발간등록번호
11-1543000-000158-01

토양방선균 유래 농용항생제의 퇴행성 유전질환치료제로 응용 개발

(Development of Agri-antibiotics Targeting Huamn Genetic Disorders)

선 문 대 학 교

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 "토양방선균 유래 농용항생제의 퇴행성 유전질환치료제로 응용 개발에 관한 연구" 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 9월 24일

주관연구기관명 : 선문대학교

주관연구책임자 : 박제원

연 구 원 : 박성렬(선임급)

연 구 원 : 김은지/안미선/원선희

연 구 원 : 아밋/산집/조전호/이창범

연 구 원 : 디페쉬/누엔후황/누엔티란홍

요 약 문

Ⅰ. 제 목

토양방선균 유래 농용항생제의 퇴행성 유전질환치료 후보물질로서의 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구과제는 퇴행성 유전질환치료 후보물질로 ① 카나마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 전기영동(GE) 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축과 ② 겐타마이신 관련 신규 유도체의 경로공학 화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 질량분석기 (MS) 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축, 그리고 ③ SAR 및 STR 구현을 통한 퇴행성 유전질환 후보물질 도출 및 3D docking model을 통한 리보솜 결합 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합 기전 예측이라는, 고유의 핵심기술을 활용한 아미노글리코사이드 신규 유도체 라이브러리의 제작 및 그 재조합 스트렙토마이세스의 개발을 궁극적 목표로 함.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

① 일차년도: 카나마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 전기영동(GE) 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축

- 3‘-수산기가 제거되거나, *N*-1-AHBA 기능기가 부가된, 그리고 6′-메틸기가 부가된 총 18종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인
- 퇴행성 유전질환 DMD 및 CF의 표적인자인 디스트로핀과 CFTR 내 무의미 돌연변이 ‘중지’코돈을 포함한 유전자의 대장균 내 발현시스템 구축
- 발현용 대장균으로부터 Cell-free extract 준비 및 카나마이신 유도체 농도별 첨가를 통한 GE 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축

② 이차년도: 겐타마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 질량분석기 (MS) 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축

- 3‘-수산기가 제거되거나, *N*-1-AHBA 기능기가 부가된, 그리고 6′-메틸기가 부가된 총 4종의 겐타마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성
- *N*-1-AHBA 기능기가 부가된 동시에 6′-메틸기가 부가된 6종의 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인
- 아미노글리코사이드 유도체의 MS 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축

③ 삼차년도: SAR 및 STR 구현을 통한 퇴행성 유전질환 후보물질 도출 및 3D docking model을 통한 리보솜 결합 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합 기전 예측

- 구축 라이브러리부터 NRI 고활성 아미노글리코사이드를 선정하는 동시에 신장세포 주를 대상으로 그 신장독성을 검정하여 관련 아미노글리코사이드를 배재
- 3D docking model을 통한 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합 기전 예측

Ⅳ. 연구개발결과

- 일차년도에 방선균 스트렙토마이세스에 생합성경로공학화를 통하여 총 18종의 카나마이신 관련 유도체를 생합성하여 개별 물질들의 구조의 신규성을 확인 함.
- 퇴행성 유전질환의 타겟 단백질인 CFTR과 Dystrophin 발현 모델을 대장균에 발현하여 GE 기반 in vitro NRI 활성검정법을 구현함.
- 이차년도에 총 9종의 카나마이신 및 겐타마이신 구조 유도체를 생합성하여 그 구조 또한 확인함.
- 퇴행성 유전질환의 타겟 단백질인 CFTR과 Dystrophin 발현 모델을 대장균에 발현하여 MS 기반 in vitro NRI 활성검정법을 구현함.
- 총 27종의 아미노글리코사이드 라이브러리를 대상으로 SAR을 수행하여 일차적으로 6종의 유도체를 선발하였음.
- 추가적으로, 전 임상 시험법 중 하나로 ex vivo NRI 활성 검증을 실시함.
- 총 3종의 신장 관련 세포주를 대상으로 한 세포독성 시험을 실시하여, 6‘-methylgentamicinA2를 최종 퇴행성 유전질환치료 가능 후보물질로 도출하였음.
- 도출된 겐타마이신 유도체와 그지노 상용 겐타마이신 C1과의 3D docking model을 통하여 타겟 분자인 리보솜 내 decoding A site에 대한 결합기전을 시뮬레이션하였음.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

① 해당분야 학문발전에의 기여도

이종(異種)의 아미노글리코사이드 항생제 관련 생합성 유전자들의 다양한 조합을 통해 퇴행성 유전질환치료용 아미노글리코사이드 유도체의 미생물 내 생합성 및 그 후보물질을 발굴하는 방법론은 전 세계적으로 전무한 상황임. 본 연구과제는 기존 수행하였고 현재수행 중인 타과제의 심화단계로 기존 유전질환치료제 연구에 있어서 그 방법론은 독창적이며 아미노글리코사이드의 신규활성연구와 관련되어 그 학술적 가치는 상당하다 할 것이며, 향후 본 연구기반기술의 기술적 향상에 큰 도움이 될 것임. 한편 미생물로부터 생산되는 신규 생리활성물질 탐색 및 생합성 경로 규명에 효율적인 유전정보를 제공해 줄 수 있는 인프라 구축이 가능함.

② 연구결과의 교육현장에의 활용 방안

본 연구 과제를 진행하는 과정에서 학생들에게 분자 생물학, 미생물학, 생화학, 및 미생물대사공학 등 다 학제간의 경계 분야를 접하게 할 수 있으므로, 관련 산학연에 우수 연구 인력 육성 및 배출을 기대함.

SUMMARY
(영문요약문)

I. Title

Development of Agri-antibiotics Targeting Human Genetic Disorders

II. R&D Objective and Necessity

This study was focusing on the candidate pharmaceuticals for the recessive human genetic disorders: at first, biosynthesis of kanamycin-related new derivatives by using biosynthetic pathway engineered Streptomyces recombinants and the setup of gel electrophoresis-based in vitro nonsense readthrough inducer (NRI) screening tool, secondly, biosynthesis of gentamicin-related new derivatives by using biosynthetic pathway engineered Streptomyces recombinants and the setup of mass spectrometry-based in vitro nonsense readthrough inducer (NRI) screening tool, and then leading the candidate drugs effective for human genetic disorders by exploiting the structure-activity & structure-toxicity relationships of the constructed aminoglycoside library as well as the binding mechanism simulation between the aminoglycoside candidates and ribosomal decoding A site by 3D docking model. The main goal of this projects was the construction of new aminoglycoside library and the development of the producing recombinants of Streptomyces.

III. R&D Contents and Scope

- First year: Biosynthesis of kanamycin new derivatives using biosynthetic pathway engineered recombinant of Streptomyces and the setup of GE-based in vitro NRI screening tool using CFTR and Dystrophin target proteins
- Second year: Biosynthesis of gentamicin new derivatives using biosynthetic pathway engineered recombinant of Streptomyces and the setup of MS-based in vitro NRI screening tool using CFTR and Dystrophin target proteins
- Third year: Leading the candidate drugs for the treatment of human genetic disorders from the newly constructed aminoglycoside library by SAR and STR assays, and the exploiting of the binding mechanism by simulating the 3D docking models between the candidate drugs and ribosomal decoding A site as an NRI target marker.

IV. R&D Results

- Total 18 different kinds of kanamycin derivatives were created and their structural characterization were proved by ESI-MS and NMR spectroscopic analyses.
- Setup of GE-based in vitro NRI screeing tool by expression of CFTR and Dystrophin proteins, in E. coli, as target ones for human genetic disorders.
- Total 9 different kinds of gentamicin-related new derivatives were biosynthesized and structurally characterized.
- MS-based in vitro NRI screeing tool was set by expression of CFTR and Dystrophin proteins, in E. coli, as target ones for human genetic disorders.
- 6 kinds of aminoglycoside candidates were chosen from total 27 series of amniglycoside library by using in vitro and ex vivo SAR assays.
- 6′-methylgentamicinA2 was finally selected as the candidate drugs for the treatment of human genetic disorders by the STR aasay using total 3 different kinds of human kidney cell lines.
- The binding mechanism of both 6′-methylgentamicinA2 and gentamicin C1 onto the ribosomal decoding A site were simulated by using 3D docking models.

V. Research Achievements and Its Application Plan

- Contribution to the related research fields
- Applicability to the educational fields

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction ········· 8

Chapter 2. Present Status of Affairs in R&D ········· 14

Chapter 3. R&D Plan and Results ········· 25

Chapter 4. Achievement and Contribution to Related R&D ········· 56

Chapter 5. R&D Application Plan ········· 60

Chapter 6. Update of Science & Technology Information ········· 64

Chapter 7. Present Status of Research Equipment & Utility ········· 66

Chapter 8. References ········· 67

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ······ 8

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ······ 14

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ······ 25

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ······ 56

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ······ 60

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ······ 64

제 7 장 연구시설·장비 현황 ······ 66

제 8 장 참고문헌 ······ 67

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 필요성

1. 세계 최초 유전질환치료용 아미노글리코사이드 유도체 토양 미생물 생합성기법 시도

➡ 기존 연구들과는 차별화된 방법론 기존의 유전질환치료용 의약제제의 개발 연구는 다음 2가지로 대별될 수 있음. 우선 미국 바이오벤처회사인 PTC theraputics의 아미노글리코사이드 모방체 (mimics) 후보물질 도출방법론은 조합합성법으로 만들어진 약 10만의 화학물질 라이브러리를 제작하는 막대한 자본력과 인력이 필요함. 또한 상당량의 기술력을 이미 특허 화하고 있어서 대학 단독의 연구내용으로는 이를 따라잡기 힘들 것으로 사료됨. 나아가 화학합성법의 경우 다단계의 화학합성 공정 및 위험도 높은 반응기가 필요하다는 단점이 있고, 화합물의 독성에 대한 기본적인 지식기반이 충분히 검증되어 있지 않으므로 라이브러리 내 다수의 후보물질이 도태될 가능성이 극히 높음. 이는 그 연구진의 결과에 보듯이 10만개의 라이브러리로부터 50% 이상이 독성 때문에 개발 포기된 것과 같은 맥락임. 한편 이스라엘 기술원 (Israel Institue of Technology)의 Baasov 교수 연구팀의 아미노글리코사이드 반합성법을 통한 아미노글리코사이드 유도체 (analogs)의 개발 방법론 또한 기존 항생제 중 자연계에 미량으로 존재하는 천연 아미노글리코사이드를 원재료로 하여 이에 특정 기능기를 치환하거나 첨부하는 연구법으로, 최소 5단계이상의 다단계의 화학합성 후에도 낮은 수율과 불순물의 정제 상 어려움 등 해결해야 할 사항이 여전히 남아있음. 따라서 미생물의 대사 다양성과 그 대사관련 유전자들의 경로공학 (pathway engineering)적 조합 및 배열을 활용한다면 전술한 주요 연구들의 화학적 방법론 상 문제점인 고비용성과 낮은 수율, 다단계의 합성공정 이후에도 다단계 정제 공정의 필요, 그리고 화합물의 독성학적 연구의 미진 등 한계를 극복할 수 있는 차별화된 방법론을 제시할 수 있음. 즉, 아미노글리코사이드 유도체의 생합성 방법구축은 약 50년간 항생제로 임상 사용되고 있던 천연 아미노글리코사이드의 광범위한 임상정보를 활용할 수 있어서 기존 조합화학방법의 hit compound 도출 상 독성에 따른 낮은 확률을 사전에 예방할 수 있고, 아직까지는 특정 기능기의 치환이나 첨가만이 가능한 반합성법과 같은 다소 무작위적이라 할 수 있는 신규 유전질환치료용 아미노글리코사이드 개발 연구에 비하여 보다 합리적인 방법으로 아미노글리코사이드 구조 다양성을 확립하기에 용이하다는 장점이 있음. 따라서 본 연구는 이종(異種)의 아미노글리코사이드 생합성 관련 유전자들을 선택적으로 조합·발현하는 미생물 생합성법으로, 기존 유전질환치료용 제제 개발연구의 문제점 및 한계를 극복할 수 있는 한 단계 진일보한 생합성 방법론으로 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 전례가 없음.

2. 유전질환치료제 후보군 도출을 위한 신속한 in vitro NRI 스크리닝 기법 구축

➡ 관련 연구 툴의 응용상 문제점 극복을 위한 NRI 활성검증법 구축 전술하였던 현존 기술력 중 최고로 평가받고 있는 미국 바이오벤처회사인 PTC therapeutics의 ELISA 기반 HTS 기술은 특허 화되어 있으므로 본 연구진에서 활용하기엔 이전비용 및 추가적인 비용상 문제가 제기되므로, 다른 별도의 NRI 활성 검정법이 필요할 것임. 또한 competative direct ELISA 기반 HTS 검정법의 경우엔, 약 1%의 가양성 결과가 나올 수 있고, titration 시 감도가 둔화될 수 있다는 단점이 PTC therapeutics의 연구진에 의하여 보고 된 바, 대학 내 실험실 수준에서 검정이 간편하고 빠른 NRI 활성 검정법의 개발이 필요할 것임. 이를 위한 대체 스크리

닝 기법으로 본 연구진이 현재 예비 실험 중에 있는 전기영동 (GE; gel electrophoresis) 기반 in vitro NRI 검점법과 최근에 생명과학 분야로 그 활용도가 높아지고 있는 질량 분석기 (MS; mass spectrometry) 기반 in vitro NRI 검정법을 구축하고자 하며, 그 정량화 또한 가능케 하고자 함. 이중 GE 기반 NRI 검정법은 기존의 NRI 검정법 중 하나로 이용되고 있기는 하나, 이들 대부분은 활성 검정에 필요한 대장균 내 발현하는 유전자 대부분이 아미노글리코사이드의 항생효과와 연관된 유전자들로, PTC therapeutics의 방법론과 같은 특정 유전질환 표적인자 단백질을 대상으로 하지 않고 있음.

따라서 본 연구는 유전질환치료용 아미노글리코사이드 유도체 개발이니 만큼, ex vivo용으로 사용가능 한, 즉 특정유전질환 표적인자인 CF와 DMD 특이 무의미 돌연변이가 발생하는 표적 단백질을 클로닝 하여 대장균에 발현한다는 점에서 타 연구들과의 구별될 수 있는 검정법의 구축일 것임. 또한 MS 기반 NRI 검증법은 기존에는 시도되지 않고 있던 검정법으로 최근 고분자량 단백질의 크기 (< 80 kDa)를 검출할 수 있는 MS 기기 내 algorithm 기반 발전은 NRI 검정법의 핵심이라 할 수 있는 절단 (truncated)된 단백질과 NRI의 효과에 따른 온전하게 full-length하게 발현된 단백질 간의 크기 비교가 가능케 할 것임. 또한 HPLC 인터페이스를 활용한 MS 검정은 NRI의 정량화에도 도움이 될 것으로 기대할 수 있음.

3. 아미노글리코사이드 유도체 라이브러리를 기반으로 SAR 및 STR 구현

➡ 아미노글리코사이드 유도체 라이브러리의 NRI 및 세포독성 역가 비교 본 연구 유전질환치료용 아미노글리코사이드의 미생물 생합성시스템 개발은 적어도 20종 이상의 유도체 라이브러리를 구축하게 할 것이고, 이는 기존 아미노글리코사이드와 구조적 유사한 유도체들을 대상으로 한 NRI 활성을 비교하는데 필수적인 라이브러리가 될 것임. 즉 기존에 임상 상용되고 있는 항생제용 아미노글리코사이드와 개발될 유도체간의 항생활성은 차제해 두더라도, 개발될 in vitro GE- 그리고 MS-기반 NRI 검정법들을 통하여 아미노글리코사이드 내 각 기능기의 존재 및 제거, 또는 치환이나 다른 기능기 (AHBA 등)의 부가 등이 NRI 활성에 미치는 영향 (SAR; Structure-activity relationship)을 검증할 수 있음. 또한 전술한 바와 같이 아미노글리코사이드의 유전질환치료용 의약제제개발에 있어서 걸림돌인 구조-독성 연관성 (STR; Structure-toxicity relationship)의 기반 연구가 이루어질 수 있음. 이상의 연구 방법론 및 내용은 아미노글리코사이드의 NRI 활성을 응용화한 유도체 및 신규신약 후보물질 도출에 있어서 관련 연구자들의 기반 연구에 도움을 줄 것임에 틀림없으며, 향후 추진될 타 연구 도출 후보물질들의 전 임상 단계상 유용기준치 제공도 가능함.

4. 본 연구진의 보유 연구자원

➡ 연구 수행 잠재력 및 독창성 본 연구팀은 다년간의 연구 결과로 대표적 아미노글리코사이드 항생제인 겐타마이신, 카나마이신 및 토브라마이신 생합성 유전자집단을 각각 *M. echinospora와 S. kanamyceticus 그리고 S. tenebrarius* 야생 생산균주들로부터 분리하여 보유하고 있음. 특히 야생 생산균주의 유전자 조작과 배양이 어려울 경우, 유전자원의 확보는 필수적임 **(그림1)**. 또한, 선행결과로 이종숙주인 S. venezuelae 내 발현을 통한 주요 겐타마이신 대사체의 생합성 경로 규명은 당해 연구의 수행에 필요한 유전질환치료용 아미노글리코사이드 후보물질의 미생물 생합성이 가능함을 시사하고 있음. 본 연구팀은 극미량의 복잡한 구조의 천연물유래 화합물의 효율적 검출과 구조 예측이 가능한 HPLC/ESI-MS/MS 미량 정밀 분석기

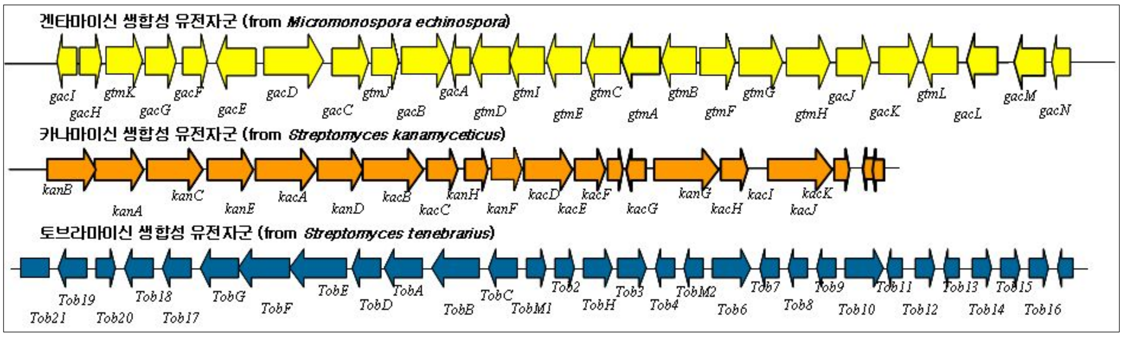
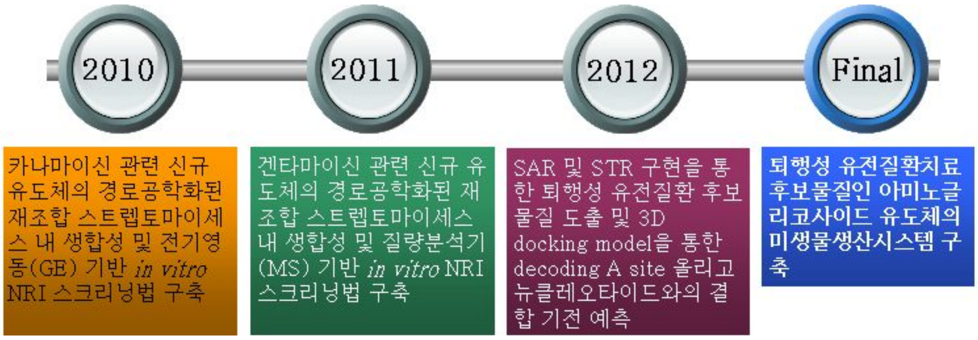


그림1. 본 연구진 보유 아미노글리코사이드계 항생제 생합성 유전자 자원

술을 구축하였던 바, 본 연구팀의 고유 기반 기술을 바탕으로 하여 생산되는 다양한 아미노글리코사이드 유도체의 프로파일링 및 생합성 여부를 확인할 수 있음. 뿐만 아니라, 이 같이 본 연구진의 바이오 및 화학분석 기반 기술은 신규 아미노글리코사이드 유도체 라이브러리의 GE- 및 MS-기반 NRI 활성 검증법 구축에 바로 투입될 수 있음. 당해 연구과제의 성공적인 수행을 위해서는 방선균인 S. venezuelae의 발효 및 생산된 신규 아미노글리코사이드 유도체의 분리 정제기술, 생합성 유도체의 검출 기술, 다양한 생합성 유전체정보 확보 및 활용 기술, 생합성 관련 유전자들의 서열분석을 통한 기능 예측 및 이종(異種)유전자들의 조합 및 발현기술, 생합성 된 신규 아미노글리코사이드 항생제 라이브러리의 구축을 위한 구조 분석기술, 마지막으로 유용 후보군의 도출을 위한 생물학적 활성 검정 기술이 요구됨.

2절. 연구개발의 범위

본 연구과제는 퇴행성 유전질환치료 후보물질로 ① 농용항생제의 일종인 카나마이신 관련 신규 유도체의 경로공학 화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 전기영동(GE) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축과 ② 겐타마이신 관련 신규 유도체의 경로공학 화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 질량분석기 (MS) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축, 그리고 ③ SAR 및 STR 구현을 통한 퇴행성 유전질환 후보물질 도출 및 3D docking model을 통한 리보솜 결합 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합 기전 예측이라는, **고유의 핵심기술을 활용한 아미노글리코사이드 신규 유도체 라이브러리의 제작 및 그 재조합 스트렙토마이세스의 개발**을 궁극적 목표로 함.



구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2010	**카나마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 GE-기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축**	**➡ 카나마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성** **✓ 3'-수산기가 제거된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인** - 본 연구팀의 기존 연구로 밝혀진 당전이 효소의 기질 유연성에 의해 생합성 되는 카나마이신 생합성 중간 대사체인 2종의 2당(pseudodisaccharide)과 4종의 3당(pseudotrisaccharide) 생합성 유전자 set에 3'-수산기 제거 추정유전자인 이종(異種)의 아프라마이신 생합성유전자 *aprD3-D4* 유전자 set을 스트렙토마이세스에 추가 발현하여 3'-수산기가 제거된 3'-dehydroxy 카나마이신 유도체를 개발함. • *kanA-B-K-kanF-aprD3-D4*의 목적 유도체: 3′-deoxy-2′-deacetylparomamine • *kanA-B-K-kanF-kacA-kacE-aprD3-D4*의 목적 유도체: 3′-deoxyparomamine, 3′-deoxy-3″-deaminokanamycinX, 3′-deoxy-3″-deaminokanamycinC • *kanA-B-K-kanF-kacA-kan-C-D-E-aprD3-D4*의 목적 유도체: 3′-deaminokanamycinX, 3′-deamino-kanamycinC **✓ *N*-1-AHBA 기능기가 부가된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인** - 앞서 전술된 6종의 아미노글리코사이드 생합성 중간 대사체 생합성 유전자 set에 1-아미노기에 AHBA(aminohlydroxybutyric acid) acyl기를 부가시킬 것으로 추정되는 이종(異種)의 뷰티로신 생합성유전자 *btrI-J-K-O-V-G-H* 유전자 set을 스트렙토마이세스에 추가 발현하여 아미노글리코사이드의 core 구조인 2DOS의 1-아미노에 acyl기를 부가시킨 6종의 *N*-1-AHBA acyl화 카나마이신 유도체를 개발함. • *kanA-B-K-kanF-btrI-J-K-O-V-G-H*의 목적 유도체: 1-*N*-AHBA-2′-deacetylparomamine • *kanA-B-K-kanF-kacA-kacE-btrI-J-K-O-V-G-H*의 목적 유도체: 1-*N*-AHBA-paromamine, 1-*N*-AHBA-3″-deaminokanamycinX 1-*N*-AHBA-3″-deaminokanamycinC • *kanA-B-K-kanF-kacA-kan-C-D-E-btrI-J-K-O-V-G-H*의 목적 유도체: 1-*N*-AHBA-kanamycinX, 1-*N*-AHBA-kanamycinC **✓ 6′-메틸기가 부가된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인** - 앞서 전술된 6종의 아미노글리코사이드 생합성 중간 대사체 생합성 유전자 set에 6'-메틸기를 부가시킬 것으로 추정되는 이종(異種)의 겐타마이신 생합성 유전자 *gtmL* 혹은 *gacD* 유전자를 스트렙토마이세스에 추가 발현하여 6종의 6'-methyl 카나마이신 유도체를 개발함. • *kanA-B-K-kanF-gtmL* 혹은 *gacD*의 목적 유도체: 6'-methyl-2′-deacetylparomamine • *kanA-B-K-kanF-kacA-kacE-gtmL* 혹은 *gacD*의 목적 유도체: 6'-methyl-paromamine, 6'-methyl-3″-deaminokanamycin X, 6'-methyl-3″-deaminokanamycinC • *kanA-B-K-kanF-kacA-kan-C-D-E-gtmL* 혹은 *gacD*의 목적 유도체: 6'-methyl-kanamycinX, 6'-methyl-kanamycinC -퇴행성 유전질환 표적인자들의 대장균 내 발현시스템 구축 -GE 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축 **➡ 전기영동(GE) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축** **✓ 퇴행성 유전질환 DMD의 표적인자인 디스트로핀 내 무의미 돌연변이 '중지'코돈을 포함한 α/β subunit의 대장균 내 발현시스템 구축** - 기존의 연구로 밝혀진 DMD 환자로부터 분리해낸 디스트로핀 암호화 유전자 중 무의미 돌연변이가 발생하는 코돈 영역을 포함하고 있는 일부 subunit을 클로닝 하여 대장균에 발현함. **✓ 퇴행성 유전질환 CF의 표적인자인 CFTR 단백질 내 무의미 돌연변이 '중지'코돈을 포함한 α/β/γ subunit의 대장균 내 발현시스템 구축** - 기존의 연구로 밝혀진 CF 환자로부터 분리해낸 CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator)를 암호화하는 유전자 중 무의미 돌연변이가 발생하는 코돈 영역을 포함하고 있는 일부 subunit을 클로닝 하여 대장균에 발현함. **✓ 발현용 대장균으로부터 Cell-free extract 준비 및 카나마이신 유도체 농도별 첨가를 통한 GE 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축** - 구축된 2종의 발현시스템으로부터 cell-free extract를 제조한 후, 생합성 된 신규 카나마이신 유도체들을 0~6.4 μg/ml 수준으로 첨가하여 일정시간 동안 반응 한 후 반응액 내 단백질을 분리 농축함.

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도	2011	**겐타마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 질량분석기(MS) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축**	**■ 겐타마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 구조 확인** **✓ 3'-수산기가 제거된 1종의 겐타마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체생합성** - 본 연구팀의 기존 연구로 밝혀진 겐타마이신A2 생합성 유전자 set에 3'-수산기 제거 추정유전자인 이종(異種)의 아프라마이신 생합성유전자 *aprD3-D4* 유전자 set을 스트렙토마이세스에 추가 발현하여 3'-수산기가 제거된 3'-dehydroxy 겐타마이신 유도체를 개발함. • *gtmA-B-gacH-gtmG-M-E-aprD3-D4*의 목적 유도체 : 3'-deoxy-gentamicinA2 **✓ *N*-1-AHBA 기능기가 부가된 1종의 겐타마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인** - 앞서 전술된 겐타마이신A2 생합성 유전자 set에 1-아미노기에 AHBA(aminohlydroxybutyric acid) acyl기를 부가시킬 것으로 추정되는 이종(異種)의 뷰티로신 생합성유전자 *btrI-J-K-O-V-G-H* 유전자 set을 스트렙토마이세스에 추가 발현하여 1종의 *N*-1-AHBA acyl화 카나마이신 유도체를 개발함. • *gtmA-B-gacH-gtmG-M-E-btrI-J-K-O-V-G-H*의 목적 유도체 : 1-*N*-AHBA-gentamicinA2 **✓ 6'-메틸기가 부가된 2종의 겐타마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인** - 앞서 전술된 겐타마이신A2 생합성 유전자 set에 6'-메틸기를 부가시킬 것으로 추정되는 생합성 유전자 *gtmL* 혹은 *gacD* 유전자를 스트렙토마이세스에 추가 발현하여 6종의 6'-methyl 카나마이신 유도체를 개발함. • *gtmA-B-gacH-gtmG-M-E-L* 혹은 *gacD*의 목적 유도체 : 6'-methyl-gentamicinA2 diastereomers **✓ *N*-1-AHBA 기능기가 부가된 동시에 6'-메틸기가 부가된 6종의 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인** - 일차년도에 생합성할 6종의 *N*-1-AHBA 기능기가 부가된 아미노글리코사이드 유도체 생합성 유전자 set에 6'-메틸기를 부가시킬 것으로 추정되는 이종(異種)의 겐타마이신 생합성 유전자 *gtmL* 혹은 *gacD* 유전자를 스트렙토마이세스에 동시 발현하여 6종의 *N*-1-AHBA-6'-methyl 아미노글리코사이드 유도체를 개발함. • *kanA-B-K-kanF-btrI-J-K-O-V-G-H-gtmL* 혹은 *gacD*의 목적 유도체: *N*-1-AHBA-6'-methyl-2'-deacetylparomamine • *kanA-B-K-kanF-kacA-kacE-btrI-J-K-O-V-G-H-gtmL* 혹은 *gacD*의 목적 유도체: *N*-1-AHBA-6'-methyl-paromamine, *N*-1-AHBA-6'-methyl-3''-deaminokanamycinX, *N*-1-AHBA-6'-methyl-3''-deaminokanamycinC • *kanA-B-K-kanF-kacA-kan-C-D-E-btrI-J-K-O-V-G-H-gtmL* 혹은 *gacD*의 목적 유도체: *N*-1-AHBA-6'-methyl-kanamycinX, *N*-1-AHBA-6'-methyl-kanamycinC **■ 질량분석기 (MS) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축** **✓ 아미노글리코사이드 유도체의 MS 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축** - 일차년도에 구축될 퇴행성 유전질환들의 표적인자인 특정 단백질 발현시스템 및 CFE를 활용하여 아미노글리코사이드 유도체의 체외 반응을 실시한 후 동일 방법으로 단백질을 분리 농축함. 대조군으로는 상용 겐타마이신 C1과 C2a를 0~6.4 μg/ml 수준으로 반응액 내 첨가함. 분리된 단백질을 HPLC/ESI-MS 상에서 분리하여 크로마토그램 상 나타난 피크를 알고리듬화 프로그램으로 deconvolution 시켜 그 단백질 크기를 확인함. 절단된 단백질과 full-length 단백질의 peak intensity를 계측하여 각각의 아미노글리코사이드 유도체의 NRI활성을 검정함.

