

(뒷면)

발간등록번호

11-1543000-000164-01

바이오폐리머를
이용한
가금바이러스
질병
억제제
개발

바이오폐리머를 이용한
가금 바이러스 질병 억제제 개발

Development of Anti-viral Agents for
Chicken Viral Disease with Biopolymer

주 의
(편집순서 8)

충남대학교

(15 포인트 고딕체열)

↑
6cm
↓

농림축산식품부

농림축산식품부

↑
3cm
↓

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “바이오폴리머를 이용한 가금 바이러스 질병 억제제 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9 월 일

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 김 철 중

세부연구책임자 : 이 지 훈

세부연구책임자 : 홍 승 표

연 구 원 : 이 중 수

연 구 원 : 박 청

연 구 원 : 문 호 진

연 구 원 : 초 두 리

연 구 원 : 김 형 범

연 구 원 : 최 재 철

연 구 원 : 멜 분

연 구 원 : 김 병 섭

연 구 원 : 강 익 재

요 약 문

I. 제 목

바이오폴리머를 이용한 가금 바이러스 질병 억제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 국내외 관련연구의 현황 및 문제점

1) 뉴캐슬병 (Newcastle Disease)

- 뉴캐슬병 (Newcastle disease)은 가금에서 치명적이고 전염성이 강한 제1종 가축전염병으로 백신을 접종하지 않은 닭에 감염될 때는 100% 폐사율을 초래하며, 적절한 백신을 하지 않는 경우 호흡기 및 소화기 증상과 산란계에서 산란을 저하로 막대한 경제적인 피해를 일으키는 치명적인 질병임
- 국내의 경우 닭에 발생하는 발생률이 계속 증가하고 있으며 한지역에 국한되지 않고 전국적으로 발생하는 추세에 있으며 양계 농가에 큰 피해를 주고 있음
- 뉴캐슬병의 주요증상은 처음에 줄기 시작하여 콧물, 기침 등의 호흡기 증상이 나타나고, 녹색설사를 하다가 폐사. 또한, 적절한 백신을 하지 않은 경우 백신항체가 낮은 산란계나 종계는 산란율이 떨어지거나 중지되기도 하고, 예방접종을 했다고 하더라도 접종 시기나 방법이 잘못되어 항체가 높지 않은 닭에서는 다리 와 목이 마비되는 신경증상이 나타나기도 함 (Korean J. Vet. Res., 40: 563-573, 2000).
- 뉴캐슬병을 예방하기 위해서 사용되는 백신은 크게 생독백신과 사독백신으로 구분됨
- B1주와 La Sota주 (Clone주 포함)는 국내뿐 만 아니라 전 세계적으로 가장 널리 사용되어 온 대표적인 뉴캐슬병 생독백신주이고 최근 생독백신접종시 나타나는 백신접종반응을 최소화시키기 위하여 각종 생독백신들이 개발되어지고 있음.
- 그러나 뉴캐슬병 생독백신의 문제점은 최근 주로 동절기 육계농장에서 자주 확인이 되며, 특히 2-3회의 생독백신 접종에도 불구하고 뉴캐슬병이 발생하여 지역적으로 유행화되고 있어 문제시 되고 있다 (Korean J. Vet. Res., 40: 563-573, 2000).
- 뉴캐슬병 사독백신은 뉴캐슬병, 닭전염성기관지염, 산란저하증 등 3종 이상의 질병을 동시에 예방할 수 있는 다가혼합 사독오일백신이 개발되어 전 세계적으로 사용되고 있음 그러

나 이역시 산란계 농장의 경우 면역력 저하로 인한 뉴캐슬병 발생 피해사례가 늘어나고 있고, 특히 동절기 산란계 농장의 경우 뉴캐슬병 발생이 지역적으로 유행화되어 산란저하 유발에 따른 경제적 피해를 가중시키고 있음. 육계와는 달리 수차례의 생독백신과 사독백신을 접종함에도 불구하고, 폐사는 일어나지 않지만 산란율 저하피해는 매우 심각한 경우가 많은 것으로 보고되고 있음

- 또한 사독백신 제조용 뉴캐슬병 백신주가 최근 유행하고 있는 유전자형 VII형 뉴캐슬병 바이러스 유행주를 얼마나 효과적으로 방어할 수 있는가 하는 문제점이 지적되고 있다. 그러나 산란저하까지 완벽하게 막아줄 수 있는 뉴캐슬병 사독백신은 아직까지 전 세계적으로 개발되어 있지 못한 실정임 (Darrell R. Kapczynski et al., Vaccine, 23, pp3424-3433, 2005).
- 앞서 언급한 내용처럼 뉴캐슬병을 예방하기 위해서는 백신을 접종하거나 위생적인 사육시설 관리를 행하는 것이 필요함. 그러나 백신접종의 경우 백신의 효율성이 낮아 예방에 많은 문제점을 가지고 있음. 따라서 백신의 예방능력을 보통해 줄 수 있는 항바이러스 억제제의 개발에 의한 뉴캐슬병의 철저한 예방 및 치료의 관리가 요구됨.

2) 닭의 조류인플루엔자 (Avian Influenza ; AI)

- 닭의 조류인플루엔자 (AI)는 조류인플루엔자 바이러스에 의해서 발생하는 닭의 급성 전염병으로서, 국내뿐 만 아니라 전 세계적으로 양계산업에 많은 경제적 피해를 유발하고 있는 주요 생산성 저하 질병 중의 하나임
- 조류인플루엔자 A형 바이러스 (Avian influenzaI virus type A: AIV type A) 감염에 의한 가금류의 전염병을 말한다. 감염시 임상증상은 감염된 바이러스의 독력, 숙주의 나이, 숙주의 2차 세균 감염 여부 및 숙주의 사양 환경조건 등에 따라 호흡기 증상, 설사, 비출 및 다리 청색증, 산란저하(심하면 산란정지), 폐사(심하면 100% 폐사) 유발 등 매우 다양한 임상소견이 관찰된다. 특히 가금인플루엔자 바이러스는 독력 분류기준에 따라 고병원성 바이러스·약병원성 바이러스 및 비병원성 바이러스로 분류할 수 있으며, 고병원성 가금인플루엔자 (Highly pathogenic avian influenza : HPAI)는 국제수역사무국(OIE) List A 질병으로써, 국내에서는 제1종 가축전염병으로 분류하고 있다.
- HPAI가 발생한 경우에는 우리나라를 포함하여 전세계적으로 감염계 전수를 살처분 하는 정책을 실시하고 있으며, 살처분 정책을 실시하지 않을 경우 발생국가는 3년간 양계산물을 해외로 수출할 수 없게 된다. 가금인플루엔자는 전파가 빠르고 병원성이 다양하며, 닭, 칠면조, 야생조류등 여러종류의 조류에 감염되는데, 주로 닭과 칠면조에 피해를 주는 급성 바이러스성 전염병으로, 오리(집오리, 철새), 거위, 메추리 등은 임상증상은 잘 나타나지 않으면서 바이러스를 분변으로 배출함.

- AI를 일으키는 바이러스는 RNA 바이러스로 Orthomyxoviridae의 Orthomyxovirus에 속한다. 이 바이러스는 혈청형이 다양한 것이 특징이며, 혈청형이 다르면 서로 교차방어가 되지 않는다. 현재 Nucleoprotein 및 matrix antigen의 항원성에 따라 Type A, B, C로 크게 나누며 동물의 인플루엔자바이러스는 모두 Type A에 속한다. 다시 Type A는 바이러스의 외막에 붙어있는 HA (Hemagglutinin)와 NA (Neuraminidase)의 모양에 따라 HA는 16종류 (H1-H16), NA(N1-N9)는 9종류로 나눈다. 따라서, HA와 NA의 각각 종류가 서로 조합되었을 때는 135종류의 Type A 인플루엔자 바이러스가 존재할 수 있다. AI바이러스는 전혀 증상을 발현시키지 않는 경우에서 100%의 폐사를 일으키는 경우까지 병원성이 매우 다양함
- 주요임상증상으로 고병원성 가금인플루엔자 바이러스가 감염되었을 경우에 특징적으로 75%이상의 폐사를 나타내지만 야외 양계장에서는 다양한 폐사율을 보일 수 있음. 일반적으로 호흡기증상도 발견할 수 있지만, 뉴캐슬병, 전염성, 기관지염, 마이코플라즈마병등과 특별히 구별하기 어렵다. 성계에서 다른 전염병과 어느 정도 구별할 수 있는 증상은 비늘의 청색증과 얼굴의 부종이며, 특히 산란계에서는 산란율의 급격한 감소다. 종계나 산란계에서 대부분 뉴캐슬병 오일 백신을 하는 현재의 여건으로 보아 50%-60%의 산란감소가 일어날 경우 가장 먼저 가금인플루엔자를 의심해야 함.
- 약병원성 가금인플루엔자의 경우에도 다양한 폐사율(0-30%)이 나타날 수 있다. 그 이유는 2차감염이나 스트레스 등에 의하여 폐사율이 변할 수 있기 때문이다. 물론, 약병원성 가금인플루엔자 바이러스도 산란율에 영향을 끼치며, 호흡기 증상과 소화기 증상을 동반하기도 함.
- 따라서 닭 뉴캐슬병(ND)과 닭 인플루엔자의 원인 바이러스 억제제를 개발하여 농가에 보급한다면, 직접적으로는 이 들 질병에 대한 백신비용과 방역관리 비용이 감소하고 질병으로 인한 가금 폐사 등의 피해가 감소할 것으로 예상되며, 간접적으로는 2차 세균감염에 사용하는 항생제 및 관련 동물용의약품의 사용량 또한 감소효과가 예상된다. 또한 파급효과로 수입 동물약품 대체 효과도 예상되므로 본 연구를 통하여 바이러스 억제제 개발이 절실히 필요함.

나. 기술도입의 타당성

- 국내에서 발생하는 뉴캐슬병(ND)에 대한 예방백신은 여러 종류가 시판되고 있지만 여전히 발병이 계속되고 있고, 닭 인플루엔자 바이러스는 치료제가 없어서 양계농가의 피해가 큰 실정임. 이러한 문제를 극복하기 위하여 국내 청국장에서 분리 추출한 바이오폴리머를 이용한 닭 바이러스 질병에 효과적인 억제제 개발이 본 연구의 목표임. 바이러스 억제제 개발을 위해서는 적합한 물질의 제형연구와 효과적으로 닭에 적용할 수 있는 방법으로 투여 경로, 용법용량, 안전성 및 효능효과에 대한 연구를 거쳐 닭 바이러스 억제제를 제작하기로 함

- 현재까지의 바이러스 질병에 대한 대처는 개개의 질병예방을 위한 백신개발이 주로 이루어졌으나 질병의 다양화 즉, 복합적인 요인들에 의한 복합감염에 따른 예방 효율의 한계 및 관리 비용의 증가로 인해 질병을 총체적으로 예방 및 치료할 수 있는 신개념의 예방 및 치료제 개발이 요구됨. 이를 위해 개체의 선천적 면역 증강을 통한 항 바이러스 효과를 유도하는 제제의 개발은 전세계적으로 주요한 연구개발의 방향이 되고 있음.
- Toll-like Receptor (TLR) 매개 면역증강을 통한 항바이러스 효과
TLR 은 동물과 사람에서 외부 병원체를 인식하는 Pattern recognition receptor (PRR)로 현재 10가지 정도가 알려져 있으며 특히 TLR4는 세균의 LPS를 TLR3는 바이러스 유전자를 인식하여 세포내부에 신호전달 체계를 통해 다양한 면역 기능을 수행하게 됨. TLR의 반응은 두가지 신호전달체계를 통해 전해지며 그중 MyD 88 신호전달 체계를 통해서 NF-kappa B를 항진시켜 다양한 싸이토카인 (IL 1-beta, IL-6, TNF-alpha 등)을 분비하게 하여 항원제시세포를 성숙시키거나 자극하게 되어 면역기능을 항진하게 되며 다른 한편으로는 TRIF 단백질을 통한 신호전달을 통해 Type 1 인터페론 (IFN-alpha, beta)을 qnsql하게 하여 세포의 항바이러스 항세균 기능을 항진하게 되며 또한 획득면역을 증진하는 역할을 담당함.
- 닭의 TLR 4는 포유류와 유사하며 대식구, B 세포, 비장세포 및 F 낭 세포 등 다양한 세포에 분포하며 특이적인 결합체인 세균의 LPS 를 처리한 경우 대식구의 nitrite 분비, 호흡기 다양한 세포의 염증대미 작용 및 IFN -r를 분비하여 B 세포 등의 항원에 대한 대응을 높임. 그러나 닭에서는 TRIF 단백질을 통한 신호전달에 대한 효율성이 떨어져 Type 1 IFN의 분비가 저하된다는 차이점이 최근 밝혀짐.
- 이러한 TLR 을 매개로한 면역증강 유도 방법은 매우 유용한 선천면역 증강 방법으로 다양한 방법을 통해 면역 치료 및 질병억제 목적으로 최근에 전세계적으로 연구 개발되고 있음. 특히 바이러스 질환의 경우 예방백신이나 항바이러스 제제를 개발한다 해도 지속적인 바이러스의 변이 및 내성증가로 인해 그 효과가 일시적이거나 지속적인 개발이 요구되고 있어 이러한 생체내 선천면역 유도를 통해 기존의 예방백신 및 항바이러스 제제의 면역 보강등을 통해 다양한 바이러스 감염에 응용할 수 있음.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증
- ◎ 분자량별, 농도별 폴리감마글루탐산의 면역활성 효능 검증 (마우스 면역세포에서 인터페론 및 염증관련 유전자, 단백질의 발현 유도 검증, 면역세포내 항바이러스 단백질인 Mx 단백질의 발현여부 등)을 확인하여 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능의 가능성 및 면역활성 여부를 검증을 위한 *In Vitro*

세포 자극 실험연구

● 뉴켓슬병(ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효과 검증

- ◎ 마우스 면역세포 및 chicken embryo fibroblast 세포, chicken peripheral blood monocyte (PBMC) 세포에서의 형광물질 (GFP)이 융합된 뉴켓슬병(ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (*In Vitro*)
- ◎ 폴리감마글루탐산의 동물(닭) 임상실험으로부터의 뉴켓슬병 (ND) 바이러스 감염 효능 검증 연구 (*In Vivo*)

● 인플루엔자바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효과 검증

- ◎ 마우스 면역세포에서의 형광물질 (GFP)이 융합된 인플루엔자 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (*In Vitro*)
- ◎ 세포내 폴리감마글루탐산에 의한 항바이러스 단백질 유전자의 변화에 따른 항바이러스 효과
- ◎ 세포내 TRIP 억제 peptide 를 이용한 폴리감마글루탐산의 항바이러스 작용 기전 연구 및 대조 실험
- ◎ 폴리감마글루탐산의 닭에서의 항인플루엔자 감염 억제 효과 검증 (*In Vivo*)

● 초고분자량 폴리감마글루탐산의 대량생산공정 확립

- ◎ 초고분자량 폴리감마글루탐산의 대량생산공정 확립
- ◎ 고분자 폴리감마글루탐산 생산을 위한 배양조건 최적화 연구
- ◎ 고분자 폴리감마글루탐산을 산업적 규모로 대량 생산하기 위한 scale-up 검토 및 최적화 연구
- ◎ 고분자 폴리감마글루탐산 생산 공정 개발
- ◎ 일반 기준 규격, 시험법 및 자체 설정 (분자량 및 함량 측정법 등) 규격 확립
- ◎ 폴리감마글루탐산 제형 확립
- ◎ 폴리감마글루탐산 제품 생산공정 최적화
- ◎ 폴리감마글루탐산의 동물용의약품 시제품 생산
- ◎ 일반기준규격, 시험법 및 자체규격 (분자량 측정) 확립
- ◎ 바이러스 감염억제 활성검증 시험법 확립 및 시설 보안

● 폴리감마글루탐산의 안전성 시험

- ◎ 국소독성시험으로 토끼를 이용하여 피부자극시험, 2주간 연속피부자극성시험, 안자극시험을 시험
- ◎ 면역독성시험으로 기니피그를 이용하여 광감작시험과 피부감작성시험
- ◎ 광독성시험으로 기니피그를 이용하여 수행
- ◎ 폴리감마글루탐산의 닭에 대한 근육투여 용량에 대한 안전성 시험

● 폴리감마글루탐산의 독성 시험

- ◎ 마우스와 비글견을 이용한 근육주사 독성시험
- ◎ 랫트와 토끼를 이용한 생식독성(최기형성) 시험

● **폴리감마글루탐산의 약리, 잔류, 대사 시험**

◎ ICP-MS를 이용한 체내에서 Gd이 부착된 폴리감마[®]의 정량화를 통한 잔류 및 대사시험 수행

● **폴리감마글루탐산의 면역유도 및 현장적용 기술**

- ◎ 뉴캐슬병(ND) 바이러스 백신과의 병용투여에 의한 폴리감마글루탐산의 면역증강 및 백신효능 증가 효과 검증
- 상용화되어 있는 뉴캐슬병(ND), 닭전염성기관지염(IB) 바이러스 혼합백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 백신 효능 증가 및 면역증강 효과 검증
- 인플루엔자 바이러스의 peptide subunit 백신을 이용한 폴리감마글루탐산의 병용 투여에 의한 백신 효능 증가 및 면역 증강 효과 검증

IV. 연구개발결과

● **폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증**

- ◎ 분자량별, 농도별 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위한 In vitro 세포 자극 실험연구
- 분자량별, 농도별 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위해 면역세포인 macrophage 세포에 분자량별, 농도별 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 (1) 면역세포의 분화 정도 비교, (2) 인터페론 및 염증관련 유전자의 발현 유도여부 등을 확인, (3) 면역세포내 항바이러스 단백질인 Mx 단백질의 발현 여부, (4) 인터페론의 분비여부, (5) 염증성 cytokine들의 분비여부 등을 확인하여 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능의 가능성 및 면역활성 여부를 검증

● **뉴캐슬병(ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효과 검증**

- ◎ 형광물질 (GFP)이 융합된 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (In vitro)
- 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효능을 확인하기 위해 다음의 실험을 mouse macrophage 세포에서 확인 (1) 폴리감마글루탐산의 직접적인 바이러스 inactivation 효능 검증 (2) 폴리감마글루탐산의 간접적인 바이러스 억제 효능 검증, 즉 ① 폴리감마글루탐산의 처리 시간별 억제 효능 검증, ② 폴리감마글루탐산의 분자량별 억제 효능 검증, ③ 폴리감마글루탐산의 농도별 억제 효능 검증, ④ 폴리감마글루탐산 처리에 의한 뉴캐슬병(ND) 바이러스 RNA 복제 억제 시험, ⑤ 폴리감마글루탐산 처리에 의한 뉴캐슬병(ND) 바이러스 유도 세포독성 억제시험등을 검증
- 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효능을 확인하기 위해 chicken embryo fibroblast세포에서 감염억제 효능 검증
- ◎ 폴리감마글루탐산의 SPF 병아리실험으로부터의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 효능 검증
- SPF 병아리의 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 LD₅₀를 확인 실험

- SPF 병아리에 대한 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 10LD₅₀를 이용하여 SPF 병아리를 대상으로 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능 (비강경로) 검증

● **인플루엔자바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효과 검증**

- ◎ 형광물질 (GFP)이 융합된 인플루엔자 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (In vitro)
- 인플루엔자 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효능을 확인하기 위해 다음의 실험을 mouse macrophage 세포에서 확인 (1) 폴리감마글루탐산의 직접적인 바이러스 inactivation 효능 검증 (2) 폴리감마글루탐산의 간접적인 바이러스 억제 효능 검증, 즉 ① 폴리감마글루탐산의 처리 시간별 억제 효능 검증, ② 폴리감마글루탐산의 분자량별 억제 효능 검증, ③ 폴리감마글루탐산의 농도별 억제 효능 검증, ④ 폴리감마글루탐산 처리에 의한 인플루엔자 바이러스 억제 시험
- TRIF 단백질 억제를 유도한 면역세포에서 인플루엔자 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효능 검증
- ◎ 폴리감마글루탐산의 SPF 병아리실험으로부터의 인플루엔자 바이러스 감염 효능 검증
- SPF 병아리와 마우스의 약독 인플루엔자 바이러스의 감염 실험
- SPF 병아리에 대한 약독 인플루엔자 바이러스를 이용하여 SPF 병아리를 대상으로 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능 (비강 및 근육경로) 검증

● **초고분자량 폴리감마글루탐산의 대량생산공정 확립**

- ◎ 초고분자량 폴리감마글루탐산의 대량생산공정 확립
- 폴리감마글루탐산의 생산성 검토를 위한 배양 조건의 최적화로서 (1)아미노산 첨가효과 (2) 미네랄 첨가효과 (3) NaCl 첨가효과에 의한 배양조건 검토
- ◎ 고분자 폴리감마글루탐산 생산을 위한 배양조건 최적화 연구
- 고분자 폴리감마글루탐산의 30 L 생산 실험에서 26시간 배양 후 OD 600 nm 10.6 정도의 균성장을 확인할 수 있었으며, 폴리감마글루탐산 생산량은 39.52 g/L 의 yield 와 1.52 g/L/h 의 productivity를 확인
- ◎ 고분자 폴리감마글루탐산을 산업적 규모로 대량 생산하기 위한 scale-up 검토 및 최적화 연구
- 고분자 폴리감마글루탐산의 500 L scale up 실험에서 24시간 배양 후 OD 600 nm 9.0 정도의 균성장을 확인할 수 있었으며, 폴리감마글루탐산 생산량은 36.72 g/L 의 yield 와 1.53 g/L/h 의 productivity를 확인
- ◎ 고분자 폴리감마글루탐산 생산 공정 개발
- Scale-up(5,000 L 발효조)을 통한 저분자 및 고분자 폴리감마글루탐산 대량생산공정 확립

- ◎ 일반 기준 규격, 시험법 및 자체 설정 (분자량 및 함량 측정법 등) 규격 확립
- 고분자량 폴리감마글루탐산의 평균분자량 측정법을 겔여과법과 광산란법 등의 다양한 측정법을 상호 보완하여 신 인플루엔자 바이러스 감염억제 활성 보유 평균분자량 측정 및 기준 규격을 확립
- 고분자량 폴리감마글루탐산의 유효성분 함량 기준 확립을 위하여 아미노산 측정법 및 겔여과법을 상호 보완하여 유효성분 함량 기준규격을 확립함
- 고분자량 폴리감마글루탐산의 바이러스 감염억제 활성 측정 확립을 위하여 시험법을 하기와 같은 프로세스를 통하여 본 제품 규격 및 품질관리에 활용함

● 폴리감마글루탐산의 안전성 시험

- ◎ 국소독성시험으로 토끼를 이용하여 피부자극시험, 2주간 연속피부자극성시험, 안자극시험을 시험
- 국소독성시험한 결과 폴리감마글루탐산은 토끼 피부에 자극이 없으며, 연속피부자극성이 없는 물질로 판단되었으며, 안점막에 대해서도 자극이 없는 것으로 확인
- ◎ 면역독성시험으로 기니픽을 이용하여 광감작시험과 피부감작성시험
- 면역독성시험을 수행한 결과 모든 예에서 피부반응이 나타나지 않아 광감작이 없고, 피부감작이 없는 물질로 확인
- ◎ 광독성시험으로 기니픽을 이용하여 수행
- 피부에 광독성 유발 가능성을 검토하기 위해 기니픽을 이용하여 시험한 결과 광독성이 없는 물질로 확인
- ◎ 폴리감마글루탐산의 닭에 대한 근육투여 용량에 대한 안전성 시험

● 폴리감마글루탐산의 독성 시험

- ◎ 마우스와 비글견을 이용한 근육주사 독성시험
- 마우스와 비글견에 폴리감마글루탐산을 1회근육주사하고 중독증상, 체중변화를 관찰하고 부검하여 관찰한 결과 독성이 관찰되지 않음 확인
- ◎ 랫트와 토끼를 이용한 생식독성(최기형성) 시험
- 랫트와 토끼를 이용하여 폴리감마글루탐산을 근육주사하고, 임신기간, 태자 및 태반의 무게, 성비, 흡수 된 태아 등 이상 유무 관찰한 결과 독성이 관찰되지 않음 확인

● 폴리감마글루탐산의 약리, 잔류, 대사 시험

- ◎ ICP-MS를 이용한 체내에서 Gd이 부착된 폴리감마[®]의 정량화를 통한 잔류 및 대사시험 수행
- 시간에 따라서 간, 비장, 폐, 신장에 분포하는 폴리감마글루탐산의 양이 줄어드는 것을 확인
- 투여한 폴리감마글루탐산이 체내 대사작용에 의해 분해되거나 체외로 배출됨을 확인

● 폴리감마글루탐산의 면역유도 및 현장적용 기술

- ◎ 뉴캐슬병(ND) 바이러스 백신과의 병용투여에 의한 폴리감마글루탐산의 면역증강 및 백신효능 증가 효과 검증
- 상용화되어 있는 뉴캐슬병(ND), 닭전염성기관지염(IB) 바이러스 혼합백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 백신 효능 증가 및 면역증강 효과 검증
- ◎ 인플루엔자 바이러스의 peptide subunit 백신을 이용한 폴리감마글루탐산의 병용 투여에 의한 백신 효능 증가 및 면역 증강 효과 검증
 - 인플루엔자바이러스의 주요항원 부위인 HA 단백질을 이용한 peptide 백신을 이용한 폴리감마글루탐산의 혼합 투여를 통한 면역증강 및 공격집종을 통한 방어능 증강 효과 검증

V. 연구성과 및 성과활용 계획

● 연구성과 및 활용계획

- ◎ 동물의 질병 억제를 위한 면역 증강 유도 방법은 병원체의 다양한 변이와 지속적인 기술 개발의 요구를 새로운 방법으로 해결할 수 있는 방법으로 전 세계적으로 다양한 바이러스 질병 예방 및 퇴치를 위해 시도되고 있음
- ◎ 특히 TLR 는 병원체를 인식하는 최첨단의 세포 방어 molecule 이며 이를 이용한 새로운 agonist 의 개발은 직접적인 면역 유도 증강은 물론 새로운 백신의 효능 증강을 위해서도 매우 시급한 기술로 다양한 활용성이 있음
- ◎ 새롭게 밝혀진 동물 종에 따른 면역유도 기능의 차이점을 확인하여 적절한 종에 따른 개발 계획의 수립 및 적용 또한 병원체에 따른 효과 검증의 차이점을 활용하여 새로운 개발 전략 수립에 활용함
- ◎ 폴리감마글루탐산은 Bacillus subtilis 가 분비하는 고분자 biopolymer 로서 TLR 4를 매개로 하는 특이 작용 및 이를 이용한 면역 증강 효과 및 항바이러스 효과를 본 연구진이 세계 최초로 규명하고 다양한 질병에 적용하고자 하였으며 특히 우리나라에 큰 피해를 일으키고 있는 인플루엔자에 대해서는 그 효과가 입증되어 닭에서 적용될 수 있는 경제적 방법으로 활용될 수 있음
- ◎ 기존의 질병백신이 아닌 새로운 형태 다양한 백신 제형에 추가되어 백신의 면역 유도능을 증가 시킬 수 있는 면역증강제로 활용될 수 있으며 특히 점막 투여 백신의 경우 점막 면역 유도에 뚜렷한 효과가 있음
- ◎ 대단위의 산업동물의 면역유도를 통한 바이오폴리머제제의 개발은 투여 방법의 개선 및 사

양관리의 용이성으로 인해 산업적으로 큰 경제적 이익을 추구할 수 있음 또한 제형에 따른 효능 효과에 차이로 인해 신물질의 적용 제형 개발에 활용함

- ◎ 상기 기술에 의한 바이오폴리머제제의 개발은 낮은 생산비용, 안정성 및 사양이 용이하고 비용이 저렴한 이점들을 가지고 있어 막대한 경제적 이점을 갖고 있음
- ◎ 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 사용으로 항생제 사용감소에 따른 항생제 오남용으로 인한 양계농가의 항생제잔류 및 내성문제를 해결할 수 있는 대안을 확보할 것으로 기대됨
- ◎ 연구개발의 결과로 생산되는 항바이러스 억제제 제품의 수요증가로 국내 동물약품회사의 매출증대에 기여함은 물론, 국내자원을 이용한 안정적인 공급량 확보로 수입동물약품에 비해 경제적 측면에서 양계농가의 부담을 덜어줄 수 있으며, 동물약품의 수입대체 효과 및 해외수출을 통한 국부창출이라는 이중 효과를 거둘 것으로 기대됨
- ◎ 폴리감마글루탐산을 이용한 바이러스 억제제 개발은 국내 양계산업 및 더 나아가 축산을 비롯한 인간의 바이러스성 질병을 억제하기 위하여 활용할 수 있는 기술을 확립함으로써 고부가가치의 생명과학 제품개발의 활성화 및 원천기술 확보에 따른 이 분야에 대한 국제 경쟁력 강화를 통한 시장선점이 기대됨

SUMMARY

(영문요약문)

In the first line of defense against viruses, innate immune responses including type 1 interferons and cytokines such as IL-1 beta initiate host antiviral responses. The discovery in 2000 that two proteins from vaccinia virus interfere with Toll-like receptor (TLR) signalling was the first indication that TLRs might be important in the sensing of viruses. TLRs are type 1 integral membrane glycoproteins consisting of an extracellular ligand binding domain composed of leucine rich repeats, as well as an intracellular Toll/interleukin 1 receptor (TIR) domain. Ligands for TLRs are conserved structural motifs on microbes, termed pathogen (or microbe)-associated molecular patterns (PAMPs). These PAMPs include lipopolysaccharide (LPS), flagellin, lipoproteins, glycolipids, and nucleic acids of bacterial, viral, parasitic or fungal origin. After ligand binding, various adaptor molecules are recruited to the intracellular domain of TLRs. These adaptor molecules include myeloid differentiation factor 88 (MyD88), TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP), TIRAP inducing interferon β (TRIF). Signalling culminates in the activation of transcription factors, such as nuclear factor (NF)- κ B, activating protein (AP)-1, interferon regulatory factor (IRF) 3 and 7, thereby leading to the production of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , chemokines and type I interferons (IFN). In addition, signalling promotes the maturation of antigen-presenting cells (APCs). Importantly, TLR ligands may promote certain cytokine milieu that influence the differentiation of naive T-helper (T_H) cells towards either a T_H 1 or T_H 2 phenotype, conferring protective immunity in the host. This ability of TLR agonists to modulate both the innate and the adaptive immune system has led to their exploitation as both prophylactic agents to enhance host immunity to pathogens, as well as being used as vaccine adjuvants to induce robust immune responses. As a new compound, poly-gamma-glutamic acid was revealed by us showed TLR 4 agonist and induce innate immune responses in animals and human. In this project, we have performed to explored the possibility of PGA for antiviral agent against viral infections (NewCastle Disease Virus and Influenza Virus) in chicken. We have shown the results that the PGA induce the immune responses relating innate immunity in animals. Even though the absence of TRIF signal protein in chicken the immune responses induced by PGA reduced the replication of less pathogenic influenza virus but not effect to highly pathogenic NDV. The PGA also induce robust immune responses to protect lethal challenge of influenza virus. The PGA as a TLR agonist would be very useful strategy to protect the animal and human infectious diseases.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1 : Introduction

Chapter 2 : Status of Technical Development

Chapter 3 : Procedures and Results of Technical Development

Chapter 4 : Establishment of Project and Relative Contribution

Chapter 5 : Application of Results in Advance

Chapter 6 : Foreign Research Information in Process

Chapter 7 : Research Facility and Equipments

Chapter 8 : References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설·장비 현황

제 8 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

- 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산을 이용하여 양계에서 문제가 되어 온 뉴캐슬병(ND) 바이러스와 닭 인플루엔자 바이러스 질병에 대한 억제제를 개발
- 뉴캐슬병(ND) 바이러스와 닭 인플루엔자 바이러스 억제제의 국내외 특허 출원 및 등록
- 뉴캐슬병(ND) 바이러스와 닭 인플루엔자 바이러스 억제제의 인허가 및 제품화

제 2 절 연구의 필요성 및 범위

1. 국내외 관련연구의 현황 및 문제점

가. 뉴캐슬병 (Newcastle Disease)

- 뉴캐슬병 (Newcastle disease)은 가금에서 치명적이고 전염성이 강한 제1종 가축전염병으로 백신을 접종하지 않은 닭에 감염될 때는 100% 폐사율을 초래하며, 적절한 백신을 하지 않는 경우 호흡기 및 소화기 증상과 산란계에서 산란율 저하로 막대한 경제적인 피해를 일으키는 치명적인 질병임
- 국내의 경우 닭에 발생하는 발생률이 계속 증가하고 있으며 한지역에 국한되지 않고 전국적으로 발생하는 추세에 있으며 양계 농가에 큰 피해를 주고 있음
- 뉴캐슬병의 주요증상은 처음에 졸기 시작하여 콧물, 기침 등의 호흡기 증상이 나타나고, 녹색설사를 하다가 폐사. 또한, 적절한 백신을 하지 않은 경우 백신항체가 낮은 산란계나 종계는 산란율이 떨어지거나 중지되기도 하고, 예방접종을 했다고 하더라도 접종 시기나 방법이 잘못되어 항체가 높지 않은 닭에서는 다리 와 목이 마비되는 신경증상이 나타나기도 함 (Korean J. Vet. Res., 40: 563-573, 2000).
- 뉴캐슬병을 예방하기 위해서 사용되는 백신은 크게 생독백신과 사독백신으로 구분됨
- B1주와 La Sota주 (Clone주 포함)는 국내뿐 만 아니라 전 세계적으로 가장 널리 사용되어 온 대표적인 뉴캐슬병 생독백신주이고 최근 생독백신접종시 나타나는 백신접종반응을 최소화시키기 위하여 각종 생독백신들이 개발되어지고 있음.
- 그러나 뉴캐슬병 생독백신의 문제점은 최근 주로 동절기 육계농장에서 자주 확인이 되며, 특히 2-3회의 생독백신 접종에도 불구하고 뉴캐슬병이 발생하여 지역적으로 유행화되고 있어 문제시 되고 있다 (Korean J. Vet. Res., 40: 563-573, 2000).

