis, and tertiary structural analysis.
- Once the catalog is completed for each function of low-temperature enzyme, it can be used not only for antibiotic candidate materials, but also for strain making of useful substances that cannot be chemically synthesized.

3. New antibiotic strain development succeeded.

- Development of a strain that combines sugar from Magnololol and Honokiol antibiotics
- Produce six types of antibiotic strains of quinolone
- Producing the Lafamycin antibiotic strain of the Macloide family in the process of an anti-bacterial activity test
- Produce six types of antibiotic strains of quinolone

4. Establishing a research platform for developing new antibiotics

- Establishing a cooperative system with Gaffibio, a raw material company of a pharmaceutical company
- Success in the production of strains of quinolon and steroid antibiotics seeking deformation in Gaffibio
- Joint study on the antimicrobial activity analysis of marine life origin natural products from polar marine life with a research team from Chungnam National University's Pharmacology College
- Joint research on antimicrobial activity analysis of antimicrobial materials developed with the research team of Chung-Ang University's Pharmacology College
- Joint study on the structure of the strain of antibiotics developed with the research team of the pharmaceutical engineering department of Sunmoon University

V. Utilization Plan of R&D Results

1. Added research on new antibiotics from polar biological resources

- Verification of the need to derive a new antibiotic backbone from polar life
- Culture of polar life and search for new antibiotic backbone from culture fluid

2. Genetic Analysis of Polar Barriers and Marine Microorganisms

- Genetic analysis of polar microorganisms that produce new antibodies
- Research on the gene for antibiotic biosynthesis pathways

3. Added research on production of new antibiotics through the expression of heterogeneous hosts
 - Inserting antibiotic biosynthesis genes into easy-to-expose residential areas to secure large quantities of new antibiotic backbone.
 - Securing a large volume of antibiotic backbone through the collection of polar organisms is limited

4. An Analysis of Recombined Antibiotics Strain Enzyme Mass Refining and Biochemical Characteristics
 - Completing the catalog of antibiotic modified enzyme by function
 - Analysis on the biochemical properties and substrate characteristics of antibiotic strain enzymes

5. Fabrication of new antibiotic strain and verification of activity
 - Overcome antibiotic-resistant bacteria problems by developing new inhibitors for β -lactamase targets
 - Establishing a mass production process for new antibacterial materials
 - Improving the productivity of highly active antibiotics by optimizing the process
 - To identify the working conditions of new antibiotics
 - Conduct safety tests after mass production of new anti-vaccine substance CDA methyl ester
 - Explore the possibility of transferring technology to the PbAcE antibiotic strainer

6. Continuing research on existing research results through R&D projects by the Ministry of Maritime Affairs and Fisheries
 - Completing a catalog of antibiotic modified enzymes through the ministry's R&D project based on the results of major projects over the past two years
 - Optimization of new antibiotics (Magnololol and Honokiol antibiotics, Quinolone antibiotics, Lafamycin antibiotic strainers of Maclride, Quinolone antibiotics, steroid antibiotics) is carried out.
 - Establishing a mass production process for new antibacterial materials and securing intellectual property rights through a new method of antibiotic production using the semi-conformity of antibiotic strain enzymes
 - To identify the working conditions of new antibiotics
 - Safety assessment of new antibiotics is carried out.
 - Research on improving activity and stability using molecular modeling technology

7. Utilizing research platforms related to the development of useful materials built through this project
- Continued joint research with research institutes, schools, and companies (pharmaceutical company research institutes, two pharmacy colleges, and pharmaceutical engineering departments) divided by stages of research on the development of useful materials
 - Various active and application points of developed useful materials are explored by the university
 - Investigate and modify the initial substances to be developed in the pharmaceutical company's laboratory
 - Obtaining the useful substance strain enzyme and researching the biochemical properties and making a strain system are carried out in the polar region.



목 차

제 1 장 서론

제1절 연구의 배경 및 목적

제2절 연구의 필요성

1. 극지생물 저온성 효소의 기질 유연성을 이용한 유용물질 개발
2. 기술적 측면
3. 경제, 산업적 측면
4. 과학적 측면
5. 사회, 문화적 측면

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 극지생물 저온성 효소의 기질 유연성을 이용한 유용물질 개발

1. 항생제의 종류 및 작용기작
2. 신규 항생제 발굴사례
3. 기술 및 특허동향 분석
4. 경제성 분석

제2절 주요특허 출원기업인 Merk 사의 항생제 개발

1. 항생제관련 주요 출원기업 리스트
2. Merk 사의 항생제 개발 전략분석

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 연구목표

1. 연구 개발의 최종 목표
2. 연차별 성과목표

제2절 연구내용

1. 1차년도 (2018년) 연구 결과
2. 2차년도 (2019년) 연구결과

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

1. 향후 연구방향
2. 성과 활용계획

제 5 장 참고문헌

C O N T E N T S

Chapter 1 Introduction

Section 1. The Background and Purpose of the Study

Section 2. the need for the study

1. Development of a useful substance using substrate flexibility of cryogenic enzyme in polar life
2. Technical aspects
3. Economic and industrial aspects
4. Scientific aspect
5. Social and cultural aspects

Chapter 2 Current Status of Domestic and Foreign Technology Development

Section 1. Development of a useful substance using substrate flexibility of cryogenic enzyme

1. Types of Antibiotics and Operation Techniques
2. New Antibiotics Excavation Cases
3. Technology and Patent Trend Analysis
4. Economic Analysis

Section 2. Development of Antibiotics for Merk Corporation, a major patent applicant

1. List of major applicants for antibiotics
2. An Analysis of Merk's Strategies for Developing Antibiotics

Chapter 3 Contents and Results of R&D Implementation

Section 1. Research Objectives

1. Final goal of research and development
2. Annual Discrimination Performance goal

Section 2. Research Contents

1. Results of the first year (2018) study
2. 2nd Year (2019) Study Results

Chapter 4 Utilization Plan of R&D Results

1. Future Research Direction
2. Performance utilization plan

Chapter 5 References

제 1장 서 론

제 1절 연구의 배경 및 목적

- (연구의 배경) 극지생물이 가지는 저온효소의 특성으로 기질유연성을 가짐으로 다른 유용 화합물의 합성에 사용가능
- (연구의 목적) 극지생물의 새로운 유전자를 이용하여 항생제 내성을 극복할 수 있는 차세대 항생제 후보물질 발굴



제 2절 연구의 필요성

1. 극지생물 저온성 효소의 기질 유연성을 이용한 유용물질 (항생제 후보물질) 개발

연구개발의 필요성 (항생제 연구의 사회적 요구)



- (1) 기존 항생제 내성균 등장에 따른 차세대 항생제 개발 요구
- (2) 반복적인 동일 물질 발견, 천연 항생물질 탐색의 한계

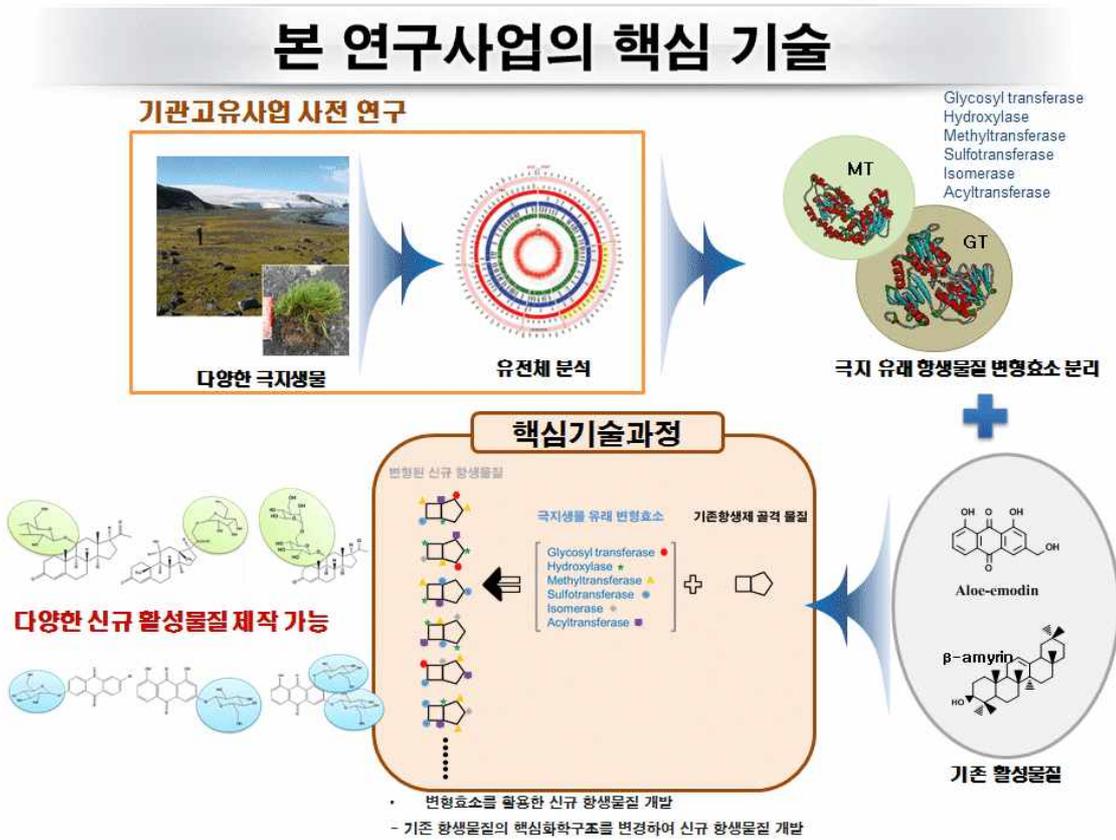
→ 새로운 자원과 새로운 기술적 접근 필요

극지유전자원 유래 변형효소를 이용한
신규 항생제 후보물질 생산 시스템으로 해결

- (1) 새로운 항생제 개발 요구
 - (가) 국민 건강을 위협하는 기존 항생제 내성균의 등장에 따른 차세대 항생제 개발 요구
 - (나) 기존의 항생제 개발 방법의 한계 극복 (배양되는 방선균에서만 연구, 반복적인 동일 물질 발견) 신종 방선균 또는 새로운 실험적 방법요구
- (2) 국내외 다른 연구자와의 극지생명자원 활용을 위한 중개연구 필요 극지 방선균을 이용한 항생제 개발 분야에서의 학·연·산 공동연구 수행
- (3) 미국, 유럽을 포함한 선진국들은 이미 국가적인 차원의 전략으로 새로운 항생제를 찾는 연구를 지원하고 있음. 특히, 미국은 2015년부터 향후 5년간 국가 정책으로 새로운 항생제를 찾으려는 연구 진행
- (4) 항생제 내성균 문제 즉, 슈퍼박테리아 출현이라는 국가적 재난 발생 이라는 시급한 국가현안에 대한 선제적 대응 필요



2. 기술적 측면

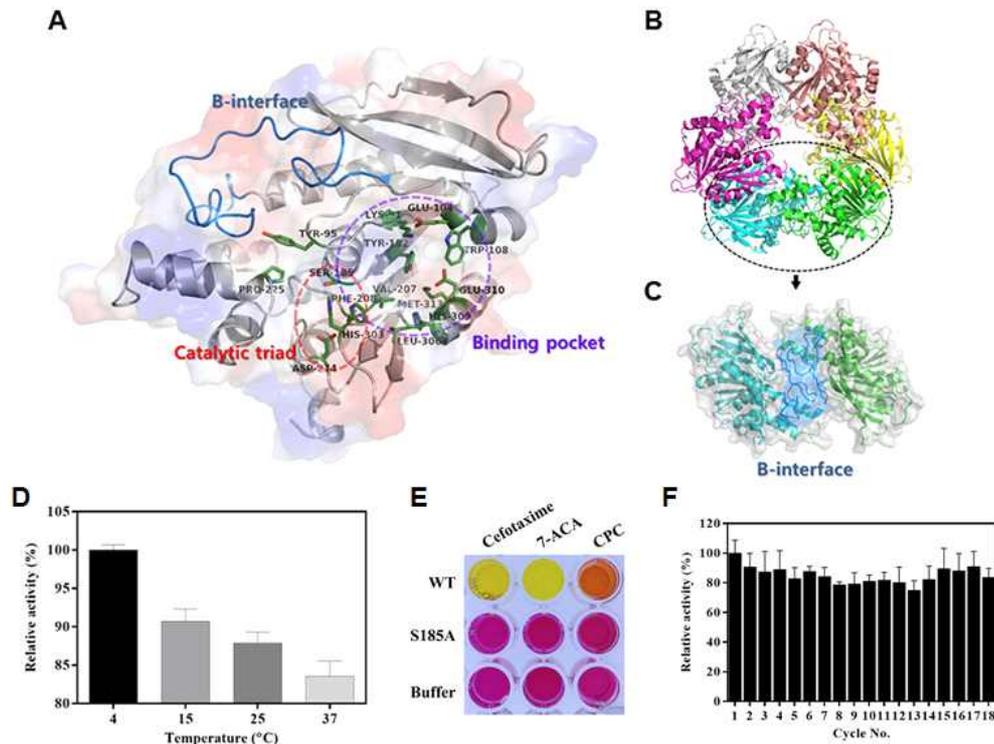


(1) 저온활성효소의 광범위하고 유연한 기질특이성을 이용한 생체기술 적용

(가) 최근 연구를 통해 저온활성 효소는 active site 부위 주변의 유연한 루프 부위 때문에 유연한 기질특이성을 가지는 것을 규명. 이러한 특성은 실제 환경과 다른 실험 조건에 의해 야기되는 예상치 못한 결과일 수 있음. 체내 시스템과 저온에서 저온 활성 효소는 기질에 강한 특이성을 가져야 하나 아마도 상온에서 실험한 제조합형 저온 활성 효소는 활성 부위 근처의 유연한 루프 영역에서 더 많은 움직임을 가질 수 있으며, 그것은 자신의 기질이 아닌 제노바이오틱 화합물의 기질 결합 및 효소 반응을 인위적으로 유도할 수 있음. 이 예상치 못한 저온 활성 효소의 특성은 미세한 화학 화합물의 효소 매개 반합성에 사용될 수 있음.

(나) 예를 들어, 최근의 연구에서 호냉성 토양 미생물인 *Paenibacillus* sp. 유래의 acetyl xylan esterase(PbAcE)가 유연하고 광범위한 기질 특성을 가지고 있다는 것을 규명. PbAcE의 구조적인 분석을 통해 유연한 서브유닛 움직임과 활성 사이트 루프 구조의 움직임으로 인해 PbAcE가 기질 유연성을 가지게 된다는 것을 증명. PbAcE는 용액에서 hexamer를 형성하며, 각 monomer에는 Ser185, Asp274 및 His303의 활성잔기를 가짐. 효소 활성 분석 데이터는 PbAcE가 강한 저온 활성 효소와 광범위한 기질 특이성을 가진 전형적인 특성을 가지고 있다는 것을 보여주었고, PbAcE는 글루코스 펜타아세테이트와 자일란 아세테이트에 대한 탈아세틸화 활성뿐만 아니라, 자일란에 대한 가역 아세틸화 활성도 가짐. 또한 PbAcE는 지질과 3차 알코올 에스테르에 대해 강한 탈아세틸화 활성을 보임. 이러한 결과는 PbAcE가 다양한 기질을 수용할 수 있고 다른 기질에 대한 탈아세틸화 생체 촉매에 유용하다는 것을 제안. 뿐만 아니라 PbAcE는

cefotaxime, 7-Aminocephalosporic acid (7-ACA), 과 cephalosporin C 의 아세틸그룹을 성공적으로 제거. 이 결과로부터 PbAcE는 다양한 항생물질의 변형에도 사용가능함을 보임. 항생제 개발에 있어서 효소를 이용한 반합성은 화학구조의 다양성을 증가시킴으로써 항생제 내성 문제를 극복하는데 매우 중요함. 더욱이, PbAcE의 상업적 적용 가능성은 18회 재사용에 이어 고정화 후에도 80%이상의 활성이 유지되도록 함으로써 확인.



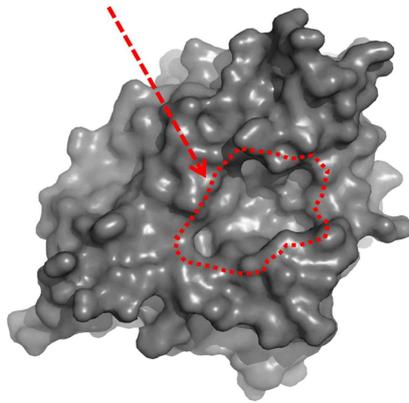
<그림1> (A) PbAcE 효소의 전체적인 삼차구조, 활성잔기 와 기질결합부위 모습 (B) PbAcE 효소 hexamer 구조 모습 (C) PbAcE의 hexamer 형성에 중요한 Beta-interface 부위 (D) PbAcE의 온도별 활성비교표. PbAcE는 높은 저온활성을 가짐 (E) PbAcE는 다양한 항생물질의 deacetylation 활성을 가짐 (F) PbAcE의 효소 고정화 후 18회 재사용 했을 때의 효소 활성 비교 그림

(다) 또 다른 예로는 Cytochrome P450 monooxygenases (CYPs)을 들 수 있음. CYP는 다양한 기질의 수산화작용을 촉진시키는 Heme 조효소 함유 효소임. CYP는 복잡한 구조의 스테로이드에 하이드록실 그룹을 효과적으로 도입하는데 특히 유용함. 따라서, 이러한 CYP는 최근 몇 년 동안 제약업계를 포함한 광범위한 산업 응용에 대해 점점 더 많은 관심을 받아오고 있음.

(라) 최근 논문에서 북극해의 카라해에서 분리된 *Bacillus* sp. PAMC 23377 에서 새롭게 확인된 CYP 스테로이드 하이드록실라아제(BaCYP106A2)를 보고하고 HPLC와 LC-MS 방법을 통해 4종류의 스테로이드 기질의 수산화 활성을 규명. BaCYP106A2의 구조분석과 다른 CYPs와의 구조 비교는 BaCYP106A2의 α9 루프 영역이 기질 유연성에 중요함을 밝힘. 본질적으로 이동하며 migh라는 것을 보여주었다. 넓은 기판 특이성에 중요하다. 결론적으로 저온 활성 효소의 광범위한 기질 특성 때문에 복잡한 화학 물질과 의약품의 효소 변형 및 반합성에 강한 장점을 가짐.

Cold-active enzymes can be used for enzymatic modification of fine chemicals and medicines

Substrate binding site of *PbAcE*



Various natural and xenobiotic substrates

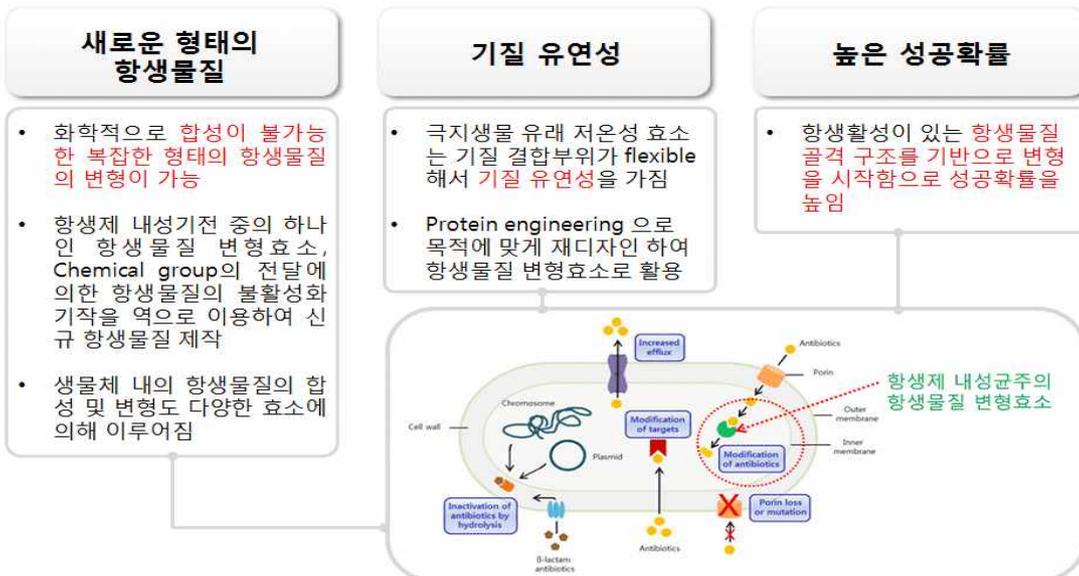
- Glucose penta-acetate
- Acetyl xylan
- tert*-butyl acetate
- Linalyl acetate
- α -terpinyl acetate
- α -terpinyl acetate
- cefotaxime
- 7-Aminocephalosporanic acid (7-ACA)
- cephalosporin C

Broad substrate specificity of *PbAcE*

(2) 저온활성효소의 구조 및 기능특성

일반적으로 저온 활성 효소는 저온 활성을 가지는 것에 반해 높은 온도에서 쉽게 불활성이 된다고 알려져 왔음. 하지만 일부 저온 활성 효소의 경우에는 다른 중온성 유사효소들과 비교 했을 때 유사한 Tm 값을 보이며 열안정성을 가짐. 예를 들어 CpsIadA (octamer)의 변성온도(tm)는 81 도로 저온 적응 효소의 경우로는 예상외로 높은 온도를 가짐. 이 결과는 CpsIadA가 열에 굉장히 안정된 효소라는 것을 나타냄. 또, EaEST (trimer) 효소의 경우에는 효소 활성의 최적 온도는 40 도이며, PaDHDPR (tetramer)의 변성온도는 52.7 도였다. PbXI (tetramer)의 경우, 최적 활동 온도는 60 도, Tm 값은 51.1 도임. 이러한 결과로부터 저온 활성 효소 중에 multimer를 이루는 효소의 경우에는 구조 안정화 인자의 증가로 인해 높은 열 안정성을 가질 수 있다는 것을 암시. 따라서 multimer 저온활성효소는 열안정성은 물론 저온활동도 있어 산업용 응용목적에 더 많은 이점을 가짐.

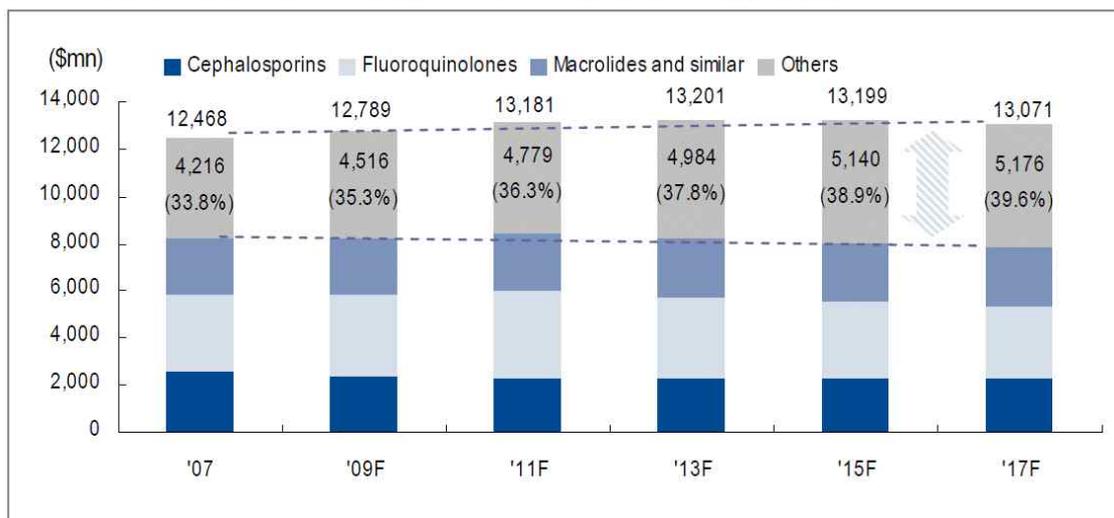
극지생물 유래 변형효소를 이용한 항생물질 반합성의 장점



3. 경제 · 산업적 측면

- (1) 세계보건기구(WHO)가 세계 공공보건 3대 위협 중 하나로 선언한 ‘항생제 내성’ 문제 관련하여 미국 국립질병통제예방센터(CDC)의 보고에 따르면 2007년 한 해 동안 약 10만 명이 ‘MRSA’에 감염되었으며, 이 중 약 2만 여명이 사망
- (2) 1세대 항생제인 페니실린계 항생제 개발이후에 글로벌 제약회사들은 새로운 항생제 개발연구를 더 이상 하지 않았음. 그 이유는 항생제 연구기간이 10년 정도로 길어 연구개발 비용이 높은데 비해 판매지속기간이 줄어든데 따른 것임. 실제로 지난 2003년부터 2007년까지 항생제 시장규모는 연평균 -3%의 역성장을 기록
- (3) 항생제에 내성을 가진 이른바 슈퍼박테리아가 등장하면서 슈퍼박테리아에도 효능을 보이는 슈퍼항생제 시장이 새롭게 주목받고 있음. 기존 항생제 시장은 정체국면이지만 슈퍼박테리아 시장은 꾸준히 성장할 것으로 전망되고 있으며, 향후 차세대 항생제 시장은 연평균 2%(CAGR 2009~2017)의 꾸준한 성장을 할 것으로 전망됨
- (4) BCC Research 자료(Antibiotic Resistance and Antibiotic Technologies: Global Markets, 2009)에 따르면, 항생제 세계 시장은 2009년 415억 달러이며, 연 9.6% 성장을 지속할 것으로 예측
- (5) 전 세계 슈퍼박테리아 항생제 시장은 반코마이신(vancomycin), 뎀토마이신(Daptomycin) 및 자이복스(Zyvox)가 주도. IMS Health 보고서에 따르면 화이자 ‘자이복스(Zyvox)’의 2009년 매출은 약 1조3000억 원에 달함

전 세계 항생제 시장 연평균 2%(CAGR 2009~2017)로 꾸준히 성장할 전망



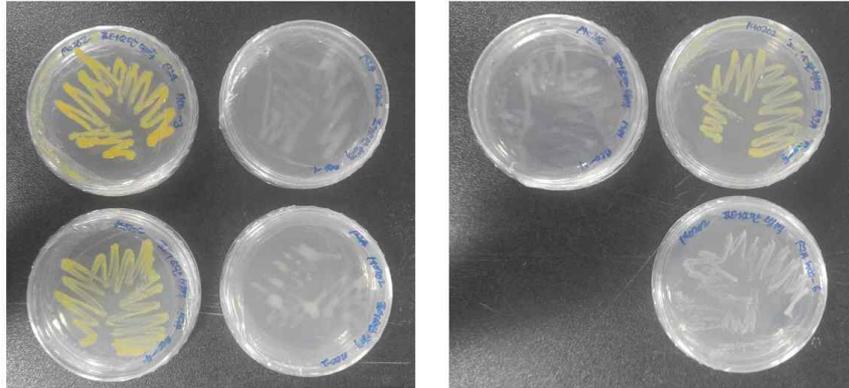
주: 7개 국가 (미국, 일본, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인, 영국) 항생제 시장 규모 기준
 자료: Datamonitor

4. 과학적 측면

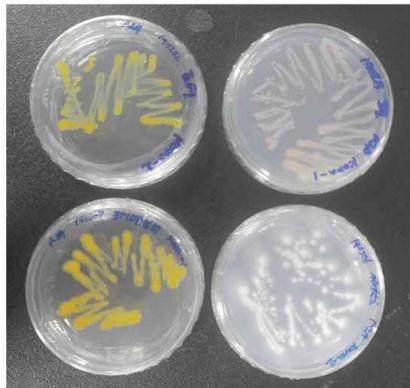
- (1) 최근 유전공학기술과 분자생물학적 연구방법이 발달하면서 생리활성물질 생산균주에 대한 생합성 효소와 그 유전자들의 발현 조작에 대한 연구가 고전적인 생리활성물질의

스크리닝 방법과 더불어 새로운 생리활성물질 탐색에 대한 중요한 연구분야가 되고 있음

- (2) 최근 남극 세종기지 주변에서 항생제 내성 균주들이 다수 발견되고 있어, 이 균주들의 항생제 회피 전략을 연구 중에 있음. 아마도 이들 균주들은 자체적으로 항생물질 변형 효소를 가지고 있을 것으로 예상됨. 이 효소들을 이용하여 신규 항생물질 개발에 이용하고 자 함 (아래 그림 참조)



Neomycin 내성 균주



Kanamycin 내성 균주

5. 사회·문화적 측면

- (1) 병원균에 항생제 저항성을 부여하는 핵심 유전자를 밝혀내는 등 슈퍼박테리아 퇴치를 위한 연구가 활발하게 진행되고 있음. 그럼에도 항생제의 남용과 오용으로 인한 문제가 갈수록 심각해지고 있으며, 이 슈퍼박테리아를 퇴치한다고 해도 또 다른 슈퍼박테리아들이 나타날 수 있음
- (2) 항생제 개발의 필요성에도 불구하고, 그동안 새로운 항생제 개발은 더디게 이루어져 왔음. 지난 50년간 새로 출시된 항생제는 oxazolidinone계열에 속하는 linezolid(Zyvox, Pfizer)와 사이클릭 지질단백질계의 daptomycin(Cubicin, Cubist) 2개에 불과하였으며, 이런 와중에 기존의 모든 항생제에 내성을 지닌 강력한 슈퍼버그가 출현
- (3) 극지생물 연구가 단순한 호기심 충족의 기초연구에 그치지 않고 실용화 연구 및 신약 개발로 이어질 수 있다는 것을 보여주는 사회적 홍보효과 기대
- (4) 연구소 기능 및 비전, 중기전략계획 등과의 연계성
 - (가) 현 정부 140대 국정과제 중 추진 전략 1번인 “창조경제 생태계 조성” 항목의 “국정

과제 과학기술을 통한 창조 산업 육성”에 부합

(나) 2011년도-2025년 극지 연구소 중장기 비전과 발전전략의 중점 연구영역인 실용화 분야의 극지생물자원 활용 연구에 부합



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 극지생물 저온성 효소의 기질 유연성을 이용한 유용물질 개발

1. 항생제의 종류 및 작용기작

가. 항생제의 종류

(1) β -lactams계

화학구조상 β -lactam ring을 기본 구조로 하는 항생제로 penicillin과 Cephalosporin이 β -lactam계의 가장 대표적인 항생제이며 그 외에 monobactam, carbapenem계 등이 여기에 포함

(2) Aminoglycosides계

streptomycin, neomycin, gentamicin, amikacin 등이 대표적인 aminoglycosides계 항생제임. 그람음성균 외막의 porin을 통하여 세포 내로 이동한 다음 30S ribosome에 비가역적으로 결합하여 단백질 합성을 억제

(3) Macrolides계

Macrolides는 “커다란 고리(large ring)”라는 뜻으로, 50S ribosome과 결합하여 단백질 합성을 억제하며 14각형, 15각형, 16각형의 고리 구조로 되어 있고 대표적인 macrolides계 항생제로는 erythromycin, azithromycin, clarithromycin 등이 있음

(4) Tetracyclines계

광범위 항생제로 그람양성균, 그람음성균, 혐기성균, rickettsiae, mycoplasma, ameoba 등 여러 종류의 병원균에 우수한 항균효과를 보임. doxycycline, minocycline 등이 개발됨

(5) Glycopeptides계

Glycopeptides계 항생제는 세포벽 생합성을 억제하여 작용하는 강력한 항생제로, 주로 그람 양성균에만 작용하는 비교적 좁은 항균영역을 갖고 있으며 여기에는 vancomycin과 teicoplanin이 포함됨

(6) Quinolones계

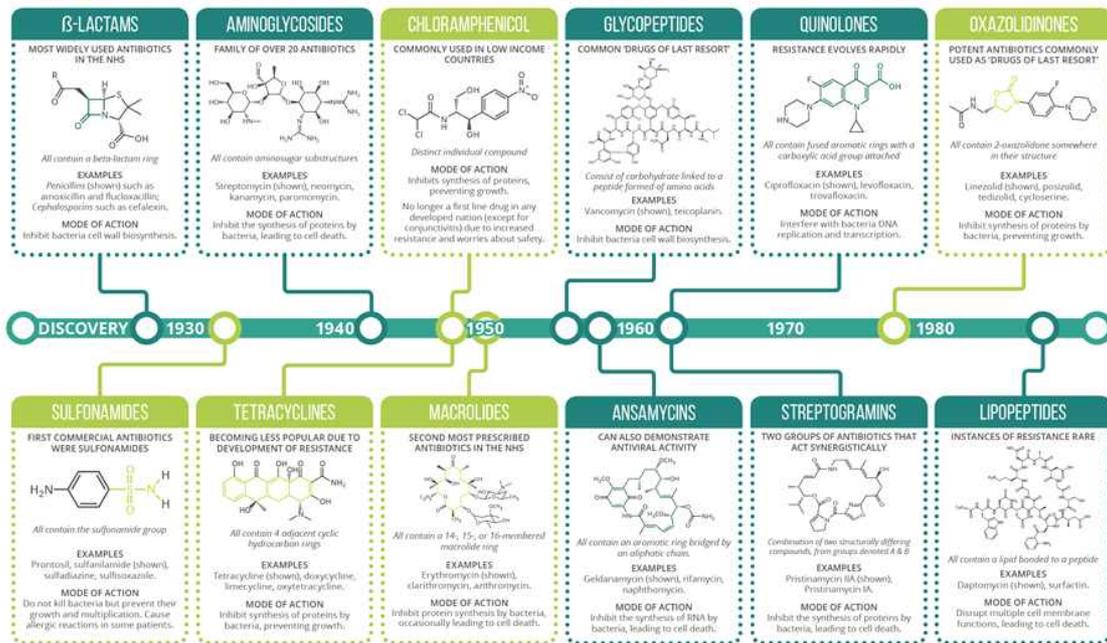
Quinolones계 항생제는 합성 화합물이며 DNA gyrase를 억제하여 DNA의 복제를 방해하는 광범위 항생제로 그람양성균과 특히 그람음성균에 대해 현저한 항균력을 보임. nalidixic acid, oxolinic acid, cinoxacin 등이 개발되었음

(7) 기타

이외에도 chloramphenicol, sulfa제 및 trimethoprim, polymyxin, bacitracin, mupirocin, fusidic acid, streptogramin 등 다양한 항생제가 개발되어 사용되고 있음

DIFFERENT CLASSES OF ANTIBIOTICS - AN OVERVIEW

Key: ● COMMONLY ACT AS BACTERIOSTATIC AGENTS, RESTRICTING GROWTH & REPRODUCTION ● COMMONLY ACT AS BACTERICIDAL AGENTS, CAUSING BACTERIAL CELL DEATH



© COMPOUND INTEREST 2014 · WWW.COMPOUNDCHEM.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem
Shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives license.



