

표 지

(뒷면)

(측면)

(앞면)

<p>주 의 (편집순서9) (16 포인트 고딕체)</p> <p>↑ 7cm ↓</p>	<p>보고서 발간 번호 : BSPE9 9219-1 0640-3</p> <p>해면을 이용한 항생제 내성 유발 단백질 인 β-lact amase 에 대한 저해제 발굴</p> <p>한국해양 과학기술원</p> <p>↑ 5cm ↓</p>	<p>보고서 발간번호: BSPE99219-10640-3 ↑ (14포인트 중고딕체) 7cm ↓</p> <p>해면을 이용한 항생제 내성 유발 단백질인 β-lactamase에 대한 저해제 발굴 (20 포인트 중고딕체)</p> <p>Development of inhibitors against β-lactamases from drug-resistant pathogens (16 포인트 신명조체)</p> <p>↑ 5cm ↓</p> <p>2015.2.24 (16 포인트 신명조체)</p> <p>한국해양과학기술원 (20 포인트 중고딕체)</p> <p>↑ 7cm ↓</p>
--	--	--

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “해면을 이용한 항생제 내성 유발 단백질인 β -lactamase에 대한 저해제 발굴” 과제의 (연차,최종)보고서로 제출합니다.

2015. 2. 24

총괄연구책임자 : 차선신

참 여 연 구 원 : 권개경, 신희재, 이연주,
이종석, 김민규, 김수민,
고영준, 김지선, 김혜경,
나정현, 박기정, 박 솔,
박승일, 설재희, 유수정,
이정우, 이재학, 오지혜,
엄태양, 이화선, 정창숙,
최병규, 한 샘,
CHIEN FANG

보고서 초록

과제 고유번호	PE99219	해당단계 연구기간	2014. 9. 1 - 2014. 12 . 31	단계 구분	1단계
연구사업명	중사업명	미래 해양생물자원 개발			
	세부사업명	해면을 이용한 항생제 내성 유발 단백질인 β -lactamase에 대한 저해제 발굴			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	해면을 이용한 항생제 내성 유발 단백질인 β -lactamase에 대한 저해제 발굴			
연구책임자	차 선 신	해당단계 참여연구원수	총 : 25 명 내부: 5 명 외부: 20 명	해당단계 연구비	정부: 250,000 천원 기업: 천원 계 : 천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 25 명 내부: 5 명 외부: 20 명	총 연구비	정부: 250,000 천원 기업: 천원 계 : 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 생물연구본부		참여기업명		
국제공동연구					
위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	53
<p>(1) 기확보 된 선도물질의 특성규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 효소 활성 부위 관찰을 통한 선도물질과 β-lactamase간의 결합 구조 규명 - Cha-I과 구조적으로 유사한 천연물 스크리닝을 통한 선도물질 추가 확보 (Cha-II, Cha-III) - β-lactamase의 기질(nitrocefin)에 대한 정상상태 효소 동력학적 지표 (K_m, K_{cat}) 측정 - Cha-I, Cha-II, Cha-III의 효소활성 저해상수 결정 (K_i) <p>(2) 기확보 된 선도물질의 변형 설계</p> <ul style="list-style-type: none"> - 선도물질과 β-lactamase간의 결합 구조 활성 부위 탐색을 기반으로, Cha-I의 결합 구조로부터 phospho-carboxylic anhydride bond 가능성 확인 - Cha-I에 L1 group을 phospho-carboxylic anhydride bond 통해 결합시킨 화합물 (Cha-I') 합성 완료 - Cha-IV의 효소활성 저해상수 결정 (K_i) 및 항생제 내성 대장균에 대한 효과 확인 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	항생제 내성, β -lactamase 저해제, 천연물 라이브러리, 구조-기반 신약발굴, 메타게놈			
	영 어	Antibiotic resistance, β -lactamase inhibitor, Natural product library, structure-based drug discovery, metagenome			

요 약 문

I. 제 목

: 해면을 이용한 항생제 내성 유발 단백질인 β -lactamase에 대한 저해제 발굴

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

- 항생제 내성 슈퍼박테리아에서 발견되는 class C β -lactamase의 활성을 제어하는 해양천연물 기반 선도 물질을 발굴하고, 이들의 작용 기작과 항 박테리아 효과분석.
- 발굴된 선도 해양 천연물의 생합성 기작을 규명하고, 생산 시스템을 구축.

2. 필요성

- 현재까지 다양한 β -lactam 계열 항생제들이 개발되어 임상에서 사용되어 왔으나, 이들 항생제에 내성을 가지는 슈퍼박테리아들이 발견되고 있음.
- β -Lactamase 저해제들과 β -lactam 항생제를 동시에 투약할 경우 β -lactamase에 의한 항생제의 분해가 억제되어 치료 효과가 높아지기 때문에 이들 항생제는 β -lactamase 저해제들과의 조합 제제 (β -lactama/ β -lactamase inhibitor combination)으로 개발되는 경우가 많음.
- Class C β -lactamase에 대한 저해제 개발 연구는 활발히 진행되고 있으나 임상에서 효과를 보이는 저해제는 개발되어 있지 않음. 따라서 이에 대한 저해제 개발은 다양한 병원균의 치료와 항생제 내성 문제를 해결할 수 있음.
- 해양 천연물의 경우, 해양이라는 환경의 특수성으로 인해 물질을 생산하는 생물의 서식 환경을 인공적으로 재연하는 것이 불가능할 뿐만 아니라 대부분이 복잡한 공생 시스템 속에서 생산되는 물질이어서 그 생산 기작을 정확하게 규명하기는 어려움.
- 현재 메타게놈 분석을 통한 생합성 유전자의 발굴이 해양천연물 공급의 한계를 극복할 새로운 대안으로 부상 중임.
- 해면에서 발굴된 굴뚝 선도 해양 천연물의 생합성 기작을 규명하여, 대장균 등의 균주에서 발현시켜 생합성 플랫폼을 구축함으로써 해양 고등생물 유래 항생물질 생산성 향상 기반 구축한다면 새로운 미래산업 창출이라는 가치에 부합되는 것으로 사료 됨.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 기확보 된 선도물질의 특성규명
 - 선도물질이 항생제의 MIC에 미치는 영향 확인
 - 선도물질의 활성에 대한 동력학적 분석
 - 다양한 선도물질 유사체들의 저해 활성 조사
2. 기확보 된 선도물질의 구조적 변형 설계
 - 저해 물질과 효소와의 결합 구조 규명
 - 선도물질과 β -lactamase 간의 결합 구조로부터 설계 아이디어 확보
 - 구조적 변형체의 저해 활성조사
3. 메타게놈분석 시스템 구축
 - 서버 구축
 - 해면 후보 선정 및 확보

Ⅳ. 연구개발결과

1. 기확보 된 선도물질의 특성규명
 - 효소 활성 부위 관찰을 통한 선도물질과 β -lactamase간의 결합 구조 규명
 - Cha-I과 구조적으로 유사한 천연물 스크리닝을 통한 선도물질 추가 확보 (Cha-II, Cha-III)
 - β -lactamase의 기질(nitrocefin)에 대한 정상상태 효소 동력학적 지표 (K_m , K_{cat}) 측정
 - Cha-I, Cha-II, Cha-III의 효소활성 저해상수 결정 (K_i)
2. 기확보 된 선도물질의 변형 설계
 - 선도물질과 β -lactamase간의 결합 구조 활성 부위 탐색을 기반으로, Cha-I의 결합 구조로부터 phospho-carboxylic anhydride bond 가능성 확인
 - Cha-I에 L1 group을 phospho-carboxylic anhydride bond 통해 결합시킨 화합물 (Cha-I') 합성 완료
 - Cha-I'의 효소활성 저해상수 결정 (K_i) 및 항생제 내성 대장균에 대한 효과 확인

V. 연구개발결과의 활용계획

- 항생제 내성 문제 해결에 확보된 β -lactamase의 저해제 선도 물질 활용 가능.
- Crystallography를 통한 β -lactamase 구조 분석은 향후 효과적인 저해제 설계 시 단서를 제공 가능함.
- 단백질 3차 구조에 기반을 둔 새로운 β -lactamase 저해제 개발의 원천지식을 제공 가능함.
- 본 연구를 통해서 새롭게 개발된 β -lactamase 활성 저해 선도 물질과 β -lactamase 간의 결합 구조는 치료제 개발에 직접 이용될 수 있어 특허 출원이 가능.

S U M M A R Y

I. Title

Development of inhibitors against β -lactamases from drug-resistant pathogens

II. The Aim of the Project

- *In vitro* characterization of inhibitory activity of a lead compound called Cha-I
- Structural modification of Cha-I to enhance its inhibitory activity
- Identification of novel lead compounds
- The effect of lead compounds on the minimum inhibitory concentration (MIC) of ceftazidime against a clinically-isolated *Escherichia coli* AmpC-BER strain
- Selection of sponges for metagenomic analyses

III. Scope of the Study

1. Determination of K_i of Cha-I

- Purification of CMY-10
 - Proteins are purified with at least 90 to 95% purity on SDS-PAGE
- Determination of the steady-state kinetics (K_m , k_{cat}) of CMY-10
 - Substrate : nitrocefin
 - [E] : 200 pM
 - Temperature : 37 °C
 - Detection of the absorbance at 486 nm for 2 min to calculate initial reaction velocity (V_0) using UV-vis spectrophotometer
- Determination of the inhibition kinetic parameter (K_i) of Cha-I against CMY-10
 - Reaction conditions are same with that of the steady-state kinetics determination
 - V_0 values are calculated with the data from the reaction mixture with or without various concentrations of Cha-I
 - K_i value of Cha-I against CMY-10 is 58.3 μ M

2. Introduction of phospho-carboxylic anhydride bond into Cha-I to synthesize Cha-I'
 - β -lactamase/Cha-I complex structure determination
 - Native β -lactamase crystals were soaked with 50 mM of Cha-I
 - X-ray diffraction data were collected using synchrotron radiation
 - Crystal structure was solved by molecular replacement
 - Active site of β -lactamase/Cha-I complex structure
 - Cha-I was covalently bound to the active-site serine residue
 - High resolution data showed that one phosphate group is in Cha-I
 - Structure-based optimization of Cha-I
 - Cha-I can be modified by adding various R-groups to a phosphate group
 - Addition of acetyl group *via* phospho-carboxylic anhydride bond to Cha-I was designed and the resulting compound (Cha-I') was successfully synthesized

3. Identification of novel lead compounds (Cha-II and Cha-III) that are similar in structure to Cha-I
 - β -lactamase inhibition assay
 - About 40 compounds that have the similar structures with Cha-I were selected and preliminary β -lactamase inhibition assay were performed
 - Two compounds inhibited the β -lactamase more effectively than Cha-I (Cha-II, Cha-III)
 - Inhibition kinetic parameter (K_i) of Cha-II and Cha-III against CMY-10 were determined as 12.6 and 8.2 μ M, respectively

4. MIC test through combinations of ceftazidime and lead compounds
 - Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination
 - Ceftazidime was serially diluted with LB media in the 96-well plate
 - 5×10^2 cfu/ml of *E. coli* BER were inoculated
 - 10mM of lead compounds were added with control lane
 - Cha-I' reduced the MIC of ceftazidime against *E. coli* BER about 1/40 (128 μ g/ml to 3 μ g/ml)

5. Search of sponges whose metagenome informations are available

- Computer server system is established for metagenome analysis
- Three sponge species (*Theonella swinhoei*, *Haliclona simulans*, *Lamellomorpha sp.*) with open metagenome informations are selected for the metagenome analysis of the symbiotic microorganism and useful natural products of the sponges

IV. Results of the Study

The development of inhibitors against β -lactamases is an effective strategy to cope with the β -lactamase-mediated antibiotic resistance since β -lactams maintain their antibiotic activity in the presence of inhibitors that block β -lactamases. In fact, three classical β -lactam inhibitors (clavulanate, sulbactam, and tazobactam) sharing the β -lactam backbone are clinically used in combination with β -lactam antibiotics (e.g. amoxicillin-clavulanate, ticarcillin-clavulanate, ampicillin-sulbactam, piperacillin-tazobactam, and cefoperazone-sulbactam). These clinical inhibitors are especially active on class A enzymes, displaying much less or no effect on other β -lactamases. Furthermore, β -lactamases resistant to the β -lactam inhibitors are emerging, which highlights the need to develop non- β -lactam inhibitors with broad-spectrum efficacy. We have discovered non- β -lactam inhibitors against serine β -lactamases from cellular metabolites. The inhibitors are most effective against class C β -lactamases with extended substrate spectrum. The chemical structures of these novel inhibitors are different from those of existing inhibitors. Remarkably, one of them exhibited the reduction of MIC for ceftazidime against the ceftazidime-resistant *E. coli* BER strain. To maximize the β -lactamase inhibition activity, we will introduce further chemical modification to these lead compounds. Our final goal is to develop non- β -lactam inhibitors that are effective towards all serine β -lactamases.

