발간등록번호
11-1543000-001045-01

효소전환 기술을 이용한 오디 유래 스틸베노이드계 식의약소재 개발

(Development of Lead Compounds using Mulberry Stilbenoid Derivatives and Biocatalysts)

전남대학교

농림축산식품자료실

0015882

농 림 축 산 식 품 부

-254

편집순서 2

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “효소전환 기술을 이용한 오디 유래 스틸베노이드계 식의약소재 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 12월 9일

주관연구기관명 : 전남대학교
주관연구책임자 : 윤 철 호
세부연구책임자 : 윤 철 호
세부연구책임자 : 강 형 식
세부연구책임자 : 정 영 희
협동연구기관명 : ㈜제노포커스
협동연구책임자 : 김 의 중

편집순서 3

요 약 문

Ⅰ. 제 목

효소전환 기술을 이용한 오디 유래 스틸베노이드계 식의약소재 개발

Ⅱ. 연구성과 목표 대비 실적

1. 연구목표

- 안전성이 확보된 GRAS 미생물유래 산화효소를 이용한 분자구조변환 방법으로 뽕나무 열매인오디 유래 스틸베노이드계(stilbenoid) 화합물로부터 천연물 유도체들을 제조하여 고부가가치 식의약소재를 개발하고 제품화함. 최종적으로 질환모델생물 기반 검증(validation)기술을 이용한 효능검증으로 면역기능 조절뿐만 아니라 여러 면역질환의 예방과 치료에 적용이 가능한 식의약소재 개발을 목표로 함.

2. 연구목표 대비 실적

구 분		지식재산권		논문		학술발표	기술거래	교육지도	사업화	기술인증	인력양성	정책활용	홍보전시	기타
		출원	등록	SCI	비SCI									
최종	목표	4	4	6			1							
	실적	7	2	5		31	0				29			
달성율(%)		175	50	83			0							

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- 본 연구팀이 보유하고 있는 P450 genome, 효소공학 및 효능검증 관련 핵심기술을 바탕으로 분자진화기술, 유도체 제조기술, 대사체 활용기술을 이용하여 스틸베노이드계 면역기능 조절 식의약소재 후보물질의 개발 및 검증 시스템을 구축함을 연구개발의 목적으로 함.
- 본 연구의 수행의 목적을 달성하기 위하여 <스틸베노이드계 면역기능 조절 식의약소재 개발> 시스템을 구축하였음.
- 본 연구과제는 본 연구팀이 보유하고 있는 <P450 분자진화기술>을 바탕으로 <스틸베노이드계 화합물 유도체 활용기술> 및 <효능 평가시스템 구축 및 검증기술>을 활용하여 연구목적을 달성하기 위하여 <새로운 기능을 가지는 면역기능 조절 식의약소재>를 개발하였음.

2. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

- 오디의 과실적 특성과 생리적 우수성을 이용한 고부가가치 기능성 식의약소재 개발 필요.

- 오디의 생리활성 기능 성분의 규명과 생리활성의 체계적이고 과학적인 효능 연구 필요.
- 오디 및 잠상산물 추출물의 항당뇨, 항고혈압 및 항노화 활성의 강화효과에 대한 과학적인 연구와 여러 성인병 예방용 고부가가치 기능성건강보조식품의 개발이 미비함.
- 항균, 항염증 및 항경련 작용을 보유한 식이성 천연항산화성 안토시아닌 색소를 많이 함유하고 있는 오디를 이용한 고부가가치의 천연 착색료 및 식품첨가물로의 개발이 필요함.
- 오디 유래 기능성건강보조식품을 제조하는 기술을 개발하여 제품을 다양화시키고 제품의 효능을 과학적으로 규명하여 규격화시킬 수 있는 기술적 연구가 절실함.

2) 경제·산업적 측면
- 오디 및 뽕잎의 생리활성 효능에 대한 과학적인 효능 연구 및 고부가가치 기능성건강보조식품의 개발이 요구됨.
- 기능성을 강화시킨 다양한 제품의 생리적 효능에 대해 동물실험을 통한 구체적이고 과학적인 연구결과의 근거 제시로 양잠농가 및 관련 농업인들의 소득을 증대시킬 수 있는 연구가 필요함.
- 최근 국내외 식품 및 생약추출물을 이용한 기능성 건강보조식품의 판매가 급성장하고 있음. 외국산 오디가공품의 수입 대체품으로서 우리나라 오디가공품의 개발 및 고부가가치의 식의약소재 개발이 필요함.

3) 사회문화적 측면
- 생활수준의 발달로 수명이 연장되면서 각종 성인병이 급격히 증가할 것으로 예상됨.
- 당뇨병과 그 합병증, 고지혈증 및 기타 성인병을 예방 및 치료할 수 있는 천연물 유래의 기능성 식의약제품의 개발이 필요함.
- 천연물 유래 안전한 기능성 천연식품의 개발이 요구됨.

Ⅳ. 연구개발 내용 및 범위

제1세부: P450 효소를 이용한 면역조절 활성 신소재 개발용 스틸베노이드계 화합물 유도체 개발
- 작물유래 스틸베노이드 화합물에서 생물(효소)전환 가능성 탐색
- 스틸베노이드 유도체 제조방법 최적화
- 스틸베노이드 유도체 후보물질 제조방법 최적화
- 스틸베노이드 유도체 시제품 제조

제2세부: 생촉매 활용가능 식물 P450의 발굴 및 오디 유래 스틸베노이드계 화합물 프로파일링
- 식물로부터 생촉매 활용가능 P450 유전자 발굴
- 생촉매 활용가능 P450 효소 대량생산 및 활용
- 오디 유래 스틸베노이드 화합물 프로파일링
- 오디로부터 유용 성분 분리 및 시제품 제조

제3세부: 오디 유래 스틸베노이드 유도체로부터 면역조절 활성 물질 탐색 및 검증
- 국내산 농특산물로부터 면역조절 활성 신소재 탐색 및 기능연구
- 스틸베노이드 화합물 유래 유도체의 면역조절 활성 탐색
- 최종 후보 물질 선정 및 delivery system 개발
- 선정 물질의 효능 검증
- 독성 및 안전성 검증

제1협동: 생촉매를 이용한 면역조절 신소재 물질 대량생산 기반구축 및 상용화
- 스틸베노이드계 유도체 제조공정 최적화

- 스틸베노이드계 유도체 후보물질 제조공정 최적화
- 선정 물질 대량생산 기반구축
- 면역기능조절 신소재 물질 상용화

Ⅴ. 연구개발 결과

○ 생물전환 가능한 오디 유래 스틸베노이드계 화합물 선정
- 스틸베노이드계 화합물의 유도체 제조

○ 오디 유래 스틸베노이드계 화합물로부터 유도체 제조
- Diversity가 100% 이상 증가된 페닐프로파노이드계 화합물 개발

○ 스틸베노이드계 화합물 유도체를 고효율로 제조할 수 있는 P450 효소 제조
- 스틸베노이드계 화합물의 화학적 다양성이 100% 이상 증가된 유도체 제조 가능한 P450 효소 개발

○ 오디 유래 면역조절 신소재 탐색
- 국내산 농특산물인 오디에서 생리활성 기능이 높은 스틸베노이드계 화합물 제조
- 최적 추출조건 확립여부 및 구조 동정

○ 스틸베노이드계 화합물의 유도체 합성 및 면역조절 활성 탐색 및 검증
- 동정된 면역조절 활성 소재의 면역능력 향상
- 합성된 스틸베노이드계 화합물의 유도체의 면역능력 향상
- 여러 질환 모델에서 후보 물질들의 면역조절 향상

○ 최종 면역조절 유도체 선정 및 delivery system 개발
- 최종 선정된 유도체의 면역조절 향상 및 안정성 확인
- 투여경로, 투여용량 및 formulation 확립

○ 시제품 개발 및 대량 생산화 공정 개발
- 스틸베노이드계 화합물의 유도체 시제품 생산
- 대량 생산 및 분리/정제 공정을 위한 저비용 고효율의 시스템 개발
- 스틸베노이드계 화합물의 유도체 제조공정 최적화

○ 실용화 및 상용화 기반 구축
- 산·학 연계 및 전략 수립으로 개발된 제품의 실용화 및 상용화 기반 구축

○ 산업화 방안 구축
- 식품 소재, 화장품 첨가물 소재로서의 각종 적합성 평가로 산업화 방안 수립을 완료하여 산업화 가능성 증진

Ⅵ. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

1) 기술적 측면

- 오디 유래 천연물 분리/정제 기반기술 개발로 다른 농작물 유래 식품소재 개발에의 파급효과 기대
- 면역기능 조절 신소재 개발 및 작용기전 규명을 통한 근원적인 기반 기술 개발
- 면역기능 저하가 원인이 되는 여러 질병 치료를 위한 기술 확립을 통한 기존 치료제의 문제점을 극복할 수 있는 효율적인 치료제 후보물질 개발
- 기존 스틸베노이드 화합물과 차별화된 고기능성 유도체를 이용한 고부가가치의 시제품 개발

2) 경제적 측면

- 연구성과의 경제적 활성화를 위해 산업체와 관련 기술 연구결과 공유
- 여러 질병의 치료기반 기술 개발로 고부가가치 생명공학산물 개발
- 신규 면역기능 조절 유도체 개발을 통한 지적재산권 취득

- 최적의 시제품 개발로 상품화를 위한 기반기술 제공
- 고부가가치의 기능성 식물추출물의 상업화로 관련 농업인들의 소득 증대 기여

3) 학문적 측면

- 다양한 학문분야에서의 생촉매(효소) 및 면역증강 소재의 응용성 제고
  : 생리활성 의약 탐색, 탐색 기술 개발, 생리 활성조절물질 탐색 기술의 교육 가능
  : 환경 유해물질 검색 및 제거 기술, 유전독성물질 검색 및 제거를 위한 미생물 이용 기술 교육 가능
- 우수한 연구자질과 능력을 갖춘 생물, 보건의료산업분야의 전문인력 육성에 활용하여 의약산업 및 바이오산업 개발에 일조 기대 뿐 만 아니라 세계적 경쟁력 있는 기초학자 양성
- 본 연구에서 이용되는 최신 연구기술 및 기법을 발전시키고 체계화하여 소속 연구원 및 대학원생들에게 훈련과 교육을 시켜 세계적 경쟁력이 있는 전문인력 양성

2. 연구성과 활용계획

1) 연구성과의 실용화로 활용

- 개발한 GRAS 미생물 유래 재조합 P450 효소 반응을 이용하여 화학적 다양성(chemical diversity을 증가시킨 스틸베노이드 유도체의 화합물의 combinatorial chemical library를 통해서 유용 물질의 대량생산, 미생물 이용기술, 유전체 응용기술, 대량생산 및 분리정제 기술, 유전자 조작을 이용한 유용 효소 개발에 활용
- 활용가능분야: 식의약, combinatorial biochemistry, bioremediation 분야
- 활용방안: P450 효소, 유용 유도체, 신기능 소재/약물 후보물질 특허출원 및 라이센싱
- 이전가능한 기술목록 (이전형태: 지적재산권 및 know-how): 스틸베노이드계 항비만 예방 및 치료제의 유용 유도체 및 약물 후보물질

2) 연구성과의 기술확산 계획

- 오디 유래 스틸베노이드 화합물의 식의약 소재로의 개발 기술로 확산
- 오디 유래 스틸베노이드 화합물의 고지혈증 치료제 등 약물후보물질 개발 기술로 확산
- 면역기능 조절 신소재 개발 및 작용기전 규명을 통한 근원적인 기반 기술로 확산
- 면역기능 저하가 원인이 되는 여러 질병 치료를 위한 기술 확립을 통한 효율적인 예방용 신물질 개발로 확산
- 기존 폴리페놀계 화합물과 차별화된 고기능성 유도체를 이용한 고부가가치의 시제품 개발
- 항암, 항균, 항염 및 심혈관 질환 연구들의 원천기술 개발
- 면역 증강물질 개발 및 기술 확립으로 각종 질병에 대한 의약품 개발

3) 추가연구 및 타연구에 활용 계획

- 오디 유래 스틸베노이드 화합물의 다양한 유도체를 제조할 수 있는 P450 효소 개발
- 스틸베노이드 화합물의 유도체의 다양한 생리활성의 검증으로 약물후보물질로 개발
- 다양한 piceatannol-glycoside, pterostilbene-glycoside, resveratrol-glycoside의 배당체 개발
- 본 연구에서 확보한 유전자원을 이용한 타 천연 기능성소재 개발에 활용
- 다양한 천연 기능성 소재의 유도체를 개발할 수 있는 P450 효소 개발
- 천연물 유래 배당체의 유도체 개발에 활용
- 오디 유래 anthocyanin 색소의 유도체 개발

편집순서 4

SUMMARY
(영문요약문)

Goal of our research is to develop highly valuable eatable materials obtained by cytochrome P450-catalyzed reactions toward stilbenoid compounds from the mulberry. Futhermore, we have an object to make new materials of highly valuable stilbenoids which were evaluated by validation metods using animal models. Finally, we will further set up application systems of stilbenoid derivatives to new drug targets and establish infra for reinforcement of natural resources using P450 enzymatic conversion. Our vision is to be a leading group in the fields of P450 related research.

Specific contents of our projects include as follows:
(1) Generation of stilbenoid metabolites and their derivatives
• Generation of human metabolites of resveratrol, piceid (polydatin), and pterostilbene
• Production of derivatives of the stilbenoid metabolites and chemical library
• Development of drug leads for hyperlipidemia, hypertension, and chemopreventive funtions
(2) Development of P450-derived genome library
• Genomes and their libraries of cytochrome P450s from plant and microorganisms
• Generation of P450 mutant library by domain swapping and error-prone PCR
• High-throughput virtual screening of chemical library and P450's DNA library
(3) Generation of engineered enzyme with human P450 enzymes
• Molecular evolution of bacterial and plant P450 genomics
• HTS systems for P450 expression, catalytic activities, and ligand binding
(4) Evaluation system by in vitro and in vivo assays
• Model system of animals for chemopreventive functions
• Effect of stilbenoid derivatives on the animal (mouse) model for hyperlipidemia and other metabolic disease
(5) Systems to use stilbenoid metabolites for the drug and lead diversification
• Analysis and separation of metabolites of drugs and lead compounds
• Generation and analysis of combinational chemical library
• Mass production and separation of drug metabolites and lead compounds
• Combinatorial chemical library with increase diversity

Expected contribution are follows:
(1) Application of human P450 enzyme engineering in various industrial fields
• Platform technology for plant P450s to the industrial application
• Screening of biologically and physiologically active materials
• Detection and removal of environmental genotoxic chemicals
(2) Development of human P450 genome library
(3) HTS system by directed volution techniques
(4) Scalable and cost-effective production of P450 enzymes and related products
(5) System development of bioconversion using P450 monooxygenase system
(6) Systems for the fields related to the pharmacogenomics
(7) Development of drug and drug candidates related to the P450-catalyzed metabolism.
(8) Needs in the field of biomedical materials
(9) Market expansion in the oxidoreductases related industries such as drug development and environmental engineering
(10) Research experience and education for Master and Ph.D. course students

편집순서 5

CONTENTS
(영 문 목 차)

Submission ---------- 1
Summary (Korean)---------- 2
Summary (English) ---------- 6
Contents ---------- 7
Chapter 1. Overview of Research and Development (R & D) and Goal of Project ---------- 11
Verse 1. The Need for R & D ---------- 11
Verse 2. Goals and Contents of R & D ---------- 21
Verse 3. Achievement of the Goal ---------- 29
Chapter 2. Current Status of Related R & D in Country and Overseas ---------- 36
Verse 1. Industrial Status and Prospect regarding Immune-regulating Materials from Plants --- 36
Verse 2. Technology Status and Prospect of Overseas Countries ---------- 37
Verse 3. Technology Status and Prospect of Country ---------- 39
Verse 4. Contribution of Research Results to the R & D in Country and Overseas ---------- 41
Chapter 3. Contents and Experimental Results of the Project ---------- 46
Verse 1. Experimental Approach Methods ---------- 46
Verse 2. Contents of R & D ---------- 58
Verse 3. Research Scope and Performing Methods ---------- 62
Verse 4. Experimental of Results of the Project ---------- 73
Chapter 4. Achievement of the Goal and Contribution to related Research Fields ---------- 214
Verse 1. Achievement of the Goal by on a Year-on-year ---------- 214
Verse 2. Contribution of Technology Development to the Related Field ---------- 218
Chapter 5. Achievement of the R & D and Plan for Utilization of the Outcome ---------- 221
Verse 1. Plan for Commercialization and Industrialization ---------- 221
Verse 2. Plan for Technology Spread ---------- 222
Verse 3. Plan for Patent Possession ---------- 222
Verse 4. Plans for Further Research and Application to the Other Research ---------- 223
Chapter 6. Information regarding Overseas Science and Technology obtained during the R & D 224
Chapter 7. Current Status of Research Facilities and Instruments ---------- 227
Chapter 8. Safety Control and Regulation of Laboratory ---------- 228
Chapter 9. References ---------- 231
<Attached> Analysis Report of Patents, Publications, and Market ---------- 233

편집순서 6

목 차

제출문 ---------- 1
요약문 ---------- 2
영문요약문 ---------- 6
영문목차 ---------- 7

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표 ---------- 11
제 1 절. 연구개발의 필요성 ---------- 11
제 2 절. 연구개발 목표, 범위 및 내용 ---------- 21
제 3 절. 연구성과 목표 대비 실적 ---------- 29

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ---------- 36
제 1 절. 식물유래 면역조절 신소재 개발에 관한 산업현황과 전망 ---------- 36
제 2 절. 국외 연구개발 기술동향 및 전망 ---------- 37
제 3 절. 국내 연구개발 기술동향 및 전망 ---------- 39
제 4 절. 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 ---------- 41

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ---------- 46
제 1 절. 실험적 접근방법 ---------- 46
제 2 절. 연구개발 수행내용 ---------- 58
제 3 절. 연구범위 및 연구수행 방법 ---------- 62
제 4 절. 연구수행 결과 ---------- 73

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ---------- 214
제 1 절. 연도별 연구개발목표의 달성도 ---------- 214
제 2 절. 관련분야의 기술발전에의 기여도 ---------- 218

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ---------- 221
제 1 절. 실용화 및 산업화 계획 ---------- 221
제 2 절. 기술확산 계획 ---------- 222
제 3 절. 지식재산권 확보계획 ---------- 222
제 4 절. 추가연구 및 타연구에의 활용 계획 ---------- 223

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보---------- 224

제 7 장 연구시설·장비 현황 ---------- 227

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적 ---------- 228

제 9 장 참고문헌 ---------- 231

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서 ---------- 233

편집순서 7

본 문 작 성 요 령

가. 본문의 순서는 **장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉮** 등으로 하고, **장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열**로 합니다. 다만, 본문의 내용 중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.

나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.

다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.

라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.

마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.

바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.

사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.

아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.

자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.

차. <첨부>자료는 협약 시 연구계획서 별첨으로 제출한 특허, 논문 및 시장분석보고서를 기준으로 연구 완료 후 변동 내용을 작성하시기 바랍니다.

제 1 장　연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절. 연구개발의 필요성

1. 식물유래 면역조절 신소재 개발에 관한 국내 연구개발의 필요성

○ 건강과 삶의 질 향상

- 산업화, 환경의 오염, 고령화 등으로 암 및 자가면역질환 등과 같은 면역질환 유병률이 급속히 증가함. 인체 만성질환 대다수가 면역과 직간접적으로 밀접하게 연관되어 있으며, 신규 면역치료제의 개발은 여러 분야의 치료제에서 파급효과를 얻을 수 있음.
- 국민소득 수준이 향상되면서 건강에 대한 소비자들의 관심 증대, 웰빙문화 확산 등으로 기능성 식품, 향장제품, 천연물 의약품에 대한 수요 급증

○ 자원활용의 극대화

- 범세계적으로 생물자원 유래 천연물시장(바이오소재, 신약 등)의 급성장이 이루어지고 있는 상황을 고려하여 우리가 확보하고 있은 비교우위 생물자원에 대한 효율적 개발을 위한 체계적인 발전전략의 수립이 필수적임.
- 효능이 밝혀진 특정 천연물은 순수 분리하여 제품으로 직접 사용하거나 식품 또는 향장제품 등에 첨가하여 사용하기도 함. 그러나 이런 천연물질 중 화학적으로 합성이 불가능한 물질들은 식물에서 추출하여 사용할 수밖에 없으나 식물에서의 생산량은 극히 제한적이고 순수분리정제에 고비용이 필요함. 농작물에서 쉽게 분리 정제가 가능한 물질들을 선별하여 생체촉매 반응으로 효능물질을 대량생산한다면 부가가치가 높은 물질의 대량 생산 가능하고 쉽게 상품화가 가능할 것임.

○ 농업경제 활성화

- DDA/FTA 등 국내·외적인 농업정책 및 시장여건 변화에 따른 농업의 대외 경쟁력이 저하되고, 영세농가의 소득하락으로 새로운 소득원 개발이 절실한 시점에서 기존의 식량농업과 원예, 축산농업 위주의 전통농업에서 탈피, 새로운 부가가치 창출을 위한 개발 필요성 증대됨.
- 작물 유래 고기능성 천연물질은 의약품과 건강식품의 원료이자 농가의 소득원으로서 중요한 의미를 가지고 있음.
- 이러한 변화는 농산물의 고품질화 및 브랜드화, 다양한 2·3차 산업부문과의 연계를 수단으로 하는 농산업의 외연 확장추세 등과 맞물려 농업부문의 새로운 성장 동력으로서 작물에서의 고기능성 천연물질이 관심을 끄는 계기로 작용하고 있음.
- 원재료를 생산하는 농작물에 대한 가치가 상승하여 농가 소득 증대에 기여할 것임.

2. 작물(뽕나무) 유래 오디로부터의 신기능성 면역조절 식의약소재 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

○ 뽕나무 열매인 오디는 독특한 맛과 향기, 색깔을 가지고 있어 생식하거나 또는 술(상심주)을 담그는데 이용되어 왔으며, 햇빛에 말려 달여 마시면 자양, 강장 효과뿐만 아니라 당뇨 및 관절통 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있음. 오디에는 당과 유기산이 풍부할 뿐 아니라 여러 정유성분과 색소를 함유하고 있어 식품첨가물 및 기능성 음료의 소재로 적합

하여 외국에서는 오디를 이용한 잼, 젤리, 음료 및 술 증 여러 가공식품의 개발이 이루어지고 있음. 그러나 국내에서는 그동안 오디의 연간 생산량이 그리 많지 않았고 또 가공상의 여러 가지 문제점들이 많아 아직까지 오디 음료가 대중화되지 못하고 있는 실정임. 따라서 오디의 과실적 특성 및 생리적 우수성을 이용하여 고부가가치 기능성 식의약소재의 개발이 절실함.

○ 오디에는 sanggenon, moracin, cyclomulberrin 및 kuwanon 등과 같은 항산화, 항고혈압, 항노화성 활성을 지니고 있는 여러 flavonoids 뿐만 아니라 albafuran, bergapten 등의 항균 및 항염증 물질이 함유되어잇음이 밝혀졌음. 또한 오디에는 resveratrol, oxyresveratrol, oxydihydroresveratrol, broussonin과 같은 phytoalexins를 함유하고 있어 항암, 항염증, 항고혈압 효과를 가지는 기능성 신소재로 최근 각광을 받고 있음. 그러나 아직까지 오디의 혈압강하 및 혈당강하 성분의 규명과 오디 추출물의 생리활성을 뒷받침해 줄 과학적인 증거가 부족하고 제조된 건강보조식품에 대한 구체적인 효능 연구가 부족하여 소비자들에 대한 신뢰성이 부족한 상태에 있으므로 체계적이고 과학적인 효능 연구가 절실함.

○ 뽕나무(Morus alba L.)의 잎 및 뿌리에는 항고혈압성 플라보노이드(kaempferol 및 quercetin 배당체, rutin)와 GABA(ɣ-aminobutyric acid)뿐만 아니라 항당뇨 성분인 1-deoxynojirimycin (DNJ) 및 moran A 등이 함유되어 있음이 밝혀지고 있다. 또한 누에가루, 상백피, 동충하초 뿐만 아니라 오디 추출물도 혈당강하 및 혈압강하작용이 있는 것으로 보고됨. 그러나 오디 및 잠상산물 추출물을 혼합한 복합제제의 항당뇨, 항고혈압 및 항노화 활성의 강화효과에 대한 과학적인 연구와 더불어 그들 복합처방제를 이용하여 당뇨병 및 여러 성인병 예방용 고부가가치 기능성건강보조식품의 개발에 관한 연구가 미비함.

○ 오디에 다량 함유되어 있는 안토시아닌 색소는 최근 독성 및 발암 등의 안전성의 문제가 제기되고 있는 합성착색료를 대체할 수 있는 천연 착색료로 크게 각광을 받고 있음. 아울러 안토시아닌 색소는 천연항산화물질로써 뿐만 아니라 항균, 항염증 및 항경련 작용을 지니고 있어 기능성 식품, 화장품 및 의약품의 신소재로써 크게 주목을 받고 있음. 따라서 식이성 천연항산화성 안토시아닌 색소를 많이 함유하고 있는 오디를 이용한 고부가가치의 식품첨가물의 개발이 필요함. 그러나 오디의 안토시아닌 색소는 대부분 cyanidin 배당체 (cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside 등)로 구성되어 있으며, 다른 식품(포도, 고구마, 및 양배추 등)의 안토시아닌 색소에 비해 열, pH, 금속 및 효소 등 여러 물리화학적인 요인에 대해 매우 불안정하여 식품의 가공 및 저장 중 쉽게 탈색 및 변색을 초래하는 단점이 있음.

○ 이러한 기술적인 측면의 연구 필요성을 요약해 볼 때 오디의 맛과 기능성을 최대한 유지시키면서 첨가제로서 혹은 기능성식품으로서 개발하고 나아가 여기에 여러 잠상 물질을 적절히 첨가하여 각 질병의 목적에 부합되게 그 효과를 상승시킨 복합처방의 고품질 기능성건강보조식품을 제조하는 기술을 개발하여 제품을 다양화시키고 그리고 이들 제품의 효능을 과학적으로 규명하여 규격화시킴으로서 소비자로부터 신뢰를 얻음으로서 소비의욕을 증대시킬 수 있는 기술적 연구가 절실함.

나. 경제・산업적 측면

○ 오디 및 뽕잎으로부터 생리활성물질의 검색과 더불어 그를 이용한 기능성식품의 개발에

관한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 아직까지 기호면이나 가공면에서 품질을 향상시킨 기능성식품이 개발되지 못한 실정이며, 또한 오디 및 뽕잎의 효능에 대한 과학적인 근거가 부족하여 이들 제품의 이용도가 크게 증대되지 않고 있는 실정임.

○ 따라서 이러한 현시점에서 국내에서 생산하고 있는 원료 값이 저렴한 오디와 뽕잎, 동충하초, 누에 및 기타 잠상물질을 이용한 건강보조식품을 저렴한 가격으로 생산하여 많은 사람들이 쉽게 이용할 수 있게 됨으로서 양잠농가의 소득증대 및 나아가 식품산업체의 산업화 발달로 국민소득이 증대되고 수입대체효과를 가져 올 것으로 예상됨. 또 기능성을 강화시킨 다양한 제품의 생리적 효능에 대해 동물실험을 통한 구체적이고 과학적인 연구결과를 근거로 홍보하여 소비자의 신뢰도를 구축하여 소비자의 이용도를 증대시킴으로서 양잠농가의 소득을 증대시킬 수 있는 연구가 필요함.

○ 최근 국외 뿐만 아니라 국내에서 식품 및 생약추출물을 이용한 기능성 건강보조식품의 판매가 급성장하고 있음. 따라서 외국산 오디가공품의 수입 대체품으로서 우리나라 오디가공품의 개발이 요구됨. 만약 우리나라의 오디 및 잠상물질을 원료로 우수한 기능성건강보조식품을 개발하여 수입되는 건강보조식품의 절반만을 대체하더라도 연간 약 1,000만 달러의 귀중한 외화소비를 줄일 수 있을 것이다. 또 WTO 체제의 농산물 수입개방화에 대처하며 오디를 이용한 고부가가치의 식의약소재 개발이 필요함.

다. 사회문화적 측면

○ 생활수준의 향상과 의학의 발달로 수명이 연장되면서 노인인구가 크게 증가되고 있고 이에 동반하여 각종 성인병이 급격히 증가할 것으로 예상됨.

○ 통계청 발표에 따르며 고혈압, 동맥경화증, 뇌졸중(중풍), 심장질환 등의 심혈관계 질환으로 인한 사망이 우리나라 사망요인 제 1순위로 부각됨. 또한 당뇨병은 우리나라 성인인구의 약 8~10%로 날로 급증하고 있으며 당뇨환자에서는 이러한 고지혈증이나 동맥경화 및 심장질환과 같은 합병증을 동반하므로 심혈관계질환의 원인이 되고 또 이들 합병증으로 인해 결국 사망하게 됨. 따라서 향후 사회문제로 크게 대두될 수 있는 당뇨병과 그 합병증, 고지혈증 및 기타 성인병을 예방 및 치료할 수 있는 천연물 유래의 기능성 식의약제품의 개발이 필요함.

○ 국민소득의 증대와 건강에 관심이 깊어지면서 천연물 유래 건강식품에 대한 소비자의 기호성의 증대와 더불어 합성첨가물을 사용한 식품을 꺼리는 경향이 두드러지면서 보다 안전한 기능성 천연식품의 개발이 필요함.

라. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

○ 오디는 국내에서 생산되고 있는 생약 과실(산수유, 구기자, 산사자, 오미자 및 복분자 등) 중 가장 생산량이 적은 과실로서 일부 가공용으로 이용되고 있으나 거의 생과 또는 건과류로서 약용으로 사용됨. 현재 잼, 젤리 및 상심주 등 일부 가공되어 이용되고 있을 뿐 거의 대중화되어 있지 못한 실정임. 그러나 최근 오디가 지니고 있는 음료 적합성 및 생리활성물질 때문에 국내에서 오디를 생산할 수 있는 뽕나무의 개발이 활발히 진행되고 있음. 최근 매실음료의 큰 호황에 힘입어 국외로부터 다량의 오디가 수입될 전망임. 따라서 현재 오디의 대량생산 및 수입 오디의 진출에 대비하여 우리나라 오디의 품질과 특성에

가장 적합한 가공법을 개발하여 효과적으로 제조할 수 있는 독특한 가공기술과 그를 이용한 식의약제품의 개발이 필요함 (전남 지역특화산업 육성계획, 후보산업: 차세대식의약소재, 전남테크노파크정책기획단, 2012).

○ 오디는 여러 가지 당, 산, 아미노산 및 향기성분을 함유하고 있어 자양 · 강장 효과가 우수할 뿐 아니라 당뇨 및 관절통 치료 효과가 있는 것으로 보고되고 있음. 그러나 anthocyanin 색소를 많이 함유하고 있어 가공 및 저장 중에 쉽게 변색 또는 퇴색되는 문제점이 부각됨. 따라서 이런 문제점을 해결하기 위해 오디 가공 산업에서는 현재 열처리 및 화학적 처리방법을 이용하여 건과류 및 가공식품을 개발하고 있으나 이로 인해 오디의 독특한 맛, 향기 및 색깔과 더불어 생리활성성분이 소실되거나 가공 후 변색 및 이취 등의 문제가 일어날 수 있음.

○ 현재까지 오디의 일반성분, 색소, 향기 및 생리활성물질에 관한 연구와 더불어 오디의 생화학적 및 약리적작용에 관한 연구는 많은 반면, 오디를 이용한 알코올 및 비알코올성 음료의 개발에 관한 연구는 미흡하고 또 체계적인 비가열 가공방법이 확립되지 못한 상태임. 특히 오디 품종마다 적당한 가공기술이 개발되어 있지 않는 실정임.

○ 지금까지 개발된 건강보조식품들 중에 많은 제품이 성분 함량 제시도 미비할 뿐만 아니라 과학적인 효능 규명도 없이 과대 광고로 소비자의 신뢰를 가지지 못함. 따라서 오디 및 잠상산물의 생리적 기능에 대한 구체적이고 과학적인 규명으로 각종 성인병 예방 및 치료에 대한 사용 한계량을 제시함으로서 실제 소비자가 믿고 이용할 수 있는 방안 제시가 요구됨.

3. 세부과제별 연구개발의 필요성

가. 제1세부과제

○ 대학 및 연구소의 몇 개 연구실에서 약물대사 연구를 수행하고 있으나 신기능 소재 및 신약 개발의 목적으로 하는 연구개발은 미비한 실정임.

○ 본 연구팀에서는 chemical library 제조기술, P450 효소공학기술, 재조합 P450 변이효소의 발현 분리정제 기술, P450 효소의 항체 제조 기술, 대사분석 기술, 생리활성물질 탐색 기술 등의 P450의 핵심기술을 바탕으로 P450 및 관련효소에 대한 연구를 수행하고 있음.

○ 본 연구팀은 in silico design 기술, 식물·사람·미생물 유전자 확보, 유전자 발현 및 활성에 대한 HTS system구축, combinatorial chemical library기술을 확보.

○ 본 연구팀은 천연물 유래 resveratrol, statin계 화합물, alkylbene계 화합물 활용 기반기술을 확보.

○ 무작위 돌연변이 PCR법이나 최근 DNA shuffling법을 이용한 효소의 분자다양성을 제공하고 필요한 성질을 갖는 효소를 탐색하려는 시도가 있으나 이 역시 단편적임.

○ 미생물 P450 효소의 중요성이 최근 강조되었는데 이는 높은 활성과 안정성 보유, 그리고 인간 P450 효소의 활성을 공유하는 미생물 P450 발견되었기 때문임 (Yun et al., 2007).

○ 1999년 일본 Kitasato 대학의 T. Omura 교수팀이 ”polyketide anthelmintic macrolide 항생제인 avermectin을 합성하는 유전자에 대한 연구”에 대한 논문을 발표하였는데 P450 유전자가 항생제 avermectin의 합성에 중요함을 발표하였음.

○ 2006년 및 2009년 미국 Caltech의 Arnold 교수팀이 P450를 활용하여 인간 P450 효소가 생

산하는 drug인 propranolol 의 대사체를 생산할 수 있는 미생물 P450 효소개발.

○ 제약 산업에 필수적인 P450 효소 및 관련제품들은 미국의 BD Bioscience 및 Biocatalysis 등의 기업들에 의해 제품화되어 판매되고 있음. 안전성 평가, 약물대사분석, 신약개발 용도로 이용됨.

○ 전 세계적으로 P450 분야 전문 Web site 운영 (예, http://www.icgeb.trieste.it 및 linked sites).

○ 효소유전자의 무작위 돌연변이기술 플랫폼: 가장 광범위한 방법의 무작위 돌연변이기술은 mutagenic PCR법이고 간단하고 손쉬운 방법이지만, 돌연변이율이 낮음. Maxygen사의 DNA shuffling기술은 가장 강력한 기술이며 특히 비슷한 유전자끼리의 family shuffling은 매우 유효한 기술이다. CalTech의 Arnold교수가 개발한 StEP 및 random priming 기술이 있으며, Pennsylvania주립대의 Benkovic교수의 ITCHY(Iterative truncation for creating hybrid enzymes) 기술, 일본의 Itaru Urabe교수의 random elongation mutagenesis기술, 대장균의 mutator유전자을 이용한 방법 등이 개발되었음.

○ 돌연변이된 효소 변이체의 탐색기술 플랫폼: 미국 Texas대 Georgiou박사팀은 Fluorescence-Assisted-Cell-Sorting (FACS) flow cytometer을 이용하여 미생물 표면에 발현된 단백질 라이브러리를 스크리닝할 수 있는 기술을 확립하였음. 미국의 Genencor International사는 subtilisin의 변이체를 발현하는 Bacillus균을 미세관막을 통해 분리 선택할 수 있는 기술을 확립함.

나. 제2세부과제

○ P450은 식물에서 여러 효능을 나타내는 Natural products 합성에 관여하고 있으며 현재까지 알려진 natural products는 수천 종에 이르다. 수백 가지의 다양한 P450 효소가 다양한 천연물 합성에 관여하는 것으로 추정되고 있다. 특히 Arabidopsis에서만 밝혀진 P450 유전자가 250여종에 달하고 다른 식물에서도 많은 종류의 P450 유전자가 있음이 보고되고 있음.

○ 하지만 그 기능이나 유전자 정보가 완전히 밝혀진 식물 P450은 수십 종뿐이고 대부분은 식물에서 그 기능이 불확실 하다. 아직도 계속해서 난치병 혹은 불치병 치료제를 식물에서 찾으려고 하는 것은 이런 P450의 역할에 의해 수만 종의 2차대사산물 derivatives의 합성이 가능함에 그 근거를 두고 있음.

○ 기능성 신소재 및 제약분야의 응용성 때문으로, Merck, Pfizer 등 세계 굴지의 제약회사들이 P450 관련 전담 연구실 운영. 생물공정 기술을 활용한 P450의 대량생산은 아직 시도되지 않았음.

○ 지금까지 P450 관련 기술은 효소의 발굴, 재설계 같은 효소의 전환 능력 향상을 위한 분야에 국한되고 생물전환공정 분야의 연구가 이루어지지 않아 산업화되지 않은 실정임.

○ 현재까지 11,200 여종의 P450 유전자가 밝혀졌으나 식물 P450 유전자를 활용한 산업용 효소에 대한 개발은 전무한 상태임.

○ 따라서, 식물 P450 효소에 관련된 산업용 산화효소의 개발은 세계 최초로 시도되는 연구분야이므로 이에 대한 연구는 지금 시작한다고 해도 세계적 수준으로 쉽게 올라갈 수 있으며 파생되는 수많은 결과물들을 선점하는 효과를 거둘 수 있으므로 이에 대한 연구가 시급한 시점임.

○ 신기능성 물질개발을 위한 P450 Genomics를 활용한 유용 drug lead 물질 개발은 세계 최초로 시도되는 연구 분야이므로 이에 대한 연구는 지금 시작한다고 해도 세계적 수준으로 쉽게 올라갈 수 있을 뿐만이 아니라 파생되는 수많은 결과물들을 선점하는 효과를 거둘 수 있기 때문에 이에 대한 연구가 시급함.

○ 산업용 효소의 개량을 위한 분자다양성을 만드는 기술(예, mutagenic PCR, DNA shuffling, Random priming, StEP, ITCHY, Random elongation, etc)은 다양하게 개발되었으나 많은 변이체 중에서 원하는 target 효소 유전자를 신속하게 탐색할 수 있는 기술은 많지 않음.

○ 현재의 탐색기술은 매우 다양한 산업용효소에 적용하기보다는 case-by-case로 적용할 수 있는 기술로 한계가 있음. 광범위하게 적용할 수 있는 범용탐색기술 플랫폼이 필요함.

다. 제3세부과제

○ 산업화, 환경의 오염, 고령화 등으로 암 및 자가면역질환 등과 같은 면역질환 유병률의 급속한 증가함.

○ 인체 만성질환 대다수가 면역과 직간접적으로 밀접하게 연관되어 있으며, 신규 면역치료제의 개발은 여러 분야의 치료제에서 파급효과를 얻을 수 있음.

○ 현재 치료제가 없는 각종 난치성 질환은 기존의 치료제로서는 완치가 불가능하기 때문에 인체의 세포면역반응을 유도시키는 치료백신 혹은 면역조절제 그리고 치료용 항체를 이용하여 치료 효과를 높이는 전략이 사용되고 있음.

○ 면역치료제 개발 기술은 대표적인 바이오 제약산업이므로 핵심원천기술을 보유할 경우 동 산업 경쟁력 제고 및 신 산업군을 형성하여 선진 제약시장의 진출이 가능하며, 국내의 생명공학수준을 국제경쟁력 있는 분야로 견인할 수 있음.

○ 기존의 항바이러스제/항암제 등은 난치성 질환에 대한 제한된 약효, 약제내성 바이러스출현, 각종 부작용 발생, 고비용(치료비) 등과 같은 단점을 가지고 있지만 천연추출물로의 유도체를 통한 면역치료제는 이를 보완·극복할 수 있는 치료 기술로 향후 10년 내에 차세대 치료제 시장을 주도할 것으로 예상됨.

○ 현재, 식물이나 작물 추출물의 유도체들을 통한 면역질환 치료제에 대한 개발은 전무한 실정이어서 식물추출물의 유도체들을 통해 고기능성, 대량생산이 가능할 수 있다는 것이 본 연구의 차별성으로, 시장경쟁력 있는 이러한 장점을 살리는 시제품 개발이 요구됨.

○ 최근 들어 기능성 식품에 대한 관심이 증대됨에 따라 소라렌, 레스베라트롤, 커큐민 등의 다양한 면역기능 조절에 관한 연구가 점차 진행되어지고 있는 시점이라 경쟁의 연구가 될 수 있으므로 빠른 실험 수행이 절실히 요구되어지고, 이러한 천연추출물의 유도체를 통한 고기능화는 획기적인 개발이 될 수 있을 것이라 사료되며 고기능성 물질의 대량생산으로 기존의 의약품보다 훨씬 안전하고 저렴하게 상품화 할 수 있는 시제품을 제작할 수 있을 것이라 사료됨

○ 결과적으로 인체에 독성이 전혀 없는 식물추출물의 유도체(derivatives)를 통해 고부가가치의 의료용 식물소재 발현시스템을 개발하여, 이를 토대로 일상생활에서 식품으로 섭취거나 환부에 붙이는 등의 최적의 system을 개발함으로써, 면역기능 강화 및 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있을 것이라 판단됨.

라. 제1협동과제

○ 기능성 물질 신소재 개발을 위한 combinatorial biocatalysis를 위한 미생물 P450 활용 플랫폼 구축을 구축하는 기술은 아직 외국에서도 개발이 더딘 상태이며, 앞으로 산업화나 활용부분에서 수준 높은 기술임.

○ 산업용 효소에 대한 연구 저변은 넓으나 대부분 단편적으로 한 개의 효소에 대한 미생물의 탐색, 해당 유전자의 클로닝, 발현 및 분리정제, 최종적으로는 효소의 생화학적인 성질의 연구에 국한됨.

○ 1999년 미국 Caltech의 F.H. Arnold 교수팀이 peroxide shunt pathway를 이용해서 P450의 분자진화 기술을 활용한 논문으로 P450 효소의 산업적 응용 가능성을 제시 (Otey et al., 2006).

○ 2002년 미국의 Vanderbilt 대학의 Guengerich교수가 P450가 제약산업 (Combinatorial chemical library), 생물공학 (생물전환공정) 및 환경공학 (환경유해물질 검색 및 제거) 분야의 산업적 응용 제시.

○ 산업용 효소의 확보기술 플랫폼: 산업용 효소의 개량을 위한 기술 중 특허로 보호되는 자사만의 플랫폼기술을 확보하고 있는 벤처회사들이 최근 매우 빠른 속도로 생기고 있음. 기술자체가 상품이 되는 시대 도래.

마. 대표적인 기능성 농특산물 유래 Chemopreventive Phytochemicals

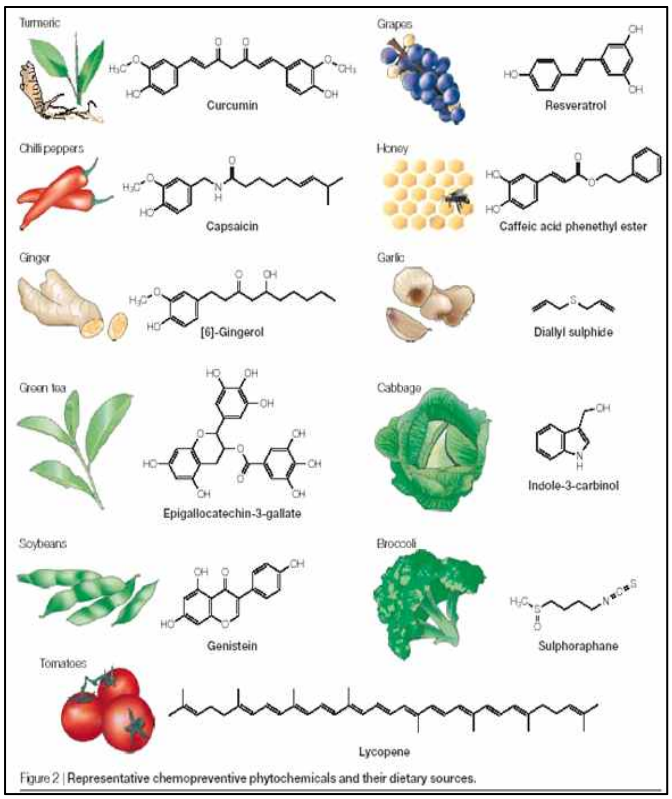
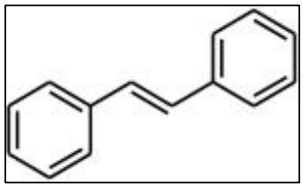


Figure 2 | Representative chemopreventive phytochemicals and their dietary sources.

바. 스틸베노이드(Stilbenoid) 화합물의 특성

○ 스틸베노이드는 나무 심재(heartwood)의 이차대사물이며 식물 조직이 산출하는 항독성 물질인 파이토알렉신(phytoalexins)으로 작용함. 스틸벤(stilbene)의 수산기

유도체(hydroxylated derivatives)이며
페닐프로파노이드(phenylpropanoids) and share most of their biosynthesis pathway with 캘콘(chalcones)의 생합성 경로를 공유함.



○ Resveratrol은 대표적인 스틸베노이드(stilbenoid)이며 다양한 측면에서 건강에 유익한 것으로 알려져 있음.

○ Stilbene의 기본구조

- (E)-stilbenoid는 diarylethene의 한 종류로 trans ethene 이중결합을 가지고 있으며 양쪽에 phenyl ring이 결합되어 있음.
- 스틸벤은 2가지 이성질체로 존재하며 트랜스 형태인 trans-1,2-diphenylethylene((E)-stilbene 또는 trans-stilbene)와 시스 형태인 cis-1,2-diphenylethylene((Z)-stilbene 또는 cis-stilbene)로 존재함. 시스형태는 불안정하며 낮은 녹는점(5-6 °C)을 가지나 (E)-stilbene의 경우는 125 °C 근처이며 두 가지 이성질체의 물리적 특성이 상당히 다름.

○ 스틸벤(Stilbene)의 특성

- 용도: 염료, 유리 광택제, 인광 물질로 사용됨.
- 스틸벤 유도체인 스틸베노이드(stilbenoids)는 자연계에서 식물에 존재하며 대표적인 것이 레스베라트롤(resveratrol)과 프테로스틸벤(pterostilbene)임. 이러한 유도체들은 E(트랜스) 이성질체로 존재하며 estrogenic activity을 나타내며, Diethyl stilbestrol, Fosfosterol, Dienesterol 등과 같은 non-steroidal synthetic estrogens을 만드는데 이용됨.

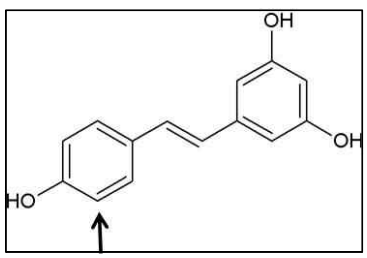
사. 본 연구개발에 활용할 오디 유래 대표적 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물의 특성

(1). 레스베라트롤(Resveratrol)

○ 화학구조

- *trans*-3,5,4'-Trihydroxystilbene; 3,4',5-Stilbenetriol; trans-Resveratrol;
- (E)-5-(p-Hydroxystyryl)resorcinol (E)-5-(4-hydroxystyryl)benzene-1,3-diol
- Resveratrol(3,4',5-trihydroxystilbene)은 polyphenolic 화합물에 속하는 stilbenoids계 화합물.
- grapes, wine, grape juice, peanuts, blueberries, bilberries, cranberries 등에서 발견됨.

Resveratrol은 1940년 미나리 아재비과의 식물의 뿌리에서 최초 분리됐다. 이후 여러 종류의 전통적인 중국과 일본의 약용 식물의 뿌리에서 분리됨. 1992년 레드 와인의 장기섭취가 심장 보호에 도움을 준다는 연구결과가 나오면서 관심을 끌게 됨. 그 이후 다양한 암질환, 알츠하이머병 예방, 심혈관 질환을 예방한다는 연구결과가 발표됨. (Kim et al., 2009)



○ 기능: 항암, 항염, 항산화, 질환감소, 항바이러스 및 항균, 면역기능 조절, 생명연장, 약물대사 조절 효과가 있는 것으로 알려져 있음.

- 항암효과: Resveratrol은 유방암, 전립선암, 위암, 직장암, 췌장암의 진행을 억제한다. 또한 설치류 종양 모델에서 발암물질에 의해 유도된 다양한 종양의 성장을 감소시키는 결과가

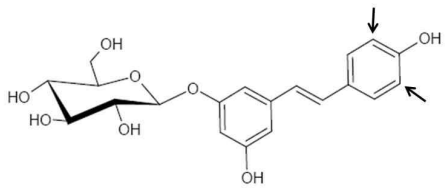
발표되었다. 피부암의 경우 98%까지 종양의 수가 감소됨.

- 항염효과: Resveratrol은 cyclooxygenase과 lipoxygenase을 포함하는 여러 inflammatory enzymes을 저해하며 NFκB, AP-1과 같은 pro-inflammatory transcription factors를 저해함.
- 항산화 효과: Resveratrol과 대사체들이 low density lipoprotein (LDL) 산화를 억제함.
- 질환감소효과: Resveratrol이 비만 생쥐의 수명을 증가시키고, 당뇨병과 심장 질환, 그리고 다른 중요한 비만관련 질병 발생의 감소를 유도. 또한 뇌졸중 감소 효과를 나타냄. Atherosclerosis의 진행을 억제하는 효과도 있음.
- 항바이러스 및 항균효과: 항바이러스 및 항균효과 뿐만 아니라 신경 보호, 항노화 효과
- 면역기능 조절효과: 관절염, 건선 등의 면역질환을 억제하는 것으로 나타났다. 생쥐의 면역 반응을 강화 현상 발견.
- 생명연장 효과: Yeast, worms, fruit flies, fish, mice에 투여시 생명연장 효과 나타냄.
- 약물대사 조절효과: Resveratrol이 대사에 관여하는 주요 human cytochrome P450 3A4의 저해제로 작용함으로써 약물대사에 관여함.

(2). 피세이드(Piceid): polydatin

○ 화학구조:

- 2-[3-Hydroxy-5-[(E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]phenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5 -triol
- Stilbenoid glucoside이며 resveratrol의 주된 유도체. *Polygonum cuspidatum*에서도 발견됨.
- 오디에서 발견되는 resveratrol은 주로 배당체로 piceid의 형태로 존재함.
- P450 효소에 의해 phenol ring에 hydroxylation 반응에 의해 유도체 생성 (화살표)

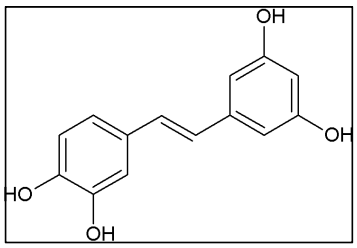


○ 기능: resveratol과 동일한 것으로 알려져 있음.

(3) 피세아타놀(Piceatannol)

○ 화학구조:

- 5-[(E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)vinyl]benzene-1,3-diol
- Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene)는 stilbenoids의 한 종류이며 전형적인 페놀계 화합물(phenolic compound)임. resveratrol의 대사체이며 red wine에서 발견됨.



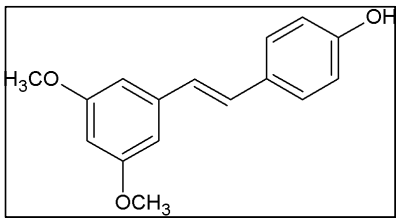
○ 기능:

- 항바이러스 효과: leukemia, non-Hodgkin's lymphoma 및 Epstein-Barr virus 관련 질병에 관련된 viral protein-tyrosine kinase인 LMP2A이 활성 저해효과.
- 항암효과: anti-cancer 및 anti-EBV drug으로 개발되고 있음.

(4). 프테로스틸벤(Pterostilbene)

○ 화학구조:

- 4-[(E)-2-(3,5-Dimethoxyphenyl)ethenyl]phenol; 3',5'-Dimethoxy-4-stilbenol
- 3,5-Dimethoxy-4'-hydroxy-E-stilbene
- Resveratrol와 유사한 구조의 스틸베노이드(stilbenoid)의 한 종류이며 blueberries와 grapes에서 발견. 식물이 세균/바이러스 감염에 대항하기위해 생산하는 phytoalexins에 속함.



○ 기능:

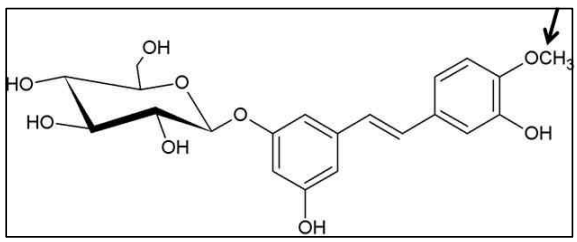
항암, 항비만(고콜레스테롤 및 고지방 저해효과) 및 인지저하 감소 효과를 나타냄. 또한 항당뇨, 항염증, 항산화, 항균 및 항바이러스, 간기능 개선 효과를 나타냄.

- 지방 및 콜레스테롤 저해효과: blueberry를 투여한 동물에서 혈액내 지방 및 콜레스테롤 농도가 감소한 것이 보고됨. 심장질환과 심장발작을 일으키는 것으로 알려진 콜레스테롤을 분해하는 효과를 나타내는 핵수용체인 PPAR들에 직접 결합하여 작용하는 것으로 알려짐.
- 항당뇨: 당뇨모델 동물(rat)에 프테로스틸벤을 투여하였을 때 혈액내 포도당의 농도가 56% 감소한 것으로 보고됨. 또한 인슐린과 헤모글로빈 레벨이 정상적으로 회복됨을 관찰함하였음.
- 인지능력감소 저해 효과: blueberry, strawberry 또는 spinach extracts를 투여한 쥐(rat)에서 인지능력 감소가 현저히 저해되거나 원상으로 회복됨을 발견하였음.
- 항암 효과: 쥐를 동물모델로 이용한 실험에서 프테로스틸벤이 강력한 항산화효과 및 항암효과를 나타내었고 레스베라트롤의 효과와 유사함을 발견하였음. 프테로스틸벤은 발암물질을 활성화시켜서 암을 유발하는 cytocrhome P450 활성을 저해함으로써 항암효과를 나타냄. 프테로스틸벤의 효과는 레스베라트롤의 효과보다 더 강력한 것으로 보고되었음.

(5). 라폰티신(Rhaponticin)

○ 화학구조:

- Rhaponticin)은 3',5-dihydroxy-4'-methoxystilbene 3- O-beta- D-glucopyranoside이며 대황 뿌리줄기(rhubarb rhizomes)에서 발견되는 스틸벤 배당체(stilbene glucoside)임.



○ 기능: 생쥐를 동물모델로 한 실험에서 당뇨를 저하시키고 Alzheimers disease를 개선시키는 효과를 발견하였음.

제 2 절. 연구개발 목표, 범위 및 내용

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

가. 최종목표

오디 유래 스틸베노이드 화합물로부터 생촉매를 이용한 생물(효소)전환 방법으로 유도체(derivatives)를 합성하여 면역기능을 조절 시킬 수 있는 고부가가치 신기능성 물질을 개발하고 이를 제품화함을 목표로 함.

나. 주요내용

○ 본 연구팀이 보유하고 있는 P450 genome, 효소공학 및 효능검증 관련 핵심기술을 바탕으로 *in silico* design, 분자진화기술, 유도체(derivatives) 제조기술, 대사체 활용기술을 이용하여 스틸베노이드(stilbenoid)계 면역기능 조절 식의약소재 후보물질의 개발 및 검증 시스템을 구축하고자 함.

○ 이 연구가 성공적으로 수행되면 <스틸베노이드(stilbenoid)계 면역기능 조절 식의약소재 개발> 시스템 구축이 가능함.

○ 제안하는 연구과제는 본 연구팀이 보유하고 있는 <*in silico* design 및 분자진화기술>을 바탕으로 <스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체 활용기술> 및 <효능 평가시스템 구축 및 검증기술>을 활용하여 <신규한 기능을 가지는 면역기능 조절 식의약소재>을 개발 하고자 함.

○ **최종목표 달성을 위한 연구팀의 핵심 보유 기술과 본 연구계획서에서 제안하는 연구내용**

2. 과제별(세부・협동) 연구개발의 목표 및 내용

가. 제1세부과제:

P450 효소를 이용한 면역조절 활성 신소재 개발용 스틸베노이드계 유도체 개발

1) 연구개발의 최종목표

오디 유래 스틸베노이드 화합물로부터 생물(효소)전환을 이용하여 유도체를 제조한다. 면역기능을 조절시킬 수 있는 물질을 탐색 및 개발하여 여러 질병들에서 면역기능을 조절할 수 있는 고부가가치의 시제품을 개발하고 산업화하고자함.

2) 연구개발 목표의 성격

- 오디 유래 스틸베노이드 화합물의 유도체을 제조하여 우수한 면역조절 능력을 가진 고기능성의 유도체를 개발
- 기능성 소재 및 건강보조식품으로 이용될 수 있는 고부가가치의 제품 개발 기반기술

3) 연구내용

○ 오디 유래 스틸베노이드 화합물에서 생물전환 가능성 탐색

- P450 효소를 활용한 스틸베노이드 화합물의 생물전환 연구
- 생물전환된 스틸베노이드 화합물 유도체 분석 방법 확립

○ 스틸베노이드 화합물 유도체 제조 최적화

- 스틸베노이드 화합물 유도체 제조방법 최적화
- 생촉매 P450 효소 이용방법 최적화

○ 스틸베노이드 화합물 유도체 후보물질 제조방법 최적화

- 스틸베노이드 화합물 유도체 후보물질 분석 및 화학구조 규명
- P450 효소를 생촉매로 이용한 스틸베노이드 화합물 유도체 후보물질 제조방법 최적화
- 실험실 수준의 스틸베노이드 화합물 유도체 시제품의 제조

나. 제2세부과제:

생촉매 활용가능 식물 P450의 발굴 및 오디 스틸베노이드 화합물 프로파일링

1) 연구개발 목표

식물에서 다양한 천연물질 합성에 관여하는 P450 유전자 분리하여 그 특성을 규명하고 이를 대량생산하여 생촉매 반응에 활용한다. 또한 작물에서 생산되는 천연물질에 대한 프로파일을 제작하고 이를 유용물질 생산의 기본 정보로 활용

2) 연구개발 목표의 성격

- 생물촉매 활용 가능한 식물유래 P450 효소 대량 생산 및 P450 생물촉매 제품화
- Natural product인 스틸베노이드계 화합물의 분리 방법 확립 및 작물별 스틸베노이드계 화합물 프로파일링 작성하고 이를 유용물질 생산의 기본 정보로 활용

3) 연구개발 내용

○ 스틸베노이드계 화합물 합성에 관여하는 식물유래 P450 조사

- Micro-array data 등 식물 유전정보 DB를 근거로 스틸베노이드계 화합물 및 이의 유도체 화합물 합성에 관여하는 P450 유전자군 선별

○ 식물에서 생촉매 효소로 사용가능한 P450 유전자 분리 및 대량 생산

- 식물 DB의 P450 유전자 정보를 기초로 하여 식물에서 P450 유전자 분리
- 식물유래 P450 유전자의 발현 (미생물, 식물) 및 대량생산
- 식물유래 P450의 활성을 조사하여 생물촉매로 활용 가능성을 검정하고 스틸베노이드계 화합물의 유도체 합성에 이용
- 식물유래 P450 효소의 상용화 가능성 탐색 및 개발

○ 식물에서 스틸베노이드계 화합물의 프로파일링

- Target 천연물질 선정: 식물에서 쉽게 생산 가능한 스틸베노이드계 화합물로서 P450 효소에 의해 생물전환 가능한 천연물질 선정
- 오디 추출물로부터 물질 분획
- 오디 스틸베노이드계 화합물 프로파일링

다. 제3세부과제:

<u>오디 유래 스틸베노이드 유도체로부터 면역기능조절 활성 물질 탐색 및 검증</u>

1) 연구개발의 최종목표

인체에 무독성이면서 면역기능을 조절시킬 수 있는 스틸베노이드계 화합물로부터 파생된 유도체를 탐색 및 개발하여 면역기능 조절 기작을 연구하고 여러 질병들에서 면역기능을 조절 시킬 수 있는 고부가가치의 시제품을 개발하고 산업화함.

2) 연구개발 목표의 성격

- 국내산 농특산물인 오디 유래 스틸베노이드계 화합물을 활용하여 우수한 면역조절 능력을 가진 고기능성의 유도체를 개발
- 건강보조식품 및 의료용 치료제로서 이용될 수 있는 고부가가치의 제품 개발 및 산업화로 경제적 효과 창출

3) 연구내용

○ 국내산 농,특산물인 오디로부터 면역조절 활성 신소재 탐색 및 기능연구

- 항산화활성 및 면역조절 활성 물질 검색
- 마우스 모델에서 면역세포 증식 및 면역 단백질의 발현 연구를 통한 기능성 신소재 탐색 및 기전 연구

○ 폴리페놀계 화합물 유래 유도체의 면역조절 활성 탐색

- 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역 활성 연구 및 기전 연구를 통한 후보 물질 선정

- 마우스 모델에서 후보 물질의 면역조절 활성 탐색 및 효과 연구

○ 최종 후보 물질 선정 및 delivery system 개발
- 질환 모델에서 면역조절 효과 규명 및 독성검사를 통한 후보물질의 안전성 연구에 의한 최종 후보 물질 선정
- 투여경로, 투여용량 및 formulation 확립을 통한 후보물질의 delivery system 개발 (주사, 경구투여, 패치형태 등)

○ 시제품 개발 및 효능 검증
- 선정 물질의 효능 검증
- 확립된 delivery system에 적합한 시제품 개발 및 효능 검증

라. 제1협동과제: 생촉매를 이용한 면역기능조절 신소재 물질 대량생산 기반구축 및 상용화

1) 연구개발의 최종목표

생물전환 기법을 이용하여 스틸베노이드계 화합물의 유도체로부터 면역기능조절 신소재 물질의 대량생산, 생물공정 최적화, 시제품 제조 및 상용화를 목표로 함.

2) 연구개발 목표의 성격
- 산·학 연계 체제를 구축하여 제품연구 및 개발 담당
- 신소재 면역조절물질의 산업적인 생산을 위해서는 고농도 대량 반응이 필수적이며, 이를 위하여 최적 반응조건을 확립하기 위한 연구가 필요. 신소재 면역조절물질 생산을 극대화하기 위한 최적화 연구결과를 토대로 생물공정의 최적 운전조건 확립.
- 축적된 천연물 및 효소제품의 연구 및 상용화 경험을 바탕으로 본 연구로부터 개발 될 선정물질에 본 기업연구소의 Know-how를 접목시켜 경제적 이익을 극대화할 수 있는 고효능 제품 개발 및 상용화.
- 면역기능조절 선정 물질의 대량 생산 후 유효성 및 안정성 검사

3) 연구내용

○ 스틸베노이드계 화합물 유도체 제조공정 최적화
- 생촉매를 활용한 스틸베노이드계 화합물로부터 유도체 생산 공정 개발

○ 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 후보물질 제조공정 최적화
- 스틸베노이드계 화합물 유도체 제조공정 최적화
- 생촉매 이용방법 최적화

○ 선정 물질 대량생산 기반구축
- 생촉매를 이용한 스틸베노이드계 화합물 유도체 선정 물질 제조방법 최적화

○ 면역기능조절 선정 물질 상용화
- 면역기능조절 선정 물질 시제품 제조

- 면역기능조절 선정 물질 시제품 대량 생산방법 최적화

○ 상용화 기반 구축
- 면역기능조절 선정 물질의 대량 생산 후 유효성 및 안정성 검사
- 대량 생산 및 분리/정제 공정을 위한 저비용 고효율의 최적 시스템 개발

3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

가. 1차년도 (2011-2012)

연구개발의 목표	연구개발의 내용
1. 오디 유래 스틸베노이드계 화합물의 생물전환(효소전환)	- P450 효소를 활용한 스틸베노이드계 화합물의 생물전환 연구 - 생물전환된 스틸베노이드계 화합물의 유도체의 분석 방법 확립
2. 식물로부터 천연물질 합성에 관여하는 P450 유전자 발굴	- Microarray data 등 식물 유전정보 DB를 근거로 Phenylpropanoid 및 이의 유도체 화합물 합성에 관여하는 P450 유전자군을 선별 - 식물 유전자 DB를 이용하여 P450 유전자를 search 한 후 full length P450 EST를 분석 - 해당 작물에서 조직별 mRNA 분리한 후 식물에서 P450 유전자 cDNA 합성
3. 오디로부터 면역조절 활성 신소재 탐색 및 효능 탐색	- 항산화활성 및 면역조절 활성 물질(면역기능 조절지표) 분석: 세포독성시험, 활성산소 생성능, Ig 생성, T/B cell 증식, 면역기능조절 cytokine 조절능 - 마우스 모델에서 면역세포 증식 및 면역 단백질의 발현 연구를 통한 기능성 신소재 탐색 및 효능 확인: Fibroblast 증식능, Collagen 발현, Proinflammatory cytokine 발현 조절능
4. 스틸베노이드계 화합물 유도체 제조공정 최적화	- 생촉매를 활용한 스틸베노이드계 화합물로부터 유도체의 생산 공정 개발

나. 2차년도 (2012-2013)

연구개발의 목표	연구개발의 내용
1. 스틸베노이드계 화합물 유도체 제조방법 최적화	- 스틸베노이드계 화합물 유도체 제조방법 최적화 - 생촉매 P450 효소 이용방법 최적화 - 스틸베노이드계 화합물 유도체 후보물질 분석 및 화학구조 확인 - P450 효소를 생촉매로 이용한 스틸베노이드계 화합물 유도체 후보물질 제조방법 최적화
2. 식물유래 P450 발현 및 스틸베노이드계 화합물 프로파일링 및 생촉매 활용 가능 P450 대량분리	- 식물에서 P450 유전자 cDNA 합성 및 염기서열 분석 한 후 발현 벡터에 클로닝 하여 대장균 및 식물 P450 유전자 발현 및 분리 - 오디 유래 물질을 분획하고 스틸베노이드계 화합물 프로파일링 - 생촉매 반응에 이용할 스틸베노이드계 화합물 선정 - 식물 P450 유전자를 발현하는 대장균을 생촉매 반응에 활용 - P450 형질전환 대장균 및 형질전환 식물로부터 활용 가능 P450 대량분리 - 오디에서 다량으로 발현되는 스틸베노이드계 화합물을 분석하여 대상 작물별 target 천연물질을 선정
3. 스틸베노이드계 화합물 유도체의 면역조절 활성 확인	- 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성 탐색: 암세포증식능, 자연살해세포 cytotoxicity 기능, 암전이능, 세포자연사 및 cell cycle, 암 진행정도측정(survival rate, tumor mass) - 마우스 암 모델에서 유도체 후보물질의 면역조절 활성 및 효능 확인 - 식이유발 고지혈증 마우스 모델에서 후보물질의 면역조절 효능 확인: 고지혈증, 고혈당 및 비만 치료효능
4. 스틸베노이드계 화합물 유도체 후보물질 제조공정 최적화	- 스틸베노이드계 화합물 유도체 제조 공정 최적화 - 생촉매 이용방법 최적화 - 생촉매를 이용한 스틸베노이드계 화합물 유도체 선정 물질 제조방법 최적화

다. 3차년도 (2013-2014)

연구개발의 목표	연구개발의 내용
1. Target 작물인 오디부터 유용 성분 분리 및 시제품 제조	- 오디에서 target 천연물질 분리정제 최적화 - P450 효소 대량생산 최적화
2. 스틸베노이드계 화합물 유도체 시제품 개발 및 제조	- 식물 P450 활용 최적화 - 스틸베노이드계 화합물 유도체 시제품 제조 - 스틸베노이드계 화합물 유도체 시제품 대량 생산방법 최적화
3. 질환동물 모델에서 효능 검증을 통한 후보물질 선정	- 독성 및 안전성검사를 통한 후보물질의 안정성 연구에 의한 최종 후보 물질 선정 - 후보물질의 투여경로 및 투여용량 확립 - 후보물질의 delivery system 개발 및 효능검증
4. 면역기능조절 스틸베노이드계 화합물 유도체 선정물질의 시제품 제조	- 면역조절물질의 추출 및 안정화 기술의 확립: 면역조절물질의 대량생산을 위한 최적의 공정 확립하기 위한 파일롯 수준의 반응기에서 추출된 면역조절물질의 고효율 회수법 개발 - 제품의 상용화를 위한 scale-up 기반 구축 - 면역기능조절 선정 물질 시제품 제조 - 면역기능조절 선정 물질 시제품 대량 생산방법 최적화

라. 4차년도 (2014-2015)

연구개발의 목표	연구개발의 내용
1. 제품화 예상 스텔베노이드계 화합물 유도체 제조 최적화	- 유도체 제조 최적화 - 생산공정 최적화 (예상되는 유도체) - Resveratrol-glycoside, Piceatannol-glycoside, Pterostilbene-glycoside
2. 제품화 예상 스텔베노이드계 화합물 유도체 활용 기반 구축	- 식물 P450을 활용한 유도체 제조의 지속적인 모니터링 및 문제해결 능력 향상 - 생산된 면역조절물질 제품의 물리 화학적 안정화 향상화
3. 제품화 예상 스텔베노이드계 화합물 유도체 선정물질의 유효성 및 안전성 검증	- 제품 효능 향상을 위한 연구 지속화 - 면역기능조절 선정 물질의 상용화에 필수적인 대량 생산 후 유효성 및 안정성 검증
4. 제품화 예상 스텔베노이드계 화합물 유도체의 사업화 추진	- 대량 생산 및 분리/정제 공정을 위한 저비용 고효율의 최적 시스템 개발 - 식품 소재, 화장품 첨가물 (미백소재), 의약외품 소재로서의 각종 평가 - 소재 적합성 시험 및 판매 - 대상 기업: (예시) (주)태평양, LG 생활건강, 애경 등

제 3 절. 연구성과 목표 대비 실적

가. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구 분		지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기타
		출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표														
1차년도	목표	2		1										
	실적	1		1		10					9			
2차년도	목표	2		1										
	실적	2		1		4					8			
3차년도	목표		2	2										
	실적	2	0	3		3					6			
4차년도	목표		2	2			1							
	실적	2	2	0		14	0				6			
5차년도	목표													
	실적													
소 계	목표	4	4	6										
	실적	7	2	5		31					29			
종료 1차년도							1							
종료 2차년도														
종료 3차년도														
종료 4차년도														
종료 5차년도														
소 계														
합 계														

* 단계별 연구성과 목표는 중간평가의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구개발계획에 맞춰 도출하고 예시와 같이 작성

나. 지식재산권

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격), **신품종, 프로그램개발** 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로) 기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
지식재산권 (발명특허)	박테리아 시토크롬 P450을 이용한 제니스테인으로부터 대산산물의 신규한 생산방법 및 이를 위한 조성물	대한민국	전남대산학협력단	2012-07-18	10-2012-0078057				
지식재산권 (발명특허)	박테리아 시토크롬 P450을 이용한 17베타-에스트라다이올로부터 대사산물의 생산방법 및 이를 위한 조성물	대한민국	전남대산학협력단	2013-07-15	10-2013-0083009				
지식재산권 (발명특허)	P450 효소를 이용한 오디유래유도체의 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	전남대산학협력단	2013-07-15	10-2013-0082602				
지식재산권 (발명특허)	시토크롬 P450 효소전환된 오디추출물을 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학조성물	대한민국	전남대산학협력단	2014-06-24	10-2014-0077026				
지식재산권 (발명특허)	고추 유래 CaCPR1 유전자 및 이의 용도	대한민국	전남대산학협력단	2014-07-18	10-2014-0091048				
지식재산권 (발명특허)	박테리아 시토크롬 P450을 이용한 제니스테인으로부터 대사산물의 신규한 생산방법 및 이를 위한 조성물	대한민국				전남대학교산학협력단	2014-09-24	10-1446051-0000	
지식재산권 (발명특허)	박테리아 시토크롬 P450을 이용한 17베타에스트라다이올로부터 대사산물의 생산방법 및 이를 위한 조성물	대한민국				전남대산학협력단	2014-12-01	10-1469514-0000	
지식재산권 (발명특허)	고추 유래 CaCPR1 유전자 및 이의 용도	대한민국	전남대산학협력단	2015-07-17	10-2015-0101837				
지식재산권 (발명특허)	아스트린진 제조용 신규한 조성물	대한민국	전남대학교산학협력단	2015-09-10	10-2015-0128399				

다. 논문게재 및 학술회의 발표

(1) 논문게재

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	권(호)	국명	발행기관	SCI여부(SCI/비SCI)
1	Interleukin-24 attenuates beta-glycerophosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by inhibiting apoptosis, the expression of calcification and osteoblastic markers, and the Wnt/beta-catenin pathway	Biochemical and Biophysical Research Communications	이기모 강형식	428 (1)	미국	Elsevier	SCI
2	Potential in vitro Protective Effect of Quercetin, Catechin, Caffeic Acid and Phytic Acid against Ethanol-Induced Oxidative Stress in SK-Hep-1 Cells	Biomolecules & Therapeutics	윤철호 곽한식	20 (5)	한국	PMC	SCI
3	Bacterial β-(1,3)-glucan prevents DSS-induced IBD by restoring the reduced population of regulatory T cells	Immunobiology	이광호 박 민 지건영	219	Netherlands	Elsevier	SCI
4	Regioselective hydroxylation of 17β-estradiol by mutants of CYP102A1 from Bacillus megaterium	Biotechnology Letters	차건수	36 (12)	Netherlands	Kluwer Academic Publishers	SCI
5	Heterologous expression and functional characterization of the NADPH-cytochrome P450 reductase from Capsicum annuum	Plant Physiology and Biochemistry	이가영 김현민	82	France	Elsevier	SCI

(2) 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표(학술회의명을 세부적으로 전부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록.-본 연구과제의 수행결과로 발표한 것만 기재합니다.)

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2012 한국식물생명공학회	김현민	2012.06.08	충북대 개신문화관	대한민국
2	2012 한국식물생명공학회	마상훈	2012.06.08	충북대 개신문화관	대한민국
3	2012 19th MDO/ 12th ISSX	강지연	2012.06.18	Noordwijk aan Zee	네덜란드
4	2012 19th MDO/ 12th ISSX	차건수	2012.06.18	Noordwijk aan Zee	네덜란드
5	2012 19th MDO/ 12th ISSX	조혜영	2012.06.18	Noordwijk aan Zee	네덜란드
6	2012 19th MDO/ 12th ISSX	임형인	2012.06.18	Noordwijk aan Zee	네덜란드
7	2012 19th MDO/ 12th ISSX	박보연	2012.06.18	Noordwijk aan Zee	네덜란드
8	2012 ICNPR	윤철호	2012.07.30	New York City	미국
9	2012 10th ISICR/ICS	지건영	2012.09.14	Geneva	스위스
10	2012 10th ISICR/ICS	장지훈	2012.09.14	Geneva	스위스
11	2013 MSK	윤철호	2013.05.02	전주,전북대학교	대한민국
12	2013 18th ICC P450	윤철호	2013.06.21	시애틀	미국
13	2013 FEBS Congress	정영희	2013.07.11	Saint Petersburg	러시아
14	2013 FEBS Congress	정영희	2013.07.11	Saint Petersburg	러시아
15	2013 한국식물생명공학회	박세희	2013.12.05	서울시립대학교 자연과학관 대회의실	대한민국
16	2013 한국식물생명공학회	김현민	2013.12.05	서울시립대학교 자연과학관 대회의실	대한민국
17	2014 FESPB/EPSO	김현민	2014.06.23	Convention centre Dublin	아일랜드
18	2014년도 대한면역학회 추계학술대회	지건영	2014.11.06	세종대학교	대한민국
19	2014년도 대한면역학회 추계학술대회	김수만	2014.11.06	세종대학교	대한민국
20	2014년도 대한면역학회 추계학술대회	정윤화	2014.11.06	세종대학교	대한민국
21	2014년도 대한면역학회 추계학술대회	이가언	2014.11.06	세종대학교	대한민국
22	2014 13th CJKES	이가영	2014.11.18	제주 그랜드 호텔	대한민국
23	2015 ILSBE	정영희	2014.12.18	도쿄	일본
24	2015 KSABC	정영희	2015.08.17	서울대 평창캠퍼스	대한민국
25	2015 KSBMB Conference	Nguyen Thi Huong Ha	2015.05.12	서울 코액스	대한민국
26	2015 KSBMB Conference	Doan Thi My Tiep	2015.05.12	서울 코액스	대한민국
27	2015 KMB 42th Meeting	윤철호	2015.06.24	경주 Hico	대한민국
28	2015 FEBS Workshop	차건수	2015.09.16	프리모스텐	크로아티아
29	2015 FEBS Workshop	이가영	2015.09.16	프리모스텐	크로아티아
30	2015 FEBS Workshop	윤철호	2015.09.16	프리모스텐	크로아티아
31	2015 FEBS Workshop	김현민	2015.09.16	프리모스텐	크로아티아

라. 기술거래 및 기술료

기술거래(이전)					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)

마. 교육 및 지도활용 내역

교육 및 지도활용 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도

바. 사업화

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용창출	R&D 기여율

사. 기술 및 제품 인증

기술 및 제품 인증						
구 분	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		

아. 인력활용/양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	연구인력 양성 성과	2012	1	8			5	4				9	
2	연구인력 양성 성과	2013	3	5			4	4				8	
3	연구인력 양성 성과	2014	2	4			1	5				6	
4	연구인력 양성 성과	2015	1	5			1	5				6	

자. 정책활용 내역

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도

차. 홍보/전시

(1) 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자

(2) 전시회 등 참여

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도

(3) 기타 활용 및 홍보실적

기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)			
번호	일자	활용명칭	활용내역

카. 기타

(1) 국제화 협력성과

국제화 협력성과								
번호	유치기간	국적	학위	전공	파견기간	파견국	학위	전공

(2) 타 연구개발사업에의 활용

타 연구개발사업에의 활용					
번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도

(3) 포상 및 수상 실적

포상 및 수상실적					
종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관

5. 구매금액이 3천만원 이상인 연구시설·장비 구매현황

연구시설·장비명	구매금액 (원)	구매일자	연구시설·장비 활용용도	설치장소	국가과학기술지식정보시스템 등록번호

* 구매금액이 3천만원 이상인 연구시설·장비는 국가과학기술지식정보시스템(NTIS)에 등록하여야 함

제 2 장　국내외 기술개발 현황

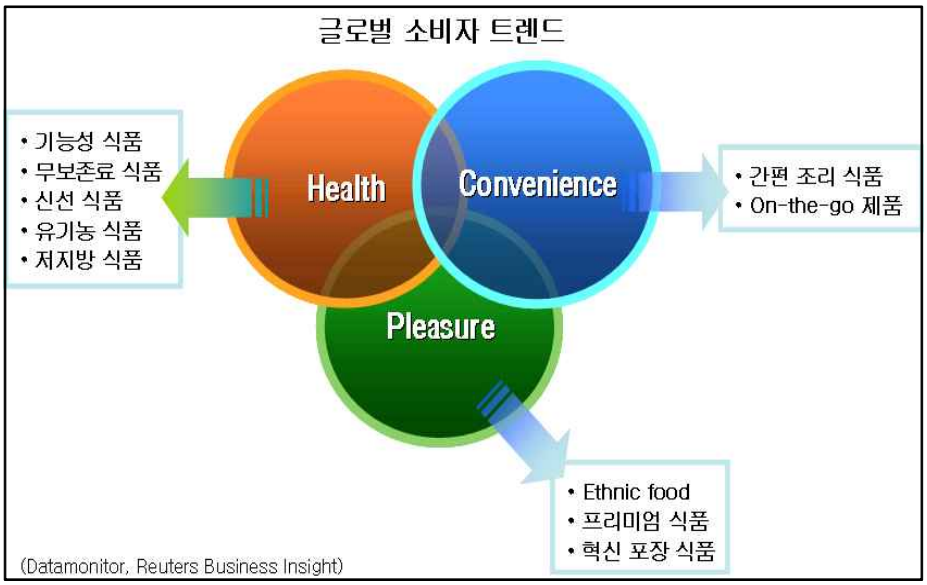
제 1 절. 식물유래 면역조절 신소재 개발에 관한 산업현황 및 전망

○ 천연물 기능성 물질에 대한 연구개발에서 특히 약리 활성을 보이는 기능성 물질의 경우 약 1건 개발 시 전 세계적으로 연간 1조원~2조원의 매출과 매출의 20-50%의 순이익 창출이 가능한 높은 투자 효율성을 가진 고부가가치 산업임.

○ 선진국에서는 이미 전 세계에 분포하는 자원식물에 대한 경제적 효용가치를 평가하여 보다 다양한 식물 종의 확보에 주력하고 있으며, 이들로부터 신기능성 의약품 소재를 분리 생산하는 체계적인 개발 정책을 펼치고 있음.

○ 건강에 대한 관심 고조 및 생활습관의 변화, 삶의 질 향상과 수명연장으로 인한 만성 또는 난치성 질환에 대한 예방적 개념이 도입됨에 따라 질환에 대한 트렌드가 치료형에서 예방형으로 변화되었고 헬스케어라는 개념이 확산되면서 보완/대체 요법으로 불리는 생물자원의 사용이 급속도로 증가함.

○ 글로벌 소비자 트렌드에 대한 여러 시장 동향 보고서에 의하면 미래 소비재 시장을 이끌 주요 키워드는 건강, 편의, 감각화, 개인화, 가족 지향 등으로 보고 있음.



제 2 절. 국외 연구개발 기술동향 및 전망

○ 주요국의 세부기술별 역점기술분야

※<자료: 특허청, 산업바이오 분야 특허동향조사 보고서(2008)>

○ 미국은 1960년대 이후 NCI(국립암연구소)를 주축으로 항암제 개발을 위한 연구를 실시하였으며, 이 프로그램은 1,550속 3,390종의 식물로부터 114,000개의 추출물을 제조하여 항암제개발을 위한 검색을 실시하였음. 이 프로그램은 최근 확대되어, 열대지역식물 7,000여종의 23,000여개 시료에 대한 AIDS 바이러스 검색을 실시하여 치료 가능한 것으로 판단되는 3종 발굴함.

○ Taxol, Vincristine, vinblastine, halichondrin B, leurosine, leurosidine NCDDG (National Cooperative Natural products Drug Discovery Groups)에 의해 개발된 Topotecan, Ellipticine 등의 유도체가 임상시험 대상물질로 선정되었음. 1980년대초, 브라질산의 뱀독성분을 기초하여 개발된 ACE 억제제들의 경우 1개품목당 판매액은 약 20억 달러 (약2조4천억원) 이상의 매출을 기록하였음. Taxus속 식물인 주목으로부터 개발된 항암제Taxol의 연간매출액은 약 12억달러 (약1조2000억원)로 추산됨. 백합과 식물을 중심으로 Vinca 알라로이드 합성에 많은 노력을 해왔으며, 최근에는 Corey groupon 의해 ginkgolide 합성에도 성공함.

○ Merck사는 코넬대학과 계약 하에 10년간 5,000만불을 투입하여 열대림에 존재하는 약 50만 종의 동식물에 대한 생태계보존과 이들로부터 천연물 신약 25종을 10년 내에 개발하려는 프로젝트에 착수함.

○ 지금까지의 기능성 소재개발 경향을 보면 주로 육지에 서식하는 식물로부터 기능성 소재를 선발하려는 연구들이 주류를 형성해 왔음. 이와 같은 경향과는 달리 해양에 서식하는 미생물로부터 기능성 소재를 분리하려는 연구프로젝트가 미국 국립암연구소의 지원 아래 로드아일랜드대학의 생의학교수인 유즈르시미즈의 주도로 진행되고 있음.

○ 생물다양성협약을 유지하기 위하여 5년간 NIH와 비영리연구 집단과의 계약을 맺어 의약품 면에서 가치 있는 화합물을 분리하는 프로그램이 시작되었고, 미시시피대학의 National Center of the Development of Natural products에서는 천연물로부터 신약, 농약에 관한 선도

물질 탐색연구, 천연물관련 전문인력을 위한 정보제공, 상업화에 따른 표준화 연구를 진행 중에 있음.

○ 일본은 미생물, 해양식물로부터 활성물질 연구에 집중하고 있다. 90년 의약품 산업진흥기금 설치, 91년 Human science 진흥재단발족, 92년 Pharma Dream 계획 개시 등 천연물분야에 적극적 연구개발투자를 하였음. 태국산 식물 Croton sublyratus로부터 항궤양성 작용성분 plunotol을 개발하여 현재 임상에 사용됨. Sophora Substratate로부터 항궤양성분 sopharedin을 리드화합물로 합성하여 항궤양약품 sophalione을 개발하였음. 남천 성분인 nantenoside를 리드화합물로 합성하여 항알레르기약인 transilast를 개발하였음. 황금(黃芩)의 주성분이 baicalein을 리드화합물로 합성하여 amlexanox 개발하여 항알레르기약으로 임상사용 중임. 버섯추출물인 렌티난(lantinan)은 암화학요법제의 병용약품으로 시판 중임.

○ 일본 도쿄대학 약학부 Sankawa 등은 생약추출물을 검색하여 우방자(牛蒡子), 연교(連翹) 등의 리그난성분이 항 PAF (platelet activating factor) 작용이 있음을 밝혔으며, Centipeda minima 추출물로부터 항PAF 작용물질 arnicolides를 확인함.

○ 감초의 주성분 glycyrrhizin이 간염치료에 사용되고 있으며, 생약 오미자의 성분인 gomishin A가 간 장해치료에 관한 임상실험 중이며 가까운 장래 임상에서의 사용이 기대되고 있음.

○ 식물 추출의약품은 크게 테르펜(Terpene), 배당체(Glycosides), 알칼로이드(Alkaloid), 폴리페놀계 성분 군 등 4가지 분야로 나누어지며 테르펜계가 향후 가장 큰 성장률을 보일 것으로 기대되는 분야임.

○ 테르펜은 세계적으로 널리 알려진 Taxol과 기타 근육증강제로 사용되는 스테로이드(Steroids) 계통의 일부약품으로 구성되어 있음.

○ 배당체 역시 큰 시장을 형성하고 있는 분야로 테르펜의 뒤를 있고 있다. 식물추출물 부분의 의약품 가운데 현재시장에서 단일처방 의약품으로 판매효과를 내고 있는 것은 Taxoids와 Camptothecins 계열이 대부분임.

○ 현재는 미생물, 해양생물 등의 천연자원으로부터 활성물질 분리, 열대식물로부터 활성 물질 분리 등에 적극적인 투자 중임.

○ 독일은 70년대 이전부터 전통사용 경험을 인정하는 허가 제도를 마련하여 천연물 분야에 집중적인 투자와 연구개발을 시작하여 버드나무로부터 해열진통제인 Salicin을 개발하여 이를 선도 화합물질로 하여 아스피린을 개발하였고, 국화과식물인 Silybum marianum으로부터 간 보호작용 물질인 Silymarin으로 간염치료제를 개발함.

○ 은행잎의 ginkgo-flavonoid 성분을 혈액 순환 장애 치료제로 개발하여 독일 내 1개 품목연간매출액이 2억 1100만불(1996년)로 국내 1위 제약회사인 동아제약 연간 총 매출액(약2억 3600만불)과 유사함.

○ 최근 독일정부 주도하에 정부와 민간회사가 공동 지원하는 Natural product pool을 1996년에 시작하였으며, 천연물성분과 유도체들을 수집, 확보하여 대단위 생리활성검색을 진행함으로써 신의약품 신농약 등을 개발하는 과제를 수행하고 있음.

○ 영국은 옥스퍼드대학과 켐브리지대학의 인근지역에 천연물신약 개발 클러스터가 형성되

어 가고 있으며 콜레스테롤, 관절염, 암 등과 관련된 천연물 의약제품 개발이 광범위하게 이루어지고 있음.

○ 중국은 수많은 고전적 문헌 및 다양한 민간요법을 보유하고 있으며, 상해약물연구소, 북경중약 연구소 등 많은 연구소와 기술이 축적된 인적자원을 확보하고 있다. 1,000종 이상의 약용식물을 검색하여 개똥쑥 (Artemisia annua)으로부터, 기존의 항말라리아제인 quinine에 내성을 갖는 말라리아에 유효한 Artemisinin을 발견하고 300종류 이상의 유도체를 합성하여 항말라리아제 Artemether를 개발함. 절강(折江) 의학연구소와 상해(上海) 약물연구소는 전통 민간약으로 노인성 기억 기능감퇴의 개선에 사용되어 온 생약인 천층탑(千層塔)으로부터 새로운 알칼로이드 huperazine A, B 두 성분을 분리하고 이중 huperazine을 분리하여 간염치료제로 개발 중에 있음. 하늘타리 (Trichosantheskirilowii)로부터 HIV 감염억제성분인 trichosanthin으로 항 AIDS약물로 임상시험 중에 있으며, 북경의과대학과 미국의 제약회사의 공동연구로 해풍 등에서 PAF 수용체 길항작용을 가지는 kadsurenone이 분리되어 구조가 결정됨. 수분초 (Sedumsarmentosum)로부터 nitrile을 가지는 배당체 sarmentosin이 분리되어 간염에 유효함을 확인하였음. 수분초로부터 nitrile기를 가지는 배당체 sarmentosin이 분리되어 간장 질환치료제로 개발 중이다. 현재 약 250개 이상의 신물질을 분리함.

제 3 절. 국내 연구개발 기술동향 및 전망

○ 우리나라는 선진국에 비해 10여년 뒤진 80년대에 생물산업 육성에 착수하였으나, 범정부적 종합계획 수립 등을 통해 현재 세계적인 연구 성과를 도출하고 있으며 산업화 촉진단계로 진입한 상태임.

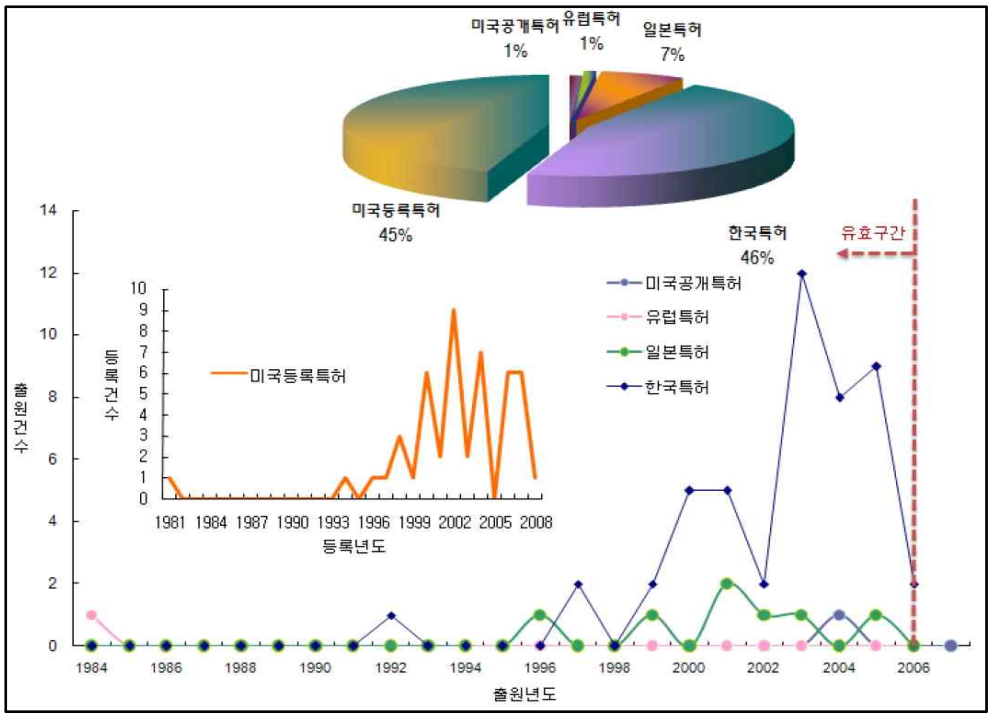
○ 전체 기능성 생리활성 소재 관련 특허 중 한국특허가 48건으로 46%를 차지하여 가장 높은 점유율을 보이고 있고, 다음으로 미국등록특허도 45%나 되어, 한국과 미국이 기능성 생리활성 소재 기술개발 시장에서 중요성이 큰 국가로 분석됨.

○ 분야별 생산비중은 ‘바이오의약(45%)’과 ‘바이오식품(35%)’이 대부분을 차지하고 있고, 바이오화학, 바이오환경, 바이오검정, 정보서비스 및 연구개발, 바이오공정 및 기기의 순으로 바이오산업 생산 비중을 차지함.

○ 하지만 바이오의약산업의 경우 수출보다는 수입의 비중이 여전히 높음. 이는 생리활성물질의 상용화가 원활하게 이루어지고 있지 않음을 단적으로 보여주는 예라고 할 수 있다.

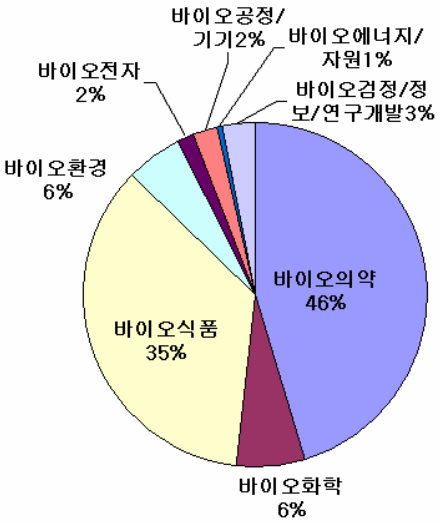
○ 특히 대학 및 연구소의 몇 개 연구실에서 기능성물질에 대한 연구를 수행하고 있으나 대부분 식품첨가물에 대한 연구가 많고 면역조절 효과 및 여러 질병에 대한 식물유래 기능성 물질에 대한 연구는 미비한 실정임.

〔기능성 생리활성소재의 국가별 특허출원 추이〕



※<자료: 특허청, 산업바이오 분야 특허동향조사 보고서(2008)>

〔'07년 생물산업 분야별 생산비중과 수출액 및 수입액(지식경제부)〕



바이오산업 분야별 생산비중

대분류	생산액	수출액	수입액
바이오의약	1,685,795	420035	792,331
바이오화학	233,895	45944	85466
바이오식품	1,316,067	932813	12016
바이오환경	200,771	8053	5367
바이오전자	57,892	35037	954
바이오공정 및 기기	84,765	20289	121108
바이오에너지 및 자원	25,422	520	3496
바이오검정/정보/연구개발	109,258	8838	141

*단위: 백만원

○ 국내 식물유래 기능성 물질의 상용화 실적이 저조한데는 여러 제도적인 문제 뿐 아니라 여러 가지 문제가 복합적으로 작용하겠으나 기술적인 측면의 문제점은 기술 개발로 해결 가능함.

제 4 절. 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

가. 국외 주요국의 역점기술개발 분야 및 현황

※<자료: 특허청, 산업바이오 분야 특허동향조사 보고서(2008)>

○ 미국은 1960년대 이후 국립암연구소를 주축으로 항암제 개발을 위한 연구를 실시하였고, 이 프로그램은 1,550속 3,390종의 식물로부터 114,000개의 추출물을 제조하여 항암제개발을 위한 검색을 실시하였음. 이 프로그램은 최근 확대되어, 열대지역식물 7,000여종의 23,000여개 시료에 대한 AIDS 바이러스 검색을 실시하여 치료후보물질 3종 발굴함.

○ Taxol, Vincristine, vinblastine, halichondrin B, leurosine, leurosidine NCDDG (National Cooperative Natural products Drug Discovery Groups)에 의해 개발된 Topotecan, Ellipticine 등의 유도체가 임상시험 대상물질로 선정되었음. 1980년대초, 브라질산의 뱀독성분을 기초하여 개발된 ACE 억제제들의 경우 1개품목당 판매액은 약 20억 달러 (약2조4천억원) 이상의 매출을 기록하였음. Taxus속 식물인 주목으로부터 개발된 항암제Taxol의 연간매출액은 약 12억달러 (약1조2000억원)로 추산됨. 백합과 식물을 중심으로 Vinca 알라로이드 합성에 많은 노력을 해왔으며, 최근에는 Corey groupon 의해 ginkgolide 합성에도 성공함.

○ Merck사는 코넬대학과 계약 하에 10년간 5,000만불을 투입하여 열대림에 존재하는 약 50만 종의 동식물에 대한 생태계보존과 이들로부터 천연물 신약 25종을 10년 내에 개발하려는 프로젝트에 착수함.

○ 지금까지의 기능성 소재개발 경향을 보면 주로 육지에 서식하는 식물로부터 기능성 소재를 선발하려는 연구들이 주류를 형성해 왔음. 이와 같은 경향과는 달리 해양에 서식하는 미생물로부터 기능성 소재를 분리하려는 연구프로젝트가 미국 국립암연구소의 지원 아래 로드아일랜드대학의 생의학교수인 유즈르시미즈의 주도로 진행되고 있음.

○ 생물다양성협약을 유지하기 위하여 5년간 NIH와 비영리연구 집단과의 계약으로 맺고, 가치 있는 의약 화합물을 분리하는 프로그램이 시작되었고, 미시시피대학 National Center of the Development of Natural products에서는 천연물로부터 신약, 농약에 관한 선도물질 탐색 연구, 천연물관련 정보제공, 상업화에 따른 표준화 연구를 진행 중에 있음.

