

## 특집: 신물질 탐색 연구동향(V)

### 신물질 발굴을 위한 미생물 스크리닝 분야의 연구전략 - 문제점 및 해결 방안 연구 -

이 철 훈

제일제당 종합연구소

21세기를 주도할 첨단산업 분야를 언급하게 될 경우 대부분의 사람들은 주저없이 정보통신 산업이나 반도체 산업들을 머리에 떠올리기 마련이다. 그러나 최근 세계적으로 유명한 미래산업 예측연구기관들의 보고에 의하면 그중에서도 제약산업을 유망 첨단산업으로 평가하고 있다. 이와같이 제약산업을 앞으로도 경쟁의 심도 측면에서나 국가간 또는 업체간의 우열의 폭이 점차 극한으로 전개될 것으로 판단된다. 이러한 상황에서 현재 세계 제약시장의 10위권에 위치하고 있는 한국의 제약산업이 21C에도 그 생명을 유지하기 위해서는 앞으로 10여년 내에 세계에 통용될 수 있는 대형 신약의 개발이 필수적이라고 생각한다.

이러한 신약의 개발은 1~2년의 연구에 의해 이루어지는 것이 아니라 사실은 모르는 사람이 거의 없으며 엄청난 시간과 노력 그리고 천문학적 수준의 연구비가 소요된다. 따라서 10여년 내로 세계적인 신약을 창출하기 위해서는 우리는 신물질 발굴의 연구를 시작하여 이미 몇 품목 이상의 우수 후보물질을 확보하고 있어야 한다. 그러나 국내 여러 연구분야의 상기부문의 연구는 아직도 태동기 상태를 벗어나지 못하고 있고, 더우기 경쟁이 과열되어 있어 서로가 자신들의 연구과정 중에서 얻은 Know-how나 연구전략의 공감각이 전혀 이루어지지 않고있다. 이러한 상황에서는 우리 각자가 거대한 선진 다국적기업과의 경쟁에서 그들을 물리칠 수 있을 가능성은 전혀 없다고 판단되며, 그들의 위협에서 조금이나마 돌파구를 찾기 위해선 절대적으로 그동안의 각자들의 시행착오들을 공유하고 협력해야 한다. 이러한 관점에서 본인은 지난 7,8년간 상기 연구분야에서 체험한 시행착오와 그에 따른 문제점 및 해결방안에 대한 사견을 여기에 제시하여 현재 열심히 연구를 수행하고 있는 동료 과학도들에게 조금이나마 도움이 되고자 희망한다.

신약을 개발하는 방법에는 여러 가지가 있을 수 있다. 합성 기술을 이용하여 기존의 의약품을 부분적으로 변형시켜 좀 더 경쟁력이 있는 신규 유도체를 만들거나 아니면 우리 주변의 천연 소재들로부터 전혀 새로운 탄소 골격의 신물질을 발굴하여 그 물질 자체를 또는 그것을 선도 물질로 하여 신약을 만들어내는 방법이다. 전자의 방법은 국내에서도 이미 십수년전부

터 수행되어 왔으나 별로 큰 성과를 거두지 못했으며, 약효나 약리학적 측면에서도 기존 의약품의 한계를 크게 극복하지 못하는 것 같다. 따라서 21C를 향해 나아갈 우리의 연구방향은 아무래도 후자의 방법을 택하는 것이 합리적이고 충분한 가치가 있다고 생각된다.

흔히 천연 소재라 하면 크게 둘로 나누어 동식물성 생약 소재와 미생물의 2차 대사 산물로 구분할 수 있으며 이중 생약 소재의 경우 우리는 수천년의 역사를 자랑하는 한방과 연계되어 충분한 자료가 확보되어 있는 한편 선진 다국적기업의 상대적인 취약 분야이므로 충분한 경쟁우위에 있다고 생각된다. 그러나 생약 스크리닝의 경우 다양한 스크리닝 소재의 확보에 매우 큰 한계성이 있고 비록 독성 등의 안전성 측면에서는 장점이 있으나 따라서 약효측면에서의 기존 의약품들에 대한 현격한 열세를 극복하기가 어려울 것으로 보인다. 그러므로, 생약 소재를 이용한 신약개발의 경우엔 기존의 치료제의 부작용이 큰 문제로 되어 있는 항암제 분야 이외에는 target이 되는 치료영역이 없다는 결정적 취약점을 갖고 있다.