- 뉴캐슬병 사독백신은 뉴캐슬병, 닭전염성기관지염, 산란저하증 등 3종 이상의 질병을 동시에 예방할 수 있는 다가혼합 사독오일백신이 개발되어 전 세계적으로 사용되고 있음 그러나 이역시 산란계 농장의 경우 면역력 저하로 인한 뉴캐슬병 발생 피해사례가 늘어나고 있고, 특히 동절기 산란계 농장의 경우 뉴캐슬병 발생이 지역적으로 유행화되어 산란저하 유발에 따른 경제적 피해를 가중시키고 있음. 육계와는 달리 수차례의 생독백신과 사독백신을 접종함에도 불구하고, 폐사는 일어나지 않지만 산란율 저하피해는 매우 심각한 경우가 많은 것으로 보고되고 있음
- 또한 사독백신 제조용 뉴캐슬병 백신주가 최근 유행하고 있는 유전자형 VII형 뉴캐슬병 바이러스 유행주를 얼마나 효과적으로 방어할 수 있는가 하는 문제점이 지적되고 있다. 그러나 산란저하까지 완벽하게 막아줄 수 있는 뉴캐슬병 사독백신은 아직까지 전 세계적으로 개발되어 있지 못한 실정임 (Darrell R. Kapczynski et al., Vaccine, 23, pp3424-3433, 2005).
- 앞서 언급한 내용처럼 뉴캐슬병을 예방하기 위해서는 백신을 접종하거나 위생적인 사육시설 관리를 행하는 것이 필요함. 그러나 백신접종의 경우 백신의 효율성이 낮아 예방에 많은 문제점을 가지고 있음. 따라서 백신의 예방능력을 보통해 줄 수 있는 항바이러스 억제제의 개발에 의한 뉴캐슬병의 철저한 예방 및 치료의 관리가 요구됨.

2) 닭의 조류인플루엔자 (Avian Influenza ; AI)

- 닭의 조류인플루엔자 (AI)는 조류인플루엔자 바이러스에 의해서 발생하는 닭의 급성 전염병으로서, 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 양계산업에 많은 경제적 피해를 유발하고 있는 주요 생산성 저하 질병 중의 하나임
- 조류인플루엔자 A형 바이러스 (Avian influenza virus type A: AIV type A) 감염에 의한 가금류의 전염병을 말한다. 감염시 임상증상은 감염된 바이러스의 독력, 숙주의 나이, 숙주의 2차 세균 감염 여부 및 숙주의 사양 환경조건 등에 따라 호흡기 증상, 설사, 비출 및 다리 청색증, 산란저하(심하면 산란정지), 폐사(심하면 100% 폐사) 유발 등 매우 다양한 임상 소견이 관찰된다. 특히 가금인플루엔자 바이러스는 독력 분류기준에 따라 고병원성 바이러스·약병원성 바이러스 및 비병원성 바이러스로 분류할 수 있으며, 고병원성 가금인플루엔자 (Highly pathogenic avian influenza : HPAI)는 국제수역사무국(OIE) List A 질병으로써, 국내에서는 제1종 가축전염병으로 분류하고 있다.
- HPAI가 발생한 경우에는 우리나라를 포함하여 전세계적으로 감염계 전수를 살처분 하는 정책을 실시하고 있으며, 살처분 정책을 실시하지 않을 경우 발생국가는 3년간 양계산물을 해외로 수출할 수 없게 된다. 가금인플루엔자는 전파가 빠르고 병원성이 다양하며, 닭, 칠면조, 야생조류등 여러종류의 조류에 감염되는데, 주로 닭과 칠면조에 피해를 주는 급성 바이러스성 전염병으로, 오리(집오리, 철새), 거위, 메추리 등은 임상증상은 잘 나타나지 않으면서 바이러스를 분변으로 배출한다.

- AI를 일으키는 바이러스는 RNA 바이러스로 Orthomyxoviridae의 Orthomyxovirus에 속한다. 이 바이러스는 혈청형이 다양한 것이 특징이며, 혈청형이 다르면 서로 교차방어가 되지 않는다. 현재 Nucleoprotein 및 matrix antigen의 항원성에 따라 Type A, B, C로 크게 나누며 동물의 인플루엔자바이러스는 모두 Type A에 속한다. 다시 Type A는 바이러스의 외막에 붙어있는 HA (Hemagglutinin)와 NA (Neuraminidase)의 모양에 따라 HA는 16종류(H1-H16), NA(N1-N9)는 9종류로 나눈다. 따라서, HA와 NA의 각각 종류가 서로 조합되었을 때는 135종류의 Type A 인플루엔자 바이러스가 존재할 수 있다. AI바이러스는 전혀 증상을 발현시키지 않는 경우에서 100%의 폐사를 일으키는 경우까지 병원성이 매우 다양함
- 주요임상증상으로 고병원성 가금인플루엔자 바이러스가 감염되었을 경우에 특징적으로 75%이상의 폐사를 나타내지만 야외 양계장에서는 다양한 폐사율을 보일 수 있음. 일반적으로 호흡기증상도 발견할 수 있지만, 뉴캐슬병, 전염성, 기관지염, 마이코프라스마병등과 특별히 구별하기 어렵다. 성계에서 다른 전염병과 어느 정도 구별할 수 있는 증상은 비늘의 청색증과 얼굴의 부종이며, 특히 산란계에서는 산란율의 급격한 감소다. 종계나 산란계에서 대부분 뉴캐슬병 오일 백신을 하는 현재의 여건으로 보아 50%-60%의 산란감소가 일어날 경우 가장 먼저 가금인플루엔자를 의심해야 함.
- 약병원성 가금인플루엔자의 경우에도 다양한 폐사율(0-30%)이 나타날 수 있다. 그 이유는 2차감염이나 스트레스 등에 의하여 폐사율이 변할 수 있기 때문이다. 물론, 약병원성 가금인플루엔자 바이러스도 산란율에 영향을 끼치며, 호흡기 증상과 소화기 증상을 동반하기도 함.
- 따라서 닭 뉴캐슬병(ND)과 닭 인플루엔자의 원인 바이러스 억제제를 개발하여 농가에 보급한다면, 직접적으로는 이 들 질병에 대한 백신비용과 방역관리 비용이 감소하고 질병으로 인한 가금 폐사 등의 피해가 감소할 것으로 예상되며, 간접적으로는 2차 세균감염에 사용하는 항생제 및 관련 동물용약품의 사용량 또한 감소효과가 예상된다. 또한 파급효과로 수입 동물약품 대체 효과도 예상되므로 본 연구를 통하여 바이러스 억제제 개발이 절실히 필요함.

2. 기술도입의 타당성

- 국내에서 발생하는 뉴캐슬병(ND)에 대한 예방백신은 여러 종류가 시판되고 있지만 여전히 발병이 계속되고 있고, 닭 인플루엔자 바이러스는 치료제가 없어서 양계농가의 피해가 큰 실정임. 이러한 문제를 극복하기 위하여 국내 청국장에서 분리 추출한 바이오폴리머를 이용한 닭 바이러스 질병에 효과적인 억제제 개발이 본 연구의 목표임. 바이러스 억제제 개발을 위해서는 적합한 물질의 제형연구와 효과적으로 닭에 적용할 수 있는 방법으로 투여 경로, 용법용량, 안전성 및 효능효과에 대한 연구를 거쳐 닭 바이러스 억제제를 제작하기로 함

- 현재까지의 바이러스 질병에 대한 대처는 개개의 질병예방을 위한 백신개발이 주로 이루어졌으나 질병의 다양화 즉, 복합적인 요인들에 의한 복합감염에 따른 예방 효율의 한계 및 관리 비용의 증가로 인해 질병을 총체적으로 예방 및 치료할 수 있는 신개념의 예방 및 치료제 개발이 요구됨. 이를 위해 개체의 선천적 면역 증강을 통한 항 바이러스 효과를 유도하는 제제의 개발은 전세계적으로 주요한 연구개발의 방향이 되고 있음.
- Toll-like Receptor (TLR) 매개 면역증강을 통한 항바이러스 효과
TLR 은 동물과 사람에서 외부 병원체를 인식하는 Pattern recognition receptor (PRR)로 현재 10가지 정도가 알려져 있으며 특히 TLR4는 세균의 LPS를 TLR3는 바이러스 유전자를 인식하여 세포내부에 신호전달 체계를 통해 다양한 면역 기능을 수행하게 됨. TLR의 반응은 두가지 신호전달체계를 통해 전해지며 그중 MyD 88 신호전달 체계를 통해서 NF-kappa B를 항진시켜 다양한 싸이토카인 (IL 1-beta, IL-6, TNF-alpha 등)을 분비하게 하여 항원제시세포를 성숙시키거나 자극하게 되어 면역기능을 항진하게 되며 다른 한편으로는 TRIF 단백질을 통한 신호전달을 통해 Type 1 인터페론 (IFN-alpha, beta)을 분비하게 하여 세포의 항바이러스 항세균 기능을 항진하게 되며 또한 획득면역을 증진하는 역할을 담당함.
- 닭의 TLR 4는 포유류와 유사하며 대식구, B 세포, 비장세포 및 F 낭 세포 등 다양한 세포에 분포하며 특이적인 결합체인 세균의 LPS 를 처리한 경우 대식구의 nitrite 분비, 호흡기 다양한 세포의 염증대미 작용 및 IFN -r를 분비하여 B 세포 등의 항원에 대한 대응을 높임. 그러나 닭에서는 TRIF 단백질을 통한 신호전달에 대한 효율성이 떨어져 Type 1 IFN의 분비가 저하된다는 차이점이 최근 밝혀짐.
- 이러한 TLR 을 매개로한 면역증강 유도 방법은 매우 유용한 선천면역 증강 방법으로 다양한 방법을 통해 면역 치료 및 질병억제 목적으로 최근에 전세계적으로 연구 개발되고 있음. 특히 바이러스 질환의 경우 예방백신이나 항바이러스 제제를 개발한다 해도 지속적인 바이러스의 변이 및 내성증가로 인해 그 효과가 일시적이거나 지속적인 개발이 요구되고 있어 이러한 생체내 선천면역 유도를 통해 기존의 예방백신 및 항바이러스 제제의 면역 보강등을 통해 다양한 바이러스 감염에 응용할 수 있음.

제 3 절 연구개발 추진전략 및 추진체계

1. 연구개발의 추진전략 · 방법

: 본 과제인 “바이오폴리머 이용 가금류 바이러스 억제제 개발”의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 다음과 같은 3개의 세부과제로 구성하여 연구를 수행하고자 함

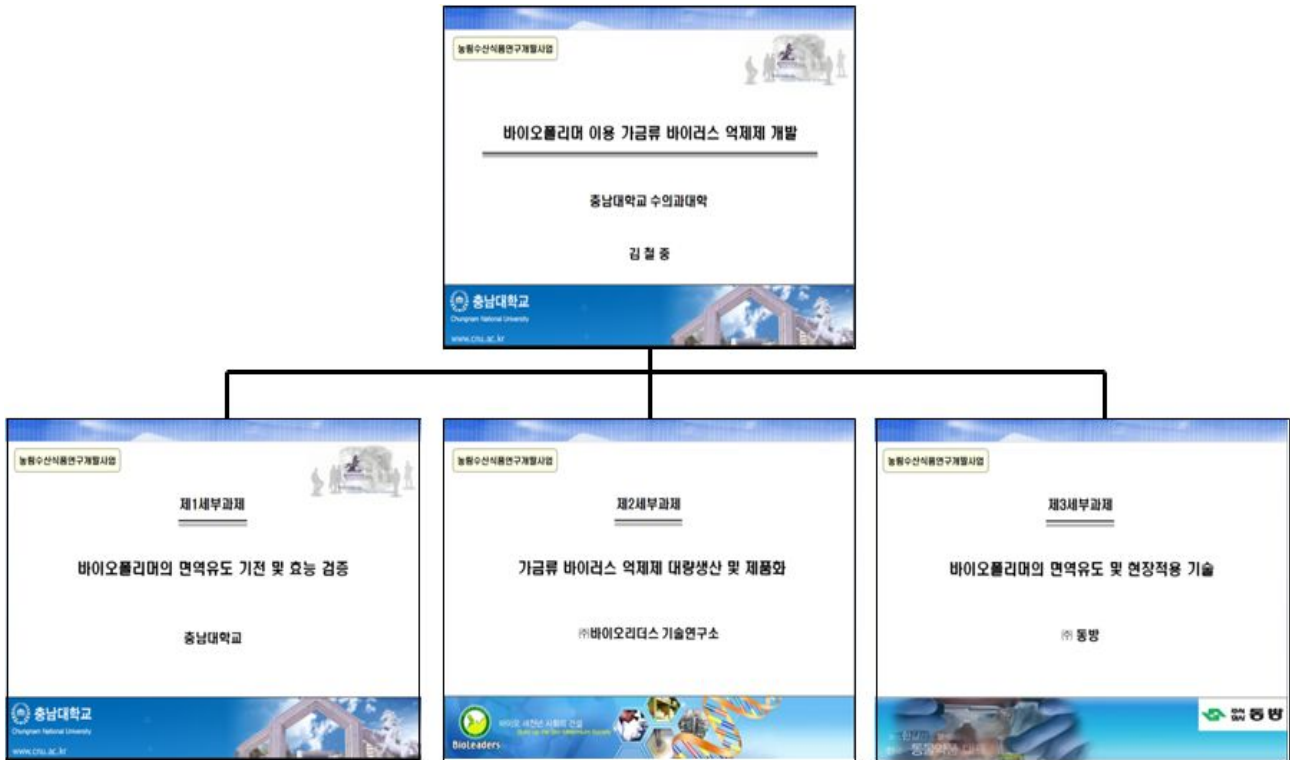


그림 1. 바이오폴리머 이용 가금류 바이러스 억제제 개발 추진전략

: 제1세부과제의 주관기관인 충남대학교(연구책임자: 김철중)에서는 “바이오폴리머의 면역유도 기전 및 효능 검증” 연구를 수행함에 있어서 제2세부과제에서의 바이오폴리머 (분자량별, 제형별 폴리감마글루탐산)를 제공받아 바이오폴리머의 면역활성 기전 및 뉴캐슬병(ND) 바이러스 및 닭 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 억제 효능을 효율적이고 체계적으로 수행하여 바이오폴리머 이용 가금류 바이러스 억제제 개발사업을 추진하고자함

: 제2세부과제의 주관기관인 (주)바이오리더스(연구책임자: 홍승표)에서는 “가금류 바이러스 억제제 대량생산 및 제품화” 연구를 수행함에 있어서 폴리감마글루탐산의 제형개발 및 생산공정의 최적화를 통하여 동물용 의약품 개발을 위해 노력을 할 것이며, 개발 생산된 분자량별, 제형별 폴리감마글루탐산을 제1세부과제에 제공하여 면역활성 연구 및 실험동물을 이용한 효능 기전연구를 수행할 수 있도록 제공할 예정임. 또한 제3세부과제에 제공하여 폴리감마글루탐산의 안전성 및 독성실험을 비롯한 가축의 현장적용 실험을 원활하게 수행할 수 있도록 제공할 예정임.

: 제3세부과제의 주관기관인 (주)동방(연구책임자: 이지훈)에서는 “바이오폴리머의 면역유도 및 현장적용 기술” 연구를 수행함에 있어서 제2세부과제로부터 제형별 폴리감마글루탐산을 제공받고, 제1세부과제에서는 실험동물에서 제형별 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 및 닭 전염성기관지염(IB) 바이러스 감염에 대한 억제 효능 결과를 제공받아 가축 (닭)의 대규모 현장적용 실험을 원활하게 수행할 것이며, 더불어, 제형별 폴리감마글루탐산의 안전성 및 독성실험을 수행하여 바이오폴리머의 항바이러스 제제 제품화 추진에 기본자료를 제공할 예정임.

: 위 세부과제별 연관성은 다음과 같음



그림 2. 세부과제별 효율적 연관성을 통한 제품화 추진

2. 연구개발의 추진체계

: “바이오폴리머 이용 가금류 바이러스 억제제 개발”의 성공적인 수행을 위하여 다음과 같은 추진체계를 수립하였고, 이를 통하여 효율적으로 연구를 수행하고자함

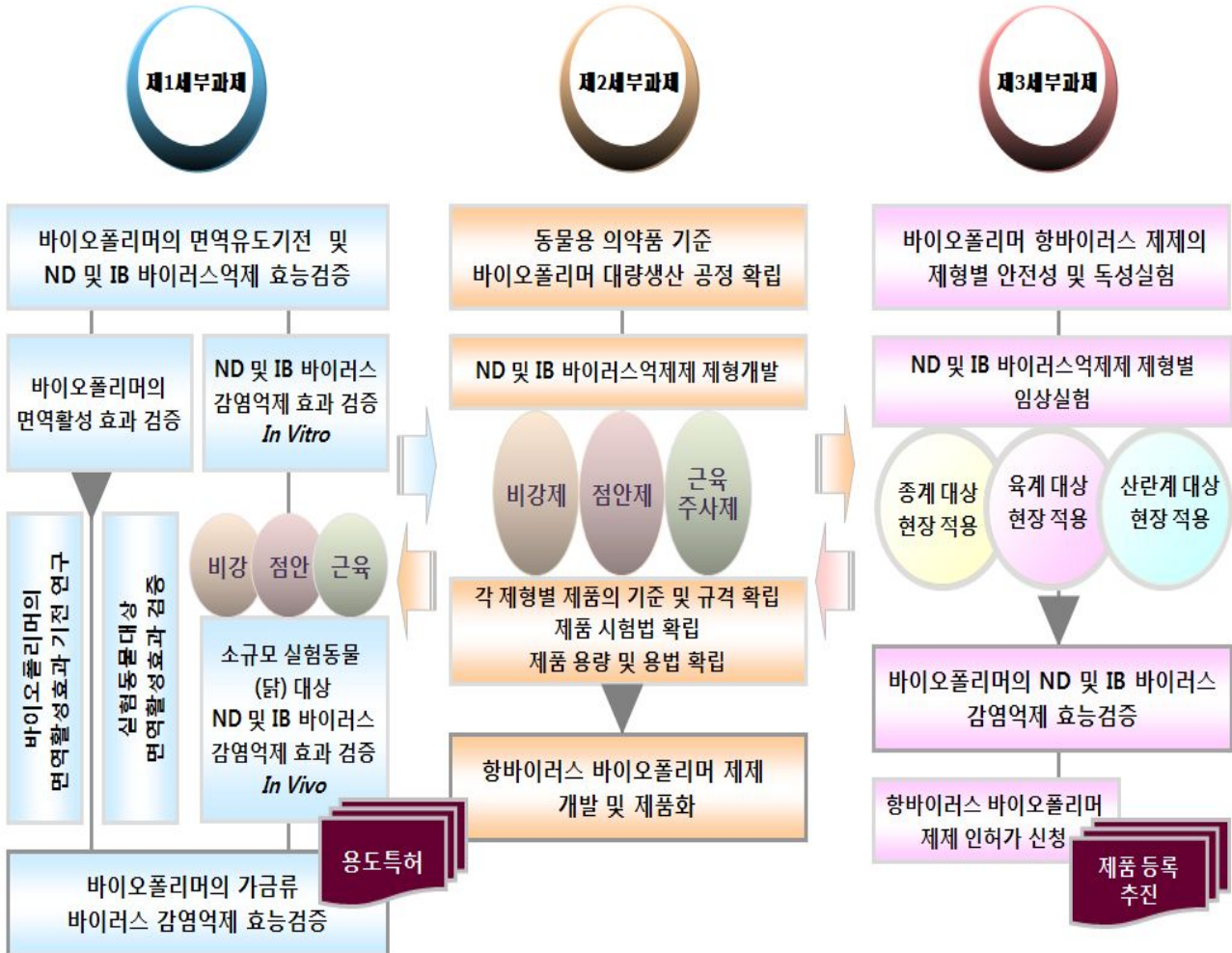


그림 3. 바이오폴리머 이용 가금류 바이러스 억제제 개발 연구의 추진체계



그림 4. 바이오폐리머 가금류 바이러스 억제제 인허가 및 제품화를 위한 추진체계

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
가금용 항바이러스 제제	미국, 유럽, 일본	80%	70%	90%	
항 Newcastle disease virus 제제 및 항 Influenza virus	미국, 유럽, 일본	60%	50%	80%	

가. 특허분석 측면

- 기존 특허는 천연 식물 추출액 (버섯 추출물과 식물 추출물)과 효모 유래 수용성 글루칸에 대한분야에 치중되어 있고, 이외에 인삼(홍삼, 선삼 등), 마늘, 죽염, 콩식품, 발효식품(된장, 고추장, 청국장등), 녹즙, 생강과 각종 야채, 과일, 유기게르마늄, 각종 효모식품, 민물다슬기, 유근피, 자연곡류(현미, 발아현미 등보리,울무, 팥, 차조 등), 각종 해조류(미역, 다시마 등) 등의 물질들을 이용한 면역증강 및 항균활성에 관여한 특허가 있으나, 본 연구과제에서는 물질특허로 보유하고 있는 폴리감마글루탐산을 이용하여 가금류 바이러스에 대한 효능 검증 시스템 구축을 통해 항-바이러스 효능 및 기전연구에 대한 방향으로 연구를 추진하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 기존 특허들의 경우에는 주로 인체 의약품 개발 분야에 치중되어 있고, 특히 가금바이러스에 대한 질병억제제의 목적으로 연구 개발된 예가 거의 없음. 본 연구과제에서는 동물의약품 개발 방향으로 연구를 추진, 특히나 가금바이러스를 대상으로 하여 우선 시장에 진입하고 단일 분획 특성분석이 완료되며 그 성분내 대해 국내 및 국외에 특허를 출원할 계획임

나. 논문분석 측면

- 기존 논문 역시 식물유래의 성분과 항바이러스 및 면역증강을 유도하는 펩타이드 및 화학유도체. 그리고 유효 유산균을 이용한 항바이러스 연구분야 등에 치중되어 있음. 더불어 선행 연구결과물들은 동물의 바이러스 질병을 억제하는 용도의 제제개발 및 연구보다는 사람을 주로 대상으로 하고 있음. 본 연구과제에서는 바실러스 유래의 안전성이 검증된 폴리머인 폴리감마글루탐산에 의한 선천성 면역증강의 개념을 바탕으로 연구를 추진하여 폴리감마글루탐산의 면역증강 기전 및 뉴캐슬병과 닭 인플루엔자에 대한 억제 효능 등을 검증하여 그 결과 등을 국제학술지 등에 게재할 계획임

다. 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 뉴캐슬병과 닭 인플루엔자 대한 치료제는 생산 및 판매가 없으며, 이 질병을 예방하기 위한 여러 종류의 국내백신 및 국외백신이 판매되고 있으나, 여전히 이들 질병 발생은 지속되고 이로 인한 피해가 많은 실정임.
- 본 연구과제에서는 뉴캐슬병과 닭 인플루엔자의 원인 바이러스를 억제제 제품을 개발 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임
- 본 연구과제에서 개발 생산될 닭 바이러스 억제제는 비강제, 점안제, 주사제 형태로 개발하는 방향으로 연구를 추진하여 사용상의 편리성과 효과를 극대화시킬 계획임.
- 닭 바이러스 억제제가 비강제, 점안제, 주사제 형태로 개발될 경우, 이는 세계 최초의 제품이 될 것임.
- 개발 될 닭 바이러스 억제제의 경우 육계, 산란계에 모두 적용이 가능하여 국내에서만 산란계 61,998천수, 육계 68,123천수 전체 138,431천수의 닭에 적용이 가능함.
- 현재 사용중인 백신도 대부분 해외에서 수입한 제품으로 본 연구과제가 성공적으로 진행됨에 따라 외화절약 효과를 거둘 수 있음.

제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- 최근 동물이나 인간의 감염병에 대한 방어 능력을 증진시키기 위한 새로운 연구 전략이 다양하게 수립되고 있음 특히 바이러스 감염 억제를 위한 기존의 예방 백신이나 특정 부위를 대상으로한 항바이러스제는 바이러스의 다양한 변이로 인한 백신의 무력화나 약제에 대한 내성 발현으로 인한 효과 감소 등으로 인하여 질병 예방 및 퇴치에 한계가 있음
- 이러한 기존 질병 예방 및 치료에 대한 전략의 실패로 인해 최근의 세계적인 연구 방향 중에 가장 활발히 추진되고 있는 부분은 생체내에서 병원체 감염에 초기에 대응 하기 위해 동원되는 선천 면역을 증진하고 이를 통해 병원체 감염을 억제하거나 획득면역의 증진을 통한 이후 감염을 제어하려는 방법을 찾고자 다양한 연구가 진행되고 있음
- 특히 최근에 Toll-like receptor 의 기능이 잇달아 밝혀짐에 따라 인간의 바이러스 감염증은 물론 동물에서도 TLR agonist 를 활용한 다양한 동물 질병 억제를 위한 시도가 이루어지고 있음 인간에서는 TLR 3 나 TLR 7 agonist 등이 개발 되어 임상 시험에 돌입한 경우가 있음 (Langford RE et al: 2013: Gastroenterology 144: 1608) 그러나 동물에 적용은 아직 초보적인 수준으로 LPS 나 병원체 단백질을 이용하여 TLR4 와의 반응을 통한 면역증진 및 항 바이러스 기능 증진 등에 대한 연구가 진행되고 있으나 독성으로 인한 문제점 등으로 기초 기전 연구가 수행되고 있음 (Mohamed F et al : Antiviral research 92(2011) 346, Micheal ST et al: Vaccine 30(2012) 4524, Kyoko S et al: Virology J 2011: 8 97)
- 다양한 천연물을 이용한 면역 기능 향진 연구 역시 활발히 수행되고 있으나 천연물의 특성

상 대부분 단일 물질이 아닌 혼합 또는 복합물로 인해 주된 기능 활성 물질에 대한 규명이 어려우며 제제 개발 단계에서의 생산상 및 일관성이 유지되기 어려움 이로 인한 품질관리에서 대부분 신약으로 인정 받기 어려움 또한 아직 정확한 면역 증진 기전이나 생체내 대사, 흡수, 배출 (Pharmacokinetics) 등에 대한 연구가 어려운 단점이 대두되고 있음

- 본 연구는 국내에서 개발된 유익세균인 *Bacillus subtilis* 에서 분비되는 단일 biopolymer 인 폴리감마글루탐산의 TLR4 agonist 작용을 통한 선천 면역 증강 및 획득 면역 증강 작용을 이용한 항바이러스 제제의 개발을 통해 동물에서 주로 빈발하는 바이러스 억제제 및 면역 증강제를 개발하였음
- 본 연구결과는 최근의 감염병 예방을 위한 가장 중요하게 대두되고 있는 미래 적용형 기술 개발로 다양한 형태의 제형 및 제제로 향후 개발 될 수 있으며 현 사람에서는 human papillomavirus 감염에 의한 여성의 자궁경부암 1단계 질환을 치료할 수 있는 기전 및 연구 결과로 임상 2상 (Phase II) 연구가 진행되고 있어 새로운 국내 개발 신약으로의 가능성이 높은 상황임
- 이와 같은 결과는 세계적으로도 TLR를 매개로 면역 증강을 통한 신약 개발에 매우 선도적인 역할을 하고 있음 또한 다양한 바이러스 감염증에 대한 적용 실험을 통해 그 적용 범위를 확대할 수 있어 가능성이 높음

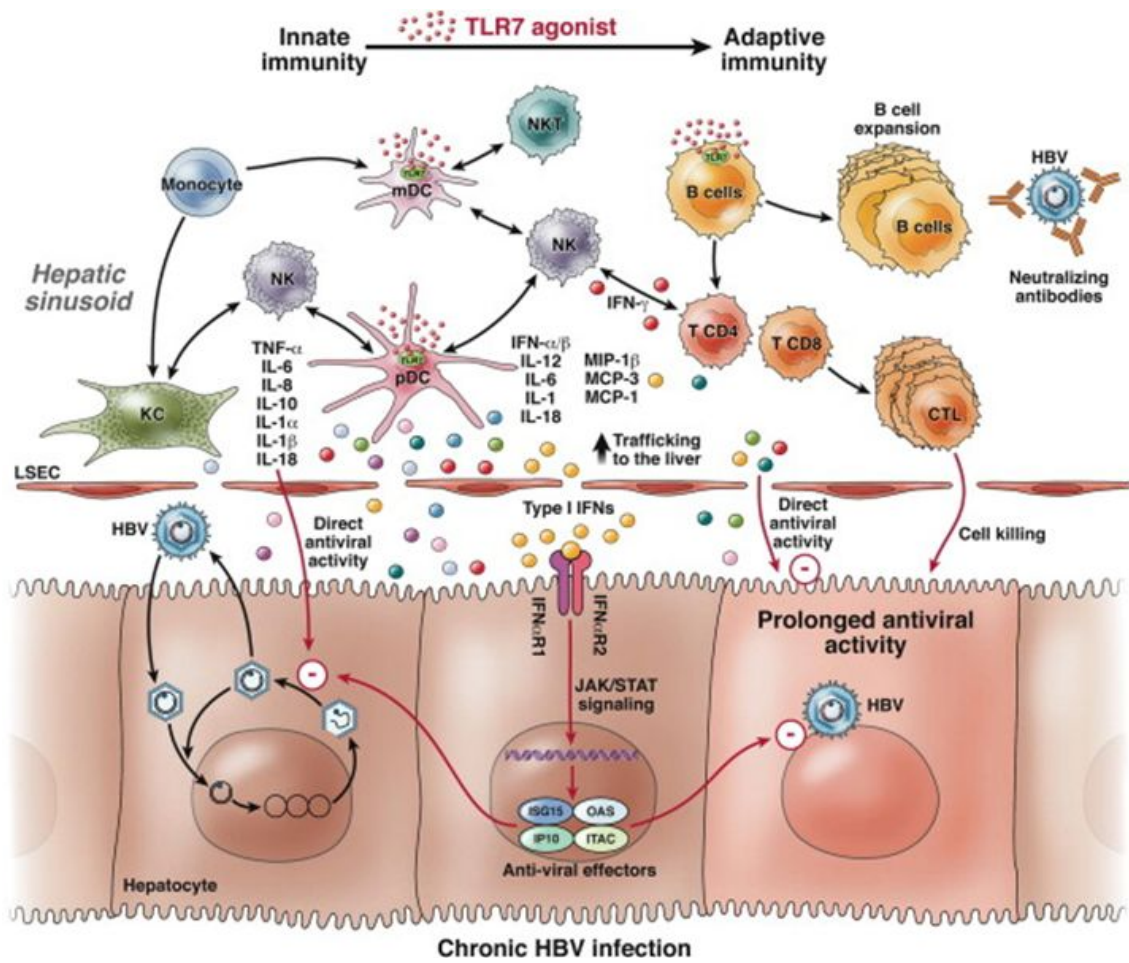


그림 5. TLR agonist 를 이용한 항바이러스 제제의 작용 기전

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 바이오폴리머의 면역유도 기전 및 효능검증

1. 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증 및 항바이러스 효능 검증

◎ 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위해 면역세포인 macrophage 세포에 고분자의 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 면역세포의 분화 정도를 비교해 본 결과 그림 1에서 보는 LPS와 비슷하게 macrophage 세포가 분화됨을 확인하였음.

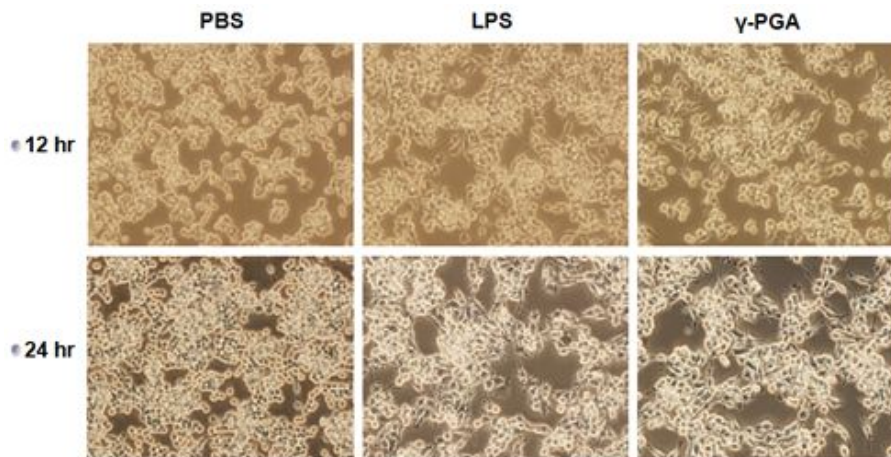


그림 1. 폴리감마글루탐산에 의한 면역세포의 분화

◎ Macrophage 세포에 고분자의 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 자극된 면역세포의 인터페론 및 염증 관련 유전자의 발현 유도여부를 확인한 결과 그림 2에서와 같이 다양한 인터페론 관련 유전자들과 염증 사이토카인을 포함한 유전자의 발현이 시간이 지남에 따라서 유도 증가됨을 확인하였음.