<그림2> 항생제 세대 분류

나. 항생제의 작용기작

(1) 세포벽 합성 억제

(가) beta-lactam antibiotics (penicillin, cephalosporin, carbapenem, monobactam)

- 세포벽 기본 구성물질인 peptidoglycan 형성의 마지막 단계에 관여하는 transpeptidase 효소와 비가역적 공유결합을 이루어 cross linking reaction을 억제

(나) Glycopeptides (vancomycin, teicoplanin)

- stem peptide의 terminal D-alanine-D-alanine component에 결합하여 subunits이 peptidoglycan backbone에 추가되는 것을 억제

(2) 세포막 구조와 기능의 파괴

(가) polymyxin

- 세포막에 있는 인지질에 작용하여 세포막의 투과성을 변화시켜 세포막 기능을 억제
그람음성균의 단백질과 질소염기를 유출시킴

(나) amphotericin B, fluconazole, itraconazole

- 진균막에 있는 스테롤과 복합체를 이루어 비정상적인 통로를 만들고 이온을 유출시킴

(3) 단백질 합성 억제

(가) Aminoglycosides (gentamicin, kanamycin, tobramycin, streptomycin, neomycin, netilmicin, amikacin)

- 박테리아 ribosome 30S subunits에 비가역적으로 결합하여 단백질 합성 시작을 차단

(나) Macrolides (erythromycin, clarithromycin, azithromycin)

- 박테리아 ribosome의 50S 부분에 특이적으로 결합하여 단백질 chain elongation 억제

(다) Lincosamide (clindamycin, lincomycin)

- macrolides와 구조는 다르지만 50S ribosome에 결합하여 단백질 합성 억제

(라) Chloramphenicol

- 박테리아 ribosome의 50S에 가역적으로 결합하여 peptide bond 형성을 억제

(마) Tetracyclines (tetracycline, doxycycline, minocycline)

- 박테리아 30S ribosomal subunits와 가역적으로 결합하여 aminoacyl tRNA가 mRNA-ribosome complex와 결합하는 것을 억제

(바) Mupirocin (pseudomonic acid)

- isoleucine tRNA synthetase를 경쟁적으로 억제하여 isoleucine-charged tRNA의 세포 내 저장을 고갈시켜 단백질 합성을 중지

(4) 주요 대사경로 차단

(가) Sulfonamide

- 기질인 p-aminobenzoic acid (PABA)와 유사한 구조로 정상적인 효소-기질 반응을 저지하여 folic acid 생성을 억제

(나) trimethoprim

- folic acid의 pteridine moiety와 유사한 구조로 dihydrofolate reductase의 competitive inhibitor로 작용하여 folic acid 생성을 억제

(5) DNA와 RNA 구조와 기능의 억제

(가) quinolones(norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, lomefloxacin)

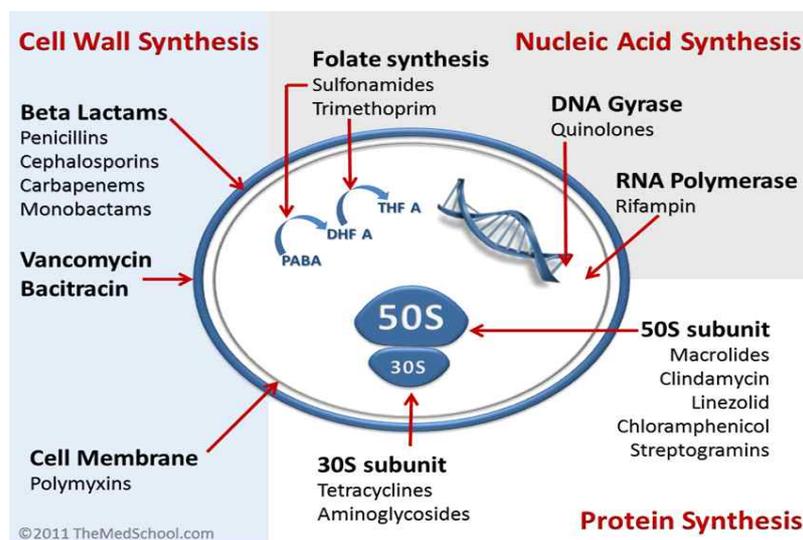
- DNA의 negative supercoiling에 관여하는 DNA gyrase의 subunits 중의 하나(A subunit)를 억제, DNA의 복제와 수선을 중단 시킴

(나) rifampin

- DNA-dependent RNA polymerase에 단단히 결합하여 DNA의 transcription을 억제

(다) nitrofurantoin

- DNA strand를 직, 간접적으로 파괴



<그림3> 항생제의 작용기전과 종류

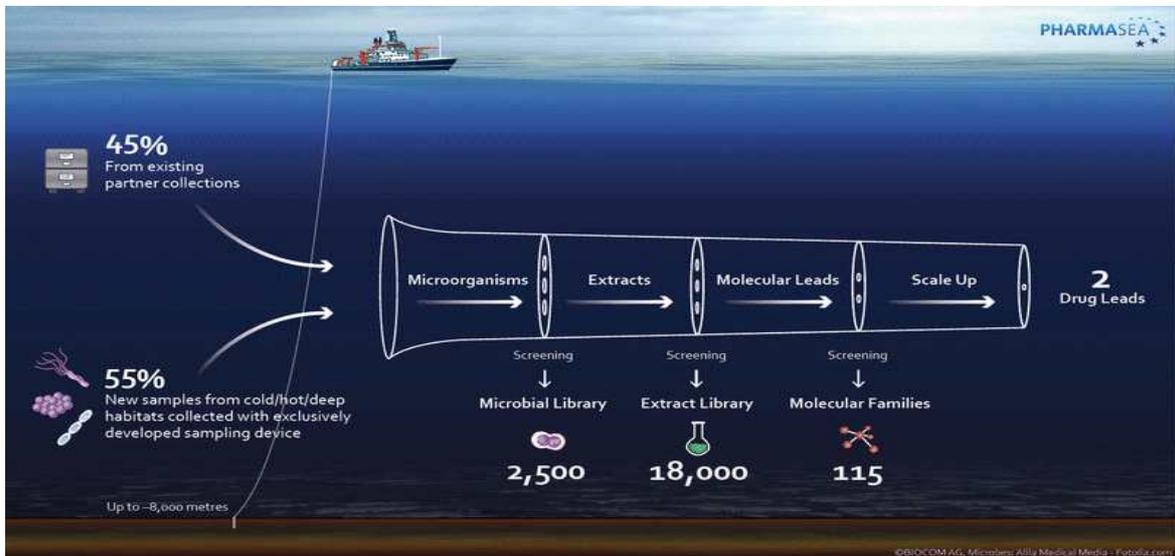
2. 신규 항생제 발굴사례

가. 국내

- (1) 국산 24호 신약 탄생, 동아에스티의 신약 슈퍼항생제 시백스트로는 2014년 7월 미국 FDA(식품의약청)의 승인을 받았고, 2015년 국내 신약 허가 승인. 국산신약으로 미국에 진출한 것은 지난 2003년 LG생명과학의 팩티브 이후 두 번째
- (2) 국산 항생제 신약 개발, 2015년 국내 23호 신약 탄생 (자보란테징, 동화약품). 자보란테징은 '자보플록사신 D-아스파르트산염'을 주성분으로 하는 퀴놀론계 항생제로써 만성기관지염, 폐기종을 포함하는 만성폐쇄성폐질환 급성악화에 사용하는 제품.

나. 국외

- (1) 전 세계 슈퍼박테리아 항생제 시장은 반코마이신(vancomycin), 뎀토마이신(Daptomycin) 및 자이복스(Zyvox)가 주도. IMS Health 보고서에 따르면 화이자 '자이복스(Zyvox)'의 2009년 매출은 약 1조3000억 원에 달함
- (2) (미국) 최근 박테리아 배양액 추출물로 부터 개발한 항생제 2종 (Daptomycin, Dalbavancin) FDA 승인
- (3) (미국, 캐나다, 프랑스, 일본) 다양한 신규 항생제 후보 물질을 탐색, 개발하여 (Telavancin, Oritavancin, Ramoplanin, Efiprestin, Lyostaphin, WAP 829A2) 임상 실험 진행중
- (4) EU가 주관하는 “PharmaSea (2012.10.01~2016.09.30)”프로젝트는 남극과 북극을 포함한 해양에서 새로운 항생제 및 신약 후보 물질을 발굴하는 대형 프로젝트로 13개국에서 24개의 기업 및 연구기관이 참여하고 있으며, 4년간 950만유로 이상의 투자를 하고 있음
- (5) 연구가 진행 중인 과제로 현재까지 1000여개의 극지 및 해양 미생물을 스크리닝 하여 12,000 여종의 항생제 후보물질을 포함한 유용물질을 분리하였으며 40,000 여개의 활성 측정 실험을 수행하였음
- (6) 항생제 및 신약 발굴을 위한 유전체 분석과 대사경로 분석을 실시한 수편의 논문 발표. (Laura E. Lallier et al. 2014, Nat. Prod. Rep), (Botana et al. 2014, Marine Drugs), (Kennedy J, Flemer B, Jackson SA, Morrissey JP, O’Gara F, et al. 2015, PLoS ONE)



<그림4>“PharmaSea”프로젝트의 전체 연구 모식도

3. 기술 및 특허동향 분석

가. 분석 배경 및 목적

본 특허 동향 분석에서는 『극지 미생물 이용 항생제 개발 기술』에 대한 특허 동향을 분석함으로써 주요국가의 특허출원동향 및 경쟁력 현황 등을 파악하고 각 분야별 핵심 특허 및 출원자 분석을 통한 분석대상기술의 R&D 전략 수립 및 IP 전략 수립에 대한 객관적인 타당성을 제공하고자 함

나. 특허동향 분석

(1) 전체 연도별 특허출원

(가) 미생물(방선균) 유래 항생제(A) 관련 기술 분야의 전체적인 특허동향을 살펴보면, 그래프에는 나타나지 않았으나, 1973년도에 처음으로 출원되었고, 1980년대 초반부터 본격적인 출원활동이 시작되어 등락을 반복하며 2000년대 초반까지 증가하다가 2000년대 후반부터 출원이 점차 감소하는 추세임

(나) 반면 극지 미생물 유래 항생제(B) 관련 기술 분야의 경우, 1975년도에 처음으로 출원되기 시작하였으나, 1990년대 중반까지는 출원활동이 미미하게 나타났으며, 1990년대 후반부터 전체적으로 출원활동이 증가되는 추세를 보이고 있음

(다) 2014년 8월 이후에 출원된 특허 중 아직 공개되지 않은 것이 존재할 것으로 예상되므로, 2014년 이후 역시 지속적인 출원이 이루어지고 있을 것으로 판단됨

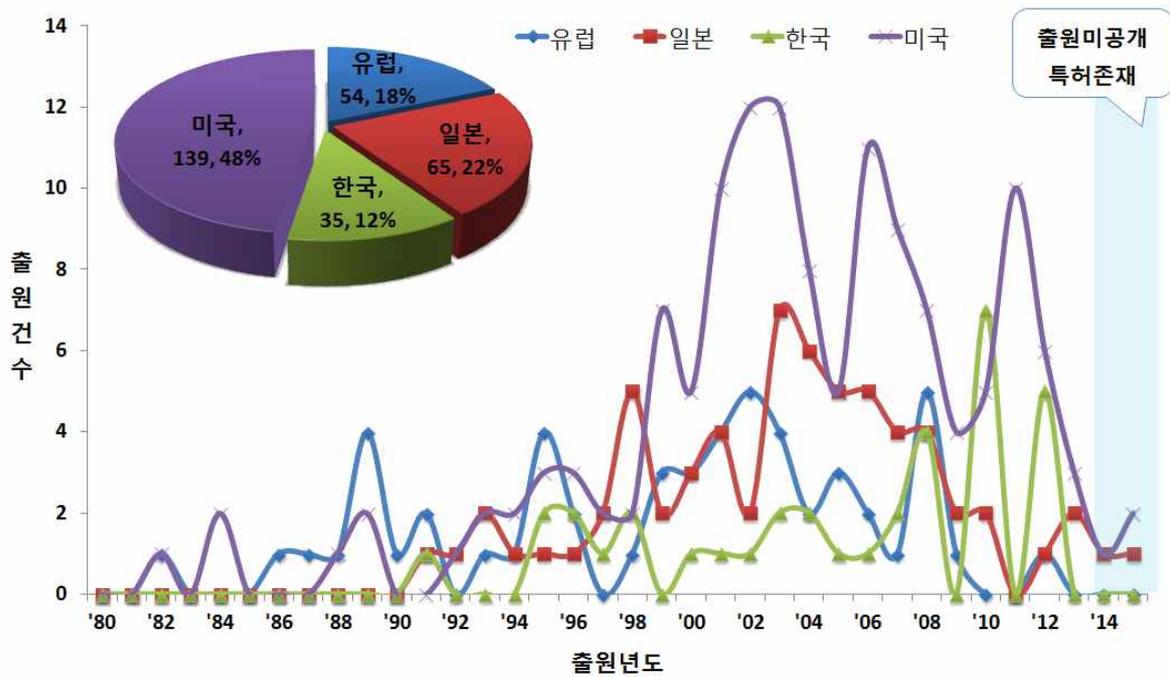


<그림5> 전체 연도별 특허출원 현황 추이

(2) 유전자변형 기술 이용 방선균 유래 항생제 기술 연도별 특허출원

(가) 유전자변형 기술 이용 방선균 유래 항생제 기술 분야는 1977년에 미국에서 첫 출+원이 이루어졌으나 본격적인 출원활동은 1980년대 후반부터 시작되었고, 전체적으로 1990년 중반에 특허출원 건수가 점차 증가하여 1990년 후반 이후부터는 등락을 반복하며 활발히 출원되다가 2012년도 이후 급격히 감소하는 추세를 보이고 있음

(나) 국가별 점유율은 미국특허가 약 48%로 나타나 가장 많은 특허출원 건수를 보이고, 그 다음으로는 일본(22%), 유럽(18%), 한국(12%)의 순으로 출원 건수를 보임. 따라서, 본 기술 분야에서는 미국이 기술의 흐름을 리드하는 것으로 볼 수 있음



<그림6> 기술 분야 특허 점유율 및 특허건수 추이

(3) 유전자 변형 기술 이용 항생제 개발 기술 연도별 특허출원

(가) 유전자 변형 기술 이용 항생제 개발 분야는 1993년도에 미국에서 처음으로 출원되기 시작하였고, 일본에서는 가장 늦은 2003년에 특허 출원이 시작되었으며, 현재까지 전체적으로 적은 수의 출원이 진행되고 있음

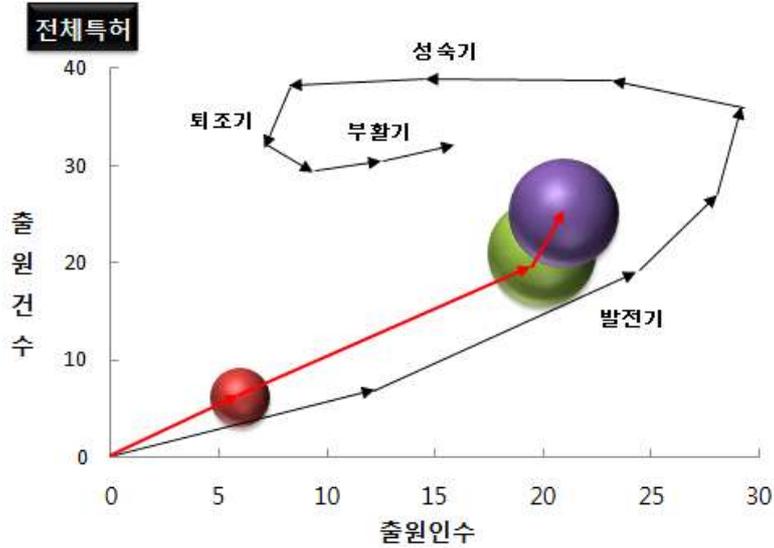
(나) 국가별 점유율은 미국특허가 약 81%로 나타나 대다수의 특허 점유율을 차지한 것으로 보여 해당 분야에서 미국이 기술 흐름을 리드하고 있는 것으로 나타났으며, 그 다음은 유럽(11%), 일본(6%), 한국(2%) 순으로 나타남

(4) 유전자 변형 기술 이용 항생제 개발 기술 분야의 위치

(가) 특허건수와 출원인수 변화의 상관관계를 통해 기술의 위치를 살펴보는 포트폴리오 기본 모델에서, 전체(한국, 미국, 일본, 유럽 통합) 특허의 포트폴리오 모델을 살펴봄

(나) 유전자 변형 기술 이용 항생제 개발 기술은 전체 유효 건수가 매우 적어 모집단의 수가 매우 적었으므로 국가별 분석 수행에 어려움이 있어 전체를 대상으로 분석을 수행함

(다) 한국, 미국, 일본, 유럽 전체 특허에 대해 유전자 변형 기술 이용 항생제 개발기술 분야의 기술주기 변화를 살펴보면, '80~'88년 구간에서는 특허출원이 이루어지지 않았고, '89~'97년 구간에서 '98년~'06년 구간을 거쳐 '07~'15년 구간에 이르기까지 특허건수 및 출원인이 급격히 증가하여, 발전기 단계에 해당한다고 분석하는 것이 타당함



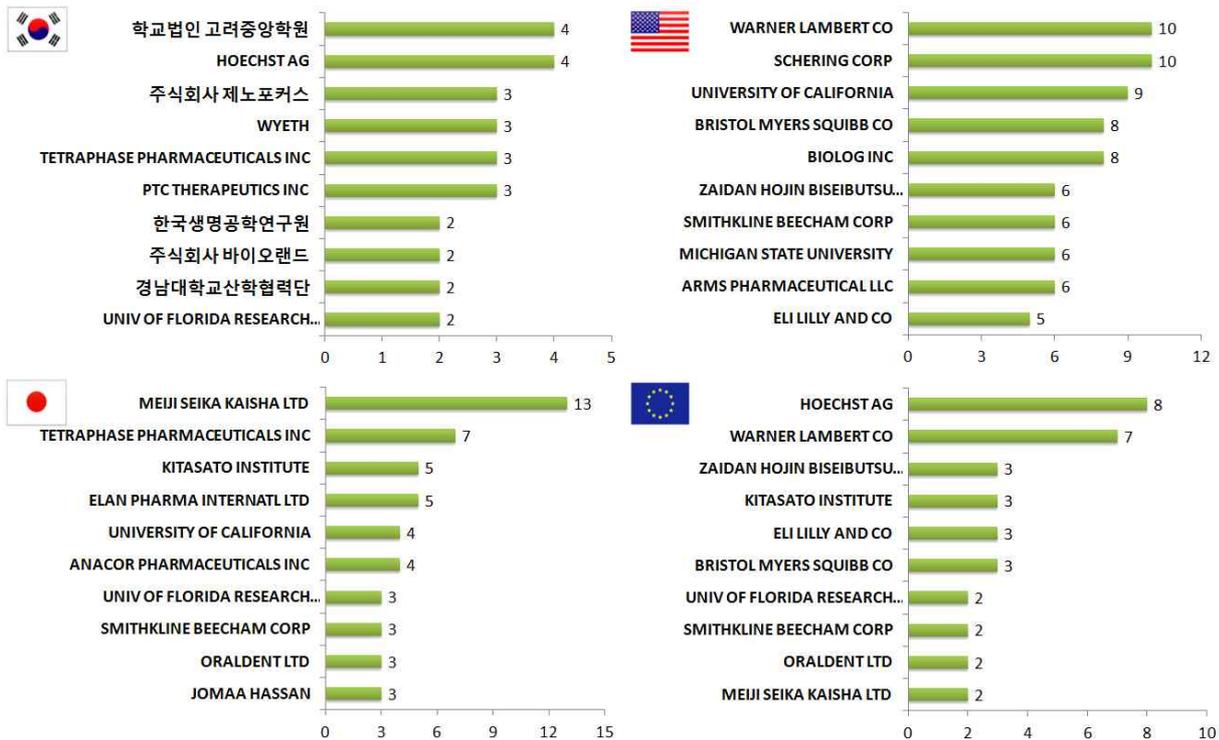
<그림7> 포트폴리오로 본 기술 분야의 위치

(5) 주요 출원인 특허동향

(가) 미생물(방선균) 유래 항생제 기술에 대한 주요출원인으로는 미국과 유럽의 회사 및 대학교가 주축을 이루어, HOECHST AG(독일), WARNER LAMBERT CO(미국), FLORIDA 대학교(미국) 등이 있음

- ① 특이점은 한국의 주요출원인은 자국 출원인과 미국국적의 출원인이 많이 있었고, 일본, 유럽의 경우 자국 출원인과 타국적 출원인이 다양하게 분포되어 있는 반면, 미국의 경우 자국 출원인이 대부분을 이루고 있음
- ② 주목할 점은 한국과 미국의 주요출원인은 다국적 기업과 함께 대학교가 강세이고, 한국국적의 출원인은 거의 자국 중심의 출원활동을 하고 있는 반면, 미국을 비롯한 일본, 유럽국적의 출원인은 자국뿐만 아니라 해외에도 활발히 진출하고 있음을 알 수 있음
- ③ 한국 내 다출원 공동 1위 출원인 중 하나인 학교법인 고려중앙학원(한국)은 자국의 대학교 법인으로, 방선균으로부터 제조된 항생물질 및 항생제에 관한 특허를 보유하고 있으며, 국내출원이 다수인 반면 해외출원에는 활발하지 않은 것으로 파악되었고, 한편, 주요출원인 중 하나인 (주)바이오랜드(한국)는 화장품, 식품, 및 의약품 원료 관련 기업으로, 유전자 변형 기술을 이용하여 미생물 유래 항생물질을 증가 및 생산하는 방법에 관한 특허를 보유하고 있음
- ④ 미국 내 다출원 기업인 WARNER LAMBERT(미국)는 진통제, 항생제 등의 의약품을 개발하는 제약회사로, 미생물 유래의 항균 화합물의 항생제 용도에 관한 특허를 보유하고 있으며, 또 다른 다출원 기업인 SCHERING(미국)은 유전자 변형 기술을 이용하여 미생물로부터 항생물질을 제조하는 방법에 관한 특허를 보유하고 있고, 미국 주요출원인 중 BRISTOL MYERS SQUIBB(미국) 및 SMITHKLINE BEECHAM(미국) 등은 한국, 일본, 및 유럽에도 모두 특허를 출원하였으며, 여러 국가에서 주요출원인에 포함되어 있어, 해외 출원활동 역시 매우 활발한 것을 알 수 있음

- ⑤ 일본의 다출원 기업인 MEIJI SEIKA KAISHA LTD(일본)는 식품 및 의약품 제조판매업체로, 배양조건 또는 유전자 변형 기술을 이용한 미생물 유래 항진균 물질 제조 방법에 관하여 다수의 특허를 출원하고 있으며, 자국 중심으로 출원활동이 이루어지고 있으나 해외에도 특허 출원을 진행한 바 있음
- ⑥ 유럽 내 다출원 기업인 HOECHST AG(독일)는 독일의 화학 및 제약회사로서, 미생물을 배양하여 제조된 항생제에 관한 특허를 보유하고 있으며, 국내뿐만 아니라 해외에도 활발히 출원하여 한국에서도 다출원 공동 1위 기업 중 하나인 것으로 나타남



<그림8> 기술에 대한 각국의 주요출원인 (Top10)

- 제 1출원인 기준(개인과 기관이 공동출원일 경우 기관을 제1출원인으로 함)
- 분석구간: 한국, 미국, 일본, 유럽 ~2015년(출원년도)

(6) 주요 출원인 특허동향

(가) 극지 미생물 유래 항생제 기술 분야는 미국을 제외한 국가의 유효 건수 및 출원인수가 매우 적었으므로 국가별 분석 수행에 어려움이 있어 전체 특허를 대상으로 주요 출원인 분석을 수행하였음

- 또한, 극지 미생물로부터 유래된 항생제와 직접적으로 관련된 특허가 거의 없어, 본 기술은 주요 키워드를 포함하는 특허를 대상으로 분석을 진행하였기 때문에 해당 기술 분야를 주도하는 출원인 분석이 어려우므로, 각국 주요출원인에 대한 그래프는 생략함

(나) 본 기술 분야에 대한 주요출원인으로는 미국과 유럽 국적의 출원인이 주축을 이루고 있으며, 특히 미국 국적의 출원인이 과반수를 차지하고 있었고, FOAMIX(이스라엘), PROCTER & GAMBLE(미국), MONOSOLRX(미국) 등이 상위권에 속해 있음

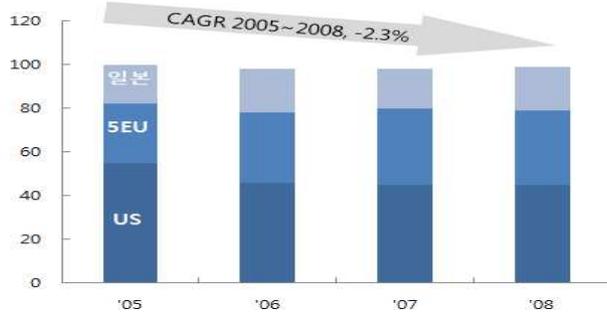
- ① 특이점으로 주요출원인은 다국적 기업 외에도 대학교에서 많은 특허를 출원한 것으로 나타났으며, 여러 국가에 진출하여 활발한 출원활동을 진행한 출원인은 거의 없는 것으로 파악됨
- ② 다출원 1위 출원인은 제약회사인 FOAMIX(이스라엘)로 확인되었는데, 대상 기술과 관련된 특허를 보유하고 있지는 않았고, 주요출원인 중 CALIFORNIA 대학교(미국)는 다른 항생제 개발기술 분야에서도 상위권에 속한 출원인임
- ③ 한국 국적의 출원인은 주요출원인에 해당되지 않았고, 한국생명공학연구원(한국) 및 한국해양연구원(한국)에서 각각 1건씩 특허를 출원한 바 있으나, 항생기능을 갖는 재조합 단백질 제조방법과 남극에 서식하는 동물 유래 항생물질에 관한 특허인 것으로 확인됨
- ④ 본 기술 분야의 전체적인 출원 건수가 적은 것은 대상 기술이 아직 개발 초기 단계여서 본격적인 연구가 진행되지 않았거나 공개되지 않은 특허가 많이 존재하기 때문인 것으로 판단됨

다. 시장성 분석

- (1) 항생제(Antibiotics)는 미생물 감염에 의한 질환을 치료하는 물질로서, 감염을 일으키는 미생물의 생육을 파괴하는 기전을 가짐
- (2) 100여년이 넘는 기간 동안 인류 보건과 밀접한 연관을 가져온 의약품인 만큼 거의 모든 주요 제약 기업의 제품 포트폴리오에 포함되어 있고 처방을 통해 소비자에게 전달되는 빈도가 가장 높은 의약품군임
- (3) 2014년 기준, 치료 영역별 5대 시장규모는 항암제 745억 달러, 당뇨치료제 639억달러, 진통제 598억 달러, 고혈압 치료제 475억달러, 항생제 403억 달러로 집계되어 조사된바 있으며, 전체 치료제 시장규모에서 4.3%를 차지하고 있음(출처: Khidi brief, 보건산업브리프 vol.176, 2015.05)
- (4) 특히 국내 의약품 시장에서는 의약 분업의 정착으로 인해 의료기관의 처방 관행이 의약품 소비의 최대 변수로 부상하고 있는 바, 항생제는 보험 청구 약제비(곧 의료기관 처방에 의한 전문 의약품의 사용 동향을 의미) 중 최대액을 차지하고 있으며 특히 소비자의 접근 용이성이 큰 의원급 의료기관의 사용빈도가 높기 때문에 항생제 시장의 동향은 곧 전체 의약품 시장을 가늠할 수 있는 척도가 됨
- (5) 항생제를 통한 감염증의 예방 또는 완치는 20세기 의학이 이룬 가장 큰 업적이라고 할 수 있으나, 치료제인 항생제의 내성이 증가하면서 치료 실패에 따른 사망이 증가하고 있는 추세임
- (6) 최근까지도 각종 세균이 여러 항생제에 내성을 보이는 다제내성균이 돼 치료할 약제가 아예 없어지는 현상이 세계 병원에서 발생하고 있으며, 이러한 항생제 내성을 극복하기 위한 항생제 내성이 없는 항생제 개발이 요구됨

(7) 세계 항생제 치료제 시장

(가) 항생제는 세계 전체 의약품시장의 4.3%를 차지하며, 지난 2003년부터 2007년까지의 세계 항생제 시장규모는 연평균 -3%의 역성장을 기록한 바 있고, 2005~2008년 주요국의 항생제 시장의 연평균 성장률은 -2.3%로 규모가 감소했는데, 이는 항생제 산업이 매우 성숙됐고 다양한 클래스와 제품들이 제네릭에 의해 많이 개발됐기 때문임



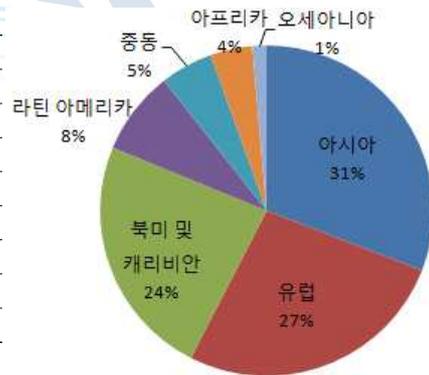
<그림9> 최근 항생제 시장규모 및 연평균증가율

출처: Datamonitor, MIDAS sales data, IMS Health, 2009.4.

(다) 세계 항생제 시장을 지역별로 구분하였을 때, 아시아 지역 항생제 시장이 130억 달러 (30.9%)로 가장 큰비중을 차지하고 있으며, 유럽(112억 달러, 26.6%)과 북미(100억 달러, 23.7%) 지역 시장 비중이 높은 것으로 나타남

(단위: 백만 달러, %)

구분	시장규모	비중
아시아	13002	30.9
유럽	11215	26.6
북미 및 캐리비안	9982	23.7
라틴 아메리카	3450	8.2
중동	2159	5.1
아프리카	1708	4.1
오세아니아	587	1.4
전체 합계	42104	100.0



출처: Icon Group international Inc. (2010b)

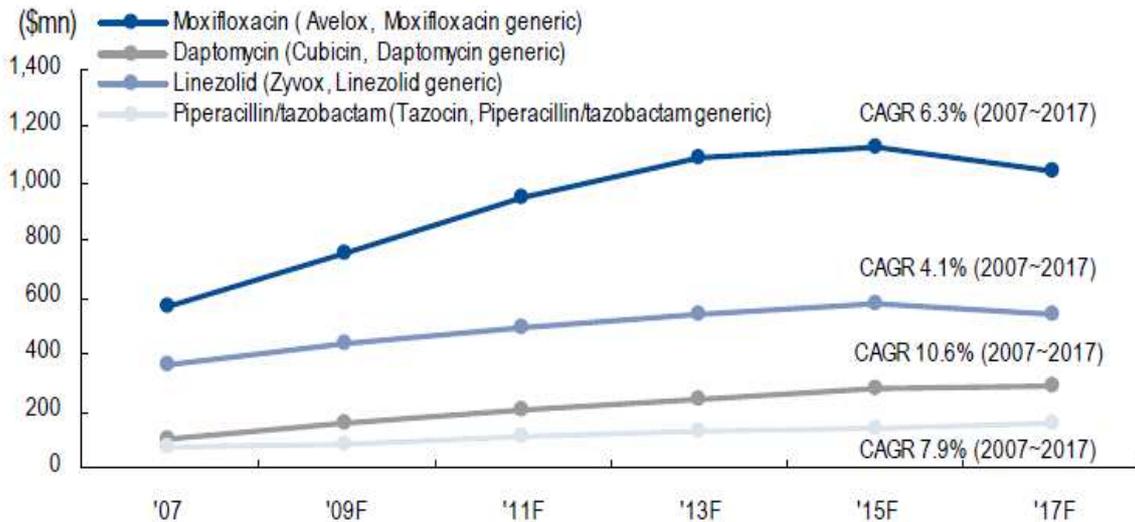
<그림10> 지역별 항생제 시장 현황, 2011년

(라) 최근 글로벌 항생제 R&D 파이프라인이 증가하는 추세이며, 이는 1, 2세대 항생제에 대해 내성을 보이는 새로운 박테리아가 나타나면서 강력한 슈퍼항생제의 필요성이 대두되었기 때문임

(마) 1세대 항생제인 페니실린계 항생제에 대해 내성을 보이는 박테리아가 나타나면서 글로벌 제약회사들은 항생제 연구를 줄였는데, 10년 연구 R&D 투자대비 판매 지속시간이 줄어들기 때문이었음

(바) 그러나 R&D 투자가 지연되면서 나타난 부작용으로 기존 항생제에 대해 내성을 보이는 다양한 종류의 슈퍼박테리아들이 반복적으로 나타나기 시작했으며 이로 인한 사망자가 빠르게 증가하는 추세임

(사) 항생제는 치료에 있어서 선택이 아닌 생존을 위한 필수 불가적인 의약품으로 자리하고 있고, 항생제는 질병 감염 시에 가장 기본적으로 처방되는 의약품 중의 하나이므로 항생제의 시장은 감소하기 보다는 꾸준한 성장을 지속할 전망으로 보임



<그림11> 전세계 항생제 종류별 시장규모 기준 (출처: Datamonitor)

(아) 세계 항생제 시장은 연간 성장률 2%로 추산되고 있으나, 항생제 시장규모보다 더 중요한 것은 현재 항생제 시장의 가장 큰 이슈인 저항성이고, 이로 인해 항생제 시장의 unmet needs 가 발생하고 있는 실정임

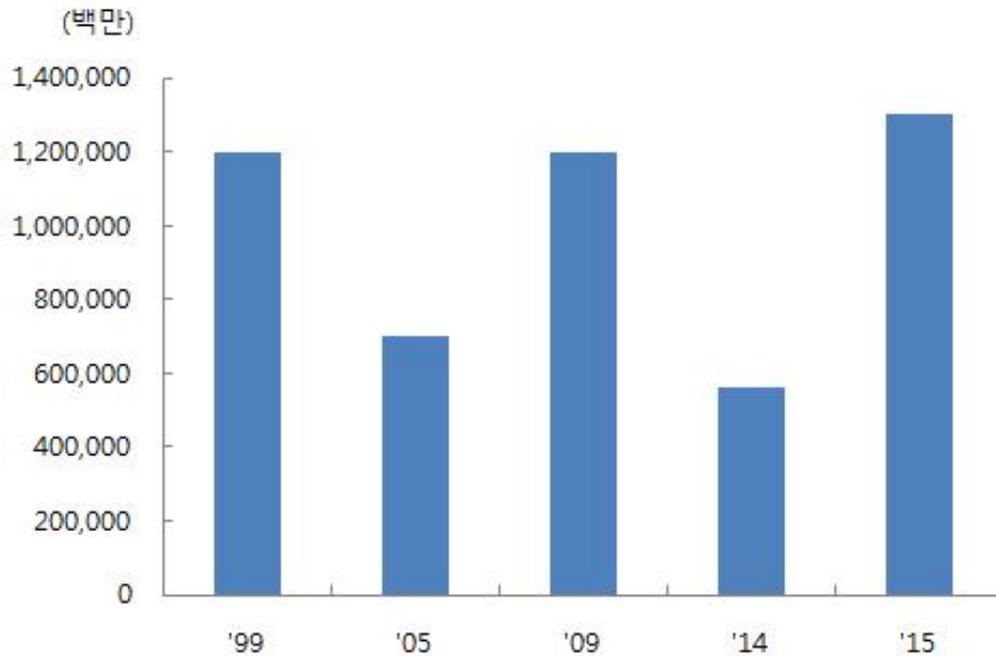
(자) 매년 6명 중 5명의 미국인이 항생제 처방을 받는다는 통계가 있는데, 이는 무려 연간 2억 6,200만 건의 항생제 처방 건수임

