

(옆면)

(앞면)

714001-07

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( ) 발간등록번호( O )  
농식품기술융합창의인재양성사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004200-01

천연물  
식의약  
소재  
산업화  
기반기술  
구축 및  
전문인력  
양성

# 천연물 식의약소재 산업화 기반기술 구축 및 전문인력 양성

2022.11.14.

2022

주관연구기관 / 단국대학교 산학협력단  
협동연구기관 / (주)파미니티  
협동연구기관 / 주식회사 네이처센스  
협동연구기관 / 중앙대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 주식회사 진셀바이오텍  
협동연구기관 / 전북대학교 산학협력단

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원



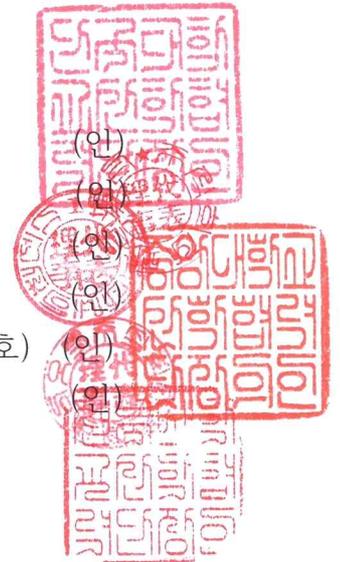
## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “천연물 식의약소재 산업화 기반기술 구축 및 전문인력 양성”(개발기간 : 2014.09.18. ~ 2022.03.17)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 11. 14.

주관연구기관명 : 단국대학교 산학협력단 (박재춘)  
협동연구기관명 : (주)파미니티 (이지원)  
협동연구기관명 : 주식회사 네이처센스 (김영자)  
협동연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (고중혁)  
협동연구기관명 : 주식회사 진셀바이오텍 (권태호, 김강호)  
협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단\* (조기환)



주관연구책임자 : 정윤화  
협동연구책임자 : 황철호  
협동연구책임자 : 홍준기  
협동연구책임자 : 전병주  
협동연구책임자 : 명순철  
협동연구책임자 : 권태호  
협동연구책임자 : 이경열

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.



최종보고서				보안등급								
				일반[○], 보안[ ]								
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명	사업명			농식품기술융합창의인재양성				
전문기관명		농림식품기술기획평가원			내역사업명							
공고번호		농림축산식품부 공고 제 2014- 170호		총괄연구개발 식별번호		714001-07						
				연구개발과제번호		714001-07						
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1801	60%	LB0303	20%	LB1705	20%					
	농림식품과학기술분류	PA0201	60%	RA0302	20%	PA0104	20%					
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문	천연물식의약소재산업화연구센터									
		영문	Research center for industrialization of natural nutraceuticals									
연구개발과제명		국문	천연물 식의약소재 산업화 기반기술 구축 및 전문인력 양성									
		영문	Industrialization and Education for Natural Nutraceuticals									
주관연구개발기관		기관명	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단			사업자등록번호						
		주소	(우)16890, 경기 용인시 수지구 죽전로 152			법인등록번호						
연구책임자		성명	정운화			직위		교수				
		연락처	직장전화				휴대전화					
			전자우편				국가연구자번호					
연구개발기간		전체	2014년 09월 18일 부터 ~ 2022년 03월 17일 까지 (7년 6개월)									
		단계 (해당 시 작성)	1단계	2014년 09월 18일 부터 ~ 2017년 09월 17일 까지 (3년)								
			2단계	2017년 09월 18일 부터 ~ 2022년 03월 17일 까지 (4년 6개월)								
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타( )				합계		연구개발비 외		
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	지원금
총계		6,798,000	233,050	2,097,450					7,031,050	2,097,450	9,128,500	(7,000,000)
1단계	1년차	975,000	33,400	300,600					1,008,400	300,600	1,309,000	(1,000,000)
	2년차	975,000	33,400	300,600					1,008,400	300,600	1,309,000	(1,000,000)
	3년차	975,000	33,400	300,600					1,008,400	300,600	1,309,000	(1,000,000)
n단계	1년차	812,000	27,830	250,470					839,830	250,470	1,090,300	(1,000,000)
	2년차	812,000	27,830	250,470					839,830	250,470	1,090,300	(1,000,000)
	3년차	785,000	27,080	243,720					812,080	243,720	1,055,800	(1,000,000)
	4년차	1,464,000	50,110	450,990					1,514,110	450,990	1,965,100	(1,000,000)
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고					
							역할	기관유형				
공동연구개발기관		단국대학교	황철호	교수								
공동연구개발기관		(주)파미너티	홍준기	연구소장								
공동연구개발기관		(주)네이처센스	전병주	연구소장								
공동연구개발기관		중앙대학교	명순철	교수								
공동연구개발기관		진셀바이오텍	권태호	대표이사								
공동연구개발기관		전북대학교	이경열	교수								
연구개발담당자 실무담당자		성명	김인용			직위		부교수				
		연락처	직장전화				휴대전화					
			전자우편				국가연구자번호					

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 11월 14일



연구책임자: 정윤희 (인)

주관연구개발기관의 장: 단국대학교 산학협력단

박재준 (직인)

공동연구개발기관의 장: (주)파미너티

이지원 (직인)

공동연구개발기관의 장: 주식회사 네이처센스

김영자 (직인)

공동연구개발기관의 장: 중앙대학교 산학협력단

고중혁 (직인)

공동연구개발기관의 장: 주식회사 진셀바이오텍 권태호

김강호 (직인)

공동연구개발기관의 장: 전북대학교 산학협력단

조기환 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		농림축산식품연구센터지원사업		총괄연구개발 식별번호			
내역사업명				연구개발과제번호		714001-07	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB1801	60 %	LB0303	20 %	LB1705	20%
	농림식품 과학기술분류	PA0201	60 %	RA0302	20 %	PA0104	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		천연물식의약소재산업화연구센터					
연구개발과제명		천연물 식의약소재 산업화 기반기술 구축 및 전문인력 양성					
전체 연구개발기간		2014년 09월 18일 부터 ~ 2022년 03월 17일 까지 (7년 6개월)					
총 연구개발비		총 9,128,500 천원 (정부지원연구개발비: 6,798,000 천원, 기관부담연구개발비: 2,330,500 천원, 지방자치단체: 0 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[O] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )	
연구개발과제 유형							
연구개발과제 특성							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	본 센터의 목표는 천연 식의약 산업화 기반구축과 핵심기술 개발 및 전문인력 양성임. 즉, 천연물 의약소재를 기능성식품 및 천연물식의약으로 인허가 제품화하여 국내외로 산업적가치를 창출하며, 융복합학문단위를 구축하여 이론과 실무적 역량을 겸비한 선도적 전문인력을 양성하고자 함. 이를 위한 전략적 연구 목표는 1)국내외 천연소재를 활용해 고령화 사회 문제를 해결하면서 산업적 가치가 큰 비노기건강, 탈모개선, 여성건강, 정신건강 등의 Health Claim에서 5종 이상의 기능성식품으로 연구개발 인허가 산업화 하고자 함. 2)미래가치가 큰 GMO 기술을 활용하여 1건 이상의 동물백신과 2종 이상의 생체유용 단백질을 대량생산, 95% 이상 고순도 분리하여 산업화 활용시스템을 구축하고자함. 3) 국내외 유용 천연 농업작물의 재배기술을 축적 보급하고 재배된 유용자원을 본 센터의 천연물로 대량공급하는 시스템을 구축하여 농업과 농가에 도움 됨. 4)천연물 식의약소재 산업화를 위한 인력 양성함					
	전체 내용	<p><b>1. 기능성식품이나 천연물식의약으로 연구개발 인허가 산업화</b></p> <p>1) 기존의 양적 구축의 유전자원 DB를 넘어 유효성과 산업적 가치를 갖는 천연물의 구축과 유효성 스크리닝 2) 병원특성화 센터사업 선행연구(보건복지부)를 통해 어느 정도 확인된 천연소재 중심으로 임상, 전임상, 기전 확인으로 효능 검증과 함께 신규천연물 유효성 검토함. 3) 유효성분의 추출공정 최적화 연구와 함께 지표설정 기준규격을 확립함 4) 국내외 기능성식품으로 인허가획득 및 제품화 산업화 5)내외 유용 천연의 재배기술을 확립 농가에 보급, 대량재배와 수매 등을 통해 지역 및 농업발전에 기여함.</p> <p><b>2. GMO 활용 백신, 유용 단백질 생산 및 대량 고순도 정제 등 산업화 시스템</b></p> <p>아직까지는 우리나라의 경우 기술적 제도적으로 GMO 산업화에 어려움을 겪고 있으나 향후 국가적 미래산업이 될 것임. 이에 GMO 관련 기반기술과 안전성 등 시스템을 구축하여야 함. 1) 이에 돼지설사항원(PEDV)을 식물발현 시스템으로 구축</p>					

		<p>및 발현시켜 동물백신으로 개발하고자 함. 2) 형질전환식물을 활용 EGF, 알부민 등 생체유용 단백질을 발현, 95% 이상의 고순도 대량정제시스템 구축함. 이처럼 GMO 활용 식의약으로 발전할 수 있는 산업화 체계를 구축하고자 함.</p> <p><b>3. 전문인력양성을 위한 학문교육시스템구축과 산업화 실무역량 강화체계구축</b></p> <p>본 연구센터는 천연물식의약소재 산업화를 위한 교육과정을 설치·운영하여, 선도적으로 학문교육체계를 구축하고 전문인력을 양성할 것임. 식품, 의약학, 생명공학, 경영마케팅, 제도법률을 아우르는 융복합 학문에 산업화 실무역량을 겸비하여 미래국가 역점사업인 천연물 식의약소재 산업을 책임질 수 있는 전문인력으로 육성할 것임.</p>
	1단계	<p><b>목표</b> 천연물 식의약소재 산업화 천연물 식의약소재 개발 천연물 식의약소재 산업화 전문인력 양성</p> <p><b>내용</b> 비뇨기건강개선 식약처 개별인정형 승인 탈모개선 식약처 개별인정형 승인 비뇨기건강개선 건강기능식품 제품화 3건 이상 탈모개선 건강기능식품 제품화</p>
	2단계	<p><b>목표</b> 천연물 식의약소재 산업화 전문인력 양성 산학연계 전문 인력양성 시스템구축 및 유효 천연물 선정 비뇨기 건강개선 식의약 인허가 및 산업화 여성 건강개선 식의약 인허가 및 산업화 탈모 건강개선 식의약 인허가 및 산업화 정신 건강개선 식의약 인허가 및 산업화 돼지 설사병 예방백신 GMO활용 유용단백질 대량생산 GMO 활용 생체유용 단백질 대량 고순도 생산 구축</p> <p><b>내용</b> 실무역량을 겸비한 전문인력 양성을 위하여 산학연 인력교류 시스템 구축 천연물 식의약 개발 의약품 융합전공 교육 과정 확립 및 국제 워크숍 개최 개발된 천연물 식의약, 건강기능식품의 국제화를 위한 효능 평가 연구 선정된 비뇨기 개선 천연물 소재의 개별인정형 신청 및 승인 비뇨기 건강개선 식의약 제품화·산업화 여성건강개선 개별인정형 승인 선별된 여성건강개선 천연물 소재의 제품화·산업화 탈모기능성 소재의 임상 효능평가 및 작용기전 규명 선정된 천연물 소재의 정신건강 개선 개별인정형 식약처 승인 선정 소재의 정신건강개선 임상효능 평가 및 작용 기전규명 식물유래 PEDV 항원단백질의 고순도 분리정제 조건 확립 식물유래 항원단백질의 효율증진을 위한 기술개발 식물유래 PEDV 항원의 돼지 적용시험 hEGF와 hSA의 대량 생산체계 확립 식물유래 성장인자를 이용한 시제품 개발</p>

연구개발성과	<p>1. 연구개발성과</p> <p>천연물 식의약소재 중 유효성과 산업적 가치를 갖는 유전자원의 데이터베이스 천연물의 구축과 유효성 스크리닝하고 병원특성화 센터사업 선행연구(보건복지부)를 통해 어느 정도 확인된 천연소재 중심으로 임상, 전임상, 기전 확인으로 효능 검증과 함께 신규천연물 유효성을 검증하였음. 유효성분의 추출공정 최적화 연구와 함께 지표설정 기준규격을 확립하였으며, 국내외 기능성식품으로 인허가획득 및 제품화 산업화를 수행하였다. 또한 GMO 관련 기반기술과 안전성 등 시스템을 구축할 필요에 따라 돼지설사항원(PEDV)을 식물발현 시스템으로 구축 및 발현시켜 동물백신으로 개발하였으며, 형질전환식물을 활용 EGF, 알부민 등 생체유용 단백질을 발현, 95% 이상의 고순도 대량정제시스템 구축하였다. 논문 56편, 특허 출원 50편,</p>
--------	---

	<p>등록 23편의 실적을 달성하였다. 사업화를 통해 982백만원의 매출실적을 달성하였다.</p> <p>2. 인력양성성과</p> <p>본 연구센터는 천연물식의약소재 산업화를 위하여 선도적으로 학문교육체계를 구축하고 전문인력을 양성하였다. 식품, 의약학, 생명공학, 경영마케팅, 제도법률을 아우르는 융복합 학문에 대한 필요과정을 포함한 교육프로그램을 통해 천연물 식의약소재 산업을 책임질 수 있는 전문인력으로 육성하였다. 산학연계 교육과 산업체 종사자, 건강기능소재 재배 농업인, 일반인 등을 각각 교육하였다. 총 사업기간 동안 천연물 식의약소재 산업화 인력양성 과제를 통해 79명의 대학원생을 배출하였다.</p>												
<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p>기능성식품/천연물식의약의 제품화를 통해서 국내외 목표가치 1,300억원 이상 추정 농가 유용작물 재배로 연 200명 이상의 고용창출 및 300억원 이상의 수익창출 수입대체효과/수출효과로 300억원 이상 국가적 수익효과</p> <p>천연물의 식의약소재로 연구개발 핵심기술 및 인허가 제품화 산업화 체계구축 전 세계 유용천연자원 확보 및 토착화, 재배기술 확립과 농가기술이전, 농업발전 노화억제, 만성질환 등의 원인적 장기적 치료예방대책 마련으로 보건의료 실현 선진국 대비 기술/제도 기반이 약한 GMO의 연구개발 산업화 시스템 강화 미래산업인 천연 식의약소재 산업화의 국가적 전문인력 양성으로 우리나라 생명산업경쟁력 강화</p> <p>유용천연작물 재배연계 의료관광, 요양, 힐링, 의농단지개발로 지역 및 농업발전</p>												
<p>연구개발성과의 비공개여부 및 사유</p>	<p>공개</p>												
<p>연구개발성과의 등록·기탁 건수</p>	<p>논문</p> <p>56</p>	<p>특허</p> <p>73</p>	<p>보고서 원문</p>	<p>연구 시설·장비</p>	<p>기술 요약 정보</p>	<p>소프트웨어</p>	<p>표준</p>	<p>생명자원</p> <p>생명 정보    생물 자원</p>		<p>화합물</p>	<p>신품종</p> <p>정보    실물</p>		
<p>연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황</p>	<p>구입 기관</p>	<p>연구시설·장비명</p>	<p>규격 (모델명)</p>	<p>수량</p>	<p>구입 연월일</p>	<p>구입가격 (천원)</p>	<p>구입처 (전화)</p>	<p>비고 (설치장소)</p>	<p>ZEUS 등록번호</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>식의약소재</p>		<p>천연물</p>		<p>전문인력양성</p>		<p>산업화</p>						
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Natraceutical</p>		<p>Natural substance</p>		<p>GMO</p>		<p>Professional manpower training</p>		<p>Industrialization</p>				



## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	13
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	33
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	42
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) .....	503
5. 연구개발성의 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	505
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획.....	506



# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 본 센터의 최종 목적은 천연 식의약 산업화 기반구축과 핵심기술 개발 및 전문인력 양성임
  - 천연물 의약소재를 기능성 및 천연물 식의약으로 인허가 제품화하여 국내외로 산업적 가치를 창출하며, 융복합 학문단위를 구축하여 이론과 실무적 역량을 겸비한 선도적 전문인력을 양성하고자 함
  - 국내외 천연소재를 활용하여 고령화 사회 문제를 해결하면서 산업적 가치가 큰 비뇨기 건강, 탈모개선, 여성건강, 정신건강 등의 Health Claim에서 5종 이상의 기능성 식품으로 연구개발 인허가 및 산업화 하고자 함
- 국내 비뇨건강 관련 시장
  - 배뇨장애로 인한 하부요로증상 경험에 대해 18세 이상 성인 2,000명을 대상으로 조사한 결과, 남성은 53.7%, 여성은 이보다 많은 68.9%로 전체의 61.4%인 절반 이상이 빈뇨, 야간뇨, 요절박, 요실금 등의 하부요로증상을 경험한 것으로 나타남.
  - 따라서 최소 여성의 경우 420만 명 이상의 비뇨기건강저하, 배뇨장애 환자가 있을 것으로 추정됨. 남성의 경우는 이보다 다소 적은 수가 예상되어 330만 정도로 추정한다고 하면 750 만 명의 수요를 확인할 수 있음.
  - 배뇨장애를 처음 겪게 되면 충격적이고 당혹스러우며, 정상적인 생활을 하기 어려울 경우도 있음. 요실금의 경우, 불편함과 수치심, 사회활동의 제약으로 인해 정신적인 장애가 유발할 수도 있어 요실금을 '사회적 암'이라고 부르기도 함. 또한 방치하게 되면 피부 질환 및 요로감염이 발생할 수 있고 심하면 변실금과 동반되는 경우가 있어 조기 대처가 매우 중요함.
  - 수치심으로 인해 구매로 이루어지는 경우가 적었던 과거와 달리 의식의 개선되고 있으며, 보다 편리한 유통방식과 전문가를 통한 의식재고와 연구 성과가 홍보 된다면, 엄청난 필요성과 구매력을 바탕으로 폭발적인 시장이 창출될 것으로 예상됨. 750만 명 중 기능성 식품을 구매할 비율을 5% 정도로 추정하면 38만 명의 잠정적 수요가 있으며, 연간 단 한 번의 구매만 가정해도 시장가치는 향후 3000억 원 정도이상 이를 것으로 판단됨.
- 여성 건강 관련 시장
  - 2013년 기준 국내 50대 이상 연령대의 여성은 전체 인구의 24%인 590명으로서 여성갱년기기 이후 다양한 증상으로 인해서 고통받는 여성이 50%로 이상으로서 300명임. 모두 본 과제 성과의 타겟 연령층이라고 생각됨. 총 여성갱년기 시장의 국내 시장은 2000억원 규모로 추정되며 매년 100% 이상 폭발적으로 성장하고 있음.
  - 노화에 의한 여성건강 개선 시장규모는 약 290억 달러(29조원)로서 매년 15%정도 증가되고 있으며 여성갱년기기 여성의 경우 외국의 국내 보다 더 높은 75% 이상의 여성이 증상을 호소하고 있음.
- 갱년기 여성 건강의 중요성
  - 현대사회에서는 여성의 다양한 사회활동 증가로 인해 여성의 위치가 가정에서 뿐만 아니라 사회적으로도 높아짐으로써 여성의 삶의 질이 국가·사회적으로 중요하게 됨. 그러나 평균수명의 연장으로 인해 현대 여성들은 생의 1/3 이상을 여성갱년기기 상태에서 지내게 되었고, 그럼으로 인해 여성갱년기기 후의 여성의 삶의 질을 향상시키기 위해 갱년기 여성 건강에 관한 관심이 고조되고 있음.
    - 미래가치가 큰 GMO 기술을 활용하여 1건 이상의 동물백신과 2종 이상의 생체유용 단백질을 대량생산하고, 95 % 이상으로 고순도 분리하여 산업화 활용 시스템을 구축하고자 함
    - 국내외 유용 천연 농업작물의 재배기술을 축적 보급하고 재배된 유용자원을 본 센터의 천연물로 대량공급하는 시스템을 구축하여 농업과 농가에 도움을 줌
    - 천연물 식의약소재 산업화를 위한 전문인력양성 교육과정을 개발하여 선도적으로 교육 체계를 구축하고 전문인력을 양성함



그림 1-1. 천연물 식의약소재 산업화 연구센터 개요도

## 1-2. 연구개발의 필요성

### ○ 천연물 식의약 소재 연구개발 산업화 필요성

-농업소재와 천연물을 활용한 식의약, 식의약 소재는 건강과 웰빙의 가치를 실현하는 가장 구체적인 방식으로 관련 산업은 **전세계의 국가적 역점사업**이 되고 있음. 세계 각국은 국가 신성장동력 창출의 기본소재이자 식량안보의 핵심인 유전자원의 확보와 보존에 막대한 노력을 경주하고 있고, 글로벌 농약·종자회사들은 기후변화에 대한 선제적 대응 차원에서 내재해성 유전자원 탐색에 몰두하고 있음. 우리나라의 경우 유전자원의 가치를 인식하기 전에 이미 많은 자원이 해외로 유출되었으며, 일부는 국내로 역수입되기도 하였음. 그러나 최근에는 유전자원의 중요성을 인식하고 유출된 유전자원의 반환과 함께 외국 유전자원의 수집에 눈을 돌려 세계 6위의 농업유전자원 보유국이 됨. 이를 활용한 보유 물질자원 식물의 실제 파삭 및 응용연구의 활성화, 고함유 기능성분 유전자원의 산업화 활용과 기능성 물질의 실용화, 식품소재 등 용도의 **다양화로 새로운 수요를 창출**하여야 함.

### ○ 비뇨기 건강을 위한 천연물 신약 개발의 필요성

- 배뇨장애는 3-6개월 정도 꾸준히 치료를 받아야 치료효과가 있는데, 위와 같은 부작용과 장기간 치료에 대한 부담으로 인해 장기간 치료하는 환자가 많지 않음. 대한배뇨장애요실금학회에서 과민성 방광 환자 108명을 대상으로 약물 치료 현황을 조사한 자료(2011)에 따르면, 이 중 3개월 이상 치료하는 비율은 10명 중 4명 이하, 6개월 이상 치료하는 환자는 10명 중 2명에도 못 미치는 정도였음. 치료 중단 시 재발확률이 60% 정도로 높음에도 불구하고, 다른 만성 질환인 고혈압·고지혈증이 3개월 이상 약물 치료 지속률이 70% 이상임을 감안할 때 과민성 방광의 약물 치료 지속률은 매우 저조한 상황임을 알 수 있음.
- 따라서 장기간 복용해서 부작용이 적으면서 효과가 의과학적으로 입증된 천연물 신약을 통한 접근이 필요함. 그러나 아직 비뇨기 건강을 위한 천연물 신약은 국내에서 개발되지 않았음.

### ○ 여성건강개선 식의약 개발의 필요성

- 갱년기로 인해 나타나는 피로, 중력 장애, 근력감소, 골다공증, 복부비만, 기억력장애, 불면증, 발열감, 성욕저하 등의 증상은 개인의 삶의 불편함을 초래할 뿐만 아니라 제대로 관리하지 못하면 비만, 당뇨, 심혈관질환, 고지혈증 등의 질병으로까지 이어질 수 있음. 실제로 다양한 대사증후군 증상을 갖는 중년여성의 경우 이미 갱년기 증세를 보이기도 함.
- 이러한 갱년기에서의 신체적·정신적 변화로 인해 삶의 의욕이 상실되고 삶의 질이 저하될 수 있음. 따라서 갱년기를 사전에 예방하고, 관리할 수 있는 천연물신약을 개발하는 일은 중년의 삶의 질을 개선하는 데 기여할 것으로 보임. 또한 중년의 삶의 질 개선은 자녀의 삶의 질에도 관여하여 한 가정의 행복에 직접적인 영향을 줄 수 있으며, 이를 통해 사회 전반적인 삶의 질을 개선시킬 수 있음.

### ○ 탈모 치료 천연물 식의약 개발의 필요성

- 탈모는 당장 치료가 되었다고 하더라도 환경이나 유전적 영향에 따라 언제든 다시 진행이 될 수 있음. 따라서 탈모증은 진행 초기부터 꾸준히 관리하는 것이 매우 중요함. 그러나 국내에서 가장 많이 판매되며 유일하게 미국 FDA 승인을 받은 경구용 탈모 치료제인 프로페시아의 경우에도 70~90%의 치료효과와 경구약 중 낮은 부작용이 보고되었음에도 불구하고, 발기부전, 성욕감퇴, 여성형 유방증 등 부작용이 나타났음. 실제로 미국 성의학저널 연구에 따르면 프로페시아 복용자의 96%가 3개월 이상 지속되는 성기능 장애를 겪었다는 보고가 있음.
- 또 다른 치료제인 아보다트의 경우에는 국내에서 진행된 임상 3상에서 디하이드로테스토스테론(DHT) 억제 효과가 90% 가까이 되어 피나스테리드보다 더 강력한 효과는 보였으나, 발기부전과 성욕감퇴, 여성형 유방증 등의 부작용은 프로페시아와 다르지 않음이 확인되었음. 특히 프로페시아와

달리 임신을 전제로 한 성관계를 준비하는 남성에게도 신중하게 복용할 것을 권장할 정도로 태아에 위험성이 있음.

- 외용제인 미녹시딜의 경우도, 미녹시딜 함유량이 높은 것을 사용할 경우 혈관이 갑자기 확장되어 혈압이 급격하게 저하될 수 있어 두통 등의 부작용이 나타날 수 있음.
- 따라서 장기간 복용 또는 외용하여도 안전하며, 효과적으로 탈모증을 꾸준히 치료할 수 있는 천연물 식의약 또는 식의약을 통한 접근이 매우 중요함.

#### ○ 정신건강개선 식의약 개발의 필요성

- 수도권에서만 스트레스로 인한 사회적 비용 손실이 연간 37.5조원으로 분석됨. 이는 2010년 GRDP (경상가격기준) 560.9조원의 6.7%에 해당하는 것으로 막대한 손실임. 스트레스로 인한 주민 1인당 생애 비용은 1억 1,594만원에 달할 것으로 예상됨. 수도권 주민의 스트레스로 인한 총 사회적 비용 중 스트레스 해소비용으로만 연간 13.4조원, 스트레스로 인한 생산성 감소비용이 연간 2.4조원에 달하여 스트레스로 인한 사회·경제적 손실이 큼.
- 치매 인식에 대한 조사('05년) 결과, 우리나라 노인들이 가장 두려워하는 질병으로 35.4%가 치매라고 응답함. 치매로 인한 연간 총 진료비는 2010년 8,100억원으로 노인성 질환 중 2위, 1인당 진료비는 연간 310만원으로 5대 만성질환보다 경제적 부담이 더 큰 질병임. 국가 총 치매 비용은 연간 8조 7천억원('10년)으로 10년마다 두 배씩 증가할 것으로 추정되어 2020년에는 18.9조원, 2030년에는 38.9조원에 이를 것으로 예상됨.
- 스트레스, 인지력 저하, 치매 등 다양한 정신건강의 저하로 개인의 삶이 저하되고, 그 뿐만 아니라 국가·사회적으로도 막대한 경제적 손실이 야기됨. 따라서 다양한 정신적 문제를 해결할 수 있는 정신건강 개선 식의약 소재의 개발이 필요함. 이를 위해 국내외에서 다양한 연구가 진행되고 있으나, 의 과학적으로 안전성과 유효성 모두를 검증받은 천연소재는 많지 않음. 특히 국내 농가에서 재배 가능한 소재를 활용하여 국내 농가산업을 함께 활성화시킬 수 있는 천연소재를 이용한 식의약 개발이 절실함.

#### ○ 천연물 식의약 소재 산업화의 농업 농가 발전에 기여

- 농민들에게 가장 필요한 것은 안정적인 수요를 예측하고 농산물을 생산하는 것. 실제 많은 농민들이 시장의 흐름을 예측하지 못하고 그림처럼 생산하는 것만도 못한 농산물을 재배하는데 인력과 경비를 소모하고 있음. 따라서 농민들은 지속적으로 국가에 안정적인 수요를 만들고 고부가가치를 창출 할 수 있는 작물을 요구하고 있음. 본 센터과제는 다음과 같은 농민들의 요구를 충족시켜 줄 수 있는 새로운 천연 작물을 선정하고 제품화·산업화함으로써 농가 소득과 행복에 기여할 수 있을 것임. 더욱이 본 센터 참여 기업은 국가과제를 통해 개발된 국내 작물을 제품화하여 실제 농가에 천연물 경작을 유도하고 소득으로 연결될 수 있게 지원하고 수매하고 있음. 따라서 농업생명산업의 첨단화가 농가와 농업발전에 실질적으로 기여할 본 센터에 대한 지원이 절실히 필요함.
- 농생명소재 분야는 국가차원에서 지원·육성해야 할 대상으로 지정하고 있으며, 농업생명소재 산업은 농학, 식품학, 의약학, 화학공학, 제도, 산업화등 산학연 의 집단 연구여야만 하므로 센터설치가 절실함.

#### ○ 천연물 식의약 연구개발 융복합 과정 교육의 필요성

- 우리나라에 전통 한의학과 생약연구의 오랜 역사로 많은 정보와 자원이 축적되어 있으나, 아직까지 과학화 및 산업화가 미흡한 실정이며, 세계 시장에 진출하기 위해서는 천연물 식의약의 과학적 연구를 체계화하고 산업화로 연결 할 수 있는 체계적인 시스템 확립과 인력양성이 절실히 요구되고 있음.
- 미래의 신성장동력산업으로 학문적발전과 실무적 역량을 갖춘 인재양성이 절실함. 그럼에도 현재 전문

가기업체 및 정부출연연구소의 연구인력은 미흡하여 현재 그 관심도가 급증하고 있으며, 앞으로 연구 인력의 수요를 충족하기 위하여 학제적 연구의 활성화를 통한 인력양성의 저변확대가 시급함.

- 천연물 과학분야의 석,박사 과정 및 박사후 과정의 제도 활성화 등 전문연구 및 교육 인력의 양성이 필요함. 따라서 우수연구센터 지원확대, 해외 중진급 연구 인력의 단기국내 방문 연구 등 적극적인 유치 활용방안이 모색(관련 연구기관의 인력 확충) 되어야 함.

#### ○ GMO 활용 식의약 소재 개발의 필요성

- GM작물은 처음 상업화가 시작된 1996년부터 재배면적이 매년 지속적으로 증가되어 2011년에는 94배 증가하여 재배되었으며, 이러한 증가는 현대 경작 기술 역사에서 가장 빠르게 채택된 작물 기술임. 이러한 사실은 GM 작물이 잠재력이 있고, 안정적이며, 지속적인 사회적, 경제적, 환경적인 이익을 제공하고 있다는 것을 반영함. 그러나 GM 작물이 인체 및 환경에 미칠 수 있는 잠재적인 위해성에 대한 우려도 지속되고 있는 실정임. 우리나라도 GM작물 개발에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며, 수년안에 상업화에 이를 것으로 전망되고 있음. 따라서 **GM 및 non-GM 기술을 활용한 천연물 식의약, 식의약 소재 연구 개발 산업화가 절실히 필요함.**
- 전반적으로 우리나라의 분자농업 관련 기술적 수준은 미국, 일본 등 과 비교하여 동등 또는 일부 우세로 판단되고 있으나 산업화 부분에서는 분자농업 관련 GMO식물을 재배할 방안이 없어 우수한 연구결과를 확보하고도 일본에 뒤처지고 있는 실정임으로 우리나라도 우수한 분자농업 관련 연구결과를 활용 할 수 있도록 분자농업 상용화 식물공장 운용기술 확립 및 산업화 기술의 확립이 시급하며 식물공장을 활용한 산업화의 기반을 구축한다면 분자농업 분야에서 세계적인 기술 우위를 확보 할 수 있음.

-

#### ○ 국내외 천연물 식의약 시장 및 개발 현황

##### • 국외 천연물 식의약 시장 및 개발 현황

- “천연물 식의약”이란 천연물 성분을 이용하여 연구·개발한 의약품으로서 조성성분·효능 등이 새로운 의약품을 뜻함.
- 2011년 세계 제약시장 규모는 9,422억달러로 전년 대비 5.1% 성장했음 (2012년 보건산업백서, 보건산업진흥원).
- 천연물식의약은 전체 의약품 시장에서 아직까지는 큰 규모는 아니지만, 꾸준히 상승세를 보이고 있음. 전 세계 천연물식의약 시장의 규모는 23조원 이상으로 추정되고 있으며, 천연물식의약 시장은 연평균 30% 이상의 가파른 성장률을 보이고 있어 꾸준히 시장이 커질 것으로 보임.
- 1981년도부터 2010년까지 세계 의약품 시장의 전체 신규 화합물을 분석한 결과, 천연물 유래 화합물을 직접 이용하는 것(N)이 4%, 천연물 유래 화합물(ND)이 22% 이며, 약리단(pharmacophore)이 천연물 유래인 것(S\*), 천연물을 모방한 것(NM) 등을 모두 합하여 천연물 유래 화합물이 전체 신규 화합물의 50%를 차지함.
- 시장분석에 따르면, 블록버스터급 천연물식의약 개발에 성공할 경우 천연물식의약 1개로 연간 1조원 이상의 매출과 20~50%의 순이익 창출이 가능할 것으로 전망되고 있음. 따라서 글로벌 제약사들도 천연물식의약 개발 연구에 투자를 아끼지 않고 있음. 세계 1위 제약사인 화이자는 2006년 식물과학연구소를 설립해 식의약후물질을 발굴하기 위해 연구하고 있음. 또한, 머크, 릴리 등 유수의 다국적제약사들도 관련 노력을 하고 있으며, GSK는 천연물식의약 벤처회사를 인수하여 연구개발에 힘쓰고 있음.

##### ① 미국

- 미국의 1호 천연물식의약인 Veregen은 2006년 FDA 승인 이후에 미국, 스위스, 독일, 오스트리아 등 여러 국가에서 시장을 확장하며, 연매출 1,700만 달러를 기록하며 연평균 158%의 높은 성장률로 성장하고 있음.

## ② 유럽

- 유럽은 천연물의약품의 역사가 길지만 90% 이상이 OTC 의약품이며, 전문의약품의 비중은 낮은 편임. 또한 상당 국가에서 천연물의약품 매출이 감소하고 있어 천연물의약품에 대한 시장 전망이 부정적이기도 하였으나, 최근 유효성 입증에 대한 과학적 근거가 부족한 제품들의 퇴출되며 유효성 및 안전성이 과학적으로 입증된 천연물 식의약에 대한 기대가 높아지고 있음.
- Sativex를 비롯한 과학적 근거에 입각해 개발된 2세대 천연물식의약이 높은 매출 성장을 기록하고 있으며, 향후에 2세대 천연물 식의약 위주로 시장이 재편되면 유럽 천연물의약품 시장은 양적, 질적으로 성장할 것으로 예상됨.

## ③ 중국

- 중국의 천연물의약품(TCM, Traditional Chinese Medicine)의 경우 전체 의약품 시장의 22.7%를 차지하고 있으며 전문의약품이 높은 비중을 차지하고 있음. 최근 5년간 연평균 35%의 고성장을 기록해왔으며 정부의 육성 정책, 천연물 개발사들의 현대화 노력, 처방 천연물의약품의 보험 급여, 인프라 확장, 환자들의 천연물 의약품에 대한 긍정적 인식 등으로 인해 향후 그 성장세가 지속될 것으로 보임.
- 특히 중국에서는 천연물의약품이 합성의약품과 대등한 치료제로 인식되고 있으며, 경구 뿐만 아니라 경피, 주사제 등 다양한 제형으로도 사용되고 있음. 중국에서는 풍부한 과거 천연물 사용 지식을 바탕으로 천연물의약품의 경쟁력을 구축하고 미국, 유럽 등 선진국 시장 진출을 계획하고 있음.

## • 국외 천연물 식의약 시장 및 개발 현황

- 2011년 국내 제약시장은 18조 9,438억원으로 전년 대비 0.2% 성장했음 (2012년 보건산업백서, 보건산업진흥원).
- 보건복지부가 2010년 가을 국회에 제출한 “보건복지부 지원 식의약 누적매출액” 자료에 따르면 총 17개의 국내 개발 식의약 중 천연물식의약의 매출액 비중이 상당히 높으며 파급효과가 높은 것으로 보고됨. 따라서 천연물식의약 연구개발 분야는 변화하고 있는 제약시장에서 향후 큰 이익을 도출해 낼 수 있는 시장임.
- 현재까지 국내에서 개발에 성공한 식의약은 34개이며, 이 중 천연물식의약은 8개로 약 24%를 차지하는데, 이 중 2011~12년에만 5건이 허가되어 2001년 천연물연구개발촉진법 이후 꾸준히 진행되었던 천연물식의약 개발의 성과가 나타나고 있음. 2010년에만 국내 의약품 시장에서 동아제약의 스티렌이 750억, SK케미칼의 조인정이 250억원을 판매하여 2개 제품만의 매출액이 1000억원을 넘었음. 2010년까지의 누적 매출로는 천연물식의약 1호인 SK케미칼의 조인스정이 1,300억원, 동아제약의 스티렌이 4,000억원의 누적매출을 보였음.

**<천연물식의약 국내 허가현황, 출처: 식품의약품안전처>**

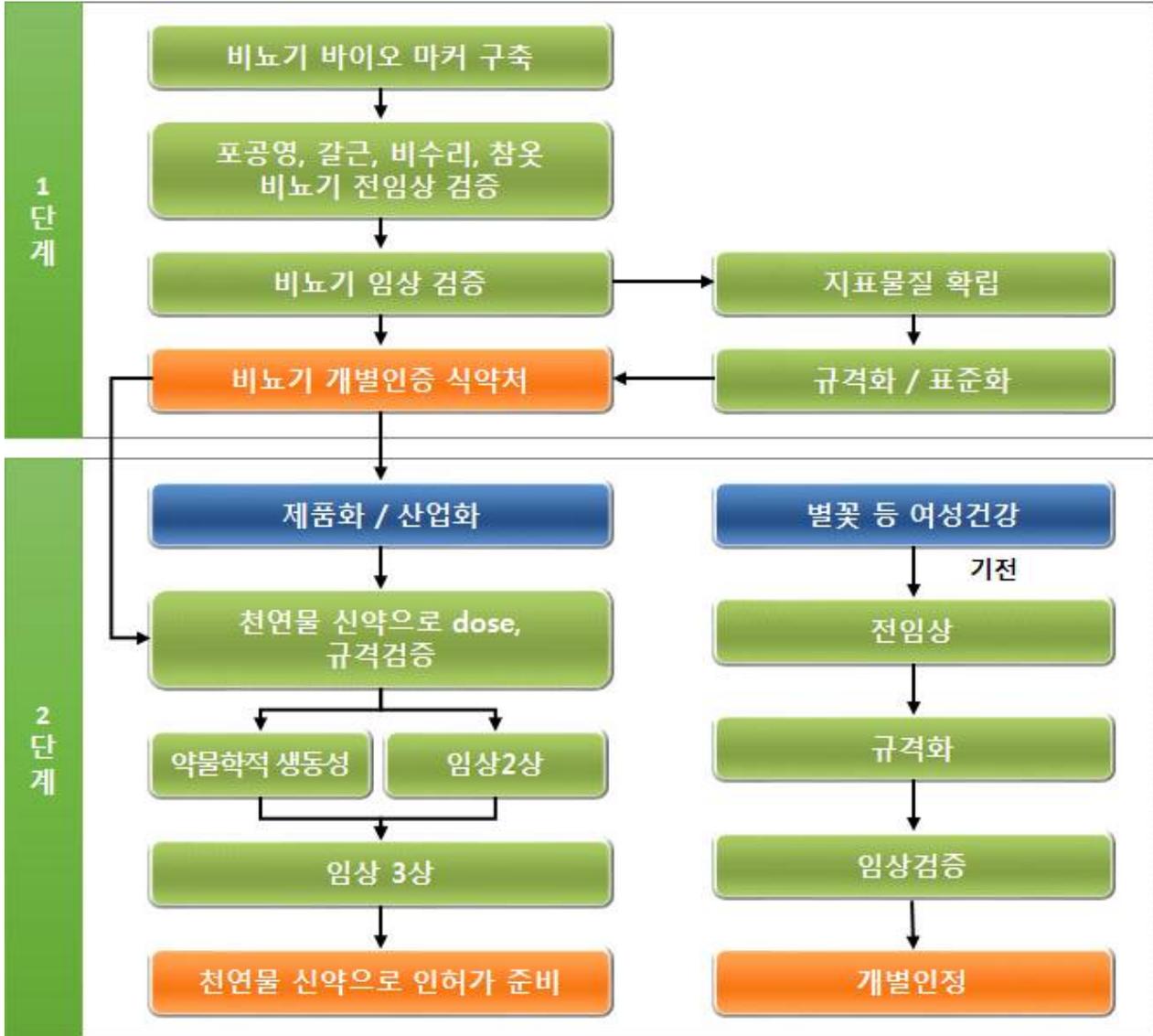
제품명	기업명	적응증	주요성분	허가일자
조인스정	SK케미칼	골관절증	위령선, 팔루근, 하고초	2001.07.
스티렌정	동아제약	위염	애엽	2002.06.
아피톡신주	구주제약	골관절염	봉독	2003.05.
신바로캡슐	녹십자	골관절증	구척, 오가피, 우슬 등	2011.01.
시네츄라시럽	안국약품	기관지염	아이비엽, 황련	2011.03.
모티리톤정	동아제약	기능성 소화불량증	견우자, 현호색	2011.05.
레일라정	한국피엠지	골관절증	당귀, 목과, 방풍 등	2012.03.
유토마외용액	영진약품	아토피 피부염	돼지폐 추출물	2012.11

• 국내외 건강기능식품 시장 현황

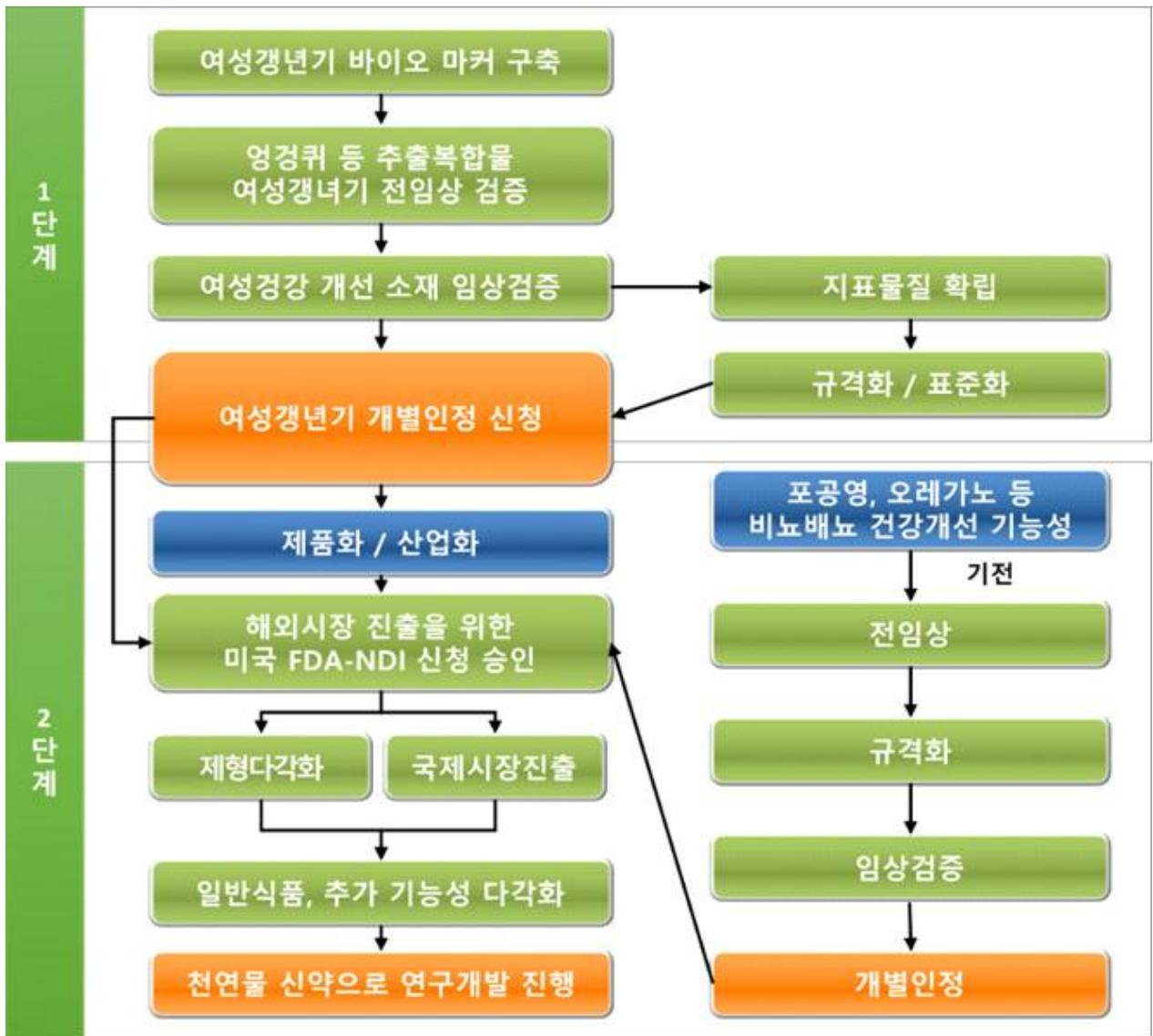
- 식품의약품안전처 자료(2013)에 의하면, 2012년 건강기능식품 생산실적 분석 결과, 총 생산액이 12조4,091억원으로 2011년(1조3,682억원) 대비 3% 증가한 것으로 나타남. 이는 전년 생산액 증가율이 28.2%인 것과 비교하면 성장률이 둔화되었다는 결과임. 이는 2012년 국내·외 전반적 경기 침체에 따른 건강기능식품 수요 감소 등의 이유로 인한 것으로 보임. 그러나 건강기능식품 중 개별 인정형 제품은 오히려 성장세가 계속 되고 있는 것으로 나타남.
- 세계 건강기능식품 시장은 2007-2011년 연평균 5.5%의 지속적인 성장을 하고 있으며, 세계적인 웰빙 트렌드의 확산과 고령화의 영향으로 높은 성장세를 유지할 것으로 예상되어 2016년에는 1200억 달러에 미칠 것으로 전망되고 있음. DataMonitor(2011)의 자료에서 글로벌 식품산업의 최근 5년간 연평균 성장률이 3.7%임을 감안할 때, 건강기능식품 시장의 성장세는 상당히 높은 것으로 파악됨.
- 국가 및 지역별 2011년 매출액에서는 미국이 29,242백만 달러로 가장 높으며, 2위는 서유럽이 15,657백만 달러로 나타남. 아시아 시장에서는 중국이 10,639백만 달러로 가장 큰 시장을 나타내고 있으며, 국내 건강기능식품 시장은 세계 시장에서 1.4%의 비중이지만, 전년 대비 성장률이 28.2%로 매우 높게 나타나 꾸준한 상승세로 세계 시장에서 성장하고 있음.

### 1-3. 연구개발 범위

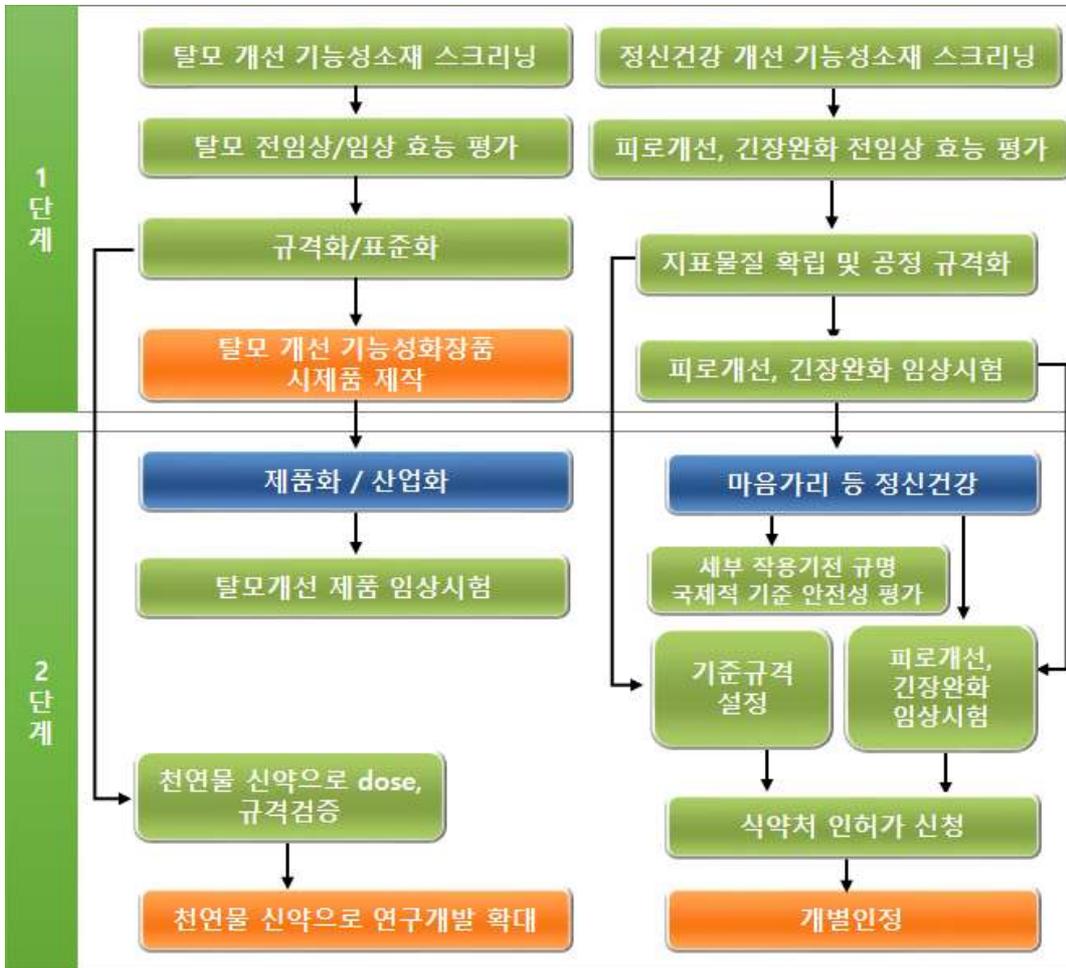
- 비뇨기 건강 개선 및 질환치료 천연물 식의약 소재의 임상효능평가
- 비뇨기 건강개선 식의약소재의 제품화 및 산업화
- 비뇨기 질환 치료 천연물 식의약 개발을 위한 포공영 임상시험계획 IRB 승인



- 여성 갱년기 기능소재의 작용기전 규명 및 임상효능평가
- 여성 갱년기 기능소재의 인정신청
- 여성 건강개선 식의약소재의 제품화 및 산업화



- 탈모 개선 및 정신건강 개선 기능소재의 작용기전 규명 및 임상효능평가
- 탈모 개선 및 정신건강 개선 소재의 표준화 및 규격화
- 탈모 개선 및 정신건강 개선 식의약소재의 제품화 및 산업화



- 정신건강개선 소재 스크리닝을 통한 기능성소재 후보 선정
- 비뇨기개선 소재 스크리닝을 통한 기능성소재 후보 선정
- 식물유래 PEDV 항원 단백질의 대량배양 및 분리정제 조건 확립
- 식물유래 hEGF 및 hSA의 고순도 분리정제 체계 확립

○ 천연물 식의약소재 산업화 전문인력 양성

- 천연물 식의약 전문인력 양성을 위한 교육과정 설치
- 산학연계 프로젝트/산업체 현장교육 강화로 전문성 강화

○ 형질전환 식물을 이용한 돼지 설사병 예방백신 개발

- PEDV 항원 유전자가 도입된 형질전환 담배의 homo line 선발 및 세대전개
- Viral vector를 이용한 PEDV 항원단백질의 대량생산 조건 확립
- 벼 현탁세포배양을 이용한 PEDV 항원단백질의 대량배양 조건 확립
- 식물유래 PEDV항원단백질의 분리정제조건 확립
- 형질전환 담배의 환경위해성 평가
- PEDV 항원단백질의 대량생산조건(항원 단백질 1g/batch) 확립
- 항원 흡수증진을 위한 기술개발
- 식물유래 PEDV 항원의 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지) 적용시험
- 적정 항원 투여농도(경구 및 주사) 규명과 적정 제형 완성

○ 형질전환 식물을 이용한 비동물성 성장인자 생산

- hEGF와 hSA의 유전자 발현 벡터 제작 및 식물세포주 구축
- hEGF와 hSA를 발현하는 *N. benthamiana* 대량 재배 시스템 확립

- 현탁세포주 구축 및 단백질 분리정제 체계 확립
- 순도 90% 이상 분리 정제된 식물유래 hEGF와 hSA의 생물학적 활성 확인
- hEGF와 hSA의 대량 생산체계 확립
- 벼 현탁세포 유래 hEGF와 hSA의 endotoxin 정량을 통한 QC 체계 확립
- 벼 현탁세포 유래 hEGF와 hSA의 표준 생산공정(SOP) 확립

## 1-4. 국내외 기술개발 동향

### ○ 식의약 산업 국내외 동향 및 전망

- ‘식의약’이란, 식품, 의약품, 의약외품, 화장품, 의료기기를 통합한 용어이며, 이러한 산업분야를 종합적으로 ‘식의약 산업’이라고 함.

- 세계 건강기능식품(supplements) 시장은 약 7%의 성장률로 성장하여 2015년에는 1,179억달러로 추산되며, 2020년에는 1,677억달러로 형성될 것으로 예상됨.



그림1-2. 국가별 건강기능식품(supplement) 시장 규모 및 전망

(출처: Nutrition Business Journal, NBJ' s global supplement & nutrition industry report, 2014)

- 우리나라 약용식물은 활성이 뛰어난 자원이 많아 이를 활용한 기능성 식품 신소재 개발에 대한 국민적 요구가 매우 크다. 또한 전통의약 지식분야에서 외국과 비교하여 상대적 우위 확보로 국제 경쟁력 제고가 가능하며, 국내 천연물식의약 연구에 필요한 잠재력이 충분히 있어 국가지식기반 산업으로 육성 가능함.
- 우리나라 천연물 식의약소재 산업의 범세계적 발전을 위해서는 우리나라내의 천연자원 뿐 아니라 세계로 진출할 천연물 유전자원의 확보와 연구개발 역시 중요함. 따라서 국내외 유전자원의 DB구축과 그 활용성을 높이는 것 역시 매우 중요함.
- 미국, 일본, EU 등 선진국들은 생명자원 R&D 국가전략을 수립하여 생명자원소재 개발을 국가 최우선 기술개발과제의 하나로 추진하고 있음. 향후 바이오테크놀로지는 농업(4%→36%)과 산업(2%→39%) 분야가 75% 경제적 기여를 할 것으로 OECD는 예상하고 있음. 차세대 국가 성장 동력 확보를 위한 생명자원 선점의 글로벌 경쟁이 심화되고 있고, 생명자원 활용 사업의 최우선적 추진이 필요함.
- 바이오의약품 개발 전문 인력은 국가 수요의 60% 수준(2008년 미래산업 핵심인재 육성사업계획)으로 다른 생명공학 인력에 비해 턱없이 부족한 상황이며 대부분 정규교육과정을 이수한 연구인력이 산업체와 연구소에서 채용된 이후에 자체 재교육을 통해서 현장전문가로 양성해야 되기 때문에 시간과 경비가 두 배로 소모되고 있는 상황
- 국가 산업발전법 제 38조에 의해 2009년부터 시작된 미래창조과학부의 바이오의약품 전문인력교육 국가지원이 5년간의 진행되고 있으며 매년 바이오식품, 의약품 개발 관련 전문 인력을 약 2810명 양성하고 있지만 지원사업이 종료되는 2014년 이후로는 국가지원을 통해 체계적이고 지속가능한 바이오의약품 전문인력 양성기관이 새롭게 필요한 상황임.
- 이미 세계적 제약기업과 선진국은 천연물 식의약 개발을 위하여 87억달러 (8조7000억원)를 연구투자에 투자하고 있음.
- 국내의 우수한 천연물 자원과 오랫동안 축적된 전통 지식을 활용할 수 있는 국내 여건이 마련되어 있기 때문에 국내 천연물 식의약 소재 개발은 기존의 글로벌 제약기업과 현격한 격차를 극복하고 세계적인 식의약개발을 이루기 위한 가장 좋은 전략이 될 수 있음.

### ■ 연구 개발과 산업의 문제점

- 국내 천연물 식의약 소재 개발은 지원과 성과에 있어서 선진국들에 크게 뒤쳐져 있는 상황임. 특히 천연물 식의약 소재를 스크리닝하고 임상효능평가를 진행하는 기술력이 선진국에 비해서 약 70% 수준으로 개발 전문인력이 매우 부족한 상황.
- 국내 천연물 식의약으로 허가 받은 경우도 대부분이 2년차를 넘어가지 못하고 허가가 취소되고 있는 상황.
- 세계적인 제약기업은 R&D 투자로 매출액의 10~25% 수준으로 제약산업을 국가 전략산업으로 집중 육성하고 있으며 지속적인 발전을 위해서 연구개발과 전문인력 양성에 대한 대규모 투자가 필수라는 사실을 인식하고 있지만 국내 기업들은 글로벌 제약 기업에 비해 연구개발비용 뿐만 아니라 식의약개발 노하우에 있어서 많이 부족한 상황에서 투자 규모도 매출액의 5% 내외로 총 4000억 수준(료슈의 한해 개발비가 8조 7000억, 1/20 수준)으로 선진국과의 기술력 차이가 점차 벌어지고 있는 상황임.
- 선진국보다 낮은 의약품 허가제도의 기준과 한미 FTA 체결을 통한 한계 설정, 천연물 대부분을 수입에 의존, 합성의약품 규정 적용을 통한 허가기관의 경직성
- 사회적으로 천연물의약품에 대한 부정적인 언론보도와 개발을 위한 산학연 네트워크 구축 부족 그리고 기술적으로 세계 기술수준에 매우 부족함.

○ 건강기능식품 및 천연물 식의약 현황

- 2013년 식약처 발표에 의하면, 건강기능식품 전체 생산 시장은 1.35조원으로 최근 5년 연평균 14.33%의 성장률로 꾸준히 상승하고 있음(2012년 건강기능식품시장). 건강기능식품 생산액은 1.05조원으로 전년대비 5.30% 증가하였음.
- 그럼에도 불구하고 수입대비 수출은 턱없이 부족하고 우리나라 시장자체도 외국의 연구성과에 따른 소재들로 장악되어 질적인 부분에서 열악한 상황임.

뿐만아니라, 지나치게 홍삼등 일부 품목에 집중되어 우리나라 천연 식의약 소재의 연구개발과 국내외 산업화의 성공모델 구축이 절실함.

연도	생산액 (조원)	수출액		수입액		시장규모 (조원)
		(조원)	(억\$)	(조원)	(억\$)	
2008	0.59	0.04	0.39	0.24	2.21	0.79
2009	0.70	0.05	0.36	0.27	2.10	0.92
2010	0.79	0.05	0.40	0.26	2.26	1.00
2011	1.00	0.06	0.50	0.37	3.38	1.32
2012	1.05	0.06	0.52	0.36	3.15	1.35
전년대비 증가율	5.30%	5.11%	3.36%	-5.18%	-6.76%	2.33%
연평균 성장률	15.50%	10.67%	7.46%	10.67%	9.26%	14.33%

표 1-2. 건강기능식품 산업현황

(출처: 식품의약품안전처)



그림 1-3. 국가별 건강기능식품(supplement) 시장 규모 및 전망

(출처: Nutrition Business Journal, NBJ' s global supplement & nutrition industry report, 2014)

- 단백질 의약품은 전 세계적으로 단일 히트제품 매출이 수조원에 이르는 매우 큰 시장임. 이런 제품의 특허 만료가 2012년부터 해마다 도래함에 따라 전 세계적으로 바이오시밀러 또는 바이오베타의 개발 경쟁이 가열되고 있음. 연 4조원대 이상의 시장을 형성한 바이오시밀러는 허셉틴을 비롯해 엔브렐·레미케이드(이상 관절염 치료제), 리툭산(비호지킨림프종 치료제), 아바스틴(대장암 치료제) 등이 있으며 바이오시밀러는 개발비용이 보통 오리지널 식의약의 10분의 1, 개발 기간은 절반 수준임. 이에 비해 제품화 성공 확률은 식의약에 비해 10배 이상 높아 글로벌 제약 업체들이 경쟁적으로 참여하고 있음.
- 바이오시밀러(Biosimilar)란, 유전자 재조합 또는 세포 배양 기술을 통해 생산되는 단백질이나 호르몬 등을 의미하는 바이오의약품의 복제 약품을 의미함. 오리지널 바이오의약품과 비교해 효능은 비슷하지만 가격이 싸기 때문에 경제성이 큰 의약품으로 인식되고 있으며, 현재 미국의 경우, 대통령인 버락 오바마(Barack Hussein Obama)의 ‘전 국민 대상 건강보험 공약’을 통해 바이오시밀러를 허용하기로 하고 이 분야의 특허 규정을 준비 중에 있는 등 기존 오리지널 바이오의약품에 대한 바이오시밀러의 대체 효과와 함께 제약업계와 바이오업계의 관심사로 급부상하고 있고, 우리나라도 국가 차원에서 미래 성장 동력 육성을 위한 적극적인 기술개발이 필요함.
- 분자농업(plant molecular farming)이란, 식물을 생산수단으로 삼아 유전자조작을 통하여 의학적으로 유용한 고부가가치 단백질과 백신, 산업적 가치가 있는 효소 등의 재조합 단백질 및 이차대사산물을 대량생산하는 산업을 의미함. 과거 식물을 주로 식량 확보 차원에서 농업적으로 이용하기 위해 유전자를 조작한 작물을 제1세대 GM(genetically modified)작물이라고 한다면 정밀 화학제품 생산, 유용 단백질 생산 등의 고부가가치 산업적 응용, 주로 의학적 용도를 목적으로 개발된 작물의 제2세대 GM작물이라고 하며 식물생산 분야에서 유전자재조합 단백질 생산, 고부가가치 대사산물 획득 및 유용한 물질 등을 생산하려는 목적을 가짐.

회사명	대상식물	제품/용도	단계
Ventria Bioscience (미국)	벼	유아용 식품첨가제 (항감염, 항염증제)	판매 중
Protalix(이스라엘)	당근	고서씨 병 치료제	판매승인
Dow AgrosciencesLLC (미국)	담배*	Newcastle disease vaccine (닭 치료용)	승인
SemBiosys (캐나다)	홍화	인슐린	승인
Cobento AS (덴마크)	애기장대	Vitamin B12 deficiency	사전승인
MeristemTherapeutics (프랑스)	옥수수	낭포성 섬유증 치료용 리파아제	제 2 상
	옥수수	락토페린	제 1 상
Monsanto (미국)	옥수수	결장·직장암에 대한 IgG	제 2 상
Planet Biotechnology (미국)	담배	충치예방을 위한 IgGs	제 2 상
	감자	일반 감기 예방	제 1 상
	감자	항암치료시탈모예방제	제 1 상

표 1-3. 식물유래 의료용 단백질의 산업화 현황

○ 연구동향

1) 해외 연구개발 동향

- 세계는 농생명자원소재 선점을 위한 신기술 전쟁 중인 상황. 미국, 일본, EU 등 선진국들은 생명자원 R&D 국가전략을 수립하여 생명자원소재 개발을 국가최우선기술개발과제의 하나로 추진하고 있음. 향후 바이오통계는 농업(4%→36%)과 산업(2%→39%) 분야가 75% 경제적 기여를 할 것으로 OECD는 예상. 또한 생명자원 활용 세계 시장 규모는 2003년 약 8천억 달러에서 2010년 약 2조 5천억 달러 수준으로 계속해서 증가하고 있음.
- 석유화학소재에서 농생명자원소재로의 패러다임 변화로 생명자원 활용, 개발하는 능력이 국가 경쟁력을 좌우하고 있음. 재생 가능한 식물자원을 연료로 하여 생물학적·화학적 전환 과정을 통한 신개념 바이오 산업은 각 국가 및 기업별 미래 성장동력으로 떠오르고 있음.
- 농업을 식량생산에서 벗어나 농생명소재 산업의 가치 사슬로 발전시키기 위한 국가 차원의 농생명소재 R&D 투자 확대가 필요. 향후 10년은 세계 생명자원소재 산업의 지형 구축기로 우리나라 농생명소재 산업의 성패를 결정하는 중요한 시기가 될 것.
- 미국에서는 바이오매스 R&D 촉진법('00)을 제정하고, 미 농무부와 에너지부에서 바이오매스산업을 신성장동력으로 개발 중. 또한 바이오에너지 및 바이오제품 로드맵('07)을 수립하고, 원료 확보에서부터 보급·확산까지의 전주기 기술혁신시스템 구축을 추진 중.
- 유럽에서는 바이오경제 전략계획을 수립하고 비식량 작물을 경쟁력 있게 생산하기 위한 계획을 추진 중. EU차원에서 지속가능화기술로드맵(SusChem Technology Roadmap)을 작성하였고, Bio-based products 시장개발('07)을 가속화하기 위한 계획 수립을 하였음. 필란드 국립기술연구소를 중심으로 바이오에너지와 화학물질을 동시에 생산할 수 있는 기술개발 프로젝트에 착수함.
- 일본은 바이오매스 일본종합전략('02)을 수립하여 관련 법안을 정비하는 한편 생명자원소재 개발 및 실용화를 위한 다양한 시범사업을 추진 중.
- 의약시장, 천연물시장, 건강기능식품으로 구분해 현재 세계 매출액이 각각 7천 120억달러, 440억

달러, 830억 달러이며 건기식이 천연물시장보다 컸고, 이는 천연물 식의약을 만들어 허가 받기가 힘들다는 것을 내포하고 있다. 지역별로 유럽과 아시아는 성장하는 추세를 보이는데, 이 같이 천연물 시장에 관심을 보이는 이유는 천연물의약품 보다 합성의약이나 바이오의약보다 개발기간이나 임상기간이 짧고 비용 역시 덜 소요된다는 점이 있음. 화합물시장의 특허만료가 다가오는 상황에서 의약분야 전체가 다변화를 시도하며 천연물의약품에 대한 관심이 커지고 있음. 또한 SWOT분석을 통해 천연물 식의약은 개발비용이 적고 축적된 전통지식을 활용해 개발함으로써 안전하고 부작용이 적다는 강점이 있지만, 구성성분의 상호과정 및 질환기전이나 작용기전 등이 불분명하고 임상승인이 어렵다는 약점이 있음.

- 미국에서 허가받은 천연물 의약품으로는 Veregen과 Fulyzaq이 있다. Veregen은 미국의 1호 천연물의약품으로 녹차 잎 추출물을 이용하여 만든 생식기 사마귀(genital warts)의 치료제로 1,700만 달러의 연매출을 기록하고 있으며 연평균 158%의 높은 성장률을 보이고 있음. Fulyzaq은 에이즈환자의 설사 치료제로 FDA 승인받은 최초의 경구용 천연물 의약품임. 현재 적응증 확장을 위한 임상연구로 미국에서 소아설사, 과민성대장증후군에 대한 연구가 진행되고 있음.
- 미국에서 연구 개발 중인 대부분의 천연물의약품은 상대적으로 unmet needs가 높은 중증질환을 타깃으로 하고 있으며 이는 미국에서 천연물 식의약이 보조치료제가 아닌 합성식의약과 대등한 의약품으로 인식되고 있음을 뜻함.
- 영국 제약사인 GW pharmaceuticals에서 개발한 Sativex는 현재 독일과 영국에서 급여 대상으로 지정되었고, 적응증확장을 위한 연구가 이루어 지고 있으며, 암성 통증과 신경병증성 통증에 대한 임상 3상 연구가 진행되고 있음. 시판된 천연물의약품들이 합성의약품으로 치료가 어려운 영역에서 성공함에 따라 향후 전문의약품 중심의 성장이 기대되는 상황.
- 중국의 천연물의약품의 경우 전체 의약품 시장의 22.7%를 차지하고 있으며 최근 5년간 35%의 고성장을 기록해 왔음. 정부의 육성 지원책, 천연물 개발사들의 현대화 노력, 처방 천연물의약품의 보험 급여, 인프라 확장, 환자들의 천연물의약품에 대한 경쟁력을 구축하고 미국, 유럽 등 선진시장 진출을 계획하고 있음.

○ 세계 탈모 치료 관련 시장

- 세계 최대 시장으로 떠오르는 중국의 탈모인구 증가율은 매년 15% 가량인 것으로 미루어보아 중국의 발모 제품 시장은 지속적으로 확대될 것임.
- 2008년 (140억 위안)에 비해 2016년 기준 중국 탈모 방지 용품 시장규모가 400억 위안으로 성장함. 또한 한국무역협회 보고서에 따르면 중국의 탈모방지 제품의 수입국 현황에서 한국으로부터의 수입이 지속적으로 증가함.

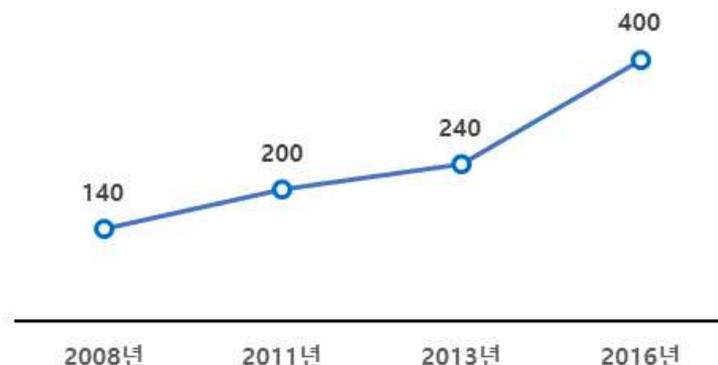


그림1-5. 중국탈모방지제품 시장규모(홍콩두피모발연구소 Kangwangpaeye)

○ 화장품법 개정으로 인한 탈모 예방 제품의 기능성 화장품 분류

- 화장품법 개정 및 시행(2017.05.30.)으로 의약외품으로 관리되던 제품이 화장품으로 전환됨(관련법령: 「화장품법」 제2조, 「화장품법 시행규칙」 제2조).

「화장품법」 [시행 2017.5.30.]

제2조(정의) 이 법에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

1. "화장품"이란 인체를 청결·미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부·모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 바르고 문지르거나 뿌리는 등 이와 유사한 방법으로 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것을 말한다. 다만, 「약사법」 제2조제4호의 의약품에 해당하는 물품은 제외한다.

2. "기능성화장품"이란 화장품 중에서 다음 각 목의 어느 하나에 해당되는 것으로서 총리령으로 정하는 화장품을 말한다.

가. 피부의 미백에 도움을 주는 제품

나. 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품

다. 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는 데에 도움을 주는 제품

**라. 모발의 색상 변화·제거 또는 영양공급에 도움을 주는 제품**

**마. 피부나 모발의 기능 약화로 인한 건조함, 갈라짐, 빠짐, 각질화 등을 방지하거나 개선하는 데에 도움을 주는 제품**

부 칙 <법률 제14264호, 2016.5.29.> 부칙보기

제1조(시행일) 이 법은 공포한 날부터 시행한다. 다만, **제2조제2호**, 제15조, 제16조, 제24조제1항 본문 및 제27조의 개정규정은 **공포 후 1년이 경과한 날부터** 시행한다.

「화장품법시행규칙」 [시행 2017.5.30.]

제2조(기능성화장품의 범위) 「화장품법」(이하 "법"이라 한다) 제2조제2호 각 목 외의 부분에서 "총리령으로 정하는 화장품"이란 다음 각 호의 화장품을 말한다.

1. 피부에 멜라닌색소가 침착하는 것을 방지하여 기미·주근깨 등의 생성을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품

2. 피부에 침착된 멜라닌색소의 색을 얇게 하여 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품

3. 피부에 탄력을 주어 피부의 주름을 완화 또는 개선하는 기능을 가진 화장품

4. 강한 햇볕을 방지하여 피부를 곱게 태워주는 기능을 가진 화장품

5. 자외선을 차단 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부를 보호하는 기능을 가진 화장품

**6. 모발의 색상을 변화[탈염(脫染)·탈색(脫色)을 포함한다]시키는 기능을 가진 화장품. 다만, 일시적으로 모발의 색상을 변화시키는 제품은 제외한다.**

**7. 체모를 제거하는 기능을 가진 화장품. 다만, 물리적으로 체모를 제거하는 제품은 제외한다.**

**8. 탈모 증상의 완화에 도움을 주는 화장품. 다만, 코팅 등 물리적으로 모발을 곱게 보이게 하는 제품은 제외한다.**

**9. 여드름성 피부를 완화하는 데 도움을 주는 화장품. 다만, 인체세정용 제품류로 한정한다.**

10. 아토피성 피부로 인한 건조함 등을 완화하는 데 도움을 주는 화장품

11. 트살로 인한 붉은 선을 얇게 하는 데 도움을 주는 화장품

○ 세계 두뇌건강기능식품 시장 트렌드

- 미국 건강기능식품의 규모는 2006년 871억불, 2010년 1,171억불로 7.7% 성장률을 보임(NBJ

report, 2012). 미국 식품과학회(IFIT)에 따르면 미국 기능성식품 시장의 10대 키워드 중 하나가 50대 이상의 실버세대임. 따라서 고령화에 따른 두뇌건강을 지키는 건강기능식품에 관심이 크게 증가하고 있음.

- 일본은 초고령화 사회의 도래로 인해 건강에 대한 관심이 매우 높으며, 1인당 건강기능식품에 대한 지출 비용이 전 세계에서 가장 높고, 건강유지와 질병의 예방 차원에서 건강기능식품을 소비할 정도로 건강기능식품에 대한 관심이 매우 높음. 이러한 초고령화 사회의 건강한 삶을 위해 일본 기능성식품 시장의 키워드로 50대 이상의 실버세대 및 멘탈 건강 등이 부각되고 있음.

## 2) 국내 연구개발 동향

- 현재까지 국내에서 개발에 성공한 식의약 중 천연물식의약은 8개로 약 24%를 차지함. 2001년 천연물연구개발촉진법 이후 꾸준히 진행되었던 성과로 볼 수 있음. 이러한 성공 사례들에 고무되어 국내 제약기업들의 천연물식의약 개발이 크게 활성화되고 있음. 국내에서 연구 개발 중인 전체 약 240여개 식의약 파이프라인 가운데 천연물 의약품이 차지하는 비중은 23% 정도. 주로 소화기계 질환, 대사성 질환, 중추신경계 질환과 관련한 천연물식의약의 개발 연구가 활발하게 진행되고 있음.
- 현재까지 우리나라에서 개발을 완료하여 OECD에 위해성 평가 자료를 공식적으로 제출한 바는 없으며, 벼 등 주요 식량작물에 대해서는 정부가 직접 GMO가 아닌 종자를 개발·보급하였음. 주요 콩, 옥수수 재배포장에 대하여 GMO 재배 실태 조사 결과, 국내에서는 GMO가 재배되지 않은 것으로 확인되었고, 현재 농촌진흥청 등에서 19개 작물 84품종, 2가축 8종에 대하여 연구가 진행 중.

## ○ 기능성화장품 시장 규모

- 2015년 국내 화장품 생산실적은 10조 7,327억원으로 전년 대비 19.6% 증가함. 이같은 증가세는 지속적인 수출 증가와 수출 지역 다변화, 기능성 화장품의 성장세, 다양한 아이디어 상품의 개발 등에 기인함. 기능성 화장품 생산실적은 2015년 3조 8,559억원으로 전년 대비 29.7% 증가하며, 매년 큰 폭의 증가세로 성장하고 있음. 화장품법 개정안에 의해 기존 의약외품에 속해있던 다양한 제품이 기능성화장품으로 전환됨에 따라 2017년부터 기능성화장품 시장은 더 큰 성장을 보일 것으로 예상됨.

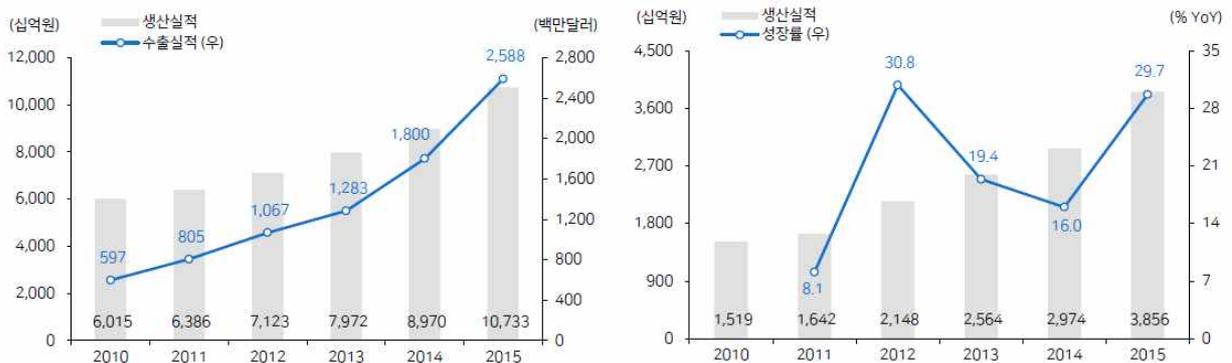


그림1-7. 국내 화장품(좌) 및 기능성화장품(우) 생산실적과 수출현황

## ○ 국내 탈모 치료 관련 시장

- ‘탈모증’은 정상적으로 모발이 존재해야 할 부위에 모발이 없는 상태를 의미하며, 일반적으로 두피의 성모(굵고 검은 머리털)가 빠지는 것을 의미함.
- 건강보험심사평가원이 2009~2013년 최근 5년간 건강보험 및 의료급여 심사결정자료를 이용하여 ‘탈모증’에 대해 분석한 결과, 진료인원은 2009년 약 18만명에서 2013년 21만명으로 5년간 15.3%인 약 3만명이 증가하여, 연평균 3.6%의 탈모증 환자가 증가하였음.

- 진료비로는 2009년 122억원에서 2013년 180억원으로 5년간 47.1% 약 58억원 증가하여 연평균 약 10.1% 증가하였음.

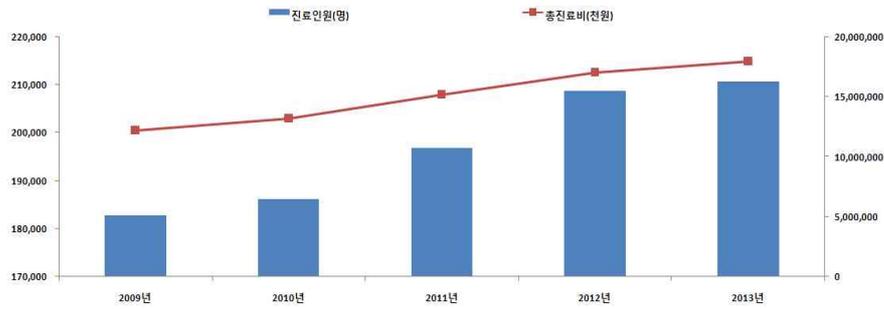


그림1-6. 탈모증 진료인원 및 총 진료비 추이 (2009년~2013년)

표. 탈모증 성별 진료인원 및 총진료비 현황 (2009년~2013년)

구 분	2009년	2010년	2011년	2012년	2013년	
진료인원 (명)	계	182,858	186,128	196,814	208,859	210,759
	남	93,463	95,605	101,316	108,801	112,898
	여	89,395	90,523	95,498	100,058	97,861
총진료비 (천원)	계	12,230,559	13,186,285	15,193,016	17,049,697	17,987,211
	남	6,268,261	6,784,227	7,703,708	8,794,075	9,476,718
	여	5,962,298	6,402,058	7,489,308	8,255,622	8,510,492

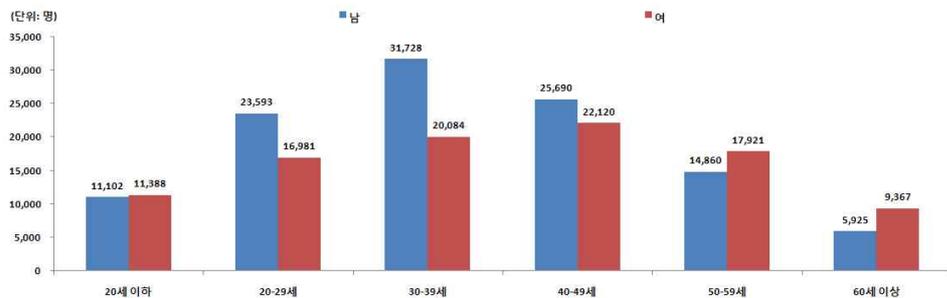


그림1-8. 탈모증 연령별 성별 진료인원 (2013년)

○ 국내 스트레스 시장

- 국내 스트레스 관련 시장은 점점 커지는 추세임. 우리나라 국민 가운데 스트레스로 신체 건강을 해친 사람은 2004년 65만여명에서 2009년에는 80여만명으로 늘어났으며 현재 신종 코로나 바이러스 감염증 확산 후 점점 스트레스 완화를 위한 식품관련 소비가 높은 상승세를 보이고 있음.
- 국내 스트레스관련 기능성 소재 시장규모는 2010년 3000억원에서 2018년 8000억원으로 증가하였으나 관련 기능성 식품에 대한 국가 경쟁력은 매우 낮은 수준.
- 코로나19확산 이후 심각해진 스트레스가 건강 문제에 대해 주요 관심사로 떠오르고 있으며 식품분야에서도 천연 재료 성분으로 출시되는 자연식품의 수요가 증가함. 국내의 경우 숙면에 도움을 주는 카테고리가 전년대비 37% 성장하였으며 스트레스 완화관련 영양제가 포함된 두뇌인지 건강 카테고리가 29% 성장함.

○ 특허동향

- 천연물식의약 개발연구 관련 특허를 가장 많이 보유하고 있는 기관은 세계 지식소유권 기관인 WO(39%) 이며, 이후 미국(37%), 유럽(21.6%), 일본(3%) 순으로 나타나고 있음.

- 미국의 다양한 회사에서 천연물식약 개발연구 임상분야에 대한 연구가 활발히 일어나고 있음. 또한 2000년대 후반부터 필요성 및 중요성이 강조되며 특허출원의 수가 급격히 증가하고 있음.
- 천연물식약 관련 산업에서 중국은 전통적으로 풍부한 한의학 지식에 기반하여, 강력한 천연물식약 연구개발 선두주자로 급부상. 천연물식약 개발연구 관련 특허를 가장 많이 보유하고 있는 국가이며 2006년 이후부터 특허의 증가추세가 두드러짐.
- 국내의 천연물식약 개발연구 및 이를 활용한 응용기술 관련 특허는 총 109건으로, 2000년대 이후 집중적으로 관련 특허가 출원되고 있다. 하지만 비임상, 임상 분야의 국내 특허는 없으며 109건 모두 생산공정 관련 특허이며, 한국은 전세계의 천연물식약 개발연구보다 3,4년 정도 뒤늦게 연구개발이 진행되고 있음.
- 세계 특허 출원 수에 비하여 아직 그 수는 적지만 서서히 증가하는 추세를 보이고, 현재까지 이어지는 것으로 비추어 볼 때 관련 기술개발이 더욱 활발해질 것으로 예상됨.
- 천연물식약 개발연구 생산 공정 분야 중 해외 특허청에 출원한 특허가 어느 한 출원기관으로 집중되는 상황은 아니나 대형 제약사들과 연구기관들도 포함됨.

■ 연구 및 산업 전망

- 블록버스터급 천연물 식약의 개발이 성공할 경우 식약1개로 국내에서 연간 1조원 이상의 매출과 20~30% 이상의 순이익창출이 가능할 것으로 예상됨 (중소기업청 2013년 바이오의약품-천연물의약품 자료).
- 세계 시장은 2011년 187조원에서 2017년 316조원, 2023년 423조원으로 시장규모가 폭발적으로 증가되면서 한국 경제 부양 산업 개발 발전시킬 수 있을 것으로 예상됨.
- 본 센터과제를 통해 성과를 도출한다면 국내외에서 각종 질환에 대한 천연물 식약의 성공사례를 제 공함으로써 천연물에 대한 재평가와 이를 이용한 천연물 식약 개발이 크게 활성화 될 수 있을 것

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 2-1. 핵심과제의 구성

- 본 센터는 제 1 핵심과제로 천연물 식의약품 소재 개발을 위한 인재개발과 전임상 효능 평가를 통한 스크리닝 시스템을 구축에 의한 소재 선정과 제 2 핵심과제로 스크리닝 된 천연물 식의약품소재의 임상효능평가와 이를 통한 고기능, 고부가가치 소재의 제품화 및 산업화 그리고 제 3 핵심과제로 GM 기술을 통한 농작물 생산과 이를 통한 고기능성 식의약 소재의 개발로 나뉜. 제 1 핵심과제에서 국내 기반기술이 취약한 천연물 식의약품소재 개발 인력 교육 프로그램에 참여한 연구자들이 산업적으로 필요로 하는 이론적 지식을 습득하도록 함. 또한 센터의 핵심과제로 참여하고 있는 다양한 산업체와의 공조를 통해서 현장 교육과 인력 교류를 시행함.
- 본 천연물 식의약 소재 개발 연구센터에 참여하는 대학들의 농업, 의학, 약학, 식품학 등의 융합 교육 시스템을 통하여 참여 대학원생들의 체계적인 통합 교육을 실시하고 실용적 학문의 적용을 위한 산업체 체험을 활성화함. 또한 본 센터의 성과로 개발되는 다양한 성과를 통해서 천연물 소재를 제품화하고 산업화하여 센터를 통해 교육된 우수한 인재들의 일자리 만들기도 자연스럽게 이루어져 교육과 채용이 성공적으로 연계될 수 있을 것임.
- 과제 시작시점 당시 연구팀은 3개 핵심과제, 10세부과제, 2개 위탁과제로 구성하여 연구를 시작하였으나 - 연차평가 및 단계평가에서 세부과제 구성과 관련하여 과제별 구성을 통합하여 수행하는 것이 적합하다는 의견을 수용하여 최종적으로 4개 세부과제, 3개 협동과제로 편성하여 연구를 수행하였음. 중도 변경된 세부과제에서 연구수행은 잔존하는 세부과제, 협동과제에서 연구수행하기로 하였음. 최종단계에서의 연구과제 수행은 다음과 같음



그림 2-1. 연구과제 과제 구성도 (최초)



그림 2-2. 연구과제 과제 구성도 (최종)

## 2-2 핵심과제 간의 연계

- 제 1 핵심과제와 연계를 통하여 교육된 우수한 인력과 스크리닝 효능 평가 시스템을 통해서 제 3 핵심과제에 의해 개발된 GMO 식물과 제 1 핵심과제의 non-GMO 천연물 소재의 효능을 평가하여 고기능 소재를 선정하고 제 2 핵심과제의 임상 효능 평가 과정을 통해서 최종 고기능, 고부가가치 소재를 개발함. 이렇게 개발된 소재는 제품화와 산업화를 통해 국제적 천연물 식의약 소재 시장에서 국가 경쟁력과 안정적 수익을 창출 할 수 있을 것으로 예상됨.
- 본 센터에서는 제 2 핵심과제와 제 3핵심과제의 각각 모든 세부과제들이 제 1 핵심과제의 교육 시스템에 참여하여 소재의 특성별, 기능성별 목표에 따라 연구추진 과정에서의 이론과 기술을 참여 학부생 및 대학원생들에게 교육하고 전수하여 천연물 식의약소재 개발을 위한 국가 기반 확립에 많은 도움이 될 것으로 예상됨. 이때 2 핵심과제의 세부과제들은 참여 대학의 대학원생들에게 장기간 현장 개발연구원으로 파견·교육함으로써 센터 인력교류를 활발히 진행하면서 스크리닝 된 소재의 임상시험부터 기능성인정 그리고 국제적 제품으로서 산업화하는 전반적인 센터목표 달성과정에 참여하여 전문 연구 인력으로 성장할 수 있도록 함.
- 제 1핵심과제, 제 2핵심과제, 제 3 핵심과제의 참여 대학교수 및 박사들은 제 1 핵심 과제의 천연물 식의약 전문 연구진 교육 프로그램에 참여하여 GMO, non-GMO별, 소재의 기능성별, 산업화 목표별 강의를 개설하고 워크숍 등을 통해서 참여 대학원생 및 연구진들을 교육함. 제 1 핵심과제의 이론 교육과 제 2 핵심과제의 산업화 현장 교육을 이수한 대학원생 및 연구진들에게는 수료증을 발급하고 제 2 핵심과제 및 3핵심과제의 참여 기업체에 우선 채용할 수 있도록 유도함. 그리고 교육 시스템을 더 체계화하여 각 교육시스템에 교육 인력을 확충하고 이후 선순환적인 교육과 채용 체계를 확립함.
- 제3핵심 목표는 GMO를 통한 백신이나 유용 단백질의 생산과 산업화임. 유용 유전자가 안정적으로 발현되는 GM작물을 개발 후 상용화하는 경우 반드시 LMO 안전성 평가를 하여야만 하는데 주관기관인 1핵심의 단국대학교는 LMO 안전성 평가 센터를 보유한 기관으로서 3핵심의 연구 성과의 안전성을 2단계에서 검증함으로써 유용 GM 작물을 산업화함.

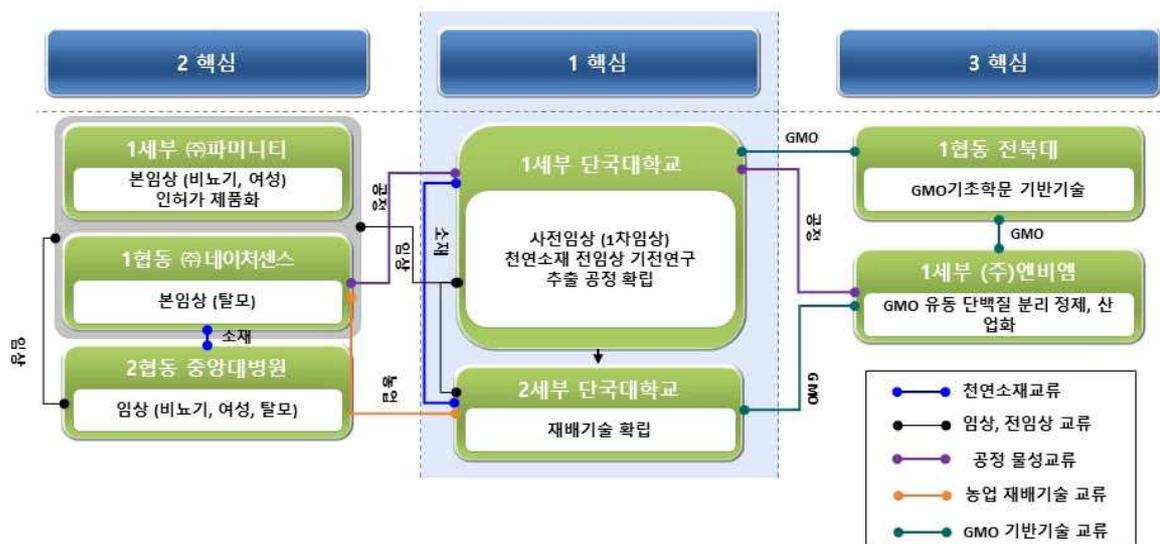


그림 2-3. 천연물 식의약소재 개발/산업화 핵심과제간 협력체계

## 2-3. 핵심과제별 추진전략, 연구 내용 및 방법

### 가. 제 1 핵심과제: 천연물 식의약소재 산업화 기반기술 구축 및 전문 인력 양성

#### ○ 천연물 의생명산업학과 신설을 통한 전문인력 양성

- 천연물 식의약 개발 사업은 천연물화학, 약리학, 독성학, 의학, 식품학, 화학, 생물학, 미생물학, 생명공학, 병리학 등 여러 분야의 첨단지식을 기반으로 하는 지식집약형 핵심기술로써 차별적 연계전공교육 및 다양한 경쟁력 강화프로그램 실시를 통해 기업 및 수요자 반영 기반 천연물 식의약 소재 개발 전문연구 인력을 육성하고자 함. 이것을 기반으로 센터 연구과제 수행 1단계에는 **융합 학과의 형식으로 유관학문 교과목 및 교육과정을 개설**하고, 단계별로 대학원생 대상 전문인력양성 교육과정을 개발하여 **지속적이고 체계적으로 전문 인력을 양성**하고자 함.
- 연구과제 참여 대학원생은 천연물 식의약 소재 산업화 관련 회사의 취업 및 연구 인력 양성을 전제로 선발되며 대학원 교육 및 현장교육을 위한 **장단기인턴 과정과 인력교류과정**을 거친 후 인증서를 수여하여 전문 인력으로서의 자질을 보증하고자 함. 일차적으로 본 연구 사업에 포함시키고, 이어 기업과의 본격적인 인력 교류를 통해서 기업 연구소로 우수 인력을 파견하여 고정 교육 및 연구 인력을 참여시킴으로써 “천연물식의약센터”에서 배출하는 **바이오식의약소재 개발 관련 전문 인력들을 양성하고 산업체 취업률을 높이고자 함.**
- 이를 위해 **산학연 컨소시엄**을 형성하여 기업과 산학협력연구를 수행하고 있는 과제들을 적극 활용하여 과제 참여 대학원생은 안정적으로 과제를 수행하도록 하며 소정의 학자금을 지원함. 또한 국내외 천연물의약품, 제약회사, 및 연구기관과 현장교육에 대한 양해각서를 체결하여 센터 참여연구원들의 단기 연수 또는 **해외 협력기관 단기연수를 추진**하며 업체 고정 인력들의 위탁교육을 동시에 수행함. 그밖에 대학, 바이오 벤처회사, 임상연구소와도 양해각서를 체결하여 경험이 많은 교수 및 연구원들을 멘토로 활용하고자 함.

#### ○ 유용식물 소재탐색 (유전자원의 조기 탐색, 수집 및 특성평가)

- 천연물 신약개발은 과거 인류가 경험적으로 사용하였던 것으로부터 분리 개발하게 되므로 화학합성 신약개발에 비해 상대적으로 독성이 적은 것으로 예측되어 신약개발 성공 가능성이 높음. 이에 **국내외 유용식물자원의 체계적 수집 및 분류하여 효능 소재를 탐색.**

#### ○ 유용식물 재배기술 확보 및 농가기술이전

- 천연물 식의약개발은 과거 인류가 경험적으로 사용하였던 것으로부터 분리 개발하게 되므로 화학합성 식의약개발에 비해 상대적으로 독성이 적은 것으로 예측되어 식의약소재로의 성공 가능성이 높음. 이에 **국내외 유용식물자원의 체계적 수집 및 분류를 통해 유전자원을 확보.** 선정 천연물의 재배기술 확보 및 지역에 확산하여 재배단지 구축을 위한 사전기술지원과 연구개발 시스템 확보.
- 주관기관의 농장, 하우스등을 활용하여 선정된 천연작물의 재배기술 확보 및 지역을 선정하여 재배단지 구축을 위한 기반기술 구축

#### ○ 천연작물의 수확 수집 및 수확 후 관리기술 개발 (천연물의 수확, 수집 후 관리를 위한 세척 건조 및 1차 가공 기술 개발)

- 천연물의 수확 후 가공기술은 천연물의 재배자체보다 더 큰 의미를 가짐. 따라서 천연물의 고유의 약리효능과 물성 등이 손상되지 않으면서 장기보관 되거나 1차가공이 될 수 있는 기반기술을 구축함.
- 주관기관에 센터전용의 대량수집된 천연물의 보관시스템, 세척과 건조 시스템을 설치하고, 장기 보관기술을 구축함과 함께, 분말화 등의 1차 가공기술을 구축함.

- 수확 후 관리된 천연물을 대상으로 전통적인 추출방법 대비 초임계추출, 초음파 추출 등의 기술접목과 효용성 증대를 위한 천연물의 유효성분 추출 기술을 개발함.

#### ○ 천연물 생리활성 물질 스크리닝 기반기술 확립 지원

- 천연물로부터 식의약을 개발하는데 있어서 전임상 효능검증 단계는 합성의약품과 달리 고도기술의 노동집약형 연구와 많은 시간투입이 필요함. 이 단계는 **천연물 생리활성 물질을 스크리닝**하며 천연물 분리기술을 확립하여 **유효성분 물질을 분리 및 약효평가**를 실시함. 본 과제에서는 생리활성으로는 항산화, 항염, 항암활성 및 암 예방 작용, 탈모방지, 항우울증, 항스트레스, 생리전증후군 개선, 여성갱년기 개선, 비뇨기 건강 개선 등의 효능을 나타내는 천연물질을 스크리닝을 위한 기반지원 함

#### ○ 천연물 전임상 독성 및 효능 탐색

- *in vitro*, *in vivo*, 포장시험 등을 통해 **신물질의 독자적인 활성 측정방법 개발 및 평가기술**을 진행을 위한 기반기술과 인프라를 구축함. 또한 **천연물 분리·정제기술을 확립**하여 활성이 보이는 식물종의 분획별 활성 및 분획물의 분리, 구조결정에 신속성 부여함. 분리되어 구조 동정된 생리활성 물질의 경우, 천연물 성분 은행제를 실시하여 천연물을 체계적이고 효율적으로 활용될 방침. 유용물질의 분리 및 구조분석 체계 확립은 식의약 개발에 중요한 부분임.

### 나. 제 2 핵심과제: 천연물 식의약 소재의 국내외 인허가 산업화

#### ○ 비뇨기 건강 개선을 위한 천연 소재의 효능 평가

- 비뇨기 건강 관련 바이오마커를 확립하고 기능성 천연물을 스크리닝 할 수 있는 시스템을 구축할 수 있는 기술을 확보하게 됨. 또한 배뇨장애 동물 모델 (과민성 방광 동물 모델)을 사용하여 배뇨 곤란 장애 개선과 소리자극에 의한 요실금 증상 개선 효능 등을 평가하게 됨. 단계별 임상 시험을 통해서는 하부요로 증상 및 만성 전립선염 증상을 평가하기 위해 통증 혹은 불편감, 배뇨증상, 삶의 질 등을 확인하게 됨. 또한 과민성방광 증상으로서 빈뇨, 야간뇨, 요절박, 요실금 등에 대한 검사를 실시하여 소재의 효능을 체계적으로 평가하게 됨.
- 비뇨기 건강에 도움을 줄 수 있는 소재의 국내 개별인정 사례는 아직까지 없지만 본 센터에 참여한 2핵심과제원들의 국내 최초 개별인정 연구개발 경험과 노하우를 통해서 충분히 국내 개별인정을 획득할 수 있음. 또한 해외에는 이미 비뇨기 건강과 관련된 다수의 소재가 개발되어 다수 판매되고 있으며 시장에서의 판매량도 고령화에 발맞춰 급격히 증가하고 있으므로 국내 개별인정 소재의 인정 필요성의 어필을 통해서 반드시 국내외 개별인정 성과를 도출할 예정.

#### ○ 탈모 억제 및 개선에 대한 천연물 소재의 효능 평가

- 탈모는 최근 환경 및 스트레스 영향에 의해서 성별, 연령에 상관없이 발생하는 증상으로서 양모제, 육모제, 탈모방지제, 발모제 등의 용어로 그 효능·효과의 범위에 따라서 화장품, 의약품, 의약품 등으로 분류하여 그 효능을 승인받을 수 있음. 탈모의 경우 다양한 제형제제로 적용 가능하기 때문에 그 적용 기준을 다양하게 해서 C57BL/6 마우스를 이용하여 모발 생장기 유도 효과 평가, 퇴행기 억제 효과 평가 등을 거쳐서 최적의 제형제제를 선정하고 **임상 효능 평가**를 단계적이고 체계적으로 평가하고 인정받게 됨.
- 탈모는 아직까지 개별인정 사례가 없는 기능성이지만 노화, 스트레스 등 다양한 원인에 의해 발생하는 증상으로서 사전에 예방과 진행의 억제가 가능하고 해외에는 이미 탈모, 양모에 도움이 되는 다수의 소재가 개발되어 관련 제품들이 다양한 형태로 판매되고 있음. 따라서 최초 개별인정 소재의 연구개발 전문성과 경험을 통해 과학적/의학적 검증과정과 풍부한 임상 결과 축적을 통해서 국내외 기능성 인정을 받을 수 있도록 할 예정임.

### ○ 정신건강 개선을 위한 천연물 소재의 임상효능 평가

- 기존에 다양한 스트레스 완화 기능성 평가 방법들이 보고되어 왔지만 본 연구를 통해서도 다양한 스트레스 정의 중, 스트레스 완화 기능을 갖는 기능성 소재의 개발과 기대효능을 고려할 때 정신, 신경장애 스트레스 완화 기능성을 주로 평가하고 자함. 자극 원인은 감정적 스트레스(Emotional Stress), 과 부담에 의한 스트레스(stress by pulsing your body too hard, 과로 등에 의한 스트레스), 환경적 요소에 의한 스트레스(Stress by Environmental Factors)에 의한 스트레스 완화 효과를 평가하고자 함. 스트레스 완화 기능성에 전임상과 임상으로 나누어 연구를 진행하고, 독성 및 부작용이 관찰되지 않는 가정 하에 가장 효과가 있는 소재를 대상으로 임상 효능평가를 진행함. 전임상 시험을 통해 스트레스를 부여할 수 있는 환경적 상황을 부여하고 행동학적, 병리학적, 생리학적 검사를 통해 그 효능을 평가함. 그리고 단계별 임상 시험을 통해서도 혈중 호르몬의 변화와 수면 평가, 스트레스관련 자가 설문, 의료 전문인의 문진을 통해서 기능성 소재의 효능을 평가함.

### ○ 여성건강 개선에 대한 천연물 소재의 임상효능 평가

- 여성갱년기는 갑작스러운 호르몬 저하에 의해서 발생하는 다양한 증상으로 기능성 평가 방법들이 아직 체계적으로 확립되지 않았음. 따라서 본 연구를 통해서 **여성갱년기 증상개선 및 작용기전을 명확히 규명**하고 이에 따라 **바이오 마커를 확립하여 천연물 스크리닝 시스템을 확립**하고자 함. 여성갱년기 평가를 위해서 갱년기 동물모델(난소절제술이 시행된 동물)을 사용하여 여성호르몬 저하에 의한 생리학적, 병리학적 검사를 진행하게 됨. 가장 대표적으로는 체모감소, 피부노화, 골밀도감소, 내장지방 증가, 혈압 증가 등의 변화를 지속적으로 관찰하고 천연물 소재의 효능을 평가함. 또한 정상 동물에서 유전자 발현 분석법을 통해서 확인하고 천연물 소재의 작용기전을 규명함. 이렇게 효능이 입증된 천연물 소재를 대상으로 임상효능 평가를 진행함. 단계별 임상 시험을 통해서도 혈중 여성 호르몬의 변화와 여성 갱년기 관련 자가설문, 전문 의료인의 문진을 통해서 새로운 기능성 소재의 효능을 평가하게 됨.

### ○ 3핵심에서 개발된 유용 단백질의 유효성 평가

- 3핵심에서 개발된 유용 단백질 들의 생리적 유효성 검증을 위해 2핵심의 전임상 연구 시스템을 통해서 독성과 유효성, 단백질 안정성 등을 평가 수행 할 예정임 따라서 1, 2 핵심과제와 3핵심과제가 그 효능과 안정성을 공동으로 협력하여 검증함으로써 GMO의 산업화에 기여하는 강력한 연계 시스템을 구축하게 됨.

### ○ 효능이 확인된 기능성 천연물 소재들의 기준 규격 설정 및 표준화 진행

- 효능이 확인된 각각의 기능성 천연물 소재들의 지표 성분 설정 및 표준화·규격화를 진행. 소재들을 식의약소재로서 사용하기 위해서는 안전한 소재로서 원료화하기 위해 **제조 기준을 확립하고, 생산공정 확립을 위한 소재의 표준화·규격화 설정**을 진행해야함. 일반 시험법을 통해 소재의 지표에 따른 기준 및 규격을 설정하고 봉해시험법, 내용량 시험법, 입도시험법, 산도시험법, 유해물질시험법 등을 진행하며 개별 성분별 시험법으로서 영양소와 기능성 원료 등을 선택하여 성분 시험법을 확립해야 함.

### ○ 효율 높은 생산 방법 구축을 통해서 국제 시장에서 경쟁력이 있는 소재로서 개발함.

- 소재가 선정되면 **국내 농가와의 협력을 통해 천연물 배양 기술을 확보**하고 최적의 소재 획득을 위해서 계절별, 작목 조건별 조건을 확립함. 추가로 생산 천연물 배양 기술을 확보하여 농가 소득과 경제력을 모두 향상시킬 수 있는 연구도 추가로 농가협동 과정을 통해서 진행하고자 함. 2차로 천연물 소재로부터 식의약의 원료를 안정적으로 공급을 위한 연구를 진행함. 각각 효능이 확인되고 기준 규격 설정 및 표준화·규격화를 마친 소재들의 생산 효율성 향상을 위한 최적화된 공전 개발을 위해서 효소반응 온도, pH, 최적효소 첨가량, 가수분해 시간, 유기용매, 유기산, 열수, 효소 추출에 따른 Pilot-scale 생산 결과를 분석함. 이를 통해 **원료의 경제성을**

**확보**하고자함. 또한 대량생산을 위해서 추출 규모에 수율의 변화를 검증하기 위하여 유기용매 추출, 열수 및 효소추출, 유기산 추출 등의 과정을 통해서 **최적의 수율 조건을 확보**함.

○ **과제 성과로서 기능성별 효과가 규명된 소재의 국내외 공인기관을 통한 기능성 인정**

- 여성갱년기 증상, 스트레스, 중장년 비뇨기 질환 완화 및 증상 개선에 효능이 입증된 각각의 천연물 소재의 국내외 특허 출원과 국내외 우수 논문으로서 보고하고, 이 성과를 바탕으로 식의약소재로서 국내외 공인기관에서 각각 소재의 기능성을 인정받음. 우선적으로 국내 식품의약품안전처로부터 개별인정을 획득한 후, 소재의 신뢰도를 바탕으로 식의약 승인을 위해 환자를 대상으로 한 임상연구를 단계별로 진행하고, 인정 절차를 진행함. 그리고 외국 식품의약품안전청에서 소재의 안전성과 기능성을 인정받기 위한 과정을 진행함.

**다. 제 3 핵심과제: GMO를 활용한 가축질병 예방백신 및 의약소재 생산**

○ **GMO 활용 가축질병(돼지 설사병) 예방백신 개발**

- PEDV 항원 유전자가 도입된 형질전환 담배의 homo line 선발하여 세대를 전개하고, 벼 현탁세포배양을 이용한 PEDV 항원단백질의 대량생산 조건을 확립함. 또한, 항원 흡수증진을 위한 기술 개발도 실시함. 이렇게 생산된 식물유래 PEDV 항원을 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지) 적용시험을 실시한 후에 적정 항원 투여농도(경구 및 주사)를 규명하고, 적정 제형을 완성하여 **산업화 가능한 가축질병(돼지 설사병) 예방 백신으로 개발**함.

○ **GMO 활용 비동물성 성장인자의 생산기술 확립 및 의약소재 개발**

- 의약 및 향장소재로 널리 사용되어지고 있는 **상피세포성장인자 (Epidermal Growth Factor, EGF)와 인간 알부민(human Serum Albumin)**의 대량생산체계(각 단백질 10g/batch)와 고순도(95% 이상) 및 분리정제 기술을 확립하여 **의약소재를 개발**함.
- 이를 위해 현탁세포주를 구축하여 단백질 분리정제 체계를 확립하여 생물학적 활성을 확인함. 그리고 산물의 대량생산 및 산업화를 위해 hEGF와 hSA의 대량 생산체계 구축 및 확립한 뒤, QC체계 및 표준 생산공정을 확립함.