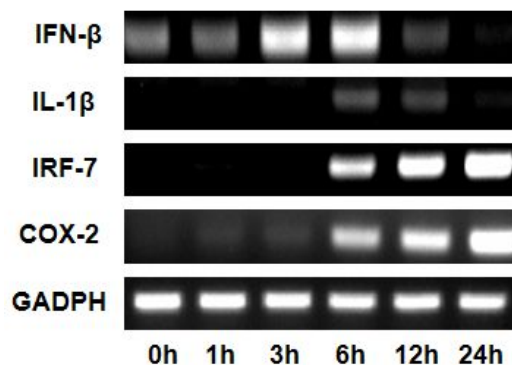


그림 2. 폴리감마글루탐산에 의한 면역세포에서의 인터페론 및 염증 관련 유전자 발현

◎ Macrophage 세포에 고분자의 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 자극된 면역세포내 항바이러스 역할에 중요한 단백질인 Mx 단백질의 발현여부를 확인한 결과 그림 3에서와 같이 Mx 단백질의 발현이 시간이 지남에 따라서 유도 증가됨을 확인하였음.

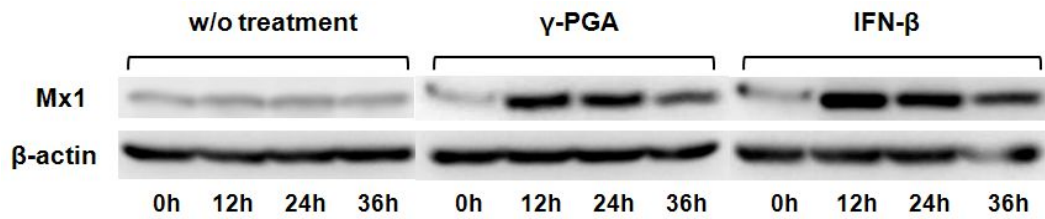


그림 3. 폴리감마글루탐산에 의한 면역세포에서의 Mx 단백질 발현

© Macrophage 세포에 고분자의 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 자극된 면역세포에서 분비되는 인터페론 베타 (IFN-B)의 분비여부를 ELISA를 이용하여 확인한 결과 그림 4와 5에서와 같이 LPS와 비슷하게 IFN-B의 분비를 자극시켰음.

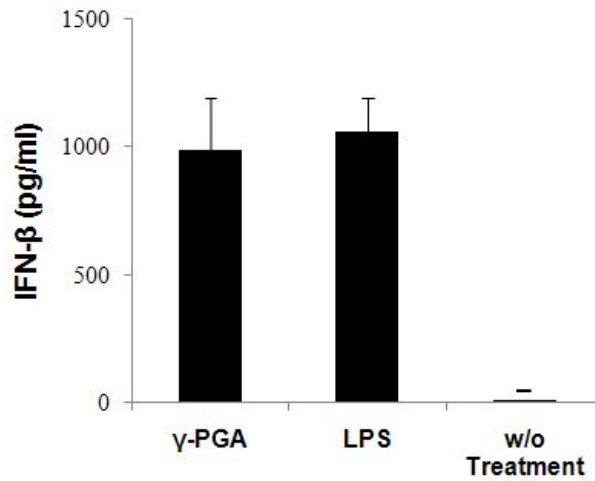


그림 4. 폴리감마글루탐산에 의한 면역세포에서의 IFN-B 분비 발현

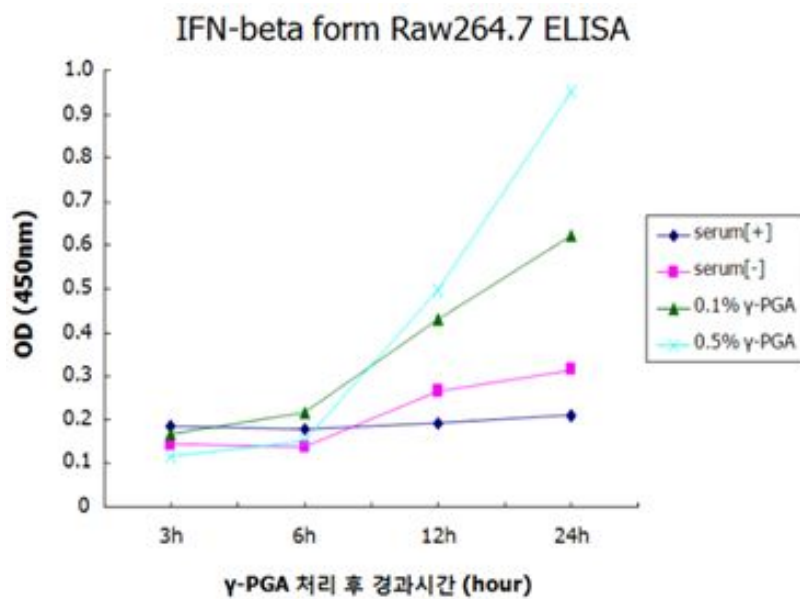


그림 5. 폴리감마글루탐산에 의한 면역세포에서의 IFN-B 분비 발현

© Macrophage 세포에 고분자의 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 자극된 면역세포에서 분비되는 염증 사이토카인의 분비여부를 ELISA를 이용하여 확인한 결과 그림 6에서와 같이 LPS와 비슷하게 TNF- α , IL-6, IL-12등의 분비를 확인하였음.

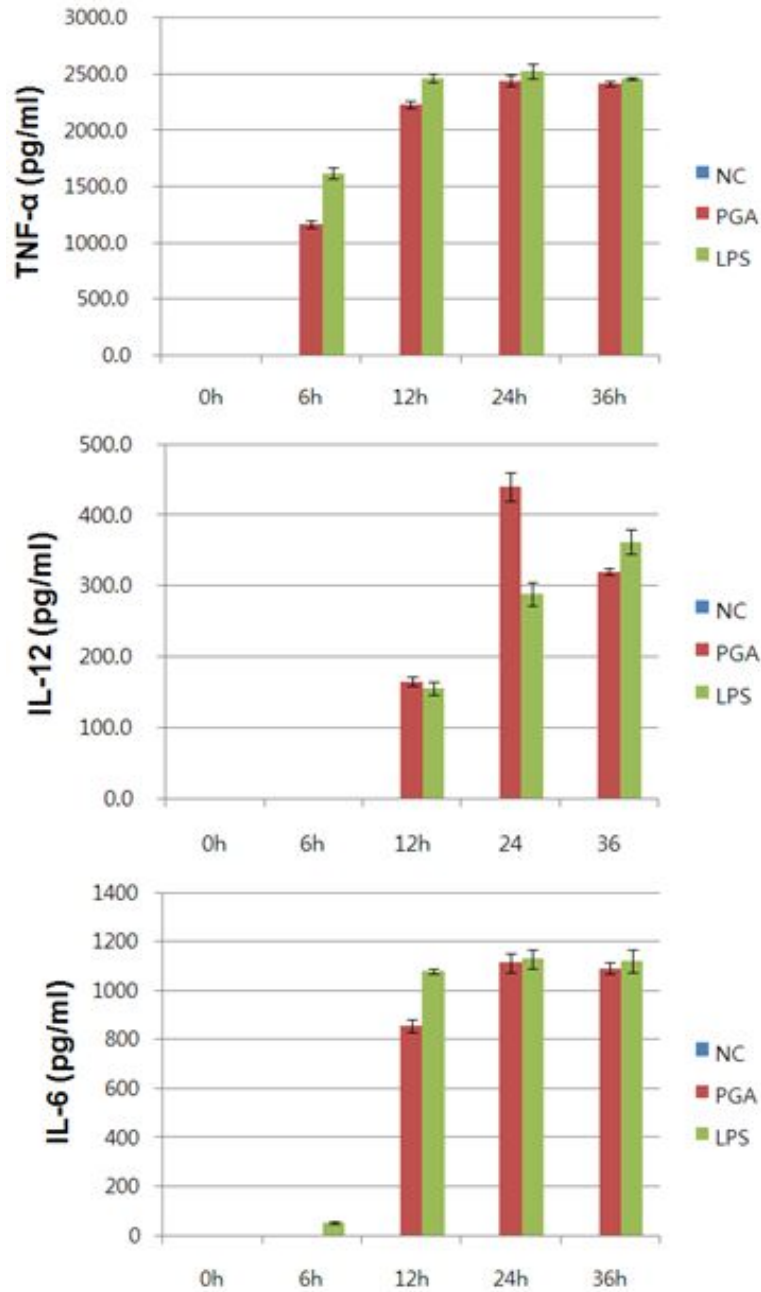


그림 6. 폴리감마글루탐산에 의한 면역세포에서의 염증 사이토카인 분비발현

© 상기의 결과들로 폴리감마글루탐산이 면역계의 일차적인 면역반응 및 바이러스 억제활성에 주요한 역할을 하는 대식세포 자극제로서 우수한 효과를 가진다는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 인터페론 경로를 자극시켜 항바이러스 효능 및 면역활성 효능을 나타낼 수 있는 있음을 확인하였음.

2. 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효과 검증

◎ 고분자 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효능을 확인하기 위해 우선 고분자의 폴리감마글루탐산과 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 co-incubation 시킴으로 인해 폴리감마글루탐산이 직접적으로 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 영향을 주는지 확인을 한 결과 그림 7 (macrophage cell line)과 8 (Vero cell line)에서 보는 바와 같이 고분자 폴리감마글루탐산은 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 직접작용하지 않음을 확인하였음.

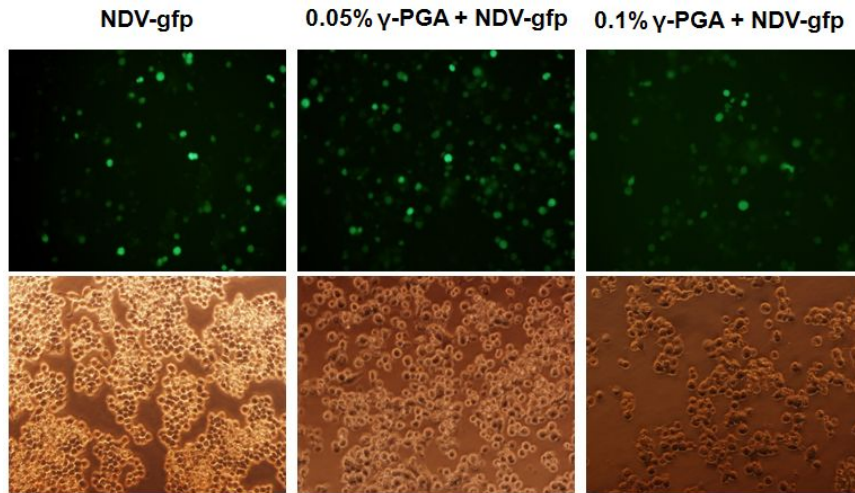


그림 7. 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 직접적 효능

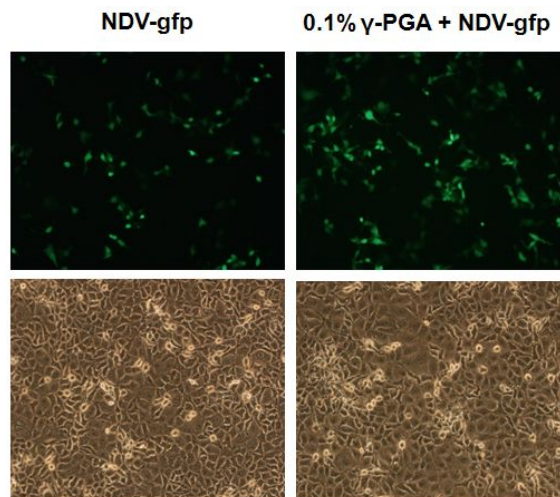


그림 8. 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 직접적 효능

◎ 분자량별 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효능을 확인하기 위해 분자량이 다른 폴리감마글루탐산을 macrophage cell line에 자극을 시킨 후 GFP를 발현하는 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 감염시켰을 결과 그림 9에서 보는 바와 같이 고분자쪽의 폴리감마글루탐산이 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제에 효과적임을 확인하였음.

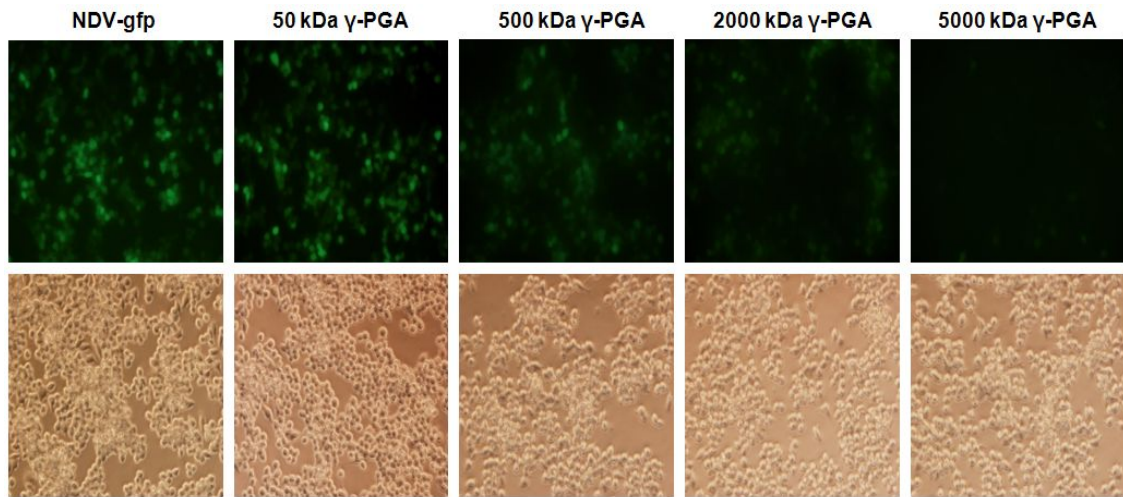


그림 9. 분자량별 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 억제 효능

◎ 다양한 농도의 고분자 폴리감마글루탐산을 이용하여 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효능을 확인한 결과 그림 10에서 보는 바와 같이 0.02%이상의 저농도 폴리감마글루탐산에서도 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효과를 확인할 수 있었음.

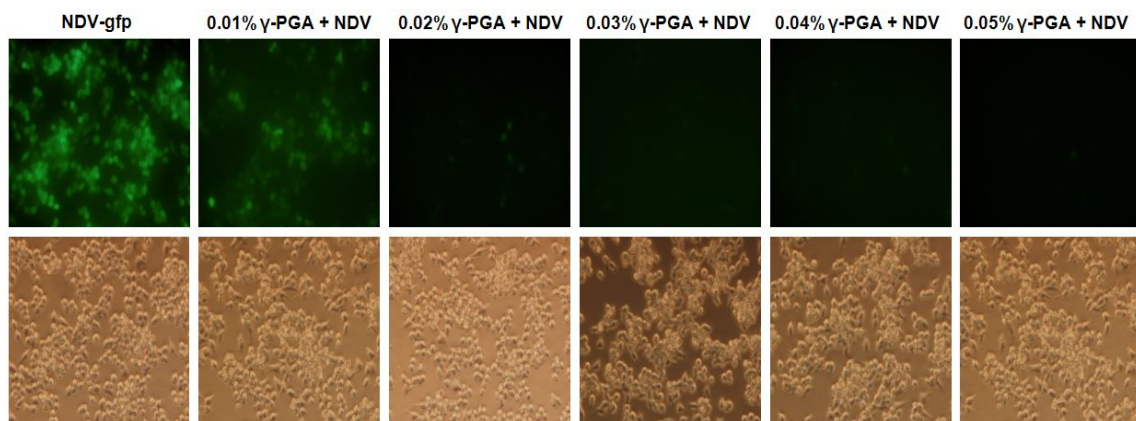


그림 10. 농도별 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 억제 효능

◎ 0.05% 농도의 고분자 폴리감마글루탐산에 의한 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효능은 고분자 폴리감마글루탐산의 세포 자극에 의한 인터페론 경로의 활성화에 의한 것임. 이에 고분자 폴리감마글루탐산에 의한 세포 활성화 및 인터페론 경로의 활성화 시간을 확인한 결과 그림 11에서 보는 바와 같이 폴리감마글루탐산으로 자극이 된 이후 4시간부터는 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효과를 확인할 수 있었음.

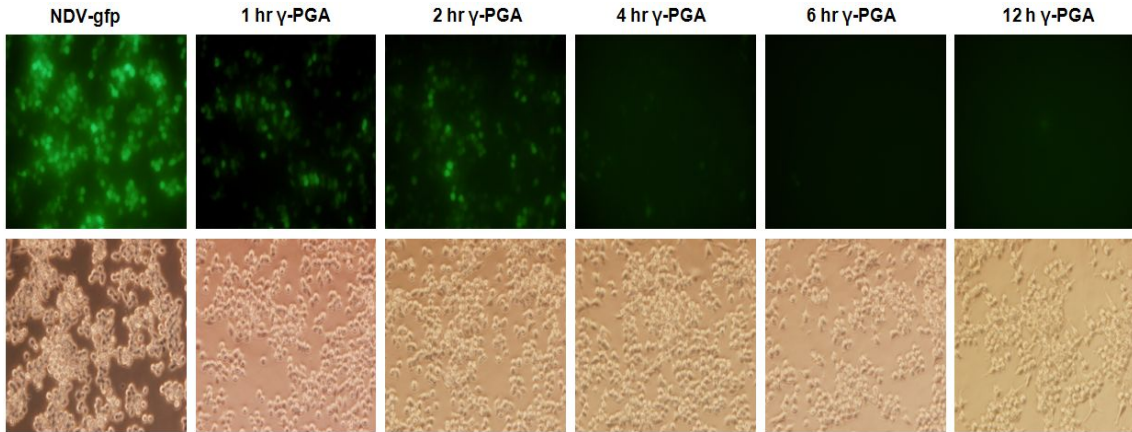


그림 11. 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 억제 효능 시간

© 0.05%의 고분자 폴리감마글루탐산을 면역세포에 6시간 이상 자극을 시킨 후 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효능을 확인한 결과 상기의 결과들처럼 그림 12에서 보는바와 같이 뉴캐슬병(ND) 바이러스 억제 효능을 GFP 발현으로 확인 하였고, 감염 세포내에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 F 유전자에 대한 RT-PCR를 수행한 결과 그림 13에서 보는 바와 같이 control에 비해 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 세포내 유전자가 감소되었음을 확인하였음.

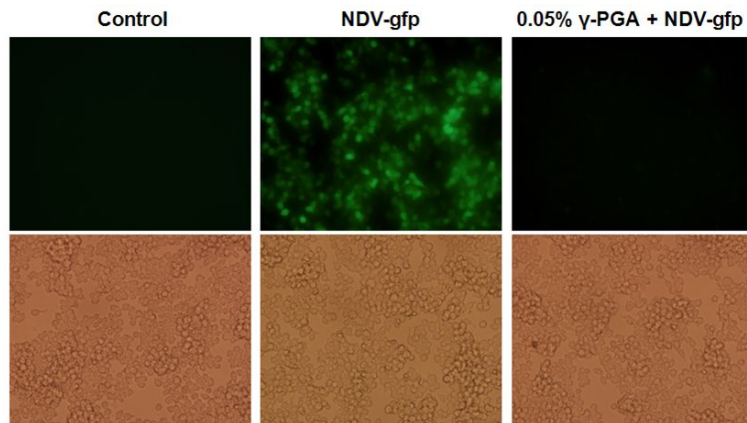


그림 12. 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 억제 효능

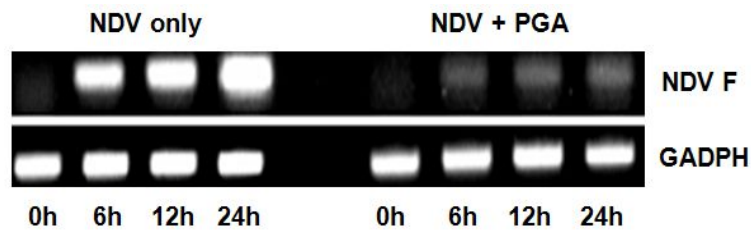


그림 13. 폴리감마글루탐산에 의한 뉴캐슬병(ND) 바이러스 유전자 발현 억제

© 상기의 결과 들은 모두 고분자 폴리감마글루탐산이 mouse 유래의 macrophage cell line 인 RAW264.7 cell line에서 인터페론 경로를 활성화시킴에 따른 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효능을 검증한 결과들임.

© 0.1%의 고분자 폴리감마글루탐산을 면역세포인 mouse macrophage cell line (RAW 264.7)에 12시간 자극을 시킨 후 GFP를 발현하는 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 MOI 3으로 감염시킨 후 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염 억제 효능을 GFP 발현과 감염세포의 cell viability로 확인하였음. 그림 14는 GFP의 세포내 발현양상을 형광현미경으로 확인한 결과로 그림에서 보는바와 같이 control에 비해 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 세포에서 Interferon으로 자극시킨 세포와 같이 바이러스의 감염 및 증식이 억제되었음.

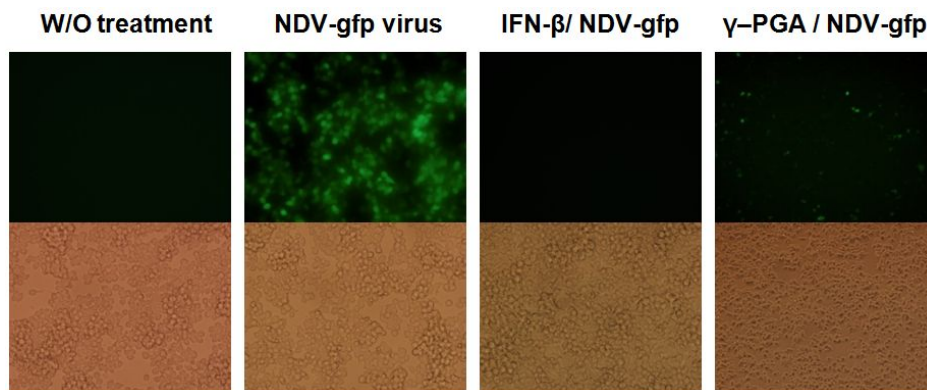


그림 14. 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 억제 효능

© 그림 15는 상기 그림 1의 세포들의 GFP 발현을 정량화한 그래프로 그림에서 보는바와 같이 control에 비해 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 세포에서 Interferon으로 자극시킨 세포와 같이 GFP 발현양이 적음을 확인하였음.

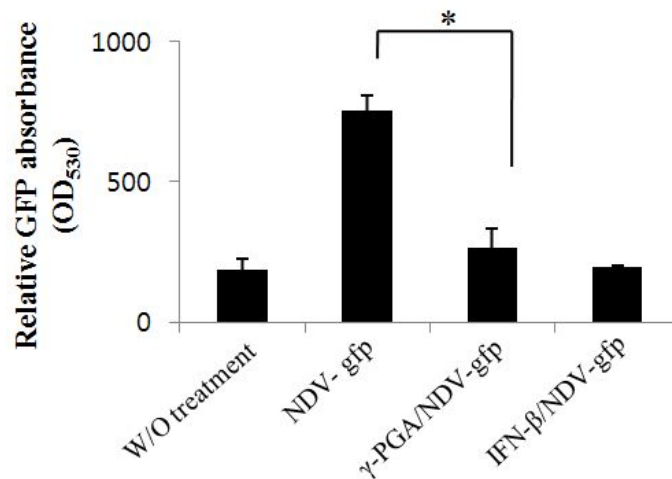


그림 15. 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 억제 효능

© 또한, 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 의한 감염 및 증식에 따른 세포사멸의 정도를 측정해본 결과 그림 16에서 보는 바와 같이 폴리감마글루탐산으로 자극된 세포의 경우 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 증식에 의한 세포 사멸에 대해 저항함을 확인하였음.

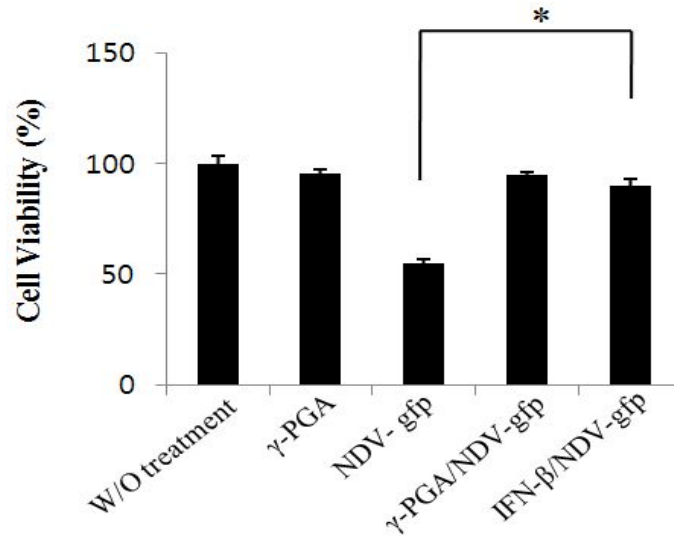


그림 16. 폴리감마글루탐산에 의한 세포사멸 억제 효능

© Macrophage 세포에 고분자의 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 자극된 면역세포에서의 인터페론관련 유전자의 발현 유도여부를 확인한 결과 그림 17에서와 같이 다양한 인터페론 관련 유전자들의 발현이 LPS와 마찬가지로 시간이 지남에 따라서 유도 및 증가됨을 확인하였음.

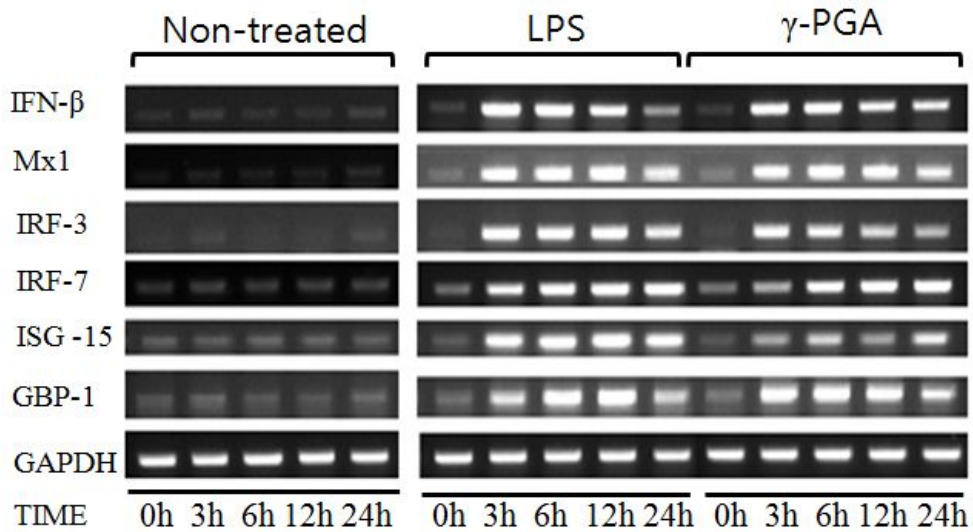


그림 17. 폴리감마글루탐산에 의한 면역세포에서의 인터페론관련 유전자 발현

© 그림 18는 상기의 그림 17에 나타난 유도 유전자들의 발현을 정량적으로 나타낸 그래프로 보는 바와 같이 폴리감마글루탐산 자극에 의해 나타나는 인터페론관련 유전자의 발현이 LPS와 비슷함을 확인하였음.

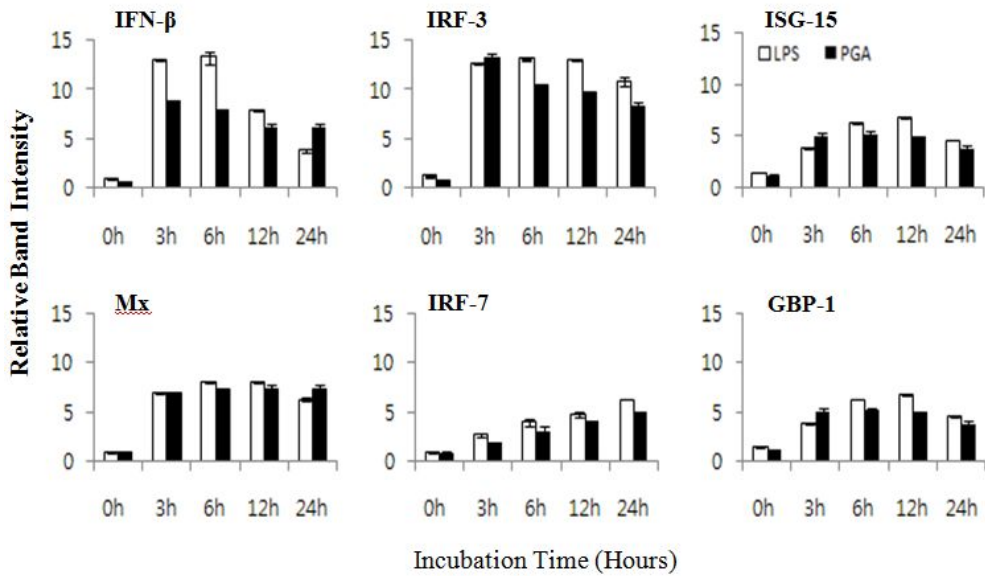


그림 18. 폴리감마글루탐산에 의한 면역세포에서의 인터페론관련 유전자발현

© 마우스 Macrophage 세포에 고분자의 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 자극된 면역세포에서 분비되는 인터페론 베타 (IFN-β)와 염증 사이토카인의 분비여부를 ELISA를 이용하여 확인한 결과 그림 19에서와 같이 LPS와 비슷하게 IFN-β, TNF-α, IL-6, IL-12등이 분비됨을 확인하였음.

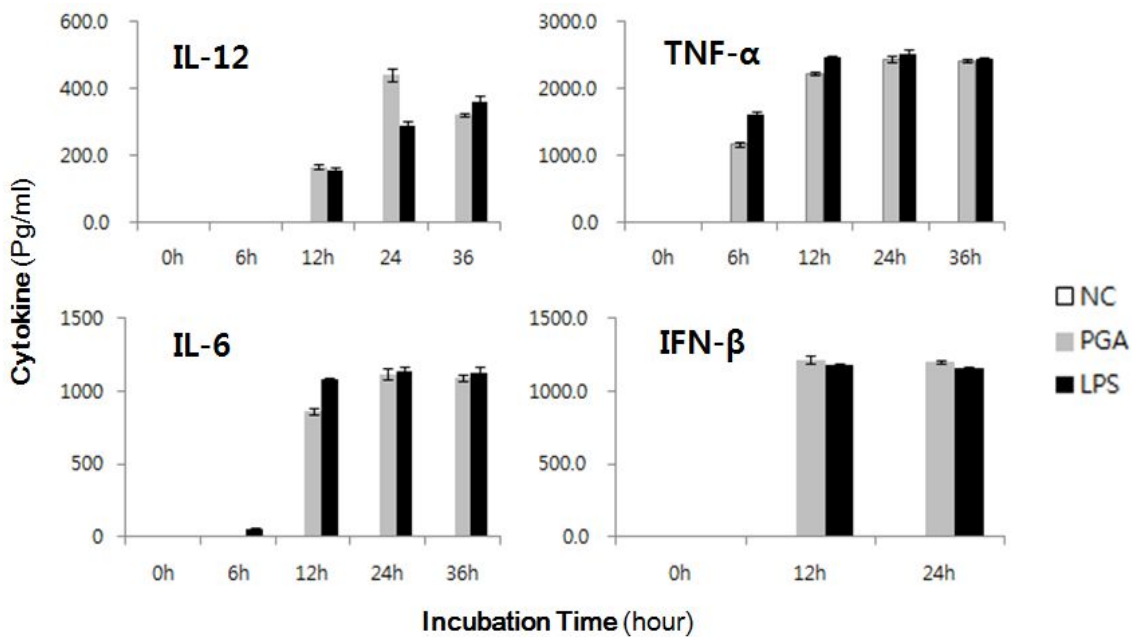


그림 19. 폴리감마글루탐산에 의한 마우스 면역세포에서의 IFN-β 및 염증 사이토카인들의 분비발현

© 상기의 결과들로 고분자의 폴리감마글루탐산이 mouse 유래의 macrophage cell line 인 RAW264.7 cell line에서 인터페론 경로를 활성화시킴에 따른 뉴켓슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효능을 검증한 결과들로 폴리감마글루탐산이 면역세포의 자극제로 우수한 효능을 갖고 있음을 확인할 수 있었음.