(차) 따라서 현재 항생제 시장은 새로운 치료약이 필요한 실정이고, 항생제 연구개발 연구소 또는 기업에게는 새로운 기회가 될 것으로 예상됨

(8) 국내 항생제 치료제 시장

(가) 국내 제약산업은 내수용 완제품 중심이어서 초기 개발비를 투자하여 신약의 원료를 만들어 내는 것이 아니라 원료의 합성을 통한 최종 완제품 생산이 대부분을 차지하며, 이로 인해 제품의 life cycle이 짧고, 신약개발투자비 보다는 상대적으로 판매비용의 비중이 높으며, 또한 특허권으로 보호되는 오리지널 의약품에 비해 부가가치 및 영업 기반이 취약하며 질병의 다중다양성으로 인해 의약품 역시 다품종 소량생산 체제로 그 시장이 세분화 되어 있는 특징이 있음

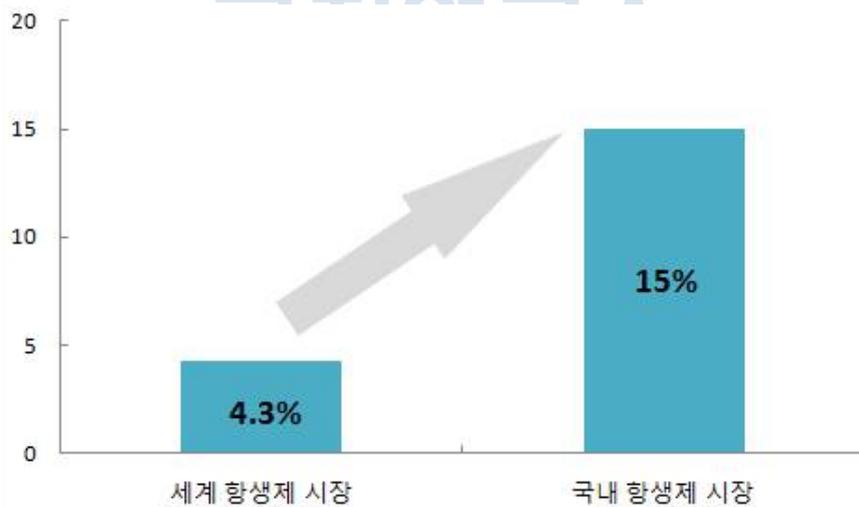
(나) 국내 항생제 시장은 2015년 기준 1조 3000억원으로 추정되고 있으며, 앞서 살펴본 전세계 항생제 시장과 부합하는 시장의 규모가 형성되고 있음을 확인하였음



<그림12> 국내 항생제 시장규모

출처: 세계일보 2015년 03월 기사 발췌, 농진청 자료, 대응화학 분석보고서, 세계일보 2015년 03월 기사 발췌 및 재구성

(다) 국내 제약산업에서 항생제 시장이 차지하는 비중은 전체 의약품 시장의 15% 수준으로서, 이는 전세계 항생제 시장 비중(4.3%)을 크게 상회하는 것으로서 국내 의약 소비의 특성을 반영한다고 볼 수 있음



<그림13> 세계 및 국내 항생제 시장규모 비교

출처: 산업기술정보원,1999; 우경숙, 2006 재인용 및 재구성

(라) 보건복지가족부의 발표에 따르면 2010~2012년 사이 국내에서 소비된 항생제의 총량(DDDs)은 미미하게 증가하였고, 3년간 매년 항생제 사용량은 OECD에 속한 30개국의 항생제 사용량 자료와 비교하면 아직도 높은 수준에 있음

(마) 연도별 상반기 항생제 처방률을 보면, 2009년 28.6%, 2010년 27.3%, 2011년 26.2%, 2012

년 26.1%으로 나타났고, 2000년 의약분업 이후 항생제 처방률이 지속적으로 감소하고 있으나 여전히 WHO 권장치(23%)보다는 높은 수준임

<표1> 국내 연도별 항생제 사용량

(단위:DDD/1,000명/day)

구분	2010	2011	2012
사용량	27.1	26.6	27.3
전년대비	-	0.3%	2.9

출처: 2012년도 의약품 소비량 및 판매액 통계 심층분석, 한국보건사회연구원

* 인구 1,000명의 성인이 소비한 항생제 양을 DDD(Defined Daily Dose) 단위로 환산후 측정, 항생제 사용량 수치가 24.7이라면, 인구 1,000명 성인이 하루에 항생제 표준량으로 24.7명분을 복용하였다는 의미임, 자료출처: 보건복지가족부, 2009

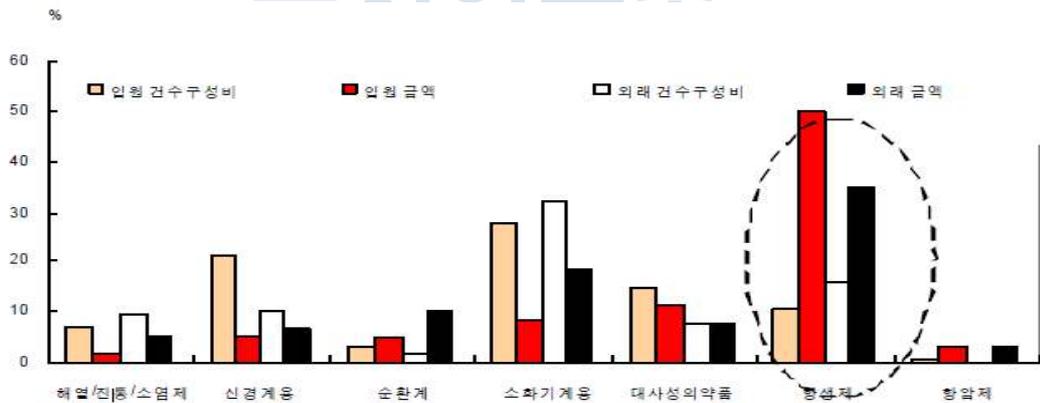
<표2> OECD 가입국 연도별 항생제 사용량

(단위:DDD/1,000명/day)

국가	벨기에	포르투갈	한국	호주	노르웨이	독일	네덜란드
사용량	24.7	23.8	23.8	22.3	20.1	14.2	12.3

* 2006년 기준, OECDE 국가 중 일부 국가들만이 자국의 항생제 사용량을 공개하고 있으며 공개된 16개 국가의 평균비율은 21.3(최고 27.2, 최저 12.3), 자료출처: 보건복지가족부, 2009

(바) 국내 항생제의 사용량은 전년도 대비 매년 증가하는 추세이고 국내 치료영역 별 약제비 비중 또한 가장 많이 차지하고 있는바, 국내 항생제 시장성장률은 지속적으로 높아질 것으로 판단됨



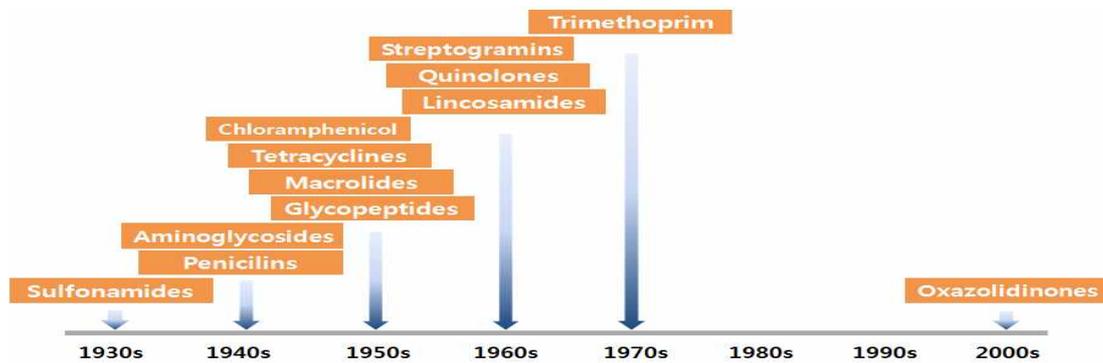
<그림 14> 주요 치료영역 별 (보험) 약제비 비중

출처: 대한 의사 협회지, 신영증권리서치 센터

(사) 한편, 국내 제약산업은 내수용 완제품 중심이어서 초기개발비를 투자하여 신약의 원료를 만들어 내는 것이 아니라 원료의 합성을 통한 최종 완제품 생산이 대부분을 차지하며, 이로 인해 제품의 life cycle이 짧고, 신약개발투자비 보다는 상대적으로 판매비용의 비중이 높으며, 또한 특허권으로 보호되는 오리지널 의약품에 비해 부가가치 및 영업 기반이 취약하며 질병의 다중다양성으로 인해 의약품 역시 다품종 소량생산 체제로 그 시장이 세분화 되어있는 특징이 있음

(9) 항생제 시장의 변화

- (가) 글로벌 제약사들은 항생제가 지속적인 매출과는 거리가 있어 이익이 안된다는 이유로 항생제 개발을 소홀히 해왔으며, 항생제 시장은 오래 전부터 있어왔었기 때문에 이미 성장한 시장이고 빅파마의 투자가 낮았던 이유로 현재 전세계 항생제 파이프라인은 부족한 실정임
- (나) 주로 상업화가 어려운 대학, 국공립연구소에서 항생제 연구가 이루어져왔고, 이 때문에 항생제가 실질적으로 시장에 나올 수 있는 기회가 많지 않았음
- (다) 실제로 1935~1968년 사이에는 142종의 항생제가 개발되었으나 이후 45년간 5종의 항생제만이 개발되었고, 1987년 이후에는 새로운 계열의 항생제가 나오지 않다가 2008~2012년에 2개의 항생제만이 승인을 받았음
- (라) '15년 1월 글로벌 제약사 머크(Merck)가 항생제 개발회사인 큐비스트(Cubist Pharmaceuticalls)를 95억불에 인수하였고, MRSA 등과 같은 슈퍼박테리아에 대한 항생제 파이프라인을 확보함에 따라 향후 글로벌 제약사들의 항생제에 대한 움직임이 보임

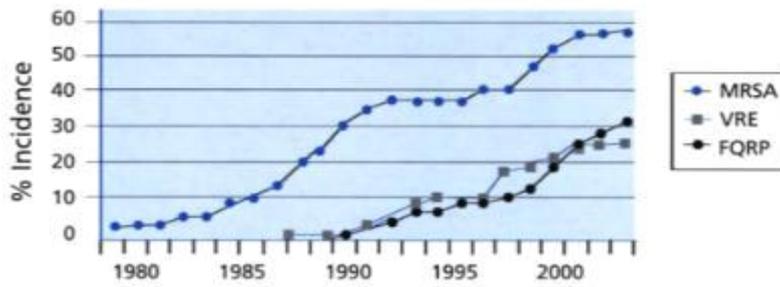


<그림15> 항생제 개발 현황

(10) 항생제 내성의 현황

- (가) 미국 질병통제예방센터(CDC)와 항생제 내성에 대한 영국의 한 보고서에 따르면 미국에서 한해 슈퍼박테리아에 감염되는 환자수는 2백만명에 이르고 미국과 유럽에서 이로 인해 사망하는 환자수는 약 50,000명에 이르고, 이로 인한 생산성 손실비용은 200억 달러에 이릅니다
- (나) 미 오바마 대통령도 항생제 저항에 대한 우려를 표명하며 지난 2014년부터 새로운 항생제 개발을 위한 이니셔티브 시행, 예산 증대 등 다각적 방안을 마련하여 추진하고 있는 실정임

Chart 1: Resistant Strains Spread Rapidly



Source: Centers for Disease Control and Prevention

<그림16> 저항성 균 발생 현황

(11) 항생제 시장의 미래와 미국 정부의 지원 현황

- (가) 세계 항생제 시장은 2010년 현재 약 420억 달러(\$42bn)에 이르고 있고, 연간 성장률은 4%로 추산되고 있음
- (나) 그러나 항생제 시장규모보다 더 중요한 것은 현재 항생제 시장의 가장 큰 이슈는 저항성 이고 이로 인해 이 시장의 unmet needs가 발생하고 있으며, 현재 항생제 시장은 새로운 치료약이 필요한 실정이고, 항생제 연구개발 기업에게는 새로운 기회가 될 것으로 전망됨
- (다) 이에 각국 정부에서도 새로운 항생제를 개발하는 데 각종 지원정책을 시행하고 있는 실정이며 미국의 경우, 미국의 Generating Antibiotic Incentives Now (GAIN) Act of 2012는 항생제 후보물질을 qualified intellectual disabilities professionals (QIDPs)로 지정해 더 빠른 FDA 심사가 이루어지며 5년간의 추가 시장독점권을 가지게 하였으며, 카바페넴 내성 장내세균 (Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, CRE)과 extended-spectrum β -lactamase producing enterobacteriaceae (ESBLs)가 QIDP 대상으로 지정된 사례임
- (라) Antibiotic Development To Advance Patient Treatment (ADAPT) Act of 2013은 미 FDA가 생존을 위협하는 수준의 감염(life-threatening infections)을 치료하는 항생제에 대해 적은 수의 임상시험으로도 허가를 내주도록 하고 있는 실정임
- (마) 미 보건복지부 산하 생물약품첨단연구개발국(Biomedical Advanced Research and Development Authority, BARDA)의 경우 항생제 전문 연구개발기업인 Achaogen의 그람음성균 항생제에 \$60m을, Cempra에는 \$58m을 지원한 바 있고, 최근에는 한 회사의 여러 항생제 파이프라인을 동시에 지원하는 프로그램도 시행하였는데 그 예가 지난 2013년 GSK의 항생제 개발에 5년간 \$200m을 지원하는 협약을 체결한 바 있음

(12) 주요 항생제 제품의 특허만료에 따른 시장 침체 전망

- (가) '19년부터 주요 항생제 제품의 특허가 만료되어 전체적으로 시장침체가 예상됨

(나) 존슨앤존슨의 레바퀸(Levaquin), 화이자의 자이복스(Zyvox), 아스트라제네카의 머렘(Merrem), 바이엘 헬스케어 아벨록스(Avelox)

<표3> 항생제 특허만료 및 출시예정

	미국	유럽	일본
2004	Ciproxin(2004년 특허만료)		Spectracef(2004년 특허만료)
2005	Zithromax(2005년 특허만료)		
	Biaxin(2005년 특허만료)		
2007	Zosyn(2007년 특허만료)	Tazocin(2007년 특허만료)	
2009	Vibativ(2009년 출시)	Merrem(2009년 특허만료)	
2010	Merrem(2010년 특허만료)	Zeftera(2010년 출시)	Tygacil(2010년 출시)
	Zef tera(2010년 출시)		
2011	Levaquin(2011년 특허만료)	Tavanic(2011년 특허만료)	Cravit(2011년 특허만료)
	Ceftaroline(2011년 출시)	Vibativ(2011년 출시)	Merrem(2011년 특허만료)
		Ceftaroline (2005년 출시예정)	
2012	Doribax(2012년 특허만료)		Tygacil(2012년 특허만료)
2013			Zeftera(2013년 출시)
2014	Avelox(2014년 특허만료)	Avelox(2014년 특허만료)	Avelox(2014년 특허만료)
2015	Zybox(2015년 특허만료)		Vibativ(2015년 출시)
2016	Tygacil(2016년 특허만료)	Zyvox(2016년 특허만료)	
2018		Tygacil(2018년 특허만료)	

출처: Datamonitor, 생명공학정책연구센터

(13) 주요 Key player 분석

(가) 항생제 시장에서 대부분의 시장을 차지하고 있는 제품은 존슨앤존슨의 레바퀸(Levaquin), 화이자의 자이복스(Zyvox), 아스트라제네카의 머렘(Merrem), 바이엘 헬스케어 아벨록스(Avelox)이고, 2006~2008의 매출액은 하기와 같음

(나) 특허 만료가 다가오고 있으나 아직까지 항암제 시장에서 가장 큰 점유율을 차지하고 있음

<표4> 주요 항생제 매출액

(단위: 백만달러)

Brand	Generic	Compaies	Sales		
			2006	2007	2008
Cravit	Levofloxacin	Daiichi Sankyo, Santen	1002	1260	1903
Levaquin, Floxin	Levofloxacin	Johnson&Johnson	1530	1640	1600
Zosym/Tazocin	Piperacillin+Tazobactam	Wyeth		880	1200
Avelox, Avalox	Moxifloxacin	Bayer, Schering-Plough, Shionogi	822	962	1100
Zyvox	Linezolid	PFizer	782	944	1100
Augmentin	Co-amoxiclav	GlaxoSmithKline	1055	1060	1080
Merrem	Meropenem	Astra Zeneca			900

출처: 각사 annual report, 우리투자증권(2010),

(다) 화이자, 자이복스(linezolid)

Datamonitor 자료에 따르면 지난해 4억 3700만달러 정도의 매출을 기록한 화이자의 자이복스(linezolid)는 2017년까지 연평균 4.1%씩 성장할 것으로 전망되고 있음



(라) 바이엘, 아벨록스(Avelox)

바이엘사의 아벨록스의 매출은 2009년 7억5900만달러에서 2017년 10억5000만달러로 연평균 성장률 6.3%를 기록할 것으로 전망되고 있음



(마) 동아ST, 시벡스트로(Sivextro)

미국 FDA로부터 신약허가 승인 획득하였고 폐렴 적응증 추가 등으로 글로벌 제품으로 성장 기대주임

수퍼박테리아 항생제로써 2,015년 유럽허가 받은 상태임



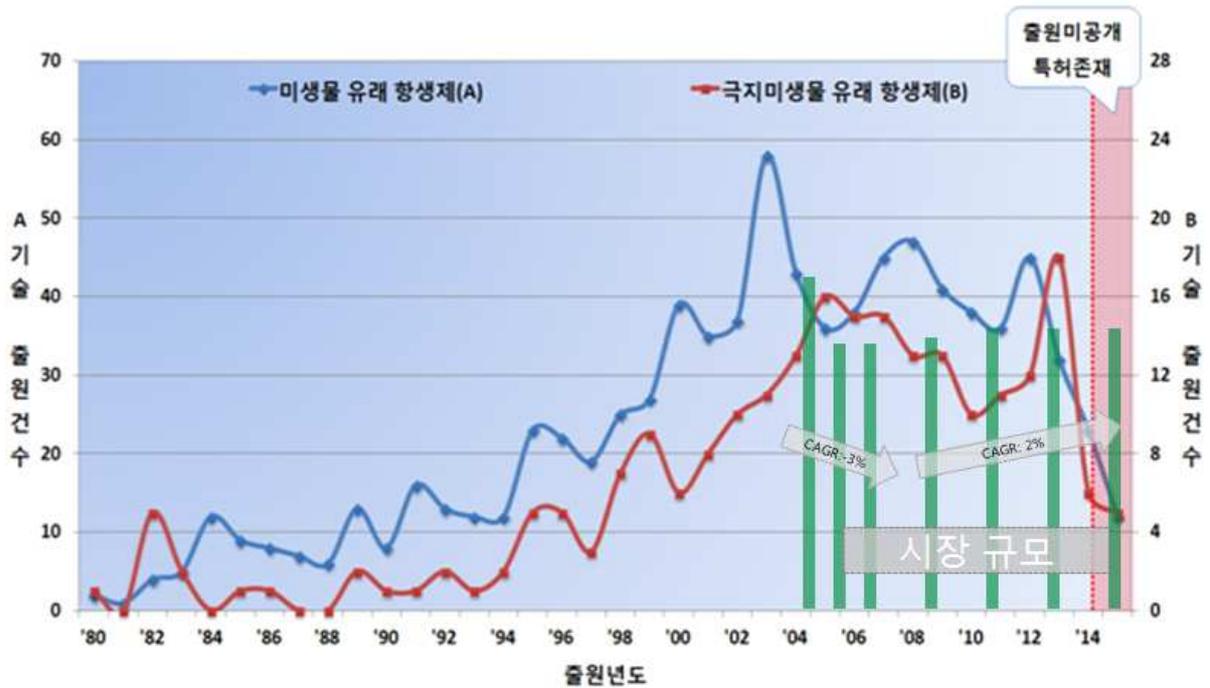
(바) 한미약품, 세트리악손

세파항생제 '세트리악손'에 대한 독일 시판허가를 획득하였고, 유럽통합승인절차(DCP)에 따라 3개국 (영국·프랑스·이태리)에 자동 시판 허가 획득함
연 100만 바이알 규모 수출-허가국가 확대 추진중에 있음



(14) R&D 방향제언

- (가) 본 분석의 수혜연구소인 극지연구소는 극지미생물을 활용함으로써 고부가가치를 창출할 수 있는 신규한 R&D 방향을 모색하는 것을 목적으로 함
- (나) 본 보고서에서는 극지미생물을 이용한 항생제 개발과 관련한 종래의 특허동향을 분석하기 위해 미생물 이용 항생제 개발 기술과 함께 비교 분석하였고, 이와 관련하여 세부기술(유전자 변형기술/배양기술)의 동향 또한 살펴봄으로써 극지연구소가 추진할 수 있는 R&D 방향에 대한 제안사항은 다음과 같음
- (다) 현재까지 미생물 이용 항생제 개발 기술과 관련하여 상당히 많은 연구가 이루어져 왔고, 2000년대 가장 많은 특허출원을 보이다가 2000년 이후 감소하는 추세를 보이고 있는데, 이는 방선균을 이용한 기술은 기술이 포화도에 이르렀으며 새로운 기술개발이 필요한 상태로서 본 연구소에서는 극지미생물을 이용하는 기술을 개발하려고 함
- (라) 한편 극지미생물 이용 항생제 기술은 현재까지 소수의 특허 출원만이 진행되고 있어 기술 개발이 초기단계로 보이며 극지연구소가 선두그룹이 될 수 있을 것으로 사료됨
- (마) 시장성과 관련하여 2007년까지 역성장률을 보이던 항생제 시장은 2017년까지 연평균 성장률 2%로 성장될 것으로 추산되고 있으며, 이는 기존 항생제에 내성을 가지는 슈퍼박테리아 및 메르스와 같은 신종 바이러스의 등장에 대항하는 새로운 항생물질 개발의 요구에 따른 것으로 판단됨
- (바) 따라서 항생제의 사용이 매년 증가하고 있으며 항생제 내성균의 출현이 급증하고 있어 향후 항생제 시장은 빠르게 성장될 전망이다 바, 항생제 내성을 개선할 수 있는 새로운 차세대 항생제를 극지미생물로부터 발굴하는 기술이 필요한 실정임



<그림17> 특허동향 비교 분석 및 시장규모 분석

(사) 이러한 실정에 맞춰 본 보고서의 수혜연구소인 극지연구소는 현재 극지에서 분리한 다양한 방선균, 곰팡이류 또는 시아노박테리아 균주 및 유전체 정보를 확보한 상태이고, 미생물 기탁은행, Polar and Alpine Microbial Collection(PAMC)을 직접 운영하여 다양한 유용 극지 미생물자원을 기 확보한 상태임

(아) 최근 극지연구소에서는 다양한 항생물질과 항암물질을 생산한다고 알려진 방선균에서 항생물질의 합성에 관여하는 효소의 삼차구조 해석에 성공하여 후속 기능연구 및 논문 발표를 준비중에 있는바, 극지 미생물을 이용한 유용물질의 생산기술의 성공 가능성을 위한 기초 기술이 유리하게 확보된 상태로 판단됨

(자) 따라서, 향후 극지연구소의 연구 결과를 활용하여 차세대 항생제 물질 발굴이 가능할 것으로 판단됨

(15) IP 확보방안

(가) 극지연구소 보유 기술 및 연구의 특허활용전략과 시장 내에서 유리한 위치 선점을 위한 IP 확보 전략을 제안하면 다음과 같음

(나) 해양과학기술원에서 출원한 특허는 총 805건이고, 이 중 총 34건이 미생물과 관련된 기술로 해양과학기술원 전체 특허수 대비 미생물 관련 기술 지식재산권 확보 현황은 다소 저조하다고 판단되고, 위즈도메인(WISDOMAIN)에서 실시한 특허평가등급은 다소 낮은 것으로 나타났음(A등급 4건, B등급 14건, C등급 6건 및 등급없음 10건)

(다) 또한 극지연구소가 보유한 미생물 관련 특허 중 본 보고서의 기술인 극지 미생물 유

래 항생제 기술은 지식재산권으로 아직 확보되지 않은 것으로 파악되며, 극지생명으로부터 유용물질 개발 기술은 육상 및 해양생물자원에 비해 극히 일부분만이 진행되어 있어, 극지는 아직까지 신물질의 원천이라고 할 수 있고 이에 대한 선점 및 선두 연구그룹이 될 수 있음

- (라) 따라서, 극지연구소는 극지 미생물 유래 항생제 개발 기술에 대한 지식재산권 확보가 미약한 것으로 판단되며, 앞으로 극지연구소의 연구 결과를 적극 활용하여 질적으로 우수한 원천특허나 핵심특허의 확보에 더욱 치중할 필요가 있다고 판단됨
- (마) 극지연구소가 보유하고 있는 연구 기술을 특허로 활용할 수 있는 측면으로는, 신규한 극지미생물의 발견 및 이로부터 유래한 항생제 물질을 발굴할 경우, **원천특허 및 핵심특허 확보가 가능함**



<그림18> IP 활용방법

극지연구소

(16) 시사점

- (가) 극지미생물 유래 항생제 개발 기술 과제를 통하여 극지연구소는 극지미생물 유래 항생제에 대한 종합적인 데이터를 확보하고, 종래 기술의 현재 위치 및 동향을 파악함으로써 신규한 R&D 방향을 모색하여 극지미생물 유래 항생제와 관련한 새로운 고부가가치화 기술 및 원천기술을 확보하는 것을 목적으로 함
- (나) 본 과제를 통하여 분석해 본 결과, 미생물 유래 항생제 개발 관련 기술은 주로 육상 및 해양생물자원을 이용한 항생제에 기초한 것으로, 현재까지 알려진 거의 모든 미생물로부터 항생·항균성에 대해 이미 특허출원이 이루어진 것으로 분석되었음
- (다) 다만 극지미생물 유래 항생물질은 출원이 소수 진행된 것으로 나타났고 극지미생물 관련 특허로는 주로 바이오연료 생산을 위한 대량생산 방법/신규 극지미생물 유래 저온저항성 유전자 이용 기술 등이 주를 이루는 것으로 나타나, 현재 극지미생물 유래 항생제 개발 기술과 관련하여서는 초기 또는 성장기 단계에 있는 것으로 판단됨
- (라) 따라서 향후 극지연구소가 연구개발함에 있어서는 아직까지 상대적으로 기술개발이 미비한 상기 극지미생물 유래 항생제 개발 기술과 관련된 연구에 집중하여 신물질에 대한 선점 및 원천기술 확보를 하는 것이 바람직한 것으로 판단됨

(마) 또한 미생물 유래 항생제와 관련하여 항생효과가 우수한 항생제 개발 연구도 중요하지만, 항생제의 인체 내성을 개선할 수 있는 연구에 대해서도 지속하여 ip 확보를 하는 것이 가장 중요하며, 특히 슈퍼버그(Superbug)에 대비하여 이를 해결하기 위한 새로운 항생제의 개발을 극지미생물 연구를 통해 이루는 것도 좋을 것으로 판단됨

라, 기술사업타당성평가 결과 (기술보증기금 수행)

평가결과: NPV(순현재가치): 192억원, 유효기간: 2018년 3월 9일

(1) 평가목적

본 평가는 한국해양과학기술원 부설 극지연구소(이하 극지연구소)의 신청으로 기술보증기금이 ‘(나)평가대상기술’의 기술에 대하여 기술성, 권리성 및 시장성을 분석하고, 이를 기초로 하여 평가대상기술의 순현재가치를 금액으로 산정하는 평가로서 기술사업 타당성 분석용으로 활용하는 것을 목적으로 한다.

(2) 평가대상기술

본 평가는 “극지미생물의 신규 유전자를 이용한 차세대 항생제 개발”을 대상으로 하였다. 항생제 개발과 관련하여 아직 출원된 특허는 없지만 본 기술과 유사한 특허로서 ‘항생제 내성 균주에 대한 항균용 조성물’의 키워드로 검색되는 대부분의 특허가 IPC 분류상 A61K 31/26(의학 또는 수의학 : 의약품, 치과용, 화장용 제제)에 속하며, 한국표준산업분류코드상 「C21101(의약품 화합물 및 항생물질 제조업)」으로 분류된다. 이를 기초로 하여 기술가치평가에 사용되는 관련 업종의 변수(할인율, 동종업종 원가율 등)를 사용하였다.

(3) 평가방법

본 평가에서는 평가대상기술의 순현재가치를 금액으로 환산하기 위하여 수익접근법을 적용하였다. 수익접근법은 평가대상기술자산의 미래 수익창출 능력에 초점을 둔 방식으로, 평가대상기술로부터 발생하는 미래현금흐름의 현재가치 합계액(NPV)을 산정한다. 본 평가는 2017년 2월 28일을 평가기준일로 하였고, 2017년 2월 13일부터 2017년 2월 28일까지 수행되었다.

(4) 평가의 주요조건 및 가정

본 평가에서의 사업주체는 비상장 창업기업으로 사업주체가 변경될 경우 기술가치 금액은 변동될 수 있다. 또한, 본 평가는 기술개발주체인 한국해양과학기술원 부설 극지연구소 소속 개발자인 박현 박사 및 이형석 박사가 제공한 기술자료, 사업계획서와 관련 산업 및 시장 조사자료를 기초로 하여 평가기관의 합리적인 판단과 추정을 기반으로 수행되었다. 따라서 가치금액의 산정에 이용된 가정 및 자료의 완전성에 한계가 있으며, 평가대상기술의 사업화 관련 향후 수익, 비용 및 투자금액에 대한 추정은 사업주체에 대한 가정, 미래의 경제적 상황 및 산업의 제반 여건의 변화에 의해 달라질 수 있는 바, 평가 결과는 변동될 수 있다.

(5) 평가결과 요약

주요 변수	추정치 또는 결과
기술의 경제적 수명(년)	10년
할인율(%)	13.94%
여유현금흐름의 현재가치 합 (단위: 억원)	192

※ 기술의 경제적 수명 : 2017년 2월 13일 ~ 2027년 2월 12일

이를 위한 세부변수 및 가정을 “나. 주요 변수 산정내역”에서 상세히 설명하였다. <표5>는 평가대상 기술에 대한 수익성 분석표이며 최종 NPV는 136억원으로 산정되었다.

<표5> 수익성 분석

(단위: 억원, %)

구 분	1년차	2년차	3년차	4년차	5년차	6년차	7년차	8년차	9년차	10년차	합 계
매 출 액	171.0	342.0	615.0	1,046.0	1,674.0	2,427.0	3,277.0	4,097.0	4,547.0	5,048.0	
매출원가	100.7	201.4	362.1	615.9	985.7	1,429.0	1,929.5	2,412.3	2,677.3	2,972.3	
판매관리비	58.1	116.2	209.0	355.4	568.8	824.7	1,113.5	1,392.2	1,545.1	1,715.3	
법인세등	1.3	2.7	4.8	8.2	13.1	19.1	29.5	42.4	49.4	57.3	
세후영업이익(A)	10.9	21.7	39.1	66.5	106.4	154.2	204.5	250.2	275.2	303.1	
감가상각비등(B)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
자본적지출(C)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
운전자본증감(D)	66.8	66.8	106.7	168.4	245.3	294.2	332.1	320.4	175.8	195.7	
투자액 회수(E)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1,972.1	
여유현금흐름(F) (F=A+B-C-D+E)	-55.9	-45.1	-67.6	-101.9	-139.0	-140.0	-127.6	-70.2	99.4	2,079.5	
현재가계수(G)	0.8646	0.7475	0.6462	0.5587	0.4831	0.4177	0.3611	0.3122	0.2699	0.2334	
현재가치(H) (H=F×G)	-48.4	-33.7	-43.7	-56.9	-67.1	-58.5	-46.1	-21.9	26.8	485.4	
기술기여도(J)											53.90
기술가치(K) (K=∑H×J)											136

※ 평가기준일 : 2017년 2월 28일

- 목표시장 및 시장규모

신청 기술의 최종 목표시장인 의약품 중 항생물질제제 시장의 전 세계 시장규모는 2015년 기준 489억 달러(약 45조 7천9백만원)이고 이 중 본 기술이 구체적 목표시장으로 설정한 베타락탐 계열 항생제 시장은 전체 항생제 시장의 57%인 229억 달러(약 26조 1,000억원)를 형성하고 있다. 특히 베타락탐 계열 항생제 중 가장 빠르게 성장하고 있는 것은 카바페넴 시장으로서 2017년 약 3억 달러(3,415억원) 규모의 단일 시장을 형성할 것으로 기대되고, 2019년 까지는 연간 3%의 성장률을 보여줄 것으로 기대되고 있다. 그런데 최근 슈퍼박

테리아 항생제 시장의 증가와 글로벌제약사의 적극적인 항생제 개발 참여로 2020년부터는 연간 성장률이 7%에 이를 것으로 시장조사기관은 기대하고 있다. 그런데 본 기술은 기존 베타락탐 계열 항생제 중 카바페넴 항생제를 극지유래 효소를 이용해 생합성 하는 방법을 통해 내성을 일으키지 않는 신규 베타락탐 항생제를 개발하는 것이므로 세부 목표 시장은 베타락탐(카바페넴)계 항생제 시장으로 한정하여 시장의 규모를 파악하였다.

