

118097-02

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003428-01

기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제 개발

2021.03.26.

주관연구기관 / 한국생명공학연구원
협동연구기관 / 바이오텐(주)

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

기존 가축질병 (AI)
제어소재

효능증대를 통한 면역증강제 개발

2021

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제 개발”(개발기간 : 2018. 11. 15. ~ 21. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 03. 26.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 김장성
협동연구기관명 : 바이오젠 (주) (대표자) 김영철



주관연구책임자 : 박수진
협동연구책임자 : 이우송

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	118097-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2년	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제 개발			
연구책임자	박 수 진	해당단계 참여연구원 수	총: 15 명 내부: 11 명 외부: 4명	해당단계 연구개발비	정부: 391,000 천원 민간: 130,333 천원 계: 521,333 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 30명 내부: 20명 외부: 10명	총 연구개발 비	정부: 684,000 천원 민간: 228,000 천원 계: 912,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원			참여기업명 바이오텐(주)	
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			1								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

<p>요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)</p> <p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구과제의 개발 목표는 기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제를 개발하는 것임. <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존의 개발된 조류인플루엔자 제어소재와 새롭게 발굴된 면역증강소재를 혼합하여 고도화된 조류인플루엔자 제어용 소재를 개발하였음. - 고도화된 후보소재의 기원, 생산지, 지표물질등에 대한 프로파일링을 하였음. - 후보 소재의 감염 및 면역조절 인자에 대한 효능 평가 및 작용기전 연구를 통한 심화연구를 수행하였음. - 후보 소재의 시제품을 제작하고, 동물약품 허가 신청(농림축산검역본부)을 하였음. <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제품의 조속한 산업화를 통한 시장선점 및 신제품의 적극적인 홍보 및 판매로 시장점유율 제공 및 수의동물약품 산업의 활성화가 기대됨. - 국내 축산업 발전에 걸림돌이 되고 있는 이러한 바이러스성 질병을 제어할 수 있어 농가소득 증대를 통한 국가 경제에 기여가 기대됨. 	<p>보고서 면수</p> <p>101</p>
---	--------------------------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구과제의 개발 목표는 기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제를 개발하는 것에 있음.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 고도화된 조류인플루엔자 바이러스 제어용 소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 기존 개발된 소재 (커큐민-스테비올배당 복합체)와 새롭게 발굴된 면역증강 소재(G-sol)를 혼합하여 고도화된 조류인플루엔자 바이러스 제어용 소재 개발하였음. ● 원료 표준화 연구 <ul style="list-style-type: none"> • 기존 AI 제어용 소재(커큐민-스테비올배당 복합체)의 고도화에 따른 기원, 생산지, 지표물질 프로파일링하였음. ● 고도화 후보소재의 효능검증 및 작용기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> • 감염 및 면역조절 인자 타깃 <i>in vitro</i> 항바이러스 효능, 동물 감염모델을 활용한 후보소재의 치료효능 및 작용기전 심화 연구를 수행하였음 ● 기능성 난용 후보소재의 수용화를 통한 면역증강제 제품화/산업화 <ul style="list-style-type: none"> • 후보소재 규격화 및 제조공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 후보소재에 대한 기시범 설정 및 대표성분 등의 성분프로파일 - 제조공정별 수득율, 제조방법 및 대량생산체계 구축 및 확립 • 시제품의 제작 및 허가를 위한 임상시험 계획 수립 <ul style="list-style-type: none"> - 후보소재의 액상과 분말 2가지 시제품 제작 - 임상시험 계획 수립을 위한 효능 및 안정성(가속시험, 장기보관 시험 등) 시험을 통한 data 확보 • 1000수 이상의 사육시설을 활용한 후보소재의 안전성 테스트 ● 동물의약품 IND 허가 신청(농림축산검역본부) (2020.11.30.) 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • AI 제어용 후보소재의 면역증강제 개발을 통한 임상시험 진행 및 제품화에 필요한 data 활용 • AI 제어용 면역증강제 개발과 관련된 다양한 바이러스 질환 관련 천연물의약품 개발에 활용 • 차별화된 제품 개발을 통한 신흥시장 선점 및 고급 제품의 축산선진국 수출 • 제품의 조속한 산업화를 통한 시장선점 및 신제품의 적극적인 홍보 및 판매로 시장점유율 제공 • AI에 대한 이해와 생물학적 기초자료 및 천연물 의약품 개발의 기초자료로 활용 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>가축질병</p>	<p>AI</p>	<p>면역증강</p>	<p>수용화</p>	<p>산업화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Livestock</p>	<p>Avian influenza</p>	<p>Immune enhancement</p>	<p>Water solublization</p>	<p>Industrialization</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	1
1-1. 연구개발 목적	1
1-2. 연구개발의 필요성	2
1-3. 연구개발 범위	27
2. 연구수행 내용 및 결과	28
2-1. 후보소재의 세포계를 활용한 <i>in vitro</i> 항바이러스 효능검증 및 작용기전	28
2-2. 후보소재의 효능검증을 위한 감염동물모델 확립	36
2-3. 구축된 감염동물모델을 활용한 후보소재의 효능검증	38
2-4. 후보소재의 장내 마이크로바이옴 변화	49
2-5. 후보소재의 표준화	55
2-6. 후보소재의 제조공정 확립	60
2-7. 제조공정에 따른 수율 조사	63
2-8. 후보소재 생산을 위한 대량생산체계 구축	65
2-9. 후보소재를 이용한 시제품 제작	66
2-10. 면역증강제 후보소재 시제품 자체 안정성평가	72
2-11. 야외농장에서의 면역증강제 후보소재 시제품에 대한 안전성 평가	75
2-12. 면역증강제 후보소재 시제품 홍보를 위한 교육 및 전시	78
2-13. 면역증강제 후보소재의 시제품의 임상시험계획서 작성 및 신청	79
2-14. 제품의 시장진출을 위한 시제품 라벨 및 홍보자료 제작	82
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	83
3-1. 목표	83
3-2. 목표 달성 여부	84
3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)	85
4. 연구결과의 활용 계획	86
붙임. 참고문헌	88
[별첨 1] 연구개발보고서 초록	91
[별첨 2] 자체평가의견서	92
[별첨 3] 연구성과 활용계획서	98

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가. 최종목표

- 기존 가축질병 (AI) 제어(키큐민-스테비올배당 복합체) 고도화 연구를 통한 면역증강제 개발

나. 세부목표

- 고도화된 AI 제어용 후보 소재의 원료 표준화 및 효능검증, 작용기전 연구
- 기능성 난용소재 수용화를 통한 면역증강제의 제품화 및 산업화

안국생명공학연구원

- 고도화 소재의 프로파일링
- In vitro/in vivo 효능평가
- 후보소재의 작용기전 연구



바이오텐 (주)

- 고도화 소재의 기시법 확립
- 임상시험 계획 수립
- 동물약품 허가 신청

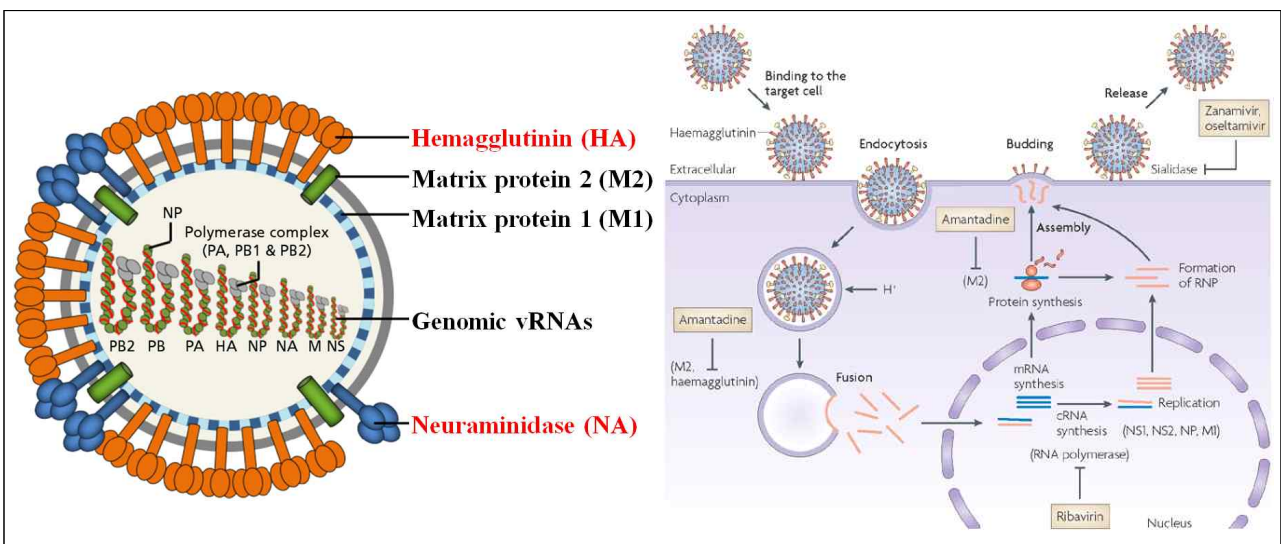


1-2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 개요

○ 인플루엔자 바이러스의 정의

- ▶ 인플루엔자바이러스는 급성 호흡기 질환을 일으키는 전염성이 매우 강한 바이러스로 온 세계에 집단감염이나 대 유행을 야기하여 소아, 고령자, 심폐질환 환자에게 심각한 호흡기 증상을 유발하는 바이러스중 하나임(Hien, T. T. *et al. N. Eng. J. Med.*, 350, 1179, 2004).
- ▶ 인플루엔자바이러스는 분류학적으로 오르토믹소바이러스(*Orthomyxovirus*)에 속하며 A, B, C의 3가지 형이 있고, 특히 유행적으로 확산되는 형은 A 및 B형이다. 이들 바이러스 표면에는 당단백질인 적혈구 응집소(Hamagglutinin, HA)와 뉴라미니데이즈(Neuraminidase, NA)라는 두 종류의 표면 항원이 존재하고 내부에는 8개의 분절되어진 RNA가 존재함.
- ▶ 헤마글루티닌 (HA)은 대부분의 항원변이와 관련되어 있으며 숙주세포의 표면에 있는 말단 시알산(Sialic acid) 잔기와 결합하여 바이러스를 부착시키고 순차적으로 바이러스가 숙주세포로 침투가 가능하게 함 (Chandrasekaran, A. *et al. Nature biotechnology* 26, 107, 2008).
- ▶ 뉴라미니데이즈 (NA)는 감염된 세포내에서 복제 및 증식된 바이러스가 세포표면의 올리고 사카라이드 부분과 말단 Neuraminic acid 잔기를 연결해주는 알파-Ketosidic bond를 절단하여 바이러스를 숙주세포 밖으로 배출하여 호흡기 점막세포로 침투하는데 중요한 역할을 함 (a. Mark, V. I. *Nature review* 6, 967, 2007. b. Huberman, K. *et al. Virology* 214, 294, 1995).



(출처: Nature Review)



[그림-1] 조류 인플루엔자바이러스의 구조 및 복제과정

- ▶ 조류 인플루엔자바이러스 (Avian influenza, AI)는 병원성에 따라 닭에 감염 시 가벼운 호흡기 증상과 1-30% 내외의 폐사와 산란 저하를 유발하는 저병원성 조류 인플루엔자(Low pathogenic avian influenza, LPAI)와 전신감염을 일으키며 95% 이상의 높은 치사율을 보이

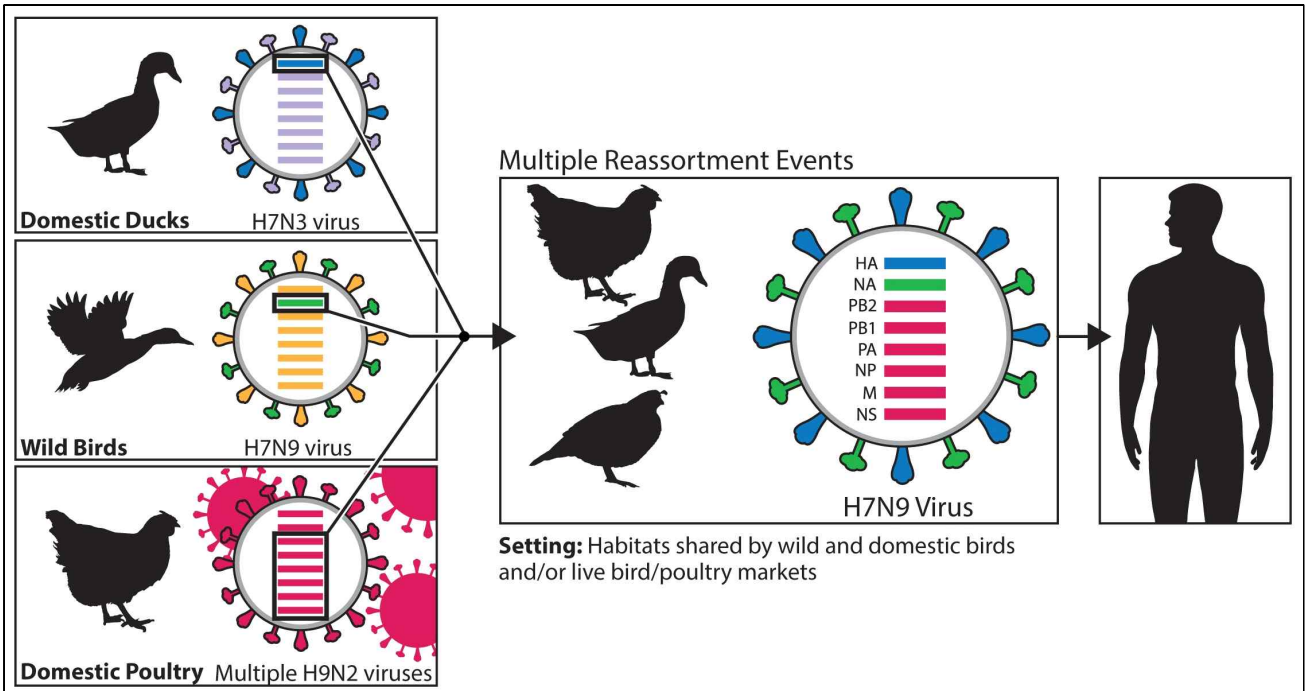
는 고병원성 조류 인플루엔자(High pathogenic avian influenza, HPAI)로 나뉘게 됨.

- ▶ 고병원성 조류 인플루엔자의 경우 H5와 H7형의 바이러스 감염에 의해서만 발생하며, 특히 주목할 점은 저병원성 조류 인플루엔자와 다르게 사람에게 전파될 수 있다는 것임.

[표-1] 저병원성 및 고병원성 조류 인플루엔자바이러스의 차이점

Properties	LPAI	HPAI
HA subtype	H1 - H16	H5 & H7
Replication	Local (Intestine and respiratory)	Systemic
Disease	Inapparent/mild	Systemic/severe
Mortality	Low 	High (75% ≤) 

- ▶ 바이러스의 표면항원들은 동일한 아형에서 변이를 일으키고, 매년 새로운 항원 변이주가 출현함. 특히 조류 인플루엔자바이러스는 대변이(Shift)가 일어나 닭, 칠면조, 오리 및 야생조류 등 여러 종류의 조류를 감염시키며 빠른 전파로 인해 닭이 감염되면 80% 이상이 폐사함으로 전 세계적으로 양계산업에 가장 큰 피해와 위협을 주고 있는 바이러스 질환임.
- ▶ 그 파급효과는 양계산업에만 한정되어 있지 않고 인체에 대한 감염으로 인하여 사람에게 질병을 일으키는 것으로 보고되고 있음 (Gubareva, L. V. et al. *Lancet*. 355, 2000).



(출처: 미국질병통제센터 CDC, 2013)

[그림-2] 조류 인플루엔자바이러스의 중간 감염과정

- ▶ 한 예로, 조류에게만 감염된다고 보고되었던 H5N1 형이 1997년 홍콩에서 인체 감염사례가

발생되었고, 중요한 점은 H5N1 형이 사람에서도 60% 이상의 치사율을 보이고 있다는 것임. 또한, 중국, 홍콩, 인도네시아의 경우 매년 닭에서 고병원성인 H5형이 지속적으로 발생하고 있어 언제 사람에게 전파될지 모르는 위급한 상황에 처해 있음.

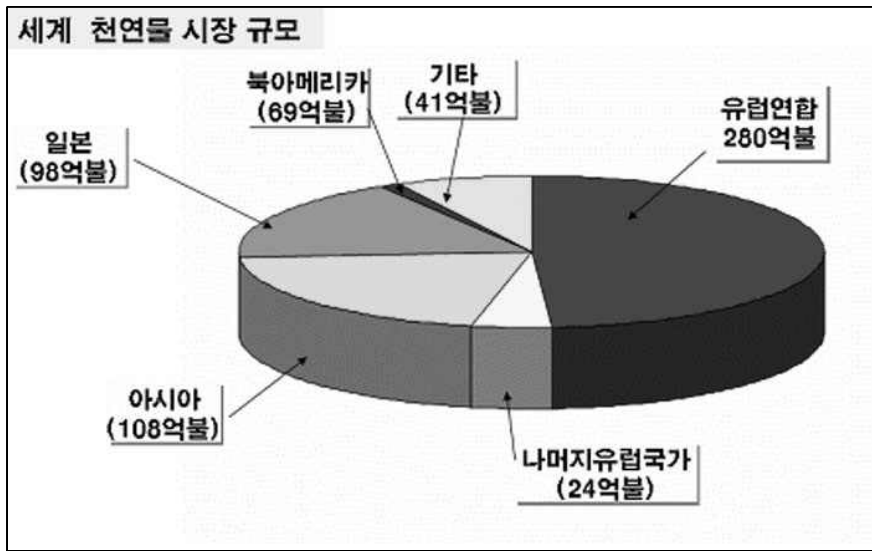
○ 조류 인플루엔자 바이러스 치료제 개발

- ▶ 인플루엔자 바이러스를 치료하기 위해서 기존의 개발되어진 치료제로는 아만타딘 (Amantadine), 리만타딘(Rimantadine), 자나미비(Zanamivir, Relenza), 오셀타미비르 (Oseltamivir, Tamiflu), 페라미비르 (Peramivir) 등 5가지 물질이 미국식품의약품 안전청 (FDA)으로부터 승인되어 사용해오고 있음.
- ▶ 그러나 M2 억제제인 아만타딘(Amantadine), 리만타딘(Rimantadine)은 인플루엔자 바이러스 A형에만 효과가 있으며 40년 동안 사용되는 동안 내성을 가진 바이러스가 발생되고 신경계 및 위장에 심각한 부작용이 나타나는 것으로 보고되어지고 있음(Bantia, S. et al. *Antiviral Research* 69, 39, 2006).
- ▶ 1999년 이후에는 바이러스의 증식에 중요한 역할을 하고 내성 발생빈도가 적으며, A형 및 B형 인플루엔자 바이러스 모두에 안정적으로 존재하는 뉴라미니데이즈 저해제로 개발되어진 릴렌자(Zanamivir, 흡입제), 타미플루 (Oseltamivir, 경구용), 페라미비르 (Peramivir, 주사제) 가 사용되어지고 있음 (Zhang, J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3009, 2006).
- ▶ 그러나 Relenza의 경우에는 높은 항바이러스 효과를 가지고 있지만 낮은 생체이용율과 빠른 신장에서의 배출의 단점(Ryan, D. M. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 2583, 1995)을 가지고 있으며, Tamiflu는 심각한 구토증세가 나타나는 부작용이 보고되어 있고 있음.
- ▶ 최근 주사제로 사용하는 페라미비어 (Permaivir)의 경우 리렌자와 타이플루보다 효과가 좋고 부작용이 낮은 경향을 보이지만 아직 그 자체에 대한 임상 사례 자료가 부족한 실정임.
- ▶ 현재 항바이러스제로 가장 많이 사용되는 타미플루의 제한적 효능성(감염 최소 48시간 이내 사용해야 효과), 내성주 발생 우려, 부작용 우려(일본과 한국 청소년에게 사용 금지) 등으로 인하여 실질적으로 사용할 수 있는 대체 항바이러스제제의 개발이 매우 시급함.
- ▶ 하지만, 이러한 치료제 개발은 사람에는 적용이 가능하나 가축에 발생하는 인플루엔자 특히 조류 인플루엔자에는 적용이 어려움이 있음.
- ▶ 따라서, 축산업에 이용할 수 있는 조류 인플루엔자 제어를 위한 항바이러스 활성을 갖는 면역증강제 및 신규 치료제의 개발이 적극 요구되고 있음.

○ 천연물 소재를 활용한 면역증강제 개발

- ▶ 신·변종 인수공통 감염질환의 다양한 원인체로 전 세계적으로 전염이 확산되고 있고, 기존의 약제에 내성을 나타내는 병원체가 증가하고 있는 실정임
- ▶ 일반적으로 바이러스 질환의 대응법으로 백신이 효과적이지만, 일반인의 사용의 용이성 및 안전성을 고려하여 면역시스템을 강화를 통한 저항력을 증대시키는 면역증강 소재의 개발이 요구됨.
- ▶ 특히, 약물의 상호작용과 부작용을 줄일수 있는 기능성 소재 개발이 시급함.

- ▶ 2009년 전 세계적으로 신중플루가 급속도로 번지면서 면역력을 높이는 데 도움을 주는 홍삼, 산삼 배양근, 초유 등이 불티나게 팔리면서 건강기능식품시장이 전년대비 4% 성장 한 2조 7000억 원을 형성한 것으로 잠정 집계되었음.



- ▶ 글로벌 천연물 의약품 시장은 연 평균 10%의 가파른 성장세를 보이고 있음.
 - 현황을 보면 천연물 시장은 2013년 24조원, 천연물 ETC 시장은 18조원으로 집계되었고, WHO는 세계 천연물 의약품 시장을 2011년 187조원에서 2023년 423조원에 달할 것으로 전망 됨.
- ▶ 세계시장에 경쟁력을 갖는 새로운 기능성 소재 개발이 요구됨.
 - 미국의 질환별 천연물 의약품 연구현황 : 현재 임상시험 중인 천연물 의약품은 대부분은 oncology에 집중되고 있으며, 중국전통약물 (Traditional Chinese Medicine)을 활용한 복합처방이 단일약제에 비해 많음 (Workshop on Botanicals as “New”Drugs (ASP-FDA), 2007).
 - 중국의 천연물 의약품 시장은 매년 20%이상의 높은 성장세를 보이고 있으며, 1990년에 22조원정도 에서, 2002년에 무려 20조원 정도로 약 10배 정도 성장하고 있으며, 지속적으로 폭발적인 성장을 진행하고 있음.
 - 천연물신약연구개발 촉진법의 시행 및 스티렌, 조인스 등 국내 개발 천연물 의약품의 성공에 힘입어 많은 국내 제약기업 및 연구자들이 활발하게 천연물신약 개발 연구 진행 중임.
- ▶ 기능성을 갖는 원료(소재)에 대한 수요 증가 및 관련 산업이 활성화 됨.
 - 미국과 일본을 중심으로 기능성 소재 시장을 선점하려는 목적으로 지난 10년간 막대한 국가예산 투입 및 활발한 연구개발이 진행되었으며, 선진국의 기능성 식품시장 드라이브 정책에 힘입어 건강식품 시장도 놀라운 성장을 지속하고 있음.
 - 기능성 소재의 경우 선진기술을 바탕으로 국내 자생원료를 이용한 개발이 가능하므로, 국제 시장에서 경쟁력이 있는 제품을 생산하여 기능성 산업을 국가적 차원에서 고부가가치 산업으로 발전시킬 수 있음.

- ▶ 이러한 세계적인 흐름에 따라 국내에서도 글로벌 수준의 천연물 제품을 10개 개발하여 22년까지 글로벌 시장 점유율을 2배 확대 [2.2% (15조, '17) → 4% (39조, '22)] 하는 것을 목표로 정책적으로 정부투자가 이루어지고 있음.

나. 연구개발 대상의 국내·외 현황

1). 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- ▶ 주관기관인 한국생명공학연구원에서는 2008년부터 지속적으로 초고속검색시스템(HTS)을 활용한 Hemagglutinin과 Neuraminidase 억제제를 개발하고, 세포계 및 동물모델을 이용하여 항바이러스 효능을 검증하여 조류 인플루엔자바이러스 예방 및 치료용 면역증강 생물소재를 발굴하여 사업화 한 성공적인 연구를 수행하였음. 또한 백신용 면역보강제 및 진단기술등을 개발하고 있음.

- ▶ 한국생명공학연구원의 조류인플루엔자 감염 및 염증인자 타깃 면역증강제 개발 핵심기술

핵심기술	본 연구팀의 핵심기술 내용
활성지표물질의 탐색 및 분리, 정제, 구조결정 및 합성 기술	<ul style="list-style-type: none"> • 초고속검색시스템(HTS)의 장비보유 및 스크리닝시스템 구축 → 샘플10,000개/6 h 스크리닝 가능 • 생리활성소재 탐색, 분리정제, 구조결정 및 합성기술 → 400종 이상의 천연물Chemical library 보유 • Neuraminidase를 비롯한 효소 및 세포접착인자저해 활성 평가 기술 → 바이오소재(식물, 미생물 등 1000종), 순수유효물질(200종) 보유
활성물질의 세포계 및 동물모델에서의 효능평가 기술	<ul style="list-style-type: none"> • 생리활성소재의 MDCK 세포를 이용한 세포계에서 바이러스 억제 효능평가 기술 • 감염 후 일어나는 염증인자 조절 및 인터페론 증가 효능평가 • 동물모델을 이용한 생리활성 소재의 바이러스 억제 효능평가 • 병리조직학적 기법, 면역화학염색 기법 등 생리활성 소재의 동물 투여 후 효능 평가기술 확립
상품화 및 사업화	<ul style="list-style-type: none"> • 난용성 약물의 가용화 기술 ⇒ 미세자가유화에멀전 시스템, 고체 분산제 제조시스템, 서방출성 약물 전달 시스템

- ▶ 국내 인플루엔자 예방을 위한 백신 생산 및 기술은 (주)녹십자와 (주) 바이오리더스의 공동 연구를 통해 2008년도 식약청에 Mock-up 백신에 대한 효능 및 안전성 연구를 수행하였고, 최근 2016년 바이오리더스와 충남대 및 충북대 공동 연구팀이 백신 아쥬반트 사업을 진행함으로써 순수 국내 기술력을 이용한 조류 인플루엔자 백신 개발 연구를 수행하고 있음.
- ▶ 국내기업에서는 새로운 조류 인플루엔자바이러스 치료제를 개발하기보다는 개발되어진 타미플루의 생산단가를 줄이기 위한 공정개발 연구에 집중되어 감염을 직접 저해하는 치료제

인 타미플루 대체물질의 개발이나 면역증강을 통한 바이러스 감염제어를 위한 면역 치료제 개발이 시급한 사항 임.

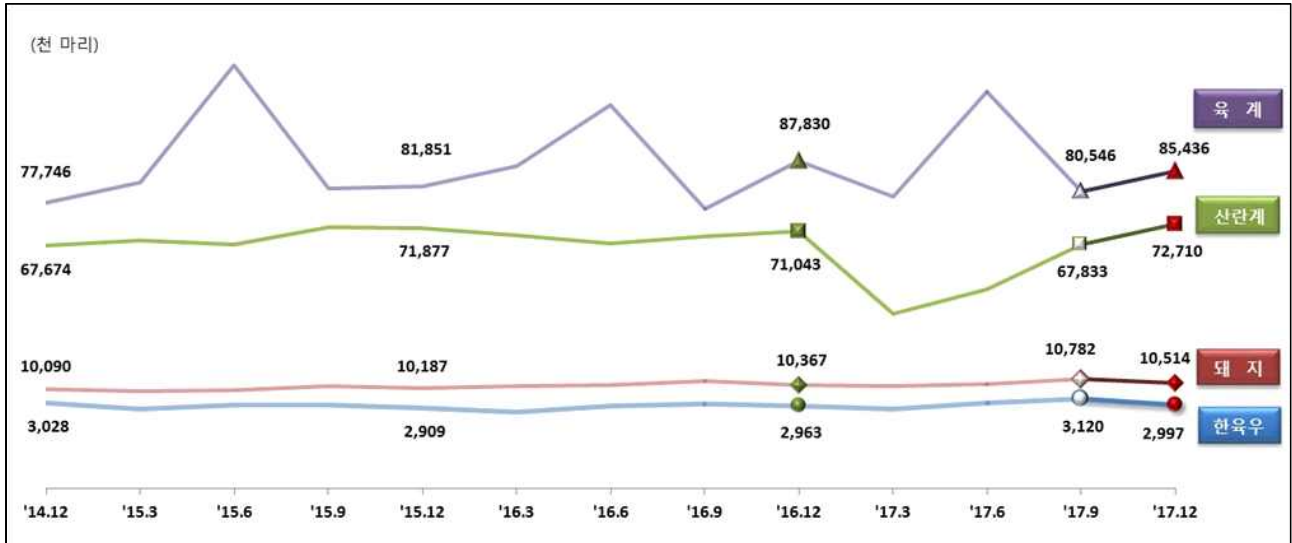
- ▶ 하지만, 국내 실정은 현재 Tamiflu 대체 물질에 대한 연구는 미비하나 전구체 및 독창적인 제조방법을 이용한 Tamiflu 합성기술에만 매진하고 있음.
- ▶ 한의학연구원과 한국화학연구원에서는 다양한 국내 한약재의 열수추출물 및 다양한 합성 화합물을 활용하여 조류 인플루엔자 뿐 만아니라 에이즈, 허피스 바이러스 등 다양한 바이러스에 대한 치료제 개발이 활발히 진행 되고 있음. 하지만 바이러스 감염 뿐 만아니라 감염과 관련된 면역 조절에 대한 면역 증강제 개발을 동시에 진행하지 않음으로써 성공적인 바이러스 치료제 개발 사례가 없음.
- ▶ 국내에서 천연물을 활용한 신약개발은 대부분 항암보조제, 당뇨와 비만등 대사질환, 천식 등 흡기 치료제등으로 집중 되어있어, 바이러스 치료제 및 면역조절을 통한 바이러스 제어를 위한 연구개발은 거의 없음.

[표-2] 천연물 신약 국내 연구개발 현황

회사명	개발 현황
동아ST	<ul style="list-style-type: none"> • 당뇨성신경병증치료제 DA9801 : 미국임상 2상 완료 • 기능성 소화불량 치료제 모티리톤 : 미국임상 2상 진행
녹십자HS	<ul style="list-style-type: none"> • 항암보조 천연물 신약 BST204 : 독임 임상 1상 완료
한미약품	<ul style="list-style-type: none"> • 복부비만치료제 ALS-L1023 : 국내 3상 진행
SK케미칼	<ul style="list-style-type: none"> • 천식치료제 3상 진행 • 과민성대장증후군 2상 진행 • 골관절염 2상 진행
영진약품	<ul style="list-style-type: none"> • COPD 치료제 YPL-100 : 미국 임상 2a상 진행

○ 시장현황

- ▶ 개방화 시대와 국민 경제 수준의 향상에 따른 소득증대는 축산농가의 소득증대에 대한 필요성을 크게 부각시키고 있음. 이러한 시대적 요청에 부응하기 위해서는 무엇보다 가축 질병을 근절시킴으로써 생산능력 향상 및 국민에게 안전한 축산물을 제공해야함.
- ▶ 특히 조류인플루엔자와 같이 인수공통질병은 비단 축산업에 영향을 줄 뿐 만아니라, 사람들에게 전염될 수 있으므로 국민의 보건과 건강에도 중요한 영향을 줌.
- ▶ 국내에서도 연간 축산 총생산액(19조 5,130억원, 2018년) 가운데 질병으로 인해 최소한 약 20%인 3조 9,026억원의 경제적 손실을 낳고 있음 (한국농촌경제연구원,2018).



(출처 : 축산물품질평가원)

[그림-3] 한우, 육우, 돼지, 닭 사육 마릿수 동향

- ▶ 국내 조류인플루엔자가 만연할 경우 직·간접적으로 8조원의 손실 발생 예상 함(LG 경제연구원).
 - '08년 조류인플루엔자로 6,800억원 피해, 가금 627만수 살처분.
 - 신종인플루엔자 대유행은 국내 연간 GDP를 0.4~9.1%까지 감소 예상.
- ▶ 이러한 신·변종 판데믹을 대비하여 국내에서도 우수 기업의 인플루엔자 치료제 확보를 위한 연구개발 투자가 활발함.
 - 신풍제약의 '신풍플루캡슐', 녹십자의 '페라미플루', 동아제약의 'DA-7218'(항생제), 대웅제약의 '메로페넴주'(항생제) 등 다양한 치료제 개발함.
- ▶ 국내 항바이러스제 연구개발은 B형 간염, C형 간염, 항인플루엔자 치료제, 에이즈 치료제 등에 집중되고 있으나, 치료제 개발을 위해 필수적인 항바이러스 물질 및 면역증강물질, 치료제 후보물질 발굴 분야의 연구가 상대적으로 미흡함.
 - 바이러스 복제와 관련된 인터페론과 사이토카인(면역조절 인자)을 타겟으로 항바이러스 활성 소재 및 면역 증강제 대한 연구가 필요함.
- ▶ 따라서, 조류 인플루엔자와 같은 가축 질병 제어를 위한 면역증강제 개발은 축산업의 발전과 국민에게 안전한 먹거리를 제공 및 건강을 지키는 매우 중요한 사업이라 할 수 있음.