○ **GMO 식물체의 환경위해성 평가**

- 제 1 세부과제 및 제 2 세부과제에서 개발한 GMO식물체의 homoline을 선발 한 후에 T4 내지 T6세대까지 세대전개 후 본 센터의 제 1핵심과제에서 환경위해성 평가를 진행

○ **GMO 산물의 산업화**

- 유전자 재조합기술을 도입해 백신생산용 식물을 개발하는 경우는 대량생산 시스템 구축에 있어 환경영향성 평가, 안정성 평가 등의 재배허가를 득하는 과정에 많은 노력이 필요한데, 이를 위해서 3단계에서는 **허가기관과의 협조체계를 구축**할 계획임.
- 제품군별 독성테스트를 포함하는 비임상 및 허가 규제를 개발 초기부터 고려하여 선진국의 사례분석을 통한 전략을 구축하고, **최종 백신개발 완료시점에서 시장에 출시될 수 있는 정도의 인허가 과정에 투자** 할 것임.
- 개발된 기술의 산업현장 적용을 항상 염두에 두고 연구를 진행하여 산업체-연구기관의 유기적 관계를 유지하고, 빠르게 변화되는 바이오기술 개발에 대처하기 위한 **기업 및 연구기관과 학교 간 네트워크를 구축하여 활용**할 계획임.
- 본 3핵심 과제에서 확보한 연구결과 중 화장품 소재로 사용예정인 EGF, VEGF 등의 산업화를 위하여서는 EGF, VEGF 생산 식물세포주에 대하여 LMO 위해성 심사를 받아야 하므로 국가 LMO

위해성 가이드라인에 따라서 위해성심사를 진행하며, 본 3핵심 과제에서 개발하고자 하는 돼지 PEDV에 대한 백신의 경우에는 수의약품 관리법과 약사법에 따라서 임상을 진행하고 KvGMP 설비에서 제품을 생산하여야 하므로 본 연구의 완료 후 즉시 사업화를 위한 임상시료생산이 가능하도록 (주)진셀바이오텍은 KvGMP 설비를 확보하고 사업화를 진행 할 계획임

#### ○ GMO 개발 및 생산관리 전문인력 양성

- 3핵심에서 개발된 유용 단백질의 생리적 유효성 검증을 위해 2핵심 전임상 연구 시스템을 활용할 예정으로 3핵심과제의 연구산물에 대한 효능과 안정성을 공동으로 협력하여 검증함으로써 GMO의 산업화에 기여하는 강력한 연계 시스템을 구축하게 됨
- 제 3핵심과제 참여 연구인력 외에 교육을 희망하는 본 사업단 참여 모든 연구원을 대상으로 GMP관련 교육 및 현장교육 기회를 제공
- 본 연구사업단 종사 인력이 GMO개발 및 생산관리 교육을 이수 한 경우 취업기회 우선 제공

#### 라. 대학연구와 인력양성(교육)

##### ○ 대학연구

- 대학연구의 역할을 기초부터 실용적 가치를 갖는 연구로 확대발전하여 농가와 농업, 천연물 식 의약품소재 산업의 발전에 기여하는 연구기반 구축.
- 농학, 생명공학, 의약학, 식품학 등 다학제 간 융복합 학문단위의 설치로 창의적이며 실효적인 학문분야 구축
- 대학의 기초학문의 경우는 사회적 니즈를 반영하지 못하는 경우가 있으나, 본 센터의 융복합 학 문단위 구축을 통해 미래사회에서 요구되는 교육체계 구축
- 국내외 다학제간 학술교류 시스템을 구축하여 새로운 융복합 학문의 국제적 위상과 경쟁력을 강화

##### ○ 인력양성(교육)

- 전문인력 양성 체계를 통해 국가사회가 요구하는 실가치를 창출함.
- 다양한 국제적 교류를 통해 국제적 역량을 갖춘 전문인력 양성
- 농학, 의약학, 공학, 경제학, 제도법률, 산업화 등 유관학문간의 융복합이 아니라 천연물 식 의 약소재의 연구부터 산업화까지 전체를 아우르는 전문가 양성됨.
- 관련 부분 종사하는 공공기관, 산업체, 연구소 등에도 교육문호를 개방하여 재교육하고 교육에 대한 대학의 사회적 임무해소.
- 학부과정부터 R&BD, 국제교류 등의 실무적 경험도 가능하도록 교육시스템화 하고 교육이수 학생들의 전문인력으로 역량을 강화.

##### ○ 인력취업

- 실무형 교육 체계를 통해 현장에 필요로 하는 전문 인력을 양성함
- 산업체 파견 실무 교육의 활성화를 통해서 직접적으로 각 업체와 연계된 인력을 양성하고 자연 스럽게 채용 유도함.
- 센터과제 참여 업체의 인재양성 프로그램 적극 참여로 우수 인력이 자연스럽게 센터 내 연구과 정에 참여할 수 있도록 함
- 센터가 구성한 연구소, 산업체 네트워크를 활용한 인재 설명회, 인턴제 설명, 연구 지원 프로그 램 등을 센터 과제 중에 운영하여 인재 풀을 만들고 업체가 선별 채용할 수 있도록 개방함.

- 지역 내 우수기업과 연계를 위하여 센터의 주소재지인 천안은 향후 충청 천연물 식의약소재 생산단지로 확대발전시킬 목표를 가지고 있음. 따라서 해당지역의 관련유수 기업에 우선적으로 센터양성 인재를 취업시킬 것임

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

#### ① 제 1-1 세부과제: 천연물 식의약소재 산업화 및 전문인력 양성

##### 1. 산학연계 인력양성 프로그램 진행 및 인력양성 성과

- 복합학문단위 대학원 설립을 위해 천연물식의약소재산업화연구센터에서는 단국대학교 일반대학원에 응 복합 대학원을 신설하고 학과간 협동 과정으로 석사, 박사, 석박사 통합과정을 운영하고자 함. 또한 2단계 사업에서는 본 센터 관련 학부과정(의생명산업학과(가칭))을 설치하여 운영하고, 대학원 과정과 연계하여 우수 전문인력을 체계적으로 양성하며, 센터 종료후에도 인력양성을 수행하고자 함.
- 이를 위해 센터에서는 세부과제와 공조하여 관련 교과목을 개발하였고, 전공 개설 신청을 하였음
- 사업 시작 후 단국대학교와 대학원 학과개설과 관련하여 지속적인 협조를 요청하였으며 설립을 조율하였음. 그러나 대학원 개설에 있어 과제시작 시점에서의 교육정책과 대학정책이 변경됨에 따라 문제점이 발생함. 정부 교육정책에 따른 대학 정원, 인력 개편요구에 따라 학사개편이 진행되고 있는 중이며, 주된 내용은 학령인원 감소로 인한 학과 통폐합이며, 이에 따라 현재 신규 학과 개설이 무산되었음
- 신규 대학원 학과개설에 대해 설문을 진행한 결과 세부적인 학과명에 대해 부정적인 평가가 많았음
- 이에 따라 센터에서는 천연물 기능성 소재의 산업화와 관련한 학과(식품영양학과, 식품공학과, 생명과학부, 약학대학, 의과대학 등)를 대상으로 천연물 식의약소재의 건강기능식품 개발과정에 필요한 과정을 전반적으로 학습할 수 있도록 특별프로그램을 수행하였음

##### 2. 산학연계 인력양성 프로그램 진행

- 본 세부에서는 식의약소재 개발 연구센터에 참여하는 대학들의 농업, 의학, 약학, 식품학 등의 융합 교육 시스템을 통하여 참여 대학원생들의 체계적인 통합 교육을 실시하고 실용적 학문의 적용을 위한 산업체 체험을 활성화 하고자 하였음.
- 2차년도부터 단국대학교와 2핵심의 (주)파미니티와 (주)네이처센스 농업회사 법인과 연계하여 산학연계 인력양성 프로그램을 계획하여 실무역량 강화과정을 통해 실무 현장을 경험하고 졸업과 동시에 산업체에 적응하여 참여할 수 있는 인재들을 교육하고자 하였음. (주)네이처센스 회사에서는 천연물 임상 연구에 참여하여 교육을 개최하여 교육을 이수하였음. 또한 (주)파미니티 에서는 연구개발과 성과홍보, 실무교육을 이수하였음. 또한 관련분야에 종사하는 전문가를 초청하여 교육을 실시하였음. 이로서, 본 세부에 참여하는 대학원생들에게 단기간 현장 개발연구원으로 파견 또는 교육함으로써 센터 인력교류를 활발히 진행하였음.(주) 파미니티와 천연물 임상 연구 관련 교육을 진행하고 공동연구 지도를 통해 연구성과를 얻었음. 이러한 인력양성 또는 산학연계 프로그램을 통해 교육받은 학생들은 관련 산업체 및 연구소로 취업되는 성과를 달성함.
- 2단계 (4차년도- 7차년도)에도 산학연계 인력양성 교육과정을 통해 2핵심의 (주)파미니티,네이처센스와 연계하여 산학연계 인력양성 프로그램 진행하였음. 매연차 (주)파미니티, (주)네이처센스와 산학연계 교육을 수행하였으며, 인력양성을 공동으로 수행하였음.

##### 3. 전문가 초청 세미나 진행

- 연구동향 세미나: 천연물소재 연구중인 전문가를 초빙하여 학부, 대학원 대상으로 본인의 연구성과를 바탕으로 한 동향을 교육하였음



그림3-1-1. 김보용-Lea dat in human & invertebrate cell PDLSC(periodontal pigment stem cell)

(하정현-조선대)



그림3-1-2. 하정현- Ocular inflammation and endoplasmic reticulum stress are attenuated by supplement with grape polyphenols in human retinal pigmented epithelium cells and in C57BL/6 mice

천연물 소재 건강기능식품에 대해 주부대상 건강기능식품 표기설명을 진행하였음



그림3-1-3. 강권수-건강기능식품의 올바른 섭취

산-학 연계 교육: 관련 업체 종사자와 대학 연구원을 대상으로 하여 교육을 진행하였음



그림3-1-4. 이근배- 건강기능식품 유해물질 사례

그림3-1-5. 이정근: 건강기능식품 마케팅



#### 4. 학부과정 대상 실험실 연계 프로그램 진행

- 센터에서는 학부과정 3학년이상을 대상으로 하여 실험실연계교육을 실시하고 있음. 학부과정에서 경험이 어려운 실무적 연구를 중심으로 한 교육이 진행되고 있으며, 7학기 이후에는 일반대학원과 함께 학부-대학원 연계과정을 진행함.
- 학부-대학원 연계과정은 학부생이 접하기 힘든 대학원 개설과목을 통하여 복합적인 심화학습을 진행하며 전문인력 양성을 위하여 필요한 교육기간을 연장하여 훈련된 전문인력을 만드는데 도움을 줌.
- 특강형식으로 교육을 진행하였으나 체계적 학습을 위하여 8회 강의를 묶어 천연물식의약소재 산업화 전 과정에 필요한 교육을 진행하였으며, 각 과정은 3차에 걸쳐 교육을 수행하였음
- 각 과정은 다음과 같이 운영하였음

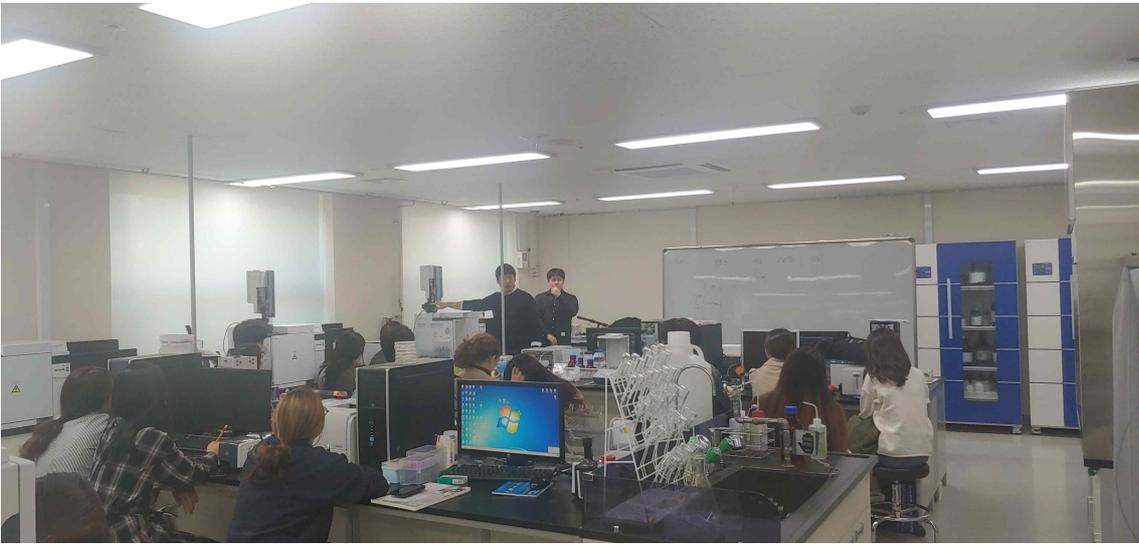


그림3-1-6. 천연물 식의약소재 전문인력 양성 프로그램

표. 3-1-1.1차 천연물 식의약소재 전문인력양성 프로그램

- 1차 프로그램은 2018-12-07 ~ 2019-02-08 동안 진행되었으며 참여 대학원생은 총 34명이었으며, 그 중 졸업 11명, 취업 7명을 달성함(2,3회참여자 제외).

교육차수	과목명	강연자 (소속기관)
1	천연물 소재의 기능성 기전연구	노유현 연구소장 (파미니티 )
2	천연물 기전연구 관련 분석장비 사용교육 1	산학협력단 공동기기센터 최영봉 교수
3	천연물 기전연구 관련 분석장비 사용교육 2	산학협력단 공동기기센터 최영봉 교수
4	천연물 기전연구 관련 분석장비 사용교육 3	산학협력단 공동기기센터 최영봉 교수
5	기능의학 관점에서 바라본 식품영양	전북대병원 기능성식품 임상시험지원센터 채수완 센터장
6	식품 마케팅	이름 이정근 부사장
7	건강기능식품의 산업화 실례	Nutracore 최범락 대표
8	기능식품 개발 전략 및 인체적용시험	인제대학교 의과대학 강제현 교수

- 천연물 식의약소재 관련 학과 (식품영양학, 생명과학, 화학, 분자생물학, 제약공학, 의학, 약학 등) 대학원생 중 천연물 식의약소재 관련 취업 희망자를 대상으로 특별 교육프로그램을 제공을 계획함. 교육과정은 연구계획, 분석, 임상, 산업화, 마케팅과 관련한 과정을 포함함

표. 3-1-2. 2차 천연물 식의약소재 전문인력양성 프로그램

- 1차 프로그램은 2019-10-04 ~ 2019-11.29 동안 진행되었으며 참여 대학원생은 총 18명이었으며, 그 중 졸업 14명, 취업 8명을 달성함 (3회참여자 제외)

교육차수	과목명	강연자 (소속기관)
1	빅데이터를 활용한 식품의 미래와 정밀의학	노유현 연구소장 (파미니티 )
2	천연물 기전연구 관련 분석장비 사용교육 1	최영봉 (단국대학교)
3	건강기능식품 기능성 인정 절차 및 현황	이혜영 (식품의약품안전처)
4	천연물 기전연구 관련 분석장비 사용교육 2	최영봉 (단국대학교)
5	건강기능식품 정책방향	강권수 (식품의약품안전처)
6	건강기능식품개발사례	김종래 HL 사이언스
7	Medical nutrition therapy & functional foods	김성희 단국대학교

8	건강기능식품시장동향	허석현 한국건강기능식품협회
---	------------	-------------------

표. 3-1-3. 3차 천연물 식의약소재 전문인력양성 프로그램

- 3차 프로그램은 2020-11-05 ~2021-02-10 동안 진행되었으며 참여 대학원생은 총 19명이었으며, 그 중 졸업 11명, 취업 3명을 달성함

교육차수	과목명	강연자 (소속기관)
1	Peanut sprouts rich in p-coumaric acid attenuates high fat diet-induced obesity and adipocyte inflammation which is accompanied with brown adipocyte activation	강인혜 교수 (제주대학교)
2	건강기능식품의 인체적용시험 사례: 체중조절 기능성	강재현 (성균관대학교)
3	건강기능식품 기능성 표시, 광고 심의 가이드라인	김상수 (한국건강기능식품협회)
4	해외직구 식품 안전관리	김술 (식품의약품안전처)
5	천연물 활용연구	김진철 (KIST)
6	건강기능식품개발사례	서민 (단국대학교)
7	건강기능식품 마케팅	이정근 (이름)
8	감귤 콤부차 발효에 의한 성분변화 및 기능특성	박성수 (제주대학교)

## 5. 천연물 식의약 소재 관련 연구

### ○ 천연물 생리활성 물질 스크리닝

- 천연물로부터 식의약을 개발하는데 있어서 전임상 효능검증 단계는 합성의약품과 달리 고도기술의 노동집약형연구와 많은 시간투입이 필요함. 이에 본 세부 과제에서는 항스트레스 천연물 소재를 *in vitro*상에서 스크리닝하여 2개의 소재를 선정하여 차기 연도에 작용기전의 규명 등 추후 연구를 진행할 예정임.

코르티코스테론(JTS)으로 진행된 본 실험에 사용된 천연추출물은 식약처에서 식용 등재된 물질로, 항스트레스에 효과 가능성이 있는 총 12개의 천연추출물을 사용하였음.

PC12 세포를 사용하여 세포내에서 시료의 안전성을 확인하기 위해 세포 생존율을 측정함. PC12 세포에 신경 성장인자를 처리하면 신경세포로 최종 분화하는 특성을 가지고 있어서 신경분화 연구 또는 항스트레스 연구의 모델로 유용하게 사용됨이 알려져 있음. 따라서 배양된 PC12 세포에 24시간동안 12개의 후보 소재 추출물을 처리하여 세포생존율을 확인하였음. 그 결과, 12개의 추출물 중 6개의 추출물에서 세포 생존율이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였음 (그림1). 이에 6개의 추출물을 이용하여 본 연구를 진행하였음.

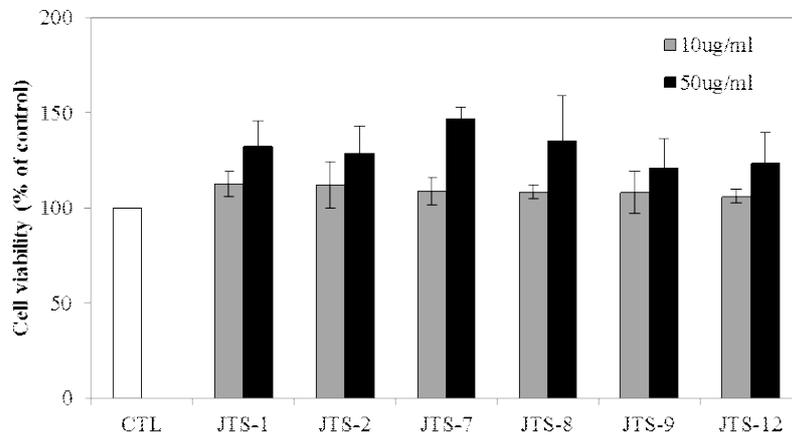


그림3-1-7. 추출물의 세포보호 효과 확인

부신피질은 생명활동에 있어서 필수적이며, 특히 스트레스상태에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 부신피질에서 분비되는 호르몬 중 하나인 corticosterone은 세포내에서 고농도로 처리했을 경우, 스트레스를 유도하는 것으로 알려져 있어 항스트레스 실험에 사용되는 것으로 보고되어 있음. 따라서 JTS 추출물이 고농도의 corticosterone에 의한 스트레스로부터 세포를 보호하는지 확인한 결과, 스트레스 유도물질인 corticosterone 처리군(CORT)은 세포생존율이 50%로 감소한 반면, CORT에 추출물을 첨가한 샘플은 CORT 단독 처리군에 비해 세포생존율이 증가하는 것을 확인하였음 (그림2).

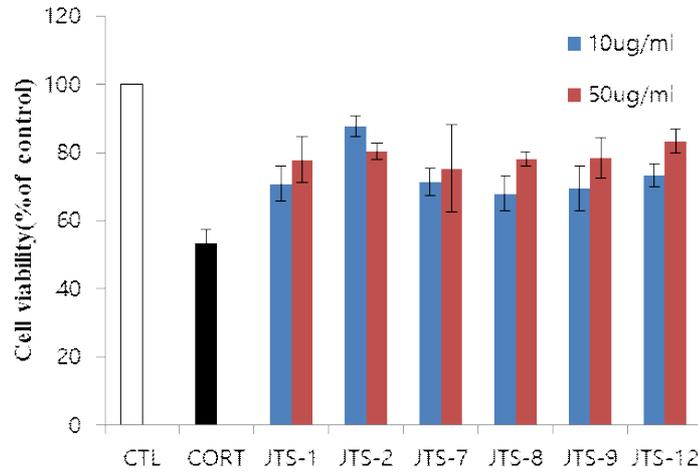


그림3-1-8. corticosterone으로 유도된 스트레스로부터 추출물의 세포보호 효과

위의 결과를 토대로 6가지의 JTS 추출물 중에서 가장 효과가 뛰어난 2가지의 추출물을 선정하여, 추출물(그림3-1-8)과 corticosterone을 처리하였을 때의 세포보호 효과를 확인하였음(그림3-1-9). 그 결과 JTS 추출물이 스트레스로부터 세포를 보호함을 확인하였음. 차후 스트레스로부터 세포를 보호하는 JTS 추출물의 효과에 대한 작용기전을 규명하고자 함.

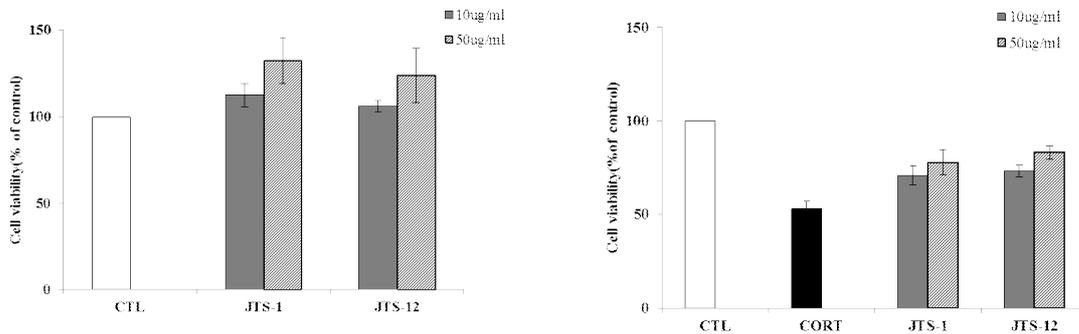


그림3-1-9. corticosterone으로 유도된 스트레스로부터 JTS 추출물의 세포보호 효과

○ 항염 효능을 나타내는 천연물질 스크리닝

- 감초추출물을 이용한 LPS로 유도된 RAW264.7 macrophage cell에서 pro-inflammatory activity를 저해함을 확인하였음. 그림 1에서 보이는 것처럼, LPS가 처리되지 않은 정상군에서는 감초추출물 100ug/ml의 농도까지는 세포생존율에 영향을 미치지 않았으나, 200ug/ml의 농도에서는 정상군과 LPS를 처리한 실험군 모두 세포생존율이 급격히 감소됨을 확인함. 이러한 결과로 모든 실험은 100ug/ml 농도의 감초추출물까지만 사용하였음.

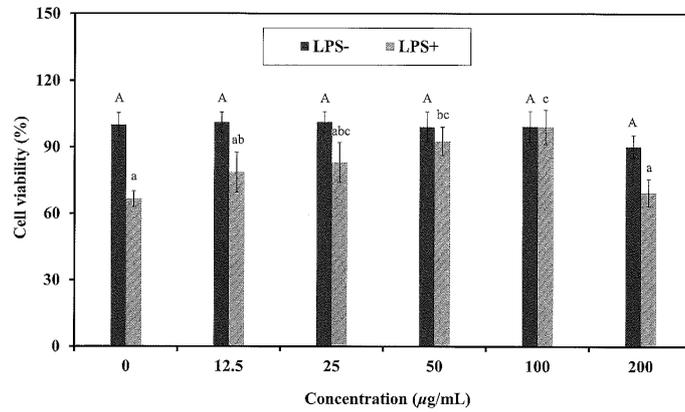


그림3-1-10. LPS처리군과 처리하지 않은 정상군의 세포생존을 확인

염증단계에서의 최종산물인 NO활성 측정을 통해 감초추출물이 염증으로부터 저해되는지 확인하였음. 그 결과 그림2에 서처럼, 100ug/ml의 감초추출물 농도의 처리까지 농도 의존적으로 NO의 생성이 감소함을 보임. 특히 100ug/ml의 경우 LPS 처리하지 않은 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않음을 확인하였음. 이 결과로 pro-inflammatory activity가 매우 높음을 확인하였음.

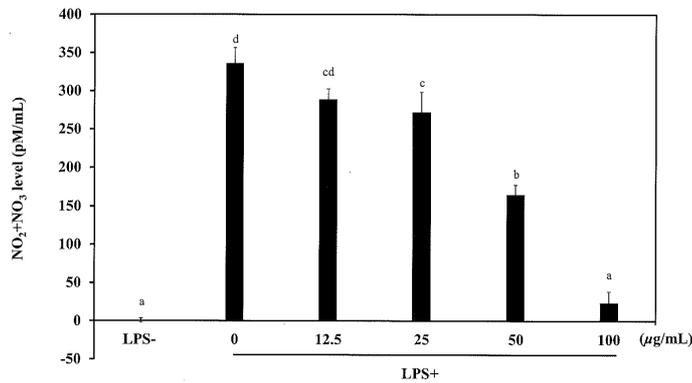


그림3-1-11. 감초추출물의 NO생성 저해 효과

염증이 발생되면 생체 내에서 ROS(활성산소)가 증가하게 되는데 감초추출물이 이러한 활성산소를 저해하는지 확인하고자 함. 그 결과, 100ug/ml의 감초추출물 처리 농도까지 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였음. 특히 100ug/ml의 경우 LPS를 처리하지 않은 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 확인됨. 이는 NO생성과 마찬가지로 감초추출물이 pro-inflammatory activity가 매우 높은 것을 확인할 수 있었음 (그림3-1-12).

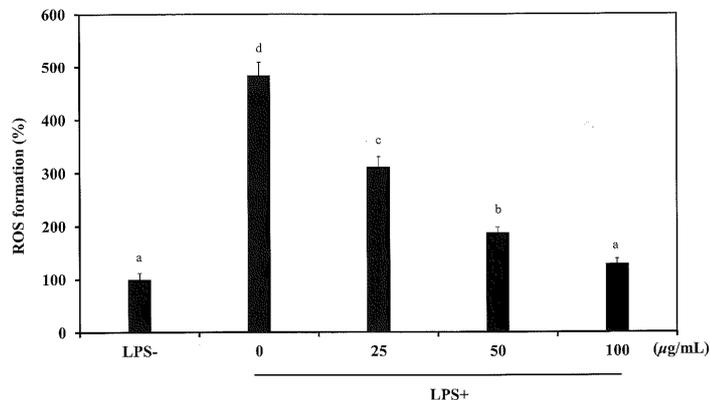


그림3-1-12. 감초추출물의 ROS생성 저해 효과

이러한 결과들을 토대로 염증관련 인자들인 iNOS와 COX-2 (그림4), 염증성 사이토카인을 mRNA수준으로 단백질을

확인하였음(그림3-1-12). 그 결과, 감초추출물을 처리한 실험군에서 농도 의존적으로 염증인자들인 iNOS와 COX-2의 발현이 감소됨을 확인하였음. 염증성 사이토카인 세 가지 인자 (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) 모두 발현이 감소함을 보였으나, TNF- $\alpha$ 의 경우 50 $\mu$ g/ml의 감초추출물 농도까지 대조군과 유의적 활성을 보이지 않음을 확인할 수 있었음. 이는 다른 두 사이토카인에 비해 연관성이 다소 적을 것으로 예상됨. 따라서 본 연구 결과로 감초추출물이 LPS로 유도된 염증유도를 저해함으로써 항염증효과를 확인할 수 있었음.

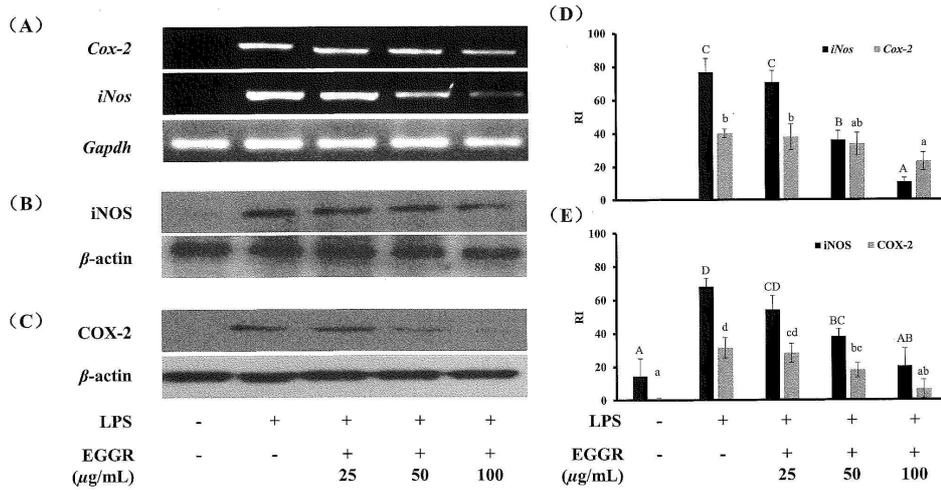


그림3-1-13. 감초추출물의 염증인자(iNOS,COX-2) 저해효과

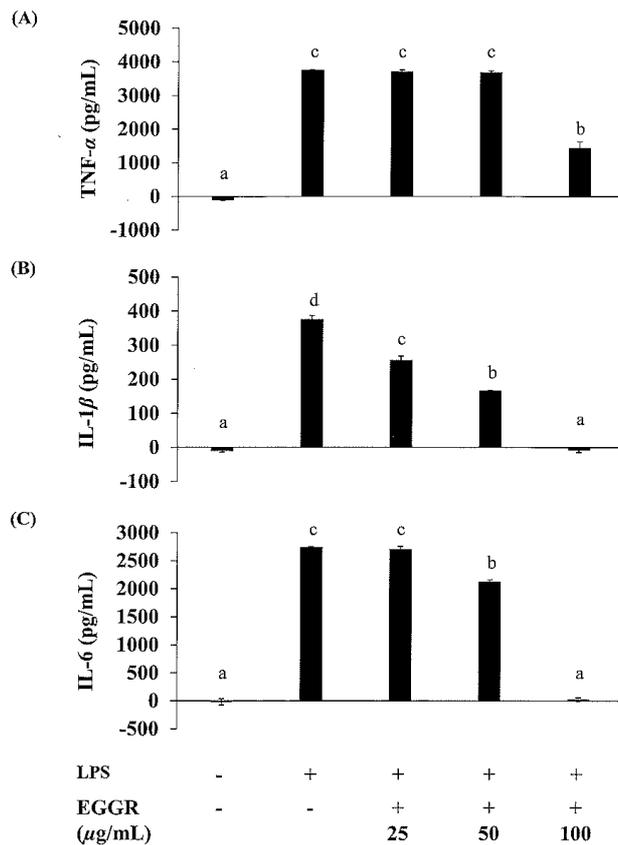


그림3-1-14. 감초추출물의 염증성 사이토카인 발현 저해효과

○ 항산화 효능을 나타내는 천연물질 스크리닝 (1)

- 갯기름나물은 혈관성 치매에 대한 예방, 혈압강화작용, 치료효과, 미백 및 주름개선 효과에 대한 연구가 진행되어 있음. 그러나 갯기름나물의 부위별 연구의 진행은 미비함. 본 연구에서는 갯기름나물 뿌리의 항산화활성을 측정하고자 하였음. 항산화 활성을 확인하기 위해 먼저 추출용매를 물, 에탄올 사용하여 추출하였음. 항산화 활성 측정을 위하여 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 측정과 DPPH, ABTS radical 소거활성, Ferric reducing antioxidant power (FRAP), Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)를 측정하였음. 또한 HepG2 cell을 이용하여 세포 생존율을 확인하고, 세포 내 ROS 소거활성, 항산화 효소 활성 측정을 통해 세포내에서의 항산화 활성을 확인하였음.

총 페놀함량과 플라보노이드 함량은 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 높은 함량을 보였음(표 1). 일반적으로 페놀기는 유기용매에서 보다 용이하게 추출되는 경향을 보임. 또한 물 추출물의 경우 에탄올 추출물에 비해 고온에서 추출하게 됨으로써 일부 항산화물질의 구조적 변화에 따라 활성이 오히려 감소하는 것으로 예상됨.

표3-1-4. 기름나물 뿌리 추출물의 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량 측정

Sample	TPC (mg GA/g)	TFC(mg QE/g)
PJRDE	4.75±0.03 <sup>b</sup>	541.61±7.59 <sup>b</sup>
PJREE	5.64±0.11 <sup>a</sup>	664.17±6.76 <sup>a</sup>

DPPH radical scavenging은 시료 125-1000µg/ml 범위에서 측정함. 에탄올 추출물(EC50:514.7µg/mL)이 물 추출물(EC50: 602.8µg/mL)에 비해 활성이 더 높았는데, 이 결과는 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량과 같은 경향을 보임(표 2).

표3-1-5. 갯기름나물 뿌리 추출물의 DPPH 소거 활성 측정

Sample	Concentration(µg/mL)				EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	125	250	500	1,000	
PJRDE	5.83±2.25 <sup>b</sup> <sub>d</sub>	22.69±1.33 <sup>c</sup>	38.12±1.34 <sup>c</sup> <sub>BC</sub>	85.84±2.90 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	602.89±2.73 <sub>A</sub>
PJREE	7.17±0.79 <sup>b</sup> <sub>d</sub>	31.21±2.07 <sup>b</sup> <sub>C</sub>	52.16±1.54 <sup>b</sup> <sub>B</sub>	95.52±2.19 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	514.70±7.26 <sub>B</sub>
Ascorbic acid	95.67±0.30 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	96.11±0.35 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	95.77±0.37 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	96.25±0.65 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	31.69±1.03 <sub>C</sub>

갯기름나물 추출물의 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 은 추출물 중에서는 에탄올 추출물이 가장 높은 항산화 활성을 나타냄. 그러나 항산화 활성의 지표로 사용한 ascorbic acid의 경우 동량의 추출물에 비해 약 500배 가량의 항산화 활성을 보임. 결과적으로 FRAP의 경우는 Electron transfer(ET)를 측정하는 지표 중 하나로 ET와 관련된 항산화 활성은 크지 않은 것으로 보임(표 3).

표3-1-6, 갯기름나물 뿌리 추출물의 FRAP 활성 측정

Samples	FRAP (µM FeSO <sub>4</sub> /g)
PJRDE	27.28±2.38 <sup>b</sup>
PJREE	39.76±1.17 <sup>a</sup>
Ascorbic acid	18,586.11±306.90

갯기름나물 추출물의 ABTS radical 소거활성은 두 추출물 모두 농도 의존적으로 ABTS 값이 증가함을 보임. ABTS도 FRAP과 마찬가지로 다른 추출물들에 비해 활성이 높지는 않음(표 4).

표3-1-7. 갯기름나물 뿌리 추출물의 ABTS 소거 활성 측정

Sample	Concentration( $\mu\text{g/mL}$ )				TEAC ( $\mu\text{mol TE/g}$ )
	250	500	1,000	2,000	
PJRDE	14.66 $\pm$ 0.89 <sup>d</sup>	22.98 $\pm$ 1.33 <sup>c</sup>	33.21 $\pm$ 1.34 <sup>b</sup>	76.13 $\pm$ 2.50 <sup>a</sup>	42.24 $\pm$ 1.84 <sub>B</sub>
PJREE	20.36 $\pm$ 0.55 <sup>d</sup>	29.63 $\pm$ 2.07 <sup>c</sup>	36.30 $\pm$ 1.54 <sup>b</sup>	87.24 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup>	50.55 $\pm$ 1.02 <sub>B</sub>

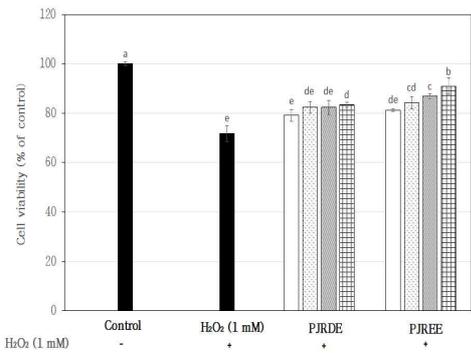
갯기름나물 추출물의 Oxygen radical absorbance capacity는 시료 1g 당 trolox  $\mu\text{M}$  함량을 나타내는 값으로 본 결과 에탄올 추출물(133.37  $\mu\text{M TE/g}$ )이 물 추출물(58.16  $\mu\text{M TE/g}$ )에 비해 유의적으로 높은 값을 보였음(표 5). 위 모든 항산화 활성 측정에서 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 항산화 활성과 총 페놀함량, 총 플라보노이드 함량을 나타냄.

표3-1-8. 갯기름나물 뿌리 추출물의 ORAC 결과

Samples	ORAC ( $\mu\text{M TE/g}$ )
PJRDE	58.16 $\pm$ 2.43 <sup>b</sup>
PJREE	133.37 $\pm$ 4.36 <sup>a</sup>
Ascorbic acid	873.96 $\pm$ 4.8

세포내에서 항산화 활성을 확인하기 위해 HepG2 cell을 이용함. 산화유도를 위해 hydrogen peroxide 를 사용하였고, 1시간 전 갯기름나물 추출물을 세포에 처리하여 항산화 활성을 확인하였음. 세포생존율 에서는 같은 농도에서 물 추출물에 비해 에탄올 추출물이 더 높은 세포생존율을 보였고, 1000  $\mu\text{g/mL}$ 까지 추출물 농도에 따라 세포생존율이 높아지는 경향을 보임(그림 1-A). 세포내 ROS 저해 활성의 경우 또한 물 추출물에 비해 에탄올 추출물에서 더 높은 소거활성을 보였고, 특히 1000 $\mu\text{g/mL}$  에탄올 추출물의 경우 105.5%로 감소하였음(그림 1-B).

(a)



(b)

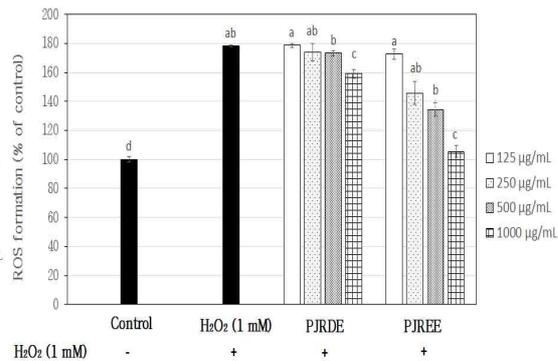


그림3-1-15. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HepG2 cell에서 갯기름나물 뿌리 추출물의 (a)세포생존율과 (b)세포내 ROS 소거활성

세포 내 항산화 활성의 근거로 세포 내 ROS를 제거하는데 사용되는 효소들을 선정하여 효소의 활성을 측정하였음. 활성을 측정한 효소는 catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR)를 사용함. 그 결과 모든 효소에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였을 때 효소 활성이 저해되었으나 갯기름 추출물을 먼저 처리한 군에서는 세 종류 모두 효소활성 감소를 저해하였고, 그 중 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 효소활성 감소 저해효과가 높았음(그림 2).

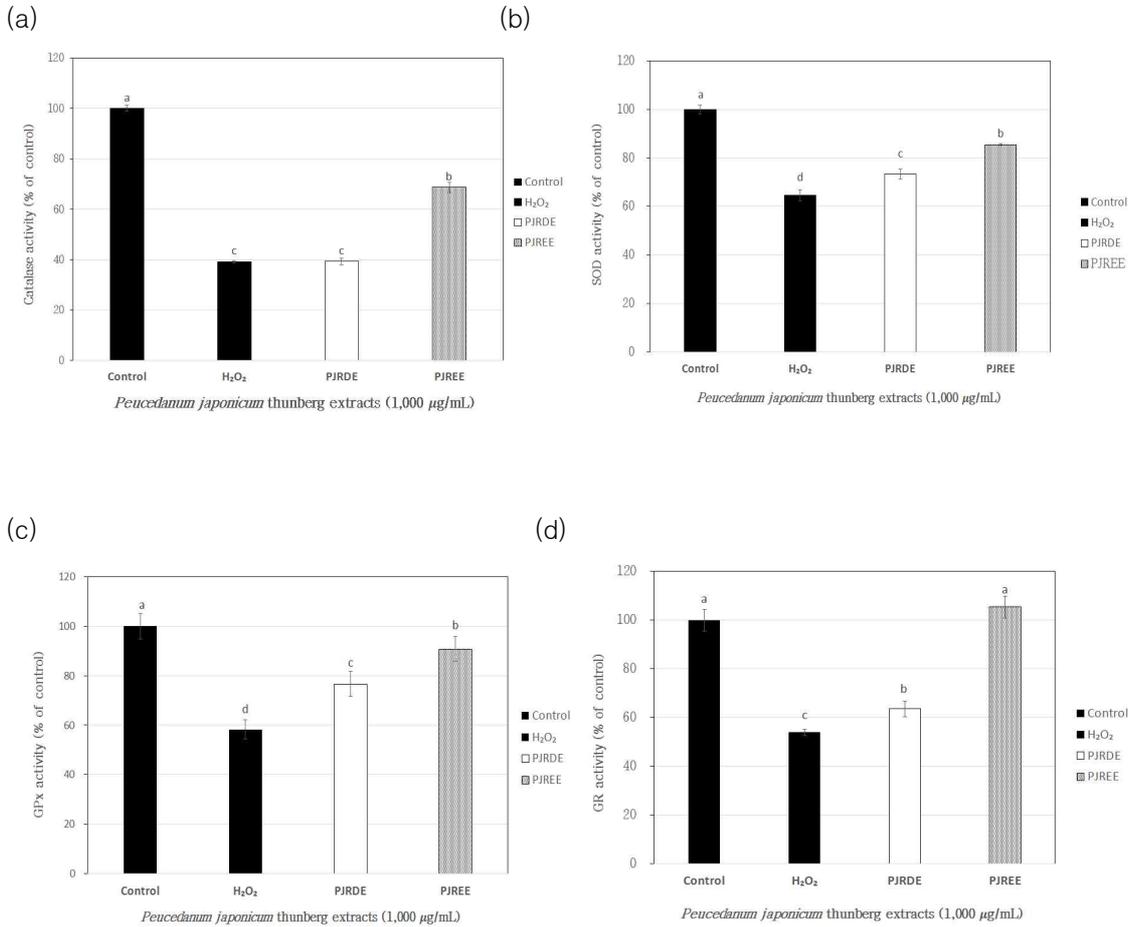


그림3-1-16. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HepG2 cell에서 갯기름나물 뿌리 추출물 처리에 따른 효소활성 측정. (a)catalase, (b)SOD, (c)GPx, and (d)GR

○ 항산화 효능을 나타내는 천연물질 스크리닝(2)

- 비수리는 아관문, 음양초 등으로 불리는 식물로 과거 당뇨나 순환성 질환에 치료목적으로 사용되었는데, 비수리 종자의 항산화 활성, 비수리 잎의 항균활성, 노화억제, 신장 기능장애 억제 등 부분적으로 연구가 되어있으나 정리되어 있지는 않음. 비수리 잎을 용매의 극성에 따른 추출물의 항산화 활성을 측정하여 비수리의 항산화 활성을 확인함. 비수리 추출용매를 물, 50% 에탄올, 100% 에탄올을 사용하여 추출하였음. 항산화 활성 측정을 위하여 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 측정과 DPPH, ABTS radical 소거활성, Ferric reducing antioxidant power (FRAP), Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)를 측정하였음. 또한 HepG2 cell을 이용하여 세포 생존율을 확인하고, 세포 내 ROS 소거활성, 항산화 효소 활성 측정을 통해 세포내에서의 항산화 활성을 확인하였음. 총 페놀함량은 50% 에탄올 추출물에서 가장 높은 값을 보였고, 총 플라보노이드 함량도 50% 에탄올 추출물에서 가장 높은 결과를 보였음(표 1). 일반적으로 페놀기를 가지고 있는 구조의 화합물들은 극성이 낮은 용매에 주로 추출되기 때문으로 예상됨. 일반적으로 페놀기를 가지고 있는 물질들이 항산화 활성을 보이는 경우가 많고 총 페놀화합물의 양을 측정하는 것이 항산화 활성을 예측하는 방법으로 많이 사용됨.

표 4-9. 비수리 추출물의 용매별 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량 측정

Sample	TPC (mg GA/g)	TFC(mg QE/g)
LDE	103.58±1.06 <sup>c4)</sup>	80.74±0.16 <sup>b</sup>
LEE100	156.01±0.86 <sup>b</sup>	97.59±0.09 <sup>b</sup>
LEE50	166.09±5.26 <sup>a</sup>	133.52±0.19 <sup>a</sup>

DPPH radical scavenging은 시료 50-400µg/ml 범위에서 측정함. 결과는 EC50으로 표기함. 위 결과 에서 DPPH radical scavenging의 EC50 값은 각각 169.75µg/ml, 144.27µg/ml, 99.43µg/ml으로 50% 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 보임(표 2). 이 결과는 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량과 같은 경향을 보이는 것으로 페놀, 플라보노이드 계열의 물질이 항산화에 영향을 주는 것으로 예상됨.

표 4-10. 비수리 추출물의 용매별 DPPH 소거 활성 측정

Sample	Concentration (µg/mL)				EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	50	100	200	400	
LDE	18.01±1.13 <sup>d</sup>	34.86±1.28 <sup>d</sup>	56.87±3.52 <sup>c</sup>	71.99±4.02 <sup>b</sup>	169.75±13.45 <sup>a</sup>
LEE100	20.67±1.27 <sup>d</sup>	40.33±1.91 <sup>c</sup>	62.00±3.14 <sup>b</sup>	77.80±1.55 <sup>a</sup>	144.27±8.65 <sup>b</sup>
LEE50	27.61±0.62 <sup>d</sup>	50.83±2.30 <sup>c</sup>	74.88±1.30 <sup>b</sup>	78.09±0.70 <sup>a</sup>	99.43±6.69 <sup>c</sup>

비수리 추출물의 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)은 모든 추출물이 농도 의존적으로 항산화활성이 증가함을 보였고 추출물 중에서는 50% 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 나타냄(표 3). 그러나 항산화 활성의 지표로 사용한 ascorbic acid의 경우 비수리 50% 에탄올 추출물의 비해 약 10배 가량의 항산화 활성을 보임(표 3).

표 4-11, 비수리 추출물의 용매별 FRAP 활성 측정

Sample	Concentration (µg/mL)				mM FeSO <sub>4</sub> /g
	50	100	200	400	
LDE	69.04±8.85 <sup>d</sup>	123.00±2.96 <sup>c</sup>	215.42±3.34 <sup>b</sup>	438.13±11.74 <sup>a</sup>	1.23±2.96 <sup>c</sup>
LEE100	73.42±0.83 <sup>d</sup>	151.08±3.01 <sup>c</sup>	268.08±13.26 <sup>b</sup>	535.04±28.30 <sup>a</sup>	1.51±3.01 <sup>b</sup>
LEE50	94.87±2.62 <sup>d</sup>	180.38±4.38 <sup>c</sup>	351.67±6.82 <sup>b</sup>	699.04±30.15 <sup>a</sup>	1.80±4.38 <sup>a</sup>

비수리 추출물의 ABTS radical 소거활성은 50%에탄올, 100% 에탄올, 물 순으로 소거활성을 보였으며, 각 추출물의 EC50 값은 08.62±15.86 µg/mL, LEE100이 383.14±12.11 µg/mL, LDE가 477.03±15.89 µg/mL 임. 비교군으로 사용한 ascorbic acid와는 9배 이상의 차이를 보였음(표 4).

표 4-12. 비수리 추출물의 용매별 ABTS 소거 활성 측정

Samples	Concentration (µg/mL)				EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	100	200	400	800	
LDE	4.00±1.20 <sup>d</sup>	16.16±1.16 <sup>c</sup>	43.42±1.26 <sup>b</sup>	77.71±1.80 <sup>a</sup>	477.03±15.89 <sup>a</sup>
LEE100	5.72±0.89 <sup>d</sup>	22.36±0.37 <sup>c</sup>	52.66±1.95 <sup>b</sup>	87.32±2.18 <sup>a</sup>	383.14±12.11 <sup>b</sup>
LEE50	11.85±0.95 <sup>d</sup>	32.30±0.76 <sup>c</sup>	63.68±2.16 <sup>b</sup>	98.40±0.42 <sup>a</sup>	308.62±15.86 <sup>c</sup>

비수리 추출물의 ORAC는 표 5와 같이 시료 1g 당 trolox  $\mu\text{M}$  함량을 나타내는 값으로 본 결과 50% 에탄올 추출물에서 가장 높은 값 (2,647.77  $\mu\text{M TE/g}$ )을 보였고, 물 추출물과 100% 에탄올 추출물은 각각 1,786.22  $\mu\text{M TE/g}$ , 2,117.05 $\mu\text{M TE/g}$ 를 보임. 위 모든 결과에서 항산화 활성은 모두 50% 에탄올 추출물이 가장 높은 항산화 활성과 총 페놀함량, 총 플라보노이드 함량을 나타냄.

표 4-13. 비수리 추출물의 용매별 ORAC 결과

Samples	ORAC ( $\mu\text{mol TE/g}$ )
LDE	1,786.22 $\pm$ 82.03 <sup>d</sup>
LEE100	2,117.05 $\pm$ 90.02 <sup>c</sup>
LEE50	2,647.77 $\pm$ 64.97 <sup>b</sup>
Ascorbic acid	15,427.9 $\pm$ 51.9 <sup>a</sup>

hydrogen peroxide로 산화 유도된 HepG2 cell에서 비수리 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 세포 생존율과 세포내 ROS 소거능을 측정하였음. 본 결과에서 용매별 세포생존율은 큰 차이를 보이지 않았으나 농도 의존적으로 세포생존율이 증가함을 보였음. 세포 내 ROS 소거능 에서도 50% 에탄올 추출물 이 ROS 발생량이 다소 적게 발생하였으나 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 모든 추출물에서 농도 의존적으로 ROS 발생이 줄어드는 경향을 보임. 위 두 결과를 통해 비수리 추출물은 세포수준에서 용매의 종류에 따른 경향보다 용매의 농도에 따라 항산화 활성에 영향을 미치는 것으로 사료됨.

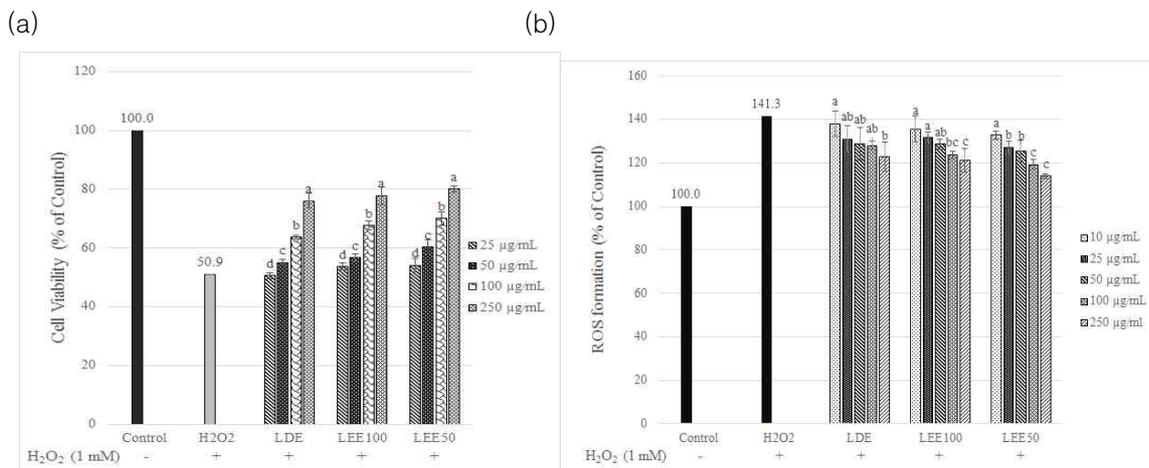


그림3-1-17. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HepG2 cell에서 비수리 추출물의 (a)용매별 세포생존율과 (b)세포내 ROS 소거활성

세포 내 항산화 활성의 근거로 세포 내 ROS를 제거하는데 사용되는 효소들을 선정하여 효소의 활성을 측정하였음. 활성을 측정한 효소는 catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR)를 사용함. 결과는 모든 효소에서 hydrogen peroxide로 처리하였을 때 효소 활성이 저해되었으나 비수리를 먼저 처리한 군에서는 세 종류 모두 효소활성의 감소를 저해함. 그 중에서도 50% 에탄올 추출물이 가장 크게 활성 감소를 저해하였음(그림 2).

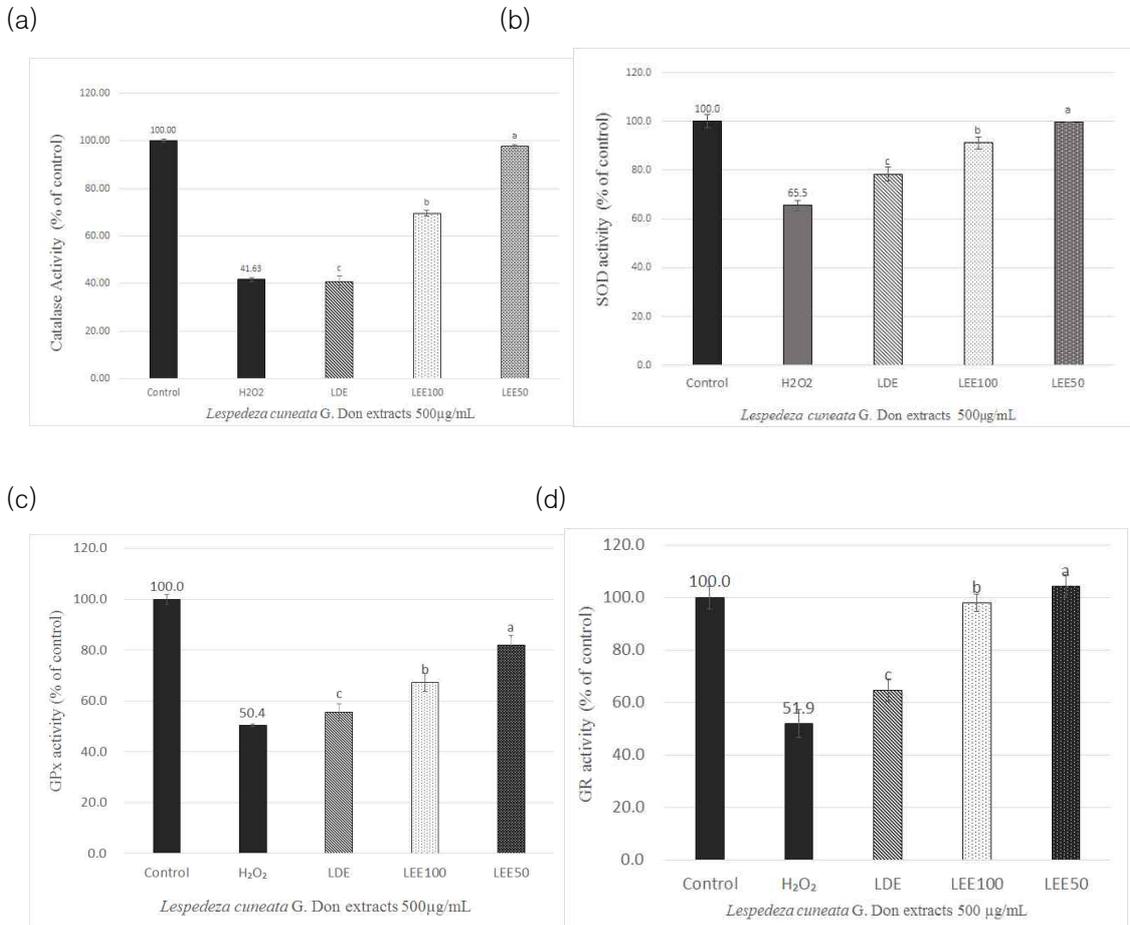


그림3-1-18. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HepG2 cell에서 효소활성 측정. (a) catalase, (b)SOD, (C)GPx, and (d)GR

○ 항염, 항산화 활성을 나타내는 물질 탐색

- 산겨릅 추출물의 ROS 소거활성에 의한 항염증 활성을 알아보기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화 스트레스를 유도한 HepG2 cell에서의 항산화 활성과 LPS로 염증을 유도한 RAW264.7 macrophage cell에서 항염증 활성을 확인함. HepG2 cell은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 세포생존율이 감소하게 되는데 미리 처리되어 있던 산겨릅 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포의 손상정도를 줄여 세포생존율이 증가하게 됨. 20ug/ml 이상의 농도에서 유의적인 차이를 보였음(그림 1). 세포 내 ROS scavenging activity 측정을 통해 HepG2 cell에서 산겨릅 추출물이 ROS 소거활성에 도움을 주는지를 확인하였음. 그 결과 그림 2에서 산겨릅 추출물의 경우 농도 의존적으로 추출물의 농도에 의해 ROS가 감소함을 확인하였음. 위 결과에 따라 40ug/ml의 농도에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군과 유의적 차이를 보이며 감소하였음(그림 2). 위 결과에 따라 산겨릅 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 유도된 cell에 ROS 생성을 저해하는 효과가 있음을 확인함.

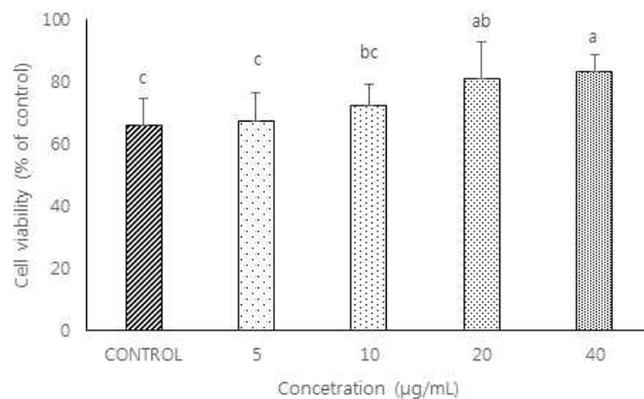


그림3-1-19. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HepG2 cell의 산겨릅 추출물 처리에 따른 세포생존율

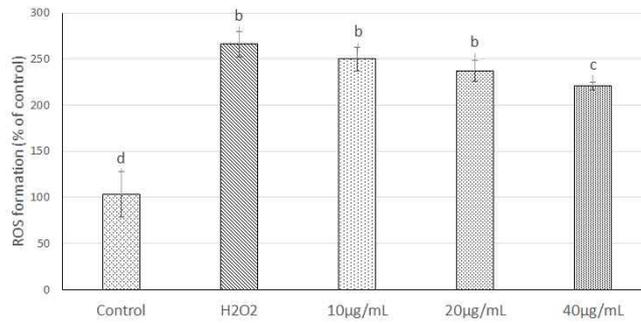


그림3-1-20. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HepG2 cell의 산겨름 추출물 처리에 따른 세포 내 ROS 소거활성

세포내 효소들의 활성을 측정하여 HepG2 cell이 효과적으로 ROS를 제거할 수 있는지를 확인하는 실험으로 모든 결과에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 처리됨에 따라 효소활성이 급격히 감소되었고, 산겨름 추출물을 처리함에 따라 활성이 증가함을 보였음 (그림 4-21). 본 결과로부터 산겨름 추출물은 4가지 효소의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로부터 활성을 저해하는 것을 막는데 도움을 주는 것으로 판단됨

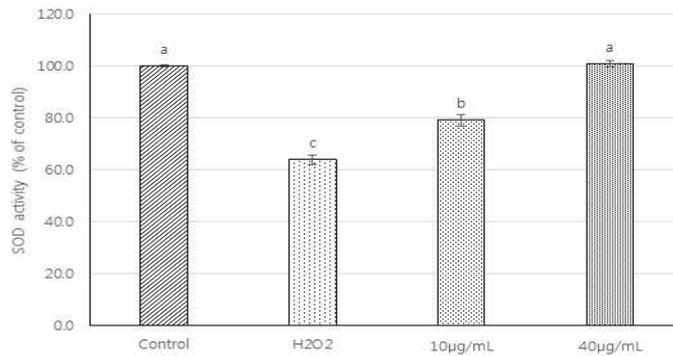


그림3-1-21. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HepG2 cell의 산겨름 추출물 처리에 따른 superoxide radical 활성 측정

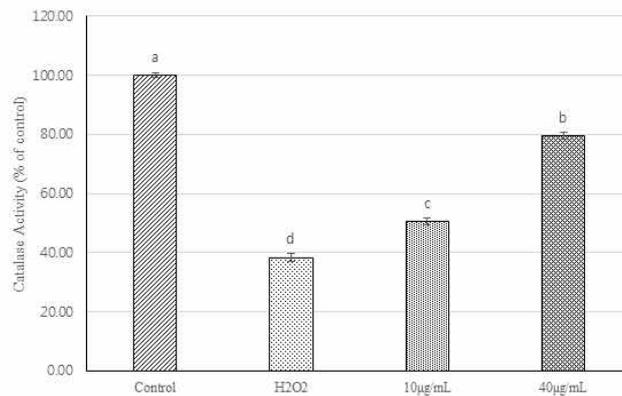


그림3-1-22 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HepG2 cell의 산겨름 추출물 처리에 따른 catalase 활성 측정

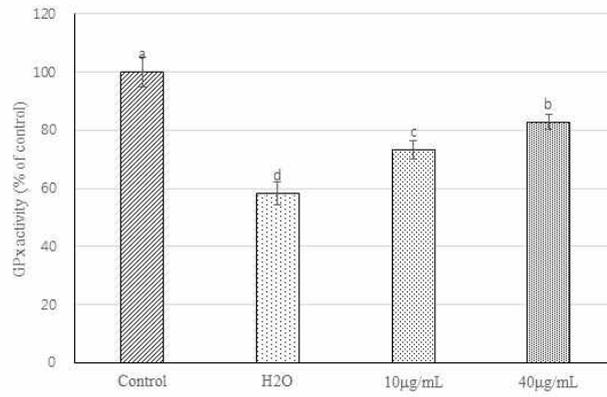


그림3-1-23. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HepG2 cell의 산겨름 추출물 처리에 따른 Glutathione peroxidase 활성 측정

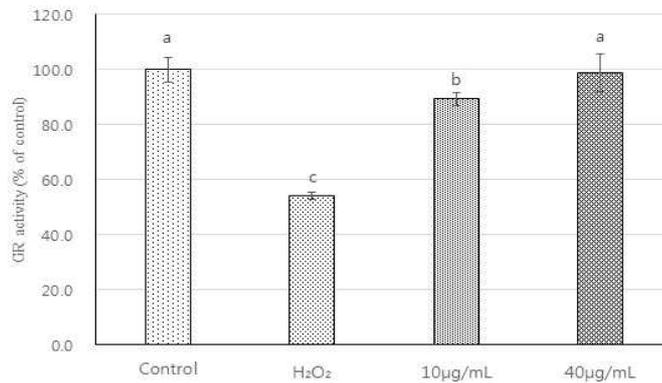


그림3-1-24. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HepG2 cell의 산겨름 추출물 처리에 따른 Glutathione reductase 측정

염증의 발생을 확인하기 위해 lipopolysaccharide를 처리한 RAW264.7 macrophage cell의 세포생존율을 확인함. 세포생존율의 경우 염증유도를 목적으로 하고 세포생존율은 크게 저해하지 않는 범위 내에서 실험을 진행하고자 하였음. 그림 4.에서 LPS의 처리에도 불구하고 세포생존율은 크게 감소하지 않았고, 오히려 40ug/ml과 80ug/ml에서는 세포생존율이 소폭 상승함을 보임.

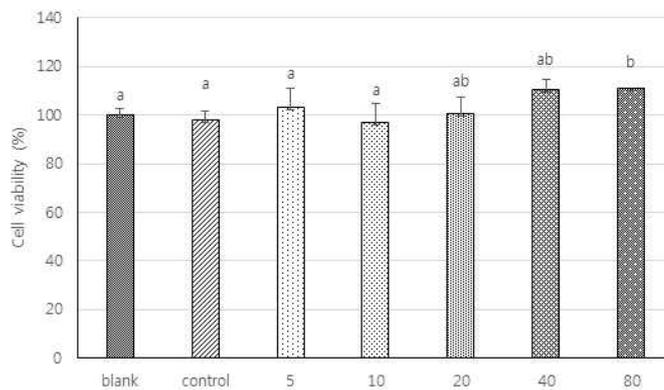


그림3-1-25. LPS로 유도된 RAW264.7 cell의 산겨름 추출물 처리에 따른 세포생존율

염증 발생 확인을 위해 NO 생성을 확인하였음. 세포내의 염증반응의 대표적 생성물인 nitro-oxide는 세포내 염증 발생의 지표로서 많은 연구에서 사용됨. 그림 5.의 경우 LPS의 처리에 의해 NO가 3배가 넘게 발생하는데 산겨름의 처리군의 경우 농도 의존적으로 NO의 생성이 감소함을 보임. 이를 통해 산겨름 추출물을 세포에 처리한 경우는 세포의 염증 유발을 저해할 수 있다고 예상됨.

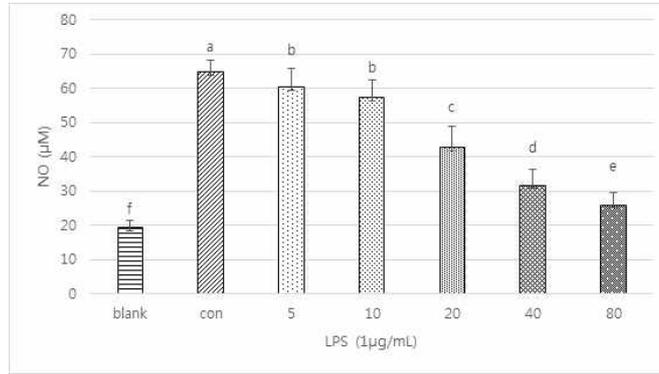


그림3-1-26. LPS로 유도된 RAW264.7 cell의 산겨름 추출물 처리에 따른 NO 생성 저해 효과

염증발생을 확인하는 요인들로 염증성 cytokine의 생성을 들 수 있음. 본 실험에서는 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 를 측정하였음. 모든 결과에서 LPS에 의해 cytokine의 발현양이 크게 증가하였고 산겨름 추출물 처리군의 경우 농도 의존적으로 cytokine 양이 감소하였음(그림 4-27). 이 결과는 NO 생성 저해 효과와 같은 경향을 보이는 것으로 염증유발이 저해됨을 확인하는 근거로 볼 수 있음. 결론적으로 본 실험의 결과로 산겨름 추출물이 항산화효과를 유발하고, 이로 인해 산화물질로 유도될 수 있는 항염증의 발생을 저해하는 것을 확인하였음.

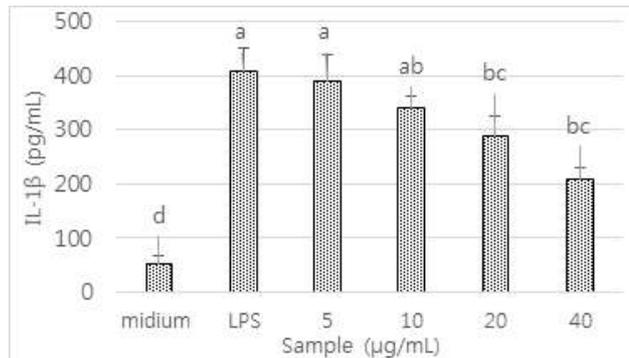


그림3-1-27. LPS로 유도된 RAW264.7 cell의 산겨름 추출물 처리에 따른 IL-1 $\beta$  발현 저해 효과

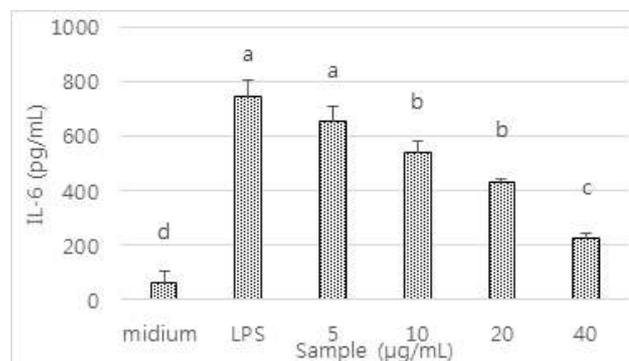


그림3-1-28. LPS로 유도된 RAW264.7 cell의 산겨름 추출물 처리에 따른 IL-6 발현 저해 효과

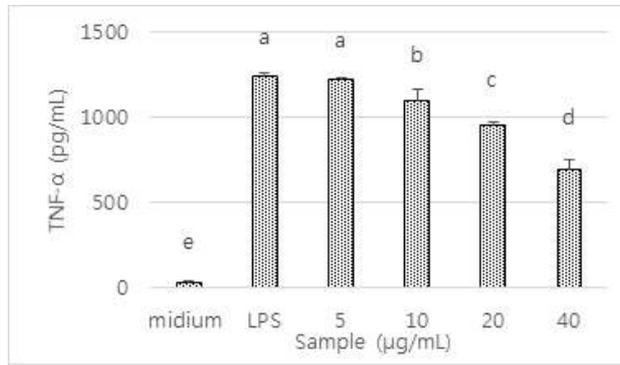
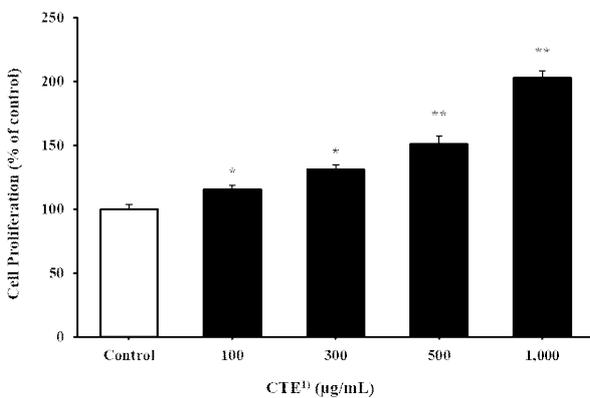


그림4-29 LPS로 유도된 RAW264.7 cell의 산겨름 추출물 처리에 따른 TNF-α 발현 저해 효과

○ Corticosterone으로 유도된 PC12의 세포 자멸사에 대한 마음가리 추출물의 신경보호활성

corticosterone에 의한 스트레스로 유도된 PC12 세포 자멸사에 대한 마음가리 추출물(*Clematis terniflora* extract; CTE)의 신경 보호 활성과 관련 신호 전달 경로를 연구함. WST-1 assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였고, Hoechst 33342 염색법, JC-10 염색법과 calcein-cobalt quenching법을 이용하여 세포의 형태학적 변화와 미토콘드리아 기능장애를 관찰함. 또한 DCF-DA를 이용한 세포 내 ROS 수준과 western blot으로 p-ERK1/2, Bad, GRP78, GADD153의 발현량을 측정함

A



B

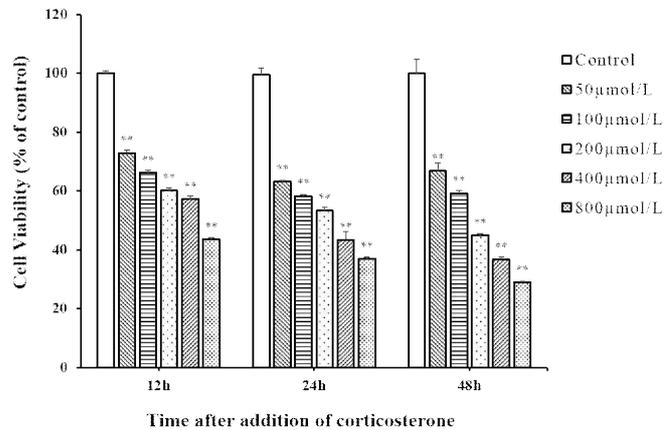


그림3-1-30. Effect of CTE and corticosterone on PC12 cell viability.

(A) Effect of different concentrations of CTE. PC12 cells were exposed to various concentrations of *clematis terniflora* extracts for 24h; (B) effect of concentration- and time-dependent of corticosterone. PC12 cells were exposed to various concentration of corticosterone for 12, 24, 48 h.

Each column represents the mean ± S.E.M.. (n=5). \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 as compared with control group.

<sup>1)</sup> CTE : *Clematis terniflora* extract.

세포생존율 결과에 따라 200 µmol/L의 corticosterone을 24시간동안 처리하는 것으로 결정함

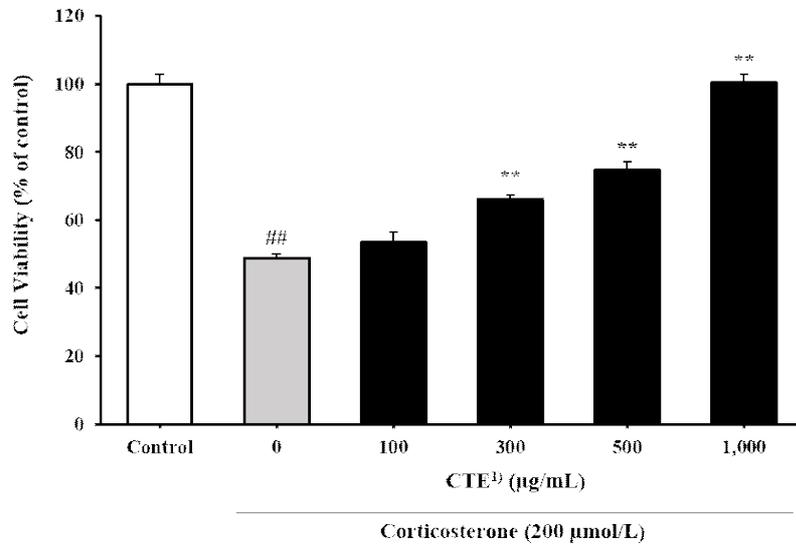


그림3-1-31. Effect of CTE on the cell viability of corticosterone-induced PC12 cells.

PC12 cells were exposed to various concentrations of *Clematis terniflora* extracts and corticosterone (200 μmol/L) for 24 h.

The results are expressed as a percentage of control. Each column represents the mean ± S.E.M. (n=5). ##P < 0.01 as compared with the control group; \*\*P < 0.01 as compared with corticosterone-treated group.

1) CTE : *Clematis terniflora* extract.

CTE를 300~1,000 μg/mL로 처리했을 때 corticosterone에 대한 PC12 세포 보호 활성이 있었고, 1,000 μg/mL CTE의 보호 활성이 가장 높았다. 그러나 1,000 μg/mL의 CTE는 세포 자체 증식률을 대조군에 비해 약 200% 까지 증가시켰기 때문에(그림 2A), 세포 증식에 의한 효과로부터 세포 보호 효과를 구분하기 어렵다고 판단되어 세포생존율을 각각 대조군에 비해 66.1%, 74.1% 까지 증가시킨 300, 500 μg/mL 농도의 CTE를 사용함

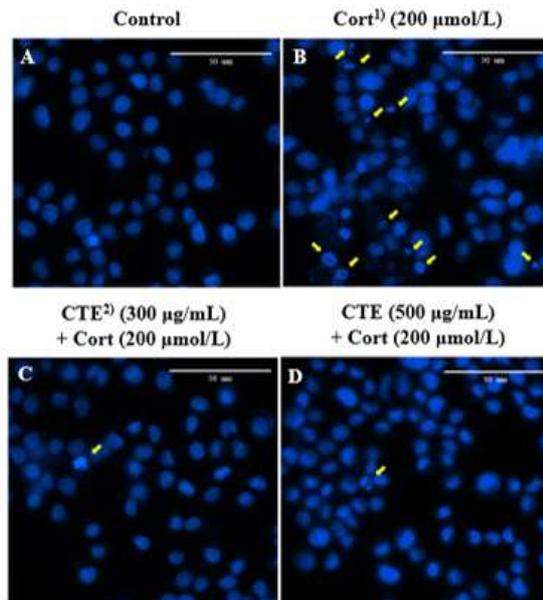


그림3-1-32. Effect of CTE on survival in corticosterone-induced PC12 cells by Hoechst 33342 staining.

Representative Hoechst 33342 staining images of cell apoptosis.

1) CORT : Corticosterone.

2) CTE : *Clematis terniflora* extract.

CTE가 corticosterone으로 유도된 PC12 세포 자멸사에 미치는 영향을 형태학적으로 확인함 apoptotic body가 현저히 줄어들었음. 앞서 확인한 세포 생존율과 apoptotic body를 확인한 결과 CTE가 corticosterone에 의한 세포 자멸사를 억제함을 확인함

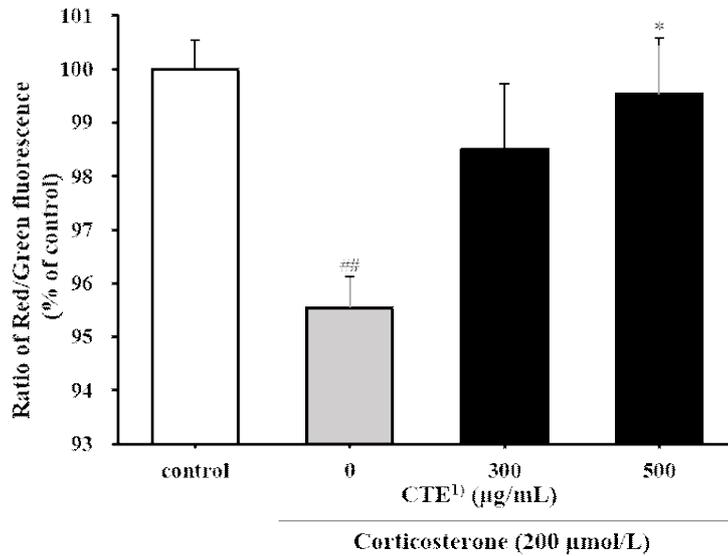


그림3-1-33. Effect of CTE on the opening of mPTP in corticosterone-treated PC12 cells.

Green fluorescence is representative of healthy mitochondria fluorescence.

<sup>1)</sup> CORT : Corticosterone.

<sup>2)</sup> CTE : *Clematis terniflora* extract.

mPTP 관찰을 위해 calcein-cobalt quenching법을 이용하였고, corticosterone 처리군에는 형광도가 감소하였으나 CTE 처리군에서는 형광도가 비교적 적게 감소하였음

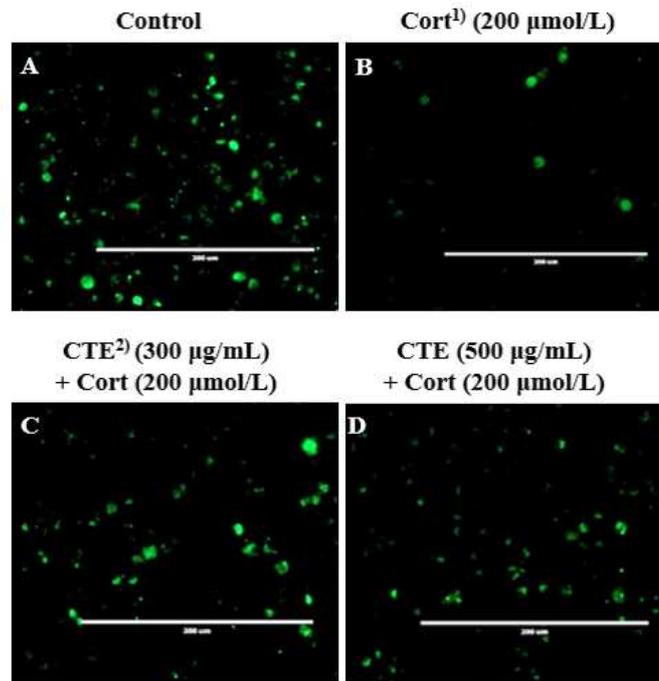


그림3-1-34. Effect of CTE on MMP in corticosterone-treated PC12 cells.

The MMP of cells in each group was calculated as the fluorescence ratio of red to green. The MMP was analyzed using a fluorescence microplate reader after JC-10 staining.

The results are expressed as a percentage of control. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=5). <sup>##</sup>P < 0.01 as compared with the control group; <sup>\*</sup>P < 0.05 as compared with corticosterone-treated group.

<sup>1)</sup> CORT : Corticosterone.

<sup>2)</sup> CTE : *Clematis terniflora* extract.

Corticosterone에 의한 영향으로 미토콘드리아의 일정 전압차를 잃게 되는데 이는 세포손상의 지표가 된다. 본 결과에서는 Corticosterone 에 의해 MMP의 손실이 일어난 결과에서 CTE 처리를 통해 유의적인 손실 억제가 일어남을 보였다.

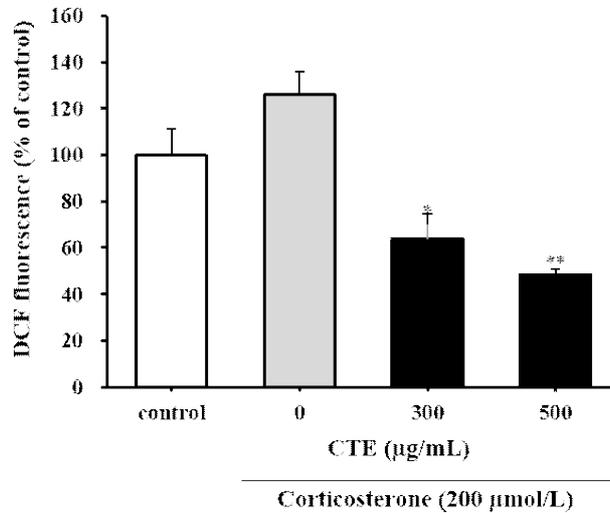


그림3-1-35. Effect of CTE on the intra-cellular ROS level.

The intra-cellular ROS was detected by the DCF-DA method. Fluorescence of DCF produced by ROS in corticosterone treated PC12 cells were compared to the control and the cells treated with various concentration of *Clematis terniflora* extracts in presence of corticosterone.

The results are expressed as a percentage of control. Each column represents the mean ± S.E.M. (n=5). \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 as compared with corticosterone-treated group.

1) CTE : *Clematis terniflora* extract.

세포 내 ROS 측정을 위해 DCF-DA를 이용하여 측정함. CTE 처리를 통해 ROS가 감소하였고, 미토콘드리아의 기능저하를 야기하는 과정을 억제하였다고 판단됨.

○ 커피 로스팅중 공기순환이 항산화 활성과 폐놀함량에 미치는 효과

커피 로스팅에 영향을 주는 요인 중 공기의 유입이 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있으나 과학적인 근거가 미비하여 본 연구를 진행함. 로스팅에 영향을 주는 요인으로 로스팅 온도, 시간 공기유입량을 조정하였음. 결과를 확인하기 위해 반응표면분석을 사용하였고 총 15가지 로스팅 조건이 부여되었음. 항산화 활성은 DPPH 와 ORAC를 사용하였고 총 폐놀함량을 확인하였음.

표3-1-14. 로스팅 조건에 따른 항산화 활성과 폐놀함량

Experimental run	Temperature (°C)	Time (min)	Air flow (L/s)	DPPH (%)		ORAC (µM TE/g)		TPC (mg GAE/g)	
				Observed	Predicted	Observed	Predicted	Observed	Predicted
1	190 (0)	13 (-1)	-0.271 (-1)	63.12 ± 3.78	61.55	743.68 ± 1.77	728.27	22.98 ± 0.89	22.63
2	200 (1)	15 (0)	-0.271 (-1)	48.79 ± 3.10	50.39	650.99 ± 0.38	657.75	17.51 ± 0.52	17.28
3	190 (0)	15 (0)	0 (0)	58.32 ± 6.87	58.39	735.74 ± 0.57	703.95	24.90 ± 1.19	24.77
4	200 (1)	15 (0)	0.271 (1)	58.89 ± 2.92	58.65	644.45 ± 2.00	641.76	22.48 ± 0.83	22.18
5	190 (0)	17 (1)	0.271 (1)	58.23 ± 3.64	59.81	686.97 ± 0.72	702.38	22.62 ± 0.45	22.97
6	190 (0)	15 (0)	0 (0)	60.60 ± 4.03	58.39	695.37 ± 2.98	703.95	25.21 ± 0.89	24.77
7	180 (-1)	17 (1)	0 (0)	60.21 ± 6.27	60.24	762.19 ± 1.47	753.54	25.82 ± 0.78	25.24
8	190 (0)	13 (-1)	0.271 (1)	64.57 ± 4.95	64.84	859.46 ± 2.47	853.49	26.99 ± 0.42	26.72
9	180 (-1)	15 (0)	0.271 (1)	67.48 ± 3.18	65.88	941.13 ± 1.52	934.37	27.02 ± 0.71	27.25
10	190 (0)	17 (1)	-0.271 (-1)	54.38 ± 1.30	54.10	700.45 ± 0.38	706.42	19.27 ± 0.26	19.54
11	200 (1)	13 (-1)	0 (0)	55.52 ± 4.76	55.49	615.34 ± 1.55	624.00	21.89 ± 1.12	22.46
12	200 (1)	17 (1)	0 (0)	50.41 ± 3.73	49.08	480.78 ± 2.60	468.05	16.95 ± 1.39	16.90
13	190 (0)	15 (0)	0 (0)	56.24 ± 4.89	58.39	680.75 ± 2.21	703.95	24.19 ± 1.06	24.77
14	180 (-1)	15 (0)	-0.271 (-1)	64.89 ± 1.77	65.14	794.51 ± 2.60	797.19	24.31 ± 0.30	24.62
15	180 (-1)	13 (-1)	0 (0)	64.98 ± 5.61	66.31	757.83 ± 3.95	770.56	26.48 ± 1.34	26.52

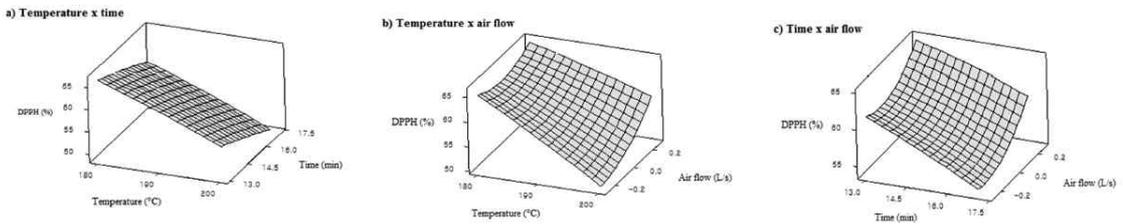


그림3-1-36. 로스팅 조건에 따른 DPPH 반응표면도

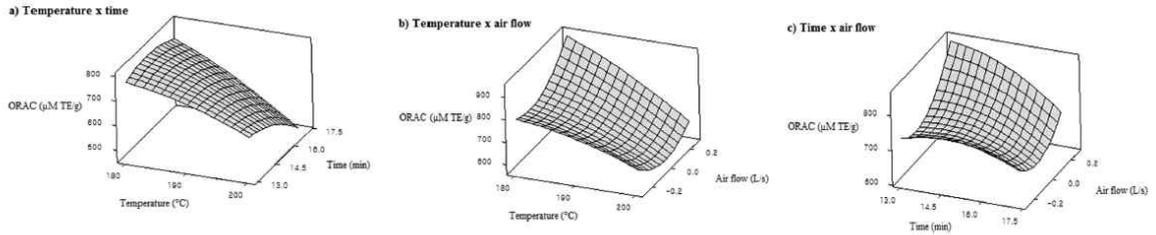


그림3-1-37. 로스팅 조건에 따른 ORAC 반응표면도

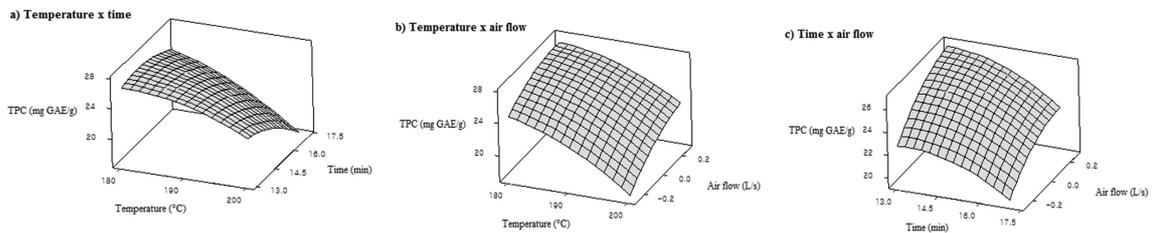


그림3-1-38. 로스팅 조건에 따른 총페놀함량 반응표면도

본 결과에 따르면 DPPH와 ORAC 모두 로스팅 시간이 짧고 온도가 낮을수록 항산화 활성이 높았으며 공기흐름이 생길수록 높은 항산화값을 보였다. 총 페놀함량에서도 거의 균일한 경향을 보였으나 특이점으로는 공기가 배출되는 것보다 유입되는 것이 총페놀함량의 값이 더 높았음

○ 커피의 로스팅 수준에 따른 항산화 활성과 항염증 활성

커피에 항산화 물질과 항염증 활성이 있다는 연구가 다수 보고되었으나 커피의 경우 로스팅 과정에서 높은 열을 길게 받게 됨에 따라 기능성 성분의 변화가 예상된다. 본 연구에서는 로스팅 수준에 따라 항산화 성분과 항염증 활성이 어떻게 변화되는지 알아보하고자 함

표3-1-15. 로스팅 처리조건에 따른 분류와 중량변화

Sample	Initial weight (g)	Initial temperature	Final temperature	Roasting time (min)	Final weight (g)	Loss (%)	Roasting level	
							Degree	Agtron No.
R1	200.0	180	199	8.00	177.0	11.5	Light	94.0±1.4
R2	200.0	180	204	9.00	172.6	13.7	Medium	75.9±1.9
R3	200.0	180	209	10.33	168.2	15.9	City	57.7±1.6
R4	200.0	180	212	11.33	153.6	23.2	French	32.2±0.3

표3-1-16. 로스팅 수준에 따른 카페인과 클로로제닉산 함량

	Light		Medium		City		French	
	AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
Caffeine	89.955 <sup>a</sup>	0.291	92.032 <sup>a</sup>	1.110	85.696 <sup>b</sup>	2.176	85.866 <sup>b</sup>	1.074
Chlorogenic acid	5.735 <sup>a</sup>	0.011	3.703 <sup>b</sup>	0.004	1.544 <sup>c</sup>	0.001	0.227 <sup>d</sup>	0.001

로스팅으로 인해 커피 생두에 있던 카페인과 클로로제닉산이 손실되게 되는데 로스팅시간이 길어짐에 따라 손실율이

증가함을 확인할 수 있다.

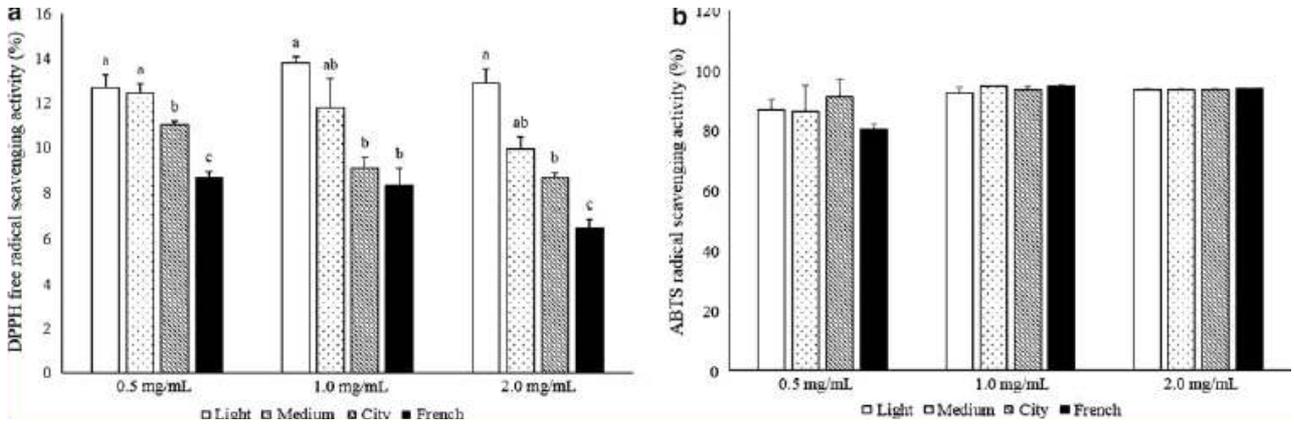


그림3-1-39. 로스팅 수준에 따른 DPPH radical scavenging activity와 ABTS radical scavenging activity

DPPH 에서는 로스팅 수준에 따라 항산화 활성이 유의적으로 변화함을 확인할 수 있었음

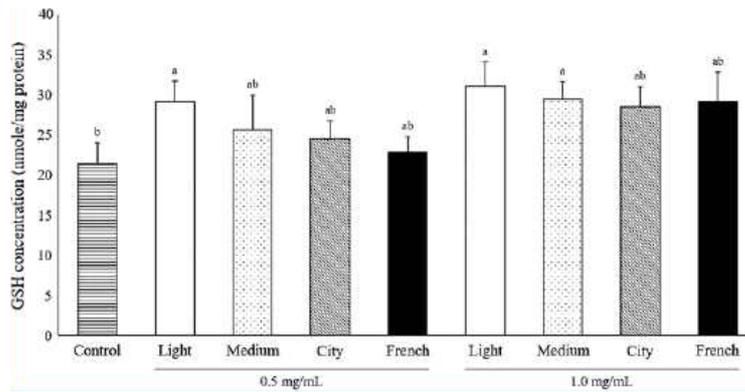
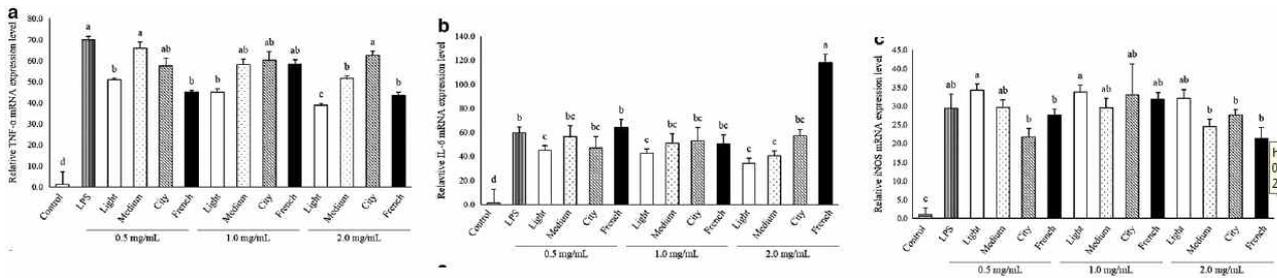


그림3-1-40. AML-12세포에서 세포내 glutathione 변화

로스팅 수준에 의해 세포 생존율에는 영향을 주지 않았지만 세포내 글루타티온 양의 변화를 야기함을 확인할 수 있다



RAW 264.7 macrophage cell에서 염증발현에 관계되는 인자인 TNF-α, IL-6, iNOS를 측정해 본 결과 농도별이나 로스팅 수준에 따라 일관되게 발현인자들이 감소하지는 않으나 TNF-α, IL-6, iNOS 모두 커피에 의해 감소하는 결과를 보였다. 이는 커피에 들어있는 유효성분들이 염증발현을 억제한다고 유추할 수 있다.

○ Corticosterone으로 유도된 세포 손상으로부터 보호 효과 확인.

-울릉도 자생식물 중 Corticosterone으로 유도된 세포 손상으로부터 보호 효과 확인

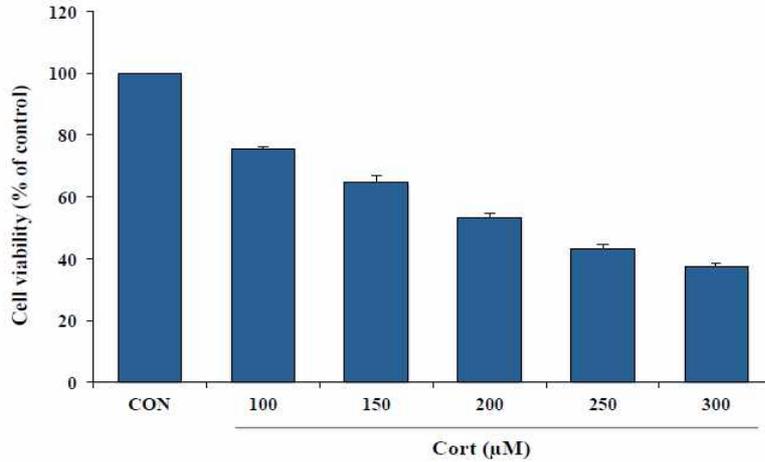


그림3-1-41. Corticosterone 농도별 PC12 세포의 세포 생존율에 미치는 영향

세포생존율은 농도 의존적으로 감소하였으며 200 μM Corticosterone에서 대조군에 비해 약 50 % 감소하는 것을 확인하였으며, 본 연구의 Corticosteron 처리 조건으로 적용.

2. 말오줌때, 우산제비꽃, 울릉섬기린초, 참나리, 두메부추의 열수추출물을 이용하여 PC12 세포에 샘플을 농도별로 24시간 동안 처리하여 자체 독성을 확인하고, Corticosterone으로 유도된 PC12 세포 손상에 대한 샘플의 세포 보호 효과 확인하기 위한 세포생존율 확인

대조군과 비교하였을 때, 200 μM Corticosterone 으로 인한 50% 세포생존율 감소가, 말오줌때 200 μg/ml 처리에서 약 99% 증가하는 것을 확인함.

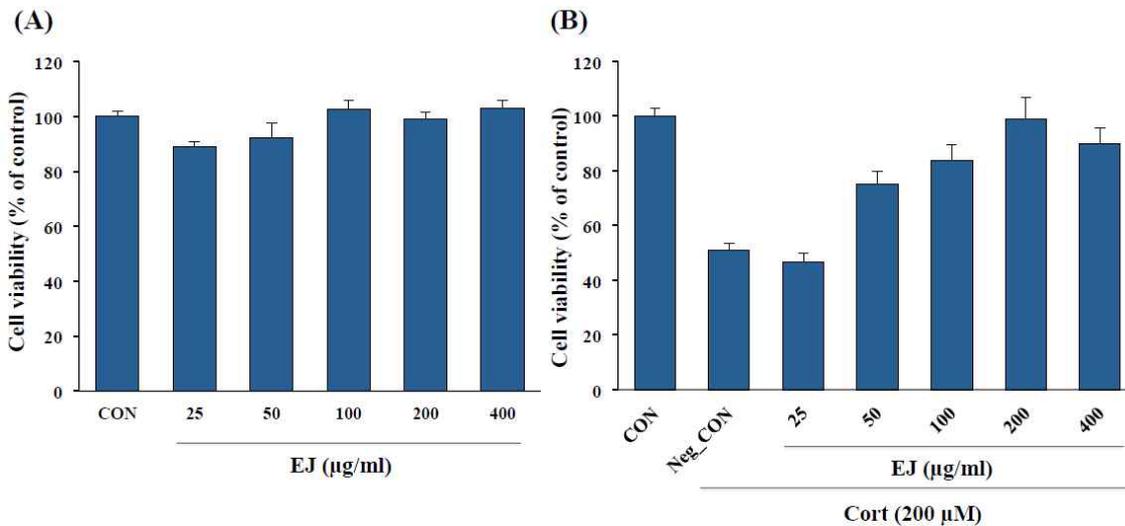


그림3-1-42. 말오줌때 열수추출물 세포생존율

(1) 말오줌때 샘플은 농도별 (25, 50, 100, 200, 400 μg/ml)로 24시간 동안 처리했을 때 PC12 자체 독성을 나타내지 않았으며, Corticosterone 유도에 의한 PC12 세포 손상에 샘플 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가함을 확인.

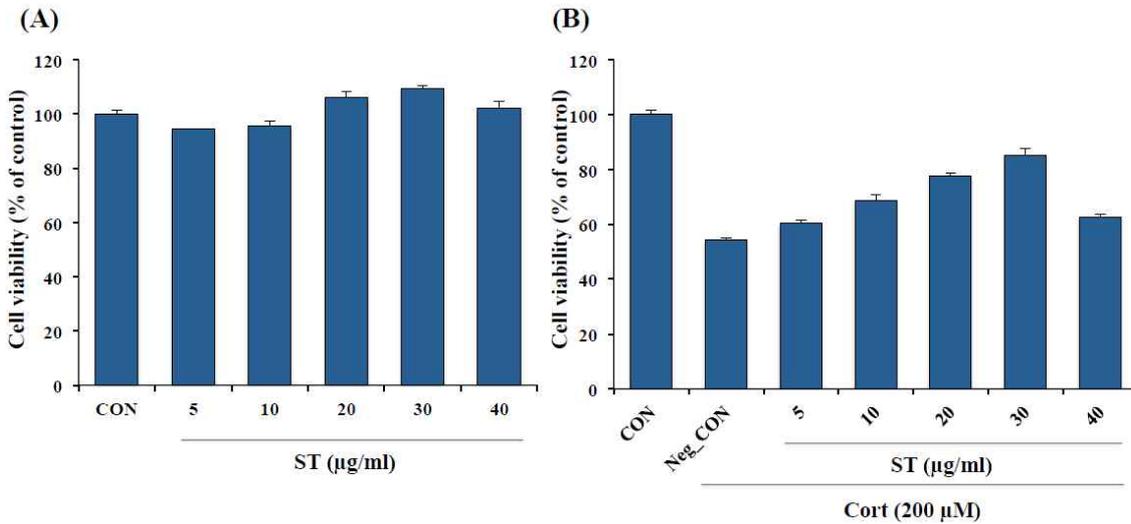


그림3-1-43. 우산제비꽃 열수추출물 세포생존율

(2) 우산제비꽃 샘플은 농도별 (40, 80, 160, 320 µg/ml)로 24시간 동안 처리했을 때 PC12 자체 독성을 나타내지 않았으며, Corticosterone 유도에 의한 PC12 세포 손상에 샘플 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가함을 확인함. 대조군과 비교하였을 때, Corticosterone 으로 인한 50% 세포생존율 감소가, 우산제비꽃 320 µg/ml 처리에서 약 80% 증가하는 것을 확인함.

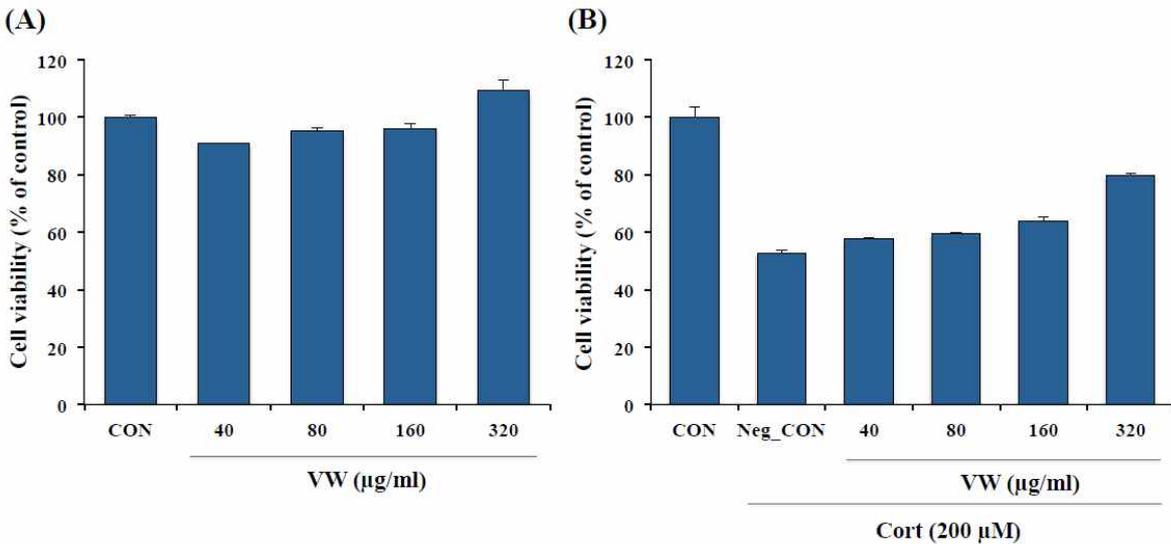


그림3-1-44. 울릉섬기린초 열수추출물 세포생존율

(3) 울릉섬기린초 샘플은 농도별 (5, 10, 20, 30, 40 µg/ml)로 24시간 동안 처리했을 때 PC12 자체 독성을 나타내지 않았으며, Corticosterone 유도에 의한 PC12 세포 손상에 샘플 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가함을 확인.

대조군과 비교하였을 때, Corticosterone 으로 인한 50% 세포생존율 감소가, 울릉섬기린초 30 µg/ml 처리에서 약 85% 증가하는 것을 확인.

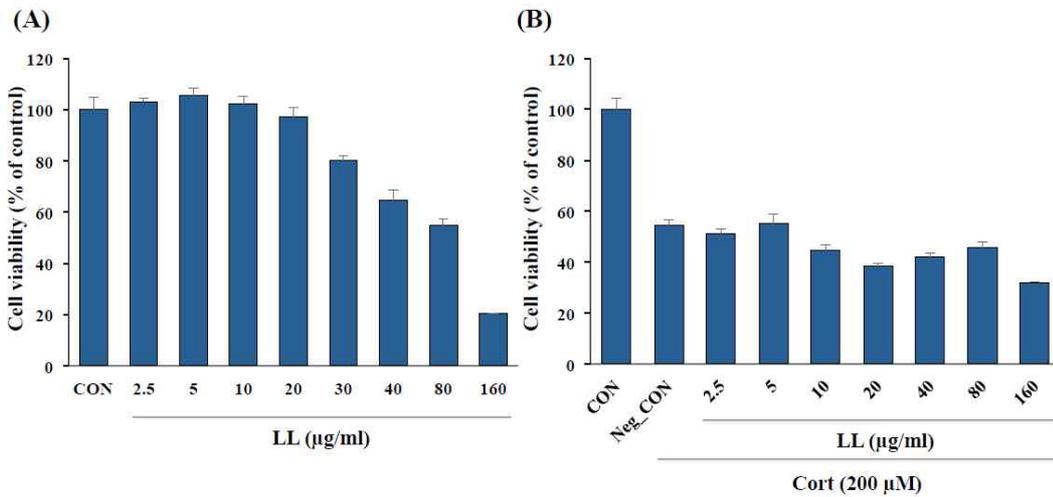


그림3-1-45. 참나리 열수추출물 세포생존율

(4) 참나리 샘플은 농도별 (2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 80, 160 µg/ml)로 24시간 동안 처리했을 때, 30 µg/ml의 양 부터 PC12 자체에 독성을 나타내는 것으로 확인하였고(Fig 5A), Corticosterone 유도에 의한 PC12 세포 보호에 효과가 없음을 확인 (Fig 5B).

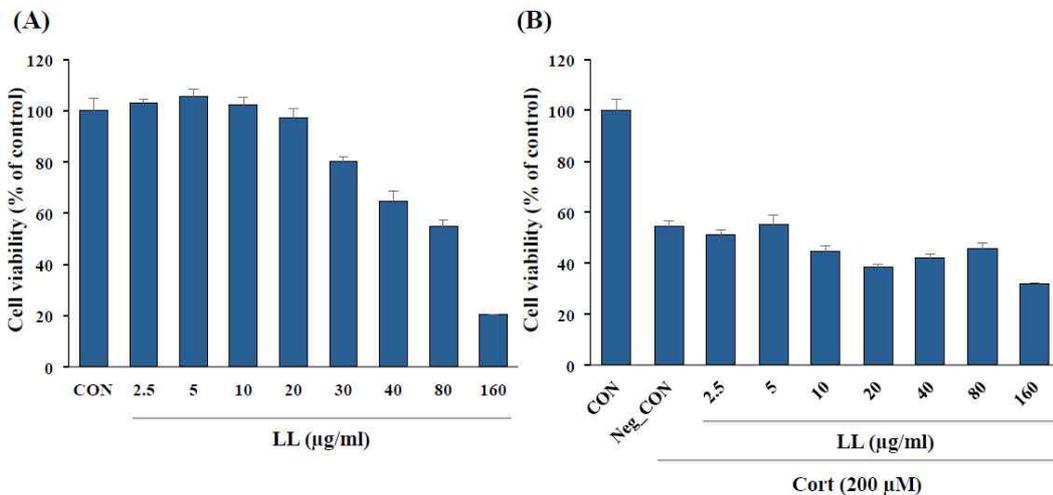


그림3-1-46. 두메부추 열수추출물 세포생존율

(5) 두메부추 샘플은 농도별 (2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/ml)로 24시간 동안 처리했을 때, 20 µg/ml의 양 부터 PC12 자체에 독성을 나타내는 것을 확인하였고 (Fig 4-46A), Corticosterone 유도에 의한 PC12 세포 보호에 효과가 없음을 확인 (Fig 4-46B).