4. 시장성 분석

가. 비용추정

- ① 극지생물 저온성효소의 기질 유연성을 이용한 유용물질 개발연구는 25억 원씩 5년 동안 지원 예정
- 2020년부터 연구개발 활동을 수행하여 2024년까지 연간 25억 원씩 전체 125억 원 규모의 연구비를 추정함

구분	2020	2021	2022	2023	2024	합계
예산 (억 원)	25	25	25	25	25	125

나. 경제적 편익 추정 전제

(가) 연구개발사업의 편익을 추정하기 위해서는 먼저 편익이 발생하기 시작하는 시점을 어떻게 결정할 것인지를 고려해야 함

- ① 일반적으로 연구개발투자 이후 편익이 발생되기까지는 일정 시간을 필요로 하므로, 해당 사업으로 인한 편익이 어느 시점부터 발생할 것인지를 예측하는 것은 편익 산정을 위해 중요함
- 마찬가지로 편익 발생 시작 시점으로부터 얼마동안 해당 사업의 편익이 유효할지를 결정하는 문제도 편익 추정결과에 직접적으로 영향을 미침
 - 또한 최초 편익 발생시점과 편익기간의 결정은 편익을 현재가치로 환산하는 과정에서 할인율의 적용 정도에도 영향을 미침

(1) 편익 회임기간

(가) 연구개발사업에 대한 투자가 이루어진 후, 경제적인 편익 또는 효과가 발생하기 전까지의 시간적 지연은 편익 회임기간이라고 정의함

- ① 일반적으로 연구개발활동으로 인한 경제적 효과가 발생하기 위해서는 기술개발의 사업화 등의 과정을 거쳐야하기 때문에 상당한 시간이 소요됨
- 연구개발부문 예비타당성조사에서는 이 편익 회임기간 동안에는 경제적 편익이 발생하지 않는 것으로 간주함
 - Mansfield(1991)는 학술적 연구가 신제품 및 공정의 상용화로 이어지기까지 걸리는 시간을 분석한 결과, 기존에 관련 연구가 없었던 기초연구의 경우에는 평균적으로 7년, 기존 연구가 존재하는 응용기술 개발의 경우에는 평균적으로 6.4년이

걸리는 것으로 분석함

(나) 본 연구에서는 편익 회임기간을 3년으로 설정하여 분석을 수행하였음

- ① 한국개발연구원(KDI)에서는 사업 주관부처가 사업계획서에 편익 회임기간을 제시하는 경우에는 이를 준용하되, 별도의 언급이 없을 경우에 기초연구는 5년, 응용 및 개발 연구는 3년을 기본으로 사업특성을 고려하여 조정함
 - 연구개발을 통한 시제품 개발 후 표준화/인증, 양산준비 등을 고려한다면, 편익 발생까지의 시간적 지연인 편익 회임기간을 고려하는 것이 현실적임
- ② 본 사업은 최종성으로 제약회사로 기술이전 1건 이상을 목표로 하고 있는 응용·개발연구로, 회임기간을 3년으로 설정하여 분석을 수행하였음
- ③ 실제 특허성과는 연구개발 기간내에 도출을 목표로 하고 있으며, 기술이전 성과도 단기간에 실현될 가능성이 높게 판단됨
- ④ 과제의 세부 특성을 고려하였을 때, 3년이라는 회임기간보다는 짧게 볼 수 있으나, 예비타당성 지침 등을 고려하면서 보수적으로 추정하여 3년을 회임기간으로 추정함
 - 의약품 개발의 경우 임상 및 인증 등에 오랜 기간이 소요되나, 본 사업은 사업성으로 기술이전 자체를 목표로 하고 있으므로 3년의 회임기간을 설정하였음

(2) 편익 발생기간

(가) 연구개발활동의 결과에 근거한 경제적 효과들은 어느 시점에 일시적으로 발생하기 보다는 다년도에 걸쳐서 발생하는 것이 일반적이므로, 해당 사업의 편익 발생 기간을 결정하는 것이 필요함

- ① 연구개발사업의 편익기간을 결정하기 위해서는 해당 기술의 특성을 최대한 반영하여 유효한 수명을 적용할 필요가 있음
 - 이를 위해 자료의 정확한 근거와 타당성을 바탕으로 여러 방법론을 활용할 수 있으며, 적절한 방법론이 없을 경우에는 기술수명주기(Technology Cycle Time, TCT)를 도입하여 편익 발생기간을 산정함

(나) 기술수명주기는 특허의 서지정보를 이용해 정량적으로 산출되는 지표 중 하나로서, 인용된 특허들의 발행연도와 인용한 특허의 발생연도 차이값들의 중간값(median age)으로 정의됨

- ① 즉, 인용-피인용 특허 시차의 중앙값으로 산출된 기술수명주기는 기술발전의 속도, 즉 혁신활동의 속도에 대한 정보를 제공함과 동시에 해당 특허에 포함된 기술의 유효 수명을 의미함
 - 연구개발사업의 목표로 제시된 기술이 편익으로 발현되는 기간은 해당 기술이 특허를 통해 권리를 보호받고 후발 특허에 의해 영향력이 사라지지 않는 기간으로 해석됨
- ② 따라서 세부분야별로 특허 인용분석을 통해 산출된 기술수명주기는 기술의 유효수명을 의미함

(다) 본 연구에서는 1960년부터 2017년까지 미국 등록특허 58개년 자료를 기준으로 국제 특허분류(IPC) 클래스별 기술수명주기 중위수(median)를 산정하여 이에 근거한 편익 발생기간을 결정함

- ① 본 사업과 연관이 있는 키워드로 검색한 7개의 IPC 클래스의 기술수명주기 중위수의 평균값은 8.06년으로 약 8년으로 산출되었음

- 8.06년은 8년을 초과하는 값이나, 0.6년은 1개월 미만의 기간이므로 편익 발생기간을 8년으로 결정하였음
- ② 따라서 편익은 사업종료 후 회임기간을 고려하여 2028년부터 2035년까지 발생하는 것으로 가정함
- ③ 경제성분석과 별개로 실제 기술이전된 성과의 차별성이 반영되는 경우에 제약산업의 특성 등을 고려하였을 때, 8년 이상의 편익 발생을 예상할 수 있으나, 정량화 분석의 어려움을 고려하여 8년으로 추정함

<표6> 본 사업의 기술수명주기

IPC	설명	총건수	중양값
A01K	축상: 조류, 어류, 곤충의 사육: 어업; 달리 분류되지 않는 동물의 사육 또는 번식: 새로운 동물	118,074	10
A01G	조직배양기술에 의한 식물의 번식; 단세포 조류의 배양; 식물세포배양	30,920	10
C12M	효소학 또는 미생물학을 위한 장치	8,364	9
C12N	미생물 또는 효소; 그 조성물; 미생물의 증식, 보존 또는 유지; 돌연변이 또는 유전자공학; 배지	28,429	7
C12P	발효 또는 효소를 사용하여 원하는 화학물질 또는 조성물을 합성하는 방법 또는 혼합물로부터 광학이성체를 분리하는 방법	7,892	8
C12Q	효소, 핵산 또는 미생물을 포함하는 측정 또는 시험방법; 그것을 위한 조성물 또는 시험지; 그 조성물을 조제하는 공정; 미생물학적 또는 효소학적 방법에 있어서의 상태응답 제어	20,540	8
G01N	재료의 화학적 또는 물리적 성질의 검출에 의한 재료의 조사 또는 분석 (면역분석 이외의 효소 또는 미생물을 포함하는 측정 또는 시험 방법)	249,302	7
		평균: 8.06년	

다. 경제적 편익 추정

- (가) 시장수요접근법은 시장가치 창출을 목적으로 하는 많은 연구개발사업의 경제성 분석에 대표적으로 활용되며, 본 연구에서도 이를 활용하여 경제적 편익을 산정하였음
- ① 시장수요접근법에서는 해당 연구개발사업의 시행으로 미래 관련 시장에서 새롭게 창출되는 부가가치를 사업의 편익으로 간주하며, 이를 계산하기 위해 부가가치 창출에 영향을 미치는 다양한 변수를 고려함
 - ② 본 연구에서 사업의 특성을 고려하여 신규 부가가치를 도출하기 위해 미래시장 규모 등을 추정함

목표	편익 도출 변수				
	미래 시장 규모 추정	사업 기여율	연구개발 기여율	연구개발 사업화 성공률	부가가치율
경제적 편익 도출					

(1) 미래시장규모

(가) 본 사업의 결과물은 다양한 산업에 활용될 수 있으나 직접적으로 활용되는 산업은 항생제 산업으로, 본 연구에서는 사업의 결과물이 활용되는 (경제적 파급효과를 미치는) 국내 항생제 시장을 대상으로 미래시장규모를 추정함

① 항생제 시장의 경우, 보건산업진흥원의 2017년 전문가리포트¹⁾에서 명시된 2015년 국내 시장규모 1조3천억원을 준용하였음

“2016년 전 세계 항생제 시장은 약 416억 달러(약 50조원)로 추정되며, 국내 시장은 2015년 기준 1조 3천억원 규모에 이르고 있다”

② 국내 항생제 시장의 연평균 성장률 관련 자료는 2%부터 7% 이상까지 다양한 분석이 존재하여, 중소기업벤처부의 2017-2019 기술로드맵²⁾에 명시된 천연항생제 시장 연평균성장률 2.90%를 준용하여 미래시장규모를 도출하였음

- 과대추정 방지를 위해 명확한 근거가 존재하는 수치들 중 최대한 보수적으로 결정하였음

(나) 따라서, CAGR를 반영해 본 사업의 편익 발생기간인 2028년부터 2035년도의 미래시장 규모를 추정하면 아래와 같음

<표 7> 편익 발생기간별 미래시장규모 추정치

연도	항생제 시장규모 (백만원)
2028	1,885,138
2029	1,939,807
2030	1,996,062
2031	2,053,948
2032	2,113,512
2033	2,174,804
2034	2,237,873
2035	2,302,772
합계	16,703,916

(다) 새로운 항생제 개발을 위하여 추진하는 방법론으로 극지 유용생물의 전망 확대

① 기존 화학구조를 변형하여 새로운 항생물질을 찾는 방법은 한계에 다다랐다고 생각하는 의견들이 나오고 있는 상황에서 극지의 유용생물은 새로운 항생물질을 찾는 최적의 지역이라고 볼 수 있음

② 신기술 발전은 극지 자연환경에서 새로운 물질을 확보, 분석, 연구활동을 쉽게 할 수 있도록 지원하고 있으며, 발전된 배양기술, 화학기술 등은 극지 생물에서 발견하는 항생물질에 대한 미래 확대 예상

1)

<https://www.khidi.or.kr/board/view?pageNum=1&rowCnt=10&no1=89&linkId=221423&menuId=MENU01435&maxIndex=00002215489998&minIndex=00001016639998&schType=0&schText=&boardStyle=&categoryId=&continent=&country=>

2) http://smroadmap.smtech.go.kr/0201/view/m_code/H10/idx/1465

(2) 사업기여율

(가) 사업기여율의 추정을 위해서는 본 사업이 기여 가능한 유사 연구개발사업을 파악해야 하며, 관련 정부 연구개발사업을 NTIS DB를 통해 검색하였음

- ① 최근 11년간 추진되고 있는 해양생물 관련 연구개발사업을 검색한 결과, 5개의 유사 사업을 도출하였음
 - 편익 전제를 위해 도출한 본 사업의 편익발생기간(8년)과 회임기간(3년)을 준용하여 유사 기술이 소멸되지 않았을 것으로 가정이 가능한 유사사업을 검색하였음
 - 유사사업비 소계는 146억원이며, 본 사업의 총 사업비는 125억원임

<표 8> 유사사업 목록

사업	기간	총사업비 (백만원)	연평균 사업비 (백만원)
남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴	2014~2016	9,455	3,152
극지유전자원 기반 신규활성 항생제 후보 물질 발굴	2018	1,029	1,028.83
북극권 동토 관측 거점유래 고분자 유기탄소 화합물 분해관련 유용 저온효소 활용연구	2017~2019	900	300
극지 결빙방지물질의 얼음제어능을 활용한 고부가 생물자원의 동결보존 후보물질 발굴	2012	2,000	2000
극지생물 유래 유용 대사체 활용기반 구축	2016	1,199	1,199
		14,583	

(나) 본 사업의 기여가 가능한 관련 연구개발사업들의 연도별 연구비를 고려하여, 본 사업의 사업기여율을 계산한 결과 10.3%임을 알 수 있음

- ① 민간 연구개발 비중은 정확한 자료 확보에 한계가 있어 2016년 정부 연구개발투자액(154,530.6억원)과 민간분야 연구개발투자액(539,524.7억원) 비율인 3.49를 적용하였음
 - 유사 민간 연구개발비는 유사사업비(146억원)와 본 사업비(125억원)의 합에 3.49를 곱한 945억원으로 추정하였음

<표 9> 사업기여율 추정결과

구 분	총사업비 (백만원)
유사사업 소계	14,583
본사업	12,500
유사 민간 연구개발	$(14,583+12,500)*3.49 = 94,519$
본사업 기여도	$12,500/(14,583+12,500+94,519) = 10.3\%$

(3) 연구개발 기여율

(가) 「제3차 과학기술기본계획」에서는 최근 데이터를 적용하여 새롭게 구한 연구개발 기여율

35.4%를 제시한 예가 있으며, KISTEP 예타 세부지침에서도 35.4% 사용을 권고하고 있는 바, 본 연구에서도 이를 준용함

- ① 단, 「제4차 과학기술기본계획」에서는 연구개발 기여율 40%를 목표치로 제시하였는데, 본 연구에서는 보다 보수적인 접근을 위하여 기존 예사 세부지침 등을 활용하여 분석함

(4) 연구개발 사업화성공률

(가) 연구개발 사업화성공률은 극지분야 연구활동의 사업화 성공률을 조사하여, 추정하는 것이 정확하나, 국내 극지연구 사업화 사례가 많지 않아 적용한계

- ① 과거 국내 극지연구는 기초연구 중심으로 연구활동을 수행하였고, 최근 들어 다양한 신기술 개발을 극지연구에 접목하면서 실용화 연구 등을 수행하고 있음
- ② 기존 연구 사례를 통하여 사업화성공률을 도출하는 방법은 사례가 많지 않아서 분석의 어려움도 있으며, 실용화 성과의 초기 단계에서 적용이 바람직하지 않음

(나) 연구개발 사업화성공률을 산출하기 위해서는 관련 사업들의 사업화 성공 여부에 대한 자료는 국가 전체 성공률을 활용함

- ① 따라서 본 연구에서는 연구개발 사업화성공률을 국가 기술개발R&D의 평균 사업화 성공률을 준용하여 22.8%³⁾로 산정하여 분석을 수행하였음

(5) 부가가치율

(가) 2014년 한국은행 산업연관표(2016)의 의약품 산업의 부가가치율을 사용하였음

- ① 의약품 산업 총산출액: 15,252,363백만원, 부가가치액: 5,828,608백만원
- 총 부가가치율: 38.2%

(6) 총 편익 산출

(가) 본 사업의 부가가치 창출 편익을 계산한 결과는 아래와 같음

<표 10> 총 편익 산출 결과

연도	미래시장 규모	사업 기여율	연구개발 기여율	사업화 성공률	부가 가치율	편익
2028	1,885,138	10.3%	35.4%	22.8%	38.2%	5,977
2029	1,939,807	10.3%	35.4%	22.8%	38.2%	6,150
2030	1,996,062	10.3%	35.4%	22.8%	38.2%	6,329
2031	2,053,948	10.3%	35.4%	22.8%	38.2%	6,512
2032	2,113,512	10.3%	35.4%	22.8%	38.2%	6,701
2033	2,174,804	10.3%	35.4%	22.8%	38.2%	6,895
2034	2,237,873	10.3%	35.4%	22.8%	38.2%	7,095
2035	2,302,772	10.3%	35.4%	22.8%	38.2%	7,301

3) 2017 국정감사 (“1만 1849개 과제 중 2703개 과제 사업화 성공“)

라. 경제성 분석 결과

(1) 경제성 분석 전체

(가) 연구개발사업에 대한 경제성 분석은 사회적 편익과 사회적 비용을 대상으로 해당 사업에 대한 투자의 적절성을 평가하기 위해 수행됨

- ① 사업 추진에 소요되는 사업비는 물론 추정된 편익 발생을 위해 소요되는 모든 비용을 분석에 포함함
- ② 일반적으로 공공투자시설의 경우 비용은 실질적으로 투자되어 쓰인 비용을 말하고 편익은 회수방법을 통한 실제 수익이 아닌 사회적 편익을 의미함
- ③ 일반적으로 사업의 투자시점과 편익발생 시점이 일치하지 않기 때문에 비용과 편익에 사회적 할인율을 적용하여 특정 기준연도의 현재가치로 환산하여 분석을 진행함

(나) 비용과 편익의 미래 흐름을 비교하기 위하여 사용되는 할인율은 자원의 기회비용에 따른 수익률을 나타냄

- ① 즉, 할인율은 투자 사업에 사용된 자본이 다른 투자 사업에 사용되었을 경우 얻을 수 있는 시간의 객관적인 가치를 나타냄
- ② 할인율 개념의 적용에 있어서는 많은 이견이 있으나 정부에 의해 주도되는 사업의 경우 사회적 할인율의 개념을 적용하고, 민간자본에 의해 추진되는 사업의 경우 시장이자율에 근거한 재무적 할인율을 적용함
- ③ 사회적 할인율은 통상 시장이자율보다 낮은 수준으로 책정되는데, 그 이유는 사업의 주체가 주로 정부이고 정부입장에서 미래사업의 중요성이 더 높게 평가되어야 할 필요가 있기 때문임
- ④ 대부분의 국가는 투자사업의 특성에 따른 할인율을 자국의 경제성장률, 물가상승률, 경제적 잠재능력 등을 고려하여 적용함
 - 일반적으로 개발도상국 사회간접자본의 경우 7~8% 이상의 할인율을, 선진국의 경우는 보통 5~6% 수준의 할인율을 적용함
 - 한국의 경우 한국개발연구원 예비타당성조사 지침에 의거하여 4.5%를 적용함⁴⁾

(다) 본 연구는 NPV, B/C, IRR을 통해 본 사업의 경제적 타당성을 분석하고 추가적으로 분석 과정에서의 불확실성을 고려하기 위해 민감도 분석을 수행함

- ① 본 연구의 연구계획서에 따라 2020년부터 2024년까지의 5년의 연구개발비를 사업비용으로 간주함
- ② 신규 부가가치는 회임기간과 기술수명주기를 고려하여 2028년부터 2035년까지 편익이 발생하는 것으로 가정
- ③ 본 사업의 연구개발비 투자시점 이전 해인 2019년 12월을 기준으로 모든 비용과 편익에 4.5% 사회적 할인율을 적용하여 현재가치로 환산하였음
- ④ 본 사업의 편익을 추정하는 과정에서 자료의 한계 및 부재 등으로 한계적으로 추정된 항목이 일부 존재하기 때문에, 편익 추정치 변화(당해연도 가치)를 통한 민감도 분석을 추가적으로 수행하여 불확실성 문제를 개선하였음
- ⑤ 경제성 분석에서는 $NPV \geq 0$, $B/C \geq 1$, $IRR \geq$ 사회적할인율인 경우 일반적으로 해당 사업이 경제성이 있다고 판단함

4) 2017년 예비타당성조사 수행 총괄지침에 따라, 2017년 9월 8일부로 사회적 할인율을 기존의 5.5%에서 4.5%로 낮춰서 적용

(2) 경제성 분석 도출

(가) 본 연구의 모든 경제적 편익과 비용은 2019년 12월을 기준으로 사회적 할인율 4.5%를 적용하여 현재가치화하였으며, 편익 추정치 증감(-20~+20%)에 따른 5가지 시나리오를 대상으로 각각 경제성 분석을 진행함

- ① 본 사업 편익에 따른 경제성 분석 결과, NPV는 18,834백만원, B/C는 2.73, IRR은 11.35%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타냄

<표 11> 경제성 분석 결과 (편익 증감 0%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	2,500	2,388		
2021	2,500	2,280		
2022	2,500	2,177		
2023	2,500	2,079		
2024	2,500	1,986		
2025				
2026				
2027				
2028			5,977	3,949
2029			6,150	3,881
2030			6,329	3,814
2031			6,512	3,748
2032			6,701	3,683
2033			6,895	3,619
2034			7,095	3,556
2035			7,301	3,495
합계	12,500	10,910	52,961	29,745

(나) 본 사업의 편익 추정치를 20% 감소시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 12,885
 백만원, B/C는 2.18, IRR는 8.68%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타냄

<표 12> 경제성 분석 결과 (편익 증감 -20%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	2,500	2,388		
2021	2,500	2,280		
2022	2,500	2,177		
2023	2,500	2,079		
2024	2,500	1,986		
2025				
2026				
2027				
2028			4,782	3,159
2029			4,920	3,105
2030			5,063	3,051
2031			5,210	2,998
2032			5,361	2,946
2033			5,516	2,895
2034			5,676	2,845
2035			5,841	2,796
합계	12,500	10,910	42,369	23,796

(다) 본 사업의 편익 추정치를 10% 감소시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 15,860
 백만원, B/C는 2.45, IRR는 10.08%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타냄

<표 13> 경제성 분석 결과 (편익 증감 -10%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	2,500	2,388		
2021	2,500	2,280		
2022	2,500	2,177		
2023	2,500	2,079		
2024	2,500	1,986		
2025				
2026				
2027				
2028			5,379	3,554
2029			5,535	3,493
2030			5,696	3,432
2031			5,861	3,373
2032			6,031	3,315
2033			6,206	3,257
2034			6,386	3,201
2035			6,571	3,145
합계	12,500	10,910	47,665	26,770

(라) 본 사업의 편익 추정치를 10% 증가시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 21,809 백만원, B/C는 3.00, IRR는 12.52%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타냄

<표 14> 경제성 분석 결과 (편익 증감 +10%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	2,500	2,388		
2021	2,500	2,280		
2022	2,500	2,177		
2023	2,500	2,079		
2024	2,500	1,986		
2025				
2026				
2027				
2028			6,575	4,344
2029			6,765	4,269
2030			6,961	4,195
2031			7,163	4,122
2032			7,371	4,051
2033			7,585	3,981
2034			7,805	3,912
2035			8,031	3,844
합계	12,500	10,910	58,257	32,719

(마) 본 사업의 편익 추정치를 20% 증가시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 24,783 백만원, B/C는 3.27, IRR는 13.60%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타냄

<표 15> 경제성 분석 결과 (편익 증감 +20%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	2,500	2,388		
2021	2,500	2,280		
2022	2,500	2,177		
2023	2,500	2,079		
2024	2,500	1,986		
2025				
2026				
2027				
2028			7,172	4,739
2029			7,380	4,657
2030			7,594	4,576
2031			7,815	4,497
2032			8,041	4,419
2033			8,274	4,343
2034			8,514	4,268
2035			8,761	4,194
합계	12,500	10,910	63,553	35,694

(바) 민감도 분석을 위한 편익 증감 시나리오 모두에서 본 사업은 경제적 타당성을 갖는 것으로 나타남

- ① NPV는 12,885백만원에서 24,783백만원, B/C는 2.18에서 3.27, IRR은 8.68%에서 13.60%로 모두 경제적 타당성 조건을 만족하였음
- ② 따라서, 본 사업의 편익이 과대 혹은 과소 추정되었을 경우에도 충분한 경제적 타당성을 확보하고 있는 것을 알 수 있음

<표 16> 민감도 분석 결과

편익증감	-20%	-10%	0%	10%	20%
NPV(백만원)	12,885	15,860	18,834	21,809	24,783
B/C	2.18	2.45	2.73	3.00	3.27
IRR	8.68%	10.08%	11.35%	12.52%	13.60%

마. 소결

(가) 본 사업은 극지생물 저온성 효소의 기질 유연성을 이용한 유용물질을 개발하고, 극지 유전자원 기반 항생물질 변형효소 선별, 항생물질 변형체 제작 및 활성 검증, 신규 항생물질의 작용기전 규명의 3개 세부항목이 제시되었음

- ① 기술이전: 항생물질 생산기술 이전 1건 이상
- ② 후보물질 개발: 5건 이상
- ③ 특허 출원/등록: 국내 8건/5건, 국제 3건/2건
- ④ 논문 발표: SCI(E) 40편 (mrnIF 70 이상 6편 포함)

(나) 본 장에서는 사업 추진을 통해 발생할 수 있는 편익을 산출하고 이를 기반으로 해당 사업의 경제적 타당성을 살펴보았음

- ① 본 사업의 최종 산출물로 인해 창출되는 신규 부가가치는 미래 관련 시장(항생제)의 규모를 기반으로 추정하였으며, 추정된 편익의 증감을 통한 민감도 분석을 수행함
- ② 추정된 편익과 계획서의 비용을 기반으로 경제성 분석을 수행한 결과는 아래 표와 같음

<표 17> 경제성 분석 결과 요약

구분	분석 결과
NPV	12,885백만원 ~ 24,783백만원
B/C	2.18 ~ 3.27
IRR	8.68% ~ 13.60%

(다) 분석 과정에서의 불확실성을 고려한 민감도 분석 결과, 본 사업은 경제적 타당성을

확보하였음

- (라) 본 사업은 연구계획서상 일부 상업화(기술개발을 통한 특허 및 기술이전 성과)를 목적으로 하고 있으며, 유전체 스크리닝 등의 기초 및 응용 연구개발의 성격도 띄고 있음
- ① 본 연구에서는 항생제 산업에의 신규부가가치 창출효과만을 직접적 경제적 편익으로 산정하여 경제성 분석을 수행하였으며, 극지생물 유전체정보 확보, 의료R&D분야 연구 연계 등을 통한 편익 창출은 별도로 고려하지 않았음
 - 따라서, 본 사업의 편익은 본 연구에서 산정한 편익항목 이외에도 다양하게 창출될 가능성이 있으며, 간접적 경제적 편익 및 타산업 파급효과 역시 활발하게 창출될 것으로 판단됨
 - 또한, 극지 저온성 효소의 활용은 국내 수산 시장의 저수온 폐사 등의 피해비용 절감 편익을 창출할 수 있으므로, 부가가치 창출 이외의 추가적인 편익 발생 가능성이 존재함
- (마) 본 사업에 대한 정확한 경제성 분석을 위해서는 명확한 최종 산출물 정의, 관련 산업 식별, 사업 종료 이후의 상업화 등의 후속연구 자료 등이 필요함
- ① 본 연구에서는 연구개발계획서의 총 사업비를 적절한 것으로 가정하고 경제성 분석을 수행하였음
 - ② 보다 정확한 미래 시장 규모 예측을 위해서는 극지 저온성 효소가 활용될 수 있는 산업, 제품, 서비스 등을 보다 명확하게 식별하는 것이 필요하며, 이를 위해서는 최종 산출물을 명확히 정의하는 것이 요구됨
 - ③ 본 사업 종료 이후 구축된 극지 저온성 효소 DB, 유용물질 등의 자원 활용 관련 추가적 비용 및 편익이 발생할 수 있으며, 보다 정확한 경제성 분석을 위해서는 이와 관련된 비용 및 편익을 추가적으로 고려할 필요가 있음

제2절 극지생물 저온성 효소의 기질 유연성을 이용한 유용물질 개발

1. 항생제관련 주요 출원기업 리스트

주요출원인 리스트

항생제 주요기업	검색식	Clinical Trial 등록 건수
MERCK SHARP & DOHME	Antibiotics and Merck	195
PFIZER INC.	Antibiotics and Pfizer	421(raw data)
GlaxoSmithKline	antibiotics and beecham antibiotics and GlaxoSmithKline	270(raw data)
BAYER AG	Antibiotics and bayer	107(raw data)
SANOFI	Antibiotics and sanofi	123(raw data)

순위	다출원인(최근 10년)
1	MERCK SHARP & DOHME
2	MELINTA THERAPEUTICS INC
3	ACHAOPEN INC
4	WOCKHARDT LIMITED
5	REMPLEX PHARMACEUTICALS, INC.
6	NEW JERSEY UNIV
7	ACTELION PHARMACEUTICALS LTD
8	PFIZER INC.
9	CUBIST PHARMACEUTICALS, INC
10	JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.

분석기업 선정

- MERCK SHARP & DOHME
- PFIZER INC.

2. Merck 사의 항생제 개발 전략분석



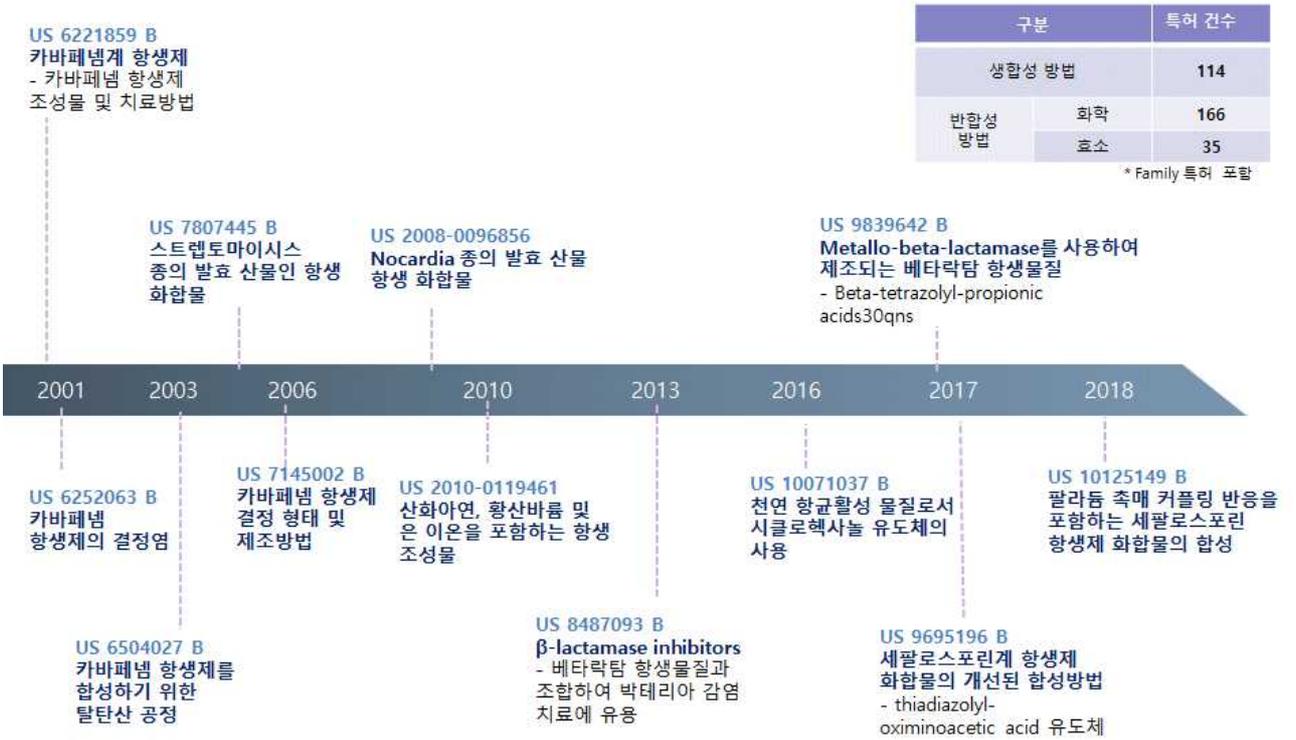
- Merck 사는 처방의약품, 일반 의약품 등을 판매하는 대표적 글로벌 제약사임
- 대표적 제품으로는 표적항암제 키트루다(Keytruda)/ 카바탁(CAVATAK), 자궁경부 예방접종 가다실(Gardasil), 당뇨치료제 시타글립틴(Sitagliptin) 등이 있음
- 2014년 내성이 강한 감염병을 치료하기 위한 항생제 전문 기업인 Cubist를 인수하는 등 항생제 분야의 파이프라인 강화
 - 2019년도 Zerbaxa(2019. 6 FDA 승인), Recarbrio(베타락탐계 병용 항생제, 2019. 07.17 FDA 승인) 등 2020년까지 20개의 신규 항생제 FDA 승인 목표

Cancer	Advanced solid tumors-Prostate KEYTRUDA® MK-3475	1st line advanced ovarian cancer LYNPARZA® MK-73391 (EU)	2nd line metastatic breast cancer LYNPARZA® MK-73392 (US, EU)
Antibiotics	HABP/VABP3 SIVEXTRO® MK-1986	Ertapenem INVANZ®	HABP/VABP ZERBAXA® MK-7625A2 (US, EU)	imipenem/ cilastatin/relebactam Recarbrio® Prevention of CMV infection/disease PREVYMIS™ MK-8228 (US, EU)
	C. Difficile Bezlotoxumab® EU/US	Imipenem/Cilastatin Relebactam®	Daptomycin Cubicin®	Bacterial infection relebactam+ imipenem/cilastatin MK-7655A (US, EU)
Vaccine	Ebola vaccine V9203 (US, EU)	Pediatric hexavalent combination vaccine VAXELISTM V419 (US)	GARDASIL®9 V503 (US)
Diabetes	STEGLUJAN™ ertugliflozin + sitagliptin MK-8835A (US, EU)2	STEGLUJAN™ ertugliflozin + sitagliptin MK-8835A (US, EU)2	STEGLUJAN™ ertugliflozin + sitagliptin MK-8835A (US, EU)2	

MERCK 특허망 (1)



MERCK 특허망 (2)



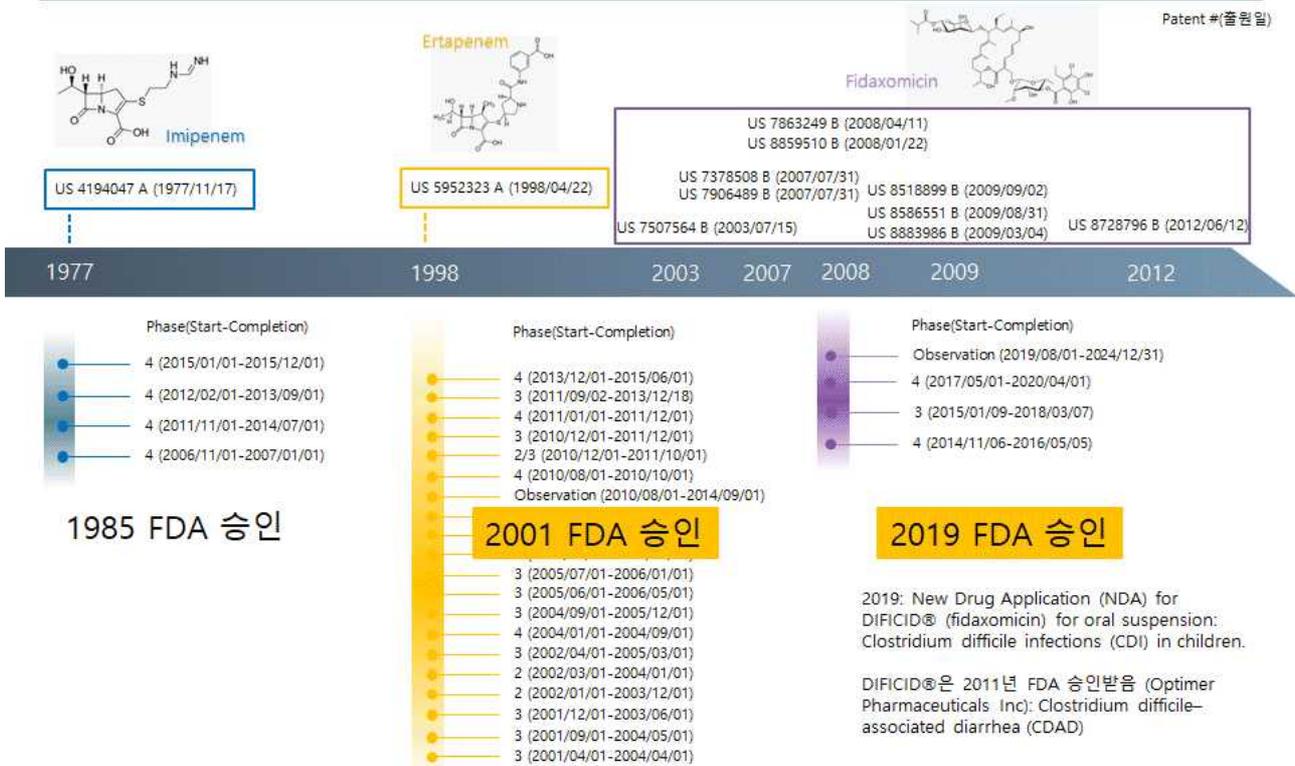
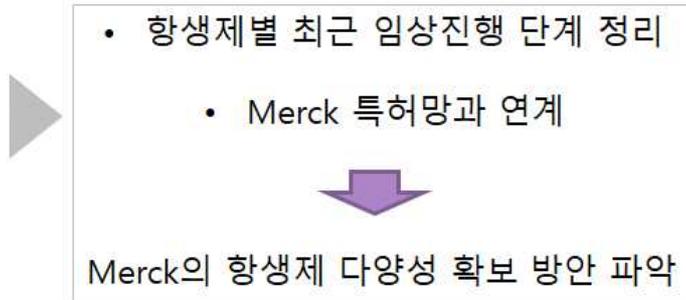
구분		특허 건수
생합성 방법		114
반합성 방법	화학	166
	효소	35