이러한 이유로 해서 미생물 2차 대사 산물의 스크리닝에 의한 신약 후보물질의 탐색이 비록 경쟁력에 있어 우리가 선진 제약 연구기관들에 비해 절대적 열세에 있으나 한번 도전해 볼 만한 최적의 분야라고 확신한다. 그러나 우리가 이 분야에서 성공을 거두기 위해서는 창의적이고 합리적인 스크리닝 target의 설정이 결정적으로 중요하다. 당소에서 우리가 직접 체험한 다음의 두가지의 스크리닝을 예로 들어 target 설정의 중요성을 분석해 보고자 한다.

#### 항진균제의 스크리닝 연구(1,2)

미생물 스크리닝 연구를 시작하면서 설정한 광범위의 target은 항감염증 치료분야였고 신중한 자료조사 및 분석의 결과 특히 항진균제 분야를 스크리닝 target으로 설정하였다. 그 이유는 항생제 분야는 수천종류의 천연 항생물질이 보고되어 있고 사용되고 있는 기존의 항생제도 매우 다양하고 전반적인 개발동향이 합성에 의한 항균제 개발로 전환되어 가고 있는 반면, 항진균제의 경우 천연 항진균제로는 Amphotericin

B를 제외하고는 이렇다할 품목이 없으며 항진균제의 주류를 이루고 있는 합성 의약품들이 대부분 fungicidal 보다는 fungistatic하여 재발의 위험성이 매우 크기 때문에 아직 파고 들만한 틈새가 있다고 판단되었기 때문이다. 최종 연구 목표로서는, 첫째 약효에 있어서 광범위해야 하며, 둘째 기존의약품에 비해 월등히 우수한 activity(MIC)를 보여야하며, 셋째 fungicidal하며 마지막으로 신물질이어야 한다고 설정하였다.

스크리닝 방법은 매우 conventional하면서도 대량 스크리닝이 가능하고 난이도에 있어서는 매우 쉬운 방법인 agar diffusion method를 선택하였다.

우선 목표설정에서의 큰 오류를 분석해 보면 다음과 같다. 즉, 진균(fungi)들은 동물세포나 인체세포와 같이 eucaryotes이다. 따라서 광범위한 강력한 fungicidal activity라고 설정한 최초의 목표는 바로 인체 세포에도 똑같이 통용될 것이란 점을 간과하였다. 즉 이 project는 시작 초기부터 맹독성의 compounds screening이 예견되었던 것이다. 오히려 한 특정한 pathogenic fungus에만 specific하게 활성을 나타내는 fungistatic compound의 스크리닝이었어야만 하지 않았을까? 또한 초기에 설정된 목표에서 전혀 고려되지 않은 중요한 항목들이 있었다.

첫째, 역가물질이 반드시 경구 흡수도가 있어야 된다는 점이다. 즉 배양액 자체의 스크리닝보다는 유기용매 추출액의 역가를 스크리닝 해야만 추출된 유효물질이 경구흡수될 수 있는 가능성이 매우 높다는 점을 유념하지 못했다. 둘째, in vitro 역가(MIC) 검증시 human serum 존재 하에서 test해야 한다는 것이다. 처음부터의 in vivo 스크리닝은 현실적으로 매우 어려움이 많기 때문에 in vitro 스크리닝 level에서 의약품의 체내 작용시 의약품의 활성에 많은 영향을 미치는 serum protein 하에서의 역가검증은 어느 정도는 합리적인 방법이기도 하다.

또한 스크리닝을 준비하는 전처리 과정 중에서도 토양으로부터 균을 분리하는 데에는 많은 노력을 기울였으나, 막상 분리된 토양균들을 스크리닝을 위해 배양할경우에 단지 하나의 배지 만을 사용하였다는 점이다. 최소한 2가지의 상이한 배지를 사용했어야만 균을 분리하는데 들었던 노력도 보상을 받았을 것이다. 즉 A란 조성의 배지를 사용해 하나의 토양균에서 항진균 활성을 보였다면 동일한 균이 항진균 활성을 보이지 않는 B란 배지를 선택하여, 전 스크리닝 과정에 모든 균이 두 가지 배지 A와 B에서 스크리닝 되었어야 효율적인 탐색이 이루어졌을 것이다. 일반적으로 이 경우 선진 제약 연구기관에서는 4~20 종류의 배지를 사용하고 있는 것으로 알고 있다.

