

항생제 코어의 생산공정 개발

Development of manufacturing process for Antibiotics
core



주식회사 가피바이오

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지유전자원 기반 신규활성 항생제 후보 물질 발굴” 과제의 위탁연구 “항생제 코어의 생산공정 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 01. 31

(본과제) 총괄연구책임자 : 이 준 혁

위탁연구기관명 : 주식회사 가피바이오

위탁연구책임자 : 장 도 연

위탁참여연구원 : Surya

“ : Alexander Bisset

“ : 김 성 근

보고서 초록

위탁연구과제명	항생제 코어의 생산공정 개발				
위탁연구책임자	장도연	해당단계 참여연구원수	5	해당단계 연구비	200,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	가피바이오 기술연구소		위탁기업명	주식회사 가피바이오	
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<p>1. Quinolone 항생제 코어 9종의 합성방법개발 및 현장적용 공정 정립</p> <div style="text-align: center;"> </div> <p>2. Bile acid 항생제 코어 8종의 합성방법개발 및 현장적용 공정 정립</p> <div style="text-align: center;"> </div>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	항생제 후보물질, 퀴놀론 항생제 코어, 담즙산 항생제 코어, 합성방법 개발, 현장생산			
	영어	Antibiotic Candidates, Quinolone Antibiotic core, Bile Acid Antibiotic Core, Synthesis Method Development, Factory Manufacture Scale-up			

요 약 문

I. 제 목

- 항생제 코어의 생산공정 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 항생제 개발 이후 수많은 감염질환의 완치가 가능해졌으나, 불과 60년 만에 항생제 내성의 출현으로 인해 감염질환의 치료 실패와 치명적인 결과를 일으킴.
- 극지연구소에서는 미생물 균주은행인 Polar and Alpine Microbial Collection을 운영하여 다양한 유용 극지 미생물자원을 기 확보하였음.
- 극지연구소에서는 다년간 기관고유사업을 통해 극지생물 40종(유전자 5만여종)의 유전자원 확보하였음
- 극지 미생물자원을 이용한 신규 항생제의 개발은 극지 미생물의 활용도를 높이고 신규 항생제 개발을 위한 모핵을 개발함으로써 제약학 및 화학발전에 이바지할 수 있을 것임
- 극지 미생물자원을 이용한 신규 항생제의 개발은 Enzyme을 이용한 학술적 연구의 활성화 및 신약, 신소재 연구 등에도 학술적 의미를 부여할 수 있을 것으로 생각됨.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 퀴놀론계 항생제 9개 코어의 합성방법 연구 및 Sample 제공
- Bile acid 항생제 7개 코어의 합성방법 연구 및 Sample 제공

IV. 연구개발결과

- 퀴놀론계 항생제 9개 코어의 합성방법 정립 및 생리활성을 나타낸 화합물 20~50g 확보
- Bile acid 항생제 7개 코어의 합성방법 정립 및 생리활성을 나타낸 화합물 20~30g 확보

V. 연구개발결과의 활용계획

- 연구수행에 있어서 스케일 업 문제 인자로 상업적 생산에 적합한 수율 개선 및 합성법 개선을 위하여 원료의약품 합성팀에서 상업화 공정의 생산기술지원을

받을 예정입니다.

o 신규 중간체 도입 또는 공정단축을 통한 생산비용 절감과 컬럼을 이용한 분리 정제에 대해 수정 보완하여 수율 증가 및 공정시간 단축을 모색하고 있음.



S U M M A R Y

I. Title

- o Development of manufacturing process for antibiotics core

II. Purpose and Necessity of R&D

- o After the development of antibiotics, it has been possible to cure numerous infectious diseases, but in just 60 years, the emergence of antibiotic resistance has resulted in treatment failure and fatal outcomes.
- o The Polar Research Institute operated the Polar and Alpine Microbial Collection, a microbial strain bank, to secure various useful polar microbial resources.
- o The Polar Research Institute has secured genetic resources for 40 polar organisms (50,000 genes) through its unique project for many years.
- o The development of new antibiotics using polar microbial resources could contribute to pharmaceutical and chemical development by increasing the utilization of polar microorganisms and developing the parent cell for the development of new antibiotics.
- o The development of new antibiotics using polar microbial resources is expected to give academic significance to the activation of academic research using Enzyme and to research new drugs and new materials.

III. Contents and Extent of R&D

- o Research on synthesis method of 9 cores of quinolone antibiotics and sample
- o Study on synthesis method of 7 cores of Bile acid antibiotics and provide sample

IV. R&D Results

- o Establish method of synthesis of 9 cores of quinolone antibiotics and make 20 ~ 50g of compound showing physiological activity
- o Establish method for synthesis of 7 cores of Bile acid antibiotics and make 20 ~ 30g of compounds showing physiological activity

V. Application Plans of R&D Results

- o The research team will receive production technology support for the commercialization process in order to improve yield and synthesis method suitable for commercial production as a factor of scale-up in research.
- o We are seeking to increase yield and shorten process time by modifying and supplementing the reduction of production cost through introduction of new intermediates or shortening of process and separation and purification using column.



목 차

제 1 장 서론	
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
제 1 절 국외 기술, 산업 동향	11
제 2 절 국내 기술, 산업 동향	12
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절 1차년도 연구개발수행 내용 및 연구결과	14
제 2 절 2차년도 연구개발수행 내용 및 연구결과	34
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	
제 1 절 1차년도 연구개발 목표와 연구개발의 기술발전 기여도	50
제 2 절 2차년도 연구개발 목표와 연구개발의 기술발전 기여도	53
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	
제 1 절 추가연구의 필요성	56
제 2 절 타 연구에의 응용	56
제 3 절 기업화 추진방안	56
제 6 장 참고문헌	57

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 항생제 내성 문제의 대두와 슈퍼항생제의 필요성

항생제의 개발은 현대 의학이 이룩한 가장 위대한 업적 중의 하나로서 페니실린이 도입된 1940년 이후 수많은 감염질환의 완치가 가능해졌다. 그러나 항생제가 임상의학에 도입된 지 불과 60여 년 만에 항생제 내성이 광범위하게 출현하여 각종 감염질환이 치료 실패하여 현재 치명적인 결과를 일으키고 있다. 항생제 내성은 세계보건기구(WHO)에서 세계 공공보건 3대 위협 중 하나로 규정할 정도로 선진국이나 후진국 모두에게 중요한 문제이다. 항생제 내성이 특히 문제가 되고 있는 주요 세균으로 소위 'ESKAPE' 균주들이 있는데, 이는 *Enterococci*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* species를 지칭한다. 또한, 지역사회 감염을 흔하게 일으키는 *Streptococcus pneumoniae*나 *Staphylococcus aureus*에서도 항생제 내성 문제는 심각한 상태이다.

이로 인해 1세대 항생제인 페니실린계 항생제 개발 이후 글로벌 제약회사들은 새로운 항생제 개발연구를 거의 중단하고 있는 추세이다. 그 이유는 항생제 연구 기간이 10년 정도로 길어 연구개발 비용이 높은 데 반해 내성문제로 판매지속기간이 줄어들었기 때문이다. 실제로 지난 2003년부터 2007년까지 항생제 시장규모는 연평균 -3%의 역성장을 기록하고 있다.

반면에, 진화하는 슈퍼박테리아에 효능을 보이는 슈퍼항생제 시장이 새롭게 주목 받고 있다. 슈퍼박테리아 시장은 꾸준히 성장할 것으로 전망되고 있으며, 향후 차세대 항생제 시장은 연평균 2%(CAGR 2009~2017)의 꾸준한 성장세가 전망된다.

따라서 극지연구소는 미생물 균주은행인 Polar and Alpine Microbial Collection을 운영하고 있어서 다양한 유용 극지 미생물자원을 기 확보하고 있으며, 다년간 기관 고유사업을 통해 극지생물 40종(유전자 5만여 종)의 유전자원 확보하여 이를 토대로 신규 슈퍼항생제 후보물질 발굴 연구를 진행하고자 하였다. 이러한 이유로 당사는 신규 슈퍼항생제의 후보물질을 만드는데 사용될 코어를 합성하여 극지연구소에서 연구를 보다 수월하게 진행할수 있도록 본과제를 진행하였다.

당사에서는 최종적으로 1차년도에는 Quinolone(퀴놀론계 항생제)계의 모핵, 2차년도

에는 Bile acid(담즙산)의 모핵을 목적 화합물로 선정하여 신규 슈퍼항생제의 후보 물질에 사용할 모핵의 공정연구, 합성 그리고 극지연구소 연구 재료로 사용할 Sample을 제공하였다.

1차년도 퀴놀론계 화합물이 선정된 이유로는 quinolone 항생제는 Nalidixic acid의 naphthyridine 핵의 6번위치에 fluorine과 7번위치에 piperazine혹은 Pyrrolidine ring 이 첨가되어 그람 음성, 양성 박테리아 뿐만 아니라 Mycobacteria, mycoplasma 및 Chlamydia에 까지 미치는 광범위 항균력이 있으며, Quinolone 항생제는 화학적으로 안정한 구조이고 생체 내 대사가 비교적 적게 일어나며, 조직 투과성이 우수하기 때문에 경구투여가 가능하고 혈액중 병원성 세균에 대한 MIC보다 높은 약물농도가 유지될 수 있는 장점을 갖고 있었다. 또한 Quinolone 구조가 가지고 있는 벤젠 구조는 소수성(Hydrophobicity)을 갖기 때문에 인체내 조직 세포막의 이중 지질막(Lipid bilayer)을 잘 통과할 수 있고, 6번위치에 Fluorine은 양성이온으로 인해 세균의 세포막에 존재하는 물질투과 매체인 porin에서의 약물 투과정도도 우수하다. 폐, 신장, 근육, 뼈, 체액 등에도 잘 이행되며, 식세포의 세포내로 잘 침투하는 특성이 있어 Brucella, Listeria, Salmonella, Mycobacterium등 인체의 세포내에 존재하는 세균의 감염증 치료에 효과적인 항생제이기 때문에

1차년도에는 Quinolone 항생제의 장점을 그대로 유지하며 신규 슈퍼항생제 개발을 위한 9종의 항생제 코어를 연구하였다.

2차년도에는 체내에서 매우 빈번히 발견되지만 화학구조와 병리적 현상의 연관성을 규명하는 연구가 최근에 와서야 진척되어 체내 역할이 재조명 되고 있는 담즙산에 대하여 연구하였다. 이제까지 알려진 담즙산의 기본적 역할은 지방의 소화를 돕는 계면활성제로서의 기능이지만, 최근 연구결과들은 담즙산이 가진 복합적인 생물학적 효능, 효과를 부각시키고 있다. 담즙산은 담즙(bile juice)을 구성하는 주요 유기 물질로서 소화기계 중에서 특히 간과 장관에서 중요한 생리적 기능을 담당하고 있다. 하지만, 일부 불용성 담즙산은 간과 장에서 세포의 세포사멸(apoptosis) 및 괴사(necrosis)를 유발하는 병리 현상에도 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨지고 있다. 담즙산은 크게 1차성과 2차성으로 구분되는데, 1차성 담즙산은 간 세포(hepatic cell)에서 지용성 물질인 콜레스테롤을 원료로 모핵에 수용성기를 첨가함으로써 생성되며, 최종적으로 지용성이자 수용성을 띠는 양성물질로 합성된다. 인체 내에서 생성되는 1차성 담즙산으로는 cholic acid (CA)와 chenodeoxycholic acid (CDCA)가 있으며, 2차성 담즙산은 CA와 CDCA가 위장관 내부에서 장내세균에 의해 변화

된 형태이며 장관으로부터 재흡수 되어 간으로 이동하는, 이른바 장간순환 (enterohepatic circulation)을 한다. 따라서 당사에서는 작용기에 따라 매우 다른 역할과 극성의 변환이 가능한 Bile acid를 2차년도 연구 목표로 하여 연구를 진행 하였다.