- ◎ 다음으로 chicken에서 고분자의 폴리감마글루탐산에 의한 인터페론 경로 활성화 및 바이러스 억제 효능 검증을 수행하였음.
- ◎ 고분자의 폴리감마글루탐산에 의한 chicken embryo fibroblast세포에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효능을 검증하기 위하여 embryonic egg에서 fibroblast를 추출 배양한 후 0.1%의 고분자 폴리감마글루탐산을 12시간 자극 시키고 GFP를 발현하는 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 MOI 1로 감염시킨 후 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염 억제 효능을 GFP 발현으로 확인한 결과 그림 20에서 보는 바와 같이 chicken embryo fibroblast에서는 폴리감마글루탐산에 의해 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효능을 확인할 수 없었음. 그림에서 보는 바와 같이 Chicken interferon로 처리된 세포에서는 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염 및 증식의 억제를 확인 할 수 있었으나 폴리감마글루탐산과 더불어 LPS로 처리된 세포에서 역시 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염 및 증식의 억제를 확인 할 수 없었음.

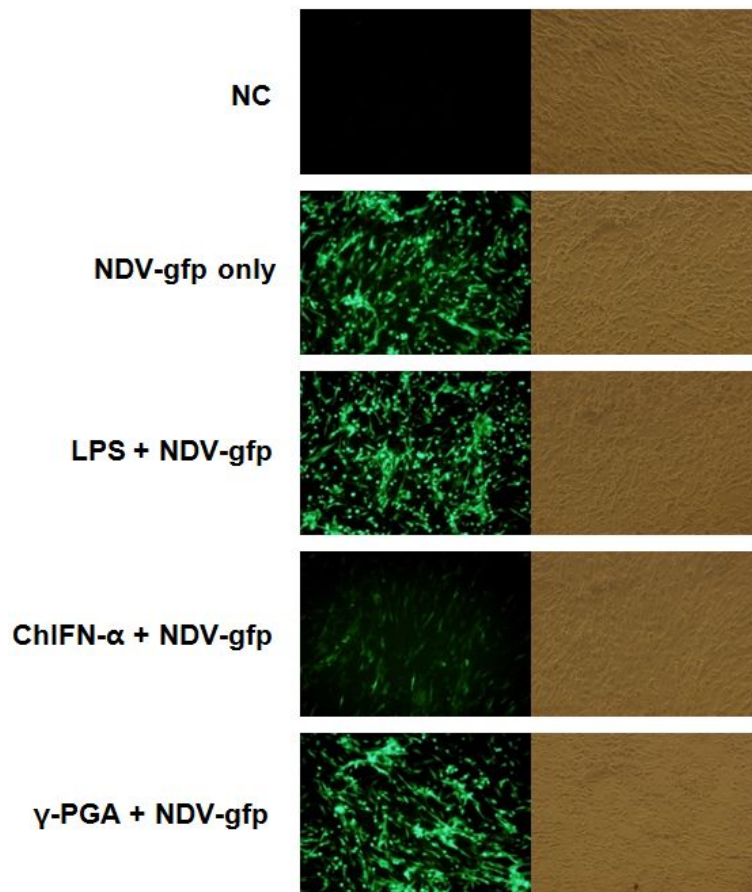


그림 20. Chicken embryo fibroblast에서 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 억제 효능

- ◎ 그림 21은 상기 그림 20의 세포들의 GFP 발현을 정량화한 그래프로 그림에서 보는바와 같이 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 세포에서 chicken interferon으로 자극시킨 세포와는 다르게 GFP 발현양이 많음을 확인하였음.

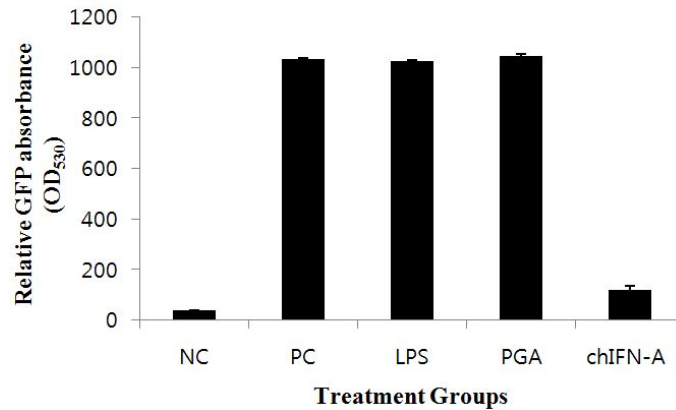


그림 21. 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 억제 효능

◎ 상기의 결과에서 보는 바와 같이 고분자의 폴리감마글루탐산에 의한 chicken embryo fibroblast세포에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 감염 억제 효능은 확인 할 수 없었음. 면역세포인 macrophage 보다 fibroblast에서의 인터페론을 비롯한 항바이러스 방어 기작이 낮았기 때문일 수도 있으므로 그림 22에서 보는 바와 같이 chicken의 blood에서 면역세포인 chicken peripheral blood monocyte (PBMC)를 분리 배양한 후 0.1%의 고분자 폴리감마글루탐산을 12시간 자극 시키고 GFP를 발현하는 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 MOI 1로 감염시킨 후 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염 억제 효능을 GFP 발현으로 확인하였음.

◎ 그림 22에서 보는 바와 같이 TLR3 ligand인 poly (I:C)로 처리된 세포에서는 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염 및 증식의 억제를 확인 할 수 있었으나 폴리감마글루탐산과 더불어 LPS로 처리된 세포에서 역시 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염 및 증식의 억제를 확인 할 수 없었음.

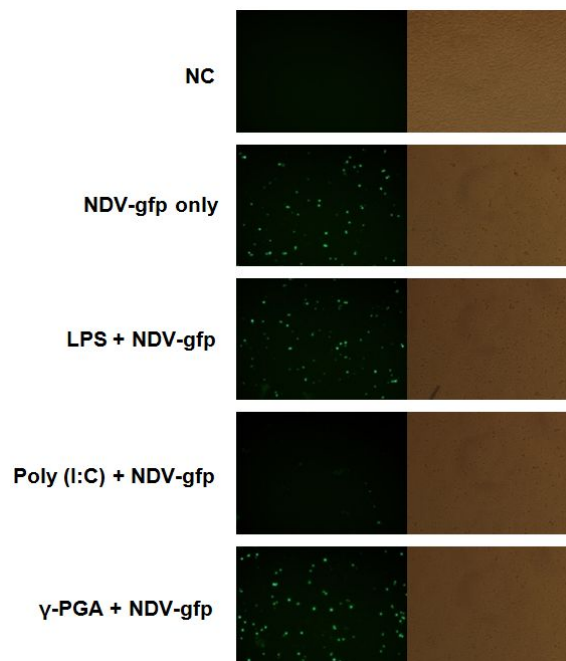


그림 22. chicken peripheral blood monocyte (PBMC)에서 폴리감마글루탐산의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 억제 효능

- ◎ 실질적인 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능을 검증하기 위하여 병아리를 대상으로 야생의 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 이용한 소규모 동물(닭)실험을 수행하였음.
- ◎ 우선적으로 야생의 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 LD₅₀를 확인하기 위하여 일반 닭농장으로 부터 뉴캐슬병(ND) 바이러스 백신을 접종하지 않은 1주일령의 병아리를 이용하여 기관지 경로로 LD₅₀ 실험을 수행한 결과 다음의 표 1에서와 같은 결과를 얻었음. 표에서 보는 바와 같이 야외 강독의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대하여 불규칙적인 치사결과를 얻었음. 이는 뉴캐슬병(ND) 바이러스 백신을 접종받은 어미로부터의 이행항체에 의한 바이러스 억제 효과로 생각되어짐.

Group	# of Chicks	% Alive
NC	4	100
(10 ¹)	4	25
(10 ²)	4	50
(10 ³)	4	75
(10 ⁴)	4	0
(10 ⁵)	4	50

표 1. 농장 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 LD₅₀ 실험

- ◎ 상기의 비교적 치사량이라고 여겨진 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 LD₅₀를 이용하여 직접적으로 농장의 병아리를 대상으로 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능을 기관지경로를 통하여 검증하였음.
- ◎ 닭농장에서부터 뉴캐슬병(ND) 바이러스 백신을 접종하지 않은 1주일령의 병아리에 기관지로 각각의 폴리감마글루탐산을 투여한 후 1일뒤 치사량의 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 기관지로 투여한 후 5-7일뒤 표 2와 같은 결과를 얻었음.

Group	# of Chicks	% Alive
NC	10	100
NDV only	10	0
PGA (0.1%)	10	0
PGA (0.2%)	10	0

표 2. 농장 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능 검증 (기관지투여)

- ◎ 표 2에서 보는 바와 같이 소규모의 병아리 실험에 있어서 LD₅₀ 확인 실험과 마찬가지로 폴리감마글루탐산의 유의 있는 항 뉴캐슬병(ND) 바이러스 효능을 확인 할 수 없었음. 역시 이는 뉴캐슬병(ND) 바이러스 백신을 접종받은 어미로부터의 이행항체에 의한 바이러스 억제 효과가 존재하기 때문으로 생각되어짐.

- ◎ 비교적 낮은 치사량이라고 여겨진 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 LD₅₀를 이용하여 직접적으로 농장의 병아리를 대상으로 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능을 비강경로를 통하여 다시 한 번 더 검증하였음.
- ◎ 닭농장으로부터 뉴캐슬병(ND) 바이러스 백신을 접종하지 않은 1주일령의 병아리에 기관지로 각각의 폴리감마글루탐산을 투여한 후 1일뒤 비교적 낮은 치사량의 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 비강으로 투여한 후 5-7일뒤 표 3과 같은 결과를 얻었음.

Group	# of Chicks	% Alive
NC	10	100
NDV only	10	0
PGA (0.1%)	10	0
PGA (0.2%)	10	0

표 3. 농장 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능 검증 (비강투여)

- ◎ 표 3에서 보는 바와 같이 소규모의 병아리 실험에 있어서 기관지투여 실험과 마찬가지로 폴리감마글루탐산의 유의 있는 항 뉴캐슬병(ND) 바이러스 효능을 확인 할 수 없었음. 역시 이는 뉴캐슬병(ND) 바이러스 백신을 접종받은 어미로부터의 이행항체에 의한 바이러스 억제 효과가 존재하기 때문으로 생각되어짐.
- ◎ 상기의 비교적 낮은 치사량이라고 여겨진 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 LD₅₀를 이용하여 직접적으로 농장의 병아리를 대상으로 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능을 경구투여를 통하여 검증하였음.
- ◎ 닭농장으로부터 뉴캐슬병(ND) 바이러스 백신을 접종하지 않은 1주일령의 병아리에 경구로 각각의 폴리감마글루탐산을 투여한 후 1일뒤 치사량의 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 기관지로 투여한 후 9-10일뒤 표 4와 같은 결과를 얻었음.

Group	# of Chicks	% Alive
NC	10	100
NDV only	10	0
PGA (0.1%)	10	0
PGA (0.2%)	10	0
PGA (0.3%)	10	0

표 4. 농장 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능 검증 (경구투여)

- ◎ 표 4에서 보는 바와 같이 소규모의 병아리 경구투여 실험에 있어서 비강투여 실험과 마찬가지로 폴리감마글루탐산의 유의 있는 항 뉴캐슬병(ND) 바이러스 효능을 확인 할 수 없었음. 역시 이는 뉴캐슬병(ND) 바이러스 백신을 접종받은 어미로부터의 이행항체에 의한 바이러스 억

제 효과가 존재하기 때문으로 생각되어짐.

- ◎ 보다 정확한 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능을 검증하기 위하여 SPF 병아리를 대상으로 야생의 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 이용한 소규모 동물(닭)실험을 수행하였음.
- ◎ 우선적으로 SPF 병아리의 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 LD₅₀를 확인하기 위하여 SPF embryonic egg를 구입하여 SPF 병아리를 키운후 1주일령의 병아리를 이용하여 LD₅₀ 실험을 수행한 결과 다음의 표 5에서와 같은 결과를 얻었음.

Group	# of Chicks	% Alive
NC	4	100
(10 ⁶)	4	0
(10 ⁷)	4	0
(10 ⁸)	4	50
(10 ⁹)	4	100
(10 ¹⁰)	4	100

표 5. SPF 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스 LD₅₀ 실험

- ◎ 표에서 보는 바와 같이 야외 강독의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대하여 SPF 병아리에 대한 LD₅₀를 얻었음.
- ◎ 상기의 SPF 병아리에 대한 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 10LD₅₀를 이용하여 SPF 병아리를 대상으로 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능을 비강경로를 통하여 검증하였음.
- ◎ 1주일령의 SPF 병아리를 준비하여 기관지로 다음 각각의 균을 나누어 폴리감마글루탐산을 투여한 후 1일 혹은 2일뒤에 치사량의 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 기관지로 투여한 후 5-10일 동안 실험경과를 확인하였음.

Group		# of chicks
Negative control (PBS only)		10
NDV only		10
PGA Pre-treatment (01%)	1-day	10
	2-day	10
PGA Pre-treatment (0.2%)	1-day	10
	2-day	10
PGA Pre-treatment (0.2%) & 1 DPI treatment	2-day+ 1-day	10
NDV Infection (Post-Infection Treatment)	PGA treatment (0.2%) (1 DPI treatment)	10

표 6. SPF 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능검증 실험 스케줄

◎ 표 6에서 보는 바와 같이 SPF 병아리를 대상으로 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능검증 실험을 수행한 결과 그림 23에서 보는 바와 같이 바이러스를 기관지로 투여후 1일 3일 5일에 걸쳐 각 group의 무게를 측정한 결과 바이러스를 투여하지 않은 negative control group를 제외한 모든 group에서 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 감염되어 나타나는 임상증상과 더불어 몸무게가 줄어듦을 확인하였음.

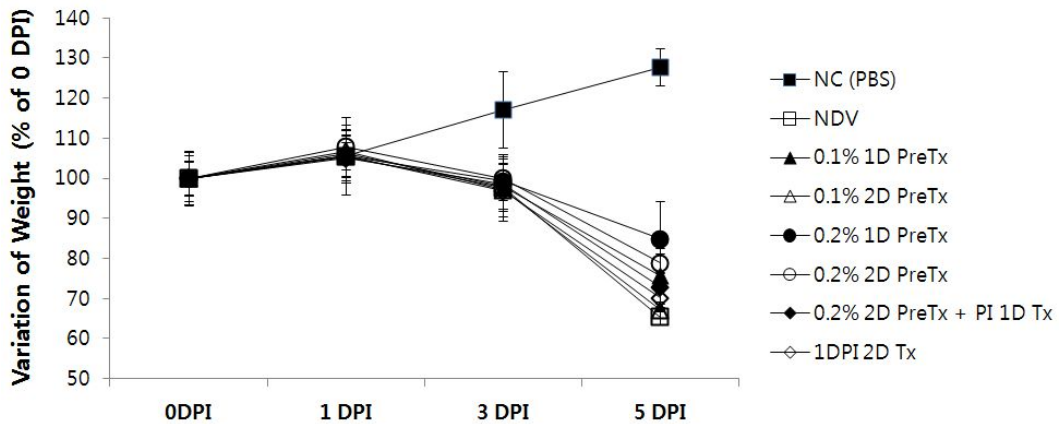


그림 23. SPF 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능검증 (Body weight 측정)

◎ 또한, 그림 24에서 보는 바와 같이 바이러스를 기관지로 투여후 시간경과에 따른 SPF 병아리의 생존율을 측정한 결과 바이러스를 투여하지 않은 negative control group를 제외한 모든 group의 SPF 병아리가 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 감염되어 감염후 약 7일이내에 모두 폐사되었음을 확인하였음.

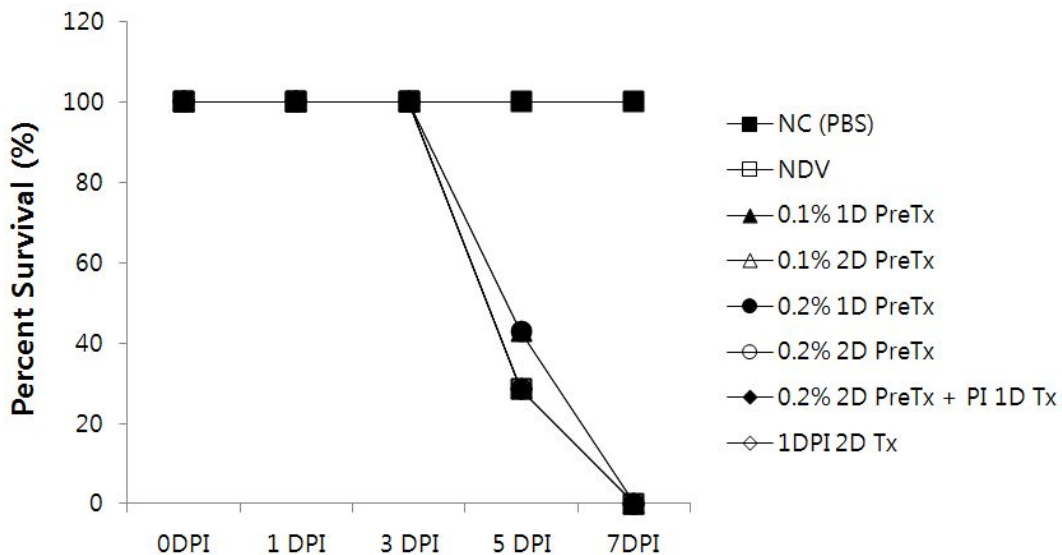


그림 24. SPF 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능검증 (생존률 측정)

◎ 다른 실험으로 8주령의 NDV negative SPF 병아리를 준비하여 기관지 및 근육으로 다음과

같이 각각의 군을 나누어 폴리감마글루탐산을 투여한 후 2일뒤에 1LD50의 강독 뉴캐슬병(ND) 바이러스를 기관지로 투여한 후 5-10일 동안 실험경과를 확인하였음.

Group		# of chicks
Negative control (PBS only)		10
NDV only		10
PGA treated (0.1%)	IM	10
	IN	10
PGA treated (0.2%)	IM	10
	IN	10
LPS (50 ug/100 ul) – IM		10
LPS (50 ug/100 ul) – IN		10

표 7. SPF 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능검증 실험 스케줄

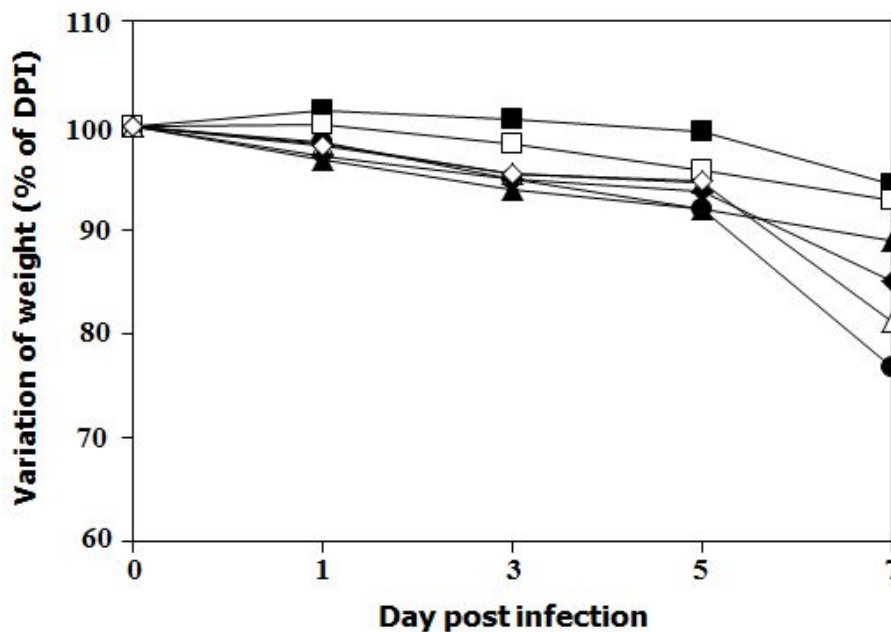


그림 25. SPF 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능검증 (Body weight 측정)

© 표 7에서 보는 바와 같이 SPF 병아리를 대상으로 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능검증 실험을 수행한 결과 그림 10에서 보는 바와 같이 바이러스를 기관지로 투여후 1일 3일 5일에 걸쳐 각 group의 무게를 측정한 결과 바이러스를 투여하지 않은 negative control

group를 제외한 모든 group에서 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 감염되어 나타나는 임상증상과 더불어 몸무게가 줄어들음을 확인하였음.

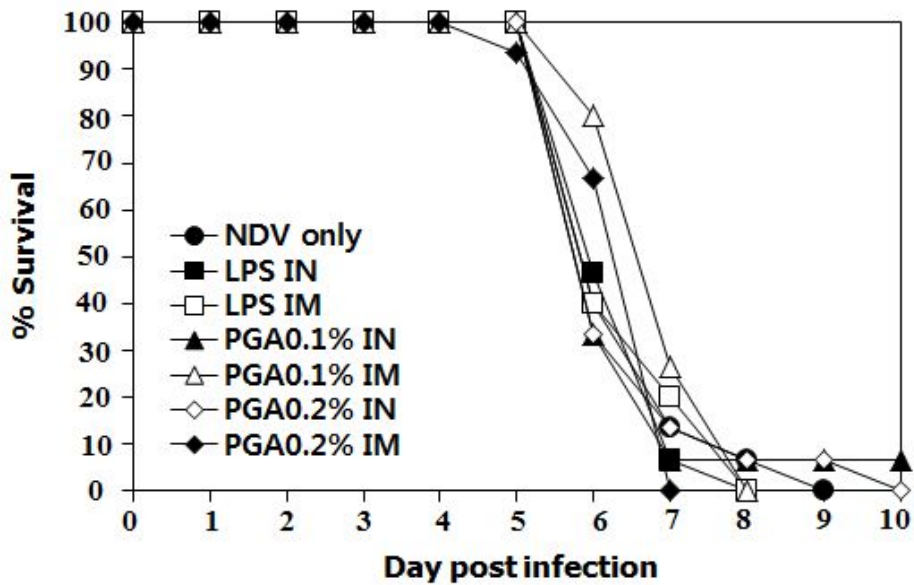


그림 26. SPF 병아리에서의 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 대한 폴리감마글루탐산의 효능 검증 (생존률 측정)

- ◎ 또한, 그림 26에서 보는 바와 같이 바이러스를 기관지로 투여후 시간경과에 따른 SPF 병아리의 생존율을 측정한 결과 바이러스를 투여하지 않은 negative control group를 제외한 모든 group의 SPF 병아리가 뉴캐슬병(ND) 바이러스에 감염되어 감염후 약 7-8일이내에 대부분 폐사되었음을 확인하였음. 그러나 10% 정도의 닭은 회복되어 10일 이후에도 생존하였음
- ◎ In vitro에서와 마찬가지로 닭에서 기관지 경로를 통한 고분자의 폴리감마글루탐산의 적용은 고병원성 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염에 대해서 그 억제 효능은 충분하지 않음을 확인할 수 있었음.
- ◎ 마우스와 돼지의 경우에서 나타나는 고분자 폴리감마글루탐산의 인터페론 유도를 포함하는 선천면역 유도능의 항바이러스 효능이 닭에서 나타나지 않는 이유는 LPS를 이용하여 수행된 선행 연구자료들 (참고문헌 참고)에서 그 이유를 찾을 수 있음 (폴리감마글루탐산의 선천면역 유도 기전이 LPS의 그것과 유사함).
- ◎ 그러나 해외 연구자들의 LPS를 이용하여 TLR4 를 자극하여 면역증강 효과를 확인하였으며 (Michael ST et al: Vaccine 30 (2012) 4524) 이는 고병원성 ND 바이러스에 따른 문제 인지에 대해서는 더욱 세심한 연구가 필요함
- ◎ 그림 27에서 보는 바와 같이 마우스를 포함하는 포유류는 LPS에 대한 반응을 하기 위하여 TLR receptor를 포함하여 LBP, CD14등의 coreceptor가 작용을 하게 됨. 또한 LPS에 대한 선천면역반응의 세포신호 체계에 있어서 MyD88 dependent pathway와 MyD88

independent pathway가 있고 각각의 pathway에는 각각의 adaptor molecule들이 존재함.

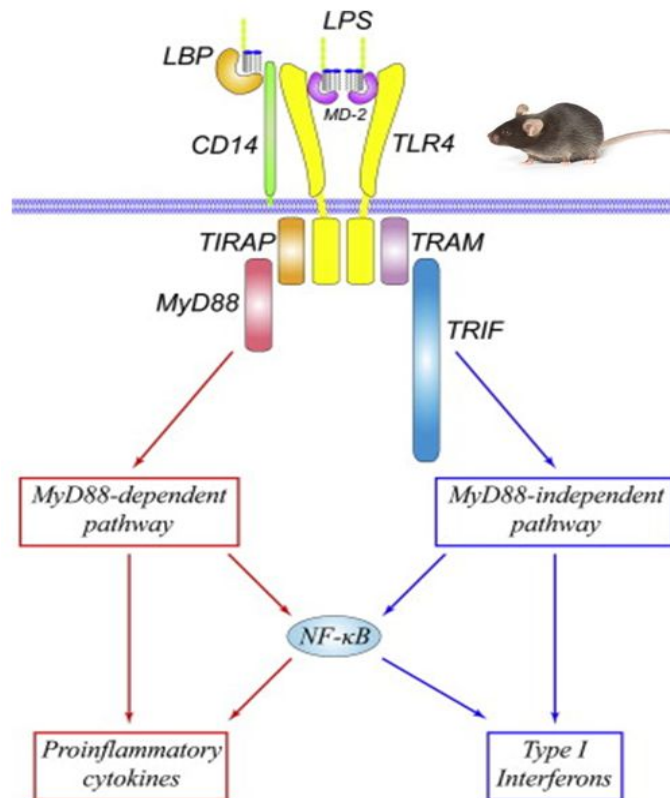


그림 27. 마우스에서의 LPS/TLR4 Signal Pathway

© 그러나 선행연구들과 본 연구에 의해 그림 28에서 보는 바와 같이 닭의 경우에는 LPS에 대한 반응을 하기 위한 LBP등의 coreceptor가 존재하지 않으며, MyD88 independent pathway중에서 중요한 adaptor molecule인 TRAM molecule이 존재하지 않음.

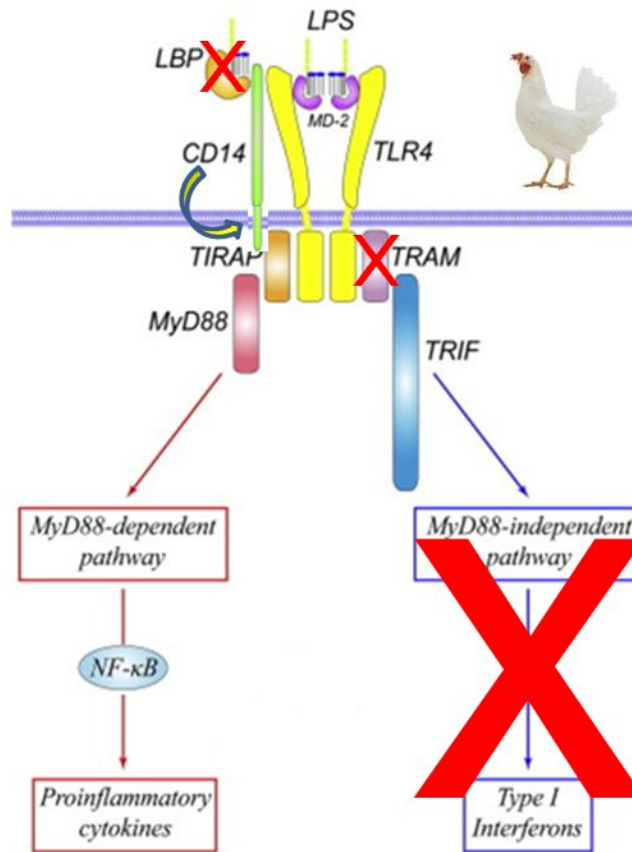


그림 28. 닭에서의 LPS/TLR4 Signal Pathway

◎ 그러나 지금까지의 실험결과에서 다음과 같은 고려점들이 존재함.

1. 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염양이 폴리감마글루탐산에 의한 선천면역 유도능 보다 높게 주어졌을 가능성과 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 독성이 강하면
2. 그림 12에서 보는 바와 같이 닭에서 MyD88 dependent pathway가 작용하고 있어 폴리감마글루탐산의 투여 조건 및 경로 변화에 의한 감염 억제 여부
3. 기관지, 비강, 경구경로를 통한 고분자의 폴리감마글루탐산의 적용이외에 혈관을 통한 적용을 고려해 볼 수 있음 (Amna et al. Avian Disease. 2001. 45: 313-320 - Endotoxin의 혈관 투여에 의한 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염억제 효능 검증)
4. 근육을 통한 폴리감마글루탐산의 적용으로 적정 염증반응의 유도 효능에 의한 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 감염억제 효능 검증 고려

2. 폴리감마글루탐산의 항 인플루엔자바이러스 효능 검증

◎ 고분자량 폴리감마글루탐산의 인플루엔자 바이러스 감염 억제 효능을 확인하기 위해 폴리감마글루탐산을 macrophage cel line에 자극을 시킨 후 GFP를 발현하는 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 결과 그림 29, 30에서 보는 바와 같이 폴리감마글루탐산이 인플루엔자 바이러스 감염 억제에 효과적임을 확인하였고, 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 사멸되는 세포의 수를 trypan

blue staining으로 확인한 결과 폴리감마글루탐산에 의해 세포사멸이 억제됨을 확인하였음.

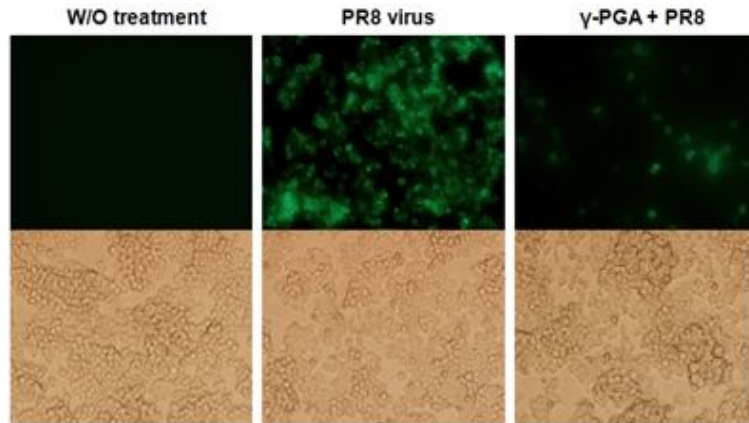


그림 29. 고분자 폴리감마글루탐산의 인플루엔자 바이러스 억제 효능

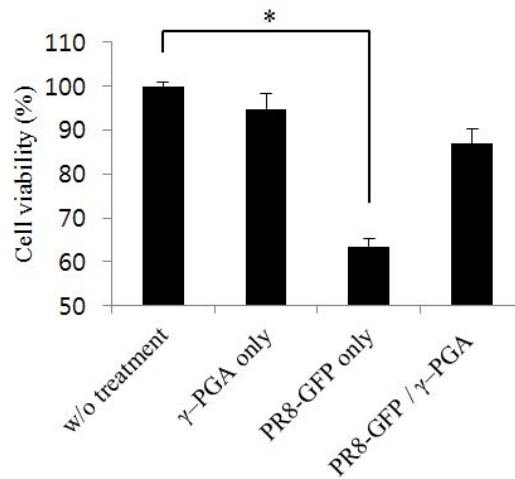


그림 30. 고분자 폴리감마글루탐산에 의한 cell viability 검증

- ◎ 고분자량 폴리감마글루탐산의 인플루엔자 바이러스 감염 억제 효능을 Mx 유전자를 발현하는 B6.A2G-Mx1 마우스를 이용하여 확인하였음. 실질적으로 Mx 유전자는 세포의 항바이러스 효능을 담당하는 주요 유전자임. 그러나 실험실에서 주로 사용이 되고 있는 inbred 마우스의 경우 Mx 유전자가 결손 혹은 돌연변이 되어 있어 인플루엔자 바이러스 감염에 매우 민감함.
- ◎ 따라서 Mx 유전자를 발현하는 B6.A2G-Mx1 마우스를 이용하여 고분자량 폴리감마글루탐산의 인플루엔자 바이러스 감염 억제 효능을 확인하였음. 마우스 인터페론(100U/g)을 positive control로 이용을 하고, 폴리감마글루탐산 (30ug of 1mg/ml)을 마우스 비강으로 투여후 12시간뒤 치사량의 H5N2 인플루엔자 바이러스를 투여하여 다음 그림의 결과를 확인하였음.