이상과 같이 초기에 잘못 설정된 연구목표에도 불구하고 우리는 cepacidine A(그림 1)라는 강력한 fungicidal activity에 광범위성 항진균력을 보이는 신물질을 발굴하였다. 표 1에서 cepacidine A의 activity와 활성의 광범위성을 볼 수 있다. 그러

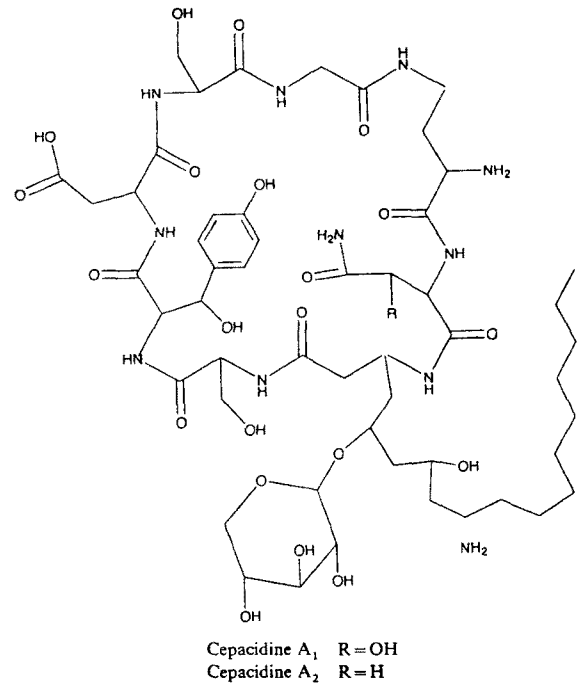


그림 1. Cepacidine A의 구조.

나 이 신물질은 우리가 이미 예견하였듯이 mouse를 이용한 감염동물 in vivo 실험에서 경구흡수도(표 2)가 전혀없었으며, 독성(표 3)이 매우 강한, 특히 cellular cytotoxicity, 물질이었으며 이것은 경험부족과 잘못 설정된 연구목표의 결과 얻어진 커다란 시행착오였으며, 우리는 이 과정을 통해 많은 것을 배울 수 있었다.

대부분의 연구자들이 그러하듯이 우리들도 이 신물질을 활용할 수 있기 위하여 농약활성시험(표 4)을 통해 농약으로의 개발을 추진하고자 하였으나 기술의 한계성으로 용이하지 않았으며 cyclosporin A나 FK-506, rapamycin의 경우처럼 면역억제제로의 전환 가능성을 타진해 보았으나, 우수한 활성에도 불구하고 결국엔 cepacidine A의 궁극적인 문제인 심각한 독성에 좌절되었다. 한가지 남은 가능성은 chemical modification에 의해 cepacidine의 독성과 활성의 분리를 시도하는 것 뿐이다.

### 항레지오넬라 항생물질의 스크리닝 연구(3)

항감염증 치료분야의 2번째 스크리닝 target의 설정시엔 cepacidine A의 연구에서 실감했던 것 같이 activity의 specificity에 중점을 두었다. 물론 국립보건원의 이 용우박사의 idea로 스크리닝이 진행되었지만, 개발을 위한 total process에서 레지오넬라균에만 특이적으로 반응하는 물질의 탐색에 주력하였으며 경구흡수의 중요성을 인지하여 solvent

