

제 2001년도
기관고유사업
보 고 서

BSKGM5000111-2001067-3

Proteome 기능 연구를 위한 저분자
천연물질은행 구축
Microbial Natural Product Library
for Proteome Research

2002 . 1 . 15

한국생명공학연구원

제 출 문

한국생명공학연구원장 귀하

본 보고서를 “Proteome 기능연구를 위한 저분자 천연물질은행 구축에 관한 연구” 과제에 대한 기관고유 사업보고서로 제출합니다.

2002 . 1 . 15 .

연 구 기 관 명 : 한국생명공학연구원

연 구 부 서 명 : 항생물질연구실

세부과제책임자 : 김 성 욱

연 구 원 : 김성욱, 김창진, 유익동

이정준, 안중석, 김항섭

안순철, 이정형, 오원근

손광희, 윤봉식, 김원곤

유인자, 박동진, 박종흠

민정원, 전선희, 김나래

요 약 문

I. 제 목

Proteome 기능연구를 위한 저분자 천연물질은행 구축에 관한 연구

II. 사업(연구개발)의 목적 및 필요성

인간 게놈 프로젝트 결과가 발표되고 프로테오믹스 연구가 활발히 진행되면 의약개발을 위한 작용 목표점이 늘어날 것으로 예상되며, 또한 고속 스크리닝 기술(HTS)이 보편화되면서 효능 검정과 더불어 “처리 속도”가 연구 성패의 주요 인자로 대두되어 초고속 다량 연구에 필요한 화합물의 확보가 관건이 되고 있는 실정이다. 즉 저비용, 신규 작용점 및 속도라는 명제를 실현할 선행 조건으로 다양성이 풍부한 물질군의 확보가 초미의 관심사가 되고 있으며, 미국의 머크사와 영국의 글락소-스미스클라인사 등 다국적 대형 선진 제약사들은 이미 수십만에서 백만종 이상의 화합물을 확보하여 신약개발에 활용하고 있다. 이들 대형 제약사와 제휴관계에 있는 파마토피어사와 같은 소규모 전문기업의 경우에도 분자설계 등을 통해 약 600만개의 물량을 확보하고 있고, 전담팀을 구성하여 동구권, 러시아, 중국, 남미 지역 등을 포함한 세계 각지로부터 다양한 화합물을 수집하고 있다.

다양한 화합물을 확보하는 가장 일반적인 방법은 조합화학 기술을 이용하여 유용 모핵의 다양한 유도체를 찾는 방법으로 가장 실용성이 높으나 의약의 작용점이 지금까지의 500여 개에서 2,000개 이상으로 늘어날 것으로 예측되는 인간 게놈연구 결과는 늘어나는 목표점에 대응하는 다양한 물질군을 필요로 하게되어, 기존의 모핵을 탈피하고 구조적으로 특색 있는 화합물을 요구하고 있다. 따라서 미생물과 식물 유래의 천연물 자원 재검토, 의도적인 분자설계, 기존 라이브러리 구입 및 전문 연구팀과의 협동 연구를 통해 물질 다양성의 확보 노력은 계속되고 있다.

2000년대까지 개발된 신의약 후보물질의 60 % 이상이 천연물이거나 천연물과 관

계가 있는 화합물이라고 보고되어져 있는 데도 불구하고, 최근 수년 사이에 대형 제약사에서는 천연물 연구를 잇달아 중단하고 있는 실정이다. 이렇게 중단되고 있는 가장 큰 요인은 기존 천연물 대부분이 단일 용매추출에 의한 미 정제 혼합물의 형태를 갖고 있다는 점이다. 즉 일반 천연물 추출액은 새로운 연구 패러다임이자 스크리닝의 필연적 과정인 HTS에 대한 적용성이 떨어지는 데다가 물질 구조에 대한 기본적인 정보가 없는 혼합물에 대한 HTS 결과로는 후속 스크리닝 방향을 결정할 아무런 단서도 얻지 못하기 때문이다.

그러나, 천연물이 HTS 적용성에서 약점을 나타내고는 있으나, 일반적으로 천연물이 갖고 있는 가장 커다란 구조적 강점 즉, 고리구조 및 chiral center가 많아서 다양한 약리활성을 나타내고 있기 때문에 이의 활용을 위한 새로운 방법론이 천연물에 적용되고 있다. 기존에 널리 이용되어 왔던 활성위주의 천연물 스크리닝이 구조를 근간으로 하는 체계로 바뀌어 가고 있는 추세여서 이러한 구조를 근간으로 하는 천연물 연구를 뒷받침하기 위해서는 천연물도 분획 및 순수 분리된 새로운 형태의 라이브러리가 요구된다.

한편, 미생물 유래 천연물의 경우 그 생산량이 제한적이거나 재현성 문제로 라이브러리를 구성하는 시료 양이 화학 합성에 비해 일정치 않고 적은 것이 약점으로 지적되어 왔다. 그러나 활성 검정 방법이 발전하고 자동화 및 소형화됨에 따라 시료 요구량이 감소하여, 미량 물질의 라이브러리화가 가능하게 되어 미생물 등 천연물 자원의 라이브러리가 재평가 되어야 할 것으로 사료되나, 그 동안 국내의 관련 연구를 통해서 상당한 성과가 있었던 미생물을 비롯한 천연자원을 근간으로 하는 화합물 라이브러리는 대단히 제한적이거나 산재한 개별적 연구 결과물에 머물러 있는 실정이다..

본 과제에서는, 미생물 유래 천연물의 분획화 라이브러리로서, HTS에 적용될 수 있는 screening-ready 형태의 가용성 높은 천연물 은행 구축을 추구하며, 궁극적으로는 구조를 근간으로 한 천연자원 유래 화합물 라이브러리를 구축한다. 즉 분자량 2,500 이하 천연물 유래 단일물질 및 분획물을 대상으로, proteomics와 chemical genomics 에 적용할 수 있는 pool로서 천연물 은행의 기반을 구축하고자 한다. 천연물 은행은 HTS/proteomics/chemical genomics에 사용될 다양한 물질을 제공하는 ligand pool로서

연구의 출발점이자, 산재한 천연물 정보의 교차점이 될 것이다.

한국생명공학연구원은 미생물을 위시한 천연 자원으로부터 물질을 분리하고 자원을 확보하는 전문적 인력 기반이 튼튼하고, 균주은행, 자원센터 및 생물정보팀을 비롯한 자체 인프라가 잘 갖추어져 있어 당 기관에서 천연물질에 기반을 둔 물질은행의 구현 가능성이 높다. 특히 미생물의 경우 일반 식물 추출물과 달리 균주 관리, 배양 및 분리 기술이 필수 요소로 필요하므로 당 기관의 풍부한 미생물 이용기술이 잘 발휘 될 수 있을 것이다. 따라서, 향후 미생물을 비롯한 활성 천연물 연구를 선도하기 위한 체계적이고 종합적인 전략 기반으로 천연물 은행의 활용가치는 크다 할 수 있다.

III. 사업(연구개발)의 내용 및 범위

연구 개발은 3 단계로 나누어 진행하며, 제 1 차 년도에는 이 중 1 단계인 ‘저분자 천연물 유래 proteome 응용소재 확보를 위한 infra 구축과정’을 수행하였다. 사업 내용은 실리카 컬럼 및 C18 컬럼을 장착하고 4 channel에 의해 4 시료의 동시 처리가 가능한 분획기를 활용하여 라이브러리를 발생시키는 과정으로 진행하였다.

사업 범위는 ① 적절한 순도가 보장된 분획을 나누기 위한 분획 최적화 ② 분석을 통한 분획의 pre-profiling 및 grouping ③ HTS version의 시범 가동과 assay 적용 ④ 제한적 데이터베이스 구축까지 수행하였다.

분획화는 최종적으로 고속 순수분리 과정으로 이행하기 위한 중간 과정이므로 버섯, 곰팡이, 방선균류를 이용하여 각각의 대사산물 분획화 조건을 찾아 두 단계에 걸쳐 pre-profiling 과정을 진행하였다. 분획화 과정이 정해지면 2단계부터는 라이브러리 size를 확충하기 위한 본격 가동을 준비 중이다. 이 과정에서 진행된 결과는 데이터베이스화 하고 96-well plate를 비롯한 HTS 및 assay 가능한 형태로 제조하여 일부 공개하고, 3단계 만료 시에는 외부에 공개할 예정이다.

(차기년도에 수행될 연구의 제 2단계는 ‘천연물 유래 proteome 소재의 다양성 부

여를 위한 과정'으로 미생물의 종 다양성, 유전자 다양성을 확충하고 대사 다양성을 유도 하며, 미량물질의 선택적 증폭을 통한 다양성 확보에 주력하여 1단계 결과를 기반으로 가치 부여과정을 진행할 예정이다. 최종적인 라이브러리의 다양성(D)은 $D = \text{종 다양성} \times \text{대사 다양성} \times \text{분획 다양성}$ 으로 표시할 수 있다. 따라서 1단계에서 최적화 한 분획에 의한 다양성에 종과 대사 다양성을 부여하는 과정을 진행하고자 하며, 제 3 단계에서는 '생체 기능조절 활성소재 확보를 위한 functional library'로 이행할 예정이다. 다양한 목표 점을 대상으로 HTS와 proteome 연구에 적용하고, 한편으로는 저분자물질과 단백질간의 작용을 연구하는 화학 생물학적 연구에 적용하여 기능 규명 연구에 활용할 계획이다.)

연구범위	연구내용
저분자 천연물 유래 Proteome 응용소재 확보 (Infra)	<ul style="list-style-type: none"> - 1st Pre-profiling; 실리카 컬럼, 고속 분획기, TLC - 분획화 정성 조건 확립 (분획 다양성) - 분획 라이브러리 발생 - 분획 라이브러리의 검증
천연물 유래 저분자 분획 라이브러리 구축 (Contents)	<ul style="list-style-type: none"> - 2nd Pre-profiling; C18 분획 (UV detector, HPLC-M/S) - 순수분리 library 축적 (lead compound library) - 분획 dB 내부공개 - 분획 dB 외부공개
천연물 유래 Proteome 소재의 다양성 부여 (Novelty)	<ul style="list-style-type: none"> - 종 다양성, 유전자 다양성 - 배양 조건에 따른 대사 다양성 - 미량 물질의 선택적 증폭
유전체 및 Proteome 기능 조절 활성소재 확보 (Function)	<ul style="list-style-type: none"> - HTS 적용 - Proteome 연구 적용 - 화학생물학적 방법론 적용

IV. 사업수행(연구개발)결과

분획 라이브러리를 표준화하기 위하여 버섯 1종, 곰팡이 1종, 식물 추출물 1종을 이용한 4-channel QUAD system 운용의 1차 최적화 시험과, 8종의 곰팡이에 대한 2차 시험 가동을 수행하였다. 특히, 곰팡이 대사산물의 경우 액체 배양물에 의한 시료 확보가 느리고, mycotoxin의 반복적 출현에 따른 물질 다양성의 제한이 확인되어 1차 년도의 연

구대상에서 유보하고, 균주 공급과 반복적 배양이 유리한 방선균을 주 분획 대상으로 연구를 진행하였다. 고속 분획기는 동시에 4가지 미생물 배양액의 분획이 가능한 4-channel system (QUAD, Biotage)을 사용하였으며, 실리카 카트리지를 정지상으로 하여 분획하였다. 시험 가동을 통해서 사용 시료 및 균주 종류에 따른 분획의 다양성을 확인하고, 균주 수를 확대하여 본격적인 전주기 관리 및 라이브러리 발생을 진행하였다.

분획 조건을 최적화한 후 방선균 대사물의 분획 라이브러리를 제조하였으며, 이때 사용한 미생물은 토양 미생물 A10325~A10434로 저장된 미생물 중 무작위로 선별한 105종이었으며, 2개월의 전주기 관리에 의해서 394개의 라이브러리를 구축하였다. 이들 각 분획은 1 균주의 배양액에서 평균 40~80개의 실리카 소분획을 확보하여 TLC로 프로파일링을 확인하였고(pre-profiling), 이 결과에 따라 소분획을 재취합하여 균주당 4~8개의 분획으로 모아서 라이브러리로 보관하였다. 이 분획들은 E-tube, mother plate, daughter plate의 형태로 영하 20도에서 냉동 보관되었으며, 96-well plate format으로 준비하였다.