○ 일본은 미생물, 해양식물로부터 활성물질 연구에 집중하고 있다. 90년 의약품 산업진흥기금 설치, 91년 Human science 진흥재단발족, 92년 Pharma Dream 계획 개시 등 천연물분야에 적극적 연구개발투자를 하였음. 태국산 식물 Croton sublyratus로부터 항궤양성 작용성분 plunotol을 개발하여 현재 임상에 사용됨. Sophora Substratate로부터 항궤양성분 sopharedin을 리드화합물로 합성하여 항궤양약품 sophalione을 개발하였음. 남천 성분인 nantenoside를 리드화합물로 합성하여 항알레르기약인 transilast를 개발하였음. 황금(黃芩)의 주성분이 baicalein을 리드화합물로 합성하여 amlexanox 개발하여 항알레르기약으로 임상사용 중임. 버섯추출물인 렌티난(lantinan)은 암화학요법제의 병용약품으로 시판 중임.

○ 일본 도쿄대학 약학부 Sankawa 등은 생약추출물을 검색하여 우방자(牛蒡子), 연교(連翹) 등의 리그난성분이 항 PAF (platelet activating factor) 작용이 있음을 밝혔으며, Centipeda minima 추출물로부터 항PAF 작용물질 arnicolides를 확인함.

○ 감초의 주성분 glycyrrhizin이 간염치료에 사용되고 있으며, 생약 오미자의 성분인 gomishin A가 간 장해치료에 관한 임상실험 중이며 가까운 장래 임상에서의 사용이 기대되고 있음.

○ 식물 추출의약품은 크게 테르펜(Terpene), 배당체(Glycosides), 알칼로이드(Alkaloid), 폴리페놀계 성분 군 등 4가지 분야로 나누어지며 테르펜계가 향후 가장 큰 성장률을 보일 것으로 기대되는 분야임.

○ 테르펜은 세계적으로 널리 알려진 Taxol과 기타 근육증강제로 사용되는 스테로이드(Steroids) 계통의 일부약품으로 구성되어 있음.

○ 배당체 역시 큰 시장을 형성하고 있는 분야로 테르펜의 뒤를 있고 있다. 식물추출물 부분의 의약품 가운데 현재시장에서 단일처방 의약품으로 판매효과를 내고 있는 것은 Taxoids와 Camptothecins 계열이 대부분임.

○ 현재는 미생물, 해양생물 등의 천연자원으로부터 활성물질 분리, 열대식물로부터 활성 물질 분리 등에 적극적인 투자 중임.

○ 독일은 70년대 이전부터 전통사용 경험을 인정하는 허가 제도를 마련하여 천연물 분야에 집중적인 투자와 연구개발을 시작하여 버드나무로부터 해열진통제인 Salicin을 개발하여 이를 선도 화합물질로 하여 아스피린을 개발하였고, 국화과식물인 Silybum marianum으로부터 간 보호작용 물질인 Silymarin으로 간염치료제를 개발함.

○ 은행잎의 ginkgo-flavonoid 성분을 혈액 순환 장애 치료제로 개발하여 독일 내 1개 품목연간매출액이 2억 1100만불(1996년)로 국내 1위 제약회사인 동아제약 연간 총 매출액(약2억 3600만불)과 유사함.

○ 최근 독일정부 주도하에 정부와 민간회사가 공동 지원하는 Natural product pool을 1996년에 시작하였으며, 천연물성분과 유도체들을 수집, 확보하여 대단위 생리활성검색을 진행함으로써 신의약품 신농약 등을 개발하는 과제를 수행하고 있음.

○ 영국은 옥스퍼드대학과 켐브리지대학의 인근지역에 천연물신약 개발 클러스터가 형성되어 가고 있으며 콜레스테롤, 관절염, 암 등과 관련된 천연물 의약제품 개발이 광범위하게 이루어지고 있음.

○ 중국은 수많은 고전적 문헌 및 다양한 민간요법을 보유하고 있으며, 상해약물연구소, 북경중약 연구소 등 많은 연구소와 기술이 축적된 인적자원을 확보하고 있다. 1,000종 이상의 약용식물을 검색하여 개똥쑥 (Artemisia annua)으로부터, 기존의 항말라리아제인 quinine에 내성을 갖는 말라리아에 유효한 Artemisinin을 발견하고 300종류 이상의 유도체를 합성하여 항말라리아제 Artemether를 개발함. 절강(折江) 의학연구소와 상해(上海) 약물연구소는 전통 민간약으로 노인성 기억 기능감퇴의 개선에 사용되어 온 생약인 천층탑(千層塔)으로부터 새로운 알칼로이드 huperazine A, B 두 성분을 분리하고 이중 huperazine을 분리하여 간염치료제로 개발 중에 있음. 하늘타리 (Trichosantheskirilowii)로부터 HIV 감염억제성분인 trichosanthin으로 항 AIDS약물로 임상시험 중에 있으며, 북경의과대학과 미국의 제약회사의 공동연구로 해풍 등에서 PAF 수용체 길항작용을 가지는 kadsurenone이 분리되어 구조가 결정됨. 수분초 (Sedumsarmentosum)로부터 nitrile을 가지는 배당체 sarmentosin이 분리되어 간염에 유효함을 확인하였음. 수분초로부터 nitrile기를 가지는 배당체 sarmentosin이 분리되어 간장 질환치료제로 개발 중이다. 현재 약 250개 이상의 신물질을 분리함.

○ 오디유래 스틸벤 화합물인 Piceatannol의 항비만 효과 입증 (2012년 JBC 논문 게재): 레드와인과 포도에 들어있는 Piceatannol 성분은 지방세포가 자라는 것을 억제해 비만 예방에 도움을 준다고 보고되었음. Piceatannol은 지방세포 생성 초기 단계에서 미성숙 지방세포의 인슐린 수용체에 밀착해 인슐린의 세포주기조절기능을 차단함으로서, 지방세포가 더 크게 자라나는 것을 막는 역할을 함. Piceatannol이 초기 단계의 지방세포들이 성숙한 지방세포로 성장하는 과정에서 나타나는 유전자 발현과 유전자 기능, 지방생성 과정 동안 인슐린의 활성 등에 변화를 유도했다는 것임. 따라서, 그 같은 Piceatannol의 작용 덕분에 지방세포들이 성장이 지연되거나 완전히 억제될 수 있으리라 기대된다고 연구팀은 설명함. 게다가 Piceatannol의 세포분열 클론증폭 억제작용은 인슐린 신호전달 기전의 활성화 억제작용과 동반해서 주목받음. 지방생성이 지방세포들의 축적을 지연 또는 예방하고, 나아가 체지방 증가를 억제하는 데 중요한 분자표적의 하나로 인식되어 왔음을 상기할 때 Piceatannol이 항비만 예방 및 치료제로서 매우 우수한 소재라는 평가.

○ 천연물 기능성 물질에 대한 연구개발에서 특히 약리 활성을 보이는 기능성 물질의 경우 약 1건 개발 시 전 세계적으로 연간 1조원~2조원의 매출과 매출의 20-50%의 순이익 창출이 가능한 높은 투자 효율성을 가진 고부가가치 산업임.

○ 선진국에서는 이미 전 세계에 분포하는 자원식물에 대한 경제적 효용가치를 평가하여 보다 다양한 식물 종의 확보에 주력하고 있으며, 이들로부터 신기능성 의약품 소재를 분리 생산하는 체계적인 개발 정책을 펼치고 있음.

○ 글로벌 소비자 트렌드에 대한 여러 시장 동향 보고서에 의하면 미래 소비재 시장을 이끌 주요 키워드는 건강, 편의, 감각화, 개인화, 가족 지향 등으로 보고 있음.

나. 연구결과가 국내기술개발현황에서 차지하는 위치

○ 우리나라는 선진국에 비해 10여년 뒤진 80년대에 생물산업 육성에 착수하였으나, 범정부적 종합계획 수립 등을 통해 현재 세계적인 연구 성과를 도출하고 있으며 산업화 촉진단

계로 진입한 상태임.

○ 전체 기능성 생리활성 소재 관련 특허 중 한국특허가 48건으로 46%를 차지하여 가장 높은 점유율을 보이고 있고, 다음으로 미국등록특허도 45%나 되어, 한국과 미국이 기능성 생리활성 소재 기술개발 시장에서 중요성이 큰 국가로 분석됨.

○ 분야별 생산비중은 '바이오의약(45%)'과 '바이오식품(35%)'이 대부분을 차지하고 있고, 바이오화학, 바이오환경, 바이오검정, 정보서비스 및 연구개발, 바이오공정 및 기기의 순으로 바이오산업 생산 비중을 차지함.

○ 하지만 바이오의약산업의 경우 수출보다는 수입의 비중이 여전히 높음. 이는 생리활성물질의 상용화가 원활하게 이루어지고 있지 않음을 단적으로 보여주는 예라고 할 수 있다.

○ 특히 대학 및 연구소의 몇 개 연구실에서 기능성물질에 대한 연구를 수행하고 있으나 대부분 식품첨가물에 대한 연구가 많고 면역조절 효과 및 여러 질병에 대한 식물유래 기능성 물질에 대한 연구는 미비한 실정임.

○ 국내 식물유래 기능성 물질의 상용화 실적이 저조한데는 여러 제도적인 문제 뿐 아니라 여러 가지 문제가 복합적으로 작용하겠으나 기술적인 측면의 문제점은 기술 개발로 해결 가능함.

○ 건강에 대한 관심 고조 및 생활습관의 변화, 삶의 질 향상과 수명연장으로 인한 만성 또는 난치성 질환에 대한 예방적 개념이 도입됨에 따라 질환에 대한 트렌드가 치료형에서 예방형으로 변화되었고 헬스케어라는 개념이 확산되면서 보완/대체 요법으로 불리는 생물자원의 사용이 급속히 증가함.

○ 건강과 삶의 질 향상

- 산업화, 환경의 오염, 고령화 등으로 암 및 자가면역질환 등과 같은 면역질환 유병률이 급속히 증가함. 인체 만성질환 대다수가 면역과 직간접적으로 밀접하게 연관되어 있으며, 신규 면역치료제의 개발은 여러 분야의 치료제에서 파급효과를 얻을 수 있음.
- 국민소득 수준이 향상되면서 건강에 대한 소비자들의 관심 증대, 웰빙문화 확산 등으로 기능성 식품, 향장제품, 천연물 의약품에 대한 수요 급증

○ 자원활용의 극대화

- 범세계적으로 생물자원 유래 천연물시장(바이오소재, 신약 등)의 급성장이 이루어지고 있는 상황을 고려하여 우리가 확보하고 있은 비교우위 생물자원에 대한 효율적 개발을 위한 체계적인 발전전략의 수립이 필수적임.
- 효능이 밝혀진 특정 천연물은 순수 분리하여 제품으로 직접 사용하거나 식품 또는 향장제품 등에 첨가하여 사용하기도 함. 그러나 이런 천연물질 중 화학적으로 합성이 불가능한 물질들은 식물에서 추출하여 사용할 수밖에 없으나 식물에서의 생산량은 극히 제한적이고 순수분리정제에 고비용이 필요함. 농작물에서 쉽게 분리 정제가 가능한 물질들을 선별하여 생체촉매 반응으로 효능물질을 대량생산한다면 부가가치가 높은 물질의 대량 생산 가능하고 쉽게 상품화가 가능할 것임.

○ 농업경제 활성화

- DDA/FTA 등 국내·외적인 농업정책 및 시장여건 변화에 따른 농업의 대외 경쟁력이 저하되고, 영세농가의 소득하락으로 새로운 소득원 개발이 절실한 시점에서 기존의 식량농업

과 원예, 축산농업 위주의 전통농업에서 탈피, 새로운 부가가치 창출을 위한 개발 필요성 증대됨.

- 작물 유래 고기능성 천연물질은 의약품과 건강식품의 원료이자 농가의 소득원으로서 중요한 의미를 가지고 있음.
- 이러한 변화는 농산물의 고품질화 및 브랜드화, 다양한 2·3차 산업부문과의 연계를 수단으로 하는 농산업의 외연 확장추세 등과 맞물려 농업부문의 새로운 성장 동력으로서 작물에서의 고기능성 천연물질이 관심을 끄는 계기로 작용하고 있음.
- 원재료를 생산하는 농작물에 대한 가치가 상승하여 농가 소득 증대에 기여할 것임.

○ 산업화, 환경의 오염, 고령화 등으로 암 및 자가면역질환 등과 같은 면역질환 유병률의 급속한 증가함.

○ 인체 만성질환 대다수가 면역과 직간접적으로 밀접하게 연관되어 있으며, 신규 면역치료제의 개발은 여러 분야의 치료제에서 파급효과를 얻을 수 있음.

○ 현재 치료제가 없는 각종 난치성 질환은 기존의 치료제로서는 완치가 불가능하기 때문에 인체의 세포면역반응을 유도시키는 치료백신 혹은 면역조절제 그리고 치료용 항체를 이용하여 치료 효과를 높이는 전략이 사용되고 있음.

○ 면역치료제 개발 기술은 대표적인 바이오 제약산업이므로 핵심원천기술을 보유할 경우 동 산업 경쟁력 제고 및 신 산업군을 형성하여 선진 제약시장의 진출이 가능하며, 국내의 생명공학수준을 국제경쟁력 있는 분야로 견인할 수 있음.

○ 기존의 항바이러스제/항암제 등은 난치성 질환에 대한 제한된 약효, 약제내성 바이러스출현, 각종 부작용 발생, 고비용(치료비) 등과 같은 단점을 가지고 있지만 천연추출물로의 derivatives를 통한 면역치료제는 이를 보완·극복할 수 있는 치료 기술로 향후 10년 내에 차세대 치료제 시장을 주도할 것으로 예상됨.

○ 현재, 식물이나 작물 추출물의 유도체 제조를 통한 면역질환 치료제에 대한 개발은 전무한 실정이어서 식물추출물의유도체를 통해 고기능성, 대량생산이 가능할 수 있다는 것이 본 실험의 차별성으로, 시장경쟁력 있는 이러한 장점을 살리는 시제품 개발이 절실히 요구됨.

○ 최근, 기능성 식품에 대한 관심이 증대됨에 따라 소라렌, 레스베라트롤, 커큐민 등의 다양한 면역기능 조절에 관한 연구가 점차 진행되고 있는 시점이라 경쟁의 연구가 될 수 있으므로 빠른 실험 수행이 절실히 요구됨. 이러한 천연추출물의 유도체를 통한 고기능화는 획기적인 개발이 될 것이라 사료되며 고기능성 물질의 대량생산으로 기존의 의약품보다 훨씬 안전하고 저렴하게 상품화 할 수 있는 시제품을 제작할 수 있을 것이라 사료됨

○ 결과적으로 인체에 독성이 전혀 없는 식물추출물의 유도체를 통해 고부가가치의 의료용 식물소재 발현시스템을 개발하여, 이를 토대로 일상생활에서 식품으로 섭취거나 환부에 붙이는 등의 최적의 system을 개발함으로써, 면역기능 강화 및 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있을 것이라 판단됨.

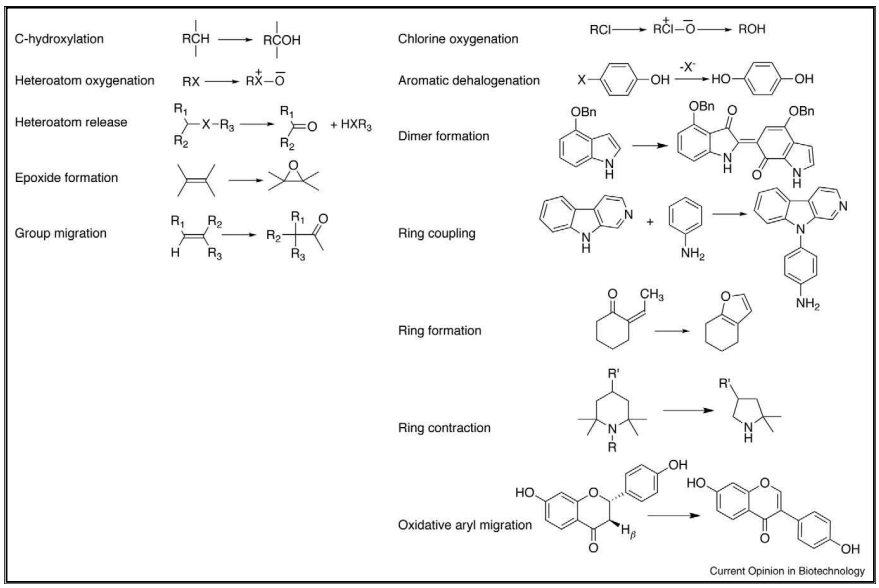
제 3 장　연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 실험적 접근방법

1. 제1세부과제 연구개발 방법

■ **Cytochrome P450 효소활용 방법**

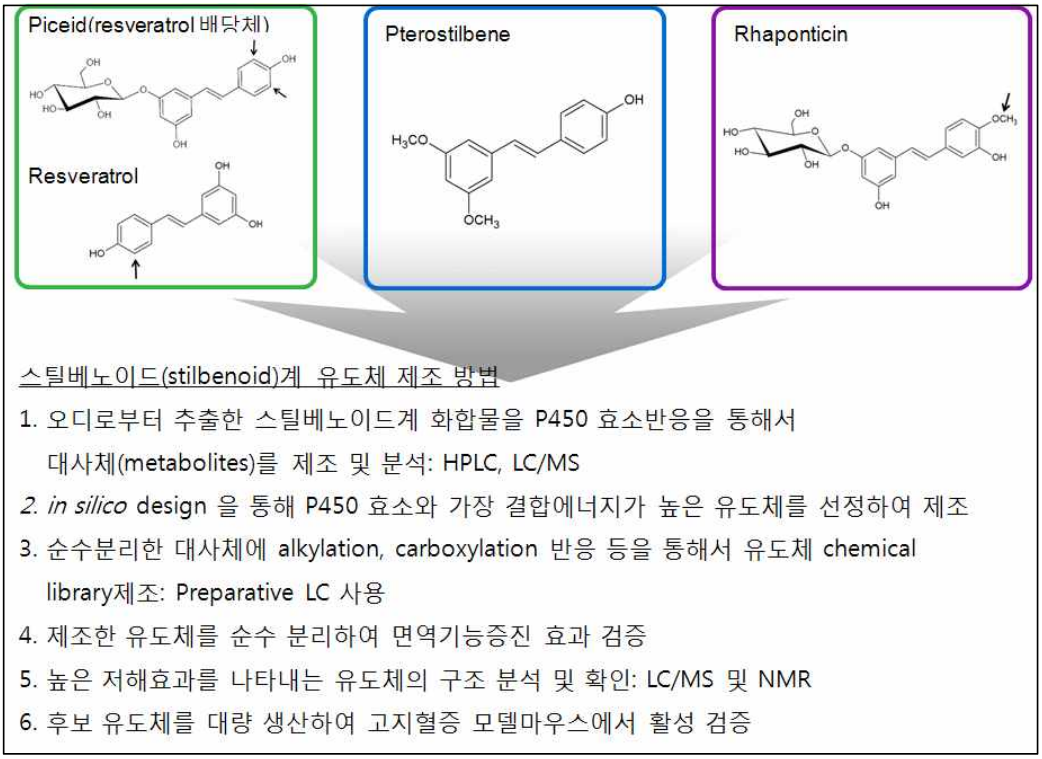
- P450의 반응의 다양성 (Lamb et al., 2007) <아래 그림>



- P450는 대표적 산화효소로서 매우 다양한 산화환원 반응을 촉매함 (Yun et al., 2007).
- 전형적인 P450 반응: C-hydroxylation이 산업적 응용성이 높은 반응이며, heteroatom oxygenation, heteroatom release, epoxide formation, group migration의 전형적인 반응 촉매.
- 특이적 P450 반응: Chloine oxygenation, aromatic dehalogenation, dimer formation, ring coupling, ring formation, ring contraction, oxidative aryl migration 등의 반응을 촉매 (Guengerich, 2002, 2006).

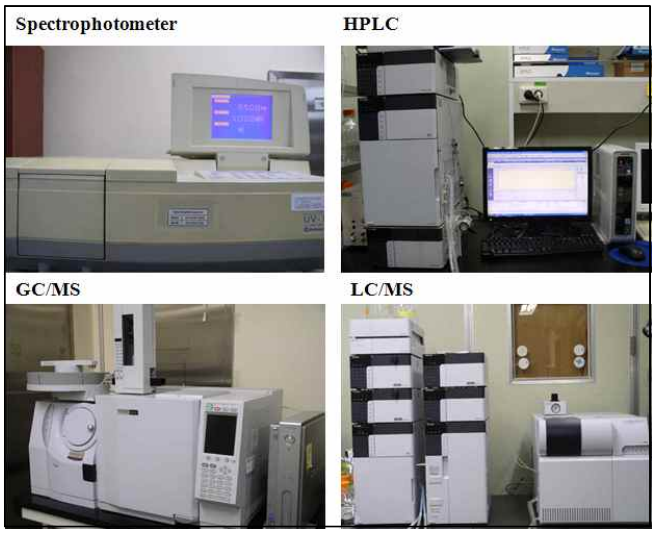
■ **스틸베노이드 화합물 유도체(derivatives) 제조 방법**

- 다양한 유기용매 조건에서 추출한 오디의 chemical library를 제조하여, 이들 library에 다양한 산화 활성을 가지는 P450 효소를 처리하면 기존의 chemical library에 생물학적인 hydroxyl group 첨가 및 C-C 결합 cleavage, dealkylation 등의 반응으로 더욱 더 다양한 화합물을 포함하는 combinatorial chemical library 제조가 가능함. 특히 이러한 oxygenase 반응은 화학적인 반응으로는 불가능한 반응을 촉매하기 때문에 다양한 형태의 화합물들을 제조 (Cirino and Arnold, 2002; Urlacher and Schmid, 2002).
- Parent compounds로 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물인 레스베라트롤(resveratrol), 피세이드(piceid), 프테로스틸벤(pterosilbene), 라폰티신(Rhaponticin)을 이용하여 생촉매인 P450 효소를 반응시켜 다양한 산화반응결과 생기는 diversity가 증가된 derivatives로 구성된 chemical library 제조.
- 또한 이렇게 생성된 hydroxyl group(-OH)에 UDP-glucosyltransferase를 이용하여 다양한 배당체를 생성하여 다양한 스틸베노이드 화합물의 chemical library를 제조하여 이 chemical library로부터 면역기능을 조절시키는 유도체 화합물을 분리하여 활성을 검증함.



■ 생촉매인 P450 효소 활성 측정

- **Spectrofluorometer 이용:** 각 P450 효소의 활성을 fluorometer를 활용한 방법으로 측정함. 이 방법은 directed evolution에서 필수적인 HTS (High Throughtput Screening) system에서 활용할 수 있음. 각 human P450 효소의 특이적 활성을 측정할 수 있는 기질은 상업적으로 구매할 수 있음 (Yun et al., 2006).
- **Spectrophotometer 이용:** 흡광를 활용하여 각 human P450 효소의 특이적 활성을 측정할 수 있는 기질과 실험방법은 연구책임자가 확보하고 있음 (예: p-nitrophenol, aniline) (Park et al., 2010).
- **HPLC 및 LC/MS 활용:** HPLC를 활용하여 각 human P450 효소의 특이적 활성을 측정할 수 있는 기질과 실험방법은 연구책임자가 확보하고 있음 (Kim et al., 2011; Kim et al., 2008).
- **GC 및 GC/MS:** GC를 활용하여 각 human P450 효소의 특이적 활성을 측정할 수 있는 기질과 실험방법은 연구책임자가 확보하고 있음.

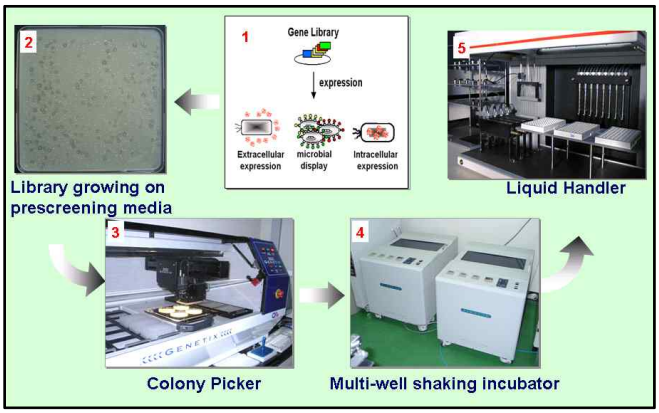


- **효소학적 kinetic parameters (K_m 및 k_{cat}) 및 Catalytic Efficiency 결정:** 각 효소의 기질의 1-500 μM 범위 농도에서 affinity의 척도인 K_m를 효소활성 측정 방법에 의해 결정함. 각 효소의 기질에 대한 K_m/k_{cat} 값을 계산하여 표면 발현된 효소 활성효율을 결정함 (Lee et al., 2014; Kang et al., 2014).

■ **Derivative를 제조하는데 사용하는 P450 효소의 분광학적 특성 측정**

- P450는 active site에 결합되어있는 heme은 아주 유용한 chromophore로 이용할 수 있기 때문에 active site내의 변화측정에 이용할 수 있음. Heme의 spin-state 변화에 따른 흡광 spectrum의 변화를 측정하여 active site내의 환경변화 측정. Heme은 high-spin(최대흡광 390 nm근처)과 low-spin(최대흡광 417 nm근처)의 2종류의 spin-state를 나타내며 각 P450 마다 특징적인 spin-state equilibrium 상태를 나타냄 (Kim et al., 2007).
- 모든 P450는 high-spin과 low-spin state 함량의 일정한 평형을 이루고 있는데 기질이나 inhibitor 등의 결합 또는 효소의 conformation의 변화에 의한 active site내의 환경이 바뀌게 되면 이러한 평형상태가 low 또는 high-spin 쪽으로 변화가 생기게 된다. 이러한 spin-state 변화는 active site 내의 변화를 확인하는 유용한 수단임.

■ **P450 효소 라이브러리의 초고속 스크리닝 (HTS) 시스템**

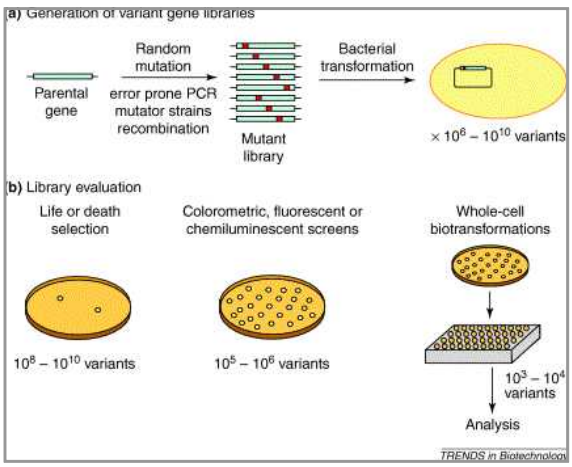


■ **P450 효소 활성의 초고속 스크리닝 (HTS) 시스템**

- P450 효소의 활성은 fluorometer를 활용한 방법으로 측정하도록 함. 이 방법은 directed evolution에서 필수적인 HTS(High Throught Screening) system에서 활용가능.
- P450 반응산물의 형광을 이용한 활성측정방법: HTS system에 활용 가능한 substrates 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin, 7-Ethoxycoumarin, Coumarin, benzo(*a*)pyrene 3-[2-(N,N-diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin (Kang et al., 2014).

■ **Diversity 증가시킨 combinatorial chemical library 제조: P450 이용**

- 현재, 다양한 형태의 chemical library가 제조 판매되고 있으며, 이들 library를 이용한 신약 개발 연구가 활발함. 이들 library를 다양한 산화 활성을 가지는 P450 효소를 처리하면 기존의 chemical library에 생물학적인 hydroxyl group 첨가 및 C-C 결합 cleavage 등의 반응으로 더욱 더 다양한 화합물을 포함하는 combinatorial chemical library 제조가 가능함. 특히 이러한 oxygenase 반응은 화학적인 반응으로는 불가능한 반응을 촉매하기 때



문에 다양한 형태의 화합물들을 제조할 수 있음. Mass profile의 확인으로 증가된 diversity 확인 (Otey et al., 2006; Sawayama et al., 2009; Kang et al., 2014; Miles et al., 2000; Fasan et al., 2007).

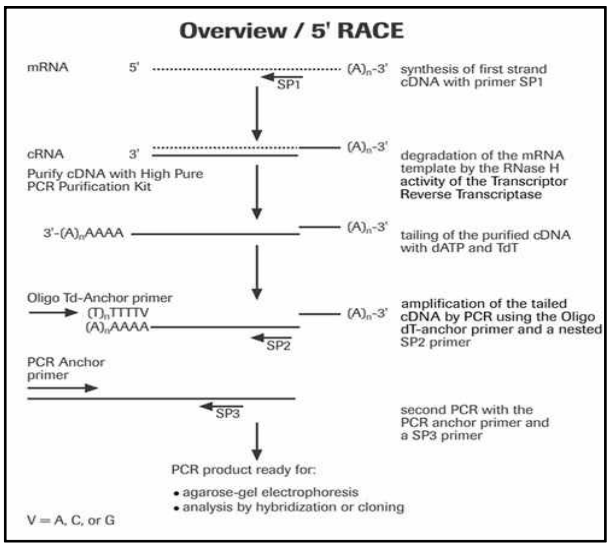
■ **Whole-Cell Biocatalysis**

- 별도의 분리 및 정제 과정이 필요없고 원하는 특성을 가지고 있는 재조합 미생물을 생체 촉매로 직접 활용할 수 있는 whole-cell biocatalyst를 개발.

2. 제2세부과제 연구개발 방법

■ **EST library에서 P450 유전자 발굴**

- 식물 유전자 DB로부터 P450 유전자군에 대한 정보 분석한 후 natural product 생산에 관여하는 P450 유전자군 선별.
- RT-PCR방법에 의한 Full length P450 유전자 분리: 식물 EST library DB로부터 full length가 확보된 P450 유전자군을 선별한 후 유전자 specific primer를 제작함. Target 식물에서 total RNA를 분리한 후 Reverse transcriptase와 oligodT를 이용한 RT 반응을 수행하여 cDNA를 합성함. 합성된 cDNA를 template로 이용하여 각각의 P450 specific primer를 이용하여 P450 유전자를 증폭한 후 cloning하여 염기서열 확인.
- 3‘ racing 방법에 의한 Full length P450 유전자 분리: 식물 EST library DB로부터 3‘ 부분의 정보가 미확보된 유전자 군을 선별한 후 P450 유전자의 3‘ exon 부분에서 SP1, SP2 primer를 제작함. Target 식물에서 total RNA를 분리한 후 Reverse transcriptase와 oilgo dT anchor primer와 SP1 primer를 이용한 RT 반응을 수행하여 1st strand cDNA를 합성함. Anchor primer와 nested SP2 primer를 이용하여 P450 유전자의 3‘exon 부분을 증폭한 후 염기서열 확인함. 밝혀진 3‘ exon 부분의 염기서열과 EST DB의 5’ exon 염기서열을 바탕으로 하여 full length P450 유전자 증폭하여 cloning 한 후 염기서열 확인.
- 5‘ racing 방법에 의한 Full length P450 유전자 분리: 식물 EST library DB로부터 5‘ 부분의 정보가 미확보 되고 3’부분의 정보는 알 수 있는 유전자 군을 선별한 후 P450 유전자의 5‘ exon 부분에서 SP1, SP2, SP3 primer를 제작함. Target 식물에서 total RNA를 분리한 후 Reverse transcriptase와 SP1을 이용한 RT 반응을 수행하여 1st strand cDNA를 합성함. RNaseH에 의해 tempalte mRNA를 제거한 후 합성된 cDNA 분리한 후 이 cDNA 에 dATP와 terminal deoxynucleotidyl tramsferase를 이용하여 polyA tail를 합성. Oligo Td-Anchor primer와 nested SP2 primer를 이용하여 cDNA로부터 P450 유전자 합성한다. Anchor primer와 nested SP3 primer를 이용하여 P450 유전자 증폭한 후 염기서열



확인함. 밝혀진 5‘ exon 부분의 염기서열과 EST DB의 3’ exon 염기서열을 바탕으로 하여 full length P450 유전자 증폭하여 cloning 한 후 염기서열 확인.

■ **Plant P450 expression in *E. coli* & purification**

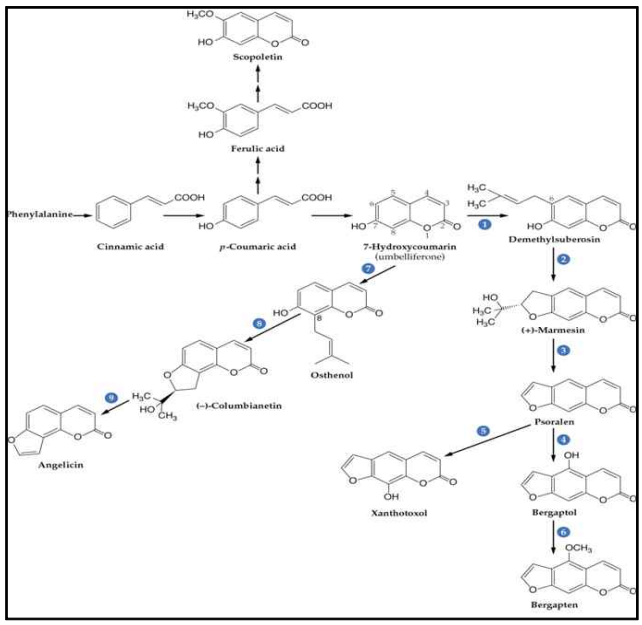
- Plant P450 유전자를 His-tag을 포함하고 있는 *E. coli* expression vector (pCW)에 cloning 하여 *E. coli* Rosseta (pLys) line에서 발현.
- His Tag affinity column을 이용하여 *E. coli*에서 발현시킨 P450효소 순수분리.

■ **Plant P450 expression in plant & purification**

- Plant P450 유전자를 His-tag을 포함하고 있는 plant expression vector (pMBP) 클로닝한 후 *Agrobacterium tumefecience* C58C1 strain에 삽입시켜 *Arabidopsis*에 vacuum infiltration 방법으로 형질전환 시킴.
- His Tag affinity column을 이용하여 *Arabidopsis*에서 발현시킨 P450효소를 분리 (Lee et al., 2014).

■ **P450 특성조사**

- *E. coli*와 식물에서 발현 시킨 각각의 P450의 생촉매 활성을 조사하고 스틸베노이드 화합물 derivatives 제조에 활용 가능성을 탐색.



■ 식물 Glucosyl transferase 유전자 분리 및 발현

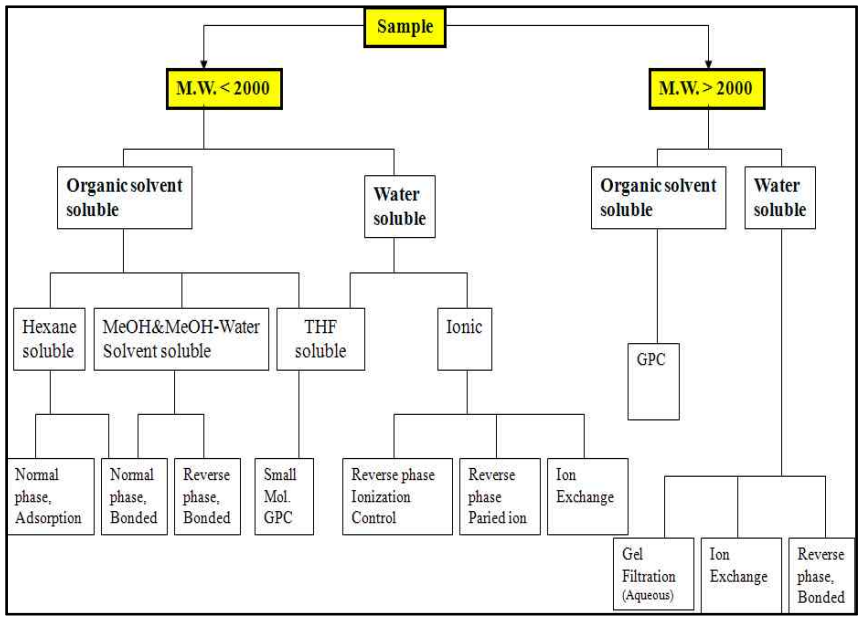
- 토마토(*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom)에서 total RNA 추출
- oligo dT와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 cDNA 합성
- Sol genomic network 데이터베이스를 이용하여 glucosyl transferase 유전자로 알려진 sequence를 기본으로 유전자 특이적인 primer 제작
- Nested PCR 방법을 이용하여 토마토 cDNA에서 glusosyl transferase 유전자 증폭 후 pET28a(+) vector에 cloning
- *E. coli* BL21에서 발현 시킨 후 talon column을 사용하여 분리 정제

■ **스틸베노이드 natural product 프로파일링**

- water, ethanol, haxane 등의 극성이 다양한 용매에 대한 용해도 차이를 이용하여

fractionation.

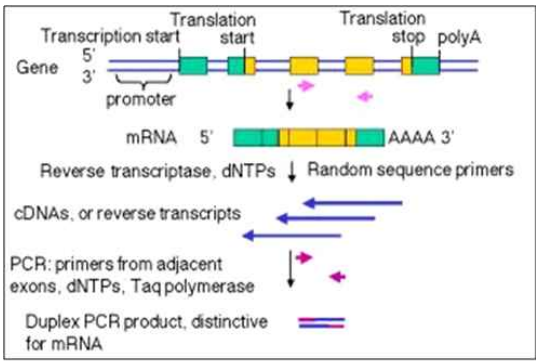
- TLC, HPLC, LC-MS, GC-MS 등의 분석방법을 통해 스틸베노이드 화합물을 확인하고 작물에서 스틸베노이드 화합물의 프로파일링.



3. 제3세부과제 연구개발 방법

■ 유전자 발현 분석

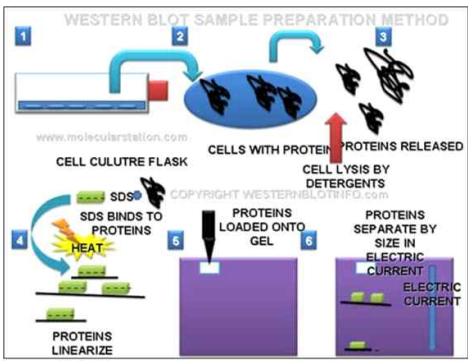
- HeLa나 Raw 264.7 세포에서 면역관련 cytokine 들의 발현을 확인하기 위해서 각 세포로부터 RNAZol B 용액을 이용하여 전체 RNA 분리.
- 추출한 전체 RNA(10 μg)를 역전사효소(RTase), dNTP, PN6, buffer를 첨가한 혼합물을 37℃ water bath에서 1시간 반응시켜 cDNA 합성.
- 합성된 cDNA에서 발현을 확인하고자 하는 유전자의 primer를 이용하여 PCR을 통해 증폭시켜 발현을 확인함.



역전사효소를 이용한 유전자 발현 분석

■ 단백질 발현 분석(western blot)

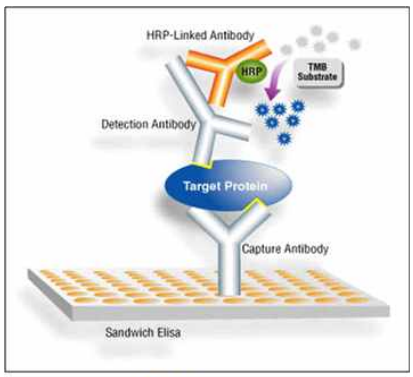
- HeLa나 Raw 264.7 세포에 후보 물질을 처리하고 36시간 후 수확하여 protein lysis buffer (20 mM HEPES PH 7.9, 100 mM KCl, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM PMSF, 100 mg/ml aprotinin, and 1 mg/ml leupeptin) 를 이용하여 lysis를 시키고 추출한 단백질(50μg)을 SDS-PAGE을 수행함.
- SDS-PAGE를 수행한 gel에서 PVDF membrane으로 단백질을 transfer 후 blocking buffer에 2시간 incubation하고 원하는 단백질의 항체를 tagging하고 각각의 단백질의 발현 확인.



단백질 발현 분석 방법

■ **효소연결 분석실험(ELISA)**

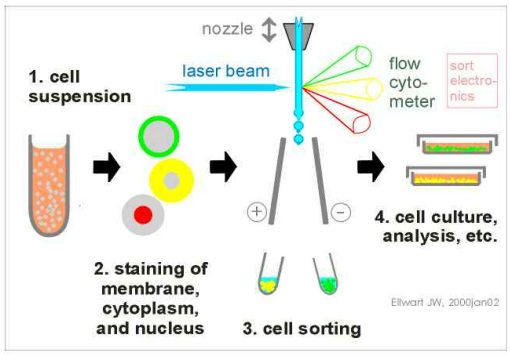
대식세포에서 유도되는 염증관련 유전자의 발현 변화를 알아보기 위해 고기능성 derivatives 착화합물을 처리 한 후 배양액을 96well plate에 넣고 1시간동안 코팅한 후 물로 세 번 세척을 함. blocking buffer로 모든 well에 가득넣고 1시간동안 반응함. 물로 세 번 세척한 후 염증관련 항체를 1시간동안 반응 시킨 후 HRP congugated 된 항체를 1시간동안 반응 시킴. 물로 세 번 세척 후 기질반응 용액을 넣은 다음 30분간 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정함



Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

■ **유세포 분석 (flow cytometry analysis)**

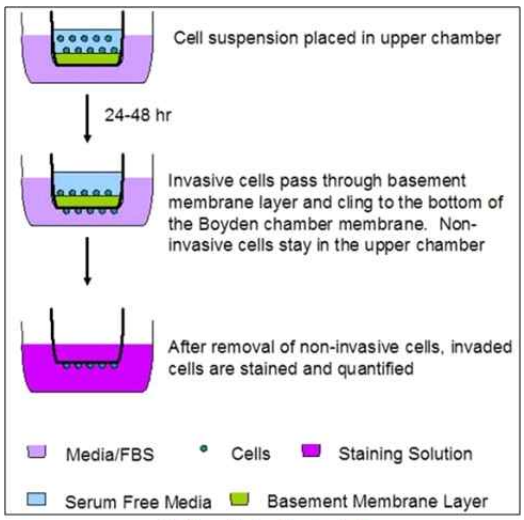
세포로부터 여러 가지 세포표면 분자들에 대한 항체를 이용하여 면역염색하기 위하여 2-5x10^5 세포로 조정하여 염색완충용액(1% FBS, 0.01% NaN_3가 포함된 PBS, pH 7.4)으로 1회 세척 후 ANNEXIN V 또는 PI Propidium Iodide)를 시료에 가하여 4℃에서 15분간 반응시키고 염색 완충용액으로 2회 세척한 후 세포 표면 분자들의 발현을 flow cytometry로 분석함.



유세포 분석 방법

■ **암세포 침윤 분석 (cell invasion assay)**

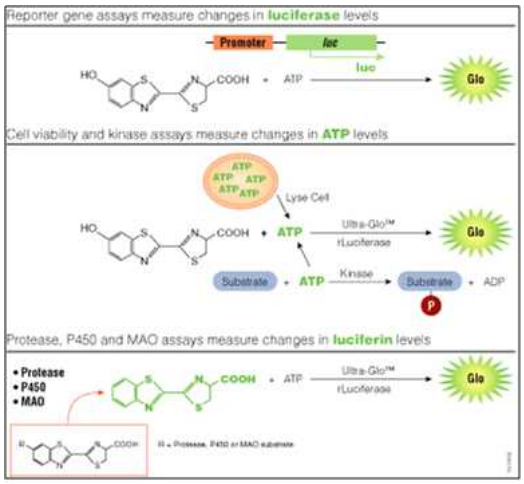
- 암 세포의 침윤능력을 알아보기 위해, modified boyden chamber를 이용하여 filter의 아랫부분을 chemoattractant로써 5 μg의 type I collagen으로 coating 하고 surface에는 matrigel 20 μg으로 coating 함.
- 이 chamber를 transwell을 장착, well의 low compartment에 10% FBS을 포함하는 RPMI 1640 배지 800 ㎕을 넣고 세포는 10% FBS을 포함하고 있는 RPMI1640 배지에 5×10^4 로 transwell의 upper compartment에 seeding 함.
- 24시간동안 배양 후 완전히 filter로 침투하지 못한 세포들은 cotton swab 으로 닦아 내고 filter의 밑바닥 로 이동한 세포들은 메탄올로 고정 시키고 filter에 있는 세포들을 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 filter 당 random하게 5군데의 microscopic field를 고른 후 염색된 세포의 수를 집계하여 세포의 침윤정도를 측정함.



암세포 침윤 분석 방법

■ **Promoter assay 및 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

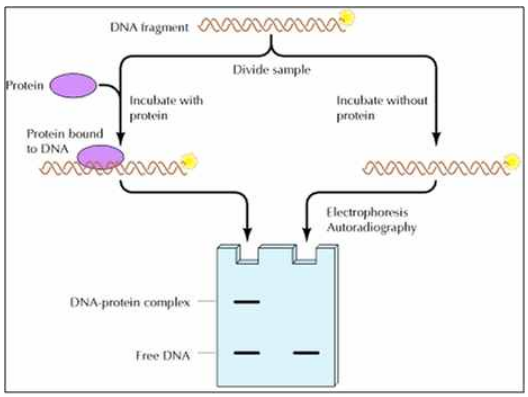
- 특정 유전자의 promoter상의 전사조절인자 결합에 대한 후보 물질의 영향을 조사하기위해 유전자 construct를 세포에 transfection한 후 후보물질을 처리하여 luciferase활성 측정.
- 후보 물질을 처리한 세포로부터 nuclear extract를 분리한 후 α-^{32}P dCTP와 DNA polymerase I의 Klenow 효소를 사용하여 3'-말단을 fill up 하여 probe를 labeling.
- DNA와 핵단백질의 결합반응은 5-10 ㎍의 nuclear extract, 2 ㎍의 poly(dI-dC)가 들어 있는 반응액(10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 250 ㎍/㎖ BSA)에 competitor를 첨가하거나 첨가하지 않고 얼음위에서 20-30분간 반응시키고 probe(0.5-1.0 ng, 100,000-200,000 cpm)를 첨가한 후 20-30분간 얼음위에서 반응시킴.
- 이 반응액을 6% polyacrylamide gel에 loading한 다음 150 V, 10 mA로 2~3시간 동안 전기영동하고 vaccum gel dryer에서 건조시킨 후 X-ray film에 노출시켜 autoradiography를 수행.



Promoter assay

■ **세포 이동능 분석(wound healing assay)**

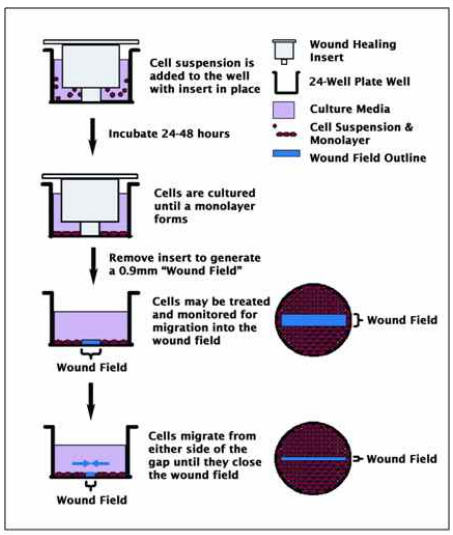
- 세포의 이동능력을 알아보기 위해, wound healing assay를 이용.
- 6 cm^2 plate에 10 % FBS을 포함하는
- MEM 배지를 5 ml을 넣고 세포를 (1X10^5 cells) seeding 하고, 후보 물질을 처리함.
- 세포가 80-90% 자랐을 때, blue tip을 이용하여 scratch를 내고 배지를 교환한 후 세포를 촬영한 것과 24, 36, 48시간 후 간극의 간격을 비교하여 세포의 이동정도를 측정함.



Electrophoretic Mobility Shift Assay

■ **세포 증식능 분석(cell proliferation assay)**

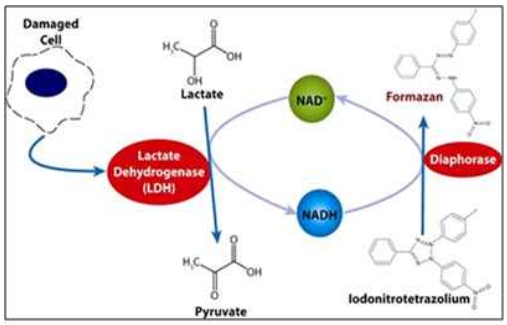
- 세포의 증식능력을 알아보기 위해, HeLa (3X10^3cells)과 RAW 264.7 (3X10^3 cells) 세포를 96well plate에 seeding 함.
- 0.5% BSA을 포함하는 α-MEM 배지를 100 ㎕를 넣고 후보 물질을 처리함.
- 72시간동안 배양 후 Cell Titer 96 AQueous NON-Radioactive cell proliferation assay (Catalog. No.G5430)의 MTS(1 ㎖)+PMS(50 ㎕)를 25 ㎕/well 처리한 후 OD_{490nm}에서 흡광도를 측정하여 세포 증식능을 분석함.



이동능 분석 (wound healing assay)

■ **세포독성능 분석(^{51}Cr release assay 및 LDH-release assay)**

- 세포에서 후보 물질에 의한 세포 독성을 알아보기 위해 후보 물질을 24시간 처리 후, NK 세포 배양.
- 표적 세포와 recombinant IL-2로 자극한 활성화된 NK 세포와 1:10, 1:2, 1:0.4 등의 비율로 섞어 반응시키고 4시간 후 NK 세포에 의한 암 세포의 specific lysis 비율을 ^{51}Cr release assay 또는 LDH-release assay를 이용하여 분석.



세포독성능 분석

■ **세포독성시험(Cytotoxicity test)**

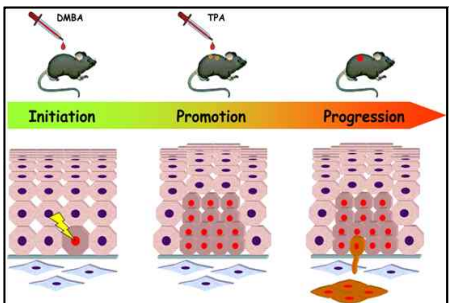
- 유도체들의 세포독성에 대한 가능성을 평가하기 위해 세포를 plate에 약 24시간 배양 후 유도체를 세포배양액에 첨가
- 유도체를 첨가한 세포에 MTT(conversion of the tetrazolium salt) 37℃, 5% CO_2 그리고 1±3 시간 배양 후 흡광도로 570 nm로 측정함.
- 세포에 치명적이 않는 유도체 농도의 50% (Toxic dose 50)로 사용

■ **유도체들의 면역증진 평가지표 제시**

- 면역기능 증진지표:
  활성산소 생성능, 혈청내 Ig 생성능, T/B cell 증식능, 면역기능 증진cytokine 발현 조절능
- 항염증작용 증진지표: Fibroblast 증식능, Collagen 발현, Proinflammatory cytokine 발현 조절능
- 항암기능 지표: 암세포증식능, 자연살해세포 cytotoxicity 기능, 암전이능, 세포자연사 및 cell cycle, 암 진행정도측정(survival rate, tumor mass)

■ **마우스 암 모델 제작**

마우스 암 모델을 제작하기 위해서, sublethal dose(650 rad)로 gamma-irradiation후 7주령의 Wild 마우스와 K/O마우스를 이용하여 질병을 유발시키고 후보 물질을 투여하여 질병 모델 제작.



동물 암 모델 제작

■ **고지혈증 치료 효과 검증: 비만 동물모델 적용 in vivo 효과 검증**

－실험방법

① 고지혈증 유발: 실험물질 투여 시작 1주일 전부터 실험물질 투여 전 기간 동안 40% beef tallow AIN-76A redent diet(Dyets Inc., PA, USA)를 공급하여 고지혈증을 유발하며 정상대조군에서는 일반설치류 pellet 사료를 동일한 방법으로 공급.

② 약물투여: 각각의 statin계 유도체 화합물을 stock(400 mg/ml in 100% ethanol)을 멸균증류수를 이용하여 200 mg/ml (in 5% ethanol)이 되게 희석하여 10 mg/kg(body weight)으로 총 84일간 매일 1회씩 경구투여, 대조 약물군에는 simvastatin 10 mg/kg(body weight)을 멸균 증류수에 용해시켜 동일한 방법으로 투여. 정상 및 HFD(high fat diet) 대조군에서는 각각 멸균 증류수 및 5% ethanol을 동일한 방법으로 투여.

③ 관찰 항목

관찰항목	검사지표
간 손상에 미치는 영향	-간 중량 -혈중 AST 및 ALT 함량의 변화 -간의 조직병리학적 소견 (지방간 병변부위의 비율 및 간세포 직경의 변화)
고지혈증에 미치는 영향	혈중 LDL, HDL, 중성지방 및 total cholesterol 양 변화
고혈당에 미치는 영향	혈당의 변화
비만에 미치는 영향	-체중의 변화량(증가량) -난소 주위 지방 중량의 변화 -난소 주위 비방 및 복벽 지방세포의 조직병리학적 변화 (지방세포 크기의 변화 및 복벽지방 두께의 변화) -심장, 신장 등 각 장기(organ)의 조직병리학적 변화

－고지혈증 치료 효과 검증을 위한 비만 동물모델 시스템 구축

비만(고지혈증) 모델마우스를 제조하였으며 이 모델동물을 statin계 유도체의 고지혈증 치료 효과 검증에 사용할 것임.

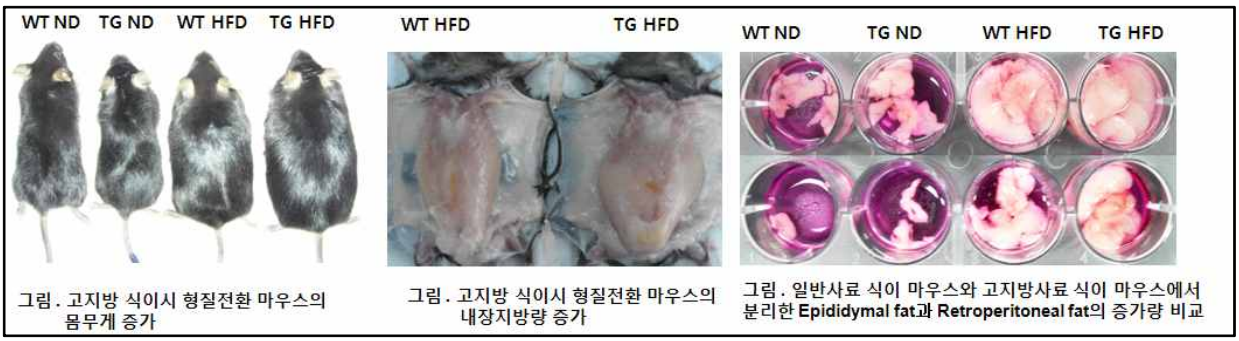


그림. 고지방 식이시 형질전환 마우스의 몸무게 증가

그림. 고지방 식이시 형질전환 마우스의 내장지방량 증가

그림. 일반사료 식이 마우스와 고지방사료 식이 마우스에서 분리한 Epididymal fat과 Retroperitoneal fat의 증가량 비교

3. 제1협동과제 연구개발 방법

■ 스틸베노이드 유도체(derivatives) 제조공정 최적화
- 생촉매를 활용한 스틸베노이드 화합물로부터 유도체(derivatives)의 생산 공정 개발

■ 스틸베노이드 유도체(derivatives) 후보물질 제조공정 최적화
- 스틸베노이드 유도체(derivatives) 제조공정 최적화
- 생촉매 이용방법 최적화

■ 선정 물질 대량생산 기반구축
- 생촉매를 이용한 선정 물질 제조방법 최적화
- 면역조절물질의 추출 및 안정화 기술 확립: 면역조절물질 대량생산을 위한 최적의 공정 확립하기 위한 파일롯 수준의 반응기에서 추출된 면역조절물질의 고효율 회수법 개발
- 제품의 상용화를 위한 scale-up 기반 구축

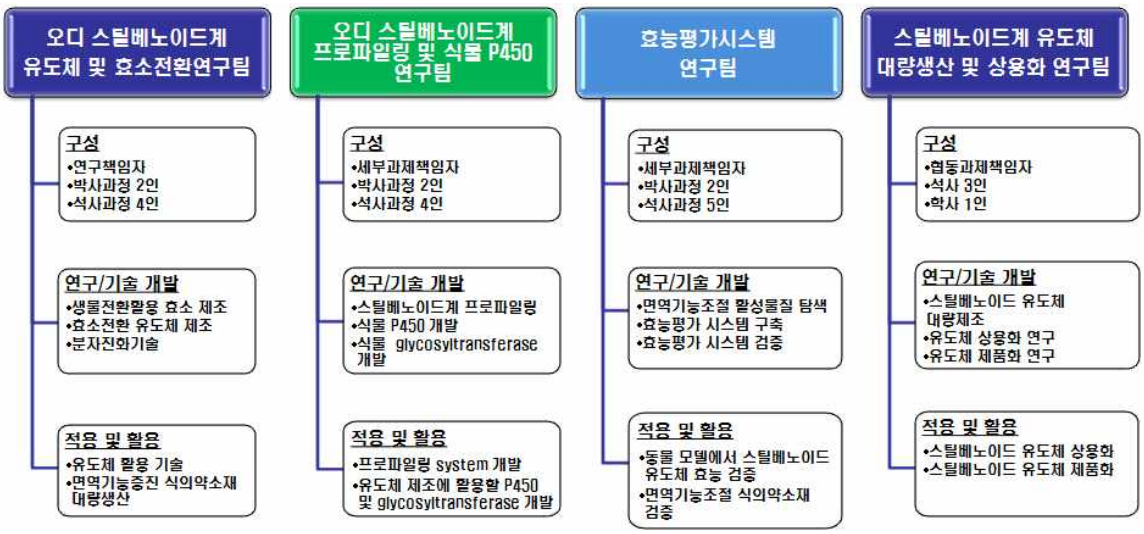
■ 면역기능조절 선정 물질 상용화
- 면역기능조절 선정 물질 시제품 제조
- 면역기능조절 선정 물질 시제품 대량 생산방법 최적화

- 생산된 면역조절물질 제품의 물리 화학적 안정화 향상화
- 면역기능조절 선정 물질의 상용화에 필수적인 대량 생산 후 유효성 및 안정성 검증

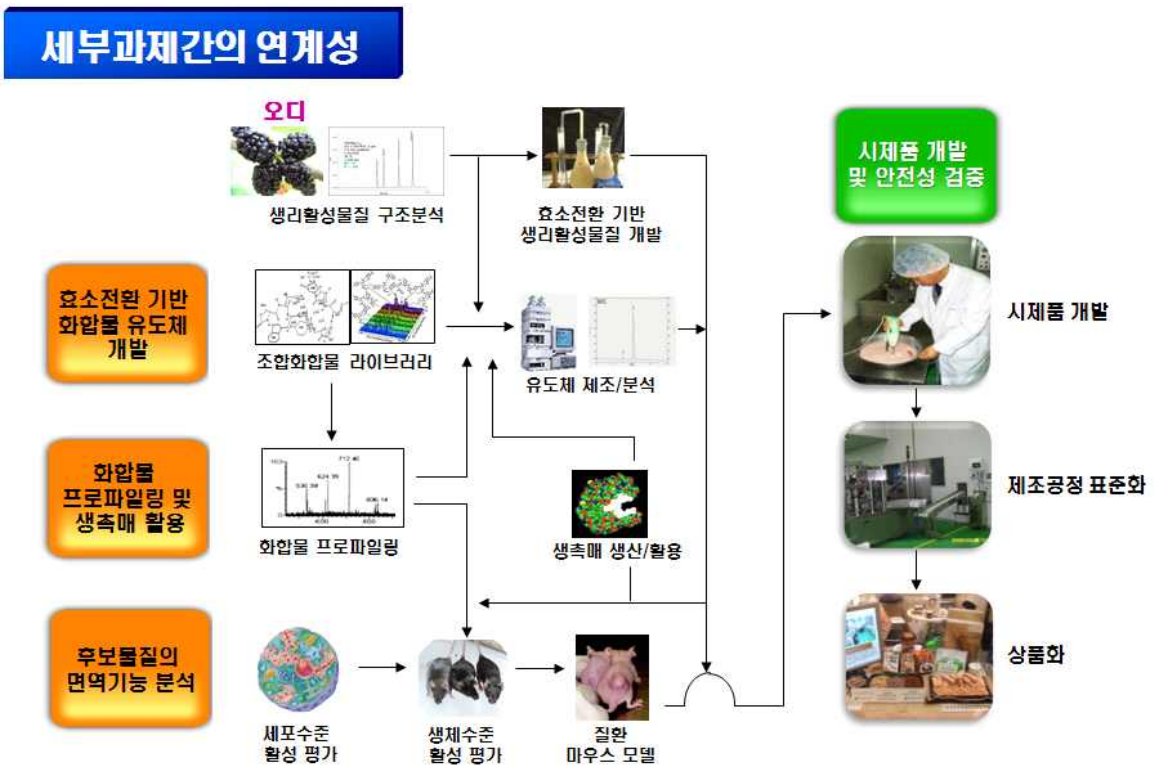
4. 연구개발의 추진체계

■ 연구진 구성 체계 및 역할

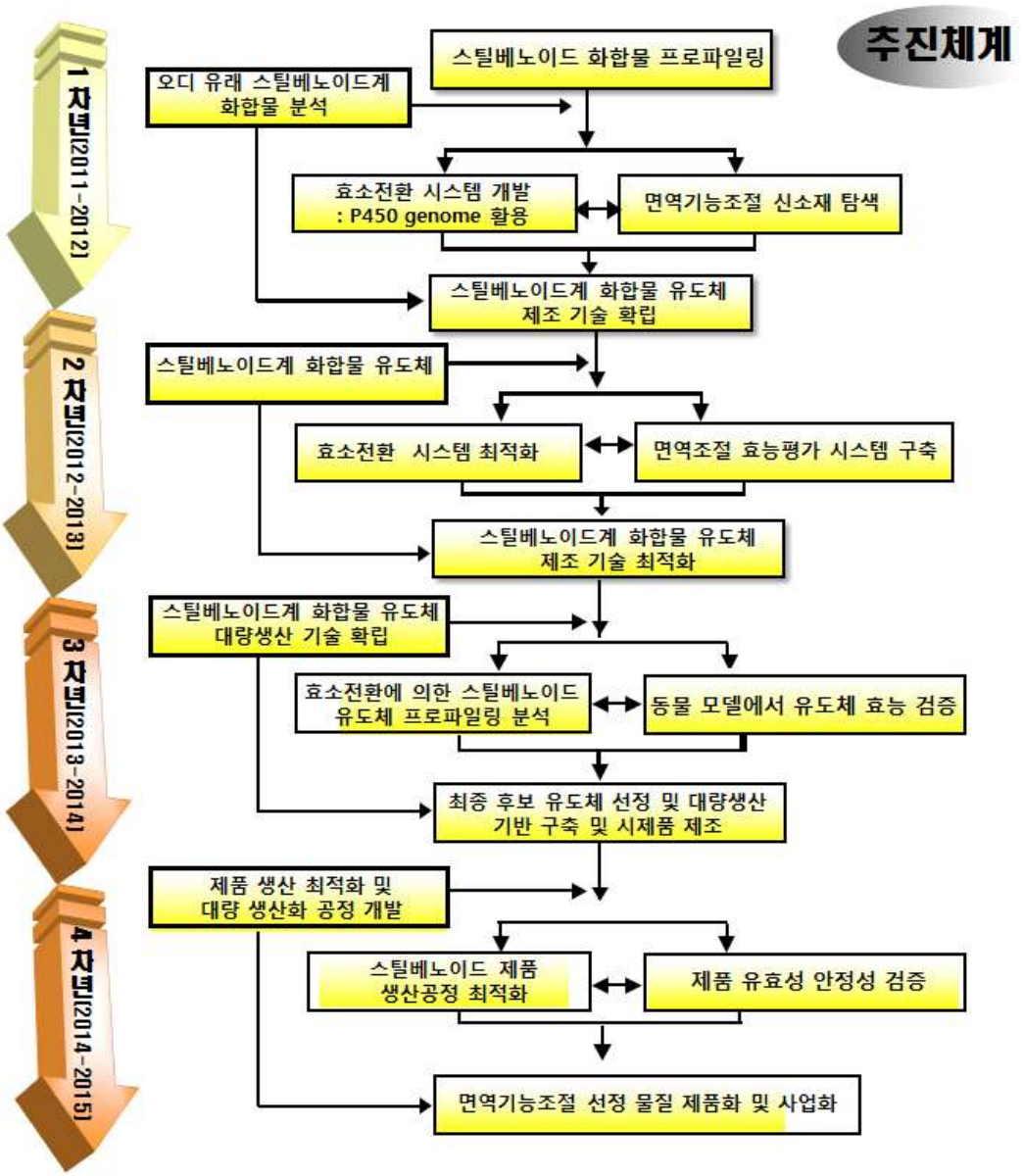
효율적인 연구추진을 위하여 3개의 연구팀으로 구성하여 유기적인 연구를 수행함. 연구책임자는 각 연구팀의 연구수행과정을 매주 평가하고 애로사항을 점검하여 효율적인 연구가 수행되도록 함.



■ 세부과제간의 연계성



■ 연차별 추진체계


추진체계
1 차년(2011~2012)
2 차년(2012~2013)
3 차년(2013~2014)
4 차년(2014~2015)
오디 유래 스틸베노이드계 화합물 분석
스틸베노이드 화합물 프로파일링
효소전환 시스템 개발 : P450 genome 활용
면역기능조절 신소재 탐색
스틸베노이드계 화합물 유도체 제조 기술 확립
스틸베노이드계 화합물 유도체
효소전환 시스템 최적화
면역조절 효능평가 시스템 구축
스틸베노이드계 화합물 유도체 제조 기술 최적화
스틸베노이드계 화합물 유도체 대량생산 기술 확립
효소전환에 의한 스틸베노이드 유도체 프로파일링 분석
동물 모델에서 유도체 효능 검증
최종 후보 유도체 선정 및 대량생산 기반 구축 및 시제품 제조
제품 생산 최적화 및 대량 생산화 공정 개발
스틸베노이드 제품 생산공정 최적화
제품 유효성 안정성 검증
면역기능조절 선정 물질 제품화 및 사업화

제 2 절 연구개발 수행내용

1. 1차년도 (2011-2012)

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
[제1세부] 오디 유래 스틸베노이드 (stilbenoid)계 화합물의 생물전환 (효소전환)	P450 효소를 활용한 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물의 생물전환 연구	-*Bacillus megaterium* 유래 P450 변이체 활용 (30종 이상) -스틸베노이드계 유도체를 생산하는 미생물 P450 효능 검정 -미생물 P450 효소 변이체를 이용한 스틸베노이드계 화합물 3종의 유도체 개발 1. 레스베라트롤 3'-hydroxylation → Piceatannol 2. 프테로스틸벤 hydroxylated derivatives 2종 3. 피세이드 hydroxylated derivative 1종
	생물전환된 스틸베노이드 (stilbenoid)계 화합물의 유도체(derivatives)의 분석 방법 확립	-HPLC, LC/MS, GC/MS 기술 이용 P450 효소반응을 통해서 제조된 스틸베노이드계 유도체 분석조건 확립 -스틸베노이드계 화합물 3종 : 1. Resveratrol, Piceatannol(resveratrol 대사체) 2. Pterostilbene, Pterostilbene 유도체 2종 3. Piceid, hydroxylated piceid 1종
[제2세부] 식물로부터 천연물질 합성에 관여하는 P450 유전자 발굴	Microarray data 등 식물 유전정보 DB를 근거로 Phenylpropanoid 및 이의 derivatives 화합물 합성에 관여하는 P450 유전자군 선별	-고추와 토마토의 유전자 DB를 이용하여 P450 유전자 분석 후 20종 이상의 P450 full length 정보 확보
	식물 유전자 DB를 이용하여 P450 유전자를 search 한 후 full length P450 EST를 분석 해당 작물에서 조직별 mRNA 분리한 후 식물에서 P450 유전자 cDNA 합성	-확보된 P450 유전자 정보를 바탕으로 고추에서 10종의 P450 유전자를 분리하여 시물 및 미생물 발현벡터에 cloning -식물과 미생물에서 P450 유전자 기능 분석 후 2종의 유전자 등록
[제3세부] 오디로부터 면역조절 활성 신소재 탐색 및 효능 탐색	항산화활성 및 면역조절 활성 물질(면역기능 조절지표) 분석: 세포독성시험, 활성산소 생성능, Ig 생성, T/B cell 증식, 면역기능조절 cytokine 조절능	-P450효소를 활용한 스틸베노이 드계 유도체들의 세포독성시험을 수행하였고, 항산화 활성 및 면 역기능 조절 cytokine의 활성을 확인함
	마우스 모델에서 면역세포 증식 및 면역 단백질의 발현 연구를 통한 기능성 신소재 탐색 및 효능 확인: Fibroblast 증식능, Collagen 발현, Proinflammatory cytokine 발현 조절능	-마우스 모델에서 P450을 활용한 스틸베노이드계 유도체들에 의한 면역기능 증진 효능을 확인함 -추가적인 마우스 모델을 이용한 면역기능 증진관련 연구목표를 달성하였음
[제1협동] 스틸베노이드 계 화합물 유도체 제조공정 최적화	생촉매를 활용한 스틸베노이드계 화합물로부터 유도체의 생산 공정 개발	-스틸베노이드계 화합물 유도체 생산을 위한 효소반응 조건 최적화 (레스베라트롤, 피세이드 유도체) -반응 시간에 따른 P450 효소 안정성 확인

2. 2차년도 (2012 -2013)

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
[제1세부] 오디 유래 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물의 생물전환 (효소전환)	스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 제조방법 최적화	- 스틸베노이드계 유도체를 생산하는 미생물 P450 변이체 17종의 효능 검정 및 높은 활성의 P450 효소 선별
	스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 후보물질 분석 및 화학구조 확인	- P450 효소반응을 통해서 제조된 스틸베노이드계 유도체 3종을 LC/MS, NMR 기술을 이용해 분석 및 화학구조 확인
	P450 효소를 생촉매로 이용한 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 후보물질 제조방법 최적화	- 스틸베노이드계 화합물 유도체의 배당체 제조를 위한 Amylosucrase 발현 및 정제
[제2세부] 식물로부터 천연물질 합성에 관여하는 P450 유전자 발굴	식물에서 P450 유전자 cDNA 합성 및 염기서열 분석 한 후 발현 벡터에 클로닝 하여 대장균 및 식물 P450 유전자 발현 및 분리	- 토마토 유전자 DB를 기반으로 유전자정보가 확보된 P450 유전자 35개 중에 cDNA에서 유전자를 분리한 13개의 P450을 벡터에 클로닝 - 식물 형질전환 방법을 통하여 3개의 토마토 P450 유전자를 담배에 형질전환 - 25종의 식물 P450 유전자 E.coli 발현 시도: 1종의 P450 발현
	오디 유래 물질을 fractionation 하고 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 프로파일링	- 오디에서 다량으로 발현되는 스틸베노이드계 화합물을 GC/MS를 통해 분석하여 target 천연물질 선정
	식물 P450 유전자를 발현하는 대장균을 생촉매 반응에 활용	- 식물 P450 유전자로 형질전환된 대장균을 이용하여 효소의 기작 분석 및 생촉매 활성 측정 - 식물유래 P450 reductase 유전자3종 분리 및 발현 - 대장균에서 발현시킨 식물유래 P450 reductase를 이용한 생촉매 활성 증가 및 반응 최적화
[제3세부] 오디로부터 면역조절 활성 신소재 탐색 및 효능 탐색	최종 후보물질의 공인 기관의 평가자료를 통한 안전성 및 독성 검사	- 한국화학융합시험연구원에 의뢰 급성 경구투여 독성시험 결과 이상소견이 관찰되지 않았음.
	마우스 모델에서 유도체 후보물질처리에 의한 면역세포 활성기능 증진방법 확립	- 암 및 염증유발 또는 억제인자 조절기능, 항암/항염 활성 조절기능, 면역세포 활성 및 침윤능력, 세포독성능(암세포 killing능력)을 통한 면역세포 활성기능 증진방법을 확립함.
	암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성 탐색	- 암 진행정도 측정(survival rate, tumor mass), 면역세포활성 및 침윤능, 자연살해세포 cytotoxicity 기능, 암전이능, 세포자연사 및 cell cycle을 통한 항암효능을 확인함.
	마우스 점막자가면역질환 모델에서 면역조절 활성 및 효능 확인	- 유도체들에 의한 체액성, 세포매개면역 및 점막면역기능 분석, 염증유발유전자 억제기능,면역세포활성 및 침윤능을 통한 점막자가면역질환 마우스 모델에서 효능을 확인함.
[제1협동] 스틸베노이드계 화합물 유도체 제조공정 최적화	스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 제조 공정 최적화	- 반응온도 와 반응시간에 따른 미생물 P450 변이체의 안정성 확인
	생촉매 이용방법 최적화	- 스틸베노이드계 화합물 유도체 (프테로스틸벤 유도체) 생산을 위한 효소 반응조건 최적화

3. 3차년도 (2013 -2014)

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
[제1세부] 전남대학교 윤철호 P450 효소를 이용한 면역조절 활성 신소재 개발용 스틸베노이드(stilbenoid)계 유도체 개발	Target 작물인 오디부터 유용 성분 분리 정제 최적화	- 스틸베노이드계 화합물의 분리 정제를 위한 용매 최적화 - 오디로부터 천연물질 분리정제 조건 확립
	시제품 제조	- 면역기능조절 스틸베노이드계 화합물 유도체 선정물질의 시제품 제조
[제2세부] 생촉매 활용가능 식물 P450의 발굴 및 오디 스틸베노이드 화합물 프로파일링	식물 P450 효소 대량생산 최적화	- 고추 및 토마토 유래 P450 유전자의 분리 및 대장균에서의 발현 조건 규명 - 대장균에서 식물유래 P450 발현을 위한 최적화 조건 규명 - 다수의 식물유래 P450을 대장균에서 발현 시키고, CO 검정을 통해 식물 P450의 활성 확인
	식물 P450 활용 최적화	- 고추 유래 P450 reductase (CaCPR)의 분리 및 대장균에서의 발현 조건 규명 - 식물 P450 reductase에 대한 antibody를 생성하여 향후 실험 응용 범위를 넓힘 - 식물 P450 reductase에 대한 특성 및 활성에 대한 실험 수행
[제3세부] 오디 유래 스틸베노이드 유도체로부터 면역기능조절 활성 물질 탐색 및 검증	독성 및 안전성검사를 통한 후보물질의 안정성 연구에 의한 최종 후보 물질 선정	- 한국화학융합시험연구원에 의뢰 안정성 및 독성검사와 최종후보물질 선정을 2차 년도에 완료함
	후보물질의 투여경로 및 투여용량 확립	- 점막자가면역질환 마우스 모델 및 암 질환 마우스 모델을 이용하여 후보물질의 효과적인 투여경로 및 투여용량을 확인함
	식이유발 고지혈증 마우스 모델에서의 효능 평가 :고지혈증, 고혈당, 비만에 미치는 영향	- 비만 마우스 모델을 이용하여 후보물질의 혈중 LDL, LDH, TAG cholesterol의 변화 및 혈당변화를 확인함 - 비만관련 유전자 발현 및 몸무게 변화를 확인함
	후보물질의 delivery system 개발 및 효능검증	- 투여경로, 투여용량 및 formulation 확립을 통한 후보물질의 최적의 delivery system을 확립함
[제1협동] (주)제노포커스 김의중 생촉매를 이용한 면역기능조절 신소재 물질 대량생산 기반구축 및 상용화	면역기능조절 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 선정물질의 시제품 제조 및 상용화방안 구축	- 오디 추출물의 스틸베노이드(stilbenoid)계 유도체(derivatives) 생산방법 최적화 -효소 변환 오디추출물의 시제품 제조 조건 확립

4. 4차년도 (2014 -2015)

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
[제1세부] 제품화 예상 스텔베노이드계 화합물 유도체 제조 최적화	- 유도체 제조 최적화	- 시제품의 제조 최적화 - 추출 유기용매 제거조건 확립
	- 생산공정 최적화	- 시제품 제조공정 최적화 - 시제품의 수율 향상을 위한 최적화
[제2세부] 제품화 예상 스텔베노이드계 화합물 유도체 활용 기반 구축	- 식물 P450을 활용한 유도체 제조의 지속적인 모니터링 및 문제해결 능력 향상	- 대장균에서 단백질 대량 발현을 위한 chaperone plasmid co-expression 배양조건 최적화 - Chaperone plasmid co-expression 배양으로 대량발현된 단백질 분리 및 P450 촉매활성 확인 - CPR 효소의 modification을 이용한 CPR 활성 조절
	- 생산된 면역조절물질 제품의 물리 화학적 안정화 향상화	- 시제품의 물리화학적 특성 연구 - 물성 등 제품 안정성 연구
[제3세부] 오디 유래 스틸베노이드 유도체로부터 제품화 예상 선정물질의 유효성 및 안전성 검증	- 제품화 효능 향상을 위한 연구 지속화	- 3차년도 연구결과를 바탕으로 점막자가면역질환 및 암 질환 마우스 모델에서 제품화 후보물질들의 최적의 투여조건 확립
	- 면역기능조절 선정 물질의 상용화에 필수적인 대량 생산 후 유효성 및 안전성 검증	- IBD 마우스 모델 및 대장암 마우스 모델에서 제품화 후보물질들의 경구 투여를 통한 항염·항암 효능 검증
[제1협동] 제품화 예상 스텔베노이드계 화합물 유도체의 사업화 추진	- 대량 생산 및 분리/정제 공정을 위한 저비용 고효율의 최적 시스템 개발	- 시제품의 대량 생산 및 분리/정제 공정 최적화 - 저비용 고효율의 시제품 생산 최적시스템 구축
	- 식품 소재, 화장품 첨가물 (미백소재), 의약외품 소재로서의 각종 평가	평가의약외품 소재로서의 각종 평가 - 식품 소재 - 화장품 첨가물 (미백소재) - 의약외품 소재로서의 각종
	- 소재 적합성 시험 및 판매	- 대상 기업: (예시) (주)태평양, LG 생활건강, 애경 등

제 3 절. 연구범위 및 연구수행 방법

1. 1차년도

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 내용
오디 유래 스틸베노이드계 화합물의 생물전환 (효소전환)	- *Bacillus megaterium* 유래 P450 효소 Library 제작 random mutagenesis를 통한 P450 유전자 변이체 선별 및 확보 P450 유전자 특이적인 primer set 제조 PCR을 이용한 P450 유전자 분리 및 확보 - 스틸베노이드계 유도체를 생산하는 미생물 P450 효능 검정 NADPH-generation system을 이용한 P450 효소 활성 및 효능 검정 - 미생물 P450 효소를 활용한 스틸베노이드계 화합물 3종의 생물전환 30종 이상의 P450 변이체 효소를 이용한 대상 스틸베노이드계 화합물의 생물전환 검정 - 미생물 P450 효소반응을 통해 제조된 스틸베노이드계 유도체 분석방법 확립 HPLC, LC/MS, GC/MS 기술 이용한 스틸베노이드계 유도체 3종의 분석방법 확립 스틸베노이드계 화합물 3종 : 1. Resveratrol, Piceatannol(resveratrol 대사체) 2. Pterostilbene, Pterostilbene 유도체 2종 3. Piceid, hydroxylated piceid 1종	- P450 효소를 활용한 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물의 생물전환 연구 - 생물전환된 스틸베노이드계 화합물 유도체의 분석 방법 확립

식물로부터 천연물질 합성에 관여하는 P450 유전자 발굴	- 식물 유전자 DB로부터 P450 유전자군에 대한 정보 분석한 후 natural product 생산에 관여하는 P450 유전자군을 선별 - EST DB로부터 full length가 확보된 P450 유전자군을 선별한 후 유전자 specific primer를 제작함. 대상 식물에서 RNA를 분리한 후 RT-PCR 방법으로 P450 유전자 분리한 후 염기서열 확인 - P450 유전자를 미생물 발현벡터 및 식물발현벡터에 cloning	- 고추 및 토마토 유전자 EST DB를 이용하여 P450 유전자를 search 한 후 full length P450 유전자군 선별 -식물 유전정보 DB를 근거로 Phenylpropanoid 및 이의 derivatives 화합물 합성 관여 P450 유전자군 선별 - 해당 작물에서 조직별 mRNA 분리한 후 식물에서 P450 유전자 cDNA 합성 - 분리한 P450 유전자를 식물 및 미생물 발현벡터에 삽입하여 P450 효소 발현 - 발현된 효소의 기능분석
오디로부터 면역조절 활성 신소재 탐색 및 효능 탐색	- P450 효소에 의한 스틸베노이드계 유도체들의 세포독성시험을 확인하기 위해, MTS assay를 통한 세포생존율을 분석 - 유도체들의 항산화기능 증진효과를 확인하기 위해, 항산화관련유전자 발현 확인 및 NO와 ROS 생성능을 효소연결 분석실험(ELISA)과 유세포 분석(FACS)로 측정 - 유도체들의 면역조절 활성을 조절하는지 확인하기 위한 염증관련 유전자 발현을 RT-PCR 또는 Real-time PCR 로 확인하였으며 면역세포증식률은 MTS assay로 분석 - 마우스모델에서 유도체들에 의한 면역기능 증진을 분석하기 위해, 유도체들을 주입 후 PCR을 이용한 면역기증조절 관련 유전자발현, 면역세포의 증식과 발현을 유세포분석기와 MTS로 측정	- 항산화활성 및 면역조절 활성 물질(면역기능 조절지표) 분석: 세포독성시험, 활성산소 생성능, Ig 생성, T/B cell 증식, 면역기능조절 cytokine 조절능 - 마우스 모델에서 면역세포 증식 및 면역 단백질의 발현 연구를 통한 기능성 신소재 탐색 및 효능 확인: Fibroblast 증식능, Collagen 발현, Proinflammatory cytokine 발현 조절능
스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 제조공정 최적화	- 스틸베노이드계 화합물 유도체를 생산하는 P450 효소 반응 조건의 최적화 (레스베라트롤, 피세이드 유도체) - 효소 활성과 안정성이 모두 높은 최적의 P450 효소 변이체 개발을 위한 기초실험 수행 - Total trunover number 실험 (TTN): 전체 반응 시간 동안 생성되는 products의 양을 단위 P450 효소 농도로 나누어 계산 - 반응 시간에 따른 P450 효소 변이체의 안정성 (stability)을 CO-spectra를 이용해서 확인	- 생촉매를 활용한 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물로부터 유도체(derivatives)의 생산 공정 개발

2. 2차년도

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 제조방법 최적화	- 미생물 P450 변이체의 효능을 검정하고 선별하기 위한 17종의 P450 변이체를 NADPH-genaration system 을 이용하여 스틸베노이드계 화합물의 생물전환 확인	- 미생물 P450 변이체에 의한 스틸베노이드계 화합물의 생물전환 활성 정도를 HPLC 를 통해 분석
스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 후보물질 분석 및 화학구조 확인	- P450 변이체를 통해 제조된 스틸베노이드계 유도체 3종의 분석 및 화학구조 확인	- 미생물 P450 변이체에 의한 스틸베노이드계 유도체를 LC/MS, NMR을 통해 분석
P450 효소를 생촉매로 이용한 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 후보물질 제조방법 최적화	- 스틸베노이드계 화합물 hydroxylated derivatives 에 대한 배당체 제조를 위해 Amylosucrase 효소 개발	- 미생물 *Deinococcus radiodurans* 에서 유래한 Amylosucrase 유전자를 클로닝 후 대장균에 발현시킴 - 대장균에 발현시킨 Amylosucrase 효소를 His-tag affinity column 이용하여 정제
식물에서 P450 유전자 cDNA 합성 및 염기서열 분석 한 후 발현 벡터에 클로닝 하여 대장균 및 식물 P450 유전자 발현 및 분리	- 토마토 cDNA에서 토마토 P450 유전자를 분리 - 토마토 P450 유전자의 염기서열 정보 확인 및 식물 발현벡터에 클로닝 - 확인된 토마토 P450 유전자를 식물에 형질전환	- 토마토 RNA에서 cDNA를 합성하고 각각의 토마토 P450 염기서열 정보에 따른 특이적 프라이머 세트를 이용하여 토마토 P450 유전자를 분리 - 분리한 토마토 P450 유전자의 염기서열 정보를 확인한뒤 식물 발현벡터인 pBI121에 클로닝 - 잎 절편 형질전환 방법을 이용하여 토마토 P450을 발현하는 형질전환 담배 생성
오디 유래 물질을 fractionation 하고 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 프로파일링	- 오디 추출물에 함유된 오디유래 물질을 분석 및 프로파일링 - 오디 추출물에 함유된 물질중 다량으로 발현되는 물질 확인 및 선정	- 4종의 오디에서 추출한 각각의 오디추출물에서 3종의 스틸베노이드계 화합물질을 GC/MS 를 통해 분석 - 3종의 스틸베노이드계 화합물질 중 다량으로 발현되는 물질(레스베라트롤)을 GC 를 통해 분석

식물 P450 유전자를 발현하는 대장균의 생촉매 활성 측정 및 생촉매 반응의 최적화	- 식물 유래의 P450을 대장균에 형질전환 및 발현 - HPLC를 통해 P450 효소의 기작 분석 및 연구 - 대장균에서 P450 효소의 생촉매 반응의 최적화를 위해 P450 환원효소를 이용	- 식물의 cDNA에서 분리한 P450 유전자를 대장균 발현 벡터에 클로닝 - 효소의 촉매반응 이용하여 후보 기질 물질을 넣어 HPLC 분석을 통해 효소기작 분석 - 기질의 binding 적정 스펙트럼을 분석하여 효소활성을 측정 - 식물 유래의 P450 환원효소의 탐색 및 유전자 분리한 뒤 발현벡터에 클로닝 - 대장균에서의 P450 효소의 생촉매 반응 최적화 위해 식물 P450 환원효소와 같이 배양
최종 후보물질의 공인 기관의 평가자료를 통한 안전성 및 독성 검사	- 농촌진흥청 고시에 따라 300 mg/kg과 2000mg/kg용량으로 랫드에 급성 경구투여 후 14일째 부검하여 육안으로 장기를 검사	- P450 효소에 의한 스틸베노이드계 유도체의 공인인증기관 평가 자료를 통한 안정성 및 독성검사
마우스 모델에서 유도체 후보물질처리에 의한 면역세포 활성기능 증진방법 확립	- 함암/항염 활성 조절기능을 확인하기 위한 관련 유전자 발현을 RT-PCR로 확인함 - 유도체에 의한 면역세포 활성을 조절하는지 확인하기 위하여 면역세포 활성관련 마커의 발현을 유세포분석기로 확인하였으며 invasion assay와 migration assay를 이용하여 면역세포의 침윤능력을 관찰함. - Lactate dehydrogenase assay를 통한 면역 세포독성능(암세포 killing능력)을 확인함	- 유도체에 의해 조절되는 항암/항염 조절인자 탐색 - P450 효소를 활용한 유도체의 면역세포 활성기능 증진방법 확립 연구

암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성 탐색	- Melanoma 세포주를 이용한 암 모델에서 암 진행정도를 확인하기 위해 survival rate, tumor mass, 암전이와 관련된 유전자 발현을 통해 암 전이정도를 측정 - 항암 효능 검증을 위해 RT-PCR을 통해 면역세포 활성 유전자의 발현을 확인하고 invasion/migration assay을 통해 면역세포 침윤능 확인, Facs analysis를 통해 Tumor infiltration lymphocytes (TIL) population을 확인함 - 자연살해세포 cytotoxicity 기능 효과를 확인하기 위해 lactate dehydrogenase assay를 수행함	- 마우스 암모델에서 P450 유도체에 의한 암 진행정도, 암전이, 생존률 변화 확인 - 암모델에서의 면역조절 활성에 의한 항암효능 확인
마우스 점막자가면역질환 모델에서 면역조절 활성 및 효능 확인	- 마우스에 점막자가면역질환(IBD)을 유도하기 위해 3.5% Dextran sulfate sodium(DSS)를 경구 투여함 - IBD의 완화효과를 확인하기 위한 체중감소, 점액혈성 설사, 대장 길이의 감소 등의 임상증상을 확인함 - Hematoxylin and eosin(H&E)염색을 통한 조직학적 점수를 측정함 - 유도체들의 의한 체액성/세포성면역세포활성의 변화를 관찰하기 위해 장간막림프절과 대장에서 활성화된 B cell과 T cell population을 분석과 IgA발현 및 활성산소의 변화를 FACS analysis를 통해 관찰함	- P450 유도체 경구 투여에 의한 IBD의 완화효과를 질병활성지표와 조직학적 관찰을 통한 효능 확인 - IBD모델에서 유도체에 의한 체액성 및 세포성면역 활성 변화 확인
스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 제조 공정 최적화	- 스틸베노이드계 화합물 유도체 생산을 위한 P450 변이체의 안정성 확인	- 반응 시간과 온도 변화에 따른 P450 효소 변이체의 안정성을 CO-spectra 를 이용하여 확인
생촉매 이용방법 최적화	- 스틸베노이드계 화합물 유도체 생산을 위한 생산 공정 최적화	- 전체 반응 시간 동안 생성되는 스틸베노이드계 화합물 유도체의 양을 단위 P450 효소 농도로 나누어 TTN (Total turnover number) 확인

3. 3차년도

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
스틸베노이드계 화합물의 분리 정제를 위한 용매 최적화와 천연물질분리	- 유기용매를 이용한 오디로부터의 천연물질 분리정제 - 오디추출물에서의 스틸베노이드계 화합물 분석 - 오디추출물에서의 스틸베노이드계 유도체의 추출량 정도 분석	- 유기용매 (메탄올, 에탄올, 부탄올, 클로로포름, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 아세톤) 이용하여 오디로부터 천연물질 분리 - GC, GC/MS 분석을 통한 target 천연물질 규명 - GC 분석을 통한 유기용매 (에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄, 아세톤, 부탄올)에 따른 스틸베노이드계 유도체 추출량 비교
오디추출물로부터 미생물유래 P450 효소를 이용한 스틸베노이드계 유도체 제조 개발	- 시제품제조	- 에틸아세테이트 이용 오디추출물 제조 - 미생물 P450 변이체에 의한 생물전환 오디추출물 제조 - 동결건조를 통한 생물전환 오디추출물의 시제품 제조
식물 P450 효소 대량생산 최적화	- 대장균을 이용한 식물 P450 발현 시스템 최적화 조건규명	- 고추 DB에서 새롭게 발굴할 고추 P450 염기서열 정보를 확인하고 고추 cDNA에서 유전자를 분리 - 대장균 발현 벡터에 고추 P450 유전자를 클로닝 한 다음 발현을 위한 최적 조건 규명 - 고추 P450 형질전환 대장균에서 분리한 P450의 활성 측정
식물 P450 활용 최적화	- 식물유래 P450 reductase의 발현 최적화 - 식물유래 P450 reductase의 대량생산 - 식물유래 P450 reductase의 활성 및 특성 조사	- 고추에서 추출한 mRNA를 이용하여 cDNA를 합성하고 고추 P450 reductase (CaCPR) 염기서열을 바탕으로 cDNA에서 유전자를 증폭 - 대장균 발현 벡터에 CaCPR 유전자를 클로닝한 다음, 발현 최적 조건 확립 - 최적화된 조건으로 고추 CPR을 발현하는 형질전환 대장균을 대량 배양하여 CPR 분리 정제 - 분리정제한 CPR을 이용하여 토끼에서 polyclonal antibody 제작 - Western blot을 사용하여 제작된 antibody의 활성을 검증 - CPR의 환원 활성 측정 - HPLC를 이용하여 식물유래 CPR의 product를 확인 - 온도 pH 변화에 따른 효소 활성을 식물유래 CPR과 동물 CPR과 비교
- 독성 및 안전성검사를 통한 후보물질의 안정성 연구에 의한 최종 후보 물질 선정	- P450 효소에 의한 스틸베노이드계 유도체의 공인인증기관 평가 자료를 통한 안정성 및 독성검사	- 농촌진흥청 고시에 따라 300 mg/kg과 2000mg/kg용량으로 랫드에 급성 경구투여 후 14일째 부검하여 육안으로 장기를 검사

- 후보물질의 투여경로 및 투여용량 확립	- 염증 및 암 마우스 모델로부터 후보물질들의 투여경로 및 투여용량에 따른 항염 및 항암 효능 확인	- DSS를 이용한 IBD 마우스 모델 및 Melanoma 세포주를 이용한 피부암 마우스 모델에서 비장 및 림프절을 적출하여 항염 및 항암 관련 유전자의 발현을 확인하고 유세포 분석기를 이용하여 면역세포들의 활성의 변화를 확인함
- 식이유발 고지혈증 마우스 모델에서의 효능 평가	- 고지방사료 식이 비만 마우스 모델에 후보물질이 미치는 영향 확인	- 생후 8주령 23 내지 24 g의 Wild-type C57BL/6 마우스(이하 WT) 웅성을 이용하여 16주 동안 고지방 사료(Research Diets, USA)를 자유식이하면서 물을 충분히 공급하고, 실온 24±2℃를 유지하여 실험에 사용함. 효소전환된 오디추출물을 3일 간격으로 16주 동안 경구 투여하였으며, 체중은 7일 간격으로 0.1g 단위까지 측정하였고, 사료 식이량은 7일 간격으로 측정함. 고지방 사료 식이 16주 후 각각의 마우스에서 부고환지방, 갈색지방, 간조직을 분리하여 크기와 무게 확인함.
	- 후보물질이 고지혈증에 미치는 영향 확인	- 고지방 사료와 효소전환된 오디추출물(MD) 식이 16주 후 각각 마우스로부터 분리한 serum에서 고지혈증 지표인 triglyceride, cholesterol, HDL, LDL을 측정함.
	- 후보물질이 고혈당에 미치는 영향 확인	- 효소전환된 오디추출물에 의한 항당뇨 효능 확인을 위해 insulin resistance 및 glucose tolerance test 를 실시함. 고지방 사료와 천연물 유래 화합물 식이 16주 후 각각의 마우스를 공복상태로 유지하고 인슐린 또는 글루코스를 복강주사한 후 꼬리 끝을 절단하여 15분 간격으로 혈액을 채취해 혈당 측정
		- 분리한 지방조직에서 인슐린 저항성관련 유전자의 발현조절 여부를 RT-PCR 방법으로 확인함.
- 후보물질의 delivery system 개발 및 효능검증	염증 및 암 마우스 모델로부터 후보물질의 주사, 경구투여 및 패치타입에 의한 항염 및 항암 효능 확인	- DSS를 이용한 IBD 마우스 모델 및 Melanoma 세포주를 이용한 피부암 마우스 모델에 후보물질을 주사제, 경구투여 및 패치타입으로 농도별 투여함. 이후 염증 및 암 마우스 모델로부터 비장 및 림프절을 적출하여 항염 및 항암 관련 유전자의 발현을 확인하고 유세포 분석기를 이용하여 면역세포들의 활성의 변화를 확인함
면역기능조절 스틸베노이드계 화합물 유도체 선정물질의 시제품 제조 및 상용화방안 구축	- 미생물유래 P450효소를 이용한 오디추출물 효소전환 - 효소전환 오디추출물을 이용한 시제품 제조	- GC/MS 분석을 사용하여 미생물유래 P450변이체에 의한 레스베라트롤 유도체 생성 확인 - 에틸아세테이트를 이용한 오디추출물 제조 - 미생물 P450 변이체에 의한 생물전환 오디추출물 제조 - 동결건조를 통한 생물전환 오디추출물의 시제품 제조

4. 4차년도

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
- 유도체 제조 최적화	- 미생물 P450 변이체의 효능을 검정하고 선별하기 위한 17종 P450 변이체를 NADPH-생성 system을 이용하여 스틸베노이드계 화합물의 생물전환 확인 - 유기용매를 이용한 오디로부터 천연물질 분리정제	- 시제품의 제조 최적화 - 추출 유기용매 제거조건 확립 - polydatin의 대사체인 astringin 제조 방법 개발
- 생산공정 최적화	- 미생물 P450 변이체의 효능을 검정하고 선별하기 위한 17종의 P450 변이체를 NADPH-genaration system 을 이용하여 스틸베노이드계 화합물의 생물전환 확인 - 유기용매를 이용한 오디로부터 천연물질 분리정제	- 시제품 제조공정 최적화 - 시제품의 수율 향상을 위한 최적화
- 대장균 발현 시스템을 이용한 식물 P450 발현의 문제 해결 및 최적화 구축	- 대장균 발현 시스템에서 외부 단백질인 식물 P450 발현 저해 문제를 해결하기 위해 chaperone plasmid와 co-expression 방법을 수행함 - Chaperone plasmid 5 종류를 가지고 co-expression 하였을 때 발현 증가가 가장 높은 시스템을 선별, 발현 최적화 조건을 구축함.	- 대장균에서 외부 단백질의 발현을 높이기 위해 chaperone protein을 발현시키는 plasmid 5 종류 (pG-KJE8, pAR3HDJ-1, pGro-7, pG-TF2, pKJE7)를 준비함. - P450 발현벡터인 pCW 벡터에 식물 P450 유전자를 cloning 하고, 5종류의 chaperone plasmid 각각을 대장균 BL21 strain에 형질전환 수행 - 5종류의 chaperone 단백질과 같이 배양했을 때와 없이 했을 때를 비교하여 발현증가가 확인된 시스템을 가지고 배지, 배양 시간, 온도 등의 발현 최적화 조건을 구축함.
- 고추 유래의 p450 효소 대량발현 및 활성 확인	- 대장균에서 chaperone 단백질 발현 시스템을 이용하여 식물 P450 단백질을 대량발현을 유도함. - 발현된 단백질을 분리하여 P450 활성을 확인함.	- 고추에서 ABA 8'-hydroxylase 기능을 하는 P450 family인 CaP450-12A-1, 2, 3 유전자를 pCW 벡터에 cloning함. - Chaperone co-expression 최적화 결과를 바탕으로 고추 P450 단백질을 대량 배양한 다음 분리하여 CO-spectral assay를 수행한 결과 membrane fraction에서 P450 활성이 확인됨. - 7-EC 기질을 사용하여 발현된 P450의 정상적인 촉매반응을 확인함.