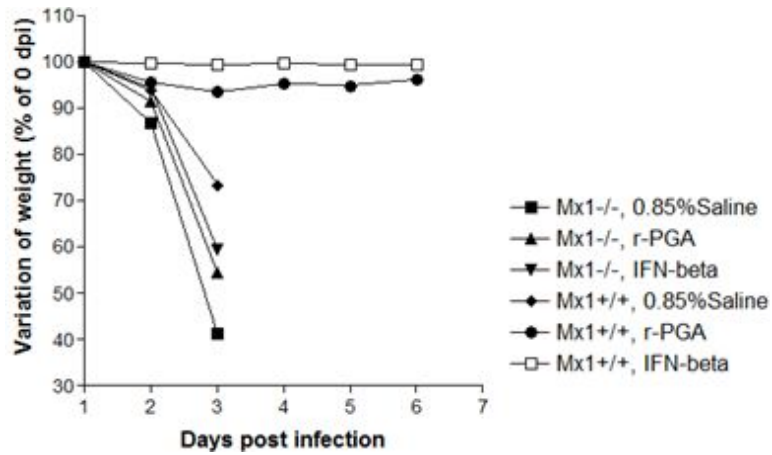


그림 31. B6.A2G-Mx1 마우스에서 폴리감마글루탐산의 인플루엔자 바이러스 억제 (Body weight)

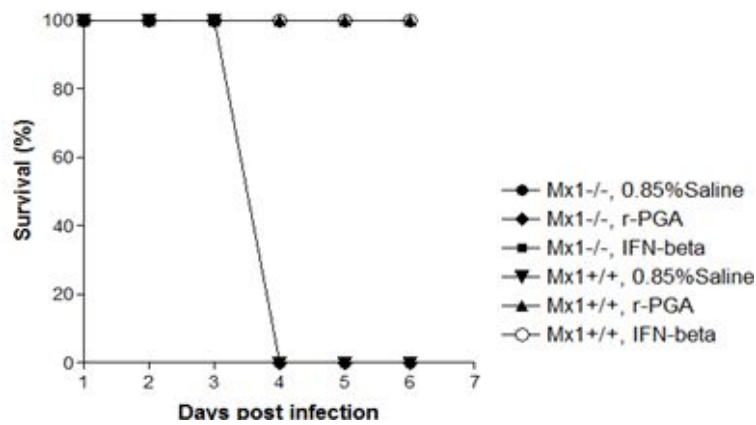


그림 32. B6.A2G-Mx1 마우스에서 폴리감마글루탐산의 인플루엔자 바이러스 억제 (Survival rate %)

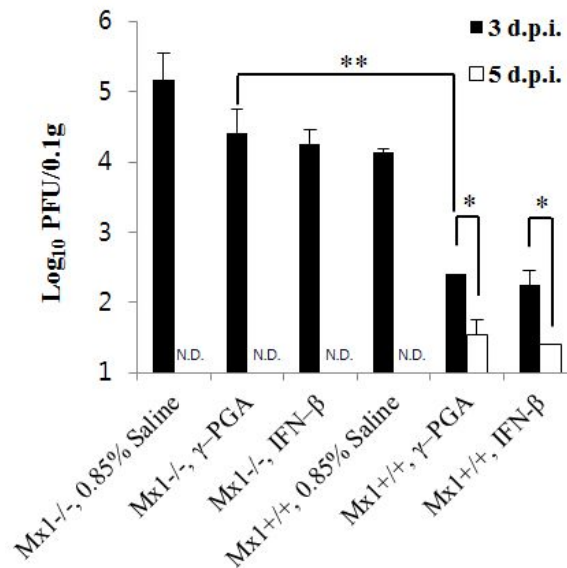


그림 33. B6.A2G-Mx1 마우스에서 폴리감마글루탐산의 인플루엔자 바이러스 억제 (Lung virus titer)

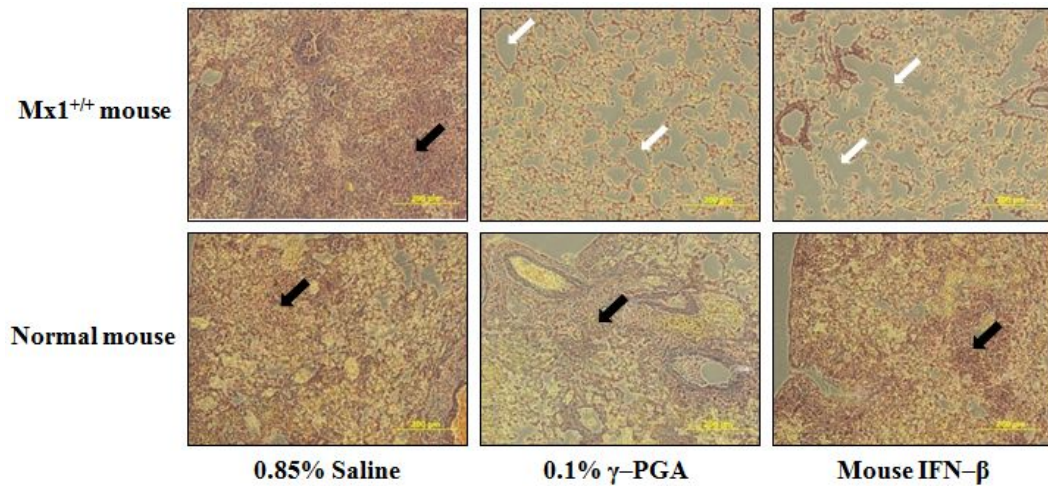


그림 34. B6.A2G-Mx1 마우스에서 폴리감마글루탐산의 인플루엔자 바이러스 억제 (Lung Histopathology)

◎ 결과적으로 고분자량 폴리감마글루탐산은 type I 인터페론 경로 자극, 즉 Mx 유전자 및 인터페론 관련 유전자를 유도하여 인플루엔자바이러스의 감염 및 증식을 억제하고 있음을 Mx 유전자를 발현하는 B6.A2G-Mx1 마우스에서 확인하였음.

◎ 실질적으로 고분자량 폴리감마글루탐산의 type I 인터페론 경로 자극을 B6.A2G-Mx1 마우스의 lung에서 확인한 결과 다음의 그림에서 보는 바와 같이 폴리감마글루탐산은 인터페론과 마찬가지로 인터페론 관련 유전자들 및 Mx 단백질을 유도하였으며, B6.A2G-Mx1 마우스의 Bone marrow derived macrophage에서 역시 다양한 인터페론 관련 유전자들을 유도할 수 있었음.

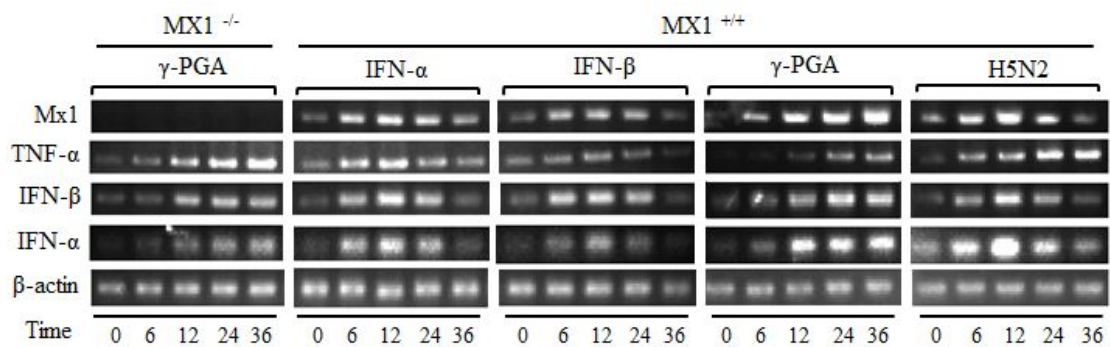


그림 35. B6.A2G-Mx1 마우스 lung에서 폴리감마글루탐산에 의한 인터페론 관련 유전자 유도

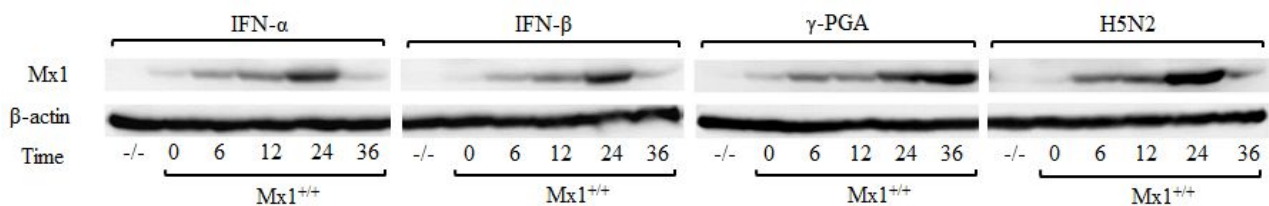


그림 36. B6.A2G-Mx1 마우스 lung에서 폴리감마글루탐산에 의한 Mx 단백질 유도

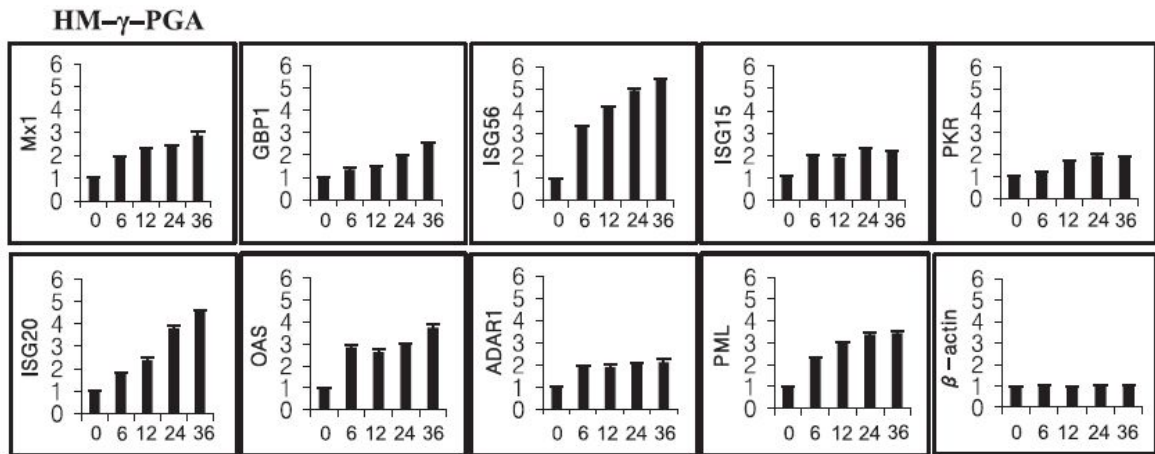
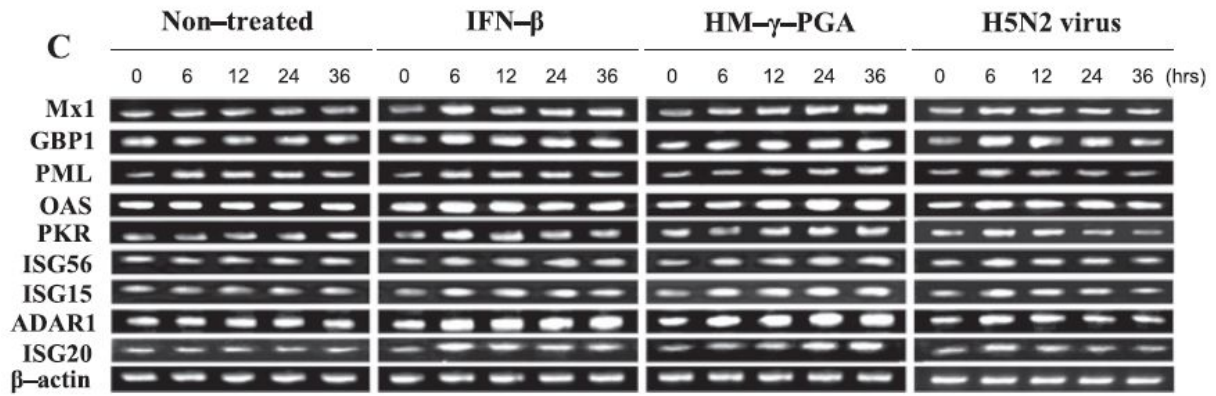


그림 37. B6.A2G-Mx1 마우스 BMDM에서 폴리감마글루탐산에 의한 인터페론 관련 유전자 유도

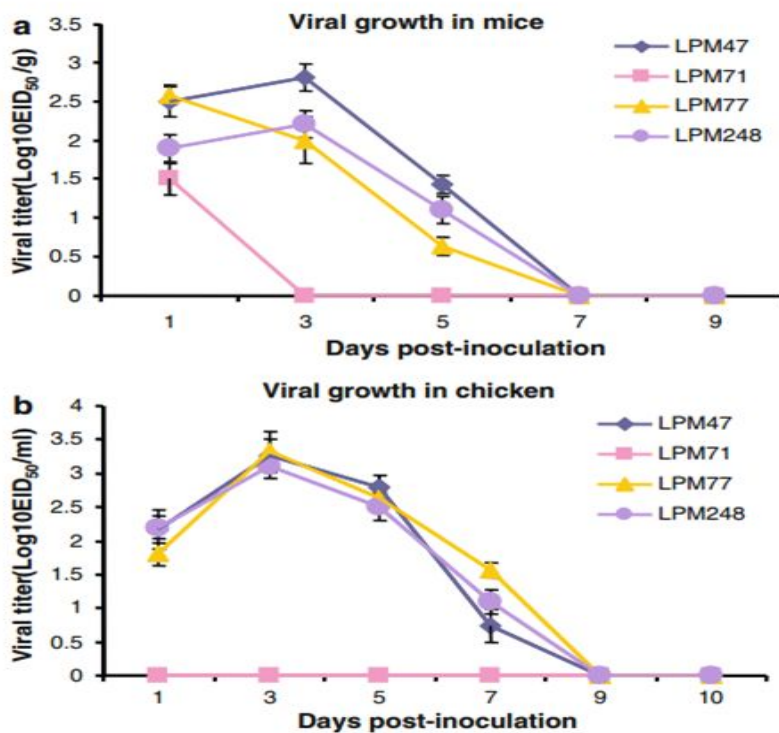


그림 38. 국내분리 닭인플루엔자바이러스 H9N2 의 증식성

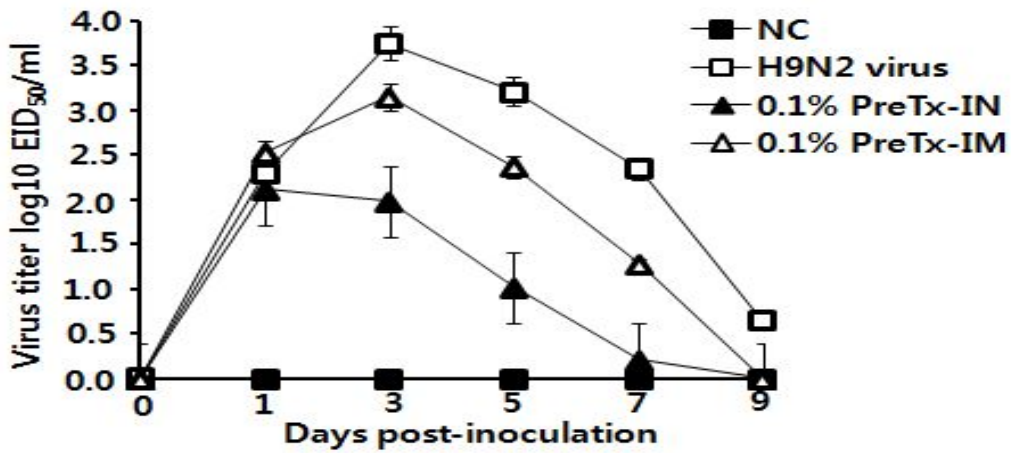


그림 39. 폴리감마글루탐산의 인플루엔자바이러스 (H9N2) 증식억제 효과

- 닭에서 폴리감마글루탐산의 저병원성 인플루엔자바이러스인 H9N2 에 대한 감염 실험 결과 비강내 투여 결과 감염 3일 후 대조군에 비해 폐에서의 바이러스 농도가 감소되어 7일 후에는 제거되었음
- 닭에서의 TRIF 단백질의 기능이 저하되거나 억제되었을 때 폴리감마글루탐산의 면역 증강 유도능을 확인하기 위해 Raw264.7 cell에 TM4b peptide를 처리하여 TNF- α 분비 유도, IFN- β 분비 유도를 ELISA 방법으로 측정하였음 각각 1mg/ml (DMSO에 용해) 농도의 TM4b 10 μ l를 10분간 전처리 후 PBS로 세척하고, 폴리감마글루탐산을 24시간 (TNF- α), 9시간(IFN- β) 처리 후, 상등액을 회수하여 cytokine 정량 ELISA를 수행한 결과로 확인함 사용된 세포의 양은 각각 TNF- α : well 당 2×10^5 cell에 처리, IFN- β : well 당 4×10^5 cell 처리임.

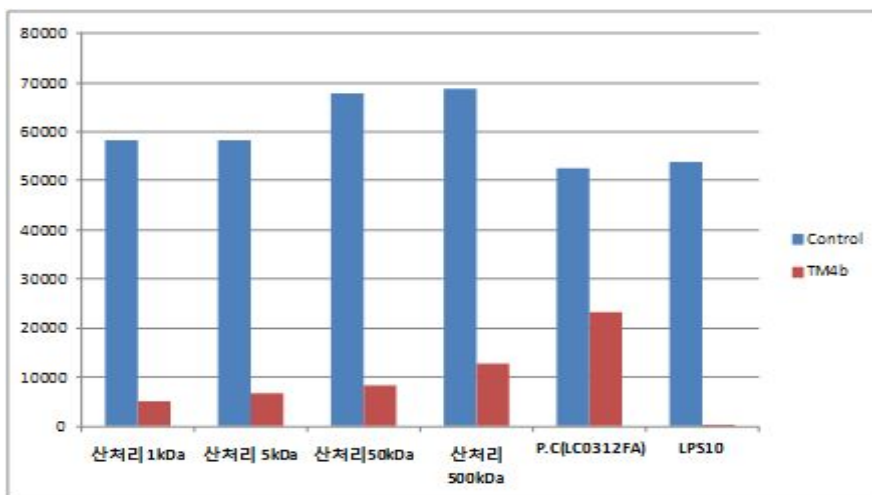


그림 40. Raw 세포에서의 TRIF 억제 peptide 처리후 TNF-alpha 분비

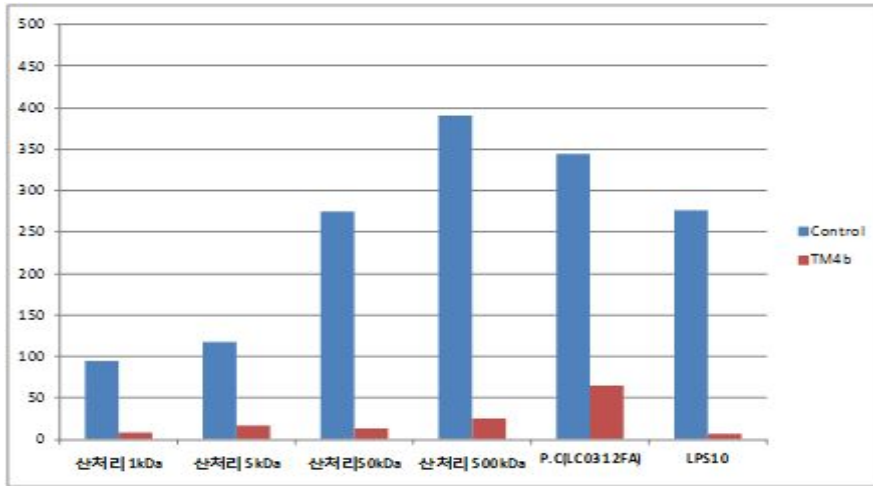


그림 41. Raw 세포에서의 TRIF 억제 peptide 처리후 Interferon-beta 분비

- 위의 결과로 TRIF 단백질의 세포신호전달 체계를 억제하여도 폴리감마글루탐산의 경우 TLR4 agonist 인 LPS 와 비교하여 TNF-alpha 나 Interferon-beta의 분비량이 완전히 감소되지 않음을 확인할 수 있음 이는 폴리감마글루탐산의 경우 가장 주된 TLR4 agonist 인 LPS 와는 다른 추가적인 면역작용 유도 기능이 존재함

제 2 절 바이오폴리머의 대량생산 기술

1. 초고분자량 폴리감마글루탐산의 대량생산공정 확립

가. 폴리감마글루탐산 대량생산을 위한 산업 균주의 생산용 배지 및 배양조건 확립

- 폴리감마글루탐산의 생산성 검토를 위한 배양 조건의 최적화로서 (1)아미노산 첨가효과 (2) 미네랄 첨가효과 (3) NaCl 첨가효과에 의한 배양조건을 검토하였음

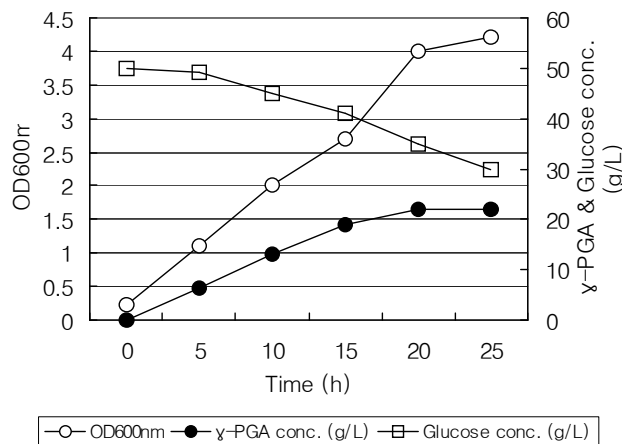


그림 42. 5 L발효기 GGC생산배지 에서의 폴리감마글루탐산 생산 발효곡선

- 생산용 기본배지 GGC배지 (Glucose 5%, L-Glutamic acid 5%, (NH₄)₂SO₄ 1%, KH₂PO₄ 0.27%, Na₂HPO₄·12H₂O 0.42%, NaCl 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.3%, Vitamin solution 1 ml/L, pH 6.8)에서 30℃, 150 rpm, 공기주입속도 1 vvm 으로 배양하였을 때, 배양 24시간에 약 22 g/L의 폴리감마글루탐산이 생산되었음을 확인함

나. 고분자 폴리감마글루탐산 생산을 위한 배양조건 최적화 연구

- 고분자 폴리감마글루탐산의 30 L 생산 실험에서 26시간 배양 후 OD 600 nm 10.6 정도의 균성장을 확인할 수 있었으며, 폴리감마글루탐산 생산량은 39.52 g/L 의 yield 와 1.52 g/L/h 의 productivity를 확인함

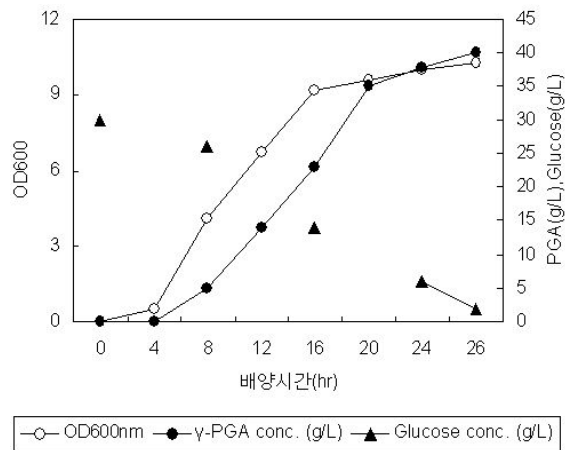


그림 43. 고분자 PGA의 30 L Jar fermenter 생산 검토

다. 고분자 폴리감마글루탐산을 산업적 규모로 대량 생산하기 위한 scale-up 검토 및 최적화 연구

- 고분자 폴리감마글루탐산의 500 L scale up 실험에서 24시간 배양 후 OD 600 nm 9.0 정도의 균성장을 확인할 수 있었으며, 폴리감마글루탐산 생산량은 36.72 g/L의 yield 와 1.53 g/L/h 의 productivity를 확인함

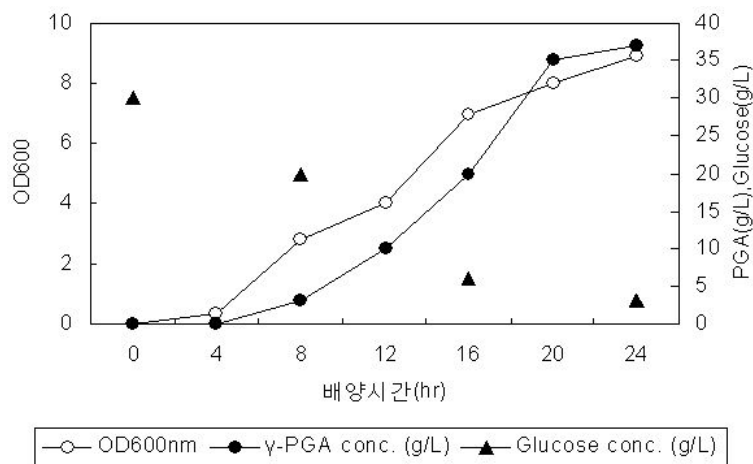
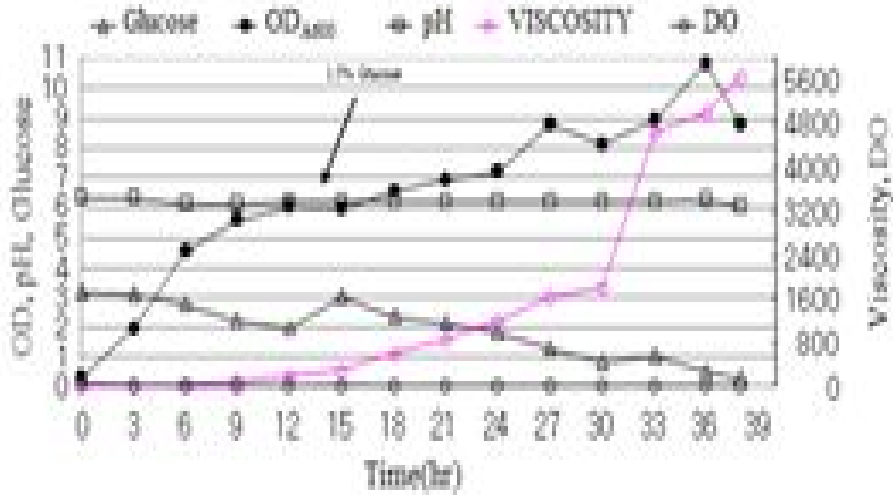


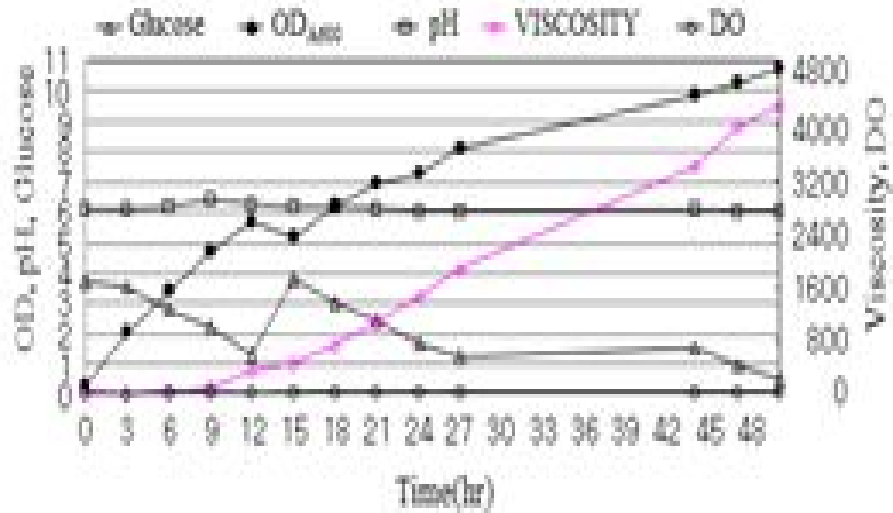
그림 44. 고분자 PGA의 500 L Jar fermenter 생산 검토

라. 고분자 폴리감마글루탐산 생산 공정 개발

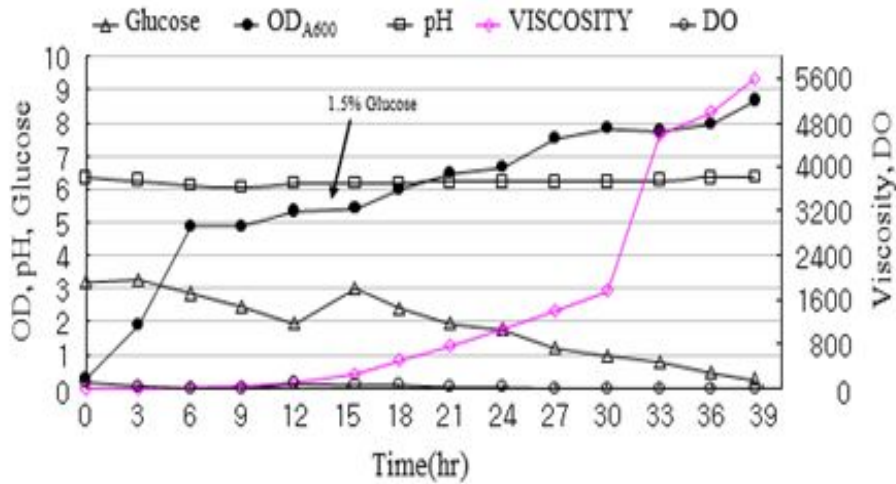
- Scale-up(5,000 L 발효조)을 통한 저분자 및 고분자 폴리감마글루탐산 대량생산공정 확립
 - : 폴리감마글루탐산 대량생산을 위한 생산공정 확립을 위해 5,000L 발효조를 사용하여 배양한 결과 그림 5와 같이 균주의 성장 및 폴리감마글루탐산의 생성을 확인함
 - : 생산성 14 -16 g/L



[50L 발효기]



[2000L 발효기]



[5000L 발효기]

그림 45. 5,000L 발효조 이용 고분자량 폴리감마글루탐산 생산 검토

○ 폴리감마글루탐산 원료의약품 대량생산 공정 확립

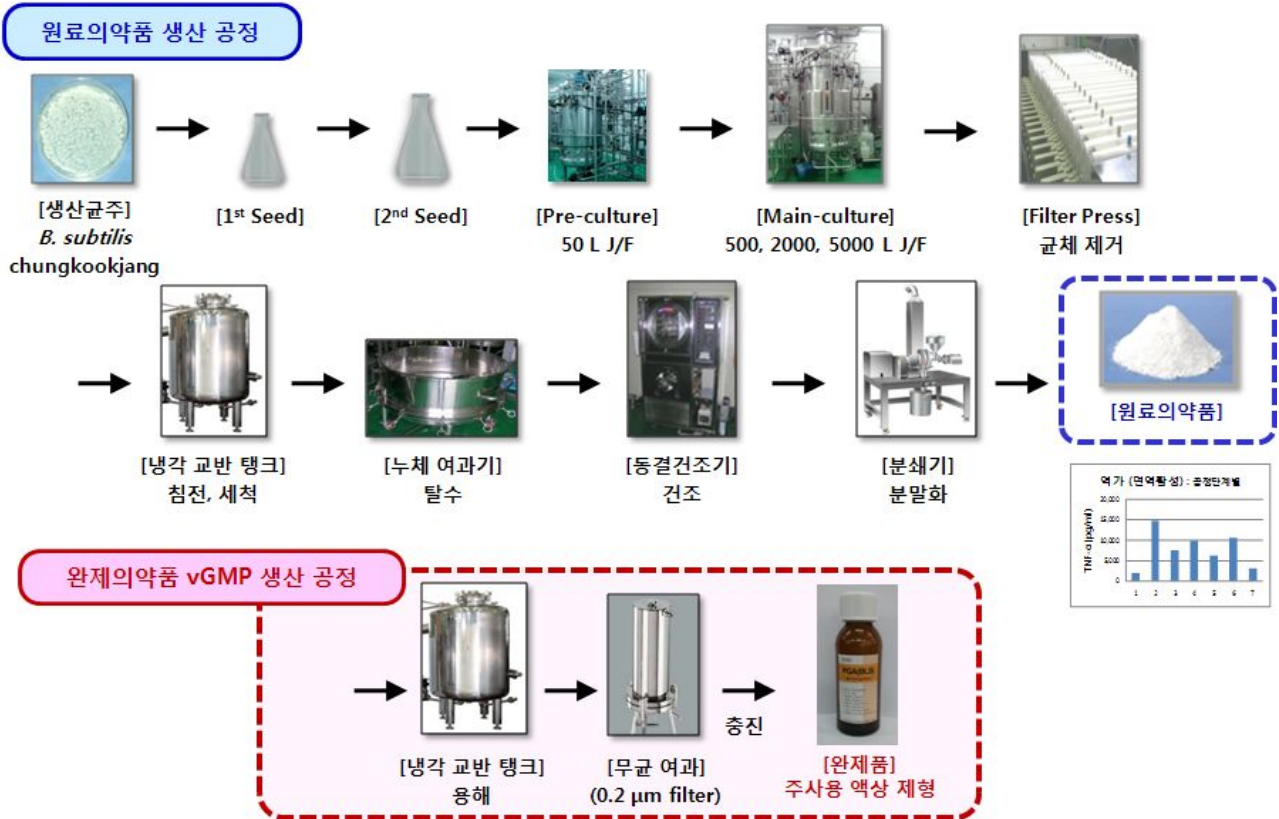


그림 46. 고분자량 폴리감마글루탐산 원료의약품 생산 공정.