1 단계에서 발생된 분획 라이브러리의 분획별 무게 분포는 대부분 분획이 20mg 으로부터 5mg 내외로 애초의 목표치에 근접하였다. 라이브러리 발생 수율은 2개월의 가동으로 확인하였으며 분획 라이브러리는 실제 활성 검색계 및 HTS에 적용하여 다양성 가치를 검정하였고, dereplication을 위해서 일부 반복적 분획에 대한 HPLC 및 NMR 분석을 통해서 배지유래 성분 및 유기산에 의한 다양성 저하를 방지할 수 있었다.

연구 기간 중 발표한 관련 논문은 국외 4편, 국내 2편, 학술 발표 2건이며 국내 특허 1건이 출원되었다. 특히, 고속 분획 과정의 유효성 검정을 위해 사용된 검색계에서 해외 논문 1편이 도출되어, 제 3 단계에서 진행할 기능부여 분획 라이브러리에 대한 가능성을 확인할 수 있었다. 천연물 순수 분리물의 경우 밀리그램당 30 달러까지 가치를 가지므로, 부분 정제되어 순도가 확인된 분획물의 경우 화합물 당 최소 10달러로 가정할 수가 있으며, code를 부여받은 라이브러리 평균 분획량을 5 mg으로 산정할 경우; $394/(2\text{-months}) \times 5 \text{ mg} \times 10 \text{ U\$/mg} = 19,700 \text{ U\$/}(2\text{-months})$ 정도의 잠재 가치를 확인할 수 있었다.

V. 사업수행(연구개발)결과의 활용계획

- 중복되고 산재한 천연자원의 종합화 기반 구축에 활용하여, 기업, 학교, 연구소 등에 있는 개개의 천연물을 구조 및 분획 기준으로 통합하는 중심적 연구체로 자리 매김을 모색하고, 천연자원의 활용성 극대화를 위한 공동의 연결고리를 제공하고자 한다. 이를 통해 중복 연구 및 의미 없는 재발견 확률을 줄이는 데 활용.
- 최종적으로 신약 후보가 될 천연물의 pool을 HTS에 활용.
- 세포기능 연구재료로 이용될 ‘Ligand의 발굴’과 이를 이용한 생체기능 연구에 활용하고 후속 연구를 통한 약효 재발견 모색.
- 분획 라이브러리는 다양한 작용점에 쉽고 체계적으로 적용되어, 특색 있는 “우리의 것”을 확보하고, bio-informatics와의 연계하여 천연물 가치 제고에 활용.

목 차

제 1 장 서론	9
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	16
제 3 장 사업(연구개발)수행 내용 및 결과	19
제 4 장 사업(연구개발)목표 달성도 및 대외기여도	40
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	41
제 6 장 참고문헌	42

제 1 장 서론

제1절 연구의 목적

본 과제는 미생물 유래 저분자 천연물질의 효율적 관리와 이용을 가능케 하는 물질 라이브러리의 연구를 그 목적으로 한다. 그간 신약 개발의 중요 자원이었던 미생물을 비롯한 천연물 연구가 활성위주의 방법론에서 구조위주의 방법론으로 이행하는 전환기를 맞이하여, 이에 상응하는 라이브러리 형태로 천연물 유래의 순수물질 및 분획물을 구성하는 방법론을 수행한다. 이들 연구를 통해 도출된 결과는 천연물 라이브러리의 구축과 표준화에 적용되며, 또한 라이브러리는 고속스크리닝(HTS)이나 단백질 연구를 위한 활성물질 공급되어 질병 치료제의 개발이나 작용기작 연구에서의 활용이 기대된다. 특히, 중복되고 산재한 국내 미생물 유래 활성물질과 관련 정보의 종합화를 담당할 중심적 연구기관 구축에 이용할 수 있을 것으로 여겨진다.

- 미생물 유래의 저분자 천연물질을 분획한 assay-ready 형태의 라이브러리를 구축
- 궁극적으로 HTS/proteomics/chemical genomics에 사용될 다양한 물질 제공
- 라이브러리는 물질 연구의 출발점이자 천연물 정보의 교차점 구성

제2절 연구의 필요성

프로테오믹스 연구 시대의 생존 요건은 새로운 단백질 목표점과 활성 소재로서 라이브러리의 확보로 요약될 수 있다. 또한 라이브러리의 경쟁력은 대개는 보유 화합물 수 즉, 라이브러리의 양적인 크기로 나타내진다. 통상 수만 개 단위의 양적 크기를 라이브러리 구성의 최소 단위로 하고 있으며, 파마코피어사의 경우는 수백만 개의 화합물을 보유하여 연구에 사용하고 있다. 그리고 라이브러리의 질적인 면도 무시할 수 없는데, 라이브러리 발생과 관리체계에 따른 접근성, 구성 물질의 구조적 다양성 그리고 각 스크리닝계에 대한 적합성 등을 들 수 있어서, 라이브러리의 효용성은 단순히 크기에 비례하지 않는다고

한다. 특히 라이브러리의 다양성은 가장 중요한 요소로 이의 확보 방안이 곧바로 라이브러리 사업의 핵심이며, 조합화학이 보편적인 방법론이다. 고리화합물이 풍부하고 키랄센터가 다양한 천연물이 물질 다양성 확보에 큰 잠재력을 가졌지만 아직 가용성 높은 순수 천연물 라이브러리가 드물다. 천연물질의 가용성을 높이기 위해서는 혼합물 형태의 추출물을 대상으로 하는 활성위주의 접근법에서, 구조에 근거한 접근법이 제시되고 있다 1). 궁극적으로는 순수 분리된 천연물 라이브러리의 추구하되, 속도와 실용성에서 효과적인 분획물 라이브러리의 구축이 요구되는 시점이다.

미생물 저분자 천연물 은행 연구 배경

머크 등 일부 대제약사는 자체적인 천연물 연구 활동을 중단하고 관련 연구 인력의 재배치를 단행하였다. 이렇게 된 배경은, 대개의 천연물 연구가 단일 화합물이 아니고 혼합물 형태의 용매 추출물을 신약개발 연구의 출발점으로 했던 것에서 발생했다. 특히 미생물 유래 천연물의 경우 균주 관리와 배양 및 추출이라는 경비가 많이 들고 복잡한 과정을 필요로 하므로 단시간 내에 혼합물을 단일물로 격상시킬 수 없었다. 기존 천연물 연구 대상이 ‘단일 분리물’이 아닌, ‘용매 추출액’이므로, HTS 첫 적용부터 구조와 활성 연구에 필요한 물질 구조 정보가 공급되지 않아서 약제 최적화를 이한 후속 과정의 결과가 없게 된다. 구조에 대한 정보를 무시하고 활성만을 기준으로 개발을 진행하는 경우 이미 발견된 결과를 재발견할 확률이 90 %가 넘는다고 알려져서 천연물 개발에 따른 위험 부담률이 높아졌다. 인간 게놈연구 이후 도래한 단백질체 연구시대가 요구하는 것은, 천연물이 혼합물 상태는 벗어나서 정성적 분석이 가능해야 하며, 동시에 전체적인 천연물 연구 과정이 지금보다 효율적이어서 비용절감이 있어야 한다는 것이다. 즉, HTS를 필두로한 최신의 스크리닝 및 단백질체 연구방법론에 대응할 수준의 assay-ready 형태의 보다 정선되고 다양한 천연물군이 필요하게 되었다. 보다 정선된 천연물군의 궁극적 형태는 당연히 구조가 밝혀진 ‘순수분리 단일물질 (구조-base)’이며, 속도와 효율면에서 우위가 있는 중간형태가 ‘정성적 분획물 (분획-base)’ 형태의 천연물이다. 즉, 미생물 자원을 비롯한 천연물 연구의 전환기가 오고 있다.

1) Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. Drug Discovery Today 6(16): pp. 840-847 (2001)

분획화의 가치는 비단 천연물의 순도를 높이는 것 뿐 아니라 천연물의 다양성을 보강하는 효과가 있다. 지금까지의 미생물 유래 천연물 연구 방향은 주로 물질 생산자인 미생물의 균주 다양성에만 의존하였다. 즉, 기대되는 분획물의 다양성(D)은 기존의 미생물 다양성(S)과 대사 다양성(M) 그리고 분획방법의 다양성(F)에 달려 있다; $D = S \times M \times F$. 게다가 미생물 다양성은 점차 배양이 어려운 미생물 자원의 활용을 위해서 메타게놈을 포함한 유전 다양성으로 확대 중인데, 유전 다양성에서 파생되는 필연적인 천연물질 다양성을 단순 용매추출로는 올바르게 평가하거나 스크리닝 할 수는 없을 것이다. 또한 미생물 자원이 배양단계를 포함하는 어렵고 비싼 과정으로 생성되므로 최초의 라이브러리 발생 시점부터 가치 있고, 물질에 대한 기본 정보가 포함되어 있어야 별도의 추가 경비 소모를 줄일 수 있을 것이다. 즉, 생성된 라이브러리는 곧바로 스크리닝이 가능한 이른바 HTS-compatible한 형태로 준비되어야 하는데, 천연물에 있어서 분획이 필요한 이유가 된다. 따라서 분획화 라이브러리는 다양성 확보 및 증가에 필요하며 구조를 근거로 한 활성물질 개발에 교두보가 될 것이다.

이미 국내에서는 한국화학연구원 내에 화합물 은행이 가동 중이다. 또한 한국 생명공학 연구원 및 벤처 기업에서 식물 유래의 천연물 은행이 구축되어 있다. 그럼에도 굳이 미생물 유래의 저분자 은행이 필요한 이유가 있을까? 화합물의 경우 합성과정과 분리과정이, 식물체의 경우 추출 및 분리 과정으로 비교적 단순한 과정을 포함하지만 미생물은 균주의 확보, 보관, 배양, 분리 등의 단위 기술이 종합된 과정을 필요로 한다. 따라서 미생물 연구의 기반이 있는 곳에서 수행하는 것이 바람직하다. 그 동안 생리활성물질 연구가 국내에서 활발히 이루어져 미생물 자원을 대상으로 한 소규모의 천연물균이 기업, 학교, 연구소 등에 산재하고 있는 것으로 파악된다. 그러나 미생물 유래의 물질은 신규 구조 발견 성공률이 전 세계적으로 1%에 지나지 않은 것으로 알려지고 있어 결국 연구의 99%는 중복이며 국내 연구의 경우도 각 연구 주체간 연구의 중복성이 예상된다. 따라서 라이브러리를 통한 정보공유 및 시료 공유가 필수적인데, 생명공학분야 전문연구소에서 인프라를 바탕으로 미생물 유래의 천연물 은행연구를 하는 것이 바람직 할 것이다. 또한 이미 보유한 화합물도 각 연구 주체가 보유한 활성 검색계에 의한 제한적인 활성만을 검색한 후 다른 활성검색에 이용되고 있지 못하여 잠재적 신규 활성체로서 재발견되거나 세포기능 연구에 활용될 수 있는 가능성을 모른 채 냉장고에 사장될 우려가 있는데 라이

브리리화 함으로써 동일 연구의 중복을 피하고 체계화 된 우리나라만의 인프라를 확보할 수 있을 것이다.