Rb1을 함유한 ginsenoside가 상처난 피부에서 sphingolipids 변화를 가져오는 신호기전 규명

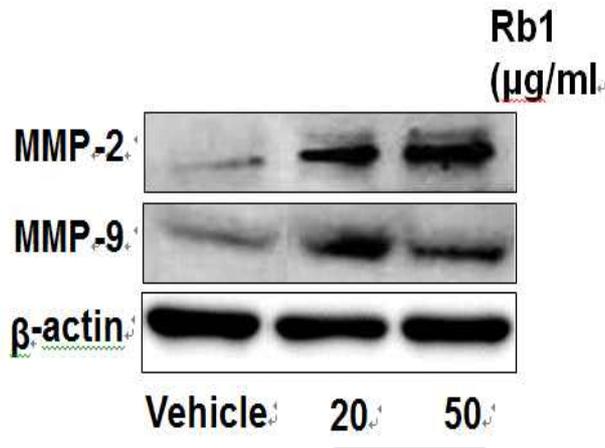


그림3-1-47. Rb1을 처리한 HaCat에서 MMP2/9 enzyme 발현확인

표3-1-15. Rb1을 처리한 HaCat에서 SPHK1과 S1Pyase효소 활성

Treatment <sup>a</sup>	SPHK1 Activity <sup>b</sup> (S1P pmol/mg protein/min) <sup>c</sup>	S1P lyase Activity <sup>b</sup> (Pentadecanal pmol/mg protein/min) <sup>c</sup>
Vehicle <sup>d</sup>	3.43 ± 0.25 <sup>e</sup>	35.12 ± 3.87 <sup>e</sup>
Rb1 <sup>e</sup>	3.92 ± 0.21* <sup>e</sup>	25.38 ± 3.12* <sup>e</sup>
CK <sup>e</sup>	2.67 ± 0.31* <sup>e</sup>	33.15 ± 4.19 <sup>e</sup>
F1 <sup>e</sup>	3.52 ± 0.29 <sup>e</sup>	36.92 ± 2.97 <sup>e</sup>
Rc <sup>e</sup>	3.47 ± 0.37 <sup>e</sup>	31.29 ± 1.39* <sup>e</sup>
Rd <sup>e</sup>	3.46 ± 0.18 <sup>e</sup>	34.10 ± 3.17 <sup>e</sup>
Re <sup>e</sup>	3.61 ± 0.22 <sup>e</sup>	29.17 ± 2.16 <sup>e</sup>
Rg1 <sup>e</sup>	3.79 ± 0.41 <sup>e</sup>	28.05 ± 3.08* <sup>e</sup>
Rg3 <sup>e</sup>	3.46 ± 0.22 <sup>e</sup>	38.17 ± 4.01 <sup>e</sup>
Rh1 <sup>e</sup>	3.61 ± 0.38 <sup>e</sup>	37.61 ± 3.49 <sup>e</sup>
Rh3 <sup>e</sup>	2.89 ± 0.27 <sup>e</sup>	33.57 ± 2.65 <sup>e</sup>
Ro <sup>e</sup>	3.64 ± 0.23 <sup>e</sup>	28.19 ± 1.95 <sup>e</sup>

Human keratinocytes (KC) were treated with different ginsenosides (20 µM).<sup>e</sup> Values are mean ± SD (n=3).<sup>e</sup> \*P < 0.01 versus vehicle control. SPHK1, sphingosine kinase1<sup>e</sup>

Rb1을 처리한 HaCat에서 SPHK1과 S1Pyase효소 활성 확인하였으나 SPHK2는 유의적인 차이가 없었음.

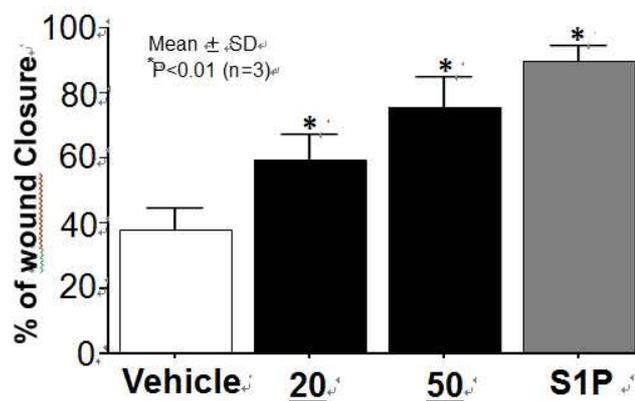


그림3-1-48. Rb1을 처리한 HaCat에서 S1P활성

Rb1을 처리한 HaCat에서 S1P가 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였음을 확인

표3-1-16. Increased levels of sphingolipids in KC in response RB1 treatment

Treatment <sup>a</sup>	Lipid content (pmol/mg protein) <sup>b</sup>			
	Ceramide	Sphingosine	S1P	Released S1P
Vehicle	995.16 ± 33.14	68.51 ± 4.73	15.53 ± 1.79	0.58 ± 0.05
Rb1 (20 μM)	1300.62 ± 123.01*	80.34 ± 7.34	16.94 ± 2.16	1.15 ± 0.25*
Rb1 (50 μM)	1619.53 ± 166.88*	95.61 ± 5.16*	21.25 ± 1.61*	1.38 ± 0.22*

Rb1 (20,50 μM)에서 ceramide level이 증가하였고 Sphingosine은 Rb1(50 μM)에서 증가하였음을 확인

표3-1-17. Altered activity of S1P generation and degradation in KC following RB1 treatment

Treatment <sup>a</sup>	Activity of SPHKs <sup>b</sup> (S1P pmol/mg protein/min)		S1P lyase activity <sup>b</sup> (Pentadecanal pmol/mg protein/min)
	SPHK1	SPHK2	
Vehicle	3.44 ± 0.25	0.56 ± 0.03	32.04 ± 2.68
Rb1 (20 μM)	4.48 ± 0.47 *	0.57 ± 0.03	24.51 ± 2.71 *
Rb1 (50 μM)	4.79 ± 0.32 *	0.62 ± 0.06	21.98 ± 1.57 *

<sup>a</sup>Human KC were treated with ginsenoside Rb1 (20-50 μM). <sup>b</sup>Values are mean ± SD (n=3). \*P < 0.01 versus vehicle control. S1P, sphingosine-1-Phosphate; SPHK, sphingosine kinase

Rb1을 처리한 HaCat cell line에서 SPHK1은 유의적인 조건에 의한 S1P에 의한 Rb1 활성화에 차이를 확인함

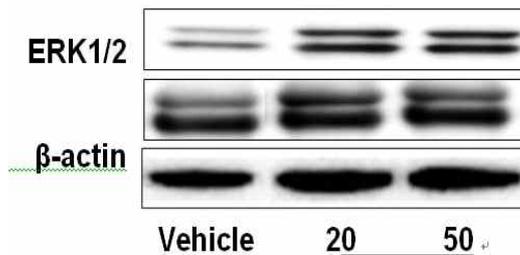


그림3-1-47. Rb1을 처리한 HaCat cell line에서 EPK1에서 ERK 1/2 발현

발효커피 유효성분 측정 및 발효커피추출액의 효과실험

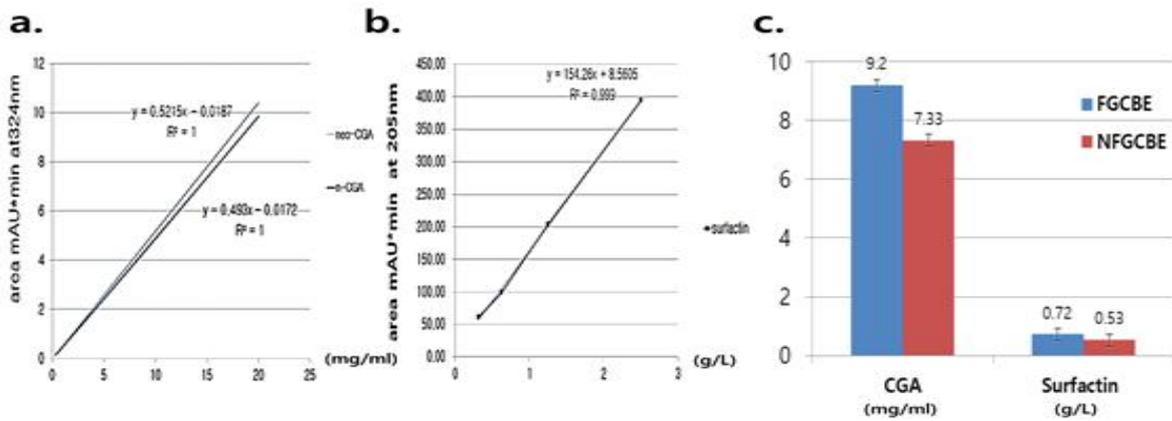


그림3-1-48. 발효커피추출액과 비발효커피추출액의 클로로겐산과 서펙틴 농도 비로 클로로겐산과 서펙틴 농도 모두 발효처리한 커피추출액에서 함량이 증가함을 확인함.

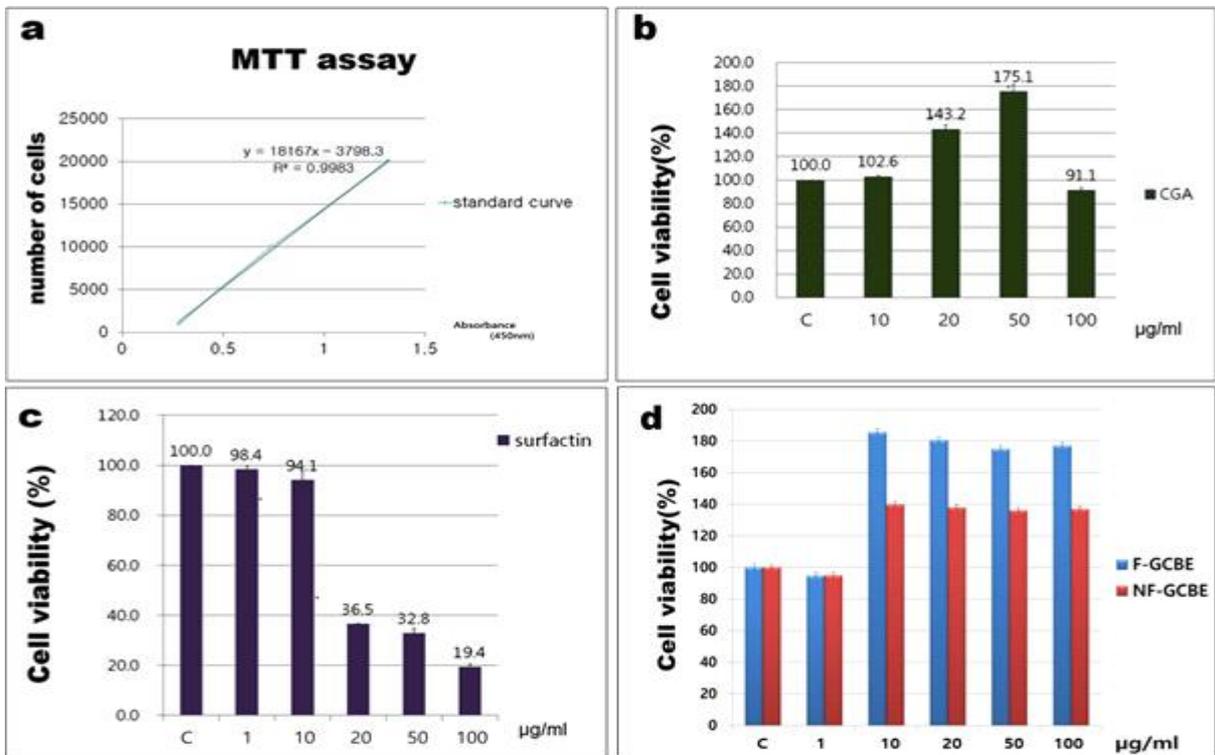


그림3-1-49. 클로로겐산,서펙틴,발효커피추출액의 세포독성

b. 클로로겐산은 50µg/mL에서 175%까지 세포생존율이 증가하다 100µg/mL에서 90%로 급감하여 50µg/mL을 기준으로 설정하였으며, c에서 surfactin을 20µg/mL에서 36.5%로 감소함에 따라 10µg/mL(94.1%)을 기준으로 설정하였다. 커피추출액의 경우 100µg/mL까지 세포생존율이 감소하는 구간이 없어 전체 농도를 실험기준으로 설정하였음.

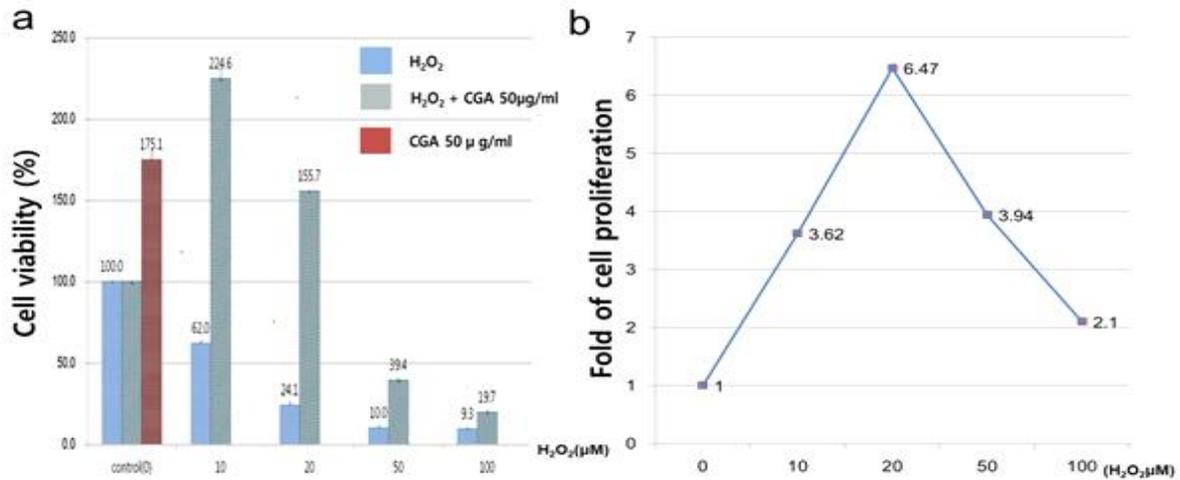


그림3-1-50. 클로로겐산의 항산화 효과

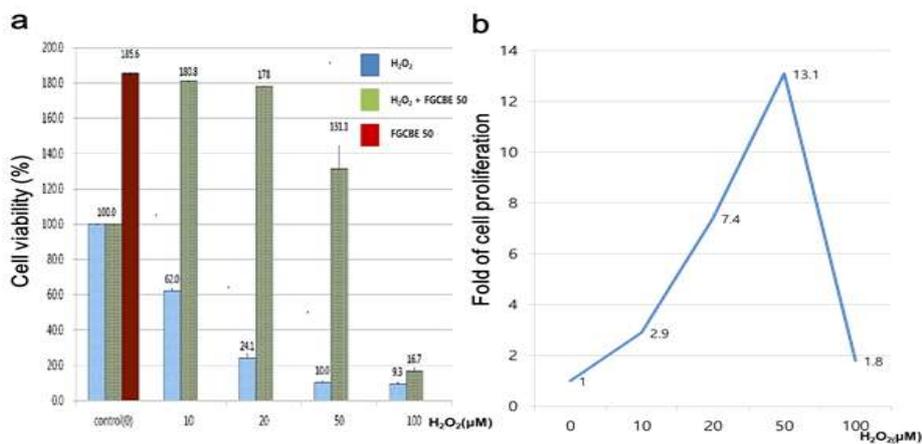


그림3-1-51. 발효커피추출액의 항산화 효과

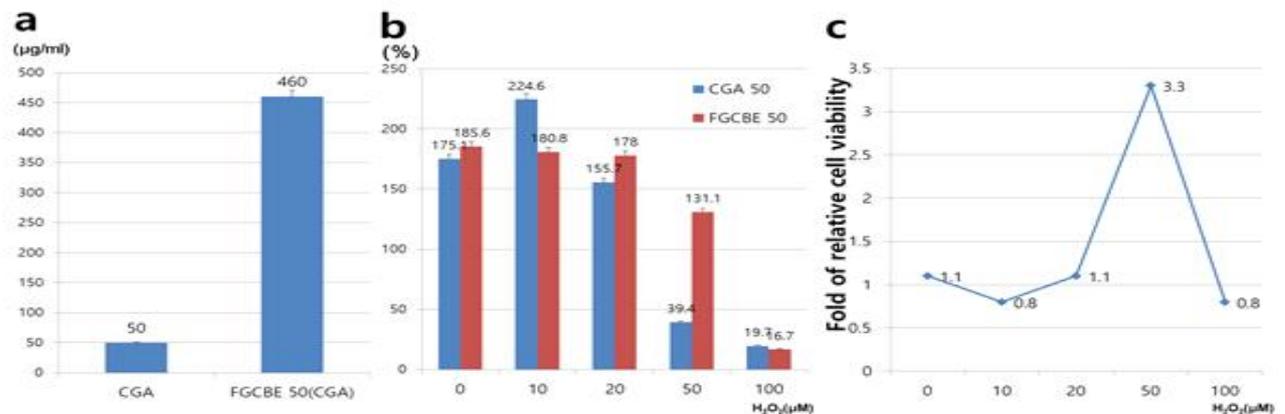


그림3-1-52. 클로로겐산과 발효커피추출액의 세포생존비교

### ○울릉섬 기린초의 세포보호 효능 확인

#### 1) Cell viability

스트레스 유도물질인 corticosterone의 농도 설정을 위하여 각 농도별로 PC12 cell에 24시간 동안 처리하였다. 그 결과 세포 생존율은 corticosterone 농도 의존적으로 감소하였으며 200 µM 에서 대조군에 비해 약 50% 감소하여 본 연구의 스트레스 유도물질 농도로 설정하였다 (Fig. 1A). 울릉섬 기린초 추출물 (10, 25, 50, 100, 200 µg/mL)의 자체독성은 없었으며(Fig. 1B), 200 µM corticosterone 으로 유도된 PC12 cell 손상에 대해 울릉섬 기린초 추출물 (WSK) 50 µg/mL에서 세포생존율이 73%로 증가하는 것을 확인하

였고(Fig. 1C) 추후 실험의 샘플농도로 설정하였다.

Apoptosis의 과정을 확인하는 Marker로 알려진 LDH의 농도를 확인한 결과, Corticosterone 이 처리된 Neg group 에서는 세포 밖으로 방출된 LDH의 농도가 증가하였고, Corticosterone과 WSK가 함께 처리된 Tre group 에서는 감소되었다(Fig. 1D).

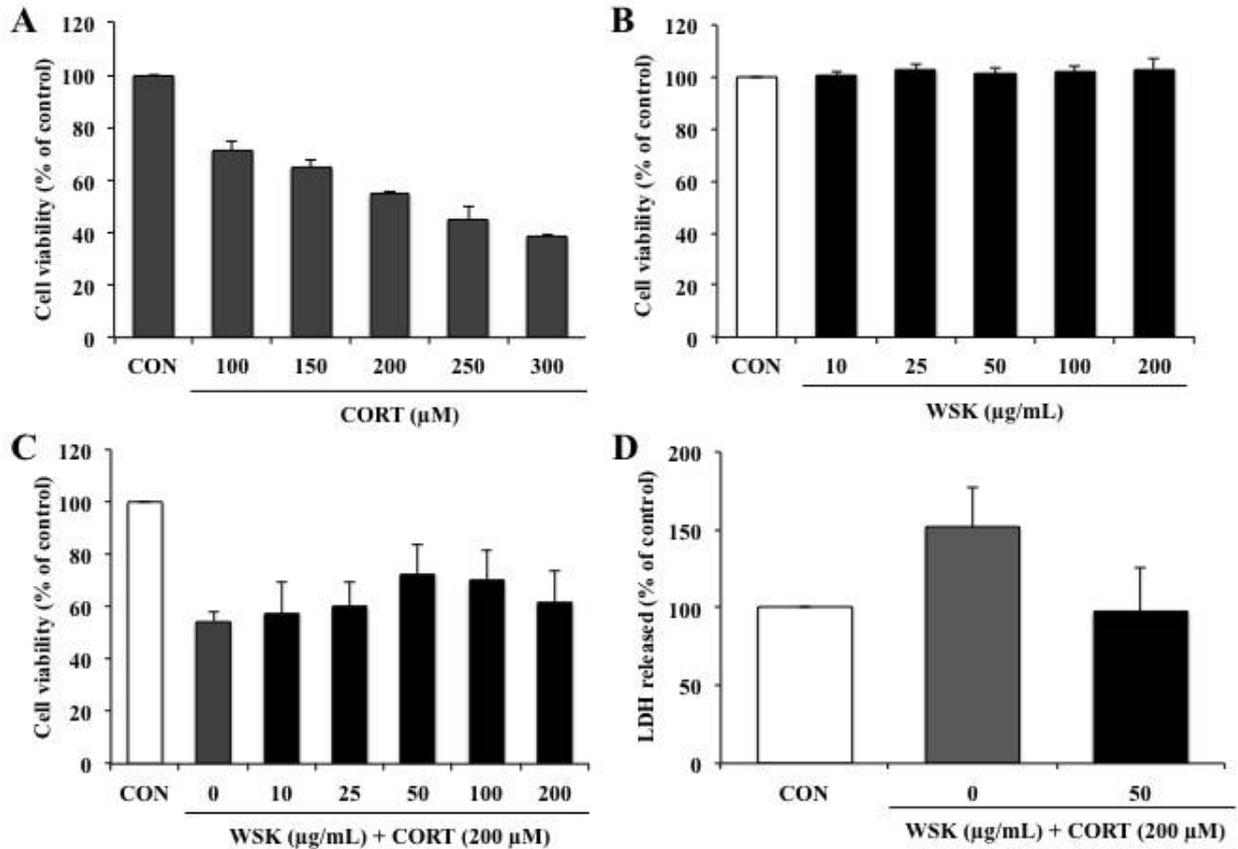


그림3-1-53. Effect of WSK and corticosterone on PC12 cell viability by EZ-cytox assay.

## 2) Hoechst & PI double staining

DNA의 Chromatin condensation이 발생했는지를 확인하기 위해 Hoechst & PI double staining 기법으로 DNA를 염색하였다. PI-positive는 Fig 2A와 같이 Neg group 에서 증가하였고, Tre group에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Hoechst counterstaining을 바탕으로 cell viability를 확인한 결과 Con group(%)대비 Neg group은 64%, Tre group은 92%를 나타낸다(Fig. 2B).

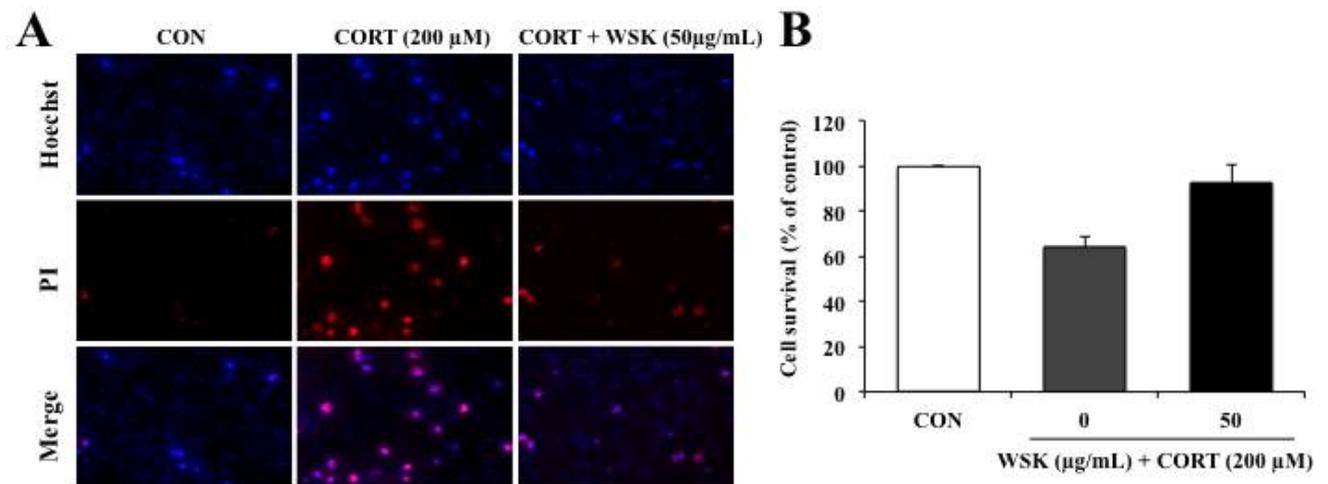


그림3-1-54. Effects of WSK on the cell survival in corticosterone-treated PC12 cells by Hoechst 33342 and PO staining.

### 3) DAN fragmentation (TUNEL staining)

DNA fragmentation은 TUNEL staining기법으로 확인하였다. Fig 3A와 같이 TUNEL-positive는 Neg group 에서 증가하였고, Tre group에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Hoechst counterstaining을 바탕으로 apoptotic cell비율을 확인한 결과 Con group(%)대비 Neg group은 306%, Tre group은 114%를 나타낸다(Fig. 3B).

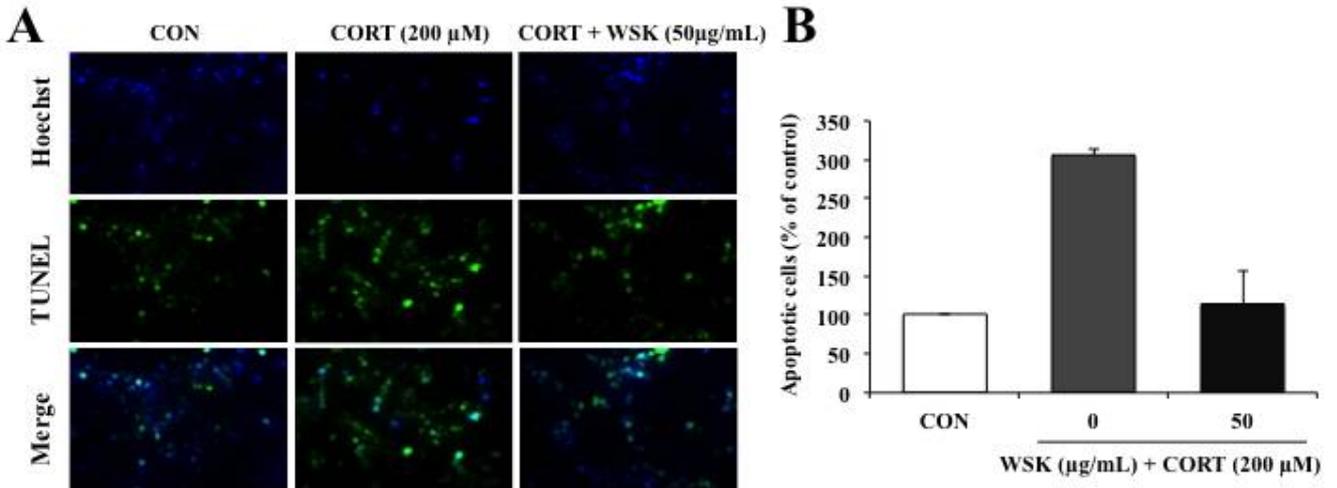


그림3-1-55. Effects of WSK on the cell survival in corticosterone-treated PC12 cells by TUNEL staining.

### 4) Intracellular Ca level

ER stress에 의해 방출된 세포내 Ca농도는 Fura-2/AM 형광염료를 이용하여 확인하였다. 세포내 칼슘 농도는 Con group 대비 Neg group은 200%, Tre group은 121%를 나타낸다(Fig. 4).

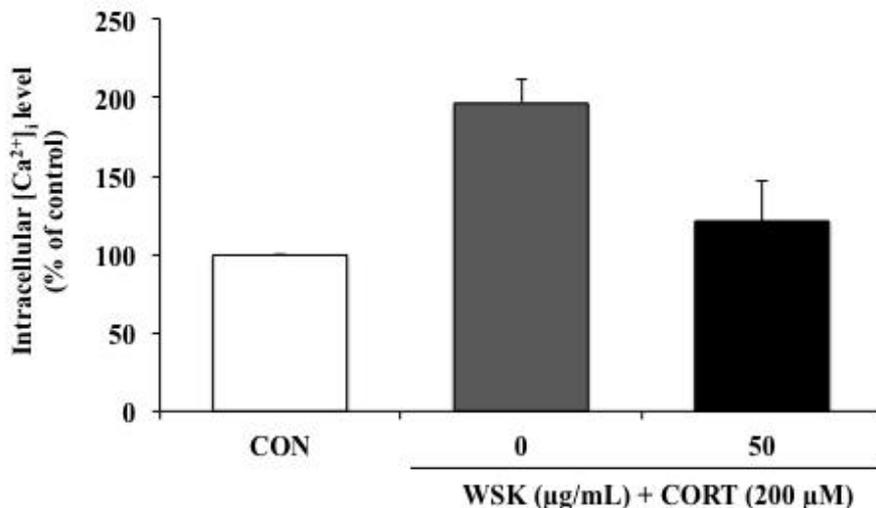


그림3-1-56. Effect of WSK on the concentration of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in corticosterone-treated PC12 cells.

### 5) Mitochondrial permeability transition pore (mPTP) open

미토콘드리아 막 투과성 전이공 (mPTP)는 칼슘의 과부하 및 산화적 스트레스와 같은 상황에서 미토콘드리아 통로가 개방되어 막 전위차 (mmp)의 불균형을 초래, 이로 미토콘드리아 기능 이상을 일으키고, 미토콘드리아 내부에 존재하는 cytochrome-c 등의 분자가 cytosol로 방출되어 caspase-dependant apoptosis pathway의 신호를 전달하게 된다.

mPTP 측정은 calcein-cobalt quenching 방법을 이용하여 확인하였다. 살아 있는 세포의 미토콘드리아에 선택적으로 라벨링되어 강한 녹색 형광을 나타내는 방법으로, Con group 대비 Neg group에서는 녹색 형광이 줄어들고, Tre group에서 다시 증가하는 형상을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

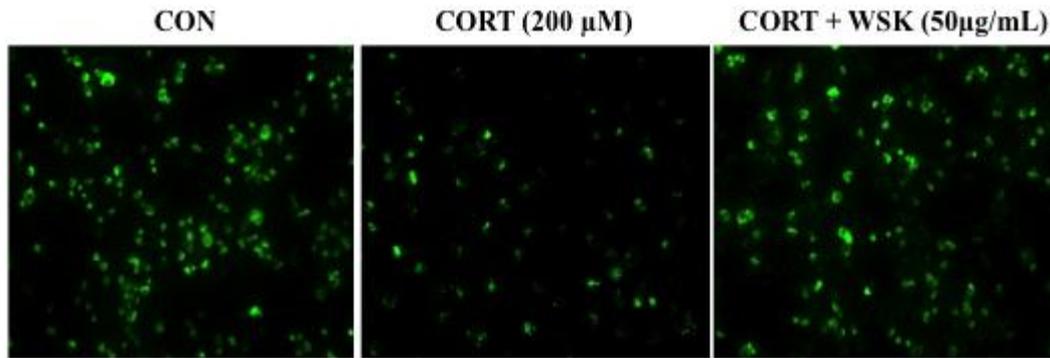


그림3-1-57. Effect of WSK on the opening of mPTP in corticosterone-treated PC12 cells.

#### 6) Mitochondrial membrane potential (MMP)

mPTP 개방에 의한 미토콘드리아 내외막의 전위차 (mmp) 불균형이 일어날지 확인하기 위해, JC-10 형광 염료를 이용하여 염색하였다. JC-10은 미토콘드리아 내에서 이합체를 이루어 red형광을 나타내지만 세포 사멸이 일어나면 mmp가 붕괴되어 미토콘드리아 내로 들어가지 못하고 단위체 형태로 남아 Green 형광을 나타낸다. 각 그룹마다 JC-10 염료를 처리한 뒤 형광현미경으로 관찰한 결과 Neg group에서는 Green 형광이 높게 나타났으며 Tre group에서는 감소하는 현상을 확인할 수 있었다 (Fig. 6A). 또한 Fluorescence spectrophotometer에서 형광 광도를 측정해 red/green 비율을 확인한 결과, Con group (%) 대비 Neg group은 85%, Tre group은 97%를 나타낸다(Fig. 6B).

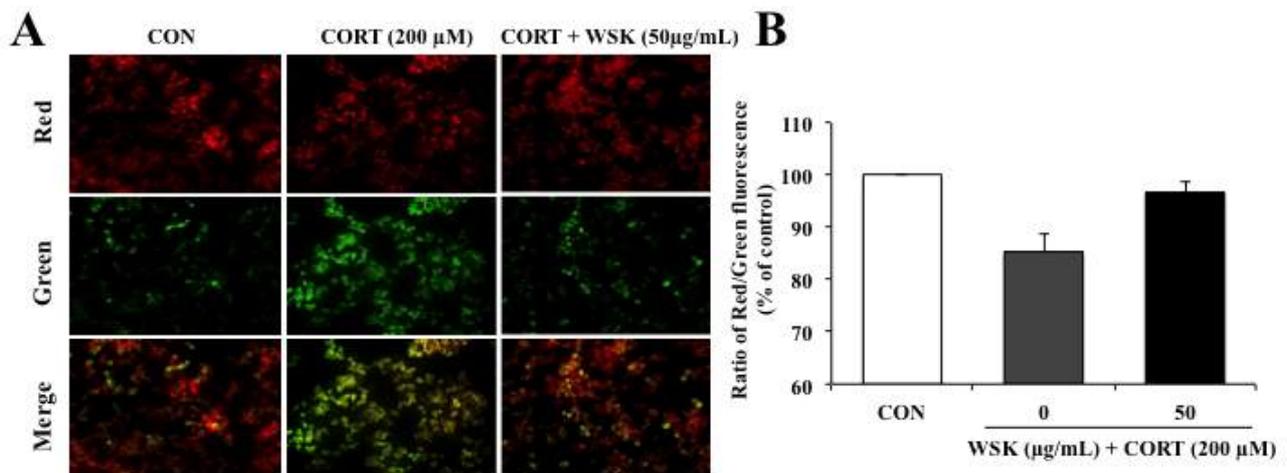


그림3-1-58. Effects of WSK on MMP in corticosterone-treated PC12 cells.

#### 7) ATP, ROS levles

미토콘드리아 기능 이상으로 인한 ATP level를 확인한 결과, Con group(%) 대비 Neg group은 76%로 감소하였고, Tre group에서 96%로 회복하였다(Fig. 7). 그 외 ROS를 측정된 결과 Neg group에서 180%로 증가하였고 Tre group에서 149%로 감소하였다(Fig. 8).

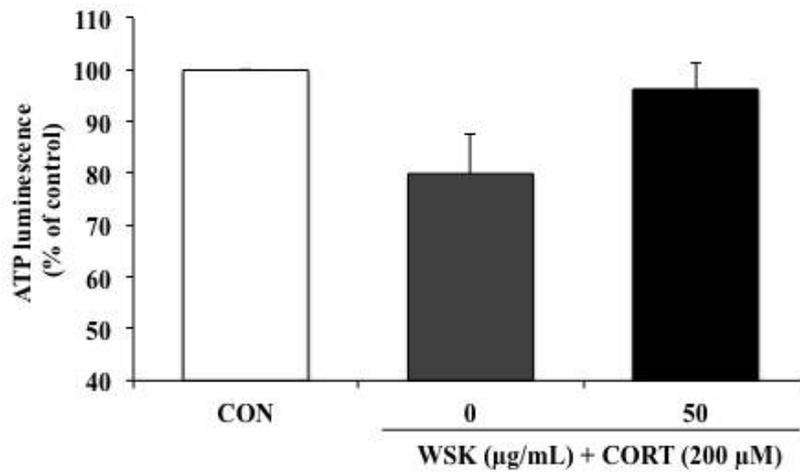


그림3-1-59. Effect of WSK on ATP in corticosterone-treated PC12 cells.

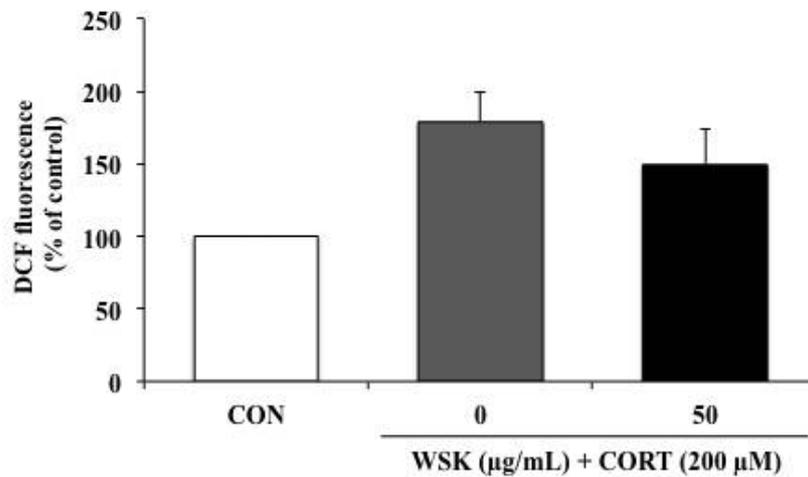


그림3-1-60. Effect of WSK on the levels of ROS in corticosterone-treated PC12 cells.

#### 8) ER stress marker proteins, mitochondrial apoptotic pathway proteins

ER stress marker protein인 GRP78과 GADD153은 각각 Nge group에서 420%, 335%로 증가하였고, Tre group에서 209%, 183%로 감소하였다(Fig. 9A, B). Mitochondrial apoptotic pathway에 관련된 Bax는 Nge group에서 130%, Tre group에서 94%를 나타냈다(Fig. 9C). Caspase-9과 Caspase-3는 각각 Nge group에서 210%, 206%로 증가하였고, Tre group에서 112%, 160%로 감소하였다(Fig. 9D, E).

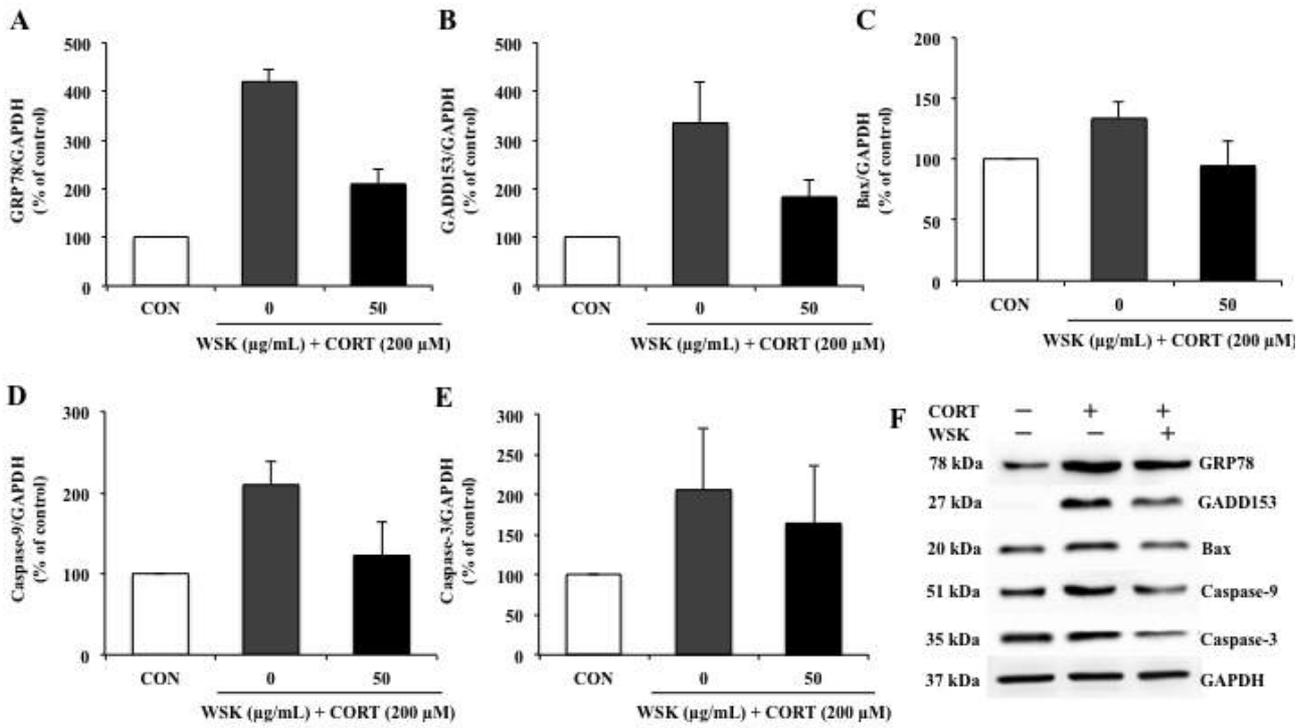


그림3-1-61. Effects of WSK on GRP78(A), GADD153(B), BAX(C), Caspase-9(D), and Caspase-3(E) expression in corticosterone-treated PC12 cells by western blot analysis.

○참나리의 세포보호 효능 확인

1) Cell viability

스트레스 유도물질인 corticosterone의 농도 설정은 앞 실험에서 측정한 200  $\mu\text{M}$ 의 농도로 진행하였다. 참나리 추출물 (25, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/mL}$ )의 자체독성은 없었으며(Fig. 1A), 200  $\mu\text{M}$  corticosterone 으로 유도된 PC12 cell 손상에 대해 참나리 추출물 (ELL) 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포생존율이 107%로 증가하는 것을 확인하였고(Fig. 1B) 추후 실험의 샘플농도로 설정하였다.

Apoptosis의 과정을 확인하는 Marker로 알려진 LDH의 농도를 확인한 결과, Corticosterone 이 처리된 Neg group 에서는 세포 밖으로 방출된 LDH의 농도가 증가하였고, Corticosterone과 ELL가 함께 처리된 Tre group 에서는 감소되었다(Fig. 1C).

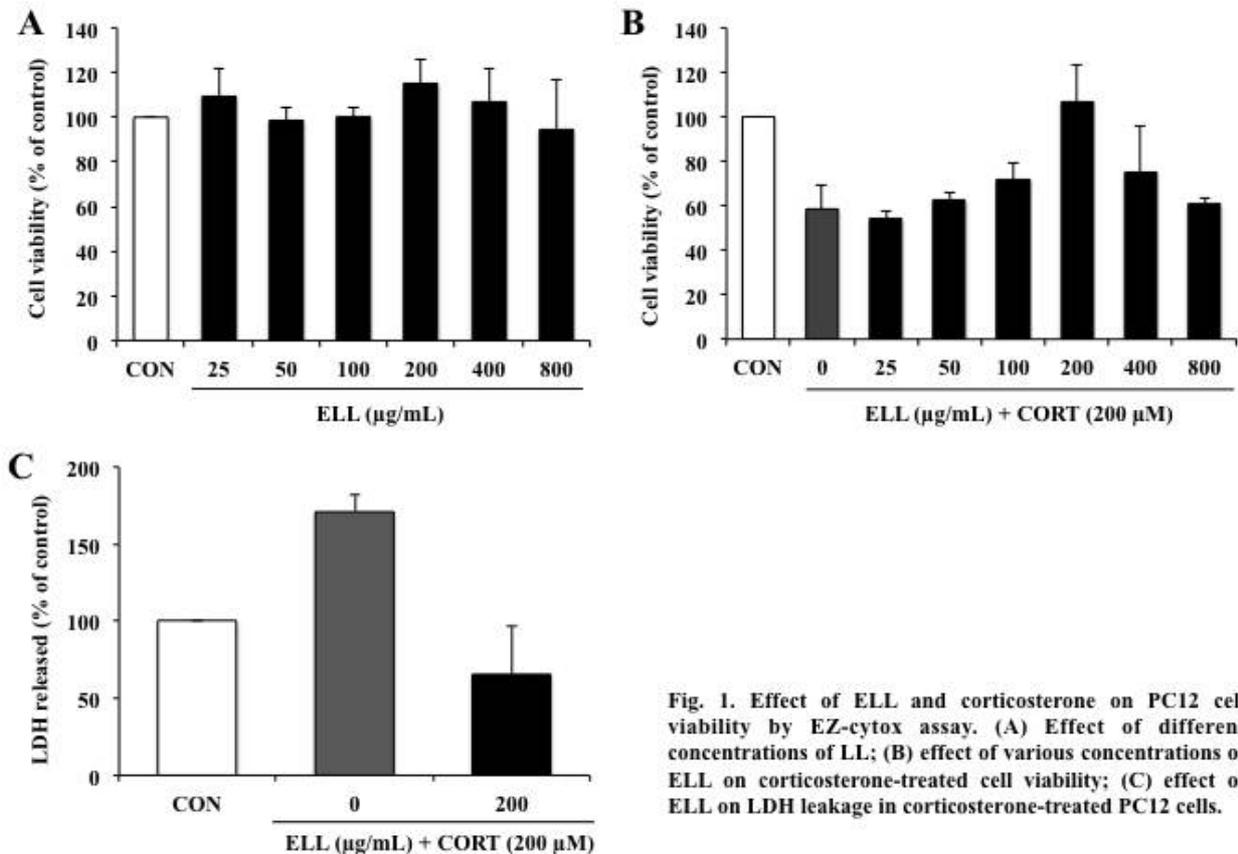


Fig. 1. Effect of ELL and corticosterone on PC12 cell viability by EZ-cytox assay. (A) Effect of different concentrations of LL; (B) effect of various concentrations of ELL on corticosterone-treated cell viability; (C) effect of ELL on LDH leakage in corticosterone-treated PC12 cells.

그림3-1-62. Effect of ELL and corticosterone on PC12 cell viability by EZ-cytox assay.

2) Hoechst & PI double staining

DNA의 Chromatin condensation이 발생했는지를 확인하기 위해 Hoechst & PI double staining 기법으로 DNA를 염색하였다. PI-positive는 Fig 2A와 같이 Neg group 에서 증가하였고, Tre group에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Hoechst counterstaining을 바탕으로 cell viability를 확인한 결과 Con group(%)대비 Neg group은 64%, Tre group은 90%를 나타낸다(그림3-1-63).

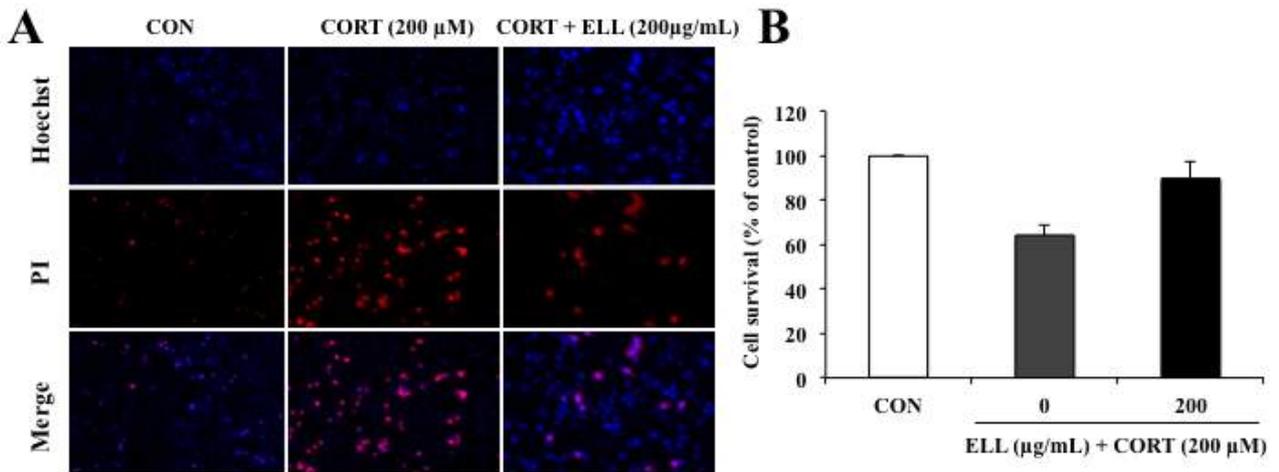


그림3-1-63. Effects of ELL on the cell survival in corticosterone-treated PC12 cells by Hoechst 33342 and PI staining.

### 3). DAN fragmentation (TUNEL staining)

DNA fragmentation은 TUNEL staining기법으로 확인하였다. 그림3-1-64와 같이 TUNEL-positive는 Neg group 에서 증가하였고, Tre group에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

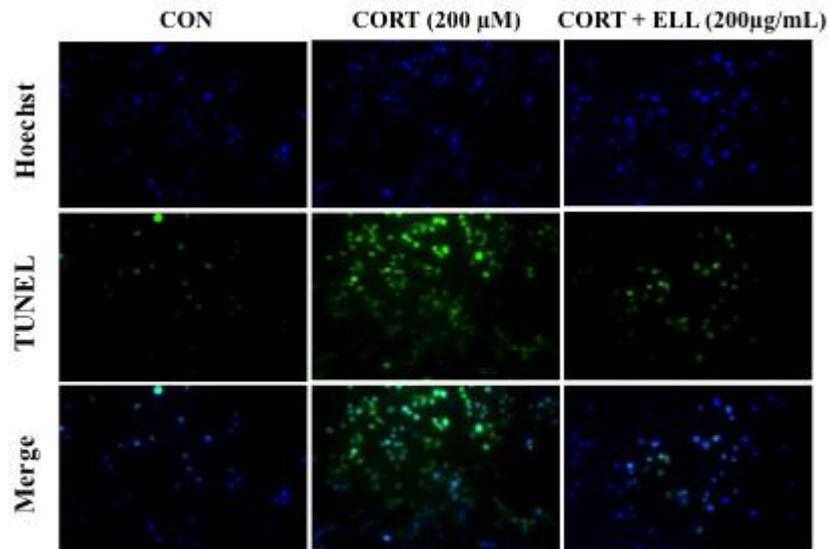


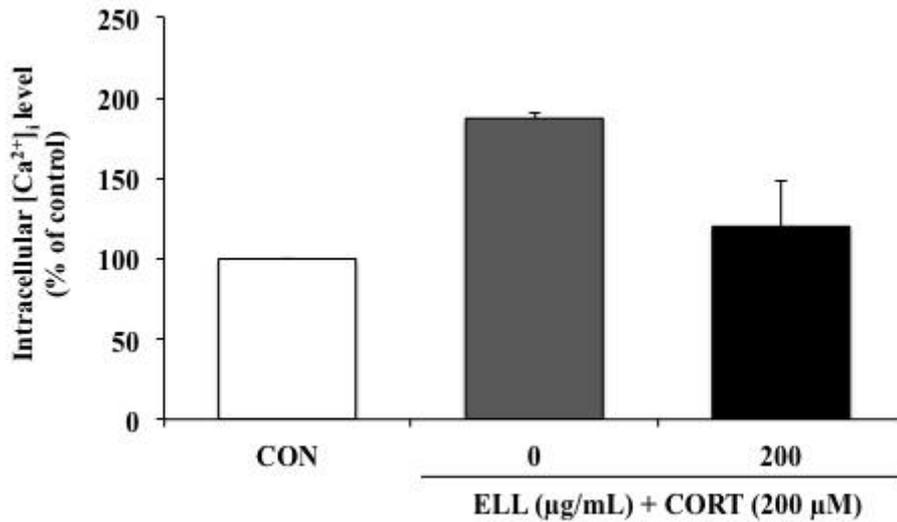
그림3-1-64. Effects on ELL on the cell survival in corticosterone-treated PC12 cells by TUNEL staining.

### 4). Intracellular Ca level

ER stress에 의해 방출된 세포내 Ca농도는 Fura-2/AM 형광염료를 이용하여 확인하였다. 세포내 칼슘 농도는 Con group 대비 Neg group은 187%, Tre group은 123%를 나타낸다(Fig. 3-1-65).

그림3-1-65. Effects on ELL on the concentration of  $[Ca^{2+}]$ , in corticosterone-treated PC12 cells.

### 5). Mitochondrial permeability transition pore (mPTP) open



mPTP 측정은 calcein-cobalt quenching 방법을 이용하여 확인하였다. 살아 있는 세포의 미토콘드리아에 선택적으로 라벨링되어 강한 녹색 형광을 나타내는 방법으로, Con group 대비 Neg group에서는 녹색 형광이 줄어들고, Tre group에서 다시 증가하는 현상을 확인할 수 있었다(그림3-1-66).

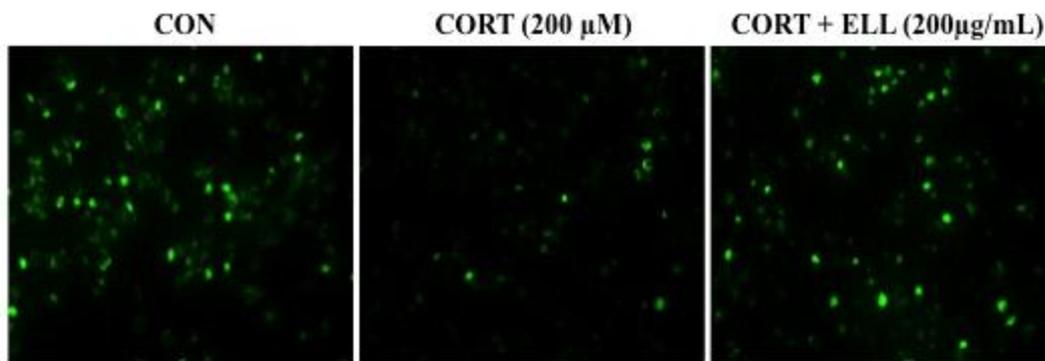


그림3-1-66. Effects of ELL on the opening of mPTP in corticosterone-treated PC12 cells.

#### 6). Mitochondrial membrane potential (MMP)

mPTP 개방에 의한 미토콘드리아 내외막의 전위차 (mmp) 불균형이 일어날지 확인하기 위해, JC-10 형광 염료를 이용하여 염색하였다. 각 그룹마다 JC-10 염료를 처리한 뒤 형광현미경으로 관찰한 결과 Neg group에서는 Green 형광이 높게 나타났으며 Tre group에서는 감소하는 현상을 확인할 수 있었다 (Fig. 6A). 또한 Fluorescence spectrophotometer에서 형광 광도를 측정해 red/green 비율을 확인한 결과, Con group (%) 대비 Neg group은 86%, Tre group은 93%를 나타낸다(그림3-1-67).

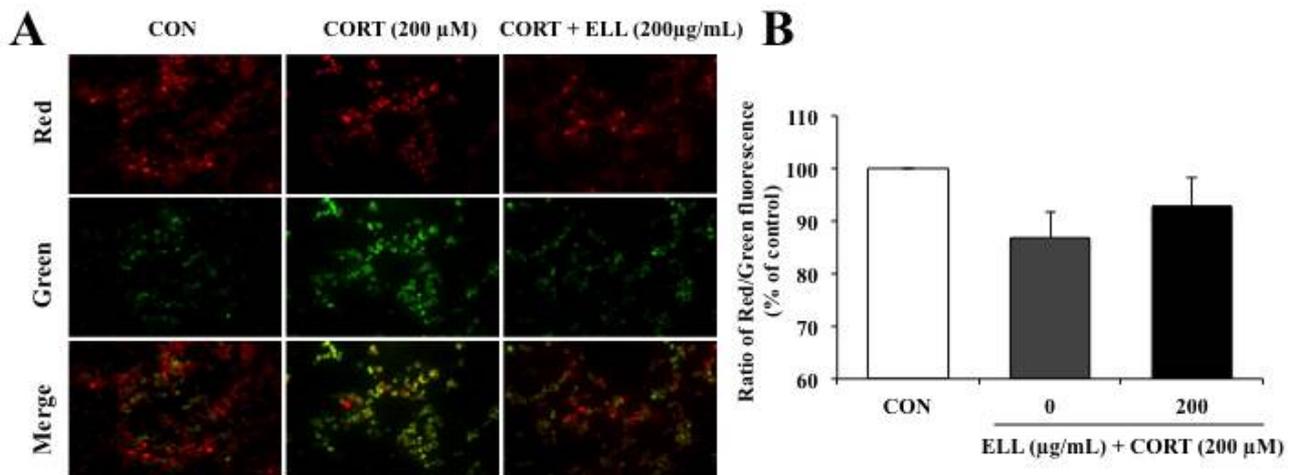


그림3-1-67. Effects of ELL on MMP in corticosterone-treated PC12 cells.

**7). ATP, ROS levles**

미토콘드리아 기능 이상으로 인한 ATP level를 확인한 결과, Con group(%) 대비 Neg group은 80%로 감소하였고, Tre group에서 92%로 회복하였다(그림3-1-68). 그 외 ROS를 측정한 결과 Neg group에서 176%로 증가하였고 Tre group에서 115%로 감소하였다(그림3-1-69).

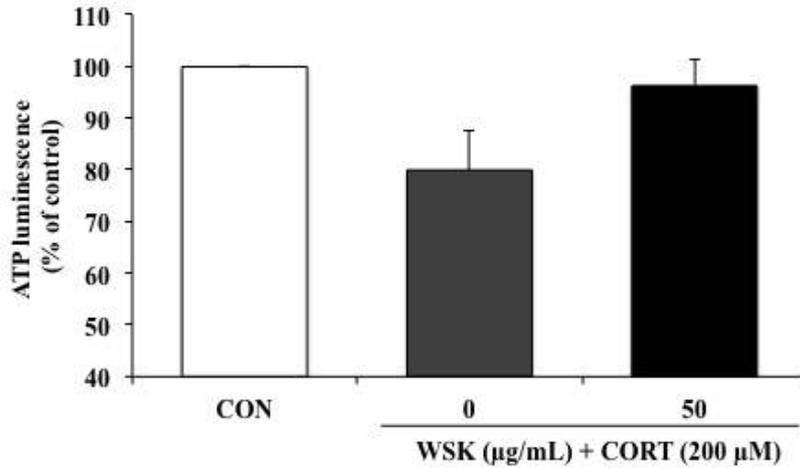


그림3-1-68. effect of ELL on the levels of ATP in corticosterone-treated PC12 cells.

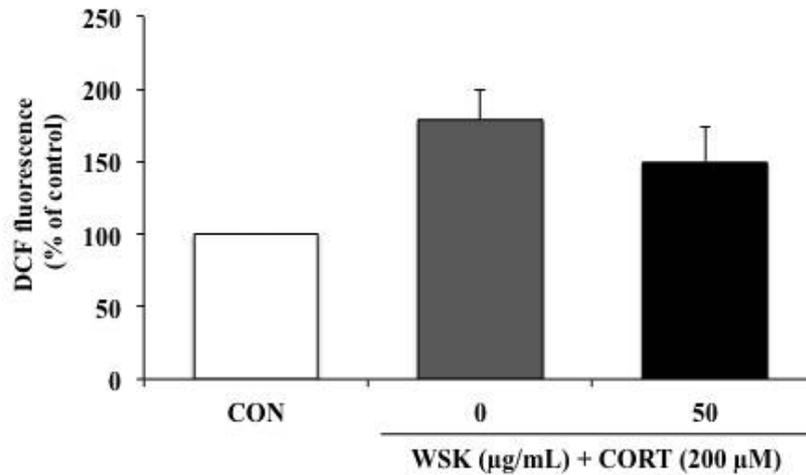


그림3-1-69. effect of ELL on the levels of ROS in corticosterone-treated PC12 cells.

**8). ER stree marker proteins, mitochondrial apoptotic pathway proteins**

ER stress marker protein인 GRP78과 GADD153은 각각 Nge group에서 367%, 305%로 증가하였고, Tre group에서 162%, 166%로 감소하였다(그림3-1-70A, B). Mitochondrial apoptotic pathway에 관련된 Bax는 Nge group에서 127%, Tre group에서 106%를 나타냈다(그림3-1-70C). Caspase-3는 Nge group에서 231%로 증가하였고, Tre group에서 186%로 감소하였다(그림3-1-70E).

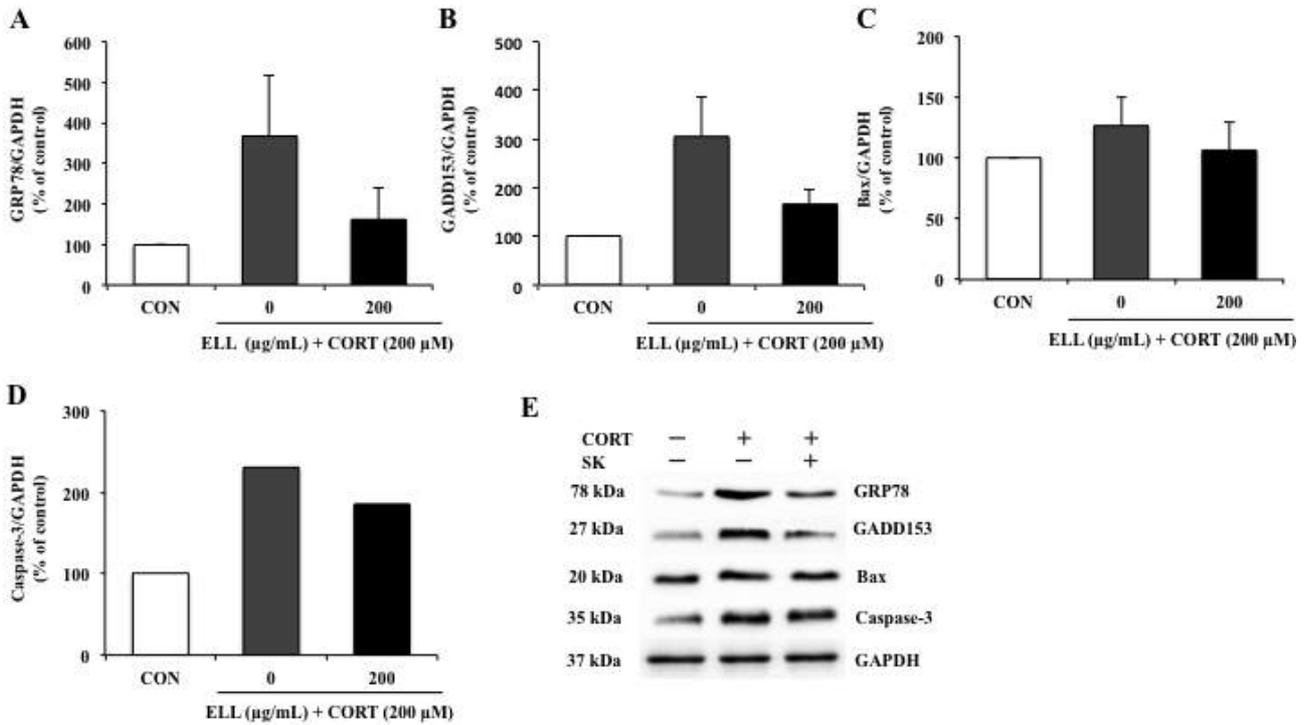


그림. Effects of ELL on GRP(A), GADD153(B), Bax(C) and Caspase-3(D) expression in corticosterone

### ○ 우산제비꽃의 세포보호 효능 확인

#### 1) Cell viability

스트레스 유도물질인 corticosterone의 농도 설정은 앞 실험에서 측정된 200 μM의 농도로 진행하였다. 우산제비꽃 추출물 (25, 50, 100, 200, 400, 800 μg/mL)의 자체 cell viability를 한 결과 400, 800 μg/mL에서 CON 대비 감소하는 경향이 나타났으며(Fig. 1A), 200 μM corticosterone 으로 유도된 PC12 cell 손상에 대해 우산제비꽃 추출물 (EVW) 100 μg/mL에서 세포생존율이 97%로 증가하는 것을 확인하였고(Fig. 1B) 추후 실험의 샘플농도로 설정하였다.

Apoptosis의 과정을 확인하는 Marker로 알려진 LDH의 농도를 확인한 결과, Corticosterone 이 처리된 Neg group 에서는 세포 밖으로 방출된 LDH의 농도가 증가하였고, Corticosterone과 ELL가 함께 처리된 Tre group 에서는 감소되었다(그림3-1-71).

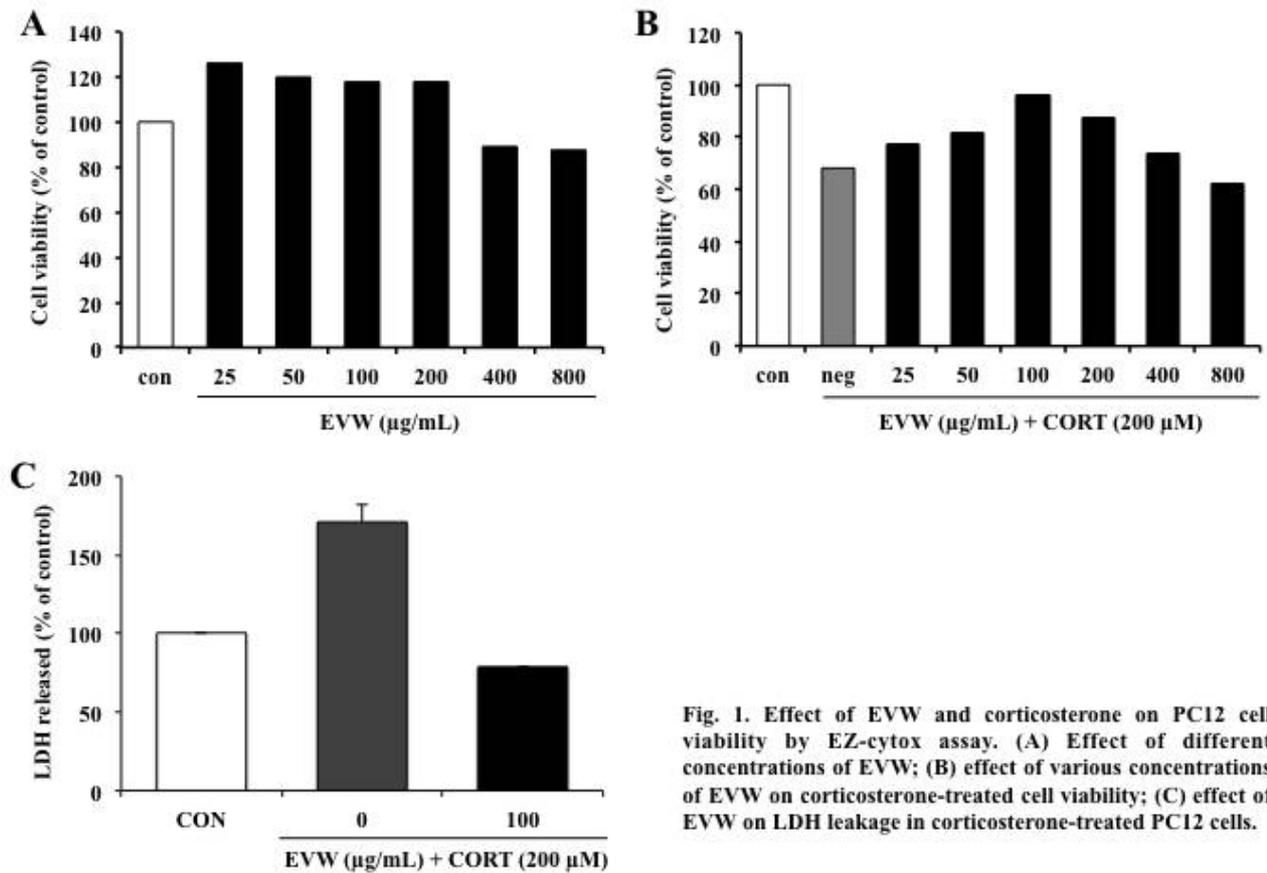


Fig. 1. Effect of EVW and corticosterone on PC12 cell viability by EZ-cytox assay. (A) Effect of different concentrations of EVW; (B) effect of various concentrations of EVW on corticosterone-treated cell viability; (C) effect of EVW on LDH leakage in corticosterone-treated PC12 cells.

그림3-1-71. Effect of EVW and corticosterone on PC12 cell viability by EZ-cytox assay.

### 2). Hoechst & PI double staining

DNA의 Chromatin condensation이 발생했는지를 확인하기 위해 Hoechst & PI double staining 기법으로 DNA를 염색하였다. PI-positive는 Fig 2A와 같이 Neg group에서 증가하였고, Tre group에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Hoechst counterstaining을 바탕으로 cell viability를 확인한 결과 Con group(%)대비 Neg group은 64%, Tre group은 83%를 나타낸다.

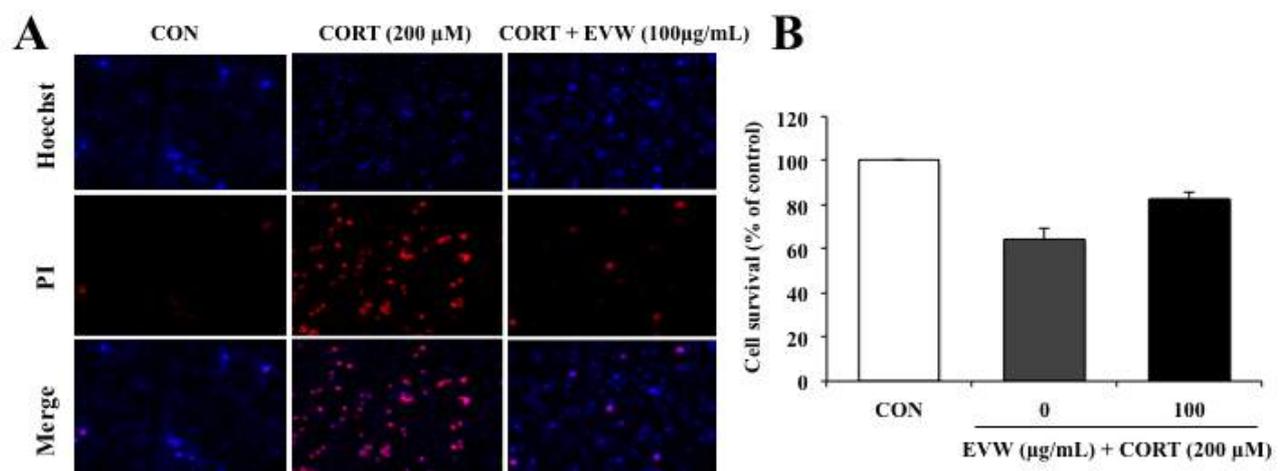


그림3-1-72. Effects of EVW on the cell survival in corticosterone-treated PC12 cells by Hoechst 33342 and PI staining.

### 3). DAN fragmentation (TUNEL staining)

DNA fragmentation은 TUNEL staining기법으로 확인하였다. Fig 3A와 같이 TUNEL-positive는 Neg

group 에서 증가하였고, Tre group에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Hoechst counterstaining을 바탕으로 apoptotic cell비율을 확인한 결과 Con group(%)대비 Neg group은 311%, Tre group은 93%를 나타낸다.

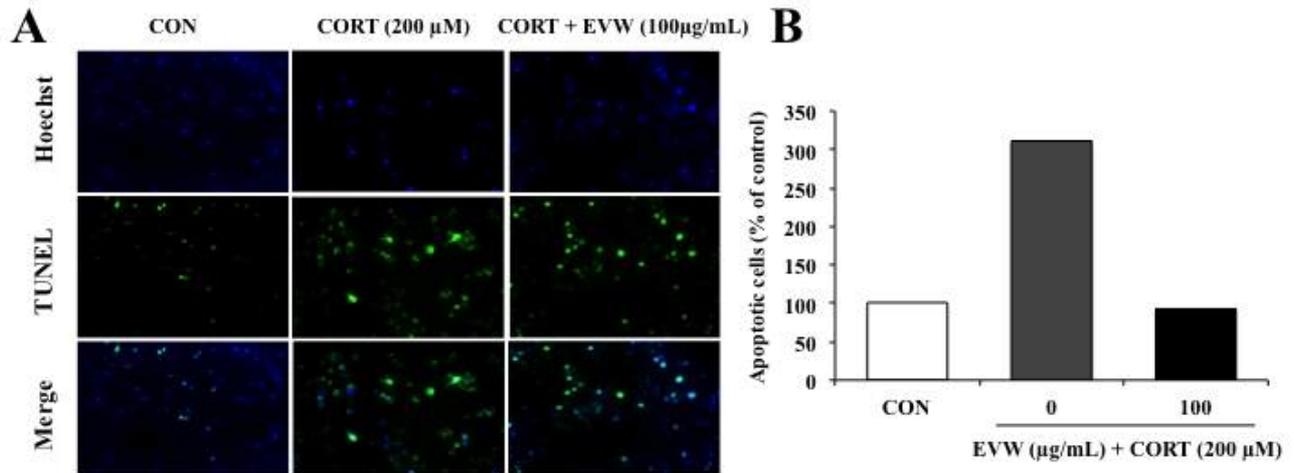


그림3-1-73. Effects on EVW on the cell survival in corticosterone-treated PC12 cells by TUNEL staining.

#### 4). Intracellular Ca level

ER stress에 의해 방출된 세포내 Ca농도는 Fura-2/AM 형광염료를 이용하여 확인하였다. 세포내 칼슘 농도는 Con group 대비 Neg group은 183%, Tre group은 116%를 나타낸다.

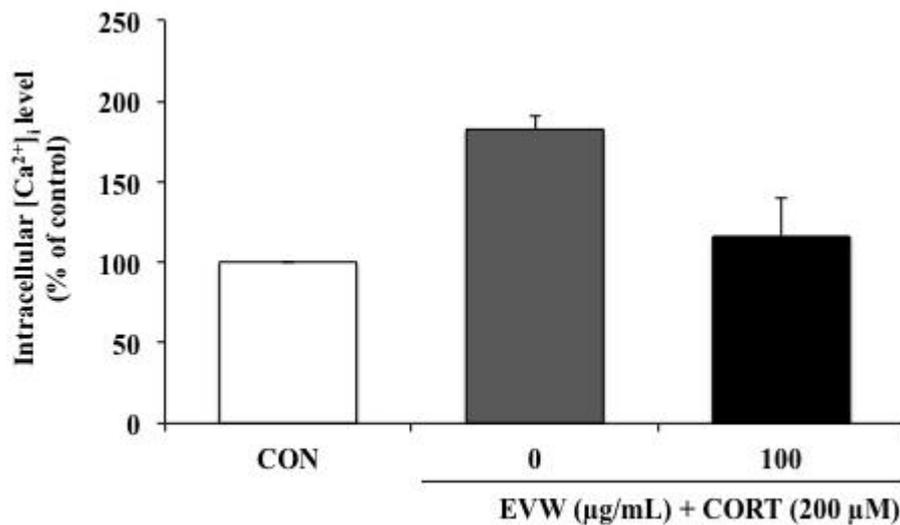


그림3-1-74. Effects on EVW on the concentration of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in corticosterone-treated PC12 cells.

#### 5). Mitochondrial permeability transition pore (mPTP) open

mPTP 측정은 calcein-cobalt quenching 방법을 이용하여 확인하였다. 살아 있는 세포의 미토콘드리아에 선택적으로 라벨링되어 강한 녹색 형광을 나타내는 방법으로, Con group 대비 Neg group에서는 녹색 형광이 줄어들고, Tre group에서 다시 증가하는 형상을 확인할 수 있었다(그림3-1-75).

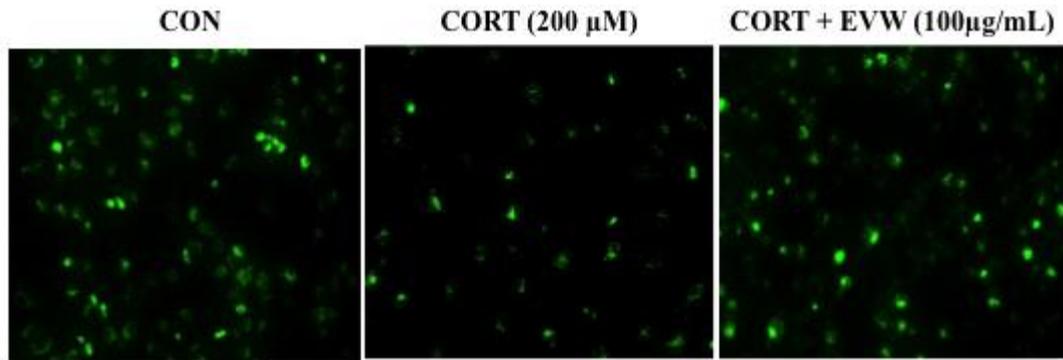


그림3-1-75. Effects of EVW on the opening of mPTP in corticosterone-treated PC12 cells.

#### 6). Mitochondrial membrane potential (MMP)

mPTP 개방에 의한 미토콘드리아 내외막의 전위차 (mmp) 불균형이 일어날지 확인하기 위해, JC-10 형광 염료를 이용하여 염색하였다. 각 그룹마다 JC-10 염료를 처리한 뒤 형광현미경으로 관찰한 결과 Neg group에서는 Green 형광이 높게 나타났으며 Tre group에서는 감소하는 현상을 확인할 수 있었다 (그림 3-1-76A). 또한 Fluorescence spectrophotometer에서 형광 광도를 측정해 red/green 비율을 확인한 결과, Con group (%) 대비 Neg group은 85%, Tre group은 106%를 나타낸다(그림3-1-76B).

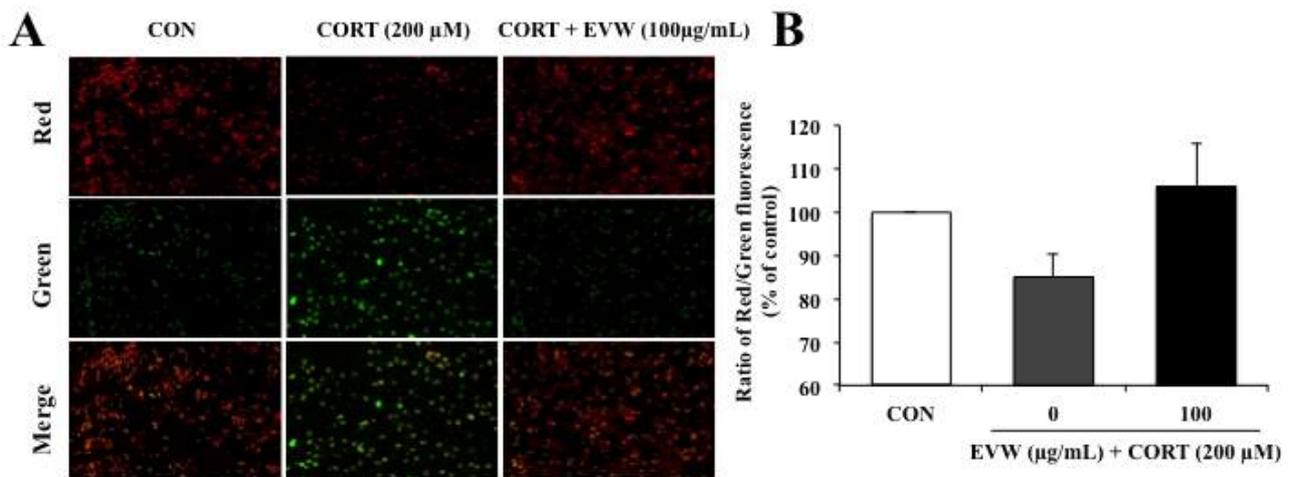


그림3-1-76. Effects of EVW on MMP in corticosterone-treated PC12 cells.

#### 7). ATP, ROS levles

미토콘드리아 기능 이상으로 인한 ATP level를 확인한 결과, Con group(%) 대비 Neg group은 87%, Tre group에서 117%를 나타내었다(그림3-1-77). 그 외 ROS를 측정한 결과 Neg group에서 175%로 증가하였고 Tre group에서 121%로 감소하였다(그림3-1-78).

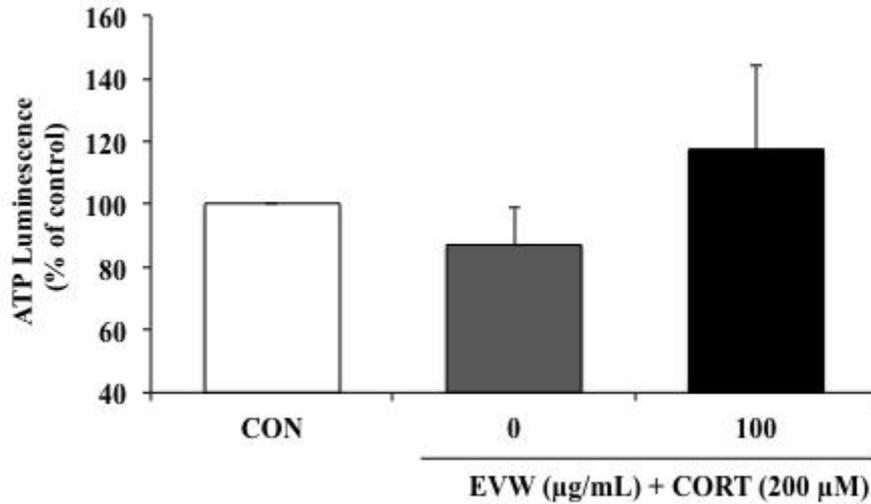


그림3-1-77. Effects of EVW on ATP in corticosterone-treated PC12 cells.

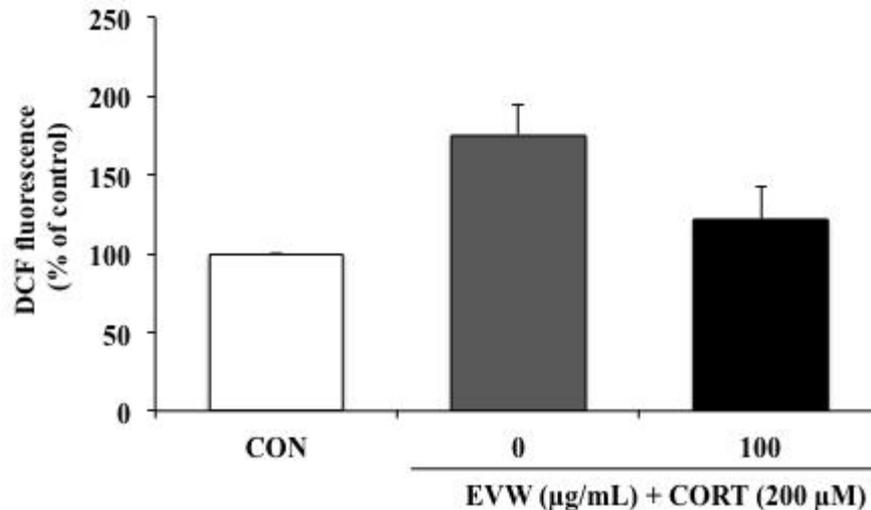


그림3-1-78. effect of EVW on the levels of ROS in corticosterone-treated PC12 cells.

본 연구는 천연식물의 신경보호 효능을 검토하는 것으로 울릉도자생식물인 울릉섬 기린초, 참나리, 우산제비꽃의 추출물을 이용하여 고농도의 스트레스 유도물질을 세포에 처리하였을 때 세포를 보호하는 효능을 확인하였다. Morphological analysis를 통해 cell의 세포사멸의 변화를 형태학적으로 관찰하고, 분자 mechanism pathway를 protein level에서 확인, 그 외 세포내 Ca, LDH, ROS, ATP 변화량을 함께 검토하였다. 그 결과, 본 추출물들에 의해 ER stress에 의한 Ca 방출량과 ER stress marker인 GRP78, GADD153 protein이 감소되는 경향을 확인할 수 있었다. 미토콘드리아의 mPTP와 mmp가 정상에 가깝게 회복되었으며 ATP의 생산이 증가되고, ROS의 양은 감소하였다. 또한 Bax, Caspase-9과 Caspase-3의 활성은 감소되었고, apoptosis에 의한 DNA chromatin condensation과 fragmentation이 본 추출물들에 의해 감소되는 현상을 확인하였다. 이에, 울릉섬 기린초, 참나리, 우산제비꽃의 추출물은 고농도의 스트레스 유도물질로부터 세포를 보호하는 효능으로, 항스트레스 천연소재로 사용 가능성이 있다고 사료된다.

○ 6-OHDA 유도 신경세포사멸 모델 내 두메부추의 천연물소재 보호활성 Mechanism

-세포사멸사 확인 (Hoechst 33342 staining, Annexin V/PI)

Hoechst 33342 staining으로 확인한 6-OHDA 유도 SH-SY5Y 세포의 세포사멸은 6-OHDA를 40, 80, 100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 6시간 동안 처리하였을 때, ASLE (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 전처리하였을 때, 세포사멸사가 유도된 세포의 비율은 6-OHDA만 처리한 군에 비하여 각각 42.5%, 52.0%, 61.9% 억제되었으며, 청색형광 발현이 감소하였다.

세포사멸사의 진행을 확인하기 위하여 Annexin V/PI staining을 하였다. 6-OHDA가 유도하는 SH-SY5Y 세포의 세포사멸사 변화는 Table 4와 그림 5-7과 같다. 6-OHDA 6시간 처리군은 대조군과 비교하였을 때, 6-OHDA의 농도가 증가함에 따라서 apoptotic population 비율이 유의적으로 증가하였다. 반면에 ASLE (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 전처리한 군에서는 6-OHDA만 처리한 군에 비하여 apoptotic population 비율이 유의적으로 억제되었다.

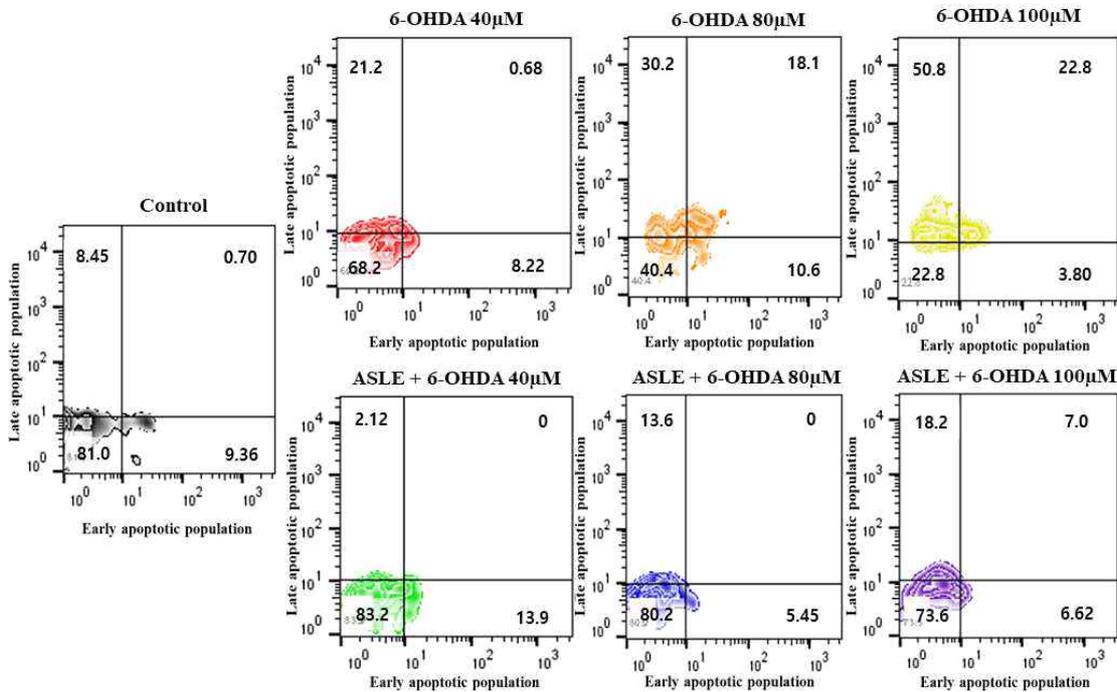


그림3-1-79. Effect of ASLE pretreatment against 6-OHDA-inducible apoptosis in SH-SY5Y cells by flow cytometric detection of Annexin V/PI (quadrangraphs).

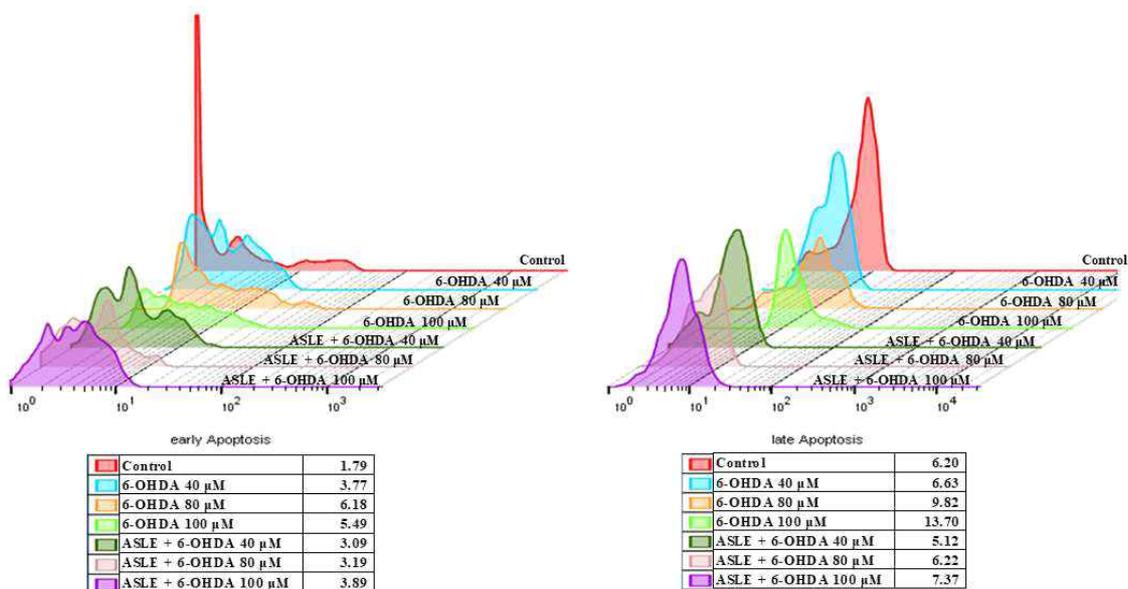


그림3-1-80. Effect of ASLE pretreatment against 6-OHDA-inducible apoptosis in SH-SY5Y cells by flow cytometric detection of Annexin V/PI (histograms).

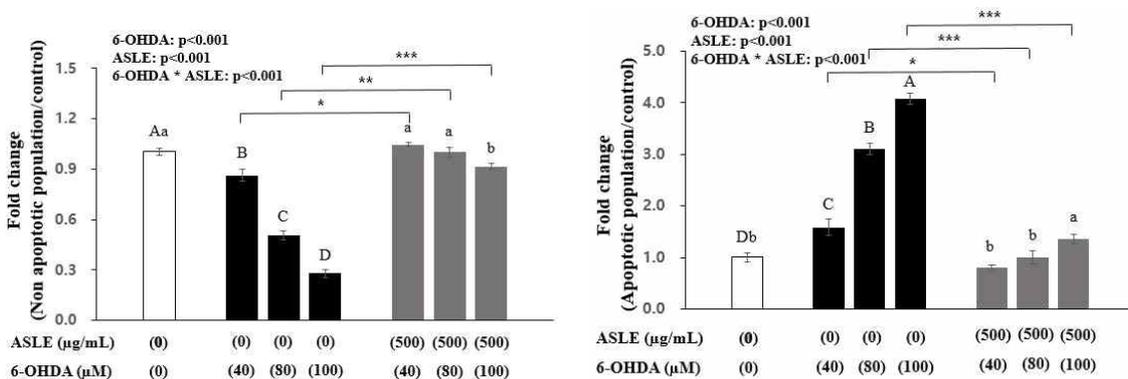


그림3-1-81. Effect of ASLE pretreatment against 6-OHDA-inducible apoptosis in SH-SY5Y cells by flow cytometric detection of Annexin V/PI population (quantitative graph).

#### MMP 손상 억제 효과

6-OHDA (40, 80, 100 μM)를 6시간 동안 처리한 후, 녹색형광은 대조군에 비하여 각각 37.3%, 82.8%, 88.3% 증가하였으며, 적색형광은 대조군에 비하여 각각 62.7%, 17.2%, 11.7% 감소하였다.

반면에 ASLE (500 μg/mL)를 전처리 하고 6-OHDA (40, 80, 100 μM)를 6시간 동안 처리하였을 때, 녹색형광은 대조군에 비하여 각각 35.8%, 36.2%, 40.0% 증가하였지만, 6-OHDA만 처리한 군에 비하여 낮았다. 적색형광은 대조군에 비하여 각각 4.2%, 63.8%, 60.0% 낮았으나, 6-OHDA만 처리한 군에 비하여 높았다. 이는, ASLE의 전처리가 6-OHDA가 유도하는 SH-SY5Y 세포의 MMP 손상을 유의적으로 억제한 것으로 보인다.

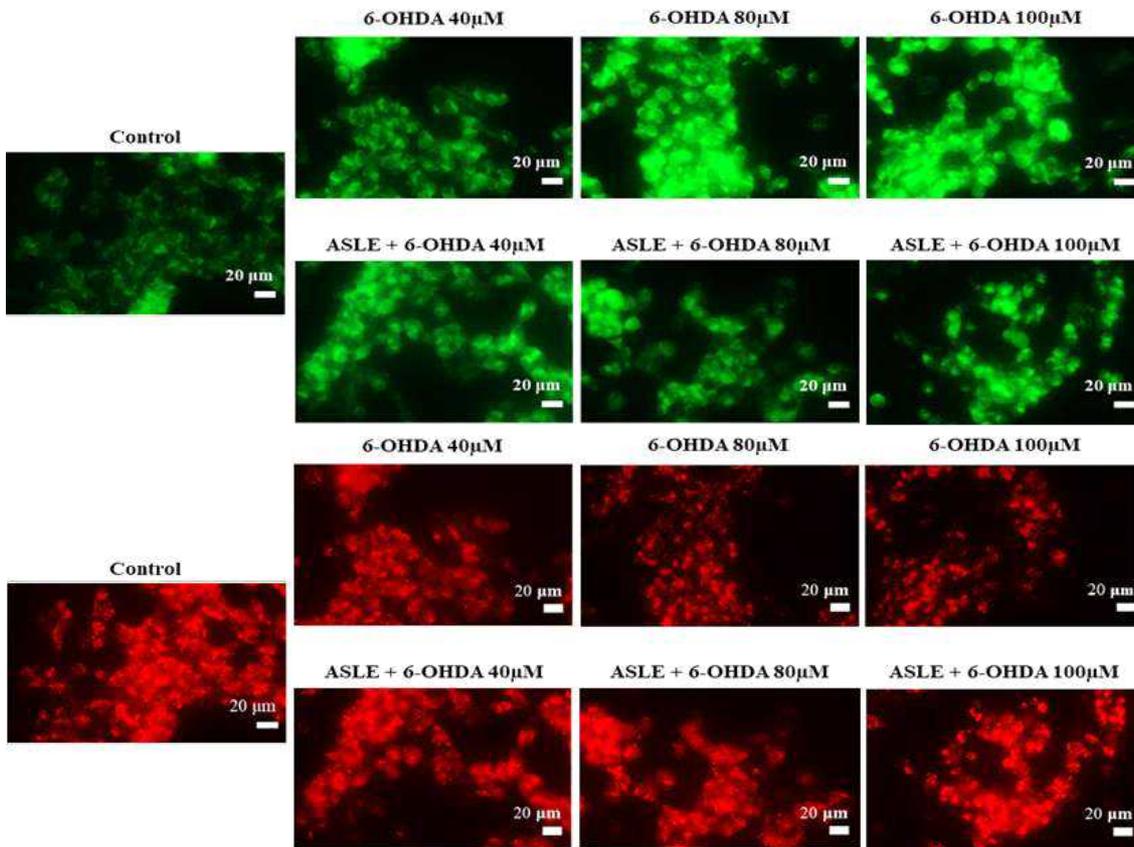


그림3-1-82. Photomicrographs of SH-SY5Y cells pretreatment with ASLE and posttreatment with 6-OHDA by JC-10 staining.

### MAO-B와 caspase-3의 발현

6-OHDA (40, 80, 100  $\mu\text{M}$ )를 6시간 동안 처리했을 때, 6-OHDA의 농도가 증가함에 따라 MAO-B와 caspase-3가 발현량이 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 반면에, ASLE (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 전처리군의 MAO-B와 caspase-3 발현량이 6-OHDA만 처리한 군보다 유의적으로 감소하였다.

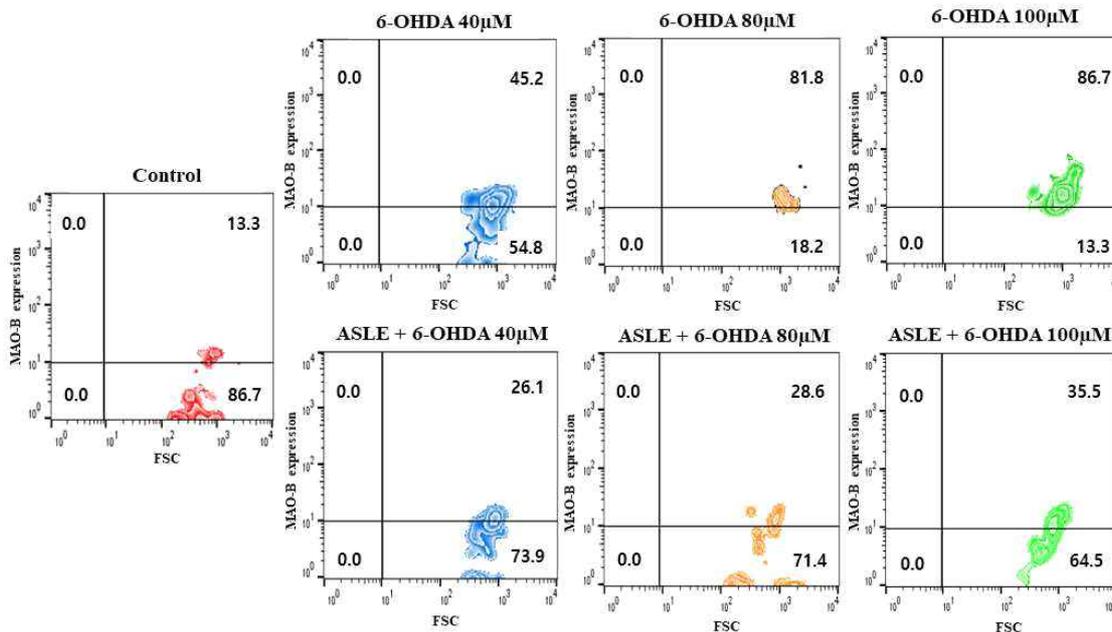


그림3-1-83. Effect of ASLE pretreatment against 6-OHDA-inducible MAO-B protein expression in SH-SY5Y cells by flow cytometry (quadron graphs).

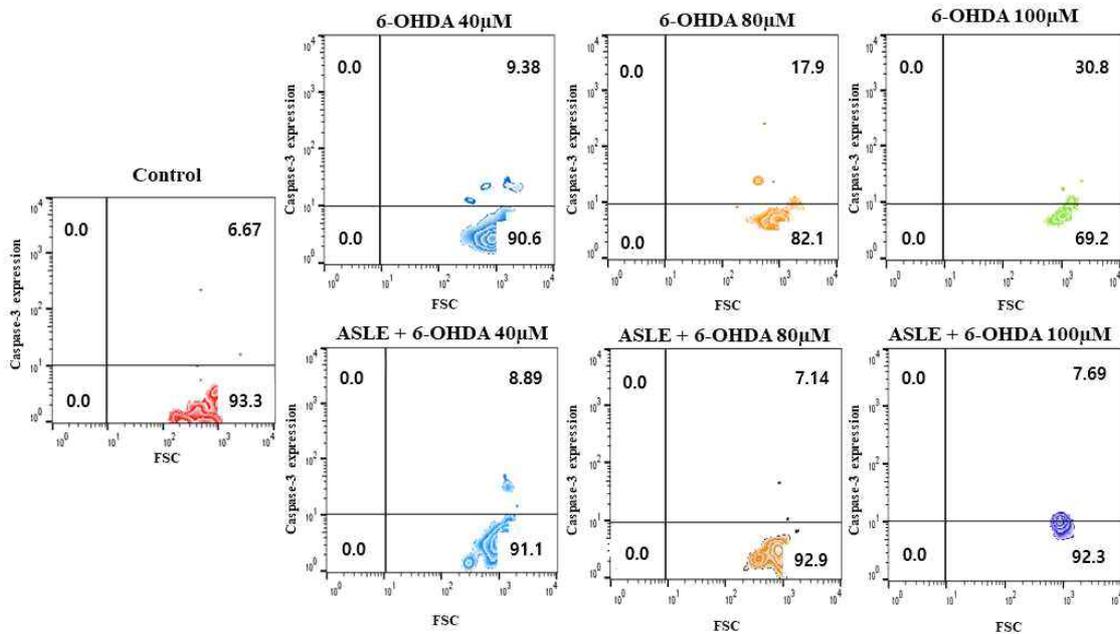


그림3-1-84. Effect of ASLE pretreatment against 6-OHDA-inducible caspase-3 protein expression in SH-SY5Y cells by flow cytometry (quadron graphs).

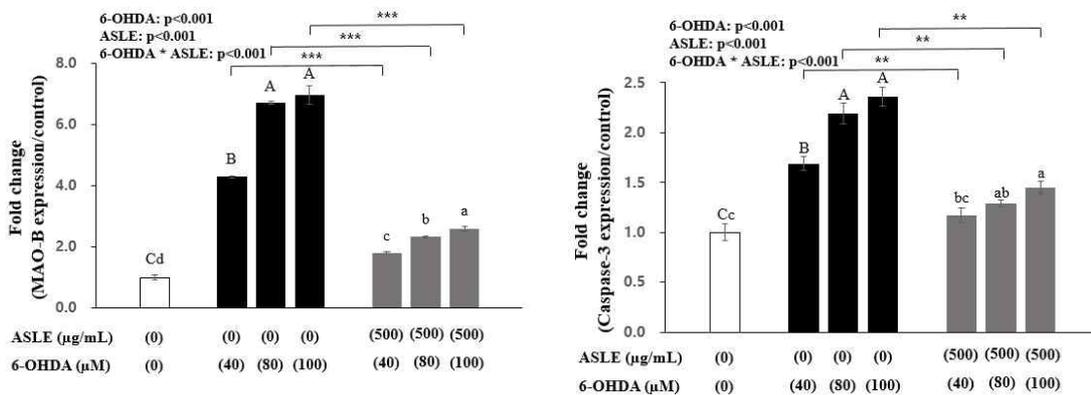


그림3-1-85. Effect of ASLE pretreatment against 6-OHDA-inducible MAO-B and caspase-3 protein expression in SH-SY5Y cells by flow cytometry (quantitative graph).

## ② 제 1-2 세부과제: 생체유용 천연자원 활용 및 DB구축

- 다수의 확보된 천연자원으로부터 생체유용 가능성이 높고 활용 가능한 천연자원 분석을 문헌조사를 통해 진행하였고 국내외 주요 원산국의 기능성 유전자원의 탐색 및 보존을 위한 기능성 유전자원 소재은행 DB를 구축하였고, 2차년도에 작년 DB를 근거로 15종의 천연유용작물을 선택하여 종자 수집, 종자발아와 실내배재에서의 생산력을 조사하고 야외포장에서의 재배도 진행함.
- 재배환경조건에 따른 유용물질 생산증진 기술 개발을 위 5종의 천연유용작물의 5종의 천연유용작물의 유용 기능성 물질(영경귀의 Apigenin, 타임의 Linalool, 민들레의 Sitosterol 등) 생합성 경로 효소들의 광을 포함한 다양한 환경 유도성을 문헌을 통해 조사, 조절된 다양한 환경조건 하에서 천연유용작물들을 재배하고 이들의 생육특성을 조사하여 특정 유용물질 생합성 유전자의 발현량을 real time RT-PCR로 정량하여 주어진 환경조건에 따른 발현 유도성을 확인함. 포장재배 식물을 대조구로 사용하여 특정 유전자의 유의적인 발현 유도성을 보인 식물조직의 기능성물질을 정량함.
- 식물 재배용 LED 비율 설정: 8:2, 7:3, 6:4  
식물의 2차 대사산물 생합성에 영향을 끼치는 적색광과 청색광의 조합을 세 가지 준비하여 유용 물질의 생산 최대성을 꾀함. 물질 생산량의 차이 뿐 아니라 식물 건물중이나 생물중에도 영향을 끼쳐 단위 면적당 생산량 증대 파악 가능.
- Hormesis 처리: UV, 저온, 건조, 고온처리( 7차 년도 추가함)  
스트레스를 이겨내기 위해 식물이 만드는 방어적인 물질, 유용한 2차 대사산물의 증대를 위해 식물 재배 후 Hormesis 처리로 UV, 저온, 건조, 고온 처리를 택하였음.
- 식물의 발아율, 건물중 생물중 측정.  
LED에 따른 식물 간 발아 정도에 차이가 있어 보다 효율적인 재배가 가능함.  
생장 차이와 물질의 합성 차이를 분석해 보다 정확한 단위 생산량 파악이 가능함.
- 식물의 유용한 2차 대사산물의 생합성 경로 파악을 통해 3개의 Key Enzyme 선정.
- 이미 알려진 Key Enzyme gene을 토대로 primer를 제작하여 qRT-PCR 진행.  
Hormesis를 통해 전사된 mRNA를 토대로 만든 cDNA를 통해 gene 증폭을 실시간으로 파악 가능한 qRT-PCR을 통한 분석법을 통해 정량화 시도.  
\*\* primer 제작에 어려움을 겪어 다른 방법으로 정량.
- Artemisinin의 정량화  
10~50mM의 artemisinin 용액을 만들어 291nm에서 흡광도를 측정하였고, 이를 이용하여 standard curve를 작성함.  
Standard curve의  $r^2$ 은 0.9992로 신뢰 가능한 수준의 standard curve를 작성, 이를 바탕으로 샘플의 artemisinin 함량을 측정함.
- Apigenin 정량법: Apigenin하의 DNA와 과산화수소 반응.  
DNA와 과산화수소를 넣고 Apigenin여부에 따른 흡광도 측정으로 검출.  
37도에서 2시간 반응 후 흡광도를 측정.
- rbCL 유연 관계를 통한 primer 제작 : Normal primer  
개똥썩과 달리 영경귀, 민들레, 타임은 key enzyme gene의 정보 검색에 어려움을 겪어 target gene 서열이 검색되는 쌍떡잎 식물의 rcCL CDS서열을 검색하여 이를 토대로 phylogeny tree를 그려 타임과 가까운 유연관계에 속하는 식물을 선정하여 그들의 target gene CDS를 Alignment하여 conserved된 region의 base 우선 순위를 따져 primer를 제작하였음.
- rbCL 유연 관계를 통한 primer 제작 : Combinatorial primer

개똥썩과 달리 엉겅퀴, 민들레, 타임은 key enzyme gene의 정보 검색에 어려움을 겪어 target gene 서열이 검색되는 쌍떡잎 식물의 rcCL CDS서열을 검색하여 이를 토대로 phylogeny tree를 그려 타임과 가까운 유연관계에 속하는 식물을 선정하여 그들의 target gene CDS를 Alignment하여 18~20bp 정도의 conserved된 region을 선정하여 combinatorial primer를 제작함.

○ rbCL 유연 관계를 통한 primer 제작 : NCBI제작.

개똥썩과 달리 엉겅퀴, 민들레, 타임은 key enzyme gene의 정보 검색에 어려움을 겪어 target gene 서열이 검색되는 쌍떡잎 식물의 rcCL CDS서열을 검색하여 이를 토대로 phylogeny tree를 그려 타임과 가까운 유연관계에 속하는 식물을 선정하여 그들의 target gene CDS를 Alignment하여 전체 서열을 conserved하게 맞춘 후 NCBI의 primer BLAST 기능을 통해 primer 제작함.

○ 전체 식물 Target gene을 수합하여 primer 제작: NCBI 제작.

rbCL을 base로 한 primer 제작에 어려움이 있어 target gene CDS 서열을 전체 Alignment하여 conserved된 서열을 맞춰 NCBI의 primer BLAST 기능을 통해 primer 제작함.

○ 전체 식물 Target gene을 수합하여 primer 제작: Combinatorial primer

rbCL을 base로 한 primer 제작에 어려움이 있어 target gene CDS 서열을 전체 Alignment하여 18~25bp 정도의 conserved된 region을 여러 개 선정하여 조합을 통해 primer를 제작함.

○ 식물분류학적 primer제작

식물분류학적 분석을 통해 파악 후 가장 유연관계 가까운 것들끼리 Target gene 분석. 타임의 경우 target gene을 보유한 공통 식물 분류가 종, 속, 과에서 없었으며 목부터 꿀풀목이라는 것으로 보이기 시작하여 해당 식물 군들이 specific한 gene sequence를 지니고 있음을 확인하였음.

