

116134-3

농생명산업기술개발사업 제3차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002995-01

항균 및 세균독소 펩타이드 고효율 생산기술의 적용을 통한 항생제 대체 치료제 및 고효율 백신생산 기술의 개발 최종보고서

2020. 2. 10.

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단
협동연구기관 / 전북대학교 산학협력단
참여기관 / (주)코미팜

2020

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

항균 및 세균독소 펩타이드 고효율
생산기술의 적용을 통한 항생제 대체
치료제 및 고효율 백신생산 기술의 개발

최종보고서

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

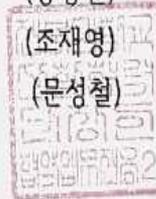
<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "항균 및 세균독소 펩타이드 고효율 생산기술의 적용을 통한 항생제 대체 치료제 및 고효율 백신생산 기술의 개발"(개발기간 : 2016. 11. 29 ~ 2019. 11.28)과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (송창선)
협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (조재영)
참여기관명 : ㈜코미팜 (문성철)



주관연구책임자 : 박찬규
협동연구책임자 : 허진
참여기관책임자 : 정호경

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116134-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.11.29 ~ 2019.11.28	단 계 구 분	(3년)/ (3년)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	항균 및 세균독소 펩타이드 고효율 생산기술의 적용을 통한 항생제 대체 치료제 및 고효율 백신생산 기술의 개발			
	세 부 과 제 명	독소 산생 병원성 세균에 의한 돼지 부종병 및 돼지 홍막폐렴 예방 백신 개발 기능성 펩타이드를 활용한 동물치료제 및 백신의 제품화기술개발			
연구책임자	박찬규	해당단계 참여연구원 수	총 : 43명 내부 : 12명 외부 : 31명	해당단계 연구개발비	정부:350,000천원 민간:100,000천원 계:450,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총 : 52명 내부 : 13명 외부 : 39명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:300,000천원 계:1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교 줄기세포재생공학과 전북대학교 수의학과			참여기업명 (주)코미팜	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

1. 항균 펩타이드 및 세균독소 펩타이드의 산업화 규모 대량생산 기술의 개발을 통한 지적재산권 확보 및 산업체 기술이전

- 가. 산업체 기술 이전 3건, 산업기술 인력양성을 위한 교육 3건
- 나. 지적 재산권 국내 특허 출원 및 등록 2건 및 국제 특허 3건

2. 산업화 가능 AMP/BTP의 발굴

- 가. 신규 AMP/BTP 총 15종 발굴, 이와 관련된 국내 및 PCT 포함 관련 특허 출원 7건, 등록 2건 완료

3. AMP 기반 젖소 유방염 치료 연고의 개발

- 가. 적합한 연고 제형 및 젖소 유방염 유발 표준 균주와 농장 유래 의심 균주 패널을 이용한 최종 제품 후보 AMP 발굴
- 나. PMAP 유방염 치료 연고에 대한 효능, 세포 독성, 안정성 평가 기술 확보
- 다. AMP 기반 젖소 유방염 치료 연고제 1종 시제품 제작

4. AMP/BTP 기반 고효율 돼지 부종병 및 흉막폐렴 백신의 개발

- 가. 목적 세균의 고스트 유도에 특화된 AMP 선별 및 흉막 폐렴 백신 2종 시제품 제작

5. AMP/BTP 생산 서비스 시스템의 구축 및 제품개발

- 가. 과제 진행 3년 기간 동안 총 166 mg AMP, 31 mg BTP를 생산 및 협동 과제에 제공

보고서 면수

137

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 동물생명정보의 분석과 단백질발현공학 기술을 활용하여 화학합성으로 생산 불가 또는 고비용인 항생제 대체제와 박테리아 독소단백질의 대량 생산 산업화 기반기술개발 <ul style="list-style-type: none"> 가. 현재 항균 펩타이드(AMP) 및 세균독소 펩타이드(BTP)의 산업화 수준 대량생산을 뒷받침하는 기술의 부재는 이들 유용 펩타이드의 항생제 대체제로의 활용등의 산업화에 가장 큰 제한 요소 나. AMP/BTP의 산업화 핵심 플랫폼기술인 대량생산 및 정제기술의 개발 (기존특허 대비 10배의 생산효율)을 통한 산업화 플랫폼의 개발 2. 개발된 산업화 기술을 활용하여 동물자원의 안전성 관리 및 생산성 향상을 위한 항생제 대체제 및 고효율 백신생산 기술의 개발 <ul style="list-style-type: none"> 가. 시제품 개발을 위한 AMP/BTP의 고효율 생산, 생화학적 특성규명 및 효능 및 안정성 평가 등을 통하여 제품화에 적합한 AMP/BTP 후보 물질을 선정하며 또한 산업화에 적합한 신규 AMP를 발굴 나. 대량생산된 AMP를 활용하여 비유종의 젖소에서 유생산의 중단 없이 유방염 치료에 사용가능한 항생제 대체 치료제의 설계 및 효능평가 다. 미생물 및 세포패널, 실험동물 및 목적동물 등을 활용한 산업화 후보 AMP/BMP의 효능과 안정성 평가 라. AMP의 세포독성 감소 및 특이성 조절을 위한 펩타이드 엔지니어링을 통한 산업화 핵심 AMP의 개발 마. 세균 고스트 유도를 위한 최적화 AMP의 선별 및 이를 활용한 BTP 혼합백신의 개발, 효능평가 및 안정성시험 바. 개발된 제품의 목적동물 및 농장현장 평가를 통한 제품성능의 평가결과 도출 3. 동물자원분야의 질환치료와 예방기술개발 및 산업화를 통한 고부가 천연소재 펩타이드산업의 활성화
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 항균 펩타이드 및 세균독소 펩타이드의 산업화 규모 대량생산 기술의 개발을 통한 지적재산권 확보 및 산업체기술이전 <ul style="list-style-type: none"> 가. 선행 연구 기술을 기반으로 항균 펩타이드 및 세균독소 펩타이드의 대량 생산 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> (1) 산업화 후보 AMP 및 BTP 대량 생산을 위한 유전자 정보 및 대량 생산용 벡터 10종 확보 (2) 발효조(Bioreactor) 기반 high cell density 발현 기술 개발 (3) Ni-NTA 대형 칼럼 기반 니켈-친화력 크로마토그래피 정제 기술 개발

- (4) Flask scale 선행 연구 기술을 각 정제 단계별 pilot scale로의 적용 및 scale-up 시스템 확보
- 나. 항균 펩타이드 및 세균독소 펩타이드를 포함하는 숙주 독성 펩타이드 생산 기술 관련 지적 재산권 확보 및 산업체기술이전
 - (1) 숙주 독성 펩타이드 발현 및 정제 생산 기술 관련 지적 재산권 확보 (중국, 미국, 유럽공동체 특허출원)
 - (2) 대량 생산 기술에 대한 산업체 기술 이전(제2협동과의 기술 이전 계약 체결) 1건 및 3건의 산업기술 인력양성을 위한 교육
 - (3) 항균 펩타이드 및 세균 독소 펩타이드 기반 백신 관련 지적 재산권 국내 특허 출원 1건, 등록 1건 완료 및 산업체 기술 이전(제2협동과의 기술 이전 계약 체결) 2건 완료

2. 산업화 가능 AMP/BTP의 발굴

가. 산업화 제품 후보 AMP의 발굴

- (1) 유전체 정보 및 생물정보학 분석 기술을 이용한 신규 항균 펩타이드 총 8종 발굴
- (2) 신규 항균 펩타이드의 효능 평가를 위한 박테리아 패널의 확보
- (3) AMP의 용혈성 및 세포 독성 평가를 위한 포유동물 세포 패널 및 평가 기술의 확보
- (4) AMP 안정성 평가 기술 개발 완료
- (5) 국내 및 PCT 포함 관련 특허 출원 7건, 등록 1건 완료

나. 산업화 가능 BTP의 발굴

- (1) 세균 독소 펩타이드 기반 백신 조성물 관련 국내 특허 출원 1건 완료

3. AMP 기반 젯소 유방염 치료 연고의 개발

가. 유방염 의심 표준 균주 패널의 확보

나. AMP 기반 젯소 유방염 치료 연고 개발을 위한 적합한 연고 제형 발굴

다. 선행 기술을 통해 기확보한 AMP를 이용한 젯소 유방염 유발 균주 특이적 AMP 스크리닝 및 발굴 완료

라. 농장 유래 젯소 유방염 의심 균주 분리 및 패널 확보

마. 최적화된 연고 제형 및 제품 후보에 대한 효능, 세포 독성, 안정성 평가 기술 확보

4. AMP/BTP 기반 고효율 돼지 부종병 및 흉막폐렴 백신의 개발

가. 백신 개발 목적 세균의 고스트 유도에 특화된 AMP 선별

	<p>나. 고스트화 유도 액을 이용한 불활화 및 투사 전자현미경(TEM)을 이용한 고스트화 검증</p> <p>다. 실험 동물을 이용한 불활화 세균의 안정성, 병원성 복귀 실험 및 접종 부작용 검사 완료</p> <p>라. 목적동물에서 불활화 균체의 안전성 및 효능 평가 및 세균의 도전감염 균량 확인</p> <p>5. AMP/BTP 생산 서비스 시스템의 구축 및 제품개발</p> <p>가. AMP/BTP 생산 시스템의 Flask scale에서 pilot scale로의 scale-up 완료</p> <p>나. 향상된 규모의 생산 시스템을 이용하여 목적 동물에 대한 효능 평가를 위한 항균 펩타이드 대량 생산 (149 mg) 완료 및 제공 (125 mg)</p> <p>다. 과제 진행 3년 기간 동안 총 166 mg AMP, 31 mg BTP를 생산 및 협동 과제에 제공</p> <p>라. AMP 기반 젖소 유방염 치료 연고제 1종 및 흉막 폐렴 백신 2종, 총 3종의 시제품 제작</p> <p>마. 시제품이 제작된 흉막 폐렴 백신 2종에 대한 품목 허가서 제출 예정</p> <p>6. 그 외 4건의 연구 인력 양성, 평균 Impact factor 3.3 이상 국제저명학술지 발표 4건(추가 1건 예정), 17건의 학술대회 발표, 5건의 홍보 성과 및 3건의 기타 실적을 완료</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. 항생제를 대체가능한 동물질환 치료제 및 고효율 백신개발을 통하여 펩타이드산업 육성을 통한 국내 천연소재 기반기술의 국제경쟁력 향상</p> <p>2. 생산이 어려운 AMP/BTP 대량생산 기술을 국내 증견제약기업 또는 생명공학기업에 기술이전 하여 천연소재유래 인체의약품 생산에 대한 후속연구의 실시</p> <p>3. 국내 가축사육농가에 개발품 적용을 통한 농가소득 향상</p> <p>4. 수입대체 및 수출을 통한 국내 항생제 대체제 산업의 활성화 및 경제성 창출</p> <p>5. 개발기술을 바탕으로 한 동물의 질병치료를 위한 다양한 항생제 대체 치료제 등의 안전성 관리기술의 개발이 가능</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>항균 펩타이드</p>	<p>세균독소 펩타이드</p>	<p>항생제 대체제 대량생산</p>	<p>유방염 치료 연고</p>	<p>동물 백신</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>antimicrobial peptides</p>	<p>bacterial toxic peptides</p>	<p>antibiotics</p>	<p>mastitis treatment</p>	<p>animal vaccines</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

제1장. 연구개발과제의 개요	8
제1절. 연구개발 목적 및 내용	8
제2절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계	9
제3절. 연구개발의 필요성	13
제2장. 연구수행 내용 및 결과	22
제1절. 1차년도 연구수행 내용 및 결과	22
제2절. 2차년도 연구수행 내용 및 결과	39
제3절. 3차년도 연구수행 내용 및 결과	64
제4절. 3년간 연구수행 결과 요약 및 평가	89
제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	95
제1절. 연차별 목표 및 내용	95
제2절. 연구개발 평가방법	106
제3절. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	109
제4장. 연구결과의 활용 계획 등	120
제1절. 항생제 대체 치료제 및 고효율 백신생산 기술 개발	120
제2절. 돼지 부종병 및 돼지 흥막 폐렴 예방 백신 개발	120
제5장. 연구개발성과의 보안등급	123
제1절. 연구개발성과의 보안등급	123
제2절. LMO 연구시설 및 수입신고	123
제6장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	124
제7장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	127
제1절. 국내외 논문 게재	127
제2절. 국내 및 국제학술회의 발표	128
제3절. 생명자원(생물자원)/화합물	129
제4절. 지식재산권	129
제5절. 전문연구 인력양성	133
제6절. 산업기술 인력양성	133
제7절. 기술거래(이전) 등	134
제8절. 기타	135
붙임. 참고문헌	137

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제1장. 연구개발과제의 개요

제1절. 연구개발 목적 및 내용

1. 최종 목표

- 가. 동물생명정보의 분석과 단백질발현공학 기술을 활용하여 화학합성으로 생산 불가 또는 고비용인 항생제 대체제와 박테리아 독소단백질의 대량생산 산업화 기반기술개발
- 나. 개발된 산업화 기술을 활용하여 동물자원의 안전성 관리 및 생산성 향상을 위한 항생제 대체제 및 고효율 백신생산 기술의 개발
- 다. 동물자원분야의 질환치료와 예방기술개발 및 산업화를 통한 고부가 천연소재 펩타이드산업의 활성화

2. 세부 목표

- 가. 항균 펩타이드 및 세균독소 펩타이드(단백질)의 대량 생산 핵심 플랫폼기술의 개발
 - (1) 선행 연구를 통해 확보한 PCT 특허출원 기술을 활용하여 산업화기술로 업그레이드된 발현 및 정제 시스템의 개발(기존특허 대비 10배의 생산효율, 300mg purified AMP/liter culture)
 - (2) AMP 및 BTP 대량생산 15건 이상 및 제품화 총7건(과제기간 내 3건, 종료후 5년이내 4건)
- 나. 산업화 후보 펩타이드의 특성규명 및 제품화 설계
 - (1) 국내 특허 확보 3종을 포함한 7종의 AMP 대량생산과 효능, 세포독성 및 혈청 내에서의 안정성 평가
 - (2) 후보 AMP 및 BTP를 이용한 돼지 부종병 및 흉막폐렴 백신혼합제의 설계
- 다. 제품화 가능한 AMP 및 BTP 후보 물질의 발굴
 - (1) 산업화 가능 AMP 및 BTP 후보물질의 선정
 - (2) 생산후보 독소펩타이드 : Stx2e(F18+ Escherichia coli), Apx 1A, Apx IIA, Apx IIIA(Actinobacillus pleuropneumoniae)
 - (3) 유전체 분석 및 생물정보학 기법을 이용한 신규 AMP의 발굴
- 라. AMP 활용 젖소 유방염 치료 항생제대체제의 설계
 - (1) 젖소 유방염 유발 주요미생물 대상 AMP 효능평가
 - (2) 선정된 AMP의 젖소 유방염 치료 연고로써의 물질 안정성평가 및 안정화기술의 개발
 - (3) 목적동물에 대한 유방염 치료 연고로써의 효능평가
 - (4) 유방염 발생 목장을 대상으로 한 치료제의 효능평가
- 마. 제품 후보 AMP 및 BTP의 평가 및 선발
 - (1) 후보 AMP의 다재내성균을 포함한 병원성 미생물 패널을 이용한 항균력 및 안정성 검증
 - (2) 후보 펩타이드를 이용한 백신 혼합제의 효능 및 안정성 검증
 - (3) 생산된 펩타이드, 혼합제 및 백신의 목적동물 효능 평가

바. AMP의 세포독성 감소 및 특이성 조절을 위한 펩타이드 엔지니어링

- (1) 제품개발로 선정된 펩타이드의 특이성 조절, 세포독성 감소를 위한 펩타이드 모델링, 구조 분석
- (2) 엔지니어링이 완료된 펩타이드의 효능 및 특성평가

사. 항균 펩타이드 및 세균독소 펩타이드 혼합백신의 개발

- (1) 균체와 독소이드의 혼합 백신 2건에 대한 안정성과 효능평가
- (2) 실험동물을 이용한 이들 불활화 세균의 안전성 및 병원성 복귀 실험
- (3) 돼지에서 이들 세균에 대한 불활화 균체의 안전성 및 효능 평가
- (4) 개발 혼합 백신과 기존 백신의 효능 비교 평가
- (5) 불활화 독소이드의 안정성 시험
- (6) 돼지 부종병 만연된 양돈장에서의 독소이드 함유 고스트 사균체 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가
- (7) 돼지 흉막 폐렴이 만연된 양돈장에서의 혼합 흉막 폐렴 예방 백신의 안전성 및 효능 평가

제2절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

1. 연구 개발 추진 전략·방법

가. 본 과제는 크게 3 부분으로 나누어짐(그림 1, 4 참조) : 산업화 수준의 항균 펩타이드(AMP)와 세균독소펩타이드(BTP) 대량생산 플랫폼기술 개발을 통한 산업화 제품개발 원천재료의 확보(1단계 : 제1 세부과제 연구), 확보된 AMP와 BTP를 활용한 항생제 대체 치료제 및 가축용 고효율 백신의 개발(2단계 : 제1, 2, 3세부과제 협력연구), 그리고 개발된 제품의 안정성 및 효능 검정을 통한 시제품 개발(3단계 : 제 1, 2, 3 세부과제 협력연구). 본 과제의 목표달성을 위하여서는 각 단계별 참여기관과의 협력연구가 필수적임

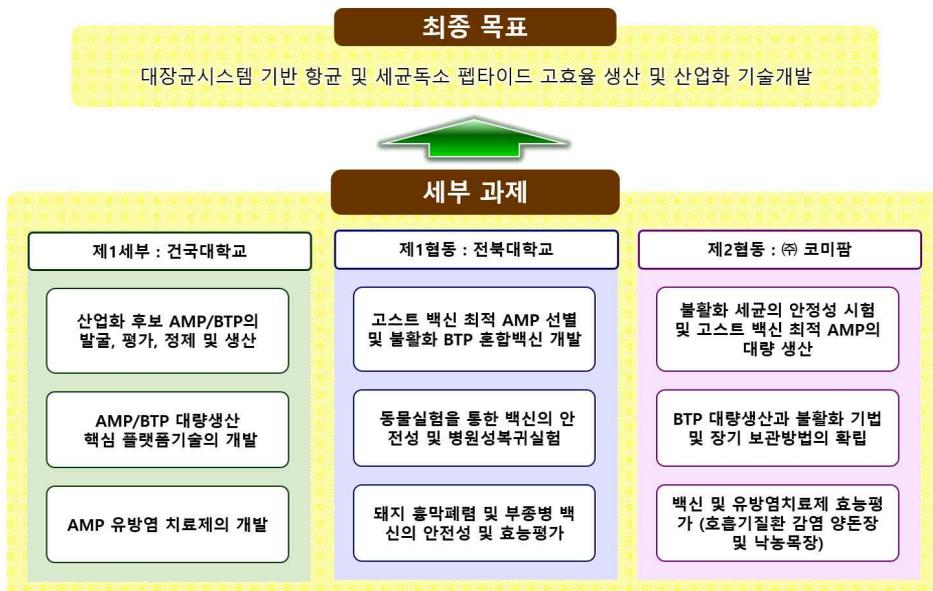


그림 2. 목표달성을 위한 각 세부 과제별 목표.

나. 본 과제의 효율적 추진을 위하여 전문기술 분야별 특성을 가진 3개 연구기관이 각 단계별 협력연구를 통하여 연구개발의 최종목적을 달성할 예정이다. 각 기관별 전문성은 아래와 같음(그림 2 참조)

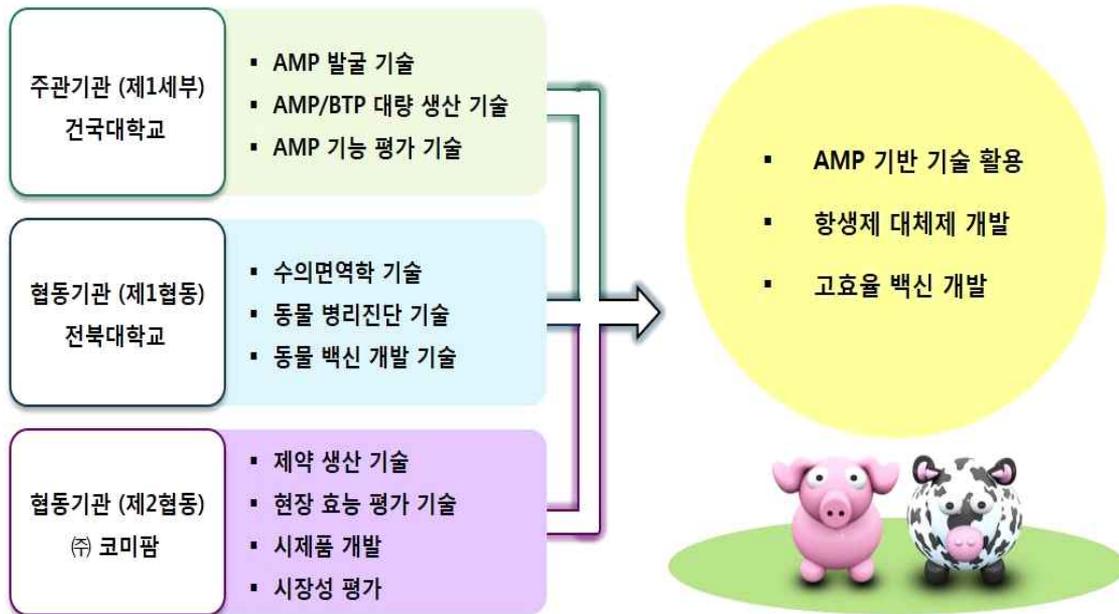


그림 2. 연구 개발 추진 전략 개요.

다. 분기별 화상회의 및 반기별 대면회의를 통한 연구진행 현황의 분석 및 국내외 기술현황의 브리핑 등을 통하여 과제의 방향설정 및 산업화 목표에 대한 지속적인 검토 실시

2. 연구개발 추진체계

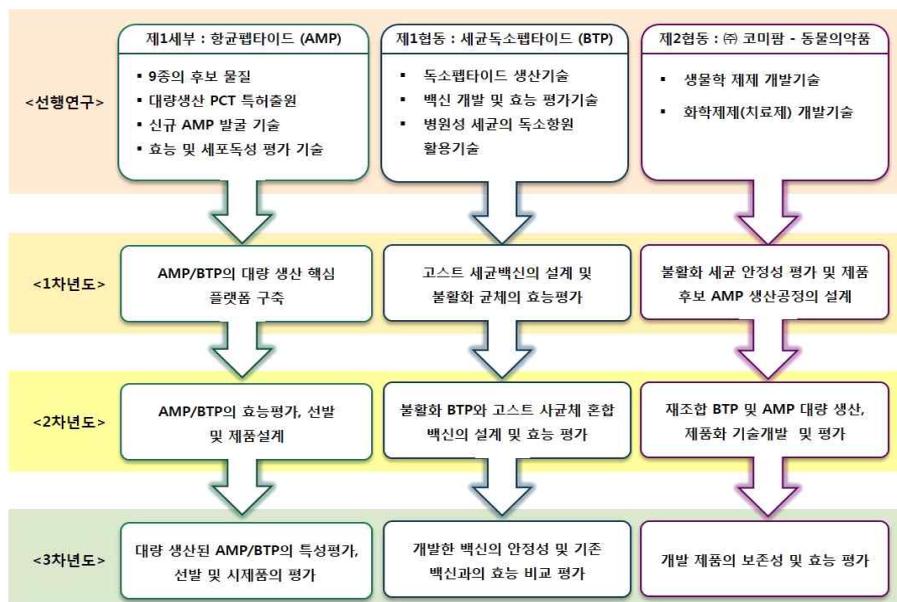


그림 3. 각 연구기관의 연차별 핵심 목표.

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	항균 및 세균독소 펩타이드 고효율 생산기술의 적용을 통한 항생제 대체 치료제 및 고효율 백신생산 기술의 개발	주관연구책임자 박찬규 외 총 22명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
대기업		
중견기업		
중소기업	1	9
대학	2	14
국공립(연)		
출연(연)		
기타		

건국대학교
대장균시스템 기반 항균 및 세균독소 펩타이드 고효율 생산 및 산업화 기술개발
박찬규 외 8명

전북대학교
독소 산생 병원성 세균에 의한 돼지 부종병 및 돼지 흉막폐렴 예방 백신 개발
허진 외 9명

(주)코미팜
기능성 펩타이드를 활용한 동물치료제 및 백신의 제품화기술개발
정호경 외 9명

3. 추진 일정

1차년도														
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	생산효율 최대화 발효시스템 개발													박찬규 (건국대학교)
2	펩타이드 대량정제 생산비 절감기술의 개발													박찬규 (건국대학교)
3	대량생산용 발현벡터시스템 개발(10종이상)													박찬규 (건국대학교)
4	산업화 후보 펩타이드 생산													박찬규 (건국대학교)
5	신규 펩타이드 물질의 발굴													박찬규 (건국대학교)

6	산업화 후보 펩타이드의 특성 분석																				박찬규 (건국대학교)
7	세균 고스트 유도에 최적화 AMP 선별																				허진 (전북대학교)
8	불활화 세균의 안전성 및 병원성 복귀 실험																				허진 (전북대학교)
9	목적동물에서 불활화 균체의 안전성 및 효능 평가																				허진 (전북대학교)
10	세균의 도전감염 균량 확인																				허진 (전북대학교)
11	체외에서의 불활화 세균의 안정성시험																				정호경 (코미팜)
12	고스트 유도에 최적화된 AMP 대량 생산																				정호경 (코미팜)
2차년도																					
1	기발굴 AMP 및 BTP의 대량 생산																				박찬규(건국대학교)
2	AMP 및 BTP의 효능 및 세포독성 평가, 선정, 제품화																				박찬규(건국대학교)
3	기발굴 AMP 기반의 젖소 유방염 원인균 효능평가 및 치료제의 설계																				박찬규(건국대학교)
4	독성 감소 및 특이성 조절을 위한 AMP 엔지니어링																				박찬규(건국대학교)
5	불활화 BTP의 실험동물에서의 안전성 평가																				허진(전북대학교)
6	돼지에서 불활화 BTP의 안전성, 효능 평가																				허진(전북대학교)
7	돼지에서 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가																				허진(전북대학교)

- 나. 이러한 사회적 변화에 따라 항균 펩타이드와 세균독소 펩타이드를 활용한 항생제 대체제 및 백신 항원 개발 등을 포함한 펩타이드산업은 동물 및 의료산업의 중요한 이슈가 되고 있으나 기술적 한계(펩타이드 발현 시 숙주세포 자체에 대한 독성으로 숙주가 사멸)로 산업화가 진전되지 않고 있음
- 다. 본 연구팀은 선행연구를 통하여 펩타이드 대량생산기술로써 고가의 화학합성을 대체할 박테리아 발현시스템 기반 항균 펩타이드(AMP, antimicrobial peptides)와 세균독소 펩타이드(BTP, bacterial toxic peptides)의 세계 최고의 생산효율을 나타낼 수 있는 기술을 선행연구에서 개발(PCT 특허 KR32016-001940, Soundrarajan등, Scientific report 2016) 하였으며, 본 과제에서는 기존 선행기술을 항생제 대체제 대량생산을 위한 플랫폼기술로 발전시켜 동물산업 치료제 및 백신 개발 등의 펩타이드산업의 활성화 기술을 개발함

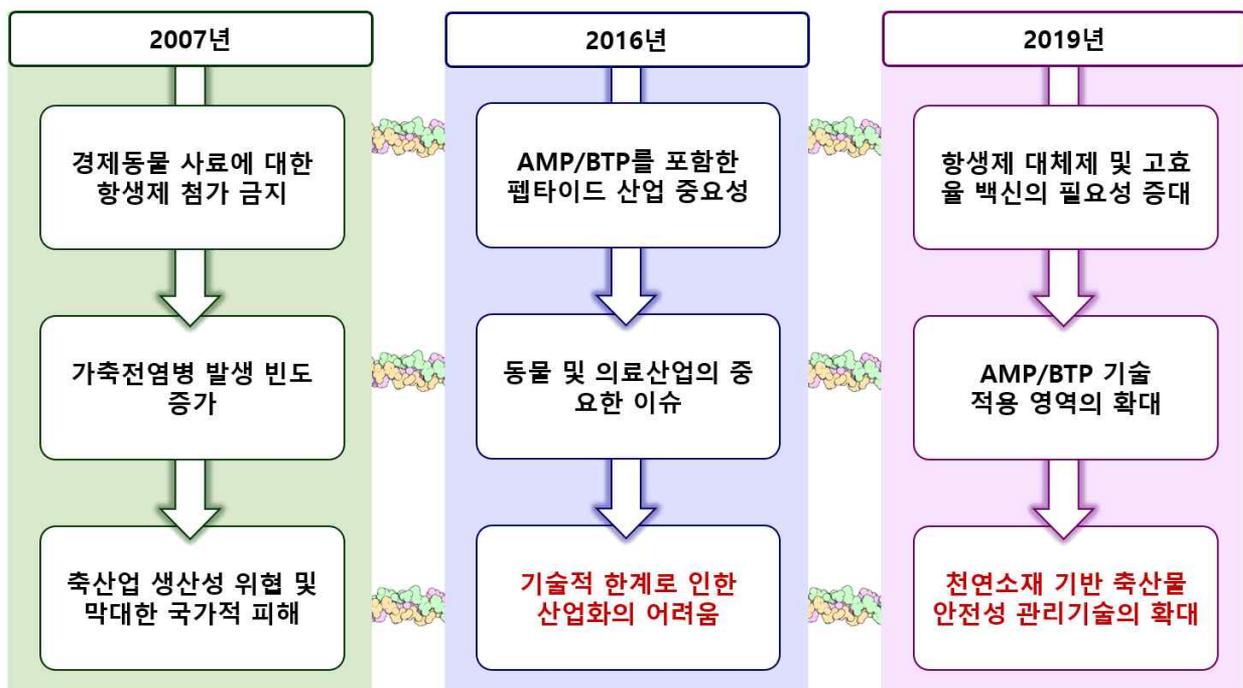


그림 5. 산업화 수준의 항생제 대체제 활용기술 개발의 시의성.

- 라. 본 연구는 크게 3 부분으로 나누어짐(그림 1, 5 참조) : 산업화 가능 수준의 항균 펩타이드(AMP)와 세균독소 펩타이드(BTP)의 대량생산 플랫폼기술 개발을 통한 산업화 제품개발 원천재료의 확보(1단계), 확보된 AMP와 BTP를 활용한 항생제 대체 치료제 및 가축용 고효율 백신의 개발(2단계), 그리고 개발된 제품의 안정성 및 효능 검정을 통한 시제품 개발(3단계).
- 마. 개발 기술의 우수성 및 활용도를 증명할 산업화 기술로는 1) 착유우의 유방염발생시 항생제 남용중단의 경제적 손실을 초래하지 않고 치료에 사용가능한 항균 펩타이드 유방염 치료 연고 연고와 2) 대량생산된 항균 펩타이드 및 독소펩타이드 항원을 활용한 고효율 돼지 부종병 및 돼지 흉막폐렴 백신개발을 계획함
- 바. 본 과제에서 개발된 기술은 AMP가 활용될 수 있는 다양한 항생제 대체제 기반 치료제 및 다양한 BTP의 생산에 적용될 수 있어 국내 펩타이드산업의 경쟁력 확보에 크게 기여 할 것임

사. 본 과제의 핵심 개발기술은 현재 본 연구팀이 보유한 세계 최고생산효율로 판단되는 대장균발현시스템 기반 항균 펩타이드 실험실 생산기술(30mg/liter culture)을 발효조 기반의 산업생산 플랫폼기술로 발전시켜 10배의 생산효율인 300mg/liter의 기술로 개발하여 항균 펩타이드의 생산 단가를 산업화 가능한 수준으로 낮추는 것임

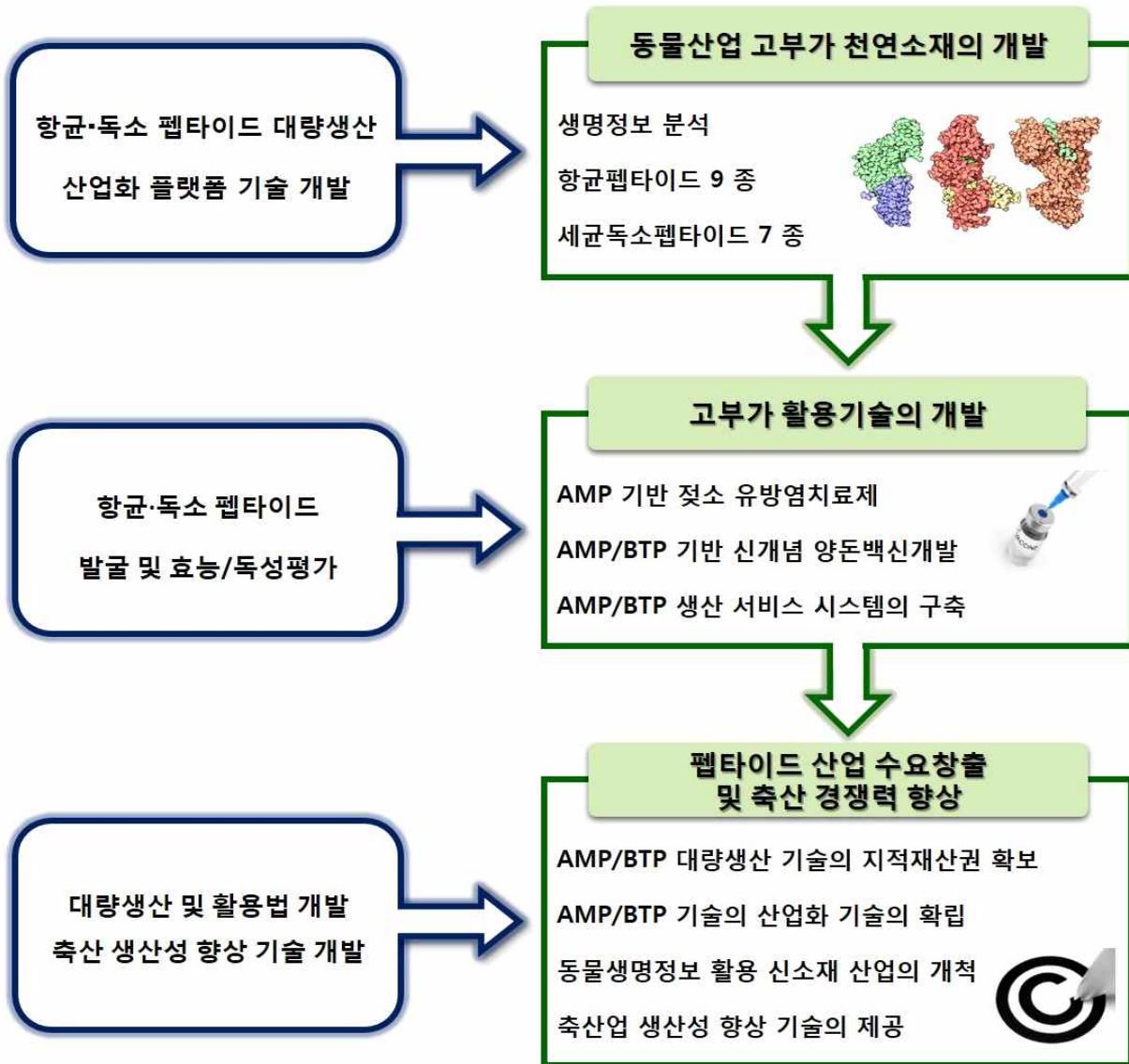


그림 5. 연구개발의 개요. AMP(항균 펩타이드), BTP(세균독소 펩타이드).

2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

- (1) 현재 동물산업은 과거의 축산물 생산뿐만 아니라 동물유래의 유용유전자를 활용한 의료 산업을 포함한 3차 산업 소재 개발 및 가축 질병예방을 위한 제제개발 등을 포함하는 분야로 전통축산과 비교하여 고부가가치를 지니는 산업에 대한 연구 및 투자의 확대가 요구됨

- (2) 항균 펩타이드(AMP)와 관련하여 4,236건의 국내특허가 검색되며 대부분의 경우 동물, 곤충과 어류 등에서 발굴한 AMP를 기반으로 한 조성물 특허임. 그러나 이들 조성물을 대량 생산할 기술의 개발은 제한적이며 융합단백질(fusion protein) 기술을 사용하여 일부 진행하였으나 다양한 AMP를 효율적으로 대량생산할 수 있는 기술은 최근 본 연구실에서 개발한(국내특허 10-2016-0009970, PCT 특허출원 KR32016-001940) 기술이 가장 우수할 것으로 판단됨
- (3) 현재는 소량 생산시 AMP의 화학합성 주문가격이 펩타이드의 길이에 따라 20만원~35만원/5mg 으로 활용이 불가할 정도의 고비용임
- (4) 펩타이드 분야 국내기업의 성장(연평균 18%)은 항생제 대체제, 백신개발, 화장품첨가제(스킨케어제), 항암제 및 신약개발 연구 등을 목적으로 함(그림 6 참조)

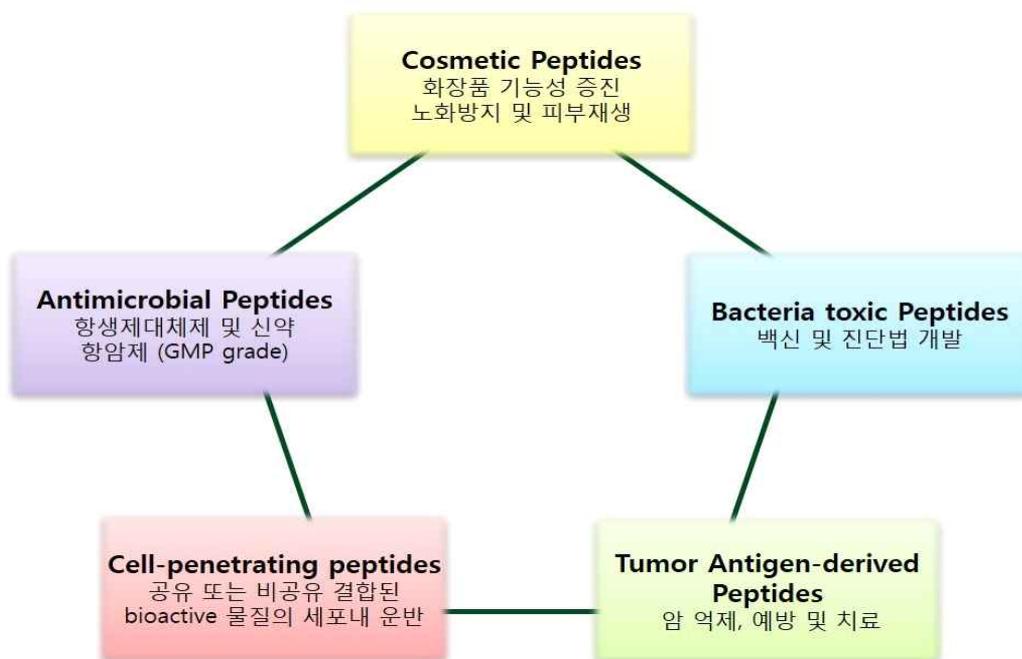


그림 6. 주요 펩타이드 산업의 개요.

- (5) 착유두수 30두의 목장이 1등급 우유를 생산할 경우와 유방염에 의해 3등급 우유를 생산할 경우의 수익성을 비교한 결과 연간 총 손실액은 3500여만 원으로 추산됨[출처, 벵링거인켈하임 동물약품(주) 발표자료]
- (6) 착유우 유방염은 치료를 위한 항생제 사용 시 잔류항생제의 문제로 평균 1개월 정도까지의 휴약 기간이 요구되어 목장경영에 심각한 경제적 손실이 발생하며 이에 대한 효율적인 대처법의 개발이 절실. AMP 등의 항생제 대체제를 활용한 치료법이 효율적인 대안이 될 수 있으나 개발된 제품은 아직 없음(그림 7 참조)
- (7) 유방염의 경우 90~95%의 경우가 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* 및 *Streptococcus uberis*에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며 이들 세균에 특이적인 항세균 펩타이드인 Bacteriocin에 대한 연구가 일부 진행되었음[출처, Son 등, 2016]

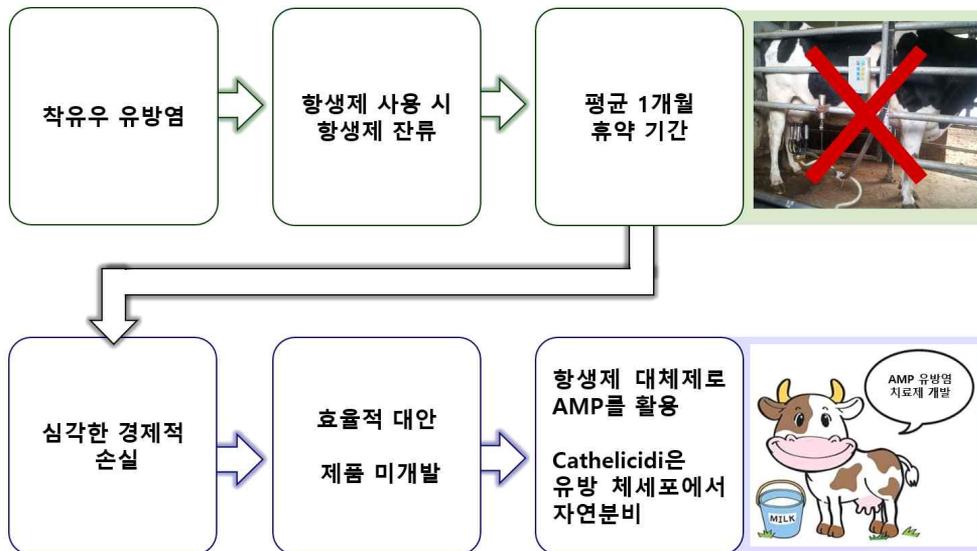


그림 8. AMP 기반 유방염 치료제개발의 시의성.

- (8) 2007년 이후 경제동물 사료에 항생제 첨가가 금지된 이후 돼지 등에서 항생제에 의해 억제되었던 많은 질병이 발현되고 있음. 특히 독소를 산생하는 F18+ 대장균, *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) 등 많은 병원성 세균들에 의한 질병이 문제가 되고 있음. 그러나 이들 독소산생 병원균에 대한 백신은 없거나 또는 시판되는 백신의 경우도 질병 발현에 중요한 역할을 수행하는 독소이드가 포함되어 있지 않아 백신의 효능이 낮아 축주들로부터 외면 받고 있는 실정임. 따라서 이들 균주들로부터 산생되는 독소를 대량생산하여 포르말린 등으로 불활화 시켜 불활화 균체와의 혼합 백신이 절실히 필요한 상황임. 하지만 이들 독소를 대량생산하기 위해서 사용되는 대장균 발현 시스템 또한 세균이며 이들 발현되는 독소에 의해 발현 숙주인 대장균이 도중에 사멸할 수 있어 이들 독소를 대량 생산할 수 있는 시스템이 부재함. 이들 독소를 대량 생산할 수 있는 시스템의 필요성이 절실함
- (9) 흉막폐렴은 돼지 세균성 호흡기 질병 중 국내에서 가장 큰 피해를 일으키고 있는 질병으로 백신시장 규모는 30억~35억원(복합제 포함)임[출처, 돼지흉막폐렴 백신시장 지각 변동 |작성자 김영길]
- (10) 세균독소 펩타이드(bacterial toxin peptide)와 관련하여 2,695건의 국내특허가 검색됨. 산업적으로 독소항원의 생산기술에 대한 수요가 많으나 발현숙주 자체에 유해성을 가지는 독소항원의 대량생산은 어려움
- (11) 현재는 고효율 백신생산에 필요한 정제된 세균독소 펩타이드의 확보가 어려워, 세균자체를 배양 및 불활성화시켜 세포전체를 사용하는 특이성이 낮은 방법을 사용
- (12) 펩타이드산업 관련 업체로는 국내 주요 동물백신개발업체(중앙백신연구소, 코미팜, 사노피아벤티스 코리아), 제약회사 및 펩타이드 전문 벤처기업(케어젠, 펩트론, 아이진, 나이백 등)이 있음
- (13) 검색어 [antimicrobial peptide AND Korea]와 [bacterial toxin peptide AND korea]를 pubmed를 통하여 논문 검색한 결과 각각 330건과 2181건의 논문이 검색되어 관련분야 관심도가 높음

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

- (1) AMP(항균펩타이드)와 BTP(세균독소 펩타이드) 검색어의 Pubmed 검색시 각각 349,857건과 62,748건의 논문이 검색됨. 특히 최근의 논문수가 급증하고 있음
- (2) 미국 특허청의 AMP와 BTP 관련 등록특허 수는 각 48,827건과 63,996건으로 산업적 중요성이 매우 높음을 보여줌
- (3) 현재 60종 이상의 펩타이드 제제가 미국 FDA 승인 후 시판, ~140종이 임상단계, ~500종이 전임상 단계이나 AMP와 세균독소 펩타이드(단백질)의 경우는 높은 생산단가로 초저분자량 펩타이드를 제외하고는 산업적 활용도가 낮음. 펩타이드 치료제의 세계시장규모는 2011년 약 14조원(\$14.1 billion)과 2013년 25조원(\$25.4 billion)[출처, Fosgerau & Hoffmann, 2014]에 달함. 제약이외의 다양한 펩타이드 산업을 포함할 경우 산업규모는 방대함
- (4) 산업적 중요도가 높으나 기술적 제약으로 AMP와 BTP를 화학합성 외의 방법으로 산업적 요구수준을 충족하여 대량생산할 수 있는 곳은 없는 것으로 판단됨
- (5) BTP인 Cholera Toxin B 서브유닛 1mg의 판매가는 \$550[출처, List biological laboratories, 미국]으로 고부가가치 기술임(표 1 참조)

표 1. 세균 독소 펩타이드의 산업적 가치.

펩타이드	용량	가격
Anthrax Edema Factor	0.1mg	\$100
Botulinum Neurotoxin Type A	10ug	\$210
Cholera Toxin	1mg	\$550
Diphtheria Toxoid	0.5mg	\$510

- (6) 국제적으로 AMP 및 BTP 물질생산 판매 관련 다수의 기업이 존재(List biological laboratories, US; Native antigen company, US; Sigma, US 등)
- (7) 국외의 경우도 국내의 상황과 마찬가지로 항생제 대체제 및 백신 개발과 세균진단법 개발 향원의 생산 단가를 낮출 수 있는 시스템의 필요성이 절실함

3. 연구개발의 중요성

가. 농업생명자원을 활용하는 펩타이드산업은 신성장동력 기술임. 그러나 고효율의 정제된 AMP와 BTP는 유전자재조합기술에 의한 대량생산이 어려워 고비용의 화학합성에 의존하고 있음. 또한, 분자량이 큰 펩타이드와 단백질은 화학합성이 불가하여 산업발전에 병목(bottleneck)으로 작용. 산업적 요구를 감당할 수 있는 기술개발의 필요성이 절실(그림 8 참조)

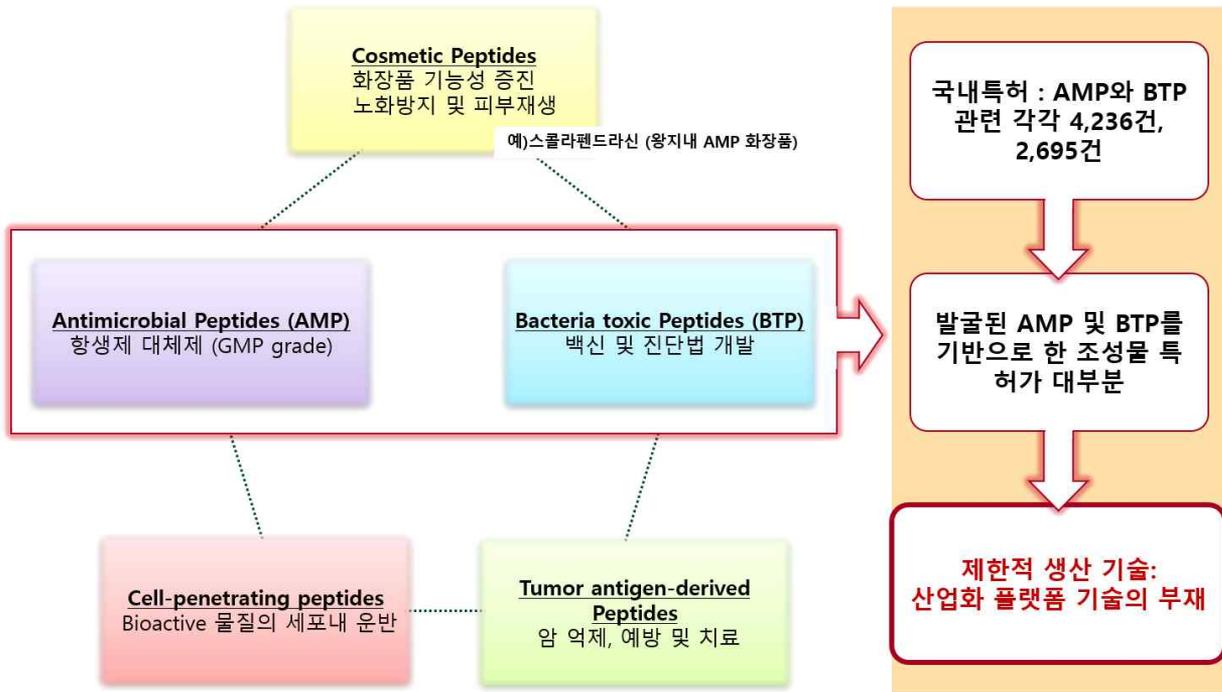


그림 9. AMP 및 BTP 산업 분야의 문제점 및 생산기술 개발의 필요성.

