

116082

-3

천연물  
기반  
송아지  
설사병  
예방용  
사료  
첨가제  
및  
치료용  
동물용  
의약품  
개발

최  
종  
보  
고  
서

2019  
농  
림  
축  
산  
식  
품  
기  
술  
기  
획  
평  
가  
원

농식품기술개발사업 최종 보고서

발간등록번호

11-1543000-002598-01

# 천연물기반 송아지설사병 예방 용 사료첨가제 및 치료용 동물 용의약품 개발 최종보고서

2019. 03. 25.

주관연구기관 / (주)애드바이오텍  
협동연구기관 / 한국생명공학연구원

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농식품기술개발사업” (개발기간 : 2016. 09. ~ 2018. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 14.

주관연구기관명 : ㈜에드바이오텍 (대표자) 정 흥 결 (인)  
참여기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 김 장 성 (인)



주관연구책임자 : 안 근 승  
참여기관책임자 : 이 소 영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.



국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

보고서 면수

- 송아지 설사병 예방 및 치료를 위한 천연물 추출물과 병원체에 대한 특이난황항체를 이용한 사료첨가제 및 동물용의약품 개발
- 송아지 설사병에 주요 병원체에 대한 분석 및 주요 바이러스와 세균에 대한 분석 완료
- 원인 병원체에 대항하는 난황항체 개발을 위한 최적의 생산조건 확립 및 분석 조건 확립
- 난황항체 역가 확인 및 항원에 대한 효능평가 완료
- 면역억제 기능을 가지는 천연물 추출물 후보군 탐색
- 천연물 추출물 설정 및 추출 단계별 분석 조건 확립
- 각 조건별 추출 및 지표물질 기시법 확립 완료
- 각 추출물을 이용한 면역억제 기전연구 완료
- 천연물 추출물과 난황항체를 이용한 사료첨가제 및 동물용의약품 시제품 배합비 개발 및 생산 완료
- 개발 시제품을 이용한 효능평가진행 및 유효성 확보
- 개발 시제품을 이용한 송아지 공격접종 시험을 통한 유효성 확보 완료 (국내, 해외)
- 확보된 유효성을 바탕으로 사업화를 위한 사료첨가제 등록완료 및 동물용의약품 등록을 위한 허가 서류 구비완료
- 동물용의약품 허가를 위한 신청서류 접수 완료를 통한 연구개발목표 달성
- 개발 시제품을 이용한 사업화 진행

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>항균, 항바이러스 및 면역활성증강용 소재인 IgY와 항염 활성이 우수한 천연소재인 마치현 복합소재를 이용한 송아지 설사병 예방 및 치료용 기능성 사료첨가제 및 동물의약품(액제 및 산제의 경구투여제) 개발</p>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 송아지 질병 원인체에 직접 결합하는 특이난황항체 및 염증제어 기반 천연물 소재 발굴 및 개발 완료</li> <li>○ 특이난황항체 생산을 위한 최적의 생산공정확립 완료</li> <li>○ 특이난황항체를 이용한 항바이러스 효능 확인</li> <li>○ 특이난황항체 및 마치현 추출물에 대한 In vitro 시험 완료 및 유효성 확보</li> <li>○ 특이난황항체와 마치현 추출물을 이용한 송아지 설사병 예방용 시제품(사료첨가제 및 동물용의약품)개발 완료</li> <li>○ 개발 시제품의 독성시험을 통한 안전성 확보</li> <li>○ 송아지 공격접종 시험을 통한 개발 시제품의 목적동물에서의 유효성 확보</li> <li>○ 개발 시제품의 사업화를 위한 동물용의약품 등록 신청</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 예방/치료 개념의 천연물기반 복합체 개발을 통한 신 시장 창출 및 매출증대</li> <li>○ 송아지 설사병 예방을 통한 농가 소득증대</li> <li>○ 화학제제 (항생제, 전해질 및 지사제 등) 사용감소로 인한 농가 비용절감</li> <li>○ 계약재배 등의 원료 고부가가치화로 인한 농가소득 증대</li> <li>○ 신호전달 작용기전 응용연구를 통한 제품개발 기반 구축</li> <li>○ 본 기술은 IL-6/STAT3 염증성 신호전달을 타겟으로 개발되어 다양한 축산용 감염·염증성 질환 치료제로 활용 가능</li> <li>○ 해외시장 개척을 위한 마케팅 전략을 통한 수출 극대화</li> <li>○ 회사 주요 매출 품목으로 성장할 가능성이 크며, 이에 따르는 전담 연구인력, 생산인력 및 마케팅인력의 지속적인 채용 증가가 이루어질 것으로 기대됨</li> <li>○ 국산 기반기술 제품 비중 확대에 의한 수입 대체효과 및 국내 동종업계 낙수효과 기대됨</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>송아지 설사병</p>	<p>마치현</p>	<p>항균</p>	<p>항염</p>	<p>면역증강</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Calf Diarrhea</p>	<p>Portulaca oleracea</p>	<p>Anti-Bacteria</p>	<p>Anti-Inflammation</p>	<p>Immune Stimulation</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	7
제1절 연구개발의 필요성 .....	7
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	27
제1절 연구개발 추진체계 및 추진일정 .....	27
제2절 연구개발 목표 및 내용 .....	30
제3절 연구개발성과 .....	34
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	112
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	128
제1절 사업화 계획 .....	128

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 송아지 설사병의 개요

송아지 설사병은 다양한 원인에 의하여 발생되며, 소화관을 통과한 내용물 중의 수분 또는 용질이 생체내의 상호이동의 이상에 의해 발생하는 것으로서, 송아지의 체액상실이나 이상은 치명적일 수 있고 폐사의 원인이 되며 회복되어도 성장장애 등을 일으켜 농가뿐만 아니라 국가적으로도 경제적 손실이 큰 질병임.

송아지는 창자가 약하기 때문에 설사를 쉽게 하며 설사병의 원인은 매우 다양함. 설사병의 원인은 감염성과 비감염성으로 나누어질 수가 있으며, 감염성은 바이러스, 세균, 기생충 등이 원인인 설사를 말하며, 비감염성은 식이성 및 스트레스에 의하여 발생하는 설사병임.

설사병은 바이러스에 대한 백신을 이용한 예방법이 있으며, 치료법으로는 전해질, 항생제, 구충제, 및 지사제를 사용하고 있음. 예방제의 경우는 항체 생성까지 일정 기간이 소요되며, 또한 예방제 및 치료제의 경우 주사를 이용하여 투여를 하므로 송아지에게 스트레스를 유발하며, 감염에 의한 화농생성, 또한 송아지에게 쇼크를 주기도 함.

표 1. 설사병의 발병원인 및 발병기전

구분	발병원인	발병기전
직접적 원인	비감염성 유질 불량, 대용유의 급격한 교체 과잉급여, 장관 과민증, 대사 장애 스트레스에 의한 자율신경기능 이상 등	섭취한 수분이 장관에서 충분히 흡수되지 않고 통과 (흡수 및 소화 불량성 설사)
	감염성 * 바이러스 소로타바이러스, 소코로나바이러스 소아데노바이러스, 소바이러스성설사 소레오바이러스, 소엔테로바이러스  * 세균 대장균, 살모넬라균, 캄필로박터균  * 기생충 콕시듐, 크립토스포리디움, 우회충, 편충	몸속의 수분이 장관 벽을 통하여 장관 속으로 유출(분비성 설사) - 탈수발생
간접적 원인	'그림1' 참조	비감염성 설사의 직접적인 원인이 되고, 감염성 설사 유인



그림 1. 설사의 간접적 원인



그림 2. 설사의 주요증상 및 치료방법

## 2. 연구개발 대상 및 기술의 개요

송아지 설사병을 예방 또는 치료하기 위해서는 일차적으로 병원균(세균 또는 바이러스)의 감염을 막거나 병원균을 죽여야 하며, 이차적으로 병원균 감염 후에 감염부위에서 일어나는 염증 또는 여러 장이나 조직으로 확산된 염증을 제어 또는 치료해야 함.

본 과제에서는 항균 및 항바이러스 효능이 있는 설사치료 소재(에드바이오텍 제공)와 항염증 효능이 있는 천연물 소재(마치현 등 생공연 제공)를 복합적으로 활용하여서 세균·바이러스 감염 및 염증을 동시에 해결할 수 있는 새로운 송아지 설사병 예방 및 치료제를 개발하고자 함.

(주)에드바이오텍은 항생제 대체 IgY 제품 및 바이러스성·세균성 질병의 예방, 치료, 면역증강용 기능성 소재와 천연물 의약품을 개발하는 회사로, 본사가 보유한 천연 항균·항바이러스 소재에 한국생명공학연구원의 항염증 소재를 복합하여 송아지 설사병 예방 및 치료제를 개발하고자 함.

지금까지 송아지 설사병을 치료하기 위하여 다양한 항생제, 항바이러스제, 소독제 또는 진통제 등이 널리 개발되어 사용되어 왔으나 치료효율이 낮았으며, 항생제 또는 항바이러스에 의한 감염억제는 감염 초기단계에 감염을 억제하는 효과는 있으나 감염 후 발생하는 염증에는 효과를 나타내기 어려우므로, 본 기술에서는 항바이러스와 항균효과 뿐만 아니라 감염 후 염증에 의해 발병되는 병리, 병변현상을 억제할 수 있도록 항염증 효능을 추가한 천연물 복합소재를 개발하여 송아지 설사병의 치료에 효과적인 새로운 치료 또는 예방법을 개발하고자 함.

본 연구팀은 국내에서 유일하게 안정적으로 STAT3에 의존적인 luciferase 활성을 나타내는 세포주를 보유하고 있어서, IL-6/STAT3 천연물 저해제의 검색에서 큰 강점을 보유함.

### 3. 연구개발의 중요성

송아지 설사병은 축산농가에 있어서 가장 경제적 손실이 큰 질병중 하나로서, 국내에서 태어나는 송아지 약 150만두 중에 약 60만두가 발생되며, 발생 폐사율이 약 25%에 육박한다. 축산농가의 피해액이 약 3000억 이상이며 미국에서 설사병에 의한 피해액은 연간 12~24조원 이상이라고 알려져 있음(Bendali 등, 1999). 한편 우리나라는 2011년부터 사료내의 항생제 사용을 금지하고 있어서 천연물 기반의 설사 예방 및 치료제의 요구가 증가하고 있음.

이에 따라 본 과제를 통하여 독성이나 부작용 없이 안전하게 처방받을 수 있는 천연물 소재를 이용한 치료제를 개발하고자 하며, 본 과제 of 성공적인 완료를 통하여 무항생제, 유기농 축산의 장려, 국민의 안전한 먹거리 공급에 이바지할 수 있을 것임.

본 과제의 성공적인 수행으로 만들어질 천연물 기반의 송아지 설사병 치료제는 현재 전 세계적으로 많은 수요는 있지만, 제품이 존재하지 않는 비 항생제 계열의 예방/치료제로써 신규 시장창출 및 수출을 기대할 수 있을 것임.

본 연구개발의 완료에 따라 (주) 에드바이오텍에서 이미 진출해 있는 중국, 일본, 대만, 태국, 베트남에 수출을 할 수 있고, 전 세계적으로 소 사육두수가 많은 국가에 수출을 기대할 수 있으며, 5년 후인 2021년에는 국내에서 29억, 해외시장에서 62억의 매출을 기대할 수 있음.

### 4. 선행연구 내용 및 결과

#### 가. 송아지 설사병 관련 균주에 대한 IgY의 항균 효능실험

본사의 생산공정에 의하여 생산된 IgY의 효능을 확인하기 위하여 항박테리아 실험 (*in vitro*)를 실시하였음. 일반적인 계란에서 얻을 수 있는 IgY 와 본사의 기술력을 이용하여 생산된 IgY와의 박테리아 성장 억제 실험을 실시한 결과 본사의 IgY에 의하여 박테리아의 성장이 70% 억제됨을 확인하였음. 본 실험을 통하여 IgY의 박테리아 성장억제 효능을 확인하였음.

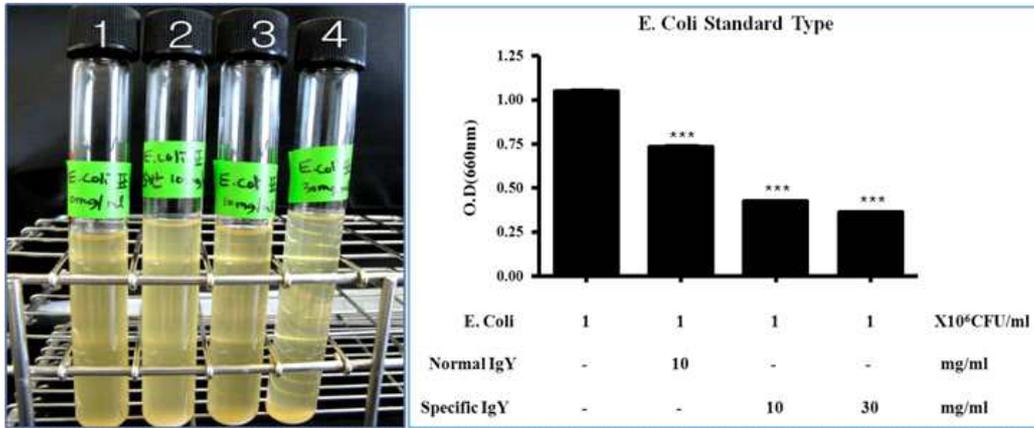


그림 4. 난황항체의 항균 효과 확인 시험

#### 나. 송아지 설사병 관련 바이러스에 대한 IgY의 항바이러스 효능실험

특이난황항체의 항바이러스 효능을 확인하기 위하여, 바이러스 중화항체 실험을 진행하였음. TF 세포주에 Bovine Rota virus를 감염시킨 후, 특이난황항체에 의한 바이러스 억제 효과를 확인 하였음. 본 실험을 통하여 본사의 IgY에 의한 바이러스 감염 억제 및 바이러스 Titer 감소 효능을 확인 할 수 있었음. 본 연구를 통하여 invitro 조건하에서의 IgY의 항바이러스 효능을 확인할 수 있었음.

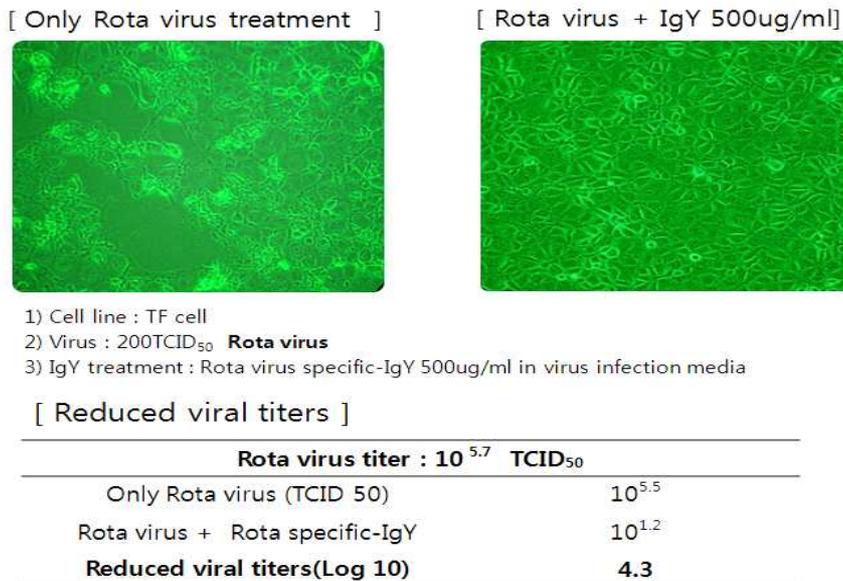


그림 5. 난황항체의 항바이러스 효능 확인시험결과

#### 다. 송아지설사병 농장실험

실제 농장에서의 IgY의 송아지 설사 억제 효능을 확인하기 위하여, 농장에서 IgY를 함유한 본사의 제품에 의한 설사병 제어 효능평가를 실시하였음. IgY 비치리 송아지에서는 26.3%가 설사병을 일으켰으나, IgY 제품의 처리를 통하여 송아지 설사율을 2.9%로 감소 시킬 수 있었음. 또한 IgY 비치리 군에서는 2마리의 송아지 폐사가 일어난 반면, 본사의 IgY 처리군에서는 폐사한 송아지가 없었음. 본 농장실험을 통하여 IgY 기반의 제품이 송아지 설사병을 제어할 수 있음을 확인하였음.

**[Ig-drink] diarrhea prevention/cure effect inspection experiment result**

Group	Number of the individuals	Diarrhea after birth				Number of the antibiotics treatment		Mortality
		1-5 days of age		1-14 days		Over 2 times	1 time treatment	
		health	diarrhea	health	diarrhea			
Control (%)	57	55 (96.5)	2 (3.5)	42 (73.7)	15 (26.3)	4	11	2
Test group (%)	35	35 (100)	0 (0)	34 (97.1)	1 (2.9)	0	1	0

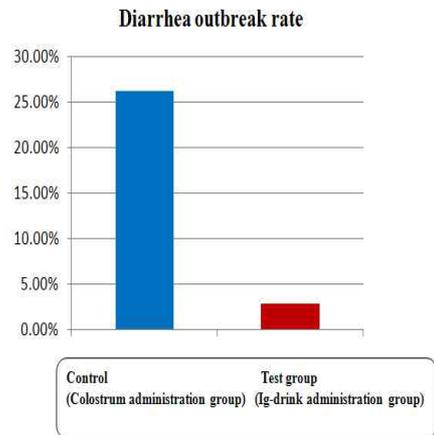


그림 6. 난황항체 농장 효능시험 결과

상기의 농장 실험을 통하여 알수 있듯이, IgY 기반의 제품은 질병의 예방에는 효능을 보이고 있으나, 감염에 따르는 이차적인 피해를 억제하기에는 한계가 있음. 이에 따라 추가적인 천연물제제에 의한 감염에 따르는 염증을 제어하는 복합제제의 필요성이 꾸준히 제기되고 있음. 이를 위하여 염증제어 천연물 소재 연구를 진행중에 있음.

라. 천연물 소재인 마치현(*Portulaca oleracea* L.) 후보 소재 확보

마치현(*Portulaca oleracea* L.)은 과지식물문 쌍떡잎식물강 쇠비름과 쇠비름속에 속하는 한해살이풀로서, 줄기에 물기가 많고 땅에 붙어 자라며 쇠비름, 오행초, 장명채, 마치채 등으로도 불림. 전국 각지 논밭에서 자생하며, 마치현의 약리학적 활성은 해독, 이뇨 및 이질에 효과가 있는 것으로 알려져 있지만, 마치현 추출물 또는 이의 분획물이 IL-6 매개성 질환, 특히 염증성 장 질환에 대해서는 알려진 바 없으며, 본 연구진들에 의하여 규명되었음.

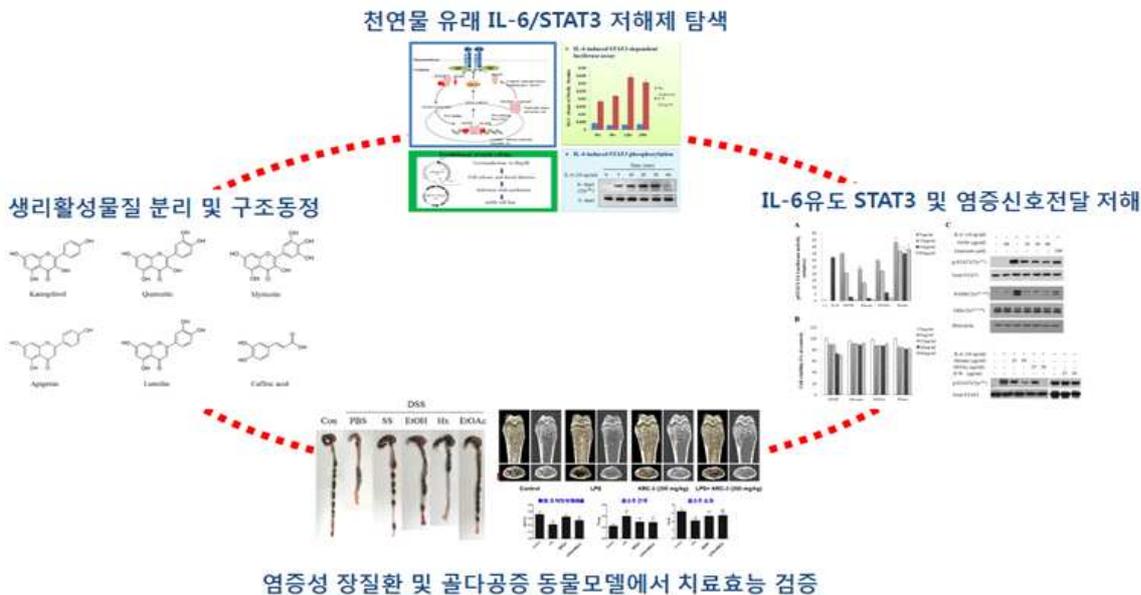


그림 7. 천연물 소재 마치현의 효능확인 시험

1) 마치현 추출물의 IL-6 유도 항염증 신호전달 저해 활성 검증 (*in vitro* 검증)

마치현에 대한 항염증 효과를 확인하기 위하여 “IL-6 유도 STAT3-dependent luciferase 활성”을 시험하였음. 마치현 추출물 4가지 (에탄올, 헥산, 에틸아세테이트, 물) 모두 세포독성을 나타내지 않는 농도에서 IL-6 유도 STAT3-dependent luciferase 활성을 확인해 본 결과, 물 추출물을 제외한 에탄올, 헥산, 에틸아세테이트 추출물에서 농도 의존적으로 활성이 억제됨을 확인할 수 있었고, IL-6 유도 STAT3의 인산화 역시 같은 결과로 마치현 추출물의 저해 활성을 검증하였음. IL-6는 염증성 사이토카인으로 염증성 대장염 환자의 혈액에서 높은 양이 검출되는 것으로 알려져 있으며, 또한 IL-6 수용체에 대한 중화항체를 투여하여 염증성 대장염 증상이 호전되었다는 보고가 발표되었음. 따라서 IL-6 유도 신호전달 저해 활성을 가지는 마치현 추출물의 경우 염증성 장질환의 후보소재로 적합함을 확인하였음.

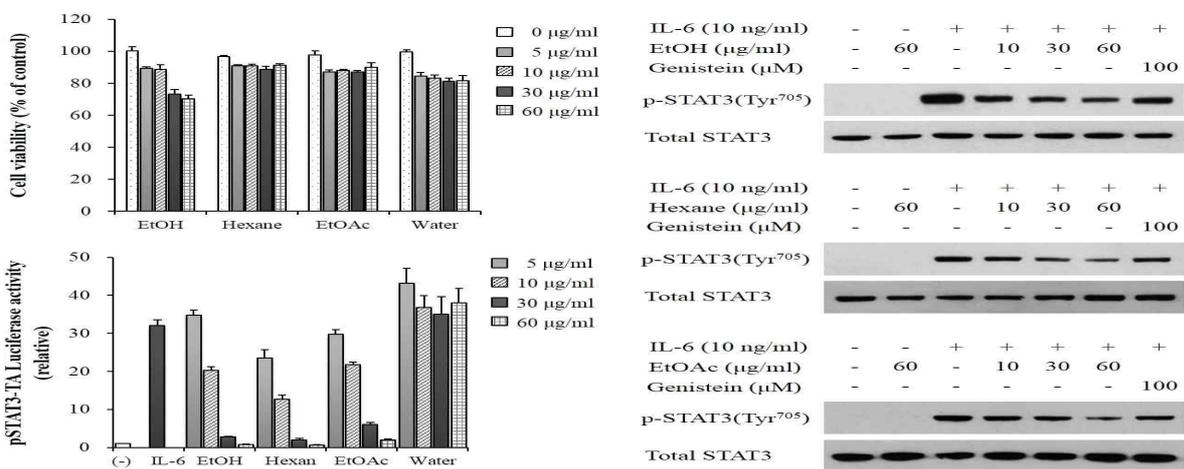


그림8. 세포수준에서 마치현 추출물의 IL-6 유도 항염증 신호전달 저해활성

특히, 마치현 추출물 중 효과가 우수한 에틸아세테이트 추출물의 경우, IL-6에 의해 유도되는 신호전달물질인 JAK2, ERK의 인산화를 저해하였고, 염증관련 유전자인 CRP의 발현양도 농도 의존적으로 억제함을 확인하였음.

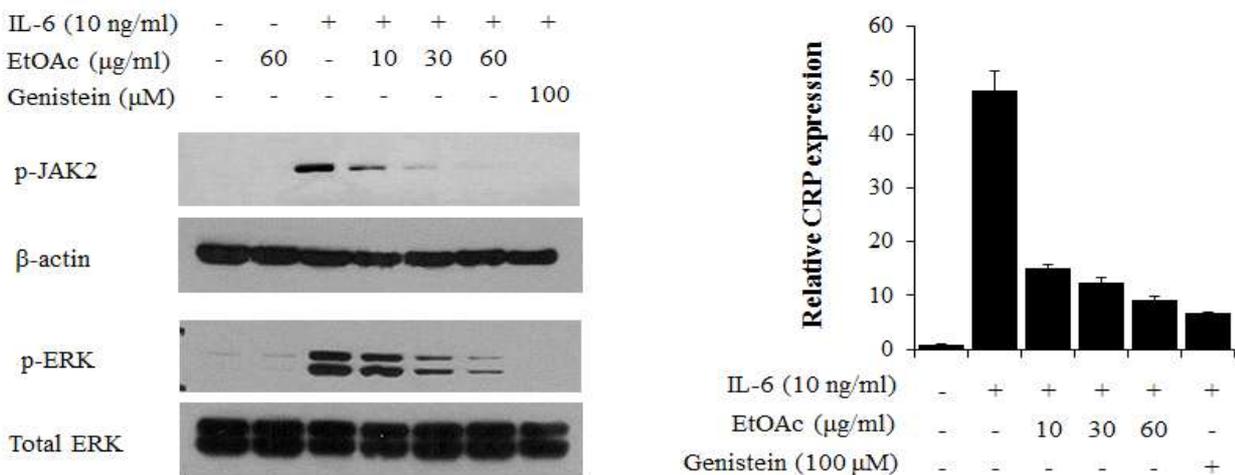


그림 9. 세포수준에서 마치현 에틸아세테이트추출물의 IL-6 유도 신호전달 저해활성

2) 염증성 장 질환 마우스 동물모델에서 마치현 추출물의 효능 검증 (in vivo 검증)

in vivo에서 활성소재 마치현 추출물의 효능을 확인하기 위해서 가장 널리 사용되고 있는 Dextran sodium sulfate (DSS) 유도성 염증성 대장염 모델을 확립하였음 (Okayasu S., Gastroenterology, 1990). DSS는 직접적으로 basal crypts의 장 상피세포에 독성을 가지며, 점막 배리어에 손상을 주어 염증성 장염을 유도하고, DSS 유도성 장염 모델은 사람의 염증성 장염의 치료제 개발에 적용하기에 적당한 모델로 알려져 있음 (Melgar S., Int. Immunopharmacol., 2008).

마우스에서 정상 대조군 (DW), 3% DSS 장 염증 유발군, 염증성 대장염 치료제로 사용되고 있는 sulfasalazine 투여군, 마치현 추출물 투여군으로 나누고, 마치현 추출물은 3% DSS 음수 2일 전부터 DSS 음수 시작 후 14일 동안 50, 200, 500 mg/kg 의 용량으로 1일 1회 경구 투여로 투여하였음. 치료시험 기간 중에 체중 측정, 변의 형태, 혈변의 정도를 나타내는 질환 활성 지표 (disease activity index, DAI) 기준, 정상변 0, 무른변 1, 무른 변과 잠혈 2, 설사와 잠혈 3, 설사와 직장 주위에 출혈과 짓무름이 있는 경우는 4로 하여 평가하였고, 시험 종료 후에는 장 길이, 혈중 사이토카인 측정, 결장의 병리 조직학적 관찰을 실시하였음.

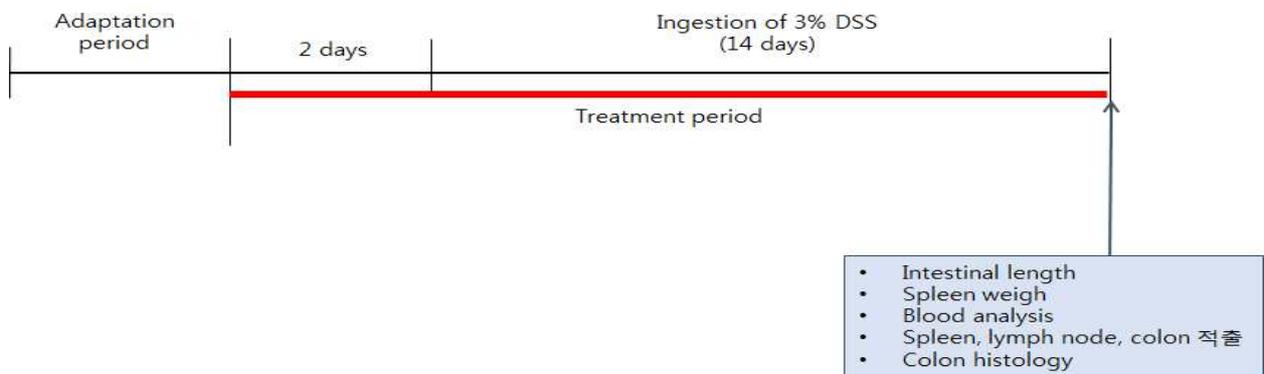


그림 10. in vivo experimental design

시험기간 체중변화를 관찰한 결과, 3% DSS 투여군에서 보였던 급격한 체중저하 및 폐사가 sulfasalazine 치료제 투여군 및 마치현의 에탄올, 헥산, 에틸아세테이트 추출물 투여 그룹에서 완화된 것을 확인할 수 있었음. 또한 3% DSS 투여군에서 보이는 설사 및 혈변, 항문의 임상 증상이 sulfasalazine 투여군 및 마치현 추출물 투여 그룹에서 호전된 것을 볼 수 있었음. 결장 길이 측정 및 결장의 병리 조직학 분석 결과, 대장염 유발군의 장 길이는 정상군에 비해 현저하게 줄어들었으나 sulfasalazine 치료제 투여군 및 마치현 추출물 투여군에서 장 길이가 회복되었고, 결장 조직 병리사진에서 대장염 유발군에서 관찰되는 장 점막층 및 근육층의 염증세포 침윤, 장 용모, 장샘 소실 등 또한 sulfasalazine 치료제 투여군 및 마치현 추출물 투여군에서 현저하게 감소함을 확인하였음.

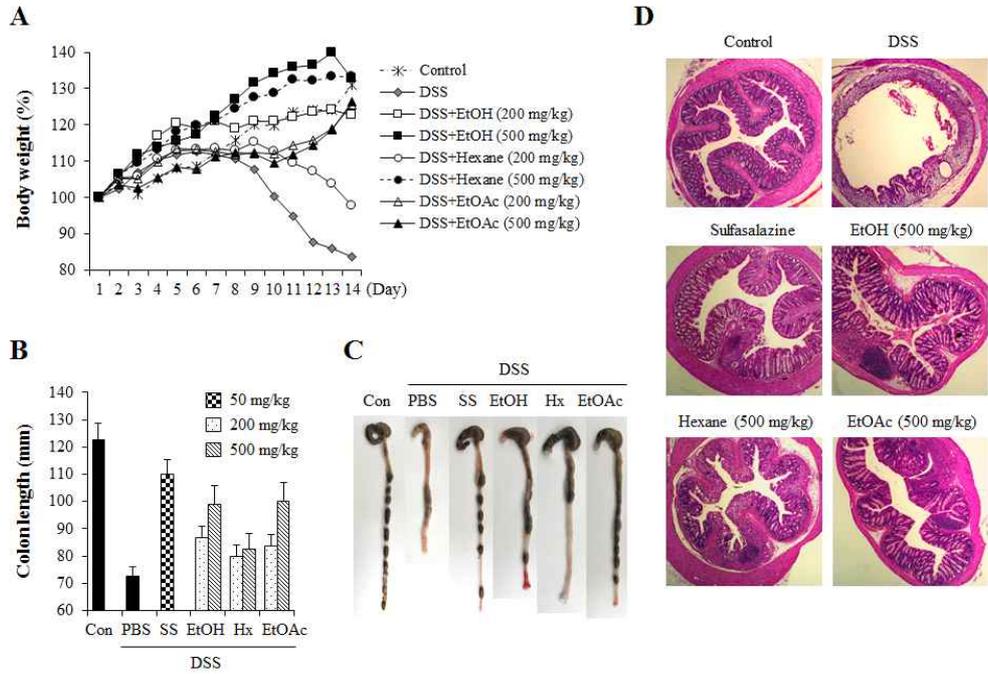


그림 11. 염증성 장 질환 마우스 동물모델에서 마치현 추출물의 효능평가  
 A 마우스체중변화, B 결장길이, C 결장사진, D 결장 조직병리 사진

염증성 장 질환의 effector cytokines인 interferon- $\gamma$ , IL-4, IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 혈중 농도 또한 3% DSS로 유발한 대장염 유발군에서 증가되었다가 sulfasalazine 치료제 투여군 및 마치현 추출물 투여군에서 현저하게 감소함을 확인할 수 있었음.

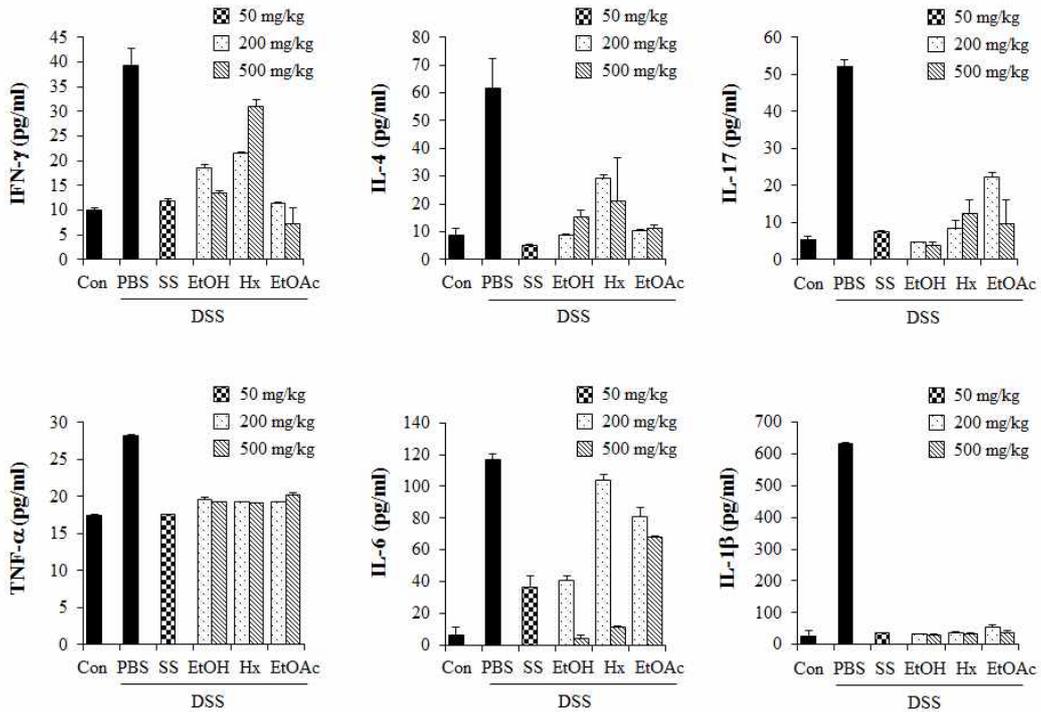


그림 12. 마치현 추출물의 혈중 사이토카인 억제 효과

## 5. 선행기술조사

### 가. 선행특허조사 대상 기술 개요

항균, 항바이러스 및 면역활성증강용 소재인 IgY와 항염 활성이 우수한 천연소재인 마치현 복합소재를 이용한 송아지 설사병 예방 및 치료용 기능성 사료첨가제 및 동물의약품(액제 및 산제의 경구투여제) 관련 기술

### 나. 선행특허조사 결과

일련번호	문헌번호	기술요지	유사도
1	한국등록특허 10-1130139	송아지 설사병 예방용 조성물에 관한 것으로, 오배자, 가자, 단삼, 황금을 포함하는 천연약용식물과 면역항체가 형성된 난황, 초유를 포함하는 것이 특징임 [유사점] 소 바이러스 설사병, 로타바이러스, 대장균, 살모넬라균 항원들을 동시에 접종한 산란계가 낳은 계란에서 얻은 난황항체와 천연약용식물을 포함하는 조성물을 제조한다는 점에서 일부 유사함 [차이점] 천연약용식물로 마치현 추출물을 사용하지 않았다는 점에서 차이가 있음	일부 유사
2	한국등록특허 10-1496937	송아지 설사병에 대한 난황 항체의 분리방법에 관한 것으로, 송아지 설사병을 일으키는 살모넬라 티피뮤리움 및 살모넬라 듀블린의 편모 단백질을 항원으로 산란계를 면역화시켜 난황 항체를 분리하는 것이 특징임 [유사점] 송아지 설사병 유발균을 항원으로 사용하여 산란계의 난황으로부터 항체를 생산한다는 점에서 일부 유사함 [차이점] 마치현 추출물을 사용하지 않는다는 점에서 차이가 있음	낮음
3	한국등록특허 10-0267746	돼지 대장균 설사증에 대한 난황항체 및 경구용 면역체에 관한 것으로, 병원성 대장균의 섬모항원 K88, K99 및 987p와, 이열성 독소를 포함하는 백신을 이용하여 난황항체를 제조하는 것이 특징임 [유사점] 대장균 항원으로 난황항체를 생산한다는 점에서 일부 유사함 [차이점] 송아지가 적용대상에 포함되어 있지 않고, 마치현 추출물을 사용하지 않는다는 점에서 차이가 있음	일부 유사
4	한국공개특허 2007-0039114	가축용 성장 촉진제를 제조하는 과정에서 쇠비름속 (Portulaca genus) 식물, 특히 쇠비름(Portulaca oleracea)의 지상부(aerial parts) 추출물의 용도에 관한 것임 [유사점] 가축용 사료의 성장 촉진제의 제제로 쇠비름(마치현)의 추출물을 사용하였고, 설사에 효과가 있다는 실험결과가 개시되어 있다는 점에서 일부 유사함 [차이점] 송아지가 적용대상에 포함되어 있지 않고, 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)를 사용하지 않는다는 점에서 차이가 있음	일부 유사

5	국내	한국공개특허 2016-0082823	<p>마치현 추출물과 금전초 추출물을 혼합한 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물, 약학 조성물 및 구강청결제 조성물에 관한 것임</p> <p>[유사점] 마치현이 설사에 사용되고, 세포독성을 억제시킨다는 언급이 포함되어 있으나, 유사도가 낮음</p> <p>[차이점] 마치현 추출물을 송아지 설사병 치료용으로 사용하지 않았고, 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)에 대해 개시되어 있지 않다는 점에서 차이가 있음</p>	낮음
6		미국공개특허 2017-0258899	<p>IgY 생산용 백신에 관한 것으로, 항원, 광물성 오일 및 생분해성 입자 형태의 아쥘반트(adjutant)를 포함하는 백신을 이용하여 난황항체를 제조하는 것이 특징임</p> <p>[유사점] 대장균, 살모넬라, 로타바이러스 항원으로 난황항체를 생산한다는 점에서 일부 유사함</p> <p>[차이점] 송아지가 적용대상에 포함되어 있지 않고 (돼지 유행성 설사병, 소 유방염에 적용), 마치현 추출물을 사용하지 않는다는 점에서 차이가 있음</p>	일부 유사
7	국외	중국공개특허 104530229	<p>소 바이러스성 설사병 E2 단백질을 IgY를 제조하는 방법에 관한 것으로, E2 단백질을 발현하는 재조합 대장균에서 얻은 E2 단백질을 닭에 면역화시켜 닭의 난황에서 IgY 항체를 수득하는 것이 특징임</p> <p>[유사점] 소 바이러스성 설사병 항원으로 난황항체를 생산한다는 점에서 일부 유사함</p> <p>[차이점] 마치현 추출물을 사용하지 않는다는 점에서 차이가 있음</p>	일부 유사
8		중국공개특허 106387439	<p>수의학적 항생물질 및 다른 화학적 합성 약물을 대체하기 위한 새끼 돼지용 항설사 사료 첨가제를 제조하는 방법에 관한 것임</p> <p>[유사점] 오행초(五行草, herba Portulacae, Chinese grass five elements, 마치현)를 가축의 항설사 사료 첨가제로 사용한다는 점에서 일부 유사함</p> <p>[차이점] 마치현을 송아지 설사병 치료용으로 사용하지 않았고, 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)에 대해 개시되어 있지 않다는 점에서 차이가 있음</p>	일부 유사

#### 다. 핵심기술요소별 상세 검토 결과

##### 1) 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체 생산

선행기술조사 결과, 송아지 설사병 병원균 및 바이러스인 대장균, 살모넬라균, 로타바이러스를 산란계에 접종시킨 후 산란계의 난황으로부터 IgY를 분리하는 기술에 대해 개시하고 있는 선행문헌은 다수 존재하는 것으로 확인되었음

##### 2) 마치현을 포함하는 송아지 설사병 예방 및 치료용 조성물

마치현이 인간과 돼지의 설사에 사용된다는 선행기술들이 존재하나, 송아지를 타겟으로 특정하여 송아지 설사병 치료용으로 사용되는 마치현 추출물에 대해 개시하고 있는 선행기술은 검색되지 않음

##### 3) 마치현과 송아지 설사병 항원에 대한 난황항체를 포함하는 송아지 설사병 예방 및 치료용 기능성 사료첨가제 및 동물의약품

선행기술조사 결과, 송아지 설사병 항원에 대한 난황항체 IgY와 마치현을 포함하여 송아지 설사병 예방 및 치료용 조성물로 기능성 사료첨가제나 동물의약품으로 사용하는 기술은 검색되지 않음

#### 라. 종합결론

송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체를 생산하는 특허가 검색되었으며, 마치현이 설사에 효과를 보인다고 개시되어 있는 특허가 검색되었으나, 마치현 추출물과 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 IgY를 포함하는 송아지 설사병 예방 및 치료용 조성물에 관련된 기술에 대해서는 특허가 검색되지 않았으므로, 신규성에 대한 이슈는 없을 것으로 판단됨.

그러나, 선행문헌 1에 송아지 설사병 항원에 대한 난황항체와 천연약용식물을 함께 사용하여 조성물을 제조하는 방법이 공지되어 있고, 선행문헌 4와 선행문헌 8에 마치현을 포함하는 가축용 사료 첨가제가 가축의 설사병에 효과가 있다고 공지되어 있으므로, 상기 선행문헌을 통해 본 발명의 구성을 용이하게 도출하여 진보성이 문제될 소지가 있을 것으로 사료됨.

따라서 공지된 방법으로 제조된 송아지 설사병 항원에 대해 생산한 난황항체를 이용하여 생성된 송아지 설사병 치료용 조성물과 마치현 추출물을 유효성분으로 포함하는 가축용 사료 첨가제에 비해, 본 발명의 마치현과 송아지 설사병 항원에 대한 IgY를 포함하는 조성물이 송아지 설사병 예방 및 치료에 있어서 단순 조합 이상의 현저한 효과나 추가적인 효능을 보인다는 비교 데이터를 제시함으로써 발명의 진보성에 대한 이슈에 대비해야 할 필요가 있을 것으로 판단됨.