**■연도별 연구성과**

(1) 1차 년도

연구목표: 다수의 확보된 천연자원으로부터 생체유용 가능성이 높고 활용 가능한 천연자원 분석

○ 문헌조사를 통해 국내외 주요 원산국의 기능성 유전자원의 탐색 및 보존

사진	원재료명	이명	학명	상위명	원재료 분류	식용여부	특성/성분	주요성분(부위별)	연전성/특성	식용의 용도 (이용부위)
	갈매나무	크리노	<i>Quercus aliena</i> Blume <i>Quercus aliena</i> var. <i>rubripes</i> Nakai (이명)	식물	가능	열매	형체: 낙엽 활엽 교목, 높이는 25m, 지름 31m, 수의 약간 거칠게 그늘져 잎 끝이 뾰족, 잎의 뒷면 상 표면에 털은 적갈색, 5~30mm×3~10cm, 등쪽 또는 옆면, 위쪽 수평면의 이빨모양 또는 톱니형 홈이, 위쪽 표면의 2~17개로 갈라진 삼로, 로 앞수원그루 또는 앞수원줄, 5월여 개화, 수꽃차례 밑거드랑이에서 별도로 자치고, 암꽃차례 뒷부분의 밑거드랑이에서 곧추섬, 끝이 좌우 상각형의 브리, 전과 직경 6~23mm×7~16mm, 끝부분이 넓어 있고, 10월에 성숙, 주로 물에서 삶아, 중국, 일본, 한반도, 전역, 콩나물, 콩자식, 견과류, 가루, 기름, 잎	전분, 지방유, tannin 등이 들어 있다.	녹비용 (어린잎), 가루, 잎 추출물, 기름 등이 없고 화피가 변질될 수 있음	
	갈매나무	갈매나무	<i>Vicia amoena</i> Fisch. ex DC.	식물	가능	줄	도토리(acorn): 해나무과 해나무속의 학갈나무, 갈매나무, 불해나무에 속하는 한국, 일본, 중국, 서발칸, 시베리아의 온대에서 난대에 걸쳐 분포한다. 물과 산의 상한 물방에서 자생한다. 높이는 60~100cm이며 가지 및 줄기는 수평적이다. 콩은 종상종자제로 밑거드랑이에서 나온 주자식의 꽃이 나오며 종형의 꽃받침은 불규칙하게 5갈래로 갈라지고 기관과 기관의 길이가 거의 같고 꽃자국은 긴 편이며 화관은 길이 12mm 정도로 나비 모양이다. 잎은 긴 타원형으로 남쪽에서 많이 있다. 꽃에는 열매로 갈 리듬형이 많이 있으며 연과 2-3개의 꽃자 줄자가 붙어 있고 씨와 뿌리로부터 번식이 가능하다. 잎은 이곳이나 거의 잎이 떨어지기 전에 10월 24일까지 계속하여 자라나며, 10월 24일 이후에는 잎이 떨어진다.	지방유, anti-A-glycohemagglutinin, trypsin inhibitor	약용(자상부), 식료	
	갈매나무	갈매나무	<i>Gallium spurium</i> Litne	식물	가능	열매	족두서낭과(Rubiaceae)의 족두서낭이 열매를 맺는 1미터 정도이며, 가시(시)가 있어 다른 물건에 잘 걸려 붙는다. 열매는 약용으로 일하고 같은 열이 있고 어린잎과 같은 맛이다. 한국, 일본 등지에 분포한다.[1]	전초에 푸에르타갈락티소이드, 다스페롤소이드, 탄닌질이 있다. (약용(전초))		
	갈매나무	갈매나무	<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	식(木)	식물	가능	갈매나무과(Ebenaceae)의 낙엽 교목(Diospyros kaki), 높이는 10미터 정도이며 열매는 가루에 익는다. 열매는 길이가 1.5~2.5cm, 10월 말에 익는다. 잎은 거칠고, 다른 부위는 약용으로 한다. 한국의 중부 이상 일본, 중국 등지에 분포한다.[1]	같은 열매가 많아 14% 정도이며 그 조성은 유효성 6%, 과당 2, 지방유, 관상용, 약용(열매)	열매가 많이 떨어진 것은 약용(열매), 14% 정도 분포한 것이 아니고 유효성이 되어 열매가 많이 떨어진 것이 있다. 잎으로 하는 열매의 유효성 1. 유효성(열매) 15~24%간 유효성을 지닌다. 온도는 온전히 합성되지 않는다. 갈의 양이 많고 2. 유효성(열매) 15% 정도 분포한 것이 많다. 유효성(열매) 15% 정도 분포한 것이 많다.	

그림 3-2-1. 유전자원 데이터베이스

○ 기능성 유전자원 소재은행 DB를 구축



			choline	
Thyme	타임	<i>Thymus vulgaris</i>	thymol, carvacrol, p-cymene, linalool, terpicene, flavonoids	아시아종묘
Parseley	파세리	<i>Petroselinum sativum</i>	anti-aging, anti-irritation effects on skin, pinene, apiole, apiin, luteolin-glycosides, apigenin-glycosides, apiole, myristicin, bergapten, imperatorin, vitamin C	한국종묘
Lemon balm	레몬밤	<i>Melissa officinalis</i> L.	antiviral activity, citronellal, citral a, citral b, monoterpenes, sesquiterpenes, triterpenylic acid, flavonoids	아람종묘
Sage	세이지	<i>Salvia officinalis</i> L.	anti-inflammatory activity, ursolic acid, oleanolic acids, diterpene carnosol	아람종묘
Marjoram	마조람	<i>Origanum majornana</i> L.	antioxidant capacity, rosmarenic acid, apigenin, luteolin-7-o-rutinose	아람종묘
Rough aster	취나물	<i>Aster scaber</i> Thunb.	inhibit reactive oxygen species, chlorogenic acid(5-O-caffeoylquinic acid), astagalin(kaempferol-3-O-glucopyranoside), cynarin(1,3-O-dicaffeoylquinic acid)	아람종묘
Sweet wormwood	개똥쑥	<i>Artemisia annua</i> L.	artemisin, camphor, artemisia ketone, germacrene D and 1,8-cineole.	아람종묘
<i>Ixeris dentata</i> (Toothed ixeris)	씀바귀	<i>Xeridium dentatum</i> (Thunb.) Tzvelev	lowering lipid levels , anti-oxidation activity, aliphatics, triterpenoids, sesquiterpene glucoside	아람종묘

○ 15종의 식물들의 종자발아 테스트



그림3-2-3. 종자발아테스트

○ 15종의 식물의 실내 재배, 생산력 조사



그림3-2-5. 실내재배조건 확립



그림3-2-6. 실내재배설비

○ 야외 포장 조건에서 재배



영경귀



민들레



타입



청겨자



씀바귀



파세리



얼청갯



방울다다기양배추



레몬밤



세이지



마조람



취나물



개똥쑥



청로메인

그림3-2-7. 야외조건재배

(3) 3차 년도

연구목표 : 재배환경조건에 따른 유용물질 생산증진 기술개발

- 5종의 천연유용작물의 유용 기능성 물질(영경귀의 Apigenin, 타입의 Linalool, 민들레의 Sitosterol 등) 생합성 경로 효소들의 광을 포함한 다양한 환경 유도성을 문헌을 통해 조사함.
- 조절된 다양한 환경조건 하에서 천연유용작물들을 재배하고 이들의 생육특성을 조사함.



사진3-2-8. LED 광조건 하의 식물 성장시설

- 특정된 유용물질 생합성 유전자의 발현량을 real time RT-PCR로 정량하여 주어진 환경조건에 따른 발현 유도성을 확인함. 포장재배 식물을 대조구로 사용함.

레몬밤



8 : 2



7 : 3



6 : 4

타임



8 : 2



7 : 3



6 : 4

영경귀



8 : 2



7 : 3



6 : 4

민들레



8 : 2



7 : 3



6 : 4

사진3-2-9. LED 광조건(R:B)에 따른 식물형태 (일차재배)

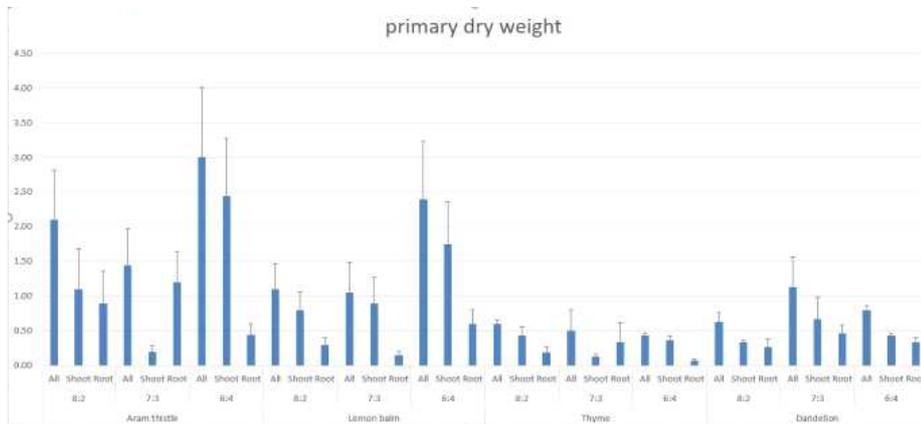
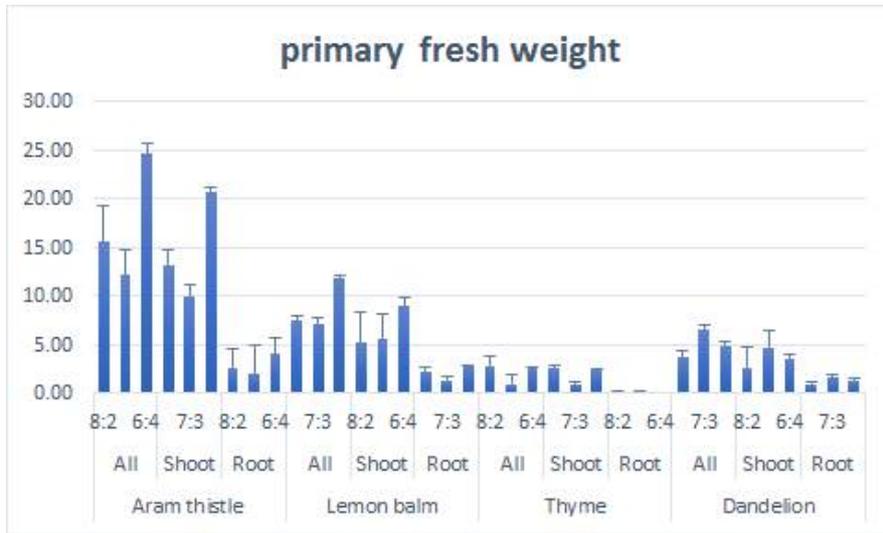
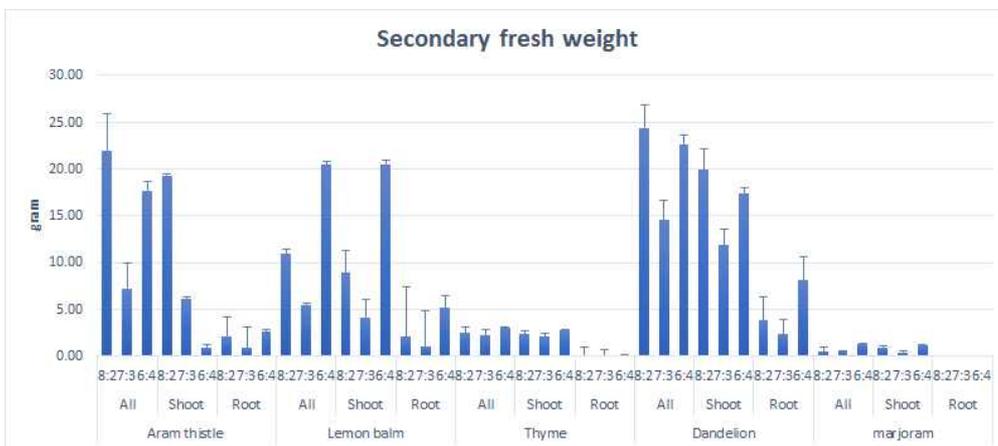


그림3-2-10. LED 광조건에 따른 식물 조직별 성장비교 (생체중, 건물중; 일차재배)

이차 재배결과 (생육기간 55일)



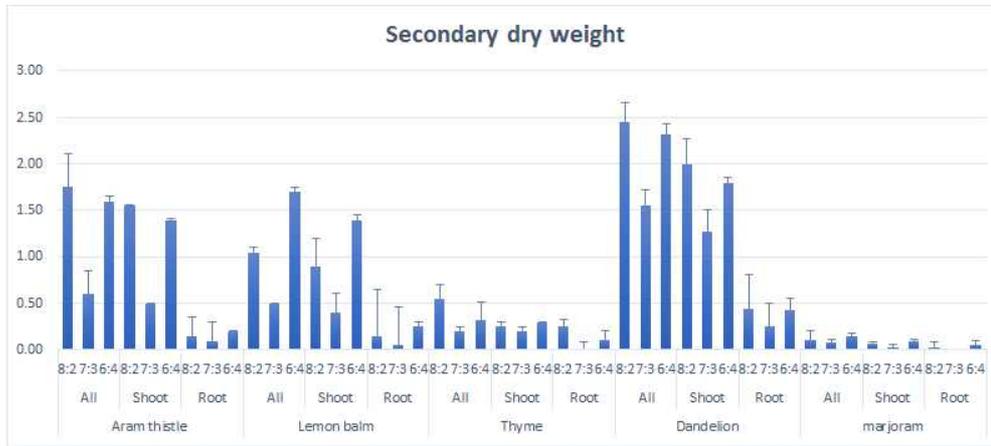


그림3-2-12. LED 광조건에 따른 식물 조직별 성장비교 (생체중, 건물중; 이차재배)

○ 특정 유전자의 유의적인 발현 유도성을 보인 식물조직의 기능성물질을 정량함.

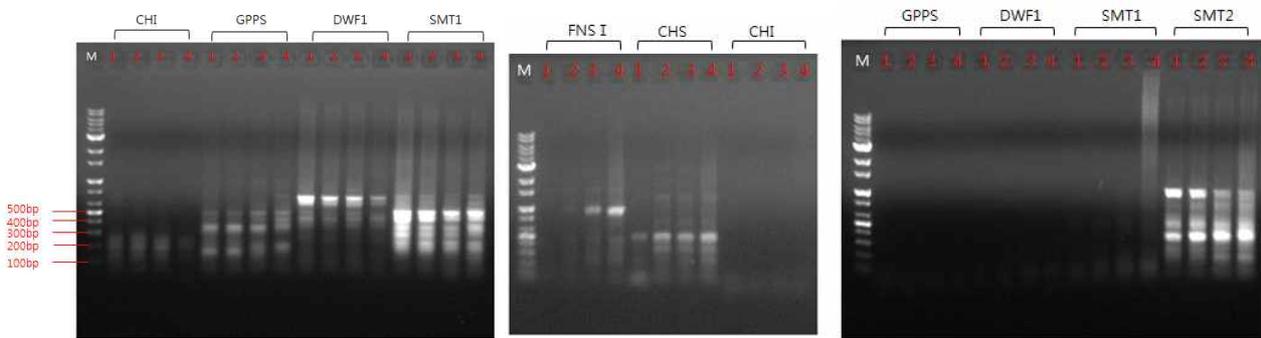


그림3-2-13. Gradient PCR에 의한 각 primer set의 적정 annealing temperature 확인

(4) 4차년도

연구목표: Artemisinin 최적 합성의 개똥쑥 식물공장 재배법 확립과 기술이전.

- LED R:B = 6:4, 7:3, 8:2 조건에서 재배한 식물에 UV, 저온, 건조 처리를 3h, 6h, 9h, 12h 한 후 수확.
- LED 비율에 따른 발아세측정과 성장 비교.
- LED비율에 따른 건물중, 생물중 비교.
- Cloning과 Sequence 분석을 통해 Key enzyme 확인.
- qRT-PCR을 통하여 LED R:B 비율과 물리적 처리에 따른 Artemisinin 발현량 차이 확인.
- LED R:B 비율과 물리적 처리에 따른 trichome분포 변화 관찰.
- Artemisinin 함량 비교를 위한 정량법 시행.

(5) 5차년도

연구목표: Apigenin최적합성의 엉겅퀴 식물공장 재배법확립과 기술 이전.

- LED R:B = 6:4, 7:3, 8:2 조건에서 재배한 식물에 UV, 저온, 건조 처리를 3h, 6h, 9h, 12h 한 후 수확.
- LED 비율에 따른 발아세측정과 성장 비교.
- LED 비율에 따른 건물중, 생물중 비교.
- 종 동정 위한 유전자 Barcord 분석.

- Apigenin 생합성 관련 3개의 Key enzyme gene 발현 분석.
- Apigenin의 DNA 분해 방지능을 이용하여 Apigenin 정량법 개발.

(6) 6차 년도

연구목표: Sitosterol 최적 합성의 민들레 식물공장 재배법 확립과 기술 이전.

- LED R:B = 6:4, 7:3, 8:2 조건에서 재배한 식물에 UV, 저온, 건조 처리를 3h, 6h, 9h, 12h 한 후 수확.
- LED 비율에 따른 발아세 측정과 생장 비교.
- LED 비율에 따른 건물중, 생물중 비교.
- Cloning과 Sequence 분석을 통해 Key enzyme 민들레 유전자 확인.
- 민들레 유전자원을 수집하고 엽록체 DNA(matK와 rbCL) 염기 서열 분석을 통해 식물종을 동정.

(7) 7차 년도

연구목표: Linalool 최적 합성의 타임 식물공장 재배법 확립과 기술이전.

- LED R:B = 6:4, 7:3, 8:2 조건에서 재배한 식물에 UV, 저온, 건조 처리를 3h, 6h, 9h, 12h 한 후 수확.
- LED 비율에 따른 발아세 측정과 생장 비교.
- LED비율에 따른 건물중, 생물중 비교.
- Cloning과 Sequence 분석을 통해 3종의 Key enzyme 선정.
- 쌍떡잎식물의 rbCL mRNA서열을 Alignment 하여 phylogeny 분석으로 유연관계를 파악하여 가까운 식물들의 gene을 mutiple alignment하여 3종의 primer를 제작.
- 쌍떡잎식물 전체의 target gene을 Alignment하여 primer 다시 제작.
- 쌍떡잎식물 전체의 target gene을 Alignment하여 combinatorial primer를 제작.
- target gene을 지닌 식물 중 타임과 분류학적으로 가장 가까운 범위에 속하는 식물들 모아 따로 alignment 하여 conserved sequence를 베이스로 primer를 제작.

### ③ 제 2-1 세부과제: 비뇨기건강, 여성건강 개선 식의약소재 인허가 산업화

#### (ㄱ) 1차년도 연구목표

- 인체적용시험용 시제품생산
- 비뇨기 건강 개선 인체적용시험 평가 방법 구축
- 천연물 식의약 소재의 여성 건강, 비뇨기 건강 소재 확정
- 비뇨기 건강 개선 인체적용시험 수행
- 비뇨기 건강 또는 여성 건강 천연물 식의약 소재의 산업화 준비

#### (ㄴ) 1차년도 연구개발 내용 및 성과

- 1차년도에 본 세부는 비뇨기 건강, 여성건강 개선 식의약 소재 인허가 산업화를 위한 지식재산권 2건을 출원함. 산업화를 위한 홍보를 진행하였음. 비뇨기 건강개선 전임상, 임상 효능 평가를 위한 시제품의 생산을 완료하였으며, 간이 인체적용시험을 수행하여 최적 임상 적용 농도를 확립하였음.
- 1차년도의 연구 진행 과정에서 여성 갱년기 개선 천연물 식의약 소재의 연구 성과가 매우 우수하며 전 임상 효능 검증부터 임상 효능 평가까지의 결과가 매우 빠르게 진행되어 비뇨기 건강 개선 천연물 식의약 소재 개발 사업보다 선행되어 연구 성과를 도출하게 되었음.

#### (A) 여성 건강 개선 식의약 소재의 연구 개발

- 여성 건강 개선 식의약 소재는 여성갱년기 개선에 매우 큰 효능을 가지고 있었으며 이에 따라서 특허 출원부터 소재 선정 전임상 효능평가 인체적용시험, 소재의 기준규격 확립까지 일련의 과정이 100% 완료되었음.
- 논문은 JMF에 투고되었으며 아래 그림1과 같이 연구 성과를 보고함. 논문은 세포 실험을 통해서 여성 갱년기 개선 작용기전을 규명하였으며 난소 적출 여성갱년기 동물모델을 통해, 뼈 건강개선, 자궁두께 유지, 염증 억제, 지질대사 활성화 등 다양한 증상 개선 효능을 규명함, 마지막으로 간이 인체적용시험을 통해서 여성 삶의 질 개선 및 질 건강 간 개선에 효능이 있음을 입증함.

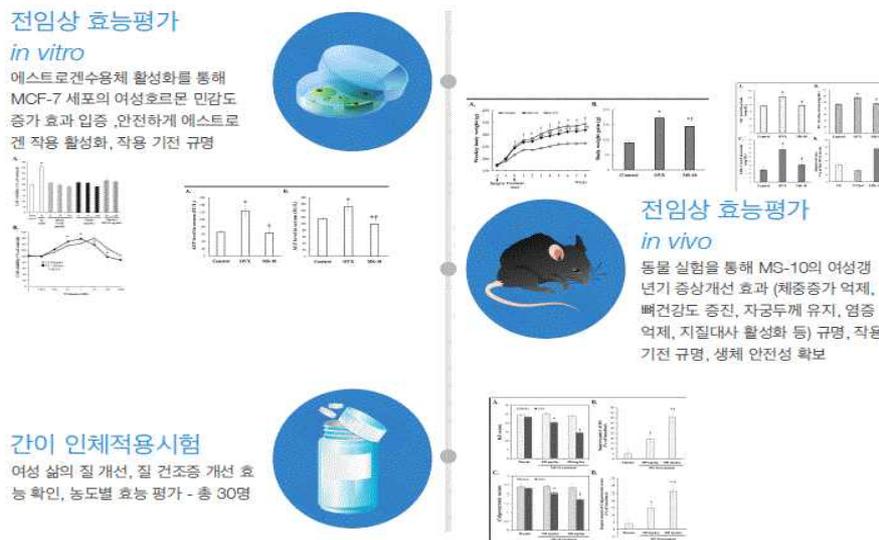
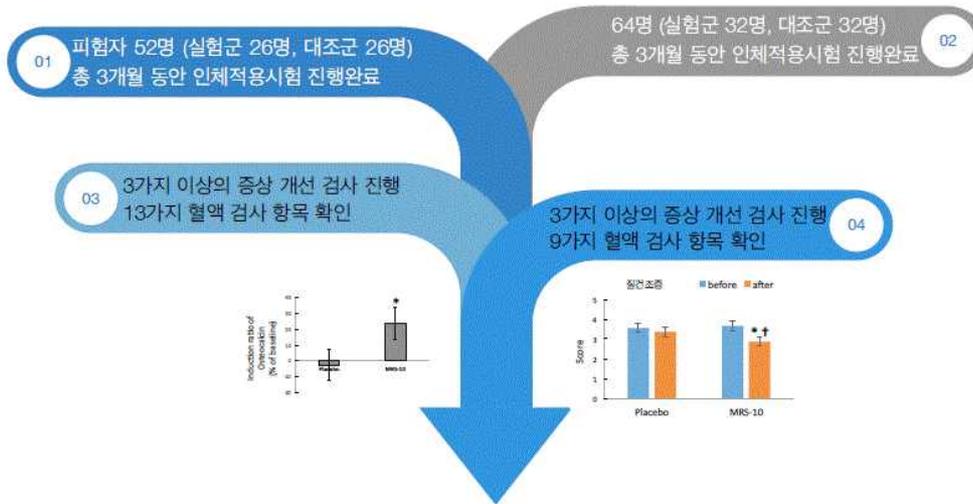


그림3-3-1. 제 2핵심 과제 논문 성과 보고

- 다수의 인체적용시험을 통해서 여성갱년기 개선 효능 규명 완료함.



## 여성갱년기 증상개선을 위한 기능성 개별인정용 보고서

- ★기존의 소재들과 차별화되어 명확한 작용기전 규명
- ★기존의 소재들 보다 더 뛰어난 여성갱년기 복합 증상 개선 효과
- ★기존의 소재들 보다 안정적이고 믿을 수 있는 천연 소재 확보
- ★기존의 소재들보다 많은 수의 인체적용시험 피험자 수 확보

그림-3-2. 제 2핵심 과제 인체적용시험 효능평가 보고서

- 인체적용시험은 두 개의 보고서를 도출하였으며 총 3가지 이상의 증상 개선 설문을 완료하였으며 22가지 혈액 검사 항목을 통해서 여성갱년기의 다양한 바이오마커들이 개선되는 것을 확인하여 개별인정 보고서를 작성.
- 위 인체적용시험 보고서는 기존의 소재들과 달리 작용기전이 과학적이고 체계적이며 기존의 소재들보다 더 뛰어난 복합증상 개선효과를 보임. 소재 또한 안정적이고 안전적이기 때문에 믿을 수 있으며 기존의 소재들에 비해서 단일 시험을 통해 더 많은 피험자로부터 결과를 확보하였음.

### (B) 비뇨기 건강 개선 식의약 소재의 개발 (인체적용시험)

- 인체적용시험을 통해서 선정된 소재가 남성 전립선 비대증 증상 개선의 효능을 확인한 결과 검증된 소재는 약 30% 가량의 비뇨배뇨 장애 개선에 효능이 있었음을 확인할 수 있었음.
- 남녀의 과민성방광증후군의 증상 개선에 있어서 OABSS(Overactive Bladder Symptom Score)검사를 통해 확인한 결과 과민성방광증후군의 대표 증상인 빈뇨, 방광뇨, 요절박, 절박성 요실금 등의 개선 여부를 확인할 수 있었으며 선정된 천연물을 섭취한 경우 약 26%의 증상 개선을 확인할 수 있었음. 이는 본 조성물이 과민성방광증후군 개선에 도움을 줄 수 있음을 보여주는 것이라고 할 수 있음.
- 개별인정을 위한 기준규격 확립이 완료됨. 여성 건강 개선 및 비뇨기 건강 개선 천연물 식의약 소재의 표준화를 확립함.

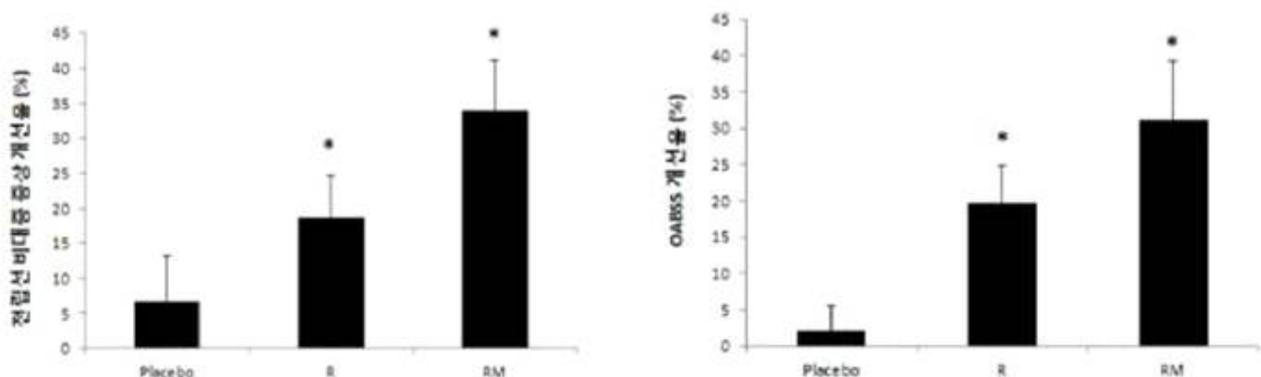


그림3-3-3. 비뇨기 건강 개선 인체적용시험 결과

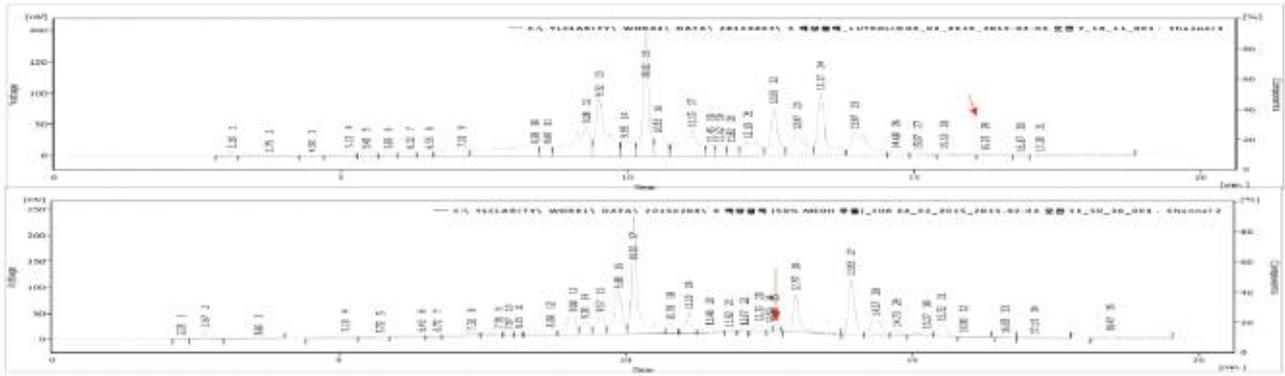


그림3-3-4. 천연물 유래 식의약 소재의 표준화

## 나. 2차년도

### (ㄱ) 2차년도 연구목표

- 다양한 연구를 통한 여성 건강 관련 우수 소재 확보
- 여성갱년기 임상효능평가 완료
- 여성갱년기 기능 소재 작용기전 규명
- 여성갱년기 기능 소재 개별인정 신청
- 여성 건강 관련 제품화 성과
- 비뇨배뇨 건강 개선 인체적용시험 수행
- 배뇨 건강 개선 소재 제품화 (IPSS 효능)

### (ㄴ) 2차년도 연구개발 내용 및 성과

#### (A) 천연물 유래 비뇨배뇨 장애 개선을 위한 식의약소재 선정 및 인체적용효능 평가 결과

본 과제 진행과정에서 비뇨배뇨 장애 개선 소재를 선정함. NY(과제 진행과정에서 새롭게 선정)는 국내에서 생산되는 천연물들의 추출복합물로서 대량 생산과 다양한 제형제제들로 제품화가 가능한 소재로서 본 연구 과정에서 비뇨배뇨건강 개선에 탁월한 효능을 보임.

NY의 효능을 확인하기 위하여 30세에서 80세까지의 남녀를 대상으로 최근 3개월간 절박뇨를 포함한, 빈뇨, 야간뇨 등의 증상이 있는 60명을 대상으로 무작위로 2개군으로 나누어 대조군과 NY 복합 추출물을 하루에 150mg씩 12주간 복용시키면서 배뇨일지 작성 및 OAB-q (overactive Bladder questionnaire)와 배뇨 곤란목록 (UDI) 등을 포함한 증상평가와 혈액지표 평가를 통해서 인체적용시험을 수행함.

이것으로 일일 평균 배뇨횟수, 평균 야간 빈뇨횟수, 일일 평균 절박뇨횟수, 최대절박뇨 점수, 일일 평균 요실금 횟수, 과민성방광 불편지수, 배뇨 곤란 정도를 측정하여 본 과제 중 선정 추출물인 NY를 섭취하기 전후를 비교하였음.

아래 그림에서 나타낸 것과 같이 NY 복합추출물을 12주간 섭취한 경우, 일일 평균 배뇨횟수의 유의한 감소를 확인할 수 있었음.

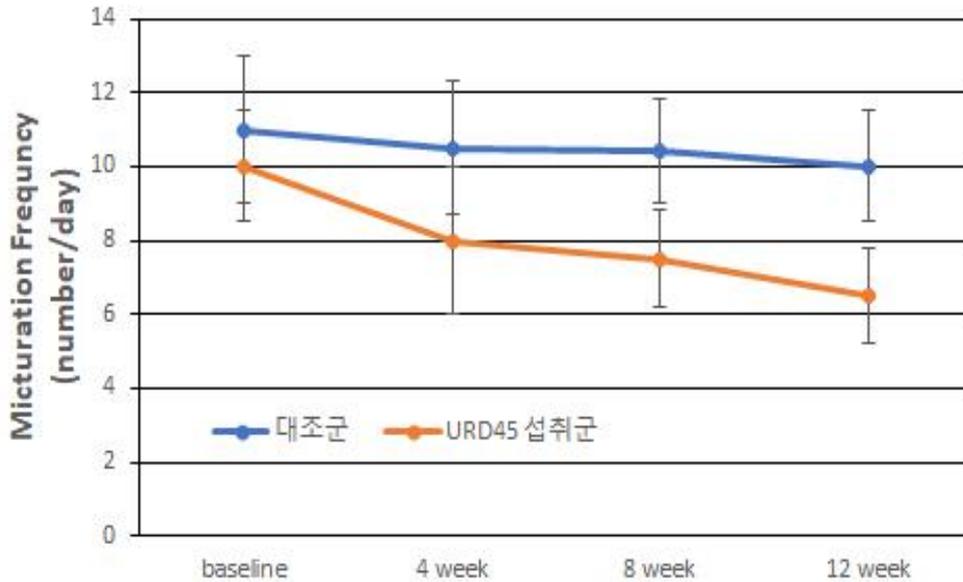


그림3-3-5. URD45 섭취에 의한 12주간 일일 평균 배뇨 빈도 변화

본 연구 결과는 URD45를 섭취한 결과 일일평균 배뇨 빈도를 10.23회에서 12주후 6.42회로 통계학적으로 유의하게 감소되는 것을 확인할 수 있었음. 이는 URD45에 의해서 배뇨건강에 도움을 줄 수 있음을 보여주는 결과임. 하지만 대조군의 경우는 섭취 전후 변화가 거의 없는 것을 확인해 볼 수 있었음 (그림 5).

또한 절박뇨 빈도 개선에서 URD45의 영향을 확인한 결과, 섭취 전 2.93회의 절박뇨 증상을 보인 반면 추출물을 12주간 섭취한 후에 1회 이하로 절박뇨가 감소되는 것을 확인할 수 있었음. 반면 대조군의 경우 섭취 전후 절박뇨 빈도의 변화가 관찰되지 않았음 (그림 6).

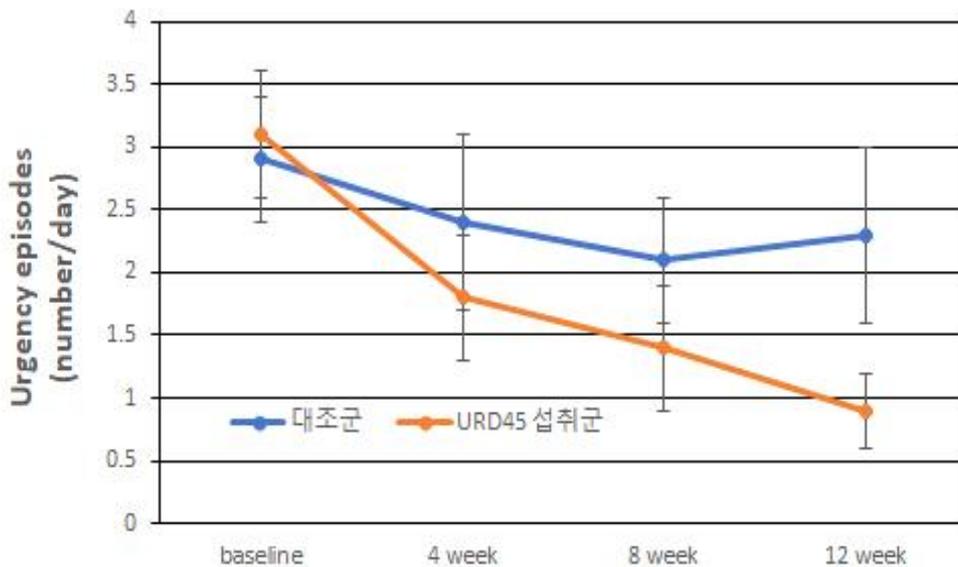


그림3-3-6. URD45 섭취에 의한 12주간 일일 평균 절박뇨 빈도 변화

일일 요실금 빈도 변화에 영향을 확인한 그림 7에서 확인할 수 있는 것과 같이 URD45를 섭취하기전에 약 0.71회에서 12주간 섭취후 0.13회로 거의 없어진 것을 확인했음. 이는 매우 의미있는 결과로서 URD45에 의해서 요실금을 개선시킬 수 있음을 보여주는 것임 (그림 7).

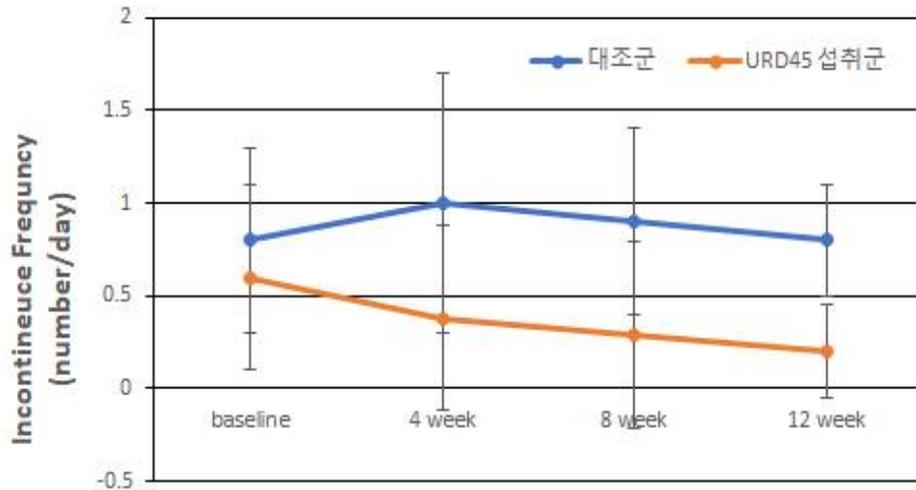


그림3-3-7. URD45 섭취에 의한 12주간 일일평균 요실금 빈도 변화

또한 그림 8에서 확인할 수 있는 것과 같이 URD45 섭취전 야간빈뇨 횟수가 일일 평균 2.93회에서 12주간 NY를 섭취한 경우 약 1.21회로 유의미하게 감소함으로써 URD45의 섭취가 야간빈뇨에 긍정적인 작용을 할 수 있음.

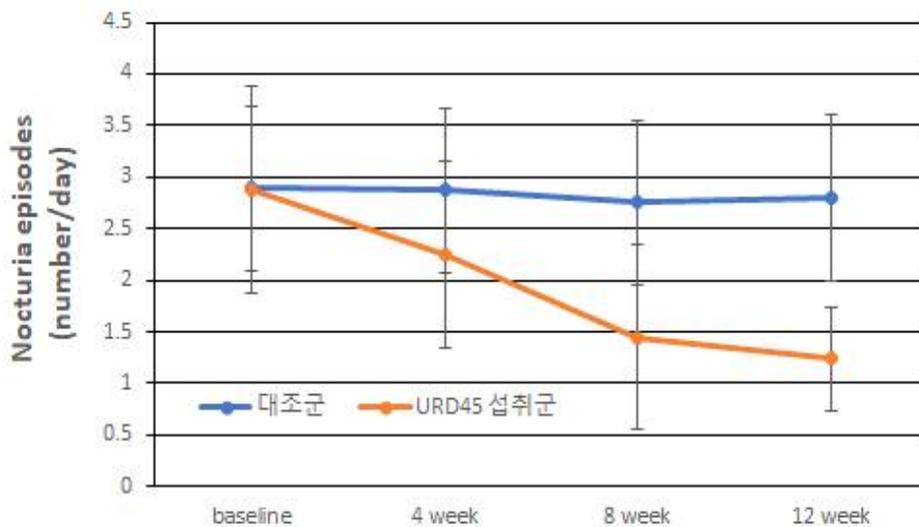


그림3-3-8. URD45 섭취에 의한 12주간 일일평균 야간빈뇨 빈도 변화

결과적으로 URD45를 12주간 섭취한 경우 일일 평균 배뇨횟수, 야간빈뇨 횟수, 절박뇨횟수, 최대 절박뇨점수와 요실급횟수, 야간뇨 횟수 모두에서 섭취전과 비교해서 섭취후에 통계학적으로 모두다 유의하게 개선시킬 수 있음을 확인할 수 있었음. 이는 URD45가 배뇨장애개선에 도움을 줄 수 있음을 보여주는 결과임. 요실금에 URD45의 효능을 확인하기 위해 SEAPI (Stress-related leakage, Emptying ability, Anatomy, protection, inhibition) 검사도 함께 수행하였음. 주관적 SEAPI 검사 결과 그림 9를 통해 확인할 수 있는 것과 같이 Stress related incontinence와 Anatomical defect degree, protection, instability 점수에서 URD45를 12주간 섭취한 결과 의미있는 증상 개선을 확인할 수 있었음. 반면 위약군에서는 섭취 전후에 차이가 없는 것을 확인할 수 있었음.

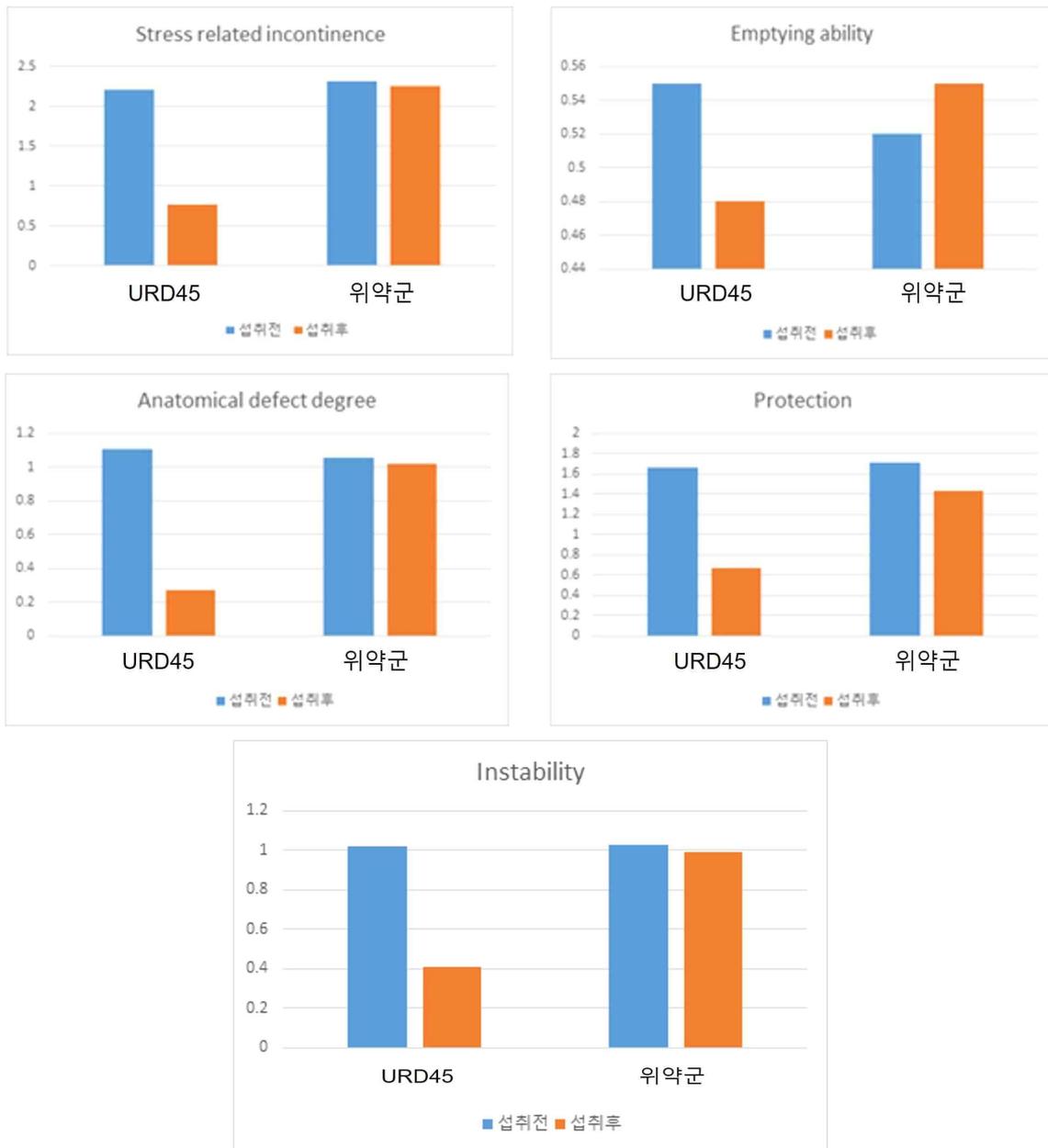


그림3-3-9 URD45 섭취에 의한 12주간 일일 평균 야간 빈뇨 변화

결과적으로 URD45의 섭취를 통해서 다양한 요실금 자각 증상을 효과적으로 개선함으로써 요실금 개선 자각증상에 도움을 줄 수 있음을 보여주는 것임.

추가로 본 실험에서는 OAB-q를 통한 과민성방광불편지수를 확인하였음. 이는 낮에 자주 소변을 보는 것, 소변을 보고 싶은 불편한 충동, 아무 때고 없이 갑작스럽게 소변을 보고 싶은 충동, 본의 아니게 약간의 소변을 지리는 것, 밤에 소변을 보는 것, 억제할 수 없이 소변을 보고 싶은 충동, 소변보고 싶은 강한 욕구가 생기면서 소변을 지리는 것 관같은 8가지 문항에 대한 답변을 각각 6점 척도로 나누어 설문을 진행함. 그 결과 다음 그림 6에서 확인할 수 있는 것과 같이 URD45를 12주간 지속적으로 섭취한 경우 총점에서 약 10점 가량의 통계학적으로 유의한 과민성방광 불편지수가 개선되는 것을 확인하였음.

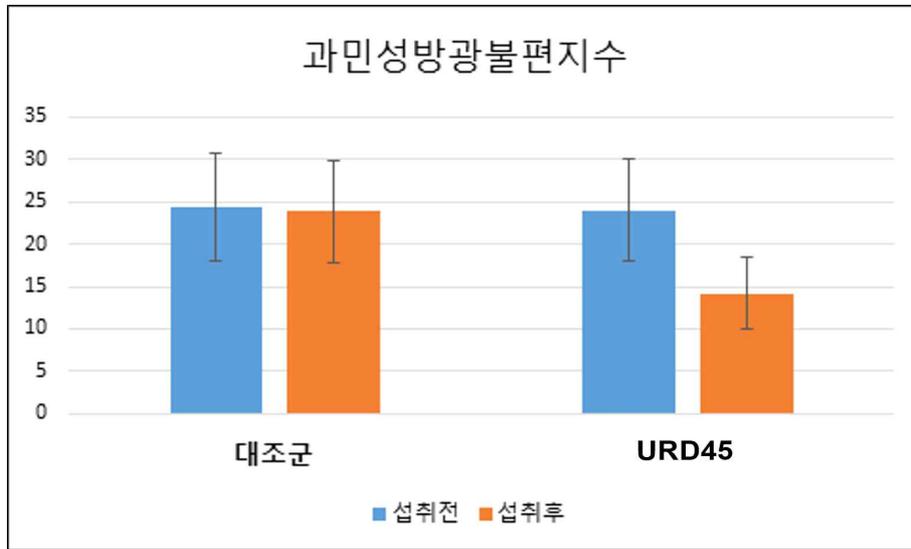


그림3-3-10. OAB-q로 평가된 URD45 섭취에 의한 과민성방광불편지수

위 인체적용시험과정에서 본 연구진은 배뇨곤란목록 (UDI)의 짧은 버전을 사용하여 증상 개선여부를 평가 하였음. 특히 배뇨곤란 목록 중에서 신체적 측면에 연관된 UDI의 문항을 선별하여 빈뇨, 배뇨감, 또는 절박 성으로 인한 누출, 활성기침 또는 재채기로 인한 누출, 소량의 누출, 방광을 비우기 어려움, 하복부 또는 생식부에서의 동통 또는 불편함에 응답을 변화를 확인하여 효능을 평가함. 그림 11을 통해서 본 연구의 URD45 섭취에 의한 배뇨곤란 응답율이 감소한 것을 개선율로 전환하여 나타냈음. 결과적으로 URD45 섭취를 통해서 배뇨증상들이 10-25% 가량 전체적으로 증상 개선되는 것을 확인함.

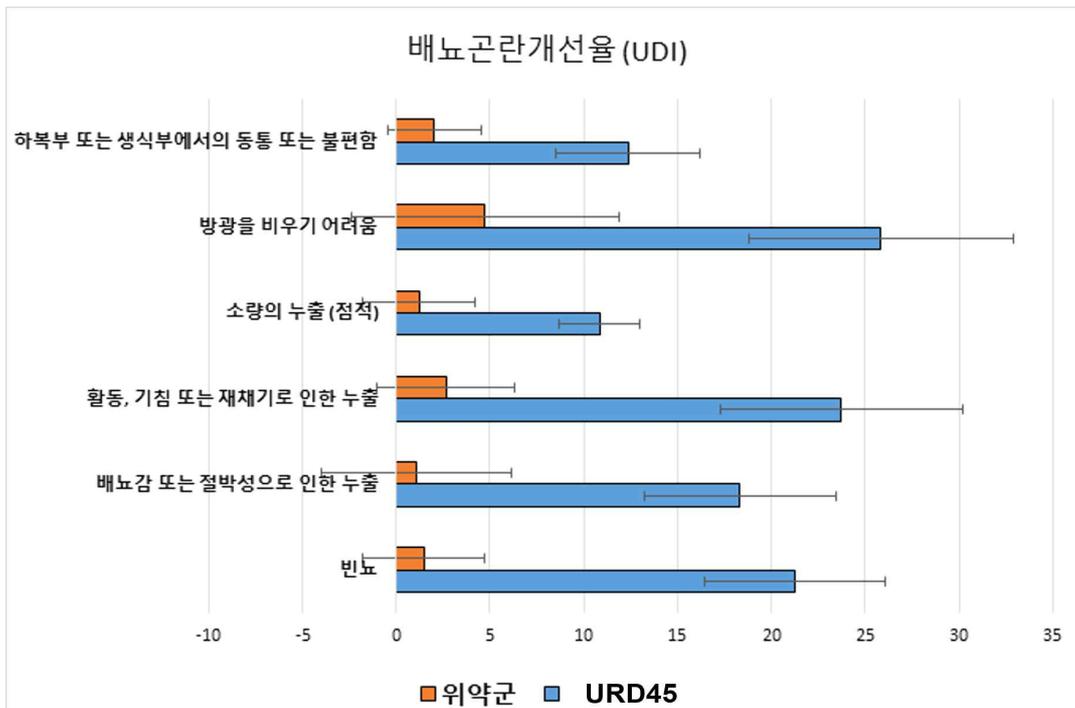


그림3-3-11. URD45 섭취에 의한 배뇨곤란 개선율

(B) 천연물 유래 여성 건강 개선 식의약소재의 갱년기 증상 개선 작용 기전 연구

1) 세포시험을 통한 추측 기전

- 에스트로겐 수용체의 발현과 활성 개선 기전
- 갱년기 여성의 경우는 여성호르몬인 에스트로겐이 완전히 없는 것이 아니고, 정상적인 상태보다는 현저

하게 줄어들어 있음. 즉, 중년이후 여성의 경우 낮은 농도의 에스트로겐을 효과적으로 활용할 수 있도록 에스트로겐 수용체의 발현 및 인산화를 통한 활성이 안전한 방식인 가역적 방식으로 개선되는 기전 규명함 (그림 12).

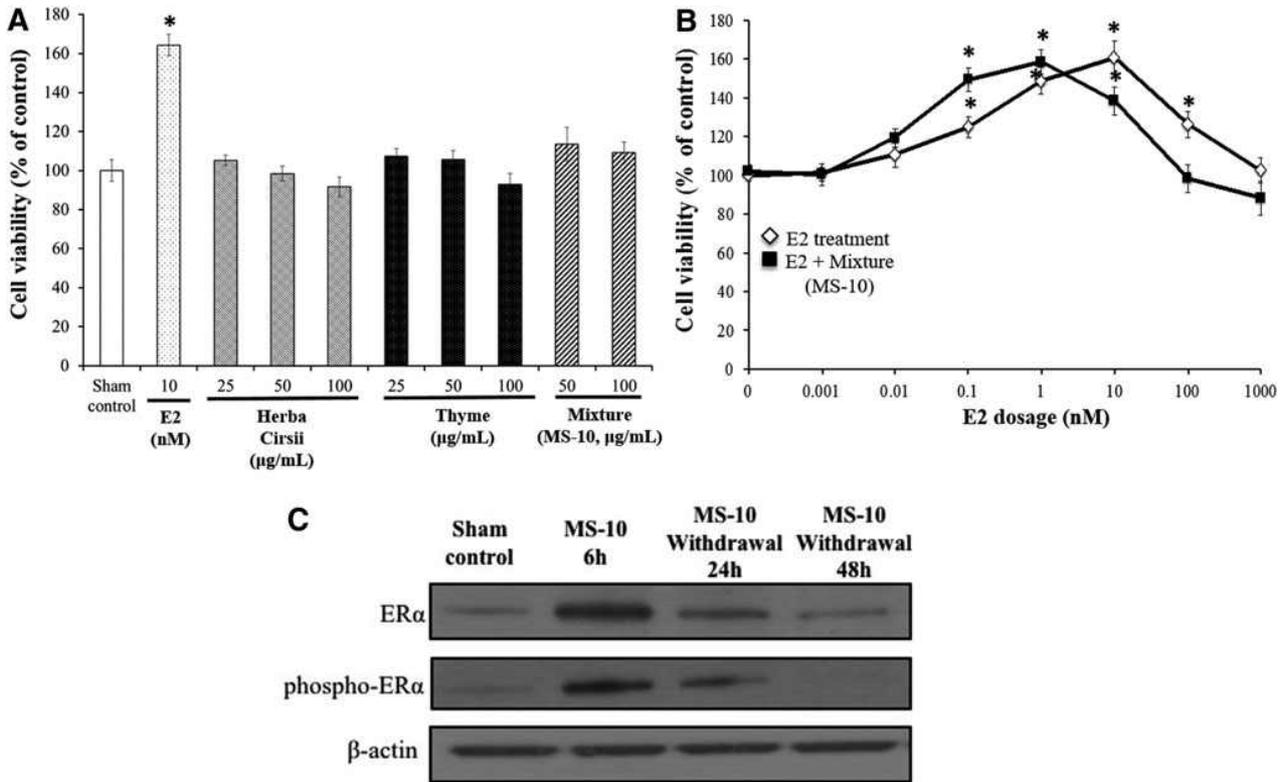


그림3-3-12> 에스트로겐 수용체 발현 및 활성 개선 (세포시험)

## 2) 동물시험을 통한 추측 기전

- 골교체지표(osteocalcin과 BSALP) 증가 억제로 갱년기 여성의 뼈건강을 지키는 기전
  - WMS77 (물질명 가치)이 여성갱년기에서 나타날 수 있는 골 교체 지표의 증가를 억제하여 불필요한 골교체를 예방해주는 기전으로 갱년기 여성의 뼈 건강 개선에 효과가 있음이 확인됨. 즉, 여성갱년기의 주요 증상인 골다공증의 억제 작용기전인 osteocalcin와 BSALP 개선됨.
  - 갱년기 여성에서는 에스트로겐의 감소로 인해 골 교체율이 증가하여 뼈 건강이 저하되고, 이로 인해 골다공증, 골연화증 등 질환 발생 위험이 증가함. 골 교체율 증가 시, 뼈대사 지표인 골성알칼리인산분해효소(Bone-specific alkaline phosphatase, BSALP)와 오스테오칼신(osteocalcin)의 혈중 농도가 증가하기 때문에 갱년기 여성에서도 BSALP 및 오스테오칼신의 혈중 농도가 증가함. 여성갱년기증상을 반영하는 OVX 동물모델시험에서 WMS77 섭취로 인해 혈중 BSALP 및 오스테오칼신의 농도가 감소되어 뼈 건강 개선 기전 제시됨 (그림 13).

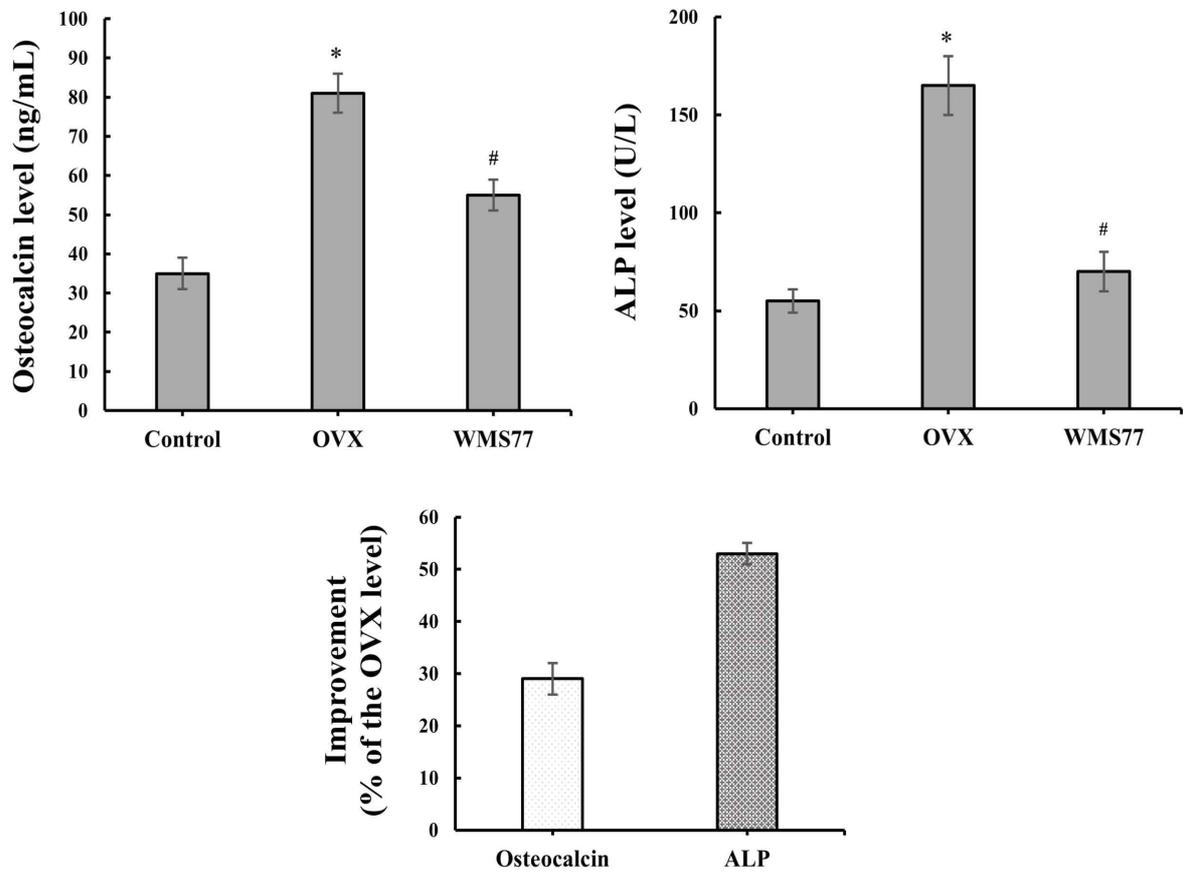


그림3-3-13. 골교체대사 개선 기전 (동물시험)

- LDL-Cholesterol, Total Cholesterol 개선을 통한 기전
  - LDL-C와 Total-C는 여성갱년기의 중요한 증상인 안면홍조, 다한, 다열 등의 혈관운동 장애의 주요 원인이 됨. 따라서 이들의 저하는 여성갱년기 개선의 주요기전으로 제시됨.
  - 여성갱년기증상을 반영하는 OVX 동물모델에서 증가하는 LDL-C, Total -C 농도를 WMS77이 효과적으로 낮춤으로서 혈관 건강 및 심혈관계 이상 억제 작용을 할 수 있다는 추정작용기전이 제시됨.

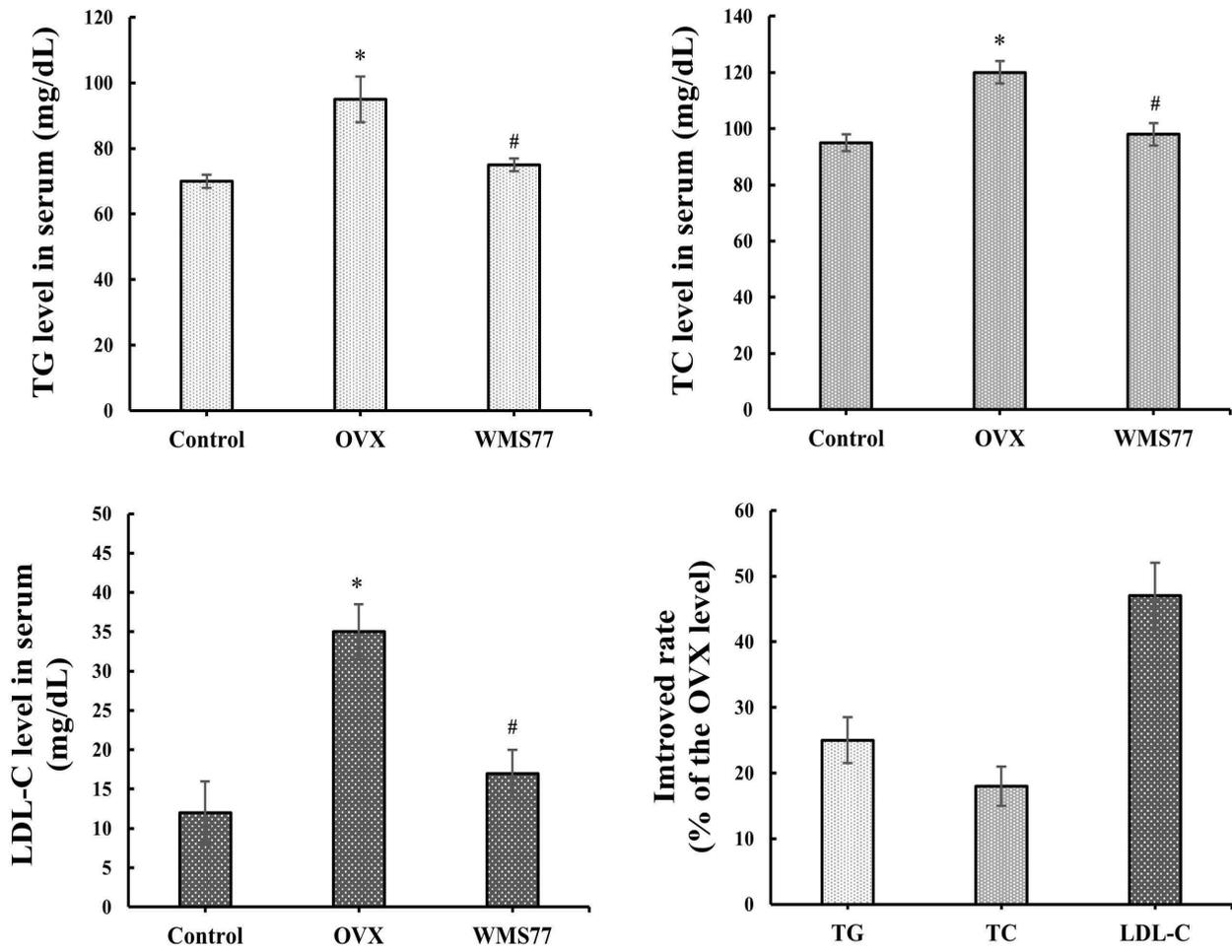


그림3-3-14. 지질단백질 조절 기전 (동물시험)

- 자궁 내 에스트로겐 수용체의 발현조절을 통한 여성갱년기 증상 개선 기전
  - 동물실험에서 WMS77의 섭취로 에스트로겐 수용체의 발현 개선을 통해 낮은 농도의 에스트로겐을 효과적으로 활용할 수 있음이 선행연구의 기전과 동일하게 다시 한 번 재확인 됨.
  - 여성갱년기 동물모델에서 여성호르몬인 에스트로겐의 농도는 정상적인 암컷 동물에 비하여 현저히 줄어들게 됨. 따라서 낮은 농도의 에스트로겐의 작용 효율 향상은 일시적 호르몬의 변화에 따른 부작용 없이 여성갱년기 증상을 개선시킬 수 있는 매우 우수한 효능이자 기전이 될 수 있음. 본 연구에서는 시험관시험을 통해서 확인된 에스트로겐 수용체의 발현 증가를 자궁에서 웨스턴블롯팅 방법과 조직면역염색방법을 통해서 확인하였음.
  - 자궁을 적출한 여성갱년기 동물모델(OVX)의 경우, 에스트로젠수용체의 발현이 감소하였다. WMS77을 섭취하지 않은 갱년기모델의 경우는 정상쥐의 약 20%에 불과하였으나, WMS77 섭취 모델의 경우는 갱년기 이전의 상태를 나타내는 정상군의 약 70% 정도까지 회복되는 것을 확인 하였다. WMS77의 섭취를 중단하면 약 1주후에 원상태로 돌아감이 확인됨.
  - 따라서, 이전의 세포실험과 마찬가지로 동물실험에서도, WMS77의 섭취로 에스트로젠 수용체의 가역적인 발현증가를 통한 수용체 활성화를 기반으로 갱년기에서 낮은 농도의 에스트로젠이 안전하고 효과적으로 활용됨이 다시 한번 확인됨.

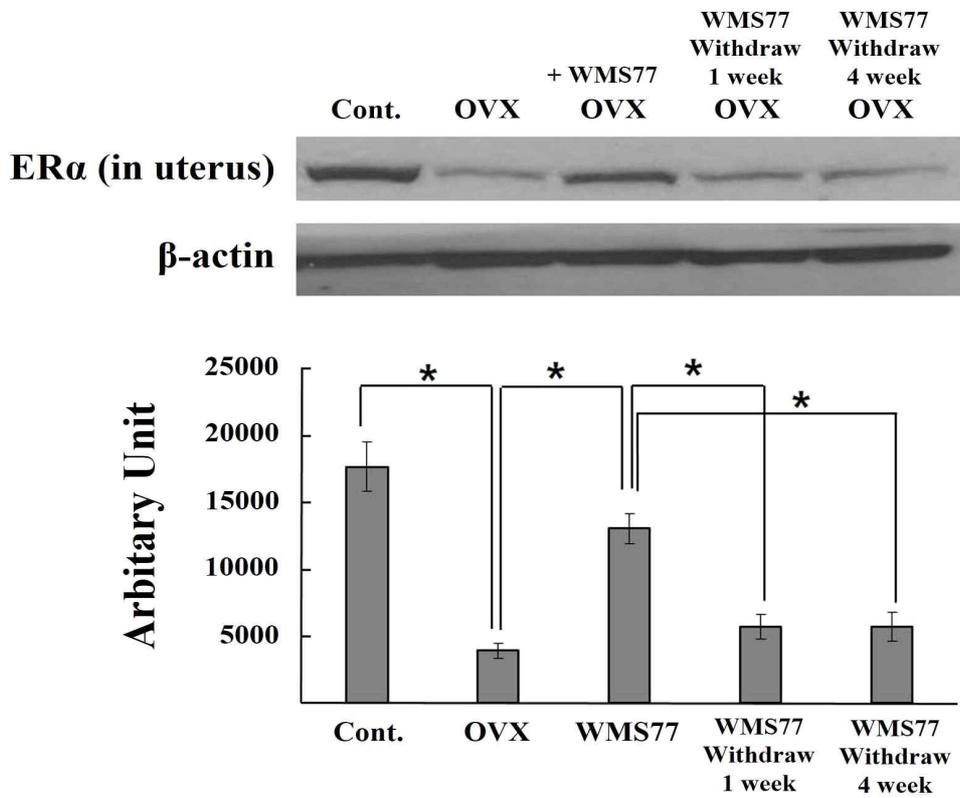


그림3-3-15. 에스트로겐 수용체 발현 및 활성 개선 (동물시험, western blot analysis)

- 면역조직화학 염색법을 통하여 여성갱년기 동물모델의 에스트로겐수용체 발현을 확인한 결과, 웨스턴블롯팅의 결과와 같이 WMS77을 섭취한 경우, 자궁의 자궁근층(M: myometrium)과 샘상피(GE: glanadular epithelium), 자궁내막 (E:endometrium), 그리고 내강상피층(LE: luminal epithelium) 모두에서 에스트로겐 수용체의 발현이 전체적으로 향상되었으며 특히 자궁내막과 내강상피층에서 에스트로겐 수용체의 발현 세포가 여성갱년기 동물모델에서보다 의미있게 증가하였음.

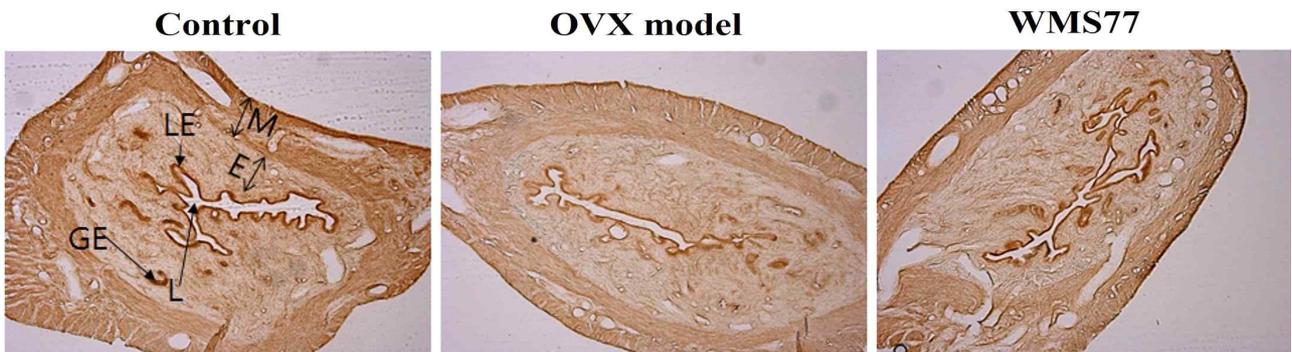


그림3-3-16. 에스트로겐 수용체 발현 및 활성 (동물시험, immunohistochemistry)

(C) 천연물 유래 여성 건강 개선 식의약소재의 질건강개선 전임상 효능 평가

- 질 ecosystem의 불균형에 의한 병원체 colonization은 질 감염의 원인이 되고 다양한 이차 질병의 원인이 됨. 즉 임신 전에는 성매개전파성질환(STD), 만성골반염(PID), 자궁경부염(cervicitis), 수정 과정에서 정자의 운동성이나 생존능 감소, 임신중 조산, 바이러스 감염의 재활성화, 유산, 조기 양막 파수, 양수감염 등의 원인이 됨.
- 방광의 건강 및 질주위의 피부 건강에도 영향을 주게됨. 또한 질 주위의 피부의 건강상태는 질과 방광의 건강과 불가분의 관계를 가지고 있음. 따라서 질건강을 위한 프로바이오틱스 소재를 질세포의 항균 펩티드 발현 정도를 통하여 스크리닝함.

- 이들과 유사한 균주를 포함한 균주의 질 항균펩티드의 발현에 대한 기전 연구와 질 및 질주위 피부세포의 상피 장벽에 대한 작용 기전은 2핵심 2세부과제와 협력함.
- 질점막세포주 VK2/E6E7 세포주에 프로바이오틱스 후보 균주들의 양을 증가시키며 처리한 후, 항균 펩티드 HBD-1, HBD-2, HBD-3, HBD-4, CAMP 유전자의 mRNA 발현 변화 양상과 filaggrin 발현을 RT-PCR, qPCR 방법으로 조사하였음.
- 후보 균주 3, 4 모두 질점막세포에서 각종 항균펩티드의 발현을 강력하게 증가시키고(그림17) 특히 3번 균주는 HBD-1과 filaggrin 발현을 증가시켰음 (그림 18).

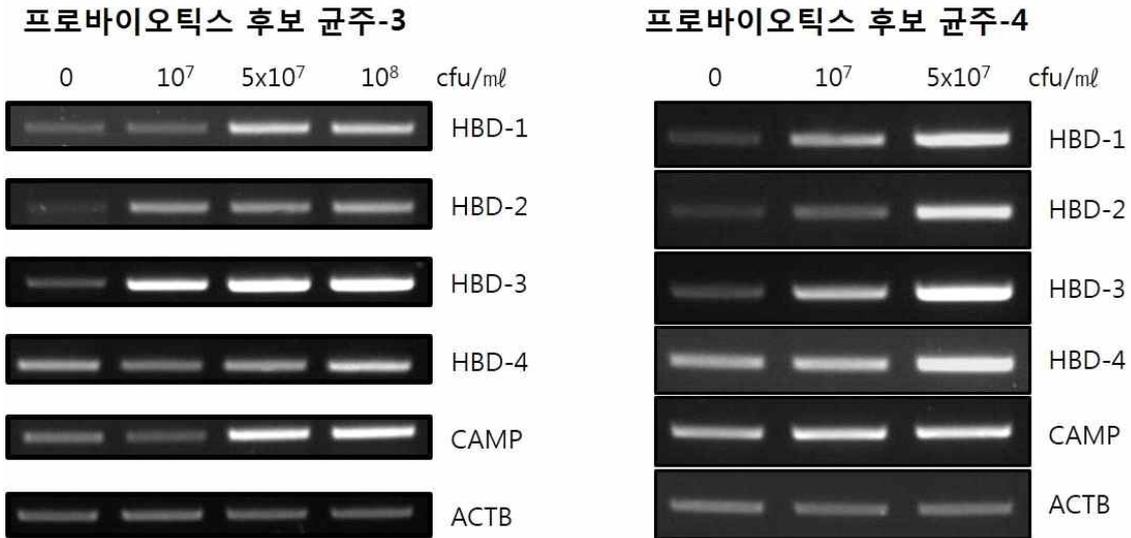


그림3-3-17. 프로바이오틱스 후보 균주-3과 후보 균주-4 처리 시, VK2/E6E7 세포주에서 각각 발현 변화를 나타내는 대표적인 항균펩티드 유전자 5종의 RT-PCR 스크리닝 결과

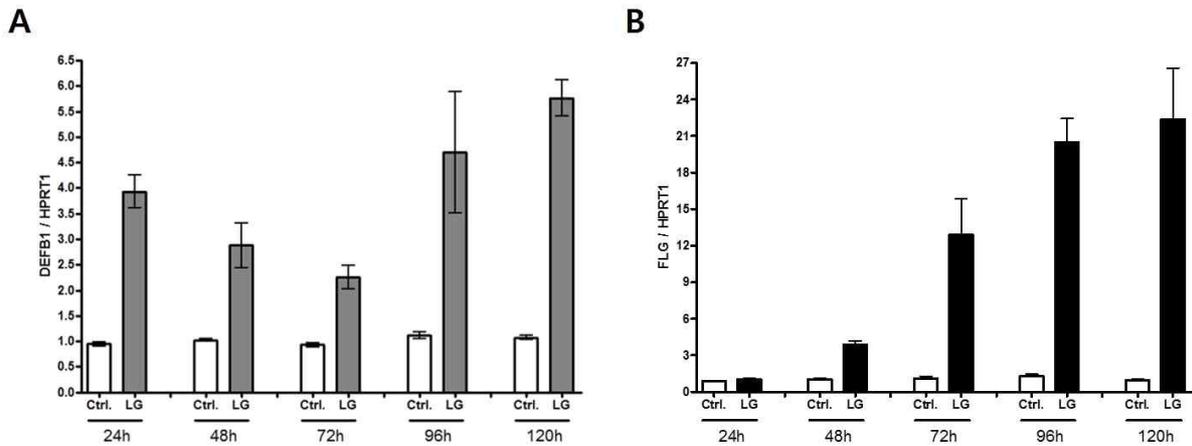


그림3-3-18 VK2/E6E7 세포주에 프로바이오틱스 후보 균주-3을 시간 증가에 따라 처리 시, 항균펩티드 HBD-1(DEFB1)과 filaggrin(FLG) mRNA 발현 변화를 qRT-PCR 방법으로 정량분석한 결과

(D) 천연물 유래 여성 건강 개선 식의약소재의 체지방 감소 전임상 효능 평가

- 비만 개선 효능 평가를 위한 in vitro 모델 확립
- 전지방세포의 3T3-L1 세포의 분화유도 조건 확립

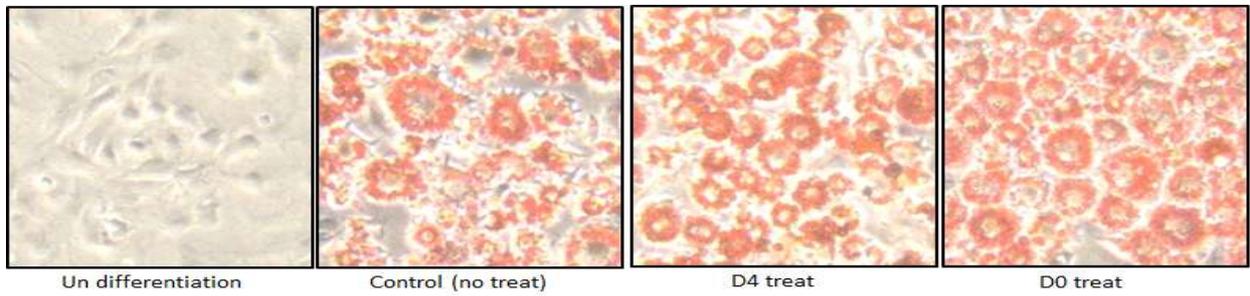
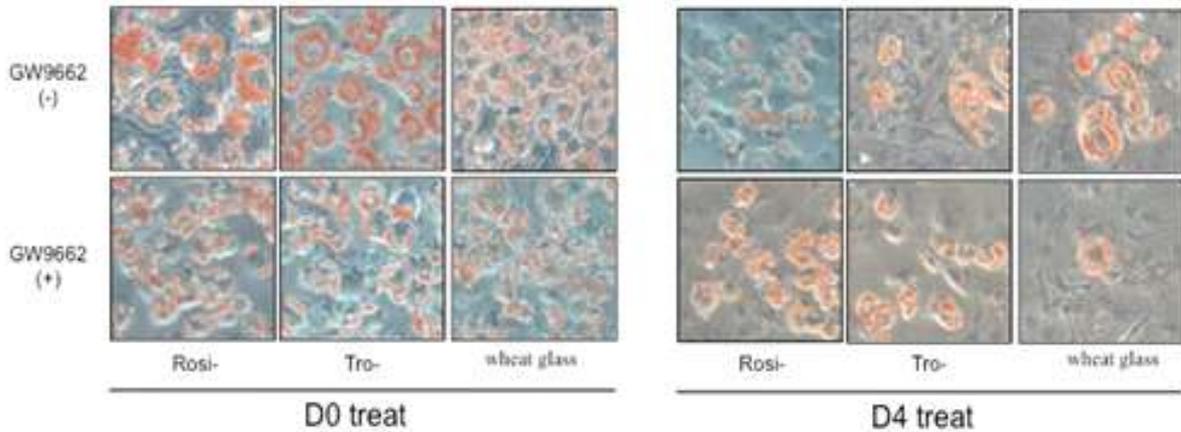
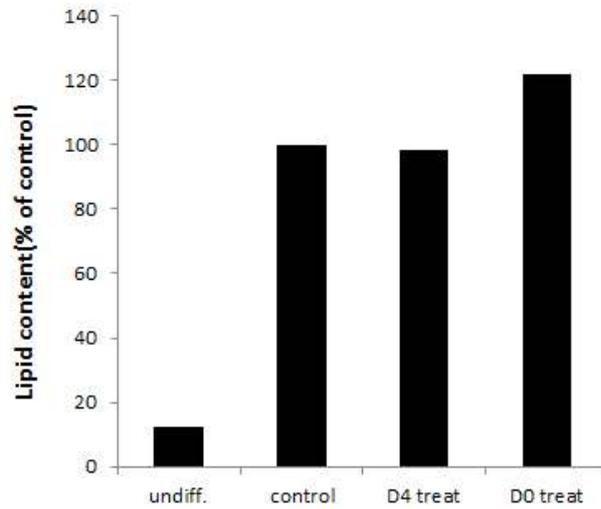


그림3-3-19. 비만 개선 평가 세포실험 조건 확립

- 전지방세포의 분화 조건 하에서 D4 추출물을 처리하고, 3T3-L1 세포 내의 지방 축적 정도를 비교함.
- 본 연구팀의 개발 소재가 분화 유도된 3T3-L1 세포에서 지방 축적 감소 효과를 보임.



3-3-20. 지방세포 내의 지방 축적 억제 효능 평가

(E) 여성 건강 관련 기능소재(WMS77)의 성분 분석을 통한 기준규격 보고

- 펙토리날린(Pectolarin) 검토 실험결과

a. WMS77-A 내 펙토리날린 분석 결과 (WMS77-A: WMS77 구성 원료의 가칭)

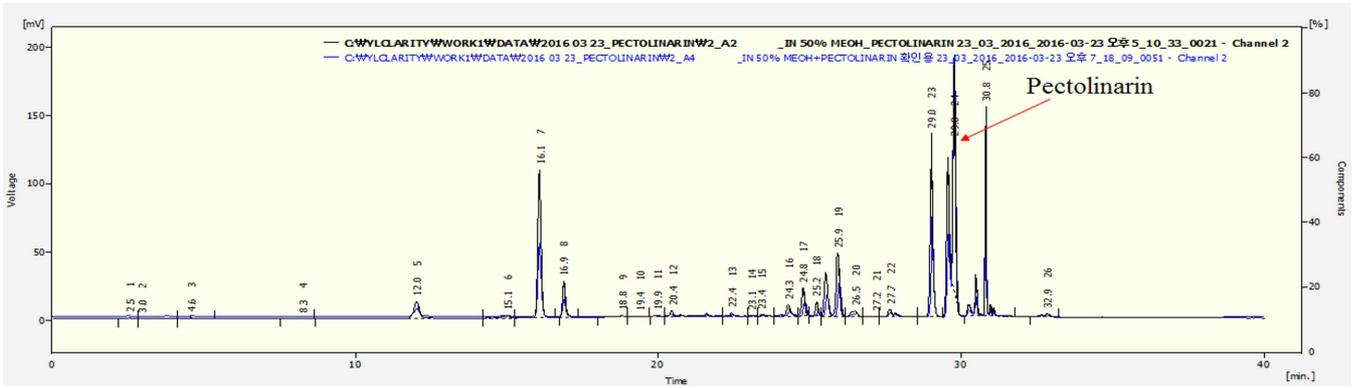


그림3-3-21. 펙토리날린 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 펙토리날린 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-A 단독 분석 그래프(검은색)에서 펙토리날린 동일 피크를 확인할 수 있었음. 이를 정량화한 결과, WMS77-A는 펙토리날린을 19.0mg/g 농도로 함유하고 있었음.

b. WMS77-B 내 펙토리날린 분석 결과 (WMS77-B: WMS77 구성 원료의 가칭)

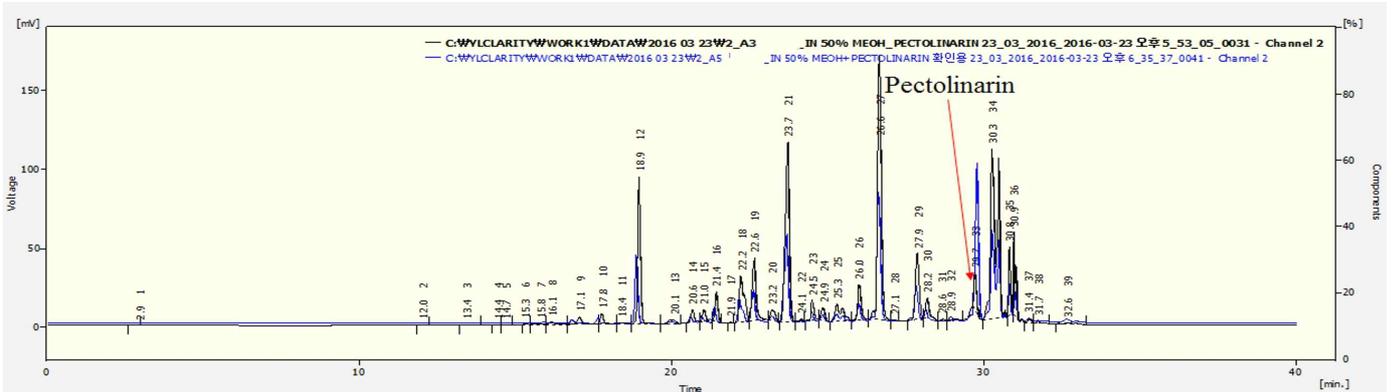


그림3-3-22. 펙토리날린 분석 결과 (WMS77-B)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-B와 펙토리날린 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-B 단독 분석 그래프(검은색)에서 펙토리날린 동일 피크를 확인할 수 있었음. 본 연구결과에서 WMS77-B 내 펙토리날린이 다량 검출 되었으며 이를 정량화한 결과, WMS77-B는 펙토리날린을 2.0mg/g 농도로 함유하고 있었음.

• **실리마린** 검토 실험결과

a. WMS77-A 내 실리마린 분석 결과

(a) Isosilibin A (이소실리빈 A) 분석 결과

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 이소실리빈-A 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 WMS77-A 단독 분석 그래프(검은색)를 비교할 때, WMS77-A 단독 분석 그래프에서 이소실리빈-A 피크를 발견할 수 없었음.

(b) Isosilibin B (이소실리빈 B) 분석 결과

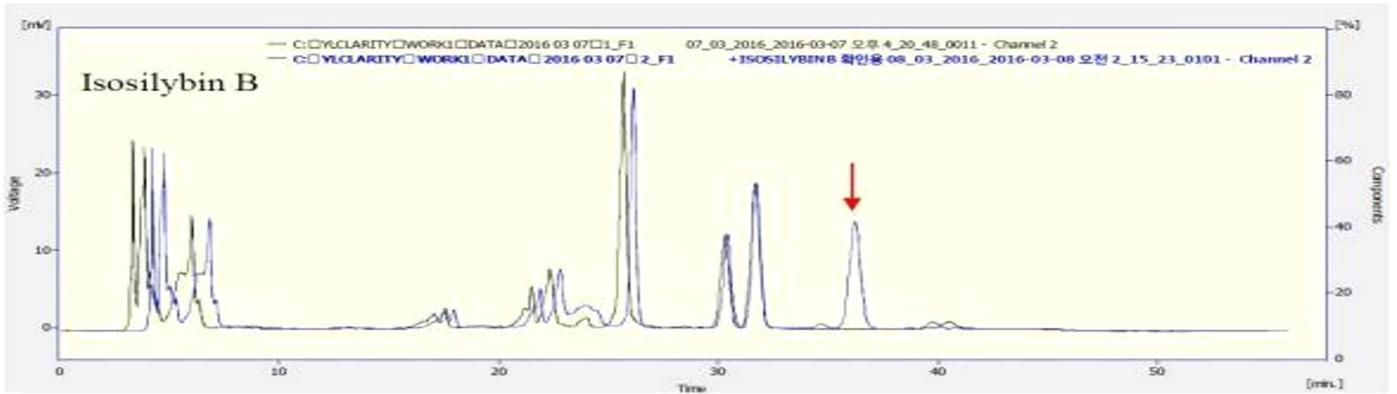


그림3-3-23. 이소실리빈 B 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 이소실리빈-B 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 WMS77-A 단독 분석 그래프(검은색)를 비교할 때, WMS77-A 단독 분석 그래프에서 이소실리빈-B 피크를 발견할 수 없었음.

(c) Silychristin (실리크리스틴) 분석 결과

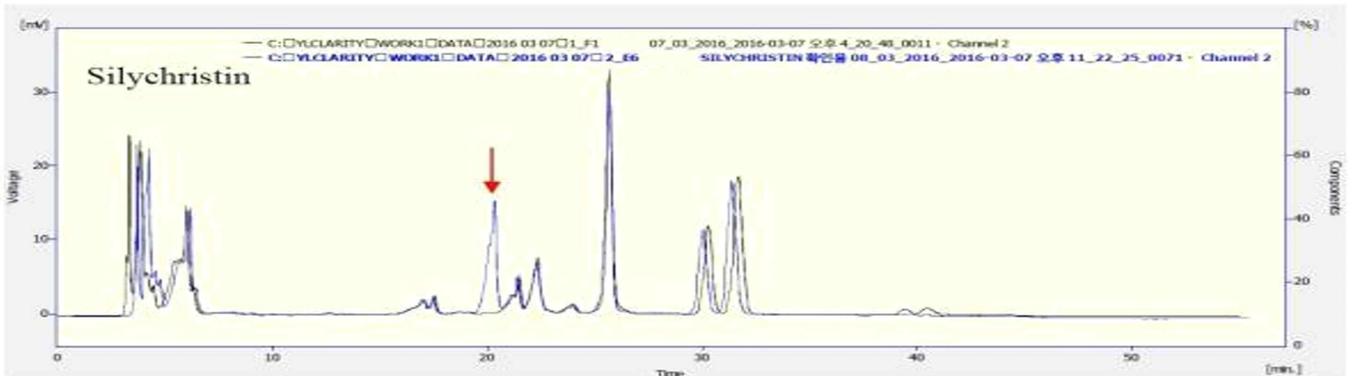


그림3-3-24. 실리크리스틴 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 실리크리스틴 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 WMS77-A 단독 분석 그래프(검은색)를 비교할 때, WMS77-A 단독 분석 그래프에서 실리크리스틴 피크를 발견할 수 없었음.

(d) Silydianin (실리디아닌) 분석 결과

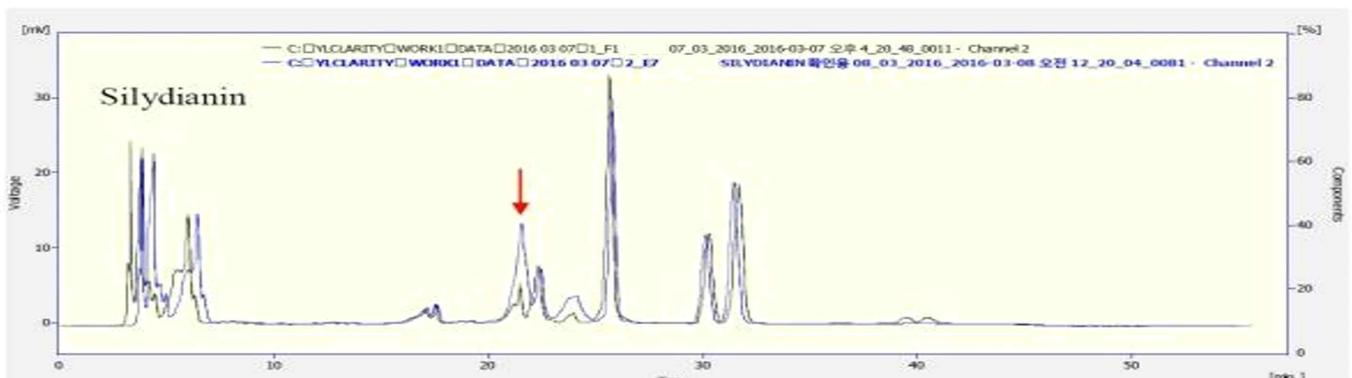


그림3-3-25. 실리디아닌 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 실리디아닌 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 WMS77-A 단독 분석 그래프(검은색)를 비교할 때, WMS77-A 단독 분석 그래프에서 실리디아닌 유사 피크를 확인할

수 있었음. 하지만, WMS77-A 내 실리디아닌 분석이 매우 어려운 정도의 그래프가 확인되었으며 소량 (0.98mg/g) 존재할 수 있음이 확인되었으나 그래프의 특징상 간섭물질이 존재할 것으로 예상됨.

(e) Silybin (실리빈, mixture of silybin A와 B) 분석 결과

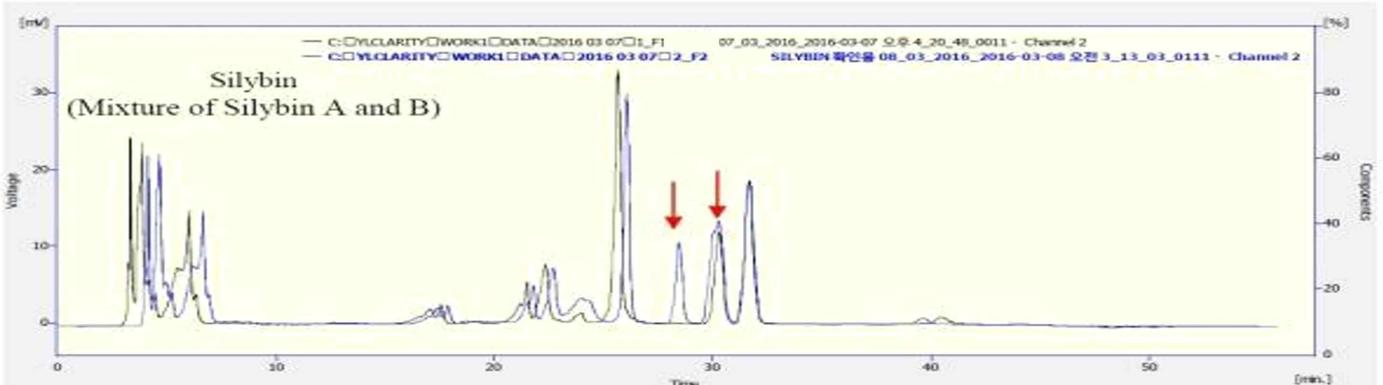


그림3-3-26. 실리빈 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 실리빈 A, B의 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-A 단독 분석 그래프(검은색)에서 실리빈 A 피크는 확인할 수 없었지만 실리빈 B는 확인할 수 있었음.

b. WMS77-B 내 실리마린 분석 결과

(a) Isosilybin A (이소실리빈 A) 분석 결과

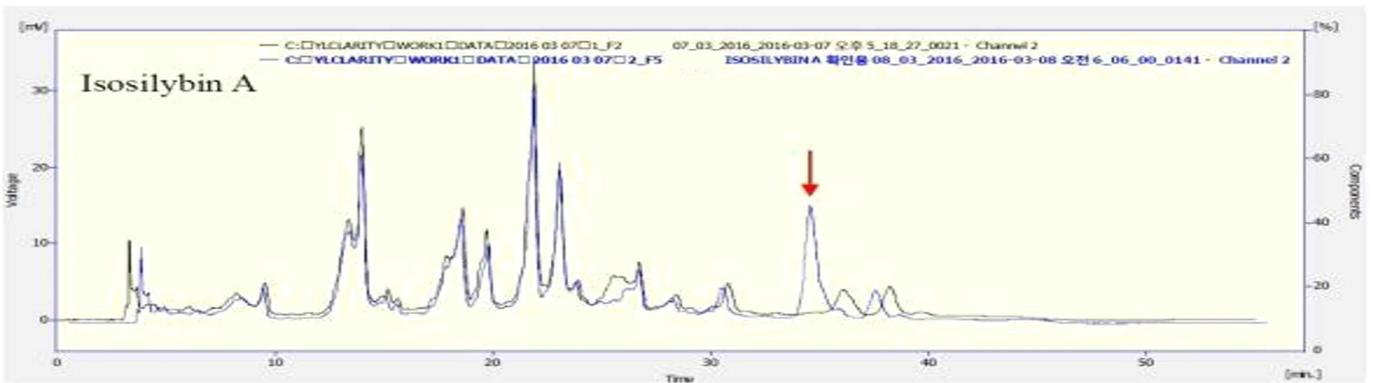


그림3-3-27. 이소실리빈 A 분석 결과 (WMS77-B)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-B와 이소실리빈 A 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-B 단독 분석 그래프(검은색)에서 이소실리빈 A 피크를 발견할 수 없었음. 결론적으로, WMS77-B 내 이소실리빈 A 은 검출되지 않았음.

(b) Isosilybin B (이소실리빈 B) 분석 결과

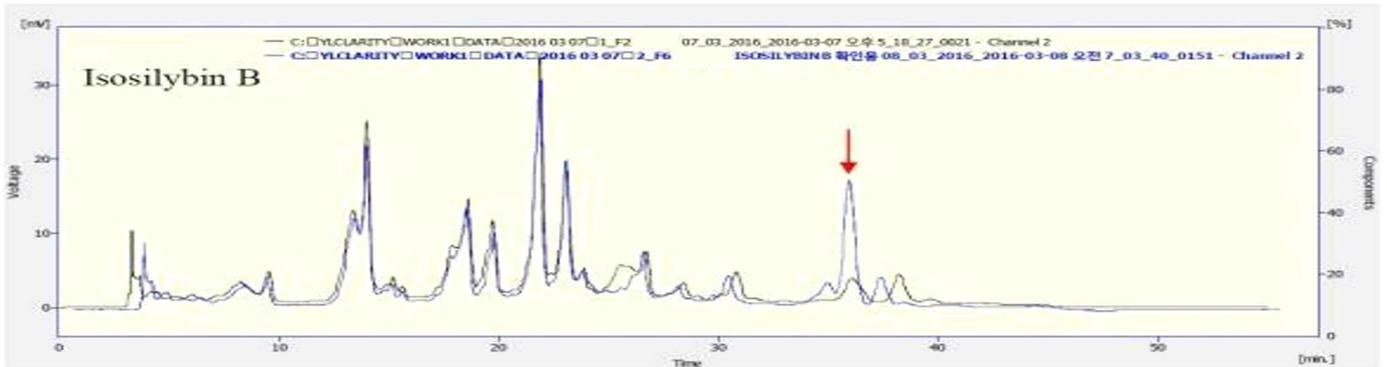


그림3-3-28. 이소실리빈 B 분석 결과 (WMS77-B)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-B와 이소실리빈-B 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-B 단독 분석 그래프(검은색)에서 이소실리빈-B와 유사 피크가 확인되었음. 이를 정량한 결과, WMS77-B 내 이소실리빈-B가 1.87mg/g 정도 함유 되어있었음.

(c) Silychristin (실리크리스틴) 분석 결과

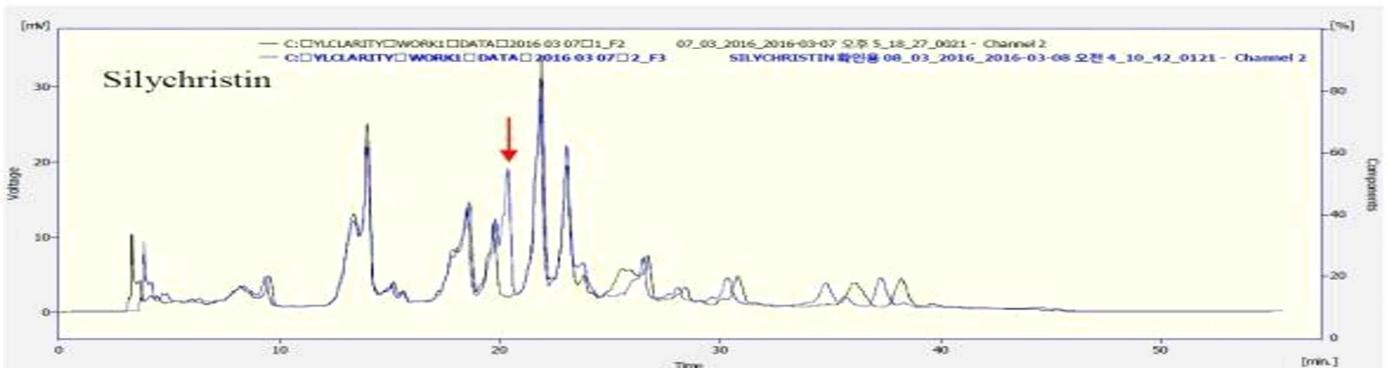


그림3-3-29. 실리크리스틴 분석 결과 (WMS77-B)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-B와 실리크리스틴 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-B 단독 분석 그래프(검은색)에서 실리크리스틴 피크를 발견할 수 없었음. 결론적으로, WMS77-B 내 실리크리스틴이 검출되지 않았음.

(d) Silydianin (실리디아닌) 분석 결과

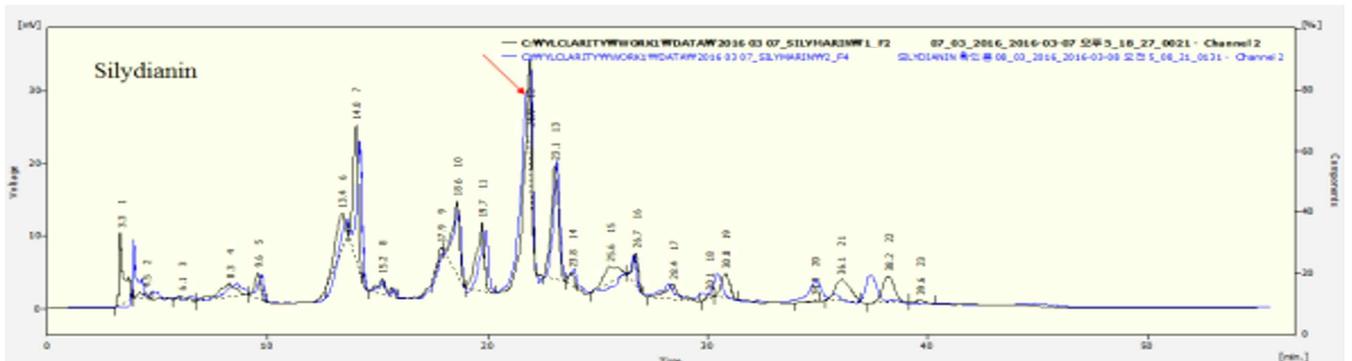


그림3-3-30. 실리디아닌 분석 결과 (WMS77-B)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-B와 실리디아닌 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-B 단독 분석 그래프(검은색)에서 실리디아닌과 동일한 피크가 확인되었음. 이를 정량한 결과, WMS77-B 내 실리디아닌을 약 3.4 mg/g 다량 함유하고 있었음.

(e) Silybin (실리빈, mixture of silybin A와 B) 분석 결과

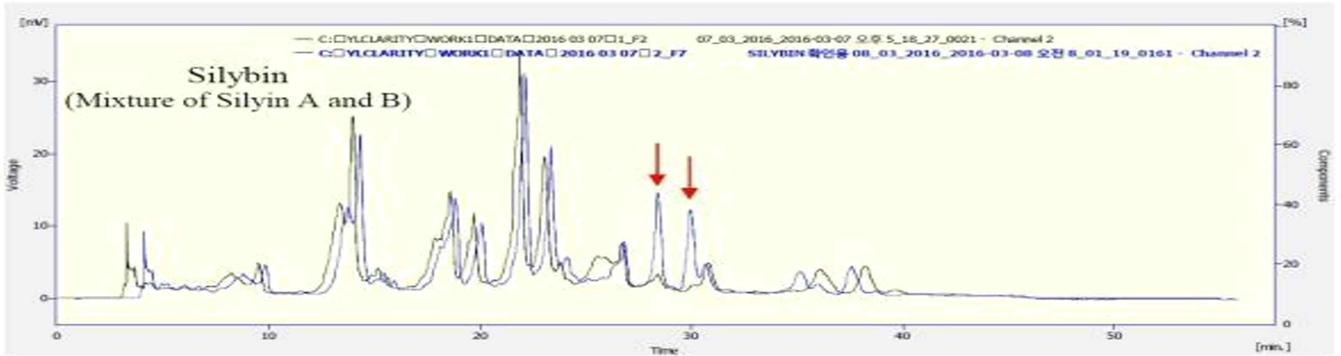


그림3-3-31 실리빈 분석 결과 (WMS77-B)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-B와 실리빈(실리빈A와 실리빈B) 표준품 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-B의 단독 분석 그래프(검은색)에서 실리빈A와 실리빈B 두 물질을 나타내는 동일 피크를 확인할 수 있었음.

• ρ-쿠마르산 (ρ-coumaric acid) 검토 실험결과

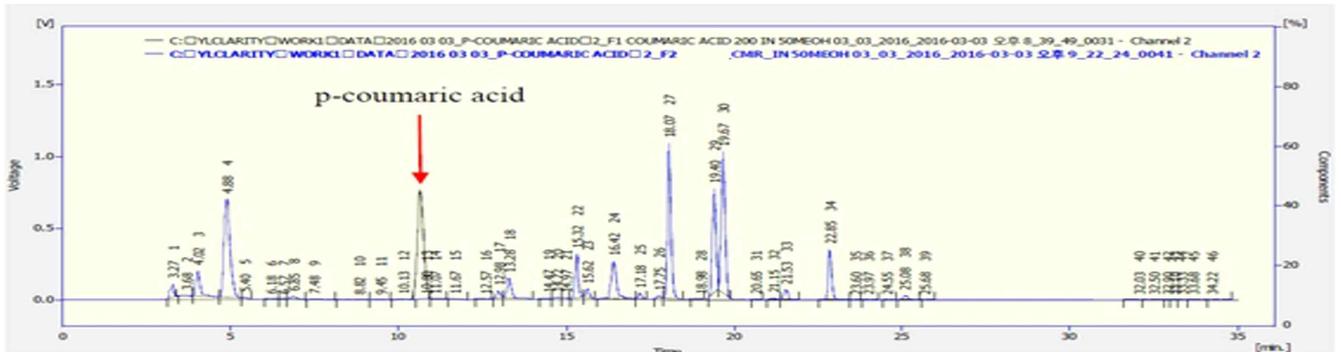


그림3-3-32. ρ-쿠마르산 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A과 ρ-쿠마르산 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-A 단독 분석 그래프(검정색)에서 ρ-쿠마르산 피크를 확인할 수 없었음. 따라서 WMS77-A 내 ρ-쿠마르산이 전혀 검출되지 않음을 확인할 수 있었음.

• 스코플레틴 (Scopoletin) 검토 실험결과

a. WMS77-A 내 스코플레틴 분석 결과

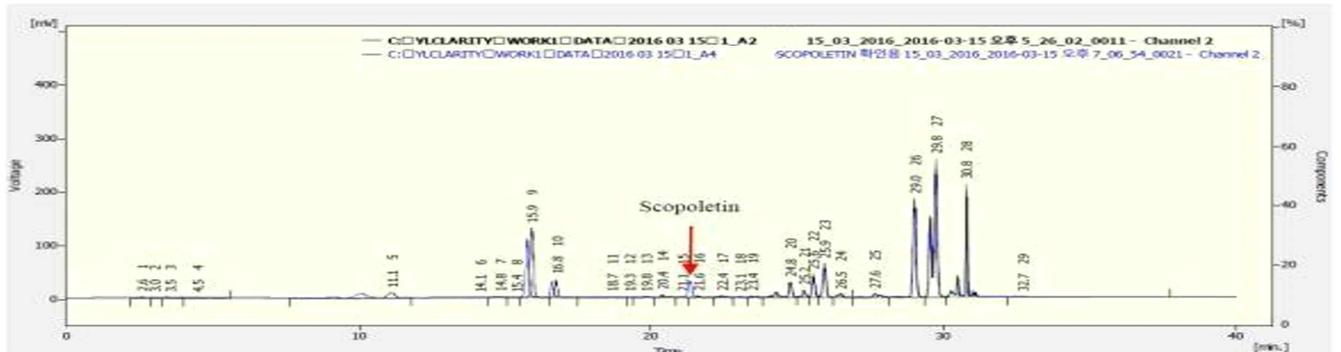


그림3-3-33. 스코플레틴 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 스코폴레틴 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-A 단독 분석 그래프(검정색)에서 스코폴레틴 피크를 발견할 수 없었음. 결론적으로, WMS77-A 내 스코폴레틴은 검출되지 않았음.

b. WMS77-B 내 스코폴레틴 분석 결과

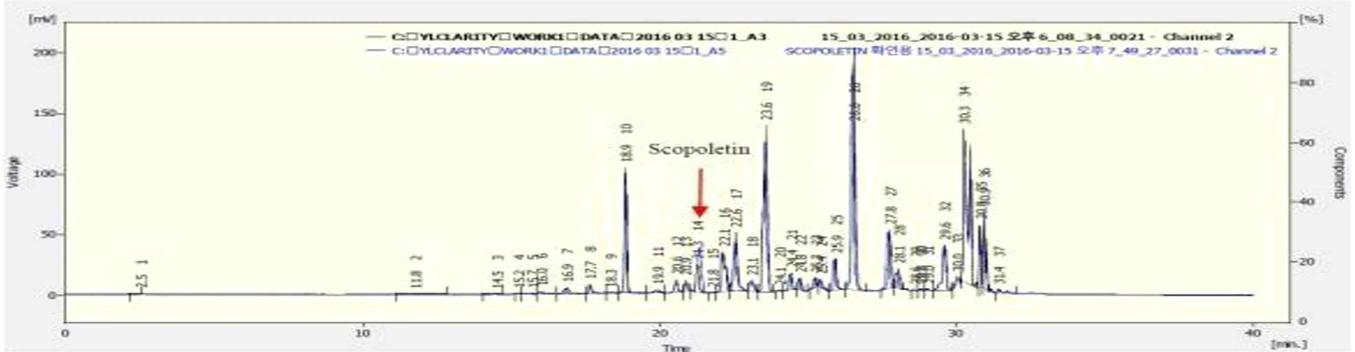


그림3-3-34. 스코폴레틴 분석 결과 (WMS77-B)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-B와 스코폴레틴 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-B 단독 분석 그래프(검정색)에서 스코폴레틴 피크를 확인할 수 있었음. 따라서 타임추출물 내 스코폴레틴이 검출되었음. 이를 정량화한 결과, WMS77-B는 스코폴레틴을 0.476mg/g 농도로 함유하고 있었음.