- 나. 동물성 단백질의 생산성 증대를 위한 축산업계의 항생제 남용은 항생제 내성균을 촉발시켜 이를 대체할 항생제 대체제의 개발이 국민 보건차원에서 매우 중요하며 기술적 대안이 반드시 필요. 그러나 기존의 많은 연구에도 불구하고 목표 도달에 이르지 못함
- 다. 현재 AMP와 BTP를 저비용 대량생산할 수 있는 곳은 찾기 어려움. 그러나 최근 본 연구팀이 실험실 수준 대량생산 기술로 개발한 펩타이드 생산기술(PCT 특허출원 KR32016-001940)의 경우 산업화 수준으로 확대 개발할 경우 펩타이드 산업의 획기적 생산 기술이 될 가능성이 매우 높으며, 실험실 수준의 원천기술의 개발이 확보된 상태로, 아이디어 개발단계가 아닌 산업화 대량생산기술화 및 시제품 개발을 목적으로 함
- 라. 가축질병 백신 개발의 병목 중의 하나는 세균독소 단백질 항원 자체의 대량생산을 위한 만족스러운 해결책이 부재하여 항생제 대체제 대량생산 기술개발과 함께 축산/수의분야의 시급한 해결이 필요한 기술임
- 마. 국가적 지원이 이루어질 경우 산업화에 근접한 기술을 바탕으로 국내외 중견기업과의 협력을 통한 기술의 산업화 가능성이 매우 높음
- 바. 동물산업 및 의생명산업 분야에 모두 활용 가능한 플랫폼기술 개발 연구로 기술적용의 다면성이 높음

4. 연구개발의 창의성·혁신성 등

- 가. 항균 펩타이드(AMP)는 차세대 현재의 항생제를 대체할 차세대 물질로 그 가능성을 인정받고 있으며 현재 약 20종에 대한 임상실험이 이루어지고 있으나, 산업화의 가장 큰 문제점은 대량생산방법 및 비용이 산업화 요건을 충족시키지 못하고 있다는 것임(그림 9, 10)[출처, Fox, Jeffrey L, 2013 및 Da Costa, João Pinto 등, 2015]

Product	Description	Indication	Phase	Company (location)
Magainin peptide/ pexiganan acetate	22-amino-acid linear antimicrobial peptide, isolated from the skin of the African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>)	Diabetic foot ulcers	3	Dipexium Pharma (White Plains, New York)/MacroChem/Genaera
Omiganan	Synthetic cationic peptide derived from indolicidin	Rosacea	2	BioWest Therapeutics/Maruho (Vancouver)
OP-145	Synthetic 24-mer peptide derived from LL-37 for binding to lipopolysaccharides or lipoteichoic acid	Chronic bacterial middle-ear infection	2	OctoPlus (Leiden, The Netherlands)
Novexatin	Cyclic cationic peptide, 1,093 daltons	Fungal infections of the toenail	1/2	NovaBiotics (Aberdeen, UK)
Lytixar (LTX-109)	Synthetic, membrane-degrading peptide	Nasally colonized MRSA	1/2	Lytix Biopharma (Oslo)
NVB302	Class B lantibiotic	<i>C. difficile</i>	1	Novacta (Welwyn Garden City, UK)
MU1140	Lantibiotic	Gram-positive bacteria (MRSA, <i>C. difficile</i>)	Preclinical	Oragenics (Tampa, Florida)
Arenicin	21 amino acids; rich in arginine and hydrophobic amino acids	Multiresistant Gram-positive bacteria	Preclinical	Adenium Biotech Copenhagen
Avidocin and purocin	Modified R-type bacteriocins from <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Narrow spectrum antibiotic for human health and food safety	Preclinical	AvidBiotics (S. San Francisco, California)
IMX924	Synthetic 5-amino-acid peptide innate defense regulator	Gram-negative and Gram-positive bacteria (improves survival and reduces tissue damage)	Preclinical	Iminex (Coquitlam, British Columbia, Canada)

그림 9. 임상 시험 단계에 있는 항균 펩타이드 목록.(Fox, Jeffrey L, 2013)

Table 2 Peptide therapeutics biologically prepared

Company	Generic name	Trade name	Preparation/expression	Ref.
Dyax Cop.	Ecallantide	Kalbitor®	Yeast	Lehmann (2008)
Canyon Pharmaceuticals	Desirudin	Iprivask®	Yeast	Roy (2000)
-	Cecropin	-	Cell-free	Martemyanov et al. (2001)
-	Multiple peptides	-	<i>Leishmania tarentolae</i>	Mureev et al. (2009)
Elli Lily Co.	Teriparatide	Forteo®	<i>E. coli</i>	Chung and Wei (2001)
-	LHP7	-	<i>Pichia pastoris</i>	Xi et al. (2013)

®Commercially available

그림 10. 생물학적 합성을 통해 생산되는 펩타이드 기반 치료제 목록.(Da Costa, João Pinto 등, 2015)

- 나. 본 연구팀은 2008년에 유용 항균 펩타이드 발굴연구를 시작(ARPC 과제)으로 9년간 관련 연구를 진행하였으며 본 연구진의 자체아이디어를 통하여 항균 펩타이드 대량생산 원천기술을 개발하여 Scientific Report(IF 5.23, 2016년)에 게재 및 PCT 출원(KR32016-001940)을 완료
- 다. 본 기술은 기개발된 AMP 생산기술의 문제점인 고비용, 고분자량 펩타이드의 생산불가 등을 극복한 최초의 산업화 전단계 기술임

표 2. 순도 95%, 25개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 15mg 합성 시 생산 단가 비교.

화학합성	본 연구실 PCT 출원 기술	개발 예정 산업생산 플랫폼기술
₩600,000	₩24,200	₩4,910

- 라. 병원균에서 생성되는 독성펩타이드(단백질)의 대량생산은 질병예방 백신개발에 있어 핵심 필요사항이나 화학합성이외의 대안이 없어 전통백신개발을 뛰어넘는 첨단백신기술의 개발이 지연되고 있는 중요 원인으로 이에 대한 해결책의 제시가 가능함

- 마. 본 과제에서 제안하는 내용은 본 연구진에서 PCT 특허를 출원하였던 기존기술과 비교시 AMP 또는 BTP 생산효율을 10배 이상 증대시키는 기술의 개발로써 산업적 차원에서 혁신적인 내용임
- 바. 개발된 기술은 본 연구의 참여업체 뿐만이 아니라 국내외의 다양한 제약회사 및 백신생산 업체에서 사용될 수 있는 핵심원천 기술로 판단되며 본 연구추진 기간 중 본 과제 참여산업체와는 별도로 중견계약과 MOU를 도출할 계획을 가지고 있음
- 사. 본 연구에는 본 연구진에서 최근 자체 개발하여 특허를 출원한 지금까지 개발된 항균 펩타이드 중 가장 강력한 항미생물 활성과 매우 낮은 포유동물 세포독성을 가지는 3종의 항균 펩타이드의 활용을 포함하고 있음(표 3 참조)

표 3. 국내 및 PCT 특허출원 3종 비단백 유래의 항균 펩타이드의 최소 억제 농도와 기존 항생제와의 효능 비교.

Peptides / Antibiotics	Minimal inhibitory concentration (MIC, $\mu\text{g/ml}$)			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Pb-CATH 1	2	3	1.5	> 128
Pb-CATH 3	3	8	2	> 128
Pb-CATH 4	1	3	0.5	> 128
Ampicillin	4	>128	>256	0.5
Azlocillin	16	8		0.5
Cephalothin	8	>128		0.25
Kanamycin	2	>64		2
Oxacillin	>128	>128		0.25
Streptomycin	8	32	>1,024	-
Vancomycin	>64	>64		1

제2장. 연구수행 내용 및 결과

제1절. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 주관기관(제1세부)

가. AMP 및 BTP의 대량생산 핵심 플랫폼 구축

(1) AMP 및 BTP 활용 산업화 후보 물질의 선정

(가) 선행 연구를 통해 기확보된 AMP들의 생화학적 특성분석을 위해 생물 정보학 및 AMP 데이터베이스를 이용하여 in silico 분석을 수행(표 4 참조)

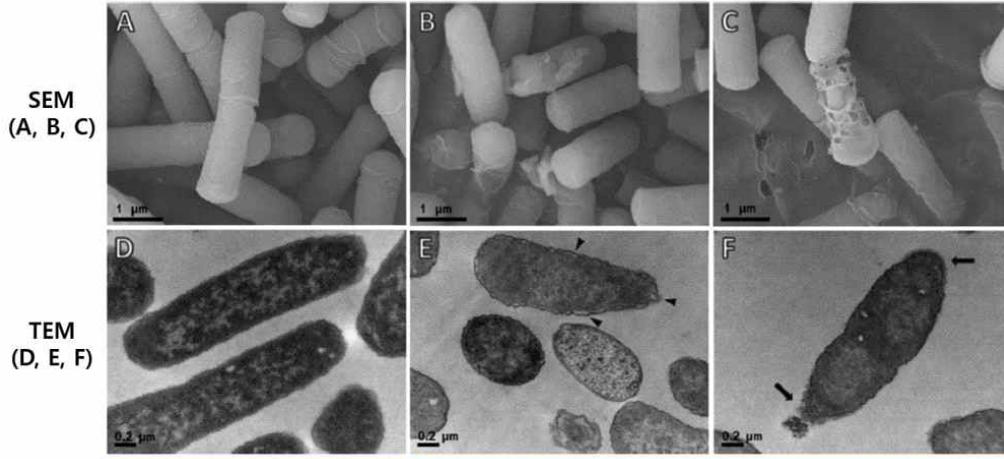
- ① 후보 AMP 5종 뱀 유래의 Pb-CATH4, 돼지 유래의 PG1, PMAP36, PR26, 개구리 유래의 Buforin II
- ② 후보 AMP들의 고유특성(펩타이드 구조, 항균활성, 작용기전) In silico 분석을 위한 생물 정보학 및 AMP 데이터베이스의 이용
 - ㉞ NCBI : 정확한 유전자 및 아미노산 서열 확보
 - ㉟ ProtParam : 알짜 전하(net charge) 및 분자량 예측
 - ㊱ PSIPRED : AMP 항균 활성에 중요한 영향을 미치는 펩타이드 2차 구조 예측
 - ㊲ APD3 및 DBAASP : 후보 AMP들의 항균 활성 및 작용기전 비교

표 4. 선행 연구를 통해 확보된 AMP 후보물질 5종의 특성분석 결과.

AMPs	PG1	PR26	PMAP36	Pb-CATH4	Buforin II
Source organism	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Python bivittatus</i>	<i>Bufo bufo gargarizans</i>
Amino acid sequence	RGGRLCYCRRR FCVCVGRG	RRRPRPPYLPRP RPPFFPPRLPP RI	GRFRRLRKKTR KRLKKIGKVLK WIPPIVGSIPLGC G	TRSRWRRFIRG AGRFARRYGW RIA	TRSSRAGLQFPV GRVHLLLRK
Length	19	26	36	24	21
Net charge	Cationic(+6)	Cationic(+8)	Cationic(+13)	Cationic(+9)	Cationic(+6)
Secondary structure	beta-sheet	Polyproline II helix	α lpha-helix	alpha-helix	alpha-helix
Mechanism (target)	Bacterial membrane	Intracellular molecule	Bacterial membrane	Bacterial membrane	Intracellular molecule

(나) 전자현미경을 이용한 후보 AMP의 항균 활성 기전에 대한 실험적 분석(그림 11 참조)

- ① Pb-CATH4를 제외한 4종의 후보 AMP들의 경우 기존에 연구가 다소 진행된 펩타이드로 다양한 데이터베이스를 통한 *in silico* 분석을 수행하여 생화학적 특성을 규명
- ② Pb-CATH4의 경우 선행연구를 통해 구축한 신규 AMP 발굴 파이프라인을 통해 자체 발굴한 신규 AMP로, 항균 기전에 대한 실험적 증명을 위해 전자현미경을 이용하여 분석을 수행하였고, 박테리아 세포막에 구멍(pore)을 형성하여 세포를 사멸함을 증명



< 펩타이드를 처리하지 않은 대장균 > < 강한 항균 활성을 보이는 Pb-CATH4 처리 후 2시간 동안 배양한 대장균 >

그림 11. 주사 전자현미경(scanning electron microscope, SEM) 및 투과 전자현미경(transmission electron microscope, TEM)을 이용한 Pb-CATH4의 작용 기전 연구

(다) 산업화 후보물질 BTP 선정

- ① 생산성에 영향을 주는 돼지의 주요 질병 중 하나인 부종병 유발 독소이드(toxoid) Shiga toxin 2e(Stx 2e)의 경우 대장균에서 대량 발현의 어려움이 있음
- ② Stx 2e의 경우 subunit A와 B로 구성되며, 큰 분자량을 가진 subunit A에 친화력(binding affinity)를 가지는 도메인에 5개의 subunit B가 다량체(pentamer)를 형성하므로 이와 관련하여 구조 분석을 수행(그림 12 참조)

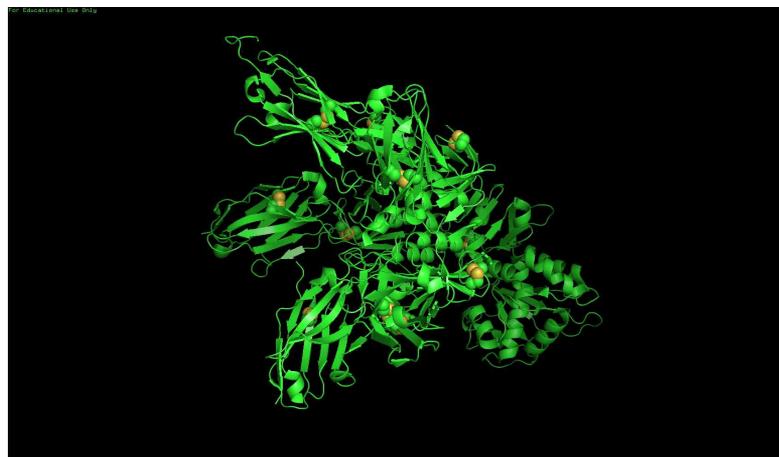


그림 13. 돼지 부종병 원인 독소이드 Stx 2e 단백질의 구조 분석.

- ③ 산업화 후보물질 BTP로 부중병 백신의 에피토프(epitope)인 Stx 2e subunit A와 B를 선정하고, 제1협동으로부터 Stx2e+ *E. coli*를 제공받아 생산시스템 구축 연구를 수행
- ④ Stx 2e subunit B 생산 및 협동과제 제공(총 25mg)

(2) 후보 AMP 및 BTP에 대한 유전자 클론 확보

- ① AMP 5종 및 BTP 2종에 대한 아미노산 서열 확보 및 codon optimization
 - ㉠ NCBI를 통해 후보 AMP 및 BTP에 대한 아미노산 서열 확보(그림 13(B)), SignalP를 이용한 유전자 구조 및 PDB 데이터베이스를 이용한 단백질 구조 분석(그림 12 참조)
 - ㉡ GenScript의 codon optimization 시스템을 이용하여 다음 단계 클로닝을 위한 최적의 유전자 염기서열 확보(그림 13(A) 참조)



그림 14. 확보된 후보 AMP 및 BTP 서열 및 클로닝.(A) 돼지 AMP PG-1,(B) Stx 2e subunit A 유전자 및(C) 클론 정보.

- ② 후보 유전자들에 대한 subcloning 및 발현용 숙주세포 형질전환 완료
 - ㉠ 제1협동으로부터 제공받은 construct를 이용하고자 하였으나 숙주 세포 독성으로 인해 PCR 증폭이 어려워 BTP 발현 박테리아 genomic DNA로부터 PCR 기법을 이용하여 BTP 유전자 증폭
 - ㉡ 발현 벡터를 위한 프라이머 디자인, assembly PCR 및 overlap PCR, 제한효소를 이용한 AMP 클로닝(그림 13(A) 참조)
 - ㉢ 확보한 발현 벡터 subcloning을 위해 DH5 α 를 사용, 생산 및 발현을 위해 BL21(DE3)를 사용
 - ㉣ 염기서열분석(Sequencing)을 통해 발현용 클론의 돌연변이(mutation) 미발생 확인(그림 14 참조) 결과, Stx 2e subunit A 유전자의 경우 돌연변이가 발생하여 추가적인 클로닝 작업을 수행

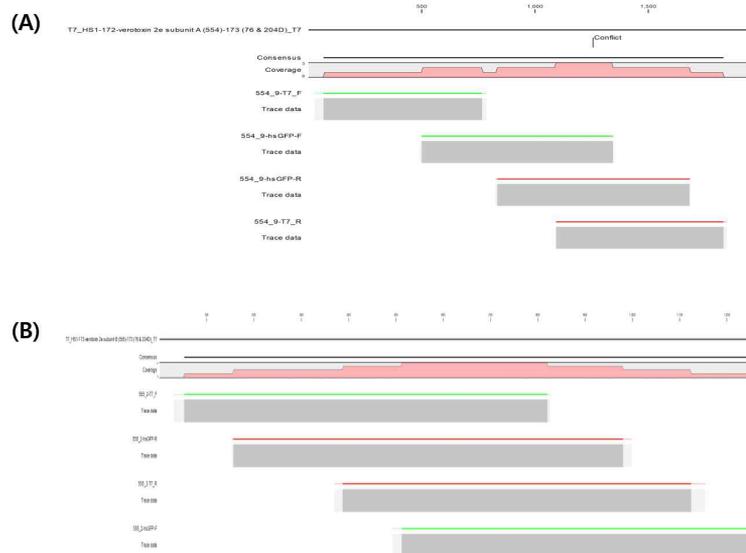


그림 14. 후보 BTP Stx 2e subunit A와 B 생산용 클론 확보. 확보한 클론(A; stx subunit A, B; subunit B)의 염기서열분석 결과.

(3) AMP 대량 생산용 발현벡터 시스템 개발(5종 이상)

(가) 엔지니어링한 녹색형광단백질 루프구조를 활용한 AMP 대량 생산용 발현벡터의 구축

- ① 대장균 발현 시스템을 이용하기 위해 AMP 자체의 숙주세포 독성 (bactericidal effect) 및 펩타이드분해를 막기 위한 대량 생산용 벡터의 구축
- ② 대장균을 이용한 AMP 대량 생산 시스템 정립을 위해 엔지니어링한 녹색형광단백질 루프 지역에 AMP가 위치하도록 클로닝
- ③ 정제 과정의 단순화, 저비용 생산 및 안전성 증진을 위해 기존 대량 생산용 벡터를 기반으로 새로운 생산용 벡터를 개발
- ④ 기존의 construct의 경우 녹색형광단백질과의 융합단백질 형태로 발현된 AMP를 분리할 때 시안화브롬(CNBr) 처리가 필요
- ⑤ 시안화브롬은 위험한 물질로 안정성 증진 및 정제 과정의 단순화, 저비용 생산을 위해 녹색형광단백질을 엔지니어링하여 새로운 생산용 벡터를 개발(그림 15 참조)

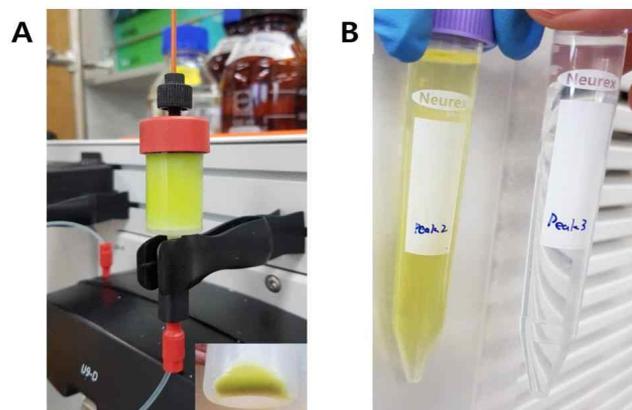


그림 15. 새로 개발한 AMP 생산용 녹색형광단백질의 발현(A) 및 Ni-NTA 크로마토그래피 정제 결과(B)

- ⑥ 확보된 모든 construct는 염기서열 분석을 통해 돌연변이 발생 여부를 확인
- ⑦ 후보 AMP 5종에 대한 대량 생산용 클론 확보 완료

(4) BTP 대량 생산을 위한 발현시스템 개발(AMP 포함 7종 이상)

(가) 산업화 후보 BTP Stx 2e subunit A와 B의 숙주 세포 독성을 극복하기 위한 대량 발현시스템 개발

- ① BTP Stx 2e subunit A와 B의 경우 발현을 위한 대장균 시스템을 이용할 경우 숙주 세포에 대한 독성을 확인
- ② 클로닝 기법을 통해 엔지니어링한 녹색형광단백질의 루프지역에 각각 BTP Stx 2e subunit A와 B 삽입한 클론을 확보
- ③ Stx 2e subunit B에 대한 발현량 극대화를 위한 발현 조건 및 생산량 극대화를 위한 생산 공정 최적화 완료
 - ㉠ 발현량 극대화를 위한 발현 조건 최적화 : OD600 0.8~1.0 사이 100mM IPTG를 이용하여 발현 유도 후 5시간 배양하여 발현량 확보
 - ㉡ Ni-NTA 크로마토그래피 후 녹색형광단백질로부터 BTP 분리 조건의 최적화 : 90mM HCl 첨가 후 90°C 에서 4시간 처리
 - ㉢ 최종 정제 후 Stx 2e subunit B 내에 disulfide bond 형성을 위해 기존의 refolding 방법을 적용한 결과, 약 15% 정도의 refolding rate를 보임
 - ㉣ Refolding rate를 높이기 위해 단계적 refolding 과정을 도입하여 약 30% 정도 수준으로 향상

(5) 생산효율 최대화를 위한 배양조건의 확립 및 기술개발

(가) AMP 생산용 신규 벡터 개발

- ① 정제 시간 및 비용 절감을 위해 새로 개발한 벡터는 고도의 엔지니어링 기법을 적용해 기존의 녹색형광단백질보다 높은 안정성을 가지도록 유도하여 발현이 육안으로 확인 가능하도록 함(그림 15 참조)

(나) 생산효율 최대화를 위한 배양조건의 확립 및 기술개발

- ① 최대 발현량을 위한 배양 조건 최적화 : OD600 0.8~1.0 사이 100mM IPTG를 이용하여 발현 유도 후 5시간 배양하여 발현량 확보
- ② Luria-Bertani (LB)를 시험배지로 선택하여 발효조 (Bioreactor) 대량생산 기술 개발을 시작
- ③ Ni-NTA 크로마토그래피 후 녹색형광단백질로부터 AMP 분리 조건의 최적화 : 90mM HCl 첨가 후 90°C 에서 4시간 처리
- ④ 후보 AMP 중 하나인 PG1의 경우 disulfide bond 형성 과정을 추가
- ⑤ AMP 기반 고스트 백신 개발 연구를 위해 PMAP36 10mg을 생산하여 협동과제에 제공
- ⑥ BTP subunit B의 경우 AMP와는 달리 분자량이 큰 단백질로 disulfide bond 형성을 위해 단계적 refolding 과정을 도입
- ⑦ 백신 개발을 위해 현재까지 생산된 BTP Stx 2e subunit B 25mg을 협동과제에 제공

(6) 생산효율 최대화를 위한 AMP 및 BTP 대량 정제 시스템의 단순화 및 비용축소기술 개발
: Ni-NTA 또는 cation exchange 칼럼 기반 기술개발

(가) 생산효율 최대화를 위한 AMP 및 BTP 대량 정제 시스템의 구축

- ① 불용성 단백질로써 발현된 AMP와 녹색형광단백질 융합단백질을 대장균의 응집체 (inclusion body)로부터 분리기술을 협동과제에 제공
- ② 제2협동으로부터 제공받은 대량 발현된 융합단백질을 이용하여 제품 개발을 위한 대량 생산 시스템 구축 연구 수행 시작

(나) AMP 및 BTP 대량 정제 시스템의 단순화 및 비용축소를 위한 Ni-NTA 또는 cation exchange 칼럼 기반 기술개발

- ① 대형칼럼 사용 정제 시스템 정립 시 칼럼 용량에 따른 샘플 볼륨 증가 문제를 극복하기 위하여 FPLC의 V9 valve 시스템 도입
- ② AMP 최종 정제 과정에 Ni-NTA 칼럼을 이용할 경우 주로 작은 분자량과 양전하를 띠는 AMP가 칼럼과의 상호작용하여 버퍼 조성 및 농도의 변화를 통해 칼럼으로부터 분리가 가능하도록 최적화 연구 수행
- ③ AMP와는 달리 분자량이 큰 BTP의 경우 His-trap 칼럼과의 상호작용이 적을 것으로 판단되어 최종 정제 과정을 HPLC나 gel filtration 대신 Ni-NTA 크로마토그래피를 적용함으로써 생산 비용, 소요 시간, 정제 과정의 간소화가 가능하도록 함

나. 산업화 후보 펩타이드의 특성 규명 및 제품 설계

(1) 산업화 후보 펩타이드의 생화학적 특성분석(in silico)

(가) 산업화 후보 5종 및 신규 후보 물질 2종 (Pb-CATH1, Pb-CATH3)의 고유 특성 (펩타이드 구조, 기능, 작용 기전 등)의 in silico 및 in vivo 분석을 실시 (표 4, 5 참조)

(나) 고유특성 연구를 위해 NCBI, PSIPRED, APD3, AMPA, HeliCast, SignalP, HMMER와 같은 다양한 데이터베이스들을 활용한 in silico 분석

표 5. 후보 AMP들의 생화학적 특성 분석 결과

Peptides	Sequences	Length	<H> ^a	Z ^b (+)	Similarity (%) ^c
Pb-CATH1	RVKRFKKFFRKIKKGFVKIFKTKIFIG	28	36	15	48.6
Pb-CATH3	HRVKRNGFRKFMRRLLKFFAGG	22	36	9	38.5
Pb-CATH4	TRSRWRRFIRGAGRFARRYGWRIA	24	40	9	37.9

<H> ^a, hydrophobicity.

Z ^b, the charge.

^c similarity to known AMPs.

(2) 효능 및 독성평가를 위한 미생물 및 포유동물 세포 패널의 구축

(가) 효능 평가를 위한 미생물 패널의 확보

- ① 그람 음성균 3종 확보 : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
- ② 그람 양성균 3종 확보 : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Streptococcus iniae* KCTC 3657

(나) 독성 평가를 위한 미생물 패널의 확보

- ① 돼지 유래 세포 3종 확보 : PK15 (pig kidney cells), ST ATCC CRL-1746 (pig testis fibroblast), 3D4/2 (pig lung macrophage)
- ② 사람 유래 세포 2종 확보 : HEK293T (human embryonic kidney cells), HaCaT (human keratinocytes)

(3) 후보 AMP의 효능, 세포 독성평가 및 혈청 내에서의 안정성 평가

(가) 후보 AMP 효능 검증을 위한 미생물별 실험 조건 최적화

- ① 정확한 항균 활성 검증을 위해 미생물 각각에 대한 성장 속도의 차이를 최우선적으로 확인한 뒤 미생물 별로 실험에 사용되는 조건을 선정
- ② *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*의 경우 일반적으로 사용되는 배지에서 잘 성장하므로 실험과정의 단순화를 위해 colorimetry 방법을 이용하여 최소 억제 농도 (MIC)를 규명
- ③ *Streptococcus iniae*의 경우 일반적인 배지의 사용이 어려운 박테리아로 disk diffusion 방법을 이용
- ㉠ Muller-Hinton broth(MHB), Cation adjusted Muller-Hinton broth(CAMHB), brain heart infusion broth(BHIB)의 배지를 이용하여 최소 억제 농도 규명에 최적화된 배지 선정
- ㉡ MHB를 이용한 MIC assay 수행

(나) 미생물 패널에 대한 후보 AMP의 항균 활성 및 작용기전 검증

- ① 확보된 6종의 미생물에 대한 후보 AMP 3종의 항균 활성 검증 (표 6 참조)
- ② 대조군(control)으로 항생제 앰피실린(ampicilin)과 겐타마이신(gentamycin)을 사용
- ③ 후보 AMP들 모두 항생제와 유사한 항균 활성을 보였으며, 분자량을 고려할 때 그 항균 활성이 더 뛰어난 것을 확인
- ④ 후보 AMP 3종에 대한 혈청 내 안정성(serum stability) 연구 수행 결정
- ⑤ Pb-CATH4의 경우 검증에 사용된 박테리아 패널 중 *S. aureus* ATCC 29213를 제외한 모든 박테리아에 가장 강한 활성을 가지므로 추가적인 세포 독성 및 용혈성 연구를 수행
- ⑥ 전자현미경을 이용한 후보 AMP의 작용기전 검증 : AMP의 대표적인 특징으로, 박테리아의 세포막과 상호작용하여 구멍(pore)을 만들어 사멸시키는 기전을 전자현미경을 통해 확인(그림 11 참조)

표 6. 확보된 박테리아 패널에 대한 후보 AMP의 항균 활성 확인 결과

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	Pb-CATH1	Pb-CATH3	Pb-CATH4	Ampicilin ^a	Gentamycin ^a
Gram-Negative Bacteria					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2	3	1	1	1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3	8	3	> 128	1
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	1.5	2	0.5	1	1
Gram-Positive Bacteria					
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 128	> 128	> 128	1	1
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	46	32	10	16	1
<i>S. iniae</i> KCTC 3657	>64	>64	10	1	1

^a Antibiotics for control

(다) 후보 AMP 세포 독성 검증을 위한 세포 별 실험 조건 최적화

- ① 확보된 5종의 포유동물 세포들의 성장 속도에 따라 각각 세포 독성 평가에 사용되는 세포 수를 최적화(표 7 참조)
- ② 독성 평가에 사용되는 세포 수를 포함한 다양한 조건들에 대한 최적화 완료

표 7. 세포 독성 검증을 위해 최적화한 세포별

Origin	Cell	Optimized cell number for cytotoxicity
Pig	PK15 (pig kidney cells)	1 X 10 ⁴
	ST ATCC CRL-1746 (pig testis fibroblast)	4 X 10 ⁴
	3D4/2 (pig lung macrophage)	4 X 10 ⁴
Human	HEK293T (human embryonic kidney cells)	4 X 10 ⁴
	HaCaT (human keratinocytes)	2 X 10 ⁴

(라) 세포 패널에 대한 후보 AMP의 세포 독성

- ① 확보된 포유동물 세포들에 대한 후보 AMP의 세포 독성 검증(그림 16 참조)

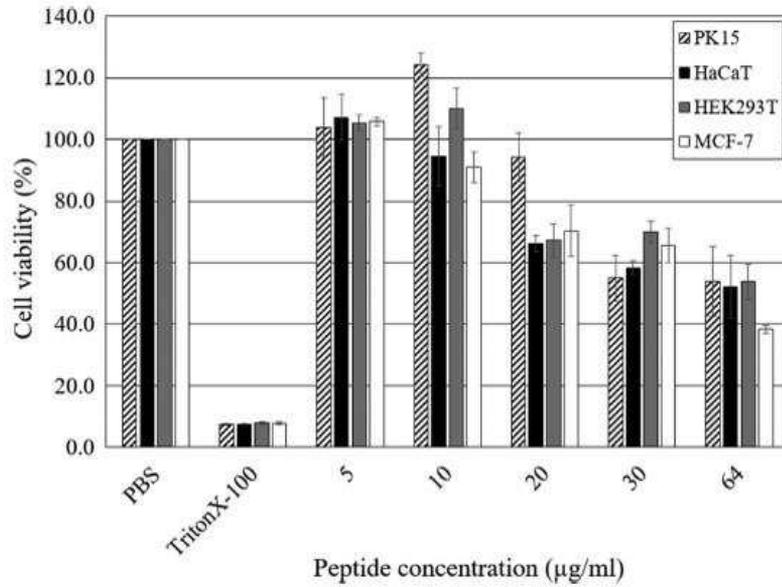


그림 16. 4종의 포유동물 세포에 대한 비단백구령이 유래 Pb-CATH4의 독성 평가.

(마) 후보 AMP의 혈액세포에 대한 용혈성 검증

- ① 세포 독성 평가에 한 종류로 용혈성 평가를 위해 닭 혈액세포를 이용
- ② 세포 독성이 높은 것으로 알려진 Melitin을 대조군(control)으로 선정 후 실험 수행
- ③ 후보 AMP의 낮은 용혈성 반응을 검증 완료(표 8 참조)

표 8. 국내 특허 및 PCT 출원 비단백구령이에서 발굴한 AMP(Pb-CATHs)의 용혈성 확인 결과

Concentration (µg/ml)	Hemolytic rate ±SD (%)			
	Pb-CATH1	Pb-CATH3	Pb-CATH4	Melitin
4	0	0	0	13±1.1
8	1.4±0.4	0	1.2±0.3	71.3±5.2
16	5.1±0.5	1.7±0.5	3.2±0.4	110.3±1.5
32	7.3±0.6	3.1±0.5	6.5±0.4	114.7±1.7
64	12.2±0.7	4.0±0.2	10.7±0.2	113.4±0.2

Note : hemolytic activity was measured in triplicate.

(바) 후보 AMP의 혈청 내 안정성(serum stability) 검증

- ① 후보 AMP들의 혈청 내 안정성 검증을 위해 fetal bovine serum (FBS)와 AMP를 1:1 부피로 혼합한 뒤 시간별로 항균 활성 변화를 확인
- ② Pb-CATH4는 혈청 내에서 안정적임을 확인(그림 17 참조)

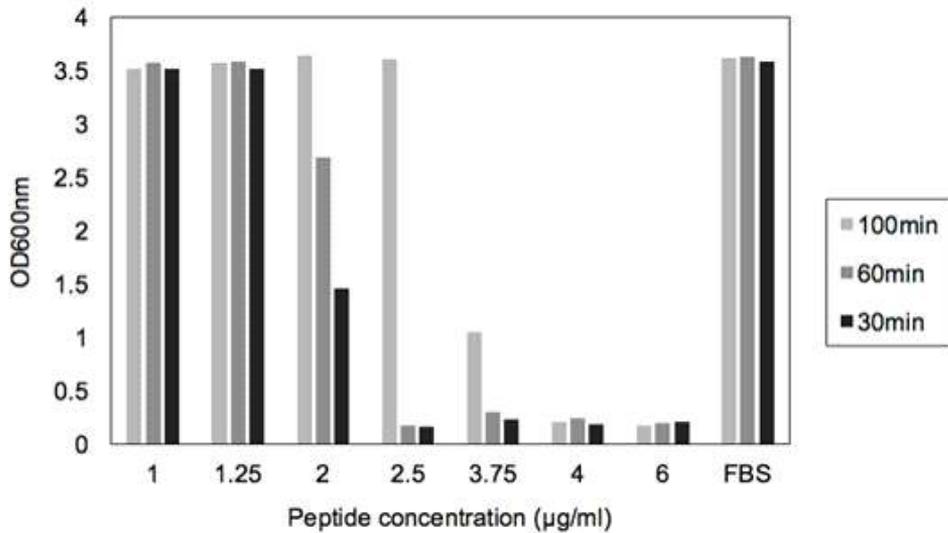


그림 17. 비단뱀구렁이 유래 Pb-CATH4의 혈청 내 안정성 평가

(4) AMP 및 BTP의 혼합 백신 후보 물질로써의 효과 검정

(가) 선정된 후보 AMP 5종의 정보를 제1협동에 제공(표 9 참조)

표 9. 백신 개발 고스트화 연구를 위해 제1협동에 제공된 AMP 정보

Peptide	Amino acid sequence	Length (amino acid)	Molecular weight (Da)
PG-1	RGGRLCYCRRRFCVCGVGRG	19	2316.8
PR-26	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRI	26	3229.9
PMAP-36	GRFRRLRKKTRKRLKIGKVLKWIPPIVGSIPLGCG	36	4157.2
Buforin II	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	21	2434.9
Pb-CATH4	TRSRWRRFIRGAGRFARRYGWRIA	24	3052.6

다. 제품화 가능한 신규 펩타이드 물질의 발굴

(1) 주요 가축질병유발 세균 중 대량생산이 어려운 BTP 신규 타겟의 발굴

(가) 산업화 후보물질 BTP로 흉막 폐렴 관련 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의해 산생되는 BTP를 추가 선정

(나) 후보 물질 연구를 위해 필수적인 대량 생산 시 소요되는 시간이 장기적인 것을 고려하여 흉막 폐렴 관련 BTP의 경우 제1협동 기관에서 발현 및 생산과 관련된 연구를 진행

2. 협동기관(제1협동)

가. 세균 고스트 유도에 최적화 AMP 선별

(1) 주관연구기관과의 협력연구를 통하여 백신개발 목적세균의 고스트화 유도에 특화된 AMP 선별

(가) PG1, PMAP36, GI24, Buforin II 등으로 돼지 부종병 관련 F18+ Stx2e+ *E. coli* 고스트 유도 하여 본 결과 PMAP36이나 GI24가 최적의 AMP임을 확인

(나) PG-1, PAMP-36, GI24, PR26, buforin II 등으로 돼지 흉막 폐렴 관련 *Actibacillus pleuropneumoniae* (APP) 1형, 2형과 5형 고스트 유도하여 본 결과 PMAP36이나 GI24가 최적 조건임을 확인(표 10 참조)

표 10. AMP를 이용한 고스트 백신 개발에 사용된 균주 목록

Strain	Description	Source of reference
<i>A. pleuropneumoniae</i>		
HJL6	<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 isolate from pig	Lab stock
HJL67	<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 2 isolate from pig	Lab stock
HJL263	<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 5 isolate from pig	Lab stock
<i>E. coli</i>		
HIL500	F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> isolate from piglet	

(2) 고스트화 유도액의 배양을 통한 불활화 확인 실험

(가) *E. coli* 및 APP 고스트 유도 후 배양을 통해 불활화 확인 검증 완료

(3) 확정된 균을 대상으로 투사 전자현미경(TEM)을 이용한 고스트화 유도 최종 검정

(가) *E. coli* 및 APP 고스트 유도 후 TEM으로 확인하여 본 결과 세포 성분은 빠져나가고 세포 외형을 그대로 유지한 상태임을 확인(그림 18 참조)

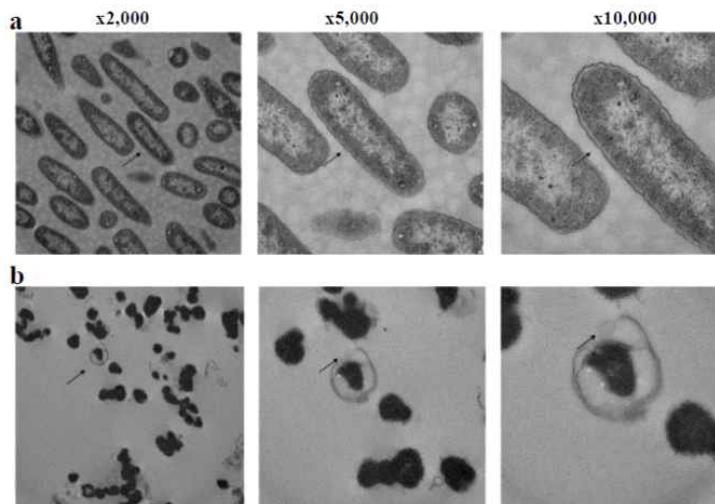


그림 18. GI24로 미처리균과 처리균에 대한 TEM 사진. (a) GI24 미처리 F18+ Stx2e+ *E. coli*, (b) GI24로 반응시킨 F18+ Stx2e+ *E. coli*

나. 실험동물을 이용한 불활화 세균의 안전성

- (1) 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 쥐의 확보
 - (가) BALB/c 마우스를 확보하여 ELISA로 APP IV 항원 또는 Stx2eB 항원으로 ELISA를 수행하여 음성임을 확인 후 실험에 사용
- (2) 실험동물에 대한 근육접종을 통한 고스트 균체 접종에 따른 부작용 및 병원성 발현 여부의 확인
 - (가) APP 1형, 2형과 5형 고스트 혼합 백신 또는 F18+, Stx2e+ *E. coli*를 마우스에 복강 접종 후 식욕감퇴, 발열, 호흡기 발현 여부 확인하여 본 결과 아무런 임상 증상이 관찰되지 않음(표 11 참조)
- (3) 부검 및 이상 징후에 대한 조직검사를 통한 정밀 검사
 - (가) APP 1형, 2형과 5형 고스트 혼합 백신 또는 F18+, Stx2e+ *E. coli*를 BALB/c 마우스에 복강 접종 후 4주째에 부검을 시행하여 폐, 주사 부위, liver, spleen, intestines 등의 이상 유무를 확인하여 본 결과 정상임을 확인

표 11. 고스트 균체 접종에 따른 부작용 및 병원성 발현 여부의 검증을 위한 실험 개요

Group	접종	비고
A	멸균 PBS	
B	APP 1형, 2형, 5형 고스트 혼합 백신	
C	F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 고스트 균체	

다. 돼지에서의 불활화 균체의 안전성 및 효능 평가

- (1) 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 돼지의 확보
 - (가) 임신 8주째 모돈 및 4주령 자돈으로부터 채취된 혈청을 대상으로 Apx IV 또는 Stx2eB 항원에 대한 ELISA를 수행하여 음성인 돼지를 실험에 사용
- (2) 고스트 세균 백신의 근육접종 후 폐사 및 부종병 및 흉막 폐렴 질환 발현 여부 확인 및 이상 징후에 대한 조직학적 소견 검사
 - (가) APP 1형과 2형 그리고 5형 고스트 혼합 백신 또는 F18+, Stx2e+ *E. coli* 고스트 백신을 근육 접종한 후 흉막폐렴 또는 돼지 부종병 발현 여부를 확인하여 본 결과 질병 발생 양상이 관찰되지 않음
- (3) 접종된 돼지 혈청 및 모돈의 경우 초유로부터 항체 역가 측정
 - (가) APP 1형과 2형 그리고 5형 고스트 혼합 백신 또는 F18+, Stx2e+ *E. coli* 고스트 백신을 근육 접종한 후 흉막폐렴 또는 돼지 부종병 발현 여부를 확인하여 본 결과 질병 발생 양상이 관찰되지 않음(그림 19 참조)
- (4) 도전감염 후 부종병 및 흉막폐렴에 대한 방어 효과 여부 검증
 - (가) APP 2형과 5형 고스트 사균 백신을 접종한 후 야외 독성 균주로 도전 감염하여 본 결과 대조군에 비해 효과가 인정되나 완벽한 효과가 인정되지 않음(표 12, 그림 20, 21 참조)

(나) F18+, Stx2e+ *E. coli* 고스트 사균 백신을 접종한 후 야외에서 분리된 F18+, Stx2e+ *E. coli*로 도전 감염하여 본 결과 대조군에 비해 효과가 입증되었으나 완벽한 효과가 입증되지 않음. 즉 독소이드 함유가 필요함이 확인됨(표 12, 그림 22~24 참조)

표 12. 도전감염 후 부종병 및 홍막페렴에 대한 방어 효과 여부 검증을 위한 실험 개요

Group	마리수	접종	도전감염
A	3	-	
B	5	F4+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 고스트균체 + F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 고스트 균체	F4+ Stx2e+ <i>E. coli</i> + F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i>
C	5	APP 1형, 2형, 5형 고스트 혼합 백신	APP 1형, 2형, 5형
D	6	멸균 PBS	F4+ Stx2e+ <i>E. coli</i> + F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i>
E	5	멸균 PBS	APP 1형, 2형, 5형

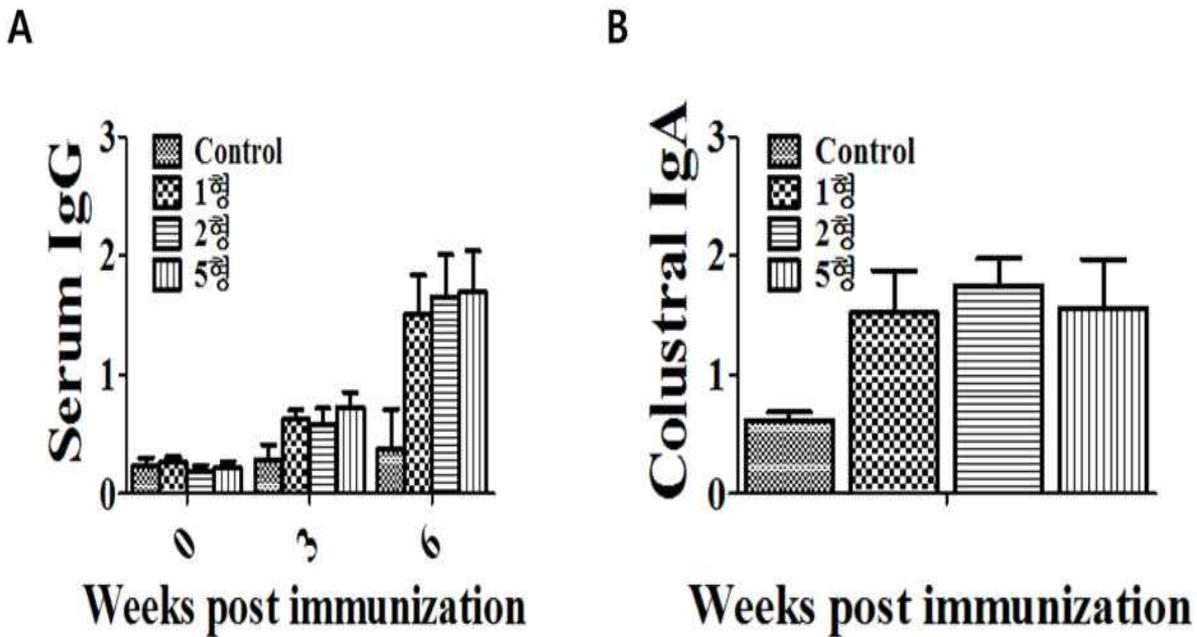


그림 19. 모돈을 대상으로 APP 1형, 2형, 5형 고스트 사균 백신 접종 후 혈청 항체 역가 (A) 및 초유에서의 IgA 항체 역가 (B)