V. Future plan

- Examination of *in vivo* efficacy of lead compounds by using animal models.
- Structural modification of lead compounds to maximize their inhibitory activities.

Keyword : Antibiotic resistance, β -lactamase inhibitor, Natural product library, structure-based drug discovery, metagenome

키워드 : 항생제 내성, β -lactamase 저해제, 천연물 라이브러리, 구조-기반 신약발굴, 메타게놈

Contents

Contents (Korean)	12
List of tables	14
List of figures	15
Chapter 1. Introduction	17
Section 1. Objective of this study	17
Section 2. Necessity of this study	17
1. Technical aspect	17
2. Economical & industrial aspect	19
3. Social & cultural aspect	19
4. Association with development of indigenous function of KIOST	21
Section 3. Expected effects	21
1. Technical aspect	21
2. Economical & industrial aspect	21

Chapter 2. Domestic and Overseas Research Development States	23
Section 1. Search of the overseas cases	23
Section 2. Search of the domestic cases	33
Chapter 3. Contents and results of this study	36
Section 1. Contents of this study	36
Section 2. Results of this study	39
1. Characterization of lead compound	39
2. Structural modification of lead compound	46
3. Building of metagenomic analysis system	48
Chapter 4. Achievement and contribution	49
Chapter 5. Plan for application of the results	50
Section 1. Utilization plans	50
Section 2. Expected performances and effects	50
Chapter 6. Reference	52

목 차

표 목차	14
그림 목차	15
제 1장 서론	17
제 1절 연구개발의 목적	17
제 2절 연구개발의 필요성	17
1. 기술적 측면	17
2. 경제·산업적 측면	19
3. 사회·문화적 측면	19
4. 연구소 고유기능 발전과의 연관성	21
제 3절 기대효과	21
1. 기술적 측면	21
2. 경제·산업적 측면	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 1절 국외현황	23
제 2절 국내현황	33

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	36
제 1절 연구개발수행 내용	36
제 2절 연구결과	39
1. 기확보된 선도물질의 특성 규명	39
2. 기확보된 선도물질의 구조적 변형 설계	46
3. 메타게놈 분석 시스템 구축	48
제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	49
제 5장 연구개발결과의 활용계획	50
제 1절 활용방안	50
제 2절 기대성과 및 예상파급효과	50
제 6장 참고문헌	52

표 목 차

표 1 : 해양박테리아 유래 항 MRSA 활성 물질	28
표 2 : 국내 연간 1조원 규모의 항생제 시장	34
표 3 : 효소반응 동력학 지표 측정 조건	41
표 4 : 연구성과목표의 달성도 및 기여내용	49

그 립 목 차

그림 1 : 신규 보고 결핵 사례 중, 다제내성 결핵균 감염 사례 비율	20
그림 2 : 항생제의 주요 대 분류와 주요 제품 발매기업	24
그림 3 : 항생제 분류별 시장 점유율	26
그림 4 : 해양박테리아 유래 신규 항생제	27
그림 5 : Baringolin의 구조	30
그림 6 : Boronic acid 와 다양한 R 그룹을 가진 boronic acid의 변형체	37
그림 7 : β -lactamase와 선도물질의 결합구조	39
그림 8 : β -lactamase의 활성 부위 전자 밀도	39
그림 9 : Cha-I의 구조	40
그림 10 : 천연물의 β -lactamase 활성 저해 측정	40
그림 11 : Cha-II (좌)와 Cha-III (우)의 구조	41
그림 12 : 정상상태 효소반응 동력학 지표 확인	42
그림 13 : 나이트로세핀 농도에 대한 Cha-I의 β -lactamase 저해 활성 Lineweaver-Burk 그래프	43
그림 14 : 나이트로세핀 농도에 대한 Cha-II의 β -lactamase 저해 활성 Lineweaver-Burk 그래프	44

그림 15 : 나이트로세핀 농도에 대한 Cha-III의 β -lactamase 저해 활성 Lineweaver-Burk 그래프	45
그림 16 : 선도물질과 β -lactamase간의 결합 구조상의 인산기	46
그림 17 : Cha-I'의 구조	46
그림 18 : 나이트로세핀 농도에 대한 Cha-I'의 β -lactamase 저해 활성 Lineweaver-Burk 그래프	47
그림 19 : <i>Theonella swinhoei</i> 사진	48

제 1 장 서론

제 1절 연구개발의 목적

1. 항생제 내성 슈퍼박테리아에서 발견되는 class C β -lactamase의 활성을 제어하는 해양천연물 기반 선도 물질을 발굴하고 이들의 작용 기작과 항 박테리아 효과를 분석.
 - 가. 효과적인 저해제가 개발되어 있지 않은 class C β -lactamase의 활성을 제어하는 해양 항생선도물질을 발굴.
 - 나. 발굴된 선도 물질과 β -lactamase간의 동력학적·열역학적 상호 작용을 분석.
 - 다. 발굴된 선도 물질의 항 박테리아 효과를 검증.
 - 라. X-ray crystallography와 modeling 기법을 이용하여, 발굴된 선도 물질의 작용기작을 원자 수준에서 규명.
2. 발굴된 선도 해양 천연물 생합성 기작 규명 및 생산 시스템 구축
 - 가. 효소 억제 활성을 나타내는 천연물의 경우 metagenomics를 통해 천연물 생합성 유전자군 발굴.
 - 나. 발굴된 생합성 유전자군을 대장균 등의 균주에서 발현시켜 생합성 플랫폼을 구축함으로써 해양 고등생물 유래 항생물질 생산성 향상 기반 구축.

제 2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면
 - 가. 항생제내성 유발 단백질인 β -lactamase에 대한 저해제 개발의 중요성
 - (1) Aminoglycoside, glycopeptide, macrolide, quinolone 등 다양한 형태의 항생제들이 개발되어 있으나 그람 음성균 감염에 대한 일차 처방약으로서 carbapenem이나 cephalosporin 계열 등 β -lactam 구조의 항생제가 사용되고 있음.
 - (2) 2000년부터 2013년 사이 FDA 승인을 얻은 항생제 신약 22종 중 β -lactam 구조의 항생제는 6종으로, 9종이 승인을 얻은 quinolone계 항생제에 이어 두번째로 많은 종을 차지함.
 - (3) 현재까지 다양한 β -lactam 계열 항생제들이 개발되어 임상에서 사용되어 왔으나 이들 항생제에 내성을 가지는 슈퍼박테리아들이 발견되고 있음.
 - (4) β -Lactamase 저해제들과 β -lactam 항생제를 동시에 투약할 경우 β -lactamase에 의한 항생제의 분해가 억제되어 치료 효과가 높아지기 때문에 이들 항생제는 β -lactamase 저해제들과의 조합 제제 (β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination)으로 개발되는 경우가 많음.
 - (5) 따라서 β -lactamase의 활성을 억제하는 저해제 개발은 항생제 내성 문제 해결에 매우 중요한 역할을 할 것임 [1-3].

나. Class C β -lactamase에 대한 저해 물질 개발의 필요성

- (1) β -Lactamase는 서열 유사도에 따라 class A, class B, class C, class D로 구분됨. 이 중에서 임상에서 항생제 내성문제에 가장 큰 문제를 야기하는 것은 class A와 class C임.
- (2) 현재 임상에서 사용되고 있는 β -lactamase 저해제들은 (clavulanic acid, tazobactam, and sulbactam) 주로 class A β -lactamase에만 효과를 보임
- (3) Class C β -lactamase에 대한 저해제 개발 연구는 활발히 진행되고 있으나 임상에서 효과를 보이는 저해제는 개발되어 있지 않음.
- (4) Class C β -lactamase의 일종인 AmpC는 병원 내 감염의 주요한 원인균인 *Acinetobacter*를 포함한 광범위 장내 병원성 미생물에서 발견되므로 이 효소에 대한 저해제 개발은 다양한 병원균의 치료와 항생제 내성 문제를 해결할 수 있음.

다. 해양생물 메타게놈 분석을 통한 β -lactamase 억제 천연물 생합성 유전자 발굴 기술 개발의 필요성

- (1). 해양 천연물의 경우, 해양이라는 환경의 특수성으로 인해 물질을 생산하는 생물의 서식 환경을 인공적으로 재연하는 것이 불가능할 뿐만 아니라 대부분이 복잡한 공생 시스템 속에서 생산되는 물질이어서 그 생산 기작을 정확하게 규명하기는 매우 어려움.
- (2) 천연물 신약 개발의 성공 여부는 안정적인 물질 수급 방안 마련 여부에 크게 좌우됨. Taxol [5] 이나 eribulin [6]의 예에서 볼 수 있듯이 생물로부터 직접 물질을 추출하여 분리, 정제하는 방식은 생태계 파괴의 문제를 초래하거나, 낮은 수율로 인한 한계들을 나타냄. 육상 식물의 경우 재배를 통해 문제가 해결될 수 있지만, 해양 천연물의 경우 배양, 양식이 불가하거나 양식된 생물의 활성 물질 함량이 매우 낮은 경우가 많아 대부분의 경우 화학 합성으로 수급의 문제를 해결함.
- (3) 비록 사례는 많지 않지만 대형 해양생물이 생산하는 천연물은 대부분 공생미생물로부터 오는 것으로 여겨지고 있음 [7]. 따라서 공생미생물을 해양미생물로부터 천연물을 생산하고자 하는 연구가 대두됨 [8].
- (4) 그러나 아직까지 대부분의 해양미생물, 특히 주요 공생미생물 배양은 성공하지 못하고 있음. 미생물 배양의 한계를 극복하기 위한 방법으로 메타게노믹스 기술이 등장하였으며 [9] 현재는 NGS system의 발달과 함께 cloning에 의하지 않고 유전체를 통째로 분석하는 기술이 가능해짐.
- (5) 현재 메타게놈 분석을 통한 생합성 유전자의 발굴이 해양천연물 공급의 한계를 극복할 새로운 대안으로 부상 중임 [10,11].
- (6) 이와 같은 항생물질 개발 과정에는 적절한 platforms의 확립이 필요하며 [12] sponge microbiome의 metagenomics를 통한 신규 항생물질 합성 유전자군의 발굴과 이종 숙주내 재구성을 통한 생산기술 개발은 신규 항생제 개발에 필요한 platform 중 하나로서 개발이 필요함.

2. 경제·산업적 측면

- 가. 항생제는 치료용 약제들 중에 두 번째로 큰 시장을 차지하고 있는 약제이지만, 기존 항생제에 내성을 지닌 슈퍼박테리아의 출현 등에 의해서 사용 가능한 항생제의 수가 점차 줄고 있는 상황임. 더욱이 슈퍼 박테리아에 감염된 환자는 국내외적으로 증가하고 있음. 따라서 새로운 치료법을 위해 효과적인 β -lactamase 저해제 시장은 크게 증가될 것임.
- 나. 또한 사람과 가축 치료용 외에도 환경 소독 및 항균제 미국시장이 약 1조원에 달하는 것을 감안할 때 연구 성과의 다양한 사업화 가능성과 파급 효과는 매우 큼.
- 다. 본 연구를 통해서 새롭게 개발될 β -lactamase 활성 저해 저해제 선도 물질과 표적 단백질의 구조는 치료제 개발에 이용될 수 있어 특허 출원이 가능함.

3. 사회·문화적 측면

가. 항생제 내성 병원균(슈퍼박테리아)의 심각성

- (1) 항생제 내성 병원균에 감염된 경우 표준 처방이 효과를 보이지 않아 병의 지속, 치사율의 증가를 야기함.
- (2) 또한 내성에 의해 1차 처방이 효과를 보이지 않는 경우 추가 처방되는 항생제의 비용이 매우 비싸기 때문에 치료 기간이 연장과 함께 의료비용이 매우 크게 증가함.
- (3) WHO의 보고에 따르면 전 세계적으로 다제내성 결핵균이 약 44만 건 보고되어 있고 최소 15만 명이 사망함. [그림 1].