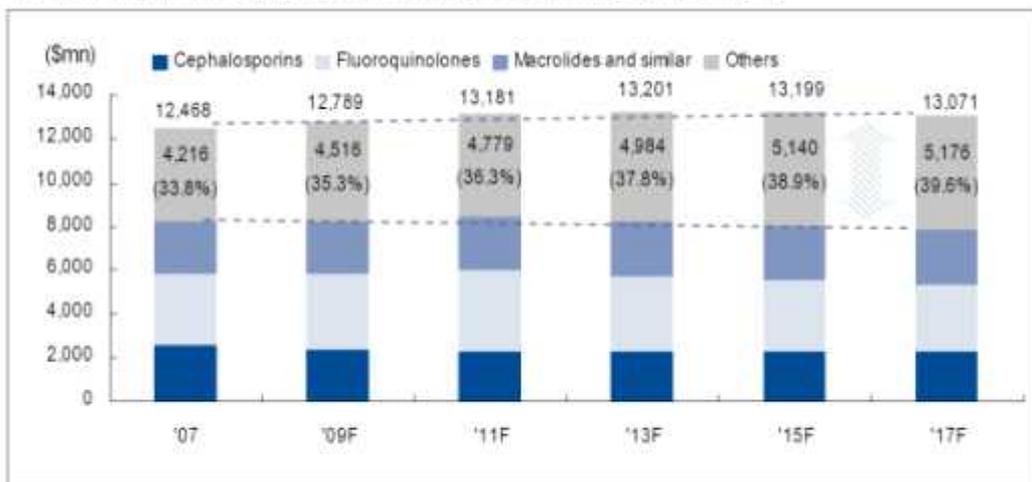
제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술, 산업 동향

- 세계보건기구(WHO)가 세계 공공보건 3대 위협 중 하나로 선언한 ‘항생제 내성’ 문제와 관련하여 미국 국립질병통제예방센터(CDC)의 보고에 따르면 2007년 한 해 동안 약 10만 명이 ‘MRSA’에 감염되었으며, 이 중 약 2만 여명이 사망
- 1세대 항생제인 페니실린계 항생제 개발 이후 글로벌 제약회사들은 새로운 항생제 개발연구를 중단. 그 이유는 항생제 연구기간이 10년 정도로 길어 연구개발 비용이 높은 데 비해 판매지속기간이 줄어들었기 때문. 실제로 지난 2003년부터 2007년까지 항생제 시장규모는 연평균 -3%의 역성장을 기록하고 있으나 슈퍼항생제 시장이 새롭게 주목받고 있어서 향후 차세대 항생제 시장은 연평균 2%(CAGR 2009~2017)의 꾸준한 성장세가 전망됨
- GVR Research 자료(Antibiotics Market Size & Share, Industry Trends Report, 2019-2026)에 따르면, 2018년 항생제 세계 시장은 451억 3천만달러로 연 4.0% 성장을 하였음.
- 전 세계 항생제 시장은 미국의 GAIN(Genating Antibiotics Incentives Now)법이 미국에서 일부 통과되어 항생제 내성 슈퍼박테리아의 치료법 개발이 더욱 촉진 되고 있음.
- 현재 사용 중인 대부분의 항생제는 자체 독성 및 슈퍼박테리아 내성으로 인해 질병에 대한 효용이 떨어지고 있음. 전 세계적으로 이 문제를 해결하는 것을 국가적 과제로 여겨, 미국은 2015년 오바마 대통령 주도하에 2020년 내 10개의 신규 항생제를 개발하자는 ‘10×20 프로그램’을 내걸고 개발을 독려하고 있음
- 2015년 말 중국에서 그리고 2016년 국내에서도 ‘최후의 보루’라고 불리는 폴리펩타이드 계열의 ‘콜리스틴 항생제(Colistin, 1950년대 개발된 항생제로 신장 독성이 매우 높은 최후의 항생제 중 하나)’가 듣지 않는 ‘mcr-1’ 유전자 내성균이 가축과 인간으로부터 발견되었고, 이는 카바페넴 항생제를 가축 사육 과정에서 대량으로 사용해서 인간으로 넘어온 것으로 추정하고 있음. 이러한 문제는 현재 인류 항생제 개발 역사상 최대 위기를 맞고 있다고 해도 과언이 아닐 것임.

- (미국, 캐나다, 프랑스, 일본) 다양한 신규 항생제 후보 물질을 탐색, 개발하여 (Telavancin, Oritavancin, Ramoplanin, Efiprestin, Lyostaphin, WAP 829A2) 임상 실험 진행중
- (미국) 최근 대장균 발현 시스템에 항생물질 구조를 조금씩 변환시키는 유전자 균을 삽입하여 고효성의 다양한 erythromycin 항생제 유도체 제작 성공 (2015, Science Advances Vol1, e1500077)
- 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.

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

<그림> 7개 국가 항생제 시장 규모 수준

제 2 절 국내 기술, 산업 동향

- 극지 에서 분리한 다양한 방선균(생산하는 2차 대사산물 화학구조의 다양성과 양적 풍부함으로 인하여 산업적으로 가장 중요하게 인식되는 미생물), 곰팡이류 또는 시아노박테리아 균주 및 유전체 정보 확보로 신규활성 물질 라이브러리 구축 및 탐색연구 시작 가능
- 극지연구소에서는 미생물 균주은행인 Polar and Alpine Microbial Collection을 운영하여 다양한 유용 극지 미생물자원을 기 확보

- 극지연구소에서는 다년간 기관고유사업을 통해 극지생물 40종(유전자 5만여 종)의 유전자원 확보 (남극생물 유전자 정보 데이터베이스 오픈 (<http://antagen.kopri.re.kr/>))
- 극지연구소에서는 극지 방선균의 (*Streptomyces* sp. PAMC26508) 전체 유전자 정보를 분석 (PLoS One. 2013 Jul 23;8(7):e68824)
- 항생물질의 수산화 변형에 관여하는 효소인 Cytochrome P450(CYPs) 유전자군 20종 이상 확인 및 특성 분석 (Int J Mol Sci. 2016년 5월, Int J Mol Sci. 2016년 12월)
- 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
- 국산 항생제 신약 개발, 2015년 국내 23호 신약 탄생 (자보란테정, 동화약품). 자보란테정은 '자보플록사신 D-아스파르트산염'을 주성분으로 하는 퀴놀론계 항생제로써 만성기관지염, 폐기종을 포함하는 만성폐쇄성폐질환 급성악화에 사용하는 제품

극지연구소

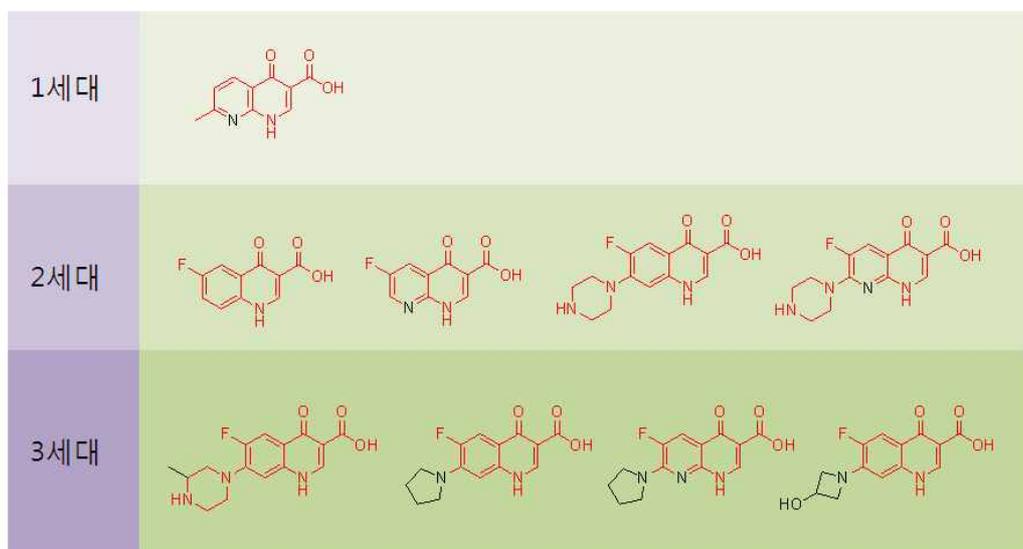
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1차년도 연구개발수행 내용 및 연구결과

1. 이론적 접근

quinolone 항생제는 Nalidixic acid의 naphthyridine 핵의 6번위치에 fluorine과 7번 위치에 piperazine혹은 Pyrrolidine ring이 첨가되어 그람 음성, 양성 박테리아 뿐만 아니라 Mycobacteria, mycoplasma 및 Chlamydia에 까지 미치는 광범위 항균력을 갖게 되었다. Quinolone 항생제는 화학적으로 안정한 구조이고 생체 내 대사가 비교적 적게 일어나며, 조직 투과성이 우수하기 때문에 경구투여가 가능하고 혈액중 병원성 세균에 대한 MIC보다 높은 약물농도가 유지될 수 있다. 이러한 이유로는 Quinolone 구조가 가지고 있는 벤젠 구조에 의해 소수성(Hydrophobicity)을 갖기 때문에 인체내 조직 세포막의 이중 지질막(Lipid bilayer)을 잘 통과할 수 있다. 또한 6번위치에 Fluorine을 갖게 됨으로써 양성이온으로 인해 세균의 세포막에 존재하는 물질투과 매체인 porin에서의 약물 투과정도도 우수하게 되었다. 폐, 신장, 근육, 뼈, 체액 등에도 잘 이행되며, 식세포의 세포내로 잘 침투하는 특성이 있어 Brucella, Listeria, Salmonella, Mycobacterium등 인체의 세포내에 존재하는 세균의 감염증 치료에 효과적인 항생제이다.

본 위탁 과제에서는 위 Quinolone 항생제의 장점을 그대로 유지하며 신규 항생제 개발을 위한 하기 그림에 나타난 9종의 항생제 코어를 대상으로 연구하였다.



<그림> 세대별 목표 quinolone 모핵 구조

2. 연구수행 세부 내용 및 연구결과

가. 성과목표 1 : Quinolone 9개 코어 화합물에 대한 합성방법 연구 및 Sample 제공

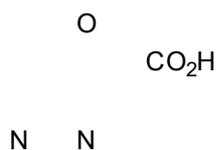
(1) 세부목표 1-1 : Quinolone 코어의 합성방법 개발 및 최적화

(2) 세부목표 1-2 : 반응 Scale up

연구 내용	연구 결과
1-ethyl-7-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	1L 반응 20g Scale up 완료 및 최적화
7-chloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	1L 반응 20g Scale up 완료 및 최적화
6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	1L 반응 20g Scale up 완료 및 최적화
6-fluoro-4-oxo-7-(pyrrolidin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	1L 반응 20g Scale up 완료 및 최적화
7-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	1L 반응 20g Scale up 완료 및 최적화
6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	1L 반응 20g Scale up 완료 및 최적화
6-fluoro-4-oxo-7-(pyrrolidin-1-yl)-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	1L 반응 20g Scale up 완료 및 최적화
6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid hydrochloride	1L 반응 20g Scale up 완료 및 최적화
6-fluoro-7-(3-methylpiperazine-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid hydrochloride	1L 반응 20g Scale up 완료 및 최적화

(가) 1-ethyl-7-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid 합성

① 목적화합물

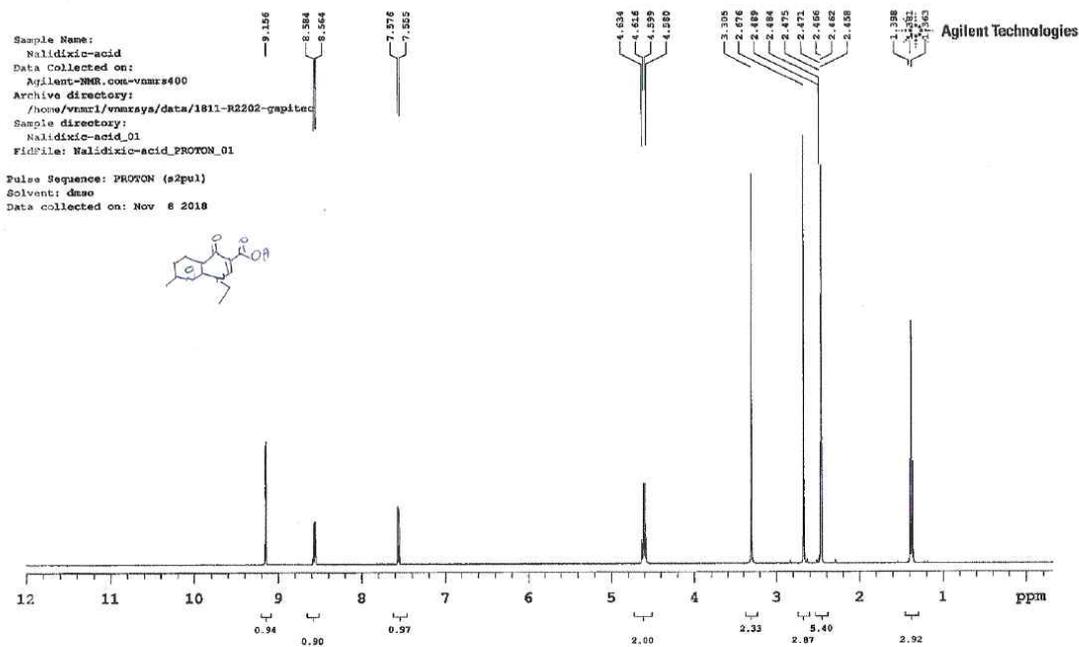


1-ethyl-7-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid

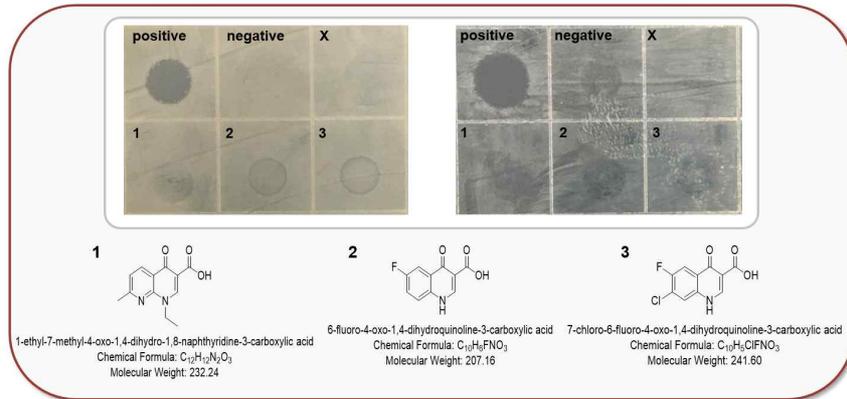
Chemical Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$