라이브러리는 왜 필요한가? 신약 개발에 있어서 라이브러리가 물질의 공급처로서 이미 기능하고 있었지만, 정작 계놈연구와 단백질 연구로 의약의 작용목표점이 기존의 500여 개에서 2,000 개 이상으로 확충되리라는 예상이 나오면서 라이브러리는 그저 숫자로 대변되는 막연한 물질 창고에서, 확충된 작용점에 상응하는 다양성의 공급원으로 격상되었다. 더구나 고속스크리닝 기술로 인해 검색 속도가 엄청나게 빨라지면서 기존 라이브러리를 보강할 물질군의 실재적인 확보가 필요하게 되어 라이브러리 수집 구축은 자체 라이브러리에건 Parallel library 이건 필수 사항이 되고 있다. 미국의 머크사(100 여만종)와 영국의 글락소-스미스클라인사 (30여만종)를 중심으로 대형 선진 제약사들은 이미 수많은 종류의 물질을 확보하여 연구 및 신약개발에 활용하고 있으며, 파마토피어사와 같은 소규모 전문기업의 경우 350만개의 물량을 확보하고 신약 개발 서비스 (LDS: lead discovery service)를 제공하고 있다²⁾. 또한 전담팀을 구성하여 동구권, 러시아, 중국, 남미 지역 등을 포함한 세계 각지로부터 다양한 화합물을 수집하고 있어서 그 확보 물량은 엄청나게 늘어날 전망이다. 2001년도 초에 발표된 미국 내 연구개발비 사용순위에 따르면 상위 30위권 기업 중에 제약회사가 11개를 차지하고 있으며, 매출액 대비 연구 개발비용은 22.8 %의 비율을 나타내어 타 업종(10%이내)에 비해 월등한 연구집중력을 보이고 있다.

이러한 라이브러리의 중요성과 아울러 천연물 자원 특히 미생물 유래 저분자 물질 라이브러리의 특징은 독창성과 다양성에 있다. 수적 열세에 있고, 확보에 어려움이 있음에도 불구하고 천연물의 경우 합성 화합물이 따라올 수 없는 창의성과 무한한 다양성으로 인해서 충분한 경쟁력이 있고, 미생물 대사물의 경우 생산미생물 자체, 그 유전자, 대사물, 대사물의 분획, 분리된 순수물질에 이르기까지 신약 개발이 lead로 이용할 수 있는 각 단계에 대한 독점적 권리를 확보 할 수 있다. 더구나 현재 분자생물학적으로 확인한 유전자 다양성을 근거로 한 분석에 따르면, 전체 곰팡이 종의 불과 0.8%만이 현재 집락을 형성하여 배양 가능한 것으로 추측하고 있다. 배양 가능한 0.8% 내에서도 실제로 이

2) Pharmacopeia Report Aug. 2000. (www.pharmacopeia.com)

용되는 종은 제한적이므로 잠재적 종 다양성은 실로 막대하다고 할 수 있다³⁾, 4). 또한 토양 미생물의 경우 단지 0.1%만이 현재의 기술로 쉽사리 배양될 뿐이며, 나머지 99.9%의 토양 미생물은 아직 미개봉 상태이어서 새로운 유전적 다양성의 원천으로 대두되고 있다. 최근에는 난배양성 미생물의 유전자원에 대한 관심이 높아지고 있으며 이러한 미생물 군으로부터의 새로운 생리활성물질을 확보하려는 노력이 구체화되고 있는 실정이다. 즉, 배양이 불가능하거나⁵⁾, 6) 수율이 극히 낮은 미생물 자원이라 하더라도 그 이용가능성은 충분하다.

천연물 은행 구축 연구의 필요성

한국생명공학연구원이 활성 천연물을 이용한 연구 분야를 선도하기 위해서는 체계적이고 종합적인 전략의 하나로서 천연물 은행의 존재가 필요하다. 미생물을 위시한 천연자원으로부터 물질을 분리하고 자원을 확보하는 기반 인력과, 균주은행, 자원센터, 생물정보팀을 비롯한 기관 내의 여타 인프라가 이미 잘 갖추어져 있어 당 기관에서 물질에 기반을 둔 은행의 구현 가능성이 높다. 또한 천연물의 체계적/종합적 확보 및 관리를 통한 assay-ready 형태의 분획 라이브러리는 다양한 작용점에 쉽고 체계적으로 적용되어, 자칫 사장되기 쉬운 특색 있는 “우리의 것”을 확보하게 할 것이며, 궁극적으로는 천연물 은행이 HTS/proteomics/chemical genomics에 사용될 다양한 물질을 제공하는 ligand pool로서 연구의 출발점이자, 산재한 천연물 정보의 교차점이 될 것이다.

기술적 측면의 필요성

베링거 인겔하임사는 선도물질 선정에 7 개월, 그리고 임상진입에 불과 18 개월의 시간을 투입해서 새로운 에이즈 치료제의 연구개발을 완료했고, 릴리사도 6 개월 간의 연구개발로 중추신경계 약물을 도출하여 속도 경쟁에서 우위를 점했는데, 이것이 고속스크리

3) Prokaryotes: The unseen majority. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: pp.6578-6583 (1998)

4) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: pp 455-463 (1999)

5) Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. Appl. Env. Microbiol. 66(6): pp. 2541-2547 (2000)

6) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem & Biol 5:R245-249 (1998)

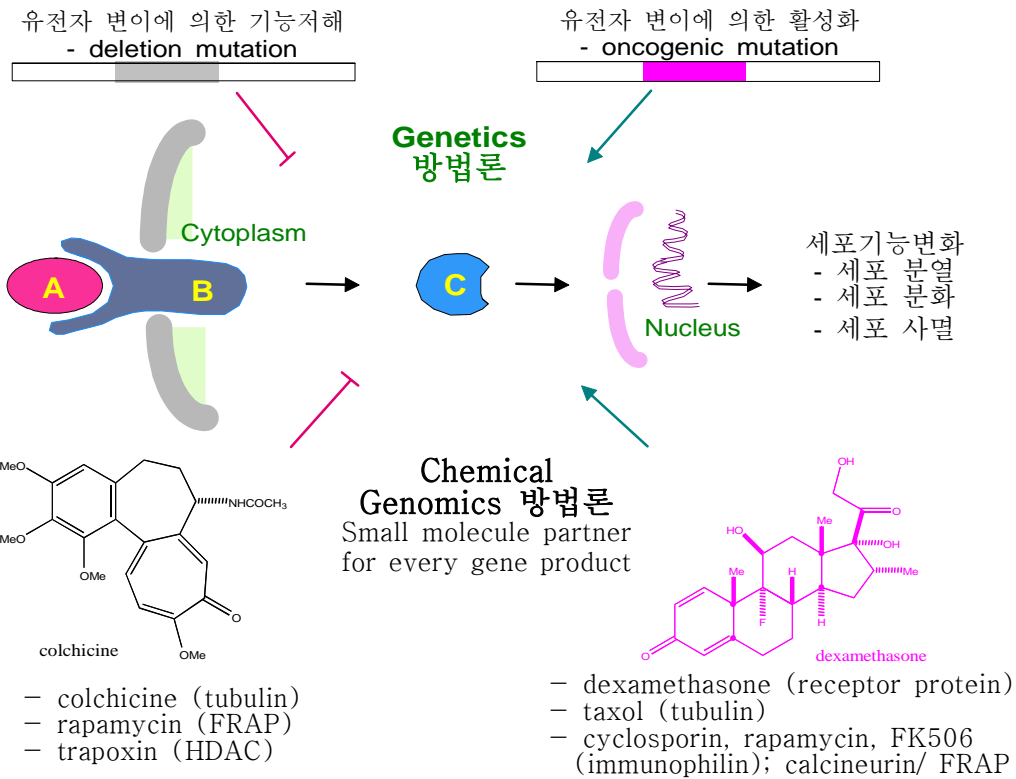
닝(HTS)의 실용성과 위력을 보여주는 결과이다. 이렇게 HTS가 가능했던 것은 기계적인 hardware와 획기적인 생화학적 assay 방법이 뒷받침되었기 때문이지만, 실상은 적용할만한 충분한 물질을 보유한 화합물은행이 있었기 때문이었다. 따라서, 최종적으로 신약 후보가 될 천연물의 pool로서 분획 라이브러리 연구는 필요하다.

유전자에 의한 세포기능조절은 실질적으로는 유전자 산물인 단백질이 담당한다. 화학 유전학은 저분자 물질이 이러한 유전자 산물인 단백질과 결합하여 기능을 조절하는 것에 기초한다(그림 참조). “Ligand의 발굴”은 화학유전학의 커다란 3가지 축에 포함되는 기술적으로 중요한 부분이며, 특히 새로운 골격의 공급처로서 천연물 은행은 중요하다. 따라서, 분획물 라이브러리는 세포기능 연구재료로 Chemical genomics와 Proteomics 분야에 소재 공급원이 된다. 즉 모든 세포기능 조절 단백질은 그에 대응하는 ligand로서 저분자 물질이 존재하며, 새롭고 다양한 저분자 물질을 확보하기 위해서는 구조의 신규성 뿐만 아니라, 활성의 신규성을 고려해야 한다. 이러한 면에서 천연물은행을 통한 체계적이고 통합적인 관리는 필수적이며 이를 위한 천연물은행 구축 연구 필요하다.

경제/산업/사회적 측면의 필요성

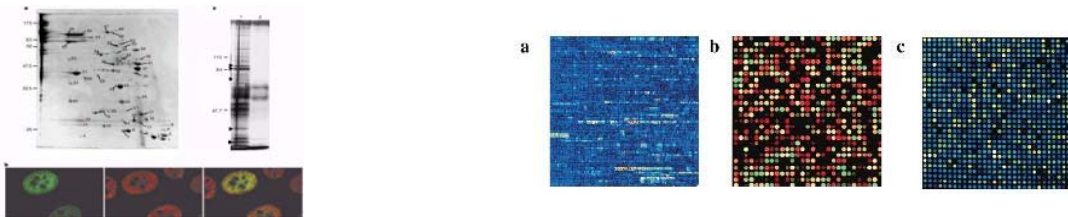
천연물에서 유래한 단일 물질의 경우 그 가격이 \$ 30 까지 거래된다고 알려져 있어 천연물의 경우 새로운 라이브러리로서의 가치가 높다. 이러한 직접적 시장 가치보다는 이러한 화합물 균을 가지고 재창출 되는 신약 개발 및 활성 소재의 부가가치는 더욱 커질 것이다. 따라서, 독자적인 소재와 객체 확보로 HTS 및 proteome 연구력의 물량적 열세를 만회할 국가 경쟁력 제고에 기여를 할 것으로 사료된다. 또한 중복연구를 회피하고 기지물질 발견의 비효율성을 중임으로써 궁극적으로 경제적 연구를 뒷받침 할 수 있을 것이다.

천연물은행 기반 연구의 기술적 연계성 및 중요성



Pre-Qualified Fractions		Screen-Ready Fractions HTS-Compatible Fractions			
Single Solvent Extracts		HPLC Fractionated Ex.		Pure Compounds	
세균	방선균	곰팡이	곤충	식물	버섯
Proteomics 및 Chemical Genomics 연구를 위한 저분자 천연물질 은행 : Ligand를 기본으로 하는 접근방법의 확장을 위해서, ligand 발견을 위한 강력한 방법과 ligand pool이 필요					

세포기능 조절하는 저분자 분획 (Proteom, DNA array)



제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

기존의 단일용매 추출물 위주의 혼합물을 이용한 천연물 활용에서 벗어나, 보다 정제된 형태의 물질군을 요구하는 경향 변화가 두드러진다. 즉, 활성을 기반으로 하던 천연물 연구가 구조 등 화학적 정보를 기반으로 한 연구개발 패러다임으로 변해가면서 점차 구조-활성 연구, HTS 등에 적응해 가고 있다. 예컨대 아벤티스사와 어넬리티콘사가 협동 연구한 새로운 천연물 의약 개발 프로그램(MEGAbolite® project)에서는 다음과 같은 기준을 내세우고 있다.

MEGAbolite® project의 가동 기준

-
- 전략적 결정사항은 추출액 스크리닝을 버리고 오로지 순수물질을 사용한 천연물 기반의 lead discovery를 수행한다.
 - 고속 분리와 profiling 그리고 고속의 구조 규명 기술을 이용하여 대규모의 순수 천연물질 라이브러리를 구성한다.
 - 효율성을 점검하기 위해서 18 개월의 제한된 시간 내에 순수물 형태의, 겹치지 않는 천연물을 미생물과 식물로부터 수집하되 물질 당 최소 확보량은 5 mg으로 한다.
 - 물질의 순도는 80 % 이상이다.
 - 수집된 라이브러리 내의 중복 방지는 LC-MS 양상에 근거한 de-replication으로 확인한다.