○ 경쟁기관현황

구분	기관명	개발 내용
주관기관	생명(연)	<ul style="list-style-type: none"> 초고속검색시스템(HTS)을 활용한 Neuraminidase 억제제 개발, 세포계 및 동물모델을 이용한 감염 및 염증인자 제어 면역증강 생물소재 개발, 백신용 면역보강제 개발, 진단기술 개발
대학	연세대	<ul style="list-style-type: none"> 고병원성 AI Attenuated 생백신 개발
	경상대, 건국대, 충북대, 충남대, 서울대	<ul style="list-style-type: none"> 효소 타겟 생물소재 개발, 바이러스를 이용한 동물실험모델 및 백신 후보주 개발, 대유행 대비 후보주 Stockpile
기업	바이오리더스	<ul style="list-style-type: none"> 조류 인플루엔자 바이러스 백신 개발
	녹십자	<ul style="list-style-type: none"> 주사형 인플루엔자 치료제 페라미플루 (peramivir) 출시 (2010년) 후 2017년에 76억원 (정부비축분 포함)의 매출 달성 인플루엔자 백신 생산 기술
	코오롱생명과학	<ul style="list-style-type: none"> 감염억제제 및 치료제 의약생산
	종근당	<ul style="list-style-type: none"> Tamiflu 전구체인 Shikimic acid가 아닌 기존 당뇨병치료제를 발효해 생산되는 부산물로 새로운 합성방법으로 Tamiflu 제조
	신풍제약	<ul style="list-style-type: none"> 인플루엔자 치료제인 타미플루의 제네릭 상품인 신풍플루 캡슐 (Oseltamivir인산염)을 출시함 (2017년). 리바비린 생산
	에스텍파마	<ul style="list-style-type: none"> 인산 Oseltamivir 시제품 제조에 성공, 시제품과 제조공정 및 품질검사를 위한 관련 자료를 식약청에 제출
	유한양행	<ul style="list-style-type: none"> GSK의 4가 인플루엔자 백신 ‘플루아릭스 테트라’ 공동 판매 협약
국책 연구기관	국립수의과학 검역원	<ul style="list-style-type: none"> 2003년 발생한 조류 인플루엔자바이러스의 재발 방지를 위해 지속적인 혈청학적 조사가 진행 중임, AI 모니터링, 가금류를 활용한 H5N1 고병원성 바이러스효능 검정
	질병관리본부	<ul style="list-style-type: none"> AI 진단 기술을 개발

○ 지식재산권현황

▶ 생명자원종을 사용한 조류인플루엔자 관련 특허

연번	특허발행번호	발명의 명칭	출원인	출원일
1	KR1020070035203A	식물 추출물로 이루어진 예비안 인플루엔자바이러스에 대한 항바이러스제 및 이를 함유하는 위생용품	주식회사엘 지생활건강	20050927
2	KR100736159B1	상사화 추출물을 함유하는 항바이러스조성물	주식회사알 엔엘바이오	20060629
3	KR100721703B1	오리나무 추출물을 함유하는 항바이러스조성물	주식회사알 엔엘바이오	20060629
4	KR100757712B1	좁사방오리나무 추출물을 함유하는 항바이러스 조성물	주식회사알 엔엘바이오	20060629
5	KR100762149B1	신나무 추출물을 함유하는 항바이러스조성물	주식회사알 엔엘바이오	20060629
6	KR100808910B1	항균 및 항바이러스 효과를 가진 신규한유산균 및 이를포함하는 조성물	주식회사씨 티씨바이오	20061019
7	KR100743862B1	솔잎 추출물을 함유하는 바이러스로 인한동물 질환의치료 및 예방용 조성물	문치웅,송 창선	20061019
8	KR100743861B1	엘더베리추출물의용도	헬스케어 브랜인터내셔 날리미터드	20070117
9	KR100796303B1	조류독감 예방기능이 구비된 발아대두동충하초의 제조방법	박동기	20070626
10	KR101426888B1	항-조류독감 바이러스 조성물	주식회사한 국인삼공사 주식회사 케이티앤 지	20071012
11	KR101035463B1	흑삼 가공 뿌리 추출물을 유효성분으로함유하는 고병원성 조류 인플루엔자바이러스의 예방 및 치료용 조성물	충남대학교 산학협력단	20071231
12	KR1020100038258A	흑인삼엽 가공 건조분말 또는 그 추출물을유효성분으로함유하는 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 예방 및치료용 조성물	충남대학교 산학협력단	20081004
13	KR1020100052656A	고병원성 조류인플루엔자 A/H5N1항바이러스 활성물질 및 이를 유효성분 으로서하는 가금용 사료 첨가제	건국대학교 산학협력단	20081111
14	KR101210972B1	한국산 겨우살이를 이용한 조류독감 억제용 사료첨가제	우진 비엔지 주식회사 환경대학교 산학협력단	20081203
15	KR100941595B1	바이러스 억제제로서 유용한 트리테르페노이드계 화합물	주식회사알 엔엘바이오	20090602

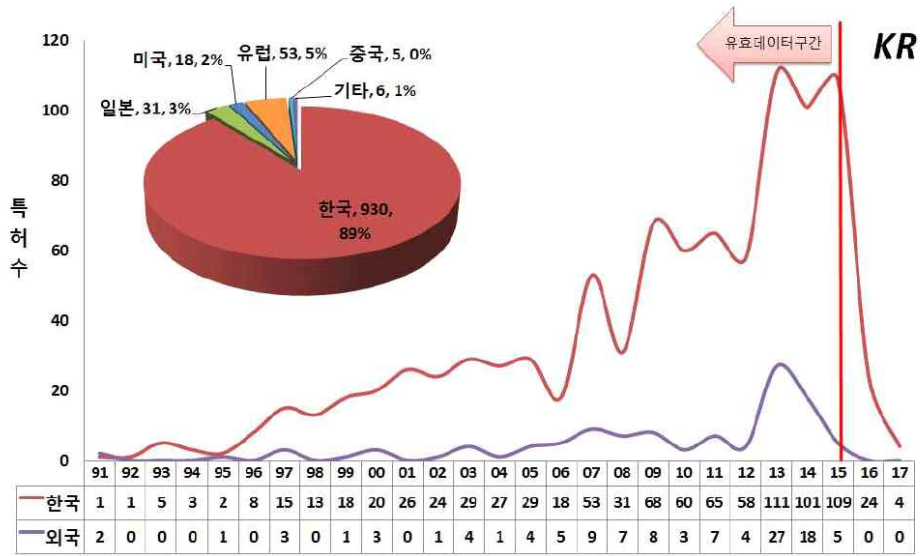
16	KR101195120B1	선복화 추출물을 함유하는 고병원성조류인플루엔자 H 5 N 1 감염 예방 및치료용 조성물	건국대학교 산학협력단	20090720
17	KR1020110065534	항-조류 인플루엔자 바이러스제, 및항-조류 인플루엔자 바이러스제를함유하는 제품	가부시키가 이샤포카코 포레이션	20091008
18	KR1020110041936A	붉나무 유래 화합물을 포함하는 인플루엔자바이러스 감염의 예방용 조성물, 상기조성물을 포함하는 기상필터 및 상기 필터 를포함하는 공기청정기	웅진코웨이 주식회사	20091016
19	KR100962334B1	울금으로부터 얻은 조류, 돼지 인플루엔자및 신종플루에 대한 항바이러스제	주식회사중앙 백신연구소 조선대학교산 학협력단	20091019
20	KR100950445B1	감초로부터 얻은 조류, 돼지 인플루엔자 및신종플루에 대한 항바이러스제	주식회사중앙 백신연구소 조선대학교산 학협력단	20091026
21	KR101176305B1	붉나무 추출물을 포함하는 인플루엔자바이러스 감염의 예방용 조성물, 상기조성물을 포함하는 기상필터 및 상기 필터 를포함하는 공기청정기	웅진코웨이주 식회사	20100326
22	KR1020110110381 A	흑인삼꽃봉오리 가공 건조분말 또는 그추출물을 유효성분으로 함유하는 고병원 성조류 인플루엔자 바이러스의 예방 및 치료용 조성물	충남대학교산 학협력단	20100401
23	KR1020120026851 A	리나리아속 식물 추출물을 함유하는항인플루엔자 바이러스 조성물	비알엔사이언 스주식회사	20100910
24	KR101189822 B1	쿠마린계 화합물을 포함하는 뉴라미니데이즈 활성의 억제용 조성 물 및인플루엔자 바이러스 감염 질환의 예방 및 치료용 조성물	한국생명공학 연구원	20100430
25	KR101425048 B1	백서향 추출물 또는 이의 분획물을유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물	한국생명공학 연구원	20101103
26	KR101000351 B1	고삼 추출물, 고삼 분획물, 이로부터 분리한테로카판계 및 플라보노이드계 화합물 또는이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자바이러스 감염 질환의 예방 및 치료 용약학적 조성물	한국생명공학 연구원	20101119
27	KR101317318 B1	신종인플루엔자, 조류인플루엔자, 일반 및독감감기, S A R S 바이러스 억제 효능을갖는 오배자 추출물 또는 이로부터 분리된화합물을 유효성분으로 함유하는 약학조성물	원광대학교산 학협력단	20110419

28	KR101338319 B1	녹차 부산물의 추출물을 함유하는인플루엔자 바이러스로 인한 동물질환의치료 및 예방용 조성물	건국대학교산학협력단	20110530
29	KR101322851 B1	한약재 추출물을 포함하는 뉴캐슬병바이러스 또는 조류독감 바이러스의 증 식억제용 조성물	강병곤 김채현 선바이오 (주) 강민기	20111012
30	KR101369100 B1	아이비엽 및 황련으로 구성된 복합생약추출물을 유효성분으로 함유하는인플루엔자 바이러스 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물	강원대학교산학협력단	20120109
31	KR101387353 B1	아이비엽 추출물 및 이로부터 분리된화합물을 유효성분으로 함유하는인플루엔자 바이러스 관련 질환의 예방 및치료용 조성물	강원대학교산학협력단	20120109
32	KR1020120116890 A	바이러스 감염 억제 활성을 갖는 신규분리한 락토바실러스 퍼멘텀 균주	씨제이제일제당 (주)	20120413
33	KR101334143 B1	폴리갈라 카렌시움 추출물 및 이로부터분리된 잔돈계 화합물을 함유하는 감기,조류 인플루엔자, 돼지 인플루엔자 또는신종플루의 예방 또는 치료용 조성물	주식회사중앙백신연구소 조선대학교 산학협력 단	20120612
34	KR1020140042011 A	복분자를 유효성분으로 포함하는오소믹소바이러스에 대한 항바이러스 조성물	고려대학교산학협력단	20120926
35	KR101310033 B1	여우오줌풀 추출물을 유효성분으로포함하는 항인플루엔자용 조성물	충남대학교산학협력단	20130205
36	KR1020140104652 A	딱지꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는항인플루엔자용 조성물	충남대학교산학협력단	20130221
37	KR1020140106198 A	굴나무속 열매 발효물을 유효성분으로포함하는 항바이러스용 조성물	(주)휴림 한국생명공학연구원	20130226
38	KR101443510B1	치커리 추출물을 유효성분으로 함유하는인플루엔자 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 제조방법	연세대학교원주산학협력단	20130325
39	KR1020140123330 A	개머루덩굴 추출물 또는 이의 분획물을유효성분으로 포함하는 바이러스성 질환 및암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	한국생명공학연구원	20130412
40	KR101435331 B1	조류독감 및 구제역 억제활성을 갖는사료첨가제 및 이를 포함하는 사료조성 물	김관운 원용옥	20130509
41	KR1020140132975 A	고련피 추출물을 포함하는 선천면역 증강 및항바이러스 조성물	(주)비타바이오	20130509
42	KR1020140132980 A	황련 추출물을 포함하는 선천면역 증강 및항바이러스 조성물	(주)비타바이오	20130509
43	KR1020140148093 A	고본 추출물을 포함하는 선천면역 증강 및항바이러스 조성물	(주)비타바이오	20130621

44	KR1020140148087 A	황백 추출물을 포함하는 선천면역 증강 및항바이러스 조성물	(주)비타바이 오	20130621
45	KR1020140148096 A	승마 추출물을 포함하는 선천면역 증강 및항바이러스 조성물	(주)비타바이 오	20130621
46	KR1020150027469 A	NK세포 활성화 작용의 항바이러스 조성물	일동제약주식 회사	20130904
47	KR101520428 B1	대극 추출물을 유효성분으로 포함하는항인플루엔자용 조성물	충남대학교산 학협력단 대한민국(농 촌진흥청장)	20131122
48	KR101534616 B1	낙지다리 추출물을 유효성분으로 포함하는항인플루엔자용 조성물	충남대학교산 학협력단 대한민국(농 촌진흥청장)	20131122
49	KR1020150099203 A	차가버섯 자실체로부터 분리된폴리페놀성분을 포함하는 인플루엔 자바이러스 감염 예방 및 치료용 조성물	전북대학교산 학협력단	20140221
50	KR1020150099202 A	장수진흙버섯 자실체로부터 분리된폴리페놀성분을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 치료용 조성물	전북대학교산 학협력단	20140221
51	KR1020140097052 A	오디를 유효성분으로 포함하는오소믹소바이러스에 대한 항바이러 스조성물	고려대학교산 학협력단	20140613
52	KR101647323 B1	천연물을 함유하는 조류인플루엔자바이러스살바이러스 조성물	경상대학교산 학협력단	20140905
53	KR1020160037462 A	차전자 추출물을 함유하는 면역증강용조성물 또는 바이러스 질환의 예방 또는 치료용 조성물	(주)비타바이 오	20140929
54	KR101643972 B1	조류독감 면역력 증진을 위한 사료 첨가제및 이의 제조방법	구덕자	20141218
55	KR101782532 B1	백지 추출물 또는 이로부터 분리된퓨라노쿠마린을 함유하는 조류 인플루엔 자,돼지 인플루엔자 또는 코로나 바이러스의예방 또는 치료용 조성물	서울대학교산 학협력단 주식회사중앙 백신연구소	20150619
56	KR1020170039456 A	오동나무로부터 추출한 C-제라닐플라보노이드계 물질을 포함하는인플루엔자 예방 및 치료용 약학 조성물	동아대학교산 학협력단	20151001
57	KR101716739 B1	차전자 추출물을 함유하는 면역증강용조성물 또는 바이러스 질환의 예방 또는 치료용 조성물	(주)비타바이 오	20160401
58	KR1020170120439 A	땅콩버섯 추출물 또는 이로부터 분리된화합물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물	전북대학교산 학협력단	20160421

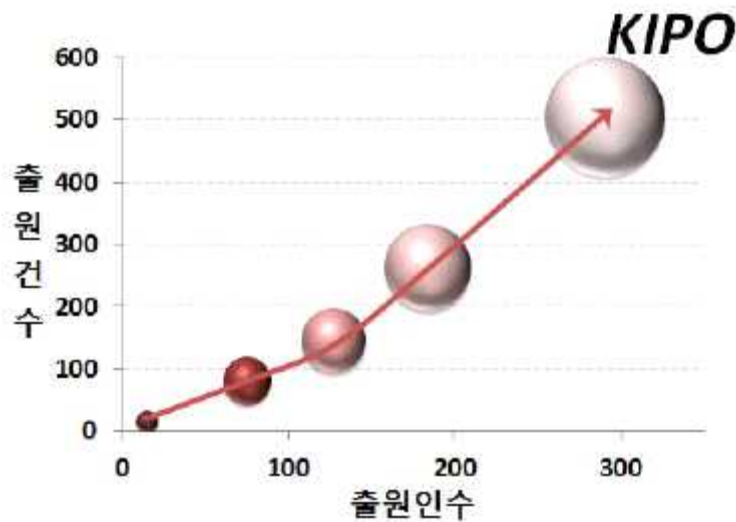
59	KR101656791 B1	항바이러스 활성을 가지는 사료 첨가제조성물	이우철 손화섭 허담	20160519
60	KR101737589 B1	차가버섯 자실체로부터 분리된폴리페놀성분을 포함하는 인플루엔 자바이러스 감염 예방 및 치료용 조성물	전북대학교산 학협력단	20161010

- 한국특허에서 고병원성 조류독감(AI)에 관련된 특허에서 언급되는 핵심 생물자원종을 추출하여 흐름도를 작성함.
- 주요출원인은 주식회사 알앤엘바이오, (주)비타바이오, 한국생명공학연구원, 충남대학교 산학협력단, 건국대학교 산학협력단, 전북대학교 산학협력단, 주식회사 중앙백신연구소, 조선대학교산학협력단(공동출원), 강원대학교 산학협력단, 고려대학교 산학협력단인 것으로 나타남.
- 2010년 이전에는 주식회사 알앤엘바이오가 가장많은 특허를 출원하였으며, 2010년 이후에는 (주)비타바이오가 가장 많은 특허를 출원하였음.
- (주)비타바이오의 주요 생물자우너종은 차전자, 고려피, 황련, 고본, 황백, 승마이만, 실제 제품에 상기 생명자원종을 사용하는 사료첨가제를 판매하고 있지 않음.
- 위와 같은 특허를 바탕으로 사료첨가제에 대하여 특허 동향을 분석하였음.
- 농식품부에서는 2012년 이후 항생제 내성균과 관련된 슈퍼박테리아의 출현과 축산물의 항생제 잔류에 대한 우려의 목소리가 높아지면서 배합사료 첨가용 항생제 감축, 축산업 허가제를 추진함.
- 25종에서 18종으로 감축 : 테트라사이클린계열 2종 및 인수공용 항생제 5종 등 7종감축 (2007.12.13.)하여 2009년 1월 1일부터 시행.
- 18종에서 9종으로 감축 : 항콕시딕제 8종 및 구충제 1종 등을 제외한 엔라마이신 등 항생제 9종의 전면 사용을 금지(2011.05.31.)하여 2011년 7월 1일부터 시행.
- 이러한 항생제의 사료첨가금지 이후 항생제를 대체하기 위한 천연항생제 대체 물질 개발과 이전에 개발된 천연항생제의 사료첨가제로의 활용 여부에 대한 연구도 증가하고 있으며, 이러한 항균제 대체 물질로 관심을 받고 있는 품목은 허브, 생균제, 유기산, 효소 등이 있음.



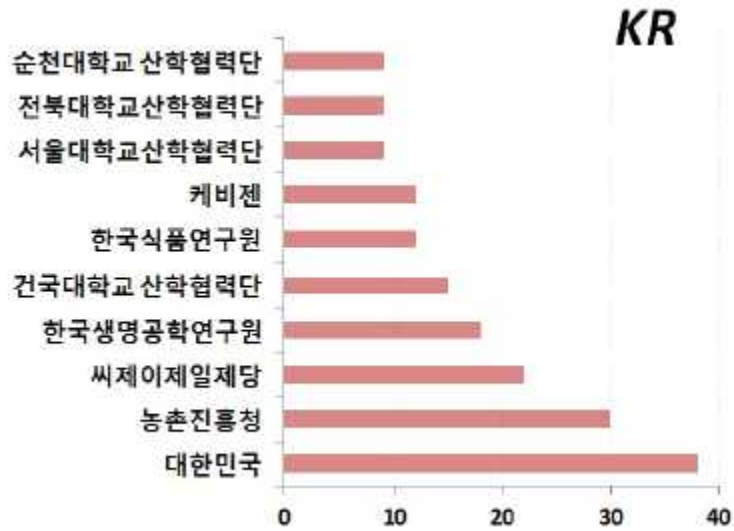
[그림-4] 내외국인 연도별 특허 출원 동향

- 현재 한국인의 출원비율이 약 89% (930건)로 한국인의 출원비율이 절대적으로 높은 것으로 나타났으며, 외국인의 출원 비중이 낮은 이유는 국내 시장성이 낮거나, 세계 시장에서의 경쟁사가 없는 관계로 국내에 외국인 출원이 적은 것으로 판단됨.
- 연도별 추이를 살펴보면, 한국인의 출원은 1995년 이후 꾸준히 성장하고 있으며, 2013년에서 2015년 구간에 특허가 집중적으로 많이 출원되었으며, 상기 구간에서 321건이 출원되어 최근에 특허 출원이 집중되고 있으며, 외국인의 출원 건수는 2013년을 정점으로 감소하고 있는 추세로 나타남.
- 외국인의 특허 출원(11%)로 가장 많은 특허를 출원한 외국인 출원인은 유럽계(약 5%, 53건), 일본(약 3%, 31건) 순으로 나타남.



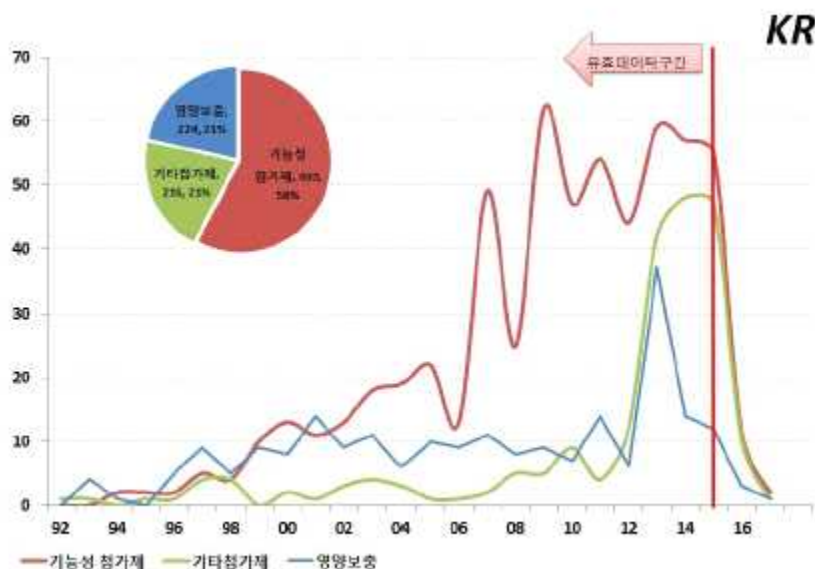
[그림-5] 한국의 기술위치

- 특허건수와 출원인수 변화의 상관관계를 통해 기술의 위치를 살펴보는 포트폴리오 기본 모델에서 한국은 출원건수와 출원인수가 모두 증가하는 발전기 단계에 있는 것으로 판단되며, 최근구간에서 급격히 증가하는 것으로 나타남.



[그림-6] 다출원인 TOP10

- 한국 특허에서는 대한민국, 농촌진흥청, 씨제이제일제당, 한국생명공학연구원, 건국대학교 산학협력단, 한국식품연구원 케비젠, 서울대학교 산학협력단, 전북대학교 산학협력단, 순천대학교 산학협력단 순으로 많이 출원하였으며, 주요 출원인으로 기업보다는 국가기관 또는 학교법인이 많은 것으로 나타났음.



[그림-7] 기술 분야별 출원 동향

- 한국에서는 기능성 첨가제(603건, 약 58%), 영양보충 (224건, 약 21%), 기능성 첨가제

(216건, 약 21%) 순으로 많이 출원된 것으로 나타남.

- 기능성 첨가제 분야는 출원량의 증감이 존재하지만, 1991년 이후 2015년 까지 증가하는 추세로 나타났으며, 기타첨가제는 2011년 이후 출원이 급격하게 증가하고 있으며, 영양 보충분야는 2013년까지 증가하지만, 2013년을 정점으로 출원이 감소하고 있음.

2). 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

▶ 현재 세계 여러나라에서는 산학연 연계로 바이러스 치료제 개발 연구 수행

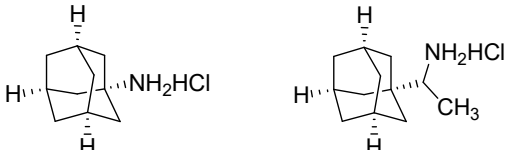
- (미국) 산학연이 바이러스 치료제 개발 연구를 수행 : Southern Research Institute의 경우 다양한 바이러스들에 대한 약효평가를 수행하고 있으며, 국립 알러지 및 전염성질환 연구원(NIAID)에서는 주로 인류의 건강을 위협하거나, 생물테러에 활용가능성이 큰 바이러스들에 대한 무료 약효평가 프로그램을 운영하고 있음.
- (일본) 산학연이 연계하여 바이러스치료제 후보물질을 개발하고 외국에 공동 라이선스하는 전략 실시함.
- (영국) 거대 제약회사와 대학교들의 항바이러스제 개발연구가 활발히 진행되고 있음.
- (벨기에) Rega연구소는 바이러스 치료제 개발에 필요한 항바이러스약효평가와 생물학적 동등성 분석(PK/ADME) 등을 수행하고 모델개발 연구를 수행하고 있음.

▶ 현재까지 조류 인플루엔자 치료제는 두 종류의 바이러스 표면 단백질(M2 protein, Neuraminidase)을 불활성화 시켜 치료할 수 있는 Amantadine과 Tamiflu의 연구가 활발히 진행되어오고 있음.

▶ 특히, M2 단백질 저해제인 Amantadine 과 Rimantadine은 현재 바이러스 내성 문제로 그에 대한 연구가 점차 줄고 있는 반면, 바이러스 분화에 관여하는 표면 단백질 Neuraminidase 저해제인 Tamiflu의 합성기법과 대체물질이 활발히 연구되고 있음.

▶ 조류 인플루엔자바이러스 치료제인 Tamiflu는 스위스 Roche사가 Neuraminidase 기질 유사체의 분자설계를 통해 개발하여 조류 인플루엔자바이러스 치료제의 독점 생산권을 갖고 있음.

[표-3] 국외 치료제 개발현황

타깃 단백질	치료제	개발국
M2	 <p>Amantadine Rimantadine</p>	Amantadine (PK-Melz, 미국에서 파킨스병 치료제 목적으로 개발)

<p>Neuraminidase</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <chem>CC(=O)N[C@@H]1[C@H](OC[C@H](O)[C@H]1O)C=C(C(=O)OCC)N</chem> Oseltamivir </div> <div style="text-align: center;"> <chem>CC(=O)N[C@@H]1[C@H](OC[C@H](O)[C@H]1O)C=C(C(=O)O)N</chem> Zanamivir </div> </div>	<p>Tamiflu(성분명: Oseltamivir, 스위스 Roche社) Relenza(성분명: Zanamivir, 미국 Glaxo社)</p>
<p>Neuraminidase</p>	<div style="text-align: center;"> <chem>CC(=O)N[C@@H]1[C@H](OC[C@H](O)[C@H]1O)C=C(C(=O)O)N</chem> Peramivir </div>	<p>Rapivab (성분명: Peramivir, BioCryst Pharmaceuticals 社 개발) (2009년 미국 FDA 승인 후 2014년부터 성인에게 사용)</p>

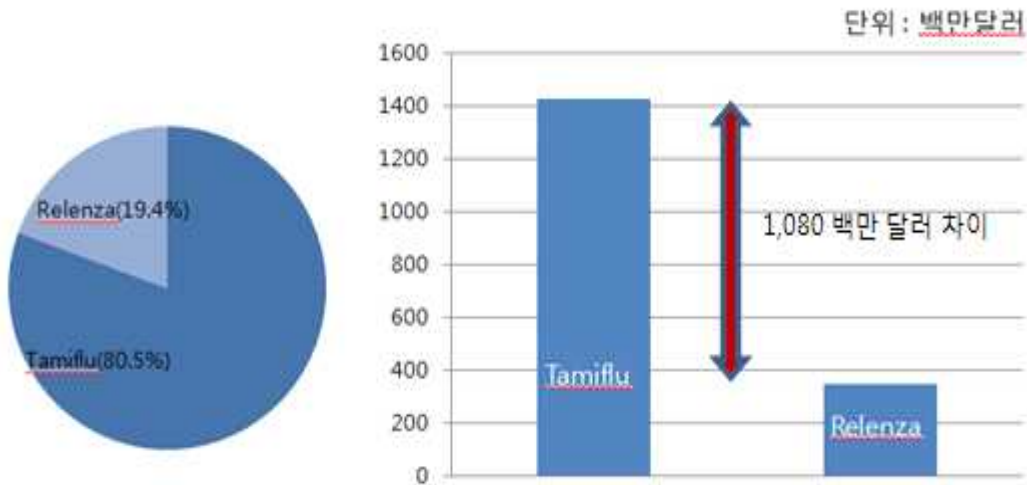
▶ 최근 인플루엔자 주사 치료제로 출시 된 Rapivab (Peramivir)는 BioCryst Pharmaceuticals 사에 의해 개발 되었으며 2009년 FDA 승인 후 2014년부터 성인 감염 치료에 사용되었으며 현재 일본에서는 ‘Rapiacta’, 우리나라에서는 ‘Peramiflu’라는 상품명으로 판매 되고 있음.



- ▶ 항바이러스제는 필연적으로 내성이 증가해 기존 치료제를 사용할 수 없는 상황이 도래, 따라서 새로운 항바이러스제의 지속적인 연구개발이 필요함.
- 타미플루에 내성을 가진 바이러스의 출현으로 조류 인플루엔자 유행 시 질병확산을 제어할 기술이 부족하여 새로운 치료제 개발 요구가 증대 되고 있음.
 - 최근에는 항체기술을 활용한 신개념 플루 치료제 개발도 활기를 띄고 있음.
 - 사노피 아벤티스(社)의 ‘광견병 치료제’와 크루셀(社)의 ‘H5N1 및 H1N1 치료제’ 개발
 - 동물과 인간을 대상으로 실시한 임상실험에서 어떠한 바이러스의 감염에도 대항할 수 있는 새로운 약물 ‘드라코’를 개발(MIT 연구진, 2011) : 신종 인플루엔자(H1N1), 감기, 뎅기열, 폴리오, 스토크 바이러스, 출혈열 바이러스 등 15종의 바이러스 퇴치에 효과를 발휘함.

○ 시장현황

- ▶ 판데믹 출현으로 국내외 항바이러스 치료제 시장은 고성장을 기록하고 있음.
 - 세계 항바이러스 시장은 '09년 약 211.5억 달러(한화 약 22.34조원)의 매출규모를 달성하였으며, 향후 '13년까지 연평균 4.5%로 성장할 것으로 전망됨 (GBI Research, 2012).
- ▶ 인플루엔자 치료제 '타미플루'와 '리렌자'가 세계시장을 주도하고 있음.
 - 2009-2010년 인플루엔자의 전세계적 유행으로 인해 로슈(社)의 타미플루는 세계적으로 상업적 성공을 이루었음.
 - 7개 주요 시장에서 2008년 4.7억 달러(한화 약 5,100억원)에서 2009년 14.2억 달러(한화 약 1.5조원)로 약 204%이상 증가함.
 - 타미플루는 다국적 제약사인 로슈가 독점권을 소유, 길리어드는 매출의 약 20%를 로열티로 수수(2008년 매출 53억 달러(약 5.7조원)의 대형 바이오 제약업체로 성장 함 (MIDAS sales data, IMS Health, March 2010).
 - Relenza도 '09-'10년 인플루엔자의 세계적 유행으로 가시적 성과를 달성 : Relenza의 주요 7개국 판매는 2008년 48백만 달러(한화 약 506억원)에서 2009년 3.4억 달러(한화 약 3,590억원)로 621.5%가 증가함 (7개국 : 미국, 일본, 프랑스, 독일, 이태리, 스페인, 영국).



출처 : MIDAS sales data, IMS Health, March 2010, 생명공학정책연구센터 재가공

[그림-8] 타미플루와 리렌자의 '09년 매출규모 비교

- ▶ 면역조절 치료제 중 인플루엔자 백신 치료제 시장의 고성장 기대하고 있음.
 - 면역조절 치료제 중 치료용 항체와 인플루엔자 백신은 성장잠재력이 무한하며, '10년까지 연간 17.2%와 46.5% 성장, 각각 12억 달러(한화 1.2조원)와 15억 달러(한화 1.5조원)의 시장 규모를 형성함 (면역조절치료제 기술동향 보고서, 생명공학정책연구센터, 2006).
 - 화학치료제 시장의 연간성장률 4.3%와 비교하였을 때 4~10배의 고성장률을 보임.

▶ 기존 치료제의 특허만료로 인한 새로운 치료제 개발이 필요한 시점 임.

- 현재 시장을 주도하고 있는 사이토카인들(EPO, Interferon alpha, G-CSF)은 특허가 만료되거나 곧 종료시점 도래하였음.
- 미국 등 각국 제약 업체들 간의 차세대 사이토카인 개발에 주력하고 있으며 이미 상품화 된 것도 많음.

○ 경쟁기관현황

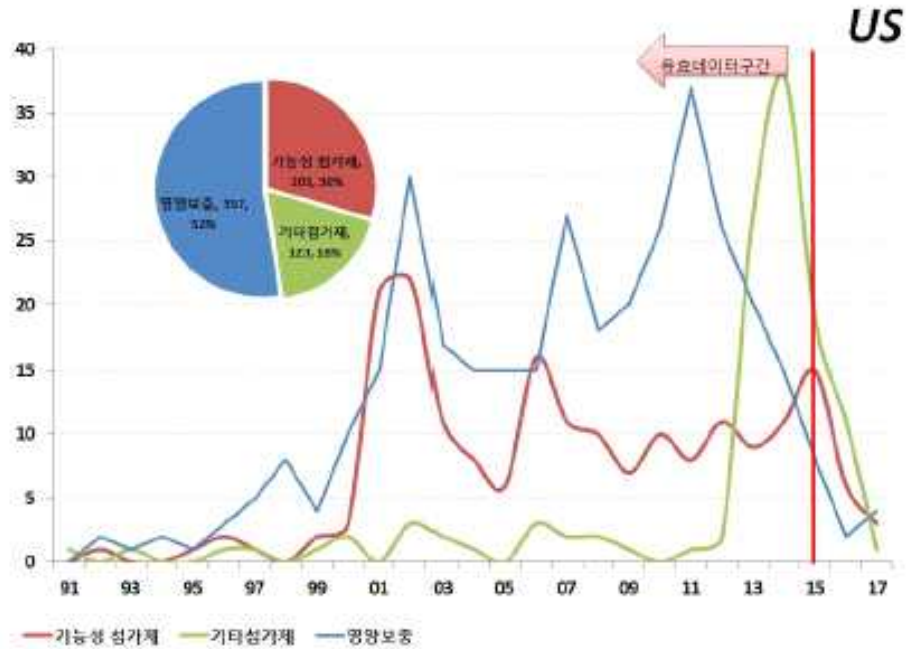
구분	개발 내용	연구 수행중인 바이러스의 subtype
USDA	Hong Kong 분리 바이러스와 미국 내 분리바이러스를 대상으로 reverse genetic system을 이용한 양계백신 개발연구 수행 중	H5N1, H9N2
WHO CDC	1997년 Hong Kong 분리바이러스와 최근 동남아시아, 특히 베트남에서 분리된 H5N1 바이러스를 이용하여 인체 백신 개발을 위해 유전자 분석 및 동물실험을 통한 백신 바이러스 선별 과 효율성 실험수행중이며, 항바이러스 신약 개발연구도 활발히 수행 중	H5N1 항바이러스 신약 개발
WHO	1980년대 중반부터 북아메리카에 야생하는 이동철새에서 조류인플루엔자 바이러스의 지속적인 분리 및 유전자 분석으로 북아메리카 대륙에 존재하는 조류인플루엔자 data base 구축을 통해 조기 인플루엔자 경보시스템체제 구성	H1- H15 N1-N9 전 subtype
중국	중국은 조류 인플루엔자 바이러스의 epicenter로 불리며 WHO와 연계하여 여러 poultry와 사람에서 분리되는 인플루엔자 바이러스의 유전자 분석과 동물실험을 통해 동남아시아에 전체에 걸친 인플루엔자바이러스의 monitoring system 구축 중	H1- H15 N1-N9 전 subtype
일본	시베리아 및 중국과 지리적으로 근접한 상황에 맞추어 WHO collaborating center를 주축으로 여러 대학과 연구기관에서 매년 이동 철새 및 일본 내 발생하는 인플루엔자 바이러스의 유전적, 혈청학적 변화를 monitoring 하고 있음	H1- H15 N1-N9 전 subtype

▶ 현재까지 천연소재로 부터로부터 상용화된 치료제는 개발되지 않았지만, 최근 중국 및 유럽 국가와 연합하여 Canopus Biopharma에서 천연물소재로부터 Tamiflu와 동등한 효능을 가지며 가격이 75%정도에서 상용 가능한 신약 StatC를 개발하여 임상시험을 통한 상용화를 위해 많은 시도를 하고 있음.

▶ Roche사 역시 Tamiflu의 약제저항성으로 인해 바이오소재를 이용한 새로운 저해물질군을 개발하려고 노력 중에 있음(<http://www.cdc.gov/flu/avian>).

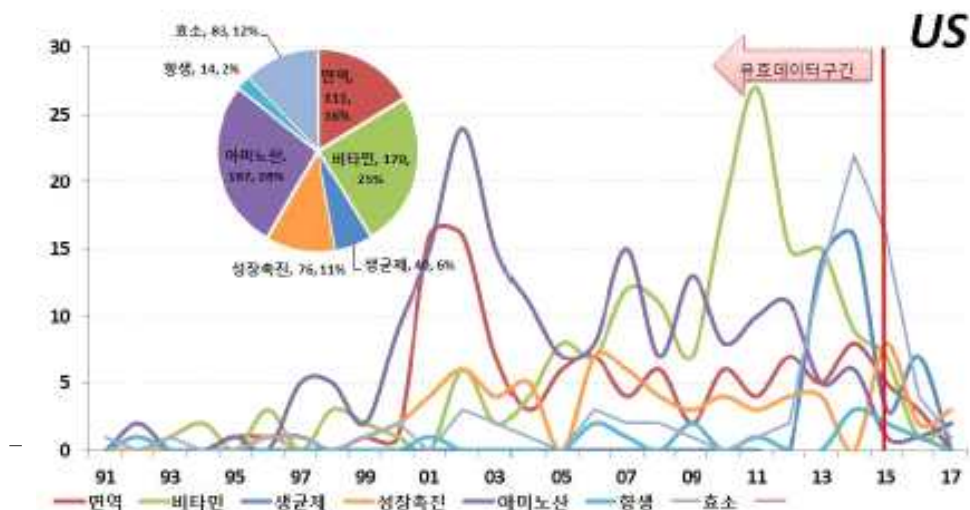
○ 지식재산권 현황

▶ 미국의 기술 분야별 특허 현황



[그림-9] 미국의 기술 분야별 동향

- 미국에서는 영양보충(357건, 약 52%), 기능성 첨가제(201건, 약 30%), 기타 첨가제(123건, 약 18%) 순으로 많이 출원된 것으로 나타남.
- 영양보충 분야는 2000년대 초반에 특허 출원이 증가하였으며, 이후 감소하지만, 2005년 이후 출원이 다시 증가하는 추세지만, 2011년 정점으로 특허 출원이 감소함.

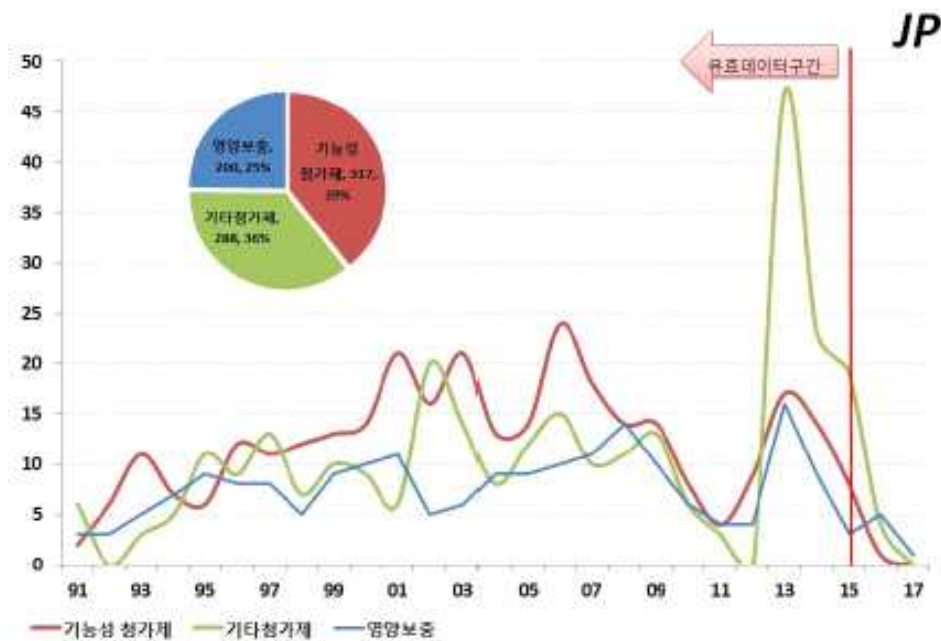


[그림-10] 미국의 세부 기술 분야별 동향

- 기능성 첨가제 분야는 2000년 초반에 특허 출원이 급증하지만, 이후 특허 출원이 증감을 반복하면서 감소하는 추세로 나타났으며, 기타 첨가제 분야는 2010년대 초반에서 중반까지 특허 출원이 급증한 것으로 나타남.

- 미국 세부 기술 분야에서는 아미노산(187건, 약 28%), 비타민(170건, 약 25%), 면역(111건 약 16%), 효소(83건 약 12%), 성장촉진(76건, 약 11%), 생균제(40건, 약 6%), 항생(14건, 2%) 순으로 나타남.
- 최근 특허 출원이 증가한 분야는 비타민, 효소, 생균제이며, 면역과 아미노산 분야는 2000년 초반에 특허 출원이 급증하지만, 이후 출원이 감소하는 경향으로 나타남.
- 비타민 분야는 최근 특허 출원이 급증한 분야이지만, 2011년을 정점으로 특허 출원이 감소하는 분야로 나타남.
- 출원량이 가장 많은 아미노산 분야는 2000년 초반 이후 특허 출원이 점진적으로 감소하는 추세로 나타남.
- 성장촉진 분야는 출원이 증감을 반복하고 있으며, 항생은 출원량의 변화가 거의 없는 것으로 나타남.