- 고추 유래의 시토크롬 p450 환원효소 modification	- CaCPR 1의 c-terminus 부분을 modification 하여 발현 벡터에 cloning함. - 대장균에서 변형된 CaCPR 1-DVAS를 발현하여 단백질만 분리함.	- 고추에서 유래한 CaCPR 1의 활용 가능성을 넓히기 위해 효소의 c-terminus 부분을 modification시킴. - 변형된 c-terminus 부분은 시퀀스 분석을 통해 단백질 서열이 DVW에서 DVAS로 바뀐 것을 확인하였고, 발현 벡터인 pET 28(a)에 cloning함. - 변형된 CaCPR 1-DVAS유전자를 대장균 시스템에서 발현을 유도하였고, 단백질을 분리하여 발현을 확인함.
- 오디로부터 추출된 스틸베노이드계 후보물질들의 투여조건 확립	- IBD 마우스 모델 및 대장암 마우스 모델에서 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질들의 투여경로 및 투여용량 확인	- 3차년도 연구내용을 바탕으로 IBD 마우스 모델 및 대장암 마우스 모델에서 오디로부터 추출된 스틸베노이드계 후보물질들의 투여경로를 확립하며, 항염·항암효능을 보이는 최적의 투여용량을 확립함.
- 오디로부터 추출된 스틸베노이드계 후보물질들의 항염작용 검증	- IBD 마우스 모델에서 오디로부터 추출된 스틸베노이드계 후보물질들의 항염효능 검증	- DSS를 이용한 IBD 마우스 모델에서 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질을 경구 투여한 후 대장의 길이변화 확인 - 염증 사이토카인의 유전자 발현변화 확인 - 스틸베노이드계 후보물질에 의해 변화하는 면역세포 확인 - 점막면역에 중요하게 작용하는 IgA의 생산능력 확인
- 오디로부터 추출된 스틸베노이드계 후보물질들의 항암작용 검증	- MC38 대장암 세포주를 이용한 대장암 마우스 모델에서 오디로부터 추출된 스틸베노이드계 후보물질들의 항암효능 검증	- 대장암 마우스모델에서 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질을 경구 투여한 후 대장암세포의 증식변화 확인. - 활성화된 면역세포에 의한 암세포 killing 능력 및 이동능력 확인 - 암세포의 증식에 관여하는 유전자들의 발현변화 확인 - 면역세포의 활성에 관여하는 유전자들의 발현변화 확인
- 대량 생산 및 분리/정제 공정을 위한 저비용 고효율의 최적 시스템 개발	- 대량 생산 및 분리/정제 공정을 위한 저비용 고효율의 최적 시스템 개발	- 시제품의 대량 생산 및 분리/정제 공정 최적화 - 저비용 고효율의 시제품 생산 최적시스템 구축
- 식품 소재, 화장품 첨가물 (미백소재), 의약외품 소재로서의 각종 평가	- 다양한 기능성 소재로서의 각종 평가	평가의약외품 소재로서의 각종 평가 - 식품 소재 - 화장품 첨가물 (미백소재) - 의약외품 소재로서의 각종
- 소재 적합성 시험 및 판매	- 소재 적합성 시험	- 대상 기업 (예상): (주)태평양, LG 생활건강, 애경 등

제 4 절. 연구수행 결과

1. 1차년도

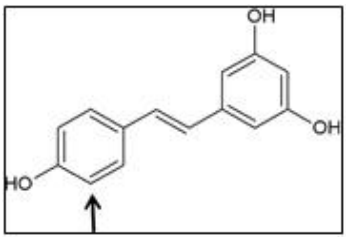
가. 제1세부과제: 스틸베노이드계 유도체를 생산하는 미생물 P450 변이체 효능 검정 및 미생물 P450 변이체를 활용한 스틸베노이드계 화합물 3종의 생물전환

○ 레스베라트롤, 프테로스틸벤, 피세이드를 기질로 활용한 미생물 P450 변이체의 스틸베노이드계 화합물 생물전환 확인

1) 레스베라트롤

레스베라트롤 500 μM 과 미생물 P450 효소 (20종) 50 pmol을 NADPH-generation system 을 이용하여 15분간 반응시킴

A. P450 효소에 의한 레스베라트롤 유도체 생성 (화살표)



B. 미생물 P450 효소에 의한 레스베라트롤 hydroxylation 반응

piceatannol resveratrol

- 미생물 P450 변이체에 의한 레스베라트롤의 유도체 생성을 HPLC 를 통해 확인 한 결과 P450효소반응을 하지 않은 control (검정) 에 비해 P450 효소반응 시킨 그래프 (파랑) 에서 1종의 새로운 peak을 확인함

C. 미생물 P450에 의한 레스베라트롤 유도체의 LC/MS 분석

Resveratrol

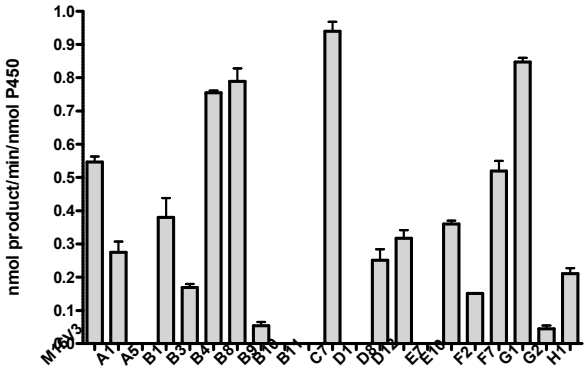
Resveratrol

Piceatannol

Piceatannol

- 미생물 P450 변이체에 의한 레스베라트롤 유도체 분석을 위해 LC/MS를 통해 확인 한 결과 유도체 peak의 분자량이 레스베라트롤 분자량 (MW 227) 에 비해 (16) 이 늘어난 피세아타놀(piceatannol_ (MW 243) 임을 확인. 피세아타놀은 시판되고 있으나 레스베라트롤에 비해 50배 이상의 고가이므로 효소전환에 의해 고부가가치의 유도체를 생산할 수 있음을 제시.

D. 미생물 P450 변이체에 의한 레스베라트롤 유도체 생산 정도 비교

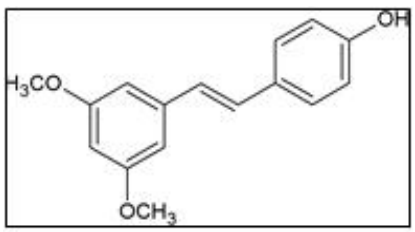


- 미생물 P450 변이체 (21종) 의 레스베라트롤 유도체 생물전환 활성을 test 한 결과 C7 의 경우 가장 높은 활성을 보였고, G2 의 경우 가장 낮은 활성을 보임. 몇몇 효소는 활성을 보이지 않음
- 각각의 P450 변이체의 활성 정도는 1.1배에서 20배 정도의 활성 차이를 보임

2) 프테로스틸벤

프테로스틸벤 200 μM 과 미생물 P450 효소 (20종) 50 pmol 을 NADPH-generation system 을 이용하여 30분간 반응시킴

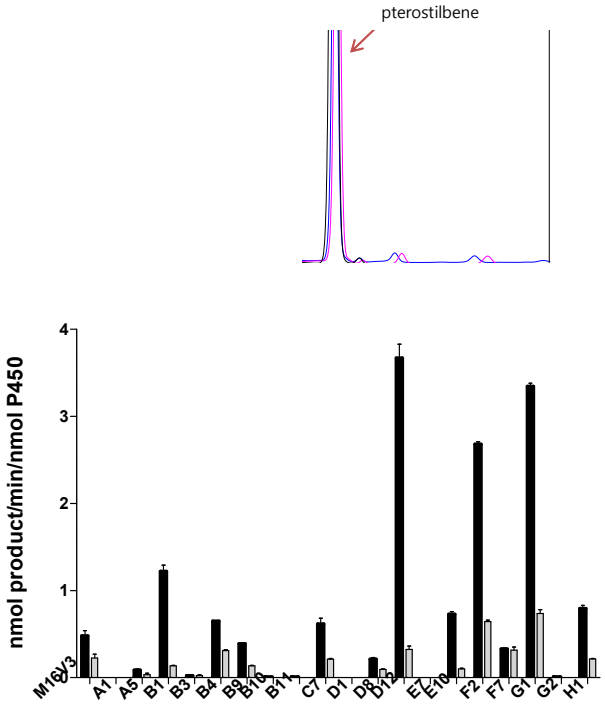
A. 프테로스틸벤



B. 미생물 P450 변이체에 의한 프테로스틸벤 hydroxylation 반응

- 미생물 P450 변이체에 의한 프테로스틸벤의 유도체 생성을 HPLC를 통해 확인한 결과 P450 효소반응을 하지 않은 control (검정) 에 비해 P450 효소반응 시킨 그래프 (분홍) 에서 2종의 새로운 peak을 확인함. 프테로스틸벤의 hydroxy 유도체는 보고된 바 없으며 신규성이 있음.

C. 미생물 P450 변이체에 의한 프테로스틸벤 유도체 생산 정도 비교



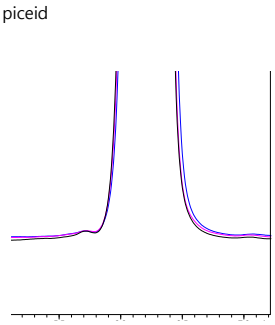
- 미생물 P450 변이체 (20종) 의 프테로스틸벤 유도체 생물전환 활성을 test 한 결과 major 유도체 (검정) 의 경우 D12 에서 가장 높은 활성을 보였으며, minor 유도체의 경우 G1 에서 가장 높은 활성을 보임. 몇몇 효소는 활성을 보이지 않음
- 각각의 P450 변이체의 활성 정도는 major 유도체 (검정) 의 경우 2배 에서 35배, minor 유도체 (회색) 의 경우 1배에서 23배 정도의 활성 차이를 보임

3) 피세이드

피세이드 500 μM 과 미생물 P450 효소 (20종) 50 pmol 을 NADPH-generation system 을 이용하여 30분간 반응시킴

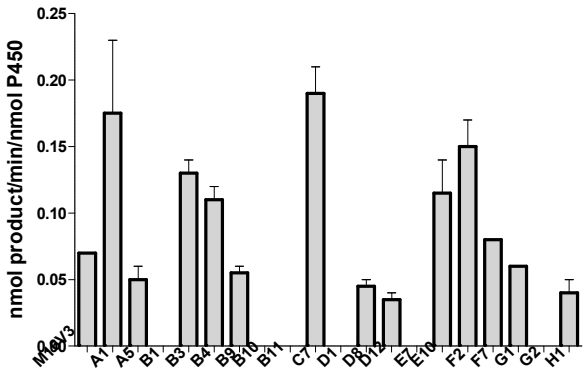
A. P450 효소에 의한 피세이드 유도체 생성 (화살표)

B. 미생물 P450 효소에 의한 피세이드 hydroxylation 반응



- 미생물 P450 변이체에 의한 피세이드의 유도체 생성을 HPLC 를 통해 확인 한 결과 P450효소반응을 하지 않은 control (검정) 에 비해 P450 효소반응 시킨 그래프 (분홍) 에서 1종의 새로운 peak을 확인함. 프테로스틸벤의 hydroxy 유도체는 보고된 바 없으며 신규성이 있음.

C. 미생물 P450 변이체에 의한 피세이드 유도체 생산 정도 비교



- 미생물 P450 변이체 (20종) 의 피세이드 유도체 생물전환 활성을 test 한 결과 C7 에서 가장 높은 활성을 보였으며, D12 에서 가장 낮은 활성을 보임
- 각각의 P450 변이체의 활성 정도는 1.1배에서 5배 정도의 활성 차이를 보임

나. 제2세부과제: 생촉매 활용가능 식물 P450의 발굴 및 오디 유래 스틸베노이드계 화합물 프로파일링

■ 고추, 토마토 EST DB를 활용한 식물 P450 유전자 발굴

1) 고추 및 토마토 유전자 EST DB를 이용하여 P450 유전자를 search

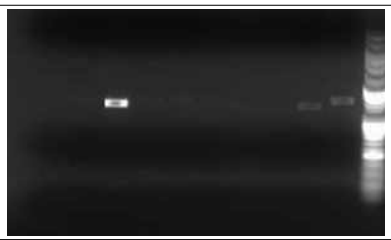
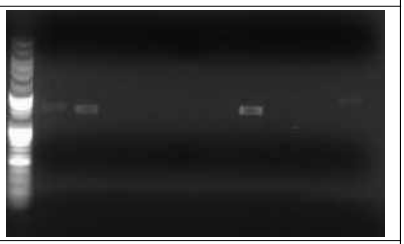
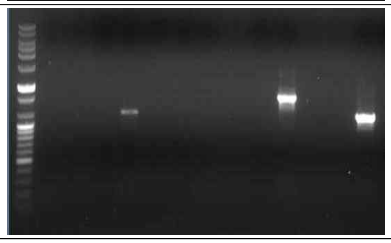
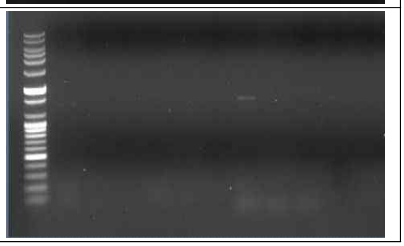
- 고추 EST DB (http://genepool.kribb.re.kr):

  : 약 100개의 P450 유전자군 선별 (Full length P450 유전자 20개)

- 토마토 EST DB (http://solgenomics.net)

  : 약 200개의 P450 유전자군 선별 (Full length P450 유전자 80개)

2) 고추 및 토마토의 잎과 열매에서 mRNA 분리한 후 식물에서 P450 유전자 cDNA 합성 및 염기서열 확인

	RNA isolated from Leaf	RNA isolated from fruit
고추 (*Capsicumannuum* L. cv. Bukang)		
토마토 (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom)		

3) 고추에서 분리한 전장 P450 유전자 cDNA를 증폭하여 cloning 한후 염기서열 확인

CaP450-01

CaP450-03: CYP71D19 R466W

CaP450-05

CaP450-07

CaP450-08

CaP450-09

CaP450-10

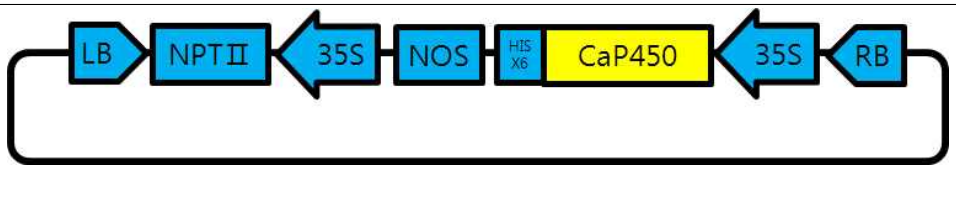
CaP450-12: CYP707A70

CaP450-15

CaP450-17

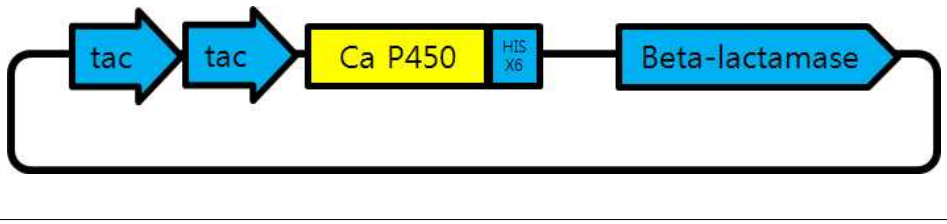
■ **고추에서 분리한 P450 유전자를 이용한 식물 및 미생물 발현벡터 제작**

1) 식물발현벡터: 식물 발현 벡터인 pCAMBIA 2300-HE에 고추에서 유래된 full length P450 유전자를 cloning



Structure of plant expression vector (pCAMBIA 2300HE)

2) 미생물 발현벡터: 미생물 발현 벡터인 pCW 벡터에 고추에서 유래된 full length P450 유전자를 cloning

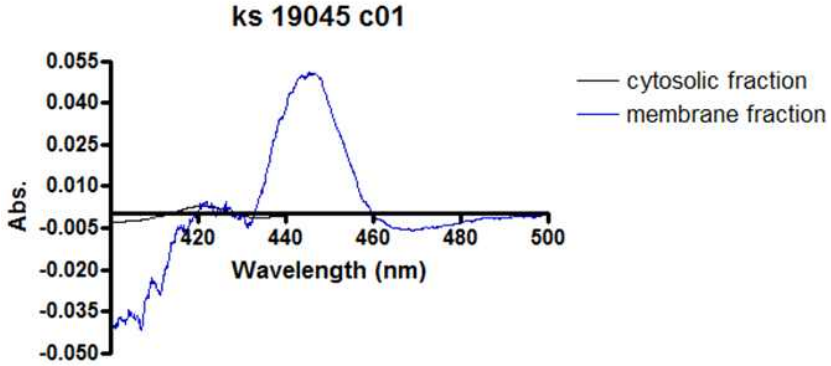


Structure of *E. coli* expression vector (pCW)

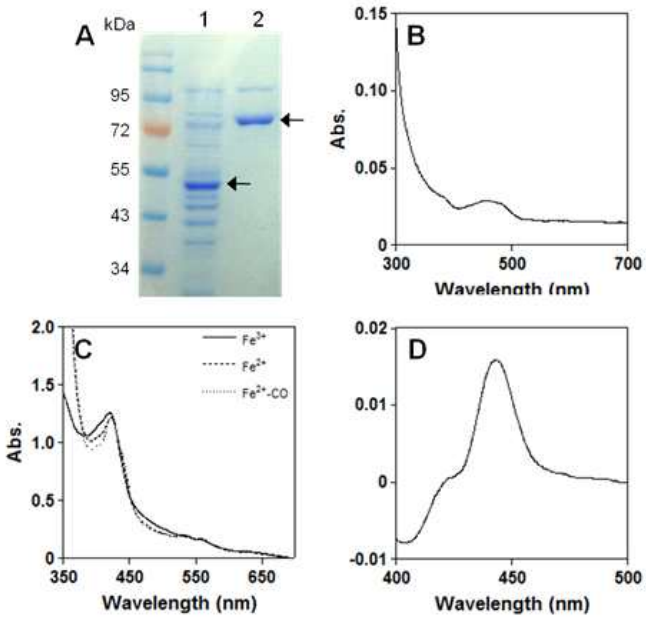
■ 식물 및 미생물에서 발현된 P450 효소의 기능분석

1) 미생물 (*E. coli)*에서 고추 P450 발현 및 활성 측정

- His-tag을 포함한 *E. coli* 발현 벡터인 pCW에 cDNA에서 분리한 P450 유전자를 cloning하여 *E. coli* BL21 strain에 형질전환
- *E. coli*에서 발현시킨 P450효소를 His Tag affinity column을 이용하여 purification



P450 CO-spectral assay of preparation of cytosolic fraction (A) and Pellet (B) of CaP450-12 expressed *E. coli*

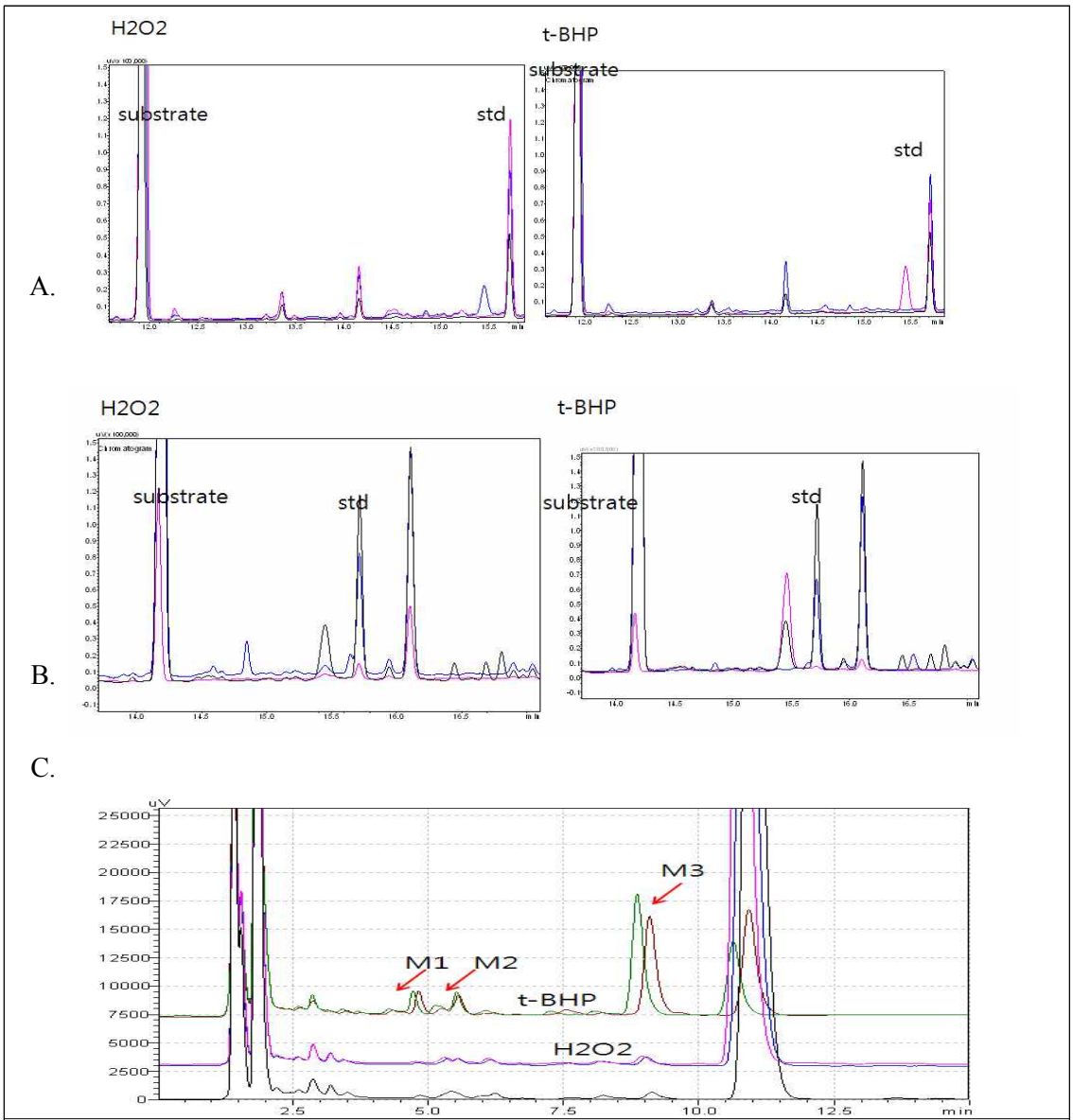


Heterologous expression of Ca P450 12 and Ca CPR in *Escherichia coli*.

A: SDS-PAGE of the expressed enzymes (1) and Ca CPR (2). B: Absorbance spectra of Ca CPR. C: UV-visible absorbance spectra of Ca P450 12 showed spectral features characteristic of cytochrome P450s, oxidized, dithionitereduced formand CO-difference spectra. D: Reduced CO-difference spectra of the Ca P450 12.

2) 식물에서 고추 P450 발현 및 활성 측정

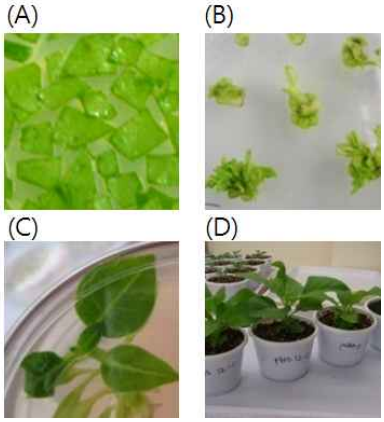
- 35S promoter를 포함한 식물 발현 벡터인 pCAMBIA 2300HE에 cDNA에서 분리한 P450 유전자를 cloning함
- Agrobacterium mediated 방법으로 식물에 P450 유전자를 도입 시키기 위해 Agrobacteria line에 P450이 cloning된 pCAMBIA 2300-HE 벡터를 transformation 시킴



CaP450-12 activity assay

A: lauric acid assay, B: myristic acid assay, C: Abscisic acid assay

- Agrobacterium mediated plant 형질전환 (대상 식물: 애기장대, 담배, 토마토)에 이용
- 고추 P450 유전자를 발현시킨 형질전환 식물을 이용하여 유전자 기능 연구
- CaP450-12, CaP450-3, CaP450-15의 경우 식물에서 과발현 시킨 후 유전자의 특성 조사



Agrobacterium-mediated transformation using by tobacco explants.

A: Leaf disc on coculture medium. B: Shoot regeneration on shoot induction medium. C: Root regeneration on root induction medium. D: Hot pepper P450 transgenic tobacco plant.

■ 오디 유래 스틸베노이드 화합물 프로파일링

1) 오디 유래 스틸베노이드 화합물 추출

- 4종의 오디 즙 (수원20호, 청일, 한울, 왕오디) 8ml 에 ethylatetate 20 ml 을 가한후 70℃에서 1시간 shaking 하여 추출

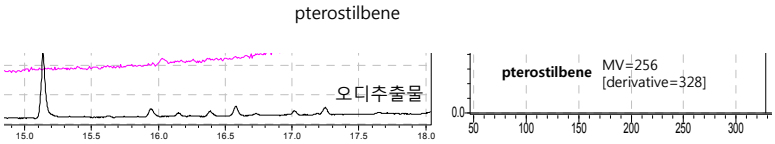
2) GC/MS 를 통한 오디 추출물에서의 스틸베노이드 화합물 분석

- 1ml 의 오디추출물에 N_2 gas를 가하여 solvent 제거후, BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsily)trifluoroacetamide) 를 첨가하여 유도체 형성후 분석

● 레스베라트롤

- GC/MS를 통하여 분석 결과 레스베라트롤 (분홍) 과 오디추출물 (검정) 에서 확인된 peak 의 retention time이 같음(화살표)을 확인하였으며, 분자량 또한 레스베라트롤(444)과 같음을 확인

● 프테로스틸벤



- GC/MS를 통하여 분석한 결과 프테로스틸벤(분홍) 과 오디추출물(검정)에서 확인된 peak의 retention time이 같음(화살표)을 확인하였으며, 분자량 또한 프테로스틸벤(328)과 같음을 확인

● 피세아타놀

- GC/MS를 통하여 분석한 결과 피세아타놀(분홍)과 오디추출물 (검정)에서 확인된 peak 의 retention time이 같음(화살표)을 확인하였으며, 분자량 또한 피세아타놀(532)과 같음을 확인

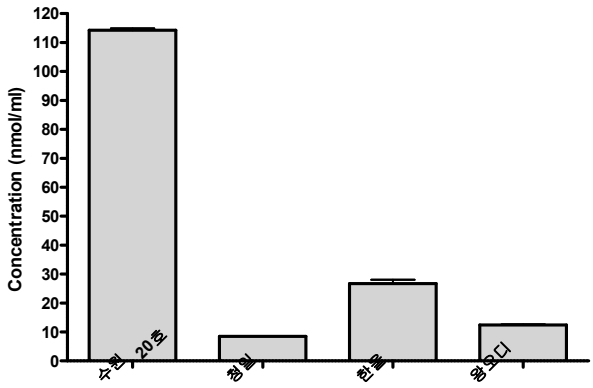
3) GC 를 통한 오디 추출물에서의 스틸베노이드계 화합물의 조성 분석

- 1 ml 의 오디추출물에 N_2 gas를 가하여 solvent 제거후, BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsily)trifluoroacetamide) 를 첨가하여 유도체 형성후 분석

- GC를 통하여 분석한 결과 4종 (수원20호, 청일, 한울, 왕오디) 의 오디추출물 (분홍) 에서 레스베라트롤 (검정) 과 같은 retention time 의 peak 확인

4) GC 를 통한 오디 추출물에서의 스틸베노이드계 화합물의 함량 분석

- 4종의 오디즙 1ml 당 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량 측정



- 오디즙 1 ml 당 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량 측정 결과 수원20호의 경우 가장 높은 함유량을 보였고 청일의 경우 가장 낮은 함유량을 보임
- 오디즙 4종의 레스베라트롤 함유량은 1.5배에서 14배의 차이를 보임

다. 제3세부과제

1) 스틸베노이드계 화합물 유도체들의 세포독성 시험

- P450 효소를 이용한 오디유래 스틸베노이드계 화합물 유도체의 독성을 확인하기 위해, mouse의 비장으로부터 대식세포(macrophages/monocytes)를 분리한 후 96-well plate에 well당 $1x10^5$ cell을 RPMI, 10% FBS 배양액 조건으로 plating 후 4종류의 오디유래 스틸베노이드계 화합물(M1, M2, M3, M4)과 그것들의 P450 효소를 이용하여 제작된 유도체들(MD1, MD2, MD3, MD4)을 농도별로 처리하고 48시간 동안 배양 후 MTS assay를 수행하였으며 또한 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는 지 확인함.
- 그 결과, 대식세포의 오디유래 스틸베노이드계 화합물(M1, M2, M3, M4)과 그 유도체들(MD1, MD2, MD3, MD4)이 세포의 생존률에 영향을 주지 않는 것으로 관찰되어, 오디유래 스티베노이드계 화합물과 그 유도체들이 0-100ug/ml 농도에서는 세포독성이 없음을 확인함(그림1).

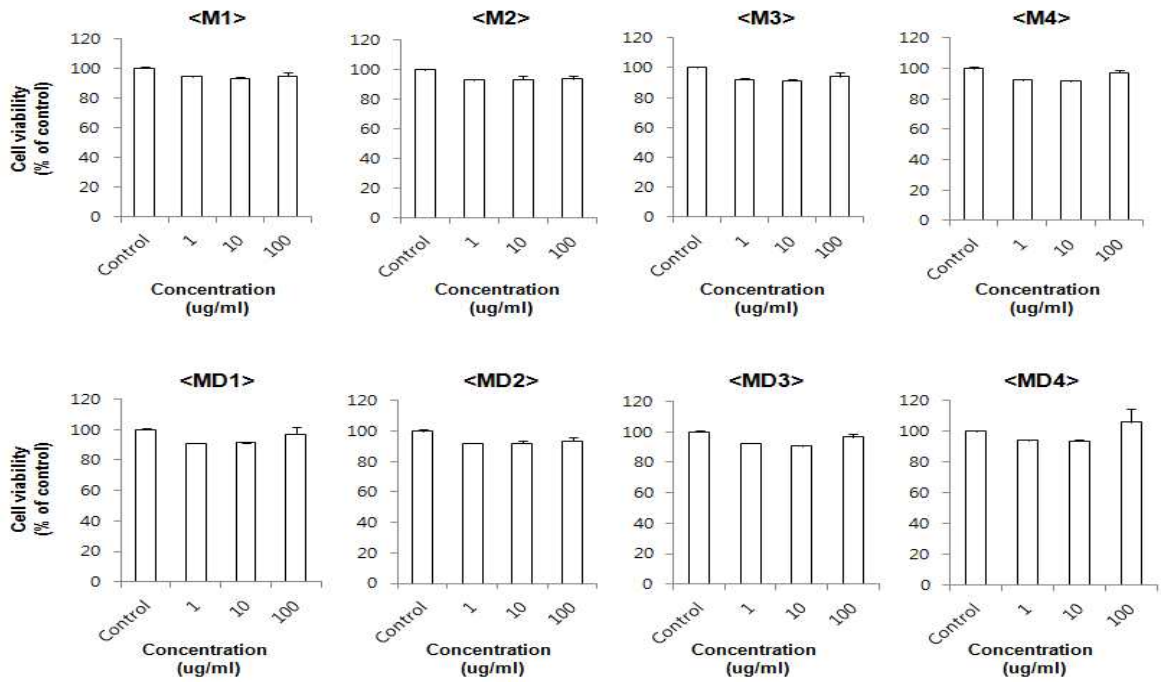


그림 1. 오디유래 스틸베노이드계 화합물들과 유도체들의 세포독성 시험

- 또 다른 스틸베노이계 화합물의 일종인 resveratrol과 이의 유도체들의 mouse 비장의 대식세포에서 세포독성을 확인한 결과, resveratrol은 10ug/ml 이상의 농도에서 세포독성을 보였고 resveratrol의 유도체인 pterostilbene과 piceid는 100ug/ml 농도부터 세포독성을 나타냄(그림2).

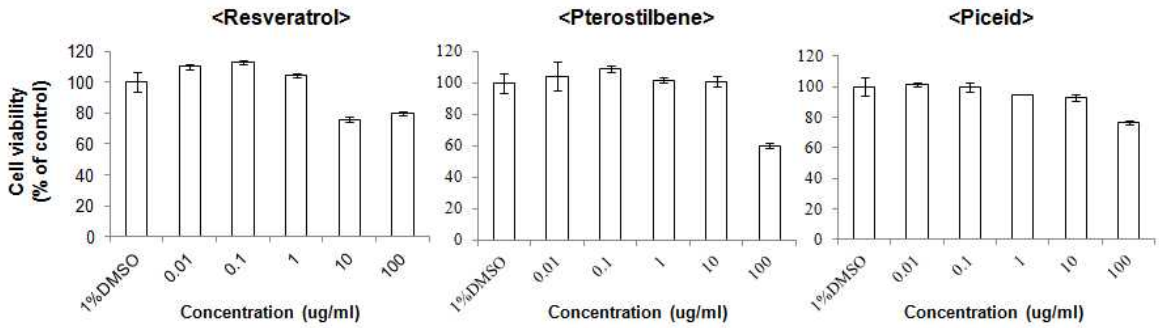


그림 2. Resveratrol과 resveratrol 유도체들의 세포독성 시험

2) 스틸베노이드계 화합물 유도체들에 의한 염증억제 및 항산화 기능 탐색

- 오디유래 스틸베노이드계 화합물 유도체들이 염증억제 및 항산화 효과에 미치는 영향을 알아보기 위해, RAW 264.7 대식세포주를 12-well plate에 $2X10^5$ cell을 DMEM, 10% FBS 배양조건으로 plating 후 오디유래 스틸베노이드계 화합물(M1, M2, M3, M4)과 P450 효소를 이용하여 만들어진 오디유래 유도체들(MD1, MD2, MD3, MD4)을 세포독성이 없는 10ug/ml 농도

로 처리하고 2시간 후 LPS(Lipopolysaccharide)를 처리해 RAW 264.7 세포를 활성화시켜 염증 매개물질인 NO(Nitric oxide)의 합성효소인 iNOS(inducible nitric oxide synthase)와 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 제거효소인 Trx-1(thioredoxin-1)과 Prx-2(peroxiredoxin-2)의 유전자발현 변화를 확인한 결과, LPS를 6시간 처리한 M1과 M4 오디유래 스틸베노이드계 화합물들에 비하여, 그 유도체들(MD1, MD4)에서 iNOS 유전자발현이 현저히 감소되었으며 12시간 처리 시, Trx-1과 Prx-2의 유전자발현이 오디유래 스틸베노이드계 화합물 유도체들(MD3, MD4)에서 증가되었음(그림 3).

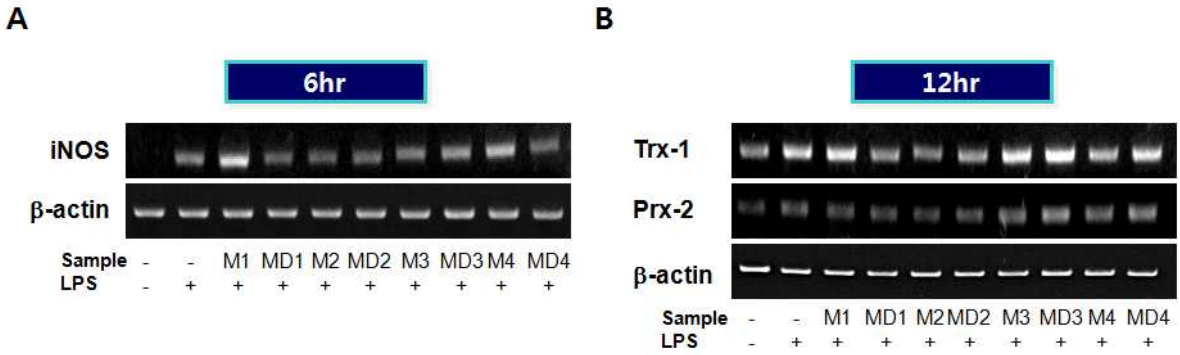


그림 3. 오디유래 스틸베노이드계 유도체들에 의한 iNOS와 항산화관련 유전자발현 억제

- 이들 유도체 중에서 MD4가 iNOS 및 Trx-1과 Prx-2의 유전자발현 변화에 가장 큰 차이를 보여 NO 및 ROS 생성에 미치는 영향을 분석한 결과, LPS에 의해 유발된 NO의 생성이 MD4에 의해서 감소되었고 ROS 생성 또한 감소되는 것으로 나타남(그림 4). 유도체가 아닌 M4 오디유래 스틸베노이드계 화합물에 의해서도 다소 적은 수준이지만 NO 및 ROS 생성에 억제효과를 보였음.

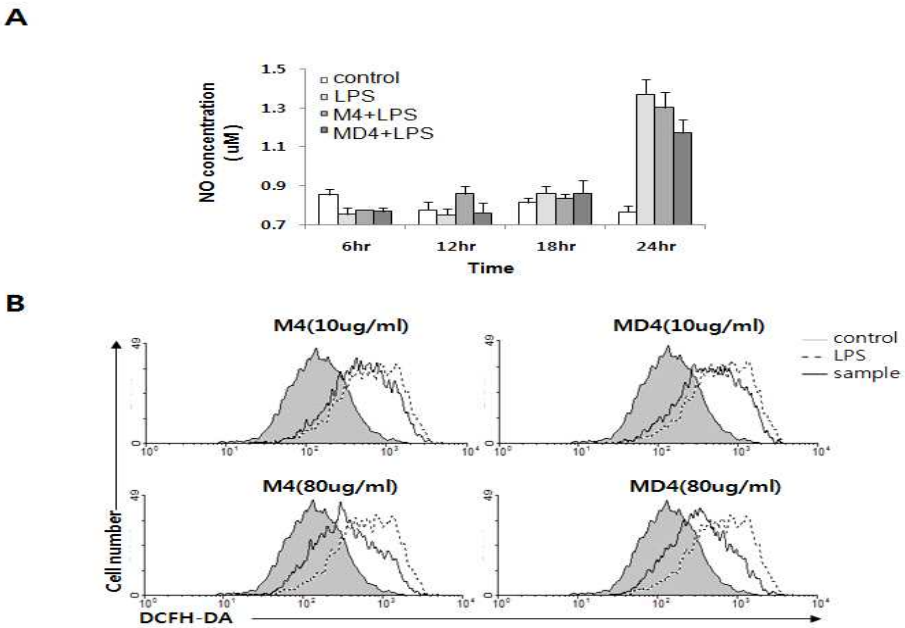


그림 4. 오디유래 스틸베노이드계 화합물 M4와 그 유도체 MD4에 의한 NO 및 ROS 생성 억제

- 한편, resveratrol 유도체들이 NO의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 resveratrol(Res)과 resveratrol 유도체들인 piceid(Pi)와 pterostilbene(Pt)을 처리한 결과, NO의 생성이 resveratrol과 resveratrol 유도체들에 의해서 모두 감소되었으며 특히, pterostilbene에 의해 현저히 감소되는 것으로 나타남(그림4). 이들 결과를 종합해 볼 때 스틸베노이드계 화합물 보다는 스틸베노이드계 화합물의 유도체가 염증억제 및 항산화 효과가 더 크다는 것을 알 수 있었음(그림3, 그림4, 그림5 참조).

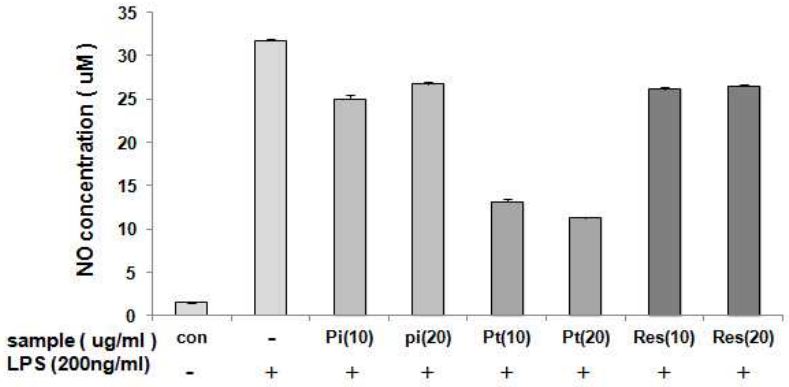


그림 5. Resveratrol 및 그 유도체들에 의한 NO 생성의 감소효과

3) 스틸베노이드계 화합물 유도체들에 의한 면역세포 증식

- P450 효소를 이용한 오디유래 스틸베노이드계 화합물 유도체들이 면역세포의 증식에 미치는 영향을 알아 보기위해 mouse의 비장으로부터 분리 한 T cell과 B cell을 $1X10^5$씩 96well에 분주 한 후 M1, M2, M3, M4와 그들 각각의 유도체인 MD1, MD2, MD3, MD4를 10ug/ml로 처리 후 48시간 후 MTS assay를 수행 한 결과, 오디유래 스틸베노이드계 화합물과 P450 효소를 이용한 오디유래 스틸베노이드계 화합물의 유도체들 또한 T cell과 B cell의 증식에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였음(그림 6).

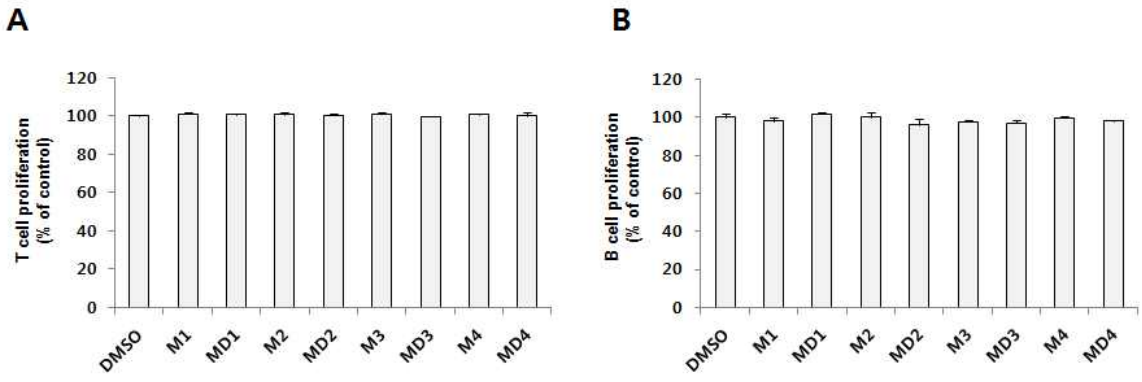


그림 6. 오디유래 스틸베노이드계 유도체에 의한 T, B세포의 증식

4) 스틸베노이드계 화합물 유도체들에 의한 염증유발 관련 유전자발현의 감소

- 오디유래 스틸베노이드계 화합물 유도체들이 염증유발 관련 유전자발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, LPS로 RAW 264.7 세포를 활성화시키기 2시간 전에 각각의 오디

유래 화합물과 그 유도체들을 전 처리했을 때 염증유발 사이토카인들 및 염증관련 유전자들의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과, MD1과 MD4를 6시간 처리 시, Cox2와 IL-1b의 발현이 감소되었으며(그림7), MD4를 12시간까지 처리 시, 대표적인 염증유발 유전자인 IL-1b, TNF-a, IL-6, Cox-2 유전자 모두 다 감소하는 것을 확인하였음(그림 8). 이들 결과로부터 P450을 이용한 오디유래 유도체들은 전 처리에 의해서도 염증유발 관련 유전자발현의 억제 효과가 있지만 후처리 시, 더 큰 효과를 보이는 것을 알 수 있었음.

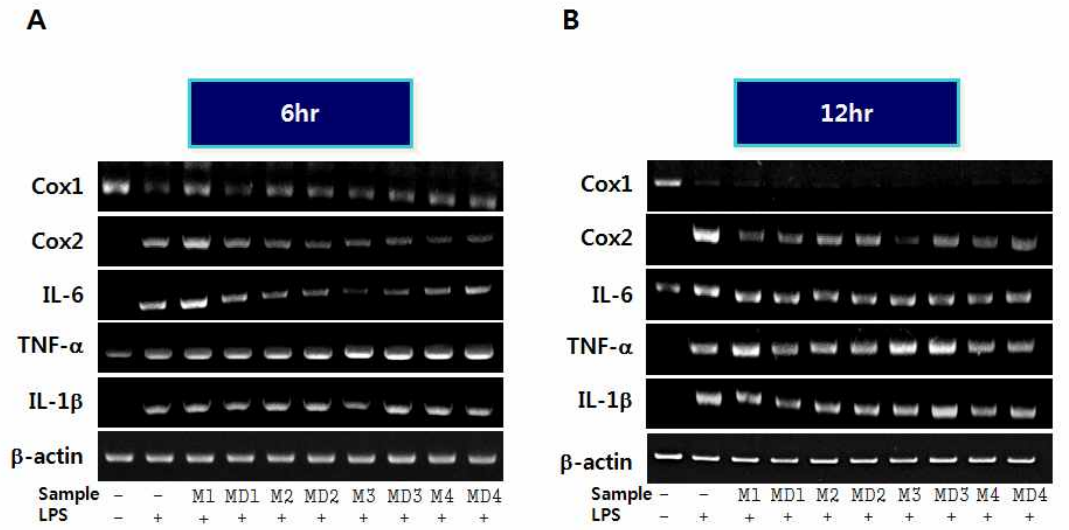


그림 7. 오디유래 스틸베노이드계 유도체들에 의한 염증유발 유전자발현의 감소효과

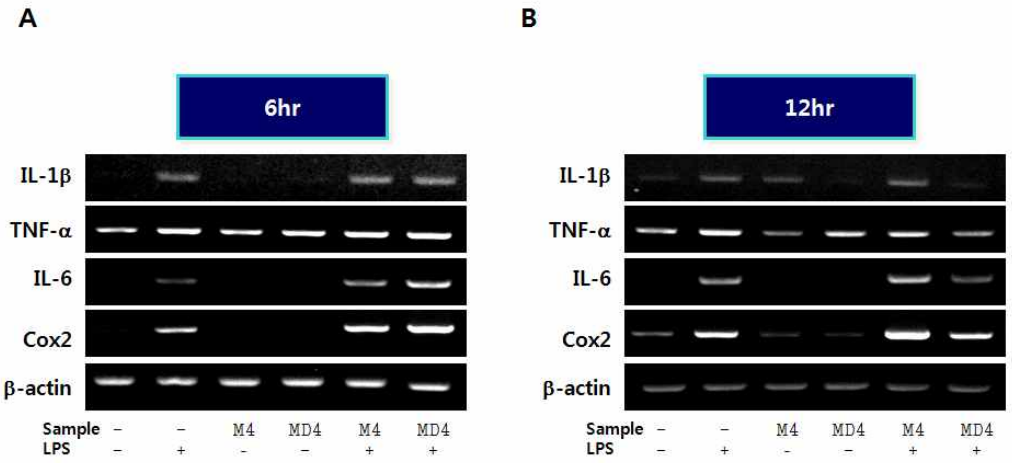


그림 8. 오디유래 스틸베노이드계 유도체 MD4에 의한 염증유발 유전자발현 감소효과

5) 동물모델에서 스틸베노이드계 유도체들에 의한 항염증 효과

- 스틸베노이드계 유도체 물질들이 *in vivo* 에서도 항염증 효과를 보이는지 알아보기 위해 다음과 같은 동물실험을 수행하였음. C57BL/6 mice(8주령)에 resveratrol, piceatanol, piceid, pterostilbene을 20mg/kg으로 8주 동안 격주로 경구투여한 후, 염증관련 사이토카인의 유전자 발현을 간조직에서 확인한 결과, 염증반응시 증가하는 pro-inflammatory cytokine인 IL-6와 TNF-a의 발현이 resveratrol 유도체들인 piceatanol, piceid, pterostilbene에 의해 각각 감소되어 이 유도체들의 항염증기능을 확인함(그림 9).

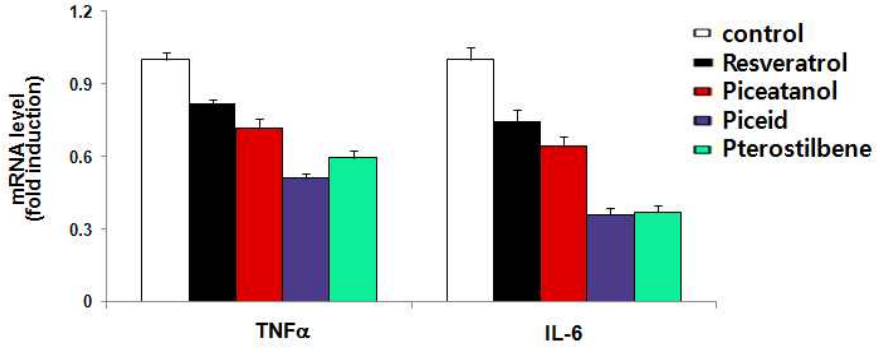


그림 9. 동물모델에서 resveratrol 유도체들에 의한 염증유발 사이토카인 유전자발현 감소

6) 동물모델에서 스틸베노이드계 유도체들에 의한 collagenase발현증가

- 병원체로부터 감염이 되었을 때 숙주방어기작으로 감염으로 인한 염증부위로 면역세포가 침윤이 될 때 침윤을 용이하게 하기 위해 collagenase를 분비하여 세포외 matrix 단백질들을 제거함. 따라서 더 많은 양의 collagenase가 발현된다면 염증반응에 더욱 신속하게 반응할 수 있음. 따라서 스틸베노이드계 유도체들에 의한 collagenase의 발현이 어떠한지 알아보기 위해, resveratrol과 그 유도체들을 경구투여한 mouse의 간에서 collagenase의 일종인 MMP-2(matrix metallopeptiase 2)와 MMP-9(matrix metallopeptiase 9)의 유전자발현을 확인한 결과, piceid와 pterostilbene에 의해 MMP-2와 MMP-9의 유전자발현이 증가되는 것을 확인 하였으며, 이는 스틸베노이드계 유도체들이 염증 및 병원체에 대해 효율적인 방어기작을 수행할 수 있게 되어 면역력 증진에 효과가 있다는 것을 알 수 있었음(그림 10).

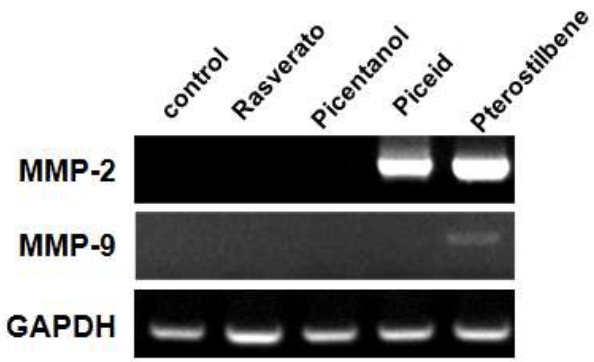


그림 10. 동물모델에서 resveratrol유도체들에 의한 MMP 유전자발현 증가

7) 동물모델에서 스틸베노이드계 유도체들에 의한 fibroblast 증식

- 염증 및 병원체에 대한 방어기작이 종료된 후 손상된 상피세포 주변의 회복기작으로 섬유아세포(fibroblast)의 증식과 collagen의 생성이 증가되어 상처치유반응을 일으킴. 따라서 오디유래 스틸베노이드 유도체들에 의한 섬유아세포의 증식을 MEF(mouse embryo fibroblast) cell을 이용하여 분석한 결과, 오디유래 유도체들에 의해 MEF세포증식이 현저히 증가됨(그림 11).

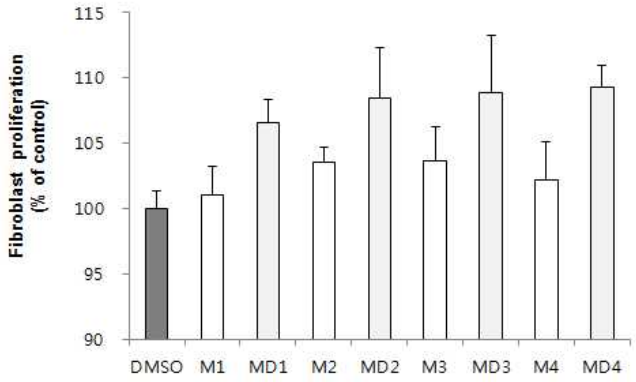


그림 11. 오디유래 스틸베노이드계 유도체들에 의한 fibroblast 증식 효과

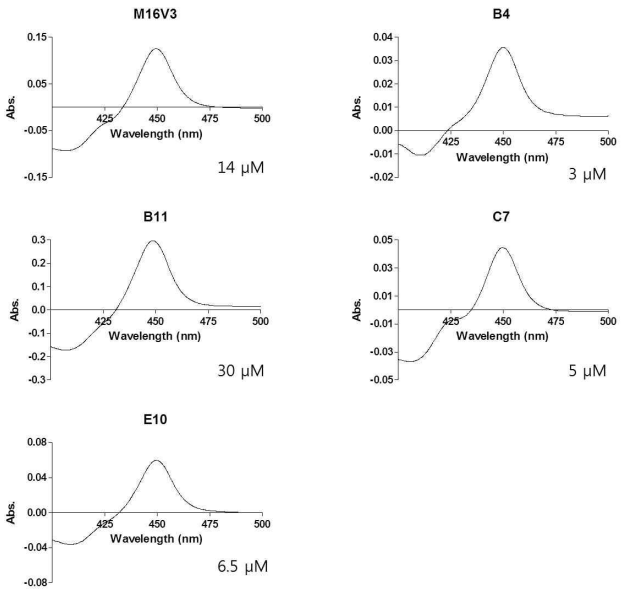
라. 제1협동과제

■ 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 제조공정 최적화

: 스틸베노이드계 화합물 유도체를 생산하는 P450 효소 반응 조건을 최적화하고, 효소 활성과 안정성이 모두 높은 최적의 P450 효소 변이체를 개발하기 위해 기초 실험 수행

1) Enzyme quantification

- 실험에 사용한 P450 Enzyme 의 농도를 정량하기 위한 기초 실험 수행

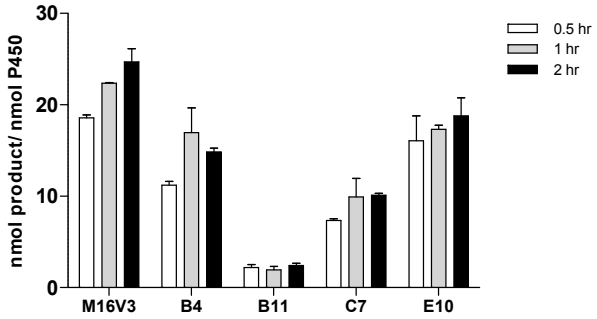


- flavin을 보결분자단으로 가지고 있는 protein 의 함량을 flavin 의 흡광을 통해 농도를 정량하는 lumiflavin method (YAGI, K., J.Biochem. (Tokyo), 38, 161 (1951).) 를 사용 하여 P450 BM3 mutnats 5종 의 농도를 정량

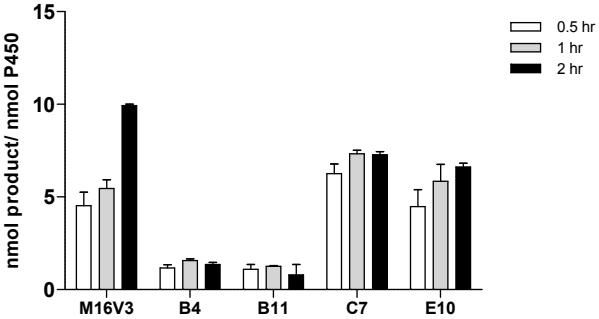
2) Total turnover number (TTN) :

전체 반응 시간 동안 생성되는 총 생성물의 양을 단위 P450 효소 농도로 나누어 계산 (mole product/mole catalyst)

A. Total turnover number of Piceatannol formation by P450 BM3 mutants



B. Total turnover number of Piceid derivative formation by P450 BM3 mutants

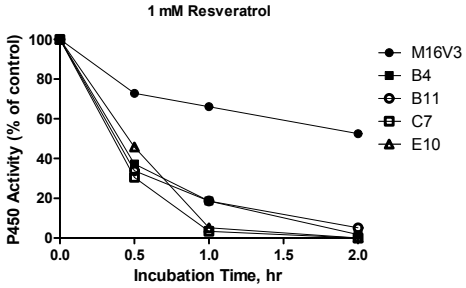


- 5종의 P450 BM3 효소 변이체의 Total turnover number (TTN)를 측정하기 위해서 50 pmol enzyme, 1 mM trans-Resveratrol (A)과 1 mM Piceid (B)를 각각 사용. 이전에 발표한 Resveratrol 대사 관련 논문 data를 참고하여 실험에 사용할 기질 농도와 효소 농도 결정. (Drug Metab Dispos. 2009 May;37(5):932-6) BM3 효소 변이체의 K_m값이 2.7~66 u M이기 때문에, total turnover number 측정 실험 동안에 충분한 양의 기질이 효소와 반응할 수 있도록 K_m값의 10배 이상이 되도록 1 mM 의 스틸베노이드 계 기질을 이용하여 실험 수행. NADPH-generation system을 이용하여 반응을 시작하고 37 ℃에서 30분, 1시간, 2시간 각각 incubation. 효소 반응에 의해서 생성된 piceatannol (A) 과 piceaid derivative (B)의 양을 HPLC 로 측정.
- P450 BM3 mutants의 Piceatannol, Piceaid derivative TTN 측정 결과 M16V3 mutant가 가장 높은 활성을 보였고, B11 mutant가 가장 낮은 활성을 보임. 가장 활성이 높은 M16V3 mutant는 반응 2시간 후, 기질인 Resveratrol의 약 0.5 %가 hydroxylation 되어서 약 5 u M의 Piceatannol 이 생성되었으며, Piceaid는 약 0.2 % 대사되어서 약 2 u M의 Piceaid derivative가 생성됨. M16V3 mutant의 경우 2시간까지 효소 반응 시간이 늘어날수록 유도체의 생성량도 계속해서 증가하는 추이를 보였으나, 나머지 mutants는 1시간 반응시켰을 때보다 2시간 반응시켰을 때 활성이 오히려 감소함. 이러한 결과는 효소의 불안정성 (instability) 때문인 것으로 보임.
- 2시간 반응시켰을 때 TTN가 10이었으므로 100 ml 반응조 수준에 생성물을 얻을 경우 3일이내에 100 mg 이상의 유도체 제조 가능. 이 유도체로 면역반응 조절에 대하 실험이 가능함.

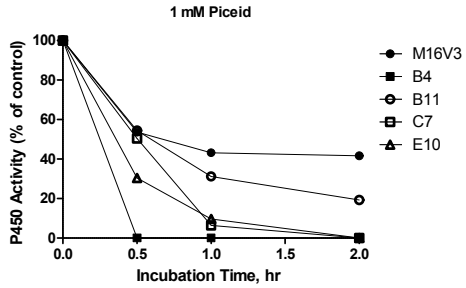
② Stability : 반응 시간에 따른 P450 효소 변이체의 안정성 확인

Stability of P450 BM3 mutants measured by CO-Difference spectra

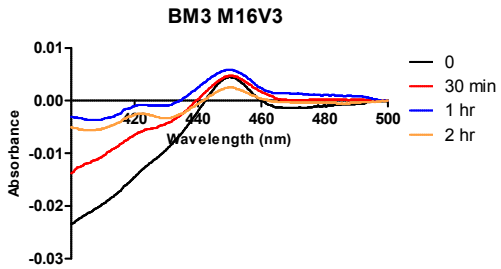
A. Resveratrol



B. Piceid



C. CO-difference spectra



- 시간에 따른 P450 BM3 효소 변이체 5종의 stability 측정. P450 BM3 mutants와 NADPH, 그리고 각 스틸베노이드 화합물 - resveratrol(A), piceid(B) - 을 넣은 반응 혼합물을 이용. 반응 시작 30분, 1시간, 2시간 후의 P450 효소 농도를 CO-difference spectra (C)로 측정함. P450 효소 농도 100%는 반응 혼합물을 incubation하기 전의 P450 효소 농도를 가리킴.
- 효소 안정성 실험 결과, 반응 시간 2시간 뒤면 대부분 효소의 활성이 모두 0% 로 줄어들었지만 M16V3 mutant는 50 % 이상 효소 활성이 남아있음. TTN 실험과 마찬가지로 resveratrol(A), piceid(B) 반응 모두에서 M16V3 mutant의 안정성이 가장 높게 측정됨. M16V3 mutant는 5종의 P450 BM3 mutants 중에서 활성과 안정성, 이 두 가지 특성이 모두 가장 높기 때문에 스틸베노이드 화합물의 유도체 생산을 위한 최적의 효소 변이체로 이용할 수 있을 것으로 기대됨.

2. 2차년도

가. 제1세부과제:

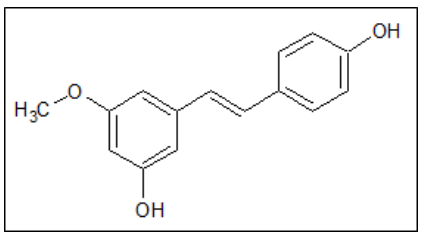
- 스틸베노이드계 유도체를 생산하는 미생물 P450 변이체 효능 검정 과 미생물 P450 변이체를 활용한 스틸베노이드계 화합물 3종의 생물전환 유도체의 분리 및 화학구조 확인
- 스틸베노이드계 화합물 hydroxylated derivatives 에 대한 배당체 제조를 위한 단백질 (amylosucrase) 발현

○ 미생물 P450 변이체의 스틸베노이드계 화합물의 생물전환 확인 및 화학구조 확인

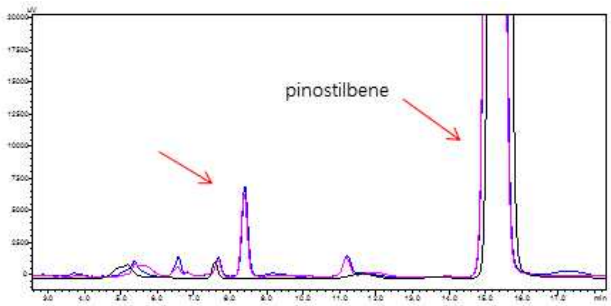
1) 피노스틸벤

- 피노스틸벤 500 μM 과 미생물 P450 효소 (20종) 50 pmol을 NADPH-generation system 을 이용하여 20분간 반응시킴

A. 피노스틸벤

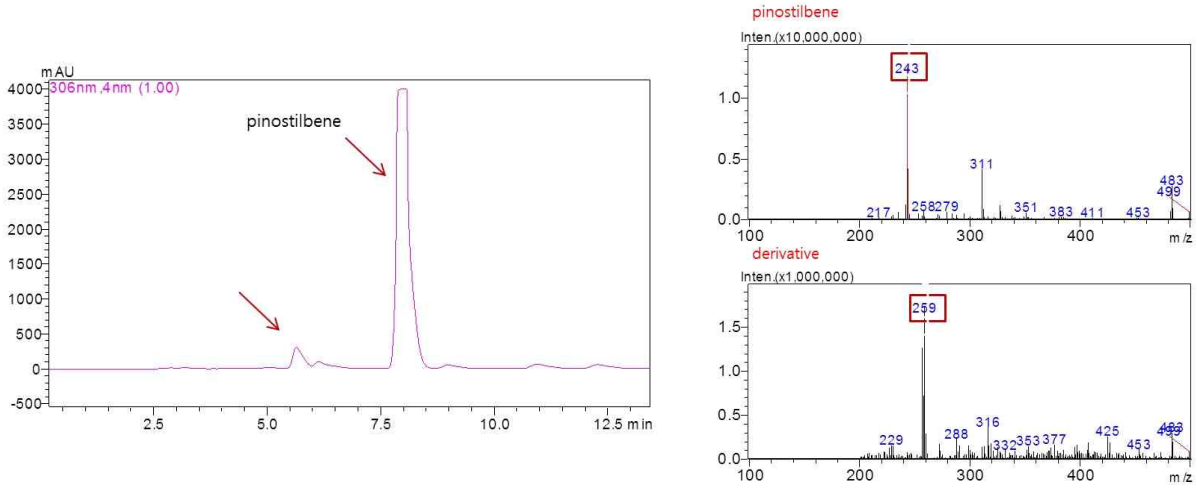


B. 미생물 P450 효소에 의한 피노스틸벤 hydroxylation 반응



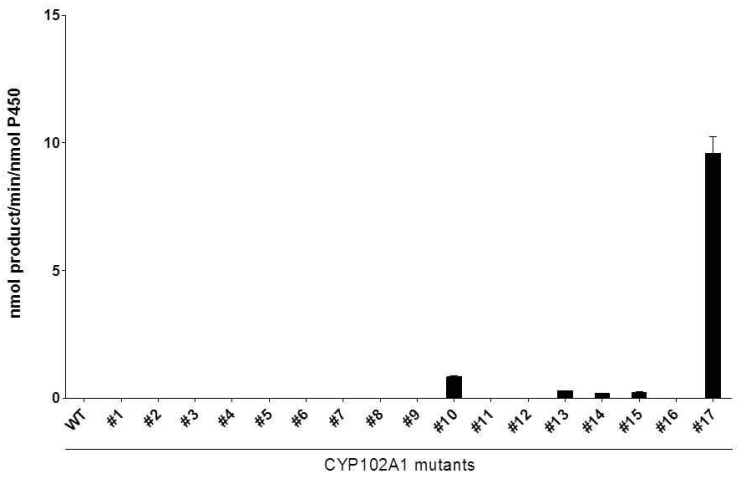
- 미생물 P450 변이체에 의한 피노스틸벤의 유도체 생성을 HPLC 를 통해 확인 한 결과 P450 효소반응을 하지 않은 control (검정) 에 비해 P450 효소반응 시킨 그래프 (파랑) 에서 1종의 새로운 peak (Retention time :.8 min)을 확인함
- 미생물 P450 변이체에 의해 새로운 피노스틸벤 유도체가 생성되었음을 확인

C. 미생물 P450에 의한 피노스틸벤 유도체의 LC/MS 분석



- 미생물 P450 변이체에 의한 피노스틸벤 유도체 분석을 위해 LC/MS를 통해 확인 한 결과 유도체 peak의 분자량이 피노스틸벤 분자량 (MW 243) 에 비해 (16) 이 늘어난 유도체(MW 259) 임을 확인.
- 새로운 피노스틸벤 유도체의 분자량을 확인한 결과 분자량이 (16) 늘어난 hydroxylated 유도체 임을 확인

D. 미생물 P450 변이체에 의한 피노스틸벤 유도체 생산 정도 비교



- 미생물 P450 변이체 (17종) 의 피노스틸벤 유도체 생물전환 활성을 test 한 결과 #17 의 경우 가장 높은 활성을 보였고, #14 의 경우 가장 낮은 활성을 보임. 대부분 효소는 활성을 보이지 않음
- 각각의 P450 변이체의 활성 정도는 1.25배에서 40배 정도의 활성 차이를 보임

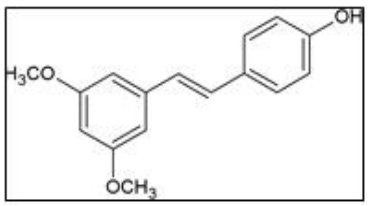
2) 프테로스틸벤

- 전년도 연구수행 내용중 프테로스틸벤의 hydroxy 유도체의 분석 및 화학구조 확인을 위한

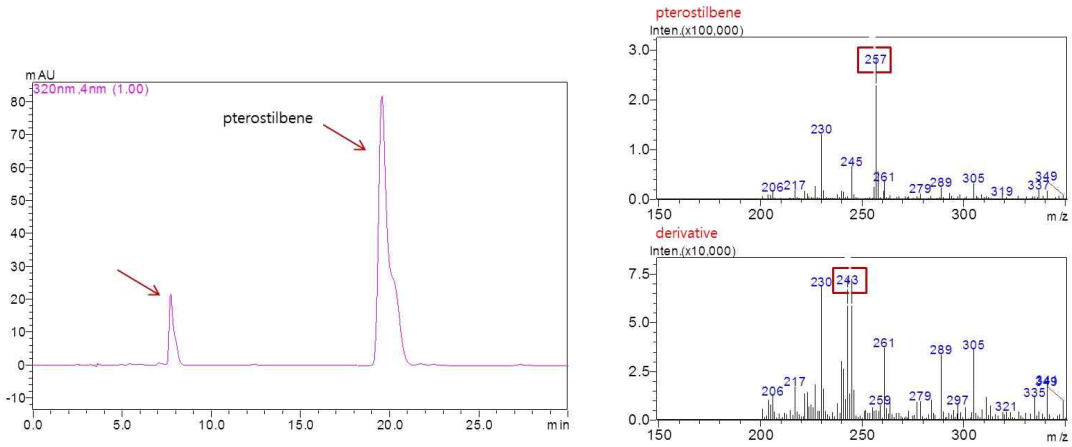
LC/MS 와 LMR 분석

- 프테로스틸벤 500 μM 과 미생물 P450 효소 (D12) 50 pmol을 NADPH-generation system 을 이용하여 20분간 반응시킴

A. 프테로스틸벤

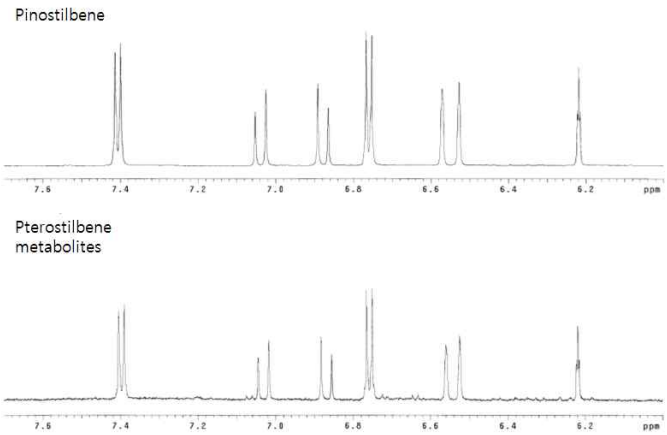


B. 미생물 P450 변이체에 의한 프테로스틸벤 유도체의 LC/MS 분석



- 미생물 P450 변이체에 의한 프테로스틸벤 유도체 분석을 위해 LC/MS를 통해 확인 한 결과 유도체 peak의 분자량이 프테로스틸벤 분자량 (MW 257) 에 비해 (14) 가 줄어든 유도체(MW 243) 임을 확인.
- 새로운 프테로스틸벤 유도체의 분자량을 확인한 결과 분자량이 (14) 줄어든 O-demethylated 유도체 임을 확인

C. 미생물 P450 변이체에 의한 프테로스틸벤 유도체의 NMR 분석



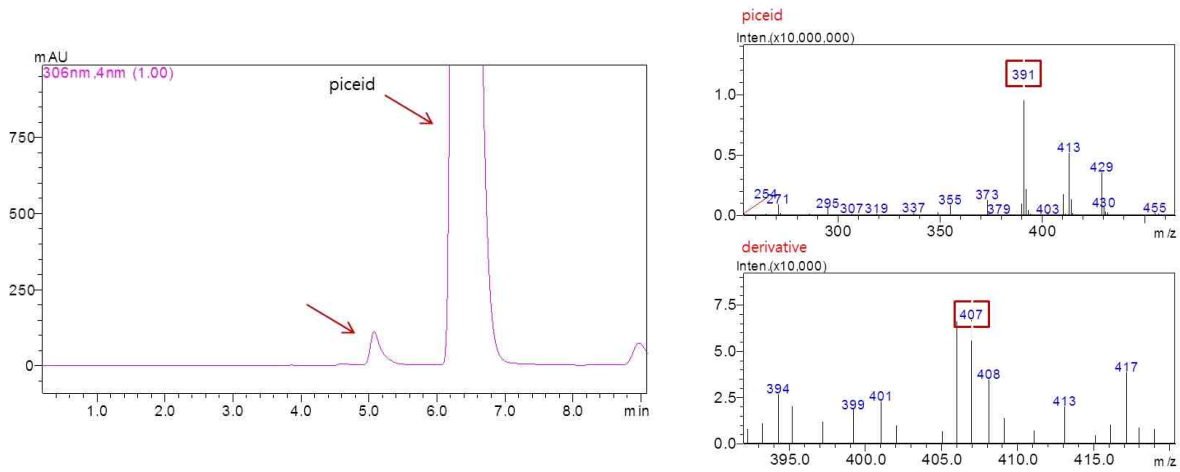
- 미생물 P450 변이체에 의한 프테로스틸벤의 유도체 분석을 위해 NMR분석을 통해 확인 한 결과 프테로스틸벤 유도체로 예상되는 물질 피노스틸벤 (위) 의 성분분석 (proton 감도로 분석한 NMR)과 프테로스틸벤 유도체 (아래) 의 성분분석 비교 결과, 동일한 물질임을 확인

3) 피세이드

- 전년도 연구수행 내용중 프테로스틸벤의 hydroxy 유도체의 분석 및 화학구조 확인을 위한 LC/MS 분석
- 피세이드 500 μM 과 미생물 P450 효소 (C7) 50 pmol을 NADPH-generation system 을 이용하여 20분간 반응시킴

A. P450 효소에 의한 피세이드 유도체 생성 (화살표)

B. 미생물 P450 변이체에 의한 피세이드 유도체의 LC/MS 분석



- 미생물 P450 변이체에 의한 피세이드의 유도체 분석을 위해 LC/MS를 통해 확인 한 결과 유도체 peak의 분자량이 피세이드 분자량 (MW 391) 에 비해 (16) 이 늘어난 유도체 (MW 497) 임을 확인.
- 새로운 피세이드 유도체의 분자량을 확인한 결과 분자량이 (16) 늘어난 hydroxylated 유도체 임을 확인

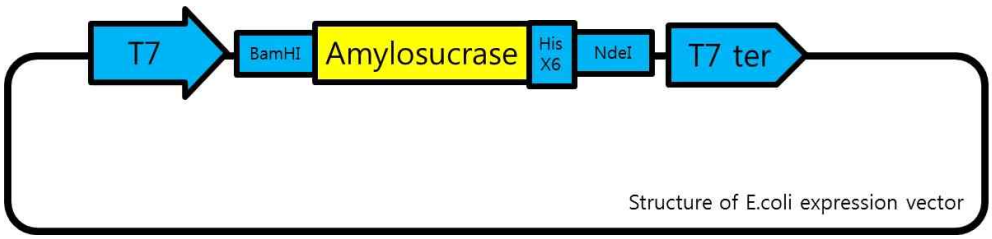
○ 스틸베노이드계 화합물 유도체 에 대한 배당체 제조를 위한 단백질(amylosucrase) 발현 기초실험 수행

1) Amylosucrase 발현을 위한 클로닝 수행

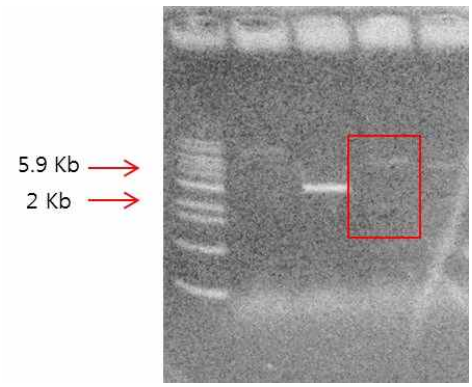
- 기존에 발표된 amylosucrase 발현 관련 논문 (FEMS Microbiol Lett. 285 (2008) 25-32) 을 참고 하여 미생물 (*Deinococcus geothermalis*) 염기서열 확보

-Amylosucrase 유전자는 ㈜ Solgent (대전) 을 통해 합성 하였음

A. 미생물 발현 벡터인 pET21(a) 벡터에 *Deinococcus geothermalis* 에서 유래된 full length Amylosucrase 유전자를 클로닝



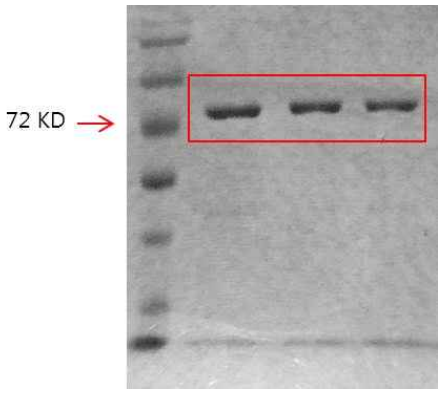
B. 미생물 발현 벡터인 pET21(a) 에 클로닝 진행후 제한효소 반응을 통한 size 확인



- 제한효소 BamH1과 Nde1을 통한 반응 후 전기영동 확인 결과 pET21(a) 벡터(5.9Kb) 와 amylosucrase (2Kb) 크기를 확인

2) Amylosucrase 정제를 위한 Ni-NTA chromatography 수행

A. *E.coli* 에서 발현시킨 Amylosucrae를 정제 진행후 SDS-PAGE 를 통한 size 확인



- 단백질 3`-말단의 His-Tag 를 포함한 미생물 발현 벡터인 pET21(a) 에 Amylosucrase 유전자를 클로닝하여 *E.coli* BL21 strain 에 형질전환
- *E.coli* 에서 발현시킨 Amylosucrase 효소를 His-Tag affinity column을 이용하여 정제 후 SDS-PAGE 를 통해 size 확인 결과 amylosucrase (73.3 KD) 임을 확인. fraction 별로 단백질 정량 후 0.2 mg/ml을 확보

나. 제2세부과제:

● 토마토 유전자 DB를 이용한 토마토 P450 유전자의 분리 및 식물 형질전환체 생성

1) 토마토 P450 유전자 분리

- 토마토 EST DB를 이용하여 전장의 유전정보가 확인된 토마토 P450 35개를 확보하였음. 이를 이용하여 토마토의 cDNA 증폭 후, 총 13개의 토마토 P450을 클로닝하여 염기서열 확인

Table 1. Tomato P450 list.

토마토 P450	토마토 P450의 유전자군 정보
Sl P450-01	
Sl P450-02	CYP73; Cinnamate 4-hydroxylase
Sl P450-03	CYP51; Obtusifoliol 14a-demethylase
Sl P450-06	
Sl P450-07	
Sl P450-09	
Sl P450-10	
Sl P450-13	
Sl P450-19	CYP82; Ferulate 5-hydroxylase
Sl P450-20	
Sl P450-21	
Sl P450-22	
Sl P450-27	

2) 토마토 P450 형질전환 식물 생성

- 클로닝된 13개의 토마토 P450을 가지고 염기서열정보를 바탕으로 유전자군 정보를 조사하여 이 중 3개의 토마토 P450을 식물 발현 벡터인 pBI121에 클로닝 하고, 식물 형질전환 방법으로 토마토 P450 형질전환 담배를 생성. 향후 형질전환체의 표현형 분석을 통해 식물체내 P450 기능 분석에 이용.

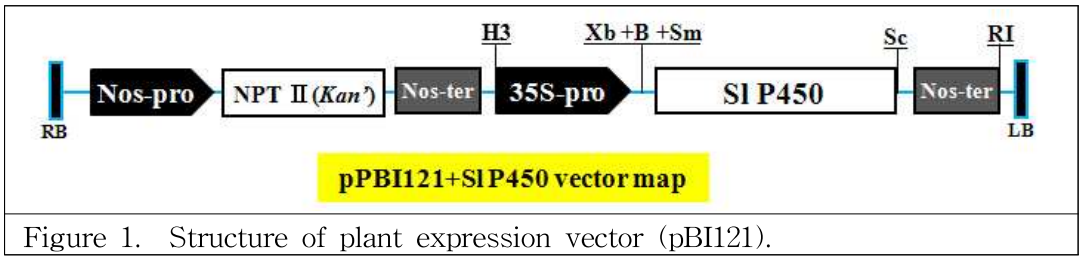


Figure 1. Structure of plant expression vector (pBI121).

● 대장균에서 식물 P450의 발현 및 생촉매 반응

1) 대장균에서의 식물 P450의 기작연구

- 고추유래의 식물 P450인 Ca P450 12 유전자는 앱식산(ABA)을 ABA 8′-Hydroxy로 가수분해 시키는 ABA 8'-hybroxylase 유전자군에 속함. ABA 8′-Hydroxy는 자연적으로 phaseic acid (PA)로 전환됨. 대사과정 정보를 바탕으로 Ca P450 12 유전자의 기작을 효소 반응으로 알아보기 위해 대장균에 형질전환 하였음. HPLC를 이용하여 분석한 결과 Ca P450 12 유전자로 형질전환된 대장균에서 발현된 P450 효소의 작용으로 ABA가 ABA 8′-Hydroxy와 PA로 전환되었음을 확인함(Figure 2). 식물 유래의 Ca P450 12 효소가 대장균에서 발현되어도 효소활성이 유지 되는지 알아보기 위해 (+)ABA를 기질로 binding 실험을 한 결과 활성이 유지되고 있음을 확인(Figure 3).

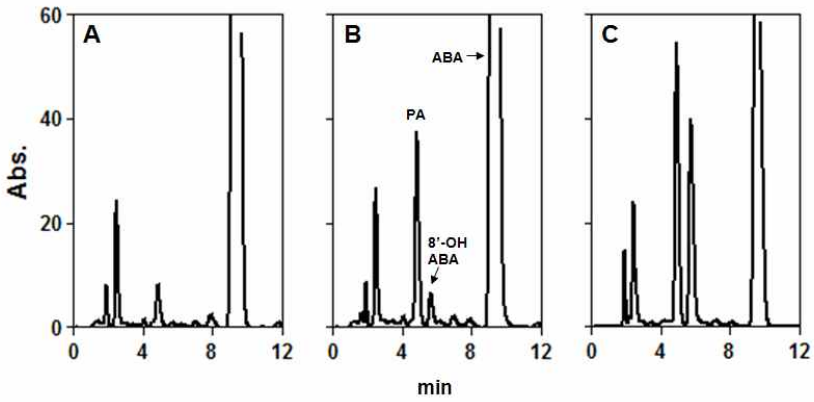


Figure 2. HPLC chromatograms of abscisic acid hydroxylation by Ca P450 12.

Ca P450 12 gene activity with abscisic acid was measured using Ca CPR in a final volume of 250 μl at 37℃ for 30 min in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). The reaction mixture extracted twice by ethyl-acetate. The sample was redissolved in HPLC mobile phase buffer and applied to HPLC analysis. A, control; B, add NADPH-generating system. Mobile phase for HPLC was used 45% MeOH containing 0.1% acetic acid (A, B) and 1% acetic acid (C). The percentage of 8'-hydroxy-ABA was incresed in acidic condition.

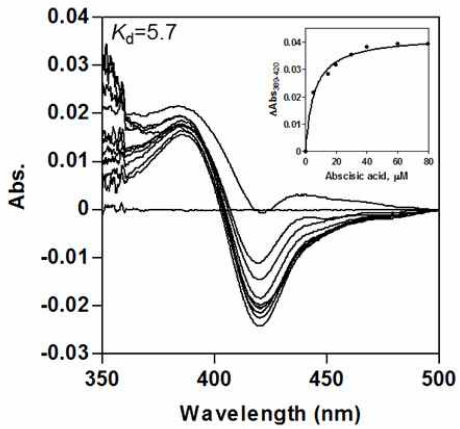


Figure 3. Substrate binding titration spectra of the Ca P450 12 enzyme.

The 500 μM Ca P450 12 enzyme was solublized in 0.1M Kpi (pH 7.4). (+)-ABA was added to the cuvet at ranging from 0 to 80 μM, and difference spectra were recorded between 500 nm and 350 nm.

2) 대장균에서의 식물 P450 생촉매 반응 최적화

- 식물 P450이 형질전환된 대장균에서 효소의 생촉매 반응을 최적화시키기 위해 P450 환원효소(Cytochrome P450 Reductase, CPR)를 이용하는 방법을 도입함. 고추의 유전체 DB를 이용하여 고추에 존재하는 Ca CPR 1, 2, 3을 찾아냈고, 이를 고추 cDNA에서 클로닝 하여 염기서열 정보를 확인함 (Figure 4). HPLC 방법을 통해 Ca P450 12 형질전환 대장균에 Ca CPR을 같이 발현 시켰을 때 대조군보다 더 높을 생촉매 활성을 가지는 것을 확인 하였다 (Figure 5).

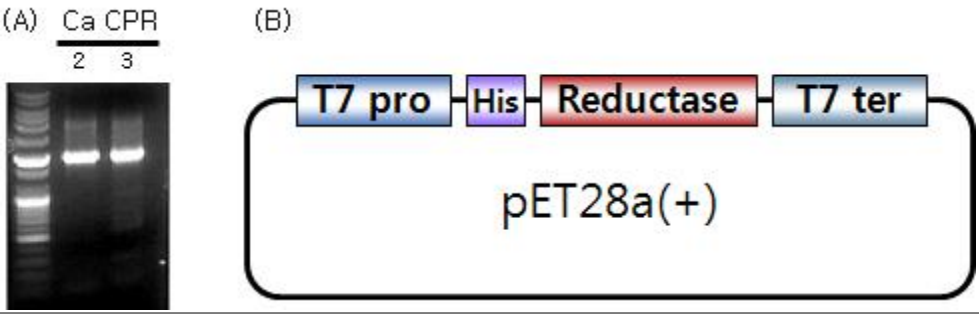


Figure 4. Ca CPR isolation and vector cloning.

Ca CPR genes PCR band picture isolated from hot pepper cDNA (A), structure of Ca CPR cloned vector (B).

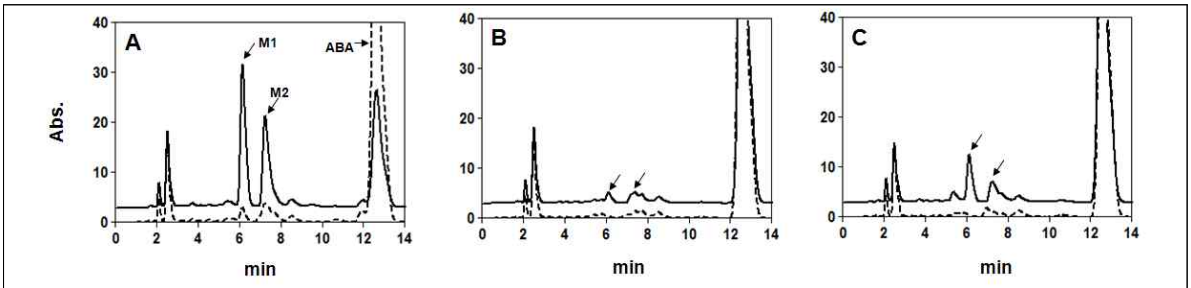


Figure 5. HPLC chromatograms of abscisic acid metabolites produced by Ca P450 12.

ABA (100uM) was incubated with Ca CPR (A), rat CPR (B), and FDX/FDR (C). Ca P450 12 does use Ca CPR, rat CPR. And FdR/Fdx was found to be a electron transfer for Ca P450 12 activities toward ABA. ABA oxidized by Ca P450 12 to produce 8'-hydroxy-ABA. M1 peak is phaseic acid and M2 is 8'-hydroxy-ABA. The product of hydroxylation of the 8'-methyl group of ABA is 8'-hydroxy-ABA (8'-OH-ABA), which is unstable and spontaneously isomerizes to form PA.

● 다른 기반에서의 식물 P450의 기작 연구

1) insect cell line을 이용한 식물 P450 기작 연구

- 대장균에서 식물 P450의 발현이 용이하지 않을 경우 eukaryote cell을 이용한 발현이 하나의 해결책으로 모색됨. 대표적인 insect cell line인 Sf9 cell과 S2 cell 각각을 이용한 방법이 존재함. Sf9 cell에서 식물 P450 (Ca P450 15, Sl P450 2, 3, 19)을 발현시키기 위해 Sf9 cell 발현벡터인 pFastBac vector에 클로닝하였고, S2 cell에서 발현시키기 위해 S2 cell 발현벡터인 pAc5.1 vector에 Ca P450 15 유전자를 클로닝 하였다.

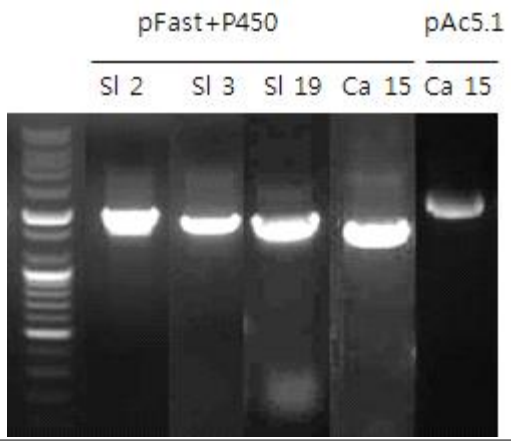


Figure 6. PCR band picture of Plant P450 genes cloned insect cell expression vector.

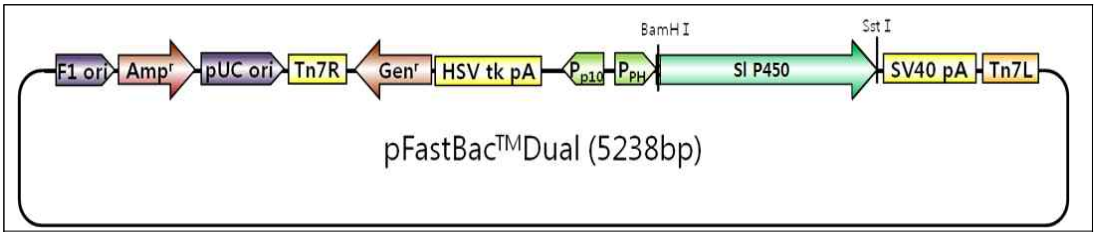


Figure 7. Structure of Sf9 cell expression vector.

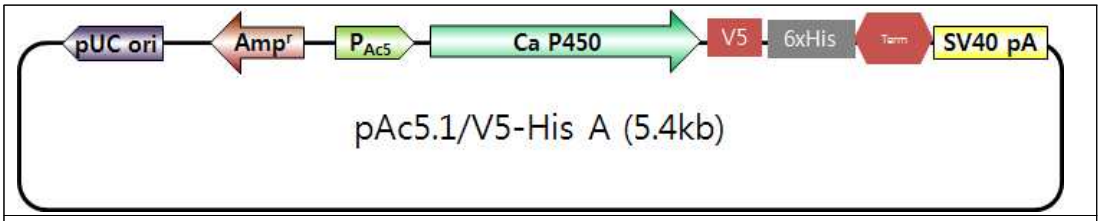
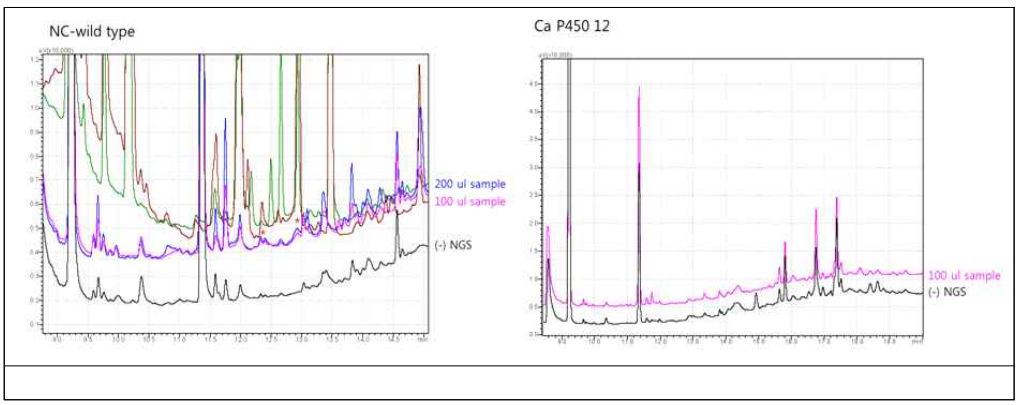


Figure 8. Structure of S2 cell expression vector

2) 식물 추출물을 이용한 P450 효소의 기작연구

- 식물에서 유래하는 P450을 가장 그대로 발현할 수 있는 방법은 식물을 이용하는 것인데 아직까지는 식물체를 가지고하는 효소의 기작연구는 미비한 실정임. 식물 유래의 P450 효소의 기작연구에 가장 최적화된 시스템을 찾기 위해 식물 추출물을 이용한 식물 P450 효소활성을 측정함.



■ 오디 유래 스틸베노이드 화합물 프로파일링

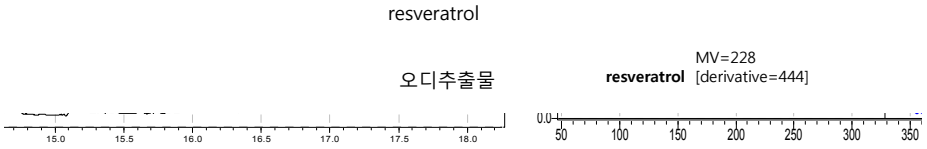
1) 오디 유래 스틸베노이드 화합물 추출

- 4종의 오디 즙 (수원20호, 청일, 한울, 왕오디) 8ml 에 ethylatetate 20 ml 을 가한후 70℃에서 1시간 shaking 하여 추출

2) GC/MS 를 통한 오디 추출물에서의 스틸베노이드 화합물 분석

- 1ml 의 오디추출물에 N_2 gas를 가하여 solvent 제거후, BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsily)trifluoroacetamide) 를 첨가하여 유도체 형성후 분석

● 레스베라트롤



- GC/MS를 통하여 분석한 결과 레스베라트롤(분홍)과 오디추출물(검정)에서 확인된 peak의 retention time이 같음(화살표)을 확인하였으며, 분자량 또한 레스베라트롤(444)과 같음을 확인

● 프테로스틸벤

- GC/MS를 통하여 분석한 결과 프테로스틸벤 (분홍) 과 오디추출물 (검정) 에서 확인된 peak 의 retention time이 같음 (화살표) 을 확인하였으며, 분자량 또한 프테로스틸벤과 (328) 같음을 확인

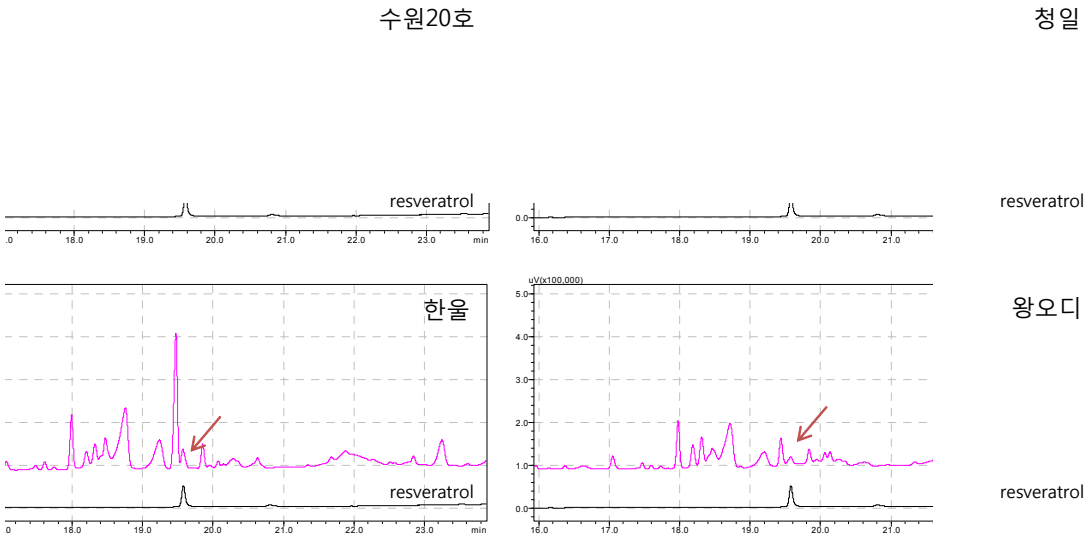
● 피세아타놀

- GC/MS를 통하여 분석한 결과 피세아타놀 (분홍) 과 오디추출물 (검정) 에서 확인된 peak 의 retention time 이 같음 (화살표) 을 확인하였으며, 분자량 또한 피세아타놀과 (532) 같음을 확인

3) GC 를 통한 오디 추출물에서의 스틸베노이드계 화합물의 조성 분석

- 1 ml의 오디추출물에 N_2 gas를 가하여 solvent 제거후, BSTFA

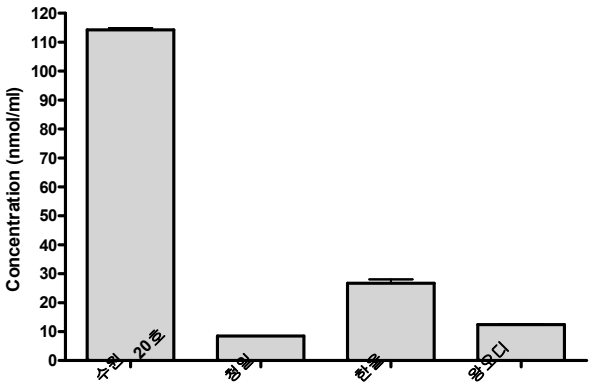
(*N,O*-bis(trimethylsily)trifluoroacetamide) 를 첨가하여 유도체 형성후 분석



- GC를 통하여 분석한 결과 4종 (수원20호, 청일, 한울, 왕오디) 의 오디추출물 (분홍) 에서 레스베라트롤 (검정) 과 같은 retention time 의 peak 확인

4) GC 를 통한 오디 추출물에서의 스틸베노이드계 화합물의 함량 분석

- 4종의 오디즙 1ml 당 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량 측정

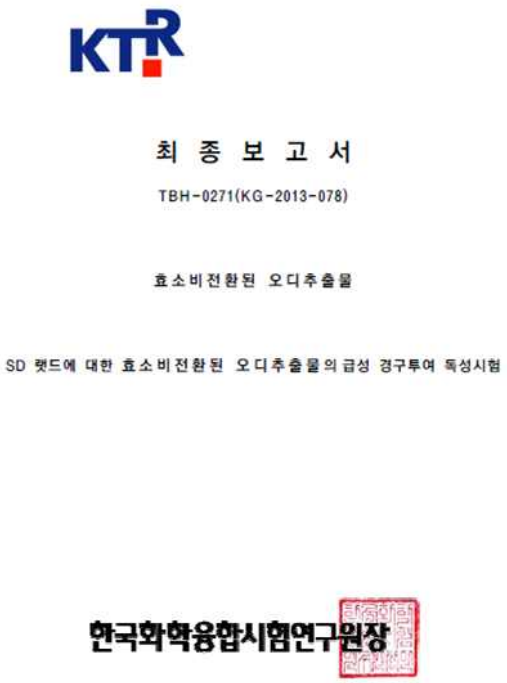


- 3 종류의 스틸베노이드계 화합물중 GC/MS 분석 결과 가장 많은 함유량을 보인 레스베라트롤을 target 으로 선정함
- 오디즙 1ml 당 함유되어 있는 레스베라트롤 의 함량 측정 결과 '수원20호' 의 경우 가장 높은 함유량을 보였고 '청일' 의 경우 가장 낮은 함유량을 보임
- 오디즙 4종의 레스베라트롤 함유량은 1.5배에서 14배의 차이를 보임

다. 제3세부과제

■ 최종 후보물질의 공인 기관의 평가자료를 통한 안전성 및 독성 검사

- 최종 후보 물질인 P450 효소를 이용한 효소전환된 오디추출물(Mulberry derivative, MD)과 효소비전환된 오디추출물(Mulberry, M)의 안전성 및 독성 검사 평가를 위해 공인 기관인 한국화학융합시험연구원에 의뢰함. 전임상 지정항목에 따라 SD 랫드에 급성 경구투여 독성시험을 시행하였으며 시험물질의 투여용량은 300 mg/kg와 2000mg/kg로 1회 경구 투여함. 시험물질 투여 후 14일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안으로 장기의 이상 유무를 관찰함. 시험 결과 시험 기간 중 사망동물은 관찰되지 않았으며 일반적인 증상만 관찰됨. 시험물질 투여에 의한 이상소견이 관찰되지 않았음. 체중측정 결과 정상적인 체중증가가 관찰되었으며 부검결과 이상소견이 관찰되지 않아 독성이 없는 것으로 밝혀짐(그림 1, 2).