DDT 6: 840-847, 2001

강화된 새로운 의약 개발 체계에서는 단순 유기용매 추출물보다는 분획물과 순수 분리물의 가치가 비중이 높아지고 있다. 이를 반영하듯이 천연물로부터 순수 물질을 수집 관리하는 연구 집단이 증가하고 있어서, 다국적 제약사는 물론이고 유럽의 연구연합(BACREX) 등이 활발한 연구를 진행하고 있고, 대량 순수정제 기술의 hardware 공급사(Sepia tech)도 활발한 영업을 시작하여 천연물 library의 가치가 증대되고 있다. 현재 다양한 형태로 물질을 판매하고 있는 국제적 물질은행 현황을 표로 나타내었다. 표에서 나

타넨 바와 같이 주로 대학이나 개별 연구소가 실질적인 화합물의 원천이 되고 있다. 또한 화합물의 보유 국가도 신약 개발의 최강국인 미국, 영국, 스위스에 국한되지 않고 러시아, 중국, 헝가리 등으로 지역적인 다양성을 나타내고 있다.

표. 화합물 판매회사 현황

판매회사	지역	화합물 유래
Aldrich	미국	대학
Bionet	영국	자체합성
Bioscreen International	미국	대학
Chembridge	미국, 영국	대학/연구소
Comgenex	헝가리	대학/자체합성
Contact Service	러시아	대학/연구소
Maybridge Plc	영국	자체합성
MicroSource Discovery Systems	미국	대학
MDPI	스위스	대학/중국(구입)
NanoSyn	미국	합성 (96, 384 well)
Pharmacopeia	미국	자체합성 CombiChem
SPECS & BioSPECS	네덜란드	대학
N.D. Zelinski Inst. of Org. Chem	러시아	대학/연구소

(출처: 화합물은행, www.combichem.com 외)

우리나라를 포함한 후발 국가에서도 다양한 물질군에 대한 수요가 급등하고 있는데 이는 신약개발 분야의 잠재력에 대한 재평가가 이루어져서 위험요인보다는 파생 경제가치가 매력적으로 작용했고, HTS의 도입과 가동이 여러 곳에서 이뤄져 실제적인 라이브러리가 절대적으로 부족하기 때문이다. 개발이외에 연구분야에서도 유전체 연구, 단백질 연구, DNA-chip, Protein-chip 등의 관련 연구가 활성화되면서 화합물의 library 유무가 연구력을 결정짓는 중요한 요인의 하나가 되어가고 있기 때문이다. 이미 국내 생명공학 관련 기업에서도 외국으로부터의 구입을 통한 자체 물질군 구축 작업이 활발히 이뤄지고

있다. 식물자원을 근간으로 하는 식물 천연물의 데이터베이스화 및 천연물 은행이 가동 중이며 (자생식물 연구단), 벤처를 중심으로 민간 연구소에서도 약 수 만종의 library를 보유하고 있으나 미생물 유래 천연물 근간의 전문 library는 없는 상태이다. 그러나 추출물 형태의 미생물 소재는 많은 대학과 연구소에서 자체 보유하고 있는 것으로 판단되며 개별적인 스크리닝 연구를 수행 중에 있다 (천연물화학연구소). 한편, 합성물 근간의 화합물 은행이 한국화학연구원 내에서 가동 중이며 향후 수십만 종의 합성 화합물 확보를 목표로 종합적인 관리와 하부 구조를 구축 중에 있으며, 한국생명공학연구원에서는 토양 미생물의 대사 추출물 은행이 DB화되어 있다 (MRDB)⁷⁾.

7) 미생물 자원 데이터베이스 <http://mrdb.or.kr/>

제 3 장 사업(연구개발)수행 내용 및 결과

제1절 연구 수행 방법

미생물

분획 조건을 결정하고, 고속분획기를 시가동 하기 위해서 사용된 균주 이외에 실제 라이브러리 발생에 사용한 균주는 토양 방선균으로 A10325~A10434 중 무작위 선별된 105종이며 그 목록은 결과표에 요약하였다.

배양조건

기본적인 액체 배지는 GSS 배지로 Soluble starch 10, Glucose 20, Soybean meal 25, Beef extract 1, Yeast extract 4, NaCl 2, K₂HPO₄ 0.25, CaCO₃ 2 (g/L), pH7.2의 조성으로 바닥에 baffle이 달린 1-L 용량의 Bellco flask에 200 mL의 양을 배양하였다. 배양온도는 28도이며 4일에서 6일간 배양하여 사용하였다. 또 하나의 액체 배지 GST 배지 조성은 soluble starch 15, glucose 10, soybean meal 10, beef extract 1, yeast extract 10, NaCl 2, K₂HPO₄ 0.25, CaCO₃ 2, MgSO₄ 0.5 (g /L)였다.

조추출

배양액은 acetone으로 추출하여 감압 건조후 다시 ethyl acetate 분획을 모아서 감압 농축하여 무게를 확인하였다. 이것을 다시 metanol에 녹는 부분만을 취해서 1 mL을 Samplet (KP-Sil, 32-62um, 60A, Biotage)에 흡착시켜 감압 건조하여 dry pack을 준비하였다.

분획기

QUAD flash system (4-channel, Biotage)에 실리카 혹은 C18 flash column을 장착하여 분획하였다. 시료는 조출액이 흡착된 Samplet으로 loading 하였다. 정해진 용매 조건으로 용출하여 조출출액 1개당 40-80개의 소분획으로 나누었다.

Library 형태

용출 소분획을 TLC로 pre-profiling하여, 종류대로 모아서 4-8개의 분획으로 나눠 E-tube에 무게 확인후 보관하였다 (Stock vial-Dried). 이 stock vial 내용물을 DMSO로 녹여 50 mg/mL의 농도로 하여 장기 냉동 보관하였으며 (Stock vial-DMSO), 이것을 80-96개씩 모아 96-well plate에 분주하여 mother plate를 제작하였다 (Master plate, 100 μ l/well). 이것을 다시 2-10 μ l씩 분주하여 daughter plate를 만들어 분양대기 상태로 보관하였다 (Assay plate 2-10 μ l/well). 전체적인 과정은 아래 그림 1/2 및 2/2 단계로 요약하였다.

1/2 단계 (stock vial format): Fractionation on Biotage QUAD-1

Microbial diversity	<u>Microbial strain from indigenous sources</u> (KRIBB resources)
Metabolic diversity	↓ <u>Culture in flask scale</u> (200 mL broth, low strength GSS media)
	↓ <u>Single solvent extraction with acetone</u> Partition into EtOAc / Concentration / Weighing
	↓ Adsorption of MeOH-soluble part into Biotage QUAD samplet (upto 1 ml)
	↓ Apply the samplet on <u>QUAD column cartridge / Quad1 system (2 bar)</u>
Fractionation diversity	<u>Fractionation with Hexane : EtOAc</u> 80 : 20 \Rightarrow 8 tubes, 60 : 40 \Rightarrow 8 tubes 40 : 60 \Rightarrow 8 tubes, 20 : 80 \Rightarrow 8 tubes 0 : 100 \Rightarrow 8 tubes, wash with 100% MeOH \Rightarrow 8 tubes
	↓ <u>Qualitative TLC</u> (spotting 3-5 μ l, Silica, CHCl ₃ : MeOH = 95 : 5)
	↓ Grouping the 1st fraction Confirm with 2nd TLC / Concentration / Weighing
Pre-profiling	↓ <u>dB Input / E-tube, Well-plate / Labeling (BioBank™®)</u> ↓ <u>Storage in freezer</u>

전주기 관리

각 단계별 최적화를 위한 내용 및 진행시간을 요약한 결과 pre-profiling과정의 단축이 필요함을 확인하였다. 미생물의 수집과 배양은 일반적인 인프라를 활용하거나, 다량 동시 발효를 하기 위한 배양기의 성능에 달려 있으므로 최적화에서 제외하고, 단지 분획화 과정을 관리하였다. 조추출 단계의 단일 용매 추출은 저분자 물질의 일반적인 방법론에 따라서 acetone과 ethyl acetate를 추출용매로 선정하였다. QUAD system에서의 분획 과정은 4가지 시료에 대해서 동시에 10 분의 시간이 소요되었다. 그러나, loading 시료의 준비, 분획 후 정성적 TLC, weighing 등의 단위 과정이 전반적인 진행속도를 느리게 하는 요인으로 밝혀졌고, 특히, TLC는 UV-detector의 연결로 해결될 수 있을 것이며, 나아가서는 C18 pass 및 HPLC-M/S와 같은 진정한 의미의 profiling 과정이 2차년도 이후에도 요구된다.

미생물 유래 저분자 천연물 라이브러리 발생의 전주기 관리

단계	Treatment	Time per Fr.
균주 분양 / 배양 (Camera, Incubator, Shaker, Fermentor)	1L Bellco flask, 200ml culture	7 day
1차 단일용매 추출 (Rotary evaporator)	Single solvent extraction with acetone/Concentration	40 min
	Aq. part/Ethyl acetate 추출/농축	20 min
2차 단일용매 추출 (SpeedVac)	- Collected MeOH soluble part - Grouping/농축/Weighing	6 hr
Silica Fractionation (4-Channel Quad System)	Samplet Preparation (Absorption/ dry overnight)	overnight
	Application on QUAD system ① Install 4 silica columns ② Washing / warming up ③ Loaded Samplets ④ Stepwise elution / Collected fractions (n = 40~60) ⑤ Wash out with MeOH	3 hr
Pre-profiling (TLC, UV-detector, Scanner, rotary evaporator, SpeedVac)	1st TLC sample(300λ) prep.	2 hr
	-TLC spot 확인; 26 spots per sample - UV 확인/ 발색/ Scan	7 hr
	sample grouping → evaporator dry	6 hr
	Transferred into 10ml test tube → dry	1 hr
	Pre-profiling with 2nd TLC	2 hr
Quantification (SpeedVac, Chemical balance)	Sample dry(E-tube)	1 hr
	최종 무게 확인	5 min
Assay plate format (Liquid handler)	Dilution, distribute	1 hr
자료 정리 및 구축 (Scanner, Camera, PC)	- Numbering - dB input	1 hr

제2절 연구 수행 결과

분획과정 최적화

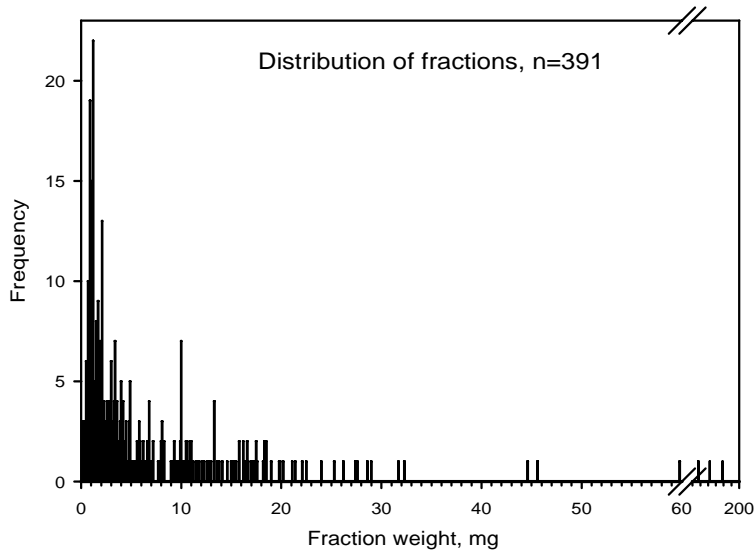
기지의 식물추출물 (AP), 곰팡이 대사산물 (F80642, F3146~F3183 중 28종) 및 버섯 (H) 대사산물을 대상으로 분획하여, 용출 조건 및 용매 배분을 조사하였다. 정성분석은 TLC로 수행하였다. 그 결과 hexane, ethylacetate, metanol이 실리카 분획에 적절한 이동상으로 확인되었다.