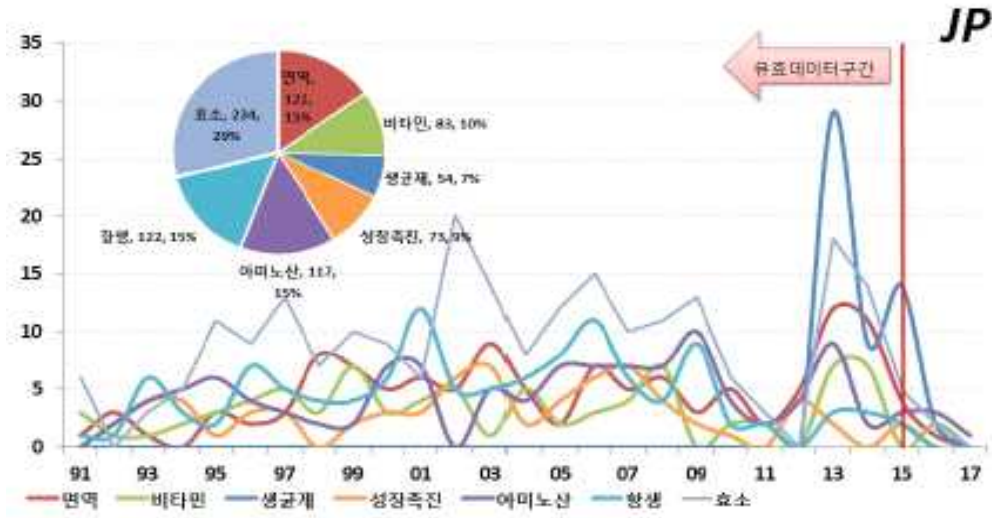
▶ 일본의 기술 분야별 특허 현황



[그림-11] 일본의 기술 분야별 동향

- 일본에서는 기능성 첨가제(317건, 약 39%), 기타첨가제(288건, 36%), 영양보충(200건, 약 25%) 순으로 많이 출원되어 왔으며, 모든 분야가 출원이 증감을 반복하고 있는 것으로 나타남.
- 가장 많은 특허가 출원된 분야인 기능성 첨가제는 2000년대에 특허 출원이 활발하였으며, 현재는 2013년 출원이 잠시 증가하지만, 현재 다시 출원이 감소하고 있어, 감소하는 추세로 나타남.
- 영양보충 분야는 2013년에 특허 출원이 정점을 이루지만, 출원의 증감의 폭이 작음.

- 기타 첨가제 분야는 2000년대 출원이 비교적 활발하지만, 2002년 이후 2012까지 감소하였다가 최근 출원이 큰 폭으로 증가하지만, 다시 감소하였음.



[그림-12] 일본의 세부 기술 분야별 동향

- 세부 기술 분야에서 항생(122건 약 15%), 효소(234건, 약 29%), 면역(122건, 약 15%), 아미노산(117건, 약 15%), 비타민(83건 약 10%), 성장촉진(73건, 약 9%), 생균제(54건 약 7%) 순으로 출원이 많은 것으로 나타남.
- 면역 및 비타민 분야는 최근 2013년~2014년에 가장 많은 특허가 출원되었음.
- 생균제 특허는 최근 2012년에서 2015년에 사이에 출원이 급증한 분야로 나타남.
- 효소 분야는 2002년에 특허 출원이 정점을 이루고 감소하지만, 2012년 이후 증가하지만, 다시 감소함.
- 성장촉진, 아미노산, 항생 분야는 출원의 증감 폭의 변화가 적고, 큰 특징이 없는 것으로 나타남.

▶ 유럽의 기술 분야별 특허 동향



[그림-13] 유럽의 기술 분야별 동향

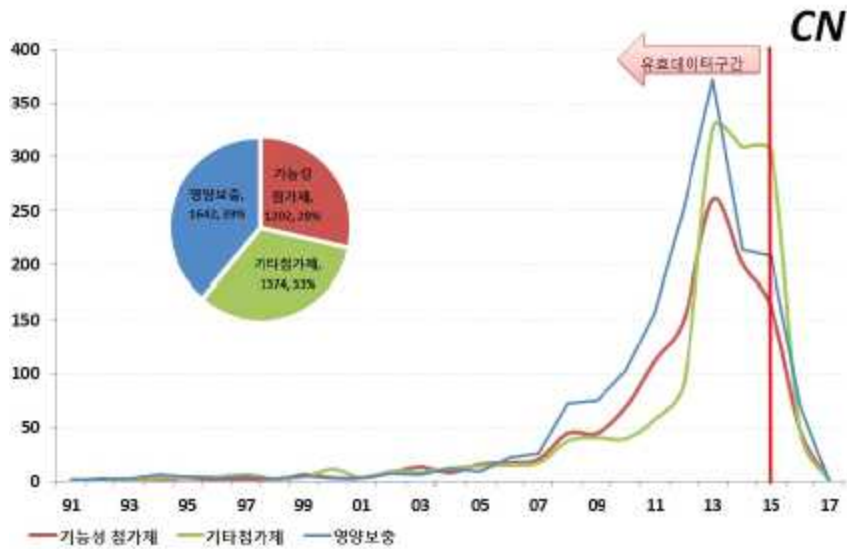
- 유럽특허에서는 영양보충(136건, 약 53%), 기능성 첨가제(86건, 약 33%), 기타 첨가제(36건, 14%) 순으로 많이 출원된 것으로 나타남.
- 기타 첨가제 분야는 최근 특허 출원이 활발하였지만, 다시 출원 감소하였음.
- 기능성 첨가제 분야는 출원의 증감을 반복하면서, 감소하는 추세인 것으로 나타남.
- 영양 보충 분야는 2000년에서 2001년 사이에 가장 많은 특허가 출원되었으며, 이후 출원이 증감을 반복하면서 감소하는 추세로 나타남.



[그림-14] 유럽의 세부 기술 분야별 동향

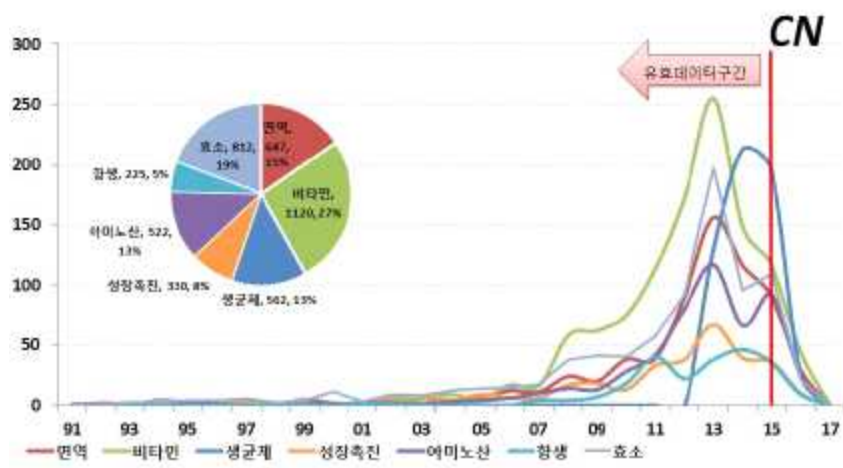
- 유럽특허 세분 기술 분야에서는 아미노산(77건, 약 30%), 비타민(59건, 약 23%), 면역(50건, 약 19%), 효소(25건 약 10%), 항생(13건, 약 5%), 생균제(11건 4%) 순으로 특허가 많이 출원되었음.
- 최근 특허 출원이 급증한 생균제 분야를 제외하고, 대부분의 세분 기술 분야의 최근 특허 출원이 저조한 것으로 나타남.
- 아미노산 분야는 1999년에서 2002년 사이에 가장 많은 특허가 출원되었으며, 면역 부분은 2003년을 기점으로 특허 출원이 감소하는 것으로 나타남.
- 비타민 분야는 1998년을 정점으로 증감을 반복하면서, 출원이 감소하고 있는 것으로 나타남.
- 항생, 성장촉진 및 효소 분야는 출원량이 작아서, 증감의 변화도 작음

▶ 중국의 기술 분야별 특허 동향



[그림-15] 중국의 기술 분야별 동향

- 중국에서는 영양보충 분야(1642건, 약 39%), 기타첨가제 분야(1374건, 약 33%), 기능성 첨가제(1202건, 약 28%)순으로 많이 출원된 것으로 나타남.
- 기타 첨가제 분야, 기능성 첨가제, 영양보충의 모든 분야가 2013년까지 특허 출원이 급격히 성장하고 있는 것으로 나타남.
- 영양보충 분야는 2013년을 정점으로 특허 출원이 비교적 급격하게 감소하고 있음.
- 기타첨가제 분야와 기능성 첨가제 분야는 2013년을 정점으로 특허 출원이 비교적 적게 감소하였음.



(출처 : 2017년 농림분야 생명자원 특허DB 수집 및 분석사업 사료첨가제 특허분석보고서, 2017)

[그림-16] 중국의 세부 기술 분야별 동향

- 세부 기술 분야에서는 비타민(1120건 약 27%), 효소(812건, 약 19%), 면역(647건, 약 15%), 생균제(562건, 약 13%), 아미노산(522건, 약 13%), 성장촉진(330건, 약 8%) 및 항생(225건, 약 5%) 순으로 특허 출원이 많은 것으로 나타남.

- 생균제 분야를 제외한 모든 분야가 2013년을 정점으로 특허 출원이 감소하고 있으며, 생균제 분야는 2014년 이후 특허 출원이 소폭 감소하는 것으로 나타남.
- 면역, 비타민, 아미노산, 효소, 생균제 분야는 상대적으로 특허 출원이 활발하고, 항생 분야와 성장촉진 분야는 특허 출원이 상대적으로 적은 것으로 나타남.

1-3. 연구개발 범위

연구개발 목표	연구개발 범위
<ul style="list-style-type: none"> 고도화된 후보 소재의 원료 표준화 및 감염 동물모델 확립/효능평가 	<ul style="list-style-type: none"> 기존 AI제어용 소재의 고도화에 따른 기원, 생산지, 지표물질의 프로파일링 고도화된 후보소재의 세포 및 동물 감염모델을 활용한 효능검증
<ul style="list-style-type: none"> 고도화된 후보소재 규격화 및 제조 공정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재에 대한 기시범 설정 및 대표성분 등의 성분프로파일 제조공정별 수득율, 제조방법 및 대량생산체계 구축 및 확립
<ul style="list-style-type: none"> 고도화된 후보소재의 작용기전 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재의 세포 및 동물실험을 통한 작용기전(인터페론 및 사이토카인 변화 등) 연구
<ul style="list-style-type: none"> 시제품의 제작 및 허가를 위한 임상시험 계획 수립 및 허가 신청 	<ul style="list-style-type: none"> 임상시험 계획 수립을 위한 효능 및 안정성(가속 및 장기보관 등)시험을 위한 data 확보 1000수 이상의 사육시설을 활용한 고도화된 후보소재의 안전성 테스트 고도화된 “수용성 면역증강제” 동물의약품 허가신청

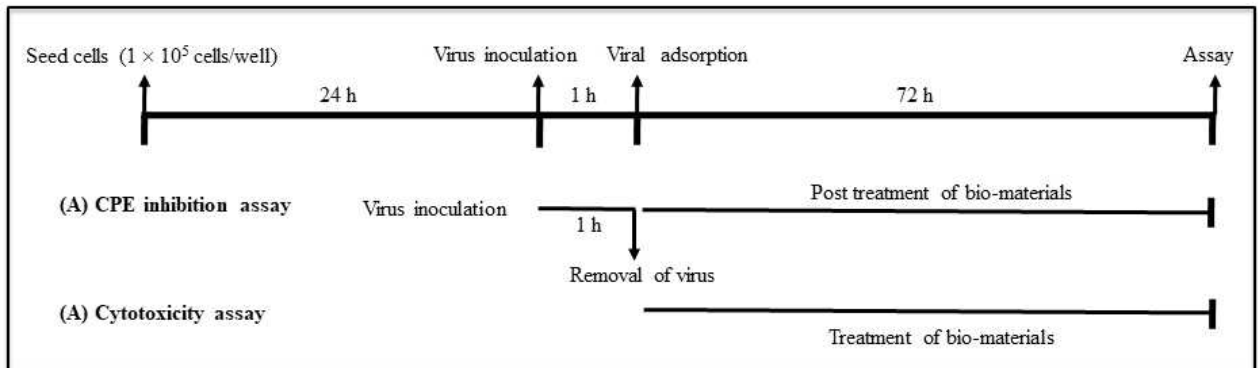
2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 후보소재의 세포계를 활용한 *in vitro* 항바이러스 효능검증 및 작용기전

가. 후보 소재의 구축된 세포계 assay 시스템을 활용한 항바이러스 활성 검증

- 기존의 활성 소재인 S-sol (Curcumin S 복합체)는 인플루엔자 바이러스 제어를 확인하고 제재로써 개발되어짐
- 기존 소재 S-sol의 효능을 고도화시키기 위해 G-sol (Curcumin G 복합체) 및 S-sol과 G-sol의 혼합체에 대한 항바이러스 효능평가를 수행함.
- 항바이러스 assay에 사용된 바이러스는 사람 균주인 H1N1 (A/PR/8/34)와 닭의 저병원성 균주인 H9N2(국내 닭에서 분리한 균주)를 사용하였음.
- S-sol과 G-sol의 복합체의 배합비율을 결정하기 위해 S/G 의 비율을 0/10부터 10/0 까지 다양한 혼합비율로 항바이러스 활성 평가를 수행하였음.
- 후보소재의 항인플루엔자 활성을 알아보기 위해 본 연구팀에서 확립한 세포변성억제효과 assay (CPE reduction assay, Post treatment assay)과 세포독성 평가 (Cytotoxicity)를 수행하였다. 또한 추출물과 화합물의 세포 독성을 측정하기 위해 72시간 세포에서 배양 후 MTT assay를 수행하였음.

▶ 항인플루엔자 바이러스 활성 검증을 위한 assay 기법

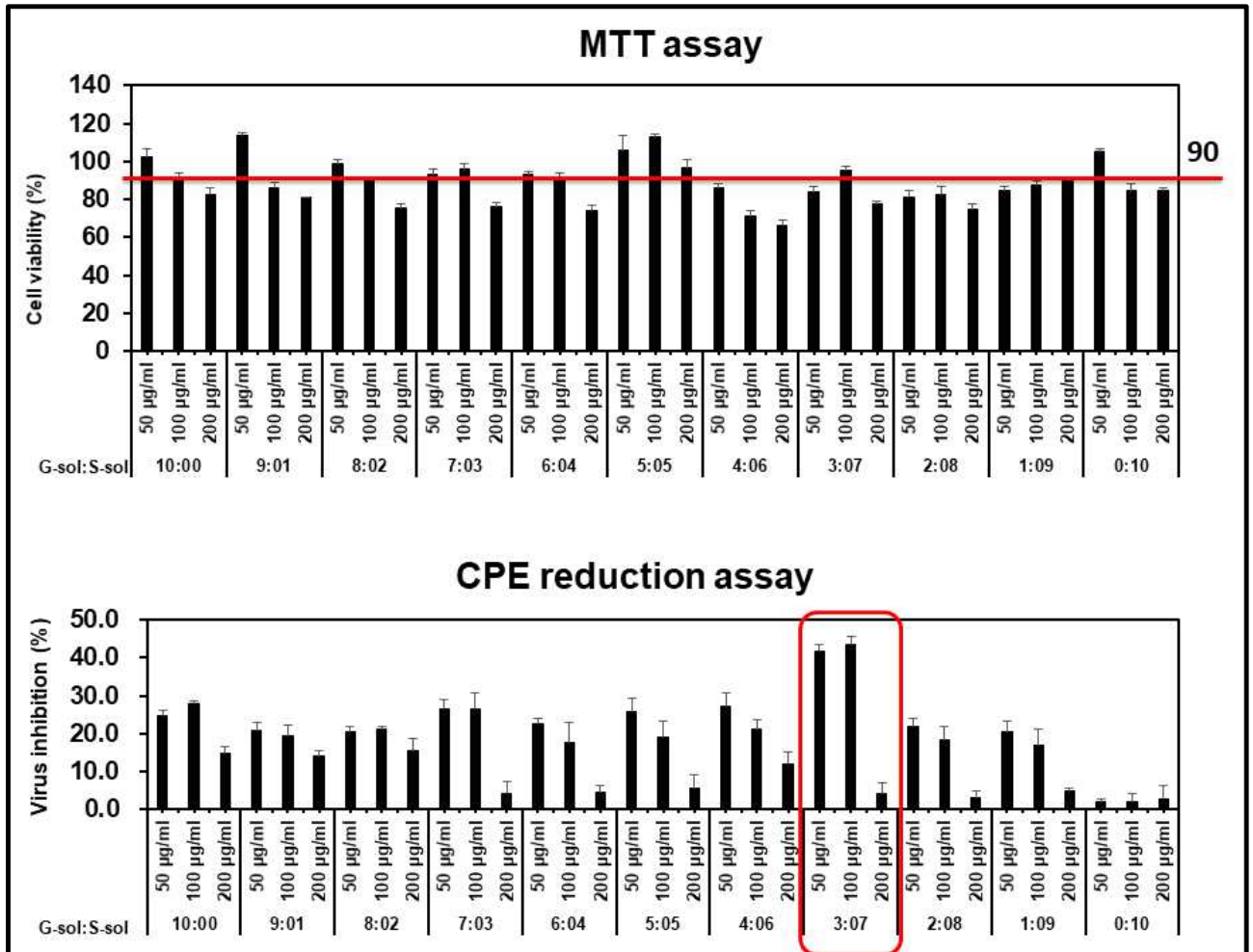


[후보소재의 항인플루엔자 바이러스 활성 assay에 대한 flow chart. (A) 세포변성억제효과 assay (CPE reduction assay, Post treatment assay), (B) 세포독성 평가 assay (Cytotoxicity assay)]

- 먼저 사람 균주인 H1N1을 이용하여 후보 소재의 항바이러스 활성 평가를 수행한 결과, G : S 혼합 비율 (0:10부터 10:0까지) 세포 변성억제 효능이 50%이상 증가되는 비율은 보이지 않았음.
- 하지만, 기존 후보소재인 S-sol 의 단독 사용을 했을때에는 거의 항바이러스 효능을 보이지 않았으나, G-sol : S-sol = 3:7의 혼합비율에서는 억제 효능이 40%이상으로 항바

이러스 활성이 증가되는 것을 확인하였음.

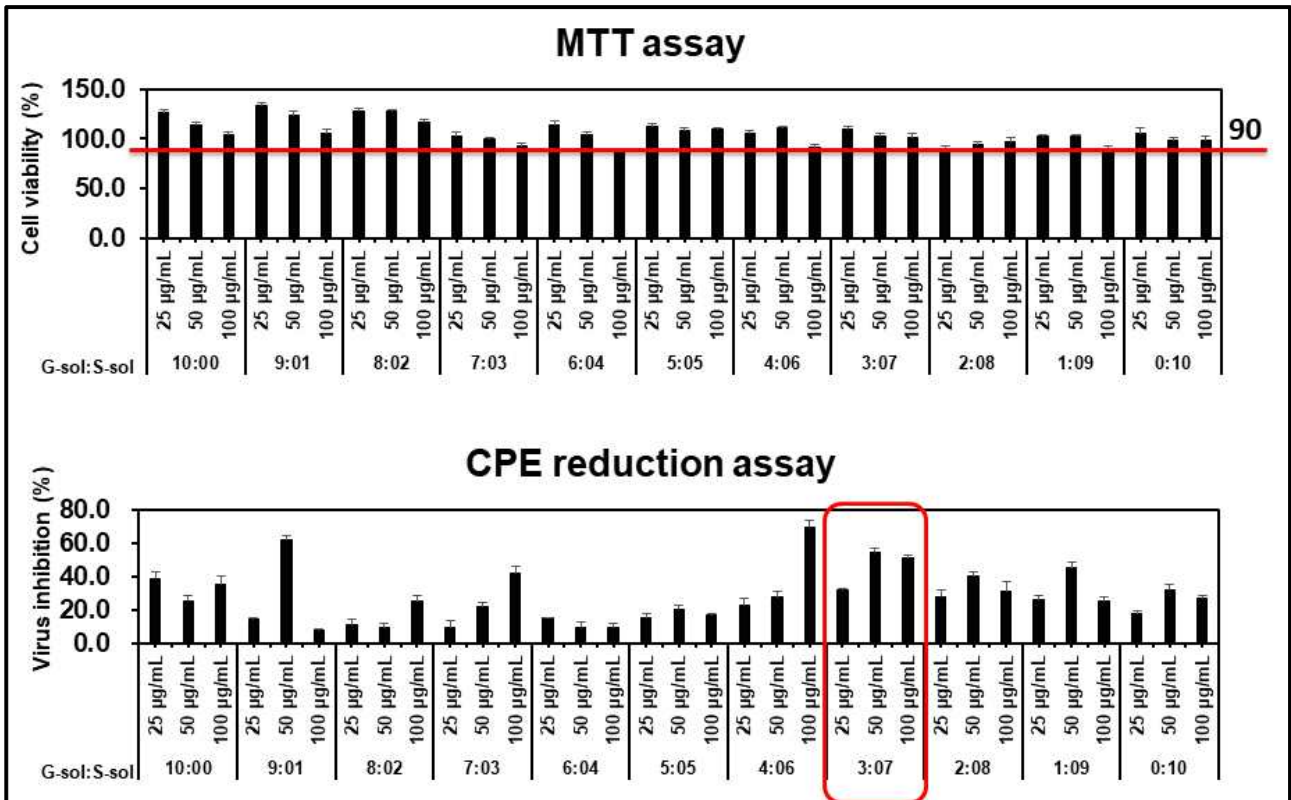
G-sol:S-sol	Dose (µg/mL)	Cell viability	CPE reduction (%)
			H1N1
10:0	200	82.3 ± 3.5	14.8 ± 1.8
	100	90.9 ± 3.3	27.9 ± 0.7
	50	102.1 ± 4.2	24.6 ± 1.4
9:0	200	81.3 ± 0.1	14.0 ± 1.4
	100	85.8 ± 2.9	19.5 ± 2.8
	50	113.8 ± 1.5	20.7 ± 2.2
8:2	200	75.6 ± 2.1	15.5 ± 3.3
	100	91.5 ± 0.2	21.2 ± 0.6
	50	98.9 ± 2.3	20.5 ± 1.2
7:3	200	76.0 ± 2.4	4.1 ± 3.2
	100	95.7 ± 3.1	26.4 ± 4.4
	50	93.2 ± 2.9	26.6 ± 2.4
6:4	200	73.8 ± 2.8	4.4 ± 1.9
	100	90.2 ± 3.6	17.6 ± 5.3
	50	93.2 ± 1.5	22.7 ± 1.3
5:5	200	96.8 ± 4.2	5.6 ± 3.5
	100	112.9 ± 1.3	19.2 ± 4.3
	50	105.6 ± 8.2	25.6 ± 3.8
4:6	200	66.4 ± 2.6	11.8 ± 3.3
	100	71.2 ± 3	21.2 ± 2.3
	50	86.0 ± 2	27.1 ± 3.6
3:7	200	77.8 ± 0.9	4.3 ± 2.7
	100	95.4 ± 1.7	43.4 ± 2.2
	50	84.0 ± 3	41.6 ± 1.8
2:8	200	75.0 ± 2.7	3.2 ± 1.9
	100	82.4 ± 4.3	18.2 ± 3.8
	50	81.1 ± 3.9	21.7 ± 2.2
1:9	200	89.3 ± 2.8	4.9 ± 0.6
	100	87.4 ± 2.2	16.9 ± 4.1
	50	85.0 ± 1.6	20.5 ± 2.9
0:10	200	84.9 ± 1.2	2.8 ± 3.5
	100	85.0 ± 3.5	2.1 ± 2.1
	50	104.9 ± 2	2.0 ± 0.8



[후보소재 G-sol과 S-sol의 혼합 비율에 따른 항인플루엔자(H1N1) 활성평가 및 세포독성 평가]

- 또한, 닭유래 균주인 H9N2을 이용하여 후보 소재의 항바이러스 활성 평가를 수행한 결과, G : S 혼합 비율 (0:10부터 10:0까지) 중 9:1, 4:6, 3:7의 비율 세포 변성억제 효능이 50%이상 나타냄을 확인하였음.
- 항바이러스 활성을 보인 3가지 G : S 혼합 비율 (9:1, 4:6, 3:7) 중 최적의 농도를 선택하기 위해, 두 가지 농도에서 활성을 나타내며 H1N1에서도 활성이 있는 G : S 혼합 비율 3:7을 최종 선정하여 향후 연구를 수행하였음.
- 항바이러스 활성은 직접적으로 나타내지 않았지만 신규 소재인 G-sol에 대한 인플루엔자 바이러스에 대한 동물모델에서의 효능 평가도 수행하였음.

G-sol:S-sol	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability	CPE reduction (%)
			H9N2
10:0	100	104.2 \pm 3.4	35.2 \pm 5.1
	50	113.7 \pm 2.5	24.9 \pm 3.6
	25	126.1 \pm 2.6	38.3 \pm 4.2
9:1	100	105.4 \pm 4.1	7.5 \pm 1.1
	50	123.5 \pm 5.1	62.3 \pm 2.3
	25	133.2 \pm 3.8	14.3 \pm 0.7
8:2	100	117.2 \pm 2.4	25.1 \pm 3.6
	50	128.4 \pm 0.8	9.4 \pm 2.1
	25	128.7 \pm 2.2	10.6 \pm 3.9
7:3	100	93.0 \pm 3.1	41.8 \pm 4.2
	50	99.6 \pm 2.4	22.3 \pm 2.3
	25	102.5 \pm 3.9	9.0 \pm 4.5
6:4	100	86.7 \pm 0.8	9.3 \pm 2.5
	50	104.5 \pm 1.9	9.3 \pm 3.7
	25	114.4 \pm 3.6	15.2 \pm 0.1
5:5	100	110.0 \pm 1.1	17.1 \pm 0.9
	50	108.7 \pm 2.6	20.5 \pm 1.9
	25	111.9 \pm 2.8	15.0 \pm 3
4:6	100	91.1 \pm 3.8	69.8 \pm 4
	50	110.7 \pm 2.2	27.4 \pm 3.9
	25	105.4 \pm 2.9	22.9 \pm 4.2
3:7	100	100.8 \pm 4.5	51.0 \pm 1.9
	50	103.1 \pm 2.3	54.2 \pm 3
	25	109.6 \pm 2.7	32.3 \pm 0.6
2:8	100	96.9 \pm 3.9	31.4 \pm 5.1
	50	95.0 \pm 1.7	40.6 \pm 2.1
	25	89.8 \pm 2.9	27.4 \pm 4.4
1:9	100	88.9 \pm 3.5	25.1 \pm 2.8
	50	102.3 \pm 2.4	45.4 \pm 3.4
	25	102.2 \pm 2.6	25.9 \pm 2.2
0:1	100	98.9 \pm 3.8	27.0 \pm 1.8
	50	98.5 \pm 2.4	32.2 \pm 2.9
	25	106.2 \pm 4.5	17.9 \pm 1.6



[후보소재 G-sol과 S-sol의 혼합 비율에 따른 항인플루엔자(H9N2) 활성평가 및 세포독성 평가]

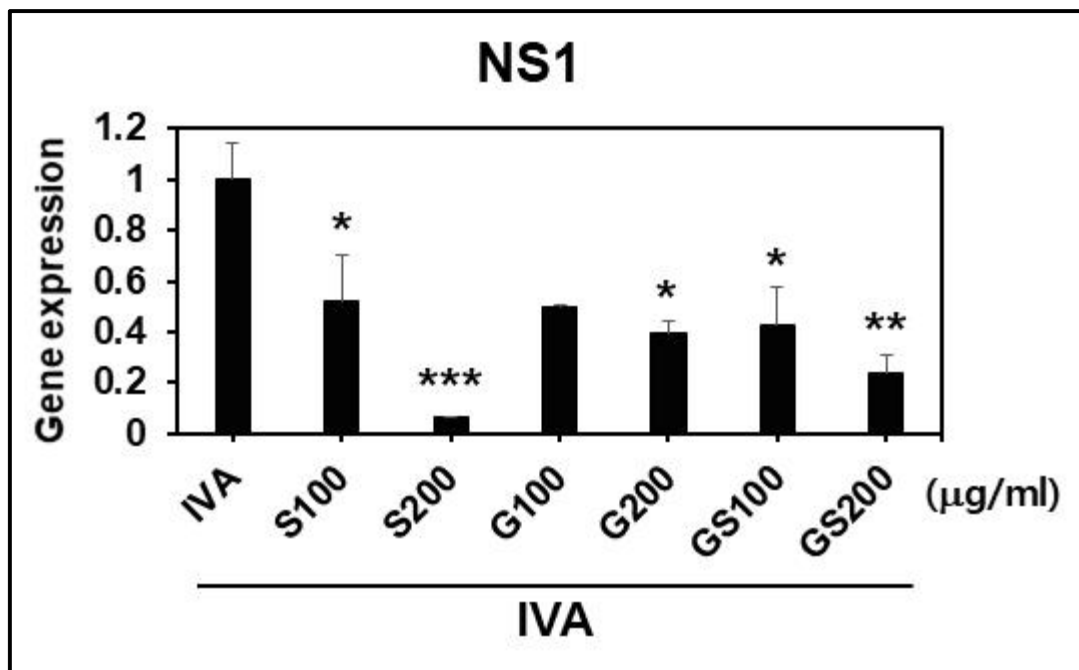
나. 후보 소재의 항바이러스 활성 작용기전 연구

- 바이러스가 감염되면 숙주세포는 이를 방어하기 위해 대식세포 및 림프구를 활성화 시키는 사이토카인 및 인터페론을 많이 생성함. 하지만 이러한 면역반응은 일정량의 바이러스가 들어가야 일어나며, 바이러스가 많이 숙주세포로 침입되었다 하더라도 많은 복제가 일어나야 자극되므로, 바이러스가 숙주세포내로 들어가 Clearance가 되면 세포내 면역반응은 일어나지 않게 됨.
- 따라서, 후보소재 (G-sol과 G와 S의 복합체)가 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 유도되는 대표적인 사이토카인 (IL-6, IL-8, IL-12, TNF-a) 및 인터페론을 real-time RT-PCR로 확인하였음.
- 실험 방법: MDCK세포를 6 well plate에 seeding 24시간 후 PBS로 2회 세척하고 바이러스를 (0.01 MOI) 감염시킴. 감염 한시간 후 바이러스를 제거하고 물질을 농도별 (100 µg/mL, 200 µg/mL)로 처리함. 물질 처리 24시간 후 PBS로 2회 세척 후 세포를 분쇄하여 RNA를 추출하고 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 real-time RT-PCR을 수행함.

➤ 인플루엔자 바이러스 및 사이토카인 검출을 위한 Real-time RT-PCR 프라이머 쌍

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
GADPH	Forward	TTCCACGGCACAGTCAAG
	Reverse	ACTCAGCACCAGCATCAC
IL-6	Forward	TCCAGAACAACACTATGAGGGTGA
	Reverse	TCCTGATTCTTTACCTTGCTCTT
IL-8	Forward	TGATTGACAGTGGCCACATTGTG
	Reverse	GTCCAGGCACACCTCATTTTC
IL-12	Forward	TGGAGGTCAGCTGGGAATACC
	Reverse	TGCAAAATGTCAGGGAGAAGTA
TNF- α	Forward	CGTCCATTCTTGCCCAAAC
	Reverse	AGCCCTGAGCCCTTAATTC
IFN- γ	Forward	CCAGATCATTCAAAGGAGCA
	Reverse	CGTTCACAGGAATTTGAATCAG
NS1	Forward	ATGGATCCAAACACTGTGTC
	Reverse	AACTTCTGACCTAATTGTTC

- 그 결과, 기존 소재 S-sol과 신규 후보소재 G-sol, G+S 복합소재 모두 농도 의존적으로 인플루엔자 바이러스 RNA가 감소되는 것을 확인하였음.

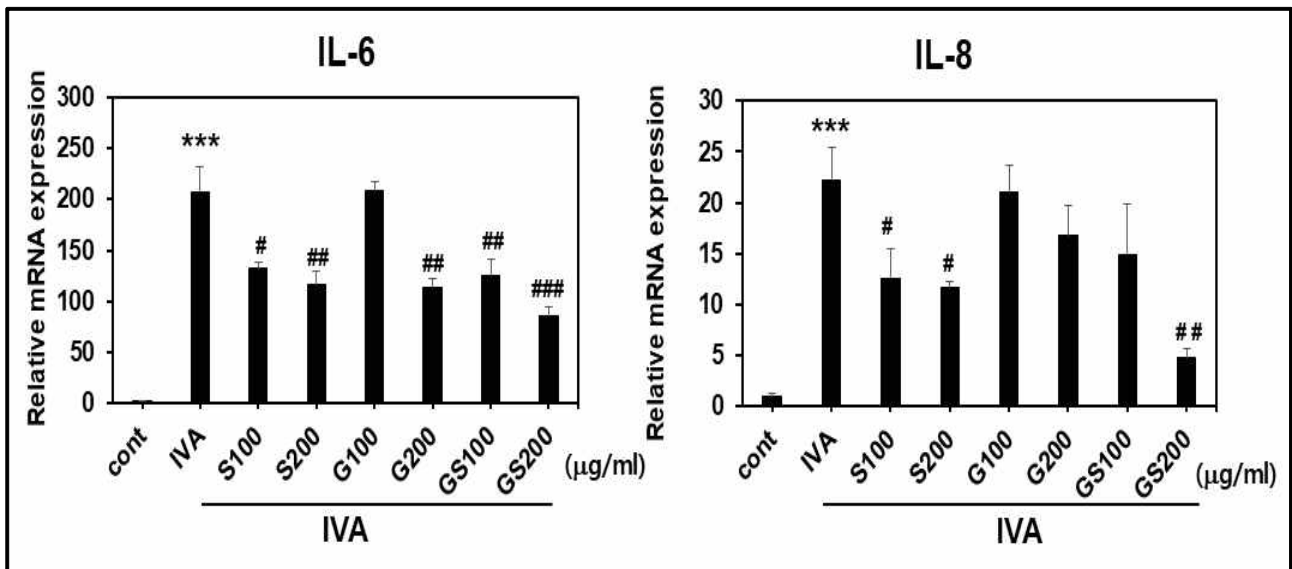
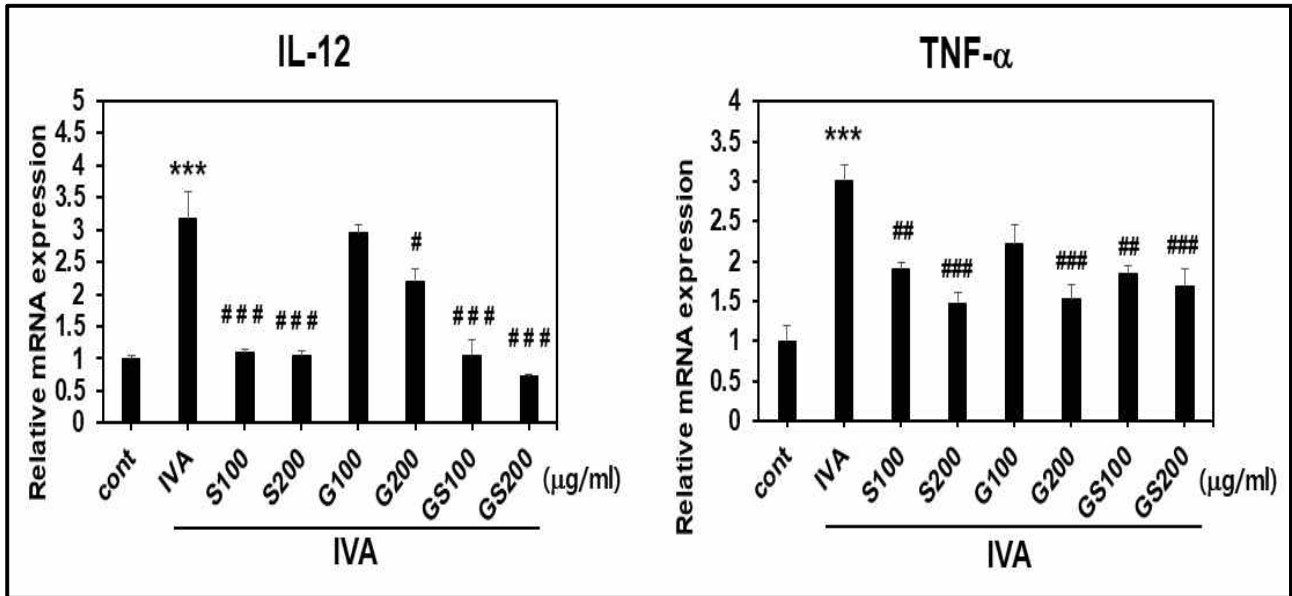


[후보소재의 인플루엔자 바이러스 RNA 억제 효능 (Real-time RT-PCR)]

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)]

- 인플루엔자 바이러스가 감염되면 바이러스 감염되지 않은 정상세포에 비해 IL-6는 170배, IL-8은 약 20배 이상, IL-12은 약 3배, TNF- α 는 약 3배 이상 발현이 증가됨을 확인하였음.