나. 심각한 국내의 항생제 내성 문제

- (1) 우리나라의 항생제 오남용에 따른 내성균 증가 속도는 세계 최고 수준임.
- (2) 폐렴, 축농증 등을 일으키는 폐구균(*Streptococcus pneumoniae*)의 경우 내성율이 80% 수준으로 급등해 페니실린은 사실상 무용지물임.
- (3) 2002년 기준으로 장염 원인균인 장구균(*Enterococcus faecium*)은 암피실린(Ampicillin)에 97% 수준의 내성율을 보이고, 반코마이신(Vancomycin)에는 33% 수준의 내성율을 보임.
- (4) 결과적으로 우리나라는 높은 항생제 내성율로 인해 각종 세균 감염질환 치료라는 큰 난관에 봉착해 있음은 물론 어떤 항생제에도 내성을 갖는 슈퍼박테리아 출현 가능성이 어느 나라 보다 높다고 볼 수 있음 [1,13,14].

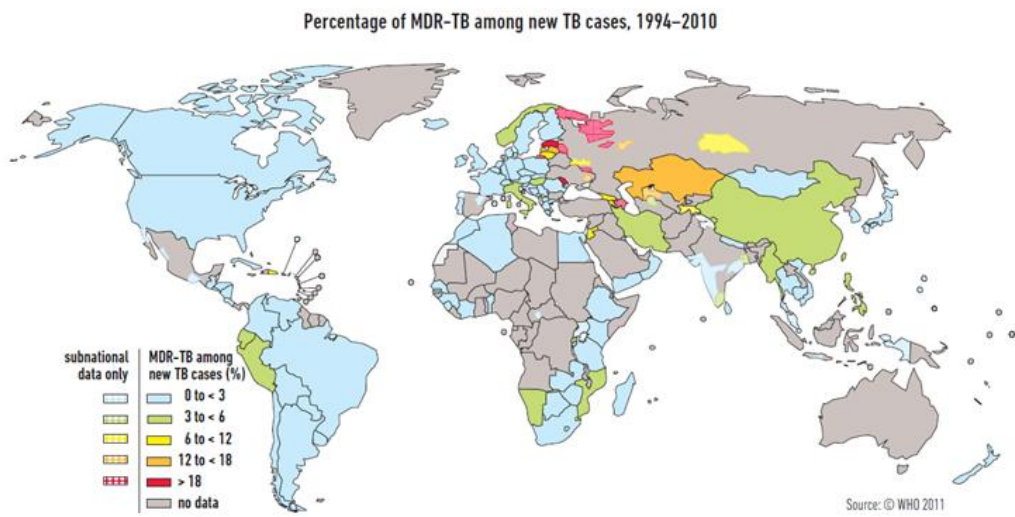


그림 1. 신규 보고 결핵 사례 중, 다제내성 결핵균 감염 사례 비율.
(WHO, 2011) [13]

4. 연구소 고유기능 발전과의 연관성

- 가. 해양자원의 관리·이용·개발에 관한 연구는 한국해양과학기술원의 발전 전략(2012-2020)에 따른 기술원의 주요기능이며 해양생물·유전자원은 대표적인 해양 자원임.
- 나. 해양생물자원 이용기술은 해양과기원이 기본 이념, 비전 및 미션과 연계하여 선정한 12대 중점 연구 분야이며 이에 따른 전략 연구과제로 ‘생체가능 제어용 스마트 신소재 발굴 및 응용기술 개발’, ‘해양 원시 단백질 3차 구조 규명을 통한 진화의 분자기작 규명’등의 연구과제가 선정되어 있음.
- 다. 본 연구과제는 해양생물을 이용한 항생물질 발굴을 주 연구 내용으로 하고 있기 때문에 해양과기원이 지향하는 이념, 중점 연구 분야, 연구 전략과 일치하며 기술원의 고유 기능에 충실하면서 기술원 발전에 기여할 것임.
- 라. 해양자원의 발굴과 활용에 중점을 두는 한국해양과학기술연구원의 발전취지와 직접적으로 연계될 수 있는 연구가 필요
- 마. 다양한 해양환경으로부터 생물자원을 확보하여 해양생물자원의 활용과 가치를 극대화하기 위해 노력하고 있음.
- 바. 본 연구는 해양생물 자원의 유용한 가치를 확보하고, 인류의 생존을 위협하는 항생제 내성문제 해결을 목적으로 하고 있기 때문에 국가의 격을 높이고, 미래산업 창출이라는 가치에 부합되는 것으로 사료됨.

제 3절 기대효과

1. 기술적 측면

- 가. 본 연구에서 발견한 미지의 물질은 기존에 보고된 β -lactamase의 저해제와 화학적 구조가 전혀 다르며 β -lactam 계열의 저해제가 갖는 내성 문제도 없으므로, 기존의 모든 항생제와 β -lactamase 저해제에 저항성이 있는 다제내성 병원성 미생물의 치료제 개발에 활용 할 수 있음.
- 나. 본 연구에서 확립 된 ITC를 통한 enthalpy 및 entropy를 이용한 binding affinity 분석 기술은 다른 표적 단백질의 저해제 개발에 폭 넓게 적용 될 수 있음.
- 다. 저해제와 표적 단백질의 분자 수준 상호 작용 대한 연구 방법은 항암제, 항바이러스제 및 면연 억제 등의 신약 개발에 광범위하게 이용 할 수 있음.

2. 경제·산업적 측면

- 가. 항생제는 치료용 약제들 중에 두 번째로 큰 시장을 차지하고 있는 약제이지만, 기존 항생제에 내성을 지닌 슈퍼 박테리아의 출현 등에 의해서 사용 가능한 항생제의 수가 점차 줄고 있는 상황임. 더욱이 슈퍼 박테리아에 감염된 환자는 국내외적으로 증가하고 있음. 따라서 새로운 치료법을 위해 효과적인 β -lactamase 저해제

시장은 크게 증가될 것임.

- 나. 또한 사람과 가축 치료용 외에도 환경 소독 및 항균제 미국시장이 약 1조원에 달하는 것을 감안할 때 연구 성과의 다양한 사업화 가능성과 파급 효과는 매우 큼.
- 다. 본 연구를 통해서 새롭게 개발된 β -lactamase 활성 저해 선도 물질과 β -lactamase 간의 결합 구조는 치료제 개발에 직접 이용될 수 있어 특히 출원이 가능함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국외현황

1. 국제적 항생제 시장은 대표적인 항생제들 각각 개별적으로도 약 1조원 이상의 시장을 확보하고 있으며, 치료용 목적으로 쓰이는 약제 중 판매량 측면에서 두 번째로 큰 시장을 차지함. 최근에는 기존의 약제에 저항성을 가지는 슈퍼박테리아 처리를 위한 새로운 항생제 개발을 중심으로 연구가 수행되고 있음. 지난 60년 동안 약 10가지의 다른 작용기작을 가지는 항생제들이 개발되어 왔으며 [그림 2], 1998년 이후는 단지 두 가지의 새로운 작용기작을 가지는 항생제만이 개발됨. 이는 신규 표적에 기반을 둔 새로운 작용기작을 가지는 항생제의 개발이 얼마나 힘든지를 보여주는 것임.
2. 기존 항생제에 대한 미생물의 빠른 저항성 획득 능력은 신약개발의 가치를 높이고 있으며, 현재는 대부분의 연구기관과 제약업체는 새로운 작용기작을 가지는 항생제 개발을 위한 새로운 표적을 찾는 데 큰 노력을 들이고 있음. 다양한 기술적인 문제들에도 불구하고 새로운 타입의 항생제 필요성은 더욱 더 커지고 있으며, 그 개발은 선택이 아닌 필수적인 상황임.
3. 현재 인류는 일상 생활환경에서 인간에게 유해한 수많은 세균이나 곰팡이 등의 미생물에 노출되어 있음. 이들 세균이나 곰팡이들은 그 종류가 대단히 많을 뿐만 아니라 토양, 대기, 하천, 해수 등 자연계에 광범위하게 분포하고 있음. 이중 병원성 미생물은 인간에게 피해를 주고 있으며, 국가 및 사회적으로 큰 문제를 일으키기도 함. 1997년에 일본에서 크게 사회문제가 되었던 O-157균 과동이 한 예이고, 작년 5월부터는 전 유럽에서 독일 북부 한 농장의 채소 새싹에서 발생한 것으로 전해지고 있는 대장균으로 인해 14개 국가에서 50여명이 사망하고 수천여명의 환자가 발생하였음.
4. 항균 기능성 물질은 인간 및 가축 대상의 항생제 용도와는 다르게 환경에 항균 및 방부효과를 위해 사용하는 것으로 미국의 시장만도 약 1조원이 넘는 등 대규모 시장을 보유하고 있음. 이 물질들은 인체에 유해성 유무(저독성) 외에도 항균효과의 지속성, 자외선에 대한 안정성, 내열성, 환경 균주에 대한 효과, 조류, 곰팡이, 박테리아 동시억제, 제작단가 등이 제품 개발 시 중요하게 고려됨.

대분류	중분류	200 대 의약품 내 주요 제품 및 발매기업
베타-락탐계	세팔로스포린	로셀틴(Roche), 진네트(GLX), 세과플로(Eli Lilly)
	페니실린	오구멘틴(Smithkline Beecham)
퀴놀론		싸이프로(Bayer)
마크로라이드		지스로텍스(Pfizer), 비악신(Abbott)
카바페넴		프리텍신(Merck)
항진균계	아졸계	스포라녹스(J&J), 디플루칸(Pfizer)
	알릴아민계	라미실(Novartis)

그림 2. 항생제의 주요 대 분류와 주요 제품 발매기업

5. EU 연합에서는 이미 항생제 내성 균주 문제로 인해 가축에 대한 항생제 사용을 처방 목적 외에는 금지시킨 상황이고 미국 FDA 에서도 다제내성 병원균을 야기 시킬 가능성이 있다고 판단하여 가축에 대한 생장 증진 목적의 항생제 사용을 금지하려는 움직임이 일고 있음. 항생제를 사용한 가축의 섭취로 인해 인체에 질병을 유발하는 병원균의 항생제 내성이 증가하는지에 대한 논란이 있지만, EU에서는 항생제 내성 생성 기작과 새로운 항생제 개발을 위한 연구에 총 3억 5천만 유로의 지원금을 책정한 상황임 [그림 3].

6. 2013년 기준, cephalosproing계 3종, carbapenem계 2종, monobactam계 2종에 대한 임상시험이 AstraZeneca, Merck 등 다국적 제약회사들의 주도로 진행되고 있음. 이들 항생제 모두 β -lactamase (clavulanic acid, diazabicyclooctane 및 boron 화합물 RPX7009)와의 혼합제제로 개발되고 있음 [16].

7. 항생제 개발에 있어서 최신 연구 경향은 육상생물을 주요 생물소스로 이용하는 신규 항생제 탐색작업과 동시에 해양생물을 이용한 항 MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) 치료제 연구개발에 주력하고 있음. 그 결과 1990년대 이후 뛰어난 항 MRSA 활성을 보이는 다수의 해양천연물이 해양박테리아로부터 발견되었으며 [그림4], 일부 해양천연물은 vancomycin (MIC, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 보다 높은 활성을 보이고 있음 [표1]. 특히 이들 항생물질 또는 항MRSA 물질들은 기존의 항생제들과 화학골격이 상이하어 앞으로 해양박테리아는 신규 항생제의 새로운 공급원으로 많은 관심을 받고 있음. 현재 개발되고 있는 해양박테리아 유래 항 MRSA 물질들은 기존 시판중인 항생제들과 함께 환자에 투여하는 방식인 다제병용요법(combination therapy) 형식으로 임상 적용되고 있음.

8. WHO (The World Health Organization)은 인류건강을 위협할 3대 요인 중 하나로 항생제 내성을 지목했으며 최근 ECDP(The European Centre for Disease Prevention)과 IDSA(The infectious Diseases Society of America)는 공동으로 분석한 현황 보고서를 통해 현재까지 신규 항생제 후보물질 중 기존의 항생제들과 비교하여 우위를 점하는 물질이 없어 내성균에 대항할 수단이 없는 최악의 상황이 발생할 수 있다는 경고를 보낸바 있음. 따라서 신규 항생제에 대한 집중적인 연구개발 노력이 요구되고 있는 심각한 상황을 인식한 미국과 유럽에서는 각각 IDSA과 ECDP 주도로 2020년까지 10개(미국), 5개(유럽)의 신규항생제 확보를 목표로 10x'20계획과 5x'20을 수행 중에 있음.