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도	2012	**SAR 및 STR 구현을 통한 퇴행성 유전질환 후보물질 도출 및 3D docking model을 통한 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합기전 예측**	**▶ SAR 및 STR 구현을 통한 퇴행성 유전질환 후보물질 도출** ✓ **구축 라이브러리부터 NRI 高활성 아미노글리코사이드를 선정** 일·이차년도를 통해 적어도 20종 이상 생합성 되어질 아미노글리코사이드 유도체 라이브러리에 대하여 2종의 개발예정 *in vitro* NRI 검정법을 실시함으로서 유전질환치료용 후보 아미노글리코사이드를 도출할 것임. 이를 통해 다양한 구조 내 기능기의 차이에 따른 NRI 활성을 예측할 수 있을 것이며 아미노글리코사이드의 구조-활성 연관성 (SAR)에 대한 기본 자료 또한 제공될 수 있을 것임. ✓ **구축 라이브러리부터 신장 세포독성 아미노글리코사이드를 배재** 아미노글리코사이드 라이브러리를 대상으로 임상적 적용의 가능성을 타진하기 위하여 상용 아미노글리코사이드의 임상 적용 문제점 중 하나인 신장 세포독성에 대하여 검정할 계획임. 이에는 정상 신장세포주인 HEK293, 신장 근위세뇨관 세포주인 LLC-PK1, 그리고 신장 상피세포 주 A498를 대상으로 하여 MTT 방법으로 그 세포독성을 확인할 예정임. 또한 대조군으로는 현재 다수의 연구가 수행된 바 있는 천연 겐타마이신 항생제와 반합성 아미카신을 동일 농도로 사용하여 비교할 것임. 이를 통해 다양한 구조 내 기능기의 차이에 따른 세포독성을 예측할 수 있을 것이며 아미노글리코사이드의 구조-독성 연관성 (STR)에 대한 기본 자료 또한 제공될 수 있을 것임. 따라서 본 연구의 최종목표는 구축된 라이브러리를 대상으로 SAR 및 STR을 수행하여 유전질환치료용 아미노글리코사이드 후보물질을 도출하고자 함. **▶ 3D docking model을 통한 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합 기전 예측** ✓ 최종 선발될 아미노글리코사이드 후보군을 대상으로 기존에 보고가 된 바 있는 겐타마이신과 토브라마이신의 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합 atomic coordinate를 template로 하여 유도체 후보군의 3D modeling을 실시함. 이때 MODELLER와 FoldX 프로그램을 구동하며, 모델링은 VADAR로 평가할 예정임. 아미노글리코사이드 유도체 후보물질과 decoding A site의 결합양상을 결정하기 위하여 molecular docking 방법을 구현하고, 각 수소결합 간의 분자적 dynamic simulation을 위해 HF/6-31G(d) 세트를 기반으로 한 Gaussian03으로 에너지 안정 상태와 구조적 최적화를 결정할 것임. 이상의 3D docking modeling은 한국생명공학연구원 시스템미생물연구센터에 의뢰할 예정임.

제 2 장　국내외 기술개발 현황

1절. 국내•외 기술개발현황

1. 유전질환치료제 관련 연구 동향 및 시장성 현황 [자료출처: 제약산업정보 2008]

➡ 신약개발에 있어서 Blue ocean 영역 유전질환은 유전자의 결함으로 인해 발생하는 질환으로 현재까지 단일유전자의 결함에 의한 질병만으로도 약 4000개 이상이 알려져 있으며, 많은 유전질환의 경우 현재 근본적인 치료법은 없으며, 생명을 좀더 연장하기 위한 소극적인 수준의 치료가 주로 행해지고 있음. 특히 퇴행성 유전질환은 선천성 유전질환과는 상이하게 건강한 성인기에도 갑자기 발병할 수 있는 질환으로. 듀시엔느 근이영양증 (DMD)과 낭성섬유증 (CF)이 주요 퇴행성 유전질환으로 알려지고 있음. 그 주요 치료방법은 골수이식으로 치유, 혹은 증세가 호전될 수 있는 경우가 많이 있으나, 조직 적합한 공여자의 부족, 면역거부 반응 가능성, 시술과정에서 생길 수 있는 위험 등 골수이식술 자체가 가지고 있는 많은 한계점 때문에 보편적

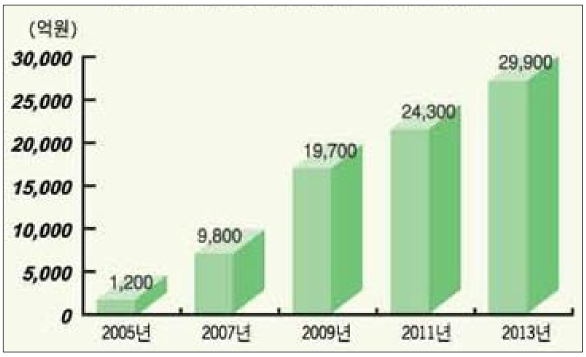


그림2. 전 세계 유전질환 치료제의 시장규모 예측

(자료출처: 제약산업정보2008)

으로 사용 가능한 방법은 아닌 실정임. 또한 고셔병과 같은 극히 일부의 유전질환의 경우 재조합 효소를 투여하는 방법이 있긴 하지만, 모든 환자에게 적용 가능한 것도 아니고, 또한 연간 치료비가 2억 이상 소요되는 고가 의약품으로 일반 환자들이 사용하기란 거의 불가능함. 이러한 유전질환치료에 기대를 모으는 치료법 중 하나는 문제가 발생한 유전자를 대체하는 유전자치료(gene therapy)임. 그 원리는 치료에 필요한 유전자를 질병 부위에 투입함으로써 병이 생긴 유전자를 대체하거나, 그 부위에 치료용 단백질을 만들게 하여 질병을 치료하게 하는 것. 즉 유전자를 환자의 몸에 넣어 건강한 유전자의 내용이 발현되게 하는 원리로서, 기존 신약들은 질환의 증상치료, 즉 대증요법(對症療法)에 초점을 맞춰 왔지만, 유전자 치료제는 질병의 원인을 유전자 차원에서 분석, 치료 유전자 또는 유전자를 집어넣은 세포를 인체에 투여해 치료를 하는 것임. 전 세계적으로 gene theraphy 임상시험은 작년 1월 기준 1280여 건이 진행되고 있으며, 대부분 미국(65%), 유럽(28%)에서 진행되고, 아시아에서 이뤄지는 임상시험은 3%에 그치고 있음. 현재 전 세계적으로 200개 이상의 회사에서 개발하고 있는 유전자 치료제 중 임상시험의 마지막 단계에 진입한 것이 약 30건이나 아직까지 상용화되고 있지는 않고 있으며, 국내에서도 모두 8개의 유전자 치료제가 임상시험 중임. 의약품시장 예측기관들은 전 세계 유전질환 치료제 시장이 향후 2-3년 내 본격적으로 확대되고, 연평균 100% 이상의 고(高)성장을 거듭할 것으로 전망하여, 2013년 무렵 약 3조원 규모의 시장이 형성될 것으로 예측하고 있음 **(그림2)**.

2. Gene theraphy의 한계 및 대체 유기합성 의약제제의 개발

◘ 안전·윤리적 측면 의문점 제기 그렇지만 유전자 치료가 보편적인 치료법으로 정착되기까지는 많은 노력과 긴 세월이 필요로 한 것으로 예상되고 있음. 치료용 유전자를 인체에 투여하기 위해 지금까지는 감기의 원인균인 아데노바이러스에 유전자를 실어 보냈는데, 이 바이러스는 인체에 침투하는 데에는 효과적이지만 독성이나 면역반응의 부작용이 동반된다는 문제점이 있었고, 이런 문제점을 잘 보여주는 사례가 1999년 미국 펜실베이니아 대학에서 있었음. 당시 유전병의 일종인 'OTC(ornithine transcarboxylase) 결핍증'을 앓고 있던 18세의 건장한 남자에 대한 임상시험 중 불과 나흘만에 호흡곤란으로 사망했고, 그 원인으로 유전자를 실어보내기 위해 사용한 아데노바이러스의 과다 사용에 따른 염증이 발생이 주요 원인으로 나타났음. 또한 2002년 프랑스에서는 일명 '버블보이 병'이라 불리는 면역결핍증(X-SCID) 희귀 유전질환을 앓고 있는 일곱 명의 소아에게 유전자 치료를 수행했는데 그 중 2명에게서 백혈병이 발병했고, 그 원인은 환자에게 주입된 유전자가 염색체의 목표했던 특정 위치에 삽입되지 못한 데서 생긴 것으로 추정되어, gene theraphy의 안전성에 대해서 의문이 제기되었음 [참고문헌1]. 또한 유전자의 기능에 대해 명확한 지식을 지녔더라도 이 유전자를 치료제로 사용하려면 치료유전자를 인체에 효율적으로 전달하는 기술의 개발이 필요하지만 아직까지는 그 기대를 충족시키지 못하는 수준임. 이 같은 사례는 gene theraphy 상용화를 위해서는 안전성과 유효성 등 아직도 넘어야 할 장벽이 많다는 것을 보여주고 있으며, 또 투입된 유전자가 당대에만 효과를 내는 게 아니라 자손으로 전달될 가능성도 있고, 또 유전자 치료제를 어디까지 적용할 것인지 윤리적 측면도 고려해야 할 것임. 이 때문에 우리나라는 gene theraphy를 '유전성 질환, 암, 에이즈(AIDS) 및 기타 생명을 위협하거나 심각한 장애를 초래하는 질환'과 '현재 이용 가능한 치료법이 없거나 유전자 치료제의 효과가 현재 이용 가능한 다른 치료법과 비교하여 우수함을 예측할 수 있는 경우'로 제한하고 있음.

◘ 대체 유전질환치료제 개발 이런 상황에서 다른 방식으로 유전질환을 치료하는 약물의 임상결과가 발표되어 학계의 관심을 끌고 있음. 미국 바이오벤처 제약회사인 PTC theraputics에서는 조합합성법으로 만들어진 약 10만의 화학물질 라이브러리로부터 아미노글리코사이드계 항생제의 scaffold와 유사 모방체 (mimics)인 후보물질로 PTC124를 개발하는데 성공하였음 [참고문헌2]. 연구팀은 마우스의 유전자 조작으로 DNA 상 무의미 돌연변이 (nonsense mutation)를 일으켜 퇴행성 유전질환 중 하나인 듀시엔느 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy: DMD)이 발생한 마우스에 PTC124을 투여했으며 2-8주 만에 근육기능이 정상으로 회복되었다고 밝혔음. 생체 내 DNA에 결함이 발생하면 그대로 RNA에 전달되며 RNA는 DNA의 유전정보를 리보솜이라는 단백질에 전달하여 단백질을 합성하도록 만들지만 RNA에 무의미 돌연변이가 존재하면 리보솜에서 '중지(stop)' 신호가 전달되어서 단백질 합성이 중단되며, 그 결과 DMD 환자들은 근육에서 근섬유 유지에 필수적인 단백질인 디스트로핀(dystrophin)이 만들어지지 않아서 근육이 약화됨. PCT124는 이 오류가 발생한 '중지' 신호를 우회하도록 만들어서 리보솜이 정상 작동되어 단백질이 정상적으로 만들어지게 유도하므로 이 유전질환의 표적인자인 디스트로핀 단백질의 발현을 정상화시키는데 성공했음을 의미함 **(그림 3)**. 이 신규물질은 또한 근이영양증(muscular dystrophy)과 다른 퇴행성 유전질환에 대한 마우스 시험에서 효과를 입증하고 현재 인간을 대상으로 주의 깊게 시험 중이라고 함. PTC124는

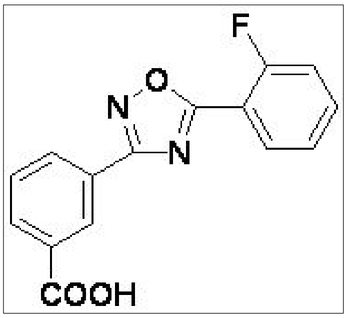


그림3. 현재 FDA 임상 3상단계에 있는 아미노글리코사이드 모방체인 PCT124

생명체의 유전자 흐름을 막아서 주요 단백질 생산을 저해하게 되는 퇴행성 유전질환을 바로잡는 혁신적인 방법으로 2008년에는 낭포성 섬유증(cystic fibrosis: CF) 환자에 대한 임상2상 결과에서도 효과를 입증하고 있음. 특히 이 유전질환은 코카시안 인종에 빈번히 일어나는 퇴행성 유전질환 중 하나로 약 2500명당 1명꼴로 나타나는 것으로 역학 조사되었고 최근의 연구보고에 따르면 이 유전질환은 낭포 내 transmembrane conductance regulator 단백질의 단절화 현상 (truncated protein) 으로 나타나는 질환임. 이번 시험으로 미국 FDA의 신속승인(fast-track authorization)을 받아서 현재 소규모의 DMD 및 다른 낭포성 섬유증 환자들을 대상으로 임상시험을 진행 중으로, 임상시험은 DMD 환자 26명을 대상으로 미국과 이스라엘에서 진행 중이며 앞으로 대규모 임상진행의 결정은 올해 후반기에 결정된다고 함.

특히, 연구진들은 유전자 교환약물이나 효소 대체요법(enzyme-replacement therapy)처럼 주기적으로 정맥 또는 근육 내 주사가 필요 없는 경구 투여 물질이고 잠재 위험도 없다고 함. 이처럼 지금까지 여러 유전성 질환에서 상당히 많은 비율들이 각각 다른 무의미 돌연변이에 의한 질병인 것으로 확인되었으며, DMD의 경우에는 13%가 무의미 돌연변이에 연관되어 있으며 CF는 70%가 연관되어 있다고 함. 그밖에 혈우병, 척수 근위축증, 신경 섬유종(neurofibromatosis), 망막색소상피 변성증 (retinitis pigmentosa) 등이 대표적인 퇴행성 유전질환으로 무의미 돌연변이가 많이 발생한다고 보고되었으며. DMD는 어머니에게서 아이들에게 유전자 결손이 전달되며 일반적으로 어렸을 때 발병하여 30세 이전에 심장이나 폐 기능 결실로 사망한다고 함. 자료에 따라서 차이를 보이지만 남성 3,000-5,000 당 1명의 비율로 발생한다고 함.

3. 아미노글리코사이드계 농용항생제의 유전질환치료제로서 잠재력

➡ 그람 음성 병원균 특이적 항생제 및 그 구조적 특성 최초의 결핵치료제인 streptomycin은 방선균인 Streptomyces griseus에 의해 생성되는 아미노글리코사이드 항생제로서 노벨수상자인 미국 Rutgers 대학의 Selman Abraham Waksman에 의해 1943년에 개발되었음. Streptomycin의 발견 이후, Streptomyces, Micromonospora, Bacillus로부터 카나마이신(kanamycins), 겐타마이신 (gentamicins), 네오마이신 (neomycins), 토브라마이신(tobramycins) 등 다양한 아미노글리코사이드들이 개발되었음 [참고문헌3]. 이처럼 아미노글리코사이드는 penicillin과 함께 가장 오래된 역사의 항생제인 동시에 아직도 전체 항생제 중 약 10% 점유율을 보이고 있는 중요 항생제 중 하나임. 특히 주요 아미노글리코사이드인 겐타마이

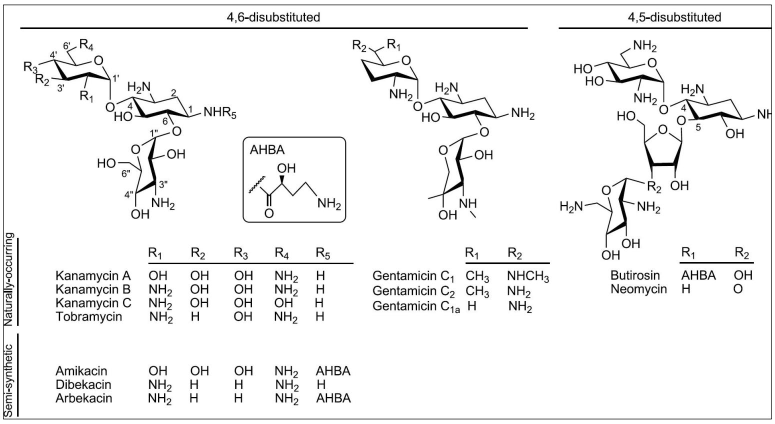


그림4. 2DOS 함유 아미노글리코사이드계 항생제의 종류

신, 카나마이신, 그리고 토브라마이신은 모두 이종의 당쇄결합으로 이루어진 3종의 아미노당 결합 화합물로, 구조의 가운데에 2DOS (2-deoxystreptamine)을 공통적으로 포함하고 있는 대표적인 2DOS 함유 아미노글리코사이드 (2DOS containing aminoglycosides) 임. 하지만, 수십년간 이들 항생제의 인축 항생제로서의 오남용은 내성 병원균의 출현을 야기하였을 뿐만 아니라, 장기간 이용에 따른 상대적으로 높은 신장독성은 이들 아미노글리코사이드계 항생제의 임상 이용 상 한계점으로 인식되어 왔음. 1980년대를 전후하여 내성 병원균의 출현은 이들 천연 항생제의 항생효과와 독성을 높이지 않는 수준으로, 특정 기능기를 치환하거나 항생제 내성 메커니즘을 극복할 수 있는 반 합성 아미노글리코사이드의 합성기법에 발전을 촉진하였고, 대표적인 반 합성 아미노글리코사이드계 항생제에는 아미카신, 다이베카신, 그리고 이세파마이신 등이 있음. 특히 가장 최근에 개발된 반 합성 카나마이신 B 유도체인 아베카신은 90년대를 기점으로 일본에서 임상 사용 중인 실정임. 특히 이들 다양한 구조의 아미노글리코사이드계 항생제는 4,5-와 4,6-결합형 아미노글리코사이드로 대별됨. 4,5-결합형 천연 아미노글리코사이드 중에서 네오마이신은 크림과 로션타입으로 피부 화상, 외상 및 피부염 등 감염 부위에 국소적으로 이용되고 있으며, 이밖에 4,5-결합형으로 네오마이신과는 구조적으로 유사하나 6'-기능기가 수산화 (6'-hydroxy)되어 있는 파로모마이신 (paromomycin)의 경우엔 구충제로 이용되고 있음. 한편 4,6-결합형 아미노글리코사이드인 카나마이신, 겐타마이신, 토브라마이신 등의 천연 항생제 및 반 합성 항생제인 아미카신과 아베카신의 경우 낭포성섬유증 (cystic fibrosis)과 AIDS 및 암 등의 질병에 따른 그람 음성 병원균의 2차 감염 치료제로서 사용되고 있는 실정임 **(그림4)**. 특히 호흡기계 감염 및 낭포성 섬유증의 주요 치사 원인 균인 Pseudomonas aeruginosa의 감염에 겐타마이신이 에어로졸 타입으로 제제 화 되어 있으며, 아프라미이신의 경우엔 그 상대적인 독성 때문에 현재는 수의제제 (veterinary medicine)로만 이용되고 있음.

◘ 아미노글리코사이드 생합성 유전자의 발견 처음 발견된 농용항생제인 streptomycin 이외의 아미노글리코사이드에 대한 생합성 과정의 정보는 매우 제한되어 있는 실정임. 그 원인으로 아미노글리코사이드를 생합성하는 야생생산균주들로부터 그 생합성 유전자집단이 확보되기 시작한 것은 1990년 후반에서야 가능하였으며, 야생균주들은 유전자 조작을 하기가 매우 어렵다는 점임. 최근에 영국의 Cambridge 대학의 Spencer그룹은 2DOS 계열 아미노글리코사이드 항생제 관련 연구를 체외 발현(in vitro) 방법으로 관련 생합성 유전자를 대장균 (Escherichia coli)에서 발현하여 생산되는 단백질로부터 그 기능을 분석하는 기술을 통하여 아

미노글리코사이드의 생합성 경로 각각에 대한 정보를 제시하고 있음. 또한 동경기술원 (Tokyo Institute of Technology)의 Eguchi 박사팀 또한 아미노글리코사이드의 생합성 관련 초기 전구체인 2DOS 생합성 관련 유전자들의 체외발현을 통해 제한적으로 그 유전자 발현산물의 기능을 밝히고 있음. 하지만, 이들 연구팀 모두 생체 내 유전자의 발현을 통한 생합성 과정의 규명보다는 생합성 관련 각각의 효소의 기질특이성이나 그 kinetics를 밝히는데 초점을 맞추고 있으며, 특히, 2DOS구조 포함한 아미노글리코사이드 중 뷰티로신 (butirosin)과 네오마이신을 중심으로 연구하고 있어서, 아직까지도 대표적이며 그 임상빈도가 높은 겐타마이신, 카나마이신, 토브라마이신 등의 전체 생합성 과정은 여전히 상당부분이 예측만 되고 있는 상황임.

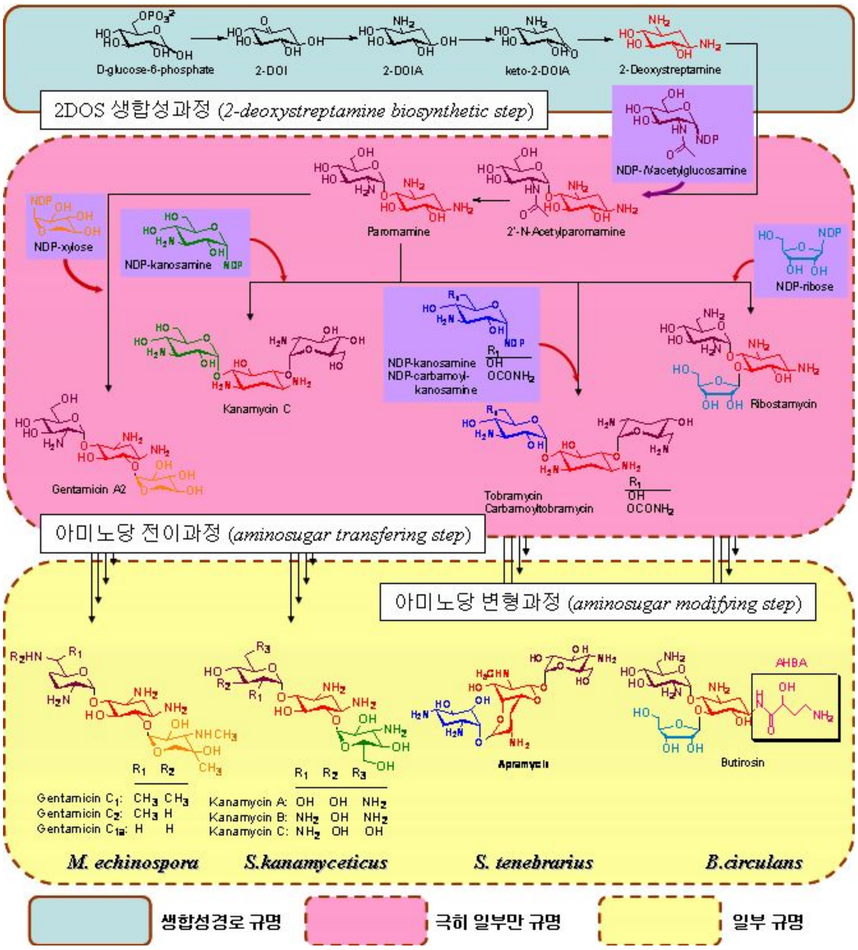


그림5. 아미노글리코사이드계 항생제의 생합성 단계 및 그 연구 진척도

아미노글리코사이드의 생합성은 크게 3가지 단계를 거쳐 생합성 되는 것이 보편적이며, 우선 그 core 구조인 ① 2DOS의 생합성과정 (2DOS biosynthetic step), 다음으로 2DOS의 양쪽 탄소 4번과 6번 수산화기에 아미노당이 각각 결합되는 ② 당 전이과정 (glycosyltransfer step), 마지막으로 3종의 당쇄 가 결합한 후, 각 구성당의 기능기인 수산화기 혹은 아미노기의 화학적 변형이 일어나는 ③ 당전이 후 변형 과정 (post-GT modifying step)이 필수적임 **(그림5)**. 하지만 전술한 바와 같이, 대다수의 생합성과정은 예측 수준에 머물러 있으며, 본 연구팀의 겐타마이신 A2 생합성 경로 규명을 제외하고는 미생물 체내 유전자의 발현을 통한 아미노글리코사이드 항생제의 생합성 경로는 밝혀지지 않고 있음. 이들 아미노글리코사이드 항생제 생산균주들인 *Micromonospora*와 *Streptomyces* 등으로 대별되는 방선균은 유전자 조작이 쉽지 않거나

일반적으로 플라스미드의 selection marker로 사용되는 amphicillin, apramycin, kanamycin 등의 아미노글리코사이드 항생제에 자연적으로 내성이 있으므로 통상적인 유전자 조작에 의해 그 생합성 경로를 규명하고 유용한 생합성 중간체나 유도체의 생산균주를 개발하는 것이 지연되어 왔으며, 특정 유용물질의 선택적 생산 및유도체 생산을 통한 개량항생제의 개발은 전통적인 돌연변이법에 의존할 수밖에 없었음. 따라서 이들 반 합성 아미노글리코사이드의 생산은 매우 중요할 것이나, 자연 생산균주는 발효 시 주로 다양한 유도체들의 혼합물을 생성하며 실제 반합성의 출발물질이 될 수 있는 유도체는 주로 미량으로 생산된다는 문제점이 지적되고 있음. 뿐만 아니라, 그 유기합성법 또한 낮은 수율과 불순물의 정제 상 어려움 등 산업적으로도 해결해야 할 사항임. 또한 항생제의 지속적인 남용으로 인한 새로운 내성 병원성 균의 출현은 그 순환이 계속될 전망임.

항생제로서의 분자수준 작용기작 최근의 항생제 작용 메커니즘에 대한 구조 생화학적 연구, 특히 기존 아미노글리코사이드 항생제와 리보솜 표적과의 결합체에 대한 고해상도 구조 분석은 아미노글리코사이드의 생물학적 작용에 대한 분자수준으로까지의 이해를 돕고 있으며, 이는 아미노글리코사이드계 항생제의 유도체 (analogs) 및 모방체 (mimics)의 개발을 촉진하고 있음. 전술한 아미노글리코사이드계 항생제는 모두 박테리아 30S 리보솜 내 16S 리보솜 RNA의 특정 보존부위인 decoding A site를 표적화 하는 것으로 알려져 있음 **(그림6)**.