38-4



38-6



38-7



32-5



32-8



그림 20. PBS 접종 후 APP로 도전감염 한 그룹

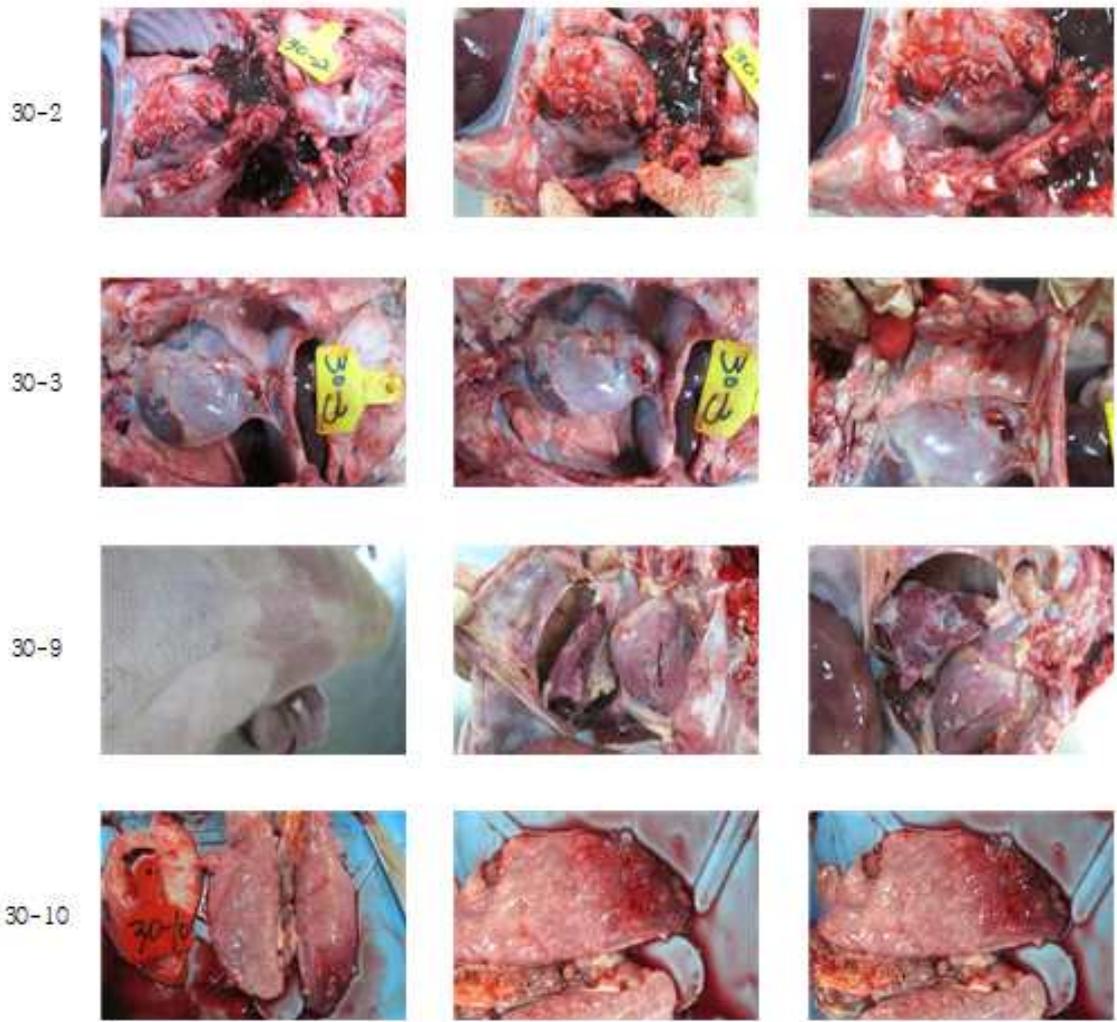


그림 21. APP 1형, 2형, 5형 고스트 사균 백신 접종 후 APP로 도전 감염한 경우

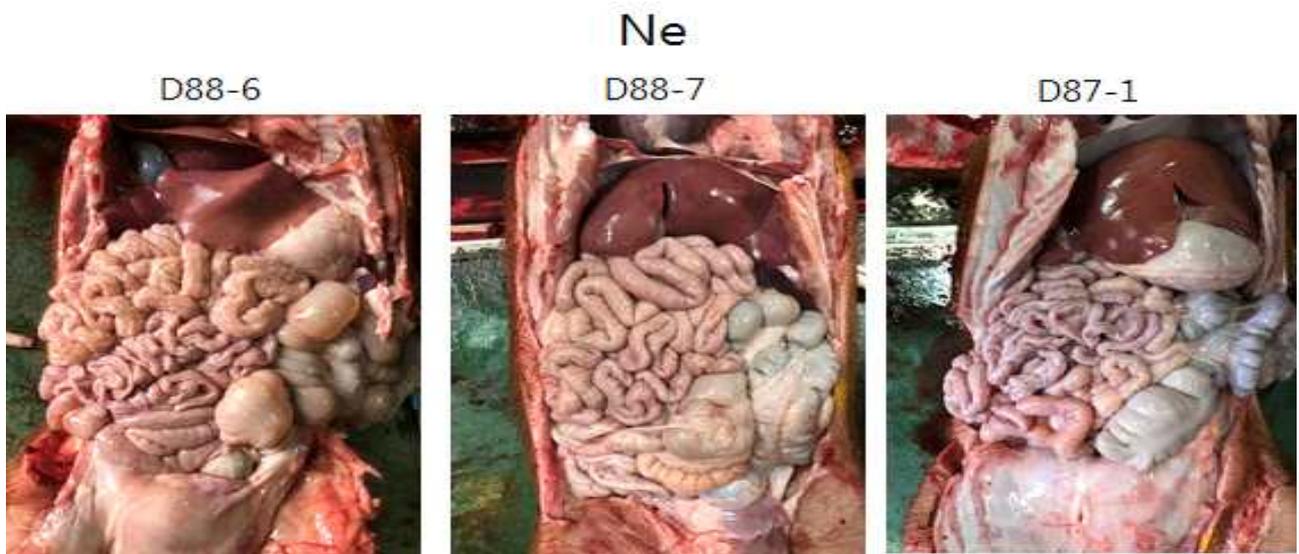


그림 22. 그룹 A (음성 대조군; 백신 및 도전감염을 하지 않은 그룹의 돼지) 부검 결과

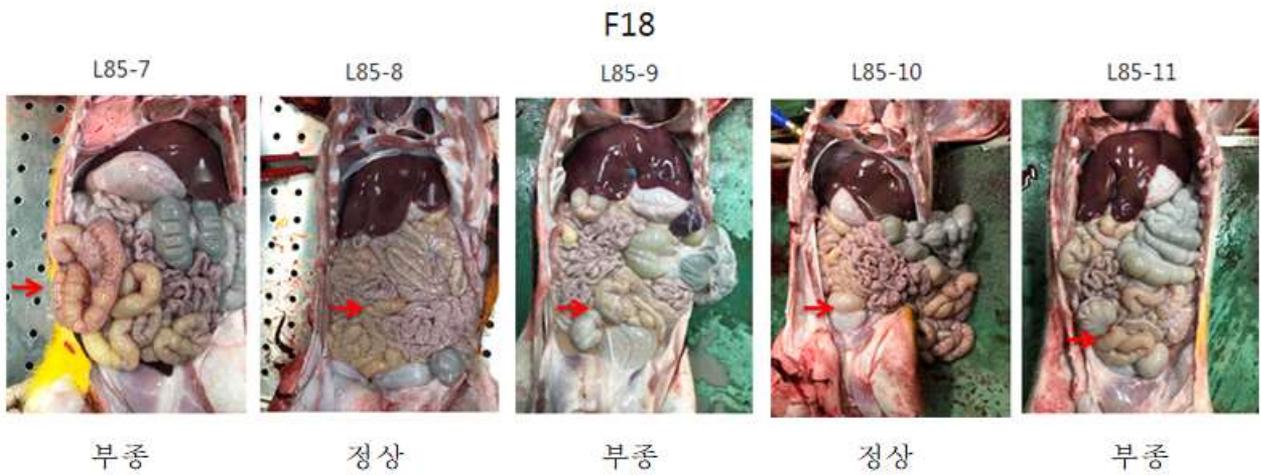


그림 23. 그룹 C 자돈의 부검 사진

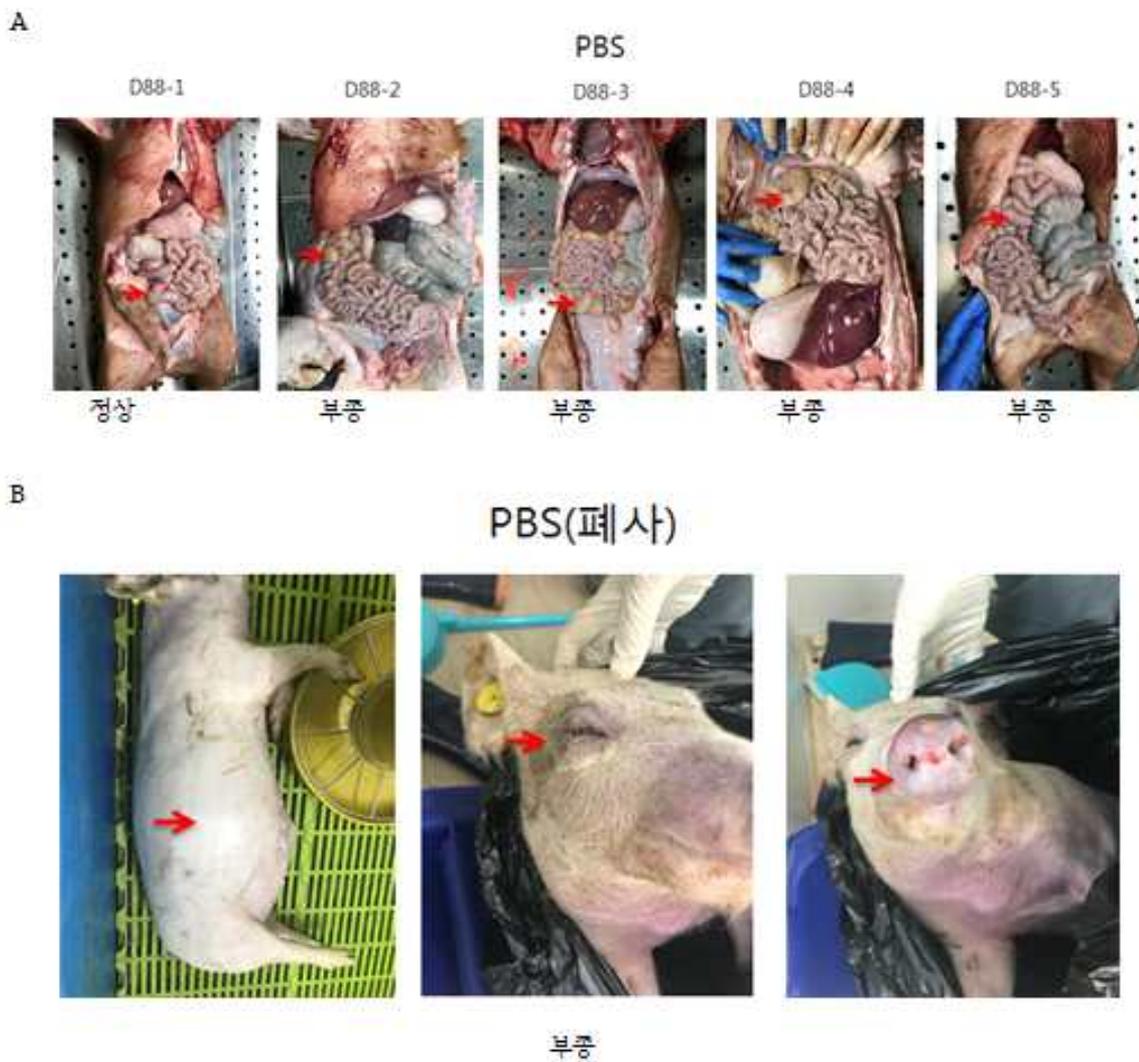


그림 24. 그룹 F 자돈의 부검 (A) 및 폐사 (B) 후 사진

라. 세균의 도전감염 균량 확인

(1) 야외 병독성 균주를 대상으로 다양한 균량 접종 후 폐사 여부 및 부검 후 각 질병 (부종병 및 흉막 폐렴)의 발현 여부를 통한 LD50 균량 결정

(가) APP 1형, 2형, 5형을 각각 5×10^8 , 5×10^9 , 5×10^{10} 이 되게 희석하여 혼합하여 비강으로 접종하여 본 결과 5×10^9 이 LD₅₀ 균량으로 결정

(나) F18+, Stx2e+ *E. coli*를 2×10^9 , 2×10^{10} , 2×10^{11} 이 되게 희석하여 경구로 접종하여 본 결과 2×10^9 이 LD₅₀ 균량으로 결정(그림 25, 26 참조)



그림 25. F18+ Stx2e+ *E. coli* 혼합균주가 2×10^{10} CFU in 10ml 접종한 그룹

도전감염 후 임상증상(눈 붓기)



그림 26. F18+ Stx2e+ *E. coli* 주가 2×10^{11} CFU in 10ml 접종한 그룹 (돼지 라벨 79는 F18+ Stx2e+ *E. coli* 혼합균주가 2×10^{10} CFU in 10ml 접종한 그룹 중 폐사한 자돈)

3. 참여기관(제2협동)

가. 체외에서의 불활화 세균의 안정성시험

- (1) 세균의 고스트 사균체를 동물 백신으로 허가된 면역 보강제와 혼합하여 냉장 보관 등의 방법으로 보관 후 정기적으로 안정성 검사를 수행
 - (가) 고스트 사균체 bulk의 보관 온도별 안정성을 확인하고 최적의 보관 조건 및 유효기간 설정

나. 세균 고스트 유도에 최적화된 AMP 대량 생산

- (1) F18+, Stx2e+ *Escherichia coli*에 최적화된 항균 펩타이드 선별
 - (가) 선별된 AMP 중 생산 조건과 수율 조건을 확인하고 생산량을 증가시켰을 때 가장 효과적으로 *E. coli*의 고스트화를 유도하는 물질을 확인한 결과, PMAP36 또는 GI24가 가장 적합함을 확인
- (2) *Actinobacillus pleuropneumoniae* 혈청형 1형, 2형, 5형을 동시에 고스트 유도가 가능한 항균 펩타이드 선별
 - (가) 선별된 AMP 중 생산 조건과 수율 조건을 확인하고 생산량을 증가시켰을 때 가장 효과적으로 APP 1형, 2형, 5형의 고스트화를 유도하는 물질을 확인한 결과, PMAP36 또는 GI24가 가장 적합함을 확인
- (3) 선별된 AMP에 대한 산업체 수준의 대량 생산 정제 공정의 설계
- (4) 정제된 AMP의 효능 평가 통한 최적의 정제 공정의 선별
 - (가) 정제 효율이 좋고 정제 단계가 적은 방향으로 공정 개선 시도
 - (나) 다양한 종류의 칼럼과 크로마토그래피를 통한 실험실적 확인 우선

제2절. 2차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 주관기관(제1세부)

가. AMP 및 BTP의 대량 생산

- (1) 산업화 수준의 생산기술 및 후보 펩타이드 발현클론을 이용한 대량 생산
 - (가) 후보 물질의 대량 생산을 위한 발효조(Bioreactor) 배양 기술의 확립
 - ① 1차년도 Luria-Bertani (LB)를 시험배지로 선택하여 발효조 (Bioreactor) 대량생산 기술 개발을 시작으로 배지, pH, DO (dissolved oxygen) 농도, 배양 혼합 속도 (agitation) 등 생산량에 영향을 주는 요인들에 대한 최적화 연구 완료
 - ② High cell density 기술의 확립 : Minimal salt, 황산마그네슘 (MgSO₄) 외 코발트 (Co), 망간 (Mn) 등을 포함, 무기물을 첨가한 최소 영양 배지를 기반으로 제한적 글루코스 (glucose) 공급 (feed)을 통해 24시간 동안 배양한 결과 기존 대비 10배 (약 32 OD cells)에 가까운 성장률을 확보(그림 27 참조)

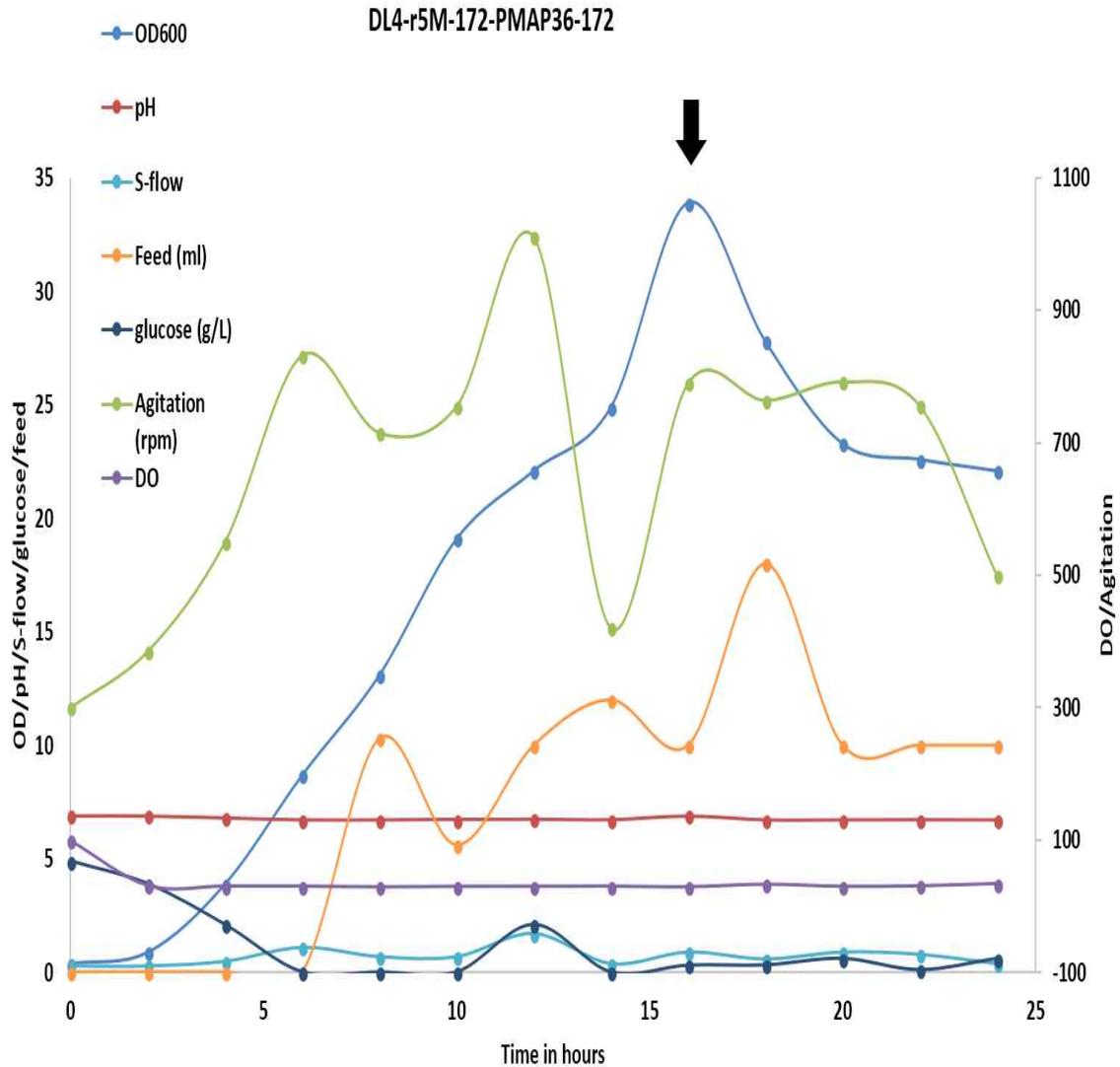


그림 27. 발효조를 이용한 대량 생산 기술개발 결과-1. 최소 영양 배지 1.7L, 배양 온도 (37°C), DO (30%) 및 pH (6.9)를 기반으로 온도 및 pH의 경우 발효조의 자동 시스템에 의해 조절, 박테리아 성장에 대한 DO, S-flow 및 agitation 변수들에 대한 차이를 모니터링한 결과를 통해 DO cascade를 작성하여 시스템의 자동화 확립. 글루코스 제한 급여를 위해 매 2시간 박테리아 성장 정도 및 글루코스 농도를 측정, 발현 유도 (화살표 표시) 후 매시간 배양액 샘플을 수집하여 SDS-PAGE 통해 발현량 확인. 배양 17시간 박테리아는 가장 높은 성장을 보임. OD₆₀₀ 32로 이는 기존 선행 연구결과 대비 10배에 가까운 것으로 high cell density 발현 기법을 확립.

- ③ 발현량이 극대화된 선행 보유 기술의 적용 : 0.1mM IPTG를 첨가하여 발현 유도 후 매 시간 샘플을 수집, SDS-PAGE 수행 결과, 선행 보유 기술과 동일한 발현량 검증 완료 (그림 28 참조)

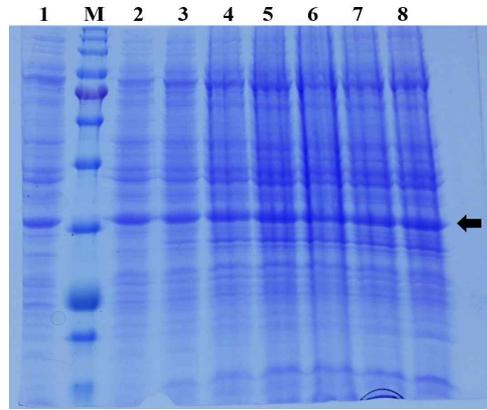


그림 28. 발효조를 이용한 대량 생산 기술개발 결과-2. DL4-r5M-172-PMAP36-173 대량 생산 클론을 발효조를 이용해 발현 유도 후 매시간 샘플을 수집하여 SDS-PAGE를 통해 발현 확인 결과. 기존 선행 연구결과와 동일한 발현량 확보.

(나) 산업화 수준의 대량 생산을 위한 정제 기술 개발

- ① 1차년도 시작된 생산효율 최대화를 위한 AMP 및 BTP 대량정제 시스템의 단순화 및 비용축소기술 개발을 위해 FPLC의 V9 valve 시스템, Ni-NTA Sepharose FF beads 및 16/40 HiScale 대형칼럼을 이용한 정제 시스템 구축 완료(그림 29 참조)

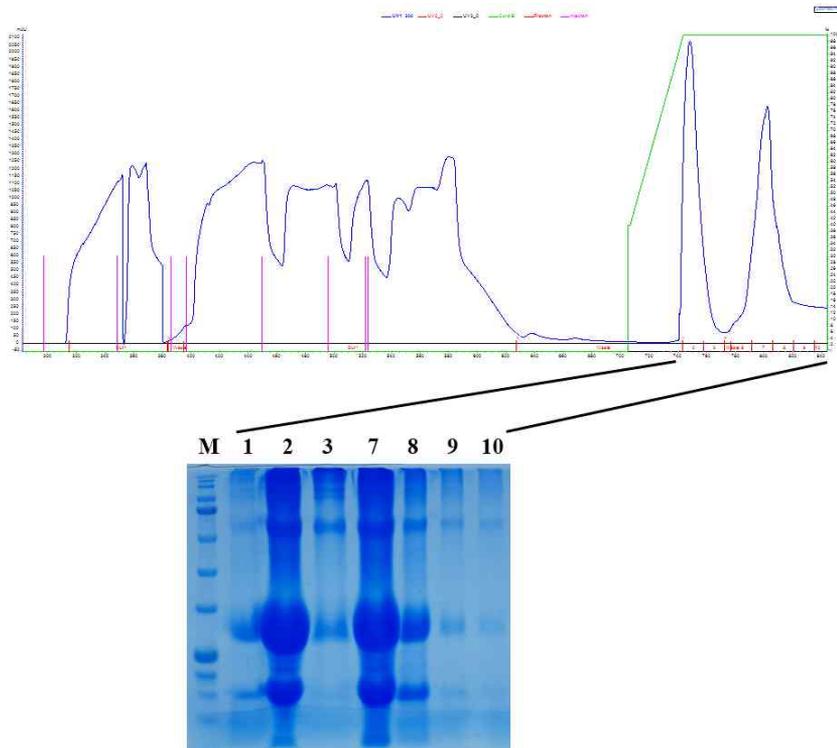


그림 29. FPLC의 V9 valve 시스템, Ni-NTA Sepharose FF beads 및 16/40 HiScale 대형칼럼을 이용한 정제결과. 녹색형광단백질과 융합단백질 형태로 대량 발현한 PMAP36을 대량 정제하기 위해 FPLC의 V9 valve 시스템을 도입, Ni-NTA 대형칼럼 이용 시 문제가 되는 샘플 볼륨 증가 문제를 극복함으로써 정제 과정 소요 시간 및 비용을 단축시킴. (하단 사진) His-tag을 가진 융합단백질은 Ni-NTA 칼럼에 달라붙은 후 500mM imidazole을 통해 elution된 사진으로 숫자는 Fraction number를 의미.

- ② FPLC의 V9 valve 시스템 도입을 통해 Ni-NTA 대형칼럼 이용 시 문제가 되는 샘플 볼륨 증가 문제를 극복하고, AMP 최종 정제 과정에 동일한 Ni-NTA 칼럼의 이용이 가능하도록 버퍼 조성, 사용량 및 농도 최적화 연구 완료(그림 30 참조)

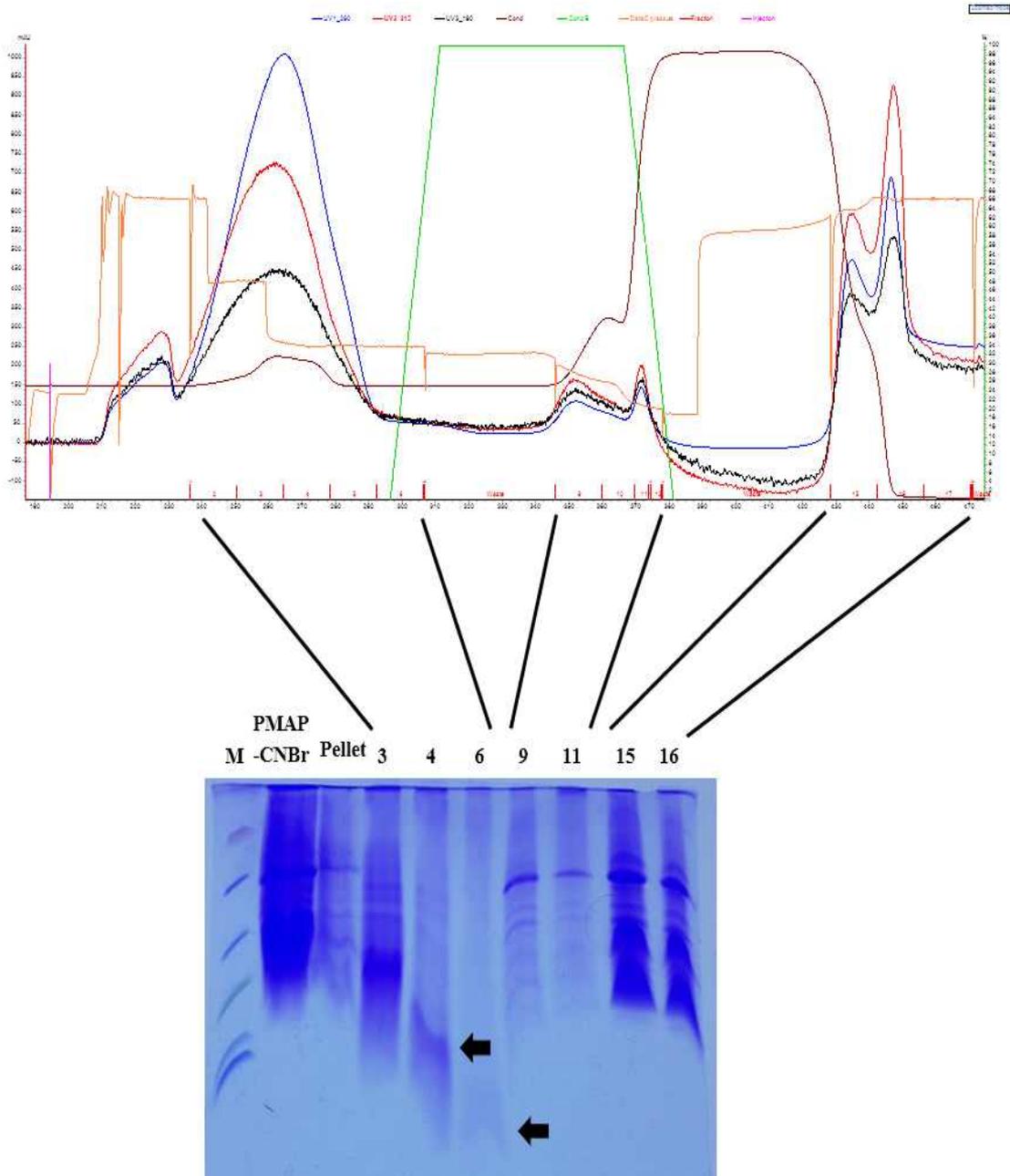


그림 30. 최종 정제 방법으로써 Ni-NTA Sepharose FF beads 및 16/40 HiScale 대형칼럼을 이용한 크로마토그래피 결과. 융합단백질 형태로 발현한 PMAP36은 Ni-NTA Sepharose FF beads를 포함한 16/40 HiScale 대형칼럼을 통한 1차 정제 후 dialysis, lyophilization 및 CNBr cleavage 단계를 거친 뒤 최종 정제되며, HPLC를 이용하던 기존 방식과 달리 Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 최종 정제함으로써 대량 정제 시스템을 구축하는 물론 비용 및 소요 시간을 단축시킴. (하단 사진) CNBr에 의해 융합단백질로부터 분리된 PMAP36은 Ni-NTA 칼럼을 빠져나오나 (화살표), His-tag을 가진 녹색형광단백질 조각들은 Ni-NTA 칼럼에 달라붙은 후 500mM imidazole을 통해 elution됨. 숫자는 Fraction number를 의미하며 1.5M NaCl 버퍼를 이용하여 칼럼 자체에 대한 친화력에 의해 미처 빠져나오지 못한 PMAP36을 정제하는 방법을 도입함.

나. 제품 후보 AMP 및 BTP의 효능평가, 선발 및 제품화

(1) 생산된 AMP의 pH, 염농도에 따른 안정성 및 혈청내 안정성 분석

(가) 후보 AMP의 혈청 내 안정성 분석

- ① 유전체 분석 및 데이터베이스 분석 기술을 이용한 본 연구실 자체 발굴 AMP인 Hg-CATH의 혈청 내 안정성 분석 완료(그림 31 참조)

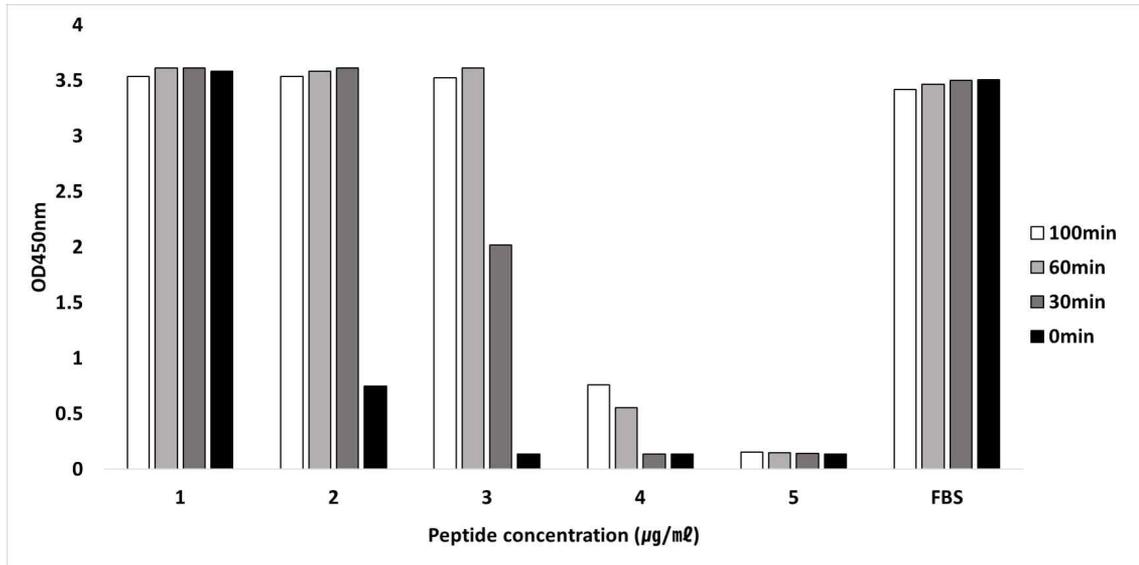


그림 31. 벌거숭이 두더지쥐 유래 Hg-CATH의 혈청 내 안정성 평가 결과. 혈청과 혼합된 Hg-CATH는 각각 0, 30, 60, 100분 동안 incubation 한 후 *E. coli* ATCC 25922에 대한 항균 활성을 확인한 결과로 5µg/ml의 경우 혈청의 영향을 받지 않는 것으로 확인됨.

(2) 생산된 제품후보 펩타이드의 효능 및 독성평가

(가) 생산된 제품후보 펩타이드의 박테리아 세포 패널을 이용한 효능 평가

- ① 박테리아 패널의 변경 및 변경된 박테리아에 대한 항균 활성 검증 방법 최적화
 - ㉠ 1차년도 구축한 박테리아 패널 6종(그람 음성균 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 및 그람 양성균 3종 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Streptococcus iniae* KCTC 3657) 중 *Streptococcus iniae*의 경우 일반적인 배지의 사용이 어려운 박테리아로 disk diffusion 방법을 이용해야 하므로 분자량이 작은 항생제에는 적용이 가능하나 그에 비해 분자량이 큰 AMP에 적용하기 어려우므로 다른 그람 양성균인 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 표준 균주를 패널로 선정
 - ㉡ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 균주에 대한 항균 활성 검증은 다른 균주들과 동일하게 colorimetry 방법의 이용이 가능하도록 배양액 종류에 대한 최적화 연구를 수행
 - ㉢ Muller-Hinton broth (MHB), Cation Adjusted Muller-Hinton broth (CAMHB), Brain Heart Infusion broth (BHIB) 중 BHIB를 이용하여 최소 억제 농도를 규명
- ② 박테리아 패널을 이용한 제품 후보 Hg-CATH의 항균 활성 검증
 - ㉠ 유전체 분석을 통해 자체적으로 발굴한 벌거숭이 두더지쥐 유래의 cathelicidin Hg-CATH는 그람 음성균에 강한 활성을 보임(표 13 참조)

표 13. 벌거숭이 두더지쥐 유래 Hg-CATH의 확보된 박테리아 패널에 대한 항균 활성 검증

Strains	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	Hg-CATH	Ampicilin ^a	Gentamycin ^a
Gram-Negative Bacteria			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.8	1	1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	> 128	1
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	5	1	1
Gram-Positive Bacteria			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	75	1	1
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	> 64	16.0	1
<i>S. iniae</i> KCTC 3657	> 64	1	1

^a Reference antibiotics for activity comparison

(나) 제품후보 펩타이드의 포유동물 세포 패널 및 닭 혈액세포를 이용한 독성평가

- ① 후보 AMP 중 상대적으로 세포 독성이 강한 것으로 알려진 PG-1의 mouse embryonic fibroblast (NIH-3T3), mouse retinal photoreceptor (661W), human embryonic kidney fibroblast (HEK293T), human neuroblastoma (SH-SY5Y), pig alveolar macrophage (3D4/2) 및 mouse polymorphonuclear leukocyte (PMN)에 대한 독성 평가 완료(그림 32 참조)

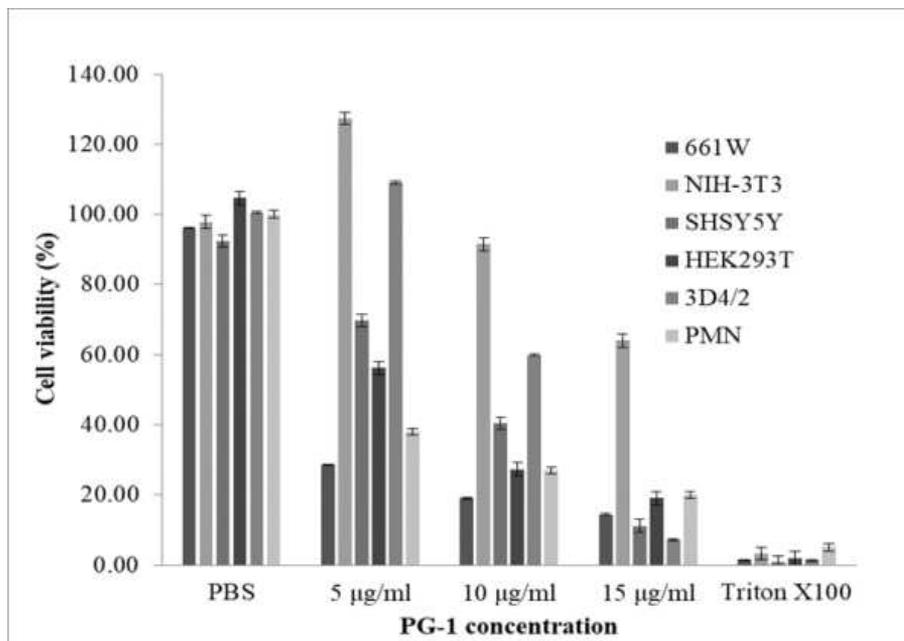


그림 32. 생산된 PG-1의 NIH-3T3, 661W, HEK293T, SH-SY5Y, 3D4/2 및 PMN에 대한 독성 평가 결과. 661W 세포에 대한 독성이 가장 민감한 것으로 나타함. AMP의 경우 기존 항생제들의 작용기전과 달리 박테리아 세포막에 대한 직접적인 영향으로 그 항균 활성 정도가 강할수록 포유동물 세포에 대한 독성 및 용혈성이 강한 것으로 알려져 있고 각 세포들에 대한 독성 또한 세포의 종류에 따라 다름. 따라서 각기 다른 막 전위 (membrane charge)를 가진 6종의 포유동물 세포 패널에 대한 독성 평가를 통해 세포들의 막 전위와 AMP의 독성과의 상관 관계를 확인 (논문 투고 준비중).

- ② 포유동물 세포 패널 5종(PK15 (pig kidney cells), ST ATCC CRL-1746 (pig testis fibroblast), 3D4/2 (pig lung macrophage), HEK293T (human embryonic kidney cells), HaCaT (human keratinocytes))에 대한 Hg-CATH의 세포 독성 평가 완료(표 14 참조)

표 14. 벌거숭이 두더지쥐 유래 Hg-CATH의 확보된 포유동물 세포 패널에 대한 세포 독성 평가

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability \pm SD (%)				
	CRL1746	3D4/2	HaCaT	HEK293T	PK15
5	92.7 \pm 5.4 ^a	94.1 \pm 2.6	99.7 \pm 1.3	97.7 \pm 2.9	104.5 \pm 4.7
10	97.7 \pm 3.2	92.7 \pm 3.2	98.5 \pm 1.3	98.2 \pm 1.5	102.2 \pm 9.4
15	97.4 \pm 1.7	96.8 \pm 0.6	99.6 \pm 1.0	93.7 \pm 12.3	108.5 \pm 1.5
20	102.0 \pm 11.2	98.2 \pm 3.7	99.1 \pm 1.1	95.5 \pm 14.0	101.6 \pm 8.5
30	94.7 \pm 0.2	100.0 \pm 1.3	110.6 \pm 0.2	93.8 \pm 13.1	84.9 \pm 2.0
64	113.2 \pm 3.4	83.3 \pm 5.2	100.0 \pm 1.9	47.7 \pm 5.1	65.8 \pm 4.5
Triton X-100 ^b	9.0 \pm 0.3	10.1 \pm 0.3	9.9 \pm 0.4	8.2 \pm 0.4	7.7 \pm 0.1

^a Results are the means \pm standard deviation from three replicate experiments

^b Control for complete cell lysis

- ③ 닭 혈액세포에 대한 Hg-CATH의 용혈성 평가 완료(표 15 참조)

표 15. 벌거숭이 두더지쥐 유래 Hg-CATH의 닭 혈액세포에 대한 세포 독성 평가

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Hemolytic rate \pm SD (%)	
	Hg-CATH	Melittin
2	3.4 \pm 0.5	4.1 \pm 0.5
4	7.3 \pm 0.2	26.5 \pm 1.8
8	8.2 \pm 0.1	94.5 \pm 0.8
16	9.9 \pm 0.2	100 \pm 1.9
32	10.1 \pm 0.5	100 \pm 1.6
64	11.4 \pm 0.9	100 \pm 0.7

Note. Results are from three replicate experiments

- (3) 생산된 기능성 펩타이드 물질의 보존성 평가 및 제품설계

(가) 연고 제형에 대한 AMP의 저장온도, 기간에 따른 효능평가

- ① 유방염 치료 연고 제형에 첨가된 AMP의 저장 기간에 따른 안정성 평가를 위해 저온 보존(-20 $^{\circ}\text{C}$) 및 장기 보관(6개월 보관 연구결과 확보)에 따른 항균 활성 검증 완료
- ② 다양한 조건의 안정성 검증 및 제품 설계를 위해 해당 연구결과를 제2협동에 제공

다. 제품화 가능한 펩타이드 후보 물질의 발굴

(1) 게놈분석 기술을 활용한 AMP 후보물질의 발굴

(가) 벌거숭이 두더지 쥐(*Heterocephalus glaber*) 유전체 내 AMP의 발굴

- ① 벌거숭이 두더지 쥐 유전체 내 존재하는 AMP를 발굴하기 위하여 NCBI BLAST (pBLAST 및 tBLASTn) 분석을 통해 4종의 대표적 AMP family와 연관된 펩타이드들을 발굴
- ② 유전체 분석 결과를 통해 1개의 alpha-defensin, 22개의 beta-defensin, 2개의 cathelicidin, 1개의 hepcidin 및 1개 LEAP-2를 포함한 27개의 AMP 후보 펩타이드들을 발굴(표 16 참조), 그 중 항균 활성 및 생산 공정의 효율성을 고려하여 최종적으로 cathelicidin 1종(Hg-CATH)을 선정

표 16. NCBI BLAST를 이용하여 벌거숭이 두더지쥐 유전체 분석 결과를 통해 발굴한 27개의 AMP 후보 펩타이드 목록

Protein families in query	Accession number	Name	Sequence	Length
Alpha-defensin	EHB12813.1	Defensin-5	MRTLALLAAILLLALQAQAERLPGRADQ AEPEVQAEIEEEQVTVISFPGEESSALQDA GVWRSEICRCRFFCGRGERRRGFCRVG LFFYSRCCR	93
Beta-defensin	XP_004869649.1	beta-defensin 1	MRTHCLLLLITICFLSFHTAPGAGLTSLGH RPDHYQCVKNGGFCLYSACPVYSKIVGT CYS GKAKCCT	67
Beta-defensin	XP_021108225.1	beta-defensin 8-like	MRILHFLFSILLVFFLMLPGFSEAVNNPV SCYQNGGCTFKCGQRQKLIGTCGFPPFS KCCR	61
Beta-defensin	XP_021108223.1	beta-defensin 104A-like	MRICVLLLAISSLLYQDTPVRSDLEVDRIC GYGTARCHRKCKSQEHKIARCPNTYACC LKTWAHSSLNIKRP	72
Beta-defensin	XP_004875486.1	beta-defensin 106A	MKTLLFICAVLFFLAPAKNEFFDAKCHK LKGKCKSSCQKNEELVAFQCQSLKCCLV LQTCELNESNS	67
Beta-defensin	XP_012924982.2	beta-defensin 105-like	MALPKGEASHRGSVQMLLLACELGTV GIWYPCSEKPPSEIAPSRKMFYFVFFLFFI VAQLQSGCQAGLDYAPSFPAGEQGACK TCRLGRGKCRRMCLENEKVEGNYGLSF FCCRERI	118
Beta-defensin	XP_004869118.1	beta-defensin 110	MKLHLVFFILLFWVTISPPKRRDPEYGSV NLSKECRRSSGQCRAQCYDNEMRVAFC LKPGIHYCMSSSG	69

Beta-defensin	EHB17176.1	Beta-defensin 125, partial	KCWDDMGHCRRRCLDNERYKLLCKNK VSCCIPIRKSYDDTPRPLPPLIPIWHITIDV GDWIPVSPGLNDEMTEFDDKEHEET	81
Beta-defensin	XP_012926219.1	beta-defensin 127	MYLFLIIAVLLIQKPTVTEQLKKCWGHYV QGNCRKICKVTEIHEVLCENGRYCCLNIK KLEEWKKITKPPPKQAPFALTLPQDEE KMETSSTPKTYHT	99
Beta-defensin	XP_021116792.1	beta-defensin 130-like	MRFHSLLAILLFFITVITKGKTGVIPGEKQ CIFLKGLCKYRSCTSTEDTIGICKGEKKC CRKWWILEPYPTPVPGKSP	79
Beta-defensin	XP_004848544.2	beta-defensin 109-like	MAARSGLGAESHCVNLSGICRRTTCKL TEDEIGGCRRRWKCCRPWWILIPPTVI FSDYQEPVKPRIK	70
Beta-defensin	XP_021110513.1	beta-defensin 124	MTQLLLLIVALLVLGHAPPGRTEFKRCW KGQGTCTRYCTRQESFIHLCPDASLCCLS YMFRRSPMPPEDE	71
Beta-defensin	EHB17174.1	Beta-defensin 119	MYNAQGFKLYLEGQAQKRALTPFFWK WKLPSFRFLLYSPHTSLTAKWKLISII VIFFWPGKHPILRCMGNIGVCRPSCCKNE QPYYYCRNYQPCCLQSYVRISITGAEGN NDWSYGNHWPPIP	126
Beta-defensin	XP_004840665.1	beta-defensin 119 isoform X1	MKLLFLFLAILLAMEPVMMSGKHPILRCMG NIGVCRPSCCKNEQPYYYCRNYQPCCLQ SYVRISITGAEGNNDWSYGNHWPPIP	83
Beta-defensin	XP_004840666.1	beta-defensin 119 isoform X2	MDIYQVAHSRCSANGKHPILRCMGNIGV CRPSCCKNEQPYYYCRNYQPCCLQSYV RISITGAEGNNDWSYGNHWPPIP	78
Beta-defensin	EHA99207.1	Beta-defensin 30, partial	LAMRSLRLVFMVLFLLSYVPPGKNGSGM NPYIKEAFDKCWLMKDVCRRKCGKNEID HIVCDNADVCCITEEEMPILVG	78
Beta-defensin	EHB17179.1	Beta-defensin 132, partial	MKSLLLVFAALRFLAELASADRGGTRLA QNDLGECSLICSWNEWLTLLYDRYRQC CVESDFLPMPIMPQHVDKSKSLHRKTTQ	83
Beta-defensin	XP_004840667.1	beta-defensin 122-like	MVMRTFLLALVLLLLFQVIPGNTKRCW NHRGSCSERCIKKEIFFICTSGYLCCVKP KHKPNLL	65
Beta-defensin	XP_004840664.1	beta-defensin 123	MKLLLLTLAVVLLTSQLTPGDTQRCWN LLGKCRHRCFRKDSVYVYCTNGKLCCV	68

			KPKYQPKPKPSWSF	
Beta-defensin	XP_004840669.1	beta-defensin 128	MKLFLVLIVLLSQVLTAWAKPPRCFNNV AGYCKKKCKMGEISEMGCLHGKLCGVN EENKKYHKSHQPPQSDQKVAEVYDY VIYPTVTLVSIL	94
Beta-defensin	XP_004848541.1	beta-defensin 136	MSLRLSGLLLFLVVALPSGSGLYGNQGV KVRTCTKLEGVCFFGFKPGWTWVAYC HNIMSCCTQNKIFLPPQSKQP	75
Beta-defensin	XP_004875488.1	beta-defensin 33-like	MRLLSLLVLLPVCLTQAASGYRRNNIYL ECGKMGGACKHQKTQGCSILPAECKSRH KHCCRL	62
Beta-defensin	XP_004921290.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: sperm-associate d antigen 11	MRGILLFAVCFCLVQRNTGDIPLGIRNTI CLMQSRRCXLFFCHAGEKRSDICSDPWN KSCIPNIKE	66
Cathelicidin	XP_004835034.1	15 kDa protein B-like	MAGAWKVLVLVLCCLAGVSCAHRHRLR YEDLVAKALRVYNEGQQGRPLFRLVETI PPPQLNSTTRFPLNFRIRETVCTSTPERL RQPQNCAFLEGGEERLCNGQFSRLGRR LSLTVSCDRDCGDLIRGQVRPSAEP SEAGEVAQVAEVAEPAGGAEVAEPA AAEAEVPPAAKYLYEKAKYDIISNILRNF	195
Cathelicidin	XP_004834996.1	cathelicidin antimicrobial peptide	MGTRRDGASPGCLSLPLLPLLLGSLLS PAPEALGYQQAVDRAVADFNQRS LYASLFRLLSLDSEPPGLSAEPG PSLCTPGLGLCFTVEDPDTPKPV SFTVKETVCPKATQLEQCD FKENGVVKQCSGTVTLGPASSA FDVSCDRARRFRRTVGLSKFFR KARKKLGKGLQKIKNVL RKYLPRPQYAYA	192
LEAP-2	XP_004836646.1	liver-expressed antimicrobial peptide 2	MWHLKLFAVLMICLLLLGQIDGSP VPALS SSKKRPRRMT PFWRGVSLRPIGASCRDD YECVSRLCRKRRC SLTVAQE	77
Hepcidin	XP_004858894.1	hepcidin	MAINTQIQAA CLLVLLLASLTSSSIV QPQT GQLADLQPHD TAEAKVSFTPTLHRL RRRDTHFPICV FCCGCCKNARCGIC CKT	83

(나) 벌거숭이 두더지 쥐 Cathelicidin Hg-CATH의 특성 분석

- ① Hg-CATH의 고유 특성(펩타이드 구조, 항균 활성, 작용 기전) 연구를 위해 PSI-PRED, APD3와 같은 데이터베이스를 이용한 in silico 분석 완료(그림 33, 표 17 참조)
- ② 선행 연구 및 1차년도 연구를 통해 추가 확보된 AMP 후보 물질 6종과의 특성 비교(표 14 참조)

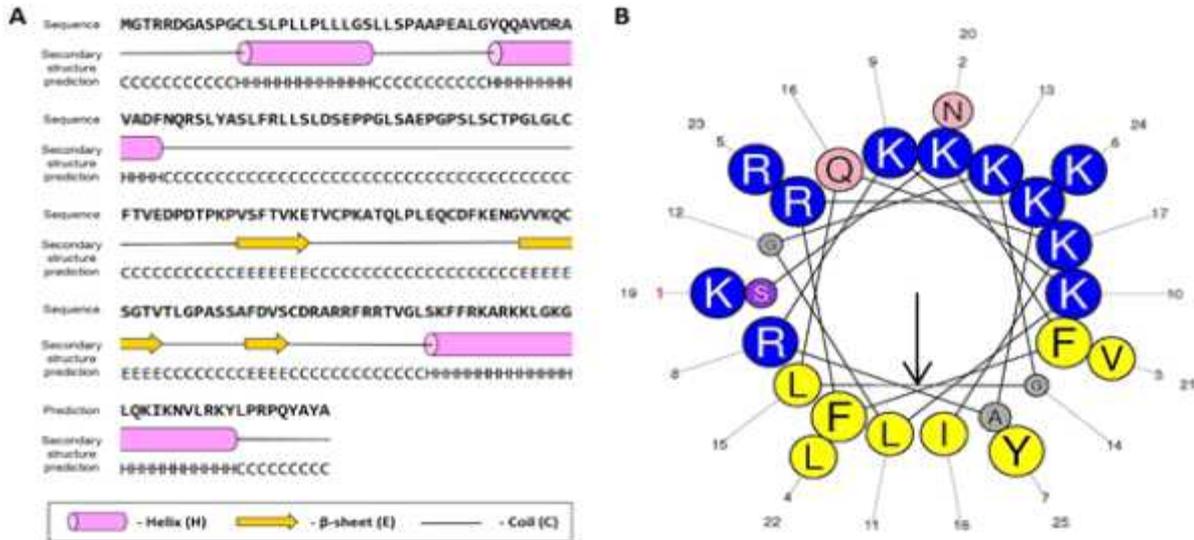


그림 33. PSIPRED를 이용하여 예측한 Hg-CATH 전구체 (preproform Hg-CATH)의 2차구조 및 HeliQuest를 이용하여 예측한 Hg-CATH의 helical wheel projection diagram. (A) preproform Hg-CATH의 2차구조 예측 결과. 분홍색의 실린더는 alpha-helix를, 노란색의 화살표는 beta-sheet를, 선의 경우 coil 구조를 각각 의미함. (B) Helical wheel modeling 결과로 소수성 아미노산은 노란색과 회색으로, 친수성 아미노산은 보라색과 파란색으로 나타냄. 화살표의 방향과 크기는 소수성 아미노산들의 분포 및 크기를 나타냄.