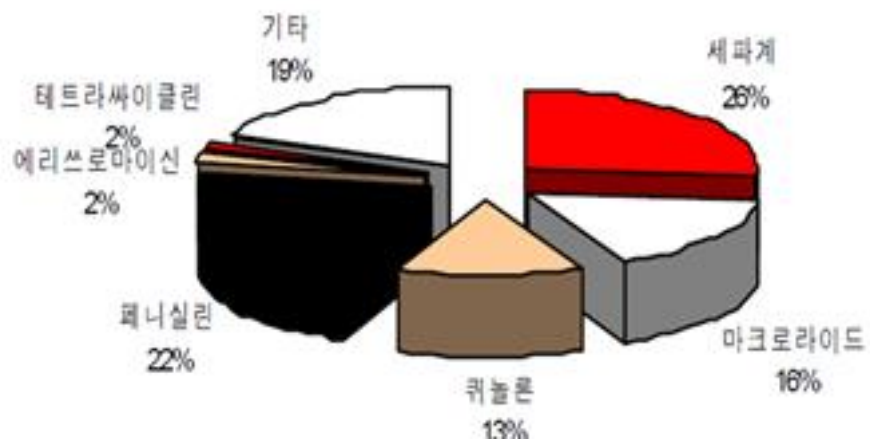


그림 3. 항생제 분류별 시장 점유율 [15]

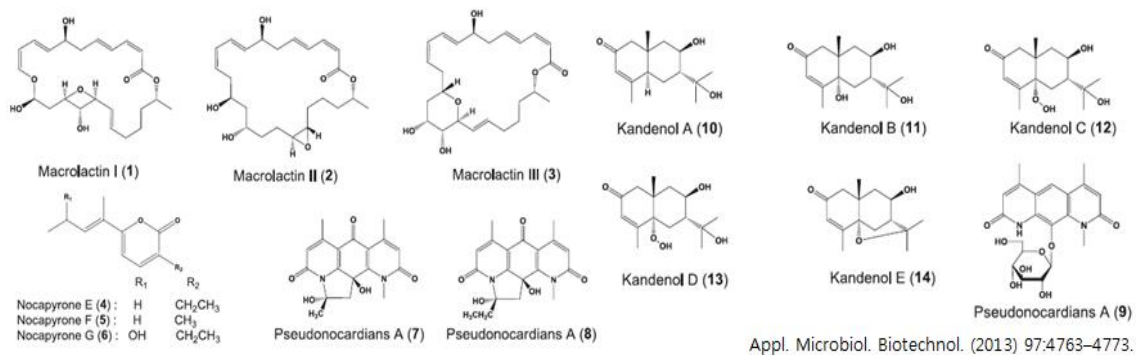


그림 4. 해양박테리아 유래 신규 항생제

Metabolites	MIC ^a	Source	References
Abyssomicin C (15)	4 µg/mL	<i>Verrucosipora</i> AB-18-032	Riedlinger et al. 2004
Actinomycin V (16)	0.1–0.4 µg/mL	<i>Streptomyces</i> sp. AM045	Lim et al. 1995
Andrimid (17)	2 µg/mL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Needham et al. 1994
Bogorol A (18)	2 µg/mL	<i>Bacillus laterosporus</i> PNG276	Barsby et al. 2001
Chlorinated dihydroquinones (19–21)	1.90–1.95 µg/mL	Actinomycete CNQ-525	Soria-Mercado et al. 2005
2,4-Diacetylphloroglucinol (22)	0.25–1 mg/mL	<i>Pseudomonas</i> sp. AMSN	Isnansetyo et al. 2001
Fijimycin A (23)	4–16 µg/mL ^b	<i>Streptomyces</i> sp. CNS-575	Sun et al. 2011
Fijimycin C (24)			
Etamycin A (25)			
Lipoxazolidinone A–C (26–28)	2 µg/mL	Marine actinomycete strain NPS8920	Michelle et al. 2008
Loloatins A–D (29–32)	0.5–8 µg/mL	<i>Bacillus</i> sp. MK-PNG-276A	Gerard et al. 1999
Lynamicins A–D (33–36)	2.2–6.2 µg/mL	<i>Marinispora</i> sp. NPS12745	McArthur et al. 2008
MC21-A (37)	1–2 µg/mL	<i>Pseudoalteromonas phenolica</i> O-BC30 ^T	Isnansetyo and Kamei 2003; 2009
MC21-B (38)	1–4 µg/mL		
Marinopyrroles A (39)	0.31–0.61 µM ^c	<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-418	Hughes et al. 2008
Marinopyrroles B (40)	1.1 µM ^c		
Moiramides B (41)	0.5 µg/mL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Needham et al. 1994
Pestalone (42)	37 ng/mL	<i>Pestalotia</i> sp. CNJ-328	Cueto et al. 2001
α-Pyrone-I (43)	4 µg/mL	<i>Pseudomonas</i> sp. F92S91	Singh et al. 2003
α-Pyrone-II (44)	16 µg/mL		
Furanone derivative (45)	16 µg/mL		
Sufoalkylresorcinol (46)	12.5 µg/mL	<i>Zygosporium</i> sp. KNC52	Kanoh et al. 2008
Thiomarinol A–G (47–53)	≤ 0.01 µg/mL	<i>Alteromonas rava</i> SANK 73390	Shiozawa et al. 1993, 1995, 1997
TPU-0037-A–D (54–57)	3.13–12.5 µg/mL	<i>Streptomyces platensis</i> TP-A0598	Furumai et al. 2002

^aMIC: values represent the lowest compound concentration inhibiting the visible bacterial growth

^bMIC₁₀₀: values represent the lowest compound concentration inhibiting 100 % of bacterial growth

^cMIC₅₀: values represent the lowest compound concentration inhibiting 90 % of bacterial growth

표 1. 해양박테리아 유래 항 MRSA 활성 물질

9. 현재 임상적용 중인 대부분의 항생제들은 육상생물 유래 물질이고 항생제 도출을 위한 물질 탐색은 주로 육상 시료 중심으로 수행되고 있어 이들로부터 신규 항생물질을 발견할 가능성은 매우 낮다고 볼 수 있음. 따라서 거대한 생물 다양성의 보고이자 미지의 신세계인 해양으로부터 신규 항생제를 도출하려는 노력이 필요함.
10. 스크립스 해양연구소의 William Fenical 교수는 Santa Barbara 근해에서 분리된 *Streptomyces* 박테리아로부터 기존의 항생제와는 전혀 다른 화학구조를 갖고 있는 anthracimycin를 발견했음. 1928년 Fleming이 페니실린을 발견한 이후 현재까지 겨우 25종의 항생제가 추가로 개발된 사실에 비추어 이 물질이 갖고 있는 화학구조의 신규성으로 인해 다수의 anthracimycin 유도체로부터 후속 항생제들이 속속 개발될 것으로 예상되어 항생제 이용에 있어서 선택의 폭을 넓힐 수 있을 것으로 기대됨.
11. 스페인 바르셀로나대학의 Alvarez교수는 스페인 남부 Alicante 근해에서 채집된 해양박테리아 *Kucuria sp.*의 배양액으로부터 분리된 baringolin이라는 신규 항생물질의 전합성을 통해 복잡한 입체화학구조 규명과 다수의 유도체를 도출했음. Baringolin은 2,3,6번에 치환체가 도입된 pyridine 구조를 포함하고 있는 *d* 계열 thio 펩타이드로서 *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Propionibacterium acnes*, and *Bacillus subtilis* 등의 병원성 박테리아 스트레인에 대해 nanomolar 수준의 활성을 보이는 중요 해양천연물임 [그림 5]. Alvarez교수의 연구는 앞으로 화학합성을 통해 화학구조는 단순화되고 활성은 개선된 Baringolin 유도체를 도출하는데 중요한 정보를 제공할 수 있음.
12. 브라질의 Thompson 연구팀은 남대서양에 서식하는 해면 *Arenosclera brasiliensis*에 공생하는 microbiome의 metagenome 연구를 통해 Polyketide synthase의 다양성을 규명함 [17].
13. 호주 연구팀은 해면 6종으로부터 공생미생물의 metagenomics 해독을 통해 공생-진화관계의 규명을 시도하는 한편 [18], 천연물 생합성 유전자를 탐색함 [19].
14. 포르투갈의 Costa 연구팀은 담수 해면인 *Ephydatia fluviatilis*에 공생하는 다양한 *Pseudomonas* 종들의 whole genome fingerprint를 통해 이들의 다양성을 규명하는 한편 이들이 광범위 항생물질을 생산함을 확인함 [20]. 이 외에도 다양한 연구팀이 다양한 해면으로부터 microbiome 분석함으로써 천연물 생합성 유전자를 발굴하고자 하는 시도를 하고 있음 [10,11].

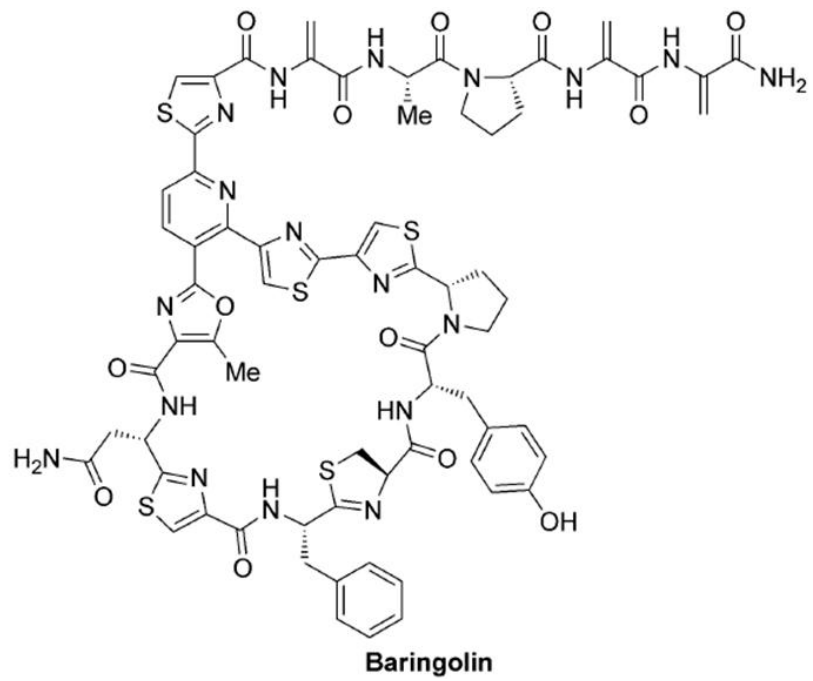


그림 5. Baringolin의 구조

15. 미국의 밴더빌트 대학교와 포틀랜드 주립대학교의 연구팀은 eLife에 '상당한 종 사이에서 수평적 유전자전달이 광범위하게 일어 난다'라는 사실을 밝힘으로 고세균이 신약의 원천이 될 수 있음을 강력히 시사했음. 연구팀은 Aciduliprofundum boonei라는 고세균에서, GH-25 뮤라미데이스(GH25-muramidase)라는 효소의 유전자를 발견함. GH-25 뮤라미데이스는 세균들이 흔히 보유하고 있는 효소로 이 효소를 이용하여 자신의 세포벽을 리모델링 할 수 있음. 세균뿐만 아니라 박테리오파지는 이 효소를 이용하여 세균의 세포벽에 구멍을 뚫어 세균의 몸속에 침입하기도 함. 연구진은 이번 연구에서 세균의 항균 유전자가 고세균은 물론 박테리오파지, 진균, 곤충, 식물에까지도 전달됐다는 사실을 밝혀냄.

16. 독일 Helmholtz centre for infection research 에서는 2014년부터 미생물 기반의 천연물에서 유래 된 새로운 항생제를 연구하기 위해 기관 내 부서들간의 협력연구를 진행한다고 발표하였음. 그리고 천연물 항생제를 찾게 되면, 그 천연물의 생합성 기작을 연구하여 미생물을 통한 생산시스템을 개발 할 수 있는 연구 또한 병행할 것이라고 발표함.

17. Staphylococcus aureus (포도상구균 일종)는 독일내에서 병원성 세균으로 잘 알려져 있는 균주로, 이 균주는 많은 항생제에 대한 저항성을 가지고 있어서, 다약제 내성균(Multi-resistant staphylococcus)로 불림. Helmholtz centre for infection research 연구팀은 토양내 Myxobacteria에서 유래 된 두 종류의 항생제 후보물질을 발견함.

18. 2014년 영국 정부 항생제 내성 대책위원회는 연구보고서를 통해 항생제 내성 확산이 지구온난화보다 시급한 위협 요인으로 떠올랐다고 밝힘. 보고서에서는 2050년에는 슈퍼박테리아 감염 사망자가 세계적으로 연간 1000만 명씩 발생할 수 있다고 경고했으며 항생제 내성 확산에 따른 세계 각국의 대응비용은 연간 63조파운드(약 11경원)로 치솟을 것으로 전망함.