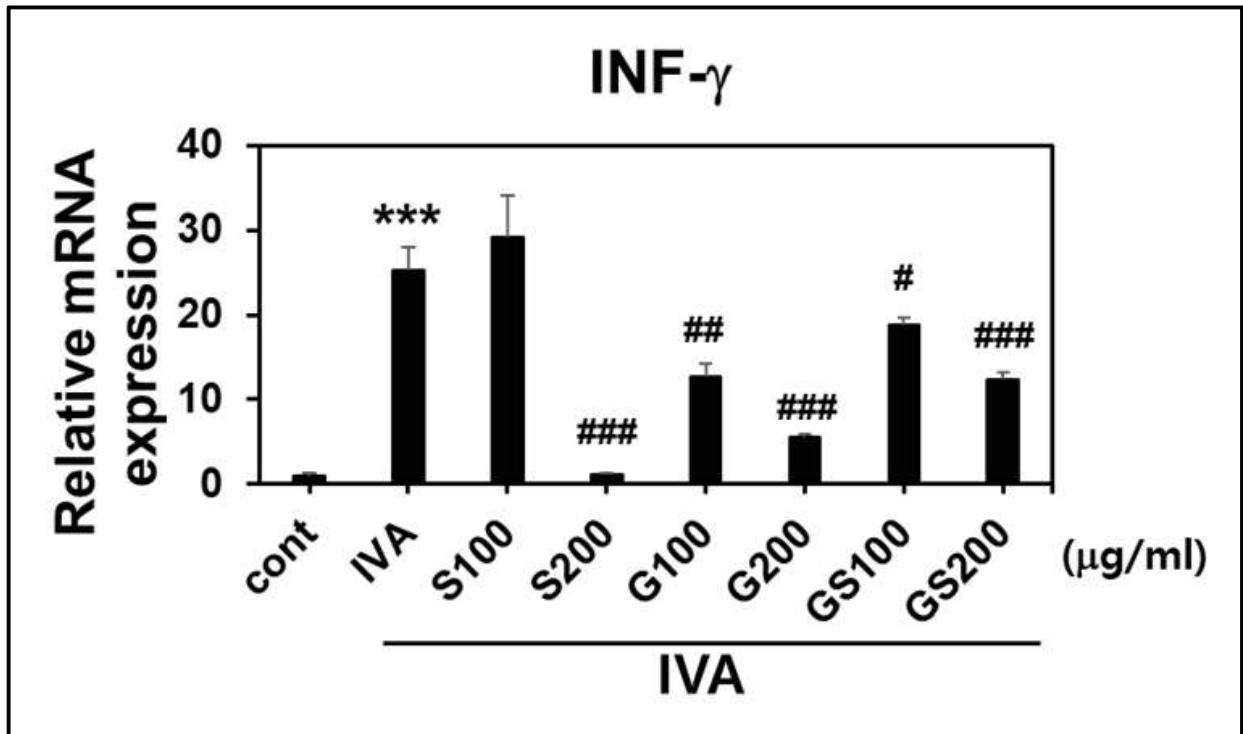
- 하지만, 기존 소재 S-sol과 신규 후보소재 G-sol, G와 S 복합소재를 처리한 경우, 모두 농도 의존적으로 IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α 사이토카인 발현이 감소함을 확인하였음.
- 특히, pro-inflammatory cytokine인 IL-6와 IL-8, IL-12의 경우 기존 소재인 S-sol 보다 고도화 소재인 G + S의 복합체에서 발현 억제 효과가 증가함을 확인하였음.



[후보소재의 인플루엔자 바이러스에 의해 유도된 사이토카인의 억제 효능 (Real-time RT-PCR) (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$)]

- 바이러스의 감염에서 가장 중요한 숙주내 방어기작은 인터페론의 생성임. 인플루엔자 바이러스가 감염되면 숙주 세포 및 면역세포는 Type I 및 Type II 인터페론을 생성하여 바이러스 감염된 세포를 사멸 및 혈액 내 바이러스를 중화시켜 항바이러스 활성을 냄으로 바이러스 감염에 의해 유도되는 인터페론의 활성을 증가 시키는지 알아보기 위하여 real-time RT-PCR로 수행하였음.

- 그 결과, 인플루엔자 숙주세포에 감염되면 인터페론- γ 가 약 25배 증가함을 확인하였음. 하지만 기존 소재 S-sol과 신규 후보소재 G-sol, G와 S 복합소재를 처리한 경우, 모두 농도 의존적으로 인터페론- γ 가 농도 의존적으로 감소함을 확인하였음.
- 이렇게 후보소재들의 경우 인플루엔자 감염시 인터페론 증가를 유도하지 않은 것을 확인하였음. 인플루엔자 감염 후 후보소재 처리에 의한 인터페론 감소는 바이러스의 세포내 복제 기전을 억제함으로써 바이러스의 생성을 억제하여 인터페론 생성 신호전달을 자극하지 않은 것으로 사료됨.



[후보소재의 인플루엔자 바이러스에 의해 유도된 인터페론의 억제 효능 (Real-time RT-PCR) (# $P < 0.01$,### $P < 0.001$)]

- 본 연구를 통해, 고도화 G+S 복합소재가 바이러스 배출을 줄이는 항바이러스 활성 뿐 만아니라 사이토카인을 억제하는 항염 활성을 나타냄을 확인하였음.
- 후보 소재들의 항인플루엔자 작용기전 연구는 향후 더욱 심화연구를 통하여 세포내 작용기전을 밝혀 국외 저명한 Journal에 투고할 예정임
- 이러한 결과를 바탕으로 후보소재의 감염 동물 모델을 활용하여 항인플루엔자 활성 평가를 수행하였음.

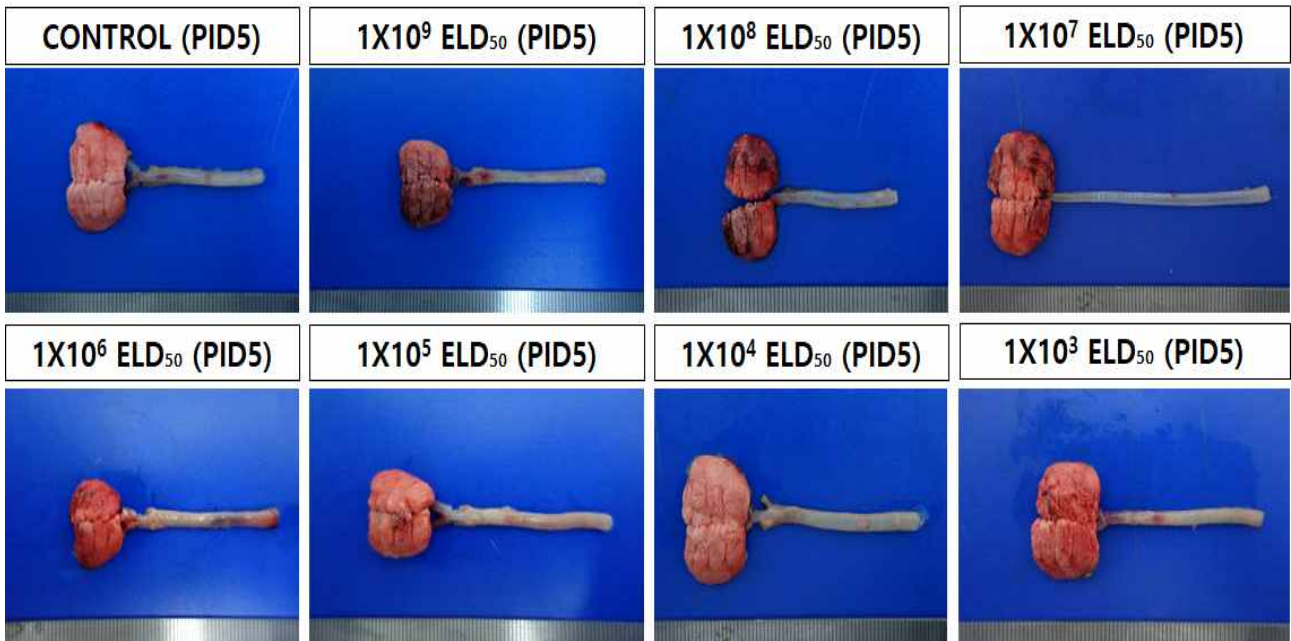
2-2. 후보소재의 효능검증을 위한 감염동물 모델 확립

가. 조류 인플루엔자 감염 동물(닭) 모델 확립

- 조류 인플루엔자 바이러스 중 저병원성 인플루엔자의 경우, 병원성이 높지 않아 폐사율은 낮으나 발생 빈도가 빈번하고 국내에 만연되어있어 가금류의 생산성을 크게 낮추어 농가에 큰 피해를 입히는 바이러스임.
- 따라서, 고도화된 후보 소재의 항바이러스 효능평가를 위한 조류 인플루엔자 감염 동물(닭) 모델 구축을 위해 저병원성 인플루엔자 H9N2 국내 분리주를 확보함.
- 확보한 국내 분리주 H9N2를 SPF 계란에 접종하여 대량 배양 후, 바이러스 역가를 측정 한 결과, 배양한 바이러스는 1×10^9 ELD₅₀ (50% embryo lethal dose)를 나타내어 높은 역가를 보임. 이렇게 배양한 바이러스를
- 대량 배양된 바이러스를 SPF 닭 4주령에 접종하여 감염모델을 구축함.
- SPF 닭의 인플루엔자 감염 동물 모델 구축
 - 접종한 바이러스 : 배양한 바이러스를 원액 (1×10^9 ELD₅₀)를 10배 계단 희석하여, 1×10^9 ELD₅₀, 1×10^8 ELD₅₀, 1×10^7 ELD₅₀, 1×10^6 ELD₅₀, 1×10^5 ELD₅₀, 1×10^4 ELD₅₀ 을 각각 접종함.
 - 접종 동물 : SPF 닭의 수정란 10일령을 구매하여 37도에서 배양 후 21에 부란하였음. 부란된 병아리를 방사선 멸균된 사료와 멸균 수로 사육 후 3주령에 바이러스를 접종하였음.
 - 실험방법 : 준비된 바이러스를 각각 3주령의 SPF 닭에 비강으로 100 uL 씩 접종 후 1일령, 3일령, 5일령, 7일령에 각각 부검하여 폐, 맹장편도, 기관 등 전신장기를 채취하였음. 부검 시 각각의 장기 혹은 조직에서의 육안적 변화를 검사하고 기록하였음. 채취된 장기는 병리조직검사 및 real-time RT-PCR 검사를 통하여 바이러스 검출을 수행함.
 - 실험 결과 : 1×10^9 ELD₅₀, 1×10^8 ELD₅₀, 1×10^7 ELD₅₀, 을 접종한 닭의 폐에서 미만성 간질성 폐렴이 확인되어 전형적인 인플루엔자 바이러스 감염 패턴을 확인하였음. 하지만, 1×10^6 ELD₅₀ 이하에서는 폐렴이 잘 관찰되지 않음.
 - 따라서, 후보소재의 효능평가를 위한 감염 동물 모델에서는 인플루엔자바이러스 1×10^7 ELD₅₀, 접종이 적당한 바이러스 용량임을 확인하였음. 또한, 저병원성 인플루엔자의 닭 감염 모델을 성공적으로 구축함.



[저병원성 인플루엔자 바이러스 역가별로 SPF 닭에 비강으로 접종한 감염 모델]



[인플루엔자 바이러스(H9N2) 역가별로 감염 후 5일 쯤 SPF 닭의 폐 사진]

2-3. 구축된 감염동물모델을 활용한 후보 소재의 효능검증

가. 구축된 인플루엔자 감염 닭 모델을 활용한 효능검증

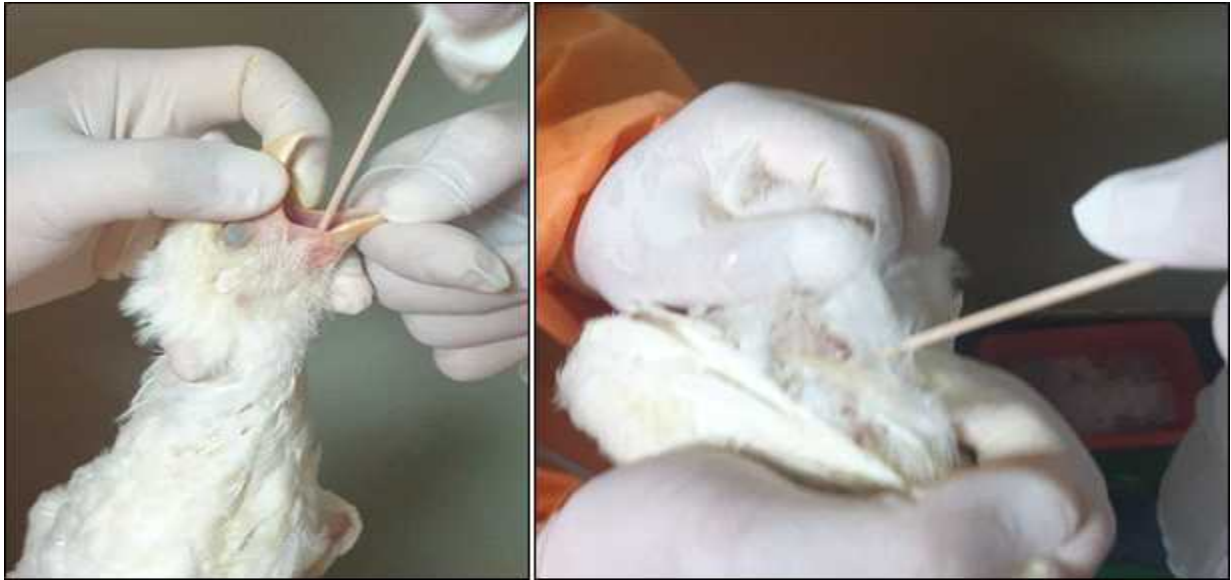
○ 실험방법

- 접종한 바이러스 : 조류 인플루엔자 H9N2 1×10^7 ELD₅₀
- 접종 동물 : SPF 닭의 수정란 10일령을 구매하여 37도에서 배양 후 21에 부란하였음. 부란된 병아리를 방사선 멸균된 사료와 멸균 수로 사육 후 4주령에 바이러스를 접종하였음.
- 시험군

▶ 시험군의 구분

구분	실험 마리수	시험물질	투여농도	투여방법	공격접종
Group 1	23	G-sol	400mg/kg/일	경구투여	H9N2
Group 2	23	G-sol	200mg/kg/일	경구투여	H9N2
Group 3	23	G-sol+S-sol mixture (3:7 혼합)	400mg/kg/일	경구투여	H9N2
Group 4	23	G-sol+S-sol mixture (3:7 혼합)	200mg/kg/일	경구투여	H9N2
Group 5	23	PBS	-		H9N2
Group 6	23	PBS	-		

- 실험방법 : 4주령의 SPF 닭에 바이러스 접종 전 14일간 후보소재 투여함. 인플루엔자 바이러스를 100 uL 씩 비강으로 접종 후, 4시간 후부터 고도화된 후보소재를 200 mg/kg/day, 400 mg/kg/day를 각각 구강투여로 총 14일간 물질을 투여하였음.
 - 1) 바이러스 접종 후 1일령, 3일령, 5일령, 7일령, 9일령, 11일령에 각각 시험군에서 지정된 8마리로부터 구강 및 총배설장에서 바이러스를 면봉으로 채취하여 real-time RT-PCR 검사하였음.
 - 2) 바이러스 접종 후 3일령, 7일령, 11일령에 각각 시험군에서 5마리씩 부검하여 기관과 맹장편도를 채취하여 real-time RT-PCR 검사하였음.
 - 3) 바이러스 접종 후 14일간 임상증상 발현 및 폐사율을 관찰 후 부검하여 병리조직학 검사를 수행하였음.



[인플루엔자 바이러스(H9N2) 접종 후 일령별로 구강과 총배설장에서 샘플 채취]

○ 실험결과

- 구강으로부터 바이러스를 면봉으로 채취하여 일자 별 인플루엔자 바이러스 검출 확인한 결과, 공격접종 양성대조군에 비해 시험물질 투여군에서 유의적인 감소 효과가 관찰되지 않음.

▶SPF 닭에 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 공격접종 후 구강 내 AI 배출량 변화

그룹		Virus replication					
		1dpc	3dpc	5dpc	7dpc	9dpc	11dpc
G1	양성률 ^A	8/8	8/8	8/8	8/8	3/8	5/8
	Ct value ^B	27.12±2.62	25.96±1.32	25.43±0.87	32.81±2.13	34.36±0.82	33.78±0.89
	EID ₅₀ ^C	2.752±0.723	3.071±0.363	3.218±0.239	1.186±0.586	0.757±0.225	0.861±0.256
G2	양성률 ^A	8/8	8/8	8/8	7/8	7/8	4/8
	Ct value ^B	26.79±2.23	25.05±3.08	25.76±1.96	30.50±2.35	33.01±1.29	31.09±3.32
	EID ₅₀ ^C	2.844±0.615	3.324±0.849	3.128±0.540	1.821±0.649	1.129±0.355	1.659±0.914
G3	양성률 ^A	7/8	8/8	8/8	8/8	3/8	4/8
	Ct value ^B	26.62±2.13	26.70±3.00	25.42±2.73	30.36±2.36	34.13±0.87	33.03±1.04
	EID ₅₀ ^C	2.890±0.586	2.869±0.827	3.222±0.753	1.861±0.650	0.823±0.240	1.124±0.286
G4	양성률 ^A	8/8	8/8	8/8	7/8	8/8	5/8
	Ct value ^B	28.23±1.92	26.19±1.87	25.79±1.27	30.78±1.50	33.19±1.02	33.54±0.51
	EID ₅₀ ^C	2.447±0.528	3.009±0.516	3.118±0.350	1.744±0.442	1.081±0.280	0.983±0.140
G5	양성률 ^A	8/8	8/8	8/8	7/8	5/8	0/8
	Ct value ^B	25.50±1.34	24.86±0.89	24.58±1.35	32.18±1.26	34.46±0.34	0.00±0.00
	EID ₅₀ ^C	3.199±0.370	3.375±0.244	3.451±0.372	1.358±0.370	0.730±0.093	0.000±0.000
G6	양성률 ^A	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	Ct value ^B	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	EID ₅₀ ^C	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000

A감염 수수/공격 접종수수

B구강에서의 real-time RT-PCR(rRT-PCR)< 이용하여 cycle threshold (Ct) value 평균 ± 표준편차

*P value <0.05, **P value <0.01, *** P value <0.001, Fisher's exact test 를 이용한 양성대조군 대비 유의성 분석 결과

C도출된 Ct value < EID₅₀로 변환한 값

- 총배설강으로부터 바이러스를 면봉으로 채취하여 일자 별 인플루엔자 바이러스 검출 확인 결과, 공격접종 양성대조군에 비해 시험물질 투여군에서 유의적인 감소 효과가 관찰되지 않았음.

▶SPF 닭에 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 공격접종 후 총배설강 내 AI 배출량 변화

그룹		Virus replication					
		1dpc	3dpc	5dpc	7dpc	9dpc	11dpc
G1	양성률 ^A	1/8	6/8	7/8	7/8	4/8	1/8
	Ct value ^B	34.9±0.0	25.62±5.85	21.52±5.65	25.21±5.07	30.17±2.83	34.54±0.0
	EID ₅₀ ^C	0.609±0.0	3.166±1.611	4.296±1.556	3.278±1.397	1.570±2.83	0.709±0.0
G2	양성률 ^A	0/8	7/8	8/8	7/8	5/8	2/8
	Ct value ^B	0.00±0.00	24.1±4.45	20.35±6.17	23.41±3.85	31.13±1.94	33.47±0.97
	EID ₅₀ ^C	0.000±0.000	1.585±1.227	4.617±1.7	3.774±1.06	1.647±0.534	1.003±0.266
G3	양성률 ^A	0/8	6/8	8/8	8/8	6/8	6/8
	Ct value ^B	0.00±0.00	27.8±6.3	21.18±5.8	23.56±3.96	30.85±3.52	30.27±4.52
	EID ₅₀ ^C	0.000±0.000	2.564±1.735	4.39±1.598	3.733±1.091	1.725±0.97	1.884±1.246
G4	양성률 ^A	3/8	3/8	6/8	7/8	6/8	8/8
	Ct value ^B	33.37±1.26	30.69±4.02	22.38±5.41	24.88±3.91	32.43±3.7	31.83±2.7
	EID ₅₀ ^C	1.03±0.347	1.769±1.109	4.057±1.491	3.37±1.076	1.291±1.181	1.454±0.743
G5	양성률 ^A	1/8	7/8	8/8	7/8	5/8	4/8
	Ct value ^B	33.57±0.0	24.89±5.53	19.21±1.34	24.98±3.21	30.79±2.4	32.59±2.6
	EID ₅₀ ^C	0.975±0.0	3.368±1.522	4.931±0.369	3.342±0.944	1.742±0.66	1.245±0.715
G6	양성률 ^A	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	Ct value ^B	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	EID ₅₀ ^C	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000

A 감염 수/공격 접종수

B 구강에서의 real-time RT-PCR(rRT-PCR)을 이용하여 cycle threshold (Ct) value 평균 ± 표준편차

*P value <0.05, **P value<0.01, *** P value <0.001, Fisher's exact test 를 이용한 양성대조군 대비 유의성 분석 결과

C 도출된 Ct value < EID₅₀로 변환한 값

- 기관 및 맹장편도 조직 내 일자 별 인플루엔자 바이러스 배출량 확인 결과, 공격접종 양성대조군에 비해 시험물질 투여군에서 유의적인 감소 효과가 관찰되지 않았음.

➤ SPF 닭에 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 공격접종 후 기관 (Trachea) AI 배출량 변화

그룹	양성률 ^A	Virus replication		
		3 dpc	7 dpc	11 dpc
G1	Ct value ^B	32.91±0.0	0.00±0.00	34.3±0.0
	EID ₅₀ ^C	1.157±0.0	0.000±0.000	0.775±0.0
	양성률 ^A	0/8	7/8	8/8
G2	Ct value ^B	30.18±0.0	33.63±1.17	33.56±0.0
	EID ₅₀ ^C	1.909±0.0	0.959±0.323	0.979±0.0
	양성률 ^A	0/8	6/8	8/8
G3	Ct value ^B	34.51±0.0	34.28±0.0	34.49±0.0
	EID ₅₀ ^C	0.717±0.0	0.779±0.0	0.723±0.0
	양성률 ^A	3/8	3/8	6/8
G4	Ct value ^B	34.23±0.0	34.27±0.0	0.00±0.00
	EID ₅₀ ^C	0.793±0.0	0.782±0.055	0.000±0.000
	양성률 ^A	1/8	7/8	8/8
G5	Ct value ^B	25.62±0.0	0.00±0.00	34.41±0.0
	EID ₅₀ ^C	3.167±0.0	0.000±0.000	0.744±0.0
	양성률 ^A	0/8	0/8	0/8
G6	Ct value ^B	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	EID ₅₀ ^C	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
	양성률 ^A	0/8	0/8	0/8

A감염 수수/공격 접종수수

B구강에서의 real-time RT-PCR(rRT-PCR) < 이용하여 cycle threshold (Ct) value 평균 ± 표준편차

*P value < 0.05, **P value < 0.01, *** P value < 0.001, Fisher's exact test 를 이용한 양성대조군 대비 유의성 분석 결과

C도출된 Ct value < EID₅₀로 변환한 값

➤ 조류 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 맹장편도 (cecal tonsil) AI 배출량 변화

그룹	양성률 ^A	Virus replication		
		3 dpc	7 dpc	11 dpc
G1	Ct value ^B	23.43±7.2	22.69±4.22	31.06±1.62
	EID ₅₀ ^C	3.769±1.989	3.974±1.163	1.666±0.447
	양성률 ^A	5/5	5/5	5/5
G2	Ct value ^B	25.11±6.3	19.77±1.59	30.51±1.0
	EID ₅₀ ^C	3.307±1.735	4.778±0.439	1.817±0.276
	양성률 ^A	5/5	5/5	4/5
G3	Ct value ^B	24.22±6.71	19.82±1.59	31.07±0.85
	EID ₅₀ ^C	3.551±1.847	4.764±0.439	1.664±0.235
	양성률 ^A	3/5	5/5	5/5
G4	Ct value ^B	26.98±6.09	21.78±2.49	30.46±1.33
	EID ₅₀ ^C	2.792±1.677	4.224±0.687	1.831±0.367
	양성률 ^A	3/5	4/5	3/5
G5	Ct value ^B	20.76±1.12	22.65±2.6	31.33±0.61
	EID ₅₀ ^C	4.505±0.308	3.984±0.715	1.593±0.167
	양성률 ^A	0/5	0/5	0/5
G6	Ct value ^B	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	EID ₅₀ ^C	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
	양성률 ^A	0/5	0/5	0/5

A감염 수수/공격 접종수수

B구강에서의 real-time RT-PCR(rRT-PCR) < 이용하여 cycle threshold (Ct) value 평균 ± 표준편차

*P value < 0.05, **P value < 0.01, *** P value < 0.001, Fisher's exact test 를 이용한 양성대조군 대비 유의성 분석 결과

C도출된 Ct value < EID₅₀로 변환한 값

- 공격접종 후 14 일간 임상증상 및 폐사율 관찰 결과, 바이러스를 접종한 그룹에서는 안면 종창, 사료섭취량 감소, 호흡증상 등의 임상증상 발현을 보였음. 시험물질을 투여한 네 그룹 모두에서 공격접종 후 2 일째에 유의적으로 임상증상이 감소하는 경향을 보였음.

➤SPF 닭에 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 공격접종 후 임상증상 관찰

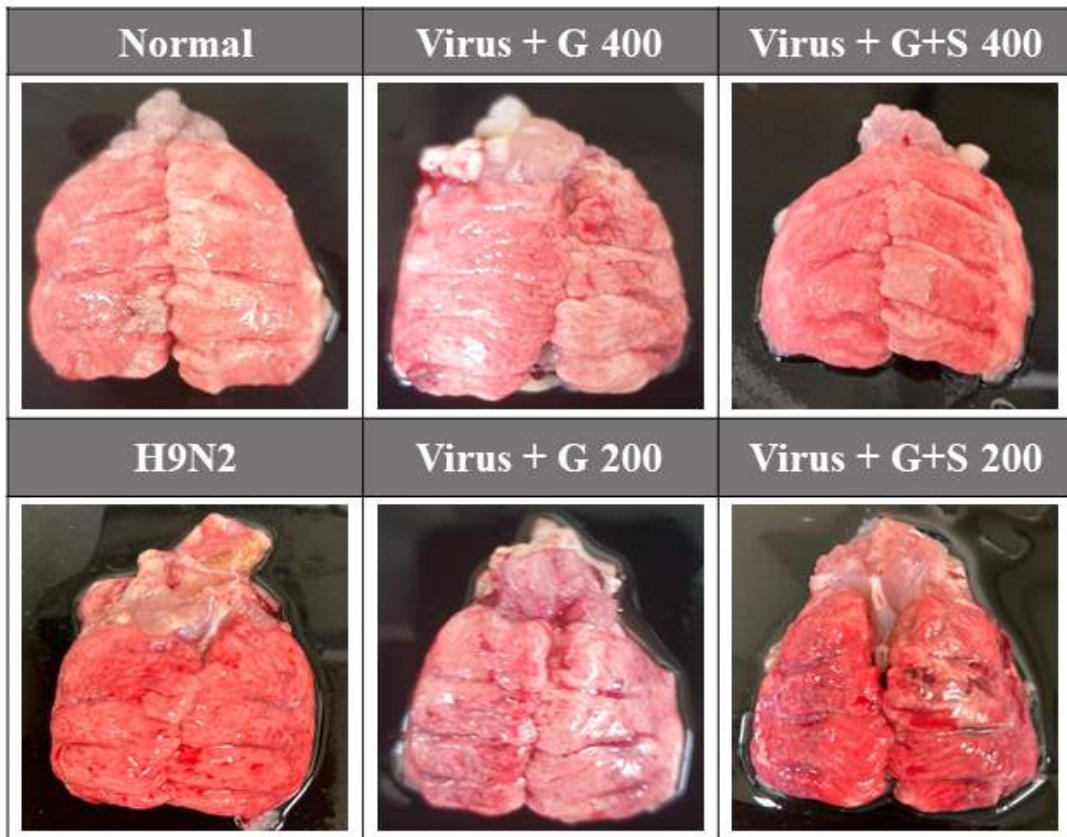
		Clinical Signs						
그룹		1 dpc	2 dpc	3 dpc	4 dpc	5 dpc	6 dpc	7 dpc
G1	임상증상	0/23 ^A	3/23 ^{**}	3/23	2/18	0/18	0/18	0/18
	폐사율	0/23 ^B	0/23	0/23	0/18	0/18	0/18	0/18
G2	임상증상	0/23	1/23 ^{***}	6/23	6/18	4/18	0/18	0/18
	폐사율	0/23	0/23	0/23	0/18	0/18	0/18	0/18
G3	임상증상	0/23	4/23 [*]	7/23	3/18	1/18	0/18	0/18
	폐사율	0/23	0/23	0/23	0/18	0/18	0/18	0/18
G4	임상증상	0/23	2/23 ^{**}	4/23	3/18	0/18	0/18	0/18
	폐사율	0/23	0/23	0/23	0/18	0/18	0/18	0/18
G5	임상증상	0/23	12/23	8/23	2/18	0/18	0/18	0/18
	폐사율	0/23	0/23	0/23	0/18	0/18	0/18	0/18
G6	임상증상	0/23	0/23	0/23	0/18	0/18	0/18	0/18
	폐사율	0/23	0/23	0/23	0/18	0/18	0/18	0/18

A 공격접종 후 임상증상을 나타낸 수수/총 수수
B 공격접종 후 폐사 수수/총 수수

*P value <0.05, **P value<0.01, *** P value <0.001, Fisher's exact test 을 이용한 양성 대조군 대비 유의성 분석 결과

- 부검 시, 바이러스 접종그룹에서는 바이러스 감염시 나타나는 미만성 간질성 폐렴을 확인할 수 있었으나 후보소재를 투여한 군에서는 농도 의존적으로 미만성 간질성 폐렴이 감소하는 것을 확인하였음.

➤ 후보 소재의 (G-sol, G+S)의 닭에서 항인플루엔자 효능평가 (부검 소견 PID11)



- 병리조직학적 검사를 수행한 결과, 바이러스를 접종한 그룹에서 폐의 림프구성 세포침윤 및 미만성 간질성 폐렴, edema 등이 관찰되었으나 시험물질을 투여한 네 그룹 모두에서 유의적으로 병변이 감소하는 경향을 보였음.

➤ 조류인플루엔자 바이러스 공격접종 후 병리조직학적 검사 결과

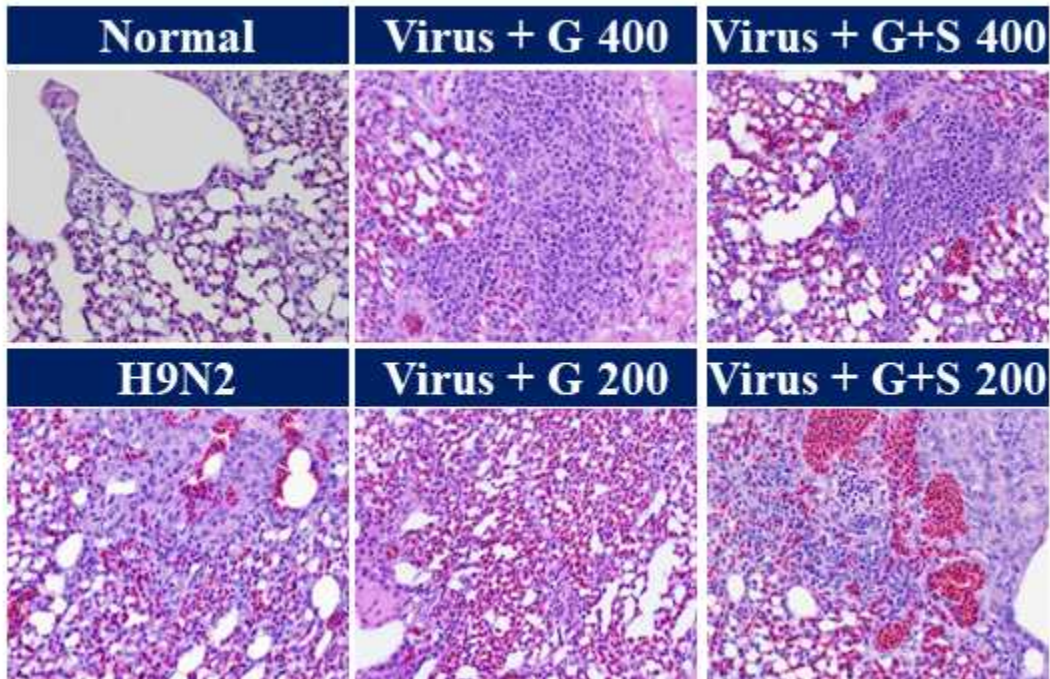
구분	조직학적 검사 (Mean ± SD) ^A	육안병변 ^B
Group 1	1.2 ± 0.6 ^{***}	0/8
Group 2	1.0 ± 0.0 ^{***}	0/8
Group 3	1.0 ± 0.0 ^{***}	0/8
Group 4	1.1 ± 0.7 ^{***}	0/8
Group 5	2.2 ± 0.4	0/8
Group 6	0.9 ± 0.3	0/8

A 공격접종 후 14일 후 폐의 조직학적 검사 결과 (0, Normal ; 1, Focal ; 2, Extensively focal ; 4, Diffuse)

B 공격접종 후 14일 후 조류인플루엔자와 관련된 육안병변을 나타낸 수수/공격접종 수수

*P value <0.05, **P value<0.01, *** P value <0.001, unpaired t-test > 이용한 양성 대조군 대비 유의성 분석 결과

➤ 후보 소재의 (G-sol, G+S-sol)의 닭에서 병리 조직학적 소견 (폐 X400)



- 이상의 결과를 종합적으로 볼 때, 바이러스 접종군에 비해 후보소재 G-sol과 G+S를 처리한 군에서 바이러스 배출량 감소는 보이지 않았지만, 임상증상의 완화와 병리조직학적 병변을 개선하는 효과를 나타냄을 확인하였음.

나. 구축된 인플루엔자 감염 마우스 모델을 활용한 효능검증

○ 실험방법

- 접종한 바이러스 : H1N1 (A/PR/8/34, 1×10^5 LD₅₀)
- 접종 동물 : 6-8주령 Balb/c 암컷 마우스
- 시험군

➤ 시험군 : 11 mouse/group

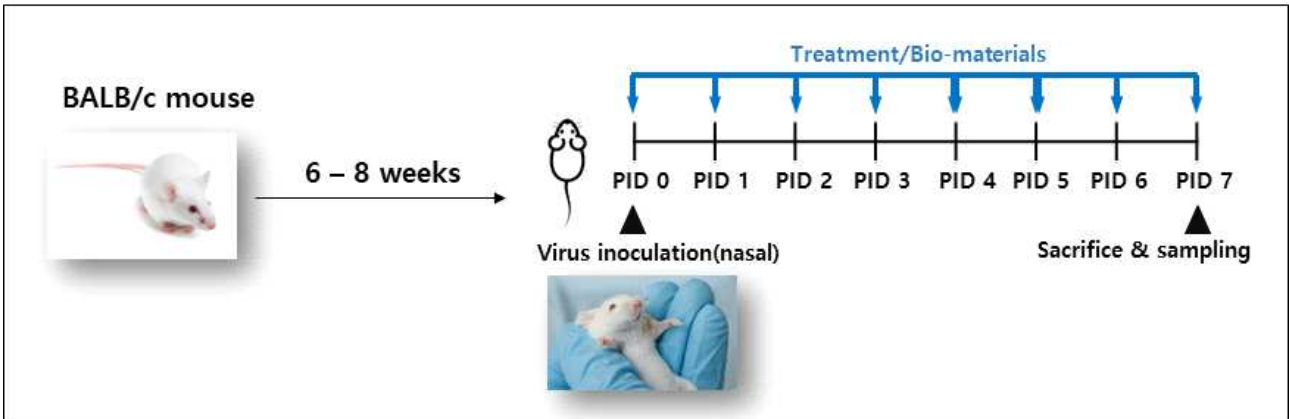
	Group 1		Group 2			Group 3			Group 4			Group 5		
후보소재	Normal control		Virus only			Virus + S-sol			Virus + G-sol			Virus + G + S		
투여량 (mg/kg/day)	PBS		PBS			100	200	400	100	200	400	100	200	400
투여마리수	11		11			11	11	11	11	11	11	11	11	11

- 실험방법 : 6-8주령의 SPF 마우스에 인플루엔자 바이러스를 100 uL 씩 비강으로 접종 후, 4시간 후부터 고도화된 후보소재를 100 mg/kg/day, 200 mg/kg/day, 400 mg/kg/day를 각각 구강투여로 총 7일간 물질을 투여하였음.
- 1) 바이러스 접종 후 1일령, 3일령, 5일령, 7일령에 몸무게 변화, 임상증상 관찰 및 폐

사시 부검을 수행하였음.