표 17. 선행 연구 및 1차년도 연구를 통해 추가 확보된 AMP 후보 물질 6종의 특성분석 결과

AMPs	Source organism	Amino acid sequence	Length	Net charge	Secondary structure	Mechanism (target)
PG1	<i>Sus scrofa</i>	RGGRLCYCRRR FCVCVGRG	19	Cationic (+6)	β -sheet	Bacterial membrane
PR26	<i>Sus scrofa</i>	RRRPRPPYLPRP RPPPFPPRLPP RI	26	Cationic (+8)	Polyproline II helix	Intracellular molecule
PMP36	<i>Sus scrofa</i>	GRFRRLRKKTR KRLKKIGKVLKW IPPIVGSIPLGCG	36	Cationic (+13)	α -helix	Bacterial membrane
Pb-CATH4	<i>Python bivittatus</i>	TRSRWRRFIRGA GRFARRYGWRI A	24	Cationic (+9)	α -helix	Bacterial membrane
Buforin II	<i>Bufo bufo</i>	TRSSRAGLQFPV	21	Anionic	α -helix	Intracellular

	<i>gargarizans</i>	GRVHRLLRK		(-3)		r molecule
Hg-CATH	<i>Heterocephalus glaber</i>	SKFFRKARKKLG	25	Cationic (+11)	α -helix	Bacterial membrane
		KGLQKIKNVLRK				
		Y				

(다) 전자 현미경을 이용한 Hg-CATH의 항균 활성 기전 검증

- ① 전자 현미경 기법을 통해 Hg-CATH의 활성 기전연구를 수행한 결과 박테리아 세포막에 달라붙어 구멍(pore)을 형성하는 활성 기전을 가지며, 이는 전형적인 AMP 특성으로 실험실 보유 후보 AMP 중 하나인 Pb-CATH4와의 활성 기전적 유사성을 가짐을 확인 (그림 34 참조)

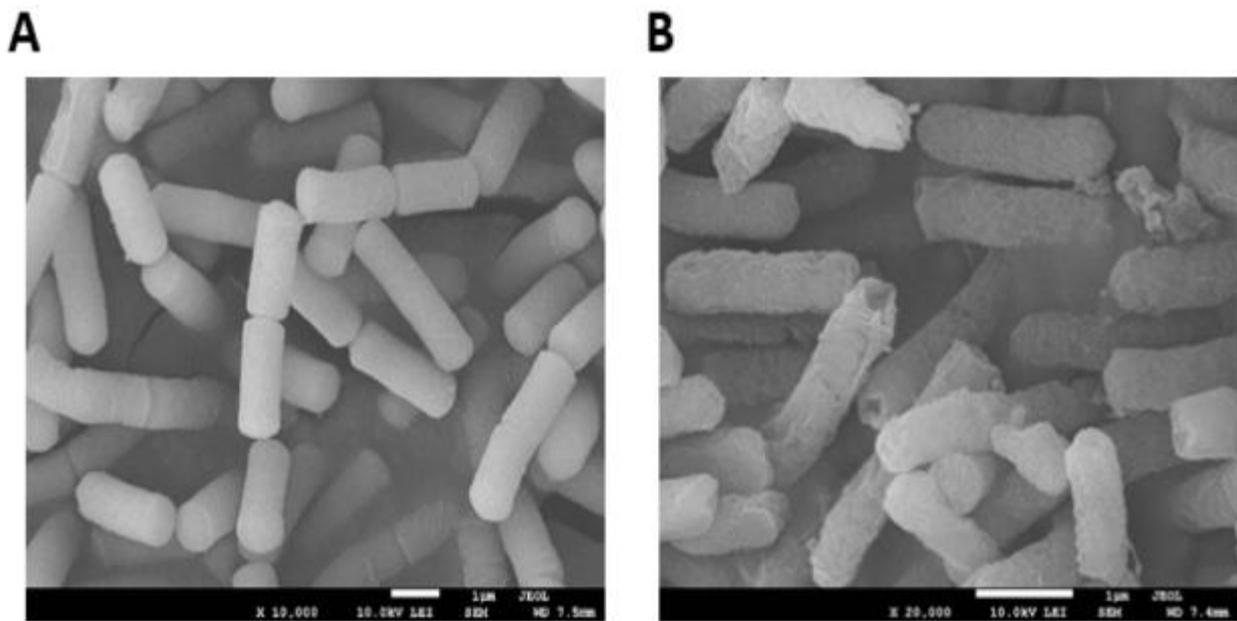


그림 34. 전자현미경 (SEM)을 이용한 Hg-CATH의 항균 활성 기전 검증. (A) AMP를 처리하지 않은 E. coli ATCC 25922. (B) 동종의 E. coli에 대해 Hg-CATH를 처리한 후 2시간 동안 배양한 결과로 Hg-CATH가 박테리아 세포막에 구멍 (pore)을 형성하여 항균 작용을 하는 것을 확인.

(2) 가축질병유발 BTP 신규 타겟의 발굴

- (가) 1차년도 산업화 후보물질 BTP로 흉막 폐렴 관련 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의해 산생되는 BTP를 추가로 선정하고 후보 물질 연구를 위해 필수적인 대량 생산 시 소요되는 시간이 장기적인 것을 고려하여 흉막 폐렴 관련 BTP의 경우 제1협동 기관에서 발현 및 생산과 관련된 연구를 진행하기로 결정

- (나) 2차년도에는 기존의 후보 BTP 물질을 이용한 연구 및 결과 도출에 집중하기 위하여 Stx 2e subunit B를 지속적으로 생산 제1협동 기관에 5.5mg을 추가 제공 완료

라. AMP 기반의 젖소 유방염 치료 연고의 설계

- (1) 젖소 유방염 유발 병원균에 대한 AMP 효능 평가

(가) 젖소 유방염 유발 병원균(주로 그람양성균)에 대해 특이적으로 강한 활성을 가지는 최종 AMP 발굴을 위해 총 6종의 후보 AMP 선정

(나) 선정된 후보 AMP 6종의 펩타이드 확보

- ① 돼지 유래 1종 : PMAP36
- ② 회색짧은꼬리 주머니쥐 유래 2종 : ModoCath1, ModoCath5
- ③ 벌거숭이 두더지쥐 유래 1종 : Hg-CATH
- ④ 소 유래 1종 : BMAP-28
- ⑤ 말 유래 1종 : EA-CATH1

(다) AMP 기반 젖소 유방염 치료 연고 설계를 위해 선정된 후보 AMP 6종에 대해 평가를 위해 젖소 유방염과 연관된 표준 균주 총 5종 확보

- ① 기존 확보 균주 1종 : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- ② 추가 확보 균주 4종 : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956, *Streptococcus dysgalactiae* ATCC 27957 및 *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 43079

(라) 추가 확보한 표준 균주 4종에 대한 최소 억제 농도(minimal inhibitory concentration; MIC) 검증 방법 최적화 완료

- ① OD (optical density) 값에 따른 CFU (colony forming unit) 형성 연구 완료(그림 35 참조)

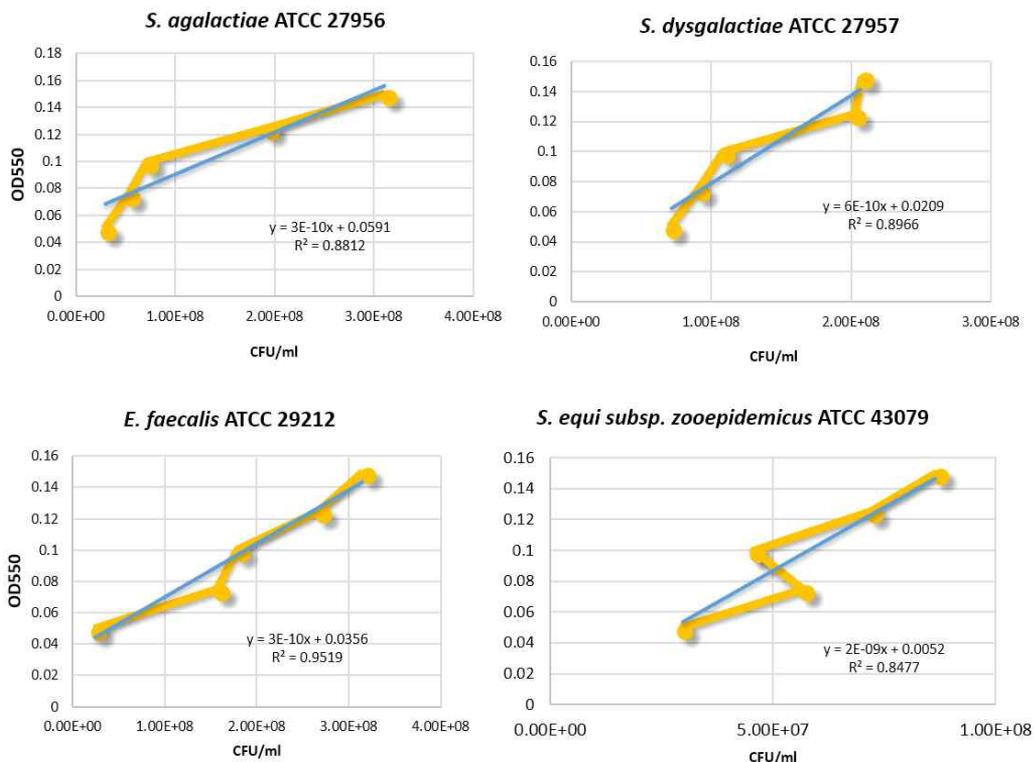


그림 35. 유방염 유발 관련 표준 균주들의 OD 값에 따른 CFU 측정. 유방염 치료 연고 제품화를 위해 확보한 표준 균주 5종 중 기 확보 1종을 제외한 신규 균주 4종에 대한 OD 값에 따른 CFU를 측정함으로써 최적의 AMP 선발을 위한 기초 자료를 확보함.

- ② 다른 균주들과 동일하게 colorimetry 방법의 이용이 가능하도록 배양액 종류에 대한 최적화 연구를 수행 완료
- (마) AMP 기반 젯소 유방염 치료 연고 설계용 표준 균주 5종에 대한 선정된 후보 AMP 6종의 항균 활성 검증(표 18 참조)

표 18. 젯소 유방염 유발 병원균 관련 그람 양성균에 대한 후보 AMP의 항균 활성.

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$, μM)								
	ModoCath1	ModoCath5	PMAP36	Hg-CATH	BMAP-28	EA-CATH1	Chlo ^a	Amp ^a	Gen ^a
Gram-Positive Bacteria									
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	3	1.5	1.5	> 32	6	32	2	1	1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2	2	4	> 32	3	6	3	2	> 5
<i>S. agalactiae</i> ATCC 27956	> 32	> 32	1	14	> 32	> 32	1	1	3
<i>S. dysgalactiae</i> ATCC 27957	32	> 32	0.5	3	> 32	32	1	1	2
<i>S. equi</i> <i>subsp.</i> <i>zooepidemicus</i> ATCC 43079	8	> 32	3	3	> 32	16	1	1	1

^aAntibiotics for control (Chlo, Chloramphenicol; Amp, Ampicilin; Gen, Gentamycin)

(2) 유방염 치료용 AMP 복합제의 개발

(가) 유방염 치료 연고 개발을 위해 펩타이드인 AMP의 물질 특성에 적합한 연고 제형 평가

① 연고 제형 3종에 대한 구성 성분 및 제조 정보(그림 36 참조)

② 연고 제형 P1의 경우 재료 특성상 혼합을 위해 높은 온도가 필요하므로 적합하지 않으므로 P2와 P3에 대한 평가 연구 수행

(나) 제2협동 제공 2종의 연고 제형에 대한 평가 완료 및 최적의 연고 제형 1종의 선정(그림 37 참조)

P1. vaseline + lanoline + liquid paraffin

* 제조 비율 (60kg 제조 기준)

→ 바세린 : 라놀린 : LP : 주성분 = 32kg : 4.8kg : 18.8kg : 4.4kg

※ 주성분 : 넣고자 하는 물질

* 제조 방법

→ 바세린과 라놀린, LP를 80°C 정도의 열을 가해 액화 상태로 만든다

→ 액화된 바세린과 라놀린을 120목 여과망으로 여과 한다 (여과 후에는 약 70°C 정도로 온도가 내려갈 것임)

→ 바세린과 라놀린, LP 주성분을 비율과 같이 넣어 교반하면서 섞어준다 (바세린과 라놀린은 60°C 이하에서 고체화가 됨)

* 참고

→ 별도의 멸균은 하지 않아도 되지만, 제작시 멸균되어 있는 가자재의 사용과 외부 공기와와의 접촉을 최소화 하는 것이 좋음

→ 방부제는 사용하지 않아도 무방함

→ 제시한 비율대로 제작했을 시 함께 첨부한 제품과 같은 농도로 제작 되어짐 (흰색 수사가 모양 제품)

P2. sodium carboxymethyl cellulose (S-CMC) + sodium alginate (S-A)

* 제조 비율 (1L 제조 기준)

→ S-CMC ----- 2g

S-A ----- 2.5 g

주성분 ----- x g

DW ----- total volume 1L

* 제조 방법

→ 일정량의 DW에 S-CMC와 S-A를 넣고 mixer로 혼합하여 준다 (일반적인 교반으로는 녹지 않음)

→ 위에서 혼합된 혼합액을 멸균하여 준다 (121°C, 15~20min)

→ 멸균된 혼합액에 주성분을 넣고 멸균 DW를 이용하여 최종 1L로 volume을 맞춰 준다

* 참고

→ 주성분에 영향을 받지 않는 방부제 첨가 해야 함

→ 제시한 비율대로 제작시 glycerol 정도의 농도로 제작 되어짐

→ 농도 조절 필요시 S-CMC와 S-A의 함량을 높이면 진한 농도가 만들어짐 (단, S-CMC와 S-A의 비율은 지켜야 함)

P3. xanthan gum + bentonite

* 제조 비율 (1L 제조 기준)

→ xanthan gum ----- 3 g
Bentonite ----- 2 g
주성분 ----- x g
DW ----- total volume 1L

* 제조 방법

→ 일정량의 DW에 xanthan gum과 bentonite를 넣고 mixer로 혼합하여 준다 (일반적인 교반으로는 녹지 않음)
→ 위에서 혼합된 혼합액을 멸균하여 준다 (121°C, 15~20min)
→ 멸균된 혼합액에 주성분을 넣고 멸균 DW를 이용하여 최종 1L로 volume을 맞춰 준다

* 참고

→ 방부제 사용하지 않아도 무방함
→ 제시한 비율대로 제작했을 시 함께 첨부한 제품과 같은 농도로 제작 되어 짐
→ 농도 조절 필요시 xanthan gum과 bentonite 의 함량을 높이면 진한 농도가 만들어짐 (단, xanthan gum과 bentonite의 비율은 지켜야 함)

그림 36. 제2협동(코미팜) 으로부터 받은 연고 제형 3종의 구성 성분 및 제조 방법 정보.

- ① 후보 AMP들의 구조적인 특징이 연고 제형과의 상호작용에 영향을 주는지 확인하기 위해 beta-sheet 구조를 가진 PG-1과 alpha-helix 구조를 가진 PMAP36 2종의 펩타이드를 이용하여 최적의 연고 제형을 발굴하고자 함
- ② 제2협동으로부터 제공받은 연고 제형 2종과 생산된 PG-1을 혼합하여 항균 활성을 확인한 결과, P3 제형의 경우 펩타이드 활성을 억제하여 부적합하므로 P2 제형이 유방염 치료 연고 제형으로 가장 적합한 것으로 판단됨
- ③ 동일한 조건으로 생산된 PMAP36을 대상으로 연구를 수행한 결과 PG-1의 결과와 같은 결과를 얻음
- ④ 최종적으로 P2 제형을 항균 펩타이드 기반 유방염 치료 연고 제형으로 선정

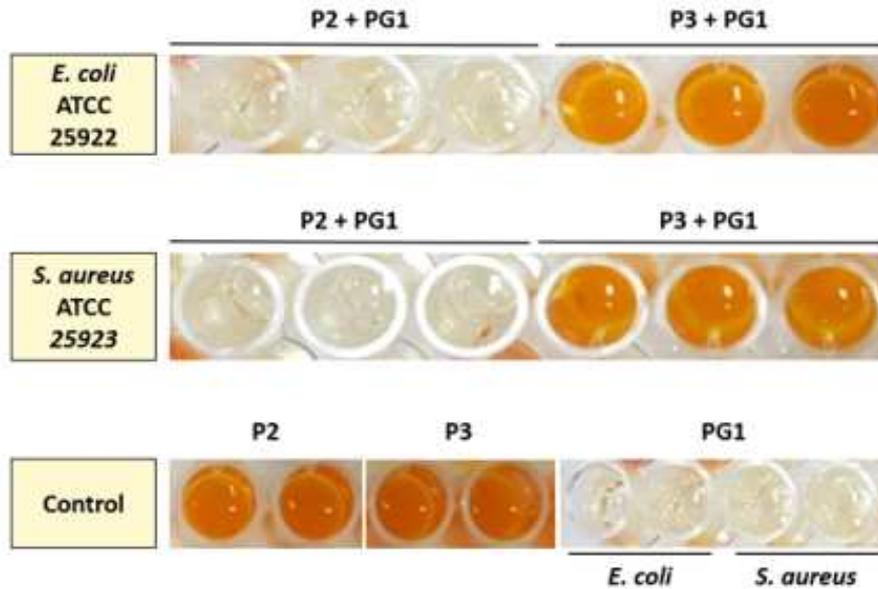


그림 37. 연고 제형 P2 및 P3와 혼합된 항균 펩타이드 PG1의 항균 활성 측정 결과.

마. AMP 독성 감소 및 특이성 조절을 위한 펩타이드 엔지니어링

(1) 엔지니어링 기법을 도입할 후보 AMP 9종의 선정 및 펩타이드 1차 모델링

(가) 총 9종의 후보 AMP를 선정 및 생화학적 정보 확보(표 19 참조)

- ① 그람 음성균 특이 AMP 3종 : Hg-CATH, Pb-CATH1, Crotalycin
- ② 그람 양성균 특이 AMP 3종 : buCATHL4A, EA-CATH1, cc-CATH3
- ③ 다양한 박테리아에 활성을 가지는 AMP 3종 : Cathelicidin-BF, PMAP36, LL-37

표 19. 엔지니어링 기법을 도입할 9종의 후보 cathelicidin 목록 및 특성 정보

Name/Class	Source	Sequence	Length	Net charge	Hydrophobic residue (%)	H/C ratio	3D Structure	Method
Gram-negative specific								
Hg-CATH	Naked mole-rat	SKFFRKARKKLG	25	11	32	0.64	N.D.	Prediction
		KGLQKIKNVLRLKY						(secondary structure)
Pb-CATH1	Snake	RVKRFKKFFRRIK	28	15	36	0.86	N.D.	Prediction
		KGFRKIFKTKIFI						(secondary structure)
Crotalycin	Snake	G	34	15	41	0.94	Helix	NMR
		KRFKKFFKKVKKS						
		VKKRLKKIFKKPM						
		VIGVTIPF						
Gram-positive specific								
buCATHL4A	Water buffaloes	GLPWILLRWLFF	14	2	64	4.5	Helix	CD
		RG						
EA-CATH1	Horse	KRRGSVTTRYQF	25	7	40	1.56	Helix	CD
		LMIHLLRPKFLA						

cc-CATH3	Common quail	RVRRFWPLVPVA INTVAAGINLYKAI RRK	29	7	51	1.89	N.D.	Prediction (secondary structure)
Broad spectrum								
LL-37	Human	LLGDFFRKSKEKI GKEFKRIVQRIKD FLRNLVPRTES GRFRRLRKKTRK	37	6	35	1.43	Helix	NMR
PMAP-36	Pig	RLKKIGKVLKWIP PIVGSIPLGCG KFFRKLKKSVKKR	36	13	37	1	Helix	Prediction (tertiary structure)
Cathelicidin-BF	Snake	AKEFFKKPRVIGV SIPF	30	11	40	0.8	Helix	NMR

(나) 선정된 9종의 후보 AMP의 펩타이드 1차 모델링

- ① 9종의 후보 AMP 중 Crotalictidin 및 LL-37을 제외한 나머지 물질의 경우 3차 구조에 대한 연구가 이루어지지 않아 3차 구조에 대한 정보를 얻기 위해 LOMETS, I-TASSER 및 Phyre2 서버를 이용한 모델링을 수행, 각각의 AMP에 대한 10종의 예측된 3차 구조 모델을 확보
- ② 각 후보 AMP 별로 얻은 10종의 3차 구조 모델의 정확도를 높이기 위해 Gromacs를 이용하여 energy minimization을 수행함으로써 가장 안정적인 3차 구조를 확보
- ③ 확보한 3차 구조들 중 가장 적합한 모델을 선정하기 위해 PyMOL을 이용한 RMSD 검정을 통한 모델링 평가 및 2차 구조와의 비교 분석을 통해 최적의 모델을 선정 완료(그림 38 참조)

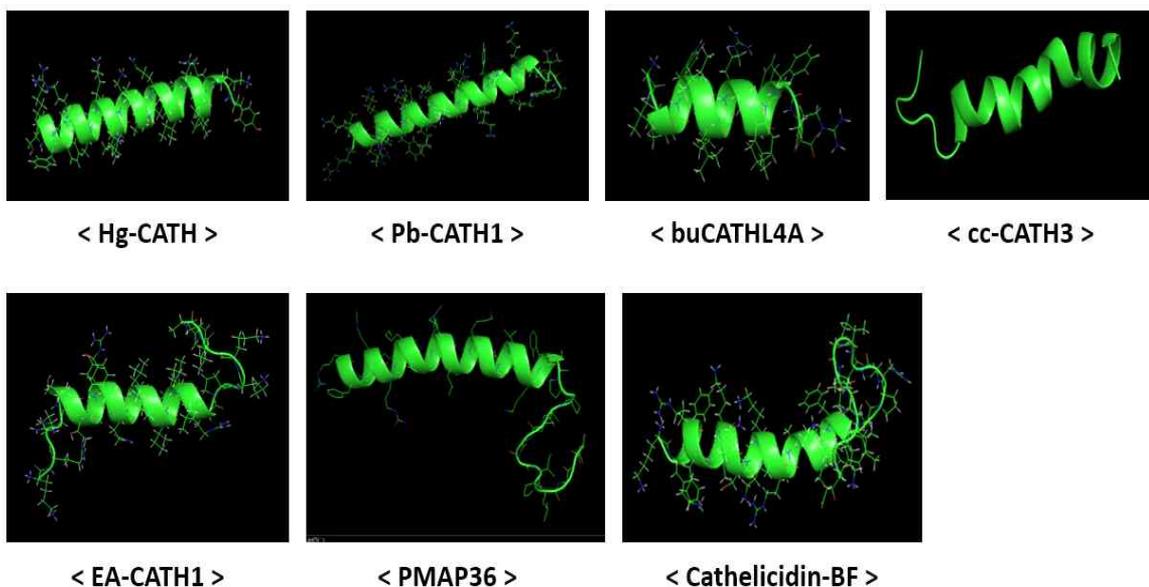


그림 38. 엔지니어링 기법을 도입할 후보 AMP 9종 중 3차 구조 연구가 이루어지지 않은 7종에 대한 3차 구조 모델링. LOMETS, I-TASSER 및 Phyre2 서버로부터 예측된 3차 구조들에 대해 energy minimization, RMSD 검정 및 2차 구조와의 비교 분석을 통해 최종적으로 선발된 3차 구조 모델로 추후 분석을 통해 엔지니어링 기법 도입에 기초 자료를 제공.

(2) 생물정보학 기법을 이용하여 특이성 및 세포 독성에 영향을 주는 요인 규명 및 가설 수립을 위한 Test set (AMP 목록) 확보 및 분석

(가) 후보 AMP 9종을 선정하기 위해 APD3 데이터베이스에서 지금까지 알려진 모든 AMP (총 1,681종)에 대한 정보 목록 작성

- ① 그람 음성균 및 그람 양성균 각각에 특이성을 가지는 AMP들을 분류함
- ② 그람 음성균 특이 AMP 301종, 그람 양성균 특이 AMP 139종

(나) Test set 선정을 위한 AMP 선별

- ① AMP의 다양한 생화학적 특성들 중 척추동물 유래, alpha-helical 구조 및 양이온성의 특징을 가지는 AMP들을 선별하기 위해 PSIPRED를 이용하여 특이성에 따라 분류된 AMP들의 2차구조를 분석
- ② 최종적으로 그람 음성균 특이 AMP 42종, 그람 양성균 특이 AMP 91종을 Test set으로 선정

(다) Test set 내의 subgroup의 분류

- ① Test set 내의 AMP 목록 중 항균 활성 정도를 기준으로 subgroup을 만들기 위해 항균 활성 기준을 앰피실린으로 선정
- ② DBAASP 데이터베이스를 이용하여 각각 3개(strong, intermediate, weak activity)의 subgroup으로 분류
 - ㉞ 그람 음성균 특이 AMP 중 강한 활성을 가지는 AMP 18종, 중간 활성 17종, 약한 활성 7종
 - ㉟ 그람 양성균 특이 AMP 중 강한 활성을 가지는 AMP 50종, 중간 활성 34종, 약한 활성 7종

(라) 확보한 Subgroup 목록을 이용하여 Test set 내 subgroup들 간의 차이점을 규명을 위한 분석

- ① 그람 음성균 특이 AMP의 경우 그 활성에 영향을 미치는 변수는 전하(charge)가 가장 크고, 그람 양성균 특이 AMP의 경우 소수성(hydrophobicity)가 가장 영향을 많이 주는 것으로 확인(그림 39 참조)

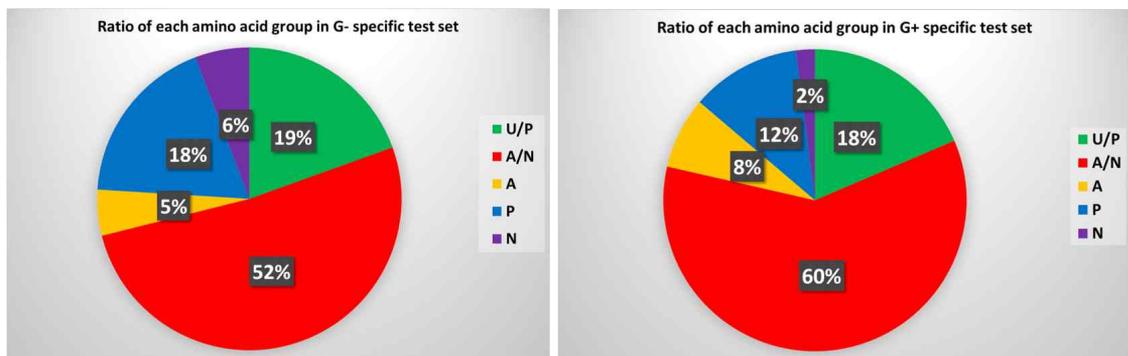


그림 39. 그람 음성균 및 양성균 특이 AMP Test set 분석 결과

(3) 후보 AMP에 대한 대량 생산용 클론의 확보, 발현 및 정제

(가) 9종의 후보 AMP에 대한 대량 생산용 벡터 확보 완료

(나) 확보된 대량 생산용 클론의 성장 곡선 연구(그림 40, 41 참조)

- ① 9종의 후보 AMP 중 PMAP36, EA-CATH1, buCATHL4A의 경우 숙주 독성 극복이 가능하여 해당 클론들이 잘 자라는 것을 확인
- ② BF-CATH, Pb-CATH1, Hg-CATH, Crocatalicidin, cc-CATH3의 경우 숙주 독성 영향으로 잘 자라지 않았고, 그 중 cc-CATH3이 가장 큰 영향을 받는 것으로 확인

		UI	1h	2h	3h	4h	5h
Broad spectrum	PMAP36	0.832	2.137	2.738	3.62	4.382	4.768
	BF-CATH	0.912	2.195	2.614	2.472	2.668	2.644
	LL-37	1.01	2.286	2.69	3.168	3.369	2.949
Gram-positive	cc-CATH3	0.913	1.755	1.63	1.662	1.608	1.312
	Ea-CATH1	1.182	2.377	2.886	3.632	3.874	4.55
	buCATHL4A	0.989	2.233	2.618	3.868	4.362	4.317
Gram-negative	Pb-CATH1	0.851	1.911	2.438	2.448	2.458	2.236
	Hg-CATH	0.718	2.051	2.316	2.652	2.679	2.427
	Crocatalicidin	0.729	1.3672	2.302	2.154	2.348	2.134

그림 40. 엔지니어링을 위한 model AMP 클론의 성장 확인 결과(표)

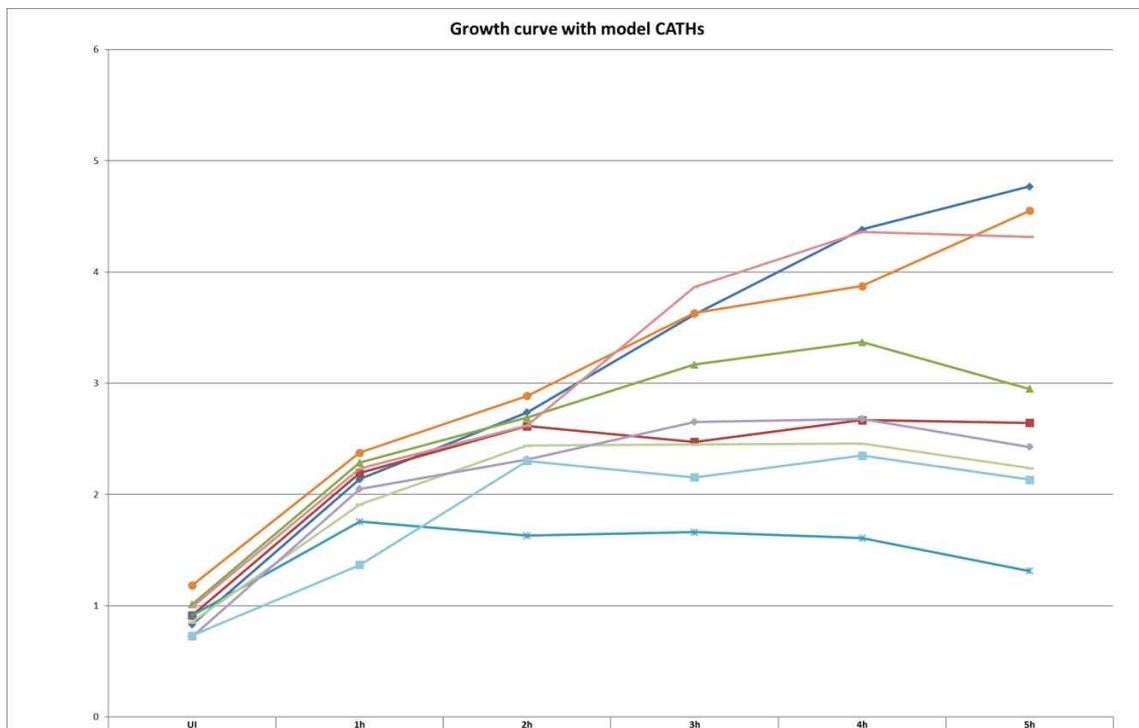


그림 41. 엔지니어링을 위한 model AMP 클론의 성장 확인 결과(그래프)

(4) 생산된 AMP의 효능 및 세포독성 평가

- (가) 확보된 대량 생산용 클론의 성장 곡선 결과를 통해 엔지니어링 연구 목표 수정이 필요할 것으로 판단되어 3차년도에 후보 AMP 9종 중 2종에 대한 대량 생산용 클론을 이용하여 생산 후 효능 평가를 진행하기로 결정(표 26 참조)

2. 협동기관(제1협동)

가. 불활화 독소이드의 실험동물에서의 안전성 평가

- (1) 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 쥐의 확보
 - (가) 재조합 Stx2eB 항원을 이용한 ELISA에서 음성인 BALB/c 마우스 확보
 - (나) 재조합 ApxIV 항원을 이용하여 음성인 BALB/c 마우스 확보
- (2) 각 재조합 독소이드(BTP)를 다양한 접종량으로 근육접종 후 부작용 및 병원성 발현 여부 확인
 - (가) 재조합 Stx2eB를 25ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml로 준비하여 근육으로 BALB/c 마우스에 각각 100ul씩 2주 간격으로 2회 접종 후 총 4주간 폐사 및 식욕 부진, 설사 등과 같은 부작용 발생하지 않음(그림 42 참조)
 - (나) 재조합 ApxIA, IIA, IIIA의 C-terminal 부분을 각각 8ug/ml 씩(총 24ug/ml), 15ug/ml 씩(총 45ug/ml), 30ug/ml 씩(총90ug/ml)로 준비하여 2주 간격으로 2회 근육으로 접종 후 총 4주간 폐사, 식욕 부진 등과 같은 부작용이 관찰되지 않음
- (3) 부검을 통한 육안 확인 및 이상 징후에 대한 조직 검사
 - (가) Stx2eB 2차 접종 2주 후에 모든 마우스를 대상으로 부검을 통해 이상 여부를 확인하여 본 결과 아무런 이상 장기가 관찰되지 않음

A



B



그림 42. 각 재조합 독소이드를 다양한 접종량으로 실험동물에 대한 근육접종. (A) 마우스에 각 재조합 Stx2eB 근육 접종. (B) 독소이드 접종 후 정상적인 활동을 보이는 마우스 그룹.

나. 목적동물에서의 불활화 독소이드의 안전성 및 효능 평가

- (1) 효소면역정량법 (ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 자돈의 확보
 - (가) 재조합 Stx2eB 항원을 이용한 ELISA에서 음성인 자돈 확보(그림 43 참조)
- (2) 재조합 독소이드(BTP)를 다양한 접종량으로 혼합하여 근육접종 후 폐사 및 부종병 발현 여부 확인
 - (가) 재조합 Stx2eB를 25ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml로 준비하여 근육으로 4주령 자돈에 각각 1ml씩 2주 간격으로 2회 접종 후 총 4주간 폐사 및 식욕 부진, 부종병 발현 여부가 관찰되지 않음(그림 43 참조)

(3) 도전감염 후 폐사 및 부검을 통한 효능 평가

(가) 재조합 Stx2eB를 50ug/ml으로 준비하여 근육으로 4주령 자돈에 각각 1ml씩 2주 간격으로 2회 접종

(나) 최종 접종 후 2주째에 부종병 발현 돼지에서 분리한 병독성 Stx2e+ F18+ *E. coli*를 경구로 접종

(다) 도전감염 후 2주간 폐사 및 부종병 발현 여부를 확인하여 본 결과 대조군에서는 2두 폐사 2두 부종병 발현이 확인된 반면 재조합 Stx2eB를 접종한 그룹에서는 1두 폐사와 1두에서 부종병 발현이 관찰되었음(표 20, 그림 44 참조)

(4) 재조합 독소이드 백신 접종 및 부검을 통한 안정성 평가

(가) P재조합 Stx2eB를 50ug/ml으로 준비하여 근육으로 4주령 자돈에 각각 1ml씩 2주 간격으로 2회 접종

(나) 최종 접종 후 2주째에 부검하여 본 결과 부종병 발현 돼지가 관찰되지 않음

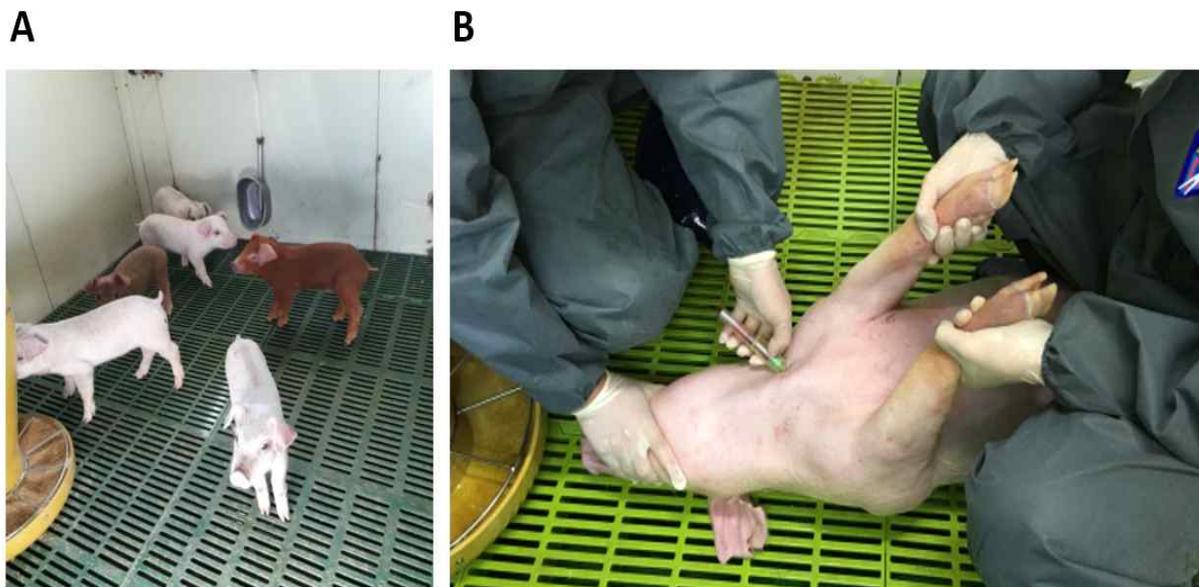


그림 43. 재조합 Stx2eB를 다양한 접종량으로 혼합하여 근육접종 후 질병 증상 및 발현 여부 확인.. (A) 재조합 Stx2eB 항원을 이용한 효소면역정량법 (ELISA) 결과 감염 병력이 없는 실험용 자돈의 확보. (B) 근육 접종 접종 후 정상적인 자돈으로부터 정기적인 채혈 모습.

표 20. 자돈에 재조합 Stx2eB를 근육접종 후 Stx2e+ F18+ *E. coli*를 경구로 도전감염 후 자돈의 상태

그룹	실험자돈 수	폐사자돈	부종병 발현 자돈	정상 자돈
A 음성 대조군	5	0	0	5
B PBS 접종군	5	2	2	1
C 백신 접종군	5	1	1	3



그림 44. 도전 감염 후 폐사되지 않은 자돈을 부검을 통해 부종병 발현 유무 확인.

다. 불활화 독소이드와 고스트 사균체 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가

- (1) 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 모돈 및 그 모돈에서 출생한 감염 음성 자돈 확보
 - (가) 재조합 ApxIV 항원을 이용한 ELISA에서 음성인 모돈 확보
 - (나) 음성 모돈에서 출생한 자돈을 대상으로 채혈한 혈청을 대상으로 ApxIV 항원에 대해 음성인 자돈 확보
- (2) 고스트 균체와 예비실험을 통해 결정된 양의 독소이드의 근육 접종
 - (가) 1×10^9 CFU/ml의 APP 2형과 APP 5형과 45ug/ml ApxIA, IIA, IIIA C-terminal 재조합 항원을 2ml씩 4주령 자돈에 1차 접종
 - (나) 1차 접종 2주 후에 동량으로 2회 접종
- (3) 접종된 자돈에 대한 도전 감염 및 부검을 통한 흉막폐렴 발현 여부 확인
 - (가) 최종 백신 접종 2주 후에 APP 1형, 2형, 5형 비강 접종 후 1주일간 폐사 확인
 - (나) 대조군에서는 10두 중에서 3두가 폐사하고 3두 포함 총 8두의 폐에서 흉막폐렴 증상이 관찰되었으며 증상이 발현된 폐로부터 APP가 분리 동정 됨
 - (다) 고스트 균체와 독소이드로 접종된 돼지에서는 폐사와 폐로부터 흉막폐렴 증상 및 APP가 분리 동정되지 않음(표 21, 그림 45 참조)

표21. 자돈에 Apx IA, IIA, IIIA C-terminal 재조합 단백질과 APP 고스트 균체를 접종한 후 야외 분리주인 APP 1형, 2형 그리고 7형으로 도전감염 후 자돈의 상태

그룹	실험자돈 수	폐사자돈	돼지 흉막폐렴 발현 자돈	정상 자돈
A 음성 대조군	5	0	0	3
B PBS 접종군	10	3	5	2

C	고스트 사균체 접종군	10	1	3	6
D	재조합 독소이드 접종군	10	0	2	8
E	재조합독소이드 및 고스트 사균체 혼합 접종군	10	0	0	10



그림 45. 돼지 흉막 폐렴 원인균을 비강으로 도전 감염.

- (4) 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 질병 발생 유무, 유사산 여부 등 모돈에서의 안정성 평가
- (가) 재조합 ApxIA, IIA, IIIA의 C-terminal 부분을 각각 8ug/ml 씩(총 24ug/ml), 15ug/ml 씩(총 45ug/ml), 30ug/ml 씩(총90ug/ml)로 준비
 - (나) 2ml 씩 분만 5주 전, 분만 2주전 각각 근육으로 접종
 - (다) 5주간 폐사, 식욕 부진 등과 같은 부작용이 관찰되지 않음
 - (라) 유사산 및 흉막 폐렴 증상 발현 안 됨
- (5) 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 질병 증상 확인 및 부검을 통한 이상 유무 확인을 통해 자돈에서의 안정성 평가
- (가) 재조합 ApxIA, IIA, IIIA의 C-terminal 부분을 각각 8ug/ml 씩(총 24ug/ml), 15ug/ml 씩(총 45ug/ml), 30ug/ml 씩(총90ug/ml)로 준비
 - (나) 2ml 씩 분만 5주 전, 분만 2주전 각각 근육으로 접종
 - (다) 4주간 폐사, 식욕 부진, 흉막 폐렴 증상 발현 안 됨

3. 참여기관(제2협동)

가. 생산된 기능성 펩타이드 물질의 보존성 평가 및 제품화

- (1) 대량 생산된 각 세균에 최적화된 AMP의 냉동 보관에 따른 기능적 변화 여부 관찰
- (2) 보존성 증진을 위한 최적화 냉동보관 보조제의 선별
- (3) 정기적으로 각 세균에 대한 각 시기별 고스트화 유도 유효 농도 측정
- (4) 보관 후 변화된 물리학적 성상 평가(표 22 참조)

표 22. PMAP-36 물리적 성상

PMAP-36 (냉동, -80℃)	생산	3개월 경과
물리적 성상		
	투명하고 불순물이 없는 액체	투명하고 불순물이 없는 액체
농도	4.98 mg/ml	4.64 mg/ml

- (5) 생산, 정제된 펩타이드와 적합한 보관 보조제와 같이 혼합하여 시제품 제작
- (가) 제1세부에서 생산한 AMP (PMAP36)을 제공받아 총 3종의 연고 제형으로 AMP를 사용한 유방염 치료 연고제 제작(그림 46 참조)
- (나) 제조 직후 연고에 들어있는 AMP 농도를 측정하고, 시제품을 실온, 냉장(4℃), 냉동(-20℃) 조건에서 보관



그림 46. 유방염 치료 연고제 시제품

- (6) 정기적으로 시제품의 기능적 효능, 물리화학적 변화 여부 등 시제품의 안정성 평가
- (가) 일정 기간마다 연고 내의 AMP 농도 측정
- (나) 제조 후 목적동물에서의 효능평가를 수행하기 위하여 전임상시험 계획
- (다) 산업 동물이므로 적용 전 추가적인 안전성 확보를 위한 자료를 확보하고 적용 대상 기관과 논의 및 조율 진행

(7) 보관 방법의 구체화 및 최적화

(가) AMP 농도가 가장 균일하게 유지되는 보관 조건 확인

나. 각 재조합 독소(BTP) 대량 생산, 장기 보존 방법 선별 및 효능 평가

(1) 산업화를 위한 대량 생산을 위한 시스템 구축

(가) 펩타이드의 대량 정제가 가능한 기관 탐색

(나) 산업화 스케일의 펩타이드 대량 생산 가능성 확인

(2) 대량 생산된 이들 독소의 기능적 효능 비교 평가

(3) 대량 생산에 따른 이들 독소의 보관 방법 구체화 확립

(4) 정제된 독소의 기능에 영향을 주지 않고 또한 부작용을 최소화할 수 있는 정제 방법 확립

(5) 정제된 재조합 독소들의 돼지를 대상으로 한 효능 비교 평가

다. 발현 정제된 BTP의 불활화과정 확립

(1) 대량 생산된 독소들의 불활화 및 고정 방법 확립

(2) 불활화 여부 또는 병독성 여부를 실험 동물 내지는 목적동물인 돼지를 이용하여 불활화 여부 확인

(3) 돼지를 이용하여 불활화된 독소이드 장기 보관에 따른 병독성 회복 여부에 대한 정기적 확인

(4) 독소이드의 장기 보관을 위한 적합한 보존제 선별

(5) 보존제 및 장기 보관에 따른 불활화 독소이드의 항원성 유지 여부 검사

제3절. 3차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 주관기관(제1세부)

가. AMP 및 BTP 대량 생산

(1) 2차년도에 추가된 제품 후보 펩타이드들의 클론을 이용한 대량 생산

(가) 발굴한 유방염 유발균 특이적 AMP 최종 후보 PMAP36의 목적동물(젓소) 효능평가를 위한 대량 생산

 유방염 유발 균주 최적화된 항균 펩타이드 PMAP36 생산 과정

- Bioreactor를 이용한 대량발현
- Insoluble extraction
- Ni affinity chromatography
- Dialysis & lyophilization
- CNBr cleavage, washing & lyophilization
- HPLC
- Lyophilization, pooling & gel running
- Peptide estimation & MIC assay

그림 47. PMAP36 생산 과정 요약.