KTR

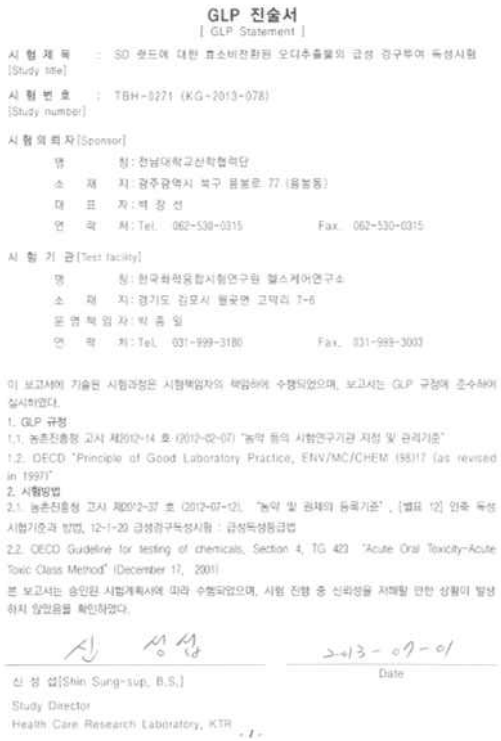
최 종 보 고 서

TBH-0271(KG-2013-078)

효소비전환된 오디추출물

SD 랫드에 대한 효소비전환된 오디추출물의급성 경구투여 독성시험

한국화학융합시험연구원장



GLP 진술서

[GLP Statement]

시 험 제 목 : SD 랫드에 대한 효소비전환된 오디추출물의 급성 경구투여 독성시험
[Study title]

시 험 번 호 : TBH-0271 (KG-2013-078)
[Study number]

시험의뢰자[Sponsor]

명 칭 : 전남대학교산학협력단
소 재 지 : 광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
대 표 자 : 박 정 선
연 락 처 : Tel. 062-530-0315 Fax. 062-530-0315

시 험 기 관[Test facility]

명 칭 : 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소
소 재 지 : 경기도 김포시 월곶면 고막리 7-6
운 영 책 임 자 : 박 종 일
연 락 처 : Tel. 031-999-3180 Fax. 031-999-3003

이 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임하에 수행되었으며, 보고서는 GLP 규정에 준수하여 실시하였다.

1. GLP 규정
1.1. 농촌진흥청 고시 제2012-14 호 (2012-02-07) "농약 등의 시험연구기관 지정 및 관리기준"
1.2. OECD "Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)"

2. 시험방법
2.1. 농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준", [별표 12] 안전 독성 시험기준과 방법, 12-1-29 급성경구독성시험 : 급성독성등급법
2.2. OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 423 "Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method" (December 17, 2001)

본 보고서는 승인된 시험계획서에 따라 수행되었으며, 시험 진행 중 신뢰성을 저해할 만한 상황이 발생하지 않았음을 확인하였다.

신 성 섭

2013-07-01

신 성 섭[Shin Sung-sup, B.S.]
Study Director
Health Care Research Laboratory, KTR

Date

신뢰성보증 확인서
[Quality Assurance Statement]

시 험 제 목 : SD 랫드에 대한 효소비전환된 오디추출물 급성 경구투여 독성시험
[Study title]

시 험 번 호 : TBH-0271 (KG-2013-078)
[Study number]

점검한 시험단계	점 검 일 자	시험책임자 보 고 일 자	운영책임자 보 고 일 자
시험계획서(초안)의 점검	2013-04-02	2013-04-03	2013-04-03
시험계획서의 점검	2013-04-03	2013-04-03	2013-04-03
실험동물 입수 및 반입의 점검	2013-04-04	2013-04-04	2013-04-04
군분리의 점검	2013-04-08	2013-04-08	2013-04-08
시험물질투여의 점검(1)	2013-04-09	2013-04-09	2013-04-09
시험물질투여의 점검(2)	2013-04-11	2013-04-11	2013-04-11
시험물질투여의 점검(3)	2013-04-16	2013-04-16	2013-04-16
일반증상관찰의 점검	2013-04-18	2013-04-18	2013-04-18
실험동물 부검의 점검(1)	2013-04-30	2013-04-30	2013-04-30
실험동물 부검의 점검(2)	2013-05-02	2013-05-02	2013-05-02
시험기초자료의 점검	2013-05-15	2013-05-16	2013-05-16
최종보고서(초안)의 점검	2013-05-15	2013-05-16	2013-05-16
최종보고서의 점검	2013-07-01	2013-07-01	2013-07-01

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 신뢰성보증부서는 시험계획서에 따라 기록된 점검일자에 주요 시험 단계의 점검을 수행 하였다.

본 최종보고서는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 신뢰성보증부서에 의하여 점검되었으며, 보고된 시험결과는 시험기초자료 및 시험 과정을 정확하게 반영하고 있다.

시험에 대한 점검 결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고되었다. 이러한 점검을 바탕으로 최종보고서를 검토하였다. 본 시험은 GLP 규정에 따라 수행되었다.

홍 승 국 [Hong Seung-guk, M.S.]
Quality Assurance Manager
Health Care Research Laboratory

KSQA Seung-Guk Hong 2012-11 QUALITY ASSURANCE PROFESSIONAL IN GLP

2013-07-01
Date

목 차
[Contents]

보고서표지
GLP 준수서 [GLP statement] ····· I
신뢰성보증 확인서 [Quality assurance statement] ····· II
시험참여자 [Study staffs] ····· III
목차 [Contents] ····· IV
1. 요약 (Summary) ····· 1
2. 서론 (Introduction) ····· 2
2.1. 시험일정 ····· 2
3. 재료 및 방법 (Materials & methods) ····· 3
3.1. 시험물질 및 부형제 ····· 3
3.2. 시험물질 조제 ····· 3
3.3. 시험물질 분석 ····· 3
3.4. 시험계 ····· 3
3.5. 사육환경 ····· 4
3.6. 시험군의 구성 ····· 5
3.7. 시험물질의 투여 경로 및 방법 ····· 5
3.8. 관찰항목 ····· 5
4. 자료의 보관 (Archives) ····· 6
5. 시험계획서의 수정 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan) ····· 6
6. 결과 (Results) ····· 7
6.1. 사망률 및 일반증상 (Table 1, 2 and Appendix 1) ····· 7
6.2. 체중변화 (Table 3, Appendix 2) ····· 7
6.3. 부검소견 (Table 4, Appendix 3) ····· 7
7. 고찰 및 결론 (Discussion & conclusion) ····· 8
8. 참고문헌 (References) ····· 9
9. Tables (Group summary) ····· 10
Table 1. Mortality ····· 10
Table 2. Clinical signs ····· 10
Table 3. Body weight ····· 11
Table 4. Necropsy findings ····· 11
10 Appendices (Individual data) ····· 12
Appendix 1. Clinical signs of female rats ····· 12
Appendix 1. (Continued) Clinical signs of female rats ····· 12
Appendix 2. Body weight of female rats ····· 13
Appendix 3. Necropsy findings of female rats ····· 14
11. Annexes ····· 15
Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor) ····· 15
Annex 2. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight ····· 16

시험참여자
[Study Staffs]

다음의 시험자는 시험 중 중요한 시험단계 및 기록을 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서(SOPs)와 본 시험의 시험계획서에 따라 수행하였다.

시험 담당자 : 김준호/B.S.
이택진/B.S.

시험물질 조제책임자 : 김민석/B.S.

동물관리 책임자 : 박학수/D.V.M., Ph.D. Candidate

검역 책임자 : 신성섭/B.S.

보고서 작성자 : 신성섭/B.S.

1. 요약 (Summary)

효소비전환된 오디추출물에 대한 급성 경구투여 독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 랫드를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg body weight (1st , 2nd step)와 2000 mg/kg body weight (3rd , 4th step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 관찰하였다.

- 실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 생존동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.
- 생존동물의 부검 소견 결과, 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 효소비전환된 오디추출물은 화학물질 분류 및 표지에 관한 세계조화시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5 (2000 mg/kg body weight < LD_{50} < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

2. 서론 (Introduction)

본 시험은 SD 랫드를 이용하여 효소비전환된 오디추출물을 급성 경구투여시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시하였다.

본 시험은 동물보호법 법률 제 10995호 (2011-08-04, 전부개정)를 근거한 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 실험동물의 사용과 관리에 관한 규정 (실험동물윤리위원회, 2010-12-10)을 준수하여 실시하였다.

2.1 시험일정

시험개시일	:	2013-04-03
실험동물입수일	:	2013-04-04
검역 및 순화기간일	:	2013-04-04 ~ 2013-04-08
군분리일	:	2013-04-08
투여일	:	2013-04-09(1st step), 2013-04-11(2nd step), 2013-04-16(3rd step), 2013-04-18(4th step)
일반증상 관찰기간일	:	2013-04-09 ~ 2013-04-23(1st step), 2013-04-11 ~ 2013-04-25(2nd step), 2013-04-16 ~ 2013-04-30(3rd step), 2013-04-18 ~ 2013-05-02(4th step)
부검일	:	2013-04-23(1st step), 2013-04-25(2nd step), 2013-04-30(3rd step), 2013-05-02(4th step)
최종보고서(초안) 제출일	:	2013-05-20
시험종료일	:	2013-07-01

3. 재료 및 방법 (Materials & methods)

3.1 시험물질 및 부형제

3.1.1 시험물질 (Annex 1.)

물 질 명 : 효소비전환된 오디추출물
공 급 원 : 전남대학교
제 조 일 : 2013-03-18
입 수 일 : 2013-03-20
입 수 량 : 34.783 g (Gross)
Lot No. : 20130310-1
보 관 조 건 : 냉장 [(2 ~ 8)℃]
유 효 기 간 : 2014-03-17 (제조 후 1 년)
외 관 및 성 상 : 적색의 분말
잔여시험물질처리 : 반환
취급(폐기)시주의사항 : 없음

3.1.2 부형제

물 질 명 : 멸균증류수 (주사용수)
제 조 원 : 대한약품공업(주)
Lot No. : L8L0K21

3.2 시험물질 조제

본 시험물질을 칭량한 후 부형제인 멸균증류수 (주사용수)에 30 mg/mL (1st - 2nd step) 및 200 mg/mL (3rd - 4th step)농도로 조제하여 사용하였다.

3.3 시험물질 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 투여액의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않았다.

3.4 시험계

계통 및 종 : Crl:CD(SD)-Rat
공급원 : (주)오리엔트 바이오 (경기도 가평군 북면 북동리 699-13)
입수시 성별 및 동물수 : 암컷 14 마리
입수시 동물 주령 및 체중범위 : 8 주령, 188.8 g ~ 216.5 g
투여시 성별 및 동물수 : 암컷 12 마리 (1st ~ 4th step 각각 3 마리)
투여시 동물 주령 및 체중범위 : 9 주령, 190.0 g ~ 201.1 g (1st step)

9 주령, 195.3 g ~ 206.3 g (2nd step)
10 주령, 209.8 g ~ 217.1 g (3rd step)
10 주령, 203.9 g ~ 226.4 g (4th step)

3.4.1 시험계의 선택사유
본 시험에 사용된 랫드는 급성 및 반복투여독성시험 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교적 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.4.2 검역 및 순화
동물을 입수 후 5 일 동안 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 동물사육실의 환경하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다.

3.4.3 개체식별
개체식별은 유성매직을 이용하여 각 개체번호를 꼬리에 표시하였다. 순화기간에는 별간색 매직을 이용하고, 투여 및 관찰기간에는 검은색 매직을 사용하였다. 사육상자는 시험번호, 시험물질명, 시험항목, 입수일, 순화기간, 군분리일, 시험기간, 성/동물번호 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하여 식별하였다.

3.4.4 군분리
순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체가 관찰되지 않아, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 무작위법으로 군분리를 실시하였다.

3.4.5 잔여동물의 처리
잔여동물은 실험종료일에 안락사 시켰다.

3.5 사육환경

3.5.1 동물실 번호 : 청정사육실 7

3.5.2 환경조건
본 시험의 환경은 온도 (22 ± 3)℃, 상대습도 (50 ± 20)%, 환기횟수 (10 ~ 15) 회/h, 조명주기 12 시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음수를 급여하여 사육하였으며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.5.3 사육환경 모니터링
시험기간 중 동물실의 온·습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 30 분마다 측정 되었으며, 조도 등의 환경조건은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서(SOPs)에 따라 정기적 (분기당 1 회)으로 측정되었다. 동물실의 환경 측정 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

3.5.4 사육조건
순화 및 시험기간 중 청정사육실내 스텐인레스제 사육상자 [270(W) ㎜ × 500(D) ㎜ × 200(H) ㎜, 대응기기]에 3 마리 이하로 넣어 사육하였다.

3.5.5 사료 및 음수
사료는 실험동물용 쥐 사료 [(주) 카길에그리퓨리나 (전라북도 군산시 소룡동 56-4)]를, 음수는 UV 조사된 여과수를 사용하여 자유섭취시켰다.

3.5.6 사료 및 음수 중의 오염물질 확인
사료의 오염물질은 사료 제조업체의 정기적 검사에 따른 사료 성적서를 사료공급자로부터 받아 확인하였고, 음수의 오염물질은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 해당 표준작업지침서(SOPs)에 따른 정기적 검사를 통해 확인한 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

3.6 시험군의 구성

3.6.1 본시험
농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준" 고시에 따라 시험물질의 독성정보가 없어 300 mg/kg B.W. 용량으로 시작하였다. 단계별 투여 용량은 300 mg/kg B.W.(1st - 2nd step) 및 2000 mg/kg B.W. (3rd - 4th step)으로 각각 3 마리씩 투여하였다. 시험물질 투여 간격은 일반증상 및 정도에 의해 결정되었다. (Annex 2. 참조)

- 시험군의 구성

시험	시험물질	성	마리수	동물번호	투여량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)
1st step	효소비전환된 오디추출물	암컷	3	2101 ~ 2103	300	10
2nd step		암컷	3	2201 ~ 2203	300	10
3rd step		암컷	3	2301 ~ 2303	2000	10
4th step		암컷	3	2401 ~ 2403	2000	10

3.7 시험물질의 투여 경로 및 방법

3.7.1 사료의 절식
투여 전 하루 밤 사료를 공급하지 않았고, 음수는 공급하였다.

3.7.2 투여방법
랫드용 경구 투여 주사기를 이용하여 위 내에 1회 강제 투여하였다.

3.8 관찰항목

3.8.1 일반증상 관찰
전 동물에 대하여 매일 1 회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단 투여 당일에는 투여 후 4 시간까지는 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 후 14 일까지 실시하였다.

3.8.2 체중변화
체중은 입수시, 군분리시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 7 일 및 14 일째에 측정하였다.

3.8.3 부검 소견
투여 후 14 일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 후, 부검하여 육안으로 장기를 검사하였다.

4. 자료의 보관 (Archives)

시험기간중에 작성된 모든 기록에 관해서는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소에서 최종보고서 발급 후 5 년간 보관한다. 보관기간 이후의 시험기초자료 및 시험물질의 보관에 관해서는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다. 기록의 보관장소는 자료보관실 (I), (II)로 하며 보관될 주된 시험기초자료는 다음과 같다.

(1) 시험계획서에 관한 기록
(2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
(3) 시험계에 관한 기록 및 자료
(4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
(5) 시험의뢰자와의 송수신 기록 (필요 시)
(6) 최종보고서에 관한 기록

5. 시험계획서의 수정 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan)

시험기간 동안 시험계획서에 대한 수정 및 이탈사항은 없었다.

6. 결과 (Results)

6.1 사망률 및 일반증상 (Table 1, 2 and Appendix 1)

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.

6.2 체중변화 (Table 3, Appendix 2)

생존동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 보였다.

6.3 부검소견 (Table 4, Appendix 3)

모든 개체의 주요장기에 대한 육안적 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상 소견이 관찰된 동물은 없었다.

7. 고찰 및 결론 (Discussion & conclusion)

효소비전환된 오디추출물에 대한 급성 경구투여 독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 랫드를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg B.W. (1^{st} - 2^{nd} step)와 2000 mg/kg B.W. (3^{rd} - 4^{th} step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상유무를 관찰하였다.

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 생존동물에 대한 체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 생존동물의 부검 소견 결과, 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 효소비전환된 오디추출물은 화학물질 분류 및 표지에 관한 세계조화시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5 (2000 mg/kg body weight < LD_{50} < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

8. 참고문헌 (References)

- 농촌진흥청 고시 제2012-14 호 (2012-02-07) "농약 등의 시험연구기관 지정 및 관리기준"

- 농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준" , [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법, 12-1-20 급성경구독성시험 : 급성독성등급법

- OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 423 "Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method" (December 17, 2001)

- OECD Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)

9. Tables (Group summary)

Table 1 . Mortality

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Mortality
		Female
1st step	300	0 % (0 / 3)[a]
2nd step	300	0 % (0 / 3)
3rd step	2000	0 % (0 / 3)
4th step	2000	0 % (0 / 3)

[a] : Number of dead animals / Number of tested animals

Table 2 . Clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs
1st step	300	Female	3	Normal
2nd step	300	Female	3	Normal
3rd step	2000	Female	3	Normal
4th step	2000	Female	3	Normal

Table 3. Body weight

Unit : g

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Days after administration		
				0	7	14
1st step	300	Female	Mean	194.2	233.6	239.5
			S.D.	6.0	5.1	6.4
			N	3	3	3
2nd step	300	Female	Mean	202.8	234.2	257.5
			S.D.	6.7	17.8	14.8
			N	3	3	3
3rd step	2000	Female	Mean	213.8	246.0	254.0
			S.D.	3.7	6.8	3.8
			N	3	3	3
4th step	2000	Female	Mean	213.7	244.0	248.2
			S.D.	11.5	10.8	11.9
			N	3	3	3

S.D. : Standard deviation, N : Number of animals

Table 4. Necropsy findings

Findings		1st step (300 mg/kg B.W.)	2nd step (300 mg/kg B.W.)	3rd step (2000 mg/kg B.W.)	4th step (2000 mg/kg B.W.)
		Female	Female	Female	Female
Number of animals		3	3	3	3
Gross findings	No gross findings	3	3	3	3
Internal findings	No gross findings	3	3	3	3

10. Appendices (Individual data)

Appendix 1. Clinical signs of female rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Hours after administration					Days after administration			
			30min	1 h	2 h	3 h	4 h	1	2	3	4
1st step	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2nd step	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3rd step	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4th step	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 1. (Continued) Clinical signs of female rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration								
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1st step	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2nd step	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3rd step	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4th step	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 2. Body weight of female rats

Unit : g

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration		
			0	7	14
1st step	300	2101	190.0	235.8	244.6
		2102	201.1	237.2	241.6
		2103	191.6	227.7	232.4
		Mean	194.2	233.6	239.5
		S.D.	6.0	5.1	6.4
2nd step	300	2201	204.7	236.6	261.9
		2202	195.3	214.6	241.0
		2203	208.3	249.3	269.5
		Mean	202.8	234.2	257.5
		S.D.	6.7	17.8	14.8
3rd step	2000	2301	214.6	253.7	257.5
		2302	217.1	243.2	249.9
		2303	209.8	241.1	254.7
		Mean	213.8	246.0	254.0
		S.D.	3.7	6.8	3.8
4th step	2000	2401	210.9	246.1	248.7
		2402	203.9	232.3	236.1
		2403	226.4	253.7	259.8
		Mean	213.7	244.0	248.2
		S.D.	11.5	10.8	11.9

S.D. : Standard deviation

Appendix 3. Necropsy findings of female rats

Animal Number : 2101 Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2102 Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2103 Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2201 Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2202 Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2203 Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2301 Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2302 Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2303 Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2401 Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2402 Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2403 Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings

11. Annexes

Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor)

시 험 물 질 관 련 정 보 기 록 지

시 험 물 질 (Test article)

시 험 물 질 조 성 (Formulation)

KTR-APM-001-701-1

Annex 2. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight.

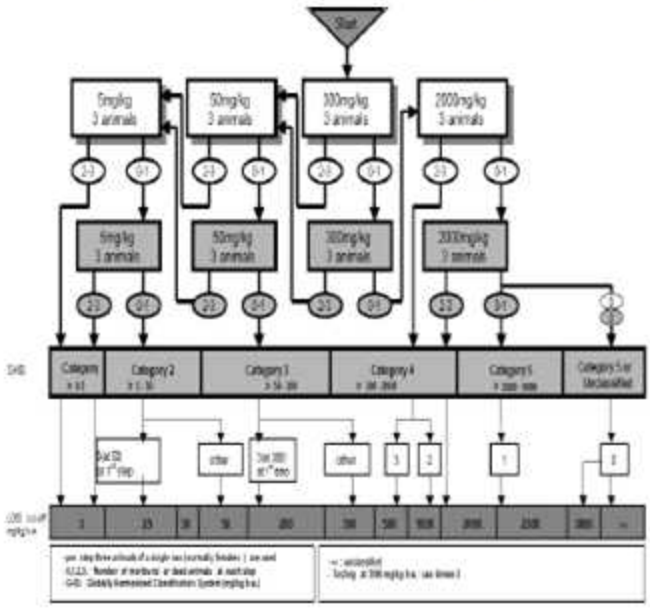


그림 1. 효소비전환된 오디추출물 (Mulberry, M)의 SD 랫드에 대한 급성 경구투여 독성시험결과

KTR

최 종 보 고 서

TBH-0270(KG-2013-077)

효소전환된 오디추출물

SD 랫드에 대한 효소전환된 오디추출물의 급성 경구투여 독성시험

한국화학융합시험연구원장

GLP 진술서
[GLP Statement]

시 험 제 목 : SD 랫드에 대한 효소전환된 오디추출물의 급성 경구투여 독성시험
[Study title]

시 험 번 호 : TBH-0270 (KG-2013-077)
[Study number]

시험의뢰자[Sponsor]
명 칭 : 전남대학교산학협력단
소 재 지 : 광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
대 표 자 : 백 장 선
연 락 처 : Tel. 062-530-0315 Fax. 062-530-0315

시 험 기 관[Test facility]
명 칭 : 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소
소 재 지 : 경기도 김포시 월곶면 고막리 7-6
운 영 책 임 자 : 박 종 일
연 락 처 : Tel. 031-999-3180 Fax. 031-999-3003

이 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임하에 수행되었으며, 보고서는 GLP 규정에 준수하여 실시하였다.

1. GLP 규정
1.1. 농촌진흥청 고시 제2012-14 호 (2012-02-07) "농약 등의 시험연구기관 지정 및 관리기준"
1.2. OECD "Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)"
2. 시험방법
2.1. 농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준", [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법, 12-1-2) 급성경구독성시험 : 급성독성등급법
2.2. OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 423 "Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method" (December 17, 2001)

본 보고서는 승인된 시험계획서에 따라 수행되었으며, 시험 진행 중 신뢰성을 저해할 만한 상황이 발생하지 않았음을 확인하였다.

신 성 섭 2013-07-01

신 성 섭[Shin Sung-sup, B.S.] Date
Study Director
Health Care Research Laboratory, KTR

신뢰성보증 확인서
[Quality Assurance Statement]

시 험 제 목 : SD 랫드에 대한 효소전환된 오디추출물 급성 경구투여 독성시험
[Study title]

시 험 번 호 : TBH-0270 (KG-2013-077)
[Study number]

점검한 시험단계	점 검 일 자	시험책임자 보 고 일 자	운영책임자 보 고 일 자
시험계획서(초안)의 점검	2013-04-02	2013-04-03	2013-04-03
시험계획서의 점검	2013-04-03	2013-04-03	2013-04-03
실험동물 입수 및 반입의 점검	2013-04-04	2013-04-04	2013-04-04
군분리의 점검	2013-04-08	2013-04-08	2013-04-08
시험물질투여의 점검(1)	2013-04-09	2013-04-09	2013-04-09
시험물질투여의 점검(2)	2013-04-11	2013-04-11	2013-04-11
시험물질투여의 점검(3)	2013-04-16	2013-04-16	2013-04-16
일반증상관찰의 점검	2013-04-18	2013-04-18	2013-04-18
실험동물 부검의 점검(1)	2013-04-30	2013-04-30	2013-04-30
실험동물 부검의 점검(2)	2013-05-02	2013-05-02	2013-05-02
시험기초자료의 점검	2013-05-15	2013-05-16	2013-05-16
최종보고서(초안)의 점검	2013-05-15	2013-05-16	2013-05-16
최종보고서의 점검	2013-07-01	2013-07-01	2013-07-01

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 신뢰성보증부서는 시험계획서에 따라 기록된 점검일자에 주요 시험 단계의 점검을 수행 하였다.

본 최종보고서는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 신뢰성보증부서에 의하여 점검되었으며, 보고된 시험결과는 시험기초자료 및 시험 과정을 정확하게 반영하고 있다.

시험에 대한 점검 결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고되었다. 이러한 점검을 바탕으로 최종보고서를 검토하였다. 본 시험은 GLP 규정에 따라 수행되었다.

홍 승 국 KSQA Seung-Guk Hong 2012-11 2013-07-01

홍 승 국 [Hong Seung-guk, M.S.] Date
Quality Assurance Manager
Health Care Research Laboratory, KTR

시험참여자
[Study Staffs]

다음의 시험자는 시험 중 중요한 시험단계 및 기록을 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서(SOPs)와 본시험의 시험계획서에 따라 수행하였다.

시험 담당자 : 김준호/B.S.
이택진/B.S.

시험물질 조제책임자 : 김민석/B.S.

동물관리 책임자 : 박학수/D.V.M., Ph.D. Candidate

검역 책임자 : 신성섭/B.S.

보고서 작성자 : 신성섭/B.S.

목 차
[Contents]

보고서표지
GLP 준수서 [GLP statement] ····· I
신뢰성보증 확인서 [Quality assurance statement] ····· II
시험참여자 [Study staffs] ····· III
목차 [Contents] ····· IV
1. 요약 (Summary) ····· 1
2. 서론 (Introduction) ····· 2
2.1. 시험일정 ····· 2
3. 재료 및 방법 (Materials & methods) ····· 3
3.1. 시험물질 및 부형제 ····· 3
3.2. 시험물질 조제 ····· 3
3.3. 시험물질 분석 ····· 3
3.4. 시험계 ····· 3
3.5. 사육환경 ····· 4
3.6. 시험군의 구성 ····· 5
3.7. 시험물질의 투여 경로 및 방법 ····· 5
3.8. 관찰항목 ····· 5
4. 자료의 보관 (Archives) ····· 6
5. 시험계획서의 수정 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan) ····· 6
6. 결과 (Results) ····· 7
6.1. 사망률 및 일반증상 (Table 1, 2 and Appendix 1) ····· 7
6.2. 체중변화 (Table 3, Appendix 2) ····· 7
6.3. 부검소견 (Table 4, Appendix 3) ····· 7
7. 고찰 및 결론 (Discussion & conclusion) ····· 8
8. 참고문헌 (References) ····· 9
9. Tables (Group summary) ····· 10
Table 1. Mortality ····· 10
Table 2. Clinical signs ····· 10
Table 3. Body weight ····· 11
Table 4. Necropsy findings ····· 11
10 Appendices (Individual data) ····· 12
Appendix 1. Clinical signs of female rats ····· 12
Appendix 1. (Continued) Clinical signs of female rats ····· 12
Appendix 2. Body weight of female rats ····· 13
Appendix 3. Necropsy findings of female rats ····· 14
11. Annexes ····· 15
Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor) ····· 15
Annex 2. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight ····· 16

1. 요약 (Summary)

효소전환된 오디추출물에 대한 급성 경구투여 독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 랫드를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg body weight (1^{st} , 2^{nd} step)와 2000 mg/kg body weight (3^{rd} , 4^{th} step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 관찰하였다.

- 실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 생존동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.
- 생존동물의 부검 소견 결과, 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 효소전환된 오디추출물은 화학물질 분류 및 표지에 관한 세계조화시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5 (2000 mg/kg body weight < LD_{50} < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

2. 서론 (Introduction)

본 시험은 SD 랫드를 이용하여 효소전환된 오디추출물을 급성 경구투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 실시하였다.

본 시험은 동물보호법 법률 제 10995호 (2011-08-04, 전부개정)를 근거한 한국화학융합시험연구원 웹스케어연구소의 실험동물의 사용과 관리에 관한 규정 (실험동물윤리위원회, 2010-12-10)을 준수하여 실시하였다.

2.1 시험일정

시험개시일	:	2013-04-03
실험동물입수일	:	2013-04-04
검역 및 순화기간일	:	2013-04-04 ~ 2013-04-08
군분리일	:	2013-04-08
투여일	:	2013-04-09(1^{st} step), 2013-04-11(2^{nd} step), 2013-04-16(3^{rd} step), 2013-04-18(4^{th} step)
일반증상 관찰기간일	:	2013-04-09 ~ 2013-04-23(1^{st} step), 2013-04-11 ~ 2013-04-25(2^{nd} step), 2013-04-16 ~ 2013-04-30(3^{rd} step), 2013-04-18 ~ 2013-05-02(4^{th} step)
부검일	:	2013-04-23(1^{st} step), 2013-04-25(2^{nd} step), 2013-04-30(3^{rd} step), 2013-05-02(4^{th} step)
최종보고서(초안) 제출일	:	2013-05-20
시험종료일	:	2013-07-01

3. 재료 및 방법 (Materials & methods)

3.1 시험물질 및 부형제

3.1.1 시험물질 (Annex 1.)

물	질	명 : 효소전환된 오디추출물
공	급	원 : 전남대학교
제	조	일 : 2013-03-18
입	수	일 : 2013-03-20
입	수	량 : 34.767 g (Gross)
L o t	N o .	: 20130310-2
보	관	조 건 : 냉장 [(2 ~ 8)℃]
유	효	기 간 : 2014-03-17 (제조 후 1 년)
외	관	및 성 상 : 적색의 분말
잔여시험물질처리		: 반환
취급(폐기)시주의사항		: 없음

3.1.2 부형제

물	질	명 : 멸균증류수 (주사용수)
제	조	원 : 대한약품공업(주)
Lot No.		: LBL0K21

3.2 시험물질 조제

본 시험물질을 칭량한 후 부형제인 멸균증류수 (주사용수)에 30 mg/mL (1^{st} - 2^{nd} step) 및 200 mg/mL (3^{rd} - 4^{th} step)농도로 조제하여 사용하였다.

3.3 시험물질 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 투여액의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않았다.

3.4 시험계

계통 및 종	: Crl:CD(SD)-Rat
공급원	: (주)오리엔트 바이오 (경기도 가평군 북면 목동리 699-13)
입수시 성별 및 동물수	: 암컷 14 마리
입수시 동물 주령 및 체중범위	: 8 주령, 197.0 g ~ 219.7 g
투여시 성별 및 동물수	: 암컷 12 마리 (1^{st} ~ 4^{th} step 각각 3 마리)
투여시 동물 주령 및 체중범위	: 9 주령, 202.4 g ~ 211.5 g (1^{st} step)

9 주령, 199.6 g → 217.1 g (2nd step)
10 주령, 223.2 g → 229.2 g (3rd step)
10 주령, 216.3 g → 235.4 g (4th step)

3.4.1 시험계의 선택사유
본 시험에 사용된 랫드는 급성 및 반복투여독성시험 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교적 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.4.2 검역 및 순화
동물을 입수 후 5 일 동안 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 동물사육실의 환경하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다.

3.4.3 개체식별
개체식별은 유성매직을 이용하여 각 개체번호를 꼬리에 표시하였다. 순화기간에는 빨간색 매직을 이용하고, 투여 및 관찰기간에는 검은색 매직을 사용하였다. 사육상자는 시험번호, 시험물질명, 시험항목, 입수일, 순화기간, 군분리일, 시험기간, 성/동물번호 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하여 식별하였다.

3.4.4 군분리
순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체가 관찰되지 않아, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 무작위법으로 군분리를 실시하였다.

3.4.5 잔여동물의 처리
잔여동물은 실험종료일에 안락사 시켰다.

3.5 사육환경

3.5.1 동물실 번호 : 청정사육실 7

3.5.2 환경조건
본 시험의 환경은 온도 (22 ± 3)℃, 상대습도 (50 ± 20)%, 환기횟수 (10 ~ 15) 회/h, 조명주기 12 시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음수를 급여하여 사육하였으며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.5.3 사육환경 모니터링
시험기간 중 동물실의 온 · 습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 30 분마다 측정 되었으며, 조도 등의 환경조건은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서(SOPs)에 따라 정기적 (분기당 1 회)으로 측정되었다. 동물실의 환경 측정 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

3.5.4 사육조건
순화 및 시험기간 중 청정사육실내 스텐인레스제 사육상자 [270(W) ㎜ × 500(D) ㎜ × 200(H) ㎜, 대중기기]에 3 마리 이하로 넣어 사육하였다.

3.5.5 사료 및 음수
사료는 실험동물용 쥐 사료 [(주) 카길에그리퓨리나 (전라북도 군산시 소룡동 56-4)]를, 음수는 UV 조사된 여과수를 사용하여 자유섭취시켰다.

3.5.6 사료 및 음수 중의 오염물질 확인
사료의 오염물질은 사료 제조업체의 정기적 검사에 따른 사료 성적서를 사료공급자로부터 받아 확인하였고, 음수의 오염물질은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 해당 표준작업지침서(SOPs)에 따른 정기적 검사를 통해 확인한 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

3.6 시험군의 구성

3.6.1 본시험
농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준" 고시에 따라 시험물질의 독성정보가 없어 300 mg/kg B.W. 용량으로 시작하였다. 단계별 투여 용량은 300 mg/kg B.W.(1st · 2nd step) 및 2000 mg/kg B.W. (3rd · 4th step)으로 각각 3 마리씩 투여하였다. 시험물질 투여 간격은 일반증상 및 정도에 의해 결정되었다. (Annex 2. 참조)

- 시험군의 구성

시험	시험물질	성	마리수	동물번호	투여량 (mg/kg B.W.)	투여용량 (mL/kg B.W.)
1st step	효소전환된 오디추출물	암컷	3	2101 → 2103	300	10
2nd step		암컷	3	2201 → 2203	300	10
3rd step		암컷	3	2301 → 2303	2000	10
4th step		암컷	3	2401 → 2403	2000	10

3.7 시험물질의 투여 경로 및 방법

3.7.1 사료의 절식
투여 전 하루 밤 사료를 공급하지 않았고, 음수는 공급하였다.

3.7.2 투여방법
랫드용 경구 투여 주사기를 이용하여 위 내에 1회 강제 투여하였다.

3.8 관찰항목

3.8.1 일반증상 관찰
전 동물에 대하여 매일 1 회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단 투여 당일에는 투여 후 4 시간까지는 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 후 14 일까지 실시하였다.

3.8.2 체중변화
체중은 입수시, 군분리시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 7 일 및 14 일째에 측정하였다.

3.8.3 부검 소견
투여 후 14 일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 후, 부검하여 육안으로 장기를 검사하였다.

4. 자료의 보관 (Archives)

시험기간중에 작성된 모든 기록에 관해서는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소에서 최종보고서 발급 후 5 년간 보관한다. 보관기간 이후의 시험기초자료 및 시험물질의 보관에 관하여는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다. 기록의 보관장소는 자료보관실 (Ⅰ), (Ⅱ)로 하여 보관될 주된 시험기초자료는 다음과 같다.

(1) 시험계획서에 관한 기록
(2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
(3) 시험계에 관한 기록 및 자료
(4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
(5) 시험의뢰자와의 송수신 기록 (필요 시)
(6) 최종보고서에 관한 기록

5. 시험계획서의 수정 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan)

시험기간 동안 시험계획서에 대한 수정 및 이탈사항은 없었다.

6. 결과 (Results)

6.1 사망률 및 일반증상 (Table 1, 2 and Appendix 1)
실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.

6.2 체중변화 (Table 3, Appendix 2)
생존동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 보였다.

6.3 부검소견 (Table 4, Appendix 3)
모든 개체의 주요장기에 대한 육안적 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상 소견이 관찰된 동물은 없었다.

7. 고찰 및 결론 (Discussion & conclusion)

효소전환된 오디추출물에 대한 급성 경구투여 독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 랫드를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg B.W. (1st - 2nd step)와 2000 mg/kg B.W. (3rd - 4th step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 관찰하였다.

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 생존동물에 대한 체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 생존동물의 부검 소견 결과, 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 효소전환된 오디추출물은 화학물질 분류 및 표지에 관한 세계조화시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5 (2000 mg/kg body weight < LD_{50} < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

8. 참고문헌 (References)

- 농촌진흥청 고시 제2012-14 호 (2012-02-07) "농약 등의 시험연구기관 지정 및 관리기준"

- 농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준", [별표 12] 인축 독성 시험 기준과 방법, 12-1-20 급성경구독성시험 : 급성독성등급법

- OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 423 "Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method" (December 17, 2001)

- OECD Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)

9. Tables (Group summary)

Table 1 . Mortality

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Mortality
		Female
1st step	300	0 % (0 / 3)[a]
2nd step	300	0 % (0 / 3)
3rd step	2000	0 % (0 / 3)
4th step	2000	0 % (0 / 3)

[a] : Number of dead animals / Number of tested animals

Table 2 . Clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs
1st step	300	Female	3	Normal
2nd step	300	Female	3	Normal
3rd step	2000	Female	3	Normal
4th step	2000	Female	3	Normal

Table 3. Body weight

Unit : g

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Days after administration		
				0	7	14
1st step	300	Female	Mean	206.8	248.7	266.4
			S.D.	4.6	14.4	16.7
			N	3	3	3
2nd step	300	Female	Mean	206.9	252.6	261.7
			S.D.	9.1	9.0	8.8
			N	3	3	3
3rd step	2000	Female	Mean	226.1	261.1	273.3
			S.D.	3.0	7.6	10.8
			N	3	3	3
4th step	2000	Female	Mean	223.6	259.8	270.1
			S.D.	10.3	13.7	15.1
			N	3	3	3

S.D. : Standard deviation, N : Number of animals

Table 4. Necropsy findings

Findings		1st step (300 mg/kg B.W.)	2nd step (300 mg/kg B.W.)	3rd step (2000 mg/kg B.W.)	4th step (2000 mg/kg B.W.)
		Female	Female	Female	Female
Number of animals		3	3	3	3
Gross findings	No gross findings	3	3	3	3
Internal findings	No gross findings	3	3	3	3

10. Appendices (individual data)

Appendix 1. Clinical signs of female rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Hours after administration					Days after administration			
			30min	1 h	2 h	3 h	4 h	1	2	3	4
1st step	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2nd step	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3rd step	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4th step	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 1. (Continued) Clinical signs of female rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration									
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1st step	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2nd step	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3rd step	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4th step	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 2. Body weight of female rats

Unit : g

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration		
			0	7	14
1st step	300	2101	206.4	235.7	253.8
		2102	202.4	246.2	260.1
		2103	211.5	264.1	285.4
		Mean	206.8	248.7	266.4
		S.D.	4.6	14.4	16.7
2nd step	300	2201	217.1	262.1	268.5
		2202	199.6	244.1	251.8
		2203	203.9	251.6	264.9
		Mean	206.9	252.6	261.7
		S.D.	9.1	9.0	8.8
3rd step	2000	2301	225.8	263.5	265.9
		2302	223.2	252.6	268.3
		2303	229.2	267.2	285.7
		Mean	226.1	261.1	273.3
		S.D.	3.0	7.6	10.8
4th step	2000	2401	219.0	256.0	260.7
		2402	235.4	275.0	287.5
		2403	216.3	248.4	262.1
		Mean	223.6	259.8	270.1
		S.D.	10.3	13.7	15.1

S.D. : Standard deviation

Appendix 3. Necropsy findings of female rats

Animal Number : 2101	Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2102	Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2103	Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2201	Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2202	Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2203	Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2301	Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2302	Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2303	Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2401	Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2402	Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	
Animal Number : 2403	Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings	

11. Annexes

Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor)

시 험 물 질 관 련 정 보 기 록 지

KTR-APM-001-F01-1

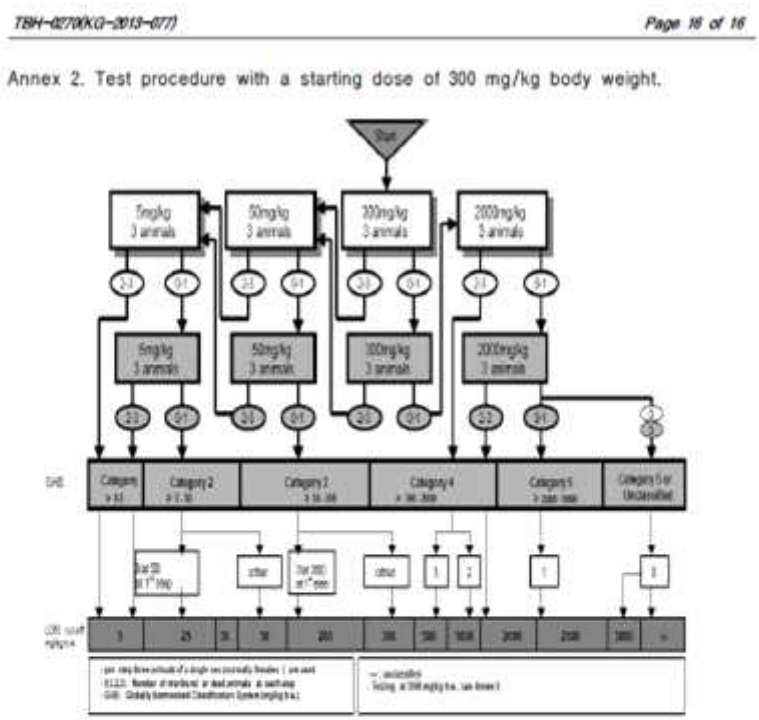


그림 2. 효소전환된 오디추출물 (Mulberry derivative, MD)의 SD 랫드에 대한 급성 경구투여 독성시험결과

■ 마우스 모델에서 유도체 후보물질처리에 의한 면역세포 활성기능 증진방법 확립

1) 효소전환된 오디추출물(MD)에 의해 조절되는 항암 조절인자 탐색

- 최종 후보물질인 P450 효소로 전환된 오디추출물에 의해 항암관련 유전자들 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, C57BL/6 10주령 된 마우스에 효소비전환된 오디추출물(M)과 효소전환된 오디추출물(MD)을 각각 20mg/Kg의 농도로 28일간 매일 경구투여를 함. 그 후 마우스를 희생시켜 각 장기에서 항암 관련 유전자들의 발현을 확인함. 그 결과, 림프절(lymph node, LN)과 비장(spleen)모두에서 세포독성 T 세포(cytotoxic T lymphocytes, CTL)와 자연살해세포(Natural killer cells, NK)에서 암세포를 killing하는데 관여하는 단백질 분해효소(protease)인 Granzyme B의 발현이 효소비전환된 오디추출물(M)을 투여한 마우스 보다 효소전환된 오디추출물(MD)을 경구 투여한 마우스에서 증가된 것을 확인함. 뿐만 아니라, 세포사멸을 유도하여 종양형성(tumorigenesis)을 억제하는데 관여하는 cytokine인 TNF-a (Tumor necrosis facor-a)의 발현도 효소전환된 오디추출물을 투여한 마우스의 림프절과 비장에서 증가되는 것을 확인함. 따라서 P450효소로 전환된 오디추출물(MD)이 효소비전환된 오디추출물(M)보다 항암 조절에 관련된 인자인 Granzyme B와 TNF-a 발현 증가를 확인함 (그림 3).

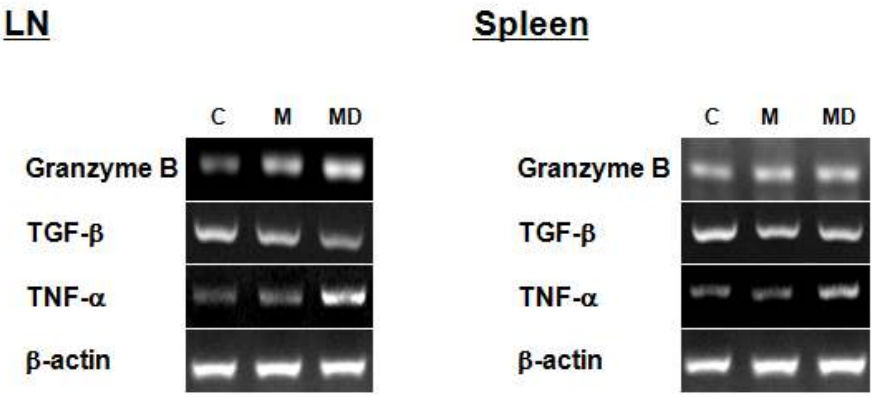


그림 3. 마우스모델에서 효소전환된 오디추출물(MD)에 의한 항암조절인자들의 유전자발현 감소

2) 효소전환된 오디추출물(MD)에 의해 조절되는 항염 조절인자 탐색

- 마우스 모델에서 효소전환된 오디추출물(MD) 처리에 의한 염증관련 조절인자들의 발현은 어떠한지 조사하기 위해 효소전환된 오디추출물과 효소비전환 오디추출물을 마우스에 경구 투여한 후 림프절과 비장세포에서 염증유발 및 억제 유전자들의 발현을 확인함. 염증유도(Pro-inflammatory) cytokine으로 알려진 IL(Interleukin, 인터루킨)-1b, IL-6, IL-17과 Pro-inflammatory 효소인 cox-2(cyclooxygenase)의 발현을 대조군(control)과, M, MD를 투여한 각각의 군에서 확인함. IL-1b과IL-6의 발현이 MD를 처리한 마우스 두 장기 모두에서 감소하는 것을 확인하였으며 cox-2의 발현도 림프절에서 많이 감소한 것을 확인함. 반면, 염증억제(anti-inflammatory) cytokine으로 잘 알려진 IL-10의 유전자 발현은 두 장기 모두 대조군에 비해 M과 MD를 처리한 군에서 모두 증가 하였으며 P450의 유도체인 MD가 IL-10의 발현이 더 많이 증가되는 것을 확인함. 이는 P450 효소로 전환시킨 오디 유도체가 효소비전환 오디 유도체보다 항염증 효과가 더 클 것으로 사료됨 (그림 4).

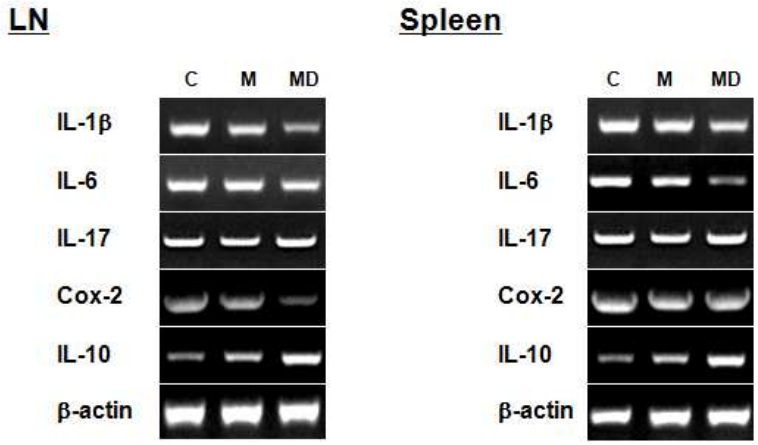


그림 4. 마우스모델에서 효소전환된 오디추출물(MD)에 의한 항염조절인자들의 유전자발현 증가

3) 효소전환된 오디추출물(MD)의 면역세포 활성 증진 연구

- 효소전환된 오디추출물에 의한 면역세포의 활성 증진 연구를 위해 유세포 분석기(flow cytometry)를 통한 활성화된 면역세포의 population을 확인함. Control과 M, MD를 경구 투여한 마우스모델의 흉선(Thymus)세포를 분리하여 면역세포의 활성 단백질로 알려진 CD69 또는 CD25의 발현을 확인함. 그 결과 활성화된 CD4 T 세포인 $CD4^{+}CD69^{+}$ population이 MD를 투여한 마우스에서 가장 많이 증가된 것을 확인하였고 활성화된 CD8 T세포($CD8^{+}CD69^{+}$)의 발현도 약간 증가된 것을 확인함 (그림 5). P450을 이용한 효소전환된 오디추출물 처리에 의해 면역세포 활성이 증진됨을 알 수 있었음.

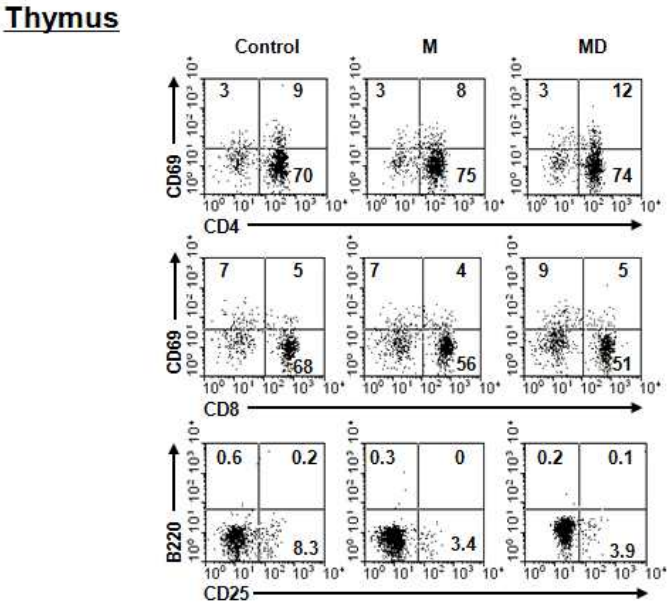


그림 5. 마우스 모델에서 효소전환된 오디추출물에 의한 면역세포 활성 증진

4) 마우스 모델에서 효소전환된 오디추출물(MD)에 의한 면역세포 침윤 및 이동 능력 증진 연구

- 암세포제거 또는 염증완화하기 위해 다른 면역세포들을 recruitment하는데 이때 chemokine이 target 부위로 면역세포 침윤 및 이동에 관여함. 효소전환된 오디추출물에 의한 면역세포의 침윤 및 이동능력을 확인하기 위해 chemokine들의 발현을 확인하였음. M과 MD를 먹인 마우스의 림프절과 비장세포에서 유전자 발현을 확인한 결과 Plasma B 세포와 Macrophage에서 분비하는 CCL17의 발현이 림프절에서 MD를 먹인 마우스에서 가장 많이 증가하였으며 B 세포와 T follicular helper 세포에서 발현하는 CXCR5 chemokine 수용체의 발현이 M과 MD모두에서 증가됨 (그림 6). 또한, 비장세포를 이용하여 migration과 invasion assay를 수행한 결과 control에 비해 M과 MD의 면역세포 침윤 및 이동 능력이 증가 된 것을 확인 할 수 있었고 특히, MD를 먹인 마우스의 비장세포가 침윤과 이동능력이 좀 더 향상된 것을 확인할 수 있었음 (그림 7).

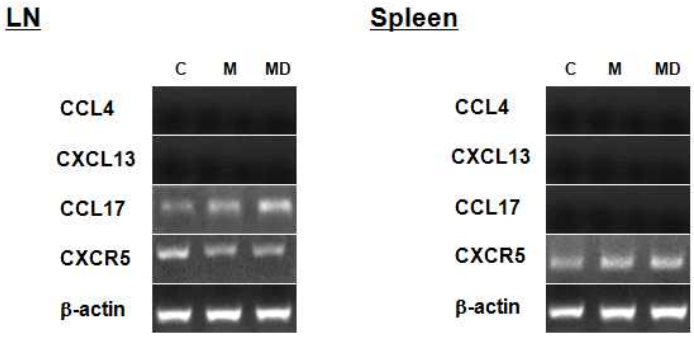


그림 6. 마우스모델에서 효소전환된 오디추출물(MD)에 의한 chemokine의 발현

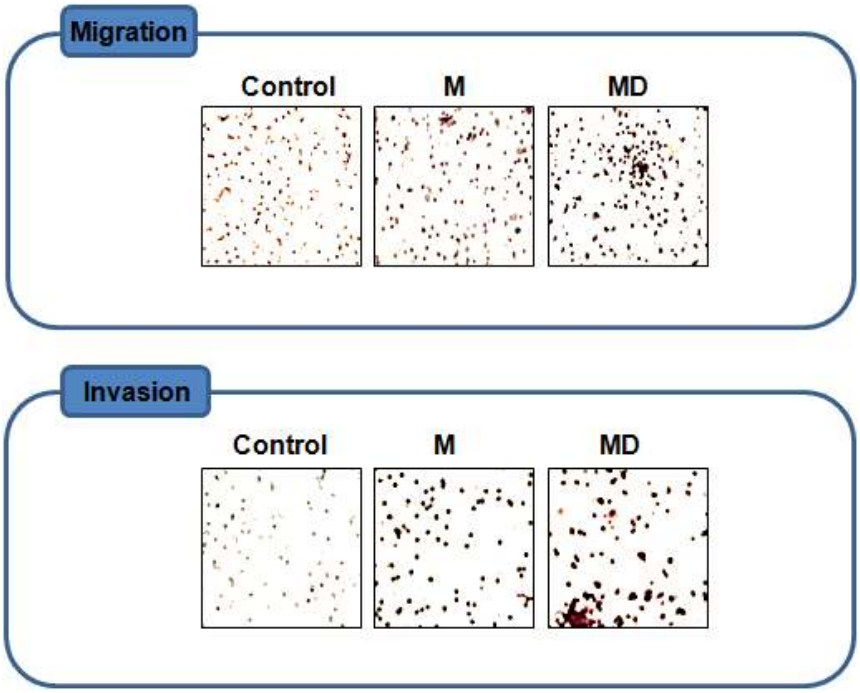


그림 7. 효소전환된 오디추출물(MD)에 의한 면역세포의 침윤 및 이동 능력 증가

5) 효소전환된 오디추출물(MD)처리에 의한 면역세포 독성능 증진

- 효소전환된 오디추출물(MD)처리에 의한 면역세포의 암세포 killing 능력 증진 효과를 확인하기 위하여 lactate dehydrogenase (LDH)를 이용한 자연살해세포 (NK cell) cytotoxicity assay를 수행함. M또는 MD를 먹인 각각의 마우스의 비장세포를 분리 한 후 IL-2를 처리하여 자연살해세포를 하루 동안 활성화 시킨 뒤 암세포 주와 공동배양 시켜 자연살해세포에 의해 살상된 암세포주의 LDH 분비 양을 통해 암세포 살상능력을 측정함. 그 결과, MD를 먹인 마우스의 자연살해세포의 암세포 살상능력이 증가된 것을 확인하였음 (그림 8).

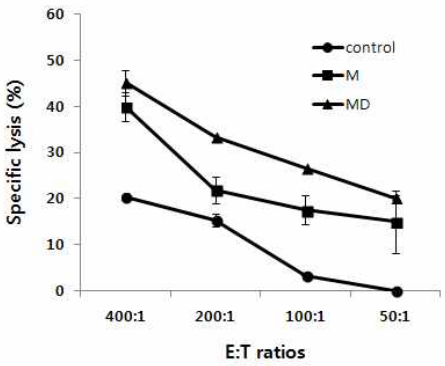


그림 8. 효소전환된 오디추출물(MD)에 의한 자연살해세포의 암세포 살상능 증가

■ 암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체에 의한 면역세포 활성조절 탐색

1) 암 질환 모델에서 효소전환된 오디유도체에 의한 암 형성 진행 측정

- 흑색종(Melanoma)세포 주를 이용한 암 질환 모델에서 M과 MD에 의한 암 진행정도를 측정하기 위하여 일주일간 M과 MD를 C57BL/6 마우스에 일주일간 전 처리 후 650rad로 감마선 조사(gamma irradiation)를 수행한 후 $5X10^5$개의 흑색종을 피부에 주입하여 3주 동안 종양의 크기와 마우스의 생존율을 확인 함. 종양의 크기를 0-21동안 측정한 결과 MD의 성장속도가 가장 느렸으며 종양을 분리했을 때에도 MD의 크기가 가장 작은 것을 확인함 (그림 9A, 9B) 마우스의 생존율을 23일 동안 관찰한 결과 MD를 먹인 마우스의 생존율이 증가되는 것을 확인함 (그림 9C). 이와 같은 결과들을 통해 효소전환된 오디유도체에 의해 항암효과가 있다는 것을 확인함.

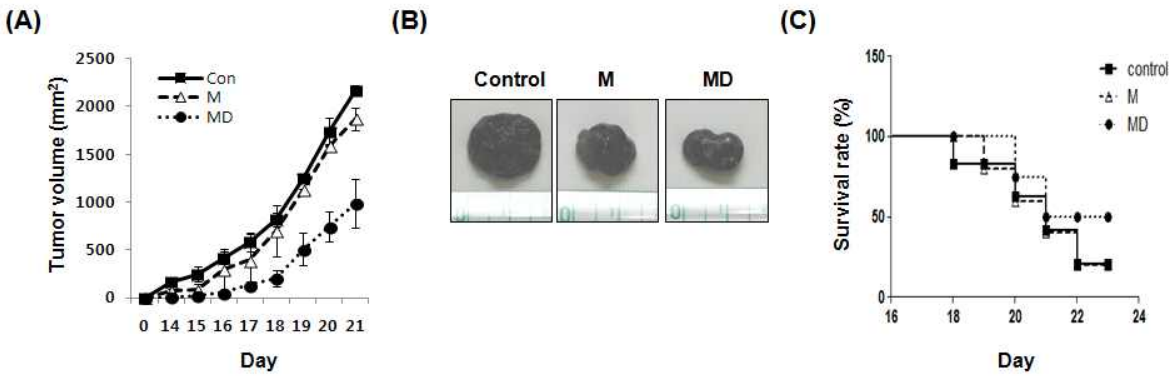


그림 9. 효소전환된 오디추출물에 의한 암 형성 진행 억제

2) 암 질환 모델에서 효소전환된 오디추출물에 의한 암 세포주기 변화

- 암 질환 모델의 종양조직에서 효소전환된 오디추출물에 의한 세포주기 변화를 관찰하기 위해 세포주기와 관련된 유전자의 발현과 유세포 분석기를 통한 cell cycle analysis를 실행함. Cell cycle을 정지 시키는 대표적인 유전자들 중의 하나인 P21의 유전자의 발현이 MD를 먹인 암 모델 마우스에서 증가되는 것을 확인함 (그림 10A). Cell cycle analysis를 통해

서도 MD를 처리했을 때 S기(synthesis phase)가 control과 M에 비해 약 10%감소되는 것을 확인함 (그림 10B).

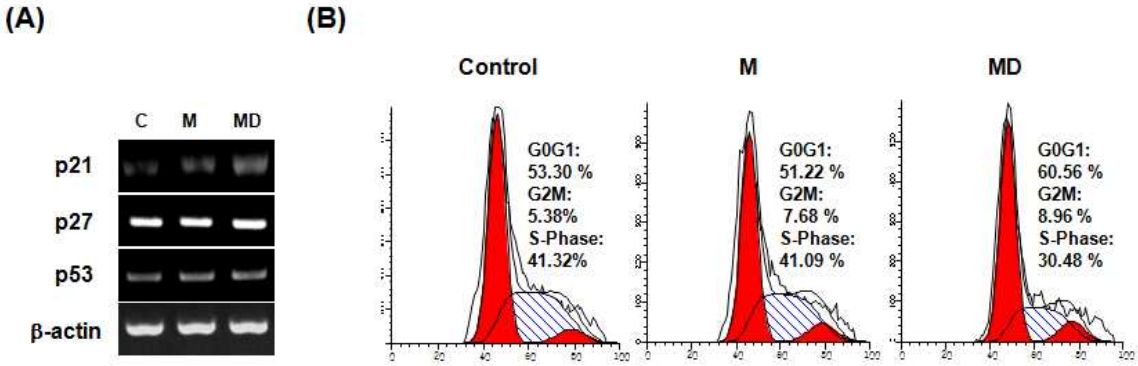


그림 10. 효소전환된 오디추추물에 의해 암세포 주기 억제

3) 암 질환 마우스 모델에서 효소전환된 오디유도체에 의한 세포사멸

- 마우스 암 모델에서 분리한 종양조직으로부터 효소전환된 오디추출물에 의한 암세포 사멸(apoptosis)이 조절되는지 확인해보기 위해 세포사멸과 연관된 유전자 발현 및 apoptosis assay를 유세포 분석기를 이용하여 확인함. 그 결과, 세포사멸신호전달에 관여하는 caspase-8과 caspage-9이 약간 감소하는 경향을 보였지만 크게 차이는 없었으며 anti-apoptosis에 관여하는 Bcl-2유전자 발현이 M과 MD에 의해 현저히 감소하는 것을 확인함. 이 중 MD에 의해 Bcl-2의 발현이 더 감소하는 것을 확인 하였고 (그림 11A) apoptosis assay결과에서도 MD에 의한 암세포 사멸이 가장 많이 증가하는 것을 확인함 (그림 11B).

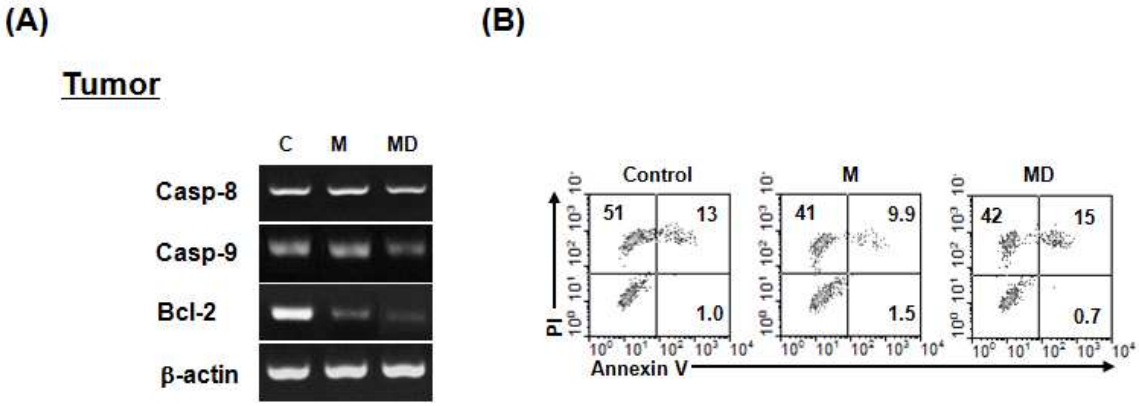


그림 11. 효소전환된 오디추출물에 의한 암세포 사멸 증가

4) 암 질환 모델에서 효소전환된 오디추출물에 의한 암 전이 측정

- 암 질환 마우스 모델에서 효소전환된 오디추출물에 의한 암 전이 효능을 확인하기 위해 암 세포 전이와 관련된 유전자들의 발현과 invasion/migration assay를 암세포에서 수행함. 흑색종의 마커인 MART-1과 gp100의 유전자 발현이 MD에 의해 감소되는 것을 확인하였으며 전이와 관련된 MMP-2(matrix metalloproteinase-2)와 MMP-9의 유전자 발현이 MD에 의해 감소됨을 확인하였으며 (그림 12A), 암세포주의 침윤과 이동능력이 MD에 의해 감소

됨 (그림 12B). MD가 암 전이를 억제한다는 것을 위의 결과를 통해 확인할 수 있었음.

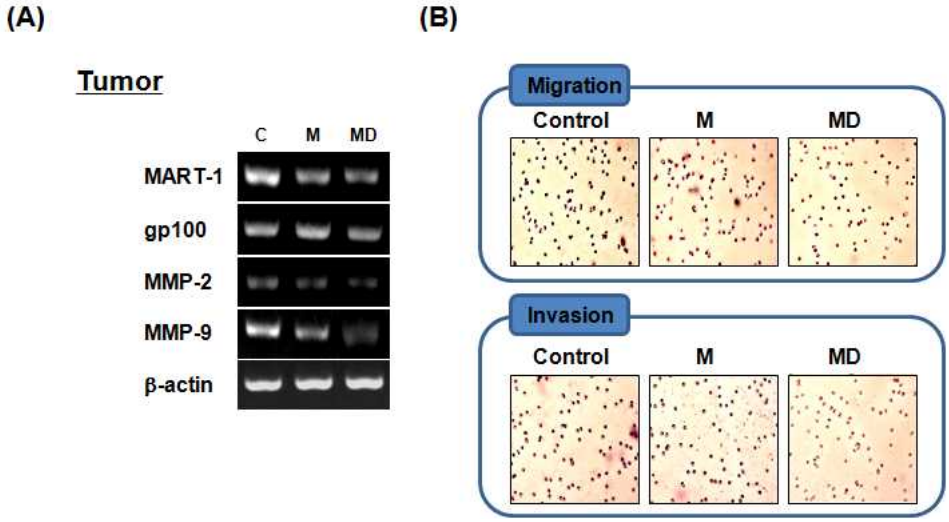


그림 12. 효소전환된 오디추출물에 의한 암 전이 감소

5) 암 모델에서 효소전환된 오디추출물에 의한 면역세포의 침윤 및 이동 능력 탐색

- 암 모델에서 효소전환된 오디추출물에 의한 면역세포의 침윤 및 이동능력을 탐색하기 위해 control, M, MD를 경구 투여한 각각의 군들의 비장세포를 이용하여 migration과 invasion assay를 수행함. Trans well 상층 부위에 effector cell인 비장세포를 분주하였으며, target cell로 하층 부위에 암 세포주를 분주하였음. Migration 실험결과 MD에서 많은 면역세포들의 이동이 증가되는 것을 확인하였으며, invasion실험결과는 MD에서 침윤능력이 약하게 증가되는 것을 확인할 수 있었음(그림 13A). 또한, control, M, MD를 투여한 암 모델에서 종양으로 이동한 면역세포(Tumor infiltration cell, TIL)의 population을 확인한 결과 MD 처리에 의해 T면역세포의 population이 약간 감소하지만 자연살해세포와 DC(CD11c)의 population이 증가함. 이를 통해 면역세포들의 암세포로 이동능력이 증가되었음을 확인함 (그림 13B).

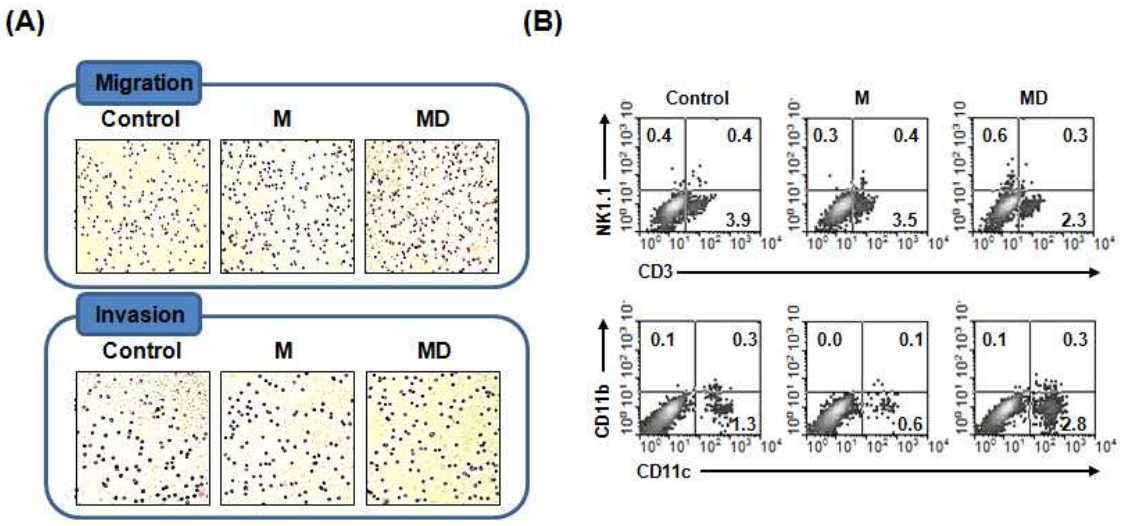


그림 13. 암 모델에서 효소전환된 오디추출물에 의한 면역세포 침윤 및 이동 능 증가

4) 암 모델에서 효소전환된 오디추출물에 의한 면역세포의 암세포 살상능

- 암 모델에서의 효소전환된 오디추출물에 의한 면역세포의 암세포 살상능을 확인 하기위해 각 장기별로 세포를 분리 후 암세포를 killing하는데 관여하는 유전자들의 발현을 확인함. 암 세포의 사멸을 일으키는 요소로 TRAIL, FAS-L, Granzyme, Perforin, IFN-g등이 알려져 있는데 림프절, 흉선(Thymus), 비장세포에서 모두 TRAIL의 발현이 MD에 의해 증가된 것을 관찰할 수 있었으며, 림프절과, 비장세포에서 Fas-L의 발현이 증가 되었으며 흉선과 비장에서 GranzymeB와 IFN-g의 유전자 발현이 MD처리에 의해 증가된 것을 확인함 (그림 14A). 이러한 유전자 조절뿐만 아니라 직접적인 암세포 killing능력 또한 증가되는지 확인하기 위해 control, M, MD의 비장세포에서 분리한 CTL (cytotoxicity T cell)과 자연살해세포를 암세포와 공동배양 후 CTL과 자연살해세포의 암세포 살상능력을 비교분석함. 그 결과, CTL과 자연살해포 모두 MD를 처리한 암 모델 마우스에서 암세포 살상능력이 증가되는 것을 관찰함 (그림 14B, 14C).

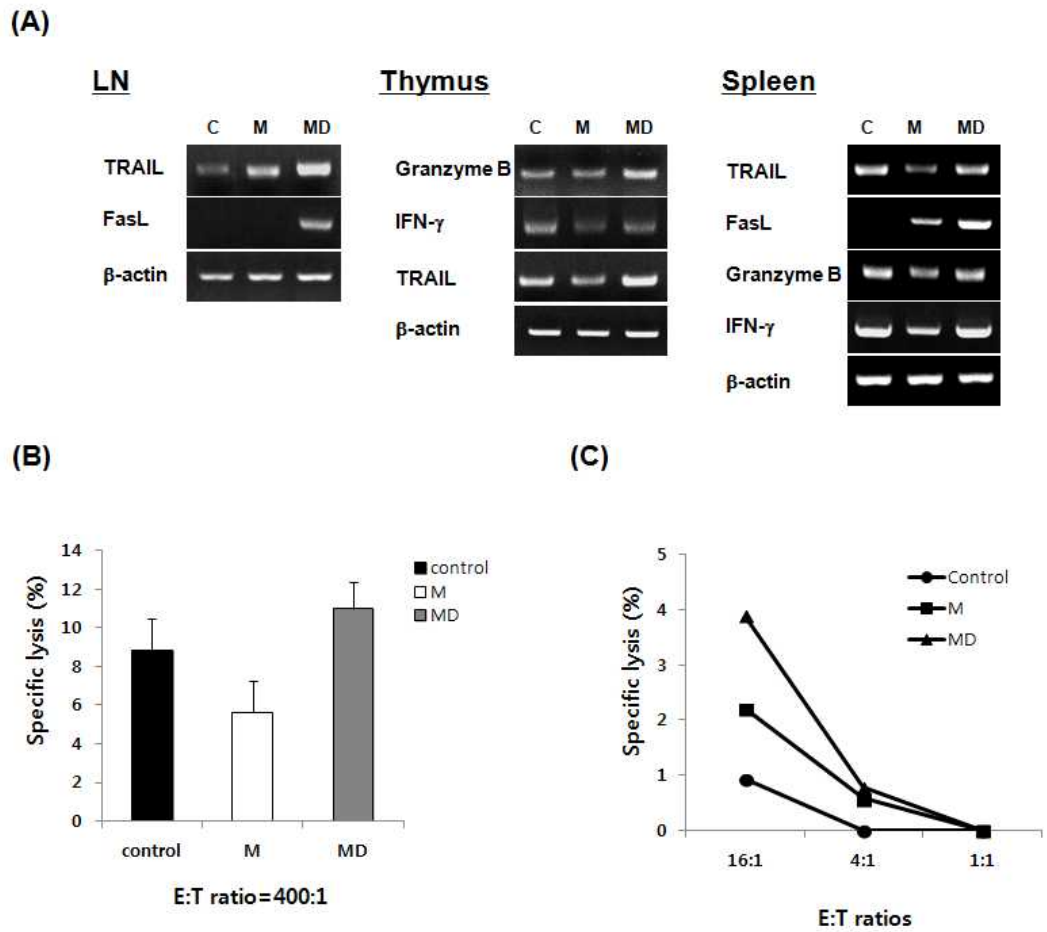
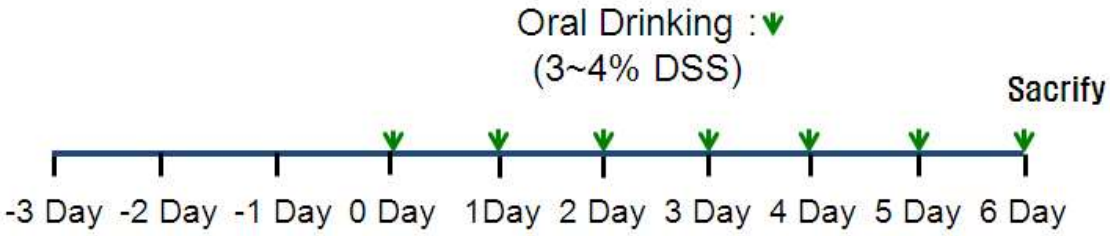


그림 14. 암 모델에서 효소전환된 오디추출물에 의한 암세포 살상능력 증가

■ 마우스 점막자가면역질환 모델에서 면역조절 활성 및 효능 확인



- P450 효소를 이용한 효소전환오디추출물의 점막자가면역질환(Inflammatory Bowel Disease, IBD)마우스모델에서 면역조절 활성 및 효능을 확인하기 위해 6주령 된 C57BL/6 마우스를 총 3.5%의 dextran sulfate sodium (DSS)를 7일 동안 자유롭게 먹이게 하여 점막자가면역질환을 유도하였음. 효소비전환오디추출물(M)과 효소전환오디추출물(MD)는 몸무게에게 비례하게 10 mg/kg농도로 3일전처리를 해서 총 9일 동안 경구투여를 함.

1) 효소전환된 오디추출물의 마우스 점막자가면역질환에서 미치는 영향

- 마우스에 DSS를 이용하여 점막자가면역질환을 유도하면 대장의 조직특이적인 염증이 유도되는데, 그에 따라 대장의 길이가 감소하고, 체중감소, 점액혈성 설사 등의 주요증상이 일어남. 이때에 효소전환오디추출물(MD)이 점막자가면역질환을 완화시킬 수 있는지 조사함. 마우스에 DSS를 이용하여 점막자가면역질환을 유도하게 되면 체중감소 및 대장의 길이가 감소하게 되어 병의 발병정도를 짐작할 수 있음. 체중은 DSS를 투여를 할 때부터 매일 같은 시간에 측정되었고 대장의 길이는 6일째 쥐를 희생한 후 대장을 적출하여, 충수돌기와 대장접합부부터 직장상부까지의 길이를 측정함. 질병활성지표(disease activity index, DAI)는 체중감소, 점액혈성 설사, 대장 길이의 감소 등의 임상증상을 통해 평가되는데 체중 감소량은 매일 같은 시간에 측정을 하였고, 설사는 매일 액상 대변물질이 있는가를 확인함. 직장출혈은 뚜렷한 혈성 설사와 심한 직장출혈이 있는 경우에 구분해서 점수가 부여됨.

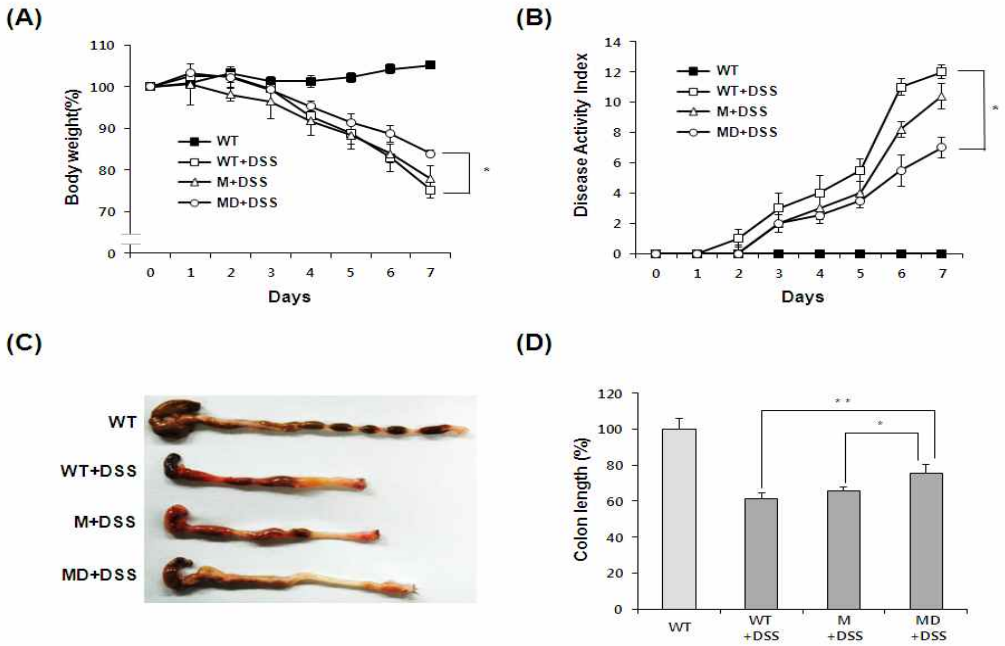


그림 15. IBD 마우스 모델에서 효소전환오디추출물의 몸무게, 장 길이 감소 완화

- 그 결과, DSS를 처리한 그룹(WT+DSS, M+DSS, MD+DSS)에서는 2일째부터 몸무게가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, M+DSS, DSS만 처리한 대조군 둘의 그룹간의 차이는 유의성이 보이지 않았지만 MD+DSS를 처리한 그룹에서는 DSS만 처리한 대조군에 비해서 몸무게가 덜 감소하는 것을 확인할 수 있었음 (그림. 15A). 또한 점막자가면역질환의 세 가지 질병질환지표인 체중감소, 설사의 정도, 혈변의 정도를 측정하여 질병활성지표(Disease Activity Index, DAI)를 보았을 때 DSS만을 처리한 대조군에 비해 DAI가 M+DSS, MD+DSS를 처리한 그룹에서 감소된 것을 확인하였고 M+DSS보다 MD+DSS를 처리한 그룹에서 질병활성지표가 더 감소되는 것을 확인할 수 있었음 (그림. 15B). 내과적으로 마우스 점막자가면역질환 모델에서 M, MD가 어떤 영향을 미쳤는지 확인하기 위해 DSS를 7일째 처리하였을 때의 장 길이를 확인함. 그 결과 MD+DSS를 처리한 그룹에서는 다른 두 그룹 간보다는 장 길이가 유의성 있게 덜 감소한 것을 확인할 수 있음 (그림. 15C, 15D).

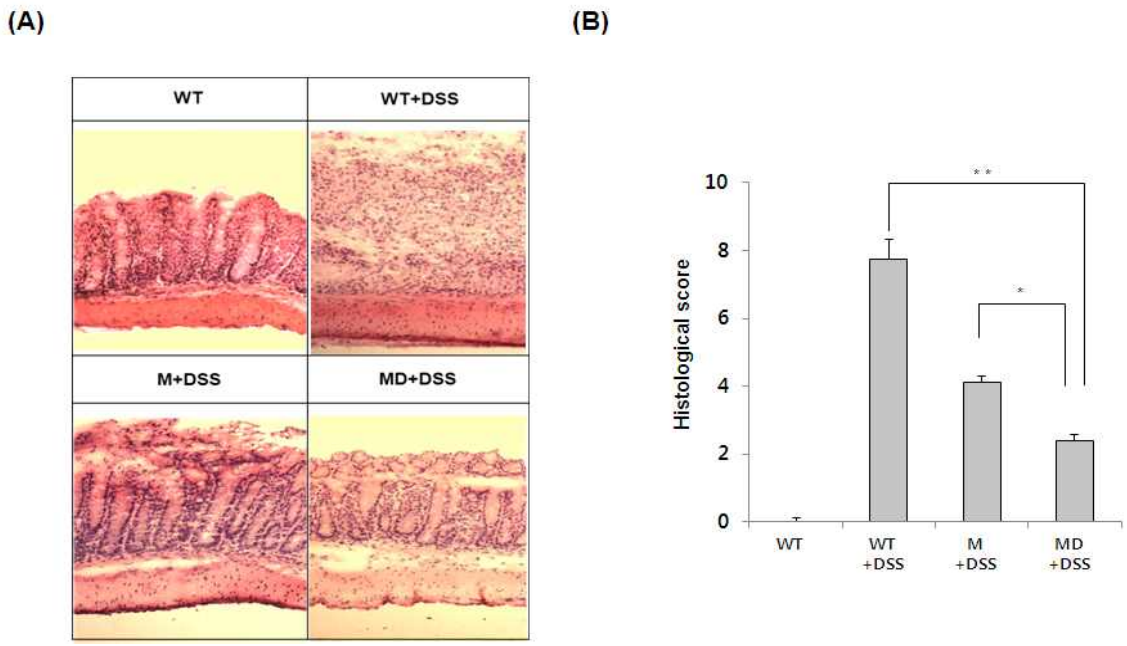


그림 16. IBD 마우스 모델에서 효소전환오디추출물의 대장 점막조직의 손상 완화

- DSS로 유발된 점막자가면역질환에서 효소전환오디추출물의 대장 점막조직 손상에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하기 위해, Hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 함. DSS를 처리하지 않은 WT의 대장 조직은 융털간의 경계, 결합조직과 융털간의 명확한 경계 그리고 일반적인 면역세포의 수 등 잘 보존되어 있는 것을 볼 수 있었음. DSS만을 처리한 대조군에서는 융털모양이 나타나지 않았고 세포간의 경계도 많이 허물어지는 것을 관찰함. 하지만 M+DSS와 MD+DSS 그룹에서는 융털의 경계가 그래도 모양을 유지하는 것을 관찰했으며, M+DSS 그룹에서 끝의 융털모양이 허물어지는 것에 반해 MD+DSS그룹에서는 M+DSS 그룹보다 더 온전히 보존되어 있는 것을 관찰함 (그림. 16A). 그리고 이러한 상태를 조직학점

점수(Histological score)를 기준으로 측정하였을 때 M+DSS 처리군 보다 MD+DSS 처리군이 DSS에 의한 대장 점막조직 손상을 완화한다는 것을 알게 됨 (그림. 16B). 이러한 결과들을 종합하여 보면 효소전환오디추출물이 DSS로 유도된 점막자가면역질환을 완화시킨다는 것을 알 수 있음.

2) 마우스 점막자가면역질환 모델에서 효소전환오디추출물의 체액성, 세포매개면역 및 점막면역기능의 활성 조절

IBD 발병이 일어난 마우스 모델에서는 대장특이적인 대식세포를 비롯한 여러 면역세포들과 체액성면역세포(B cell)나 세포매개면역세포(T cell)가 과하게 활성화되면 비정상적인 염증반응이 일어나게 됨. 이 때에 효소전환오디추출물이 면역세포활성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 장간막림프절(MLN)과 대장에서 활성화된 B cell과 T cell의 population을 분석함.

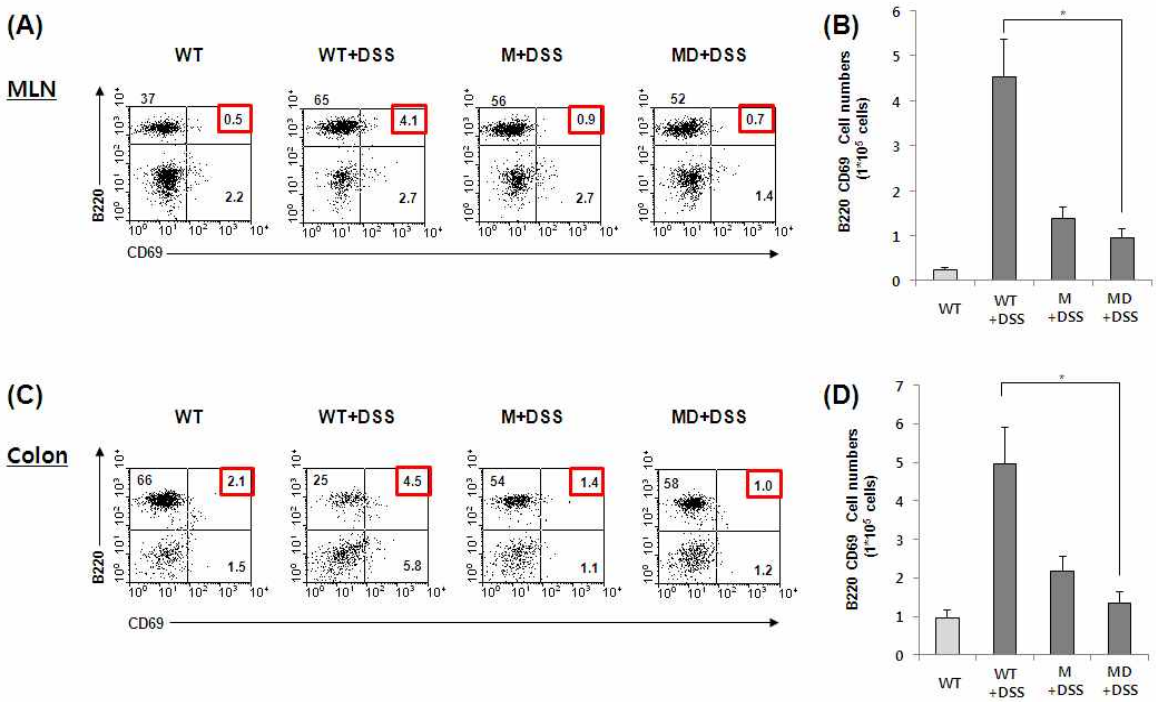


그림 17. IBD 마우스 모델에서 효소전환오디추출물에 의한 체액성면역세포활성 조절

- 그 결과, MLN에서 DSS만을 처리한 대조군 마우스 모델에서의 B cell이 활성이 많이 유도된 것을 확인 할 수 있었고, M, MD를 처리한 군을 B cell의 활성이 감소 된 것을 확인 할 수 있었음 (그림 17A, 17B). Colon에서도 DSS가 유도되었을 때 B cell 활성이 증가하였지만 M, MD를 처리하였을 때 B cell 활성을 감소 시켰고, M보다 MD가 좀 더 체액성면역세포 활성 조절능이 뛰어나다는 것을 알 수 있었음 (그림 17C, 17D). 한편 IBD모델을 유도시킨 후의 마우스 모델에서 B cell이 MLN에서 많이 증가되었고, Colon에서는 많이 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 Colon의 이동관련 molecule등이 DSS에 의해 많이 손실되어 B cell의 이동능이 많이 감소된 것으로 예상 됨.

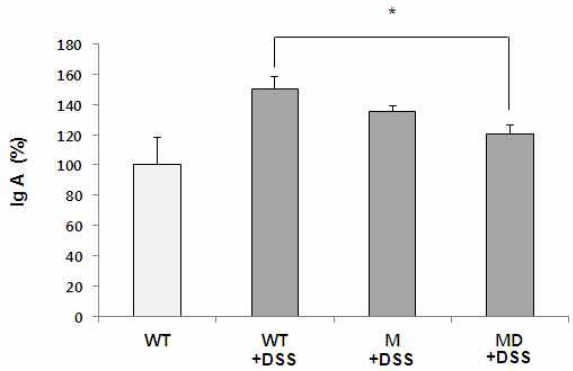


그림 18. IBD 마우스 모델에서 효소전환오디추출물에 의한 IgA의 감소

- 이러한 효소전환오디추출물의 B cell의 체액성면역활성 감소를 점막면역 지표인 IgA를 측정한 결과, 증가된 WT+DSS그룹의 IgA에 비해 MD+DSS그룹의 IgA가 유의성있게 감소되는 것을 확인할 수 있었음 (그림 18).

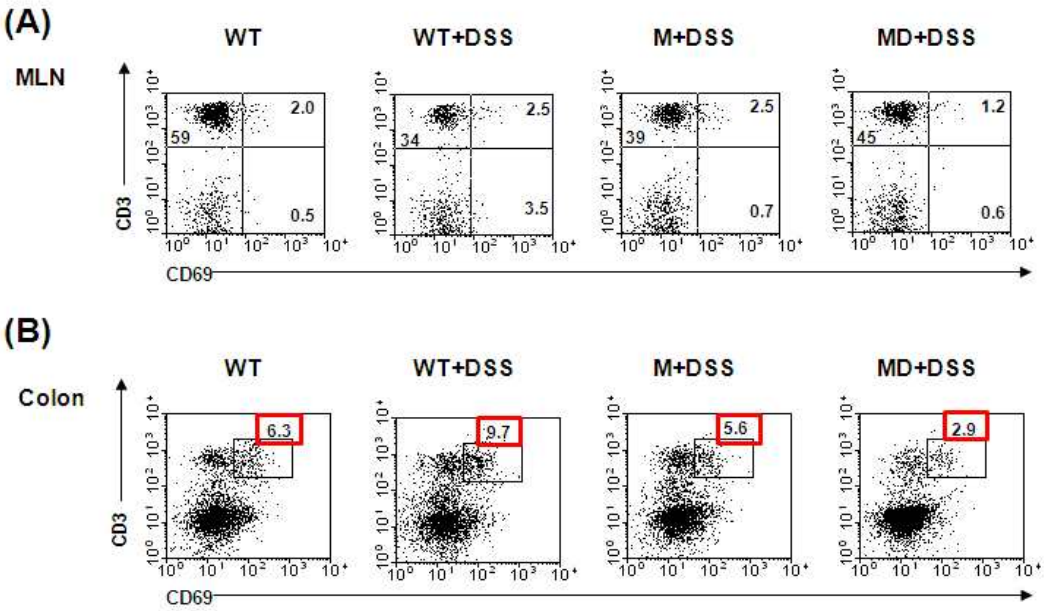


그림 19. IBD 마우스 모델에서 효소전환오디추출물에 의한 세포매개면역활성 조절

- 대표적인 세포매개면역에 관련하는 T 세포 또한 B 세포와 유사하게 Colon에서 DSS에 의해 세포성매개면역 활성이 증가되는 것을 관찰할 수 있었음. 추가적으로 M과 MD를 처리한 그룹에서는 증가된 세포매개 면역 활성이 다시 감소되는 것을 확인할 수 있었음 (그림 19B). 하지만 MLN에서는 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었음 (그림 19B).

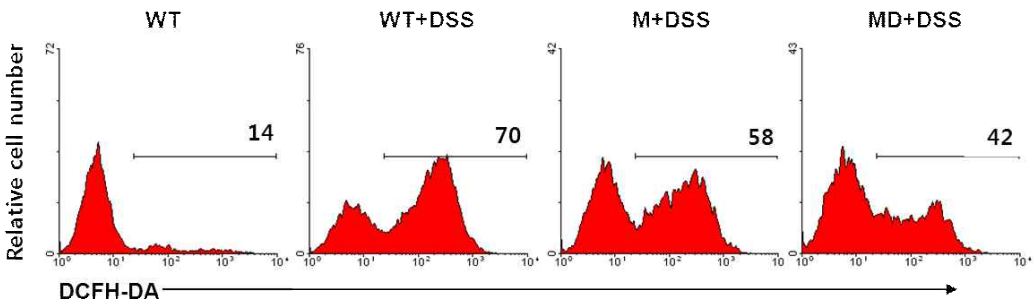


그림 20. IBD 마우스 모델에서 효소전환오디추출물에 의한 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 감소

- 활성산소종(ROS)는 보통 세포매개면역세포 중 하나인 대식세포에서 주로 분비하는 물질로서 암세포 및 외부생물에 대한 방어기작으로 분비한다고 알려져 있음. 점막자가면역질환이 발생하게 되면 대장조직에 대식세포가 침투를 하게 되어 활성산소를 생산해 염증반응을 더욱 심화시킨다고 알려져 있음. DSS에 의해 일어난 점막자가면역질환에서 효소전환오디추출물이 대장조직세포에서 활성산소생성에 영향을 미치는지 알아보기 위해 Colon을 콜라제나아제Ⅳ(collagenase Ⅳ)를 1 mg/ml 처리한 후 37℃ 교반기에 15분 250 rpm으로 세포를 분리함. 그리고 활성산소 positive 세포를 보기위해 세포내에 활성산소와 반응해서 형광물질을 내는 DCFH-DA 시약을 이용하여 5x105 세포를 37℃에서 15분간 반응시키고 염색 완충용액 (1% FBS, 0.01% NaN3가 포함된 PBS, pH 7.4)로 2회 세척한 후 활성산소의 발현을 유세포분석기로 분석함. 그 결과, DSS에 의해 유도된 염증성장질환에서 활성산소가 많이 증가된 것을 확인할 수 있었고, 효소비전환 오디추출물(M)은 약간이나마 감소된 것을 확인을 하였고, P450을 이용한 효소전환 오디추출물(MD)이 염증성 장질환에서 유도되는 활성산소를 많이 감소시키는 것을 확인할 수 있었음 (그림 20).
- 이러한 결과들을 비추어보면 점막자가면역질환이 일어났을 때, 과도한 체액성 및 세포매개면역활성이 일어났고, 이러한 면역활성을 효소전환오디추출물이 면역 활성을 낮추게 한다는 것을 알 수 있었음.