선행특허기술의 대비

일련번호	1	한국등록특허 10-1130139	유사도	일부 유사
출원일자		2009.09.29	등록일자	2012.03.19
출원인		(주)양성그린바이오	법적상태	등록
제목	송아지 설사병 예방용 조성물			

구 성 대 비

기술요소	선행기술
<p>-항체 생산 방법-</p> <p>1) 바이러스/박테리아 항원으로 이루어진 백신 준비</p> <p>2) 백신을 산란계에 접종시켜 면역화</p> <p>3) 면역화된 산란계로부터 계란을 수득하고, 계란의 난황에서 항체를 분리 및 정제</p> <p>-핵심 구성-</p> <p>: 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)와 마치현 추출물을 포함하는 조성물</p>	<p><input type="checkbox"/> 기술요지</p> <p>○ 송아지 설사병 예방용 조성물에 관한 것으로, 오배자, 가자, 단삼, 황금을 포함하는 천연약용식물과 면역항체가 형성된 난황, 초유를 포함하는 것이 특징임</p> <p><input type="checkbox"/> 유사점 (Page 3, 청구항 1)</p> <p>○ 소 바이러스 설사병, 로타바이러스, 대장균, 살모넬라균 항원들을 동시에 접종한 산란계가 낳은 계란에서 얻은 난황항체와 천연약용식물을 포함하는 조성물을 제조한다는 점에서 일부 유사함</p> <pre> graph TD     A[항원(송아지 설사병 원인체)을 접종한 산란계가 낳은 계란] -- 분리 --&gt; B[면역항체가 형성된 난황]     C[항원(송아지 설사병 원인체)을 접종한 젖소] -- 분리 --&gt; D[면역항체가 형성된 초유]     E[오배자] -- 열수추출 --&gt; F[오배자추출물]     G[가자] -- 열수추출 --&gt; H[가자추출물]     I[단삼] -- 열수추출 --&gt; J[단삼추출물]     K[황금] -- 열수추출 --&gt; L[황금추출물]     B -- 혼합 --&gt; M[송아지 설사병 예방용 조성물]     D -- 혼합 --&gt; M     F -- 혼합 --&gt; M     H -- 혼합 --&gt; M     J -- 혼합 --&gt; M     L -- 혼합 --&gt; M     </pre> <p><input type="checkbox"/> 차이점</p> <p>○ 천연약용식물로 마치현 추출물을 사용하지 않았다는 점에서 차이가 있음</p>

검 토 의 견

본 기술과 관련문헌을 비교한 결과, 송아지 설사병 예방용 조성물에 관한 것으로, 항균성이 우수한 천연약용식물과 항체를 포함하는 난황 및 초유를 포함하는 조성물을 제조하는 기술을 개시하고 있으며, 소 바이러스 설사병, 로타바이러스, 대장균, 살모넬라균으로 면역화된 난황항체와 천연약용식물을 포함하는 조성물을 제조한다는 점에서 일부 유사하나, 천연약용식물로 마치현을 사용하지 않는다는 점에서 일부 차이가 있음

일련번호	1	한국등록특허 10-1130139	유사도	일부 유사
출원일자	2009.09.29		등록일자	2012.03.19
출원인	(주)양성그린바이오	법적상태	등록	
제목	송아지 설사병 예방용 조성물			

**구 성 대 비**

기술요소	선행기술
<p>-항체 생산 방법-</p> <p>1) 바이러스/박테리아 항원으로 이루어진 백신 준비</p> <p>2) 백신을 산란계에 접종시켜 면역화</p> <p>3) 면역화된 산란계로부터 계란을 수득하고, 계란의 난황에서 항체를 분리 및 정제</p> <p>-핵심 구성-</p> <p>: 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)와 마치현 추출물을 포함하는 조성물</p>	<p><input type="checkbox"/> 기술요지</p> <p>○ 송아지 설사병 예방용 조성물에 관한 것으로, 오배자, 가자, 단삼, 황금을 포함하는 천연약용식물과 면역항체가 형성된 난황, 초유를 포함하는 것이 특징임</p> <p><input type="checkbox"/> 유사점 (Page 3, 청구항 1)</p> <p>○ 소 바이러스 설사병, 로타바이러스, 대장균, 살모넬라균 항원들을 동시에 접종한 산란계가 낳은 계란에서 얻은 난황항체와 천연약용식물을 포함하는 조성물을 제조한다는 점에서 일부 유사함</p> <div style="text-align: center;"> <pre> graph TD     A[항원(송아지 설사병 원인체)을 접종한 산란계가 낳은 계란] -- 분리 --&gt; B[면역항체가 형성된 난황]     C[항원(송아지 설사병 원인체)을 접종한 계란] -- 분리 --&gt; D[면역항체가 형성된 초유]     E[오배자] -- 열수추출 --&gt; F[오배자추출물]     G[가자] -- 열수추출 --&gt; H[가자추출물]     I[단삼] -- 열수추출 --&gt; J[단삼추출물]     K[황금] -- 열수추출 --&gt; L[황금추출물]     B -- 혼합 --&gt; M[송아지 설사병 예방용 조성물]     D -- 혼합 --&gt; M     F -- 혼합 --&gt; M     H -- 혼합 --&gt; M     J -- 혼합 --&gt; M     L -- 혼합 --&gt; M </pre> </div> <p><input type="checkbox"/> 차이점</p> <p>○ 천연약용식물로 마치현 추출물을 사용하지 않았다는 점에서 차이가 있음</p>

**검 토 의 견**

본 기술과 관련문헌을 비교한 결과, 송아지 설사병 예방용 조성물에 관한 것으로, 항균성이 우수한 천연약용식물과 항체를 포함하는 난황 및 초유를 포함하는 조성물을 제조하는 기술을 개시하고 있으며, 소 바이러스 설사병, 로타바이러스, 대장균, 살모넬라균으로 면역화된 난황항체와 천연약용식물을 포함하는 조성물을 제조한다는 점에서 일부 유사하나, 천연약용식물로 마치현을 사용하지 않는다는 점에서 일부 차이가 있음

일련번호	2	한국등록특허 10-1496937	유사도	일부 유사
출원일자	2007.12.31		등록일자	2015.02.23
출원인	주식회사 단바이오텍	법적상태	등록	
제목	대장균의 필리 항원 또는 살모넬라균의 편모 단백질 항원에 대한 난황 항체의 분리방법			

구 성 대 비

기술요소	선행기술																																																	
<p>-항체 생산 방법-</p> <p>1) 바이러스/박테리아 항원으로 이루어진 백신 준비</p> <p>2) 백신을 산란계에 접종시켜 면역화</p> <p>3) 면역화된 산란계로부터 계란을 수득하고, 계란의 난황에서 항체를 분리 및 정제</p> <p>-핵심 구성-</p> <p>: 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)와 마치현 추출물을 포함하는 조성물</p>	<p><input type="checkbox"/> 기술요지</p> <p>○ 송아지 설사병에 대한 난황 항체의 분리 방법에 관한 것으로, 송아지 설사병을 일으키는 살모넬라 티피뮤리움 및 살모넬라 듀블린의 편모 단백질을 항원으로 산란계를 면역화시켜 난황 항체를 분리하는 것이 특징임</p> <p><input type="checkbox"/> 유사점 (Page 2, 청구항 2)</p> <p>○ 송아지 설사병 유발균을 항원으로 사용하여 산란계의 난황으로부터 항체를 생산한다는 점에서 일부 유사함</p> <div data-bbox="715 1149 1342 1503" data-label="Figure"> <table border="1"> <caption>산란계 난황 항체 titer (추정값)</caption> <thead> <tr> <th>항원</th> <th>W3</th> <th>W2</th> <th>W4</th> <th>W9</th> <th>W8</th> <th>W12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>F4 (K88)</td> <td>~10</td> <td>~100</td> <td>~100</td> <td>~250</td> <td>~450</td> <td>~450</td> </tr> <tr> <td>F2 (K99)</td> <td>~10</td> <td>~20</td> <td>~100</td> <td>~200</td> <td>~350</td> <td>~450</td> </tr> <tr> <td>F6 (9879)</td> <td>~10</td> <td>~20</td> <td>~100</td> <td>~200</td> <td>~350</td> <td>~450</td> </tr> <tr> <td>F41</td> <td>~10</td> <td>~20</td> <td>~100</td> <td>~200</td> <td>~350</td> <td>~450</td> </tr> <tr> <td>ST</td> <td>~10</td> <td>~20</td> <td>~100</td> <td>~200</td> <td>~350</td> <td>~450</td> </tr> <tr> <td>SD</td> <td>~10</td> <td>~20</td> <td>~100</td> <td>~200</td> <td>~350</td> <td>~450</td> </tr> </tbody> </table> </div> <p><input type="checkbox"/> 차이점</p> <p>○ 마치현 추출물을 사용하지 않는다는 점에서 차이가 있음</p>	항원	W3	W2	W4	W9	W8	W12	F4 (K88)	~10	~100	~100	~250	~450	~450	F2 (K99)	~10	~20	~100	~200	~350	~450	F6 (9879)	~10	~20	~100	~200	~350	~450	F41	~10	~20	~100	~200	~350	~450	ST	~10	~20	~100	~200	~350	~450	SD	~10	~20	~100	~200	~350	~450
항원	W3	W2	W4	W9	W8	W12																																												
F4 (K88)	~10	~100	~100	~250	~450	~450																																												
F2 (K99)	~10	~20	~100	~200	~350	~450																																												
F6 (9879)	~10	~20	~100	~200	~350	~450																																												
F41	~10	~20	~100	~200	~350	~450																																												
ST	~10	~20	~100	~200	~350	~450																																												
SD	~10	~20	~100	~200	~350	~450																																												

검 토 의 견

본 기술과 관련문헌을 비교한 결과, 송아지 설사병 항원에 대한 난황 항체의 분리방법에 관한 것으로, 살모넬라 티피뮤리움 및 살모넬라 듀블린의 편모 단백질을 항원으로 포함하고 있으며, 상기 항원은 송아지 설사병에 대한 항원으로 이를 이용하여 난황항체를 생산하는 점에서 일부 유사하나, 마치현 추출물을 사용하지 않는다는 점에서 일부 차이가 있음

일련번호	3	한국등록특허 10-0267746	유사도	일부 유사
출원일자	1998.04.03		등록일자	2000.07.07
출원인	대한민국(국립수의과학검역원 장)		법적상태	등록
제목	돼지 대장균 설사증 예방 및 치료용 난황항체를 이용한 경구용 면역제제			
구 성 대 비				
기술요소		선행기술		
<p>-항체 생산 방법-</p> <p>1) 바이러스/박테리아 항원으로 이루어진 백신 준비</p> <p>2) 백신을 산란계에 접종시켜 면역화</p> <p>3) 면역화된 산란계로부터 계란을 수득하고, 계란의 난황에서 항체를 분리 및 정제</p> <p>-핵심 구성-</p> <p>: 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)와 마치현 추출물을 포함하는 조성물</p>		<p><input type="checkbox"/> 기술요지</p> <p>○ 돼지 대장균 설사증에 대한 난황항체 및 경구용 면역제제에 관한 것으로, 병원성 대장균의 섬모항원 K88, K99 및 987p와, 이열성 독소를 포함하는 백신을 이용하여 난황항체를 제조하는 것이 특징임</p> <p><input type="checkbox"/> 유사점 (Page 5, 청구항 1)</p> <p>○ 대장균 항원으로 난황항체를 생산한다는 점에서 일부 유사함</p> <p><input type="checkbox"/> 차이점</p> <p>○ 송아지가 적용대상에 포함되어 있지 않고, 마치현 추출물을 사용하지 않는다는 점에서 차이가 있음</p>		
검 토 의 견				
<p>본 기술과 관련문헌을 비교한 결과, 돼지 대장균 설사증에 대한 난황항체 및 경구용 면역제제에 관한 것으로, 병원성 대장균의 섬모항원 K88, K99 및 987p와, 이열성 독소를 포함하는 백신으로 난황항체를 제조하는 기술을 개시하고 있으며, 설사증 병원균 항원으로 난황항체를 생산하는 점에서 일부 유사하나, 적용대상이 송아지가 아니고, 마치현 추출물을 사용하지 않는다는 점에서 일부 차이가 있음</p>				

일련번호	4	한국공개특허 2007-0039114	유사도	일부 유사
출원일자	2007.01.31		공개일자	2007.04.11
출원인	인테나 에스피아		법적상태	포기
제목	가축병 치료제와 축산에서 동물의 안녕을 위한 약용 식물과 그 추출물의 용도			
구 성 대 비				
기술요소		선행기술		
<p>-항체 생산 방법-</p> <p>1) 바이러스/박테리아 항원으로 이루어진 백신 준비</p> <p>2) 백신을 산란계에 접종시켜 면역화</p> <p>3) 면역화된 산란계로부터 계란을 수득하고, 계란의 난황에서 항체를 분리 및 정제</p> <p>-핵심 구성-</p> <p>: 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)와 마치현 추출물을 포함하는 조성물</p>		<p><input type="checkbox"/> 기술요지</p> <p>○ 가축용 성장 촉진제를 제조하는 과정에서 쇠비름속(<i>Portulaca</i> genus) 식물, 특히 쇠비름(<i>Portulaca oleracea</i>)의 지상부(aerial parts) 추출물의 용도에 관한 것임</p> <p><input type="checkbox"/> 유사점 (Page 2, 청구항 2, Page 4, 표 3)</p> <p>○ 가축용 사료의 성장 촉진제의 제제로 쇠비름(마치현)의 추출물을 사용하였고, 설사에 효과가 있다는 실험결과가 개시되어 있다는 점에서 일부 유사함</p> <p><input type="checkbox"/> 차이점</p> <p>○ 송아지가 적용대상에 포함되어 있지 않고, 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)를 사용하지 않는다는 점에서 차이가 있음</p>		
검 토 의 견				
<p>본 기술과 관련문헌을 비교한 결과, 가축용 성장 촉진제를 제조하는 과정에서 쇠비름(마치현, <i>Portulaca oleracea</i>)을 사용하는 기술을 개시하고 있으며, 쇠비름(마치현)을 포함하는 가축용 사료 성장 촉진제를 사용한 결과 설사에 효과가 있다는 실험결과가 개시되어 있다는 점에서 일부 유사하나, 적용대상이 송아지가 아니고, 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)를 사용하지 않는다는 점에서 일부 차이가 있음</p>				

일련번호	5	한국공개특허 2016-0082823	유사도	낮음
출원일자	2014.12.29		공개일자	2016.07.11
출원인	(주)휴벳		법적상태	공개
제목	마치현 및 금전초 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주질환 예방 또는 개선용 조성물			
구 성 대 비				
기술요소		선행기술		
<p>-항체 생산 방법-</p> <p>1) 바이러스/박테리아 항원으로 이루어진 백신 준비</p> <p>2) 백신을 산란계에 접종시켜 면역화</p> <p>3) 면역화된 산란계로부터 계란을 수득하고, 계란의 난황에서 항체를 분리 및 정제</p> <p>-핵심 구성-</p> <p>: 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)와 마치현 추출물을 포함하는 조성물</p>		<p>□ 기술요지</p> <p>○ 마치현 추출물과 금전초 추출물을 혼합한 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물, 약학 조성물 및 구강청결제 조성물에 관한 것임</p> <p>□ 유사점 (Page 3, 식별번호 [0002])</p> <p>○ 마치현이 설사에 사용되고, 세포독성을 억제시킨다는 언급이 포함되어 있으나, 유사도가 낮음</p> <div style="text-align: center;"> <p>A) Western blot analysis of MMP1, MMP8, and β-actin in cells treated with LPS (20 μg/ml) and POEE (0, 50, 100 μg/ml). MMP1 and MMP8 levels are significantly reduced by POEE treatment.</p> <p>B) Line graph showing the scores of gingival index over time (1st to 5th day) after LPS injection (100 μg/ml). The POEE groups (POEE=50 and POEE=2.5) show significantly lower gingival index scores compared to the Normal, V&amp;H, and POEE=0.5 groups.</p> </div> <p>□ 차이점</p> <p>○ 마치현 추출물을 송아지 설사병 치료용으로 사용하지 않았고, 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)에 대해 개시되어 있지 않다는 점에서 차이가 있음</p>		
검 토 의 건				
<p>본 기술과 관련문헌을 비교한 결과, 마치현 추출물과 금전초 추출물을 포함하는 치주질환 예방 또는 개선용 조성물에 관한 기술을 개시하고 있으며, 마치현이 설사에 사용된다는 점이 개시되어 있으나, 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)와 마치현 추출물을 포함하는 송아지 설사병 예방 또는 치료용 조성물이 아니라는 점에서 차이가 있음</p>				

일련번호	6	미국공개특허 2017-0258899	유사도	일부 유사
출원일자	2014.08.22		공개일자	2017.09.14
출원인	Investiacion Aplicada	법적상태	심사중	
제목	EMULSIFIED VACCINE TO OBTAIN FORMULATIONS OF CONCENTRATED IGY IMMUNOGLOBULINS; PROCESSES AND USES FOR THE SAME			
구 성 대 비				
기술요소		선행기술		
<p>-항체 생산 방법-</p> <p>1) 바이러스/박테리아 항원으로 이루어진 백신 준비</p> <p>2) 백신을 산란계에 접종시켜 면역화</p> <p>3) 면역화된 산란계로부터 계란을 수득하고, 계란의 난황에서 항체를 분리 및 정제</p> <p>-핵심 구성-</p> <p>: 송아지 설사병 병원균 및 바이러스에 대한 난황항체(IgY)와 마치현 추출물을 포함하는 조성물</p>		<p><input type="checkbox"/> 기술요지</p> <p>○ IgY 생산용 백신에 관한 것으로, 항원, 광물성 오일 및 생분해성 입자 형태의 아쥘반트(adjuvant)를 포함하는 백신을 이용하여 난황항체를 제조하는 것이 특징임</p> <p><input type="checkbox"/> 유사점 (Page 11, 청구항 14)</p> <p>○ 대장균, 살모넬라, 로타바이러스 항원으로 난황항체를 생산한다는 점에서 일부 유사함</p> <p><input type="checkbox"/> 차이점</p> <p>○ 송아지가 적용대상에 포함되어 있지 않고(돼지 유행성 설사병, 소 유방염에 적용), 마치현 추출물을 사용하지 않는다는 점에서 차이가 있음</p>		
검 토 의 건				
<p>본 기술과 관련문헌을 비교한 결과, 항원, 광물성 오일, 생분해성 입자 형태의 아쥘반트를 포함하는 IgY 생산용 백신에 관한 기술을 개시하고 있으며, 대장균, 살모넬라, 로타바이러스 항원으로 난황항체를 생산한다는 점에서 일부 유사하나, 송아지가 적용대상에 포함되어 있지 않고, 돼지 유행성 설사병과 소 유방염에 적용되고 있으며, 마치현 추출물을 사용하지 않는다는 점에서 일부 차이가 있음</p>				

## 6. 개발대상 제품의 국내외 시장분석

### 가. 국내 제품생산 및 시장 현황

국내 동물약품 시장 규모는 약 7천억원 정도이며 꾸준한 성장세를 보이고 있다. 또한 송아지 설사병 치료제 시장은 연간 약 100억원 규모이다. 현재 당사가 개발하고자하는 제품은 천연물 기반의 송아지 설사병 예방 및 치료제이고 항염, 항균, 항바이러스 기능을 함유하는 제제이다. 이에 대한 국내 경쟁사는 없는 상황이며, 천연물을 기반으로 한 제품개발 연구를 진행하는 회사는 있는바, 현재 시장은 확대되고 있는 상황이고 경쟁사는 전무한 상황이라고 볼 수가 있다.

표 1. 국내 송아지 설사병 치료 시장 규모

	소 (두)	송아지 두수	설사병 발생	치료시장규모(단위:백만원)
한국	3,190,000	1,595,000	638,000	9,570

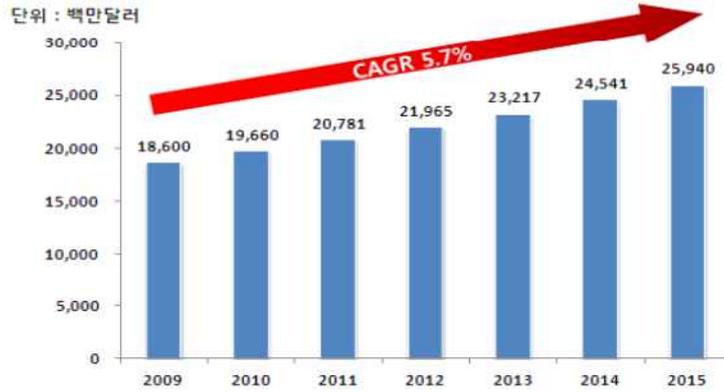


출처 : 농림수산식품기술기획평가원(2010), 한국동물약품협회(2012)

### 나. 국외 제품생산 및 시장 현황

전 세계 동물약품 시장규모는 24조원 (Vetnosis, 2014)이며, 그중 항생제와 백신이 약 60%의 비중을 가지는 구조를 가지고 있다. 전 세계적인 송아지 설사병 치료제 시장 규모는 3조원 규모이며, 전 세계적으로도 꾸준히 증가하는 추세이다.

### 세계 동물약품 시장규모



출처 : IFAH(International Federation for Animal Health), BCC Research(2010)

표 2. 해외 송아지 설사병 치료 시장 규모

	소 (두)	송아지 두수	설사병 발생	치료시장규모(단위:백만원)
우루과이	12,108,000	6,054,000	2,421,600	36,324
뉴질랜드	9,938,000	4,969,000	1,987,600	29,814
아르헨티나	51,895,000	25,947,500	10,379,000	155,685
호주	27,600,000	13,800,000	5,520,000	82,800
브라질	213,035,000	106,517,500	42,607,000	639,105
벨라루스	4,364,000	2,182,000	872,800	13,092
캐나다	11,915,000	5,957,500	2,383,000	35,745
미국	89,800,000	44,900,000	17,960,000	269,400
인도	301,100,000	150,550,000	60,220,000	903,300
EU	88,150,000	44,075,000	17,630,000	264,450
멕시코	17,121,000	8,560,000	3,424,000	51,360
러시아	19,132,000	9,566,000	3,826,400	57,396
우크라이나	4,408,000	2,204,000	881,600	13,224
중국	100,550,000	50,275,000	20,110,000	301,650
이집트	6,485,000	3,242,500	1,297,000	19,455
일본	3,850,000	1,925,000	770,000	11,550
소계	961,450,000	479,130,000	191,652,000	2,874,780

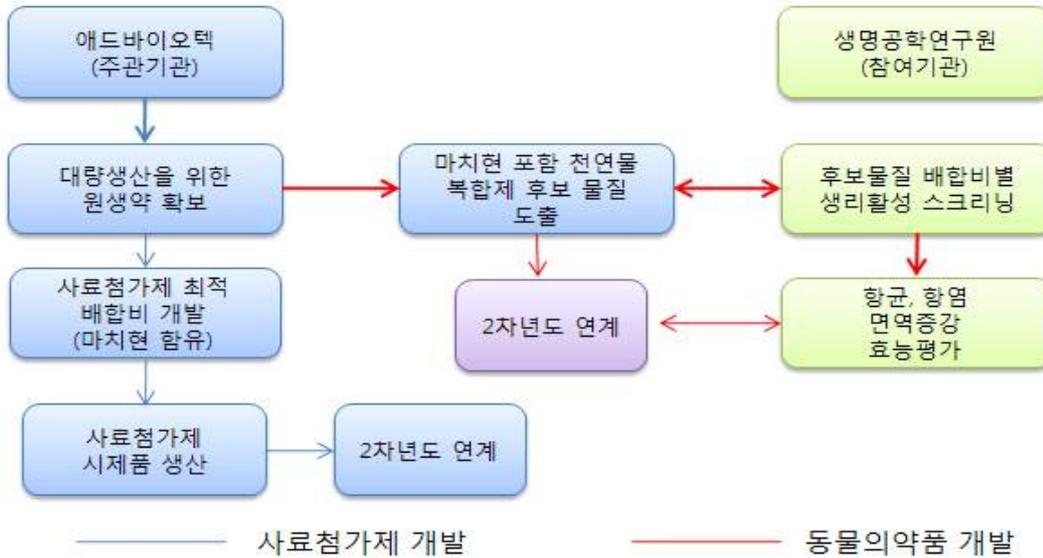
(USDA)

# 제 2 장 연구수행 내용 및 결과

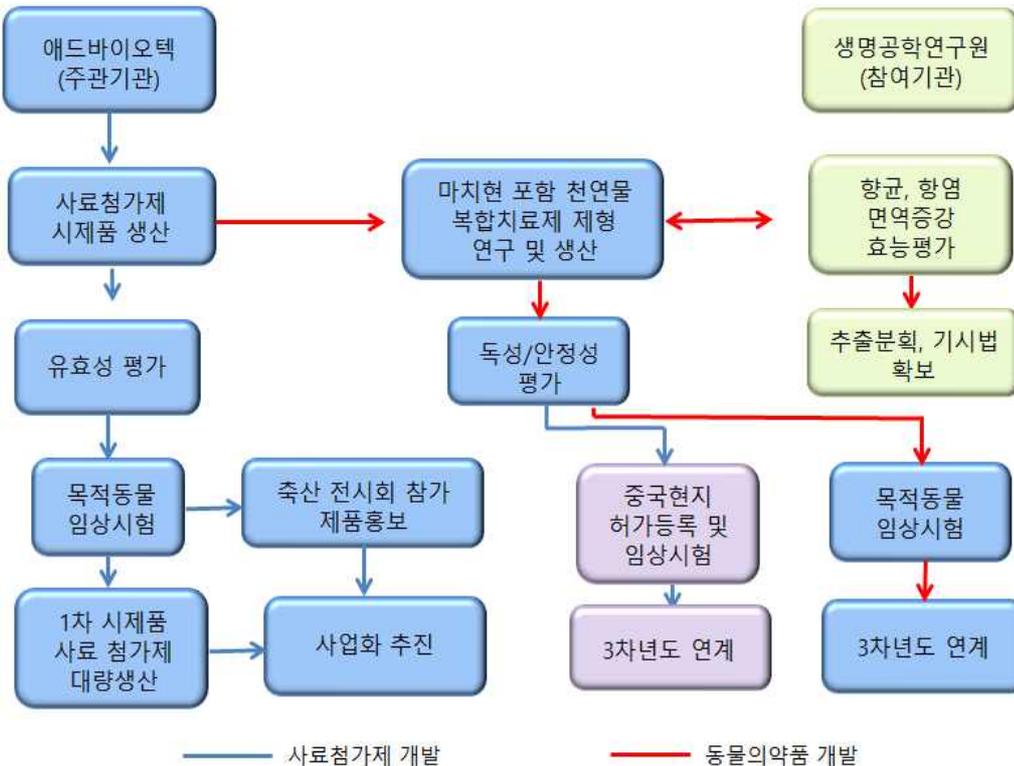
## 제 1 절 연구개발 추진체계 및 추진일정

### 1. 연구개발 추진체계

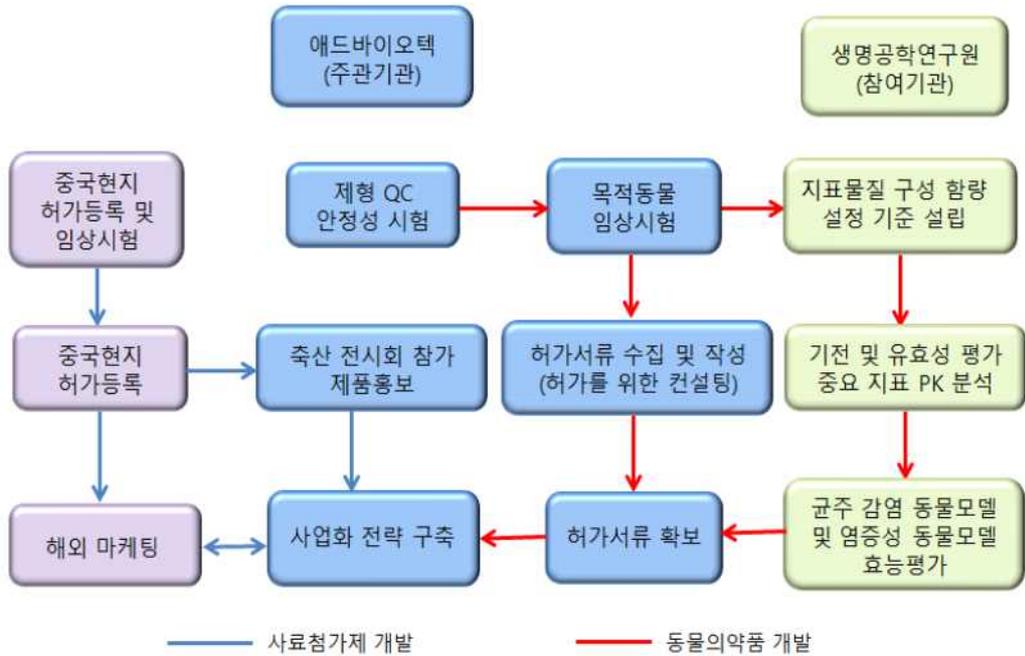
<1차년도 추진체계>



<2차년도 추진체계>



<3차년도 추진체계>



2. 연구개발 추진일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	시장조사 및 천연물 원료 확보									■	■	■			53,000	안근승 (에드바이오텍)
2	IgY 원료 생산										■	■	■		17,200	안근승 (에드바이오텍)
3	기전 및 효능평가												■	■	30,200	안근승 (에드바이오텍)
4	최적 원료 추출법 확립 및 소재 활성 지표 성분 분석									■					11,000	이소영 (한국생명공학 연구원)
5	천연소재 배합비 선정									■	■				11,000	이소영 (한국생명공학 연구원)
6	복합 추출 배합물의 활성 검증										■	■	■		11,000	이소영 (한국생명공학 연구원)
2차년도																
1	IgY 원료 생산 및 기능성사료첨가제 제작	■	■												65,000	안근승 (에드바이오텍)
2	기전 및 효능 연구	■	■	■	■	■	■	■	■						50,000	안근승 (에드바이오텍)
3	사료첨가제 현장임상		■	■	■	■	■	■							30,000	안근승 (에드바이오텍)



## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발 최종목표

다양한 원인을 가지고 있는 송아지 설사병의 적절한 예방 및 제어를 위하여,

\* 항균, 항바이러스 및 면역활성증강용 소재인 IgY와 항염 활성이 우수한 천연소재인 마치현 복합소재의 최적 배합비율을 선정함.

\* 추출 공정 및 원료 표준화 시스템을 확립하며 새로운 사료첨가제 및 동물의약품(액제 및 산제의 경구투여제) 개발함. 3) 동물임상시험을 통한 효능 검증 및 시제품의 인허가 진행(서류 제출)을 목표로 함.

### 2. 연차별 세부 목표

#### 가. 1차년도

- 시장조사 및 원료확보
- 최적원료 추출법 확립 및 소재활성 지표 성분 분석

#### 나. 2차년도

- 천연소재 배합비 선정
- 복합 추출 배합물의 활성 검증 및 효능 연구
- 기능성 사료첨가제 시제품 제작
- 복합 추출 배합물 성분분석 및 기시법 확립
- 시제품의 *in vitro* 항염 평가: 대식세포를 이용한 NO, 염증성 cytokine 등 측정
- 시제품의 *in vivo* 항염 평가: 송아지 설사병을 유발하는 살모넬라 균 감염에 의한 마우스 치사율 평가
- 기능성 사료첨가제 제작 완료
- 기전 및 효능 연구 완료
- 사료첨가제 현장 임상
- 동물의약품 제형연구 및 시제품 생산
- 임상제형 품질관리 및 안정성 시험
- 동물의약품 허가서류 작성
- 독성/안정성 평가
- 동물의약품 목적동물 임상시험
- 중국 현지 임상시험 진행
- 중국 허가등록 진행(사료첨가제)

#### 다. 3차년도

- 시제품의 품질관리를 위한 확립된 기시법에 따른 정량, 정성분석
- 시제품의 활성 효능 평가 및 작용 기작 연구

- 임상제형 품질관리 및 안정성 시험
- 동물약품 목적동물 임상시험 완료
- 동물약품 허가용 자료수집 및 허가 진행(허가서류 제출)
- 사업화 전략구축
- 중국 현지 임상시험 진행 완료
- 중국 사료첨가제 등록
- 해외 마케팅

### 3. 연차별 목표 및 내용

#### 가. 1차년도 개발목표

- 주관기관((주)에드바이오텍): 송아지 설사병 예방 및 치료 효능이 탁월한 최적 복합소재 개발

세부목표	개발 내용 및 범위
시장조사 및 원료확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내 및 해외 치료제 시장에 대한 다각도 분석을 바탕으로 가능한 시장점유율과 판매망 구축계획 수립</li> <li>• 마치현 및 천연 활성 후보물질들에 대한 원료 확보</li> <li>• 추출법 확립 및 지표 성분 분석</li> </ul>

- 협동기관(한국생명공학연구원): 복합소재에 대한 활성 검증 및 성분분석

세부목표	개발 내용 및 범위
최적 원료 추출법 확립 및 소재 활성 지표 성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HPLC, GC 분석을 통한 원료의 표준분석법 개발, 원료 표준화 및 추출 공정 최적화</li> <li>• 주관기관에서 선정한 추출분획에 대하여 지표성분의 성분 및 함량 분석</li> </ul>

#### 나, 2차년도 개발목표

- 주관기관((주)에드바이오텍): 기능성 사료첨가제 개발 및 동물의약품 개발 진행

세부목표	개발 내용 및 범위
마치현 포함 최적 배합비 도출	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 마치현을 포함한 항균, 항염, 면역활성 등 송아지 설사병 치료에 최적화된 소재의 복합비율 설정</li> </ul>
기능성 사료첨가제 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 한국생명공학 연구원에서 기존 연구된 마치현을 포함한 천연 소재 건조분말과 기타 부형제등을 혼합하여 펠렛 형태의 첨가제를 개발</li> </ul>
기전 및 효능 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 복합 추출 배합물 및 시제품에 대한 기전 및 효능 연구</li> </ul>
사료첨가제 현장 임상	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 송아지 설사병의 예방 및 치료에 대한 객관적인 데이터를 제</li> </ul>

	<p>시할 수 있는 대학교에서 사양시험 진행(예, 호서대학교 등)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 사양시험을 통해 가장 경제적이고 효율적인 사료첨가제의 배합비율 확정</li> <li>• 대량 생산 체계 확립</li> <li>• 보조사료 추출제로 사료 성분 등록 예정이며 송아지 사육농가에서 일반 사료에 첨가하여 설사 예방 및 치료를 목적으로 하는 첨가제로써 조달청 및 대리점을 통해 판매 극대화</li> </ul>
사료첨가제 생산 및 판매 전략 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 송아지에게 투여가 쉬우며, 약물전달에 최적화된 약물 전달 제형의 도출</li> <li>• 15g 용량의 동물의약품 생산</li> </ul>
동물의약품 제형 연구 및 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유효기간 설정용 안정성 시험</li> <li>• 제형의 기준 설정 및 시험법 개발(함량)</li> <li>• 안정성 시험 및 유효기간 설정</li> </ul>
임상제형 품질관리 및 안정성 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 검역본부에 시험실시계획보고</li> <li>• 기원 및 개발경위</li> <li>• 원료 역사적 사용례 및 제품성분사용례</li> <li>• 원료 제조공정/기준 및 시험법 자료</li> </ul>
동물의약품 허가서류 작성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 복합 추출 배합물 및 시제품에 대한 독성/안전성 평가 개시</li> </ul>
독성/안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 예방효과 및 치료제에 대해서는 호서대학교에 의뢰하여 시험에 대한 신뢰성을 확보하고 마케팅 및 동물의약품 등록을 위한 자료로 활용</li> </ul>
동물의약품 목적동물 임상 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 중국 농업부의 허가를 위한 현지 파트너 이용</li> </ul>
중국 허가등록 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 중국 현지에 특화된 환경 및 원인균에 의한 송아지 설사병 효능에 대한 현지화 임상시험(증체량, 사료효율, 설사양상, 폐사율, 설사개선 등)</li> </ul>

- 협동기관(한국생명공학연구원): *In vivo* 항염 모델 구축 및 효능 검증, 기시험 개발

세부목표	개발 내용 및 범위
복합 추출 배합물의 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 주관기관에서 선정한 복합 추출 배합물에 대하여 항균 및 IL-6/STAT3 활성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disk assay를 사용하여 항균 평가</li> <li>- IL-6/STAT3 luciferase assay를 통한 활성 평가</li> </ul> </li> </ul>
선정된 복합 추출 배합물 성분분석/기시험 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HPLC, GC 분석을 통한 분석법 표준화 및 추출 공정 최적화</li> <li>• 주관기관에서 선정한 복합 추출 배합물에 대하여 지표성분의 성분 및 함량 분석</li> </ul>
시제품의 <i>in vitro</i> 항염 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 주관기관에서 선정한 복합 추출분획 및 시제품에 대하여 항염 평가: 대식세포를 이용한 NO, 염증성 cytokine 등 측정</li> <li>• 기존 IgY와 비교평가를 통한 효능 증가 검증</li> </ul>
시제품의 <i>in vivo</i> 항염 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 송아지 설사병을 유발하는 살모넬라 균 감염 마우스 모델 구축</li> <li>• 살모넬라 균 감염에 의한 마우스 치사율 평가</li> </ul>

다. 3차년도 개발목표

- 주관기관((주)에드바이오텍): 동물의약품 개발 및 허가 진행, 사업화 전략 수립

세부목표	개발 내용 및 범위
임상제형 품질관리 및 안정성 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>유효기간 설정용 안정성 시험</li> <li>제형의 기준 설정 및 시험법 개발(함량)</li> <li>안정성 시험 및 유효기간 설정</li> </ul>
동물의약품 목적동물 임상 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>예방효과 및 치료제에 대해서는 호서대학교에 의뢰하여 시험에 대한 신뢰성을 확보하고 마케팅 및 동물의약품 등록을 위한 자료로 활용</li> </ul>
동물약품 허가용 자료 수집 및 허가 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>안전성(독성) 자료(최종선정 생약기반 검역원과 최종 협의하여 결정)</li> <li>유효성(목적동물 Field 임상) 평가 자료</li> <li>검역본부 허가 진행(서류 제출)</li> </ul>
사업화 전략 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>제품 생산 및 판매 계획 수립</li> <li>설비 확충 및 투자 전략 수립</li> <li>글로벌 동물의약품 판매회사 납품관로개척</li> </ul>
중국 허가등록 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>중국농업부의 허가를 위한 현지 파트너 이용</li> </ul>
중국 현지 임상시험 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>중국 현지에 특화된 환경 및 원인균에 의한 송아지 설사병 효능에 대한 현지화 임상시험(증체량, 사료효율, 설사양상, 폐사율, 설사개선 등)</li> </ul>
해외 마케팅	<ul style="list-style-type: none"> <li>한국 과 중국에서 기 실시한 임상시험 결과를 이용한 해외 현지화 효능 마케팅</li> <li>국제전시회를 이용한 제품전시 및 바이어 발굴</li> </ul>

- 협동기관(한국생명공학연구원): 동물의약품 시제품에 대한 효능검증, 작용기전 연구

세부목표	개발 내용 및 범위
시제품 품질관리를 위한 정량, 정성 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>주관기관에서 선정한 시제품 품질관리를 위해 확립된 기시험법에 따른 HPLC, GC 분석을 통한 지표성분의 정량, 정성 분석</li> </ul>
시제품의 활성 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>동물의약품 시제품의 항균, 활성 효능 평가                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disk assay를 사용하여 항균 평가</li> <li>- IL-6/STAT3 luciferase assay를 통한 활성 평가</li> </ul> </li> <li>기존 IgY와 비교평가를 통한 효능 증가 검증</li> </ul>
시제품의 작용 기작 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>대식세포를 이용한 동물의약품 시제품의 항염 효과 검증</li> <li>동물의약품 시제품의 IL-6/STAT3 신호전달 저해 효과 검증</li> <li>구축된 살모넬라 감염 동물모델을 이용하여 시제품의 마우스 치사율 평가</li> </ul>

### 제 3 절 연구개발 성과

#### 1. *In vitro*, *In vivo* 효능평가 결과

##### 가. 원료 확보를 위한 추출법 확립 및 지표성분 분석

###### 1) 마치현

##### 가) 마치현 추출물 최적조건 탐색

국내산(영천) 및 중국산 마치현은 50%, 70%, 100% 에탄올 비율에 따른 마치현의 추출 효율과 활성을 비교하여 최적의 에탄올 용매 조건을 확립하였다. 추출 온도는 에탄올 용매의 끓는점 (약 75℃)을 감안하여 70℃로 설정 하였으며, 원물대비 용매의 양과 추출 시간은 추출 시비용 단가와 연계하여 건조 중량 대비 10 배의 용매로 5시간 추출하는 것으로 결정하였다.

표 3. 마치현 원물 대비 추출용매 함량 및 추출 효율

산지	중량 (g)	에탄올 함량 (%)	용매의 양	추출시간	수득량 (g)
국내산(영천)	20	50	10배	5시간	3.9
		70	10배	5시간	3.3
		100	10배	5시간	1.3
중국산	20	50	10배	5시간	3.3
		70	10배	5시간	2.5
		100	10배	5시간	1.3

추출용매별 IL-6/STAT3 저해활성을 측정해본결과, 국내산 및 중국산의 경우 50%, 70%, 100% 에탄올 비율이 증가 할수록 저해 활성이 우수한 것을 확인하였고, 중국산 100% 에탄올 추출물을 선정하여 추후 *in vivo* 모델을 이용한 활성 검증을 통하여 최적의 추출용매를 검증하였다.

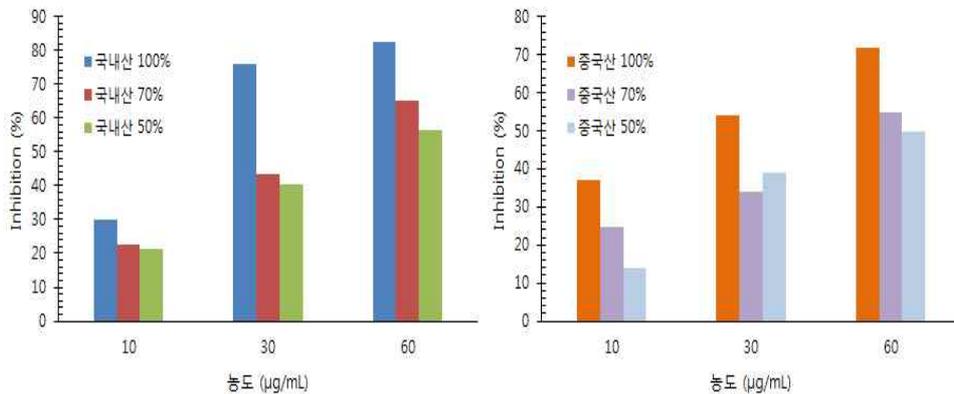


그림 13. 마치현 추출용매별 활성 검증

나) 마치현 샘플의 분석을 위한 전처리 공정

마치현 20 g의 건조 후 세절된 시료에 50%, 70%, 100% 에탄올 용매 200 ml를 첨가한 후 이를 70°C에서 5 시간 동안 추출하였다. 각각 마치현 에탄올추출물은 종이필터로 여과한 후 여과액을 감압 농축하였으며 농축된 마치현 추출물은 다시 메탄올 20 ml에 재 용해하였고, 이는 HPLC system에 Injection하기 전 C18 sep-pak 카트리지를 이용하여 비극성 성분을 제거하였다.



그림 14. 마치현 시료의 분석을 위한 전처리 공정

다) HPLC chromatographic system 세팅 조건

표 4. HPLC chromatographic system 세팅 조건

➤ HPLC condition		➤ Solvents gradiants	
System	Agilent 1200 Series	Time (min)	% of solvent (B)
Flow	1 ml	0	17
Sample inj.	10 µl	15	17
Column	Phenomenex Luna 5µ C18 100A (250 × 4.6 mm)	40	32.5
Oven	40 °C	40.1	100
UV/VIS-DAD	320 nm	60	100
Mobile phase	0.5% Acetic acid in H <sub>2</sub> O (A), Acetonitrile (B)	60.1	17
		70	17

국내산 및 중국산 에탄올 추출물을 대상으로 지표물질을 선정하기 위해 HPLC 분석을 진행하였다. 국내산의 경우 14분과 17분대 피크에서 major 피크를 확인할 수 있으며 중국산은 14분, 21, 23분, 36분대에서 major 피크를 확인하였다. 현재 17분, 21분, 23분, 36분대 피크는 각각

ferulic acid, (7'S)-N-trans-feruloyloctopamine, (7'S)-N-trans-feruloylnormetanephrine 및 daidzein으로 추정되며 피크들을 분리 정제하여 구조를 확인하였다.