Molecular Weight: 232.24

② $^1\text{H-NMR}$ 확인결과



③ 항균활성

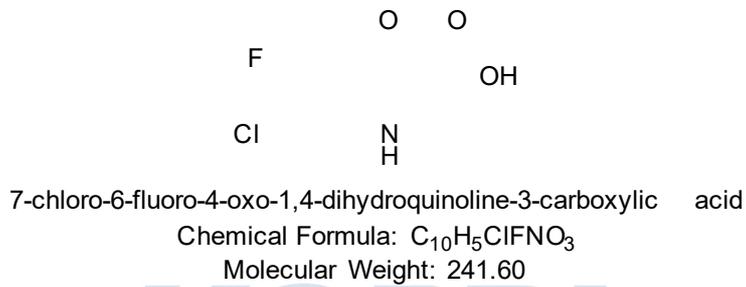
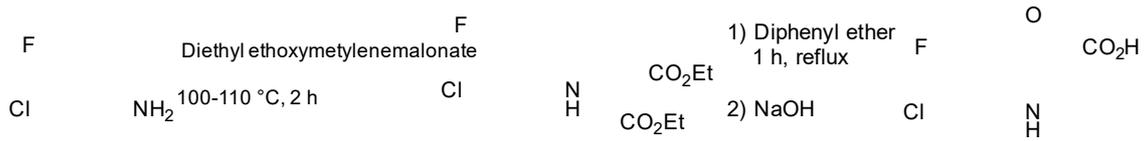


positive: kanamycin 0.1 mg/ml, 10 ul *S. aureus* 10⁸ cell, *E. coli* (DH5a) 10⁸ cell
 negative: 100% DMSO, 10 ul 37°C, 24 hrs incubation
 compound: 0.1 mg/ml, 10 ul

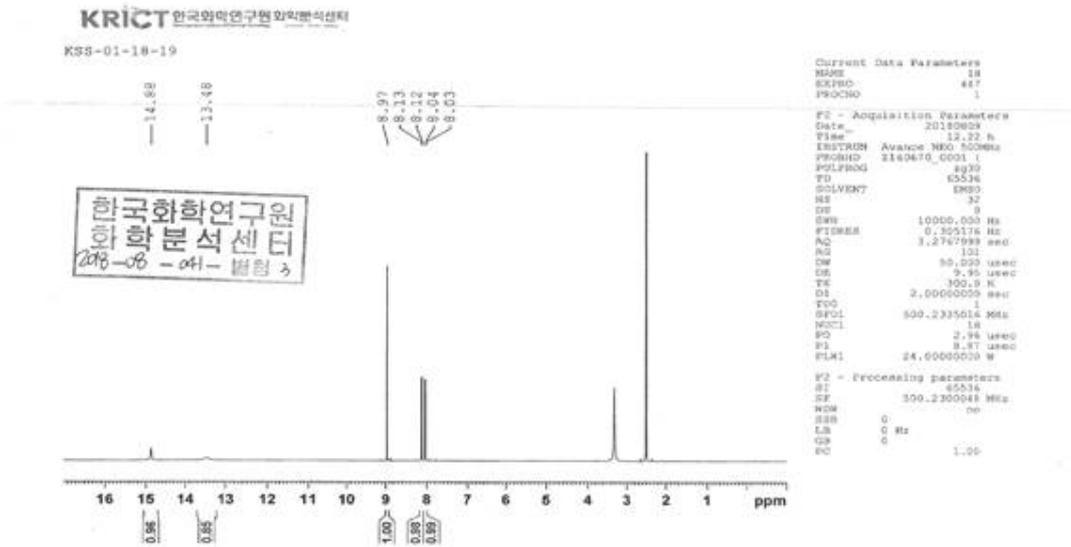


(나) 7-chloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid 합성

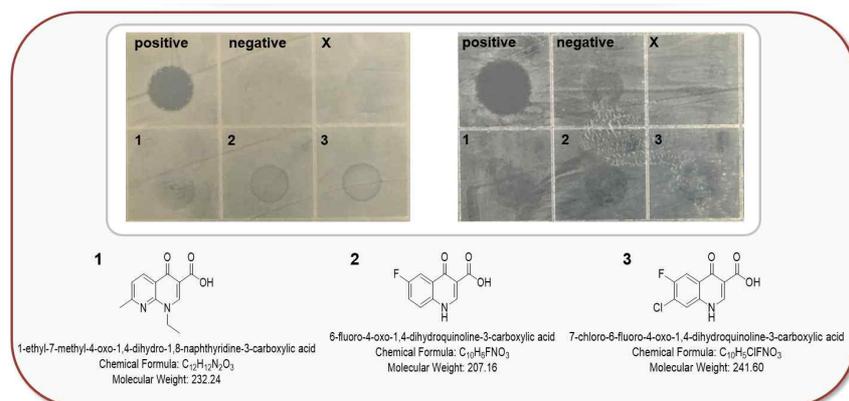
① 반응



② ¹H-NMR 확인결과



③ 항균활성

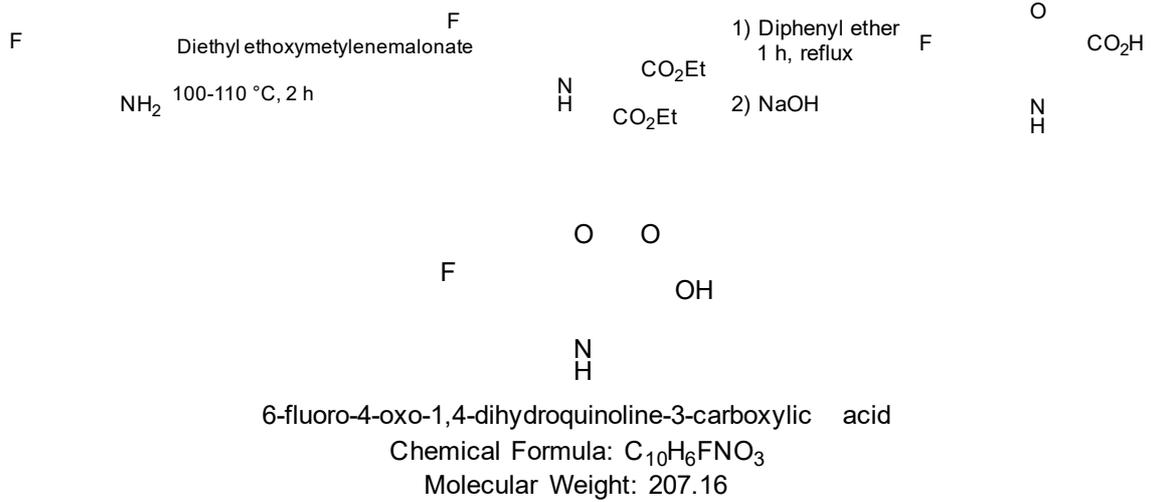


positive: kanamycin 0.1 mg/ml, 10 ul *S. aureus* 10⁸ cell, *E. coli* (DH5a) 10⁸ cell
 negative: 100% DMSO, 10 ul 37°C, 24 hrs incubation
 compound: 0.1 mg/ml, 10 ul

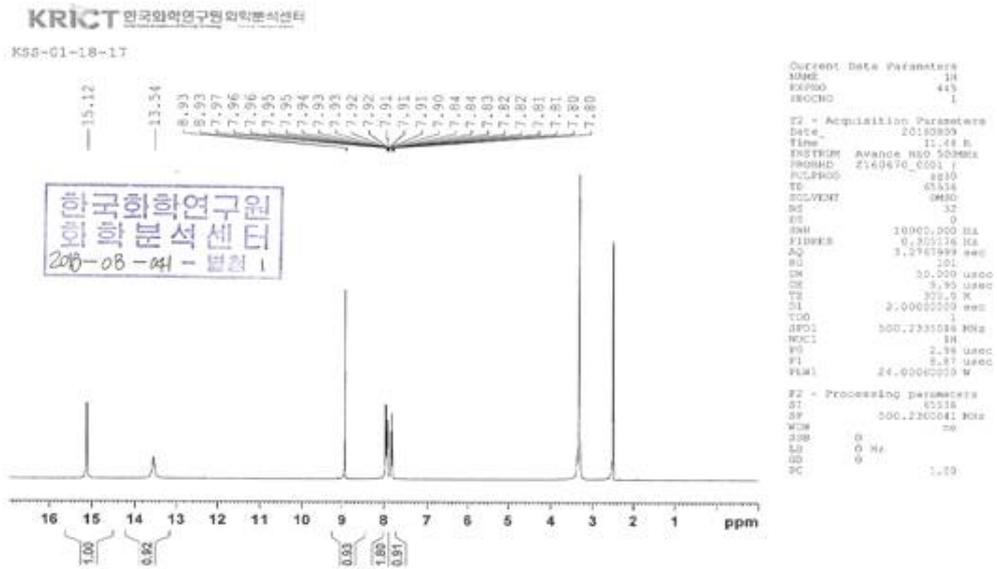


(다) 6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid 합성

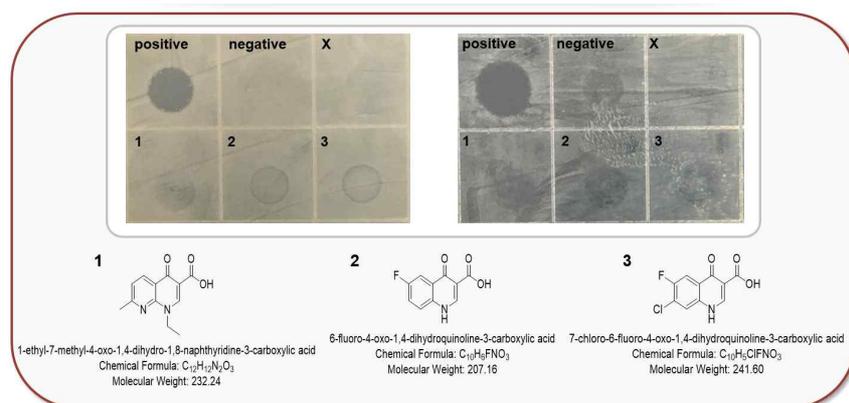
① 반응



② ¹H-NMR 확인결과



③ 항균활성



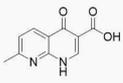
positive: kanamycin 0.1 mg/ml, 10 ul *S. aureus* 10⁸ cell, *E. coli* (DH5a) 10⁸ cell
 negative: 100% DMSO, 10 ul 37°C, 24 hrs incubation
 compound: 0.1 mg/ml, 10 ul



③ 항균활성

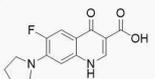
positive		negative		positive		negative	
1	2	1	2	1	2	1	2
<i>S. aureus</i>				<i>E. coli</i>			

1



7-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid
 Chemical Formula: C₁₀H₈N₂O₃
 Molecular Weight: 204.19