* Family 특허 포함

Merck: Clinical Trial 등록 화합물

분석기업	검색식	Clinicaltrials.gov 등록 건수
MERCK SHARP & DOHME	Antibiotics and Merck	195

임상단계	등록건수
1상	43
2상	49
3상	47
4상	33
합계	172



제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 연구목표

1. 연구개발의 최종목표

가. 극지생물의 새로운 유전자를 이용하여 항생제 내성을 극복할 수 있는 차세대 항생제 개발

- (1) 기술이전 : 항생물질 생산기술 이전 1건 이상
- (2) 후보물질 개발 : 5건 이상
- (3) 특허 출원/등록 : 국내 13건/5건, 국제 8건/4건
- (4) 논문 발표 : SCI(E) 30편 (mrnIF 70 이상 8편 포함)

2. 연차별 성과목표

구분	년도	성과목표	연구내용	연구범위
1차년도	2018	극지 생물 유전자 정보로부터 유용 변형 효소 스크리닝 및 유전자 확보	<ul style="list-style-type: none"> - 극지 생물 유전체 정보로부터 유용 변형효소 정보획득 - 재조합 변형효소 발현을 위한 벡터 시스템 구축 - 재조합 변형효소 발현 테스트 	<ul style="list-style-type: none"> - 유용 변형효소 발굴 - 발현 벡터 시스템 구축 - 수용성 단백질 발현 가능 유전자 확보: 15종
		재조합 변형효소 발현 및 정제	<ul style="list-style-type: none"> - 발현 및 정제 조건 확립 - 정제된 변형효소의 활성 측정 - 재조합 변형효소 대량생산 	<ul style="list-style-type: none"> - 재조합 변형효소 생산 프로토콜 확립 - 변형효소 활성 측정 방법 확립 - 생화학적 특성분석: 3건
		변형효소 구조 분석 및 항생물질을 기질로 이용한 대사 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 변형효소의 결정화 조건 탐색 - X-선 결정학 방법을 이용한 변형효소의 고해상도 구조 해석 - 구조 비교분석을 통한 기능적 특성 분석 - 항생물질 변형 활성 테스트 	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질 구조 및 기능 연구 4건 이상 - 항생물질 변형 활성 확인 - SCI(E)급 논문발표: 4건 (mrnIF 70 이상 1편 포함) - 국내특허출원: 2건

2차년도	2019	극지 생물 유전자 정보로부터 유용 변형 효소 스크리닝 및 유전자 확보	<ul style="list-style-type: none"> - 극지 생물 유전체 정보로부터 유용 변형효소 정보획득 - 재조합 변형효소 발현을 위한 벡터 시스템 구축 - 재조합 변형효소 발현 테스트 	<ul style="list-style-type: none"> - 유용 변형효소 발굴 - 발현 벡터 시스템 구축 - 수용성 단백질 발현 가능 유전자 확보: 15종
		재조합 변형효소 발현 및 정제	<ul style="list-style-type: none"> - 발현 및 정제 조건 확립 - 정제된 변형효소의 활성 측정 - 재조합 변형효소 대량생산 	<ul style="list-style-type: none"> - 재조합 변형효소 생산 프로토콜 확립 - 변형효소 활성 측정 방법 확립 - 생화학적 특성분석: 3건
		변형효소 구조 분석 및 항생물질을 기질로 이용한 대사 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 변형효소의 결정화 조건 탐색 - X-선 결정학 방법을 이용한 변형효소의 고해상도 구조 해석 - 극지생물 유래 변형효소와 기존에 알려진 비극지 생물유래 변형효소와의 구조 비교분석을 통한 기능적 특성 분석 - 변형된 신규 항생물질의 활성측정 - 신규 항생물질의 구조분석 - 분자모델링 기술을 이용한 구조최적화 작업 수행 	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질 구조 및 기능 연구 4건 이상 - 항생물질 변형 활성 확인 - 신규 항생물질의 구조분석 및 최적화 작업 수행 - SCI(E)급 논문발표: 4건 (mrnIF 70 이상 1편 포함) - 국내특허출원/등록: 3/1건

제 2절 연구내용

1. 1차년도 (2018년) 연구 결과

가. 성과목표 1: 극지 생물 유전자 정보로부터 유용 변형 효소 스크리닝 및 유전자 확보

(1) 극지 생물 유전체 정보로부터 유용 변형효소 정보획득

(가) 극지생물 유전체 정보로부터 36종의 항생물질 변형효소 선정

(나) 대표적 남극 어류인 Antarctic blackcod(*Notothenia coriiceps*)와 blackfin icefish (*Chaenocephalus aceratus*)를 대상 유전체 데이터베이스에서 타겟 유용 변형 효소 후보인 CYP, AMP, Glycosyltransferase, Methyltransferase, Monooxygenase 유전자 서열 탐색

(다) 총 731개의 잠재적 유용 변형 효소 후보유전자 서열 확보

<표18> 유용 변형 효소 활용 가능 남극 어류 유전자 염기서열

후보 유전자	Antarctic blackcod	Antarctic blackfin icefish
Cytochrome P450	45	63
Antimicrobial peptide	3	2
Glycosyltransferase	23	18
Methyltransferase	285	208
Monoxygenase	67	17

(라) 남극조새풀의 발현유전체 데이터로부터 단백질 인산화 효소군인 MAPK cascade 관련 유전자군을 선별하여 8종의 MAPK, 4종의 MAPKK, 67종의 MAPKKK 유전자 선별 완료

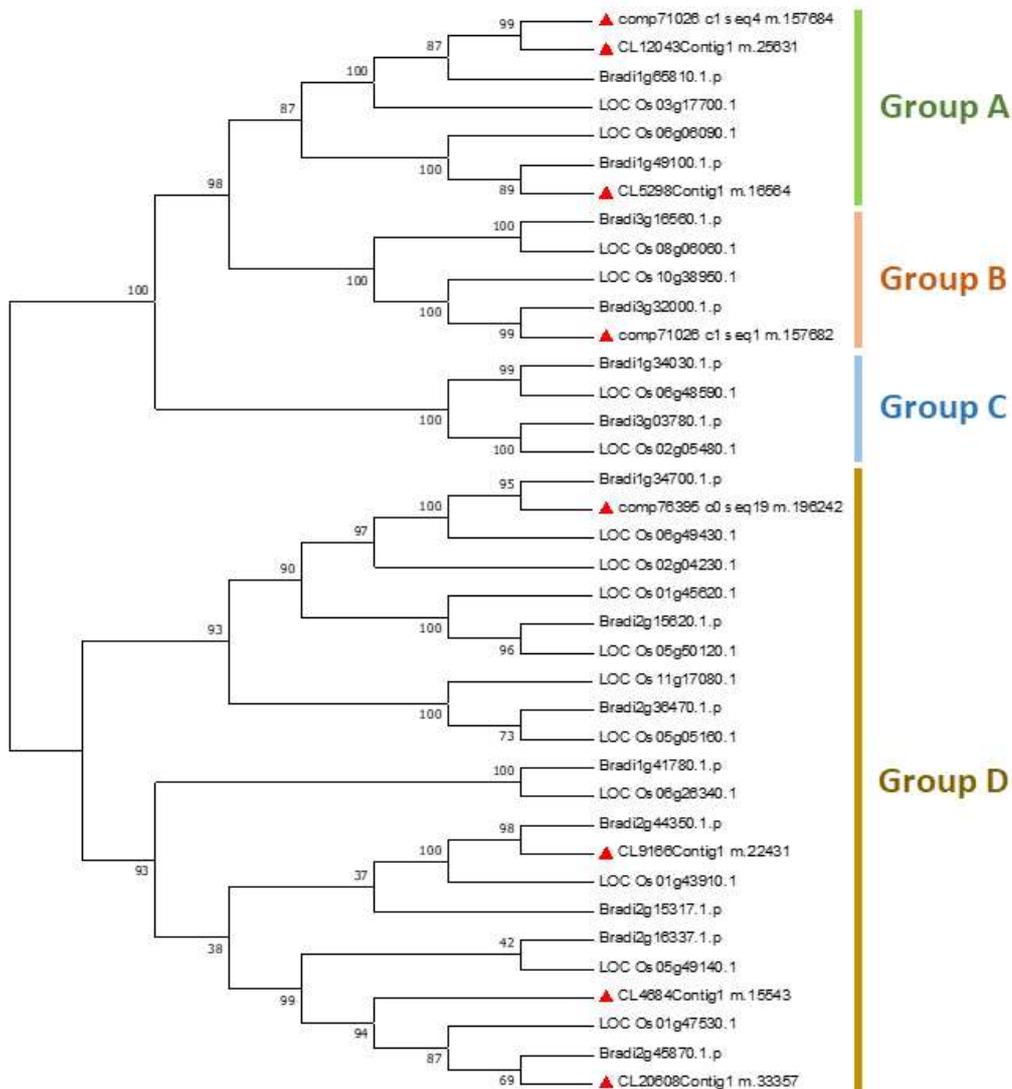


그림. 남극조새풀에서 분리한 8종의 MAPK 유전자들에 대한 계통분석. 벼와 Brachypodium distachyon 유래 MAPK 유전자들을 함께 사용하였으며, 남극조새풀 유래 유전자들은 붉은 삼각형으로 표시하였음. 일반적으로 알려진 대로 전형적인 4개 그룹으로 구분되었음.

(2) 재조합 변형효소 발현을 위한 벡터 시스템 구축

(가) 항생물질 변형효소 발현을 위해 대장균 발현 벡터에 클로닝 111종 (극지연 71종 +

선문대 40종)

유전자 합성 리스트

Strain	Protein name	homolog	Cloning	length(bp)	solubility
1	qnr		O	666	X
2	aac(6')-Ii		O	558	O
3	aac(6')-Ic		O	747	X
4	Rv1347c		O	642	X
5	aac(2)-Ia		O	546	O
6	aac(2)-Ib-d_Mf		O	597	O
7	aac(2)-Ib-d_Mt		O	555	O
8	aac(2)-Ib-d_Ms		O	642	O
9	aph(3')-IIb		O	816	O
10	Hph		O	1272	X
11	YcbJ		O	930	O
12	Rv3225c		O	1434	O
13	Rv3817		O	765	O
14	aph(9)		O	1005	O
15	ant(6)-Ib		O	864	O
16	WP_062166445.1		O	696	O
17	WP_067189847.1	qnr	O	576	X
18	WP_068238484.1		O	615	X
19	WP_052275051.1	aac(6')-Ib	O	552	X
20	WP_068231688.1		O	561	O
21	WP_062167160.1	aac(6')-Ic	O	489	O
22	WP_062002162.1	Rv1347c	O	969	O
23	WP_025103768.1		O	561	O
24	WP_068337664.1	aac(2)-Ib-d	O	462	X
25	WP_025104855.1		O	735	X
26	WP_066283089.1	aph(3')-IIb	O	750	X
27	WP_066614901.1		O	1059	?
28	WP_066278453.1		O	1011	X
29	WP_029989184.1	YcbJ	O	1323	O
30	WP_068632480.1		O	1074	X
31	WP_066618022.1		O	936	X
32	WP_025102985.1	Rv3225c	O	885	X
33	WP_066283132.1		O	936	X
34	WP_039003793.1		O	1122	O
35	WP_062766075.1		O	978	O
36	WP_025105199.1			2649	
37	WP_039003556.1			2490	
38	WP_067195266.1	Penicillin acylase		2436	
39	WP_068232208.1			2478	
40	WP_068336088.1			2229	

41		WP_068233797.1			2226		
42		WP_067189577.1			2193		
43		WP_068632499.1			2406		
44		WP_066609788.1			2589		
45	KOPRI 균주	WP_068332949.1			O	1305	O
46		WP_067191143.1		Citrate synthase	O	1296	O
47		WP_082763639.1			O	1305	O
48	Ice fish	CA_CacV3p		antifreezing	O	1551	X
49		WP_068342638.1			O	333	O
50	KOPRI 균주	WP_039001987.1		ActVA-Orf6	O	327	O
51		WP_068338855.1			O	675	X
52		WP_062765834.1			O	1323	X
53	KOPRI 균주	WP_062170588.1		glycosyltransferase	O	1227	O
54		WP_066283562.1			O	1365	X
55		hHDAC6_B4_440			O		
56	Human	hHDAC6_479-835		Histone deacetylase 6	O		
57		hHDAC6_1109-1215			O	336	O
58		WP_039002014.1			O		
59		WP_082767130.1			O		
60		WP_068633129.1			O		
61		WP_061999050.1			O		
62	KOPRI 균주	WP_062166924.1		penicillin binding protein	O		
63		WP_061998310.1			O	1113	
64		WP_082802249.1			O	1113	
65		WP_068630562.1			O	1110	
66		WP_082767012.1			O		
67		WP_066611968.1			O	1137	
68		WP_062170588.1			O		
69	KOPRI 균주	WP_082758510.1		UDP-glucosyltransferase GtfABC	O		
70		AMG82272.1			O		
71		WP_066283562.1			O		

(나) 선문대학교에서 진행 중인 항생물질 변형효소 발현 시스템 구축 현황

Sample	Function	Cyclization	Efficiency	Stability	Page mark	Re-purification	C-Tag	Substrate	Sample	Function	Cyclization	Efficiency	Stability	Page mark	Re-purification	C-Tag	Substrate
1. CPM945	Salicylic acid synthetase	Sal	X			O	O	Salicylic acid	7.22	12.29.2016	ICP-1000000	X			O	O	ICP-1000000
2. CPM952	Phenylacetate synthase	O	O	12.1.A	O	Penicillin G(SDS)		Phenylacetate	7.22	12.29.2016	ICP-1000000	X			O	O	Phenylacetate
3. Oxa	Chloramphenicol synthetase	Sal				O	O	Oxa	7.24	12.31.2016	ICP-1000000	X			O	O	Oxa
4. CPM985	TyC	X				O	O	TyC	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	TyC
5. CPM970	Chloramphenicol synthetase	X				O	O	Chloramphenicol	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Chloramphenicol
6. CPM972	Chloramphenicol synthetase	Sal				O	O	Chloramphenicol	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Chloramphenicol
7. CPM974	TyC	Sal				O	O	TyC	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	TyC
8. 2017-463	CPM984	X				O	O	Stability	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Stability
9. 2017-348	CPM982	O	O	12.1.A	O	Penicillin G(SDS)		Stability	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Stability
10. 2016-328	CPM982	O	O	12.1.A	O	Penicillin G(SDS)		Stability	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Stability
11. 2017-238	CPM984	O	X			O	O	Stability	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Stability
12. 2016-204	CPM984	X				O	O	Stability	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Stability
13. 2017-271	CPM982	O	X			O	O	Stability	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Stability
14. 2017-202	CPM982	X				O	O	Stability	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Stability
15. 14-199	CPM984	O	O	12.1.A and 12.1.B	O	Stability		Stability	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Stability
16. 10-101	CPM984	X				O	O	Stability	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	Stability
17. 2017-202	ICP-1000000	O	O	Spindle 2017B1	O	O	O	ICP-1000000	7.26	12.30.2016	ICP-1000000	X			O	O	ICP-1000000

(3) 재조합 변형효소 발현 테스트

(가) 항생물질 변형효소 타겟 111 중 중에서 발현 테스트를 통해 40개의 타겟 발현 플라즈미드 확보

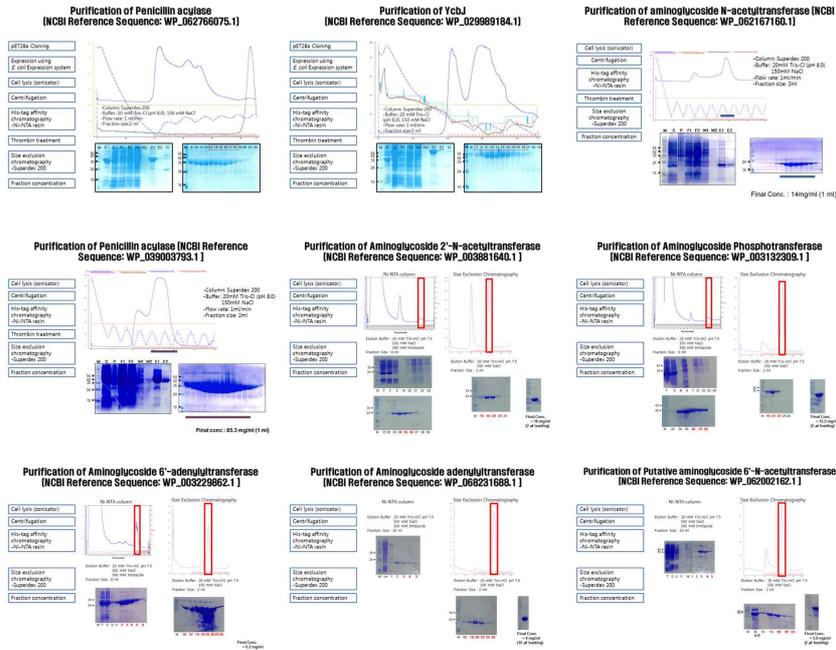
(나) Soluble 한 단백질 발현 조건 탐색을 위해 두 가지 온도 조건 (30도, 20도)에서 발현 테스트 수행, 20종의 soluble 한 단백질 발현 확인

나. 성과목표 2: 재조합 변형효소 발현 및 정제

(1) 발현 및 정제 조건 확립

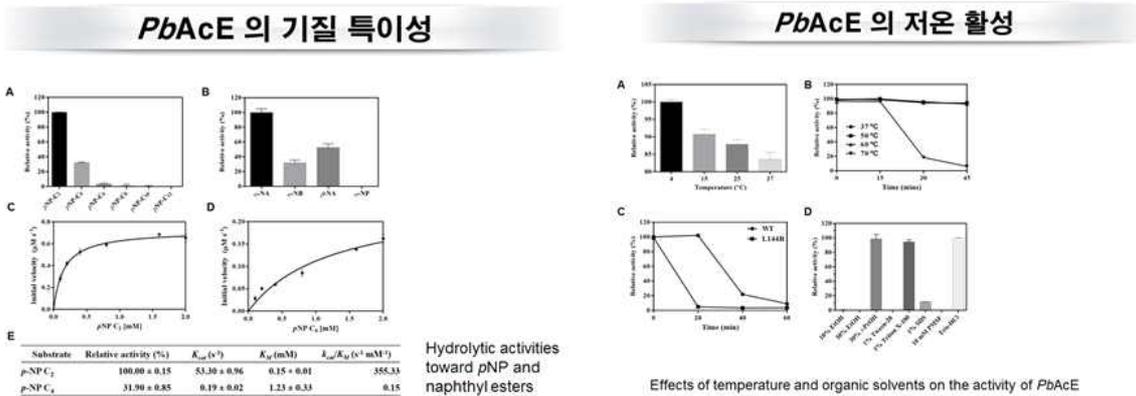
(가) 20종의 항생물질 변형효소 재조합 단백질 발현 확인

(나) 구조분석 및 생화학적 특성 분석을 위해 항생물질 변형효소 20종의 대량 정제된 재조합 단백질 확보



(2) 정제된 변형효소의 활성 측정

(가) PbAcE의 기질 특이성 및 온도별 활성 측정을 통해 Broad한 기질 특이성 및 높은 저온 활성 확인



(나) CYP154C4 2종과 CYP106A6 1종의 기질 특이성 규명

(3) 재조합 변형효소 대량생산

(가) 항생물질 변형효소 6종의 대량 생산 최적화 시스템 구축 완료

(나) 생산된 재조합 변형효소들은 구조분석 및 생화학적 특성 규명에 사용

다. 성과목표 3: 변형효소 구조 분석 및 항생물질을 기질로 이용한 대사 특성 규명

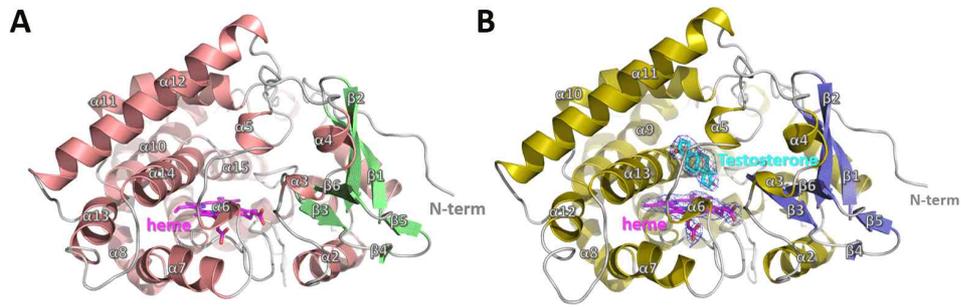
(1) 변형효소의 결정화 조건 탐색

(가) 결정화 조건 스크리닝을 위해 단백질 별로 약 2000 여 가지 이상의 조건을 탐색

(나) 항생물질 변형효소 6종의 결정화 조건 확보

(2) X-선 결정학 방법을 이용한 변형효소의 고해상도 구조 해석

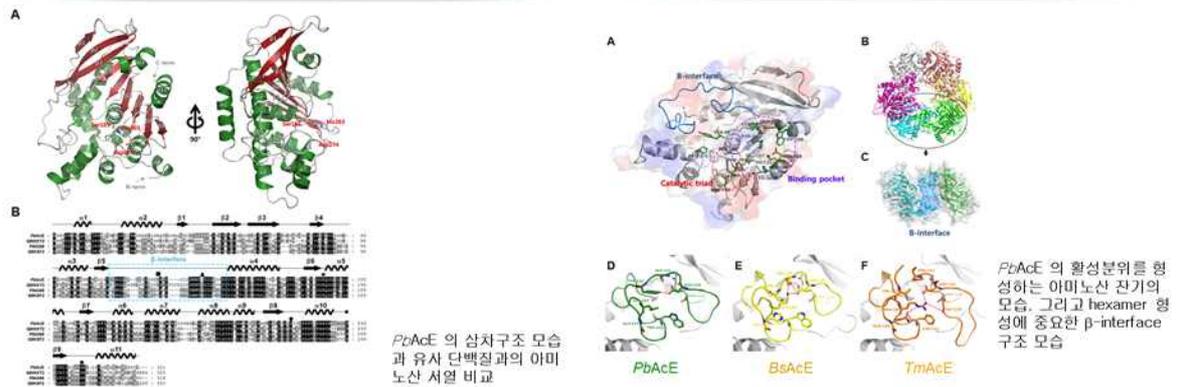
(가) 극저 방사선 유래의 CYP154C4 효소 2종의 구조분석 및 기질 특이성 규명



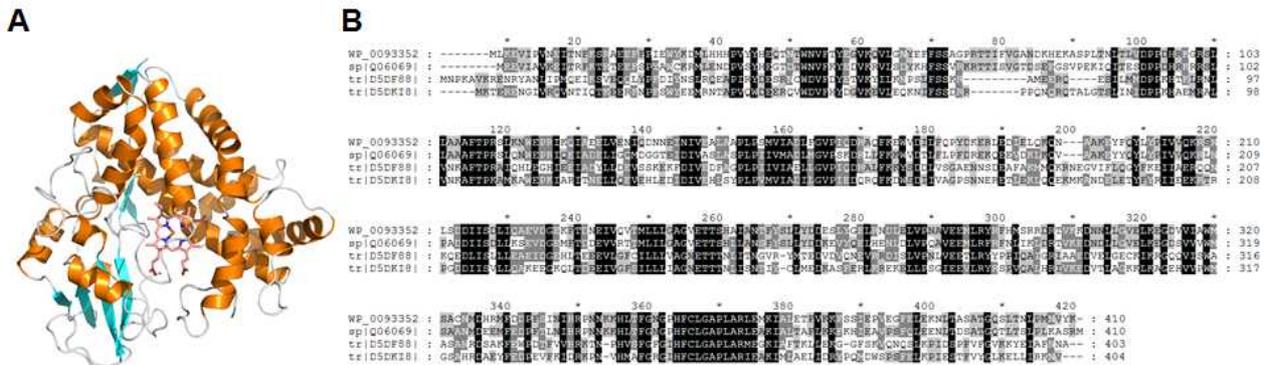
(나) PbAcE 의 구조분석을 통하여 저온활성을 갖는 이유 설명

항생물질 변형 저온성 acetyl xylan esterase (*PbAcE*) 구조

PbAcE 의 활성 부위

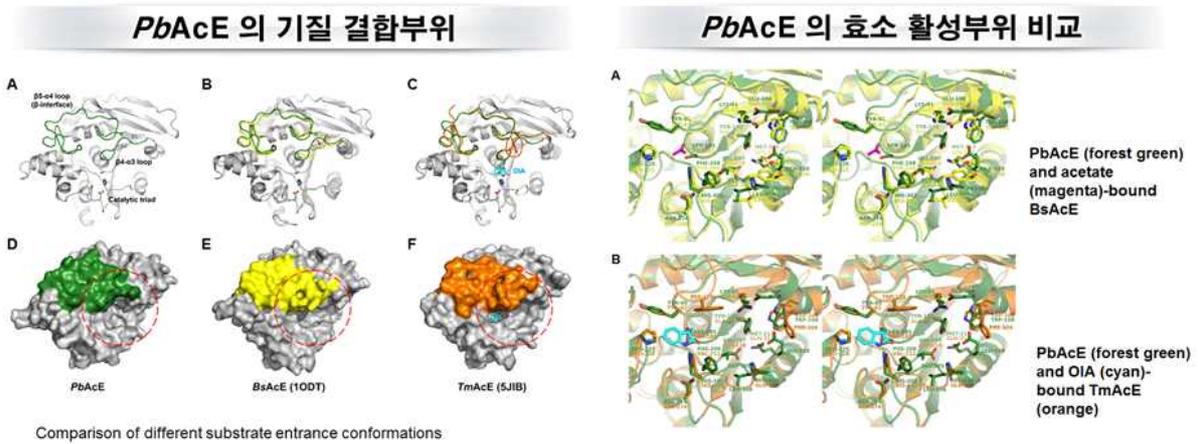


(다) CYP106A6 효소의 구조분석 및 유사 단백질들과의 아미노산 서열 비교



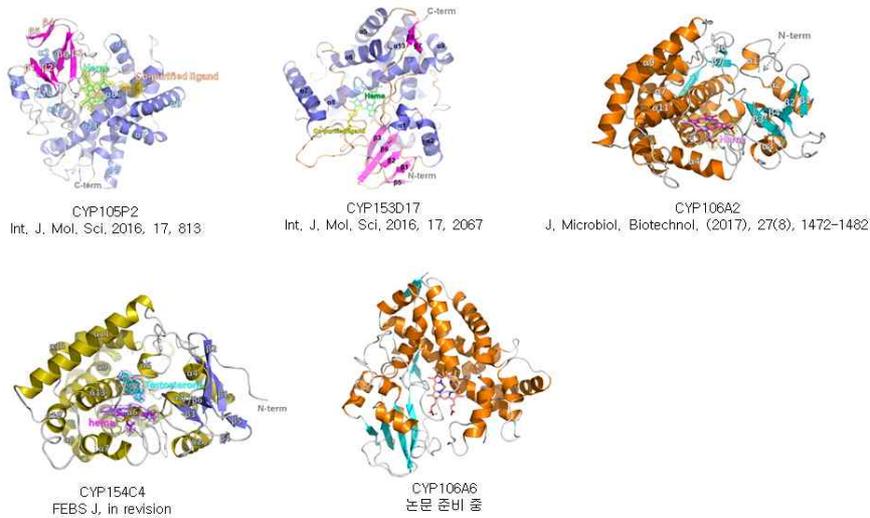
(3) 구조 비교분석을 통한 기능적 특성 분석

(가) PbAcE 효소의 기질결합 부위 특성 분석, PbAcE는 다른 중온성 유사 단백질들과는 달리 보다 open 형태의 기질 결합 부위를 가진다



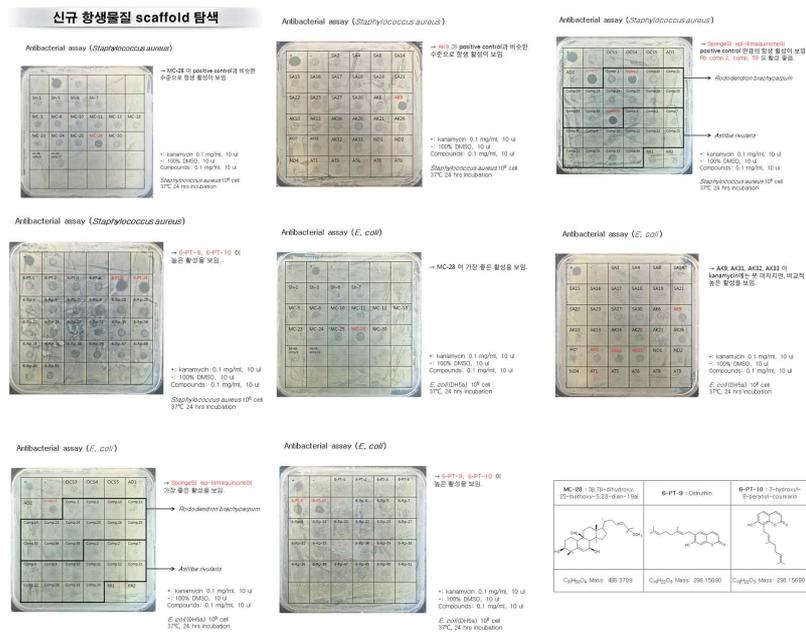
(나) 항생물질 변형에 있어서 수산화기를 붙일 수 있는 CYP 효소들의 구조적 특성 규명

극지생물 유래 Cytochrome P450 (CYP) hydroxylase의 구조 및 특성 규명



(4) 항생물질 변형 활성 테스트

(가) 극지해양 생물 유래의 신규 항생물질 탐색, 3종의 고 항균활성 추출물을 확보 하고 변형효소를 이용한 modification 실험 수행 중



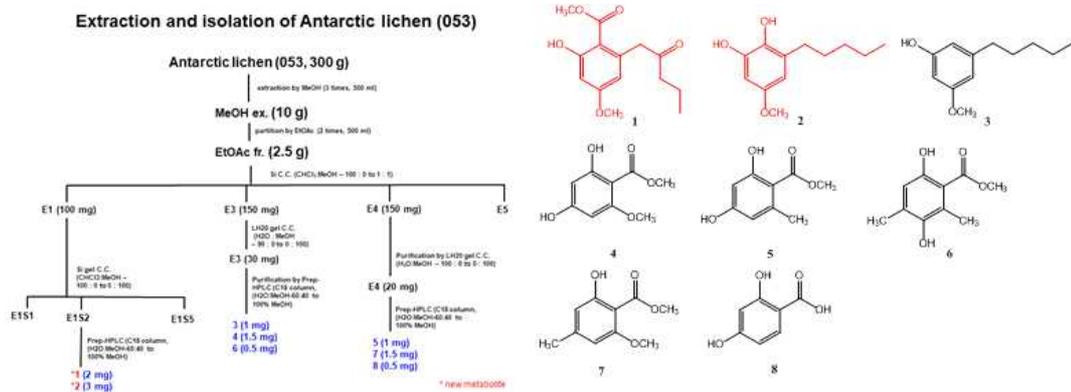
(5) 남극 바톤 반도 세종기지 인근의 지의류 (053번)로부터 항균 활성 화합물 분리

(가) 지의류 053번 (300 g)을 메탄올 (MeOH) 500 ml로 실온에서 24시간씩 3회에 걸쳐 냉침하여 추출하였으며, 10 g의 추출액을 얻음

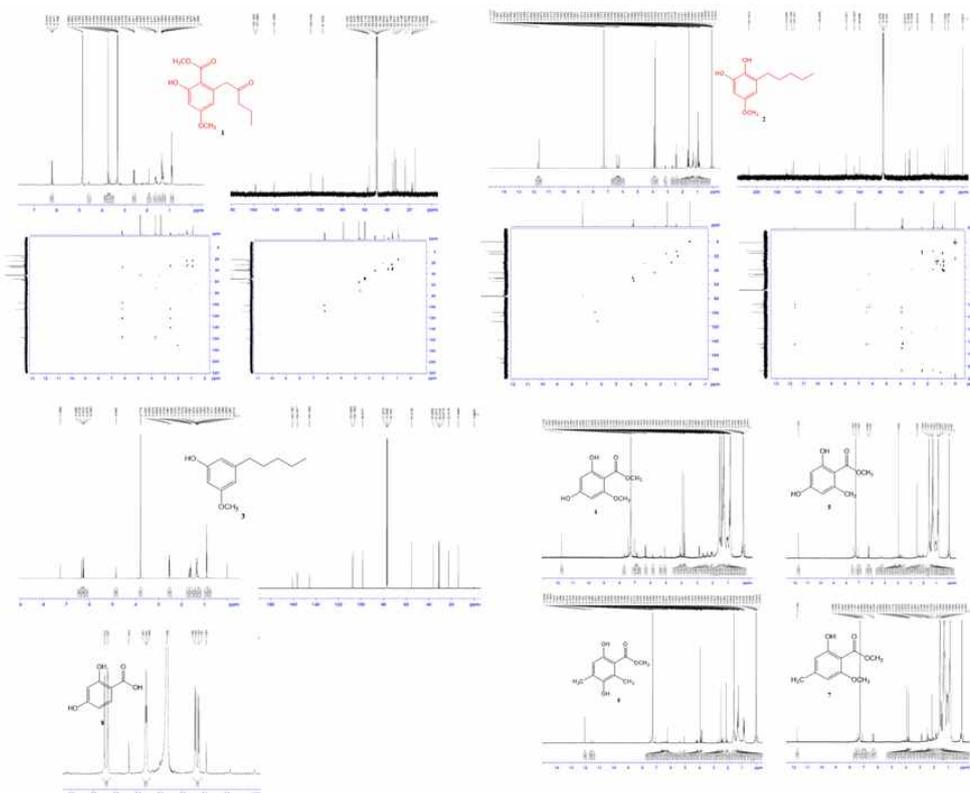
(나) 추출 농축액은 증류수 0.5 L로 현탁 시킨 후 헥산 (Hex), 에틸아세테이트 (EtOAc), 부탄올 (BuOH)를 사용하여 순차적으로 추출하였고, 이로부터 Hex 분획물 (3g), EtOAc 분획물 (2.5 g), BuOH 분획물 (2 g), 나머지 물 분획물 (2.5 g)을 각각 확보

(다) 이 중 효능 성분을 함유하고 있는 EtOAc 추출물 (2.5 g)은 silica gel column (230-400 mesh, 360 g), CHCl₃-MeOH (99:1~50:50)의 조건으로 분리를 진행하였고, 5개의 분획물 (E1-E5)들을 확보. 분획물 E1 (100 mg)은 CHCl₃-MeOH (100:0~80:20) 용매조건에서 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피법 (CC; Φ 3 cm; 230-400 mesh, 300 g)으로 반복 실시하여 5개의 소 분획물 (E1S1 to E1S5)들을 확보. 소 분획물 E1S2 (10 mg)은 semiprep. HPLC 기기를 사용하여 RP-18 column 및 MeOH-H₂O (50:50~0:100) 용매 조건에서 2 ml/min의 유속으로 분리를 시도하여 화합물 1 (2 mg, t_R 65 min)과 2 (3 mg, t_R 70 min)를 얻었음.