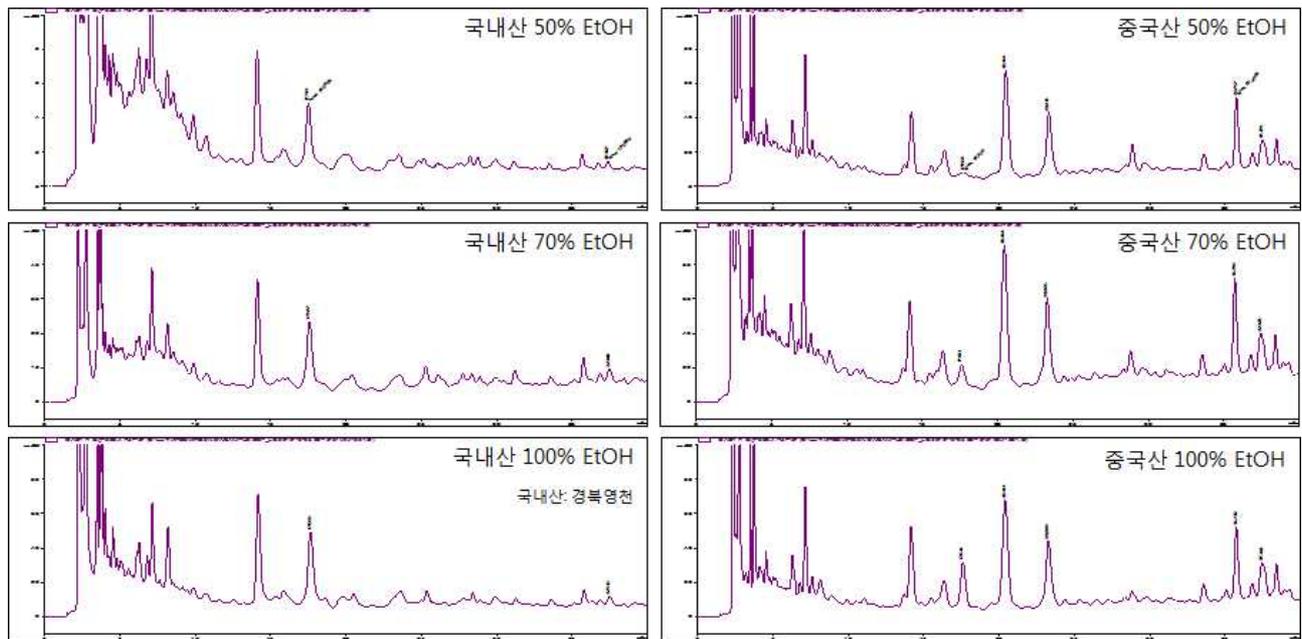


그림 15. 마치현 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램

## 2) 아출

### 가) 아출 추출물 최적조건 탐색

2종의 국내산 과 1종의 중국산 아출은 100% 에탄올을 추출 용매로 2시간동안 sonication 추출한 후, HPLC 분석을 실시하였음. 아출의 주요 화합물로는 germacrone 화합물이 보고되고 있으며, 우선적으로 이 화합물을 지표성분으로 각각의 추출물에 대한 분석을 실시한 결과, 3종의 아출에서 35분대 검출되었다. 2종의 국내산 아출은 유사한 HPLC 크로마토그래피를 보여주고 있으며, 중국산의 경우 국내산과 비교하여 31분 및 32분대 피크가 상대적으로 크게 검출되었다. 현재 germacrone 이외 major 피크로 검출되는 주요 피크들에 대하여 분석 중에 있으며, 국내산과 중국산 시료에 대한 in vitro 활성을 검증하였다.

### 나) HPLC 분석 조건

표 5. HPLC chromatographic system 세팅 조건

➤ HPLC condition

System	Agilent 1200 Series
Flow	1 ml/min
Sample inj.	10 µl
Column	Phenomenex Luna 5µ C18 100A (250 × 4.6 mm)
Oven	40 °C
UV/VIS-DAD	210 nm
Mobile phase	H <sub>2</sub> O (A), Acetonitrile (B)

➤ Solvents gradients

Time (min)	% of solvent (B)
0	30
20	30
30	90
40	90
42	100
50	100
60	30

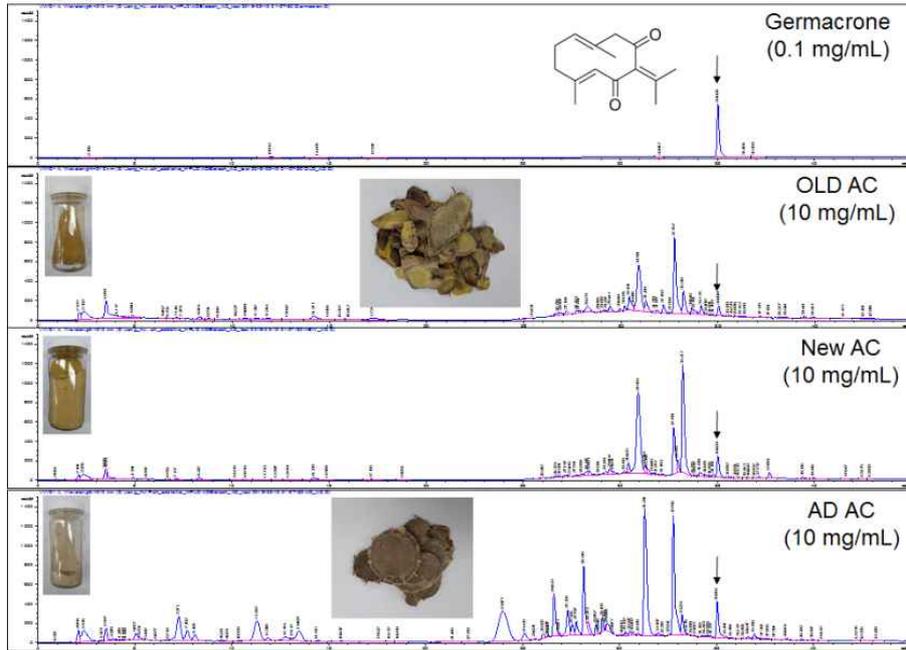
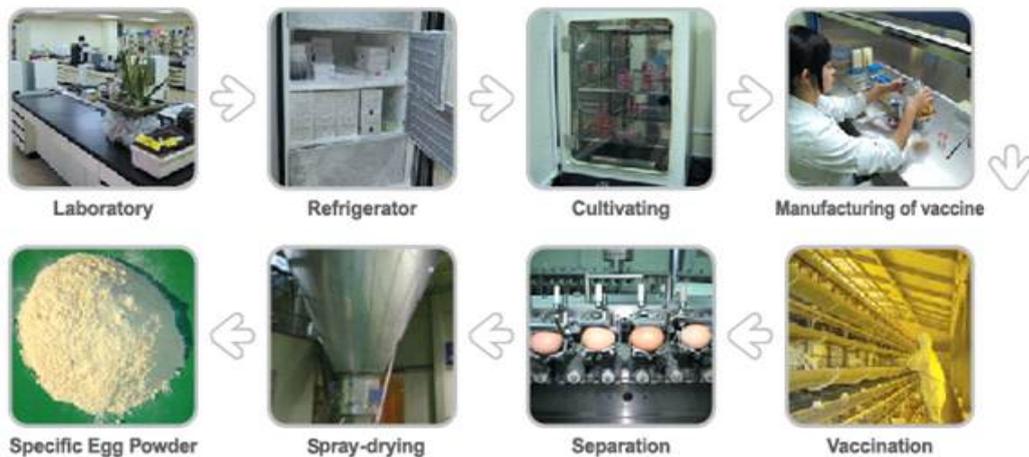


그림 15. 아출 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램

나. 송아지 설사병 원인체에 대한 특이난황항체 생산

1) 난황항체 생산 공정확립



송아지 설사병을 유발하는 바이러스 및 박테리아의 항원을 확보하여 대량 생산 방법을 확립

하고 Oil adjuvant를 이용하여 양계 접종용 혼합 백신을 개발한다. 개발한 백신을 산란계에 접종하여 송아지 설사병을 유발하는 바이러스 및 박테리아에 대해 고역가의 IgY(특이난황항체)를 함유하는 계란을 생산하며 이를 할란 및 분무 건조하여 농축한다.

## 2) 송아지 설사병 IgY 항원 배양기법 확립

### 가) 바이러스 배양

소 로타바이러스(Bovine rotavirus)는 한국수의유전자원은행(KVCC-VR9200179)에서 분양 받아 사용하였다. 바이러스 감염을 위해 한국세포주은행에서 분양받은 Rhesus monkey kidney (MA104)세포를 사용하였으며 세포배양을 위해 DMEM에 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin solution를 첨가하였고, 배양조건은 5% CO<sub>2</sub>와 37°C를 유지하였다. 세포는 T-25플라스크를 이용하여 대략 3~5일마다 세포가 80~90%정도 자란 상태에서 계대배양하였다. 바이러스의 감염에 이용한 감염배지는 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지에 10μg/ml trypsin을 첨가하여 사용하였다. 소 로타바이러스의 활성화를 위해 감염배지 1ml에 바이러스 100μl를 혼합하여 37°C에서 1시간 반응 후, MA-104세포에 1-2시간 감각 시켰다. 바이러스 감염 배지를 제거하고 10% FBS 및 1% penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 감염된 MA104세포의 약 80%에 CPE가 일어날 때까지 1-3일간 배양하였다.

### 나) Genomic RNA 추출 및 유전자 증폭

소 로타바이러스에 감염된 세포의 상층액 300μl에 TriReagent (MRC,USA) 1ml을 첨가하여 바이러스 RNA를 추출하였다. Maxime RT PreMix kit (iNtRON,Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였으며 cDNA 합성 산물을 주형으로 하여 VP6와 VP7유전자를 2x<sup>2</sup>EF-Taq Premix kit (SolGent, Korea)를 사용하여 증폭 하였다. 유전자를 증폭하기 위해 primer(Table1)를 합성하였으며 forward primer에는 EcoRI과 NcoI 을 reverse primer에는 XhoI 제한효소 염기서열을 포함시켰다. PCR조건은 95°C에서 15 분 동안 효소의 활성화와 DNA의 변성을 수행 한 후, 95°C에서 20초, 56°C에서 40초, 72°C에서 40초간 반응을 30번 반복하였으며 T100TM Thermal Cycler(Bio-Rad, CA, USA)를 사용하였다. PCR 반응물은 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 클로닝 하였으며 염기서열 분석을 통해 각각의 유전자를 확인 하였다.

표 6. Primers used for amplification of the DHV

Primer name	Sequence (5'→3')	Size (bp)
BRV-VP6_F (EcoRI)	5' -AACGAATCCATGGATGTCCTATACTTCTTTGT-3'	1,207
BRV-VP6_R (XhoI)	5' -TCAGCTCGAGCTCATTTGACAAGCATGC-3'	
BRV-VP7_F (NcoI)	5' -CCATGGATGGATACTGCGTATGCAAAT-3' '	800
BRV-VP7_R (XhoI)	5' -CTCGAGTACTCTGTAATAGAACGC-3'	

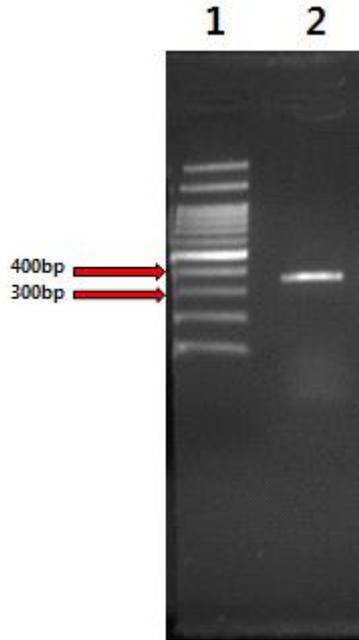


그림 16. PCR product of BRV VP7 (EcoRI/HindIII)  
Lane 1, DNA marker; lane 2, BRV VP7 insert DNA fragment 342bp.

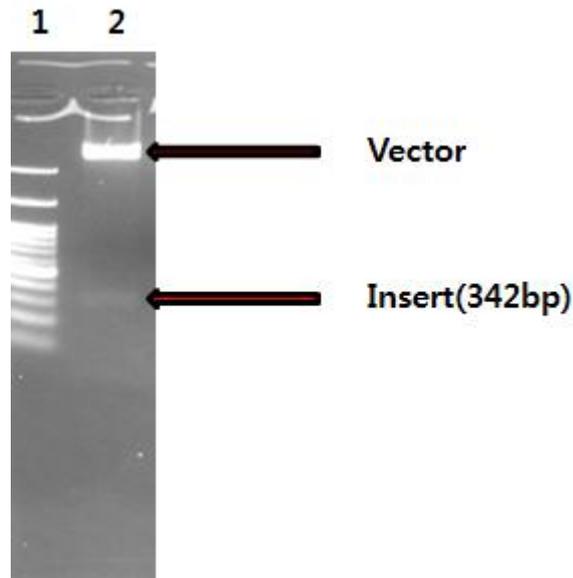


그림 16. Enzymatic digestion analysis of pET28a-VP7(EcoRI/HindIII)  
Lane 1, DNA marker; lane 2, expected 342bp VP7 fragment and 5369bp linearized vector.

#### 다) 유전자 발현

각각의 유전자 발현을 위해 pET32a(+)와 pET21d(+)(Novagen, CO, USA) Vector를 사용하였는데 pET32a(+)vector는 N-말단에 thioredoxin 단백질과 6개의 히스티딘이 삽입되어있으며 T7 promoter를 가진다. VP6는 pET32a(+)에 VP7유전자는 pET21d(+)벡터에 클로닝 하였다 (Fig.1-2). 제조합 단백질 유전자로 형질 전환된 E.coli BL21(DE3), Rosetta(DE3), Tuner(DE3)

균주를 각각 획득하여 5ml의 LB 액체배지(100 $\mu$ g/ml ampicillin)에서 접종 한 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 16 시간 동안 배양하였다. 각각의 형질전환 균주 전 배양균을 50ml의 LB 액체배지(100  $\mu$ g/ml ampicillin)에 1/100으로 재접종하여 37 $^{\circ}$ C 진탕배양 실시하여, 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 흡광도(A600)가 0.4~0.6에 도달 할 때까지 진탕배양 실시하였다. 발현 시스템의 T7 프로모터를 이용하기 위해서 isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranoside (IPTG; Sigma, USA)를 농도별로(0, 0.25, 0.5, 0.75, 1mM) 첨가 한 뒤 1시간 간격으로 배양액을 1ml씩 획득하여 원심 분리한 후, 단백질 발현유도 조건을 검토하였다. 총 4시간 동안 배양한 뒤 high-centrifuge를 이용하여 10,000 g, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리를 통해 총 균체를 획득하였다. 획득한 50 ml의 총 균체 펠렛을 5ml 용균 완충액(50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0)으로 재 부유 시켜준 뒤 추가로 1% Triton X-100과 40  $\mu$ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)를 첨가하여 상온에서 20분 반응하였다. 그 후 100  $\mu$ g/ml lysozyme을 첨가하여 잘 섞어 준 뒤, 얼음에서 1시간 반응 후 액체질소를 이용하여 동결과 해동을 3회 실시하여 대장균을 용균 하였다. 다음으로 10,000 g, 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리하여 용해성 부분과 불용성 부분을 분리하였고, 이를 SDS-PAGE를 통해 단백질 발현을 확인하였다.

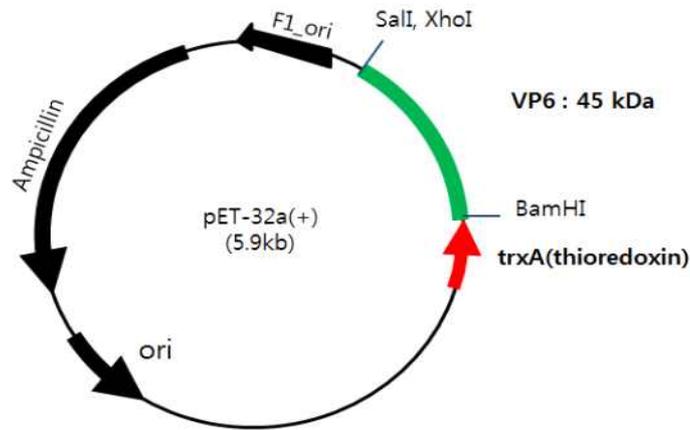


그림 17. Schematic structure of the pET-32a(+)-VP6 plasmid

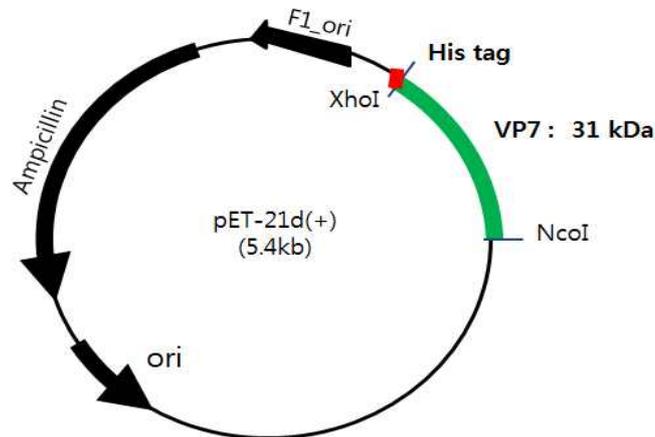


그림 18. Schematic structure of the pET-21d(+)-VP7

라) 재조합 단백질의 확인

Cell lysis를 통하여 얻어진 Inclusion body에 생산된 단백질을 SDS-PAGE로 확인하였다. SDS-PAGE는 다음과 같은 조건하에서 시행하였다.

SDS-PAGE : 12% poly acrylamide gel

- Resolving gel : D.W, 30% acrylamide gel Mix, 1.5M Tris(pH8.8), 10% SDS, 10% ammonium persulfate TEMED
- Stacking gel : D.W, 30% acrylamide gel Mix, 1.0M Tris(pH6.8), 10% SDS, 10% ammonium persulfate TEMED
- Sample dye; 2X SDS-sample dye

생산된 항원의 검증을 위하여 재조합 항원에 붙어있는 6개의 Histidine을 이용하여 Western-blot을 시행하여 생산된 항원을 검증하였고 Western blot 시험의 조건은 다음과 같다.

- Blocking buffer : 5% skim milk, Wash buffer : TBS-T
- 1st Ab : Mouse Anti-His-tag ab 1:5,000 dilution 5% skim milk
- 2nd Ab : Anti-Mouse-HRP ab 1:5,000 dilution 5% skim milk

그림 19 ~ 20의 결과에 나타났듯이 각각의 재조합 단백질 발현 vector가 삽입된 세포를 LB borth로 배양하고 IPTG로 과발현하였을 때 Induction 후 BRV VP7 단백질 위치 과발현되는 것을 확인 수 있었다.

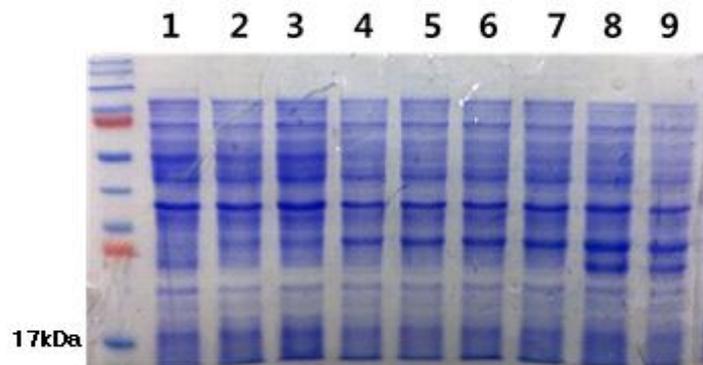


그림 19. BRV VP7 recombinant protein expression by pET28a(+)-VP7

Lane 1; non-induced pET28a(+) vector; Lane 2; induced pET28a(+) with 1.0 mmol/L IPTG after 1h of incubation; Lane 3; induced pET28a(+) with 1.0 mmol/L IPTG after 4h of incubation; Lane 4, 6, 8; non-induced pET28a(+)-VP7-E.coli BL21-DE3, Tuner, Codon plus; Lane 5, 7, 9; induced pET28a(+)-VP7-E.coli BL21-DE3, Tuner, Codon plus with 1.0 mmol/L IPTG after 4h of incubation

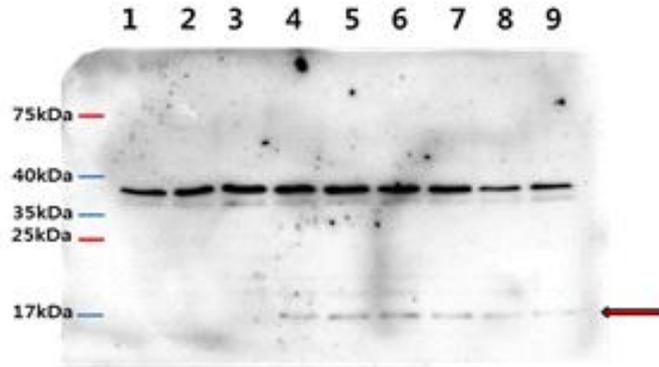


그림 20. BRV VP7 recombinant protein expression by pET28a(+)-VP7

Lane 1; non-induced pET28a(+) vector; Lane 2; induced pET28a(+) with 1.0 mmol/L IPTG after 1h of incubation; Lane 3; induced pET28a(+) with 1.0 mmol/L IPTG after 4h of incubation; Lane 4, 6, 8; non-induced pET28a(+)-VP7-E.coli BL21-DE3, Tuner, Codon plus; Lane 5, 7, 9; induced pET28a(+)-VP7-E.coli BL21-DE3, Tuner, Codon plus with 1.0 mmol/L IPTG after 4h of incubation

#### 마) Salmonella typhimurium, E. coli 배양

Salmonella typhimurium, E. Coli 는 혈액배지에 도달한 후, 37°C 배양기에서 1일 호기배양하였다. 콜로니(colony)를 확인한 후, 준비된 10ml BHI broth에 접종하여 1일 동안 배양한 후, 1000ml BHI broth 접종하여 37°C 진탕배양기에서 24~48시간 진탕배양하였다. 수득된 배양액을 0.3% 포르말린(formalin)으로 48시간 실온에서 불활화시킨 후, 10000Xg으로 원심분리한 다음 PBS(pH 7.2)로 풀어준 뒤, 0.1% 포르말린(formalin)으로 다시 불활화를 시켰다. 불활화 한 후, 1일간 실온에서 방치한 후, 4°C 냉장고에서 보관하였다. 그리고 스펙트로포토메터(Spectrophotometer)를 이용하여 1012 cell/ml로 농도를 맞춰 항원을 생산하였다.

#### 3) 난황항체 생산을 위한 산란계 접종용 백신 제조

산란계 접종을 위한 바이러스와 재조합 단백질의 혼합 백신을 다음과 같이 제조 하였다.

백신제조 전 냉장 보관된 항원을 실온에 꺼내 놓는다. Adjuvant oil를 37±1°C water bath에서 15 ~ 20분 정도 데우고, Homogenizer를 멸균증류수에 Formaldehyde solution 37 %를 0.1 % 넣어 소독하고, 70 % 알코올을 뿌려 건조 시킨다. 백신용기, 고무전, Cap, PBS 1x, 체, 집게, 주사기, 50 ml tube, 20 ul pipetman, 20 ul tips, 50 ml tube, 플라스틱 비이커(500, 1,000L)를 준비 한다.

37±1°C로 데워진 water bath에 각 각의 adjuvant를 넣어 20 분간 데운다. Homogenizer 물기를 제거하고, 70 % 알코올을 뿌려 건조한다. 재조합 단백질 항원을 단백질을 혼합한다. 혼합된 항원은 표준 시험용체를 70 % 에탄올을 분무하여 불로 달궈준 후 무균상태로 걸러준다. 혼합 항원과 adjuvant를 섞어주고, Homogenizer 5,000rpm/min 속도로 25 min - Centrifug 시행한 후 백신병 에 분주 후 산란계 접종용 백신으로 생산 한다.

#### 4) 산란계 시험 방법 및 결과

송아지 설사병의 주요 원인체인 로타바이러스 와 로타바이러스 유래 재조합 단백질에 대한 난황항체 형성 여부 및 백신 구성을 확인하기 위한 산란계 시험을 진행 하였다.

산란계 시험의 경우 산란계의 경우 약 25주령 이상된 Hy-line brown 계열을 이용하여 생산된 산란계용 백신을 접종 하였고, 접종 후 생산된 계란을 이용하여 아래와 같은 구성으로 시험을 진행 하였다.

표 7. 산란계시험 백신 항원 구성

Group	백 신 항 원 구 성
R-1	Rota Virus A, B, C + <i>E. coli</i> + <i>S.Typhimurium</i>
R-2	Rota Virus A, B, C + <i>E. coli</i> + <i>S.Typhimurium</i> + Rota Virus VP6-농도 1 + Rota Virus VP7-농도 1
R-3	Rota Virus A, B, C + <i>E. coli</i> + <i>S.Typhimurium</i> Rota Virus VP6-농도 2 + Rota Virus VP7-농도 2

#### 5) 난황항체 역가 측정

##### 가) 바이러스 ELISA 시험용 단백질 추출

생산된 바이러스 항원을 준비한다. 초원심 분리기를 이용하여 30,000 ~ 50,000rpm, 2 ~ 3시간 시행 후 상층액을 제거하여, PBS(1X)를 이용하여 풀어준다. PBS(1X)를 이용하여 풀어준 pellet 샘플은 Soincation을 실행한 뒤 초원심 분리기로 30,000~50,000rpm, 2 ~ 3시간 시행 후 상층액을 제거하고 PBS에 재 부유 시킨다. 생산된 샘플은 filter를 진행하고, 포르말린을 0.1 % 처리 한 뒤 단백질 정량 뒤 코팅농도 설정 시험을 진행하여 ELISA 시험용 항원으로 사용 하였다.

##### 나) 박테리아 ELISA 시험용 단백질 추출

박테리아 배양이 끝나면 균 배양액을 원심관에 옮겨 9000rpm 4℃에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 버리고, PBS(1X)를 이용하여 2회 세척한다. 10mM HEPES buffer(GibcoBRL, USA) 500ml 로 균을 부유시킨 뒤 다시 원심분리를 하여 1회 washing한다. 원심분리 후 상층액을 버리고 pellet을 10mM HEPES buffer 300ml로 suspension 후 30 ml씩 분주하여 sonication(10초 sonication, 10초 hold, 10min)하여 항원을 Lysis 시킨다. Lysis한 상층액을 8,000rpm 4℃에서 30분간 원심하여 상층액을 수거하고 pellet은 버린다. 분리한 상층액에 1% N-Lauroly sarcosine(SIGMA USA)를 최종 농도 0.1 % 가 되도록 첨가한 후 실온에서 10 분간 정치한 후 15,000rpm 4℃에서 50분간 원심 분리한다. 상층액을 버리고 detergent를 제거하기 위해 pellet을 10mM HEPES buffer 50ml로 다시 부유시켜 15,000rpm 4℃에서 50분간 원심 분리한다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 pellet(OMP)을 10mM HEPES buffer 25ml로 부유한다. pellet을 부유한 후 sonication (10초 sonication, 10초 hold, 1min)을 하고, 0.45um 사이즈로 fillter한 후 Formalin 0.1% Thimerosal 0.01 %가 되도록 첨가한다. 단백질을 정량하고 OMP 항원의 항원성을 확인하기 위하여 표준혈청을 사용하여 ELISA로 검사한다.

다) 항체 역가 측정을 위한 ELISA용 재조합 단백질 정제

ELISA를 통한 항체의 역가를 확인하기 위하여, 각 각의 재조합 단백질을 Ni-NTA column(QIAGEN, USA)을 이용하여 아래와 같이 분리 정제하였다.

단백질 분리 정제를 위하여 재조합 단백질 항원 생산 방법은 동일하게 IPTG에 의한 과 발현 과정과 Lysozyme을 이용한 Lysis 과정을 거쳐 수거된 Inclusion body를 8M Urea buffer를 이용하여 단백질을 녹여서 사용하였다.

단백질 정제에 사용 되는 시약은 다음과 같이 제조하였다.

- Lysis buffer (NPI-10) : 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH 8.0
- Wash Buffer (NPI-20) : 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20mM imidazole, pH 8.0
- Elution Buffer (NPI-500) : 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 500mM imidazole, pH 8.0
- Ni-NTA spin column

라) 난황항체의 역가를 측정하기 위한 ELISA 시험 방법

난황 중의 특이난황항체의 역가는 Indirect ELISA method 방법을 응용하여 측정 하였다. 먼저 각 항원별 설정된 농도로 Carbonate coating buffer에 희석하여 각 well당 100 ul 씩 96well polystyrene plate에 Coating 하여 4°C에서 over night 한다. (또는, 37°C에서 1시간 방치시킨다). PBS-T(phosphate buffer saline, 0.05% Tween 20, pH 7.4)로 세척 후 2% BSA가 함유된 PBS(1X) buffer로 1시간동안 37°C에서 blocking하며 상기와 같은 방법으로 세척하였다. 음성대조군, 양성대조군 및 샘플을 2X 씩 희석하여 Well당 100 μl씩 넣고 37°C에서 1시간 정치한다. 1시간 후 3번 세척 하고, 2차 항체 (anti-chicken: Sigma, U.S.A)를 PBS(1X)에 적정량 희석하여 각 Well에 100 ul 씩 분주한 후 37°C에 1시간 반응시킨다. 그 후 3번 세척을 하고 substrate로 TMB solution를 각 well에 100 ul 씩 분주한 다음 실온에서 약 10분간 반응 시키고, Stop solution 1.6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 ul을 분주하여 반응을 중지 시켜 450nm의 파장에서 ELISA reader 로 각 well의 흡광도를 측정하여 ELISA value로 나타내었다. 측정된 결과에 음성샘플의 평균값을 2배수 하여 처리된 난황의 측정값에 대입하여 분석 Data의 역가를 나타내었다.

6) 산란계 시험을 통한 난황항체의 형성 확인 시험 결과

Rota virus에 대한 백신과 재조합 백신과의 혼합 시 Rota virus의 역가에 미치는 영향 및 재조합 단백질의 역가형성에 미치는 영향을 알아보기 위한 시험을 진행하였다. 본 실험에서는 재조합단백질을 혼합하지 않은 그룹-1과 재조합 단백질 VP6를 2가지 농도 조건으로 각 각 혼합해 그룹-2,3 으로 혼합백신을 제조하여 산란계 접종한 뒤 생산된 난황을 이용하여 역가를 측정하였다.

먼저 Rota virus에 대한 역가를 확인 한 결과 Rota virus와 재조합 단백질을 혼합하지않은 백신을 접종한 그룹-1은 Rota virus 항원에 대한 역가가 2차접종 3주차 이후 감소하는 경향을 보였고, 그 외 항원에 대해서는 역가가 단계적으로 증가하는 경향을 보였다.

Rota virus의 자체의 역가는 저해하지 않는 것으로 나타났으며,

이와 비해 Rota virus와 재조합 단백질을 혼합한 백신을 접종한 그룹-2는 3차 접종이후 까지

역가가 단계적으로 증가하는 경향을 보였고, 감소경향은 보이지 않았다.

시험 결과 재조합 단백질 VP6를 2가지 농도 조건으로 각 각 혼합한 그룹-2,3에서 6,400에서 역가가 형성이 되어 25,600까지 역가가 나타났다. 그룹-2의 경우 2차접종 1주차를 기준으로 하여 12,800까지의 역가가 올라가면서 최종주차에는 25,600까지의 역가가 측정되었다.

그룹-3의 경우 6,400에서 단계적으로 증가해서 3차접종 이후에는 역가가 25,600으로 일정한 경향을 보였다,

이에 따라서 본 연구개발 항체의 메인 타겟인 Rota virus에 대한 직접적인 역가가 그룹-1,2보다는 그룹-3이 더 높게 형성이 되었고, 재조합 단백질의 경우, 그룹-2 에 비하여 그룹-3의 경우 순차적으로 올라가는 것으로 나타나 그룹-3을 재조합 단백질의 항원 농도로 설정하였다

표 8. R-1 그룹 주차별 각 항원에 대한 역가 결과

주차	RotaV-A	RotaV-B	RotaV-C	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurim</i>
1-1	1,600	3,200	6,400	3,200	1,600
1-2	1,600	6,400	3,200	3,200	1,600
1-3	3,200	12,800	6,400	3,200	3,200
2-1	6,400	6,400	12,800	6,400	12,800
2-2	6,400	6,400	12,800	6,400	6,400
2-3	6,400	12,800	12,800	3,200	6,400
3-1	3,200	3,200	6,400	6,400	12,800
3-2	3,200	3,200	6,400	12,800	12,800
3-3	3,200	3,200	6,400	12,800	12,800

표 9. R-2 그룹 주차별 각 항원에 대한 역가 결과

주차	RotaV-A	RotaV-B	RotaV-C	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurim</i>
1-1	800	6,400	3,200	1,600	1,600
1-2	1,600	3,200	3,200	1,600	1,600
1-3	3,200	6,400	6,400	1,600	3,200
2-1	6,400	1,600	3,200	3,200	3,200
2-2	6,400	6,400	12,800	3,200	6,400
2-3	6,400	6,400	12,800	3,200	6,400
3-1	3,200	6,400	6,400	6,400	6,400
3-2	3,200	6,400	12,800	6,400	6,400
3-3	3,200	6,400	12,800	6,400	6,400

표 10. R-3 그룹 주차별 각 항원에 대한 역가 결과

주차	RotaV-A	RotaV-B	RotaV-C	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurim</i>
1-1	1,600	3,200	6,400	800	6,400
1-2	1,600	6,400	3,200	800	1,600
1-3	1,600	3,200	6,400	800	800
2-1	6,400	12,800	25,600	6,400	6,400
2-2	6,400	12,800	25,600	6,400	6,400
2-3	6,400	12,800	25,600	6,400	12,800
3-1	3,200	6,400	12,800	12,800	12,800
3-2	3,200	6,400	12,800	12,800	12,800
3-3	3,200	6,400	12,800	12,800	12,800

7) 농장접종 백신난황 항체역가 확인시험결과

지난 산란계 실험으로 설정된 Rota virus과 재조합 단백질의 혼합백신을 제조하고 임상시험약 및 독성시험 등의 원료를 생산하기 위하여 산란계 농장에 위탁계약을 통해 백신 접종 후 생산된 난황으로부터 각각의 항원에 대한 역가 검사를 시행하였다.

Group	백신항원구성
R-3	Rota Virus A, B, C + <i>E. coli</i> + <i>S. Typhimurim</i> Rota Virus VP6-농도 2 + Rota Virus VP7-농도 2

표 11. R-3 그룹 주차별 각 항원에 대한 역가 결과

주차	RotaV-A	RotaV-B	RotaV-C	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurim</i>	VP6	VP7
1-1	3,200	1,600	1,600	3,200	3,200	3,200	3,200
1-2	3,200	1,600	1,600	3,200	3,200	12,800	6,400
2-1	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600	12,800	12,800
2-2	1,600	3,200	3,200	1,600	1,600	12,800	12,800
3-1	6,400	6,400	6,400	6,400	6,400	12,800	12,800
3-2	6,400	6,400	6,400	6,400	6,400	12,800	12,800

표 12. 최종생산 원료의 각 항원에 대한 역가 결과

시료	RotaV-A	RotaV-B	RotaV-C	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurim</i>	VP6	VP7
축우난황분말	25,600	25,600	25,600	51,200	12,800	102,400	51,200

산란계 시험을 통하여 축우 Rotavirus에 대한 난황항체 형성여부를 확인하고 산란계 농장에 대량접종 하였다.

농장접종 난황을 주차별로 수거하여 각 항원별로 난황항체의 역가를 확인 한 결과 1차접종시 각 항원별로 1,600~3,200의 결과가 나타났으며 주차별로 역가가 증가되어 3차 접종 이후 6,400~12,800의 역가를 유지하는 것으로 확인 되었다.

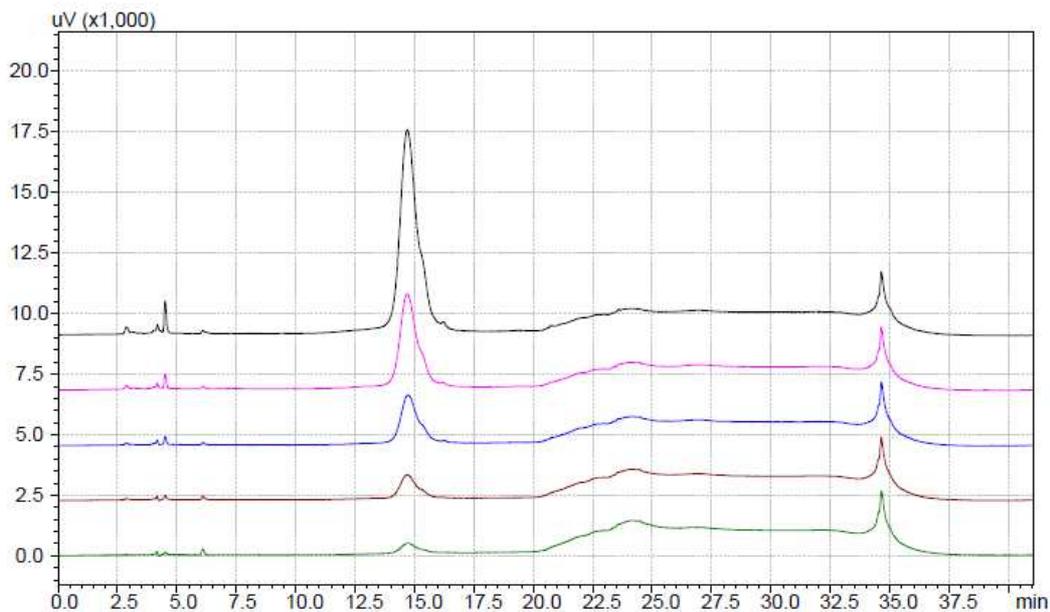
특이난황항체가 함유되어 있는 난황을 수거하여 할란 과정을 거치고 수거된 난황액을 분무건조하여 생산된 난황분말에 대해서 난황항체의 역가를 측정한 결과 로타바이러스 3종에 대해서는 25,600의 역가가 나타났으며, 각 항원별로 최대 102,400의 역가가 나타났다.

다. 지표물질 함량 설정을 위한 기준 및 시험법에 관한 연구

1) HPLC를 이용한 난황항체의 함량시험

가) HPLC를 이용한 IgY 함량 분석 조건의 확립 결과

HPLC 분석 직선성(linearity)측정



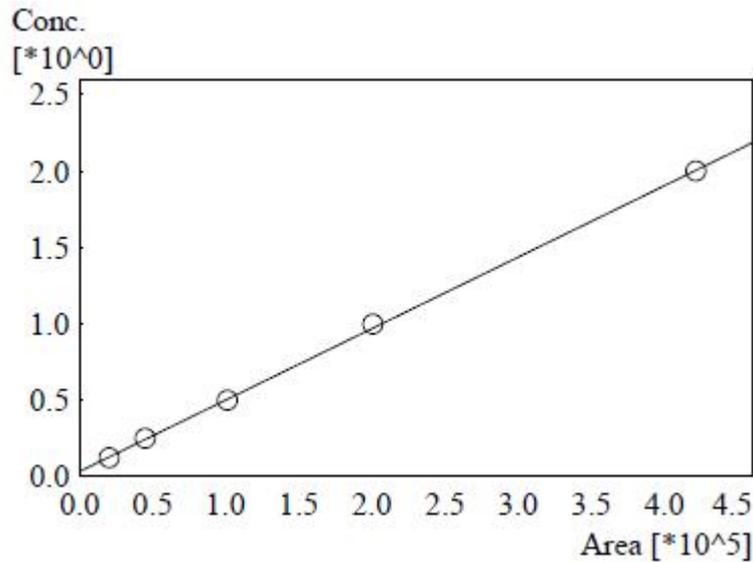


그림 21. IgY 표준용액 농도별 HPLC 분석 및 표준곡선 작성

- IgY 표준용액의 농도별 HPLC 분석 결과, 그림 7과 같이 14.9 min의 동일한 머무름 시간 (retention time, RT)에 분석되는 피크를 확인할 수 있었다. 각 표준용액에 대하여 작성된 표준 곡선으로부터 직선성의 상관계수(R2)를 구한 결과 1.000의 상관관계를 나타내어 직선성이 인정 되었으며, 표준용액의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)가 각각 0.010 mg/ml, 0.110 mg/ml로 나타났다(표 13).

표 13. IgY std. 표준곡선 등식, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

Sample	Equations	R2	LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)
IgY protein	$y=4.680e-006*x+0.03600$	0.999	0.010	0.110

#### HPLC 분석 시스템 적합성(suitability) 측정

- 한 개의 표준용액을 반복 측정함으로써 HPLC 분석 시스템의 적합성을 알아본 결과 머무름 시간(RT), 피크 면적(peak area) 및 피크 높이 50% 지점 넓이(50% width)의 상대표준편차 (RSD, %)가 모두 1.0% 이하로 나타났으며, 최저이론단수(plate number) 2000 이상으로 나타나 적합성 기준을 모두 만족하는 결과를 나타내었다(표 14).

표 14. HPLC 분석 시스템 적합성 측정

	RT	area	50% width	Plate number
1	14.884	68003	0.593	3330
2	14.900	68313	0.609	2942
3	14.917	68041	0.594	3286
4	14.907	67998	0.605	3021
5	14.910	67986	0.705	3245
6	14.904	68361	0.595	3151
7	14.918	67598	0.606	3214
8	14.905	68142	0.601	3146
9	14.896	67568	0.610	3272
mean	14.897	68152	0.601	3178
% RSDa)	0.07	0.39	0.985	
Criteria	RSD(%) Max 1.0%			Min 2000

a)RSD(상대표준편차, %) = (표준편차/평균) × 100

정밀성(precision) 측정

- 각 HPLC 분석결과와 일간 및 일내 변동을 알아본 결과 시험에 사용된 표준물질의 각 농도 측정에서 모두 기준치인 상대표준편차 1.0% 이하의 값을 나타내었다(표 15).

표 15. IgY 분석 정밀성 측정

IgY Conc. (mg/ml)	Precision RSD(%)a)			
	intra day			inter day
	1st	2nd	3rd	
0.0625	0.12	0.13	0.11	0.26
0.125	0.18	0.21	0.17	0.32
0.25	0.48	0.58	0.54	0.57
0.5	0.51	0.64	0.67	0.71
1.0	0.47	0.54	0.51	0.61
2.0				
Criteria	RSD(%) Max 1.0%			

a)RSD(상대표준편차, %) = (표준편차/평균) × 100

정확성

- HPLC 분석방법의 정확성을 측정한 결과 정밀성에서의 결과와 마찬가지로 모든 농도에서 기준치인 회수율 100±3%에 부합하는 결과가 측정되었다(표 16).

표 16. IgY 분석 정확성 측정

IgY Conc. (mg/ml)	Area	RSD(%)a	Real data IgY Conc. (mg/ml)	Recovery(%)b)
0.125	20617 ± 14.0	0.07	0.125 ± 0.001	100.0
0.25	45100 ± 15.1	0.13	0.251 ± 0.003	100.4

0.5	101379 ± 116.6	0.12	0.502 ± 0.006	100.4
1.0	201036 ± 671.3	0.33	1.001 ± 0.013	100.1
2.0	421555 ± 731.1	0.17	1.998 ± 0.015	99.9
RSD(%)				
Criteria	-	Max	-	100.2±0.2%
		1.0%		

a)RSD(상대표준편차, %) = (표준편차/평균) × 100

b)Recovery(회수율, %) = (측정농도/이론농도) × 100

- 이상의 결과로 볼 때 HPLC 시스템을 이용한 IgY 분석 조건은 확립되었음을 알 수 있었으며, 본 연구에서 확립된 분석조건에서의 분석 범위는 0.125 ~ 2 mg/ml로 설정하였다.

나) 난황 분말 시료 내 IgY 분석

난황 분무건조 분말시료 내 IgY 함량 분석조건 확립

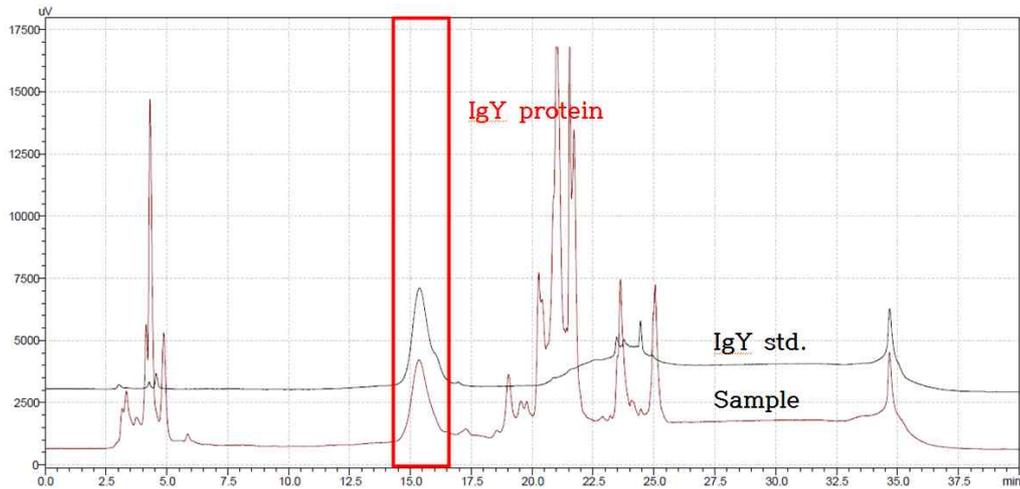


그림 22. 난황분말 내 IgY 분석조건 확립

- HPLC 시스템을 이용한 IgY 분석조건 시료 내 IgY 분석에 대한 적합성을 알아본 결과 그림 19과 같이 같은 머무름 시간(14.91 min)에 높은 분리능(resolution factor,  $R \geq 2.5$ )의 피크를 확인하여 IgY 분석 방법의 적합성을 나타냈으며, 정밀성을 측정한 결과 머무름 시간(RT) 및 피크면적의 상대표준편차(RSD, %)가 모두 1.0% 이하로 나타나 정밀성 기준을 만족하는 결과를 보여주었다(표 17).