• 미리세틴 (Myricetin) 검토 실험결과

a. WMS77-A 내 미리세틴 분석 결과

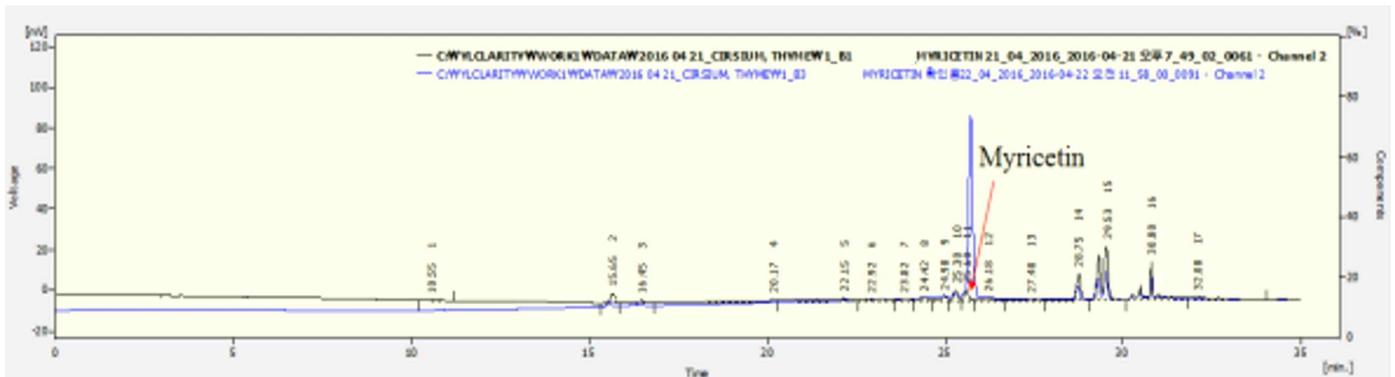


그림3-3-35. 미리세틴 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 myricetin 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-A 단독 분석 그래프(검정색)에서 myricetin 피크를 확인할 수 있었음. 따라서 WMS77-A 내 myricetin이 검출되었음. 이를 정량화한 결과, WMS77-A는 myricetin을 0.636mg/g 농도로 함유하고 있었음.

b. WMS77-B 내 미리세틴 분석 결과

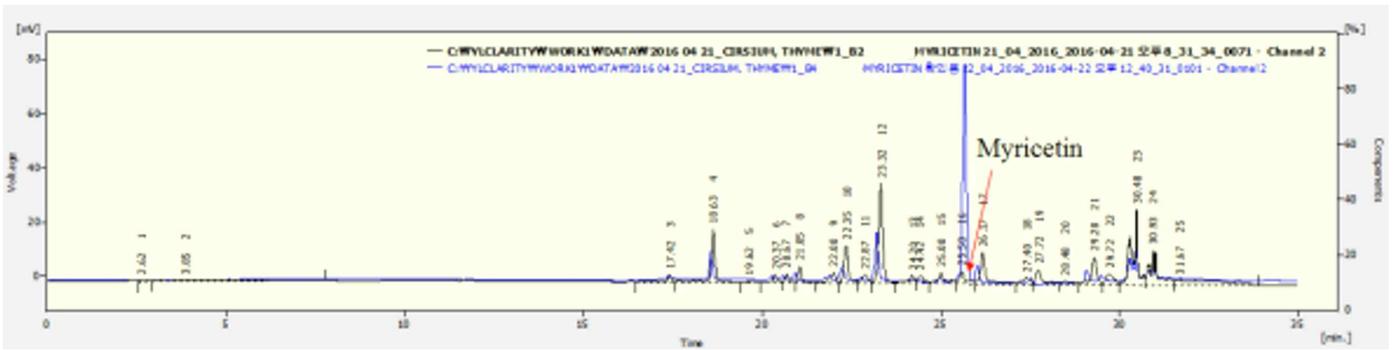


그림3-3-36. 미리세틴 분석 결과 (WMS77-B)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-B와 myricetin 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-B 단독 분석 그래프(검정색)에서 myricetin 피크를 확인할 수 있었음. 따라서 WMS77-B 내 myricetin이 검출되었음. 이를 정량화한 결과, WMS77-B는 myricetin을 0.513mg/g 농도로 함유하고 있었음.

• 펙토리나리게닌 (Pectolarigenin) 검토 실험결과

a. WMS77-A 내 펙토리나리게닌 분석 결과

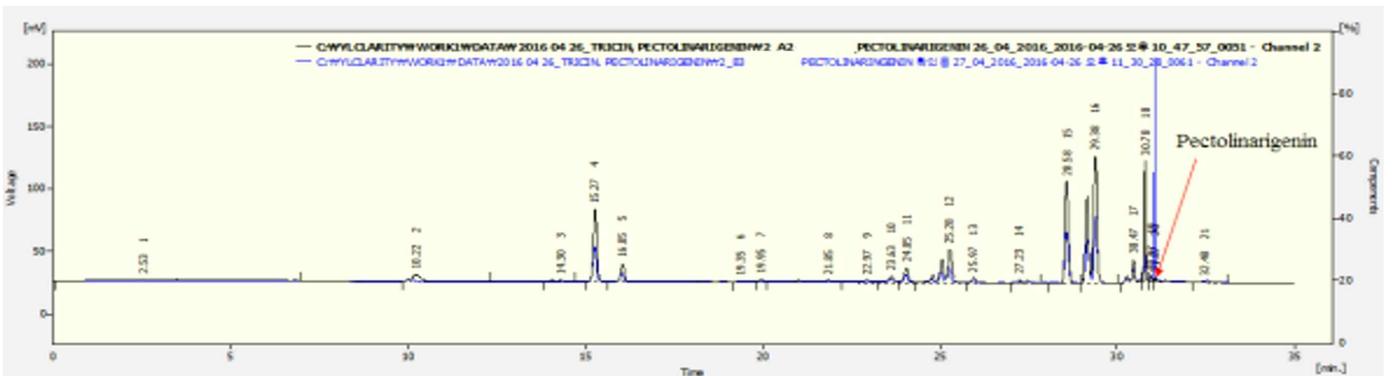


그림3-3-37. 펙토리나리게닌 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 pectolarigenin 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-A 단독 분석 그래프(검정색)에서 pectolarigenin 피크를 확인할 수 있었음. 따라서 WMS77-A 내 pectolarigenin이 검출되었음. 이를 정량화한 결과, WMS77-A는 pectolarigenin을 0.26mg/g 농도로 함유하고 있었음.

b. WMS77-B 내 펙토리나리게닌 분석 결과

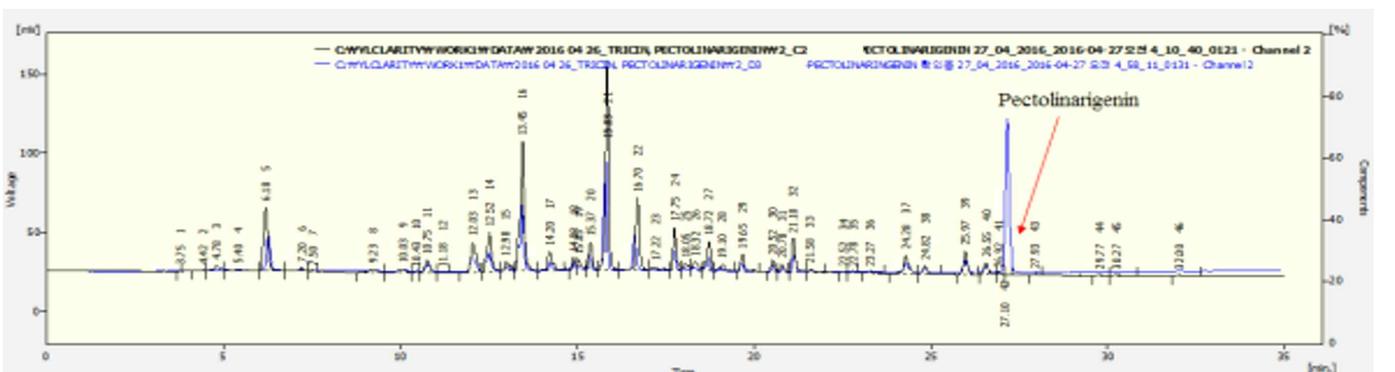


그림3-3-38. 펙토리나리게닌 분석 결과 (WMS77-B)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-B와 pectolarigenin 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-B 단독 분석 그래프(검정색)에서 pectolarigenin 피크를 확인할 수 있었음. 따라서 WMS77-B 내 pectolarigenin이 검출되었음. 이를 정량화한 결과, WMS77-B는 pectolarigenin을 0.003mg/g 농도로 함유하고 있었음.

• **트리신 (Tricin) 검토 실험결과**

a. WMS77-A 내 트리신 분석 결과

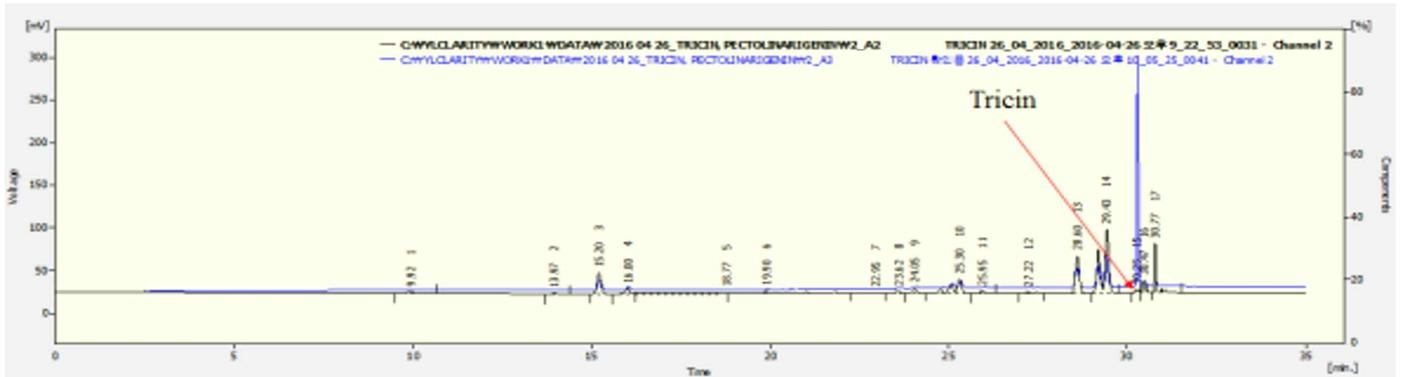


그림3-3-39. 트리신 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 tricin 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-A 단독 분석 그래프(검은색)에서 tricin 피크를 확인할 수 있었음. 따라서 WMS77-A 내 tricin이 검출되었음. 이를 정량한 결과, WMS77-A은 tricin을 0.29mg/g 농도로 함유하고 있었음.

b. WMS77-B 내 트리신 분석 결과

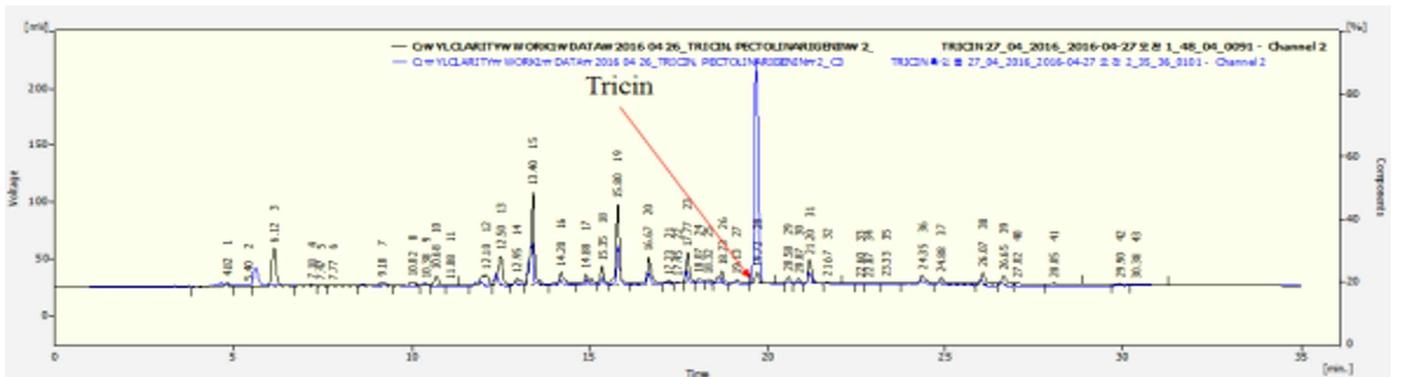


그림3-3-40. 트리신 분석 결과 (WMS77-B)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-B와 tricin 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-B 단독 분석 그래프(검정색)에서 tricin 피크를 확인할 수 있었음. 따라서 WMS77-B 내 tricin이 검출되었음. 이를 정량한 결과, WMS77-B은 tricin을 1.11mg/g 농도로 함유하고 있었음.

• **리코리시딘 (Licoricodin) 검토 실험결과**

a. WMS77-A 내 리코리시딘 분석 결과

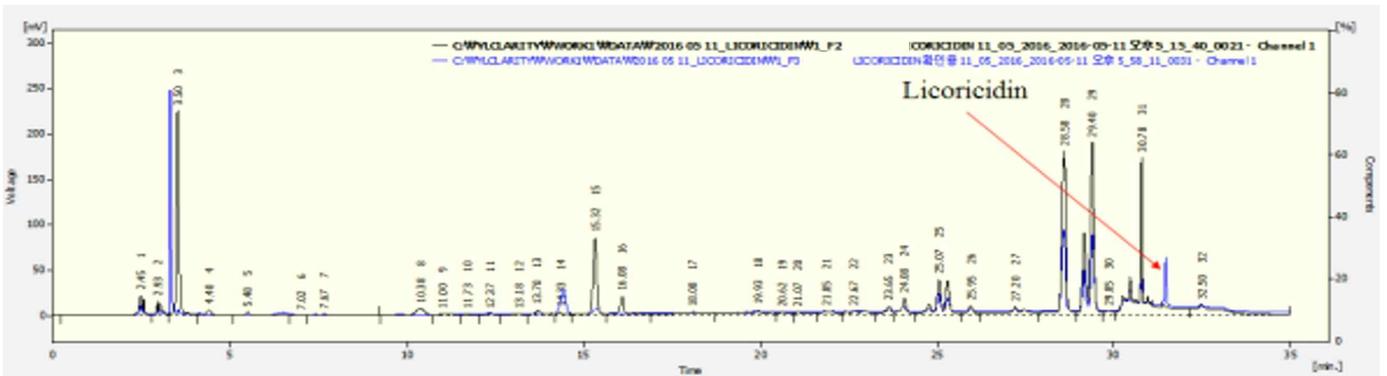
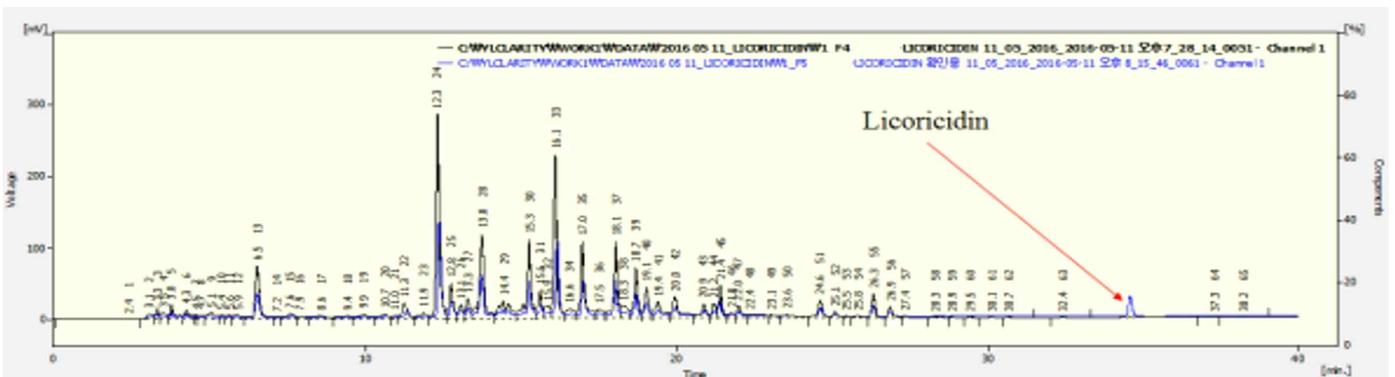
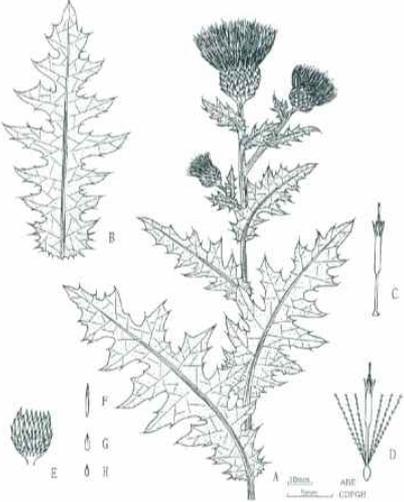
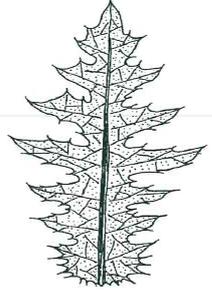


그림3-3-41. 리코리시딘 분석 결과 (WMS77-A)

- 위 HPLC 분석결과와 같이 WMS77-A와 licoricidin 표준품의 혼합 분석 그래프(파란색)와 비교하여 WMS77-A 단독 분석 그래프(검정색)에서 licoricidin 피크를 발견할 수 없었음.

b. WMS77-B 내 리코리시딘 분석 결과

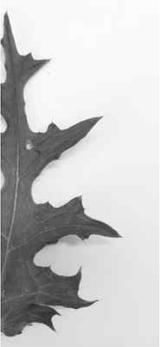


식물구조	특징	해당 식물 그림
줄기	날개가 없음	
잎	모양: 피침상 타원형 색깔: 민무늬 녹색	
엽선	점첨두	
엽연	결각 있음 가시가 겹치지 않음 짧은 가시 (2-3mm)	
꽃 (색)	고개를 숙이지 않음 (자주색/붉은색/분홍색)	

- WMS77-A 원재료 관리 지침 작성
- 여성 건강 관련 기능소재(WMS77)의 원재료인 WMS77-A 원재료의 생산관리지침을 아래 표와 같이 확립하여 원재료를 감별 및 관리함.

표. WMS77 원재료 생산관리지침

식물구조	특징	Yes (WMS77의 원재료 WMS77-A)	No
줄기	날개가 없음		 <p>(날개있음)</p>
잎	모양: 피침상 타원형 색깔: 민무늬 녹색		 <p>(난형)</p>  <p>(흰무늬 녹색)</p>
엽선	점첨두		 <p>(예두)</p>

식물구조	특징	Yes (WMS77의 원재료 WMS77-A)	No
엽연	결각 있음 짧은 가시 (3mm 이내)		 (결각 거의 없음. 긴 가시)  (앞이 다닥다닥 달리고, 가시가 많고, 긴 가시)
꽃 (색)	고개를 숙이지 않음 (자주색/붉은색/분홍색)		 (고개숙임)  (흰꽃)

#### 다. 3차년도

##### (ㄱ) 3차년도 연구목표

- 비뇨배뇨 건강에 도움을 줄 수 있는 천연물 유래 소재를 통한 전임상 효능평가
- 비뇨배뇨 건강에 도움을 줄 수 있는 천연물 식의약소재 제품화 및 산업화
- 여성 건강 관련 소재의 개발 및 제품화

##### (ㄴ) 3차년도 연구개발 내용 및 성과

##### (A) 여성 건강 개선 천연물 유래 소재의 효능 기전 규명

- 여성 건강 개선 가능성을 갖는 소재 (WMS77)의 처리를 통해 사람 유방세포 (estrogen 수용체 발현 세포주) 영향을 주는 유전자 선별 검사 결과

- Basic information

Sample type	mRNA
Platform	Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA)
Label	biotin
Label protocol	Biotinylated cRNA were prepared from 0.55 ug total RNA using the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, Austin, TX)
Hybridization protocol	Following fragmentation, 0.75 ug of cRNA were hybridized to the Illumina Expression Beadchip according to the protocols provided by the manufacturer
Scanning protocol	Arrays were scanned using the Illumina Bead Array Reader Confocal Scanner
Data processing	Array data export processing and analysis was performed using Illumina GenomeStudio v2011.1 (Gene Expression Module v1.9.0)
Software	R 3.1.2 ( <a href="http://www.r-project.org">www.r-project.org</a> )

- 분석 유전자 정보

Table 1: Expression BeadChip Content

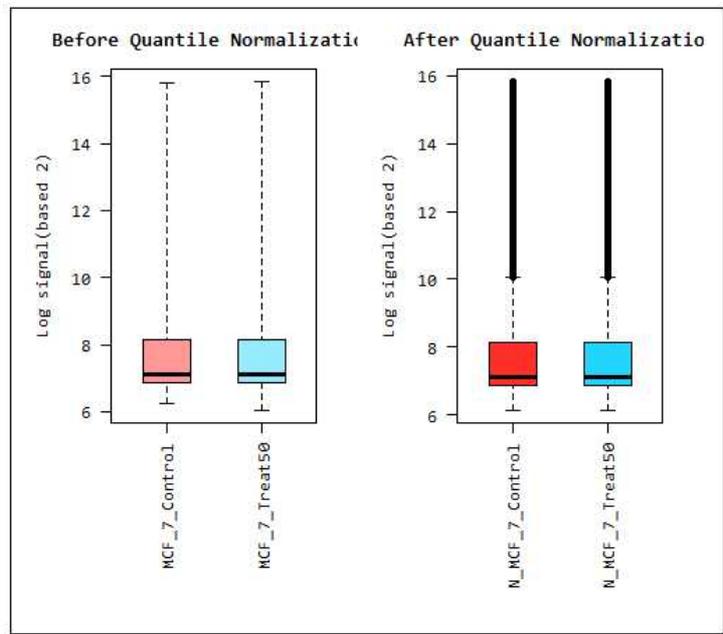
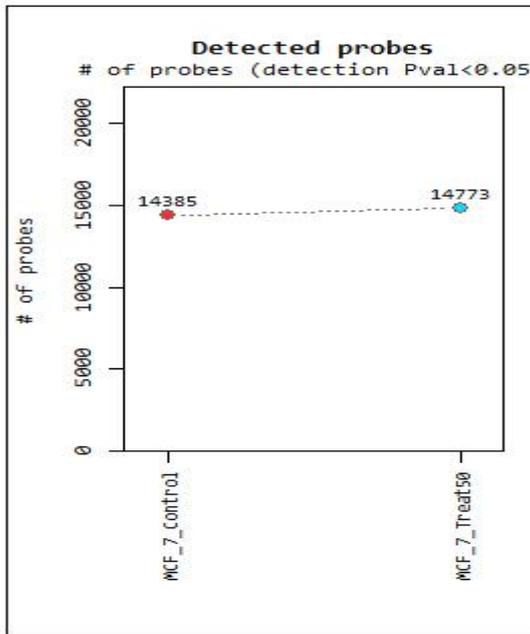
Probes	Description	Human HT-12 v4.0* 12-sample	Mouse WG-6 v2.0 6-sample	Mouse Ref-8 v2.0 8-sample	Rat Ref-12 12-sample	Human WG DASL HT* 12-sample
<b>RefSeq Content</b>						
NM	Coding transcript, well-established annotation	28,688	26,766	24,854	6,277	27,253
XM	Coding transcript, provisional annotation	11,121	6,856	796	15,983	426
NR	Non-coding transcript, well-established annotation	1,752	56	47	1	1,580
XR	Non-coding transcript, provisional annotation	2,209			12	26
Source	RefSeq source release	Human RefSeq Rel 38	Mouse RefSeq Rel 22		Rat RefSeq Rel 16	Human RefSeq Rel 38
<b>Supplementary Content</b>						
UniGene	Experimentally confirmed mRNA sequences that align to EST clusters	3,461			250	
RIKEN FANTOM2	Exemplar protein-coding sequences from the RIKEN FANTOM2 database		5,859			
RefSeq Release 5	Transcripts with NM and XM annotation in RefSeq Release 5 (Build 33.1)		3,573			
MEEBO	Probes to transcripts that do not align with 100% accuracy to RefSeq, but are confirmed as valid mRNA mapping to clusters in Expressed Sequence Tag databases*		2,371			
<b>Total</b>		<b>47,231</b>	<b>45,281</b>	<b>25,697</b>	<b>22,523</b>	<b>29,285</b>

\* > 99.98% of the bead types are present on any HumanHT-12 array

- Detected probes plot

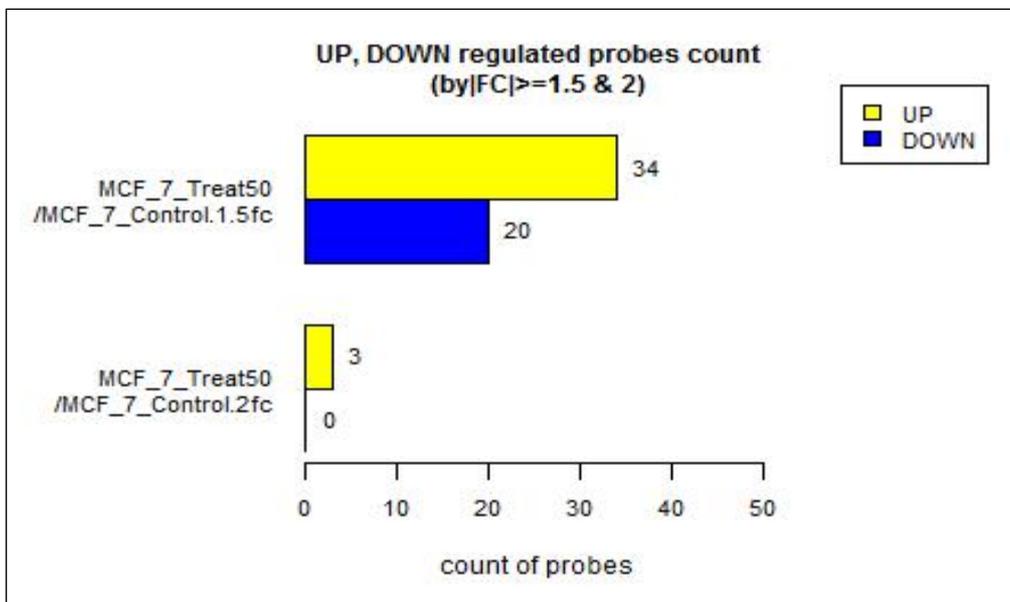
각 샘플 별 detection Pval<0.05인 probes의 수.

각 샘플의 Normalized signal에 대한 최대, 최소, Percentile 값의 분포를 나타냄.



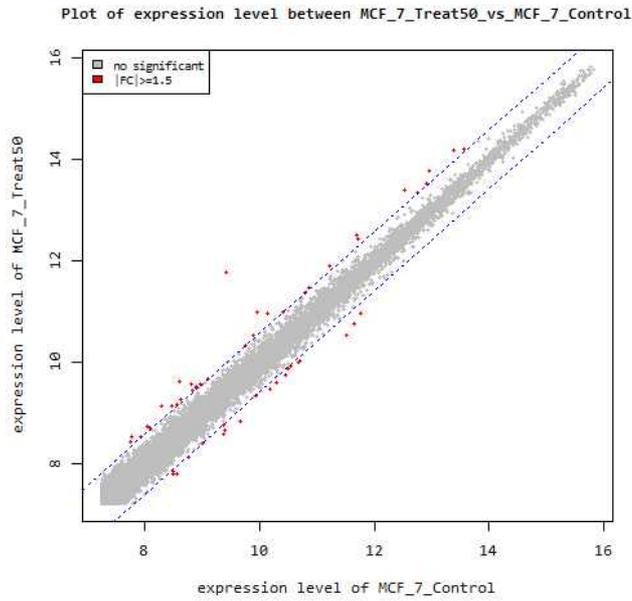
- Barplot-Significant probes

fold change, statistical test p-value를 기준으로 UP, DOWN인 probe의 개수



- Scatter plot of expression level

2개의 그룹 혹은 샘플의 expression level(normalized value)을 scatter plot으로 나타냄 (X축: control, Y축: test)

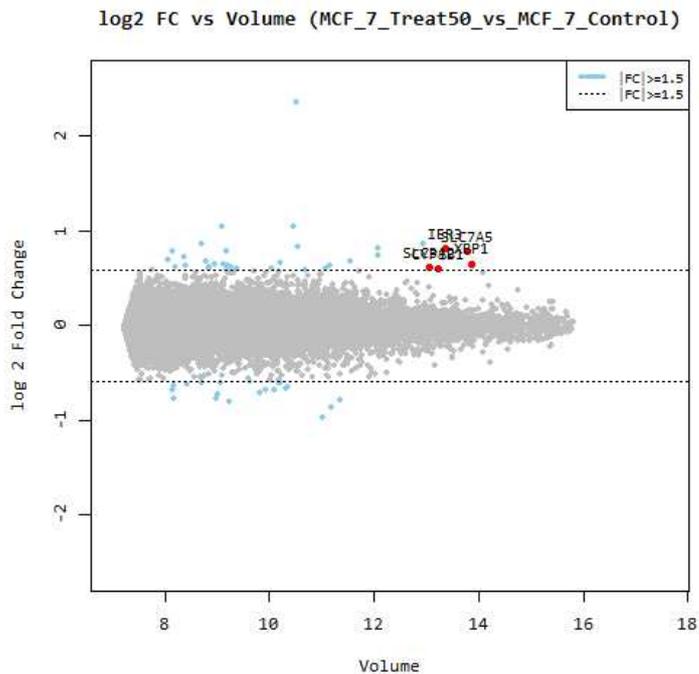


- Volume plot of expression level

Signal의 강도(volume)에 따라 2개의 그룹 혹은 샘플의 expression 차이가 있었던 probes를 확인 하기 위해 Volume plot으로 나타냄 (X축: Volume, Y축: log<sub>2</sub> FC)

volume은  $\sqrt{\text{control.mean} * \text{test.mean}}$ , log<sub>2</sub> normalized value) 으로 정의함.

significant cut-off를 만족하면서 동시에 volume이 높은 상위 5개의 probe를 붉은색 점으로 표시함.

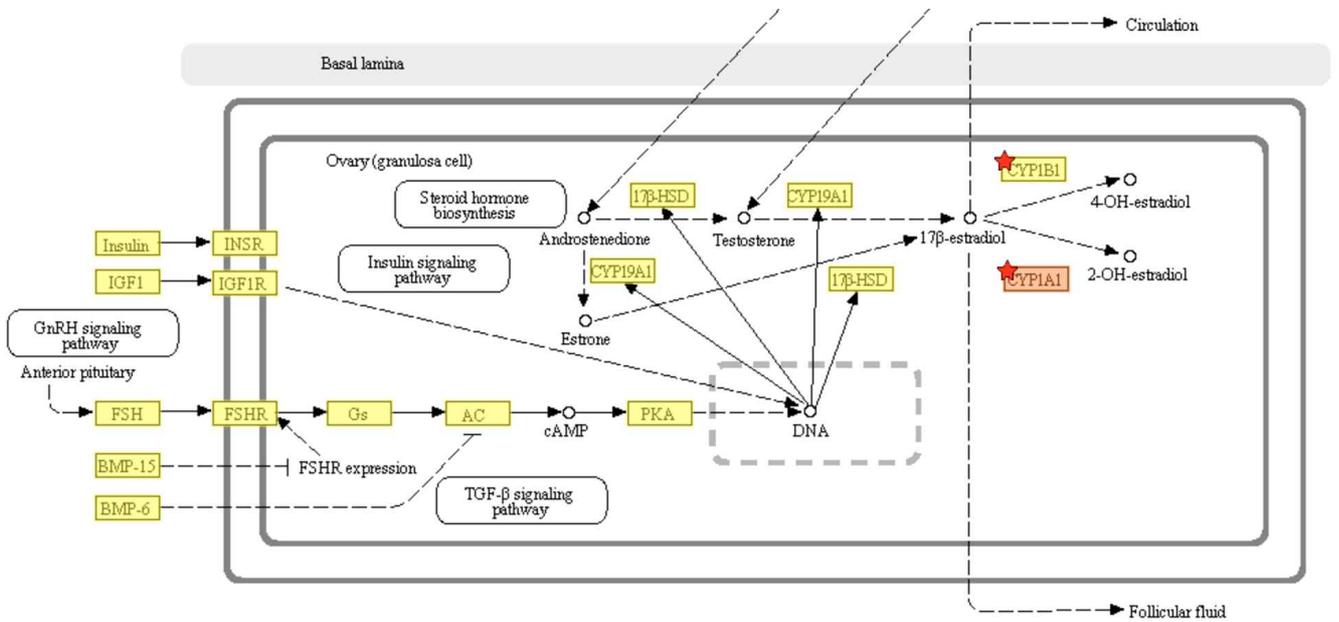


- Cluster analysis\_Hierarchical clustering heatmap

어떠한 sample과 gene이 유사한지 expression level(normalized value)를 이용하여 Hierarchical clustering (Euclidean Method, Complete Linkage)을 통하여 그룹화 함.

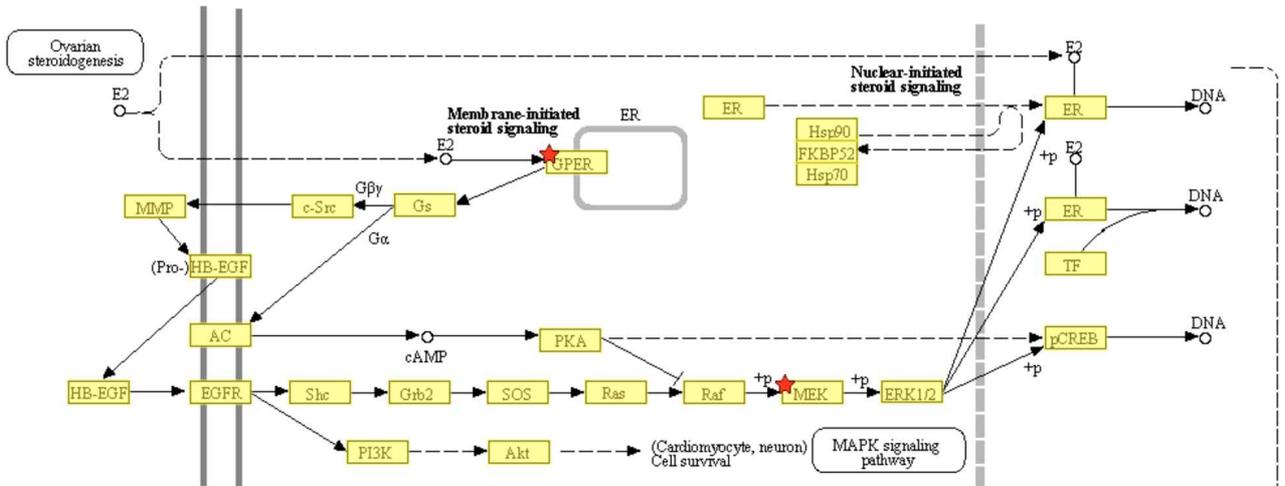




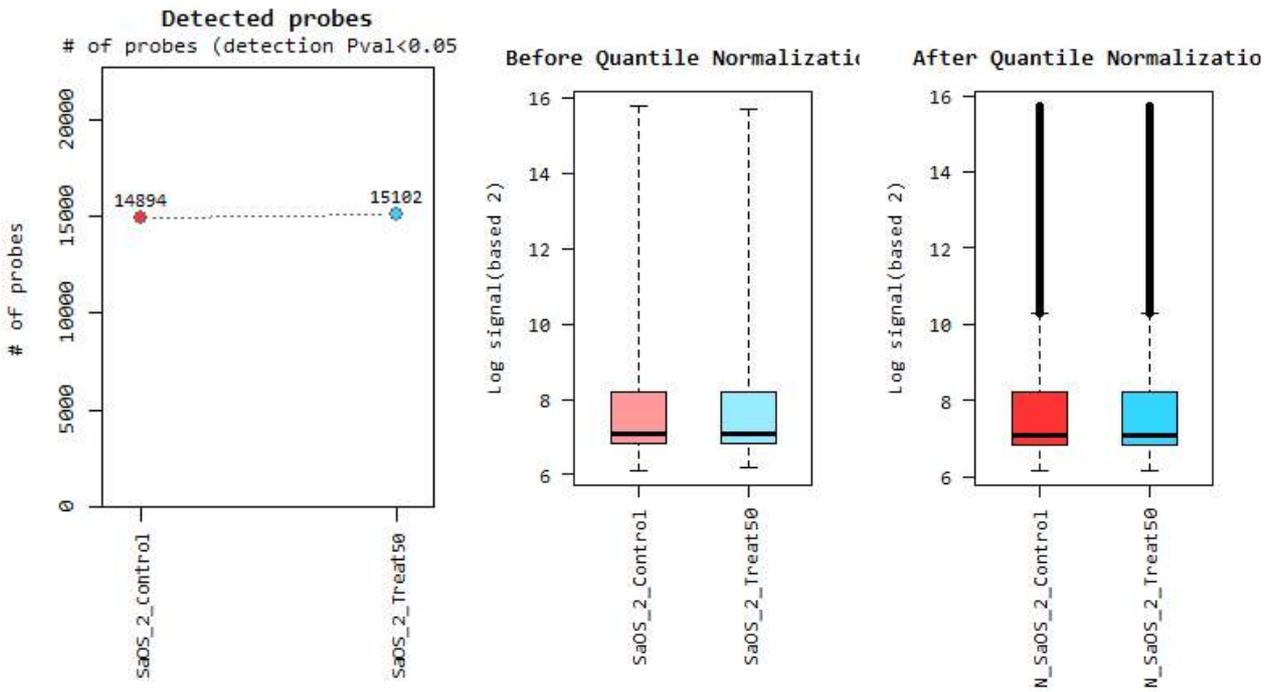


더욱이 1년차와 2년차 결과에서 WMS77을 세포와 동물에 각각 처리했을 때, 여성호르몬의 수용체 발현이 증가되는 것을 확인하였음. 또한 유전자 분석을 통해서 에스트로겐에 의한 신호전달 과정에서 발현이 증가되는 mRNA와 단백질을 확인한 결과 아래 그림에서 확인할 수 있는 GPER과 MEK의 발현이 전반적으로 향상되는 것을 확인하였음.

**ESTROGEN SIGNALING PATHWAY**

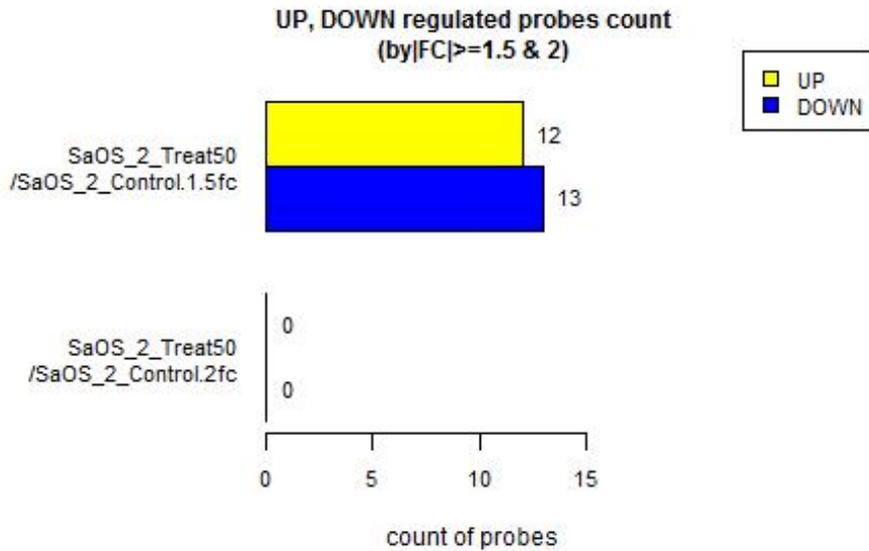


- 여성 건강 개선 기능성을 갖는 소재 (WMS77)의 처리를 통해 사람 골육종 세포 (estrogen 수용체 발현 세포주) 영향을 주는 유전자 선별 검사 결과
  - detected probes plot
  - 각 sample 별 detection Pval < 0.05인 probes의 수
  - 각 sample의 Normalized signal에 대한 최대, 최소, Percentile 값의 분포를 나타냄.



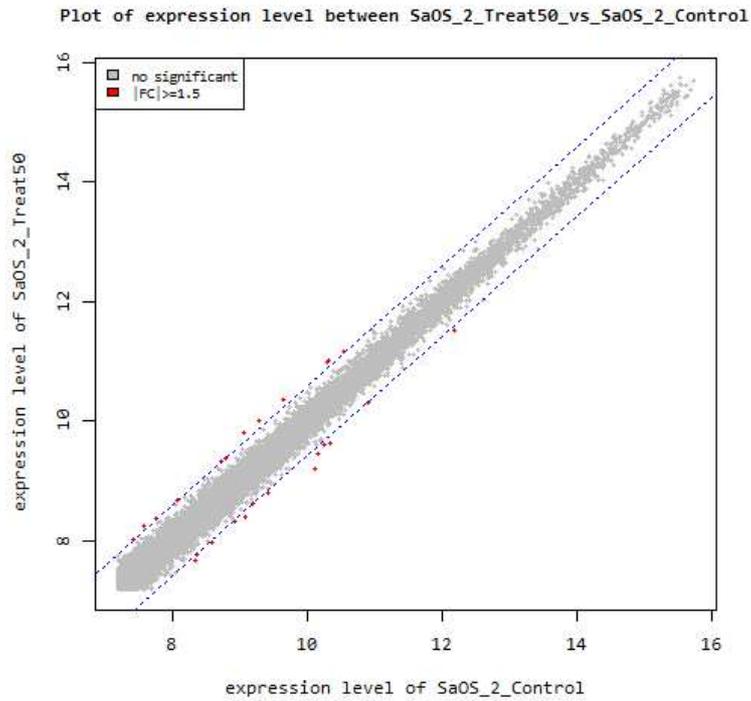
- Barplot-significant probes

fold change, statistical test p-value를 기준으로 UP, DOWN인 probe의 개수



- Scatter plot of expression level

2개의 그룹 혹은 샘플의 expression level(normalized value)을 scatter plot으로 나타냄 (X축: control, Y축: test)

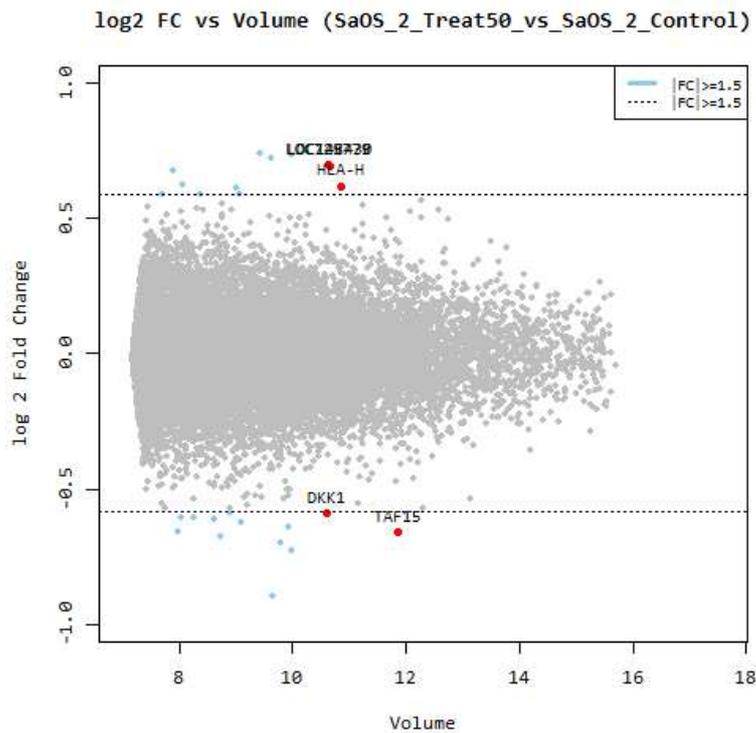


- Volume plot of expression level

Signal의 강도(volume)에 따라 2개의 그룹 혹은 샘플의 expression 차이가 있었던 probes를 확인 하기 위해 Volume plot으로 나타냄 (X축: Volume, Y축: log2 FC)

volume은  $\sqrt{\text{control.mean} * \text{test.mean}}$ , log2 normalized value) 으로 정의함.

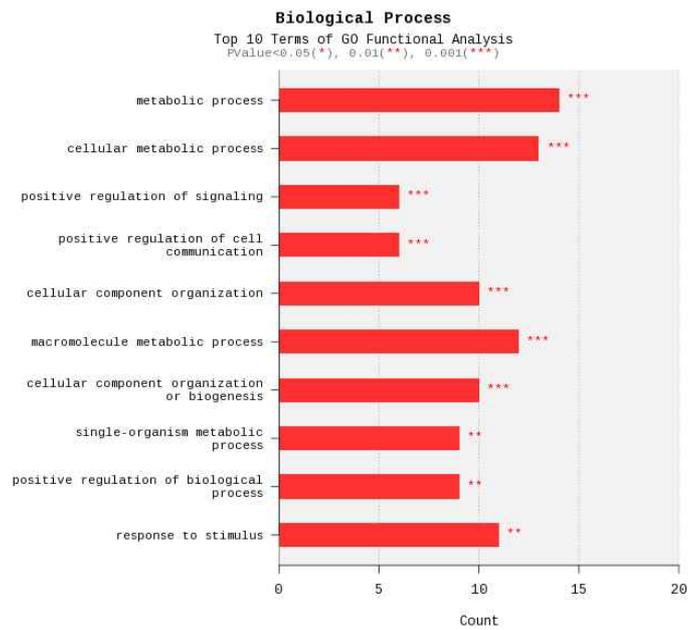
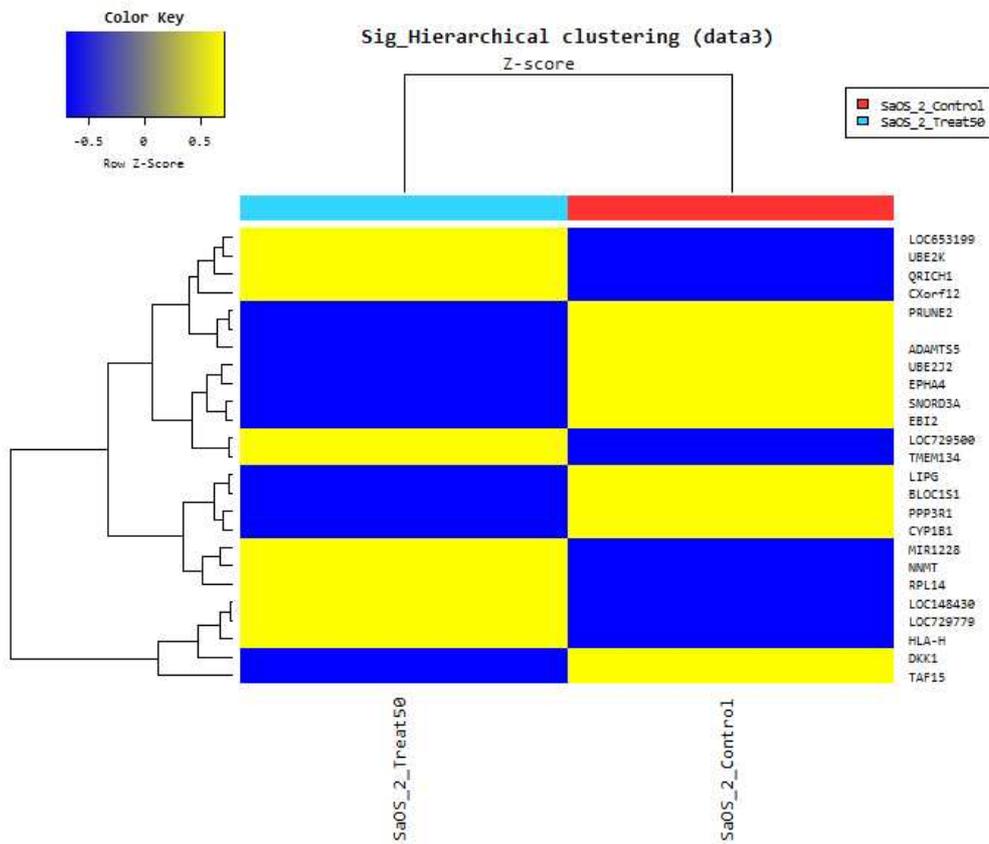
significant cut-off를 만족하면서 동시에 volume이 높은 상위 5개의 probe를 붉은색 점으로 표시함.

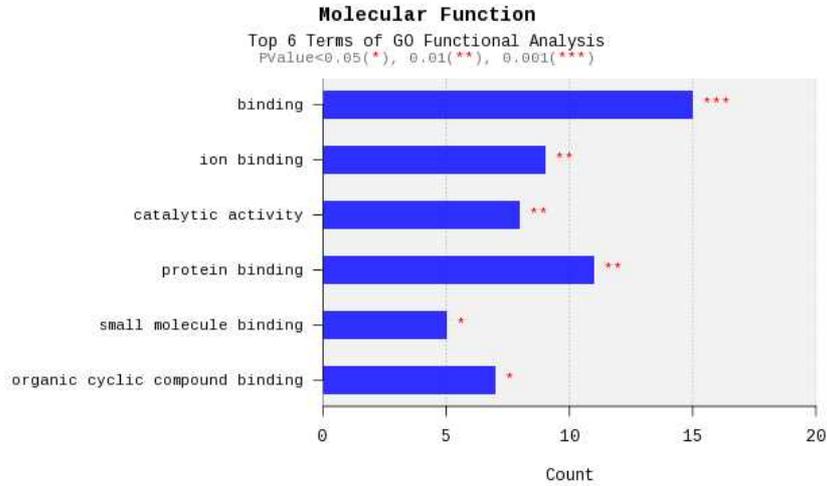


- Cluster analysis\_Hierarchical clustering heatmap

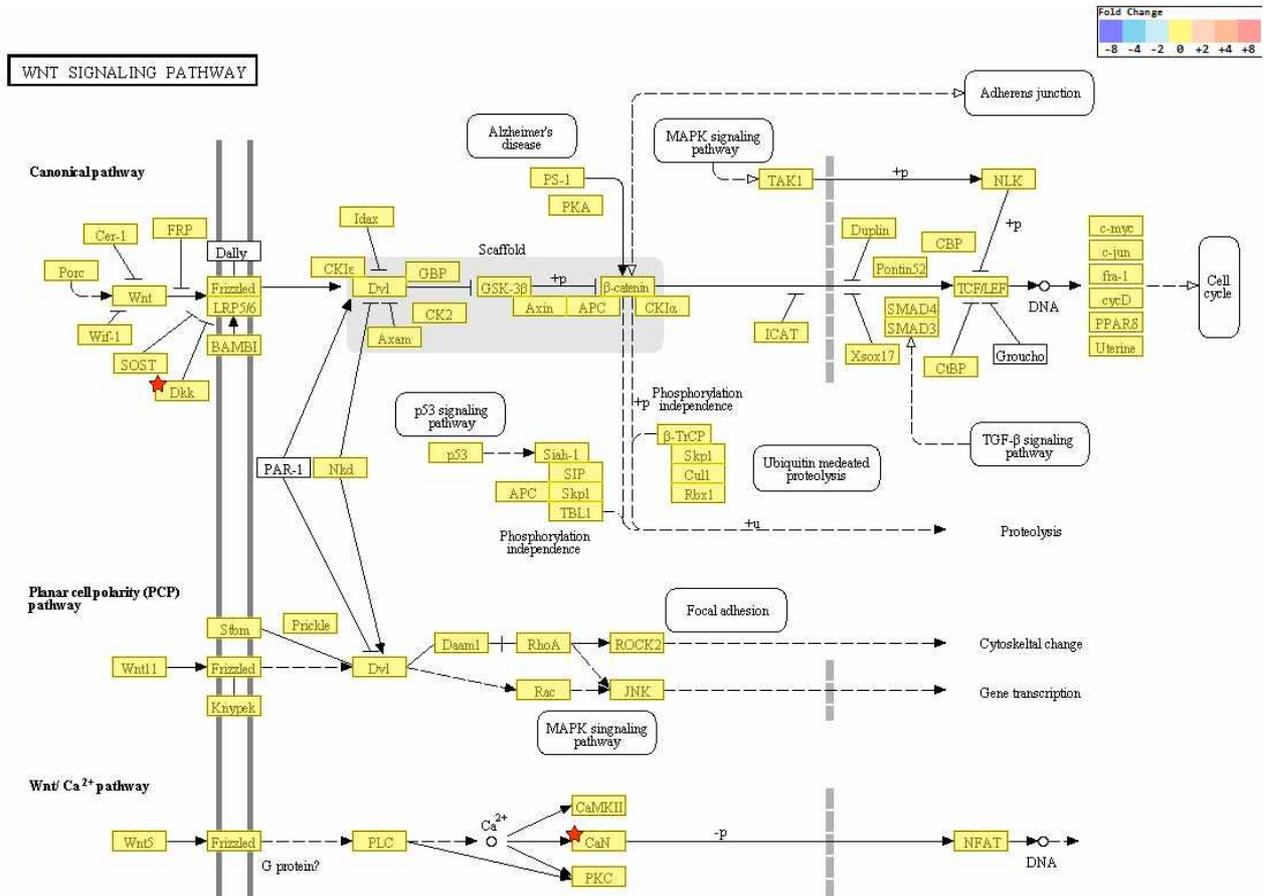
어떠한 sample과 gene이 유사한지 expression level(normalized value)를 이용하여 Hierarchical clustering (Euclidean Method, Complete Linkage)을 통하여 그룹화 함.

Gene Ontology Enrichment Analysis 결과 중 p-value 기준 상위 10개의 term을 bar graph로 나타냄.  
(gomap\_stat를 기반으로 작성됨)

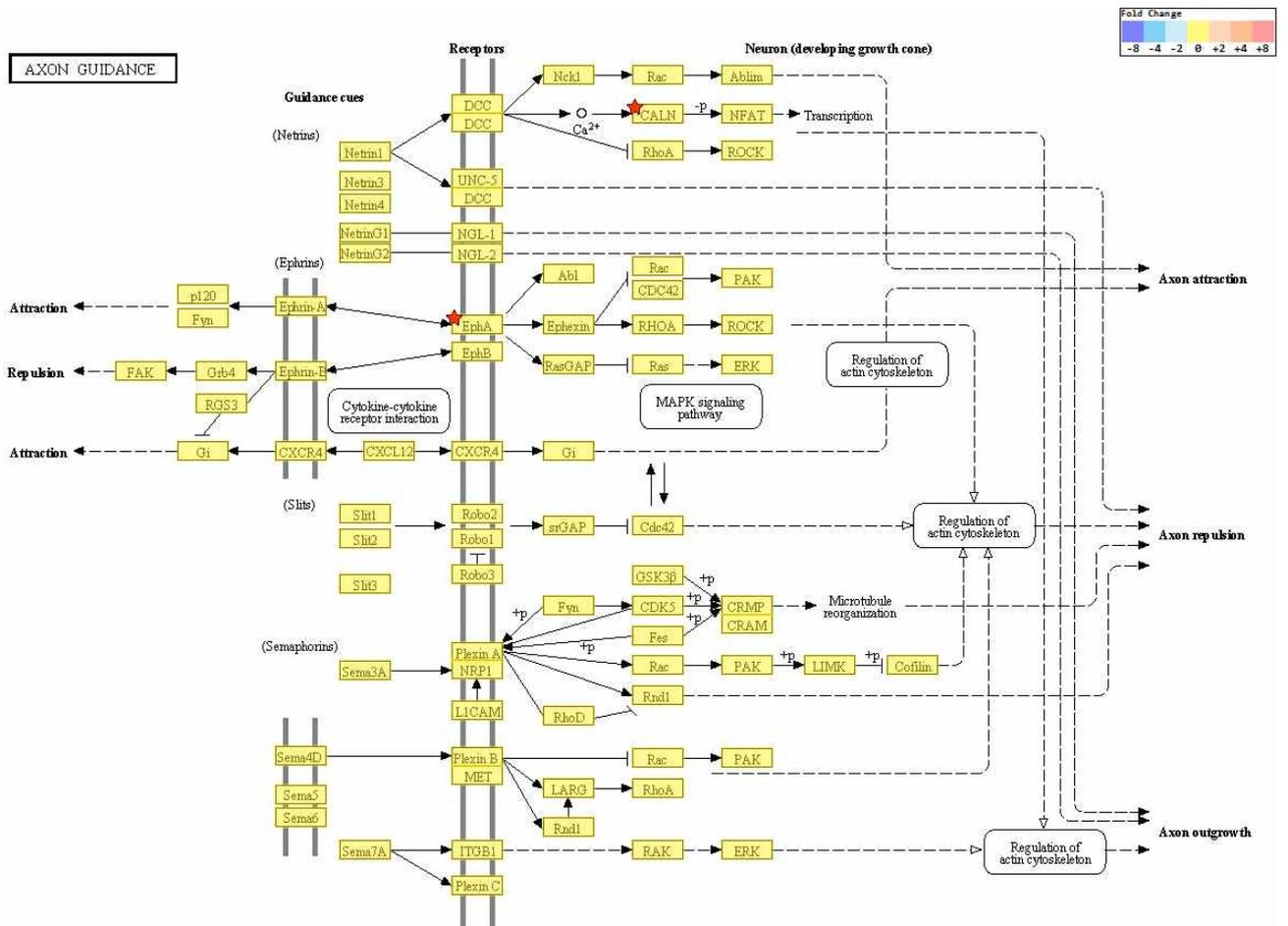




여성 건강 개선 가능성을 갖는 소재인 WMS77의 처리에 의해서 여성갱년기에 주로 발생하는 골다공증 및 파골세포 활성화와 칼슘 흡수 감소 등의 증상을 개선시킬 수 있는 기전을 분석하던 중 유전자 분석을 통해서 Wnt 신호전달과정에서 CaN의 발현 및 인산화를 통한 활성을 증가시킴으로서 칼슘의 흡수와 하위 신호 전달체계를 전체적으로 향상시킬 수 있음이 확인되었음.

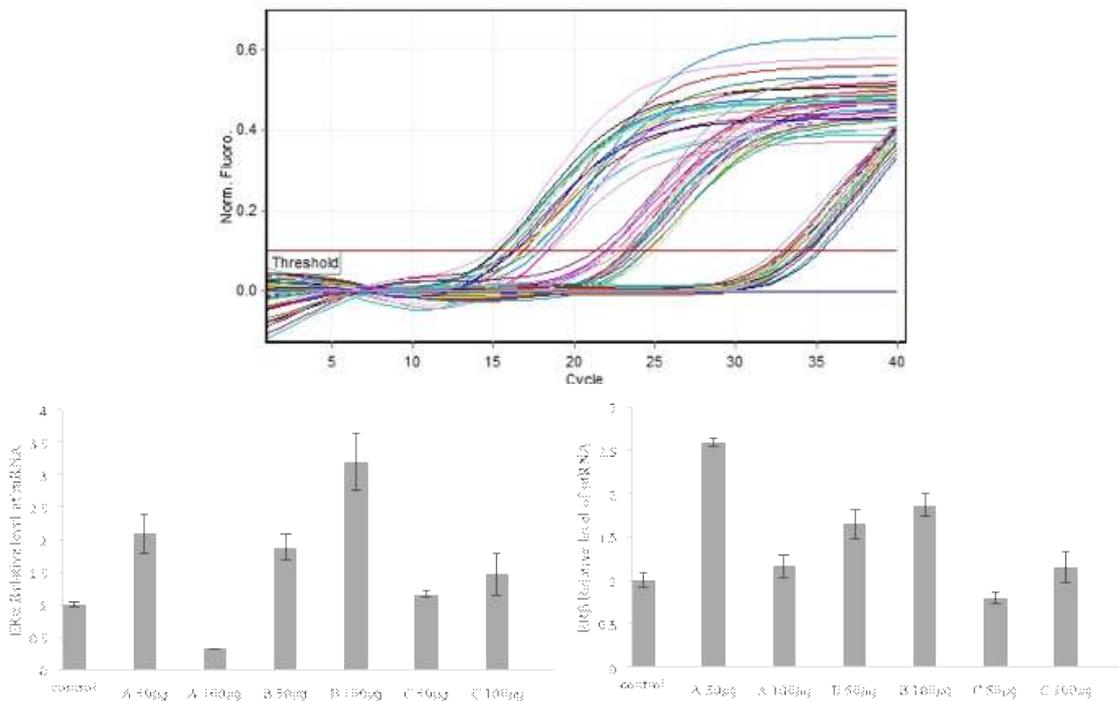


여성 건강 개선 가능성을 갖는 소재인 WMS77 처리에 의한 여성갱년기 개선 증상 연구를 하는 과정에서 본 연구진이 예상하는 것과는 달리 정신 안정과 기억력 등의 개선 증상을 확인하였음. 이 과정에서 다양한 작용기전 연구를 수행하는 과정에서 본 소재가 Axon Guidance(axon pathfinding)에 영향을 줄 수 있는 신호 전달기전에 영향을 줄 수 있음을 확인하였음. 특히 본 소재는 신경세포 축삭돌기의 기억 형성 오류를 control할 수 있는 EphA 수용체의 발현을 향상시킴으로서 신호전달을 통해서 axon repulsion에 긍정적인 영향을 미침으로서 효율적인 기억의 형성과 기억오류 방지 등의 작용을 할 수 있을 것으로 예상됨.



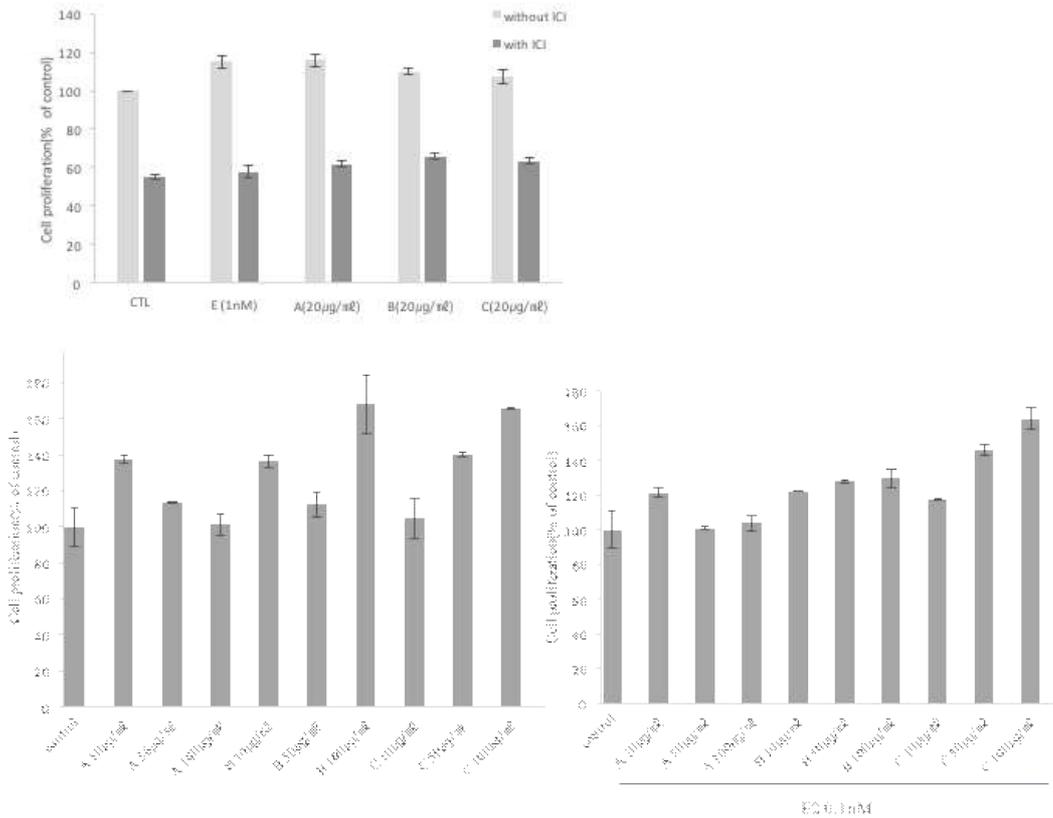
• 여성 건강 개선 기능성을 갖는 소재 (WMS77)의 전임상 세포 실험 연구 결과

- 다양한 천연물을 통해서 에스트로겐 수용체의 발현 변화와 에스트로겐의 작용에 관한 연구를 위하여 real-time PCR을 수행함.

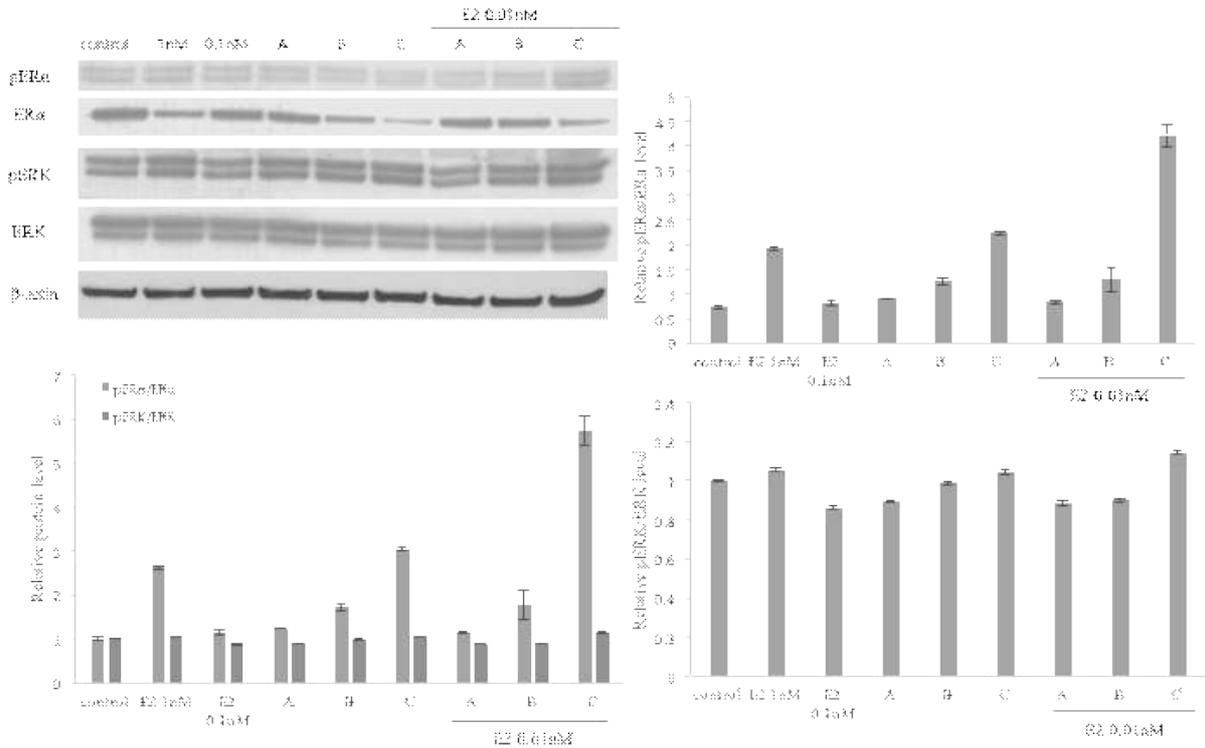


본 연구는 다양한 국내 생산 천연물 유래 추출물들의 여성건강 개선 효능을 확인하기 위하여 수용체의 발현에 영향을 줄 수 있는 물질들을 확인함. 연구 결과 본 연구과정중에 개발된 엉겅퀴(A)의 경우 50µg의

농도로 처리했을 때 ER alpha와 beta 수용체 모두를 대조군 대비 두배 이상 발현 향상시킬 수 있음을 확인 하였음. 이는 매우 흥미로운 결과로서 실제 에스트로겐의 농도에 따른 수용체의 발현을 생리적으로 관찰하면 음성피드백에 의해서 농도의존적 수용체를 발현을 관찰 할 수 있었음. 이와 유사하게 본 연구 개발소재 인 엉겅퀴를 처리한 경우에서도 농도의존적으로 수용체의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었음. 엉겅퀴와 타임을 복합한 경우는 앞에서 설명한 것과 같이 에스트로겐의 작용농도 활성을 통해서 오히려 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었음. 이는 다음의 세포증식율과 건강개선 효능 평가를 통해서도 확인할 수 있는 것과 같이 복합소재가 더 높은 세포 생존율이 에스트로겐 반응 활성 등을 나타내는 것을 통해서 확인하였음.

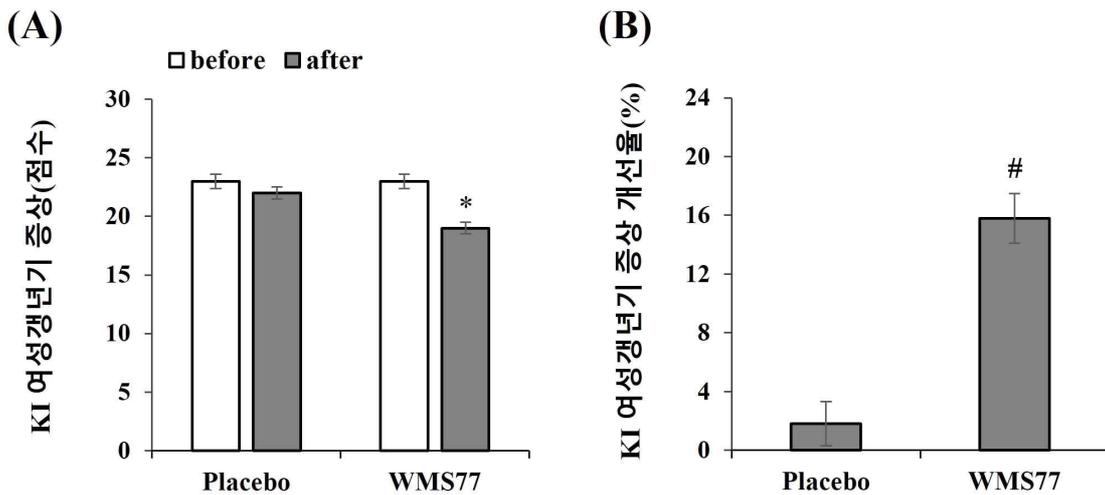


이 결과를 에스트로겐 수용체 알파와 ERK와 p-ERK의 발현으로 비교하여 확인한 결과를 아래 확인할 수 있음. 이를 수용체 발현 분석을 확인한 결과 ERα와 ERK의 발현이 전체적으로 향상되는 것을 확인할 수 있었음.



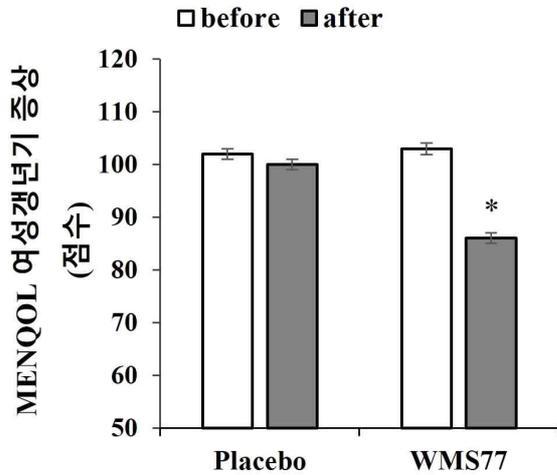
• 여성건강 개선 소재를 선정하여 여성갱년기 개선 인체적용시험 연구 결과

- WMS77 또는 위약을 12주간 일일 500 mg 섭취한 군에서 섭취전과 후 KI 검사법을 이용하여 평가한 여성갱년기 증상 점수(A)와 섭취 후 개선율을(B)을 나타냄. WMS77을 12주간 일일 500mg 섭취한 군(WMS77)에서 다양한 여성갱년기 증상이 통계적으로 유의하게 약 16% 개선시킴을 확인함. Paired t-test 정확 검정으로 섭취전과 후의 값을 비교하여  $P < 0.05$  일때, 유의한 것으로 표시하였으며 (\* $P < 0.05$ ), 군간 차이를 나타내기 위해서 Two sample t-test정확 검정으로 비교하여  $P < 0.05$  일 때, 유의한 것으로 표시함 (# $P < 0.05$ ).

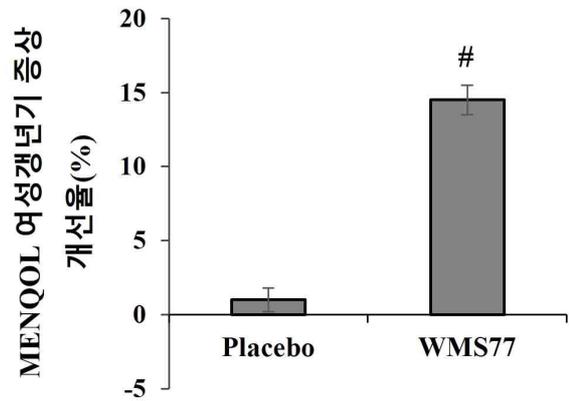


- WMS77 또는 위약을 12주간 일일 500 mg 섭취한 군에서 섭취전과 후 MENQOL 검사법을 이용하여 평가한 여성갱년기 증상 점수(A)와 섭취후 개선율을 나타냄.. WMS77을 12주간 일일 500 mg 섭취한 군(WMS77)에서 다양한 여성갱년기 증상이 섭취전에비해 약 16점 감소하여 WMS77 섭취로 여성갱년기 증상이약 15.1% 개선됨을 확인함. Paired t-test 정확 검정으로 섭취전과 후의 값을 비교하여  $P < 0.05$  일 때, 유의한 것으로 표시하였으며(\* $P < 0.05$ ), 군간 차이를 나타내기 위해서 Two sample t-test 정확 검정으로 비교하여  $P < 0.05$  일 때, 유의한 것으로 표시함(# $P < 0.05$ ).

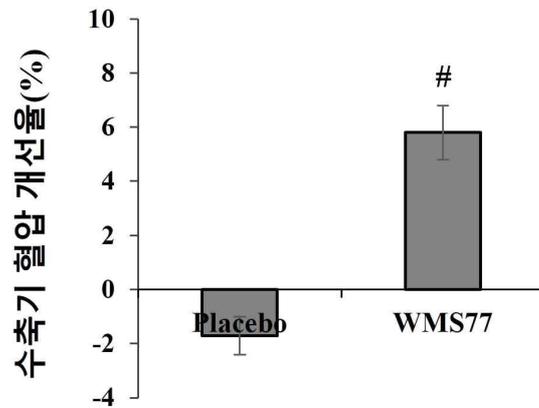
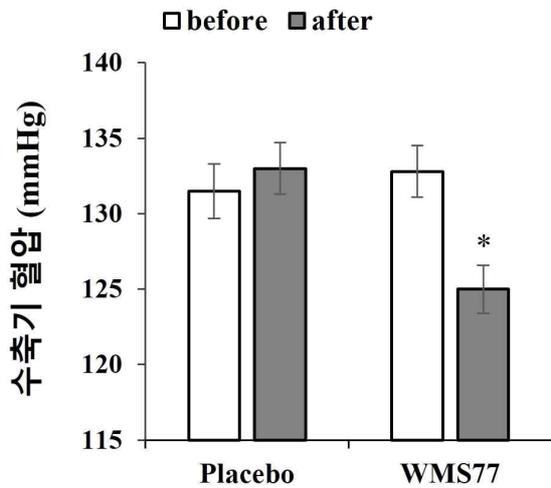
(A)



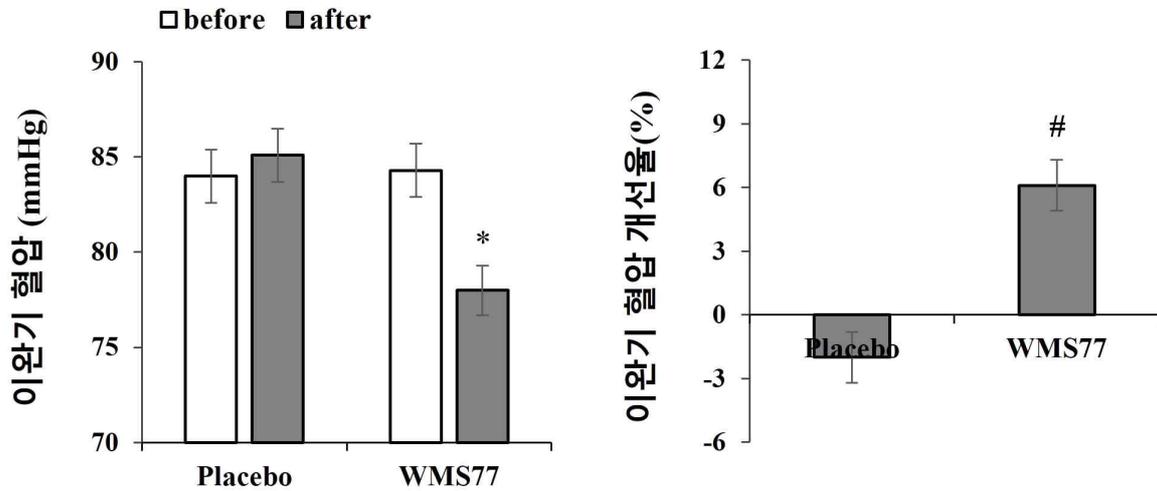
(B)



- WMS77 또는 위약을 12주간 일일 500 mg 섭취한 군에서 섭취전과 후의 수축기 혈압(A)과 섭취후수축기 혈압 개선율(B)을 나타냄.. WMS77을 12주간 일일 500 mg 섭취한 군(WMS77)에서수축기 혈압이 섭취전에 비해 약 5.7% 개선됨. Paired t-test 정확 검정으로 섭취전과 후의 값을 비교하여  $P < 0.05$  일 때, 유의한 것으로 표시하였으며( $*P < 0.05$ ), 군간 차이를 나타내기 위해서 Two sample t-test 정확 검정으로 비교하여  $P < 0.05$  일 때, 유의한 것으로 표시함( $\#P < 0.05$ ).



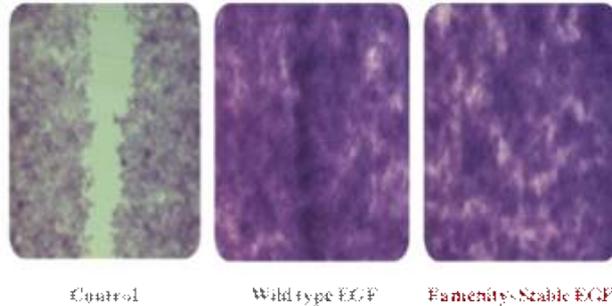
- WMS77 또는 위약을 12주간 일일 500 mg 섭취한 군에서 섭취전과 후의 이완기 혈압과 섭취후 이완기 혈압 개선율을 나타냄. WMS77을 12주간 일일 500 mg 섭취한 군(WMS77)에서이완기 혈압이 섭취전에 비해 약 6.6% 개선됨. Paired t-test 정확 검정으로 섭취전과 후의 값을 비교하여  $P < 0.05$  일 때, 유의한 것으로 표시하였으며( $*P < 0.05$ ), 군간 차이를 나타내기 위해서 Two sample t-test 정확 검정으로 비교하여  $P < 0.05$  일 때, 유의한 것으로 표시함( $\#P < 0.05$ ).



- WMS77 또는 위약을 12주간 일일 500 mg 섭취한 군에서 섭취전과 후의 분당 심박수와 섭취후개선율을 나타냄. WMS77을 12주간 일일 500 mg 섭취한 군(WMS77)에서분당 심박수가 섭취전에 비해 약 6.7% 개선된 것을 확인함. Paired t-test 정확 검정으로 섭취전과 후의 값을 비교하여  $P < 0.05$  일 때, 유의한 것으로 표시하였으며( $*P < 0.05$ ), 군간 차이를 나타내기 위해서 Two sample t-test 정확 검정으로 비교하여  $P < 0.05$  일 때, 유의한 것으로 표시함( $\#P < 0.05$ ).

• 여성건강 개선 소재와 성능 향상된 EGF의 연구 개발 결과

Wound healing effect of wild-type EGF and Famenity-stable EGF

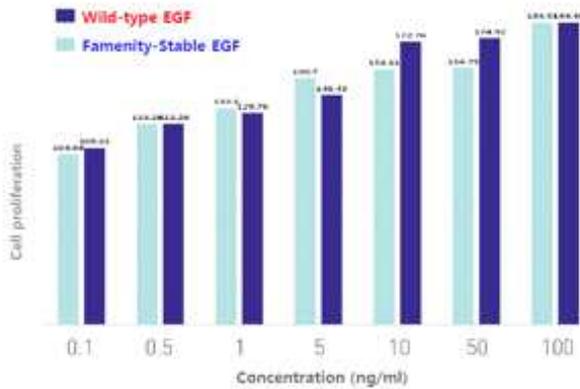


Regeneration of epidermal cells for wound-healing

본 연구 과제를 통해서 새로운 여성건강 개선 소재를 개발하고 피부건강 개선 소재로서 개발하기 위하여 EGF와 bFGF의 안정성을 높이는 연구를 수행하였음. 개발된 안전화 성장인자의 경우는 실제 human epidermal cell line을 배양하는 과정에서 일정 부위의 손상을 유발하여 본 연구를 통해서 개발된 EGF를 처리하는 경우 일반적인 EGF와 동일한 손상 회복 효과를 보이는 것을 확인함.

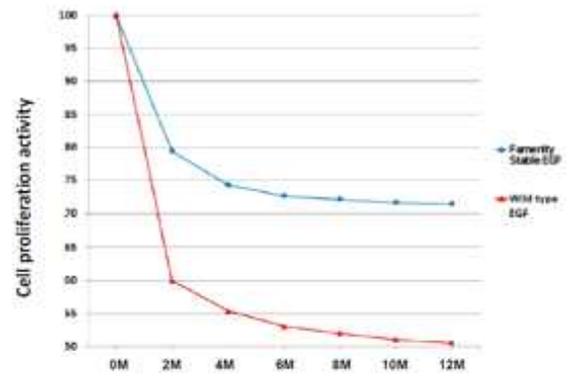
본 과제를 통해서 연구 개발한 Famenity stable EGF가 일반적인 wild EGF와 안정도를 비교한 결과에서 12개월동안 노출되었을 때 일반 EGF보다 월등한 세포 기능성이 유지되는 것을 확인할 수 있었음.

- Comparison of cell proliferation for Famenity-stable EGF and wild-type EGF



Cell proliferation assay for HaCat cells

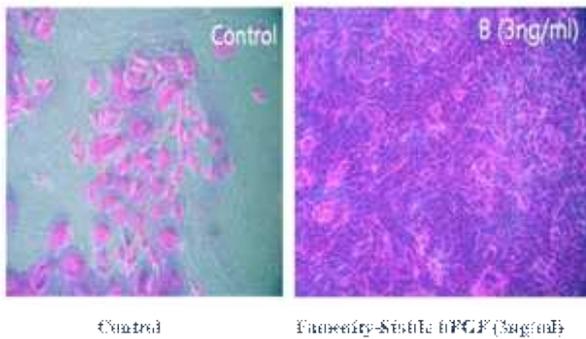
- Solution Incubation test (pH 7, 25 °C, 12 months)



Wild-type EGF and Famenity-stable EGF samples were incubated at 25 °C in 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.0).

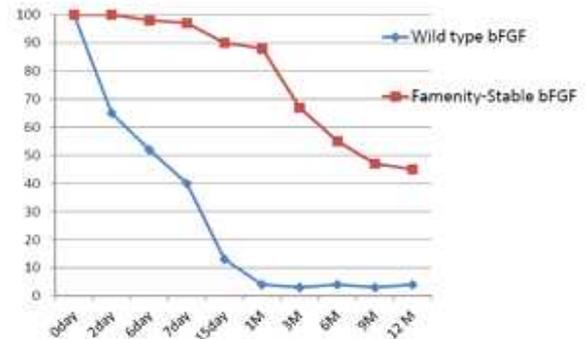
Famenity-stable bFGF 또한 기능성과 안전성이 12개월가량 유지되는 것으로 확인되었으며 이를 통해서 기존에 알려진 EGF와 bFGF의 성능을 유지하면서 안전성을 높임으로서 활용도를 높이고 다양한 여성 피부 건강 제품 개발에 활용될 수 있을 것으로 예상되었음.

- Significant cell proliferation effect of Famenity-stable bFGF



Cell proliferation assay for NIH-3T3 cells

- Solution Incubation test (pH 7, 25 °C, 12 Months)

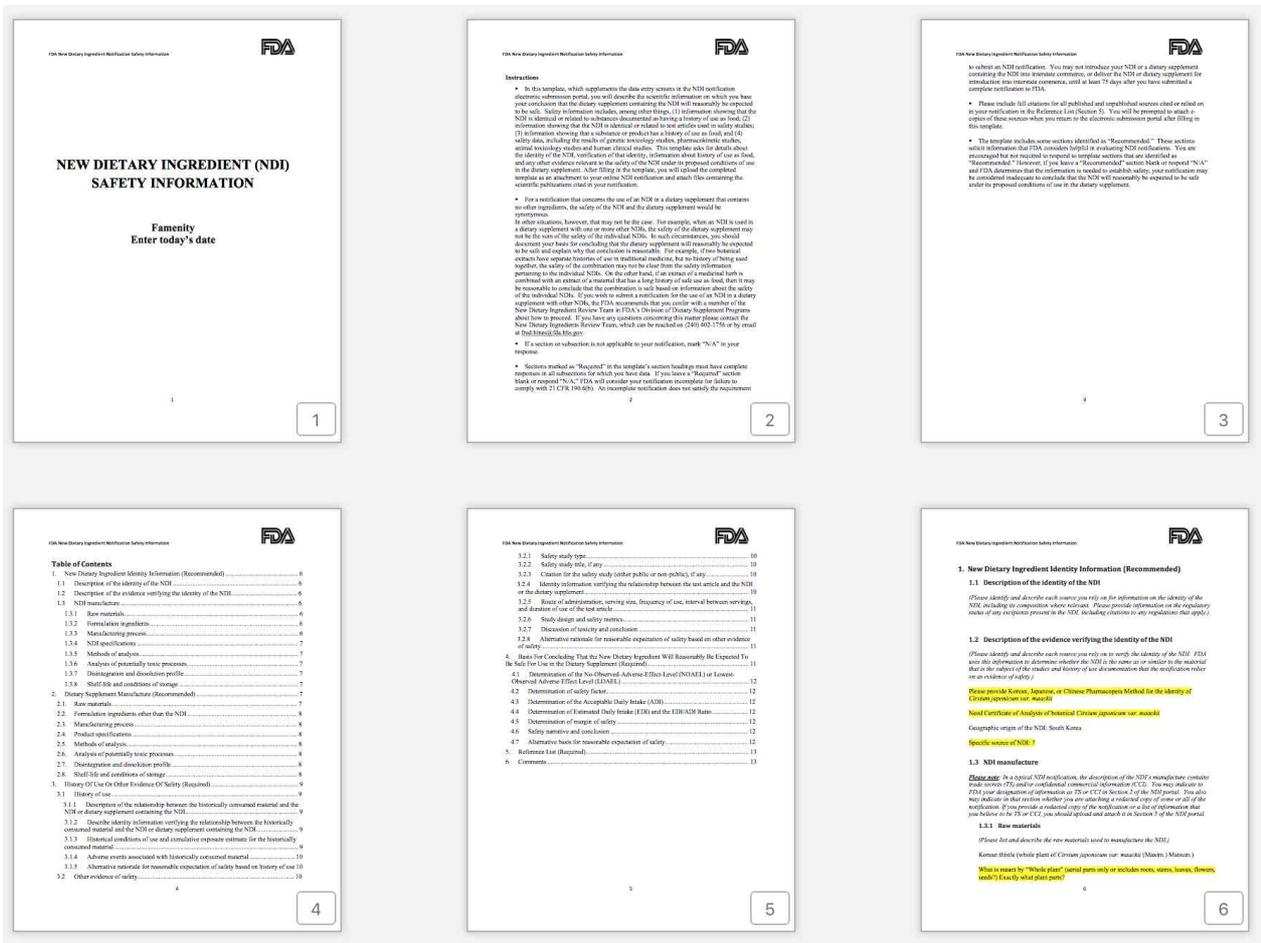


Wild-type bFGF and Famenity-stable bFGF samples were incubated at 25 °C in 20mM sodium phosphate buffer (pH 7).

위의 세포실험을 기반으로 본 성장인자들과 과제를 통해서 연구 개발된 소재를 복합하여 피부 건강 개선 마스크팩 제작에 활용하였음.

### (B) 여성 건강 개선 천연물 유래 소재 제품화를 위한 개별인정 신청 준비

- WMS77은 개별인정 서류를 작성 완료하여 식약처와 개별인정 승인을 위한 지속적인 교류를 진행하였고, 동시에 미국 및 해외 진출을 위한 FDA NDI 승인 서류 작성을 수행함.



(C) 본 과제를 통해 연구 개발한 제품화 성과

- 국내 소재 (WMS77, 국내쌀, 연구개발된 EGF)를 활용한 여성 피부건강 제품

# TAMI SENSE REVITALIZING ALL IN ONE MASK



Stem Cell cultures and EGF extracts from plants bring healthy and youthful skin

EGF + 5-Peptide + Botanical Stem Cell

This specialized facial mask, designed to extract from signs of visible aging

**Dual Functional Mask Pack**

33 ml



**Famenity** www.famenity.com

- 위 마스크팩을 생산하여 현재 국내외에서 제품을 판매하고 있음 (농협, 프랑스 수출, 인터넷 쇼핑몰 등). 본 제품을 활용하여 마스크팩에서 더 많은 뷰티분야로 확대 적용하고 있음.

- 본 연구를 통해서 개발된 여성 건강 개선 소재, WMS77의 제품화 개발



- 여성 건강 개선 소재인 WMS77을 활용하여 여성 건강 개선 건강기능식품을 시제품으로 만들고, 국내외 마케팅을 전개하였음.
- 본 제품의 다양한 제품화를 위하여 제형을 다양화하기 위한 시제품 제작을 완료하였음. 제품은 omega-3와 본 연구의 개발소재인 WMS77을 함께 섞어 젤리형태, 초콜릿형태, 아이스커피음료, 믹스커피 제형으로 다각화하여 시제품화 하였음.



- WMS77이 첨가된 구미젤리와 젤리형 제제로 제형제제를 다각화 함.



- 본 연구과제를 통해서 기술이전 받은 탈모 개선 소재를 적용한 샴푸와 에센스 제품



(D) 본 과제 성과의 외부 홍보 성과

- 국내 개발 소재를 활용한 산업화 성과의 국내 수상내역

Famenify brings scientifically backed natural ingredients



**KFDA** Awarded the KFDA President Award for support to the growth of health functional food industry.

**Health and Welfare** Awarded the "Ministerial Prize for promoting tech. of health business" in the Bio-Korea 2017.

**Agriculture, Food and Rural Affairs** Awarded Grand Prize for global development of health functional foods and cosmetics in preventing anti-aging and dementia with natural ingredients.

**NH Nonghyup** Awarded Grand Prize by a creative idea for growing the primary industry into a high value-added industry

- 본 과제를 통해서 연구 개발한 소재들의 해외진출을 위한 활발한 홍보 및 교류활동 전개

# 농협, 쌀 활용 제조회사 파미니티 美설명회 지원

우은식 입력 2017.06.29. 15:41 댓글 0개

【세종=뉴스시스】우은식 기자 = 농협은 29일 농식품 아이디어(TED) 경연대회에서 대상을 수상한 파미니티의 미국 진출을 위한 현지 설명회를 개최했다.



농협은 지난 28일 미국 네브라스카 주에 위치한 네브라스카 이노베이션 캠퍼스(NIC) 회의실에서 농협 창조농업지원센터와 농업기술실용화재단의 창업보육 실무자, 네브라스카-링컨대학 로니 그린 총장, 파미니티 등 미국 진출 기업체 관계자가 참석한 가운데 미국 진출을 위한 사전 설명회를 개최했다.

- 본 연구 과제를 통해서 개발된 소재의 미국 진출을 위한 설명회를 개최하였으며 이에 참석하여 네브라스카 주립대학과 네브라스카주 관계자들과 교류를 통해 미국시장 진출을 위한 공동연구개발 투자를 진행하고자 하였음.

## 라. 4차년도

(ㄱ) 4차년도 연구목표

- 시장친화적 비노배뇨 질환 임상시험 및 인체 작용기전 규명
- 비뇨기 건강개선 기능성 소재의 인체 효능 평가
- 여성건강개선 기능성소재의 인체 효능 평가

(ㄴ) 4차년도 연구개발 내용 및 성과

### (A) 여성갱년기 식의약소재의 뼈건강 개선 및 MENQoL 개선 효능 평가

- 여성갱년기 개선에 관련된 천연 에스트로겐 함유 식물들의 경우 유방암 등 다양한 부작용을 일으킬 수 있는 유전적 변화를 유발한다는 사실들을 확인할 수 있었음. 하지만 WMS77의 경우는 에스트로겐에 대한 민감도를 증가시킴에도 불구하고 암을 유발과 관련이 높은 유전자들 (CYP1A1, CYP1B1, LIPG, DKK1)의 통계적 유의미한 감소를 보였음.
- 세포의 암 억제 유전자인 PRUNE2의 뚜렷한 발현 증가를 확인할 수 있었으며 이 유전자는 osteoblast의 osteocyte로의 분화를 촉진하고 ossification 과 mineralization에 있어서 매우 중요한 유전자로서 보고되어 왔음.

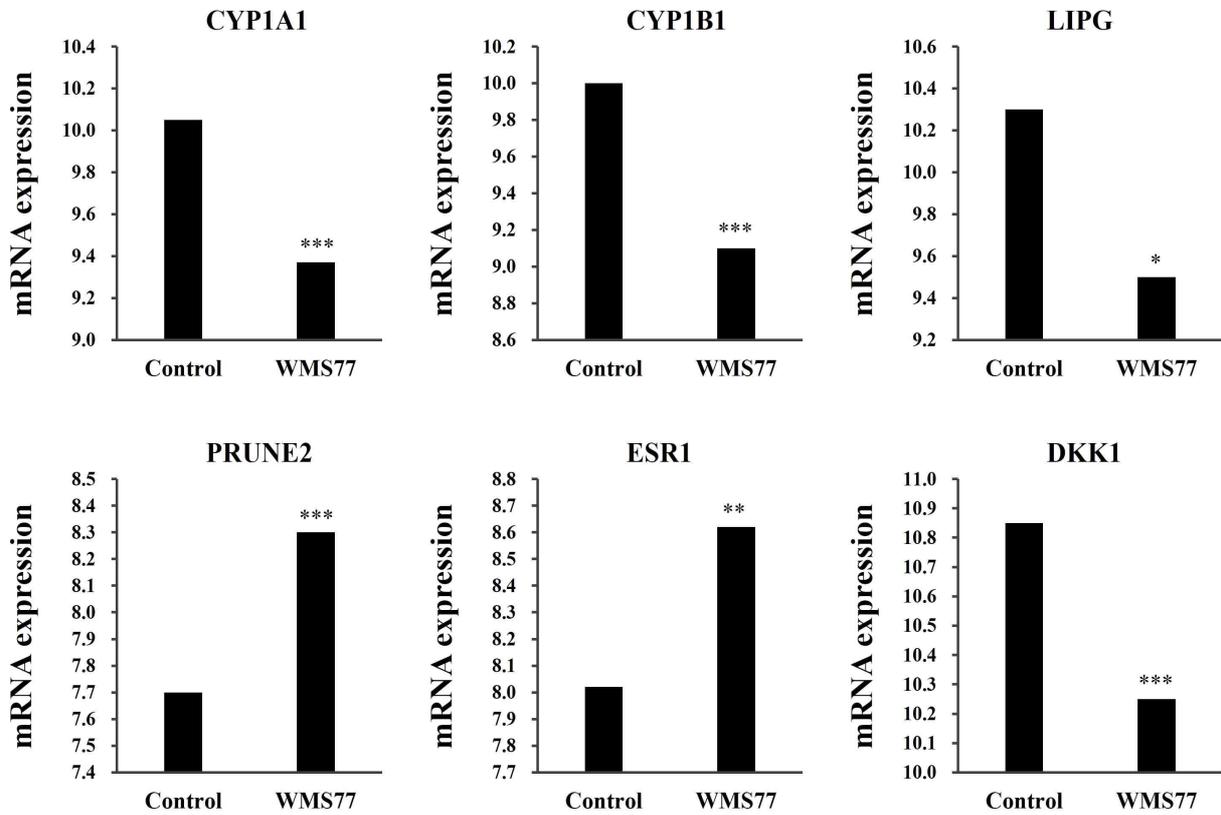


그림3-3-42. 뼈세포 SAOS-2 osteoblast-like cell에서 WMS77 처리에 의한 암억제 유전자 변화

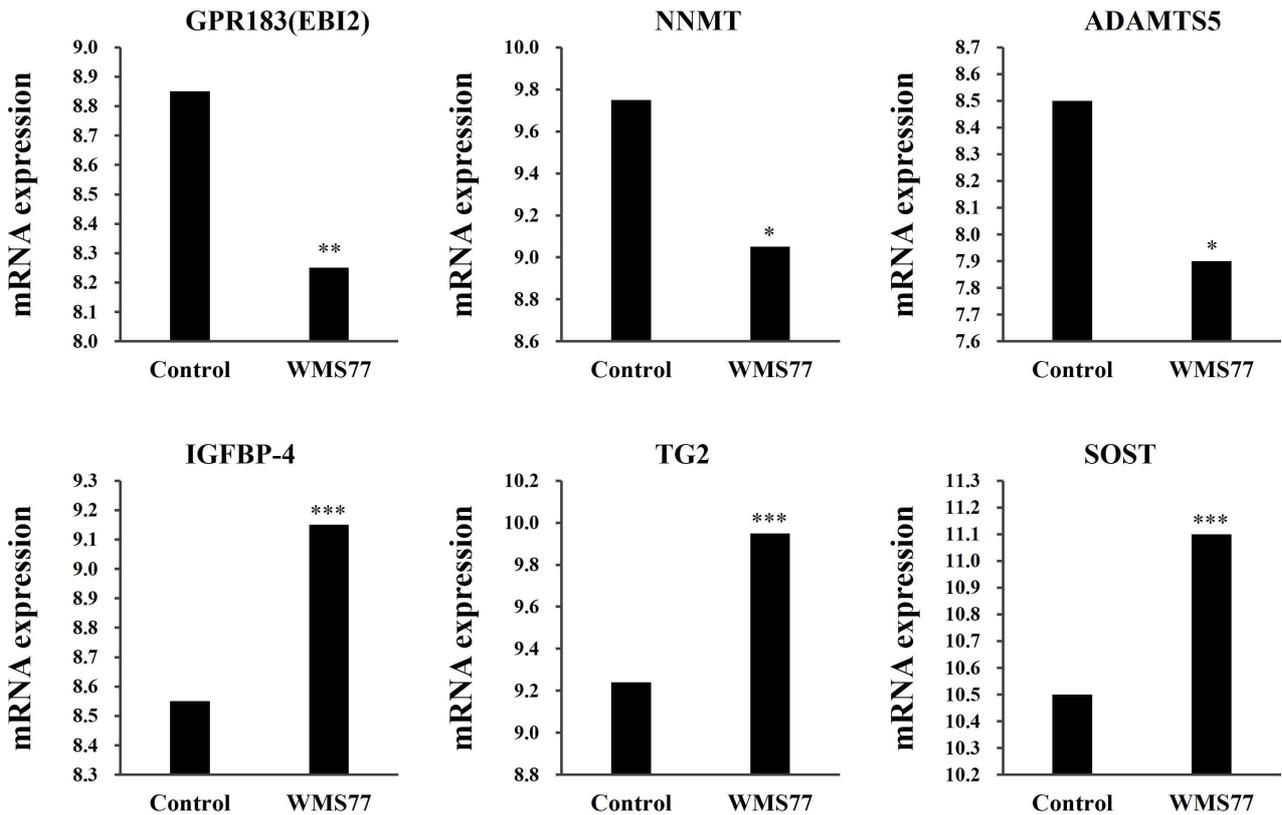


그림3-3-43. 뼈세포 SAOS-2 osteoblast-like cell에서 WMS77 처리에 의한 ossification과 mineralization 유전자 변화

- WMS77의 처리는 SAOS-2세포의 분화와 광물화에 긍정적으로 작용할 수 있는 유전자들의 발현을 향상시키고 파골세포의 분화 및 증식을 증가시키는 유전자들의 발현을 통계학적으로 유의미하게 감소시키는

것을 확인할 수 있었음.

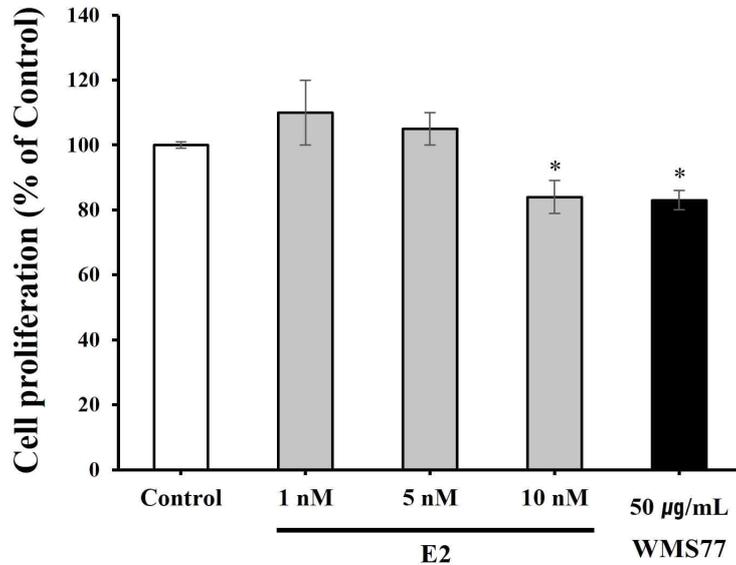


그림3-3-44. 뼈세포 SAOS-2 osteoblast-like cell에서 WMS77 처리에 의한 세포생존율

- WMS77의 처리는 SAOS-2세포의 분화와 광물화에 영향을 줄 수 있는 유전자의 발현이 증가되고 암의 증식 (세포 이상 분열)을 억제시킬 수 있음을 확인하였으므로 세포 증식률을 비교하였음.
- WMS77의 처리는 SAOS-2 세포 사멸 없이 세포의 증식을 80% 수준으로 의미있게 감소시키는 것을 확인할 수 있었음. 이는 양성 대조군으로서 E2 10nM 처리군과 유사한 효과였음. 따라서 암세포의 이상 증식을 억제하고 분화 유발되어 세포의 doubling 시간을 감소시키는 것을 확인할 수 있는 결과였음.

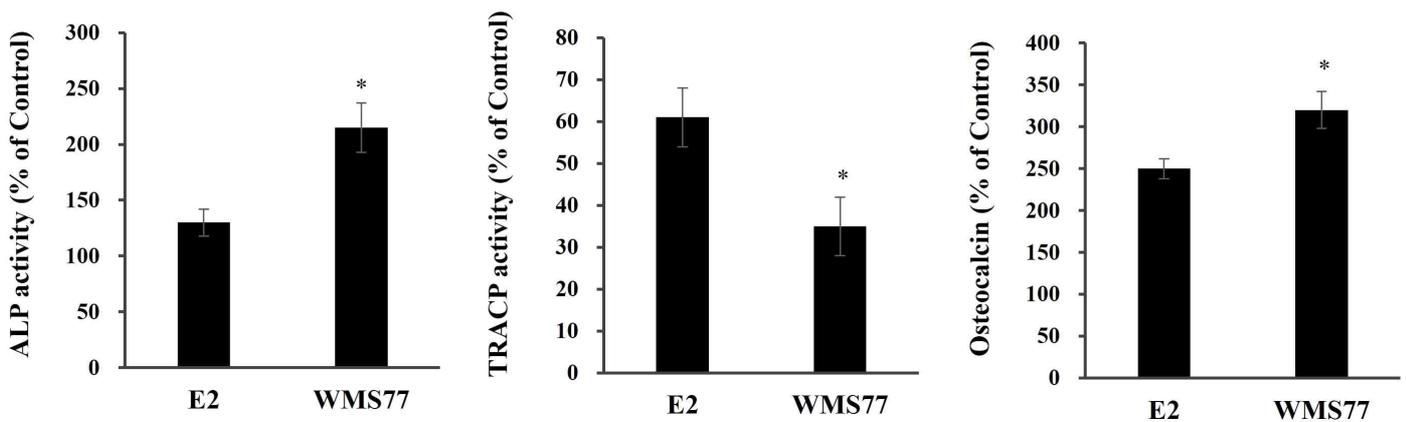


그림3-3-45. 뼈세포 SAOS-2 osteoblast-like cell에서 WMS77 처리에 의한 ossification 지표

- WMS77의 처리는 SAOS-2세포의 분화와 광물화에 영향을 줄 수 있는 유전자의 발현이 증가된다는 것을 확인하였기 때문에 본 연구에서는 WMS77을 처리한 후, 골대사 지표인 ALP와 ACP 활성 변화를 확인하였음.
- 결과적으로 조골 작용과 관련이 높은 ALP 효소의 활성이 증가되었으며 반대로 TRACP의 활성은 유의미하게 감소하였음. 동시에 이런 골 건강 개선 관련 호르몬인 osteocalcin의 농도가 통계적으로 유의미하게 증가되었음.

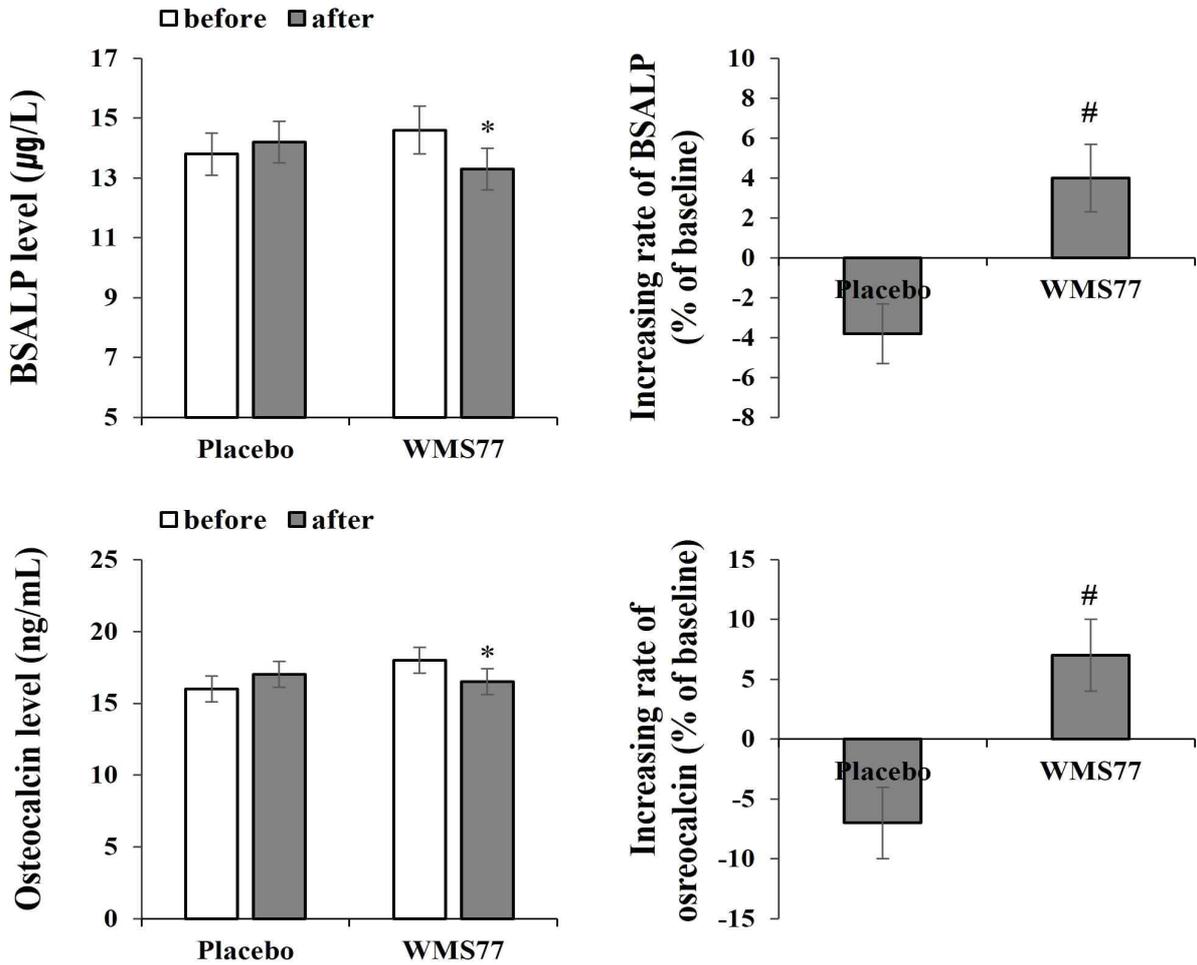


그림3-3-46. WMS77를 3개월간 꾸준히 섭취한 여성의 BSALP 활성 및 Osteocalcin 농도

- WMS77을 통해 전임상 효능 평가과정에서 72시간 동안 뼈세포의 ossification과 mineralization이 향상되는 것을 확인하였으며 세포에서 확인된 결과를 바탕으로 인체에서 3개월간 지속적으로 섭취시 ossification과 mineralization을 반영하는 지표인 혈중 BSALP와 osteocalcin의 농도를 변화를 확인하였음. 여성갱년기에 발병률이 매우 높은 골다공증을 갖는 여성은 파골의 활성화로 인하여 음성 조절과정 중 혈중 BSALP와 Osteocalcin의 농도에서 의미있는 증가가 보고되었음. 하지만 본 연구에서 WMS77 500 mg 지속적으로 섭취한 중년 여성의 경우 혈중 BSALP와 Osteocalcin의 농도의 감소를 통해 안정화가 유지되는 것을 확인하였음. 더욱이 개인별 농도 변화율을 확인했을 때 통계학적으로 유의한 개선을 보였음.