- ① 확립한 High cell density 기술을 이용하여 발효조를 통해 3.2L, 54.4 OD cell/ml로 1L 플라스크 수준과 비교 시 43배 이상의 발현량 획득(그림 48 참조)

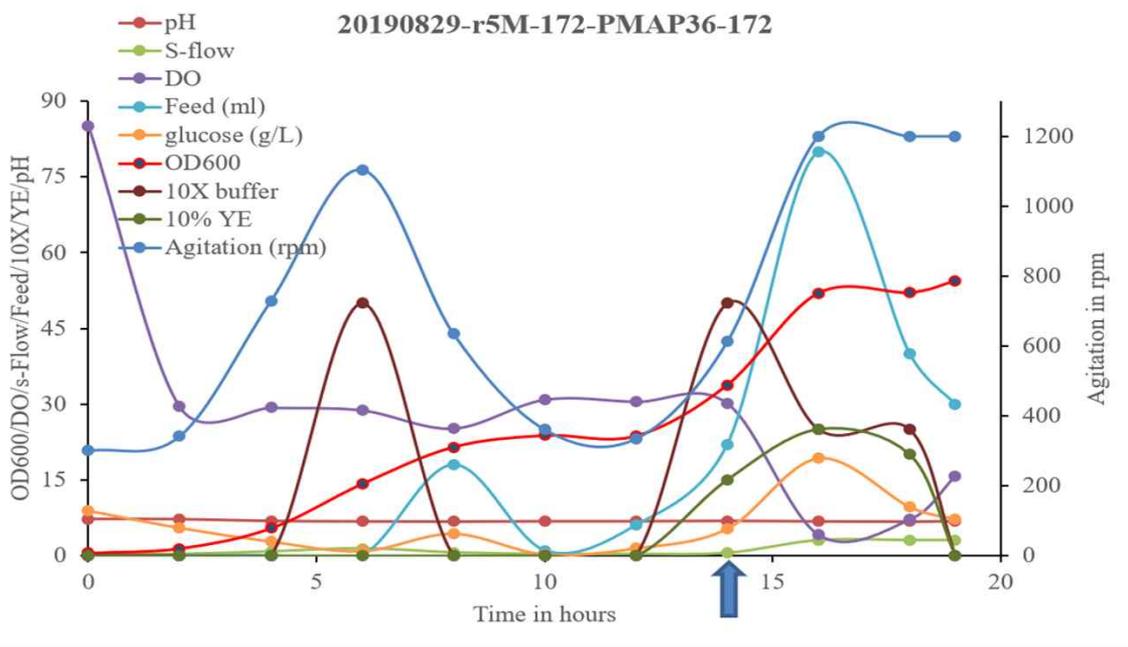


그림 48. 발효조 기반 High cell density 기술의 적용.

- ② High cell density 기술 기반 PMAP36 발현량과 1L 플라스크 규모와의 발현량 비교를 위한 Ni-NTA chromatography 수행 결과, 1L 플라스크 수준과 유사함을 확인(그림 49 참조)

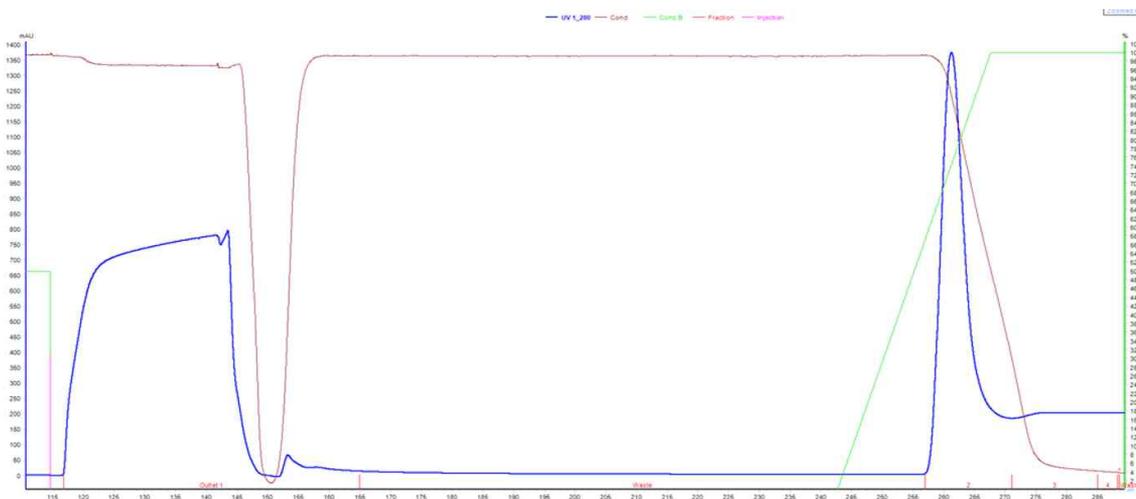


그림 49. High cell density 기술 기반 발현 PMAP36의 Ni-NTA 정제. 1L 플라스크 발현량과의 비교를 위해 동일한 박테리아 수 만큼 insoluble extraction 과정을 거쳐 Ni affinity chromatography를 수행한 결과, 발효조 발현 시 발현량은 1L 플라스크와 유사하나 biomass가 증가함을 확인.

- ③ FPLC를 통한 발현량 검증 후 insoluble extraction 과정을 통해 불용성으로 발현된 용합 단백질을 추출, SDS-PAGE를 통해 washing 과정에서 용합 단백질의 손실 없이 추출했음을 확인(그림 50 참조)

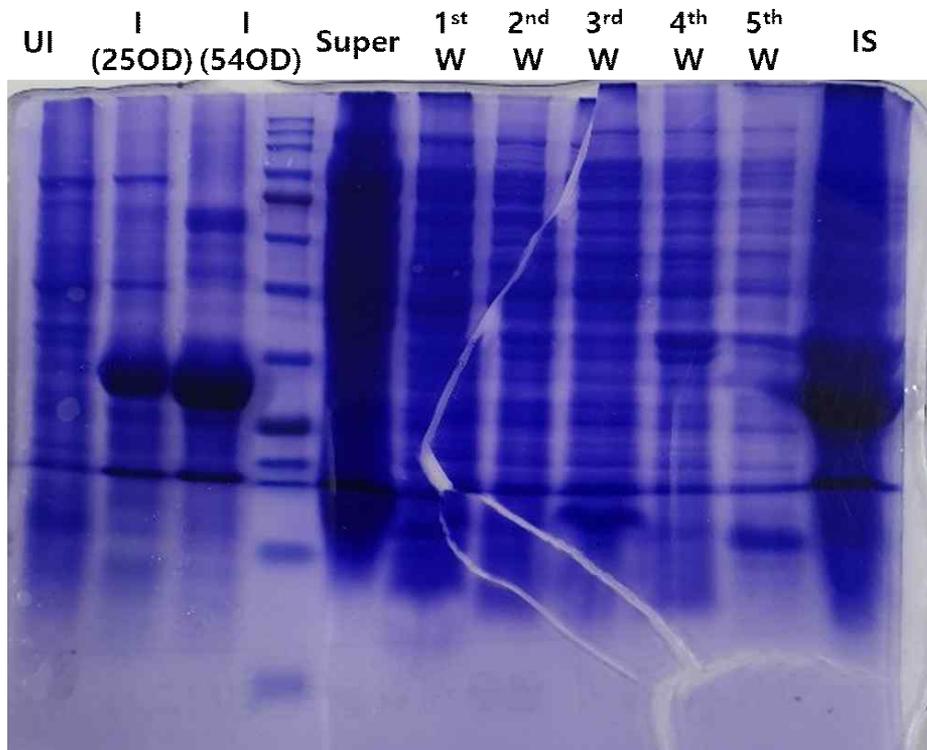


그림 50. 발효조를 통해 발현한 PMAP36 용합단백질 insoluble extraction 결과. I(25OD)와 I(54OD)는 서로 다른 시기에 발효조를 이용하여 발현한 것으로 54OD cell의 경우 그 발현량이 더 증가된 것을 확인하였고, insoluble extraction 과정에서 용합 단백질의 손실 없이 추출하였음을 확인함(UI, uninduced; I, induced; Super, supernatant; W, washing; IS, insoluble protein)

- ④ Insoluble extraction 과정을 통해 얻은 불용성 용합 단백질을 Ni affinity chromatography를 통해 정제 및 SDS-PAGE를 통한 결과 확인(그림 51, 52 참조)

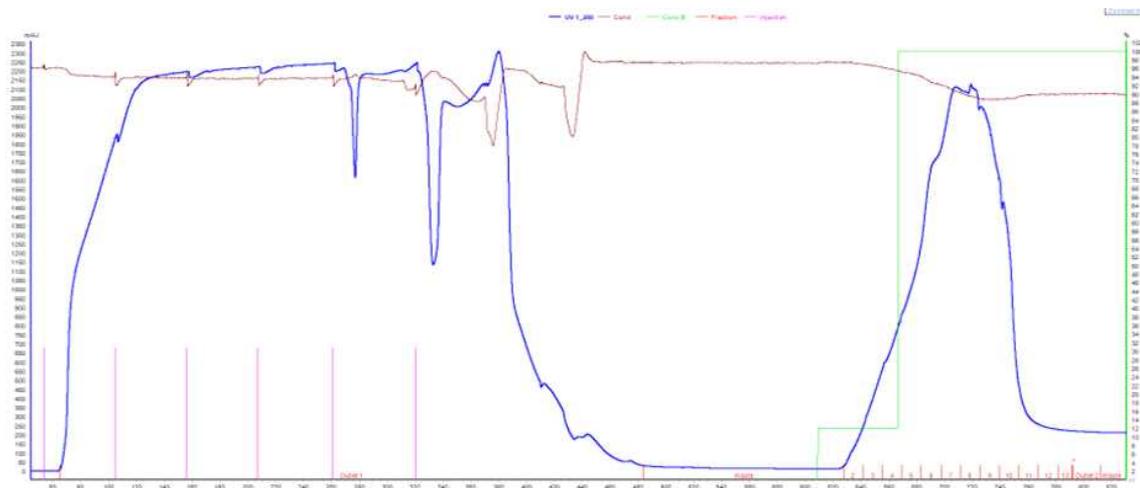


그림 51. HiScale 16/40 Ni-NTA Sepharose FF large column을 이용한 대량 정제. 추출한 불용성 단백질의 부피가 커 여러번 나누어 injection. Elution 과정을 거쳐 용합 단백질을 정제했고, 발현량이 칼럼 용량보다 크므로 여러번의 정제 과정을 거침.

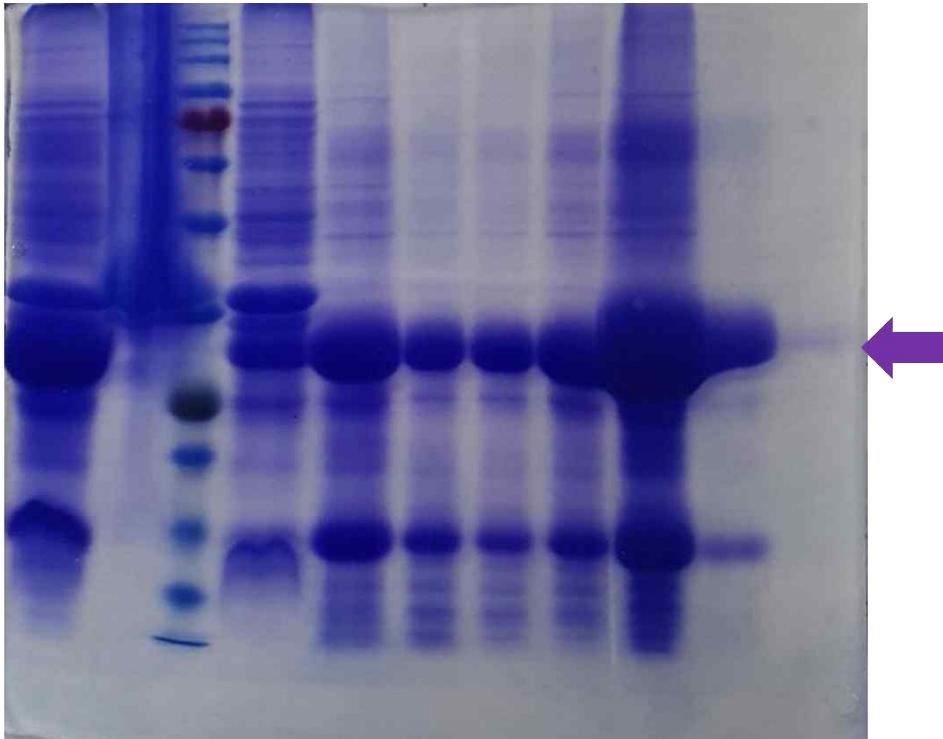


그림 52. HiScale 16/40 Ni-NTA Sepharose FF large column을 이용한 PMAP36 융합 단백질 chromatography fraction 결과. 여러 번에 걸쳐 수행된 Ni affinity chromatography elution 과정 으로부터 얻은 fraction을 gel에 확인하여 정제된 융합 단백질 확인

- ⑤ FPLC를 통해 정제된 PMAP36 융합 단백질은 투석(dialysis), 동결 건조(lyophilization) 과정을 거친 후 CNBr 처리 및 동결 건조 과정을 거쳐 최종 정제 단계인 HPLC를 수행한 뒤 Tricine SDS-PAGE를 통해 확인(그림 53, 54 참조)

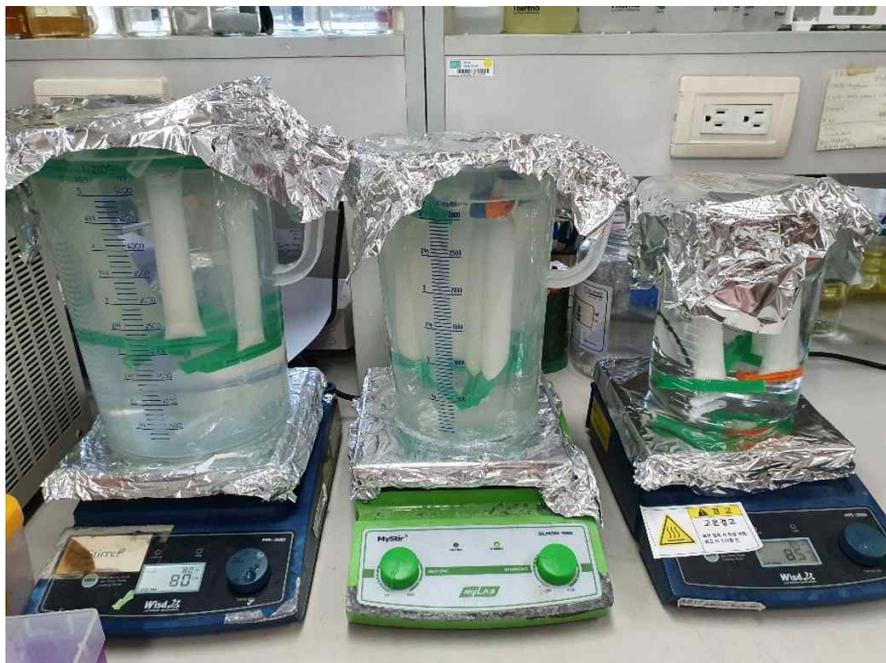


그림 53. Ni affinity chromatography를 거쳐 정제된 PMAP36의 membrane을 이용한 dialysis 과정.

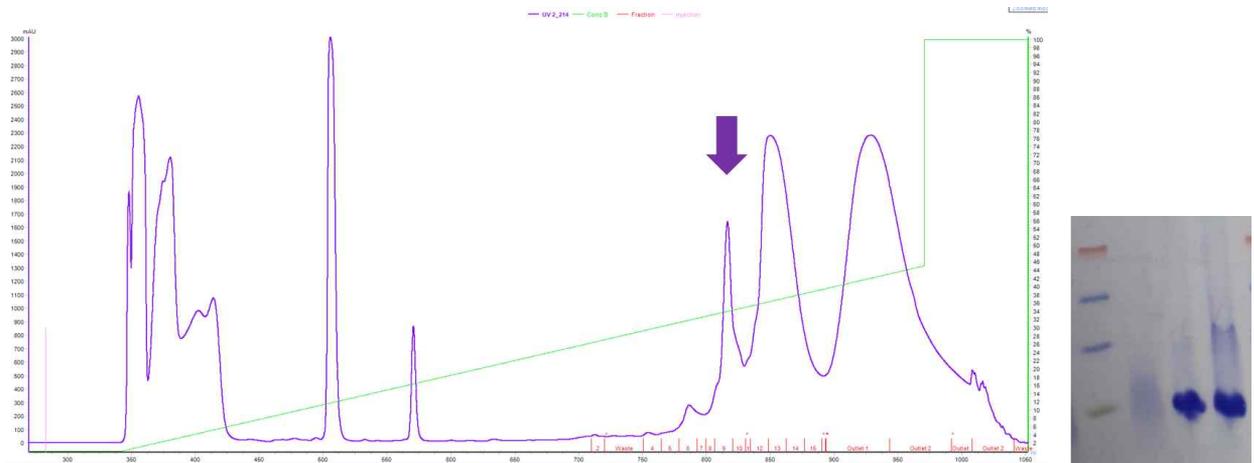


그림 54. HPLC를 통해 정제된 PMAP36 펩타이드. Chromatogram 상의 화살표로 표시된 peak이 PMAP36이 담긴 fraction으로 Tricine SDS-PAGE로 확인.

- ⑥ 발효조로부터 대량 발현된 PMAP36 펩타이드는 그 양에 따라 여러번의 HPLC 과정을 거치며, 녹색형광단백질과 함께 elution된 PMAP36은 재정제 과정을 거쳐 재생산
 - ⑦ 생산된 순수 PMAP36 펩타이드는 bradford assay를 통해 정량하고, MIC assay를 통해 그 항균 활성을 확인함으로써 생화학적 활성을 가진 물질임을 검증
 - ⑧ 최종 정제된 PMAP36 펩타이드는 본 연구실 1L 플라스크 생산 PMAP36 펩타이드와 비교시 동일한 최소 억제 농도를 가지는 것을 확인
- (나) 발효조 기반 High cell density 기술을 통해 3.2L 부피, 54OD cells/ml로 발현된 PMAP36 펩타이드 각 생산 단계별 생산량은 총 149 mg으로 본 연구실 선행 연구 결과(1L 기준 평균 13 mg 생산)와 비교할 때 약 12배가 넘는 것을 확인(표 23 참조)
- (다) 생산된 펩타이드 중 125 mg을 목적동물(젓소)에 대한 효능평가를 위해 제2협동에 제공

표 23. 목적 동물 효능 평가를 위한 발효조 및 대형 Ni-NTA 칼럼을 이용한 대량 발현 및 생산 결과

Production	Flask	Bioreactor	Bioreactor/Flask
OD	4	54	13.5
Culture volume	1L	3.2L	3.2
Insoluble extraction	1.3g	25.3g	19.5
Ni-NTA	250mg	8.6g	34.5
HPLC	13mg (10 to 15mg)	149mg	11.5 (10 to 15)

(2) 엔지니어링 모델 후보 AMP의 생산, 정제 및 효능 평가

(가) 대량 생산을 위한 모델 후보 AMP의 선정

- ① 유방염은 주로 그람 양성균에 의해 유발되므로 2차년도 확보한 유방염 유발 표준 균주에 대해 엔지니어링 모델 후보들에 대한 생산용 클론을 확보, 그 중 그람 양성균 특이 및 광범위 활성을 가지는 AMP 일부의 활성을 검증함(표 18 참조)
- ② 그 중 가장 강한 활성을 가지는 PMAP36을 최종 연고제형 후보 AMP를 선정하여 대량 생산 및 활성, 안정성 평가를 진행(그림 48~54, 58~59 및 표 18, 23, 25, 26, 28 참조)
- ③ 그 외 다른 모델 후보 중 기존에 알려진 연구 결과 및 2차년도 대량 생산용 클론의 성장 곡선 연구 결과(그림 40, 41 참조)를 토대로 그람 양성균에 강한 활성을 가지는 것으로 판단되는 조류 유래 cc-CAHT3에 대한 항균 활성 검증을 수행하기 위해 대량 생산을 진행

(나) 모델 후보 cc-CATH3의 발현, 정제 및 생산

- ① 클로닝을 통해 고도의 엔지니어링 기법이 도입된 녹색형광단백질의 루프 지역에 삽입된 모델 후보 cc-CATH3 클론에 대해 숙주 독성 여부 평가는 2차년도에 완료(그림 40, 41 참조)
- ② 숙주 독성이 강한 cc-CATH3 펩타이드는 다른 모델 후보인 PMAP36 펩타이드처럼 생산 효율을 극대화할 수는 없지만, 숙주 독성이 있을 경우 생산이 어느 정도 가능한지에 대한 연구를 진행하지 않았음
- ③ 연구실 내 누적된 데이터를 기반으로 1L 플라스크를 이용하여 최대한 발현이 되도록 조건을 설정한 뒤 발현, insoluble extraction 과정 및 Ni-NTA chromatography를 수행(그림 43 참조)

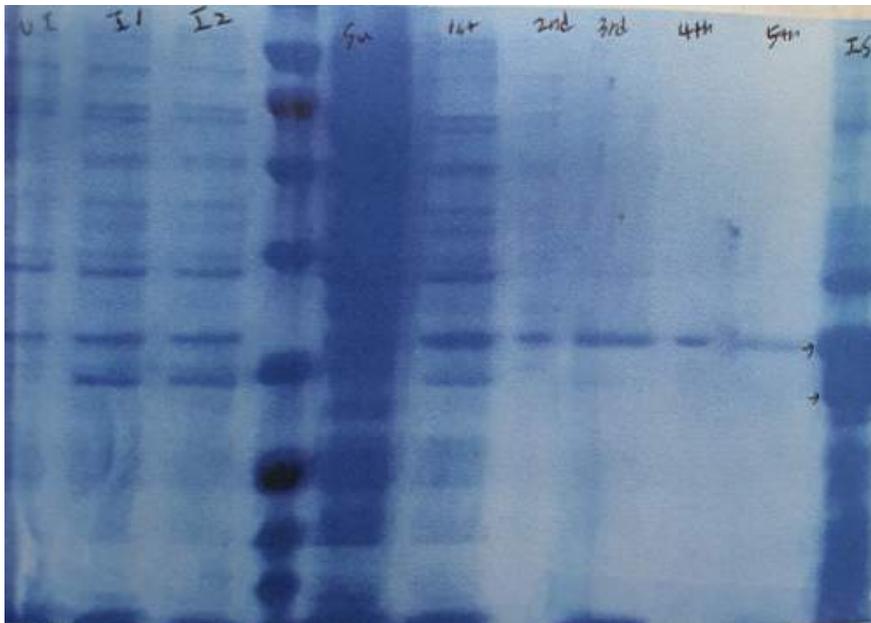


그림 55. cc-CATH3 insoluble extraction 결과. Band들의 패턴이 기존의 PMAP36과는 차이가 나는 것을 확인. Fusion protein 내에서 발현 과정에서 cleavage가 일어난 것으로 판단됨.

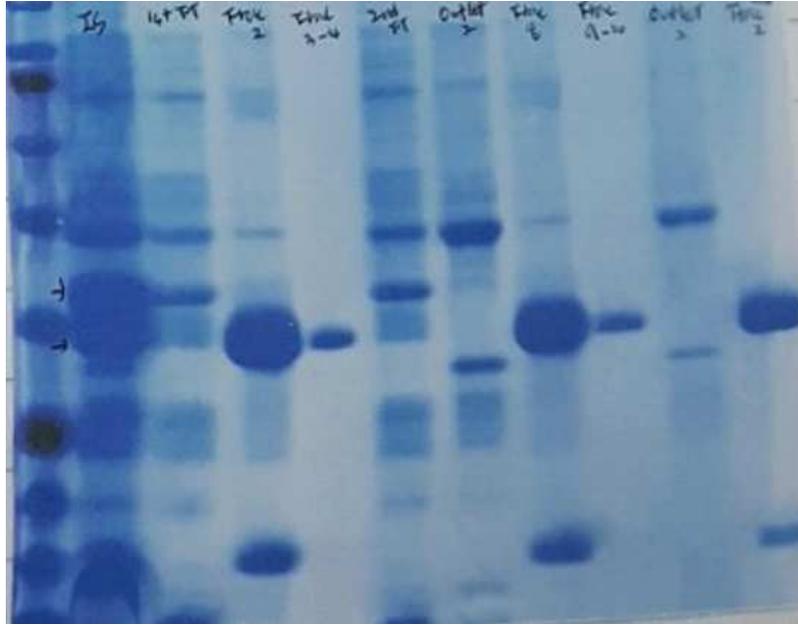
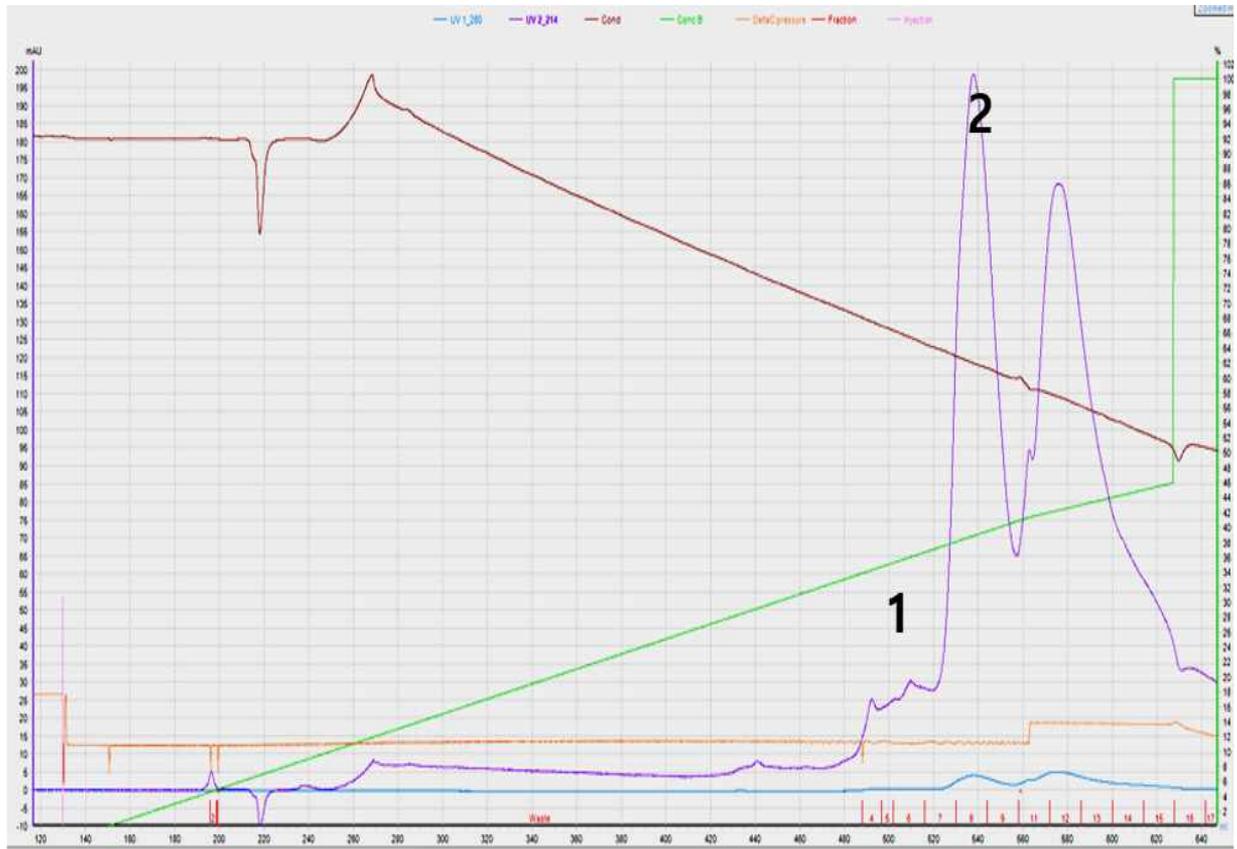


그림 56. cc-CATH3 fusion protein의 FPLC 수행 후 각각의 fraction들을 12% SDS-PAGE를 통해 확인한 결과. 비록 발현 및 클론의 성장이 억제되긴 하였으나, Ni-NTA chromatography 후 band 패턴은 PMAP36과 유사함을 확인함.

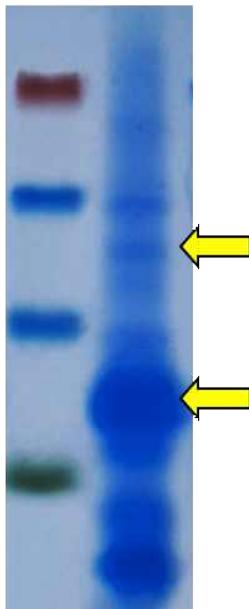
- ④ FPLC 수행 후 dialysis, lyophilization, CNBr treatment 및 washing을 포함한 lyophilization의 모든 과정을 거친 후 준비된 cleaved cc-CATH3 fusion protein 중 순수 cc-CATH3를 정제하기 위해 HPLC를 수행(그림 57 참조)
 - ⑤ HPLC chromatogram peak들 중에서 cc-CATH3 펩타이드로 예측되는 peak을 서로 혼합(pooling)하고(frac 1), 대조군으로 잘린 녹색형광단백질로 예측되는 peak을 선택하여 lyophilization을 통해 가루(powder) 형태로 만든 후 16% tricine SDS-PAGE를 통해 확인(그림 57 참조)
 - ⑥ 잘린 녹색형광단백질에는 His-tag이 존재하여 western blot을 통한 검출이 가능하므로 anti-His-tag antibody를 이용하여 western blot을 수행한 결과 cc-CATH3 펩타이드로 예상되는 frac 1에서는 신호가 검출되지 않아 해당 fraction에 대해 펩타이드 농도를 결정하는 bradford assay를 수행(그림 57 참조)
 - ⑦ 연구실 대량 생산용 벡터를 이용하여 얻은 cc-CATH3 클론을 1L 플라스크를 이용하여 발현 및 정제 시 540 μ g 생산이 가능
- (다) 엔지니어링 모델 후보 AMP 2종의 유방염 관련 표준 균주에 대한 항균 활성 검증
- ① 해당 박테리아 패널을 대상으로 대량 생산된 엔지니어링 모델 후보 AMP 2종 PMAP36 및 cc-CATH3의 항균 활성을 검증하기 위해 MIC assay를 수행
 - ② 그 결과, PMAP36 및 cc-CATH3 모두 매우 강한 활성을 보이는 것을 확인(표 24 참조)



cc-CATH3 Frac 1



cc-CATH3 Frac 2



Frac Frac
1 2

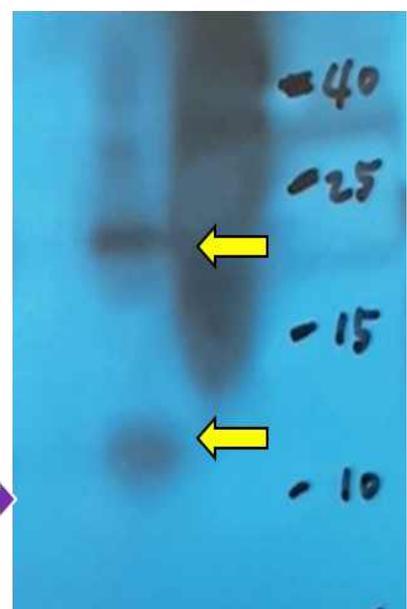


그림 57. 모델 후보 cc-CATH3 펩타이드 생산을 위한 HPLC, 정제된 fraction 확인을 위한 tricine SDS-PAGE 및 western blot 수행 결과. Chromatogram 상의 fraction 1번을 통해 정제된 cc-CATH3 펩타이드를 확인하였으며, fraction 2번의 경우 CNBr를 통해 일부만 잘린 녹색형광단백질(partially cleaved GFP)의 각 조각(fragment) 및 cc-CATH3가 섞여있음을 확인함. Fraction 1에 일부만 잘린 녹색형광단백질의 존재 유무를 확인하기 위해 western blot을 수행한 결과, fraction 1에는 신호가 검출되지 않았으므로 cc-CATH3만 있음을 확인 가능.

표 24. 유방염 유발 관련 표준 균주에 대한 모델 후보 AMP 2종의 MIC assay 결과

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$, μM)				
	PMAP36	cc-CATH3	Chloramphenicol ^a	Ampicilin ^a	Gentamycin ^a
Gram-Positive Bacteria					
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1.5	0.375	2	1	1 (2.09)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4	1	3	2	5
<i>S. agalactiae</i> ATCC 27956	1	1	1	1	3
<i>S. dysgalactiae</i> ATCC 27957	0.5	2	1	1	2
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 43079	3	1	1	1	1

^aAntibiotics for control

나. 제품 후보 AMP 및 BTP 평가 및 선발

(1) 2차년도에 생산된 AMP의 pH, 염농도 및 혈청 내 안정성 테스트

(가) pH에 따른 안정성

- ① AMP는 세포, 조직 및 기관별로 그 발현이 다름. 각각의 발현 대상에 따라서 pH 환경 또한 다양하며, 항생제 대체 물질로써 의약학 분야에 적용을 위해서 pH에 따른 안정성을 확인하는 것은 중요한 의미가 있음.
- ② 제품 후보 PMAP36 펩타이드 경우 다소 낮은 pH에서도 항균 활성에 영향을 받지 않는 것을 확인됨(표 25 참조).

표 25. 제품 후보 PMAP36의 pH에 따른 안정성 평가 결과.

Condition	MIC ($\mu\text{g/ml}$, μM)
Control ^a	2
pH 5	2
pH 6	2
pH 7	2

^a Minimum inhibitory concentration (MICs) using Mueller-Hinton Broth (MHB) without any additives.

(나) 염 농도에 따른 안정성

- ① AMP는 각각의 펩타이드에 따라 생리학적 염 농도에서 그 안정성의 차이를 가지기 때문에 염 농도에 따른 안정성을 검증하는 것이 중요함
- ② 제품 후보 AMP PMAP36 펩타이드와 PMAP36 연고의 염 농도(150mM NaCl)에 따른 안정성을 확인한 결과, 모두 생리학적 염 농도 내에서 그 항균 활성이 전혀 영향을 받지 않는 것으로 확인됨(그림 58 참조)

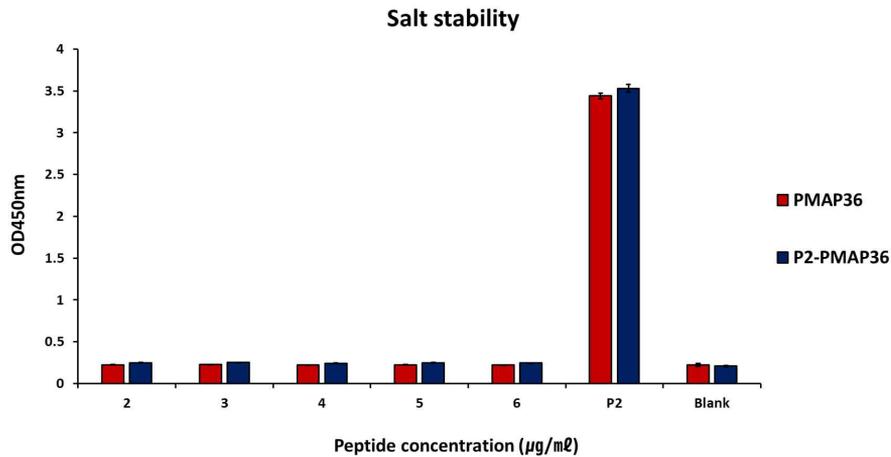


그림 58. 생리학적 염 농도(150mM NaCl) 내 PMAP 및 유방염 치료 연고의 안정성.

(다) 혈청 내 안정성 테스트(Serum stability)

- ① PMAP36 펩타이드 및 연고 제형 혼합물을 각각 소 태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS) 과 1:1 부피로 혼합(50%)하여 37°C 에서 각각 0분, 60분, 120분 간 반응시킨 후 MIC assay를 수행
- ② PMAP36 펩타이드와 연고 제형 혼합물은 혈청 내에서 높은 안정성을 가짐을 확인(그림 59, 60 참조)

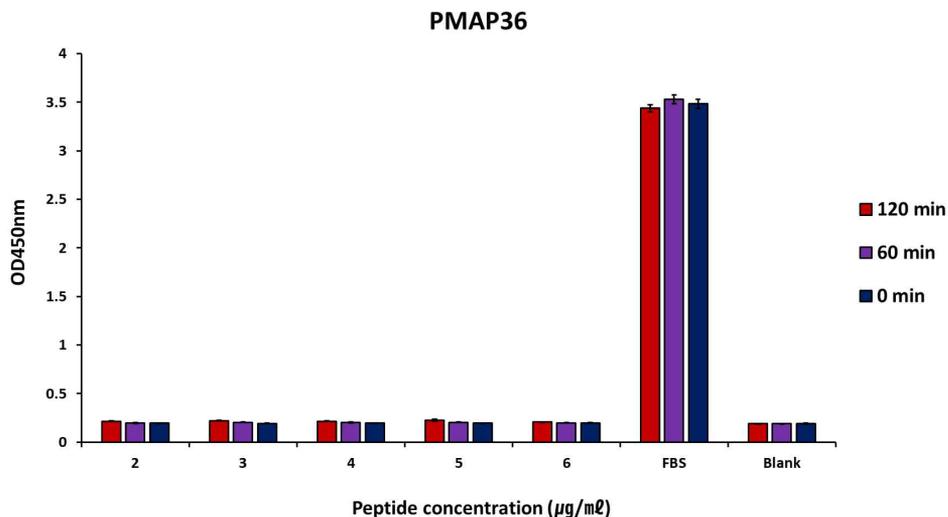


그림 59. 소 태아 혈청과 반응시킨 PMAP36 펩타이드의 혈청 내 안정성 결과.

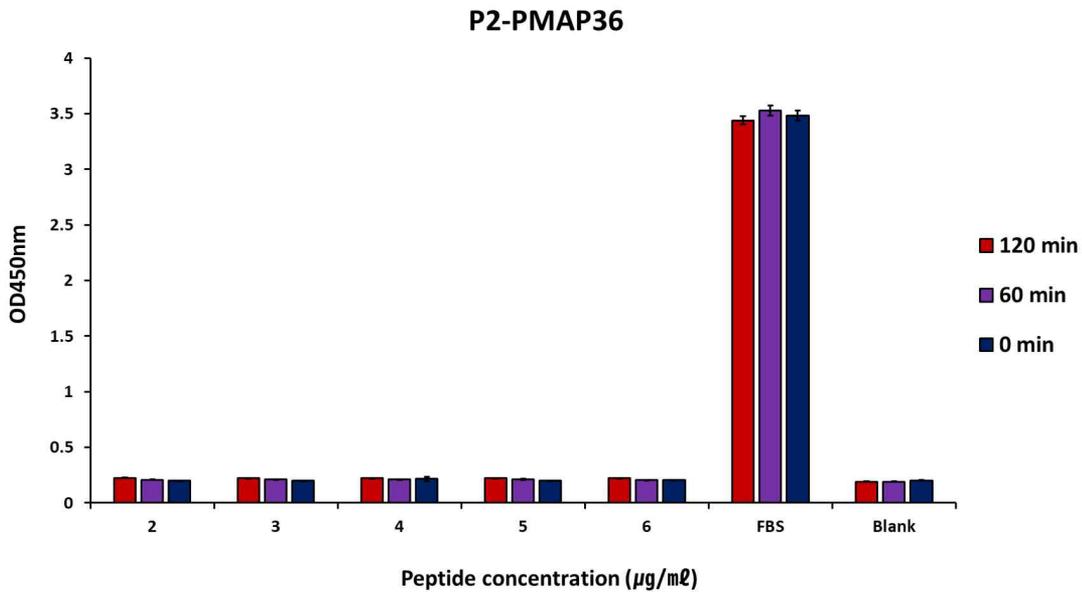


그림 60. 소 태아 혈청과 반응시킨 유방염 치료 PMAP 연구의 혈청 내 안정성 결과.

(2) 제품후보 AMP에 대한 세균 및 포유동물 세포패널을 이용한 효능 및 독성평가

(가) 유방염 유발 표준균주에 대한 PMAP36 펩타이드의 항균 활성 평가

- ① 2차년도 유방염 유발 표준 균주 패널에 대해 후보 AMP 6종에 대해 항균 활성 평가를 수행하여 가장 강한 활성을 보이는 PMAP36 펩타이드를 제품 후보로 선정(표 19 참조)
- ② 엔지니어링 후보 AMP 중 cc-CATH3를 선정, 유방염 유발 표준 균주 패널에 대한 항균 활성 평가를 통해 cc-CATH3가 PMAP36과 거의 동일하게 강한 활성을 가지는 것을 확인(표 24 참조)
- ③ 확보한 박테리아 패널에 대한 항균 활성 및 극대화된 대량 생산의 가능성을 고려하여 PMAP36 펩타이드를 최종 제품후보 AMP로 선정
- ④ 확보된 유방염 유발 관련 표준 균주 패널은 그람 양성균으로 구성되어 있으므로 국내 유방염 유발 주요 균주들을 고려하여 그람 음성균 *E. coli* 및 *P. aeruginosa*를 추가적으로 선정
- ⑤ 해당 박테리아 패널을 대상으로 대량 생산된 후보 AMP 2종 PMAP36 및 cc-CATH3의 항균 활성을 검증하기 위해 MIC assay를 수행
- ⑥ 그 결과, PMAP36 및 cc-CATH3 모두 매우 강한 활성을 보이는 것을 확인(표 26 참조)

표 26. 그람 음성균이 추가된 유방염 유발 관련 표준 균주 패널에 대한 제품 후보 AMP 2종의 MIC assay 결과

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$, μM)				
	PMAP36	cc-CATH3	Chloramphenicol ^a	Ampicilin ^a	Gentamycin ^a
Gram-Negative Bacteria					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2	1	1	1	1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2	2	17	> 128	1

Gram-Positive Bacteria					
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1.5	1	2	1	1
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	5	1	2	16	1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4	1	3	2	5
<i>S. agalactiae</i> ATCC 27956	1	1	1	1	3
<i>S. dysgalactiae</i> ATCC 27957	0.5	2	1	1	2
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 43079	3	1	1	1	1

^aAntibiotics for control

(나) 농장 유래 유방염 의심 균주에 대한 PMAP36 펩타이드의 효능 평가

- ① 농장 유래 유방염 의심 균주는 동일 균주를 제외하고 총 12종의 균주를 제2협동으로부터 제공받았으나, 이 중 일반 배지에 배양이 어려운 균주 2종을 제외한 10종에 대해 Glycerol stock을 확보
- ② 10종 중 2종은 일반 배지에서의 성장 속도가 느려 최소 억제 농도 검증을 위한 colorimetry 기법의 적용이 어려우므로 이를 제외한 8종에 대한 MIC assay를 수행
- ③ 확보된 최종 균주 패널은 다음과 같음
 - ㉠ 그람 음성균: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966
 - ㉡ 그람 양성균: *Staphylococcus chromogenes* CBCC 1462, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Staphylococcus saccharolyticus* JCM 1768, *Corynebacterium simulans* UCL 553, *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180, *Streptococcus uberis* JCM 5709
- ④ 농장 유래 유방염 의심 균주 패널에 대한 효능 평가를 위해 세포 수 및 배양액에 대한 최적화 연구 완료
- ㉢ 농장 유래 유방염 의심 균주 패널의 세포 수 측정 완료(그림 61 참조)

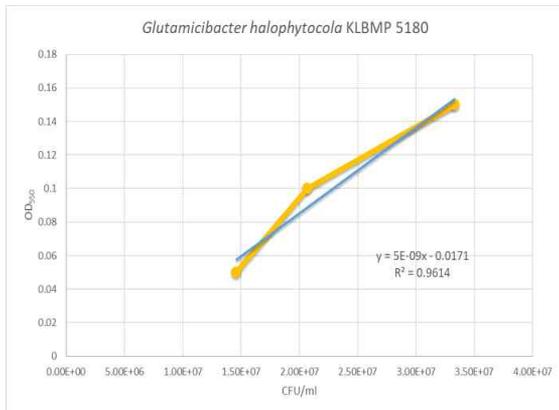
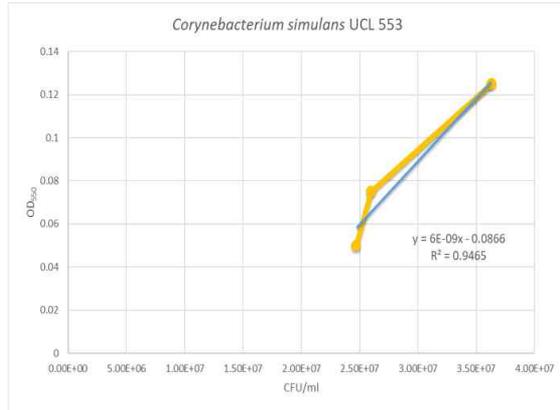
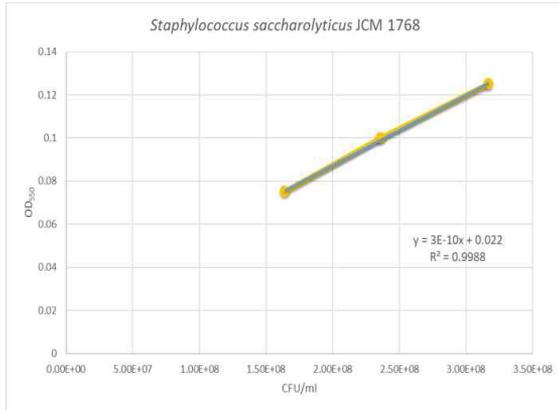
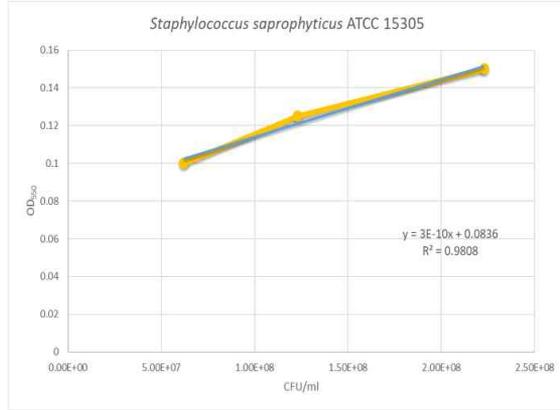
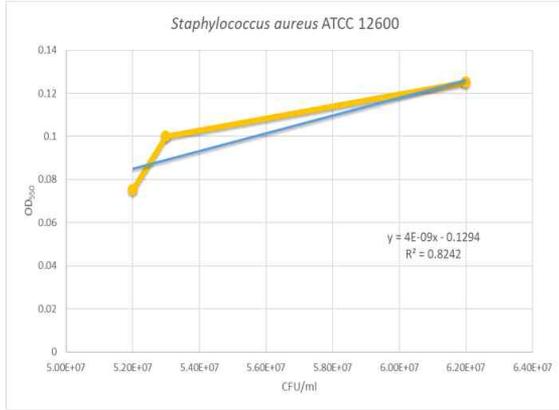
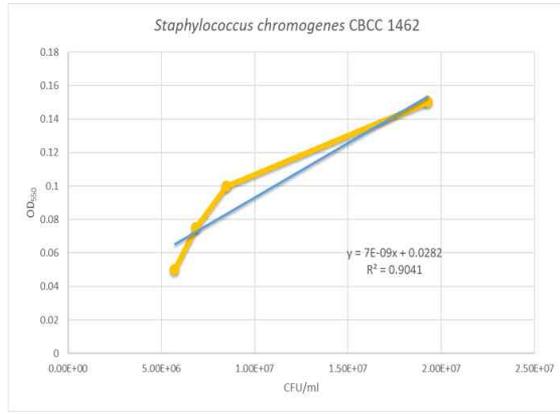
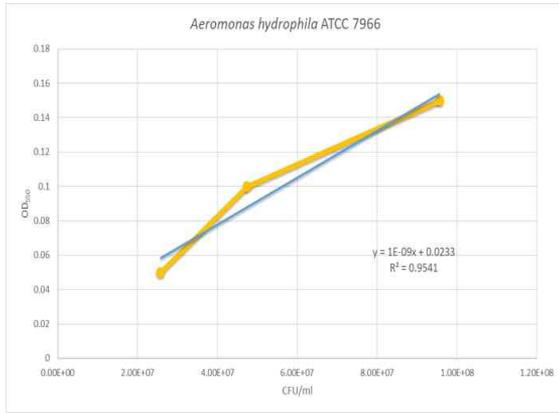


그림 61. 농장 유래 유방염 의심 균주 패널의 OD 값에 따른 세포 수 확인

- ⑤ 농장 유래 유방염 의심 균주 패널 8종에 대한 배양액 및 colorimetry 기법의 적용 완료 (그림 62 참조)

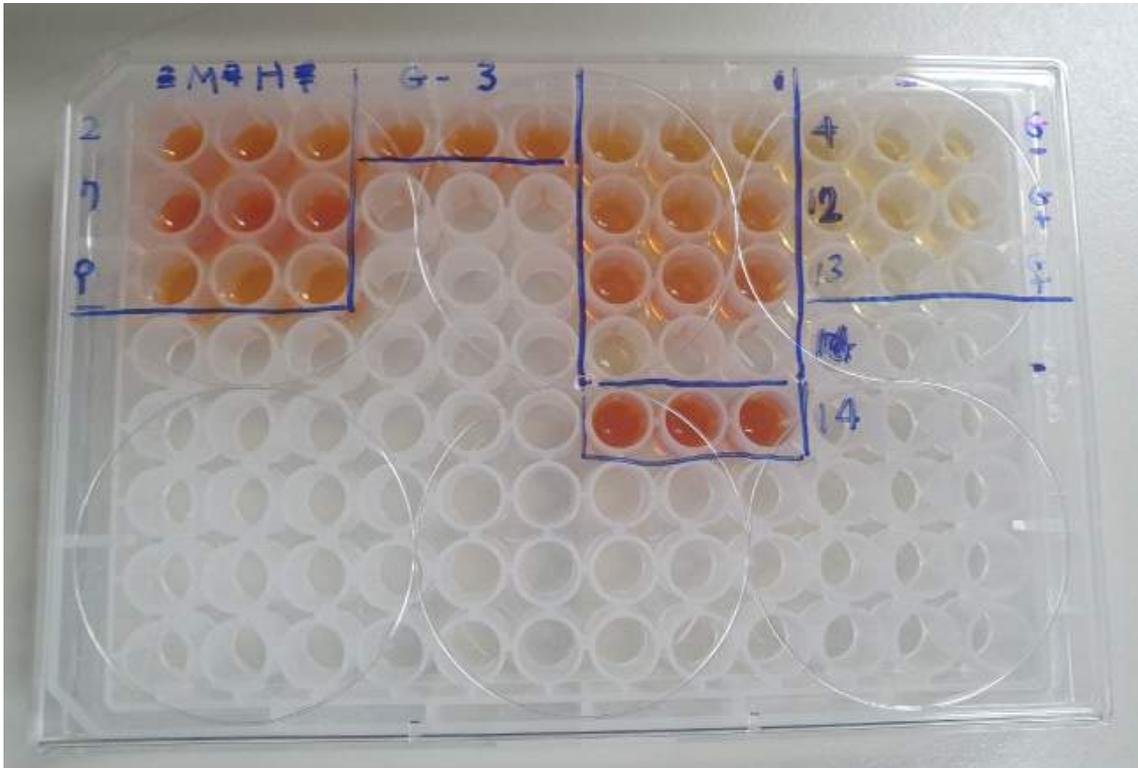


그림 62. 농장 유래 유방염 의심 균주 8종에 대한 colorimetry 기법 및 배양액 최적화

- ⑥ 제품 후보 PMAP36 펩타이드의 농장 유래 유방염 의심 균주 패널에 대한 항균 활성 검증(표 27 참조)

표 27. 농장 유래 유방염 의심 균주 패널에 대한 PMAP36 펩타이드의 항균 활성 결과

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$, μM)			
	PMAP36	Chloramphenicol ^a	Ampicillin ^a	Gentamycin ^a
Gram-Negative Bacteria				
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	32<	1	> 128	1
Gram-Positive Bacteria				
<i>Staphylococcus chromogenes</i> CBCC 1462	3	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	1.5	1	2	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	3	1	1	1
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i> JCM 1768	3	1	1	1
<i>Corynebacterium simulans</i> UCL 553	1	1	128	2

<i>Glutamicibacter halophytocola</i> KLBMP 5180	1	1	3	1
<i>Streptococcus uberis</i> JCM 5709	2	15	72	8

^aAntibiotics for control

(다) 제품 후보 AMP PMAP36와 cc-CATH3 펩타이드의 세포 독성 평가

- ① 제2협동으로부터 제공받은 소 유래 혈액 세포에 대한 제품 후보 AMP 2종 펩타이드의 용혈성 평가 완료
- ② PMAP36 및 cc-CATH3 모두 낮은 용혈성을 보임(표 28 참조)

표 28. 제품 후보 AMP 2종의 용혈성 평가 결과

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Hemolytic rate \pm SD (%)	
	PMAP36	cc-CATH3
8	0.7 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
16	1.1 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1
32	1.5 \pm 0.5	2.3 \pm 0.4
64	2.0 \pm 0.3	N.D

Note. The experiment for hemolytic activity was triplicated.