표 1. Cepacidine A의 항진균 효과

Test Method		Agar Dilution			
Material		Cepacidine A (Cpa-A)	Amphotericin B (Amp-B)	Ketoconazole (KE)	
Microorganisms	Strain No.	Cpa-A	Amp-B	KE	
1	<i>Candida albicans</i>	KCTC 1940	0.391	0.782	>50
2	<i>Candida albicans</i> (R)	KCTC 38245	0.391	0.782	>50
3	<i>Candida glabrata</i>	KCTC 1714	0.013	0.196	6.25
4	<i>Cryptococcus neoformans</i>	KCTC 1197	0.025	0.098	6.25
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCTC 1213	0.049	0.098	6.25
6	<i>Aspergillus niger</i>	KCTC 2119	0.098	0.196	25
7	<i>Microsporium gypseum</i>	KCTC 1252	0.196	0.196	1.563
8	<i>Microsporium canis</i>	KCTC 11621	0.025	0.391	1.563
9	<i>Epidermophyton floccosum</i>	KCTC 1246	0.049	3.125	0.782
10	<i>Trichophyton mentagrophyte</i>	KCTC 6085	0.049	3.125	0.782
11	<i>Trichophyton rubrum</i>	KCTC 38484	0.049	0.782	1.563
12	<i>Fusarium oxysporum</i>	KCTC 6084	0.196	0.196	0.782
13	<i>Pyricularia oryzae</i>	KCTC 1939	1.563	12.5	>50
14	<i>Rhizopus stolonifer</i>	KCTC 6062	0.391	0.391	3.125

Geometric Mean		Reading Point	
Compound	GM	1) Yeast Type : 48~72 Hrs.	
Cpa-A	0.10363	2) Mold Type : 72~120 Hrs.	
Amp-B	0.52678	Culture Medium	
KE	5.66232	PDA(Potato Dextrose Agar) Medium	

표 2. Cepacidine A의 감염동물시험(경구)

Test compd	Route	Dose (mg/kg)	Response	
			No. of survivals/ Treated after 7days	survivor %
Control (PBS)	PO	20	0/5	0
Cepacidine A	PO	100	1/5	20
Amphotericin B	PO	30	5/5	100

Testing strains: *Candida albicans* (ATCC 10231) Mice, ICR : 20±1 gms, n=5/group (female)

extraction step을 절대 간과하지 않았다. 단지 상기 과제 의 경우 레지오넬라에 의한 감염증의 치료제 개발을 목표로 추진되었다가 최종적인 개발 point를 하절기 냉각탑수 살균 소독제로 개발방향이 선회한 이유는 신약으로의 개발을 위해서는 앞으로 오랜기간의 개발 기간과 막대한 연구비가 소요되는 반면, 살균소독제로의 개발은 그것에 대한 소비자들의 needs도 상당히 컸으며, 물론 신물질의 공산품으로의 개발이 흔한 경우는 아니지만, 쉽게 연구결과에 대한 output을 제시할 수도 있고 또 시장도 막대할 수 있기 때문이었다.

상기 연구결과 AL072(그림 2)란 물질이 발견되었으며 그 activity의 특이성을 표 6에서 볼 수 있다. 참고적으로 상기 물질은 계획대로 상품화가 진행되어 97년 하절기에 출시될 예정이다.

이상의 두 경우의 스크리닝 예에서 볼 수 있듯이 초기에 설정되는 스크리닝 목표의 합리성이 결국 그 project의 성패를 반이상 좌우한다는 중요한 사실을 잊지 말아야 할 것이다. 가

표 3. Cepacidine A의 독성 및 자극성

LD <sub>50</sub> (Mouse)	12.5 mg/kg (i.v.) <sup>a</sup>			
Oral Absorption	-(HPLC Analysis)			
Eye Irritation (Rabbit) <sup>b,c</sup>	Conc.	Retina	Cornea	Conjunctiva
	0.1%	-	-	-
	0.5%	-	-	-
	1.0%	++	+	+++
Skin Irritation (Rabbit)	0.5%	Scratching		-
		Non-Scratching		-
	1.0%	Scratching		-
	Non-Scratching		-	

<sup>a</sup>Amphotericin B : 4 mg/kg (i.v.) <sup>b</sup>24 Hrs. After Treatment <sup>c</sup>Maximum Irritation : +++++

능하면 충분한 시간을 갖고 자료조사 및 제품의 개발경향, 특허의 출원동향 그리고 가능하다면 그 분야의 전문가들에게 충분한 자문을 받은 후에 최종적으로 개발될 제품의 spec.을 결정해야만 한다.