마. 일반 기준 규격, 시험법 및 자체 설정 (분자량 및 함량 측정법 등) 규격 확립

- 고분자량 폴리감마글루탐산의 평균분자량 측정법을 겔여과법과 광산란법 등의 다양한 측정법을 상호 보완하여 신 인플루엔자 바이러스 감염억제 활성 보유 평균분자량 측정 및 기준

규격을 확립함

- 고분자량 폴리감마글루탐산의 유효성분 함량 기준 확립을 위하여 아미노산 측정법 및 겔 여과법을 상호 보완하여 유효성분 함량 기준규격을 확립함

1) 함량(정량) 분석법 및 물리화학적 특성 규명을 위한 평균분자량/물질 분포 분석법

가) 함량(정량)/평균분자량/물질 분포 분석법의 개요

- 주성분(폴리감마글루탐산)의 함량 분석을 위해서는 HPLC 분석법을 이용함
- 주성분이 고분자물질인 특징을 가지고 있기 때문에 평균분자량과 물질 분포를 확인하기 위해 GPC와 FPLC 분석법을 보완적으로 사용함
- 동일한 제조 공정에서 생산된 동일한 평균분자량을 가지는 주성분은 인위적인 추가 가공 또는 정제 공정을 거치지 않는 조건에서 동일한 물질 분포를 가지는 것을 FPLC 분석법을 통해 확인
- 따라서, 약효와 관련되는 주성분 확인 규격 설정 및 분석법에는 HPLC 분석법을 적용하고, 주성분의 동일성 여부를 분석하기 위해서는 보완적으로 GPC 분석법을 적용하여 평균분자량을 확인함
- 미지의 주성분(폴리감마글루탐산)의 동일성 여부를 분석하기 위해서는 GPC, FPLC, HPLC의 3가지 분석법을 사용함. 각 분석 방법의 기술적 특성을 이용하여 고분자 물질인 폴리감마글루탐산의 함량, 평균분자량 및 분자량 분포를 아래와 같이 분석법을 적용하고자 함

분석법	분석 항목	비고
GPC	평균분자량과 함량 분석	○ 고압 resin 충전 상태로 분자량의 표준곡선이 직선에 근접하기 때문에 평균분자량 측정에 사용
FPLC	분자량 분포 분석	○ polymer 자체의 특성(예, 선형 polymer의 길이에 따른 분류 가능)을 반영하여 분자량 분포 확인에 사용
HPLC	함량과 순도 분석	○ 샘플의 소수성과 친수성의 차이를 이용하여 분석하기 때문에 함량 측정에 사용

나) HPLC 분석법 이용 폴리감마글루탐산 함량(정량) 분석

(1) HPLC 분석법을 이용한 폴리감마글루탐산 함량(정량) 분석 개요

- 사용 컬럼 : Reversed-Phase analytical column
- Reversed-Phase analytical column은 hydrocarbon으로 치환된 silica bead가 충전되어 있음. 이 충전물들은 유기용매에 매우 친화도가 높아 일반 silica bead와는 반대로 물과의 친화성은 낮아져 있음. 즉 물을 용매로 통과시킬 때 소수성의 차이에 의해서 소수성이 강할수록 더 강하게 충전물과 결합하게 됨.
- 그리고 차츰 유기용매의 양을 증가 시키면 소수성이 약한 순으로 컬럼의 충전물에서 제거되게 되며, 이를 이용하여 분리하는 방식이 Reversed-Phase chromatography라 함.

% Carbon Load	15
Chemistry	C18
Mode	Reversed-Phase
Molecular Weight Range	N/A
Particle Shape	Spherical
Particle Size	5 μm
Particle Substrate	Silica

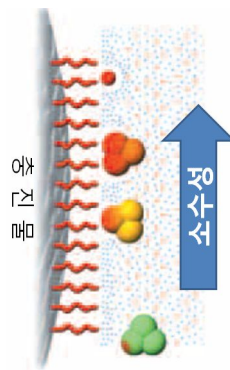


표 1. Reversed-phase column 충전물 성상과 모식도

○ 폴리감마글루탐산의 기본적으로 매우 높은 친수성을 가지는 반면 글루탐산, 글루탐산 올리고머 등은 폴리감마글루탐산에 비해서 높은 소수성을 가지고 있음. 따라서, 이들의 혼합물을 분석할 경우, 가장 친수성이 높은 폴리감마글루탐산은 먼저 충전물을 지나서 분리되고 차후에 기타 성분들이 차례대로 용출되어, 시료내부의 불순물이 제외된 폴리감마글루탐산의 함량 정보를 분석할 수 있음.

(2) 폴리감마글루탐산 함량(정량) 분석을 위한 HPLC 분석법

- 이 약 1 g을 정밀히 달아 물 100ml에 녹인 액을 시험용액으로 사용함. 시험용액 일정량을 취하여 아래의 조작조건에 따라 액체크로마토그램법에 따라 시험함.
- ① 표준액의 조제: 표준물질 100.0mg 취하여 0.1N NaOH 수용액에 녹여 표준원액 1% 용액을 제조한 후 이를 적절히 희석하여 표준액으로 사용함.
- ② 조작: 검액 및 표준액 20 μl 를 취하여 다음 실험조건에서 액체크로마토그램법에 따라 시험함.

<액체크로마토그램법의 조작조건>

- : 검출기(detector) : 자외부흡광광도계 (측정과장 220nm)
- : 컬럼(column) : 안지름 약 4.6mm, 길이 250mm인 스테인레스관에 5 μm 의 액체크로마토그래프용 옥타데실실릴화한 실리카 겔을 충전함. [Shiseido capcellpak C18 UG120(6.0mm×250mm, ODS, Japan) 또는 이와 동등한 것]
- : 이동상 : A 용매 - 20mM sodium phosphate monobasic (pH 7.0), 10N NaOH 수용액으로 조절, B 용매 - 5% acetonitrile 수용액
- : 유속/온도/주입량 : 1.0ml/분, 35 $^{\circ}\text{C}$, 20 μl
- : 농도구배 :

시간 (분)	용매	
	A (%)	B (%)
0	100	0
10	80	20
15	0	100
20	0	100

(3) HPLC 분석법 이용 폴리감마글루탐산 함량(정량) 분석

○ 표준검량선(Standard curve)의 제작

: 각기 농도의 폴리감마글루탐산 샘플에서 1분 이전에 나오는 peak을 기준으로 하여 검량선을 제작함. 아래는 위의 검량데이터를 기초로 한 검량선임

PGA (%)	PGA (mg/ml)	면적
FIH0531 FA 0.01%	0.10	590.8183
FIH0531 FA 0.02%	0.20	2549.1265
FIH0531 FA 0.04%	0.40	1378.1837
FIH0531 FA 0.06%	0.60	-
FIH0531 FA 0.08%	0.80	4435.3555
FIH0531 FA 0.10%	1.00	5912.3301

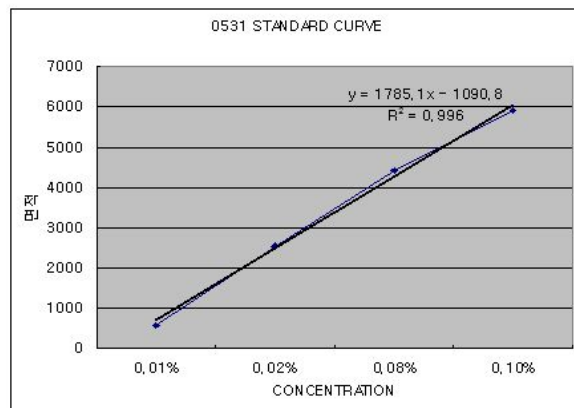


그림 47. 폴리감마글루탐산 검량선.

: 이와 같이 농도에 따른 변화도가 나타났고 상관성이 0.996으로 매우 높은 것을 알 수 있고, 이것으로 폴리감마글루탐산의 순도에 대한 검량이 가능함

① 평균분자량 (GPC) 분석법 <액체크로마토그래프법의 조작조건>

- 검출기 : RI detector
- 컬럼 : Viscotek GMPWXL (7.6 mm ID X 300mm)
- 이동상 : 0.1 M NaNO₃ (pH 7.0)
- 유속 : 0.8 ml/분
- 온도 : 40 °C
- 주입량 : 100 µl

② 물질분포 (FPLC) 분석법 <액체크로마토그래프법의 조작조건>

- 검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 215nm)
- 컬럼 : 안지름 약 70mm, 길이 600mm인 유리관에 47 µm의 액체크로마토그래프용 Sephacryl S-500을 충전한다.
- 이동상 : 0.25M NaCl 또는 0.25M NH₄Cl
- 유속 : 15 ml/분
- 온도 : 25 °C

- 주 입 량 : 3 ml

2. 폴리감마글루탐산의 제형확립 및 제형별 제품생산 공정 최적화 (근육주사용 항바이러스 제형)

가. 폴리감마글루탐산 제형 확립

© 동물용 의약품 폴리감마글루탐산의 최적 제형을 검토하기 위해 염종류에 따른 폴리감마글루탐산의 면역활성 및 항바이러스 활성을 분석한 결과, 폴리감마글루탐산칼륨이 TNF- α , IFN- β 및 항바이러스 활성이 타 제형과 비교하여 우수한 것으로 확인되었음 (그림 48).

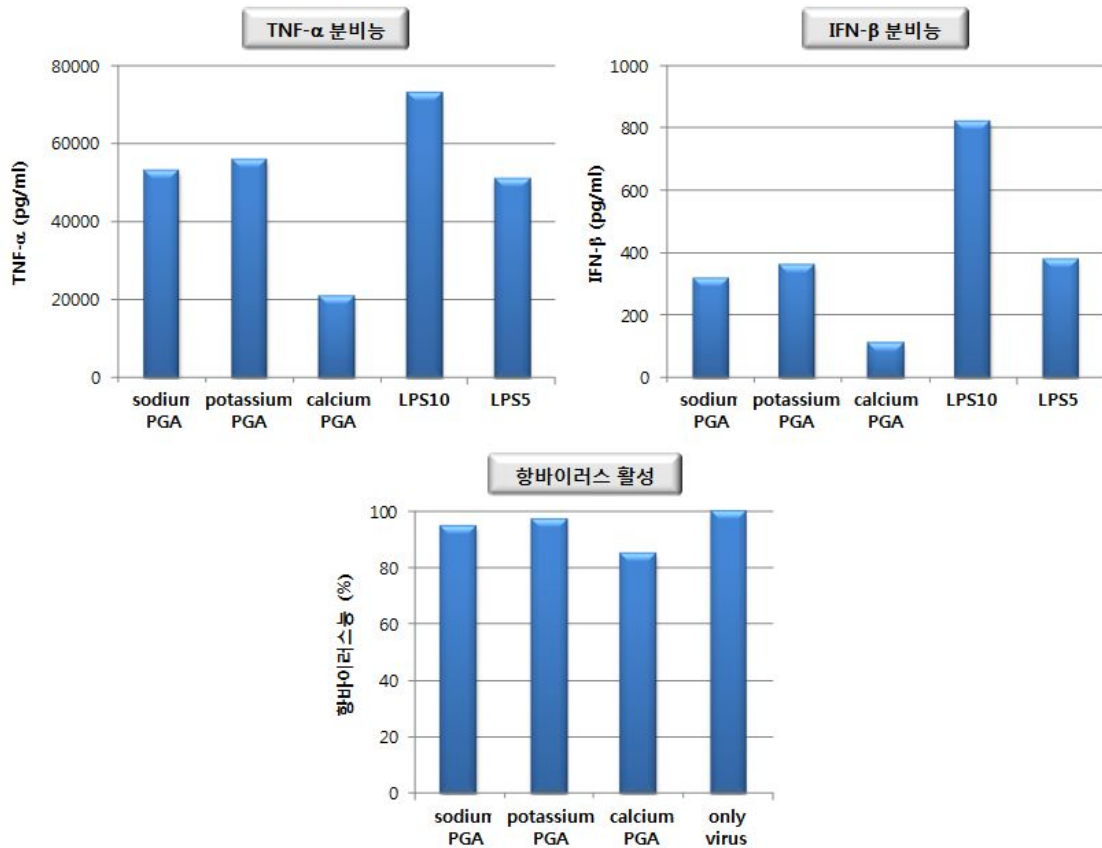


그림 48. 폴리감마글루탐산 제형별 면역활성 및 항바이러스능 비교

나. 폴리감마글루탐산 제품 생산공정 최적화

© 동물용 의약품 폴리감마글루탐산은 바실러스 서브틸리스 청국장 균주를 액상발효한 후 순수 정제 공정을 거쳐 얻어지는 고형물을 용액화하여 제조함. 고순도의 액상 폴리감마글루탐산은 생산까지 총 7일이 소요되며, 1주일 단위 연속생산이 가능함 (그림 49).

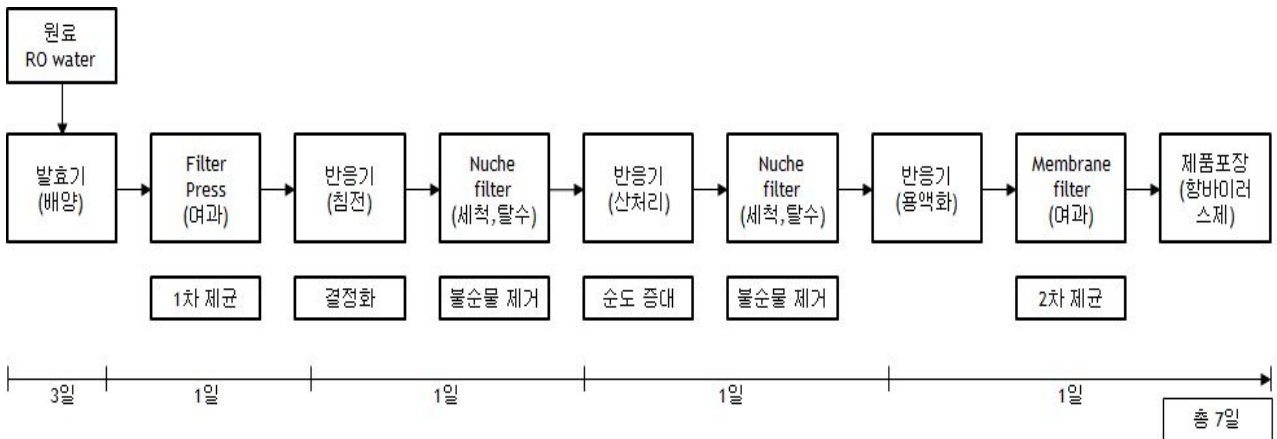


그림 49. 동물용 의약품 고순도 폴리감마글루탐산 액상 제형 생산공정

◎ 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 액상 제형의 품질 확보를 위하여 크린부스를 설치함으로써 무균 상태의 공간에서 여과 작업을 진행하고 있음. 크린부스는 HEPA필터(FFU)를 통해 유입된 공기가 수직층류방식으로 크린부스 안으로 들어와 내부를 무균 상태로 유지시켜 줌 (그림 50).

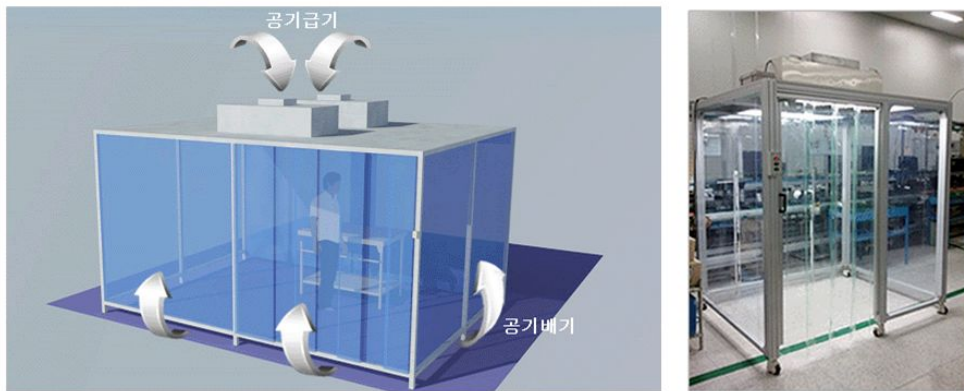


그림 50. 무균 상태 유지를 위한 크린부스 시스템

◎ 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 생산 제품의 안정적인 관리를 위해 0℃~4℃로 보관 가능한 cooling container를 비치하여 제품의 품질 유지가 가능함 (그림 51).



그림 51. 동물용 의약품 보관용 cooling container

다. 폴리감마글루탐산의 동물용 의약품 시제품 생산

◎ 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 최적 제형 검토를 통하여 검증된 제형으로 고순도 폴리감마글루탐산 생산공정 시스템으로 액상 제형의 시제품을 제조하였음 (그림 52).

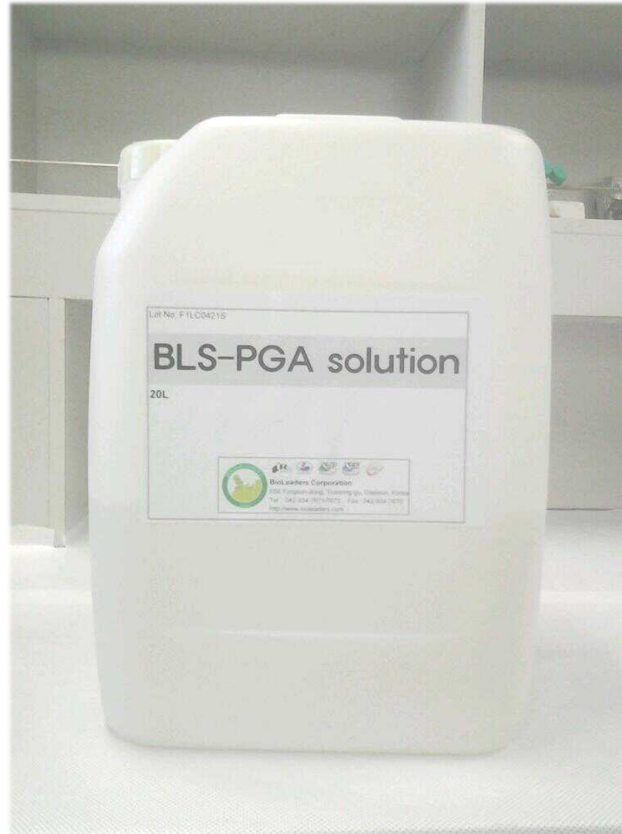


그림 52. 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 시제품

◎ 생산된 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 시제품은 원료 규격뿐만 아니라 세부적인 분석을 수행하여 동물용 의약품 원료로서의 품질에 문제가 없음을 확인하였음 (표 5).

구분	TNF		IFN	anti viral	점도 (cP)	평균분자량 (kDa) PD	DL ratio (D:L)	유리 glu (%)	흡광도		원소분석		Endo toxin (EU/ml)
	0.025%	0.005%	0.025%	0.025%					A260	A280	Ca	Mg	
동물용 의약품 시제품	LPS10 대비 88%	LPS10 대비 21%	LPS10 대비 25%	99%	372	2,900(3.3)	47:53	N.D.	0.03	0.026	0.13	0.22	24

표 5. 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 시제품 규격

라. 폴리감마글루탐산의 제형개발 및 제형별 기준 확립

(1) 일반기준규격, 시험법 및 자체규격 (분자량 측정) 확립

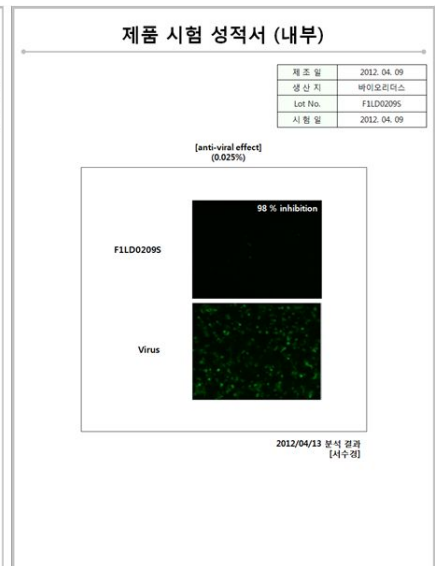
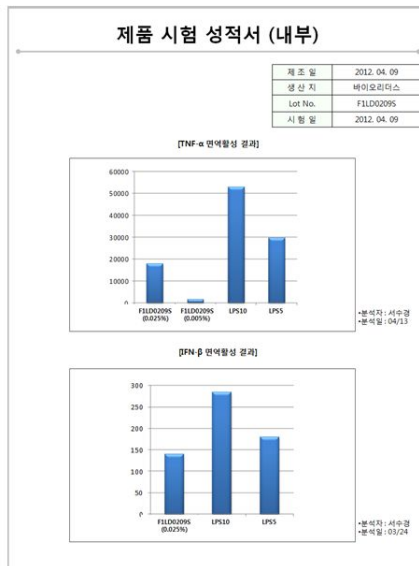
(가) 일반기준 항목 설정

◎ 폴리감마글루탐산 동물용 의약품의 일반기준규격 설정을 위한 시험 항목 결정

번호	항 목	분석법
1	제품 종류	
2	A600	
3	T600	
4	합량	HPLC method
5	pH	
6	점도	63 spindle, 60 rpm
7	평균분자량 (kDa) [PD]	GPC 분석
8	일반생균수	LB plate
9	색도	색도계 분석 (L*,a*,b*)
10	endotoxin	LAL assay kit
11	enterotoxin	Bacillus diarrhoeal enterotoxin visual immunoassay
12	Anti-viral effect	0.025% 처리
13	IFN-β stimulation	Mouse IFN Beta ELISA (0.025% 처리)
14	TNF-α stimulation	Mouse TNF Alpha ELISA (0.005% 처리)
15	중금속	ICP 분석
16	비소	ICP 분석
17	강열잔분	

◎ 폴리감마글루탐산 동물용 의약품 제품의 내부 시험성적서

제품 시험 성적서 (내부)				
제조일	2012. 04. 09	㈜바이오리디스 Tel. 042) 934-7671/2 Fax. 042) 934-7670 대안 유상구 흥신동 559		
생산지	바이오리디스	QA담당	QA종말	
Lot No.	F1LD02095			
시험일	2012. 04. 09			
상기 시험결과 등재에 대한 분석결과를 다음과 같이 보고합니다.				
번호	항 목	분석 결과	비 고	분석자
1	제품 종류	solution		김미영
2	A600	0.001		
3	T600	99.8		
4	합량	22.3 mg/ml	HPLC method	
5	pH	6.70		
6	점도	480 cP	63 spindle, 60 rpm	
7	평균분자량 (kDa) [PD]	3,900 kDa (R3)		
8	일반생균수	not detected	5일 결과	
9	색도	92.0, -24, 2.0	L*,a*,b*	
10	endotoxin	26 EU/ml	LAL assay kit	
11	enterotoxin	확정 예정 (4월 3일)	Bacillus diarrhoeal enterotoxin visual immunoassay	
12	Anti-viral effect	98 % inhibition	0.025% 처리	서수경
13	IFN-β stimulation	LPS10 대비 49 %	Mouse IFN-Beta ELISA (0.025% 처리)	김지연 서수경
14	TNF-α stimulation	LPS10 대비 3 %	Mouse TNF-Alpha ELISA (0.005% 처리)	
15	중금속	N.D.		김미영
16	비소	N.D.		
17	강열잔분			




(2) 기준 및 시험법 확립

◎ 동물용 의약품 원료 제품의 기준 및 시험법 확립

기준		시험방법	
성상 시험	무색투명한 액체이다.	동물용 의약품 공정서의 일반시험법	
확인 시험		식품첨가물 공전 폴리감마글루탐산 확인시험법	
함량 시험	제품 1ml당 Poly-γ-glutamic acid가 2% 이어야한다.	[시험법 별첨]	
pH 시험	6.5 ~ 7.5	동물용 의약품 공정서의 일반시험법 중 pH 측정법 (25℃)	
점도	150~500 cP	동물용 의약품 공정서의 일반시험법 중 점도측정법 중 회전점도계법에 따라 시험한다. 25℃ 항온조에서 30분간 방치 후 spindle 63, rpm 60으로 측정한다. 시료에 spindle을 장착하여 10 분 경과 후 수치를 확인한다.	
순도 시험	중금속	2 ppm이하	동물용 의약품 공정서의 일반시험법 중 중금속시험법
	비소	0.2 ppm이하	동물용 의약품 공정서의 일반시험법 중 비소시험법
강열잔분	3 % 이하	동물용 의약품 공정서의 일반시험법 중 강열잔분측정법	
멸균도	음성	동물용 의약품 공정서의 일반시험법 중 무균시험법	
내용량	표시량의 100 % 이상이어야 한다.	동물용 의약품 공정서의 일반시험법 중 내용량시험법	

◎ 동물용 의약품 원료 제품의 제품성적서 (Certificate of analysis)



BioLeaders Corporation
 559 Yongsan-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea
 Tel: 042-934-7871/7872 Fax: 042-934-7870
<http://www.bioleaders.com>

Certificate of Analysis

1. Product name : BLS-PGA solution
 2. Lot number : F1LD0209S
 3. Manufacture date : April. 9. 2012

항목	규격	결과	
성상	무색투명한 액체	무색투명한 액체	합격
함량	2 % 이상	2.23	합격
점도 [25 °C]	150 cP ~ 500 cP	480 cP	합격
pH	6.5 ~ 7.5	6.7	합격
중금속	2 ppm 이하	불검출	합격
비소	0.2 ppm 이하	불검출	합격
강열잔분	3 % 이하	1.5%	합격
멸균도	음성	음성	합격

Date: April. 16. 2012.

Jae-Chul Choi
 Q/A
 BioLeaders Corporation

(3) 바이러스 감염억제 활성검증 시험법 확립 및 시설 보안

(가) 항바이러스 활성 분석법 확립

- ◎ 사용하는 virus : GFP (Green fluorescence protein)를 발현하는 PR8 Influenza virus 사용
- ◎ 원리 : γ -PGA를 처리한 Raw cell 264.7 mouse macrophage cell line에 GFP 발현 PR8 virus의 저해효과를 확인함
- ◎ 측정방법
 - ① 24 well plate에 1well 당 3×10^5 cell(in 500 μ l DMEM media) 준비
 - *DMEM media 조성 : DMEM + 10% FBS + antibiotic/anti-mycotic
 - ② 약 16시간 후 media를 제거하고 PBS로 1회 washing하고 PGA 처리군, negative control, positive control로 나누어 처리함
 - *DMEM media 조성 : DMEM + 0% FBS + antibiotic/anti-mycotic
 - [처리군]
 - Negative Control: replace with DMEM + 1% FBS
 - Positive Control: replace with DMEM + 1% FBS
 - PGA treatment 0.025% PGA
 - ③ 9 hour incubation (37°C, 5% CO₂)
 - ④ Media를 제거하고 PBS로 1회 washing 후 PR8-gfp virus를 PGA 처리군, positive control에 infection 시킴
 - ⑤ 2 hour incubation 후 infectant를 제거하고 PBS로 1회 washing
 - ⑥ 새로운 media로 교체
 - * DMEM media 구성 : DMEM + FBS 1% + antibiotic/anti-mycotic
 - ⑦ 12 hour incubation하고 형광현미경 관찰

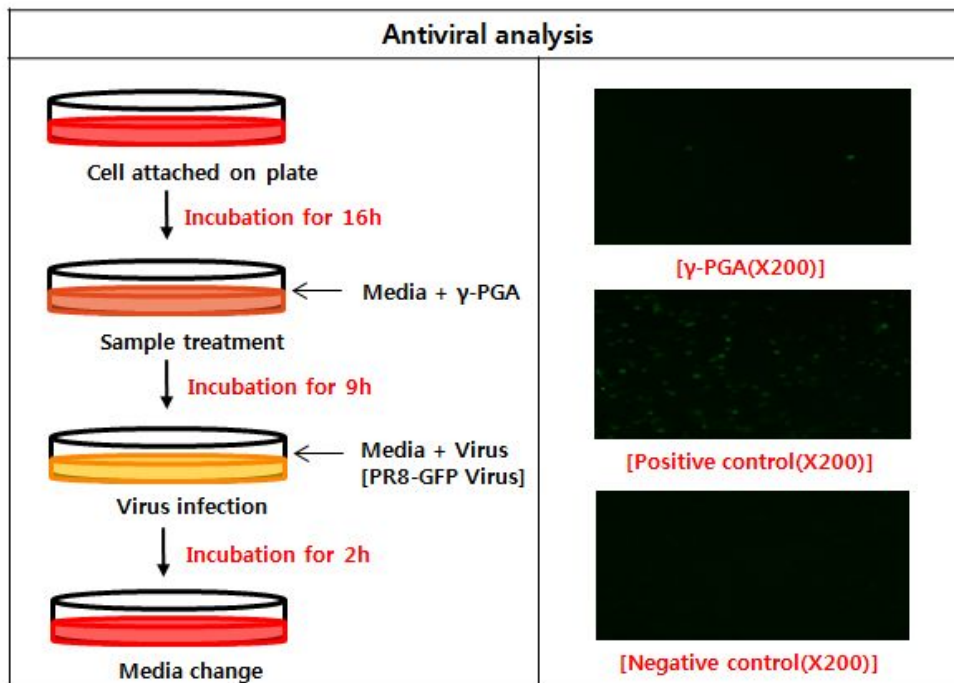


그림 53. 항바이러스 활성 측정 방법 모식도 및 결과

(나) 대식세포를 이용한 TNF- α cytokine 분비 활성 분석법 확립

- ◎ cell line : RAW264.7 macrophage cell line
- ◎ 원리 : γ -PGA를 처리한 Raw cell 264.7에서 분비되는 TNF- α 측정
- ◎ 측정방법
- ① 24 well plate에 1well 당 2×10^5 cell (in 500 μ l DMEM media) 준비
*DMEM media 구성 : DMEM + 10% FBS + antibiotic/anti-mycotic
- ② 16시간 후 PGA을 FBS가 없는 DMEM로 0.025%, 0.005%로 희석하여 처리
- ③ 24시간 incubation
- ④ 상층액을 centrifuge (13000rpm, 10min) 후 상층액 확보
- ⑤ TNF- α ELISA 수행 (Mouse TNF ELISA Set, BD 555268)

(다) 대식세포를 이용한 IFN- β cytokine 분비 활성 분석법 확립

- ◎ cell line : RAW264.7 macrophage cell line
- ◎ 원리 : γ -PGA를 처리한 Raw cell 264.7에서 분비되는 IFN- β 측정
- ◎ 측정방법
- ① 24 well plate에 1well 당 2×10^5 cell (in 500 μ l DMEM media) 준비
*DMEM media 구성 : DMEM + 10% FBS + antibiotic/anti-mycotic
- ② 16시간 후 PGA을 FBS가 없는 DMEM로 0.025%로 희석하여 Plate에 처리
- ③ 9시간 incubation
- ④ 상층액을 centrifuge (13000rpm, 10min) 후 상층액 확보
- ⑤ IFN- β ELISA 수행 (Mouse IFN beta ELISA Kit, PBL 42400-1)

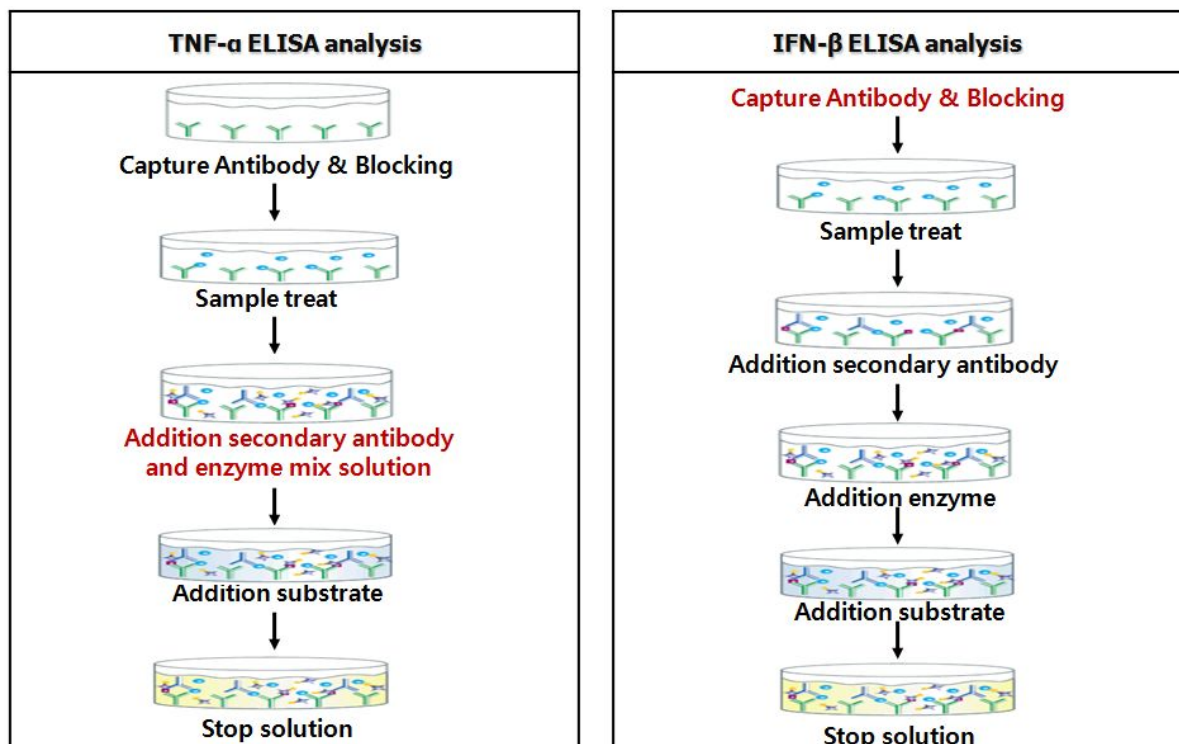


그림 54. TNF- α 및 IFN- β ELISA 분석 모식도

제 3 절 바이오폴리머의 안전성(독성) 실험

1. 폴리감마글루탐산의 안전성 시험

가. 국소독성시험

(1) 피부자극시험

- 폴리감마글루탐산 용액을 토끼의 피부에 1회 처치한 후, 피부반응과 피부자극성의 유무 및 그 정도를 평가하기 위하여 0.5 mL의 시험물질을 적용한 3겹의 패취(약 $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$)를 부착하여 시험한 결과 투여 후 24, 48 및 72 시간째의 관찰에서 시험물질투여부위의 찰과 및 비찰과부위에서 홍반 및 부종 등의 피부반응은 모든 예에서 확인되지 않았음.
- 본 시험 조건에서 시험물질인 폴리감마글루탐산 용액은 토끼 피부에 대해서 자극이 없는 물질로 판단됨.