토양 방선균을 대상으로 한 분획 라이브러리 발생

약 2 개월에 걸친 집중적인 분획을 실시하였다. 배양배지는 GSS 및 이의 변형 배지인 GST 두 가지로 단순화하고, 각 200 mL의 배양액에서 출발하여 단일 용매추출, 농축, 분획의 과정을 거쳐서 각 분획별 1-20 mg의 분획을 목표로 하였다. 총 105종의 균주에서 n=394의 시험 라이브러리가 발생되었다 (표 참조). 이들은 stock vial, master plate 형태로 보관중이며, 라이브러리 효용성 검사를 위해 암세포주 5종에 대한 HTS 적용, cell-based assay에의 적용성이 시험되었다.

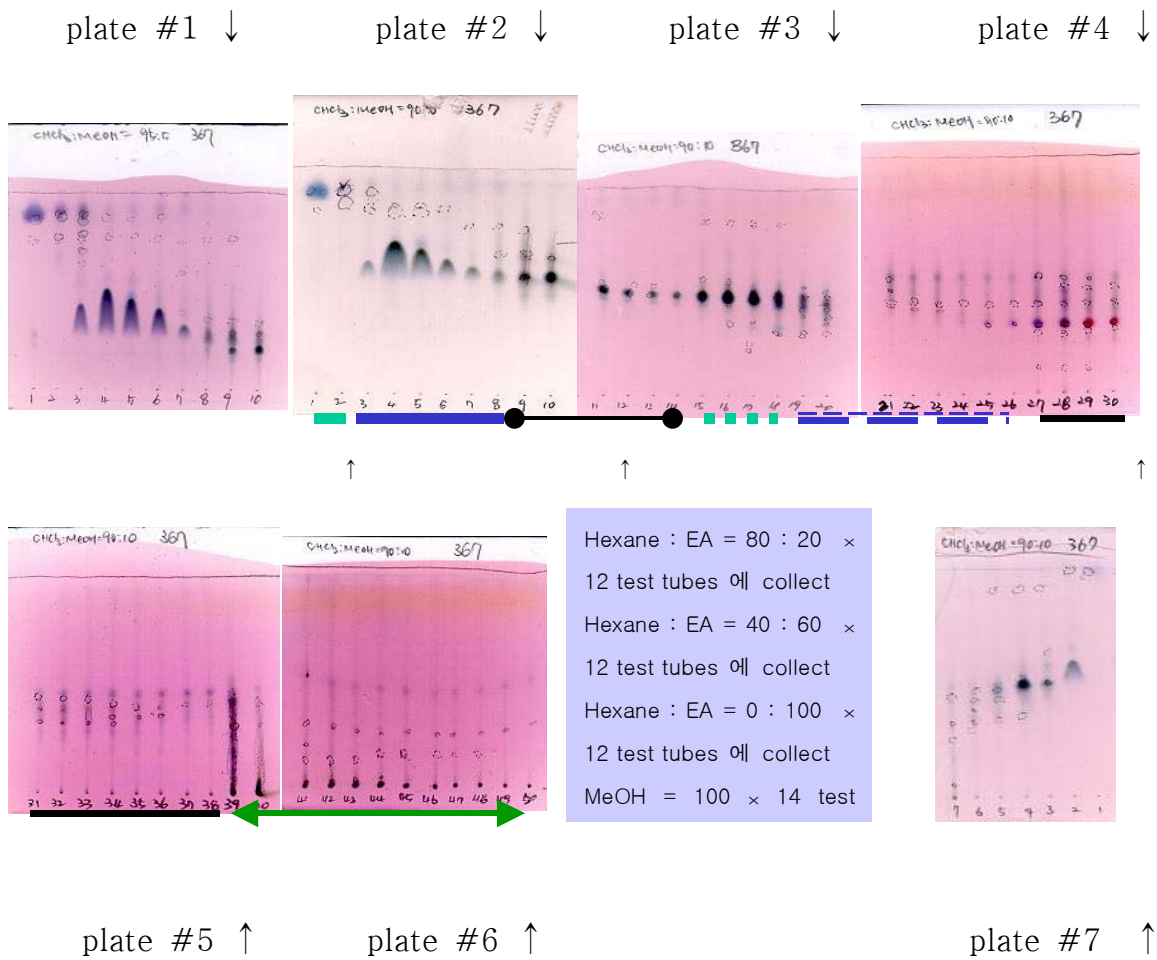
라이브러리의 분석

각 분획 라이브러리를 양적인 무게 분포를 발생된 분획 라이브러리 391종에 대해서 조사하였다. 대부분이 20 mg 이내의 양이 확보되었으며, 5 mg 이하의 것도 상당수 있어서 대사 다양성 보강을 위한 배양법 개선 및 C18에 의한 분획화 실험이 요구되었다. (그림 참조)



Pre-profiling 실험

TLC에 의한 분획의 분석을 기반으로 용출된 소분획을 프로파일링 하여 재취합 하여 모았다. 예커대, 방선균 367의 경우 시범적으로 모든 용출된 소분획 60개 모두를 #1에서 #6까지 여섯 개의 1st TLC를 통해서 추출된 물질군을 펼쳤으며, 이들을 grouping 하여 #7의 2nd TLC로 확인하였다. 또한 이 TLC들의 뒷면에 보인 분리 양상을 UV와 발색을 통해 grouping 하였다 (2개의 그림 참고).



1/2: Pre-profiling of strain A367 extracts by qualitative TLC analysis of QUAD FRASH™ cartridge eluates.

방선균367

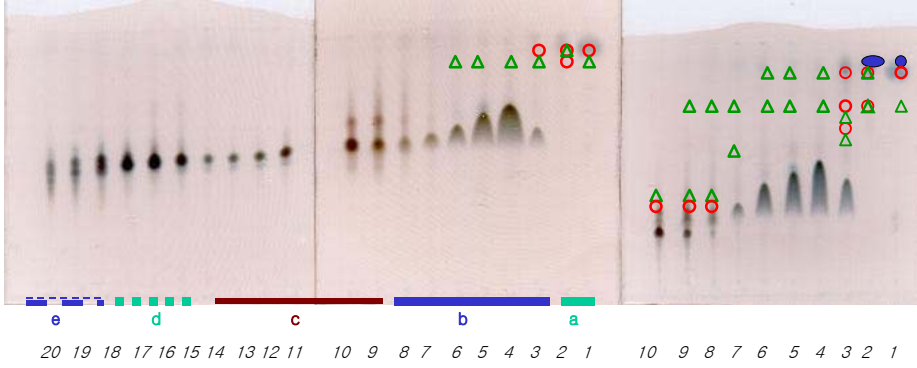
UV: ○

Flu : △

CHCl₃ : MeOH = 90 : 10

CHCl₃ : MeOH = 90 : 10

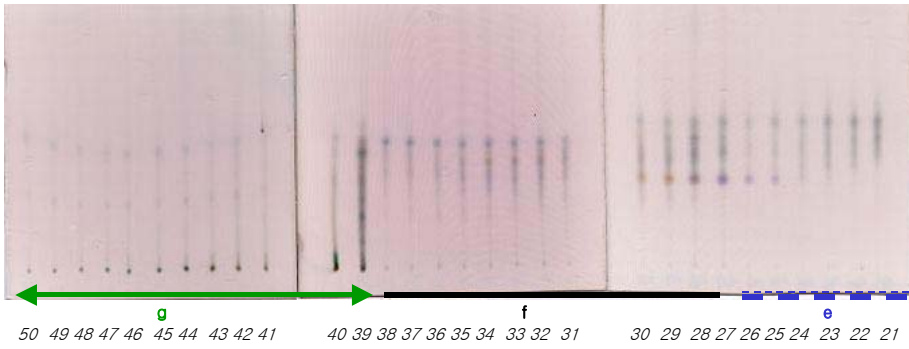
CHCl₃ : MeOH = 95 : 5



CHCl₃ : MeOH = 90 : 10

CHCl₃ : MeOH = 90 : 10

CHCl₃ : MeOH = 90 : 10



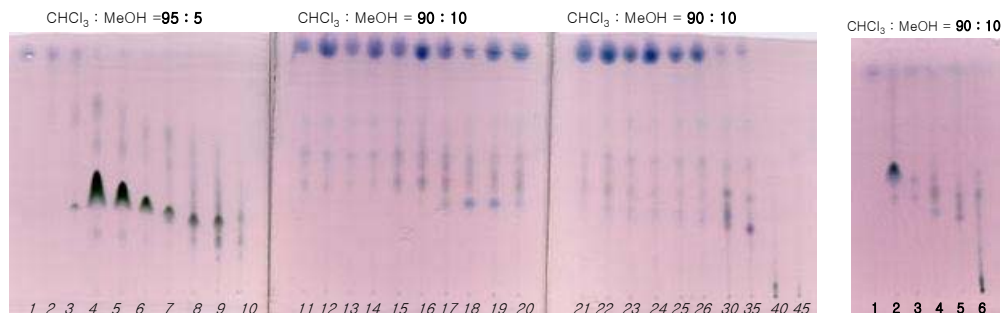
CHCl₃ : MeOH = 90 : 10



7 6 5 4 3 2 1
g f e d c b a

2/2: Pre-profiling of strain A367 extracts by qualitative TLC analysis of QUAD FRASH™ cartridge eluates.

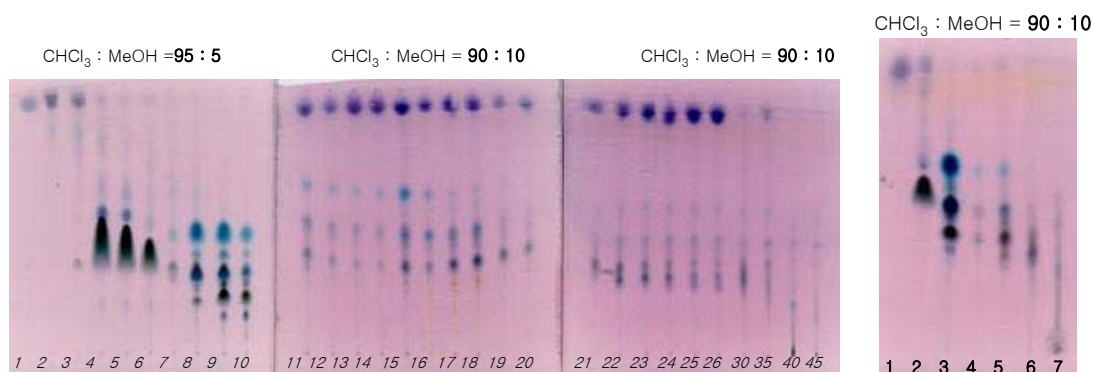
방선균 368의 경우 45개 용출 소분획 중 30개만 일부 취하여 TLC를 하고, 6개의 분획으로 재구성하였다.



Pre-profiling of Actinomycetes A368 after elution from silica.

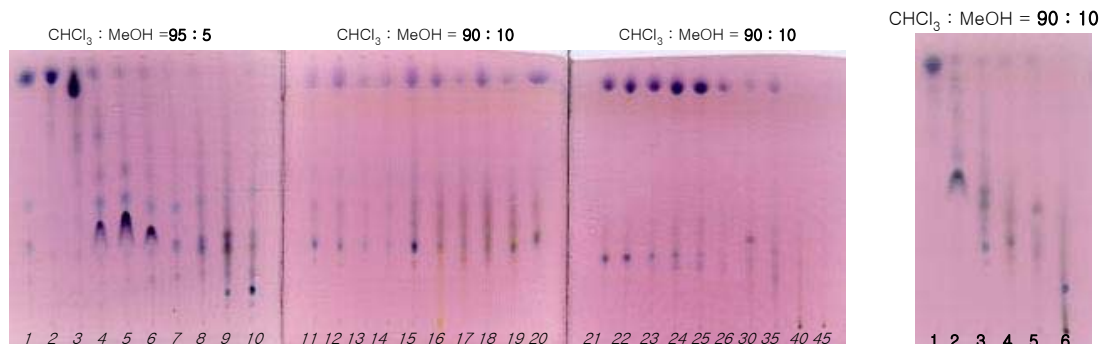
1 fraction : (1-2), 2 fraction : (3-10), 3 fraction : (11-14), 4 fraction : (15-26), 5 fraction : (27-38), 6 fraction : (39-50)

방선균 370의 경우 7, 371의 경우 6개로 최종 분획되었다.