표 17. 난황분말 내 IgY 함량 분석 방법 정밀성 측정

	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	mean	SD	% RSD <sup>a)</sup>	Criteria
RT	14.95	14.89	14.91	14.85	14.92	14.89	14.90	0.03	0.27	RSD(%) Max1.0%
Peak area	96813	97207	96749	96867	96947	97016	96868	229	0.24	

a)RSD(상대표준편차, %) = (표준편차/평균) × 100

- 시료 내 IgY 분석방법의 정확성은 측정된 IgY 함량의 일내 및 일간 변동을 상대표준편차 (RSD, %)로 계산한 결과 모두 1% 이내로 분석되어 정확성 기준에 적합한 결과를 보여주었다 (표 13). 이로서 시료 내 IgY 분석 방법은 정립되었으나 차후 HPLC 분석을 위한 난황분말 전 처리 방법의 표준화가 정립되어야 함을 알 수 있었다.

표 18. 난황 분말 내 IgY 함량 분석 방법 정확성 측정

	intra day			inter day
	1st	2nd	3rd	
Precision RSD(%) <sup>a)</sup>	0.116	0.466	0.437	0.340
Criteria	RSD(%) Max 1.0%			

a)RSD(상대표준편차, %) = (표준편차/평균) × 100

다) IgY 정량 시험 결과

HPLC 시스템을 이용한 IgY의 정량 시험법 개발을 완료 하였다. 분석시험 결과 표 19의 결과에 나타나듯이 3회 반복시험 결과 난황분말 1g당 15.321g의 IgY가 존재하는 것으로 나타났다.

표 19. 난황분말 내 IgY 함량 분석 시험 결과

	시험 분석 횟수			시험결과 (mg/g)
	1st	2nd	3rd	
IgY 함량	15.298	15.359	15.306	15.321

라) 생산 시제품에 대한 난황항체 함량 시험분석 결과

HPLC를 이용하여 산란계 및 농장에서 백신접종으로 생산된 IgY의 함량 분석을 위하여 다음과 같은 방법으로 시험을 진행하였다.

① HPLC 분석 조건

난황 분말 내 총 IgY 함량을 측정하기 위하여 표 20와 같은 HPLC system을 이용하였으며, 칼럼온도는 80℃, 검출기는 UV 280nm, 시료 주입량은 2μl, 이동상은 각각 0.1% TFA를 혼합한 아세트니트릴(AcN)과 물을 사용하여 gradient profile로 실시하였고, 유속은 0.8 ml/min을 사용하여 실험하였다.

표 20. HPLC 분석 gradient profile

Time (min)	Flow (ml/min)	Mobile phase	
		A	B
0	0.8	70	30
3	0.8	70	30
10	0.8	60	40
17	0.8	55	45
22	0.8	0	100
27	0.8	0	100
28	0.8	70	30
40	0.8	70	30

표 21. IgY 정성 및 정량분석을 위한 HPLC system

HPLC system	- Shimadzu HPLC
	- Pump : LC-20AD
	- Detector : SPD-20A UV/VIS
Analysis program	- Lab solutions v5.3, Shimadzu corporation
Column	: Waters XBridge BEH300 C4 3.5 $\mu$ m 4.6x250
Solvent	- A : 0.1% TFA in H <sub>2</sub> O
	- B : 0.1% TFA in AcN

## ② HPLC를 이용한 IgY 함량 분석 결과

난황 분말 내 총 IgY 함량을 측정하기 위하여 표 20와 같은 HPLC system을 이용하였으며, 칼럼온도는 80°C, 검출기는 UV 280nm, 시료 주입량은 2 $\mu$ l, 이동상은 각각 0.1% TFA를 혼합한 아세토니트릴(AcN)과 물을 사용하여 gradient profile로 실시하였고, 유속은 0.8 ml/min을 사용하여 실험하였다.

과제 1차년도 연구과정에서 정립된 HPLC 시스템을 이용한 IgY 정량실험법으로 난황분말 추출액을 사용하여 3회 반복시험 결과난황분말 1 g당 15.321 mg의 IgY가 존재하였으며, 이를 함량으로 변환하면 난황분말내에 1.53%의 IgY가 존재하는 것으로 판단되었다.

농장접종으로 생산된 난황분말의 IgY 함량을 알아내기 위하여 같은 방법으로 분석한 결과 retention time 15.052 min 부근에서 표준 IgY와 난황분말 추출액의 peak가 동시간대 임을 확인 하였으며, 난황분말 1g당 14.241 mg의 IgY가 존재하는 것을 확인하였다. 이는 난황분말내에 1.42%의 IgY가 존재하는 것으로 지난 실험실규모의 산관계 실험의 난황분말보다 IgY의 함량이 약 5% 감소한 하였으나, 함량의 기준 범위내에서 생산되었기에 문제는 없는 것으로 판단 된다.

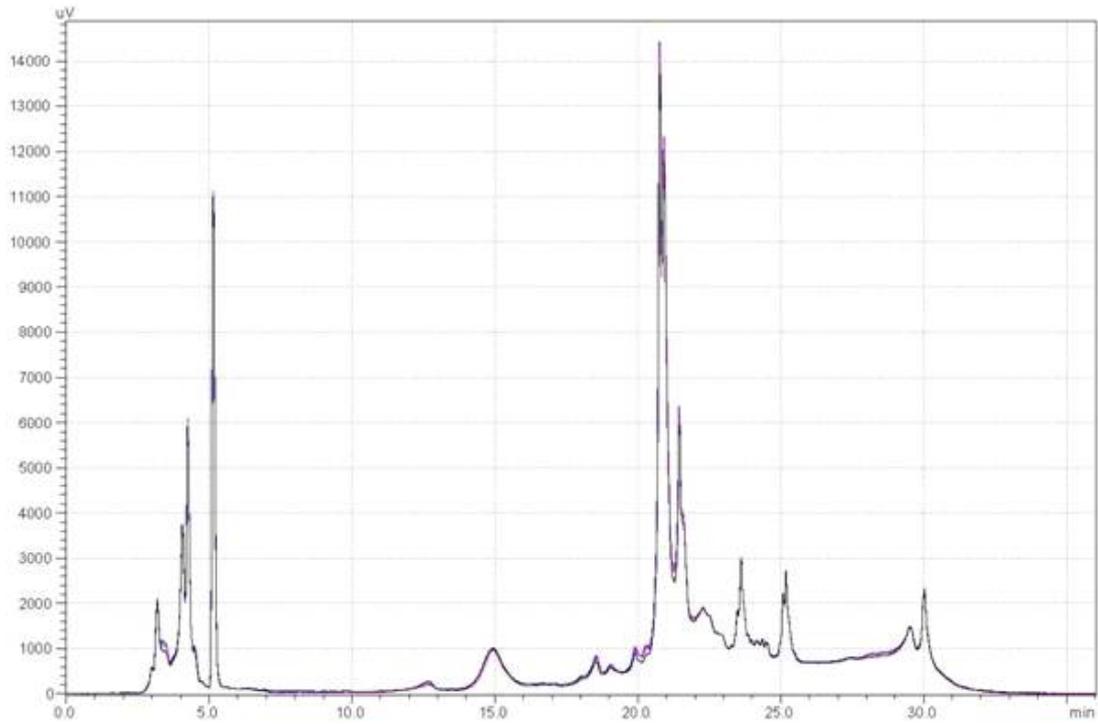


그림 23. 난황분말의 IgY 함량 분석 크로마토그래프

표 22. 산란계 집중 난황분말 내 IgY 함량 분석 시험 결과

	시험 분석 횟수			시험결과 (mg/g)
	1st	2nd	3rd	
IgY 함량	15.298	15.359	15.306	15.321

표 23. 농장 집중 난황분말 내 IgY 함량 분석 시험 결과

	시험 분석 횟수			시험결과 (mg/g)
	1st	2nd	3rd	
IgY 함량	14.196	14.375	14.152	14.241

라. 특이난황항체의 분리 방법에 관한 연구

1) Ammonium sulfate 처리에 따른 난황항체 분리

생산된 특이 난황 항체단백질을 순수하게 분리하기 위해 ammonium sulfate 처리법을 이용하여 분리정제를 진행하였다.

고역가의 계란을 수거하여 난황 분리기를 이용하여 난백과 알끈을 제거하고, Whatman No.1 filter paper로 난막을 제거한 뒤, 비커에 난황만을 분리하였다. 분리한 난황의 양을 측정하여 1차 증류수를 넣어 1시간 동안 교반한 뒤, 이 난황액을 -70℃ 초저온냉장고에서 하루 동안 보관하였다.

난황액을 실온에 꺼내 하루정도 녹인 뒤, 10분 동안 원심분리(9,000 rpm, 4°C)하여 상등액을 얻어 vaccum pump를 사용하여 Whatman No.1 filter paper에 여과하여 준비하였다. 여과된 상등액 ammonium sulfate를 ice 조건에서 조금씩 첨가시켜 충분히 녹여주었다. ammonium sulfate 처리된 용액을 4°C에서 over night 정치시킨 뒤, 30분 동안 원심분리(9,000 rpm, 4°C) 하여 pellet을 수거하여 1xPBS buffer에 resuspension시켜 sample을 수거하였다. 수거된 샘플은 SDS-PAGE를 통해 특이난황 항체의 분리 정제 순도를 확인하였다.

## 2) 난황항체의 분리확인

Ammonium sulfate를 이용한 항체 분리농도를 설정한 뒤 분리된 난황항체의 확인을 위하여 SDS-PAGE와 Western-blot을 이용하여 확인 하였다. SDS-PAGE는 12% SDS-PAGE gel에서 전기영동을 실시하여 Commassie blue solution을 이용하여 staining 후 destaining하여 결과를 확인하며, 전기영동한 gel을 Membrane transfer 과정을 거쳐 5% skim milk로 blocking 한 뒤 Anti-Chicken-IgY-HRP로 incubation한 후, ELC 처리 후 분리된 단백질의 난황항체 여부를 확인하였다.

설정된 Ammonium sulfate 35%를 처리하여 난황액에서 난황항체를 분리하여 분리 순도를 확인하였다. SDS-PAGE 시험을 진행하여 분리 순도를 확인한 결과 SDS-PAGE상에서 난황항체 약 75kda의 Heavy Chain과 약 21kda의 Light Chain 부분이 선명하게 나타나며, 1~2개의 단백질 밴드도 나타나는 것으로 미루어 보아 분리된 샘플의 순도는 약 90%로 추정된다. SDS-PAGE와 동일한 단백질 농도로 샘플을 Manbrane에 Transfer하여 Anti-chicken-IgY-HRP Ab를 사용하여 Incubation 후 화학발광으로 결과를 확인하였을 때 SDS-PAGE 상에서 확인된 Heavy Chain과 Light Chain 부분 선명히 발색되어 나타나는 것으로 분리된 단백질의 난황항체가 맞음을 확인할 수 있었다.

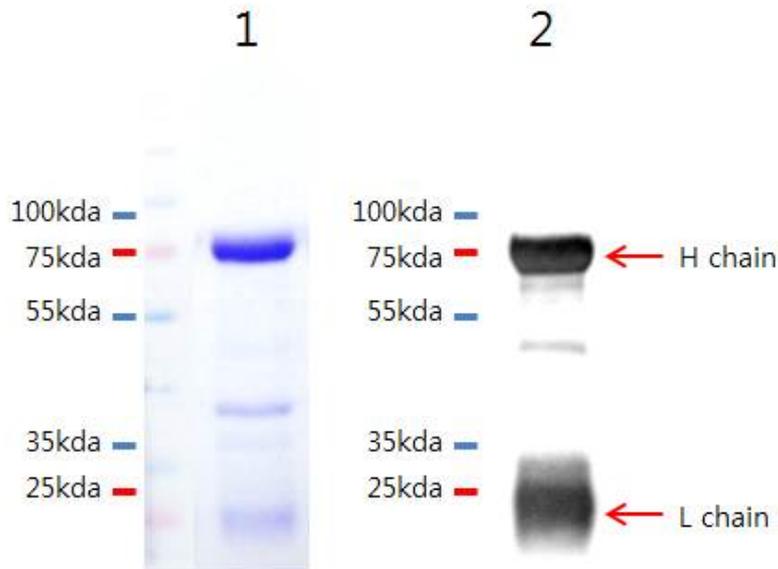


그림 24. 난황항체 확인시험 결과

## 1, 축우-IgY SDS-PAGE; 2, 축우-IgY Western blot

마. 항원에 대한 확인 및 효능평가 시험결과

### 1) In vitro 효능평가 시험

- 로타바이러스에서 난황항체 의 중화항체가 실험방법 설정을 위하여 난황항체가 Rota virus 에서 항바이러스 효과가 있는지 MA104세포에서 세포병변효과 (Cytopathiceffect, CPE)를 통해 확인한다.

가) 세포 설정

- 축우 : MA104 ATCC(CRL-2378.1)

나) IgY 샘플 이력

- 일반 IgY 농도 : 일반난황 IgY 44.88mg/ml

- 축우 IgY 농도 : (기존 축우항원구성) - 축우난황 IgY 33.15 mg/ml

다) 난황항체의 농도 설정

- 일반 IgY - U type plate에 30 mg/ml으로 시작하여 12번 well 까지 2진 희석 후 세포에 넣어준다. (30 mg/ml ~ 0.015 mg/ml)

- 축우 IgY - U type plate에 30 mg/ml으로 시작하여 12번 well 까지 2진 희석 후 세포에 넣어준다. (30 mg/ml ~ 0.015 mg/ml)

라) 시험 방법

① 96 well plate에 MA104 cells을 2x10<sup>4</sup>cells로 준비하여 24시간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 에서 하루 배양한다.

② 난황항체를 U type plate에 30 mg/ml으로 시작하여 12번 well 까지 2진 희석 하여 (30 mg/ml ~ 0.015 mg/ml) 각 농도별로 준비한다. 최종 vol.은 100 $\mu$ l가 되도록 한다.

③ 로타바이러스를 100  $\mu$ l안에 0.2M.O.I가 되도록 준비한 후 농도별로 준비된 난황항체 well에 100 $\mu$ l 씩 넣는다. (난황항체와 바이러스의 비율을 1:1로 한다.) cell control에는 (-) media 200  $\mu$ l 넣어주며 virus control에는 (-)media 100 $\mu$ l와 0.2M.O.I virus 100  $\mu$ l를 넣어준다.

④ 농도별로 준비된 난황항체와 Rota virus 의 중화 반응을 위해 1시간 동안 incubation 한다. (37°C, 5% Co<sub>2</sub>)

⑤ cell이 seeding된 96 well plate을 1X PBS로 3회 washing한다.

⑥ Washing된 96well plate에 ④을 100 $\mu$ l 씩 넣어 1시간 동안 감염시간을 갖는다. (37°C, 5% Co<sub>2</sub>)

⑦ 흡착반응시간이 끝나면 집종액을 제거한다

⑧ PBS(1X)로 2회 2ml씩 washing 후 (-)media를 넣어 준 후 48h배양 한다. (37°C, 5% Co<sub>2</sub>)

⑨ 배양시간이 끝나면 10% formalin solution으로 well당 2ml씩 넣어 하루 동안 세포를 고정 한다.

⑩ 고정 후 10% formalin solution제거 한 후 1% crystal violet용액을 well당 1ml씩 넣어 세포를 1시간 동안 염색한다.

① 염색액을 흐르는 물에 씻어 제거 후 상온에 건조시킨 후 육안으로 관찰한다.

라) 시험 결과

시험결과는 1% crystal violet 용액으로 염색한 뒤 well에 CPE가 일어난 여부를 관찰하여 결과를 나타내었다.

표 24. IgY 희석 결과

m g / ml	0.015	0.029	0.059	0.117	0.234	0.469	0.938	1.88	3.75	7.5	15	30
CPE	O	O	O	O	O	O	O	x	x	x	x	x

생산된 IgY를 30mg/ml부터 2진 희석하여 처리한 결과 1.88mg/ml까지는 CPE가 일어나지 않는 것으로 나타났다. 항원균인 로타바이러스를 중화시키는 농도는 1.88mg/ml 이상인 것으로 보인다.

2) 항원 박테리아에 대한 성장억제 효능평가 시험

- 대장균 및 살모넬라 난황항체 의 증식억제능력을 비교 시험으로 생산된 난황항체의 항원균인 E.coli 표준주(K99), Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium에 결합하여 성장을 억제하는 효능을 확인하기 위한 방법으로 다음과 같이 시행하였다.

가) 균주 설정

- 축우 : E.coli 표준주(K99), Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium

나) IgY 샘플 이력

- 일반 IgY 농도 : 일반난황 IgY 44.88mg/ml

- 축우 IgY 농도 : (기존 축우항원구성) - 축우난황 IgY 33.15 mg/ml

다) 균주 농도 설정

- E.coli K99의 3중 : 1 X 10<sup>7</sup> CFU/ml

라) 난황항체의 농도 설정

- 일반 IgY - 30 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml (4가지 조건)

- 축우 IgY - 30 mg/ml, 1 mg/ml , 0.1 mg/ml (3가지 조건)

마) 시험 방법

① 균주를 Shaking incubation 하여 37°C에서 LB broth 배양 후 O.D=0.7~0.8 (600nm) 1 x 10<sup>7</sup> CFU/ml 준비 한다..

② 난황항체를 80 mg/ml, 30 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml의 농도로 각각 제조한 후에 각각의 well에 50  $\mu$ l 씩 넣는다.

③ 상위의 ①항목에서 1 x 10<sup>7</sup> CFU/ml로 준비한 각각의 균을 해당 ②항목에서 준비한 well에 150  $\mu$ l 씩 넣어준다. 혼합된 난황항체와 균주의 최종농도는 10 mg/ml, 7 mg/ml, 5 mg/ml, 3 mg/ml, 1 mg/ml의 난황항체 1 x 10<sup>7</sup> CFU/ml의 균이 혼합된 것과 같다.

- ④ 1~10번 라인은 균주를 혼합하지 않은 특이 난황항체 주입하며, 11,12번 라인은 균주를 혼합하지 않은 비특이 난황항체를 농도 별로 넣어준다.
- ⑤ 37°C 에서 정치 배양 하며, 0h, 3h, 6h, 24h ~ 48h의 배양액을 에 따른 ELISA Reader OD 600nm를 측정 한다.
- ⑥ 결과 값을 그래프로 정리 한다

3) 대장균 및 살모넬라 난황항체의 효능 시험 결과

특이 난황항체 와 비특이 난황항체를 80mg/ml, 30mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml 로 준비 하고, 107CFU/ml의 균을 첨가하여 37°C에서 정치 배양 하여 0h, 3h, 6h, 24h~48h (3시간 간격 마다 ELISA OD(600nm)측정하며, 각 Well마다 샘플이 200 ul 넣고, 37°C에서 정치 배양 하였다.

가) 특이 난황항체, 비특이 난황항체 및 균의 농도별 성장곡선

[성장 저해 능력 검사방법(OD측정) - 난황항체의 농도에 따른 균 성장억제]

- ① 축 우 : E.coli 표준주(K99) , Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium (3종)  
IgY 비교 : 일반 IgY, 축우IgY 10 mg/ml ~ 1 mg/ml, Bacteria : 107CFU/ml

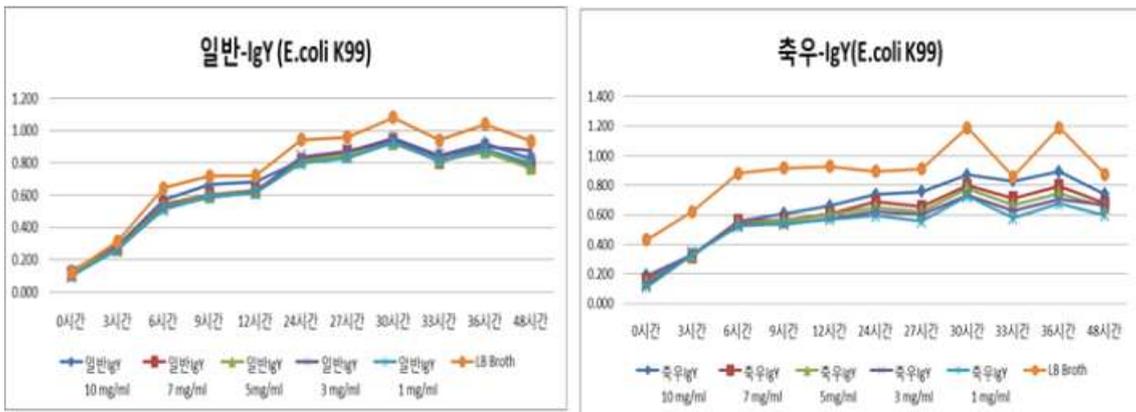


그림 9. 난황항체의 농도에 따른 균 성장억제 결과

\* E.coli K99 비특이 일반 IgY 따른 효과는 나타나지 않았으며, LB broth 대비 약간의 성장억제 효과가 나타났다. E.coli K99 특이에 대한 특이 축우 IgY 에 효과가 LB broth 대비 특이 축우 IgY 1mg/ml ~ 10mg/ml 모두 눈에 띄게 성장억제효과를 확인 하였다.

- ② 축 우 : Salmonella Enteritidis

IgY 비교 : 일반 IgY, 축우IgY 10 mg/ml ~ 1 mg/ml, Bacteria : 107CFU/ml

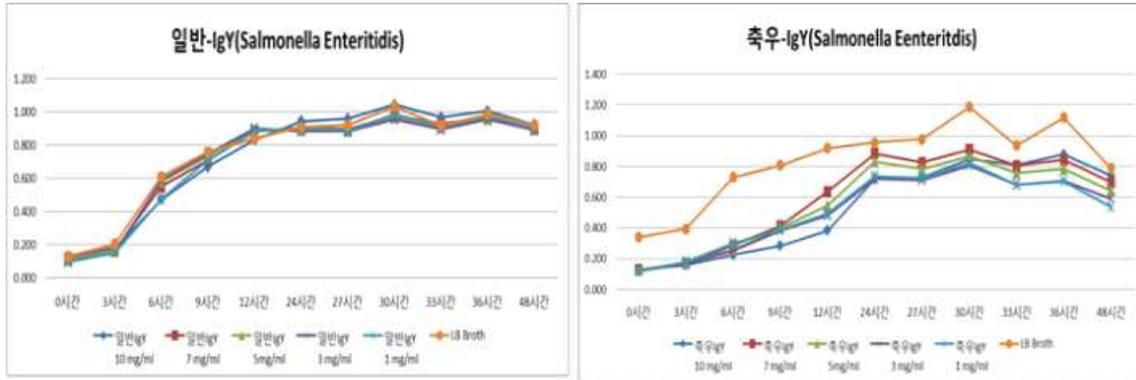


그림 25. 난황항체의 농도에 따른 균 성장억제 결과

③ 축 우 : Salmonella Typhimurium

IgY 비교 : 일반 IgY, 축우IgY 10 mg/ml ~ 1 mg/ml, Bacteria : 1 x 10<sup>7</sup>CFU/ml

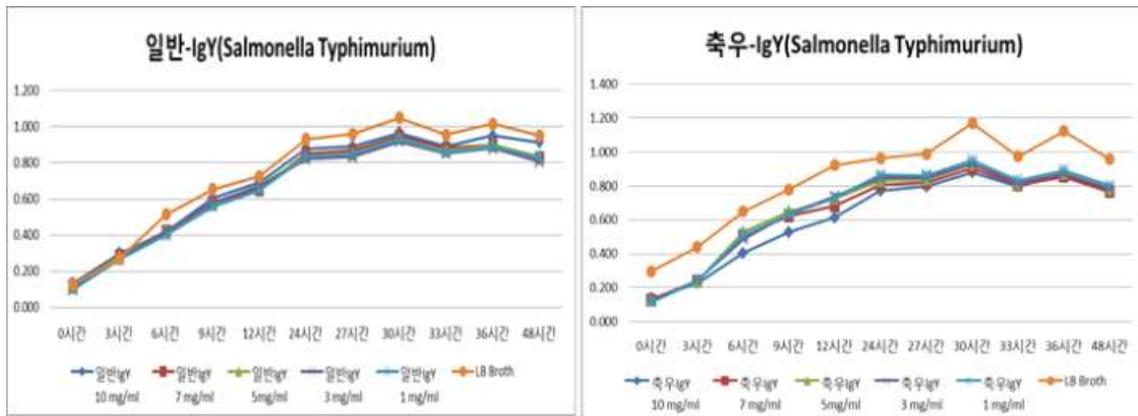


그림 26. 난황항체의 농도에 따른 균 성장억제 결과

\* Salmonella Typhimurium 비특이 일반 IgY 따른 효과는 나타나지 않았으며, LB broth 대비 약간의 성장억제 효과가 나타났다. Salmonella Typhimurium 특이에 대한 특이 축우 IgY 에 효과가 LB broth 대비 축우 IgY 1mg/ml ~ 10mg/ml 모두 눈에 띄게 성장억제효과를 확인 하였다.

기존 축우 IgY에 대한 S. newport, S. dublin의 교차반응을 확인하기 위해 성장억제 효과를 확인하였다. 기존 축우 IgY에는 S. newport, S. dublin 항원이 포함되어 있지 않지만 성장억제 효과를 확인할 수 있었다. 추후 Salmonella typhimurium 임상균주에 대한 성장억제 시험을 진행할 예정이며 S. newport, S. dublin, Salmonella typhimurium 임상균주를 포함하여 IgY를 생산할 예정이다.

④ 축 우 : Salmonella newport

IgY 비교 : 일반 IgY, 축우 IgY 10mg/ml, 1.25mg/ml, Bacteria : 10<sup>7</sup>CFU/ml

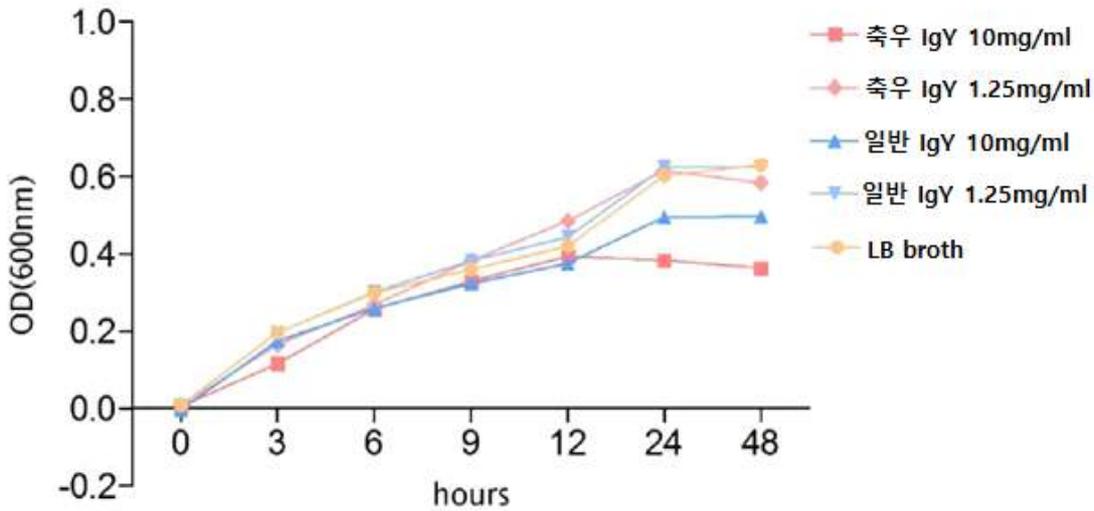


그림 27. 난황항체의 농도에 따른 균 성장억제 결과

\* Salmonella newport의 성장억제 결과 축우 IgY 1.25mg/ml 에서는 LB대비 약간의 성장억제 효과가 나타났고 축우 IgY 10mg/ml에서 눈에 띄게 성장억제 효과를 확인하였다.

⑤ 축우 : Salmonella dublin

IgY 비교 : 축우 IgY 10mg/ml, 1.25mg/ml, Bacteria : 107CFU/ml

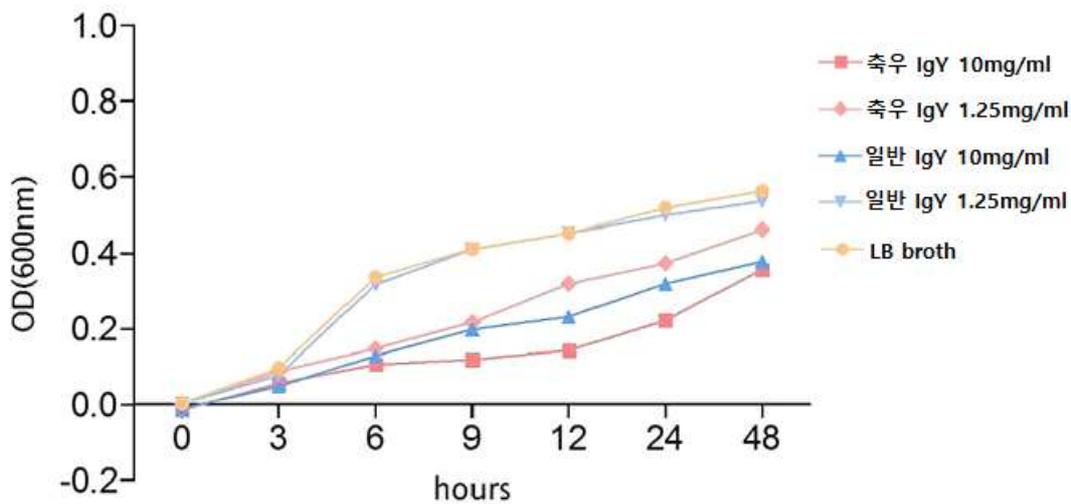


그림 28. 난황항체의 농도에 따른 균 성장억제 결과

\* Salmonella dublin의 성장억제 결과 축우 IgY 1.25mg/ml 에서는 LB대비 약간의 성장억제 효과가 나타났고 축우 IgY 10mg/ml에서 일반 IgY 대비 성장억제 효과를 확인하였다.

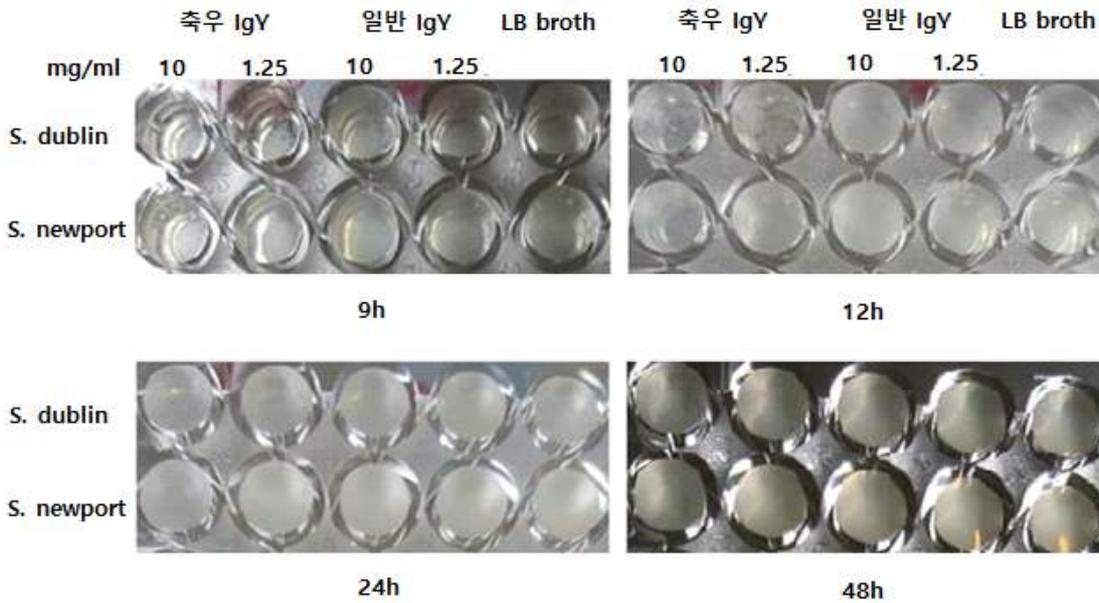


그림 29. 시간별 배양 배지 확인결과

#### 사. 항원에 대한 Binding affinity 확인 시험

생산된 난황항체가 항원에 대한 binding affinity를 확인하기 위한 시험을 진행 하였다. 생산된 항원을 PBS(1X)에 일정량 부유시키고, 5X sample dye를 첨가한 뒤 Polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동을 실시하였다. SDS-PAGE는 12% SDS-PAGE gel에서 전기영동을 실시하였으며 Commassie blue solution을 이용하여 staining 후 destaining하여 결과를 확인하였다. Western blot의 경우 Membrane에 transfer를 진행하고 5 % skim milk를 이용하여 blocking 하였다. PBS-T로 washing하고 IgY 항체를 2 ug/ml 농도로 처리한 뒤 4℃에서 Overnight 처리하고 PBS-T로 washing 한다. Anti-Chicken-IgG-HRP(Sigma #A9046)로 1:20,000 희석하여 처리 한 뒤 HRP substrate를 이용하여 결과를 확인 하였다. E.coli 표준주 (K99)의 경우 50kDa과 75kDa사이에서 항체 특이적 밴드가 관찰되었으며 Salmonella typhimurium의 경우는 25kDa부터 75kDa에 해당하는 전반적인 부분에서 특이적 밴드가 관찰 되었다. 두 결과를 종합하면 산란계에서 생산된 난황항체가 대장균(E.colu K99)과 살모넬라 (Salmonella typhimurium)에 특이적으로 결합할 수 있음을 확인하였다.

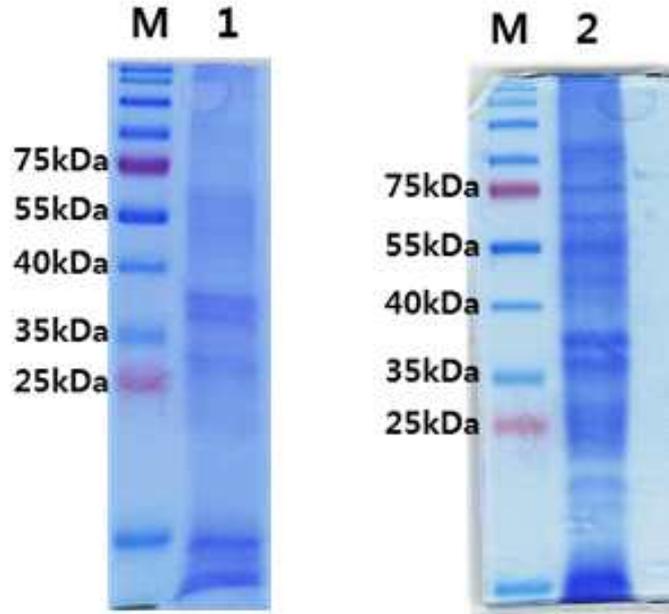


그림 30. Salmonella typhimurium 및 E.coli 표준주(K99) SDS-PAGE 결과  
 Line M: Protein marker; Line 1: E.coli 표준주(K99) Protein; Line 2: Salmonella typhimurium protein

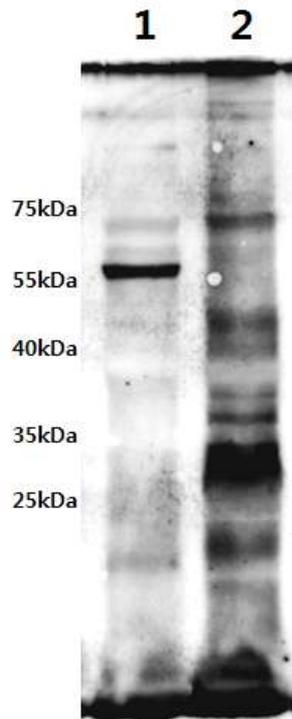


그림 31. Salmonella typhimurium 및 E.coli 표준주(K99) Western blot 결과  
 Line M: Protein marker; Line 1: E.coli 표준주(K99) Protein; Line 2: Salmonella typhimurium protein

아. 독성, 안전성 평가

시제품에 대한 독성/안전성 평가를 위해 연구실 수준의 설치류(마우스) 2주 반복투여독성 시험을 수행하였다. 주관기관에서 제작한 시제품 2종인 액상 제형의 아이지가드 페이스트, 고상 제형인 아이지가드 파우더를 4주령 ICR male 마우스에 1000 mg/kg, 2000 mg/kg 2개의 농도 별로 2주간 매일 경구 투여하여 독성/안전성 평가를 시험하였다

시제품 2종을 경구 투여한 후 14일 동안 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였고, 관찰기간 종료 후 부검 시 장기의 육안적 검사를 실시하여 독성지표를 관찰하였다. 마우스에 2주 반복투여 시 2000 mg/kg 농도까지 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 및 부검소견에서 이상 소견은 관찰되지 않았다.

실험 결과, 대조군 및 실험군은 마우스 체중무게, 장기무게, 물 및 사료 섭취량에는 유의적 차이가 발견되지 않음으로 시제품에는 독성이 나타나지 않음을 검증하였다.

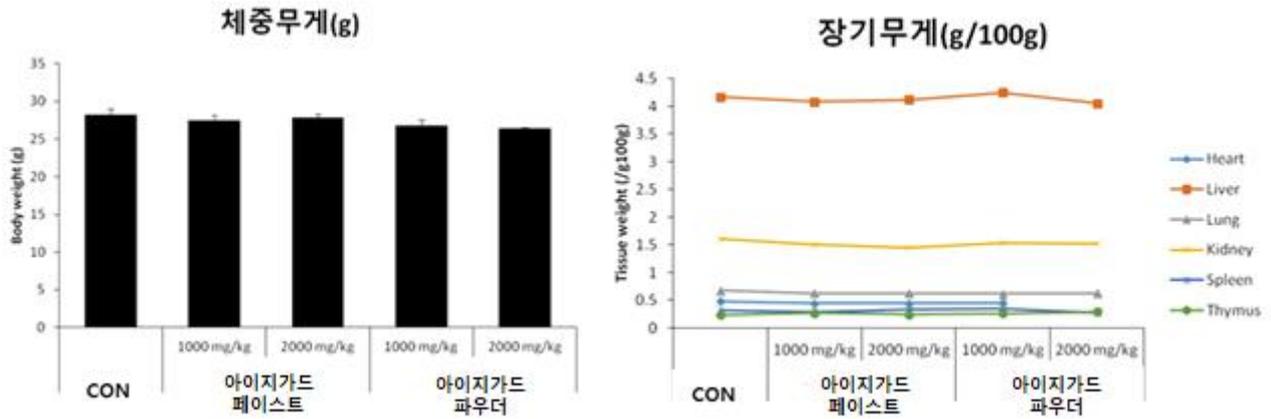


그림 32. 아이지가드 페이스트와 아이지가드 파우더를 투여한 마우스 체중 및 장기무게

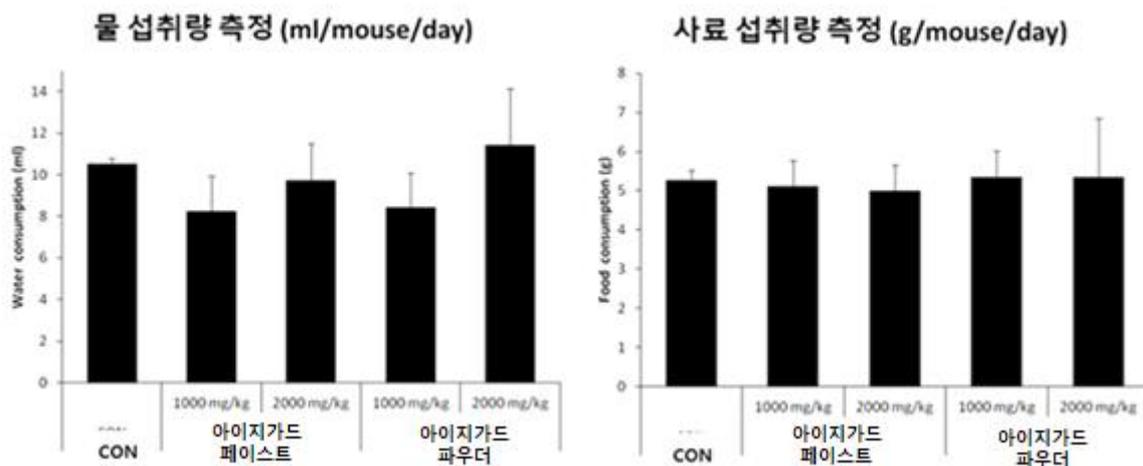


그림 33. 아이지가드 페이스트와 아이지가드 파우더를 투여한 마우스 체중 및 장기무게

## 자. 복합 추출 배합물의 활성 검증

### 1) 복합 추출 배합물에 대하여 항균 및 IL-6/STAT3 활성 평가

#### 복합 추출 배합물에 대한 항균 활성 검증

복합 추출 배합물인 액상 제형의 아이지가드 페이스트(A, B), 고상 제형인 아이지가드 파우더(A, B)에 대하여 일차적으로 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 활성을 측정하였다.

실험결과, 4종의 복합 추출 배합물 중 아이지가드 파우더 A에서만 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 활성을 나타냈으며, 나머지 3종은 항균활성 나타내지 않았다.

추가적으로 다른 병원성 미생물에 대한 항균 활성을 검증할 예정이며, 복합 추출 배합물에 마치현의 함량을 조절하여 활성을 재검증할 예정이다.

#### 복합 추출 배합물에 대한 IL-6/STAT3 저해 활성 검증

복합 추출 배합물인 아이지가드 페이스트(A, B), 아이지가드 파우더(A, B)에 대하여 IL-6/STAT3 저해 활성 검증을 측정하였다.

실험결과, 4종의 복합 추출 배합물은 농도 의존적으로 IL-6에 의해 유도되는 STAT3 luciferase 활성을 저해하였다. 특히, 액상 제형인 아이지가드 페이스트A, B가 아이지가드 파우더 A, B와 비교하여 보다 우수한 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 추후 복합 추출 배합물에 마치현의 함량을 조절하여 활성을 재검증할 예정이다.

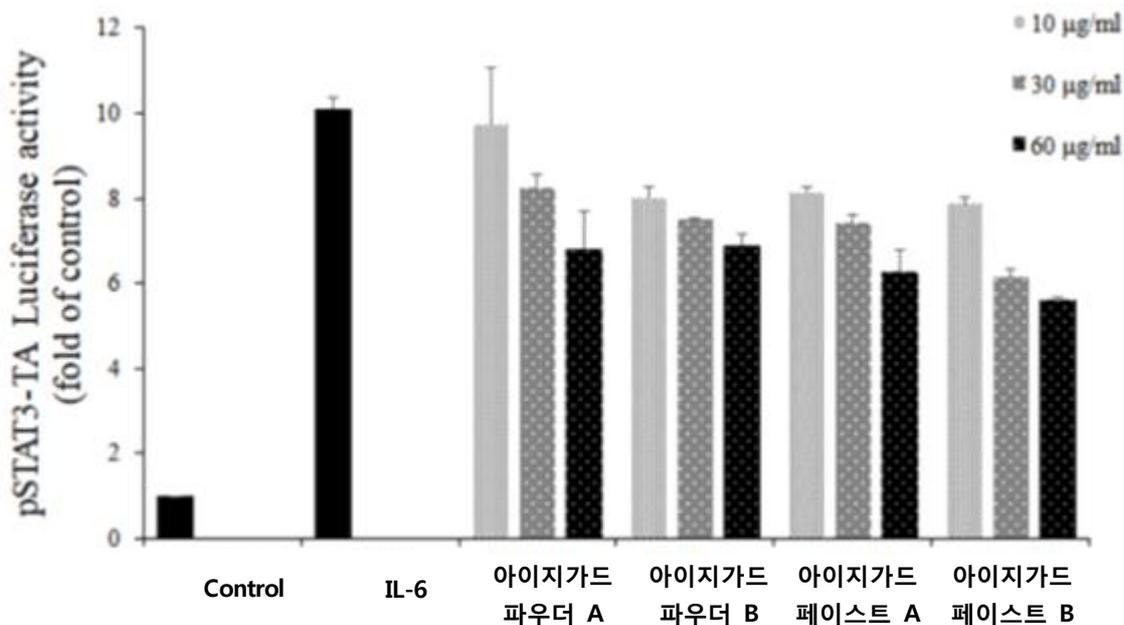


그림 34. 아이지가드 페이스트(A, B), 아이지가드 파우더(A, B)의 IL-6/STAT3 저해 활성

2) 선정된 복합 추출 배합물 성분분석/기시법 확립

가) HPLC, GC 분석을 통한 분석법 표준화 및 추출 공정 최적화

① 선정된 소재인 마치현 에탄올 추출물에 대한 분석법 확립

마치현 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램에서 분리된 화합물인 N-trans-feruloyltyramine (1)와 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine (2)가 주요 peak로 나타났으며, 이들 2개의 화합물을 표준화합물로 선택하였다. 원료의 품질 관리를 위해선 재현성 있고 정확한 지표성분의 분석이 이루어져야 하며, 그에 따라 본 연구에서도 활성을 가지는 feruloyl amide 를 대상으로 validation method를 개발하였다.