(2) 2주간 연속 피부자극성 시험

- 시험물질인 폴리감마글루탐산 용액을 연속적으로 투여한 후, 국소적으로 나타나는 누적피부자극성 여부 및 정도를 평가하기 위하여 시험물질원액을 0.03 mL씩 투여부위 각 1부위(약 $2 \times 2 \text{ cm}^2$)에 1일 1회, 2주간연속으로 14회, 개방경피에 투여한 결과 시험물질투여부위 및 대조부위에서 투여 후 모든 관찰시간에 홍반 및 부종 등의 피부반응은 모든 예에서 관찰되지 않았음.
- 본 시험 조건에서 시험물질인 폴리감마글루탐산 용액은 토끼피부에 대해서 연속피부자극성이 없는 물질로 판단됨.

(3) 안자극성 시험

- 시험물질인 폴리감마글루탐산 용액을 토끼의 안점막에 1회 처치한 후, 안자극성의 유무 및 그 정도를 평가하기 위하여 결막낭(conjunctival sac)에 시험물질원액 0.1 mL 투여한 결과 시험물질투여 후 1, 24, 48, 72 및 96시간째 관찰에서 각막, 홍채 및 결막 등의 안자극성은 모든 예에서 확인되지 않았음.
- 본 시험 조건에서 시험물질인 폴리감마글루탐산 용액은 토끼의 안점막에 대해서 자극이 없는 물질로 판단됨.

나. 면역독성 시험

(1) 광감작성 시험

- 시험물질인 폴리감마글루탐산 용액의 광감작성 유발가능성을 Hartley계의 수컷 기니픽을 사용하여 Adjuvant & Strip법으로 검토히기 위하여 시험물질원액 0.1 ml 씩 감작부위에 개방도포한 결과 시험물질군의 야기 후 24 및 48 시간의 관찰에서 광조사 및 비광조사부위에서 홍반 및 부종 등의 피부반응은 10마리 모두에서 관찰되지 않았음.
- 본 시험 조건에서 시험물질인 폴리감마글루탐산 용액은 광감작성이 없는 물질로 판단됨.

(나) 피부 감작성 시험

- 기니픽을 이용한 피부감작성시험(Maximization 법)을 실시하여 인체 피부에 대한 알레르기 유발가능성을 검토하기 위하여 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 %(v/v)의 시험물질을 0.1 mL씩 피내투여-1차감작, 0.1 mL씩을 포함한 2×2 cm² 패취 부착-2차감작-한 결과 좌우의 야기부위에 100% 시험물질 및 주사용수로 24 시간 폐색철폐하여 야기한 결과, 홍반 및 부종 등의 피부반응은 모든 예에서 관찰되지 않았음.
- 본 시험 조건에서 시험물질인 폴리감마글루탐산 용액은 피부감작성이 없는 물질로 판단됨.

다. 광독성 시험

- 시험물질인 폴리감마글루탐산 용액의 피부에 대한 광독성 유발가능성을 검토하기 위하여 기니픽의 피부에 장파장자외선(320~400 nm)을 적용하여 일어나는 피부이상반응을 평가[약 2×2 cm² 부위에 시험 물질원액 0.05 ml 개방도포]한 결과 시험물질군 및 시험물질대조군은 모든 관찰시간에서 광조사 유무에 관계없이 홍반 및 부종 등의 피부반응이 모든 예에서 관찰되지 않았음.
- 본 시험조건에서 시험물질인 폴리감마글루탐산 용액은 광독성이 없는 물질로 판단됨.

2. 폴리감마글루탐산의 닭 근육투여 용량에 대한 안전성 시험

- 고분자 폴리감마글루탐산의 닭에서의 근육투여 시 용량에 대한 안전성을 시험하기 위하여 1주령 산란계 병아리에 2%의 폴리감마글루탐산 용액을 수당 0.025ml, 0.05ml, 0.1ml, 0.2ml 용량으로 근육주사하고 10일간 관찰하였는데 주사의 편리성을 위하여 각각의 용량은 PBS 희석액을 추가하여 총 주사량은 0.2ml가 되게 하였음.
- 총 시험군은 5개의 시험군으로 구성하였으며, 각 군당 시험계는 5수씩 편성하여 각 군별 희석액으로 희석된 각각의 폴리감마글루탐산 0.2ml를 왼쪽 가슴근육에 투여하고 10일간 관찰하였으며, 시험군의 구성은 표 4에 나타내었음.

시험군	시험물질	동물수	시험물질투여량 (mL/animal)	희석액 (PBS)
1군	PBS	5	0.0	0.2
2군	rPGA	5	0.025	0.175
3군	rPGA	5	0.05	0.15
4군	rPGA	5	0.1	0.1
5군	rPGA	5	0.2	0.0

표 4. 안전성 시험군의 구성

- 관찰항목으로는, 폴리감마글루탐산(rPGA) 투여 후 10일간 모든 병아리에 대하여 폐사율 및 일반증상을 관찰하였고, 각 그룹의 모든 병아리에 대하여 시험물질 투여 전, 투여 후의 10일간의 체중 변화를 측정하였음. 또한 시험물질 투여 후 10일간의 관찰기간 종료일에 모두 안락사시켜 주사 부위를 포함한 전신장기의 병변 유무를 관찰하였음.
- 폴리감마글루탐산(rPGA) 투여 후 10일간 관찰결과로 폐사는 없었으며 특이적인 임상증상도 없었음. 부검소견에서도 주사 부위의 염증소견은 관찰되지 않았으며 기타 장기의 육안 병변 역시 관찰되지 않았음.
- 폴리감마글루탐산(rPGA) 투여 후 처치군 4군과 5군에서 대조군(1군) 보다 통계적으로 유의적인 체중증가가 관찰 되었음(z-검정, 유의수준 0.05).

구분	기간	개체 별 체중(g)					평균	표준 편차	증체율 (%)
1군 (대조 군)	시험 전	66.0	64.3	61.2	65.2	66.2	64.6	1.818	243.2
	시험 후	167.1	177.6	152.1	149.5	139.0	157.1	13.643	
2군	시험 전	63.0	72.4	57.4	67.9	57.8	63.7	5.802	257.1
	시험 후	146.0	181.3	157.9	149.5	184.2	163.8	15.991	
3군	시험 전	63.0	62.5	63.9	63.3	66.0	63.7	1.128	248.8
	시험 후	164.3	162.0	149.4	161.2	156.0	158.6	5.333	
4군	시험 전	54.5	63.8	67.0	61.3	66.2	62.6	4.500	275.0
	시험 후	165.6	168.9	185.9	174.0	165.9	172.1	7.550	
5군	시험 전	66.9	61.2	70.7	68.4	62.0	65.8	3.676	266.1
	시험 후	192.5	188.3	162.7	170.0	162.5	175.2	12.771	

표 5. 폴리감마글루탐산 투여 후 증체량 변화

- 결론적으로 1주령의 닭에서 폴리감마글루탐산 0.2ml까지 근육투여는 병증 및 폐사를 일으키지 않았으며 부검 시 접종부위를 포함하여 기타 장기에 육안으로 관찰되는 병변도 관찰되지 않았음. 다만, 처치군 4군과 5군에서 대조군 보다 통계적으로 유의적인 체중증가가 관찰되었음(z-검정, 유의수준 0.05).

3. 폴리감마글루탐산의 독성 시험

가. 마우스와 비글견을 이용한 근육주사 독성 시험

(1) 마우스를 이용한 근육주사 독성 시험

- ICR계 마우스에서 폴리감마글루탐산의 급성독성을 알아보기 위하여 암·수 마우스에 2,000 mg/kg를 1회 근육 주사하였다. 음성대조군에는 생리식염수를 1 mL/kg 주사하였다. 관찰기간 동안 시험물질 투여에 기인한 치사동물 및 일반 중독증상은 관찰되지 않았음. 시험물질 투여 후 체중은 음성대조군 및 시험군에서 시간경과에 따라 정상적인 증가하였다. 부검결과 육안적인 이상소견은 관찰되지 않았음.
- 따라서 폴리감마글루탐산을 ICR계 마우스에 1회 근육 주사한 결과, 2,000 mg/kg에서 급성독성이 관찰되지 않았으므로 폴리감마글루탐산의 LD₅₀은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 판단됨.

(2) 비글견을 이용한 근육주사 독성 시험

- 비글견에서 폴리감마글루탐산의 급성독성을 알아보기 위하여 암·수 비글견에 1,000 mg/kg를 1회 근육 주사하였음. 음성대조군에는 생리식염수를 1 mL/kg 주사하였다. 관찰기간 동안 시험물질 투여에 기인한 치사동물 및 일반 중독증상은 관찰되지 않았음. 시험물질 투여 후 체중은 음성대조군 및 시험군에서 시간경과에 따라 정상적인 증가하였다. 부검결과 육안적인 이상소견은 관찰되지 않았음.
- 따라서 폴리감마글루탐산을 비글견에 1회 근육 주사한 결과, 1000 mg/kg에서 급성독성이 관찰되지 않았으므로 폴리감마글루탐산의 LD₅₀은 1000 mg/kg 이상인 것으로 판단됨.

나. 랫트와 토끼를 이용한 생식독성(최기형성) 시험

(1) 랫트를 이용한 생식독성(최기형성) 시험

- 이 실험은 폴리감마글루탐산의 생식독성(최기형성)의 안전성을 확인하기 위하여 교배가 확인된 건강한 암컷 SD 랫트를 이용하여 본 시험을 수행하였음.
- 음성대조군과 폴리감마글루탐산 투여군은 최저용량군 (250 mg/1mL/kg), 중간용량군 (500 mg/1 mL/kg) 최고용량군 (1000 mg/1 mL/kg)의 3 단계 용량군을 설정하여 시험물질을 임신 6일에서 18일까지 매일 대퇴부에 근육주사 하였음.
- 모든 투여군에서 모체에는 어떠한 영향이나 변화도 나타나지 않았으며, 시험물질 투여 후 체중은 음성대조군 및 시험군에서 시간경과에 따라 정상적인 증가가 하였음($P>0.05$).
- 음성대조군과 폴리감마글루탐산 3 단계 용량군은 임신기간, 태자 및 태반의 무게, 성비, 흡수된 태아, 사망태아 등에서 유의할 만한 변화를 관찰하지 못하였고($P>0.05$), 외표, 내부장기 및 골격기형검사에서도 모든 군에서 아무런 이상을 관찰할 수 없었음.
- 따라서 폴리감마글루탐산을 랫트에 기관형성기간 동안 근육 주사한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 모독성 및 배·태아 발생독성은 관찰되지 않았으며, 폴리감마[®]의 무해용량 (No Observed Adverse Effect Levels)은 최고용량군인 1000 mg/kg/day 이상으로 사료됨.

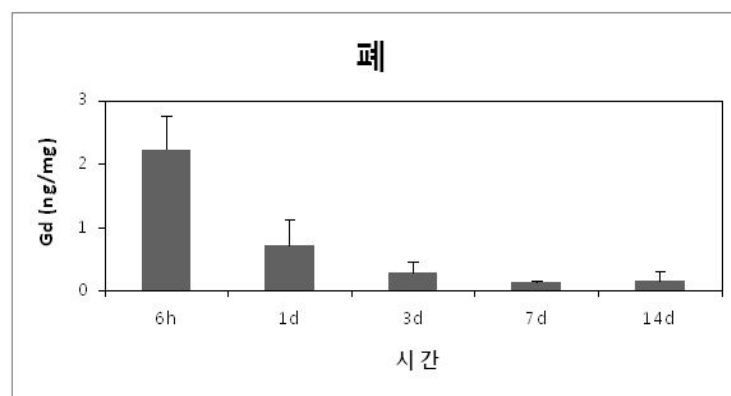
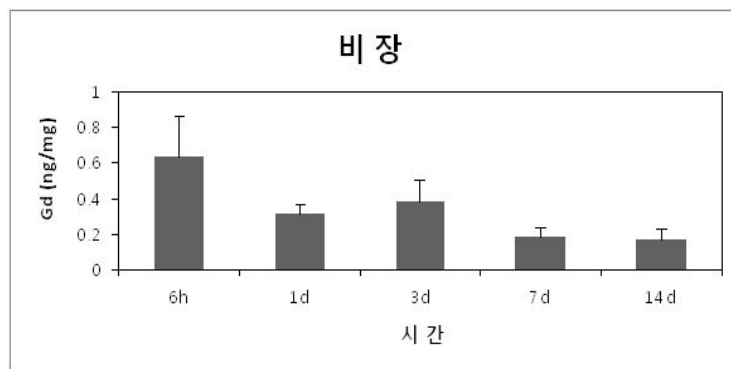
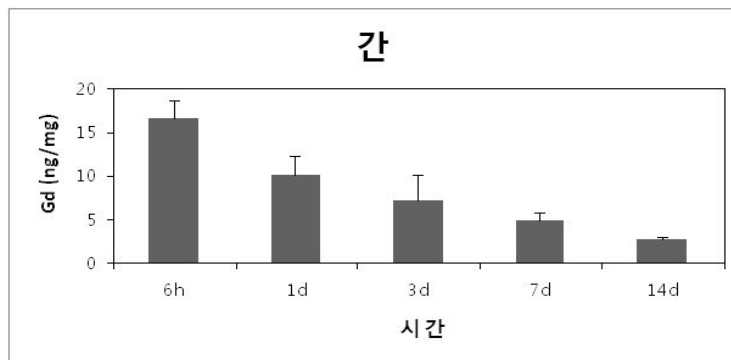
(2) 토끼를 이용한 생식독성(최기형성) 시험

- 이 실험은 폴리감마글루탐산의 생식독성(최기형성)의 안전성을 확인하기 위하여 교배가 확인된 건강한 암컷 NZW 토끼를 이용하여 본 시험을 수행하였음.
- 음성대조군과 폴리감마글루탐산 투여군은 최저용량군 (250 mg/1mL/kg), 중간용량군 (500 mg/1 mL/kg) 최고용량군 (1000 mg/1 mL/kg)의 3 단계 용량군을 설정하여 시험물질을 임신 6일에서 18일까지 매일 대퇴부에 근육주사 하였음.
- 모든 투여군에서 모체에는 어떠한 영향이나 변화도 나타나지 않았으며, 체중 및 사료섭취량은 음성대조군 및 폴리감마글루탐산 3 단계 용량군에서 시간경과에 따라 정상적인 증가가 하였음 ($P>0.05$).
- 음성대조군과 폴리감마글루탐산 3 단계 용량군에서 임신기간, 태자 및 태반의 무게, 성비, 흡수된 태아, 사망태아 등에서 유의할 만한 변화를 관찰하지 못하였고 ($P>0.05$), 외표, 내부장기 및 골격기형검사에서도 모든 군에서 아무런 이상을 관찰할 수 없었음.
- 따라서 폴리감마글루탐산을 토끼에 기관형성기간 동안 근육 주사한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 모독성 및 배·태아 발생독성은 관찰되지 않았으며 폴리감마글루탐산의 무해용량 (No Observed Adverse Effect Levels)은 최고용량군인 1000 mg/kg/day 이상으로 사료됨

3. 폴리감마글루탐산의 약리, 잔류, 대사 시험

- 폴리감마글루탐산을 근육주사 투여 방법을 이용하여 마우스에 투입한 후에, 6시간, 1일, 3일, 7일, 14일이 경과한 후에 폴리감마글루탐산의 생체 내 장기별 분포를 분석함으로써, 체내에서의 대사거동을 분석함 : 근육주사 마우스 15마리 (시간별 3마리) x 4개의 장기 (간, 비장, 폐, 신장)
- 투여된 폴리감마글루탐산의 정량분석을 위해, 폴리감마글루탐산에 Gd 성분을 부착함으로써, ICP-MS(Inductivity Coupled Plasma Mass Spectrometer, X-series, Thermo Elemental, 한국기초과학지원 연구원 환경과학연구부)를 이용하여 정량화 가능, 투여 방법은 근육주사로 함.
- 근육주사로 투입된 폴리감마글루탐산을 6시간, 1일, 3일, 7일, 14일이 경과한 후에 4개의 장기 (간, 비장, 폐, 신장)를 적출한 후, 건조하고, 건조된 각각의 장기를 ICP-MS를 이용하여 폴리감마글루탐산의 정량 분석 실시.
- 시험결과를 요약하면,
 - 폴리감마글루탐산(분자량 6000kDa)을 대상으로 마우스에, 근육주사를 통하여 투여한 결과, 일반 중독 증상은 관찰되지 않았음.
 - 근육주사를 통하여 투여하였을 때, 모든 장기에서의 이상 소견은 발견되지 않았음.
 - 근육주사를 통하여 투여하였을 때, 간, 비장, 폐, 신장에서의 건조된 각 장기의 무게를 기준으로 Gd 이온의 농도를 ICP-MS를 이용하여 측정하였음.
 - 근육주사 전에 폴리감마글루탐산에 부착되어 있는 Gd 의 농도를 ICP-MS를 이용하여 측정 한 결과 약 24 %의 부착률을 확인하였음.
 - 이러한 분석결과를 바탕으로, 근육주사에 시간에 따른 각 장기에 분포하는 폴리감마글루탐산의 양을 정량화 할 수 있었음.

- 근육주사를 통하여 마우스내에 도입된 폴리감마글루탐산은 초기에 대부분이 간에 축적되었으며, 2주동안 관찰결과, 시간에 따라 간에 축적된 양이 점점 감소하는 경향을 보였다. 비장과 폐에서도 비슷한 경향이 관찰되었음.
- 근육주사를 통하여 마우스에 도입된 폴리감마글루탐산이 시간에 따라서, 신장을 통하여 배출되는 꾸준히 배출되는 것을 ICP-MS를 통하여 확인할 수 있었으며, 시간에 따라서 배출되는 양이 점점 감소되는 경향을 통하여, 체내의 간, 비장, 폐 등에 축적되었던 폴리감마글루탐산이 생체 내의 대사작용이나 분해에 의해 신장을 통하여 배출된다는 것을 확인할 수 있었.



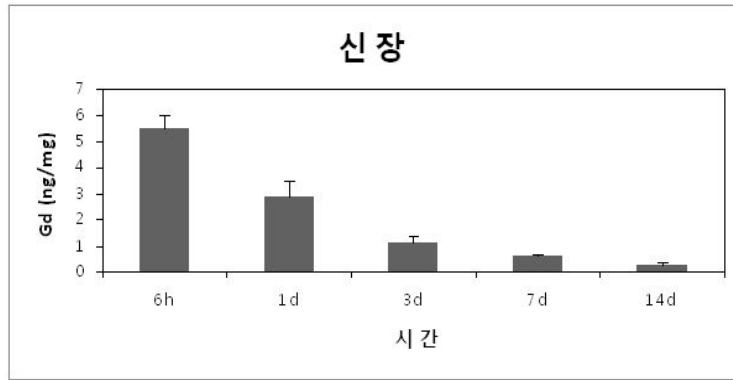


그림 55. 시험결과 : 근육주사 투여 후 각 장기별 분포(Gd)

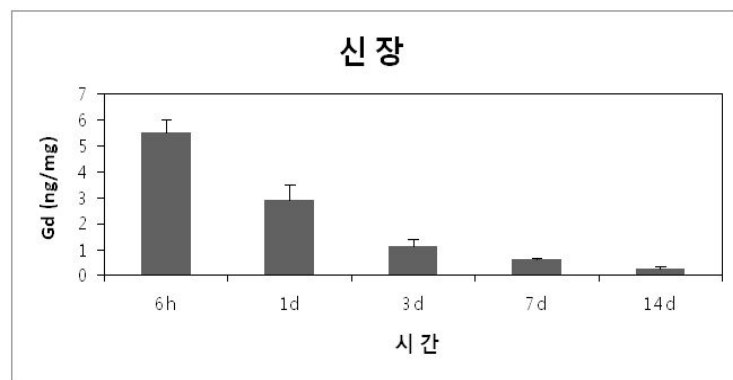
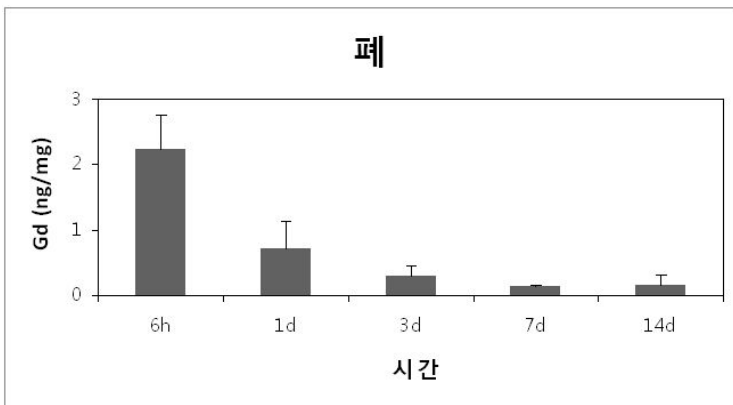
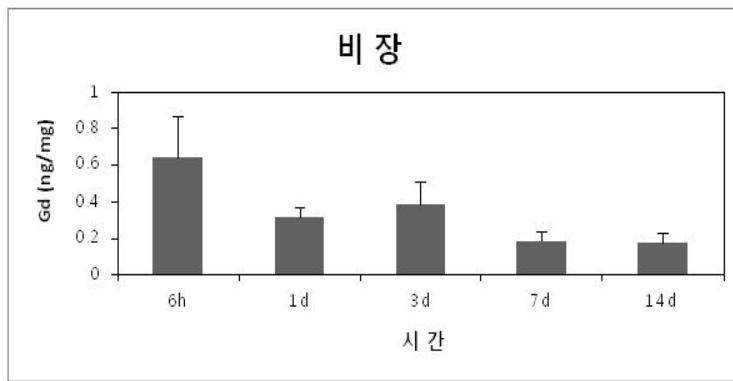


그림 56. 시험결과 : 근육주사 투여 후 각 장기별 분포 (폴리감마글루탐산)

제 4 절 바이오폴리머의 현장적용 기술

1. 상용화 백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 백신효능 증강 시험

○ 고분자 폴리감마글루탐산의 닭에서의 상용화된 뉴캐슬병(ND) 백신 접종에 대한 면역반응 증가 효능을 검사하기 위하여 시판중인 GNI oil vaccine(MSD, Intervet Inc)백신을 사용하였는데, 이 백신은 뉴캐슬병(ND), 닭전염성기관지염(IB) 및 전염성F낭병(IBD) 바이러스가 함유된 혼합 백신임. 4주령의 SPF 닭 24수를 시험계로 사용하였으며, 시험군은 12수씩 나누어 2개 군으로 편성하였으며 그 구성은 표 1에 나타내었음.

시험군	시험물질	동물수	PGA주사량 (mL/animal)	백신접종량 (mL/animal)
1군	GNI vaccine+PBS	12	0.1	0.5
2군	GNI vaccine+rPGA	12	0.1	0.5

표 1. 백신효능 증강 시험군의 구성

○ 24수 모두에 GNI백신을 오른쪽 가슴 근육으로 투여하였고, 1군은 PBS 0.1cc를 왼쪽 가슴근육에 투여하였으며 2군은 rPGA 0.1cc를 역시 왼쪽 가슴근육에 투여하였음. 백신 접종 후 1주, 2주, 3주, 4주, 6주 및 8주에 각각 전수 채혈하여 항체검사를 수행하였음. NDV에 대한 항체가 검사는 OIE의 방법에 따라 혈구응집억제 반응을 실시하였고, IB에 대한 항체가 검사는 ELISA kit의 방법에 따라 실시하였고, IBDV에 대한 항체가 검사는 OIE의 방법에 따라 CEF에서 바이러스 중화시험 통해 중화항체의 역가를 측정하였음.

주령	계사	검사			검사 수	역가별 마릿 수												평균	편차	표준 편차	
		항목	방법	기준		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				12
5.0	PGA 1주	ND	HI	log2	12	6	3	2	1										0.8	1.0	7.9
5.0	PBS 1주	ND	HI	log2	12	9	2		1										0.5	1.2	7.9
6.0	PGA 2주	ND	HI	log2	11						1		5	5					8.3	0.9	6.9
6.0	PBS 2주	ND	HI	log3	12							4	5	3					7.9	0.8	6.9
7.0	PGA 3주	ND	HI	log4	11							2	8	1					7.9	0.5	6.9
7.0	PBS 3주	ND	HI	log5	11						1	2	7	1					7.7	0.8	6.9
8.0	PGA 4주	ND	HI	log6	12							7	5						7.4	0.5	6.9
8.0	PBS 4주	ND	HI	log7	12						1	3	6	2					7.8	0.9	6.9
10.0	PGA 6주	ND	HI	log8	12							1	7	4					7.3	0.6	6.9
10.0	PBS 6주	ND	HI	log9	12						1	2	3	6					7.2	1.0	6.9
12.0	PGA 8주	ND	HI	log6	12						1	4	5	2					6.7	0.9	6.4
12.0	PBS 8주	ND	HI	log7	12						3	1	5	3					6.7	1.2	6.4

표 2. ND 바이러스 HI 항체역가 측정치

주령	검사수	역가별 마릿 수							평균	편차
		0	1	2	3	4	5	6		
5.0	대조 1주	12	10	2					0.2	0.4
5.0	rPGA 1주	12	9	3					0.3	0.5
6.0	대조 2주	12		7	4	1			1.5	0.7
6.0	rPGA 2주	12		6	5	1			1.6	0.7
7.0	대조 3주	12		1	8	3			2.2	0.6
7.0	rPGA 3주	12	1		11				1.8	0.6
8.0	대조 4주	12		2	6	4			2.2	0.7
8.0	rPGA 4주	12		1	9	2			2.1	0.5
10.0	대조 6주	12		2	7	3			2.1	0.7
10.0	rPGA 6주	12			11	1			2.1	0.3
12.0	대조 8주	12		1	10	1			2.0	0.4
12.0	rPGA 8주	12		2	7	3			2.1	0.7

표 3. IB 바이러스 ELISA 항체역가 측정치

계사	검사			검사수	역가별 마릿 수												평균	편차
	항목	방법	기준		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
PBS 대조 1주	IBD	VN	log2	12	3		3	2	3	1							3.5	2.5
rPGA 1주	IBD	VN	log2	12	2	1	1	3	2	2	1						3.0	2.0
PBS 대조 2주	IBD	VN	log2	12				1	3	1		4	3				6.0	1.9
rPGA 2주	IBD	VN	log2	12				1	2	3	4					2	7.0	2.5
PBS 대조 3주	IBD	VN	log2	12								1	3	5	1	2	10.0	1.2
rPGA 3주	IBD	VN	log2	12				1					6	2	3		9.5	2.2
PBS 대조 4주	IBD	VN	log2	17					1	2	1	3	4	5	1		8.5	1.7
rPGA 4주	IBD	VN	log2	12				1		1	2	4	4				7.7	1.5
PBS 대조 6주	IBD	VN	log2	12						2	1	3	4		2		8.4	1.6
rPGA 6주	IBD	VN	log2	12				1			2	6	2	1			7.8	1.5
PBS 대조 8주	IBD	VN	log2	12					2	1	1	4	1	1	1	1	8.1	2.2
rPGA 8주	IBD	VN	log2	12						4	2	3	2	1			7.5	1.4

표 3. IBD 바이러스 중화항체 역가 측정치

- 폴리감마글루탐산(rPGA)의 닭에서의 상용화된 백신에 대한 면역증가 효과를 평가하기 위하여 4주령의 SPF닭에 GNI 불활화 오일백신(NDV, IBV, IBDV)을 접종하고 폴리감마글루탐산 (rPGA) 0.1cc를 근육 접종한 그룹과 PBS를 접종한 그룹으로 나누어 8주간 관찰하였

음. 백신접종 항원에 대한 항체가 변화 여부를 관찰한 결과 상기의 결과에서 보는 바와 같이 3가지 항원에 대한 항체가 모두에서 폴리감마글루탐산 (rPGA) 투여군과 PBS투여군 간의 유의적인 차이를 관찰 할 수 없었음.