(라) E3 (150 mg) 분획은 Sephadex LH-20 gel (200 g) 컬럼 및 H₂O-MeOH (90:10~0:100) 용매조건으로 정제하였고, 정제된 분획물은 다시 semiprep. HPLC 기기를 사용하여 RP-18 column 및 MeOH-H₂O (30:70~0:100) 용매조건으로 분리를 시도하여 화합물 3 (1 mg, t_R 85 min), 4 (1.5 mg, t_R 88 min), 6 (0.5 mg, t_R 90 min)을 분리하였다. 소분획 E4 (30 mg)을 silica gel column 과 hexane-ethyl acetate (50:1 ~ 1:1) 용매를 사용하여 정제한 다음 semiprep. HPLC 기기를 사용하여 RP-18 column 및 MeOH-H₂O (20:80~100:0) 용매조건으로 분리를 시도하여 화합물 5 (2 mg, t_R 74 min)와 화합물 7 (2.5 mg, t_R 76 min), 8 (2.5 mg, t_R 76 min)을 각각 분리



Chemical structures of 1-8 isolated from Antarctic lichen (053).

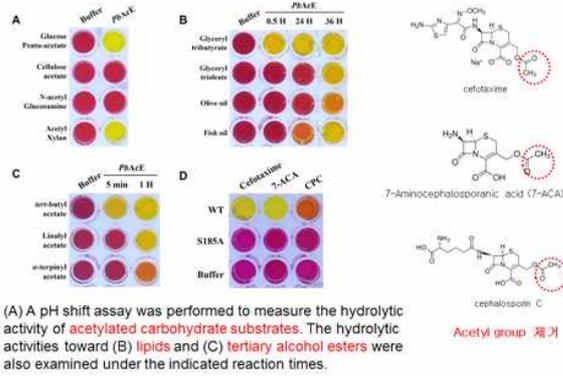


1D- and 2D-NMR Spectra of compounds 1-8.

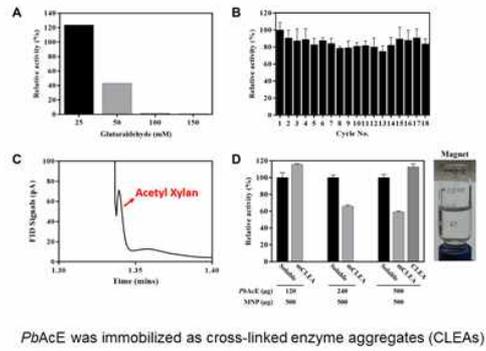
(마) 남극지의류 (053)에 대하여 분취용 HPLC를 사용하여 8개의 페놀성 이차대사산물들을 분리하였음. 이들 중 화합물 1번과 2번이 신규 화합물로 밝혀졌음. 모든 화합물들에 대하여 항균 및 항 박테리아 활성이 진행 중

(바) PbAcE 의 Beta-lactam 계열 항생물질 3종에 대한 Acetyl group 제거 활성 확인, Acetyl group 제거 후 다른 작용기를 도입하여 새로운 활성의 항생물질 개발에 이용 가능

PbAcE의 β -lactam antibiotics 변형 활성

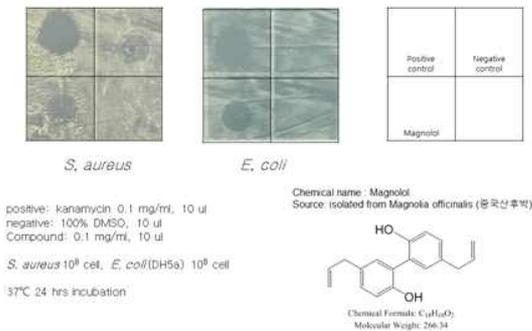


PbAcE의 상업적 활용성 확인

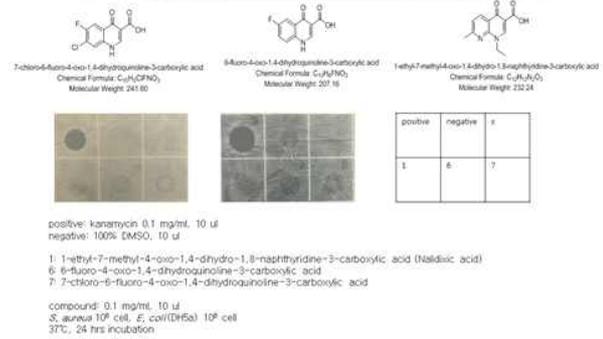


(사) 신규 항생물질 backbone 물질 확보, 식물추출물인 Magnolol 과 Quinolone 계열의 backbone 물질 확보

항생물질 backbone 물질 확보

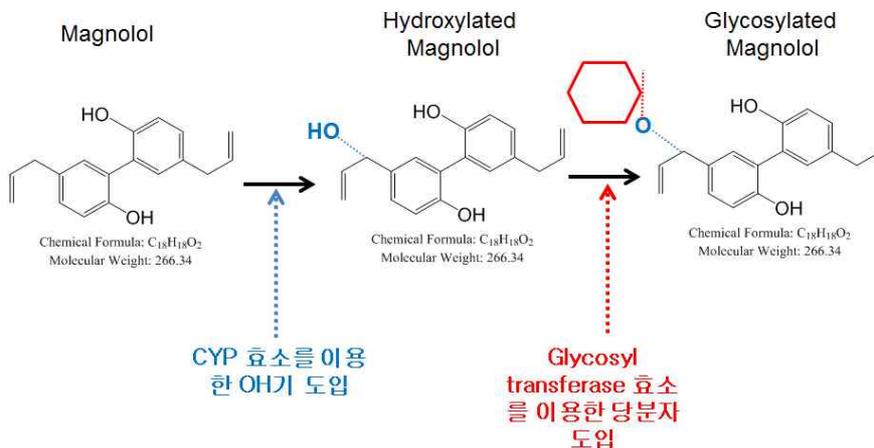


Quinolone 계열의 항생물질 backbone 물질 확보



(아) Magnolol의 변형을 위해 기 확보 중인 CYP 효소와 Glycosyltransferase 효소를 이용하여 당분자 추가 실험 중

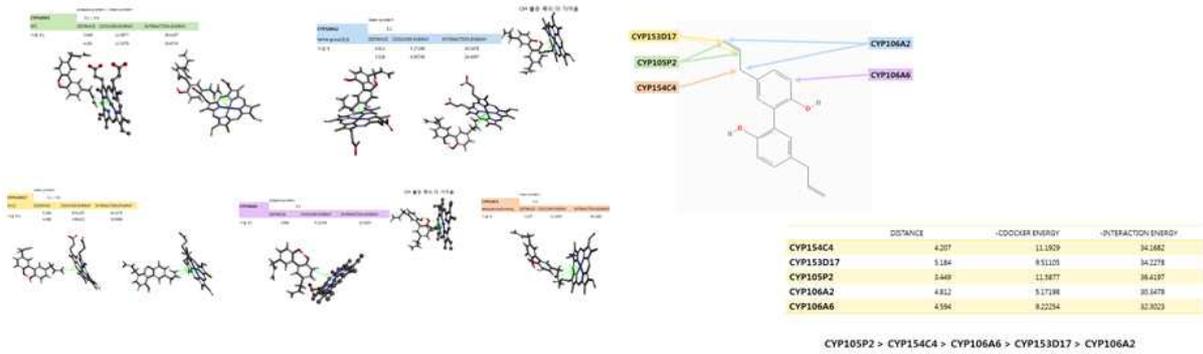
Cytochrome P450 (CYP) hydroxylase 와 Glycosyl transferase를 이용한 Magnolol의 변형



(자) 분자모델링을 이용하여 CYP 효소 종류에 따른 Magnolol 기질에 대한 항생물질 변형 사이트 예측

분자 모델링을 이용한 CYP에 의한 Magnolol 의 변형 예측

분자 모델링을 이용한 CYP에 의한 Magnolol 의 변형 예측



2. 2차년도 (2019년) 연구결과

가. 성과목표 1: 극지 생물 유전자 정보로부터 유용 변형 효소 스크리닝 및 유전자 확보

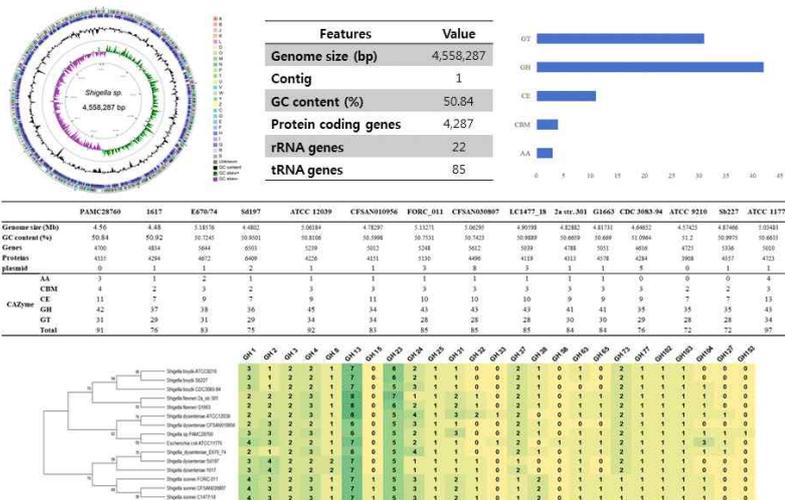
(1) 극지 생물 유전체 정보로부터 유용 변형효소 정보 획득

- 남극곰새들의 발현유전체 데이터로부터 P450 유전자군에 속하는 143종의 유전자 선별 완료 (별첨 엑셀파일; DaP450.v5.0.xlsx)

(2) 남극 미생물 17종의 게놈으로부터 항생물질 변형에 이용 잠재력이 있는 3개의 카테고리의 유전자 transferase, oxygenase, CYP450 확보

(가) 이들 저온 활성 변이효소는 중온성 효소와 비교하여 넓은 specificity spectrum을 가지고 있어 항생제 backbone의 변형에 유용, 아래 그림들은 남극 지의류에서 발견된 *Streptomyces* sp. NP160 미생물과 *Shigella* sp. PAMC 28760 미생물의 유전체 분석을 통해 이 미생물들이 가지고 있는 항생제 변형관련 유전자를 선별하는 연구결과를 나타냄

Complete genome sequencing of *Shigella* sp. PAMC 28760: Identification of CAZyme genes and analysis of their potential role in glycogen metabolism for cold survival adaptation



극지미생물 중 하나인 *Shigella* sp. PAMC 28760에 대한 Circular map과 유전체 정보 및 CAZyme 분석 결과

Shigella sp. PAMC 28760의 CAZymes에 대한 게놈 분석 정보와 비교 유전체 분석 결과

dbCAN2 분석 결과 탄수화물 대사 효소와 관련된 91 개의 유전자가 밝혀짐

Glycoside hydrolase (GH) enzyme-coding genes을 나타냄

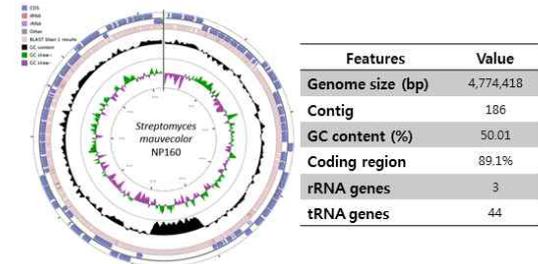
Draft genome analysis of antimicrobial *Streptomyces* isolated from Himalayan lichen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
NP160	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
NP161	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NP167	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
NP175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NP183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*1. *Bacillus subtilis*; 2. *Streptomyces aureus*; 3. *Micromonospora lactus*; 4. *Enochloridium*; 5. *Pseudomonas aeruginosa*; 6. *Enterobacter cloacae*; 7. *Streptomyces aureus*; 8. *Streptomyces maritimus*; 9. *Streptomyces sanguinis*; 10. *Streptomyces violaceus*; 11. *Streptomyces citreus*; 12. *Streptomyces roths*; 13. *Aggriplanctus actinomycetoides*; 14. *Streptomyces argenteus*; 15. *Actinomyces viscosus*; 16. *Actinomyces israelii*.

*, negative; **, > 8 mm; ***, > 8 mm; ***, > 10 mm; and ***, > 20 mm.

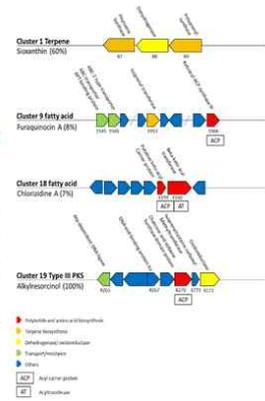
네팔 유래 2종의 이끼에서 49종의 박테리아를 스크리닝함 → 그 중 강한 항균 활성을 보인 NP088, NP131, NP132, NP134 및 NP160 확인



Streptomyces sp. NP160에 대한 유전체 분석 결과 및 cluster 분석. 6 타입의 PKS 유전자지문 유전자와 강한 항균력을 지님

Table 1. Summary of NP160 antiSMASH results for 42 clusters.

Cluster	Type	Size (bp)	Host similar domain domain (percentage, %)	ORF(s) (NCBI)
Cluster 1	Strept	5220	2624	Streptomyces Streptomyces gene cluster (1)
Cluster 2	C1_pks	4994	4742	Multigene Streptomyces gene cluster (2)
Cluster 3	C1_pks	4750	4742	Streptomyces Streptomyces gene cluster (3)
Cluster 4	C1_pks	4613	4391	Streptomyces Streptomyces gene cluster (4)
Cluster 5	C1_pks	4434	4391	Streptomyces Streptomyces gene cluster (5)
Cluster 6	C1_pks	4400	4391	Streptomyces Streptomyces gene cluster (6)
Cluster 7	C1_pks	3967	3747	Streptomyces Streptomyces gene cluster (7)
Cluster 8	C1_pks	386	4032	Streptomyces Streptomyces gene cluster (8)
Cluster 9	C1_pks	3829	3729	Streptomyces Streptomyces gene cluster (9)
Cluster 10	C1_pks	3494	3729	Streptomyces Streptomyces gene cluster (10)
Cluster 11	C1_pks	3220	3729	Streptomyces Streptomyces gene cluster (11)
Cluster 12	C1_pks	3142	3486	Streptomyces Streptomyces gene cluster (12)
Cluster 13	C1_pks	3111	3486	Streptomyces Streptomyces gene cluster (13)
Cluster 14	C1_pks	2943	2848	Streptomyces Streptomyces gene cluster (14)
Cluster 15	C1_pks	2853	2218	Streptomyces Streptomyces gene cluster (15)
Cluster 16	C1_pks	2742	2487	Streptomyces Streptomyces gene cluster (16)
Cluster 17	C1_pks	2511	2378	Streptomyces Streptomyces gene cluster (17)
Cluster 18	C1_pks	1439	1439	Streptomyces Streptomyces gene cluster (18)
Cluster 19	C1_pks	1094	704	Streptomyces Streptomyces gene cluster (19)



NP160의 antiSMASH 분석법으로 확인한 다양한 이차대사 관련 gene cluster 예측

(나) 이들 효소유전자를 기반으로 cloning을 통하여 재조합 효소 합성 후 유용성 검증

species	Genome size	No. gene	transferase	oxyganase	CYP450
PAMC25564	4,170,970	3,968	223	259	5
PAMC28760	4,558,287	4,456	215	289	4
PAMC28499	4,880,615	4,679	154	246	8
PAMC26645	4,101,852	4,394	211	274	4
PAMC25046	3,568,862	4,152	241	241	5
PAMC22915	5,230,360	5,146	187	198	6
PAMC27889	3,361,909	3,985	195	240	8
PAMC20947	4,063,136	4,018	256	199	9
PAMC28707	4,231,322	4,321	241	235	4
PAMC28705	3,883,676	4,216	165	254	5
PAMC25021	4,727,871	4,460	195	241	6
PAMC22135	3,453,563	3,243	201	215	4
PAMC22222	4,694,146	4,073	154	198	5
PAMC21344	4,862,862	4,367	198	187	7
PAMC25430	4,705,947	4,746	175	225	5
PAMC22241	4,078,928	3,537	225	234	8
PAMC28562	4,657,241	4,486	254	215	6

(3) 재조합 변형효소 발현을 위한 벡터 시스템 구축

(가) 항생물질 변형효소 발현을 위해 대장균 발현 벡터에 클로닝 50종 (극지연 35종 + 선문대 15종)

유전자 합성 리스트

Strain	Protein name	homolog	주분날짜	해송날짜	Cloning	length(bp)
1	qnr		20180109	20180228	O	666
2	aac(6)-ii		20180109	20180209	O	558
3	aac(6)-ic		20180109	20180206	O	747
4	Rv1347c		20180109	20180201	O	642
5	aac(2)-Ia		20180109	20180228	O	546
6	aac(2)-Ib-d.MF		20180109	20180223	O	597
7	aac(2)-Ib-d.Mt		20180109	20180223	O	555
8	aac(2)-Ib-d.Ms		20180109	20180223	O	642
9	aph(3)-Ib		20180109	20180228	O	816
10	hph		20180109	20180223	O	1272
11	Ycb1		20180109	20180206	O	930
12	Rv3225c		20180109	20180309	O	1434
13	Rv3817		20180109	20180206	O	765
14	aph(9)		20180109	20180221	O	1005
15	ant(6)-Ib		20180109	20180223	O	864
16	WP_062166445.1		20180118	20180309	O	696
17	WP_067180847.1	qnr	20180118	20180221	O	576
18	WP_068238484.1		20180118	20180221	O	615
19	WP_052275051.1	aac(6)-Ib	20180118	20180313	O	552
20	WP_068231688.1		20180118	20180223	O	561
21	WP_062167160.1	aac(6)-Ic	20180118	20180213	O	489
22	WP_062002162.1	Rv1347c	20180118	20180224	O	969
23	WP_025103768.1	aac(2)-Ib-d	20180118	20180223	O	561
24	WP_06837664.1		20180118	20180221	O	462
25	WP_025104855.1		20180118	20180224	O	735
26	WP_066283089.1	aph(3)-Ib	20180118	20180224	O	750
27	WP_066614901.1		20180118	20180224	O	1059
28	WP_066276853.1		20180118	20180223	O	1011
29	WP_025989184.1	Ycb1	20180118	20180221	O	1323
30	WP_068632480.1		20180118	20180224	O	1074
31	WP_066618022.1		20180118	20180223	O	936
32	WP_025102985.1	Rv3225c	20180118	20180223	O	885
33	WP_066281332.1		20180118	20180223	O	936
34	WP_039601793.1		20180118	20180223	O	1122
35	WP_062766075.1		20180118	20180221	O	978
36	WP_025105199.1		20180124	20180305		2649
37	WP_039003556.1		20180124	20180316		2490
38	WP_067195266.1	Penicillin acylase	20180124	20180227		2436
39	WP_068232208.1		20180124	20180223		2478
40	WP_068336088.1		20180124	20180307		2229
41	WP_068233797.1		20180124	20180309		2216
42	WP_067189577.1		20180124	20180227		2193
43	WP_068632499.1		20180124	20180302		2406
44	WP_066609788.1		20180124	20180306		2589
45	WP_068329491.1	Citrate synthase	20180208	20180327	O	1305
46	WP_067191143.1		20180208	20180402	O	1296
47	WP_082763539.1	antifreezing	20180208	20180327	O	1305
48	CA_CacV3p	antifreezing	20180208	20180404	O	1551
49	WP_068342638.1	ActVA-Crh6	20180214	20180313	O	333
50	WP_039001987.1		20180214	20180312	O	327
51	WP_068338855.1		20180214	20180313	O	675

52	KOPRI 균주	WP_062765834.1	glycosyltransferase	20180515	20180702	O	1323
53		WP_062170588.1	erase	20180515	20180702	O	1227
54		WP_066283562.1		20180515	20180625	O	1365
55	Human	hHDAC6_84_440	Histone deacetylase 6	20180710	20181016	O	1086
56		hHDAC6_479_835		20180710	20181005	O	1086
57		hHDAC6_1109-1215		20180710	20180810	O	336
58		WP_039002014.1		20180731	20181016	O	1395
59		WP_082767130.1		20180731	20181107	O	1521
60		WP_068633129.1		20180731	20181005	O	1113
61	KOPRI 균주	WP_061999050.1	penicillin binding protein	20180731	20181011	O	1119
62		WP_062166924.1		20180731	20180928	O	1170
63		WP_061998310.1		20180731	20181005	O	1113
64		WP_082802249.1		20180731	20181016	O	1113
65		WP_068630562.1		20180731	20181107	O	1110
66		WP_082767012.1		20180731	20181005	O	1617
67		WP_066611968.1		20180731	20181011	O	1137
68		WP_062170588.1_2	UDP-glucosyltransferase	20180831	20181015	O	1227
69		WP_082758510.1		20180831	20181114	O	1221
70		AMG827272.1		20180831	20181206	O	1251
71	KOPRI 균주	WP_066283562.1	phosphotransferase	20180831	20190207	O	1365
72		WP_066620342.1	carbapenemase	20181204	20190102	O	564
73		WP_062764557.1	antiphenicolin-acyltransferase	20181204	20181226	O	1101
74		WP_066617968.1	penicillin-N-acyltransferase	20181204	20181221	O	1143
75		WP_068336926.1	carbapenem pathway (CarA)	20190104	20190305	O	1938
76		WP_062166443.1	carbapenem pathway (CarA)	20190104	20190322	O	1695
77		WP_062001506.1	carbapenem pathway (CarB)	20190104	20190207	O	771
78		WP_068236916.1	carbapenem pathway (CarB)	20190104	20190211	O	801
79		WP_066614576.1		20190104	20190207	O	747
80	KOPRI 균주	WP_082763452.1	N-acetyltransferase			O	
81		WP_062000933.1		20190104	20190214	O	528
82		WP_068633004.1		20190104	20190304	O	875
83		WP_062002402.1	TEM1-beta-lactamase	20190104	20190221	O	822
84		WP_062166692.1		20190104	20190205	O	810
85		WP_066281234.1		20190104	20190207	O	855
86	Collinella aerofaciens	MECA9	7α-hydroysteroid dehydrogenase	20190128	20190321	O	801

(나) 선문대학교에서 진행 중인 항생물질 변형효소 발현 시스템 구축 현황

Sample	Function	Crystallization	Diffraction	Resolution	Paper work	Re-purification → Substrate mixing	C-Polymers	Substrate
2014	1. CYP4A7E	Fatty acid hydroxylase	Salt	X			O	Fatty acids
4.29	CYP209F2	Flavone hydroxylase	O	O	2.1 Å	O	Published	Flavone
3	DcaA	Daunosamin hydroxylase	Salt			O	O	DNR
10.19	CYP18A8	7-FC	X			O	O	7-FC
2015	5. CYP17G3	steroid hydroxylase	X			O	O	oleic acid
4.29	CYP19G3	steroid hydroxylase	X			O	O	oleic acid
7.30	CYP109F2	Oleanonolone hydroxylase	Salt			O	O	Oleanonolone
2016	7. CYP137C4	7-FC	Salt			O	O	7-FC
2.16	8. 22724-4629	CYP106A4	X			O	O	Steroids
2.16	9. 23377_3548	CYP106A2	O	O	2.7 Å	on going	On preparation	Steroids
2.16	10. 26495_360	CYP105K7	O	O	3.1 Å	O	Acceptor	Steroids
3.25	11. 22724-4530	CYP106A5	O	X		O	O	Steroids
3.25	12. 38993_2194	CYP108B14	X			O	O	7
3.25	13. 28404_1711	CYP105D16	O	X		O	O	Alkane
3.25	14. 26621-3332	CYP103D18	X			O	O	Alkane
5.9	15. 3-4_5939	CYP106A6	O	O	~ 2.8 Å data 수집 (Re-refinement 필요)	O	O	Steroids
5.9	13. H5445-5132	GT-tyc	X			O	O	GT-steroids
5.9	17. 20857_2322	GT-NHE	O	O	Spectroscopy (발현)	O	O	GT-steroids
10.26	35. 22657-2322	GT-NHE	O	O	On going			
10.26	38. 2640-4731	CYP105D16	X					테스트용기질 과 반응성 기질
10.26	37. H6838304	GT-NHE	X					테스트용기질 과 반응성 기질
11.26	38. W2893089	CYP104C8	X					Corticosterone Progesterone
07.20	39. CYP106A4	CYP106A4	X					
07.20	40. CYP109A6	CYP109A6	O	O	On going			
09.18	41. 232062171	GT-tyc						
09.18	42. H7187498	GT-NHE						
09.18	43. H6846-8182	GT-tyc						
06.12	44. H71871291	GT-tyc						
06.27	45. 238513418	GT-NHE						
06.27	46. 3-4_5939	CYP106A6						
06.27	47. 7AMDH	가득학연구소						
06.27	48. 78MDH	가득학연구소						
08.28	49. 238572478	GT-NHE						
08.28	50. H6846-8182	GT-tyc						
08.28	51. 22724-4530	CYP106A5						Progesterone + Testosterone → Androstenedione, androsta- diene, androsterone, androste-
7.22	18. H7187498	GT-NHE	X			O	O	FDX-FDX
7.22	25. 40640_2389	CYP104C4	X			O	O	Steroids
7.22	20. W2228-1029	CYP104C8	X			O	O	Steroids
7.29	21. H7028-4402	CYP104C0	X			O	O	Steroids
7.29	23. 30909-6729	CYP104C4	X			O	O	Steroids
8.19	23. CYP105D5	Flavone hydroxylase	O	O	~ 3 Å		O	Flavone
8.19	24. W0963-91	CYP104C2	O	O	2.2 Å	On going	O	Steroids
9.23	25. W0298_4298	CYP104C3	X			1. Corticosterone		테스트용기질 과 반응성 기질
9.23	26. W0298_4298	CYP104C3	X			2. Progesterone		테스트용기질 과 반응성 기질
9.23	27. CYP4A7E	Fatty acid hydroxylase	X			1. Lauric acid		테스트용기질 과 반응성 기질
9.23	28. CYP4A7E	Fatty acid hydroxylase	X			2. Myristic acid		테스트용기질 과 반응성 기질
9.23	29. 23206_2171	GT-tyc	X			Testosterone		테스트용기질 과 반응성 기질
9.23	30. H7187498	SP_Permeation inhibitor	X					FDX-FDX
9.30	31. 40640_2389	CYP104C4	X			1. Corticosterone		테스트용기질 과 반응성 기질
9.30	32. 40640_2389	CYP104C4	O	O	2.7 Å	On going	2. Progesterone	테스트용기질 과 반응성 기질
9.30	33. 23377_3548	CYP106A2	O	O	2.3 Å	On preparation		테스트용기질 과 반응성 기질
9.30	34. 23377_3548	CYP106A2	X			2. Progesterone		테스트용기질 과 반응성 기질
10.15	52. 22657_2322	GT-NHE						
10.15	54. 39938_7381	CYP205A8						
10.15	55. 24820_2420	HIS ngadh						
12.14	56. 14820_124	CYP205D6						Alpha ionone Beta ionone
12.14	57. H7187498	NHE						Progesterone, androstenedione + androstenedione, androsterone, androstadiene, androsterone, androstadiene
01.24	58. 3-4_5939	CYP106A6						Progesterone, androstenedione + androstenedione, androsterone, androstadiene
01.24	59. W0448_5095	CYP237B4						Vitamin D2, Vitamin D3
01.24	60. H71871291	tyc						

(4) 재조합 변형효소 발현 테스트

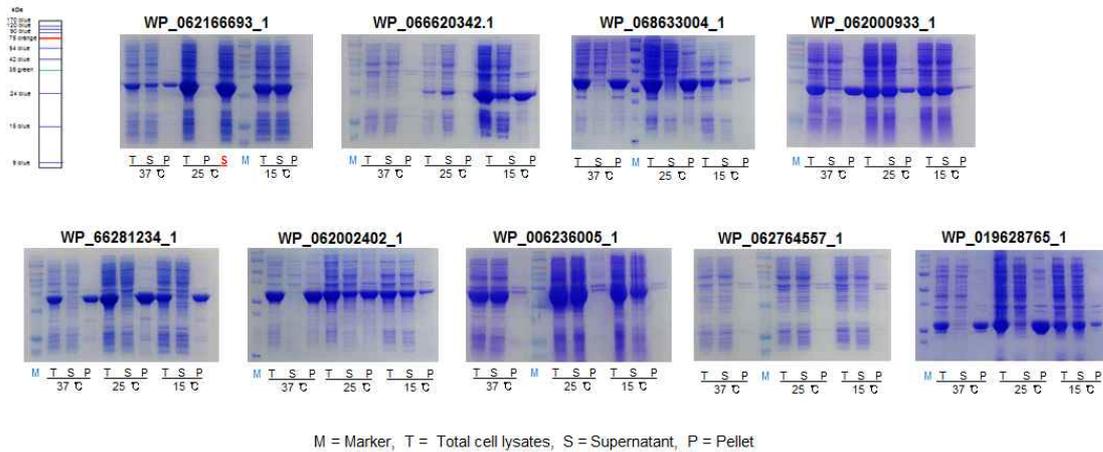
(가) 항생물질 변형효소 타겟 120 중 중에서 발현 테스트를 통해 50개의 타겟 발현 플라스미드 확보

(나) Soluble 한 단백질 발현 조건 탐색을 위해 두 가지 온도 조건 (15도, 25도, 37도)에서 발현 테스트 수행, 24종의 soluble 한 단백질 발현 확인

Expression test of Antibiotics modification enzyme

Temperature-dependent expression test : 37 °C, 25 °C, 15 °C

cell culture 100 mL (OD ~0.6 @ 37 °C, 0.5 mM IPTG) → 100 mL harvest (OD 1.4~2.0, 8000 rpm, 15 min, 4 °C) → sonication 2/4 sec (on/off, 30%, total 5 min)



나. 성과목표 2: 재조합 변형효소 발현 및 정제

(1) 발현 및 정제 조건 확립

(가) 24종의 항생물질 변형효소 재조합 단백질 발현 확인

(나) 구조분석 및 생화학적 특성 분석을 위해 항생물질 변형효소 17종의 대량 정제된 재조합 단백질 확보

(2) 정제된 변형효소의 활성 측정

(가) Thin Layer Chromatography 방법을 이용한 항생물질 변형효소의 기질 특이성 확인

Thin Layer Chromatography (1)

*TLC silica gel 60 RP-18

*Reverse Phase

*Visualization

(1) Non-destructive visualization

: UV 254nm wavelength

(2) Destructive visualization

: 20% H₂SO₄ + 110°C heat

*Mobile phase

-100mM monosodium phosphate

-75mM sodium acetate

-pH 4.6 adjusted by formic acid

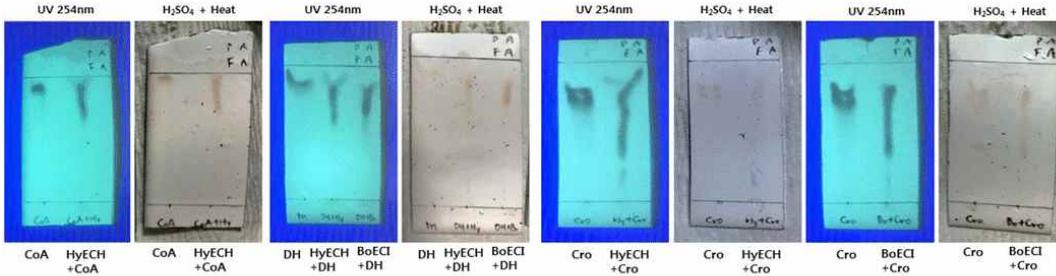
-acetonitrile(94 : 6, v/v)

*Sample

-Protein : About 50uM

-Substrate : 4mM (CoA, DL-β-hydroxybutyryl CoA, Crotonoyl-CoA)

-Buffer : 50mM Sodium phosphate, 300mM NaCl



Thin Layer Chromatography (2)

*TLC silica gel 60 RP-18

*Reverse Phase

*Visualization

(1) Non-destructive visualization

: UV 254nm wavelength

(2) Destructive visualization

: 20% H₂SO₄ + 110°C heat

*Mobile phase

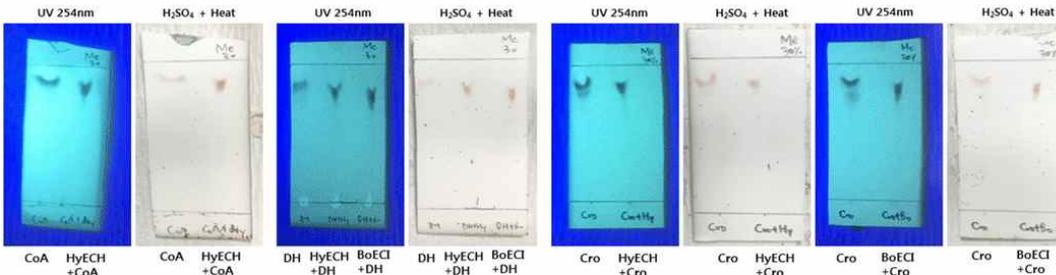
-30% Methanol

*Sample

-Protein : About 50uM

-Substrate : 4mM (CoA, DL-β-hydroxybutyryl CoA, Crotonoyl-CoA)

-Buffer : 50mM Sodium phosphate, 300mM NaCl



Thin Layer Chromatography (3)

*TLC silica gel 60 RP-18

*Reverse Phase

*Visualization

(1) Non-destructive visualization

: UV 254nm wavelength

(2) Destructive visualization

: 20% H₂SO₄ + 110°C heat

*Mobile phase

-30% Methanol

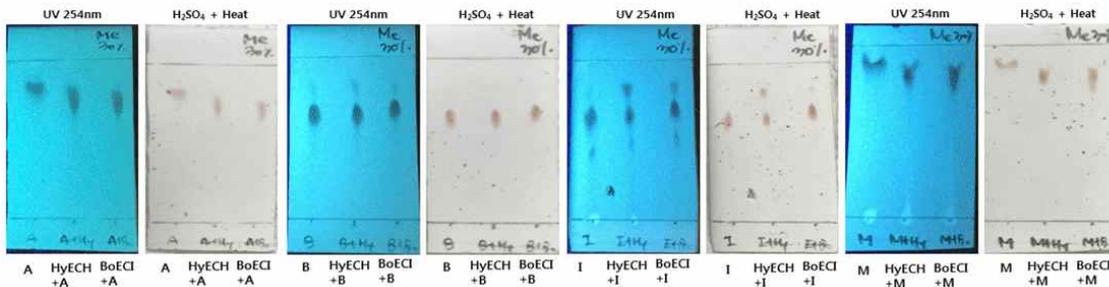
*Sample

-Protein : About 50uM

-Substrate : 5mM (Acetyl CoA, Butyryl CoA, Isobutyryl CoA, Malonyl CoA)