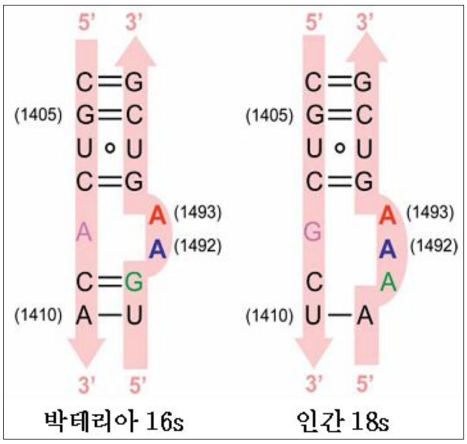


그림6. 아미노글리코사이드계 항생제의 docking 부위인 decoding A site

이 같은 특이적 결합은 단백질의 번역과정의 정확도 (fidelity)를 떨어뜨려서, 결과적으로 단절화(truncated)되거나 불완전하게 folding된 단백질이 박테리아 내 발현되어서 병원균의 사멸을 야기 시킴. 지난 십년간 박테리아 리보솜 구조 결정과 decoding A sire의 올리고핵산 3차원적 구조 규명은 박테리아 내 decoding 메커니즘의 이해하는데 유용한 자료를 제공하였음 [참고문헌4]. 즉 리보솜 내 해독과정 중 aminoacyl-tRNA 선정 단계에서 mRNA의 유전자 코돈와 aminoacyl-tRN의 상보 코돈간의 mini-helix 형성은 decoding A site 내 구조를 “off” 상태 (두개의 보존 코돈인 아데닌 A1492와 A1493가 helix 안으로 접혀 있는 상황) 에서 “on" 상태 (두개의 코돈이 해독 A 부위에서 튀어나와 helix내 상보적 결합과 상호 작용하는 상황)로 구조적 변화를 일으킴 **(그림7)**. 이 같은 구조적 변화는 일종의 분자적 스위치로서 번역과정을 지속하

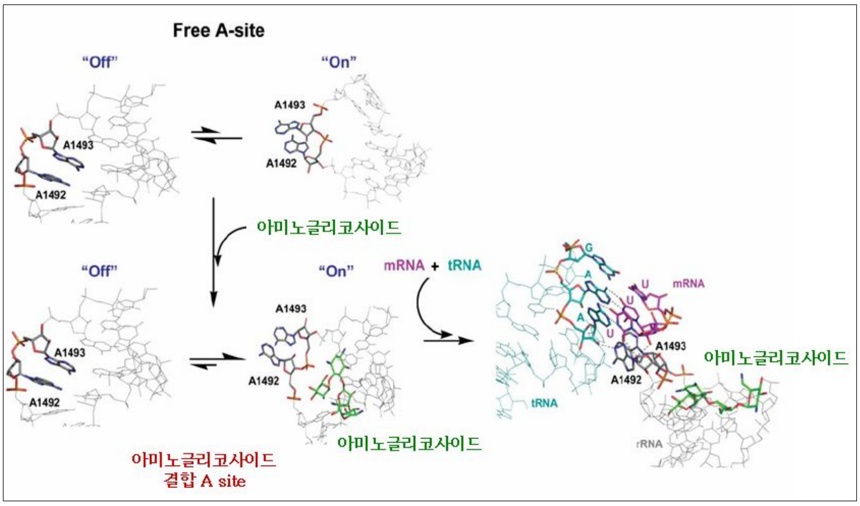


그림7. 아미노글리코사이드의 리보솜 구조 내 분자 switch로서의 역할

는데 비가역적인 주요 결정자라 할 수 있음. 파로모마이신 (paromomycin)과 같은 아미노글리코사이드의 박테리아 decoding A site와의 결합은 심지어 tRNA와 mRNA의 상보적인 결합이 없는 상황에도 보존 아데노신 코돈의 구조적 평형화를 변형시킴. 따라서 아미노글리코사이드 결합에 따른 decoding A site와 비상보적 상태인 tRNA와 mRNA 결합체간의 향상된 친화도는 리보솜이 상보적 또는 비상보적인 tRNA-mRNA 결합을 구분하지 못하게 하며, 결과적으로 단백질의 지속적인 번역화를 가능케 함. 한편 박테리아 리보솜에 특이적인 이들 아미노글리코사이드 항생제의 작용 기작이 치료 유용성에 대부분을 차지하고는 있으나, 아미노글리코사이드계 항생제는 병원균의 리보솜에만 국한되지 않고, 진핵세포 내 리보솜과의 결합에도 관여하여서, 이에 따른 오번역(misstranslation)을 촉진시키는 효과도 보고 되어 오고 있음. 특히 아미노글리코사이드계 항생제의 진핵세포내 단백질 합성을 방해하는 기작의 발견은 항생제의 특이적 항생기작에 있어서는 단점이라 할 수 있으나, 인체 내 조숙 무의미 돌연변이 (premature nonsense mutation)에 따른 유전질환의 치료 신약제제로서의 잠재적 응용성 입장에서 매우 흥미로운 토픽으로 대두됨.

Nonsense Readthrough Inducer (NRI) 지난 몇 년간, 아민글리코사이드는 항생제로서 이용 뿐 만아니라 premature stop codon 일명 무의미 돌연변이 (nonsense mutation)에 기인한 인간 유전질환 치료 효과는 또 다른 약제 잠재성을 보여주고 있음. 특히 이들 유전질환들은 3종의 '중지'코돈 (UAA, UAG 혹은 UGA) 중 하나가 아미노산 코딩 코돈을 치환시켜 특정 단백질의 premature 종료를 야기 시키고, 결국 단절된(truncated) 단백질만을 발현되는 것으로 알려지고 있음. 현재까지 이 같은 nonsense mutation이 수백 종 발견되고 있으며, 그중 치명적인 유전질환으로는 CF, DMD, ataxia-telangiectasia, hurler syndrome, hemophilia 등이 있음. 뿐만 아니라 이들 유전질환에 대하여 뚜렷한 치료제 또한 아직 없는 상태여서, 최근 각광 받고 있는 gene theraphy가 그 실마리가 될 수는 있으나 전술한 바와 같이 아직까지 유전자치료를 임상화 하기 엔 여전히 다수의 문제점이 남아있는 실정임. 유전질환 치료제로서 아미노글리코사이드의 잠재성은 생체 내 리보솜이 premature stop codon을 'read-through' 하도록 유도함으로서 무의미 돌연변이 (nonsense mutation)를 억제할 수 있는 능력에 기인한다 할 것임 (**그림 8**). 즉 이 같은 기작은 유사 상보적인 tRNA에 의해 무작위적 으로 아미노산이 삽입됨으로서

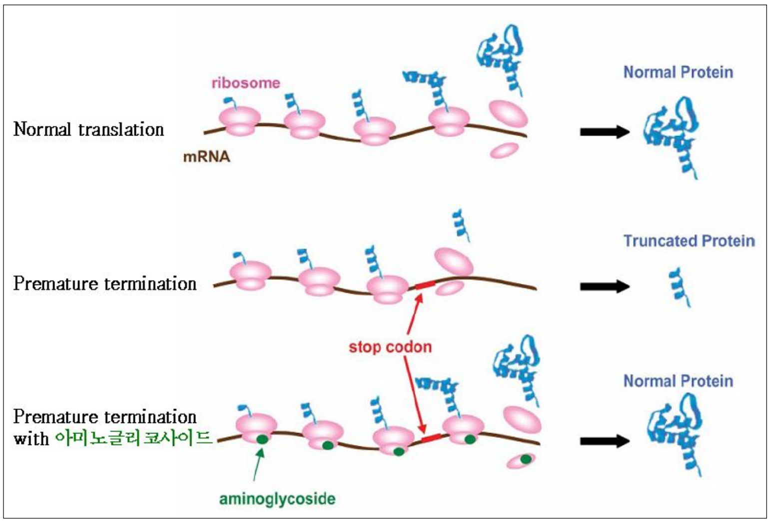


그림8. 아미노글리코사이드의 NRI 메커니즘

mRNA로부터 온전한 full-length의 단백질 합성이 이루어지는 것을 의미함. 일반적으로 단백질 합성의 종료는 mRNA내 '중지'코돈 (stop codon)이 나타남으로서 signal화 되며, 최종적으로 release factor 단백질들에 의해 조절되는 것으로 알려져 왔음. 이 같은 번역 종료의 효율은 상당히 높아서 '중지'코돈 하나 당 아미노산의 missincorporation 가능성은 일반적으로 약 10000분지 1의 이하임. 이 같은 진핵세포 내 아미노글리코사이드에 의한 번역 종료 억제현상은 박테리아 내 단백질 합성에 있어서 번역 충성도를 방해하는 항생기작 **(그림9)**과도 일맥상통한 것으로 특정 아미노글리코사이드의 리보솜 내 decoding A site와의 결합은 유사 상보적인 mRNA-tRNA 결합체를 안정화시키는 구조적 변화를 일으키는 것으로 예측됨 .

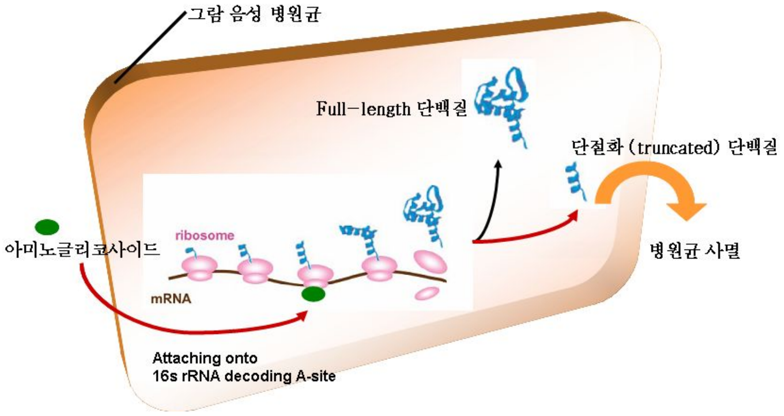


그림9. 기존 아미노글리코사이드계 항생제의 항생기작

아미노글리코사이드가 인체 유래세포 내 premature nonsense mutation을 억제할 수 있음은 1985년 처음으로 밝혀졌으며, 첫 시도된 유전질환 케이스는 CF이었음 [참고문헌5]. 특히 이 유전질환은 코카시안 인종에 빈번히 일어나는 열성 유전질환 중 하나로 약 2500명당 1명꼴로 나타나는 것으로 역학조사 된 바 있으며, 최근의 연구보고에 따르면 이 유전질환은 낭포 내 transmembrane conductance regulator (CFTR) 단백질의 돌연변이화로 나타나는 질환이며, 겐타마이신 계열 아미노글리코사이드를 통한 CFTR 단백질의 nonsense readthrough현상이 유도됨을 임상적으로 확인한 바도 있음 [참고문헌6]. 그 밖에 다른 유전질환으로 DMD, Hurler

syndrome, ataxia-telangiectasia 등을 대상으로 in vitro 활성, 세포 주 및 동물 실험으로 이루어지기도 하였음. 이들 연구의 대부분에 있어서, 온전한 full-size 기능성 단백질의 회복은 사용된 아미노글리코사이드의 종류에 따라 1부터 25%까지 다양하였음. 하지만 이 같은 특정 단백질 발현이 근본적으로 없는 퇴행성 유전질환의 경우에는 해당 단백질의 기능이 정상에 비해 1%만 나타나더라도, 임상적으로 생존가능한 완화된 형질을 유지하고, 근본적인 생명유지가 가능함은 주목할 부분임. 따라서 퇴행성 유전질환의 경우 아미노글리코사이드는 gene theraphy의 대체 수단 혹은 병용될 수 있는 주요 후보물질이라 할 것임.

표1. 유전질환치료용 의약제제 개발 연구기관의 현황

연구수행기관	연구개발 기법	연구상 문제점
PTC therapeutics (미국)	아미노글리코사이드 모방체 전 합성	• Hit 확률이 극히 낮음 (1/100,000) • 고비용
이스라엘기술원	아미노글리코사이드 유도체 반 합성	• 낮은 수율 • 다단계 유기화학 공정
**대학교	아미노글리코사이드 유도체 생합성	• 관련생합성 유전자들에 대한 정보 불충분 • 실용화 걸음마 단계

2절. 기존연구의 문제점

1. 퇴행성 유전질환치료 목적 아미노글리코사이드의 현 상황 한계점

➡ 시판 기존 아미노글리코사이드계 항생제의 NRI 효과 수십 년간 아미노글리코사이드의 유기합성의 목표는 내성 병원균에 보다 효과적인 후보군을 도출하는데 초점을 맞추었으며, 유전질환치료용 표적인자인 NRI에 대한 연구는 거의 전무한 실정이었음. 현재까지도 유전질환치료제로 연구되고 있는 아미노글리코사이드는 모두 상용화되고 있는 아미노글리코사이드계 항생제를 대상으로 하고 있음. 상용화되고 있는 아미노글리코사이드의 in vitro NRI 활성을 비교해 보면, 6‘ 수산기를 가진 아미노글리코사이드 (겐타마이신 생합성 중간 대사체 중 하나인 G-418과 파로모마이신)가 동일 위치에 아미노기를 가진 아미노글리코사이드보다 우수한 억제 활성을 나타내고 있음.

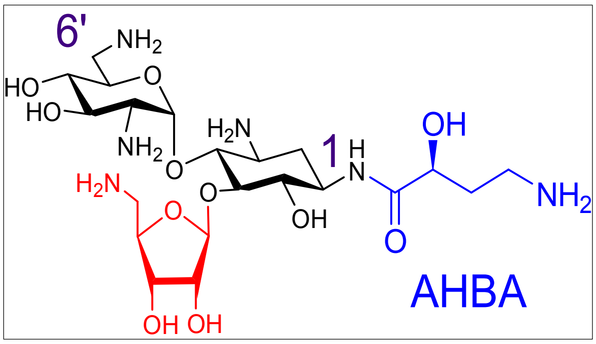


그림10. 전 임상단계에 있는 유전질환치료용 반 합성 아미노글리코사이드 NB54

➡ 유전질환치료용 반합성 아미노글리코사이드 및 임상단계 진입 후보물질 2009년 이

스라엘 연구진들은 기존 아미노글리코사이드 항생제인 파로모마이신과 겐타마이신에 비교하여 향상된 NRI 활성을 지닌 유도체 NB54을 반 합성 하는데 성공하였음 [참고문헌7]. 또한 신장세포주를 대상으로 한 세포독성의 경우에도 기존 상용화 항생제에 비하여 약 10배쯤 낮은 독성을 보이는 것으로 나타났음. 실제로 생체 내 유전자의 무의미 돌연변이가 원인이 되어 나타나는 퇴행성 유전질환인 Usher syndrom 질환자 내 주요 표지자인 PCDH15 단백질을 대상으로 한 ex vivo 검정법 또한 그 NRI효과가 유효하게 나타나 현재 전 임상 단계 중임 **(그림10)**.

◘ 아미노글리코사이드 반 합성법의 한계점 전술한 이스라엘 연구진의 신규 유전질환치료용 후보 아미노글리코사이드의 반합성법은 기존 천연 아미노글리코사이드를 원재료로 사용하여 유기합성법으로 특정 기능기를 변환시키는 방법임 **(그림11)**. 하지만 이 같은 반 합성법에는 천연 아미노글리코사이드의 주요 대사체가 아닌 미량 대사체를 활용했다는 점, 그리고 최소 5단계이상의 다단계의 화학합성 후에도 낮은 수율과 불순물의 정제 상 어려움 등 산업적으로도 해결해야 할 사항이 여전히 남아있음.

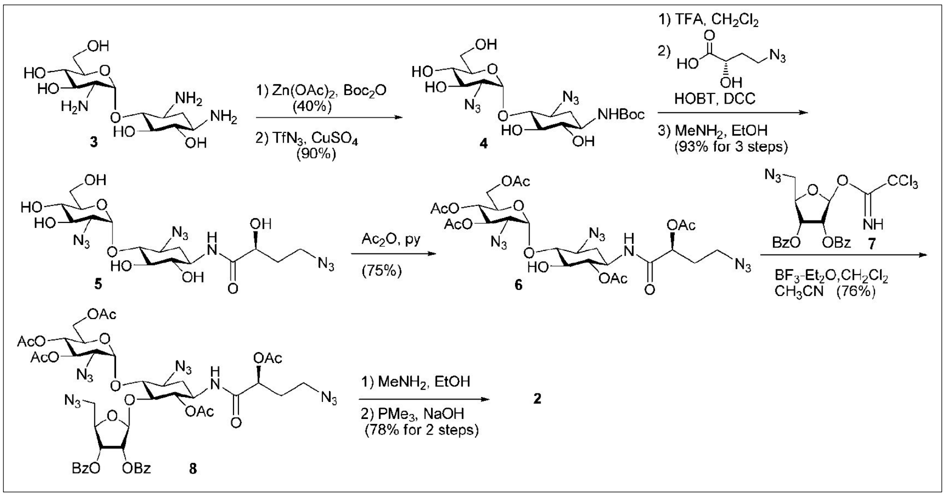


그림11. Neamine을 전구체로하여 NB54 유전질환치료용 아미노글리코사이드를 반 합성하는 복잡한 유기합성 공정

생화학자가 아미노글리코사이드의 연구에 아예 선을 그어 버리고 가까이 하지 않았던 또 하나의 큰 이유는 이러한 물질을 취급할 경우 많은 화학 반응 상 문제점이 내재한다는 점임. 아미노당은 거의 같은 정도의 화학반응성을 갖는 다수의 수산기를 보통 5개 이상을 갖는 다관능기성 화합물임. 어느 것 1개의 수산기에만 처리한다는 것은 매우 어려운 문제로서, 즉, 1개의 수산기만을 보호하거나 유리상태로 놔두기란 매우 어려운 일임. 정밀한 실험계획과 일련의 복잡한 화학반응을 필요로 함. 따라서 2당(disaccharide)의 합성은 상당히 곤란한 일이며, 3당(trisaccharide)가 되면 별로 그 합성예가 없어서, 훨씬 큰 올리고당합성에 대해서는 거의 보고조차 없음. 이것이 peptide화학의 경우와는 매우 대조적인 것이라 할 수 있음.

◘ 신속 간편한 in vitro NRI 활성 검정법 필요성 전술한 바 있는, 현재 임상3상에 도전중인 미국 바이오벤처회사인 PTC therapeutics에서는 조합합성법으로 만들어진 약 10만의 화학물질 라이브러리로부터 아미노글리코사이드계 항생제의 구조적 모방체 (mimics)인 PTC124를 후보물질로 개발하고 있으며, 그 연구진들은 이들 라이브러리의 NRI 활성 검정을 위하여

자체적으로 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 기반 HTS (high throughput screening) 기술을 개발하여 특허화 하였음 **(그림12).**

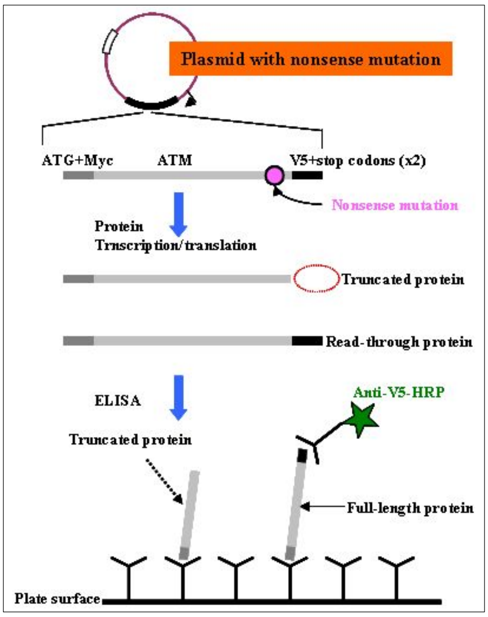


그림12. 미국 PTC therapeutics에서 특허화 한 in vitro NRI 검정용 ELISA기법

이 기술은 우선 퇴행성 유전질환의 하나인 DMD를 앓고 있던 환자의 특정 결여 디스프로핀, 즉 무의미 돌연변이가 일어난 유전질환 표적인자를 암호화하고 있는 유전자를 대장균 내 발현하는 것임. 특정 유전자를 발현하기 전, N-말단 앞으로 Mycoplasma 표면 단백질 (Myc) 암호화 유전자를 그리고 C-말단 뒤쪽으로 레트로바이러스 일종인 V5 표면 단백질 (V5) 암호화 유전자를 각각 연결하여 ex vivo 발현시킴. 이 후, 발현된 단절 (truncated) 단백질이나 첨가된 NRI 활성 화합물에 의해 온전하게 (full-length) 발현된 디스트로핀을 미리 항 Myc 항체로 코팅시킨 96well plate에 경쟁 반응시킴. 최종적으로 완전히 발현된 드스트로핀의 경우엔 V5 N-말단까지 발현됨으로써 항 V5-HRP의 첨가를 통해 NRI 활성을 정량화 하는 기술임. 이와 같이 ELISA 기반 HTS 기술은 PTC theraputics의 기술력으로 특허화되어 있으므로 본 연구진에서 활용하기엔 기술력 이전 비용 및 추가적인 비용상 문제가 제기되므로, 다른 별도의 NRI 활성 검정법이 필요할 것임. 또한 competative direct ELISA 기반 HTS 검정법의 경우엔, 약 1%의 가양성 결과가 나올 수 있고, titration 시 감도가 둔화될 수 있다는 단점이 PTC therapeutics의 연구진에 의하여 보고가 된바 [참고문헌8], 그 고속 효율성을 뛰어 넘을 수는 없겠지만, 실험실 수준에서 검정이 가능한 간편하고 빠른 NRI 활성 검정법의 개발이 요망되고 있음.

➡ 아미노글리코사이드의 세포 독성 문제점 아미노글리코사이드의 제제화함에 있어서 제한점 중 하나는 인체 내 신장 및 내이신경 독성과 관련된 side effect로서 무엇보다, 아미노글리코사이드의 유전질환치료제로서의 응용 가능성의 가잘 큰 걸림돌은 바로 상대적으로 높은 세포독성임. 즉 대증용법으로서 유전질환치료제의 이용에는 전생애주기를 통한 꾸준한 투약이 필요하므로, 현재 상용 아미노글리코사이드의 투약수준이 치사량에 이르지는 않으나 환자 내

특정 장기에 대한 독성은 보완되어야 할 상황임. 가령, NRI 활성이 우수한 것으로 보고되고 있는 겐타마이신 중간 대사체인 G-418의 경우, 낮은 수준의 농도 하 에서도 그 세포독성이 여전히 높아서 신약화가 불가능한 실정임 (G-418의 LD50: 0.04 µg/ml, 겐타마이신 혹은 카나마이신의 LD50: 2.5~5.0 µg/ml). 감염증치료제로서 지금까지도 장내감염 치료제로 이용되고 있는 아미노글리코사이드로 겐타마이신, 아미카신 그리고 토브라마이신이 있으나, 겐타마이신의 경우에만 임상 연구가 수행되었음. 이 같은 독성의 원인은 생체 내 phospholipids와의 결합, phospholipase 억제, 그리고 free radicals의 생성과 같은 복합적 원인으로 인식되어 오고 있음. 박테리아 리보솜과의 선택적 결합이외에도 대다수의 아미노글리코사이드는 보다 낮은 친화도로 decoding A site와 결합함. 아미노글리코사이드 세포독성의 또 다른 원인은 리보솜 이외에 미토콘드리아 12S rRNA decoding A site와의 결합에 기인할 것으로 추정하고 있음. 아미노글리코사이드의 구조 scaffold 내 독성을 유도하는 기능기와 그 항생활성 부위는 서로 상이함에 대한 여러 보고가 있음 [참고문헌9]. 첫째, 기존 임상 이용중인 아미노글리코사이드로부터 나온 급성독성 데이터와 일부 화학 합성 아미노글리코사이드간의 비교를 통하여 아미노글리코사이드의 독성과 관련되어 deamination(탈아미노)과 deoxygenation(탈수산화)이 2가지 주요 요인임이 밝혀졌음. 즉, 아미노글리코사이드 구조 scaffold 내 아미노기의 숫자가 줄어들수록 그 독성은 약화되며, 반면 수산기의 숫자가 줄어들수록 그 독성은 강화되는 것으로 보고 됨. 가령, 파로모마이신과 그 구조적 유사체인 네오마이신의 세포독성을 조사한 결과, 6‘-아미노기가 없는 파로모마이신이 그 세포독성이 낮음을 알 수 있었고 (파로모마이신의 LD50: 160 µg/ml, 네오마이신의 LD50: 24 µg/ml), 이는 하나의 기능기 변화가 아미노글리코사이드의 세포독성에 유의적은 변화를 줄 수 있음을 시사하고 있으며, 카나마이신 B와 그 congener인 A 및 C의 독성 비교에서도, 아미노기의 숫자가 하나씩 적은 카나마이신 A와 C의 LD50 수치가 카나마이신 B에 비하여 높았음 (카나마이신 A의 LD50: 280 µg/ml, 카나마이신 C의 LD50: 225 µg/ml, 카나마이신 B의 LD50: 132 µg/ml). 이와 같은 구조 내 활성 아미노기 숫자의 감소에 따른 아미노글리코사이드 독성의 감소는 세포 내 다른 구성물과의 상호결합과 같은 비특이적인 상호작용 또는 활성 라디칼의 낮은 생성률로 설명될 수 있음. 반면 deamination과는 별도로, 아미노글리코사이드 구조 내 deoxygenation은 독성을 향상시키는 것으로 보고됨. 가령, 카나마이신 B (LD50: 132 µg/ml) scaffold 내 3’-수산기가 제거된 토브라마이신의 경우 세포독성이 높게 나타남 (LD50: 79 µg/ml). 카나마이신 B의 5-수산기를 5-fluorine으로의 화학 치환 역시 동일한 결과를 보여주고 있음 [참고문헌10]. 한편, 또 다른 아미노글리코사이드 독성관련 결정 인자 중 하나는 2DOS core 구조 내 N-1-아미노기의 acylation임. 즉 니아민 (neamine)과 N-1-AHBA-neamine의 세포독성을 비교할 경우 N-1-아미노기의 acylation을 통한 아미노기의 protection은 낮은 독성을 보이는 것으로 밝혀졌음 (LD50; 니아민의 LD50: 125 µg/ml, N-1-AHBA-니아민의 LD50: 260 µg/ml). 뿐만 아니라 최근 겐타마이신 대사체 4종을 대상으로 한 신장 및 세포독성 연구에서. 아미노글리코사이드 구조 내 단일키랄 탄소 원자의 구조적 변화는 그 항생활성에는 차이를 보이지 않으며 그 독성을 감소시킬 수 있음을 보여주고 있음. 즉 겐타마이신 주요 대사체인 겐타마이신 C1, C2, C2a 와 C1a 중에서, 겐타마이신 C2a의 6‘-diastereomer인 겐타아미신 C2는 매우 낮은 세포 독성을 보여주었음. 따라서 이 같은 겐타마이신 C2의 경우, 아직까지 겐타마이신 대사체 들과의 read-through 효율이 조사되지는 않았으나, 유전질환치료제로의 응용화의 필수불가결 요인인 생애주기로 이용성이 가능할 것이므로, 유전질환치료 후보 겐타마이신으로 응용화가 가능할 것임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 일차년도 연구개발 내용 및 결과

1. 일차년도 연구개발 추진개요

가. 농용항생제 일종인 카나마이신 관련 신규 유도체의 스트렙토마이세스 내 생합성

■ **아미노글리코사이드 생합성유전자들을 경로공학화하여 이종숙주 스트렙토마이세스로부터 유도체 생합성** 본 연구 일차년도와 이차년도 수행을 통해 미생물 내 생합성 되는 아미노글리코사이드 유도체들의 생합성을 위하여 각 생합성유전자들의 발현 단백질의 촉매반응을 토대로 한 경로공학을 미생물 생산시스템 구축에 적용함. 즉 각각의 생합성유전자산물의 기능을 예측하여, 특정 유전자 조합을 만들면 이는 방선균의 일종으로 미리 유전자 조작된 재조합균주인 *Streptomyces venezuelae*에 특정 생합성경로를 만들어주어서 본 연구진이 의도한 아미노글리코사이드 유도체의 스트렙토마이세스 내 생합성을 가능케 함. 특히, 그 발현 유전자 조합들을 우선 각각 *Streptomyces-E. coli* shuttle vector인 high copy pSE34로 합쳐 클로닝한

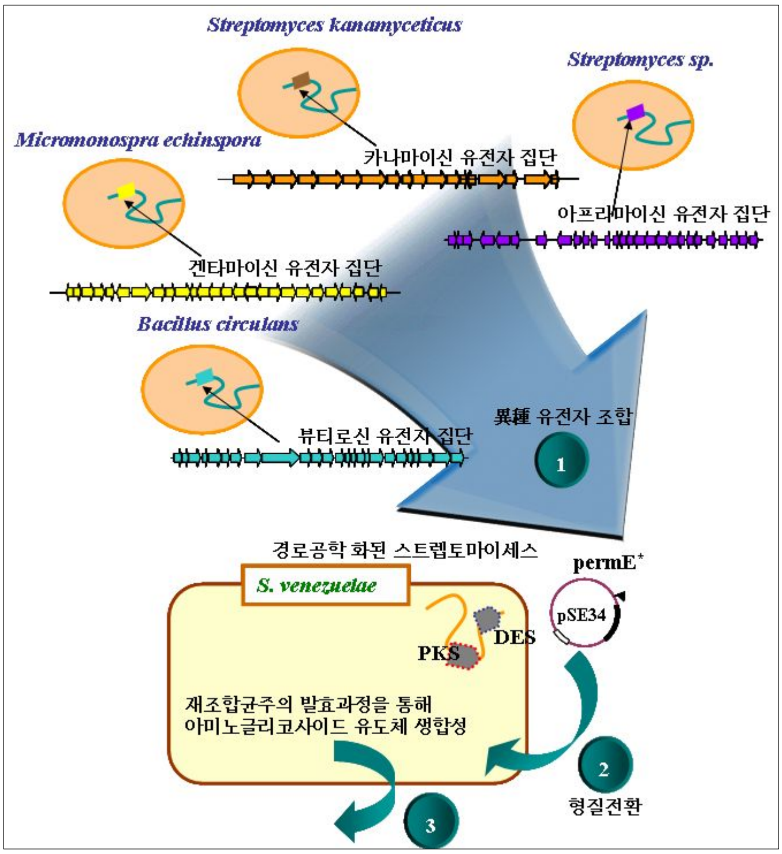


그림13. 일·이차년도 아미노글리코사이드 유도체 생합성 추진전략

후, 이종숙주인 스트렙토마이세스에 형질전환시킴. 이때 selection marker로는 thiostreptone resistant를 표현형으로 하여 그 형질전환체를 선발하게 됨. 이 재조합 스트렙토마이세스를 R2YE 배지에 3일간 진탕배양한 후, 상등액 만을 모아서 20 mM HCl로 산성화 시킨 후 OASIS MCX (Waters) 양이온교환 고체상추출법으로 cleanup하고, 끝으로 5 % 암모니아수 함

유 메탄올로 카트리지에 흡착된 아미노글리코사이드를 추출해냄. 추출액을 SpeedVac으로 완전히 날린 후, 소량의 증류수에 다시 녹여 일정량을 본 연구팀 개발 고감도 HPLC/ESI-MS/MS [참고문헌11]에 주입하여 의도하는 유도체가 나오는지를 확인할 수 있음. 이상의 경로공학 설계된 유전자 set의 스트렙토마이세스 미생물 내 발현하는 일·이차년도 추진전략은 다음 그림과 같음 **(그림13)**. 특히, 본 연구에선 퇴행성 유전질환치료제로 응용 가능한 신규 아미노글리코사이드 유도체들은 선발하는 것이 목적이므로, 우선 기존 상용 아미노글리코사이드 중 그 NRI 활성이 타 아미노글리코사이드에 비하여 우수한 것으로 보고가 된 겐타마이신과 카나마이신을 기본골격으로 하였음. 다음으로 전술한 바와 같이 아미노글리코사이드의 유전질환 치료제로 활용하기 위해선 기존 항생제로서의 임상적용상 단점으로 지적받고 있는 세포독성이 감소된 아미노글리코사이드 유도체를 개발하여야함. 기존의 아미노글리코사이드 독성연구로부터 도출된 중요 지표는 다음과 같음. 첫째, 기능기로서 수산기의 증가와 아미노기의 감소가 아미노글리코사이드의 세포독성을 낮추는데 유용하였다는 점임. 둘째로는 아미노기에 이웃한 수산기의 제거는 아미노글리코사이드 구조내 염기화를 초래하여 오히려 그 독성이 강화된다는 점임. 셋째로, 겐타마이신의 대사 중간체인 겐타마이신C2와 C2a는 구조적으로 매우 유사한 6번 chiral carbon의 diastereomers임에도 겐타마이신C2의 NRI 활성이 월등히 높다는 점임. 마지막으로 아미노기 혹은 수산기를 특정 비이온성 기능기로 치환할 경우, 그 독성 또한 감소된다는 점임. 따라서 이상의 기존 보고를 통하여 본 연구팀은 다음과 같은 3종의 기능기 제거 및 특정 기능기의 부가로서 유전질환치료의 주요 활성인 NRI 활성을 유지 또는 증가시키는 한편, 그 세포독성을 감소시킬 것으로 기대되는 생합성방법을 전략화 하기로 함.