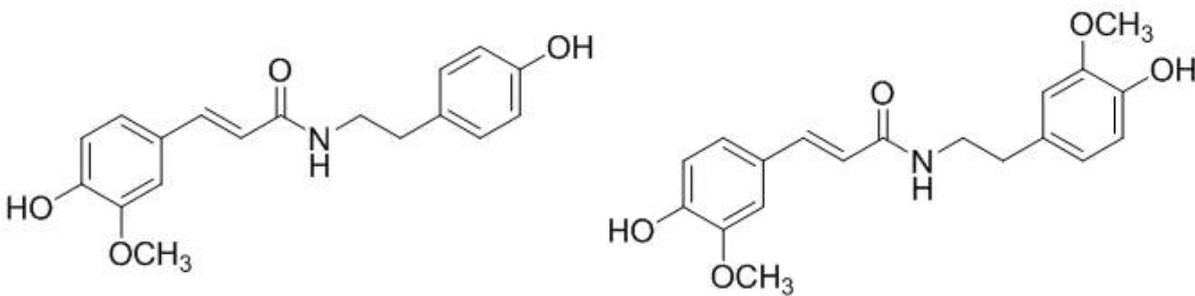


그림 35. 화합물 1과 2의 구조

<u>HPLC condition</u>		<u>Solvent gradient</u>	
System	Agilent HPLC system (1200 series)	Time (min)	% of Solvent (B)
Flow rate	1 ml	0	17
Sample inj.	10 µl	15	17
Column	Phenomenex Luna 5u C18 100A (250 × 4.6 mm)	40	32.5
Oven Tem.	35 °C	40.1	100
Wave length	320 nm	60	100
Mobile phase	0.5% Acetic acid in H <sub>2</sub> O (A) Acetonitrile (B)	60.1	17
		70	17

그림 18. HPLC 분석조건 및 용매조건

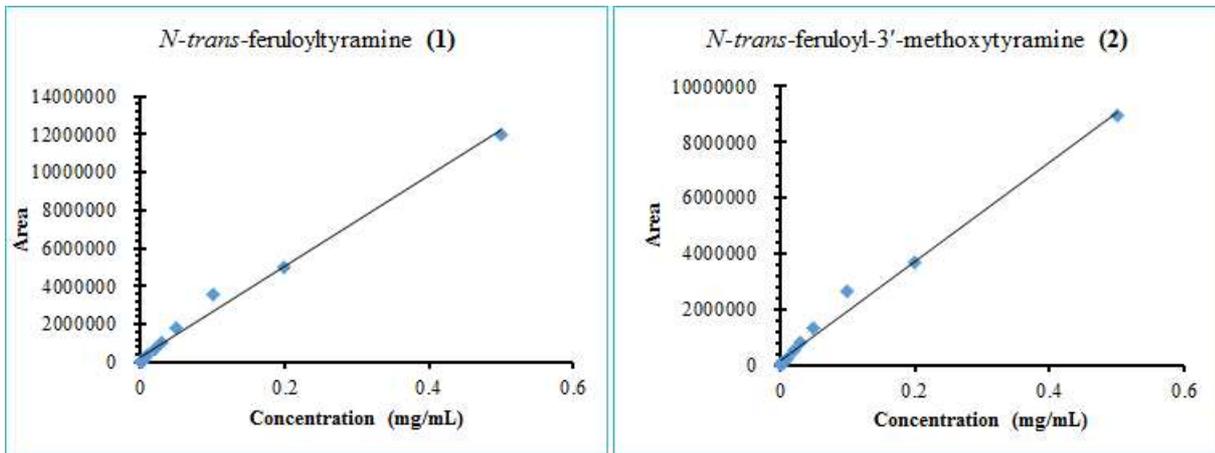


그림 36. 화합물 1과 2의 정량곡선

ICH 가이드 라인에 따라 두 화합물에 대한 직선성, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ)를 구하였다. 두 화합물은 0.0005, 0.001, 0.002, 0.003, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.5 mg/mL의 농도로 조정 한 후, 각각의 농도에 따라 3 회 반복하여 분석 하였다. 각 표준용액에 대하여 작성된 표준곡선으로부터 직선성의 상관계수(R<sup>2</sup>)를 구한 결과 0.99의 상관관계를 나타내어 직선성이 인정되었으며, 표준용액의 검출한계(LOD)는 각각 0.00015 mg/ml, 0.00021 mg/ml로 나타났으며, 정량한계(LOQ)가 각각 0.0005 mg/ml, 0.0007 mg/ml로 나타났다(표 25).

표 25. 화합물 표준곡선 등식, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

Compounds	$t_R$ (min)	Equation (Linear Model) <sup>a</sup>	Linear Range (mg/mL)	$r^2$ <sup>b</sup>	LOD <sup>c</sup> (mg/mL)	LOQ <sup>d</sup> (mg/mL)
1	33.4	$y = 23,986,671x + 234,432$	0.0005 - 0.5	0.9908	0.00015	0.0005
2	35.1	$y = 17,829,312x + 170,165$	0.0005 - 0.5	0.9910	0.00021	0.0007

a y: peak area at 314 nm; x: standard concentration (mg/mL). b r<sup>2</sup>: coefficient of determination with 12 indicated points in the calibration curves. c LOD: limit of detection, S/N = 3 (n = 7). d LOQ: limit of quantification, S/N = 10 (n = 7).

표 26. 정확성 및 정밀도

Compounds	Spiked Amount (mg/mL)	Content (mg/mL)		Recovery Test (%, n = 3)	Precision Test (n = 3)	
		Expected	Measured		Intra-Day RSD <sup>a</sup> (%)	Inter-Day RSD (%)
1	0.005	0.056233	0.057629	102.5	1.42	1.87
	0.01	0.061233	0.062367	101.9	0.59	1.35
	0.02	0.071233	0.073218	102.8	1.46	0.76

	0.001	0.012524	0.012094	96.6	1.57	1.47
2	0.002	0.013524	0.013693	101.2	1.95	1.13
	0.004	0.015524	0.016063	103.5	1.62	1.75

### 3) 주관기관에서 선정 한 복합 추출 배합물에 대하여 지표성분의 성분 및 함량 분석

마치현 복합 배합물(아이지가드 페이스트, 액상 제형) 1 g에 100% 에탄올 용매 20 ml를 첨가한 후 이를 2시간 동안 sonication 추출하였으며, 에탄올 추출물은 종이필터로 여과한 후 여과액을 감압 농축하였다. 농축된 마치현 추출물은 다시 메탄올 5 ml 에 용해하였으며, 용해된 용매를 C18 sep-pak cartridge를 이용하여 비극성 성분을 제거한 후, HPLC 분석하였다.

분석 조건으로는 320 nm 파장에서 ACN 과 물을 사용하여 분석하였으며, 그 결과 다음과 같이 마치현 에탄올 추출물 및 마치현 복합 배합물(아이지가드 페이스트, 액상제형)에서 N-trans-feruloyltyramine(1)는 33.4분에서 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine(2)은 35.1분에서 화합물을 검출할 수 있다. 또한, 15.1 분에서 ferulic acid의 peak를 확인할 수 있었다.

ferulic acid, N-trans-feruloyltyramine(1) 및 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine(2)에 대한 정량 분석 결과, 마치현 에탄올 추출물 1 g에는 각각 9.6, 14.7, 8.0 µg이 함유되어 있는 것을 확인할 수 있다. 또한, 아이지가드 페이스트 A 1 g 에는 ferulic acid, N-trans-feruloyltyramine(1) 및 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine(2)가 각각 6.4, 3.1, 2.6 µg이 함유되었으며, 아이지가드 페이스트 B 1 g 에는 각각 6.3, 3.1, 2.5 µg이 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

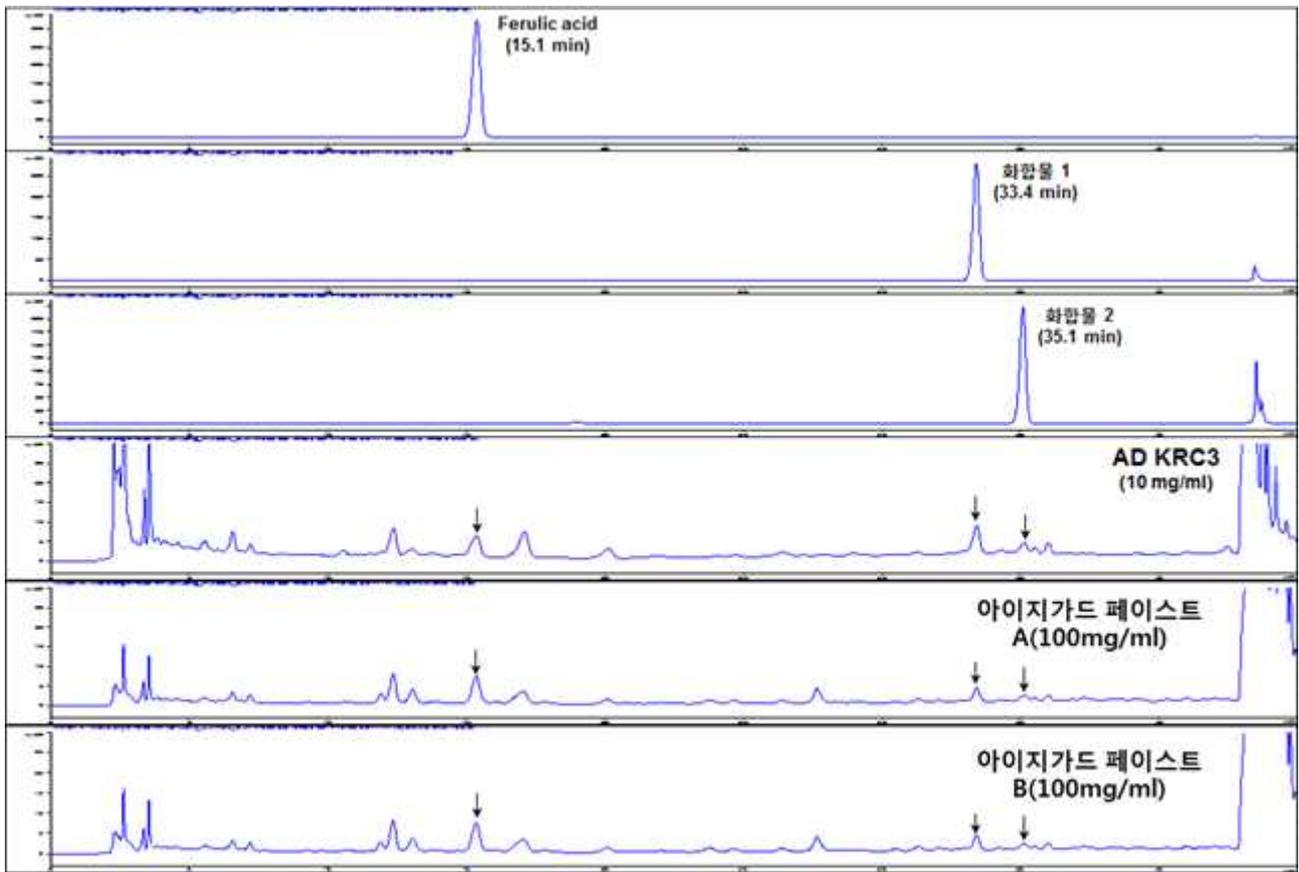


그림 37. 마치현 에탄올 추출물 및 마치현 복합 배합물(아이지가드 페이스트)에 대한 HPLC 크로마토그램

표 27. 마치현 에탄올 추출물, 아이지가드 페이스트 A와 B에 들어있는 화합물의 함량(mg/g)

	AD KRC3	아이지가드 페이스트 A	아이지가드 페이스트 B
ferulic acid	0.0096	0.0064	0.0063
화합물 1	0.0147	0.0031	0.0031
화합물 2	0.0080	0.0026	0.0025

#### 차. 시제품의 in vitro/in vivo 항염 평가

##### 1) 선정된 복합 추출분획 및 시제품에 대하여 항염 평가

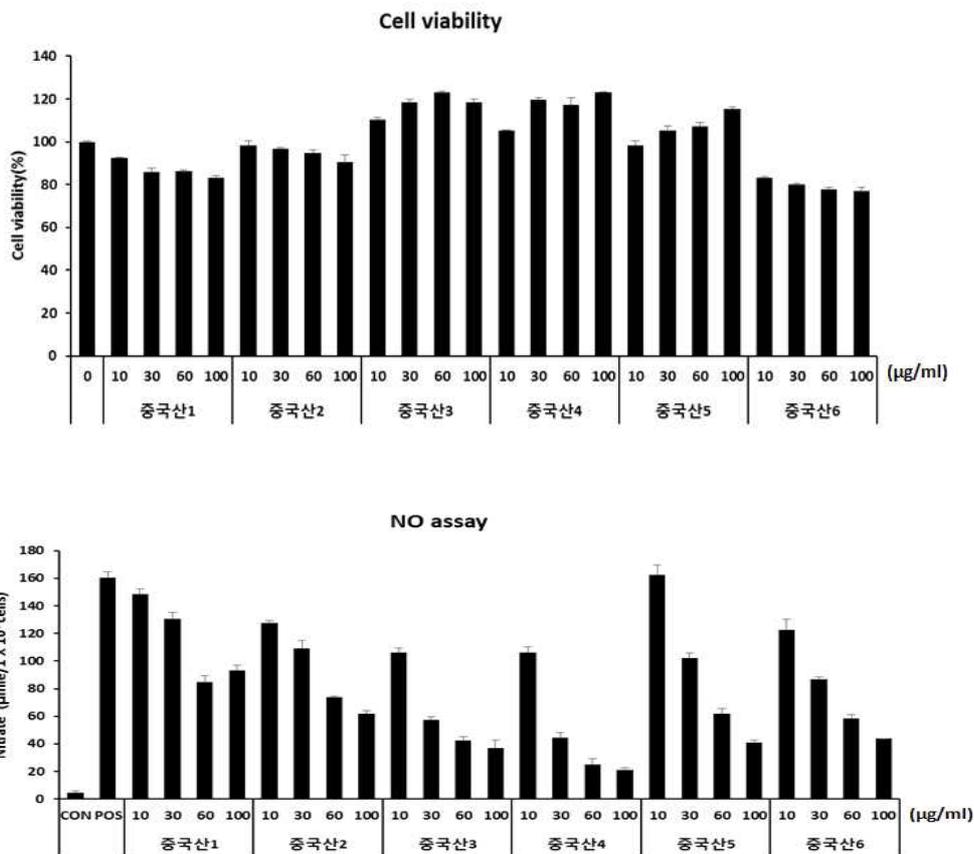
##### 가) 염증 매개체인 nitric oxide (NO)를 저해하는 in vitro 활성 평가

염증성 장 질환 시 활성화된 대식세포가 배출하는 염증매개체인 NO를 저해하는 in vitro 활성 평가방법을 수행하였다. 마우스 대식세포인 J774A.1 세포에 세균 세포막 성분인 lipopolysaccharide (LPS)를 자극하면 NO를 생성하게 되는데 이를 저해하는 활성을 평가하였다.

나) 염증성 사이토카인인 IL-6 신호전달 저해 in vitro 활성 평가

염증성 사이토카인인 IL-6의 신호 전달 저해 활성을 측정하기 위해 HEK-Blue™ IL-6 cells을 이용하여 in vitro 활성을 평가하였다. HEK-Blue™ IL-6 cells은 IL-6에 의해 유도되는 JAK-STAT3의 활성을 모니터링 할 수 있는 세포로 SEAP (알칼라인 포스파타아제) 유전자 앞에 4개의 STAT3 binding sites와 interferonβ minimal promoter를 가지고 있어서 STAT3-dependent SEAP 활성을 측정할 수 있고, SEAP 활성 측정은 효소-기질 반응으로 colorimetry 방법으로 측정하였다.

최적 복합 배합물 선정을 위해 1차년도 원료 선정 시 선정된 중국산 마치현을 종류별로 6종 구입하여 in vitro 활성을 확인 해 본 결과, 세포독성이 나타나지 않는 10~100 µg/ml의 농도에서 농도 의존적으로 NO활성을 저해하는 것을 확인하였고, IL-6 저해 활성도 확인하여 가장 효능이 우수한 중국산 2종을 선별하여 추후 실험을 진행하였다.



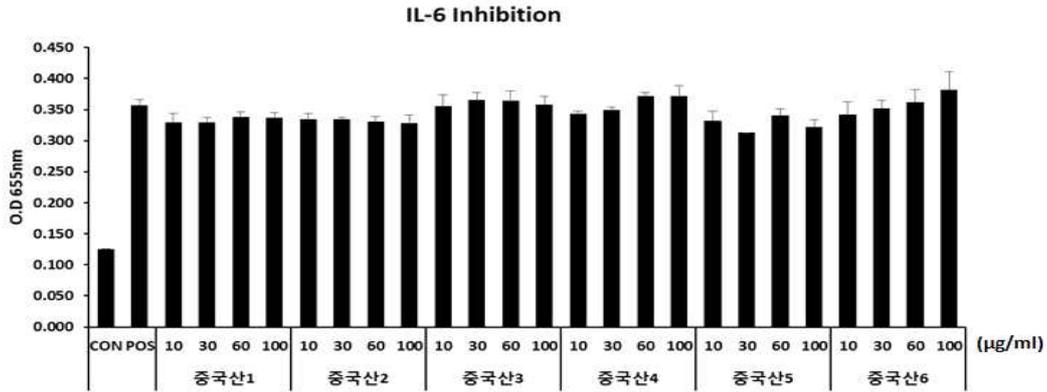


그림 38. 종류별 중국산 마치현 추출물의 세포 독성, NO 저해 활성 및 IL-6 저해 활성 평가

선정된 중국산 마치현 2종을 추출 용매 비율별로 비교하기 위해 에탄올 100%, 70%를 이용하여 추출한 후 *in vitro* 활성 평가를 위해 NO 저해 활성을 확인한 결과 농도 의존적으로 NO 저해 활성을 나타내었고, 에탄올 100% 추출물에서 가장 우수한 효능을 확인하였다.

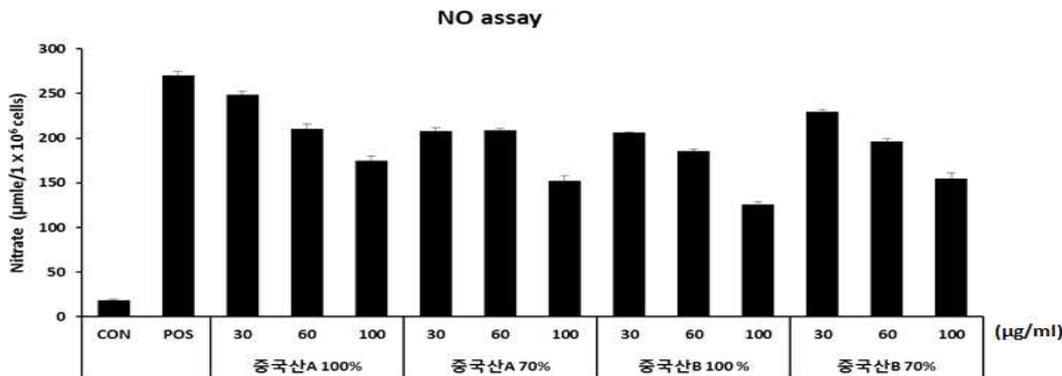


그림 39. 추출 용매 비율별 중국산 마치현 추출물의 NO 저해 활성 평가

다) DSS 유도성 염증성 대장염 모델을 이용한 *in vivo* 활성 평가

*in vivo*에서 마치현 추출물의 효능을 확인하기 위해서 가장 널리 사용되고 있는 Dextran sodium sulfate (DSS) 유도성 염증성 대장염 모델을 확립하였다. DSS는 직접적으로 basal crypts의 장 상피세포에 독성을 가지며, 점막 배리어에 손상을 주어 염증성 장염을 유도하고, DSS 유도성 장염 모델은 염증성 장염의 치료제 개발에 적용하기에 적당한 모델로 알려져 있다. *in vitro* 활성 평가에서 확인된 추출 용매 비율별 중국산 마치현 추출물을 DSS 유도성 염증성 대장염 모델을 활용하여 *in vivo* 활성을 확인하였다.

4주령의 ICR male 마우스를 정상 대조군 (Control), 3% DSS 장 염증 유발군, 염증성 대장염 치료제로 사용되고 있는 sulfasalazine 투여군, 에탄올 100% 마치현 추출물 투여군, 에탄올 70% 마치현 추출물 투여군으로 나누어 7일간 적응기를 가졌다. sulfasalazine 및 마치현 추출물은 3% DSS 음수 2일 전부터 DSS 음수 시작 후 14일 동안 sulfasalazine 50 mg/kg, 마치현 추출물은 100 mg/kg, 300 mg/kg 의 용량으로 1일 1회 경구 투여로 투여하였다. 치료시험 기

간 중에는 체중 측정, 변의 형태, 혈변의 정도를 나타내는 질환 활성 지표 (disease activity index, DAI) 기준, 정상변 0, 무른변 1, 무른 변과 잠혈 2, 설사와 잠혈 3, 설사와 직장 주위에 출혈과 짓무름이 있는 경우는 4로 하여 평가하였고, 시험 종료 후에는 장 길이, 혈중 사이토카인 측정, 결장의 병리 조직학적 관찰을 실시하였다.

DSS 유도성 염증성 대장염 동물 모델 실험 결과, 에탄올 100% 마치현 추출물을 300 mg/kg 투여한 그룹이 체중저하, 폐사 등 임상증상이 가장 완화되는 것을 확인하였고, DSS에 의해 감소된 장 길이도 회복되는 것을 검증하였으며 혈중 염증성 사이토카인 IL-6, IL-17 농도도 감소됨을 확인하였다.

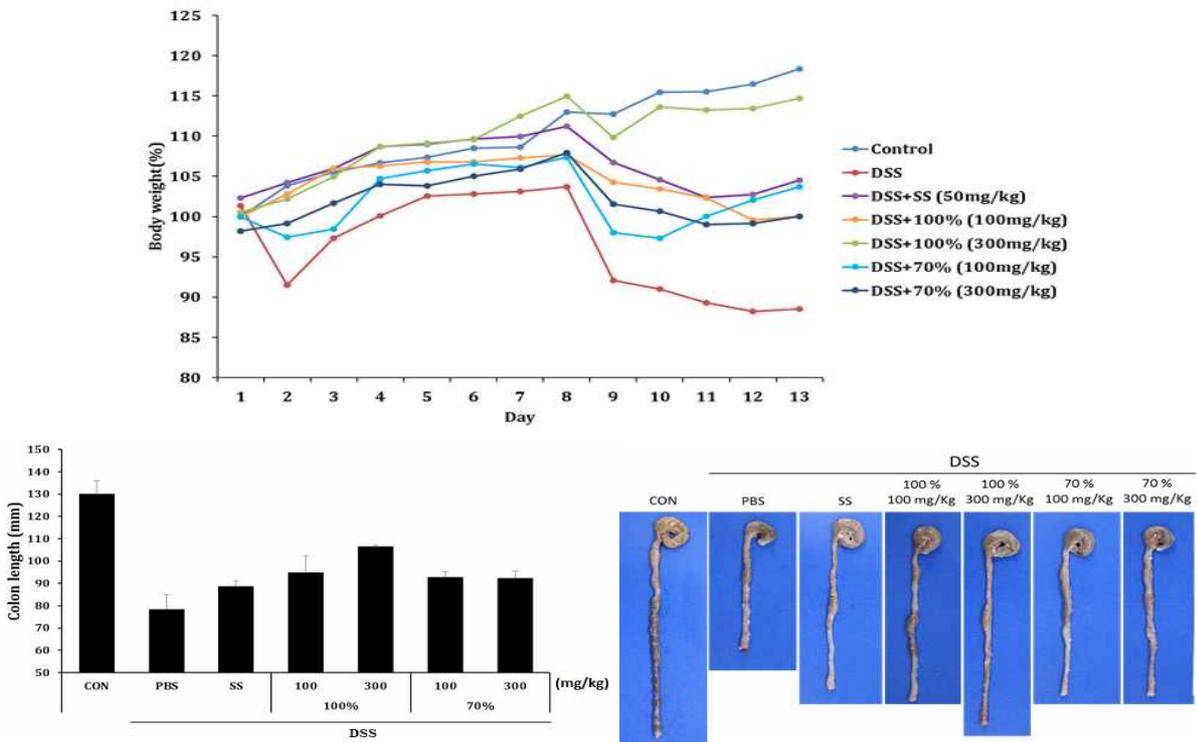


그림 40. DSS 유도성 염증성 대장염 모델에서 추출 용매 비율별 중국산 마치현 추출물의 활성 평가 (체중변화, 장 길이 변화)

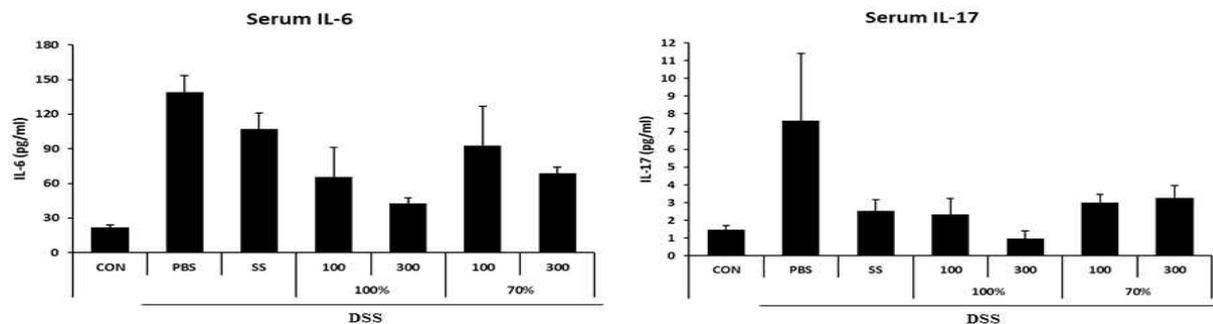


그림 41. DSS 유도성 염증성 대장염 모델에서 추출 용매 비율별 중국산 마치현 추출물의 활성 평가 (혈중 염증성 사이토카인 농도 변화)

선정된 중국산 마치현 추출물을 100% 에탄올로 추출하는 방법을 이용하여 대량생산 한 후, 대량 생산 원료에 대한 in vivo 활성을 검증하기 위해 DSS 유도성 염증성 대장염 마우스 모델 실험을 실시하였다. 4주령의 ICR male 마우스를 정상 대조군 (Control), 3% DSS 장 염증 유발군, sulfasalazine 투여군, 대량생산 마치현 추출물 투여군으로 나누어 7일간 적응기를 가진 후, sulfasalazine 50 mg/kg, 추출물 투여그룹은 100 mg/kg, 300 mg/kg 의 용량으로 1일 1회 경구 투여로 투여하였음.

DSS 유도성 염증성 대장염 마우스 모델 실험 결과, DSS에 의해 체중 감소와 장길이 감소가 유발 된 것을 마치현 추출물을 투여한 그룹에서 농도 의존적으로 체중이 증가하고, 장 길이가 증가하여 임상증상이 완화됨을 확인하였다.

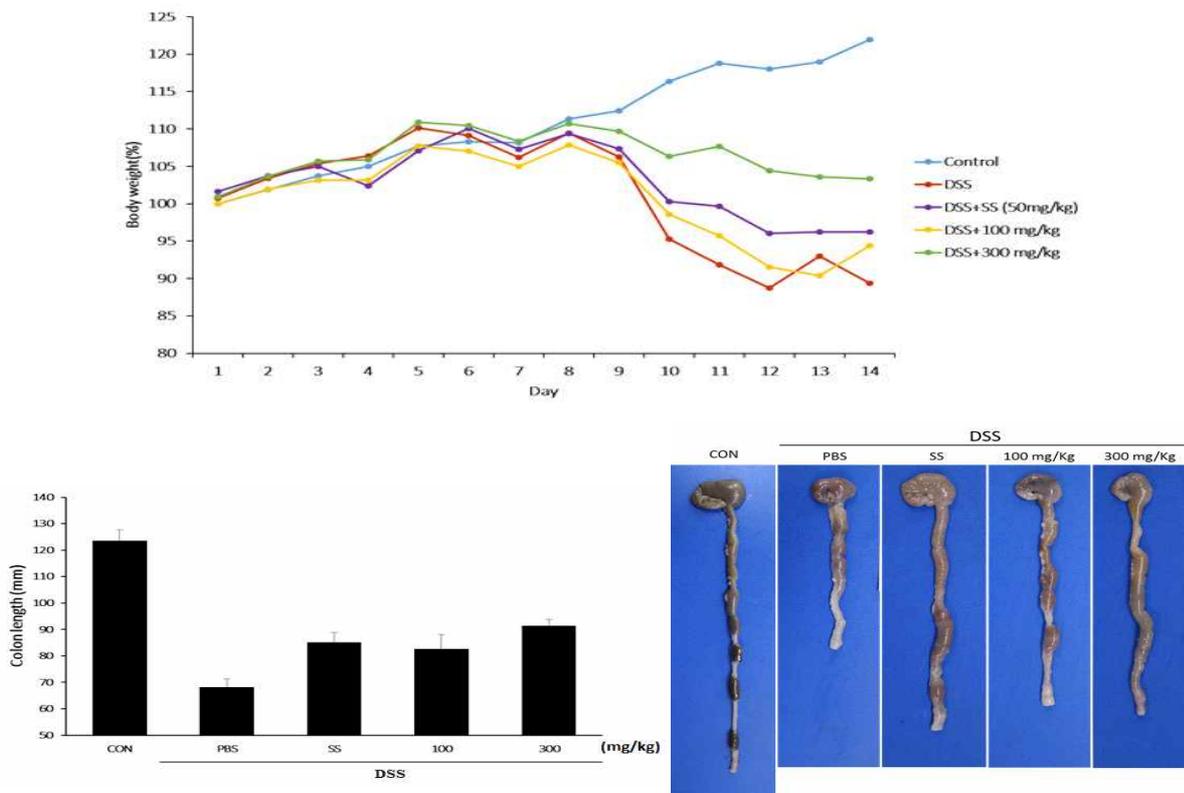


그림 42. DSS 유도성 염증성 대장염 모델에서 대량생산 된 마치현 추출물의 활성 평가 (체중변화, 장 길이 변화)

마치현 추출물의 활성 기전연구를 위해 마치현 추출물에서 분리한 10여 종의 화합물 중 신규 화합물인 화합물2, 화합물4에 대한 추가 연구를 진행하였다. 지표물질로도 선정된 화합물 2, 화합물4의 활성 평가를 위해 세포수준에서 IL-6 신호 전달 저해 효과를 확인한 결과 저농도 1 μM에서부터 효과가 있음을 확인하였고, 이 중 효과가 더 우수한 화합물 2의 면역과 염증에서 중요한 역할을 하는 JAK (Janus kinase), STAT3 및 ERK(Extracellular signal Regulated Kinases)의 phosphorylation 저해 효과를 Western blot을 통해 확인하였다.

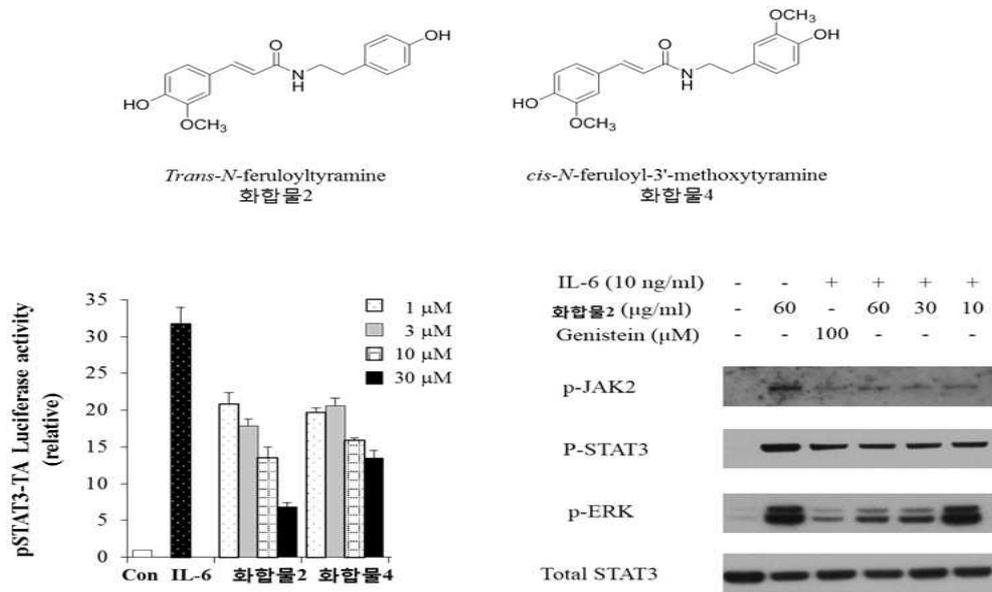


그림 43. 마치현 추출물에서 분리한 신규 화합물의 in vitro 활성 평가

4주령의 ICR male 마우스를 정상 대조군 (Control), 3% DSS 장 염증 유발군, 염증성 대장염 치료제로 사용되고 있는 sulfasalazine 투여군, 신규 화합물 투여군으로 나누어 7일간 적응기를 가진 후, sulfasalazine 50 mg/kg, 신규 화합물 그룹은 1 mg/kg, 3 mg/kg 의 용량으로 1일 1회 경구 투여로 투여하였음. 시험 종료 후에는 체중변화, 장 길이, 혈중 사이토카인 측정, 결장의 병리 조직학적 관찰을 실시하였다.

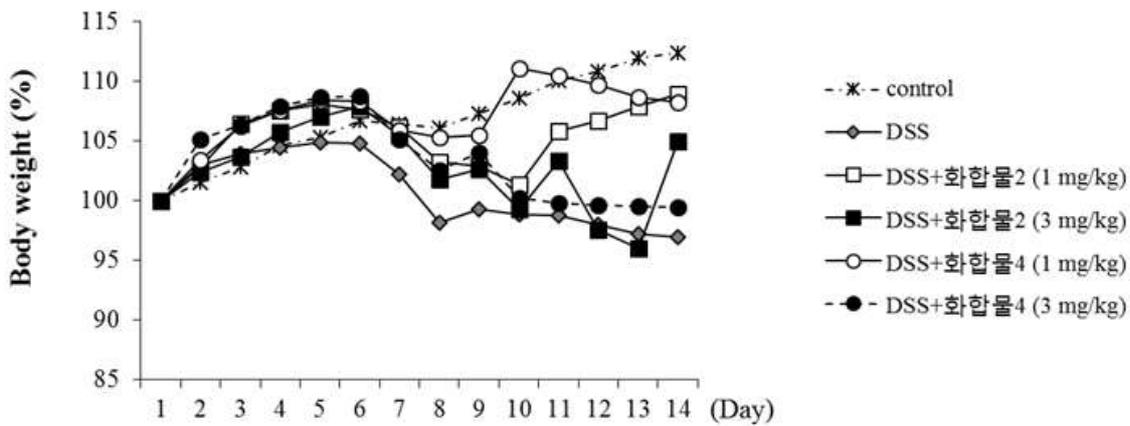


그림 44. DSS 유도성 염증성 대장염 모델의 체중 변화

시험기간 체중변화를 관찰한 결과, 3% DSS 유도에 의한 급격한 체중저하 및 폐사가 sulfasalazine 치료제 투여군 및 화합물2, 화합물4 투여 그룹에서 완화됨. 또한 3% DSS 투여군에서 보이는 설사 및 혈변, 항문의 임상증상이 sulfasalazine 투여군 및 화합물 투여 그룹에서 호전된 것을 볼 수 있었고, 결장 길이 측정 및 결장의 병리 조직학 분석 결과, 대장염 유발군의 장 길이는 정상군에 비해 현저하게 줄어들었으나 sulfasalazine 치료제 투여군 및 화합물 투여군에서 장 길이가 회복되었다. 결장 조직 병리사진에서도 대장염 유발군에서 관찰되는 장 점막층 및 근육층의 염증세포 침윤, 장 용모, 장샘 소실 등 또한 sulfasalazine 치료제 투여군 및 화합물 투여군에서 현저하게 감소함을 확인하였다. 따라서 화합물 2, 화합물 4 투여 그룹은 1 mg/kg, 3 mg/kg를 처리한 실험 군에서는 DSS를 처리에 의해 유도되는 염증성 대장염 증상을 치료하는 효과가 우수함을 확인하였다.

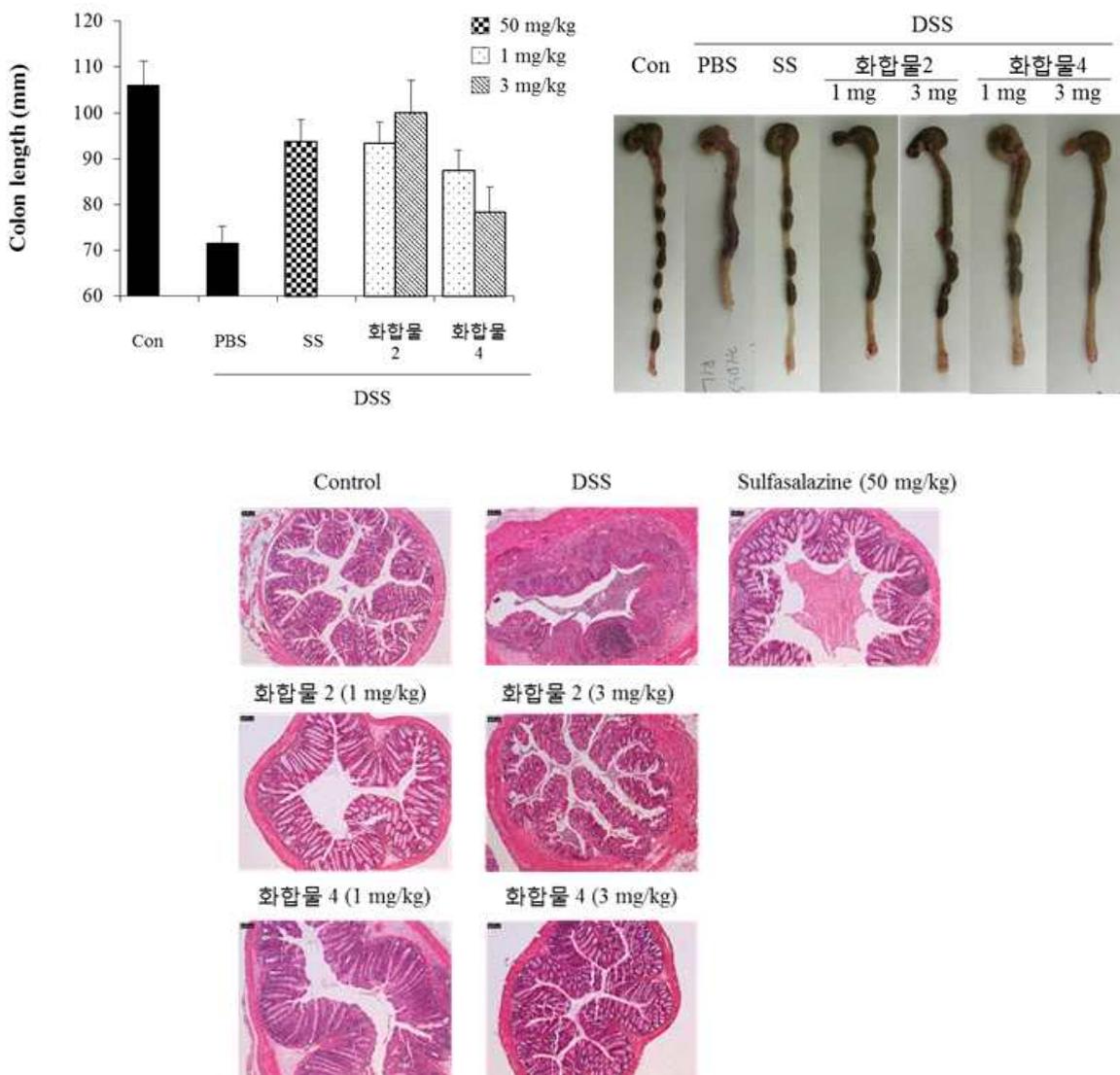


그림 45. DSS 유도성 염증성 대장염 모델의 장 길이 변화 및 조직 병리 결과

염증성 대장염의 effector cytokine인 interferon- $\gamma$ , IL-4, IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 혈중 농도 또한 3% DSS로 유발한 염증성 대장염 유발군에서 증가되었다가 sulfasalazine 치료제 투여군 및 화합물 투여군에서 현저하게 감소하였다.

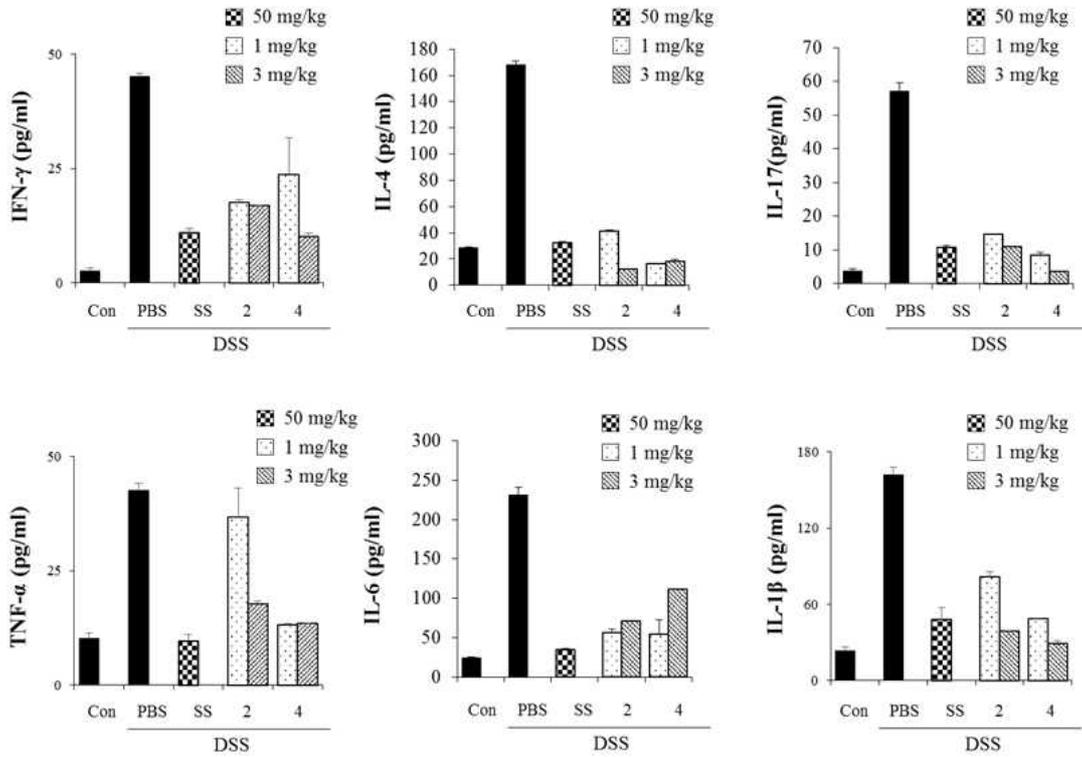


그림 46. 마치현 추출물에서 분리한 신규 화합물의 혈중 사이토카인 분비량 변화

## 2. 사료첨가제, 동물용의약품 개발 및 목적동물 임상시험

### 가. 사료첨가제 제작 및 현장임상

사료첨가제 제작에 사용한 원료는 그림 47와 같으며 총 3가지의 시제품을 생산하였다. 시제품 배합비는 표 28와 같다.