3) 마우스 점막자가면역질환 모델에서 효소전환오디추출물의 조절 T세포 증식 조절

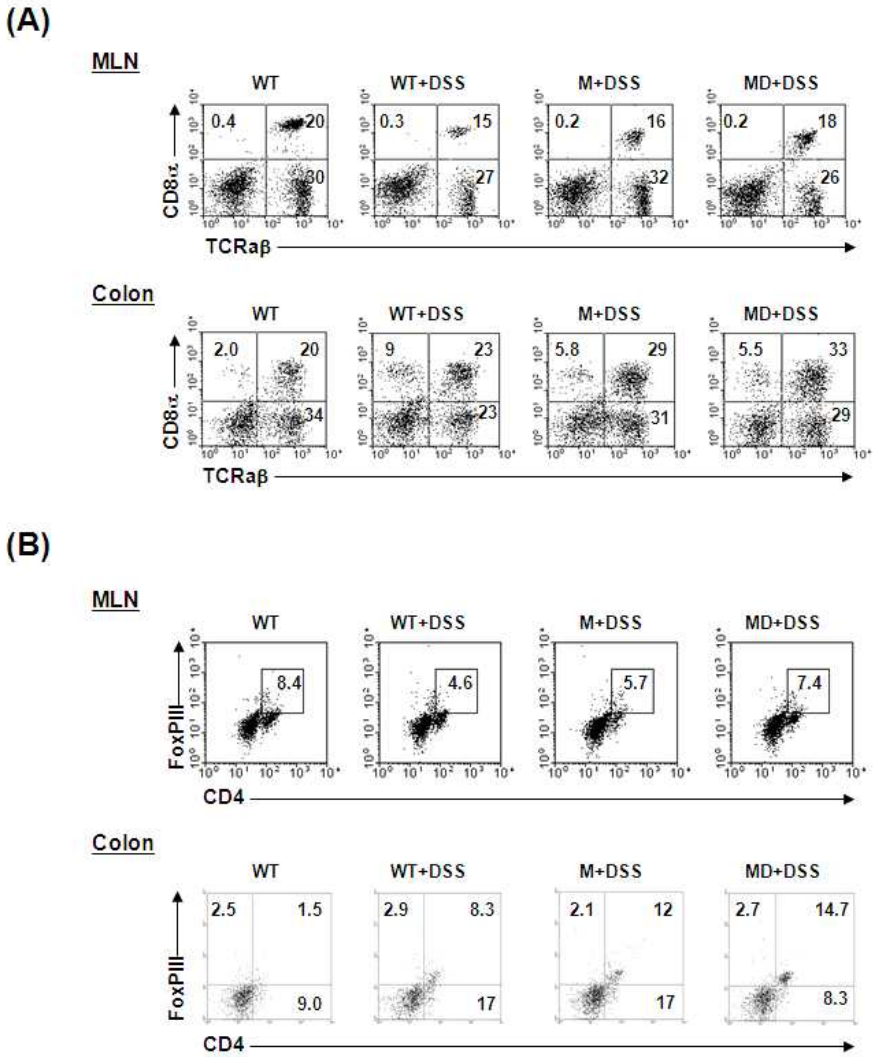


그림 21. IBD 마우스 모델에서 효소전환오디추출물에 의한 조절 T세포 증식조절

- 조절 T세포는 활성화된 면역세포들을 억제를 시키는 역할을 하여 면역 항상성을 유지하는데 핵심적인 역할을 하고 있는데 현재는 이런 항상성 유지의 균형이 깨어지면서 자가면역질환이 생긴다는 보고가 있음. 본 실험에서는 DSS로 유발된 염증성 장질환 마우스 모델에서 조절 T세포의 population을 보기 위하여 spleen, colon 조직에서 세포를 분리하여 여러 가지 세포 표면분자들에 대한 항체를 이용하여 $CD8^+$조절T세포와 $CD4^+$조절T세포의 population을 보았음. 소화계통에서 면역세포를 가지고 있는 MLN에서는 DSS를 처리하여 염증성 장 질환을 유도하였을 때 $CD8^+$조절T세포와 $CD4^+$조절T세포가 감소를 하였다. 하지만 DSS 처리 그룹(WT+DSS, M+DSS) 중에서도 MD+DSS 그룹은 덜 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 21). 반대로 colon에서는 흥미롭게도 DSS를 처리하여 점막자가면역질환을 유도하였을 때 $CD8^+$조절T세포와 $CD4^+$조절T세포가 증가하였고, 그중에서도 MD+DSS 처리 그룹의 $CD8^+$조절T세포와 $CD4^+$조절T세포가 가장 많은 것을 확인함 (그림 21). 이는 대장조직에서 DSS에 의해 일어나는 비정상적인 면역반응을 효소전환오디추출물이 $CD8^+$조절T세포와 $CD4^+$조절T세포를 이용하여 감소시키게 되어 점막면역자가질환을 완화시킨다는 것

을 보여주고 있음. 즉, DSS에 의해 유도되는 점막자가면역질환에서 효소전환오디추출물(MD)이 효과적으로 면역 활성조절을 하는 것을 알 수 있었음.

4) 마우스 점막면역자가질환 모델에서 효소전환오디추출물의 염증유발유전자 억제기능

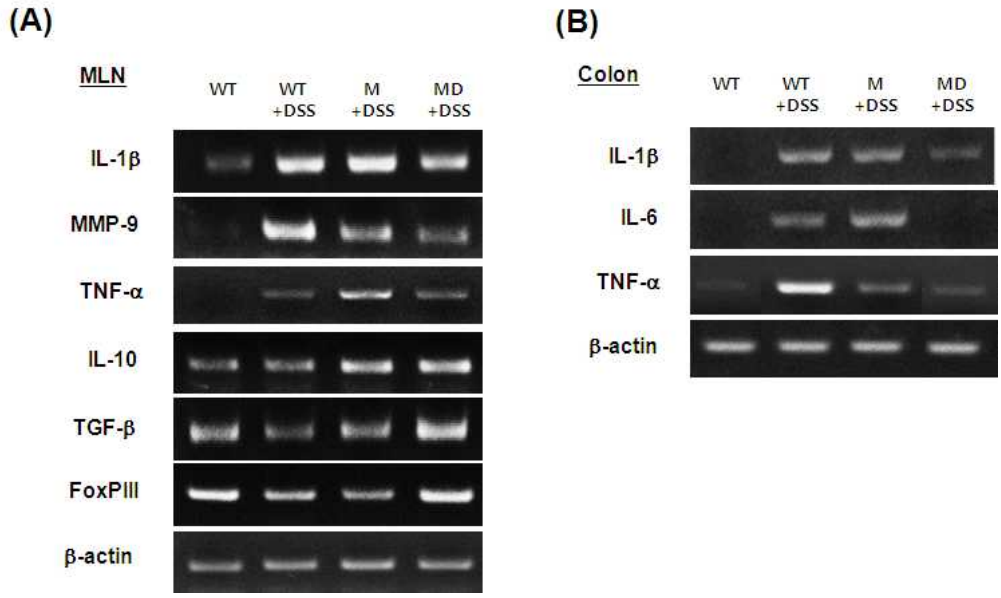


그림 22. IBD 마우스 모델에서 효소전환오디추출물에 의한 염증유발 유전자 억제와 조절 T세포 증식관련 사이토카인 유전자의 증가

- 소화기관의 면역세포들의 관리하는 기관인 MLN에서 조절T세포 분화하는 사이토카인인 IL-10과 TGF-β, FoxP III 발현을 보았고, 조직손상지표인 MMP-9과 염증 관련 사이토카인인 IL-1β, TNF-α의 발현을 조사함. 그 결과, TNF-α의 발현은 차이를 보이지는 못했지만, 염증성 장질환 모델에서는 IL-1β가 많이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 효소전환오디추출물(MD)이 IL-1β가 많이 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었음. 또한 조직손상지표인 MMP-9이 또한 효소비전환오디추출물(M)보다 효소전환오디추출물(MD)이 조직손상이 덜 일어난 것을 확인할 수 있었음. 또한 이러한 면역 활성을 조절하는 역할인 조절T세포의 증식 및 활성을 증가시키는 사이토카인 또한 효소비전환오디추출물(M)보다 효소전환오디추출물(MD)이 더 효과적인 것을 확인 할 수 있음 (그림 22A). 그리고 Colon에서는 염증과 밀접한 관련이 있는 유전자인 IL-1β, IL-6, TNF-α 발현을 보았음. 그 결과 MD+DSS그룹이 다른 DSS그룹(WT+DSS, M+DSS)보다 더 낮은 염증 관련 사이토카인의 발현을 확인함. 이는 MLN에서 조절T세포의 증식 및 활성이 유전자레벨에서 증가 되었고 Colon의 염증이 덜 일어난다는 것을 의미함.

5) 마우스 점막면역자가질환 모델에서 효소전환오디추출물의 면역세포 활성 및 침윤능

- DSS에 의해 점막자가면역질환이 일어나게 되면 불필요한 면역반응이 생성되게 되는데

필요한 면역반응하에 실제로 암세포를 죽이는 능력은 어떠한지를 확인하기 위해 LDH assay를 수행함. WT과 WT+DSS, M+DSS, MD+DSS그룹의 비장조직세포를 분리 후 암세포(Yac-1, mouse lymphoma)주와 4시간동안 공동 배양함. 그 결과 면역세포활성이 WT에 비해 WT+DSS그룹이 많이 감소되는 것을 확인하였고 M+DSS과 MD+DSS그룹은 면역세포활성이 회복되는 것을 확인할 수 있었음 (그림 23A). 하지만 효소비전환오디추출물(M)과 효소전환오디추출물(MD)와의 차이점을 볼 수 없었음.

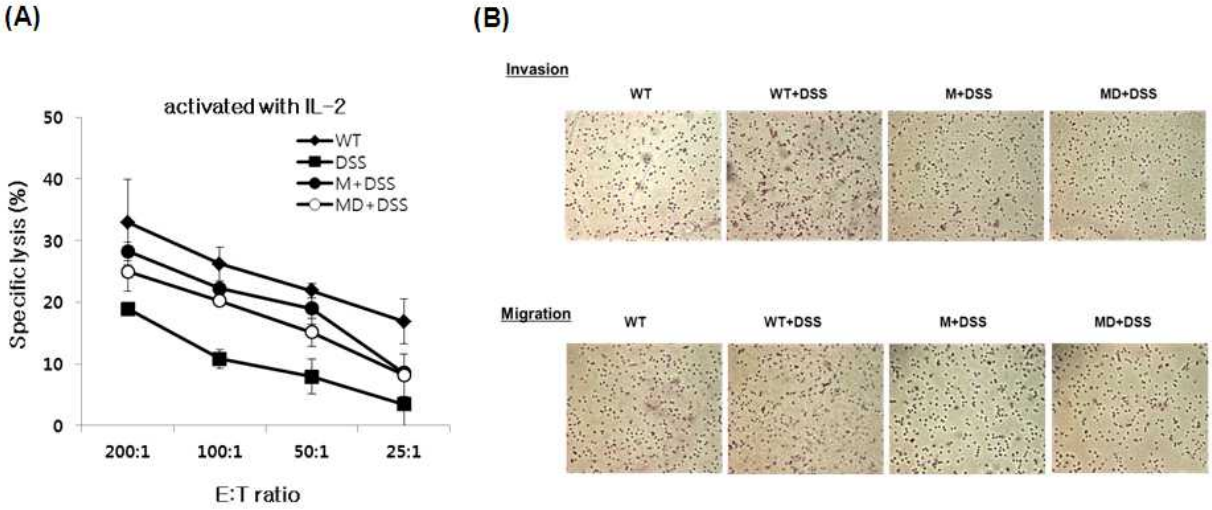


그림 23. IBD 마우스 모델에서 효소전환오디추출물의 면역세포활성과 침윤능

- 면역세포들의 조직을 이동하고 침투하는 능력을 확인하기 위해 invasion과 migration assay를 수행함. 그 결과 면역세포의 조직손상정도는 WT+DSS가 많은 것을 확인하였지만 이동 및 침투하는 능력은 크게 차이점을 확인할 수 없었음(그림 23B).

라. 제1협동과제

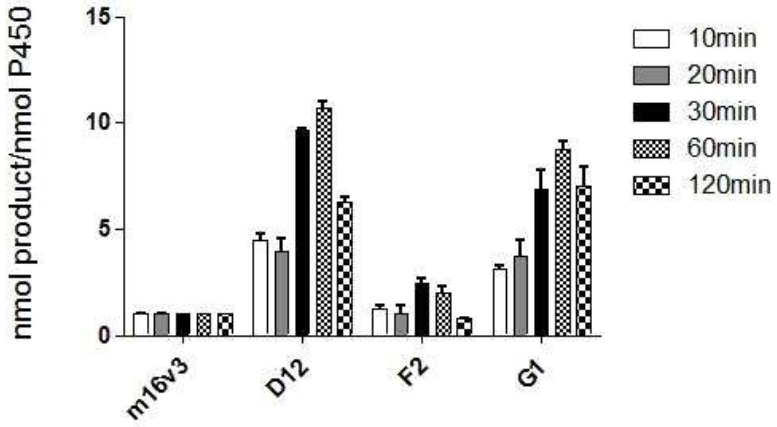
■ 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 제조공정 최적화

: 스틸베노이드계 화합물 유도체를 생산하는 P450 효소 반응 조건을 최적화하고, 효소 활성과 안정성이 모두 높은 최적의 P450 효소 변이체를 개발하기 위해 기초 실험 수행

1) Total turnover number (TTN) :

전체 반응 시간 동안 생성되는 총 생성물의 양을 단위 P450 효소 농도로 나누어 계산 (mole product/mole catalyst)

A. Total turnover number of pinostilbene formation by P450 BM3 mutants



- 4종의 P450 BM3 효소 변이체의 Total turnover number (TTN)를 측정하기 위해서 50 pmol enzyme, 1 mM Pterostilbene을 사용. 이전에 발표한 stilbenoid 대사 관련 논문 data를 참고하여 실험에 사용할 기질 농도와 효소 농도 결정. (Drug Metab Dispos. 2009 May;37(5):932-6) BM3 효소 변이체의 K_m값이 2.7～66 u M이기 때문에, total turnover number 측정 실험 동안에 충분한 양의 기질이 효소와 반응할 수 있도록 K_m값의 10배 이상이 되도록 1 mM 의 스틸베노이드 계 기질을 이용하여 실험 수행. NADPH-generation system을 이용하여 반응을 시작하고 37 ℃에서 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간 동안 각각 incubation. 효소 반응에 의해서 생성된 pinostilbene 의 양을 HPLC로 측정.

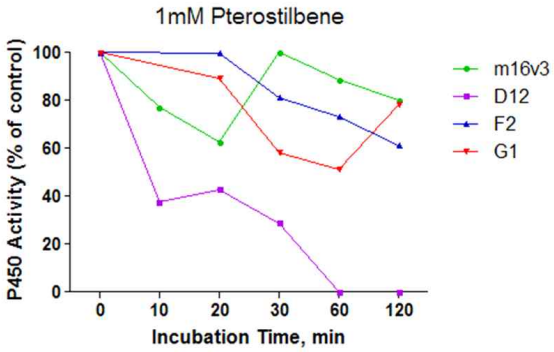
- P450 BM3 mutants의 pterostilbene derivative TTN 측정 결과 D12 mutant가 가장 높은 활성을 보였고, M16V3 mutant가 가장 낮은 활성을 보임. 가장 활성이 높은 D12 mutant는 반응 1시간 후, 기질인 pterostilbene 의 약 0.5 %가 hydroxylation 되어서 약 5 u M의 Piceatannol 이 생성되었으며, Piceaid는 약 4 % 대사되어서 약 40 u M의 Pterostilbene derivative가 생성됨. M16V3를 제외한 mutants 의 경우 1시간 반응시켰을 때보다 2시간 반응시켰을 때 활성이 오히려 감소함. 이러한 결과는 효소의 불안정성 (instability) 때문인 것으로 보임.
- 1시간 반응시켰을 때 D12 의 TTN가 11이었으므로 100 ml 반응조 수준에 생성물을 얻을 경우 3일이내에 100 mg 이상의 유도체 제조가 가능함. 이 유도체로 면역반응 조절에 대한 실험이 가능함.

2) Stability : 반응 시간에 따른 P450 효소 변이체의 안정성 확인

Stability of P450 BM3 mutants measured by CO-Difference spectra

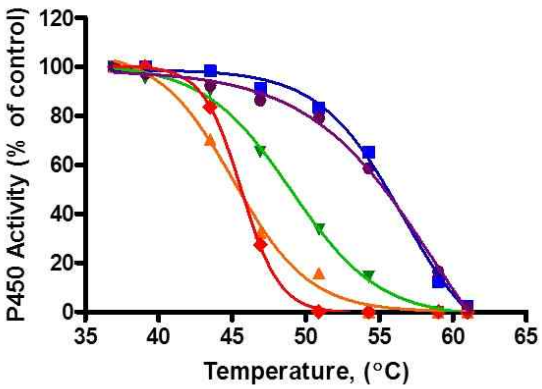
A. Pterostilbene

- 시간에 따른 P450 BM3 효소 변이체 5종의 stability 측정. P450 BM3 mutants와 NADPH, 그리고 각 스틸베노이드 화합물 - pterostilbene - 을 넣은 반응 혼합물을 이용. 반응 시작 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간 후의 P450 효소 농도를 CO-difference spectra 로 측정함. P450 효소 농도 100%는 반응 혼합물을 incubation하기 전의 P450 효소 농도를 가리킴.



- 효소 안정성 실험 결과, 반응 시간 2시간 뒤면 전년도 수행결과 내용중 resveratrol이나 piceid에서 대부분 효소의 활성이 모두 0% 로 줄어들었지만 pterostilbene에서는 M16V3 mutant와 G1은 50 % 이상 효소 활성이 남아있음. pterostilbene의 경우 G1이 유도체를 많이 생성하며 안정성도 높은 것으로 확인됨.

B. 온도 변화에 따른 P450 효소 변이체의 안정성 확인



BM3 Enzymes	T_{50} (℃)
M16V3	56.9
C7	45.1
D12	49.0
F2	45.6
G1	58.9

- 온도에 따른 P450 BM3 효소 변이체 5종의 stability 측정. P450 BM3 mutants를 넣은 혼합물을 이용. PCR을 이용해 37℃, 39.1℃, 43.5℃, 46.9℃, 50.9℃, 54.5℃, 59℃, 61℃에서 10분간 반응후 P450 효소 농도를 CO-difference spectra 로 측정함. P450 효소 농도 100%는 반응 혼합물을 incubation하기 전의 P450 효소 농도를 가리킴.

- 효소 안정성 실험 결과 효소의 안정성이 50% 아래로 떨어지는 T_{50}(℃) 값이 나머지 효소 모두 50℃ 아래에서 형성되었으나 M16V3 와 G1 의 경우 각각 56.9℃, 58.9℃ 로 매우 높은 값을 나타내었다. 특히 G1의 경우 TTN 값과 반응시간에 따른 효소 안전성 모두 높게 나타나 스틸베노이드계 화합물 유도체 생산의 최적의 효소 변이체로 이용할 수 있을 것으로 생각됨.

3. 3차년도

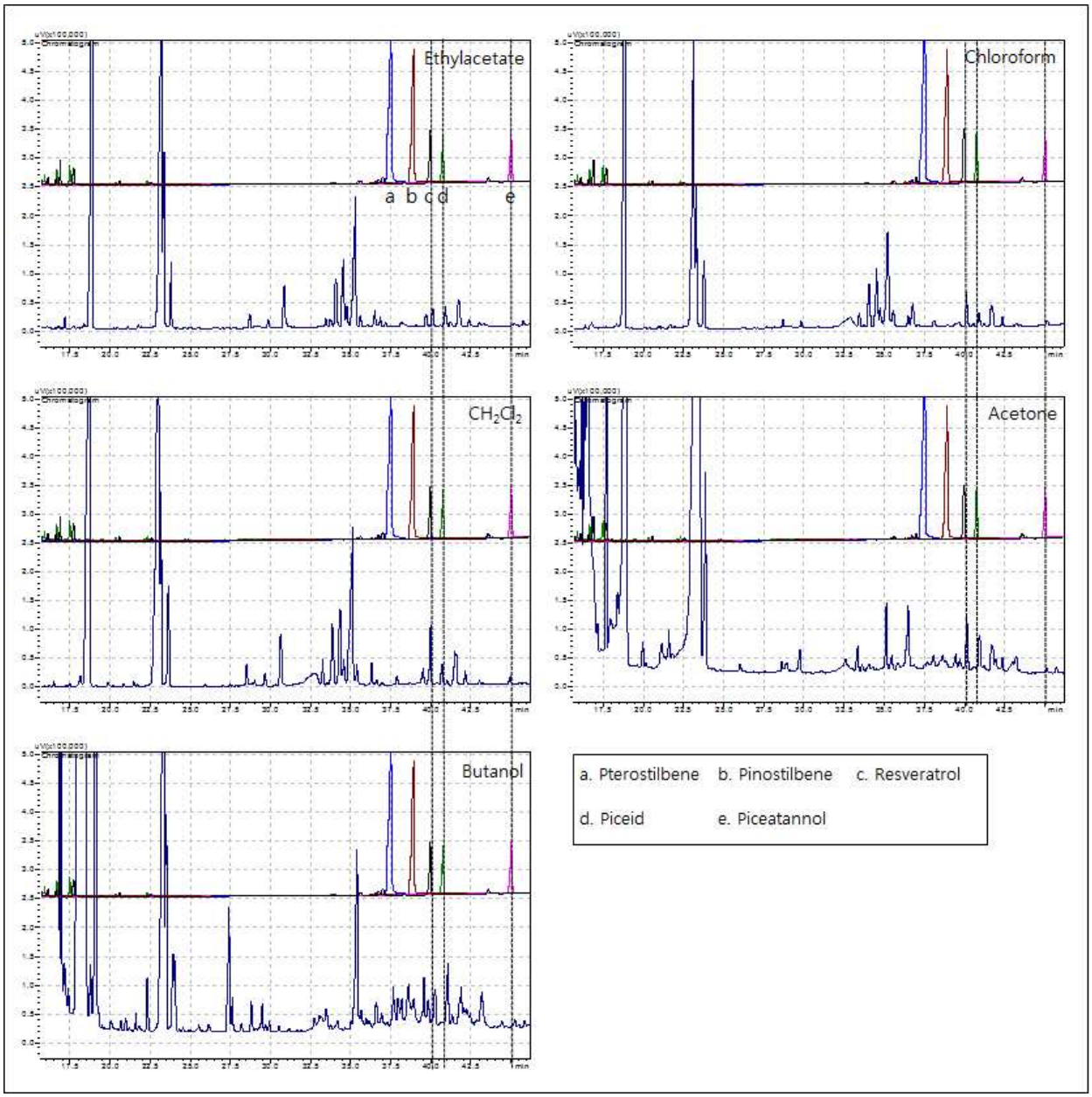
가. 제1세부과제 : 오디로부터 스틸베노이드계 유도체의 분리정제 최적화

1) 오디 유래 스틸베노이드 화합물 추출

- 오디로부터 스틸베노이드계 유도체의 분리정제 조건을 최적화 하기위해 7가지 유기용매(메탄올, 에탄올, 부탄올, 클로로포름, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 아세톤)을 이용하여 추출
- 수원20호 오디즙 5 ml 에 유기용매 15 ml 을 가한 후 70℃에서 1시간 shaking 하여 추출

2) GC를 통한 오디 추출물에서의 스틸베노이드 화합물 분석

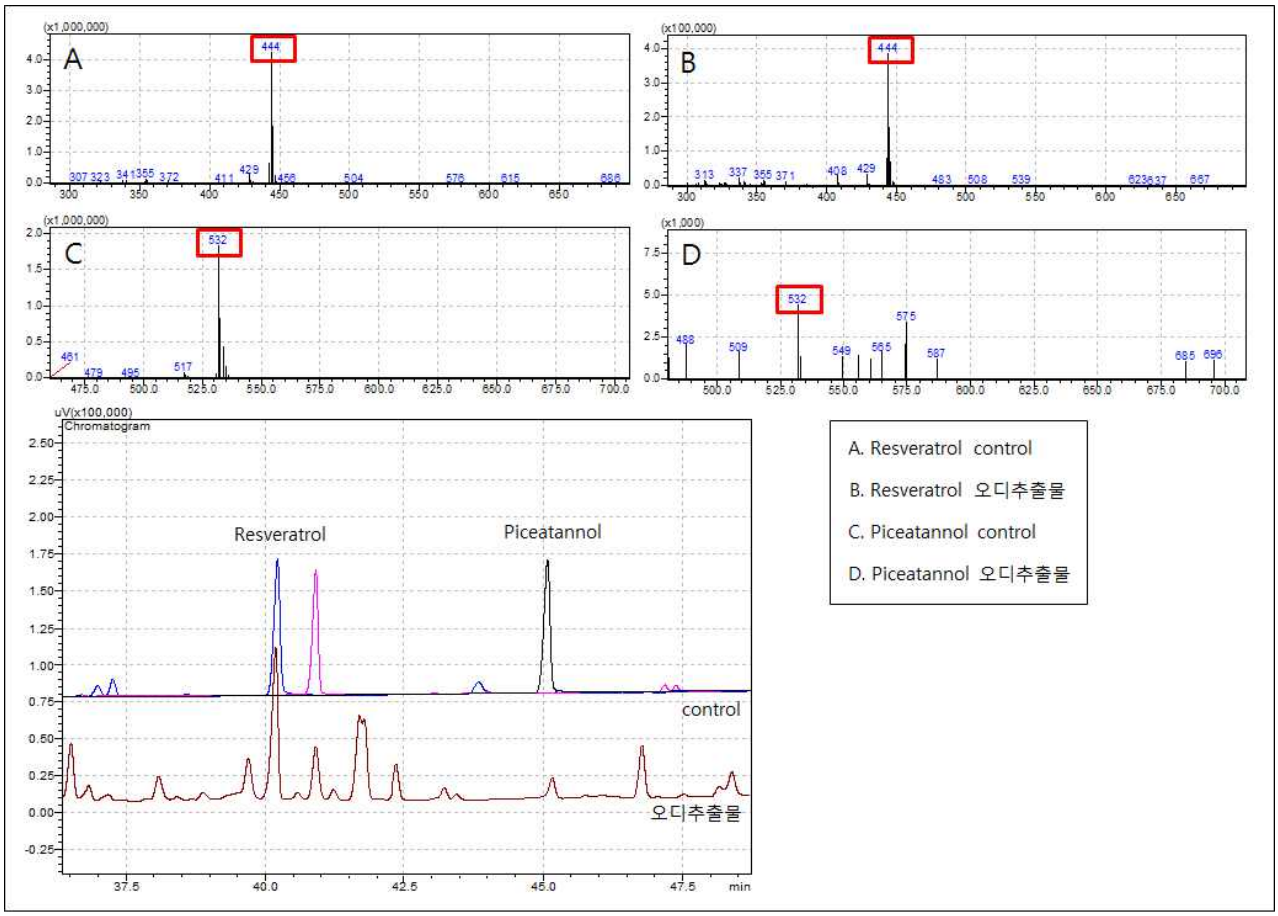
- 에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄, 아세톤, 부탄올 총 5가지의 유기용매를 이용한 오디추출물 1ml 에 N_2 gas를 가하여 solvent 제거
- GC분석을 위해 BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsily)trifluoroacetamide) 를 첨가하여 75℃에서 20분간 반응시킨후 스틸베노이드 화합물 분석



- GC를 통하여 스틸베노이드계 화합물 과 오디추출물을 비교 분석한 결과 에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄, 아세톤, 부탄올을 이용한 오디추출물에서 레스베라트롤, 피세이드, 피세아타놀과 같은 retention time 의 peak 을 확인 (c. Resveratrol, d. Piceid, e. Piceatannol)

3) GC/MS를 통한 오디 추출물에서의 스틸베노이드 화합물 분석

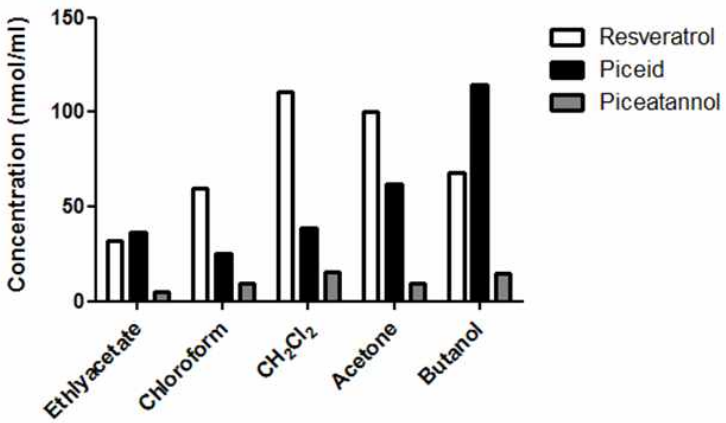
- 디클로로메탄을 이용하여 추출한 1ml 의 오디 추출물 에 N_2 gas를 가하여 solvent 제거후, BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsily)trifluoroacetamide) 를 첨가하여 유도체 형성후 분석



- GC/MS를 통하여 분석한 결과 control(resveratrol)과 오디추출물에서 확인된 peak 의 retention time이 같음을 확인하였으며, 분자량 또한 control(444)과 같음을 확인
- 오디추출물에서 control (piceatannol) 과 retention time이 같은 peak을 확인하였으며, 분자량 또한 control(532)와 같음을 확인

4) 오디 추출물의 스틸베노이드계 유도체의 추출량 정도 비교

- 오디즙 (수원20호) 1ml 당 함유되어 있는 레스베라트롤, 피세이드, 피세아타놀의 추출량을 GC 분석을 이용하여 측정



- GC 분석을 이용하여 오디추출물에서의 스틸베노이드 유도체 추출량을 측정비교 한 결과 디클로로메탄을 이용한 추출물에서 가장 많은 레스베라트롤의 추출량을 보였고 부탄올의 오디추출물에서 가장 많은 피세이드의 추출량을 보임
- 디클로로메탄을 이용한 추출물의 경우 에틸아세테이트를 이용한 추출물에 비하여 3배의 추출량 증가를 보임
- 부탄올을 이용한 추출물의 경우 클로로포름을 이용한 추출물에 비하여 4배의 추출량 증가를 보임
- 디클로로메탄을 이용한 추출물의 경우 에틸아세테이트에 비하여 3배의 추출량 증가를 보임

나. 제2세부과제: 대장균 발현 시스템에서 식물 유래의 P450 유전자 발현 최적화

- CaP450-12 유전자의 경우 ABA-8' hydroxylase 패밀리를 구성하고 있음. 고추 게놈의 분석 결과 상동성이 높은 4개의 ABA-8' hydroxylase 유전자가 존재함을 확인함. 고추에서 유래한 CaP450-12 유전자는 대장균 시스템에서 발현이 확인됨. CaP450-12 유전자를 제외한 나머지 3개 유전자를 (CaP450-12-1, CaP450-12-2, CaP450-12-3) 발현시키기 위해 유전자 서열 정보를 고추 DB를 활용하여 수집함.

1) 고추 게놈에서 ABA-8' hydroxylase 패밀리에 속한 유전자 발굴

- 고추 cDNA에서 CaP450-12-1, 2, 3 유전자를 분리하기 위해 우선적으로 cDNA를 추출할 고추 조직을 선별함. CaP450-12-1, 2, 3 유전자의 발현 정보를 바탕으로 각각의 유전자를 분리함. 각각 full length의 유전자를 분리하기 위한 프라이머 세트를 제작하였고, PCR 반응을 통해 CaP450-12-1은 1.2kb, CaP450-12-2는 1.3 kb, CaP450-12-3은 1.4 kb의 밴드를 확인함 (Figure 1). 이후 시퀀스 정보를 분석한 결과 고추 게놈 DB에서 수집한 유전자 서열 정보와 일치함.

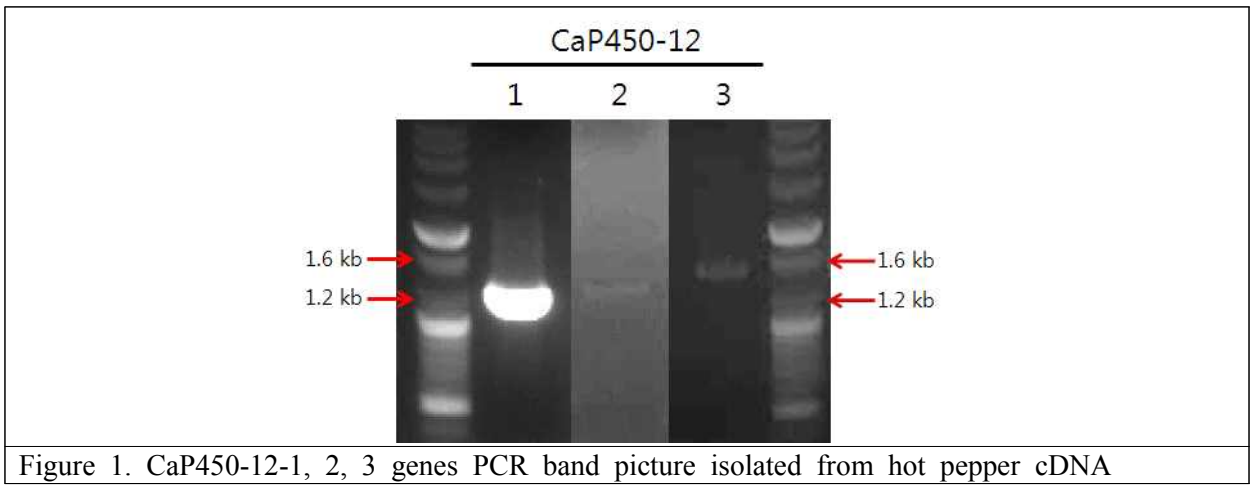


Figure 1. CaP450-12-1, 2, 3 genes PCR band picture isolated from hot pepper cDNA

2) 대장균 시스템에서 식물 유래의 P450 유전자의 발현을 위한 최적화 실험

- 대장균에서의 P450 발현에 사용되는 벡터인 pCW에 CaP450-12-1, 2, 3 유전자를 추가로 클

로닝 하였고(Figure 2), 유전자 발현에 사용되는 대장균 라인인 BL21 (DE3)에 형질전환 수행. 형질 전환된 대장균 BL21 (DE3) 라인에 CO 가스를 주입하여 450 nm의 파장에서 흡광 피크를 가지는지 확인하는 실험을 진행. 기존의 실험 방법에서는 흡광 피크를 확인하지 못해서 유전자 발현의 최적화를 위한 조건을 잡는 실험으로 균을 키우는 배양 온도 (28℃와 37℃), aeration 정도, 균의 배양 시간 (2시간 간격으로 수집)의 차이를 두어 실험을 진행. 실험결과 배양 27시간 이후에 P450의 발현이 확인됨(Figure 3).

Figure 2. Structure of *E. coli* expression vector (pCW)

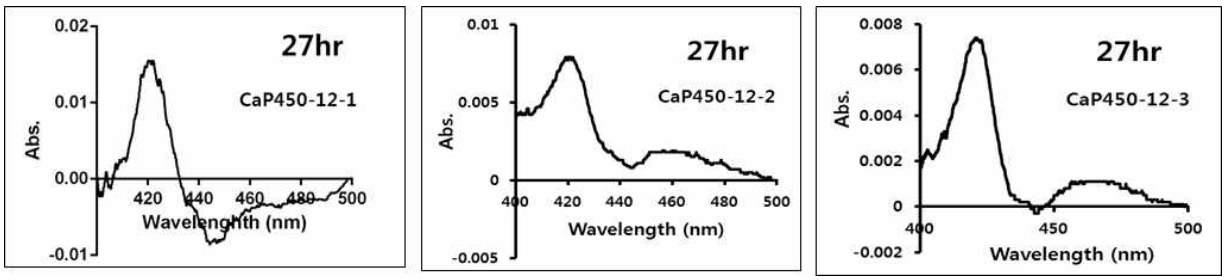


Figure 3. P450 CO-spectral assay of CaP450-12-1, 2, 3 expressed *E. coli*

● 대장균에서의 식물 P450 생촉매 반응 최적화

- 식물에서 유래한 P450 유전자를 대장균에서 발현시키는 생촉매 반응을 최적화 시키는 방법으로 식물에 존재하는 시토크롬 P450 환원효소(Cytochrome P459 Reductase, CPR)를 이용함. 고추의 경우 전체 게놈에 2개의 CPR이 존재함.

1) 고추 유래의 시토크롬 P450 환원효소 발현 최적화

- 고추 cDNA에서 CaCPR 1, 2 유전자를 발굴하여 발현 벡터에 클로닝 수행. 대장균에 형질전환 시킴. 발현되는 최적 조건을 찾기 위해 IPTG로 단백질 발현을 유도시킨 결과 0.5 mM IPTG 이상, 유도물질 넣은 후 3시간 이상 배양 조건에서, insoluble protein 즉 membrane fraction에 발현이 확인됨(Figure 4A). 9,000 g에서 원심분리 하였을 때 membrane fraction에 발현됨. 대장균에서 발현시킨 CaCPR 1, 2 protein을 정제하여 토끼에게 주사 하였고, CaCPR 1, 2 protein에 대한 antibody를 생성함. 생성된 antibody로 CaCPR protein에 대한 western blot을 수행하여 protein detection을 확인함(Figure 4B).

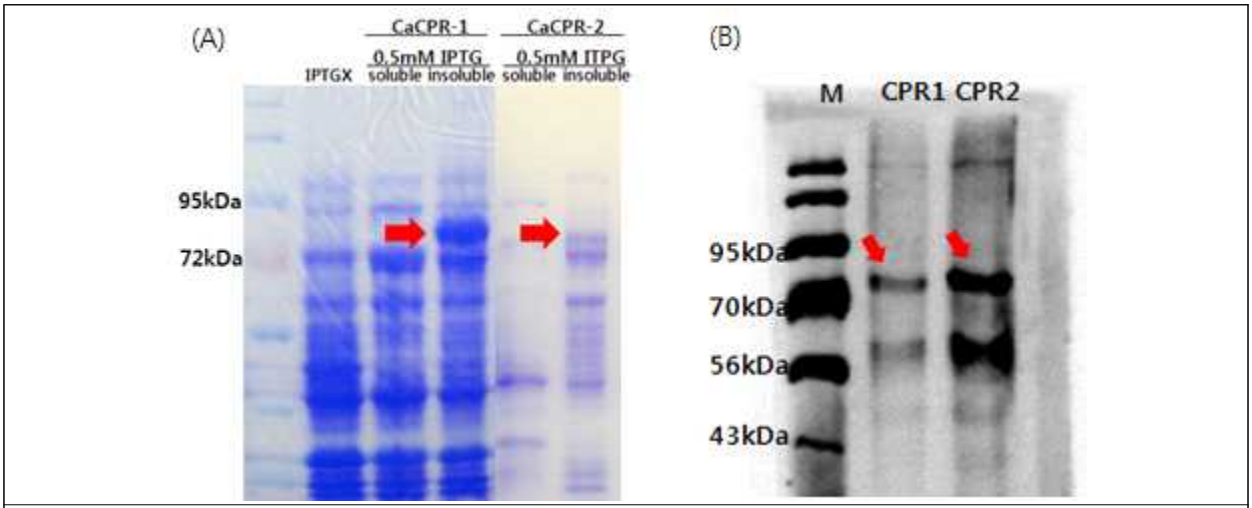


Figure 4. SDS-PAGE of CaCPR 1, 2 protein expression (A) and western blot analysis(B).

2) 고추유래의 시토크롬 P450 환원효소의 특성 및 활성 실험

- 식물 reductase의 활성을 측정하기 위해 일반적으로 사용되는 기질인 cytochrome c를 가지고 CaCPR 1의 활성을 확인함(Figure 5A). 또한 reductase의 활성을 측정하는 chemical 기질인 MTT, CTC에서도 환원 활성을 확인함(Figure 5B, C).

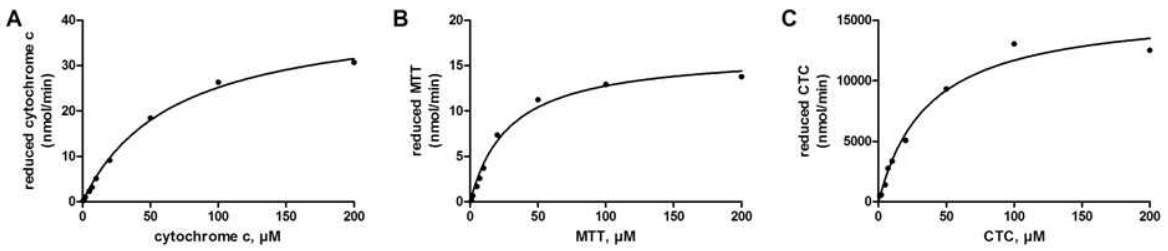


Figure 5. Concentration-dependent reduction of cytochrome c, MTT, and CTC by CaCPR 1.

- CPR의 기질로 알려진 항암제인 doxorubicin을 가지고 CaCPR 1에서 환원이 되는지 실험을 수행함. HPLC 분석결과 CaCPR 1에 의해 doxorubicin이 7-deoxydoxorubivinone으로 바뀐 것을 확인함(Figure 6A). 이후 CaCPR 1(Figure 6B)과 rat CPR (rCPR)(Figure 6C)을 가지고 pH 변화에 따른 doxorubicin 환원 활성 정도를 비교하는 실험을 수행. 실험결과 doxorubicin을 기질로 했을 경우 CaCPR 1이 rCPR 보다 더 높은 환원 활성을 가지는 것을 확인함.

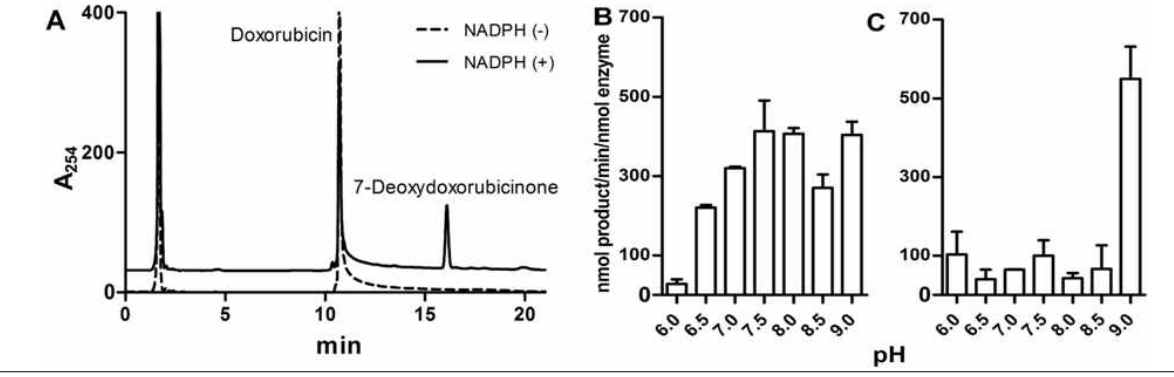


Figure 6. Reduction of doxorubicin by CaCPR 1 and rCPR

- CaCPR 1의 온도 stability를 알아보기 위해 37℃에서 75℃까지 범위를 가지고 MTT에 대한 효소활성을 실험함. 실험 결과 CaCPR1이 rCPR 보다 더 높은 thermal stability를 가지는 것을 확인함(Figure 7).

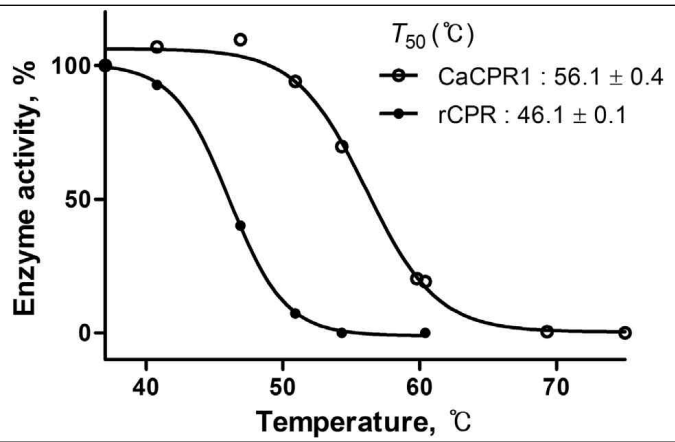


Figure 7. Thermal stability of CaCPR 1 and rCPR

다. 제3세부과제

■ 최종 후보물질의 공인 기관의 평가자료를 통한 안전성 및 독성 검사

- 최종 후보 물질인 GRAS 미생물인 Bacillus megaterium 유래 P450 효소인 CYP102A1을 이용한 효소전환된 오디추출물(Mulberry derivative, MD)과 효소비전환된 오디추출물(Mulberry, M)의 안전성 및 독성 검사 평가를 위해 공인 기관인 한국화학융합시험연구원에 의뢰함. 전임상 지정항목에 따라 SD 랫드에 급성 경구투여 독성시험을 시행하였으며 시험물질의 투여용량은 300 mg/kg와 2000mg/kg로 1회 경구 투여함. 시험물질 투여 후 14일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안으로 장기의 이상 유무를 관찰함. 시험 결과 시험 기간 중 사망동물은 관찰되지 않았으며 일반적인 증상만 관찰됨. 시험물질 투여에 의한 이상소견이 관찰되지 않았음. 체중측정 결과 정상적인 체중증가가 관찰되었으며 부검결과 이상소견이 관찰되지 않아 독성이 없는 것으로 밝혀짐**(그림 1, 2)**.

KTR

최 종 보 고 서

TBH-0271(KG-2013-078)

효소비전환된 오디추출물

SD 랫드에 대한 효소비전환된 오디추출물의 급성 경구투여 독성시험

한국화학융합시험연구원장

GLP 진술서
[GLP Statement]

시 험 제 목 [Study title] : SD 랫드에 대한 효소비전환된 오디추출물의 급성 경구투여 독성시험

시 험 번 호 [Study number] : TBH-0271 (KG-2013-078)

시험의뢰자[Sponsor]

명 칭 : 전남대학교산학협력단
소 재 지 : 광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
대 표 자 : 배 장 선
연 락 처 : Tel. 062-530-0315 Fax. 062-530-0315

시 험 기 관[Test facility]

명 칭 : 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소
소 재 지 : 경기도 김포시 월곶면 고막리 7-6
운 영 책 임 자 : 박 종 일
연 락 처 : Tel. 031-999-3180 Fax. 031-999-3003

이 보고서의 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임하에 수행되었으며, 보고서는 GLP 규정에 준수하여 실시하였다.

1. GLP 규정
1.1. 농촌진흥청 고시 제2012-14 호 (2012-02-07) "농약 등의 시험연구기관 지정 및 관리기준"
1.2. OECD "Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)"

2. 시험방법
2.1. 농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준", [별표 12] 만족 독성시험기준과 방법, 12-1-20 급성경구독성시험 : 급성독성등급법
2.2. OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 423 "Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method" (December 17, 2001)

본 보고서는 승인된 시험계획서에 따라 수행되었으며, 시험 진행 중 신뢰성을 저해할 만한 상황이 발생하지 않았음을 확인하였다.

신 성 섭 2013-07-01

신 성 섭[Shin Sung-sup, B.S.] Date
Study Director
Health Care Research Laboratory, KTR

신뢰성보증 확인서
[Quality Assurance Statement]

시 험 제 목 : SD 랫드에 대한 효소비전환된 오디추출물 급성 경구투여 독성시험
[Study title]

시 험 번 호 : TBH-0271 (KG-2013-078)
[Study number]

점검한 시험단계	점 검 일 자	시험책임자 보 고 일 자	운영책임자 보 고 일 자
시험계획서(초안)의 점검	2013-04-02	2013-04-03	2013-04-03
시험계획서의 점검	2013-04-03	2013-04-03	2013-04-03
실험동물 입수 및 반입의 점검	2013-04-04	2013-04-04	2013-04-04
군분리의 점검	2013-04-08	2013-04-08	2013-04-08
시험물질투여의 점검(1)	2013-04-09	2013-04-09	2013-04-09
시험물질투여의 점검(2)	2013-04-11	2013-04-11	2013-04-11
시험물질투여의 점검(3)	2013-04-16	2013-04-16	2013-04-16
일반증상관찰의 점검	2013-04-18	2013-04-18	2013-04-18
실험동물 부검의 점검(1)	2013-04-30	2013-04-30	2013-04-30
실험동물 부검의 점검(2)	2013-05-02	2013-05-02	2013-05-02
시험기초자료의 점검	2013-05-15	2013-05-16	2013-05-16
최종보고서(초안)의 점검	2013-05-15	2013-05-16	2013-05-16
최종보고서의 점검	2013-07-01	2013-07-01	2013-07-01

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 신뢰성보증부서는 시험계획서에 따라 기록된 점검일자에 주요 시험 단계의 점검을 수행 하였다.

본 최종보고서는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 신뢰성보증부서에 의하여 점검되었으며, 보고된 시험결과는 시험기초자료 및 시험 과정을 정확하게 반영하고 있다.

시험에 대한 점검 결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고되었다. 이러한 점검을 바탕으로 최종보고서를 검토하였다. 본 시험은 GLP 규정에 따라 수행되었다.

홍 승 국 [Hong Seung-guk, M.S.]
Quality Assurance Manager
Health Care Research Laboratory

KSQA Seung-Guk Hong 2012-11 QA PROFESSIONAL IN GLP

2013-07-01
Date

시험참여자
[Study Staffs]

다음의 시험자는 시험 중 중요한 시험단계 및 기록을 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서(SOPs)와 본 시험의 시험계획서에 따라 수행하였다.

시험 담당자 : 김준호/B.S.
이택진/B.S.

시험물질 조제책임자 : 김민석/B.S.

동물관리 책임자 : 박학수/D.V.M., Ph.D. Candidate

검역 책임자 : 신성섭/B.S.

보고서 작성자 : 신성섭/B.S.

목 차
[Contents]

보고서표지
GLP 준수서 [GLP statement] ····· I
신뢰성보증 확인서 [Quality assurance statement] ····· II
시험참여자 [Study staffs] ····· III
목차 [Contents] ····· IV
1. 요약 (Summary) ····· 1
2. 서론 (Introduction) ····· 2
2.1. 시험일정 ····· 2
3. 재료 및 방법 (Materials & methods) ····· 3
3.1. 시험물질 및 부형제 ····· 3
3.2. 시험물질 조제 ····· 3
3.3. 시험물질 분석 ····· 3
3.4. 시험계 ····· 3
3.5. 사육환경 ····· 4
3.6. 시험군의 구성 ····· 5
3.7. 시험물질의 투여 경로 및 방법 ····· 5
3.8. 관찰항목 ····· 5
4. 자료의 보관 (Archives) ····· 6
5. 시험계획서의 수정 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan) ····· 6
6. 결과 (Results) ····· 7
6.1. 사망률 및 일반증상 (Table 1, 2 and Appendix 1) ····· 7
6.2. 체중변화 (Table 3, Appendix 2) ····· 7
6.3. 부검소견 (Table 4, Appendix 3) ····· 7
7. 고찰 및 결론 (Discussion & conclusion) ····· 8
8. 참고문헌 (References) ····· 9
9. Tables (Group summary) ····· 10
Table 1. Mortality ····· 10
Table 2. Clinical signs ····· 10
Table 3. Body weight ····· 11
Table 4. Necropsy findings ····· 11
10 Appendices (Individual data) ····· 12
Appendix 1. Clinical signs of female rats ····· 12
Appendix 1. (Continued) Clinical signs of female rats ····· 12
Appendix 2. Body weight of female rats ····· 13
Appendix 3. Necropsy findings of female rats ····· 14
11. Annexes ····· 15
Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor) ····· 15
Annex 2. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight ····· 16

1. 요약 (Summary)

효소비전환된 오디추출물에 대한 급성 경구투여 독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 랫드를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg body weight (1st , 2nd step)와 2000 mg/kg body weight (3rd , 4th step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 관찰하였다.

- 실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 생존동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가기 관찰되었다.
- 생존동물의 부검 소견 결과, 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 효소비전환된 오디추출물은 화학물질 분류 및 표지에 관한 세계조화시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5 (2000 mg/kg body weight < LD_{50} < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

2. 서론 (Introduction)

본 시험은 SD 랫드를 이용하여 효소비전환된 오디추출물을 급성 경구투여시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시하였다.

본 시험은 동물보호법 법률 제 10995호 (2011-08-04, 전부개정)를 근거한 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 실험동물의 사용과 관리에 관한 규정 (실험동물윤리위원회, 2010-12-10)을 준수하여 실시하였다.

2.1 시험일정

시험개시일	:	2013-04-03
실험동물입수일	:	2013-04-04
검역 및 순화기간일	:	2013-04-04 ~ 2013-04-08
군분리일	:	2013-04-08
투여일	:	2013-04-09(1st step), 2013-04-11(2nd step), 2013-04-16(3rd step), 2013-04-18(4th step)
일반증상 관찰기간일	:	2013-04-09 ~ 2013-04-23(1st step), 2013-04-11 ~ 2013-04-25(2nd step), 2013-04-16 ~ 2013-04-30(3rd step), 2013-04-18 ~ 2013-05-02(4th step)
부검일	:	2013-04-23(1st step), 2013-04-25(2nd step), 2013-04-30(3rd step), 2013-05-02(4th step)
최종보고서(초안) 제출일	:	2013-05-20
시험종료일	:	2013-07-01

3. 재료 및 방법 (Materials & methods)

3.1 시험물질 및 부형제

3.1.1 시험물질 (Annex 1.)

물 질 명	:	효소비전환된 오디추출물
공 급 원	:	전남대학교
제 조 일	:	2013-03-18
입 수 일	:	2013-03-20
입 수 량	:	34.783 g (Gross)
Lot No.	:	20130310-1
보 관 조 건	:	냉장 [(2 ~ 8)℃]
유 효 기 간	:	2014-03-17 (제조 후 1 년)
외 관 및 성 상	:	적색의 분말
잔여시험물질처리	:	반환
취급(폐기)시주의사항	:	없음

3.1.2 부형제

물 질 명	:	멸균증류수 (주사용수)
제 조 원	:	대한약품공업(주)
Lot No.	:	LBL0K21

3.2 시험물질 조제

본 시험물질을 칭량한 후 부형제인 멸균증류수 (주사용수)에 30 mg/mL (1st - 2nd step) 및 200 mg/mL (3rd - 4th step)농도로 조제하여 사용하였다.

3.3 시험물질 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 투여액의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않았다.

3.4 시험계

계통 및 종	: Crl:CD(SD)-Rat
공급원	: (주)오리엔트 바이오 (경기도 가평군 북면 북동리 699-13)
입수시 성별 및 동물수	: 암컷 14 마리
입수시 동물 주령 및 체중범위	: 8 주령, 188.8 g ~ 216.5 g
투여시 성별 및 동물수	: 암컷 12 마리 (1st ~ 4th step 각각 3 마리)
투여시 동물 주령 및 체중범위	: 9 주령, 190.0 g ~ 201.1 g (1st step)

9 주령, 195.3 g ~ 206.3 g (2nd step)
10 주령, 209.8 g ~ 217.1 g (3rd step)
10 주령, 203.9 g ~ 226.4 g (4th step)

3.4.1 시험계의 선택사유
본 시험에 사용된 랫드는 급성 및 반복투여독성시험 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교적 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.4.2 검역 및 순화
동물을 입수 후 5 일 동안 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 동물사육실의 환경하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다.

3.4.3 개체식별
개체식별은 유성매직을 이용하여 각 개체번호를 꼬리에 표시하였다. 순화기간에는 별간색 매직을 이용하고, 투여 및 관찰기간에는 검은색 매직을 사용하였다. 사육상자는 시험번호, 시험물질명, 시험항목, 입수일, 순화기간, 군분리일, 시험기간, 성/동물번호 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하여 식별하였다.

3.4.4 군분리
순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체가 관찰되지 않아, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 무작위법으로 군분리를 실시하였다.

3.4.5 잔여동물의 처리
잔여동물은 실험종료일에 안락사 시켰다.

3.5 사육환경

3.5.1 동물실 번호 : 청정사육실 7

3.5.2 환경조건
본 시험의 환경은 온도 (22 ± 3)℃, 상대습도 (50 ± 20)%, 환기횟수 (10 ~ 15) 회/h, 조명주기 12 시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음수를 급여하여 사육하였으며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.5.3 사육환경 모니터링
시험기간 중 동물실의 온·습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 30 분마다 측정 되었으며, 조도 등의 환경조건은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서(SOPs)에 따라 정기적 (분기당 1 회)으로 측정되었다. 동물실의 환경 측정 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

3.5.4 사육조건
순화 및 시험기간 중 청정사육실내 스텐인레스제 사육상자 [270(W) ㎜ × 500(D) ㎜ × 200(H) ㎜, 대응기기]에 3 마리 이하로 넣어 사육하였다.

3.5.5 사료 및 음수
사료는 실험동물용 쥐 사료 [(주) 카길에그리퓨리나 (전라북도 군산시 소룡동 56-4)]를, 음수는 UV 조사된 여과수를 사용하여 자유섭취시켰다.

3.5.6 사료 및 음수 중의 오염물질 확인
사료의 오염물질은 사료 제조업체의 정기적 검사에 따른 사료 성적서를 사료공급자로부터 받아 확인하였고, 음수의 오염물질은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 해당 표준작업지침서(SOPs)에 따른 정기적 검사를 통해 확인한 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

3.6 시험군의 구성

3.6.1 본시험
농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준" 고시에 따라 시험물질의 독성정보가 없어 300 mg/kg B.W. 용량으로 시작하였다. 단계별 투여 용량은 300 mg/kg B.W.(1st - 2nd step) 및 2000 mg/kg B.W. (3rd - 4th step)으로 각각 3 마리씩 투여하였다. 시험물질 투여 간격은 일반증상 및 정도에 의해 결정되었다. (Annex 2. 참조)

- 시험군의 구성

시험	시험물질	성	마리수	동물번호	투여량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)
1st step	효소비전환된 오디추출물	암컷	3	2101 ~ 2103	300	10
2nd step		암컷	3	2201 ~ 2203	300	10
3rd step		암컷	3	2301 ~ 2303	2000	10
4th step		암컷	3	2401 ~ 2403	2000	10

3.7 시험물질의 투여 경로 및 방법

3.7.1 사료의 절식
투여 전 하루 밤 사료를 공급하지 않았고, 음수는 공급하였다.

3.7.2 투여방법
랫드용 경구 투여 주사기를 이용하여 위 내에 1회 강제 투여하였다.

3.8 관찰항목

3.8.1 일반증상 관찰
전 동물에 대하여 매일 1 회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단 투여 당일에는 투여 후 4 시간까지는 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 후 14 일까지 실시하였다.

3.8.2 체중변화
체중은 입수시, 군분리시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 7 일 및 14 일째에 측정하였다.

3.8.3 부검 소견
투여 후 14 일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 후, 부검하여 육안으로 장기를 검사하였다.

4. 자료의 보관 (Archives)

시험기간중에 작성된 모든 기록에 관해서는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소에서 최종보고서 발급 후 5 년간 보관한다. 보관기간 이후의 시험기초자료 및 시험물질의 보관에 관해서는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다. 기록의 보관장소는 자료보관실 (I), (II)로 하며 보관될 주된 시험기초자료는 다음과 같다.

(1) 시험계획서에 관한 기록
(2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
(3) 시험계에 관한 기록 및 자료
(4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
(5) 시험의뢰자와의 송수신 기록 (필요 시)
(6) 최종보고서에 관한 기록

5. 시험계획서의 수정 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan)

시험기간 동안 시험계획서에 대한 수정 및 이탈사항은 없었다.

6. 결과 (Results)

6.1 사망률 및 일반증상 (Table 1, 2 and Appendix 1)

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.

6.2 체중변화 (Table 3, Appendix 2)

생존동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 보였다.

6.3 부검소견 (Table 4, Appendix 3)

모든 개체의 주요장기에 대한 육안적 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상 소견이 관찰된 동물은 없었다.

7. 고찰 및 결론 (Discussion & conclusion)

호소비전환된 오디추출물에 대한 급성 경구투여 독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 랫드를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg B.W. (1^{st} - 2^{nd} step)와 2000 mg/kg B.W. (3^{rd} - 4^{th} step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상유무를 관찰하였다.

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 생존동물에 대한 체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 생존동물의 부검 소견 결과, 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 호소비전환된 오디추출물은 화학물질 분류 및 표지에 관한 세계조화시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5 (2000 mg/kg body weight < LD_{50} < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

8. 참고문헌 (References)

- 농촌진흥청 고시 제2012-14 호 (2012-02-07) "농약 등의 시험연구기관 지정 및 관리기준"

- 농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준" , [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법, 12-1-20 급성경구독성시험 : 급성독성등급법

- OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 423 "Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method" (December 17, 2001)

- OECD Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)

9. Tables (Group summary)

Table 1 . Mortality

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Mortality
		Female
1st step	300	0 % (0 / 3)[a]
2nd step	300	0 % (0 / 3)
3rd step	2000	0 % (0 / 3)
4th step	2000	0 % (0 / 3)

[a] : Number of dead animals / Number of tested animals

Table 2 . Clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs
1st step	300	Female	3	Normal
2nd step	300	Female	3	Normal
3rd step	2000	Female	3	Normal
4th step	2000	Female	3	Normal

Table 3. Body weight

Unit : g

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Days after administration		
				0	7	14
1st step	300	Female	Mean	194.2	233.6	239.5
			S.D.	6.0	5.1	6.4
			N	3	3	3
2nd step	300	Female	Mean	202.8	234.2	257.5
			S.D.	6.7	17.8	14.8
			N	3	3	3
3rd step	2000	Female	Mean	213.8	246.0	254.0
			S.D.	3.7	6.8	3.8
			N	3	3	3
4th step	2000	Female	Mean	213.7	244.0	248.2
			S.D.	11.5	10.8	11.9
			N	3	3	3

S.D. : Standard deviation, N : Number of animals

Table 4. Necropsy findings

Findings		1st step (300 mg/kg B.W.)	2nd step (300 mg/kg B.W.)	3rd step (2000 mg/kg B.W.)	4th step (2000 mg/kg B.W.)
		Female	Female	Female	Female
Number of animals		3	3	3	3
Gross findings	No gross findings	3	3	3	3
Internal findings	No gross findings	3	3	3	3

10. Appendices (Individual data)

Appendix 1. Clinical signs of female rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Hours after administration					Days after administration			
			30min	1 h	2 h	3 h	4 h	1	2	3	4
1st step	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2nd step	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3rd step	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4th step	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 1. (Continued) Clinical signs of female rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration									
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1st step	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2nd step	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3rd step	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4th step	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 2. Body weight of female rats

Unit : g

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration		
			0	7	14
1st step	300	2101	190.0	235.8	244.6
		2102	201.1	237.2	241.6
		2103	191.6	227.7	232.4
		Mean	194.2	233.6	239.5
		S.D.	6.0	5.1	6.4
2nd step	300	2201	204.7	236.6	261.9
		2202	195.3	214.6	241.0
		2203	208.3	249.3	269.5
		Mean	202.8	234.2	257.5
		S.D.	6.7	17.8	14.8
3rd step	2000	2301	214.6	253.7	257.5
		2302	217.1	243.2	249.9
		2303	209.8	241.1	254.7
		Mean	213.8	246.0	254.0
		S.D.	3.7	6.8	3.8
4th step	2000	2401	210.9	246.1	248.7
		2402	203.9	232.3	236.1
		2403	226.4	253.7	259.8
		Mean	213.7	244.0	248.2
		S.D.	11.5	10.8	11.9

S.D. : Standard deviation

Appendix 3. Necropsy findings of female rats

Animal Number : 2101 Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2102 Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2103 Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2201 Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2202 Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2203 Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2301 Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2302 Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2303 Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2401 Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2402 Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2403 Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings

11. Annexes

Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor)

시 험 물 질 관 련 정 보 기 록 지

시 험 물 질 (Test article)

시 험 물 질 조 제 (Formulation)

KTR-APM-001-701-1

Annex 2. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight.

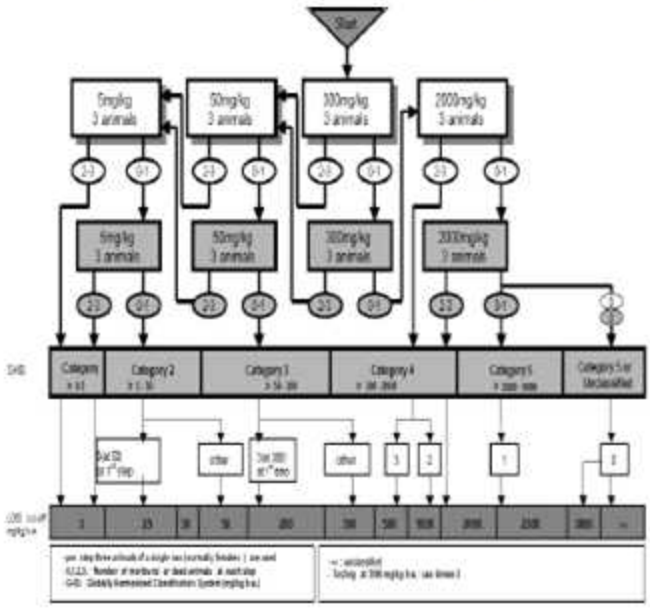


그림 1. 효소비전환된 오디추출물 (Mulberry, M)의 SD 랫드에 대한 급성 경구투여 독성시험결과

KTR

최 종 보 고 서

TBH-0270(KG-2013-077)

효소전환된 오디추출물

SD 랫드에 대한 효소전환된 오디추출물의 급성 경구투여 독성시험

한국화학융합시험연구원장

GLP 진술서
[GLP Statement]

시 험 제 목 : SD 랫드에 대한 효소전환된 오디추출물의 급성 경구투여 독성시험
[Study title]

시 험 번 호 : TBH-0270 (KG-2013-077)
[Study number]

시험의뢰자[Sponsor]
명 칭 : 전남대학교산학협력단
소 재 지 : 광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
대 표 자 : 백 장 선
연 락 처 : Tel. 062-530-0315 Fax. 062-530-0315

시 험 기 관[Test facility]
명 칭 : 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소
소 재 지 : 경기도 김포시 월곶면 고막리 7-6
운 영 책 임 자 : 박 종 일
연 락 처 : Tel. 031-999-3180 Fax. 031-999-3003

이 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임하에 수행되었으며, 보고서는 GLP 규정에 준수하여 실시하였다.

1. GLP 규정
1.1. 농촌진흥청 고시 제2012-14 호 (2012-02-07) "농약 등의 시험연구기관 지정 및 관리기준"
1.2. OECD "Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)"
2. 시험방법
2.1. 농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준", [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법, 12-1-2) 급성경구독성시험 : 급성독성등급법
2.2. OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 423 "Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method" (December 17, 2001)

본 보고서는 승인된 시험계획서에 따라 수행되었으며, 시험 진행 중 신뢰성을 저해할 만한 상황이 발생하지 않았음을 확인하였다.

신 성 섭 2013-07-01

신 성 섭[Shin Sung-sup, B.S.] Date
Study Director
Health Care Research Laboratory, KTR

신뢰성보증 확인서
[Quality Assurance Statement]

시 험 제 목 : SD 랫드에 대한 효소전환된 오디추출물 급성 경구투여 독성시험
[Study title]

시 험 번 호 : TBH-0270 (KG-2013-077)
[Study number]

점검한 시험단계	점 검 일 자	시험책임자 보 고 일 자	운영책임자 보 고 일 자
시험계획서(초안)의 점검	2013-04-02	2013-04-03	2013-04-03
시험계획서의 점검	2013-04-03	2013-04-03	2013-04-03
실험동물 입수 및 반입의 점검	2013-04-04	2013-04-04	2013-04-04
군분리의 점검	2013-04-08	2013-04-08	2013-04-08
시험물질투여의 점검(1)	2013-04-09	2013-04-09	2013-04-09
시험물질투여의 점검(2)	2013-04-11	2013-04-11	2013-04-11
시험물질투여의 점검(3)	2013-04-16	2013-04-16	2013-04-16
일반증상관찰의 점검	2013-04-18	2013-04-18	2013-04-18
실험동물 부검의 점검(1)	2013-04-30	2013-04-30	2013-04-30
실험동물 부검의 점검(2)	2013-05-02	2013-05-02	2013-05-02
시험기초자료의 점검	2013-05-15	2013-05-16	2013-05-16
최종보고서(초안)의 점검	2013-05-15	2013-05-16	2013-05-16
최종보고서의 점검	2013-07-01	2013-07-01	2013-07-01

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 신뢰성보증부서는 시험계획서에 따라 기록된 점검일자에 주요 시험 단계의 점검을 수행 하였다.

본 최종보고서는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 신뢰성보증부서에 의하여 점검되었으며, 보고된 시험결과는 시험기초자료 및 시험 과정을 정확하게 반영하고 있다.

시험에 대한 점검 결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고되었다. 이러한 점검을 바탕으로 최종보고서를 검토하였다. 본 시험은 GLP 규정에 따라 수행되었다.

홍 승 국 KSQA Seung-Guk Hong 2012-11 CERTIFIED QA PROFESSIONAL 2013-07-01

홍 승 국 [Hong Seung-guk, M.S.] Date
Quality Assurance Manager
Health Care Research Laboratory, KTR

시험참여자
[Study Staffs]

다음의 시험자는 시험 중 중요한 시험단계 및 기록을 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서(SOPs)와 본시험의 시험계획서에 따라 수행하였다.

시험 담당자 : 김준호/B.S.
이택진/B.S.

시험물질 조제책임자 : 김민석/B.S.

동물관리 책임자 : 박학수/D.V.M., Ph.D. Candidate

검역 책임자 : 신성섭/B.S.

보고서 작성자 : 신성섭/B.S.

목 차
[Contents]

보고서표지
GLP 준수서 [GLP statement] ····· I
신뢰성보증 확인서 [Quality assurance statement] ····· II
시험참여자 [Study staffs] ····· III
목차 [Contents] ····· IV
1. 요약 (Summary) ····· 1
2. 서론 (Introduction) ····· 2
2.1. 시험일정 ····· 2
3. 재료 및 방법 (Materials & methods) ····· 3
3.1. 시험물질 및 부형제 ····· 3
3.2. 시험물질 조제 ····· 3
3.3. 시험물질 분석 ····· 3
3.4. 시험계 ····· 3
3.5. 사육환경 ····· 4
3.6. 시험군의 구성 ····· 5
3.7. 시험물질의 투여 경로 및 방법 ····· 5
3.8. 관찰항목 ····· 5
4. 자료의 보관 (Archives) ····· 6
5. 시험계획서의 수정 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan) ····· 6
6. 결과 (Results) ····· 7
6.1. 사망률 및 일반증상 (Table 1, 2 and Appendix 1) ····· 7
6.2. 체중변화 (Table 3, Appendix 2) ····· 7
6.3. 부검소견 (Table 4, Appendix 3) ····· 7
7. 고찰 및 결론 (Discussion & conclusion) ····· 8
8. 참고문헌 (References) ····· 9
9. Tables (Group summary) ····· 10
Table 1. Mortality ····· 10
Table 2. Clinical signs ····· 10
Table 3. Body weight ····· 11
Table 4. Necropsy findings ····· 11
10 Appendices (Individual data) ····· 12
Appendix 1. Clinical signs of female rats ····· 12
Appendix 1. (Continued) Clinical signs of female rats ····· 12
Appendix 2. Body weight of female rats ····· 13
Appendix 3. Necropsy findings of female rats ····· 14
11. Annexes ····· 15
Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor) ····· 15
Annex 2. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight ····· 16

1. 요약 (Summary)

효소전환된 오디추출물에 대한 급성 경구투여 독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 랫드를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg body weight (1^{st} , 2^{nd} step)와 2000 mg/kg body weight (3^{rd} , 4^{th} step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 관찰하였다.

- 실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 생존동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.
- 생존동물의 부검 소견 결과, 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 효소전환된 오디추출물은 화학물질 분류 및 표지에 관한 세계조화시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5 (2000 mg/kg body weight < LD_{50} < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

2. 서론 (Introduction)

본 시험은 SD 랫드를 이용하여 효소전환된 오디추출물을 급성 경구투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 실시하였다.

본 시험은 동물보호법 법률 제 10995호 (2011-08-04, 전부개정)를 근거한 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 실험동물의 사용과 관리에 관한 규정 (실험동물윤리위원회, 2010-12-10)을 준수하여 실시하였다.

2.1 시험일정

시험개시일	:	2013-04-03
실험동물입수일	:	2013-04-04
검역 및 순화기간일	:	2013-04-04 ~ 2013-04-08
군분리일	:	2013-04-08
투여일	:	2013-04-09(1^{st} step), 2013-04-11(2^{nd} step), 2013-04-16(3^{rd} step), 2013-04-18(4^{th} step)
일반증상 관찰기간일	:	2013-04-09 ~ 2013-04-23(1^{st} step), 2013-04-11 ~ 2013-04-25(2^{nd} step), 2013-04-16 ~ 2013-04-30(3^{rd} step), 2013-04-18 ~ 2013-05-02(4^{th} step)
부검일	:	2013-04-23(1^{st} step), 2013-04-25(2^{nd} step), 2013-04-30(3^{rd} step), 2013-05-02(4^{th} step)
최종보고서(초안) 제출일	:	2013-05-20
시험종료일	:	2013-07-01

3. 재료 및 방법 (Materials & methods)

3.1 시험물질 및 부형제

3.1.1 시험물질 (Annex 1.)

물 질 명 : 효소전환된 오디추출물
공 급 원 : 전남대학교
제 조 일 : 2013-03-18
입 수 일 : 2013-03-20
입 수 량 : 34.767 g (Gross)
Lot No. : 20130310-2
보 관 조 건 : 냉장 [(2 ~ 8)℃]
유 효 기 간 : 2014-03-17 (제조 후 1 년)
외 관 및 성 상 : 적색의 분말
잔여시험물질처리 : 반환
취급(폐기)시주의사항 : 없음

3.1.2 부형제

물 질 명 : 멸균증류수 (주사용수)
제 조 원 : 대한약품공업(주)
Lot No. : L8L0K21

3.2 시험물질 조제

본 시험물질을 칭량한 후 부형제인 멸균증류수 (주사용수)에 30 mg/mL (1^{st} - 2^{nd} step) 및 200 mg/mL (3^{rd} - 4^{th} step)농도로 조제하여 사용하였다.

3.3 시험물질 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 투여액의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않았다.

3.4 시험계

계통 및 종 : Crl:CD(SD)-Rat
공급원 : (주)오리엔트 바이오 (경기도 가평군 북면 북동리 699-13)
입수시 성별 및 동물수 : 암컷 14 마리
입수시 동물 주령 및 체중범위 : 8 주령, 197.0 g ~ 219.7 g
투여시 성별 및 동물수 : 암컷 12 마리 (1^{st} ~ 4^{th} step 각각 3 마리)
투여시 동물 주령 및 체중범위 : 9 주령, 202.4 g ~ 211.5 g (1^{st} step)

9 주령, 199.6 g → 217.1 g (2nd step)
10 주령, 223.2 g → 229.2 g (3rd step)
10 주령, 216.3 g → 235.4 g (4th step)

3.4.1 시험계의 선택사유
본 시험에 사용된 랫드는 급성 및 반복투여독성시험 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교적 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.4.2 검역 및 순화
동물을 입수 후 5 일 동안 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 동물사육실의 환경하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다.

3.4.3 개체식별
개체식별은 유성매직을 이용하여 각 개체번호를 꼬리에 표시하였다. 순화기간에는 빨간색 매직을 이용하고, 투여 및 관찰기간에는 검은색 매직을 사용하였다. 사육상자는 시험번호, 시험물질명, 시험항목, 입수일, 순화기간, 군분리일, 시험기간, 성/동물번호 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하여 식별하였다.

3.4.4 군분리
순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체가 관찰되지 않아, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 무작위법으로 군분리를 실시하였다.

3.4.5 잔여동물의 처리
잔여동물은 실험종료일에 안락사 시켰다.

3.5 사육환경

3.5.1 동물실 번호 : 청정사육실 7

3.5.2 환경조건
본 시험의 환경은 온도 (22 ± 3)℃, 상대습도 (50 ± 20)%, 환기횟수 (10 ~ 15) 회/h, 조명주기 12 시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음수를 급여하여 사육하였으며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.5.3 사육환경 모니터링
시험기간 중 동물실의 온 · 습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 30 분마다 측정 되었으며, 조도 등의 환경조건은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서(SOPs)에 따라 정기적 (분기당 1 회)으로 측정되었다. 동물실의 환경 측정 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

3.5.4 사육조건
순화 및 시험기간 중 청정사육실내 스텐인레스제 사육상자 [270(W) ㎜ × 500(D) ㎜ × 200(H) ㎜, 대중기기]에 3 마리 이하로 넣어 사육하였다.

3.5.5 사료 및 음수
사료는 실험동물용 쥐 사료 [(주) 카길에그리퓨리나 (전라북도 군산시 소룡동 56-4)]를, 음수는 UV 조사된 여과수를 사용하여 자유섭취시켰다.

3.5.6 사료 및 음수 중의 오염물질 확인
사료의 오염물질은 사료 제조업체의 정기적 검사에 따른 사료 성적서를 사료공급자로부터 받아 확인하였고, 음수의 오염물질은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 해당 표준작업지침서(SOPs)에 따른 정기적 검사를 통해 확인한 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

3.6 시험군의 구성

3.6.1 본시험
농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준" 고시에 따라 시험물질의 독성정보가 없어 300 mg/kg B.W. 용량으로 시작하였다. 단계별 투여 용량은 300 mg/kg B.W.(1st · 2nd step) 및 2000 mg/kg B.W. (3rd · 4th step)으로 각각 3 마리씩 투여하였다. 시험물질 투여 간격은 일반증상 및 정도에 의해 결정되었다. (Annex 2. 참조)

- 시험군의 구성

시험	시험물질	성	마리수	동물번호	투여량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)
1st step	효소전환된 오디추출물	암컷	3	2101 → 2103	300	10
2nd step		암컷	3	2201 → 2203	300	10
3rd step		암컷	3	2301 → 2303	2000	10
4th step		암컷	3	2401 → 2403	2000	10

3.7 시험물질의 투여 경로 및 방법

3.7.1 사료의 결식
투여 전 하루 밤 사료를 공급하지 않았고, 음수는 공급하였다.

3.7.2 투여방법
랫드용 경구 투여 주사기를 이용하여 위 내에 1회 강제 투여하였다.

3.8 관찰항목

3.8.1 일반증상 관찰
전 동물에 대하여 매일 1 회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단 투여 당일에는 투여 후 4 시간까지는 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 후 14 일까지 실시하였다.

3.8.2 체중변화
체중은 입수시, 군분리시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 7 일 및 14 일째에 측정하였다.

3.8.3 부검 소견
투여 후 14 일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 후, 부검하여 육안으로 장기를 검사하였다.

4. 자료의 보관 (Archives)

시험기간중에 작성된 모든 기록에 관해서는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소에서 최종보고서 발급 후 5 년간 보관한다. 보관기간 이후의 시험기초자료 및 시험물질의 보관에 관하여는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다. 기록의 보관장소는 자료보관실 (Ⅰ), (Ⅱ)로 하며 보관될 주된 시험기초자료는 다음과 같다.

(1) 시험계획서에 관한 기록
(2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
(3) 시험계에 관한 기록 및 자료
(4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
(5) 시험의뢰자와의 송수신 기록 (필요 시)
(6) 최종보고서에 관한 기록

5. 시험계획서의 수정 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan)

시험기간 동안 시험계획서에 대한 수정 및 이탈사항은 없었다.

6. 결과 (Results)

6.1 사망률 및 일반증상 (Table 1, 2 and Appendix 1)

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.

6.2 체중변화 (Table 3, Appendix 2)

생존동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 보였다.

6.3 부검소견 (Table 4, Appendix 3)

모든 개체의 주요장기에 대한 육안적 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상 소견이 관찰된 동물은 없었다.

7. 고찰 및 결론 (Discussion & conclusion)

호소전환된 오디추출물에 대한 급성 경구투여 독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 랫드를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg B.W. (1st - 2nd step)와 2000 mg/kg B.W. (3rd - 4th step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 관찰하였다.

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 생존동물에 대한 체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 생존동물의 부검 소견 결과, 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 호소전환된 오디추출물은 화학물질 분류 및 표지에 관한 세계조화시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5 (2000 mg/kg body weight < LD_{50} < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

8. 참고문헌 (References)

- 농촌진흥청 고시 제2012-14 호 (2012-02-07) "농약 등의 시험연구기관 지정 및 관리기준"

- 농촌진흥청 고시 제2012-37 호 (2012-07-12), "농약 및 원제의 등록기준" , [별표 12] 인축 독성 시험 기준과 방법, 12-1-20 급성경구독성시험 : 급성독성등급법

- OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 423 "Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method" (December 17, 2001)

- OECD Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)

9. Tables (Group summary)

Table 1 . Mortality

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Mortality
		Female
1st step	300	0 % (0 / 3)[a]
2nd step	300	0 % (0 / 3)
3rd step	2000	0 % (0 / 3)
4th step	2000	0 % (0 / 3)

[a] : Number of dead animals / Number of tested animals

Table 2 . Clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs
1st step	300	Female	3	Normal
2nd step	300	Female	3	Normal
3rd step	2000	Female	3	Normal
4th step	2000	Female	3	Normal

Table 3. Body weight

Unit : g

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Days after administration		
				0	7	14
1st step	300	Female	Mean	206.8	248.7	266.4
			S.D.	4.6	14.4	16.7
			N	3	3	3
2nd step	300	Female	Mean	206.9	252.6	261.7
			S.D.	9.1	9.0	8.8
			N	3	3	3
3rd step	2000	Female	Mean	226.1	261.1	273.3
			S.D.	3.0	7.6	10.8
			N	3	3	3
4th step	2000	Female	Mean	223.6	259.8	270.1
			S.D.	10.3	13.7	15.1
			N	3	3	3

S.D. : Standard deviation, N : Number of animals

Table 4. Necropsy findings

Findings		1st step (300 mg/kg B.W.)	2nd step (300 mg/kg B.W.)	3rd step (2000 mg/kg B.W.)	4th step (2000 mg/kg B.W.)
		Female	Female	Female	Female
Number of animals		3	3	3	3
Gross findings	No gross findings	3	3	3	3
Internal findings	No gross findings	3	3	3	3

10. Appendices (Individual data)

Appendix 1. Clinical signs of female rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Hours after administration					Days after administration			
			30min	1 h	2 h	3 h	4 h	1	2	3	4
1st step	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2nd step	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3rd step	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4th step	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 1. (Continued) Clinical signs of female rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration									
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1st step	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2nd step	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3rd step	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4th step	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 2. Body weight of female rats

Unit : g

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration		
			0	7	14
1st step	300	2101	206.4	235.7	253.8
		2102	202.4	246.2	260.1
		2103	211.5	264.1	285.4
		Mean	206.8	248.7	266.4
		S.D.	4.6	14.4	16.7
2nd step	300	2201	217.1	262.1	268.5
		2202	199.6	244.1	251.8
		2203	203.9	251.6	264.9
		Mean	206.9	252.6	261.7
		S.D.	9.1	9.0	8.8
3rd step	2000	2301	225.8	263.5	265.9
		2302	223.2	252.6	268.3
		2303	229.2	267.2	285.7
		Mean	226.1	261.1	273.3
		S.D.	3.0	7.6	10.8
4th step	2000	2401	219.0	256.0	260.7
		2402	235.4	275.0	287.5
		2403	216.3	248.4	262.1
		Mean	223.6	259.8	270.1
		S.D.	10.3	13.7	15.1

S.D. : Standard deviation

Appendix 3. Necropsy findings of female rats

Animal Number : 2101 Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2102 Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2103 Group : 1st step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2201 Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2202 Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2203 Group : 2nd step Dose : 300 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2301 Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2302 Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2303 Group : 3rd step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2401 Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2402 Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings
Animal Number : 2403 Group : 4th step Dose : 2000 mg/kg Terminal sacrifice : Day 14
Gross findings : No gross findings Internal findings : No gross findings

11. Annexes

Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor)

시 험 물 질 관 련 정 보 기 록 지

KTR-APM-001-F01-1

Annex 2. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight.

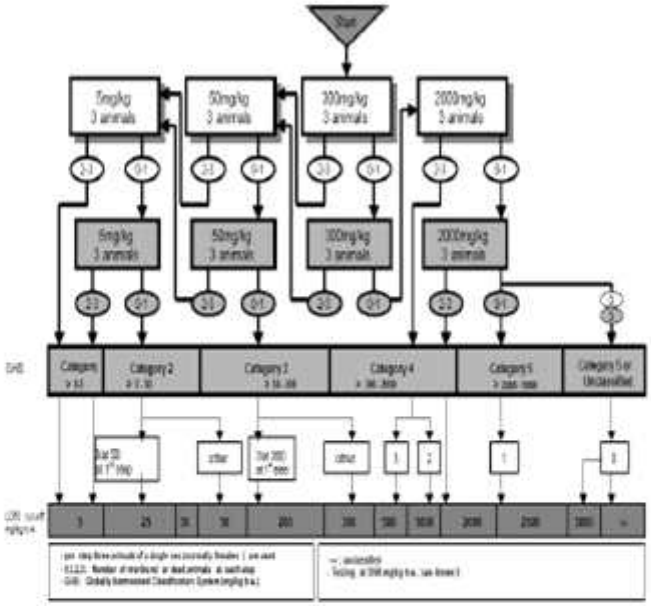


그림 2. 효소전환된 오디추출물 (Mulberry derivative, MD)의 SD 랫드에 대한 급성 경구투여 독성시험결과

■ 식이유발 고지혈증 마우스 모델에서의 효능평가

1) 효소전환 오디추출물이 비만에 미치는 영향

- 효소전환 오디추출물이 투여농도와 경로에 따라 비만에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해, 고지방사료를 식이시켜 비만을 유도함과 동시에 오디추출물(M)과 효소전환 오디추출물(MD)을 각각 5, 25, 125 mg/Kg의 농도로 16주동안 3일 간격으로 경구투여를 함. 16주 후 마우스를 희생시켜 체적을 관찰한 결과, 오디추출물과 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았음 **(그림 3)**. 마우스들의 무게를 매주 측정한 결과 두 그룹 모두 오디추출물이나 효소전환 오디추출물에 의한 몸무게 감소효과는 나타나지 않았음 **(그림 4A)**. 에너지 대사조절에 미치는 영향을 알아보기 위해 rectal temperature를 측정하였으나 그룹간의 차이는 없었음 **(그림 4B)**.

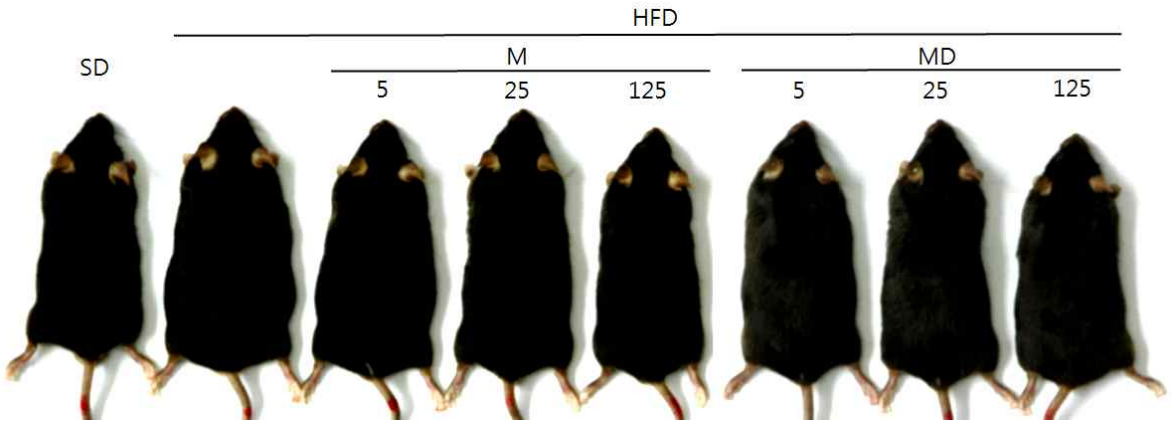


그림 3. 비만마우스모델에서 효소전환 오디추출물에 의한 체적변화

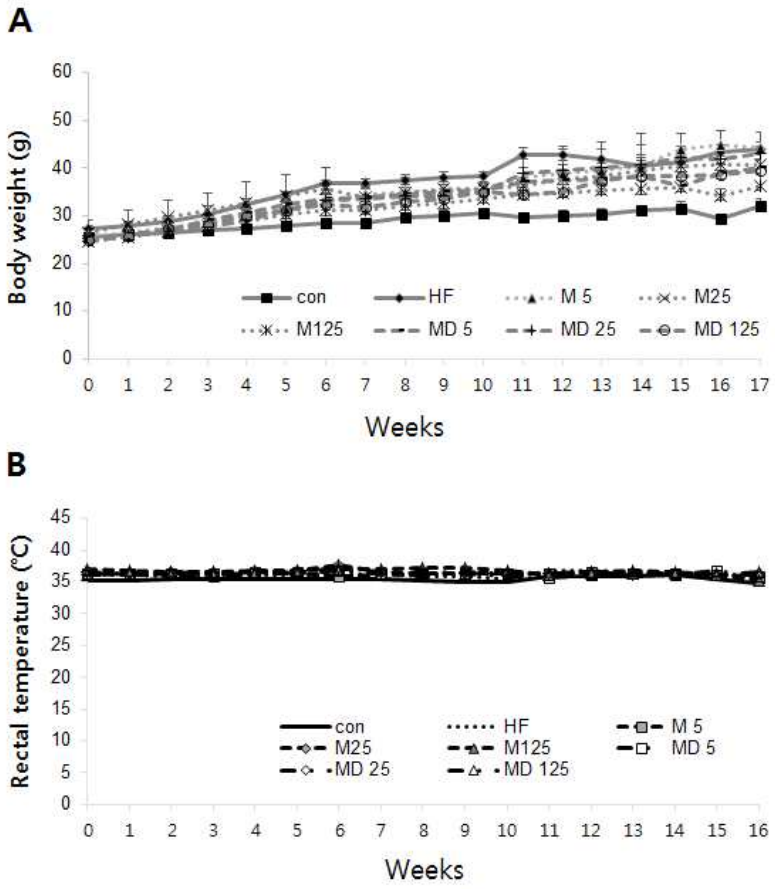


그림 4. 효소전환 오디추출물에 의한 몸무게와 rectal temperature 변화

- 비만이 되면 지방세포의 크기 증가로 인해 지방조직의 부피와 크기가 증가하는 양상을 보이는데, 비만마우스 간조직 **(그림 5A),** 부고환지방 **(그림 5B)**, 갈색지방 **(그림 5C)**, 을 분리하여 크기와 무게를 측정함. 그 결과, 오디추출물을 투여한 마우스와 효소전환 오디추출물을 경구 투여한 마우스간의 유의적인 차이는 확인되지 않았음.

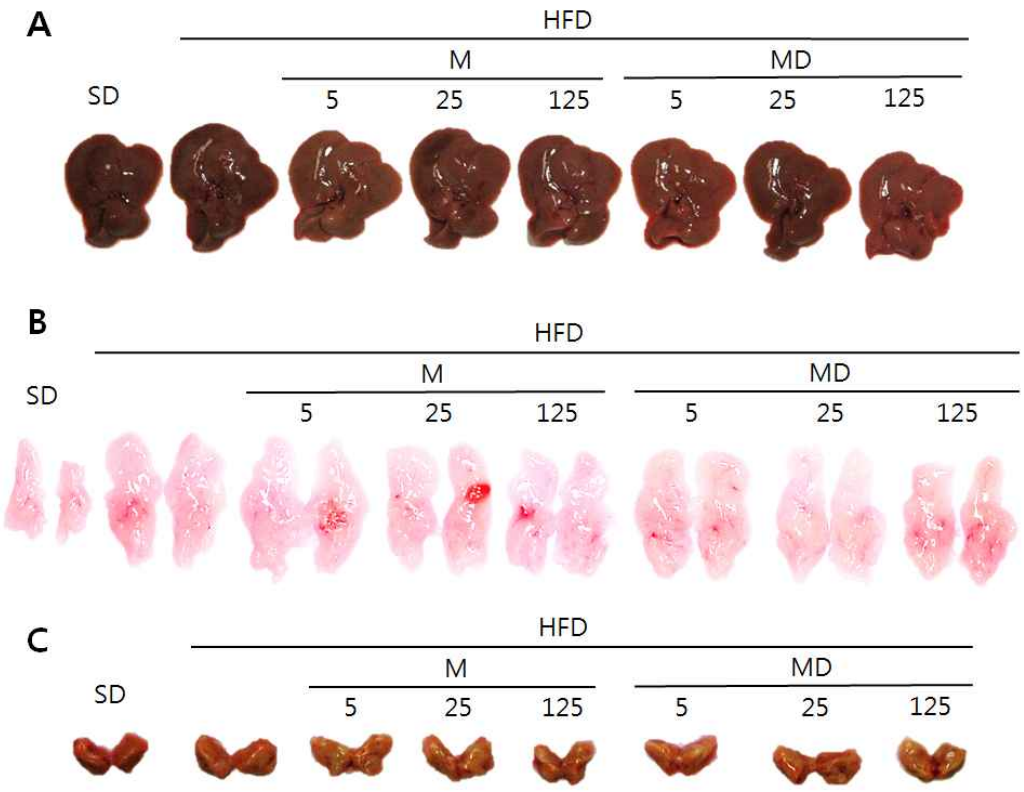


그림 5. 효소전환 오디추출물에 의한 지방조직과 간조직의 변화 확인

2) 효소전환 오디추출물이 고지혈증에 미치는 영향

- 고지방사료에 의해 비만이 유도됨에 따라 혈중 LDL, HDL, TAG cholesterol의 수치가 높아지는 데, 오디추출물 및 효소전환 오디추출물이 투여농도와 경로에 따라 고지혈증의 완화에 영향을 미치는지 확인함 **(그림 6)**. 그 결과, 두 그룹간의 투여 농도에 따른 고지혈증 개선 효과는 보이지 않았음.

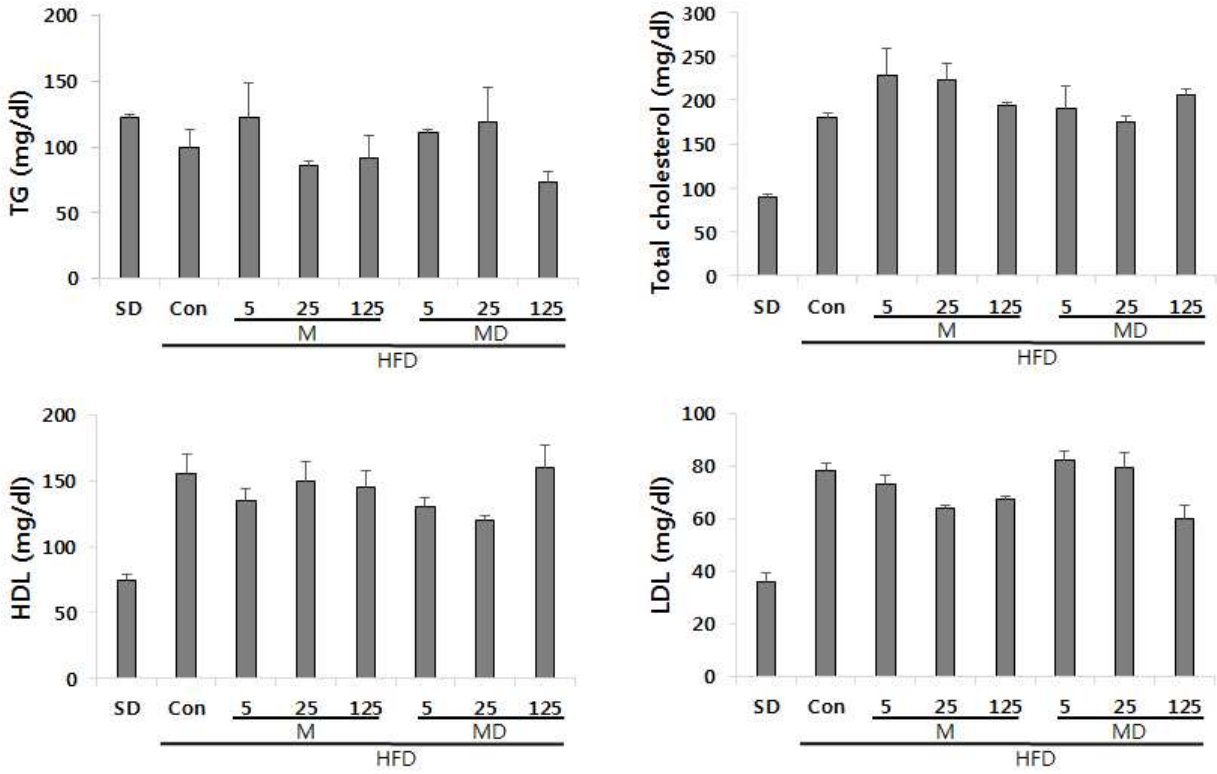


그림 6. 효소전환 오디추출물에 의한 혈중 metabolic parameter들의 변화 확인

- 비만에 의해 지방조직의 크기가 증가하고 간 조직에서 지방침착이 증가하게 되면 대사작용의 불균형이 일어나면서 insulin resistance (인슐린 저항성)와 glucose tolerance (글루코스 저항성)가 일어나게 되는데 이로 인해 제 2형 당뇨가 발생하게 되고 지방간이 일어나게 됨. 16주 동안 고지방사료를 식이하고 오디추출물 또는 효소전환 오디추출물을 투여한 마우스에 각각 insulin과 glucose를 주사하여 insulin resistance test와 glucose tolerance test를 시행함. 그 결과, 오디추출물 또는 효소전환 오디추출물에 의한 비정상적인 인슐린 저항성과 글루코스 저항성이 개선되지 않음을 확인하였음 **(그림 7)**.

3) 효소전환 오디추출물이 비만마커 유전자 발현에 미치는 영향

- 오디추출물 및 효소전환 오디추출물이 비만에 미치는 영향을 확인하기 위해 비만이 유발될 시 증가하는 대표적 비만마커 유전자들의 발현 변화를 PCR을 통해 관찰하였음. 그 결과, 비만이 유도될 시 대표적 비만마커 유전자들인 PPARɣ-1,2, CEBP-2, FAS, CD36, Adiponectin 유전자의 발현이 증가되었지만, 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의해 비만마커 유전자들의 발현이 감소되지 않았음 **(그림8)**. 이는 오디추출물 및 효소전환 오디추출물이 비만 개선에 큰 효과를 보이지 않는 것으로 사료됨.