- 아미노글리코사이드 구조 scaffold 상 아미노기와 이웃하지 않는 수산기의 제거
- 아미노글리코사이드 구조 scaffold 상 1-아미노기에 acylrl를 부가
- 아미노글리코사이드 구조 scaffold 상 6‘-메틸기의 부가
- 아미노글리코사이드 구조 scaffold 상 6‘-메틸기의 부가

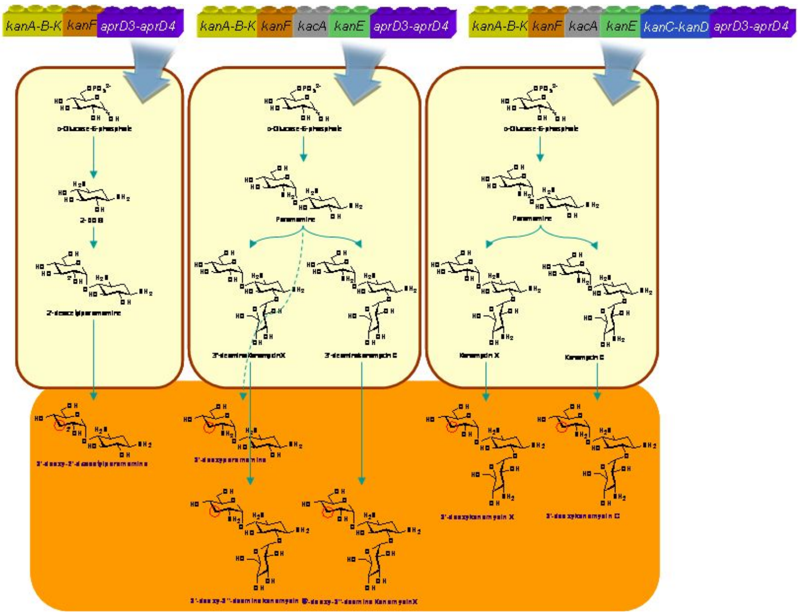


그림14. 생합성경로 공학화를 통한 3‘-deoxykanamycin 유도체 생합성

◘ 3‘-수산기가 제거된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조

확인   본 연구팀이 선행연구로 밝혀낸 바 있는 카나마이신 중간 대사체인 2종의 2당과 4종의 3당을 미생물 내 생합성할 수 있는 카나마이신 생합성 유전자 집단 (gene cluster) 내 특정 유전자 조합에 추가적으로 이종(異種)의 아프라마이신 생합성유전자인 aprD3-D4 유전자 set을 추가 발현한 스트렙토마이세스로부터 카나마이신 관련 신규 유도체들을 생산하고, 이를 분리 정제하여 최종 NMR signal assignment로 구조를 확인하고자 함. 3‘-dehydroxykanamycin 유도체의 생합성 세부 전략은 위 그림과 같음 **(그림14)**.

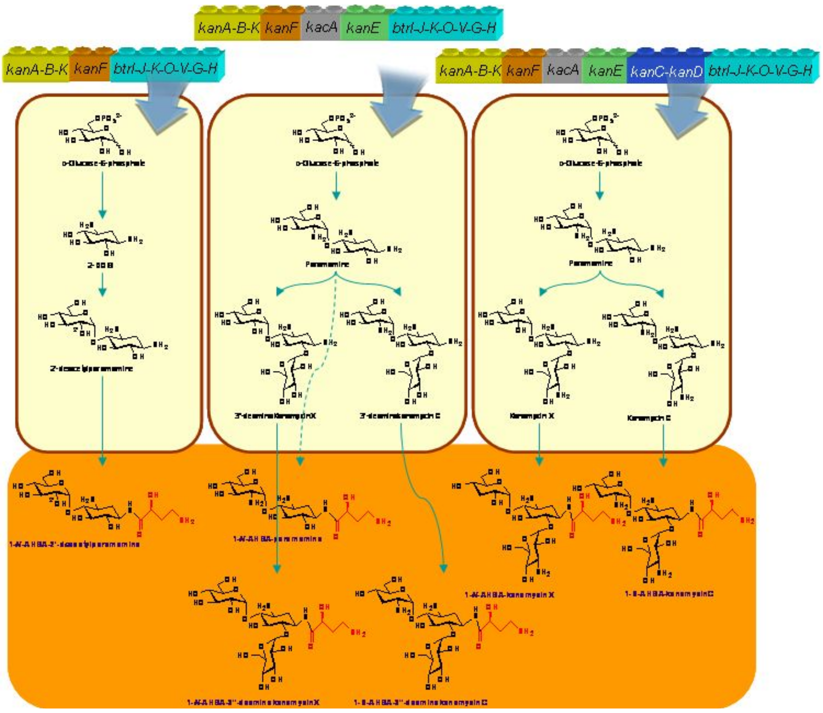


그림15. 생합성경로 공학화로 1-*N*-AHBA-kanamycin 유도체 생합성

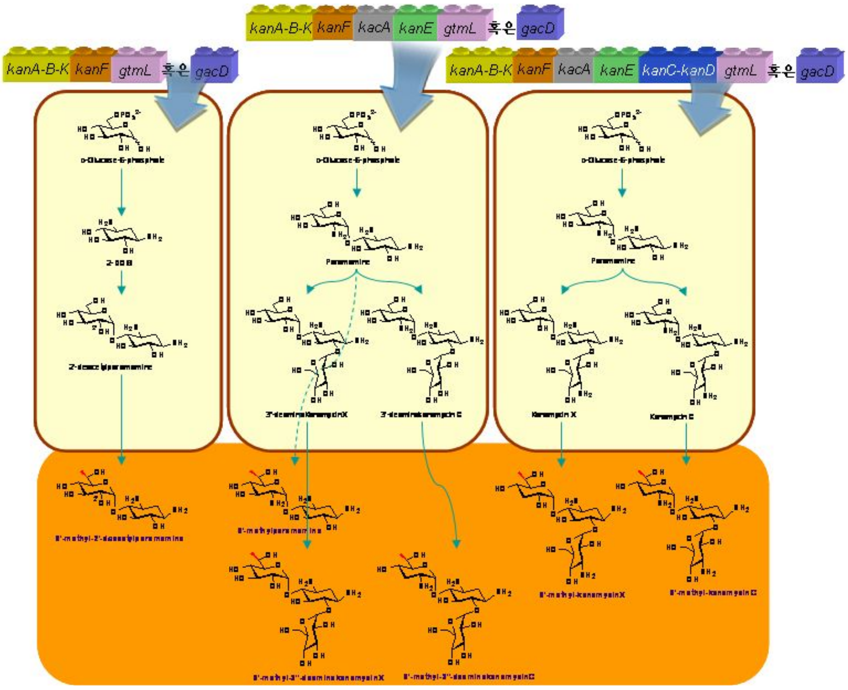


그림16. 생합성경로 공학화를 통한 6′-methylkanamycin 유도체 생합성

◘ *N*-1-AHBA 기능기가 부가된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인 전술한 2종의 2당과 4종의 3당을 생합성하는 유전자 조합에 뷰티로신 생합성 유전자 집단으로부터 분리 클로닝된 AHBA 생합성 및 부가 생합성 유전자 7개를 추가 발현하여 6종의 유도체를 미생물 내 생산하고, 이를 분리 정제하여 최종 구조 분석을 실행함. *N*-1-AHBA kanamycin 유도체의 생합성 추진 전략은 다음과 같음 (그림15).

◘ 6′-메틸기가 부가된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인 동일한 카나마이신 중간 대사체 생합성 유전자 조합에 추가적으로 이종(異種)의 겐타마이신 생합성 유전자인 gtmL 혹은 gacD 유전자를 각각 발현한 스트렙토마이세스로부터 카나마이신 관련 신규 유도체들을 생산하고, 이를 분리 정제하여 최종 NMR signal assignment로 구조를 확인하고자 함. 6'-methylkanamycin 유도체의 생합성 추진 전략은 다음과 같음 (그림16).

나. 전기영동(GE) 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축

◘ 퇴행성 유전질환인 CF와 DMD 표적인자인 디스트로핀과 CFTR 단백질 내 nonsense mutation '중지'코돈을 포함한 일부 subunit을 대장균 내 발현 각각의 단백질은 이미 GenBank accession number로 등록되어 있어서 대장균 발현시스템을 구축하는데 큰 어려움을 없을 것임. 특히 무의미 돌연변이가 일어나는 '중지'코돈을 포함하고 있는 최소 단백질 subunit 만을 발현할 계획임. 디스트로핀과 CFTR 표적인자 일부 subunit을 암호화하는 유전자를 인공 합성하여 대장균 내 플라스미드 상태로 형질전환 시킴. 위 2종의 단백질을 발현하는 대장균을 배양한 후, CFE를 제조함. 이후 다양한 농도의 시판 카나마이신과 카나마이신 유사체들을 0-6.4 μg/ml 수준으로 CFE 반응액에 첨가한 후 3시간 반응을 실시함. 반응 후, 단백질을 분리 농축한 다음 최종 SDS-PAGE 상에서 절단 단백질과 온전하게 발현된 단백질간의 겔 상 intensity를 비교하여 NRI 활성을 검정함.

2. 일차년도 연구개발 내용

<table>
<tr><th>연 구
범 위</th><th>연구수행방법</th><th>구체적인 내용</th></tr>
<tr><td>3‘-수산기가 제거된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인</td><td>아미노글리코사이드 생합성유전자들을 경로공학화하여 이종숙주 스트렙토마이세스로부터 3‘-deoxykanamycin 유도체 생합성</td><td>- 각각의 생합성유전자산물의 기능을 예측하여, 특정 유전자 조합을 만들면 이는 방선균의 일종으로 미리 유전자 조작된 재조합균주인 Streptomyces venezuelae에 특정 생합성경로를 만들어주어서 본 연구진이 의도한 아미노글리코사이드 유도체의 스트렙토마이세스 내 생합성을 가능케 함. 특히, 그 발현 유전자 조합들을 우선 각각 Streptomyces-E. coli shuttle vector인 high copy pSE34로 합쳐 클로닝한 후, 이종숙주인 스트렙토마이세스에 형질전환시킴. 이때 selection marker로는 thiostreptone resistant를 표현형으로 하여 그 형질전환체를 선발하였음. 이 재조합 스트렙토마이세스를 R2YE 배지에 3일간 진탕배양한 후, 상등액 만을 모아서 20 mM HCl로 산성화 시킨 후 OASIS MCX (Waters) 양이온교환 고체상추출법으로 cleanup하고, 추출액을 SpeedVac으로 완전히 날린 후, 소량의 증류수에 다시 녹여 일정량을 본 연구팀 개발 고감도 HPLC/ESI-MS/MS 에 주입하여 목적 유도체의 생산성을 확인함 (그림17).

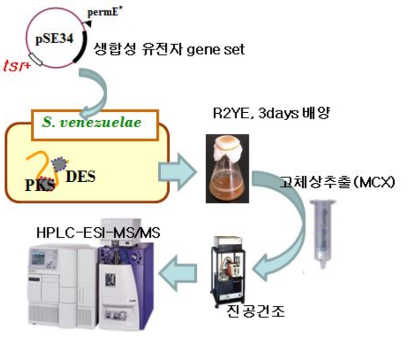
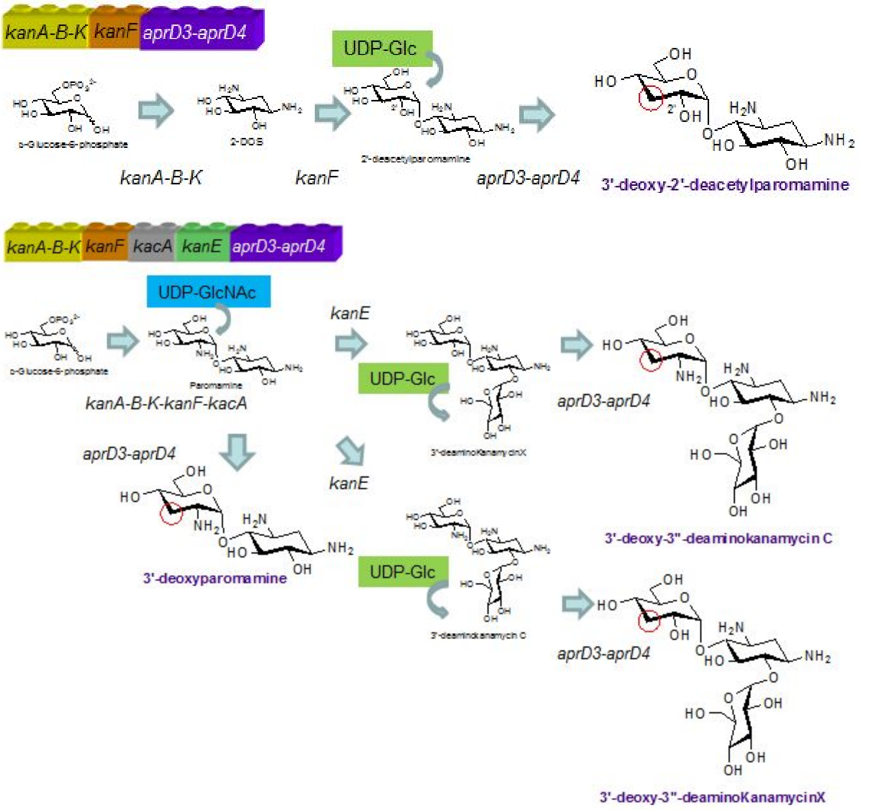


그림17. 유도체 생합성 방법

- 본 연구팀이 선행연구로 밝혀낸 바 있는 카나마이신 중간 대사체인 2종의 2당과 4종의 3당을 미생물 내 생합성할 수 있는 카나마이신 생합성 유전자 집단 (gene cluster) 내 특정 유전자 조합에 추가적으로 이종(異種)의 아프라마이신 생합성유전자인 aprD3-D4 유전자 set을 추가 발현함 (그림18).


</td></tr>
</table>

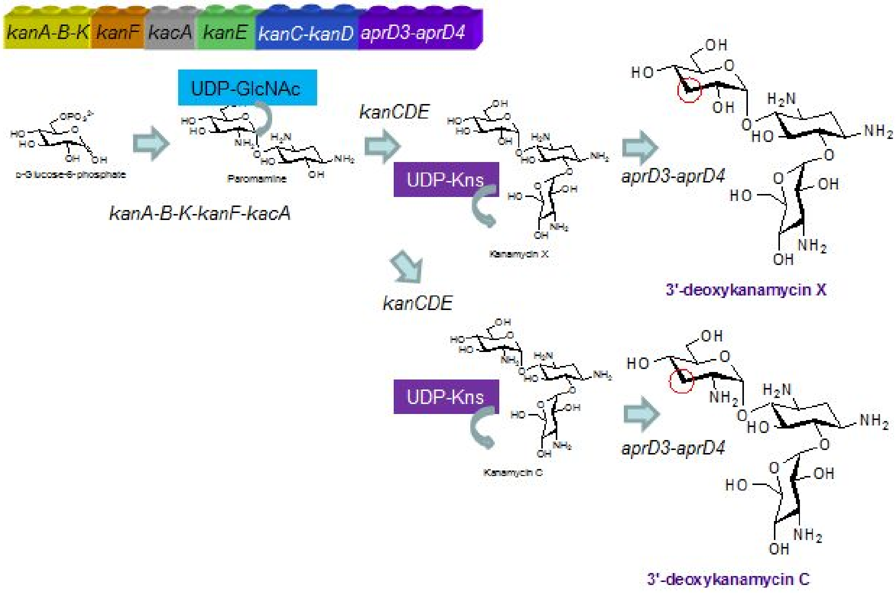
<table>
<tr><th>연 구
범 위</th><th>연구수행방법</th><th>구체적인 내용</th></tr>
<tr><td>3‘-수산기 가 제거된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인</td><td>아미노글리코사이드 생합성유전자들을 경로공학화하여 이종숙주 스트렙토마이세스로부터 3‘-deoxykanamycin 유도체 생합성</td><td>

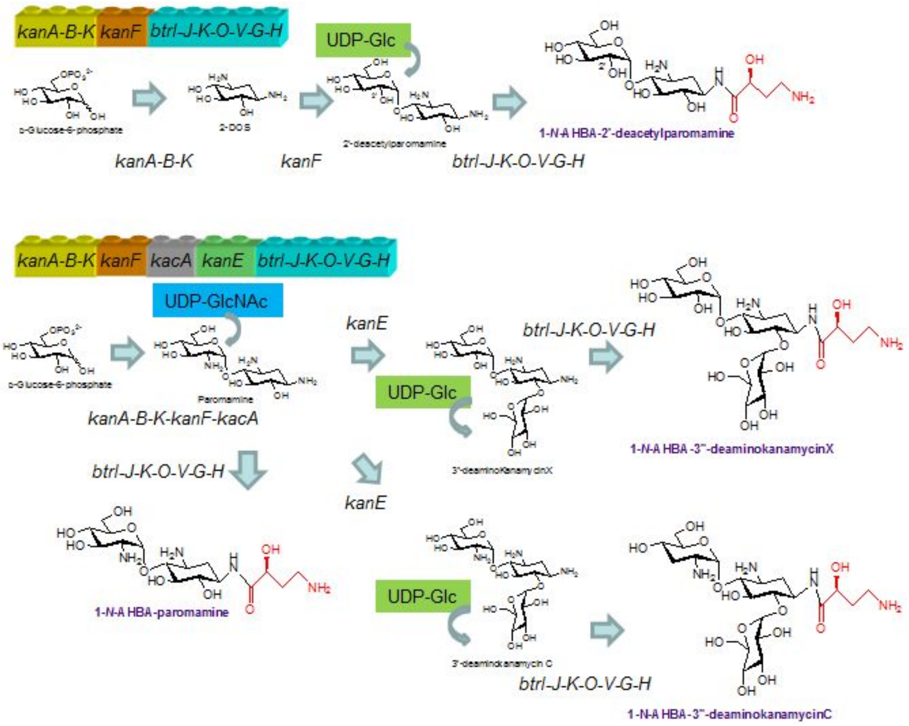
그림18. 3‘-deoxykanamycin 유도체 생합성 방법</td></tr>
<tr><td>N-1-AHBA 기능기가 부가된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인</td><td>아미노글리코사이드 생합성유전자들을 경로공학화하여 이종숙주 스트렙토마이세스로부터 N-1-AHBA-kanamycin 유도체 생합성</td><td>- 전술한 2종의 2당과 4종의 3당을 생합성하는 유전자 조합에 뷰티로신 생합성 유전자 집단으로부터 분리 클로닝된 AHBA 생합성 및 부가 생합성 유전자 7개를 추가 발현함 (그림19).


그림19. N-1-AHBA-kanamycin 유도체 생합성 방법 (다음장 계속)</td></tr>
</table>

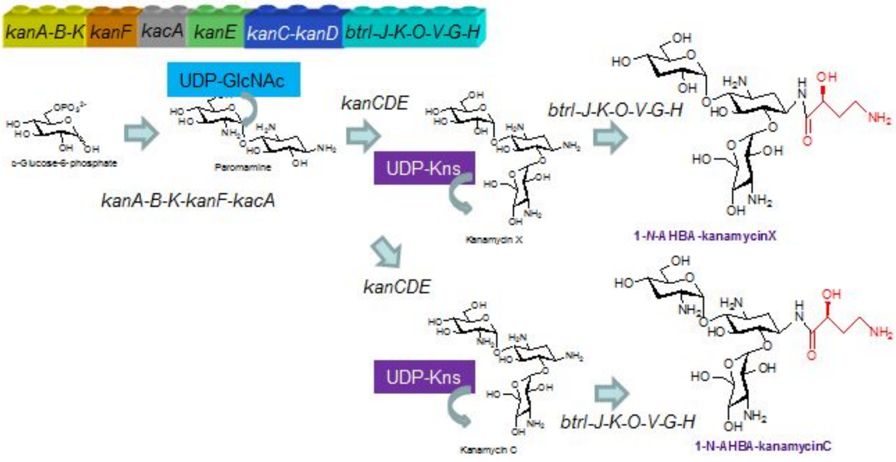
<table>
<tr><th>연 구
범 위</th><th>연구수행방법</th><th>구체적인 내용</th></tr>
<tr><td>N-1-AHBA 기능기가 부가된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인</td><td>아미노글리코사이드 생합성유전자들을 경로공학화하여 이종숙주 스트렙토마이세스로부터 N-1-AHBA-kanamycin 유도체 생합성</td><td>


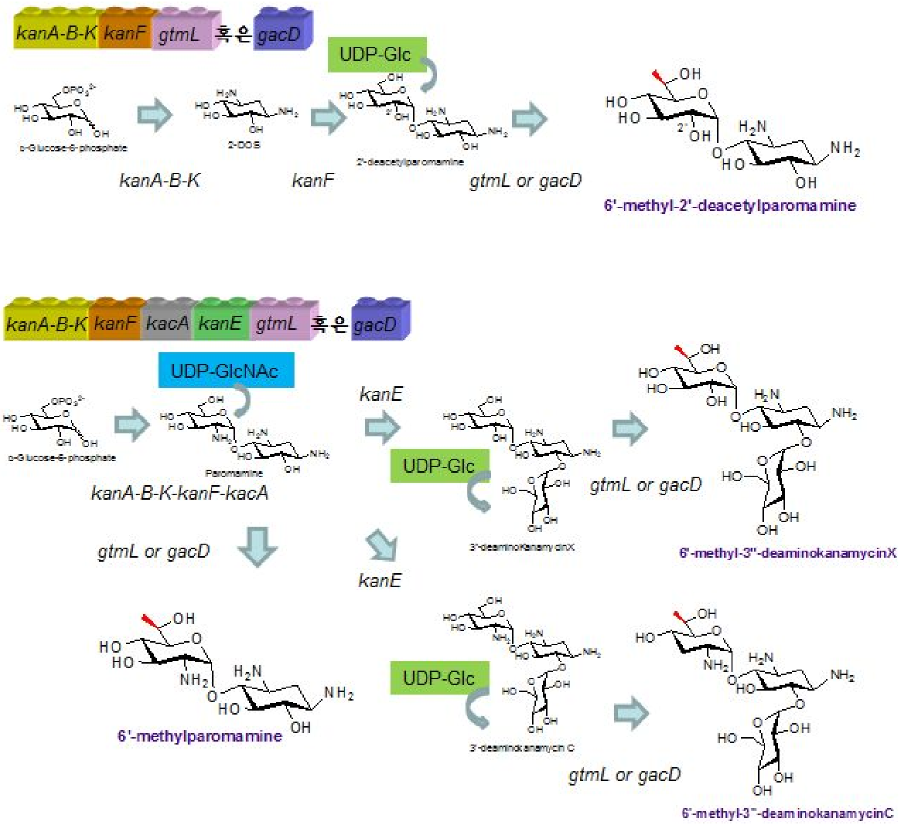
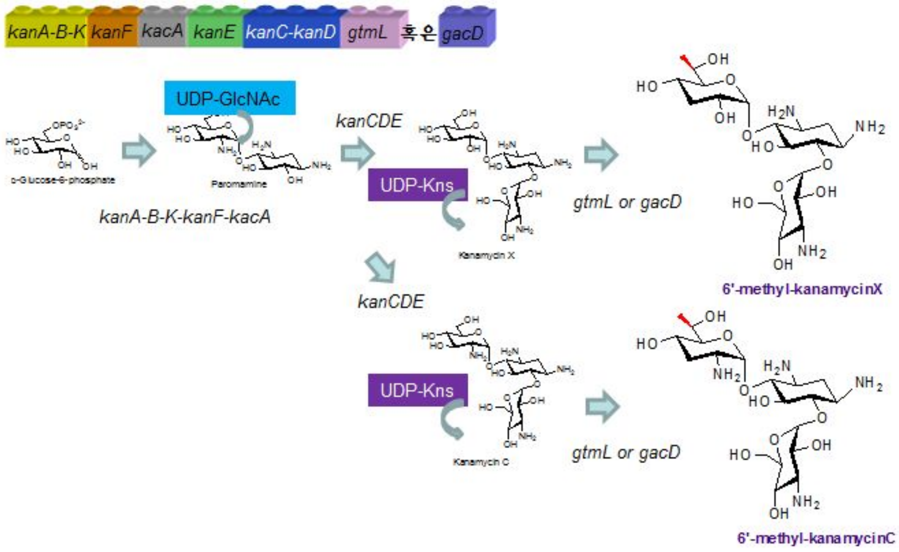
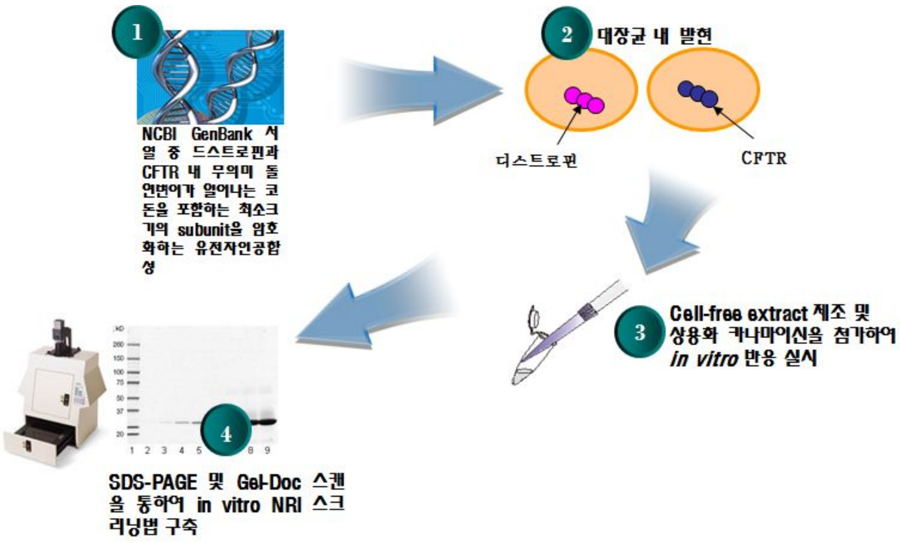
그림19. N-1-AHBA-kanamycin 유도체 생합성 방법
</td></tr>
<tr><td>6'-메틸기가 부가된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인</td><td>아미노글리코사이드 생합성유전자들을 경로공학화하여 이종숙주 스트렙토마이세스로부터 6'-methylkanamycin 유도체 생합성</td><td>
- 동일한 카나마이신 중간 대사체 생합성 유전자 조합에 추가적으로 이종(異種)의 겐타마이신 생합성 유전자인 gtmL 혹은 gacD 유전자를 각각 추가 발현함 (그림20).