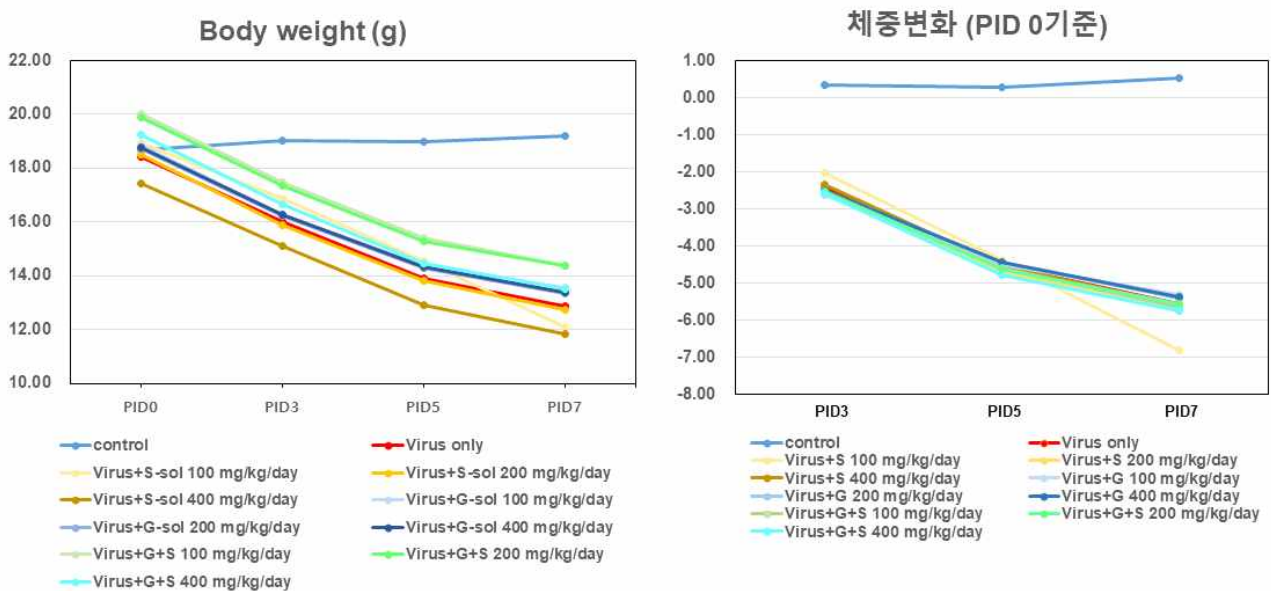
- 2) 실험동물의 부검은 바이러스 접종바이러스 접종 후 폐사 또는 실험 종료시 안락사 시켜 바로 부검을 수행하였고, 조직에서의 육안적 변화를 검사하고 기록함. 부검시 폐를 채취하여 real-time RT-PCR 검사를 수행하였음.

➤ 마우스에서 후보소재 투여에 의한 항인플루엔자 효능 실험



○ 실험결과

- 바이러스 감염 후 1, 3, 5, 7 일에 마우스의 몸무게를 측정하였음. 그 결과 바이러스를 접종하지 않은 음성 대조군은 일령이 증가함에 따라 몸무게도 증가하는 양상을 보였음. 하지만 바이러스를 접종하고 치료제를 투여하지 않은 양성 대조군의 경우 7일 후에는 평균 12.85 g으로 약 6 g 이상 몸무게가 감소하는 것을 보였음. 후보소재를 투여한 그룹의 경우도 모두 감염 후 7일까지 바이러스 접종 군과 거의 동일하게 몸무게가 감소하는 양상을 나타내었음.



[인플루엔자 바이러스 감염 후 후보소재를 투여한 마우스의 체중변화]

- 또한, 바이러스 감염 후 물질 비투여군에 비하여 후보소재 투여군에서의 임상증상(털이

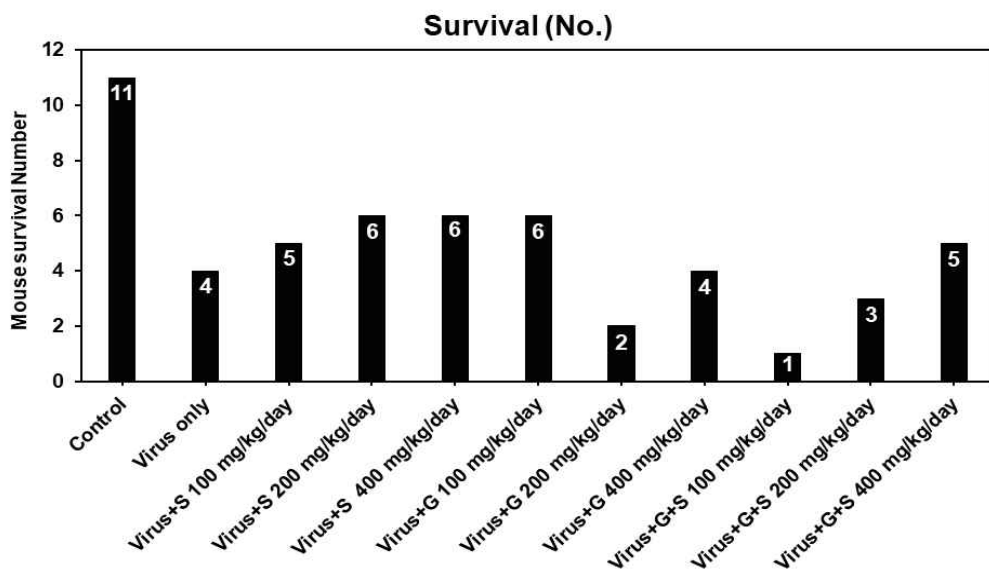
거칠고, 눈을 감고 모였으며 자극에 대한 반응이 느려짐, 균집현상, 체중감소, 몸의 떠림 등이 약간 감소되어 보였으나 큰 차이는 없었음.

➤ 후보 소재의 (S-sol, G-sol, G+S-sol)의 마우스에서 항인플루엔자 효능평가 (임상증상 PID5)



[인플루엔자 바이러스 감염 후 후보소재를 투여한 마우스의 임상증상]

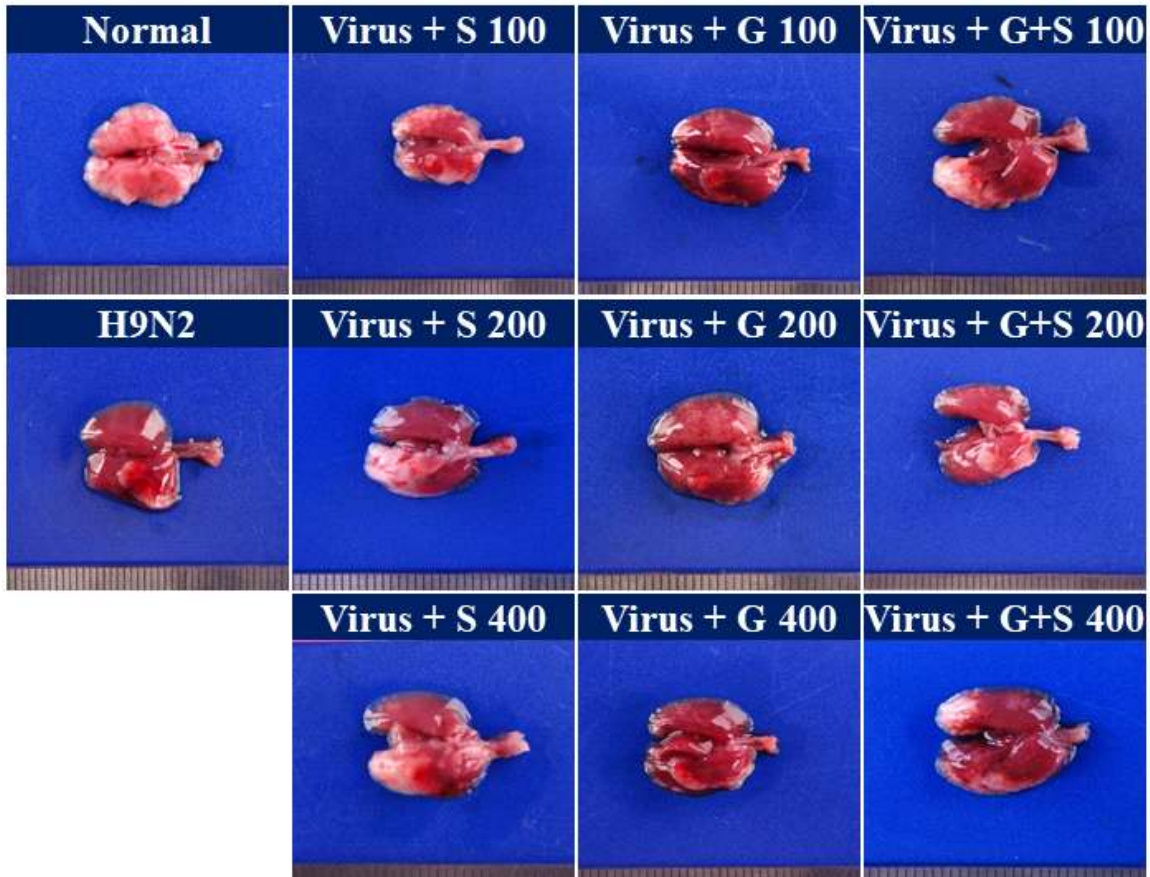
- 바이러스 접종군은 바이러스 접종 후 7일에 11마리 중 4마리의 생존율을 보였으며, 후보 소재의 경우 농도 의존적으로 생존율의 증가가 보였으나 물질 비투여군과 투여군 사이의 큰 차이는 보이지 않음.



[인플루엔자 바이러스 감염 후 후보소재를 투여한 마우스의 생존율]

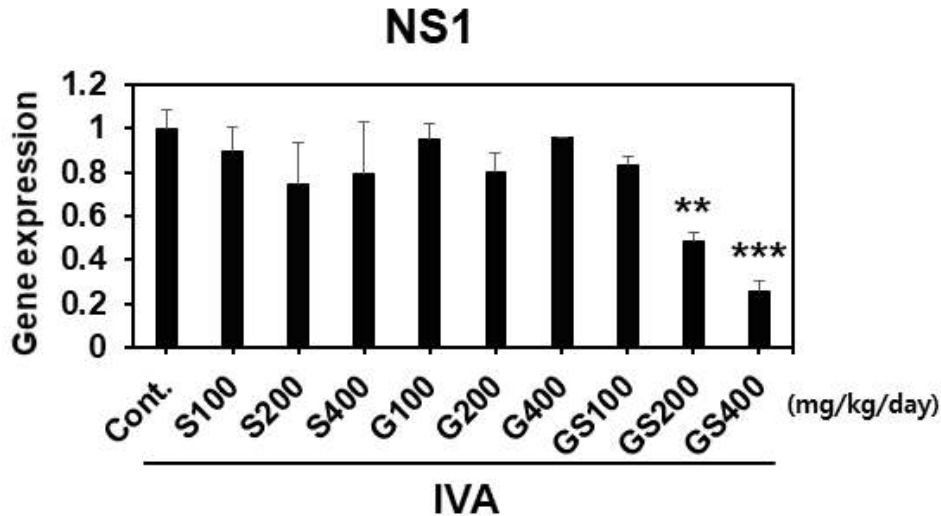
- 폐사 또는 실험 종료 후 마우스를 부검하여 인플루엔자의 주요 타깃 장기인 폐의 육안적 검사한 결과, 바이러스 감염후 비투여군에서는 전형적인 심한 간질성 폐렴을 나타내었음. 바이러스 감염 후 후보소재 G-sol을 투여한 그룹에서는 바이러스 집종균과 같이 모든 폐엽에서 간질성 폐렴이 나타남. 하지만, G+S 복합체를 투여한 그룹에서는 폐엽에 따라 간질성 폐렴이 개선되는 양상을 보였음.

▶ 후보 소재의 (S-sol, G-sol, G+S-sol)의 마우스에서 항인플루엔자 효능평가 (부검 소견 PID7)



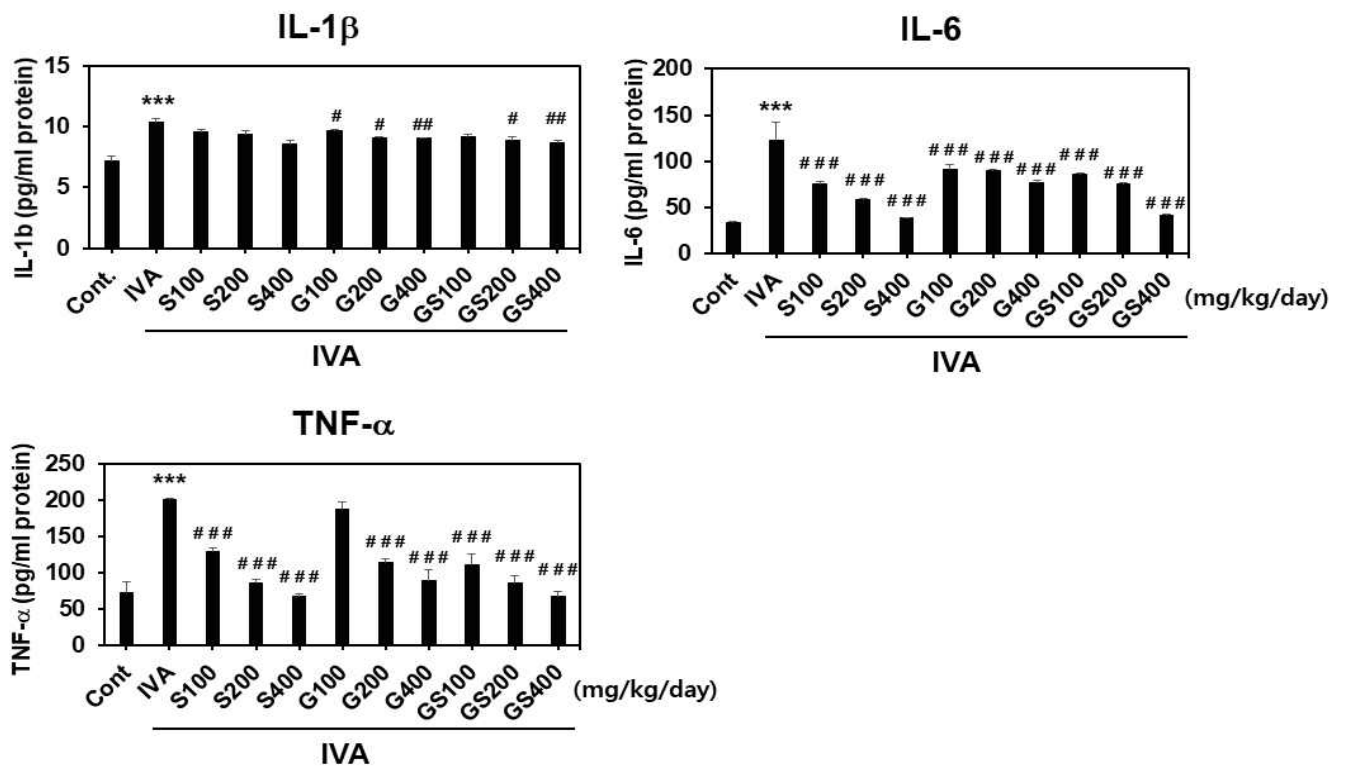
[인플루엔자 바이러스(H1N1) 감염 후 비투여군과 후보소재 투여군의 마우스에서의 폐 사진]

- 폐사 또는 실험 종료 후 마우스를 부검하여 인플루엔자의 주요 타깃 장기인 폐를 채취하여 폐 조직을 균질화하고, 원심분리한 상층액에서 RNA를 추출한 후 인플루엔자에 특이적인 primer pair를 이용하여 real-time RT-PCR 기법으로 바이러스 배출기간을 검사하였음. 그 결과, 바이러스 감염 후 물질 비투여군에 비하여 후보소재 S-sol과 G-sol 투여군은 바이러스 배출량이 감소가 미미하였음. 하지만, G+S 투여군의 경우 농도 의존적으로 바이러스 배출량이 감소하는 것을 확인함. 특히, G+S 200 mg/kg/day 과 400 mg/kg/kg을 투여군의 경우 바이러스 배출량이 현저히 감소함을 확인하였음.



[인플루엔자 바이러스감염 후 후보소재 투여군의 마우스에서의 폐에서 real-time RT-PCR에 의한 바이러스 복제 결과]

- 폐사 또는 실험 종료 후 마우스를 부검하여 인플루엔자의 주요 타깃 장기인 폐를 채취하여 폐 조직을 균질화하고, 원심 분리한 상층액에서 대표적인 사이토카인 측정 (TNF- α , IL-6, IL-1b)을 위한 ELISA 검사를 수행하였음. 그 결과, 바이러스 감염군에 비해 바이러스 감염후 후보소재 투여군에서 모두 농도 의존적으로 사이토카인이 감소하는 경향을 나타내었음. 특히 G-sol 단독투여보다는 G+S 복합체를 투여한 군에서 현저히 사이토카인 발현이 저해됨을 확인하였음.

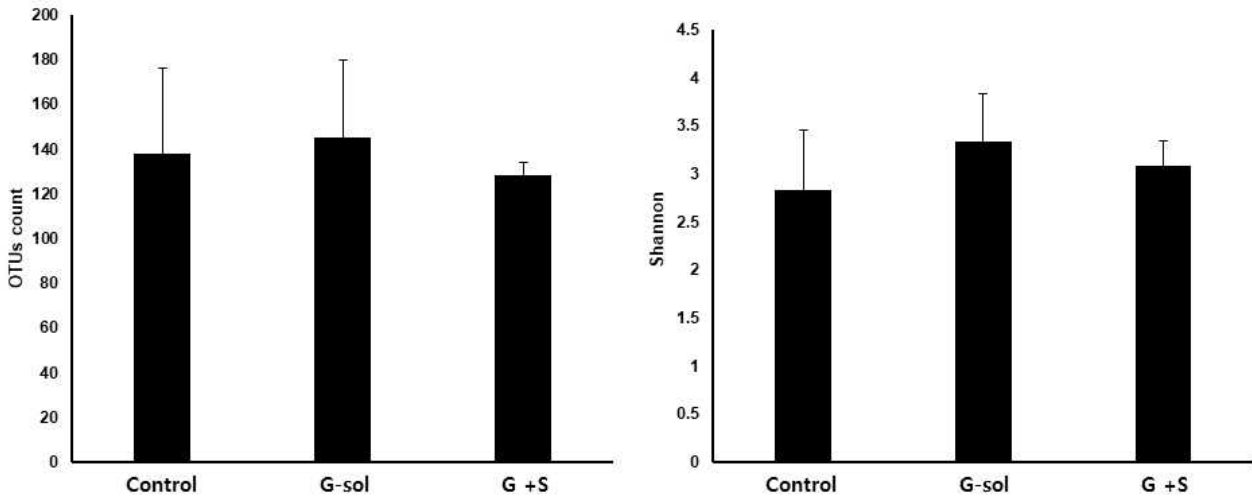


[바이러스감염 후 후보소재 투여군의 마우스에서의 폐에서 사이토카인 ELISA 검사 결과]

2-4. 후보소재의 장내 마이크로바이옴 변화

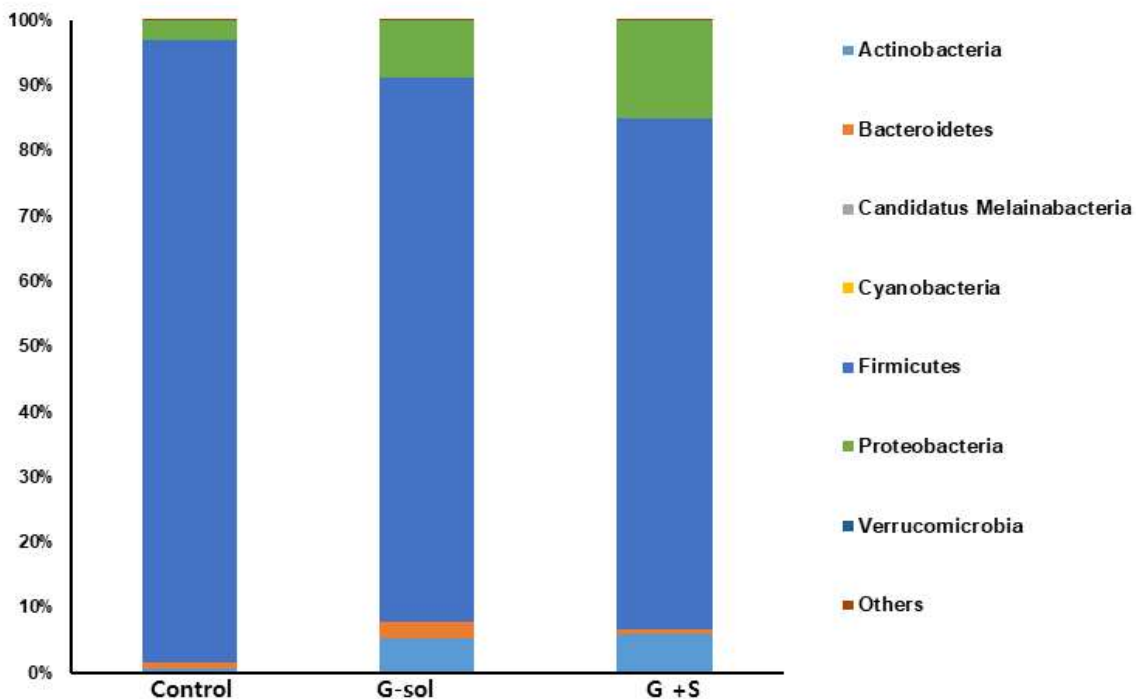
가. 후보소재의 닭 장내 마이크로바이옴 변화에 따른 효능평가

- 물질처리에 의한 닭의 장내 미생물 변화를 관찰함. G sol 단일처리와 G sol, S sol 함께 처리하였을 때, 장내 미생물의 풍부도와 다양성이 물질 처리에 크게 영향을 받지 않는 것을 확인함.



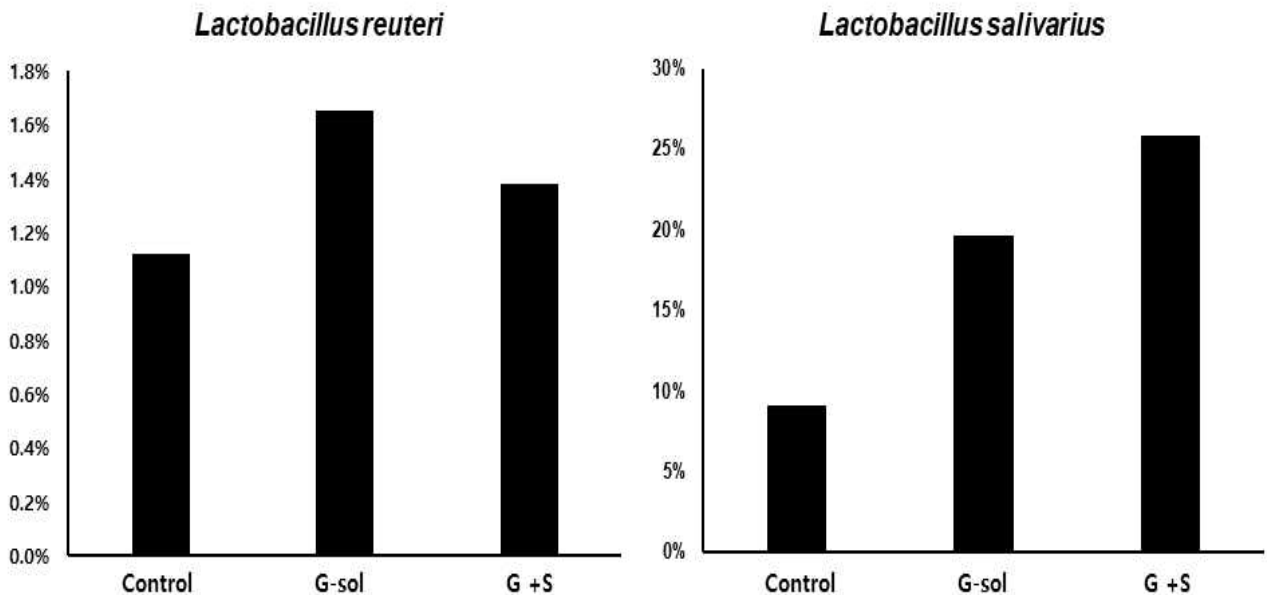
[장내 미생물 Richness and Diversity 분석]

- 물질처리에 의한 미생물 균총 변화를 분석함. 그림 2에서 보는 바와 같이 모든 그룹에서 Firmicutes가 우점종으로 나타남. 또한 물질처리에 의해 Firmicutes가 감소하고 Proteobacteria와 Actinobacteria가 증가함.



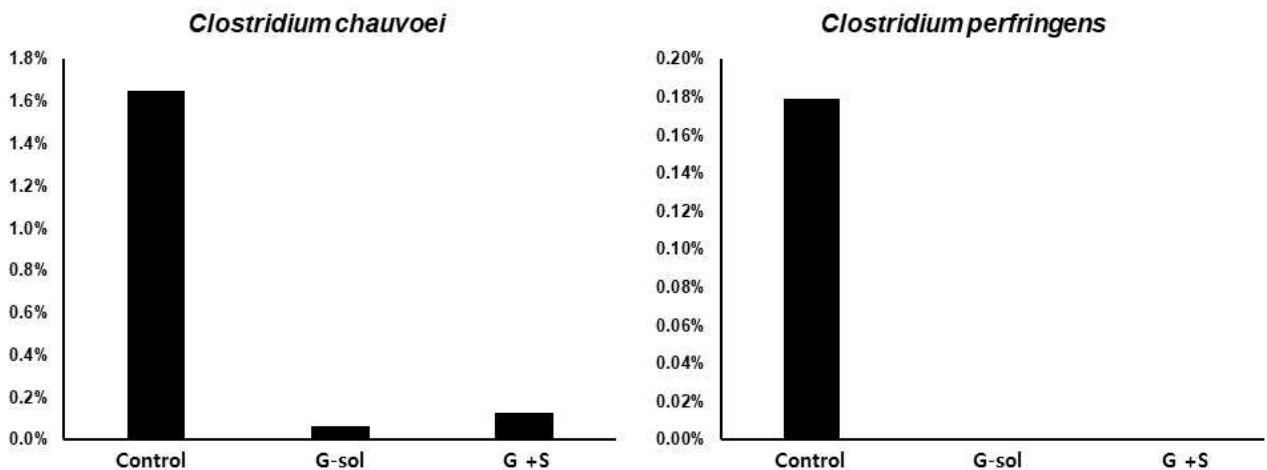
[대조군과 실험군의 Phylum 수준에서 분변 세균총 비교]

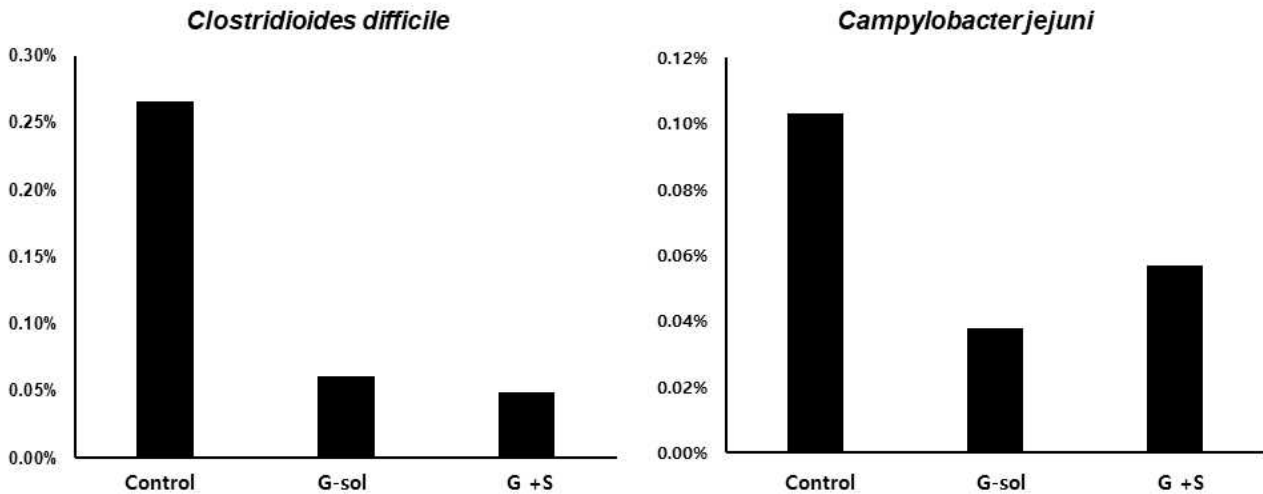
- 물질 처리에 의해 변화하는 장내 미생물 균총을 자세히 관찰하기 위해 더 낮은 수준의 (genus 및 species) 계통학적 분석을 함. 그림 3에서와 같이 식약처 프로바이오틱스 고시종에 해당하는 *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius* species들의 변화가 관찰됨. G sol 단일처리와 G + S 혼합 소재에 의해 *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*의 population이 증가됨을 확인함.



[물질처리 시 증가되는 유익균 분석]

- 뿐만 아니라 그림 3에서와 같이 가축전염병예방법 기타지정에 해당하는 유해균인 *Clostridium chauvoei*, *Clostridium perfringens*, *Clostridioides difficile*, *Campylobacter jejuni* species들의 변화가 관찰됨. 모두 물질처리에 의해 population이 감소됨을 확인함.



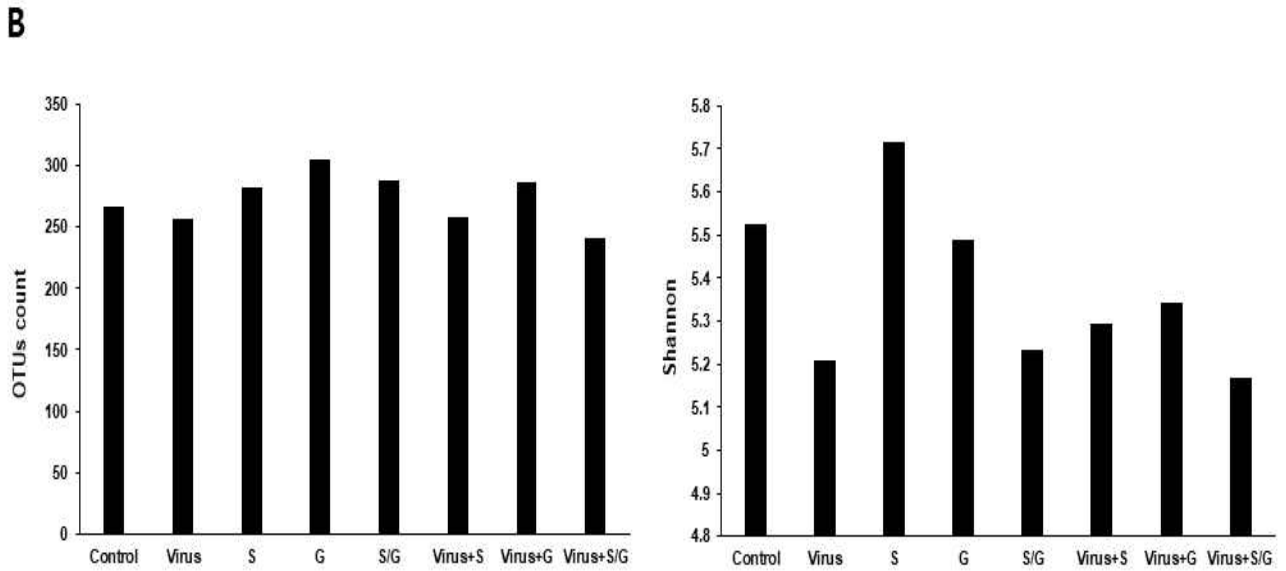
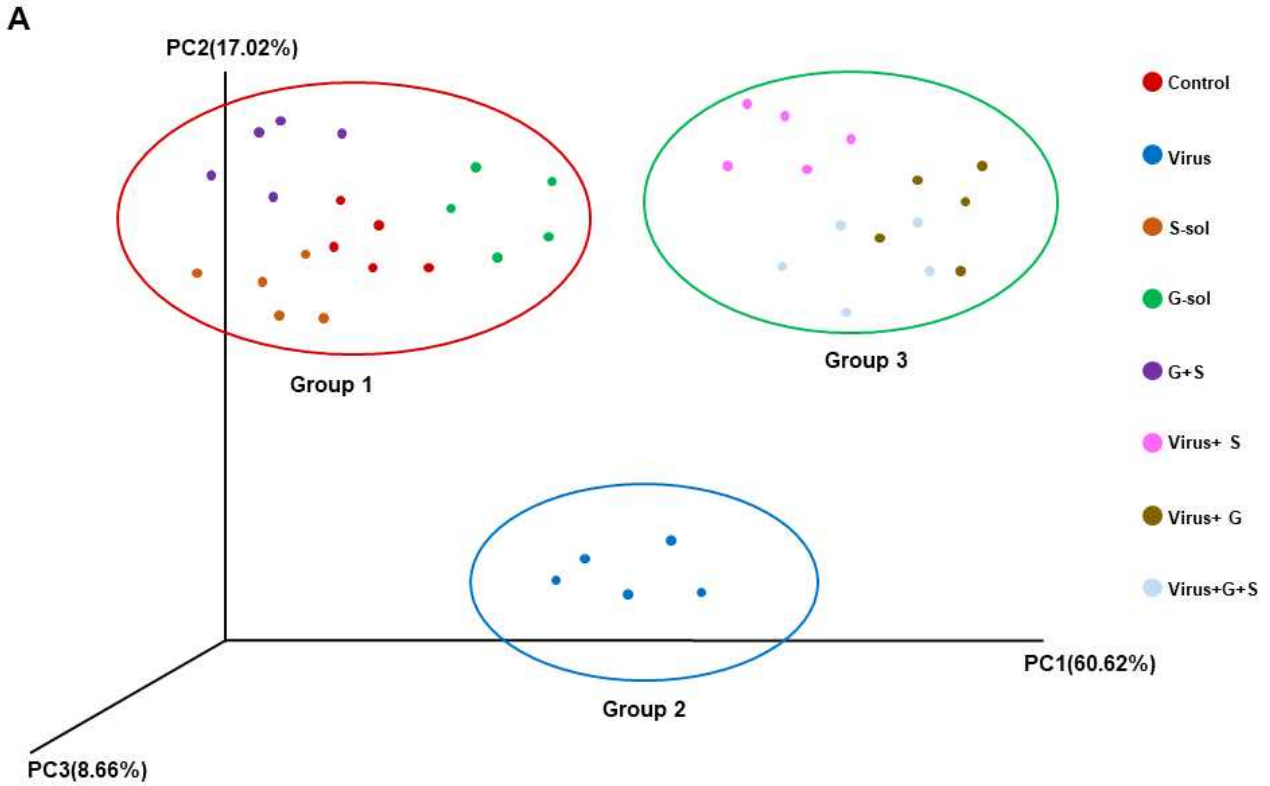


[물질처리시 감소되는 유해균 분석]

- 결론적으로, 물질처리시 닭의 장내 미생물 변화를 관찰하기 위해 닭의 분변을 이용하여 장내 세균총 분석을 한 결과 물질처리에 의해 닭의 장내 미생물의 풍부도와 다양성에 크게 영향을 주지 않았고, 유익균에 해당하는 미생물 증가와 유해균 미생물이 감소함을 확인하였음.
- 따라서 물질처리에 의해 장내 미생물의 풍부도와 다양성에 영향을 주지 않고 유익균 증가와 유해균 감소를 보이므로 두 물질의 처리는 닭의 건강한 장내 세균총 유지에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보임.

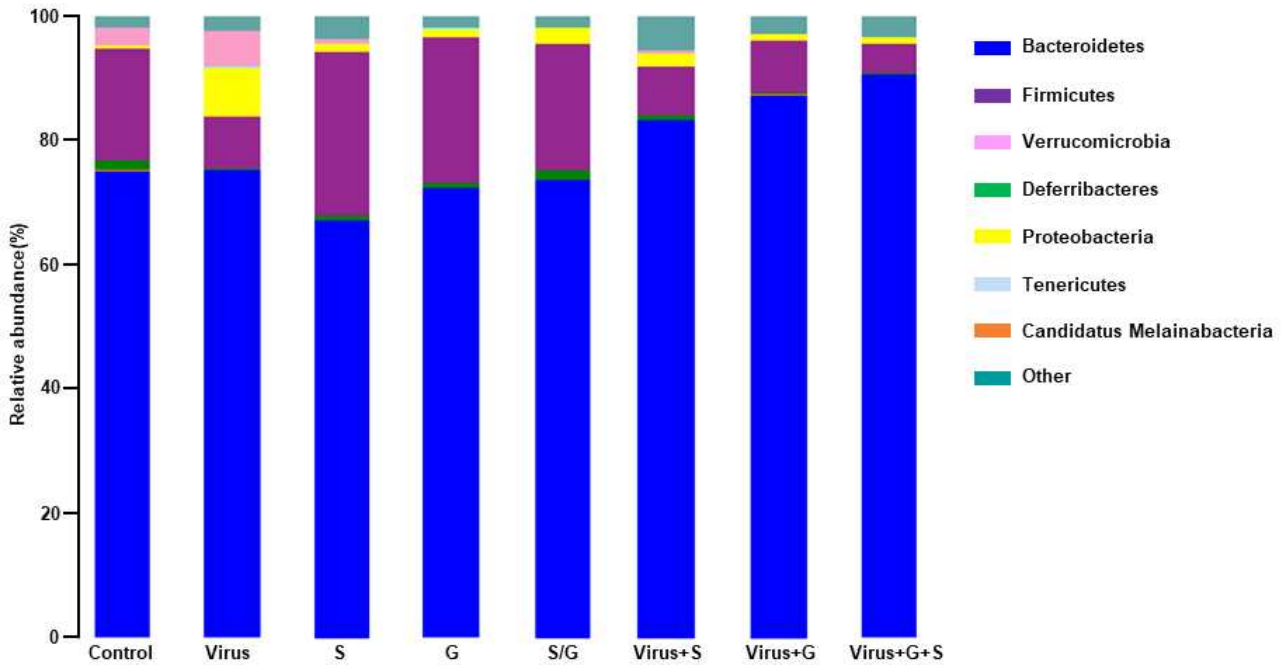
나. 후보소재의 마우스 장내 마이크로바이옴 변화에 따른 효능평가

- Influenza 바이러스 감염은 장내 미생물 변화를 초래하여 장내 염증반응을 유발함으로써 병을 악화 시킨다고 보고됨. 따라서 바이러스 감염과 물질에 의한 감염 치료에 따른 장내 미생물 변화를 관찰함. 그림 1에서와 같이 보고된 내용처럼 바이러스 감염에 의해 장내 미생물 조성 변화뿐만 아니라(그림 A, Group1= no virus, Group2= virus, Group3= virus + 물질) 미생물 양과 다양성 변화도(그림 B) 일어남을 확인함. 그리고 이러한 변화는 물질 처리에 의해 다시 변화됨을 관찰함으로써 물질 처리에 의한 감염 치료가 물질에 의한 장내 미생물 변화도 관여함을 예상함.