상기의 예로 제시했던 두 경우의 스크리닝은 일반적으로 일련기를 'disease-directed screening'이라 하며 이 경우는 종래의 conventional한 스크리닝 방법으로 항생, 항진균 물질의 탐색에 적합한 방법이다. 그러나 최근의 전반적인 미생물 2차 대사산물의 스크리닝 추세는 'target-directed screening'으로서 질병의 원인이 되는 key target을 선정하여 그들의 길항물질들을 선별한 후 2차적인 'pharmacological screening'에 의해 적응분야를 탐색하는 전략을 의미한다. 주로 선택되는 key targets로는

표 4. Cepacidine A의 농약 활성

Disease	Control Value (%)				Standard	Conc. (ppm)	C.V. (%)
	Concentrations (ppm)						
	1	5	25	50			
RCB	29	95	97	97	Blasticidine-S	50	100
RSB	0	63	80	87	Validamycin	50	100
CGM	88	100	100	100	Dichlofluanid	40	99
TLB	9	47	62	69	Chlorothalonil	50	98
WLR	93	99	99	100	Flusilazol	2	93
BPM	9	0	13	17	Flusilazol	10	100

RCB: Rice Blast, RSB: Rice Sheath Blight, CGM: Cucumber Gray Mold, TLB: Tomato Late Blight, WLR: Wheat Leaf Rust, BPM: Barley Powdery Mildew.

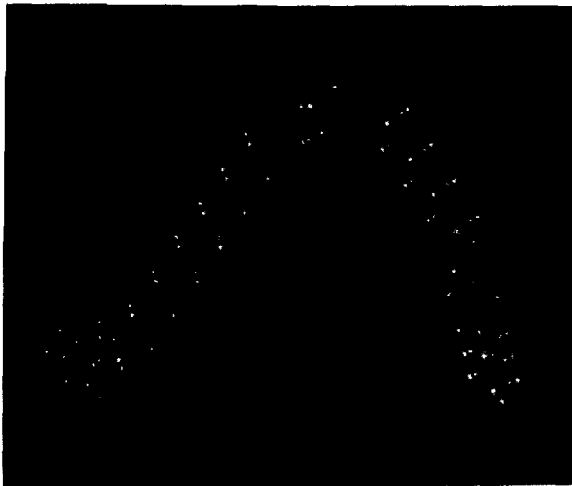
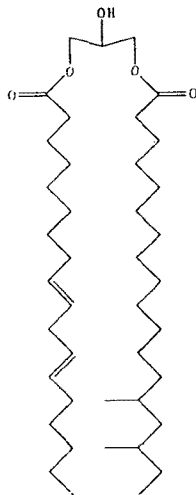


그림 2. AL072의 구조.

광범위한 cellular signal transduction에 관련되는 receptors나 enzymes 또는 transcription factors 등이 있으며, 이들의 antagonists나 inhibitors의 개발이 전세계적으로 활발하게 추진되고 있다. 특히 새로이 정체가 밝혀지는 enzyme의 경우 가장

표 5. 항레지오넬라 항생물질 AL072의 항생역가

Microorganism	Strain	Φ
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC33152	108
<i>Staphylococcus aureus</i>	C4039	13
<i>Streptococcus pyogenes</i>	C4003	-
<i>Streptococcus agalatae</i>	C4029	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	C4042	12
<i>Corinebacterium diphtheriae</i>	C4084	9
<i>Bacillus subtilis</i>	C4062	8
<i>Bacillus megatherium</i>	C4066	6
<i>Escherichia coli</i>	C4020	10
<i>Citrobacter freundii</i>	C4049	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	C4045	22
<i>Shigella flexneri</i>	C4077	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	C4078	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	C4022	-
<i>Enterobater cloacae</i>	C4023	-
<i>Enterobater cloacae</i>	C4008	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	C4053	9
<i>Serratia marcescens</i>	C4054	-
<i>Serratia marcescens</i>	C4059	-
<i>Proteus mirabilis</i>	C4012	-
<i>Proteus mirabilis</i>	C4013	-
<i>Proteus morgani</i>	C4015	-
<i>Proteus morgani</i>	C4016	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C4057	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C4028	18
<i>Pseudomonas cepacia</i>	C4071	-

선호되는 screening target이 되고 있다.