그림20. 6′-methylkanamycin 유도체 생합성 방법 (다음장 계속)
</td></tr>
</table>

연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용
6‘-메틸기가 부가된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인	아미노글리코사이드 생합성유전자들을 경로공학화하여 이종숙주 스트렙토마이세스로부터 6‘-methylkanamycin 유도체 생합성	 **그림20. 6′-methylkanamycin 유도체 생합성 방법**
퇴행성 유전질환 DMD 및 CF의 표적인자 디스트로핀과 CFTR 내 무의미 돌연변이 ‘중지’코돈을 포함한 유전자의 대장균 내 발현시스템 제작 및 전기영동(GE) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축	퇴행성 유전질환인 CF와 DMD 표적인자인 디스트로핀과 CFTR 단백질 내 nonsense mutation ′중지‘코돈을 포함한 일부 subunit을 대장균 내 발현 및 기존 카나마이신 항생제를 이용한 in vitro NRI 스크리닝법 구축	- 각각의 단백질은 이미 GenBank accession number로 등록되어 있어서 대장균 발현시스템을 구축하는데 큰 어려움을 없었음. 특히 무의미 돌연변이가 일어나는 ‘중지’코돈을 포함하고 있는 최소 단백질 subunit 암호화하는 유전자를 대장균 내 플라스미드 상태로 형질전환 시켰음. 발현시스템구축 및 이를 통한 in vitro NRI 스크리닝법 구축의 전체 수행방법은 다음과 같음 (그림21).  **그림21. 전기영동 (GE)기반 In vitro NRI 스크리닝법 구축 방법** - 다양한 농도의 시판 카나마이신을 0-6.4 μg/ml 수준으로 CFE 반응액에 첨가한 후 3시간 반응을 실시함. 반응 후, 단백질을 분리 농축한 다음 최종 SDS-PAGE 상에서 절단 단백질과 온전하게 발현된 단백질간의 겔 상 intensity를 비교하여 NRI 활성을 검정함.

3. 일차년도 연구개발 결과

가. 3'-수산기 제거 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인 (그림22)

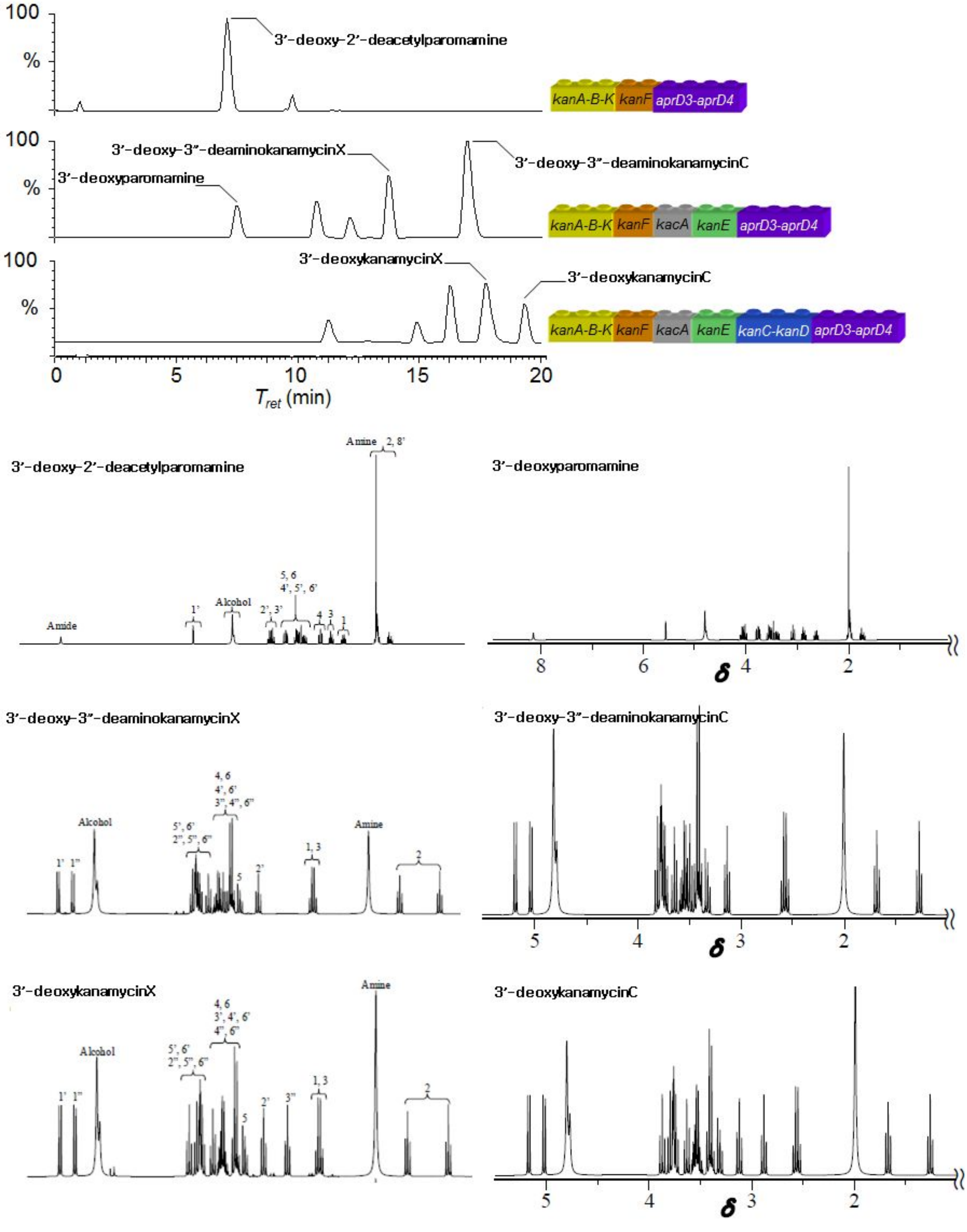


그림22. 3'-deoxykanamycin 유도체의 생합성 결과 크로마토그램 및 ^{1}H-NMR 데이타

나. N-1-AHBA기능기 부가 6종 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인 (그림23)

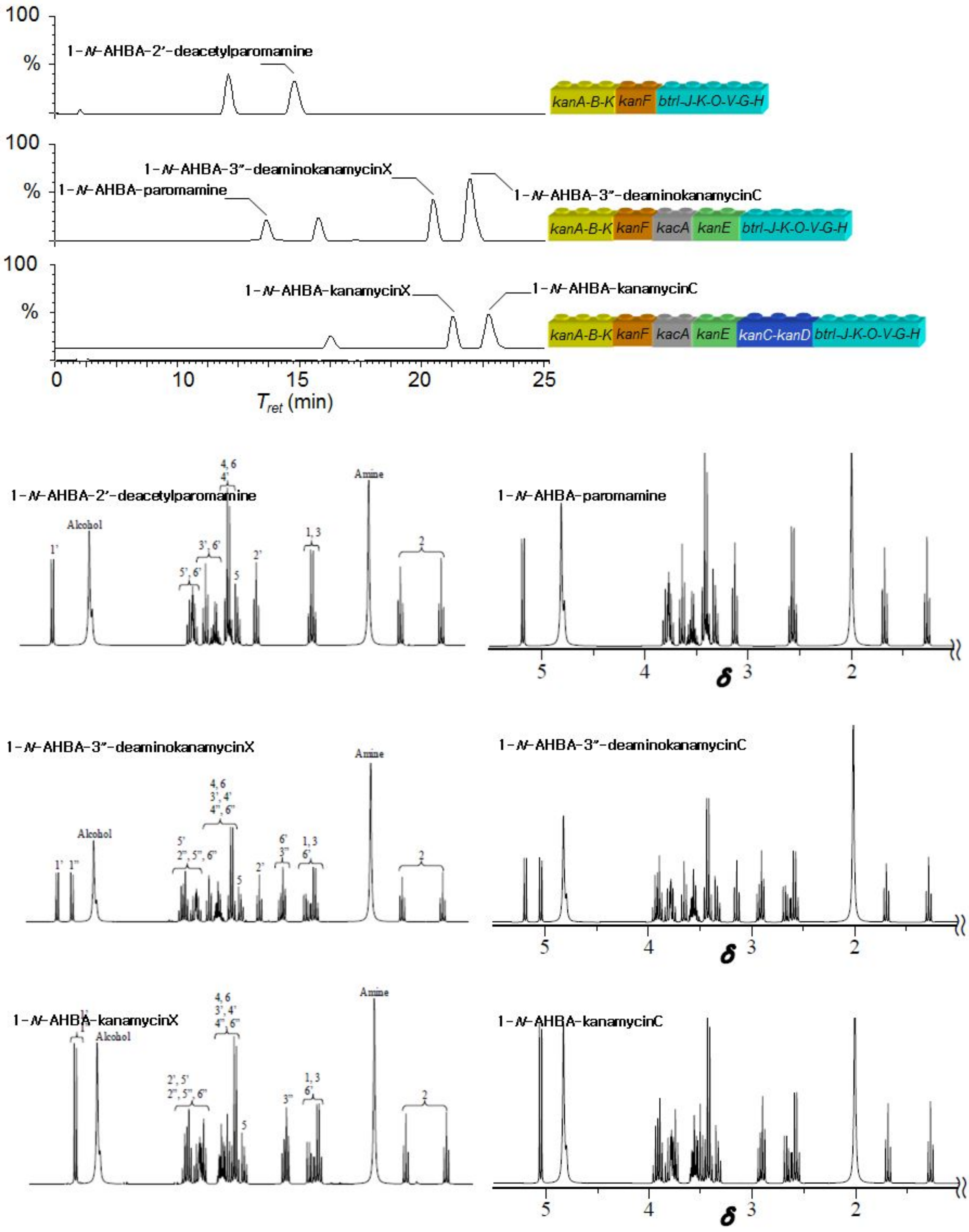


그림23. 1-N-AHBA-kanamycin 유도체의 생합성 결과 크로마토그램 및 ^{1}H-NMR 데이타

다. 6'-메틸기가 부가된 6종의 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인 (그림24)

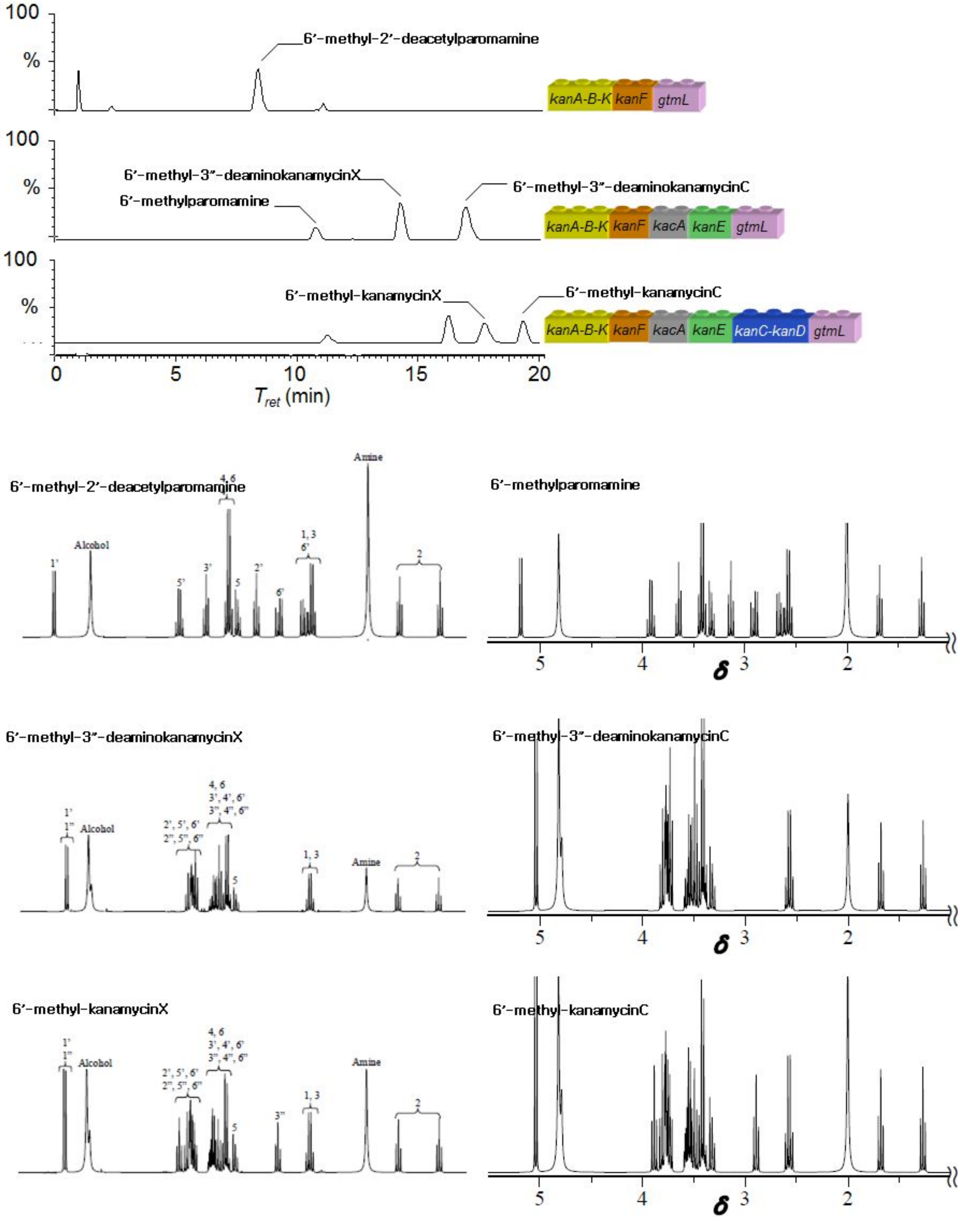
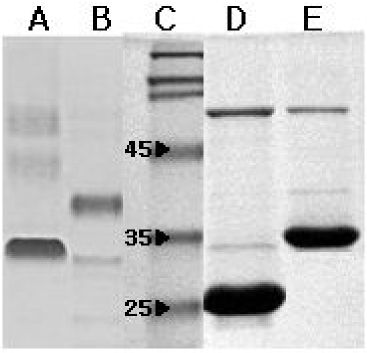


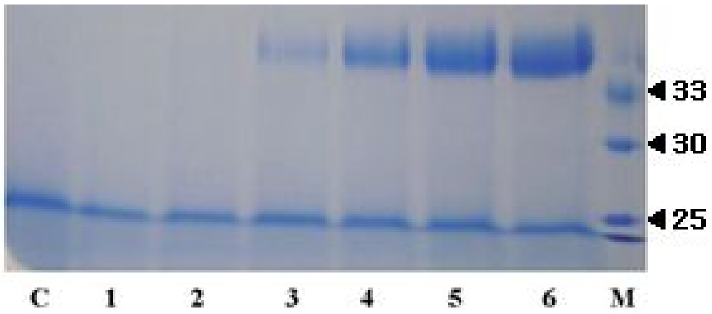
그림24. 6'-methylkanamycin 유도체의 생합성 결과 크로마토그램 및 ^{1}H-NMR 데이타

라. 퇴행성 유전질환 DMD 및 CF의 표적인자 디스트로핀과 CFTR 내 무의미 돌연변이 ‘중지’코돈을 포함한 유전자의 대장균 내 발현시스템 제작 및 전기영동(GE) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축 (그림25와 26)



A: 무의미 돌연변이중지코돈 디스트로핀
B: 정상 디스트로핀
C: size marker
D: 무의미 돌연변이중지코돈 CFTR
E: 정상 CFTR

그림25. 디스트로핀과 CFTR의 대장균 내 발현시스템 제작



C: 무의미 돌연변이중지코돈 CFTR CFE control
1: C + 0.2 ug/ml 카나마이신 B
2: C + 1.0 ug/ml 카나마이신 B
3: C + 2.0 ug/ml 카나마이신 B
4: C + 3.0 ug/ml 카나마이신 B
5: C + 4.0 ug/ml 카나마이신 B
6: C + 5.0 ug/ml 카나마이신 B
M: size marker

그림26. 무의미 돌연변이 중지코돈 CFTR 을 이용한GE 기반in vitro NRI 스크리닝법 구축

2절. 이차년도 연구개발 내용 및 결과

1. 이차년도 연구개발 추진개요

가. 농용항생제 일종인 겐타마이신 관련 신규 유도체의 스트렙토마이세스 내 생합성

◘ 3‘-수산기가 제거되거나, *N*-1-AHBA 기능기가 부가되거나, 혹은 6’-메틸기가 부가된 총 4종의 겐타마이신 유도체 생합성 및 구조 확인 본 연구팀이 선행연구 [참고문헌12]로 밝혀낸 바 있는 겐타마이신A2 생합성 유전자 조합에 ① 이종(異種)의 아프라마이신 생합성유전자인 aprD3-D4 유전자 set을 추가 발현하거나, ② 뷰티로신 생합성 유전자 집단으로부터 분리 클로닝 된 AHBA 생합성 및 부가 생합성 유전자 7개를 추가 발현하거나, 혹은 ③ 겐타마이신의 6‘-메틸기 부가 효소를 암호화할 것으로 추정되는 gtmL 이나 gacD 유전자를 추가 발현하여 스트렙토마이세스로부터 겐타마이신 관련 신규 유도체들을 생산하고, 이를 분리 정제하여 최종 NMR signal assignment로 구조를 확인하고자 함.

◘ *N*-1-AHBA 기능기가 부가된 동시에 6′-메틸기가 부가된 6종의 아미노글리코사이드 유도체 생합성 일차년도에 생합성할 6종의 N-1-AHBA 기능기가 부가된 아미노글리코사이드 유도체 생합성 유전자 set에 6‘-메틸기를 부가시킬 것으로 추정되는 이종(異種)의 겐타마이신 생합성 유전자 gtmL 혹은 gacD 유전자를 스트렙토마이세스에 동시 발현하여 6종의 유도체를 미생물 내 생산하고, 이를 분리 정제하여 최종 구조 분석을 실행함. *N*-1-AHBA-6’-methylkanamycin 유도체들의 생합성 세부 전략은 다음과 같음 (그림27).

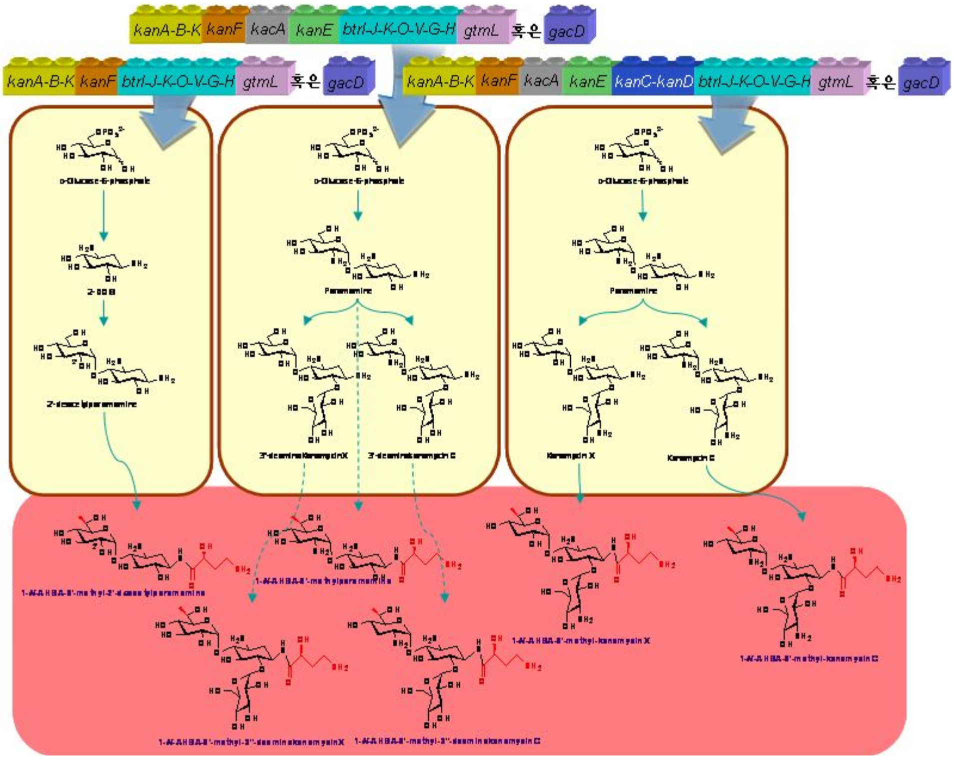


그림27. 생합성경로 공학화를 통한 다기능기를 부가시킨 카나마이신 유도체 생합성

나. 질량분석기 (MS) 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축

◘ 아미노글리코사이드 유도체의 MS 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축 일차년도에 수행할 퇴행성 유전질환들의 표적인자인 특정 단백질 발현시스템 및 CFE를 활용하여 아미노글리코사이드 유도체의 체외 반응을 실시한 후 동일 방법으로 단백질을 분리 농축함. 대조군으로는 상용 겐타마이신 C1과 C2a를 0-6.4 μg/ml 수준으로 반응액 내 첨가함. 분리된 단백질을 HPLC/ESI-MS 상에서 분리하여 크로마토그램 상 나타난 피크를 알고리듬화 프로그램으로 decomvolution 시켜 그 단백질 크기를 확인함. 절단된 단백질과 full-length 단백질의 peak intensity를 계측하여 각각의 아미노글리코사이드 유도체의 NRI활성을 검정함.

2. 이차년도 연구개발 내용

<table>
<tr><th>연 구
범 위</th><th>연구수행방법</th><th>구체적인 내용</th></tr>
<tr><td>

겐타마이신 관련 신규 유도체의 경로 공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 구조 확인

</td><td>

3‘-수산기가 제거된 1종의 겐타마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성

</td><td>

- 각각의 생합성유전자산물의 기능을 예측하여, 특정 유전자 조합을 만들면 이는 방선균의 일종으로 미리 유전자 조작된 재조합균주인 *Streptomyces venezuelae*에 특정 생합성경로를 만들어주어서 본 연구진이 의도한 아미노글리코사이드 유도체의 스트렙토마이세스 내 생합성을 가능케 함. 특히, 그 발현 유전자 조합들을 우선 각각 Streptomyces-*E. coli* shuttle vector인 high copy pSE34로 합쳐 클로닝한 후, 이종숙주인 스트렙토마이세스에 형질전환시킴. 이때 selection marker로는 thiostreptone resistant를 표현형으로 하여 그 형질전환체를 선발하였음. 이 재조합 스트렙토마이세스를 R2YE 배지에 3일간 진탕배양한 후, 상등액 만을 모아서 20 mM HCl로 산성화 시킨 후 OASIS MCX (Waters) 양이온교환 고체상추출법으로 cleanup하고, 추출액을 SpeedVac으로 완전히 날린 후, 소량의 증류수에 다시 녹여 일정량을 본 연구팀 개발 고감도 HPLC/ESI-MS/MS 에 주입하여 목적 유도체의 생산성을 확인함 (그림28).

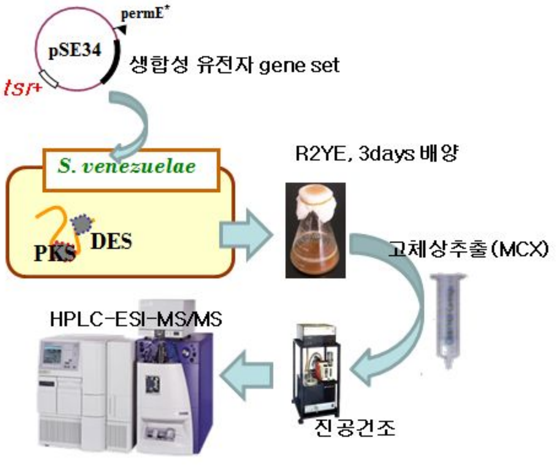


그림28. 유도체 생합성 방법

- 본 연구팀의 기존 연구로 밝혀진 겐타마이신A2 생합성 유전자 set에 3‘-수산기 제거 추정유전자인 이종(異種)의 아프라마이신 생합성유전자 *aprD3-D4* 유전자 set을 스트렙토마이세스에 추가 발현하여 3‘-수산기가 제거된 3’-dehydroxy 겐타마이신 유도체를 개발하고자함.

• *gtmA-B-gacH-gtmG-M-E-aprD3-D4*의 목적 유도체 : 3′-deoxy-gentamicinA2 **(그림29)**.

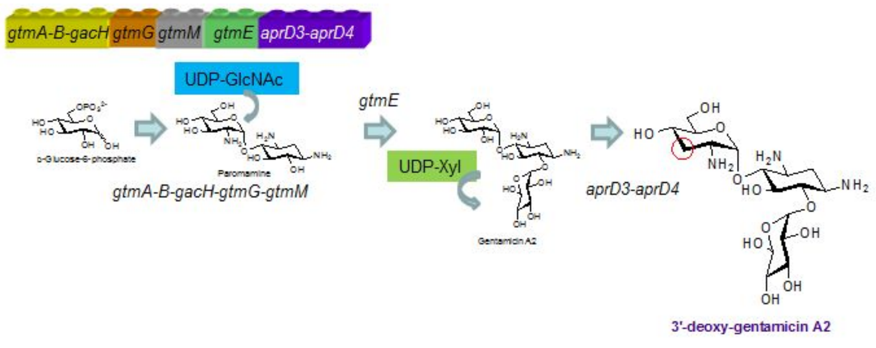


그림29. 3‘-수산기 제거된 겐타마이신 유도체 생합성 방법

</td></tr>
</table>

<table>
<tr><th>연 구
범 위</th><th>연구수행방법</th><th>구체적인 내용</th></tr>
<tr><td rowspan="2">겐타마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 구조 확인</td><td>N-1-AHBA 기능기가 부가된 1종의 겐타마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인</td><td>- 앞서 전술된 겐타마이신A2 생합성 유전자 set에 1-아미노기에 AHBA(aminohlydroxybutyric acid) acyl기를 부가시킬 것으로 추정되는 이종(異種)의 뷰티로신 생합성유전자 btrI-J-K-O-V-G-H 유전자 set을 스트렙토마이세스에 추가 발현하여 1종의 N-1-AHBA acyl화 카나마이신 유도체를 개발하고자함.

• gtmA-B-gacH-gtmG-M-E-btrI-J-K-O-V-G-H의 목적 유도체 : 1-N-AHBA-gentamicinA2 (그림30).

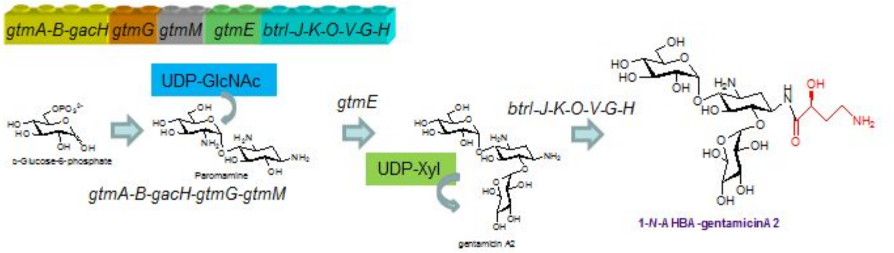


그림30. N-1-AHBA 부가된 겐타마이신 유도체 생합성 방법</td></tr>
<tr><td>6′-메틸기가 부가된 2종의 겐타마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인</td><td>- 앞서 전술된 겐타마이신A2 생합성 유전자 set에 6‘-메틸기를 부가시킬 것으로 추정되는 생합성 유전자 gtmL 혹은 gacD 유전자를 스트렙토마이세스에 추가 발현하여 2종의 6‘-methyl 카나마이신 유도체를 개발하고자함.
특히, gtmL과 gacD 유전자는 in silico로 그 기능이 methyltransferase로 예측되고 있는 바, 본 경로 공학화를 통하여 각 유전자 기능 및 그 작용점을 규명하고 확인할 수 있다는 부가적인 연구결과를 획득할 수가 있음. 따라서 그 작용점이 다를 경우엔 기존의 아미노글리코사이드 구조를 더욱 다양화시킬 수가 있는 작용점 구조 다양화 유전자로 향후 이용될 수 있을 것으로 예상하는 바임.