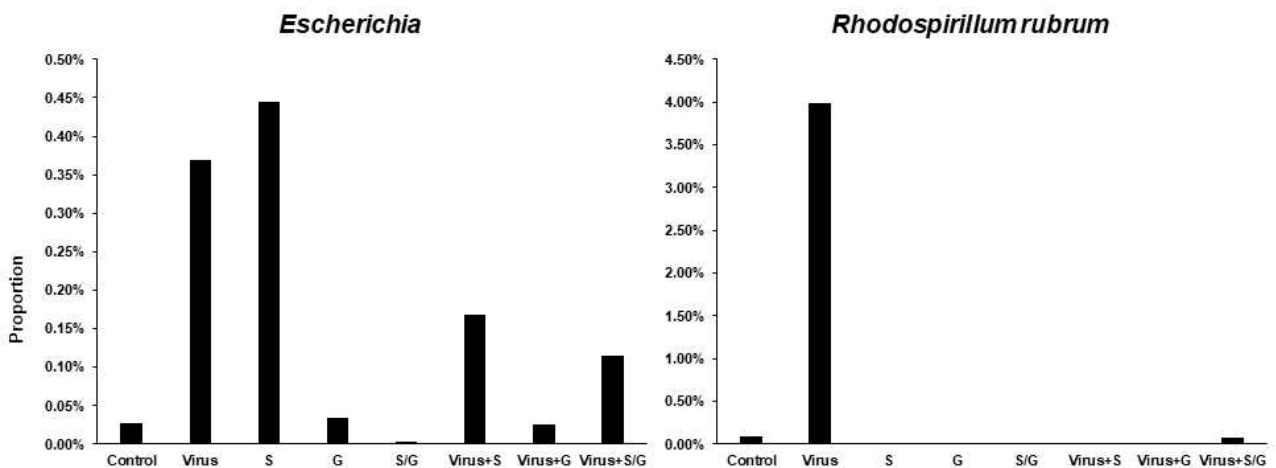
[장내 미생물 PCA 분석 및 Richness and Diversity 분석]

- 이러한 변화를 좀 더 자세하게 분석하기 위해 실험한 사용한 8개 집단의 세균총을 분석함. 그림 2에서 보는 바와 같이 보고된 결과와 일치하게 Bacteroidetes 와 Firmicutes 가
- 마우스에 우점으로 존재함을 확인함. 그리고 보고된 결과와 같이 influenza 감염 시 유해균이 많이 포함된 Proteobacteria 가 증가함을 확인하였고, Verrucomicrobia 도 증가함을 확인함. 그리고 이러한 증가는 물질 처리(물질별 및 조합에 따른 정도 차이는 있음)에 의해 감소됨을 확임 함. 이러한 장내 미생물 변화가 물질에 의한 감염 치료에 기여했을 거라 예상됨.



[대조군과 실험군의 Phylum 수준에서 분변 세균총 조성 비교]

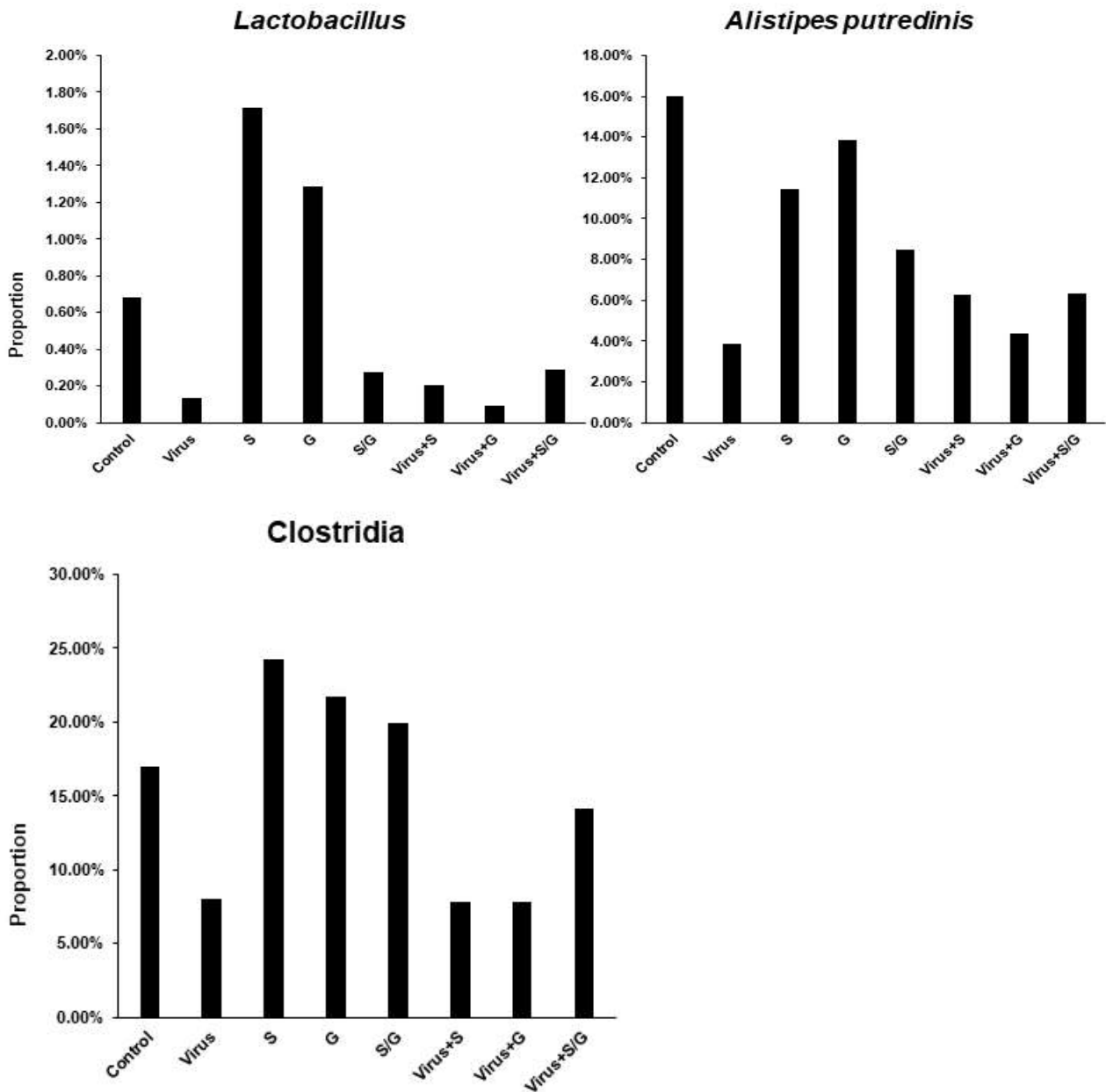
- 바이러스 감염 시 증가되어 물질 처리 시 감소되는 장내 미생물 변화 원인을 밝히기 위해 좀 더 낮은 수준의(genus 및 species) 계통학적 세균총 분석을 함. 그림 3에서와 같이 유해균으로 알려진 *Escherichia* 및 *Rhodospirillum rubrum* 미생물이 바이러스 감염 시 증가하여 물질 처리 시(물질별 및 조합에 따른 정도 차이는 있음) 이러한 증가가 감소됨을 확인함.



[인플루엔자 감염 시 증가하여 물질 처리시 감소하는 장내 미생물 분석]

- 뿐만 아니라, Influenza 감염은 유익균으로 알려진 *Lactobacillus* 와 최근 새로운 probiotic로서의 가능성이 있는 *Alistipes putredinis* 감소시키고 물질 처리는 이러한 감소를 회복시킴(물질별 및 조합에 따른 정도 차이는 있음). 그리고 장내 상피세포에 부착하여 감염체로부터 host defenses에 관여한다고 보고된 SFB(Segmented Filamentous Bacteria) 에 속하는 Clostridia 도 바이러스 감염에 감소했다가 물질 처리 시 회복됨을 확임 함(물질별 및 조합에 따른 정도 차이는 있음). 또한, 흥미로운 발견은 물질 처리만

으로도 이러한 유익균들의 증가를 확인하였음.



[인플루엔자 바이러스 감염시 감소하여 물질 처리시 증가하는 장내 미생물 분석]

- 결론적으로, 장내 세균총 분석을 통하여 Influenza 바이러스 감염에 의한 마우스에 일어나는 질병 현상에 장내 미생물의 변화도 기여함을 확인하였고, 물질 처리에 의한 질병 억제는 물질에 의한 장내 미생물 변화 회복, 즉 유해균 감소와 유익균 증가가 기여함을 예상함. 뿐만 아니라 물질 처리만으로도 유익균 증가를 확인함으로써 이 물질들의 prebiotics 가능성을 발견함.

※ 본 연구에서 발굴한 고도화 소재인 G-sol과 G+S 복합체의 항바이러스 효능 및 사이토카인 억제 기능을 확인하였으며 장내 유익균 증가 및 유해균 감소에 기여에 대한 결과는 특허 출원 준비 중에 있음.

2-5. 후보소재의 표준화

가. 원료의 규격 확인

- AI제어 고도화 면역증강 후보소재의 표준화를 목적으로 후보소재원료에 대하여 표준화를 실시함.
- 후보소재 원료는 강황, 감초, 스테비올배당체로 각각의 소재에 대하여 성상, 확인시험, 유효성분의 규격을 확인함으로써 표준화 함.
- 후보소재에 활용하려 하는 강황과 감초는 다년간의 연구 결과 면역력을 강화 시키며 항염증, 항산화 등 수많은 효능을 밝혀져 있으며, 강력한 항바이러스 효능을 가지는 약제로써 알려져 있음.

[표-1] 후보소재 원료 강황의 대한민국약전(KP) 규격

명칭	강황(薑黃) <i>Curcuma longa</i> Linné
성상	강황의 뿌리줄기로서 속이 익을 때까지 삶거나 찌서 말린 것. 특유한 냄새가 있고 맛은 쓰고 자극성이며 칩을 노랗게 물들인다.
확인시험	가루 0.5 g을 달아 황산과 에탄올 각 1 방울을 유리판에 떨어뜨려서 섞으면 적자색을 띤다.
유효성분	커큐민(Curcumin)

[표-2] 후보소재 원료 감초의 대한민국약전(KP) 규격

명칭	스테비올배당체 (Steviol Glycoside)
성상	스테비아(<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni)의 건조잎을 열수로 추출하여 얻어진 수용성추출물을 메탄올로 정제한후 건조한 것으로, 백~옅은 황색의 분말, 박편 또는 과립으로서 냄새가 없거나 또는 약간 특유한 냄새를 가지며 강한 단맛이 있다.
확인시험	0.5g을 물 100mL에 녹인 액을 시험용액으로 하고, 정량용 스테비오사이드 및 리바우디오사이드 A를 각각 5mg씩을 취하여 물 10mL에 녹인 액을 표준용액으로 한다. 시험용액 및 표준용액을 정량법의 조작조건에 따라 액체크로마토그래피를 행할 때, 시험용액의 주피크의 유지시간은 표준용액의 스테비오사이드 및 리바우디오사이드 A의 양쪽 피크의 유지시간 또는 한쪽 피크의 유지시간과 일치한다.
유효성분	스테비올배당체 (Stevioside, Rebaudioside A)

- 대한약전과 식품 및 식품첨가물공전을 기초로 후보소재원료의 규격을 확인함.

나. 후보소재 원료의 유효성분의 분석조건 확립 및 함량측정

- 후보소재 원료의 지표성분에 대하여 HPLC 장비를 활용하여 분석하였으며, 측정값은 표준품의 측정값을 토대로 유효성분 함량을 수치를 환산함.
- HPLC 분석 조건 확립

HPLC 분석 방법

- HPLC는 Agilent technology 1200 series 장비를 사용하여 분석하였으며 pump system은 binary pump, 컬럼은 Phenomenex, Gemini-NX C18, 110 Å (3 μm, 4.6 X 150mm), 이동상은 물 (A, 0.1% TFA)과 아세토니트릴(B, 0.1% TFA)을 이용하여 기울기 용리를 이용하여 분석함 (K.P. 분석법 기반 최적조건 병행).
- 분석 시료제작
 - 분석시료제작은 후보소재 원료 각각을 MeOH(HPLC grade) 1 mL 첨가하여 약 3 분간 vortexing 한다. 그 다음 MeOH의 혼합액을 취하여 0.2μm membrane filter 로 filtration 한 후 HPLC 분석한다.
- HPLC 조건 및 기울기 용리 조건
 - 커큐민(Curcumin)

<ul style="list-style-type: none"> ▪ HPLC Apparatus : Agilent technology 1200 series ▪ Pumping system : Binary pumps ▪ Detector : DAD (210 nm) ▪ Flow rate : 1.0 ml/min ▪ Sample injection volume : 10 ul ▪ Column : Phenomenex, Gemini-NX C18, 110Å, 3μm, 4.6 X 150 mm ▪ Column oven : 20 °C ▪ Flow solvent A : 0.1% TFA in Water ▪ Flow solvent B : 0.1% TFA in Acetonitrile 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Solvent isocratic condition <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Time (min)</th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Solvent A (%)</th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Solvent B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>55</td> <td>45</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">25</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">55</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">45</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	0	55	45	25	55	45
Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)								
0	55	45								
25	55	45								

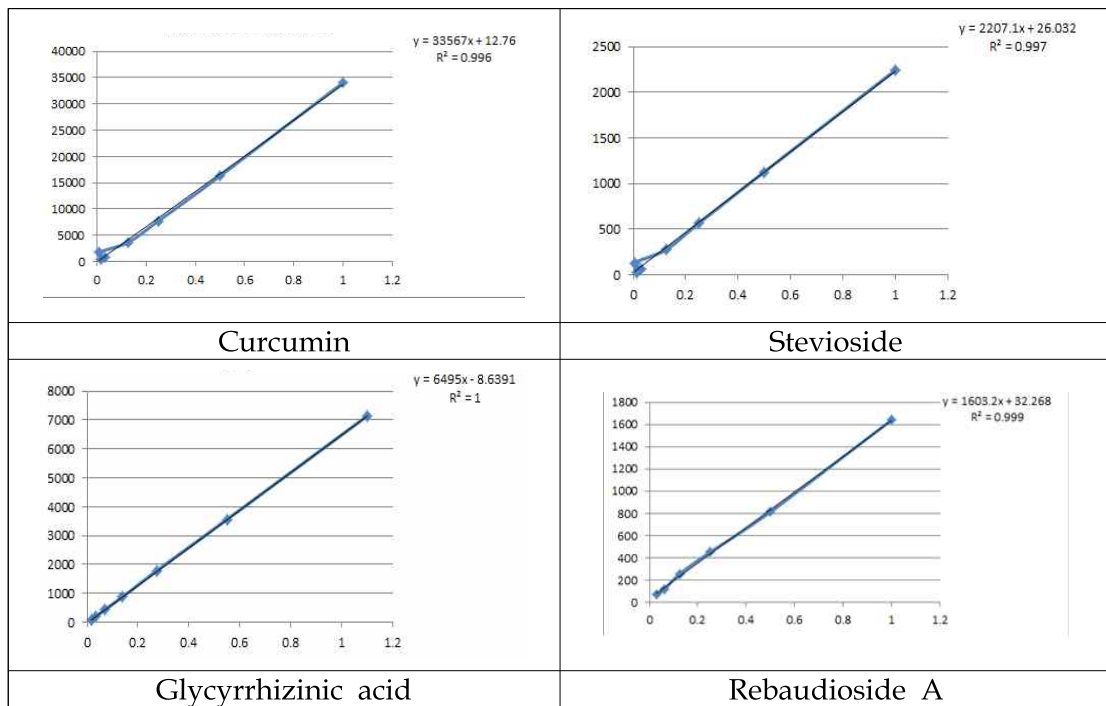
- 글리시리진산(Glycyrrhizic acid)

<ul style="list-style-type: none"> ▪ HPLC Apparatus : Agilent technology 1200 series ▪ Pumping system : Binary pumps ▪ Detector : DAD (254 nm) ▪ Flow rate : 1.0 ml/min ▪ Sample injection volume : 10 ul ▪ Column : Phenomenex, Gemini-NX C18, 110Å, 3μm, 4.6 X 150 mm ▪ Column oven : 40 °C ▪ Flow solvent A : 0.1% TFA in Water ▪ Flow solvent B : 0.1% TFA in Acetonitrile 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Solvent gradient condition <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Time (min)</th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Solvent A (%)</th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Solvent B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>35</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">40</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">60</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">40</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	0	65	35	15	65	35	20	50	50	30	50	50	35	35	65	40	60	40
Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)																				
0	65	35																				
15	65	35																				
20	50	50																				
30	50	50																				
35	35	65																				
40	60	40																				

- 스테비올배당체(Steviol glycoside)

<ul style="list-style-type: none"> ▪ HPLC Apparatus : Agilent technology 1200 series ▪ Pumping system : Binary pumps ▪ Detector : DAD (210 nm) ▪ Flow rate : 1.0 ml/min ▪ Sample injection volume : 10 ul ▪ Column : Phenomenex, Gemini-NX C18, 110Å, 3um, 4.6 X 150 mm ▪ Column oven : 40 °C ▪ Flow solvent A : 0.1% TFA in Water ▪ Flow solvent B : 0.1% TFA in Acetonitrile 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Solvent gradient condition <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Solvent A (%)</th> <th>Solvent B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>35</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	0	65	35	15	65	35	20	50	50	30	50	50	35	35	65	40	60	40
Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)																				
0	65	35																				
15	65	35																				
20	50	50																				
30	50	50																				
35	35	65																				
40	60	40																				

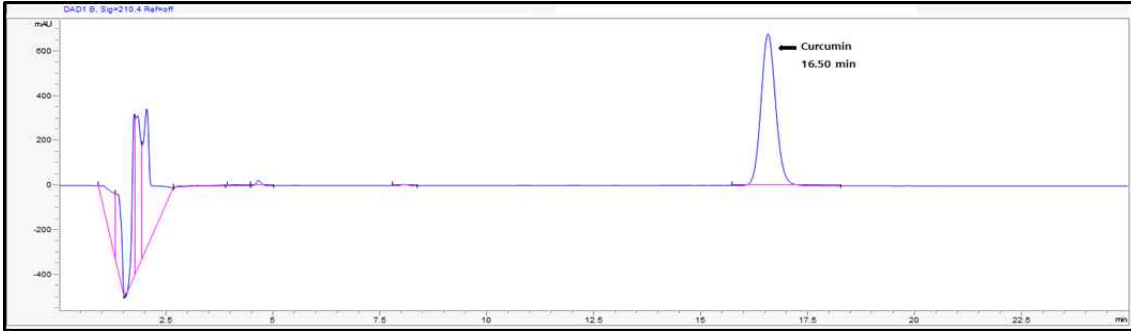
- 검량곡선



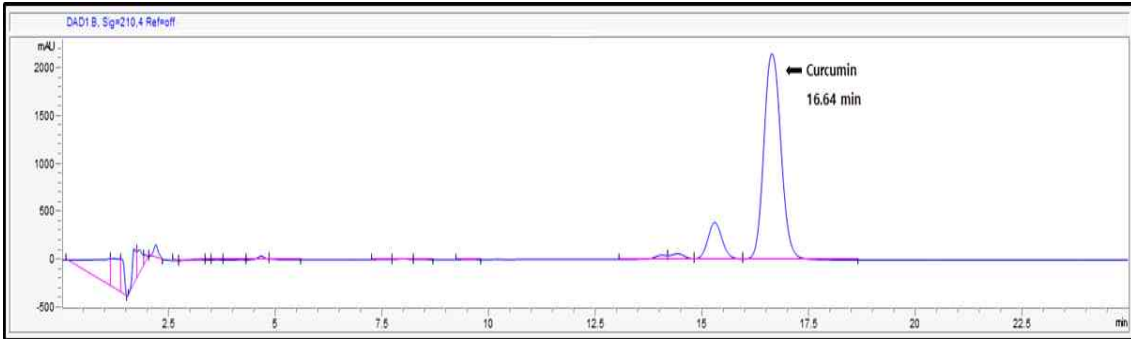
- 후보소재 원료의 정량 분석을 위하여 원료에 대한 검량선 작성: 원료 standard stock solution(1.0mg/mL)을 이용하여 용제 (HPLC용)로 희석하여 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL을 제조하였으며 이것을 autosampler (agilent, G1329A)를 이용하여 10.0 μL를 주입하여 HPLC-UVD를 활용하여 chromatogram 상에서 peak area를 기준으로 하여 검량선을 작성하였으며 표준 곡선을 바탕으로 추출물의 HPLC에서 Curcumin, Glycyrrhizic acid, Steviol glycoside(Stevioside + Rebaudioside A)를 정량함.

Coefficient of determination	
Curcumin	$Y=33567x + 12.76 / R^2(\text{correlation}) : 0.996$
Glycyrrhizinic acid	$Y=6495x - 8.6391 / R^2(\text{correlation}) : 1$
Stevioside	$Y=2207.1x + 26.032 / R^2(\text{correlation}) : 0.997$
Rebaudioside A	$Y=1603.2x + 32.268 / R^2(\text{correlation}) : 0.999$

- 후보소재 원료 강황의 커큐민과 표준품의 RT(Retention time) 비교

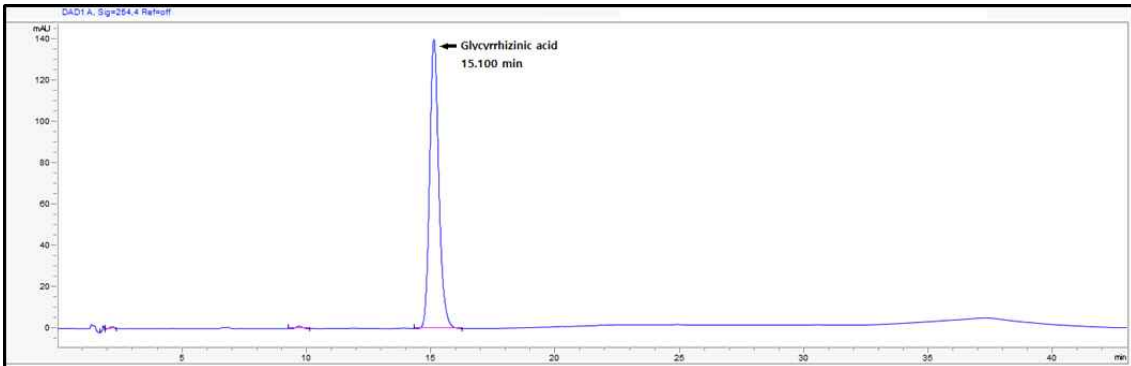


☞ Curcumin 표준품 (Standard)

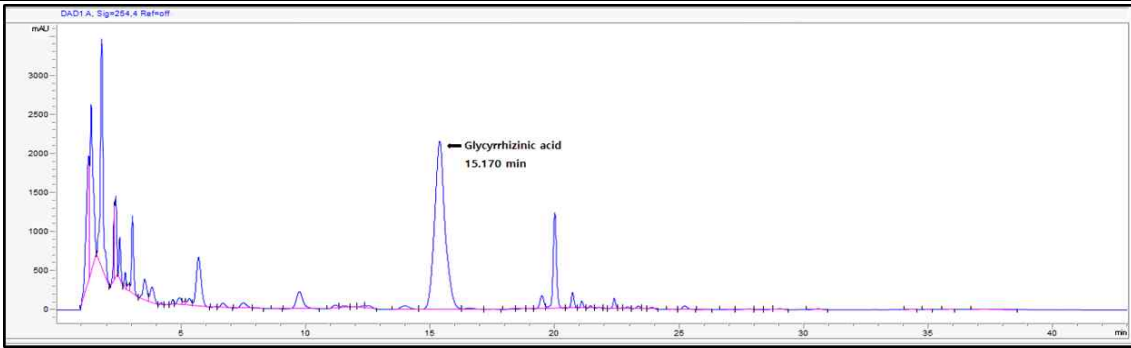


☞ 후보소재 원료 강황의 Curcumin

- 후보소재 원료 감초의 글리시리진산과 표준품의 RT(Retention time) 비교

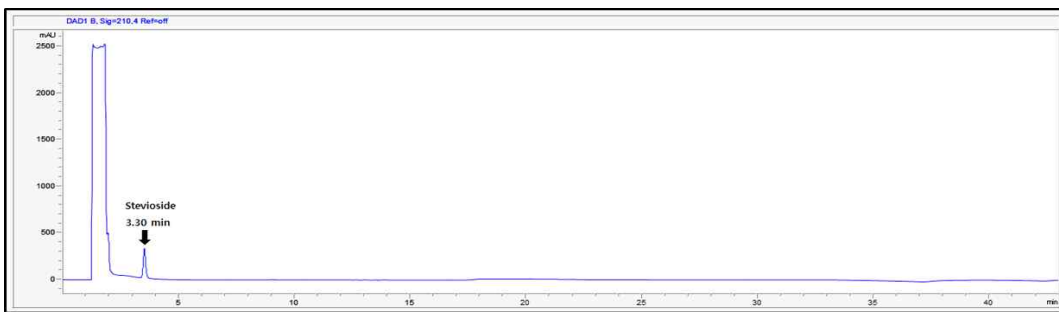


☞ Glycyrrhizic acid 표준품 (Standard)

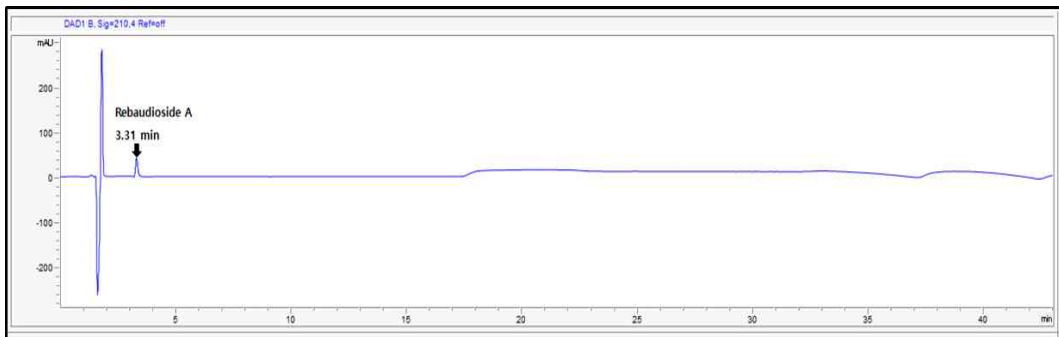


☞ 후보소재 원료 감초의 Glycyrrhizic acid

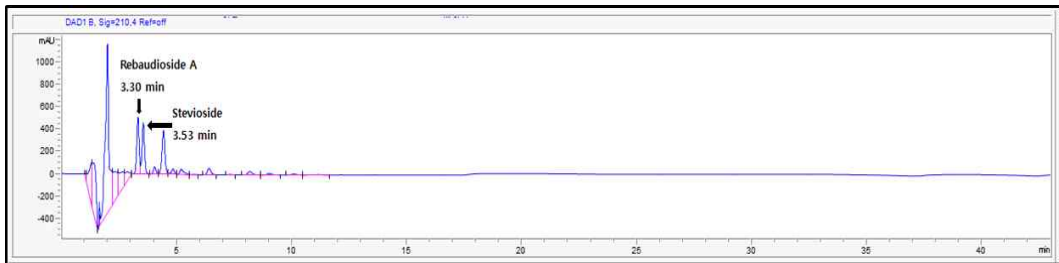
- 후보소재 원료 스테비올배당체와 표준품의 RT(Retention time) 비교



☞ Stevioside 표준품 (Standard)



☞ Rebaudioside A 표준품 (Standard)



☞ 스테비올배당체의 Stevioside, Rebaudioside A

2-6. 후보 소재의 제조공정 확립


가. 후보소재 개발을 위한 추출공정 확립

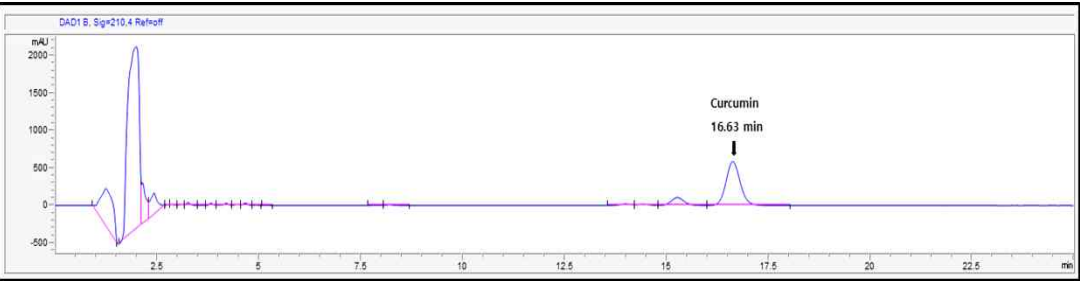
- 표준화한 후보소재 원료(강황, 감초, 스테비올배당체)를 활용하여 면역증강 후보소재를 제조하기 위하여 수용성 커큐민/감초 추출물을 함유하는 추출공정을 확립함.
- 후보소재의 생산은 난용성 물질(강황의 커큐민, 감초의 글리시리진산)의 수용화 및 추출 효율을 향상시키는 장비인 마이크로웨이브(Microwave) 추출기를 활용함.
- 마이크로웨이브 추출장비를 활용하여 다양한 반응시간과 출력으로 추출효율을 분석한 결과, 3,300W의 출력으로 1시간 동안 추출하는 조건이 가장 높은 효율을 보였음.
- 따라서, 확립된 마이크로웨이브의 추출조건을 기반으로 표준화한 후보소재원료를 사용하여 추출을 수행하였음.

																								
1. 원료측량	2. 추출가공을 위한 원료 준비	3. 마이크로웨이브를 이용한 추출																						
		<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="background-color: #FFD700;">강황추출물</th> <th style="background-color: #8B4513; color: white;">감초추출물</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>원료칭량</td> <td>원료칭량</td> </tr> <tr> <td>용해</td> <td>용해</td> </tr> <tr> <td>추출</td> <td>추출</td> </tr> <tr> <td>여과</td> <td>여과</td> </tr> <tr> <td colspan="2">↓</td> </tr> <tr> <td colspan="2">혼합</td> </tr> <tr> <td colspan="2">↓</td> </tr> <tr> <td colspan="2">살균</td> </tr> <tr> <td colspan="2">↓</td> </tr> <tr> <td colspan="2">제품 포장</td> </tr> </tbody> </table>	강황추출물	감초추출물	원료칭량	원료칭량	용해	용해	추출	추출	여과	여과	↓		혼합		↓		살균		↓		제품 포장	
강황추출물	감초추출물																							
원료칭량	원료칭량																							
용해	용해																							
추출	추출																							
여과	여과																							
↓																								
혼합																								
↓																								
살균																								
↓																								
제품 포장																								
4. 필터프레스를 활용한 정제	5. 80℃ 이상에서 온열살균	6. 후보소재 제조 공정도																						

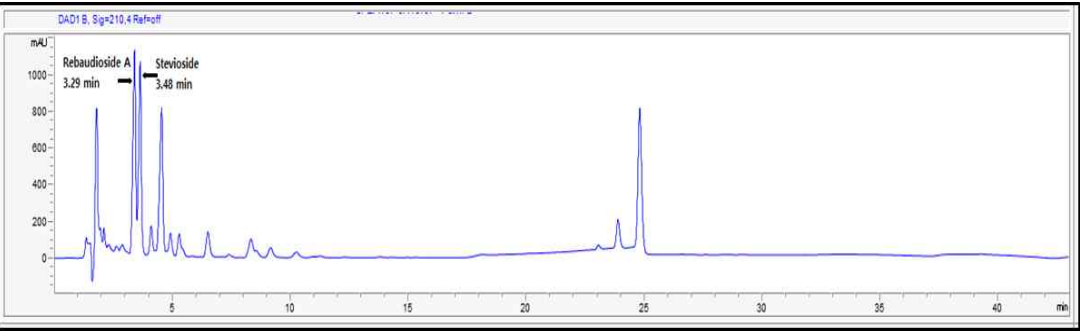
나. 후보소재 유효성분 함량 분석

- 유효성분에 대한 자체적인 함량 분석 및 외부 분석기관의 의뢰를 통하여 확인함.

 <p>강황추출물</p>	<p>성상</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 노랑색의 액체 ○ 강황의 매운향이 남. 	유효성분 함량 (g/L)	
		Curcumin	3.1
		Steviol Glycoside	110.3



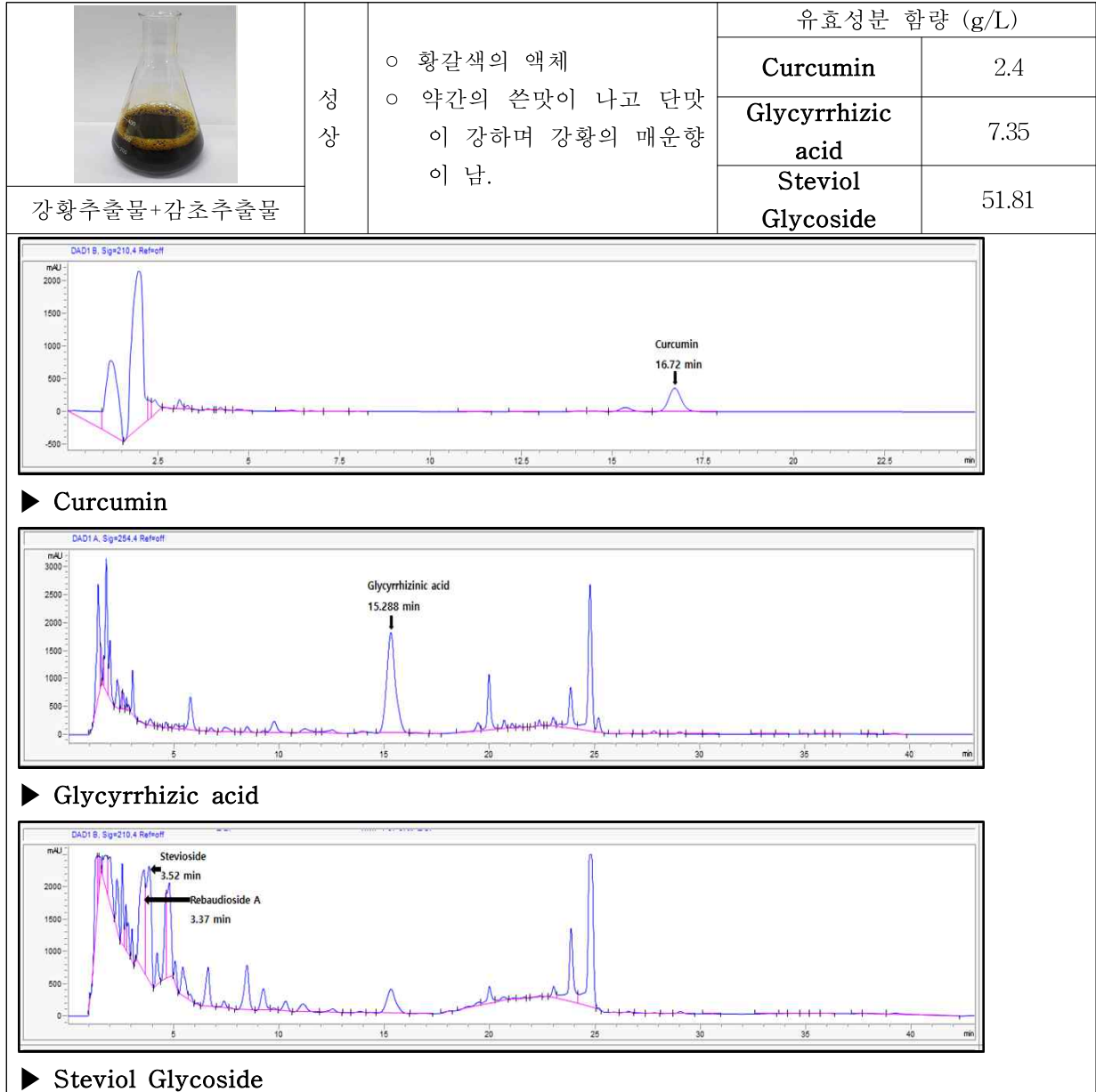
▶ Curcumin



▶ Steviol Glycoside

[강황추출물 유효성분 함량 검정]

- 마이크로웨이브 장비를 활용하여 추출된 수용성 커큐민과 감초추출물을 제조한 후 혼합하여 면역증강 후보소재를 제조함.
- 혼합 제조한 후보소재도 자체적인 함량분석 및 외부 분석의뢰로 함유된 유효성분의 수치를 확인함.



[표-3] 추출물들의 유효성분 함량의 범위

함량(g/L)	추출물 유효성분		
	강황 추출물	감초 추출물	면역증강 후보소재
Curcumin	2.7 ~ 3.3	-	2.3 ~ 2.9
Glycyrrhizic acid	-	15.5 ~ 18.5	7.0 ~ 8.5
Steviol glycoside	103.5 ~ 117.13	-	48.1 ~ 60.2

다. 후보소재의 규격화를 위한 pH 및 비중 측정

- 후보소재의 표준화를 위하여, 제조공정을 통해 3회 생산된 후보소재를 기반으로, pH 및 비중을 측정하여 규격을 확인함.
- pH와 비중측정은 ‘동물의약품 일반시험법’에 준하여 시행함.
- 측정된 pH 및 비중을 기반으로 후보소재의 표준화를 완료함.