Pre-profiling of Actinomycetes A370 after elution from silica.

1 (1-2), 2 (3-7), 3 (8-10), 4 (11-14), 5 (15-28), 6 (29-38), 7 (39-50)



Pre-profiling of Actinomycetes A371 after elution from silica.

1 (1-3), 2 (4-7), 3 (8-14), 4 (15-26), 5 (27-38), 6 (39-50)

이렇게 발생된 라이브러리의 목록을 다음의 표에 나타내었다

**Microbial Natural Compound Library from *Streptomyces*
; Fractionation library**

Set	균주	추출시료, loading on Samplet [®] (mg)	Box No	Acc No	MNCL (BioBank™)	
					Code	Amount (mg/lot)
<i>Streptomyces</i>	A10325~A10434중 105종	30	1	1	G03251	6.6
				2	G03252	4.0
				3	G03253	4.1
				4	G03254	1.1
				5	G03255	1.0
				6	G03256	9.0
				7	G03257	0.9
		30	1	8	G03261	8.1
				9	G03262	3.4
				10	G03263	1.8
				11	G03264	0.6
				12	G03265	1.0
				13	G03266	11.0
		30	1	14	G03271	17.6
				15	G03272	3.6
				16	G03273	3.2
				17	G03274	0.9
				18	G03275	1.0
				19	G03276	9.3
				20	G03277	0.9
		30	1	21	G03281	10.1
				22	G03282	1.2
				23	G03283	1.1
				24	G03284	0.5
				25	G03285	0.8
				26	G03286	7.2
				27	G03287	0.7
			1	28	G03291	13.3
				29	G03292	4.6
				30	G03293	3.1
				31	G03294	0.6
				32	G03295	0.9
				33	G03296	14.6
				34	G03297	1.2

Set	균주	추출시료, loading on Samplet [®] (mg)	Box No	Acc No	MNCL (BioBank™)	
					Code	Amount (mg/lot)
<i>Streptomyces</i>	A10325~A10434중 105종	50	2	35	G03301	10.0
				36	G03302	3.6
				37	G03303	4.4
				38	G03304	1.3
				39	G03305	2.9
				40	G03306	19.0
		180	2	41	G03311	7.9
				42	G03312	1.5
				43	G03313	1.7
				44	G03314	1.0
				45	G03315	1.1
				46	G03316	59.8
		235	2	47	G03321	4.0
				48	G03322	1.6
				49	G03323	2.1
				50	G03324	1.0
				51	G03325	1.2
				52	G03326	173.8
50	2	53	G03331	5.6		
		54	G03332	3.8		
		55	G03333	1.5		
		56	G03334	0.3		
		57	G03335	0.4		
		58	G03336	18.2		
50	2	59	G03341	10.5		
		60	G03342	4.1		
		61	G03343	4.5		
		62	G03344	1.1		
		63	G03345	1.3		
		64	G03346	9.7		
30	3	65	G03351	3.7		
		66	G03352	7.9		
		67	G03353	3.4		
		68	G03354	0.9		
		69	G03355	1.5		
		70	G03356	10.6		
200	3	71	G03361	2.1		
		72	G03362	0.7		
		73	G03363	1.8		
		74	G03364	1.7		
		75	G03365	1.0		
		76	G03366	189.3		
30	3	77	G03371	3.1		
		78	G03372	3.0		
		79	G03373	3.3		
		80	G03374	0.7		
		81	G03375	1.2		
		82	G03376	16.2		
20	3	83	G03381	5.8		
		84	G03382	1.8		
		85	G03383	1.4		
		86	G03384	0.9		
		87	G03385	1.6		
		88	G03386	8.2		

Set	균주	추출시료, loading on Samplet [®] (mg)	Box No	Acc No	MNCL (BioBank™)	
					Code	Amount (mg/lot)
<i>Streptomyces</i>	A10325~A10434중 105중	30	3	89	G03391	6.2
				90	G03392	2.7
				91	G03393	4.8
				92	G03394	1.2
				93	G03395	0.9
				94	G03396	13.8
		20	4	95	G03401	10.9
				96	G03402	3.9
				97	G03403	3.6
				98	G03404	0.6
				99	G03405	0.9
		30	4	100	G03406	4.2
				101	G03411	4.9
				102	G03412	3.2
				103	G03413	4.5
				104	G03414	1.1
20	4	105	G03415	0.9		
		106	G03416	16.2		
		107	G03421	4.5		
		108	G03422	1.7		
		109	G03423	2.4		
230	4	110	G03424	0.9		
		111	G03425	1.0		
		112	G03426	9.5		
		113	G03431	1.7		
		114	G03432	0.9		
60	4	115	G03433	2.4		
		116	G03434	0.8		
		117	G03435	0.9		
		118	G03436	181.1		
		119	G03441	8.3		
40	5	120	G03442	7.9		
		121	G03443	19.9		
		122	G03444	4.2		
		123	G03405	2.3		
		124	G03406	17.4		
40	5	125	G03451	2.1		
		126	G03452	3.0		
		127	G03453	4.8		
		128	G03454	12		
		129	G03455	1.7		
40	5	130	G03456	25.3		
		131	G03461	9.9		
		132	G03462	12.1		
		133	G03463	0.8		
		134	G03464	0.5		
40	5	135	G03465	0.6		
		136	G03466	22.1		
		137	G03471	4.7		
		138	G03472	4.4		
		139	G03473	2.7		
40	5	140	G03474	0.7		
		141	G03405	1.1		
		142	G03406	13.0		

Set	균주	추출시료, loading on Samplet [®] (mg)	Box No	Acc No	MNCL (BioBank™)	
					Code	Amount (mg/lot)
<i>Streptomyces</i>	A10325~A10434중 105중	40	5	143	G03481	4.8
				144	G03482	1.6
				145	G03483	0.5
				146	G03484	0.4
				147	G03485	0.6
				148	G03486	27.6
		30	5	149	G03491	7.0
				150	G03492	2.9
				151	G03493	4.3
				152	G03494	1.2
				153	G03495	1.2
				154	G03496	13.3
		50	6	155	Gs03501	18.3
				156	Gs03502	1.8
				157	Gs03503	2.0
				158	Gs03504	0.9
				159	Gs03505	1.2
				160	Gs03506	16.6
40	6	161	Gs03511	5.8		
		162	Gs03512	2.0		
		163	Gs03513	2.9		
		164	Gs03514	2.1		
		165	Gs03515	2.3		
		166	Gs03516	12.1		
40	6	167	Gs03521	9.2		
		168	Gs03522	1.9		
		169	Gs03523	3.4		
		170	Gs03524	1.5		
		171	Gs03525	1.2		
		172	Gs03526	8.3		
50	6	173	Gs03531	12.3		
		174	Gs03532	9.3		
		175	Gs03533	2.7		
		176	Gs03534	14.1		
20	6	177	Gs03541	7.9		
		178	Gs03542	1.1		
		179	Gs03543	1.1		
		180	Gs03544	8.1		
60	6	181	Gs03551	29.0		
		182	Gs03552	7.2		
		183	Gs03553	2.3		
		184	Gs03554	15.2		
30	6	185	Gs03571	12.8		
		186	Gs03572	1.8		
		187	Gs03573	5.9		
		188	Gs03574	10.0		
20	7	189	Gs03581	16.4		
		190	Gs03582	7.7		
		191	Gs03583	4.2		
		192	Gs03584	15.8		
80	7	193	Gs03591	13.6		
		194	Gs03592	4.1		
		195	Gs03593	1.2		
		196	Gs03594	18.3		

Set	균주	추출시료, loading on Samplet [®] (mg)	Box No	Acc No	MNCL (BioBank™)	
					Code	Amount (mg/lot)
<i>Streptomyces</i>	A10325~A10434중 105종	50	7	197	Gs03601	3.4
				198	Gs03602	1.1
				199	Gs03603	0.6
				200	Gs03604	11.7
		40	7	201	Gs03611	5.1
				202	Gs03612	1.9
				203	Gs03613	1.0
				204	Gs03614	32.3
		40	7	205	Gs03621	15.1
				206	Gs03622	5.4
				207	Gs03623	3.0
				208	Gs03624	11.0
		50	7	209	Gs03631	8.0
				210	Gs03632	4.2
				211	Gs03633	9.9
				212	Gs03634	18.5
60	7	213	Gs03641	10.5		
		214	Gs03642	5.0		
		215	Gs03643	11.8		
		216	Gs03644	13.3		
20	7	217	Gs03651	7.9		
		218	Gs03652	3.9		
		219	Gs03653	2.3		
		220	Gs03654	13.3		
40	8	221	Gs03671	2.1		
		222	Gs03672	18.5		
		223	Gs03673	2.1		
		224	Gs03674	3.0		
		225	Gs03675	0.7		
		226	Gs03676	1.2		
		227	Gs03677	6.8		
30	8	228	Gs03681	1.2		
		229	Gs03682	11.2		
		230	Gs03683	0.2		
		231	Gs03684	0.8		
		232	Gs03685	1.5		
		233	Gs03686	8.0		
50	8	234	Gs03701	4.0		
		235	Gs03702	10.0		
		236	Gs03703	7.9		
		237	Gs03704	0.2		
		238	Gs03705	1.9		
		239	Gs03706	1.2		
		240	Gs03707	3.3		
50	8	241	Gs03711	6.8		
		242	Gs03712	3.8		
		243	Gs03713	0.8		
		244	Gs03714	1.9		
		245	Gs03715	3.0		
		246	Gs03716	17.2		