• gtmA-B-gacH-gtmG-M-E-L 혹은 gacD의 목적 유도체 : 6‘-methyl-gentamicinA2 diastereomers (그림31).

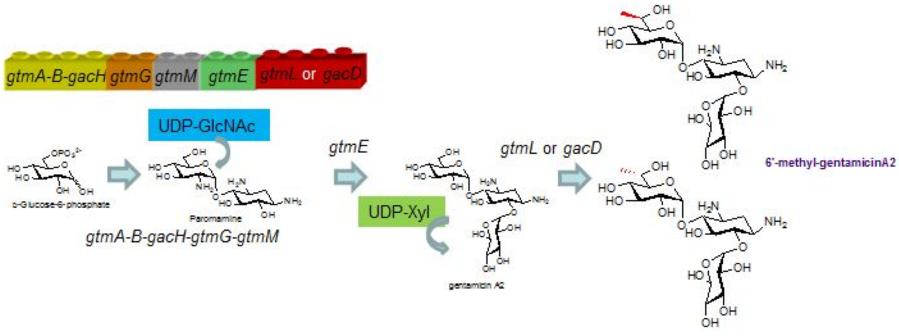


그림31. 6‘-메틸기가 부가된 겐타마이신 유도체 생합성 방법</td></tr>
</table>

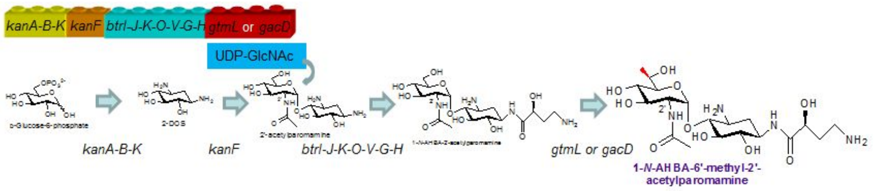
<table>
<tr><th>연 구
범 위</th><th>연구수행방법</th><th>구체적인 내용</th></tr>
<tr>
<td>젠타마이신 관련 신규 유도체의 경로 공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 구조 확인</td>
<td>N-1-AHBA 기능기가 부가된 동시에 6′-메틸기가 부가된 6종의 아미노글리코사이드 유도체 생합성 및 구조 확인</td>
<td>
- 일차년도에 생합성할 6종의 N-1-AHBA 기능기가 부가된 아미노글리코사이드 유도체 생합성 유전자 set에 6‘-메틸기를 부가시킬 것으로 추정되는 이종(異種)의 겐타마이신 생합성 유전자 gtmL 혹은 gacD 유전자를 스트렙토마이세스에 동시 발현하여 6종의 N-1-AHBA-6’-methyl 아미노글리코사이드 유도체를 개발하고자함.
• kanA-B-K-kanF-btrI-J-K-O-V-G-H-gtmL 혹은 gacD의 목적 유도체:
N-1-AHBA-6‘-methyl-2′-acetylparomamine (그림32).


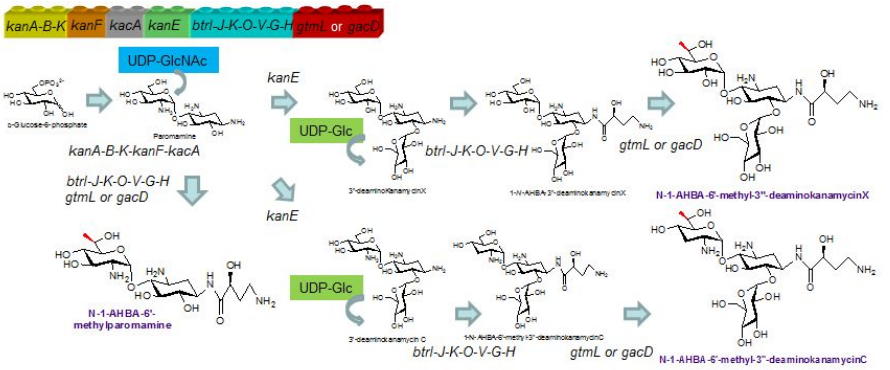
그림32. 6‘-메틸기와 1-N-AHBA 부가된 카나마이신 유도체 생합성 방법(1)
• kanA-B-K-kanF-kacA-kacE-btrI-J-K-O-V-G-H-gtmL 혹은 gacD의 목적 유도체:
N-1-AHBA-6‘-methyl-paromamine,
N-1-AHBA-6‘-methyl-3″-deaminokanamycinX,
N-1-AHBA-6‘-methyl-3″-deaminokanamycinC (그림33).


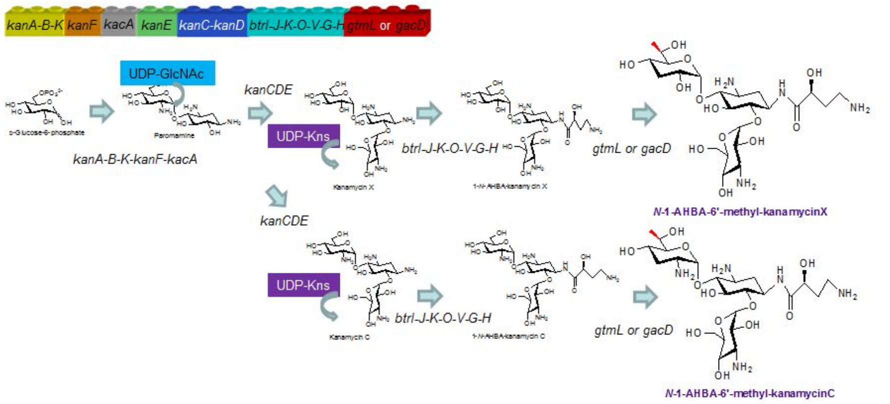
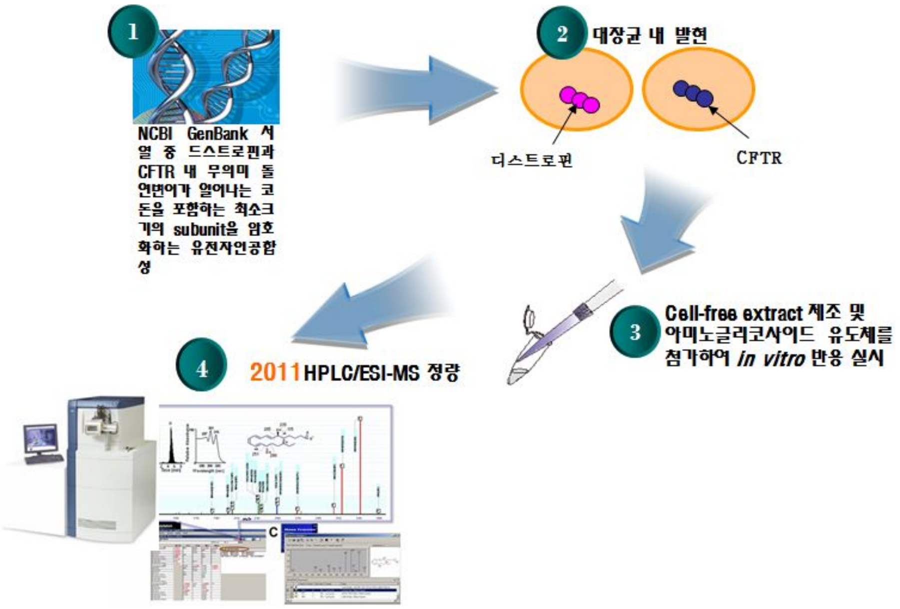
그림33. 6‘-메틸기와 1-N-AHBA 부가된 카나마이신 유도체 생합성 방법(2)
• kanA-B-K-kanF-kacA-kan-C-D-E-btrI-J-K-O-V-G-H-gtmL 혹은 gacD의 목적 유도체: N-1-AHBA-6‘-methyl-kanamycinX,
N-1-AHBA-6‘-methyl-kanamycinC (그림34).


그림34. 6‘-메틸기와 1-N-AHBA 부가된 카나마이신 유도체 생합성 방법(3)
</td>
</tr>
</table>

연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용
질량분석기 (MS) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축	아미노글리코사이드 유도체의 MS 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축	- 일차년도에 구축된 퇴행성 유전질환들의 표적인자인 특정 단백질 발현시스템 및 CFE를 활용하여 시판 겐타마이신 C1과의 체외 반응을 실시한 후 동일 방법으로 단백질을 분리 농축함. 이때, 각각의 단백질은 이미 GenBank accession number로 등록되어 있어서 대장균 발현시스템을 구축하는데 큰 어려움을 없었음. 특히 무의미 돌연변이가 일어나는 '중지'코돈을 포함하고 있는 최소 단백질 subunit 암호화하는 유전자를 대장균 내 플라스미드 상태로 형질전환 시켰음. - 다양한 농도의 아미노글리코사이드를 0-6.0 μg/ml 수준으로 반응액 내 첨가함. CFE 반응액에 첨가한 후 3시간 반응을 실시한 후, 단백질을 분리 농축한 다음, 분리된 단백질을 HPLC/ESI-MS 상에서 분리하여 크로마토그램 상 나타난 피크를 알고리듬화 프로그램으로 deconvolution 시켜 그 단백질 크기를 확인함. 절단된 단백질과 full-length 단백질의 peak intensity를 계측하여 각각의 아미노글리코사이드의 NRI활성을 검정하여 스크리닝 방법으로 구축하고자함 (그림35).  그림35. 질량분석기 (MS)기반 In vitro NRI 스크리닝 방법 구축

2. 이차년도 연구개발 결과

가. 생합성된 총 10종의 아미노글리코사이드 유도체의 구조 확인을 위한 분리 및 정제

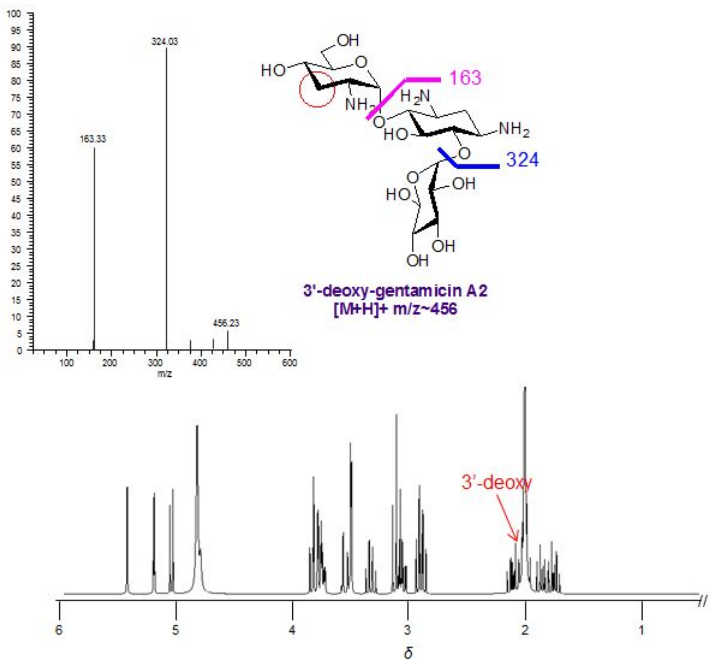
① 각각의 경로 공학화된 *S. venezuelae* 재조합균주 발효액으로부터 일차년도 구축된 전처리 및 SPE 과정을 거친 후, 세팅된 HPLC-ESI-MS/MS 기법으로 각각의 대사체의 생산성을 확인함.

② 구축된 HPLC 분석법을 scale-up한 Prep-HPLC로 배양액을 머무름시간에 따라서 분획한 후, 각 분획을 ESI-MS/MS로 분석하여 정제함.

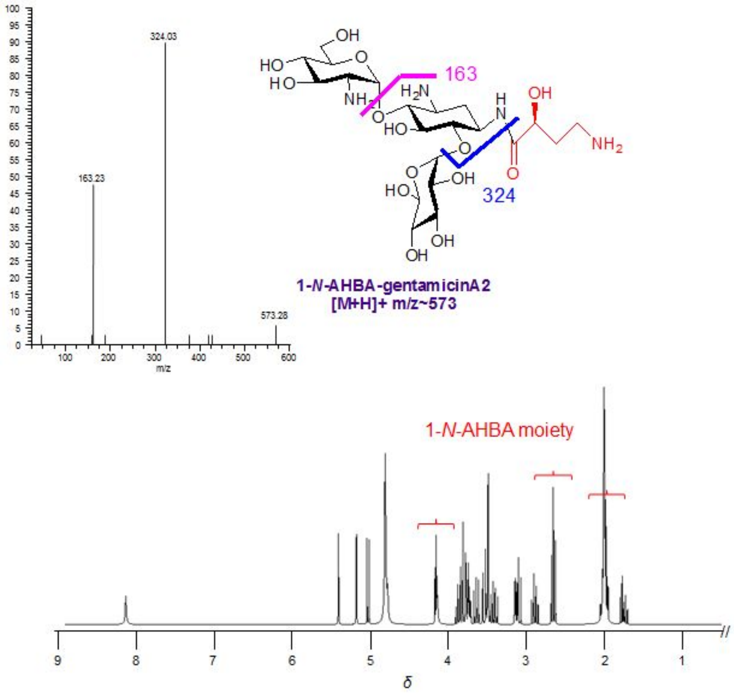
③ 고체상 추출법으로 관련 분획에서부터 desalting 및 동결건조를 통하여 건조시료를 제작 함.

④ 최종 ^{1}H와 ^{13}C-NMR로 각 정제된 분획 내 대사체의 구조를 확인한 후, 고체상 추출법으로 다시 농축하여 차년도에 SAR과 신장독성 실험에 활용할 예정임.

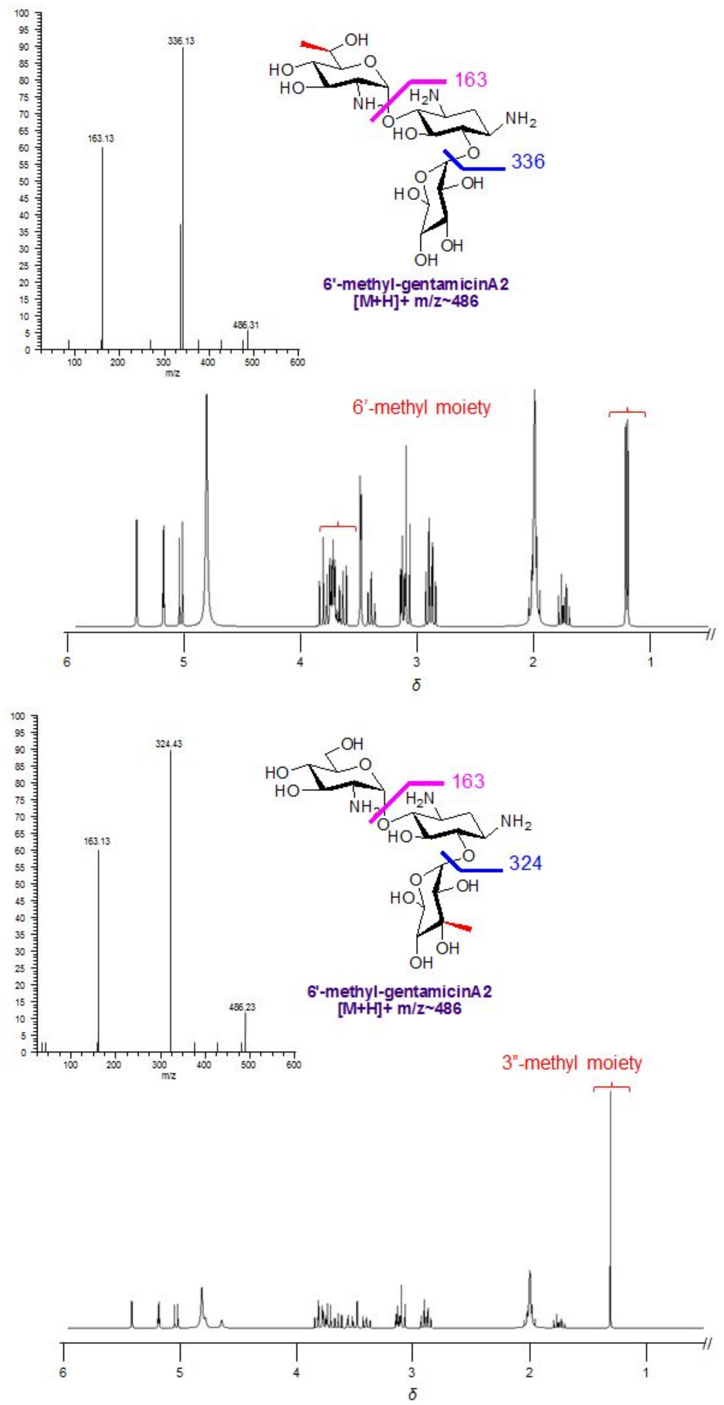
나. 3'-수산기가 제거된 1종의 겐타마이신 유도체 3′-deoxy-gentamicinA2의 구조 확인 (그림36)



다. *N*-1-AHBA 기능기 부가 겐타마이신 유도체 1-N-AHBA-gentamicinA2 구조 확인 (그림37)

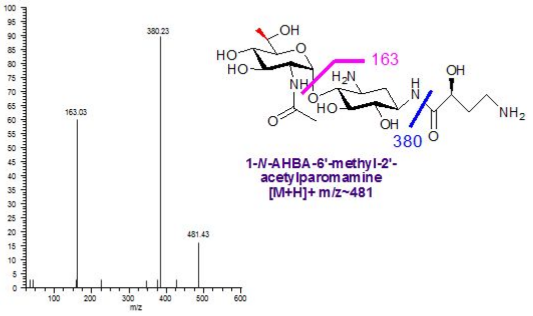


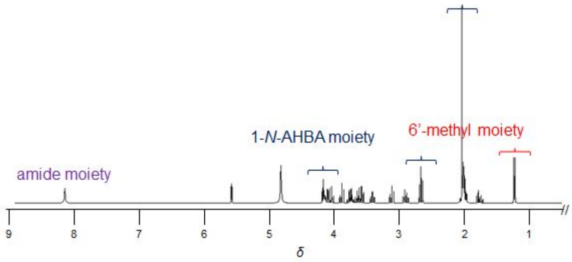
라. 6′-메틸기 부가 겐타마이신 유도체 6‘-methyl-gentamicinA2 구조이성체 구조 확인 (그림38)

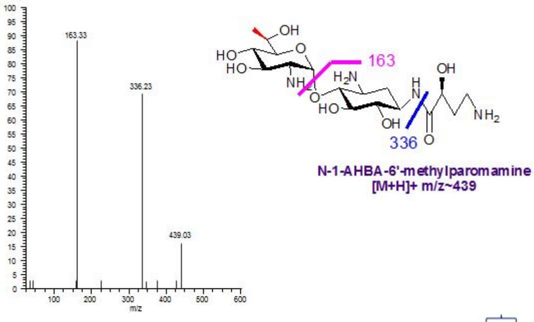


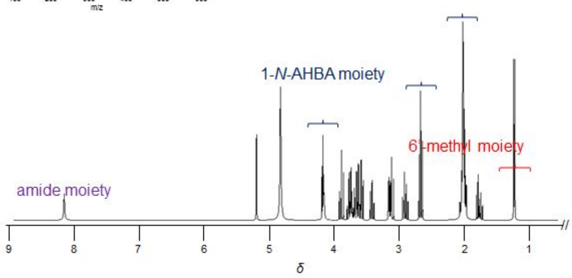
- methyltransferase를 암호화할 것으로 예측된 *gacD*와 *gtmL*을 각각 발현시킨 재조합 균주의 대사체를 분석한 바, GacD는 6‘-methyltransferase로 gtmL의 경우엔 3“-C-methyltrnsferase로 기능함을 밝혀냈음. 이후 연구수행에 있어서는 *gacD*를 추가적으로 삽입한 유전자 세트로 신규 아미노글리코사이드 유도체를 생합성하도록 하였으며, 향후 *gtmL*을 활용한 추가적인 유도체 생합성이 가능할 것임.

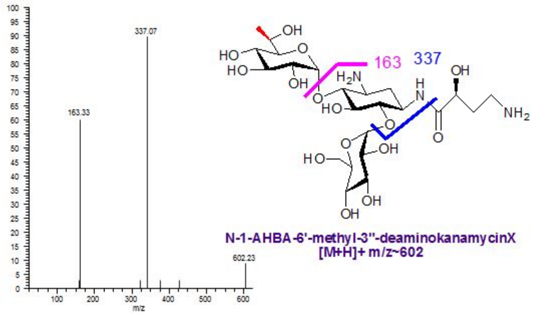
마. *N*-1-AHBA 기능기와 동시에 6′-메틸기가 부가 6종의 카나마이신 유도체 구조 확인 (그림39)

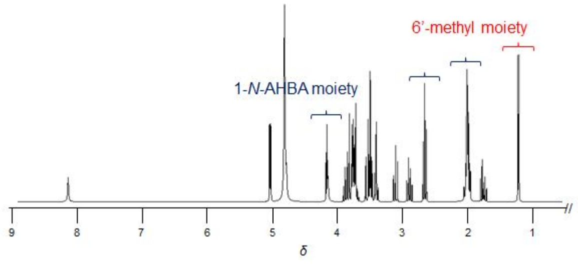


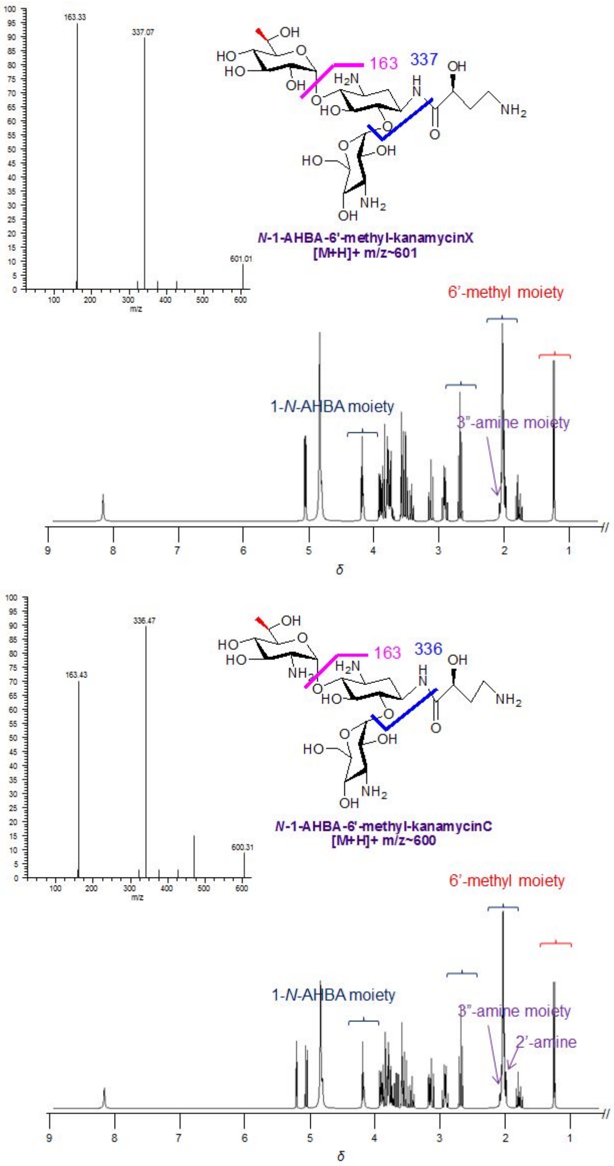












바. 질량분석기 (MS) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축

- 일차년도에 퇴행성 유전질환에 대표적인 원인 단백질인 CFTR과 Dystrophin 일부 subunit을 대장균에 발현하는데 성공하였으며 전기영동 (GE) 기반 in vitro NRI 활성을 검증한 바 있음. 이번 2차년도에는 동일한 in vitro 상태에서 발현되는 DMD 및 CF의 표적인자 디스트로핀과 CFTR 내 무의미 돌연변이 '중지'코돈을 포함한 유전자의 대장균 내 발현시스템을 통하여 발현된 무의미중지코돈 truncated 단백질과 NRI활성이 보고된 바 있는 겐타마이신C1 아미노글리코사이드의 NRI효과에 따른 온전한 (full-length) 단백질간의 발현 정도를 질량분석기 (MS)기반으로 하여 정량하고자 하였음. **(그림40)** x축은 겐타마이신의 농도 (0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8 그리고 6.0 ug/ml)에 따라, 그리고 y축은 각 단백질의 발현 비율로 하여 플로팅을 해본 결과, DMD 및 CF 유래 단백질의 온전한 dystrophin (40 kDa)과 CFTR(33 kDa)의 발현이 회복됨을 확인할 수 있었음. 특히 **그림41**는 겐타마이신을 2.4 ug/ml로 처리한 in vitro 첨가구에서 truncated 단백질의 비율이 줄면서 full-length CFTR이 발현됨을 보여주는 전형적인 예임. 다만, DMD와 CF 두가지 모델 중에서 MS 기반 in vitro NRI 활성곡선이 CFTR에서 농도구배형 Sigmoid 곡선을 나타내는 것으로 보아서, **(그림42)** 차년도에 수행할 예정인 아미노글리코사이드 유도체들의 SAR 비교 시에 CFTR을 바탕으로 한 in vitro NRI 스크리닝법을 도입할 계획임.

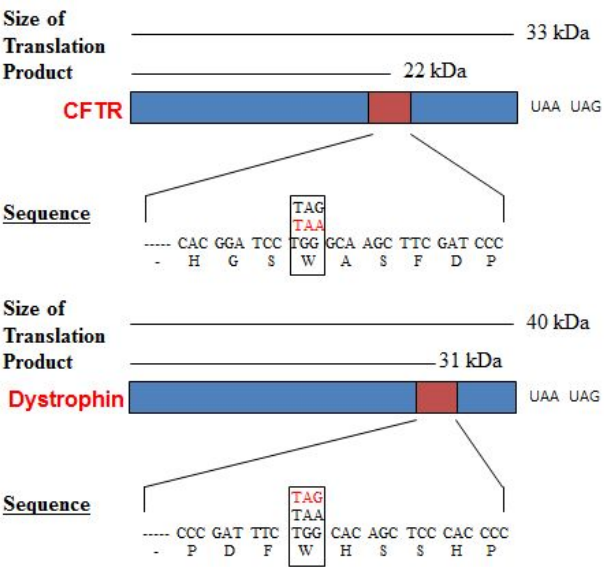


그림40. CFTR과 Dystrophin subunit의 서열 및 그 환산 단백질의 크기

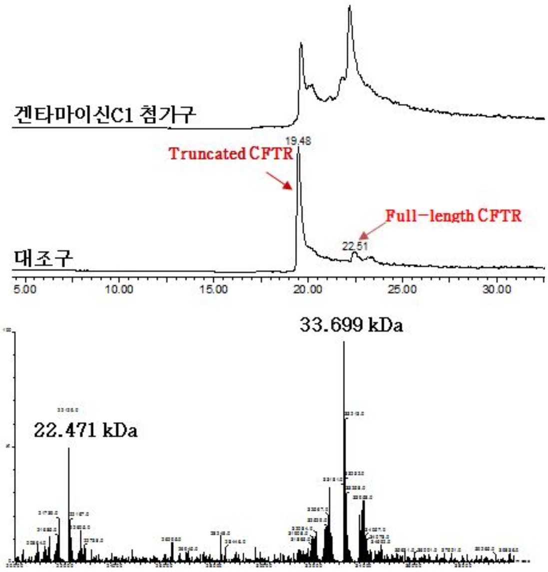


그림41. 겐타마이신 처리구에서 *in vitro* NRI 활성이 나타남을 보여주는 전형적인 MS기반

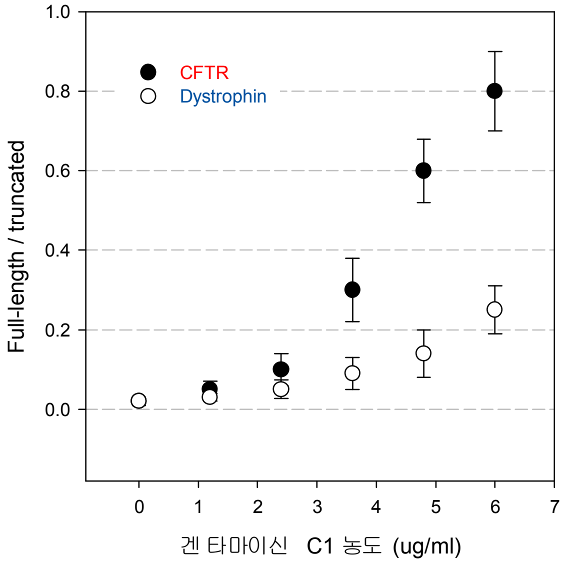


그림42. 겐타마이신C1 을 이용한 MS 기반 in vitro NRI활성의 플로팅 곡선

3절. 삼차년도 연구개발 내용 및 결과

1. 삼차년도 연구개발 추진개요

가. SAR 및 STR 구현을 통한 퇴행성 유전질환 후보물질 도출

■ 구축된 라이브러리의 NRI 활성 검정을 통한 아미노글리코사이드 유도체간의 구조-활

성 연관성 파악 20종 이상 생합성 된 아미노글리코사이드 유도체 라이브러리에 대하여 in vitro NRI 검정법을 실시하여, 이를 통해 다양한 구조 내 기능기의 차이에 따른 NRI 활성을 예측할 수 있을 것이며 아미노글리코사이드의 SAR에 대한 기본 자료 또한 제공될 수 있을 것임.