[표-4] 후보소재 원료 및 후보소재의 pH 및 비중 측정

구 분	추출물 pH 및 비중		
	강황 추출물	감초 추출물	면역증강 후보소재
pH	4.5 ± 0.5	5.0 ± 0.5	5.0 ± 0.5
비중	10.7 ± 0.3	10.38 ± 0.3	10.54 ± 0.3




2-7. 제조공정에 따른 수율 조사

가. 면역증강 후보소재 제조공정 비교

- 마이크로웨이브 추출 장비를 활용한 생산은 8시간 기준 4회 사용이 가능하며, 1회 가동 시 25~30L 생산됨에 따라 일일 생산량은 추출기당 100~120L 정도 추출됨.
- 마이크로웨이브를 이용한 추출공정은 유효성분의 추출효율은 인정되나, 제품의 산업화 과정에서 일일 생산 용량에 제한점이 있음.
- 제조공정의 목표치는 표준화된 후보소재의 유효성분 함량 수치를 이상과 일일 생산량의 비교로 설정함.
- 각각 추출공정의 다양한 조건(반응시간과 온도 및 압력)은 추출효율이 가장 높은 조건을 수립하여 평가함.
- 공정A는 100℃에 도달 후 0.4bar이하의 압력으로 1시간, 공정B는 100℃에서 8시간, 공정 C는 100℃에서 1.2bar을 압력으로 강황 추출물은 2시간 동안, 감초추출물은 1시간동안 추출하였을 때 추출이 가장 높았음.

[표-5] 후보소재 제조공정 비교 조건

구분	공정 A	공정 B	공정 C
추출방법	마이크로웨이브 추출기	열수 추출기	고온, 고압의 추출기
온도	100℃	100℃	120℃
기압	1.4	1.0	1.2
시간 (h)	1시간	8시간	강황 추출물 : 2시간 감초추출물 : 1시간 (100℃ 도달 후)

		
공정 A. 마이크로웨이브 추출	공정 B. 열수 추출기	공정 C. 고온·고압 추출기
[후보소재 제조공정비교 추출장비 사진]		

- 각 공정별 후보소재를 제조하고 유효성분의 함량 수치와 일일 생산량을 비교함.
- 각각의 공정으로 생산한 후보소재의 유효성분 함량을 분석한 결과, 글리시리진산과 스테비올배당체의 함량은 모두 기준함량에 적합하였으나, 커큐민의 함량은 공정A와 C만이 적합한 수치로 확인됨.
- 하지만, 공정A는 일일 생산량이 100 ~ 120L 이하로 생산되는 반면, 공정 C는 대용량의 가압추출기를 적용하면 일일 1000L를 생산할 수 있을 것으로 판단함.

[표-6] 공정별 후보소재의 유효성분 함량비교

구분	커큐민	글리시리진산	스테비올배당체
허용범위(g/L)	2.3 ~ 2.9	7.0 ~ 8.5	48.1 ~ 60.2
공정 A	2.61	7.81	54.15
	2.75	7.26	51.15
	2.66	7.76	54.16
공정 B	1.82	7.95	58.24
	1.73	7.42	55.31
	1.85	7.89	56.79
공정 C	2.61	7.72	57.75
	2.75	7.58	55.56
	2.72	7.35	56.71

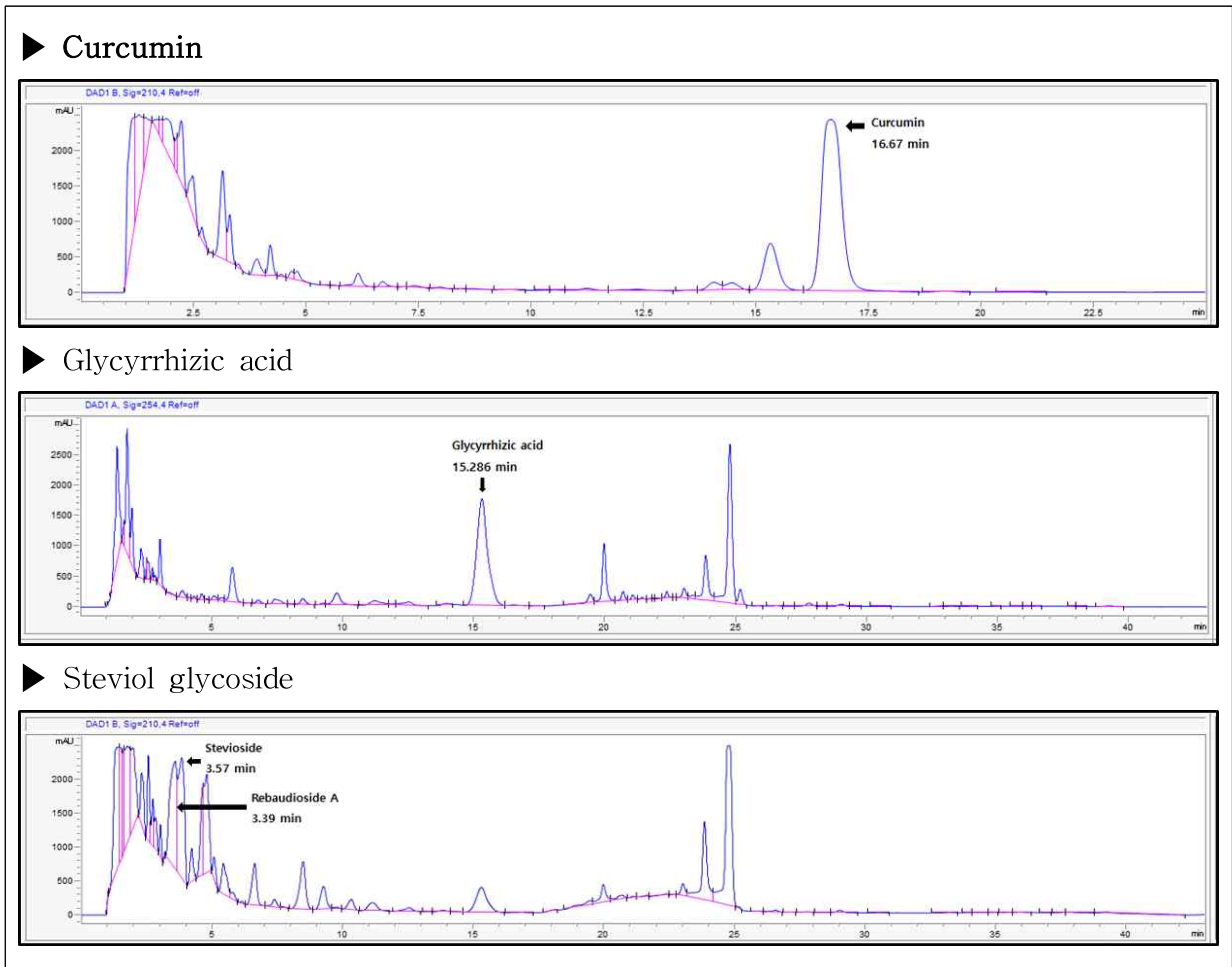
[표-7] 공정별 후보소재의 유효성분 및 일일 생산량 비교분석

구분	공정 A	공정 B	공정 C
Curcumin	적합	허용치 미달	적합
Glycyrrhizic acid	적합	적합	적합
Stevioside	적합	적합	적합
일일 최대 생산량	100 ~ 120L	1,000L	1,000L

2-8. 후보소재 생산을 위한 대량생산체계 구축

가. 대용량 가압추출기를 활용한 후보소재의 유효성분 함량 분석

- 제조공정별 수율 조사에서 확립된 공정C를 기반으로, 대용량 가압추출기에서의 후보소재를 제조한 후 유효성분의 함량을 분석하였음.



- 대용량가압추출기를 활용하여 제조된 후보소재의 유효성분 함량을 분석한 결과, 커큐민, 글리시리진산, 스테비올배당체의 함량 모두 기준함량에 적합한 것을 확인하였음.

[표-8] 대량생산시스템 적용 후보소재의 유효성분 함량

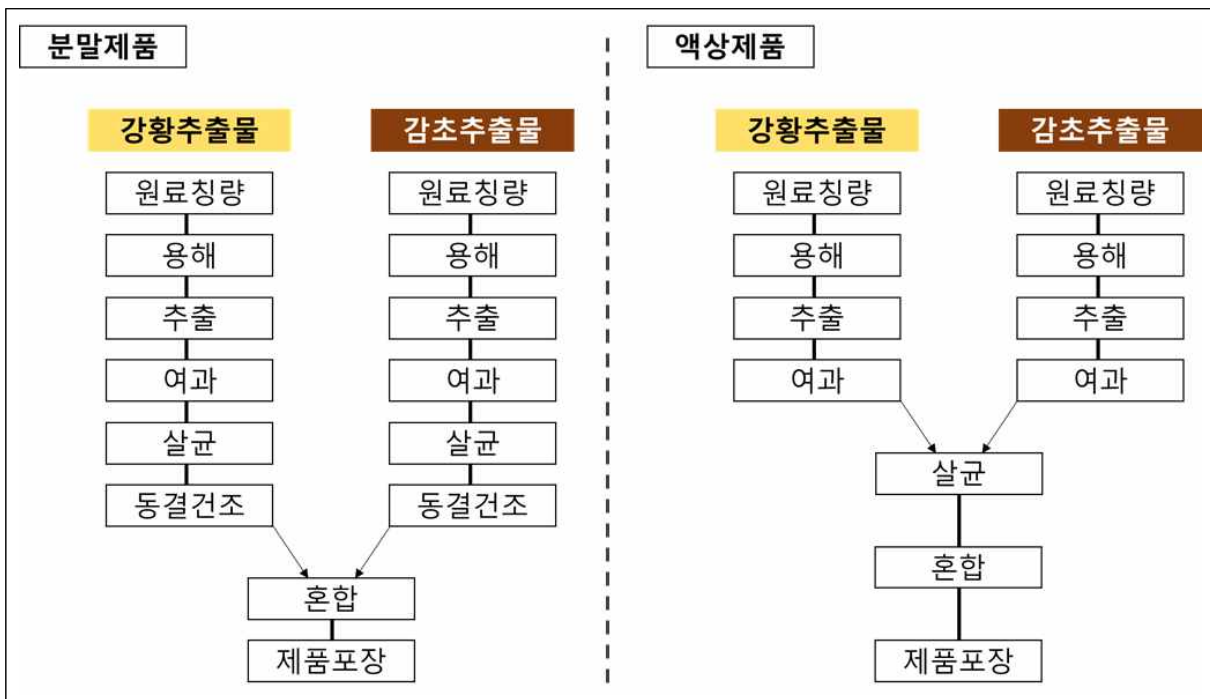
구분	유효성분 허용범위	대용량 가압 추출기
Curcumin	2.3 ~ 2.9 g/L	2.7 g/L
Glycyrrhizic acid	7.0 ~ 8.5 g/L	7.8 g/L
Stevioside	48.1 ~ 60.2 g/L	54.3 g/L

- 본 대량생산평가는 현재 1회 평가된 사항으로, 3회 이상 수행하여 반복 평가를 통해 최종적으로 대량생산체계를 구축할 예정임.

2-9. 후보소재를 이용한 시제품 제작

가. 확립된 대량생산 공정으로 면역증강제 후보소재 시제품 생산

- 면역증강제 후보소재 시제품은 액상과 분말 2가지 제형으로 시제품을 생산하려 하였음.
- 면역증강제 후보소재 시제품의 대량생산은 공정별 후보소재의 유효성분 및 일일 생산량을 비교분석하여 확립된 대용량 가압추출기를 사용하는 공정으로 생산하려 하며, 이에 대하여 생산과정에 대한 작업 표준서를 작성하려 함.
- 제작공정은 원료를 칭량하여 대용량 가압추출기로 강황추출물(반제품 1), 감초추출물(반제품 2)를 생산하고 이후 2개의 강황, 감초추출물들을 1:1로 혼합한 뒤 멸균하여 후보소재 면역증강제 후보소재 시제품을 생산함.
- 분말 제품의 경우, 액상 제품의 공정과정에 동결건조(Freeze/Dry) 공정을 추가하여 생산함.
- 포장은 생산제품의 제형에 따라 포장을 달리하며, 액상 제형은 PE 용기에 분말 제형은 파우치 팩에 담아 포장함.
- 액상, 분말 제형에 따라 각각의 시제품에 대한 공정도를 작성함.



[시제품에 대한 공정서]

1. 원재료 칭량	2. 추출가공을 위한 원재료 준비	3. 대용량 가압추출기로 추출
4. 필터프레스를 활용한 정제	5. 80℃ 이상에서 온열살균	6. 동결건조 (분말 제품)
감초추출액 액상 / 분말 제품		

[면역증강제 후보소재 시제품 생산 과정 및 액상 / 분말 제품 이미지]

- 확립된 공정으로 면역증강제 후보소재 시제품을 생산하였으며 안정성 시험을 위해 면역증강제 후보소재 시제품의 2가지 제형 모두 3회 생산하였음.

나. 시제품의 HPLC 장비를 사용한 제품의 유효성분 함량 분석방법 수립

- 면역증강제 후보소재 시제품의 유효성분 정량 및 분석방법 수립을 위하여 시제품에 함유된 원료들의 유효성분을 분석함.
- 시제품은 면역증강제 후보소재 원료인 감초와 강황을 사용하기에 글리시리진산 (Glycyrrhizic acid)과 커큐민(Curcumin)을 제품의 유효성분으로 설정하였으며 유효성분으로서 제품내 함량을 측정하려 함.
- 시제품에서 유효성분의 함량은 HPLC 분석 장비를 활용하여 측정하고자 하였으며, 분석

을 위해 성분별 유효 파장의 값, Retention time, Standard 등의 기준 값을 확립하여 시제품에 대한 유효성분 함량 분석법을 수립하였음.

HPLC 분석방법

○ 분석 시료제작

- 시제품의 분석시료제작은 시제품 2종을 MeOH로 10배 희석하여 vortexing 한다. 그 다음 시제품과 MeOH의 혼합액의 상층액 1mL를 취하여 0.2 μ m membrane filter로 filtration 한 후 HPLC 분석한다.

○ HPLC조작 조건

- 클리시리진 분석 Chromatogram Info :

equipment	HPLC - Agilent technology 1200 series
Pumping system	Binary pump (G1312A)
Detector	DAD 254 nm / Glycyrrhizin
Column	Phenomenex, Gemini-NX C18, 3mm, 4.6 x 150nm
Column oven	40
Flow rate [ml/min]	1
Flow solvent A : B	0.1% TFA in Water : 0.1% TFA in Acetonitrile (65:35)

- 커큐민 분석 Chromatogram Info :

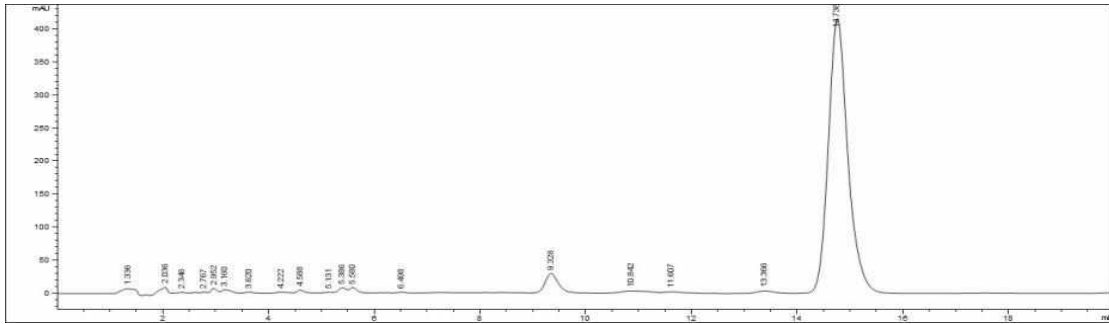
equipment	HPLC - Agilent technology 1200 series
Pumping system	Binary pump (G1312A)
Detector	DAD 380 nm / Curcumin
Column	Phenomenex, Gemini-NX C18, 3mm, 4.6 x 150nm
Column oven	30
Flow rate [ml/min]	1
Flow solvent A : B	0.1% TFA in Water : 0.1% TFA in Acetonitrile

Solvent condition:

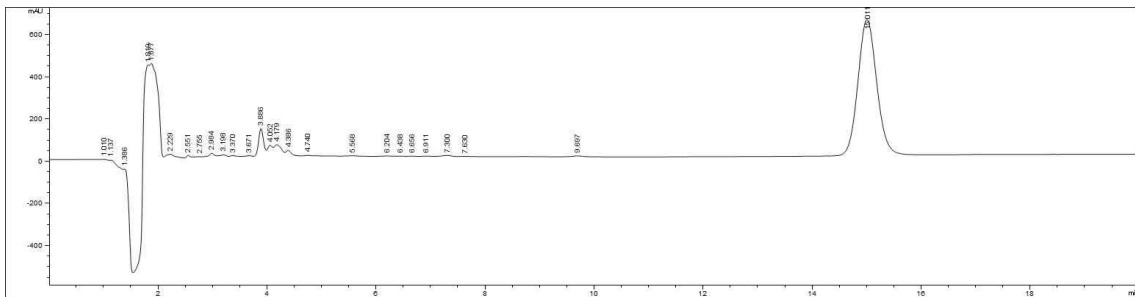
시간	A(%)	B	flow rate(mL/min)
0	70	30	1.0
10	65	35	1.0
20	55	45	1.0
30	50	50	1.0
40	30	70	1.0
50	0	100	1.0
60	0	30	1.0

○ 유효성분의 시험 용액에 대표 크로마토그램

▶ Glycyrrhizic acid



▶ Curcumin



구성 요소	정체 시간(분)
Glycyrrhizic acid	14.7
Curcumin	15.01


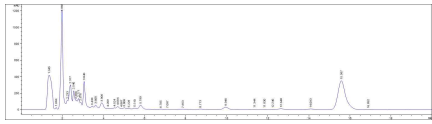
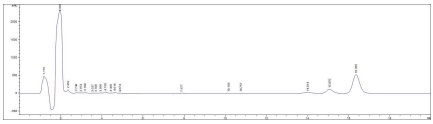

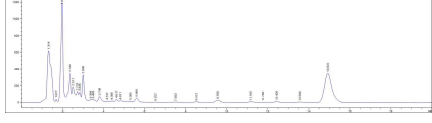
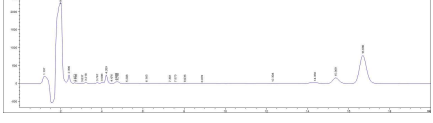
[HPLC장비를 활용한 시제품의 유효성분 함량 분석방법]

다. 면역증강제 후보소재 시제품에 대한 유효성분 함량 검정


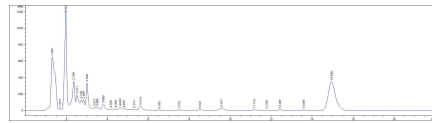
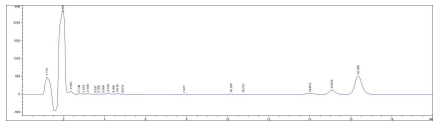

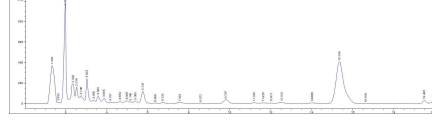
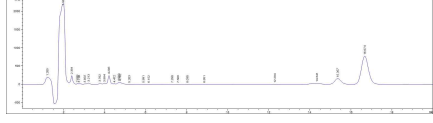
- 대량생산 공정으로 3회 생산된 면역증강제 후보소재 시제품들에 대하여 확립된 HPLC 조건으로 시제품의 유효성분 함량을 검증하였음.
- 생산된 모든 시제품에 대하여 3회 반복하여 유효성분 함량을 분석하여 평균치를 기록하였으며, 기준 함량범위 이하의 시제품이 사용되지 않도록 하였음.

액상 제형		글리시리진산 	커큐민
		글리시리진산 	커큐민

[면역증강제 후보소재 시제품 1배치의 유효성분 함량 확인]

액상 제형		글리시리진산	커큐민
			
분말 제형		글리시리진산	커큐민
			

[면역증강제 후보소재 시제품 2배치의 유효성분 함량 확인]

액상 제형		글리시리진산	커큐민
			
분말 제형		글리시리진산	커큐민
			

[면역증강제 후보소재 시제품 3배치의 유효성분 함량 확인]

- 분석 결과 고온, 고압 추출기를 활용한 3회의 공정으로 생산된 면역증강제 후보소재 시제품의 액상, 분말 2가지 제형 모두 유효성분을 기준함량(액상제형 : 커큐민-2.4g/L, 글리시리진산-7.5g/L, 분말제형 : 커큐민-9.6g/kg, 글리시리진산-30g/kg) 이상이 측정되는 것을 확인됨으로, 규격에 적합한 함량을 함유 한 것을 확인 할 수 있었음.
- 또한, 분석된 유효성분의 수치는 시제품 생산 공정 구축 및 자체 안정성 평가 그리고 기준 및 시험방법 등의 자료로 활용하였음.


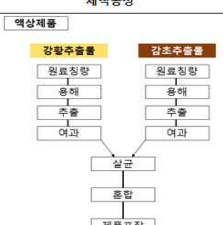
[표-9] 3배치 대량생산한 면역증강제 후보소재 시제품의 유효성분 함량 분석결과

함량	액상 제형의 시제품(g/L)			분말 제형의 시제품(g/kg)		
	1 batch	2 batch	3 batch	1 batch	2 batch	3 batch
Glycyrrhizic acid	7.63	7.8	7.72	32.5	36.9	35.1
Curcumin	2.63	2.77	2.74	11.2	10.6	10.3



라. 면역증강제 후보소재 시제품의 작업 표준서 작성

- 실질적인 생산 공정을 반영하여 작성된 공정도를 토대로 작업 표준서를 작성함으로써, 시제품의 작업 표준화를 실시함.

액상 제품

 작업표준서		결재 작성자 담당 연구소장 대표	문서분류		제조 페이지번호 1
			작성자 작성일자 2019.09.17		
작업명 후보소재 면역증강제 시제품 액상제품	원재료 감초, 감황, 스테비올배당체, 증류수	부재료 멸균 PE 용기, 스티커, 박스			
반제품 .1 1. 용기에 감황과 스테비올배당체를 칭량하여 넣는다. 2. 증류수를 투입하여 잘 섞어준다. 3. 고온고압 추출기에 투입하여 120분 동안 100°C이상의 온도에서 가열한다. 4. 추출기로 추출한 액을 정제기로 정제한다. 5. 정제된 추출액을 보관용기에 투입하여 보관한다.	반제품 혼합 1. 반제품 1과 반제품 2를 1:1의 비율로 잘 섞어준다. 2. 80°C 이상의 온도에서 30분 간 가열하여 살균한다. 3. 살균한 혼합액을 병에 1L 씩 투입하여 포장한다. 4. 캡 누수확인 후 스티커를 부착한다. 5. 완제품을 20개씩 박스에 포장한다. 6. 박스에 스티커를 부착한다.				
반제품 .2 1. 용기에 감초를 칭량하여 넣는다. 2. 증류수를 투입하여 잘 섞어준다. 3. 고온고압 추출기에 투입하여 120분 동안 110°C이상의 온도에서 가열한다. 4. 추출기로 추출한 액을 정제기로 정제한다. 5. 정제된 추출액을 보관용기에 투입하여 보관한다.	제작공정 				
관리 및 점검항목 장비 가동 전 위생상태 확인 원료 상태 확인(이물질 혼입, 변질) 보관용기 확인(보관, 위생상태)	작업 시 주의 및 유의사항 작업내용과 점검항목을 숙지 후 작업을 실시한다. 문제점 발생 시 기계가동을 중단하고 담당자에게 보고한다.				

분말 제품

 작업표준서		결재 작성자 담당 연구소장 대표	문서분류		제조 페이지번호 1
			작성자 작성일자 2019.09.17		
작업명 후보소재 면역증강제 시제품 분말제품	원재료 감초, 감황, 스테비올배당체, 증류수	부재료 멸균 파우치, 스티커, 박스			
반제품 .1 1. 용기에 감황과 스테비올배당체를 칭량하여 넣는다. 2. 증류수를 투입하여 잘 섞어준다. 3. 고온고압 추출기에 투입하여 120분 동안 100°C이상의 온도에서 가열한다. 4. 추출기로 추출한 액을 정제기로 정제한다. 5. 80°C 이상의 온도에서 30분 간 가열하여 살균한다. 6. 동결건조용 트레이에 3.5L 씩 부어 동결건조 한다. 7. 동결건조된 분말을 멸균된 파우치 팩에 담아 박스에 보관	반제품 혼합 1. 반제품 1과 반제품 2를 1:1의 비율로 잘 섞어준다. 2. 혼합된 분말을 멸균된 은박 파우치 팩에 1kg 씩 포장한다. 3. 밀봉된 파우치팩에 제품 스티커를 부착한다. 4. 완제품을 20개씩 박스에 포장한다. 5. 박스에 스티커를 부착한다.				
반제품 .2 1. 용기에 감초를 칭량하여 넣는다. 2. 증류수를 투입하여 잘 섞어준다. 3. 고온고압 추출기에 투입하여 120분 동안 110°C이상의 온도에서 가열한다. 4. 추출기로 추출한 액을 정제기로 정제한다. 5. 80°C 이상의 온도에서 30분 간 가열하여 살균한다. 6. 동결건조용 트레이에 3.5L 씩 부어 동결건조 한다. 7. 동결건조된 분말을 멸균된 파우치 팩에 담아 박스에 보관	제작공정 				
관리 및 점검항목 장비 가동 전 위생상태 확인 원료 상태 확인(이물질 혼입, 변질) 보관용기 확인(보관, 위생상태)	작업 시 주의 및 유의사항 작업내용과 점검항목을 숙지 후 작업을 실시한다. 문제점 발생 시 기계가동을 중단하고 담당자에게 보고한다.				

[2종의 시제품에 대한 작업표준서 작성]

2-10. 면역증강제 후보소재 시제품 자체 안정성 평가

가. 안정성 평가









- 과제명 [기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제 개발]에 의거하여 제조한 면역증강제 후보소재 시제품의 장기보관시험 및 가속시험을 통하여 제형의 안정성 여부를 규명하고자 함.
- 면역증강제 후보소재 시제품의 안정성 평가는 ‘동물용의약품 일반시험법’에 제시된 평가항목과 시험법에 따라 1년간(19년 11월 ~ 20년 11월) 장기보관시험 및 가속시험의 조건에 맞추어 평가되었음.

나. 안정성 평가 수행

- 액상 및 분말 제형의 시제품에 대하여 장기보관시험과 가속시험 조건에 부합하는 환경에서 평가를 수행함.
- 장기보관시험과 가속시험의 조건은 ‘동물의약품 일반시험법’에 따라 설정하였으며, 장기보존시험은 25±2℃/상대습도 40±5%, 가속시험은 40±2℃/상대습도 75±5%의 조건에 맞추어 시제품 2종에 대하여 각 3개 배치를 사용하여 평가하였음.
- 안정성 평가는 액상, 분말제형에 따라 정상 외 10개의 평가항목을 설정한 뒤 각 항목별 허용기준을 설정하여 평가되었음.
- 평가는 장기보관시험은 12개월간 개시일과 개시일로부터 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 후 총 5회, 가속시험 6개월간 개시일과 개시일로부터 2개월 4개월 6개월 후 총 4회 실시되었음.
- 12 개월간을 평가 이후 2개의 제형에 대한 장기보관 시험, 가속 시험 결과에 대한 종합결과 보고서를 작성함.

액상 제 품					
	시험개시일	3개월 후	6개월 후	9개월 후	12개월 후
분 말 제 품					
	시험개시일	3개월 후	6개월 후	9개월 후	12개월 후

[장기보관 시험 보관 제품 평가시기 별 성상]

액상 제품				
	시험개시일	2개월 후	4개월 후	6개월 후
분말 제품				
	시험개시일	2개월 후	4개월 후	6개월 후

[가속시험 보관 제품의 평가시기 별 성상]

다. 안정성 평가 결과 및 고찰

- 12개월간의 장기보관 및 가속시험 결과 세균 및 대장균은 검출되지 않았고, PH, 잔류용매 수치는 규격에 적합 하였으며, 유효성분, 성상(이취, 색, 외관 등)도 변화 없이 양호하였음.
- 평가 결과 면역증강제 후보소재 시제품에 대하여 보관방법에 대한 보존성이 확보될 수 있으며, 유통과정 중의 품질변화나 규격 부적합 사유가 발생되지 않을 것으로 판단되어 안정성에 문제점이 없을 것으로 사료됨.

액상제 품

장기보관 시험

자체 안정성 시험 종합 결과 보고서

품명	면역증강제 후보소재 시제품 역상제형	시험구분			보관조건
		자체 안정성 시험 (장기보관 시험)			온도 : 25 ± 2°C 습도 : 40 ± 5%
시험항목	내지번호 기준	1배치	2배치	3배치	
성상	갈색의 액체	적합	적합	적합	
확인시험	검역과 표준액의 피크 유지시간이 동일하다.	적합	적합	적합	
pH	4.7~5.7	5.19	5.20	5.19	
비중	1.028~1.038	1.033	1.033	1.032	
함량시험	글리시리진 산	7.87	7.73	7.68	
	커큐민	2.67	2.46	2.53	
미생물한도	세균(cfu/ml)	1.0x103 이하	적합	적합	적합
	진균(cfu/ml)	1.0x102 이하	적합	적합	적합
	특정미생물 불검출	적합	적합	적합	
내용량 시험	표시량의 100%이상	100%	100%	100%	
시험자	-	허성윤, 이성화	허성윤, 이성화	허성윤, 이성화	
확인자	-	김영민	김영민	김영민	
결론	-	적합	적합	적합	

가속 시험

자체 안정성 시험 종합 결과 보고서

품명	면역증강제 후보소재 시제품 역상제형	시험구분			보관조건
		자체 안정성 시험 (가속 시험)			온도 : 40 ± 2°C 습도 : 75 ± 5%
시험항목	내지번호 기준	1배치	2배치	3배치	
성상	갈색의 액체	적합	적합	적합	
확인시험	검역과 표준액의 피크 유지시간이 동일하다.	적합	적합	적합	
pH	4.7~5.7	5.19	5.20	5.19	
비중	1.028~1.038	1.033	1.033	1.032	
함량시험	글리시리진 산	7.62	7.91	7.79	
	커큐민	2.52	2.71	2.61	
미생물한도	세균(cfu/ml)	1.0x103 이하	적합	적합	적합
	진균(cfu/ml)	1.0x102 이하	적합	적합	적합
	특정미생물 불검출	적합	적합	적합	
내용량 시험	표시량의 100%이상	100%	100%	100%	
시험자	-	허성윤, 이성화	허성윤, 이성화	허성윤, 이성화	
확인자	-	김영민	김영민	김영민	
결론	-	적합	적합	적합	

분말제 품

장기보관 시험

자체 안정성 시험 종합 결과 보고서

품명	면역증강제 후보소재 시제품 분말제형	시험구분			보관조건
		자체 안정성 시험 (장기보관 시험)			온도 : 25 ± 2°C 습도 : 40 ± 5%
시험항목	내지번호 기준	1배치	2배치	3배치	
성상	갈색의 액체	적합	적합	적합	
확인시험	검역과 표준액의 피크 유지시간이 동일하다.	적합	적합	적합	
재제입도	18 호 (850µm 이하)	적합	적합	적합	
재제균일도	10개의 검체 함량 균일성	적합	적합	적합	
함량시험	글리시리진 산	30.2	32.8	32.1	
	커큐민	9.78	9.83	9.95	
내용량 시험	표시량의 100%이상	100%	100%	100%	
시험자	-	허성윤, 이성화	허성윤, 이성화	허성윤, 이성화	
확인자	-	김영민	김영민	김영민	
결론	-	적합	적합	적합	

가속 시험

자체 안정성 시험 종합 결과 보고서

품명	면역증강제 후보소재 시제품 분말제형	시험구분			보관조건
		자체 안정성 시험 (가속 시험)			온도 : 40 ± 2°C 습도 : 75 ± 5%
시험항목	내지번호 기준	1배치	2배치	3배치	
성상	갈색의 액체	적합	적합	적합	
확인시험	검역과 표준액의 피크 유지시간이 동일하다.	적합	적합	적합	
재제입도	18 호 (850µm 이하)	적합	적합	적합	
재제균일도	10개의 검체 함량 균일성	적합	적합	적합	
함량시험	글리시리진 산	32.5	33.7	33.1	
	커큐민	9.85	9.77	9.79	
내용량 시험	표시량의 100%이상	100%	100%	100%	
시험자	-	허성윤, 이성화	허성윤, 이성화	허성윤, 이성화	
확인자	-	김영민	김영민	김영민	
결론	-	적합	적합	적합	

[장기보관 시험, 가속시험 종합 결과 보고서]

2-11. 야외 농장에서의 면역증강제 후보소재 시제품에 대한 안전성 평가

가. 안전성 평가 목적

- 면역증강제 후보소재 시제품의 안전성을 확인하고자 현장(양계농장)에서 시제품을 투여 후 대조군과 평가군의 간의 체중변화, 임상증상, 폐사 두수를 측정함으로써 면역증강제 후보소재 시제품의 안전성 평가하고자 함.

나. 안전성 평가 계획

- 안전성 평가의 시험군의 평가그룹은 저, 중, 고 3개의 그룹으로 평가 하려 하였으며, 평가 그룹별 투여농도는 사용 권장농도를 기준으로 0.5, 1, 2배수로 설정하였음.
- 제품의 제형별 사용 권장농도는 양계의 일일 급수량과 사료섭취량을 고려하여 액상제품은 급수에 0.4% 혼합, 분말제품은 사료에 0.1%로 혼합하는 것으로 결정하였으며, 액상제형은 급수에 분말제형은 사료에 혼합하여 평가하려 함.
- 안전성 평가의 분류군별 마릿수는 건강한 양계(주령) 1050두를 각 분류군별 150두씩 대조군, 액상제형 시험군 I (급수에 0.2% 혼합), 액상제형 시험군 II (급수에 0.4% 혼합), 액상제형 시험군 III (급수에 0.8% 혼합), 분말제형 시험군 I (사료에 0.05% 혼합), 분말제형 시험군 II (사료에 0.1% 혼합), 분말제형 시험군 III (사료에 0.2% 혼합) 로 무작위로 분류한 후, 제품을 2주간 동안 투여하여 안전성을 평가하고자 하였음.
- 안전성 평가의 평가 항목은 평가기간동안 양계에게서 체중 변화와 임상증상(위축계, 호흡기 이상증상, 기침, 콧물이나 눈물, 낮은 성장률, 행동력 저하, 분변이상 등), 폐사두수를 확인하여 면역증강제 후보소재 시제품의 안전성을 평가 하려 함.
- 안전성 평가를 위하여 평가 시작 시 체중은 평균에서 $\pm 3\%$ 의 양계들만을 평가에 사용하려 하며, 일주일간의 순치기간동안 임상증상 및 건강에 이상이 있는 닭은 평가에서 제외 하려 함.

다. 시험동물 및 평가 농장 정보

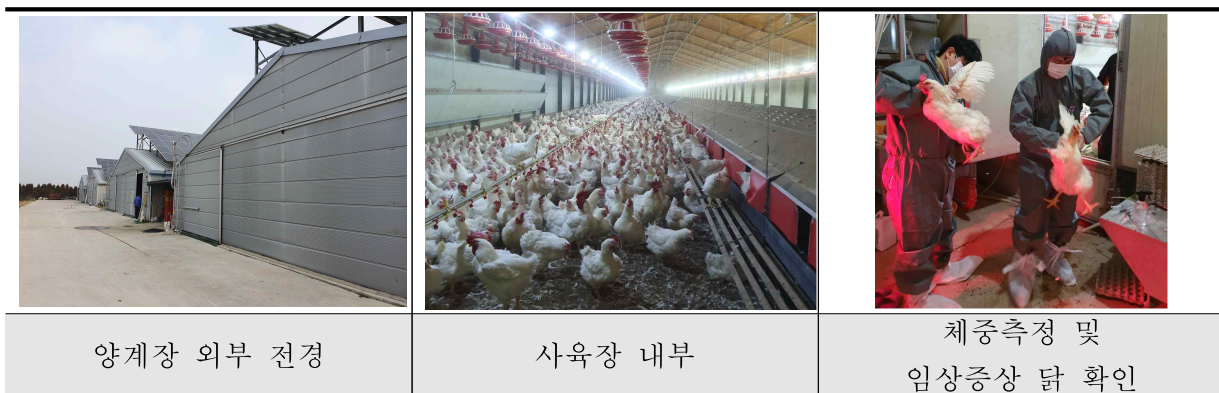
- 시험동물은 전북 익산시 용안면 난포리 45에 있는 거성종계장과 과제연구 참여 의향서를 작성하고 시설 및 사육되는 양계를 평가에 사용함.
- 농장에서 사육하는 양계는 대증으로 많이 사육되는 아바에이커 종으로 야외 농장에서의 면역증강제 후보소재 시제품의 안전성 평가에 적합한 종이라 판단하였음.