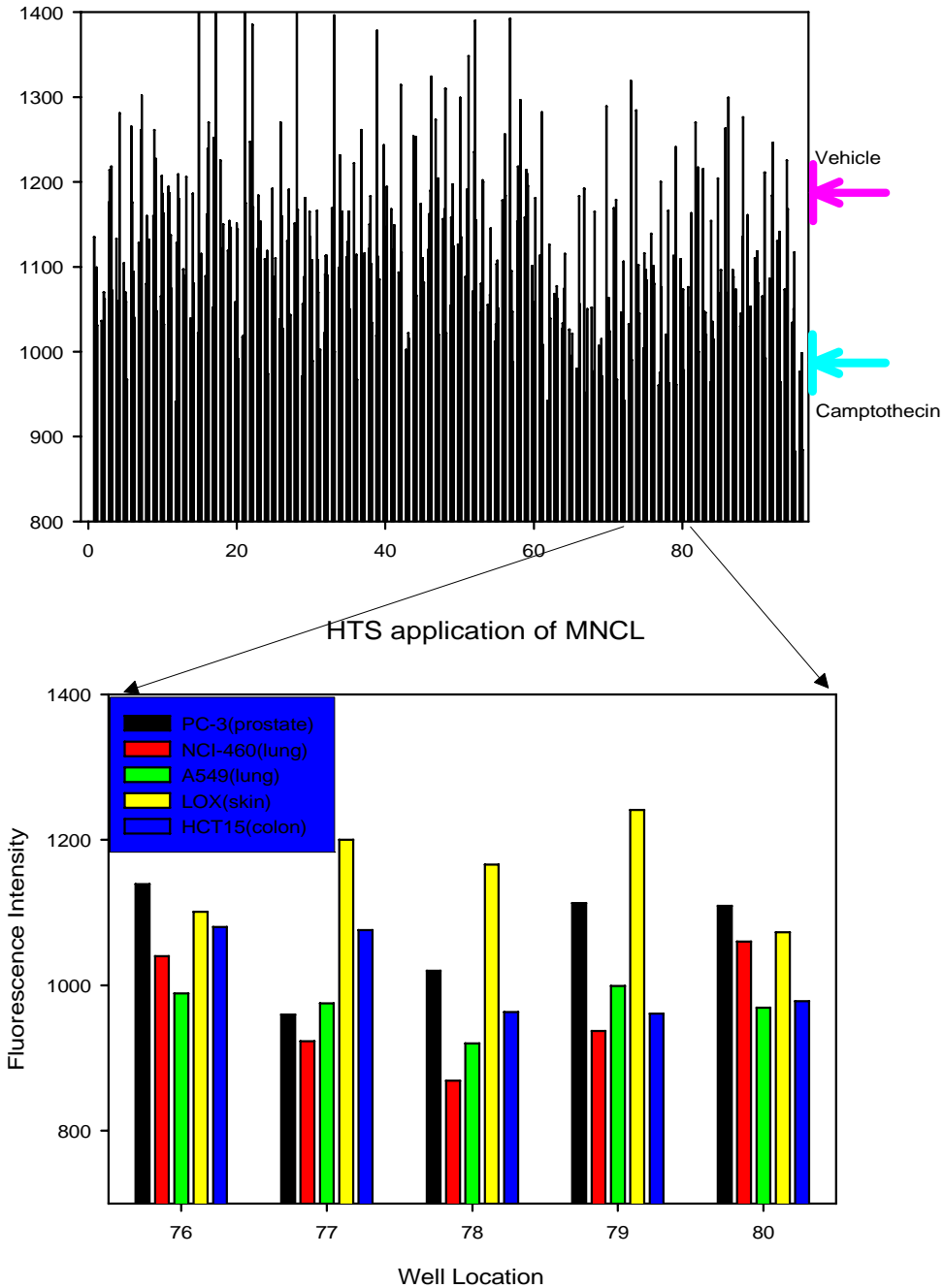
Set	균주	추출시료, loading on Samplet [®] (mg)	Box No	Acc No	MNCL (BioBank™)	
					Code	Amount (mg/lot)
<i>Streptomyces</i>	A10325~A10434중 105종	20	9	247	Gs03721	3.1
				248	Gs03722	10.0
				249	Gs03723	1.2
				250	Gs03724	0.9
				251	Gs03725	1.6
				252	Gs03726	6.7
		38	9	253	Gs03731	0.9
				254	Gs03732	17.1
				255	Gs03733	6.8
				256	Gs03734	1.0
				257	Gs03735	0.8
				258	Gs03736	1.6
		79.2	9	259	Gs03737	10.9
				260	Gs03741	0.9
				261	Gs03742	24.0
				262	Gs03743	6.6
				263	Gs03744	1.0
				264	Gs03745	2.3
		64.6	9	265	Gs03746	1.2
266	Gs03747			6.0		
267	Gs03751			1.0		
268	Gs03752			27.4		
269	Gs03753			1.7		
270	Gs03754			0.4		
40.8	10	271	Gs03755	1.7		
		272	Gs03756	17.0		
		273	Gs03761	1.8		
		274	Gs03762	15.8		
		275	Gs03763	2.8		
		276	Gs03764	2.1		
49.2	10	277	Gs03765	5.2		
		278	Gs03771	0.2		
		279	Gs03772	20.2		
		280	Gs03773	0.8		
		281	Gs03774	2.1		
		282	Gs03775	4.0		
94	10	283	Gs03776	16.7		
		284	Gs03781	44.6		
		285	Gs03782	0.7		
		286	Gs03783	1.7		
		287	Gs03784	1.3		
		288	Gs03785	21.4		
48.7	10	289	Gs03791	0.9		
		290	Gs03792	26.2		
		291	Gs03793	1.4		
		292	Gs03794	1.5		
		293	Gs03795	15.5		
		48.8	11	294	Gs03801	1.0
295	Gs03802			10.0		
296	Gs03803			1.2		
297	Gs03804			2.0		
298	Gs03805			3.3		
299	Gs03806			2.1		
300	Gs03807			1.5		

Set	균주	추출시료, loading on Samplet [Ⓢ] (mg)	Box No	Acc No	MNCL (BioBank™)	
					Code	Amount (mg/lot)
<i>Streptomyces</i>	A10325~A10434중 105중	58.9	11	301	Gs03811	1.7
				302	Gs03812	21.1
				303	Gs03813	0.8
				304	Gs03814	2.0
				305	Gs03815	1.4
				306	Gs03816	0.9
				307	Gs03817	28.6
		73		308	Gs03821	0.5
				309	Gs03822	15.4
				310	Gs03823	0.5
				311	Gs03824	1.5
				312	Gs03825	1.1
				313	Gs03826	1.2
				314	Gs03827	45.6
		22.5		315	Gs03831	1.3
				316	Gs03832	3.5
				317	Gs03833	1.2
				318	Gs03834	1.2
				319	Gs03835	1.0
				320	Gs03836	5.6
				321	Gs03837	13.8
		8.7		322	Gs03841	3.0
				323	Gs03842	4.9
				324	Gs03843	5.7
				325	Gs03844	2.2
				326	Gs03845	1.9
				327	Gs03846	2.1
				328	Gs03847	17.5
		49.5		329	Gs03851	1.4
				330	Gs03852	12.6
				331	Gs03853	3.5
				332	Gs03854	2.6
				334	Gs03855	1.9
				335	Gs03856	2.1
				336	Gs03857	6.4
40.6		337	Gs03861	1.9		
		338	Gs03862	10.6		
		339	Gs03863	1.0		
		340	Gs03864	6.3		
		341	Gs03865	1.6		
		342	Gs03866	2.8		
		343	Gs03867	17.5		
47.3		344	Gs03871	2.6		
		345	Gs03872	11.5		
		346	Gs03873	2.2		
		347	Gs03874	3.3		
		348	Gs03875	0.7		
		349	Gs03876	2.5		
		350	Gs03877	22.5		

Set	균주	추출시료, loading on Samplet [Ⓞ] (mg)	Box No	Acc No	MNCL (BioBank™)	
					Code	Amount (mg/lot)
<i>Streptomyces</i>	A10325~A10434중 105중	39.7		351	Gs03881	3.4
				352	Gs03882	6.8
				353	Gs03883	2.6
				354	Gs03884	0.5
				355	Gs03885	5.9
				356	Gs03886	3.4
				357	Gs03887	4.9
				358	Gs03888	10.8
		54.7		359	Gs03891	3.2
				360	Gs03892	10.0
				361	Gs03893	5.8
				362	Gs03894	1.0
				363	Gs03895	2.7
				364	Gs03896	2.1
				365	Gs03897	4.9
				366	Gs03898	10.3
		41.1		367	Gs03901	4.0
				368	Gs03902	4.9
				369	Gs03903	2.6
				370	Gs03904	0.7
				371	Gs03905	1.3
				372	Gs03906	1.0
				373	Gs03907	2.1
				374	Gs03908	15.0
		72.9		375	Gs03911	16.6
				376	Gs03912	2.9
				377	Gs03913	0.7
				378	Gs03914	1.2
				379	Gs03915	3.6
				380	Gs03916	10.0
		54.7		381	GT03951	3.4
				382	GT03952	7.9
383	GT03953			0.8		
384	GT03954			6.2		
385	GT03955			0.9		
386	GT03956			8.1		
387	GT03957			16.3		
59.1		388	GT04031	0.8		
		389	GT04032	31.7		
		390	GT04033	0.7		
		391	GT04034	3.9		
		392	GT04035	1.2		
		393	GT04036	2.4		
		394	GT04037	19.8		

분획 라이브러리의 검증: HTS application (BioBank , Victor II, Wallac)

시범적으로 발생된 96-well plate format의 분획 라이브러리를 HTS에 적용하였다. 96개의 분획 라이브러리에 대한 세포주의 반응을 camptothecin을 기준으로 조사하였다.



5 가지 암 세포주 PC-3, NCI-460, A549, LOX, HCT15에 대한 반응이 분획별로 차이를 보여 분획화에 의한 다양성을 확인 할 수 있으며, daughter plate에서 만들어진 assay

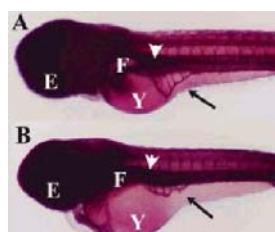
plate가 HTS-compatible 함을 확인 할 수 있었다.

분획 라이브러리의 검증: Zebra fish embryo assay on 96 well plate

Cell-based assay에 적용하여 라이브러리 (master plate lot 011210)의 정성적 분석과 효용성을 조사하였다. 사용된 검색계는 신생 혈관 형성 및 흡수 독성을 동시에 확인할 수 있는 zebra fish embryo assay 였다. DMSO에 녹여진 분획 96는 zebra fish embryo에 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 처리되고 배양하면서 배의 발달 사항을 현미경으로 관찰하였다. 분획물 각각이 다양한 반응을 보여서, 구성된 라이브러리가 구조적으로 의미가 있음을 보여주고 있다. 96 개의 분획 라이브러리 중 4 개에서 hit이 나타났다. 특히 code G4233의 경우 단순한 기형성을 보여주어서 처리 농도에 따라서는 바람직한 활성을 기대하게 해서 라이브러리의 기능 부여에 기대를 걸게 한다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	G3252	G3303	G3371	G3405	G3471	Gs3533	Gs3632	Gs3722	Gs3853	Gs3885	Gs3902	Gt4293
B	G3253	G3305	G3372	G3411	G3472	Gs3573	Gs3642	Gs3762	Gs3862	Gs3886	Gs3903	G4132
C	G3262	G3321	G3373	G3412	G3473	Gs3583	Gs3643	Gs3772	Gs3864	Gs3887	Gs3912	G4136
D	G3272	G3332	G3381	G3413	G3481	Gs3592	Gs3651	Gs3802	Gs3871	Gs3891	Gs3915	G4231
E	G3273	G3342	G3391	G3421	G3492	Gs3601	Gs3701	Gs3805	Gs3874	Gs3893	Gt3951	G4232
F	G3292	G3343	G3393	G3444	G3493	Gs3611	Gs3702	Gs3842	Gs3877	Gs3895	Gt3952	G4233
G	G3293	G3351	G3402	G3452	Gs3513	Gs3622	Gs3703	Gs3843	Gs3881	Gs3897	Gt3954	G4234
H	G3302	G3353	G3403	G3453	Gs3523	Gs3623	Gs3721	Gs3852	gs3882	Gs3901	Gt4292	G4237

Zebra fish embryo assay with Fractionation Library on 96 well plate



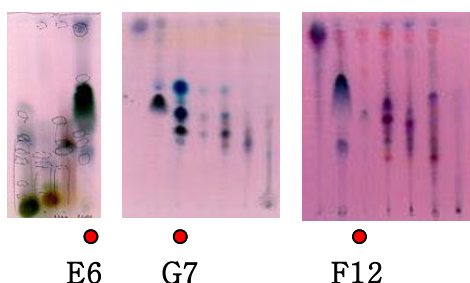
Yellow (G3302) : embryo death
 Pink (G3343, G4233) : activity with malformation
 Red (Gs4642) : SIV (subintestinal vein) inhibition

Treatment by 1, 10, and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 12 zebra fish embryo per compound