19. 일본 도쿄대 미생물학과 하야모토 히로시 조교를 비롯한 연구팀은 메타실린 황색포도구균(MRSA)을 살균하는 효과가 있는 새로운 항생물질인 라이소신E를 발견함. 기존의 항균제는 투여한지 30분 경과 후 겨우 MRSA를 살균을 시작하는데 비해, 라이소신E는 1분만에 99.9% 살균하는 것으로 나타남. 본 연구팀은 7~8년 후 실용화를 목표로 연구 중임.

20. 미국 애리조나주립대학 바이오디자인연구소 산하의 감염증 및 백신학 센터의 Yixin 박사와 Wei Kong 박사는 사람을 포함하여 모든 생명체들이 생산하는 강력한 방어인자인 항미생물 펩티드로 (cationic antimicrobial peptides: CAMP)부터 세균이 생존하기 위하여 이용하는 기작을 규명함. 또한 이번 연구에서는 이 2중요소 시스템의 기능을 차단 하면 질병을 유발시키는 세균이 항미생물 펩타이드의 살상 효과의 희생자가 될 수 있음을 밝혀냄.
21. 미국 보스턴의 Northeastern University의 김 Lewis 교수는 이런 MRSA에 작용할 수 있는 신형 항생제인 'teixobactin'을 발견했다고 Nature에 보고함. 실험쥐를 사용한 실험에서 이 신형 항생제는 MRSA 및 다른 병원균을 없애는데 효과적인 것을 실험을 통해 증명했지만, 안타깝게도, 세포벽이 없는 그람 양성균 (gram-positive)에만 유효한 것으로 나타남.
23. 미국은 국가적인 차원에서 항생제 내성에 대응하고 있음. 미국은 2015년부터 향후 5년간 국가적인 차원의 전략으로 새로운 항생제를 찾고, 항생제 내성 감염을 현재보다 더 빠르게 진단할 수 있는 방법을 찾으라고 여러 기관들에게 주문함. 또한 항생제 내성 감염을 신속하게 찾는 기술을 개발한 사람에게 20만 달러 상금을 수여하기로 함. FDA에서는 건강한 가축을 생산하기 위해 사용되는 항생제의 남용을 막기 위해, 수의사의 처방에 의해서만 약을 구입할 수 있게 시행하라고 명령했고, 현재 26개의 주요 생산업체에서 이 규율을 적용하고 있다고 함. 또한 미국 내 the President's Council of Advisors on Science and Technology (PCAST)에서는 위 전략을 구축하기 위해 기존보다 2배의 증대 된 900만 달러를 매년 투입할 것을 제안함. 그리고 항생제 내성 및 축산업계를 위한 대체 항생제를 개발하는 기초연구에도 더 투자할 것을 제안함.
24. 우리 몸에서 공생하는 미생물들은 수많은 종류의 약과 유사한 분자 (drug-like molecules)를 만들 수 있는 유전정보를 가지고 있다고 알려짐. University of California (San Francisco) Michael Fischbach 연구팀은 질 (vagina) 안에서 공생하고 있는 미생물이 만드는 thiopeptide가 피부에 감염되는 미생물 (ex. Staphylococcus aureus)을 죽이는데 효과적이라는 연구 결과를 Cell지에 게재함. 이번 연구는 microbiome (동물 혹은 식물과 공생하는 미생물이, 동물 혹은 식물과 상호작용하여 이로운 역할을 한다라는 이론) 연구자들이 궁금해 하는 '어떻게 미생물이 우리 건강에 영향을 끼치는가?' 에 대한 질문에 실마리를 제공해 준 것이라 사료됨.

25. 스탠포드대학 의학부의 연구팀은 청력 손실, 신장 손상, 그 외의 부작용이 유발되지 않고도 마우스를 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 이미노글라이코시드 계열의 항생제인 N1MS를 개발해 냈. 기존의 아미노글라이코시드 계열의 항생제는 사람들의 목숨을 구하는데 필수적이었으나 이들 항생제가 투여된 환자들의 20~60%가 부분적인 또는 완전한 청력 손실을 경험하고 있는 것으로 추산 되었음. 기존 아미노글라이코시드 항생제를 독성이 없는 다른 약물로 대체 할 것으로 기대함.
26. 미국 세인트루이스대학 Mee-Ngan F. Yap 박사 연구팀은 포도상구균이 아지스로마이신(azithromycin) 및 관련 항생제들에 저항을 발생시키는 기작을 제시함. 보통 포도상구균은 사람들에게 흔히 감염되면서도 저항성 발생이 심각한 세균으로 전세계의 여러 곳에서 의사 및 환자들을 위협하고 있음. 이번 연구에서 세균이 아지스로마이신에 대하여 저항성을 발생시키는 진화적 기작을 보여주는 동시에 보다 효과적인 항생제 개발의 길을 열어줄 것으로 기대함.

제 2절 국내현황

1. 국내에서도 다제내성균 감염환자가 발생하면서 다제내성균 환자를 위한 슈퍼항생제 도입 및 개발에 국내 제약사들의 관심이 높아지는 상황으로 연간 1조원 이상의 항생제 시장이 형성되어 있음 [표 2].
2. 동아제약과 녹십자, 인트론 바이오와 크리스탈지노믹스 등의 국내 제약회사 및 벤처 회사들이 꾸준히 항생제 내성을 지닌 박테리아에 대한 신규 항생제 개발을 계속하고 있음. 동아제약의 'DA-7218'은 그람양성균 및 슈퍼박테리아 MRSA에 효능이 있는 항생제로 미국 트라이어스사가 파트너로 개발에 참여중이며, 현재 미국 임상 3상을 진행 중임. 녹십자는 일본 아리젠 사와 "WAP-8294A2"라는 슈퍼 항생제의 임상실험을 공동으로 추진하고 있으며, 인트론바이오테크놀로지는 슈퍼박테리아를 포함, 항생제가 잘 듣지 않는 내성균 감염증에 효과적인 바이오신약을 개발하고 있음. 크리스탈제노믹스는 항생제 개발에 표적이 되는 단백질의 삼차원 구조 규명을 중점적으로 수행하고 있음. 또한 한국생명공학연구원의 바이오시스템연구분부는 특정 표적 병원균의 유전정보를 해독해 독성문제를 개선한 '폴리믹신'항생제를 생산하는 기술 등을 연구하고 있음.
3. 이화여대 윤여준 교수팀이 polyketide의 생산량을 늘리기 위하여 생합성 유전자군을 방선균에서 발현시키는 연구들을 진행하였으나 (22) metagenomics를 통한 생합성 유전자 발굴 사례는 볼 수 없음.

업 체	주요 품목	2006년			2007년			2008 상반기
		상반기	하반기	계	상반기	하반기	계	
한미약품	트리악손	285	309	594	372	393	765	414
	클래리							
유한양행	메로펜	321	356	677	364	347	711	362
	이세파신							
일동제약	후루마린	248	289	537	296	273	569	309
	후로목스							
CJ	바난	197	199	396	210	225	435	242
	사이틀신							
종근당	아벨록스	170	170	340	194	201	395	209
	크목실린							
제일약품	크라비트	170	173	343	190	182	372	207
	옵니세프							
국제약품	국제세파제돈	145	166	311	200	190	390	204
	국제세포테탄							
대웅제약	씨프러스	162	168	330	183	186	369	200
	셀바실린							
중외제약	파세틴	124	127	251	130	154	284	168
	프리페넴							
삼진제약	제티암	167	155	322	172	164	336	167
	타이록신							

▲ 업체별 항생제 매출 순위(단위: 억원)

표 2. 국내 연간 1조원 규모의 항생제 시장

4. 산림 토양으로부터 항진균 유전자군을 발굴하고 이를 대장균에서 생산하는 연구가 진행 됨 [21].
5. 국가과학기술연구회는 2014년 11월 26일 양재동 엘타워에서 "병원균의 반격 과학기술로 극복한다"를 주제로 두번째 국민안전포럼을 열었음. 이번 포럼에서는 감염병 위기 대응 방안에 대해 "위험 징후를 조기에 감시하는 시스템과 대응이 가능한 의사결정 컨트롤타워 구축"과 관련하여 출연연 중심의 산학연 클러스터를 구축해 역량을 모아야 함이 주장 됨. 또한 감염병 위기에 대응하기 위한 과학적, 군사적 측면 등에서도 출연연의 역할이 중요하며 출연연마다 장점을 중심으로 역할을 분담하는 네트워크 강화 필요성이 주장 됨.
6. 2014년 중국 베이징에서 열린 아시아태평양경제협력체(APEC) 고위급 회담에서 송재훈 삼성서울병원 원장이 우리나라를 대표해 제안한 아태지역의 항생제 내성 문제 해결을 위한 APEC가이드라인이 정식 채택되었음. 이 일환으로 아시아 지역 항생제 내성에 대한 국제공조의 첫걸음인 '캠페인 4'가 아시아 각국에서 시작됨. 송재훈 원장이 설립한 아시아태평양 감염재단이 각국과 협력해 항생제 내성의 위험성을 알리고, 이에 대한 대책을 마련하는 아시아 지역 최초의 국제 캠페인임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구개발수행 내용

- 독창적이고 확고한 선행 연구 결과를 바탕으로 과제 진행
 - 본 연구는 AmpC의 3차 구조 규명 결과 이 효소의 활성 부위에 의도치 않은“미지의 물질 X”가 공유 결합되어 있다는 사실 확인으로부터 시작됨.
 - 이는 미지의 물질 X가 한 번 결합하면 효소는 영구히 그 활성을 잃게 됨.
 - 따라서 미지의 물질 X는 AmpC 효소 저해제 개발을 위한 최고의 선도 물질임.
 - 현재의 저해상도 구조에서는 "X"의 전체 구조를 알 수 없으나 특정 구조적 뼈대를 가지고 있음.
 - 이를 통해 특정 구조적 뼈대를 포함하고 있으며 상업적으로 구매 가능한 물질들을 대상으로 AmpC 효소 활성 억제 실험을 실시하여 기대한 활성을 보이는 물질을 확보함 (Lead I).

- 기존의 저해제와 구조적 뼈대가 완전히 다른 저해제 개발
 - 임상에서 사용되고 있진 않으나 실험용으로 사용되고 있는 AmpC 효소에 대한 저해제들은 거의 모두 boronic acid를 기본 구조 가짐 [그림 6].
 - 기 확보한 Lead I에 대한 후속연구와 함께 해양천연물을 기반으로 유망 항생물질을 탐색하여 독창적인 화학골격을 갖고 있는 AmpC 저해물질을 도출하는 노력을 병행함.
 - 본 연구에서는 선행연구결과인 AmpC의 구조로부터 확인된 미지의 물질 X를 기본 구조로 이용하여 저해제를 개발하고자 함.
 - 이를 통해 'best-in-class'가 아닌 'first-in-class'로서 세계를 선도할 혁신적인 신규 억제 물질을 개발하고자 함.
 - 이를 통해 추격형 개발이 아닌 세계를 선도할 수 있는 신규 억제 물질을 개발하고자 함.

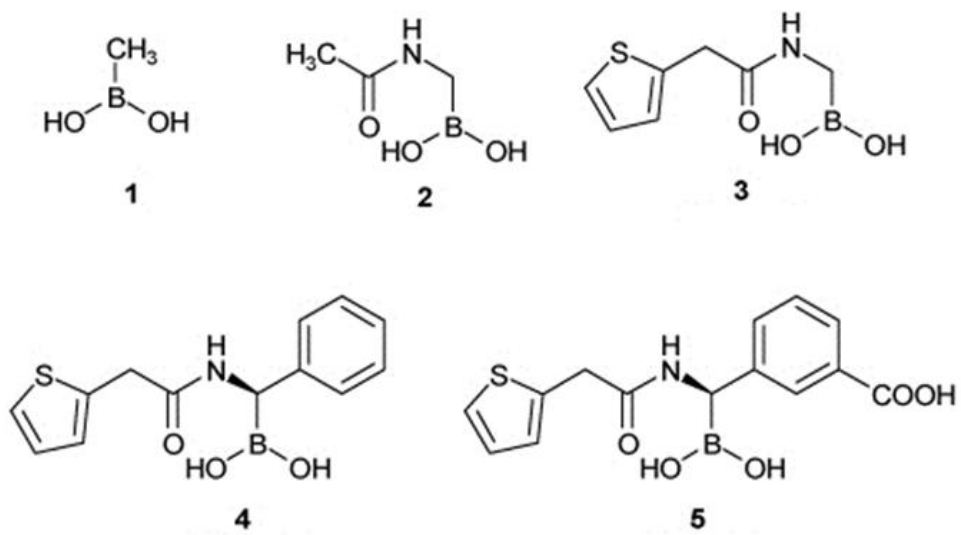


그림 6. Boronic acid [1]와 다양한 R 그룹을 가진 boronic acid의 변형체 [2-5].