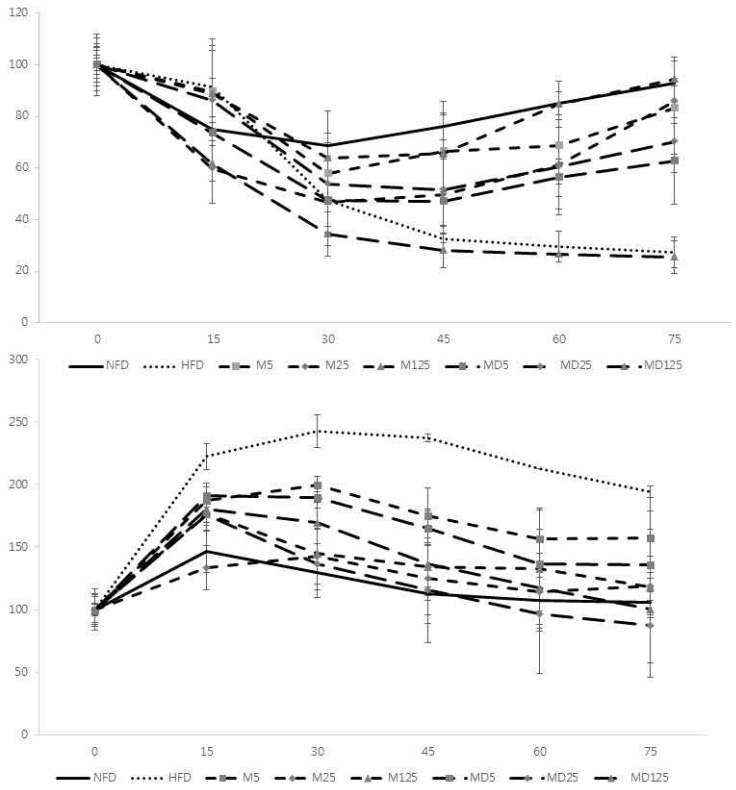


그림 7. 효소전환 오디추출물에 의한 ITT, GTT 변화 결과

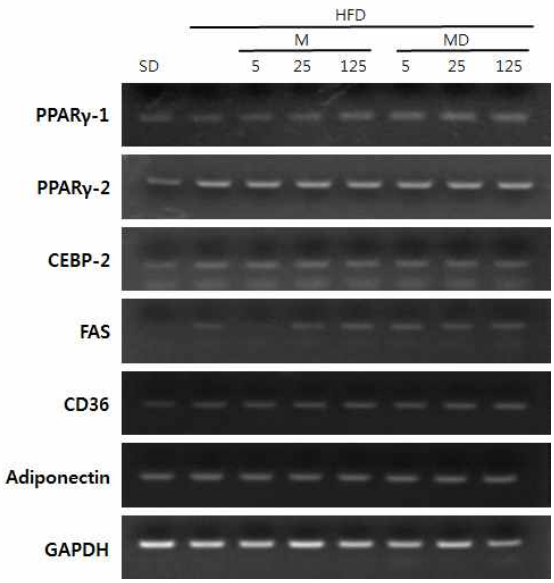


그림 8. 효소전환 오디추출물에 의한 비만마커 유전자들의 발현 변화

- 종합하여 볼 때, 오디추출물과 효소전환 오디추출물은 식이유발 고지혈증 마우스 모델에서 비만, 고지혈증 및 고혈당 개선에 큰 효과를 미치지 않는 것으로 생각됨.

■ IBD 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여 시 투여용량 및 항염 효능 확인

1) IBD 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여에 의한 IBD 염증지표 변화 확인

- IBD 마우스 모델에서 오디추출물(M) 및 효소전환 오디추출물(MD)의 투여용량과 투여경로에 따라 해당질병에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, C57BL/6 10주령 된 마우스에 DSS로 IBD를 유발시킨 후 오디추출물과 효소전환 오디추출물을 각각 20, 100, 500 μg/Kg의 농도로 7일간 매일 복강투여를 함. 마우스에 DSS를 이용하여 점막자가면역질환을 유도하게 되면 체중감소 및 대장의 길이가 감소하게 되어 병의 발병정도를 짐작할 수 있음. 체중은 DSS를 투여를 할 때부터 매일 같은 시간에 측정되었고 대장의 길이는 6일째 마우스를 희생한 후 대장을 적출하여, 충수돌기와 대장접합부부터 직장상부까지의 길이를 측정함. 질병활성지표(disease activity index, DAI)는 체중감소, 점액혈성 설사, 대장 길이의 감소 등의 임상증상을 통해 평가되는데 체중 감소량은 매일 같은 시간에 측정을 하였고, 설사는 매일 액상 대변물질이 있는가를 확인함. 직장출혈은 뚜렷한 혈성 설사와 심한 직장출혈이 있는 경우에 구분해서 점수가 부여됨. 실험 후 마우스를 희생시켜 장의 길이를 확인함. 그 결과, DSS에 의해 감소된 대장의 길이가 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 복강투여한 그룹에서 모두 회복되었으며, 오디추출물보다 효소전환 오디추출물이 감소된 대장 길이의 회복에 효과적임을 알 수 있었음 **(그림 9)**. 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 농도변화에 따른 대장 길이 회복에는 큰 차이를 보이지 않았음.

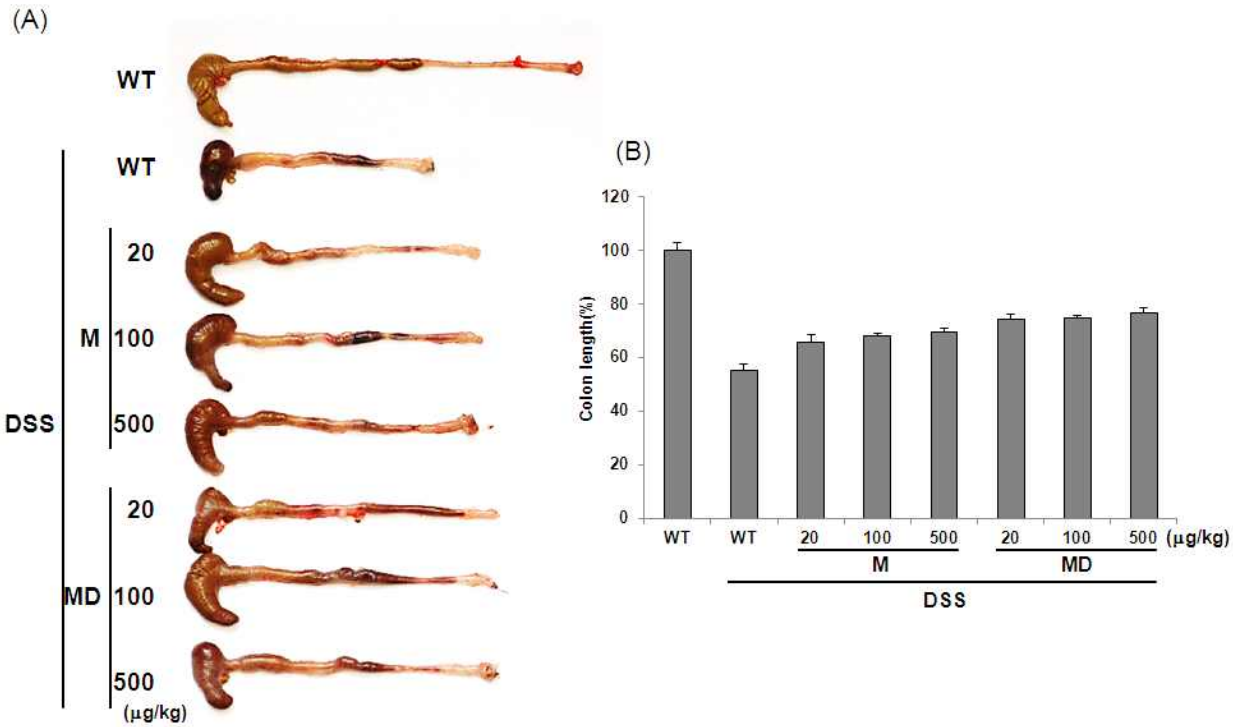


그림 9. IBD 마우스모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여에 의한 대장 길이의 변화 확인

- IBD 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여에 의한 체중변화는 어떠한지 조사하기 위하여, 오디추출물과 효소전환 오디추출물을 마우스에 복강투여한 후 마우스의 몸무게

변화와 DAI 지수를 확인함. 그 결과 DSS를 투여한 그룹에서 체중이 감소하는 것을 확인하였으며 오디추출물과 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹에서는 대조군과 비교하여 체중변화가 적은 것을 확인함. 농도 변화에 따른 체중변화는 없었으나 오디추출물 보다 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹에서 몸무게 변화가 더 적은 것을 확인할 수 있었음. DAI 지수를 관찰한 결과 대조군과 비교하여 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹에서 그 스코어가 적은 것을 확인함 **(그림 10)**.

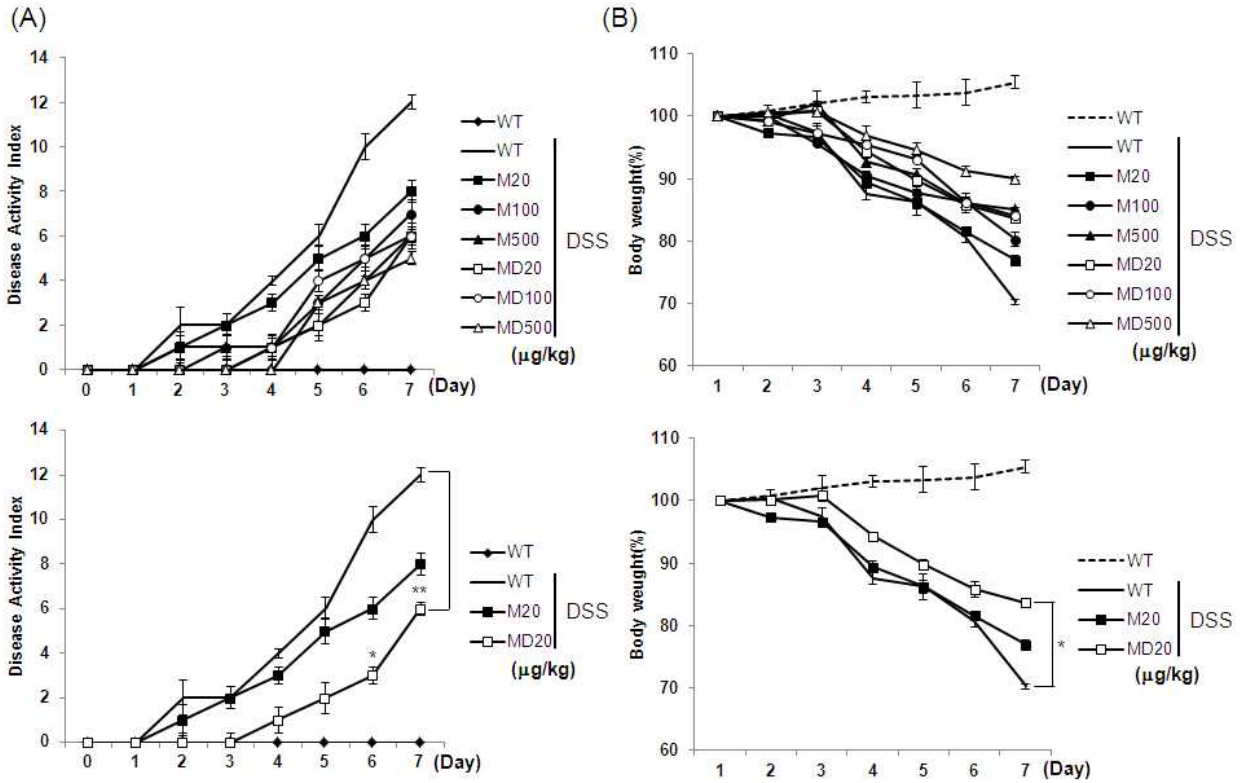


그림 11. IBD 마우스모델에서 복강투여된 효소전환 오디추출물에 의한 몸무게와 DAI 지수의 변화

2) IBD 마우스 모델에서 복강투여된 효소전환 오디추출물의 대장 점막조직의 손상 완화 및 염증관련 사이토카인의 발현변화 확인

- DSS로 유발된 점막자가면역질환에서 복강투여된 오디추출물(M) 및 효소전환 오디추출물(MD)이 대장 점막조직 손상에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하기 위해, Hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 함. DSS를 처리하지 않은 WT의 대장 조직은 융털간의 경계, 결합조직과 융털간의 명확한 경계 그리고 일반적인 면역세포의 수 등이 잘 보존되어 있는 것을 관찰할 수 있었음. DSS만을 처리한 그룹에서는 융털모양이 나타나지 않았고 세포간의 경계도 많이 허물어져 대장 점막조직의 손상이 크게 되었음을 알 수 있었음. 하지만 오디추출물 또는 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹에서는 융털의 경계가 일정부분 유지되어 있음을 관찰하였으며, 오디추출물 투여 그룹과 비교하여 효소전환 오디 추출물을 투여한 그룹에서 대장 점막조직 손상이 완화되었음을 알 수 있었음. 오디 추출물 및 효소전환 오디

추출물 모두 용량이 증가됨에 따라 그 손상이 적음을 관찰함 **(그림 11)**.

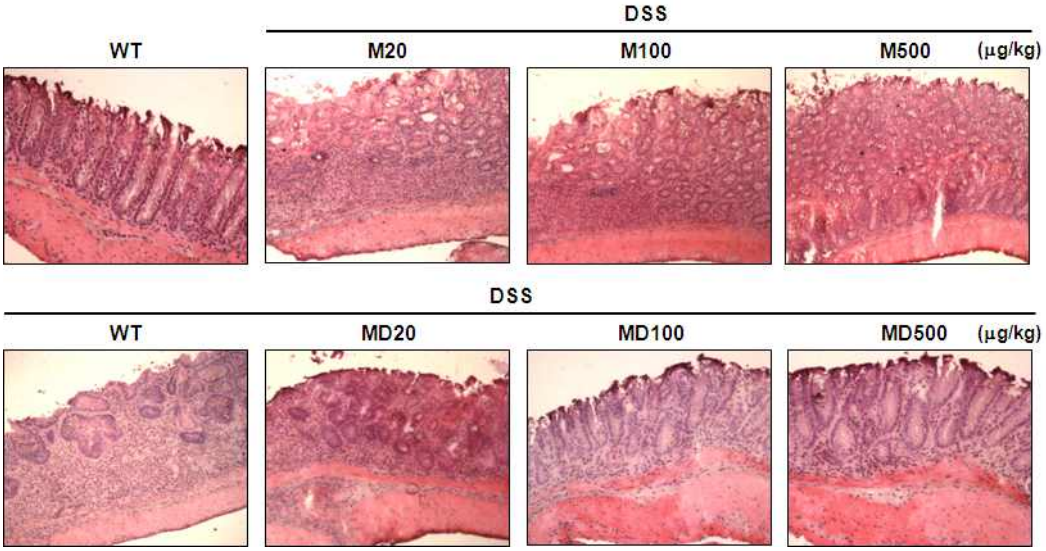


그림 11. IBD 마우스모델에서 복강투여된 효소전환 오디추출물에 의한 대장점막조직의 손상완화

- DSS에 의해 유도된 IBD 마우스 모델에서 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 항염 효능을 검증하기 위하여 염증 지표인 사이토카인들의 유전자들의 발현을 확인함. 그 결과, DSS에 의해 증가된 염증 사이토카인 유전자 발현이 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹 모두 용량이 증가됨에 따라 감소하였으며, 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹에서 염증 사이토카인의 발현이 현저하게 감소됨을 확인함. 항염증 사이토카인인 인터류킨 10 (IL-10) 의 발현은 DSS에 의해 감소되었으며, 이는 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 복강투여한 그룹 모두 정상 레벨로 회복되었음 **(그림 12)**.

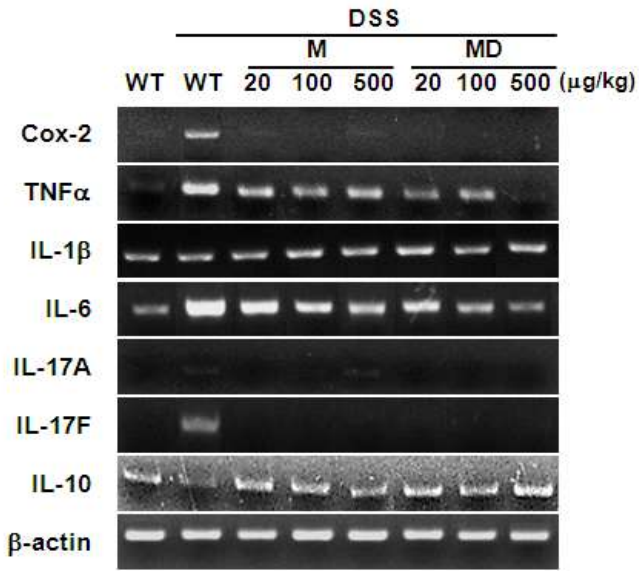


그림 12. IBD 마우스 모델에서 복강투여된 효소전환 오디추출물에 의한 염증 유전자 발현

3) 복강투여된 효소전환 오디추출물에 의한 면역글로불린 생성 및 면역세포의 변화 확인

- 오디 추출물(M) 및 효소전환 오디추출물(MD)에 의한 면역글로불린 A (IgA) 의 변화를 확인하기 위하여 ELISA를 수행함. IBD 마우스 모델에서 오디 추출물 또는 효소전환 오디추출물을 복강투여한 각각의 마우스에서 대변을 채취한 후 PBS에 섞어 원심분리하여 그 상층액을 따서 실험에 사용함. 그 결과, DSS에 의해 증가된 IgA 레벨이 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 복강투여한 마우스에서 정상 레벨로 감소하는 것을 확인하였으며, 오디 추출물 및 효소전환 오디추출물의 투여용량이 높을수록 감소폭이 증가하는 것을 확인할 수 있었으나 오디추출물과 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹 간 큰 차이는 보이지 않음 **(그림 13)**.

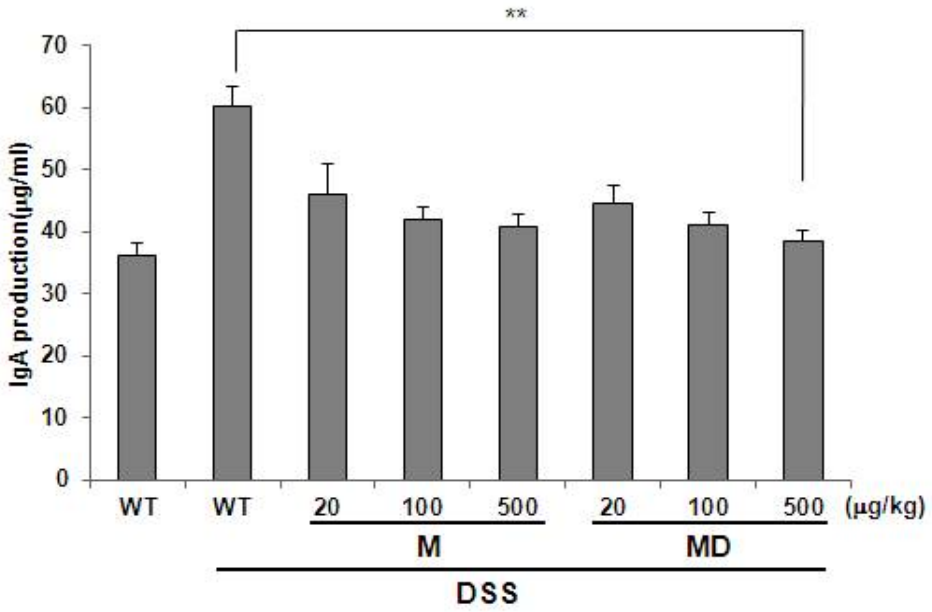


그림 13. IBD 마우스모델에서 복강투여된 효소전환 오디추출물에 의한 면역글로불린 A의 발현변화

- 효소전환 오디추출물에 의한 면역세포의 변화를 확인하기 위하여 마우스 대장 조직으로부터 세포를 분리한 후 유세포 분석기를 이용하여 T cell의 변화를 관찰함. 그 결과, DSS에 의해 감소된 T cell population이 오디추출물 또는 효소전환 오디추출물을 복강투여한 그룹에서 증가됨을 알 수 있었으나 투여용량에 따른 변화는 관찰되지 않았음 **(그림 14)**.

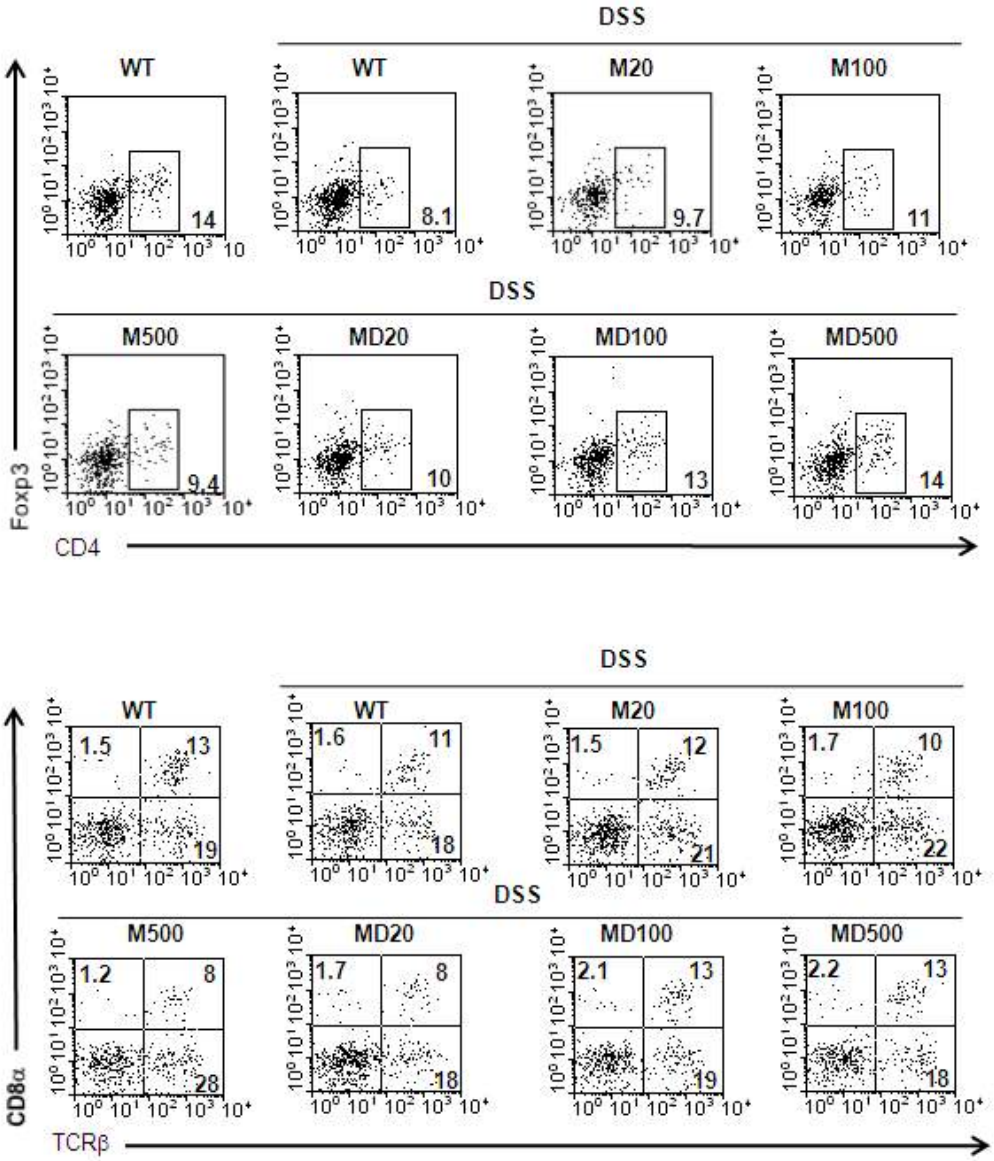


그림 14. IBD 마우스모델에서 복강투여된 효소전환 오디추출물에 의한 T cell의 증가

- 이 결과를 바탕으로 DSS에 의해 유도된 IBD 마우스 모델에서 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 복강투여에 의해 점막자가면역질환이 완화되었음을 알 수 있었고, 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물이 보다 효과적임을 알 수 있었음. 투여용량의 경우 오디 추출물 및 효소전환 오디추출물 모두 500 ug/Kg의 농도가 가장 효과적임을 알 수 있었음.

■ IBD 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여 시 투여용량 및 항염 효능 확인

1) IBD 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여가 마우스 점막자가면역질환에 미치는 영향 확인

- IBD 마우스 모델에서 오디추출물(M) 및 효소전환 오디추출물(MD)의 농도별 경구투여에 따른 점막자가면역질환에 미치는 영향을 알아보기 위하여, C57BL/6 10주령 마우스에 DSS로 IBD를 유발시킨 마우스에 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 각각 5, 25, 125 mg/Kg의 농도로 7일간 매일 경구투여 함. 그 결과, DSS에 의해 감소된 대장의 길이가 오디 추출물 및 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹 모두에서 회복되었으며, 특히 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹에서 보다 회복되었음 **(그림 15)**. 투여용량별 대장의 길이 변화를 관찰한 결과 오디추출물 및 효소전환 오디추출물 모두 투여용량이 증가됨에 따라 감소된 대장 길이가 회복됨을 알 수 있었음.

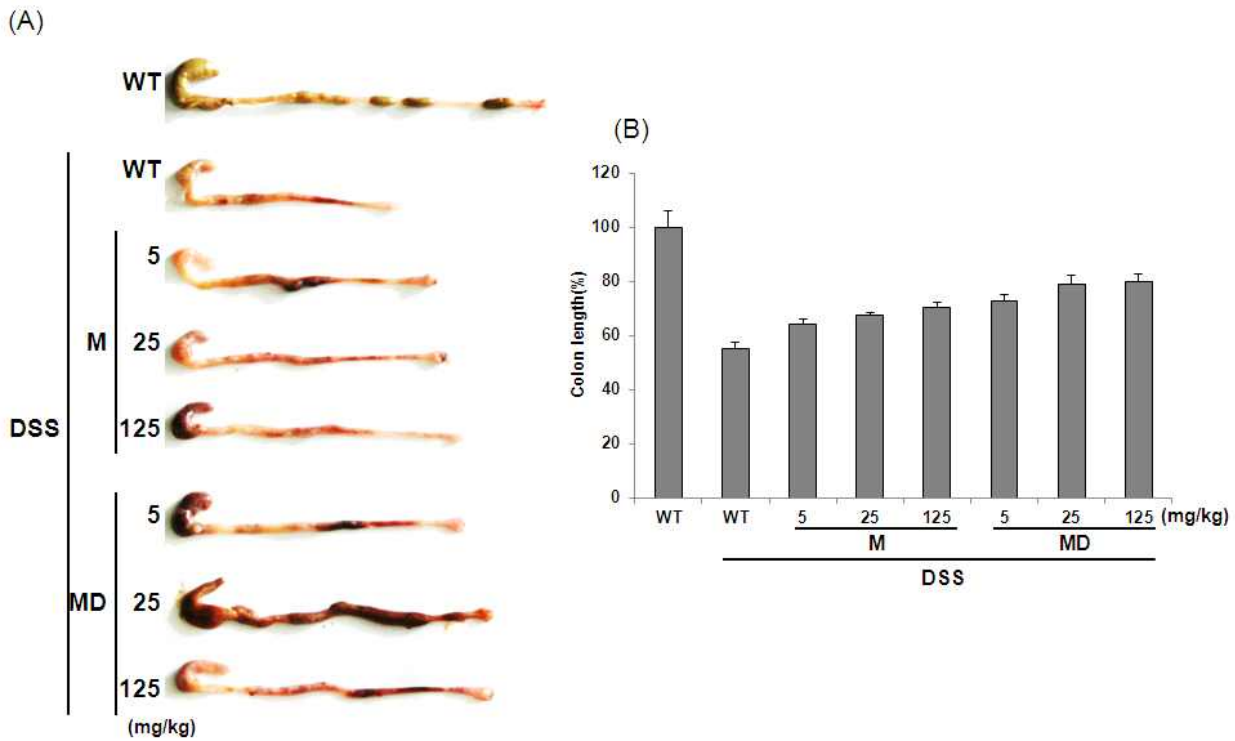


그림 15. IBD 마우스 모델에서 경구투여된 효소전환 오디추출물에 의한 대장 길이 변화 확인

- IBD 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여에 의한 체중변화는 어떠한지 조사하기 위하여, 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 마우스에 복강투여한 후 마우스의 체중변화와 DAI 지수를 확인함. DSS에 의해 유도된 IBD 마우스 그룹의 경우 체중이 크게 감소하였으며, 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 경구투여한 마우스에서 체중 감소폭이 완화됨을 관찰할 수 있었음 **(그림16)**. 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물의 경우 DSS에 의해 감소된 체중을 보다 회복시킴을 알 수 있었음. 투여농도에 의한 체중 감소폭의 완화는 오디추출물 및 효소전환 오디추출물 모두 큰 차이를 관찰할 수는 없었지만, 농도가 증가됨에 따라 감소된 체중 폭이 완화되었음. DSS에 의해 증가된 DAI 지수 변화 역시 체중변

화와 마찬가지로 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의해 감소되었으며, 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물이 보다 감소되었음. 투여농도별 DAI지수 감소는 오디추출물 및 효소전환 오디추출물 모두 큰 차이를 보이지 않았으나 투여용량이 증가됨에 따라 감소됨을 관찰함.

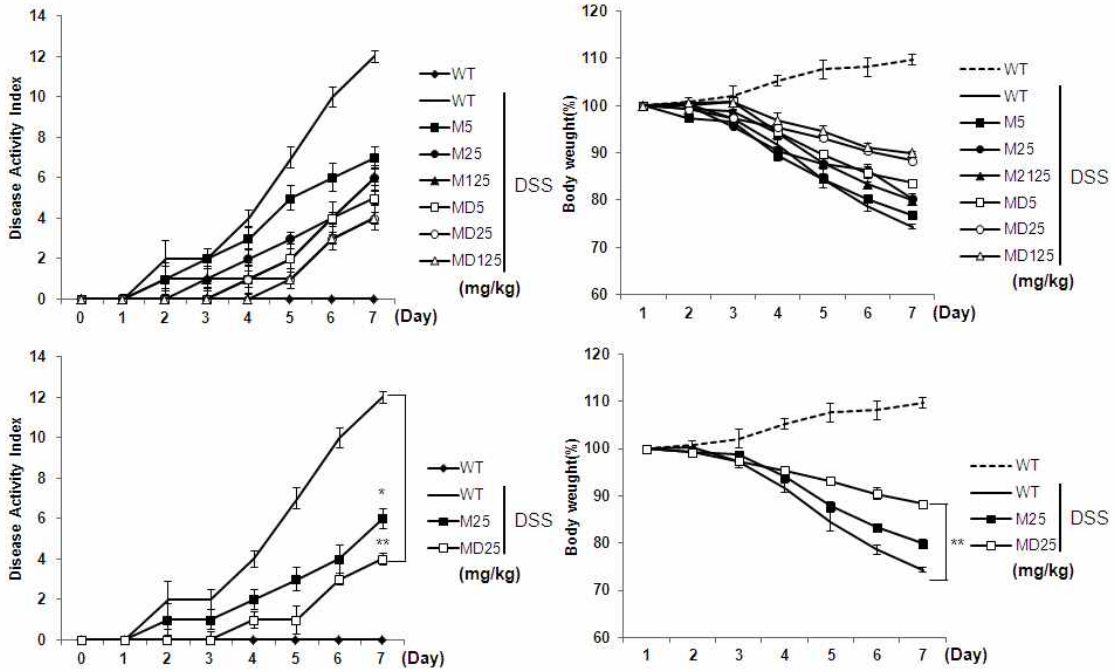


그림 16. IBD 마우스모델에서 경구투여된 효소전환 오디추출물에 의한 몸무게 및 DAI 지수의 변화

2) IBD 마우스 모델에서 구강투여된 효소전환 오디추출물의 대장 점막조직의 손상 완화와 염증 사이토카인 변화 확인

- IBD 마우스 모델에서 구강투여된 효소전환오디추출물의 농도가 대장 점막조직 손상에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하기 위해, Hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 함. 그 결과, DSS를 처리하지 않은 WT의 대장 조직은 융털간의 경계, 결합조직과 융털간의 명확한 경계 그리고 일반적인 면역세포의 수 등 잘 보존되어 있는 것을 볼 수 있었음. DSS를 처리한 그룹에서는 융털모양이 손상되었으며 세포간의 경계도 많이 허물어지는 것을 관찰함. DSS를 처리한 그룹에 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹에서 대장 점막조직의 손상이 회복되었으며 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹에서 그 회복이 증가됨을 알 수 있었음 **(그림 17)**. 투여용량이 증가함에 따라 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹 모두 손상된 대장 점막조직이 회복되었음.

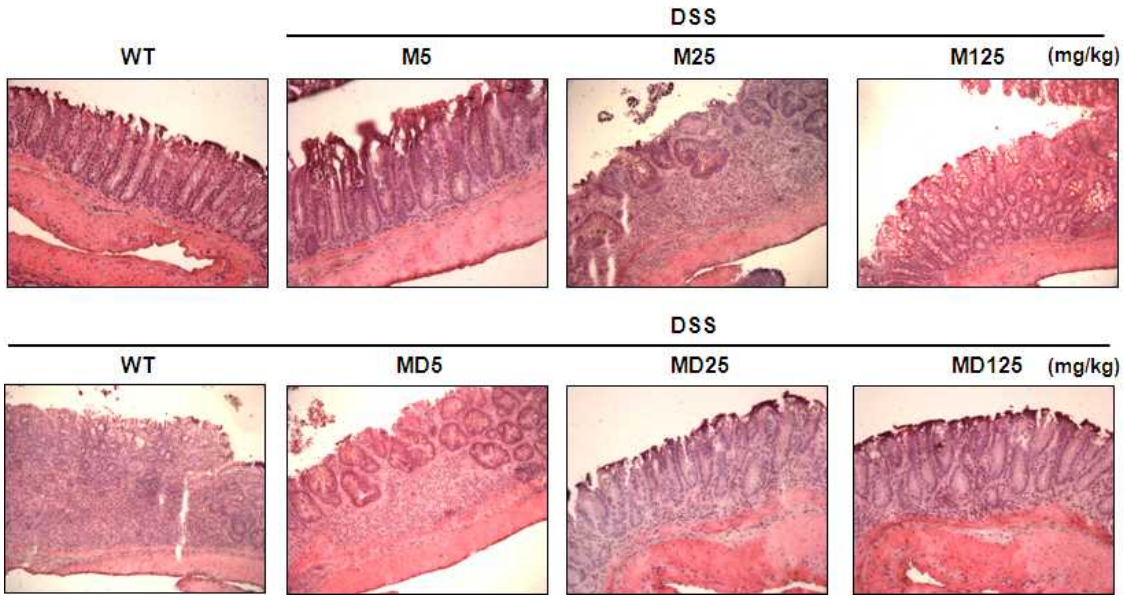


그림 17. IBD 마우스모델에서 경구투여된 효소전환 오디추출물에 의한 대장점막조직의 손상완화

- 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 경구투여에 의한 IBD 마우스 모델의 염증 사이토카인 유전자 발현의 변화를 관찰한 결과, DSS에 의해 증가된 염증 사이토카인들의 유전자 발현이 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의해 감소되었으며, 투여농도가 증가됨에 따라 염증 사이토카인의 유전자 발현이 감소됨을 알 수 있었음 **(그림 18)**. 염증 사이토카인의 유전자 발현 역시 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹에서 크게 감소되었으며, 항염증 사이토카인인 IL-10의 유전자 발현은 오디추출물 및 효소전환 오디추출물 모두 투여용량이 증가함에 따라 정상 레벨로 회복되었음.

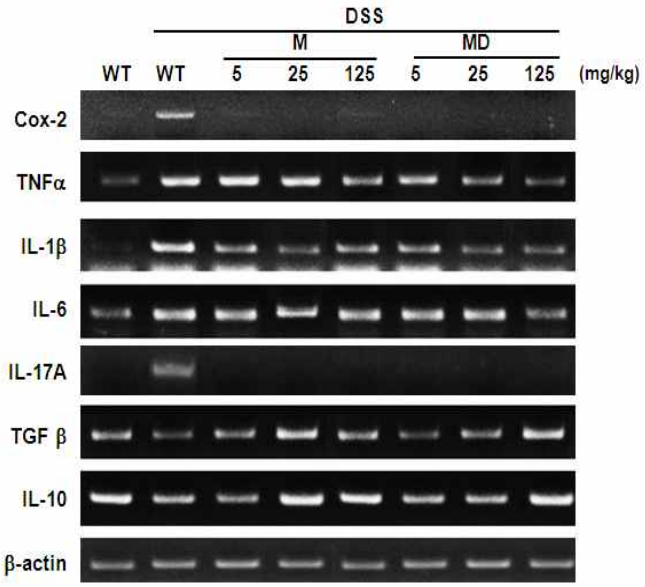


그림 19. IBD 마우스 모델에서 구강투여된 효소전환 오디추출물에 의한 염증관련 유전자 발현

3) 경구투여된 효소전환 오디추출물에 의한 면역글로불린 생성 및 면역세포 변화 확인

- 효소전환 오디추출물에 의한 면역글로불린 A (IgA) 의 생성을 확인하기 위하여 ELISA를 수행함. DSS에 의해 IBD가 유도된 마우스 그룹의 경우 IgA의 레벨이 증가되었으며, 오디 추출물 및 효소전환 오디추출물의 경구투여에 의해 증가된 IgA 레벨이 투여용량이 증가함에 따라 정상레벨로 회복하였음 **(그림19)**. 이는 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹 모두에서 관찰되었으며, 효소전환 오디추출물이 오디추출물과 비교하여 차이를 보이지는 않았음.

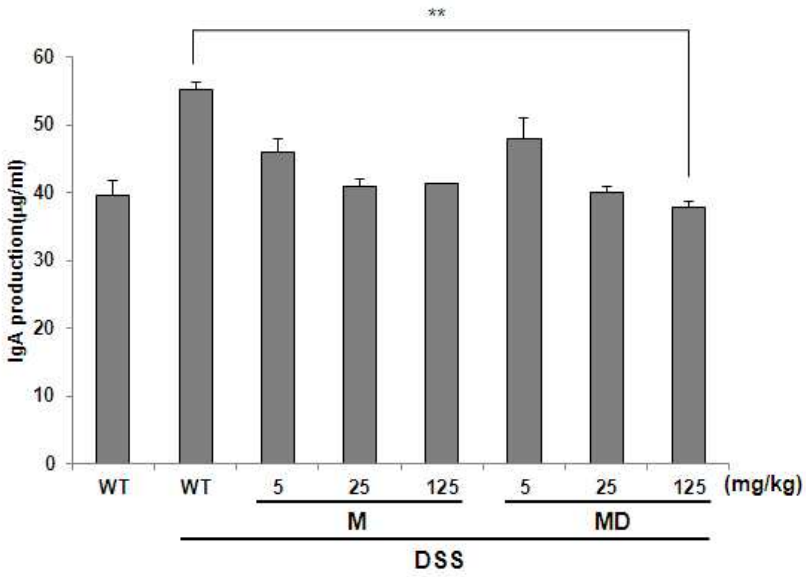


그림 19. IBD 마우스모델에서 경구투여된 효소전환 오디추출물에 의한 면역글로불린 A의 발현 변화

- 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의한 면역세포의 변화를 관찰하기 위하여 IBD 마우스 모델의 대장조직으로부터 세포를 분리한 후 유세포 분석기를 이용하여 T cell의 population을 분석하였음. 그 결과 DSS에 의해 감소된 T cell의 population이 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 경구투여에 의해 증가되었으며, 투여용량이 증가함에 따른 변화는 관찰되지 않았음 **(그림 20)**.

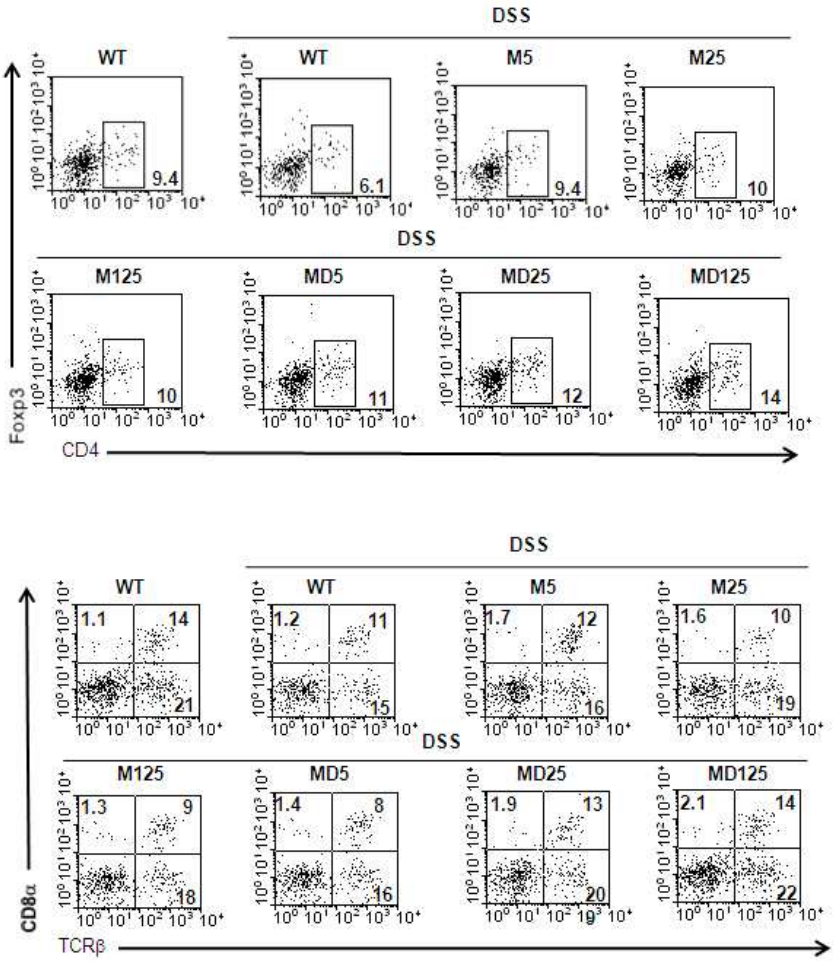


그림 20. IBD 마우스모델에서 경구투여된 효소전환 오디추출물에 의한 T cell의 증가

- 위 결과를 바탕으로 DSS에 의해 유도된 IBD 마우스 모델에서 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 경구투여에 의해 점막자가면역질환이 완화됨을 알 수 있었으며, 특히 오디추출물의 경우 경구투여시 25mg/Kg 의 농도에서부터 점막자가면역질환의 치료효과가 관찰되었으며, 효소전환 오디추출물의 경우 가장 낮은 농도인 5mg/Kg 부터 점막자가면역질환이 완화됨을 통해 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물의 효과가 더 뛰어남을 알 수 있었음. 이를 종합하여 경구투여서 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 최적 투여용량은 25mg/kg 으로 생각되어짐.

■ IBD 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여 시 투여용량 및 항염 효능 확인

1) IBD 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여에 의한 대장 길이 변화 및 대장점막조직 변화 확인

- DSS에 의해 유도된 IBD 마우스 모델에서 오디추출물(M) 및 효소전환 오디추출물(MD)의 패치타입투여 시 투여용량별 효능을 확인하기 위하여 IBD를 유발한 마우스에 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 각각 5, 25, 125 mg/Kg의 농도로 14일간 이틀에 한번 패치타입으로 투여함. 이 후 마우스를 희생하여 대장의 길이 변화 및 대장점막조직의 손상을 확인함. 그 결과, DSS에 의해 감소된 대장의 길이는 오디추출물 및 효소전환 오디추출물 모두에서 회복되지 않았으며, 투여용량의 증가에 따른 효능도 관찰되지 않았음 **(그림21)**. 대장점막조직의 손상을 확인해 본 결과 또한 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의한 효능은 관찰되지 않았음 **(그림22)**.

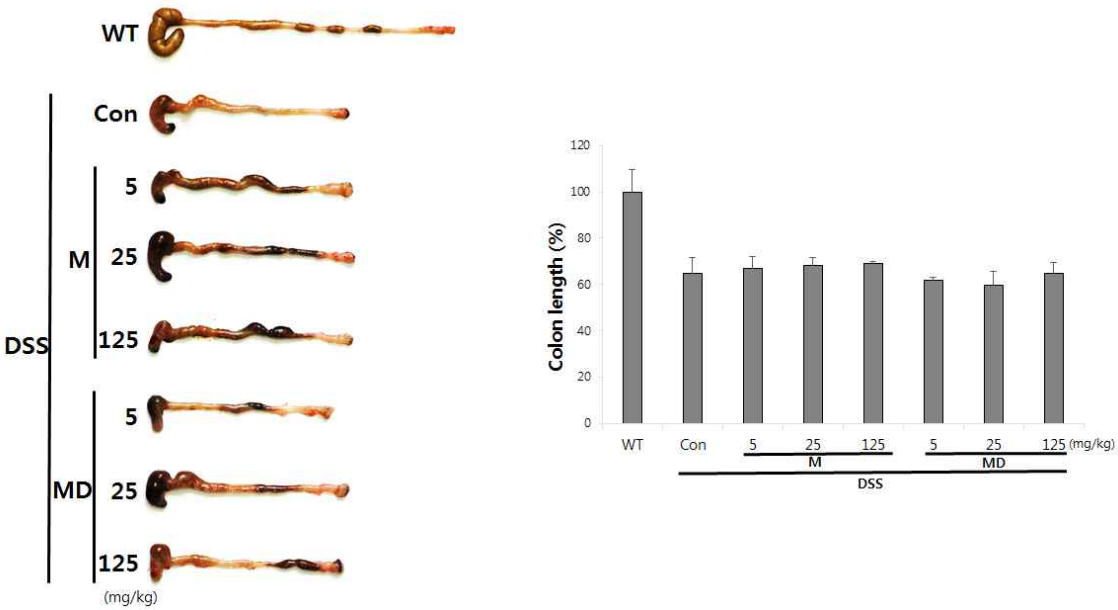


그림 21. IBD 마우스 모델에서 패치타입투여 시 효소전환 오디추출물에 의한 대장 길이 변화

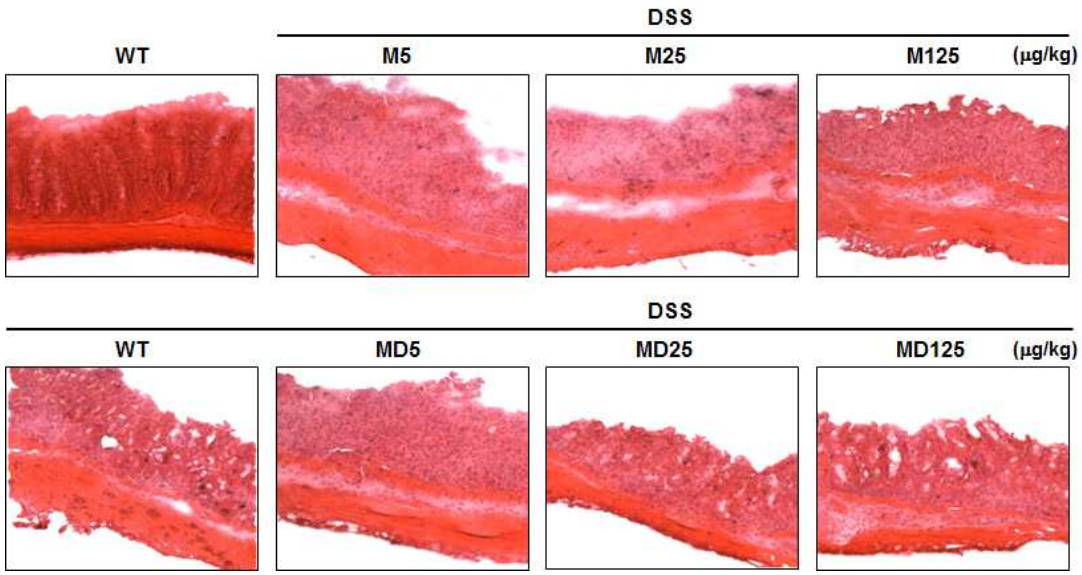


그림 22. IBD 마우스모델에서 경구투여된 효소전환 오디추출물에 의한 대장점막조직의 변화

2) IBD 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여시 염증 사이토카인 변화 확인

- DSS에 의해 유도된 IBD 마우스 모델에서 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 패치타입투여 시 염증 사이토카인 유전자들의 발현 변화를 관찰한 결과, DSS에 의해 증가된 염증 사이토카인의 유전자 발현이 감소되지 않았음 **(그림23)**.

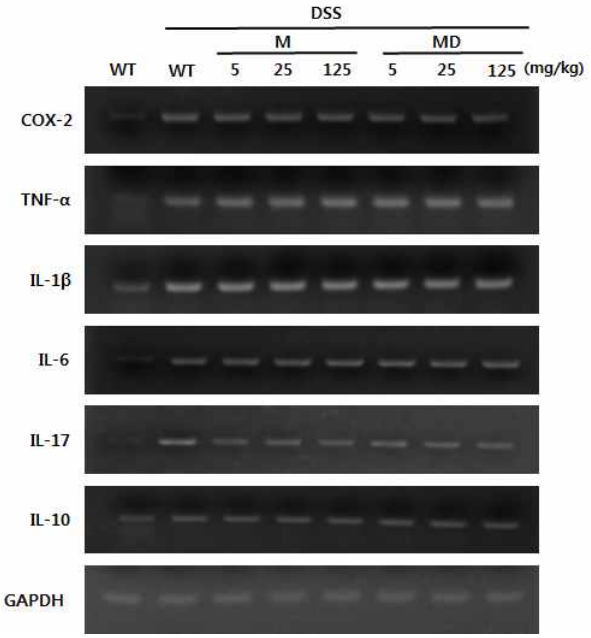


그림 23. IBD 마우스 모델에서 패치타입투여 시 효소전환 오디추출물에 의한 염증 유전자 발현

- 이 결과를 통해 DSS에 의해 유도된 IBD 마우스 모델에서 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 패치타입 투여방법 점막자가면역질환의 치료에 효과적인 방법이 아닌 것으로 생각되어짐. 이는 투여용량을 증가시켜도 큰 변화를 관찰하지 못함.

■ 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여 시 투여용량 및 항암 효능 확인

1) 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여에 의한 암세포 증식 및 전이억제 확인

- 암 질환 마우스 모델에서 오디추출물(M) 및 효소전환 오디추출물(MD)의 복강투여에 의한 항암 효능을 검증하기 위하여 C57BL/6 마우스에 피부암 세포인 B16F10 암세포주를 피하에 주입하여 암 질환을 유도하였음. 이 후 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 각각 20, 100, 500 μg/Kg의 농도로 14일간 매일 복강투여를 함. 암세포를 주입한 후 21일째 마우스를 희생하여 암조직의 크기 관찰하였음. 그 결과 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 복강투여한 마우스의 암세포 크기가 현저하게 감소하였으며, 특히 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물을 복강투여한 그룹에서 암조직의 크기가 크게 감소하

였음 **(그림 24)**. 오디추출물의 경우 투여용량이 증가됨에 따른 암조직의 감소가 관찰되지 않았지만 효소전환 오디추출물의 경우 투여용량이 증가됨에 따라 암조직의 크기가 감소되었음. 이를 통해 암조직으로부터 분리한 암세포에서 세포주기 및 세포사멸, 암전이 관련 유전자의 발현 변화를 확인한 결과, 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 복강투여한 그룹에서 세포주기 억제 및 세포사멸 유전자의 발현이 증가되었고, 암전이 유전자의 발현은 감소되었음. 특히 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물의 효과가 크게 관찰되었으며, 투여용량의 증가에 따른 유전자 발현 변화 역시 증가되었음 **(그림 25)**.

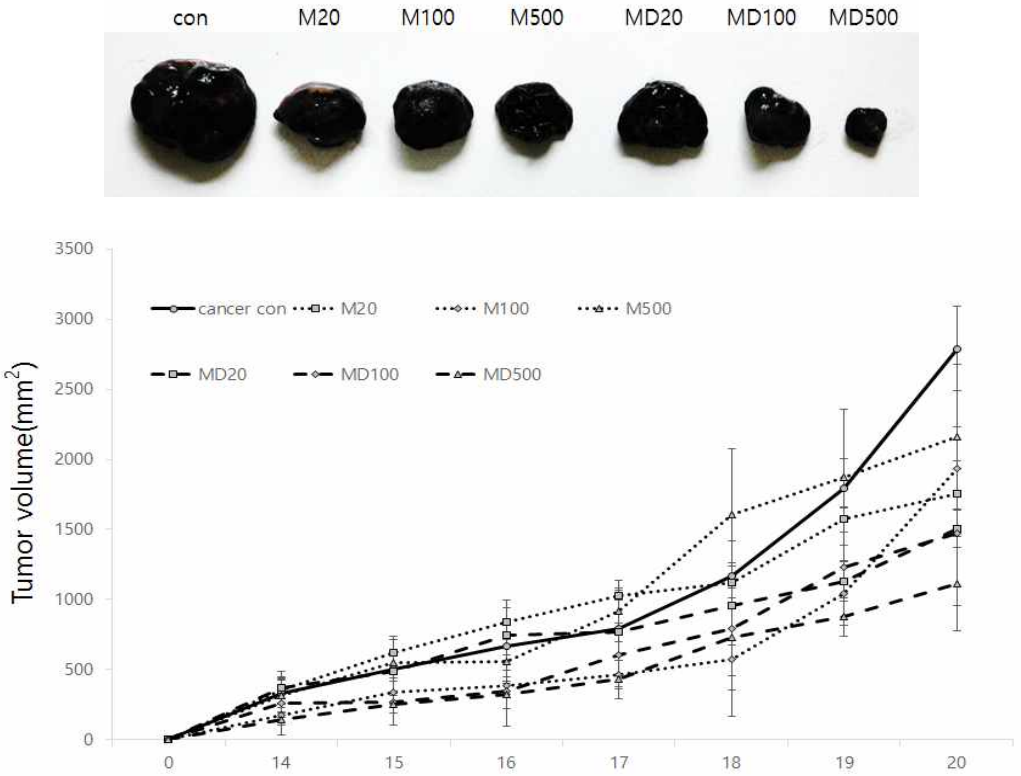


그림 24. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여시 암조직의 변화 확인

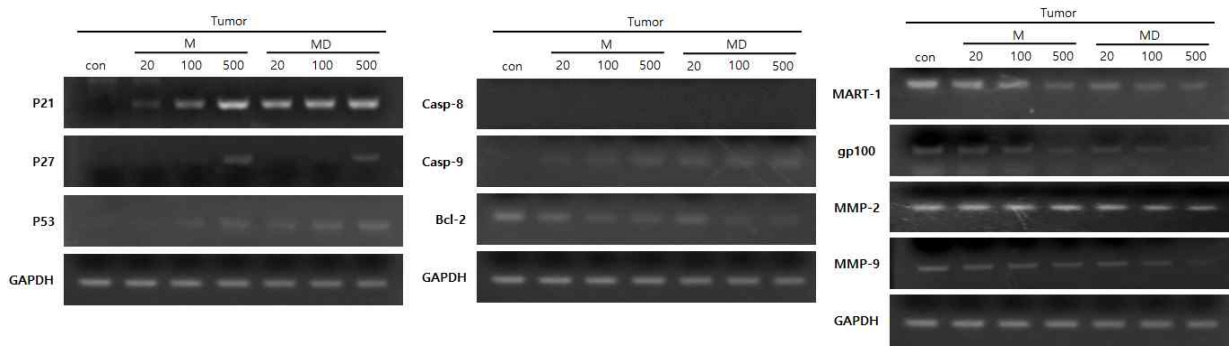
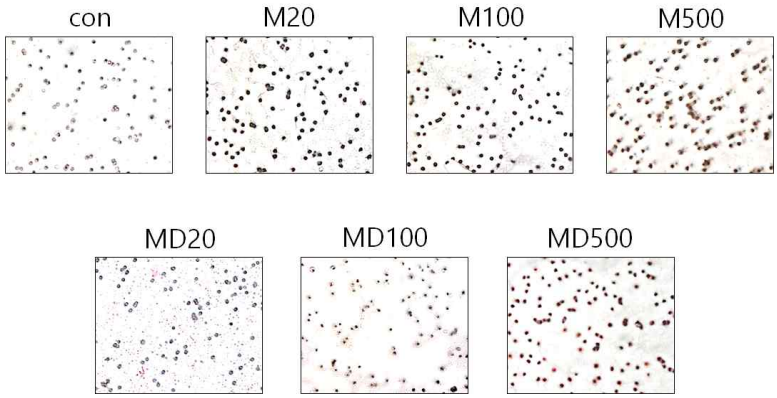


그림 25. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여시 암세포이 세포주기 및 세포사멸, 전이능력 유전자 발현의 변화 확인

- 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의해 암세포의 증식이 억제됨을 통해 면역세포의 침윤능력과 암세포의 전이능력을 확인하기 위해 암 질환 마우스 모델의 비장 및 암조직으로부터 세포를 분리하여 invasion 및 migration 분석법을 수행하였음. 그 결과, 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 복강투여한 그룹의 면역세포의 침윤능력이 대조군과 비교하여 크게 증가하였으며, 투여용량이 증가함에 따라 면역세포의 침윤능력 또한 증가하였음. 암세포의 전이능력의 경우 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 복강투여한 마우스 그룹에서 전이능력이 감소하였으며, 투여용량이 증가함에 따라 그 전이능력 역시 감소됨을 알 수 있었음 **(그림 26)**. 이 결과를 바탕으로 면역세포의 침윤능력과 관련이 있는 CCL4, CXCL13, CCL17, CXCR5의 유전자 발현 변화를 암 질환 마우스 모델의 비장으로부터 분리한 면역세포에서 확인하였음. 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 복강투여한 그룹에서 침윤능력 유전자 발현이 증가됨을 관찰하였지만 투여용량의 증가에 따른 유전자 발현의 증가는 관찰되지 않았음 **(그림 27)**.

<면역세포의 침윤능력>



<암세포이 전이능력>

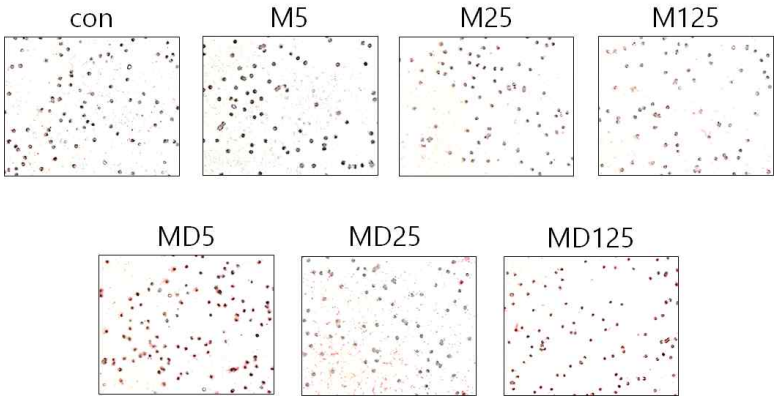


그림 26. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여시 면역세포의 침윤능력 및 암세포의 전이능력 변화 확인

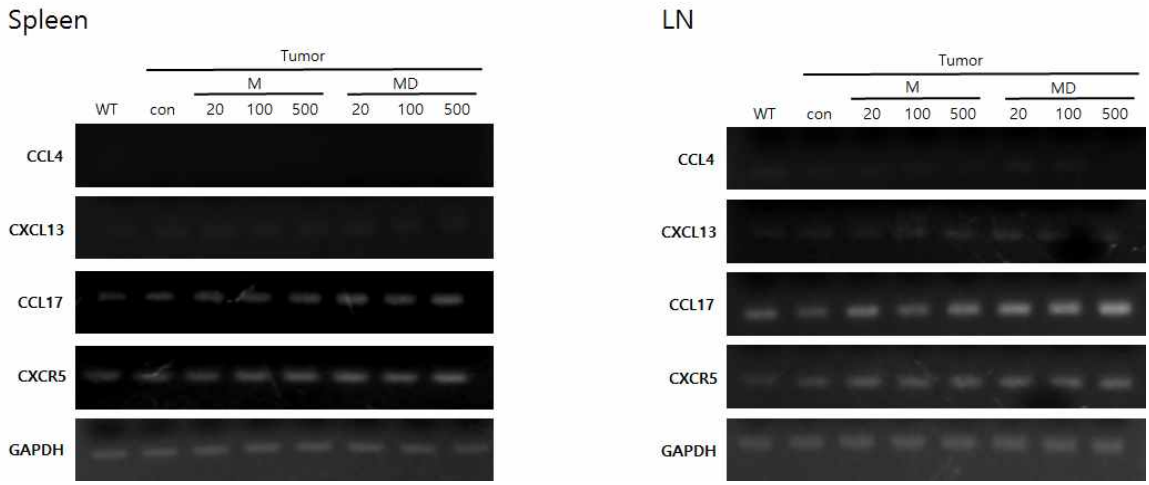


그림 27. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여시 면역세포 침윤능력 유전자 발현 확인

- 이를 통해 암 질환 마우스 모델에서 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 복강투여에 의해 암세포의 증식과 전이능력이 감소됨을 알 수 있었으며, 투여용량이 증가됨에 따라 그 효능이 증가됨을 알 수 있었음. 또한 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물에 의한 항암 효능이 보다 증가되는 것으로 생각되어짐.

2) 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여에 의한 면역세포의 활성증진 확인

- 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 복강투여에 의한 면역세포의 활성증진을 확인하기 위하여 암 질환 마우스 모델의 림프절 및 비장으로부터 세포를 분리하여 유세포 분석기를 이용한 활성화된 면역세포의 분석하였음. 림프절 및 비장의 면역세포의 활성을 분석한 결과, 암 질환에 의해 감소된 CD4, CD8 T cell 및 NK cell의 활성이 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의해 증가되어짐을 관찰하였으며, 투여용량의 증가에 따라 면역세포들의 활성 또한 증가됨을 알 수 있었음 **(그림 28)**. 대식세포 및 수지상 세포의 변화를 분석한 결과, 암 질환에 의해 활성화가 증가되었으며, 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의해 그 활성이 정상 레벨로 감소됨을 관찰하였음 **(그림 29)**.

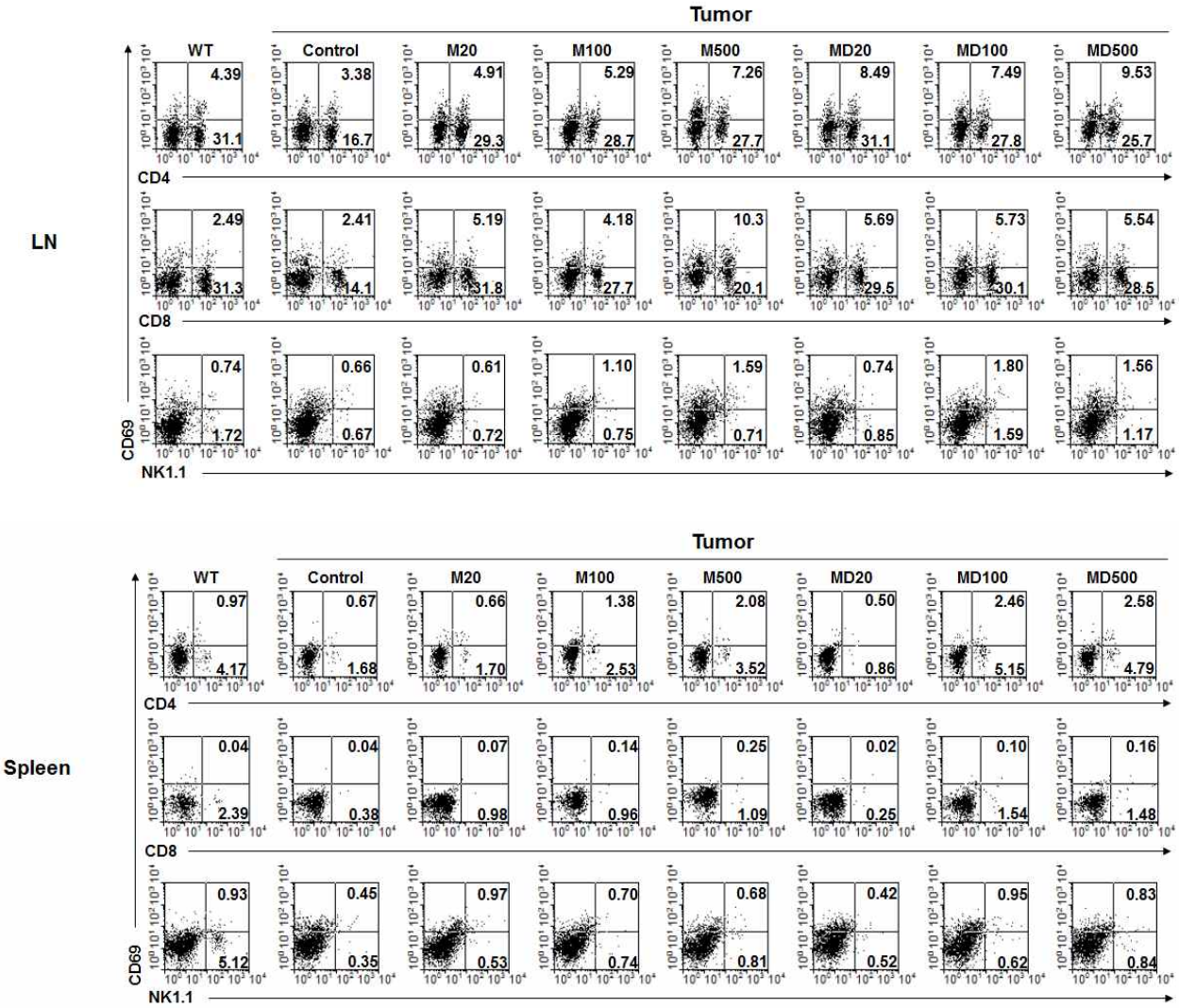


그림 28. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여시 CD4, CD8 T cell 및 NK cell의 면역세포 활성 확인

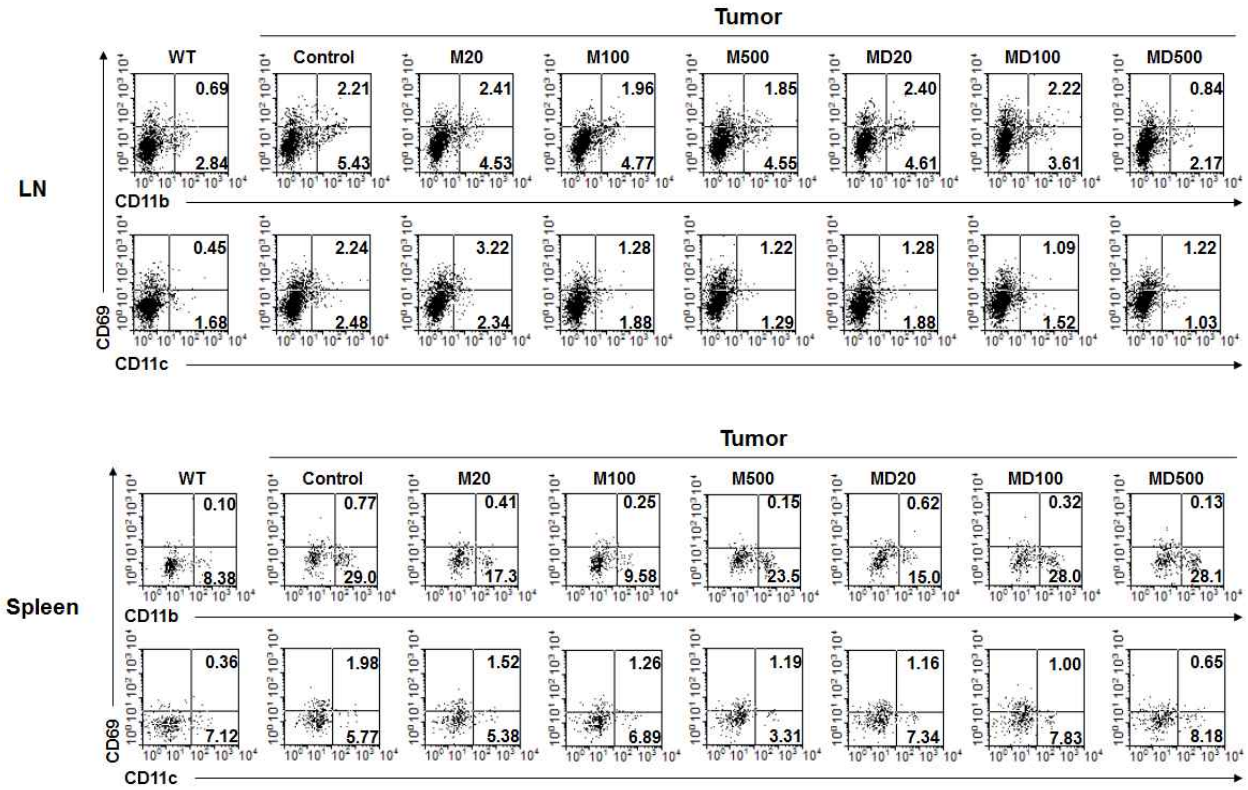


그림 29. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여시 대식세포 및 수지상 세포의 면역세포 활성 확인

- 이 결과를 통해 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의해 활성화된 NK cell 및 CD8 T cell의 암세포 살상능력을 확인하였음. 그 결과 NK cell 및 CD8 T cell의 암세포 살상능력이 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의해 증가되었으며, 투여용량이 증가에 따라 그 살상능력 또한 증가됨을 관찰하였음. 특히 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물에 의해 NK cell 및 CD8 T cell의 암세포 살상능력이 크게 증가됨을 알 수 있었음 **(그림 30)**. 이에 NK cell 및 CD8 T cell의 암세포 살상능력 관련 유전자의 발현 변화를 관찰하였으며, 그 결과, 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 투여용량이 증가됨에 따라 암세포 살상능력 관련 유전자의 발현이 증가되었으며, 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물에 의한 유전자 발현이 크게 증가됨을 알 수 있었음 **(그림 31)**.

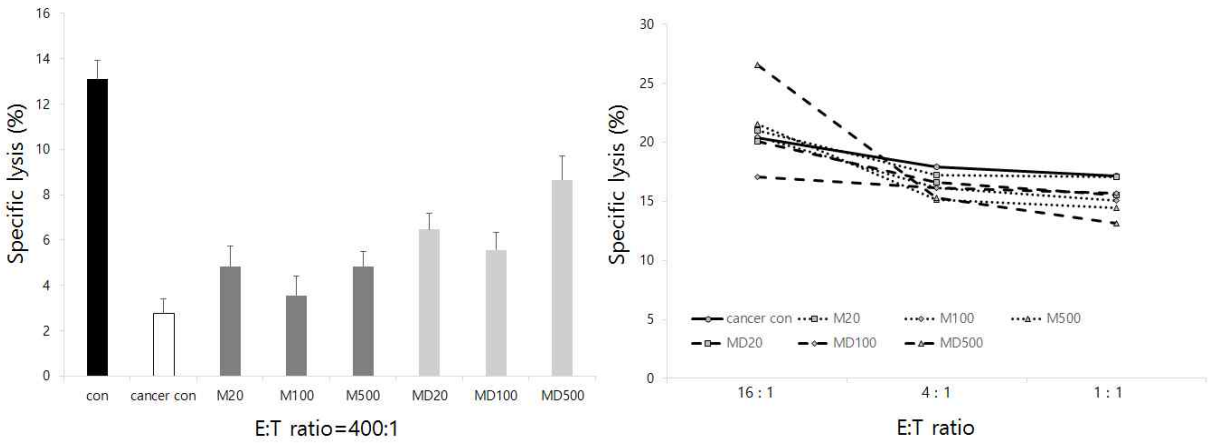


그림 30. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여시 면역세포의 암세포 살상능력 확인

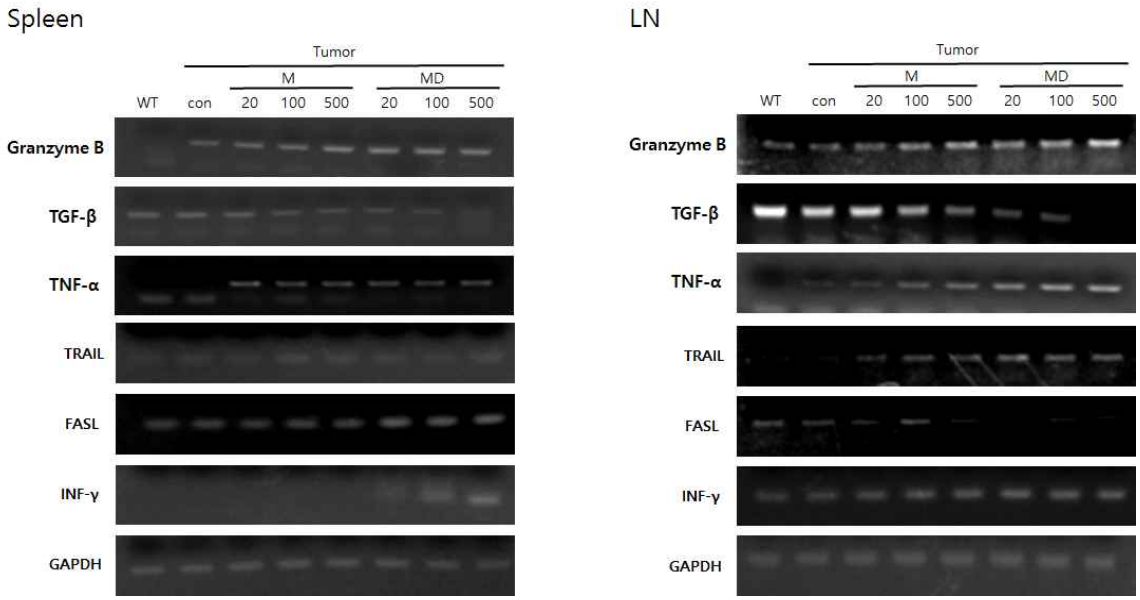


그림 31. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여시 암세포 살상능력 유전자 발현 확인

- 이를 종합하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 복강투여에 의해 면역세포들의 활성이 증가되며, 투여용량이 증가함에 따라 그 활성이 크게 증가됨을 알 수 있음. 특히 오디추출물과 비교하여 효소전환 오디추출물의 경우 암 질환 마우스 모델에서 면역세포의 활성증진에 보다 효과적임을 알 수 있었음. 이에 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 복강투여할 시 500 ug/Kg이 최적의 투여용량으로 사료됨.

■ 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여 시 투여용량 및 항암 효능 확인

1) 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여에 의한 암세포 증식 및 전이억제 확인

- 오디추출물(M) 및 효소전환 오디추출물(MD)의 경구투여에 의한 항암효능을 검증하기 위해 암 질환 마우스 모델에 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 각각 5, 25, 125 mg/Kg의 농도로 14일간 매일 경구투여함. 암 질환 마우스 모델을 희생하여 암조직의 크기를 관찰한 결과 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹의 암조직 크기가 크게 감소됨을 확인할 수 있었으며, 가장 높은 농도인 125 mg/Kg을 투여한 그룹의 경우 암조직의 크기가 크게 감소되지 않았음을 관찰하였음 **(그림 32)**. 이에 암조직으로부터 세포를 분리하여 세포주기, 세포사멸 및 암 전이 유전자의 발현을 확인한 결과, 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹에서 세포주기 억제 및 세포사멸 유전자 발현이 증가하였으며, 암전이 유전자의 발현은 감소되었음 **(그림 33)**. 특히 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 투여용량 중 25 mg/Kg의 농도에서 가장 큰 효과를 관찰할 수 있었음.

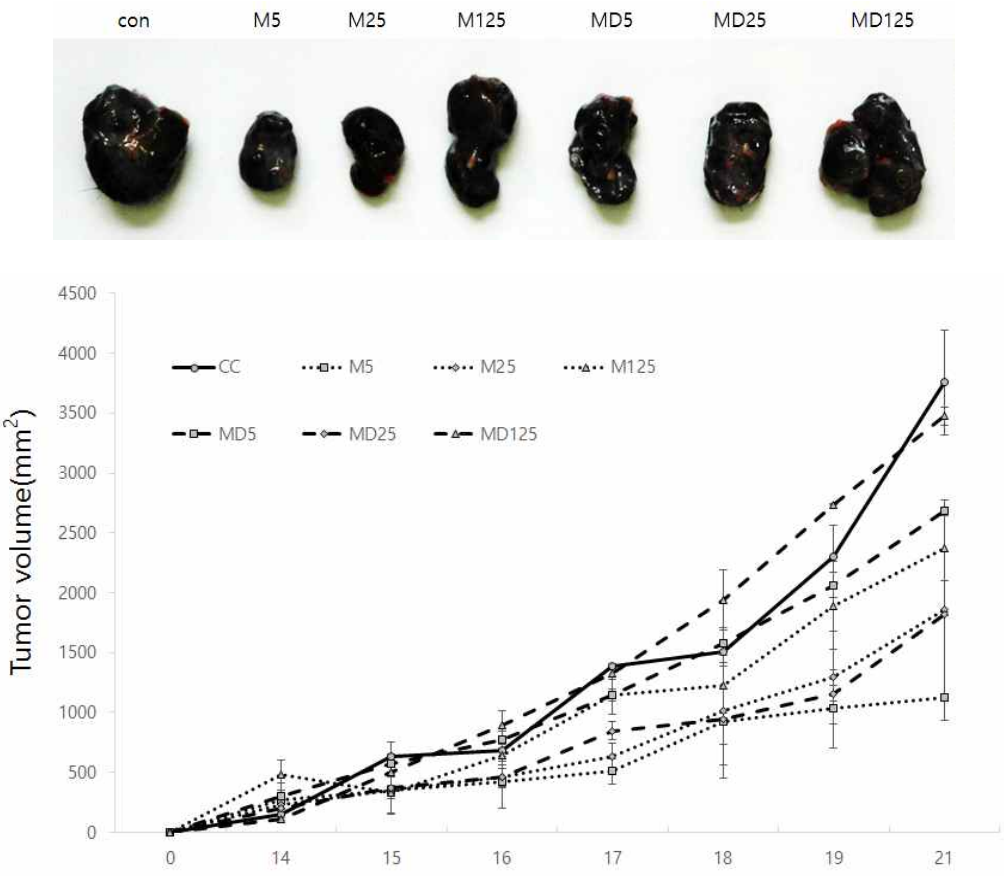


그림 32. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여시 암조직의 변화 확인

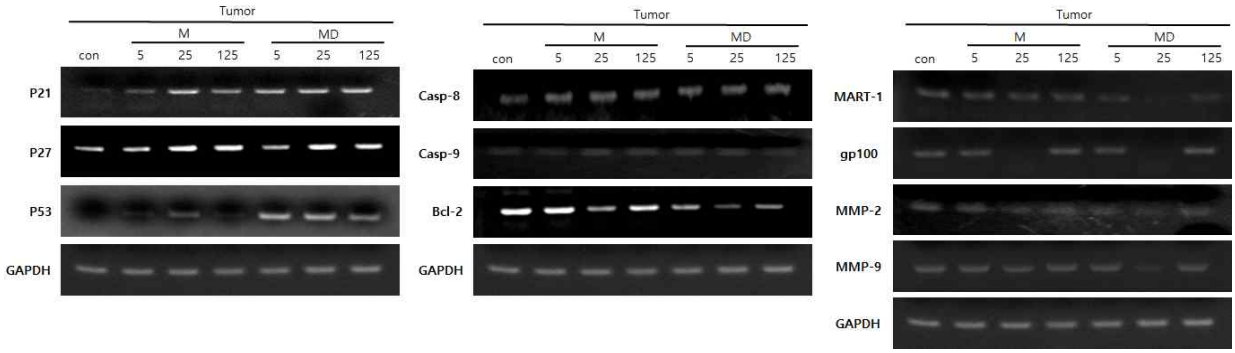


그림 33. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여시 암세포이 세포주기 및 세포사멸, 전이능력 유전자 발현의 변화 확인

- 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 경구투여에 의한 암세포의 증식 억제됨을 통해 면역세포의 침윤능력을 확인한 결과, 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹에서 면역세포의 침윤능력이 증가되었으며, 투여용량 중 25 mg/Kg의 농도에서 면역세포의 침윤능력이 가장 크게 관찰되었음 **(그림 34)**. 면역세포의 침윤능력 관련 유전자의 발현 역시 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹에서 증가되었으며. 특히 25 mg/Kg의 농도에서 가장 크게 증가됨을 알 수 있었음 **(그림 35)**.

<면역세포의 침윤능력>

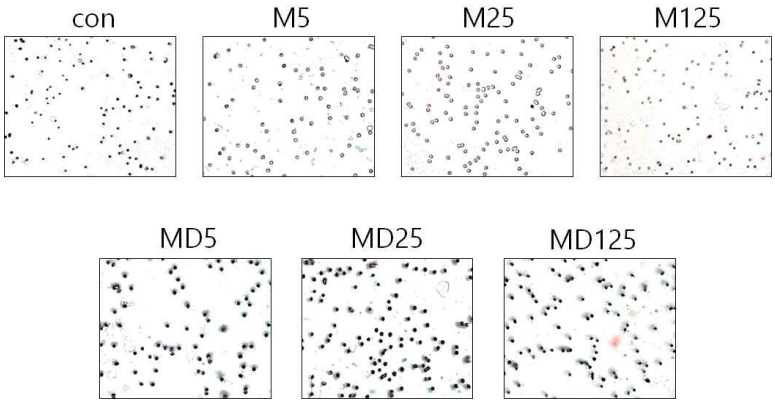


그림 34. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여시 면역세포의 침윤능력 확인

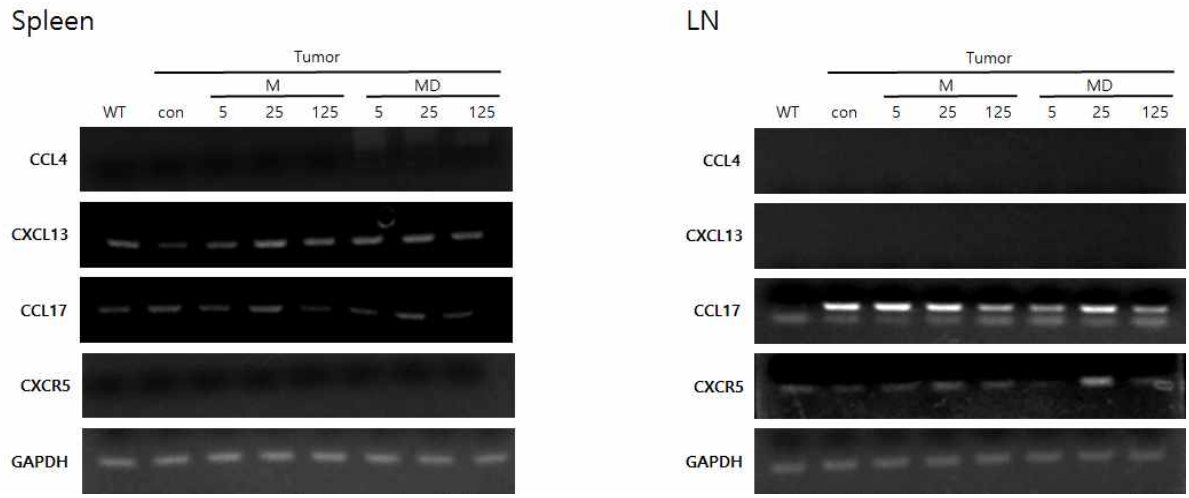


그림 35. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 복강투여시 면역세포 침윤능력 유전자 발현 확인

- 이 결과를 통해 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 경구투여에 의한 암세포의 증식 및 전이능력이 감소를 확인하였으며, 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 투여용량 중 25 mg/Kg의 농도로 투여 시 그 효능이 크게 증가됨을 알 수 있었음.

2) 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여에 의한 면역세포의 활성증진 확인

- 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 경구투여에 의해 암세포의 증식 및 전이능력이 감소됨을 통해 면역세포들의 활성증진을 확인하였음. 그 결과 암 질환에 의해 감소된 CD4, CD8 Tcell 및 NK cell의 활성이 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의해 증가되었으며 **(그림 36)**. 암 질환에 의해 증가된 대식세포 및 수지상 세포의 경우 정상 레벨로 감소됨을 관찰하였음 **(그림 37)**. 면역세포의 활성증진 또한 투여용량 중 25 mg/Kg의 농도에서 가장 변화를 관찰할 수 있었음.

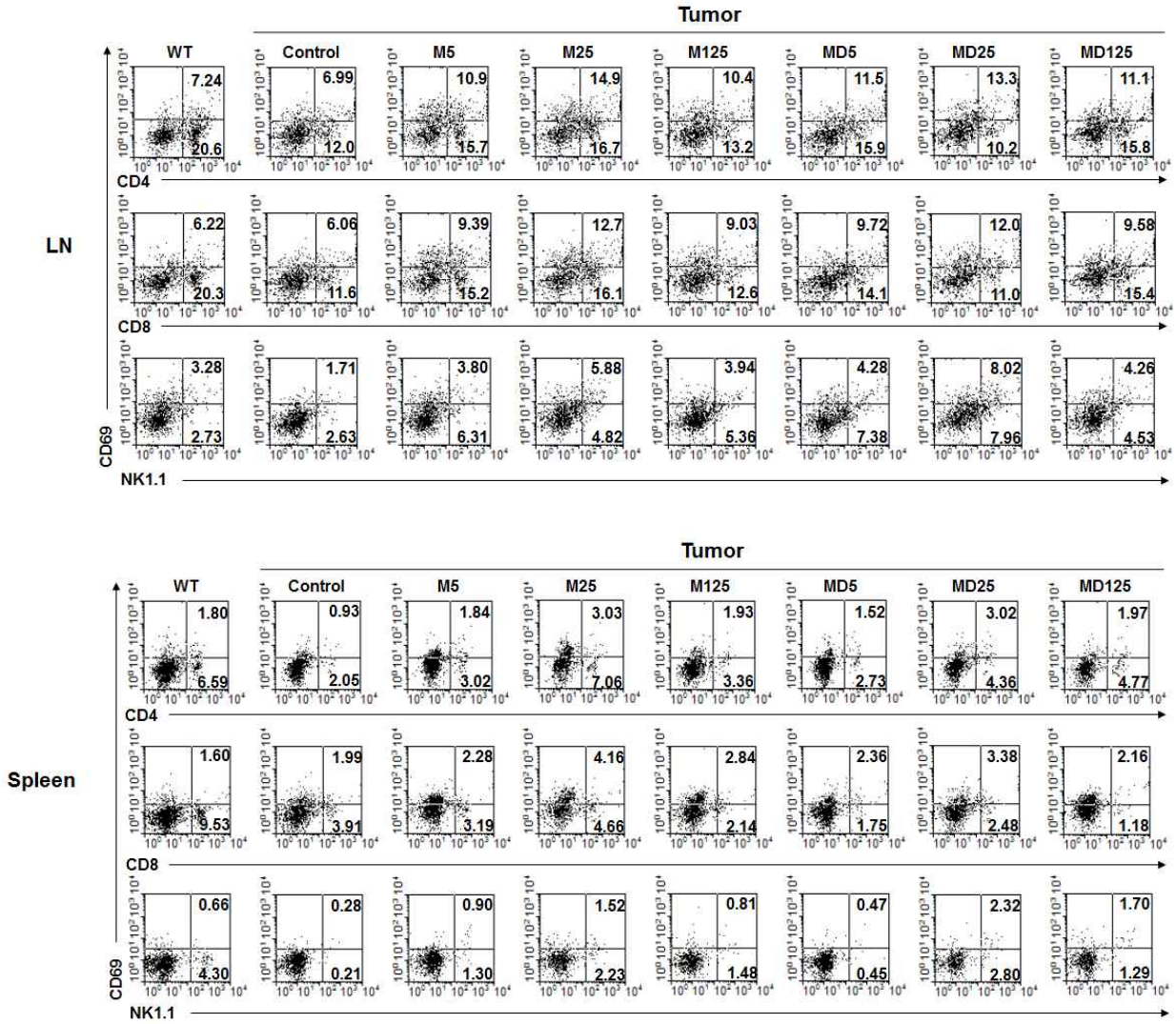


그림 36. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여시 CD4, CD8 T cell 및 NK cell의 면역세포 활성 확인

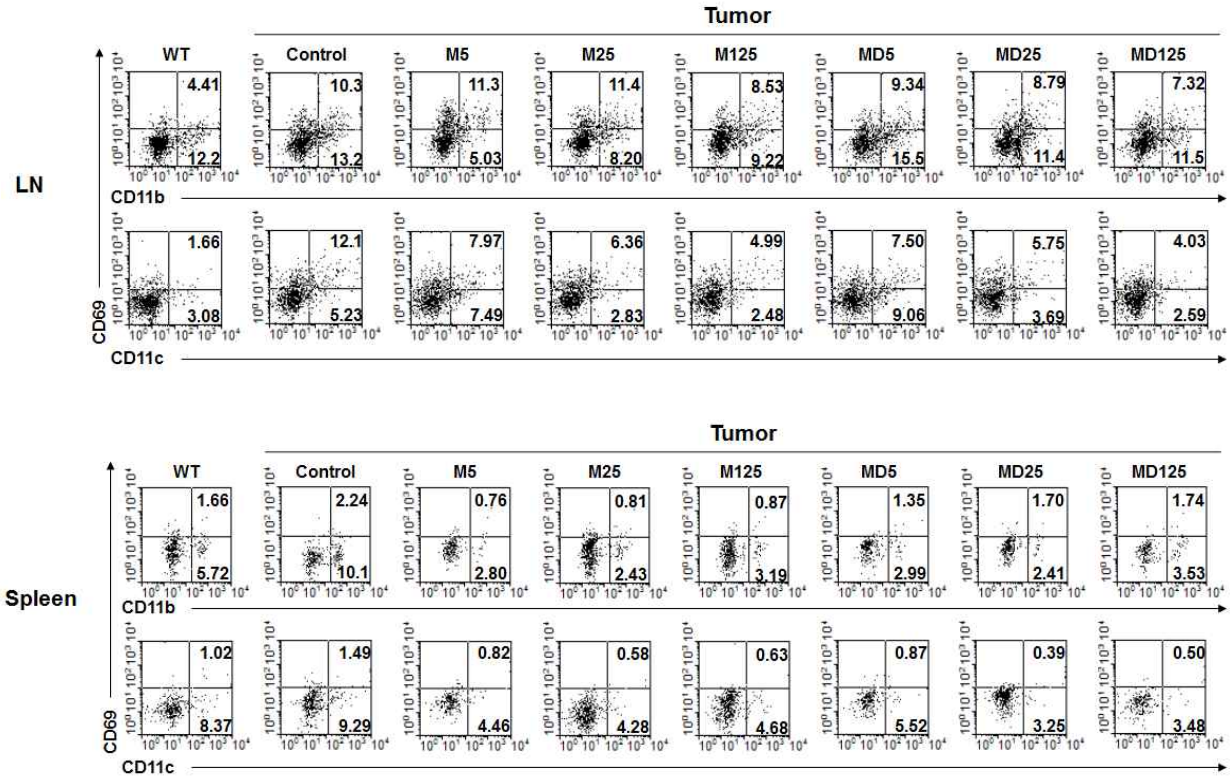


그림 37. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여시 대식세포 및 수지상 세포의 면역세포 활성 확인

- 이에 활성화된 NK cell 및 CD8 T cell의 암세포 살상능력을 확인한 결과, 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물에 의해 암세포의 살상능력이 크게 증가되었으며, 특히 오디추출물의 경우 투여용량이 증가됨에 따라 그 살상능력이 증가 되었지만, 효소전환 오디추출물의 경우 25 mg/Kg의 농도에서 가장 큰 살상능력이 관찰되었음 **(그림 38)**. 암세포 살상능력과 관련된 유전자의 발현 변화 역시 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 경구투여한 그룹에서 크게 증가하였으며, 25 mg/Kg의 농도로 경구투여한 그룹에서 그 변화가 가장 크게 관찰되었음 **(그림 39)**.

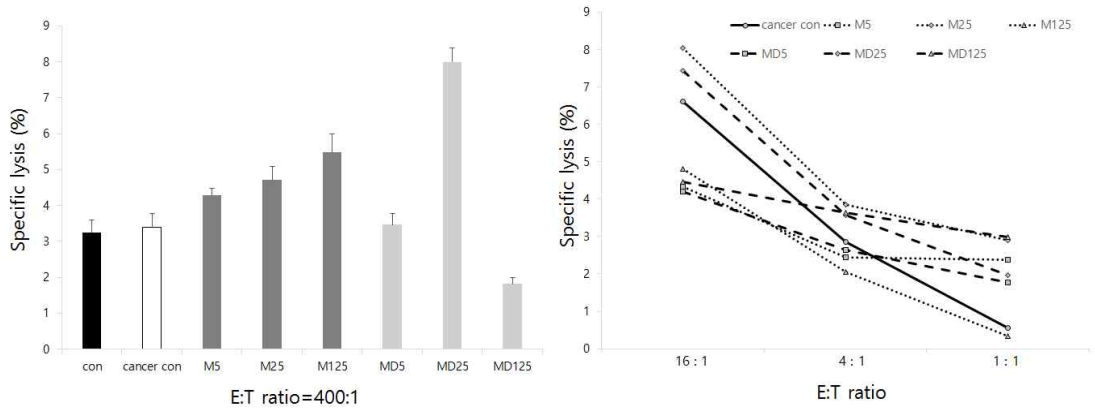


그림 38. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여시 면역세포의 암세포 살상능력 확인

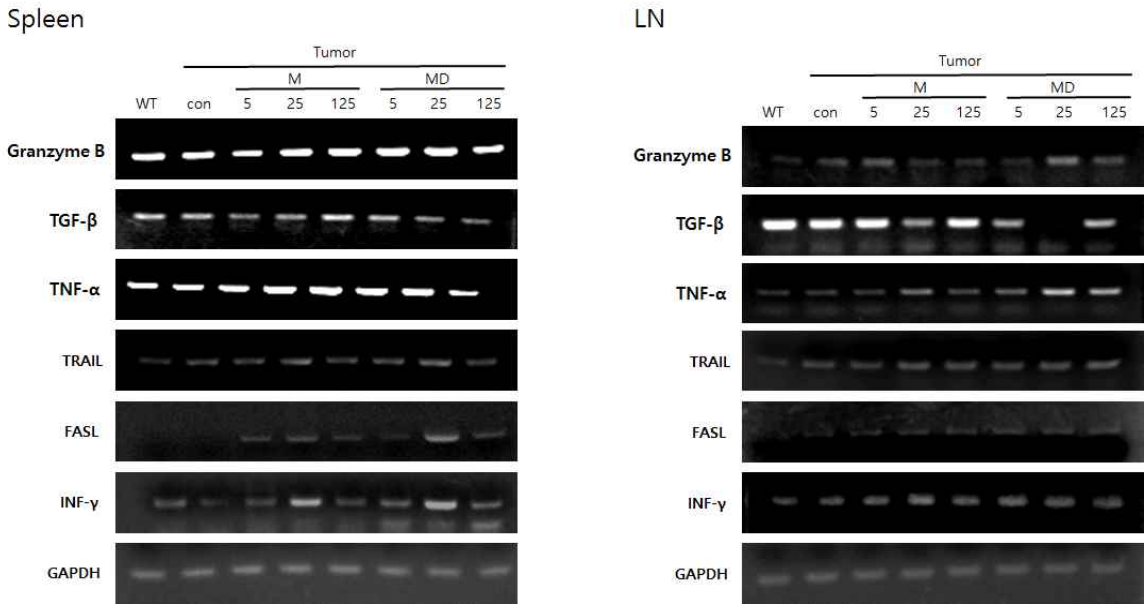


그림 39. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 경구투여시 암세포 살상능력 유전자 발현 확인

- 위 결과를 통해 암 질환 마우스 모델로부터 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 경구투여에 의한 항암효능 및 면역세포 활성증진에 큰 효과를 보임을 알 수 있었으며, 특히 경구투여 시 투여용량 중 25 mg/kg의 농도로 투여 시 항암 효능 및 면역세포의 활성능력을 가장 극대화 할 수 있을 것으로 사료됨.

■ 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여 시 투여용량 및 항암 효능 확인

1) 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여에 의한 암세포 증식 및 전이억제 확인

- 암 질환 마우스 모델에서 오디추출물(M) 및 효소전환 오디추출물(MD)의 패치타입투여에 의한 항암효능을 검증하기 위해 암 질환 마우스 모델에 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 각각 각각 5, 25, 125 mg/Kg의 농도로 14일간 매일 경구투여함. 암 질환 마우스 모델로부터 암 조직의 크기 변화를 관찰한 결과, 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹에서 암 조직의 크기가 감소하였고, 투여용량의 증가에 따른 암 조직의 크기 변화 역시 큰 차이를 보이지 않았음 **(그림 40)**. 암 조직으로부터 세포를 분리하여 세포주기, 세포사멸 및 암 전이 관련 유전자 발현의 변화를 관찰한 결과, 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹과의 차이를 보이지 않았음 **(그림 41)**.