2. 폴리감마글루탐산의 면역증강 효능 평가 시험

- 폴리감마글루탐산의 면역증강 효과를 시험하기 위하여 인플루엔자바이러스의 주요항원 부위인 HA 단백질 중에서 다양한 혈청형의 인플루엔자바이러스를 중화할 수 있으며 cross protection을 가능케 하는 HA2 부분을 E. coli에서 발현하였음 이는 향후 새로운 신규 subunit 백신의 candidate 로 universal vaccine 용도로 사용할 수 있음 또한 이를 비강점막으로 투여하여 호흡기 질병인 인플루엔자 감염을 억제하고자 시도하였으며 폴리감마글루탐산의 면역 증강 효과를 확인하기 위해 혈청내 항체 형성 여부 (그림 57) 및 폐와 장에서의 항체 형성 여부를 측정 한 결과 항원만을 투여한 경우에 비해 유의성 있게 높은 항체가를 유도 하였음 (그림 57)

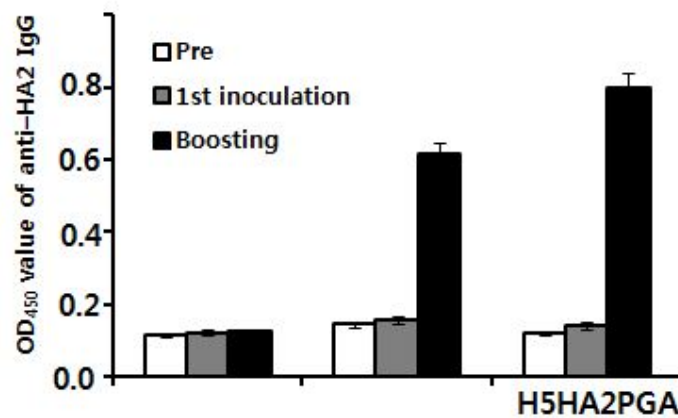


그림 57. 인플루엔자바이러스 HA2 항원과 폴리감마글루탐산 혼합투여를 통한 혈중 항체 형성

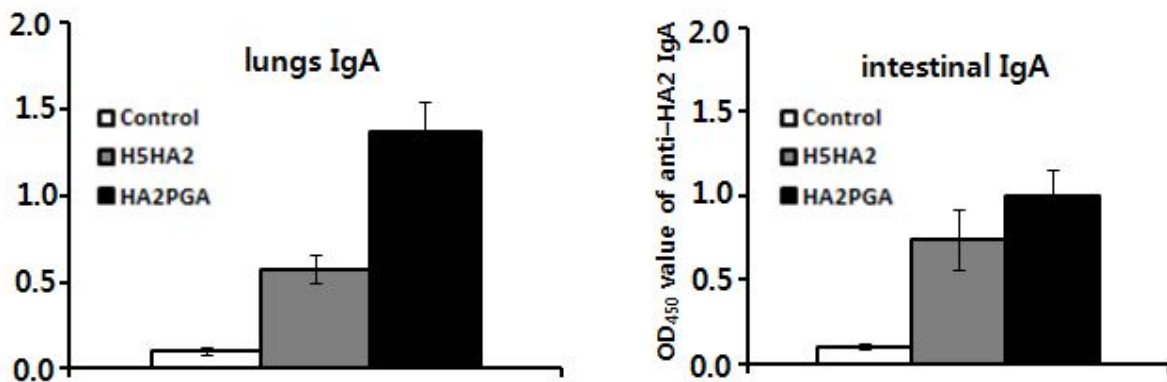


그림 58. 인플루엔자바이러스 HA2 항원과 폴리감마글루탐산 혼합투여를 통한 점막 항체 형성

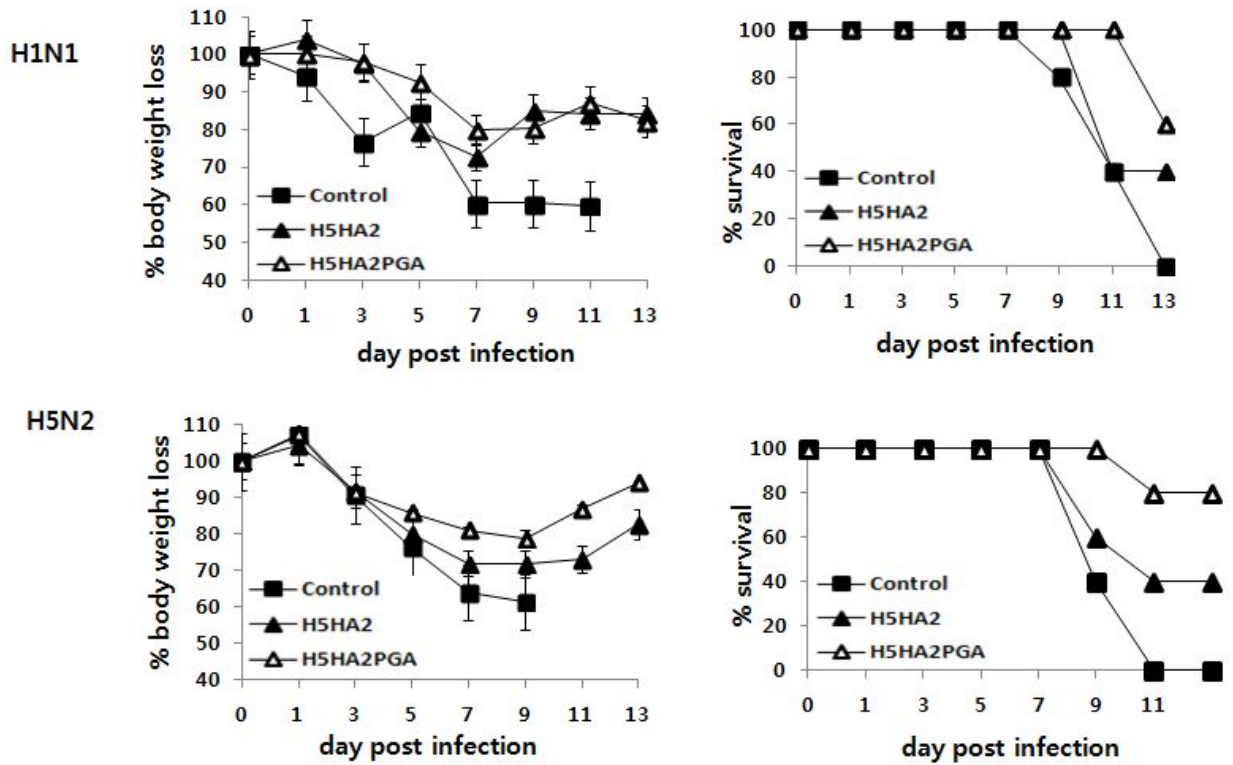


그림 59. 인플루엔자바이러스 HA2 항원과 폴리감마글루탐산 혼합투여를 통한 방어능 효과

- 인플루엔자바이러스의 HA2 단백질과 폴리감마글루탐산 혼합 백신 투여 후 두가지 다른 바이러스공격접종 결과 H1N1 인플루엔자 바이러스 감염에 대해서는 60%의 방어능을 나타냈으며 H5N2를 공격접종한 경우는 80%의 방어능을 나타내었음

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

세부연구목표		달성도 (%)	연구개발 수행내용
<ul style="list-style-type: none"> ● 바이오폴리머의 면역유도 기전 및 효능검증 	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 분자량별, 농도별 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위한 <i>In vitro</i> 세포 자극 실험연구 	100%	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 분자량별, 농도별 폴리감마글루탐산의 면역활성 효능 검증 (마우스 면역세포에서 인터페론 및 염증관련 유전자, 단백질의 발현 유도 검증, 면역세포내 항바이러스 단백질인 Mx 단백질의 발현여부 등 유효 확인하여 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능의 가능성 및 면역활성 여부를 검증을 위한 <i>In Vitro</i> 세포 자극 실험 연구 ◎ 폴리감마글루탐산의 면역활성 효능 검증에 대한 연구 결과를 <i>Antiviral Research</i> (IF 4.4) 논문에 게재하였음.
<ul style="list-style-type: none"> ● 뉴캐슬병 (ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효과 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 형광물질 (GFP)이 융합된 뉴캐슬병 (ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (<i>In vitro</i>) 		<ul style="list-style-type: none"> ◎ 마우스 면역세포에서의 형광물질 (GFP)이 융합된 뉴캐슬병 (ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (<i>In Vitro</i>) ◎ Chicken embryo fibroblast 세포, chicken peripheral blood monocyte (PBMC) 세포에서의 형광물질 (GFP)이 융합된 뉴캐슬병 (ND) 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (<i>In Vitro</i>)
	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 폴리감마글루탐산의 동물(닭) 임상실험으로부터의 뉴캐슬병 (ND) 바이러스 감염 효능 검증 연구 (<i>In Vivo</i>) 		<ul style="list-style-type: none"> ◎ ① 다양한 농도의 폴리감마글루탐산을 이용, ② 다양한 연령의 SPF 닭 이용, ③ 다양한 투여경로의 적용, ④ 다양한 양의 병원성 뉴캐슬병 (ND) 바이러스 등을 적용한 임상실험으로부터 뉴캐슬병 (ND) 바이러스 감염 억제 효능 검증 연구 (<i>In Vivo</i>)

세부연구목표		달성도 (%)	연구개발 수행내용
● 인플루엔자 바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효과 검증	◎ 형광물질 (GFP)이 융합된 인플루엔자바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (In vitro)		◎ 마우스 면역세포에서의 형광물질 (GFP)이 융합된 인플루엔자바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (In Vitro) ◎ 면역 세포에서의 형광물질 (GFP)이 융합된 인플루엔자바이러스를 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (In Vitro)
	◎ 폴리감마글루탐산의 동물 임상실험으로부터의 인플루엔자바이러스 감염 효능 검증 연구 (In Vivo)		◎ 다양한 투여경로의 적용, 다양한 양의 바이러스 등을 적용한 임상실험으로부터 인플루엔자 바이러스 감염 억제 효능 검증 연구 (In Vivo) ◎ 저병원성 조류 인플루엔자바이러스를 이용한 다양한 투여 경로에 따른 바이러스 증식억제 효능 검증 (In Vivo)

세부연구목표		달성도 (%)	연구개발 수행내용
● 가금바이러스 질병억제제 대량생산 및 제품화	◎ 고분자 폴리감마글루탐산 생산을 위한 배양조건 최적화 연구	100%	◎ 고분자 폴리감마글루탐산의 30 L 생산 실험에서 폴리감마글루탐산 생산량은 39.52 g/L 의 yield 와 1.52 g/L/h 의 productivity를 확인
	◎ 고분자 폴리감마글루탐산을 산업적 규모로 대량 생산하기 위한 scale-up 검토 및 최적화 연구	100%	◎ 고분자 폴리감마글루탐산의 500 L scale up 실험에서 폴리감마글루탐산 생산량은 36.72 g/L 의 yield 와 1.53 g/L/h 의 productivity를 확인
	◎ 고분자 폴리감마글루탐산 생산 공정 개발	100%	◎ Scale-up(5,000 L 발효조)을 통한 저분자 및 고분자 폴리감마글루탐산 대량생산공정 확립
	◎ 일반 기준 규격, 시험법 및 자체 설정 (분자량 및 함량 측정법 등) 규격 연구	100%	◎ 일반 기준 규격, 시험법 및 자체 설정 (분자량 및 함량 측정법 등) 규격 확립
	◎ 폴리감마글루탐산 제형 확립	100%	◎ 동물용 의약품 폴리감마글루탐산의 최적 제형을 검토하기 위해 염종류에 따른 폴리감마글루탐산의 면역활성 및 항바이러스 활성을 분석
	◎ 폴리감마글루탐산 제품 생산공정 최적화	100%	◎ 동물용 의약품을 위한 고순도의 액상 폴리감마글루탐산의 생산 공정 최적화
	◎ 폴리감마글루탐산의 동물용 의약품 시제품 생산	100%	◎ 고순도 폴리감마글루탐산 생산공정 시스템으로 액상 제형의 시제품을 제조
	◎ 일반기준규격, 시험법 및 자체규격 (분자량 측정 확립)	100%	◎ 폴리감마글루탐산 동물용 의약품의 일반기준규격 설정을 위한 시험 항목 결정, 내부 시험성적서, 시험법 확립, 제품성적서 (Certificate of analysis) 결정
	◎ 바이러스 감염억제 활성 검증 시험법 확립 및 시설 보안	100%	◎ 항바이러스 활성 분석법 확립 ◎ 바이러스 감염억제 활성검증 시험법 확립 및 시설 보안

세부연구목표		달성도 (%)	연구개발 수행내용
● 폴리감마글루탐산의 안전성 시험	◎ 폴리감마글루탐산의 안전성 시험	100%	◎ 국소독성시험으로 토끼를 이용하여 피부자극시험, 2주간 연속피부자극성 시험, 안자극시험을 시험 ◎ 면역독성시험으로 기니픽을 이용하여 광감작시험과 피부감작성시험 ◎ 광독성시험으로 기니픽을 이용하여 수행
	◎ 폴리감마글루탐산의 독성 시험	100%	◎ 마우스와 비글견을 이용한 근육주사 독성시험 ◎ 랫트와 토끼를 이용한 생식독성 (취기 형성) 시험
	◎ 폴리감마글루탐산의 약리, 잔류, 대사 시험	100%	◎ ICP-MS를 이용한 체내에서 G Φ 부착된 폴리감마 [®] 의 정량화를 통한 잔류 및 대사시험 수행

세부연구목표		달성도 (%)	연구개발 수행내용
● 바이오폴리머의 면역유도 및 현장 적용 기술	◎ 상용화 백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 백신효능 증강 시험	100%	◎ 고분자 폴리감마글루탐산의 닭에서 상용화된 뉴캐슬병(ND) 백신 접종에 대한 면역반응 증가 효능을 검사하기 위하여 시판중인 GNI oil vaccine(MSD, Intervet Inc)백신과 병용투여 연구
	◎ 폴리감마글루탐산의 면역증강 효능 평가 시험	100%	◎ 폴리감마글루탐산 (rPGA)의 면역증강 효능의 일반적 특성을 확인하기 위하여 인플루엔자 항원을 이용한 항체형성 증가 및 방어능 증가 효능 평가 수행

◎ 향후 연구개발목표의 달성 계획 및 내용

세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<p>● 폴리감마글루탐산을 이용한 비강용 항바이러스 동물용 제제 연구 및 개발</p>		<p>◎ 폴리감마글루탐산을 이용한 신규 제품 제형 연구 및 개발 ◎ 동물 비강 분무용 항바이러스 제제 연구 및 개발</p>

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

- ◎ 폴리감마글루탐산은 Bacillus subtilis 가 분비하는 고분자 biopolymer로서 TLR 4를 매개로 하는 특이 작용 및 이를 이용한 면역 증강 효과 및 항바이러스 효과를 본 연구진이 세계 최초로 규명하고 다양한 질병에 적용하고자 하였으며 특히 우리나라에 큰 피해를 일으키고 있는 인플루엔자에 대해서는 그 효과가 입증되어 닭에서 적용될 수 있는 경제적 방법으로 활용될 수 있음
- ◎ 기존의 질병백신이 아닌 새로운 형태 다양한 백신 제형에 추가되어 백신의 면역 유도능을 증가시킬 수 있는 면역증강제로 활용될 수 있으며 특히 점막 투여 백신의 경우 점막 면역 유도에 뚜렷한 효과가 있음
- 본 연구결과는 최근의 감염병 예방을 위한 가장 중요하게 대두되고 있는 미래 적용형 기술 개발로 다양한 형태의 제형 및 제제로 향후 개발 될 수 있으며 현 사람에서는 human papillomavirus 감염에 의한 여성의 자궁경부암 1단계 질환을 치료할 수 있는 기전 및 연구 결과로 임상 2상 (Phase II) 연구가 진행되고 있어 새로운 국내 개발 신약으로의 가능성이 높은 상황임
- 이와 같은 결과는 세계적으로도 TLR 를 매개로 면역 증강을 통한 신약 개발에 매우 선도적인 역할을 하고 있음 또한 다양한 바이러스 감염증에 대한 적용 실험을 통해 그 적용 범위를 확대할 수 있어 가능성이 높음
- 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능 검증 및 대량생산, 제품화 기술개발은 첨단 바이오 소재개발을 위한 범용기반 기술로 자리 잡을 수 있을 것으로 판단되며 첨단 바이오소재 산업에 다양한 접근방법을 제공함으로써 바이오소재 산업의 다변화 및 신규 응용 상품의 개발을 통한 바이오산업 전반의 활성화에 기여할 수 있음

- 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산을 이용한 바이러스 감염에 대한 억제제 개발기술은 종래의 백신제형과 다르게 투여가 용이하도록 제형의 개발을 통한 효능의 극대화를 이룰 수 있고, 바이러스등의 병원체 감염을 직접적으로 방어할 수 있는 인터페론과 연관된 innate 면역체계를 동원함으로써 기존의 백신 및 예방제와는 효능 면에서도 차이를 나타낼 수 있고 그 성과를 기대할 수 있는 기술로 축산분야에 많은 기여를 할 것이라 기대
- 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 바이러스 감염에 대한 억제제 제품화 기술개발은 바이오소재를 이용한 동물용 의약품의 제형 개발기술 노하우를 축적시킬 수 있는 계기가 될 것으로 기대됨.
- 본 연구 개발 결과 및 노하우는 가금외 더 나아가 축산을 비롯한 인간의 면역을 증강시키기 위해 활용할 수 있는 기술을 확립함으로써 이 분야에 대한 국제경쟁력 강화 및 고부가가치의 생명과학산업 및 바이오벤처산업의 육성 및 활성화를 이룰 수 있음
- 아미노산고분자 소재인 폴리감마글루탐산의 면역학적 응용 연구 및 제형개발기술은 기술 선진국과 경쟁하고 있는 국내 아미노산 고분자소재 분야의 연구 응용기술을 향상시켜 선진국의 기술수준을 뛰어넘을 수 있는 토대를 제공할 것임

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화 · 산업화 계획

- 대단위의 산업동물의 면역유도를 통한 바이오폴리머제제의 개발은 투여 방법의 개선 및 사양관리의 용이성으로 인해 산업적으로 큰 경제적 이익을 추구할 수 있음
- 상기 기술에 의한 바이오폴리머제제의 개발은 낮은 생산비용, 안정성 및 사양이 용이하고 비용이 저렴한 이점들을 가지고 있어 막대한 경제적 이점을 갖고 있음
- 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 사용으로 항생제 사용감소에 따른 항생제 오남용으로 인한 양계농가의 항생제잔류 및 내성문제를 해결할 수 있는 대안을 확보할 것으로 기대됨
- 연구개발의 결과로 생산되는 항바이러스 억제제 제품의 수요증가로 국내 동물약품회사의 매출증대에 기여함은 물론, 국내자원을 이용한 안정적인 공급량 확보로 수입동물약품에 비해 경제적 측면에서 양계농가의 부담을 덜어줄 수 있으며, 수입동물 약품의 가격 폭등 등에 따른 공급 차질 문제를 해결할 수 있을 것으로 기대됨
- 동물약품의 수입대체 효과 및 해외수출을 통한 국부창출이라는 이중 효과를 거둘 것으로 기대됨
- 수입 축산물에 대항하여 국내 축산물의 고급화에 일조함으로써 수입축산물과의 차별화 전략의 일환으로 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대됨
- 폴리감마글루탐산을 이용한 바이러스 억제제 개발은 국내 양계산업 및 더 나아가 축산을 비롯한 인간의 바이러스성 질병을 억제하기 위하여 활용할 수 있는 기술을 확립함으로써 고부가가치의 생명과학 제품개발의 활성화 및 원천기술 확보에 따른 이 분야에 대한 국제 경쟁력 강화를 통한 시장선점이 기대됨

제 2 절 교육 · 지도 · 홍보 등 기술확산 계획 등

- 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능은 바이러스를 직접 target으로 하는 다른 여러 항바이러스 물질이나 백신과는 달리 체내의 면역계를 증가시킴으로 인한 바이러스 감염억제의 개념이므로 본 과제에서 제시하는 기술개발은 가축에 있어서의 다양한 바이러스성 질병 및 소모성질병들을 예방, 관리하기 위한 중요 기술로 활용될 수 있음.
- 상기의 기술은 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 바이러스 감염억제 효능을 확인한 후,

기술의 특허출원 및 제품화에 그 목적이 있고, 산업화를 위해서 국내의 동물약품회사인 (주)동방을 통하여 상품화로 농가에 보급될 수 있도록 추진할 계획에 있음.

- 또한, 상기의 기술에 의한 바이러스 감염 억제제는 백신으로의 접목뿐 만아니라 사료를 통한 가축으로의 전달로 농장에 직접 보급, 전달되어 다양한 질병의 예방에 적용될 수 있음
- 본 기술은 양계를 비롯한 축산에의 적용이외에 궁극적으로 인간의 다양한 질병을 예방하기 위해 활용될 수 있는 기술임
- 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수						과제종료후

제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

1. 연구성과목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	1									
2차년도	1	1					2			
3차년도		1					1			
계	2	2					3			

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

2. 연구논문

계재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Induction of type I interferon by high molecular poly- γ -glutamate protects B6.A2G- <i>Mx1</i> mice against influenza A virus.	문호진, 이종수	김철중	성문희, 부하령등	Antiviral Research	94	국외	SCI (IF 4.4)
2012	Mucosal immunization with recombinant influenza hemagglutinin protein and poly gamma-glutamate/chitosan nanoparticles induces protection against highly pathogenic influenza A virus.	문호진, 이종수	김철중	성문희, 부하령등	Veterinary Microbiology	160	국외	SCI (IF 3.3)

제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능은 바이러스를 직접 target으로 하는 다른 여러 항바이러스 물질이나 백신과는 달리 체내의 면역계를 증가시킴으로 인한 바이러스 감염억제의 개념이므로 본 과제에서 제시하는 기술개발은 가축에 있어서의 다양한 바이러스성 질병 및 소모성질병들을 예방, 관리하기 위한 중요 기술로 활용될 수 있음.
- 또한, 상기의 기술에 의한 바이러스 감염 억제제는 백신으로의 접목뿐 만아니라 사료를 통한 가축으로의 전달로 농장에 직접 보급, 전달되어 다양한 질병의 예방에 적용될 수 있음
- 본 기술은 양계를 비롯한 축산에의 적용이외에 궁극적으로 인간의 다양한 질병을 예방하기 위해 활용될 수 있는 기술임

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Prophylactic treatment with Toll-like receptor ligands enhances host immunity to avian influenza virus in chickens

Avian influenza viruses (AIV) pose a threat towards the health of both poultry and humans. To interrupt the transmission of the virus, novel prophylactic strategies must be considered which may reduce the shedding of AIV. One potential is the

prophylactic use of Toll-like receptor (TLR) ligands. Many cells of the immune system express TLRs, and cellular responses to TLR stimulation include activation and the production of cytokines. TLR ligands have been employed as prophylactic treatments to enhance host resistance to pathogens both in mammals and chickens. Therefore, the present study was conducted to determine whether TLR ligands may be used prophylactically in chickens to enhance host immunity to AIV. Chickens received intramuscular injections of either low or high doses of the TLR ligands poly I:C, lipopolysaccharide (LPS) and CpG ODN. Twenty-four hours post-treatment, chickens were infected with the low pathogenic avian influenza virus H4N6, and both oropharyngeal and cloacal virus shedding were assessed on days 4 and 7 post-infection. To identify potential correlates of immunity, spleen and lungs were collected on days 2, 4 and 7 post-infection for RNA extraction. The results suggested that all of the TLR ligand treatments induced a significant reduction in virus shedding, with the TLR3 ligand poly I:C conferring the greatest AIV immunity compared to control birds, followed by CpG ODN and LPS. Furthermore, transcriptional analysis of gene expression in the spleen and lungs suggest IFN- α and IL-8 as correlates of immunity conferred by poly I:C, and IFN- γ for CpG ODN and LPS. In conclusion, TLR ligands, have the ability to enhance host immunity against AIV, and future studies should consider exploring the combinatory effects of poly I:C and CpG ODN prophylaxis in conjunction with AIV vaccination.

Vaccine 30 (2012) 4524–4531

2. In vivo administration of ligands for chicken toll-like receptors 4 and 21 induces the expression of immune system genes in the spleen

Toll-like receptors (TLRs) are a group of conserved proteins that play an important role in pathogen recognition in addition to the initiation and regulation of innate and adaptive immune responses. To date, several TLRs have been identified in chickens, each recognizing different ligands. TLR stimulation in chickens has been shown to play a role in host-responses to pathogens. However, the mechanisms through which TLRs modulate the chicken immune system have not been well examined. The present study was conducted to characterize the kinetics of responses to TLR4 and TLR21 stimulation in chickens following intramuscular injections of their corresponding ligands, lipopolysaccharide (LPS) and CpG oligodeoxynucleotides (ODNs), respectively. To this end, relative expression of cytokine genes in the spleen was determined at 2, 6, 12 and 24 h after injection of TLR ligands. The results indicated that LPS strongly induced the up-regulation of some immune system genes early on in the response to treatment, including interferon (IFN)-, interleukin (IL)-10, and IL-1. Furthermore, treatment with CpG ODN promoted the up-regulation of major histocompatibility complex (MHC)-II, IFN- and IL-10. The response to CpG ODN appeared to be somewhat delayed compared to the response to LPS. Moreover, we found a significant increase in IFN-gene expression in response to LPS but not CpG ODNs. Future studies may be aimed to further characterize the molecular mechanisms of TLR activation in chickens or to exploit TLR

agonists as vaccine adjuvants.

Veterinary Immunology and Immunopathology 131(2009)285–289

3. GS-9620, an Oral Agonist of Toll-Like Receptor-7, Induces Prolonged Suppression of Hepatitis B Virus in Chronically Infected Chimpanzees

GASTROENTEROLOGY 2013;144:1508 – 1517

4. Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens

Toll-like receptors (TLRs) are evolutionarily conserved pattern recognition receptors that have been identified in mammals and avian species. Ligands for TLRs are typically conserved structural motifs of microorganisms termed pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Several TLRs have been detected in many cell subsets, such as in macrophages, heterophils and B cells, where they mediate host-responses to pathogens by promoting cellular activation and the production of cytokines. Importantly, TLR ligands help prime a robust adaptive immune response by promoting the maturation of professional antigen presenting cells. These properties make TLR ligands an attractive approach to enhance host-immunity to pathogens by administering them either prophylactically or in the context of a vaccine adjuvant. In this review, we discuss what is known about the immunostimulatory properties of TLR ligands in chickens, both at the cellular level as well as in vivo. Furthermore, we highlight previous successes in exploiting TLR ligands to protect against several pathogens including avian influenza virus, Salmonella, Escherichia coli, and Newcastle disease Virus.

Veterinary Immunology and Immunopathology 152(2013):191–199

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 본 연구과제를 수행하면서 새로 구입한 연구시설 및 장비는 없음

제 8 장 참고문헌

1. Adler HE, Damassa A.J. 1979. Toxicity of endotoxin to chicks. *Avian Dis. Abstract.* 23:174-178.
2. Alexander, D.J. 2000. Newcastle disease and other avian Paramyxoviruses. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2000, 19(2):443-462.
3. Alexander, D.J. 2001. Newcastle Disease. *British Poultry Science.* 42:5-22
4. Ali, H.A., Sawada, T., Hatakeyama, H., Ohtsuki N., Itoh, O. 2004. Characterization of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology* 100:43 - 53.
5. Azim A.C., Cao H., Gao X., Joo M.S., Malik A.B., Breemen R.B., Sadikot R.T., Park G.Y., and Christman J.W. Regulation of cyclooxygenase - 2 expression by small GTPase Rac2 in bone marrow macrophages. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 2007, 293:L668-L673.
6. Bae, R.S., Park, C., Choi, J.C., Poo, H.Y., Kim, C.J., Sung, H.S. 2010. Effects of Ultra high Molecular Weight Poly-glutamic Acid from *Bacillus subtilis* (chungkookjang) on corneal wound healing. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(4): 803-808.
7. Bohls, R.L., Smith R., Ferro P.J., Silvy N.J., Li, X., and Collison, E. 2006. The use of flow cytometry to discriminate avian lymphocytes from contaminating thrombocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 2006, 30:843 - 850.
8. Brownlie, R and Allan B. 2011. Avian Toll-like receptors. *Cell tissue Res* 343:121-130.
9. Chiang, S.C., Veldhuizein, Barnes F.A., Craven J., Haagmans, H., and Bingle C.D. 2011. Identification and characterization of BPI/LBP/PLUNC-like gene repertoire in chicken reveals the absence of a LBP gene. *Dev Comp Immunol.* 2011, 35(3): 285 - 295.
10. de Leeuw, O and Peeters, B. 1999. Complete Nucleotide sequence of Newcastle Disease virus: Evidence for the Existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. Gen. Virol.* 80:131-136.
11. Fenton, M.J., and Golenbock, D.T. 1998. LPS-binding proteins and receptors. *J. Leukoc. Biol.* 63:25-32.
12. Hailman, E., Lichenstein, H.S., Wurfel, M.M., Miller, D.S., Johnson, D.A., Kelley, M., Busse, L.A., Zukowski, M.M., Wright, S.D., 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* 179:269 - 277.
13. Heller E.D., Levy A.M., Vaiman R, Schwartsburd B. 1997. Chicken embryo fibroblasts produce two types of interferon upon stimulation with Newcastle disease virus. *Vet Immun Immunopath.* 57:289-303.
14. Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin P., Mann, N., Mudd S. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743 - 748.
15. Iliev, D.B., Roach J.C., Mackenzie, S., Planas, J.V., and Goetz F.W. 2005. Endotoxin recognition: in fish or not in fish? *FEBS Lett.* 579: 6519 - 6528.

16. **Kagan, J. C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov.** 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-*Nat. Immunol.* 9:361 - 368.
17. **Kaiser, MG., Cheeseman, JH., Kaiser,P., and Lamont, SJ.** 2005. Cytokine Expression in Chicken Peripheral Blood Mononuclear Cells after In Vitro Exposure to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poultry Science* 85:1907 - 1911.
18. **Karpala A.J., Lowenthal J.W., and Bean A.G.** 2008. Activation of the TLR3 pathway regulates IFN beta production in chickens. *Dev Comp Immunol.* 32:435-44.
19. **Keestra, A.M., van Putten, J.P.,** 2008. Unique properties of the chicken TLR4/MD-2 complex: selective lipopolysaccharide activation of the MyD88-dependent pathway. *J. Immunol.* 181,4354 - 4362.
20. **Kim T.W., Lee T.Y., Bae H.C., Hahm J.H., Kim Y.H., Park C., Kang T.H., Kim C.J., Sung M.H., Poo HY.** 2007. Oral administration of high molecular mass poly - gamma - glutamate induces NK cell - mediated antitumor immunity. *Journal of Immunology* 179:775 - 780.
21. **Kumar, S., Nayak, B., Collins, B.L., Samal, S.K.** 2011. Evaluation of the Newcastle Disease Virus F and HN Proteins in Protective Immunity by Using a Recombinant Avian Paramyxovirus Type 3 Vector in Chickens. *J. Virol.* 85(13):6521-6534.
22. **Lee T.Y., Kim Y.H., Yoon S.W., Choi J.C., Yang, J.M., Kim C.J., Schiller J.T., Sung M.H., Poo H.Y.** 2009. Oral administration of poly - gamma - glutamate induces TLR4 - and dendritic cell - dependent antitumor effect. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58(11):1781 - 1794.
23. **Lee, Y.J., Sung, H.W., Choi, J.G., Lee, E.K., Yoon H.C., Kim, J.H., and Song, C.S.** 2008. Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins. *J, Vet Sci.* 9(3):301-308.
24. **Lawlor, S.M., and O'Brien N.M.** 1995. Modulation of oxidative stress by P-carotene in chicken embryofibroblasts *British Journal of Nutrition.*13, 841-850
25. **Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi, P.S.** 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42: 145-151.
26. **Mayo, M.A. 2002a.** Virus Taxonomy - Houston 2002. *Arch Virol* 147, 1071-1076.
26. **Mayo, M.A. 2002b.** A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 147, 1655-1663.
27. **Moon, H.J., Lee J.S., Choi, Y.K., Park, J.Y., Talactac, M.R., Chowdhury, M.Y.E., Poo, H.Y.,**
28. **Sung, M.H., Lee, J.H., Jung, J.A., and Kim, CJ.** 2012. Induction of Type I interferon by high molecular poly- γ -glutamate protects B6.A2G-*Mx1* mice against influenza A virus. *Antiviral Res.* 10:1016.
29. **Office International des Epizooties.** 2009. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_Index.htm.pp.576-589.

Accessed March 15, 2012.

30. **Palsson-McDemott, E. M., and L. A. O'Neill.** 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113: 153 - 162.
31. **Parcells, M.S., Lin, S.F., Dienglewicz, R.L., Majerciak, V., Robinson, D., Chen, H.C., Wu, Z., Dubyak, G.R., Brunovskis, P., Hunt, H.D., Lee L.F., and Kung, HJ.** 2001. Marek's Disease Virus (MDV) encodes an Interleukin-8 Homolog (vIL-8); Characterization of the vIL-8 Protein and VIL-8 Deletion mutant MDV+. *Journal of Virology* 75:5159-5173.
32. **Park M.S., Garcia-Sastre, A., Cros, J.C., Basler, C.F., and Palese, P.** 2003. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host Range Restriction. *J Virol.* 77:1501-1511.
33. **Peeters, B., Verbruggen, P., Nelissen, F., and de Leeuw O.** 2004. The P gene of Newcastle disease virus does not encode an accessory X protein. *J. Gen.Virol.* 85:2375 - 2378.
34. **Poo, H.Y., Park, C., Kwak, M.S., Choi, D.Y., Hong, S.P., Lee, H.H., Lim, Y.T., Choi, Y.K., Bae, S.R., Uyama, H., Kim, C.J., Sung, M.H.** 2010. New biological Functions and Applications of High-Molecular-Mass Poly- γ -glutamic Acid. *Chemistry and Biodiversity*. Vol. 7.
35. **Puig-Saus, C., Gros A., Alemany R., and Cascallo M.** 2011. Adenovirus i-Leader Truncation Bioselected Against Cancer-associated Fibroblasts to Overcome Tumor Stromal Barriers. *Molecular Therapy* 20:1. 54-62.
36. **Reed, J.R., Leon, R.P., Hall, M.K., and Schwertfeger, K.L.** 2009. Interleukin-1beta and fibroblast growth factor receptor 1 cooperate to induce cyclooxygenase-2 during early mammary Tumourigenesis. *Breast Cancer Research.* 11:R21(doi:10.1186/bcr2246).
37. **Sato M, Suemori H, Hata N, et al.** 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13:539-548.
38. **Schwarz H., Schneider K., Ohnemus A., Lavric M., Kothlow S., Bauer S., Kaspers, B., and Staeheli P.** 2007. Chicken toll-like receptor 3 recognizes its cognate ligand when ectopically expressed in human cells. *J Interferon Cytokine Res.* Abstract.27(2):97-101.
39. **Seal, B.S., King D.J., Sellers H.S.** 2000. The avian response to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology.* 24(2000):257-268
40. **Shin S.M., Kwon J.H, Lee S., Kong H.S., Lee S.J., Lee C.K., Cho K.H., Ha N.J., Kim K.J.** Immunostimulatory Effects of Cordyceps militaris on macrophages through enhanced production of cytokines via the activation of NFkB. *Immune Network.* 2010; 10:2: pp 55-63.
41. **Sung, M.H., Park, C., Kim, C.J., Poo, H.Y., Kenji, S., Ashiuchi, M.** 2005. Natural and edible Biopolymer Poly- γ -glutamic Acid: Synthesis, Production and Applications. *The Chemical Record.* 5: 352-366.

42. **Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S., and Miyake, K.** 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368: 94 - 99.
43. **Tayeb A.B., Hanson R.** 2001. The interaction between Newcastle Disease Virus and Escherichia coli endotoxin in chickens. *Avian Diseases.* 45:313-320.
44. **von Maltzan and Pruett.** 2011. ELISA assays and alcohol: increasing carbon chain length can interfere with detection of cytokines. *Alcohol.* 45(1): 1 - 9. doi:10.1016/j.alcohol.2010.08.010
45. **Wadsworth, T.L., and Koop, D.R.** 1999. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Inflammation and Immunopharmacology.* Volume 57, Issue 8, 15. 1999;941 - 949.
46. **Weiss, J., 2003.** Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 785 - 790.
47. **Wilden H., Fournier P., Zawatzky, L., and Schirmacher V.** 2009. Expression of RIG-I, IRF-3, IFN- β and IRF-7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle Disease Virus. *International Journal of Oncology* 34: 971-982.
48. **Wise G.M., Suarez D.L., Seal, B.S., Paderson, J.C., Senne D.A., King, D.J., Kapczynski D.R., and Spackman, E.** 2004. Development of a real-time Reverse transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 42.1:329- 338.
49. **Wu, Z., Rothwell, L., Hu, T., Kaiser, P., 2009.** Chicken CD14, unlike mammalian CD14, is trans-membrane rather than GPI-anchored. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 97 - 104.
50. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88- independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640 - 643.
51. **Yamamoto, M., S. Sato, Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira S.** 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4:1144 - 115.
52. **Yamanouchi, K., Barrett T., Ka, C.** 1998. New approaches to the development of virus vaccines for veterinary use *Rev. sci. tech. Off. int. Epi.* Abstract.17 (3), 641-653.
53. **Yoshikawa, T., Okada, N., Oda, A., Matsuo, K., Matsuo, K., Kayamuro, H., Ishii, Y., Yoshinaga, T., Akagi, T., Akashi, M., Nakagawa, S., 2008.** Nanoparticles built by self-assembly amphiphilic c-PGA can deliver antigens to antigen-presenting cells with high efficiency: a new tumor-vaccine carrier for eliciting effector T cells. *Vaccine* 26,1303 - 1313.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품 연구개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.