2



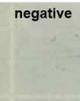
6-fluoro-4-oxo-7-(pyrrolidin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid
 Chemical Formula: C₁₄H₁₃FN₂O₃
 Molecular Weight: 276.27

positive: kanamycin 0.1 mg/ml, 10 ul
 negative: 100% DMSO, 10 ul
 compound: 0.1 mg/ml, 10 ul

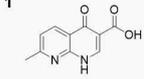
S. aureus 10⁸ cell, *E. coli* (DH5a) 10⁸ cell
 37°C, 24 hrs incubation



③ 항균활성

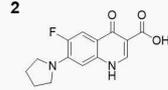
positive		negative		positive		negative	
							
1		2		1		2	
<i>S. aureus</i>				<i>E. coli</i>			

1



7-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid
 Chemical Formula: C₁₀H₈N₂O₃
 Molecular Weight: 204.19

2



6-fluoro-4-oxo-7-(pyrrolidin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid
 Chemical Formula: C₁₄H₁₃FN₂O₃
 Molecular Weight: 276.27

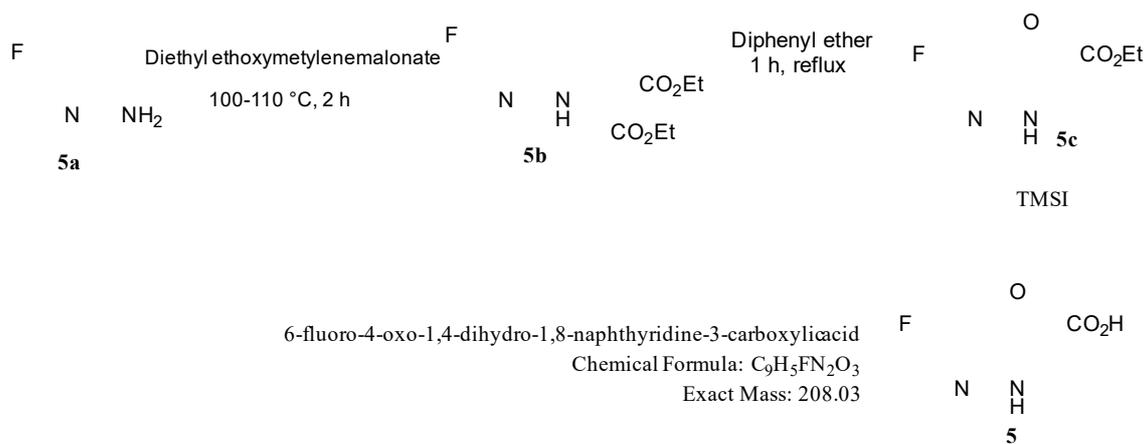
positive: kanamycin 0.1 mg/ml, 10 ul
 negative: 100% DMSO, 10 ul
 compound: 0.1 mg/ml, 10 ul

S. aureus 10⁸ cell, *E. coli* (DH5a) 10⁸ cell
 37°C, 24 hrs incubation

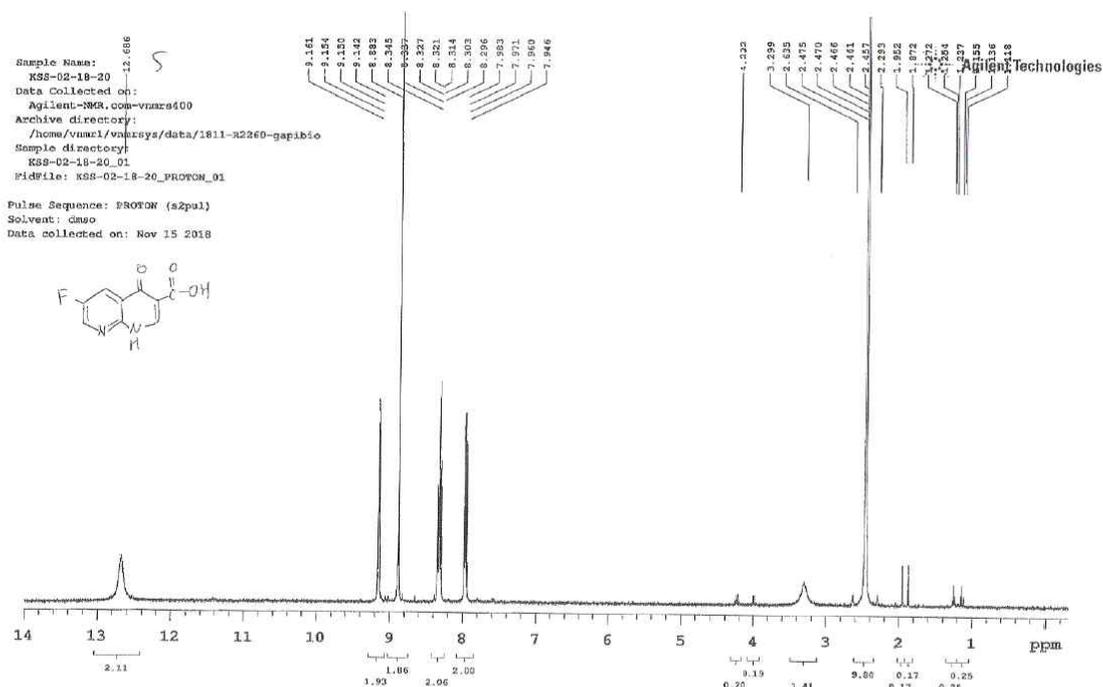


(바) 6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid 합성

① 반응



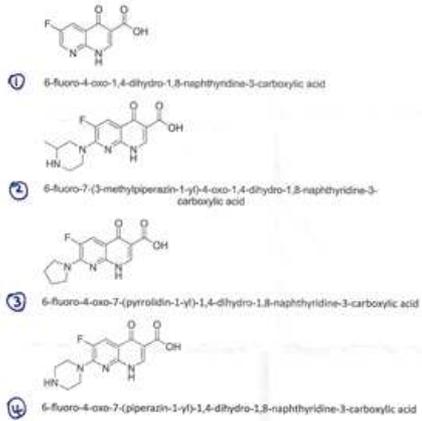
② $^1\text{H-NMR}$ 확인결과



③ 항균활성

<Antimicrobial assay>

20190304



<Antibacterial assay>- *S. aureus*



Positive: Kanamycin 0.1 mg/ml, 10 ul
Negative: 100% DMSO, 10 ul
Compound: 0.1 mg/ml, 10 ul
S. aureus, *E. coli* 10⁸ cell
37°C, 24 hrs incubation

<Antibacterial assay>- *E. coli*



<Antifungal assay>- *C. albicans*



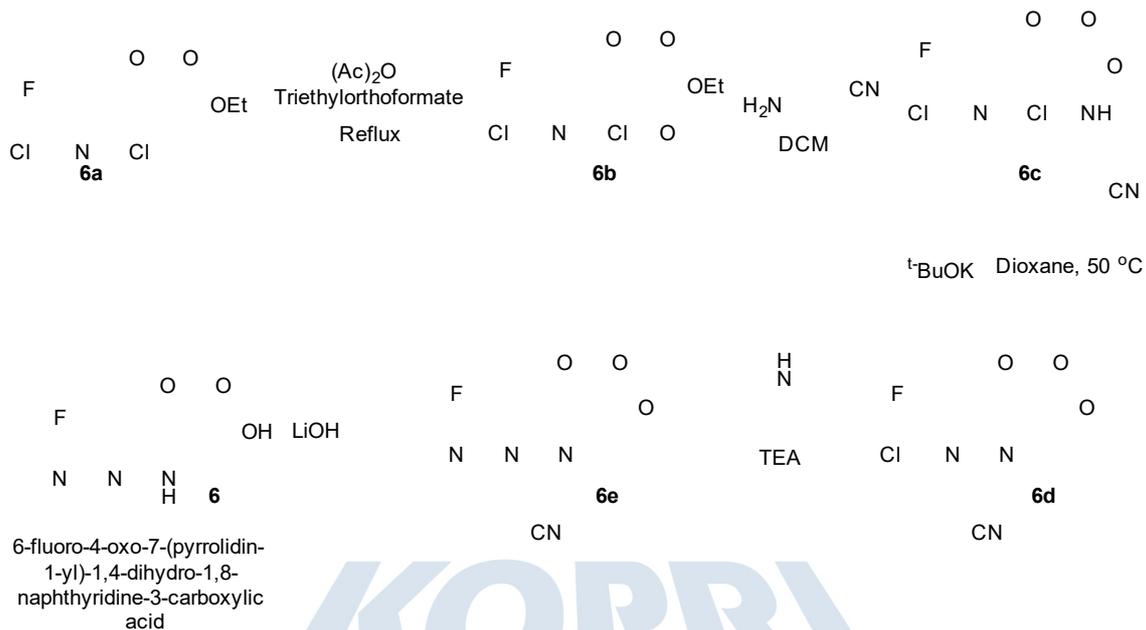
Positive: Nystatin 0.1 mg/ml, 10 ul
Negative: 50% DMSO, 10 ul
Compound: 0.1 mg/ml, 10 ul
C. albicans 10⁸ cell
37°C, 24 hrs incubation

Bacteria *S. aureus* 에 대해
compound 3이 활성을 보임.

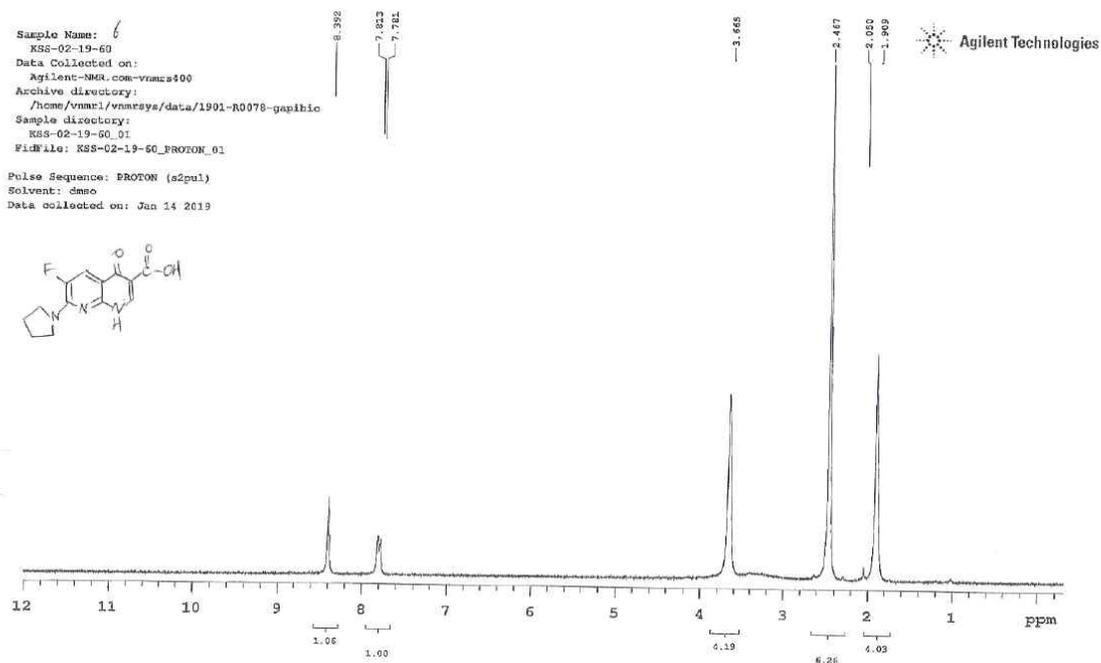


(사) 6-fluoro-4-oxo-7-(pyrrolidin-1-yl)-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid 합성

① 반응



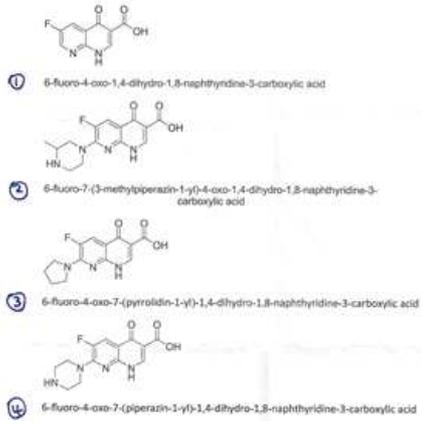
② $^1\text{H-NMR}$ 확인결과



③ 항균활성

<Antimicrobial assay>

20190304



<Antibacterial assay>- *S. aureus*



Positive: Kanamycin 0.1 mg/ml, 10 ul
Negative: 100% DMSO, 10 ul
Compound: 0.1 mg/ml, 10 ul
S. aureus, *E. coli* 10⁸ cell
37°C, 24 hrs incubation