➡ 구축된 라이브러리의 신장세포 독성검정으로 아미노글리코사이드 유도체간의 구조-독성 연관성 파악 아미노글리코사이드 라이브러리를 대상으로 임상적 적용의 가능성을 타진하기 위하여 상용 아미노글리코사이드의 임상 적용 문제점 중 하나인 신장 세포독성에 대하여 검정할 계획임. 이에는 정상 신장세포주인 HEK293, 신장 근위세뇨관 세포주인 LLC-PK1, 그리고 신장 상피세포 주 A498를 대상으로 하여 MTT 방법으로 그 세포독성을 확인할 예정임. 또한 대조군으로는 현재 다수의 연구가 수행된 바 있는 천연 겐타마이신 항생제와 반 합성 아미카신을 동일 농도로 사용하여 비교할 것임. 이를 통해 다양한 구조 내 기능기의 차이에 따른 세포독성을 예측할 수 있을 것이며 아미노글리코사이드의 구조-독성 연관성 (STR)에 대한 기본 자료 또한 제공될 수 있음.

나. 3D docking model을 통한 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합 기전 예측

➡ 3D 도킹 모델 시연 최종 선발될 아미노글리코사이드 후보군을 대상으로 기존에 보고가 된 바 있는 겐타마이신과 토브라마이신의 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합 atomic coordinate를 template로 하여 유도체 후보군의 3D modeling을 실시함. 위 3D docking modeling은 한국생명공학연구원 시스템미생물연구센터에 의뢰할 예정임. 이상 3차년도의 세부 추진전략은 아래와 같음 **(그림43)**.

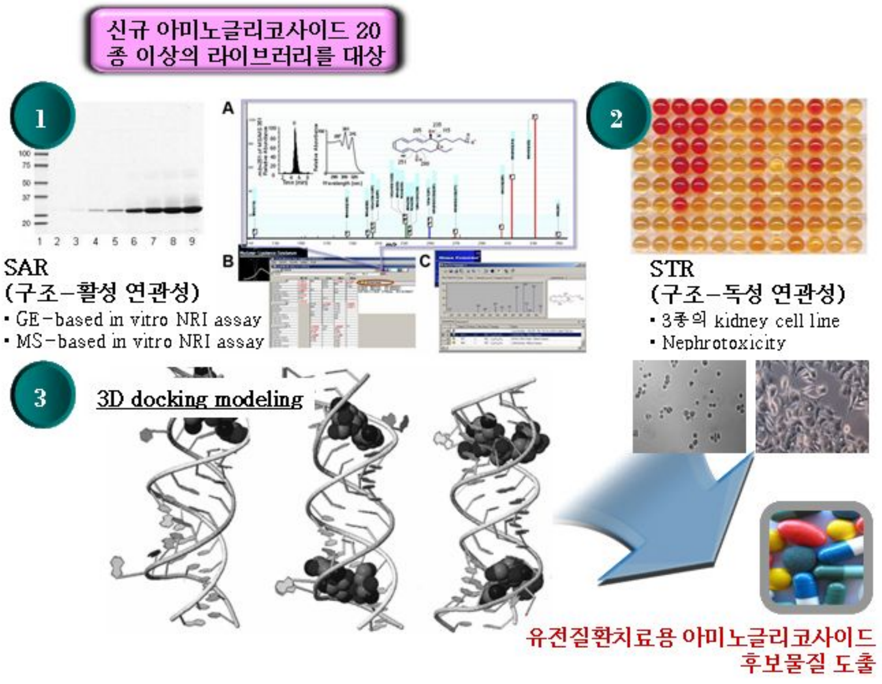


그림43. 삼차년도 세부 추진 전략

2. 삼차년도 연구개발 내용

연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용
SAR 및 STR 구현을 통한 퇴행성 유전질환 후보물질 도출 및 3D docking model을 통한 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합기전 예측	구축된 라이브러리의 NRI 활성 검정을 통한 아미노글리코사이드 유도체간의 구조-활성 연관성 파악	**- 구축 라이브러리부터 NRI 高활성 아미노글리코사이드를 선정** 일·이차년도를 통해 적어도 20종 이상 생합성 되어질 아미노글리코사이드 유도체 라이브러리에 대하여 2종의 개발된 in vitro NRI 검정법을 실시함으로서 유전질환치료용 후보 아미노글리코사이드를 도출코자 함. 이를 통해 다양한 구조 내 기능기의 차이에 따른 NRI 활성을 예측할 수 있을 것이며 아미노글리코사이드의 구조-활성 연관성 (SAR)에 대한 기본 자료 또한 제공할 수 있음. (a) 일・이차년도를 통해 생합성된 아미노글리코사이드 라이브러리를 ESI-MS와 NMR로 구조 확인한 후, 미생물배양을 통해 아미노글리코사이드 각각을 NRI 검정에 필요한 10 mg 정도를 제조함. (b) 제조된 라이브러리를 2.0 - 50.0 ppm 수준으로 수용화 시킨 후, 구축될 in vitro NRI에 사용함. (c) 우선, 무의미돌연변이 코돈을 포함하고 있는 디스트로핀과 CFTR을 암호화하고 있는 유전자를 대장균 내 발현함. 이후 발현된 단백질을 함유하는 대장균을 sonication하여 cell-free extract (무세포추출물)를 확보함. (d) 전술한 대장균 유래 무세포추출물에 아미노글리코사이드 라이브러리 (최종 0.1 - 2.5 ppm 수준)를 각각 30℃에서 1시간 동안 반응한 후, 0.1% trichrolo-acetic acid (TCA)로 단백질을 침전시킴. (e) 침전된 단백질을 다시 Tris 완충액 (pH 7.4)에 용해한 후 구축된 GE- 및 MS-기반 in vitro NRI 검정을 통하여 각 아미노글리코사이드 유도체의 구조-활성 연관성 (Structure-Activity Relationship; SAR)을 평가함.
		- 구축 라이브러리부터 ex vivo NRI 활성 검정을 통한 추가 SAR 수행 최근 본 연구팀이 미국 미시건대학교 Weiss교수팀으로부터 분양 받은, 퇴행성 유전질환자 즉 낭포성섬유증 (cystic fibrosis; CF)질환자로부터 적출한 세포주 CF1001,를 대상으로 하여 전 임상 초기단계인 ex vivo NRI 검정방법을 실시함으로써 추후 임상실험의 기본 자료를 제공함. 이는 아미노글리코사이드 구축라이브러리의 SAR 검정 시 보다 구체적이며 임상에 근접한 데이터임. 즉 본 연구과제 일・이차년도 수행을 통해 구축될 GE와 MS기반 NRI검정법을 CF질환 세포주에 적용하여 아미노글리코사이드 라이브러리의 ex vivo활성을 구현할 것이며, 이는 임상 단계과정 중 도태될 수 있는 신규 유전질환치료제 후보군의 실패가능성을 낮추는데 일익을 담당할 것임. 그 추진방법은 다음과 같음.

		(a) 일·이차년도를 통해 생합성된 아미노글리코사이드 라이브러리를 ESI-MS와 NMR로 구조확인한 후, 미생물 배양을 통해 라이브러리 내 아미노글리코사이드 각각을 NRI 검정에 필요한 10 mg 정도를 제조함. (b) 제조된 라이브러리를 1.0 - 50.0 ppm 수준으로 수용성화 시킨 후, ex vivo NRI 활성검정에 사용함. (c) 우선, 미국 미시건대학교 Weiss교수팀에서 계대 받은 CF유전질환자 적출 세포 주 CF1001을 활성화시킴. 즉 DE medium에 전 배양시킨 후, 원심 분리하여 T-flask에서 본 배양을 5일간 수행함. 배양 3일시에 타킷 아미노글리코사이드 라이브러리 각각의 물질을 최종 0.1 - 2.5 ppm 수준이 되도록 처리한 후 2일간 추가 배양함. 필요시 매일 time course에 따라 세포를 분리하여 샘플링을 실시함. (d) 각 처리구와 함께 대조구로서 그 활성이 보고 된 바 있는 겐타마이신 또한 처리하여 비교함. 처리 시료들을 sonication 시킨 후, 원심 분리하여 그 상등액을 확보함. (e) 각 처리구의 상등액에 0.1% TCA를 첨가하여 단백질을 침전시키고, 고속 원심 분리하여 침전된 단백질을 수거한 후, 이를 다시 Tris 완충액 (pH 7.4)에 용해함. (f) 구축된 GE- 및 MS-기반 in vitro NRI 검정을 통하여 각 아미노글리코사이드 유도체의 구조-활성 연관성 (Structure-Activity Relationship; SAR)을 보다 정밀하게 평가함. 이 같은 두 단계에 걸친 SAR 활성 검정을 통하여 라이브러리로부터 유효 활성을 보이는 아미노글리코사이드 유도체를 일차 스크리닝할 것이며, 특히 ex vivo 실험은 전 임상단계에 보다 근접한 약효 검정 확인방법 이라 할 것임.
	구축된 라이브러리의 신장세포 독성 검정을 통한 아미노글리코사이드 유도체간의 구조-독성 연관성 파악	**- 구축 라이브러리부터 신장 세포독성 아미노글리코사이드를 배제** 아미노글리코사이드 라이브러리를 대상으로 임상적 적용의 가능성을 타진하기 위하여 상용 아미노글리코사이드의 임상 적용 문제점 중 하나인 신장 세포독성에 대하여 검정함. 이에는 정상 신장세포주인 HEK293, 신장 근위세뇨관 세포주인 LLC-PK1, 그리고 신장 상피세포 주 A498를 대상으로 하여 MTT 방법으로 그 세포독성을 확인함. 또한 대조군으로는 현재 다수의 연구가 수행된 바 있는 천연 겐타마이신 항생제와 반합성 아미카신을 동일 농도로 사용하여 비교할 것임. 이를 통해 다양한 구조 내 기능기의 차이에 따른 세포독성을 예측할 수 있을 것이며 아미노글리코사이드의 구조-독성 연관성 (STR)에 대한 기본 자료 또한 제공될 수 있을 것임 따라서 본 연구의 최종목표는 구축된 라이브러리를 대상으로 SAR 및 STR을 수행하여 유전질환치료용 아미노글리코사이드 후보물질을 도출하고자 함. (a) 제조된 라이브러리를 1.0 - 50.0 ppm 수준으로 수용성화 시킨 후, 3종의 신장세포주를 대상으로 하여 세포독성 검정에 사용함. (b) 정상 신장세포주인 HEK293, 신장 근위세뇨관 세포주인 LLC-PK1,

		그리고 신장 상피세포 주 A498를 활성화시킴. 즉 DE medium에 전 배양시킨 후, 원심 분리하여 T-flask에서 본 배양을 5일간 수행함. 배양 3일시에 타킷 아미노글리코사이드 라이브러리 각각의 물질을 최종 0.1 - 2.5 ppm 수준이 되도록 처리한 후 2일간 추가 배양함. 필요시 매일 time course에 따라 세포를 분리하여 샘플링을 실시함. (c) 각 처리구와 함께 대조구로서 그 독성이 보고 된 바 있는 겐타마이신 또한 처리하여 비교함. 최종 MTT 로 정색반응을 실시하여 각 세포주에 대한 아미노글리코사이드 라이브러리의 개별 LD50을 측정함.
	3D docking model을 통한 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합기전 예측	- **3D modeling을 통하여 유전질환치료용 아미노글리코사이드 후보 선도물질 결합기전의 비교 및 분석** 최종 선발된 아미노글리코사이드 후보군을 대상으로 기존에 보고가 된 바 있는 겐타마이신과 토브라마이신의 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합 atomic coordinate를 template로 하여 유도체 후보군의 3D modeling을 실시함. 이때 MODELLER와 FoldX 프로그램을 구동하며, 모델링은 VADAR로 평가할 예정임. 아미노글리코사이드 유도체 후보물질과 decoding A site의 결합양상을 결정하기 위하여 molecular docking 방법을 구현하고, 각 수소결합 간의 분자적 dynamic simulation을 위해 HF/6-31G(d) 세트를 기반으로 한 Gaussian03으로 에너지 안정상태와 구조적 최적화를 결정함.

3. 삼차년도 연구개발 결과

가. 구축된 MS기반 CFTR in vitro NRI 활성검정법을 통한 아미노글리코사이드 라이브러리의 활성 비교

- 일차년도 18종 및 이차년도 9종을 포함한 총 27종의 아미노글리코사이드 라이브러리들을 대상으로 기존 상용 아미노글리코사이드인 겐타마이신 C1을 대조구로 사용하여 기구축된 MS기반 CFTR in vitro NRI 검정법을 실시하였음. 예비실험을 통하여 적정 농도구간을 설정한 바 4.8 ug/ml 처리농도로 고정하여 각각의 아미노글리코사이드 라이브러리들의 CFTR 복귀활성을 측정하였음. 그 결과 겐타마이신 C1 (녹색 바)과 상대적인 활성이 비교 가능한 총 6종의 유도체들 (적색 바)에서 유사하거나 향상된 CFTR NRI 활성을 확인할 수 있었음. 이상의 6종 유도체로는 3‘-deoxy-3″-deaminokanamycinC, 3′-deoxykanamycinX, 3′-deoxykanamycinC 및 3’-deoxygentamicinA2, 1-N-AHBA-gentamicinA2 그리고 6‘-methylgentamicinA2가 동일 농도의 겐타마이신 C1과 유사 활성을 나타내었음 **(그림44)**. 특히 겐타마이신 구조 유도체인 1-N-AHBA-gentamicinA2 그리고 6‘-methylgentamicinA2의 경우엔 대조구인 겐타마이신 C1보다 높은 활성을 나타내었고, 이상의 결과로부터 CFTR in vitro NRI 활성 시 아미노글리코사이드 scaffold 내 3’-deoxy 기능기 즉, 3‘ 위치의 수산기의 제거와 2DOS내 비이온성 기능기인 AHBA의 부착 및 6’ 위치에 수산기를 6‘-메틸기로 masking한 pseudotrosaccharide의 경우에 유효한 활성이 확인되었음.

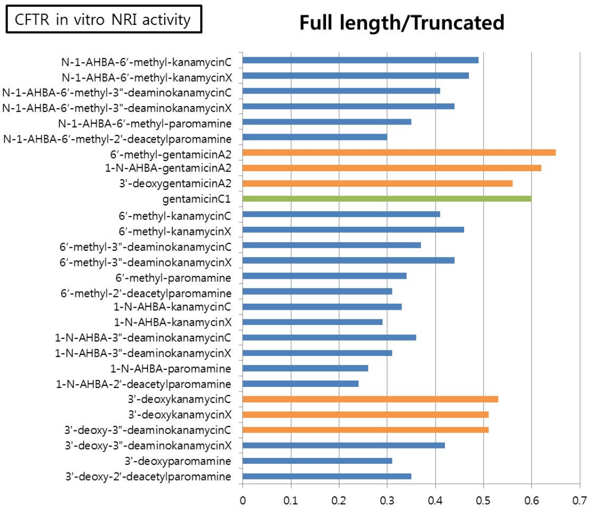


그림44. 아미노글리코사이드 라이브러리의 CFTR in vitro NRI 활성 비교

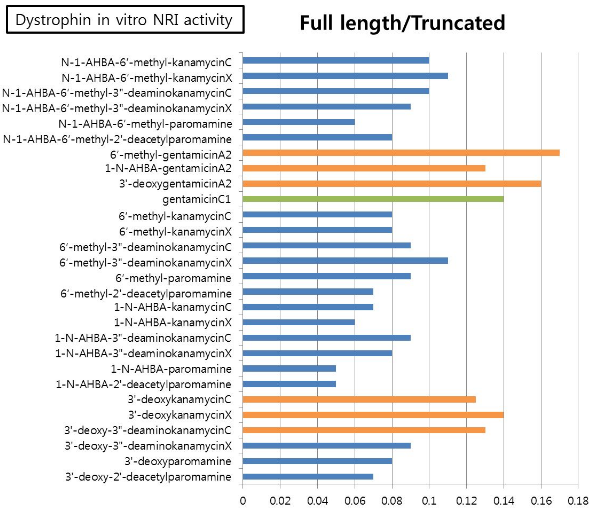


그림45. 아미노글리코사이드 라이브러리의 Dystrophin in vitro NRI 활성 비교

나. 구축된 MS기반 Dystrophin in vitro NRI 활성검정법을 통한 아미노글리코사이드 라이브러리의 활성 비교

- 일차년도 18종 및 이차년도 9종을 포함한 총 27종의 아미노글리코사이드 라이브러리들을 대상으로 기존 상용 아미노글리코사이드인 겐타마이신 C1을 대조구로 사용하여 기 구축된 MS기반 Dystrophin in vitro NRI 검정법을 실시하였음. 예비실험을 통하여 적정 농도구간을 설정한 바 4.8 ug/ml 처리농도로 고정하여 각각의 아미노글리코사이드 라이브러리들의 CFTR 복귀활성을 측정하였음. 그 결과 겐타마이신 C1 (녹색 바)과 상대적인 활성이 비교 가능한 총 6종의 유도체들 (적색 바)에서 유사하거나 향상된 CFTR NRI 활성을 확인할 수 있었음 **(그림45)**. 이상의 6종 유도체로는 3‘-deoxy-3″-deaminokanamycinC, 3′-deoxykanamycinX, 3′-deoxykanamycinC 및 3’-deoxygentamicinA2, 1-N-AHBA-gentamicinA2 그리고 6‘-methylgentamicinA2가 동일 농도의 겐타마이신 C1과 유사 활성을 나타내었음. 이는 전술한 CFTR in vitro NRI 활성 결과와 유의한 결과를 보이고 있어서, 본 연구과제를 통해 구축된 in vitro 활성검정법의 퇴행성 유전질환치료제 개발에 필수적인 활성법의 응용화가 가능함을 시사하고 있음. 이상의 결과로부터 CFTR in vitro NRI 활성 시 아미노글리코사이드 scaffold 내 3’-deoxy 기능기 즉, 3‘ 위치의 수산기의 제거와 2DOS내 비이온성 기능기인 AHBA의 부착 및 6’ 위치에 수산기를 6‘-메틸기로 masking한 pseudotrosaccharide의 경우에 유효한 활성이 있음을 재차 확인할 수 있었음.

다. CF질환자 적출 세포주를 대상으로 아미노글리코사이드 라이브러리의 ex vivo NRI 활성 비교

- 일차년도 18종 및 이차년도 9종을 포함한 총 27종의 아미노글리코사이드 라이브러리들을 대상으로 기존 상용 아미노글리코사이드인 겐타마이신 C1을 대조구로 사용하여 기 구축된 MS기반 CFTR 및 Dystrophin in vitro NRI 검정법을 실시한 후, 유효한 활성을 보인 총 6종의 아미노글리코사이드 유도체를 일차적으로 선발하여, 본 연구개발로 추가적으로 도입한 ex vivo NRI 활성을 비교하였음. 처리 구간을 기존 논문들에 언급된 겐타마이신의 처리 농도를 참조하여 2.4, 3.6 그리고 4.8 ug/ml의 세가지 구간으로 CF환자 적출 세포주 내 CFTR의 발현정도를 비교하였음 **(그림46)**. 그 결과 카나마이신 관련 아미노글리코사이드 유도체 3종의 경우엔, 대조구인 겐타마이신 C1의 ex vivo활성에 비하여 다소 낮은 활성이 나타났으며, 반면 겐타마이신 유도체 3종의 경우엔 모든 처리구간에 있어서 대

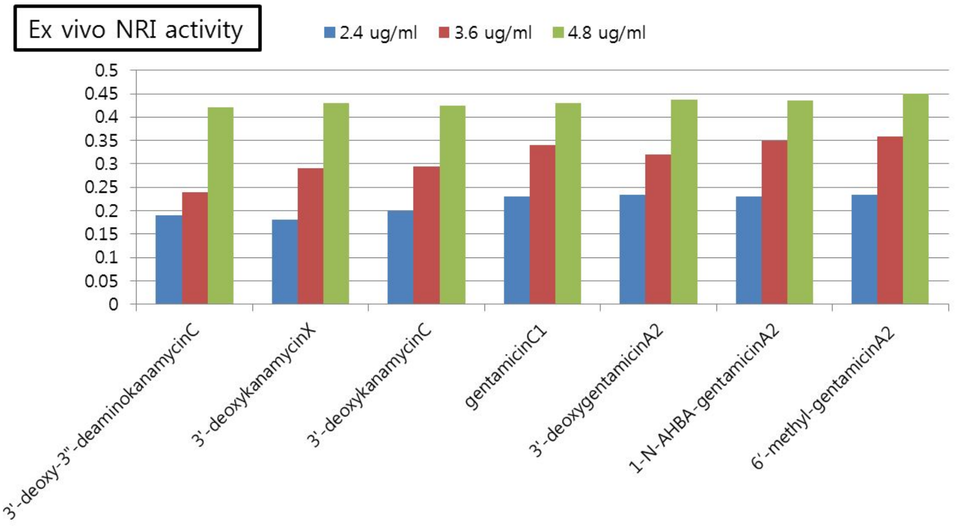


그림46. 아미노글리코사이드 라이브러리의 ex vivo NRI 활성 비교

조구보다 향상된 활성값을 보여주고 있음. 특히, 처리구간의 변화에 따른 활성값의 눈에 띠는 변화 및 차이는 향 후 제제화에 필수적인 therapeutical index값이 좁게 나타날 수 있어 임상 적용 상 문제점으로 지적될 수 있음으로, 본 ex vivo NRI 활성검정법을 통하여 총 6종 유도체로는 3'-deoxy-3"-deaminokanamycinC, 3′-deoxykanamycinX, 3′-deoxykanamycinC 및 3'-deoxygentamicinA2, 1-N-AHBA-gentamicinA2 그리고 6'-methylgentamicinA2를 이차적으로 스크리닝 할 수 있었음.

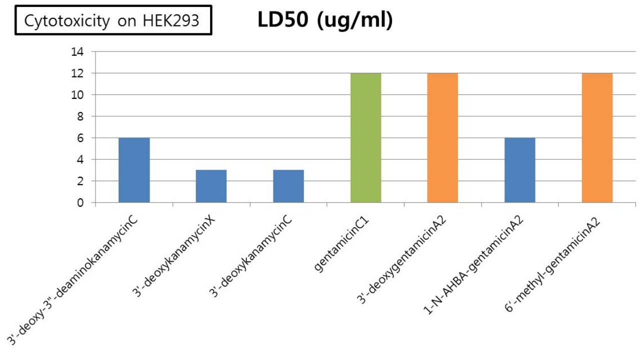


그림47. 일차 스크리닝된 6종의 아미노글리코사이드 라이브러리의 신장세포주 HEK293에 대한 세포독성

라. SAR 구현 후 선발된 3종의 겐타마이신 유도체를 대상으로 신장 세포 독성 비교

- 이차 선발된 6종의 카나마이신 및 겐타마이신 유도체와 대조구인 겐타마이신 C1을 총 3종의 정상 신장 세포주를 대상으로 하여 cytotoxicity를 비교하였음. 활용된 세포주로는 신장세포주인 HEK293, 신장 근위세뇨관 세포주인 LLC-PK1 그리고 신장 상피세포주인 A498이 활용되었음. 개별 처리구간은 48 ug/ml을 기준으로 2배씩 serial dilution하였고, MTT 방법으로 세포독성을 확인하여 LD50 수치로 환산하였음. 우선 신장세포주인 HEK293의 경우 겐타마이신 유도체인 3'-deoxygentamicinA2과 6'-methylgentamicinA2 (적색 바)은 겐타마이신 C1 처리구(녹색 바)의 LD50 수치와 유사한 세포독성을 보였음 **(그림47)**. 반면, 신장 근위세뇨관 세포주인 LLC-PK1에 있어서는 3'-deoxy-3"-deaminokanamycinC, 1-N-AHBA-gentamicinA2 및 6'-methylgentamicinA2 처리구(적색 바)에서 대조구와 유사하거나 감소된 세포독성을 확인할 수 있었음 **(그림48)**. 특히, 6'-methylgentamicinA2 처리구는 대조구인 겐타마이신 C1처리구에 비하여 2배 낮은 세포독성을 나

타내어, 임상 이용 가능성을 제시하고 있음. 마지막으로, 신장 상피세포주를 대상으로 한 세포독성 실험 결과에선, 2종의 겐타마이신 유도체인 1-N-AHBA-gentamicinA2 및 6‘-methylgentamicinA2 처리구(적색 바)에서 대조구와 유사하거나 감소된 세포독성을 확인할 수 있었음 **(그림49)**. 6‘-methylgentamicinA2 처리구는 대조구인 겐타마이신 C1처리구에 비하여 2배 낮은 세포독성을 상피세포주에서도 나타내어, 임상 이용 가능성을 또한 제시하고 있음. 본 신장 세포주 대상 세포독성 STR 검정을 통하여 겐타마이신 유도체인 6‘-methylgentamicinA2을 퇴행성 유전질환치료제 후보물질로 도출하였음.

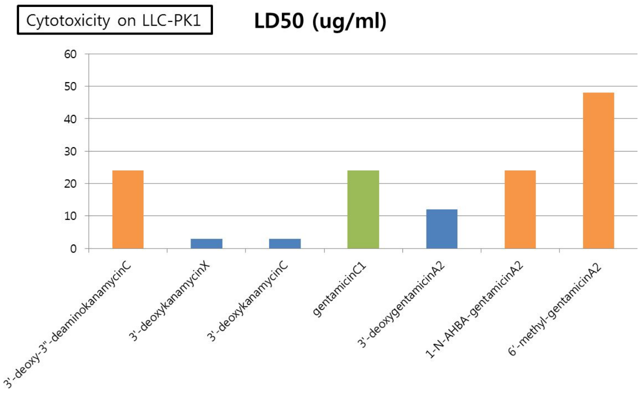


그림48. 일차 스크리닝된 6종의 아미노글리코사이드 라이브러리의 신장 근위세뇨관 세포주 LLC-PK1에 대한 세포독성

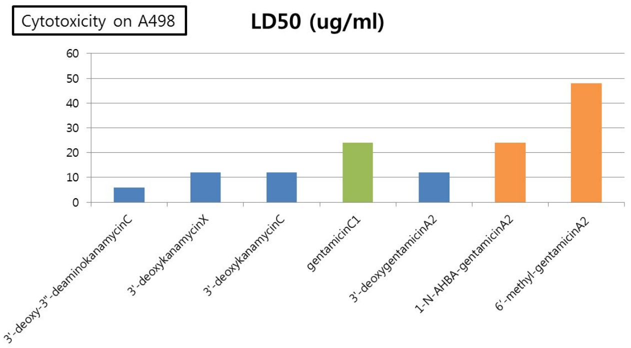


그림49. 일차 스크리닝된 6종의 아미노글리코사이드 라이브러리의 신장 상피 세포주 A498에 대한 세포독성

마. 3D docking model을 통한 겐타마이신 C1과 그 유도체인 6‘-methylgentamicinA2의 리보솜 내 decoding A site와의 결합기전 시뮬레이션

- 후보물질로 도출된 6‘-methylgentamicinA2와 겐타마이신 C1 구조를 기존에 보고된 그람음성 대장균 내 리보솜 단백질 구조를 template로 하여 3D 모델링을 실시한 결과 **(그림50)**, 대조군인 겐타마이신 C1에 비하여 유도체 후보물질인 6’-methylgentamicinA2의 시뮬레이션 상 RMSD 및 Gibb′s free energy 수치가 낮게 나타났으며, 이는 겐타마이신 C1의 binding affinity가 유도체에 비하여 좀 더 강함을 의미하고 있으며, 이를 통하여 본 연구과제를 통해 도출된 유도체의 경우엔 리보솜 내 decoding A site에 이완가능한 형태로 flexible하게 결합함으로서 NRI 활성을 보이고 있음을 확인할 수 있었음.