-Buffer : 50mM Sodium phosphate, 300mM NaCl

-37°C incubation for 3 hours



Experimental design of AGA acetylation activity using TLC

Materials

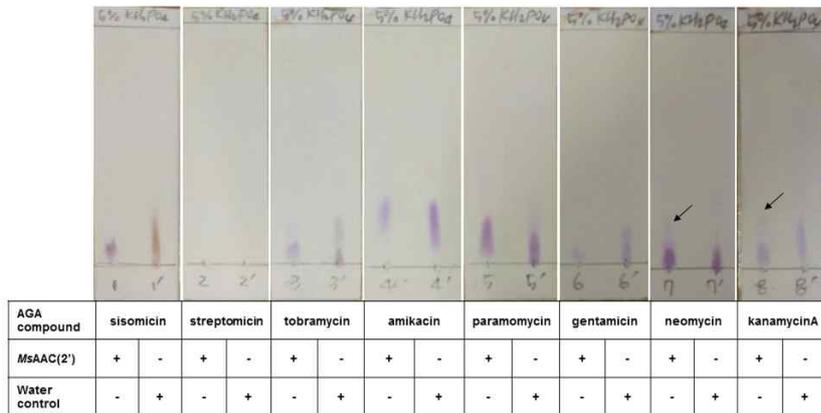
1. Enzyme: AAC(2'), mutants
2. Acetyl-CoA
3. AGA (aminoglycoside antibiotics: neomycin, sisomicin, streptomycin, tobramycin, amikacin, paromomycin, gentamicin, kanamycin A)
4. Mobile phase solution: 5% KH₂PO₄
5. Staining solution: ninhydrin/acetone solution (5g/L)
6. Phosphate buffer (10mM, pH 7.0)

Methods

1. Experiment group

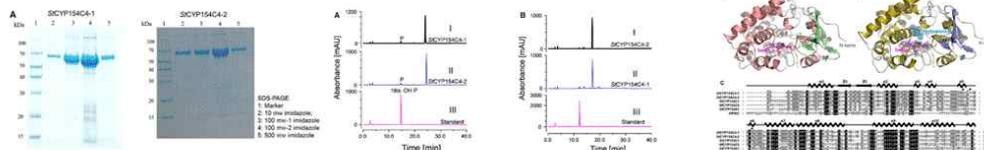
Experiment group	Control group
AAC(2') (17.4 mg/mL) ~ 30 µg	2 µL
Acetyl CoA (100 mM) 4 mM	2 µL
AGA (100 mM) 1 mM	0.5 µL
phosphate buffer 45.5 µL	45.5 µL
total 50 µL	50 µL
2. Spotting : A20 µL aliquot of the incubated reaction mixtures is transferred to a silica gel 60 TLC plate.
3. Separation : 5% KH₂PO₄ mobile phase solution
4. Air-dried overnight
5. Staining : spraying with ninhydrin solution
6. Incubation at 60 °C for 20 min

Results of AGA acetylation activity test using TLC

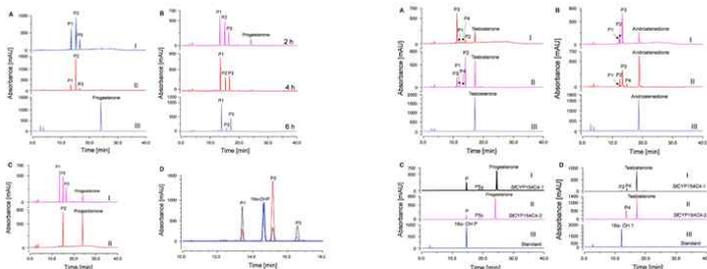


(나) StCYP154C4-1과 StCYP154C4-2의 스테로이드 계열 기질에 대한 특이성 규명

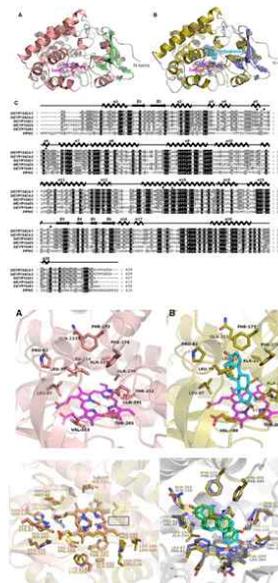
Characterization of two steroid hydroxylases from different *Streptomyces* spp. and their ligand-bound and -unbound crystal structures



단백질 정제와 in vitro 반응으로 16α-hydroxyprogesterone 생성물 확인



왼쪽은 progesterone을 기질로 두 가지 CYP154C4 단백질을 사용한 반응임 (P1은 di-, P2는 mono-, P3는 mono-의 산화형태)
오른쪽은 다른 기질(A,B) 및 diacetyxyiodobenzene(PIDA)를 사용한 반응(C,D) 결과임



기질 free form과 binding form의 구조 결정 완료

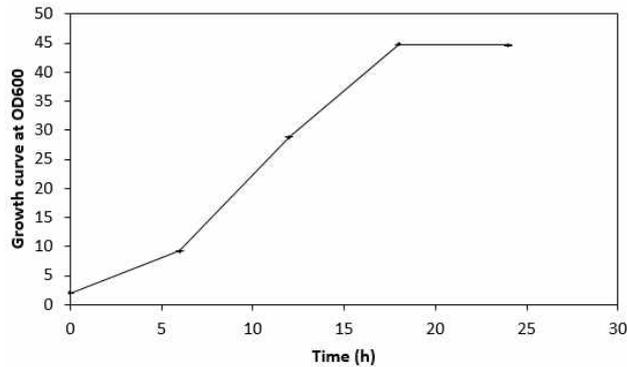
위 사진들은 활성 부위 나타냄. 아래는 헴 바인딩 부분 겹쳐 보였으며, 마지막은 4J6D와 기질 binding form을 겹쳐놓은 것임

(3) 재조합 변형효소 PbAcE 대량생산

(가) 선별된 효소 생산 균주의 생물반응기 배양 조건 시험

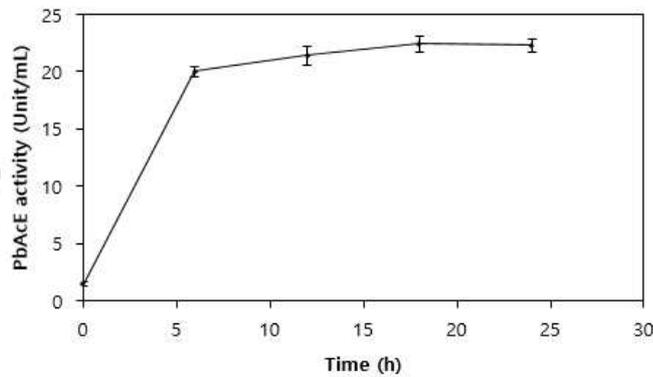
균주: 재조합 대장균, pET28a-PbAcE

배양조건: 4-L jar fermenter, 37°C, modified R배지, 1mM IPTG 투입하여 발현 유도



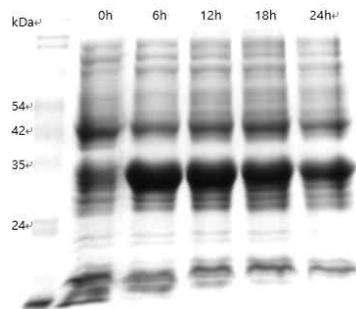
<그림19> 시간에 따른 세포 농도 변화

(나) 재조합 에스테레이즈 생산을 위해 재조합 대장균을 jar fermenter에서 배양하여 OD600=45의 세포 농도에 도달함



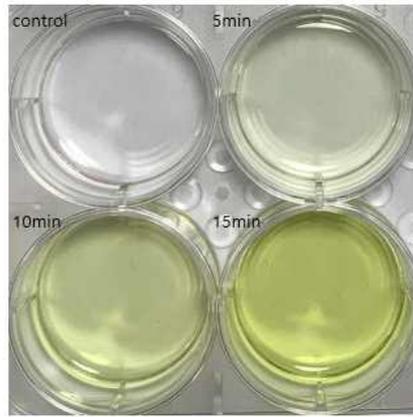
<그림20> 배양 시간에 따른 PbAcE 활성 변화

(다) SDS-PAGE 분석 결과 IPTG 첨가 6시간 이후부터 발현 확인 가능



<그림21> PbAcE의 발현 분석을 위한 SDS-PAGE 결과

(라) PbAcE + pNPA (p-nitrophenyl acetate) 반응 결과 시간에 따라 노란색이 증가함을 확인함 --> 에스테레이즈 활성 확인



<그림22> PbAcE의 활성 확인

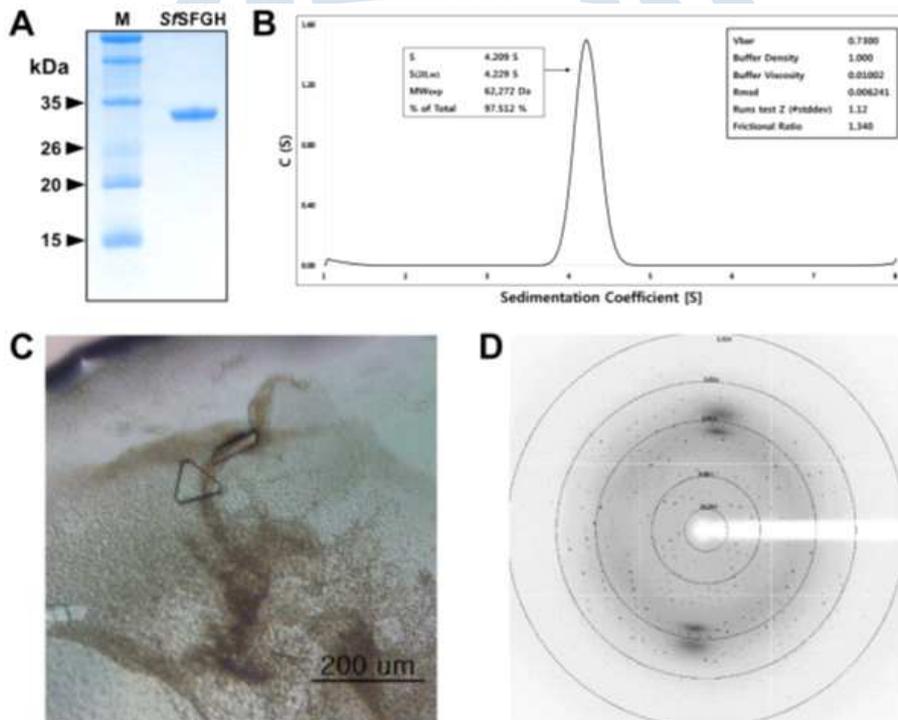
(마) 변형효소의 생산성은 세포농도 증대와 단위세포 당 생산성 증대를 통해 향상 가능함을 확인함

다. 성과목표 3: 변형효소 구조 분석 및 항생물질을 기질로 이용한 대사 특성 규명

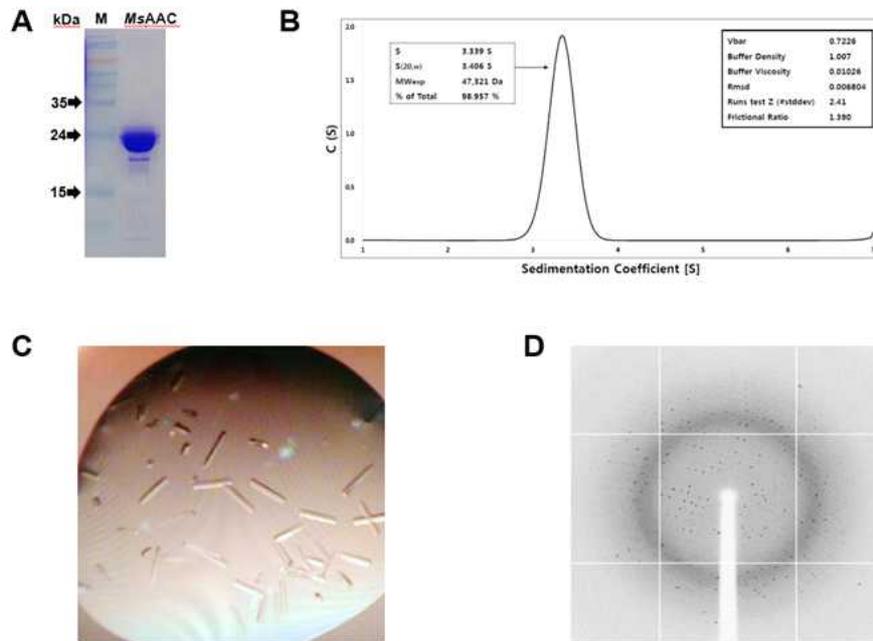
(1) 변형효소의 결정화 조건 탐색

(가) 결정화 조건 스크리닝을 위해 단백질 별로 약 2000 여 가지 이상의 조건을 탐색

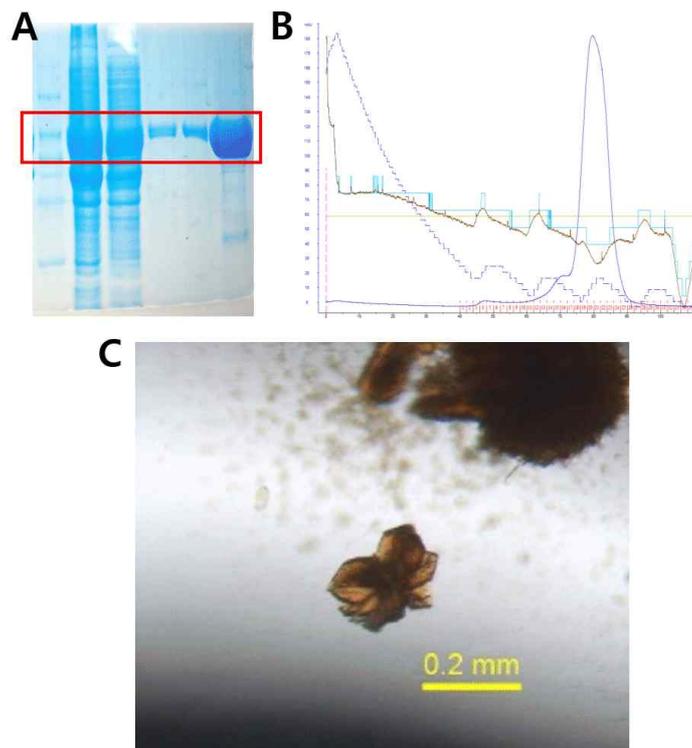
(나) 항생물질 변형효소 8종의 결정화 조건 확보



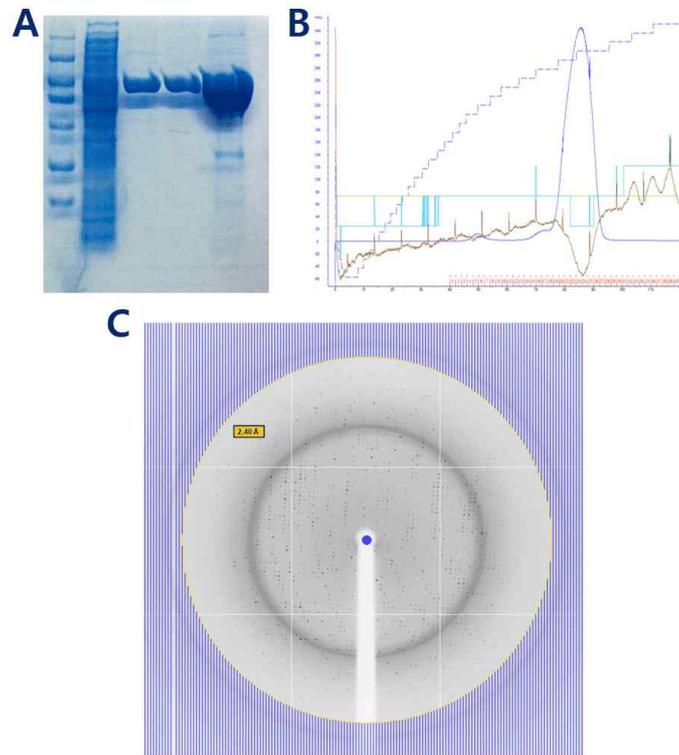
<그림23> (A) 정제된 재조합 SfSFGH 단백질의 SDS-PAGE 결과 (B) Analytical ultracentrifugation (AUC) 실험으로 SfSFGH 단백질은 용액에서 대부분 dimer 형태를 가짐 (C) SfSFGH 단백질 결정 사진 (D) SfSFGH 단백질 결정을 이용한 X-선 회절 이미지



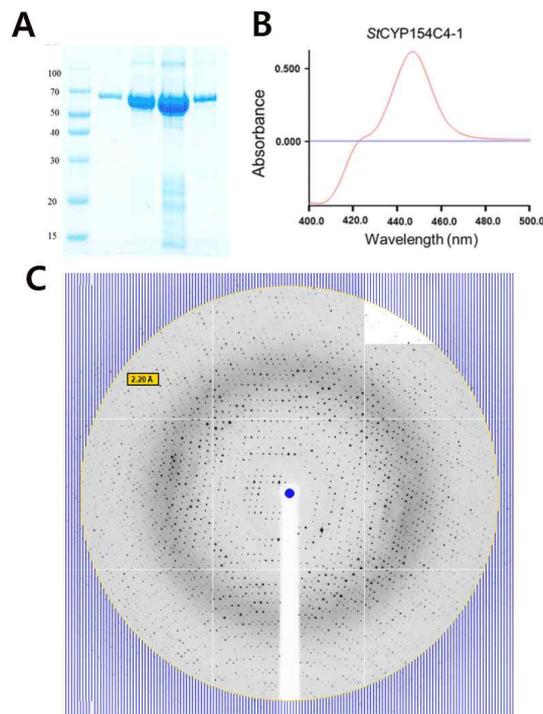
<그림24> (A) 정제된 재조합 MsAAC(14.8 μ g) 단백질의 SDS-PAGE 결과 (B) Analytical ultracentrifugation (AUC) 실험으로 MsAAC 단백질은 용액에서 대부분 dimer 형태를 가짐 (C) MsAAC 단백질 결정 사진 (D) MsAAC 단백질 결정을 이용한 X-선 회절 이미지



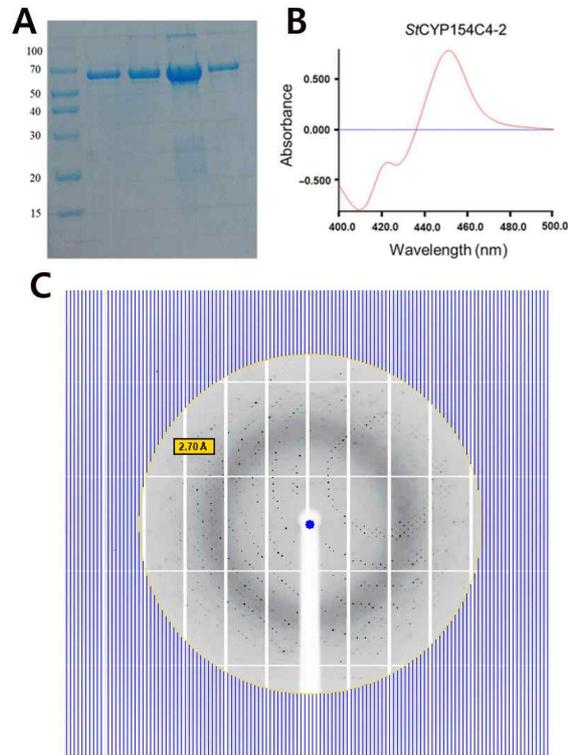
<그림25> (A) 정제된 재조합 CYP101D5 단백질의 SDS-PAGE 결과 (B) 재조합 CYP101D5 단백질의 gel-filtration 정제 결과 (C) CYP101D5 단백질 결정 사진



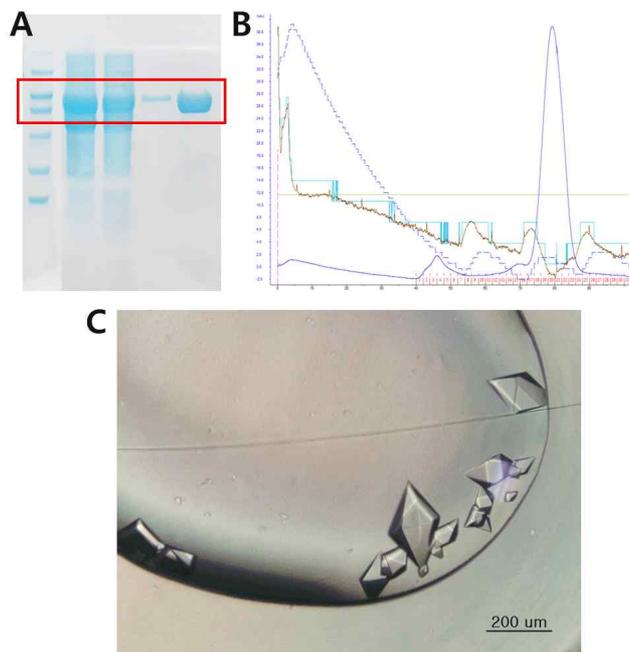
<그림26> (A) 정제된 재조합 CYP106A6 단백질의 SDS-PAGE 결과 (B) 재조합 CYP106A6 단백질의 gel-filtration 정제 결과 (C) CYP106A6 단백질 결정 사진



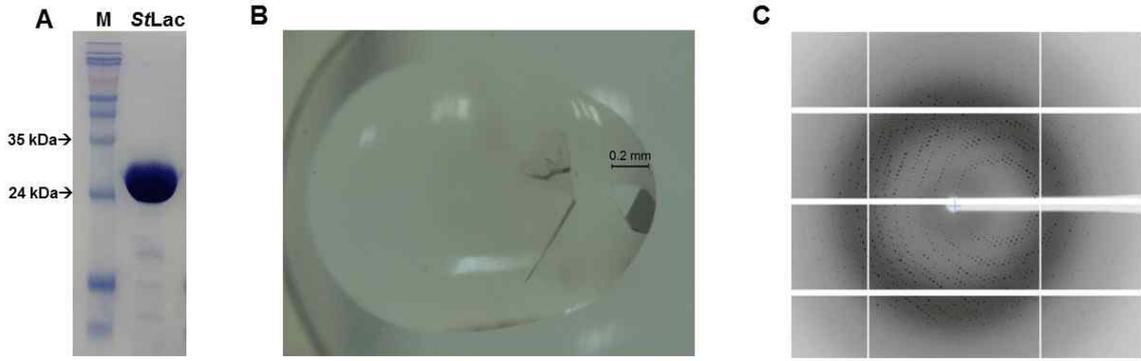
<그림27> (A) 정제된 재조합 StCYP154C4-1 단백질의 SDS-PAGE 결과 (B) UV-visible absorption spectroscopy of the dithionite-reduced CO-bound form of StCYP154C4-1 (C) StCYP154C4-1 단백질 결정을 이용한 X-선 회절 사진



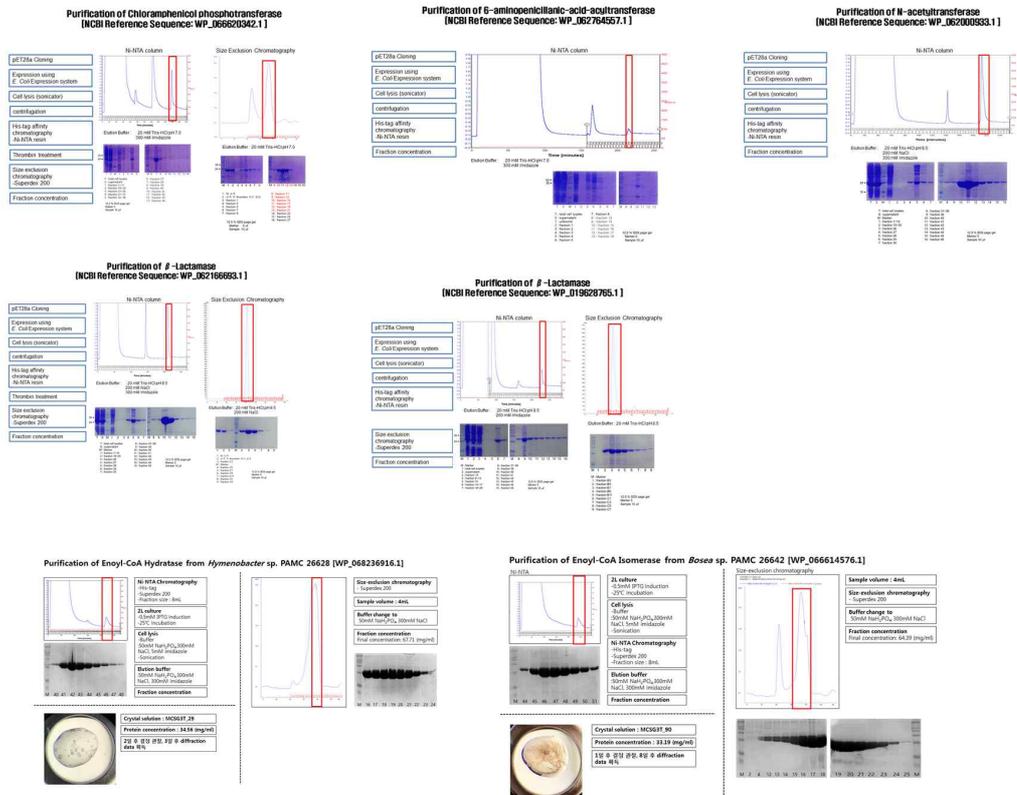
<그림28> (A) 정제된 재조합 StCYP154C4-2 단백질의 SDS-PAGE 결과 (B) UV-visible absorption spectroscopy of the dithionite-reduced CO-bound form of StCYP154C4-2 (C) StCYP154C4-2 단백질 결정을 이용한 X-선 회절 사진



<그림29> (A) 정제된 재조합 CYP106A6 단백질의 SDS-PAGE 결과 (B) 재조합 CYP106A6 단백질의 gel-filtration 정제 결과 (C) CYP106A6 단백질 결정 사진



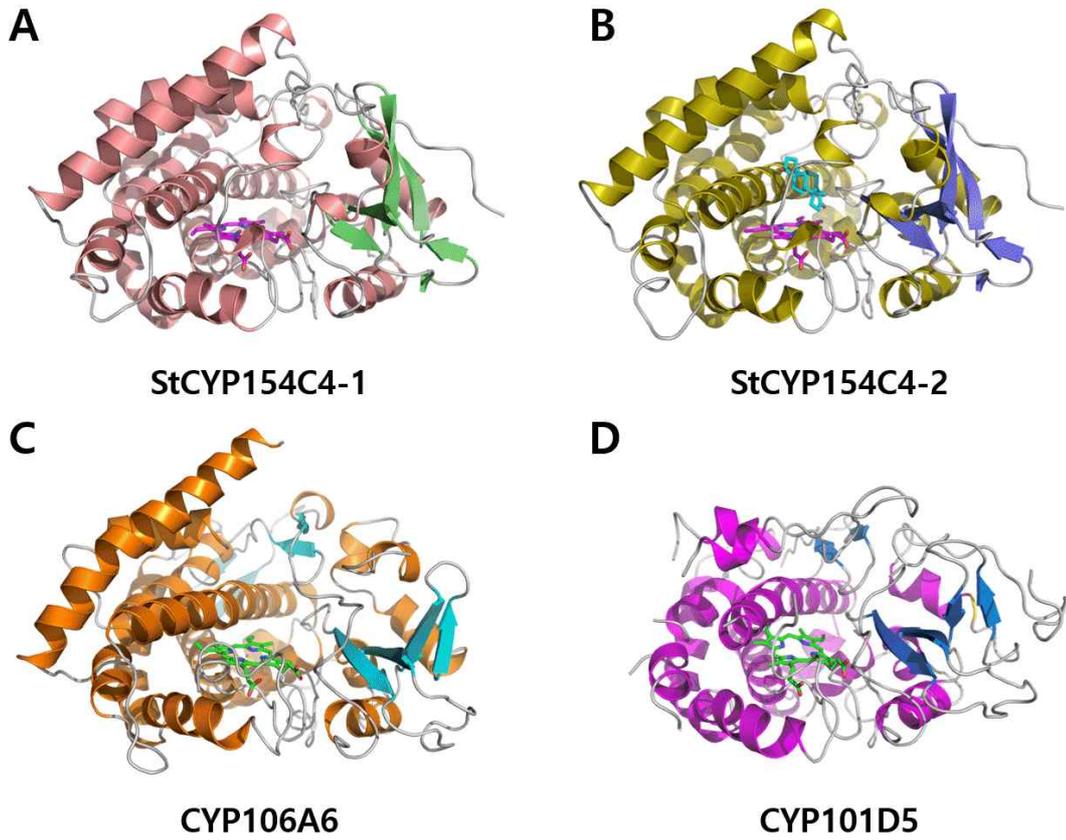
(A) Purified Sflac (30 mg/mL) was visualized using 12.5% SDS-PAGE.
 (B) Crystals of Sflac used for X-ray diffraction data collection.
 (C) A representative X-ray diffraction pattern of the Sflac crystal, with a maximum resolution limit of 1.88 Å.



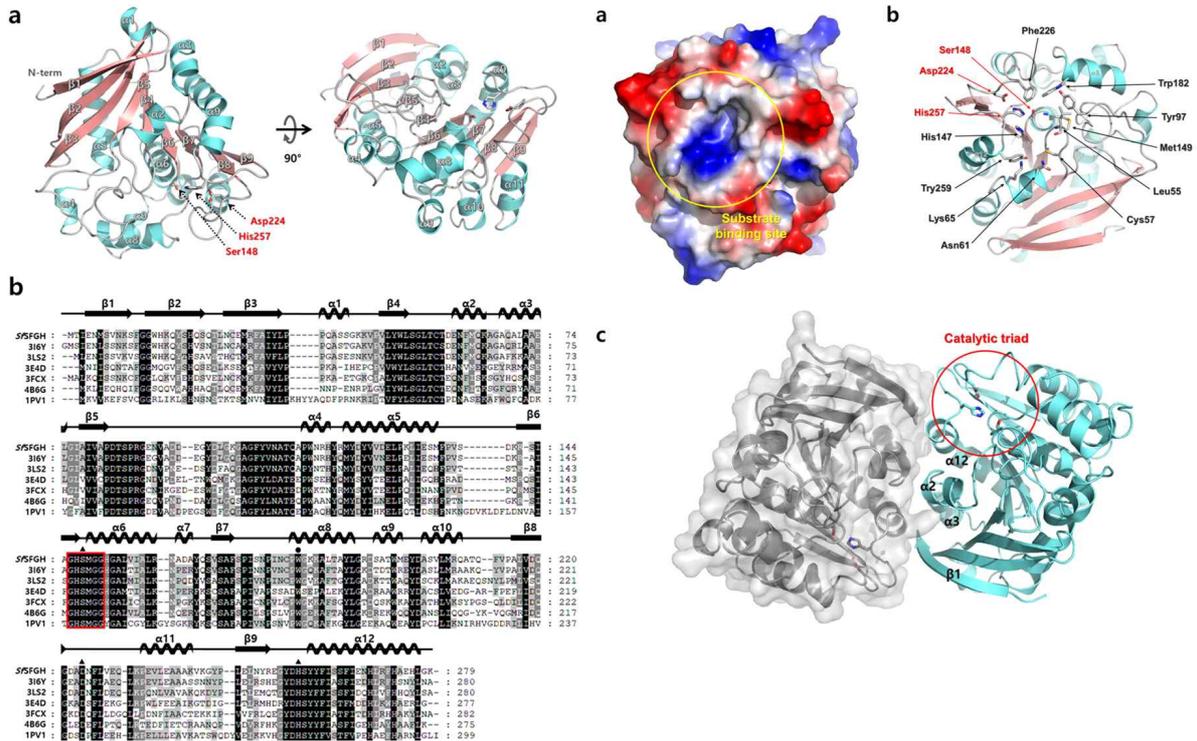
<그림30> 항생물질 변형효소의 정제 및 결정화 사진

(2) X-선 결정학 방법을 이용한 변형효소의 고해상도 구조 해석

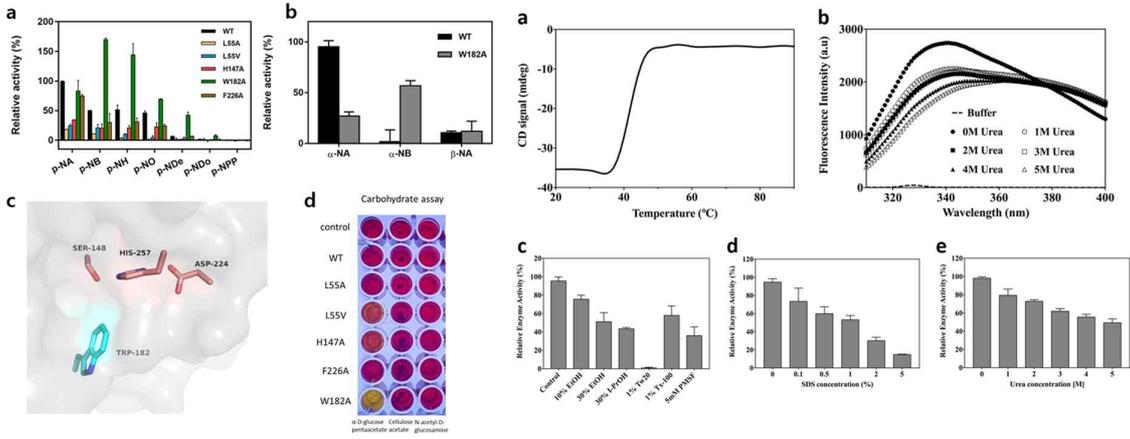
(가) 극지 균류 유래의 CYP 효소 4종의 구조분석 및 기질 특이성 규명