<Antibacterial assay>- *E. coli*



<Antifungal assay>- *C. albicans*



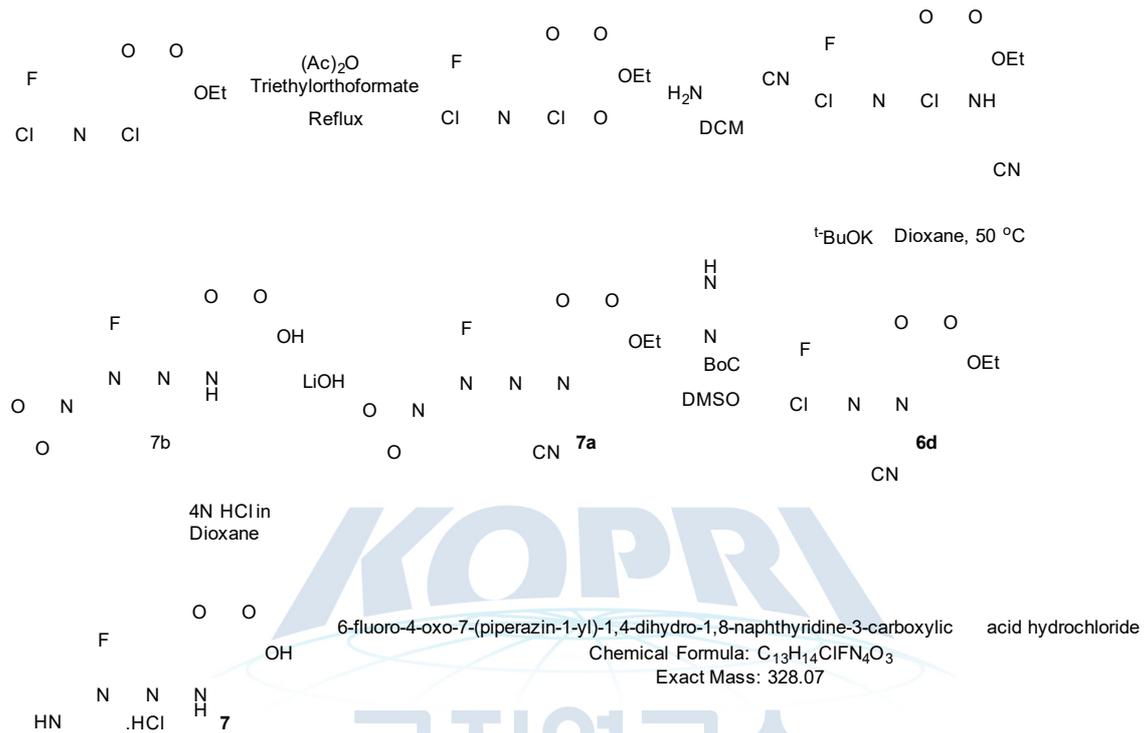
Positive: Nystatin 0.1 mg/ml, 10 ul
Negative: 50% DMSO, 10 ul
Compound: 0.1 mg/ml, 10 ul
C. albicans 10⁸ cell
37°C, 24 hrs incubation

Bacteria *S. aureus* 에 대해
compound 3이 활성을 보임.

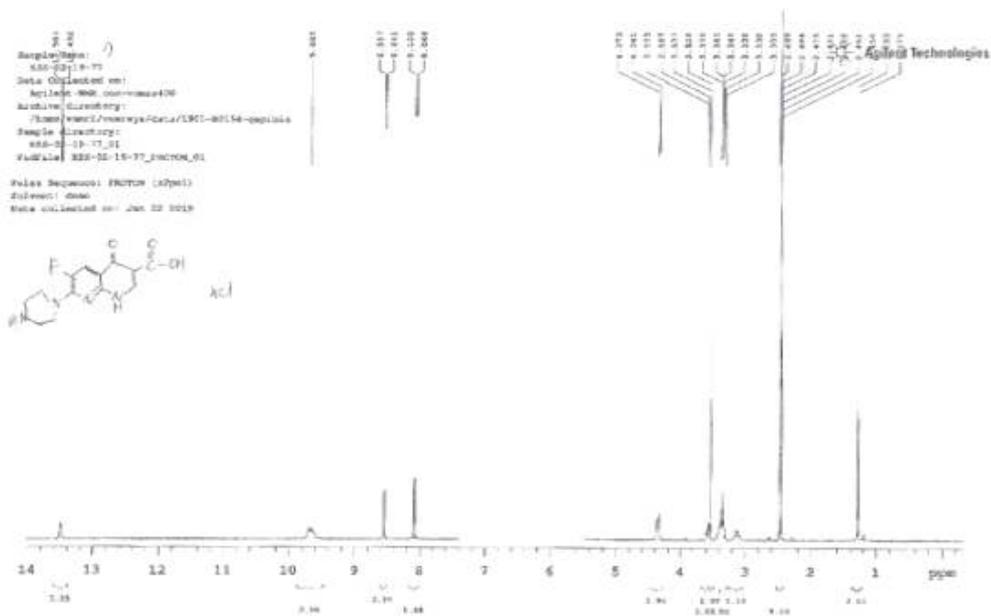


(아) 6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid hydrochloride 합성

① 반응



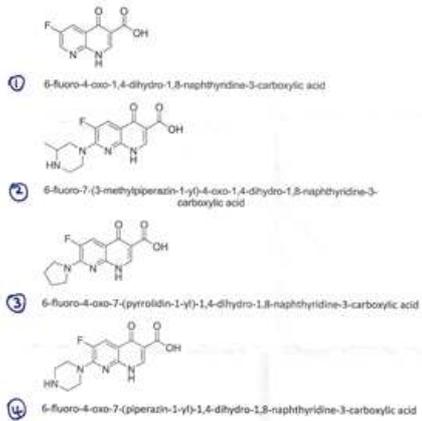
② ¹H-NMR 확인결과



③ 항균활성

<Antimicrobial assay>

20190304



<Antibacterial assay>- *S. aureus*



Positive: Kanamycin 0.1 mg/ml, 10 ul
Negative: 100% DMSO, 10 ul
Compound: 0.1 mg/ml, 10 ul
S. aureus 10^8 cell
37°C, 24 hrs incubation

<Antibacterial assay>- *E. coli*



<Antifungal assay>- *C. albicans*



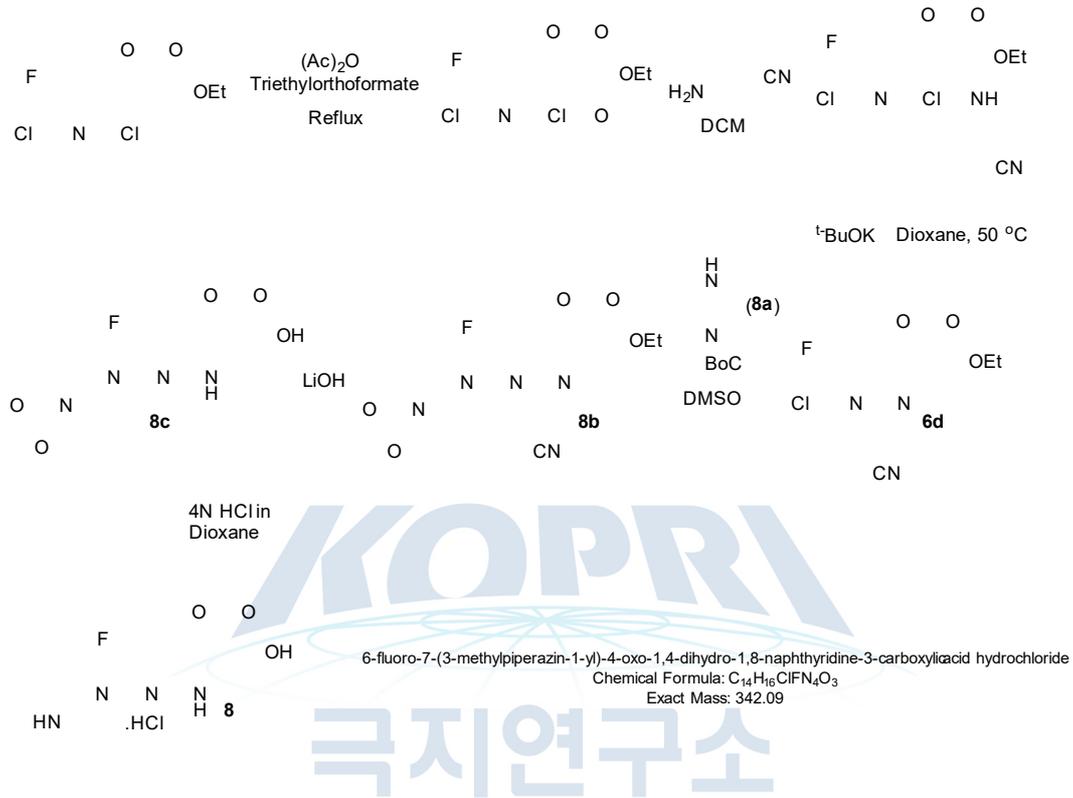
Positive: Nystatin 0.1 mg/ml, 10 ul
Negative: 50% DMSO, 10 ul
Compound: 0.1 mg/ml, 10 ul
C. albicans 10^8 cell
37°C, 24 hrs incubation

Bacteria *S. aureus* 에 대해
compound 3이 활성을 보임.

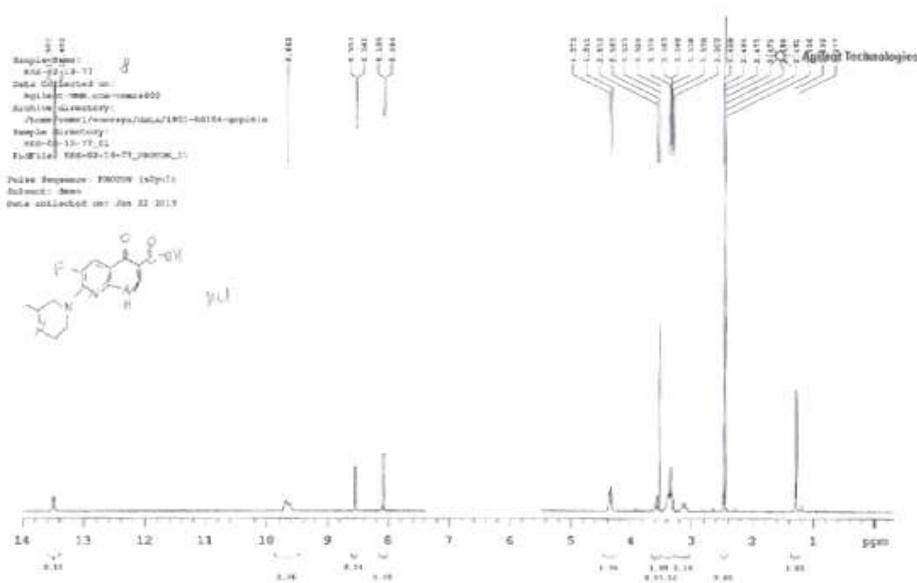


(자) 6-fluoro-7-(3-methylpiperazine-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid hydrochloride 합성

① 반응



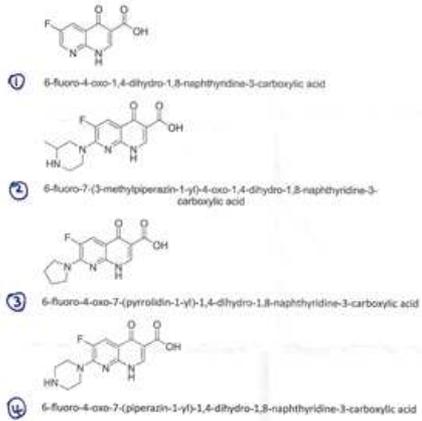
② ¹H-NMR 확인결과



③ 항균활성

<Antimicrobial assay>

20190304



<Antibacterial assay>- *S. aureus*



Positive: Kanamycin 0.1 mg/ml, 10 ul
Negative: 100% DMSO, 10 ul
Compound: 0.1 mg/ml, 10 ul
S. aureus, *E. coli* 10⁸ cell
37°C, 24 hrs incubation

<Antibacterial assay>- *E. coli*



<Antifungal assay>- *C. albicans*



Positive: Nystatin 0.1 mg/ml, 10 ul
Negative: 50% DMSO, 10 ul
Compound: 0.1 mg/ml, 10 ul
C. albicans 10⁸ cell
37°C, 24 hrs incubation

Bacteria *S. aureus* 에 대해
compound 3이 활성을 보임.