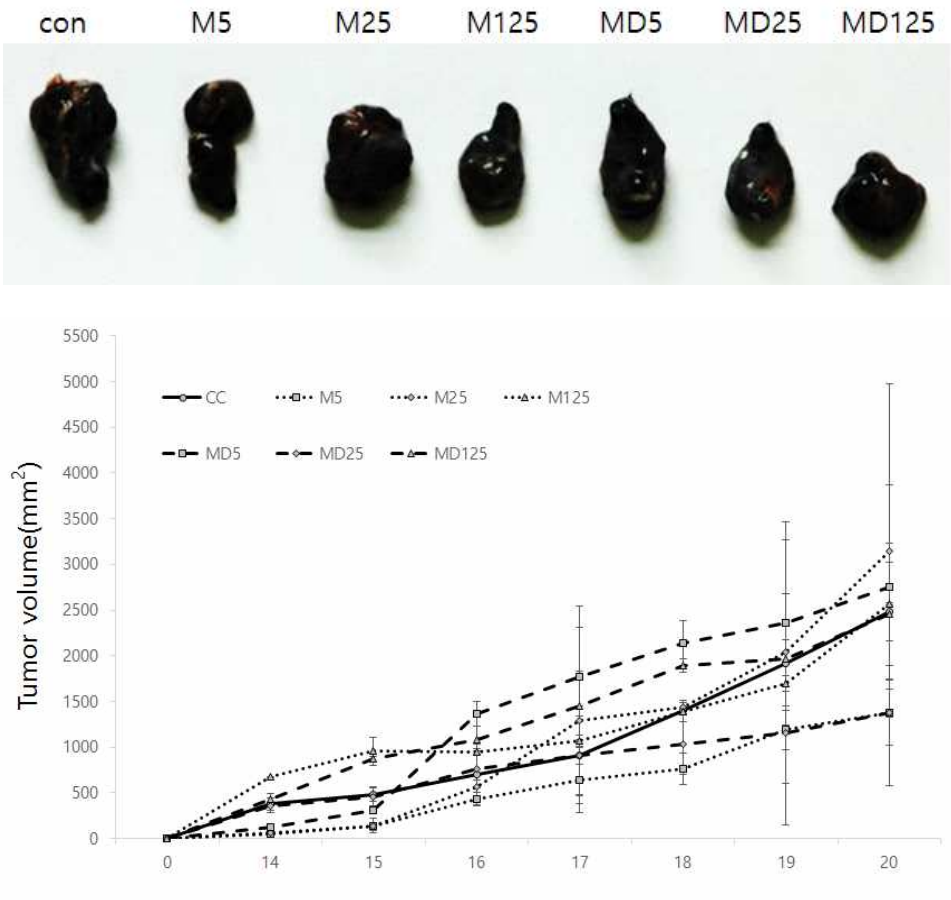


그림 40. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여시 암조직의 변화 확인

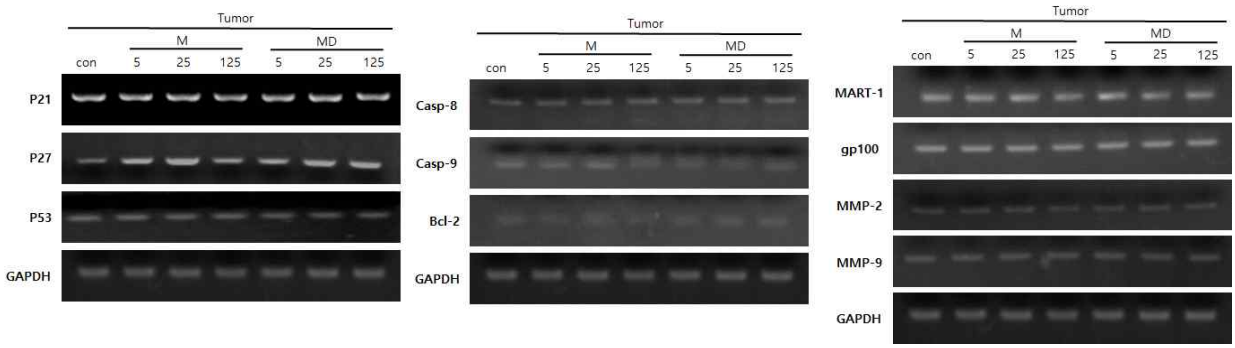


그림 41. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여시 암세포이 세포주기 및 세포사멸, 전이능력 유전자 발현의 변화 확인

- 패치타입투여에 의한 면역세포의 침윤능력을 확인한 결과 또한 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 투여한 그룹과의 차이는 관찰되지 않았으며 **(그림 42)**, 면역세포의 침윤능력 관련 유전자의 발현을 확인한 결과 또한 차이를 보이지 않았음 **(그림 43)**.

<면역세포의 침윤능력>

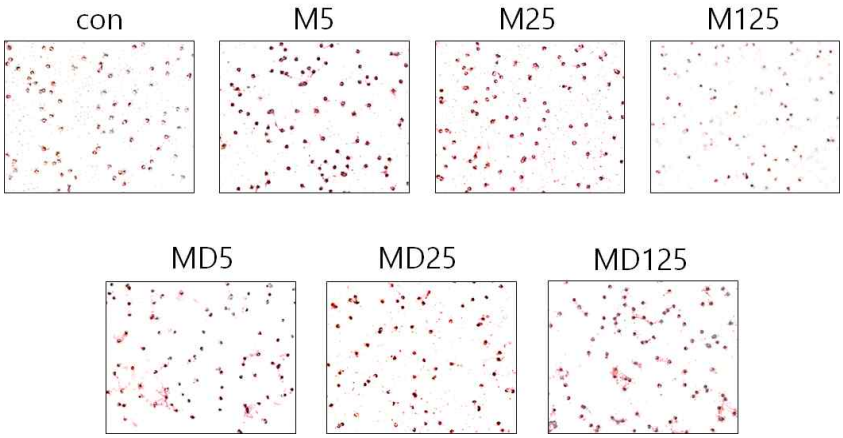


그림 42. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여시 면역세포의 침윤능력 확인

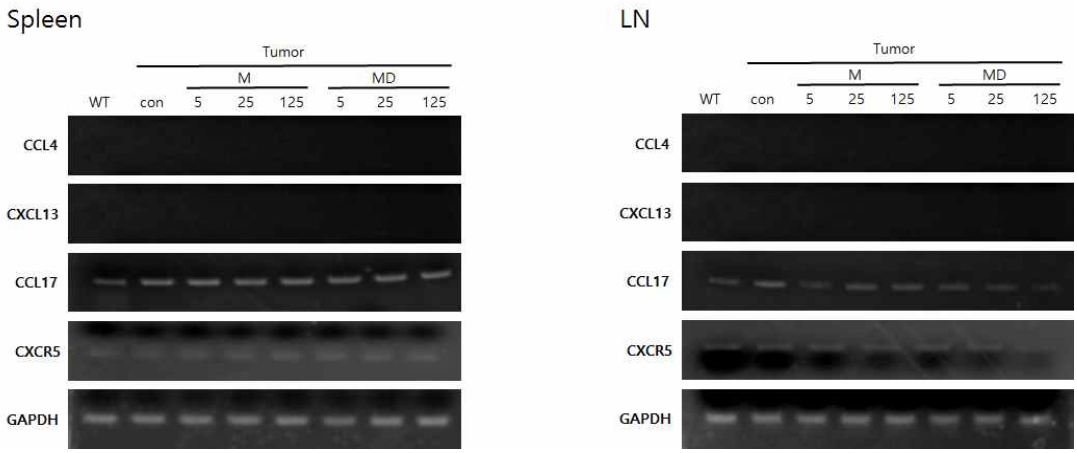


그림 43. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여시 면역세포 침윤능력 유전자 발현 확인

2) 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여에 의한 면역세포의 활성증진 확인

- 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 패치타입투여에 의한 면역세포들의 활성을 확인한 결과, 암 질환에 의해 감소된 CD4, CD8 T cell 및 NK cell의 활성이 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 투여에 의해 증가되었으며 **(그림 44)**, 암 질환에 의해 증가된 대식세포 및 수지상 세포의 경우 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 투여에 의해 감소되었으나 정상레벨로의 회복은 관찰되지 않았음 **(그림 45)**.

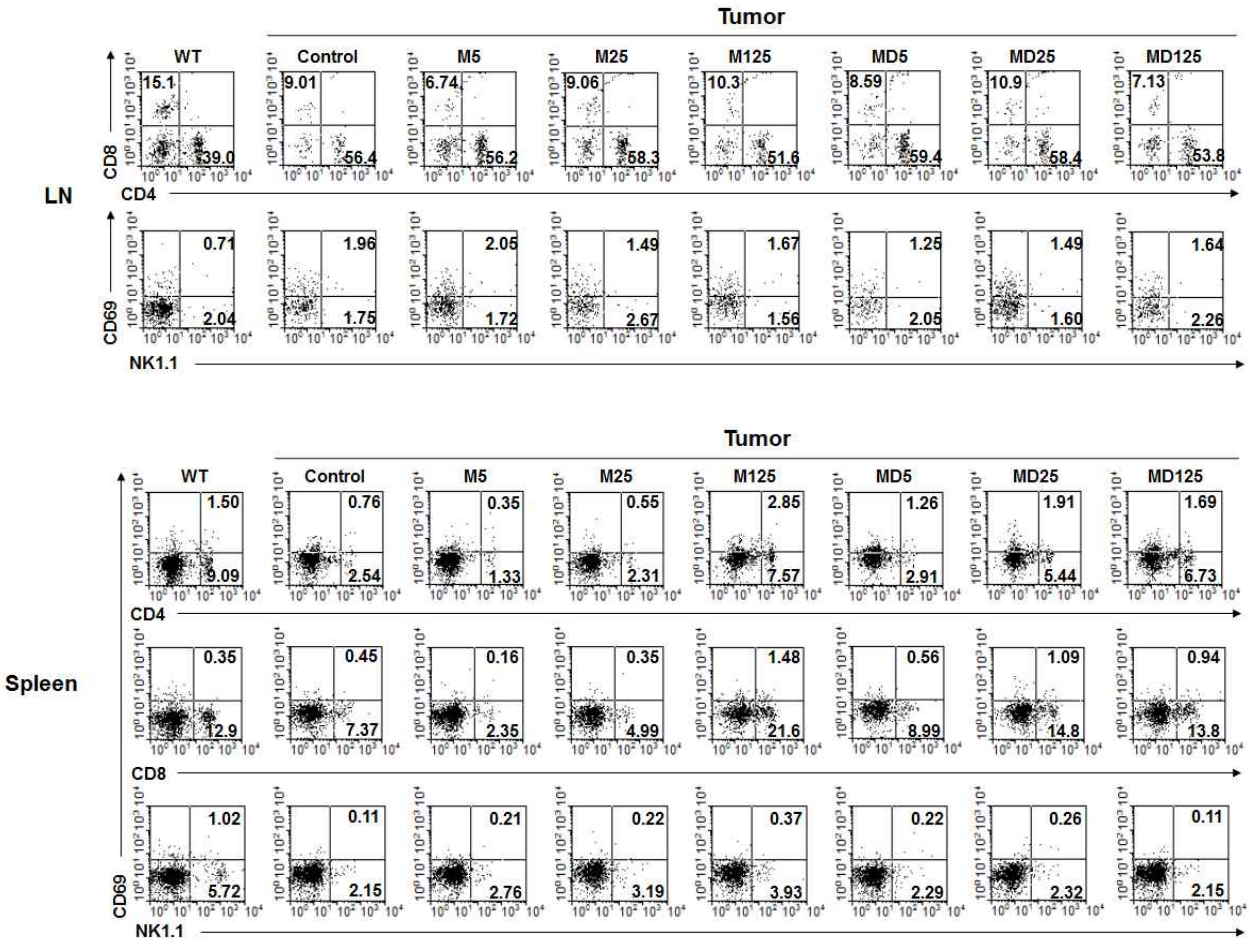


그림 44. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여시 CD4, CD8 T cell 및 NK cell의 면역세포 활성 확인

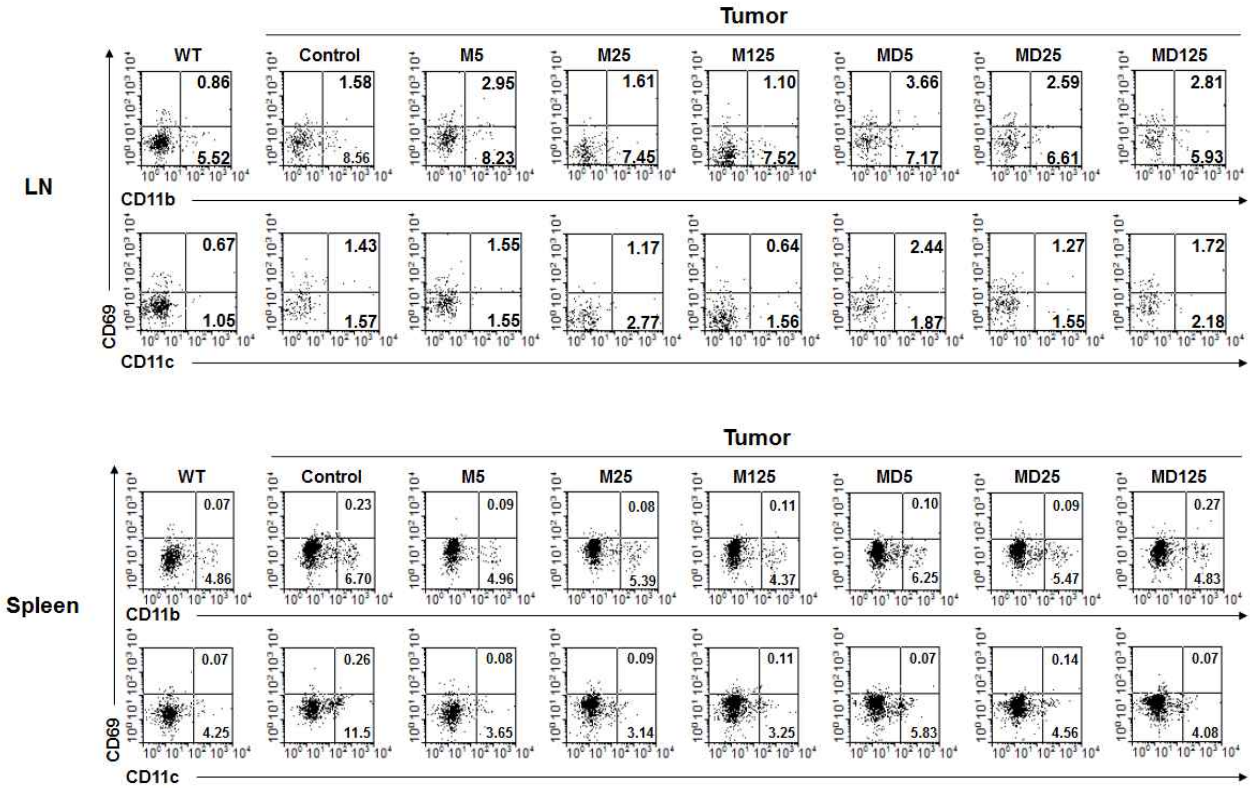


그림 45. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여시 대식세포 및 수지상 세포의 면역세포 활성 확인

- NK cell 및 CD8 T cell의 암세포 살상능력을 확인한 결과, 대조군과 비교하여 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 투여에 따른 암세포 살상능력이 증진되지 않았으며 **(그림 46)**, 암세포 살상능력과 관련된 유전자의 발현 또한 차이를 보이지 않았음 **(그림 47)**.

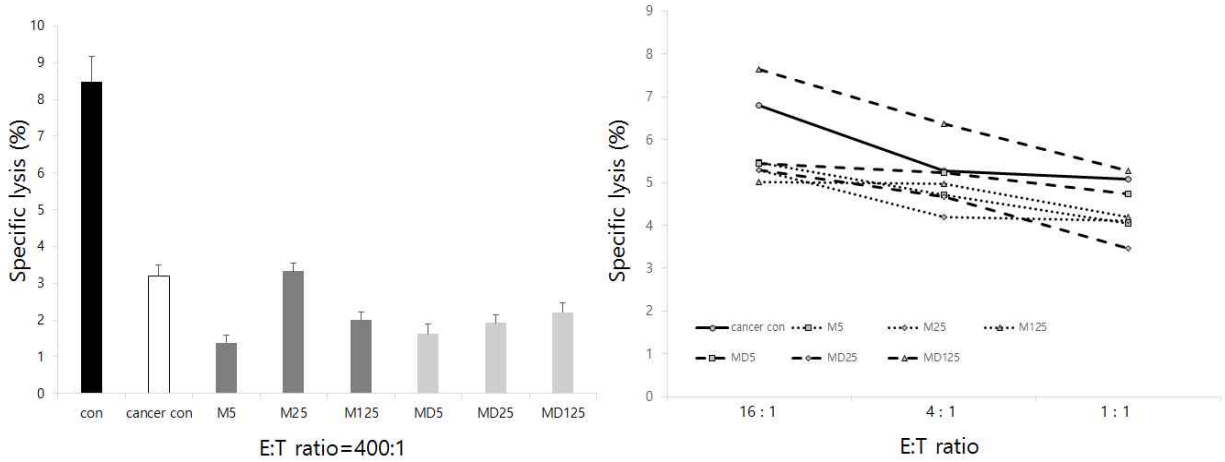


그림 46. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여시 면역세포의 암세포 살상능력 확인

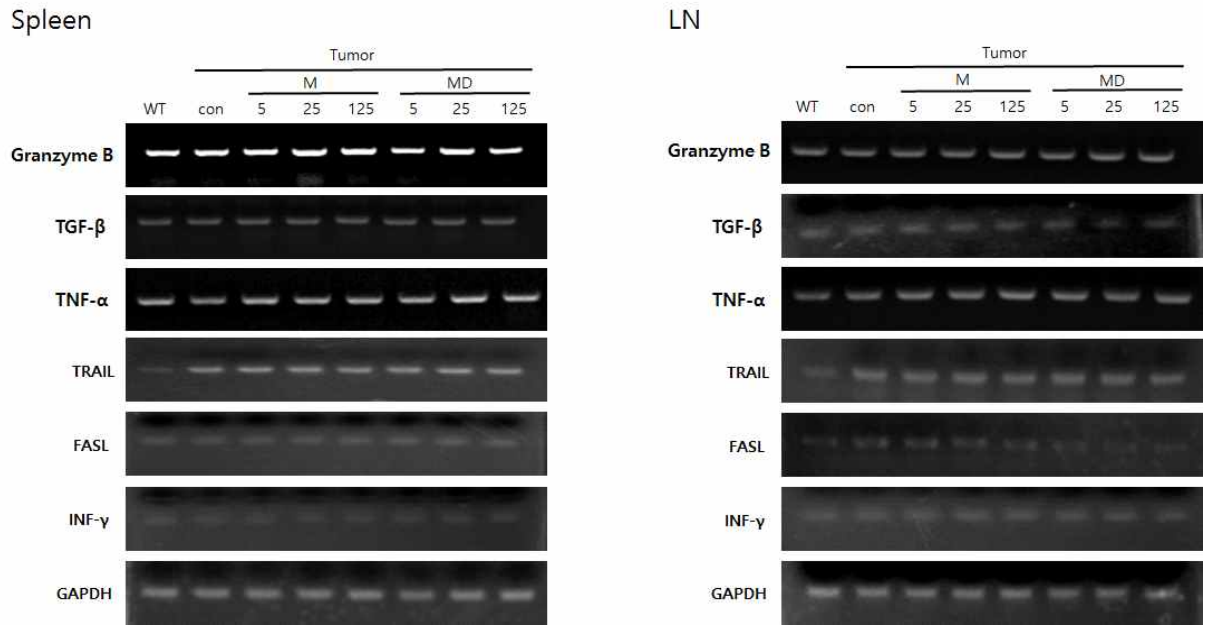


그림 47. 암 질환 마우스 모델에서 효소전환 오디추출물의 패치타입투여시 암세포 살상능력 유전자 발현 확인

- 이러한 결과를 바탕으로, 암질환 마우스 모델에서 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 패치타입투여에 의한 항암효능 및 면역세포들의 활성증진에 대한 효능은 관찰되지 않았으며, 투여용량의 증가에 따른 효능 또한 큰 차이를 보이지 않았음. 이는 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 패치타입투여법은 암 질환 치료에 적합한 방법이 아닌 것으로 생각됨.

■ **점막자가면역질환 및 암 질환에서 오디추출물 및 효소전환 오디추출물의 항염 및 항암 효능을 보이는 최적의 투여방법과 투여용량에 대한 고찰**

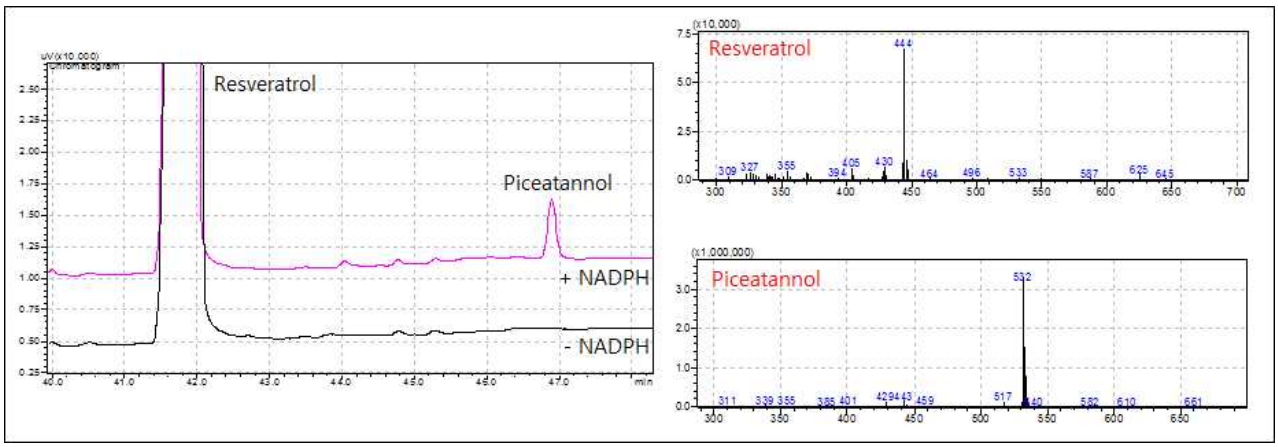
- 위 모든 결과를 종합하여 볼 때, 점막자기면역질환 및 암 질환 마우스 모델로부터 오디추출물 및 효소전환 오디추출물을 투여시 복강투여법 및 경구투여법에 의한 투여경로가 가장 효과적인 것으로 사료되며, 패치타입투여법에 의한 항염·항암 효능은 기다하기 어려울 것으로 생각됨. 또한 투여용량의 경우 복강투여법은 500 ug/Kg의 농도로 투여 시 가장 큰 효과를 보였으며, 경구투여의 경우 25 mg/Kg의 농도로 투여 시 최적의 투여용량으로 생각되어짐. 점막자기면역질환 및 암 질환에서 오디추출물 또한 항염·항암 효능을 보였지만, 효소전환 오디추출물과 비교 시 효소전환 오디추출물의 항염·항암 효능이 더 큰 것으로 보여짐.

라. 제1협동과제: 생촉매를 이용한 면역기능조절 신소재 물질 대량생산 기반구축 및 상용화

1) 미생물 P450 효소에 의한 레스베라트롤 hydroxylation 반응

- 레스베라트롤 300 μM 과 미생물 P450 효소 (mutant#10) 100 pmol을 NADPH-generation

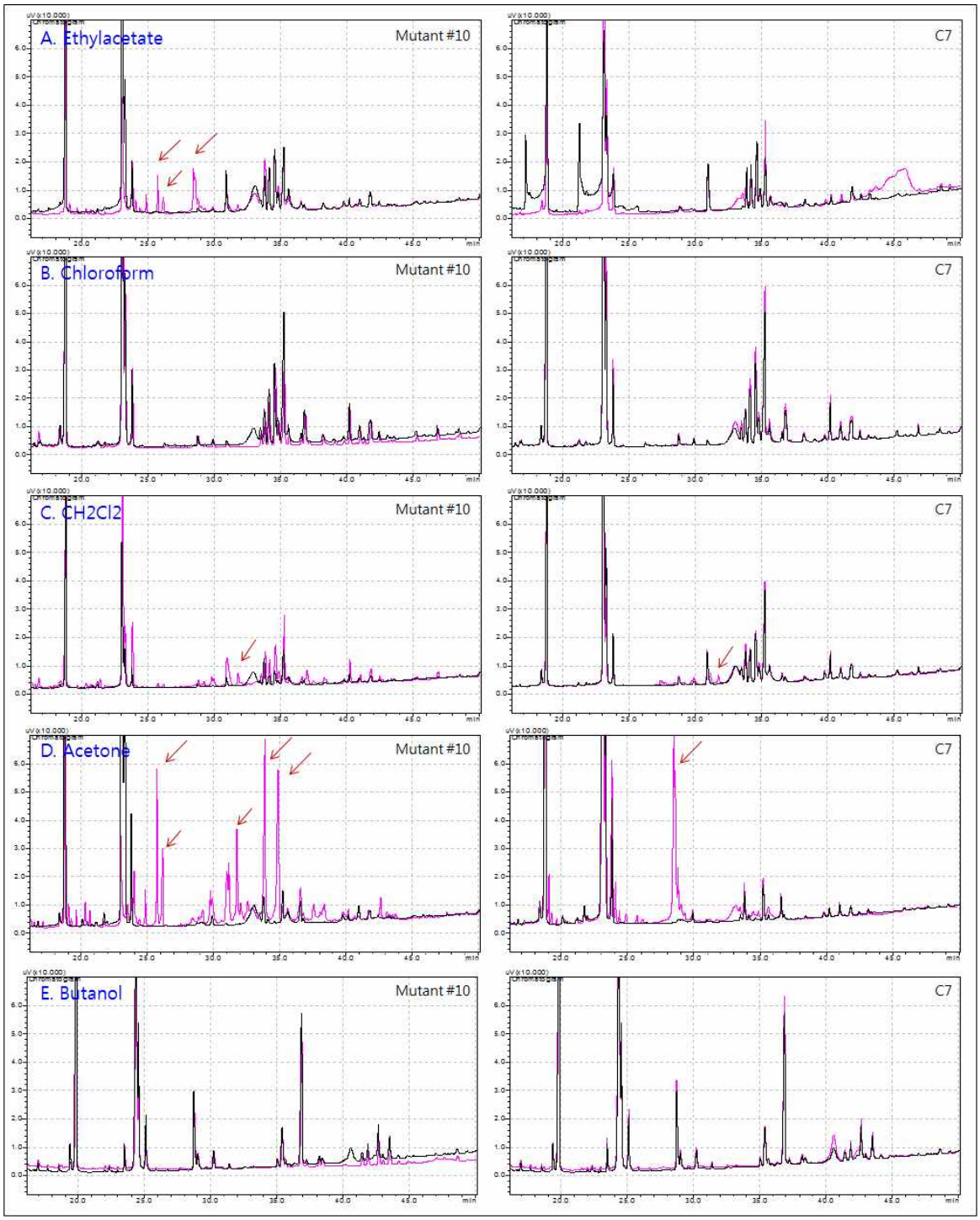
system 을 이용하여 37℃ 30분 반응시킴



- P450 변이체에 의한 레스베라트롤의 유도체인 피세아타롤의 생성을 GC/MS 를 통해 확인한 결과 P450효소반응을 하지 않은 control (검정) 에 비해 P450 효소반응 시킨 그래프 (분홍) 에서 1종의 새로운 peak 을 확인함
- 미생물 P450 변이체에 의한 레스베라트롤 유도체 확인을 위해 GC/MS를 통해 분석한 결과 유도체 peak 의 분자량 (MW 532) 이 피세아타놀 유도체 임을 확인

2) 오디추출물에 대한 미생물 P450 효소전환 반응

- 5가지 유기용매를 이용하여 추출한 각각의 오디추출물을 기질로 사용하여 미생물 유래 P450 효소2종 (mutant #10, C7)에 대한 효소전환반응 수행
- 각각의 P450 효소 100 pmol과 NADPH-generation system 을 이용하여 37℃ 1시간 반응



- 오디추출물을 이용한 P450 효소반응결과 클로로포름과 부탄올을 제외한 오디추출물에서 스틸베노이드 화합물뿐 아니라 새로운 peak 확인
- 특히 아세톤을 이용한 오디추출물에서의 P450 효소반응의 경우 많은 새로운 peak 확인
- C7 효소에 비하여 mutant#10 의 경우 에틸아세테이트와 아세톤을 이용한 오디추출물에서 다양한 생성물을 확인
- 앞서 1차년도 마우스모델실험에 의하면 스틸베노이드계 유도체 물질을 경구투여결과 염증반응시 증가하는 pro-inflammatory cytokine인 IL-6와 TNF-a의 발현이 resveratrol 유도체들인

piceatanol, piceid, pterostilbene에 의해 각각 감소되는 것을 확인하였고 이를 통해 유도체들의 항염증기능을 확인

- 또한 효소전환된 오디추출물의 마우스모델의 경구투여결과 흉선(Thymus)세포를 분리하여 면역세포의 활성 단백질로 알려진 CD69 또는 CD25의 발현을 확인 하였고 이를 통해 효소전환된 오디추출물의 면역세포 활성 증진 효능을 갖는다는 것을 확인

● 오디추출물을 이용한 시제품 제조

1) 에틸아세테이트(atyl acetate)를 이용하여 추출한 오디추출물 제조

- 수원20호 오디즙 5 ml 에 에틸아세테이트 15 ml 을 가한 후 70℃에서 1시간 shaking 하여 추출한 오디추출물을 기질로 사용하여 미생물 유래 P450 효소변이체(mutant#10) 에 대한 효소전환반응 수행
- P450 효소변이체(mutant#10) 100 pmol과 NADPH-generation system 을 이용하여 37℃ 1시간 반응하여 효소전환 오디추출물 제조
- 동결건조기를 통한 효소전환 오디추출물의 시제품 제조

4. 4차년도

가. 제1세부과제

■ 시제품의 제조 최적화

- 수원20호 오디즙 5 ml 에 유기용매 15 ml 을 가한 후 70℃에서 1시간 shaking 하여 추출
- GC 분석을 이용하여 오디추출물에서의 스틸베노이드 유도체 추출량을 측정 비교하였음.
- 디클로로메탄을 이용한 추출물에서 가장 많은 레스베라트롤의 추출량을 보임.
- 부탄올의 오디추출물에서 가장 많은 피세이드(polydatin)의 추출량을 보임
- 디클로로메탄을 이용한 추출물의 경우 에틸아세테이트를 이용한 추출물에 비하여 3배의 추출량 증가를 보이므로 디클로로메탄이 가장 효율적인 유기용매로 확인함.

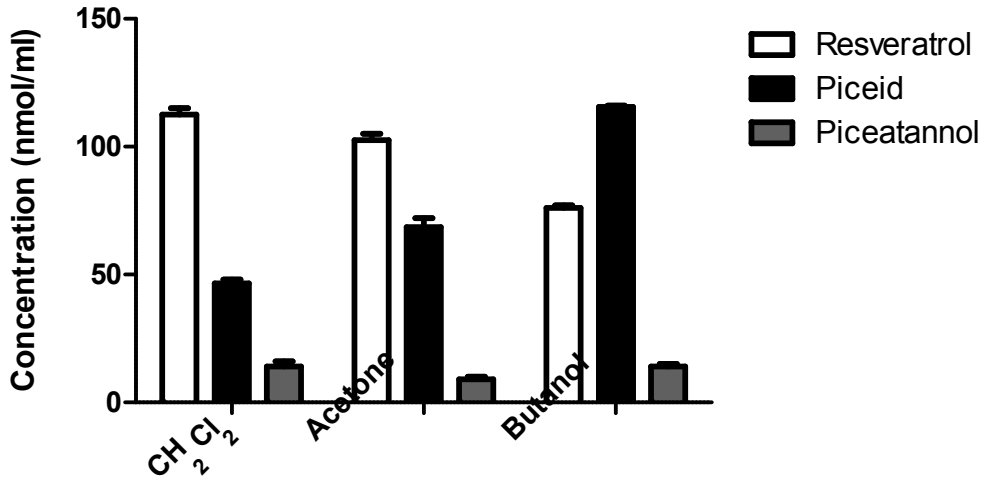


Figure 1. 유기용매 의존적 스틸베노이트 화합물의 추출량 비교

■ 추출 유기용매 제거조건 확립

- 상기 유기용매를 이용하여 최적의 추출조건을 확립하였음.
- 레스베라드롤 추출: 디클로로메탄
- 피세이드(piceid, polydatin라고도 명명): 부탄올
- 피세아타놀: 디클로로메탄
- 상기 추출물을 동결건조기를 이용하여 잔존 유기용매를 동결건조 방법으로 제거하였음.
- 유기용매를 제거할 수 있는 동결건조기 사용

■ **피세이드(piceid, polydatin)으로부터 Astringin의 제조**

1) 폴리데이틴의 대사체 확인

- 야생형 CYP102A1, CYP102A1 돌연변이체, CYP102A1 키메라, CYP102A1 키메라의 돌연변이체의 폴리데이틴 산화 여부를 확인하였다. 100 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.4) 0.25㎖에 P450 BM3 50 ㎮ol과 기질로 폴리데이틴을 100㎕를 넣어 전형적인 정상상태(steady-state) 반응을 시켰다. 반응의 시작을 위해 NADPH-생성 시스템(최종 농도: 1㎖ 당 10mM 글루코스 6-포스페이트, 0.5mM $NADP^+$및 1IU 효모 글루코스 6-포스페이트 디하이드로게네이즈)을 첨가하였다. DMSO로 폴리데이틴 20mM 용액을 제조하고 효소 반응액으로 희석하여 최종 유기용매 농도가 1%(v/v)이하가 되도록 반응혼합물을 제조하였다. 용액을 37℃에서 30분간 반응시키고 2배의 얼음으로 차갑게 한 에틸-아세테이트로 반응을 종결시켰다.

2) HPLC 분석

- 반응혼합물을 원심분리하여 상등액을 제거하여 버리고 용매를 질소가스 하에서 증발시킨후, HPLC로 분석하였다. 시료 30㎕를 Gemini C_{18} 컬럼(4.6mm×150mm, 5㎛, Phenomenex, Torrance, CA)에 주입하였다. 이동상은 85%A(아세토나이트릴/0.5% : 아세틱엑시드 = 5:95, v/v), 15%B(아세토나이트릴/0.5% : 아세틱엑시드 = 95:5)을 사용하였다. 이동상을 1㎖/min의 속도로 흘려주었고, 용출액을 320nm의 UV로 측정하였다.
- CYP102A1(P450 BM3)이 폴리데이틴을 산화할 수 있는지 조사하기 위하여 P450 야생형 CYP102A1, CYP102A1 돌연변이체, CYP102A1 키메라 및 CYP102A1 키메라의 돌연변이체를 이용하여 폴리데이틴의 산화능을 기질 농도 1000㎛M로 고정시키고 측정하였다.

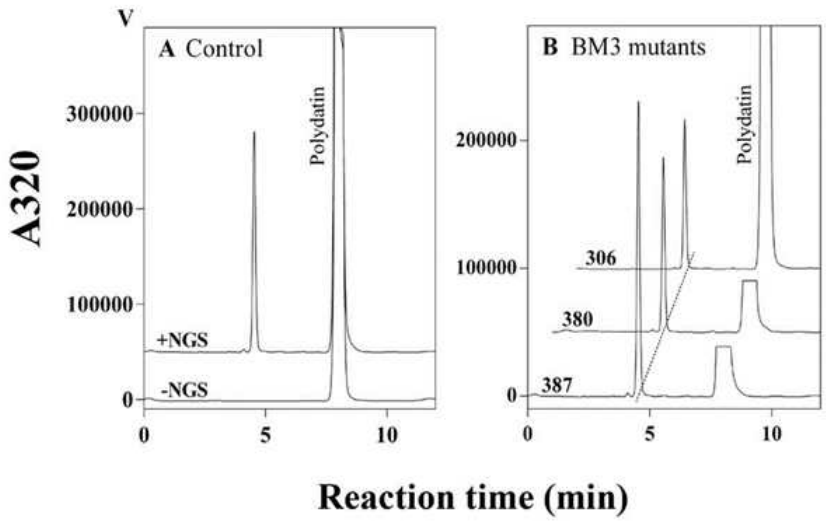


Figure 2. 박테리아 야생형 CYP102A1, CYP102A1 돌연변이체, CYP102A1 키메라 및 CYP102A1 키메라의 돌연변이체에 의해 생성된 폴리데이틴 대사산물의 HPLC 크로마토크램

- 위 HPLC을 통해 NADPH 생성 시스템을 사용하지 않은 피크와 비교한 결과 새로운 대사산

물의 피크를 확인할 수 있었다. 또한, CYP102A1 키메라(M16V3) 및 CYP102A1 키메라의 돌연변이체 3종류(387, 380, 306)의 효소를 선택하여 대사산물을 생성하는 효율을 속도론적 매개변수를 이용하여 비교하였다.

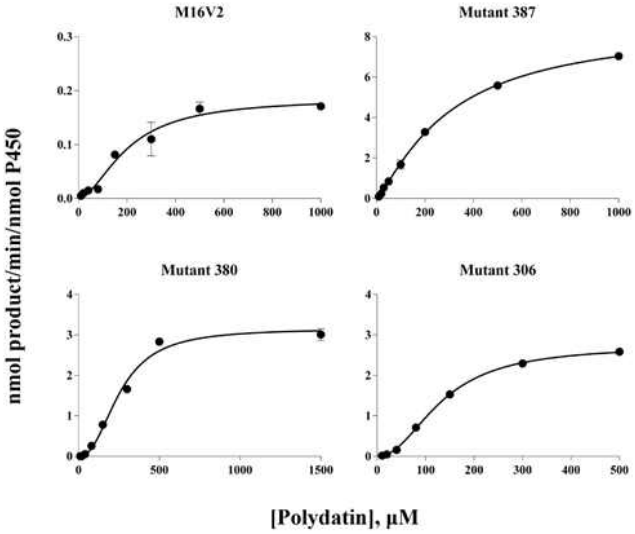


Figure 3. 박테리아 야생형 CYP102A1, CYP102A1 돌연변이체, CYP102A1 키메라 및 CYP102A1 키메라의 돌연변이체에 의해 생성된 폴리데이틴 대사산물 생성의 기질 농도 의존성

Table 1. CYP102A1 키메라 및 CYP102A1 키메라 돌연변이체의 속도론적 매개변수

Table. *Kinetic parameters of astringin formation by CYP102A1 mutants*

	Astringin formation			
CYP102A1	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($min^{-1}\cdot\mu M$) (relative catalytic efficiency)	K_d (μM)
	min^{-1}	μM		
M16V3	0.19 ± 0.02	202 ± 32	0.00094 (1)	59 ± 6
387	8.6 ± 0.3	303 ± 20	0.0284 (30)	7.1 ± 0.8
380	3.2 ± 0.1	256 ± 15	0.0125 (13)	58 ± 12
306	2.7 ± 0.1	134 ± 30	0.0201 (21)	36 ± 11

Wild type CYP102A1 did not show any apparent activity of polydatin hydroxylation.

3) LC-MS 분석

- CYP102A1 키메라 돌연변이체가 생산하는 폴리데이틴의 대사산물을 동정하기 위하여, 폴리데이틴 및 대사산물의 LC 프로파일과 프래그멘테이션(fragmentation) 패턴을 비교하여 LC-MS 분석을 하였고, CYP102A1 키메라 돌연변이체를 포함한 반응혼합물의 LC-MS 분석에 의하여 CYP102A1 키메라의 돌연변이체에 의한 3'-하이드록실화 폴리데이틴(아스트린진)의 생산을 확인하였다.
- CYP102A1 키메라 돌연변이체를 1000 μM의 폴리데이틴과 NADPH-생성 시스템의 존재하에

37℃에서 30분간 반응시켰다. 얼음으로 식힌 2배의 에틸-아세테이트를 가하여 반응을 종결시켰다. 원심분리 후, 상등액을 제거하여 버리고 유기 용매 층을 질소하에 건조하였다. 반응물을 100㎕의 이동상에 볼텍스 믹싱으로 재구성시키고 20초간 소니케이션하였다. 제조된 용액의 적정량으로 5㎕을 LC 컬럼에 주입하였다. LC-MS 분석은 LCMS 소프트웨어를 장착한 쉬마쯔 LCMS-2010 EV 시스템(Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하여 전자분무이온화 모드(electro spray ionization(positive) mode)에서 실시하였다. Shim-pack VP-ODS 컬럼(4.6mm×150mm i.d.; Shimadzu co., Japan)에서 이동상은 85%A(아세토나이트릴/0.5% : 아세틱엑시드 = 5:95, v/v), 15%B(아세토나이트릴/0.5% : 아세틱엑시드 = 95:5)을 사용하였다. 이동상을 0.1 ㎖/min의 속도로 분리하였다. 대사산물을 확인하기 위하여, 질량스펙트라(mass spectra)를 전자분무이온화 모드(electro spray ionization(positive) mode)에서 기록하였다. 인터페이스와 디텍터 볼트는 각각 4.4kV 및 1.5kV 였다. 네블라이제이션(Nebulization) 가스 속도는 1.5㎖/min으로 설정하였으며, 인터페이스, CDL(curve desolvation line) 및 히트블록 온도는 각각 250℃, 250℃ 및 200℃로 하였다.

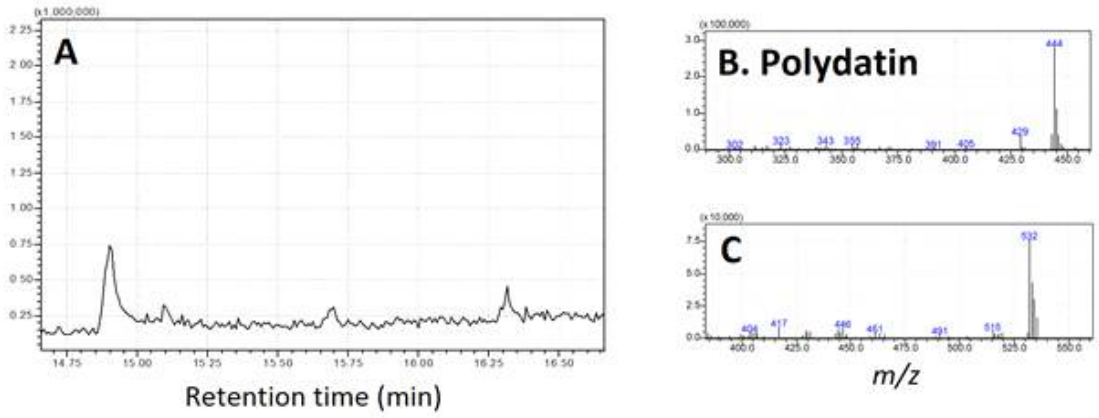


Figure 4. CYP102A1 키메라의 돌연변이체 387에 의하여 생성된 폴리데이틴 및 그의 대사산물의 LC-MS 용출 프로파일

- CYP102A1 키메라의 돌연변이체 387에 의해 생성된 대사산물의 총이온전류(total ion current; TIC) 프로파일을 나타냈다. 반응샘플의 질량스펙트라는 5.182min(3'-하이드록시 폴리데이틴), 6.453min(폴리데이틴)에서 피크를 나타냈다. CYP102A1 키메라의 돌연변이체 387에 의한 3'-하이드록실화 산물과 폴리데이틴의 질량스펙트라는 $[M+H]^+$로 계산하였을 때 각각 407, 391로 관찰되었다.

4) Piceid의 대사체의 NMR 분석

- 박테리아 CYP102A1 키메라의 돌연변이체 387에 의하여 생성된 대사산물의 구조를 확인한 결과, 생성된 산물은 NMR 분석에 의해 3'-하이드록시 폴리데이틴인 아스트린진(astringin)인 것을 확인하였다.

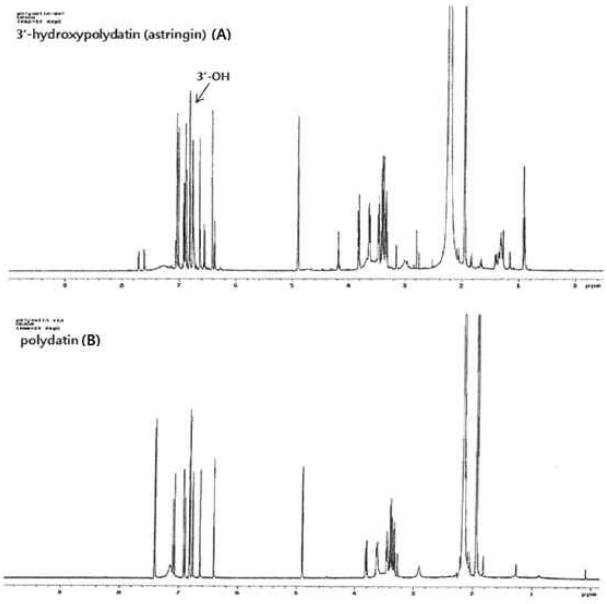


Figure 5. 박테리아 CYP102A1 키메라의 돌연변이체 387에 의해 생성된 대사산물의 구조 확인

5) Piceid(polydatin)의 대사체의 화학구조 확인

- CL/MS 및 NMR 분석결과 P450 반응에 의해 생성되는 piceid의 대사체는 Astringin임.

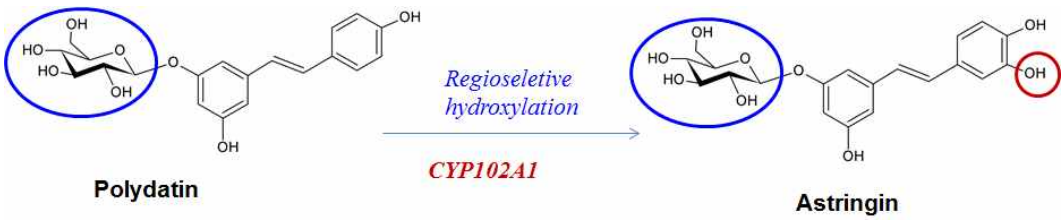


Figure 6. P450 반응을 이용한 polydatin(piceid)로부터 astringin의 제조

6) Piceid(polydatin)으로부터 astringing 제조의 conversion percent 및 selectivity

Table 2. Production of astringin from polydatin by the CYP102A1 chimera M16V2 and its mutants.

Enzyme	Conversion [%][a]	Selectivity [%][b]	Enzyme	Conversion [%][a]	Selectivity [%][b]
M16V2	1.3	85	**380**	2.6	99
306	5.0	99	**387**	6.9	99

[a]The conversion and [b]formation of astringin were determined by HPLC, The reactions contained P450 (50pmol), an NADPH regeneration system and polydatin (0.05 mM) in a potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The samples were incubated for 1 hour at 37°C. The results are reported as the means of duplicated experiments, and the values did not differ by > 5%.

7) Piceid(polydatin)으로부터 astringing 제조의 total turnover number (TTN) 측정

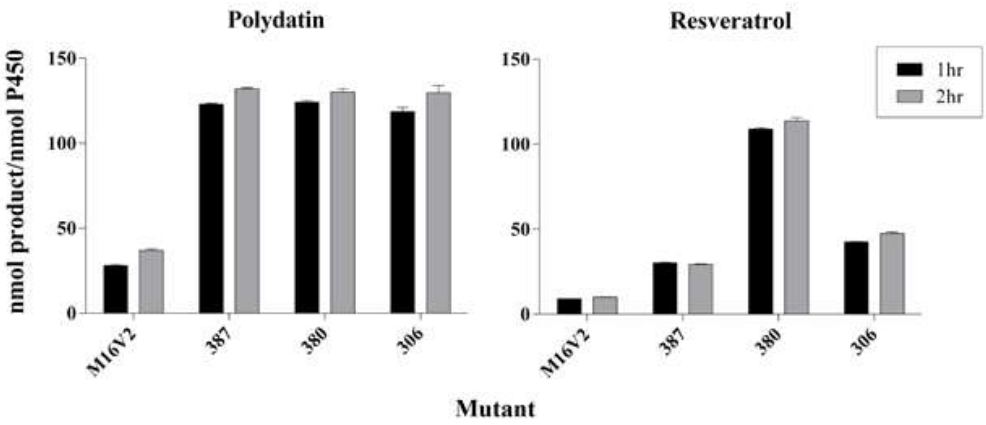


Figure 7. Total turnovers numbers of Polydatin and Resveratrol by BM3 mutants.

Polydatin: 500μM, Enzyme 50 pmol, Reaction time: 1 hour – 2 hour

나. 제2세부과제

■ 대장균 발현 시스템을 이용한 식물 P450 발현 문제 해결 및 최적화 구축

- 식물의 대사과정에 관여하는 식물 P450 효소의 대량발현을 위해 대장균 발현 시스템을 이용함. 대장균 발현 시스템은 단백질 발현에 일반적으로 많이 사용하는 방법 중의 하나이지만 식물 유래의 단백질 같은 외부 단백질이 종종 발현이 되지 않고 inclusion-body나 protease에 의한 단백질 분해 등이 일어남. 본 연구과제 수행에서도 기존의 실험방법으로는 대장균 발현 시스템에서 식물 P450의 발현이 어려워 새로운 실험방법의 시도가 요구됨.
- 대장균에서 식물 P450의 발현을 높이기 위해 잘못된 단백질 folding을 방지하는 역할을 하는 chaperone 단백질의 co-expression 방법을 도입함. 이 방법에 사용되는 벡터는 pG-KJE8, pAR3HDJ-1, pGro-7, pG-TF2, pKJE7 이며 이는 각각 특정한 chaperone 단백질을 포함함. 벡터 map은 다음과 같음(그림 1).

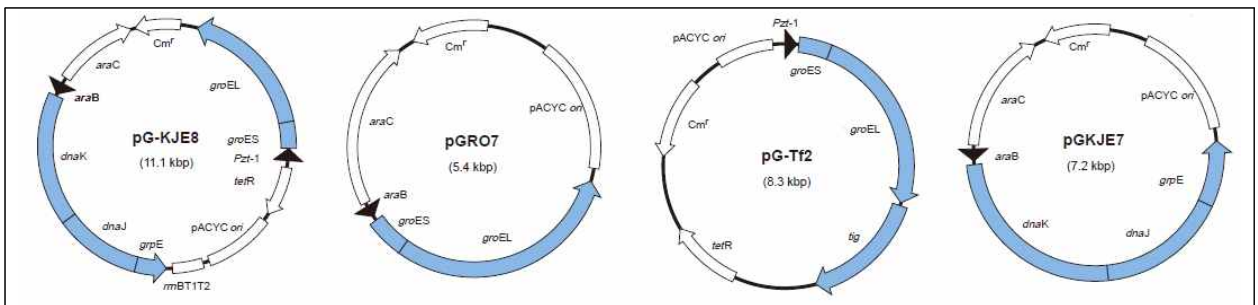


그림 1. Chaperone plasmid 의 벡터 map

출처: http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/9120-25_e.v0707.pdf

- 대장균에서 식물 P450의 발현 최적화 시스템 구축을 위해 토마토에서 분리한 P450 유전자인 SlP450-3, SlP450-27을 P450 발현 벡터인 pCW에 cloning함. 완성된 P450 발현 벡터와 각각의 chaperone plasmid를 대장균 BL21 (DE3) strain에 형질전환 하여 단백질 co-expression 유도함.
- SlP450-27의 대장균 발현 최적화 실험은 각각의 plasmid와 co-expression 하면서 배양시간을 여러 구간(24hr-48hr, 4hr 간격)으로 나누어 수행함(그림 2). 일산화탄소(CO)를 이용한 흡광피크 측정법을 통해 발현양을 분석한 결과 pCW 벡터에 SlP450-27만 발현시켰을 때 보다 pAR3HDJ-1, pKJE7을 co-expression 시켰을 때 발현이 더욱 향상됨을 확인함. pAR3HDJ-1을 공동 배양한 경우가 가장 높은 발현양을 보였고, 배양시간 분석 결과 24hr 때 발현값 (0.004uM) 보다 29hr때 발현값 (0.03uM)이 약 7배 정도 더 높은 것을 확인함(그림 2C).

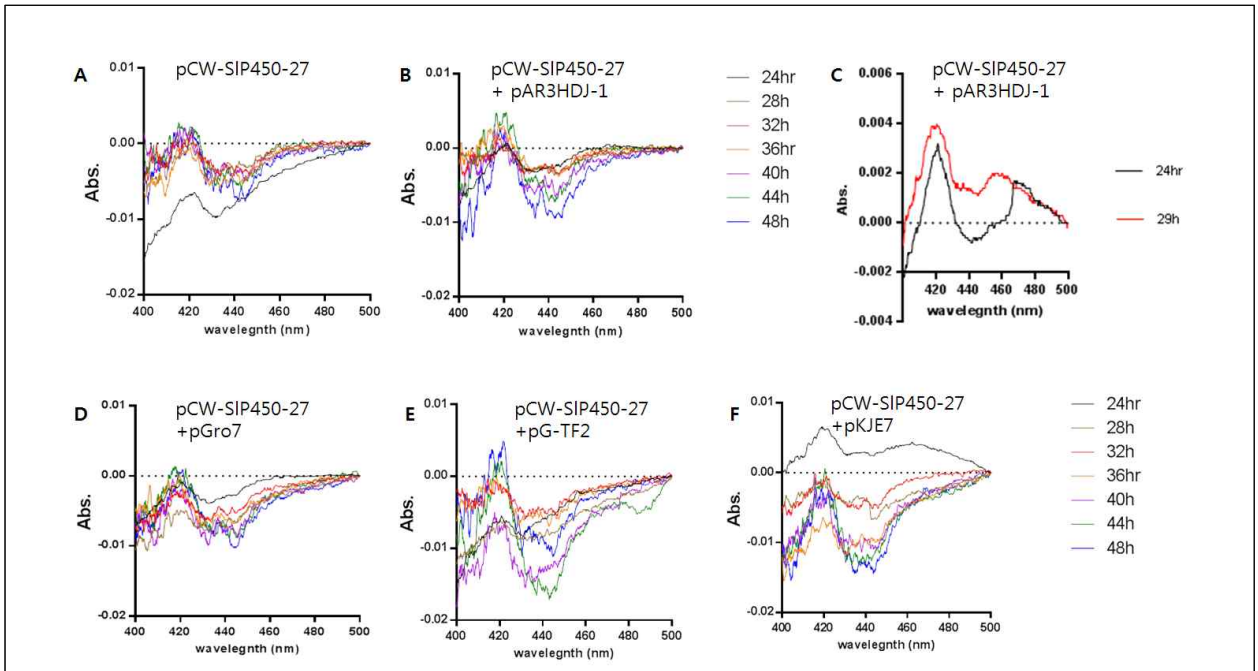


그림 2. SlP450-27의 CO-spectral assay 흡광도

- SlP450-3의 chaperone plasmid 대장균 발현 최적화 실험결과 SlP450-3만 발현 시켰을 경우 보다 pG-TF2, pKJE7를 같이 발현했을 때 발현양이 증가한 것을 확인함(그림 3). 특히 pKJE7와 같이 배양시켰을 경우 가장 높은 발현 값(0.06uM)을 확인함(그림 3F)

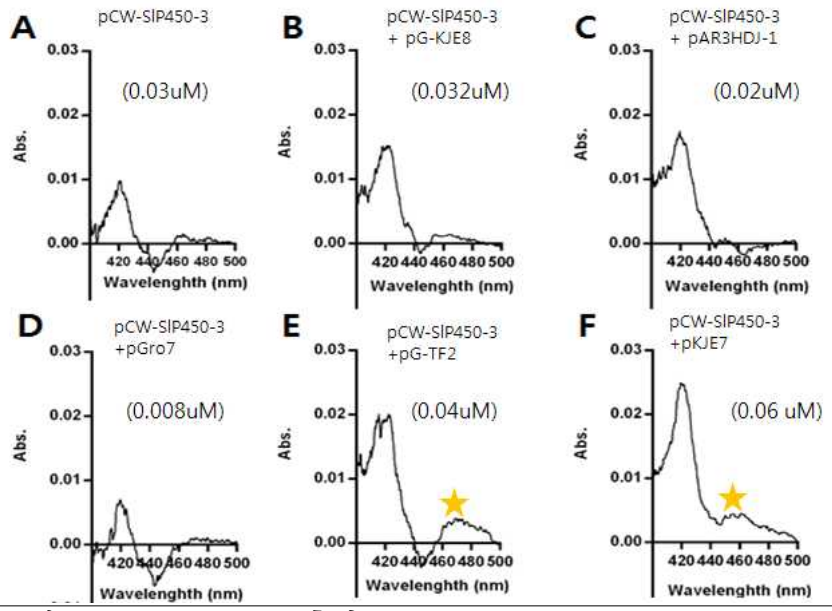


그림 3. SlP450-3의 CO-spectral assay 흡광도

■ **고추 유래의 CaP450-12A-1, 2, 3 효소 대량발현 및 활성 확인**

- 고추 ABA 8'-hydroxylase family인 CaP450-12A-1, 2, 3를 대장균에서 발현시키기 위해 P450 발현 벡터인 pCW 벡터에 클로닝함. 단백질 발현양을 높이기 위해 chaperone plasmid와 co-expression 하는 방법으로 실험한 결과 pKEJ7을 같이 배양 시켰을 때 CaP450-12A-1, 2, 3 발현이 더 향상됨을 확인함(그림 4).

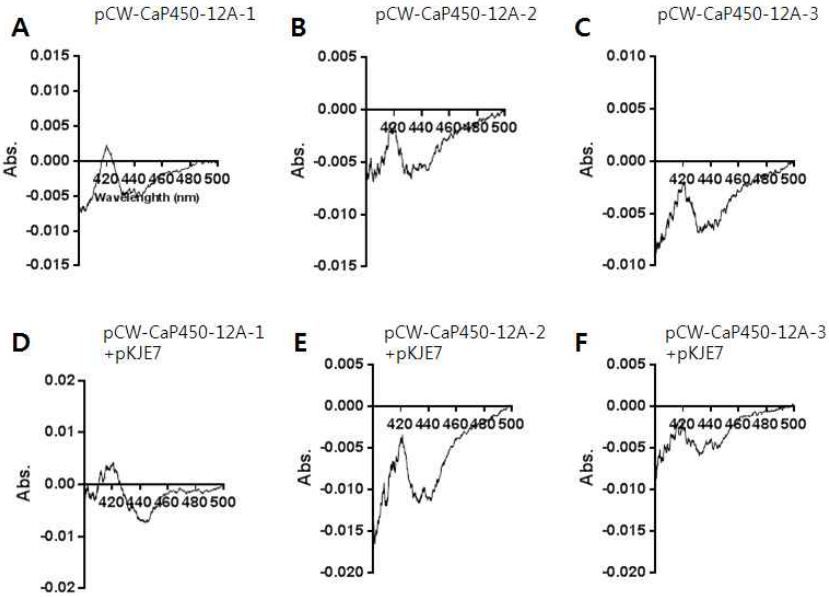


그림 4. 대장균에서 발현된 CaP450-12A-1, 2, 3의 CO-spectral assay 흡광도

- 고추 ABA 8'-hydroxylase family인 CaP450-12A-1, 2, 3를 대장균에서 대량발현 실험을 수행함. 연구과제 수행을 통해 얻은 결과를 토대로 chaperone plasmid인 pKEJ7을 같이 co-expression

함. P450 발현 배지 300ml에 형질전환 된 대장균을 접종한 뒤 CaP450-12A-1, 2, 3 단백질 발현을 유도함. 배양 후 초고속원심분리기를 이용하여 membrane fraction과 cytosol fraction으로 분리함. 분리된 sample에 CO-spectral assay를 수행한 결과 membrane fraction에서 P450 활성이 확인됨(그림 5).

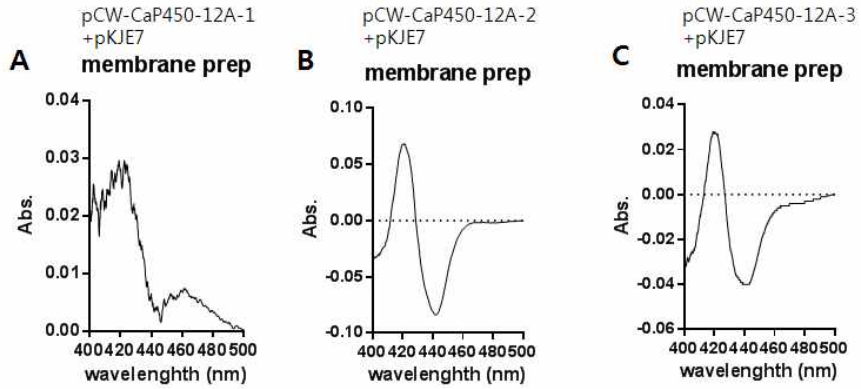


그림 5. 대량배양 후 얻은 membrane fraction에서 CO-spectral assay 흡광도

- 대장균에서 발현된 CaP450-12A-1, 2, 3가 실제로 P450 촉매 반응을 하는지 알아보기 위해 HPLC를 이용하여 실험을 수행함. 대부분의 P540이 기질로 반응하는 7-EC를 발현된 효소에 처리하여 생성물인 7-hydroxy coumarin이 생성되는지 알아보는 실험방법임. 이때 NGS는 전자전달물질로 사용됨. 실험결과 발현된 CaP450-12A-1, 2, 3 효소 모두 기질 촉매반응이 확인됨(그림 6).

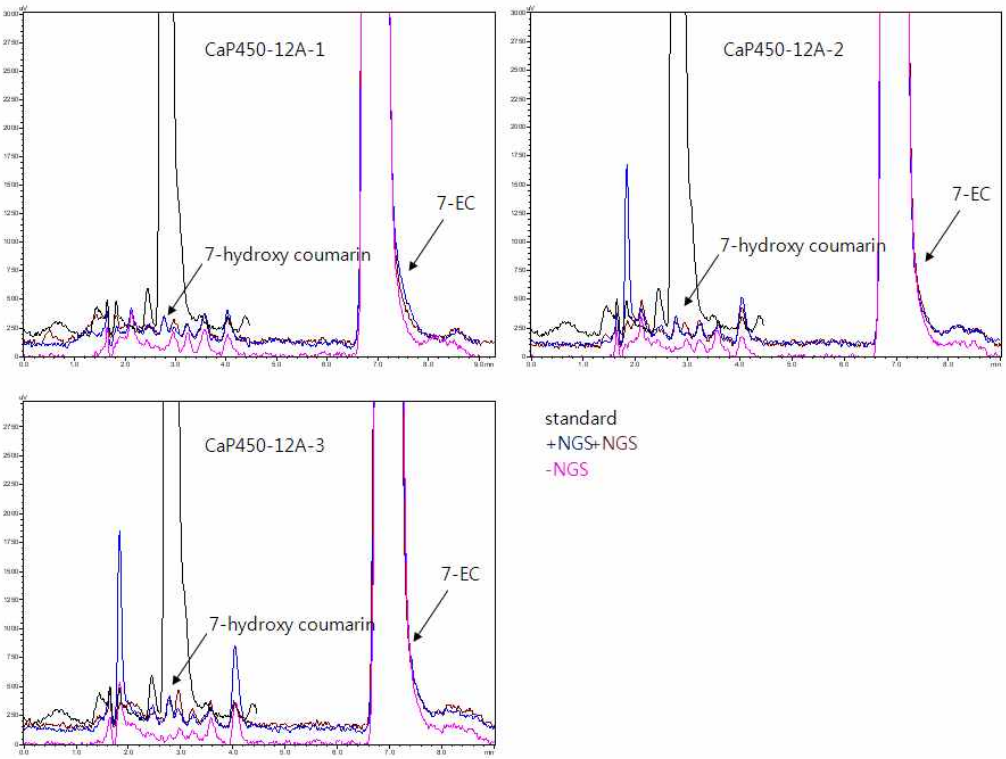


그림 6. CaP450-12A-1, 2, 3 효소의 기질 촉매반응

■ **고추 유래의 시토크롬 P450 환원효소 modification**

- 시토크롬 P450 환원효소(Cytochroem P450 Reductase, CPR)는 P450 촉매반응에 필수적인 효소임. 대장균에서 발현된 식물 P450의 생촉매 활용을 위한 시스템 개발에서 전자전달에 관여하는 CPR 효소의 효율을 높이기 위해 식물 유래의 CPR 이용함. 본 연구과제 수행 결과 고추 유래 P450의 기질촉매반응시 CaCPR 1의 사용이 더 효율적임을 확인함.

- CaCPR 1의 활용 가능성을 더 높이기 위해 modification 실험을 수행함. CPR의 c-terminus 부분에 따라 CPR 활성이 변한다는 연구결과를 토대로 CaCPR 1의 c-terminus 부분을 DVW에서 DVAS로 modification 시킴(그림 7). DNA sequence 분석으로 변형된 CaCPR 1-DVAS 유전자를 확인하였고, 단백질 발현 벡터인 pET28(a) 벡터에 cloning하여 대장균에 형질전환 시킴. 대장균에서 변형된 CaCPR 1-DVAS의 발현을 유도하였고, 단백질을 분리하여 absorption spectrum으로 변형된 CaCPR 1-DVAS의 발현을 확인함(그림 8).

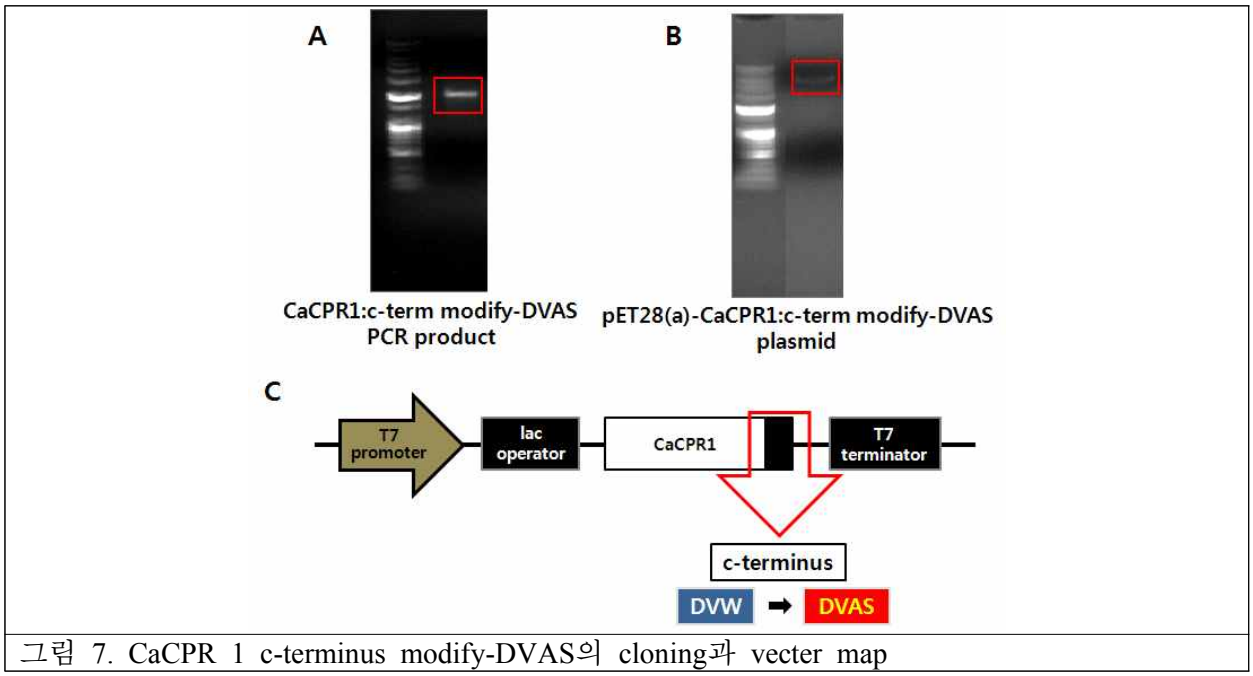


그림 7. CaCPR 1 c-terminus modify-DVAS의 cloning과 vecter map

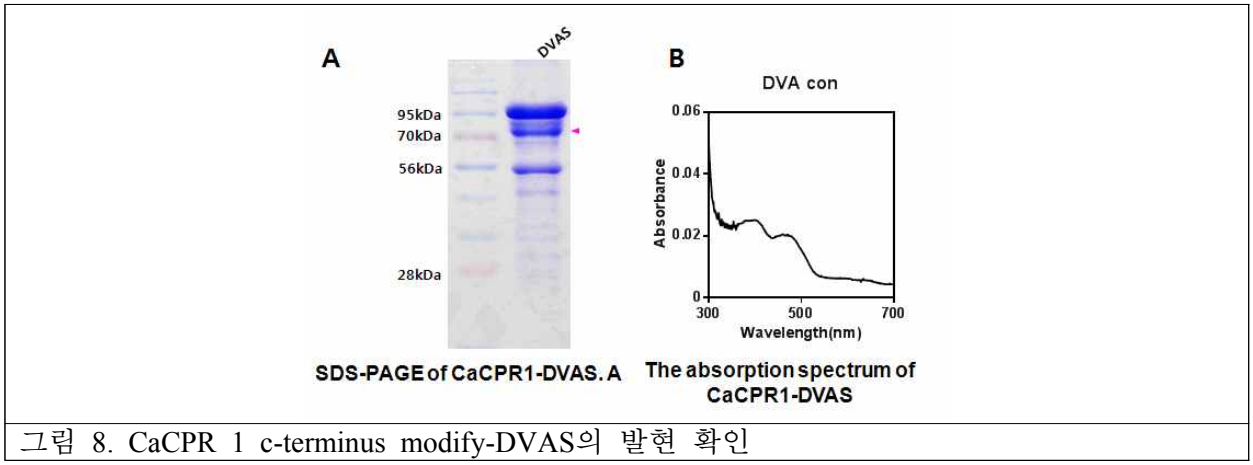


그림 8. CaCPR 1 c-terminus modify-DVAS의 발현 확인

다. 제3세부과제

■ 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질들의 최적의 투여경로 및 투여용량 확립

- 본 연구과제의 수행을 통해 만성염증성장질환(IBD) 마우스 모델 및 암 마우스 모델에서 오디유래 추출물들의 항염·항암 효능을 보이는 최적의 투여경로는 경구투여임을 확인하였으며, 경구투여시 최적의 투여용량은 25 mg/Kg임을 확인하였음. 또한 본 연구과제에서 수행한 투여용량인 25 mg/Kg은 공인 기관으로부터 평가된 안전성 및 독성검사에서 독성 및 이상소견이 보이지 않는 투여용량의 범위임을 확인하였음. 이에 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질인 피세이드(Piceid), 프테로스틸벤(Pterostilbene), 피노스틸벤(Pinostilbene)의 투여경로를 경구투여법으로 확립하였으며, 그 투여용량은 25 mg/Kg으로 확립하였음.

■ IBD 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질들의 경구 투여에 의한 항염 효능 확인

- 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질들의 점막자가면역질환에서 항염 효능을 확인하기 위하여, 10주령 C57BL/6 마우스에 DSS를 이용하여 IBD를 유발시킨 후 각각의 스틸베노이드계 후보물질들을 25 mg/Kg의 농도로 7일간 경구 투여함. 그 결과, DSS에 의해 감소된 대장의 길이가 오디 및 스틸베노이드계 후보물질에 의해 회복됨을 확인할 수 있었음 **(그림 1)**. 또한 대장조직으로부터 세포를 분리한 후 염증사이토카인들인 Cox-2, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17A, TGF-β들의 유전자 발현변화를 확인한 결과 DSS에 의해 증가된 염증사이토카인들의 유전자 발현이 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질들에 의해 감소되는 결과를 확인함 **(그림 2)**. 반면에, 항염증사이토카인으로 알려진 IL-10의 유전자발현을 확인한 결과 DSS에 의해 감소된 항염증사이토카인의 유전자 발현이 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질들에 의해 증가됨을 알 수 있었음.

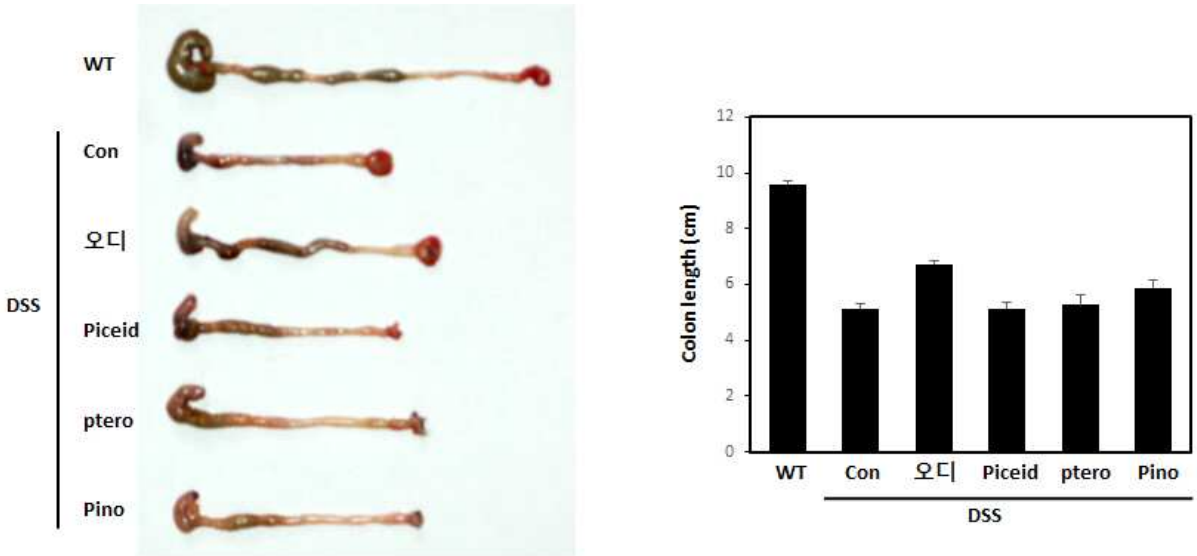


그림 1. IBD 마우스 모델에서 경구투여된 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질에 의한 대장 길이 변화 확인

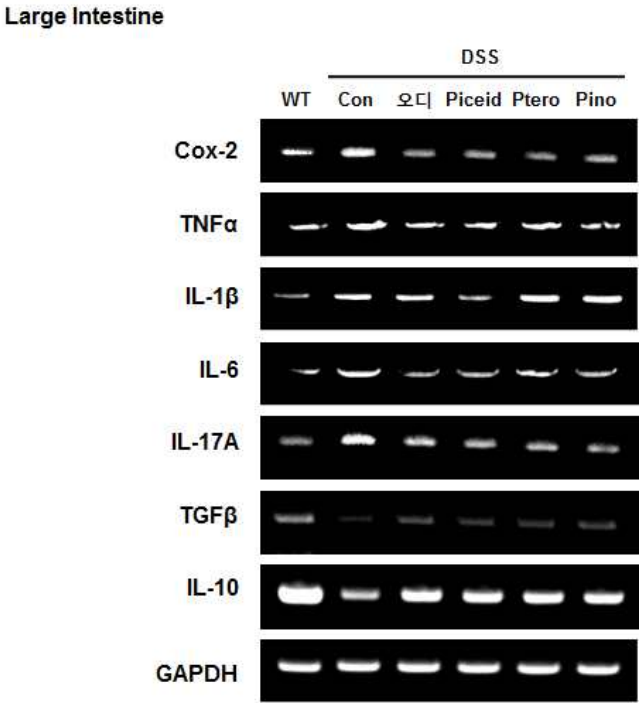


그림 2. IBD 마우스 모델에서 경구투여된 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질에 의한 염증관련 유전자 발현변화 확인

- 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질에 의한 면역글로불린 (Ig) 의 생성을 확인하기 위하여 IBD 마우스 모델의 feces로부터 점막면역반응에 중요하게 작용하는 IgA를 추출한 후 ELISA를 수행함. DSS에 의해 IBD가 유도된 마우스 그룹의 경우 IgA의 레벨이 증가됨을 확인할 수 있었으며, 증가된 IgA의 레벨이 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의해 감소됨을 확인할 수 있었음. 특히, 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드 및 프테로스틸벤을 경구투여한 그룹에서 IgA의 레벨이 크게 감소됨을 알 수 있었음 **(그림 3)**.

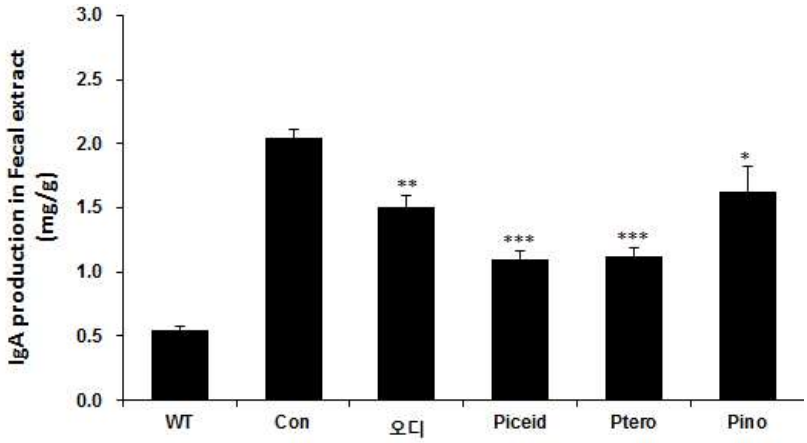


그림 3. IBD 마우스모델에서 경구투여된 오디 및 오디로부터 추출된 스틸베노이드계 후보물질에 의한 면역글로불린 A의 생성 변화 확인

- IBD 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의해 면역세포의 변화를 관찰하기 위하여 대장조직으로부터 세포를 분리한 후 유세포 분석기를 이용하여 T cell의 population 변화를 분석하였음. 그 결과, DSS에 의해 감소된 T cell의 population이 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의해 증가되었으며, 특히 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드를 경구투여한 그룹에서 크게 증가됨을 확인할 수 있었음 **(그림 4)**.

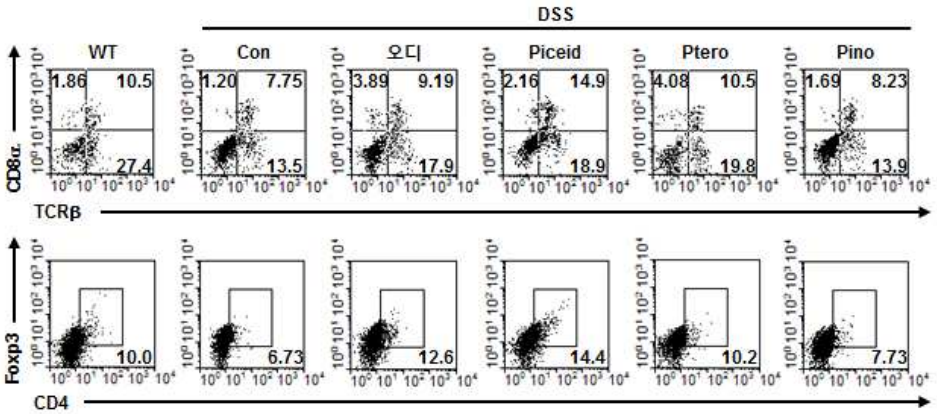


그림 4. IBD 마우스모델에서 경구투여된 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질에 의한 T cell의 증가

- 위 결과를 바탕으로 DSS에 의해 유도된 IBD 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의해 점막자가면역질환이 완화됨을 알 수 있었으며, 특히 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드 및 프테로스틸벤의 효과가 가장 큰 것으로 사료됨. 또한 3차년도 연구결과와 마찬가지로 IBD 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여시 25 mg/Kg의 농도에서 항염증 효과를 보임으로써 점막자가면역질환의 치료효과를 관찰할 수 있었음. 따라서 본 연구결과를 통해 점막자가면역질환의 하나인 만성염증성장질환에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 최적의 투여경로 및 투여용량을 확립하였으며, 특히 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드 및 프테로스틸벤의 효과가 탁월함을 검증하였음.

■ 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 항암효능 검증

1) 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 암세포 증식 및 전이억제 확인

- 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 항암효능을 확인하

기 위해 암 질환 마우스 모델을 제작한 후 오디 및 스틸베노이드계 후보물질을 25 mg/Kg의 농도로 21일간 매일 경구투여함. 암 질환 마우스모델을 제작하기 위하여 마우스의 피하에 암세포를 주입한 후 21일간 매일 암세포의 증식변화를 관찰한 결과, 대조군과 비교하여 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질을 경구투여한 그룹의 암세포의 증식이 억제됨을 확인할 수 있었으며, 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 암세포 증식이 유희적으로 억제됨을 알 수 있었음 **(그림 5)**. 특히 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드를 경구투여한 그룹의 암세포 증식이 가장 많이 억제되는 결과를 확인함. 암질환 마우스 모델을 희생하여 암조직의 크기를 관찰한 결과 또한 대조군과 비교하여 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질을 경구투여한 그룹의 암세포 크기가 가장 작았으며, 특히 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드를 경구투여한 그룹에서 그 크기가 가장 작음을 확인하였음 **(그림 5)**.

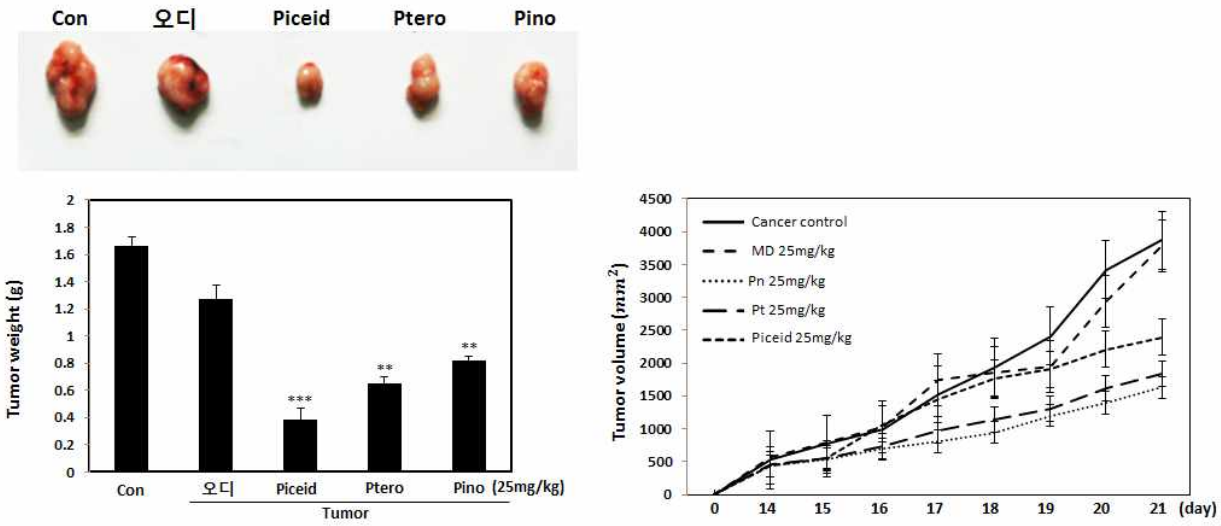


그림 5. 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 암조직의 변화 확인

- 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 암세포 증식이 억제됨을 확인하였음. 이에 암 조직으로부터 세포를 분리한 후 세포주기 및 세포사멸, 암 세포의 전이관련 유전자들의 발현변화를 확인하였음. 그 결과, 세포주기를 조절하는 유전자인 p21과 p53의 유전자 발현에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 세포사멸을 유도하는 유전자인 Capase-8 및 Bcl-2의 유전자 발현이 크게 증가됨을 알 수 있었음 **(그림 6)**. 또한 암세포의 전이를 증가시키는 MMP-9의 발현이 감소됨을 확인하였음. 특히 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드가 가장 효과적으로 유전자들의 발현을 조절함을 관찰하였음.

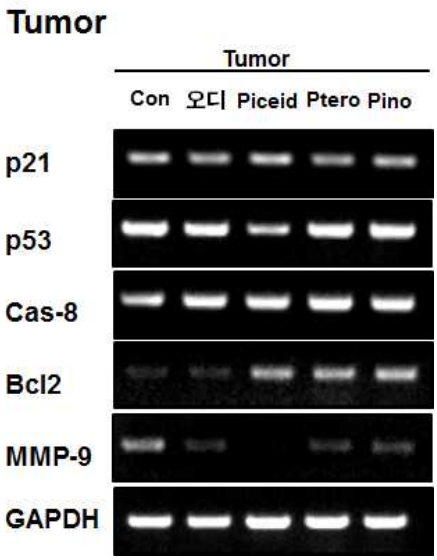


그림 6. 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베토이드계 후보물질의 경구투여시 암세포이 세포주기 및 세포사멸, 전이능력 유전자 발현의 변화 확인

- 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질들의 경구 투여에 의한 면역세포들의 침윤능력을 확인하기 위해 마우스 암 모델의 비장으로부터 세포를 분리한 후 invasion assay를 수행하였음. 그 결과, WT과 암 모델 대조군간의 차이는 관찰되지 않았으며, 대조군과 비교하여 오디 및 스틸베노이드계 후보물질을 경구투여한 그룹에서 면역세포들의 전이 능력이 증가되는 결과를 확인함 (**그림. 7**). 특히 앞선 결과와 마찬가지로 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드를 경구투여한 그룹의 면역세포가 가장 높은 전이 능력을 보였음. 또한 마우스의 비장 및 림프절로부터 세포를 분리한 후 면역세포의 침윤능력에 관여하는 유전자의 발현을 확인한 결과, 대조군과 비교하여 오디 및 스틸베노이드계 후보물질을 경구투여한 그룹에서 증가됨을 알 수 있었음 (**그림. 8**).

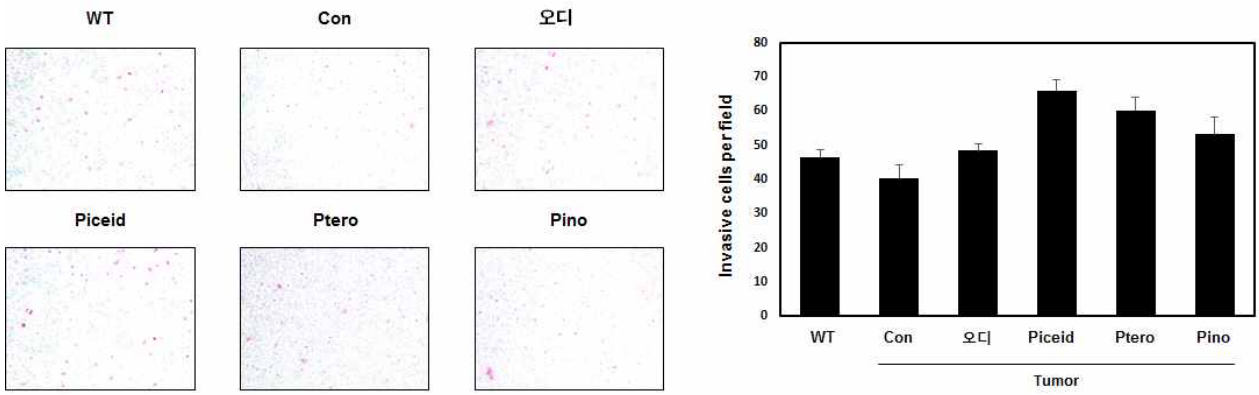


그림 7. 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 면역세포의 침윤능력 확인

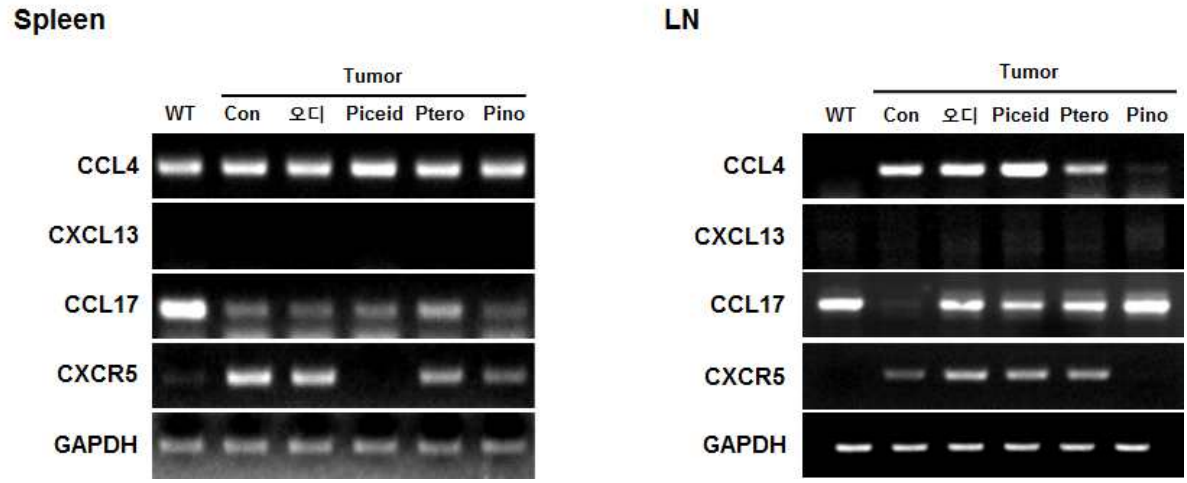


그림 8. 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질들의 경구투여에 의한 면역세포 침윤능력 관련 유전자 발현의 변화 확인

2) 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 자연살해세포의 활성 증진 및 암세포 killing 능력 증가 확인

- 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의하여 암세포의 증식 및 전이 능력이 억제된 결과를 바탕으로, 암 질환 마우스 모델에서 암세포를 직접적으로 killing할 수 있는 자연살해세포의 활성 증진 및 암세포 killing 능력을 확인하였음. 암 질환 마우스 모델의 비장 및 림프절로부터 세포를 분리한 후 활성화된 자연살해세포의 population을 확인한 결과, 대조군과 비교하여 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질을 경구투여한 그룹의 활성화된 자연살해세포의 population이 증가 되었으며, 특히 오디로부터 추출한 후보물질 중 피세이드를 경구투여한 그룹의 활성화된 자연살해세포의 population이 크게 증가됨을 알 수 있었음 (**그림. 9**). 이 결과를 바탕으로 활성화된 자연살해세포의 암세포 killing능력을 확인한 결과, 위 결과와 일치하게 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질을 경구투여한 그룹의 자연살해세포가 암세포를 가장 많이 killing 하였으며, 오디로부터 추출한 스틸베노이계 후보물질 중 피세이드를 경구투여한 그룹에서 자연살해세포의 암세포 killing 능력이 가장 크게 증가됨을 알 수 있었음 (**그림 10**). 또한 마우스의 비장 및 림프절로부터 세포를 분리한 후 자연살해세포의 활성 및 killing 능력에 관여하는 유전자들의 발현을 확인한 결과, 대조군과 비교하여 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질을 경구투여한 그룹에서 유전자들의 발현이 증가되었으며, 이는 비장 보다 림프절에서 그 차이가 크게 관찰되었음 (**그림. 11**).

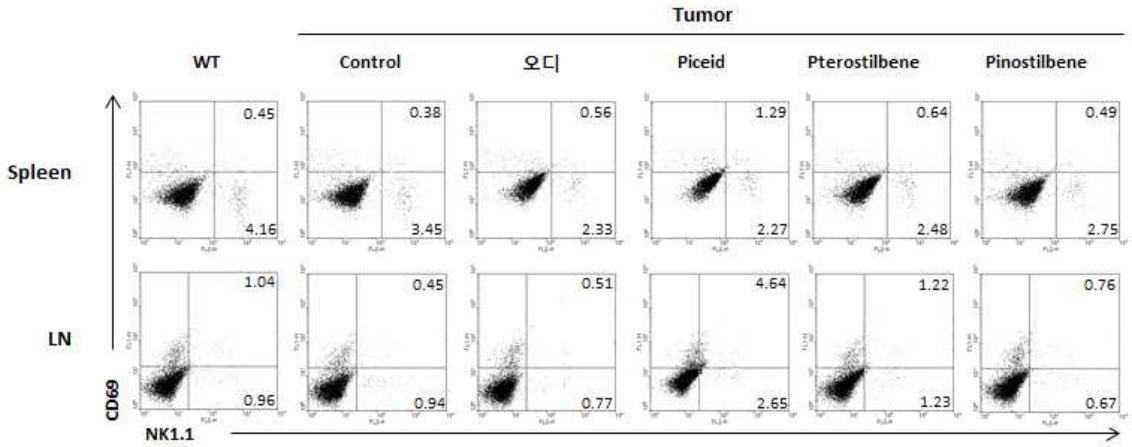


그림 9. 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 활성화된 자연살해세포의 population 변화 확인

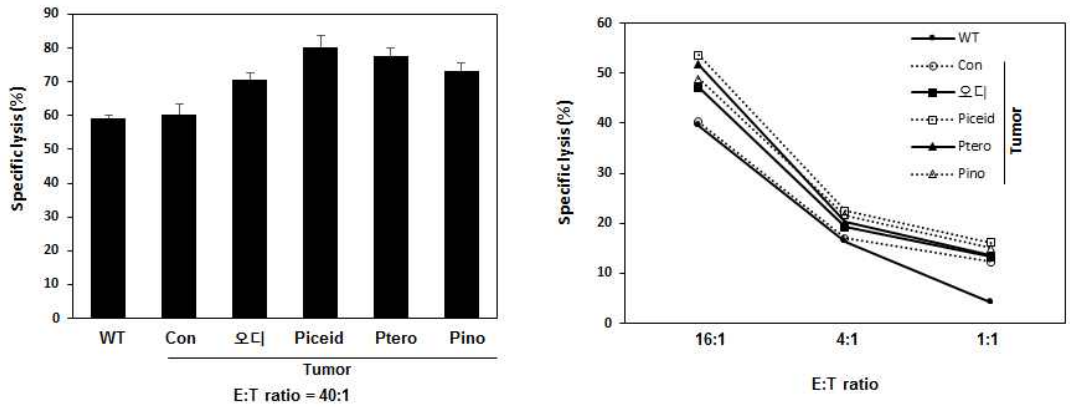


그림 10. 암 질환 마우스 모델에서 활성화된 자연살해세포의 암세포 killing 능력 비교

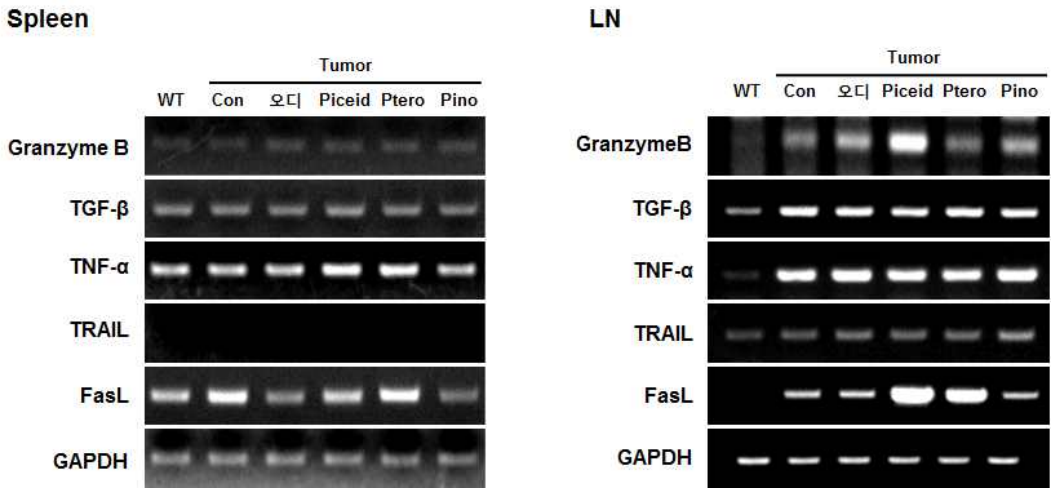
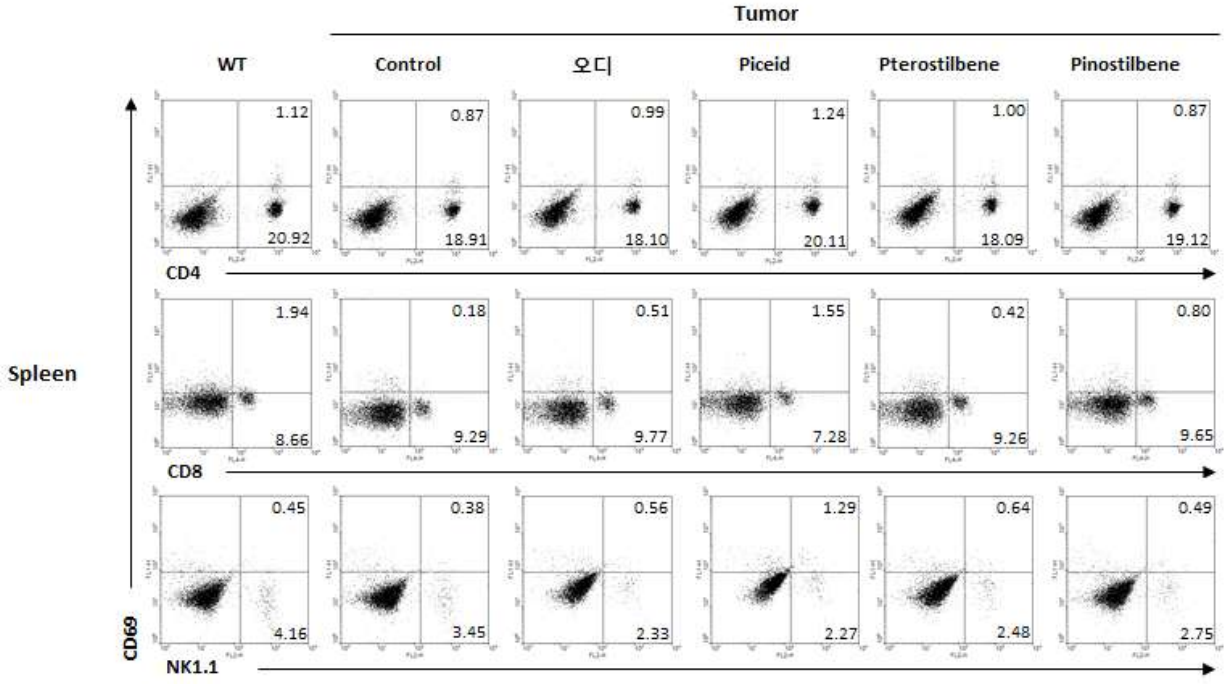


그림 11. 암 질환 마우스 모델에서 활성화된 자연살해세포의 암세포 killing 능력 및 활성에 관여하는 유전자들의 발현 변화 확인

3) 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 활성화된 면역세포들의 population 변화 및 면역세포의 활성에 관여하는 유전자 발현 변화 확인

- 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 활성화된 면역세포들의 population 변화를 확인하기 위하여 암 질환 마우스 모델의 비장 및 림프절에서 세포를 분리한 후 유세포 분석기를 이용하여 population을 확인하였음. 암 질환 마우스 모델의 비장 및 림프절의 활성화된 $CD4^+$ T cell 및 $CD8^+$ T cell, NK cell의 population을 확인한 결과 대조군과 비교하여 암 질환에 의해 감소된 활성화된 면역세포들이 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질을 경구투여한 그룹에서 증가되었으며, 특히 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드를 경구투여한 그룹의 활성화된 면역세포가 크게 증가되는 결과를 확인함 (**그림. 12**). 또한 암 질환에 의해 활성이 증가된 대식세포 및 수지상세포가 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의해 감소되었으며, 특히 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드의 경구투여에 의해 정상수치로 회복되는 결과를 확인할 수 있었음. 이러한 결과는 비장으로부터 분리한 면역세포와 비교하여 림프절에서 분리한 면역세포에서 그 차이가 크게 관찰되었으며, 이는 암 질환에서 비장의 면역세포보다 림프절의 면역세포가 더 직접적으로 중요하게 작용할 것으로 생각되어짐.