<축우 IgY 분말>



<마치현>



<아출>



<이스트킬처>



<고령토>



<옥태말분>



<엔테로코커스 웨시엄>



<감태 분말>



<오배자 추출물>



<비타킬처>

그림 47. 시제품 제작에 사용된 원료

표 28. 시제품 배합비 (A, B, C)

구분	시제품 A	시제품 B	시제품 C
원료 (%)			
IgY	10.0	10.0	10.0
마치현 분말	7.0	7.0	8.0
아출 분말	7.0	7.0	8.0
감태 분말	적량	적량	적량
오배자 추출물	적량	적량	적량
비타컬처 <sup>1</sup>	적량	적량	적량
이스트 킬처	적량	적량	적량
고령토	적량	적량	적량
엔테로코커스 웨시엄	적량	적량	적량
옥태말분	적량	적량	적량
합계	100.0	100.0	100.0

<sup>1</sup> 비타민, 미네랄, 효모 혼합제

각각의 원료들을 배합비율표에 따라 배합하여 생산하였으며 시제품 선정은 위하여 세 가지 제품을 생산하였으며, 최종 제품 선정은 경제성, 기호성 등을 평가 후 결정하였다. 원가분석은 각각의 원료들의 원가를 조사하여 완제품 1kg을 만드는데 필요한 원가와 생산비를 합하여 분석하였다. 시제품의 원가는 표 16과 같다. 기호성 평가는 한우 5마리를 이용하여 세가지 사료첨가제를 배합사료와 혼합하여 하루에 한 제품씩 3일간 각각 섭취한 양을 측정하여 비교하는 방법인 카페테리아식 (Morimoto, 1971) 방법으로 진행하였다. 기호성 평가 결과는 표 30과 같다.

표 29. 시제품 원가 (1kg당 원가)

구분	시제품 A	시제품 B	시제품 C
원료			
IgY	2,300	2,300	2,300
마치현 분말	490	490	560
아출 분말	476	476	544
감태 분말	455	455	-
오배자 추출물	420	420	-
비타컬처 <sup>1</sup>	-	-	360
이스트 킬처	170	128	-
고령토	38	-	-
엔테로코커스 웨시엄	-	-	100
옥태말분	148	188	176
생산비	600	600	600
합계 (원)	5,097	5,057	4,640

<sup>1</sup> 비타민, 미네랄, 효모 혼합제

표 30. 시제품 기호성 평가

구분	시제품 A	시제품 B	시제품 C
사료섭취량, kg	22.7	23.2	25.6

시제품 선정은 위하여 세 가지 사료첨가제의 기호성 조사를 실시하였다. 조사결과 제품C가 기호성이 가장 좋았으며 그 뒤로 A, B로 나타났다. 경제성과 기호성을 고려하여 최종 제품은 C

로 선정하였다.

개발된 사료첨가제를 보조사료로 등록하기 위하여 제품명은 네오 페리틴(Neo Ferritin)으로 정하였다. 일반성분 분석을 위하여 단미사료협회에 분석을 의뢰했으며 의뢰 성분은 수분, 조단백질, 조회분, 조지방, 납, 카드뮴, 수은, 구연산, 살모넬라D 그룹을 의뢰 했다.

사료성분등록증과 사료검정증명서는 다음과 같다.



그림 48. 최종 제품 선정





## 나. 사료첨가제 현장 임상

### 1) 배경 및 목적

송아지 설사병은 다양한 원인에 의하여 발생되며, 소화관을 통과한 내용물 중의 수분 또는 용질이 생체내의 상호이동의 이상에 의해 발생하는 것으로서, 송아지의 체액상실이나 이상은 치명적일 수 있고 폐사의 원인이 되며 회복되어도 성장장애 등을 일으켜 농가뿐만 아니라 국가적으로도 경제적 손실이 큰 질병이다. 갓 태어난 송아지는 질병에 대한 저항성이 전혀 없는 상태로 태어나기 때문에 설사를 쉽게 하며 설사병의 원인은 매우 다양하게 일어난다. 송아지 설사는 감염성과 비감염성으로 나누어질 수 있으며, 감염성은 바이러스, 세균, 기생충 등이 원인인 설사이며, 비감염성은 식이성 및 스트레스에 의하여 발생하는 설사병이다.

특히 2011년부터 사료내 항생제 첨가를 금지함에 따라 기존의 항생제를 대체하는 제재에 대한 관심 및 수요가 높아지고 있는 상황이다. 그중 천연물을 기반으로 한 약물의 수요는 꾸준히 높아지고 있다.

마치현은 탁월한 항염 작용을 가지고 있는 천연물로 알려져 있다. 마치현은 대표적인 송아지 설사병 유발 원인균주인 E. coli, Salmonella에 대한 항균효과, Rotavirus, Coronavirus에 대한 항바이러스 효과를 가지고 있고, 중성구 및 대식세포의 식균, 항균 작용을 강화하여 송아지 설사병 원인균에 대한 감염을 효과적으로 제어 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 임신중인 어미소에게 마치현을 포함한 천연물 복합제재의 급여가 혈액 성분 및 초유성분에 미치는 영향을 조사하여 강건한 송아지의 생산과 어미소의 면역력증진에 영향이 있는지를 조사하였다.

### 2) 재료 및 방법

대조군 : 일반 배합사료를 급여군

시험군 : 일반 배합사료에 사료첨가제 급여군 (두당 1일 100g 급여)

급여방법은 상기의 시험사료를 직접 제조하여 어미소에게 송아지 출산 3개월 전부터 급여하였다.

분석항목은 혈액과 초유를 분석하였으며 혈액은 각 처리군별 송아지 출산 후 채혈을 실시하여 전혈과 혈청을 대상으로 아래와 같은 시험을 실시하여 분석하였다.

혈액분석: 혈액분석은 Forcyte 혈구계수기(Manual Type Blood Cell Count)를 이용하여 다음 항목을 측정하였다.

WBC= White Blood Cell (백혈구)

NE= Neutrophil (호중구)

LY= Lymphocyte (림프구)

MO= Monocyte (단핵구)

EO= Eosinophil (호산구)

BA= Basophil (호염구)

혈액내 Interleukin-2 (IL-2) lymphokine의 측정: 시험군과 대조군에서 추출한 혈액내의 IL-2의

양을 측정하고자 수입 competitive ELISA를 사용하였으며 제조회사의 방법대로 수행하였다.  
 혈액내 Interferon gamma ( $\gamma$ -IFN)의 측정: 시험군과 대조군에서 채취한 혈액내의  $\gamma$ -IFN의 양을 측정하고자 수입한 indirect ELISA를 사용하였으며 제조회사의 방법대로 수행하였다.  
 혈액내 IgA 의 측정: 시험군과 대조군에서 채취한 혈액내의 IgA의 양을 측정하고자 수입한 competitive ELISA를 사용하였으며 제조회사의 방법대로 수행하였다.  
 혈액내 IgG 의 측정: 시험군과 대조군에서 채취한 혈액내의 IgA의 양을 측정하고자 competitive ELISA를 사용하였으며 제조회사의 방법대로 수행하였다.  
 초유는 유당, 지방, 무지고형분, 단백질, 면역글로불린, 비타민A의 함량 변화를 측정하였다.

### 3) 통계처리

본 시험에서 얻은 자료에 대한 통계적 분석은 SAS 9.3 (2012)의 Turkey 검정을 이용하여 유의성을 분석하였다.

### 4) 결과 및 고찰

혈액분석 결과는 표 18과 같다.

일반적으로 면역증강의 효과를 확인하려면 외부 항원에 저항하기 위하여 체내 면역림프구에서 분비되는 Interferon- $\gamma$ , T림프구에서 분비되는 Interleukin-2의 증가를 확인하고 더 나아가 Neutrophil, Monocyte 등의 혈구세포의 증가를 확인해야 한다. 아울러 체액성 면역수준을 대표하는 B림프구에서 분비되는 total Ig G와 Ig A의 함량을 측정하였다.

- i. Ig G, Ig A : 혈중 Ig G 및 Ig A의 농도는 시험군에서 유의적으로 높게 나타났다. (두 처리군에 나타나는 수치는 정상치에 비해 모두 높았으나 소의 경우 계절에 따라 정상치보다 매우 높게 나타날 수 있다는 기존의 보고가 있다.)
- ii. Interferon- $\gamma$  : 시험군에서 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다.
- iii. Interleukin-2 : 시험군에서 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다.
- iv. 백혈구(WBC) : 백혈구의 수치는 시험군에서 유의적으로 높게 나타났다.
- v. 호중구(NE) : 호중구의 수치는 시험군에서 유의적으로 높게 나타났다.
- vi. 림프구(LY) : 림프구의 수치는 대조군에서 유의적으로 높게 나타났다.
- vii. 단핵구(MO) : 시험군에서 높게 나타나는 경향이 있었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.
- viii. 호산구 (EO) : 시험군에서 높게 나타나는 경향이 있었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

표 31. 혈액 분석 결과

구분	대조군	시험군	SEM	<i>P-value</i> <sup>1</sup>
Ig G (mg/ml)	380.4	511.4	32.04	0.001
Ig A (mg/ml)	3.61	4.53	2.36	0.001
Interferon- $\gamma$ (pg/ml)	1.24	1.47	66.45	0.018
Interleukin-2 (pg/ml)	0.10	0.21	7.14	0.024
White blood cell(WBC) (k/ $\mu$ l)	6.71	6.78	0.607	0.007

Neutrophil(NE) (k/ $\mu$ l)	2.51	2.29	0.335	0.003
Lymphocyte(LY) (k/ $\mu$ l)	3.41	3.25	0.272	0.026
Monocyte(MO) (k/ $\mu$ l)	0.74	0.89	0.120	0.581
Eosinophil(EO) (k/ $\mu$ l)	0.05	0.06	0.041	0.075
Basophil(BA) (k/ $\mu$ l)	0.02	0.01	0.003	0.086

<sup>1</sup>Means with difference superscript in the same row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

초유 분석 결과는 표 32과 같다.

초유 분석결과 유당, 지방, 무지고형분의 함량에서 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 시험군에서 높게 나타나는 경향을 나타내었다. 단백질, 면역글로불린, 비타민 A의 함량은 시험군에서 유의적으로 높게 나타났다.

표 32. 초유 분석 결과

구분	대조군	시험군	SEM	$P$ -value <sup>1</sup>
유당, %	2.84	3.0	4.86	0.083
지방, %	10.82	11.5	3.32	0.061
무지고형분, %	22.2	21.9	9.57	0.206
단백질, %	17.52	28.1	8.73	0.001
면역글로불린, g/L	5.76	7.9	13.36	0.042
비타민 A, mg/g	37.44	48.6	10.61	0.014

<sup>1</sup>Means with difference superscript in the same row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

본 시험결과를 종합하여 볼 때 대조군에 비해 시험군에서 면역세포의 수치가 증가하는 것으로 나타났다. 특히 시험군에서 백혈구, 호중구, 림프구의 수치가 증가한 것으로 볼 때 선천면역(innate immunity)을 증가시키는 것으로 사료된다.

또한 초유의 성분을 강화시켜 보다 질 좋은 초유를 송아지에게 공급하여 면역력을 향상시켜 질병예방 및 성장을 촉진 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

#### 다. 동물용의약품 시제품 생산

동물의약품은 산제, 액제 총 2가지 형태로 제작하였으며 동물약품 부표 내용은 다음과 같다.

##### 1) 아이지가드 페이스트

원료약품 및 분량 (본제 20g 중)

비타민 B <sub>6</sub> (Pyridoxine hydrochloride, KVP) .....	20 mg
비타민 C (Ascorbic acid, KVP) .....	20 mg
바실러스서브틸리스 (Bacillus subtilis, 사료공정서) .....	2.0*10 <sup>7</sup> CFU
마치현추출물 (Purslane, 식품첨가물공진) .....	적당량
프락토올리고당 (Fructo-oligosaccharide, 식품공진) .....	적당량
난황분말 (Yolk powder, 식품공진) .....	적당량
초유 (Colostrum, 식품공진) .....	적당량

소르빈산 (Sorbic acid, KVP) .....	적당량
정제수 (Water, KP) .....	적당량

성상 및 제형

- 가. 제형 : 액제
- 나. 성상 : 연한 갈색 또는 갈색의 점성이 있는 현탁제

제조방법

동물용의약품 공정서 제제총칙 중 액제 방법에 따른다.

효능 및 효과

송아지의 설사 예방, 면역증강, 장기능 개선, 정장작용, 질병 시 영양공급

용법 및 용량

- 가. 분만 후 초유 급여 전·후에 20g을 경구투여
- 나. 설사 발생 시 1일 1두당 20g씩 2~3일간 경구투여

포장단위

10g, 20g, 100g (20g\*5ea), 200g (20g\*10ea)

2) 아이지가드 파우더

원료약품 및 분량 (본제 20g 중) (본제 1kg 중)

비타민 B <sub>6</sub> (Pyridoxine hydrochloride, KVP) .....	20.0 g
비타민 C (Ascorbic acid, KVP) .....	20.0 g
바실러스서브틸리스 (Bacillus subtilis, 사료공정서) .....	1.0*10 <sup>9</sup> CFU
엔테로코커스훼시엄 (Enterococcus faecium, 사료공정서) .....	1.0*10 <sup>9</sup> CFU
마치현추출물 (Purslane, 식품첨가물공전) .....	적당량
프락토올리고당 (Fructo-oligosaccharide, 식품공전) .....	적당량
난황분말 (Yolk powder, 식품공전) .....	적당량
초유 (Colostrum, 식품공전) .....	적당량
포도당 (Glucose, KP) .....	적당량

성상 및 제형

- 가. 제형 : 산제
- 나. 성상 : 미황색 또는 연한 갈색의 가루

제조방법

동물용의약품 공정서 제제총칙 중 산제 방법에 따른다.

효능 및 효과

송아지의 설사 예방, 면역증강, 장기능 개선, 정장작용, 질병 시 영양공급

용법 및 용량

가. 대용유 첨가 : 0.5 ~ 1.0% (1일, 1두, 대용유 1L당 5~10g 첨가)

나. 송아지사료 첨가 : 0.1 ~ 0.2%

포장단위

100g, 500g (100g\*5ea), 1kg (100g\*10ea)

### 3) 제품사진



아이지가드 페이스트



아이지가드 파우더

라. 시제품 품질관리를 위한 정량, 정성 분석

마치현으로부터 분리 정제한 Ferulic acid와 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine을 지표성분으로 선정하여 주관기관에서 생산된 시제품인 분말상 제형의 아이지가드 파우더와 액상제형의 아이지가드 페이스트에 대하여 HPLC를 이용하여 정량분석을 실시하였음.

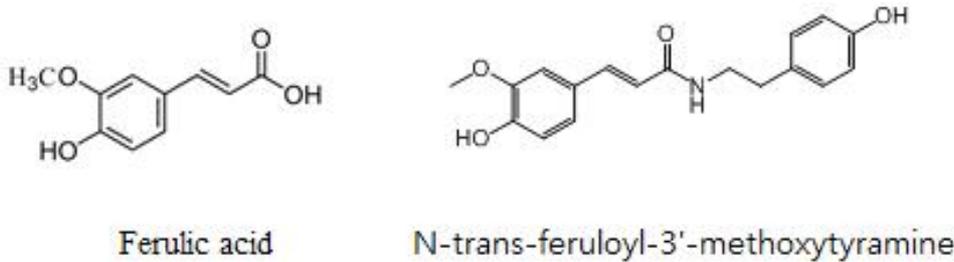


그림 50. 지표성분인 Ferulic acid와 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine의 구조

분말상 제형의 아이지가드 파우더와 액상제형의 아이지가드 페이스트 각각 1 g에 100% 에탄올 용매 20 ml를 첨가한 후 이를 2시간 동안 sonication 추출하였으며, 이 에탄올 추출물은 종이필터로 여과한 후 여과액을 감압 농축하였음. 각각의 에탄올 추출은 40~53%의 수율로 추출되었으며, 아이지가드 파우더 원제 및 아이지가드 파우더 시제품이 각각 510.7 mg, 434.5 mg이었으며, 아이지가드 페이스트 원제와 시제품은 각각 531.1 mg과 398.8 mg으로 측정되었음.

농축된 각각의 에탄올 추출물은 다시 메탄올 5 mL에 용해하였으며, 용해된 용매를 C18 sep-pak cartridge를 이용하여 비극성 성분을 제거한 후, HPLC 분석하였음. 분석 조건으로는 320 nm 파장에서 ACN과 물을 사용하여 분석하였음.

표 32. HPLC 분석 및 용매 조건

System	Agilent HPLC system (1200 series)	Time (min)	% of Solvent (B)
Flow rate	1 mL	0	17
Sample inj.	10 µL	15	17
Column	Phenomenex Luna 5µ C18 100A (250 × 4.6 mm)	40	32.5
		40.1	100
Oven Tem.	35 °C	60	100
Wave length	320 nm	60.1	17
Mobile phase	0.5% Acetic acid in H2O (A) Acetonitrile (B)	60.1	17
		70	17

마치현이 함유된 시제품 내 지표성분의 정량을 위해 2가지 지표성분에 대하여 1 ~ 200 µg/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였음. 두 지표성분에 대하여 검량선의 상관계수 r2가 0.99 이상으로 나타났음.

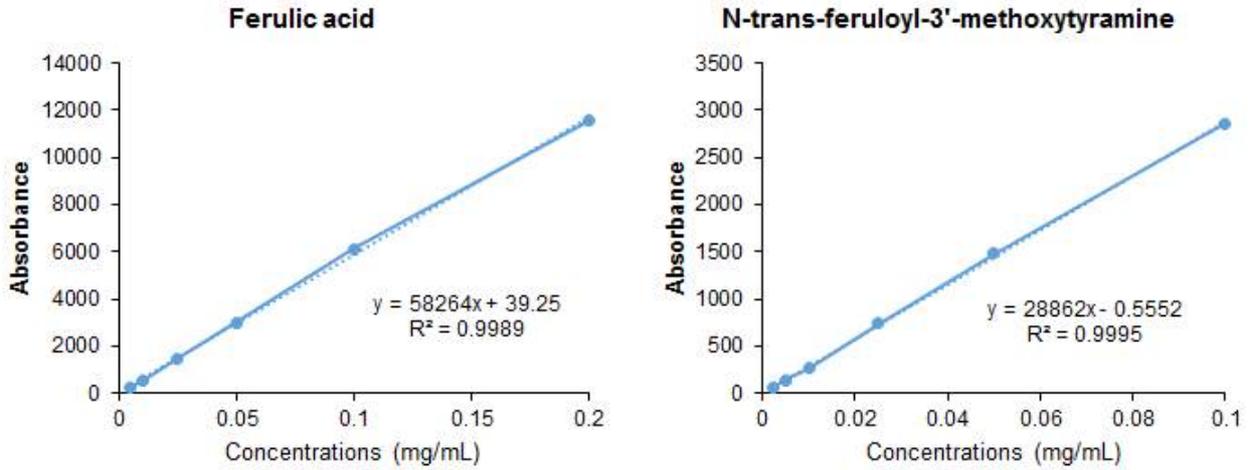


그림 51. 지표성분인 Ferulic acid와 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine의 검량곡선

시제품에 대한 분석결과 지표화합물인 ferulic acid는 15분대에서 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine은 33분대에서 화합물이 검출되었음.

분말상 제형인 아이지가드 파우더 제품에서는 두 가지 지표화합물에 대한 피크만 확인할 수 있었으며, 마치현이 첨가되지 않은 아이지가드 파우더 원제품에서도 지표화합물이 검출되는 분대에서 겹쳐지는 피크를 확인할 수 있었음.

지표화합물인 ferulic acid, N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine에 대한 정량 분석 결과, 아이지가드 페이스트 시제품 1 g 에는 ferulic acid 및 N-trans-feruloyl-3'- methoxytyramine가 각각 13.2, 6.8  $\mu\text{g}$ 이 함유돼있는 것으로 확인되었음

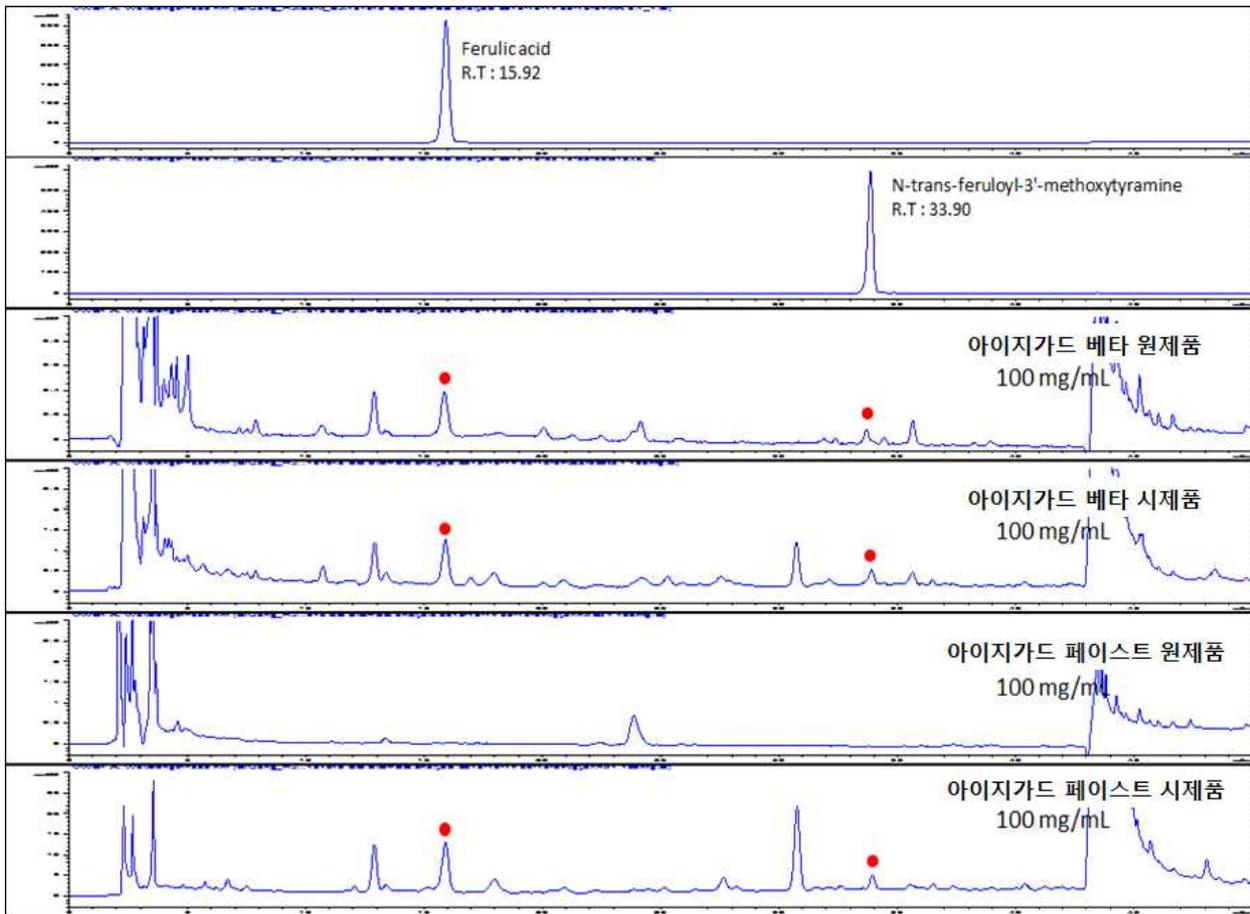


그림 52. 아이지가드 파우더 및 아이지가드 페이스트 제품의 HPLC 분석 패턴

위에 검량곡선에 분석한 시제품의 Peak Area값을 대입하여 지표성분의 함량을 구하였으며, 시제품에 함유된 지표성분의 함량은 아래 표와 같이 나타났음.

표 33. 마치현 추출물 및 시제품 내 지표성분 함량

시료(ug/g)	아이지가드 페이스트 시제품
ferulic acid	13.2
N-trans-feruloyl- 3'-methoxytyramine	6.8

#### 마. 시제품의 활성 효능 평가

마치현 추출물이 함유된 시제품에 대하여 다양한 병원균에 대한 항균활성을 agar well diffusion assay로 측정하였음. 측정에 사용된 균주는 Staphylococcus aureus(S. aureus), MRSA (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus), Salmonella enteritidis, Salmonella enteritidis enterica, Shigella sonnei, Bacillus cereus, Escherichia coli (E. coli) 그리고 야생에서 분리된 E.coli (야생균주) 및 Staphylococcus aureus (야생균주) 균주 총 9종을 사용하였고, 각 균주를

평판배지에 37°C에서 24시간 배양한 후 단일 colony를 액체배지에 계대 배양하여 24시간 최적 조건에서 배양시켰음. 평판배지의 각 well에 5 mg/mL, 3 mg/mL, 1 mg/mL로 희석된 시제품을 100 µL씩 점적하고 37°C에서 24시간 배양한 후 주변에 생성된 저해환(clear zone, cm)을 측정하여 항균 활성을 비교하였음.

실험결과, 아이지가드 페이스트 원제품의 경우 5 mg/mL 및 3 mg/mL 농도에서 *Staphylococcus aureus* 균주에만 항균활성을 나타냈음. 그러나, 마치현 추출물이 함유된 아이지가드 페이스트 시제품은 5 mg/mL 농도에서 *Salmonella enteritidis* 균주를 제외한 8종의 균주에서 항균 활성을 나타냈으며, 3 mg/mL 농도에서는 *Salmonella enteritidis enterica* 균주를 제외한 8종의 균주에서 항균활성을 나타냈음. 또한, 시제품의 농도를 1 mg/mL 로 조정 후 실험한 결과, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), MRSA, *Shigella sonnei*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (야생균주) 균주에서 항균활성을 확인하였음. 특히, 시제품 5 mg/mL, 3 mg/mL 농도에서 야생에서 분리된 균주인 *E.coli*(야생균주), *Staphylococcus aureus* (야생균주)에 항균활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 1 mg/mL 농도에서도 *Staphylococcus aureus* (야생균주)에서 항균활성을 나타냄.

표 34. 아이지가드 페이스트 원제품 및 시제품에 대한 항균활성

항균활성	항생제 <sup>b)</sup>	아이지가드 페이스트 원제품 (mg/mL)			아이지가드 페이스트 시제품 (mg/mL)		
		5	3	1	5	3	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.4 <sup>c)</sup>	2.4	1.5	-	2.4	1.45	1.0
MRSA <sup>a)</sup>	1.7	-	-	-	1.1	1.0	1.0
<i>Salmonella enteritidis</i>	1.2	-	-	-	-	0.95	-
<i>Salmonella enteritidis enterica</i>	2.0	-	-	-	1.1	-	-
<i>Shigellasonnei</i>	1.7	-	-	-	0.9	0.9	1
<i>Bacillus cereus</i>	1.8	-	-	-	1.2	0.9	1.1
<i>Escherichia coli</i>	1.7	-	-	-	1.0	1.0	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (야생균주)	1.4	-	-	-	1.2	1.0	1.0
<i>Escherichia coli</i> (야생균주)	1.5	-	-	-	1.0	0.9	-

a) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

b) Gentamicin c) Clear zone (ø cm)

아이지가드 파우더 원제품의 경우 5 mg/mL 및 3 mg/mL 농도에서 *Staphylococcus aureus* 균주에만 항균활성을 나타냈음. 그러나, 마치현이 함유된 아이지가드 파우더 시제품은 5 mg/mL 농도에서 총 9종의 균주에서 항균 활성을 나타냈으며, 3 mg/mL 농도에서는 *Salmonella enteritidis enterica*, *Escherichia coli* 균주를 제외한 7종의 균주에서 항균활성을 나타냈음. 또한, 시제품의 농도를 1 mg/mL 로 조정 후 실험한 결과, 5 mg/mL 농도결과와 유사하게 총 9종의 균주에서 항균 활성을 나타냈음. 특히, 마치현이 함유된 시제품은 5 mg/mL, 3 mg/mL, 1mg/mL 농도에서 야생에서 분리된 균주인 *E.coli*(야생균주), *Staphylococcus aureus* (야생균

주)에 항균활성을 나타내는 것을 확인하였음.

표 35. 아이지가드 파우더 원제품 및 시제품에 대한 항균활성

항균활성	항생제 <sup>b)</sup>	아이지가드 파우더 원제품 (mg/mL)			아이지가드 파우더 시제품 (mg/mL)		
		5	3	1	5	3	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.4 <sup>c)</sup>	3.2	1.55	-	2.8	1.5	1.1
MRSA <sup>a)</sup>	1.7	-	-	-	1.2	0.9	1.1
<i>Salmonella enteritidis</i>	1.2	-	-	-	1.2	0.95	1.0
<i>Salmonella enteritidis enterica</i>	2.0	-	-	-	1.2	-	1.0
<i>Shigellasonnei</i>	1.7	-	-	-	1.1	0.9	1.0
<i>Bacillus cereus</i>	1.8	-	-	-	1.1	1.0	1.0
<i>Escherichia coli</i>	1.7	-	0.9	-	1.2	-	1.0
<i>Staphylococcus aureus</i> (야생균주)	1.4	-	-	-	1.5	0.9	1.1
<i>Escherichia coli</i> (야생균주)	1.5	-	-	-	1.2	0.9	0.9

a) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

b) Gentamicin c) Clear zone (ø cm)

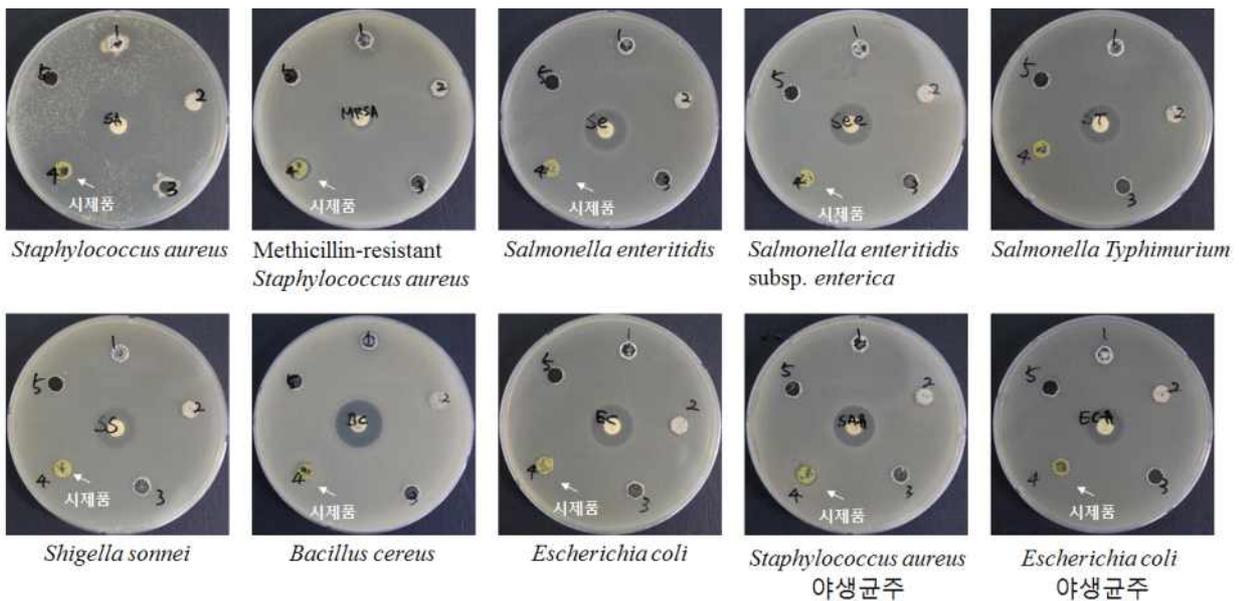


그림 53. 아이지가드 파우더(원제품, 시제품) 및 아이지가드 페이스트(원제품, 시제품)의 항균활성 1: 아이지가드 파우더 원제품, 2: 아이지가드 파우더 시제품, 3: 아이지가드 페이스트 원제품, 4: 아이지가드 페이스트 시제품, 5: MeOH, 항생제: gentamicin

마치현 함유 시제품의 정량분석에서 지표성분으로 확인 된 ferulic acid계의 화합물 2종을 추

가 분리하여 구조를 확인하고 IL-6/STAT3 luciferase assay를 통한 활성평가를 실시하였음.

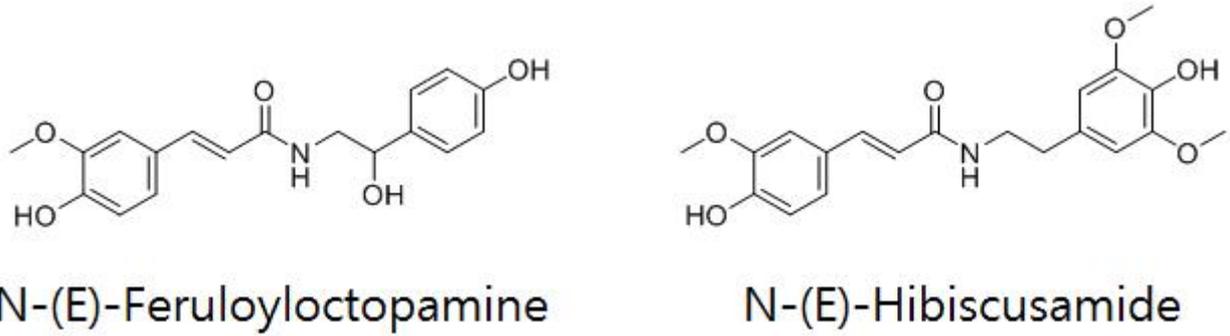


그림 54. ferulic acid계의 화합물 2종

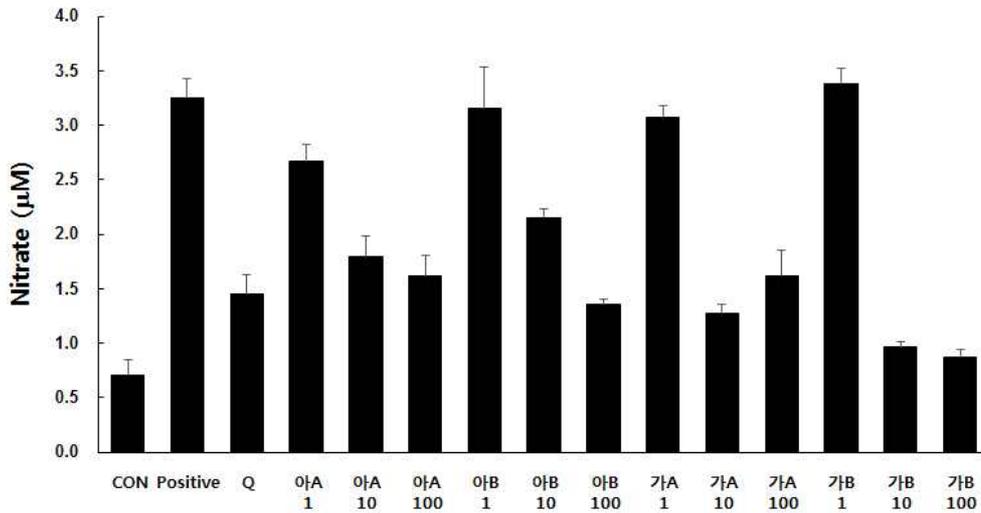
IL-6/STAT3 luciferase assay를 통한 활성평가 결과 농도의존적으로 Inhibition 활성이 증가하였으며, N-(E)-Hibiscusamide 화합물이 2배정도 활성이 높은 것을 확인하였음.

		1	2	3	Mean	Inh.%
Control		3809	3489	3448	3582	100.0
IL-6		38235	38574	35170	37326.33	0.0
Stattic	1 $\mu$ M	3617	5005	3559	4060.333	98.6
N-(E)- Feruloyloct opamine	30 $\mu$ M	24200	20825	34717	26580.67	31.8
	10 $\mu$ M	23644	39722	29124	30830	19.3
	3 $\mu$ M	27328	36653	33352	32444.33	14.5
N-(E)- Hibiscusam ide	30 $\mu$ M	17138	12656	18459	16084.33	62.9
	10 $\mu$ M	25720	21995	29124	25613	34.7
	3 $\mu$ M	29532	23394	27490	26805.33	31.2

그림 55. IL-6/STAT3 luciferase assay 결과

#### 바. 시제품의 작용 기작 연구

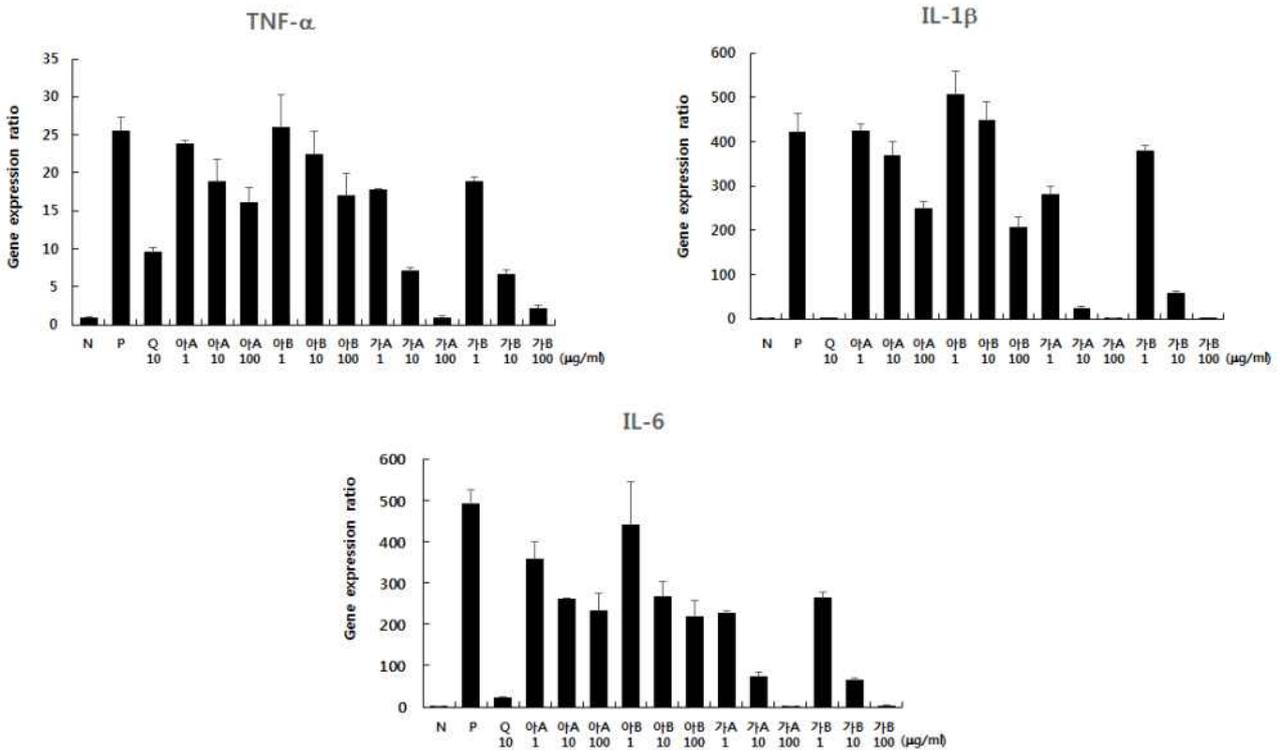
대식세포를 이용한 시제품의 항염효과 검증을 위해 마우스 대식세포인 J774A.1을 이용하여 염증반응 시 대식세포가 분비하는 NO 농도를 측정하여 저해활성 평가를 실시함. 주관기관에서 제조된 아이지가드 페이스트 원제품(A), 마치현 함유 아이지가드 페이스트 시제품(B), 아이지가드 파우더 원제품(A), 마치현 함유 아이지가드 파우더 시제품(B)을 1~100  $\mu$ g/mL 농도로 농도별로 전처리한 후 LPS로 자극하여 분비된 NO를 측정하였음. 그 결과, 전체적인 제품 모두 농도의존적으로 NO 분비를 저해하는 것을 확인하였고, 마치현 함유에 따른 NO 분비 변화는 아이지가드 페이스트, 아이지가드 파우더 모두 마치현이 함유된 시제품에서 NO 분비 저해 활성이 더 우수한 것을 확인할 수 있었음.



\* Q: Quercetin 10 µg/ml, 아A: 아이지가드 페이스트 A, 아B: 아이지가드 페이스트 B, 가A: 아이지가드 베타 A, 가B: 아이지가드 베타 B

그림 56. 대식세포에서 시제품의 NO 분비 변화

추가적인 항염 효과 검증을 위해 대식세포에서 LPS 자극에 의한 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ , IL-6의 유전자 발현량을 확인해 본 결과, 원제품, 시제품 모두 농도 의존적으로 염증성 사이토카인 유전자 발현량을 억제시켜주는 효능이 있음을 확인함.



\* Q: Quercetin 10 µg/ml, 아A: 아이지가드 페이스트 A, 아B: 아이지가드 페이스트 B, 가A: 아이지가드 베타 A, 가B: 아이지가드 베타 B

그림 57. 대식세포에서 시제품의 염증성 사이토카인 발현량 변화

시제품의 IL-6/STAT3 신호전달 저해 효과를 확인하기 위해 마치현에서 분리한 10종의 화합물의 IL-6/STAT3 luciferase assay를 실시하여 저해 활성을 확인하였음. IL-6/STAT3 저해 정도는 IC<sub>50</sub>(50% inhibitory concentration)를 계산하여 확인해 본 결과, 저농도에서도 IL-6/STAT3 저해 활성이 우수한 것을 확인하였고, 화합물 간의 조합에 따라서도 IL-6/STAT3 저해 활성이 우수한 것을 확인하였음.

Compounds	IC <sub>50</sub> (μM)
<i>N-cis</i> -feruloyltyramine (1)	19.3
<i>N-trans</i> -feruloyltyramine (2)	5.6
Converted mixture (1 + 2)	15.2
<i>N-cis</i> -feruloyl-3'-methoxytyramine (3)	16.2
<i>N-trans</i> -feruloyl-3'-methoxytyramine (4)	6.0
Converted mixture (3 + 4)	6.5
<i>N-cis</i> -hibiscusamide (5)	6.7
<i>N-trans</i> -hibiscusamide (6)	0.2
Converted mixture (5 + 6)	5.9
(7' <i>S</i> )- <i>N-cis</i> -feruloyloctopamine (7)	19.5
(7' <i>S</i> )- <i>N-trans</i> -feruloyloctopamine (8)	2.6
Converted mixture (7 + 8)	6.7
(7' <i>S</i> )- <i>N-cis</i> -feruloylnormetanephine (9)	28.6
(7' <i>S</i> )- <i>N-trans</i> -feruloylnormetanephine (10)	13.0
Converted mixture (9 + 10)	13.7
Oleanolic acid acetate <sup>1</sup>	0.7

<sup>1</sup> Oleanolic acid acetate was used as the positive control.

그림 28. IL-6/STAT3 저해 활성 결과

IL-6/STAT3 저해 활성이 우수한 화합물 2종을 선정하여 면역과 염증에 중요한 역할을 하며 IL-6/STAT3 신호전달 단백질인 JAK (Janus kinase), STAT3 및 ERK(Extracellular signal Regulated Kinases)의 phosphorylation 저해 효과를 Western blot을 통해 확인하였음. 그 결과, IL-6 자극에 의해 인산화 된 단백질을 화합물 처리 시 농도의존적으로 활성이 억제되는 것을 확인하였음.

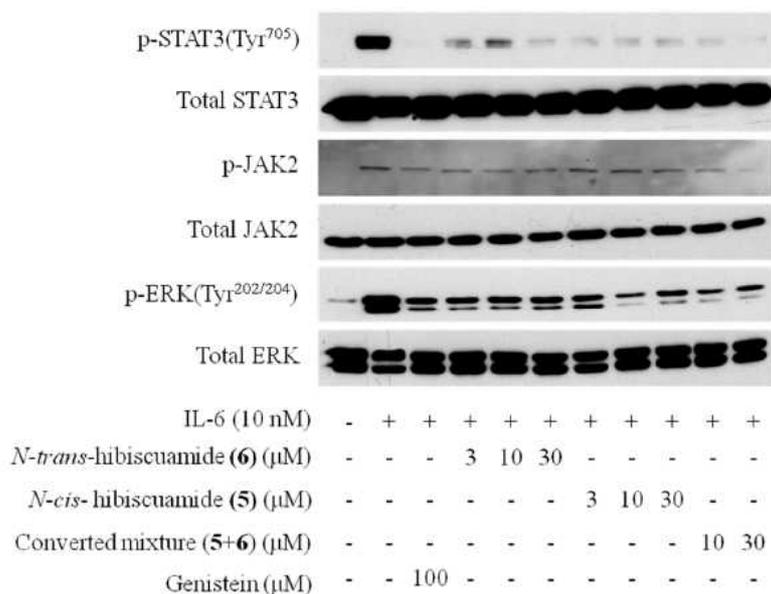


그림 58. IL-6/STAT3 신호전달 저해 활성 결과

2차년도에 구축된 살모넬라 감염 동물모델을 이용하여 시제품의 마우스 치사율을 평가하기 위해 마우스를 이용하여 동물실험을 실시하였음. 주관기관에서 제조한 원제품, 시제품을 마우스에 600 mg/kg 농도로 7일간 투여 후, 7일째 살모넬라균을 복강 투여하여 감염시킴. 살모넬라균 감염 후 시간별로 마우스 체중을 측정하였고, 마우스 치사 여부를 확인함. 실험 결과, 살모넬라균 감염 후 마우스 체중은 약물투여군 모두 전반적으로 감염에 의한 체중 감소가 되는 것을 확인하였음.