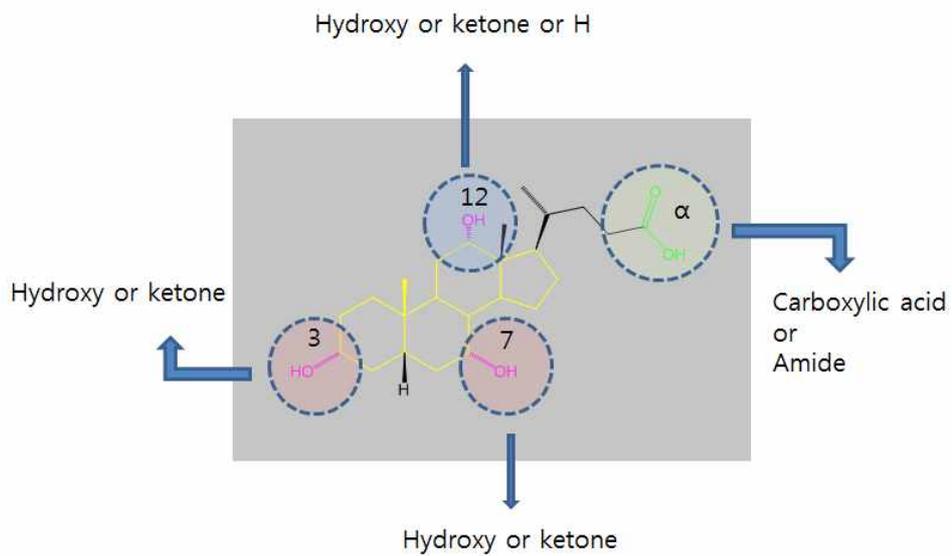


제 2 절 2차년도 연구개발수행 내용 및 연구결과

1. 이론적 접근

- Bile acid 7종 이상의 모핵 연구

당 사에서는 Bile acid는 위와 같은 구조를 기본 골격으로 하여 점선원으로 표시된 부분의 작용기 또는 키랄성이 상이함에 따라 아래와 같은 방법으로 Bile acid를 변형하여 유도체를 합성하고자 한다.



<그림> Bile acid 유도체 합성

2. 연구내용 및 결과

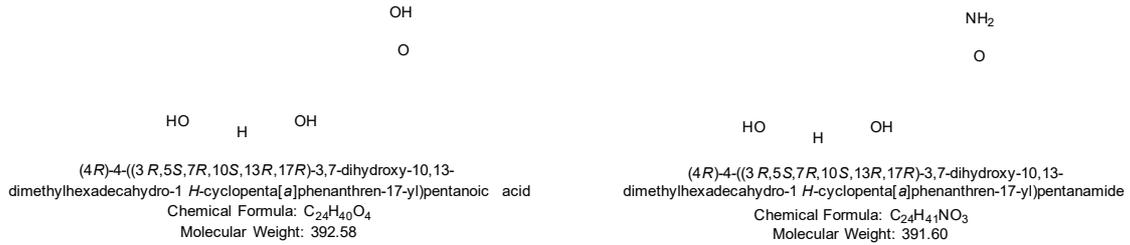
가. 성과목표 1 : 신규 항생제 코어의 합성방법 개발 및 현장적용 공정 정립

(1) 세부목표 1-1 : Bile acid 항생제 코어 합성법 개발

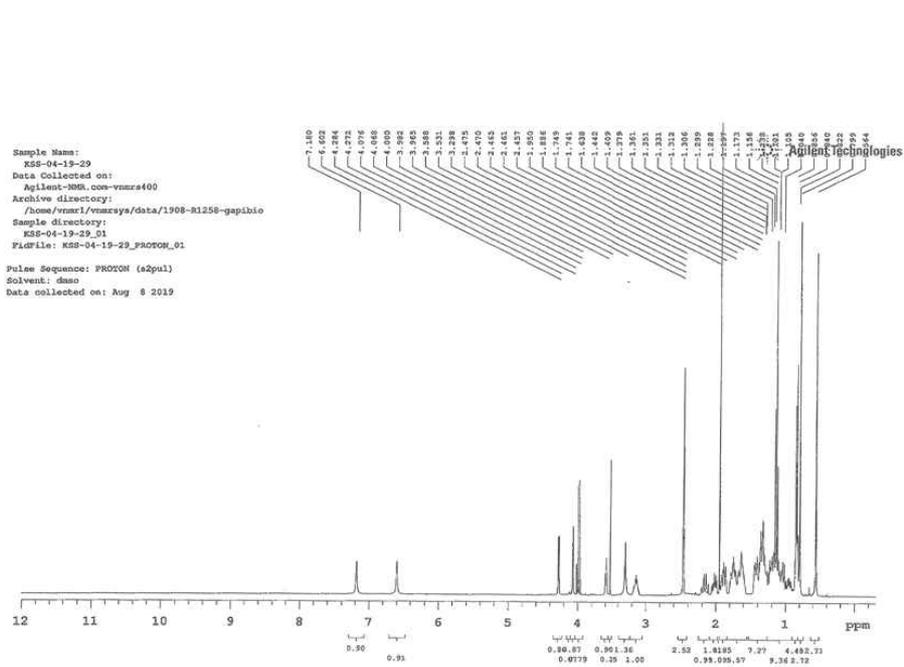
연구 내용	연구 결과
cholic acid, chemodeoxycholic acid, ursodeoxy cholicacid에 대하여 Amide 화합물 3종을 합성 및 분리정제 하였음.	각 10~15g의 화합물을 합성하여 항생제 후보물질 합성을 위한 코어물질로 1~2g을 선행적으로 Kopri에 송부하였음.
cholic acid, chemodeoxycholic acid, ursodeoxy cholicacid에 대하여 methyl ester 화합물 3종을 합성 및 분리정제 하였음.	각 10~15g의 화합물을 합성하여 항생제 후보물질 합성을 위한 코어물질로 1~2g을 선행적으로 Kopri에 송부하였음.
cholic acid와 chemodeoxycholic acid를 이용하여 7번위치의 hydroxy기를 Ketone으로 치환하여 2종의 화합물을 합성 및 분리 정제 하였음.	각 10~15g의 화합물을 합성하여 항생제 후보물질 합성을 위한 코어물질로 1~2g을 선행적으로 Kopri에 송부하였음.
chemodeoxycholic acid를 이용하여 methyl ester에서 활성이 우수하여 ethyl ester 화합물 1종을 합성 및 분리 정제 하였음.	15g의 화합물을 합성하여 항생제 후보물질 합성을 위한 코어물질로 1~2g을 선행적으로 Kopri에 송부하였음.

(가) (4R)-4-((3R,5S,7R,10S,13R,17R)-3,7-dihydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanamide(GA-BA-001) 의 합성

① 반응



② ¹H-NMR 확인결과

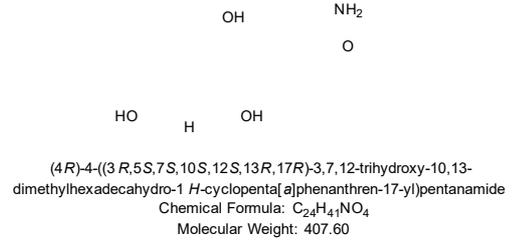
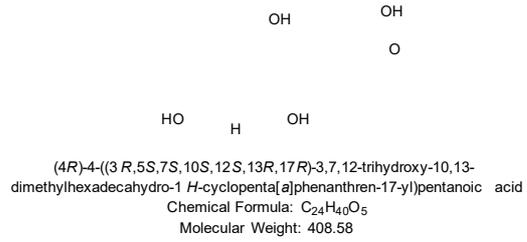


③ 항균활성

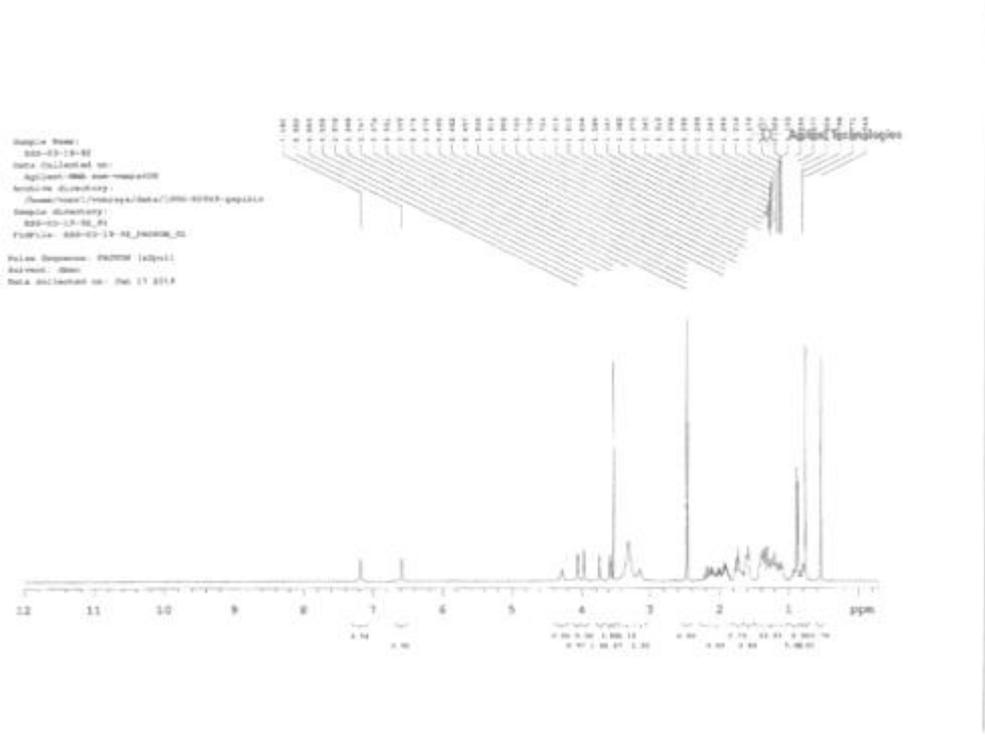
- 항균활성 없음.

(다) (4R)-4-((3R,5S,7S,10S,12S,13R,17R)-3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethylhexa-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanamide(GA-BA-003) 의 합성

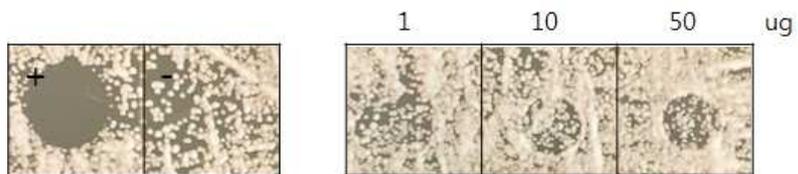
① 반응



② ¹H-NMR 확인결과



③ 항균활성



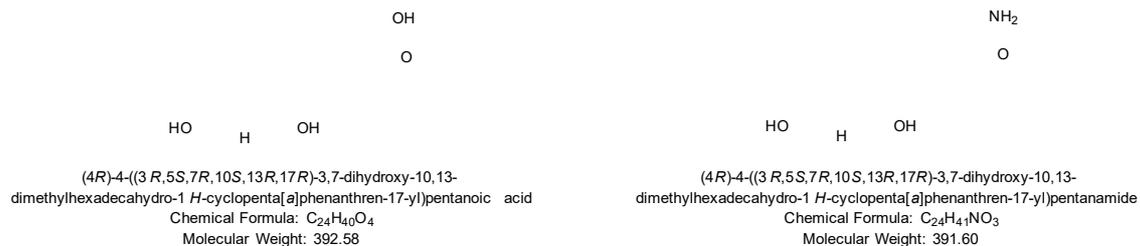
- *Candida albicans*
- 25°C, 24 hr incubation
- Nystatin and compound resolved in 50% DMSO
- +: Nystatin 1 ug, -: 50% DMSO

⇒ Antifungal activity가 크진 않지만 dose dependent 하게 나타남.