(나) SfsFGH 효소의 구조분석을 통하여 활성부위 잔기 및 기질결합에 중요한 잔기 확인

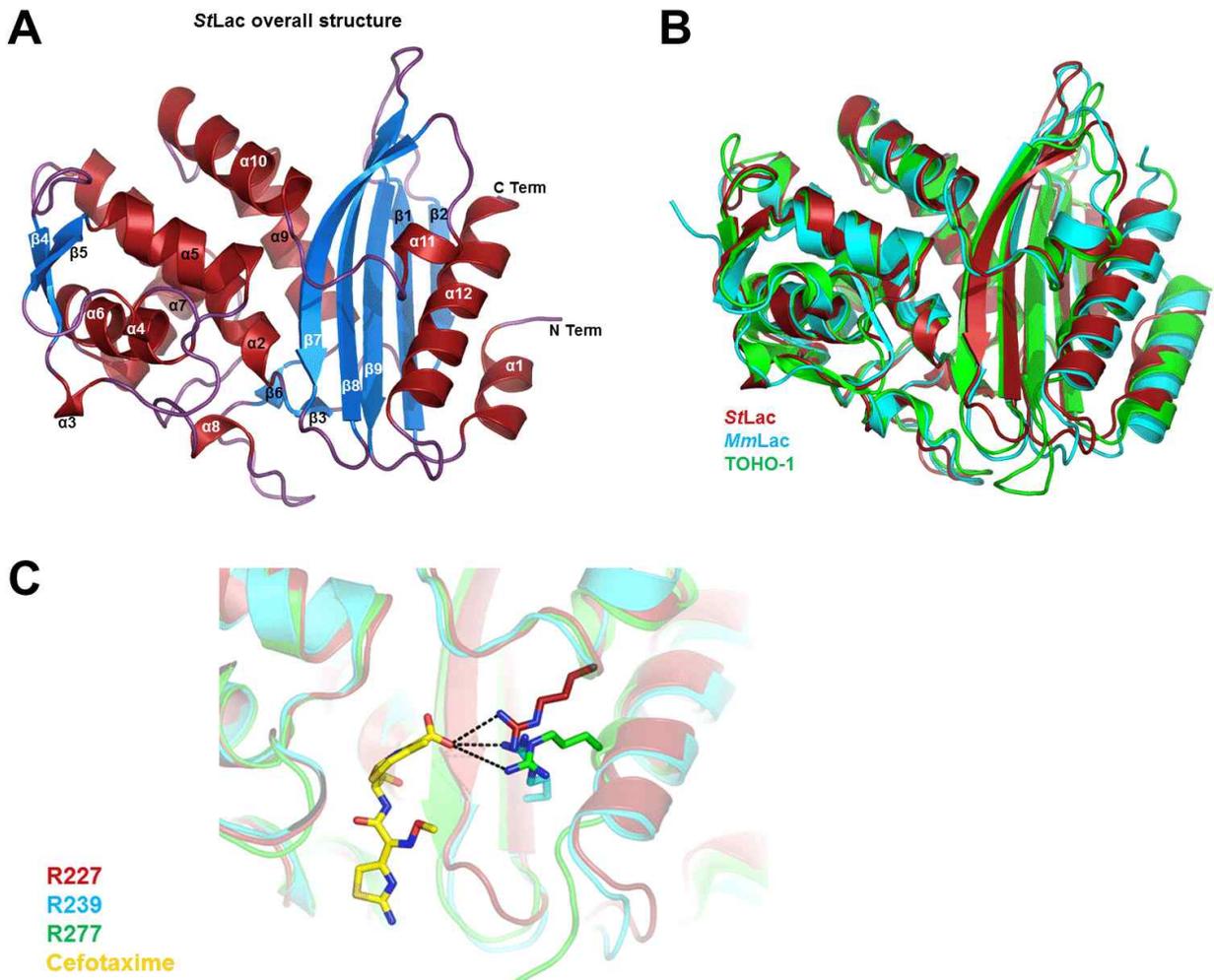


(다) SfSFGH 효소의 기질특이성 및 여러 조건에서의 안정성 비교



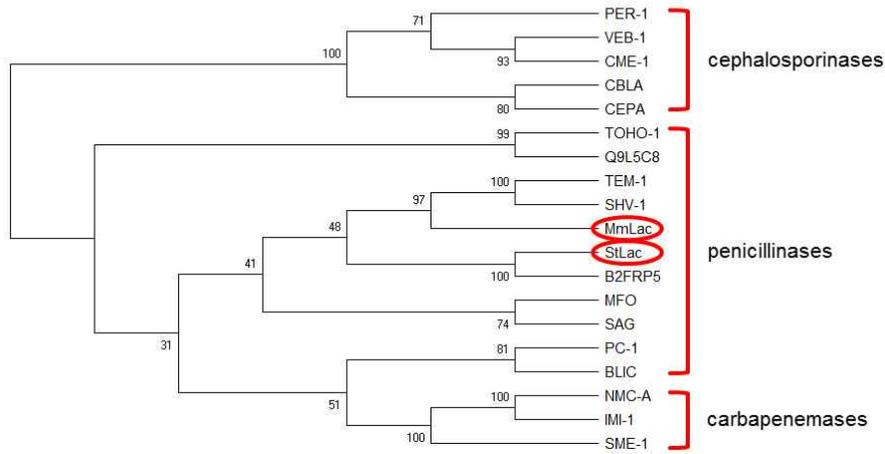
(3) 극지생물 유래 변형효소와 기존에 알려진 비극지 생물유래 변형효소와의 구조 비교분석을 통한 기능적 특성 분석

(가) 극지 해양미생물 (*Moritella marina* ATCC15381) 유래 β -lactamase (MmLac) 와 중온성 미생물 (*Stenotrophomonas* sp. KCTC 12332) 유래 β -lactamase (StLac) 의 구조 및 기능 비교

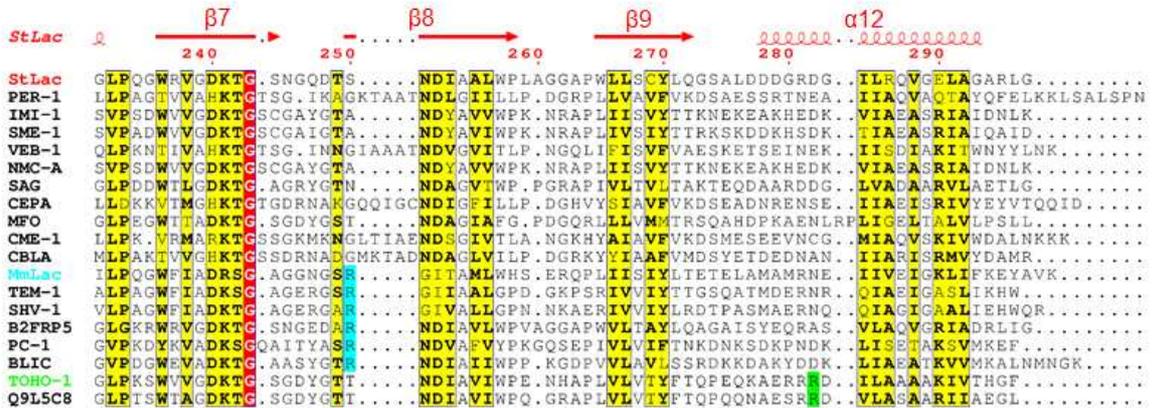
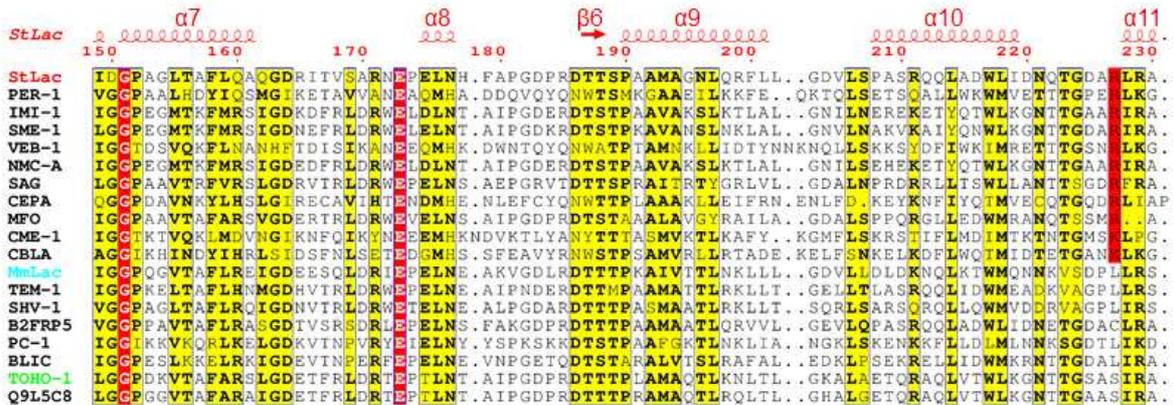


(나) MmLac 와 StLac 두 효소 모두 class A β -lactamase 에 속하며 기능적 구분에 의하면 penicillinase 그룹에 속함

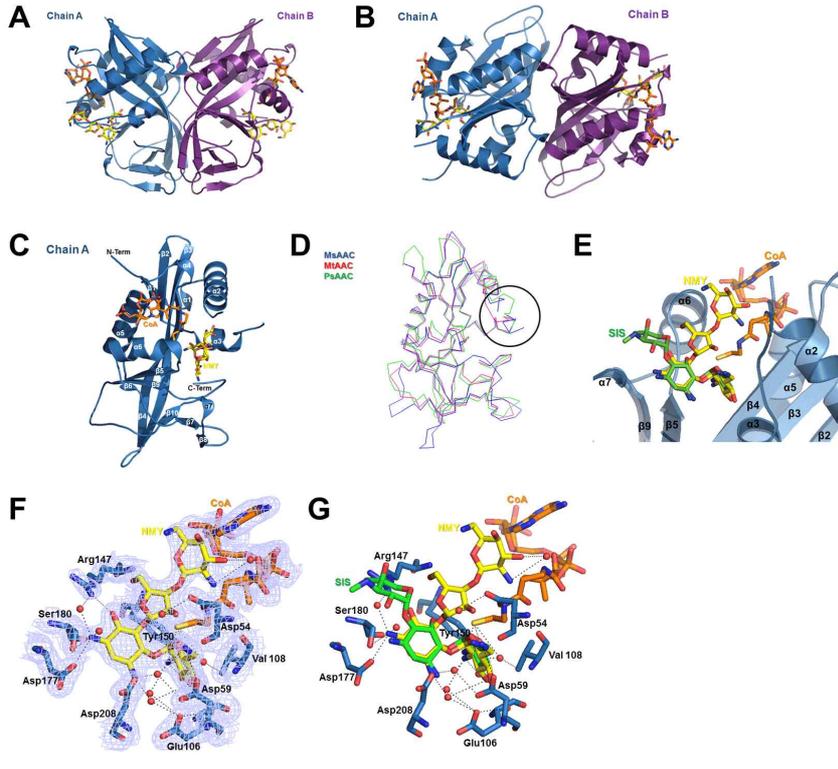
Phylogenetic tree for 19 Class A β -lactamases



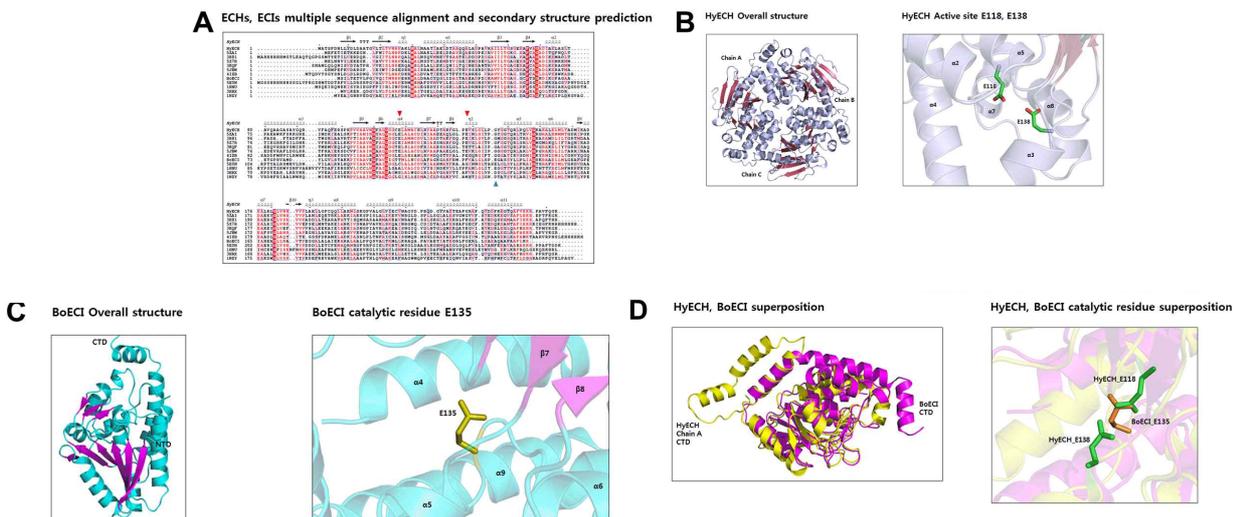
(다) 아미노산 서열 비교를 통해 MmLac 와 StLac 두 효소의 기질결합 부위에 Arg 잔기의 위치가 서로 달라 기질 특이성에 영향을 줌. Arg 잔기 위치에 따른 class A β -lactamase 들의 새로운 grouping이 가능 할 것으로 예상됨



(라) MsAAC 효소의 구조분석 및 다른 유사 단백질들과의 구조비교를 통해 MsAAC 효소의 다양한 항생물질을 기질로 이용하는 특성 규명, 그림에서 노란색은 MsAAC 효소의 기질인 neomycin 이고 녹색은 또 다른 기질인 sisomicin 임.

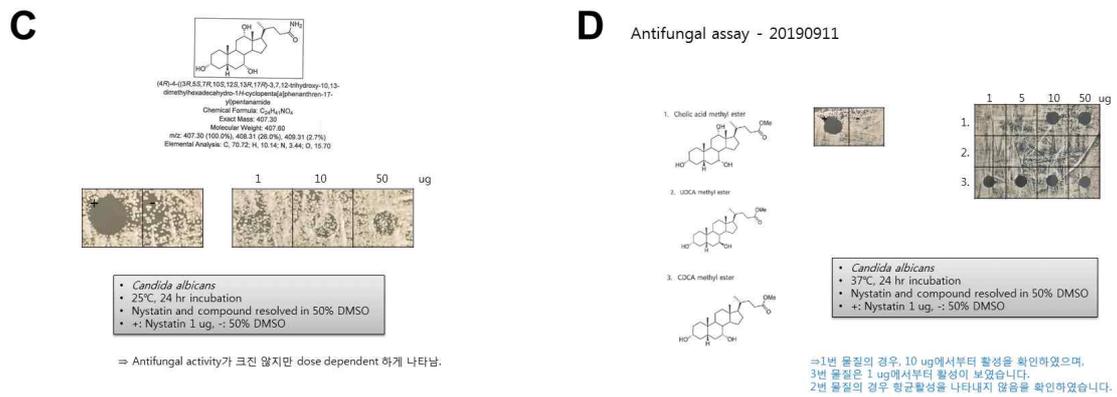
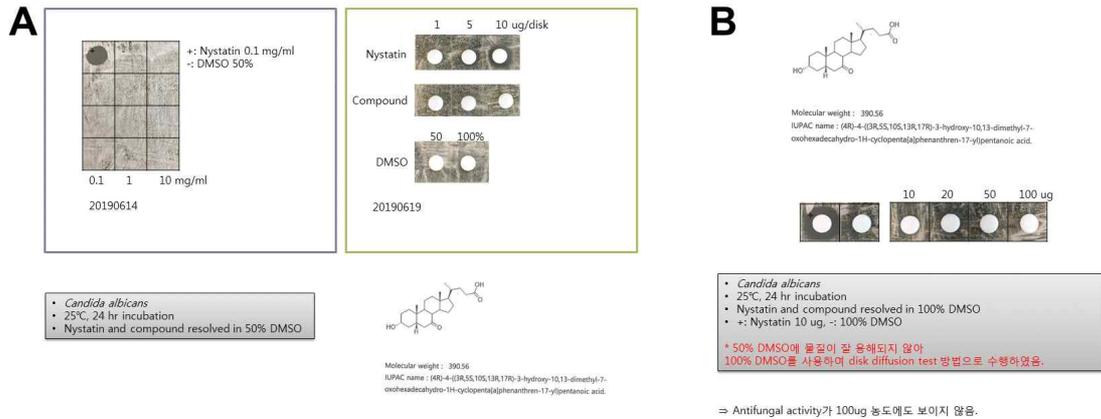


(마) Two bacterial enoyl-CoA isomerase (BoECI) and enoyl-CoA hydratase (HyECH)의 삼차구조해석. 구조비교 및 multiple sequence alignment를 통해 HyECH는 효소 활성 부위에 두 개의 활성 잔기 (E118, E138)를 가지는 반면 BoECI는 하나의 활성 잔기 (E135)를 가지는 사실 발견. 이 결과는 향후 새로운 효소의 기능적 분석에 유용하게 사용 되어 질 수 있음



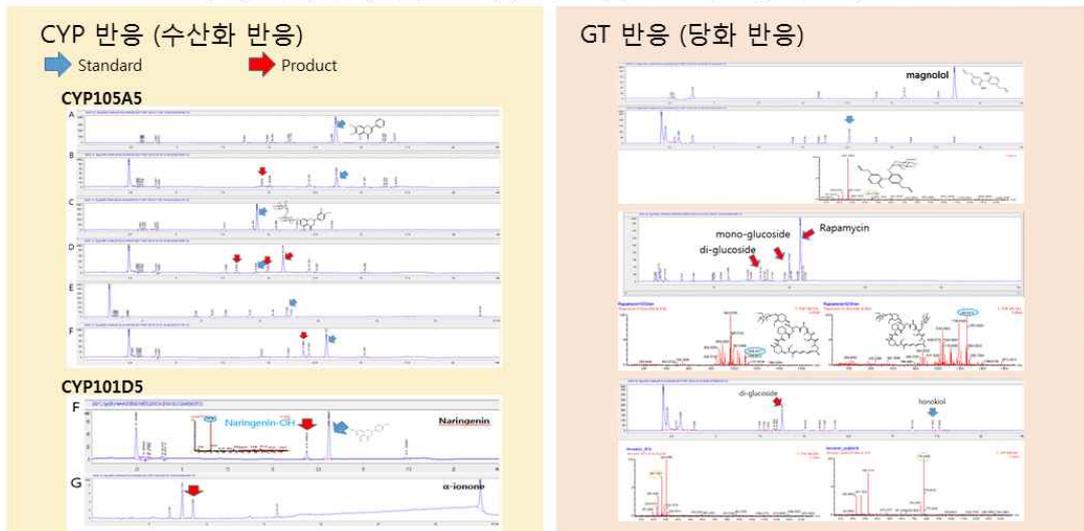
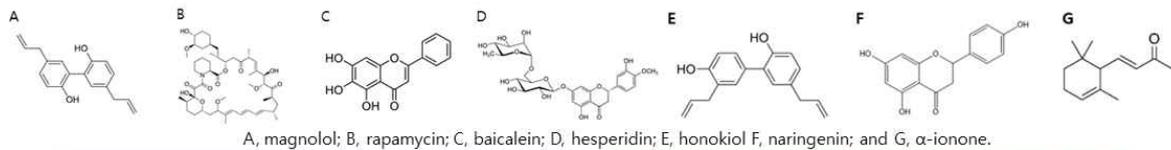
(4) 변형된 신규 항생물질의 활성측정

- 항진균 활성을 가지는 신규 스테로이드 계열의 항생물질을 확보 하고 변형효소를 이용한 modification 실험 수행 중



(5) 신규 항생물질의 구조분석

- CYP 와 Glycosyl transferase 효소를 이용한 신규 유도체 생산 및 구조분석



(6) 분자모델링 기술을 이용한 최적의 변형체 생산 시스템 확립

- Homology modeling 및 Docking 실험을 통한 geldanamycin 의 변형체 생산 연구

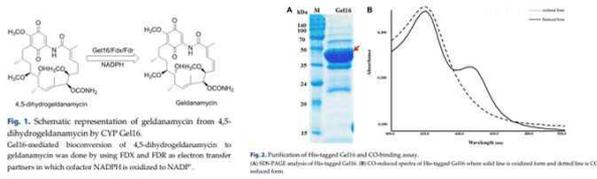


Fig. 1. Schematic representation of geldanamycin from 4,5-dihydrogeldanamycin by CYP Gel16. Gel16-mediated bioconversion of 4,5-dihydrogeldanamycin to geldanamycin was done by using FDX and FDR as electron transfer partners in which cofactor NADPH is oxidized to NADP⁺.

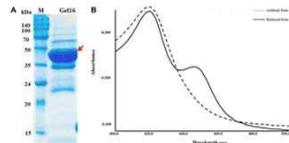


Fig. 2. Purification of His-tagged Gel16 and CO-binding assay. (A) SDS-PAGE analysis of His-tagged Gel16. (B) CO-induced spectra of His-tagged Gel16 where solid line is oxidized form and dotted line is CO-induced form.

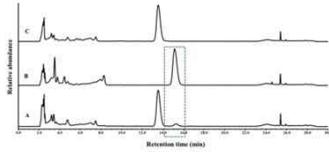
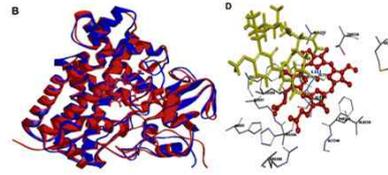


Fig. 3. In-vitro enzymatic conversion of 4,5-dihydroxygeldanamycin to geldanamycin. HPLC profile of the in-vitro enzyme reaction mixture of the purified His-tagged Gel16 with 4,5-dihydroxygeldanamycin (A), enzyme reaction mixture of the purified His-tagged Gel16 with geldanamycin (B), and control reaction mixture with 4,5-dihydroxygeldanamycin without the purified His-tagged Gel16 (C). The peak at 15.3 min was found to correspond to geldanamycin.

4,5-dihydrogeldanamycin에서 geldanamycin으로 생전환하는 핵심 단백질인 cytochrome P450 monooxygenase Gel16의 in vitro 반응 수행



Homology modeling 분석으로 노란색의 4,5-dihydrogeldanamycin 기질의 닥킹 결과를 확인

Table 2. Average binding energy obtained using eDOCK in the Gel16-FDXs and FDX4-FDRs.

Protein interaction	Binding energy (kcal/mol)	Protein interaction	Binding energy (kcal/mol)
Gel16-FDX1	-580.64203	FDX4-FDR1	-764.45379
Gel16-FDX2	-226.09404	FDX4-FDR2	-477.52682
Gel16-FDX3	-259.95903	FDX4-FDR3	-139.22173
Gel16-FDX4	-411.84485	FDX4-FDR4	-323.78993
Gel16-FDX5	-386.17994	FDX4-FDR5	-300.03324
Gel16-FDX6	-562.10587	FDX4-FDR6	-434.44984
Gel16-FDX7	-304.34470	Spiroch (FDX-FDR)	-454.80394
Gel16-FDX8	-440.20690	PDX-PDR	-314.08223
Gel16-FDX9	-285.12662		
Gel16-FDX	-578.31419		
(Spiroch)			
Gel16-PDX	-336.41614		

In silico 분석을 통해 9개의 FDX와 6개의 FDR로부터 Gel16 단백질 최적의 redox partner 예상



제 3절 연구결과

1. 정량적 결과 요약

	논문	특허 (등록/출원)	항생물질 변형효소	신규 항생물질 백본
2018년 (1차년도)	5	0/3	20종	9종 (Magnolol, 해양생물추출물, Quinolone 계열)
2019년 (2차년도)	15	2/3	17종	14종 (honokiol, 라파마이신, 지의류 유래항균물질, 스테로이드 계열)
합계	20 편	2/6	37종 확보	23종 확보



2. 연구개발 기술적 성과 TOP3

- 하나

신규 고효율 항진균 물질 CDCA methyl ester 대량생산 기술 개발
- 둘

β -Lactam 계열의 항균물질의 deacetyl 반응을 유도할 수 있는 PbAcE 효소 개발
- 셋

항생물질 변형효소 기능별 카달로그 구축으로 신규 변형체 제작 연구의 수월성 확보

3. 연구성과의 의의

구분	성과의 의의
자체 평가 종합의견	<ul style="list-style-type: none"> - 극지생물 유래 저온성 단백질의 기질 유연성을 이용한 향생물질 변형 가능성 확인 - 향생물질 변형효소 기능별 카달로그 구축 - 신규 향생물질 변형체 개발 성공 - 신규 향생물질 개발 관련 연구 플랫폼 구축
1차년도 (2018년)	<ul style="list-style-type: none"> - 극지생물 유래 향생물질 변형효소 유전자 확보 - 저온성 효소의 향생물질 변형 가능성 확인 - 변형을 수행 할 백본 물질 확보
1차년도 (2019년)	<ul style="list-style-type: none"> - CYP hydroxylase 효소 추가확보 - β-락타메이즈 단백질 2종에 대한 삼차구조 확보 - Acetyltransferase 효소의 삼차구조 및 특성규명 - 스테로이드 계열의 신규 향진균 물질 확보

가. 자체 종합 평가의견

- (1) 극지생물 유래 저온성 단백질의 기질 유연성을 이용한 향생물질 변형 가능성 확인
 - (가) 다양한 극지생물의 유전자 정보로부터 향생물질 변형효소 유전자 확보
 - (나) 6종의 CYP 효소의 구조분석 및 향생물질에 대한 수산화 반응 확인
 - (다) 다양한 타입별 CYP 효소는 향생물질의 다른 부위에 수산화 반응성을 가짐
 - (라) PbAcE 효소의 향생물질의 특정 acetyl group 제거 활성 확인 (국내특허 출원)

- (2) 향생물질 변형효소 기능별 카달로그 구축
 - (가) 재조합 향생물질 변형효소 발현을 위한 벡터 시스템 구축
 - (나) 전자동 단백질 정제 시스템 구축 (2년차, AVANT FPLC 연구장비 도입)
 - (다) Glycosyl transferase, Hydroxylase, Methyltransferase, Sulfotransferase, Isomerase, Acyltransferase 효소로 기능 별 향생물질 변형효소를 나누어 유전자를 찾고 재조합 단백질 대량생산, 생화학적 특성 분석, 삼차구조분석 진행 중
 - (라) 저온성 효소 기능별 카달로그가 완성되면 향생제 후보물질 뿐만 아니라 다른 화학 합성이 불가능한 유용물질의 변형체 제작에도 사용 가능

- (3) 신규 향생물질 변형체 개발 성공
 - (가) Magnolol 과 honokiol 향생물질의 당이 결합된 변형체 개발
 - (나) 퀴놀론 계열의 향생물질 변형체 6종 제작
 - (다) 마클로라이드 계열의 라파마이신 향생물질 변형체 제작 항균활성 테스트 진행 중
 - (라) 퀴놀론 계열의 향생물질 변형체 6종 제작

- (4) 신규 항생물질 개발 관련 연구 플랫폼 구축
 - (가) 제약회사 원료 업체인 가피바이오와의 협력체계 구축
 - (나) 가피바이오에서 변형을 원하는 퀴놀론계 및 스테로이드계 항생물질의 변형체 제작 성공
 - (다) 충남대 약대 연구팀과의 극지 해양생물 유래 천연물의 항균활성 분석 공동연구
 - (라) 중앙대 약대 연구팀과의 개발된 항균물질의 항균활성 기작 분석 공동연구
 - (마) 선문대학교 제약공학과 연구팀과의 개발된 항생물질의 변형체 구조분석 공동연구

나. 1차년 (2018년) 성과 및 의의

- (1) 극지생물 유래 항생물질 변형효소 유전자 확보
 - (가) 극지 생물 유전자 정보로부터 유용 변형 효소 스크리닝 및 유전자 확보 (111종의 유전자 선정, 이중 20종의 재조합 단백질 발현 성공)
 - (나) 극지 어류 3종에 대한 (Antarctic blackcod, Antarctic blackfin icefish, Antarctic emerald rockcod) 의 유용 변형 효소 후보 유전자 서열 확보
 - (다) 남극조새풀에서 분리한 8종의 MAPK 유전자들에 대한 계통분석
 - (라) 극지 미생물 유래 항생물질 변형 효소 유전자 111종 확보
- (2) 저온성 효소의 항생물질 변형 가능성 확인
 - (가) 40종의 발현 가능한 플라스미드 확보, 이 가운데 20종의 soluble 발현 타겟 단백질 플라스미드 확보
 - (나) 6종 (CYP154C4 2종, CYP106A6, PbAcE 효소)의 항생물질 변형효소 재조합 단백질 대량 생산 조건 확립
 - (다) CYP154C4 2종, CYP106A6, PbAcE 효소의 구조 및 생화학적 특성 분석 완료
- (3) 변형을 수행 할 백본 물질 확보
 - (가) 식물 추출물인 Magnolol backbone 의 항균활성 확인
 - (나) 고활성, more soluble 한 Magnolol 변형체 제작을 위해 CYP효소와 glycosyl transferase효소를 이용한 수산화 그룹 또는 당분자가 결합된 변형체 제작
 - (다) 위탁 연구기관인 가피텍 제약회사에서 화학 합성을 통해 Quinolone 계열의 backbone 물질 5종 대량 합성, 물질 5종에 대한 항균활성 확인

다. 2차년 (2019년) 성과 및 의의

- (1) CYP hydroxylase 효소 추가확보
 - (가) CYP hydroxylase 101D5 효소의 삼차구조 분석완료
 - (나) CYP hydroxylase 101D5 효소의 생화학적 특성 및기질 특이성 규명
- (2) β-락타메이즈 단백질 2종에 대한 삼차구조 확보
 - (가) 저온성 과 중온성 미생물 유래 β-락타메이즈 2종의 삼차구조 해석완료
 - (나) 온도에 따른 활성 변화 및 구조적 특성 비교 분석
 - (다) β-락타메이즈 저해제 개발은 β-락탐 계열 항생제에 내성을 가지는 항생제 내성균 문제

(3) Acetyltransferase 효소의 삼차구조 및 특성규명

(가) 항생물질 neomycin 과 sisomicin 두 종류와의 복합체 구조 규명

(나) 구조분석을 통해 기질특이성과 다양한 항생물질 기질 결합에 따른 구조적 변화 설명

(다) β -lactamase 단백질의 구조와 기능을 분석하여 신규 β -lactamase 저해제 개발에 이용

(라) 항생제 내성균들이 가지는 β -lactamase 단백질들은 β -lactam 계열의 항생물질에 살아남기 위해 β -lactam 고리를 가수분해하는 특성을 가지고, 다양한 돌연변이로 기질에 대한 특이성을 바꿀 수 있음. 하지만 적절한 β -lactamase 저해제를 개발 한다면 항생제 내성균주를 대상으로 기존의 일반 β -lactam 계열의 항생물질과 조합하여 사용가능

(4) 스테로이드 계열의 신규 항진균 물질 확보

(가) chenodeoxycholic acid (CDCA) 와 Ursodeoxycholic acid (UDCA) 기본 구조의 4종의 스테로이드 계열 화합물의 항균활성 테스트

(나) CDCA methyl ester 물질에서 강한 항진균 활성 확인

(다) 극지 생물 유래 변형효소를 이용한 CDCA methyl ester 물질 반합성 대량 방법으로 특허 준비 중



제 4장 연구개발결과의 활용계획

1. 향후 연구방향

가. 극지 생물자원에서부터 신규 향생물질 탐색연구 추가

- (1) 극지생물 유래 신규 향생물질 백본 도출 필요성 확인
- (2) 극지생물 배양 및 배양액으로부터 신규 향생물질 백본 탐색

나. 극지 방선균 및 해양 미생물의 유전체 분석

- (1) 신규 향생물질을 생산하는 극지 미생물의 유전체 분석
- (2) 향생물질 생합성 경로 유전자 연구

다. 이종숙주 발현을 통한 신규 향생물질 생산연구 추가

- (1) 향생물질 생합성 유전자를 발현이 용이한 이종숙주에 삽입하여 신규 향생물질 백본 대량 확보
- (2) 극지생물 채집을 통한 다량의 향생물질 백본 확보는 한계가 있음

라. 재조합 향생제 변형효소 대량정제 및 생화학적 특성분석

- (1) 기능별 향생물질 변형효소 카탈로그 완성
- (2) 향생물질 변형효소의 생화학적 특성 및 기질특이성 분석

마. 신규 향생물질 변형체 제작 및 활성 검증

- (1) β -락타메이즈 타겟의 신규 저해제 개발로 향생제 내성균 문제 극복
- (2) 신규향생물질 대량생산 공정 수립
- (3) 공정 최적화를 통한 고효율 향생물질 생산성 개선
- (4) 신규 향생물질의 작용기전 규명
- (5) 신규 향진균 물질 CDCA methyl ester 의 대량생산 후 안전성 실험 수행
- (6) PbAcE 향생물질 변형효소의 기술이전 가능성 탐색

2. 성과 활용계획

가. 해수부 R&D 사업을 통한 기존 연구결과를 이어가는 계속 연구 추진

- (1) 지난 2년간의 주요사업 연구결과를 토대로 향후 해수부 R&D 사업을 통한 향생물질 변형효소 카탈로그 완성
- (2) 신규 향생물질 (Magnolol 과 honokiol 향생물질, 퀴놀론 계열의 향생물질, 마클로라이드 계열의 라파마이신 향생물질 변형체, 퀴놀론 계열의 향생물질, 스테로이드 계열의 향생물질)의 구조변형을 통한 최적화 작업 수행
- (3) 신규향생물질 대량생산 공정 수립, 향생물질 변형효소의 반합성을 이용한 신규 향생물질 생산방법으로 지식재산권 확보
- (4) 신규 향생물질의 작용기전 규명
- (5) 신규 향생물질의 안전성 평가 수행
- (6) 분자모델링 기술을 이용한 활성 및 안정성 개선 연구수행

나. 본 사업을 통해 구축된 유용물질개발 관련 연구 플랫폼 활용

- (1) 유용물질 개발연구 단계별로 임무를 나눈 연구소, 학교, 회사 (제약회사연구소, 약학 대학 2곳, 제약공학과) 와의 지속적인 공동연구
- (2) 개발된 유용물질의 다양한 활성 및 적용점 탐색은 대학교에서 수행
- (3) 개발하고자 하는 초기 물질 탐색 및 변형하고자 하는 초기물질 합성은 제약회사 연구소에서 수행
- (4) 유용물질 변형효소 확보와 생화학적 특성연구 및 변형체제작은 극지연에서 수행



제 5장 참고문헌

1. Zhang G, Li Y, Fang L, Pfeifer BA. Tailoring pathway modularity in the biosynthesis of erythromycin analogs heterologously engineered in *E. coli*. *Sci Adv*. 2015 May 29;1(4):e1500077. doi: 10.1126/sciadv.1500077. eCollection 2015 May. PubMed PMID: 26601183; PubMed Central PMCID: PMC4640655.
2. Vicente M, Hodgson J, Massidda O, Tonjum T, Henriques-Normark B, Ron EZ. The fallacies of hope: will we discover new antibiotics to combat pathogenic bacteria in time? *FEMS Microbiol Rev*. 2006 Nov;30(6):841-52. Review. PubMed PMID:17064283.
3. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere*. 2009 Apr;75(4):417-34. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086. Epub 2009 Jan 30. Review. PubMed PMID: 19185900.
4. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part II. *Chemosphere*. 2009 Apr;75(4):435-41. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.006. Review. PubMed PMID: 19178931.
5. Singh RK, Tiwari SP, Rai AK, Mohapatra TM. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *J Antibiot (Tokyo)*. 2011 Jun;64(6):401-12. doi:10.1038/ja.2011.21. Epub 2011 Apr 6. Review. PubMed PMID: 21468079
6. Clardy J, Fischbach MA, Walsh CT. New antibiotics from bacterial natural products. *Nat Biotechnol*. 2006 Dec;24(12):1541-50. Review. PubMed PMID: 17160060.
7. Hong W, Zeng J, Xie J. Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. *Acta Pharm Sin B*. 2014 Aug;4(4):258-65. doi: 10.1016/j.apsb.2014.06.012. Epub 2014 Jul 31. Review. PubMed PMID: 26579393; PubMed Central PMCID: PMC4629089.