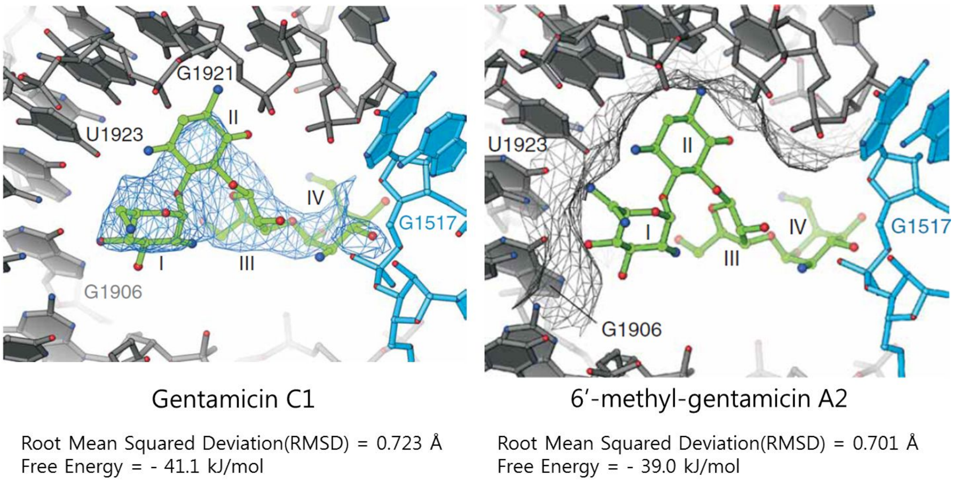


그림50. 젠타마이신 C1과 6'-methylgentamicinA2의 decoding A site와의 결합 3D docking model

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 연구개발의 목표 및 달성도

구분	세부과제명	세부연구목표	평가착안점	가중치 (%)	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	카나마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 GE-기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축	카나마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성	3'-수산기가 제거된 6종의 카나마이신 유도체 생합성 및 구조확인	30	100	카나마이신관련 아미노글리코사이드 유도체 총 18종 생합성에 성공하였으며 각 유도체 구조 확인함.
			N-1-AHBA 기능기가 부가된 6종의 카나마이신 유도체 생합성 및 구조확인	30		
			6'-메틸기가 부가된 6종의 카나마이신 유도체 생합성 및 구조확인	20		
		퇴행성 유전질환 DMD 및 CF의 표적인자인 디스트로핀과 CFTR 내 무의미 돌연변이 '중지'코돈을 포함한 유전자의 대장균 내 발현시스템 구축	퇴행성 유전질환 DMD의 표적인자인 디스트로핀의 대장균 내 발현시스템 구축	5		대표적인 퇴행성 유전질환 DMD와 CF의 표적유전자 발현시스템 구축에 성공함.
			퇴행성 유전질환 CF의 표적인자인 CFTR 단백질의 대장균 내 발현시스템 구축	5		
		전기영동(GE) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축	발현용 대장균으로부터 CFE 준비 및 GE 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축	10		구축된 발현용 대장균의 Cell-free extract에 기존 카나마이신 표준품을 적용한 전기영동 기반 in vitro NRI 스크리닝법 구축에 성공함.
2차 년도	겐타마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합	겐타마이신 관련 신규 유도체의 경로공학화된 재조합 스트렙토마이세스 내 생합성 및 구조 확인	3'-수산기가 제거된 1종의 겐타마이신 유도체 생합성 및 구조확인	10	100	총 9종의 겐타마이신 관련 유도체의 생합성 및 구조 확인함.
			N-1-AHBA	20		

	성 및 질량분석기 (MS) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축		기능기가 부가된 1종의 겐타마이신 유도체 생합성 및 구조확인			
			6′-메틸기가 부가된 2종의 겐타마이신 유도체 생합성 및 구조확인	20		
			N-1-AHBA-6‘-메틸기가 부가된 6종의 아미노글리코사이드 유도체 생합성	30		
		질량분석기 (MS) 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축	아미노글리코사이드 유도체의 MS 기반 *in vitro* NRI 스크리닝법 구축	20		일차년도 수행 퇴행성 유전질환 표적인자 단백질 발현시스템의 체외반응을 질량분석기로 분석하는 MS기반 in vitro NRI 활성측정방법을 구축함.
3차년도	SAR 및 STR 구현을 통한 퇴행성 유전질환 후보물질 도출 및 3D docking model을 통한 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합기전 예측	구축 라이브러리부터 NRI 高활성 아미노글리코사이드를 선정	구축 라이브러리부터 NRI 高활성 아미노글리코사이드를 선정	40	100	일차년도와 이차년도 구축한 총 27종의 아미노글리코사이드 라이브러리로부터 in vitro NRI활성을 비교하여 6종의 유도체를 일차선발함.
		구축 라이브러리부터 신장 세포독성 아미노글리코사이드 배재	구축 라이브러리부터 신장독성을 검정하여 최종 유도체 후보군을 선발	40		3종의 신장 세포주를 대상으로하여 일차선발 6종의 아미노글리코사이드 유도체들의 세포독성을 비교하여, 최종 6‘-methylgentamicinA2를 최종 후보물질로 선발함.
		3D docking model을 통한 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합 기전 예측	3D docking model으로 decoding A site 올리고뉴클레오타이드와의 결합기전 예측	20		겐타마이신 C1a과 후보물질 6‘-methylgentamicinA2의 3D 도킹 모델을 통하여 리보솜 내 decoding A site에 대한 후보물질의 flexibility 확인함.
		ex vivo NRI 검정방법 구축 및 후보물질 도출 툴로 활용	낭포성섬유증(CF)질환자 적출 세포주 CF1001로 ex vivo NRI 검정방법 도입	추가달성		퇴행성 유전질환자 즉 낭포성섬유증 (cystic fibrosis)질환자로부터 적출한 세포주 CF1001를 대상으로 전 임상 초기단계인 ex vivo NRI 검정방법을 실시

2절. 연구개발의 관련분야 기여도

1. 퇴행성 유전질환치료용 아미노글리코사이드 제제의 개발 가능성 제시

수십 년간 아미노글리코사이드의 유기합성의 목표는 내성 병원균에 보다 효과적인 후보군을 도출하는데 초점을 맞추었으며, 유전질환치료용 표적인자인 NRI에 대한 연구는 거의 전무한 실정이었음. 현재까지도 유전질환치료제로 연구되고 있는 아미노글리코사이드는 모두 상용화되고 있는 아미노글리코사이드계 항생제를 대상으로 하고 있음. 본 연구개발을 통하여 기존의 상용 아미노글리코사이드와 비교시 NRI활성이 보다 향상된 유도체들을 생합성하는데 성공하였으며, 이는 기존의 Gene Theraphy와 병용되거나 별도 이용이 가능한 제제의 개발 가능성을 보여주고 있으며, 퇴행성 유전질환제 개발에 또 다른 방향성을 제시하고 있음.

2. 유전질환치료용 기존 반합성 아미노글리코사이드 임상 후보물질과의 차별성

2009년 이스라엘 연구진들은 기존 아미노글리코사이드 항생제인 파로모마이신과 겐타마이신에 비교하여 향상된 NRI 활성을 지닌 유도체 NB54을 반 합성 하는데 성공하였음. 또한 신장세포주를 대상으로 한 세포독성의 경우에도 기존 상용화 항생제에 비하여 약 10배쯤 낮은 독성을 보이는 것으로 나타났음. 실제로 생체 내 유전자의 무의미 돌연변이가 원인이 되어 나타나는 퇴행성 유전질환인 Usher syndrom 질환자 내 주요 표지자인 PCDH15 단백질을 대상으로 한 ex vivo 검정법 또한 그 NRI효과가 유효하게 나타나 현재 전 임상 단계 중임. 하지만, 전술한 이스라엘 연구진의 신규 유전질환치료용 후보 아미노글리코사이드의 반합성법은 기존 천연 아미노글리코사이드를 원재료로 사용하여 유기합성법으로 특정 기능기를 변환시키는 방법으로서, 이 같은 반 합성법에는 천연 아미노글리코사이드의 주요 대사체가 아닌 미량 대사체를 활용했다는 점, 그리고 최소 5단계이상의 다단계의 화학합성 후에도 낮은 수율과 불순물의 정제 상 어려움 등 산업적으로도 해결해야 할 사항이 여전히 남아있음. 반면, 본 연구개발을 통해 제작된 아미노글리코사이드 유도체의 경우엔 생합성 경로공학화된 재조합 미생물을 활용하여 기존 지식재산권의 배타성을 해결하는 주요한 기술이며, 나아가 다양한 유도체의 생합성이 가능함을 기존 유기합성 화학의 한계점을 극복 가능한 기술이라 할 것임.

3. 신규 in vitro NRI 활성 검정법 구축 및 응용화 가능성 제시

전술한 바 있는, 현재 임상3상에 도전 중인 미국 바이오벤처회사인 PTC therapeutics에서는 조합합성법으로 만들어진 약 10만의 화학물질 라이브러리로부터 아미노글리코사이드계 항생제의 구조적 모방체 (mimics)인 PTC124를 후보물질로 개발하고 있으며, 그 연구진들은 이들 라이브러리의 NRI 활성 검정을 위하여 자체적으로 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 기반 HTS (high throughput screening) 기술을 개발하여 특허화 하였음. 이와 같이 ELISA 기반 HTS 기술은 PTC theraputics의 기술력으로 특허화되어 있으므로 본 연구진에서 활용하기엔 기술력 이전 비용 및 추가적인 비용상 문제가 제기되므로, 다른 별도의 NRI 활성 검정법이 필요하였음. 또한 competative direct ELISA 기반 HTS 검정법의 경우엔, 약 1%의 가양성 결과가 나올 수 있고, titration 시 감도가 둔화될 수 있다는 단점이 PTC therapeutics의 연구진에 의하여 보고가 된바, 그 고속 효율성을 뛰어 넘을 수는 없겠지만, 실험실 수준에서 검정이

가능한 간편하고 빠른 NRI 활성 검정법의 개발이 요망되었음. 본 연구개발을 통하여 아미노글리코사이드 뿐만 아니라 신규 후보물질들의 NRI 활성검정이 가능한 총 2종의 in vitro NRI 검정법을 개발하여 그 응용화를 직접 확인하였으며, 추가적으로 CF 환자 적출 세포주를 이용한 ex vivo NRI 검증법 또한 활용에 성공함으로서 기존 특허화된 PTC therapeutics의 검정법을 회피할 수 있는 자체 NRI 검정법의 구축이 가능해 졌음. 이는 향후 관련연구분야에 프로토콜로 활용화 가능할 것임.

4. 아미노글리코사이드의 세포 독성 문제 개선 방안 제시

아미노글리코사이드의 제제화함에 있어서 제한점 중 하나는 인체 내 신장 및 내이신경 독성과 관련된 side effect로서 무엇보다, 아미노글리코사이드의 유전질환치료제로서의 응용 가능성의 가잘 큰 걸림돌은 바로 상대적으로 높은 세포독성임. 즉 대증용법으로서 유전질환치료제의 이용에는 전생애주기를 통한 꾸준한 투약이 필요하므로, 현재 상용 아미노글리코사이드의 투약수준이 치사량에 이르지는 않으나 환자 내 특정 장기에 대한 독성은 보완되어야 할 상황임. 가령, NRI 활성이 우수한 것으로 보고되고 있는 겐타마이신 중간 대사체인 G-418의 경우, 낮은 수준의 농도 하 에서도 그 세포독성이 여전히 높아서 신약화가 불가능한 실정임 (G-418의 LD50: 0.04 μg/ml, 겐타마이신 혹은 카나마이신의 LD50: 2.5~5.0 μg/ml). 감염증치료제로서 지금까지도 장내감염 치료제로 이용되고 있는 아미노글리코사이드로 겐타마이신, 아미카신 그리고 토브라마이신이 있으나, 겐타마이신의 경우에만 임상 연구가 수행되었음. 본 연구개발을 통하여 아미노글리코사이드 구조 scaffold 내 아미노기의 숫자가 줄어들수록 그 신장 독성은 약화되며, 반면 수산기의 숫자가 줄어들수록 그 독성은 강화됨을 확인하였음. 또한 활성 아미노기와 수산기를 masking하는 비이온성 기능기, 가령 메틸기의 수식 등은 세포 내 다른 구성물과의 상호결합과 같은 비특이적인 상호작용 또는 활성 라디칼의 낮은 생성률로 설명될 수 있을 것임. 다음으로, 아미노글리코사이드 scaffold 내 3‘과 4’의 수산기의 부착 및 core structure인 2DOS 내 알킬화는 신장 세포독성을 감소시킴을 확인하였고, 6‘-위치 단일키랄 탄소원자의 구조적 변화 또한 NRI활성 뿐만 아니라 세포독성에 영향을 미침을 확인한 바, 본 연구개발 결과를 통하여 다양한 아미노글리코사이드 유도체의 SAR 및 STR 확인은 퇴행성 유전질환치료제로의 이용성 외에도 최근의 사회적 문제인 기존 아미노글리코사이드 항생제 다제내성세균인 그람음성 superbug에 대응할 수 있는 차세대 항생제의 임상 이용 가능성을 제시할 수 있을 것임.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

1. 연구개발 정량적 성과

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표								1		
	달성	2							2		
2차년도	목표	1							1		
	달성								2		
3차년도	목표		1						2		
	달성	1	2						0		
계	목표	1	1						4		
	달성	3	2						4		

가. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Generation of reduced macrolide analogs by regio-specific biotransformation	박제원, 윤여준	박제원, 윤여준	박성렬,한아름,반연희,유영지,김은지, 김은지	Journal of Antibiotics	64	국외	SCI
2011	Characterization and identification of pradimicin analogs from Actinomadura hibisca using liquid chromatography-tandem mass spectrometry	박제원, 윤여준	박제원 윤여준	박성렬,한아름,반연희,유영지,김은지,김범석,송재경	Journal of Chromatography A	1218	국외	SCI
2012	Microbial transformation of trichostatin A to 2,3-dihydrotrichostatin A	박제원, 윤여준	박제원 윤여준	박성렬, 한아름, 반연희, 유영지, 김은지, 김은지	Journal of Natural Products	74(5)	국외	SCI
2012	Discovery of parallel pathways of kanamycin biosynthesis allows antibiotic manipulation.	박제원, 박성렬	송재경, 윤여준	케샵 네팔, 한아름, 반연희, 유영지, 김은지, 김의민, 김두일	Nature Chemical Biology	7	국외	SCI (IF=15.808)

나. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010	신규한 올리고마이신 유도체	이화여자대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0079101					

	및 이를 포함하는 항생제								
2010	신규한 트리코스타틴 유도체 및 이를 포함하는 항암제	이화여자 대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0096108	2013	신규한 올리고마이신 유도체 및 이를 포함하는 항생제	이화여자대학교 산학협력단	대한민국	제 10-1231289 호 (2013.02.01)
2013	로사마이신 유도체 및 이를 포함하는 항생제	선문대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0054109	2013	신규한 트리코스타틴 유도체 및 이를 포함하는 항암제	이화여자대학교 산학협력단	대한민국	제 10-1189756 호 (2012.10.04)

다. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과(학위취득자)

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
11		3			2	1	1		2

(2) 장ㆍ단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외
해당사항없음	해당사항없음		연구책임자 (2012년8월)

2. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1				1	
	달성	0				1	

연구성과 활용 목표로 기술실시 1건을 목표로 하였던 바, 최근의 제약 및 바이오벤처의 영업실적 및 바이오관련 영업 손실 등의 악재로 그 목표를 달성하지 못하고 있으나, 관련 업체 중 경기도 성남 소재 (주)인트론과 현재 공동연구를 추진 중에 있음. 전임상 단계인 실험동물 대상 독성실험에 사용가능한 유도체의 양을 확보하기 위하여 기업주도하의 scale-up 발효조의 투입이 절실히 요구되고 있는 바, 향후 공동연구의 추진이 필수적인 실정임.

2절. 연구개발결과의 활용방안

1. 연구결과의 활용방안

➡ 교육현장에서 산업현장으로의 징검다리역할 대학 내 재학 중이거나 대학 참여연구원의 자격으로 과제 수행 중인 원급 및 선임급 연구조원들은 아직까지는 기존의 연구 틀 안에 안주하는 경향이 있음. 특히 장차 대한민국의 기간산업에 주요 역할을 하여야 한 당사자들에게 보다 큰 울타리가 있음을 인식시키고, 그 과제의 연장선상에는 산업현장이 있음을 각인시킬 필요성이 있음. 따라서 본 연구과제와 같은 신규 미생물 생산 대사 유도체의 개발기술은 기존에 알지 못했던 기존 항생제의 새로운 잠재성을 찾아가는 단계로서 그 결과보다는 방법론에 초점을 맞추는 기술개발로 연구원들에게 인식시키고, 동일 성격의 연구 과제를 대학 밖 산업현장에서 수행할 때 보다 익숙하게 접근할 수 있게 하는 것이 본과제의 또 다른 활용방안이라 여겨짐.

2. 기대성과

가. 기술적, 경제·산업적 측면

➡ 타 기술로의 파급효과 유전자 조작이 어려운 미생물로부터 생산되는 신규 생리활성물질 탐색 및 생합성 경로 규명에 효율적인 유전정보를 제공해 줄 수 있는 인프라 구축이 가능함. 또한 각종 미생물 관련 이차대사산물의 유도체 생합성을 위한 유전자 재설계를 도입하여 고부가 생리활성물질 혹은, 신약으로 상업화할 수 있는 가능성을 제시함. 또한, 기존의 약효가 입증된 항생제로부터 구조 개선을 통하여 고부가 유전질환치료용 의약용 제제를 창출할 가능성이 매우 높은 방법론을 확립할 수 있으며, 연구 기간이나 비용 측면에서 매우 경제적인 개발 접근 방법으로서 타 미생물 유래 유용 이차대사산물의 개발에 응용될 수 있음.

➡ 유망 시장으로의 접근성을 확장할 수 있는 기회제공 아직까지도 대다수 유전질환의 경우 근본적인 치료법은 없으며, 생명을 좀더 연장하기 위한 소극적인 수준의 치료가 주로 행해지고 있음. 따라서 다소 무작위적이라 할 수 있는 기존의 신규 유전질환치료용 아미노글리코사이드 개발 연구에 비하여 보다 합리적인 방법으로 아미노글리코사이드 구조 다양성을 확립하기에 용이하다는 장점이 있고 미생물 기반 아미노글리코사이드 유도체 발굴 및 그 생합성기법의 성공적 안착은 잠재적인 효과가 상당할 것임. 한편, 의약품시장 예측기관들은 전 세계 유전질환 치료제 시장이 향후 2~3년 내 본격적으로 확대되고, 연평균 100% 이상의 고(高)성장을 거듭할 것으로 전망하여, 2013년 무렵 약 3조원 규모의 시장이 형성될 것으로 예측하고 있음, 또한 개발된 유용 유전질환치료제의 미생물 기반 생합성법은 기반기술로서 향후 상당한 기술료 수익을 창출할 수도 있을 것이므로, 이는 경제·산업적 측면에서 매우 중요한 과제라 사료됨.

나. 학문적, 인력양성 측면

➡ 당해 관련 학문기반의 심화 당해 연구과제와 같은 여러 종의 아미노글리코사이드 항생제 관련 생합성 유전자들의 다양한 조합을 통해 퇴행성 유전질환치료용 아미노글리코사이드

유도체의 미생물 내 생합성 및 그 후보물질을 발굴하는 방법론은 전 세계적으로 전무한 상황임. 본 연구팀은 최근 겐타마이신 관련 유전자의 이종숙주 내 체내발현으로 겐타마이신A2의 생합성에 성공한 동시에, 그 생합성 경로를 밝힌 바 있음. 또한 겐타마이신과 카나마이신, 그리고 토브라마이신 생합성 관련 당전이 효소들의 기질 유연성을 바탕으로 하여 내성 병원균의 대표적인 내성 메커니즘인 아미노글리코사이드 항생제 변형효소의 작용점을 표적화한 차세대 아미노글리코사이드 항생제의 생합성 및 그 생산 재조합균주의 개발 또한 본 연구진이 수행중임. 따라서 본 연구과제는 기존 수행하였고 지금 현재수행 중인 타과제의 심화단계로 기존 유전질환치료제 연구에 있어서 그 방법론은 독창적이며 아미노글리코사이드의 활성연구와 관련되어 그 학술적 가치는 상당하다 할 것이며. 향후 본 연구기반기술의 기술적 향상에 큰 도움이 될 것임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

유전질환치료제 최근 개발경향 유전질환치료용 아미노글리코사이드 개발은 현존 전 세계적 연구 진척사항에 비추어서 중·장기적 기간이 소요할 것임. 즉, 유전질환치료 상 절대 우위를 점하고 있는 gene therapy의 경우 아직까지 그 안전성 및 윤리적 측면에서 검증되지 않는 부분이 다수 존재함. 따라서 이에 대한 보안책 또는 대안으로 유전질환치료제제의 개발(아미노글리코사이드 모방체 및 반합성체)이 대두되고 있는 실정임. 특히 유전질환에 대한 완치효과가 뚜렷이 보고된 적이 없던 바, 치료에 대한 전생애주기적 투여와 그에 따른 제제 독성 문제는 가장 시급히 처리될 필수불가결한 문제임.

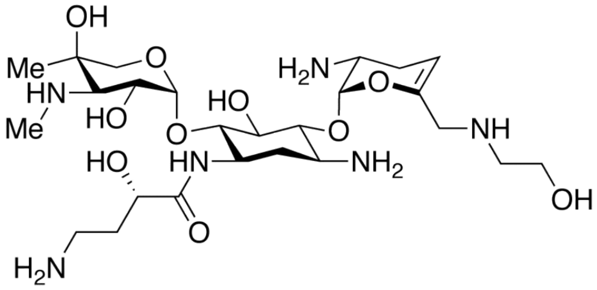
PTC therapeutics 미국 바이오벤처 제약회사인 PTC theraputics에서는 조합합성법으로 만들어진 약 10만의 화학물질 라이브러리로부터 아미노글리코사이드계 항생제의 scaffold와 유사 모방체 (mimics)인 후보물질로 PTC124를 개발하는데 성공하였음. 미국 FDA의 신속승인 (fast-track authorization)을 받아서 현재 소규모의 DMD 및 다른 낭포성 섬유증 환자들을 대상으로 임상시험을 진행 중으로, 임상시험은 DMD 환자 26명을 대상으로 미국과 이스라엘에서 진행하여 2010년 11월에 대규모 임상진행이 결정된 상황임.

반합성 아미노글로코사이드 NB54 한편, 2009년 이스라엘 연구진들은 기존 아미노글리코사이드 항생제인 파로모마이신과 겐타마이신에 비교하여 향상된 NRI 활성을 지닌 유도체 NB54을 반 합성 하는데 성공하였음. 또한 신장세포주를 대상으로 한 세포독성의 경우에도 기존 상용화 항생제에 비하여 약 10배쯤 낮은 독성을 보이는 것으로 나타났음. 실제로 생체 내 유전자의 무의미 돌연변이가 원인이 되어 나타나는 퇴행성 유전질환인 Usher syndrom 질환자 내 주요 표지자인 PCDH15 단백질을 대상으로 한 ex vivo 검정법 또한 그 NRI효과가 유효하게 나타나 2012년 2월 현재 실험신약신청 중임. 이와 같이, 아미노글리코사이드 모방체 및 반합성체의 유전질환치료제제로서의 개발은 향후 gene therapy와는 별도로 산업화의 한 축을 이룰 것임. 무엇보다 본 연구진의 수행목표인 미생물생합성 방법을 통한 유전질환치료용 아미노글리코사이드 라이브러리 개발은 기존 연구 방향과는 상이하여, 특허화 장벽을 벗어날 수 있는 신규하고 진보적인 핵심기술력 임이 자명함. 단지, 그 연구가 아직은 아이디어 창출에 상당부분을 의존하고 있는 바, 향후 기술력의 상용화 및 산업화를 위해서는 중장기적인 실용화 준비 기간이 절실함.

아미노글리코사이드 생합성 경로의 재발견 한편, 농용항생제로서 토양미생물 방선균에서 생산되고 있는 카나마이신과 토브라마이신의 경우, 각각 일본 도쿄기술연구원 (Tokyo Institute of Technology)의 에구치교수팀에서 본 연구진이 발견하여 Nature Chemical Biology에 게재한 카나마이신의 생합성경로의 부가 생합성경로, 즉 카나마이신 B로부터 A가 생합성되는 2차 경로 또한 2012년 3월에 유수 학술지인 Angewante Chemical International Eds에 한편, 독일의 Wehmeir팀은 토브라마이신 생합성경로 중 carbamoyltransferase의 효소적 특성을 밝혀서 이 또한 Angewante Chemical International Eds에 2013년 4월 게재하였음. 위 두 연구그룹의 연구내용을 활용할 경우 본 연구진의 목표인 보다 다양한 아미노글리코사이드 유도체

를 개발할 수 있을 것이며, in vitro NRI검정을 통하여 관련 유전질환치료 선도물질을 선발하는데 일조할 것으로 예측함. 이와 같이, 아미노글리코사이드 모방체 및 반합성체의 유전질환치료제제로서의 개발은 향후 gene therapy와는 별도로 산업화의 한 축을 이룰 것임. 무엇보다 본 연구진의 수행목표인 미생물생합성 방법을 통한 유전질환치료용 아미노글리코사이드 라이브러리 개발은 기존 연구 방향과는 상이하여, 특허화 장벽을 벋어날 수 있는 신규하고 진보적인 핵심기술력 임이 자명함. 단지, 그 연구가 아직은 아이디어 창출에 상당부분을 의존하고 있는 바, 향후 기술력의 상용화 및 산업화를 위해서는 중장기적인 실용화 준비기간이 절실함.

◘ 신규 아미노글리코사이드 반합성제제 plazomicin 임상3상 진입 예정 2012년 5월 미국의 제약 바이오벤처 제약회사인 Achaogen이 자연계 존재하는 아미노글리코사이드로서 현재 임상 이용 중인 sisomicin에 기능기를 유기화학적으로 부착시킨 plazomicin 신약후보물질 [그림25]이 다 국가간 임상2상을 마치고, 3상 준비 중임을 보도하였음. plazomicin은 현재 전 세계적으로 문제화되고 있는 그람음성 다제내성균인 녹농균, 폐렴간균 및 부동간균의 치료 가능 신약후보 의약품으로 복합형 요도감염증과 급성신유염 치료 의약품으로, 본 연구과제의 가치산물 중 하나인 아미노글리코사이드 유도체인 AKX 또한 최근의 슈퍼버그관련 세계보건 문제와 맞물려 그 사회적 관심사 또한 높다 할 수 있음.



아미노글리코사이드 반합성 신약후보물질
plazomicin의 구조

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당 사항 없음.

제 8 장 참고문헌

[1] Atkinson T.J. Cystic fibrosis, vector-mediated gene therapy, and relevance of toll-like receptors: a review of problems, progress, and possibilities. *Curr. Gene Ther.* **8**:201-207 (2008).

[2] Welch C.J. *et al.* PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations.
Nature **447**:87 - 91 (2007).

[3] Llewellyn N.M. & Spencer J.B. Biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* **23**:864-874 (2006).

[4] Hainrichson M., Nudelman I. & Baasov T. Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases. *Org. Biomol. Chem.* **6**:227-239 (2008).

[5] Burke J.F. & Mogg A.E. Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin. *Nucleic Acids Res.* **13**:6265-6272 (1985).

[6] Wilschanski M. *et al.* Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N. Engl. J. Med.* **349**:1433-1441 (2003).

[7] Rebibo-Sabbah A. *et al.* In vitro and ex vivo suppression by aminoglycosides of PCDH15 nonsense mutations underlying type 1 Usher syndrome. *Hum. Genet.* **122**:373-381 (2007).

[8] Du L *et al.* Nonaminoglycoside compounds induce readthrough of nonsense mutations. *J. Exp. Med.* **206**:2285-2297 (2009).

[9] Shitara T., Umemura E., Tsuchiya T. & Matsuno T. Synthesis of 5-deoxy-5-epifluoro derivatives of arbekacin, amikacin, and 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]
tobramycin (study on structure-toxicity relationships). *Carbohydr Res.* **276**:75-89 (1995).

[10] Park JW *et al.* Analytical profiling of biosynthetic intermediates involved in the gentamicin pathway of Micromonospora echinospora by high-performance liquid chromatography using electrospray ionization mass spectrometric detection. *Anal. Chem.* **79**:4860-4869 (2007).

[11] Park JW *et al.* Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:8399-8404 (2008).

[12] Park JW *et al.* Discovery of parallel pathways of kanamycin biosynthesis allows antibiotic manipulation. *Nat. Chem. Biol.* **7**:843-852 (2011)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품연구개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.