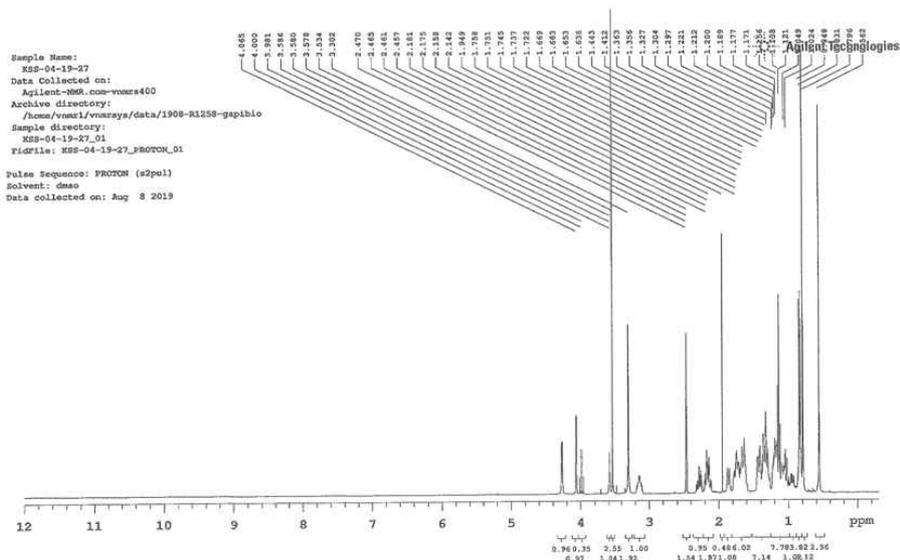


(라) (4R)-4-((3R,5S,7R,10S,13R,17R)-3,7-dihydroxy-10,13-dimethylhexa-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanamide(GA-BA-004) 의 합성

① 반응



② ¹H-NMR 확인결과



③ 항균활성



- *Candida albicans*
- 37°C, 24 hr incubation
- Nystatin and compound resolved in 50% DMSO
- +: Nystatin 1 ug, -: 50% DMSO

GA-BA-004는 1 ug에서부터 활성이 보였습니다.



③ 항균활성



- *Candida albicans*
- 37°C, 24 hr incubation
- Nystatin and compound resolved in 50% DMSO
- +: Nystatin 1 ug, -: 50% DMSO

GA-BA-005번 물질의 경우 항균활성을 나타내지 않음을 확인하였습니다.



③ 항균활성



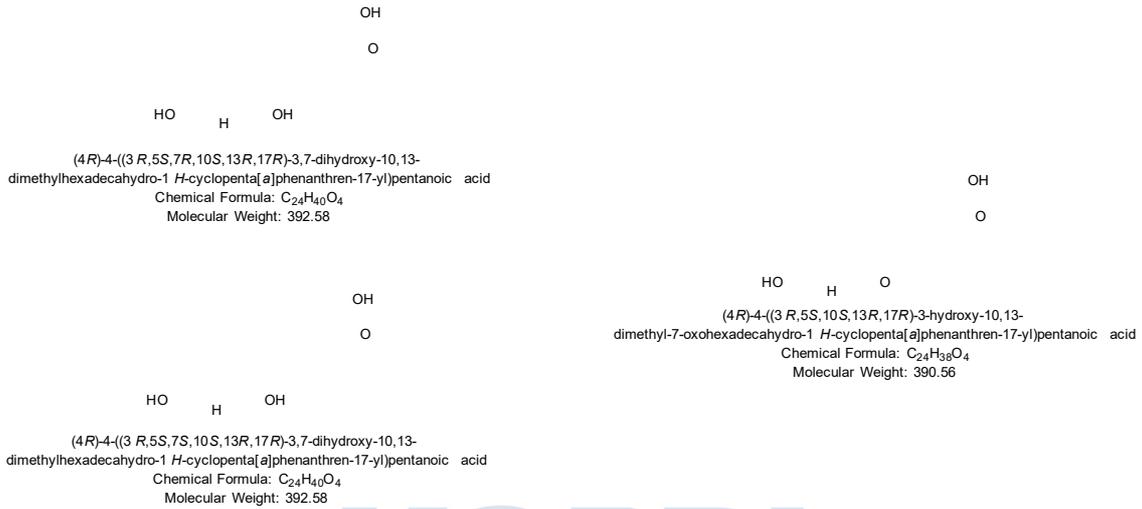
- *Candida albicans*
- 37°C, 24 hr incubation
- Nystatin and compound resolved in 50% DMSO
- +: Nystatin 1 ug, -: 50% DMSO

GA-BA-006번 물질의 경우, 10 ug에서부터 활성을 확인하였습니다.

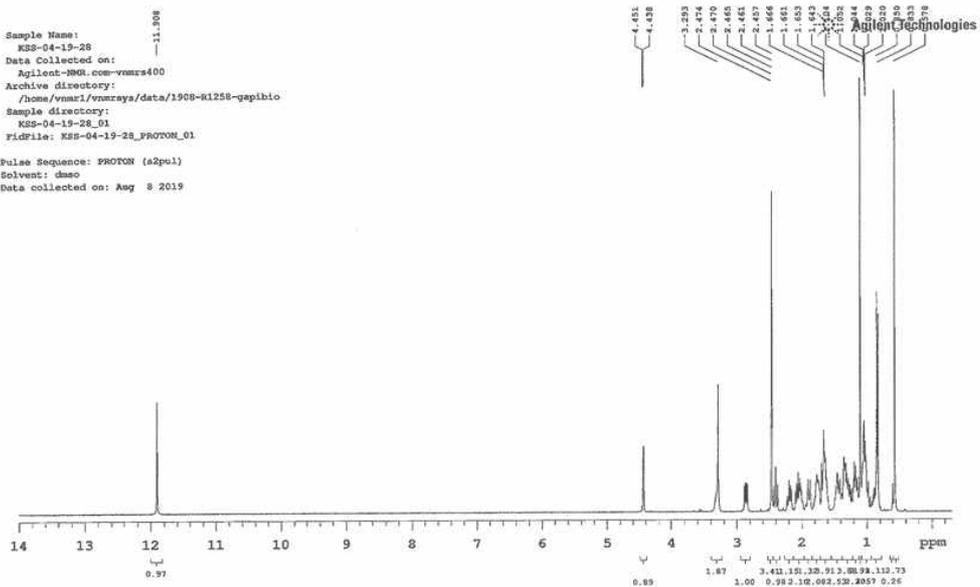


(사) (4R)-4-((3R,5S,10S,13R,17R)-3-hydroxy-10,13-dimethyl-7-oxo-hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanoic acid (GA-BA-007, 008)의 합성

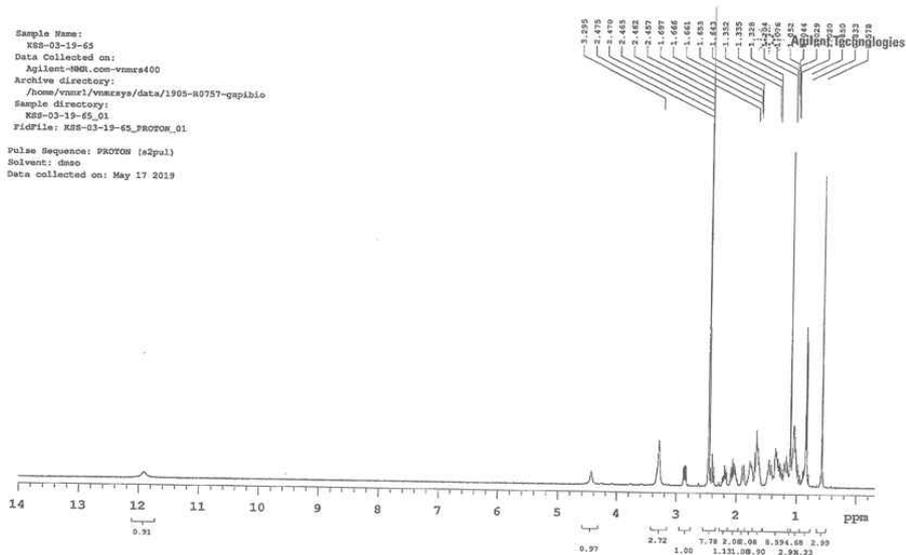
① 반응



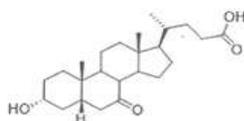
② ¹H-NMR 확인결과
GA-BA-007



GA-BA-008

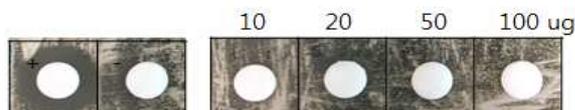


③ 항균활성



Molecular weight : 390.56

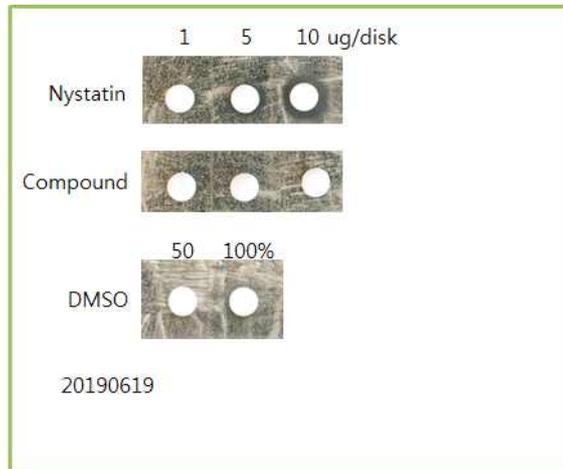
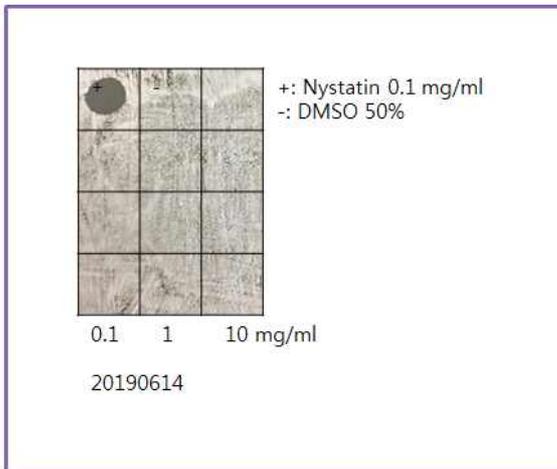
IUPAC name : (4R)-4-((3R,5S,10S,13R,17R)-3-hydroxy-10,13-dimethyl-7-oxohexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanoic acid.



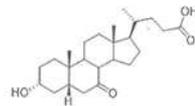
- *Candida albicans*
- 25°C, 24 hr incubation
- Nystatin and compound resolved in 100% DMSO
- +: Nystatin 10 ug, -: 100% DMSO

* 50% DMSO에 물질이 잘 용해되지 않아
100% DMSO를 사용하여 disk diffusion test 방법으로 수행하였음.

⇒ Antifungal activity가 100ug 농도에도 보이지 않음.



- *Candida albicans*
- 25°C, 24 hr incubation
- Nystatin and compound resolved in 50% DMSO



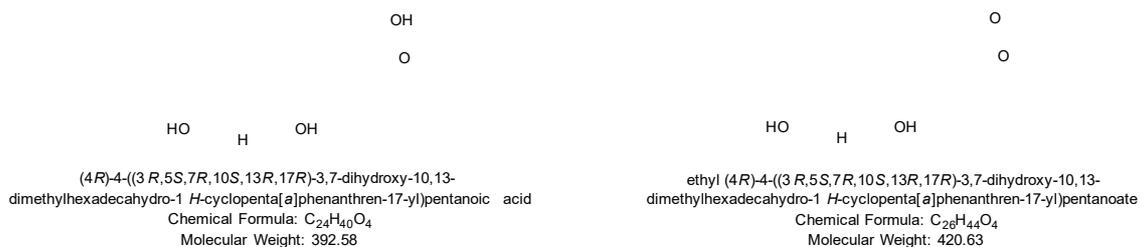
Molecular weight : 390.56

IUPAC name : (4R)-4-((3R,5S,10S,13R,17R)-3-hydroxy-10,13-dimethyl-7-oxohexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanoic acid.