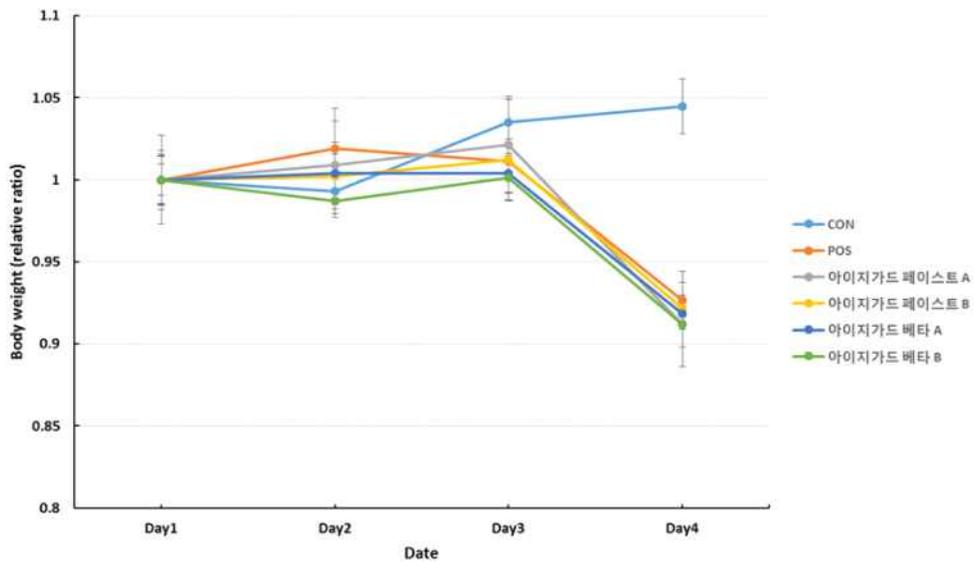


그림 59. 살모넬라 감염 동물모델의 마우스 체중 변화

또한, 살모넬라 감염 동물모델을 통해서 살모넬라균 감염 시 마우스 생존율은 약물 투여군에서 모두 마우스 생존율을 높이는 효과가 있음을 확인할 수 있었으나, 아이지가드 페이스트, 아이지가드 파우더의 원제품, 시제품 간의 차이는 크게 나타나지는 않았음.

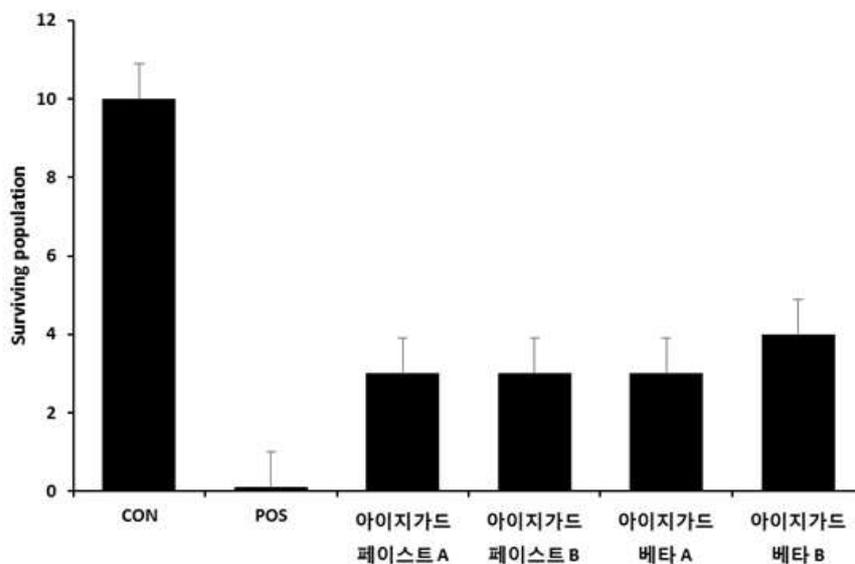


그림 60. 살모넬라 감염 동물모델의 결과

사. 동물의약품 목적동물 임상실험 (국내)

1) 실험목적

현재 소 로타바이러스 설사병에 대한 치료약은 전무한 상태로 항생제로 합병증을 막고, 설사로 인한 탈수증세를 막고자 대증요법을 실시하고 있으나, 폐사율을 낮추기에는 역부족한 상황이다. 따라서 스스로 바이러스를 이겨낼 수 있도록 축체의 면역력을 높여 줄 면역증강제가 절실한 상황이다.

본 실험은 아이지가드 페이스트, 아이지가드 파우더를 급여하여 송아지의 설사 예방 및 치료 효과를 확인하기 위하여 진행하였다.

2) 실험기준

본 실험은 호서대학교 동물실험윤리위원회의 심의절차를 거쳐 승인을 받은 후 실시하였다. (승인번호: HSIACUC-18-110~1)

3) 공시동물

1~2주령 송아지 15두 공시

송아지를 입식하여 병원균의 존재 유무를 확인하고 각각의 균과 바이러스가 음성임을 확인 후 진행하였다.

4) 공격접종 균 및 바이러스 준비

송아지 설사병을 유발하기 위하여 사용한 공시 바이러스는 검역원으로부터 분양 받은 Bovine rotavirus(KVCC-01090020)를 사용하였으며 대장균과 살모넬라균은 야외에서 분리한 균을 사용하였다.

5) 공격접종 및 시험군

가) 공격접종

공격접종균과 치료군에 소 세균성 소화기 질환을 유발하기 위하여 병원성 E.coli 50mL ( $1.04 \times 10^9$  CFU/mL), Salmonella typhimurium 50mL ( $8.4 \times 10^8$  CFU/mL) 및 bovine rotavirus 50mL ( $3.16 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL)을 우유와 혼합하여 1회 경구 접종하여 분변 및 임상증상 발현을 확인한 후 아이지가드 페이스트, 베타를 투여하였다.

나) 시험군

시험군의 구성은 표 36과 37와 같다.

표 36. 아이지가드 페이스트 시험군의 구성

시험군	시험두수	처리방법
무처리군	5	무처리 대조군
공격접종군	5	분만 후 2~3주일째에 bovine rotavirus 50mL ( $3.16 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /mL), E.coli 50mL ( $1.04 \times 10^9$ CFU/mL), Salmonella typhimurium 50mL ( $8.4 \times 10^8$ CFU/mL)를 1회 경구 투여

치료군	5	아이지가드 페이스트를 분만 후 6시간 이내 본제 20g 급여, 분만 후 2~3주일째에 로타바이러스, 대장균 및 살모넬라균 접종에 의한 임상증상 발현, 설사 발생 시 본제 20g을 1일 1회, 5일간 경구투여
-----	---	---

표 37. 아이지가드 파우더 시험군의 구성

시험군	시험두수	처치방법
무처치군	5	무처치 대조군
공격접종군	5	분만 후 2~3주일째에 bovine rotavirus 50mL ( $3.16 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /mL), <i>E.coli</i> 50mL ( $1.04 \times 10^9$ CFU/mL), <i>Salmonella typhimurium</i> 50mL ( $8.4 \times 10^8$ CFU/mL)를 1회 경구 투여
치료군	5	임상증상 발현 확인 후 약 50℃ 미지근한 물 430mL에 대용유 60g과 아이지가드 파우더 10g을 희석하여 1일 2회 5일간 경구 투여

## 6) 임상효능 지표

### 가) 체중측정

소화기 질환 유발 전, 약물 투여 전과 투여 후 1, 4, 7 및 14일에 체중을 측정하였다.

### 나) 대용유 및 사료 섭취량 측정

실험 농장에서 계류 1주 동안 매일 오전, 오후 각각 1회씩 대용유 2L를 공급하였으며 음수는 자유급여 하였다. 이 후 매일 오전 대용유 2L를 공급하였으며 대용유 급여 후 오전, 오후 각각 200g의 어린송아지용 펠렛사료를 급여하고 음수는 자유급여 하였다.

### 다) 임상 증상 관찰

공시물질 투여 개시시점부터 시험이 종료되는 시점까지 임상 증상을 관찰하였다(표3).

### 라) 혈액분석

약물 투여 전 1회, 약물투여 후 1, 4, 7 및 14일째에 경정맥에서 혈액을 채취하여 분석하였다.

### 마) 분변 내 균수 및 바이러스량 측정

균접종 및 약물투여 후 분변을 채취하여 균 수 및 바이러스량을 측정하였다.

### 바) 부검 및 병리소견

시험기간 동안 사망한 개체와 종료 시 생존한 개체를 부검하여 육안적 소견을 관찰하고, 육안 병변이 관찰되는 조직을 채취하여 관찰하였다.

### 사) 조직 내 균 수 및 바이러스 측정

부검 후 병변이 발견되는 장, 소장 부위를 무균적으로 채취하여 조직내 균 수 및 바이러스를 측정하였다.

표 38. 소에 소화기 질환 유발 후 증상 별 임상지수

구분	임상증상	임상지수
외관/행동이상	정상	0
	둔함	1
	침울	2
	황와	3
탈수	정상	0
	가벼운 탈수(안구함몰 및 갈증없음)	1
	중등수준(안구함몰 및 식욕감퇴, 구강건조)	2
	심한수준(안구함몰 심함, 기립곤란)	3
	쇼크상태(안구함몰 매우심함, 혼수상태)	4
직장 체온	정상 (38.5~39.5℃)	0
	39.51~40.5℃	1
	>40.5℃	2
	<38℃	3
분변형태	정상변	0
	연변(모양이 있는 연한 변)	1
	약한 설사(노란색의 묽은 변)	2
	심한 설사(수양성, 분출성 변)	3
분변색깔	정상	0
	변색이상(녹색, 황록색, 유허색, 회백색)	1
	점액성 혈변	2
	출혈성	3
피부/피모	정상	0
	피모거침	1
	홍반(코-고열)	2
	청색증(코)	3
폐사	폐사	10

7) 통계 처리

통계처리는 STATISTICA 프로그램을 이용하여 F-test를 실시하였다. 즉, LSD를 이용한 One-way ANOVA 분석을 하였고, 이 후 Duncan 분석에 의하여 사후 검정을 실시 하였다.

8) 아이지가드 페이스트 임상시험 결과

가) 임상증상 및 생존율

임상증상 및 생존율은 그림 1, 2와 같다. 공격접종군의 경우 모든 개체별로 탈수로 인한 안구 함몰, 피모거침, 수양성 및 분출성 설사, 혈변, 행동 둔화가 지속적으로 관찰되었으며 공격접종 후 3일째 2마리, 4일째 3마리가 사망하였다.

치료군의 경우 임상증상의 유발된 후 아이지가드 페이스트를 경구투여 하였으며 모든 개체에서 탈수로 인한 안구 함몰, 피모거침, 수양성 및 분출성 설사, 행동 둔화가 지속적으로 관찰되었고 점액성 혈변은 Day 2까지만 관찰되었고 Day 3일째부터는 점액성 변만 관찰되었다. 치료군의 경우 공격접종 후 3일째 1마리, 5일째 2마리, 6일 때 2마리가 사망하였으며 공격접종군에 비해 생존기간이 2일 더 지속되었다.

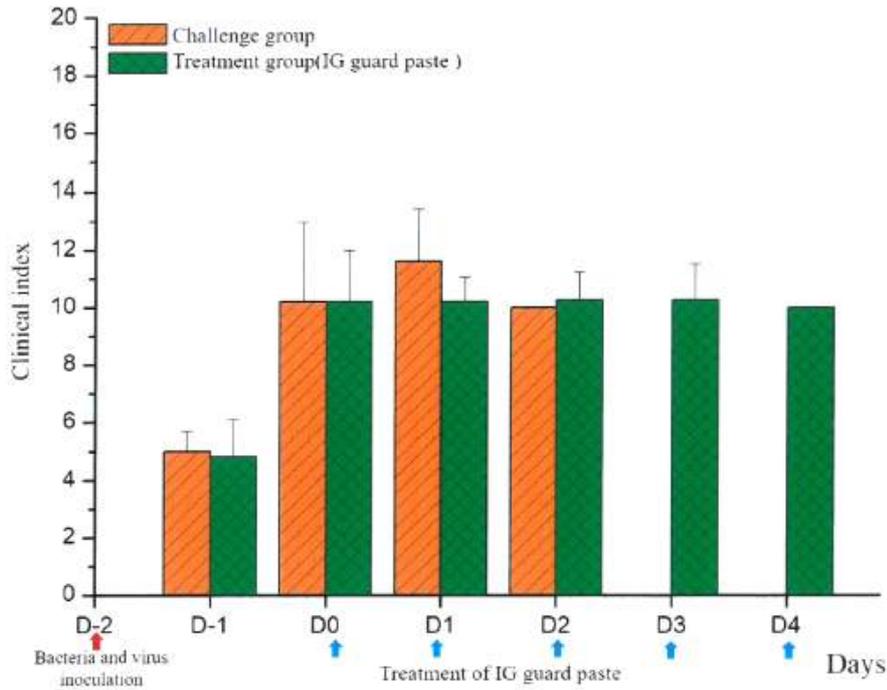


그림 61. 공격접종 후 공격접종군과 치료군의 임상증상과 생존율

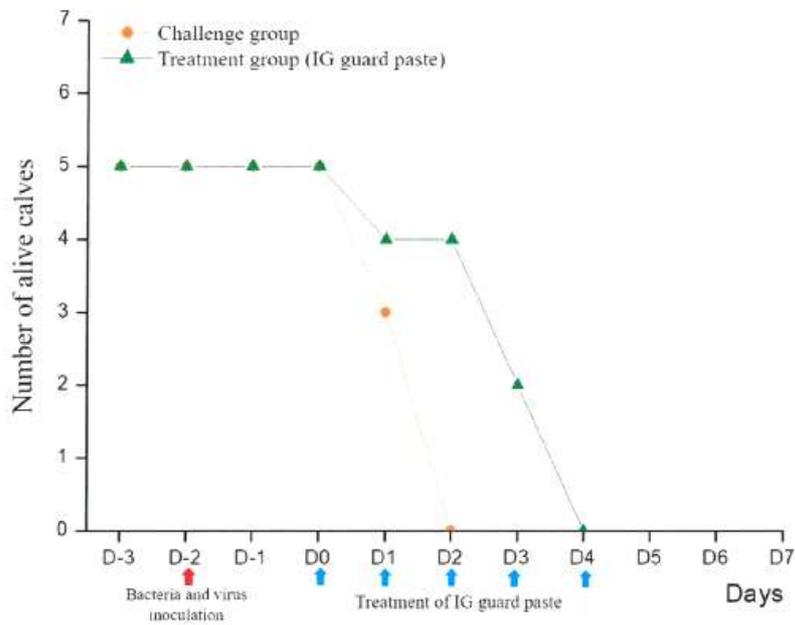


그림 62. 공격접종 후 공격접종군과 치료군의 생존율

다) 체중변화

아이지가드 페이스트 급여 1일째의 무처치군, 공격접종군 및 치료군의 평균 체중은 각각 45.62±6.44kg, 42.70±3.70kg, 42.86±4.41kg 이었으며 공격접종군에서는 체중 측정 전 1마리가 폐사하였다. 공격접종 4일째에 공격접종군은 모두 폐사하였고 치료군도 공격접종 6일째에 모두

폐사하였다(표 39).

표 39. 소화기 질환 균접종 및 약물투여 후 소의 체중과 일당증체량

구분	체중 변화 (kg)				증체량	일당증체량 (kg/day)
	공격접종 (Day-2)	투여개시 (Day 0)	투여 후 1일 (Day 1)	실험종료 (Day 14)		
무처치군	44.88±6.72	45.28±6.55	45.62±6.44	49.50±6.88	4.22±0.97	0.53±0.12
공격 접종군	44.10±3.53	43.30±3.68	42.70±3.70 <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	-0.60±0.16 <sup>d</sup>	-0.30±0.08
치료군	43.82±4.46	43.26±4.56	42.86±4.41	- <sup>c</sup>	-0.40±0.23 <sup>d</sup>	-0.20±0.12

- a: One animal of challenge group died before weighing.
- b: 4 animal of challenge group died within 4 days post-challenge.
- c: The all animal of treatment group died within 6 days post-challenge.
- d: weight gain calculated

라) 체온변화

Day-3일부터 종료일까지 1일 1회 이상 각 시험개체에 대해 체온을 측정한 결과는 그림 3과 같다. 공격접종군의 경우 공격접종 후 2일차에 일부 개체에서 체온상승이 관찰되었으며, 이후 종료시점까지 모두 고온이 관찰되었다.

치료군의 경우, 분만 후 6시간 이내에 아이지가드 페이스트를 1회 먹이고 1~2주간 계류한 후 공격접종하여 질환을 유발시킨 후 1일 1회 아이지가드 페이스트를 20g씩을 투여하였으나, 공격접종 후 2일차에 일부 개체에서 체온 상승이 관찰되었으며 이후 3일째부터 종료시점까지 치료군 모두 고온이 관찰되었다.

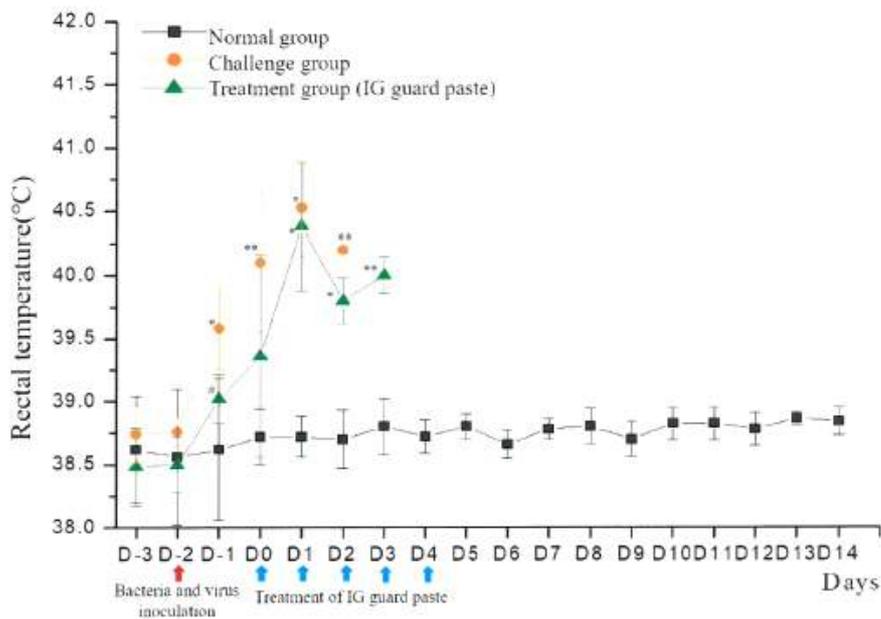


그림 63. 체온변화 측정

9) 아이지가드 파우더 임상시험 결과

가) 임상증상 및 생존율

임상증상 및 생존율은 그림 4, 5와 같다. 공격접종군의 경우 모든 개체에서 탈수로 인한 안구 함몰, 피모거침, 수양성 및 분출성 설사, 혈변, 행동 둔화가 지속적으로 관찰되었으며 공격접종 후 3일째 2마리, 4일째 3마리가 사망하였다.

치료군의 경우 임상증상이 유발된 후 아이지가드 파우더를 경구투여 하였으며 경우 모든 개체에서 탈수로 인한 안구 함몰, 피모거침, 수양성 및 분출성 설사, 혈변, 행동 둔화가 지속적으로 관찰되었으며, 공격접종 후 4일째에 1마리, 6일째에 2마리, 7일째에 1마리, 8일째에 1마리가 폐사하였고 공격접종군에 비하여 생존기간이 4일 더 지속되었다.

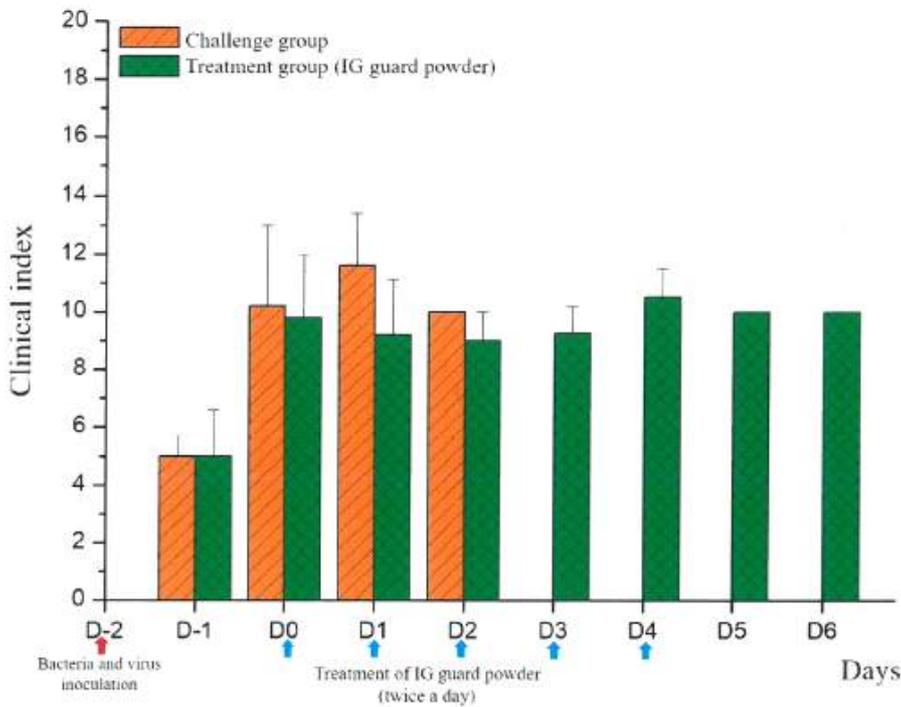


그림 64. 공격접종 후 공격접종군과 치료군의 임상증상과 생존율

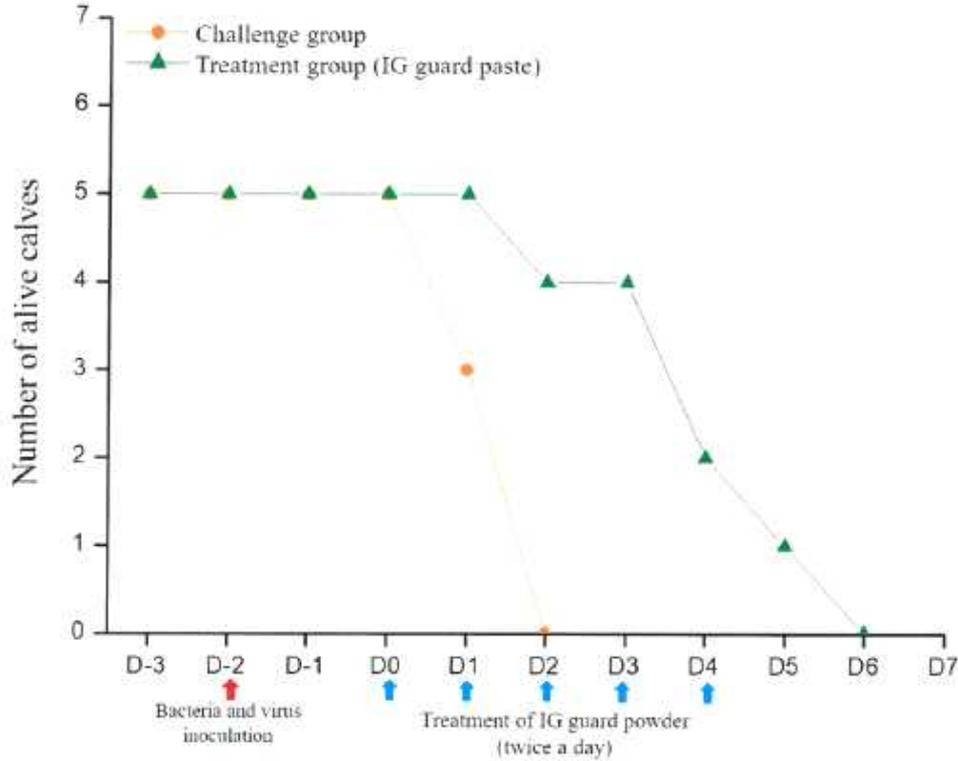


그림 65. 공격접종 후 공격접종군과 치료군의 생존율

나) 체중변화

아이지การ์ด 파우더 급여 후 1일째의 무처치군, 공격접종군 및 치료군의 평균 체중은 각각 45.62±6.44kg, 42.70±3.70kg, 43.24±4.06kg 이었으며, 공격접종군에서는 체중 측정 전 1마리가 폐사하였다. 공격접종 4일째 전에 공격접종군은 모두 폐사하였고 치료군도 공격접종 8일째 모두 폐사하였다(표 40).

표 40. 소화기 질환 군접종 및 약물투여 후 소의 체중과 일당증체량

구분	체중 변화 (kg)				실험종료 (Day 14)	증체량	일당증체량 (kg/day)
	공격접종 (Day-2)	투여개시 (Day 0)	투여 후 1일 (Day 1)	투여 후 4일 (Day 4)			
무처치군	44.88±6.72	45.28±6.55	45.62±6.44	46.28±6.23	49.50±6.88	4.22±0.97	0.53±0.12
공격접종군	44.10±3.53	43.30±3.68	42.70±3.70 <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	-	-0.60±0.16 <sup>c</sup>	-0.30±0.08
치료군	44.16±4.04	43.52±4.15	43.24±4.06	35.55±4.60 <sup>c</sup>	- <sup>d</sup>	-0.28±0.29 <sup>e</sup>	-0.12±0.12

<sup>a</sup>: One animal of challenge group died before weighing  
<sup>b</sup>: 4 animal of challenge group died within 4 days post-challenge.  
<sup>c</sup>: 3 animal of treatment group died within 6 days post-challenge.  
<sup>d</sup>: 2 animal of treatment group died within 6 days post-challenge.  
<sup>e</sup>: weight gain calculated

다) 체온변화

Day-3일부터 종료일까지 1일 1회 이상 각 시험개체에 대해 체온을 측정한 결과는 그림 6과 같다. 공격접종군의 경우 공격접종 후 2일차에 일부 개체에서 체온 상승이 관찰되었으며 이후

종료시점까지 모두 고온이 관찰되었다.

치료군의 경우, 공격접종 후 1일 2회 본제 10g씩 투여하였으나 공격접종 후 2일차에 일부 개체에서 체온 상승이 관찰되었으며, 이후 공격접종 3일째부터 종료시점까지 치료군 모두 고온이 관찰되었다.

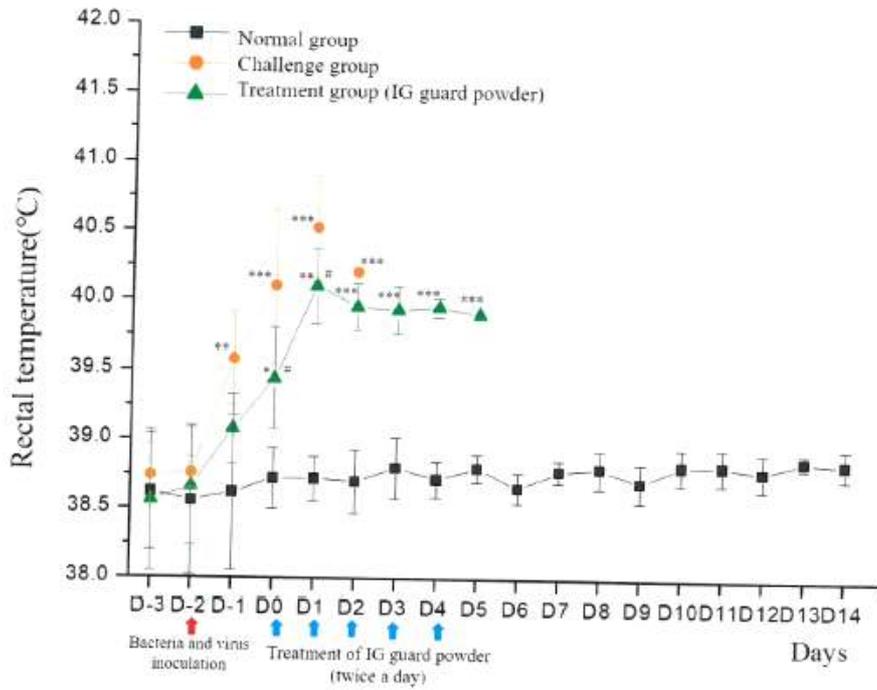


그림 66. 체온변화 측정

#### 10) 결론

아이지가드 페이스트와 아이지가드 파우더의 송아지 설사 예방 및 치료효과를 확인하고자 소화기 질환 원인체인 E.coli, Salmonella typhimurium과 bovine rotavirus에 대한 예방 및 방어효과를 확인하였고, 소화기 질환 유발 후 임상효능을 평가하였다.

E.coli, Salmonella typhimurium와 bovine rotavirus 대한 방어효과를 확인한 결과 아이지가드 페이스트, 아이지가드 파우더 두제품 모두에서 방어효과가 인정되었다.

결론적으로 아이지가드 페이스트와 아이지가드 파우더는 소화기 질환에 걸린 소의 치료 및 사전 예방에 효과가 있는 제품으로 확인되었고, 송아지 설사를 확실하게 치료하기 위해서는 항생제와 병용하여 사용하는 것이 효과적일 것으로 판단된다.

11) 아이지가드 페이스트 동물용의약품 허가 신청서

[V] 동물용의약품    [V] 제조품목    신고서  
 [ ] 동물용의약외품    [ ] 수입품목

접수번호	2018-1022	접수일	2018-12-07	처리기간	10일
신고인	업소명 (주)에드바이오텍	제조업허가번호 118			
	대표자 성명 정홍걸	대표자 생년월일			
소재지	본사 (24398)강원도 춘천시 동내면 거두단지1길 39 (거두리 1 (전화번호: 033-261-4907 )				
	제조소	(전화번호: )			
제조(수입)관리자	성명 이애선	면허 또는 승인번호 약사 제29927호			
신고품목	제품명 아이지가드 페이스트				
	입종구분 제조업	품목구분 동물용의약품			

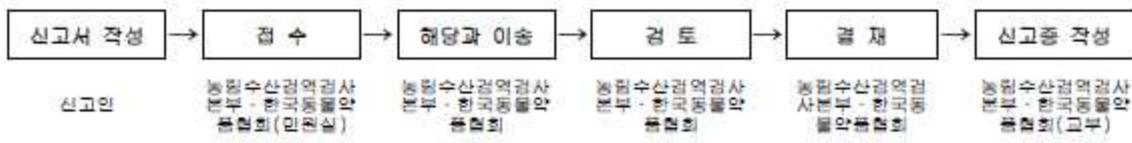
「동물용 의약품등 취급규칙」 제5조제4항 또는 제16조제2항에 따라 동물용의약품·동물용의약외품의 제조(수입)품목을 신고합니다.

2018년 12월 07일  
 신고인                      정홍걸                      (서명 또는 인)

한국동물약품협회 귀하

첨부서류	< 제조품목 > 1. 해당 품목의 제품명, 원료약품의 분량, 성상·제조방법, 효능·효과, 용법·용량, 포장단위, 저장방법, 유효기간, 주의사항, 시험기준 및 시험방법 심사에 관한 서류(필요한 경우 물품을 포함합니다) 2. 해당 품목의 안전성 및 유효성에 대한 심사에 필요한 서류(농림수산식품부장관이 안전성 및 유효성에 문제가 없다고 인정하여 고시한 품목은 제외됩니다) 3. 해당 품목의 제조공정에 관한 서류 4. 이미 허가를 받은 품목과 재형이 다르거나 제조시설, 실험시설 또는 시험기구가 다른 경우에는 그 시설내역 및 시험기구에 관한 서류	수수료 10,000원
	< 수입품목 > 1. 해당 품목의 제품명, 원료약품의 분량, 성상·제조방법, 효능·효과, 용법·용량, 포장단위, 저장방법, 유효기간, 주의사항, 시험기준 및 시험방법 심사에 관한 서류(필요한 경우 물품을 포함합니다) 2. 해당 품목의 안전성 및 유효성에 대한 심사에 필요한 서류 3. 생산국의 정부(그 정부가 위임·위탁한 기관을 포함합니다)가 해당 품목이 생산국 내에서 적법하게 제조·판매되고 있음을 확인한 제조·판매증명서(신청일부터 2년 이내에 발행한 것에만 해당합니다) 4. 최초로 동물용의약품 또는 동물용의약외품을 수입하는 경우 시험기준 제15조에 따라 수입자가 갖추어야 할 수입 및 품질관리에 필요한 시설·설비내역서 및 수입관리자에 관한 서류(역사연혁증 사본 또는 수입관리자 승인서 사본)	
담당 공무원	법인 등기사항증명서(최초로 수입하는 경우에 한합니다)	

처리절차



12) 아이지가드 파우더 동물용의약품 허가 신청서

동물용의약품     제조품목    신고서  
 동물용의약품외품     수입품목

접수번호	2018-1021	접수일	2018-12-07	처리기간	10일
신 고 인	업소명 (주)에드바이오텍			제조업허가번호 118	
	대표자 성명 정홍걸			대표자 생년월일	
소 재 지	본사 (24398)강원도 춘천시 동내면 거두단지1길 39 (거두리 1			(전화번호: 033-261-4907 )	
	제조소			(전화번호: )	
제조(수입) 관리자	성명 이애선			면허 또는 승인번호 약사 제29927호	
	신고품목	제품명 아이지가드 파우더			
업종구분 제조업			품목구분 동물용 의약품		

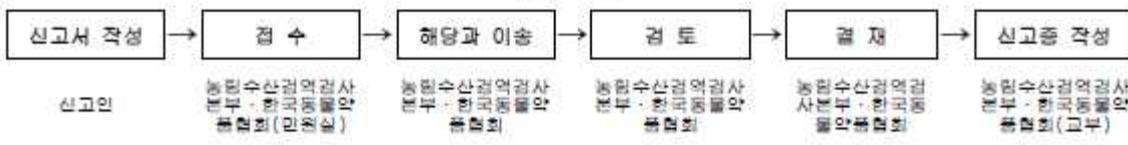
「동물용 의약품등 취급규칙」 제5조제4항 또는 제16조제2항에 따라 동물용의약품·동물용의약품외품의 제조(수입)품목을 신고합니다.

2018년 12월 07일  
신고인                      정홍걸                      (서명 또는 인)

**한국동물약품협회 귀하**

첨부서류	<p>&lt; 제조품목 &gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>해당 품목의 제품명, 원료약품의 분량, 성분, 제조방법, 효능·효과, 용법·용량, 포장단위, 저장방법, 유효기간, 주의사항, 시험기준 및 시험방법 심사에 관한 서류(필요한 경우 불충족을 포함합니다)</li> <li>해당 품목의 안전성 및 유효성에 대한 심사에 필요한 서류(농림수산업식품부장관이 안전성 및 유효성에 문제가 없다고 인정하여 고시한 품목은 제외됩니다)</li> <li>해당 품목의 제조공정에 관한 서류</li> <li>이미 허가를 받은 품목과 제형이 다르거나 제조시설·시험시설 또는 시험기구가 다른 경우에는 그 시설내역 및 시험기구에 관한 서류</li> </ol> <p>&lt; 수입품목 &gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>해당 품목의 제품명, 원료약품의 분량, 성분, 제조방법, 효능·효과, 용법·용량, 포장단위, 저장방법, 유효기간, 주의사항, 시험기준 및 시험방법 심사에 관한 서류(필요한 경우 불충족을 포함합니다)</li> <li>해당 품목의 안전성 및 유효성에 대한 심사에 필요한 서류</li> <li>생산국의 정부(그 정부가 위임·위탁한 기관을 포함합니다)가 해당 품목이 생산국 내에서 적법하게 제조·판매되고 있음을 확인한 제조·판매증명서(신청일로부터 2년 이내에 발행한 것에만 해당합니다)</li> <li>최초로 동물용의약품 또는 동물용의약품외품을 수입하는 경우 시험기준령 제15조에 따라 수입자가 갖추어야 할 수입 및 품질관리에 필요한 시설·설비내역서 및 수입관리자에 관한 서류(약사면허증 사본 또는 수입관리자 승인서 사본)</li> </ol>	수수료 10,000원
담당 공무원	법인 등기사항증명서(최초로 수입하는 경우에 한합니다)	

**처 리 절 차**



13) 아이지가드 페이스트 시험 성적서

제 20180117-1-000176 호			
시험 · 검사 성적서			
수 신 : (주)애드바이오테크			
대 표 청송길			
시료명칭	아이지가드 페이스트		
제조일자	2017-12-06	제조번호	ADB-NIDP-G12211
제조국가	KR/KOREA, REPUBLIC OF / R.KOREA KRW.	제조회사	(주)애드바이오테크
의뢰목적	[40]기타용도/참고용		
시험방법	시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 성적
항상시험	HPLC / Ascorbic acid	-	20.24mg/20g
항상시험	HPLC / Pyridoxine Hydrochloride(vitamin B6)	-	29.19mg/20g
항상시험	생균제시험 / Bacillus subtilis	-	7.6 × 10 <sup>6</sup> CFU/20g
항상시험	생균제시험 / Enterococcus faecium	-	5.6 × 10 <sup>6</sup> CFU/20g
귀하가 ( 20180117-1-000176 )으로 위탁 신청한 검체의 시험 · 검사 결과는 위와 같습니다. 2018 년 02 월 14 일			
한국동물약품기술연구원장 			
* 이 성적은 제시된 검체에 한하며 시험 · 검사 의뢰목적외의 광고, 선전 등에 이용할 수 없습니다.			
- P1 -			

14) 아이지가드 파우더 시험 성적서

제 20180117-1-000175 호			
<b>시험 · 검사 성적서</b>			
수 신 : (주)애드바이오테크 대 표 : 정충길			
시료명칭	아이지가드 베타		
제조일자	2017-12-05	제조번호	A08-NIGB-G12212
제조국가	KR/KOREA, REPUBLIC OF / R.KOREA KRW.	제조회사	(주)애드바이오테크
의뢰목적	[40]기타용도/참고용		
시험방법	시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 성적
항상시험	HPLC / Ascorbic acid	-	20.69g/kg
항상시험	HPLC / Pyridoxine Hydrochloride(vitamin B6)	-	21.37g/kg
항상시험	생균제시험 / Bacillus subtilis	-	5.9 × 10 <sup>6</sup> CFU/g
항상시험	생균제시험 / Enterococcus faecium	-	불검출
귀하가 ( 20180117-1-000175 )으로 위탁 신청한 검체의 시험 · 검사 결과는 위와 같습니다. 2018 년 02 월 12 일			
한국동물약품기술연구원장 			
* 이 성적은 제시된 검체에 한하며 시험 · 검사 의뢰목적외의 광고, 선전 등에 이용할 수 없습니다.			
- P1 -			

아. 동물의약품 목적동물 임상실험 (국외)

1) 시험목적

아이지가드 페이스트 C와 아이지가드 파우더 C 제품이 송아지 설사를 야기하는 로타바이러스와 대장균에 대한 예방, 치료효과를 확인하기 위하여 송아지에게 공격접종을 통해 효능 평가

2) 시험기준

중화인민공화국농업부 고시 제 683호  
<수약임상시험품질관리규범, 수약 GCP> 기준에 따라 진행하였다.

3) 공시동물

1일령 송아지 10두 (청도 레서시 경신목장에서 구입)  
송아지를 입식하여 분변과 혈청에 로타바이러스와 E.coli 항체가 음성임을 확인 후 진행하였다.

4) 공격접종 바이러스와 대장균 타입

소 로타바이러스 (BRV 179) : TCID<sub>50</sub>=10<sup>-6.62</sup>/0.1ml  
대장균 (E.coli K99) : 2.0×10<sup>10</sup>CFU/ml.

5) 시험장소

본 시험의 균 배양, 항체 검사 등은 청다오 농업대학 예방수의 시험실에서 실시 하였으며 송아지 사육 및 공격접종 시험은 산둥, 화홍 생물공학 유한공사의 표준화 동물시험실에서 진행하였다.

6) 시험방법

가) 동물 사육관리

- ① 공격접종 전 3일이상 입식하여 스트레스 예방
- ② 1주간 매일 오전, 오후 각 1회씩 대용유 2L, 펠렛사료 급여, 음수는 자유급여
- ③ 1주 후 매일 오전 대용유 2~2.5L 급여 후 어린송아지용 펠렛사료 급여, 음수는 자유급여

나) 시료 채취 및 조사항목

- ① 임상증상 관찰  
송아지 출생 후 매일 1회 이상 임상증상을 관찰하고, 14일 동안 각 항목별 score를 부여한다.
- ② 체중측정  
송아지 출생 후 1회, 공격접종 후 1, 4, 7, 14일에 측정한다.
- ③ 체온측정  
송아지 출생 후 1회, 공격접종 후 1, 4, 7, 14일에 측정한다.
- ④ 분변 양상  
1일 1회 분변 양상을 관찰하여 score를 부여하고 2~3일 간격으로 채취한다.

⑤ 분변중 바이러스 검사

소독된 면봉으로 직장에서 분변을 2~3일 간격으로 채취하여 BRV 바이러스의 존재를 RT-PCR로 검사한다.

⑥ 분변중 세균 검사

공격접종 후 2~3일 간격으로 분변을 채취하여 균액 PCR 방법을 통해 세균 배출 여부를 확인한다.

⑦ 혈청 항체 검사

공격접종 후 2~3일 간격으로 혈액을 채취하여 혈정을 분리하여 ELISA로 특이성 IgG를 측정하여 응집시험을 통해 대장균 항체를 측정한다.

⑧ 부검 병변

사망한 동물 발생 시 또는 시험종료 후 생존한 동물을 안락사하여 육안적 병변을 확인한다.

7) 시험군 및 제품 급여 방법

표 40. 시험군 및 제품 급여 방법

	시험 두수	제품 급여 방법	공격접종 방법	공격접종 투여량	공격접 종 시기
시험군	5두	1일령(출생 6시간 이내) 아이지가드 페이스트 C 20g/두 급여 3일령부터 매일 아이지가 드 파우더 C를 대용유에 혼합하여 1회 10g씩 1일 2 회 급여	BRV 세포배양물 대장균 균액	1ml/두 10ml/두 (잇몸에 주사로 감염)	4일령
대조군	5두				

8) 결과

① 체중측정

공격접종 후 1, 4, 7, 14, 18일에 체중을 측정한다. 결과는 표 41와 같다.

표 41. 공격접종 후 체중 변화

번호 <sup>1</sup>	0d	1d	4d	7d	14d
1	38.69	38.71	38.76	38.41	38.43
2	37.52	37.55	37.60	37.68	37.80
3	36.70	36.73	36.78	36.94	37.07
4	36.42	36.45	36.50	36.17	36.19
5	36.07	36.09	36.14	35.82	35.84
6	37.70	37.72	37.77	37.43	37.45
7	36.05	36.07	36.12	35.79	35.82
8	39.75	39.77	39.82	39.47	39.49

(kg)

9	36.07	36.09	36.14	35.82	35.84
10	36.91	36.94	36.99	36.65	36.67

<sup>1</sup> 1~5번: 시험군, 6~10번: 대조군

② 체온측정

공격접종 후 1, 4, 7, 14, 18일에 체온을 측정한다. 결과는 표 42과 같다.

표 42. 공격접종 후 체온 변화 (°C)

번호 <sup>1</sup>	0d	1d	4d	7d	14d
1	40.2	40.3	39.7	39.4	39.8
2	38.2	38.9	39.1	39.7	38.8
3	39.0	38.2	38.9	38.7	39.0
4	39.9	40.7	40.5	39.6	39.6
5	39.7	40.5	40.8	40.3	40.4
6	39.4	41.2	40.9	40.2	39.6
7	39.8	41.0	39.9	39.7	40.4
8	39.3	40.7	40.9	39.2	40.1
9	39.1	39.6	40.2	40.7	40.9
10	40.2	40.6	40.5	39.5	40.5

<sup>1</sup> 1~5번: 시험군, 6~10번: 대조군

③ 분변 중 바이러스 검사

RT-PCR을 이용하여 분변 중 바이러스를 검사한 결과는 표 43와 같다.