- 구조 기반 신약 설계 기술을 적용하여 저해제의 활성 극대화
 - 다양한 병원성 세균의 AmpC와 Lead I간의 결합체 구조를 규명하고 이를 바탕으로 Lead I의 AmpC에 대한 결합력을 극대화 시킬 수 있는 구조 변형 아이디어를 획득.
 - Lead I의 효율적인 합성법을 개발하여 이를 기반으로 다양한 유도체를 확보하고 이들에 대한 활성분석을 거쳐 AmpC 억제 활성이 개선된 유도체를 도출.
 - 선별된 변형체와 AmpC간의 결합체 구조를 규명한 후 이 구조를 이용하여 Lead I에 대한 2차 구조 변형을 실시.
 - 최적의 저해제 개발이 완료될 때까지 이와 같은 과정을 반복 실시.

- 다양한 병원성 장내 세균에서 발견되는 class C β -lactamase를 표적으로 선정
 - AmpC β -lactamase는 대표적인 class C 계열의 효소로서 저해제 개발을 위한 모델 단백질로 사용되고 있음.
 - 본 연구에서는 야생형 AmpC 효소뿐만 아니라 기질에 대한 특이성이 확장된 (extended substrate spectrum) 돌연 변이 AmpC를 대상으로 저해제 개발 시도.
 - 또한 *Acinetobacter* spp.를 포함한 다양한 병원성 장내 세균들의 AmpC 효소를 활용하여 광범위 AmpC 효소들에 대해 억제 효과를 발휘하는 저해제 개발.

- 동물 모델에서 효과를 보이는 class C β -lactamase 저해제 개발
 - 개발된 저해제의 임상 적용 가능성을 높이고자 단백질 차원에서 효소 활성을 억제하는 물질의 개발이 아니라 마우스 모델에서 효과를 발휘하는 저해제 개발을 목적으로 함.

- 해면 공생미생물로부터 활성 해양천연화합물 탐색
 - 미생물학, 천연물화학 등의 전통적인 MBT 기술과 IT 기술을 근간으로 하는 생물정보학의 융합연구를 통한 성과 창출 추진.
 - 국내외 네트워크를 활용한 관련 연구팀의 인프라 활용.
 - 기존 연구 성과를 활용하여 집중 연구가 필요한 해면 선택.
 - 급속도로 발달하고 있는 NGS 장비의 효과적 활용.
 - UHPLC / MS 등 미량 대사산물의 분석 장비 활용을 통해 대사산물 profiling으로 분석 시간 단축 추진.

제 2절 연구결과

1. 기확보된 선도물질의 특성 규명

가. 선도물질과 β -lactamase간의 결합 구조 규명

○ 효소 활성 부위 관찰

(1) 선도물질과 β -lactamase간의 결합 구조

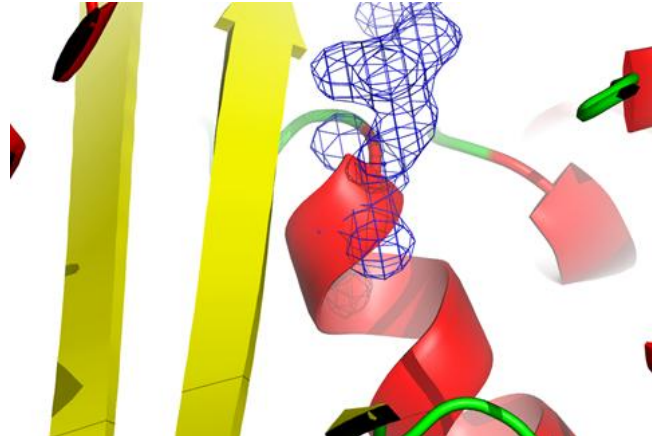


그림 7. β -lactamase와 선도물질의 결합구조

(2) 효소 활성 부위의 전자 밀도

1.8 Å resolution $F_o - F_c$ map at 5 σ

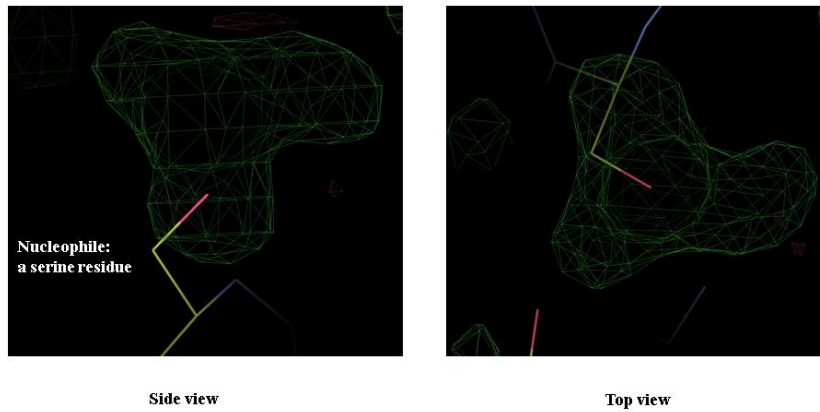


그림 8. β -lactamase의 활성 부위 전자 밀도

(3) 선도물질 Cha-I 확인

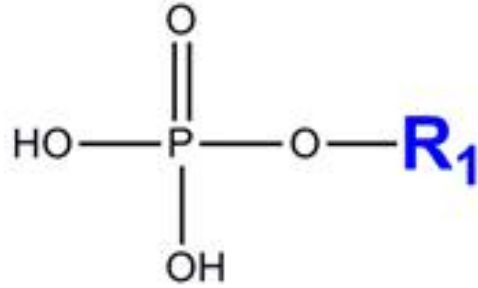
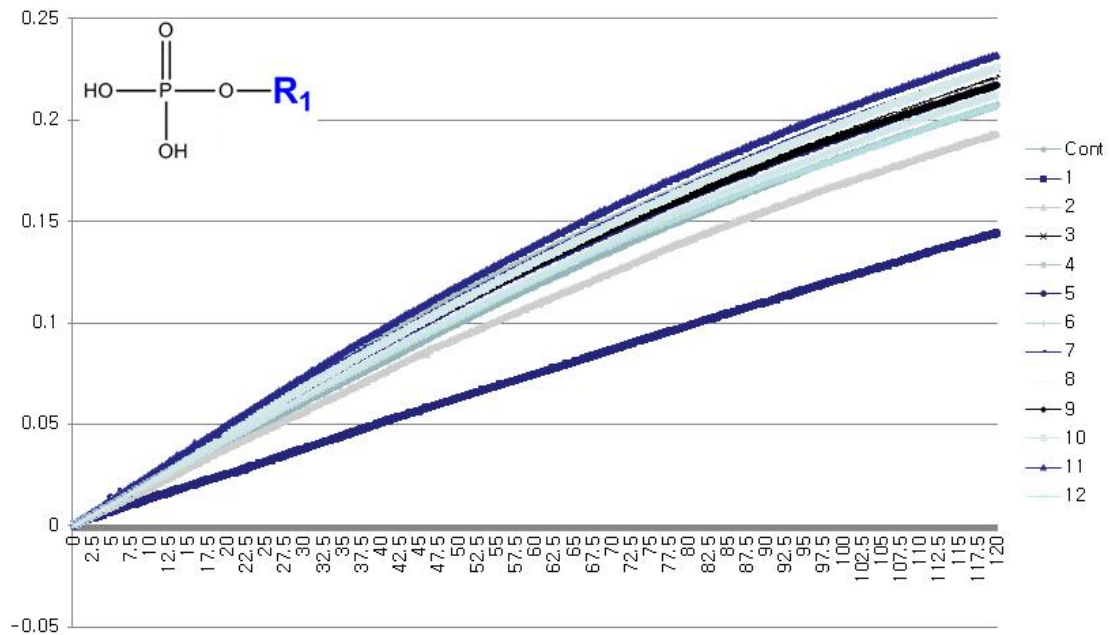


그림 9. Cha-I의 구조

나. 선도물질 추가 확보

○ Cha-I과 구조적으로 유사한 천연물 스크리닝

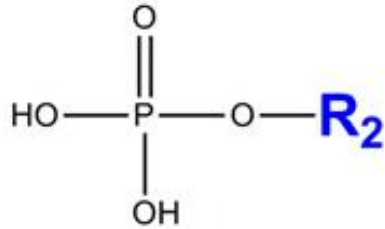
(1) 효소 활성 저해 측정



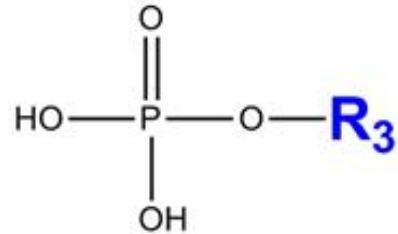
pH: 7.0, Enzyme: 2 μM, Substrate: 20 μM, Chemicals: 1 mM

그림 10. 천연물의 β-lactamase 활성 저해 측정

(2) 선도물질 추가 확보 (Cha-II, Cha-III)



Cha-II



Cha-III

그림 11. Cha-II (좌)와 Cha-III (우)의 구조

다. 효소반응 동력학 지표 측정

○ β -lactamase의 기질(nitrocefin)에 대한 정상상태 효소 동력학적 지표 (K_m , K_{cat}) 측정

(1) 반응조건

[S] (μM)	5	7.5	10	15	20	40	60	80	120	150	200
1mM NCF	5	7.5	10	15	20	40	60	80	120	150	200
1M MES pH 6.5	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Enz. (20 nM)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
TDW	895	892.5	890	885	880	860	840	820	780	750	700

표 3. 효소반응 동력학 지표 측정 조건

- 정상상태 효소반응 동력학 지표 결정

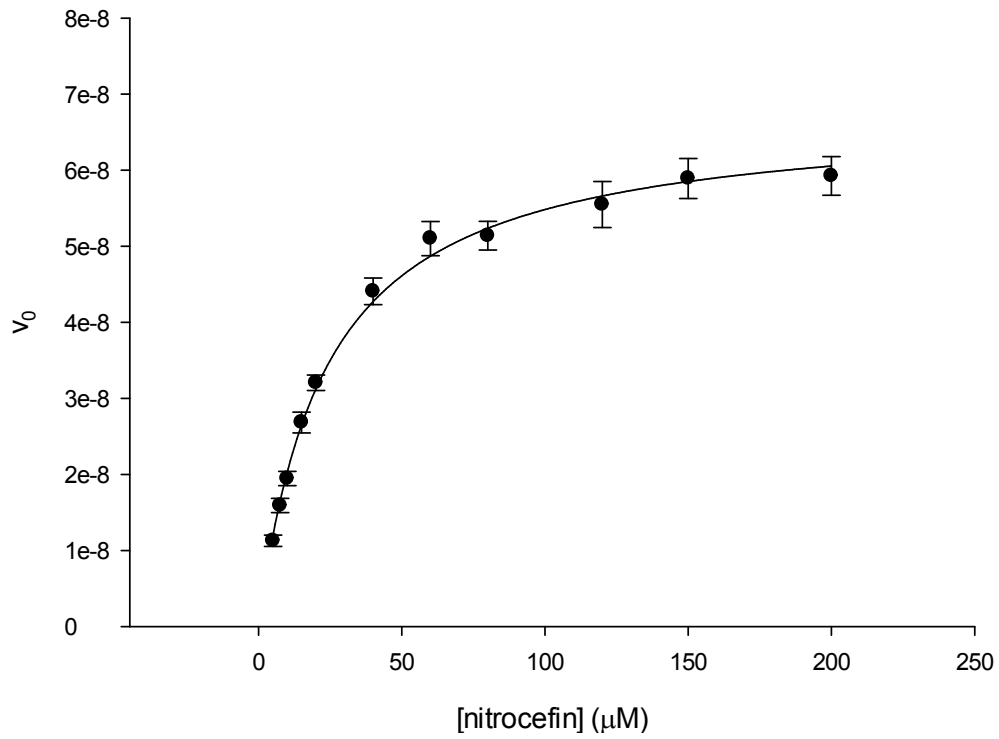


그림 12. 정상상태 효소반응 동력학 지표 확인

; 실험 결과 $K_m = 23.3 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 680.3 \text{ s}^{-1}$ 로 결정 되었음.