- ② HEK293T(human embryonic kidney cells)과 PK15(pig kidney cells)에 대한 PMAP36 펩타이드의 세포독성 검증 완료(그림 63 참조)
- ③ PMAP36 펩타이드의 혈청(FBS) 첨가 여부에 따른 세포 독성 검증 결과, 혈청이 첨가되지 않은 배지에서 독성이 적었으며, HEK293T 세포에서 독성이 더 적은 것으로 나타남
- ④ 세포 독성 결과는 용혈성 결과와 유사한 것으로 확인

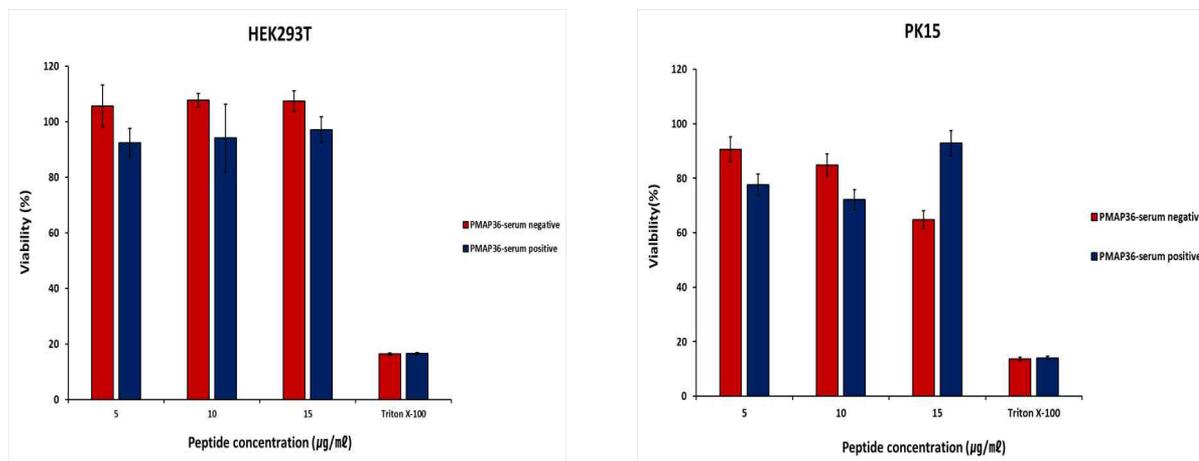


그림 63. PMAP36 펩타이드의 혈청 첨가 유무에 따른 세포 독성 평가 결과.

(3) 유방염 유발균 특이적 AMP를 이용한 유방염치료 연고제의 목적동물(젓소) 활용 과용량안전성 (최대 3 dose) 및 효능 평가

(가) 유방염 유발균 특이적 AMP 펩타이드 및 최적의 연고제형(P2)의 혼합제의 용혈성 평가

- ① 유방염 유발 표준 균주 패널에 대한 최소 억제 농도 결과 중 각각의 펩타이드의 가장 큰 최소 억제 농도를 기준으로(PMAP36: 5 µg/ml, cc-CATH3: 2µg/ml) 과용량 안전성 평가(3 dose)를 수행
- ② 제품 후보 PMAP36 및 cc-CATH3의 과용량 용혈성 평가 결과 거의 독성이 없는 것으로 확인됨(표 29 참조)

표 29. PMAP36 및 cc-CATH3 펩타이드의 과용량(3 dose) 용혈성 평가 결과

PMAP36		cc-CATH3	
Concentration (µg/ml)	Hemolytic rate±SD (%)	Concentration (µg/ml)	Hemolytic rate±SD (%)
5	0.1±0.1	2	0.0±0.1
10	0.7±0.0	4	0.1±0.1
15	1.5±0.1	6	0.3±0.0

Note. The experiment for hemolytic activity was triplicated.

- ③ 최종 제품 후보 PMAP36과 연고 제형 혼합제(P2-PMAP36)의 과용량 용혈성 평가결과 역시 거의 독성이 없는 것으로 확인됨(표 30 참조)

표 30. PMAP36 연고제형의 과용량(3 dose) 용혈성 평가

Concentration (µg/ml)	Hemolytic rate ± SD (%)	
	PMAP36	P2-PMAP36
5	0.1±0.1	0.0±0.1
10	0.7±0.0	0.0±0.0
15	1.5±0.1	0.0±0.1

Note. The experiment for hemolytic activity was triplicated.

(나) 유방염 유발균 특이적 AMP 펩타이드 및 최적의 연고제형(P2)의 혼합제의 세포 독성 평가

- ① HEK293T(human embryonic kidney cells)과 PK15(pig kidney cells)에 대한 PMAP36 펩타이드 연고 제형의 과용량(3 dose) 세포 독성 검증 결과, 예상했던 대로 PMAP36 펩타이드의 독성 평가 결과 완전히 동일함을 확인(그림 63 참조)

다. 기능성 펩타이드의 품질평가

(1) 펩타이드 제품들에 대한 순도 확인 및 생물학적 활성 검정(Quality Control)

(가) 최종 제품 후보로 선정된 PMAP36 펩타이드 및 최적의 연고 제형(P2)을 이용한 유방염 치료 연고제 PMAP36에 대한 순도 확인을 위한 LC (liquid chromatography) 기술 개발

- ① 발효조를 이용하여 대량 생산된 PMAP36 펩타이드 및 연고 제형과 혼합한 치료 연고제 PMAP36의 순도 확인을 위해 C18 HPLC 칼럼을 이용하여 HPLC를 수행
- ② 생산된 PMAP 펩타이드를 injection하여 얻은 chromatogram 상의 2종의 peak (1, 2번)을 동결건조를 통해 농축시킨 다음 16% Tricine SDS-PAGE를 통해 분석한 결과, 순수 PMAP 펩타이드와 일부만 잘린 녹색형광단백질 모두 검출됨(그림 64 참조)
- ㉠ Chromatogram 상의 peak를 기준으로 볼 때, 1번 peak의 경우 순수 PMAP36 펩타이드가 검출되었고, 2번 peak에서는 순수 PMAP 펩타이드 및 녹색형광단백질 조각 모두 검출됨
- ㉡ 펩타이드 결합을 검출하는 UV 214 nm로 모니터링하여 얻은 각 Peak의 intensity, 해당 펩타이드 및 단백질 분자량의 크기 비율을 고려할 때 PMAP 펩타이드의 순도는 70~80%로 판단됨
- ③ 치료 연고제 PMAP36 (P2-PMAP)을 injection하여 얻은 chromatogram의 경우, 4종의 peak (3~6번)이 검출되었고, 각각 농축시켜 16% Tricine SDS-PAGE를 통해 분석한 결과, PMAP36 펩타이드만 injection 했을 경우와 동일하게 순수 PMAP36 펩타이드와 녹색형광단백질 조각이 모두 검출됨
- ㉢ 연고 제형과 잘린 녹색형광단백질과의 반응으로 인해 칼럼 내에서 더 오래 잔류 (longer duration time)하여 PMAP36 펩타이드(4번 peak)와 완전히 분리되어(6번 peak) 검출되는 것으로 판단됨
- ④ 발효조 기반의 대량 생산의 경우, 플라스크(flask) 수준의 생산된 펩타이드 보다 그 순도가 낮으나, 순도를 높이고자 할 경우 정제 단계의 추가로 생산 비용 측면에서 효율이 다소 떨어짐. 순도 70~80% 수준에서도 그 효능이 고순도의 펩타이드와 동일하기 때문에 동물 의약품으로의 제품화에 문제가 없을 것으로 생각됨.
- ⑤ 유방염 치료 연고제 PMAP36은 제작 후 냉장 보관(4℃) 상태로 보관 시간에 따라(3개월 마다) 품질평가 중으로, HPLC를 이용한 품질평가는 제작과 동시에 가장 먼저 수행되었고, 현재 1개월 보관 기간의 데이터를 확보

(나) 개발한 LC 기술을 적용한 제품 후보 물질 PG-1 펩타이드의 순도 확인

- ① 최종 제품 후보 PMAP36 기반 유방염 치료 연고 품질관리를 위해 개발한 LC 기술을 다른 제품 후보 AMP PG-1 펩타이드에 적용하여 순도 측정 완료
- ② 대량 생산된 PG-1 펩타이드의 순도가 95% 이상임을 확인(그림 65 참조)

생산된 PMAP 펩타이드

치료 연고제 PMAP36

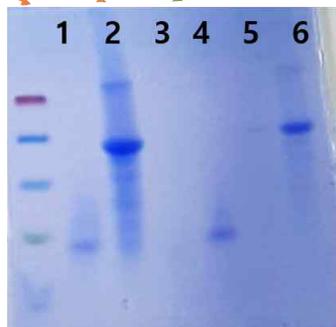
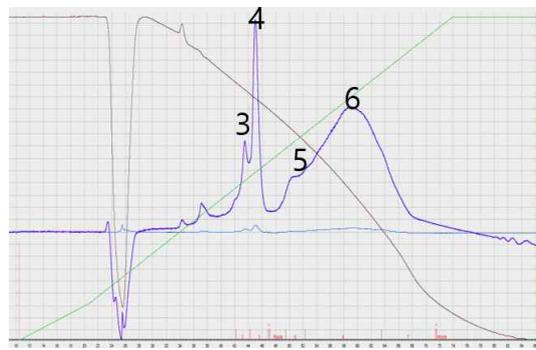
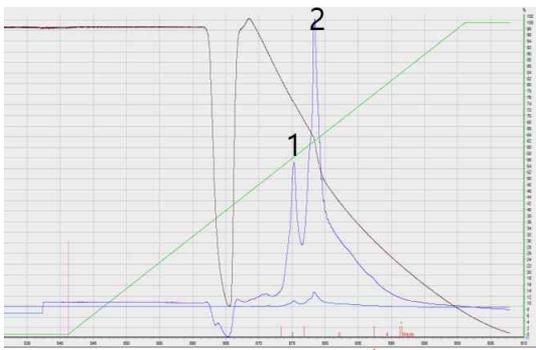


그림 64. HPLC를 이용한 생산된 PMAP 펩타이드 및 치료 연고제 PMAP36의 순도 검정 결과

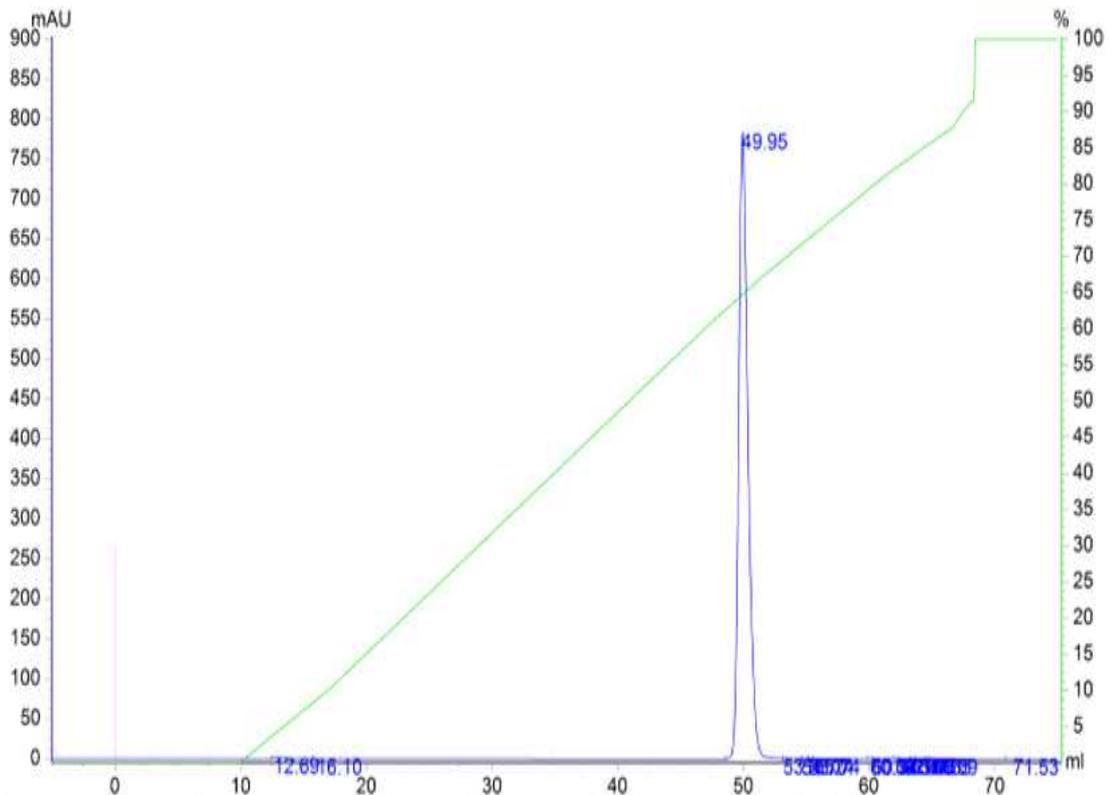


그림 65. LC 기술을 적용한 다른 제품 후보 PG-1의 순도 측정.

(다) 펩타이드 제품의 생물학적 활성 검증

- ① 유방염 치료 연고제 PMAP36의 생물학적 활성을 검증하기 위해 PMAP36 펩타이드의 항균 활성, 용혈성 결과를 포함한 세포 독성, 혈청, 염 농도 및 pH 기반 안정성 결과(표 18, 25, 26, 27, 28 및 그림 58~60 참조)를 토대로 비교한 결과, 치료 연고제 PMAP36의 연고 제형과의 혼합에도 그 활성이 전혀 저해되지 않아 항균 활성을 포함한 효능, 세포 독성 및 안정성의 모든 면에서 PMAP 펩타이드의 결과와 동일한 것을 확인함(표 30, 31 및 그림 61~63 참조).

표 31. 유방염 치료 연고제 PMAP36의 pH에 따른 안정성 평가 결과.

Condition	MIC ($\mu\text{g/ml}$, μM)
Control ^a	2
pH 5	2
pH 6	2
pH 7	2

^a Minimum inhibitory concentration (MICs) using Mueller-Hinton Broth (MHB) without any additives.

2. 협동기관(제1협동)

가. 독소이드(BTP) 함유 돼지 흉막 사균 백신과 기존 상업용 백신과의 효능 비교 평가

(1) 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 모돈 및 그 모돈에서 출생한 감염 음성 자돈 확보

(가) 재조합 ApxIV 항원을 이용한 ELISA에서 음성인 모돈 확보

(나) 음성 모돈에서 출생한 자돈을 대상으로 채혈한 혈청을 대상으로 ApxIV 항원에 대해 음성인 자돈 확보

(2) 기존 상업용 시판 백신의 접종 기준에 맞춰 상업용 백신과 고스트 균체와 재조합 독소이드가 함유된 혼합 백신을 근육접종

(가) 사균체 백신 APP 2형과 APP 5형을 1×10^9 CFU/ml이 되도록 혼합 후 2ml접종

(나) ApxIA, IIA, IIIA, IV C-terminal을 각 20ug/ml로 제작한 재조합 항원을 2ml접종

(다) 사균체 백신 APP 2형과 APP 5형 1×10^9 CFU/ml에 ApxIA, IIA, IIIA, IV C-terminal을 각 20ug/ml로 혼합한 재조합 항원 2ml씩 4주령 자돈에 1차 접종

(라) 1차 접종 2주 후에 동량으로 2차 접종

(3) 1차 및 2차 접종 전, 도전감염 전 각각 모든 자돈에서 가검물 채취 및 항체 역가 측정

(가) APP 2형, 5형 항원, ApxIA, IIA, IIIA, IV C-terminal의 항원에 대한 항체 반응은 백신 접종 후 2주 후부터 그룹C와 그룹E에서 증가(표 32, 그림 66 참조)

(4) 도전감염을 시행한 자돈의 부검을 통해 시판 백신과 개발 백신의 효능 비교 평가

(가) 최종 백신 접종 2주 후에 APP 1형, 2형, 5형, 7형, 10형을 혼합하여 5×10^9 CFU/ml, 2ml 비강 접종 후 1주일간 폐사 확인

- (나) 대조군에서는 3마리의 돼지가 폐사하고 폐사한 돼지를 포함 총 8개체에서 흉막폐렴 증상이 나타났고 증상이 나타난 폐에서 APP가 분리됨
- (다) 고스트 균체백신에서는 2마리의 돼지가 폐사하고 폐사한 돼지를 포함 총 6마리에서 흉막폐렴 증상이 나타났고 증상이 나타난 폐에서 APP가 분리됨
- (라) 독소이드 혼합백신에서는 폐사는 없었으나 2마리에서 흉막폐렴 증상이 나타났고 나타난 폐에서 APP가 분리됨
- (마) 독소이드 + 고스트사균 혼합백신에서는 폐사도 없었고, 폐에서의 균 미검출(표 33 참조)

표 32. 자돈에 Apx IA, IIA, IIIA C-terminal 재조합 단백질과 APP 고스트 백신 접종 그룹

그룹	
A	PBS 접종군
B	음성 대조군
C	고스트 사균체 접종군
D	재조합 독소이드 접종군
E	재조합독소이드 및 고스트 사균체 혼합 접종군

표 33. 도전감염 후 그룹별 방어 효능 및 실험 전반의 개요

Group	Immunization		No. of pigs used	No. of dead pigs	Challenge	
	Prime	Booster			Isolation of challenge strain	
					Organ	No. of infected lung ^a
A	PBS	PBS	10	3	Lung	8/10
B	Ghost cells	Ghost cells	10	1	Lung	6/10
C	Individual C-terminal fragments of Apx toxins	Individual C-terminal fragments of Apx toxins	10	0	Lung	2/10
D	Ghost cells & individual C-terminal fragments of Apx toxins	Ghost cells & individual C-terminal fragments of Apx toxins	10	0	Lung	0/10

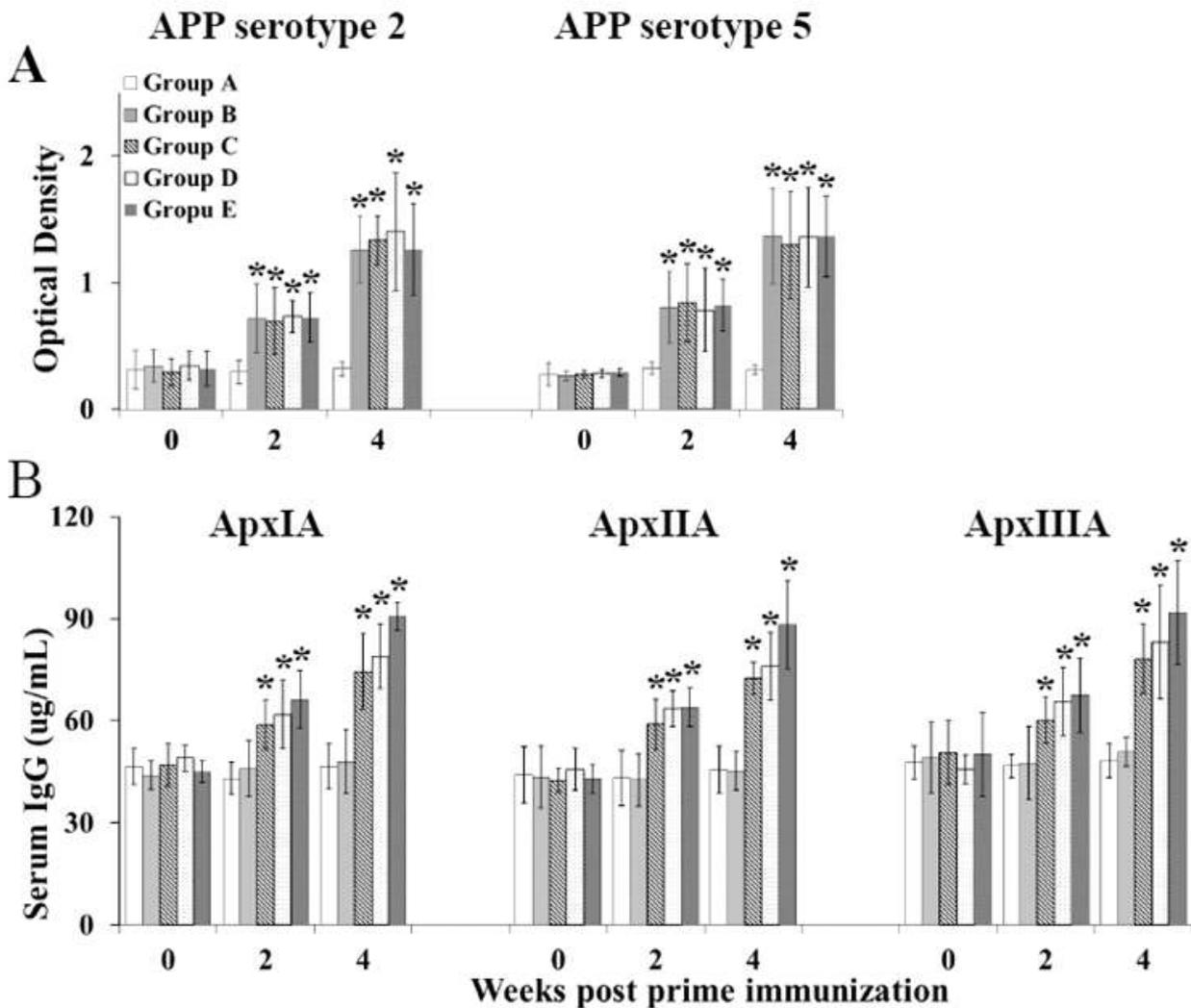


그림 66. 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 자돈 혈청에서의 접종 주차별 IgG 면역 확인

나. 고스트 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드(BTP) 혼합 돼지 부종병 예방 백신의 안전성 및 효능 평가

- (1) 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 모돈 및 그 모돈에서 출생한 감염 음성 자돈 확보
 - (가) 재조합 Stx2eB 항원을 이용한 ELISA에서 음성인 모돈 확보
 - (나) 음성 모돈에서 출생한 자돈을 대상으로 채혈한 혈청을 대상으로 Stx2eB 항원에 대해 음성인 자돈 확보
- (2) 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 질병 증상 확인 및 부검을 통한 이상 유무 확인을 통해 자돈에서의 안정성 평가
 - (가) 재조합 Stx2eB를 25ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml로 준비하여 근육으로 4주령 자돈에 각각 1ml씩 2주 간격으로 2회 접종 후 총 4주간 폐사 및 식욕 부진, 부종병 발현 여부가 관찰되지 않음
 - (나) 2차 접종 후 2주째에 부종병 발현 돼지에서 분리한 병독성 Stx2e+ F18+ *E. coli*를 경구로 접종

- (다) 도전감염 후 2주간 폐사 및 부종병 발현 여부를 확인하여 본 결과 대조군에서는 2두 폐사 2두 부종병 발현이 확인된 반면 재조합 Stx2eB를 접종한 그룹에서는 25ug/ml에서 1두 폐사와 1두에서 부종병 발현이 관찰됨(표 20, 그림 44 참조)
- (3) 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 도전감염을 통한 방어 여부로 최적의 접종량 결정
- (가) 재조합 Stx2eB의 안정성을 확인한 결과 50ug/ml이 되도록 혼합하기로 결정
- (나) 50ug/ml에 사균체 백신 Stx2e+ F18+, Stx2e+ F4를 2×10^9 CFU/ml이 되도록 혼합하여 혼합백신 제조
- (4) 1차, 2차 근육 접종 후 접종된 자돈에 대한 도전 감염을 통한 방어 여부 확인
- (가) 50ug/ml에 사균체 백신 Stx2e+ F18+, Stx2e+ F4를 2×10^9 CFU/ml이 되도록 혼합하여 1ml 접종
- (나) 5일령에 1차 접종 후 이유 후(약3주) 2차 접종
- (다) 최종 접종 후 2주후에 부종병 발현 돼지에서 분리한 병독성 Stx2e+ F18+ *E. coli*를 경구로 접종
- (라) 도전감염 후 2주간 폐사 및 부종병 발현 여부를 확인한 결과 대조군 A그룹에서는 5마리 중 모든 돼지에서 장기병변을 확인. 그러나 재조합 독소이드 백신 접종 B그룹에서는 5마리 중 4마리에서 장기병변을 확인 그리고 사균체 백신 그룹 C 그룹에서는 5마리 중 2마리에서 장기병변을 확인. 마지막으로 독소이드, 사균체 혼합 백신그룹 D그룹에서는 5마리 중 2마리에서 장기 병변을 확인(표 34, 그림 67 참조)

표 34. 자돈에 재조합 Stx2eB를 근육접종 후 Stx2e+ F18+ *E. coli*를 경구로 도전감염 후 자돈의 상태

그룹	1차 접종(5일령)	2차 접종(4주령)	도전감염(6주령)	부검(7주령) 병변여부
A	PBS	PBS		5/5
B	재조합 Stx2eB proteins	재조합 Stx2eB proteins	F18+	4/5
C	F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 고스트 cells	F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 고스트 cells	Stx2e+	2/5
D	고스트 cells + 독소이드	고스트 cells + 독소이드	<i>E.coli</i>	2/5

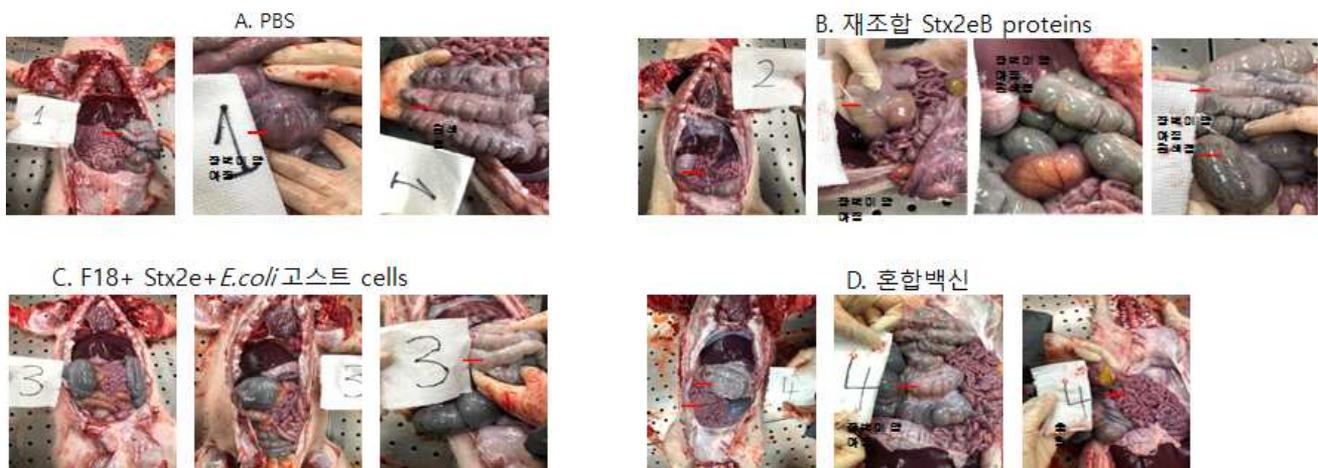


그림 67. 도전감염 후 부검에서 병변 확인

3. 참여기관(제2협동)

가. 호흡기 질병이 만연된 양돈장에서의 개발 백신의 효능평가

(1) 고스트 사균제와 불활화 독소이드 혼합 백신 최적 조건의 시제품 개발

(가) APP 1형, 2형, 4형, 5형 불활화 항원과 APP 2형, 5형이 발현하는 독소를 혼합한 시험백신 제작(그림 68 참조)



그림 68. 홍막페림 백신 시제품

(2) 혼합 백신 접종군과 비접종군 간의 질병 발생 여부 및 항생제 사용 빈도 비교 분석

(3) 혼합 백신 접종군에서 백신 접종에 의한 부작용 발생 여부 조사

(가) 시험 백신 2두분을 접종한 돼지에서 접종 직후 모두 과민반응을 나타내지 않고 이상이 없음을 확인

(나) 시험 백신 접종 후 21일까지 관찰한 결과 모든 돼지가 이상 없음을 확인

나. 각 재조합 독소(BTP) 대량 생산, 장기 보존 방법 선별 및 효능 평가

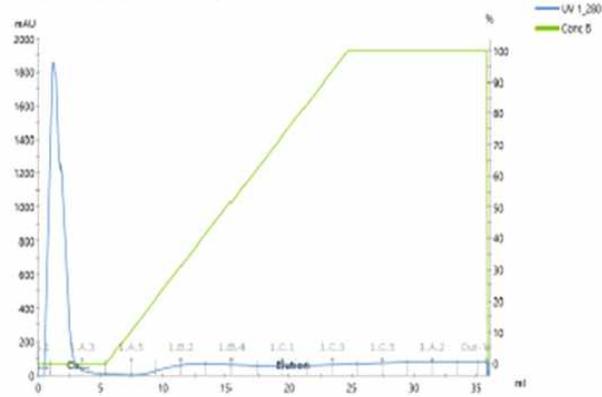
(1) 산업화를 위한 재조합 독소(BTP)의 대량 생산을 위한 시스템 구축

(가) 단백질 정제 전문 기관에서 산업화를 위한 대량 정제 가능성 확인

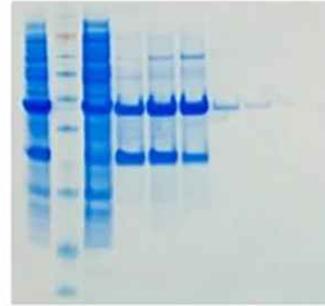
(나) 실험실 내 소규모 정제에서 대량 정제로 스케일 업을 위한 최적화 과정 진행(그림 69~71 참조)

(다) 정제 결과물의 분석 결과, 일부 펩타이드는 추가적인 불순물 제거를 위한 과정과 목적 단백질의 정확한 확인을 위한 단계가 필요하나 산업화의 가능성이 있는 것으로 판단됨

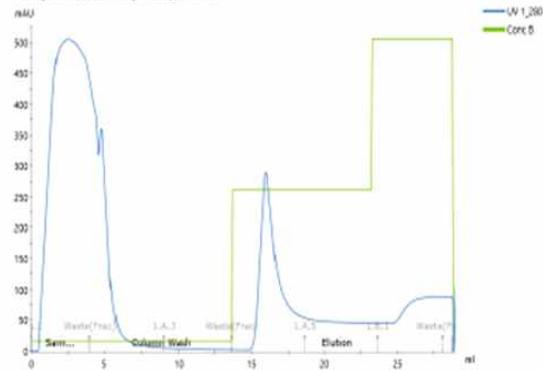
Komipharm_HisTrap 1ml_Test 01



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Komipharm_HisTrap 1ml_Test 06



1 2 3 4 5 6

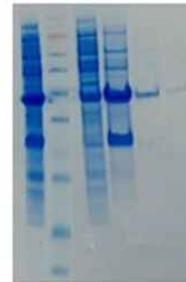
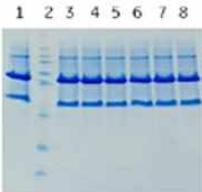
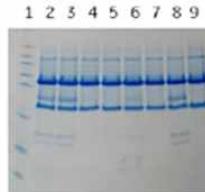


그림 69. AMP/BTP 대량 생산 조건 최적화를 위한 크로마토그래피 공정 개선 과정

(B) 0 hr



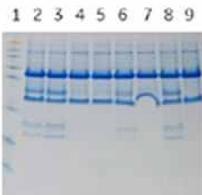
(C) 3 hr



(D) 6 hr



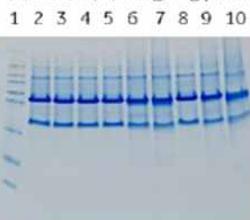
(E) 12 hr



(F) 24 hr



(B) CNBr 0, 1, 5 mg/ mg protein



(C) CNBr 10, 15 mg/ mg protein

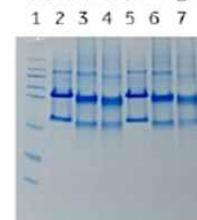
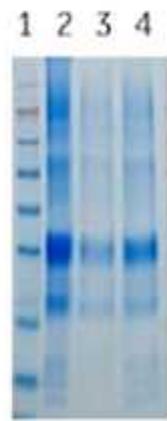
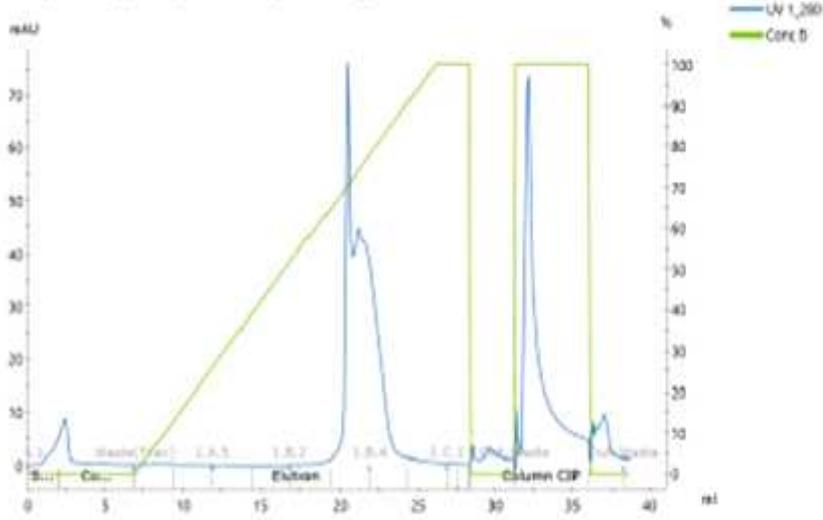
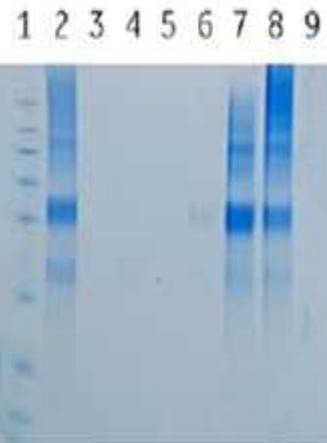
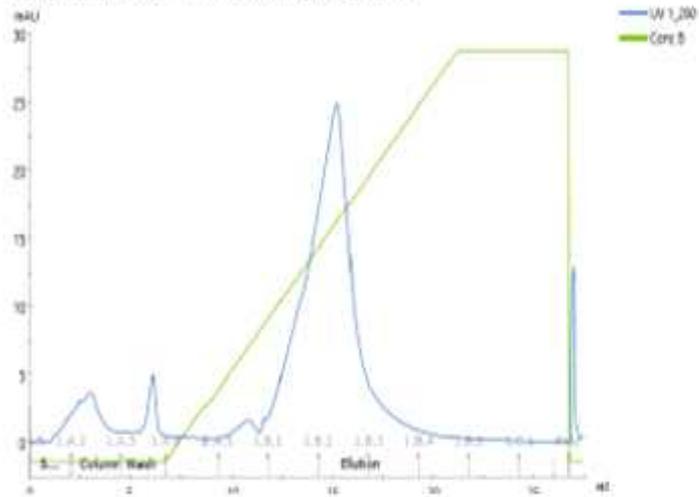


그림 70. AMP/BTP 대량 생산 조건 최적화를 위한 CNBr 효소 반응 공정 개선 과정

Komipharm_HiTrap 1 mL Copto MMC_Test 04



Komipharm_HiTrap 1 mL Copto Q impRes_Test 01



Komipharm_HiTrap 1 mL Q FF_Test 05

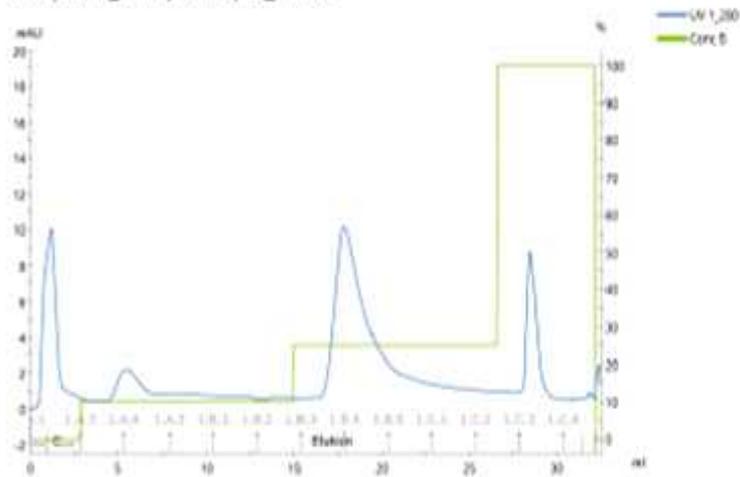


그림 71. AMP/BTP FPLC 레진 스크리닝을 통한 공정 정제 개선 과정

- (2) 대량 생산된 이들 독소의 기능적 효능 비교 평가 및 보관 방법 구체화 확립
- (3) 정제방법 간소화 및 정제된 재조합 독소들의 돼지를 대상으로 한 효능 비교 평가
- (4) 발현 정제된 재조합 독소의 불활화 과정 및 고정 방법 확립
 - (가) cell viability assay를 통하여 재조합 독소는 세포에 독성을 나타내지 않음을 확인
- (5) 목적동물인 돼지를 이용한 불활화 여부 또는 병독성 여부 확인
 - (가) APP 불활화 백신의 안전시험법에 준하여 4~6주령 돼지 2두에 안전시험에 사용하는 양과 동량의 APP 독소 혼합액을 접종하고 21일간 이상 없이 생존함을 확인
- (6) 불활화된 독소이드 장기 보관에 따른 병독성 회복 여부의 정기적 확인
- (7) 독소이드의 장기 보관을 위한 적합한 보존제 선별 및 불활화 독소이드의 항원성 유지 여부 검사
 - (가) 총 2종의 보존제를 일정 비율로 혼합하여 -80℃에서 보관하고 농도 확인
 - (나) 해동 횟수에 따른 독소이드의 농도 변화를 확인하고 bulk 보관량 설정

제4절. 3년간 연구수행 결과 요약 및 평가

1. 항균 및 세균독소 펩타이드 고효율 생산기술의 적용을 통한 항생제 대체 치료제 및 고효율 백신생산 기술의 개발(제1세부)

가. 3년간 연구수행 내용 요약

(1) 1차년도

(가) AMP 및 BTP의 대량 생산 핵심 플랫폼 구축

- ① 총 7종의 산업화 후보 AMP 및 BTP를 선정, 각 후보 물질들의 고유특성 분석을 완료하였고, 유전자 클론 및 대량 생산용 클론을 확보함
- ② 고도의 엔지니어링 기술을 적용하여 높은 안정성을 가지는 녹색형광단백질을 개발하고, 루프구조를 이용하여 후보 물질의 숙주세포 독성 문제를 극복함과 동시에 정제 시스템의 단순화, 생산 비용 축소 및 안정성 증진을 위한 신규 대량 생산용 발현 벡터 시스템을 개발하였고, 이에 대한 배양조건 및 정제 최적화 연구를 완료함
- ③ 1차년도 목표 중 발효조를 이용한 대량생산 기술과 Ni-NTA 또는 cation exchange 칼럼 기반 기술 개발을 시작
- ④ AMP (PMAP36) 10mg 및 BTP (Stx 2e subunit B) 25mg을 협동과제에 제공

(나) 산업화 후보 펩타이드의 특성 규명 및 제품 설계

- ① 다양한 데이터베이스를 활용한 AMP의 고유특성 (펩타이드 구조, 기능, 생화학적 특성 등) 분석 시스템을 구축함
- ② 산업화 후보 AMP의 효능, 용혈성 및 세포 독성 평가, 혈청 내 안정성, 작용 기전 검증 시스템을 개발함

(다) 제품화 가능한 신규 펩타이드 물질의 발굴

- ① 대량 생산이 어려운 AMP 및 BTP에 대한 분석, 생산 및 협동 과제를 제공함으로써 항체 및 백신 개발 연구를 진행할 수 있으며, 이와 관련된 제품 설계에 토대를 마련함
- ② 지속적인 협의를 통해 주관 기관 및 협동 기관들이 유기적으로 업무를 분담함으로써 효율적인 연구를 수행

(2) 2차년도

(가) AMP 및 BTP의 대량 생산

- ① 1차년도 발효조(Bioreactor) 대량생산 기술 개발을 시작으로 생산량에 영향을 주는 요인들에 대한 최적화 연구를 완료하였고, 기존 대비 10배에 가까운 성장률을 확보함으로써 High cell density 기술을 확립
- ② 발효조를 이용한 대량생산 기술은 cell density를 높이는 것과 기존의 발현량이 극대화된 flask scale의 선행 보유 기술을 적용하는 것이 핵심임. High cell density 기술을 확립함과 동시에 발현량이 극대화된 선행 보유 기술의 적용에 성공함
- ③ FPLC의 V9 valve 시스템, Ni-NTA Sepharose FF beads 및 16/40 HiScale 대형칼럼을 이용함으로써 생산효율 최대화를 위한 AMP 및 BTP 대량정제 시스템을 개발함

(나) 제품 후보 AMP 및 BTP의 효능평가, 선발 및 제품화

- ① 유전체 분석을 통해 자체 발굴한 후보 AMP 및 생산된 제품후보 펩타이드에 대해 1차년도에 구축한 다양한 박테리아 및 포유동물 세포 패널을 이용하여 효능 및 독성 평가, pH, 염농도 및 혈청 내 안정성 검증
- ② 유방염 치료 연고 제형에 첨가된 AMP의 저온 보존(-20℃) 및 장기 보관(현재 6개월 보관 연구결과 확보)에 따른 항균 활성 검증 완료, 저장 조건 및 기간에 따른 안정성 평가를 통한 제품 설계를 위해 해당 연구결과를 제2협동에 제공

(다) 제품화 가능한 펩타이드 후보 물질의 발굴

- ① NCBI BLAST(pBLAST 및 tBLASTn) 분석을 통해 벌거숭이 두더지 쥐(Heterocephalus glaber)의 유전체 내 존재하는 4종의 대표적 AMP family와 연관된 펩타이드들을 발굴한 뒤 최종적으로 선정한 Hg-CATH의 in silico 분석 완료
- ② 전자 현미경 기법을 통해 합성된 Hg-CATH의 활성 기전연구를 수행
- ③ 기존의 후보 BTP 물질을 이용한 연구 및 결과 도출에 집중하기 위하여 Stx 2e subunit B를 지속적으로 생산 제1협동 기관에 5.5mg을 추가 제공

(라) AMP 기반의 젖소 유방염 치료 연고의 설계

- ① 젖소 유방염 유발 병원균(주로 그람 양성균)에 대해 특이적으로 강한 활성을 가지는 최종 AMP 발굴을 위해 총 6종의 후보 AMP 선정 및 확보 후 젖소 유방염과 연관된 표준균주 총 5종에 대한 스크리닝 완료
- ② 유방염 치료 연고 개발을 위해 펩타이드인 AMP의 물질 특성에 적합한 연고 제형에 대한 평가를 위해 제2협동 제공 2종의 연고 제형에 대한 평가 완료 및 최적의 연고 제형 1종(P2)을 선정 후 연구 결과를 제2협동에 제공