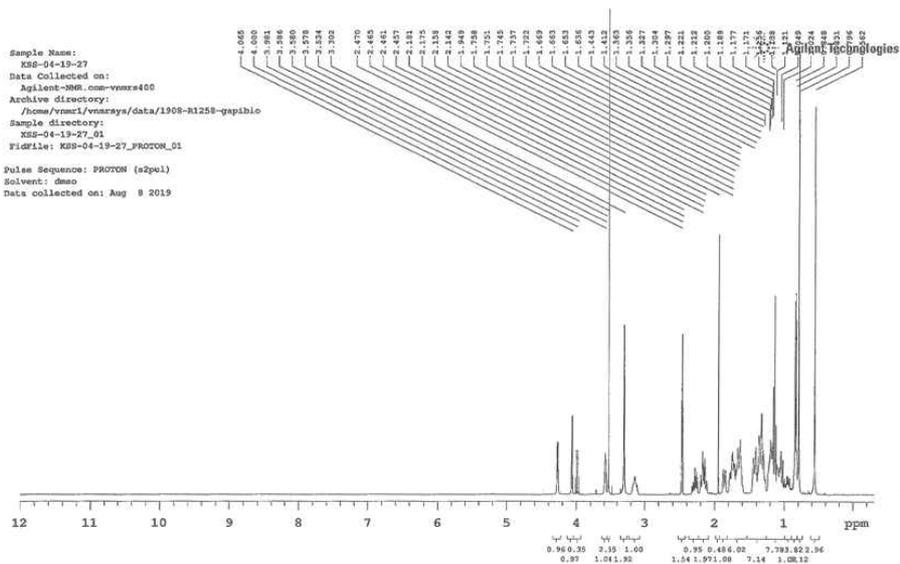


(아) ethyl (4R)-4-((3R,5S,7R,10S,13R,17R)-3,7-dihydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanoate(GA-BA-009) 의 합성

① 반응



② ¹H-NMR 확인결과



③ 항균활성

- 항균활성 없음.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 1차년도 연구개발 목표와 연구개발의 기술발전 기여도

1. 1차년도 연구개발 목표

1차년도에는 목표인 신규 Quinolone계열 항생제를 개발하기 위한 코어 합성 및 그 화합물에 대한 현장생산 방법 개발에 맞게 Quinolone 항생제 모체, 1세대 1종, 2세대 4종 3세대 4종으로 총 9종의 모핵을 연구 개발하였다. 목표 화합물과 목표 수량은 다음 표와 같았다.

목표항목	목표수량	평가항목	비고
7-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	20~50g	¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, IR, Mass, HPLC	순도시험은 European pharmacopoeia, US pharmacopoeia, Japan pharmacopoeia 중 선택된 유사 화합물 순도 측정법에 따라 측정
6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	20~50g		
6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	20~50g		
6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	20~50g		
6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	20~50g		
6-fluoro-7-(3-methylpiperazin-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	20~50g		
6-fluoro-4-oxo-7-(pyrrolidin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	20~50g		
6-fluoro-4-oxo-7-(pyrrolidin-1-yl)-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	20~50g		
6-fluoro-7-(3-hydroxyazetid-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	20~50g		

2. 1차년도 연구개발목표별 주요 달성도

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도 (%)
1. Quinolone 항생제 코어의 합성방법 개발 및 현장생산공정 정립	1-1	1-3세대 Quinolone 항생제 코어 합성법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 극지 생물 Enzyme을 이용한 신규 Quinolone 항생제 개발을 위한 항생제 코어의 산업적 합성방법 Scale up - 총 5종 이상의 Quinolone 1-3세대 항생제 코어를 합성하였으며(H^1-NMR), 화합물에서 항균 활성을 확인하였음. - 항균 활성 확인 분자에 대한 합성법 개발 정립하였음. 	100
	1-2	신규 항생제 코어의 Scale up	<ul style="list-style-type: none"> - 사업화를 위한 검증된 생리활성 항생제 코어의 의약품 수준 대량생산을 위한 공정 최적화 및 Scale up 	100

3. 1차년도 연구개발의 기술발전의 기여도

- 확보된 차세대 항생제 후보물질의 임상시험을 통한 글로벌 항생제 개발은 경제적 가치 창출 및 국민의 건강한 삶에 기여할 것으로 기대된다.
- 국내기업 및 외국제약사와의 공동개발 또는 기술이전을 통한 실용화 추진으로 관련 산업 개발에 기여할 수 있다.
- 극지생물유래 유용 항생제 개발사업은 신약 개발을 위한 기반이 되는 사업으로 극지생명과학분야 기초연구, 의료 R&D 분야 및 실용화 연구 단계를 연계시켜 주는 매개적인 역할 수행
- 효소는 기질 및 입체 특이성이 높기 때문에 Enzyme을 이용한 신규 항생제 개발은 의약품 및 의약품 중간체, 정밀 화학 제품, 농약, 아미노산, 펩타이드, 비타민, 기능성 건강식품, 사료 등 새로운 유용물질의 창출과 고부가가치 산업의 발전을 기대할 수 있다.

- 효소를 이용한 의약품 개발은 현재 Racemic mixture 형태의 이성질체 의약품의 합성법 개발에 도움을 줄 수 있다. 의약품의 경우 입체적 성질에 따라 하나의 이성질체만이 약효를 나타내고 다른 하나는 심각한 부작용을 나타내는 경우가 많아 약효가 있는 하나의 이성질체만을 효율적으로 생산하는 기술은 국민 복지 차원에서도 중요하다고 할 수 있다.
- 효소를 이용한 합성방법 개발은 화학반응에서의 많은 합성 단계, 고 순도의 광학 순도를 얻기 어렵다는 점을 극복할 수 있는 방법으로써, 본 과제의 극지 미생물자원을 이용한 신규 항생제 개발은 기존 화학 합성방법을 효소 방법으로 대체하는 기술적 파급효과를 지닌다.



제 2 절 2차년도 연구개발 목표와 연구개발의 기술발전 기여도

1. 2차년도 연구개발 목표

2차년도 연구개발 목표는 신규 bile acid 모체 항생제를 개발하기 위한 코어 합성 및 그 화합물에 대한 현장적용방법 개발으로 본 위탁연구 2년차에서 Bile acid 모체, 7종이상의 모핵을 연구할 예정이며, 목표 화합물과 목표 수량은 다음과 같다.

목표항목	목표수량	평가항목	비고
Bile acid 코어 7종 이상	각 20~30g	¹ H-NMR, C ¹³ -NMR, IR, Mass, HPLC	순도시험은 European pharmacopoeia, US pharmacopoeia, Japan pharmacopoeia 중 선택된 항생제 순도 측정법에 따라 측정

2. 2차년도 연구개발목표별 주요 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 신규 항생제 코어의 합성방법 개발 및 현장적용공정 정립	1-1 Bile acid 항생제 코어 합성법 개발	- 극지 생물 Enzyme을 이용한 신규 bile acid 항생제 코어의 산업적 생산방법 Scale up - 총 9종의 화합물을 합성하였으며, 2가지 화합물에 대한 우수한 항균 활성이 확인되었음. - 항균 활성 확인 분자에 대하여 합성법을 정립하였음.	90
	1-2 검증된 생리활성 코어의 Scale up	- 검증된 생리활성 항생제 코어의 사업화를 위한 의약품 수준의 대량생산 공정 개발 - 항균 활성 확인 분자의 방법은 5L Size(100g size)까지 Scale up 하였음.	90

3. 2차년도 연구개발의 기술발전예의 기여도

- 확보된 차세대 항생제 후보물질의 임상시험을 통한 글로벌 항생제 개발은 경제적 가치 창출 및 국민의 건강한 삶에 기여할 것으로 기대된다.
- 수입에 의존하는 항생제를 국산화하여 경제적으로 수입대체 효과를 기대할 수 있다.
- 현 국내 의약품 시장에서 교역액(수입+수출)중 수출이 차지하는 비중이 2013년 31%에서 2017년 42.3%로 그 비중이 11.3% 상승하고 있으며, 본 과제의 신규 항생제 후보물질 발굴을 통한 신규 항생제 개발을 통하여 국내 수출에 기여할 수 있다.



<그림> 의약품 수출입 및 무역수지 현황, 출처 : 한국보건산업진흥원

- 신규 극지생물유래 유용 항생제 개발사업은 신약 개발을 위한 기반이 되는 사업으로 극지생명과학분야 기초연구, 의료 R&D 분야 및 실용화 연구 단계를 연계시켜 주는 매개적인 역할 수행
- 신규 항생제 유효물질 및 선도물질 선정을 위해 개발된 Bile acid 후보물질들은 물질들의 bile acid pool을 확립하고 이에 대한 데이터를 수집하여 항생제 후보물질뿐만 아니라 다른 증상의 신약개발에도 기여할 수 있을 것으로 사료됨.

- 극지 미생물자원을 이용한 신규 항생제의 개발은 극지 미생물의 활용도를 높이고 신규 항생제 개발을 위한 모형을 개발함으로써 신약개발에 연관된 제약학 및 화학산업에 이바지 할 수 있을 것이다.
- 극지 미생물효소를 이용한 합성방법은 저온에서 기존 효소들과 유사 또는 그 이상의 반응성을 나타 낼수 있어서 에너지 및 반응 안정성 면에서 매우 우수한 기술적 파급효과를 지닌다.



제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

본 과제의 목적은 글로벌 수준의 슈퍼박테리아를 제거하는 슈퍼항생제 후보물질을 발굴하는 사업으로 당 사는 2년의 연구기간 동안 17개의 후보물질을 개발하였다. 하지만 연구기간이 짧은 연유로 더 많은 항생제 코어를 개발하여 다각도에서 신약 개발을 하기 위한 신규 항생제 코어 연구가 더 필요하다고 사료된다.

제 2 절 타 연구에의 응용

코어의 개발은 효소 또는 화학촉매를 이용하여 후보물질의 개발함에 가장 먼저 선행되어야 하는 연구로써 추후 항생제외의 신약개발에도 응용될 수 있음은 물론 의약품 중간체, 정밀 화학 제품, 농약, 아미노산, 펩타이드, 비타민, 기능성 건강식품, 사료 등 새로운 유용물질의 창출과 고부가가치 산업의 발전 등 타 연구에의 응용이 무궁무진하다고 할 수 있다.

제 3 절 기업화 추진방향

당사의 사업화 방안은 본 연구에 의해 얻어진 결과를 기술이전 받아 신규 항생제 후보물질을 좀더 연구하고 최적화 하여 1차적으로 신규 항생제 전임상을 통해 효능 및 독성 시험을 진행할 예정이다. 추후 전임상이 끝난 후보물질에 대하여 1차적으로 국내 제약업체와 공동연구를 시도할 예정이며, 국내의 공동연구가 어려워 진다면 글로벌 제약사와의 협약으로써 공동개발 또는 로열티에 대한 매출을 예상하고 있다.

제 6 장 참고문헌

1. Wikipedia, “Quinolone antibiotics”,
https://en.wikipedia.org/wiki/Quinolone_antibiotic
2. 국립수산과학원, “수산용 항생제”,
https://www.nifs.go.kr/page?id=antibiotics_1_02
3. NCBI, “Bile Acid Metabolism and Signaling”,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4422175/>
4. NCBI, “Bile Acid-Induced Necrosis in Primary Human Hepatocytes and in Patients with Obstructive Cholestasis”,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4361327/>
5. John Y.L. Chiang, 『Comprehensive Physiology』, Published online(2013)
6. Wikipedia, “Primary bile acids, Secondary bile acids”,
https://en.wikipedia.org/wiki/Bile_acid
7. BBC Research, 『Antibiotic Resistance and Antibiotic Technologies : Global Markets(PHM025B)』, (2009)
8. Hashemi et al., J Antimicrob Agents 2017, 3:2
9. ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH 41, 10 2008 1233-1240
10. ChemMedChem 13, 10, 2018 1018-1027
11. Molecules 23, 2018, 311
12. Antibiotic Development: The 10 x'20 Initiative, IDSA(Infectious Diseases Society of America), 2010년 4월 15일
13. NCBI, “Colistin resistance”,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6519339/>
14. “녹십자, 반코마이신 뛰어넘는 슈퍼항생제 개발 착수”, 후생신보, 2011년 1월 21일
15. “Tailoring pathway modularity in the biosynthesis of erythromycin analogs heterologously engineered in E. col, Bio”, AAAS(American Association for the Advancement of Science), 2015년 5월 29일
16. Pharma Sea, “What is PharmaSea?”,
<http://www.pharma-sea.eu/pharmasea.html>
17. “항생제, 선택이 아닌 생존을 위한 치료제”, 우리투자증권 산업분석, 2010년 9월 7일
18. KPDC(Korea Polar Data Center), 한국극지연구소미생물균주은행,
<https://kpdc.kopri.re.kr/>

19. 남극생물 유전자 정보 데이터베이스, <http://antagen.kopri.re.kr>
20. “국내개발 신약 23호’자보란테정‘탄생”, 비즈한국, 2015년 3월 20일
21. “동아ST, 국산 24호 신약 탄생시켜··R&D 투자 결실”, MEDIPANA, 2015년 4월 17일
22. Jae-Hoon Song, M.D.,Ph.D.(2009), “Current status and future strategies of antimicrobial resistance in Korea”, 대한내과학회지: 제77권 제2호 통권 제588호 2009, 143-151



뒷 면

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.