우리들과 같이 이 분야에 기술적으로나 경험적으로 낙후된 후발 연구기관에서 효소저해제 스크리닝을 추진할 경우, 대상인 효소의 선정이 얼마나 중요할 것이냐에 대해서는 언급할 필요도 없을 것이다. 하나의 cascade에서 기존 의약품이 A란 효소의 저해제일 경우 그 total metabolism의 pathway를 신중히 분석하여 부작용을 최소화할 수 있고 또 경쟁자들의 흥미가 상대적으로 덜한 또 다른 효소 B를 target으로 설정하는 것이 우리에게 유리하다는 것은 두 말할 필요도 없다. 그러나 정말로 결정적인 성패의 열쇠는 screening assay 방법이다. 논문이나 특허나 학술발표장 등에서 공개되는 assay 방법은 절대로 사용해서는 안되며, 반면 조금 이론적으로는 무리가 있다 싶어도 독창적이며 무모한 assay 방법이 강구되어야만 성공할 수 있다. 경우에 따라서는 research 성격을 벗어나 '마루타'적인 survey의 방법도 동원해볼 만하지 않을까?

미생물 스크리닝을 수행함에 있어서 가장 운영하기 어려운 측면은 상기에 언급한 여러 가지 전략 운영들 보다는 연구인력의 적절한 운영이라고 말할 수 있다. 스크리닝의 전 과정 중 초기 up stream 분야는 고도의 집중력이 필요되는 동시에 매우 반복적인 그리고 단순한 작업으로 구성된다. 토양으로부터 균을 분리하여 균의 배양액을 제조하고, 추출하고 assay하는

일련의 작업이 모두 연구원의 손에 의해 이루어져야 하기에 담당 연구원들의 의욕이 반복되는 단순 작업에 의해 저하될 경우가 많이 있으나 각 부분이 나름대로 상당한 전문성과 고도의 집중력을 필요로 하기 때문에 연구인력의 빈번한 교환 근무는 바람직하지 못하다. 또한 지금까지의 경험으로 짐작하여 볼 때, 수행할 수 있는 assay의 capacity는 평균 500~1,000 assay/월이며 동시에 평균 약 5~10% 정도의 연구원의 실수에 의한 false positive가 발생한다. 이러한 문제점들을 해결할 수 있는 유일한 방법은 BioRobotics system의 도입이다. 해외선진 연구기관의 일반적인 screening capacity는 대략 1,000 assay/일 정도이며 이들에 경쟁할 수 있기 위해서는 우리도 'high-throughput(HTP) screening'의 도입이 필수적이다. 금년 7월부터 당 연구팀에도 이 BioRobotics system이 도입되어 토양균의 선별 작업부터 최종 assay reaction 완료까지의 거의 모든 공정을 자동화하여, 10,000~30,000 assay/월로 capacity를 늘리고 연구원들은 주로 역가물질의 분리 및 특성규명등의 창의적인 연구에 전념할 수 있도록 재편성할 계획이다. 이와같이 하여 종래의 연구능력을 30배 이상 확대시켜 선도물질의 발굴에 좀

더 박차를 가함은 물론 요즘 한창 issue가 되고 있는 'combinatorial chemistry(4)'의 도입으로 좀더 우수한 역가의 후보물질 창출에 최선의 노력을 다할 것이다.

## 참고문헌

1. Lee, C.-H., S., Kim, B., Hyun, J.-W., Suh, C., Yon, C., Kim, Y. Lim, and C. Kim, 1994. Cepacidine A, a novel antifungal actibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*(I). *J. Antibiotics* **47**, 1402-1405.
2. Lim, Y., J.-W. Suh, S. Kim, B. Hyun, C. Kim, and C.-H. Lee, 1994. Cepacidine A, a novel antifungal actibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*(II). *J. Antibiotics* **47**, 1406-1416.
3. Yon, C., J.-W. Suh, J.-H. Chang, Y. Lim, C.-H. Lee, Y.-S. Lee, and Y.-W. Lee, 1995. AL072, a novel anti-*Legionella* antibiotic produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiotics* **48**, 773-779.
4. 안양수. 1996. Combinatorial chemistry and molecular diversity. 무한탐구 창간호, 6-7