(마) AMP 독성 감소 및 특이성 조절을 위한 펩타이드 엔지니어링

- ① 엔지니어링 기법을 도입할 후보 AMP 9종의 선정하고 이에 대한 펩타이드 1차 모델링을 완료한 동시에 생물정보학 기법을 이용하여 특이성 및 세포 독성에 영향을 주는 요인 규명 및 가설 수립을 위한 Test set (AMP 목록) 확보 및 분석 연구 수행
- ② 후보 AMP에 대한 대량 생산용 클론의 확보하여 발현 및 정제를 위해 각 클론에 대한 성장 곡선(growth curve) 연구를 통해 숙주 독성 검증
- ③ 후보 AMP 클론의 성장 곡선 연구 수행 후 3차년도 성과 목표 및 개발 내용을 변경(표 35 참조), 3차년도에 후보 AMP 9종 중 2종에 대한 대량 생산용 클론을 이용하여 생산 후 효능 평가를 진행하기로 결정

표 35. 펩타이드 엔지니어링 관련 목표 및 개발 내용 변경 이유

기존 성과목표 및 개발 내용	변경된 성과목표 및 개발 내용
<ul style="list-style-type: none"> ○ AMP 독성 감소 및 특이성 조절을 위한 펩타이드 엔지니어링 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 후보 AMP 2종을 선정하여 특이성 및 세포 독성에 영향을 주는 요인 규명을 위한 펩타이드 1차 모델링 ▶ 1차 모델링 결과를 기반으로 아미노산 치환에 따른 2차 모델링을 통한 펩타이드 구조 분석 ▶ 후보 펩타이드 선발을 위해 생물정보학 기법을 이용한 분석 ▶ 최적의 펩타이드 선발을 위한 클론의 확보, 발현 및 정제 ▶ 생산된 AMP의 효능 및 세포 독성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ AMP 독성 감소 및 특이성 조절을 위한 펩타이드 엔지니어링 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 엔지니어링 기법을 도입할 후보 AMP 9종의 선정 및 펩타이드 1차 모델링 ▶ 생물정보학 기법을 이용하여 특이성 및 세포 독성에 영향을 주는 요인 규명 및 가설 수립을 위한 Test set (AMP 목록) 확보 및 분석 ▶ 후보 AMP에 대한 대량 생산용 클론의 확보, 발현 및 정제 ▶ 생산된 AMP의 효능 및 세포독성 평가
연구 배경 및 의의	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 기존의 항생제와는 다른 기전을 통해 항균 작용을 하는 AMP의 세포 독성 문제는 AMP 산업화에 있어 반드시 극복해야 할 문제점 중 하나임 ○ 이에 대한 방안으로 독성을 최소화한 신규 AMP 물질을 발굴하거나 기존의 AMP에 대해 펩타이드 엔지니어링 기법을 적용하는 방법이 있음 ○ 보고된 바에 의하면 AMP의 항균 활성 능력과 세포 독성은 상관관계 (강한 항균 활성을 가질수록 세포 독성 또한 강함)가 있는 것으로 밝혀졌으나, 세포 독성과 AMP 자체 보유 특성들에 대한 연관성에 대해 정확히 밝혀지지 않았으며, 현재까지 AMP의 그람 음성균 혹은 양성균 특이적 항균 활성 기전과 AMP 특성과의 상관관계에 관한 연구는 보고된 바 없음 ○ 따라서 AMP 고유 특성과 세포 독성 및 활성 특이성 간의 연관성을 규명하고, 엔지니어링 기법을 이용하여 이를 증명, 효능이 향상된 신규 AMP 물질을 발굴하는 것은 학문적, 산업적 가치가 있으나 상당한 연구 기간 및 비용이 요구됨 	
앞으로의 연구목표 및 방향	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 당해연도 각기 다른 항균 특이성을 가지는 9종의 후보 AMP를 선정, 1차 펩타이드 모델링을 완료 하였으며, 생물정보학 기법을 통해 항균 특이성 및 세포독성에 영향을 주는 요인을 규명하기 위해 Test set을 확보하고 분석 연구를 수행 중임 ○ 3차년도에는 9종의 후보 AMP 중 2종을 최종 물질로 선정, 생산 및 생산된 물질에 대한 효능평가를 진행 	

(3) 3차년도

(가) AMP 및 BTP 대량 생산

- ① 발굴한 유방염 유발균 특이적 AMP 최종 후보 PMAP36의 목적동물(젓소) 효능 평가를 위해 발효조 및 대형 Ni-NTA 칼럼 기반 대량생산을 수행한 결과 총 149mg의 PMAP36 펩타이드를 생산하였고, 이 중 125mg을 제2협동에 제공 완료함
- ② 엔지니어링 모델 후보 AMP 2종 PMAP36 및 cc-CATH3를 발현, 정제 및 생산하여 항균 활성 및 용혈성을 포함한 세포 독성을 검증함

(나) 제품 후보 AMP 및 BTP 평가 및 선발

- ① 제품 후보 AMP PMAP36의 pH, 염 농도 및 혈청 내 안정성 평가 완료
- ② 2차년도 유방염 유발 표준 균주 패널에 한 AMP 6종의 항균 활성 평가에 이어 농장 유래 유방염 의심 균주를 제2협동으로부터 제공받아 이에 대한 MIC assay 방법의 최적화 및 최종 제품 후보 PMAP36 펩타이드의 항균 활성을 검증
- ③ 유방염 유발균 특이적 AMP 기반 유방염 치료

(다) 기능성 펩타이드의 품질평가

- ① 최종 제품 후보로 선정된 PMAP36 최종 펩타이드 및 최적의 연고 제형(P2)을 이용한 유방염 치료 연고제 PMAP36에 대한 순도 확인을 위한 LC(liquid chromatography) 기술을 개발 완료하였고, 다른 제품 후보 중 하나인 PG-1 펩타이드에 적용하여 순도를 측정함
- ② 효능 평가를 위해 대량 생산된 PMAP36 펩타이드 및 치료 연고제 PMAP36 모두에 대해 항균 활성, 용혈성을 포함한 세포 독성, 혈청, 염 농도 및 pH을 기반으로한 안정성 검증까지 모두 완료함

나. 대표적 연구성과(자세한 사항은 “제7장. 연구개발과제의 대표적 연구실적” 참조)

- (1) 숙주 독성 효과를 인해 대장균을 이용하여 대량 발현이 어려운 AMP 및 BTP 대량 생산 핵심 플랫폼 구축을 위해 **발효조를 이용한 대량 발현(100OD 이상), 대형 Ni-NTA 칼럼 적용 및 각 정제 단계별 최적화 연구를 통해 실질적으로 140mg 이상의 AMP를 생산**하였고, 이를 제2협동에 제공함으로써 목적 동물(젓소)에 효능 평가가 가능하도록 함
- (2) 유전체 정보 및 생물 정보학 기법을 이용하여 강한 활성을 가지면서도 세포 독성이 적고 안정성을 가지는 신규 항균 펩타이드를 8종 발굴하여 제품화 가능한 후보 물질로써 생화학적 특성 분석(in silico)은 물론, 효능, 세포 독성 및 다양한 조건(pH, 염 농도 및 혈청) 내 안정성을 평가하였고, 전자 현미경을 활용하여 항균 활성 기전을 규명했으며, 이와 관련하여 국제저명학술지 발표 및 지적 재산을 확보함
- (3) 대량 생산한 유방염 치료 제품 최종 후보 PMAP36 펩타이드에 가장 적합한 연고 제형을 발굴하였고, 최적화된 연고 제형과 혼합한 해당 펩타이드의 저장온도, 시간에 따른 효능을 평가를 통해 제품 설계를 완료하였음은 물론, 목적 동물(젓소) 활용 과용량 안정성(최대 3 dose)을 포함한 다양한 안정성 검증 및 LC 기법 기술을 통해 품질관리 기술을 제안함
- (4) **해당 과제기간 동안 1건의 기술이전, 3건의 산업 전문 인력양성을 위한 교육, 3건의 연구 인력 양성, 10건의 국내외 특허 출원 및 등록, 3건의 국제저명학술지 발표(Impact factor 4이상, 추가 1건 예정), 12건의 학술대회 발표, 5건의 홍보 성과 및 2건의 기타(타 연구의 활용 등) 실적을 완료함**

다. 종합평가

- (1) 차세대 천연 항생 물질 AMP는 전 세계적으로 큰 문제인 항생제 내성 획득의 탁월한 대안으로 여겨지나 대량 생산 시스템의 부재로 그 산업화에 어려움이 있음. 발효조 및 대형 Ni-NTA 칼럼 기반 대량 생산 기술 개발을 통해 실질적인 산업화의 토대를 마련함
- (2) AMP 기반 유방염 치료 연고 제품화를 위한 유방염 유발 균주 특이적 AMP 및 적합한 연고 제형 발굴, 저장 온도, 저장 기간, pH, 염 농도 등을 포함한 다양한 조건의 안정성 및 용혈성을 포함한 세포 독성 평가, 제작된 제품의 품질 관리 기술 개발까지 해당 과제의 모든 목표 성과를 달성함

2. 독소 산생 병원성 세균에 의한 돼지 부종병 및 돼지 흉막 폐렴 예방 백신 개발(제1협동)

가. 3년간 연구수행 내용 요약

- (1) 세균 고스트 유도에 최적화 AMP 선별
- (2) 실험동물을 이용한 불활화 세균의 안전성 및 병원성 복귀 실험
- (3) 돼지에서의 불활화 균체의 안전성 및 효능 평가
- (4) 세균의 도전감염 균량 확인
- (5) 불활화 독소이드의 실험동물에서의 안전성 평가
- (6) 목적동물에서의 불활화 독소이드의 안전성 및 효능 평가
- (7) 불활화 독소이드와 고스트 사균체 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가
- (8) 독소이드(BTP) 함유 돼지 흉막 사균 백신과 기존 상업용 백신과의 효능 비교 평가
- (9) 고스트 사균체와 재조합 Stx2e 독소이드(BTP) 혼합 돼지 부종병 예방 백신의 안전성 및 효능 평가

나. 대표적 연구성과

- (1) **해당 과제기간 동안 2건의 기술이전, 1건의 연구 인력 양성, 4건의 국내외 특허 출원 및 등록, 1건의 국제저명학술지 발표, 5건의 학술대회 발표 실적을 완료함.**

다. 종합평가

- (1) 독소 산생 병원성 세균에 의한 돼지 부종병 및 돼지 흉막 폐렴에 대한 BTP 함유 불활화 독소이드와 고스트 사균체 혼합 백신의 안전성 및 효능을 확인 하였다.
- (2) 다양한 병원균에서 생성되는 독성 펩타이드(단백질)를 화학합성이 아닌 AMP 또는 BTP 함유 불활화 독소이드 백신에 사균체 백신과의 혼합 백신으로 인한 효과 증대를 확인 하였다
- (3) 이를 기반으로 다양한 독성 산생 병원성 세균에 대해 좀 더 효과적이고 빠르게 대응이 가능 하도록 활용할 계획임

3. 기능성 펩타이드를 활용한 동물치료제 및 백신의 제품화기술(참여기관; 제2협동)

가. 3년간 연구수행 내용 요약

- (1) AMP와 BTP 대량생산 산업화 기술개발
- (2) AMP와 BTP 자체의 안전성 및 안정성 확인

- (3) 산업화 스케일의 세균 고스트 제작 조건 최적화
- (4) AMP 활용 고스트 균체와 BTP를 사용한 흉막폐렴 및 부종병 시험백신 제작
- (5) 각 시험백신의 실험동물에서의 안전성 및 효능 평가
- (6) 각 시험백신의 목적동물에서의 안전성 및 효능 평가
- (7) 각 시험백신의 안정성 평가
- (8) 젖소 유방염 유발 주요미생물 대상 AMP 평가
- (9) AMP 활용 유방염 치료 연고제 시제품 제작
- (10) 목적동물에 대한 유방염 치료 연고제 효능평가

나. 대표적 연구성과(자세한 사항은 “제7장. 연구개발과제의 대표적 연구실적” 참조)

(1) 제품 개발 성과

NO	품목명(임시)	품목명(영어)
1	프로백 에이피피 고스트	PRO-VAC APP ghost
2	프로백 에이피피엠 고스트	PRO-VAC APPm ghost

(2) 사업화 계획

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(백만원)	248			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		-	5	5	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	-	20	20
국외		-	0.04	0.08	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	흉막폐렴 외 호흡기 질병을 예방하는 고스트 불활 화 혼합제제			

다. 종합평가

- (1) 돼지 흉막폐렴에 대한 고스트 사균체와 독소이드 혼합 시험백신을 제조하여 안전성과 효
능 확인
- (2) 돼지 부종병에 대한 고스트 사균체와 독소이드 혼합 시험백신을 제조하여 안전성과 효능
평가
- (3) AMP와 BTP의 대량정제 산업화 가능성 확인

제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제1절. 연차별 목표 및 내용

1. 1차년도

가. 개발 목표 및 내용

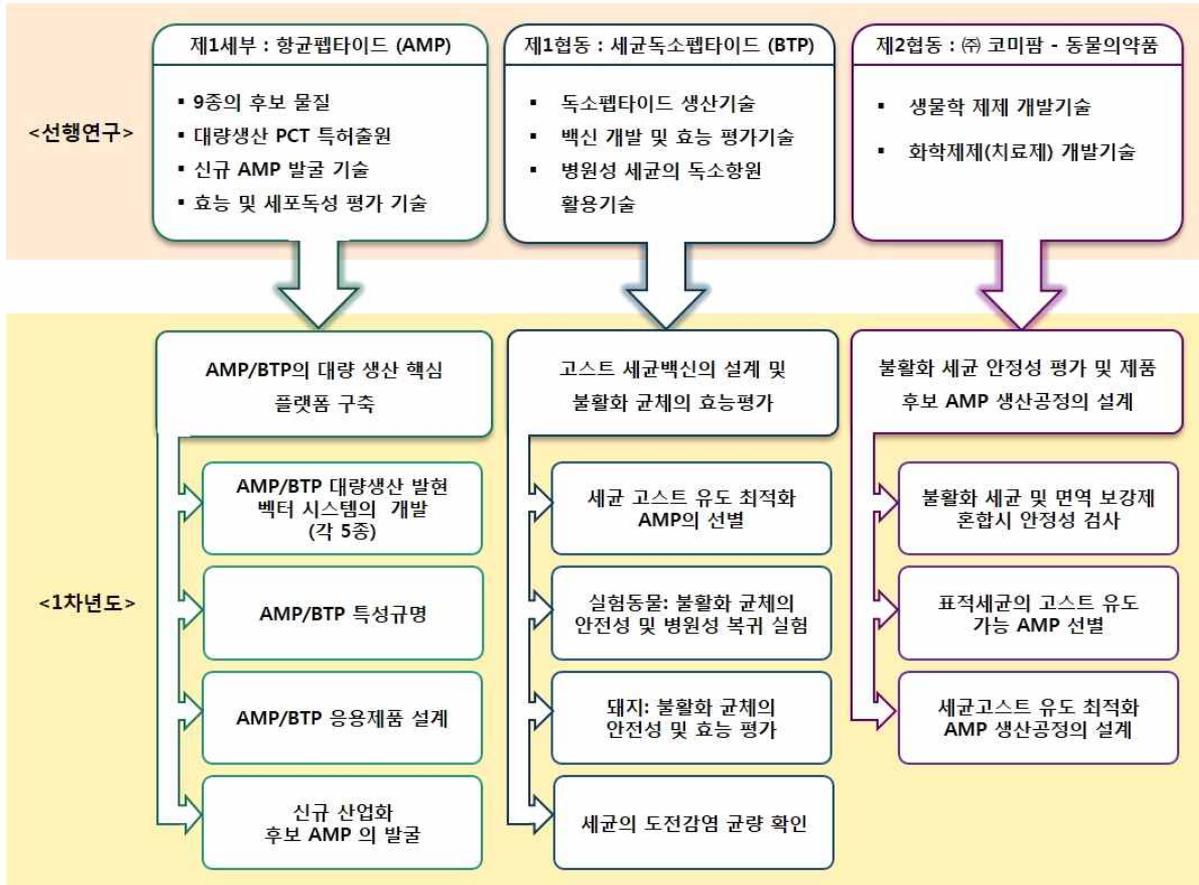


그림 72. 1차년도 핵심 개발 목표.

(1) 주관연구기관(건국대학교)

1차년도		
개발 목표	개발 내용	연구 범위
○ AMP 및 BTP의 대량 생산 핵심 플랫폼 구축	<ul style="list-style-type: none"> ▶ AMP 및 BTP 활용 산업화 후보물질의 선정 ▶ 후보 AMP 및 BTP에 대한 유전자 클론 확보 ▶ AMP 대량 생산용 발현벡터 시스템 개발(5종 이상) ▶ BTP 대량 생산을 위한 발현시스템 개발(7종 이상) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항균 펩타이드 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 국내 특허 보유 뱀 유래의 Pb-CATH4 ▶ 돼지 유래의 PG1, PMAP36, PR26 ▶ 개구리 유래의 Buforin II ○ 세균독소 펩타이드 <ul style="list-style-type: none"> ▶ F18+ <i>Escheichia coli</i>에 의한

	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 생산효율 최대화를 위한 배양조건의 확립 및 기술개발 ▶ 생산효율 최대화를 위한 AMP 및 BTP 대량 정제시스템의 단순화 및 비용축소기술 개발 : Ni-NTA 또는 cation exchange 칼럼기반 기술개발 	<p>Stx2e 독소</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>에 의해 생성되는 Apx 1A, Apx IIA, Apx IIIA, Apx IV
○ 산업화 후보 펩타이드의 특성 규명 및 제품 설계	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 산업화 후보 펩타이드의 생화학적 특성분석(in silico) ▶ 효능 및 독성평가를 위한 미생물 및 포유동물 세포패널의 구축 ▶ 후보 AMP의 효능, 세포 독성평가 및 혈청 내에서의 안정성 평가(7종 이상) ▶ AMP 및 BTP의 혼합 백신 후보 물질로써의 효과 검증(7종 이상) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물 패널(총 5종) <ul style="list-style-type: none"> ▶ 그람 음성균 3종, 그람 양성균 2종, 균류 1종 ○ 포유동물 세포패널(총 5종) <ul style="list-style-type: none"> ▶ 사람 및 쥐 신경세포 포함 4종 ▶ 돼지 적혈구
○ 제품화 가능한 신규 펩타이드 물질의 발굴	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 주요 가축질병유발 세균 중 대량생산이 어려운 BTP 신규 타겟의 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항균 펩타이드 <ul style="list-style-type: none"> ▶ Hyposin-HA5, BAC GM-100 ▶ 유전체 정보 이용이 가능한 생물에서의 신규 항균 펩타이드의 발굴 ○ 부종 병 및 돼지 흉막 폐렴(보완사항 3에 해당) <ul style="list-style-type: none"> ▶ <i>Actinobacillus</i>

(2) 협동연구기관(전북대학교)

개발 목표	개발 내용	연구 범위
○ 세균 고스트 유도에 최적화 AMP 선별	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 주관연구기관과의 협력연구를 통하여 백신개발 목적세균의 고스트화 유도에 특화된 AMP 선별 ▶ 고스트화 유도 액의 배양을 통한 불활화 확인 실험 ▶ 확정된 균을 대상으로 투사 전자현미경(TEM)을 이용한 고스트화화 유도 최종 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 병원성 세균 <ul style="list-style-type: none"> ▶ F18+, Stx2e+ <i>Escherichia coli</i> ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 1형 ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>

<p>○ 실험동물을 이용한 불활화 세균의 안전성 및 병원성 복귀 실험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 쥐의 확보 ▶ 실험동물에 대한 근육접종을 통한 고스트 균체 접종에 따른 부작용 및 병원성 발현 여부의 확인 ▶ 부검 및 이상 징후에 대한 조직검사를 통한 정밀 검사 	<p>2형</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 5형 <p>○ 실험동물</p>
<p>○ 돼지에서의 불활화 균체의 안전성 및 효능 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 돼지의 확보 ▶ 고스트 세균 백신의 근육접종 후 폐사 및 부종병 및 흉막 폐렴 질환 발현 여부 확인 및 이상 징후에 대한 조직학적 소견 검사 ▶ 접종된 돼지 혈청 및 모돈의 경우 초유로부터 항체 역가 측정 ▶ 도전감염 후 부종병 및 흉막폐렴에 대한 방어 효과 여부 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 마우스를 대상으로 한 안전성 및 면역 유도 실험 ▶ 목적동물인 돼지에서의 안전성 및 효능 평가 <p>○ 해당 병원성 세균의 독소이드</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 부종병 : Stx2e ▶ 돼지 흉막폐렴 : Apx 1A, Apx IIA, Apx IIIA, Apx IV
<p>○ 세균의 도전감염 균량 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 야외 병독성 균주를 대상으로 다양한 균량 접종 후 폐사 여부 및 부검 후 각 질병(부종병 및 흉막 폐렴)의 발현 여부를 통한 LD₅₀ 균량 결정 	

(3) 참여기관((주) 코미팜)

개발 목표	개발 내용	연구 범위
<p>○ 체외에서의 불활화 세균의 안정성시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 세균의 고스트 사균체를 동물 백신으로 허가된 면역 보강제와 혼합하여 냉장 보관 등의 방법으로 보관 후 정기적으로 안정성 검사를 수행 	<p>○ 병원성 세균</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ F18+, Stx2e+ <i>Escherichia coli</i> ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 1형
<p>○ 세균 고스트 유도에 최적화된 AMP 대량 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ F18+, Stx2e+ <i>Escherichia coli</i> 에 최적화된 항균 펩타이드 선별 ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 혈청형 1형, 2형, 5형을 동시에 고스트 유도가 가능한 항균 펩타이드 선별 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 2형 ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 5형

	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 선별된 AMP에 대한 산업체 수준의 대량 생산 정제 공정의 설계 ▶ 정제된 AMP의 효능 평가 통한 최적의 정제 공정의 선별 	
--	--	--

2. 2차년도

가. 개발 목표 및 내용

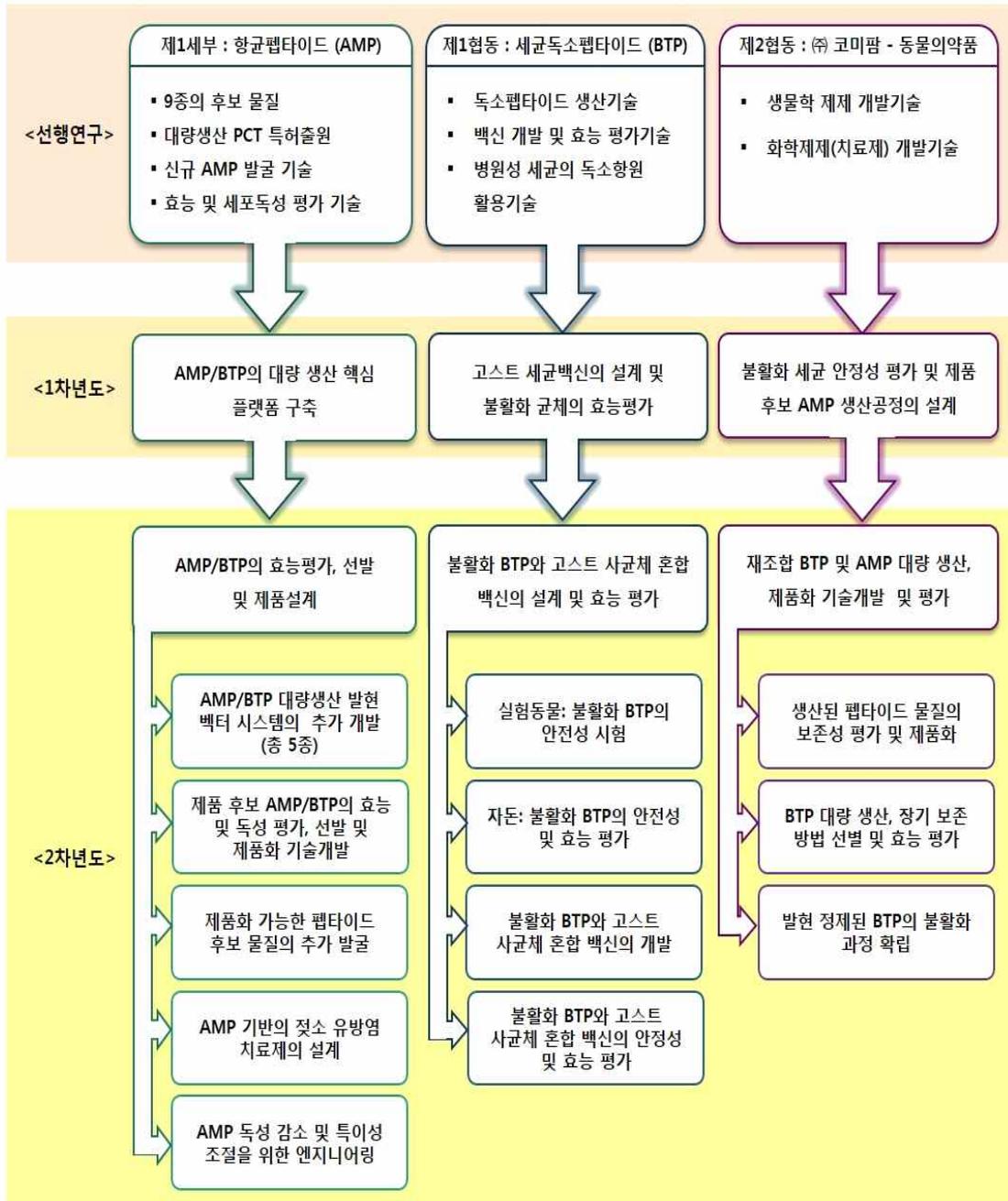


그림 73. 2차년도 핵심 개발 목표.

(1) 주관연구기관(건국대학교)

2차년도		
개발 목표	개발 내용	연구 범위
○ AMP 및 BTP의 대량 생산	▶ 1차년도에 개발한 산업화 수준의 생산기술 및 후보 펩타이드 발현클론을 이용한 대량 생산	○ 항균 펩타이드 ▶ 국내 특허 보유 뱀 유래의 Pb-CATH1, Pb-CATH3, Pb-CATH4 ▶ 돼지 유래의 PG1, PMAP36, PR26 ▶ 개구리 유래의 Buforin II ○ 세균독소 펩타이드 ▶ F18+ <i>Escheichia coli</i> 에 의한 Stx2e 독소 ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 에 의해 산생되는 Apx 1A, Apx IIA, Apx IIIA, Apx IV ▶ <i>Clostridium perfringens</i> type C의 알파 및 베타 2 독소 ▶ <i>Clostridium novy</i> 의 알파독소
○ 제품 후보 AMP 및 BTP의 효능평가, 선발 및 제품화	▶ 생산된 AMP의 pH, 염농도에 따른 안정성 및 혈청내 안정성 분석 ▶ 생산된 제품후보 펩타이드 10종에 대해 1차년도에 구축한 다양한 박테리아 및 포유동물 패널을 이용한 효능 및 독성평가 ▶ 생산된 기능성 펩타이드 물질의 보존성(저장온도, 기간에 따른 효능) 평가 및 제품설계	
○ 제품화 가능한 펩타이드 후보 물질의 발굴	▶ 계놈분석 기술을 활용한 AMP 후보물질의 발굴 ▶ 가축질병유발 BTP 신규 타겟의 발굴	○ 항균 펩타이드 ▶ 유전체 정보 이용이 가능한 생물에서의 신규 항균 펩타이드의 발굴 ○ 세균독소 펩타이드 ▶ F4+ enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC) 또는 F5+ ETEC ▶ F6+ ETEC 또는 F41+ ETEC에 의해 발현되는 LT, Sta, Stb, Stx1, Stx2
○ AMP 기반의 젖소 유방염	▶ 젖소 유방염 유발 병원균에 대한 AMP 효능 평가	○ 주요 유방염 유발 박테리아 ▶ <i>Staphylococcus aureus</i> ,

<p>치료 연고의 설계</p>	<p>▶ 유방염 치료용 AMP 복합제의 개발</p>	<p><i>Streptococcus agalactiae</i>, <i>Streptococcus dysgalactiae</i> 및 <i>Streptococcus uberis</i>(약 90%의 유방염 유발 원인균)에 대한 항균효과의 평가</p>
<p>○ AMP 독성 감소 및 특이성 조절을 위한 펩타이드 엔지니어링</p>	<p>▶ 엔지니어링 기법을 도입할 후보 AMP 9종의 선정 및 펩타이드 1차 모델링</p> <p>▶ 생물정보학 기법을 이용하여 특이성 및 세포 독성에 영향을 주는 요인 규명 및 가설 수립을 위한 Test set (AMP 목록) 확보 및 분석</p> <p>▶ 후보 AMP에 대한 대량 생산용 클론의 확보, 발현 및 정제</p> <p>▶ 생산된 AMP의 효능 및 세포독성 평가</p>	<p>○ 항균 펩타이드</p> <p>▶ 국내 특허 보유 뱀 유래의 Pb-CATH4</p> <p>▶ 돼지 유래의 PG1</p>

(2) 협동연구기관(전북대학교)

개발 목표	개발 내용	연구 범위
<p>○ 불활화 독소이드의 실험동물에서의 안전성 평가</p>	<p>▶ 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 쥐의 확보</p> <p>▶ 각 재조합 독소이드(BTP)를 다양한 접종량으로 근육접종 후 부작용 및 병원성 발현 여부 확인</p> <p>▶ 부검을 통한 육안 확인 및 이상 징후에 대한 조직 검사</p>	<p>○ 병원성 세균</p> <p>▶ F18+, Stx2e+ <i>Escherichia coli</i></p> <p>▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 1형</p> <p>▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 2형</p> <p>▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 5형</p>
<p>○ 목적동물에서의 불활화 독소이드의 안전성 및 효능 평가</p>	<p>▶ 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 자돈의 확보</p> <p>▶ 재조합 독소이드(BTP)를 다양한 접종량으로 혼합하여 근육접종 후 폐사 및 부종병 발현 여부 확인</p>	<p>○ 실험동물</p> <p>▶ 마우스를 대상으로 한 안전성 및 면역 유도 실험</p>

	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 도전감염 후 폐사 및 부검을 통한 효능 평가 ▶ 재조합 독소이드 백신 접종 및 부검을 통한 안정성 평가 	
○ 불활화 독소이드와 고스트 사균체 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 모든 및 그 모돈에서 출생한 감염 음성 자돈 확보 ▶ 고스트 균체와 예비실험을 통해 결정된 양의 독소이드의 근육 접종 ▶ 접종된 자돈에 대한 도전 감염 및 부검을 통한 흉막폐렴 발현 여부 확인 ▶ 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 질병 발생 유무, 유사산 여부 등 모돈에서의 안정성 평가 ▶ 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 질병 증상 확인 및 부검을 통한 이상 유무 확인을 통해 자돈에서의 안정성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 목적동물인 돼지에서의 안전성 및 효능 평가 ○ 해당 병원성 세균의 독소이드 ▶ 부종병 : Stx2e ▶ 돼지 흉막폐렴 : Apx 1A, Apx IIA, Apx IIIA, Apx IV

(3) 참여기관((주) 코미팜)

개발 목표	개발 내용	연구 범위
○ 생산된 기능성 펩타이드 물질의 보존성 평가 및 제품화	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대량 생산된 각 세균에 최적화된 AMP의 냉동 보관에 따른 기능적 변화 여부 관찰 ▶ 보존성 증진을 위한 최적화 냉동보관 보조제의 선별 ▶ 정기적으로 각 세균에 대한 각 시기별 고스트화 유도 유효 농도 측정 ▶ 보관 후 변화된 물리학적 성상 평가 	○ 각 세균에 최적화된 항균 펩타이드들

	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 생산, 정제된 펩타이드와 적합한 보관 보조제와 같이 혼합하여 시제품 제작 ▶ 정기적으로 시제품의 기능적 효능, 물리화학적 변화 여부 등 시제품의 안정성 평가 ▶ 보관 방법의 구체화 및 최적화 	
<p>○ 각 재조합 독소(BTP) 대량 생산, 장기 보존 방법 선별 및 효능 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 산업화를 위한 대량 생산을 위한 시스템 구축 ▶ 대량 생산된 이들 독소의 기능적 효능 비교 평가 ▶ 대량 생산에 따른 이들 독소의 보관 방법 구체화 확립 ▶ 정제된 독소의 기능에 영향을 주지 않고 또한 부작용을 최소화할 수 있는 정제 방법 확립 ▶ 정제된 재조합 독소들의 돼지를 대상으로 한 효능 비교 평가 	<p>○ 병원성 세균</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ F18+, Stx2e+ <i>Escherichia coli</i> ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 1형 ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 2형 ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 5형
<p>○ 발현 정제된 BTP의 불활화과정 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대량 생산된 독소들의 불활화 및 고정 방법 확립 ▶ 불활화 여부 또는 병독성 여부를 실험 동물 내지는 목적동물인 돼지를 이용하여 불활화 여부 확인 ▶ 돼지를 이용하여 불활화된 독소이드 장기 보관에 따른 병독성 회복 여부에 대한 정기적 확인 ▶ 독소이드의 장기 보관을 위한 적합한 보존제 선별 ▶ 보존제 및 장기 보관에 따른 불활화 독소이드의 항원성 유지 여부 검사 	<p>○ 해당 병원성 세균의 독소이드</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 부종병 : Stx2e ▶ 돼지 흉막폐렴 : Apx 1A, Apx IIA, Apx IIIA, Apx IV

3. 3차년도

가. 개발 목표 및 내용

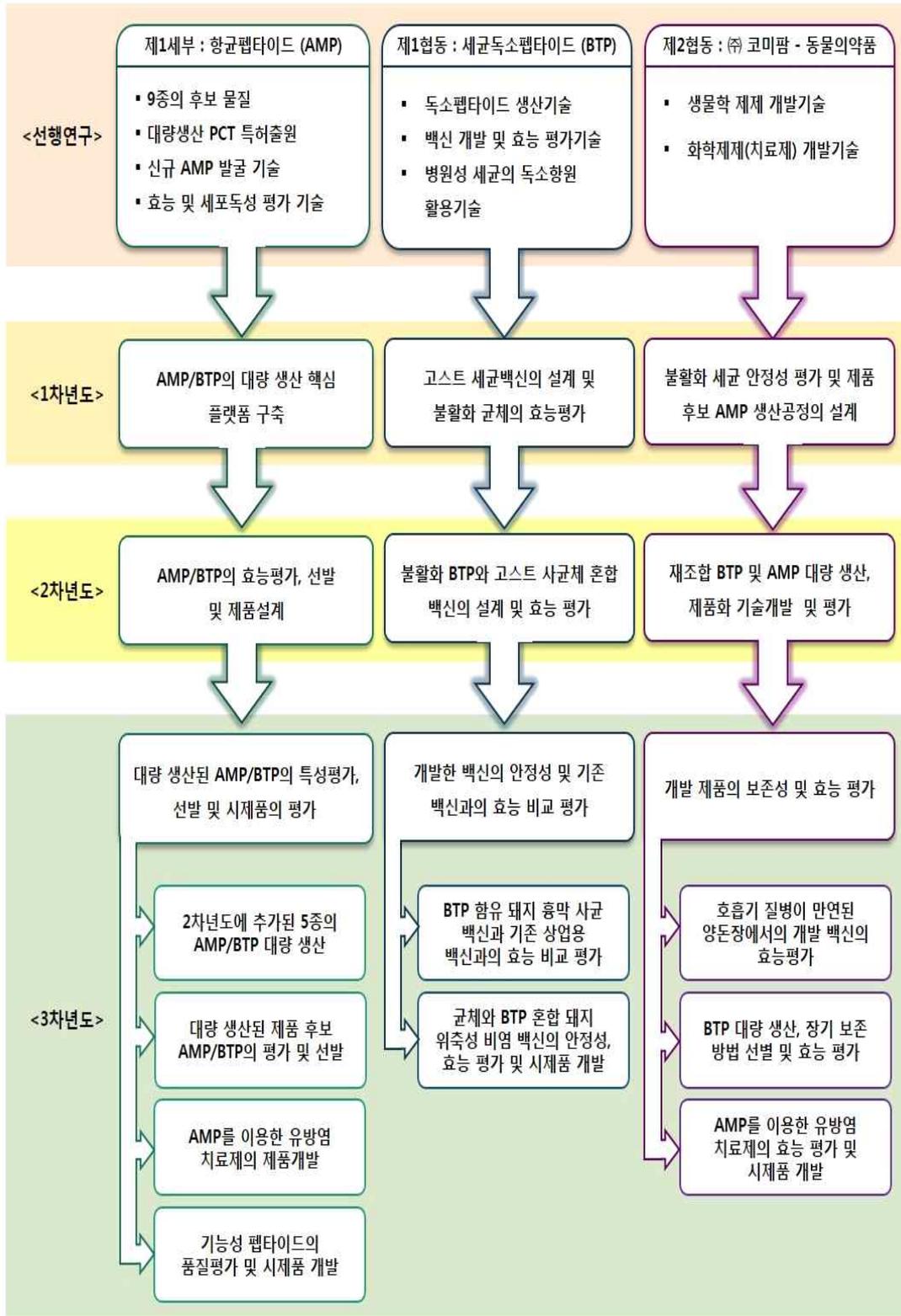


그림 74. 3차년도 핵심 개발 목표.

(1) 주관연구기관(건국대학교)

3차년도		
개발 목표	개발 내용	연구 범위
○ AMP 및 BTP 대량 생산	▶ 2차년도에 추가된 제품 후보 펩타이드들의 클론을 이용한 대량 생산	○ AMP ▶ 국내 특허 보유 뱀 유래의 Pb-CATH1, Pb-CATH3 ▶ 엔지니어링을 통해 변형된 최적의 PG1 및 Pb-CATH4 ▶ 유방염 원인균 특이적 항균 펩타이드를 활용한 치료제
○ 제품 후보 AMP 및 BTP 평가 및 선발	▶ 2차년도에 생산된 AMP 혈장 내 안정성 테스트 ▶ 제품후보 AMP에 대한 세균 및 포유동물 세포패널을 이용한 효능 및 독성평가 ▶ 유방염 유발균 특이적 AMP를 이용한 유방염치료 연고제의 목적동물(젓소) 활용 과용량 안전성 (최대 3 dose) 및 효능 평가	○ 세균독소 펩타이드 ▶ <i>Clostridium perfringens</i> type C의 알파 및 베타 2 독소 ▶ <i>Clostridium novy</i> 의 알파독소
○ 기능성 펩타이드의 품질평가	▶ 펩타이드 제품들에 대한 순도 확인 및 생물학적 활성 검정(Quality Control)	○ 1, 2차년도 연구를 통해 안정성 및 세포 독성 평가 및 엔지니어링 과정을 거쳐 선발된 최적의 항균 펩타이드

(2) 협동연구기관(전북대학교)

개발 목표	개발 내용	연구 범위
○ 독소이드(BTP) 함유 돼지 흉막 사균 백신과 기존 상업용 백신과의 효능 비교 평가	▶ 효소면역정량법 (ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 모돈 및 그 모돈에서 출생한 감염 음성 자돈 확보 (각 그룹 당 최소 5마리씩 확보) ▶ 기존 상업용 시판 백신의 접종 기준에 맞춰 상업용 백신과 고스트 균체와 재조합 독소이드가 함유된 혼합 백신을 근육접종	○ 병원성 세균 ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 1형, 2형, 5형 ○ 해당 병원성 세균의 독소이드 : Apx 1A, Apx 2A, Apx 3A,

	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 1차 및 2차 접종 전, 도전감염 전 각각 모든 자돈에서 가검물 채취 및 항체 역가 측정 ▶ 도전감염을 시행한 자돈의 부검을 통해 시판 백신과 개발 백신의 효능 비교 평가 	Apx IV
<p>○ 고스트 사균제와 재조합 Stx2e 독소이드(BTP) 혼합 돼지 부종병 예방 백신의 안전성 및 효능 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 효소면역정량법 (ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 모든 및 그 모든에서 출생한 감염 음성 자돈 확보 (각 그룹 당 최소 5마리씩 확보) ▶ 1차, 2차 근육 접종 후 접종된 자돈에 대한 도전 감염을 통한 방어 여부 확인 ▶ 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 질병 증상 확인 및 부검을 통한 이상 유무 확인을 통해 자돈에서의 안정성 평가 ▶ 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 도전감염을 통한 방어 여부로 최적의 접종량 결정 	<p>○ 병원성 세균</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ F18+ Stx2e+ <i>Escherichia coli</i> <p>○ 해당 병원성 세균의 독소이드(BTP)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Stx2e

(3) 참여기관((주) 코미팜)

개발 목표	개발 내용	연구 범위
<p>○ 호흡기 질병이 만연된 양돈장에서의 개발 백신의 효능평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 고스트 사균제와 불활화 독소이드 혼합 백신 최적 조건의 시제품 개발 ▶ 혼합 백신 접종군과 비접종군 간의 질병 발생 여부 및 항생제 사용 빈도 비교 분석 ▶ 혼합 백신 접종군에서 백신 접종에 의한 부작용 발생 여부 조사 ▶ 돼지 흉막폐렴 백신 및 부종병 백신 임상시험신청서류 제출 	<p>○ 병원성 세균</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ F18+, Stx2e+ <i>Escherichia coli</i> ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 1형 ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 2형 ▶ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 5형 <p>○ 해당 병원성 세균의 독소이드</p>
<p>○ 각 재조합 독소(BTP) 대량 생산, 장기 보존</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 산업화를 위한 재조합 독소(BTP)의 대량 생산을 위한 시스템 구축 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 부종병 : Stx2e ▶ 돼지 흉막폐렴 : Apx

<p>방법 선별 및 효능 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대량 생산된 이들 독소의 기능적 효능 비교 평가 및 보관 방법 구체화 확립 ▶ 정제방법 간소화 및 정제된 재조합 독소들의 돼지를 대상으로 한 효능 비교 평가 ▶ 발현 정제된 재조합 독소의 불활화과정 및 고정 방법 확립 ▶ 목적동물인 돼지를 이용한 불활화 여부 또는 병독성 여부 확인 ▶ 불활화된 독소이드 장기 보관에 따른 병독성 회복 여부의 정기적 확인 ▶ 독소이드의 장기 보관을 위한 적합한 보존제 선별 및 불활화 독소이드의 항원성 유지 여부 검사 ▶ 유방염 유발균 특이적 AMP를 이용한 유방염 치료 연고제의 제품허가서류 제출 	<p>1A, Apx IIA, Apx IIIA, Apx IV</p>
----------------------	--	--------------------------------------

제2절. 연구개발 평가방법

1. 연구개발 성과 목표 핵심사항 요약

- 가. 대장균발현시스템 기반 항균 펩타이드 산업화 생산규모 기술개발 여부 : 현재 PCT 특허출원기술인 15mg/liter 배양의 10배이상 효율성 확보(>150mg/liter)
- 나. 박테리아 독성단백질의 대장균발현시스템 기반 산업화규모 발현기술 개발 여부
- 다. 유용 항균 펩타이드 또는 박테리아 독성단백질 생산 서비스 제품 상품화 : 10건 이상(과제 완료 5년이내 포함)
- 라. 돼지 부종병 예방 백신 및 돼지 흉막 폐렴 예방백신의 개발 및 산업체 기술이전 : 백신개발 2건 및 기술이전료 확보 2건

2. 연차별 평가방법 세부사항

연구기간 (년차)	평가 항목	평가방법
1차년도 ('16)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항미생물 펩타이드 및 세균독소 펩타이드(단백질)의 발현 및 정제 산업화단계 플랫폼기술의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 플랫폼기술 적용 생산품 존재

	○ 항미생물 및 세균독소 펩타이드 대량생산 발현벡터시스템의 개발(10종 이상)	• 발현시스템 구축 증빙
	○ 효능 및 독성평가를 위한 박테리아 및 포유동물 세포패널의 구축	• 평가패널 구축증빙
	○ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (APP) 1형, 2형, 5형 및 F18+ Stx2e+ <i>Escherichia coli</i> 세균의 고스트 유도에 최적화 AMP 선별	• APP의 각 혈청형 및 F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 에 최적 조건의 AMP 선발 결과
	○ 목적동물을 대상으로 세균에 대한 불활화 균체의 안전성 및 효능 평가	• 안전성 및 효능평가 결과
	○ 각 혈청형 alc F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 에 최적화된 AMP 대량 생산	• 2차년도 연구에 필요한 펩타이드 확보여부
	○ 기 확보 후보 AMP의 안정성 평가	• 혈청 내에서의 안정성 및 효능평가 결과
2차년도 ('17)	○ 항균 펩타이드 및 세균독소 펩타이드(단백질)의 대량생산	• 계획서상의 펩타이드 종류 및 생산량 일정의 충족
	○ 생산된 펩타이드 물질의 안정성, 보존성 평가 및 제품화	• 펩타이드 제품화 프로토콜의 확보 및 연계 산업체의 확보
	○ AMP 독성감소 및 특이성 조절을 위한 펩타이드 엔지니어링	• 펩타이드 엔지니어링 전략 및 결과의 적절성
	○ 기능성 펩타이드 후보물질의 발굴	• 발굴된 산업화 후보 신규AMP 및 BTP의 타당성
	○ 기능성 펩타이드 신규물질의 발굴 및 효능 및 독성 평가	• 확보된 효능 및 독성 평가결과 의 타당성
	○ 발현 정제된 BTP의 불활화과정 확립	• 기술 프로토콜 확립을 증명하는 결과확보
	○ 불활화 균체(APP 1형, 2형, 5형 및 F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i>) 와 불활화 독소이드 혼합 백신 개발	• 돼지 부종병 및 흉막 폐렴 예방 백신 시제품 개발

	○ 불활화 균체와 불활화 독소이드 혼합 백신 목적동물에서의 안전성 및 효능평가 평가	<ul style="list-style-type: none"> 모든 및 자돈에서의 혼합 백신의 안전성 여부 자돈에서의 혼합 백신의 도전감염 균주에 대한 방어 여부
	○ 유방염 유발 세균에 대한 AMP 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> 유방염 유발 세균에 대한 효능평가 결과의 적절성
3차년도 ('18)	○ 항균 펩타이드 및 박테리아 독성단백질 시제품 생산	<ul style="list-style-type: none"> 펩타이드 물질 시제품 10 종에 대한 기존제품과의 품질비교 결과의 적절성 소비자 맞춤형 AMP 및 BTP 생산시스템 구축여부
	○ 불활화 균체와 불활화 독소이드 혼합 백신 목적동물에서 상업용 백신과의 효능 비교 평가	<ul style="list-style-type: none"> 상업용 백신(돼지 흉막 폐렴)과의 효능 비교 여부
	○ 돼지 부종병 또는 흉막폐렴 만연 농장에서의 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> 현장 수준에서의 자연감염에 대한 돼지 부종병 및 흉막 폐렴 예방 효과
	○ 항균 펩타이드 기반 유방염치료 연고제제의 개발	<ul style="list-style-type: none"> 유방염치료연고제 시제품 개발 1건

3. 사업화 및 연구기반 평가지표

(단위 : 백만원, 건수, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문 SCI	비SCI	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치																			

최종목표	5	2		2	60	3						6		2	8		3		3	2
1차연도	1	0										1		2	2					
2차연도	1	0		1	30							2		2	3		2		1	1
3차연도	3	2		1	30	3						3		2	3		1		2	1
소계	5	2		2	60	3						6		2	8		3		3	2
종료 1차연도	1	2		1	30	1														
종료 2차연도						1	300													
종료 3차연도						1	400													
종료 4차연도						0	500													
종료 5차연도						0	800													
소계	1	2		1	30	3	2000													
합계	6	4		3	90	6	2000					6		2	8		3		3	2

제3절. 목표 달성도 및 관련분야 기여도

1. 계획대비 달성도

가. 주요 연구성과 목표 대비 달성도

평가 항목	평가 방법 기반 실적	달성도 (%)
○ 항미생물 펩타이드 및 세균독소 펩타이드(단백질)의 발현 및 정제 산업화단계 플랫폼기술의 개발	• 산업화를 위한 플랫폼기술 개발 및 후보 물질 생산 완료	100
○ 항미생물 및 세균독소 펩타이드 대량생산 발현벡터시스템의 개발(10종 이상)	• 발현 벡터시스템 구축	100
○ 효능 및 독성평가를 위한 박테리아 및 포유동물 세포패널의 구축	• 표준 균주, 목적 동물 유래 균주 및 포유동물 세포 평가패널 구축	100

○ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (APP) 1형, 2형, 5형 및 F18+ Stx2e+ <i>Escherichia coli</i> 세균의 고스트 유도에 최적화 AMP 선별	<ul style="list-style-type: none"> • APP의 각 혈청형 및 F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 에 최적 조건의 AMP 선발 	100
○ 목적동물을 대상으로 세균에 대한 불활화 균체의 안전성 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 안전성 및 효능 평가 결과 	100
○ 각 혈청형 alc F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i> 에 최적화된 AMP 대량 생산	<ul style="list-style-type: none"> • 연구에 필요한 펩타이드 확보 	100
○ 기확보 후보 AMP의 안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 혈청 내에서의 안정성 평가 완료 	100
○ 항균 펩타이드 및 세균독소 펩타이드(단백질)의 대량생산	<ul style="list-style-type: none"> • 계획서상의 펩타이드 종류 및 생산량 일정의 충족 	100
○ 생산된 펩타이드 물질의 안정성, 보존성 평가 및 제품화	<ul style="list-style-type: none"> • 펩타이드 물질의 혈청 내 안정성 평가 • 저장 기간, 온도에 따른 보존성 평가 • 시제품 제작 	100
○ AMP 독성감소 및 특이성 조절을 위한 펩타이드 엔지니어링	<ul style="list-style-type: none"> • 펩타이드 엔지니어링을 위한 in silico 분석 • 후보 물질의 선정(2종) 	100
○ 기능성 펩타이드 후보물질의 발굴	<ul style="list-style-type: none"> • 발굴된 산업화 후보 신규 AMP 및 BTP의 타당성 확보 	100
○ 기능성 펩타이드 신규물질의 발굴 및 효능 및 독성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 확보된 효능 및 독성 평가결과 의 타당성 확보 	100
○ 발현 정제된 BTP의 불활화과정 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 기술 프로토콜 확립을 증명하는 결과확보 	100
○ 불활화 균체(APP 1형, 2형, 5형 및 F18+ Stx2e+ <i>E. coli</i>) 와 불활화 독소이드 혼합 백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 돼지 흉막 폐렴 예방 백신 시제품 개발 	100
○ 불활화 균체와 불활화 독소이드 혼합 백신 목적동물에서의 안전성 및 효능평가 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 모돈 및 자돈에서의 혼합 백신의 안전성 여부 • 자돈에서의 혼합 백신의 도전감염 균주에 대한 방어 여부 	100
○ 유방염 유발 세균에 대한 AMP 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> • 유방염 유발 세균에 대한 효능 평가 	100

○ 항균 펩타이드 및 박테리아 독성단백질 시제품 생산	• 항균 펩타이드 기반 유방염 치료 연고 및 백신 시제품 제작(총 3종)	100
○ 불활화 균체와 불활화 독소이드 혼합 백신 목적동물에서 상업용 백신과의 효능 비교 평가	• 상업용 백신(돼지 흉막 폐렴)과의 효능 비교 여부	100
○ 항균 펩타이드 기반 유방염치료 연고제제의 개발	• 유방염치료연고제 시제품 개발 1건	100

나. 세부/협동과제별 목표 대비 달성도

(1) 제1세부 : 건국대학교

년도	연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	○ AMP 및 BTP의 대량 생산 핵심 플랫폼 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 선행 연구를 기반으로 기존 확보된 AMP들의 생화학적 특성 분석을 통해 산업화 후보 AMP를 선정 - 후보 AMP 및 BTP에 대한 아미노산 서열 정보, 발현 벡터를 위한 codon optimization, PCR 및 클로닝 기법을 이용한 클론의 확보 - 엔지니어링한 녹색형광단백질 루프구조를 활용한 AMP 대량 생산용 발현벡터의 구축 - 산업화 후보 물질로 선정된 BTP Stx 2e subunit A와 B의 숙주 세포에 대한 독성을 극복하기 위한 대량 발현 시스템 개발 - AMP 생산용 신규 벡터 개발, 생산효율 최대화를 위한 배양조건의 확립 및 기술개발 - 생산효율 최대화를 위한 AMP 및 BTP 대량 정제시스템의 단순화 및 비용축소기술 개발: Ni-NTA 또는 cation exchange 칼럼기반 기술개발 	100
	○ 산업화 후보 펩타이드의 특성 규명 및 제품 설계	<ul style="list-style-type: none"> - 산업화 후보 AMP의 생화학적 특성 분석 - 확보된 6종의 미생물에 대한 후보 AMP의 항균 활성 검증 - 후보 AMP들의 용혈성 평가를 포함한 세포 독성 및 혈장 내 안정성 검증 	100
	○ 제품화 가능한 신규 펩타이드 물질의 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - 주요 가축질병유발 세균 중 대량생산이 어려운 BTP 신규 타겟의 발굴 	100

2차 년도	○ AMP 및 BTP의 대량 생산	- 1차년도에 개발한 산업화 수준의 생산기술 및 후보 펩타이드 발현클론을 이용한 대량 생산	100
	○ 제품 후보 AMP 및 BTP의 효능평가, 선발 및 제품화	- 후보 AMP의 혈장 내 안정성 분석 - 생산된 제품후보 펩타이드에 대해 1차년도에 구축한 다양한 박테리아 및 포유동물 세포 패널을 이용한 효능 및 독성평가 - 생산된 기능성 펩타이드 물질의 보존성(저장온도, 시간에 따른 효능) 평가 및 제품 설계	100
	○ 제품화 가능한 펩타이드 후보 물질의 발굴	- 계놈분석 기술을 활용한 AMP 후보 물질의 발굴 - 가축질병유발 BTP 신규 타겟의 발굴	100
	○ AMP 기반의 젖소 유방염 치료 연고의 설계	- 젖소 유방염 유발 병원균에 대한 AMP 효능 평가 - 유방염 치료용 AMP 복합제의 개발	100
	○ AMP 독성 감소 및 특이성 조절을 위한 펩타이드 엔지니어링	- 엔지니어링 기법을 도입할 후보 AMP 9종의 선정 및 펩타이드 1차 모델링 - 생물정보학 기법을 이용하여 특이성 및 세포 독성에 영향을 주는 요인 규명 및 가설 수립을 위한 Test set (AMP 목록) 확보 및 분석 - 후보 AMP에 대한 대량 생산용 클론의 확보, 발현 및 정제 - 생산된 AMP의 효능 및 세포독성 평가	100
3차 년도	○ AMP 및 BTP 대량 생산	- 2차년도에 추가된 제품 후보 펩타이드들의 클론을 이용한 대량 생산	100
	○ 제품 후보 AMP 및 BTP 평가 및 선발	- 2차년도에 생산된 AMP의 pH, 염농도 및 혈청 내 안정성 테스트 - 제품후보 AMP에 대한 세균 및 포유동물 세포패널을 이용한 효능 및 독성평가 - 유방염 유발균 특이적 AMP를 이용한 유방염치료 연고제의 목적동물(젖소) 활용 과용량 안전성(최대 3 dose) 및 효능 평가	100
	○ 기능성 펩타이드의 품질평가	- 펩타이드 제품들에 대한 순도 확인 및 생물학적 활성 검정(Quality Control)	100

(2) 제1협동 : 전북대학교

년도	연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	○ 세균 고스트 유도에 최적화 AMP 선별	- 주관연구기관과의 협력연구를 통하여 백신개발 목적세균의 고스트 유도에 특화된 AMP 선별 - 고스트화 유도 액의 배양을 통한 불활화 확인 - 확정된 균을 대상으로 투사 전자현미경(TEM)을 이용한 고스트화 유도 최종 확인	100
	○ 불활화 세균의 안전성 및 병원성 복귀 실험	- 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 쥐 확인 - 실험동물에 대한 근육접종을 통한 고스트 균체 접종에 따른 부작용 및 병원성 발현 여부의 확인 - 부검 및 이상 징후에 대한 조직검사를 통한 정밀 검사	100
	○ 목적동물에서 불활화 균체의 안전성 및 효능 평가	- 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 돼지 확인 - 고스트 세균 백신의 근육접종 후 폐사 및 부종병 및 흉막 폐렴 질환 발현 여부 확인 및 이상 징후에 대한 조직학적 소견 확인 - 접종된 돼지 혈청 및 모돈의 경우 초유로부터 항체 역가 확인 - 도전감염 후 부종병 및 흉막폐렴에 대한 방어 효과 여부 확인	100
	○ 세균의 도전감염 균량 확인	- 야외 병독성 균주를 대상으로 다양한 균량 접종 후 폐사 여부 및 부검 후 각 질병(부종병 및 흉막 폐렴)의 발현 여부를 통한 LD ₅₀ 균량 결정	100
2차 년도	○ 불활화 BTP의 실험동물에서의 안전성 평가	- 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 쥐 확인 - 각 재조합 독소이드(BTP)를 다양한 접종량으로 근육접종 후 부작용 및 병원성 발현 여부 확인 - 부검을 통한 육안 확인 및 이상 징후에 대한 조직 검사 확인	100
	○ 돼지에서 불활화 BTP의 안전성, 효능 평가	- 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 실험용 자돈 확인 - 재조합 독소이드(BTP)를 다양한 접종량으로 혼합하여 근육접종 후 폐사 및 부종병 발현 여부 확인	100

		<ul style="list-style-type: none"> - 도전감염 후 폐사 및 부검을 통한 효능평가 - 재조합 독소이드 백신 접종 및 부검을 통한 안정성 평가 	
	○ 돼지에서 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 모돈 및 그 모돈에서 출생한 감염 음성 자돈 확인 - 고스트 균체와 예비실험을 통해 결정된 양의 독소이드의 근육접종 - 접종된 자돈에 대한 도전 감염 및 부검을 통한 흉막 폐렴 발현 여부 확인 - 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 질병 발생 유무, 유사산 여부 등 모돈에서의 안정성 평가 - 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 질병 증상 확인 및 부검을 통한 이상 유무 확인을 통해 자돈에서의 안정성 평가 	100
3차 년도	○ 돼지에서 BTP 함유 사균 백신과 기존 백신과의 효능 비교 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 모돈 및 그 모돈에서 출생한 감염 음성 자돈 확인 - 기존 상업용 시판 백신의 접종 기준에 맞춰 상업용 백신과 고스트 균체와 재조합 독소이드가 함유된 혼합 백신을 근육접종 - 1차 및 2차 접종 전, 도전감염 전 각각 모든 자돈에서 가검물 채취 및 항체 역가 확인 - 도전감염을 시행한 자돈의 부검을 통해 시판 백신과 개발 백신의 효능 비교 평가 	100
	○ 자돈을 대상으로 균체와 BTP 혼합 백신의 최종 접종량 결정 시험	<ul style="list-style-type: none"> - 효소면역정량법(ELISA)를 이용한 감염 병력이 없는 모돈 및 그 모돈에서 출생한 감염 음성 자돈 확인 - 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 질병 증상 확인 및 부검을 통한 이상 유무 확인을 통해 자돈에서의 안정성 평가 - 다양한 백신의 용량에 따라 백신 접종 후 도전감염을 통한 방어 여부로 최적의 접종량 결정 - 1차, 2차 근육 접종 후 접종된 자돈에 대한 도전 감염을 통한 방어 여부 확인 	100

(3) 참여기관(제2협동) : (주)코미팜

년도	연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	○ 체외에서의 불활화 세균의 안정성시험	<ul style="list-style-type: none"> - 18+, Stx2e+ <i>Escherichia coli</i> 및 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 고스트 사균체에 대한 안정성을 평가에 앞서 상기 세균들의 고스트 유도에 최적화된 AMP선발 과정 선행 - 선행 연구 결과를 기반으로 온도 조건에 따라 체외에서 불활화 세균의 안정성 평가 진행 - 고스트 사균체를 포함하는 백신의 안정성 평가 결과를 토대로 백신의 제조공정과 유효기간 확립 	100
	○ 고스트 유도에 최적화된 AMP 대량 생산	<ul style="list-style-type: none"> - F18+, Stx2e+ <i>Escherichia coli</i> 에 최적화된 항균 펩타이드 선별 - <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 혈청형 1형, 2형, 5형을 동시에 고스트 유도가 가능한 항균 펩타이드 선별 - 선별된 AMP에 대한 산업체 수준의 대량 생산 정제 공정의 설계 - 정제된 AMP의 효능 평가를 통한 최적의 정제 공정 선별 	100
2차 년도	○ 생산된 기능성 펩타이드 물질의 보존성 평가 및 제품화	<ul style="list-style-type: none"> - 대량 생산된 각 세균에 최적화된 AMP의 냉동 보관에 따른 기능적 변화 여부 관찰 - 보존성 증진을 위한 최적화 냉동보관 보조제의 선별 - 정기적으로 각 세균에 대한 각 시기별 고스트화 유도 유효 농도 측정 - 보관 후 변화된 물리학적 성상 평가 - 생산, 정제된 펩타이드와 적합한 보관 보조제와 같이 혼합하여 시제품 제작 - 정기적으로 시제품의 기능적 효능, 물리화학적 변화 여부 등 시제품의 안정성 평가 - 보관 방법의 구체화 및 최적화 	100
	○ 제조합 BTP 대량생산 및 제품개발 특성분석	<ul style="list-style-type: none"> - 산업화를 위한 대량 생산을 위한 시스템 구축 - 대량 생산된 이들 독소의 기능적 효능 비교 평가 - 대량 생산에 따른 이들 독소의 보관 방법 구체화 확립 	100

3차 년도		<ul style="list-style-type: none"> - 정제된 독소의 기능에 영향을 주지 않고 또한 부작용을 최소화할 수 있는 정제 방법 확립 - 정제된 재조합 독소들의 돼지를 대상으로 한 효능 비교 평가 	
	○ 발현 정제된 BTP의 불활화과정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 대량 생산된 독소들의 불활화 및 고정 방법 확립 - 불활화 여부 또는 병독성 여부를 실험 동물 내지는 목적동물인 돼지를 이용하여 불활화 여부 확인 - 돼지를 이용하여 불활화된 독소이드 장기 보관에 따른 병독성 회복 여부에 대한 정기적 확인 - 독소이드의 장기 보관을 위한 적합한 보존제 선별 - 보존제 및 장기 보관에 따른 불활화 독소이드의 항원성 유지 여부 검사 	100
	○ 호흡기 질병이 만연된 양돈장에서의 개발 백신의 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> - AMP 활용 고스트 균체와 독소이드를 혼합하여 질병별 최적의 시험백신 제작(<i>APP, E. coli</i>) - 각 백신의 실험동물에서 시험백신의 안전성, 안정성 및 효능 평가 - 각 백신의 목적동물에서 시험백신의 안전성 및 효능 평가 - 외부 농장에서 시험백신의 적용시험을 위한 임상시험 계획서 작성 및 제출 	100
○ 제품개발용 재조합 BTP 대량 생산, 보존법 선별 및 목적동물 대상 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> - 산업화를 위한 재조합 독소(BTP)의 대량 생산 시스템 구축을 위한 검증 - 대량 생산한 BTP의 검증 - 독소이드의 장기 보관을 위한 보존제 선별 및 안정성 평가 - 유방염 유발 균주에 감수성이 있는 AMP를 사용한 유방염 치료 연고제의 품목허가서류 제출 	90	

다. 사업화 및 연구기반 성과 평가

(단위 : 백만원, 건수, 명)

성과 목표	사업화지표				연구기반지표				
	지식 재산권	기술 실시	사업화	기술	학술성과	교육	인력	정책 활용·홍	기 타

				(이전)							인 증	논문		학 술 발 표	지 도	양 성	보		(타 연구 활용 등)		
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	진 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		SCI	비 SCI				논 문 평 균 IF	정 책 활 용		홍 보 전 시	
																					단 위
가중치																					
최종목표	5	2		2	60	3							6		2	8		3		3	2
1차연도	1	0											1		2	2					
1차연도	3			1	10								2		2.38	4		1		1	
2차연도	1	0		1	30								2		2	3		2		1	1
2차연도	4	0		0	10								0		0	9	1	2		0	1
3차연도	3	2		1	30	3							3		2	3		1		2	1
3차연도	5	2		2	70	2							2		4.2	4	2	1		4	2
4차연도																					
4차연도																					
5차연도																					
5차연도																					
소 계	5	2		2	60	3							6		2	8		3		3	2
소 계	12	2		3	90	2							4(1)		3.3	17	3	4		5	3
종료 1차연도	1	2		1	30	1															
종료 2차연도						1	300														
종료 3차연도						1	400														
종료 4차연도						0	500														
종료 5차연도						0	800														
소 계	1	2		1	30	3	2000														
합 계	6	4		3	90	6	2000						6		2	8		3		3	2

라. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

(1) 부종병 백신

(가) 원인

- ① BTP (stx2e) scale-up 정제 과정의 추가적인 최적화 필요
- ② stx2e 독소는 극소량으로 작용하고 발현 또한 소량으로 일반적인 정량이 어려움

(나) 차후대책

- ① 산업화 가능할 정도의 생산량을 만족하는 BTP (stx2e) 정제 방식 탐색
- ② stx2e 표준정량법의 개발

(2) 유방염 치료 연고제

(가) 원인

- ① 품목허가 제출시 포함되는 신규 물질 AMP (PMAP36)의 약전 수준에 적합한 절대 정량법 제시 필요
- ② 신규 물질의 안전성·유효성 평가에 관련이 있는 시험항목 설정

(나) 차후대책

- ① LC/MS 분석에 필요한 표지 펩타이드 확립중에 있으며 이를 바탕으로 제품에 포함되는 AMP (PMAP36)의 표준정량법 설정
- ② 원유를 생산중인 목적동물에 개발한 유방염 연고제 적용 후 생산된 원유가 집유 단계에서 현행 잔류물질검사를 실시하였을 때 적합 판정을 받을 수 있는 기준을 제시해야 하며, 개발 제품이 이를 충족하는지 추적 관찰이 필요함(집유업체(예, 서울우유)에서 인정될 수 있는 안전성 검증을 수행하여 문제가 없음을 확인하여야 젖소 목장에서서의 임상시험이 가능함)

2. 관련 분야 기여도 (국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성 및 기여도 평가)

가. 항생제 대체 치료제 및 고효율 백신 생산 기술의 개발

세부연구 항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
항균펩타이드 대량생산 기술	○ 산업화 가능수준의 항균펩타이드 대량생산기술은 국내외적으로 전무함. ○ 최근 건국대 연구팀에 의해 실험실 생산수준의 대량생산 기술개발	- 건국대 연구팀에 의해 개발된 실험실 수준의 기술을 기반으로 생체반응기를 이용한 대량생산 기술을 확립한 - 생산성의 경우 10배 이상이 생산성을 확보함	- 생체반응기 적용기술: 30% - 유전자제조합 단백질 발현 벡터 구축기술:30% - 발현단백질 대량정제기술: 40%
제품화 적합 신규항균 펩타이드의 발굴	○ 현재 내인성 항균펩타이드의 경우 약 1000종 이상이 발굴됨. 그러나 제품 개발에 적용가능한 경우는 제한적임.	- 본 연구팀에서 신규 발굴한 항균펩타이드 들은 항균성, 세포독성, 혈장안정성 등에서 항생제 대체제로 활용가능한 특징을 보유하여 특허 출원됨.	- 신규항균펩타이드 발굴: 50% - 항균펩타이드 효능 및 안전성 분석: 50%

나. 돼지 부종병 및 돼지 흉막 폐렴 예방 백신 개발

세부연구 항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
돼지 흉막 폐렴 예방백신	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고스트 사균체 예방백신 개발 : 현재 국내에서는 1형, 2형, 5형, 7형만 포함된 백신 개발 중임 ○ 재조합 독소이드 사균체 혼합 예방백신 개발 : 2종 내지 3종의 재조합 독소이드 혼합 백신 개발 연구 진행 중임 	<ul style="list-style-type: none"> - 최근 돼지 흉막폐렴 원인체인 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>의 혈청형이 총 18개로 밝혀짐 - 이중 국내에선 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12혈청형 분리 - 모든 혈청형을 포함한 백신 개발 - 4종의 재조합 독소이드 혼합 백신 제조를 통해 다른 모든 혈청형에 대해서도 방어 가능한 백신 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 사균체 분리 : 100% - 재조합 독소이드 발현 시스템 구축 : 100%
돼지 부종병 예방백신	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고스트 사균체 예방백신 개발 : 이유 자돈에서의 병원성 대장균에 대한 백신 개발 연구 진행 중 ○ 재조합 독소이드 사균체 혼합 예방백신 개발 : 재조합 독소이드 발현 시스템 구축 개발 연구 진행 중 	<ul style="list-style-type: none"> - 이유 자돈에서 문제가 되고 있는 F4+ 병원성 대장균 및 F18+ 병원성 대장균 고스트 백신 개발 완료 - 재조합 독소이드 발현 시스템 구축 및 정제 시스템 구축 완료 	<ul style="list-style-type: none"> - F4+ 병원성 대장균 및 F18+ 병원성 대장균 고스트 사균체 백신 : 50% - 재조합 독소이드 발현 구축 : 30%

제4장. 연구결과의 활용 계획 등

제1절. 항균펩타이드 고효율생산 및 항생제 대체 치료제 개발

1. 추가연구의 필요성

- 가. 3년간의 연구를 통하여 개발기술의 국제특허(미국, 유럽, 중국) 출원등 항균펩타이드를 활용한 항생제 대체제개발에 필요한 산업화 원천기술을 고부가가치를 가지는 단계로 발전시킴. 치료제 개발의 경우 연구기간의 제약 등의 사유로 산업화 초기의 기술개발에 도달하여 시제품을 제작함. 그러나 개발기술의 본격적인 산업화를 위해서는 다양한 항균펩타이드 기반의 제품개발 및 효능검정과 임상실험 단계 등의 추가 연구가 필요함
- 나. 개발된 항균펩타이드 생산 플랫폼기술의 경우 현재까지 개발된 가장 우수한 기술로 판단됨. 그러나 기술적 향상이 필요한 부분이 또한 존재하여 이에 대한 추가적 연구의 진행을 통한 세계 최고수준의 항균펩타이드와 독소펩타이드 대량생산 기술의 확보를 위한 추가적 연구가 필요함
- 다. 본연구에서 개발된 다수의 항균펩타이드들의 특성은 다양하여 이를 활용한 다양한 활용법 개발연구를 통한 연구성과의 극대화가 필요함

2. 타 연구의 응용 및 활용방안

- 가. 항균펩타이드는 선천면역계의 주요 성분으로 이들을 활용한 가축의 선천성 면역 증대를 통한 개체 강건성 향상과 관련한 응용기술개발에 활용이 가능함
- 나. 항생제 내성박테리아의 발생 억제를 위하여 가축생산 단계에서 항생제의 사용이 금지되고 있음. 항균 펩타이드는 기존 항생제와 비교시 내성의 발생 가능성이 매우 낮기 때문에 다재 내성균에 대처하기 위한 물질로써 인체 및 동물에 적용하기 위한 다양한 감염치료제의 개발에 활용이 가능함. 또한 항박테리아제제 이외에도 항바이러스, 항진균제제로의 활용법 개발이 가능함

3. 기업화 추진방안

- 가. 본 과제에서 개발하여 산업화 초기단계에 있는 유방염치료제의 지속적 산업화
- 나. 다재내성 박테리아 및 항진균 신규 치료제 개발에 적용
- 다. 다양한 항균펩타이드 물질 자체의 대량생산을 통한 치료제 원료의 생산공정의 확립 및 산업화

제2절. 돼지 부종병 및 돼지 흉막 폐렴 예방 백신 개발

1. 추가연구의 필요성

- 가. 재조합 변형 Stx2e 독소이드 함유 병원성 대장균 불활화 사균체 혼합 백신의 사업화를 위한 재조합 변형 Stx2e 독소이드의 대량 발현을 위한 조건 확립
 - (1) 동물용 의약품 제조회사에서 백신으로 사용하기 위해서는 재조합 변형 Stx2e 독소이드의 대량 생산은 필수적임
 - (2) 따라서 재조합 변형 Stxc2e 독소이드의 스케일 업을 위한 추가 연구가 필요함

- (3) 동물용 제조회사에서 백신을 상용화 하기 위해서는 야외에서의 임상 시험 계획서를 작성하여 수의검역본부에 제출 후 야외에서의 실험이 필요하다면 이 소요 기간은 약 3년이 소요됨
- (4) 더불어 백신을 제조 유통하기 위해서는 안정성 실험은 필수이며 이 실험은 약 2년간의 안전성 및 효능 평가와 같이 수행되어야 함
- (5) 이와 같이 연구 개발에 성공한 연구 결과를 사업화하기 위해서는 약 3년간의 추가 연구가 절대적으로 필요함

나. 재조합 ApxIA-, IIA-, IIIA-, IVA-C-terminal 독소이드 함유 APP 1형, 2형, 5형, 7형, 10형 불활화 사균체 혼합 백신의 사업화를 위한 재조합 ApxIA-, IIA-, IIIA-, IVA-C-terminal 독소이드의 대량 발현을 위한 조건 확립

- (1) 동물용 의약품 제조회사에서 백신으로 사용하기 위해서는 재조합 ApxIA-, IIA-, IIIA-, IVA-C-terminal 독소이드의 대량 생산은 필수적임
- (2) 따라서 재조합 ApxIA-, IIA-, IIIA-, IVA-C-terminal 독소이드 대량 배양 조건 확립을 위한 추가 연구가 필요함
- (3) 동물용 제조회사에서 백신을 상용화하기 위해서는 야외에서의 임상 시험 계획서를 작성하여 수의검역본부에 제출 후 야외에서의 실험이 필요하다면 이 소요 기간은 약 3년이 소요됨
- (4) 더불어 백신을 제조 유통하기 위해서는 안정성 실험은 필수이며 이 실험은 약 2년간의 안전성 및 효능 평가와 같이 수행되어야 함
- (5) 이와 같이 연구 개발에 성공한 연구 결과를 사업화하기 위해서는 약 3년간의 추가 연구가 절대적으로 필요함

2. 타 연구의 응용 및 활용방안

가. 주요 분비형 독소의 기본적인 구조에 기초한 재조합 독소이드 제조 기초 정보 제공

- (1) 독소 분비 병원성 세균에 의한 질병은 계속해서 증가하고 있음. 이들 독소 분비 병원성 세균에 대한 예방 백신을 개발하기 위해서는 반드시 재조합 독소이드가 함유된 혼합 백신 개발이 필요함
- (2) 우리가 본 연구를 통해 획득한 독소의 구조에 대한 분석에 대한 기초 정보를 활용하여 독소 분비 병원성 세균에 의해 생성되는 독소의 기초 구조에 대한 분석에 대한 정보를 제공하여 최적의 백신에 적합한 항원 발굴에 대한 정보 제공

나. 재조합 독소이드 제조 및 발현 기술 제공

- (1) 발굴된 재조합 독소이드에 대한 정보를 바탕으로 하여 재조합 독소이드를 발현 시스템을 구축할 수 있도록 기초 정보 및 기술 제공
- (2) 발현기술과 대량 발현 기술에 대한 정보 제공

3. 기업화 추진방안

가. 이유 후 자돈 병원성 대장균성 설사 또는 사균체 및 재조합 독소이드 혼합 돼지 부종병 예방 백신 시제품 제작

- (1) 재조합 변형 Stx2e 독소이드 대량 생산 시스템 구축
- (2) 재조합 변형 Stx2e 독소이드 및 병원성 대장균 불활화 사균체 혼합 시제품 생산
- (3) 제작된 시제품으로 야외 현장 임상실험 및 안정성 실험 수행
- (4) 재조합 변형 Stx2e 독소이드 함유 병원성 대장균 불활화 사균체 혼합 백신 생산 및 국내 판매

나. 돼지 흉막 폐렴 예방 백신 기술이전 및 재조합 독소이드 함유 혼합 백신의 시제품 제작

- (1) 재조합 ApxIA-, IIA-, IIIA-, IVA-C-terminal 독소이드 대량 생산 시스템 구축
- (2) 재조합 ApxIA-, IIA-, IIIA-, IVA-C-terminal 독소이드 및 APP 1형, 2형, 5형, 7형, 10형 불활화 사균체 혼합 시제품 생산
- (3) 제작된 시제품으로 야외 현장 임상실험 및 안정성 실험 수행
- (4) 재조합 ApxIA-, IIA-, IIIA-, IVA-C-terminal 독소이드 및 APP 1형, 2형, 5형, 7형, 10형 불활화 사균체 혼합 백신 생산 및 국내 판매

제5장. 연구개발성과의 보안등급 및 LMO 연구시설 및 수입신고

제1절. 연구개발성과의 보안등급

보안등급 분류	○ 해당 사항 없음
---------	------------

제2절. LMO 연구시설 및 수입신고

시설번호	제LML09 - 183호	안전관리 등급	2등급
수입신고		해당 사항 없음	

제6장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

○ 기술적 위험요소 분석

(「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「산업안전보건법」에 따른 연구실 안전조치 이행계획(해당 연구실안전점검 및 정밀안전진단실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진 실시, 보험가입 등) 및 기타 당해 연구개발사업 수행 시 필요한 연구실안전 확보 계획을 서술)

제3장 소속기관의 안전관리

제9조 (소속기관장의 책무)

- ① 소속기관장은 소속기관의 안전 체계를 구축하고 안전관리를 철저히 시행하여 안전환경을 확보하는 안전관리총괄책임을 진다.
 - ② 소속기관장은 소속 교직원, 연구원 및 조교 등을 포함하여 10인 이내로 실무위원회를 구성 하고 위원장이 된다.
 - ③ 소속기관장은 실험실 사용자들의 안전을 위하여 다음 각 호의 사항을 수행하여야 한다.
 1. 정기적인 실험실 안전관리사항 점검 및 평가
 2. 화재나 안전사고 발생 시 대처요령 교육
 3. 화학물질 관리, 실험실 보건 및 안전교육
 4. 정기 건강검진 관리
 5. 유해표시 및 물질안전보건자료 제공
 6. 실험실 안전사고조사 및 데이터베이스화
 7. 안전한 실험실 환경조성에 필요한 시설 제공
 8. 안전프로그램의 시행 지원 및 평가체제 마련
 9. 안전관련정보가 원활히 교환될 수 있는 체제 마련
 10. 실험실 공기 중 유해물질 농도 측정, 환기대책수립
 11. 기타 보건 및 안전 향상에 관한 사항
 - ④ 소속기관장은 실험실별로 안전관리책임자(정.부)를 임명한다.
 - ⑤ 소속기관장은 실험실 안전사고 발생시 1차적인 경위조사 및 사고 확대방지에 만전을 기하고, 사후대책 수립 후 7일 이내에 안전관리위원회에 보고하여야 한다.
 - ⑥ 소속기관장 및 안전관리위원회는 안전점검 및 정밀안전진단의 실시 결과 또는 사고조사의 결과에 따라 연구활동종사자 또는 공중의 안전한 이용을 위하여 긴급한 조치가 필요하다고 판단되는 경우에는 연구실의 사용제한·금지 또는 철거 등 안전상의 조치를 취하여야 한다.(신설 2014. 12.17.)
- #### 제10조 (실험실의 등록)
- ① 실험실을 새로 개설하는 경우에는 안전관리 전담부서에 등록하여야 하며, 등록서류에 소속기관, 실험실명, 위험등급, 연락처, 안전관리책임자 등을 기록하여 제출하여야 한다.

② 등록 후에는 실험실에 안전수칙과 비상시 행동요령, 비상연락망을 부착하며, 안전관리지침을 비치하여 관리하고, 환경안전점검일지를 기록하며 연구활동종사자 안전교육 이수증을 비치하여야 한다.(개정 2014.12.17.)

제14조 (위험등급의 지정)

전담부서는 실험실에 대한 위험등급 지정 시, 실험실 안전관리책임자와 협의하여 실험실의 위험정도에 따라 다음과 같이 관리등급을 지정한다.

1. A등급 : 가연성 가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성동위원소, 위험성 높은 장비가 설치된 실험실 등
2. B등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성 가스, 소량의 폐수발생 실험실 등
3. C등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터관련 실험실 등

제15조 (정밀안전진단의 실시 및 보고)

- ① 소속기관 및 전담부서는 안전점검을 실시한 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 정밀안전진단을 실시할 수 있다.
- ② 전담부서는 정밀안전진단을 직접 실시하거나 일정 요건을 갖춘 전문기관으로 하여금 대행하게 할 수 있다.
- ③ 정밀안전진단을 실시한 소속기관장 및 전담부서의 장은 지체 없이 그 결과를 총장에게 보고하고, 필요시 이를 해당기관에 통보하여야 한다.(개정 2014.12.17.)

○ 안전관리대책

제5장 안 전 교 육

제16조 (안전교육)

- ① 소속기관장 및 전담부서는 실험실의 안전관리에 관한 정보를 연구활동종사자에게 제공하여야 한다.
- ② 소속기관장 및 전문부서는 연구활동종사자에 대하여 실험실 사용에 따르는 안전성 확보 및 사고예방에 필요한 교육·훈련을 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 규정된 내용에 따라 실시하여야 한다.
- ③ 안전교육의 대상은 대학생, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원 및 업체직원 등 모든 실험실 이용자로 한다.
- ④ 소속기관장은 자체적으로 다음과 같은 안전교육을 계획하여 실시한다.
 1. 실무위원회 교육
 2. 외부 기관 또는 전문가 초빙교육
 3. 학과별 순회교육
 4. 소방안전교육, 대피교육, 소방체험교육
- ⑤ 안전관리책임자(정)는 다음 각 호와 같은 실험실 자체교육을 실시한다.
 1. 학기 초 안전관련 수시 교육
 2. 실험 시작 전 위험이 따르는 기기조작요령 및 안전교육(위험시설, 기계, 가스, 약품 등)

3. 자체 세미나 시 안전내용을 포함한 교육

⑥ 안전교육내용은 안전관리지침서를 근거로 하되 세부 교육내용은 따로 정한다.

제17조 (안전교육의 관리)

안전교육 이수자에게는 수료증을 교부하여야 하고, 안전교육 결과를 소속기관장에게 통보하여야 한다.

소속기관장은 미이수자가 안전교육을 이수할 수 있도록 적절한 조치를 취해야 하며, 미이수자가 실험에 참여하는 것을 제한할 수 있다.

제6장 안전관리비 계상, 보험가입 및 건강검진

제18조 (안전관리비 계상)

① 본교는 실험실 안전관리에 필요한 비용을 매년 확보하여야 하며, 안전관리비를 계상한 때에는 미래창조과학부장관에게 보고하여야 한다.(개정 2014.12.17.)

② 실험실에서 연구과제 수행 시 해당과제 인건비 총액의 1%이상 2%이하의 범위 안에서 예산을 반영하여야 한다.(개정 2014.12.17.)

③ 안전관리비는 연구활동종사자에 대한 보험료, 교육훈련, 건강검진 비용, 보호장비 구입, 안전설비 설치·유지 및 보수, 안전점검 및 정밀안전진단비 등에 사용하여야 한다.

제19조 (보험가입)

① 본교는 관계 법령이 정하는 기준에 따라 연구활동종사자를 피보험자 및 수익자로 하는 보험에 가입하여야 하며, 가입 시 그 결과를 14일 이내에 미래창조과학부장관에게 보고하여야 한다.(개정 2014.12.17.)

② 제1항의 규정에 따라 연구활동종사자에 대하여 보험에 가입하는 경우 보험가입에 필요한 비용을 매년 예산에 계상하여야 한다.

제20조 (건강검진)

소속기관장은 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자에 대하여 매년 건강검진을 실시하여야 한다.

제7장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

제1절. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Genome wide analysis of the antimicrobial peptides in <i>Python bivittatus</i> and characterization of cathelicidins with potent antimicrobial activity and low cytotoxicity	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	Dayeong Kim 및 Nagasundarandan Soundra rajan	9	미국	American Society for Microbiology	SCI	2017.6.19.	10.1128/AAC.00530-17
2	Efficacy Evaluation of Combination Vaccine of Recombinant C-Terminal Fragments of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA in Piglets	Sains Malaysiana	문자영, 허진	46(2)	말레이시아	University Kebangsaan Malaysia	SCIE	2017.02.	0126-6039
3	Protegrin-1 cytotoxicity towards mammalian cells positively correlates with the magnitude of conformational changes of the unfolded form upon cell interaction	Scientific Reports	Nagasundarandan Soundra rajan 및 박수연	9(11569)	영국	nature publishing group	SCI	2019.08.09.	10.1038/s41598-019-47955-2
4	<i>SLA-I</i> Genetic Diversity in Pigs: Extensive Analysis of Copy Number Variation, Heterozygosity,	Scientific Reports	Minh Thong Le	-	영국	nature publishing group	SCI	-	-

	Expression, and Breed Specificity								
5	In silico characterization of 19 opossum cathelicidins and experimental validation of their antibacterial and West Nile virus inhibitory effects	Frontiers in Immunology	조혜선, 염주리	-	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	-	

제2절. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	The 2 nd International Caparica Conference in Antibiotic Resistance (IC2AR)	조혜선, 오경수, 라판디안, 박찬규	2017.06.12.	리스본	포르투갈
2	The 2 nd International Caparica Conference in Antibiotic Resistance (IC2AR)	라판디안, 김다영, 조혜선, 박찬규	2017.06.12.	리스본	포르투갈
3	The 8 th Asian Pig Veterianry Society Congress	문자영, 강지영, 서정우, 김원경, 최영환, 최민수, 허진	2017.05.13.	우한	중국
4	The 8 th Asian Pig Veterianry Society Congress	김원경, 문자영, 조정상, 허진	2017.05.13.	우한	중국
5	Conference Program TICEAS, ICEASS	문자영, 조정상, 김원경, 앵호사이한, 허진	2018.02.24.	방콕	태국
6	Antimicrobial peptide symposium 2018 (AMP 2018)	조혜선, 라판디안, 박찬규	2018.06.06.	푸아티에	프랑스
7	Antimicrobial peptide symposium 2018 (AMP 2018)	라판디안, 박수현, 레반찬퀴, 박찬규	2018.06.06.	푸아티에	프랑스
8	PAG ASIA 2018	레민통	2018.05.31.	서울	대한민국
9	2018 동물유전육종학회	레민통, 이해정, 레반찬퀴, 박찬규	2018.07.05.	대전	대한민국
10	2018 동물유전육종학회	전효임, 레민통, 조혜선, 안병용,	2018.07.05.	대전	대한민국

		라판디안, 박찬규			
11	2018 동물유전육종학회	안병용, 박찬규	2018.07.05.	대전	대한민국
12	2018 동물유전육종학회	레민통, 조혜선, 안병용, 레반찬귀, 라판디안, 박찬규	2018.07.05.	대전	대한민국
13	2018 제13차 대한백신학회 추계학술대회	문자영, 김원경, 허진	2018.09.28.	서울	대한민국
14	Gordon Research Conferences	박찬규, 조혜선	2019.02.24.	루카	이탈리아
15	2019 한국 동물유전육종학회	조혜선, 염주리, 전효임, 박찬규	2019.06.24.	대전	대한민국
16	2019 한국동물유전육종학회	박찬규	2019.06.24.	대전	대한민국
17	13 th Vaccine Congress	김원경, 문자영, 앵호사이한, 이준우, 조영규, 박민서, 허진	2019.09.16.	방콕	태국

제3절. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	Actinobacillus pleuropneumoniae; APP (1,2,5,7,10,12 serovar)	KCTC 14005BP	한국생명공학연 구원	2019

제4절. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록		
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호
1	비단뱀으로부터 분리한 신규한 항균 펩타이드 및 이의 발굴방법	PCT 출원	박찬규	2017.04.04.	PCT/KR2017/ 003707			

2	그람 음성 박테리아에 대한 항균 활성을 갖는 별거숭이두더지쥐 유래의 항균성 폴리펩티드 및 이를 포함하는 약학 조성물	대한민국	박찬규	2017.08.22.	10-2017-0106 311			
3	항균 펩타이드를 포함하는 불용성 융합단백질 및 이를 이용한 항균 펩타이드의 제조 방법	미국 출원	박찬규	2018.07.03.	16/067876			
4	항균 펩타이드를 포함하는 불용성 융합단백질 및 이를 이용한 항균 펩타이드의 제조 방법	중국 출원	박찬규	2018.06.25.	201680076161 .6			
5	항균 펩타이드를 포함하는 불용성 융합단백질 및 이를 이용한 항균 펩타이드의 제조 방법	유럽 공동체 출원	박찬규	2018.08.24.	EP16888255.3			
6	별거숭이두더지쥐 유래의 그람 음성균에 대해 강한 활성을 가지는 신규 항균 펩타이드의 발굴 및 특성 규명	PCT 출원	박찬규	2018.08.21.	PCT/KR2018/ 009577			

7	이유 자돈의 대장균증을 예방하기 위한 재조합 P22 라이소자임 - PMAP36 융합 단백질을 이용한 장내독소형 대장균(ETEC) 고스트 백신 조성물	대한민국	허진, 정호경	2017.01.26.	10-2017-0012 339			
8	돼지 유전자 자연 변이체 유래의 PR-35 항균 펩타이드 및 이를 포함하는 약학 조성물	대한민국	박찬규	2019.01.15.	10-2019-0005 327			
9	개선된 고스트 장관독소형 대장균를 유효성분으로 포함하 는 돼지 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물	대한민국	허진, 문성철	2019.05.09.	10-2019-0054 525			
10	그람 음성 박테리아에 대한 강한 항균 활성을 갖는 별거숭이두더지쥐 유래의 항균성 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 약학 조성물	대한민국				박찬규	2019.0 5.23.	10-19836 68

11	이유 자돈의 대장균증을 예방하기 위한 재조합 P22 라이소자임 - PMAP36 융합 단백질을 이용한 장내독소형 대장균(ETEC) 고스트 백신 조성물	대한민국				허진, 문성철	2019.7.9	1020001200000
12	회색 짧은 꼬리 주머니쥐 유래의 광범위하고 강한 항균 활성을 갖는 항균성 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 항균 조성물	대한민국	박찬규	2019.09.03.	10-2019-0120608			
13	회색 짧은 꼬리 주머니쥐 유래의 그람 양성균에 대한 강한 항균 활성 및 항바이러스 활성을 갖는 항미생물 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 항미생물 조성물	대한민국	박찬규	2019.09.30.	10-2019-0120609			
14	돼지 흉막폐렴균 사균체를 포함한 돼지 흉막폐렴 백신 조성물	대한민국	허진, 문성철	2019.11.20.	10-2019-0149635			

제5절. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	석사졸업	2017		1				1					1	
2	석사졸업	2018		2			1	1	2					
3	석사졸업	2019		1			1		1					

제6절. 산업기술 인력양성

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1	“녹색형광단백질을 기반으로 한 항균 펩타이드 PMAP36의 고효율 생산 기술”에 관한 기술이전	1차년도에 시행된 기술이전의 일환으로 제2협동에서 파견된 인력에 대해 발효조를 이용한 효율적인 발현 시스템, 실질적 대량 생산 정제기술 및 이와 관련된 단백질 정량 기법, QC (quality control) 기술에 대한 실무 교육	건국대 (제1세부)	35	280	1
2	“녹색형광단백질을 기반으로 한 항균 펩타이드 PMAP36의 고효율 생산 기술”에 관한 기술이전	1차년도에 시행된 기술이전의 일환으로 제2협동에서 파견된 인력에 대해 발효조를 이용한 효율적인 발현 시스템, 실질적 대량 생산 정제기술 및 이와 관련된 단백질 정량 기법, QC (quality control) 기술에 대한 실무 교육 2차	건국대 (제1세부)	1	13	1

3	PAMP 36 단백질의 주사 제형 혼합 활성 확인	Colorimetry 방법을 이용한 유방염 치료 연고 PAMP 36 (혼합 주사 제형)의 활성을 검증하는 방법 교육	건국대 (제1세부)	1	13	1
---	-----------------------------	--	------------	---	----	---

제7절. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	노하우 (Know-How)	“녹색형광단백질을 기반으로 한 항균 펩타이드 PMAP36의 고효율 생산 기술”에 관한 기술이전	(주)코미팜	2017.03.17.	30,000,000원 (10,000,000원)	1
2	노하우 (Know-How)	“녹색형광단백질을 기반으로 한 항균 펩타이드 PMAP36의 고효율 생산 기술”에 관한 기술이전	(주)코미팜	2018.03.17.	30,000,000원 (10,000,000원)	2
3	노하우 (Know-How)	“녹색형광단백질을 기반으로 한 항균 펩타이드 PMAP36의 고효율 생산 기술”에 관한 기술이전	(주)코미팜	2019.03.17.	30,000,000원 (10,000,000원)	3
4	노하우(Know-How)	개선된 고스트 장관독소형 대장균을 유효성분으로 포함하는 돼지 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물 외 3건 이술 이전	(주)코미팜	2019.10.18.	30,000,000원 (30,000,000원)	1

5	기술이전	Stx2eA-C-말단 단편 -Stx2eB-오량체 재조합 단백질 및 F4를 발현하는 장관독소형 대장균 및 F18을 발현하는 장관 독소형 대장균 사균체 혼합 항원을 포함하는 돼지의 병원성 대장균증의 예방 또는 치료용 백신 조성물 외 2건 (돼지 흉막폐렴균 사균체를 포함한 돼지 흉막폐렴 백신 조성물)	(주)코미팜	2019.12.23.	30,000,000원 (30,000,000원)	1
---	------	---	--------	-------------	------------------------------	---

제8절. 기타

No	성과 유형	명칭	내용	발표일시	장소	국명
1	홍보전시	한중 IP 기술 교역 로드쇼	산·학·연의 중국 기술시장 진출을 위한 현지 기업 기관과의 일대일 상담회 및 유관 프로젝트 연계 추진, 양국 유관기관 교류 확대 지원	2017.11.29.	시안	중국
2	기타	NTB 기술이전 설명회	국가연구개발 R&D 성과물 중 기술이전이 가능한 기술정보 발굴 및 활용을 목적으로 기술발표 및 산업체와의 상담	2018.08.08.	서울	대한민국
3	기타	숙주 독성 펩타이드 및 단백질 발현 시스템 분양 및 사용	숙주 독성 펩타이드 및 단백질 발현 시스템을 이용하여 타 기관에서 연구 수행 중인 숙주 독성이 강한 항균 펩타이드 멜리틴 (Melittin) 연구를 목적으로 발현 시스템을 분양하고 사용할 수 있도록 계약을 체결	2019.04.29.	서울	대한민국

4	홍보	인터넷뉴스(뉴스와이어)	건국대 박찬규 교수팀, 항생제 대체 신규 항균 펩타이드 8종 발굴	2019.12.26.	서울	대한민국
5	홍보	인터넷뉴스(스트레이트뉴스)	건국대 박찬규 교수팀, 항생제 대체 신규 항균 펩타이드 8종 발굴	2019.12.26.	서울	대한민국
6	홍보	인터넷뉴스(대학저널)	건국대 박찬규 교수팀, 항생제 대체 신규 항균 펩타이드 8종 발굴	2019.12.26.	서울	대한민국
7	홍보	인터넷뉴스(투데이건국)	박찬규 교수팀, 항생제 대체 신규 항균 펩타이드 8종 발굴	2019.12.26.	서울	대한민국
8	제품화	마스타케어	시제품 제작 및 품목허가서 제출 예정	2018.	서울	대한민국
9	제품화	프로백 에이피피 고스트(PRO-V AC APP ghost)	시제품 제작 및 품목허가서 제출 예정	2019.	서울	대한민국
10	제품화	프로백 에이피피엠 고스트(PRO-V AC APPm ghost)	시제품 제작 및 품목허가서 제출 예정	2019.	서울	대한민국

붙임. 참고문헌

1. 벙링거인켈하임 동물약품(주) 발표자료.
2. Son, S. J. et al. "Short communication : In vivo screening platform for bacteriocins using *Caenorhabditis elegans* to control mastitis-causing pathogens." *Journal of Dairy Science*(2016).
3. 돼지흉막폐렴 백신시장 지각 변동! 작성자 김영길.
4. Soundrarajan, Nagasundarapandian, et al. "Green fluorescent protein as a scaffold for high efficiency production of functional bacteriotoxic proteins in *Escherichia coli*." *Scientific reports* 6(2016).
5. Fox, Jeffrey L. "Antimicrobial peptides stage a comeback." *Nature biotechnology* 31.5(2013) : 379-382.
6. Da Costa, João Pinto, et al. "Antimicrobial peptides : an alternative for innovative medicines?." *Applied microbiology and biotechnology* 99.5(2015) : 2023-2
7. Fosgerau, Keld, and Torsten Hoffmann. "Peptide therapeutics : current status and future directions." *Drug discovery today* 20.1(2015) : 122-128.
8. List biological laboratories, 미국(<https://www.listlabs.com/>).

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.