라. 효소활성 저해상수 결정

○ Cha-I, Cha-II, Cha-III의 효소활성 저해상수 결정 (K_i)

(1) Cha-I

그림 13. 나이트로세핀 농도에 대한 Cha-I의 β -lactamase 저해 활성
Lineweaver-Burk 그래프

; $K_i = 58.3 \mu\text{M}$

(2) Cha-II

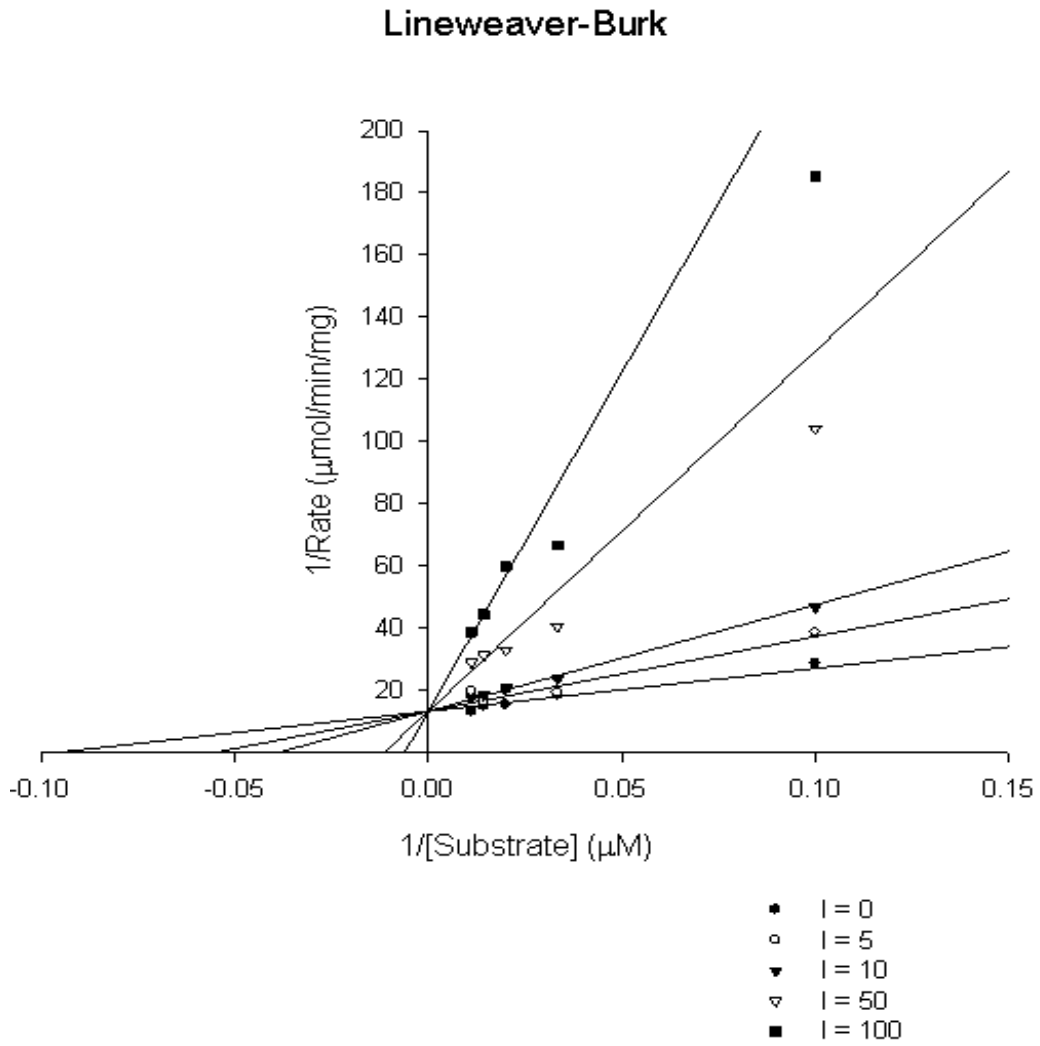


그림 14. 나이트로세핀 농도에 대한 Cha-II의 β -lactamase 저해 활성
Lineweaver-Burk 그래프

; $K_i = 12.6 \mu\text{M}$

(3) Cha-III

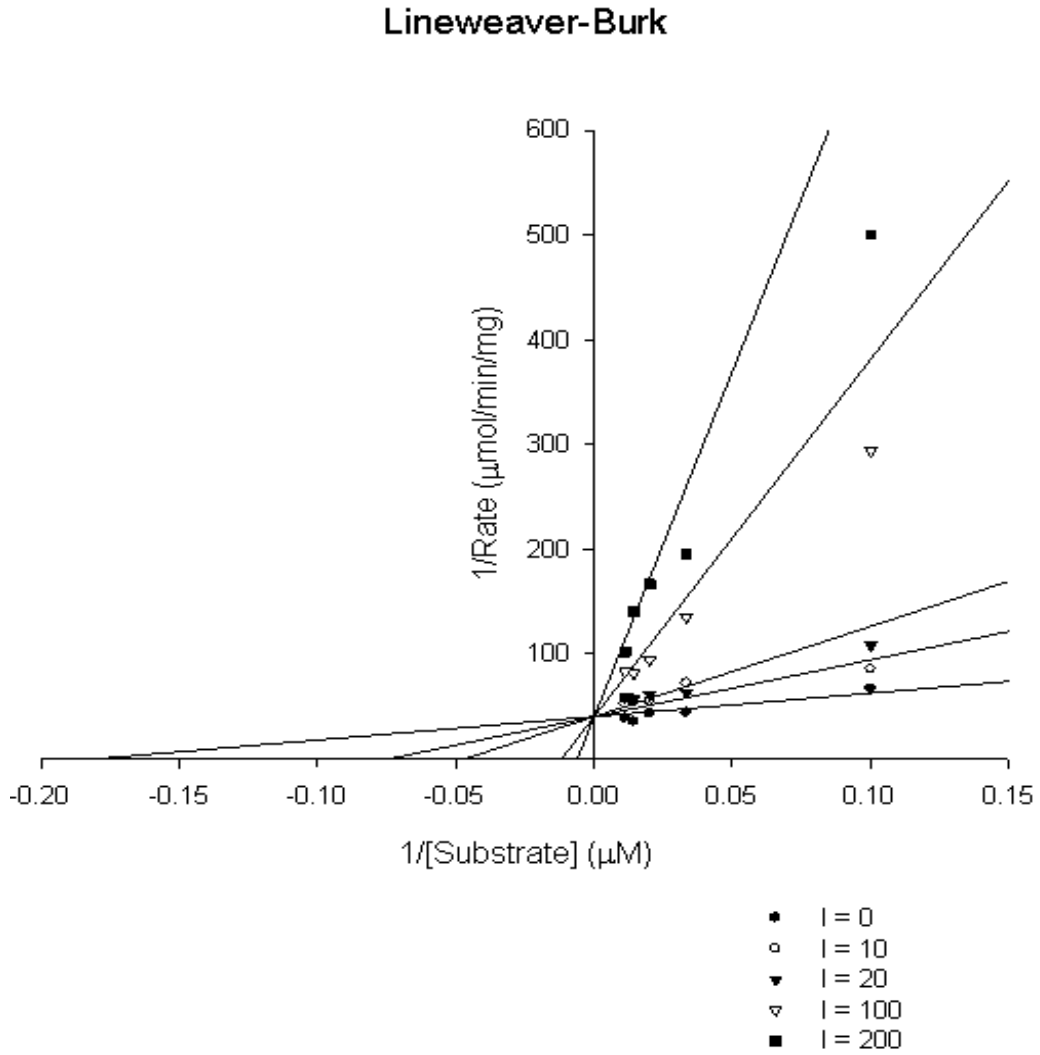


그림 15. 나이트로세핀 농도에 대한 Cha-III의 β -lactamase 저해 활성
Lineweaver-Burk 그래프

; $K_i = 8.2 \mu\text{M}$

2. 기확보된 선도물질의 구조적 변형 설계

가. 선도물질과 β -lactamase간의 결합 구조로부터 구조적 변형 설계

○ 선도물질과 β -lactamase간의 결합 구조 활성 부위 탐색

(1) Cha-I의 결합 구조로부터 phospho-carboxylic anhydride bond 가능성 확인

1.8 Å resolution $F_o - F_c$ map at 5 σ

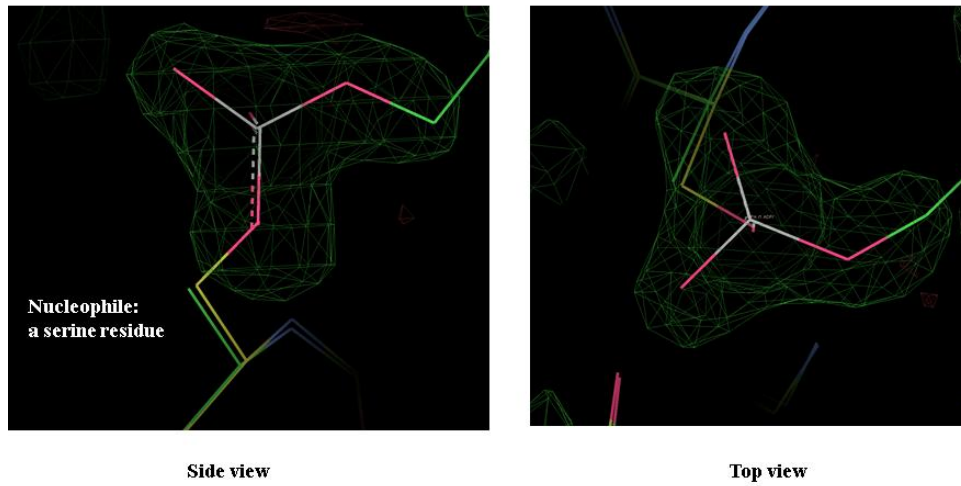


그림 16. 선도물질과 β -lactamase간의 결합 구조상의 인산기

(2) Cha-I'의 화학 합성

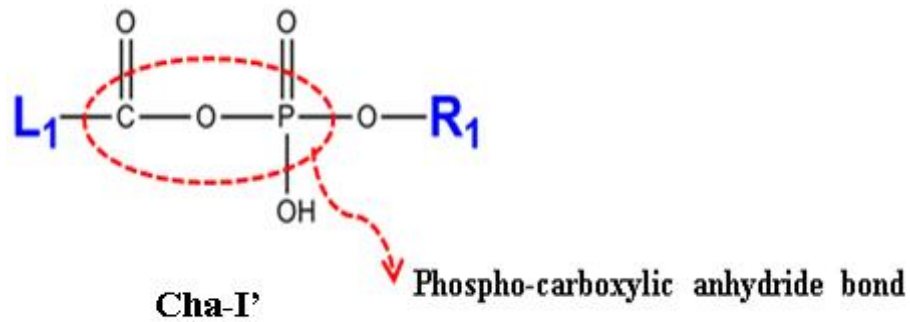


그림 17. Cha-I'의 구조

; Cha-I에 L1 group을 phospho-carboxylic anhydride bond 통해 결합시킨 화합물 (Cha-I')합성 완료

나. Cha-I'의 효소활성 저해상수 결정

(1) Cha-I'의 효소활성 저해상수 결정 (K_i)