분획 라이브러리의 검증: Farnesyl transferase inhibitor

항암제 개발이 목표점으로 인정되는 라스 파네실 저해제 스크리닝에 적용된 경우에도 hit이 나왔다. Gs3601은 70 % 이상의 뚜렷한 저해 활성을 보여서 후속 연구의 가능성을 보여 주고 있다. FPT 저해제의 검증은 배양액 중 인산 등에 의해서 간섭을 받기 때문에 단순한 용매 추출액 상태의 천연물은 잘못된 양성 반응이 자주 나타나는데 비해, 분획 라이브러리를 적용한 경우에는 이러한 경향이 없어서 분획화를 통해서 순도 높은 미생물 천연물 라이브러리가 구성되었음을 알 수 있었다. 활성을 보이는 분획의 프로파일링 dB에서 TLC 상의 분리 상태를 확인한 결과 well location E-6는 지방산 관련 물질임을 알 수 있었고, F-12는 zebra fish embryo assay와 중복되어 세포독성 물질임을 예상할 수 있었다. 따라서 구성된 라이브러리가 각 검색계에서 의미 있는 반응을 보이고 있음을 알 수 있었다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	G3252	G3303	G3371	G3405	G3471	Gs3533	Gs3632	Gs3722	Gs3853	Gs3885	Gs3902	Gt4293
B	G3253	G3305	G3372	G3411	G3472	Gs3573	Gs3642	Gs3762	Gs3862	Gs3886	Gs3903	G4132
C	G3262	G3321	G3373	G3412	G3473	Gs3583	Gs3643	Gs3772	Gs3864	Gs3887	Gs3912	G4136
D	G3272	G3332	G3381	G3413	G3481	Gs3592	Gs3651	Gs3802	Gs3871	Gs3891	Gs3915	G4231
E	G3273	G3342	G3391	G3421	G3492	Gs3601	Gs3701	Gs3805	Gs3874	Gs3893	Gt3951	G4232
F	G3292	G3343	G3393	G3444	G3493	Gs3611	Gs3702	Gs3842	Gs3877	Gs3895	Gt3952	G4233
G	G3293	G3351	G3402	G3452	Gs3513	Gs3622	Gs3703	Gs3843	Gs3881	Gs3897	Gt3954	G4234
H	G3302	G3353	G3403	G3453	Gs3523	Gs3623	Gs3721	Gs3852	gs3882	Gs3901	Gt4292	G4237



FPTase inhibition activity from the Fractionation Library

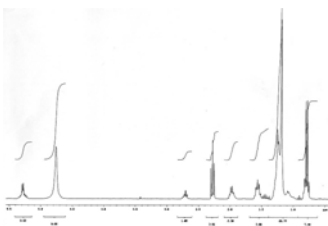
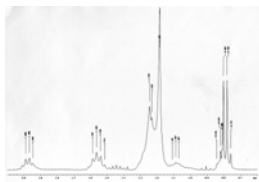
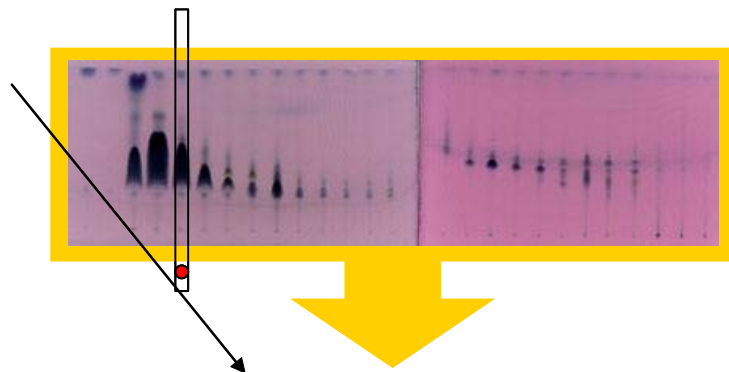
E6 > 70 % inhibition

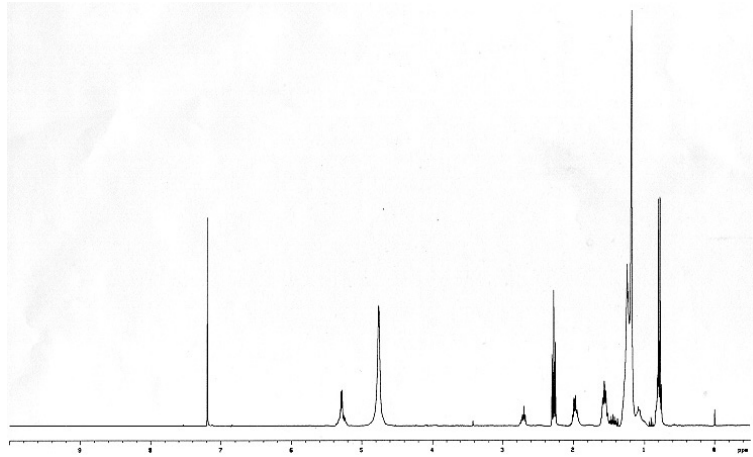
70 > G7, F12 > 45 % inhibition

Treatment by 1 mg/ml, 2 μ l

분획 라이브러리의 검증: NMR for de-redundancy, and HPLC for purity

분획 code G0413을 이용해서 발견빈도가 높은 물질군을 분획 그대로 H^1 -NMR로 분석하였다. 다수의 aliphatic 그룹이 나타나는 지방산 특유의 peak을 보여서 차후 동일한 분획에 대한 회피를 가능하게 하였다.





분획 Gs3736을 acetonitril, water를 이동상으로 한 HPLC와 Gs3743을 methanol, water로 분리한 HPLC 결과 상당히 정제된 결과를 보임으로 단순한 분획이 아니고, 순수 물질에 근접하는 분획의 순도를 확인할 수 있었다.

제 4 장 사업(연구개발)목표 달성도 및 대외기여도

연구연차	연구범위	연구내용	달성도, %
1차년도 (당해년도)	저분자 천연물 유래 Proteome 응용소재 확보 (Infra)	<ul style="list-style-type: none"> - 1st Pre-profiling; 실리카 컬럼, 고속 분획기, TLC - 분획화 정성 조건 확립 (분획 다양성) - 분획 라이브러리 발생 - 분획 라이브러리의 검증 	100
2차년도	천연물 유래 저분자 분획 라이브러리 구축 (Contents)	<ul style="list-style-type: none"> - 2nd Pre-profiling; C18 분획 (UV detector, HPLC-M/S) - 순수분리 library 축적 (lead compound library) - 분획 dB 내부공개 - 분획 dB 외부공개 	(해당없음)
3차년도	천연물 유래 Proteome 소재의 다양성 부여 (Novelty)	<ul style="list-style-type: none"> - 종 다양성, 유전자 다양성 - 배양 조건에 따른 대사 다양성 - 미량 물질의 선택적 증폭 	(해당없음)
1,2,3 차년도	유전체 및 Proteome 기능 조절 활성소재 확보 (Function)	<ul style="list-style-type: none"> - HTS 적용 - Proteome 연구 적용 - 화학생물학적 방법론 적용 	100

3 단계의 연구범위를 제 1차년 도에 수행하여 분획 라이브러리의 효용성을 검증하였고, 1차년 도에 목표한 라이브러리 발생을 위한 인프라 구축은 목표치대로 수행하여 시범 라이브러리를 방선균으로부터 도출할 수 있었다. 이 라이브러리는 2단계 3단계 연구 진행에 따라서 그 데이터베이스를 외부 공개하고 물질을 공급할 예정이어서, HTS, cell-based assay, 단백질연구, DNA chip 기술에 적용할 수 있을 것이다. 또한 토양 방선균을 대상으로 갖춰진 시설과 훈련 인력은 지속적인 라이브러리의 발생에 활용되어 후속 되는 연구에 연구소재와 신약개발 lead를 공급하게 될 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

추가연구의 필요성

제 2단계에서는 pre-profiling을 위한 전용 UV detector를 구입하여, flash column에서 용출되는 분획을 in-line 분석하고 이를 통해 라이브러리 발생 속도를 증가시킬 후속 연구가 필요하다. 수행될 연구의 제 2단계는 ‘천연물 유래 proteome 소재의 다양성 부여를 위한 과정’으로 미생물의 종 다양성, 유전자 다양성을 확충하고 대사 다양성을 유도하며 또한 미량물질의 선택적 증폭을 통한 다양성 확보에 주력하여 1단계 결과를 기반으로 가치 부여과정이 진행 될 예정이다. 최종적 라이브러리의 다양성 (D)은 다음과 같은 식으로 표시할 수 있다. 즉, $D = \text{종 다양성} \times \text{대사 다양성} \times \text{분획 다양성}$ 이다. 따라서, 1단계에서 최적화 한 분획에 의한 다양성에 종과 대사 다양성을 부여하는 과정을 진행한다. 연구의 제 3 단계는 ‘생체 기능조절 활성소재 확보를 위한 functional library의 구축’이 예정 되어있다. 즉, 다양한 목표점을 대상으로 HTS에 적용하고, 유전체 및 proteome 연구에 적용하며 저분자물질과 단백질간의 작용을 연구하는 화학 생물학적 연구에 적용하여 기능 규명 연구로 이행 될 것이다.

타연구에 응용

- 중복되고 산재한 천연자원의 종합화 기반 구축에 활용하여, 기업, 학교, 연구소 등에 있는 개개의 천연물을 구조 및 분획 기준으로 하나로 엮는 중심적 연구체로 자리매김을 모색하고, 천연자원의 활용성 극대화를 위한 공동의 연결고리 제공한다. 이를 통해 중복 연구 및 의미 없는 재발견 확률을 줄이는 데 활용할 수 있다.
- 최종적으로 신약 후보가 될 천연물의 pool로 HTS에 이용된다
- 세포기능 연구재료로 이용될 ‘Ligand의 발굴’과 이를 이용한 생체기능 연구에 활용하고 후속 연구를 통한 약효 재발견.
- 분획 라이브러리는 다양한 작용점에 쉽고 체계적으로 적용되어, 자칫 사장되기 쉬운 특색 있는 “우리의 것”을 확보하고, bio-informatics와의 연계하여 천연물 가치 제고에 활용.

제 6 장 참고문헌

- 7) Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. *Drug Discovery Today* 6(16): pp. 840–847 (2001)
- 7) Pharmacopeia Report Aug. 2000. (www.pharmacopeia.com)
- 7) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: pp.6578–6583 (1998)
- 7) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: pp 455–463 (1999)
- 7) Cloning the soil metagenome: a Strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Env. Microbiol.* 66(6): pp. 2541–2547 (2000)
- 7) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem & Biol* 5:R245–249 (1998)
- 7) 미생물 자원 데이터베이스 <http://mrdb.or.kr/>

기관고유사업보고서 초록

계 정 번 호	KGM5000111	당해년도 연구기간	2001. 1. 1. ~ 2001. 12.31	
연구과제명	중과제명	생명공학 미래핵심 원천기술개발사업		
	세부과제명	Proteome 기능연구를 위한 저분자 천연물질은행 구축		
연구책임자	김성욱	총 참여 연구원수	총 : 18 명 내부 : 15 명 외부 : 3 명	
연구비	296,200 천원 (직접비 150,000 천원)			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :		
	연구비 :	연구기간 :		
요약 (연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)			면수	1
<p>- 고속 분획을 위한 QUAD FLASH system 도입 후 버섯 1종, 곰팡이 1종, 식물 추출물 1종에 대한 적용으로 test run으로 분획 조건 최적화.</p> <p>- 토양 방선균 A10325~A10434 중 무작위 선별된 105종에 대해 TLC로 pre-profiling 하면서 QUAD를 통해 n=394의 분획 library를 발생시킴 (mg scale).</p> <p>- 라이브러리 발생 수율과 전주기 관리는 2개월의 가동으로 확인</p> <p>- 개별 배양액에서 평균 4~8개의 분획으로 모아서 라이브러리로 보관</p> <p>- 라이브러리는 E-tube, mother plate, daughter plate의 형태로 영하 20도에서 냉동 보관</p> <p>- 분양을 위한 96-well plate format으로 준비</p> <p>- 분획 라이브러리는 실제 활성 검색계 및 HTS에 적용하여 다양성 가치를 검정하였고, dereplication을 위해서 일부 반복적 분획에 대한 HPLC 및 NMR 분석을 통해서 배지유래 성분 및 유기산에 의한 다양성 저하를 방지.</p> <p>- 연구 기간 중 발표한 관련 논문은 국외 4편, 국내 2편, 학술 발표 2건이며 특히 1건</p> <p>- 부분 정제되고 TLC로 순도가 확인된 분획물의 경우 물질당 최소 10달러로 가정할 수가 있으며, code를 부여받은 라이브러리 평균 분획량을 5 mg을 산정 할 경우: $394/(2\text{-months}) \times 5 \text{ mg} \times 10 \text{ U\\$/mg} = 19,700 \text{ U\\$/}(2\text{-months})$ 정도의 잠재 가치를 확인.</p>				
색인어	한 글	미생물, 저분자, 2차 대사물, 물질은행, 천연물		
	영 어	Microbial natural product library, Fractionation		

* 1-2장으로 작성