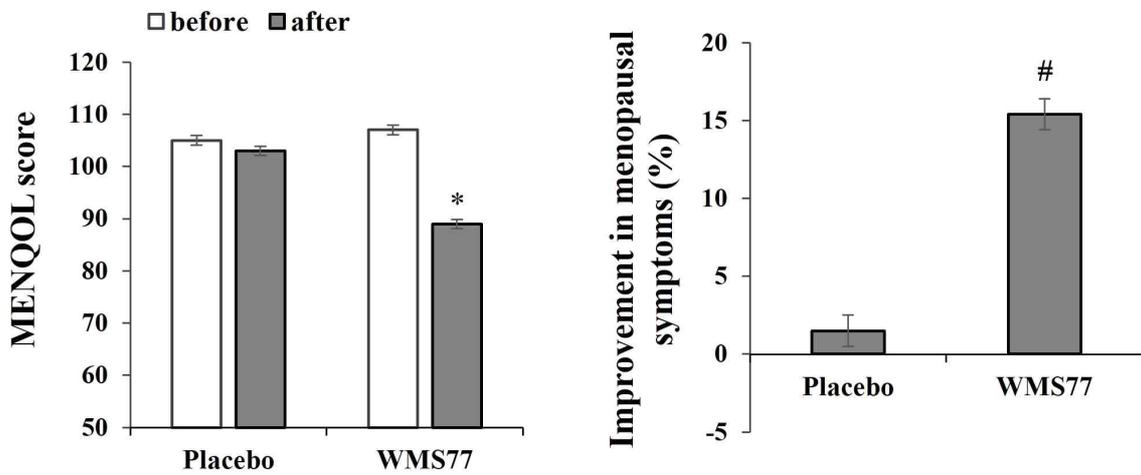


그림3-3-47. WMS77를 3개월간 꾸준히 섭취한 여성의 MENQOL 점수 개선

- 뼈건강 개선을 포함하는 MENQoL 여성갱년기 설문을 통해서도 전반적인 점수 개선 (증상 개선)을 확인할 수 있었으며 대조군 대비 WMS77을 지속적으로 섭취한 군은 약 15% 정도의 뚜렷한 증상 개선을 확인할 수 있었음.

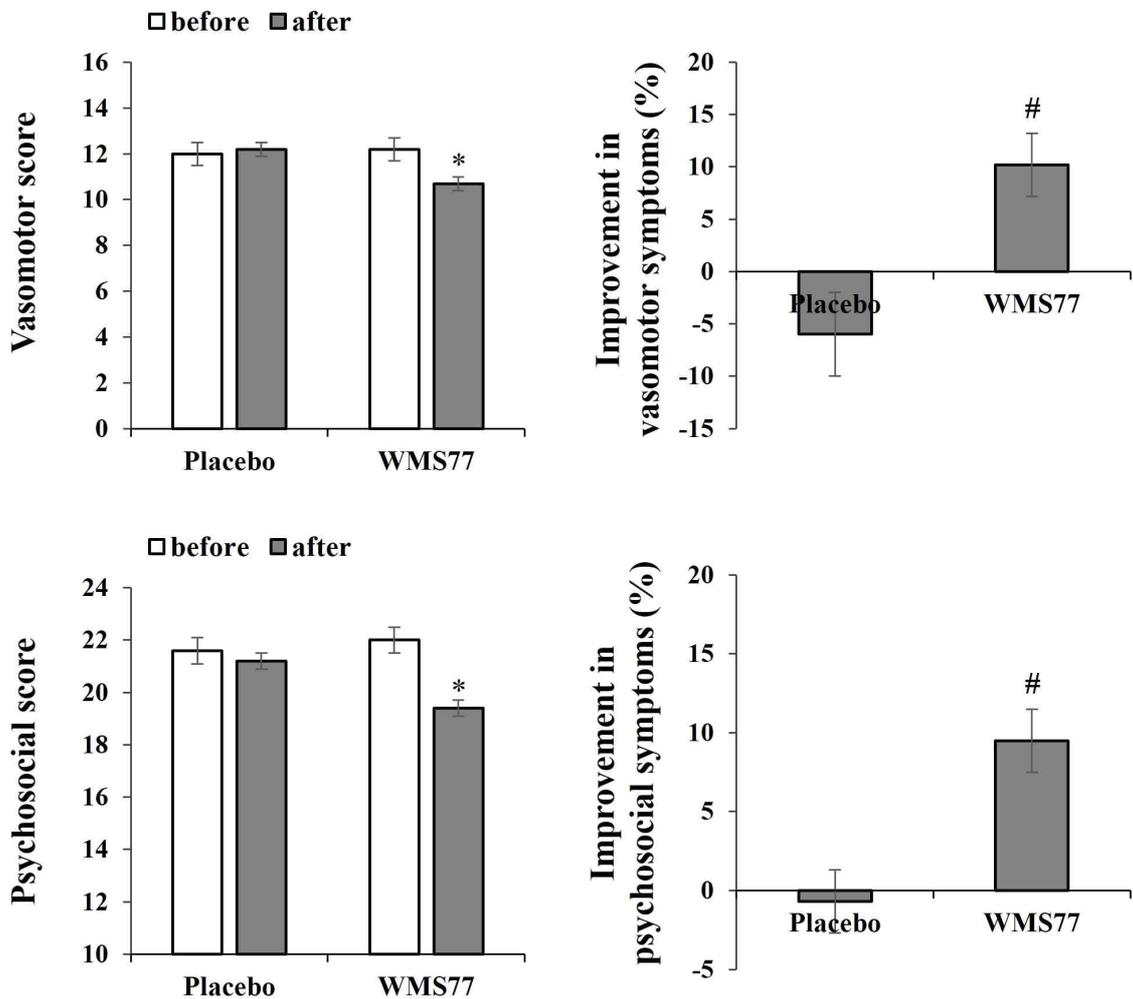


그림3-3-48. WMS77를 3개월간 꾸준히 섭취한 여성의 혈관운동신경증상 및 정신적 증상 개선

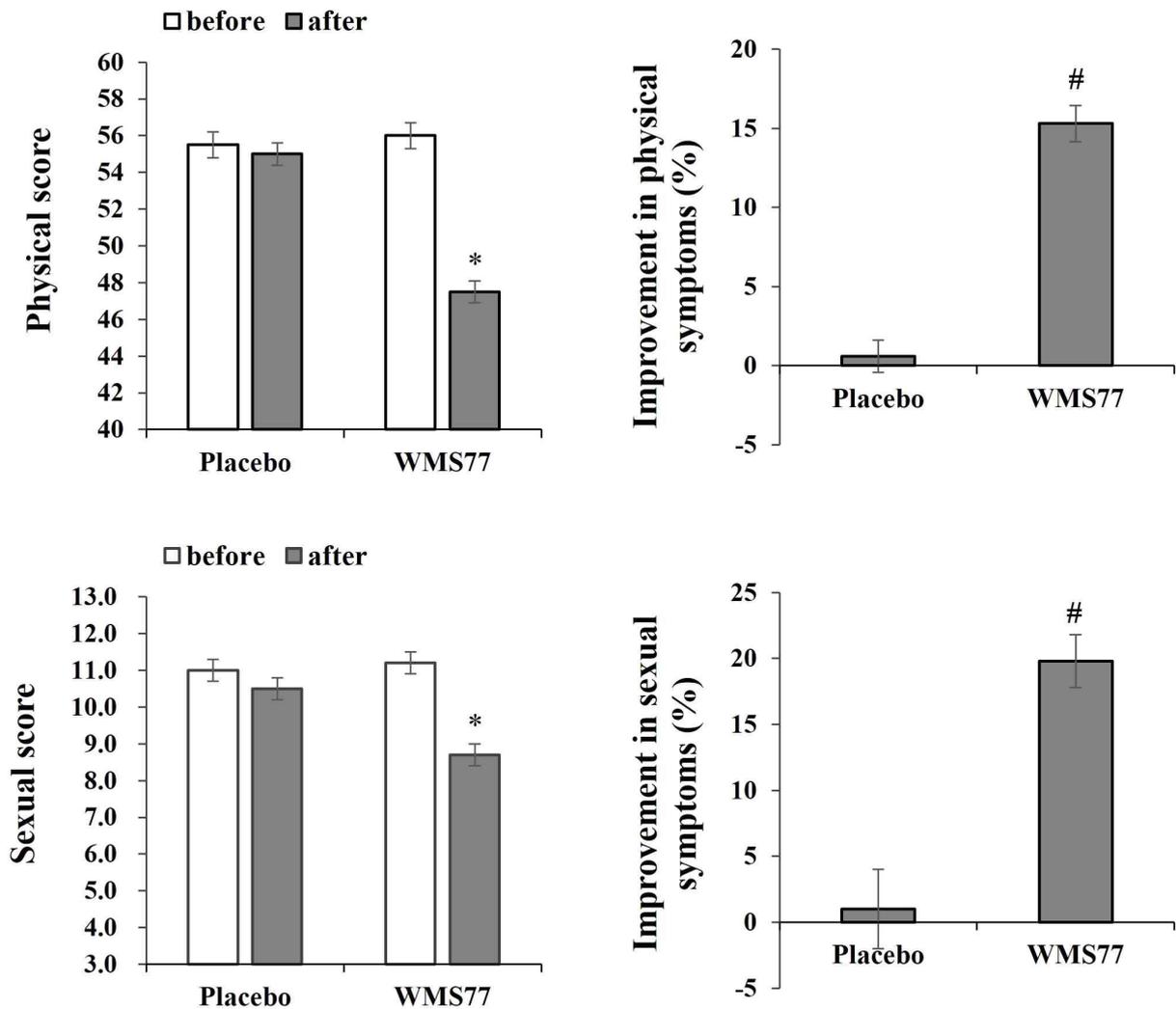


그림3-3-49. WMS77를 3개월간 꾸준히 섭취한 여성의 신체적증상 및 성적증상 개선

- 여성갱년기는 일반적으로 혈관운동신경 증상, 정신적 증상, 신체적 증상, 성적 증상으로 나누어 볼 수 있는데, 본 연구에서 WMS77의 섭취를 통해 각 증상별 개선 정도를 확인한 결과 전반적으로 증상들이 모두 개선되는 것을 확인할 수 있었음.

그림3-3-50. 여성갱년기 식의약소재의 추가 인체적용시험을 통해 300mg/day 섭취 실험

- 본 임상시험은 여성갱년기 예방 및 개선을 위한 천연 물질 개발 연구를 위한 시험으로, 만성 여성갱년기 환자에서 천연소재 WMS77 (영경귀와 타임 추출복합물)의 여성갱년기 예방 및 증상 완화에 대한 유효성을 입증하고자 수행함.
- 본 연구에 사용된 시험물질 WMS77은 천연물로서 한국식품의약품안전처에서 식품으로 사용 가능하다고 인정된 원료들로 이루어져있으며, 시험물질의 효능을 확인하기 위한 대조물질은 덱스트린(녹말 가수 분해물)으로 시험물질과 동일한 모양, 색상의 캡슐로 제작 하여 육안으로 시험물질과의 구별이 불가능하도록 제작하여 시료로 사용함.
- 임상연구는 2017년 8월부터 2018년 5월까지 약 9개월간 진행되었으며, 만 45세 이상 또는 여성갱년기 자각증상이 있는 45세 미만의 여성을 대상으로 모집하여 진행하였음. 총 4차로 진행되었으며 총 89명이 참여함. 인체적용시험은 연구 참여 대상자는 WMS77 투여군과 위약(덱스트린) 투여군 중 하나의 군에 무작위로 배정되도록 하였음 (1차 방문을 통해서 임상 시험 대상군을 분류하였음.)
- 2차 방문에서는 연구대상자에게 전반적인 임상시험에 대한 설명문을 배부하였으며, 연구참여 동의서를 작성하여 제출하도록 하였다. 초기검사 및 연구대상자의 선정/제외 기준 적합여부 판단을 위한 스크리닝

검사로서 신체검사(신장, 체중), 활력징후(혈압, 맥박수), 흡연력 조사 등의 기본적인 건강상태를 평가하고, 현재까지의 모든 병력(수술 포함) 및 현재 복용 중이거나 과거에 복용하였던 약물에 대한 조사를 시행하였다. 또한 여성갱년기정상의 정도를 평가하는 검사로서 자가 증상평가 설문조사(KI, MENQoL, PWI), 혈액검사, 소변검사를 실시하였으며, 4주 분량의 시험물질 혹은 대조물질을 배부함.

- 3차 방문은 1차 방문으로부터 4주후 진행되었으며, 연구대상자의 체중, 활력징후(혈압, 맥박수)를 평가하고, 전반적인 건강 및 효능 점검을 통한 공복상태에서의 혈액, 소변 검사를 시행함. 여성갱년기 증상정도 검사를 위한 자가 증상 평가 설문을 실시하여 2차 방문 이후 이상반응의 여부를 확인하였으며, 8주 분량의 시험 물질 혹은 대조물질을 배부하였음.
- 4차 방문은 3차 방문으로부터 8주후 진행되었으며, 연구대상자의 체중, 활력징후(혈압, 맥박수)를 평가하고, 전반적인 건강 및 효능 점검을 통한 공복상태에서의 혈액, 소변 검사를 시행함. 여성갱년기 증상정도 검사를 위한 자가 증상평가 설문을 실시하여 2차 방문 이후 이상반응의 여부를 확인하였으며, 연구 참여 종료 확인서를 작성하여 제출하도록 하였음.

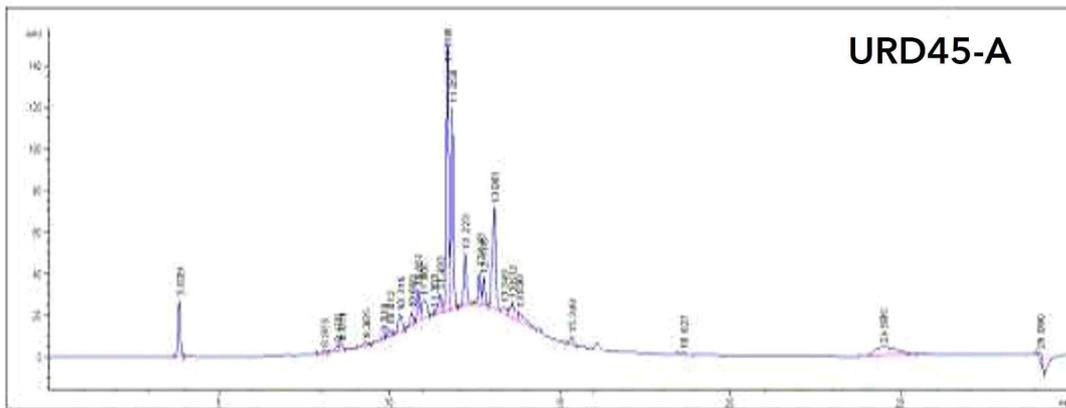
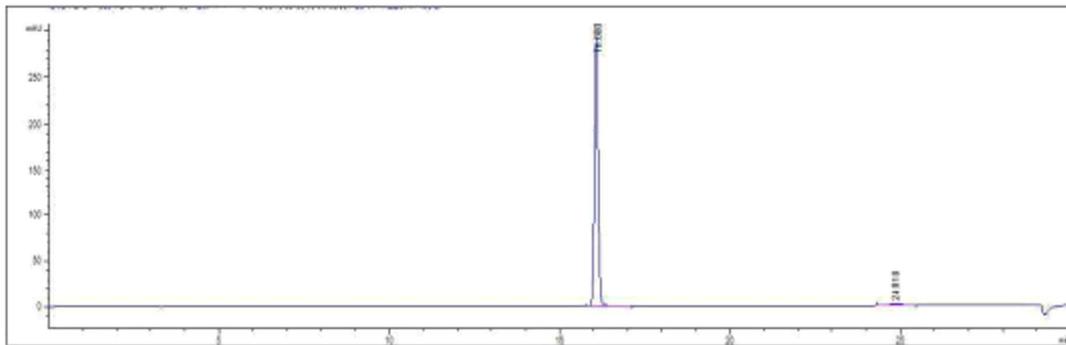
	1 차	2 차	3 차
복용기간	0 day	30 days	90 days
설명문 및 동의서	O	X	X
건강식품 배부	O	O	X
중요확인서	X	X	O
유효성 평가	Serum		
	Bone ALP		
	Osteocalcin		
	FSH		
	LH		
	Estradiol (E2)		
	Progesterone		
	Somatomedin-C (IGF-1)		
	Cortisol (CIA)		
	CTx		
	Bilirubin		
	AST (SGOT)		
	ALT (SGPT)		
	Creatinine		
	ET-1 (Human, Rat, Mouse)		
	NTx		
	Urine	Deoxypyridinoline	
	NTx		
그 외	자가증상평가 설문조사(KI, MenQoL, PWI), 혈압, 맥박수, 신장, 체중, 허리둘레		

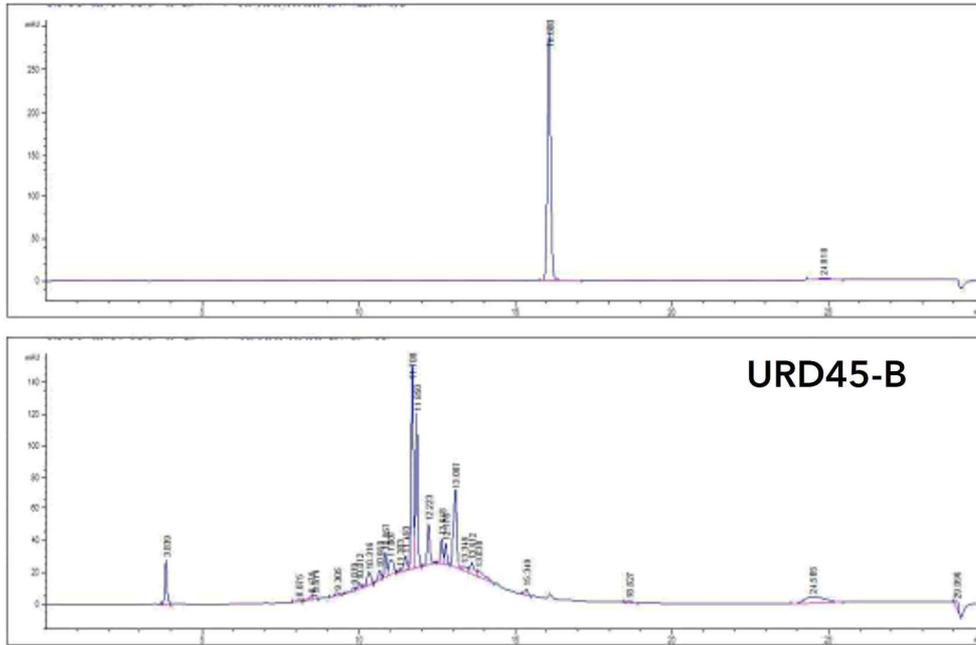
<유효성 평가 항목>

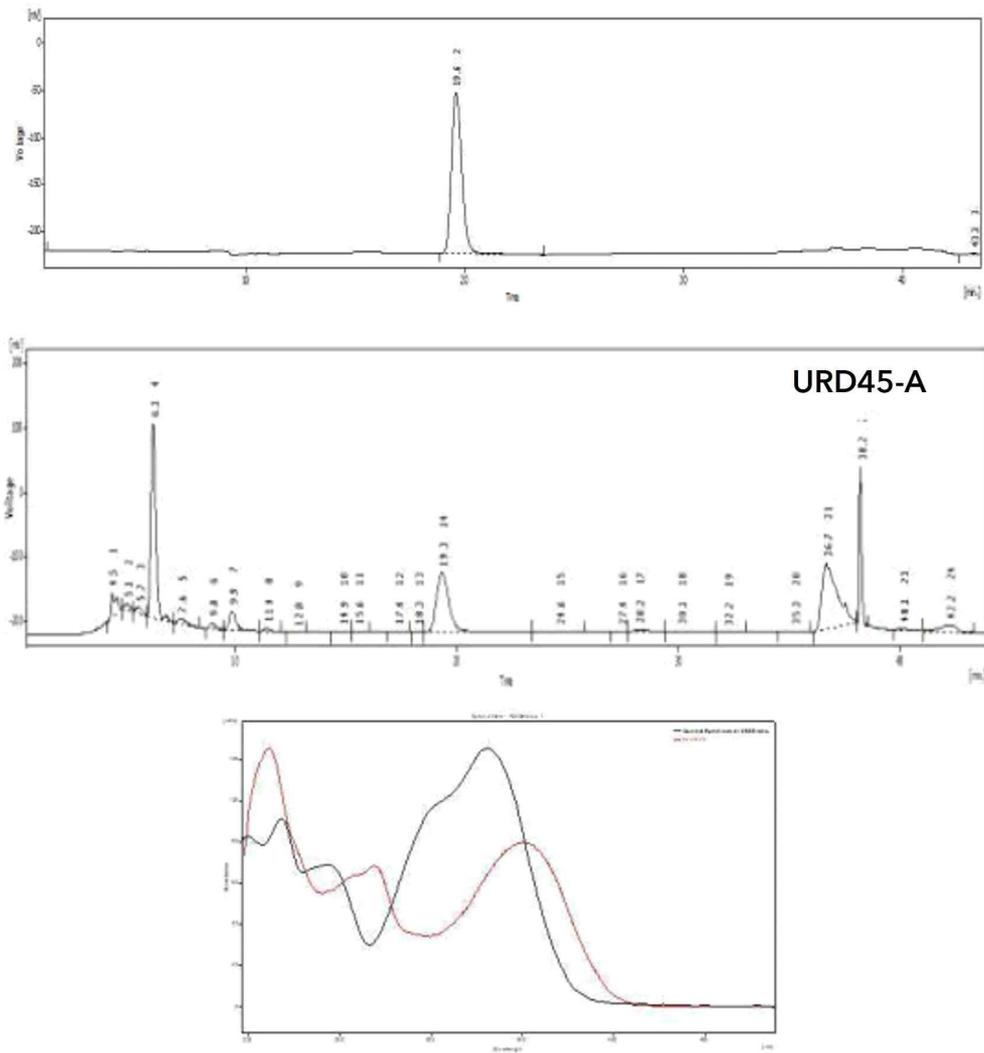
(B) 비뇨배뇨 건강 개선 소재인 URD45의 지표물질 탐색 분석 결과

• Luteolin 분석 검토 실험 결과

- URD 45-A 내 Luteolin 분석 결과

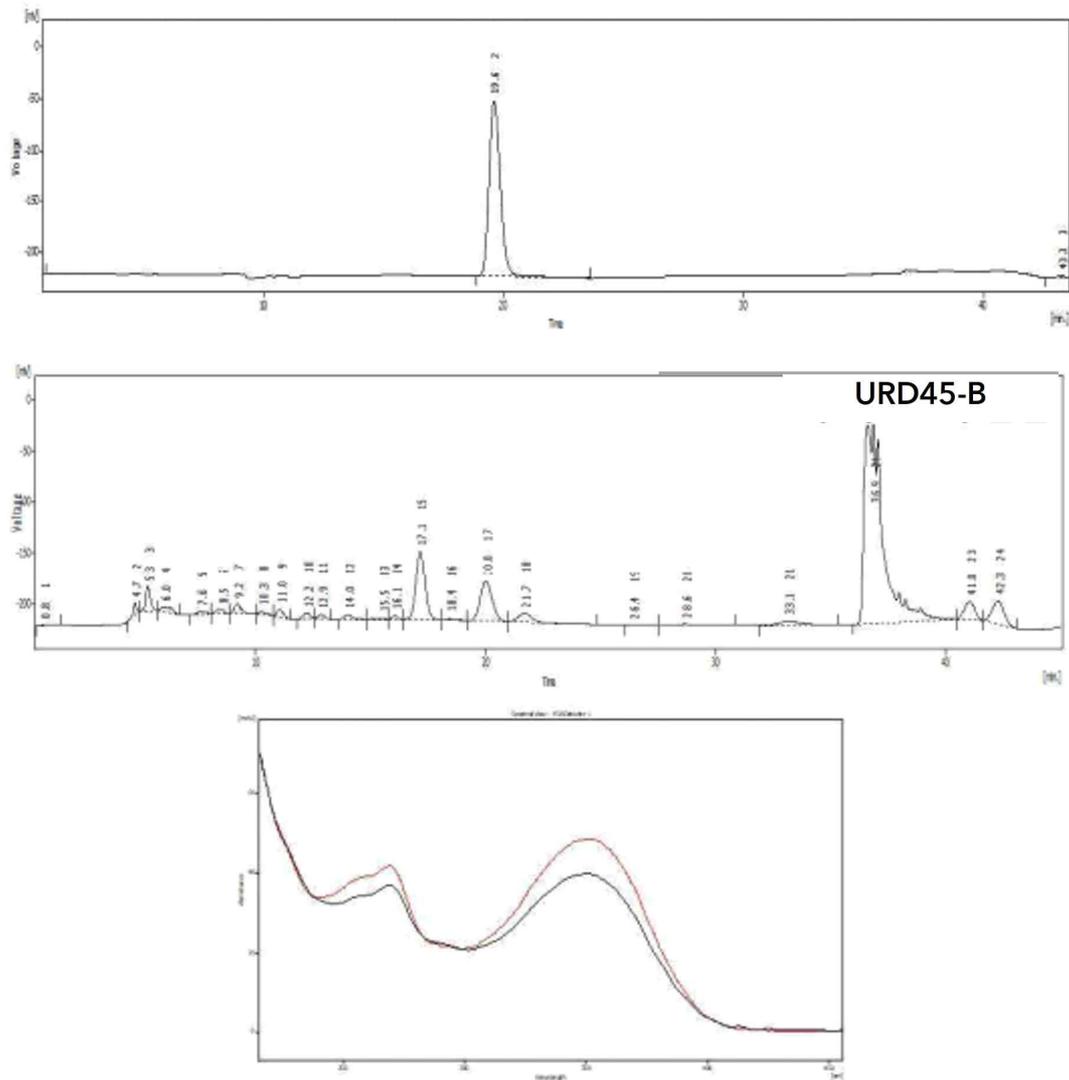






위 HPLC 분석결과와 같이 URD45-A와 Isoorientin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 URD45-A에 Isoorientin이 존재하지 않는 것으로 판단함.

- URD45-B 내 Isoorientin 분석 결과



위 HPLC 분석결과와 같이 URD45-B와 Isoorientin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치함. 이를 정량화한 결과, URD45-B에서 Isoorientin이 0.811mg/g 검출됨.

<여성갱년기 식의약소재의 일반식품 제품화 및 국제 박람회 홍보>



국내 생산 천연물을 활용하여 특허권이 확보된 식의약소재의 일반식품 제품화 4종 진행함. 위 제품은 유제품 및 물을 섞어서 식사대용으로 섭취할 수 있는 일반식품으로서 국내외 시장 진출을 위하여 일본 박람회에서 다양한 제품화 업체들에게 마케팅 진행함.

<전문가들을 대상으로 천연물 식의약 소재 산업화 교육 실시>





**<약용작물 재배 전문가-농민을 대상으로 천연물 산업화 교육>**

- 주기적으로 천연물 식의약 소재 산업화에 소재가 되는 약용작물 및 특수 기능성 작물의 재배 조건 등의 교육을 수행하였음.

**마. 5차년도**

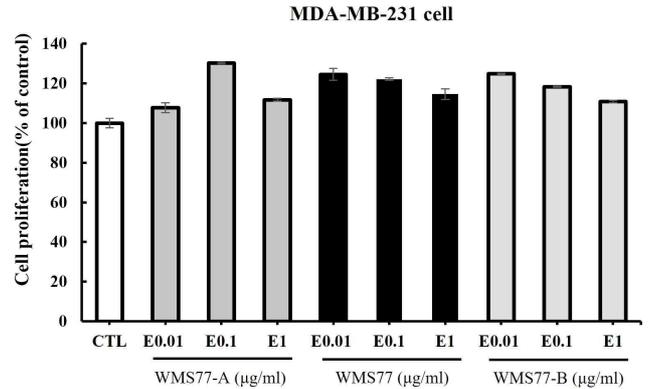
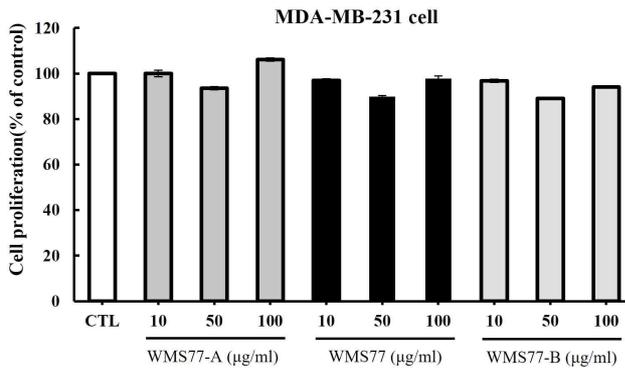
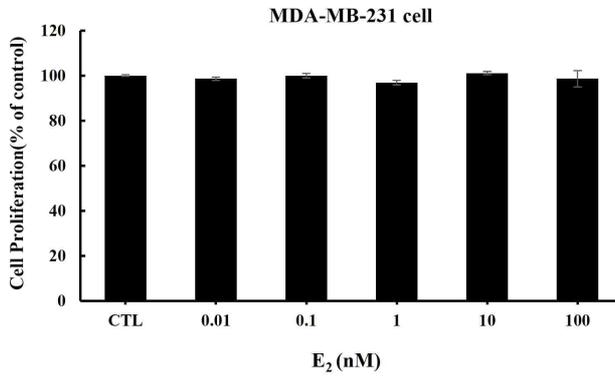
(ㄱ) 5차년도 연구목표

- 여성 건강개선 소재의 FDA-NDI 승인을 통한 해외 시장 진출
- 비노배노 개선 소재의 효능 평가 및 장단기 독성 평가
- 천연물 유래 신물질 분석 및 효능 분석

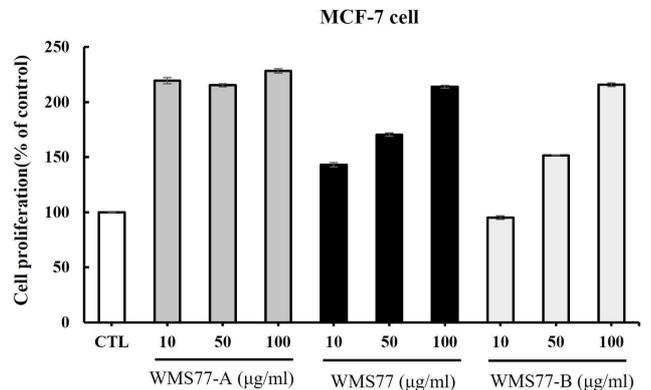
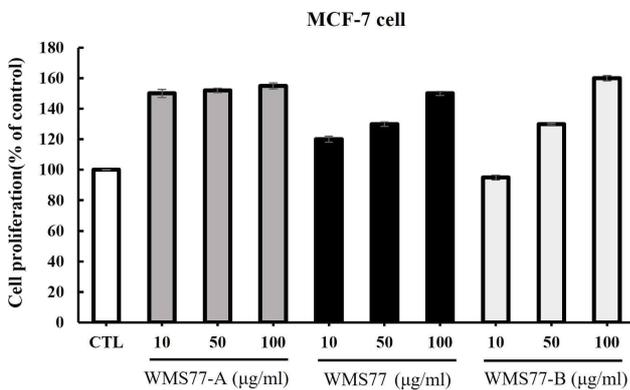
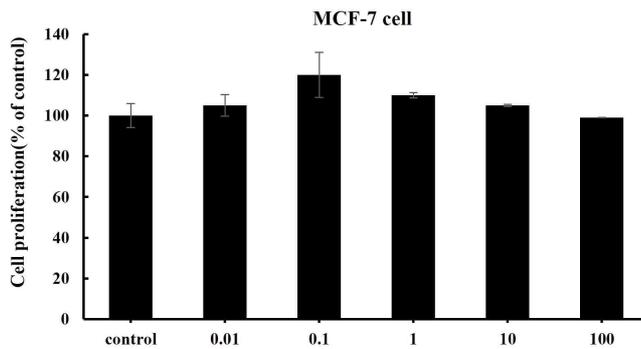
(ㄴ) 5차년도 연구개발 내용 및 성과

**(A) 국내 천연물자원 유래 소재 WMS77의 여성갱년기 개선 효능 검증**

- 여성 호르몬 수용체 음성의 세포주 MDA-MB 231을 활용한 WMS77의 안전성 검증 (유방암에 위험도 분석을 위한 안전성 검증)
- 인체 전이성 유방암 세포이자 ER 음성세포인 MDA-MB 231cell에서 호르몬인 에스트로겐에 대한 영향을 확인하고자 농도를 다르게 하여 처리한 결과 농도에 따른 세포 성장에 미치는 영향이 없음을 확인하였음. WMS77의 의한 세포성장을 확인하기 위해 처리한 결과 세포 성장에 영향이 없는 것을 확인하였음. WMS77과 에스트로겐을 함께 처리한 결과 낮은 에스트로겐 농도하에서 세포 성장률이 증가한 것을 확인할 수 있었음. 이를 통하여 WMS77은 에스트로겐의 대한 민감도를 증가시킴을 확인하였음.



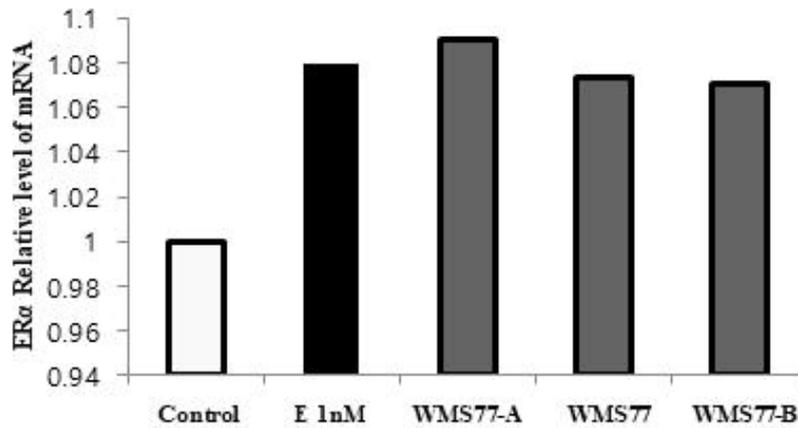
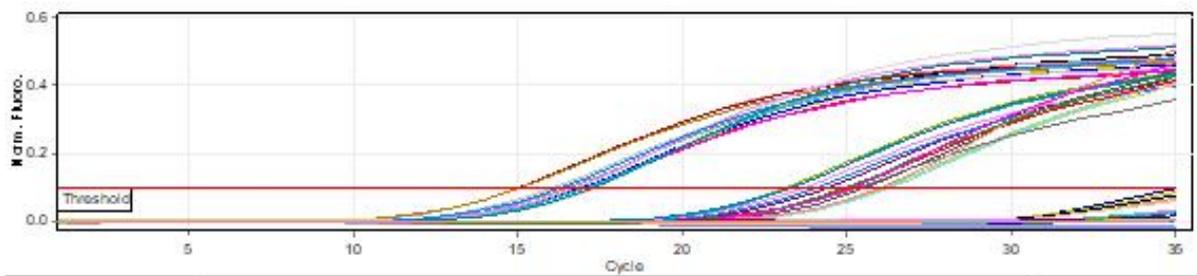
- 인체 유방암 세포이자 ER 양성세포인 MCF-7 cell에서 에스트로겐에 대한 영향을 확인한 결과 농도에 따른 세포 성장률을 확인하였음. 추출물을 단독, 복합으로 나누어 처리한 결과 모든 추출물이 농도에 따라 세포성장이 증가하는 것을 확인하였음.



- 유방암 세포인 MCF-7에 에스트로겐 및 ICI 182,780, 추출물을 처리한 결과 항에스트로겐의 대한 세포 증식은 없었으나, 에스트로겐에 의한 세포 증식은 ICI 182,780에 의해 저해되는 것을 확인하였음. 또한 WMS77과 항에스트로겐을 함께 처리한 결과 세포증식이 증가하였으며 이를 통하여 추출물내 포함된 에

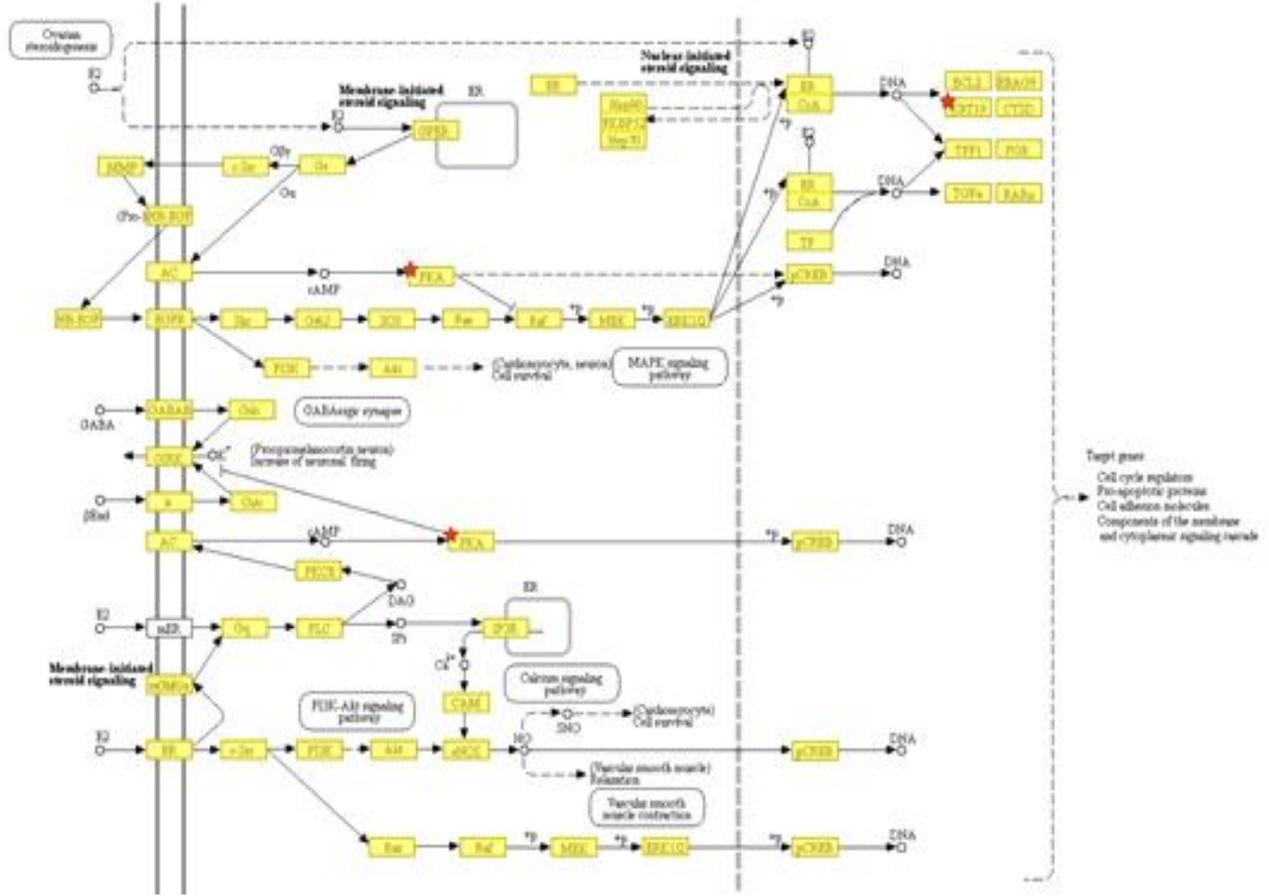
스트로겐에 의한 성장 외에 성장요인이 있음을 확인하였음. 에스트로겐 및 WMS77과 항에스트로겐을 함께 처리한 결과 세포 증식은 저해되지 않으며 세포 증식이 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 따라서 WMS77은 에스트로겐에 대한 민감도를 증가시킬 뿐만 아니라 세포의 성장을 증가시킴을 확인할 수 있었음.

- **qRT-PCR 수행:** MCF-7 세포에 estradiol 1nM, 엉경귀, 타임, WMS77을 24시간동안 처리하여서 여성호르몬 관련 유전자 estrogen receptor alpha mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 확인한 결과 estrogen receptor alpha가 추출물에서 더 많이 발현되는 것을 확인하였음.

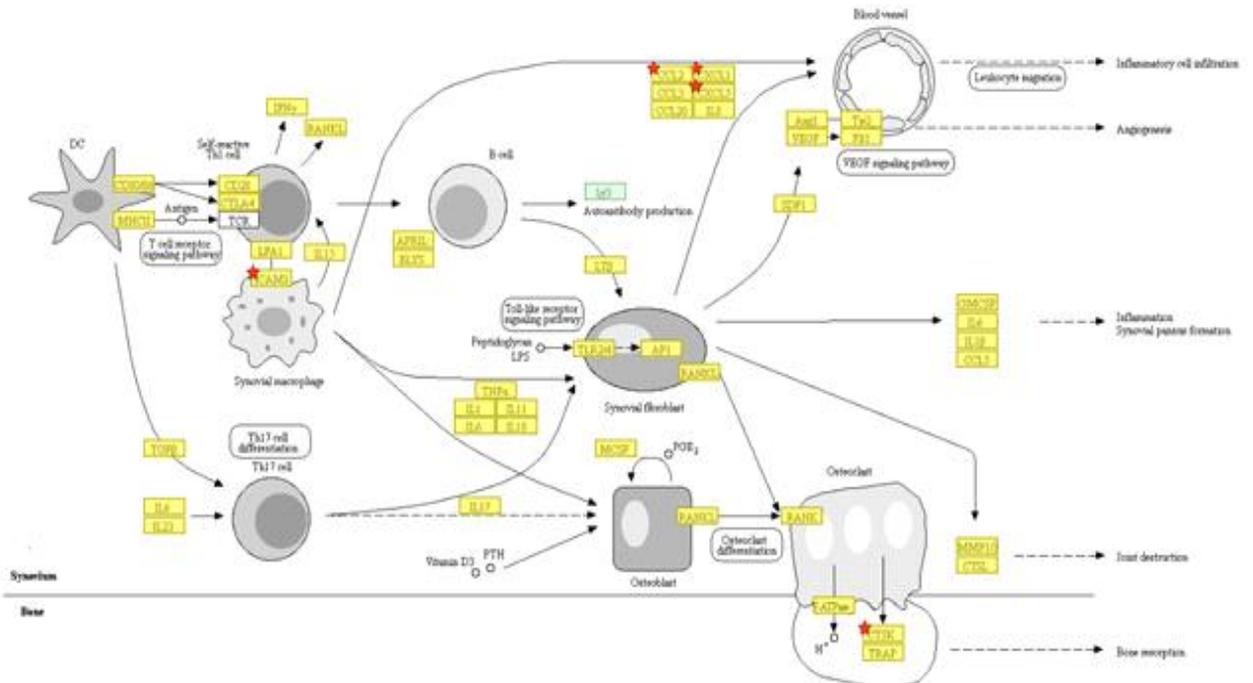


- WMS77 복합추출물의 microarray 수행

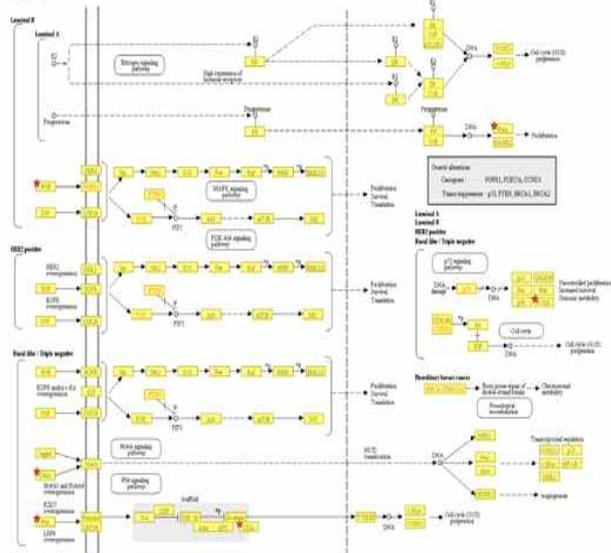
ESTROGEN SIGNALING PATHWAY



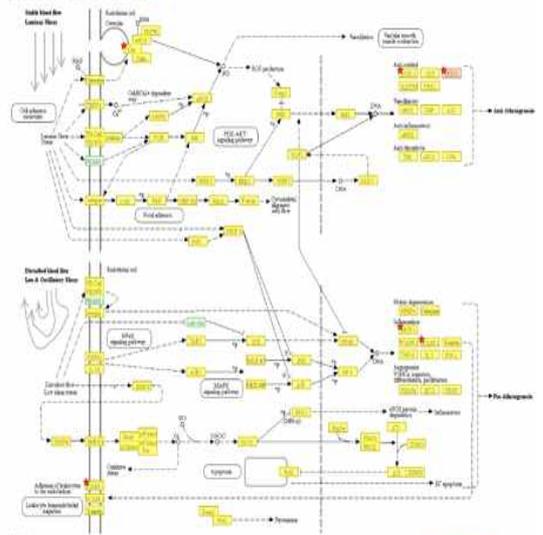
RHEUMATOID ARTHRITIS



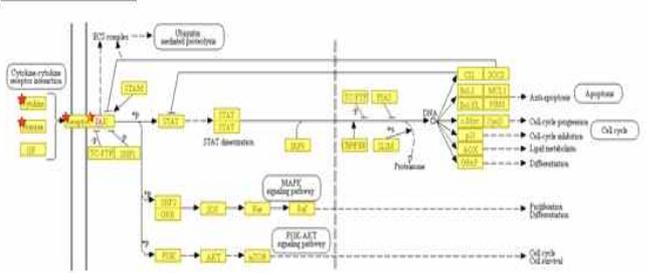
**BREAST CANCER**



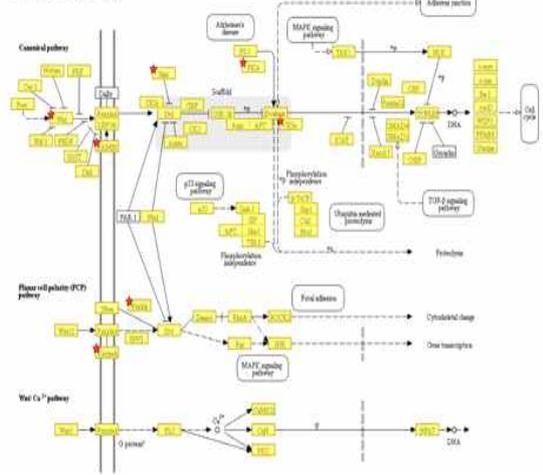
**PLATELET SIGNALING AND ADHERENCE**



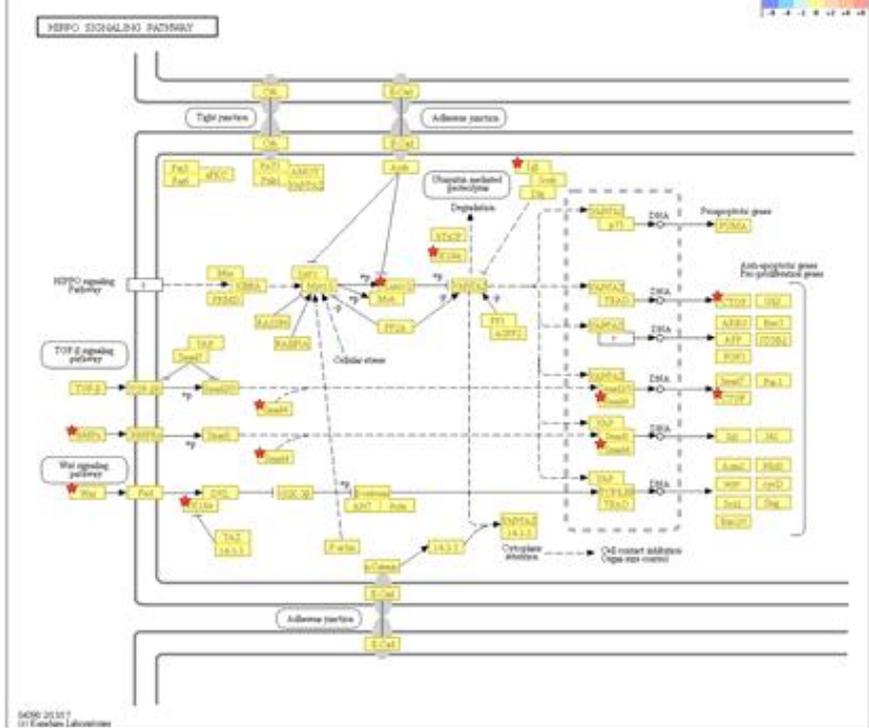
**MAPK SIGNALING PATHWAY**

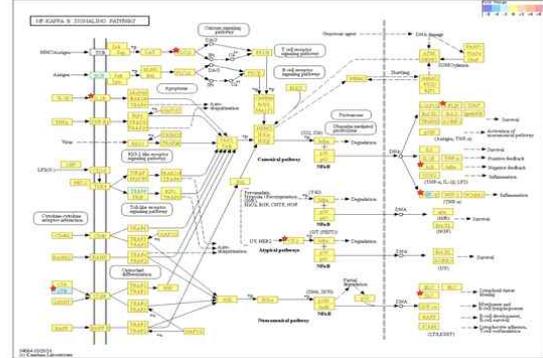
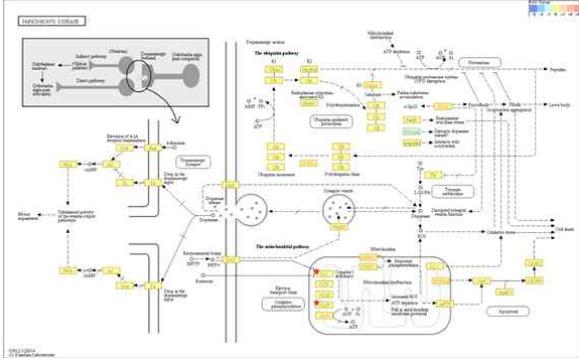
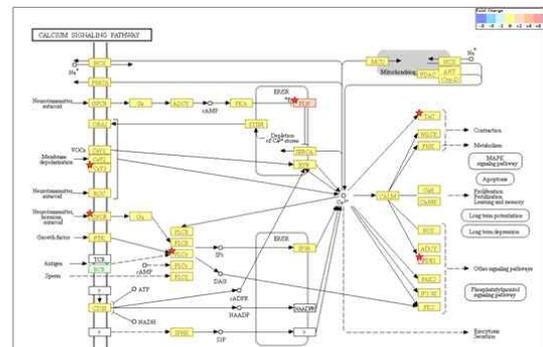
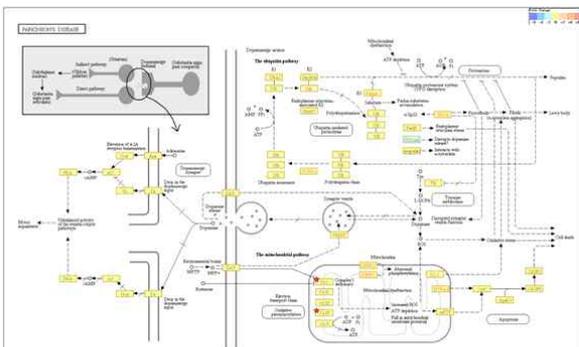
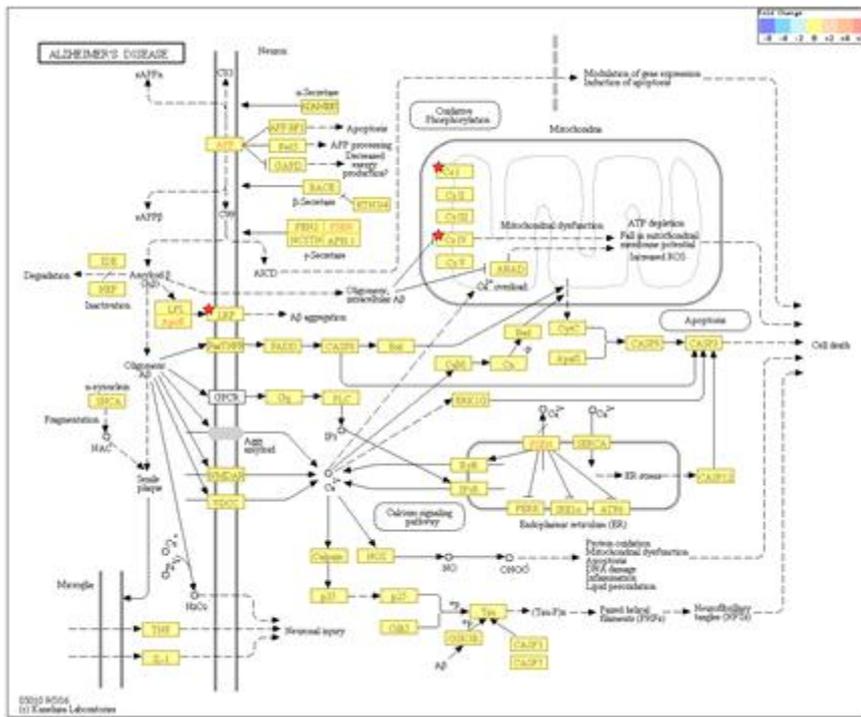


**WNT SIGNALING PATHWAY**



**HERP SIGNALING PATHWAY**

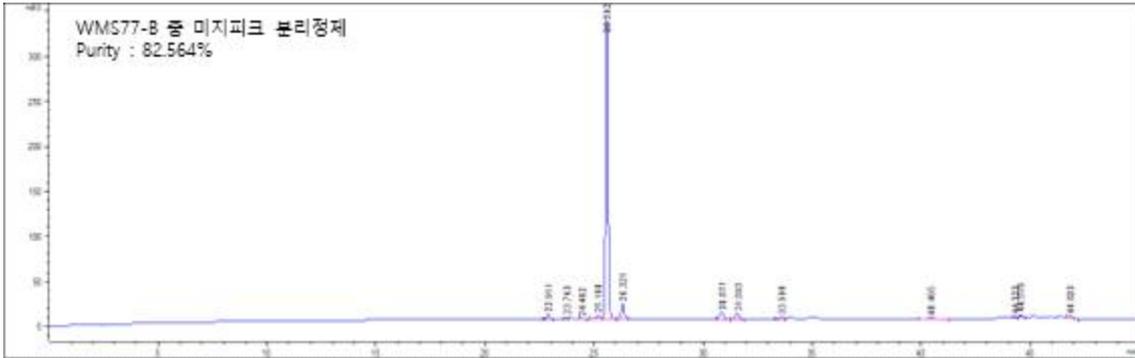




**(B) 신경세포 SH-SY5Y cell 및 SK-N-SH에서 WMS77 처리에 의한 유전자 변화**

- 전임상 연구 결과 신경세포인 SH-SY-5Y cell 및 SK-N-SH cell에 WMS77을 처리하여 대조군과 비교하여 15102개의 유전적 변화를 확인하였음. 유전적 변화를 확인한 결과 분자적 기능 수준에 있어서 약 15 개 이상의 유전자에 있어서 통계학적 유의미한 변화를 확인하였음.
- WMS77을 처리하고 24 h 지난 뒤에 세포의 증식과 분화 및 신호 전달 기전에 있어서 다양한 유전적 변화를 확인할 수 있었음.
- WMS77을 처리한 결과 SH-SY-5Y cell 및 SK-N-SH cell에서 세포성장을 확인할 수 있었음.
- WMS77은 천연 에스트로겐 함유 식물들과 달리 estrogen receptor 신호전달의 민감도를 증가시키며 뿐만 아니라 다양한 증식 분화를 통하여 여성갱년기 증상을 개선시키며 cancer관련 인자를 억제함을 유전자를 통하여 확인하였음.

(C) WMS77 중 WMS77-B의 미지피크 확인 분석



- WMS77-B 시료 중 unknown peak의 구조를 밝히기 위해서 시료에서 unknown peak만 분리·정제하였음.
- 최대한 분리·정제 후, NMR을 사용 하여 구조 분석을 수행하였음. 아울러, 분리·정제한 시료의 순도가 82.564%에 그쳐 NMR 분석 시 다른 물질 피크 때문에 데이터를 해석하기는 불가능 하다고 판단함.
- HPLC-Q-TOF-SPE-NMR을 사용하여 주입시료 중 소량은 Q-TOF로 보내 MS/MS데이터를 얻고 나머지 시료중에서 타겟 피크만 분리해 NMR에 주입시켜 분석하는 방법을 사용하였음.



1260 Infinity HPLC System  
(Agilent Corp., USA)

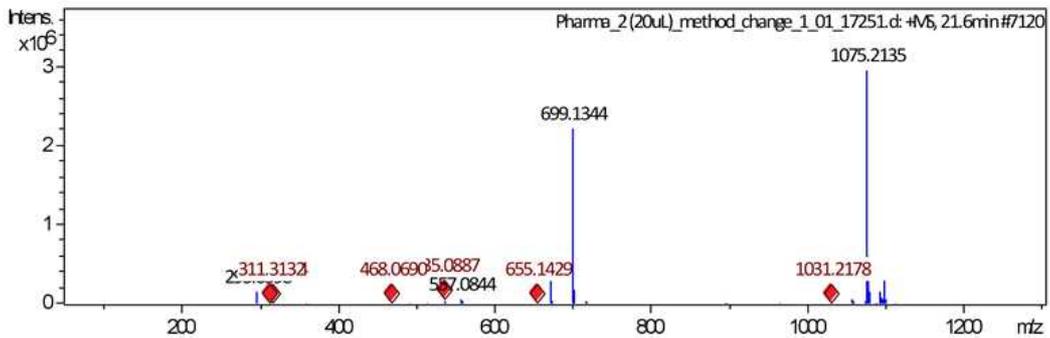
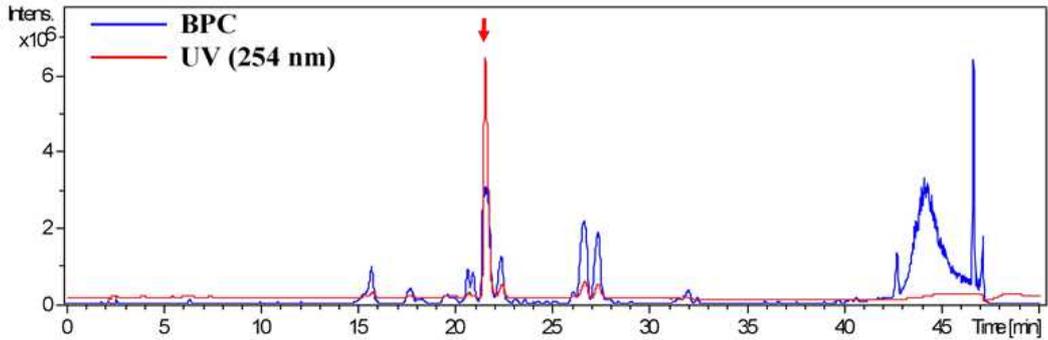


Solid Phase Extraction  
(SPE) System  
(Bruker Corp., Germany)



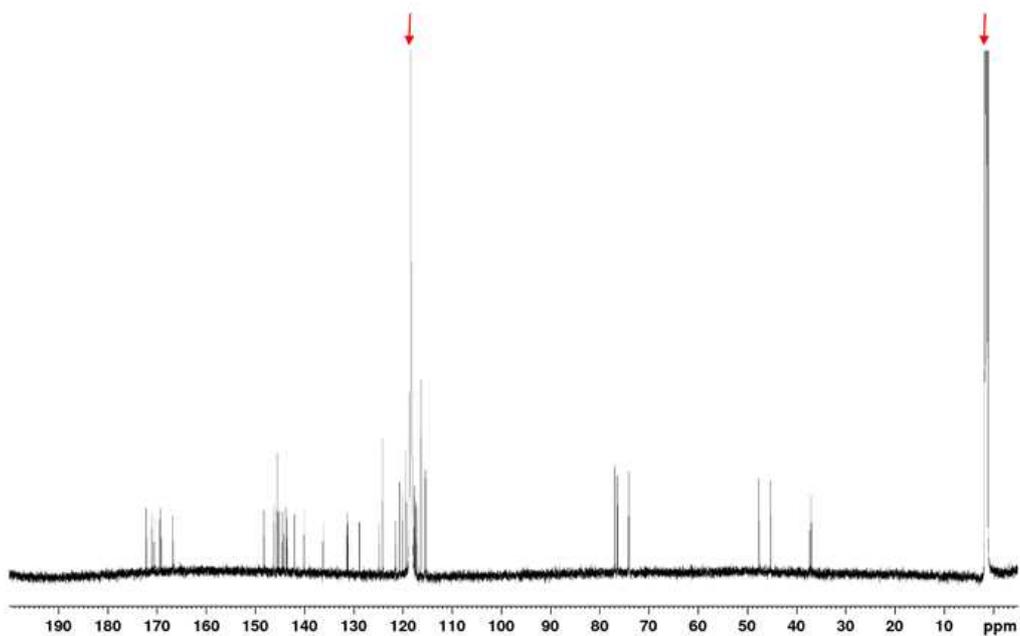
Cryo-800MHz FT-NMR  
Spectrometer  
(Bruker Corp., Germany)

■ HPLC 분석조건																												
Instrument:	Agilent HPLC Infinity system																											
Detector:	UV detector																											
Wavelength:	254 nm																											
Column:	Discovery C18 column 5 $\mu$ m SC-04 (250 x 4.6mm)																											
Column temperature:	35 °C																											
Injection volume:	20 $\mu$ L																											
Flow rate:	1.4 mL/min																											
Mobile phase:	Solvent A: 0.1% formic acid in ACN Solvent B: 0.1% formic acid in water																											
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Solvent A (%)</th> <th>Solvent B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>15</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>15</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>28</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>42</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>44</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>15</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>15</td> <td>75</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	0	15	75	7	15	75	28	30	70	40	60	40	42	90	10	44	90	10	45	15	75	50	15	75
Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)																										
0	15	75																										
7	15	75																										
28	30	70																										
40	60	40																										
42	90	10																										
44	90	10																										
45	15	75																										
50	15	75																										

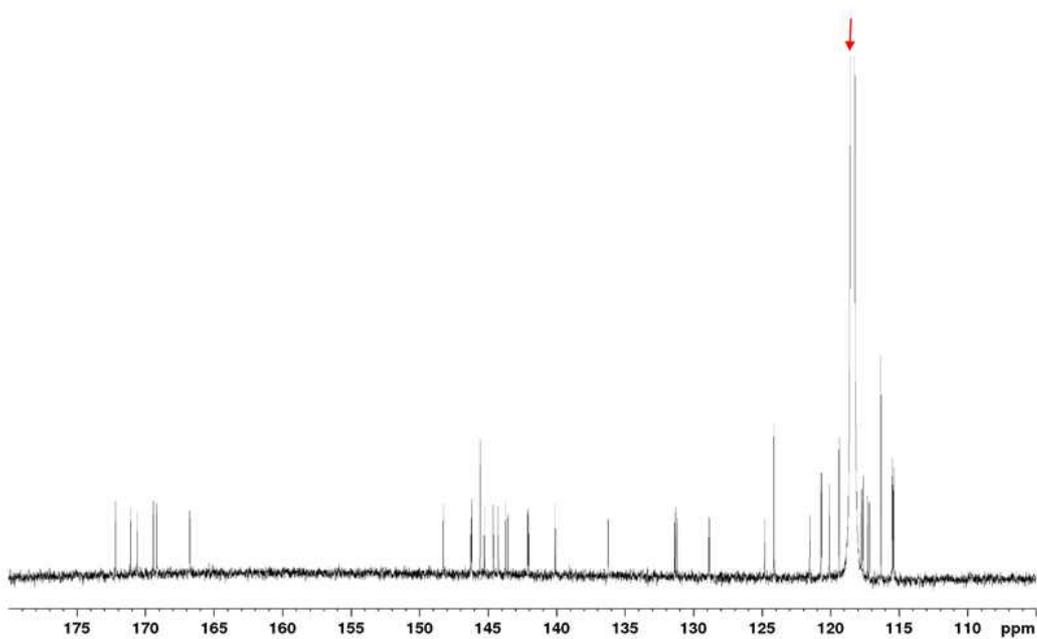


<HPLC 크로마토그램, MS/MS Spectrum>

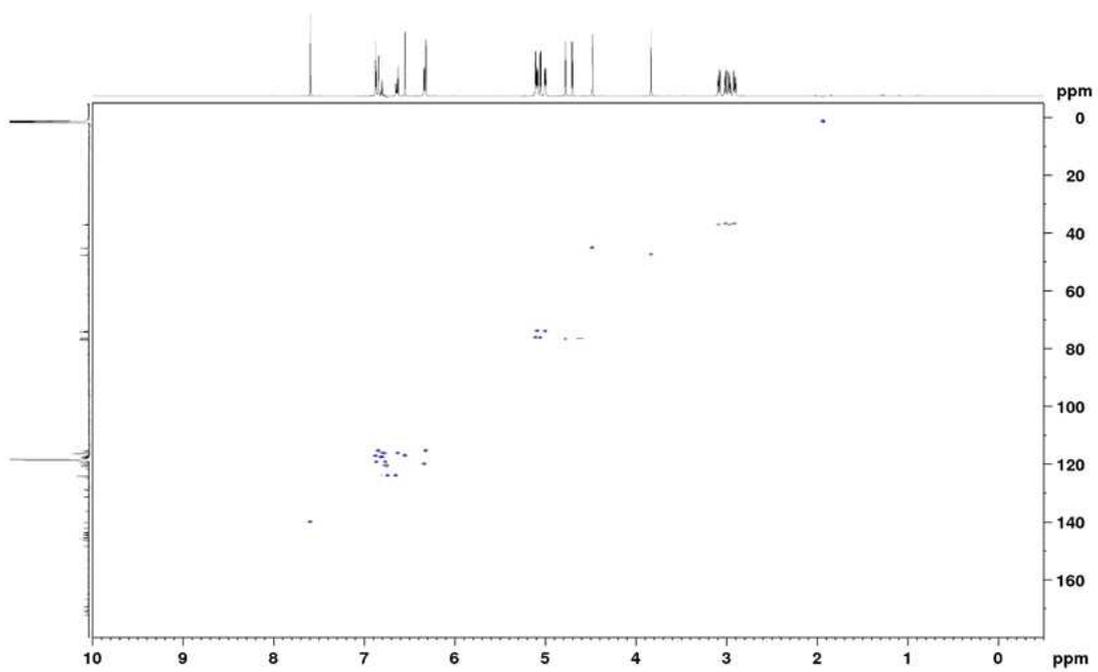




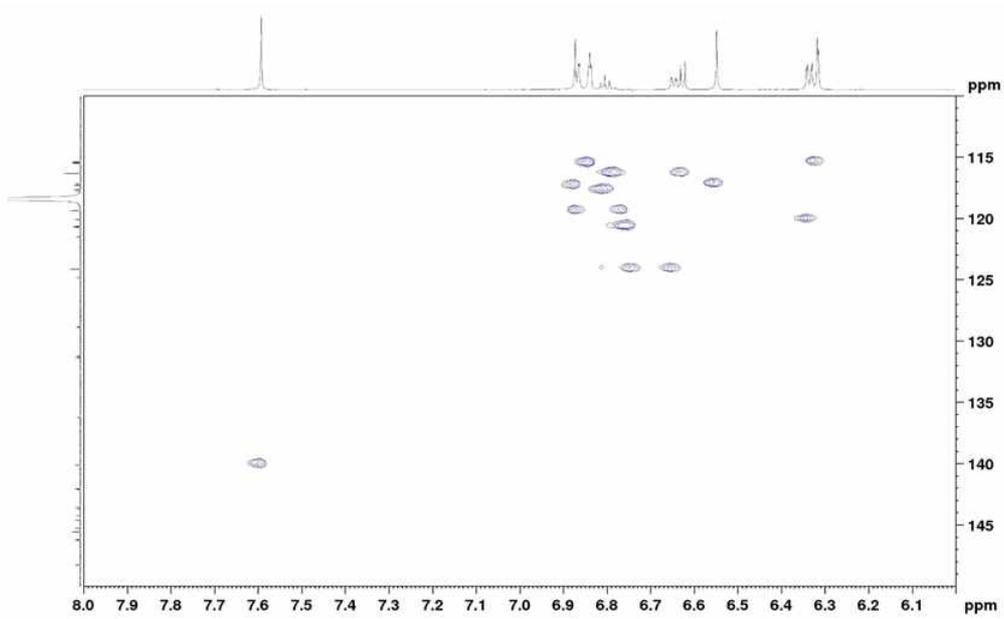
< $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum – Solvent peak 표시>



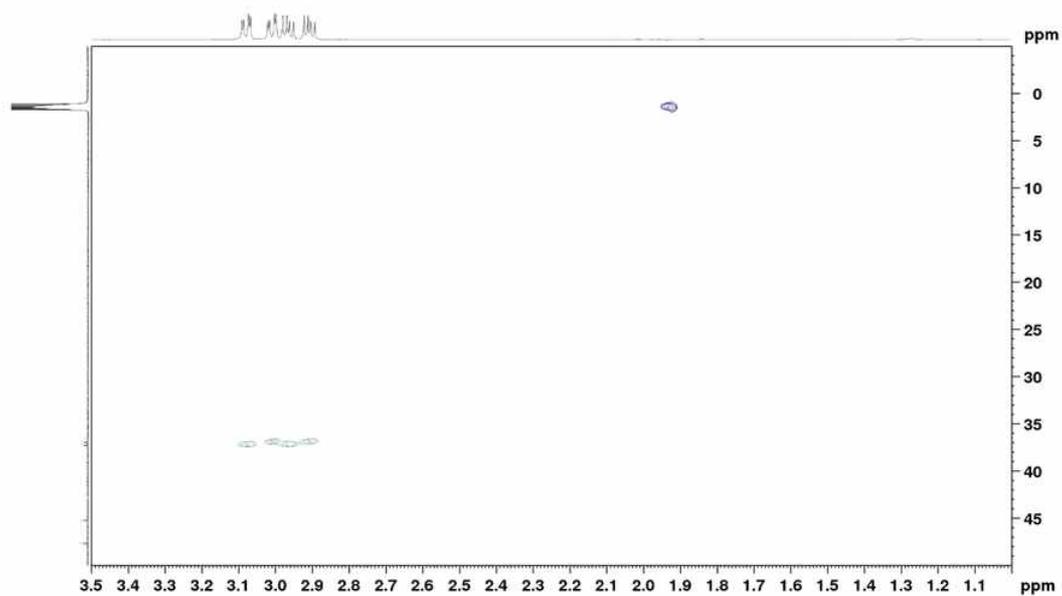
< $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum (2) – Solvent peak 표시>



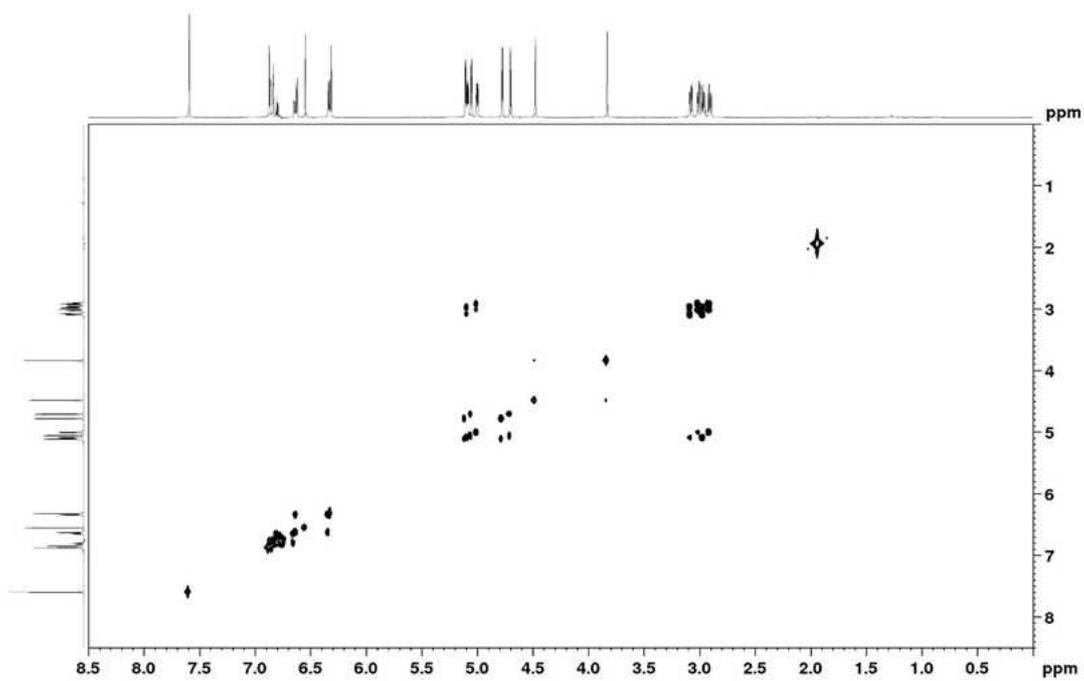
<HSQC NMR Spectrum>



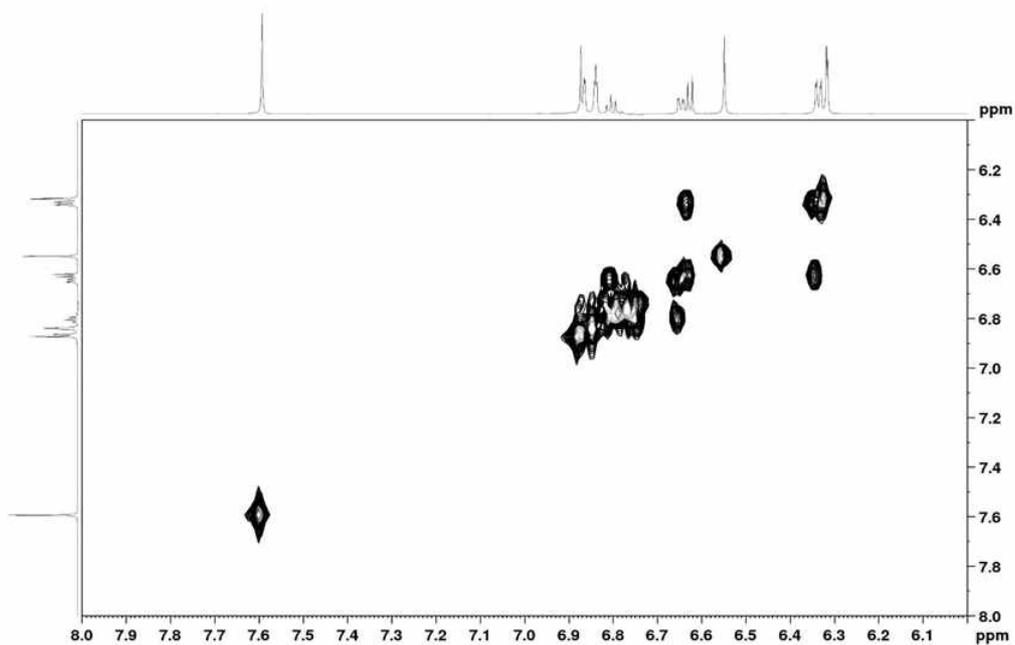
<HSQC NMR Spectrum (1)>



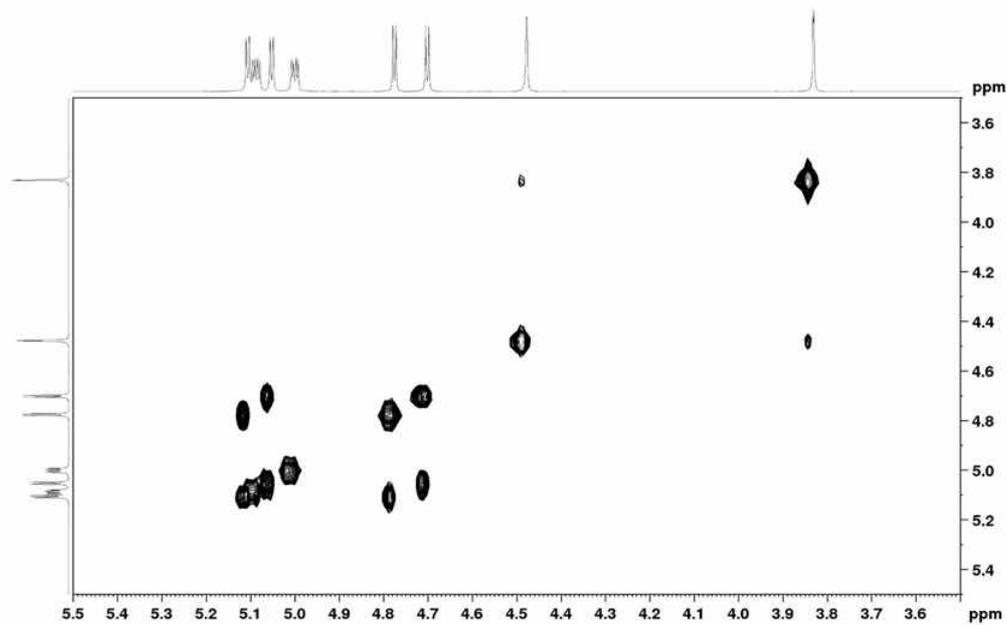
<HSQC NMR Spectrum (2)>



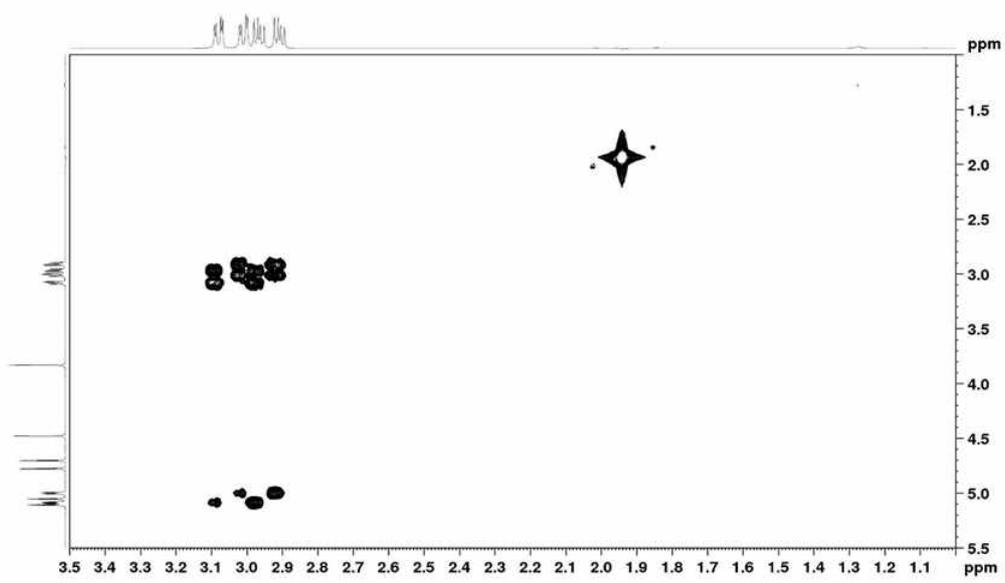
<COSY NMR Spectrum>



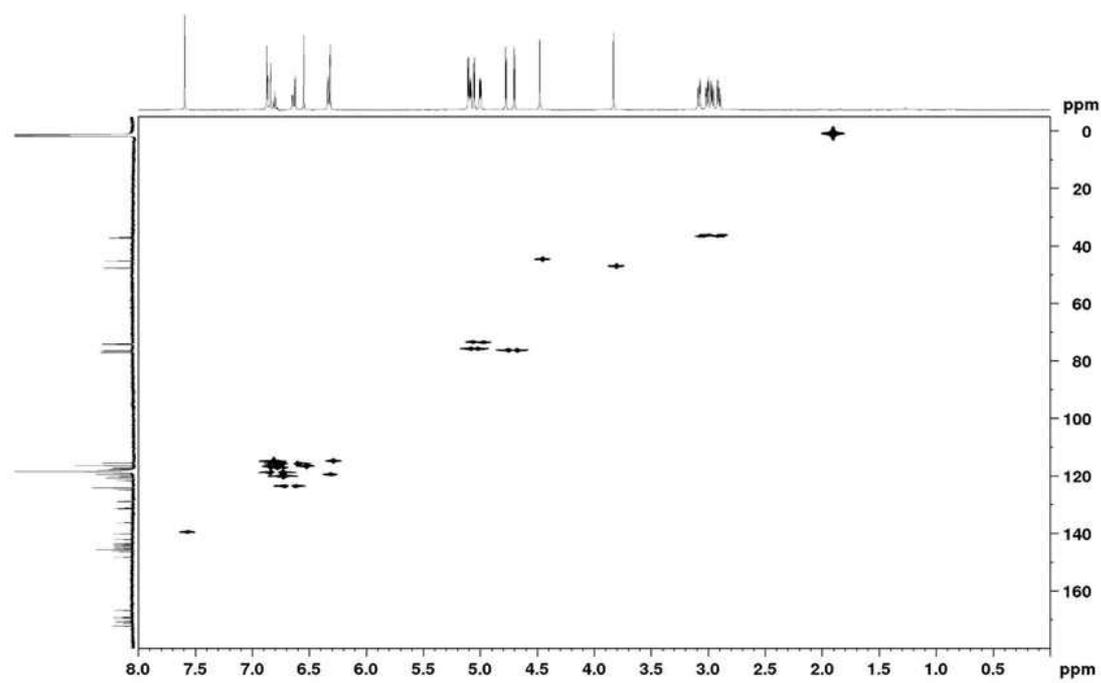
<COSY NMR Spectrum (1)>



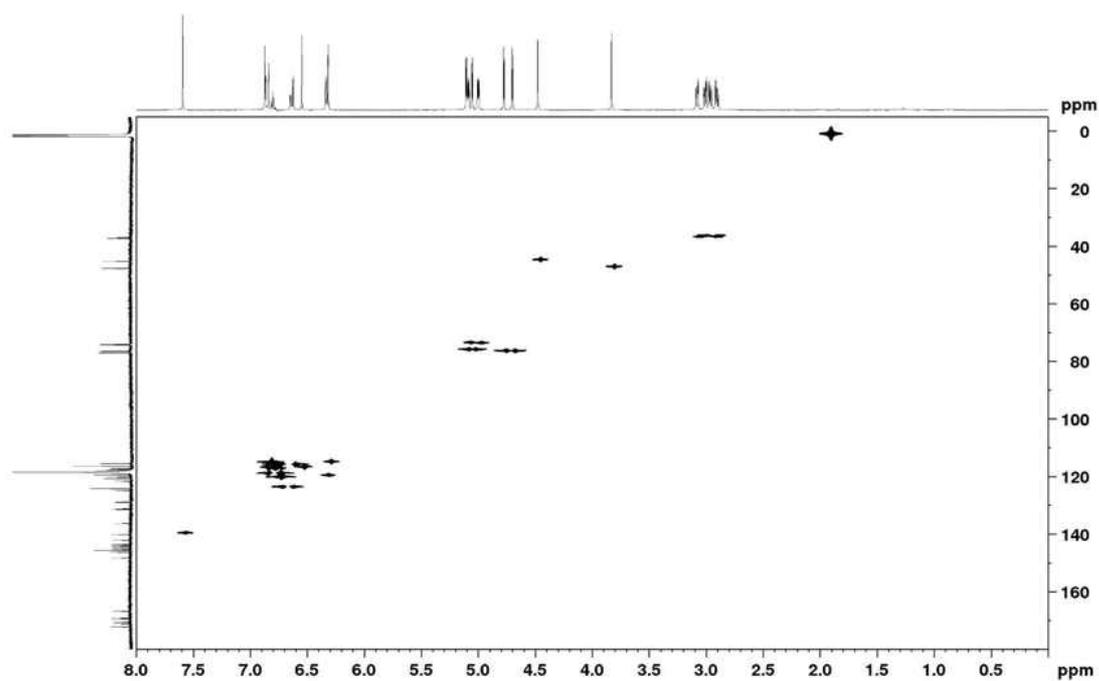
<COSY NMR Spectrum (2)>



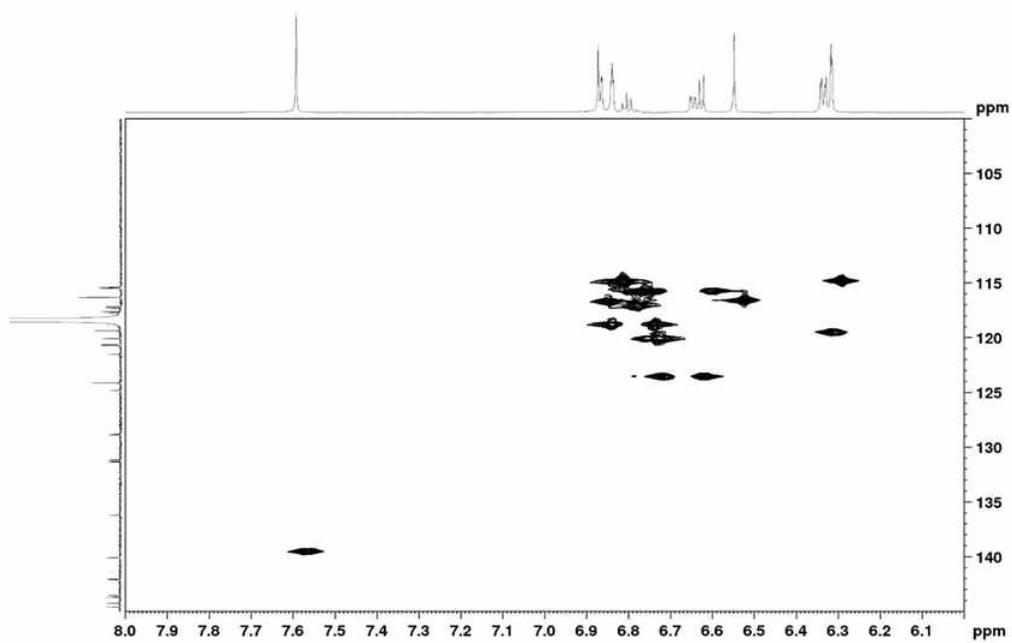
<COSY NMR Spectrum (3)>



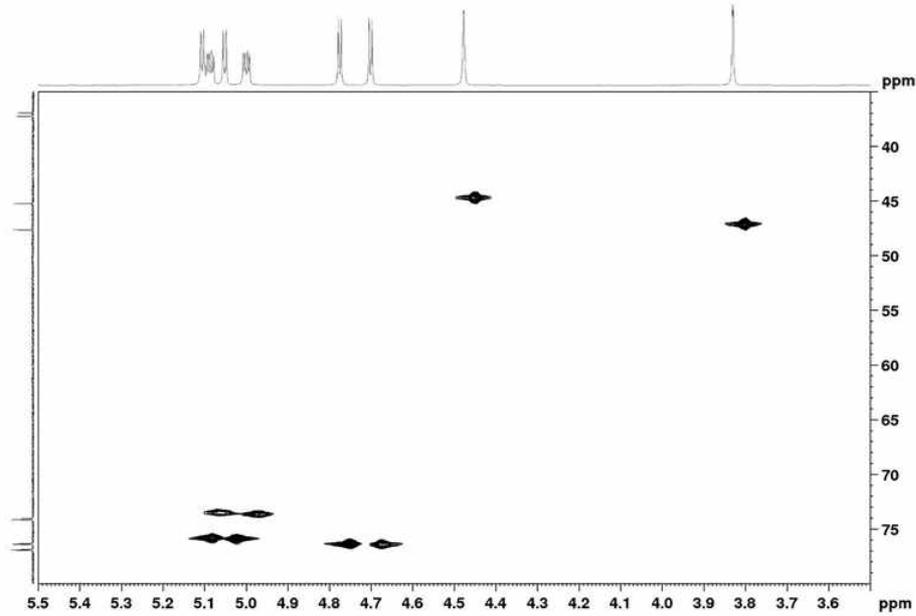
<HMQC NMR Spectrum>



<HMQC NMR Spectrum (1)>



<HMQC NMR Spectrum (2)>



<HMQC NMR Spectrum (4)>

**바. 6차년도**

(ㄱ) 6차년도 연구목표

- WMS77의 한국식품의약품안전처 건강기능식품 개별인정형 소재 신청 및 승인
- WMS77의 FDA-NDI 승인을 통한 해외 시장 진출
- URD45의 비노배뇨건강 개선 효능 평가 및 장단기 독성 평가
- 새롭게 밝힌 신규 물질의 구조 규명 및 가능성 규명
- 국내외 인허가를 통한 제품화 · 산업화

(ㄴ) 6차년도 연구개발 내용 및 성과

**(A) 여성 건강 개선 소재의 건강기능식품 기능성 원료 인정 완료**

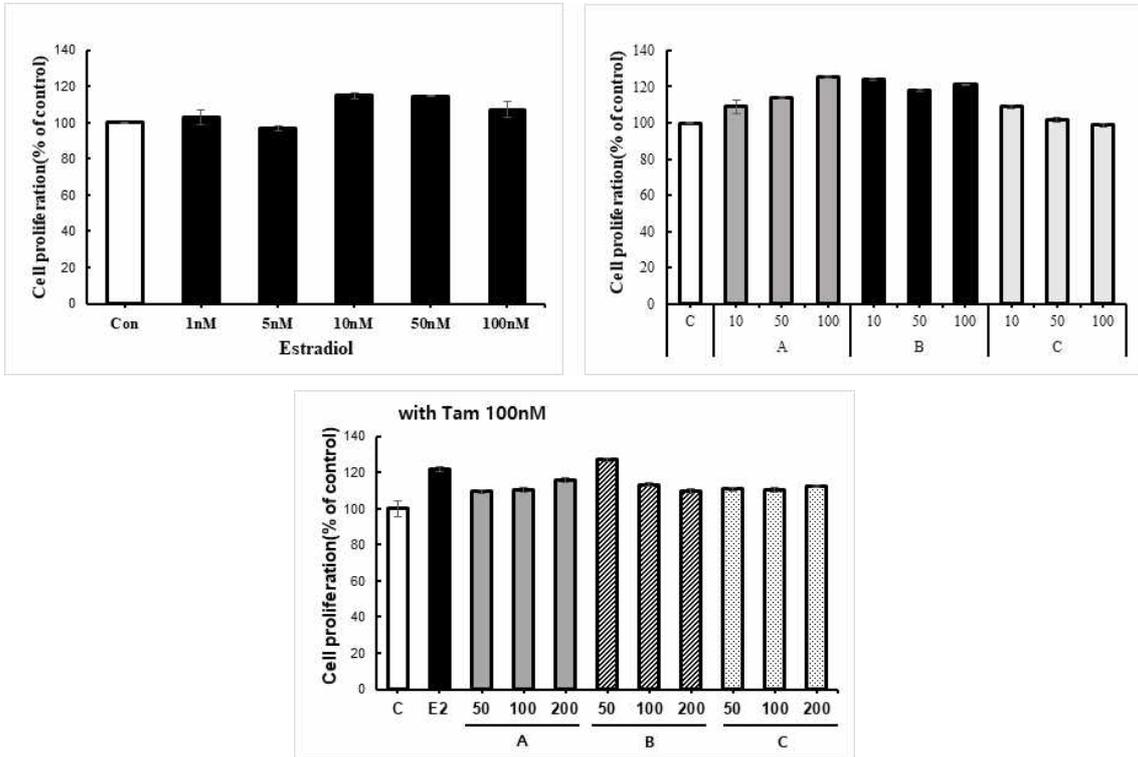
**접수증**

접수번호: 20190515442      접수일시: 2019.11.06

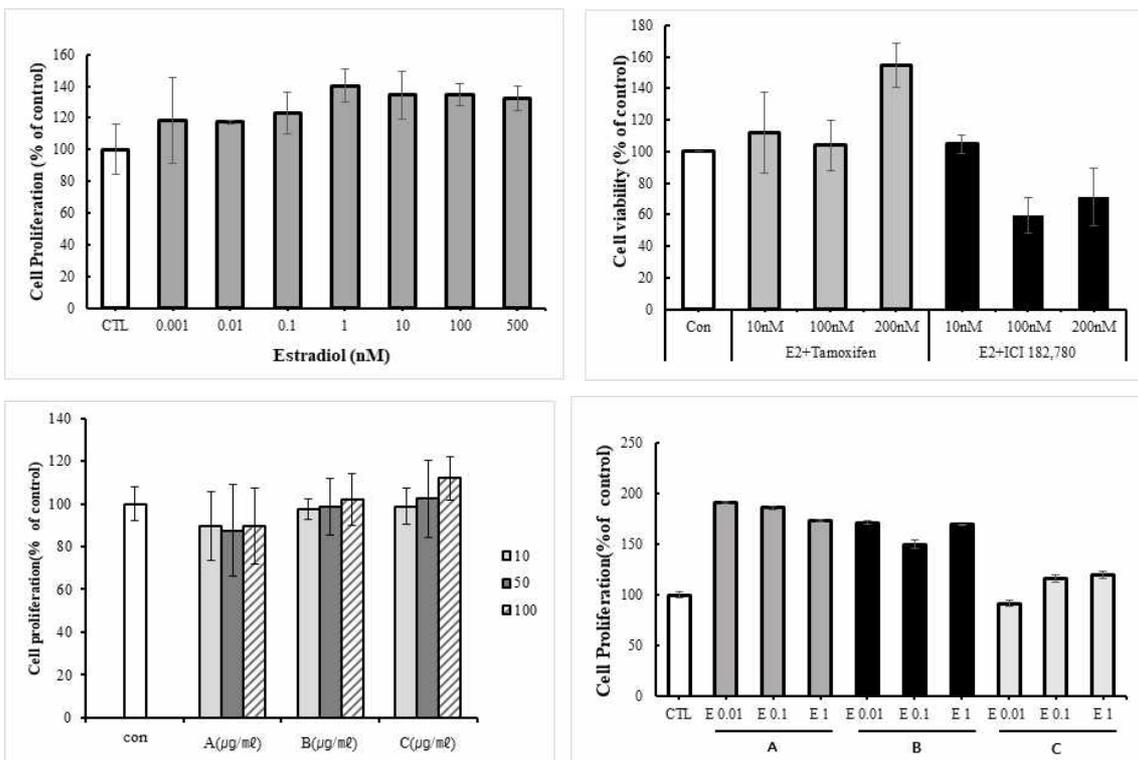
민원사무명	건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)
신청번호	6215962
민원인 (대표 또는 대리인)	<input type="text"/>
처리예정일	2020.04.22
처리주관부서	식품의약품안전평가원 영양기능연구팀(4)
안내사항	※ 방문수령의 경우에는 교부받고자 하는 민원실에 본 접수증을 제출하셔야 하며, 본인의 신분증 또는 대리인인 경우에는 위임장을 제시하셔야 민원서류를 수령하실 수 있습니다.
수수료	1,900,000

위 건명의 민원을 접수하였습니다.

(B) WMS77에 의한 여성갱년기 골강화 활성 효능 검증 결과

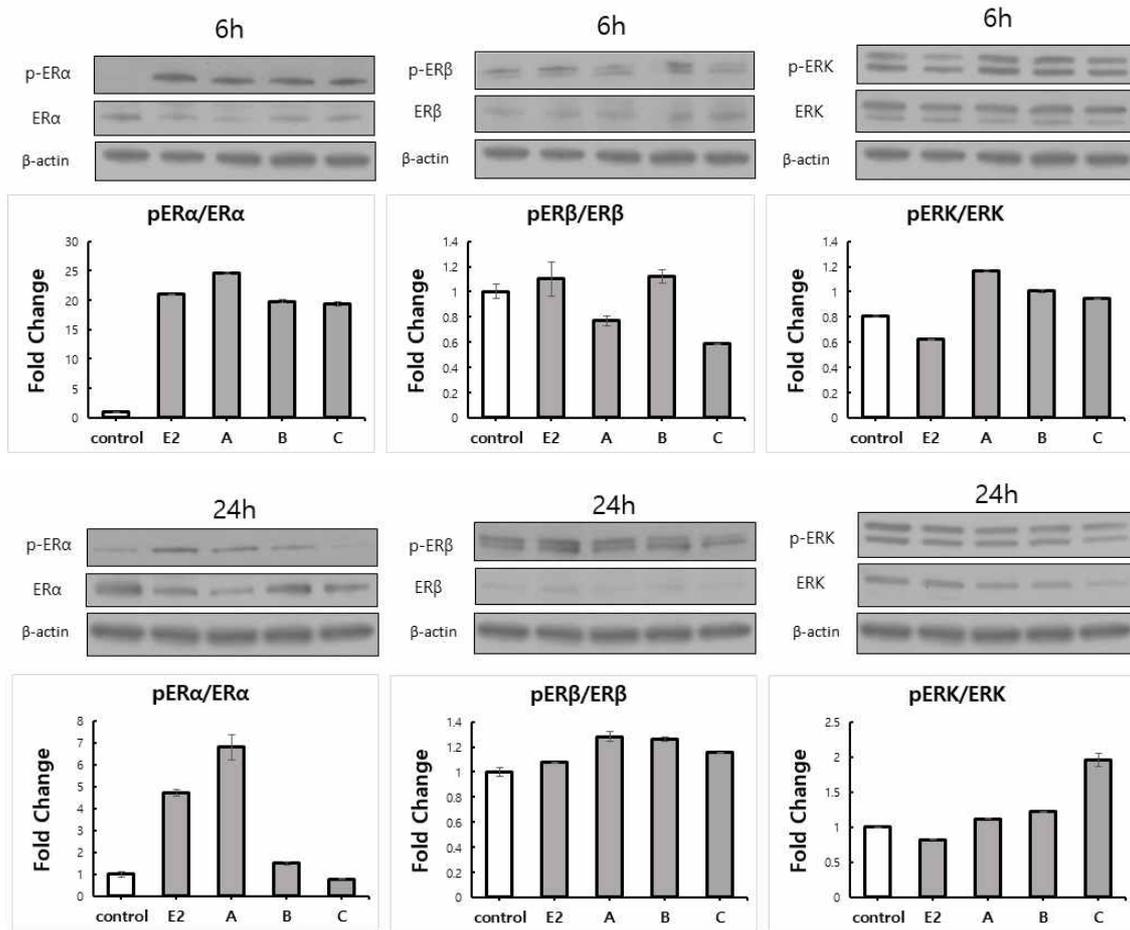


조골세포인 SAOS-2 세포에서 추출물인 WMS77 및 단독 물질이 골강화 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 WMS77 및 여성호르몬인 estradiol을 농도별로 처리하여 확인을 하였다. 조골세포인 SAOS-2에서 WMS77은 대조군과 비교하여 세포 증식이 유의성 있게 증가하는 것을 확인하여 본 WMS77의 골강화 활성 능을 확인 할 수 있었다. Estradiol 1nM을 처리한 결과 유의하게 골세포 증식이 증가하지 않는 것을 확인할 수 있었으며 저해제에 의한 세포 증식 에스트로겐을 처리했을때와 비슷한 양상을 보임을 확인할 수 있었음.

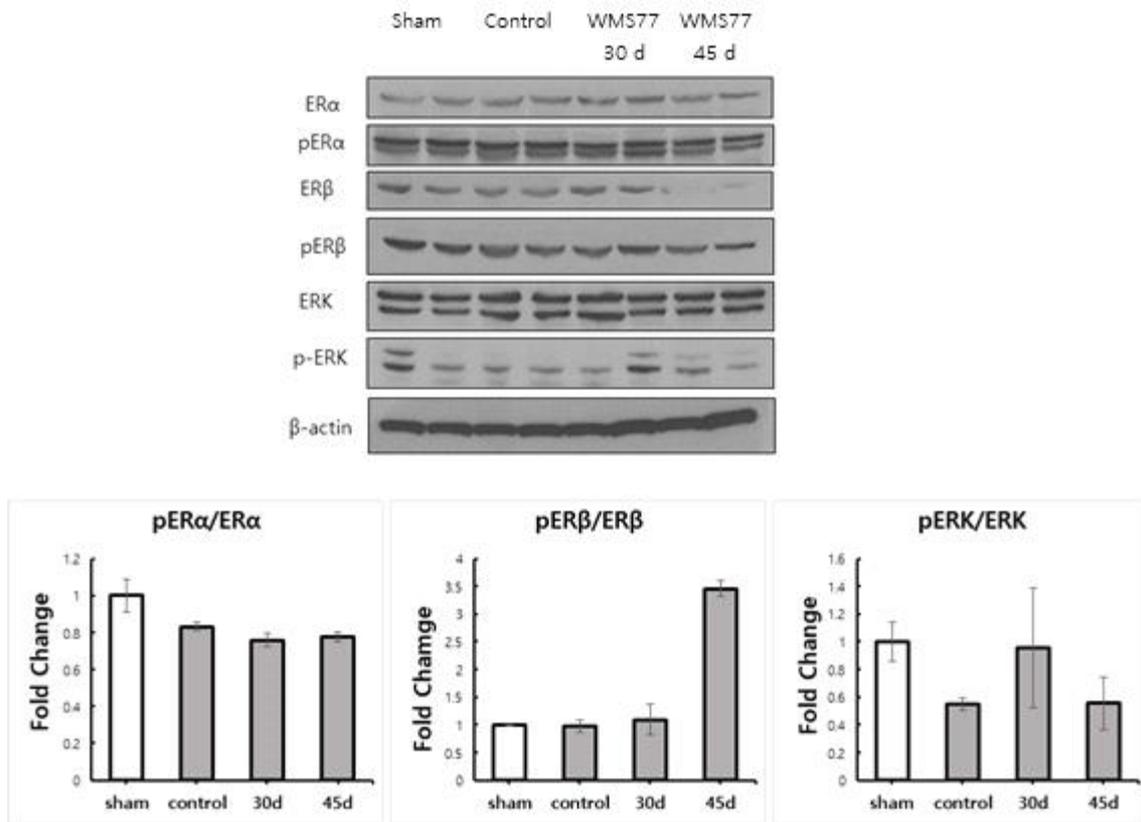


유방암 세포인 MCF-7 세포에서 CD-FBS를 통하여 호르몬 영향을 배제시킨 후 WMS77이 세포증식에 미치는 영향을 확인하였음. 여성호르몬인 에스트로겐 (estradiol, E2)의 농도에 따라 세포의 증식능이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 WMS77 처리에 따라서 세포의 증식능이 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 또

한 에스트로겐 존재 하에 WMS77에 의한 세포증식효과가 더 증가하는 것을 확인할 수 있었음.



유방암 세포인 MCF-7세포에서 WMS77의 처리 시간에 따른 estrogen receptor alpha와 beta의 발현량을 확인한 결과 WMS77을 처리할시 ERK의 발현량은 대조군인 control과 에스트로겐처리군과 비교하여 유의적으로 증가하고 활성을 띄는 것을 확인할 수 있었음. Estrogen receptor alpha의 경우 초반 6시간동안은 활성이 증가하나 24시간 후에는 활성이 사라지는 것을 확인할 수 있었으며 estrogen receptor beta의 활성은 지속적으로 유의한 차이를 보이며 유지되는 것을 확인할 수 있었음.



난소를 절제한 OVX 대조군, 30일 동안 투여한 군, 45일 동안 투여한 군의 자궁 조직의 estrogen receptor alpha와 beta 및 ERK의 발현량을 확인할 결과 estrogen receptor alpha의 경우 그 영향이 유의하지 않았으나 estrogen receptor beta의 활성이 45일동안 투여한 군에서 유의적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 ERK의 발현량도 대조군과 비교하여 30일 투여군에서 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었음.

### (C) WMS77의 설치류 2주 투여 DRF 시험 수행

- 본 시험은 WMS77을 Sprague-Dawley 랫드에 2주 동안 반복적으로 경구투여를 하였을 때 나타나는 독성을 조사하여 추후 진행할 반복투여 독성시험의 투여량을 설정하기 위하여 수행하였음.
- 시험물질 WMS77 1250, 2500, 5000, 10000 mg/kg/day 투여군과 멸균주사용수만 투여하는 부형제대조군으로 설정하였고, 그룹당 암수 각 5마리씩인 10마리를 배정하였음.
- 관찰한 항목으로는 사망을 포함한 일반증상, 체중 변화, 사료 및 물섭취량 산출, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검소견을 실시하였고, MS-10 투여군과 부형제대조군을 비교하였음.
- 일반증상을 관찰한 결과로는 모든 WMS77 투여군 동물에서 시험물질색 변이 4일 또는 6일째부터 부검일까지 관찰이 되었고, 체중변화, 사료 및 물섭취량, 안과학적 검사의 결과는 WMS77이 미칠만한 영향과 이상소견이 관찰되지 않았음. 요검사 결과에서는 2500 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 SG(요비중) 및 pH가 유의하게 증가하는 결과를 보였음. 혈액학적 검사 결과로는 WMS77에 의한 영향은 관찰되지 않았으나 혈액생화학적 검사 결과로는 모든 WMS77 투여군 수컷에서 GLU(요당)가 감소하거나 유의하게 감소하였음. 장기중량의 측정결과는 10000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 간의 상대 중량이 유의하게 증가하였으나 전체적인 부검 관찰 결과는 WMS77에 의한 이상소견을 관찰되지 않았음.
- 위 결과를 바탕으로 추후에 실시할 반복 경구투여 독성시험에서는 장기간의 투여기간을 고려하여, WMS77에 의한 독성이 나타날 것으로 예측되는 10000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 그 아래로 공비 2로 2 개의 군을 설정하는 것이 적절하다고 사료됨.

Table 1. Clinical signs

CLINICAL SIGNS						
DAYS	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)
MALE						
1-3	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
4-5	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5
6-14	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
FEMALE						
1-3	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
4-5	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5
6-14	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

The day of first treatment was designated Day 1.

Number of animals with the sign / Number of animals examined.

- 일반증상으로 WMS77 색깔의 변이 WMS77 투여군 암수 모든 동물에서 투여 후 4일 또는 6일부터 부검일까지 관찰되었음.

Table 2. Body weights

BODY WEIGHTS (g)					
DAYS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)
MALE					
1	211.46±7.10	210.76±5.81	206.54±6.86	200.59±9.01	204.93±9.33
7	260.96±7.50	258.73±8.12	257.09±8.82	250.73±10.10	253.22±12.31
14	312.75±9.28	302.07±13.87	305.54±13.50	292.99±6.91	303.90±19.33
GAIN	101.28±8.45	91.30±9.21	99.00±8.99	92.40±5.08	98.97±11.70
N	5	5	5	5	5
FEMALE					
1	142.32±9.17	143.47±7.47	143.65±9.98	144.47±6.30	144.19±8.56
7	170.79±10.46	170.98±10.15	170.35±13.85	166.63±5.56	175.90±6.59
14	190.70±13.10	193.78±13.28	190.20±15.72	185.26±13.26	196.07±12.34
GAIN	48.37±10.18	50.31±7.26	46.55±6.83	40.79±8.14	51.88±9.78
N	5	5	5	5	5

The day of first treatment was designated Day 1.

Gain is body weight on Day 14 - body weight on Day 1.

Data are expressed as Mean ± S.D.

- 모든 동물에서 시험물질 WMS77에 대한 체중의 영향은 관찰되지 않았음.

Table 3. Food consumptions

FOOD CONSUMPTIONS (g/head/day)					
DAYS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)
MALE					
1	24.06±2.47	24.46±0.62	26.21±2.10	23.58±0.59	20.75±0.15
7	27.49±0.72	25.23±0.30	27.71±1.96	23.35±0.37*	24.16±0.41*
13	27.30±2.06	25.19±0.88	27.10±0.87	24.93±1.65	25.34±0.54
N	5	5	5	5	5
FEMALE					
1	18.48±0.91	18.96±2.27	18.59±1.27	16.40±1.20	18.82±1.83
7	16.09±3.28	13.76±1.02	15.51±0.74	15.25±1.12	15.84±2.40
13	19.41±0.65	18.66±0.70	18.31±2.35	15.99±0.04	17.52±1.73
N	5	5	5	5	5

The day of first treatment was designated Day 1.

Data are expressed as Mean ± S.D.

\* Significant difference at  $P < 0.05$  levels compared with the Vehicle control.

Table 4. Water consumptions

WATER CONSUMPTIONS (g/head/day)					
DAYS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)
MALE					
1	26.48±3.92	23.44±6.79	16.86±5.09	19.50±10.25	20.18±5.85
7	27.06±0.75	22.73±2.38	28.90±0.67	25.61±0.75	29.18±2.04
13	26.94±0.25	23.54±1.33	29.94±1.53	28.71±2.66	34.00±2.55
N	5	5	5	5	5
FEMALE					
1	23.03±0.56	25.48±0.10	26.58±1.67	22.18±1.12	18.81±5.43
7	18.77±3.65	15.50±1.42	16.97±2.07	17.15±0.80	17.74±3.13
13	23.21±3.66	23.47±1.55	22.68±4.41	16.77±1.17	19.65±4.46
N	5	5	5	5	5

The day of first treatment was designated Day 1.