[표-10] 제품의 안전성 평가를 위한 시험군 분류

Group	No. of animals	Age of animals (days)	Treatment	Dose	Route	평가 기간 (days)
대조군	150	28	None	0	Oral	14
액상 제형	시험군 I	150	액상 시제품	0.2%	Oral	14
	시험군 II	150	액상 시제품	0.4%	Oral	14
	시험군 III	150	액상 시제품	0.8%	Oral	14
분말 제형	시험군 I	150	분말 시제품	0.05%	Oral	14
	시험군 II	150	분말 시제품	0.1%	Oral	14
	시험군 III	150	분말 시제품	0.2%	Oral	14

라. 안전성 평가 수행

- 시험기간 : 2019. 11. 12. ~ 12. 09 (28일간)
- 시험장소 : 거성종계장(전북 익산시 용안면 난포리 45)
- 공시동물 : 육계 총 1050두(분류군 별 각 150두)
- 안전성 평가는 3주령의 닭을 7일간의 순치기간 이후 시행되었으며, 순치기간 동안 임상 증상 및 건강상태를 관찰한 후 건강한 닭을 선별하였고, 그중 체중이 760~800g의 1050마리의 닭을 평가에 사용하였음.
- 안전성 평가는 총 2주 동안 시험군에게 면역증강제 후보소재 시제품을 농도별고 급이하며, 대조군과 시험군의 사료 섭취량, 급수량, 체중변화, 임상증상(위축계, 호흡기 이상증상, 기침, 콧물이나 눈물, 낮은 성장률, 행동력 저하, 분변이상 등), 폐사 두수를 2일단위로 기록하여 평가함.
- 체중 측정은 개시체중, 중간 체중, 종료체중으로 나누어서 총 3회 측정하였으며, 측정은 분류군에 해당하는 모든 양계의 체중을 측정한 후 평균을 내어 기록하였음.



양계장 외부 전경

사육장 내부

체중측정 및 임상증상 닭 확인

[야외 농장에서의 면역증강제 후보소재 시제품에 대한 안전성 평가]

마. 야외 농장에서의 면역증강제 후보소재 시제품에 대한 안전성 평가 결과 및 고찰

- 안전성 시험에서 2가지 제형의 면역증강제 후보소재 시제품 모두 독성에 의한 체중의 변화는 관찰되지 않았으며, 오히려 시험군의 종료체중은 대조군보다 높았음.
- 평가기간동안 대조군과 시험군에서 임상증상 및 폐사가 있었으나 시험약의 독성으로 인하여 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았음.

[표-11] 제품 급이에 따른 양계의 안전성시험 기간 중 체중 변화

Group	개시체중 평균(kg)	중간체중 평균(kg)	종료체중 평균(kg)
대조군	0.78	1.25	1.79
액상 제형	시험군 I	0.78	1.28
	시험군 II	0.78	1.26
	시험군 III	0.79	1.29
분말 제형	시험군 I	0.78	1.27
	시험군 II	0.79	1.28
	시험군 III	0.78	1.28

[표-12] 제품 급이에 따른 양계의 안전성시험 기간 중 임상증상 두수

Group	1day	2day	4day	6day	8day	10day	12day	14day
대조군	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(1/150)	(2/150)	(1/149)	(1/149)	(1/149)
액상 제형	시험군 I	(0/150)	(0/15)	(2/150)	(1/149)	(0/149)	(1/149)	(1/149)
	시험군 II	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(1/150)	(2/150)
	시험군 III	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(2/150)	(2/150)	(1/149)
분말 제형	시험군 I	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(1/150)	(1/150)	(2/150)	(2/150)
	시험군 II	(0/150)	(1/150)	(2/149)	(0/149)	(1/149)	(1/149)	(1/149)
	시험군 III	(0/150)	(0/150)	(1/150)	(0/150)	(1/150)	(1/150)	(1/150)

[표-13] 제품 급이에 따른 양계의 안전성시험 기간 중 폐사 두수

	Group	1day	2day	4day	6day	8day	10day	12day	14day
액상 제형	대조군	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(1/150)	(1/150)	(1/150)
	시험군 I	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(1/150)	(1/150)	(1/150)	(1/150)	(1/150)
	시험군 II	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)
	시험군 III	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(1/150)	(1/150)
분말 제형	시험군 I	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)
	시험군 II	(0/150)	(0/150)	(1/150)	(1/150)	(1/150)	(1/150)	(1/150)	(1/150)
	시험군 III	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)	(0/150)

- 2주간 1050마리의 양계를 활용한 2주간의 면역증강제 후보소재 시제품의 2가지 제형에 대한 안전성 평가 결과 시제품의 투여로 인하여 대상동물에서의 폐사 및 임상증상의 발생은 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않아 시제품은 독성이 없는 것으로 사료되며, 체중의 변화는 평균체중이 대조군보다 높은 것을 보았을 때 양계의 성장을 촉진하여 증체량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었음.
- 따라서, 면역증강제 후보소재 시제품의 2가지 제형 모두 대상동물에게 권장 투여농도의 0.5배, 1배, 2배를 2주간 급이 하여도 독성 및 유해성을 가지지 않으며 안전성이 높은 것으로 확인됨.

2-12. 면역증강제 후보소재 시제품 홍보를 위한 교육 및 전시

가. 면역증강제 후보소재 시제품에 대한 교육 및 컨설팅

- 동물의약품 관련 업종 실무자들을 대상으로 면역증강제 후보소재 시제품에 대한 효능 효과 및 출시 이후 시장성에 대하여 교육하였음.
- 교육 및 컨설팅은 3회 이상 시행하려 계획하였지만, 코로나19 바이러스의 대규모 유행으로 정부지침에 따라 대규모 감염이전 1회의 교육 이후 실시하지 않음.



동물용 의약품 관련 업종 실무자들을 대상으로 한 교육 실시

[면역증강제 후보소재 시제품 대한 교육 및 컨설팅]

나. 면역증강제 후보소재 시제품의 전시

- 면역증강제 후보소재 시제품에 대하여 제품의 출시 후 판매 증진 및 제품의 홍보를 위하여 시제품을 정읍시의 동물용의약품 전문 판매점인 ‘고성동물병원’과 한국생명공학연구원 전북분원 바이오 이노비즈 센터에 약 2개월(2020년 1월~2월) 간 전시하여 방문객들을 대상으로 제품을 홍보함.



[면역증강제 후보소재 시제품 대한 제품 홍보]

2-13. 면역증강제 후보소재 시제품의 임상시험 계획서 작성 및 신청

가. 면역증강제 후보소재 시제품 임상시험 계획 수립

- 임상시험 계획은 농림축산검역본부와 임상시험 전문기관인 (주)카브, 동물용의약품 전문제조 업체인 CTC바이오(주)의 협조를 받아 계획을 수립하였으며, 실험실에서의 안전성, 효능평가에 대한 임상시험 계획을 수립함.
- 면역증강제 후보소재 시제품은 동일한 원료의약품을 사용하여 액상과 분말 2가지 제형으로 개발되었으나, 품목허가는 제형에 따라 품목이 따로 분류되어 허가를 따로 진행되어야 함.
- 2개의 시제품을 동시에 품목허가를 진행하기엔 임상시험, 생산 등의 진행비용을 고려하여 품목허가는 제품의 사용 편의성 좋고 제조공정 비용 저렴한 액상제형을 먼저 진행하고자 하였음.
- 액상제형에 면역증강제 후보소재 시제품의 임상시험계획서 작성 및 제출, 이후의 홍보를 위하여 제품의 명칭을 명명할 필요가 있어 액상제형의 시제품 명을 ‘에이가드’라 명명함.
- 에이가드의 실험실에서 안전성과 효능평가를 위해 임상시험은 대상동물(닭)과 저병원성 조류인플루엔자 H9N2바이러스를 공시재료로 사용하여 평가하기로 하였으며, 평가에 유의성을 위한 바이러스 접종량, 대상동물의 주령, 마릿수, 시험약 투여방법, 투여량 등을 설정함.
- 에이가드의 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 실험실 내 효능시험은 총 21일간 진행하며 에이가드를 그룹별 농도에 맞추어 1주일간 투여한 후 바이러스를 접종하여 2주간 2일 간격으로 바이러스 감염에 의한 구강, 기관, 맹장편도, 총배설장에서 바이러스

배출량의 변화 및 임상증상(위축계, 호흡기 이상증상, 기침, 콧물이나 눈물, 낮은 성장률, 행동력 저하, 분변이상 등) 및 폐사율을 확인하려 함.

- 에이가드의 실험실 내 안전성 시험은 총 14일간 진행하며 효능시험에서 효능을 보인 농도의 5배 농도에 시험약(에이가드)을 매일 경구 투여해 투여기간 동안 체중변화와 임상증상(위축계, 호흡기 이상증상, 기침, 콧물이나 눈물, 낮은 성장률, 행동력 저하, 분변이상 등) 및 폐사율을 관찰하려 함.

나. 임상시험 인허가 관련 서류 작성

- 농림축산검역본부의 동물용의약품 임상시험 인허가 심사를 위해선 임상시험계획서, 제조 위수탁계약서, 시험약의 예상 부표, 임상시험 계획서 승인 요청 공문, 임상 시험책임자의 수의사 면허증이 제출되어야 함.
- 임상시험 계획서는 수립된 임상시험 계획을 토대로 실험실내 안전성, 효능평가에 대하여 계획서를 작성하였음.
- 에이가드의 제조 위수탁 계약은 동물용의약품 전문 제조업체인 (주)CTC바이오와 협의 후 계약서를 체결하였으며, 향후 제품의 품목허가 이후 제품의 생산, 관리 및 품질의 관리, 보증의 책임에 대하여 계약함.
- 에이가드의 예상 부표는 기존의 등록된 동물용의약품들의 부표들과 국가법령정보센터의 ‘동물용의약품 등 제조업 및 품목허가 등 지침’, 농림축산검역본부로부터 발행된 ‘동물용의약품 안전성·유효성 검토 가이드라인’, ‘동물용의약품 웹공정서’를 참조하여 에이가드의 규격에 맞추어 작성하였음.
- 최종적으로, 작성한 임상시험계획서, 제조 위수탁 계약서, 제품 예상부표 및 제출공문을 첨부하여 연구과제 ‘기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제 개발’의 최종목표인 임상시험계획서 인허가 신청을 위해 농림축산검역본부 동물용의약품 관리과에 제출하였음.

제목 : RE: 바이오텐) 임상시험 제출 관련 공문 및 첨부서류를 전달 합니다. ★

보낸사람 : "박양주" <vet2017@korea.kr>
받는사람 : "허성돈" <syheo@bioten.co.kr>

선생님 안녕하십니까?

바이오텐에서 보내주신 에이가드 임상시험설계서를 2020.12.1 기술검토부서에 검토 요청하였습니다.

(최초 자료는 11.27 제출하였으나, 일부 수정사항 때문에 수정된 자료를 받고 20.12.1 의뢰 실시)

1차 검토 기한은 '21.1.13 정도로 예상됩니다.(변동 가능)

감사합니다.



임상시험 인허가 관련 서류 제출에 대한 농림축산검역본부의 답장

[면역증강제 후보소재 제품 에이가드의 라벨 및 리플렛]

2-14. 제품의 시장진출을 위한 시제품 라벨 및 홍보자료 제작

가. 에이가드 제품 라벨 및 리플렛 제작

- 과제의 동물의약품 시제품 에이가드의 라벨과 홍보자료용 리플렛 제작함.
- 제품사용에 대한 매뉴얼은 리플렛에 포함하여 제작함.
- 향후 제품출시 이후 판매증진을 위해 시제품의 홍보목적으로 사용하고자 함.



제품 라벨 이미지

제품 리플렛 이미지



제품 라벨



제품 리플렛

[면역증강제 후보소재 제품 에이가드의 라벨 및 리플렛]

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 최종목표

- 기존 가축질병 (AI) 제어(커큐민-스테비올배당 복합체) 고도화 연구를 통한 면역증강제 개발

나. 세부목표

- 고도화된 AI 제어용 후보 소재의 원료 표준화 및 효능검증, 작용기전 연구
- 기능성 난용소재 수용화를 통한 면역증강제의 제품화 및 산업화

한국생명공학연구원

- 고도화 소재의 프로파일링
- In vitro/in vivo 효능평가
- 후보소재의 작용기전 연구



바이오텐 (주)

- 고도화 소재의 기시범 확립
- 임상시험 계획 수립
- 동물약품 허가 신청



3-2. 목표 달성여부

목표	평가 착안점	달성여부
<ul style="list-style-type: none"> 고도화된 후보소재의 세포 및 동물 감염모델을 활용한 효능검증 	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재의 활성평가를 위해 표적동물인 닭을 이용한 감염모델을 구축하였음. 동물 감염동물모델 구축 및 감염 모델을 이용하여 효능평가를 검증. 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 후보소재의 세포 및 동물 실험을 통한 작용기전 (인터페론 및 사이토카인 변화 등) 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재의 세포 및 동물실험에서 바이러스 배출량 변화, 인터페론, 사이토카인 변화, 장내 미생물 변화 등 작용기전 연구 수행 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 기존 AI제어용 소재의 고도화에 따른 기원, 생산지, 지표물질의 프로파일링 	<ul style="list-style-type: none"> 고도화된 후보소재의 생산지에 따른 지표물질의 프로파일링 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 면역증강 후보소재 원료 및 규격설정을 통한 표준화 	<ul style="list-style-type: none"> 면역증강 후보소재원료 및 후보소재의 지표 성분 함량 평가를 통하여 표준화를 완료하였음. 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 후보소재원료 기반의 제조 공정 구축 	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재원료를 활용한 추출물의 지표성분 평가를 통하여 제조공정을 구축하였음. 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 제조공정별 유효성분의 함량 평가 및 수득율 조사를 통한 제조공정 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> 공정별 후보소재의 유효성분 함량 평가를 통하여 제조공정 최적화 완료하였음. 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 대량생산장비 활용 후보소재의 유효성분 함량 및 생산성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재를 생산 가능한 3가지 공정들에서의 추출효율과 유효성분 함량을 평가하였고, 그중 가장 우수한 공정을 선별하여 대량생산 공정을 구축 완료함. 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 후보소재를 이용한 시제품 제작 	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재를 이용하여 액상과 분말 2가지 제형으로 시제품을 제작함. 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 시제품을 이용한 안정성 평가 (가속, 장기보관 등) 	<ul style="list-style-type: none"> 2가지 제형의 시제품에 대하여 동물의약품 일반시험법에 따라 장기 보관 시험 (1년) 및 가속시험을 수행하여 시제품의 안정성을 확인함. 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 1,000수 이상의 시설을 활용한 안전성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 시제품의 야외 안전성 평가를 1000수 이상의 양계농장에서 시제품을 투여하며 체중변화, 임상증상, 폐사율을 평가해 시제품의 안전성을 확인함. 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 임상시험계획 수립개발 	<ul style="list-style-type: none"> 전문기관인 농림축산검역본, 카브(주), CTC 바이오(주)의 협의하여 임상시험 계획 수립함. 	달성
<ul style="list-style-type: none"> 임상시험계획서 인허가 신청 	<ul style="list-style-type: none"> 동물의약품 IND 인허가 신청(농림축산검역본부) (2020.11.30.). 	달성

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

안건	미달성 원인	차후대책
재산권(특허출원)		
<ul style="list-style-type: none"> 고도화된 소재에 대한 조류인플루엔자 효능평가에 대한 특허 출원 1건 	<ul style="list-style-type: none"> 전세계적으로 발생된 코로나-19 영향으로 동물실험 및 야외 효능평가 실험 지연 	<ul style="list-style-type: none"> 현재 특허출원 준비 중에 있음
기술실시		
<ul style="list-style-type: none"> 고도화 소재에 대한 기술이전 1건 	<ul style="list-style-type: none"> 특허 출원의 지연으로 기업과의 기술이전에 대한 협의가 지연됨. 	<ul style="list-style-type: none"> 특허가 출원이 되면 충분히 달성할 수 있으리라 기대됨
결론	<ul style="list-style-type: none"> 코로나-19 발생으로 인한 연구 실험의 지연으로 미비 된 특허 및 기술이전은 과제 종료 후에도 지속적으로 진행할 계획임. 	

4. 연구결과의 활용 계획

가. 연구개발 결과의 활용방안

○ 활용계획

- AI 제어용 후보소재의 면역증강제 개발을 통한 임상시험 진행 및 제품화에 필요한 data 활용.
- AI 제어용 면역증강제 개발과 관련된 다양한 바이러스 질환 관련 천연물의약품 개발에 활용.
- 차별화된 제품 개발을 통한 신홍시장 선점 및 고급 제품의 축산선진국 수출.
- 제품의 조속한 산업화를 통한 시장선점 및 신제품의 적극적인 홍보 및 판매로 시장점유율 제공.
- AI에 대한 이해와 생물학적 기초자료 및 천연물 의약품 개발의 기초자료로 활용.

나. 기대성과 및 파급효과

○ 기술적 측면

- A현대 과학적 방법으로 천연물 신약의 약리, 효능 및 기전을 규명하고, 안전성과 안정성을 확보함으로써 효과적이고 안전한 천연물의약품 개발 및 실용화 기반 구축.
- A현재 존재하는 백신을 대체가능하며, 백신이 가지고 있는 가격적 문제와 부작용을 완화시킨 천연물 신약 개발.
- A축산업에 활용할 수 있는 AI 제어용 면역 증강제 개발로 새로운 패러다임 제시 가능.

○ 경제적·산업적 측면

- 생명자원에 대한 원천기술의 확보 및 산업적 선점 효과
- 세계적으로 천연물의약품으로 개발되는 약용식물자원에 대한 관심이 높아지고 있으며, 특히 신약에 대한 특허권은 엄청난 양의 로얄티 지불을 초래하게 되고, 점차 지적재산에 대한 관심과 그 영향이 커질 전망이다.
- 천연소재는 인체에 독성이 적으면서도 다양하고 우수한 효과를 지니고 있으므로 이에 대한 기반기술의 확보는 국가적으로도 중요한 자원이 될 것임.
- 부작용이 적고 효능이 우수한 천연물유래 AI 제어용 면역 증강제를 개발함으로써 기존의 치료제를 대체 또는 보조할 수 있는 AI 제어용 면역 증강제 시장을 선점함으로써 국가 경제발전에 크게 기여하게 됨.
- 본 연구에 의한 천연물 추출, 분리, 정제 기술 및 원료 대량생산기술의 확보로 천연물 관련 신약 개발을 가속화함으로써 국내 산업의 확장 및 신규창출 그리고 막대한 수출 효과

가 예상된다.

- 자체 천연물 신약 정보 인프라 구축의 기반기술로 활용됨.

다. 사업화 전략

○ 언론홍보

- AI 제어용 면역 증강제제 임상시험 계획 승인 시 보도자료 배포
- AI 제어용 면역 증강제 농림축산검역본부 품목허가 서류 접수 시 보도자료 배포
- AI 제어용 면역 증강제 농림축산검역본부 품목허가 승인 시 보도자료 배포

○ 학술홍보

- 개발초기부터 주요 임상외와 공동개발 추진
- 결과들을 고급 임상학술지에 발표함으로써 미래의 임상가들의 관심 유도
- 임상자료 분석 결과, 국내외 전문 학술지에 논문을 게재
- 대한바이러스학회 또는 대한수의학회 등 관련 학회에 광고 및 부스

○ 온라인 홍보

- 자체 홈페이지 및 제품 단독 홈페이지 구축하여 홍보
- Naver의 HiDoc을 통해 제품을 온라인 홍보

붙임. 참고문헌

1. Tran, T.H., Nguyen, T.L., Nguyen, T.D., Luong, T.S., Pham, P.M., Nguyen, v.V., Pham, T.S., Vo, C.D., Le, T.Q., Ngo, T.T., Dao, B.K., Le, P.P., Nguyen, T.T., Hoang, T.L., Cao, V.T., Le, T.G., Nguyen, D.T., Le, H.N., Nguyen, K.T., Le, H.S., Le, V.T., Christiane, D., Tran, T.T., Menno, de J., Schultsz, C., Cheng, P., Lim, W., Horby, P., Farrar, J.; World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team, 2004. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.*, 350, 1179-88
2. Chandrasekaran, A., Srinivasan, A., Raman, R., Viswanathan, K., Raguram, S., Tumpey, T.M., Sasisekharan, V., Sasisekharan, R., 2008. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat. biotechnol.*, 26, 107-13.
3. Itzstein, M.v., 2007. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 967-74.
4. Huberman, K., Peluso, R.W., Moscona, A., 1995. Hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza 3: role of the neuraminidase in the viral life cycle. *Virology*, 214, 294-300.
5. Gubareva, L.V., Kaiser, L., 2000. Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet*, 355, 827-35.
6. Bantia, S., Arnold, C.S., Parker, C.D., Upshaw, R., Chand, P., 2006. Anti-influenza virus activity of peramivir in mice with single intramuscular injection. *Antiviral Res.*, 69, 39-45.
7. Zhang, J., Yu, K., Zhu, W., Jiang, H., 2006. Neuraminidase pharmacophore model derived from diverse classes of inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3009-14.
8. Ryan, D.M., Ticehurst, J., Dempsey, M.H., 1995. GG167 (4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) is a potent inhibitor of influenza virus in ferrets. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 2583-4.
9. Yeung, Y.Y., Hong, S., Corey, E.J., 2006. A short enantioselective pathway for the synthesis of the anti-influenza neuramidase inhibitor oseltamivir from 1,3-butadiene and acrylic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 6310-1.
10. McCullers, J.A., 2005. Antiviral therapy of influenza. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 14, 305-12.

11. Liu, A.L., Wang, H.D., Lee, S.M., Wang, Y.T., Du, G.H., 2008. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 7141-7.
12. Li, X., Ohtsuki, T., Shindo, S., Sato, M., Koyano, T., Preeprame, S., Kowithayakorn, T., Ishibashi, M., 2007. Mangiferin identified in a screening study guided by neuraminidase inhibitory activity. *Planta Med.*, 73, 1195-6.
13. Lee, C.H., Kim, S.I., Lee, K.B., Yoo, Y.C., Ryu, S.Y., Song, K.S., 2003. Neuraminidase inhibitors from *Reynoutria elliptica*. 26, 367-74.
14. Jeong, H.J., Ryu, Y.B., Park, S.J., Kim, J.H., Kwon, H.J., Kim, J.H., Park, K.H., Rho, M.C., Lee, W.S., 2009. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their in vitro anti-influenza viral activities. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 6816-23.
15. Ryu, Y.B., Kim, J.H., Park, S.J., Chang, J.S., Rho, M.C., Bae, K.H., Park, K.H., Lee, W.S., 2010. Inhibition of neuraminidase activity by polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 971-4.
16. Ryu, Y.B., Curtis-Long, M.J., Lee, J.W., Kim, J.H., Kim, J.Y., Kang, K.Y., Lee, W.S., Park, K.H., 2009. Characteristic of neuraminidase inhibitory xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 2744-50.
17. Ryu, Y.B., Curtis-Long, M.J., Lee, J.W., Ryu, H.W., Kim, J.Y., Lee, W.S., Park, K.H., 2009. Structural characteristics of flavanones and flavones from *Cudrania tricuspidata* for neuraminidase inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 4912-5.
18. Shiraishi, K., Mitamura, K., Sakai-Tagawa, Y., Goto, H., Sugaya, N., Kawaoka, Y., 2003. High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-treated children with influenza. *J. Infect. Dis.* 188, 57-61.
19. Ryu, H.W., Curtis-Long, M.J., Jung, S., Jin, Y.M., Cho, J.K., Ryu, Y.B., Lee, W.S., Park, K.H., 2010. Xanthenes with neuraminidase inhibitory activity from the seedcases of *Garcinia mangostana*. *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 6258-64.
20. Lee, S.W., Chang, J.S., Lim, J.H., Kim, M.S., Park, S.J., Jeong, H.J., Kim, M.S., Lee, W.S., Rho, M.C., 2010. Quinolone alkaloids from *Evodiae fructus* inhibit LFC-1/ICAM-1-mediated cell adhesion. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 31, 64-8.

21. Ryu, Y.B., Jeong, H.J., Yoon, S.Y., Park, J.Y., Kim, Y.M., Park, S.J., Rho, M.C., Kim, S.J., Lee, W.S., 2011. Influenza virus neuraminidase inhibitory activity of phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia cava*. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 6467–73.
22. Park, J.Y., Jeong, H.J., Kim, Y.M., Park, S.J., Rho, M.C., Park, K.H., Ryu, Y.B., Lee, W.S., 2011. Characteristic of alkylated chalcones from *Angelica keiskei* on influenza virus neuraminidase inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 5602–4.
23. Kwon, H.J., Kim, H.H., Yoon, S.Y., Ryu, Y.B., Chang, J.S., Cho, K.O., Rho, M.C., Park, S.J., Lee, W.S., 2010. In vitro inhibitory activity of *Alpinia katsumadai* extracts against influenza virus infection and hemagglutination. *Viol. J.*, 7, 307.
24. Woo, H.S., Kim, D.W., Curtis-Long, M.J., Lee, B.W., Lee, J.H., Kim, J.Y., Kang, J.E., Park, K.H., 2011. Potent inhibition of bacterial neuraminidase activity by pterocarpanes isolated from the roots of *Lespedeza bicolor*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 6100–3.
25. Ko, J.A., Ryu, Y.B., Park, T.S., Jeong, H.J., Kim, J.H., Park, S.J., Kim, J.S., Kim, D., Kim, Y.M., Lee, W.S., 2012. Enzymatic synthesis of puerarin glucosides using *Leuconostoc dextranucrase*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 1224–9.
26. Jeong, H.J., Kim, Y.M., Kim, J.H., Kim, J.Y., Park, J.Y., Park, S.J., Ryu, Y.B., Lee, W.S., 2012. Homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* displaying viral neuraminidases inhibition. *Biol. Pharm. Bull.*, 2, 786–90.
27. Lee, S.W., Hwang, B.S., Kim, M.H., Park, C.S., Lee, W.S., Oh, H.M., Rho, M.C., 2012. Stilbene derivatives isolated from *Rheum undulatum* inhibit LFA-1/ICAM-1-mediated cell adhesion. *Arch. Pharm. Res.*, 35, 1763–70.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제 개발				
	(영문) Developmnet of immune enhancer by improving the efficacy of AI control material				
주 관 연 구 기 관	한국생명공학연구원		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 기능성바이오소재연구센터	
참 여 기 업	바이오텐 (주)			(성명) 박 수 진	
총연구개발비 (912,000 천원)	계	912,000	총 연 구 기 간	2018.11.~ 2020.12.(2년1월)	
	정부출연 연구개발비	684,000	총 참 연 구 원 수	총 인 원	30
	기업부담금	228,000		내부인원	20
	연구기관부담금			외부인원	10
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구과제의 개발 목표는 기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제를 개발하는 것임. <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존의 개발된 조류인플루엔자 제어소재와 새롭게 발굴된 면역증강소재를 혼합하여 고도화된 조류인플루엔자 제어용 소재를 개발하였음. - 고도화된 후보소재의 기원, 생산지, 지표물질 등에 대한 프로파일링을 하였음. - 후보 소재의 감염 및 면역조절 인자에 대한 효능 평가 및 작용기전 연구를 통한 심화 연구를 수행하였음. - 후보 소재의 시제품을 제작하고, 동물약품 허가 신청(농림축산검역본부)을 하였음. <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제품의 조속한 산업화를 통한 시장선점 및 신제품의 적극적인 홍보 및 판매로 시장점유율 제공 및 수의동물약품 산업의 활성화가 기대됨. - 국내 축산업 발전에 걸림돌이 되고 있는 이러한 바이러스성 질병을 제어할 수 있어 농가소득 증대를 통한 국가 경제에 기여가 기대됨. 					

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		118097-02	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제 개발			과제유형	(개발)
연구기관	한국생명공학연구원			연구책임자	박수진
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.11.15.-2019.08.14.	293,000	97,667	390,667
	2차연도	2019.08.15.-2020.12.31.	391,000	130,333	521,333
	계	2년	684,000	228,000	912,000
참여기업	바이오텐 (주)				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020.01.31.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
한국생명공학연구원	책임연구원	박수진

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
-----------	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구과제의 개발 목표는 기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제를 개발하는데 있음.
- 국내 뿐 만아니라, 전 세계적으로 인플루엔자 치료제 개발은 사람에게 적용이 가능하나 가축 특히 조류 인플루엔자에는 적용이 어려움이 있음.
- 이에 본 연구에서는 기존에 본 연구팀에서 개발된 소재를 고도화하여 더욱 효과적으로 조류 인플루엔자를 제어할 수 있는 소재를 개발하여 신속하게 사업화 시킬 수 있음.
- 본 연구에서 개발한 고도화 소재는 바이러스 배출량을 감소, 염증성 사이토카인 감소 및 장내 미생물 변화를 통해 조류 인플루엔자 제어에 좋은 효능을 나타냄.
- 이러한 결과를 바탕으로 신속하게 시제품을 제작하여 대규모 농장에서 안전성 시험 및 임상 시험계획을 수립하고, 농림축산검역본부에 IND 허가 신청을 하였음.
- 결론적으로 본 연구개발결과는 매우 우수하며 창의성이 있다 할 수 있음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

- 조류 인플루엔자 예방 및 치료제의 국내외 판매 실적은 전혀 보고되지 않았음. 본 연구를 통해 개발한 조류 인플루엔자 예방 및 치료제는 연간 1억 원 이상의 국내 판매 및 연간 1억 원 이상의 해외 수출이 기대됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

- 조류 인플루엔자 제어용 고도화된 소재를 바이오텐(주)에 기술 이전하여 제품화 하고, 국내 판매 및 전 세계에 수출을 하려고 함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구는 기존의 조류인플루엔자 제어 소재를 고도화 한 소재를 개발하기 위해, 한국생명공학연구원 (박수진 박사)가 후보소재에 대한 세포계 및 동물에서의 항바이러스 효능평가와 작용기전 연구를 수행하였고, 이러한 결과를 이용하여 바이오젠(주) (이우송 박사)는 신속한 임상시험 및 시제품 제작, 임상계획서 수립, 동물의약품 IND 허가 신청을 하는 등 서로간의 유기적인 공동연구를 통해 성공적으로 고도화 후보 소재를 개발하였음.
- 이와 같이 후보소재의 성공적인 개발을 위해 연구원과 기업의 고유 업무 뿐 만아니라 주기적인 미팅을 통해 상호간에 공동연구도 활발히 진행하는 등 연구개발 수행에 있어 최선의 노력을 다하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구를 통해 학술발표 1편 발표, 교육지도 1건, 홍보전시 2건을 하였음. 특히, 고도화된 소재에 대한 홍보전시를 통해 제품화 되어 출시되면, 소기의 목적 이상의 결과를 달성할 것으로 기대됨.
- 지적소유권으로서 현재 1건의 특허를 준비 중에 있음.
- 이와 같이 본 연구를 통해 공개발표된 연구개발성과는 아주우수하다고 할 수 있음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
고도화된 후보소재 원료 표준화 및 감염동물모델 확립/효능평가	20	100	<ul style="list-style-type: none"> 고도화된 후보소재의 생사지에 따른 지표 물질의 프로파일링 완료함. 후보소재의 활성평가를 위해 표적동물인 닭을 이용한 감염모델을 구축하였음. 동물 (닭, 마우스) 감염동물모델 구축 및 감염 모델을 이용하여 효능평가를 검증.
고도화된 후보소재의 규격화 및 제조 공정확립	20	100	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재원료를 활용한 추출물의 지표성분 평가를 통하여 제조공정을 구축하였음. 후보소재를 생산 가능한 3가지 공정들에서의 추출효율과 유효성분 함량을 평가하였고, 그중 가장 우수한 공정을 선별하여 대량생산공정을 구축 완료함.
고도화된 후보소재의 작용기전 연구	20	100	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재의 세포 및 동물실험에서 바이러스 배출량 변화, 인터페론, 사이토카인 변화, 장내 미생물 변화 등 작용기전 연구 수행
시제품의 제작 및 허가를 위한 임상시험계획 수립 및 허가신청	40	100	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재를 이용하여 액상과 분말 2가지 제형으로 시제품을 제작함 2가지 제형의 시제품에 대하여 동물의약품 일반시험법에 따라 장기 보관 시험 (1년) 및 가속시험을 수행함. 시제품의 야외 안전성 평가를 1000수 이상의 양계농장에서 시제품을 투여하며 체중변화, 임상증상, 폐사율을 평가해 시제품의 안전성을 확인함. 전문기관인 농림축산검역본부, 카브(주), CTC바이오(주)의 협의하여 임상시험 계획 수립 <u>동물의약품 IND 허가 신청(농림축산검역본부) (2020.11.30.)</u>
합계	100		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구과제의 개발 목표는 기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제를 개발하는데 있음.
- 본 연구에서 사용되어지고 있는 조류 인플루엔자 바이러스 중 국내에서 가장 빈번하게 발생되어지고 경제적으로 심각한 피해를 끼치는 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스주 (H9N2) 로써 바이러스 주를 직접 분리, 동정을 하기 때문에 수요에 적합한 연구를 수행할 있는 대단한 장점을 지니고 있음.
- 또한, 조류 인플루엔자 감염 숙주인 닭에서 감염 동물 모델을 구축하여 사육 현장에 직접 적용하는 것과 같은 실험을 수행하였음. 따라서 구축된 동물모델을 이용한 후보소재의 효능평가 실험은 바로 현장에 적용할 수 있는 큰 장점이 있음.
- 참여 연구기관이 바이오텍에서는 연구 목표에 따라 후보소재의 성분분석 및 규격설정을 통한 표준화, 후보소재원료 기반의 제조공정 구축, 제조공정별 유효성분의 함량 평가 및 수득율 조사를 통한 제조공정 최적화, 대량생산장비 활용 후보소재의 유효성분 함량 및 생산성 평가를 수행하여 본 연구의 목표에 따라 성실하게 연구를 수행하였으며 여러 우수한 결과를 창출하였음.
- 1차년도의 결과를 바탕으로 2차년도에는 고도화된 소재에 대한 사이토카인 및 인터페론 발현에 대한 작용기전 연구를 수행하였으며, 후보소재에 대한 액상과 분말의 2가지 제형으로 시제품을 출시하고, 1000수이상의 야외 축산농가에서 임상시험을 거쳐 시제품을 즉시 산업화하기 위한 임상시험 전 단계의 데이터를 제공하였음.
- 이러한 연구결과를 바탕으로 임상계획을 수립하여 **2020.11.30.에 동물의약품 IND 허가 신청을 하였음.**
- 이와 같이 본 과제의 책임자 및 연구원들의 최선을 다한 노력의 결과, 본 연구가 지향하는 목표를 충분히 달성하였다고 생각됨.

※ 현재까지 국외에서는 조류 인플루엔자 제어용 생물소재 개발에 대하여 활발한 연구가 진행되어지고 있지만, 국내에서는 아주 미미한 수준으로 연구가 진행되어 오고 있음. 하지만 본 연구팀에서는 후보소재 개발을 위한 확실한 시스템을 구축하였고, 너무도 빠른 시일 내에 후보물질을 도출하여 축산부분에는 상품화하여 현장농가에 적용하고 있고, **현재 농림축산검역본부에 IND 허가 신청을 진행하고 있어 본 과제의 목표를 백퍼센트 수행했다고 사료 되어 짐.**

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 전세계적으로 발생한 코로나-19 발생으로 인한 연구 실험 지연에도 불구하고, 신속한 임상계획을 수립하여 연구기간 내에 동물의약품 IND 허가신청은 본 과제의 책임자 및 연구원들의 최선을 다한 노력의 결과라고 생각됨.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 현재 농림축산검역본부의 동물의약품 IND 허가를 신청 요청을 하였고, 이러한 임상시험을 거치면 내년 하반기에 제품화 할 수 있을 것으로 예측됨.
- 향후 고도화된 신규 조류 인플루엔자 후보 소재에 대하여 특허를 출원 및 기술이전을 통해 참여업체의 제품화 및 판매 증진 촉진에 활용할 것임.

IV. 보안성 검토

○ 해당사항 없음.

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

- 본 연구의 결과물은 지적재산권의 기술이전을 통한 제품화, 매출증대를 목표로 하고 있기 때문에 평가 시 천연소재 및 결과물에 대해서 특별히 보안유지를 해 주실 것을 간곡히 부탁드립니다.

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	기존 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제 개발			
주관연구기관	한국생명공학연구원		주관연구책임자	박수진
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	684,000	228,000	0	912,000
연구개발기간	2018. 11. 15. - 2020.12.31. (2년)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 기존의 가축질병 (AI) 제어소재 효능증대를 통한 면역증강제 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 고도화된 후보소재를 발굴하여 항바이러스 효능 및 작용기전 연구를 통해 시제품을 제작하고 임상실험 계획을 수립하여 동물의약품 IND 허가 신청(2020.11.30.) 중에 있음 .

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치																			
최종목표	1			1	20	1			2					1	1	1		1	
연기간내 달성실적	0			0	0	1			4					1	1	1		2	
달성율(%)						100			200					100	100			200	

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	후보소재의 항바이러스 효능 및 작용기전 검증 기술
②	바이러스 감염동물모델을 활용한 항바이러스 활성 검증기술
③	후보소재의 임상시험 계획 수립 및 동물의약품 허가신청

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	V	V				V	V	V	V	
②의 기술					V			V	V	
③의 기술								V	V	

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 소재의 항바이러스제 개발과 특허 및 지적재산권 획득을 통한 관련 사업의 주도권을 섭렵할 수 있음. 인수공통바이러스 질병에 활용하여 국민의 건강에 기여하고 농가소득향상에 기여할 것으로 예상됨.
②의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 바이러스성 질병에 적용할 수 있는 기능성 검정 원천기술을 확보하여 활성검증을 통한 기능성 후보소재를 발굴 및 제품으로 개발 할 수 있을 것으로 기대됨.
③의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 후보소재의 동물의약품 허가를 통한 제품화로 양계 농가의 소득향상에 기여할 것으로 예상됨. 또한 이 제품을 향후 전 세계에 수출함으로써 국가 경제에 기여할 것으로 기대됨.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	1			1	20	1			2					1	1	1		1	
연구기간내 달성실적	0			0	0	1			4					1	1	1		2	
연구종료 후 성과창출 계획	1	1		1	20														

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	조류인플루엔자 제어용 고도화 소재개발		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	20,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	연구종료 후 5년 이내	실용화예상시기 ³⁾	2026
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	<ul style="list-style-type: none"> • 해당 제품 제조 설비 및 장비 구비 • 동물의약품 품목허가 완료 		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

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