Lineweaver-Burk

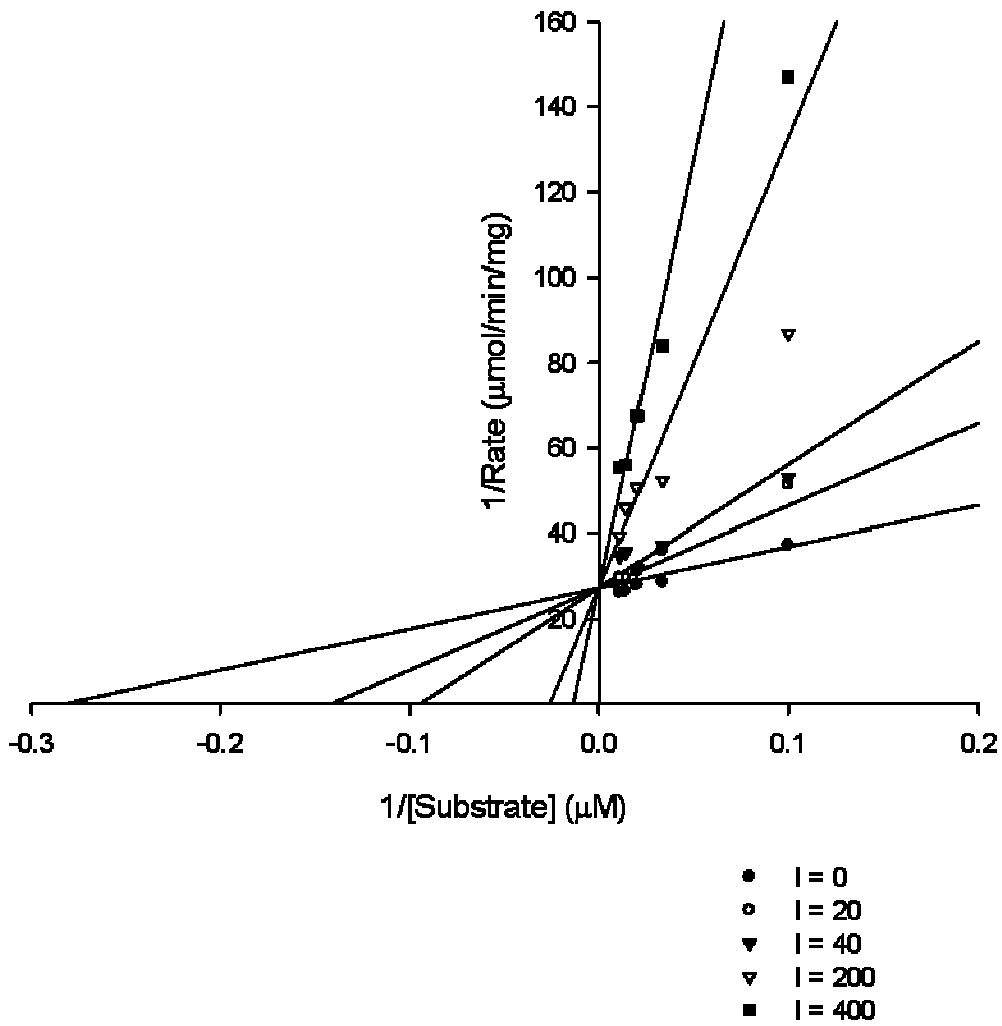


그림 18. 나이트로세핀 농도에 대한 Cha-I'의 β -lactamase 저해 활성
Lineweaver-Burk 그래프

; $K_i = 20.0 \mu\text{M}$

(2) Cha-I'의 항생제 내성 대장균에 대한 효과 확인

- 3세대 항생제 ceftazidime에 내성을 갖는 대장균에 대한 MIC 값 측정

(가) Cha-I'와 ceftazidime을 동시에 투약 시 항생제 내성 대장균의 MIC 값은 기존의 128 $\mu\text{g/ml}$ 에서 3 $\mu\text{g/ml}$ 로 40배 감소시킴을 확인

(나) Cha-I'의 β -lactamase 저해제 효과를 *in vivo*에서 증명

3. 메타게놈 분석 시스템 구축

가. 서버 구축 및 해면 후보 선정, 확보

(1) 차세대 염기서열 분석 기법을 이용한 metagenome 분석을 위한 서버 시스템 구축.

- 효율적인 분석 시스템 구성을 위해 데이터 분석을 위한 메인서버와 대량의 염기서열과 분석 결과 저장을 위한 스토리지 서버로 구분하여 운영.

(2) 의약학적 유용 물질 생산 해면 및 공생미생물

(가) *Theonella swinhoei*의 공생미생물인 *Entotheonella* 속 [23, 24]



그림 19. *Theonella swinhoei* 사진 [23]

(나) *Haliclona simulans*의 공생미생물인 *Streptomyces* 속 [24, 25]

(다) *Lamellomorpha* sp. 생물 군집의 메타게놈 정보 [26]

(라) 공개된 *Entotheonella*, *Streptomyces* 속 유전 정보 및 메타게놈 정보 상시 활용 가능

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

성과목표(가중치)	연구성과 및 기여내용	연차목표 달성도	최종목표 달성도
1. 기 확보된 선도물질의 특성 규명 (50 %)	<ul style="list-style-type: none"> - 선도물질이 항생제의 MIC에 미치는 영향 확인 완료 - 선도물질의 활성화에 대한 동력학적 분석 완료 - 선도물질과 β-lactamase간의 결합 구조로부터 설계 아이디어 확보 	100 %	100 %
2. 기 확보된 선도물질의 구조적 변형 설계 (45 %)	<ul style="list-style-type: none"> - 천연물 유래 Class C β-lactamase 저해제 선도물질 4종 확보 - 천연물 Cha-I, Cha-II, Cha-III의 β-lactamase 활성 저해 효과 확인 - Cha-I의 acetylation 화합물인 Cha-I'의 합성 완료 및 β-lactamase 활성 저해 효과 확인 - 발굴된 선도물질인 Cha-I'의 항생제 내성 대장균 성장 저해 효과를 입증 	100 %	100 %
3. 메타게놈 분석 시스템 구축 (5 %)	<ul style="list-style-type: none"> - 메타게놈 분석용 서버 구축 완료 및 항생제 생성 해면 및 공생미생물 후보 선정 (메타게놈 연구결과가 공개된 <i>Theonella swinhoei</i>, <i>Haliclona simulans</i>, <i>Lamellomorpha sp.</i> 을 선정하여 항생물질을 생성하는 공생미생물의 서열 확보) 	100 %	100 %
합계 (100 %)		100 %	100 %

표 4. 연구성과목표의 달성도 및 기여내용

제 5장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 활용방안

1. 본 연구를 통하여 확보된 class C AmpC β -lactamase의 저해제 선도 물질은 다양한 종류의 항생제와의 조합하여 사용함으로써 임상에서 발견되는 항생제 내성 문제 해결에 활용할 수 있음.
2. 항생제 내성의 원인이 되는 β -lactamase의 crystallography를 통한 분자 수준의 구조 분석은 항생제 내성 균주가 빠른 시간 내에 획득하는 자연적 돌연변이형 β -lactamase에 대한 효과적인 저해제의 설계에 단서를 제공할 수 있음.
3. β -lactamase 단백질과 저해제 선도 물질간의 결합 구조 분석을 통해, 선도 물질과 표적 단백질의 상호 작용을 원자 수준에서 규명함으로써 3차 구조에 기반을 둔 새로운 β -lactamase 저해제를 개발할 수 있는 원천 지식을 제공할 수 있음.
4. 메타게놈 분석을 통해 해면공생물의 유용 화합물 합성효소 (Polyketide synthase 등) 유전자를 확보하여 이중 발현 시스템을 구축하면 생리활성물질을 저비용, 대량 생산 가능함.

제 2 절 기대성과 및 예상과급효과

1. 기술적 측면

- 가. 본 연구에서 발견한 미지의 물질은 기존에 보고된 β -lactamase의 저해제와 화학적 구조가 전혀 다르며 β -lactam 계열의 저해제가 갖는 내성 문제도 없으므로, 기존의 모든 항생제와 β -lactamase 저해제에 저항성이 있는 다제내성 병원성 미생물의 치료제 개발에 활용 할 수 있음.
- 나. 본 연구에서 확립된 ITC를 통한 enthalpy 및 entropy를 이용한 binding affinity 분석 기술은 다른 표적 단백질의 저해제 개발에 폭 넓게 적용 될 수 있음.
- 다. 저해제와 표적 단백질의 분자 수준 상호 작용 대한 연구 방법은 항암제, 항바이러스제 및 면연 억제 등의 신약 개발에 광범위하게 이용 할 수 있음.

2. 경제 산업적 측면

- 가. 항생제는 치료용 약제들 중에 두 번째로 큰 시장을 차지하고 있는 약제이지만, 기존 항생제에 내성을 지닌 슈퍼 박테리아의 출현 등에 의해서 사용 가능한 항생제

의 수가 점차 줄고 있는 상황임. 더욱이 슈퍼 박테리아에 감염된 환자는 국내외적으로 증가하고 있음. 따라서 새로운 치료법을 위해 효과적인 β -lactamase 저해제 시장은 크게 증가될 것임.

- 나. 또한 사람과 가축 치료용 외에도 환경 소독 및 항균제 미국시장이 약 1조원에 달하는 것을 감안할 때 연구 성과의 다양한 사업화 가능성과 파급 효과는 매우 큼.
- 다. 본 연구를 통해서 새롭게 개발된 β -lactamase 활성 저해 선도 물질과 β -lactamase 간의 결합 구조는 치료제 개발에 직접 이용될 수 있어 특히 출원이 가능함.

제 6장 참고문헌

- [1] 박수현, 김기갑, 정우진, 미생물과 인간과의 생존경쟁, Bugs & Drugs, 서울대학교 의과대학.
- [2] 강창수, 항생제 내성과 대응방안 연구, Korea Institute of Patent Information.
- [3] Fan C, Moews PC, Walsh CT, Knox JR 1994. Vancomycin resistance: structure of D-alanine:D-alanine ligase at 2.3 Å resolution. *Science*. 266(5184):439-4.
- [4] Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. 2014. New horizons for old drugs and drug leads. *J Nat Prod* 77, 703-723.
- [5] Goodman J, Walsh V. 2001. The story of taxol: nature and politics in the pursuit of an anti-cancer drug. Cambridge University Press.
- [6] Jackson KL, Henderson JA, Phillips AJ. 2009. The halichondrins and E7389. *Chem Rev* 109, 3044-3079.
- [7] Still PC, Johnson TA, Theodore CM, Loveridge ST, Crews P. 2014. Scrutinizing the scaffolds of marine biosynthetics from different source organisms: Gram-Negative cultured bacterial products enter center stage. *J Nat Prod* 77, 690-702.
- [8] Vizcaino MI, Gup X, Crawford JM. 2014. Merging chemical ecology with bacterial genome mining for secondary metabolite discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 285-299.
- [9] Lorenz P, Eck J. 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* 3, 510-516.
- [10] Banik JJ, Brady SF. 2010. Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules. *Curr Opin Microbiol* 13, 603-609.
- [11] Wilson MC, Piel J. 2013. Metagenomic Approaches for Exploiting Uncultivated Bacteria as a Resource for Novel Biosynthetic Enzymology. *Chem Biol* 20, 636-647.
- [12] Lewis K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev* 12, 371-387.
- [13] WHO 2011, Antimicrobial resistance
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>)
- [14] Overcoming Antimicrobial Resistance 2002, Inaugural Symposium of APUA-KOREA, APUA Korea.
- [15] Natasha Gilbert 2012, Rules tighten on use of antibiotics on farms, *Nature* 481:125.
- [16] Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. 2013. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *66*, 571-591.

- [17] Trindade-Silva AE, Rua CPJ, Andrade BGN, Vicente ACP, Silva GGZ, Berlinck RGS, Thompson FL. 2013. Polyketide Synthase Gene Diversity within the Microbiome of the Sponge *Arenosclera brasiliensis*, Endemic to the Southern Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 79, 1598–1605.
- [18] Fan L, Reynold D, Liu M, Stark M, Kjelleberg S, Webster NS, Thomas T. 2012. Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, E1878–1887.
- [19] Woodhouse JN, Fan L, Brown MV, Thomas T, Neilan BA. 2013. Deep sequencing of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases from the microbiomes of Australian marine sponges. *ISME J* 7, 1842–1851.
- [20] Keller-Costa T, Jousset A, van Overbeek L, van Elsas JD, Costa R. 2014. The freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* harbours diverse *Pseudomonas* species (Gammaproteobacteria, Pseudomonadales) with broad-spectrum antimicrobial activity. *PLoS One* 9, e88429.
- [21] Chung EJ, Lim HK, Kim J-C, Choi GJ, Park EJ, Lee MH, Chung YR, Lee S-W. 2008. Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 74, 723–730.
- [22] Jung WS, Kim E, Yoo YJ, Ban YH, Kim EJ, Yoon YJ. 2014. Characterization and engineering of the ethylmalonyl-CoA pathway towards the improved heterologous production of polyketides in *Streptomyces venezuelae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 3701–3713.
- [23] Wilson MC, Mori T, Ruckert C, Uria AR, Helf MJ, Takada K, Gernert C, Steffens UA, Heycke N, Schmitt S, Rinke C, Helfrich EJ, Brachmann AO, Gurgui C, Wakimoto T, Kracht M, Crusemann M, Hentschel U, Abe I, Matsunaga S, Kalinowski J, Takeyama H, Piel J. 2014. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature*. 506(7486):58–62.
- [24] Gurgui C, Piel J. 2010. Metagenomic approaches to identify and isolate bioactive natural products from microbiota of marine sponges. *Methods Mol Biol*. 668:247–64.
- [25] Viegelmann C, Margassery LM, Kennedy J, Zhang T, O'Brien C, O'Gara F, Morrissey JP, Dobson AD, Edrada-Ebel R. 2014. Metabolomic profiling and genomic study of a marine sponge-associated *Streptomyces* sp. *Mar Drugs*. 12(6):3323–51.
- [26] Li ZY, Wang YZ, He LM, Zheng HJ. 2014. Metabolic profiles of prokaryotic and eukaryotic communities in deep-sea sponge *Lamellomorpha* sp. indicated by metagenomics. *Sci Rep*. 4:3895

주 의

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