Data are expressed as Mean ± S.D.

- 사료섭취량과 물섭취량도 모든 동물에서 WMS77에 의한 이상소견은 관찰되지 않았음.

Table 5. Ophthalmological examination

OPHTHALMOLOGICAL EXAMINATION						
SITES	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)
MALE						
Left eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
FEMALE						
Left eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the finding / Number of animals examined.

- 안과학적 소견 또한 WMS77에 의한 이상소견은 관찰되지 않았음.

Table 6. Urinalysis

		URINALYSIS					MALE				
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)								
			G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)				
GLU	-	0	5	5	5	5	5				
BIL	-	0	5	5	5	5	5				
KET	-	0	5	5	3	4	2				
SG	+/-	1	0	0	2	1	3				
	≤1.005	0	2	0	0	0	0				
	1.010	1	3	1	2	1	2				
	1.015	2	0	1	1	1	0				
	1.020	3	0	2	0	3	1				
pH	1.025	4	0	1	2	0	2				
	7.0	0	1	0	0	0	0				
	7.5	1	3	4	1	1	3				
	8.0	2	1	0	4	3	1				
PRO	8.5	3	0	1	0	1	1				
	-	0	4	1	2	1	2				
	+/-	1	1	4	2	4	3				
URO	1+	2	0	0	1	0	0				
	0.2	0	5	5	5	5	5				
NIT	-	0	5	5	5	5	5				
BLO	-	0	5	5	4	4	5				
	+/-	1	0	0	1	0	0				
	1+	2	0	0	0	0	0				
	2+	3	0	0	0	1	0				
LEU	-	0	5	4	4	2	5				
	+/-	1	0	1	0	3	0				
	1+	2	0	0	1	0	0				
CLARITY	-	0	5	5	5	5	5				
	COLOR-Yellow		5	5	5	5	5				
N			5	5	5	5	5				

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, BLO: Occult blood, LEU: Leukocyte.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	BLO	LEU	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.2	Negative	Negative	Negative	Clear
+/-	1	100	NA	Trace	15	1.0	NA	Trace	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Large	Other

NA: Not applicable, Sl: Slight.

		URINALYSIS					FEMALE				
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)								
			G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)				
GLU	-	0	5	5	5	5	5				
BIL	-	0	5	5	5	5	5				
KET	-	0	5	5	5	2	3				
SG	+/-	1	0	0	0	3	2				
	≤1.005	0	2	0	0	0	0				
	1.010	1	0	2	2	2	0				
	1.015	2	0	1	3	1	4				
	1.020	3	0	0	0	0	1				
pH	1.025	4	0	0	0**	2**	0**				
	7.0	0	3	1	0	0	0				
	7.5	1	2	1	0	0	0				
	8.0	2	0	2	4	2	0				
PRO	8.5	3	0	1	1**	3**	5**				
	-	0	5	5	5	4	3				
	+/-	1	0	0	0	1	2				
URO	0.2	0	5	5	5	5	5				
	-	0	4	5	4	5	5				
NIT	-	0	5	5	5	5	5				
BLO	+/-	1	1	0	1	0	0				
	1+	2	0	0	0	0	0				
	2+	3	0	0	0	1	0				
LEU	-	0	5	5	5	5	4				
	+/-	1	1	2	0	0	1				
	-	0	5	5	5	5	4				
CLARITY	+/-	1	0	0	0	0	1				
	-	0	5	5	5	5	5				
COLOR-Yellow			5	5	5	5	5				
N			5	5	5	5	5				

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, BLO: Occult blood, LEU: Leukocyte.

\*\* Significant difference at  $P<0.01$  levels compared with the Vehicle control.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	BLO	LEU	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.2	Negative	Negative	Negative	Clear
+/-	1	100	NA	Trace	15	1.0	NA	Trace	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Large	Other

NA: Not applicable, Sl: Slight.

- 요검사 결과로는 2500 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 SG(요비중) 및 pH가 유의하게 높은 결과를 보였음 ( $P<0.01$ ).

Table 7. Hematological test

		HEMATOLOGICAL TEST					MALE				
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)									
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)					
RBC	$10^9/\mu\text{L}$	7.65±0.31	7.58±0.22	7.58±0.29	7.80±0.40	7.57±0.22					
HGB	g/dL	14.5±0.3	14.4±0.3	14.6±0.5	14.8±0.4	14.4±0.4					
HCT	%	46.6±1.1	45.9±0.8	46.8±1.7	47.3±1.6	46.3±1.0					
MCV	fL	60.9±1.5	60.5±0.8	61.8±1.0	60.7±1.2	61.2±0.7					
MCH	pg	19.0±0.5	19.0±0.2	19.3±0.3	19.0±0.5	19.0±0.2					
MCHC	g/dL	31.2±0.2	31.4±0.4	31.2±0.3	31.4±0.4	31.0±0.2					
RDW	%	12.8±0.4	12.2±0.3	12.4±0.6	12.1±0.3	12.4±0.4					
HDW	g/dL	2.31±0.08	2.33±0.07	2.30±0.08	2.31±0.04	2.25±0.09					
PLT	$10^3/\mu\text{L}$	1095.4±144.3	1148.2±76.8	1301.8±167.3	1158.8±93.1	1122.0±53.5					
MPV	fL	5.70±0.37	5.62±0.16	5.70±0.29	5.52±0.11	5.58±0.18					
WBC	$10^3/\mu\text{L}$	9.68±0.87	9.65±1.69	8.65±1.38	11.07±1.43	11.26±2.19					
NEU	%	8.5±4.8	8.2±1.8	7.5±1.6	6.3±1.5	8.0±0.4					
NEU	$10^3/\mu\text{L}$	0.8±0.4	0.8±0.2	0.7±0.2	0.7±0.1	0.9±0.2					
LYM	%	86.1±6.3	86.6±2.7	86.6±3.1	88.4±2.2	86.5±1.1					
LYM	$10^3/\mu\text{L}$	8.3±1.1	8.4±1.5	7.5±1.2	9.8±1.5	9.7±1.8					
MONO	%	2.96±0.68	3.30±1.09	3.72±1.87	3.54±0.95	3.74±0.65					
MONO	$10^3/\mu\text{L}$	0.29±0.08	0.32±0.10	0.32±0.16	0.38±0.06	0.43±0.15					
EOS	%	1.50±1.57	0.84±0.21	0.80±0.19	0.48±0.11	0.54±0.09					
EOS	$10^3/\mu\text{L}$	0.15±0.15	0.08±0.02	0.07±0.02	0.06±0.02	0.06±0.01					
BASO	%	0.24±0.05	0.20±0.10	0.22±0.04	0.26±0.05	0.26±0.05					
BASO	$10^3/\mu\text{L}$	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.00	0.03±0.01	0.03±0.01					
LUC	%	0.66±0.05	0.90±0.19	1.12±0.53	1.00±0.29	0.98±0.30					
LUC	$10^3/\mu\text{L}$	0.06±0.01	0.09±0.03	0.10±0.05	0.11±0.04	0.11±0.06					
N		5	5	5	5	5					

Data are expressed as Mean ± S.D.

		HEMATOLOGICAL TEST					FEMALE				
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)									
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)					
RBC	$10^9/\mu\text{L}$	7.58±0.11	7.18±0.24	7.61±0.34	7.34±0.20	7.53±0.38					
HGB	g/dL	14.2±0.1	13.9±0.1	14.6±0.4	14.0±0.3	14.4±0.5					
HCT	%	45.0±0.3	43.9±0.4	45.5±1.6	43.8±1.1	45.2±1.7					
MCV	fL	59.3±0.7	61.1±2.1	59.8±0.9	59.7±0.9	60.1±1.7					
MCH	pg	18.8±0.2	19.3±0.8	19.2±0.3	19.1±0.4	19.1±0.6					
MCHC	g/dL	31.7±0.2	31.7±0.4	32.1±0.3	32.0±0.2	31.8±0.3					
RDW	%	11.6±0.7	11.9±0.7	11.8±0.6	11.8±0.5	11.8±0.3					
HDW	g/dL	2.06±0.09	2.06±0.11	2.13±0.18	2.11±0.13	2.09±0.13					
PLT	$10^3/\mu\text{L}$	1235.4±85.4	1155.6±94.3	1165.2±116.1	1207.4±142.5	1184.8±56.6					
MPV	fL	5.36±0.11	5.34±0.15	5.38±0.04	5.32±0.08	5.42±0.11					
WBC	$10^3/\mu\text{L}$	7.36±1.76	8.05±2.34	7.44±2.31	7.83±1.70	7.26±1.80					
NEU	%	4.5±0.8	5.1±1.3	5.3±3.0	5.1±0.8	4.9±0.9					
NEU	$10^3/\mu\text{L}$	0.3±0.1	0.4±0.1	0.4±0.2	0.4±0.1	0.3±0.0					
LYM	%	90.0±1.2	89.8±1.9	90.0±4.1	90.0±1.5	89.0±2.9					
LYM	$10^3/\mu\text{L}$	6.6±1.6	7.2±2.2	6.7±2.2	7.1±1.6	6.5±1.8					
MONO	%	2.94±0.38	2.70±0.34	2.34±0.89	2.70±1.44	3.48±1.83					
MONO	$10^3/\mu\text{L}$	0.22±0.06	0.21±0.06	0.18±0.09	0.20±0.08	0.23±0.09					
EOS	%	1.12±0.28	1.14±0.50	1.16±0.44	1.22±0.59	1.08±0.41					
EOS	$10^3/\mu\text{L}$	0.08±0.02	0.09±0.03	0.08±0.03	0.09±0.04	0.08±0.02					
BASO	%	0.14±0.05	0.22±0.04	0.24±0.05	0.20±0.00	0.26±0.05					
BASO	$10^3/\mu\text{L}$	0.01±0.00	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01					
LUC	%	1.22±0.04	1.12±0.20	0.94±0.24*	0.74±0.23**	1.32±0.22					
LUC	$10^3/\mu\text{L}$	0.09±0.02	0.09±0.04	0.07±0.02	0.06±0.02	0.10±0.03					
N		5	5	5	5	5					

Data are expressed as Mean ± S.D.

\*\*\* Significant difference at  $P<0.05$ / $P<0.01$  levels compared with the Vehicle control.

- 혈액학적 검사에서는 2500 및 5000 mg/kg/day 암컷군에서 LUC(대형비염색세포) 백분율이 유의하게 낮았으나( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 용량-반응 상관성 없는 변화로 WMS77에 의한 영향이 아닌 것으로 판단함. 그 외, WMS77에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

Table 8. Clinical biochemistry test

CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST						MALE					CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST						FEMALE																																																																																																																																																																																																																																										
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)					TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)					TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)																																																																																																																																																																																																																																											
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)			G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)			G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)																																																																																																																																																																																																																																							
AST	U/L	104.1±27.8	93.8±18.6	88.1±19.6	91.6±10.0	87.6±10.7	AST	U/L	76.6±5.0	77.4±2.3	85.5±24.4	83.8±12.2	77.2±6.7	ALT	U/L	36.7±7.1	34.6±6.3	34.9±6.1	40.2±8.7	37.7±6.0	ALT	U/L	24.1±0.8	23.1±3.7	24.6±3.7	24.7±6.0	21.4±1.5	ALP	U/L	227.8±37.1	228.7±36.0	200.1±29.4	221.4±51.7	212.4±46.0	ALP	U/L	163.0±30.9	175.8±52.5	169.7±31.4	158.2±20.6	133.4±19.0	CPK	U/L	276.2±239.7	254.0±127.6	316.0±167.6	242.2±46.3	220.8±62.3	CPK	U/L	155.0±23.3	167.2±20.5	207.0±182.5	171.2±113.1	185.6±106.0	TBIL	mg/dL	0.12±0.01	0.13±0.02	0.12±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01	TBIL	mg/dL	0.13±0.01	0.13±0.01	0.12±0.01	0.13±0.02	0.12±0.02	GLU	mg/dL	120.9±11.1	102.8±5.4*	107.7±15.3	95.1±12.9**	93.2±12.0**	GLU	mg/dL	102.7±7.4	110.3±11.0	109.4±18.0	102.0±3.1	97.9±10.8	TCHO	mg/dL	92.4±13.2	80.4±5.1	75.0±5.7	83.2±11.6	87.8±7.2	TCHO	mg/dL	66.0±7.3	70.8±15.3	69.4±6.1	68.4±5.5	71.8±5.9	TG	mg/dL	85.2±13.9	88.0±9.3	80.6±9.0	89.2±10.8	82.8±7.5	TG	mg/dL	38.4±6.0	40.2±6.1	38.0±1.7	37.2±5.3	52.8±17.4	TP	g/dL	5.82±0.14	5.89±0.06	5.76±0.09	5.96±0.24	5.87±0.14	TP	g/dL	5.51±0.35	5.56±0.19	5.56±0.26	5.52±0.17	5.55±0.14	ALB	g/dL	2.99±0.07	2.99±0.05	2.98±0.07	3.05±0.14	3.01±0.08	ALB	g/dL	2.96±0.19	3.04±0.13	2.99±0.17	2.97±0.12	2.98±0.05	A/G ratio		1.06±0.02	1.03±0.02	1.07±0.05	1.04±0.03	1.05±0.03	A/G ratio		1.17±0.05	1.21±0.03	1.16±0.04	1.17±0.05	1.16±0.06	BUN	mg/dL	14.4±1.7	15.2±2.8	14.3±1.6	12.6±2.2	13.0±1.9	BUN	mg/dL	15.0±1.4	13.4±1.2	13.5±3.4	14.8±1.8	15.0±1.9	CRE	mg/dL	0.40±0.03	0.41±0.02	0.40±0.03	0.40±0.03	0.38±0.02	CRE	mg/dL	0.39±0.02	0.37±0.01	0.36±0.01	0.38±0.02	0.37±0.02	IP	mg/dL	8.93±0.22	8.96±0.32	9.49±0.89	9.25±0.35	9.00±0.58	IP	mg/dL	8.98±0.49	8.43±0.26	8.54±0.59	8.49±0.46	8.78±0.31	Ca <sup>2+</sup>	mg/dL	10.27±0.20	10.50±0.14	10.32±0.10	10.37±0.17	10.51±0.14	Ca <sup>2+</sup>	mg/dL	10.14±0.32	10.18±0.39	10.13±0.20	10.03±0.11	10.20±0.24	Na <sup>+</sup>	mmol/L	142.8±1.2	143.7±1.4	142.5±1.2	143.3±0.9	143.6±1.9	Na <sup>+</sup>	mmol/L	142.0±1.1	141.1±0.7	141.3±1.0	142.4±1.3	142.2±0.9	K <sup>+</sup>	mmol/L	4.84±0.37	4.65±0.34	4.99±0.38	4.86±0.24	5.03±0.41	K <sup>+</sup>	mmol/L	4.71±0.27	4.63±0.31	4.53±0.38	4.80±0.25	4.76±0.29	Cl <sup>-</sup>	mmol/L	102.9±1.8	103.1±0.9	102.2±1.2	101.4±1.2	103.4±2.6	Cl <sup>-</sup>	mmol/L	104.2±1.8	103.8±0.8	103.2±1.8	104.9±1.1	103.5±1.2
N		5	5	5	5	5	N		5	5	5	5	5	N		5	5	5	5	5	N		5	5	5	5	5																																																																																																																																																																																																																																

Data are expressed as Mean ± S.D.

\*/\*\* Significant difference at  $P<0.05/P<0.01$  levels compared with the Vehicle control.

Data are expressed as Mean ± S.D.

- 혈액생화학적 검사에서는 WMS77 투여군의 모든 수컷에서 GLU(혈당) 농도가 유의하게 낮았음( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

Table 9. Absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						MALE					
PARAMETERS	GROUPS (mg/kg/day)					PARAMETERS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)
Body weights (g)	283.66±9.95	274.39±13.53	276.25±10.56	267.14±7.55	275.53±14.95	Body weights (g)	176.23±10.33	178.53±13.95	174.55±14.92	174.75±9.13	182.05±10.19
Thymus	0.5980±0.0785	0.5982±0.0624	0.6262±0.0468	0.6171±0.1511	0.7331±0.1094	Thymus	0.4991±0.0621	0.5015±0.1031	0.4402±0.1348	0.5077±0.0868	0.5282±0.0470
% to body weight	0.2109±0.0278	0.2176±0.0121	0.2273±0.0232	0.2322±0.0622	0.2663±0.0379	% to body weight	0.2828±0.0252	0.2816±0.0597	0.2489±0.0610	0.2916±0.0555	0.2902±0.0206
Spleen	0.7493±0.0691	0.7582±0.0708	0.7345±0.0927	0.6715±0.0676	0.7143±0.1349	Spleen	0.4688±0.0564	0.5088±0.0801	0.5202±0.0864	0.4727±0.0959	0.4980±0.0347
% to body weight	0.2639±0.0189	0.2766±0.0265	0.2664±0.0368	0.2514±0.0244	0.2580±0.0370	% to body weight	0.2661±0.0291	0.2836±0.0228	0.2965±0.0273	0.2705±0.0518	0.2736±0.0122
Kidney-left	1.0292±0.0404	0.9410±0.0663	1.0274±0.1049	0.9980±0.0601	1.0795±0.1121	Kidney-left	0.6664±0.0499	0.7557±0.1128	0.7024±0.0927	0.6748±0.0408	0.7417±0.0624
% to body weight	0.3631±0.0172	0.3439±0.0334	0.3719±0.0353	0.3736±0.0208	0.3913±0.0276	% to body weight	0.3779±0.0113	0.4218±0.0367	0.4013±0.0257	0.3867±0.0264	0.4087±0.0458
Kidney-right	1.0426±0.0675	0.9822±0.0603	1.0499±0.1059	1.0064±0.0699	1.0855±0.0912	Kidney-right	0.7015±0.0524	0.7827±0.1075	0.7117±0.0855	0.7137±0.0623	0.7672±0.0557
% to body weight	0.3675±0.0196	0.3589±0.0319	0.3803±0.0390	0.3768±0.0251	0.3937±0.0180	% to body weight	0.3978±0.0095	0.4371±0.0337	0.4071±0.0262	0.4088±0.0348	0.4223±0.0373
Heart	1.0299±0.0734	0.9930±0.0550	0.9969±0.0891	0.9542±0.0554	1.0044±0.1202	Heart	0.7077±0.0446	0.7428±0.1055	0.7489±0.0565	0.7049±0.0510	0.7412±0.0474
% to body weight	0.3636±0.0312	0.3623±0.0210	0.3608±0.0286	0.3572±0.0181	0.3647±0.0416	% to body weight	0.4025±0.0322	0.4150±0.0377	0.4299±0.0266	0.4038±0.0294	0.4077±0.0291
Lung	1.2978±0.0866	1.2882±0.0860	1.3318±0.0240	1.2410±0.0638	1.3292±0.1156	Lung	1.0086±0.0549	1.0581±0.0527	1.0414±0.0707	1.0295±0.0643	1.0858±0.0457
% to body weight	0.4574±0.0231	0.4696±0.0263	0.4825±0.0140	0.4645±0.0180	0.4821±0.0276	% to body weight	0.5728±0.0230	0.5940±0.0257	0.5976±0.0231	0.5892±0.0225	0.5972±0.0278
Liver	8.4584±0.8712	8.5228±0.4818	8.6586±0.6306	8.2490±0.2657	8.4393±0.4393	Liver	5.2988±0.3495	5.7140±0.7759	5.8350±0.5895	5.3304±0.4498	6.1818±0.4408
% to body weight	2.9765±0.2019	3.1070±0.1246	3.1339±0.1857	3.0898±0.1301	3.0665±0.1591	% to body weight	3.0082±0.1339	3.1903±0.2095	3.3413±0.1536**	3.0496±0.1828	3.3954±0.1458**
N	5	5	5	5	5	N	5	5	5	5	5

The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

Data are expressed as Mean ± S.D.

\*\*\* Significant difference at  $P<0.05/P<0.01$  levels compared with the Vehicle control.

- 10000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 간의 절대/상대 중량이 유의하게 높았음( $P<0.01$ ). 그 외, 2500

mg/kg/day 투여군 암컷에서 간의 상대무게가 유의하게 낮았으나( $P < 0.01$ ), 용량-반응 상관성이 없었고, 정상범위 이내의 변화로 WMS77에 의한 영향이 아닌 것으로 판단됨.

Table 10. Necropsy findings

		NECROPSY FINDINGS				
ORGANS	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)	G5 (10000)
						MALE
	No gross findings	5	5	5	5	5
	N	5	5	5	5	5
						FEMALE
	No gross findings	5	5	5	5	5
	N	5	5	5	5	5

- 부검소견으로는 WMS77에 의한 영향이 관찰되지 않았음.

#### (D) HPLC-UV를 이용한 WMS77의 분석법 검증

본 시험은 HPLC-UV를 이용하여 WMS77을 정량하는 분석법을 검증하기 위하여 수행되었음.

분석법 검증은 특이성, 시스템 적합성, stock standard comparison(SSC), performance check standard(PCS), 직선성, 정확성, 정밀성, 균질성 및 안정성에 대하여 평가하였음. QC 시료는 차광 조건 하에서 멸균주사용수를 이용하여 WMS77을 저농도(5 mg/mL)와 고농도(500 mg/mL)로 조제하였고, 시험의 결과로는 아래와 같음.

- 부형제 및 희석용매 중 내인성 간섭물질은 확인되지 않았음.
- 검증 기간동안 시스템 적합성은 기준을 충족하였음.
- 분석 배치마다 평가한 SSC 및 PCS는 기준을 충족하였음.
- Chlorogenic acid 및 rosmarinic acid의 검량선은 1-10 µg/mL 농도범위에서 직선성 기준에 적합하였음.
- QC 시료는 배치내, 배치간 정확성 및 정밀성 기준을 충족하였음.
- QC 시료는 조제 당일 및 조제 후 냉장 조건에서 7일간 보관 후에 상, 중, 하층에서 균질하였음.
- QC 시료는 실온에서 5시간 전처리 후 HPLC의 자동 주입기에서 7시간, 그리고 조제 후 냉장조건에서 7일간 안정하였음.
- 표준원액은 실온에서 6시간, 냉장조건에서 7일간 안정하였음.
- 이상의 결과로서 본 분석방법은 멸균주사용수 현탁액 중 WMS77을 정량하기에 적합하였음.

#### - Specificity 결과

희석용매와 부형제에서 WMS77의 검출에 영향을 줄 수 있는 내인성 간섭물질은 확인되지 않았음.

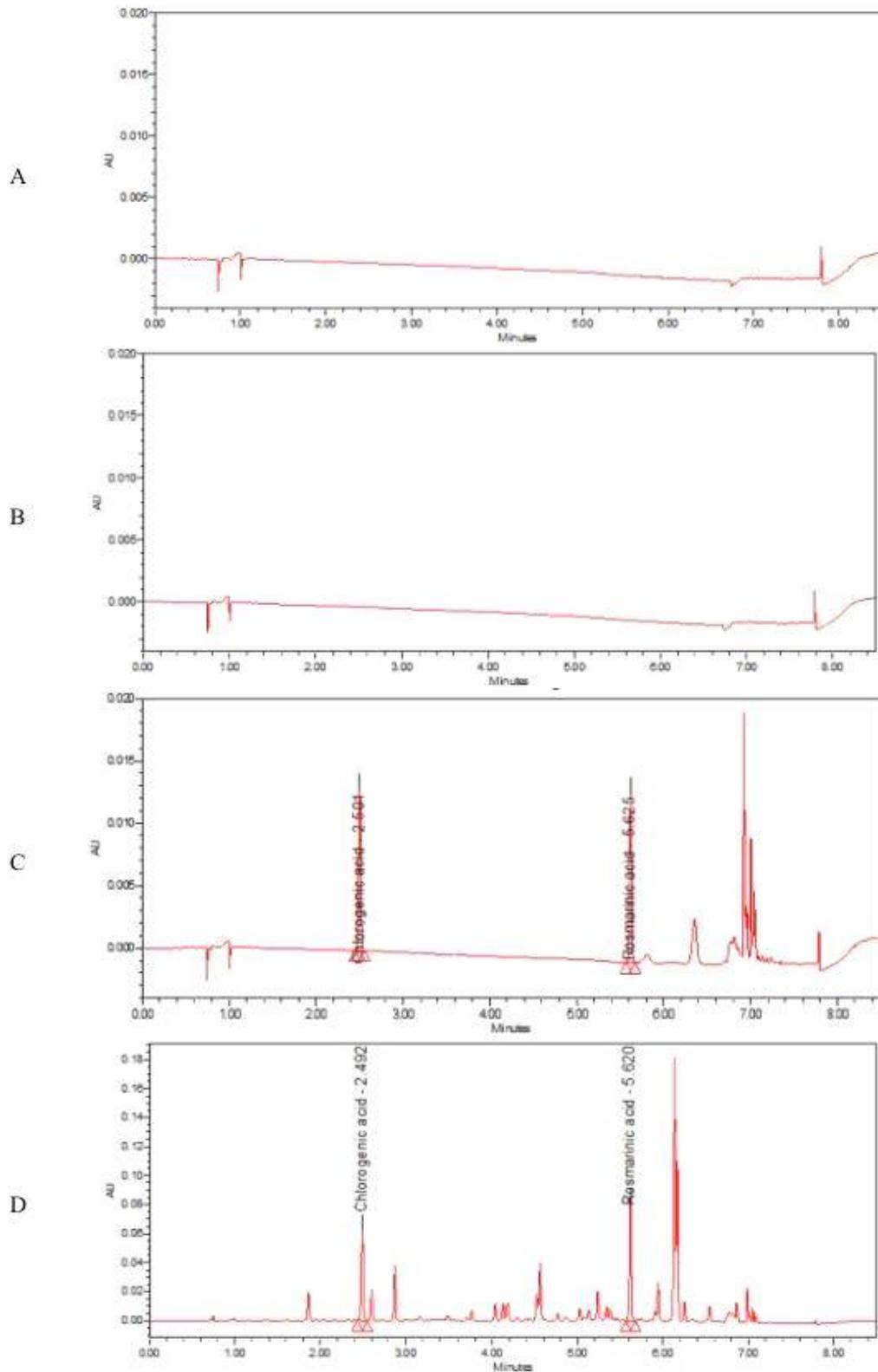


그림3-3-51. HPLC chromatograms of dilution solvent (50 % methanol, A), vehicle (Sterile distilled water for injection, B), standard working solution (SW\_5, C) and QC\_L (D)>

- System suitability 결과

시스템 적합성 분석 결과는 Chlorogenic acid의 변동계수는 0.2 % 에서 0.4 %, 대칭 계수는 0.87 에서 0.93, 이론단수는 55993 에서 61616 이었음. Rosmarinic acid의 변동계수는 0.3 % 에서 0.4 %, 대칭계수는 0.87 에서 0.90, 이론단수는 158643 에서 364369 였음.

위 결과는 허용 기준을 충족하였음(Table 1, 2).

Table 1. System suitability of chlorogenic acid

Batch ID	Peak area	Tailing factor	Theoretical plate number
SST_23Jan18	102798	0.91	62044
	103428	0.92	61867
	102825	0.92	61814
	102896	0.92	61284
	102996	0.92	61070
Mean	102989	0.92	61616
SD	257	-	-
CV (%)	0.2	-	-
SST_25Jan18	94235	0.93	56444
	93392	0.93	56315
	93660	0.93	56171
	93897	0.93	55688
	94160	0.93	55345
Mean	93869	0.93	55993
SD	350	-	-
CV (%)	0.4	-	-
SST_30Jan18	100113	0.86	59143
	100181	0.87	59701
	99810	0.87	59633
	99418	0.87	59893
	100052	0.87	59562
Mean	99915	0.87	59586
SD	311	-	-
CV (%)	0.3	-	-

Table 2. System suitability of rosmarinic acid

Batch ID	Peak area	Tailing factor	Theoretical plate number
SST_23Jan18	103370	0.88	362291
	104122	0.89	362336
	103465	0.89	365683
	103587	0.89	365059
	103638	0.89	366478
Mean	103636	0.89	364369
SD	291	-	-
CV (%)	0.3	-	-
SST_25Jan18	97009	0.90	361762
	96245	0.90	361832
	96548	0.90	358858
	96601	0.90	355431
	97053	0.90	355952
Mean	96691	0.90	358767
SD	339	-	-
CV (%)	0.4	-	-
SST_30Jan18	95380	0.87	144657
	95562	0.87	159342
	95292	0.87	153622
	94891	0.87	175785
	95548	0.87	159810
Mean	95335	0.87	158643
SD	273	-	-
CV (%)	0.3	-	-

Table 3. Stock standard comparison

Compounds	Batch ID	Area of SW_3	Area of SSC	RE (%)
Chlorogenic acid	23Jan18_1	99944	99792	-0.2
	25Jan18_1	96635	96678	0.0
	30Jan18_1	97397	95375	-2.1
Rosmarinic acid	23Jan18_1	101173	101022	-0.1
	25Jan18_1	99909	99921	0.0
	30Jan18_1	92985	91630	-1.5

#### - Performance check standard(PCS) 결과

별도로 조제한 chlorogenic acid 표준원액을 목적농도 수준으로 조제하여 측정한 PCS의 상대오차는 -1.4 % 에서 4.9 % 였고, 별도로 조제한 rosmarinic acid 표준원액을 목적농도 수준으로 조제하여 측정한 PCS의 상대오차는 -1.7 % 에서 4.9 % 였음.

이 결과는 허용 기준을 충족하였음(Table 4).

Table 4. Performance check standard

Compounds	Batch ID	Nominal conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Measured conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	RE (%)
Chlorogenic acid	23Jan18_1	5	4.962	-0.8
			5.014	0.3
			4.974	-0.5
	25Jan18_1	5	5.070	1.4
			5.083	1.7
			5.119	2.4
30Jan18_1	5	4.931	-1.4	
		5.187	3.7	
		5.247	4.9	
Rosmarinic acid	23Jan18_1	5	4.959	-0.8
			5.016	0.3
			4.963	-0.7
	25Jan18_1	5	5.069	1.4
			5.114	2.3
			5.101	2.0
30Jan18_1	5	4.916	-1.7	
		5.178	3.6	
		5.243	4.9	

#### - Linearity 결과

Chlorogenic acid의 검량선 범위 1-10  $\mu\text{g/mL}$ 에서 결정계수( $R^2$ )는 0.99 이상으로 허용 기준을 충족하였고, Rosmarinic acid 또한 마찬가지로 같았음.

이 결과는 허용 기준을 충족하였음(Table 5, Figure 2, 3).

Table 5. Linearity

Compounds	Batch ID	Curve equation <sup>a)</sup>	R <sup>2</sup>
Chlorogenic acid	23Jan18_1	$y = 19998 x + 376$	0.9999
	25Jan18_1	$y = 18891 x + 1166$	0.9999
	30Jan18_1	$y = 19554 x + 307$	1.0000
Rosmarinic acid	23Jan18_1	$y = 20223 x + 415$	0.9999
	25Jan18_1	$y = 19527 x + 1242$	0.9998
	30Jan18_1	$y = 18627 x + 346$	1.0000

R<sup>2</sup>: Coefficient of determination

<sup>a)</sup>  $y = a x + b$

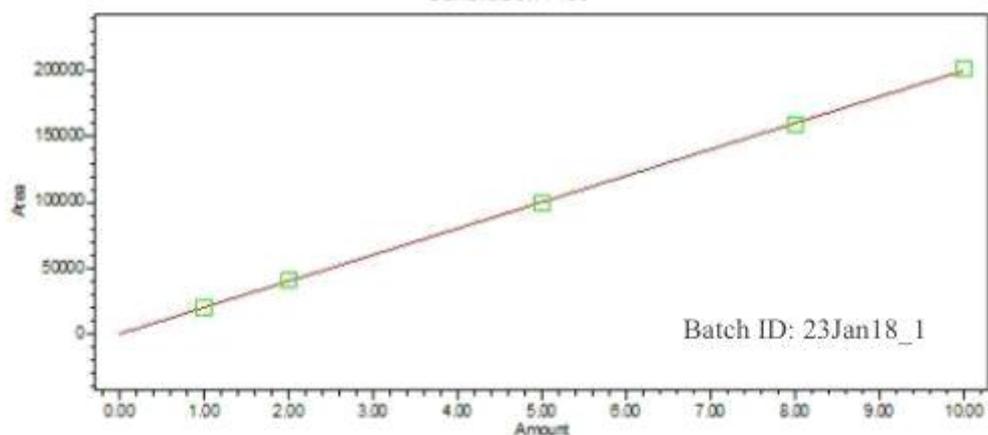
a: Slope

b: Intercept

x: Measured concentration

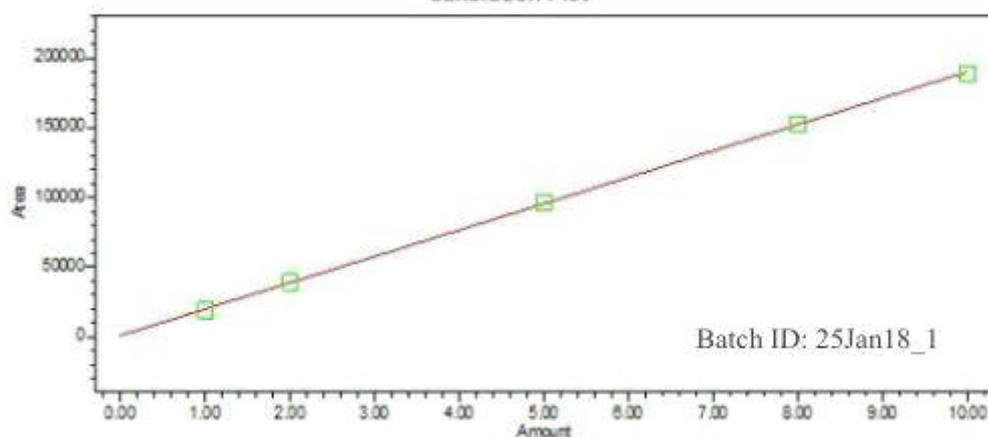
y: Peak area

Calibration Plot



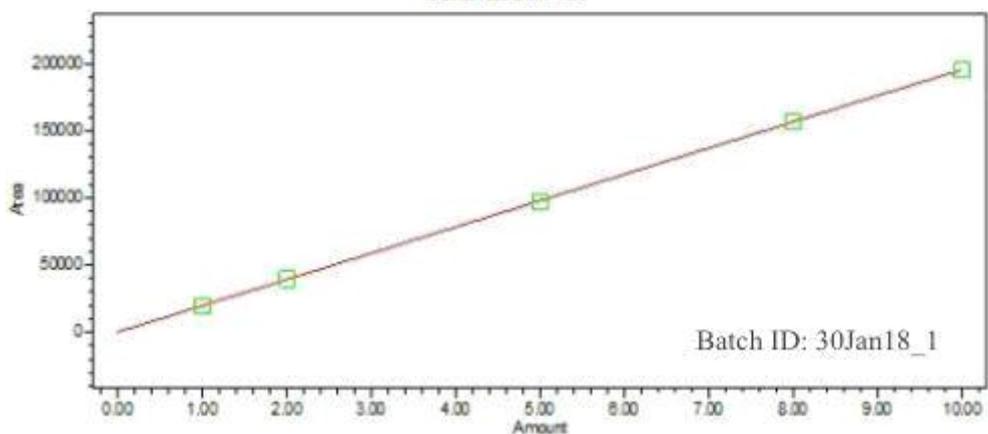
Name: Chlorogenic acid; Processing Method: 17NV0950; Fit Type: Linear (1st Order);  
Cal Curve Id: 1341; A: 376; B: 19998; C: 0; D: 0; R<sup>2</sup>: 0.9999

Calibration Plot

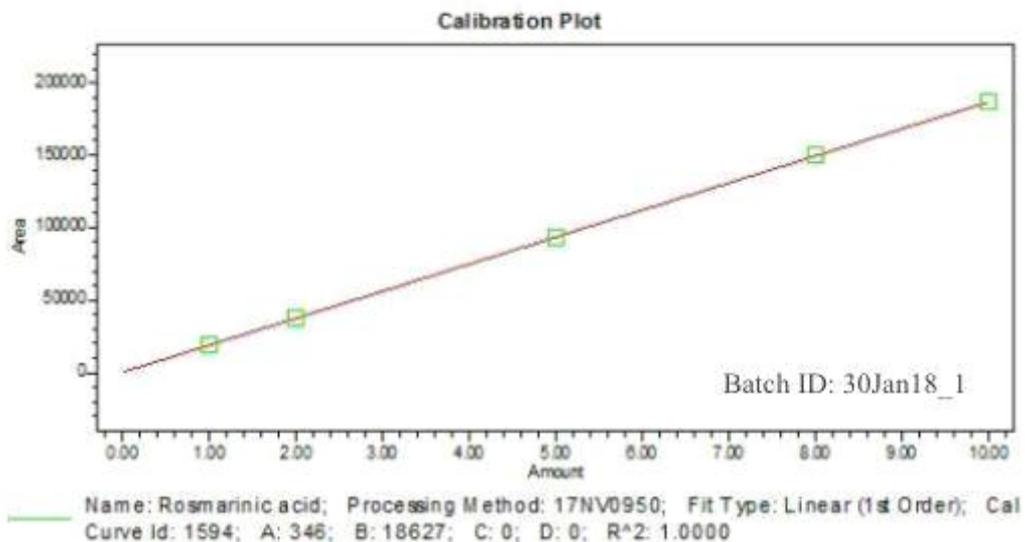
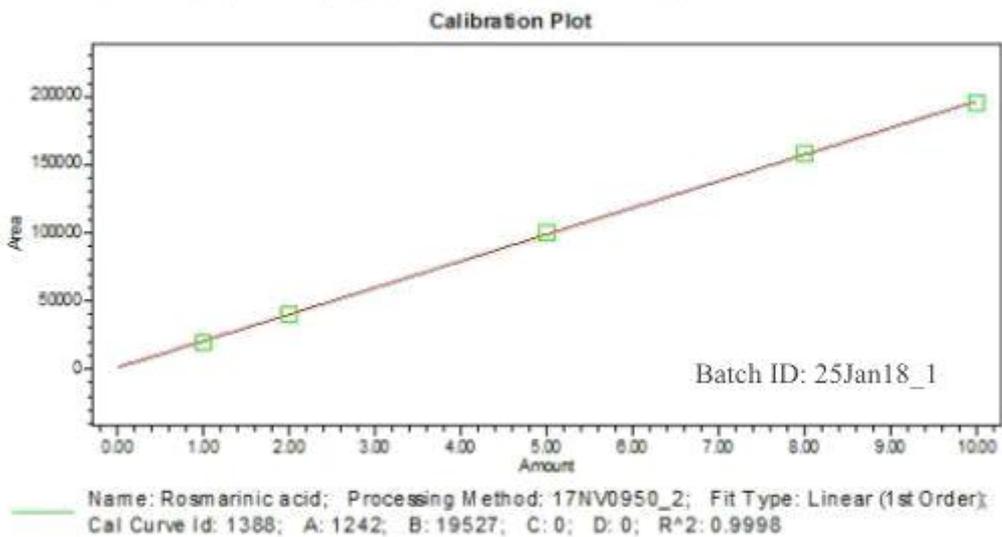
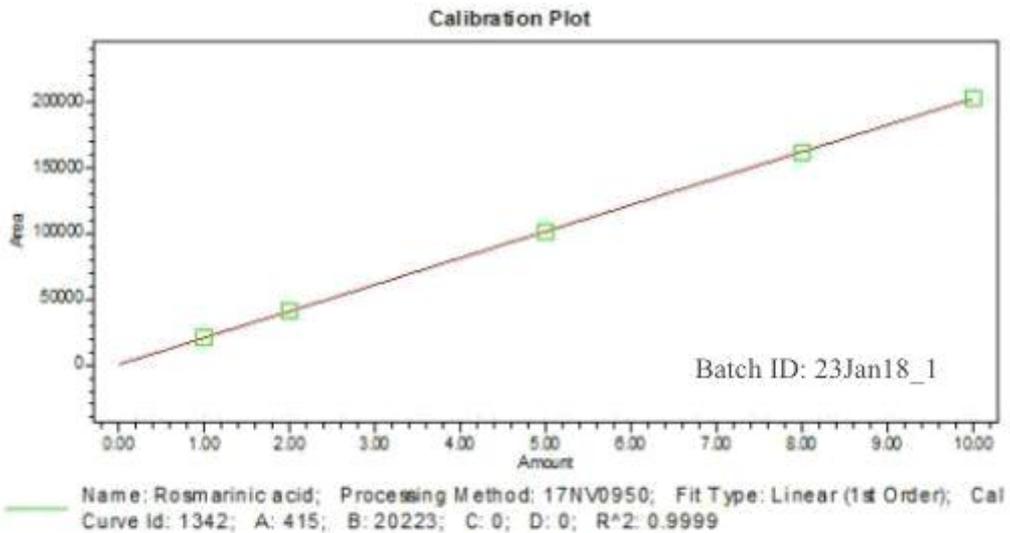


Name: Chlorogenic acid; Processing Method: 17NV0950\_2; Fit Type: Linear (1st Order);  
Cal Curve Id: 1387; A: 1166; B: 18891; C: 0; D: 0; R<sup>2</sup>: 0.9999

Calibration Plot



Name: Chlorogenic acid; Processing Method: 17NV0950; Fit Type: Linear (1st Order);  
Cal Curve Id: 1593; A: 307; B: 19554; C: 0; D: 0; R<sup>2</sup>: 1.0000



**- Accuracy and Precision 결과**

Chlorigenic acid의 배치내 회수율은 109.6 % (QC\_L) 및 100.0 % (QC\_H), 변동계수는 0.5 % (QC\_L) 및 0.8 % (QC\_H) 였음. Chlorogenic acid의 배치간 회수율은 112.4 % (QC\_L) 및 103.6 % (QC\_H), 변동계수는 2.0 % (QC\_L) 및 2.8 % (QC\_H) 였음.

Rosmarinic acid의 배치내 회수율은 91.3 % (QC\_L) 및 81.9 % (QC\_H), 변동계수는 0.6 % (QC\_L) 및 0.9 % (QC\_H) 였음. Rosmarinic acid의 배치간 회수율은 95.7 % (QC\_L) 및 84.3 % (QC\_H), 변동계수는 3.9 % (QC\_L) 및 3.3 % (QC\_H) 였음.

이 결과는 허용 기준을 충족하였음(Table 6, 7).

Table 6. Intra-batch accuracy and precision of MS-10

Compounds	Batch ID	QC level (mg/mL)	Measured conc. (mg/mL)		CV (%)	Recovery (%)
			Each	Mean		
Chlorogenic acid	23Jan18_1	Low (5)	5.489	5.478	0.5	109.6
			5.446			
			5.500			
		High (500)	497.6	500.0		
			504.5			
			498.1			
Rosmarinic acid	23Jan18_1	Low (5)	4.589	4.566	0.6	91.3
			4.538			
			4.570			
		High (500)	407.4	409.6		
			413.6			
			407.7			

Table 7. Inter-batch accuracy and precision of MS-10

Batch ID	Chlorogenic acid		Rosmarinic acid	
	QC_L (5 mg/mL)	QC_H (500 mg/mL)	QC_L (5 mg/mL)	QC_H (500 mg/mL)
23Jan18_1	5.489	497.6	4.589	407.4
	5.446	504.5	4.538	413.6
	5.500	498.1	4.570	407.7
25Jan18_1	5.758	520.5	4.822	415.4
	5.657	529.4	4.763	420.1
	5.686	517.4	5.079	413.1
30Jan18_1	5.683	527.6	4.897	436.6
	5.641	528.4	4.866	435.8
	5.706	538.0	4.928	445.0
Mean	5.618	517.9	4.784	421.6
SD	0.111	14.7	0.185	13.9
CV (%)	2.0	2.8	3.9	3.3
Recovery (%)	112.4	103.6	95.7	84.3

- Homogeneity 결과

조제 당일 chlorogenic acid QC 시료의 회수율은 108.7 % (QC\_L) 및 100.9 % (QC\_H), 변동계수는 0.6 % (QC\_L) 및 0.2 % (QC\_H)였음. 조제 7 일 후 chlorogenic acid QC 시료의 회수율은 112.6 % (QC\_L) 및 105.2 % (QC\_H), 변동계수는 0.7 % (QC\_L) 및 0.5 % (QC\_H) 였음.

조제 당일 rosmarinic acid QC 시료의 회수율은 90.8 % (QC\_L) 및 82.5 % (QC\_H), 변동계수는 1.1 % (QC\_L) 및 0.4 % (QC\_H) 였음. 조제 7 일 후 rosmarinic acid QC 시료의 회수율은 94.3 % (QC\_L) 및 88.0 % (QC\_H), 변동계수는 0.5 % (QC\_L) 및 0.7 % (QC\_H) 였음.

이 결과는 허용 기준을 충족하였음(Table 8).

Table 8. Homogeneity of MS-10

Batch ID	Chlorogenic acid		Rosmarinic acid		
	QC_L (5 mg/mL)	QC_H (500 mg/mL)	QC_L (5 mg/mL)	QC_H (500 mg/mL)	
23Jan18_1	T	5.469	504.4	4.575	412.1
	M	5.436	505.8	4.562	414.3
	B	5.404	504.0	4.483	411.1
Mean	5.436	504.7	4.540	412.5	
SD	0.033	0.9	0.049	1.6	
CV (%)	0.6	0.2	1.1	0.4	
Recovery (%)	108.7	100.9	90.8	82.5	
30Jan18_1	T	5.587	524.4	4.697	438.1
	M	5.668	529.1	4.742	443.6
	B	5.629	524.2	4.713	438.0
Mean	5.628	525.9	4.717	439.9	
SD	0.040	2.8	0.023	3.2	
CV (%)	0.7	0.5	0.5	0.7	
Recovery (%)	112.6	105.2	94.3	88.0	

T ; Top  
M ; Middle  
B ; Bottom

#### - Pre-processed stability 결과

실온에서 5시간 보관 후 분석한 chlorogenic acid QC 시료의 회수율은 110.6% (QC\_L) 및 102.2% (QC\_H), 변동계수는 0.3 % (QC\_L) 및 1.0 % (QC\_H) 였고, 실온에서 5 시간 보관 후 분석한 rosmarinic acid QC 시료의 회수율은 92.2 % (QC\_L) 및 83.8 % (QC\_H), 변동계수는 0.4 % (QC\_L) 및 0.5 % (QC\_H) 였음.

이 결과는 허용 기준을 충족하였음(Table 9).

Table 9. Pre-processed stability of MS-10

Compounds	Batch ID	Storage condition	QC level (mg/mL)	Measured conc. (mg/mL)		CV (%)	Recovery (%)		
				Each	Mean				
Chlorogenic acid	23Jan18_1	5 hrs (Room temperature)	Low (5)	5.507	5.528	0.3	110.6		
				5.544					
				5.533					
			High (500)	506.6	511.2			1.0	102.2
				510.5					
				516.5					
Rosmarinic acid	23Jan18_1	5 hrs (Room temperature)	Low (5)	4.591	4.612	0.4	92.2		
				4.620					
				4.626					
			High (500)	416.6	419.1			0.5	83.8
				419.8					
				420.8					

#### - post-processed stability 결과

자동주입기에 7 시간 보관 후 분석한 chlorogenic acid QC 시료의 회수율은 109.7 % (QC\_L) 및 101.4 % (QC\_H), 변동계수는 0.7 % (QC\_L) 및 1.3 % (QC\_H) 였고, 자동 주입기에 7 시간 보관 후 분석한 rosmarinic acid QC 시료의 회수율은 90.4 % (QC\_L) 및 81.1 % (QC\_H), 변동계수는 0.7 % (QC\_L) 및 1.4 % (QC\_H) 였음.

이 결과는 허용 기준을 충족하였음(Table 10).

Table 10. Post-processed stability of MS-10

Compounds	Batch ID	Storage condition	QC level (mg/mL)	Measured conc. (mg/mL)		CV (%)	Recovery (%)
				Each	Mean		
Chlorogenic acid	23Jan18_1	7 hrs (15 °C Auto-sampler)	Low (5)	5.520	5.486	0.7	109.7
				5.445			
				5.493			
			High (500)	499.6	506.9	1.3	101.4
				511.8			
				509.3			
Rosmarinic acid	23Jan18_1	7 hrs (15 °C Auto-sampler)	Low (5)	4.556	4.518	0.7	90.4
				4.492			
				4.506			
			High (500)	398.9	405.4	1.4	81.1
				410.2			
				407.0			

- Storage stability 결과

냉장 조건에서 2 일간 보관 후 분석한 chlorogenic acid QC 시료의 회수율은 113.1 % (QC\_L) 및 106.1 % (QC\_H), 변동계수는 1.0 % (QC\_L) 및 1.9 % (QC\_H) 였고, 냉장 조건에서 7 일간 보관후 분석한 chlorogenic acid QC 시료의 회수율은 111.8 % (QC\_L) 및 105.5 % (QC\_H), 변동계수는 1.0 % (QC\_L) 및 0.8 % (QC\_H) 였음.

냉장 조건에서 2 일간 보관 후 분석한 rosmarinic acid QC 시료의 회수율은 92.0 % (QC\_L) 및 85.0 % (QC\_H), 변동계수는 1.1 % (QC\_L) 및 2.0 % (QC\_H) 였고, 냉장 조건에서 7 일간 보관 후분석한 rosmarinic acid QC 시료의 회수율은 94.1 % (QC\_L) 및 88.0 % (QC\_H), 변동계수는 1.4 % (QC\_L) 및 0.8 % (QC\_H) 였음.

이 결과는 허용 기준을 충족하였음(Table 11).

Table 11. Storage stability of MS-10 (Refrigeration for 2nd and 7th day)

Batch ID	Chlorogenic acid		Rosmarinic acid	
	QC_L (5 mg/mL)	QC_H (500 mg/mL)	QC_L (5 mg/mL)	QC_H (500 mg/mL)
25Jan18_1	5.677	529.0	4.638	419.2
	5.594	541.4	4.542	435.2
	5.699	521.3	4.616	421.4
Mean	5.657	530.6	4.599	425.2
SD	0.056	10.2	0.05	8.7
CV (%)	1.0	1.9	1.1	2.0
Recovery (%)	113.1	106.1	92.0	85.0
30Jan18_1	5.527	532.4	4.643	444.1
	5.632	524.1	4.771	437.6
	5.612	526.1	4.706	438.5
Mean	5.590	527.5	4.707	440.0
SD	0.056	4.4	0.064	3.6
CV (%)	1.0	0.8	1.4	0.8
Recovery (%)	111.8	105.5	94.1	88.0

- Stock solution stability 결과

실온에서 6 시간, 냉장 조건에서 7 일간 보관한 chlorogenic acid 표준원액의 상대오차는 각각 0.0 % 및 -0.7 % 였고, 실온에서 6 시간, 냉장 조건에서 7 일간 보관한 rosmarinic acid 표준원액의 상대오차는 각각 0.1 % 및 -0.6 % 였음.

이 결과는 허용 기준을 충족하였음(Table 12, 13).

Table 12. Stock solution stability of chlorogenic acid

Batch ID	Storage conditions	Peak area	Mean	SD	RE (%)
25Jan18_1	Control <sup>a)</sup>	97246	96879	394	-
		96463			
		96929			
	6 hrs (Room temperature)	97299	96901	531	0.0
		96298			
		97105			
30Jan18_1	Control <sup>a)</sup>	96415	96681	244	-
		96733			
		96894			
	7 days (Refrigerator)	95862	96004	194	-0.7
		96225			
		95926			

a) Freshly prepared on the day of analysis

-: Not calculated

(E) WMS77-B 추출 분말 중 Target peak의 분리조건 및 분취

- 분리 목적: 세포실험 및 동물실험에 필요한 대량의 시료를 얻기 위해 분리 정제 (목표량: 약 500 mg, 순도 90% 이상)

1. HPLC 를 이용한 분리정제 (컬럼 스크리닝)

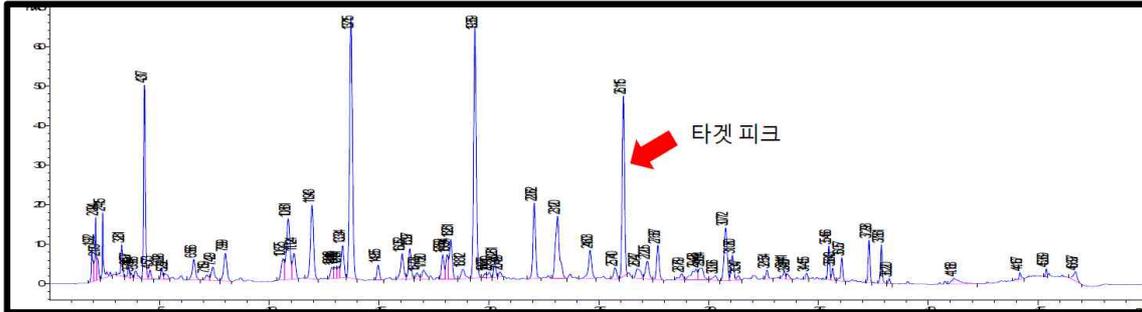
<컬럼별 스크리닝>

1.1. [분석조건 1]

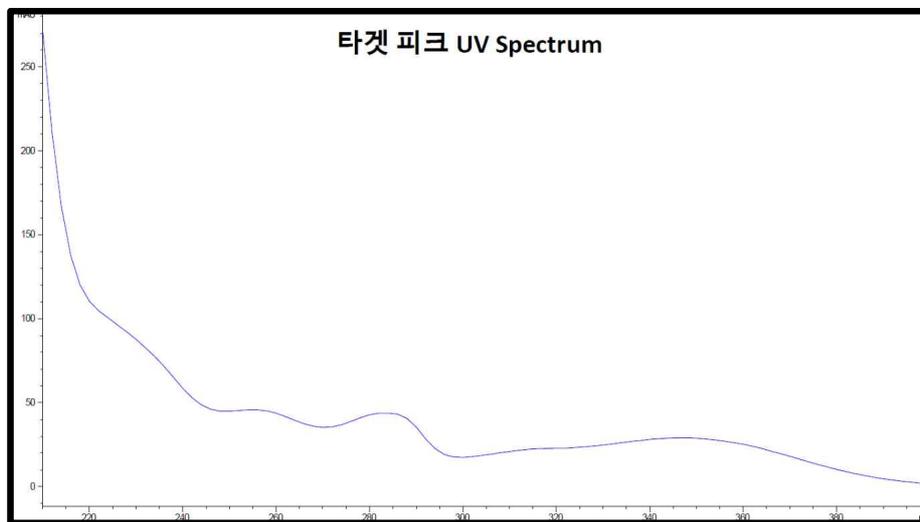
- Equipment : Agilent 1260 infinity II
- Column : Supelco Discovery C18 (4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m)
- Temperature: 35 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 1.4 ml/min
- UV at 254nm
- Eluent : A : 0.5% Phosphoric acid in Water  
B : 0.5% Phosphoric acid in acetonitrile
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

	A	B
0	85	15
7	85	15

28	70	30
40	40	60
42	10	90
44	10	90
45	85	15
50	85	15



[분석조건1] 분리데이터



[분석조건1] Target peak의 spectrum

위 분석 데이터를 바탕으로 컬럼별 TEST를 진행함.

Table 1 Screening column

	컬럼명	사이즈
1	YMC Pack ODS-A	4.6mmi.d. X 250mm, 5um, 12nm
2	YMC Pack ODS-AQ	4.6mmi.d. X 250mm, 5um, 12nm
3	YMC Pack Pro C18	4.0mmi.d. X 150mm, 3um, 12nm
4	YMC-Triart C18	4.6mmi.d. X 250mm, 5um, 12nm

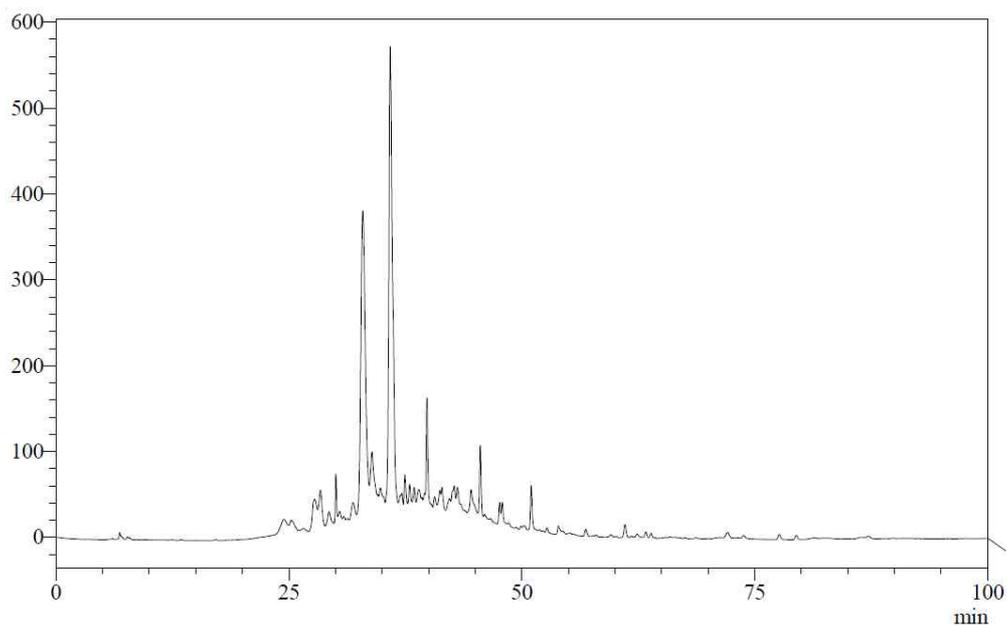
1.2. [분석조건 2]

- Equipment : Shimadzu LC 10A
- Column : YMC Pack ODS-A  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 254nm
- Eluent : A : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water

B : 0.1% TFA in acetonitrile

- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

	A	B
0	85	15
100	10	90



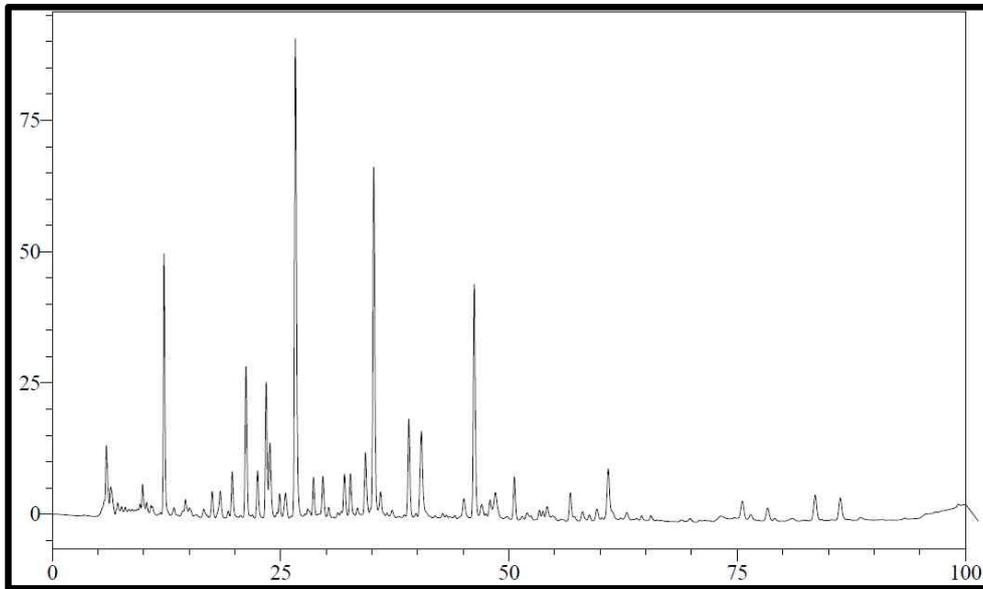
[분석조건2] 분석 크로마토그램

분리 method를 변경했을 때 차이가 있는지 확인하기 위해 gradient 조건을 변경하여 분석을 진행함.

1.3. [분석조건 3]

- Equipment : Shimadzu LC 10A
- Column : YMC Pack ODS-A  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 254nm
- Eluent : A : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
B : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

	A	B
0	75	25
80	40	60
90	10	90
100	10	90



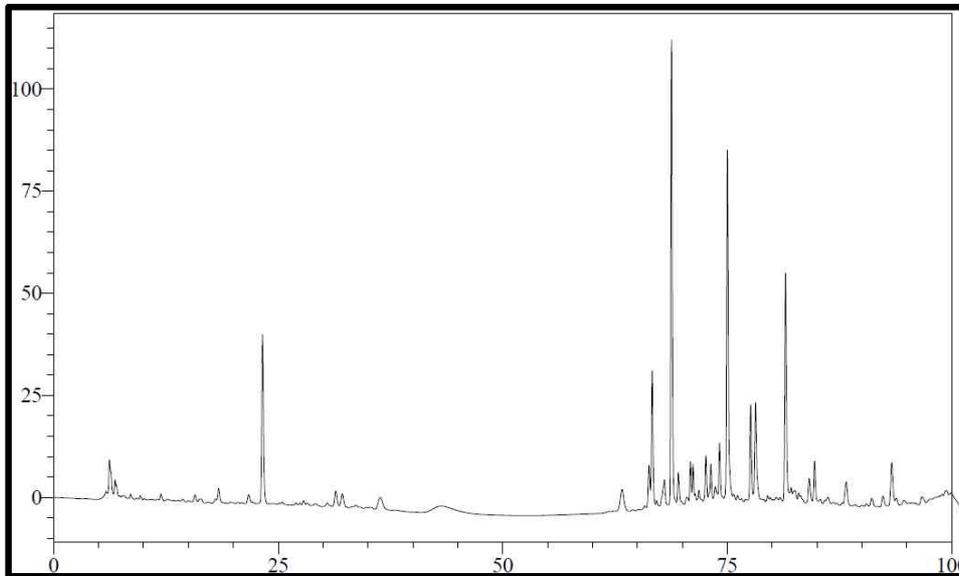
[분석조건3] 분석 크로마토그램

Gradient 조건을 변경하여 아래 [분석조건4]와 같이 분석을 진행함.

1.4. [분석조건4]

- Equipment : Shimadzu LC 10A
- Column : YMC Pack ODS-A  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 254nm
- Eluent : A : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
B : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

	A	B
0	80	20
80	50	50
90	10	90
100	10	90



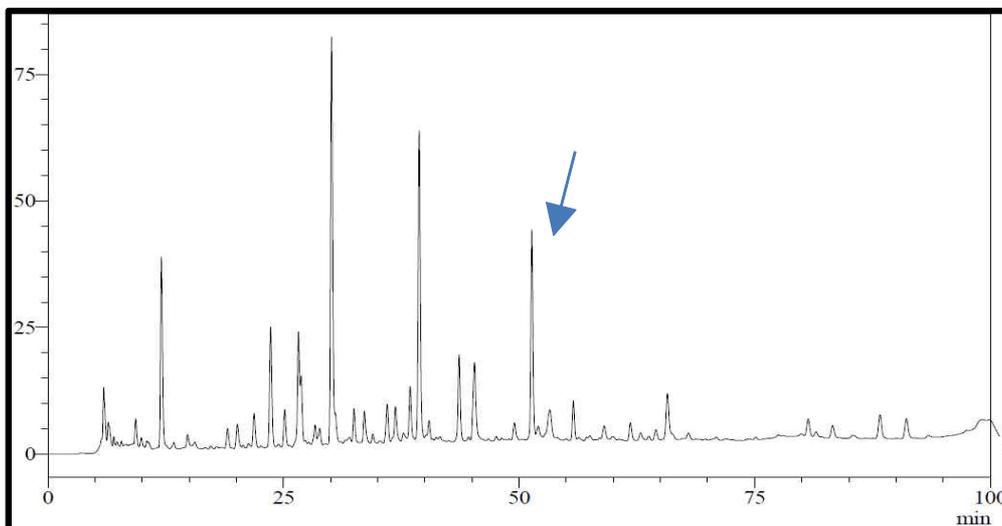
[분석조건4] 분석 크로마토그램

Target으로 설정한 peak가 상당히 뒤쪽에 있기 때문에 분리시간이 뒤쪽에 나오는 일반적으로 좋은 조건은 아닌 것으로 판단함.

1.5. [분석조건5]

- Equipment : Shimadzu LC 10A
- Column : YMC Pack ODS-A  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 254nm
- Eluent : A : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
B : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

	A	B
0	77	23
80	45	55
90	10	90
100	10	90



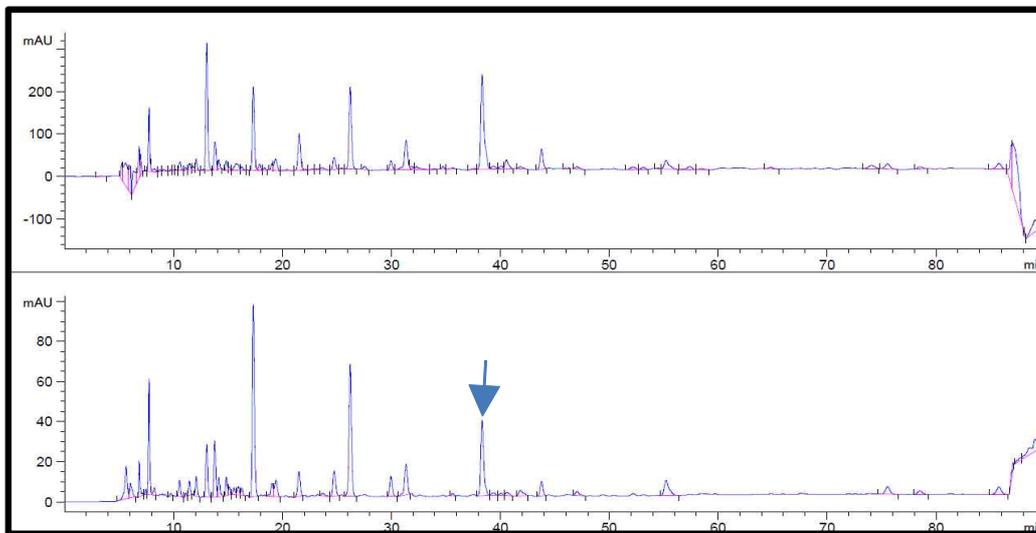
[분석조건5] 분석 크로마토그램

Target으로 설정한 peak로 보이지만 뒷부분의 impurity가 분리되지 않아 더 좋은 분리능 조건이 필요함.

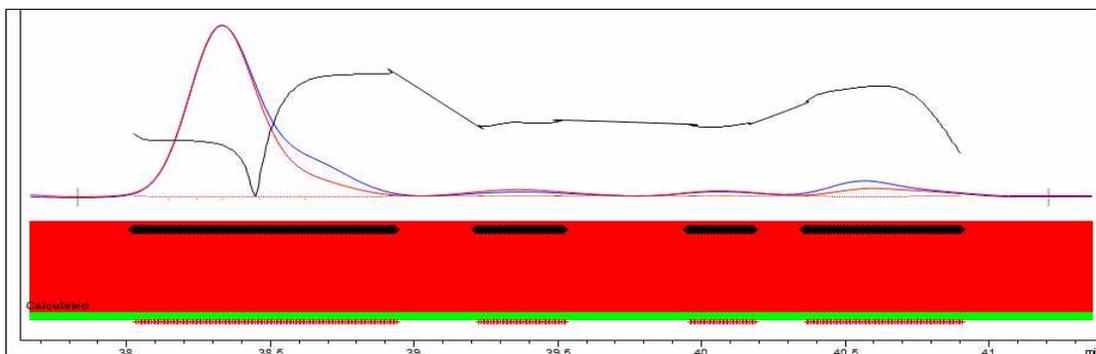
1.6. [분석조건6]

- Equipment : Agilent 1260
- Column : YMC Pack ODS-A  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 210nm, 254nm
- Eluent : B : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
A : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

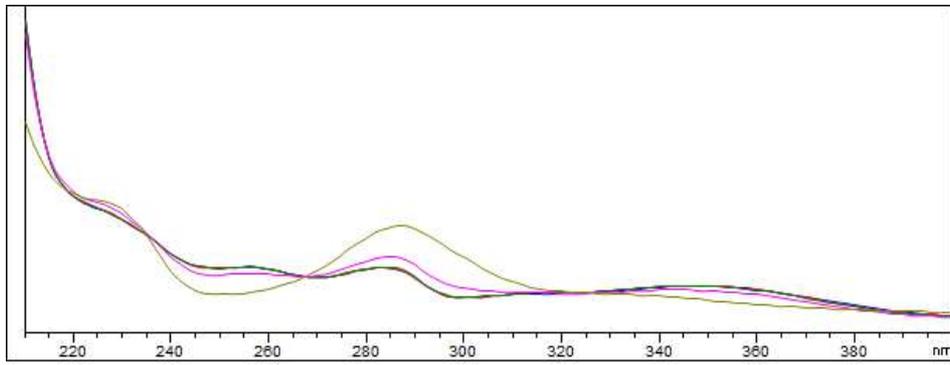
	A	B
0	20	80
80	40	60
90	90	10
100	90	10



[분석조건6] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm



[분리조건6] Purity graph



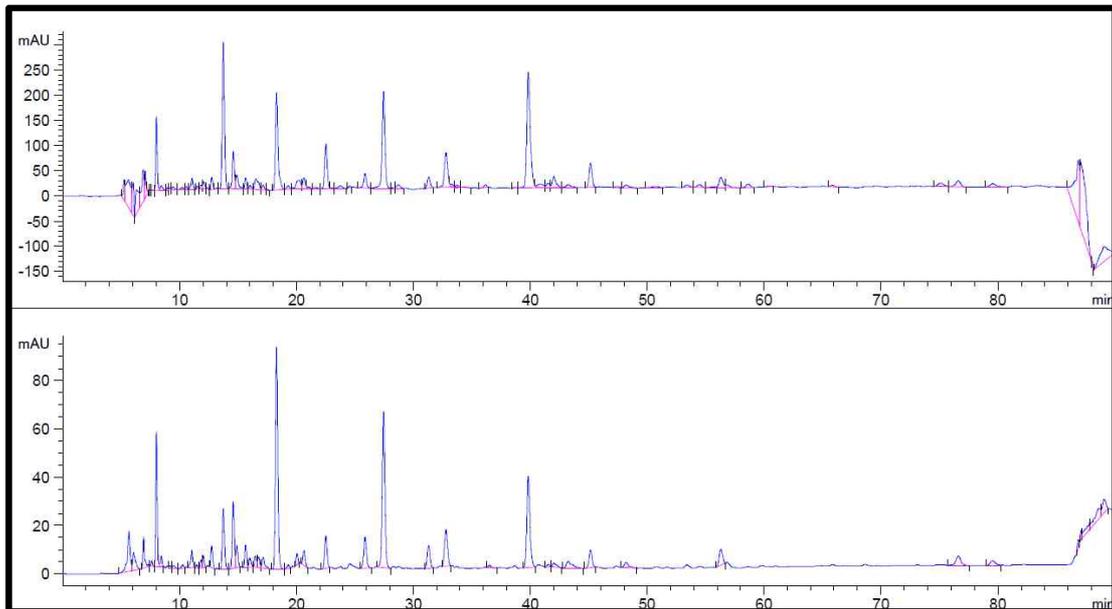
[분리조건6] Target peak spectrum

Target peak라 생각되지만 spectrum 자체가 깨끗하지 못한 것으로 보아 완전 분리는 되지 않은 것으로 보임.

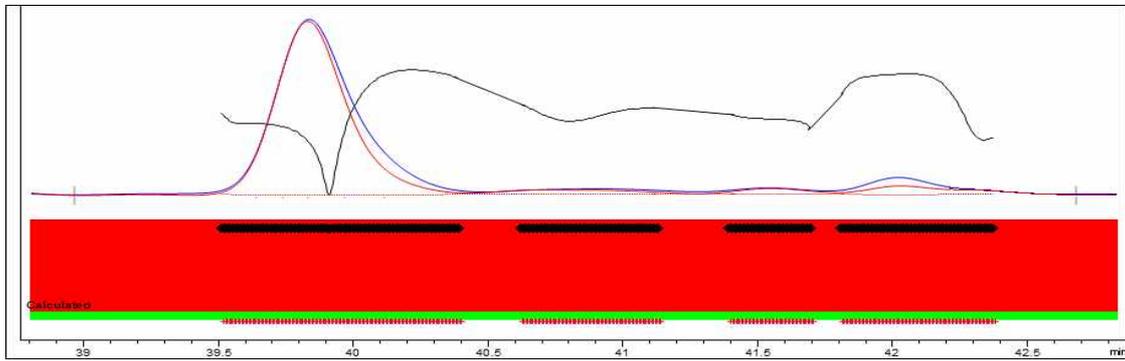
1.7. [분석조건7]

- Equipment : Agilent 1260
- Column : YMC Pack ODS-A  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 210nm, 254nm
- Eluent : B : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
A : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

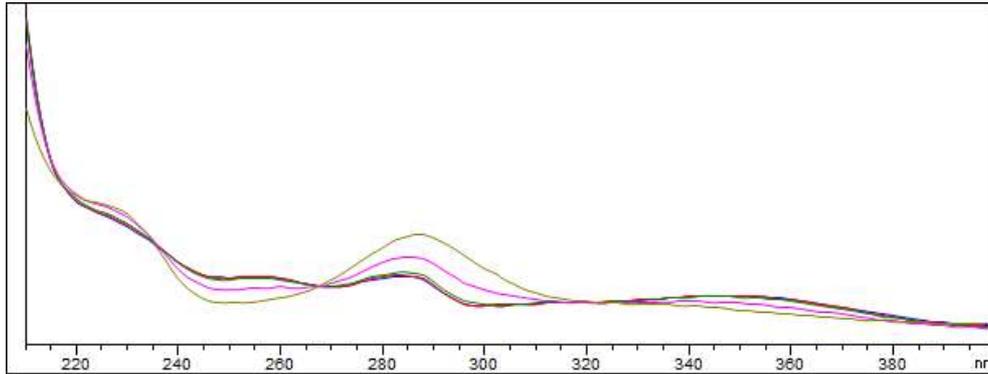
	A	B
0	20	80
80	40	60
81	90	10
90	90	10



[분석조건7] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm



[분석조건7] Purity graph



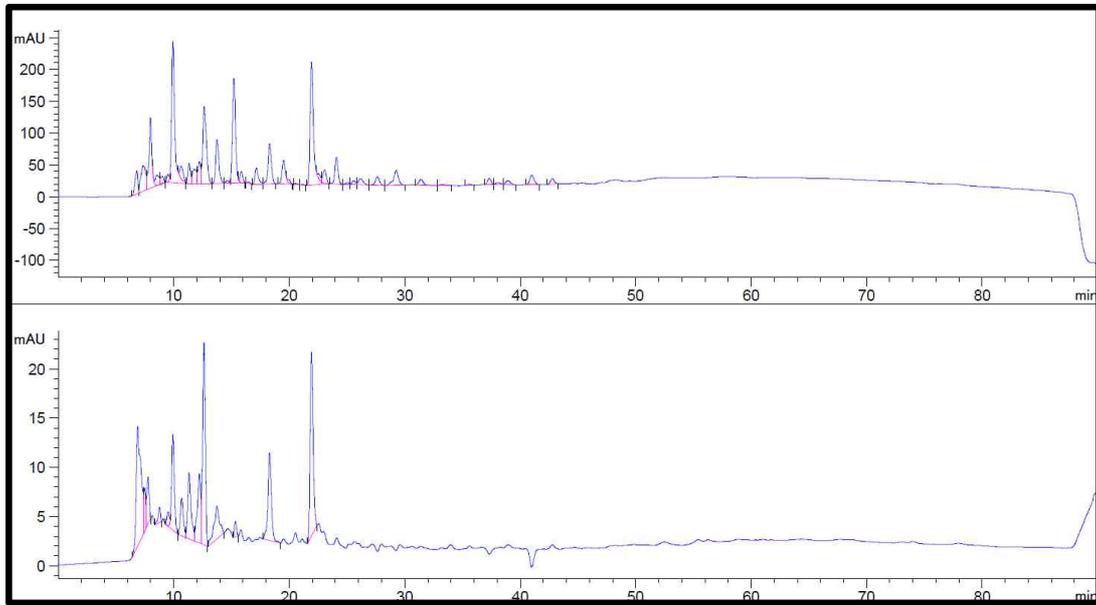
[분석조건7] Target peak spectrum

YMC ODS-A에서 분석조건 변경만으로 분리조건을 설정하는 데 쉽지 않을 것으로 예상되어 다른 컬럼을 선정하여 TEST 진행 - YMC Pack ODS-AQ를 TEST

1.8. [분석조건8]

- Equipment : Agilent 1260
- Column : YMC Pack ODS-AQ  
(4.6mm i.d. X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 210nm, 254nm
- Eluent : B : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
A : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

	A	B
0	20	80
80	40	60
81	90	10
90	90	10



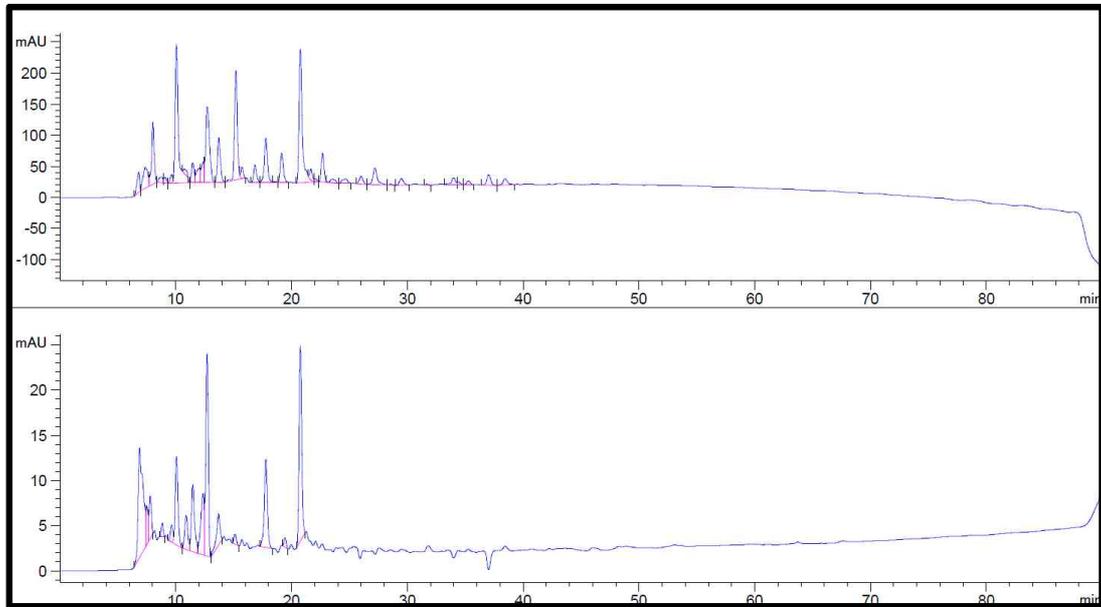
[분석조건8] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm

YMC Pack ODS-A에서와 동일한 Gradient를 설정하였을 때 peak들이 전체적으로 빠른 시간에 용출되는 것을 확인 - YMC Pack ODS-A컬럼보다 YMC Pack ODS-AQ컬럼이 탄소함량이 낮아 일어나는 현상

1.9. [분석조건9]

- Equipment : Agilent 1260
- Column : YMC Pack ODS-AQ  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 210nm, 254nm
- Eluent : B: 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
A : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

	A	B
0	20	80
80	70	30
81	90	10
90	90	10



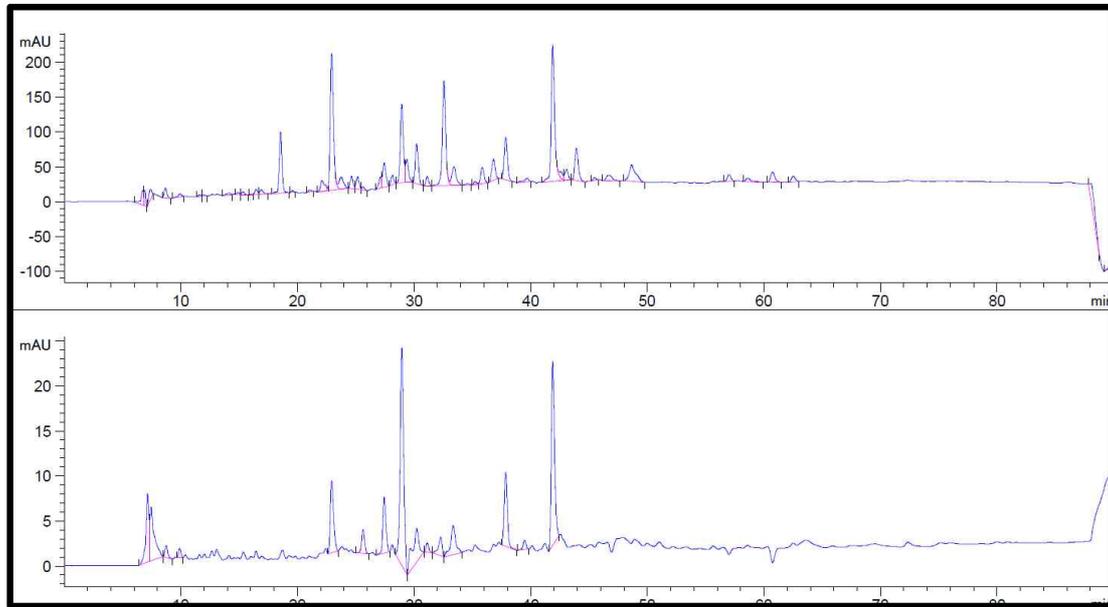
[분석조건9] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm

분석조건을 일부 변경했음에도 분리가 크게 변경되지 않아 다시 한 번 분석조건을 변경함.

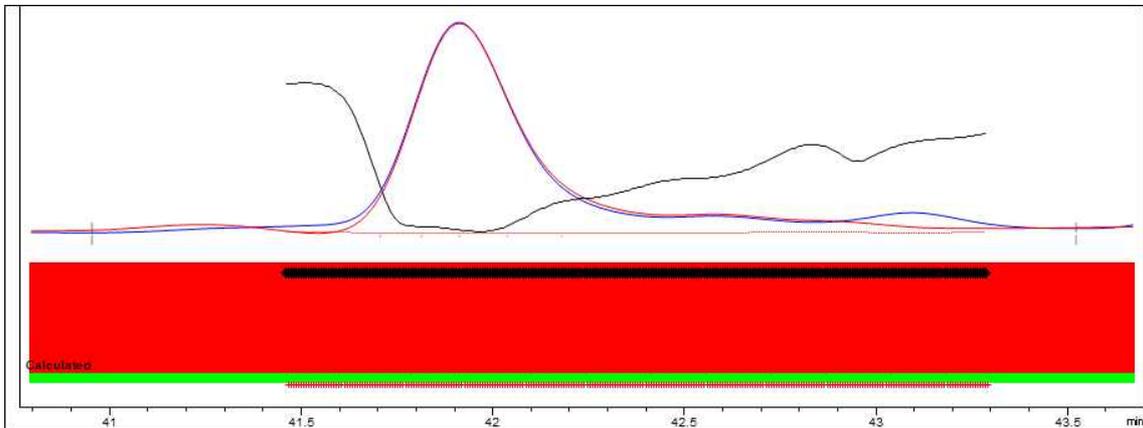
1.10.[분석조건10]

- Equipment : Agilent 1260
- Column : YMC Pack ODS-AQ  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 210nm, 254nm
- Eluent : B : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
A : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

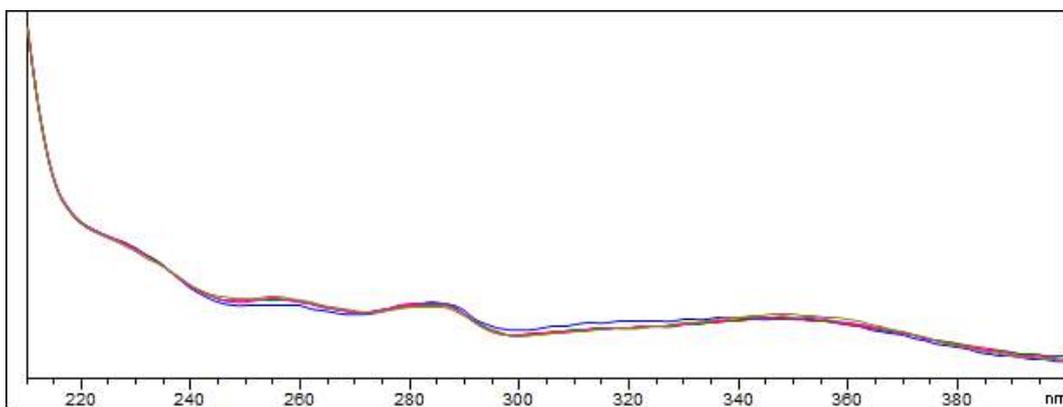
	A	B
0	10	90
80	50	50
81	90	10
90	90	10



[분석조건10] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm



[분석조건10] Peak purity data



[분석조건10] Target peak spectrum

YMC Pack ODS-A에서 분석했던 데이터와 비교해보면, YMC Pack ODS-AQ쪽이 다른 peak의 분리는 좋지 않았지만 Target의 분리에는 오히려 더 나은 결과를 보이는 것으로 판단함.

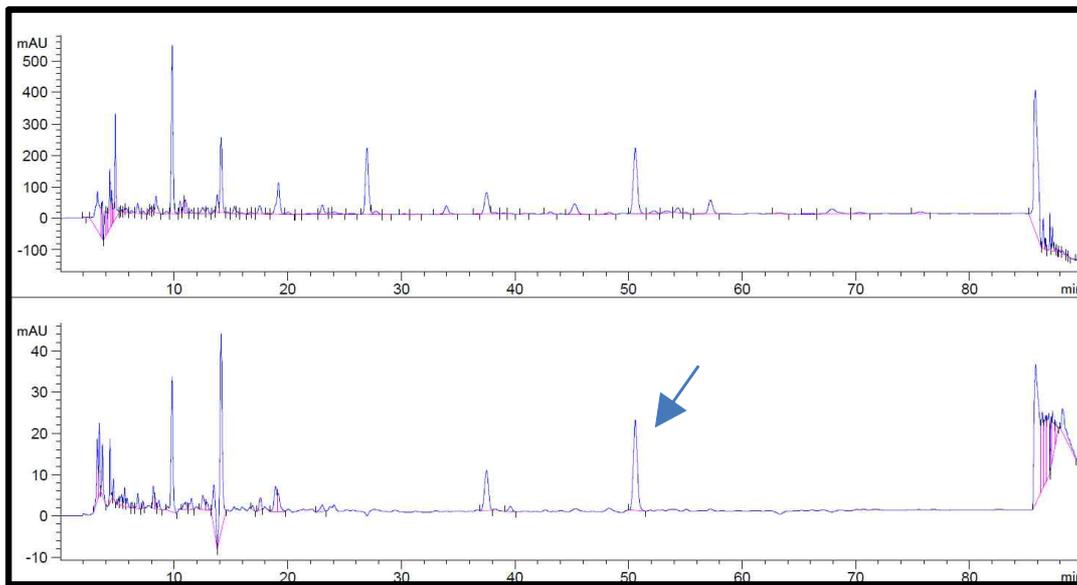
위와 같은 방식으로 다른 컬럼에 대한 검토를 추가 - YMC Pack Pro C18

### 1.11.[분석조건11]

- Equipment : Agilent 1260

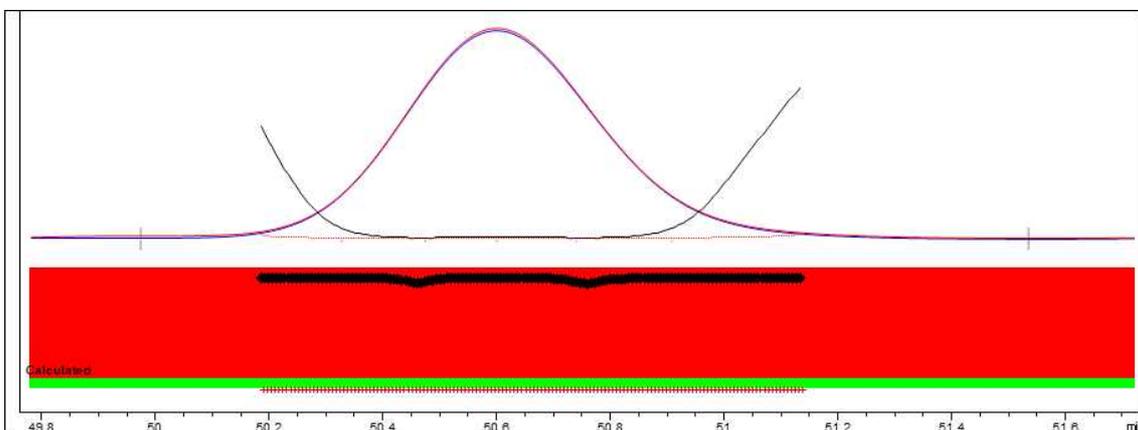
- Column : YMC Pack Pro C18  
(4.0mmi.d.X 150mm, 3 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 210nm, 254nm
- Eluent : A : 0.1% TFA in acetonitrile  
B : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

	A	B
0	20	80
80	30	70
81	90	10
90	90	10

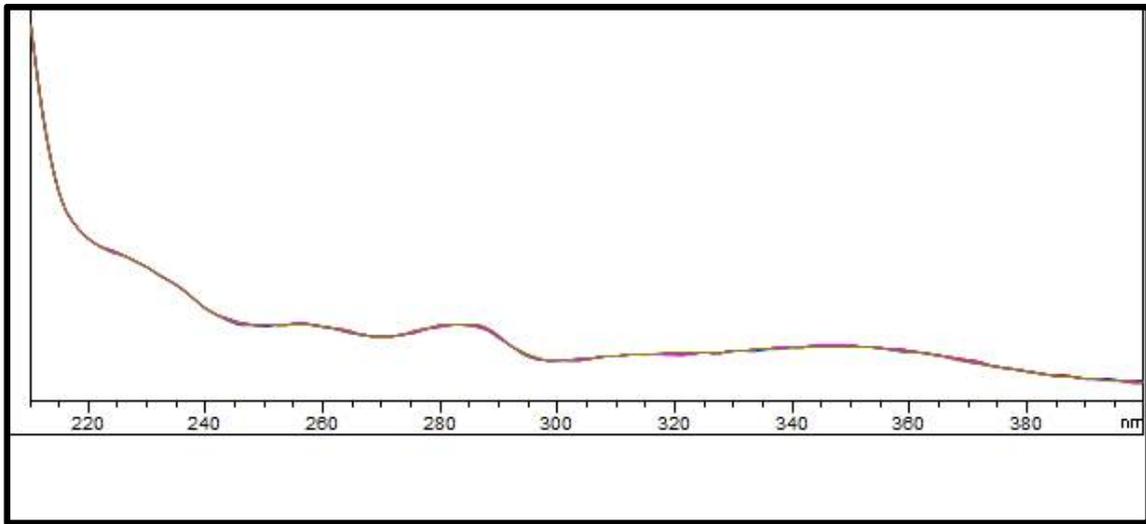


[분석조건11] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm

YMC Pack ODS-A에서는 전체적으로 골고루 퍼져있음에 반해 Pro C18의 경우 Target부분이 떨어져 나간 듯한 데이터가 나옴.



[분석조건11] Purity data



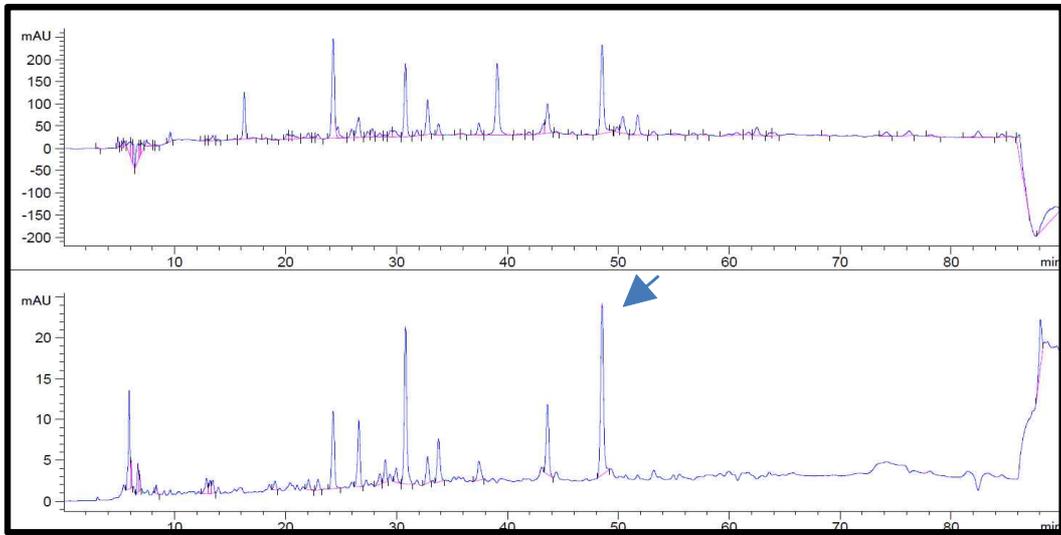
[분석조건11] Target peak의 spectrum

Target으로 예측되는 peak의 spectrum을 확인한 결과 purity도 높으며 우리가 원하는 Target의 spectrum과 매우 유사함을 확인함.

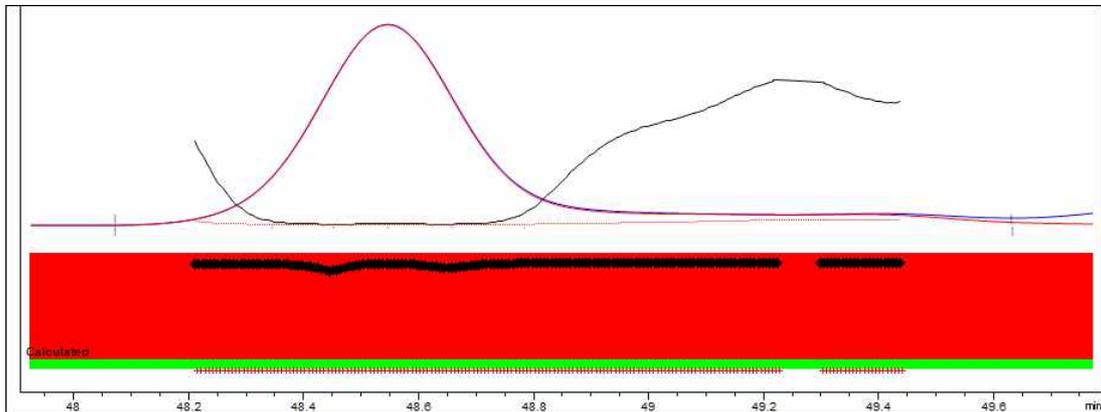
1.12.[분석조건12]

- Equipment : Agilent 1260
- Column : YMC-Triart C18  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 210nm, 254nm
- Eluent : A : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
B : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 5 $\mu$ l
- Gradient condition

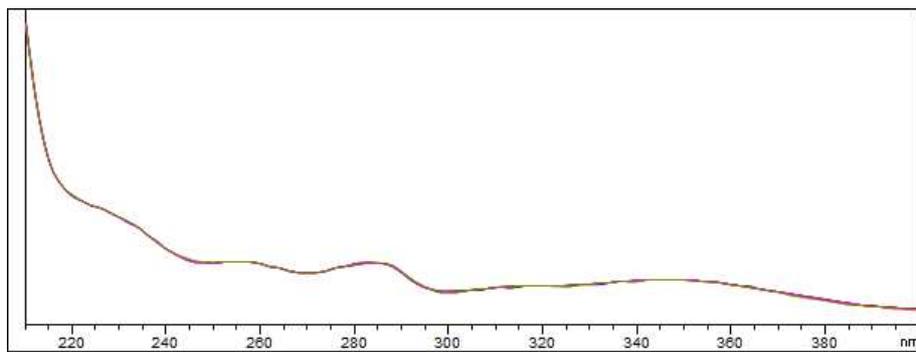
	A	B
0	85	15
80	50	50
81	10	90
90	10	90



[분석조건12] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm



[분석조건12] Purity data



[분석조건12] Target peak의 spectrum

여러 컬럼을 사용하여 분석조건 screening을 진행한 결과, 결과만 놓고 봤을때는 YMC-Triart C18이 가장 좋은 결과를 보이는 것으로 나타남. 다만 YMC Pack Pro C18의 경우 scale up이 용이하지 않기 때문에 대안으로 YMC-Triart C18을 사용하는 것이 좋을 것으로 판단됨.

## 2. 부하량 TEST

YMC Triart C18컬럼이 적절한 컬럼으로 선정되어 부하량 TEST를 진행함.

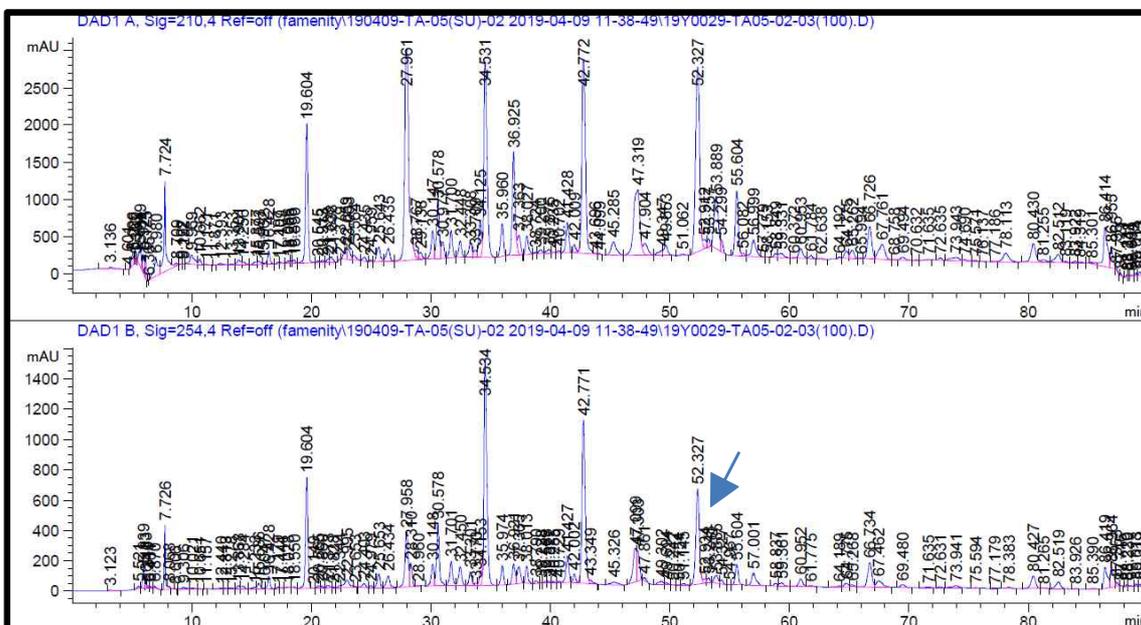
부하량이 증량되었을 때 분리가 어떻게 바뀌는지 확인이 필요함.

### 1.13.[분석조건13]

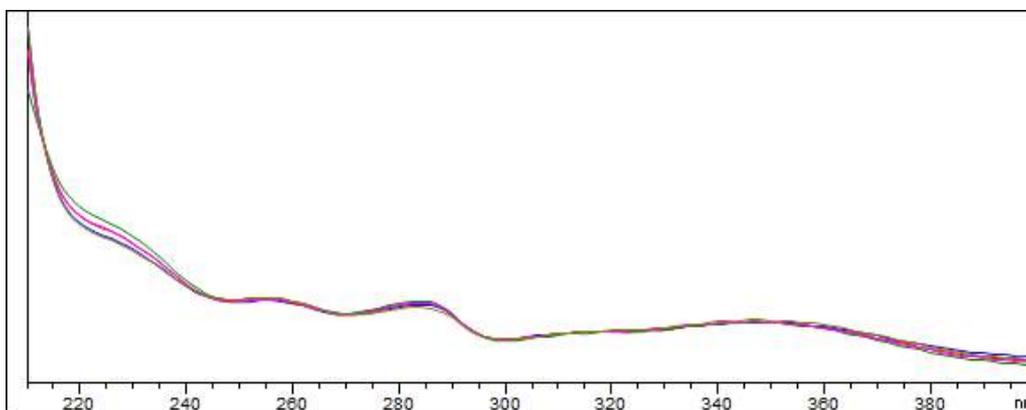
- Equipment : Agilent 1260

- Column : YMC-Triart C18  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 210nm, 254nm
- Eluent : A : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
B : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 100 $\mu$ l
- Gradient condition

	A	B
0	85	15
80	50	50
81	10	90
90	10	90



[분석조건13] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm



[분석조건13] Target peak의 spectrum

Spectrum data를 보면 해당 peak임이 확인되고 있으나 약간의 흔들림이 있는 것으로 보아 peak 겹침이 있는 것으로 보임.

이는 분취를 진행했을 때 순도구간 설정을 통해 필요한 부분을 골라내는 작업을 진행해야 될 것으로 보임.

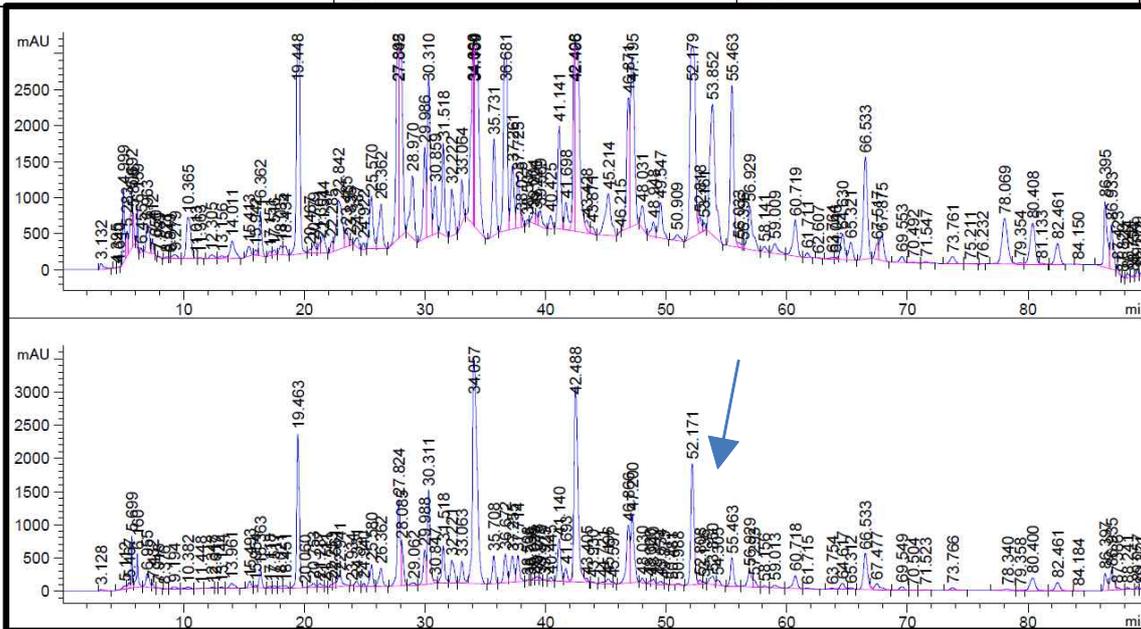
동일한 조건에서 세 번 TEST하여 확인한 후 부하량을 설정함.

현재까지 최대 부하량은 5mg/mL에서 100ul (4.6mmi.d.컬럼)으로 더 높은 농도가 주입이 가능한 지 확인이 필요함.

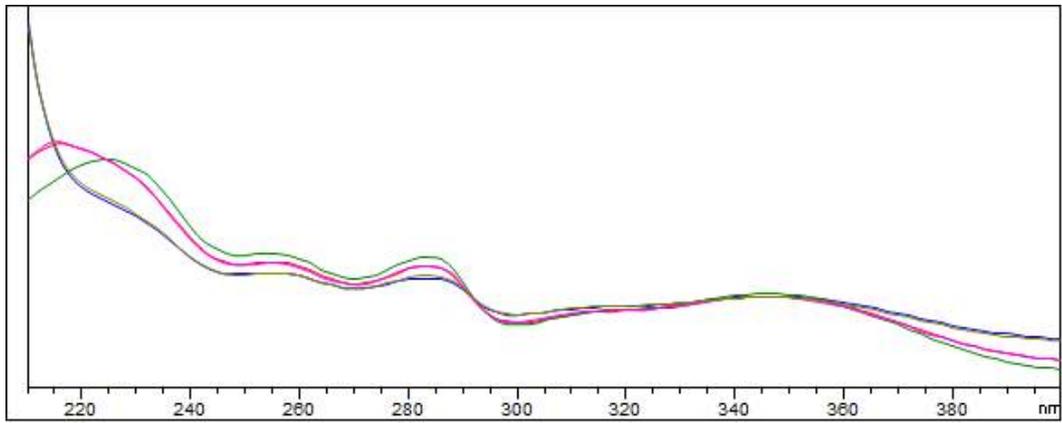
1.14.[분석조건14]

- Equipment : Agilent 1260
- Column : YMC-Triart C18  
(4.6mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: 25 $^{\circ}$ C
- Flow rate : 0.5ml/min
- UV at 210nm, 254nm
- Eluent : A : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
B : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 100 $\mu$ l (20mg/mL)
- Gradient condition

	A	B
0	85	15
80	50	50
81	10	90
90	10	90



[분석조건14] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm



[분석조건14] Target peak의 spectrum

Peak에 impurity가 많이 있어 순도가 높게 나오지 않는 것으로 예상  
 분취 scale에서 나누어 받았을 때 순도가 나올 수 있는지를 통해 부하량을 확정해야 될 것으로 보임.