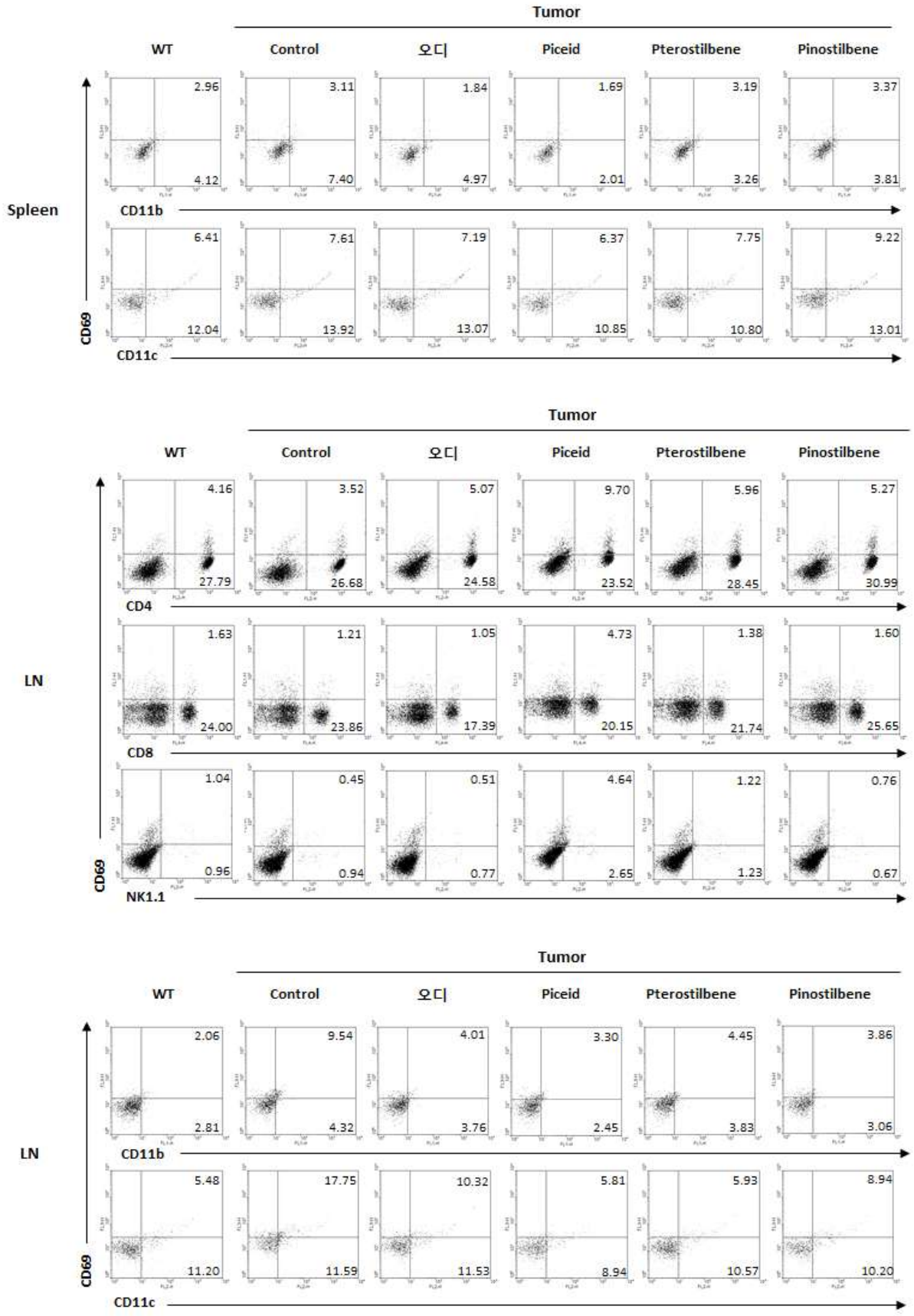


그림 12. 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 활성화된 면역세포의 population 변화 확인

- 위 결과를 바탕으로 암 질환 마우스 모델에서 오디 및 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질의 경구투여에 의한 항암효능을 관찰할 수 있었으며, 특히 오디로부터 추출한 스틸베노이드계 후보물질 중 피세이드 및 프테로스틸벤의 효과가 가장 탁월한 것으로 사료됨. 이러한 효과는 오디의 경구투여에 의해 면역세포의 활성을 증진시켜 암 세포를 killing 함으로써 암 세포의 증식을 억제할 수 있음을 알 수 있었음.

라. 제1협동과제

■ 전환효소 (P450 BM3) 생산 연구

- Polydatin 기질에서 astringin 전환에 사용되는 효소 P450 BM3(CYP102A1)의 생산은 대장균 발현 시스템을 이용하여 수행하였다. 효소 발현 및 생산 연구는 플라스크 수준에서 시작하여 최종 50L pilot scale까지 확인하였다.

1) 플라스크 배양

- 야생형 및 돌연변이 CYP102A1로 형질 전환된 대장균 (E. coli DH5α F'IQ)의 배양과 조효소 제조 방법은 다음과 같으며 이때 사용되는 배지 및 시약의 조성은 표 1과 같다.
- 배양 및 조효소 제조
  ① Ampicillin (final conc. 100 μg/mL) 이 포함된 LB medium 6mL에 transformation된 colony를 접종하여 37℃의 진탕 배양기에서 15h 동안 배양한다 (총 3개).

  ② Ampicillin (final conc. 100 μg/mL) 이 첨가된 TB medium (1L size erlenmeyer flask, 250mL)에 TB medium 첨가제를 첨가하여 혼합한 이후 seed (1%, v/v) 를 접종하여 37℃ 진탕 배양기에서 200rpm의 조건으로 3h 동안 배양한다.

  ③ 0.5mM IPTG를 0.1%첨가하고 1mM δ-ALA를 50:1비율로 첨가하여 30℃ 진탕 배양기에서 190rpm의 조건으로 20~24h 동안 incubation한다.

  ④ 배양액을 4℃, 3900rpm의 조건으로 15min동안 원심분리하여 pellet의 wet weight 확인.

  ⑤ Sample 70mg당 1mL의 2X TES buffer와 1mL의 cold 증류수를 첨가하여 pellet과 혼합.

  ⑥ Sample 1g당 50mg/mL농도의 lysozyme 20μL 첨가하여 혼합.

  ⑦ 혼합액을 4℃, 3900rpm의 조건으로 15min동안 원심분리하여 pellet을 취한다.

  ⑧ Pellet에 buffer(Sonication buffer, DTT, PMSF. pellet 1g당 1mL)를 첨가하여 10회 동안 sonication한다. → (30sec sonication and 30sec recovery) 10회 반복

  ⑨ Sonication된 sample을 4℃, 100,000g 조건으로 1h 동안 원심분리하여 상등액을 취한다.

표 1. 재조합 대장균 배양 배지 조성 및 효소 정제 reagents

TB medium

Trytone	12g	
Yeast extract	24g	
Peptone	2g	
KH_2PO_4	2.31g	For 1L
K_2HPO_4	12.54g	
1M NaCl	1mL	
20% Glycerol	30mL	

TB medium 첨가제

1M Thiamin	1mL/L
1M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1mL/L
2.5M $(NH_4)_2SO_4$	1mL/L
0.2M $FeCl_2 \cdot 6H_2O$	250μL/L

2X TES buffer

100mM Tris-Acetate	100mL of 1M	
500mM Sucrose	250mL of 2M	For 1L
0.5mM EDTA (pH 8.0)	1mL of 0.5M	pH 7.6 at 4℃
(Adjust the pH using NaOH/CH_3COOH)	Add ddH_2O	

Sonication buffer with DTT and PMSF

100mM Potassium phosphate buffer pH 7.4	50mM of 1M	
20% Glycerol	100g	
6mM Mg-acetate	6μL of 0.5M	For 0.5L
or 1mM EDTA	1μL of 0.5M	pH 7.4 at 4℃
0.1mM DTT (0.1%)	0.5μL of 100mM	
1mM PMSF (1%)	1μL of 100mM	

2) 3L 및 50L 발효 배양

- 상기 플라스크 배양 조건을 기본으로 발효조 배양 조건을 설정하였으며, glycerol feeding에 의한 유가식 발효 배양에서 3L scale에서는 OD_{600}98까지, 50L scale에서는 OD_{600}84까지 확보 가능하였다. 따라서, 대량 발효를 위한 scale-up이 가능함을 확인하였고, 이로부터 발현되어 만들어진 효소의 활성도 유지함을 확인하였다 (그림 1, 2).

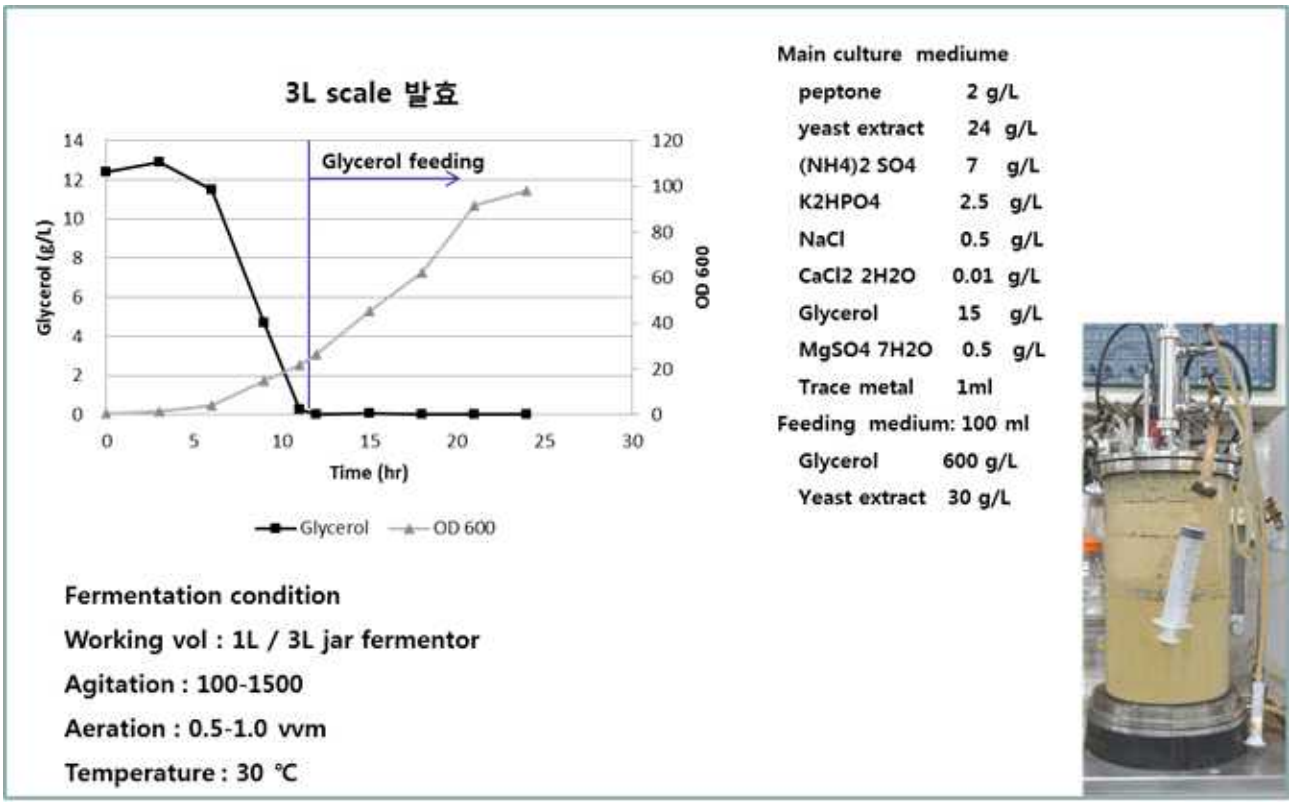


그림 1. 3L scale 발효 배양 결과

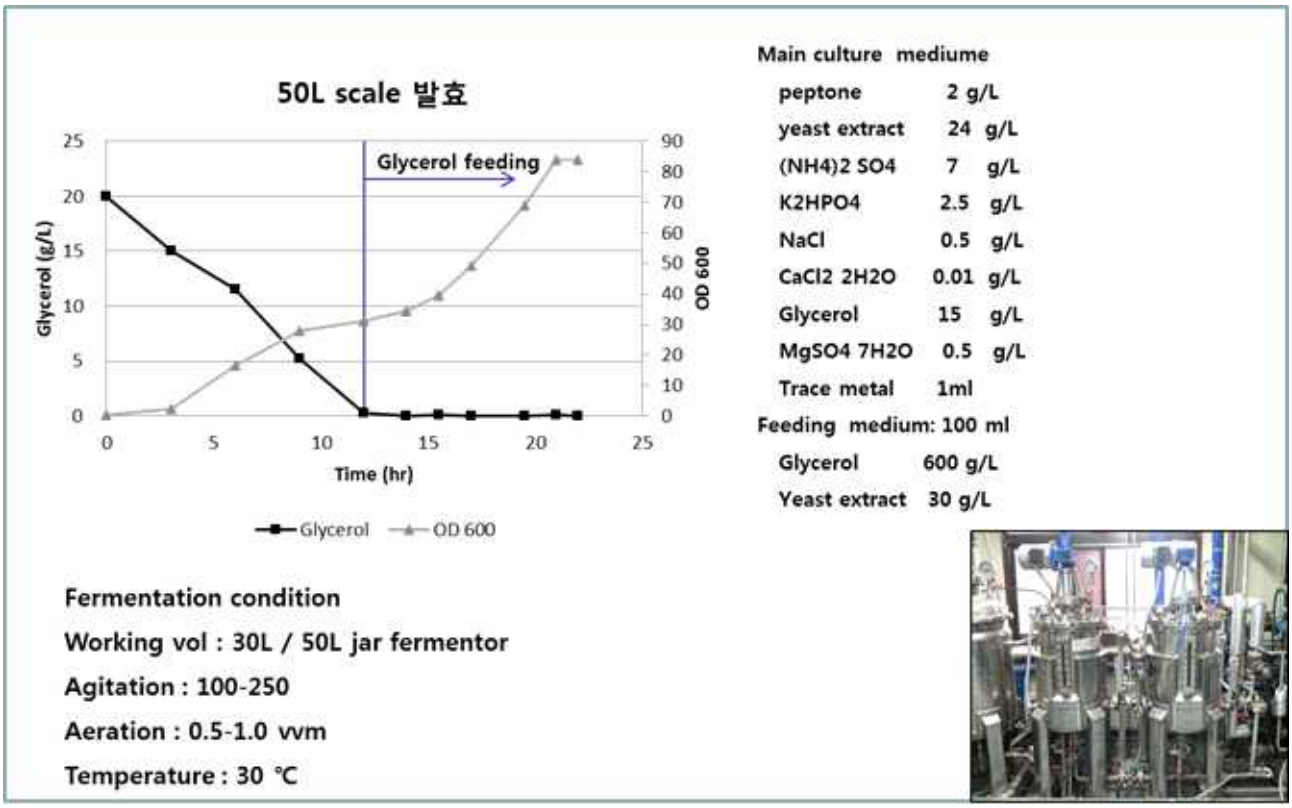


그림 2. 50L scale 발효 배양 결과

3) 효소 제형화

- 50 L 발효조에서 회수한 P450 BM3 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고, Lysozyme과 homogenizer를 활용하여 세포를 파쇠하여 세포 내 효소를 획득하였다. 파쇄 세포 용액을 원심분리하여 1차 cell debris를 제거 후 잔존 debris는 MF (Microfiltration) 과정을 통하여 완전 제균하였다. 농축 액상 조효소액에 Trehalose 등 부형제를 첨가하여 동결 건조를 통하여 최종적으로 powder 형태의 샘플을 얻을 수 있었다 (그림 3).

그림 3. P450 BM3 powder

■ P450 BM3에 의한 astringin 전환 연구

- 야생형 및 돌연변이 CYP102A1 효소를 이용하여 polydatin의 산화물인 astringin 전환에 관한 연구를 수행하였다. 상기 P450 BM3에 의한 astringin 생성 반응은 NADPH를 조효소로 요구하기 때문에 NADPH 생성 시스템 (NGS)을 도입하였다 (Glieder et al., 2002).

1) 효소 전환 반응 set-up

- Test tube scale에서의 효소 전환 반응은 아래와 같이 진행하였고, 이때 사용되는 완충액 및 NGS 조성은 표 2와 같다.
- 효소 전환 반응
  - ① Reaction mixture를 제조하여 5min 동안 37℃에서 incubation 한다 (표2).
  - ① <P450BM3농도 확인>
  - ① -Spectralassaybuffer와 조효소액 sample을 1:1 비율로 혼합한다 (2개 제조).
  - ① -1개의 sample은 4μL의 safranin T를 첨가하고 sodium hydrosulfite를 첨가한 후 blank로 사용하고 나머지 하나는 동일하게 4μL의 safranin T를 첨가하고 sodium hydrosulfite를 첨가한 후 40방울의 CO gas를 흘려 보낸 이후 A_{450}과 A_{490}을 확인하여 아래의 식에 의거하여 protein 농도를 확인한다.

※ $\mathbf{Protein\ concentraion\ (nmol/mL)} = (\frac{A_{450}-A_{490}}{0.091}) \times 2$

② NGS (38μL)를 reaction mixture에 첨가하여 반응을 시작한다.

③ 1h 동안 37℃에서 반응시킨다.

④ 0.6mL의 cold Ethyl acetate를 첨가하여 반응을 종료시킨다.

⑤ 30sec 동안 vortexing한다.

⑥ 4℃, 3000rpm 조건으로 8min 동안 원심분리 하여 상층액 (ethyl acetate층)을 취한다.

⑦ 50℃ 이상의 환경을 유지 하는 가운데 N2 gas를 이용하여 solvent를 제거한다.

⑧ Sample을 170μL의 mobile phase (buffer A : B = 85 : 15)에 녹인다.

⑨ 20μL(가변: 10~50μL)의 sample을 HPLC (column : Gemini 5u c18 110A 150 × 4, 60 mm micron)에 injection한다.

⑩ Measurement: A308, A320 nm, Flow rate: 1 mL/min

⑪ HPLC를 이용하여 2개의 peak (앞 : Astringin, 뒤 : Polydatin)를 확인한다.

⑫ 앞쪽 peak 부분의 sample을 수집한다.

⑬ 수집된 sample 을 Freeze drier 를 이용하여 liquid 를 제거한다.

⑭**표 2. 전환 효소 반응액 조성 및 reagents**

Reaction mixture 조성 (Total 250㎕중 reaction mixture는 212㎕)

ex) 6개의 mixture가 필요한 경우 (약간의 여유를 두어 6.2배의 mixture를 제조)

	Conc. (pmol/μL)	Final conc. (pmol)	Sample (μL)	DW (μL)	Sample (×6.2)	DW (×6.2)
P450 BM3	24.31	50	2.1	183.65	13.02 (13)	1138.63 (1139)
Kpi (1M, pH7.4)	1	0.1	25		155	
	Conc. (mM)	Final conc. (mM)	Sample (μL)		Sample (×6.2)	
Polydatin (DMSO)	100	0.5	1.25		7.75 (7.8)	

Spectral assay buffer

1M Potassium phosphate buffer pH 7.4	100mL	Make up to 1 liter miliQ water and pH in necessary 7.4 with KOH/CH3COOH
Mg-acetate	1.29g	
Dextrose ((+)glucose)	1.802g	

NGS 조성 (Total 250μL중 NGS는 38μL)

ex) 5+1(blank)개의 mixture가 필요한 경우 (약간의 여유를 두어 5.2배의 mixture를 제조)

	Mixture ratio	Sample (×2.6)	Total
Glucose-6-phosphate (0.2 M)	25	65	198
NADP+ (10 mg/mL)	25	65	
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1	2.6 (3)	
DW	25	65	
HPLC mobile phase			
Mobile phase	구성 성분		
Buffer A	CH3CN : 0.5% CH3COOH = 5 : 95		
Buffer B	CH3CN : 0.5% CH3COOH = 95 : 5		

- 1 시간 동안의 효소 전환 반응 후 HPLC 분석 결과는 아래 그림 4와 같으며, 전환 수율은 15% 였다. 현재 효소 전환 수율이 낮기 때문에 시제품 생산에 도입하기 위해서는 고농축 형태의 효소를 사용하여 전체 사용 효소의 양을 증가시키는 것, 효소 반응 시간을 늘려 전환 수율 향상을 기대하는 등의 효소 전환 반응 최적화가 필요하다. 또, 효소 반응액 중에 소량 존재하는 astringin은 HPLC로 분리/정제하여 추후 chromatography 방법을 이용한 scale-up purification 가능성을 확인하였다.

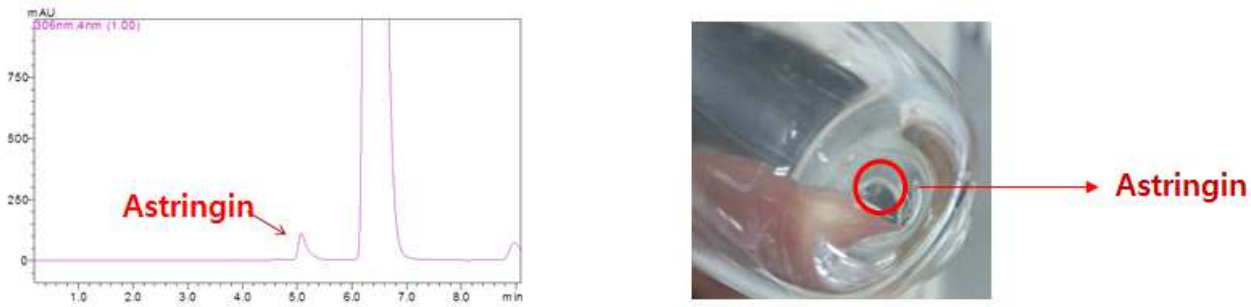


그림 4. 효소 전환 반응액의 HPLC 분석 결과

2) 효소 전환 반응 scale-up

- 상기 표 2에 나타난 효소 전환 반응 조성을 기본으로 최종 1L scale의 효소 반응을 진행하였고, 대략 15%의 astringin이 함유된 효소 반응 조성물을 동결 건조하여 최종 sample을 확보하였다 (그림 5). 해당 효소 반응물은 전환 반응에 사용되는 salts, 잔존 효소, NGS 잔여

물 등이 포함되어 있어 실제 제품 성능 test에는 적합하지 않다. 추후 scale-up된 chromatography purification 방법 등을 통해 정제도가 높은 astringin 제품을 생산할 계획이며, 이를 위해 전환 반응 수율을 향상시키는 효소 반응 최적화 연구가 보다 면밀히 선행돼야 한다.

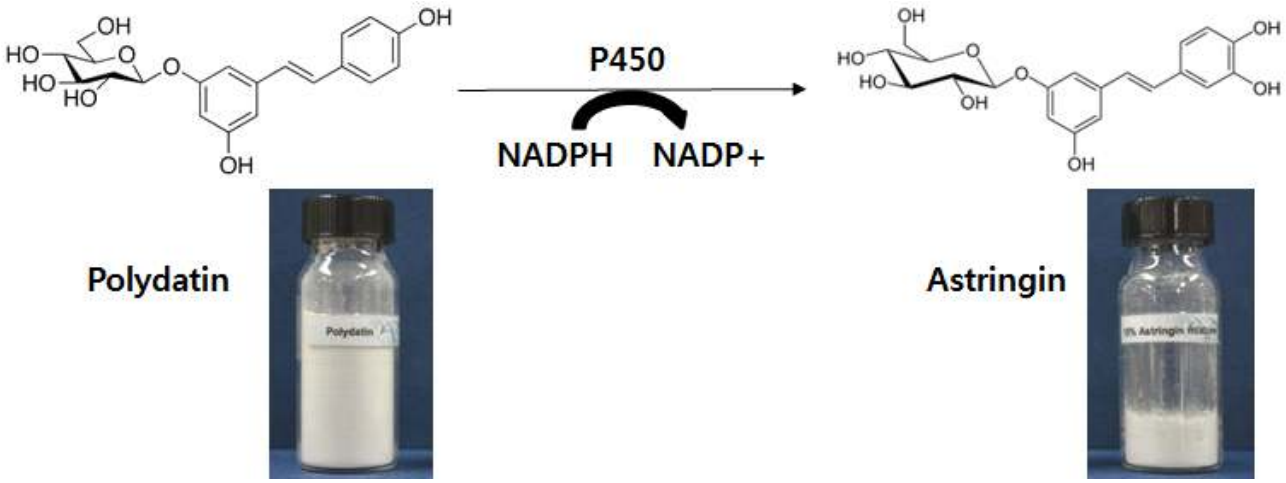


그림 5. Astringin 전환 효소 반응 모식도 및 최종 효소 반응 조성물

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구개발목표의 달성도

1. 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
1차 년도 (2011 -2012)	[제1세부] 오디 유래 스틸베노이드 (stilbenoid)계 화합물의 생물전환 (효소전환)	P450 효소를 활용한 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물의 생물전환 연구	100
		생물전환된 스틸베노이드 (stilbenoid)계 화합물의 유도체(derivatives)의 분석 방법 확립	100
	[제2세부] 식물로부터 천연물질 합성에 관여하는 P450 유전자 발굴	Microarray data 등 식물 유전정보 DB를 근거로 Phenylpropanoid 및 이의 derivatives 화합물 합성에 관여하는 P450 유전자군 선별	100
		식물 유전자 DB를 이용하여 P450 유전자를 search 한 후 full length P450 EST를 분석 해당 작물에서 조직별 mRNA 분리한 후 식물에서 P450 유전자 cDNA 합성	100
	[제3세부] 오디로부터 면역조절 활성 신소재 탐색 및 효능 탐색	항산화활성 및 면역조절 활성 물질(면역기능 조절지표) 분석: 세포독성시험, 활성산소 생성능, Ig 생성, T/B cell 증식, 면역기능조절 cytokine 조절능	100
		마우스 모델에서 면역세포 증식 및 면역 단백질의 발현 연구를 통한 기능성 신소재 탐색 및 효능 확인: Fibroblast 증식능, Collagen 발현, Proinflammatory cytokine 발현 조절능	100
	[제1협동] 스틸베노이드계 화합물 유도체 제조공정 최적화	생촉매를 활용한 스틸베노이드계 화합물로부터 유도체의 생산 공정 개발	100

2. 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
2차 년도 (2012 -2013)	[제1세부] 오디 유래 스틸베노이드 (stilbenoid)계 화합물의 생물전환 (효소전환)	스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 제조방법 최적화	100
		스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 후보물질 분석 및 화학구조 확인	100
		P450 효소를 생촉매로 이용한 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 후보물질 제조방법 최적화	100
	[제2세부] 식물로부터 천연물질 합성에 관여하는 P450 유전자 발굴	식물에서 P450 유전자 cDNA 합성 및 염기서열 분석 한 후 발현 벡터에 클로닝 하여 대장균 및 식물 P450 유전자 발현 및 분리	100
		오디 유래 물질을 fractionation 하고 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 프로파일링	100
		식물 P450 유전자를 발현하는 대장균을 생촉매 반응에 활용	100
	[제3세부] 오디로부터 면역조절 활성 신소재 탐색 및 효능 탐색	최종 후보물질의 공인 기관의 평가자료를 통한 안전성 및 독성 검사	100
		마우스 모델에서 유도체 후보물질처리에 의한 면역세포 활성기능 증진방법 확립	100
		암 세포주를 활용한 질환 모델에서 유도체의 면역조절 활성 탐색	100
		마우스 점막자가면역질환 모델에서 면역조절 활성 및 효능 확인	100
	[제1협동] 스틸베노이드계 화합물 유도체 제조공정 최적화	스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 제조공정 최적화	100
		생촉매 이용방법 최적화	100

3. 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
3차 년도 (2013 -2014)	[제1세부] P450 효소를 이용한 면역조절 활성 신소재 개발용 스틸베노이드계 유도체 개발	Target 작물인 오디부터 유용 성분 분리 정제 최적화	100
		시제품 제조	100
	[제2세부] 생촉매 활용가능 식물 P450의 발굴 및 오디 스틸베노이드 화합물 프로파일링	식물 P450 효소 대량생산 최적화	100
		식물 P450 활용 최적화	100
	[제3세부] 오디 유래 스틸베노이드 유도체로부터 면역기능조절 활성 물질 탐색 및 검증	독성 및 안전성검사를 통한 후보물질의 안정성 연구에 의한 최종 후보 물질 선정	100
		후보물질의 투여경로 및 투여용량 확립	100
		식이유발 고지혈증 마우스 모델에서의 효능 평가 :고지혈증, 고혈당, 비만에 미치는 영향	100
		후보물질의 delivery system 개발 및 효능검증	100
	[제1협동] 생촉매를 이용한 면역기능조절 신소재 물질 대량생산 기반구축 및 상용화	면역기능조절 스틸베노이드(stilbenoid)계 화합물 유도체(derivatives) 선정물질의 시제품 제조 및 상용화방안 구축	100

4. 4차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
4차 년도 (2014 -2015)	[제1세부] 제품화 예상 스텔베노이드계 화합물 유도체 제조 최적화	- 유도체 제조 최적화	100
		- 생산공정 최적화	100
	[제2세부] 제품화 예상 스텔베노이드계 화합물 유도체 활용 기반 구축	- 식물 P450을 활용한 유도체 제조의 지속적인 모니터링 및 문제해결 능력 향상	100
		- 생산된 면역조절물질 제품의 물리 화학적 안정화 향상화	100
	[제3세부] 오디 유래 스틸베노이드 유도체로부터 제품화 예상 선정물질의 유효성 및 안전성 검증	- 제품화 효능 향상을 위한 연구 지속화	100
		- 면역기능조절 선정 물질의 상용화에 필수적인 대량 생산 후 유효성 및 안전성 검증	100
	[제1협동] 제품화 예상 스텔베노이드계 화합물 유도체의 사업화 추진	- 대량 생산 및 분리/정제 공정을 위한 저비용 고효율의 최적 시스템 개발	100
		- 식품 소재, 화장품 첨가물 (미백소재), 의약외품 소재로서의 각종 평가	70
		- 소재 적합성 시험 및 판매	70

제 2 절. 관련분야의 기술발전에의 기여도

1. 국가전략기술 및 중점과학기술에의 기여도

가. 국가중점과학기술과 연관성

- 2014년 과학기술기본계획상 국가전략기술(120개) 중 30개 중점과학기술이 선정되었고 이중 바이오 분야는 의료기기 기술, 맞춤형 신약개발 기술, 생명시스템 분석 기술, 유전체정보 이용 기술, 줄기세포 기술, 원격건강관리서비스 기술, 식품 안전 및 가치창출 기술, 유용 유전자원 이용 기술임.
- 본 연구팀의 연구목표는 유용 유전자원 이용 기술을 발달시키고 이를 맞춤형 신약개발 기술, 식품 안전 및 가치창출 기술 등에 활용하고자 함.

나. 유용 유전자원 이용 기술 개발

- 기술의 정의: 유용 생명자원의 발굴 및 기능 해석기술, 자원의 보존 및 활용으로 산업적 가치를 창조(의료· 식품· 산업화 소재 등)하고 지적재산권을 선점하는 기술

핵심기술	요소기술	요소기술의 세부내용
유전자원의 다양성 확보 및 활용기술	유전자원 다양성 확보	산업화 가능한 P450 유용자원의 확보
	유전자원 활용도 증진	P450 유전자원 활용 기술 접목
유용 유전자원을 이용한 종자·소재 개발 및 산업화 기술	유용 소재 분리 및 기능성 검정 기술	P450 효소전환을 활용한 유용소재의 분리 정제, 대량생산, 기능성 검정
	산업화를 위한 소재의 가공 및 대량 생산 기술	P450 효소전환을 활용한 소재의 가공 및 안정성 인증을 위한 표준화

다. 식품 안전 및 가치창출 기술에 이용

- 기술의 정의: 식품관리·위해인자 제거·가공 등을 통해 안전을 확보하고, 기능성을 부가시키는 기술

핵심기술	요소기술	요소기술의 세부내용
기능성식품 개발 기술	기능성 탐색 기술	- In vitro, in vivo assay에 의한 건강 증진 및 질환 예방용 기능성 소재 탐색 기술 - 건강 증진 및 질환 예방 관련 분자 및 P450 유전자 표적 반응성에 의한 기능성 소재 탐색 기술

라. 맞춤형 신약개발 기술에 이용

- 기술의 정의: 개개인 환자의 유전적·병적·생리적·임상적 특성을 고려하여 치료효과 극대화 및 부작용 최소화가 가능한 치료제를 개발하는 기술

핵심기술	요소기술	요소기술의 세부내용
약물표적 및 후보물질 발굴	화학적 다양성을 반영하는 신물질 라이브러리	- P450 기반의 유도체 라이브러리 - P450 효소전환을 활용한 다양성 지향의 천연물 기반 라이브러리

마. 관련산업 발전에 미치는 효과

산업/제품	기술 세부분야	관련 핵심기술	"P450 활용기술"의 응용분야
제약	in vitro 독성 실험, PK예측	약물대사/상호작용, 독성분석	약물대사/상호작용, 독성분석
의약화학	라이브러리 대량구축 설계 및 combinatorial biosynthesis	탐색 기술, 약물후보물질 발굴	Drug design, fine chemical 합성
환경공학	환경 유해물질 검색 및 제거	검색 및 제거 기술	유해물질 검색 및 제거
생물공학	유용 물질의 대량생산	미생물 이용기술, 유전체 응용기술, 분리정제 기술	생물전환공정

- 의료관련산업 분야: drug design과 fine chemicals의 합성 등의 신약개발, 환경으로부터 유해한 화학물질의 제거가능, steroid, drug, carcinogen, alcohol 대사에 관계된 의학적 응용에 이용 가능함.
- 생물의약 산업분야의 수요 확대: P450 효소 관련분야 등 생물의약산업에 대한 수요는 거의 무한대로 성장할 것으로 예측됨.
- 산화환원효소 관련 시장의 확대: 신약개발, 환경산업, 생물의약 산업 등 관련 분야의 새로운 수요를 창출함으로 관련 산업에서의 새로운 시장을 개척, 확대할 것으로 예측되며, 이 분야의 세계시장도 개척, 확대될 것으로 예측됨.

2. 관련분야의 기술발전에의 기여효과

가. 기능성 바이오신소재 개발

- 면역기능 조절 신소재 개발 및 작용기전 규명을 통한 근원적인 기반 기술로 활용
- 면역기능 저하가 원인이 되는 여러 질병 치료를 위한 기술 확립을 통한 효율적인 예방용 신물질 개발에 기여
- 기존 폴리페놀계 화합물과 차별화된 고기능성 유도체를 이용한 고부가가치의 시제품 개발
- 항암, 항균, 항염 및 심혈관 질환 연구들의 원천기술 개발에 활용
- 면역 증강물질 개발 및 기술 확립으로 각종 질병에 대한 의약품 개발에 활용
- Monooxygenase인 P450 효소를 whole-cell biocatalyst로 개발

나. 기능성 바이오신소재의 제품화 및 산업화

- 신규 면역기능 조절 스틸베노이드계 화합물 유도체 개발을 통한 지적재산권 취득 기대
- 최적의 시제품 상업화로 바이오회사와 협력을 통한 대량생산과 고수익 창출
- 고부가가치의 기능성 식물추출물의 상업화로 농가의 소득 증대 기여
- 여러 질병의 치료기반 기술 개발로 고부가가치 생명공학산물 개발에 활용

다. 관련분야 전문인력양성 기여

- 해당분야의 전문연구인력 양성 효과: 생물공학, 효소공학, 합성생물학, 대사공학 분야
- 우수한 연구자질과 능력을 갖춘 생물, 보건의료산업분야의 전문인력 육성과 기초과학

자 양성
- 연구원 및 대학원생들에게 최신 연구기술에 대한 체계적 훈련과 교육기회 부여
- 매년 박사학위 2명, 석사학위 2명 이상의 인력 배출 및 학문 후속세대 양성
- 단백질·효소공학, 생화학, 합성생물학, 분자생물학, 면역학 관련 분야 전문 연구인력으로 활용
- 지역 R&D 주체에 필요한 생명과학분야의 전문 연구인력 양성.

라. 신약개발 및 관련 의료관련 산업분야의 발전을 도모

- P450 효소 기술은 생명공학 분야 (특히, 신약개발 등 의약분야)의 필수 기술이기 때문에 수요가 생명공학 산업의 발전과 비례할 것으로 예측되며, P450 효소 기술의 진보가 약물대사 기능제어 기술과 관련된 약물유전체연구 기술의 발전을 선도할 것임.

마. 생물의약 산업분야 및 산화환원효소 관련 시장의 확대

- 신약 개발, 환경산업, 생물의약 산업 등 관련 분야의 새로운 수요를 창출함으로 관련 산업에서의 새로운 시장을 개척, 확대할 것으로 예측되고 이 분야의 세계시장도 개척, 확대될 것으로 예측됨.

3. 연구결과물의 활용방안

가. 산업화 활용분야

- 관련 제약회사나 화학 관련 업체를 통한 기술이전 시도
- Combinatorial chemistry를 수행하는 제약회사나 관련 업체를 통한 생물전환 제품 생산
- 효소라이브러리 기술 access fee 대체
- 신약 lead compound 기술 라이센스 대체
- 효소 제품 및 효소 이용제품 출시에 이용

나. 활용(상용화) 방안

- P450 genome, P450 효소, 유용대사산물, 약물 후보물질 특허출원 및 라이센싱
- 형태: P450 genome library, P450 효소 라이브러리, P450 상용화 효소 및 생물전환제품
- 상용화 가능성: 효소 라이브러리, Combinatorial biocatalyts, stilbenoid metabolites

다. 이전가능한 기술목록 (이전형태: 특허)

- 산업적 유용성이 높은 P450 효소 활성을 활용한 whole-cell biocatalyst
- Human P450 genome, enzyme library, 상용화 효소

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 실용화 및 산업화 계획

1. 실용화 가능성

- 개발한 GRAS 미생물 유래 재조합 P450 효소 반응을 이용하여 화학적 다양성(chemical diversity을 증가시킨 스틸베노이드 유도체의 화합물의 combinatorial chemical library를 통해서 유용 물질의 대량생산, 미생물 이용기술, 유전체 응용기술, 대량생산 및 분리정제 기술, 유전자 조작을 이용한 유용 효소 개발에 활용 가능함.
- 고정화 효소를 이용하여 생물반응기로 P450 활성을 이용한 생산물을 생산하면 소규모 장치에서 연속적인 생산을 할 수 있으므로 높은 생산성으로 생산할 수 있어 경제적임.
- 화학합성법보다 부산물이 적고 정제가 용이하며 높은 생산성을 갖고 우수한 품질의 제품을 값싸게 공급할 수 있어 가격 및 품질 경쟁력이 있음.
- 생물전환법으로 유용한 화합물을 생산하면 수입대체 및 수출이 가능하고 새로운 시장을 창출할 수 있음.
- 미생물에서 얻어진 P450 효소의 combinatorial chemical library를 통해서 화학합성법보다 생산성이 높고 안정성이 좋은 유용물질의 대량생산 및 분리 정제를 할 수 있음.

2. 활용가능분야

- 식의약, combinatorial biochemistry, bioremediation 분야
- Combinatorial biochemistry를 수행하는 제약회사나 화학관련 업체를 통한 생물전환 제품 생산
- 신약 lead compound 기술 라이센스 대체
- 재조합 미생물, 효소 제품 및 효소 이용제품 출시에 이용

3. 활용방안

○ P450 효소, 유용 유도체, 신기능 소재/약물 후보물질 특허출원 및 라이센싱

○ 형태/규모

- 스틸베노이드 화합물의 chemical library
- P450 효소 라이브러리 및 상용화 효소
- P450 효소를 이용한 생물전환제품

4. 이전가능한 기술목록 (이전형태: 특허 및 know-how)

- 스틸베노이드(stilbenoid)계 항비만 예방 및 치료제의 유용 유도체(derivatives) 및 약물 후보물질 (lead compounds)

: piceatannol-glycoside, pterostilbene-glycoside, resveratrol-glycoside

- 산업적 유용성이 높은 P450 효소 활성을 활용한 whole-cell biocatalyst
- P450 genome, enzyme library, 상용화 효소

제 2 절. 기술확산 계획

- 오디 유래 스틸베노이드 화합물의 식의약 소재로의 개발 기술로 확산 계획
- 오디 유래 스틸베노이드 화합물의 고지혈증 치료제 등 약물후보물질로 활용
- 면역기능 조절 신소재 개발 및 작용기전 규명을 통한 근원적인 기반 기술로 활용
- 면역기능 저하가 원인이 되는 여러 질병 치료를 위한 기술 확립을 통한 효율적인 예방용 신물질 개발에 활용
- 기존 폴리페놀계 화합물과 차별화된 고기능성 유도체를 이용한 고부가가치의 시제품 개발
- 항암, 항균, 항염 및 심혈관 질환 연구들의 원천기술 개발에 활용
- 면역 증강물질 개발 및 기술 확립으로 각종 질병에 대한 의약품 개발에 활용
- Monooxygenase인 P450 효소를 whole-cell biocatalyst로 개발
- drug design과 fine chemicals의 합성 등의 신약개발, 환경으로부터 유해한 화학물질의 제거 가능, steroid, drug, carcinogen, alcohol 대사에 관계된 의학적 응용에 이용 가능함.
- 생물의약 산업분야의 수요 확대: P450 효소 관련분야 등 생물의약산업에 대한 수요는 거의 무한대로 성장할 것으로 예측됨.
- 산화환원효소 관련 시장의 확대: 신약개발, 환경산업, 생물의약 산업 등 관련 분야의 새로운 수요를 창출함으로 관련 산업에서의 새로운 시장을 개척, 확대할 것으로 예측되며, 이 분야의 세계시장도 개척, 확대될 것으로 예측됨.

제 3 절. 지식재산권 확보계획

1. 지식재산권 출원 계획 (출원 가능한 목록)

(1) 시토크롬 P450 효소전환된 아스트린진을 포함하는 고지혈증 예방 또는 치료용 약학조성물

(2) 시토크롬 P450 효소전환된 아스트린진을 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학조성물

2. 지식재산권 등록 계획 (기 출원한 특허)

(1) 제목: 시토크롬 P450 효소전환된 오디추출물을 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학조성물
- 출원국: 대한민국
- 출원인: 전남대산학협력단
- 출원일: 2014-06-24
- 출원번호: 10-2014-0077026

(2) 제목: 고추 유래 CaCPR1 유전자 및 이의 용도
- 출원국: 대한민국
- 출원인: 전남대산학협력단
- 출원일: 2015-07-17
- 출원번호: 10-2015-0101837

(3) 제목: 아스트린진 제조용 신규한 조성물

- 출원국: 대한민국
- 출원인: 전남대학교산학협력단
- 출원일: 2015-09-10
- 출원번호: 10-2015-0128399

제 4 절. 추가연구 및 타연구에의 활용 계획

1. 추가연구 계획

(1) 오디 유래 스틸베노이드 화합물의 다양한 유도체를 제조할 수 있는 P450 효소 개발

(2) 스틸베노이드 화합물의 유도체의 다양한 생리활성의 검증으로 약물후보물질로 개발

(3) 다양한 piceatannol-glycoside, pterostilbene-glycoside, resveratrol-glycoside의 배당체 개발

2. 타연구에의 활용 계획

(1) 본 연구에서 확보한 유전자원을 이용한 타 천연 기능성소재 개발에 활용

(2) 다양한 천연 기능성 소재의 유도체를 개발할 수 있는 P450 효소 개발

(3) 천연물 유래 배당체의 유도체 개발에 활용

(4) 오디 유래 anthocyanin 색소의 유도체 개발

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 오디유래 스틸벤 화합물인 Piceatannol의 항비만 효과 입증 (2012년 JBC 논문 게재): 레드와인과 포도에 들어있는 Piceatannol 성분은 지방세포가 자라는 것을 억제해 비만 예방에 도움을 준다고 보고되었음. Piceatannol은 지방세포 생성 초기 단계에서 미성숙 지방세포의 인슐린 수용체에 밀착해 인슐린의 세포주기조절기능을 차단함으로서, 지방세포가 더 크게 자라나는 것을 막는 역할을 함. Piceatannol이 초기 단계의 지방세포들이 성숙한 지방세포로 성장하는 과정에서 나타나는 유전자 발현과 유전자 기능, 지방생성 과정 동안 인슐린의 활성 등에 변화를 유도했다는 것임.

○ Piceatannol의 작용으로 지방세포들이 성장이 지연되거나 완전히 억제될 수 있으리라 기대됨. 게다가 Piceatannol의 세포분열 클론증폭 억제작용은 인슐린 신호전달 기전의 활성화 억제작용과 동반해서 주목받음. 지방생성이 지방세포들의 축적을 지연 또는 예방하고, 나아가 체지방 증가를 억제하는 데 중요한 분자표적의 하나로 인식되어 왔음을 상기할 때 Piceatannol이 항비만 예방 및 치료제로서 매우 우수한 소재라는 평가.

○ 미국은 1960년대 이후 NCI(국립암연구소)를 주축으로 항암제 개발을 위한 연구를 실시하였으며, 이 프로그램은 1,550속 3,390종의 식물로부터 114,000개의 추출물을 제조하여 항암제개발을 위한 검색을 실시하였음. 이 프로그램은 최근 확대되어, 열대지역식물 7,000여종의 23,000여개 시료에 대한 AIDS 바이러스 검색을 실시하여 치료 가능한 것으로 판단되는 3종 발굴함.

○ Taxol, Vincristine, vinblastine, halichondrin B, leurosine, leurosidine NCDDG (National Cooperative Natural products Drug Discovery Groups)에 의해 개발된 Topotecan, Ellipticine 등의 유도체가 임상시험 대상물질로 선정되었음. 1980년대초, 브라질산의 뱀독성분을 기초하여 개발된 ACE 억제제들의 경우 1개품목당 판매액은 약 20억 달러 (약2조4천억원) 이상의 매출을 기록하였음. Taxus속 식물인 주목으로부터 개발된 항암제Taxol의 연간매출액은 약 12억달러 (약1조2000억원)로 추산됨. 백합과 식물을 중심으로 Vinca 알라로이드 합성에 많은 노력을 해왔으며, 최근에는 Corey groupon 의해 ginkgolide 합성에도 성공함.

○ Merck사는 코넬대학과 계약 하에 10년간 5,000만불을 투입하여 열대림에 존재하는 약 50만 종의 동식물에 대한 생태계보존과 이들로부터 천연물 신약 25종을 10년 내에 개발하려는 프로젝트에 착수함.

○ 지금까지의 기능성 소재개발 경향을 보면 주로 육지에 서식하는 식물로부터 기능성 소재를 선발하려는 연구들이 주류를 형성해 왔음. 이와 같은 경향과는 달리 해양에 서식하는 미생물로부터 기능성 소재를 분리하려는 연구프로젝트가 미국 국립암연구소의 지원 아래 로드아일랜드대학의 생의학교수인 유즈르시미즈의 주도로 진행되고 있음.

○ 생물다양성협약을 유지하기 위하여 5년간 NIH와 비영리연구 집단과의 계약을 맺어 의약품 면에서 가치 있는 화합물을 분리하는 프로그램이 시작되었고, 미시시피대학의 National Center of the Development of Natural products에서는 천연물로부터 신약, 농약에 관한 선도물질 탐색연구, 천연물관련 전문인력을 위한 정보제공, 상업화에 따른 표준화 연구를 진행중에 있음.

○ 일본은 미생물, 해양식물로부터 활성물질 연구에 집중하고 있음. 태국산 식물 Croton sublyratus로부터 항궤양성 작용성분 plunotol을 개발하여 현재 임상에 사용됨. Sophora Substratate로부터 항궤양성분 sopharedin을 리드화합물로 합성하여 항궤양약품 sophalione을 개발하였음. 남천 성분인 nantenoside를 리드화합물로 합성하여 항알레르기약인 transilast를 개발하였음. 황금(黃芩)의 주성분이 baicalein을 리드화합물로 합성하여 amlexanox 개발하여 항알레르기약으로 임상사용 중임. 버섯추출물인 렌티난(lantinan)은 암화학요법제의 병용약품으로 시판 중임.

○ 일본 도쿄대학 약학부 Sankawa 등은 생약추출물을 검색하여 우방자(牛蒡子), 연교(連翹) 등의 리그난성분이 항 PAF (platelet activating factor) 작용이 있음을 밝혔으며, Centipeda minima 추출물로부터 항PAF 작용물질 arnicolides를 확인함.

○ 감초의 주성분 glycyrrhizin이 간염치료에 사용되고 있으며, 생약 오미자의 성분인 gomishin A가 간 장해치료에 관한 임상실험 중이며 가까운 장래 임상에서의 사용이 기대되고 있음.

○ 테르펜은 세계적으로 널리 알려진 Taxol과 기타 근육증강제로 사용되는 스테로이드(Steroids) 계통의 일부약품으로 구성되어 있음.

○ 배당체 역시 큰 시장을 형성하고 있는 분야로 테르펜의 뒤를 있고 있다. 식물추출물 부분의 의약품 가운데 현재시장에서 단일처방 의약품으로 판매효과를 내고 있는 것은 Taxoids와 Camptothecins 계열이 대부분임.

○ 현재는 미생물, 해양생물 등의 천연자원으로부터 활성물질 분리, 열대식물로부터 활성 물질 분리 등에 적극적인 투자 중임.

○ 독일은 버드나무로부터 해열진통제인 Salicin을 개발하여 이를 선도 화합물질로 하여 아스피린을 개발하였고, 국화과식물인 Silybum marianum으로부터 간 보호작용 물질인 Silymarin으로 간염치료제를 개발함.

○ 은행잎의 ginkgo-flavonoid 성분을 혈액 순환 장애 치료제로 개발하여 독일 내 1개 품목연간매출액이 2억 1100만불(1996년)로 국내 1위 제약회사인 동아제약 연간 총 매출액(약2억 3600만불)과 유사함.

○ 최근 독일정부 주도하에 정부와 민간회사가 공동 지원하는 Natural product pool 사업을 통해, 천연물성분과 유도체들을 수집, 확보하여 대단위 생리활성검색을 진행함으로써 신의약품 신농약 등을 개발하는 과제를 수행하고 있음.

○ 영국은 옥스퍼드대학과 켐브리지대학의 인근지역에 천연물신약 개발 클러스터가 형성되어 가고 있으며 콜레스테롤, 관절염, 암 등과 관련된 천연물 의약제품 개발이 광범위하게 이루어지고 있음.

○ 중국은 수많은 고전적 문헌 및 다양한 민간요법을 보유하고 있으며, 상해약물연구소, 북경중약 연구소 등 많은 연구소와 기술이 축적된 인적자원을 확보하고 있다. 1,000종 이상의 약용식물을 검색하여 개똥쑥 (Artemisia annua)으로부터, 기존의 항말라리아제인 quinine에 내성을 갖는 말라리아에 유효한 Artemisinin을 발견하고 300종류 이상의 유도체를 합성하여 항말라리아제 Artemether를 개발함. 절강(折江) 의학연구소와 상해(上海) 약물연구소는

전통 민간약으로 노인성 기억 기능감퇴의 개선에 사용되어 온 생약인 천층탑(千層塔)으로부터 새로운 알칼로이드 huperazine A, B 두 성분을 분리하고 이중 huperazine을 분리하여 간염치료제로 개발 중에 있음. 하늘타리 (Trichosantheskirilowii)로부터 HIV 감염억제성분인 trichosanthin으로 항 AIDS약물로 임상시험 중에 있으며, 북경의과대학과 미국의 제약회사의 공동연구로 해풍 등에서 PAF 수용체 길항작용을 가지는 kadsurenone이 분리되어 구조가 결정됨. 수분초 (Sedumsarmentosum)로부터 nitrile을 가지는 배당체 sarmentosin이 분리되어 간염에 유효함을 확인하였음. 수분초로부터 nitrile기를 가지는 배당체 sarmentosin이 분리되어 간장 질환치료제로 개발 중이다. 현재 약 250개 이상의 신물질을 분리함.

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

“해당 사항 없음”

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

* 연구수행 기간 중 소속 기관의 연구실 안전관리 관련 규정에 따른 이행실적(자체양식)

▢ 전남대학교 연구실 안전관리 추진계획도

안전관리추진계획 ⇒ 1. 연구활동종사자 안전교육
2. 연구실 정기안전점검 실시
3. 연구실 정밀안전진단 실시
4. 연구실 정기안전점검 및 정밀안전진단 결과에 대한 개선
5. 연구실 안전문화 확산을 위한 사업 등

▢ 전남대학교 연구실 안전관리 항목

항 목	적 용 범 위	시행기관	비고
연구실 정기 안전점검 (년 1회 이상)	- 과학기술분야 모든 연구실	전남대학교	
연구실 정밀 안전진단 (2년 1회 이상)	- 유해물질 및 유해인자 취급 연구실 - 정기점검 결과 추가점검이 필요한 연구실	전남대학교	
연구실 실내 공기질 관리 (매년 실시)	- 측정 및 분석 - 유해화학물질 사용, 유해인자 보유, 정밀진단결과 4등급 연구실	전남대학교	
연구실 종사자에 대한 안전교육(매학기별 6시간이상)	- 과학기술분야 모든 연구활동종사자	전남대학교	
연구종사자 건강검진 (매년 실시)	- 과학기술분야 연구활동종사자	전남대학교	
연구활동종사자 안전공제 (매년 실시)	- 과학기술분야 연구활동종사자	전남대학교	

▢ 전남대학교 연구실 안전환경관리자 현황

구 분	성 명	비 고
용봉캠퍼스	윤 찬, 이안승	

가. 연구실 정기 안전점검, 정밀안전진단

1) 대상 연구실

- 과학기술분야 모든 연구실
- 연구개발활동에 「화학물질관리법」 제2조제7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실
- 연구개발활동에 「산업안전보건법」 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실
- 연구개발활동에 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실

※ 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리

※ 관리위험등급의 지정

- A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및

동물,

방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실

- B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

2) 2014년도 안점점검 및 진단 시행 일정

구 분	안전점검 시행시기	대상 연구실	비 고
정기점검	2015. 4 ~ 6월	광주캠퍼스 해당 연구실	
정밀진단	2015. 9 ~ 10월	광주캠퍼스 해당 연구실	

나. 연구실 공기질 측정

1) 실시 일정 및 내용 : 연구실 정기점검 및 정밀진단 실시와 함께 유해물질농도 측정관리, 환기대책수립

다. 연구실 안전교육

1) 교육대상

- 과학기술분야 연구실에 종사하는 연구활동종사자 전원(대학생, 대학원생, 연구원, 연구보조원, 교수, 조교 등)
- 연구실(실험・실습실)을 출입하는 자(대학생, 대학원생, 연구원, 연구보조원, 교수, 조교 등)
  (대학원을 수료한 자라도 연구실을 출입하는 경우하는 교육을 이수하여야 함)
- 희망하는 창업보육센터 업체의 직원

2) 교육 횟수

- **매학기별 1회 6시간(6차시) 이수를 기본으로 함(총 년 2회-12시간이상)**

3) 전공특성별 안전교육 실시

- 전공특성별 안전교육을 실시
- 연구활동종사자의 교육만족도 향상 및 실질적 안전교육이 될 수 있도록 함
- 필수 2과목, 선택 4과목, 최종 평가 60점이상 수료

※ 집합교육으로 순회안전교육 및 실험전 안전교육 실시하며, 전남대학교 연구환경안전망 홈페이지(http://safety.jnu.ac.kr)를 통해 사이버 교육 상시 실시

라. 연구활동종사자 건강검진

1) 검진대상자 및 검진대상 물질

- 과학기술분야 연구실의 연구활동종사자로서 위 물질을 취급하지 않더라도 건강검진을 원하는 연구활동종사자
- 산업안전보건법에 따른 유해인자 보유 연구실(메탄올외 178종)
- 상기 물질을 취급하여 연구에 종사하는 자

2) 건강검진 종류

- 일반검진
- 유해인자별 건강검진 : 특수검진

3) 추진일정

- 기관별 유해인자 취급기준 설정(2015.07.)

- **건강검진대상자 선정을 위한 조사표 작성 요청(2015.07.~08.)**
- 건강검진대상자 선정을 위한 유해인자 노출정도 분석 및 평가(2015.08.)
- 건강검진대상자 선정 및 통지(2015.08.)
- 건강검진 실시기관 선정(2015.09.)
- **건강검진 실시(2015.09.~10.)**

마. 연구활동종사자 안전공제

1) 가입 대상자
- 과학기술분야 연구실에 종사하는 연구활동종사자 전원(4대보험가입자 제외)
- 실험·실습실을 출입하여 교육 또는 연구를 수행하는 자
  (대학생, 대학원생, 연구원, 연구보조원)

2) 안전공제 재가입
- 가입회사명 : 교육시설재난공제회
- **재가입 년월일 : 2014. 10. 18.**

3) 보상기준 및 내용

구 분		내 용	비 고
보상기준		▪연구실에서 발생한 사고로 연구활동종사자가 부상·질병 -신체장해·사망 등 생명 및 신체상의 손해발생시 보상	
보상내용	사망	▪1인당 1억원 보상	
	후유장해	▪1억원을 한도로 후유장해등급별 정액 보상	
	부상	▪1천만원을 한도로 1인당 상해등급별 정액 및 실손 보상	

바. 추가 이행 계획

구 분	내 용	비 고
▪실험실 안전장비 구입	실험실 사고 예방을 위한 안전보호장비와 안전수칙 등 설치	
▪연구실험실 안전점검시스템 구축	고도화된 안전점검시스템 업데이트 : 자가 일일점검시스템 업데이트 등 시스템 유지 보수	
▪GHS 안전표식 부착	실험실에 안전 표식 부착	

제 9 장 참고문헌

전남 지역특화산업 육성계획, 후보산업: 차세대식의약소재, 전남테크노파크정책기획단, 2012.

Cirino PC & Arnold FH. Protein engineering of oxygenases for biocatalysis. Curr Opin Chem Biol 6, 130-135 (2002).

Fasan R, Chen MM, Crook NC, Arnold FH. Engineered alkane-hydroxylating cytochrome P450(BM3) exhibiting nativelike catalytic properties. Angew Chem Int Ed Engl. 46, 8414-8 (2007).

Glieder A, Farinas ET, Arnold FH. Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. Nat Biotechnol 20, 1135-1139 (2002).

Guengerich FP. Cytochrome P450 enzymes in the generation of commercial products. Nat Rev Drug Discov 1, 359-366 (2002).

Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. AAPS J. 8, E101-11 (2006).

Kang JY, Ryu SH, Park SH, Cha GS, Kim DH, Kim KH, Hong AW, Ahn T, Pan JG, Joung YH, Kang HS, Yun CH. Chimeric cytochromes P450 engineered by domain swapping and random mutagenesis for producing human metabolites of drugs. Biotechnol Bioeng. 111, 1313-1322 (2014).

Kim DH, Ahn T, Jung HC, Pan JG, Yun CH. Generation of the human metabolite piceatannol from the anticancer-preventive agent resveratrol by bacterial cytochrome P450 BM3. Drug Metab Dispos. 37, 932-936 (2009).

Kim DH, Kim KH, Isin EM, Guengerich FP, Chae HZ, Ahn T, Yun CH. Heterologous expression and characterization of wild-type human cytochrome P450 1A2 without conventional N-terminal modification in Escherichia coli. Protein Expr Purif. 57, 188-200 (2007).

Kim DH, Kim KH, Kim DH, Liu KH, Jung HC, Pan JG, Yun CH. Generation of human metabolites of 7-ethoxycoumarin by bacterial cytochrome P450 BM3. Drug Metab Dispos. 36, 2166-70 (2008).

Kim KH, Kang JY, Kim DH, Park SH, Park SH, Kim D, Park KD, Lee YJ, Jung HC, Pan JG, Ahn T, Yun CH. (2011) Generation of human chiral metabolites of simvastatin and lovastatin by bacterial CYP102A1 mutants. Drug Metab Dispos. 39, 140-50 (2011).

Lamb DC, Waterman MR, Kelly SL, Guengerich FP. Cytochromes P450 and drug discovery. Curr Opin Biotechnol. 18, 504-12 (2007).

Lee GY, Kim HM, Ma SH, Park SH, Joung YH, Yun CH. Heterologous expression and functional characterization of the NADPH-cytochrome P450 reductase from Capsicum annuum. Plant Physiol Biochem. 82, 116-122 (2014).

Miles CS, Ost TW, Noble MA, Munro AW, Chapman SK. Protein engineering of cytochromes P-450. Biochim Biophys Acta 1543, 383-407 (2000).

Otey CR, Landwehr M, Endelman JB, Hiraga K, Bloom JD, Arnold FH. Structure-guided

recombination creates an artificial family of cytochromes P450. PLoS Biol. 4, e112 (2006).

Park SH, Kim DH, Kim D, Kim DH, Jung HC, Pan JG, Ahn T, Kim D, Yun CH. Engineering bacterial cytochrome P450 (P450) BM3 into a prototype with human P450 enzyme activity using indigo formation. Drug Metab Dispos. 38, 732-9 (2010).

Sawayama AM, Chen MM, Kulanthaivel P, Kuo MS, Hemmerle H, Arnold FH. A panel of cytochrome P450 BM3 variants to produce drug metabolites and diversify lead compounds. Chemistry. 15, 11723-9 (2009).

Urlacher V, Schmid RD. Biotransformations using prokaryotic P450 monooxygenases. Curr Opin Biotechnol. 13, 557-64 (2002).

Yun CH, Kim KH, Kim DH, Jung HC, Pan JG. The bacterial P450 BM3: a prototype for a biocatalyst with human P450 activities. Trends Biotechnol. 25, 289-298 (2007).

Yun CH, Yim SK, Kim DH, Ahn T. Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in *Escherichia coli*. Curr Drug Metab. 7, 411-429 (2006).

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

[별첨 1] **특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서**

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
Resveratrol-glucoside (piceid 등) 합성 및 면역기능조절 물질 개발	미국	40	60	90	
Pterostilbene-glucoside 합성 및 면역기능조절 물질 개발	미국	40	60	90	

1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

Part 1: 특허 및 논문 분석

1-1. 협약시 연구 계획서 제출 자료 특허 및 논문 분석

1-2. 연구 완료 후 변동 내용

Part 2: 제품 및 시장 분석

1-1. 협약시 연구 계획서 제출 자료

1-2. 연구 완료 후 변동 내용

Part 1: 특허 및 논문 분석

1-1. 1991-2010 특허 동향 및 논문 (연구 계획서 제출 자료)

1) 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국외(미국, 일본, 유럽, PCT)
특허 DB	Aureka DB
검색기간	1991-2010
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

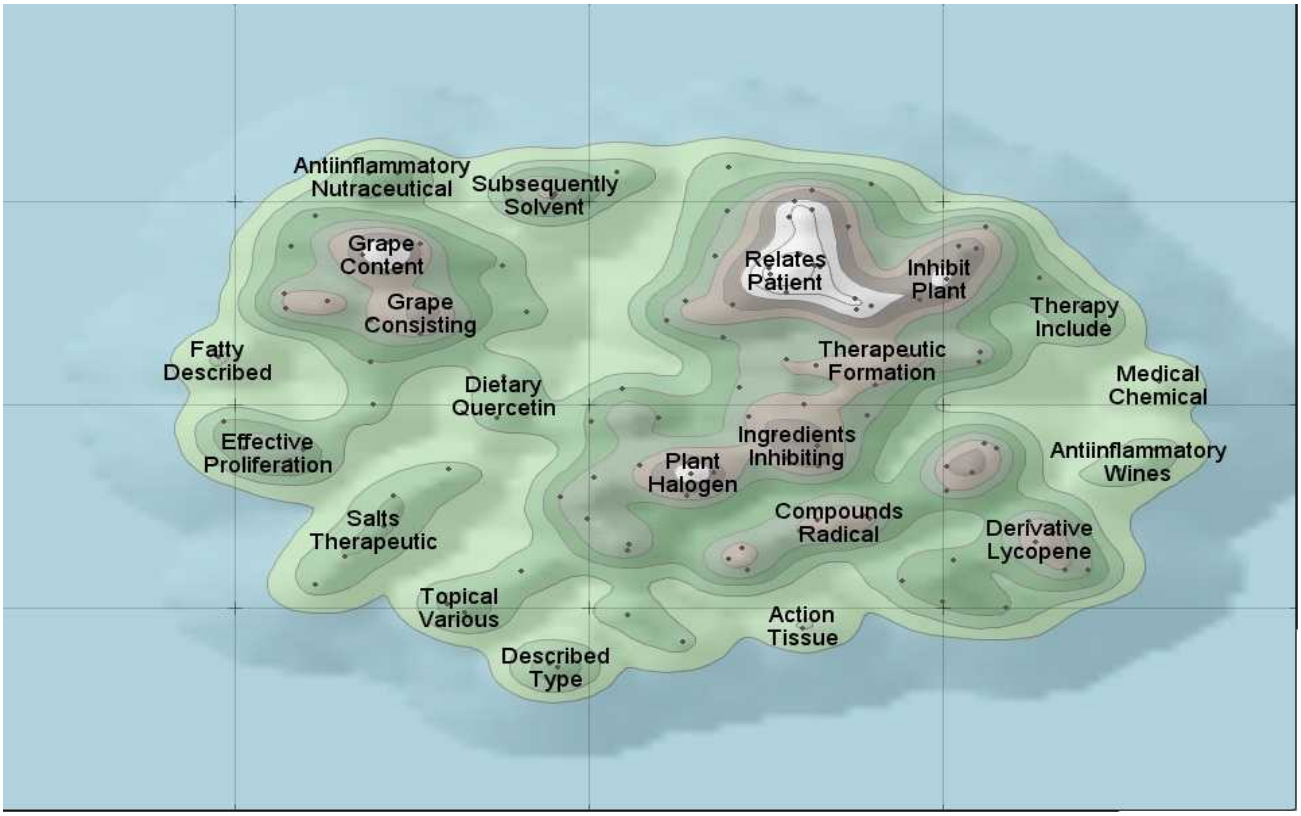
개발기술명		Resveratrol-glucoside (piceid 등) 합성 및 면역기능조절 물질 개발	Pterostilbene-glucoside 합성 및 면역기능조절 물질 개발
Keyword		Resveratrol and derivative	Pterostilbene and derivative
검색건수		244	46
유효특허건수		128	15
핵심특허 및 관련성	특허명	COSMETIC AND ITS PRODUCTION	Pterostilbene as a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha isoform
	보유국	일본	미국
	등록년도	2000	2006
	관련성(%)	30%	50%
	유사점	항균, 미백효과 등 오디 유래 스틸베노이드계 화합물 유도체의 일부 기능과 유사	Pterostilbene이 핵수용체인 peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα)를 활성화 시켜 혈액내 지방의 농도를 감소시키는 기능과 유사
	차이점	단순 천연물(용설란) 추출물을 이용한 화장품 소재 개발이지만, 본 연구에서는 효능이 향상된 신규 유도체 개발이 목표임.	Pterostilbene 화합물 자체를 이용한 용도 특허이지만, 본 연구에서는 효능이 더욱더 향상된 신규 유도체 개발이 목표임.

1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

Resveratrol 특허 분석

□ **특허등고선**

* 패밀리특허를 제외한 128건에 대한 등고선맵



- 레스베라트롤의 염증성 질환, 전립선암, 항-인플루엔자, 항-HSV, 비만, 당뇨, 치주질환, 근육소모질환, COPD 등 다양한 질환에 관한 의약용도, 미백 화장료, 기능성식품에 관한 특허가 출원되고 있음.

□ 핵심특허(인용도가 높은 등록특허 상위 5개)

1. JP3053368

등 록 번 호	JP3053368	등 록 연 월 일	2000.04.07
출 원 번 호	1996-168324	출 원 연 월 일	1996.06.06
출 원 인	YUSHIRO CHEM IND MITSUBA BOEKI KK	발 명 자	ASHIDA TSUTOMU
특 허 명	COSMETIC AND ITS PRODUCTION		
기 술 요 지	PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a cosmetic which is excellent in antimicrobial properties, ultraviolet absorption, prevents skin roughening and malting and keeps skin beautiful and provide its production process. SOLUTION: This cosmetic contains yucca extract and saponin, flavone and resveratrol are contained in the yucca extract. If the cosmetic is calculated as 100wt.%, the content of saponin, flavone and resveratrol is 0.001-5wt.%. The objective cosmetic is produced by chipping at least one of the roots or stems of yucca and drying, or drying and chipping them, crushing them into a powder, then soaking the powder in an ethanol-water mixed solvent thereby preparing the yucca extract. Subsequently, the yucca extract is formulated to a cosmetic. The ethanol-water mixed solvent contains 75-95wt.% of ethanol.		

2. US5747536

등 록 번 호	US5747536	등 록 연 월 일	1998-05-05
출 원 번 호	US1996726302A	출 원 연 월 일	1996-10-02
출 원 인	SIGMA TAU IND FARMACEUTI	발 명 자	Cavazza, Claudio
특 허 명	Pharmaceutical composition comprising L-carnitine or derivative thereof and trihydroxy or tetrahydroxystilbenoid		
기 술 요 지	The coordinated therapeutic use of L-carnitine, lower alkanoyl L-carnitines or the pharmacologically acceptable salts thereof with resveratrol, resveratrol derivatives or resveratrol-containing natural products is disclosed for producing a medicament for the prophylaxis and treatment of cardiovascular disorders, peripheral vascular diseases and peripheral diabetic neuropathy.		

3. US6022901

등 록 번 호	US6022901	등 록 연 월 일	1998-05-05
출 원 번 호	US199878300A	출 원 연 월 일	1998-05-13
출 원 인	PHARMASCIENCE INC	발 명 자	Goodman, David William
특 허 명	Administration of resveratrol to prevent or treat restenosis following coronary intervention		
기 술 요 지	A method for preventing or treating restenosis and for preventing the recurrence or progression of coronary heart disease is provided. The method involves administration of a selected active agent to a patient following coronary intervention, e.g., coronary artery bypass surgery, endarterectomy, heart transplantation, heart balloon angioplasty, atherectomy, laser ablation or endovascular stenting. The active agent comprises cis-resveratrol, trans-resveratrol, a mixture thereof, or a pharmacologically acceptable salt, ester, amide, prodrug or analog thereof. Administration may be oral, parenteral, or the like. Pharmaceutical compositions for use in conjunction with the therapeutic method are also provided.		

4. US6475530

등 록 번 호	US6475530	등 록 연 월 일	2002-11-05
출 원 번 호	US2000684697A	출 원 연 월 일	2000-10-04
출 원 인	KUHRTS ERIC H	발 명 자	Kuhrts, Eric H.
특 허 명	Methods and compositions for producing weight loss		
기 술 요 지	Dislcosed are methods and compositions for producing weight loss in a mammal by administration of a composition containing a weight loss effective amount of a noradrenaline stimulating compound such as ephedrine, mahuang (a plant source of ephedrine alkaloids), citrus aurantium (bitter orange), synephrine, norephedrine, psuedophedrine, a methylxanthine, such as caffeine or guarana, and a botanical COX inhibitor such as resveratrol polygonum cuspidatum, scutellaria baicalensis, turmeric, curcumin, rosmary, green tea, ocimum sanctum (holy basil), or ginger, instead of an NSAID such as aspirin, and optionally a free fatty acid reducing compound. The thermogenic formula is coupled with a growth hormone stimulating formulation containing L-arginine or L-omithine, L-lysine, and a free fatty acid reducing agent such as nicotinic acid. The thermogenic formula would preferably be administered in the daytime, and the growth hormone producing formula at nighttime. The two compositions form a system of AM and PM weight loss strategy for the therapeutic intervention of obesity.		

5. US6197834

등 록 번 호	US6197834	등 록 연 월 일	2001-03-06
출 원 번 호	US1998145039A	출 원 연 월 일	2000-10-04
출 원 인	UNIV NORTHEASTERN OHIO	발 명 자	Docherty, John
특 허 명	Method of inhibiting formation of infectious herpes virus particles		
기 술 요 지	The present invention provides a method of inhibiting the formation of infectious herpes virus particles, particularly infectious herpes simplex virus (HSV) particles, in a host cell. The method involves administering an effective amount of a hydroxylated stilbenoid, particularly resveratrol, to a herpes virus infected host cell. The present invention also provides a method of treating a herpes virus infection, particularly an HSV infection. The method comprises administering a topical composition comprising a therapeutically effective amount of a hydroxylated stilbenoid to a herpes virus-infected site. The present invention also relates to a topical composition for treating a herpes virus infection selected from the group consisting of an HSV infection, a cytomegalovirus infection, and a varicella zoster virus infection. The present invention also provides a method of reducing the cytopathic effect of HSV on mammalian cells. The method involves administering resveratrol to the host cell, either in vitro or in vivo, in an amount sufficient to inhibit replication of HSV-1 or HSV-2 within the host cell.		

Pterostilbene 특허 분석

□ **핵심특허(인용도가 높은 상위 4개)**

1. US20060057231A1

공 개 번 호	US20060057231A1	공 개 연 월 일	2006-03-16
출 원 번 호	US2005207038A	출 원 연 월 일	2005-08-18
출 원 인	RIMANDO, AGNES	발 명 자	RIMANDO, AGNES
특 허 명	Pterostilbene as a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha isoform		
기 술 요 지	Resveratrol, a stilbenoid antioxidant found in grapes, wine, peanuts and other berries, has been reported to have hypolipidemic properties. We investigated whether resveratrol and its three analogs (pterostilbene, piceatannol and resveratrol trimethyl ether) would activate the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) isoform. This nuclear receptor is proposed to mediate the activity of lipid-lowering drugs such as the fibrates. The four stilbenes were evaluated along with ciprofibrate (positive control) at 1, 10, 100, 300 µM concentrations, for the activation of endogenous PPARα; in H4IIEC3 cells. Cells were transfected with a peroxisome proliferator response element-AB (rat fatty acyl CoA β-oxidase response element)--luciferase gene reporter construct. Of the four analogs, pterostilbene demonstrated the highest induction of PPARα; showing 7-and 9-14 fold increases in luciferase activity at 100 and 300 µM, respectively, relative to control. The maximal luciferase activity responses to pterostilbene at 100 µM are similar to those obtained with the hypolipidemic drug, ciprofibrate. These results suggest that pterostilbene acts as a PPARα; agonist, like that of the fibrate class, and may be a more effective hypolipidemic agent than resveratrol.		

2. EP1782802A1

공 개 번 호	EP1782802A1	공 개 연 월 일	2007-05-09
출 원 번 호	EP2005774387A	출 원 연 월 일	2005-07-19
출 원 인	UNIV VALENCIA	발 명 자	ESTRELA ARIQUEL, J., M., OTRI-OTT, U.DE VALENCIA
특 허 명	COMBINED USE OF PTEROSTILBENE AND QUERCETIN FOR THE PRODUCTION OF CANCER TREATMENT MEDICAMENTS		
기 술 요 지	The invention relates to the combined use of pterostilbene and quercetin for the production of cancer treatment medicaments. The in vitro growth of melanoma cells B16-F10 (B1611-F10) is inhibited (56%) by combined exposures of short duration (60 min/day) to PTER (40 μM) + QUER (20 μM) (-average values of plasma concentrations measured within the first hour following the IV administration of 20 mg of each polyphenol/kg-). The combined intravenous administration of PTER + QUER (20 mg/kg x day) to mice inhibits (73%) the metastatic growth of melanoma B16M-F10 in the liver, a common site for metastasis development. The invention demonstrates that the combination of PTER + QUER inhibits the growth of malignant melanoma metastasis and prolongs the survival of the carrier host.		

3. WO2008028098A2

공 개 번 호	WO2008028098A2	공 개 연 월 일	2008-03-06
출 원 번 호	WO2007US77332A	출 원 연 월 일	2007-08-31
출 원 인	US AGRICULTURE	발 명 자	BAERSON, SCOTT, R.
특 허 명	A NOVEL O-METHYLTRANSFERASE GENE FROM SORGHUM CLONING, EXPRESSION, TRANSFORMATION AND CHARACTERIZATION		
기 술 요 지	This invention relates to an O-methyltransferase gene cloned from sorghum, the sorghum O-methyltransferase-3 gene, SbOMT3. Quantitative real-time RT-PCR and recombinant enzyme studies with putative O-methyltransferase sequences obtained from an EST data set from sorghum have led to the identification of the novel root hair-specific O-methyltransferase designated SbOMT3. Transgenic plants which express SbOMT3 can convert resveratrol into pterostilbene in planta. SbOMT3 is also involved in the biosynthesis of sorgoleone.		

4. WO2009032870A2

공 개 번 호	WO2009032870A2	공 개 연 월 일	2009-03-12
출 원 번 호	WO2008US75170A	출 원 연 월 일	2008-09-04
출 원 인	US AGRICULTURE	발 명 자	JOSEPH, JAMES, A.
특 허 명	METHOD TO AMELIORATE OXIDATIVE STRESS AND IMPROVE WORKING MEMORY VIA PTEROSTILBENE ADMINISTRATION		
기 술 요 지	Disclosed is a pharmaceutical composition for treating oxidative stress comprising a therapeutically effective amount of a substantially pure compound of pterostilbene and a physiologically acceptable carrier. Pterostilbene is administered in an amount between about 2.5 mg to about 10 mg per kilogram of subject body weight. Also disclosed is a method for increasing a working memory of a subject, the method comprising administrating an effective amount of a substantially pure compound of pterostilbene, wherein the working memory for a subject increase and the therapeutic effectiveness is about 10 mg of pterostilbene per kilogram of subject body weight.		

1) 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	전 세계
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 구글학술검색(Scholar.google.com)
검색기간	최근 5년간 (2006년 1월부터 현재까지)
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		Resveratrol-glucoside (piceid 등) 합성 및 면역기능조절 물질 개발	Pterostilbene-glucoside 합성 및 면역기능조절 물질 개발
Keyword		Resveratrol and derivative	Pterostilbene and derivative
검색건수		7640	321
유효논문건수		31	143
핵심논문 및 관련성	논문명	Synthesis of novel trans-stilbenoid derivatives and evaluation of their potent antioxidant and neuroprotective effects.	Anti-inflammatory action of pterostilbene is mediated through the p38 MAPK pathway in colon cancer cells
	학술지명	Eur J Med Chem.	Cancer Prev Res (Phila)
	저 자	Jung JC, Lim E, Lee Y, Kang JM, Kim H, Jang S, Oh S, Jung M.	Shiby Paul, Agnes M. Rimando, Hong Jin Lee, Yan Ji, Bandaru S. Reddy, and Nanjoo Suh
	게재년도	2009	2009
	관련성(%)	60%	60%
	유사점	- Resveratrol derivative 제조 및 효능 검정 - Antioxidant and europrotective effects 연구	- 천연물로부터 추출한 pterostilbene 사용 - 항염 및 항산화 작용 효과 분석
	차이점	본 논문은 resveratrol derivative를 화학적 합성으로만 제조하였으나 본 과제에서는 생촉매를 이용하여 고기능, 고효율의 다양한 기능을 가진 resveratrol derivative를 제조하고자함.	본 논문은 천연물에서 추출한 pterostilbene를 연구에 사용하였으며 LPS로 유도된 염증 반응에 pterostilbene이 저해효과를 나타냄을 발견하였음. 그러나, 본 과제에서는 생촉매를 이용하여 고기능, 고효율의 다양한 기능을 가진 pterostilbene derivative를 제조하여 항염작용 및 항산화 이외에 항암, 항비만 작용에 대한 효능을 검증하고자함.

1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

1-2. 연구 완료 후 변동 내용

1) 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국외(미국, 일본, 유럽, PCT, 중국, 한국)
특허 DB	google patent search
검색기간	2011-현재 (2015.10)
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석 결과

개발기술명	Resveratrol-glucoside (piceid 등) 합성 및 면역기능조절 물질 개발	Pterostilbene-glucoside 합성 및 면역기능조절 물질 개발
Keyword	Resveratrol, derivative, synthesis and immune response	Pterostilbene, derivative, synthesis and immune response
검색건수	857	47
유효특허건수	130	15

다. 관련 핵심 특허 분석

Patent no	**Compound**	**Claims or Abstracts**
US20120149663	Boronic acid derivatives of resveratrol	Improved cellular toxicity against estrogen dependent human breast cancer cells, induces G1 cell cycle arrest, irreversible anti-proliferative effect against multidrug resistant cell line
WO2011039175	Combination of resveratrol and piceatannol	Skin cancer protection in smokers or other hyper proliferative skin diseases
US8,350,093B2	Methylated curcumin-resveratrol hybrid molecule	Use in treating cancer (actually in Alzheimer's Disease
US20130035305A1	Combination of resveratrol and piceatannol precursors and stereoisomeric	Diseases associated with an increased IL-6 serum level: depression, anxiety, migraine, chronic inflammatory disorders, chemoprevention of tumorigenesis, treating prostate cancer

	forms, hydroxystilbene	
WO2012154956	Resveratrol derivative pterostilbene	Anxiolytic effect
US20120178801	Composition comprising at least one stilbene derivatives and anthocyanins	Use in treating obesity or inducing weight loss
WO2012112670	Resveratrol-based boron-containing analogs	For dyslipidemias and cancer
WO2011130400	4-Acetoxy-resveratrol	Male and female health, anti-aging, agerelated disorders
US20120058088	Composition of trans-resveratrol, a metal chelator, phenolic antioxidants	To improve cell transformation therapy, treat macular degeneration or dystrophy
WO2012156275	Resveratrol or derivatives thereof and essential oil of cloves	Itching
WO2011130400A1	4-Acetoxy-resveratrol	Treatment and prevention of physiological and pathophysiological conditions mediated by sirtuins, estrogen and chemical interventions important for males and females that can be administered in a food product
US20110189275A1	Pterostilbene: caffeine, carbamazepine, glutaric acid and piperazine cocrystals	Invention for therapeutic uses of pterostilbene cocrystals and methods for delivering them, and dosage forms containing them, to humans
WO2011073482A1	Resveratrol comprising of glucopyranoside derivatives	Nutritional composition for the treatment and/or prevention of inflammatory processes
US20130040921A1	Methoxy and acetyl derivatives of resveratrol in b-cyclodextrin complex	Pharmaceutical/nutraceutical resveratrol and/or derivatives in rice oil provides antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, cardioprotective, neuroprotective and/or cancer chemoprotective action and protecting against infections, reducing obesity and preventing illness of old age
US20140011889A	Resveratrol-Containing Compositions and Methods of Use for	A resveratrol-containing composition capable of providing a therapeutic benefit to a subject such as modulation of a biological activity, improving cell transplantation therapy,

	Cardiac-Related Diseases	or improving macular degeneration or dystrophy treatments. The compositions comprise trans-resveratrol, a metal chelator, and one or more additional antioxidants such as phenolic antioxidants or vitamin D.
US20140378547A1 EP2760547A1	Antioxidant compositions for treatment of inflammation or oxidative damage	One embodiment of the invention is directed to a method of preventing, reducing, or eliminating at least one negative effect of oxidative damage, such as an oral disease, caused by a dental device in the mouth of a patient. Another embodiment relates to a method of preventing, reducing, or eliminating at least one negative effect of inflammation. The method may include applying topically to a soft oral tissue in the patient an oral antioxidant composition. The antioxidant composition may include between 0.0001% and 5.0% w/w or at least one antioxidant, wherein the at least one antioxidant includes a natural phytochemcial antioxidant, a flavonoid, an anthocyanidin, a dihydrochalcone, a phenylpropanoid, a chalcone, a curcuminoid, a tannin, a stilbenoid, a coumarin, a carotenoid, or a vitamin, and an orally pharmaceutically acceptable carrier. The pH of the oral antioxidant composition may be at least 5.0.

2) 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	전 세계
논문 DB	pubmed DB (www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 5년간 (2011년 1월부터 현재까지)
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석 결과

개발기술명	Resveratrol-glucoside (piceid 등) 합성 및 면역기능조절 물질 개발	Pterostilbene-glucoside 합성 및 면역기능조절 물질 개발
Keyword	Resveratrol, cardiovascular, cancer treatment, antioxidant	Pterostilbene, antioxidant
검색건수	2793	169
유효논문건수	577	68

다. 관련 핵심 논문

논문명	A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease	Combinatorial resveratrol and quercetin polymeric micelles mitigate doxorubicin induced cardiotoxicity in vitro and in vivo.
학술지명	Eur J Med Chem.	J Control Release
저 자	R. Scott Turner et al	Cote B, Carlson LJ, Rao DA, Alani AW
게재년도	2015.09	2015.06
내용	본 논문은 resveratrol의 알츠하이머 치료제로서의 가능성을 알아본 연구 결과를 소개하고 있음. 경증에서 중등도 알츠하이머 환자들을 대상으로 고용량의 resveratrol을 투여한 최대 규모의 임상시험 결과에 대한 논문으로 다른 물질의 효과를 배제하고 resveratrol 효과만을 보기 위해 합성한 resveratrol을 정제하여 사용하였다. 발표된 결과에 따르면 고용량의 resveratrol이 투여된 환자들은 알츠하이머가 진행될 때에 감소하는 생체 표지자가 안정화된 것으로 나타났다. resveratrol이 알츠하이머의 치료제 또는 보조제로 사용 될 수 있는 가능성을 제시함.	본 논문은 널리 연구되어온 두 가지 polyphenols인 resveratrol과 quercetin을 혈류로 주입할 수 있게 해서 이들 화합물들의 생물학적 이용 가능성을 늘리는 시스템을 개발했는데 이 경우 심장 독성 때문에 사용이 제한적이던 항암제인 adriamycin의 독성을 줄여주는 효과를 나타내었다. 폴리페놀들의 공동-투여가 자체의 항암 성질들을 보여주면서 동시에 기존의 화학요법제 항암제들의 효과를 향상시킴으로써, 암 치료에서 중요한 단초를 제공하고 다양한 화학약물의 대규모적인 사용에 대한 가능성 제시함.

Part 2: 제품 및 시장 분석

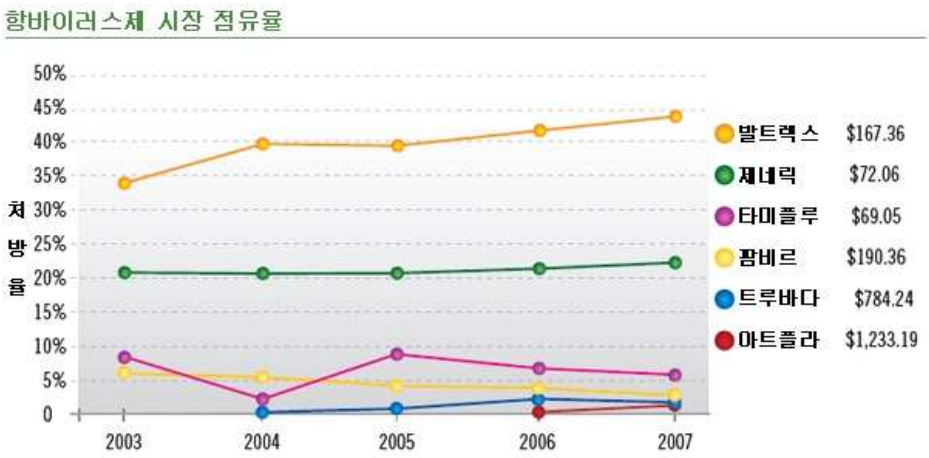
2-1. Resveratrol derivatives 시장분석 (협약시 연구 계획서 제출 자료)

■ **시장분석범위의 한정**

- 천연물 추출물 및 이로부터 유래된 Resveratrol derivatives 등 스틸베노이드 화합물의 세포접착저해를 필요로 하는 바이러스성 감염성 염증 예방 및 치료분야와 더불어 위생용품, 목욕용품, 화장료, 식·음료수, 생활필수품분야 등에도 응용성을 지님.
- 본 물질이 적용되는 시장의 범위가 관절염, 천식, 골다공증, 건선, 염증성 장염과 같은 면역관련 염증질환, rhinovirus, 말라리아 및 HIV-1 감염 질환과 같은 바이러스 감염 질환의 예방 및 치료제 분야 등 그 범위가 광범위함. Resveratrol derivatives의 명확한 작용효과를 확인한 항바이러스 예방/치료분야를 중심으로 시장을 한정하여 분석함.

■ **항바이러스제 시장**

- 항바이러스제 계열은 2007년 처방당 비용은 4.5%, 이용도 2.1% 증가 등 환자당 연간 평균 비용은 14.6% 늘어난 21.27달러였으며 2007년 대상포진 치료제 '발트렉스'와 HIV 치료제 '아트리플라(Atripla)'가 항바이러스제 추세를 견인하였고 특허 소송 합의에 따라 발트렉스 제네릭은 내년 말부터 이용할 수 있음.
- 항바이러스제 시장은 발트렉스가 약 45%의 점유율로 독주하고 있으며 제네릭은 23%, 타미플루가 10%, 팜비르, 트루바다, 아트플라가 10% 이하에서 경쟁하고 있는 실정이며 2008년도엔 '제리트(Zerit)', 올해에 발트렉스가 특허 만료될 예정임.



- 2006년 전세계 의약품시장 규모가 6430억 달러에 달하며, 이중 항감염제 시장의 규모는 380억달러이고, 여기서 항바이러스제 시장규모는 80억 달러로 2016년까지 50%의 성장이 기대됨. 이에 항바이러스제는 시장집중도가 높아 10대 제약사가 매출 및 판매의 98~99%를 점유하고 있는 실정이나, 향후 10년간 치료제의 2/3이상이 특허만료 될 예정으로, 따라서 특허권이 존속되고 있는 메이저 약품과의 경쟁, 특허권이 만료되었을 때의 제네릭 의약품과의 경쟁이 더욱 치열해질 전망임.
- 국내 항바이러스제 시장규모는 전세계시장규모의 1~2%규모를 차지고 하고 있는데, 대략

1억 달러의 규모인 것으로 추측됨. 영국의 감기 및 몸살약 시장규모는 2008년 6억 4300만달러 수준으로 영국전체 일반의약품 시장의 18%를 차지하고 있는데, 우리나라는 국내의 의약품 시장의 7~10%를 차지하는 900~1000억 규모로 추정되고 있어 향후 영국의 경우와 마찬가지로 18%까지 성장 가능할 것으로 판단됨

- 이러한 시장규모에서 천연물 항바이러스제의 기술이전 및 사업화 성공 예에서 보듯이, 본 기술의 상용화가 제품화되어 시장진입에 성공한다면, 기술기여도 등을 고려하여 초기 매출규모는 보수적으로 판단할 경우, 전체 국내 시장규모에서 2~5% 정도(200~500만 달러/1년), 호의적으로 판단할 경우 7~10% (700~1000만 달러/1년)가 될 것으로 추측됨.
- 항바이러스질환을 예방하기 위해 위생용품분야, 화장료 분야, 식·음료분야, 생활필수품 분야, 목욕용품 분야 등에도 Resveratrol derivatives 응용이 가능한데, 항바이러스만을 위한 상기 적용분야의 시장은 크지는 않은 것으로 판단되나, 진균, 항균제와 함께 첨가물로서 생필품, 목욕용품, 화장료 분야, 위생용품분야에 응용될 수 있으며, 감기의 예방을 위한 식이 음료, 식품 등에서 향후 그 시장범위를 확장시킬 수 있을 것으로 판단됨.

■ **시장분석 종합**

Resveratrol derivatives 관련 시장성을 종합 분석 결과, 시장의 추이 성장 주기상 성장기에 진입하여 성장성이 양호하고, Resveratrol derivatives 분야의 차별화된 기술성으로 향후 경쟁적 시장 지위의 확보가 예상되며, 초기 투자비용과 상용화에 소요되는 시간이 길지는 않을 것으로 판단됨.

2-1. 연구 완료 후 변동 내용

(1) 천연물신약 시장동향 변화

■ 천연물 시장 규모

(억달러)

구분	2012년	2013년	2014년
해외시장	779	888	1,012
국내시장	4.3	5.2	6.2

출처: 제3차 천연물신약연구개발촉진계획 수립, 한국보건산업진흥원 (2011)

- 천연물신약은 미국 FDA의 최초 승인 이래 지속적인 성장 추세를 보이고 있으며 천연물 관련 의약품의 수와 시장의 규모 또한 지속적인 증가를 보이고 있음.
- IMS 보고서에 따르면 세계 천연물의약품 시장은 25조원이상으로 추정되고 있으며, 이 중 처방 의약품이 18조 이상을 차지하고 있으며, 연간 8~10%의 성장률을 기록함. 판매되는 의약품의 50% 정도가 천연물의약품이거나 천연물에서 유래된 단일물질이며 이 예로 신종인플루엔자(신종플루) 치료제인 shikimic acid으로부터 합성한 물질인

타미플루(오셀타미비르)이며, 목련과 상록수 열매로 3000여 년 전부터 향신료로 널리 쓰여진 중국의 토착식물인 대회향 또는 팔각회향(star anise)이라는 천연물질로부터 개발되었으며 아스피린, 탁솔, 은행잎엑스, 차전차엑스 등이 개발되어 오래전부터 시판되어 큰 매출을 올리고 있음.

■ 천연물의약품 시장 성장 원동력

- 제약사들이 블록버스터급 화합물 의약품의 특허 만료 및 화합물 의약품 외의 보다 안전한 다른 의약품의 개발에 대한 필요성을 인식하고 있어 천연물의약품(botanical drug)을 포함하는 식물 유래 의약품(plant-derived drug) 개발에 특화된 회사와 적극적인 기술이전 또는 공동개발을 추진하고 있음.
- 평균 신약 개발 전체 비용인 8억불로 제약사들은 오랜 기간 사용되어온 천연물에서 표적에 재현성 있게 작용하고 안전성이 확보된 성분을 찾고 있으나 천연물의약품 (botanical drug)은 8,000만불의 비용 및 10년의 개발 기간으로 향후 10억불의 잠재적인 매출을 기대할 수 있음.
- 일반적으로 다국적 제약사는 평균 2억불 이상의 매출이 예상되는 천연물 성분(botanical compound)개발에 관심을 보이고 있음.
- 사노피아반티스(Sanofi-Aventis), 글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline), 화이자(Pfizer), 비엠에스(Bristol-Myers Squibb), 존슨앤존슨(Johnson & Johnson), 노바티스(Novartis), 로슈(Roche), Bradley Pharmaceuticals (now part of Nycomed), 엘라이 릴리(Eli Lilly), 제넨텍(Genentech), 암젠(Amgen) 등과 같은 대형 제약사들이 천연물의약품 개발의 사업 전략이 어느 정도 익숙해 있으며 특히 머크(Merck)사는 50만 종의 열대 동식물에서 10년 내 신약 25종 개발을 목표로 투자하고 있는 것으로 알려짐.
- 식물 재배와 천연물의약품 개발을 지탱할 수 있는 기술의 발전, 마지막으로 환경의 보호와 글로벌 생산물을 생산 둘 다에 대한 필요성이 확대됨 (BCC research).
- 천연물의약품의 개발을 위한 규정 마련 및 정부 과제 지원에 있어서 미국은 미국FDA가 천연물의약품 가이던스 제정과 함께 암젠(Amgen), 바이오젠(Biogen), 젠자임(Genzym)e 등 대형 제약회사들을 중심으로 천연화합물 연구 개발 프로젝트를 추진하였고, 독일의 경우 정부와 민간 제약회사가 공동으로 체계적인 생리활성검색을 통한 천연물 신약개발 프로그램을 진행하였으며, 중국의 경우 업계에서는 중국 전통의 약초의학산업을 바탕으로 한 천연물 연구가 진행 중임.
- 중국, 인도 및 다른 기타 원료 공급 시장 또한 확대되고 있으며 합성 의약품에 비해 적은 개발 비용 등의 이유들로 향후 괄목할 만한 성장을 할 것으로 전망됨.

■ Resveratrol과 그 유도체 의 활용 연구

- 2011년 본 연구를 시행하기 전에도 천연물 추출물 및 이로부터 유래된 resveratrol derivatives 등 스틸베노이드 화합물은 관절염, 천식, 골다공증, 건선, 염증성 장염과 같은 면역관련 염증질환, rhinovirus, 말라리아 및 HIV-1 감염 질환과 같은 바이러스 감염 질환에 효과가 있음이 발표되었다. 하지만 이를 활용한 제품군은 의약분야 보다는 위생용품분야, 화장료 분야, 식·음료분야, 생활필수품 분야, 목욕용품 분야 등에 국한되어 사용되고 있었음.

- 최근 논문과 특허 등을 살펴보면 resveratrol과 그 derivatives를 활용하여 항암, 치매, 심혈관계 치료제로서의 활용 등에 관한 연구를 중점적으로 하고 있음
- 과거에는 resveratrol의 활용이 천연물을 이용한 식품으로서의 활용도가 높았다면 현재는 순수 정제한 resveratrol 또는 그 derivatives를 활용하여 의약품을 만드는 방향으로 연구를 하고 있음
- 특히 기존의 resveratrol 함유 식음료, 화장품, 목욕용품의 경우 시장의 성장을 기대하기 어려우나 정제한 resveratrol과 그 derivatives를 활용한 고부가가치 의약품의 경우 천연물 신약 시장에서의 활용도가 높을 것으로 보임

편집순서 8

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업*(해당사업 표기)*의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업*(해당사업 표기)*의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

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