표 43. 공격접종 후 분변 중 바이러스 검사

번호 <sup>1</sup>	1d	4d	7d	10d	14d
1	-	+	+	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	+	-	-
4	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+

<sup>1</sup> 1~5번: 시험군, 6~10번: 대조군

④ 분변 중 세균 검사

RT-PCR을 이용하여 분변 중 세균을 검사한 결과는 표 44와 같다.

표 44. 공격접종 후 분변 중 세균 검사

번호 <sup>1</sup>	1d	4d	7d	10d	14d
1	-	-	+	+	+

2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+

<sup>1</sup> 1~5번: 시험군, 6~10번: 대조군

⑤ 혈청의 항체 검사

ELISA 항체 검사방법에 따라 분리된 혈청에서 IgG를 분석한 결과는 표 45과 같다.

표 45. 공격접종 후 혈청 중 IgG 수치

번호 <sup>1</sup>	1d	4d	5d	8d	11d	14d	18d
1	16.01	37.55	36.96	38.28	64.63	70.37	64.21
2	8.23	64.84	77.91	85.69	72.48	82.13	80.63
3	14.55	73.58	71.86	88.54	82.56	76.96	74.21
4	10.15	9.15	13.50	20.15	45.98	54.47	50.13
5	13.55	15.81	14.84	19.72	35.64	36.81	36.67
6	9.27	14.63	14.83	18.43	40.21	38.36	33.12
7	14.49	17.49	16.11	19.44	37.74	35.21	24.57
8	15.31	15.75	15.86	21.10	31.05	31.35	30.28
9	16.13	15.87	15.79	22.56	38.90	33.51	34.80
10	14.47	13.43	12.92	13.81	45.12	41.32	35.09

<sup>1</sup> 1~5번: 시험군, 6~10번: 대조군

9) 평가 및 결론

송아지 설사를 예방 및 치료하기 위하여 1일령 송아지 10두를 공시하여 공격접종 시험을 진행하였다. 시험 결과 시험군에서는 2번 3번 송아지가 임상지표인 체온, 체중, 분변 상태등이 정상적으로 나타났고, RT-PCR 검사를 통해 분변 중 로타바이러스와, 대장균이 음성임을 확인하였다. 또한 혈청의 IgG 수치도 대조군에 비해 높게 나타났다. 1번, 4번, 5번 송아지는 완전한 보호를 받지 못하였지만 임상증상은 대조군에 비해 적게 나타났다.

시험결과를 토대로 아이지가드 페이스트 C와 아이지가드 파우더 C는 송아지 설사의 주요 병원체인 로타바이러스와 대장균에 대한 예방 및 치료효과가 있는 것으로 나타났다.

현재 중국에 제품등록을 진행중이며 추후 많은 판매를 할 수 있을 것으로 예상된다.

10) 중국 아이지가드 페이스트 C 허가 신청서.

중국에 직접 사업화를 위하여 연구과제 개발 제품인 아이지가드 페이스트 C 및 아이지가드 파워더 C의 제품판매 허가를 위하여 아래와 같은 서류를 준비하여 제출하였다.

- ① The Physical and Chemical Properties : 성상 및 성분 기준 제시(주원료, 부원료, 수분, 회분 함량)
- ② Certificate of Formula : 원료 배합비 및 공급원 제시
- ③ Flow Chart : 제조 공정도 제시
- ④ Manufacture Process : 제조 전 준비사항, 작업자의 위생, 제조방법 설명
- ⑤ Production Standard and Test Method 제품의 Certificate of Analysis (3batch) 및 시험방법(성분, 미생물, 중금속 분석)
- ⑥ Label of Product : 표기사항(효능, 용법, 저장방법 및 유통기한)
- ⑦ Instruction for Use : 제품명, 제조국, 원료, 성상, 기능, 용도, 용량, 보관, 유통기한
- ⑧ Packing and Storage : 포장 형태, 무게, 포장 재질, 사이즈, 저장, 유통기한, 사진
- ⑨ 공증서류 : 제조증명서, Non GMO 증명서, 사료 등의 기준 및 규격 중국어 번역, 자유판매 증명서, KVGMP 인증서 등

**农业农村部行政审批受理通知书**

受理编号: 04050020181206-5

许可名称	进口饲料和饲料添加剂登记		
申请人	中农达(北京)技术服务有限公司		
通讯地址	北京市通州区新华北路绿地中央广场二期一号楼1611-1612		
联系人	赵亚博文	电子邮箱	
联系电话	18515343582	传真	
材料是否齐全	<input checked="" type="radio"/> 是 <input type="radio"/> 否	材料接收时间	2018-12-12 15:14:01.0
收费状况	不收费	受理时间	2018年12月12日
法定办结时限	20个工作日(专家评审时间不超过6个月;质量复核检验时间不超过3个月)	承诺办结日期	2019年10月16日
批件发送方式	打印	申请编号(产品)	lg-营养液C

受理人: 齐... 联系电话: 010-59191809

**行政审批规定:**

1. 申请人申请行政许可,应当如实向行政机关提交有关材料和反映真实情况,并对其申请材料实质内容的真实性负责。
2. 行政许可申请人隐瞒有关情况或者提供虚假材料申请行政许可的,行政机关不予受理或者不予行政许可,并给予警告;行政许可申请属于直接关系公共安全、人身健康、生命财产安全事项的,申请人在一年内不得再次申请该行政许可。

农业农村部政务大厅      电子信箱: nybzfb@agri.gov.cn  
 通讯地址: 北京市朝阳区农展南路11号      邮政编码: 100125  
 查询网址: http://202.127.45.111:8090/JGGK/getOpenInfo      查询密码: 180913

11) 중국 아이지가드 파우더 C 허가 신청서

农业农村部行政审批受理通知书



受理编号: 04050020181206-6

许可名称	进口饲料和饲料添加剂登记		
申请人	中世达(北京)技术服务有限公司		
通讯地址	北京市通州区新华北路绿地中央广场二期一号楼1611-1612		
联系人	赵亚博文	电子邮箱	
联系电话	18515343582	传真	
材料是否齐全	<input checked="" type="radio"/> 是 <input type="radio"/> 否	材料接收时间	2018-12-12 15:14:04.0
收费状况	不收费	受理时间	2018年12月12日
法定办结时限	20个工作日(专家评审时间不超过6个月;质量复核检验时间不超过3个月)	承诺办结日期	2019年10月16日
批件发送方式	自取	申请编号(产品)	lg-防护粉C

申请人凭本通知书及有效证件领取审批结果

受理人: 张义

联系电话: 010-59191809

行政许可法规定:

1. 申请人申请行政许可,应当如实向行政机关提交有关材料和反映真实情况,并对其申请材料实质内容的真实性负责。
2. 行政许可申请人隐瞒有关情况或者提供虚假材料申请行政许可的,行政机关不予受理或者不予行政许可,并给予警告;行政许可申请属于直接关系公共安全、人身健康、生命财产安全事项的,申请人在一年内不得再次申请该行政许可。

农业农村部政务服务大厅

电子信箱: nybzhb@agri.gov.cn

通讯地址: 北京市朝阳区农展南里11号

邮政编码: 100125

查询网址: <http://202.127.45.111:8090/JGGK/getOpenInfo>

查询密码: 892024





# 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

## 제 1 절 목표

구분	내용
최종목표	<p>다양한 원인을 가지고 있는 송아지 설사병의 적절한 예방 및 제어를 위하여,</p> <p>1) 항균, 항바이러스 및 면역활성증강용 소재인 IgY와 항염 활성이 우수한 천연소재인 마치현 복합소재의 최적 배합비율을 선정. 2) 추출 공정 및 원료 표준화 시스템을 확립하며 새로운 사료첨가제 및 동물약품(액제 및 산제의 경구투여제) 개발. 3) 동물임상시험을 통한 효능 검증 및 시제품의 인허가.</p>
세부목표	<p>&lt;1차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시장조사 및 원료 확보</li> <li>- 최적원료 추출법 확립 및 소재활성 지표 성분 분석</li> </ul> <p>&lt;2차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연소재 배합비 선정</li> <li>- 복합 추출 배합물의 활성 검증 및 효능 연구</li> <li>- 기능성 사료첨가제 시제품 제작</li> <li>- 복합 추출 배합물 성분분석 및 기시범 확립</li> <li>- 시제품의 in vitro 항염 평가: 대식세포를 이용한 NO, 염증성 cytokine 등 측정</li> <li>- 시제품의 in vivo 항염 평가: 송아지 설사병을 유발하는 살모넬라 균 감염에 의한 마우스 치사율 평가</li> <li>- 기능성 사료첨가제 제작 완료</li> <li>- 기전 및 효능 연구 완료</li> <li>- 사료첨가제 현장 임상</li> <li>- 사료첨가제 생산 및 판매전략 수립</li> <li>- 동물약품 제형연구 및 시제품 생산</li> <li>- 임상제형 품질관리 및 안정성 시험</li> <li>- 동물약품 허가서류 작성</li> <li>- 독성/안정성 평가</li> <li>- 동물약품 목적동물 임상시험</li> <li>- 중국 현지 임상시험 진행</li> <li>- 중국 허가등록 진행(사료첨가제)</li> </ul>

구분	내용
	<p data-bbox="331 309 488 344"><b>&lt;3차년도&gt;</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="360 367 1267 403">- 시제품의 품질관리를 위한 확립된 기시법에 따른 정량, 정성분석</li> <li data-bbox="360 425 995 461">- 시제품의 활성 효능 평가 및 작용 기작 연구</li> <li data-bbox="360 483 863 519">- 임상제형 품질관리 및 안정성 시험</li> <li data-bbox="360 542 847 577">- 동물약품 목적동물 임상시험 완료</li> <li data-bbox="360 600 1150 636">- 동물약품 허가용 자료수집 및 허가 진행(허가서류 제출)</li> <li data-bbox="360 658 612 694">- 사업화 전략구축</li> <li data-bbox="360 716 804 752">- 중국 현지 임상시험 진행 완료</li> <li data-bbox="360 775 687 810">- 중국 사료첨가제 등록</li> <li data-bbox="360 833 552 869">- 해외 마케팅</li> </ul>

## 제 2 절 목표달성 여부

<1차년도>

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
표준분석법 개발 및 원료 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>· IgY의 크기를 분리할 수 있는 HPLC용 column을 사용하여 분석 함.</li> </ul>	<p>IgY의 크기를 분리할 수 있는 HPLC용 Protein separation column을 사용하여 분석 함.</p> <p>Column내 완충제와 단백질 사이의 극성을 이용함.</p> <p>용매 2종류의 혼합비를 달리하여 극성을 조절 후 일정 용매비에서 용출된 단백질을 표준물질을 이용하여 정량 함.</p>
HPLC, GC 분석을 통한 원료의 표준분석법 개발, 원료 표준화 및 추출 공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 최적 원료 추출법 확립</li> <li>· 유효성분 함량 변화 분석</li> </ul>	<p>마치현의 뿌리를 제외한 지상부를 물로 깨끗이 씻은 후 건조한 건생약 20 g을 세절하고 질량대비 10배의 에탄올(50, 70, 100%)을 가하여 5시간이상 환류 추출하였음(75~80℃). 이 추출액은 10 μm 여과지로 여과한 후 감압농축(60℃)하고 각각의 추출물에 대한 수율 및 활성을 평가함. 확립된 분석법을 적용하여 국산(영천) 및 중국산의 마치현에 대한 HPLC 정성분석을 실시함.</p>
주관기관에서 선정한 추출분획에 대하여 지표성분의 성분 및 함량 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 성분규명: 지표성분 규명, 활성성분 규명, 원료생약 성분 규명</li> </ul>	<p>국내산 및 중국산 마치현 에탄올 추출물에 대하여 HPLC 분석결과 14, 17, 21, 23, 36분대에 관찰된 major 피크들에 대하여 확인결과, ferulic acid (17분), (7'S)-N-trans-feruloyloctopamine (21 분), (7'S)-N-trans-feruloylnormetane phrine (23 분) 및 daidzein (36분)으로 추정되며, 피크들을 분리 정제하여 구조 확인 중에 있음.</p>

<2차년도>

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
마치현 포함 최적 배합비 도출	<ul style="list-style-type: none"> <li>마치현을 포함한 항균, 항염, 면역활성 등 어미소, 송아지의 질병예방, 성장을 촉진할 수 있는 최적화된 소재의 복합비율 설정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>면역력 개선, 초유 성분을 강화할 수 있는 최적의 배합비 도출 완료</li> </ul>
기능성 사료첨가제 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>한국생명공학 연구원에서 기존 연구된 마치현을 포함한 천연소재 건조분말과 기타 원료들을 혼합하여 펠렛 형태의 첨가제를 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>마치현 및 IgY가 포함된 펠렛 형태의 기능성 사료첨가제 제작 완료</li> </ul>
기전 및 효능 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>복합 추출 배합물 및 시제품에 대한 기전 및 효능 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 제품에서 분리된 난항황체를 이용하여 대장균 1종, 살모넬라 2종의 성장억제 효능평가를 실시한 결과 모든 균주에서 성장억제 효과 확인 완료</li> </ul>
사료첨가제 현장 임상	<ul style="list-style-type: none"> <li>송아지 설사 예방 및 면역, 성장촉진에 대한 객관적인 데이터를 제시할 수 있는 기관에서 사양시험 진행</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>충남지역 한우농장에서 임신 중인 어미소에게 개발한 사료첨가제를 급여하여 첨가제의 성분이 송아지에게 전달되어 면역력 증가, 성장 촉진 효과 확인</li> </ul>
동물의약품 제형 연구 및 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>송아지에게 투여가 쉬우며, 약물전달에 최적화된 약물 전달 제형의 도출</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>액제(아이지가드 페이스트), 산제(아이지가드 파우더) 총 2가지 제형 도출 완료</li> </ul>
임상제형 품질관리 및 안정성 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>유효기간 설정</li> <li>제형 기준 설정 및 시험법 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>안정성 시험 및 가속시험 진행중</li> </ul>
동물의약품 허가서류 작성	<ul style="list-style-type: none"> <li>검역본부에 시험실시계획보고</li> <li>기원 및 개발경위</li> <li>원료 역사적 사용례 및 제품성분 사용례</li> <li>원료 제조공정/기준 및 시험법 자료</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>컨설팅 업체와 계약하여 허가서류 작성 진행중</li> </ul>
독성/안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>복합 추출 배합물 및 시제품에 대한 독성/안전성 평가 개시</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>시제품에 대한 독성/안전성 평가를 위해 연구실 수준의 설치류(마우스) 2주 반복투여 독성 시험을 수행함. 시제품 2종을 마우스에 2주 반복투여 시 2000 mg/kg 농도까지</li> </ul>

		사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 및 부검소견에서 이상소견은 관찰되지 않았음.
동물의약품 목적동물 임상시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 예방효과 및 치료제에 대해서는 호서대학교에 의뢰하여 시험에 대한 신뢰성을 확보하고 마케팅 및 동물의약품 등록을 위한 자료로 활용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 호서대학교에서 목적동물 임상시험 계약 및 진행중</li> </ul>
중국 허가등록 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 중국 내 제품등록을 위한 현지 파트너 이용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 현지파트너와 계약하여 허가 등록 진행중</li> </ul>
중국 현지 임상시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 중국 현지에서 송아지 설사병 효능에 대한 현지화 임상시험 진행</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 젓소 송아지 150두를 공시하여 1차 임상시험 완료 시험결과 대조군 대비 시험군에서 설사 예방에 탁월한 효과 입증 확인</li> </ul>
복합 추출 배합물의 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 주관기관에서 선정한 복합 추출 배합물에 대하여 항균 및 IL-6/STAT3 활성 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 복합 배합물 중 가드베타 A에서만 Staphylococcus aureus 에 대한 항균 활성을 나타냄</li> <li>• 4종의 복합배합물은 농도 의존적으로 IL-6에 의해 유도되는 STAT3 luciferase 활성을 저해함.</li> </ul>
선정된 복합 추출 배합물 성분분석/기시법 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HPLC, GC 분석을 통한 분석법 표준화 및 추출 공정 최적화</li> <li>• 주관기관에서 선정한 복합 추출 배합물에 대하여 지표성분의 성분 및 함량 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HPLC를 이용한 분석법 표준화를 위하여 feruloyl amide를 대상으로 validation method를 확립하였음. 직선성의 상관계수(R2)를 구한 결과 0.99로 측정되었으며, 검출한계(LOD)는 각각 0.00015 mg/ml, 0.00021 mg/ml로 정량한계(LOQ)가 각각 0.0005 mg/ml, 0.0007 mg/ml로 나타났음. 정확성을 위한 회수율 실험결과 화합물 1 와 2 모두 90 에서 110 사이 범위 안에서 계산되었었으며, 정밀성을 위한 intra-, inter-day의 RSD 의 값은 2% 이내로 확인되었음.</li> </ul>

		<p>이상의 Validation 실험 결과는 본 연구에서 개발한 분석법이 충분한 재현성과 정확성을 가진 것으로 확인됨.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 마치현 에탄올 추출물이 함유된 아이지가드 페이스트 A와 B에 들어있는 ferulic acid, N-trans-feruloyltyramine(1) 및 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine(2)의 함량을 분석한 결과, 아이지가드 페이스트 A 1g 에는 각각 6.4, 3.1, 2.6 µg이, B 1 g 에는 각각 6.3, 3.1, 2.5 µg이 함유되어 있는 것으로 확인하였음.</li> </ul>
<p>시제품의 in vitro 항염 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 주관기관에서 선정한 복합 추출분획 및 시제품에 대하여 항염 평가</li> <li>• 기존 IgY와 비교평가를 통한 효능 증가 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 선정된 마치현 추출물의 항염 활성 평가를 위해 NO 저해 활성과 IL-6 신호전달저해 활성을 평가하여 최종적으로 에탄올 100% 중국산 마치현추출물의 활성을 검증하였음.</li> <li>• 기존 IgY와 마치현이 함유된 시제품의 효능을 확인하기 위해 염증성 마우스모델을 이용하여 시제품이 600 mg/kg 농도에서 효능이 있음을 검증함.</li> </ul>
<p>시제품의 in vivo 항염 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 송아지 설사병을 유발하는 살모넬라 균 감염 마우스 모델 구축</li> <li>• 살모넬라 균 감염에 의한 마우스 치사율 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 살모넬라 균 감염 마우스 모델 구축을 위해 Salmonella typhimurium 균을 세균 수별로 마우스에 감염시켜 치사율을 평가함으로써 최종적으로 <math>6 \times 10^6</math> CFU/ml 의 세균을 복강 투여하는 마우스 모델을 구축하였음.</li> </ul>

<3차년도>

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
임상제형 품질관리 및 안정성 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>유효기간 설정용 안정성 시험</li> <li>제형의 기준 설정 및 시험법 개발(함량)</li> <li>안정성 시험 및 유효기간 설정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>동물용의약품 취급규칙 및 동물용의약품 안전성, 유효성 심사에 관한 규정을 토대로 완료하였으며 검역본부 허가 등록 진행 중</li> </ul>
동물의약품 목적동물 임상시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>국내목적동물 임상시험 실시</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>호서대학교에서 목적동물 임상시험 완료 (보고서 별첨)</li> </ul>
동물약품 허가용 자료 수집 및 허가 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>안전성(독성) 자료(최종 선정 생약기반 검역원과 최종 협의하여 결정)</li> <li>유효성(목적동물 Field 임상) 평가 자료</li> <li>검역본부 허가 진행</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>호서대학교 목적동물 임상시험 자료를 토대로 검역본부 허가 등록 진행 중</li> </ul>
사업화 전략 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>제품 생산 및 판매 계획 수립</li> <li>설비 확충 및 투자 전략 수립</li> <li>글로벌 동물의약품 판매회사 납품관로개척</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>펠렛 형태의 사료첨가제를 우선 출시하여 매출 창출 및 홍보 효과 극대화</li> <li>표준화 원료확보 및 대량 추출공정에 따른 투자 및 시설 확대</li> <li>국가별 상황에 맞는 이원화 정책을 통한 허가진행 효율 극대화 및 수출 증대 (허가를 받기 쉬운 지역부터 전략적으로 진행)</li> </ul>
중국 허가등록 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>중국농업부의 허가를 위한 현지 파트너 이용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>중국 현지 임상시험 자료를 토대로 현지 파트너를 이용하여 등록 진행중</li> </ul>
중국 현지 임상시험 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>중국 현지에 특화된 환경 및 원인균에 의한 송아지 설사병 효능에 대한 현지화 임상시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>중국 현지 임상시험 완료 (보고서 별첨)</li> </ul>
해외 마케팅	<ul style="list-style-type: none"> <li>한국 과 중국에서 실시한 임상시험 결과를 이용한 해외 현지화 효능 마케팅</li> <li>국제전시회를 이용한 제품전시 및 바이어 발굴</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(주)에드바이오텍이 기 보유하고 있는 축산관련 제품의 기존 판매망의 활용 과 국내외 시장조사를 통한 가격 및 제품 경쟁력을 바탕으로 신시장 개척</li> <li>임상시험 결과를 바탕으로 현지화 된 설사병 균주 및 원인에 대학 효능자료획득</li> </ul>
시제품 품질관리를 위한 정량, 정성 분	<ul style="list-style-type: none"> <li>주관기관에서 선정한 시제품 품질관리를 위</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>마치현으로부터 분리 정제한 Ferulic acid 와</li> </ul>

<p>석</p>	<p>해 확립된 기시법에 따른 HPLC, GC 분석을 통한 지표성분의 정량, 정성 분석</p>	<p>N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine을 지표성분으로 선정하여 주관기관에서 생산된 시제품인 분말상 제형의 아이지가드 파우더와 액상제형의 아이지가드 페이스트에 대하여 HPLC를 이용하여 정량분석을 실시하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 시제품에 대한 분석결과 지표화합물인 ferulic acid는 15분대에서 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine은 33분대에서 화합물이 검출되었으며, 아이지드링크 시제품 1 g에는 ferulic acid 및 N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine가 각각 13.2, 6.8 µg이 함유돼있는 것으로 확인되었음.</li> </ul>
<p>시제품의 활성 효능 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 동물의약품 시제품의 항균, 활성 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disk assay를 사용하여 항균 평가</li> <li>- IL-6/STAT3 luciferase assay를 통한 활성 평가</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 마치현이 함유된 아이지가드 파우더 시제품 및 아이지가드 페이스트 시제품에 대하여 원제품과 항균 활성을 비교한 결과, 마치현이 함유된 시제품에서 9종의 균주에 대한 항균활성이 우수한 것을 확인하였음.</li> <li>• 특히 마치현이 함유된 시제품의 경우 야생에서 분리된 균주인 <i>E.coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> 균주에서 항균활성을 가지는 것을 확인하였음.</li> <li>• IL-6/STAT3 luciferase의 저해활성을 확인해 본 결과, 지표성분으로 확인된 ferulic acid계의 화합물 2종이 농도의존적으로 저해활성이 있음을 확인하였음.</li> </ul>
<p>시제품의 작용 기작 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대식세포를 이용한 동물의약품 시제품의 항염 효과 검증</li> <li>• 동물의약품 시제품의 IL-6/STAT3 신호전달 저해 효과 검증</li> <li>• 구축된 살모넬라 감염 동물모델을 이용하여 시제품의 마우스 치사율 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 아이지가드 파우더 및 아이지가드 페이스트 제품 모두 대식세포의 NO 분비 저해 활성과 염증성 사이토카인 발현량을 억제하는 것을 확인하였음.</li> <li>• 시제품의 IL-6/STAT3 신호전달 저해 효과를 확인하기 위해 마치현에서 분리한 10종의 화합물의 IL-6 저해 활성과 2종의 JAK, STAT3, ERK 인산화 억제 활성을 확인하였음.</li> <li>• 살모넬라 감염 동물모델을 이용하여</li> </ul>

		시제품의 마우스 치사율을 평가하여 확인한 결과, 시제품 모두 마우스 생존율을 높이는 것을 확인하였음.
--	--	--

### 제 3 절 성과 달성 여부

1) 논문

학술지명 : Food Research International

논문명 : Portulaca oleracea extracts and their active compounds ameliorate inflammatory bowel diseases *in vitro* and *in vivo* by modulating TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  signalling

주저자 : 김예슬

출판일자 : 2018. 04. 01

ISSN : 0963-9969

임팩트팩터 : 3.52



## Portulaca oleracea extracts and their active compounds ameliorate inflammatory bowel diseases *in vitro* and *in vivo* by modulating TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ signalling



Yesol Kim<sup>a,1</sup>, Hyung Jin Lim<sup>a,b,1</sup>, Hyun-Jae Jang<sup>a</sup>, Soyoung Lee<sup>a</sup>, Kyungsook Jung<sup>a</sup>, Seung Woong Lee<sup>a</sup>, Seung-Jae Lee<sup>a,\*</sup>, Mun-Chual Rho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Immunoregulatory Materials Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongseup, Jeonbuk 56212, Republic of Korea

<sup>b</sup> Department of Bioactive Material Sciences, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 54896, Republic of Korea

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Portulaca oleracea  
Inflammatory bowel diseases  
*cis*-*N*-Feraloyl-3'-methoxytyramine  
Dextran sulphate sodium  
Mitogen-activated protein kinases

#### ABSTRACT

*Portulaca oleracea* L. (*P. oleracea*) is an herb that is widely used in traditional medicine to treat various diseases. However, its effects on inflammatory diseases, such as inflammatory bowel disease (IBD), are not yet well characterized. Here, we investigated the impact of the ethyl acetate (EtOAc) and ethanol (EtOH) extracts of *P. oleracea* on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses and phosphorylation of ERK, JNK, and p38 expression in RAW264.7 macrophages. In addition, the inhibitory effects of these extracts and fractions on 3% dextran sulphate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis were examined using an ICR mouse model. DSS-induced colitis, including body weight loss, reduced colon length, and histological colon injury, was significantly ameliorated in mice fed the *P. oleracea* extracts (200 and 500 mg/kg). In particular, *P. oleracea* extracts also inhibited pro-inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ) production in mice with DSS-induced colitis; the *P. oleracea* extracts displayed higher and/or similar inhibitory activity to sulfasalazine at high concentrations. Furthermore, the chemical structures of active compounds separated from the EtOAc extract of *P. oleracea* were elucidated using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (see Figure in supplementary materials), resulting in the identification of three known compounds. Among these active compounds, *cis*-*N*-feruloyl-3'-methoxytyramine (2) exhibited the strongest effects on preventing DSS-induced IBD in animal models. Thus, extract of *P. oleracea* and their active compounds represents a new therapeutic approach for patients with inflammatory bowel diseases.

2) 학술대회 발표

학술회의명 : KAIInternational Meeting 2017

발표제목 : Anti-inflammatory Effects of *Portulaca Oleracea* L. Extract on Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis Mouse Model

발표장소 : 세종대학교 컨벤션 센터

발표자 : 허가영



P-091

***Anti-inflammatory Effects of *Portulaca Oleracea* L. Extract on Dextran Sulfate Sodium-induced Ulcerative Colitis Mouse Model***

**Gayeong Hur, Hyun-Jae Jung, Yeon-Yong Kim, Seung-Woong Lee, Soyoung Lee\***

*Immunoregulatory materials research center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup, Korea*

*Portulaca oleracea* L. is a widespread medicinal plant. Many studies were reported that *Portulaca oleracea* L. extract (PLE) alleviated inflammatory disease including inflammatory bowel disease (IBD). However, the functional mechanism of anti-inflammatory effects of IBD is not clear. IBD is a group of inflammatory disease including Crohn's disease and ulcerative colitis. We used dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis mice model. In this study, the ameliorating efficacy of PLE on DSS-induced colitis mice was evaluated. 3% DSS and sulfasalazine or PLE were treated mice. The results showed PLE treated groups significantly ameliorated in weight loss, colon length reduction and histological changes. Histologically, the colon of PLE treated groups exhibited less epithelial cell shedding, crypt destruction and infiltration of inflammatory cells compared to DSS treated mice. Furthermore the concentrations of interferon- $\gamma$ , interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in serum were decreased in PLE treated groups. Consequently, these results showed that PLE ameliorated colitis in DSS treated mice. PLE could be a therapeutic natural material for ulcerative colitis.

**Keywords:** Anti-inflammation, Inflammatory Bowel disease, Ulcerative colitis, *Portulaca oleracea* L., Dextran sulfate sodium

### 3 특허

특허명 : 페루로일티라민 화합물을 포함하는 STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 용도

출원등록번호 : 10-2017-0179553

출원등록구분 : 특허출원

출원등록일 : 2017. 12. 26

#### 관인생략 출원번호통지서

출원일자 2017.12.26  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2017-0179553 (접수번호 1-1-2017-1290204-00)  
출원인명칭 한국생명공학연구원(3-1999-034166-5)  
대리인성명 안소영(9-2000-000155-5)  
발명자성명 노문철 이승용 이소영 이승재 정경숙 이우송 장현재 박찬선  
발명의명칭 페루로일티라민 화합물을 포함하는 STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 용도

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 116082-03-2-HD020

【부처명】 농림축산식품부(농림부)

【연구관리전문기관】 농림수산식품기술기획평가원

【연구사업명】 농생명산업기술개발사업(舊 농림기술)

【연구과제명】 송아지 설사병 예방용 사료첨가제 및 치료용 동물약품 개발을 위한 천연물 소재표준화 및 활성연구



Article

## Study of the UV Light Conversion of Feruloyl Amides from *Portulaca oleracea* and Their Inhibitory Effect on IL-6-Induced STAT3 Activation

Joo Tae Hwang <sup>1</sup>, Yesol Kim <sup>1</sup>, Hyun-Jae Jang <sup>1</sup>, Hyun-Mee Oh <sup>1</sup>, Chi-Hwan Lim <sup>2</sup>, Seung Woong Lee <sup>1,\*</sup> and Mun-Chual Rho <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Natural Product Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 181 Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeonbuk 56212, Korea; jthwang@kribb.re.kr (J.T.H.); yesolkim@kribb.re.kr (Y.K.); water815@kribb.re.kr (H.-J.J.); ohhm@kribb.re.kr (H.-M.O.)

<sup>2</sup> College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, 99 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 300-764, Korea; chlim@enu.ac.kr

\* Correspondence: lswdoc@kribb.re.kr (S.W.L.); rho-m@kribb.re.kr (M.-C.R.); Tel.: +82-63-570-5264 (S.W.L.); +82-63-570-5230 (M.-C.R.); Fax: +82-63-570-5239 (S.W.L. & M.-C.R.)

Academic Editor: Thomas J. Schmidt

Received: 16 May 2016; Accepted: 28 June 2016; Published: 30 June 2016

**Abstract:** Two new feruloyl amides, *N*-*cis*-hibiscusamide (**5**) and (7'*S*)-*N*-*cis*-feruloylnormetanephine (**9**), and eight known feruloyl amides were isolated from *Portulaca oleracea* L. and the geometric conversion of the ten isolated feruloyl amides by UV light was verified. The structures of the feruloyl amides were determined based on spectroscopic data and comparison with literature data. The NMR data revealed that the structures of the isolated compounds showed *cis*/*trans*-isomerization under normal laboratory light conditions. Therefore, *cis* and *trans*-isomers of feruloyl amides were evaluated for their convertibility and stability by UV light of a wavelength of 254 nm. After 96 h of UV light exposure, 23.2%–35.0% of the *cis* and *trans*-isomers were converted to *trans*-isomers. Long-term stability tests did not show any significant changes. Among all compounds and conversion mixtures collected, compound **6** exhibited the strongest inhibition of IL-6-induced STAT3 activation in Hep3B cells, with an IC<sub>50</sub> value of 0.2 μM. This study is the first verification of the conversion rates and an equilibrium ratio of feruloyl amides. These results indicate that this natural material might provide useful information for the treatment of various diseases involving IL-6 and STAT3.

**Keywords:** *Portulaca oleracea* L.; feruloyl amides; IL-6; STAT3; conversion study

특허명 : 송아지 소화기성 질병의 예방 또는 치료용 난황항체 제조방법, 이에 의해 제조된 난황항체 및 이의 용도

출원등록번호 : 10-2018-0167140

출원등록구분 : 특허출원

출원등록일 : 2018. 12. 21

### 출원번호통지서

출원 일자 2018.12.21  
특기사항 심사청구(유)공개신청(무)  
출원번호 10-2018-0167140 (접수번호 1-1-2018-1290000-27)  
출원인명칭 (주)에드바이오택(1-2004-046212-0)  
대리인명칭 특허법인다물(9-2006-100062-6)  
발명자성명 정홍길  
발명의명칭 송아지 소화기성 질병의 예방 또는 치료용 난황항체 제조방법, 이에 의해 제조된 난황항체 및 이의 용도

### 【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 116082-3  
【부처명】 농림축산식품부  
【연구관리 전문기관】 농림식품기술기획평가원  
【연구사업명】 농생명산업기술개발사업  
【연구과제명】 천연물기반 송아지 설사병 예방용 시료첨가제 및 치료용 동물 의약품 개발

### 【발명의 설명】

#### 【발명의 명칭】

송아지 소화기성 질병의 예방 또는 치료용 난황항체 제조방법, 이에 의해 제조된 난황항체 및 이의 용도{Manufacturing method of Immunoglobulin Y for preventing or treating calf digestive diseases, and Immunoglobulin Y thereby and the use thereof}

#### 【기술분야】

【0001】 본 발명은 송아지 소화기성 질병의 예방 또는 치료용 난황항체 제조방법, 이에 의해 제조된 난황항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 송아지 소화기성 질병 유발균 또는 바이러스 항원을 이용하여 이종항체를 제조한 다음, 상기 항원 및 이종항체를 결합시킨 복합체를 산란계에 접종함으로써 난황항체를 제조하는 송아지 소화기성 질병의 예방 또는 치료용 난황항체 제조방법, 이에 의해 제조된 난황항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

4 투자유치  
투자유치

투자기업	투자유치 금액
SBI 인베스트먼트(주)	28억원
HB 인베스트먼트(주)	10억원
STIC 인베스트먼트(주)	10억원
마그나 인베스트먼트(주)	10억원
총	58억원

1. '투자기업' 은 정관 및 내부규칙의 변경, 이사회 승인을 비롯하여 본 계약의 체결 및 유지를 위하여 '투자기업' 이 이행하여야 하는 모든 조치를 취하여야 하며, 추후 본 계약 내용변경 시 정관 은 동 변경사항에 따라 변경하여야 한다.

2. 본 계약에서 인정하는 경우를 제외하고 '투자기업' 과 이해관계인' 이 본 계약에서 행한 진술 및 보증이 주금의 납입기일 현재에도 그대로 진실 되고 정확하여야 한다.

3. '투자기업' 은 본 계약의 체결 이후 주금의 납입기일까지 자산, 부채, 자본의 동일성을 유지하여야 한다.

4. 본 계약에 따라 '투자자' 가 인수하기로 예정된 본건 우선주식의 발행을 금지하거나 제한하는 등 본 계약의 이행을 방해하는 소송 또는 기타의 절차(행정절차, 감사 등 포함)가 진행 중이거나 진행될 우려가 없어야 한다.

5. '투자기업' 은 본 계약의 이행과 관련하여 필요한 정부의 인허가 및 제3자의 동의 등을 획득하여야 한다.

**제4조 (주식 발행 및 인수조건)**

① '투자기업' 은 다음 각호와 같이 신주를 발행한다.

1. 기발행 주식의 종류 및 수 : 보통주 1,400,000주 (액면가 500원)

우선주 81,360주

2. 발행할 주식의 종류 : 기명식 상환전환 우선주

3. 발행할 주식의 총수 :

4. 일주의 발행가액 :

5. 발행할 주식의 총액 : 일금 이십팔억일만칠천구백사원(W2,800,017,904-)

② 제1항의 발행할 주식 중 '투자자' 는 다음 각 호와 같은 조건으로 동 주식을 인수한다.

1. 인수할 주식의 총수 : ;

2. 일주의 인수가액 : 일금 팔천칠백칠십육원

3. 인수할 주식의 총액 :

4. 주금 납입기일 : 2016. 11. 30. (절차상 필요할 경우 협의 후 조정)

③ '투자기업' 은 납입기일로부터 3 영업일 전까지 '투자자' 에게 주금의 납입을 위한 은행의 별단예금 계좌를 통지하여야 하고, '투자자' 는 납입기일까지 신주의 인수대금 전액을 '투자기업' 이 통지하는 은행의 별단예금 계좌에 송금하여야 한다.

④ '투자기업' 은 발행일에 신주를 발행하여 주주명부에 변동 사항을 기재하고 자본증가의 상업

## 5 고용창출

본 연구기술개발 과제를 통하여 총 4명의 신규인원을 고용하였다. 남은 8명은 과제 종료 후 고용 예정이다.

항목		성과	
고용 효과	과제 종료 전	연구인력	3 명
		생산인력	1 명
	과제 종료 후	연구인력	2 명
		생산인력	6 명
총		12 명	

성 명	소속/지위	참여기간	참여율
전 세 민	(주)에드바이오텍/과장	2016. 11 ~ 2018. 12	100%
이 상 화	(주)에드바이오텍/사원	2017. 01 ~ 2018. 12	20%
양 송 이	(주)에드바이오텍/주입	2018. 09 ~ 2018. 12	20%
MONY TAMANNA JAHAN	(주)에드바이오텍/대리	2018. 09 ~ 2018. 12	19%

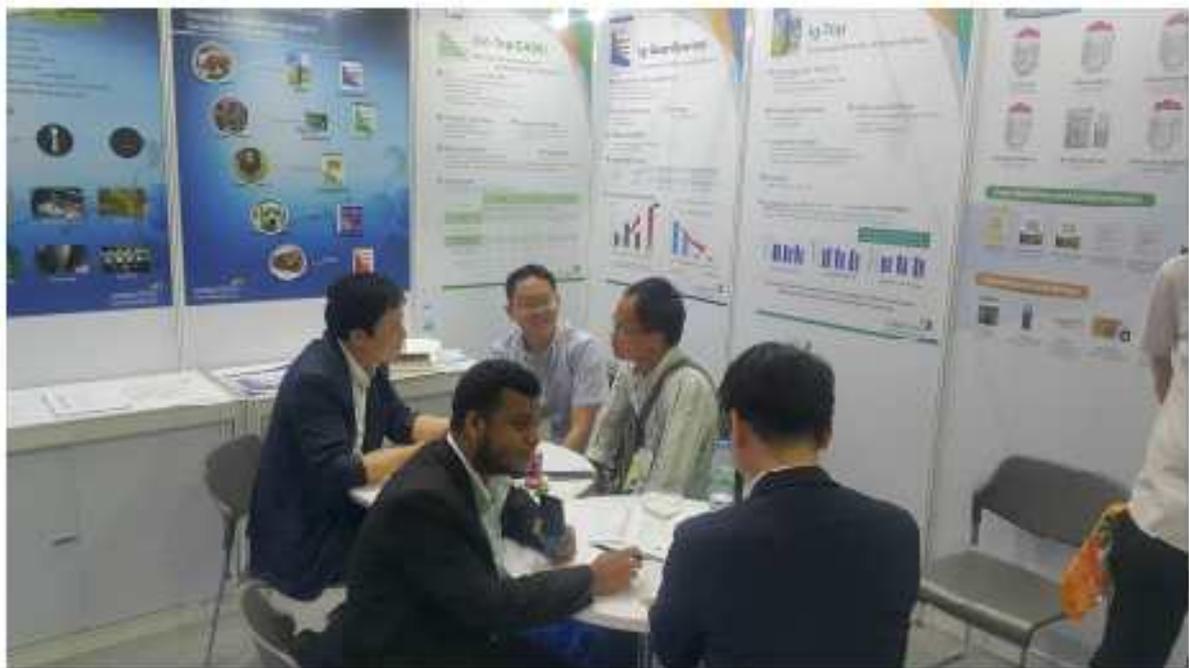
## 6) 홍보

### 가) 전시회 참석

- (1) 전시회명 : VIV ASIA 2017
- (2) 전시회 장소 : BITEC, Thailand
- (3) 전시회 일시 : 2017. 03. 15 ~ 2017. 03. 18
- (4) 전시회 참가 품목
  - Ig Guard Paste
  - Ig Guard Powder
- (5) 상담업체 수

일자	일반 상담	심화 상담	소계
2017. 03. 15	6	2	8
2017. 03. 16	7	2	9
2017. 03. 17	10	6	16
2017. 03. 18	5	2	7
합계	28	12	40

(6) 참가 사진



- (1) 전시회명 : Euro Tier 2018 exhibition
- (2) 전시회 장소 : Messe Hannover, Hannover, Germany
- (3) 전시회 일시 : 2018. 11. 13 ~ 2018. 11. 16
- (4) 전시회 참가 품목
  - Ig Guard Paste
  - Ig Guard Powder
  - Ig Top
- (5) 상담업체 수

일자	일반 상담	심화 상담	소계
2018. 11. 13	10	2	12
2018. 11. 14	8	3	11
2018. 11. 15	13	4	17
2018. 11. 16	8	2	10
합계	39	11	50

(6) 참가 사진





## 제 4. 장 연구결과의 활용 계획

### 제 1 절 사업화계획

모든 소 사육 농가에서 송아지 설사병 제어 제제는 지속적으로 수요가 발생하므로, 국내 다수의 소 사육 농가를 비롯한 중국, 인도 등 대단위 소 사육 국가를 대상으로 매출 극대화 세계 동물용의약품 시장은 지역적인 편중과 화학제제가 높은 판매 비중을 차지하고 있으나 지속적인 수요 확대와 인식의 변화로 인하여 항생제를 대체하거나 보완할 수 있는 제품에 대한 시장수요가 확대가 예상됨에 따라 지속적으로 준비하여 세계시장에 진입

(단위:백만원)		2018년	2019년	2020년	2021년	2022년	
동물 의약품	한국시장	9,570	9,570	9,570	9,570	9,570	
	시장점유율	8.0%	16.0%	24.0%	28.8%	34.6%	
	예상매출	765	1,531	2,296	2,756	3,311	
	일본 시장	11,550	11,550	11,550	11,550	11,550	
	시장점유율	1.0%	1.5%	2.3%	2.7%	3.2%	
	예상매출	115	173	265	311	369	
	중국 시장	301,650	301,650	301,650	301,650	301,650	
	시장점유율	0.3%	0.5%	0.7%	1.0%	1.5%	
	예상매출	904	1,508	2,111	3,016	4,524	
	기타 시장	2,571,150	2,571,150	2,571,150	2,571,150	2,571,150	
	시장점유율	0.05%	0.05%	0.10%	0.10%	0.20%	
	예상매출	1,285	1,285	2,571	2,571	5,142	
사료첨 가제	국 내	수량(톤)	9	18	25	40	50
		매출액	44	90	125	200	250
	해 외	수량(톤)	13	30	50	70	90
		매출액	64	150	250	350	450

#### 1. 일본

##### 가. Distributor 계약

- 일본 최대 동물약품회사이며 전세계 동물약품 11위인 교리츠 제약으로 연매출 5,000억 규모의 회사와 일본내 독점 계약 체결(2018)
- 자사 제품 기준으로 200만불 이상의 수출 예상이 기대됨(2019)

##### 나. 마케팅 및 영업 활동

- 북해도 및 규슈 지역을 중심으로 세미나 및 마케팅 활동
- 1개월 ~ 2개월 동안 농가에 무상 샘플 제공(2019.04 ~2019.05)
- One plus one 캠페인을 통한 농가 사용 저변 확대 → 효능의 구전 마케팅 실시

- 일본 내 유사 제품과의 비교 data 자료 작성
- 현지 목적동물 임상시험 진행(2020)

## 2. 중국

### 가. Distributor 계약

- 중국 산둥성에 소재한 Rise Long社와 딜러쉽 계약 체결 협의 중
- 협의 결과에 따라 중국 독점 계약 및 成별 계약 추진

### 나. 마케팅 및 영업 활동

- 중국 농림성에 제품등록 진행중(2018~2019)
- 중국에서 진행한 목적동물 임상 데이터 활용
- 중국 청도농업대학교와의 업무 제휴를 통한 전문성 인증
- 논문 및 세미나 발표
- 초기 육우 송아지 농가 위주 영업 진행
- 향후 유가공 업체가 보유하고 있는 젖소 송아지 농장 대상 영업 진행

## 3. 한국

### 가. 유통

- 자사 영업망을 통한 직접 유통
- 두가지 type의 제품으로 유통
- 가격별 동물용 의약품 및 사료첨가제 two track으로 진행

### 나. 마케팅 및 영업 활동

- 조달청 및 대리점을 통한 판매
- 농가 대상 세미나 개최
- 축산 단체(한우협회, 낙농육우협회 등) 홍보

<뒷면지>

주 의

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