### 3. 분취 TEST

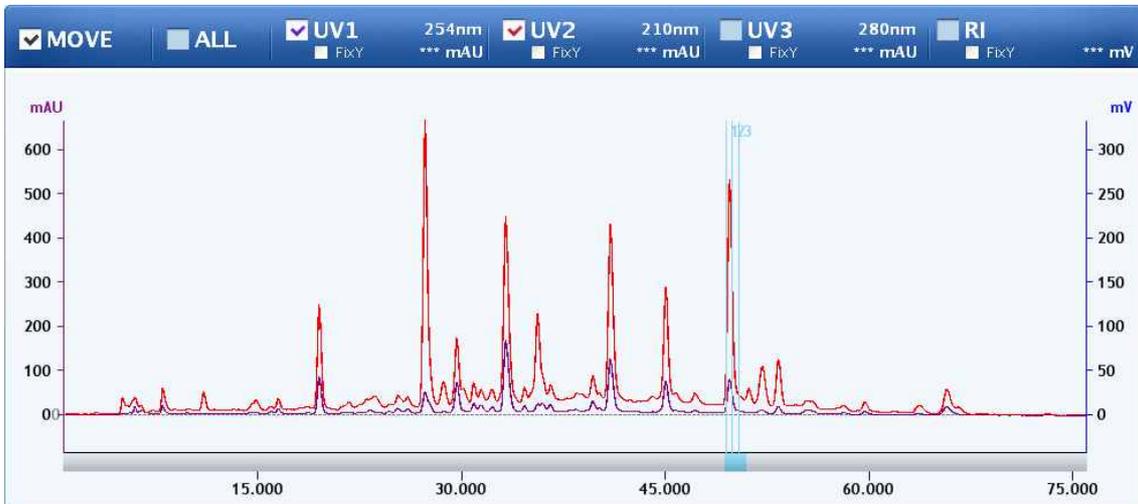
분취 TEST는 분석에서 설정한 분취조건과 부하량 조건을 바탕으로 R&D Scale의 분취 장비를 이용하여 분취를 실제 진행하여 정상적인 scale up이 가능한 지 scalability를 확인하는 과정

#### 1.15.[분취조건1]

- Equipment : YMC LC Forte/R
- Column : YMC-Triart C18  
(20mmi.d.X 250mm, 5 $\mu$ m, 12nm)
- Temperature: Ambient (22 $^{\circ}$ C)
- Flow rate : 9.5ml/min
- UV at 210nm, 254nm
- Eluent : A : 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) in Water  
B : 0.1% TFA in acetonitrile
- Injection volume : 2mL (20mg/mL)
- Gradient condition

	A	B
0	85	15
80	50	50
81	10	90
90	10	90

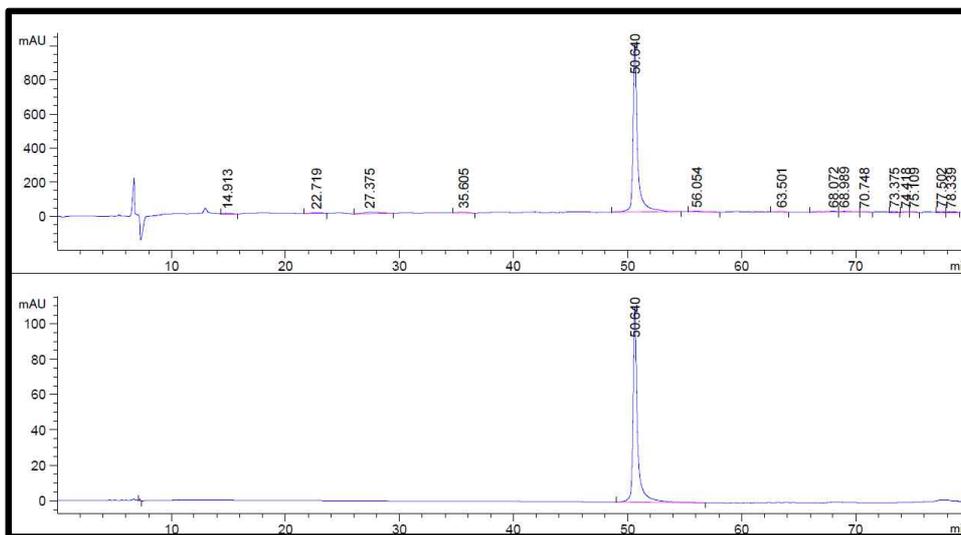
분석에서 최대 TEST 함량인 20mg/mL의 100ul 주입 (실제 주입량 2mg -> 4.6mmi.d.컬럼)을 scale up을 통해 약 20배 scale up된 20mmi.d.컬럼에 주입  
 실제 주입량은 20mmi.d.컬럼에서 40mg



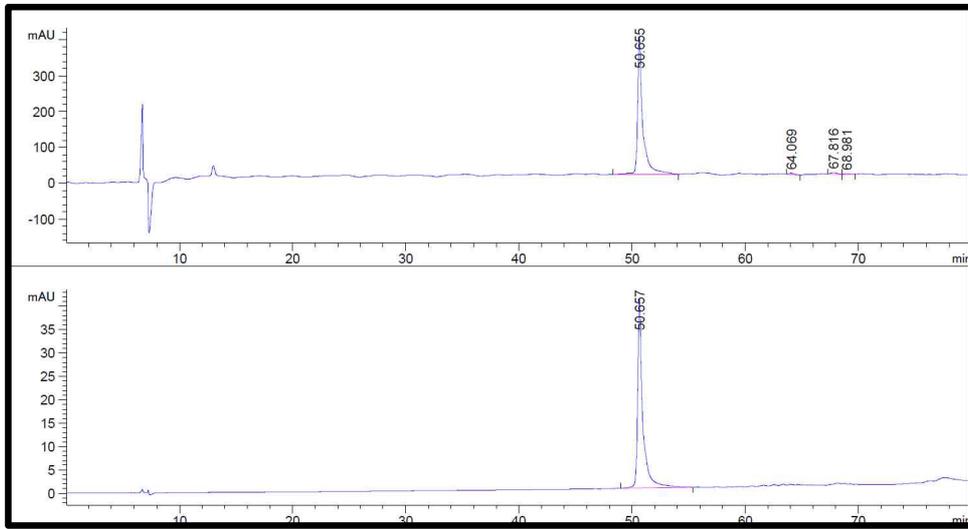
Date:20190419 105854  
 Flowrate:9.5 mL/min  
 LowerLimit:0 MPa  
 UpperLimit:20 MPa

**[분취조건1] 분취 크로마토그램**

크로마토그램에서 적색크로마토그램이 210 nm이고, 보라색 크로마토그램이 254 nm  
 “[분석조건14] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm“ 의 주입량과 동등한 데이터임에도 210 nm  
 에서 패턴이 다르게 나오는 것을 알 수 있음.  
 이는 시스템의 UV cell 크기가 분석HPLC에 비해 커짐에 따라 감도가 줄었다는 점과 “[분석조건14] 분석  
 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm“ 의 데이터가 UV cell이 작아 흡광도 범위가 넘어가는 부분은 잘  
 려진 것과 impurity가 상대적으로 크게 보임에 따른 복합적인 요인으로 생각할 수 있음.  
 따라서 분취에서는 254nm보다 peak를 잘 볼 수 있는 210nm를 사용하는 것이 적절한 분취데이터를 수득  
 하는 방법이라고 할 수 있음.  
 “[분석조건14] 분석 크로마토그램; 위 210 nm, 아래 254 nm“에서 254 nm의 데이터와 ”[분취조건1] 분  
 취 크로마토그램“ 데이터를 비교하면 비슷한 패턴을 보임을 알 수 있고, 이에 따라 적색화살표 부분이  
 target물질임을 알 수 있고, 이를 두 개 내지 세 개의 fraction으로 나눌 수 있음. [분취조건1]을 통해 분리  
 한 fraction을 [분석조건 14]에 의해 분석을 진행하고, 단 주입량은 fraction으로서 50ul를 주입함.

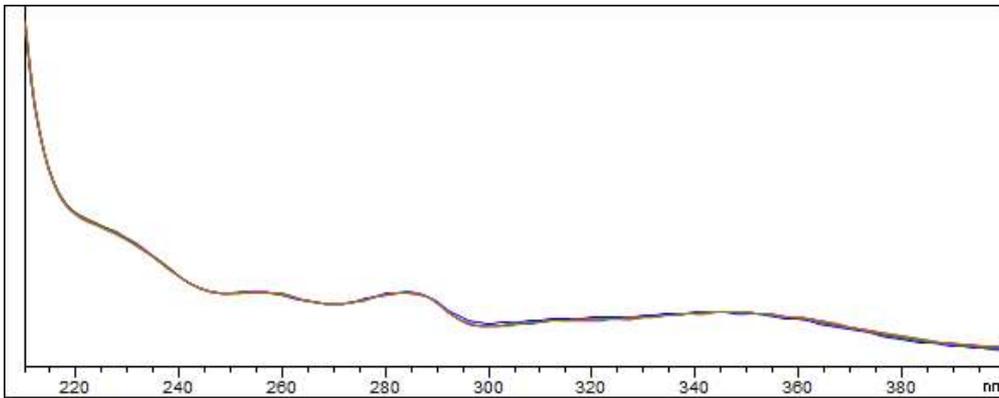


분취조건1의 Fr1의 분석데이터; 위 210 nm, 아래 254 nm

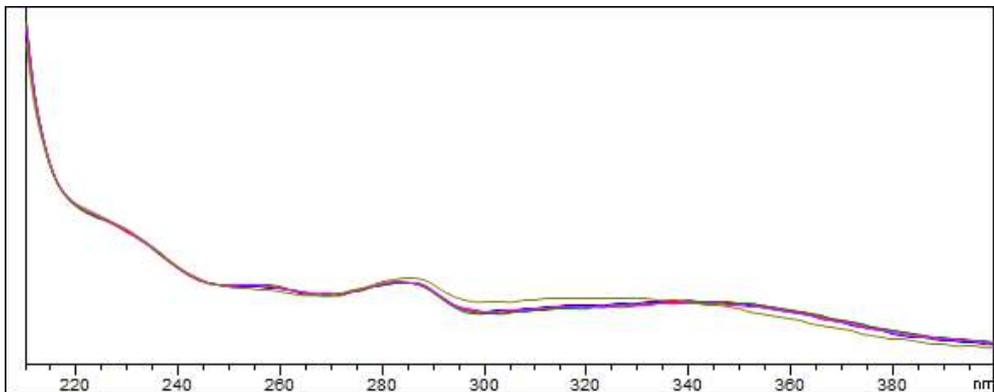


분취조건1의 Fr2의 분석데이터; 위 210 nm, 아래 254 nm

“분취조건1의 Fr1의 분석데이터; 위 210 nm, 아래 254 nm”와 “분취조건1의 Fr2의 분석데이터; 위 210 nm, 아래 254 nm”의 두 가지 데이터를 확인하면 분취를 통해 높은 순도의 target 물질을 얻을 수 있음을 확인함.



분취조건1의 Fr1의 spectrum



분취조건1의 Fr2의 spectrum

“분취조건1의 Fr1의 spectrum”과 “분취조건1의 Fr2의 spectrum”의 각 데이터를 보면 분리하고자 하는 Target spectrum과 일치함을 확인함.

다만 Fr2의 경우 Figure 30 분취조건1의 Fr2의 분석데이터. 210nm[상], 254nm[하].의 분석데이터만 확인하면 고순도로 보이지만 Figure 32 분취조건1의 Fr2의 spectrum의 데이터를 보면 미세하게 다른 물질과 섞여 있는 것으로 보임

따라서 분취 시에 더 잘게 나누어 순도구간을 정해야 하고, 더불어 spectrum과 동시에 확인하여 순도를 만족하는 지 확인해야 함.

#### 4. 1, 2차 정제

UV에서 peak 크기로 봤을 때는 양이 많은 것처럼 보이나 실제로 분획했을 때 양이 적었기 때문에 UV 흡광이 양에 비해 매우 높은 샘플로 보임. 상대적으로 양이 매우 적은 샘플의 경우 바로 고순도로 분리하는 것보다 다량으로 1차 정제 후 이를 2차 정제하는 것이 효율적인 경우가 매우 많음. Lab scale에서 1차 정제로 최대 부하한 후 이를 농축하여 2차 정제에서 분리하고자 함. 이렇게 진행하는 이유는 1차 정제에서 Target peak의 농도를 높이고 정밀 분리 진행시에도 부하량을 증량시키기 위함임. 만약 1, 2차 정제로 나누어 진행하지 않을 경우에는 500mg 획득에 1100번 정도 진행해야 되는 것으로 계산함.

#### 1) 1차 정제

##### 1.16.[분취조건2]

Equipment : LC Forte/R

Column : YMC Triart C18 (20mmi.d. X 250mm, 5um)

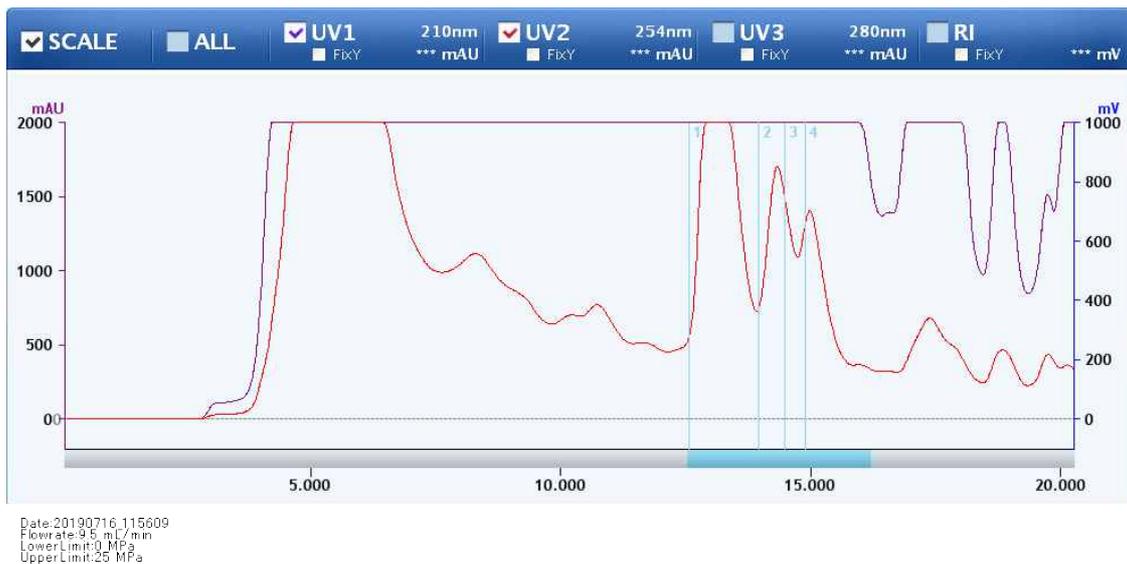
Flow rate : 9.5mL/min

Eluent : A) 50mM ammonium phosphate monobasic + Phosphoric acid=pH1.5

B) Acetonitrile

30%B(0min), 70%B(50)

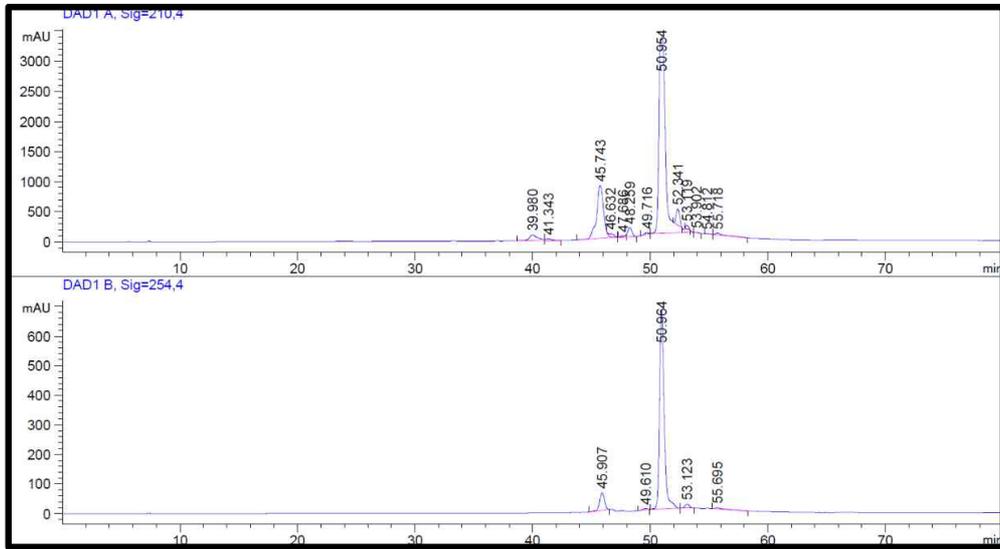
Injection : 3mL (1g/3mL)



#### [분취조건2] LC Forte/R 1차 분리정제

위와 같은 1차 정제 최대 부하량으로 분리했을 때 254 nm(적색크로마토그램)에서 적색 box안에 Target이 있는 것을 확인함.

이에 대한 분석 데이터는 아래 “[분취조건2] 1차정제 분석데이터”에 나타난 바와 같이 target peak를 확인할 수 있음.



[분취조건2] 1차정제 분석데이터

이 결과로 위와 같은 부하량 데이터를 얻었으므로 같은 부하량으로 2차정제를 실시함.

2) 2차 정제

1.17.[분취조건3]

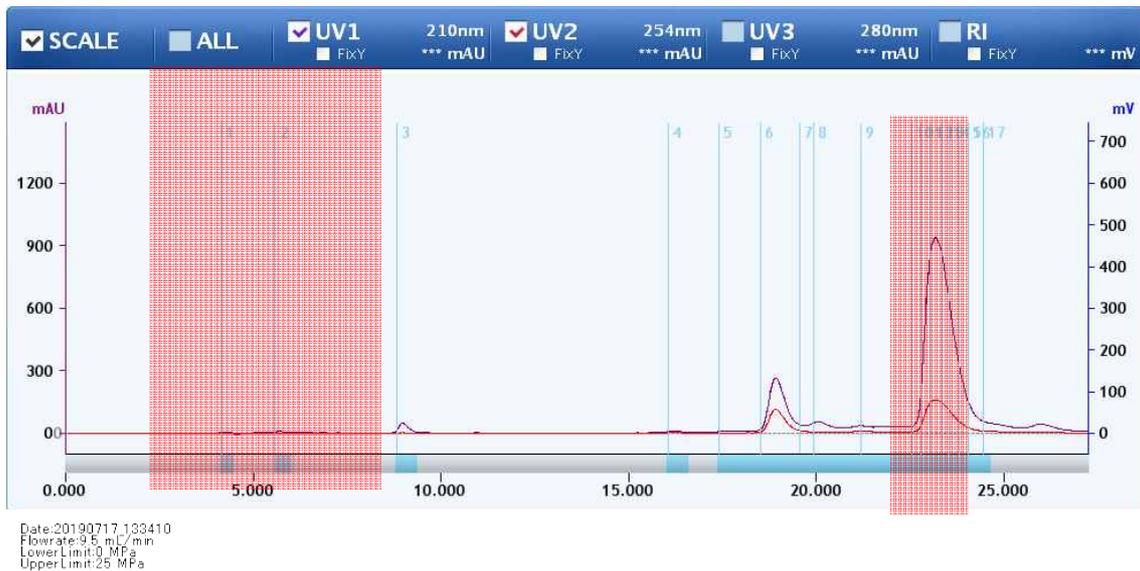
Equipment : LC Forte/R

Column : YMC Triart C18 (20mmi.d. X 250mm, 5um)

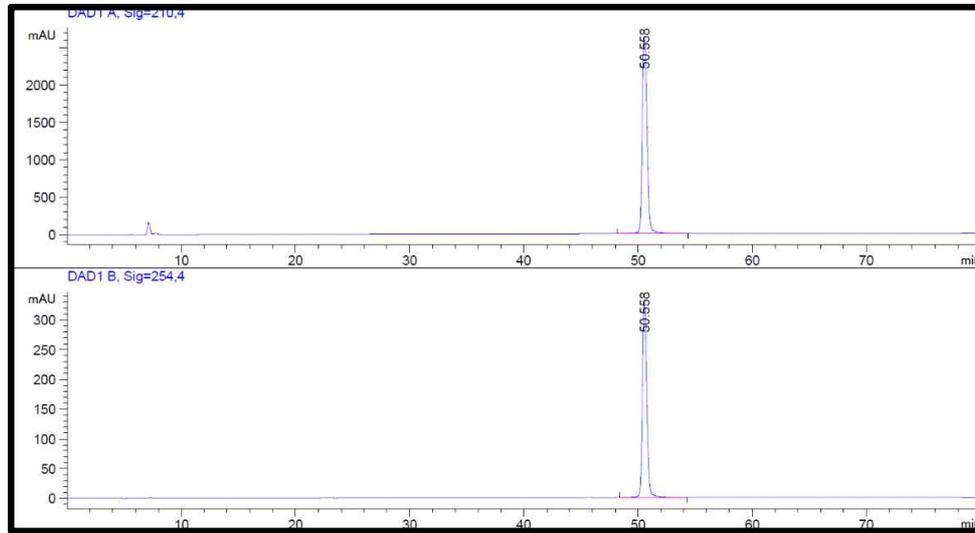
Flow rate : 9.5mL/min

Eluent : 30% acetonitrile with 0.1% TFA

Injection : 1mL (1차정제농축)



[분취조건3] 2차정제 실시 데이터



2차정제물의 분석데이터

위와 같이 진행하여 1, 2차 정제를 통해 기존 분취와 비교하여 약 16배 부하량이 증량되고 있음을 확인함.

5. Scale up 1차 정제

위 4번 항에서 진행한 semi prep 단계에서의 1, 2차 정제의 데이터를 바탕으로 scale up을 진행하여 분리를 진행함.

먼저 target 물질의 정제를 위해 1차 정제를 scale up하여 진행함.

1.18.[분취조건4]

Equipment : YMC K-Prep LAB 300

Column : YMC SB column Packed with YMC Gel Triart C18  
(50mmi.d. X 500mm, 15um, 12nm)

Flow rate : 59mL/min

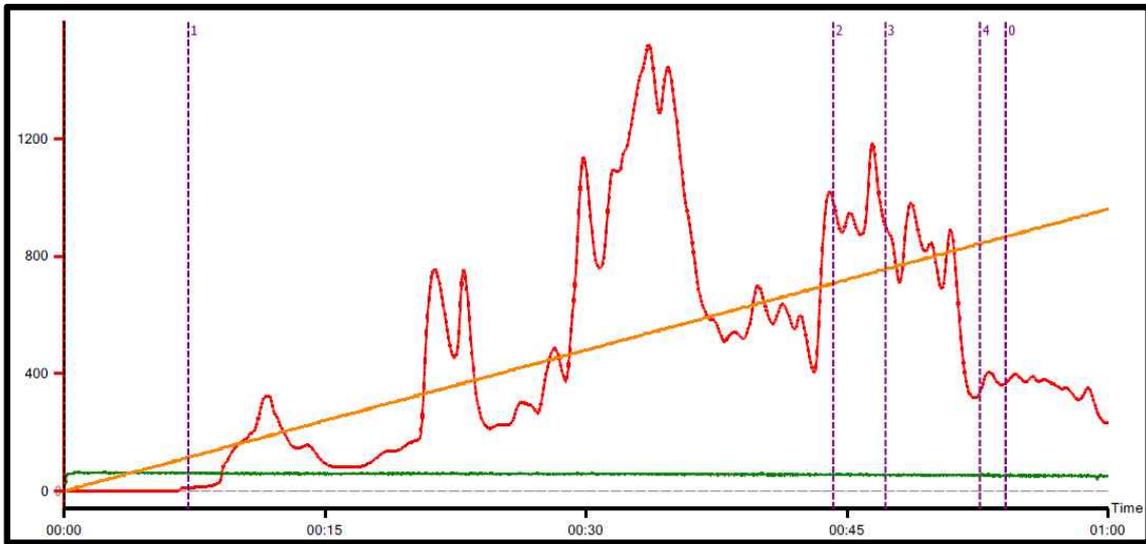
Eluent : A)50mM ammonium phosphate(pH 1.8) : ACN = **14 : 3**

B) 50mM ammonium phosphate(pH 1.8) : ACN = 3 : 7

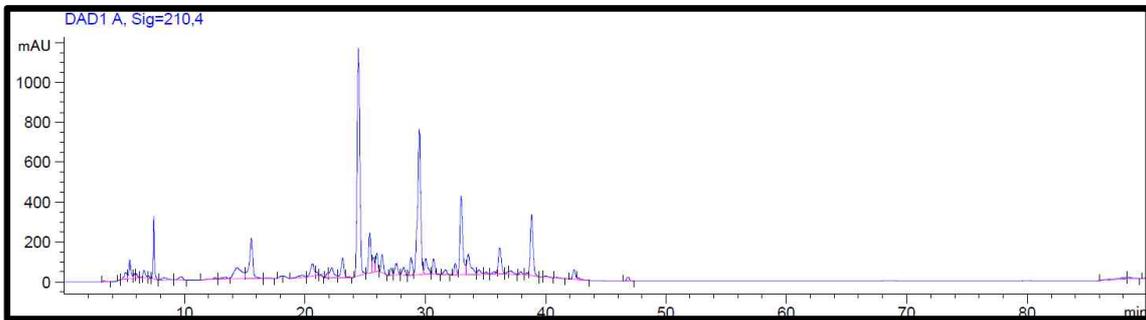
Injection : 20mL (5g/18mL)

Gradient condition

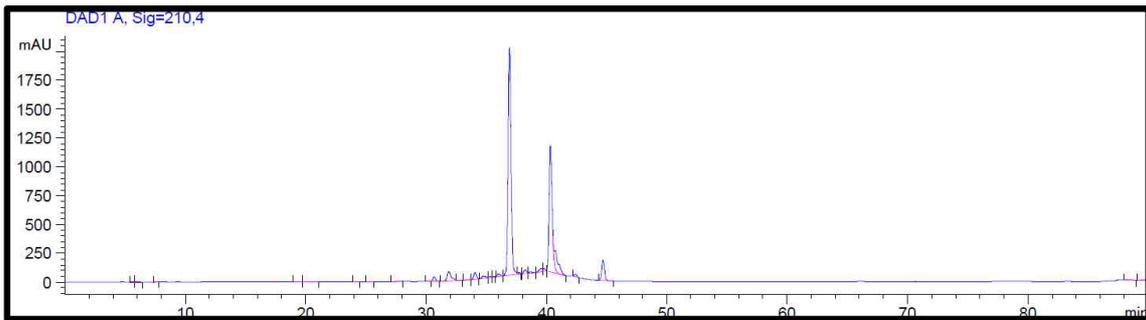
	<b>A</b>	<b>B</b>
0	100	0
60	40	60
60.01	0	100
75	0	100
75.01	100	0
100	100	0



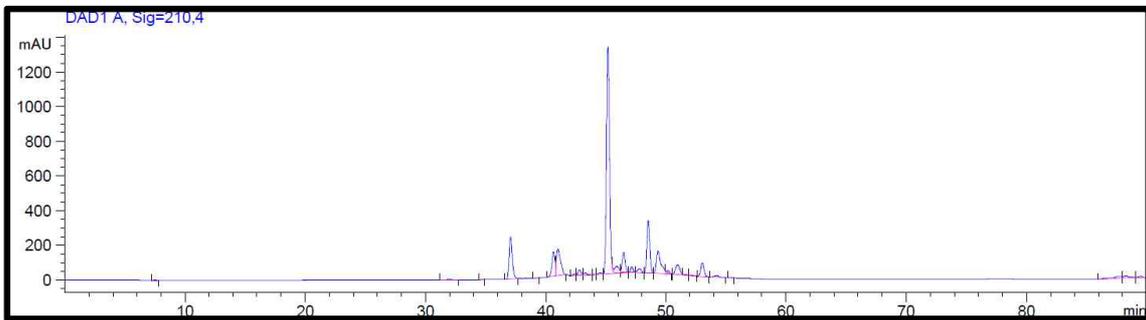
[분취조건4] scale up 1차 정제



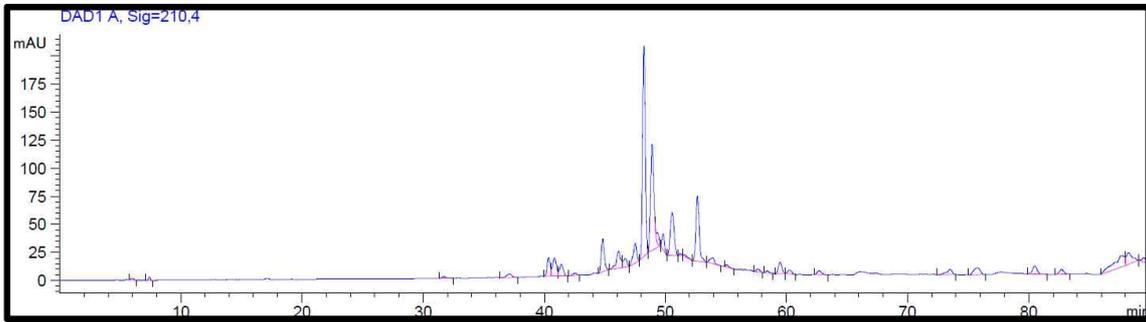
[분취조건4] 1차 정제 Fr1



[분취조건4] 1차 정제 Fr2



[분취조건4] 1차 정제 Fr3

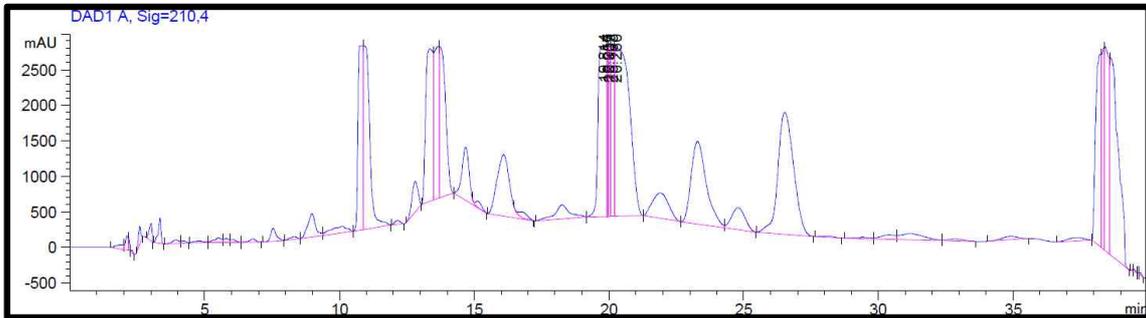


[분취조건4] 1차 정제 Fr4

위의 각 데이터를 보면 Fr3에서 target 물질이 대부분 나온 것을 확인할 수 있었고, 이를 총 71회 진행함. 1차 정제한 정제물은 모두 동결건조를 진행함.

6. Scale up 2차 정제

5번에서 진행한 1차 정제물을 2차로 정제함. 정제 조건을 설정하기 위해 다시 LC분석을 진행하였고, 0.1% TFA in water 63%로 isocratic 조건이 적당한 것을 확인함.



2차 정제물 확인, 조건설정

위 데이터를 이용하여 2차 정제를 실시함. 정제의 분리조건은 아래 [분취조건5]와 같음.

1.19.[분취조건5]

Equipment : YMC K-Prep LAB 300

Column : YMC DAU column with YMC Gel Triart C18  
(50mmi.d. X 500mm, 10um, 12nm)

Flow rate : 59mL/min

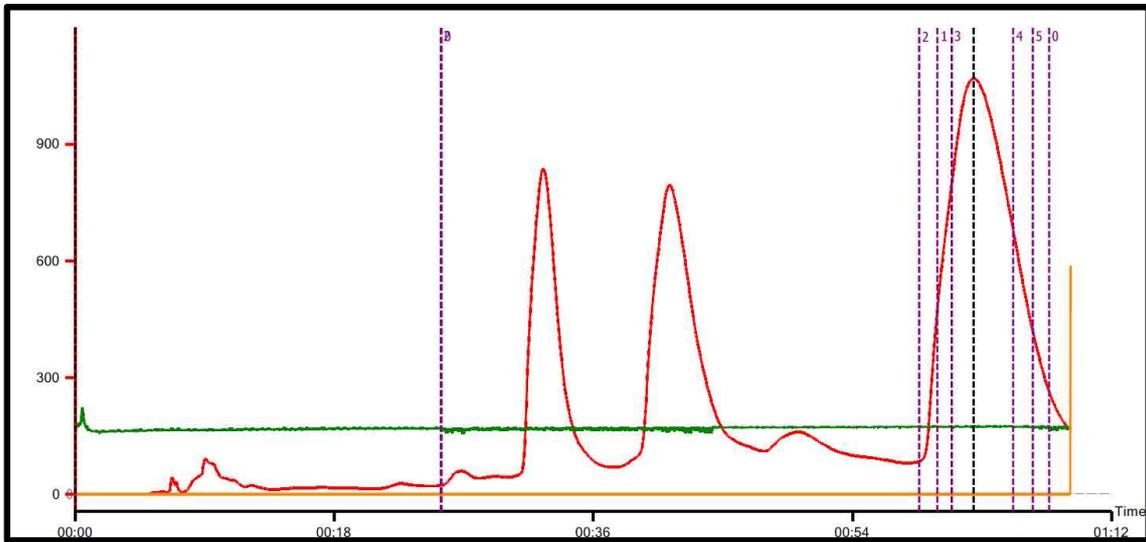
Eluent : A)0.1% TFA in Water/Acetonitrile (63/27)

B) Acetonitrile

Injection : 10mL (4g/10mL)

Gradient condition

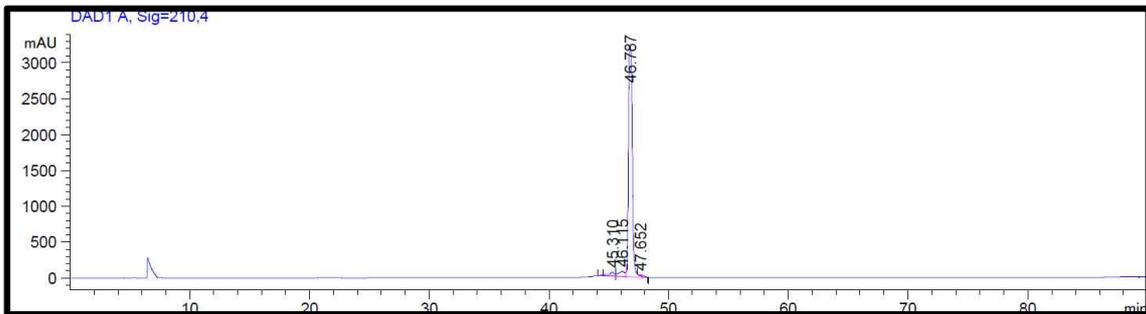
	A	B
0	100	0
60	100	0
60.01	0	100
75	0	100



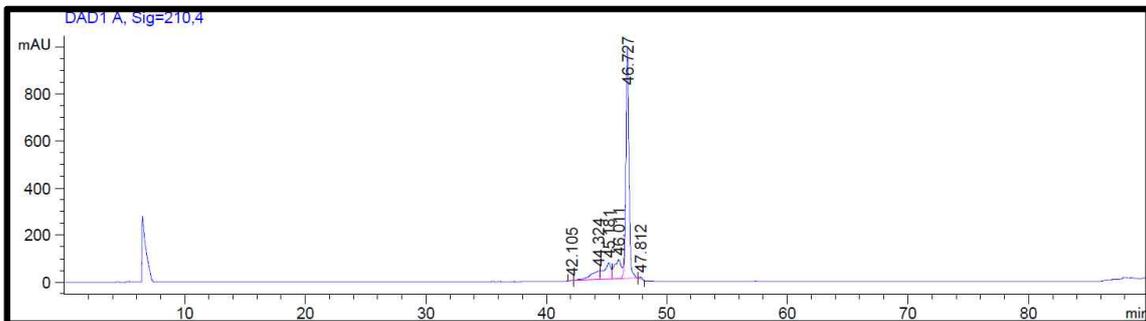
[분취조건5] Scale up 2차 정제

2차 정제 진행한 데이터를 각 분획별로 확인하면 아래와 같이 [분취조건5] 2차정제 Fr 1, 93%, [분취조건5] 2차정제 Fr 2, 68%, [분취조건5] 2차정제 Fr 3, 97%, [분취조건5] 2차정제 Fr 4, 96%, [분취조건5] 2차정제 Fr 5, 83%로 나타남. 분취그래프에서 번호 순으로 Fraction 한 것이 아니기 때문에 앞에서부터 순도를 보면, 68%, 93%, 97%, 96%, 83% 순으로 확인됨.

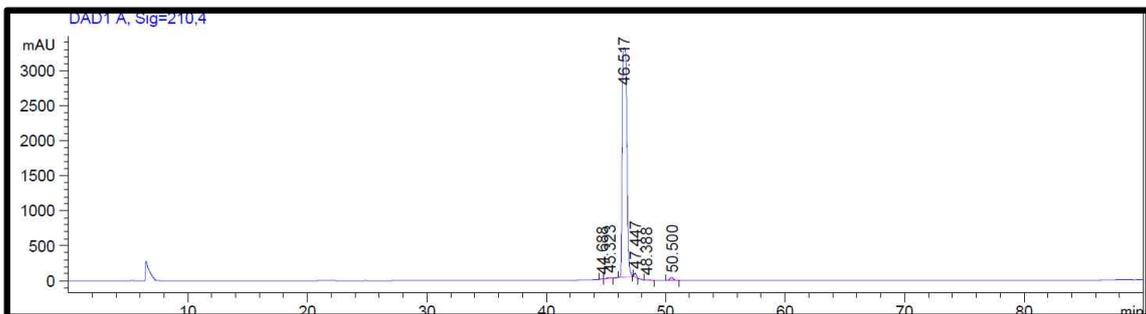
HPLC 분석을 통해 순도 확인했을 때 분석에서 93%까지 나온 영역까지는 사용하기로 함.



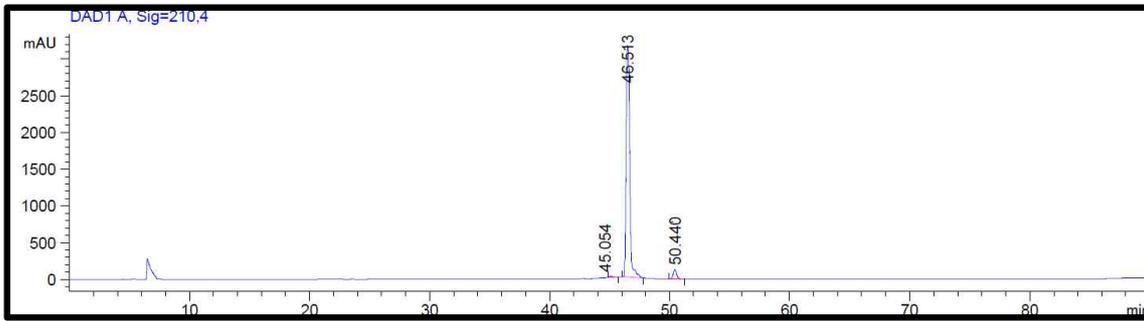
[분취조건5] 2차 정제 Fr 1, 93%



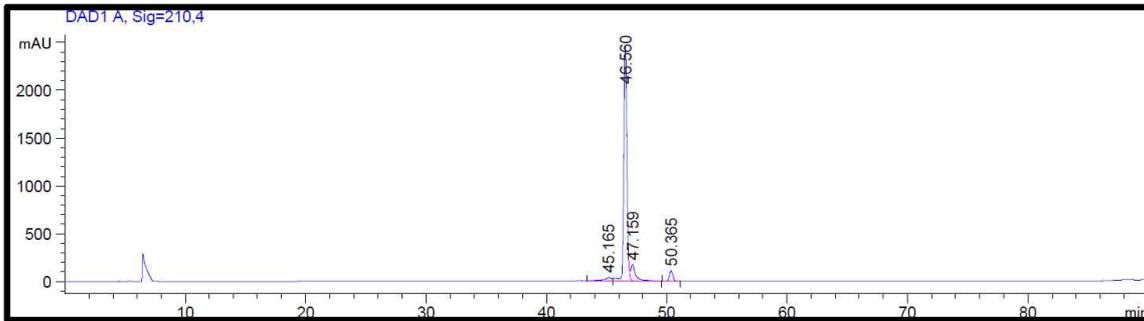
[분취조건5] 2차 정제 Fr 2, 68%



[분취조건5] 2차 정제 Fr 3, 97%



[분취조건5] 2차 정제 Fr 4, 96%



[분취조건5] 2차 정제 Fr 5, 83%

2차 정제를 위 조건으로 20회 진행하였고, 각 분획을 따로 동결건조 진행함.

각 분획의 질량은 2번: 28.9 mg, 3번: 460.5 mg, 4번: 86.1 mg, 5번: 6.3 mg으로 총 581.8 mg이 순도 구간



[REDACTED]

Your notification will be kept confidential for 90 days after the filing date of [REDACTED]. After the 90-day date, the notification will be placed on public display at [www.regulations.gov](http://www.regulations.gov) as new dietary ingredient notification report number [REDACTED]. Prior to that date, you may wish to identify in writing specifically what information you believe is trade secret or confidential commercial information and include an explanation of the basis for this belief.

If you have any questions concerning this matter please contact Dr. [REDACTED]

Sincerely, [REDACTED]

[REDACTED]

#### 사. 7차년도

(ㄱ) 7차년도 연구목표

- URD45의 비뇨배뇨 개선 소재 인체적용시험을 통한 작용 기전과 효능시험
- URD45의 비뇨배뇨 개선 소재의 제품화 및 산업화
- 타임으로부터 분석된 신약후보물질(famitopia)의 여성암 항암 효능 분석
- 개발된 소재를 활용한 국내외 시장 분석을 통한 사업화 전략 구축
- 연구개발 된 소재 WMS77과 URD45의 천연물 신약 인허가

(ㄴ) 7차년도 연구개발 내용 및 성과

(A) 비뇨배뇨 소재의 일반독성 및 유전독성 평가; 소재 명칭 URD45으로 기재

번호	시험명	시험계	시험항목	결과 및 고찰
1	URD45의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험	SD랫드	일반증상, 체중, 부검	시험물질 영향없음 ALD 5,000mg/kg 이상 상회
2	URD45의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복 경구투여 용량결정시험	SD랫드	일반증상, 체중, 사료, 혈액, 부검	시험물질 영향없음 고용량 5,000mg/kg 설정
3	URD45의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험	SD 랫드	일반증상, 체중, 사료, 안과, 뇨, 혈액학, 혈액생화학, 암컷성주기, 부검, 장기중량, 조직병리학	시험물질 영향없음 NOAEL 5,000mg/kg
4	URD45의 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험	세균	복귀변이콜로니수, 생육저해, 침전	유전자돌연변이 유발성 음성
5	URD45의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험	햄스터 세포주	염색체 구조이상 염색체 수적이상	염색체이상 유발성 음성
6	URD45의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 소핵시험	SD랫드 골수세포	일반증상, 체중, 소핵 유발 출현빈도	골수세포에 대한 소핵유발성 음성

• 단회 경구투여 독성시험

시험제목	URD45의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험
시험계	랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF
시험방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>군구성 : 대조군, 고용량군(5,000mg/kg)</li> <li>투여용량 : 1일 1회, 단회투여</li> <li>평가항목 : 일반증상, 체중측정, 부검</li> </ul>
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>사망유무 : 대조군 및 고용량군에서 사망동물은 관찰되지 않았음.</li> <li>일반증상 : 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.</li> <li>체중변화 : 대조군과 고용량군 비교시 유의성 있는 체중변화 관찰되지 않았음.</li> <li>부검소견 : 시험물질에 의한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았음.</li> </ul>
결론	URD45 개략의 치사량 (ADL)은 암수 모두 5,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨.

• 반복 경구투여 용량결정시험

시험제목	URD45의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복 경구투여 용량결정 시험
시험계	랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF
시험방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 군구성 : 대조군, 저(1,250mg/kg), 중(2,500mg/kg), 고용량군 (5,000mg/kg)</li> <li>• 투여용량 : 1일 1회 2주간, 반복투여</li> <li>• 평가항목 : 일반증상, 체중측정, 사료섭취량, 혈액학적, 혈액생화학적, 부검, • 장기중량, 조직병리학적 검사</li> </ul>
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사망유무, 일반증상 : 갈색변 외 특이증상 없었음.</li> <li>• 체중변화, 사료섭취량 : 시험군, 대조군 간 유의성 관찰되지 않았음.</li> <li>• 혈액학적, 혈액생화학적 : 대조군과 시험군 비교시 유의성 있는 수치 변화는 관찰되지 않았음.</li> <li>• 장기중량 : 모든 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 장기중량의 변화 관찰되지 않았음.</li> <li>• 부검소견 : 시험물질에 의한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았음.</li> </ul>
결론	URD45의 13주 반복 독성시험 고용량은 5,000 mg/kg으로 설정 가능함.

• 13주 반복 경구투여 독성시험

시험제목	URD45의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험
시험계	랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF
시험방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 군구성 : 대조군, 저(1,250mg/kg), 중(2,500mg/kg), 고용량군(5,000mg/kg)</li> <li>• 투여용량 : 1일 1회 13주간, 반복투여</li> <li>• 평가항목 : 일반증상, 빈사 및 사망동물처리, 체중측정, 사료섭취량, 안과학적, 뇨, 혈액학적, 혈액생화학적, 암컷 성주기, 부검, 장기중량, 조직병리학 적 검사</li> </ul>
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사망유무 : 시험물질에 의한 사망은 관찰되지 않았음.</li> <li>• 일반증상 : 갈색변 외 특이증상 없었음.</li> <li>• 체중변화, 사료섭취량 : 시험군, 대조군 간 유의성 관찰되지 않았음.</li> <li>• 안과학적 : 이상소견 관찰되지 않았음.</li> <li>• 혈액학적, 혈액생화학적 : 시험물질에 의한 영향 관찰되지 않았음.</li> <li>• 장기중량 : 모든 측정 장기중량에서 유의성 있는 변화 관찰되지 않았음.</li> <li>• 부검소견 : 계획부검 시 이상소견 관찰되지 않았음. 비계획부검 시 수컷 대조군 1례는 시험물질과 무관하게 사망 관찰됨. 암컷 2,500 mg/kg 투여군에서 1례는 단일레에서만 관찰되었으며, 이외의 암컷 시험물질 투여군에서 해당소견 관찰되지 않아 시험물질에 의한 영향은 아니라고 판단됨.</li> </ul>
결론	URD45의 13주 반복 경구투여 결과, 무독성량 (NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단됨.

• 복귀돌연변이시험

시험제목	URD45의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
시험계	세균, <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i>
시험방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 균주 : TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 <i>uvrA</i>(pKM101)/S9mix(-/+)</li> <li>• 용량설정 : 5,000, 2,500, 1,250, 625, 313 ug/plate</li> <li>• 평가방법 : 프리인큐베이션법과 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열로 시험 실시. 시험물질 처리시 및 복귀변이콜로니수 계측 시 침전관찰, 복귀 변이콜로니수의 계측 (자동콜로니 계측기), 미생물에 의한 오염유무확인, 1 개 이상의 균주에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비하여 2배 이상 증가하고, 증가에 따른 용량의존성이 있을 경우 양성 판정.</li> </ul>
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 복귀변이콜로니수의 계측 : 시험물질군에서 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배를 초과하지 않았음.</li> <li>• 시험물질에 의한 생육저해 및 침전 : 대사활성화 비존재화 또는 존재하 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았음.</li> <li>• 유전자돌연변이 유발성 결과에서 재현성이 확보되었고 생육저해가 확인되지 않은 용량이 4단계 이상 확보됨. 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 증가하였고 잡균에 의한 오염도 확인되지 않아 시험은 적절하게 실시되었다고 판단함.</li> </ul>
결론	URD45의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단됨.

• 염색체이상시험

시험제목	URD45의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험
시험계	세포주, Chinese Hamster Lung cells, CHL/IU 세포
시험방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세포주 : CHL/IU, ATCC Catalog No. CRL-1935, 햄스터 폐, 섬유아세포</li> <li>• 용량설정 : 단시간처리법 대사활성화비존재하 1,250, 625, 313, 156 ug/mL</li> <li>• 단시간처리법 대사활성화존재하 2,500, 1,250, 625, 313 ug/mL</li> <li>• 연속처리법 대사활성화비존재하 625, 313, 156, 78.1 ug/mL</li> <li>• 평가방법 : 검체슬라이드 관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하며, 염색체 관찰 대상용량은 각 처리법 모두 용량당 300개 이상의 분열중기상이 관찰 가능한 3용량을 설정함. 염색체 이상은 구조이상, 수적 이상, 기타로 구분함. 염색체 구조이상은 염색분체절단 또는 교환, 염색체 절단 또는 교환, 염색분체갭 및 단편화를 관찰함.</li> <li>• 시험의 성립조건 : 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 하나 이상의 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하거나, 증가에 따른 용량의존성이 있을 경우, 그리고 음성대조군의 historical control data의 관리범위 이상으로 증가할 경우 양성 판정.</li> </ul>
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 염색체이상 출현빈도 : 단시간처리법의 대사활성화비존재하 or 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이 확인되지 않았음.</li> <li>• 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가가 확인됨.</li> </ul>
결론	URD45의 염색체이상 유발성은 음성으로 판단됨.

• 소핵시험

시험제목	URD45의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 소핵시험
시험계	랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF
시험방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 군구성 : 음성, 양성대조군, 저(1,250mg/kg), 중(2,500mg/kg), 고용량군(5,000mg/kg)</li> <li>• 투여용량 : 24시간 간격 2회</li> <li>• 평가항목 : 일반증상, 체중측정, 검체제작(골수세포), 검체관찰</li> <li>• 성립조건 : 음성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 95% 범위 내에 있을것. 양성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있음.</li> <li>• 결과판정 : 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 한 용량 이상에서 통계학적으로 유의하게 증가하며, 용량의존성 증가가 확인됨.</li> </ul>
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 일반증상 : 시험물질군에서 일반증상 이상 관찰되지 않았음.</li> <li>• 체중변화 : 시험물질군에서 음성대조군대비 유의한 체중변화 없었음.</li> <li>• 소핵 유발 출현빈도 : 시험물질군에서 소핵다염성적혈구 출현빈도 및 다염성적혈구의 비율은 시험물질군 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었음. 양성대조군에서 소핵다염성적혈구 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가가 확인됨.</li> </ul>
결론	URD45의 Sprague-Dawley 랫드 골수세포에 대한 소핵 유발성은 음성으로 판단됨.

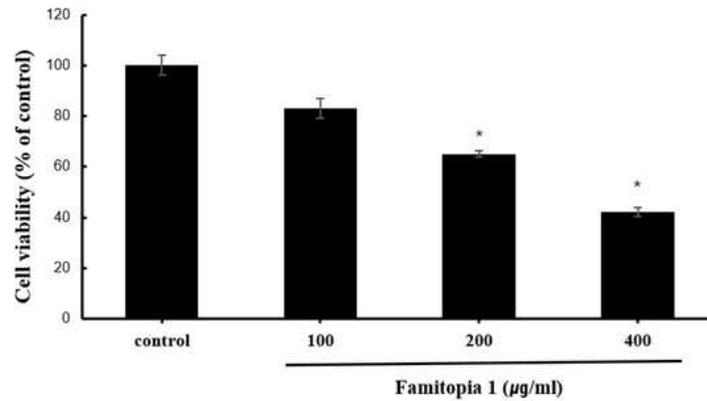
(B) URD45 배뇨 개선 인체적용시험을 통한 효능 평가

URD45(비뇨배뇨 건강 개선 소재의 가치)의 배뇨기능 개선에 대한 유효성과 안전성에 대한 평가를 위한 인체 적용 시험을 중앙대학교병원 비뇨기과에서 진행함. 8주간 진행하여 URD45 섭취 전후에서 유효성 및 안전성 평가 지표들의 변화를 확인하고 있음.

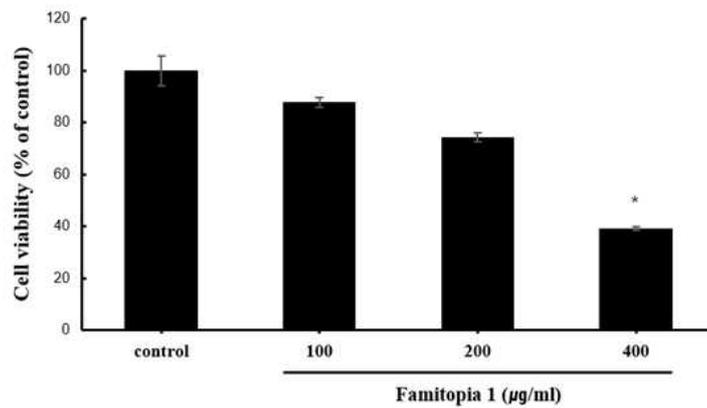
(C) WMS77-B으로부터 분석된 신약후보물질(famitopia)1, 2의 다양한 암세포주에서 항암 효능 평가

- Famitopia1의 유방암, 골육종 세포주에서의 항암 효과 확인

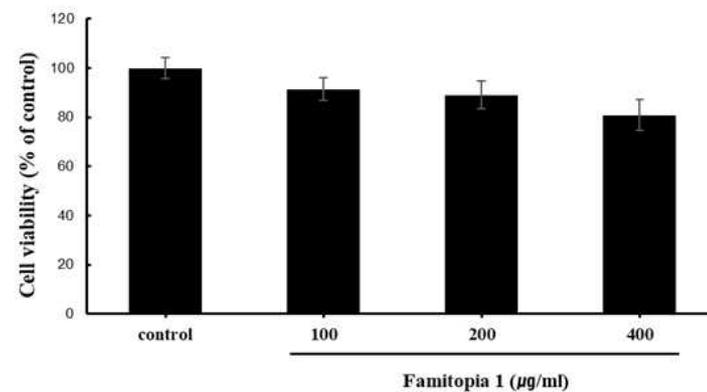
(A) MCF-7 cell



(B) MDA-MB-231 cell



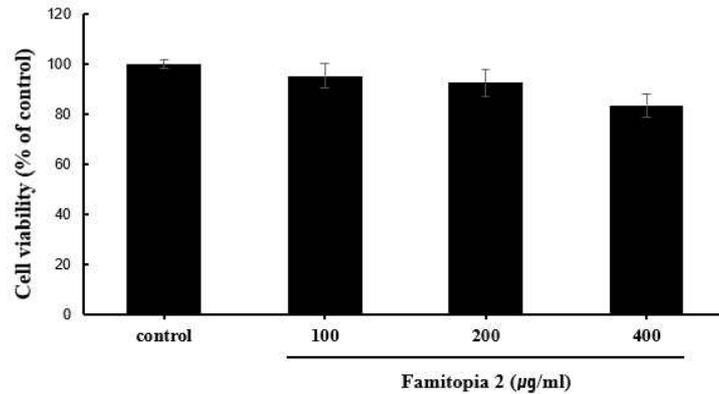
(C) Saos-2 cell



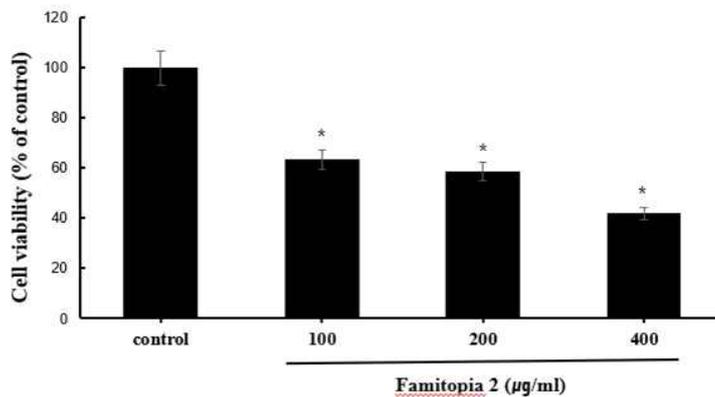
- Famitopia1의 항암효과를 확인하고자 유방암 세포주인 MCF-7 cell과 MDA-MB-231 cell, 골육종세포주인 Saos-2 cell에서 항암 효능 여부를 확인함. 항암 활성은 famitopia 1을 농도별로 100, 200, 400 µg/ml을 세포에 처리한 후 48시간동안 배양하고 CCK-8 assay를 사용하여 세포성장률을 확인함.
- 유방암 세포주인 MCF-7 cell과 MDA-MB cell에서 famitopia 1의 항암 활성을 확인한 결과 농도에 따라 항암 활성이 증가하여 암세포 증식이 감소함을 확인할 수 있음. 400 µg/ml 농도에서 세포성장 억제율이 50% 이상으로 항암효과가 높게 나타나는 것을 확인함. 따라서 famitopia 1은 유방암 세포에서 항암 효과를 나타낼 것으로 기대함.
- 골육종 세포주인 Saos-2 cell 에서도 농도에 따라 세포성장이 감소하긴 하였으나 그 차이가 미미하여 통계적으로 유의성이 없는 것으로 보아 항암 효과의 가능성이 없는 것으로 판단함.

- Famitopia 2의 간암, 전립선암, 신경세포주에서의 항암 효과 확인

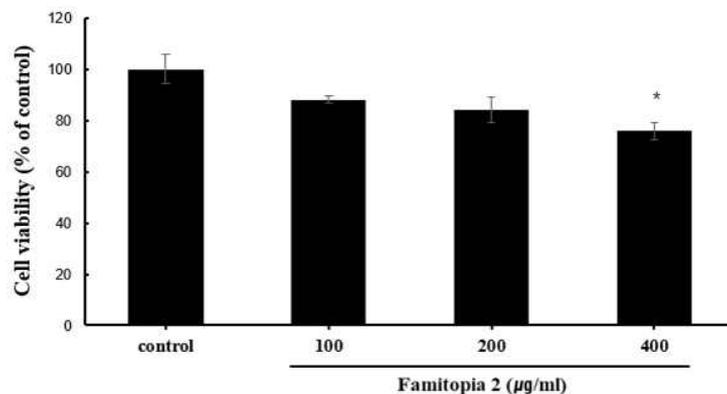
**(A) Hep3B cell**



**(B) Du145 cell**



**(C) SH-SY5Y cell**



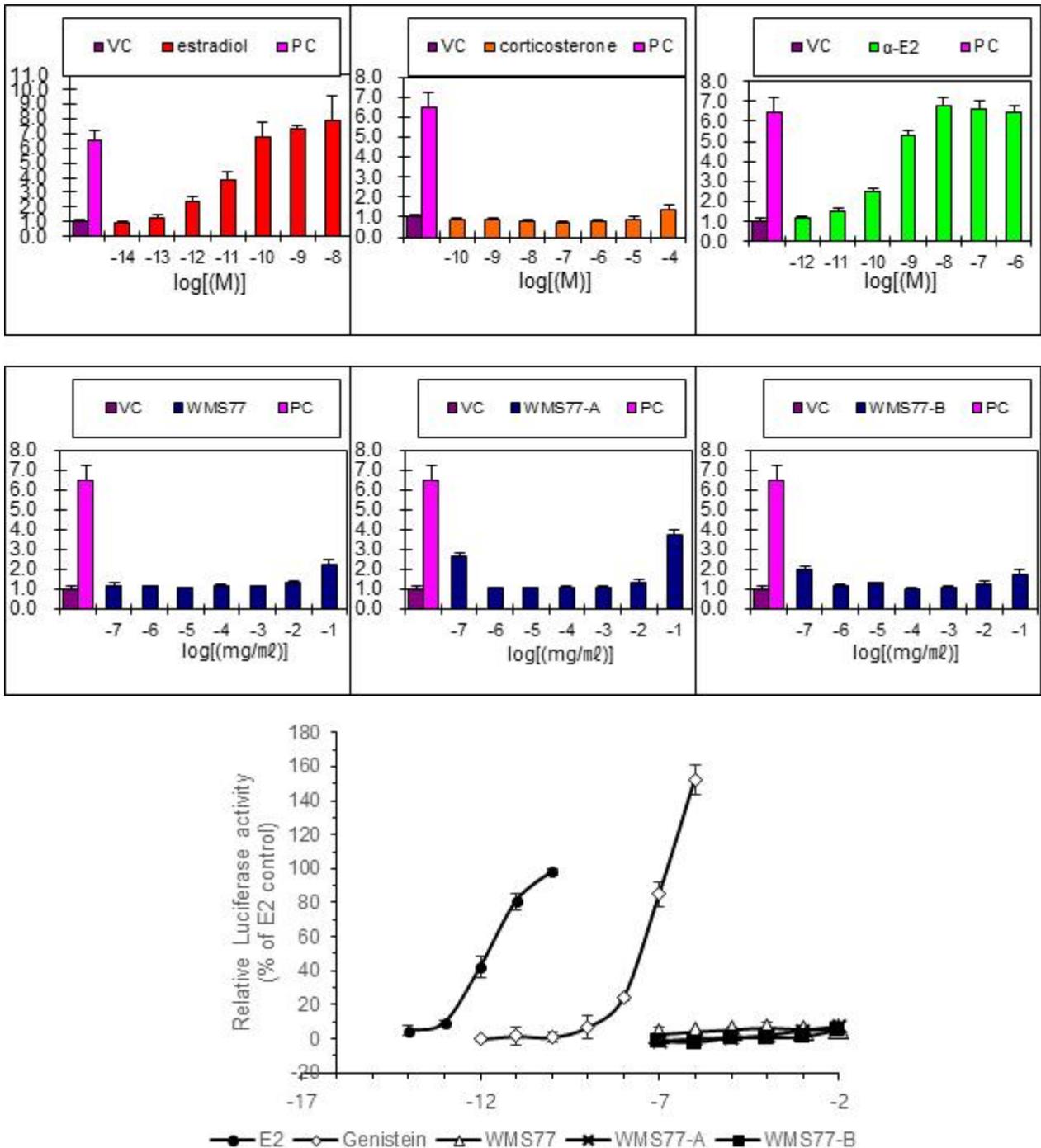
- 간암세포주인 Hep3B cell 및 전립선암 세포주 Du145, 신경세포주인 SH-SY5Y cell에서는 famitopia 2의 항암 활성을 확인함. famitopia 2를 농도별로 세포에 처리한 후 48시간동안 배양하고 생존 정도를 CCK-8 assay를 사용하여 측정함.
- Famitopia 2는 전립선 암 세포주인 Du145 cell에서 세포 성장을 억제함을 확인할 수 있었으나 간암세포인 Hep3B cell와 신경세포주인 SH-SY5Y cell에서는 세포성장 억제가 유의적으로 확인되지 않음. 이를 통하여 famitopia2는 Du145 cell의 세포 성장을 억제시켰으므로 전립선 암에 대한 항암 효능을 보일 것으로 기대함.

**(D) WMS77 소재의 에스트로겐 활성 측정을 통한 안전성 확인**

- 호르몬 대체 요법에 의한 폐경기 증상 치료는 효과적이지만 발암 위험을 포함하는 부작용을 나타냄. 이

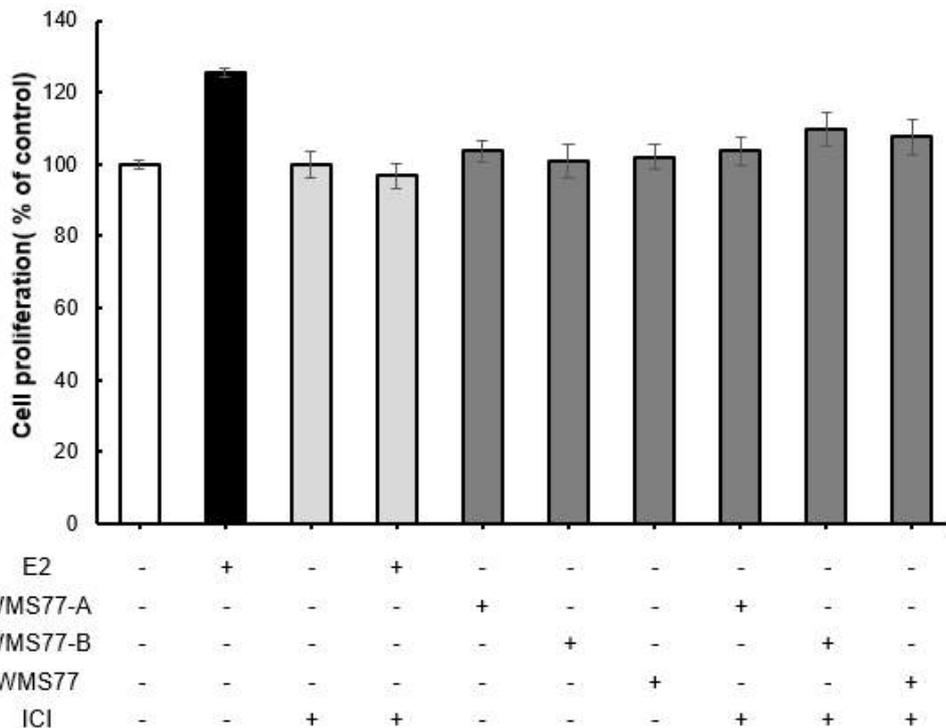
에 따라 천연물에 대한 관심이 높아졌으나 이러한 천연물에서도 에스트로겐이 유발하는 암의 위험을 증가시키는 요인이 있는 것으로 보고되고 있음. 에스트로겐은 에스트로겐 수용체 ER $\alpha$ , ER $\beta$ 에 대해 리간드로 작용하여 에스트로겐 조절 시스템에 장애를 유발하여 인간의 건강에 유해한 영향을 끼치게 되므로 hER $\alpha$ 에 의해 매개되는 에스트로겐성 전사 활성 검사인 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) TG455를 사용하여 잠재적인 에스트로겐 활성을 확인하여 WMS77의 안전성을 평가함.

- 본 연구를 통하여 WMS77이 MCF-7 세포에서 에스트로겐 활성을 유발하지 않는다는 것을 확인하였으며, WMS77는 hER $\alpha$  및 hER $\beta$ 에 대한 유의한 선택적 활성, ER에 대한 비 선택적 활성 또는 ER 표적 유전자 발현에 대한 영향을 나타내지 않는 것을 확인함. 이러한 결과는 갱년기 여성의 증상을 완화하고자 하는 소재로 활용할 때, WMS77이 발암 위험이 없는 소재로 활용될 수 있다는 것을 나타냄.



- OECD TG455 방법에 따라 ER $\alpha$  리간드로 기능하고 hER $\alpha$ -Luc 유전자로 안정적으로 형질 감염된

HeLa9903 세포에서 추출물의 작용 반응을 확인함. 이 STTA 분석에서 양성대조군으로 알려진 식물성 에스트로겐인 E2와 Genistein은 농도 의존적으로 상당한 에스트로겐 활성을 나타내는 것을 확인 하였으나, WMS77-A, WMS77-B, 그리고 두 추출물의 복합물질인 WMS77은 어떤 농도에서도 에스트로겐 활성을 나타내지 않음을 확인함.



- 여성 유방암 유래 MCF-7 세포는 에스트로겐 수용체를 가지고 있어서 에스트로겐 유사작용 물질의 첨가에 의해 세포증식이 더욱 촉진되는 특징을 가지고 있음. 이를 바탕으로 에스트로겐 활성 검사를 위하여 세포증식 실험법인 E-screen assay가 개발됨. MCF-7 세포주는 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 를 모두 발현하는 호르몬 의존성 유방암 세포주로 알려져 있기 때문에 WMS77 노출이 MCF-7 세포의 증식에 영향을 미치는지를 확인함. 그 결과 WMS77은 양성 대조군 E2의 활성 효과와 비교하여 MCF-7 세포의 증식에 영향을 미치지 않았음을 보여주었고, 이를 통하여 WMS77이 E2 매개 유방암의 발병에 영향을 미치지 않았음을 나타냄.

(E) 여성 건강 개선 소재 WMS77(가칭)의 건강기능식품 기능성 원료 인정 완료



<p>[별지 제3호서식] (양쪽)</p> <p>건강기능식품 기능성 원료 인정서</p> <p>제출번호: 650</p> <p>대표명: [redacted]</p> <p>소재명: [redacted]</p> <p>원료명: MS-10 정장리용유황추출물</p> <p>수출국: 수출국 제조회사명: [redacted]</p> <p>수출국 제조회사 소재지: [redacted]</p> <p>건강기능식품 기능성 원료 및 건강기능성 원료의 규격, 제108제1항에 따라 인정기능성원 기능성 원료로 인정됩니다.</p> <p>3000년 10월 30일</p> <p>식품의약품안전처장</p> <p>* 판공처명 1. 원료명 2. 제조사(원재료, 제조방법, 기능성원료(또는) 기능성원료, 제조사 유무사항) 3. 규격 4. 제조사 표시(기능성, 내용, 원료 및 원료명, 원료 기·주체사항, 기타사항) 5. 인정방법</p> <p>210mm×297mm(단면종이 80g/㎡)제출용종이</p>	<p>SEP 19 2019</p> <p>This letter is to inform you that the Food and Drug Administration (FDA) filed your notification that you submitted to FDA on behalf of [redacted] pursuant to 21 United States Code (U.S.C.) § 350(b)(2) (section 350(b)(2) of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act) on July 8, 2019. Your notification concerns your new dietary ingredient, which is an extract of "Korean flaxseed (whole plant of Corchorus japonicus var. rotundifolius) (Matsuda, 'Matsuda') that you intend to market in a dietary supplement under that trade name, "MS-10".</p> <p>In accordance with 21 CFR 350.3(c), FDA must acknowledge its receipt of a notification for a new dietary ingredient. For 75 days after the filing date, you must not introduce or deliver for introduction into interstate commerce any dietary supplement that contains the new dietary ingredient that is the subject of this notification. Please note that acceptance of this notification for filing is a procedural matter, and this does not constitute a finding by FDA that the new dietary ingredient or supplement that contains the new dietary ingredient is safe or is not adulterated under 21 U.S.C. § 342. FDA is not precluded from taking action in the future against any dietary supplement containing your new dietary ingredient if it is found to be unsafe, adulterated, or misbranded.</p> <p>Your notification will be kept confidential for 90 days after the filing date of July 8, 2019. After the 90-day date, the notification will be placed on public display at www.regulations.gov as a new dietary ingredient notification report number 1119. Prior to that date, you may wish to identify in writing specifically what information you believe to be most sensitive or confidential commercial information and include an explanation of the basis for that belief.</p> <p>Deputy Director Office of Dietary Supplement Programs Center for Food Safety and Applied Nutrition</p>	<p>Health Canada / Santé Canada</p> <p>Product Licence / Licence de mise en marché</p> <p>Product Number/Numéro de produit: 07030710 Brand Name/ Marque commerciale: MS-10 Global Identifier ID Name of licensee/ Nom du titulaire: [redacted]</p> <p>Authorized for the following/ Autorisé pour ce qui suit: Doseage form/Forme posologique: Capsule Recommended mode of administration/ Mode d'administration recommandé: Oral Recommended daily/ daily dose recommendation: Adults: Take 1 capsule, 1 time per day. Recommended duration of use/ Durée d'utilisation recommandée: Consult a health care practitioner for use beyond 90 weeks. Recommended use or purpose/ Usage ou les fins recommandées: Helps to reduce symptoms of menopause such as hot flashes, night sweats, sleep disturbances and irritability. Clinically shown to help relieve symptoms of menopause such as hot flashes, night sweats, sleep disturbances and irritability. Health promotion/ Santé promotion: support sexual health in menopausal women. Clinically shown to help promote/maintain support sexual health in menopausal women. Risk information/ Révissements sur les risques: Caution and Warnings: Consult a healthcare practitioner prior to use if you are pregnant, breastfeeding, or if symptoms persist or worsen. Do not use this product if you are taking anti-coagulants.</p>
<p>인정형 원료 인정</p>	<p>미국 FDA NDI</p>	<p>Health Canada PL</p>

본 과제를 수행하면서 개발한 여성 건강 개선 소재인 WMS77의 국내 식품의약품안전처 건강기능식품 인정형 기능성 원료 인정을 신청하였고, 신청 결과 2020년 6월 승인되어 WMS77에 대한 효능과 안전성을 개별 인정형 기능성 원료로서 입증 받았음. 또한 동시에 WMS77 소재의 미국 및 해외 진출을 위해 FDA 등재와 Health Canada PL을 등록받음.

## • 식의약 소재 사업화의 인허가 과정 및 결과

### - 개별인정 기능성원료

개별인정 원료란 기존에 없던 원료를 제조사가 수년간 연구·개발을 거쳐 원료 기능성과 기준 및 규격 등 연구 자료를 제출해 식품의약품안전처로부터 개별적으로 기능성과 안전성을 인정받은 성분으로 인정받은 업체만이 동 원료를 제조 또는 판매할 수 있다.

식품의약품안전처에서 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 제출자료는 다음과 같이 설명한다.

#### 1) 심사대상 및 제출자료

식약처장이 별도로 인정하는 원료 또는 성분은 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 (식약처고시 제2019-69호, 2019.8.5)」 제3조 및 제12조에 따라 심사대상 및 제출 자료는 다음과 같습니다

- 제출자료 전체의 총괄 요약본(제2호부터 제10호까지 내용을 간략히 요약한 자료)
- 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
  - 기원 및 개발경위
 

언제, 어느 나라에서, 어떤 경위로 개발되었는지를 기재한다. 특히, 천연물을 원재료로 사용한 경우에는 그 기원, 학명, 원산지, 사용부위 등을 구체적으로 기재한다.
  - 국내·외 인정·허가 현황
 

국내·외 및 국제기구에서의 인정·허가 상황, 사용 기준·규격 등의 관련 내용을 정확히 기재한다. 국제 식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission, CAC) 등 국제기구에서 검토 중인 경우에는 안전성 평가 상황 및 사용기준, 규격 등에 관한 자료를 첨부한다.
  - 국내·외 사용현황
 

국내·외에서 식품 등으로 사용실적이 있는 경우에는 사용용도, 유통량, 제조회사, 섭취실태 등에 관한 자료를 첨부한다.
- 제조방법에 관한 자료
  - 제조 온도, 시간, 압력 등 단위공정별 구체적인 제조방법
  - 제조공정에 사용된 용매, 효소, 미생물 등 안전성·기능성 평가와 관련된 제조방법 및 제조국가 등
  - 주요 제조단계별(추출, 여과, 농축 등) 기능(또는 지표)성분의 함량 및 수율 변화에 대한 상세한 자료
  - 두 가지 이상의 원재료를 혼합한 경우 각 원재료의 명칭, 배합비 및 안정성관련 자료
  - 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 가목부터 라목까지의 자료
  - 제조방법 중 일부 공정 위탁인 경우 수탁업체(해외 업체 포함)가 발행한 가목부터 라목까지의 자료
- 원료의 특성에 관한 자료
  - 해당 원료를 특징 지을 수 있는 성상, 물성 등에 관한 자료
  - 해당 원료의 표준화를 확인하기 위한 기능성분(또는 지표성분)에 관한 자료
  - 육안으로 다른 원재료와 구별하기 곤란한 원재료가 존재할 경우 이를 구분할 수 있는 성상, 지표성분 등의 자료
- 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서
  - 기능성분(또는 지표성분)의 규격
 

(1) 원재료의 생산, 원료의 제조·가공 공정과 안정성 등 원료의 특성을 고려하여 3룻트 이상의 제품에 대한 시험결과를 근거로 설정한다. 다만, 함량으로 설정하기가 부적당한 것은 역가시험으로 설정할 수 있다.

- (2) 분석오차를 고려하여 표시하고자 하는 값에 대한 하한치와 상한치는 표시량의 80 ~ 120%를 원칙으로 한다. 단, 타당한 사유가 있을 경우 달리 정할 수 있다.
- (3) 두 가지 이상의 해당 원료를 혼합한 경우 각 원료의 기능성분(또는 지표성분)의 규격을 설정하여야 한다.

- 기능성분(또는 지표성분)의 시험방법

- (1) 기능성분(또는 지표성분)의 규격을 분석하는데 적합하여야 하며, 「건강기능식품의 기준 및 규격」, 「식품의 기준 및 규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」, 국제식품규격위원회 (Codex Alimentarius Commission, CAC) 규정, AOAC 방법 등에 따라 국내·외에서 공인된 방법을 사용하여야 한다. 이때, 제출한 시험방법의 적용 매질(Matrix)과 신청된 원료의 매질(Matrix)이 동일해야 한다. 다만, 공인된 방법이 없거나 더 타당하다고 인정되는 경우 신청자가 제시하는 시험방법을 사용할 수 있다. 이 경우에는 별표 1을 참고하여 제시한 시험방법의 타당성을 밝혀야 한다
- (2) 두 가지 이상의 해당 원료를 혼합한 경우 각 원료의 기능성분(또는 지표성분)의 시험방법을 설정하여야 한다.

- 국내·외 시험·검사기관에서 시험분석한 시험성적서

설정된 기능성분(또는 지표성분)의 규격과 시험방법의 타당성을 검토하기 위하여 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제6조제3항제1호에 따른 식품전문 시험·검사기관 또는 같은 법 제8조에 따른 국외시험·검사기관 중 건강기능식품 검사업무를 수행하는 시험·검사기관의 시험성적서 또는 검사성적서를 제출하여야 한다.

- 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

- 유해물질의 규격

원재료 또는 제조과정으로 인한 유해물질의 오염 또는 잔류 가능성을 막고 안전성을 확보할 수 있도록 별표 2에 따라 설정한다. 이 경우 원료의 특성을 고려하여 3ロット 이상의 제품에 대한 시험결과를 근거로 한다.

- 유해물질의 시험방법

「건강기능식품의 기준 및 규격」, 「식품의 기준 및 규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」, 국제식품규격위원회 (Codex Alimentarius Commission, CAC) 규정, AOAC 방법 등에 따라 국내·외에서 공인된 방법을 사용하여야 한다. 다만, 공인된 방법이 없거나 더 타당하다고 인정되는 경우 신청자가 제시하는 시험방법을 사용할 수 있다. 이 경우에는 별표 1을 참고하여 제시한 시험방법의 타당성을 밝혀야 한다.

- 국내·외 시험·검사기관에서 시험분석한 시험성적서

설정된 유해물질의 규격과 시험방법의 타당성을 검토하기 위하여 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제6조제3항제1호에 따른 식품전문 시험·검사기관 또는 같은 법 제8조에 따른 국외시험·검사기관의 시험성적서 또는 검사성적서를 제출하여야 한다. 다만, 「식품의 기준 및 규격」에 농약의 잔류허용기준이 있는 경우에는 「수입식품등 검사에 관한 규정」 [별표 3] 정밀검사 대상 잔류농약 검사항목에 대하여, 없는 경우에는 5가지 농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 시험결과와 분석자료를 제출하여야 한다.

- 안전성에 관한 자료

원료를 제안된 방법에 따라 섭취하였을 때 해당 원료가 인체에 위해가 없음을 확인할 수 있는 과학적 근거 자료를 제출하여야 한다.

- 안전성 자료의 요건은 다음과 같다.

- (1) 섭취 근거 자료는 당해 원료가 안전하다고 판단할 수 있는 역사적 사용 기록 뿐 아니라 제조방법, 용도, 섭취량 등이 기술된 과학적 자료이어야 한다.
- (2) 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료는 국내·외 학술지에 게재되거나 게재증명서를 받은 것, 국내·외 정부 보고서 또는 국제기구 보고서, 관련 데이터베이스 검색결과 등이어야 한다.
- (3) 섭취량 평가 자료는 다양한 과학적 자료(섭취실태조사자료, 통계자료 등)를 사용하여 작성하여야 한다. 어린이 등 특정 대상군을 섭취대상으로 하는 경우에는 해당 섭취대상에 대한 섭취량 평가 자료를 제출하여야 한다.
- (4) 안전성과 관련된 인체적용시험자료로 제8호다목에 따른 자료도 사용할 수 있다.

- (5) 독성시험자료는 우수실험실운영규정(GoodLaboratory Practice, GLP)에 따라 운영된 기관이 경제협력개발기구(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)에서 정하고 있는 독성시험방법(OECD Test Guideline)에 준하여 시험한 보고서이어야 한다.

- 기능성 내용에 관한 자료

- 기능성 내용

해당 원료의 섭취로 얻어지는 보건용도에 유용한 효과를 기재 한다.

- 기능성에 관한 자료로 인체적용시험, 동물시험, 시험관시험 자료 등을 제출하여야 한다.

(1) 인체적용시험은 중재시험(intervention study) 또는 관찰시험(observational study) 자료를 제출하여야 한다. 특히 중재시험 중 무작위배정 대조군 이중맹검(Randomized Controlled Trial, Double-blind)으로 설계된 시험이 바람직하며, 또한 그 결과가 일반인에게도 보편적으로 적용되어야 한다.

(2) 동물시험 및 시험관시험은 원료·성분의 작용기전 등을 설명하여 인체적용시험 결과를 과학적으로 뒷받침할 수 있어야 한다.

(3) 두 가지 이상의 원재료를 혼합한 경우에는 혼합된 원료로서 기능성이 입증되어야 하며, 타당한 혼합 사유 및 그 과학적 근거가 제출되어야 한다.

- 기능성 자료의 요건은 다음과 같다.

(1) 동물시험 및 시험관시험은 과학기술논문인용색인(Science Citation Index(Expanded), SCI(E) 포함)이나 한국학술지인용색인(Korea Citation Index, KCI)과 동등 이상의 학술지에 게재된 것(게재증명서 포함) 이어야 한다.

(2) 인체적용시험은 국제 인체적용시험관리기준(Guideline for Good Clinical Practice by International Conference on Harmonization, ICH GCP)에 따라 인체적용시험 윤리위원회(IRB) 승인을 받아야 하며, 다음 세목의 자료 중 하나를 제출하여야 한다.

1) 인체적용시험계획서 및 최종보고서

2) 과학기술논문인용색인(Science Citation Index(Expanded), SCI(E) 포함)이나 한국학술지인용색인(Korea Citation Index, KCI)과 동등 이상의 학술지에 게재된 것(게재증명서 포함) 이어야 한다. 다만, 학술지에 게재된 논문으로 제출할 경우, 인체적용시험계획서 및 최종보고서 제출을 요청할 수 있다.

- 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

- 안전성 및 기능성 자료를 근거로 원료의 안전성이 보장되고 기능성이 나타나는 일일 섭취량 또는 그 범위를 설정한다. 어린이 등 특정 대상군을 섭취대상으로 하는 경우에는 해당 섭취대상에 대하여 설정하여야 한다.

- 기능성 자료를 근거로 하여 해당 원료의 기능성이 가장 효과적으로 나타나는 섭취방법을 기재한다.

- 해당 원료의 과다섭취에 따른 부작용, 신청 기능성과 관련된 식품 또는 복용중인 의약품 성분과의 상호작용, 취약집단(임산부, 수유부, 어린이, 노약자 등) 등을 고려하여 섭취 시 주의사항을 기재한다.

**2) 기능성 원료 평가관련 제출 자료**

식품의약품안전처장은 법 제15조제2항에 따라 건강기능식품에 사용할 수 있는 원료 또는 성분으로 인정하고자 하는 경우 그 원료 또는 성분의 안전성 및 기능성 등에 대하여 다음 각 호와 같이 평가한다.

- 원료와 관련된 사항

- 원재료의 기원, 학명, 원산지, 사용부위 등이 구체적으로 기재되었는지 여부

- 복합원료인 경우에는 원재료 각각에 대하여 가목의 내용이 적합하게 기재되어 있는지 여부

- 식품 또는 식품첨가물로서 국내·외 인정·허가 현황 및 국내·외 사용현황의 적절성 여부

- 제조방법과 관련된 사항

- 제조 시 온도, 시간, 압력 등이 기능성 원료 생산에 적합한지 여부(필요 시 제조공정 적절성이 확인될 수 있어야 한다.)

- 원료의 제조과정에 사용된 용매, 효소 등이 「건강기능식품의 기준 및 규격」(식약처 고시), 「식

품의 기준 및 규격」(식약처 고시), 「식품첨가물의 기준 및 규격」(식약처 고시)에 적합하게 사용되었는지 여부

- 원재료로부터 신청한 원료에 이르기까지 제조단계별 기능성분(또는 지표성분)의 함량 및 수율 변화가 적합하게 분석되었는지 여부
- 두 가지 이상의 원재료를 혼합한 경우에 안정성이 확보될 수 있는지 여부
- 수입인 경우 제조회사가 발행한 가목부터 라목까지의 자료가 적절한지 여부
- 일부 공정 위탁인 경우 수탁업체가 발행한 가목부터 라목까지의 자료가 적절한지 여부
- 기능성분(또는 지표성분)과 관련된 사항
  - 기능성 원료의 특성에 대한 검토를 바탕으로 기능성분(또는 지표성분)의 대표성이 확보되었는지 여부
  - 기능성분(또는 지표성분)에 대한 함량, 규격 및 시험방법이 적합하게 설정되었는지 여부
  - 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제6조제3항제1호에 따른 식품전문 시험·검사기관 또는 같은 법 제8조에 따른 국외시험·검사기관 중 건강기능식품 검사업무를 수행하는 시험·검사기관의 시험성적서 또는 검사성적서가 적합한지 여부(필요시 확인시험을 할 수 있다.)
- 유해물질에 대한 규격 설정
  - 원재료 또는 제조과정으로 인한 유해물질의 오염 또는 잔류가능성을 별표 2에 따라 적절하게 설정하였는지 여부
  - 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제6조제3항제1호에 따른 식품전문 시험·검사기관 또는 같은 법 제8조에 따른 국외시험·검사기관의 시험성적서 또는 검사성적서가 적합한지 여부(필요시 확인시험을 할 수 있다.)
- 안전성과 관련된 사항
  - 국내·외 식용으로 인정된 원재료인지 여부 또는 식용으로 사용 적합한지 여부
  - 섭취량 평가가 적절한지 여부. 어린이 등 특정 대상군을 섭취대상으로 하는 경우 해당 섭취대상에 대한 섭취량 평가가 적절한지 여부
  - 안전성 자료 검색 결과 부작용, 독성 정보 등이 있는지 여부
  - 독성시험자료를 제출하는 경우 독성이 있는지 여부
  - 유해물질에 대한 규격이 안전성을 확보할 수 있도록 설정되어 있는지 여부
  - 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제6조제3항제1호에 따른 식품전문 시험·검사기관 또는 같은 법 제8조에 따른 국외시험·검사기관의 유해물질관련 안전성 시험성적서 또는 검사성적서가 적합한지 여부
- 기능성과 관련된 사항
  - 법 제15조제2항 규정에 따라 기능성 인정 범위에 해당하는지 여부
  - 연구의 유형과 수준에 따라 기능성이 개별적으로 평가되었는지 여부
  - 기능성 관련 인체적용시험 등 제출자료가 시험설계, 시험대상자 등이 적절하게 설정되었는지 여부 및 유의적인 결과를 나타내는지 여부
  - 일일제안섭취량에서 기능성이 확보되는지에 대한 여부
  - 총체적인 근거자료의 양, 일관성, 관련성을 고려하여 기능성이 평가되었는지 여부
  - 별지 제1호 서식에 따라 영업자가 신청한 기능성 인정 내용의 적절성 여부
- 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항이 원료의 안전성 및 기능성을 바탕으로 설정되었는지 여부. 어린이 등 특정 대상군을 섭취대상으로 하는 경우에는 해당 섭취대상에 대한 섭취량, 섭취방법 등이 적절히 설정되었는지 여부
- 국·내외에서 허가된 의약품 성분이거나, 현재 허가 진행 중인 원료인지 여부
- 제출자료 종합평가

해당 원료의 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황, 제조방법, 원료의 특성, 전통적 사용, 섭취량 평가결과, 인체적용시험결과, 독성시험결과 등 제출된 모든 자료를 종합적으로 검토하여 원료 또는 성분의 안전성과 기능성이 확보되어 있는지를 평가한다.

## - 해외 NDI 등 인허가

### 1) NDI(New Dietary Ingredient)

1994년 10월 15일 이전에 건강 기능 식품으로 미국에서 판매되지 않은 건강기능 원료 및 식품을 의미하며, 원료의 안정성과 효능 등과 관련된 자료를 바탕으로 심사하여 인증을 부여하는 제도. 미국 식품, 의약품 및 화장품 법에 따라 미국에서 새로운 건강기능 원료가 포함된 건강기능성식품 등을 판매하려는 경우, 해당 제조업체 및 유통업체는 미국 FDA(Food and Drug Administration, 식품의약국)에 해당 건강기능 원료에 대하여 통보하고 NDI인증 신청 및 심사를 받아야 한다. 심사에 필요한 자료가 복잡하고 까다로워 인증 난이도가 높은 것으로 알려져 있다.

### 2) NDI 신청 자료

신규 건강기능 원료 판매를 위해서는 주(State)간의 상거래에 해당 건강기능 원료가 도입되기 최소 75일 전에 미국 FDA 측에 자료를 제출해야하며, 모든 자료는 영문으로 작성이 되어야한다. 또한 미국 FDA 측의 보완자료 요청에 즉각적으로 대응할 수 있도록 해야한다. NDI 승인에 있어서 다음에 대한 내용을 준비하여야 하며 이를 뒷받침하기 위한 명확한 reference를 함께 준비하여야한다.

#### - Identity Information about the NDI and the Dietary Supplement

- What is the purpose of including information about the identity of the NDI and the dietary supplement containing the NDI in my notification?
- What types of identity information should I include in my NDI notification?
- How much detail should my description of the manufacturing process contain?
- What is a specification?
- What specifications for my process and ingredients should I include in the notification?
- What additional information should I submit if my NDI is a discrete chemical entity (e.g., a vitamin, mineral, amino acid, or a constituent or a metabolite of another dietary ingredient)?
- What additional chemistry information should I submit if my NDI is a salt?
- What additional chemistry information should I submit if my NDI is an enzyme?
- What additional chemistry information should I submit if my NDI is a covalently modified derivative of a dietary ingredient?
- What information should I submit if my notification relies on history of use or other evidence of safety for a substance or product that is similar to, but not exactly the same as, my NDI or dietary supplement?
- What additional identity information should I submit if my product contains a mixture of ingredients?
- What additional identity information should I submit if my NDI is a botanical or is derived from a botanical?
- Should I describe the production methods for my botanical NDI?
- How should the identity section of my NDI notification deal with toxins in related plants or microorganisms?
- How should I describe an extract or concentrate of a botanical or a dietary substance?
- What additional information should I include if my NDI is produced using fermentation?
- What additional information should I include if my NDI is a live microbial dietary ingredient?
- What information should I provide in my notification if the labeling of the NDI or dietary supplement containing the NDI will include an expiration date or "use by" date?
- What information should I submit to describe the conditions of use that I intend to recommend or suggest in the labeling of my dietary supplement?

#### - History of Use or Other Evidence of Safety

(1) What safety information is required to support an NDI notification?

- Should I submit both a history of safe use and safety testing data for the NDI?
- What data and information should I submit to substantiate an NDI's history of safe use?
- What documentation of an NDI's history of use should I submit?
- Am I required to submit a comprehensive survey of every historical use of the NDI?
- How do I determine whether historical use was "daily chronic" or "intermittent"?
- Should I estimate the intake of historically consumed materials related to my NDI if I am relying on those related materials to establish a history of safe use, and should this estimate be included in my NDI notification?
- Where may I find information on how to estimate consumer intake?
- How is the reliability of history of use data evaluated?
- Should I cite the history of use of an NDI in traditional medicine?
- Does FDA recommend submitting additional animal and human studies to supplement evidence of a history of safe use by humans?
- What factors are helpful in evaluating whether to submit animal or human safety studies in addition to history of use data?
- Should I use toxicology or clinical studies published by others, or unpublished studies I have performed, if those studies used test articles that are similar but not identical to the NDI or the dietary supplement containing the NDI?
- Are there scenarios in which FDA considers additional safety data unnecessary if the proposed use of the NDI leads to intake levels that are the same as or less than the levels consumed historically?
- What types of data does FDA recommend to assess safety if the dietary supplement containing the NDI is intended for daily chronic use, the NDI has a documented history of safe intermittent use, and the proposed use of the NDI leads to intake levels that are the same as or less than the levels consumed historically?
- What types of data does FDA recommend to assess safety if the dietary supplement containing the NDI is intended for daily chronic use, the NDI has a documented history of safe daily chronic use, and the proposed use of the NDI leads to intake levels that are greater than the levels consumed historically?
- What types of data does FDA recommend to assess safety if the dietary supplement containing the NDI is intended for daily chronic use, the NDI has a documented history of safe intermittent use, and the proposed use of the NDI leads to intake levels that are greater than the levels consumed historically?
- What types of data does FDA recommend to assess safety if the dietary supplement containing the NDI is intended for intermittent use, the NDI has a documented history of safe intermittent use, and the proposed use of the NDI leads to intake levels that are greater than the levels consumed historically?
- What types of data does FDA recommend to assess safety if the dietary supplement containing the NDI is intended for intermittent use, the NDI has a documented history of safe daily chronic use, and the proposed use of the NDI leads to intake levels that are greater than the levels consumed historically?
- What types of data does FDA recommend to assess safety if there is no history of use of the NDI that can be relied on to provide evidence of safe use in dietary supplements?
- Am I required to use only FDA-published safety test protocols?
- What are some sources of safety testing protocols that can be used in testing NDIs and dietary supplements?
- What is the appropriate highest dose of an NDI to use in animal and human safety studies?
- What should I do to justify the use of a particular protocol?
- How will I identify a potential hazard using a standard genetic toxicity test, and what should I do after identifying a potential genetic toxicity hazard?

- Should the NDI notification discuss the history of use or other evidence of safety that forms the basis for my conclusion that a genotoxic dietary ingredient can reasonably be expected to be safe?
- Where can I find good examples of genotoxicity protocols that can be used in conducting animal and human studies on NDIs?
- What is the purpose of a subchronic oral toxicity study?
- What is the appropriate duration for a subchronic oral toxicity study?
- Where can I find more information and examples of a subchronic oral toxicity study?
- What is the purpose of reproductive toxicity and teratology studies?
- Should I include a discussion of the reproductive and teratology studies in my NDI notification?
- Should I identify the “No Observed Adverse Effect Level” (NOAEL) for all test substance-related changes in both reproductive and teratology test endpoints?
- Where can I find sample protocols for reproductive and teratology studies?
- What is the purpose of repeat-dose toxicity testing?
- Am I required to conduct human clinical studies to assess the safety of my NDI or the dietary supplement containing my NDI?
- What kinds of human clinical studies are useful to assess the safety of an NDI or dietary supplement containing an NDI?
- What is the purpose of “repeat-dose” human studies, and how are such studies classified?
- Where can I find more information and examples of clinical protocols that can be used in conducting human studies for NDIs and dietary supplements?
- What information should I submit to demonstrate the safety of an NDI produced by fermentation using microorganisms like bacteria or yeast?
- What information should I submit to demonstrate the safety of a microbial NDI (live or killed)?
- What should I do to demonstrate the safety of an NDI that contains nanomaterials or otherwise involves the application of nanotechnology?

#### – Summary of the Basis for Your Conclusion of Safety

- Should my notification include separate safety profiles for the NDI and the dietary supplement in which the NDI will be used?
- What should I include in my comprehensive safety profile for the NDI?
- What should I include in my dietary supplement safety narrative?
- What is the difference between a NOEL and a NOAEL, and which should I use?
- What safety factors should be used if only animal toxicity studies are available?
- Does FDA recommend including margin of safety discussions in NDI notifications?
- What is the difference between a safety factor and a margin of safety?
- When is the ratio of the EDI to the ADI adequate to support the conclusion that a dietary supplement containing an NDI will reasonably be expected to be safe?
- What is an example of a common error about margin of safety in NDI notifications that have been submitted to FDA for review?
- Are the recommendations in section VI requirements for safety information to include in an NDI notification?

#### (F) WMS77 여성갱년기 증상 완화 소재의 다양한 시제품 개발

			
정제	액상	캡슐	젤리

WMS77 소재의 다양한 제품화를 위하여 제형을 여러 가지 형태로 시제품 제작을 완료하였음. WMS77과 다양한 맛과 제형으로 젤리형태, 초콜릿형태, 아이스커피음료, 믹스커피 등의 제형으로 다각화 하여 시제품을 개발하였음.

**(G) 갱년기 여성 건강 증진을 위한 WMS77 소재의 제품 개발 완료**

- 갱년기 여성을 위한 건강기능식품(B2B)

제품 사진					
판매원	김정문알로에	두드림	유니베라	(주)뉴랜드올네이처	(주)카리스
제품명	우먼스 레벨업W	리피어라	미즈에버 플러스	로제골드 플러스	우먼스메가밸런스

- 갱년기 여성건강 토탈케어(B2C) 미즈텐 퀴즈케어

	
미즈텐 퀴즈케어(1개월분)	소케이스

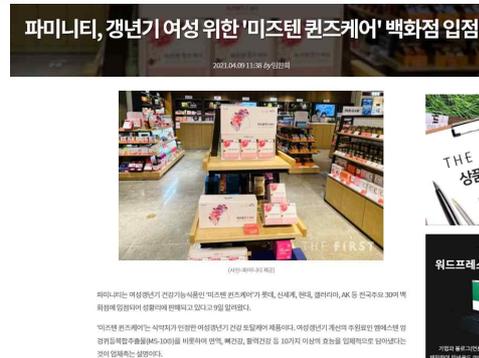
갱년기 여성건강에 도움을 줄 수 있는 WMS77 뿐만 아니라 에너지 생성에 필요한 나이아신, 아연, 비타민 B6, 비타민 B1, 비타민 B2 그리고 비타민 D를 포함한 10종 기능성으로 갱년기 여성건강 토탈케어가 가능하고, 중년 여성들이 선호할 디자인으로 제품화하였음.

**(H) WMS77 ‘미즈텐 퀴즈케어’의 다양한 유통채널 진입**

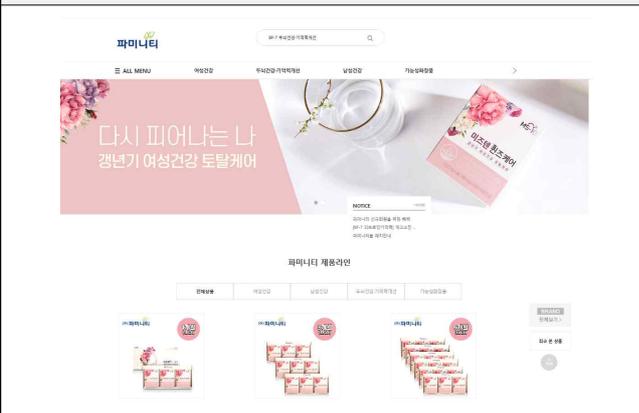
2021년 3월에 본 과제를 통해 개발된 소개인 WMS77이 주원료로 포함된 갱년기 여성건강 토탈케어 ‘미즈텐 퀴즈케어’제품을 출시하여 홈쇼핑, 온라인, 약국, 백화점 등에서 판매되고 있고, 홈쇼핑의 경우 GS 홈쇼핑, 롯데홈쇼핑 런칭 되었으며 CJ홈쇼핑, SK스토아에 런칭하였고, 전국 주요 30여 백화점에 입점해 있음. 현재 자사몰 또는 네이버 스마트스토어팜을 통해 온라인 판매를 진행하고 있음.



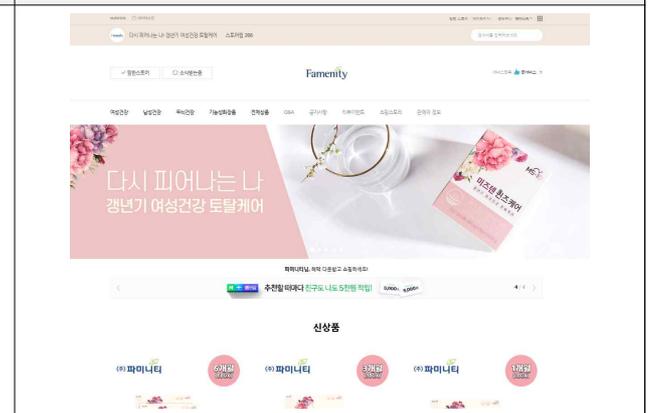
홈쇼핑(GS, 롯데, CJ, SK)



롯데백화점, 현대백화점, AK, 갤러리아등 30곳 입점



자사몰(www.famenitymall.com)



네이버 스마트스토어 (https://smartstore.naver.com/famenity)

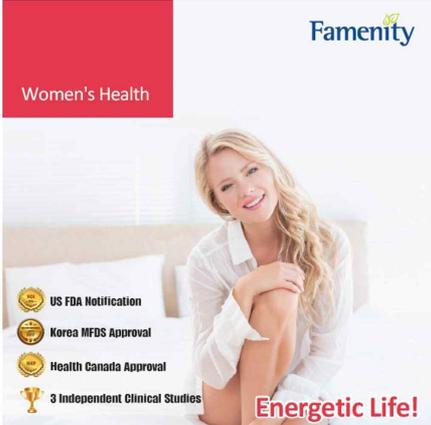
(I) WMS77 마케팅을 통한 제품홍보 및 판매

검색 포털사이트인 네이버의 검색광고, 브랜드광고, 바이럴마케팅 등 다양한 마케팅을 진행하고 있고, 해외 잡지광고 및 홍보기사를 통해 WMS77 및 미즈텐 제품을 알리고 있음.

• 네이버광고

<p>검색광고</p>	<p>브랜드광고</p>	<p>바이럴마케팅</p>

• 해외광고

<p>NUTRITIONAL OUTLOOK (MARCH 2021)</p>		 <p><b>Women's Health</b></p> <p>US FDA Notification Korea MFDS Approval Health Canada Approval 3 Independent Clinical Studies</p> <p><b>Energetic Life!</b></p> <p>Menopausal Symptom Improvement, Vaginal Dryness Improvement, Inappropriate Weight Gain</p> <p>Helps improve menopause*</p> <p>Want to know more? Contact us: <a href="mailto:sales@famenity.com">sales@famenity.com</a> For details: <a href="http://famenity.com/en/functional-ingredients/ms-10/">http://famenity.com/en/functional-ingredients/ms-10/</a></p> <p><small>*These statements have not been evaluated by the Food and Drug Administration. This ingredient is not intended to diagnose, treat, cure, or prevent any disease.</small></p>
<p>NUTRITIONAL OUTLOOK (MAY 2021)</p>		

• 홍보기사

時事대거인

HOME > 한국 > 광주전남

농림식품기술기획평가원, 여성건강개선 차세대 천연식약소재, 국제적으로 인정받아

김 승상고 기자 | 승인 2021.03.24 14:04

MS-10™ 영경귀등록합추출물 미국 FDI NDI(새로운 기능성 소재) 등록



농림식품기술기획평가원(원장 오병석)은 우리나라 고유의 천연물인 MS-10™ 영경귀등록합추출물이 미국 FDA에서 NDI(New Dietary Ingredient, 새로운 기능성 소재)에 등록되었다고 밝혔다. 사진은 연구성과물 미즈텐 원즈케어이다. (사진: 농림식품기술기획평가원)

광남일보

농기평, 여성건강 개선 천연식약소재 국제적 인정

MS-10™ 영경귀등록합추출물 미국 FDA NDI 등록

2021. 03.23(화) 09:55

기사 보기



미즈텐원즈케어

- ▶ 로또, "이것"만 있다면 1등 당첨률 대폭상승!! 적용률만 98%
- ▶ 956회 로또, 당첨번호 이미 나왔다! 업계 실수로 6자리 몽땅 공...
- ▶ 월3000만원 벌고 싶으면 "이 자각증" 따면된다!!

농림식품기술기획평가원(원장 오병석, 이하 농기평)은 우리나라 고유의 천연물인 MS-10™ 영경귀등록합추출물(이하 MS-10™)이 미국 FDA에서 NDI(New Dietary Ingredient, 새로운 기능성 소재)에 등록됐다고 23일 밝혔다.

농기평 “MS-10 천연신소재, 여성 갱년기 증상 개선에 효과”

일찍 2021-03-23 (17543) 수정 2021-03-23 (17543) 게재 2021-03-23 (17543)



파미나티에서 출시한 미즈텐 퀴즈케어 농기평 제품

농림식품기술기획평가원(농기평)은 우리나라 고유의 천연물인 MS-10 영경취동복합추출물이 미국 FDA에서 새로운 기능성 소재로 등록됐다고 23일 밝혔다.

이 천연물 소재는 이미 지난해 12월 우리나라는 물론 미국 유럽 일본 등에서 국제특허를 받았다.

농기평은 농식품 기술융합 정의연계장상사업의 하나로 천연물식약소재산업화연구센터를 선정해 천연 식의약 산업화 기반구축과 전문인력 양성을 지원하고 있다.

이 센터는 천연물을 이용한 여성건강 개선을 목표로 우리나라뿐만 아니라 전 세계 수많은 천연물의 효능을 검증해왔고, 그 중에 MS-10을 선정해 그 효능과 안전성을 입증했다.

갱년기 여성 건강 위한 '미즈텐 퀴즈케어'

파미나티, 여성 건강 맞춤형 건강기능식품

기사입력 2021.03.23 11:17:54 | 최종수정 2021.03.23 11:17:54



파미나티(대표 이지원)는 MS-10 영경취동복합추출물(이하 엠펬스텐)을 활용한 여성 건강 맞춤형 건강기능식품 '미즈텐 퀴즈케어'를 출시했다고 밝혔다.

(J) 2핵심 연구결과의 정량성과

천연물 식의약 소재의 국내외 인허가 산업화 과제로 본 2핵심과제 연구팀은 일정한 품질을 유지하기 위한 원료의 표준화로 4건 이상의 지표성분설정을 완료 하였으며, 지표성분 분석법에 대한 시험법 밸리데이션을 완료하였다. 또한 제품의 재현성을 향상시키는 대량생산 공정인 제조공정도를 2건 이상 확보하였으며, 제품의 기준 규격 또한 확보하였다. 개발된 소재의 안전성을 확보하기 위하여 단회, 2주 반복, 유전독성 등의 독성시험을 15건 이상 수행하여 안전성을 입증하였다. 천연물 식의약 소재로서 비뇨기, 여성, 탈모, 정신건강 개선관련 20건 이상의 기능성 평가가 전임상시험(세포, 동물), 인체적용시험, 간이임상 등으로 진행되었으며, 학술적 성과를 이루었다. 2핵심과제에서는 이러한 과정을 통하여 천연물 식의약 소재로 개별인정 기능성원료와 NDI 등 국내외 인허가를 승인받았다.

④ 제 2-1 협동과제: 탈모개선, 정신건강 개선 식의약소재 인허가 산언화

※ 본 과제에 사용된 시료는 정식 명칭이 아닌 가칭으로 표기함.

탈모 기능성 소재명 가칭 : TMRS36

정신건강 기능성 소재명 가칭 : GMS70

① 탈모 예방 및 개선 식의약소재의 개발

(ㄱ) 스크리닝을 통한 개선 소재 선정

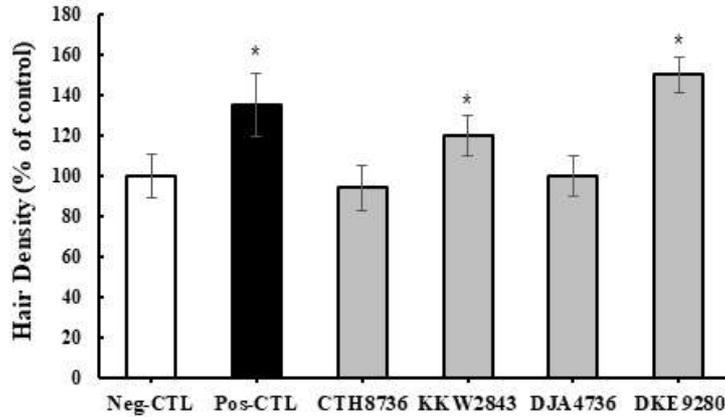


그림3-4-1. 탈모 예방 및 개선 소재 스크리닝

(ㄴ) 탈모 예방 및 개선 소재의 지표성분 분석 결과

i. TMRS36의 성분 분석 결과 종합

표. TMRS36 성분 분석 결과

성분명	함량 (mg/g)
chlorogenic acid	4.3
rosmarinic acid	0.84
<i>p</i> -coumarinic acid	0.04
acacetin	N.D.
apigenin	N.D.
luteolin	N.D.
quercetin	N.D.

ii. TMRS36 성분 분석 방법

▪ Chlorogenic acid 분석방법

⊙ 전처리 방법

ⓐ 시료 약 0.2 g을 취함.

ⓑ 30% MeOH 25 mL을 가함.

ⓒ 위의 용액을 30분동안 초음파 추출함.

ⓓ 추출이 끝난 후, 실온에서 냉각시킴.

ⓔ 0.45 um filter로 여과 후 시험용액으로 사용함.

⊙ 표준용액 조제

- 표준물질 적정량을 30% 메탄올로 용해하여 표준원액으로 함.

표. Chlorogenic acid 표준용액 조제

Chlorogenic acid Working solution (ppm)					
STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	Stock solution
1.5625	3.125	6.25	12.5	25	
STD 6	STD 7	STD 8	STD 9	STD 10	1000
50	100	200	400	800	
Chlorogenic acid -Sigma C3878; Lot number: SLBJ3632V, 97%					
Stock solution=1000ppm					

⊙ 시험용액 계산

$$Chlorogenic\ acid\ 함량(mg/g) = \frac{\text{시험용액 중 chlorogenic acid}(ug/mL) * \text{최종부피}(mL) * \text{표준품순도}}{\text{시료량}(g) * 1000}$$

⊙ 분석조건

표. HPLC 분석 조건

Instrument	YL9100 HPLC system																								
Detector	UV detector																								
Wavelength	330nm																								
Column	Supelco discovery C18(250mm x 4.6mm, 5µm)																								
Column temperature	40°C																								
Injection volume	5 µL																								
Flow rate	1.4 ml/min																								
Mobile phase	Solvent A: Phosphoric acid/D.W=0.5/99.5 (v/v) Solvent B: Phosphoric acid/Acetonitrile=0.5/99.5 (v/v)																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Solvent A (%)</th> <th>Solvent B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>27</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>28</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	0	95	5	7	95	5	27	70	30	28	10	90	30	10	90	31	95	5	40	95	5
Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)																							
0	95	5																							
7	95	5																							
27	70	30																							
28	10	90																							
30	10	90																							
31	95	5																							
40	95	5																							

▪ ρ-coumarinic acid 분석방법

⊙ 전처리 방법

- ⓐ 시료 약 0.5 g을 취함.
- ⓑ 50% MeOH 20 mL을 가함.
- ⓒ 위의 용액을 30분동안 초음파 추출함.
- ⓓ 추출이 끝난 후, 실온에서 냉각시킴.
- ⓔ 0.45 µm filter로 여과 후 시험용액으로 사용함.

⊙ 표준용액 조제

- 표준물질 적정량을 100% 메탄올로 용해하여 표준원액으로 함.

표. ρ-coumarinic acid 표준용액 조제

ρ-coumarinic acid Working solution (ppm)					
STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	Stock solution
1.5625	3.125	6.25	12.5	25	
STD 6	STD 7	STD 8	STD 9	STD 10	1000
50	100	200	400	800	

⊙ 시험용액 계산

$$\rho\text{-coumarinic acid 함량}(mg/g) = \frac{\text{시험용액 중 } \rho\text{-coumarinic acid}(ug/mL) * \text{최종부피}(mL) * \text{표준품순도}}{\text{시료량}(g) * 1000}$$

⊙ 분석조건

표. HPLC 분석 조건

Instrument	YL9100 HPLC system																								
Detector	UV detector																								
Wavelength	280nm , 330nm																								
Column	Supelco discovery C18(250mm x 4.6mm, 5µm)																								
Column temperature	40°C																								
Injection volume	5 µL																								
Flow rate	1.4 ml/min																								
Mobile phase	Solvent A: Phosphoric acid/D.W=0.5/99.5 (v/v) Solvent B: Phosphoric acid/Acetonitrile=0.5/99.5 (v/v)																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Solvent A (%)</th> <th>Solvent B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>27</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>28</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	0	95	5	7	95	5	27	70	30	28	10	90	30	10	90	31	95	5	40	95	5
Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)																							
0	95	5																							
7	95	5																							
27	70	30																							
28	10	90																							
30	10	90																							
31	95	5																							
40	95	5																							

iii. TMRS36 성분 분석 HPLC profile

a. TMRS36-MC-001 분석 결과

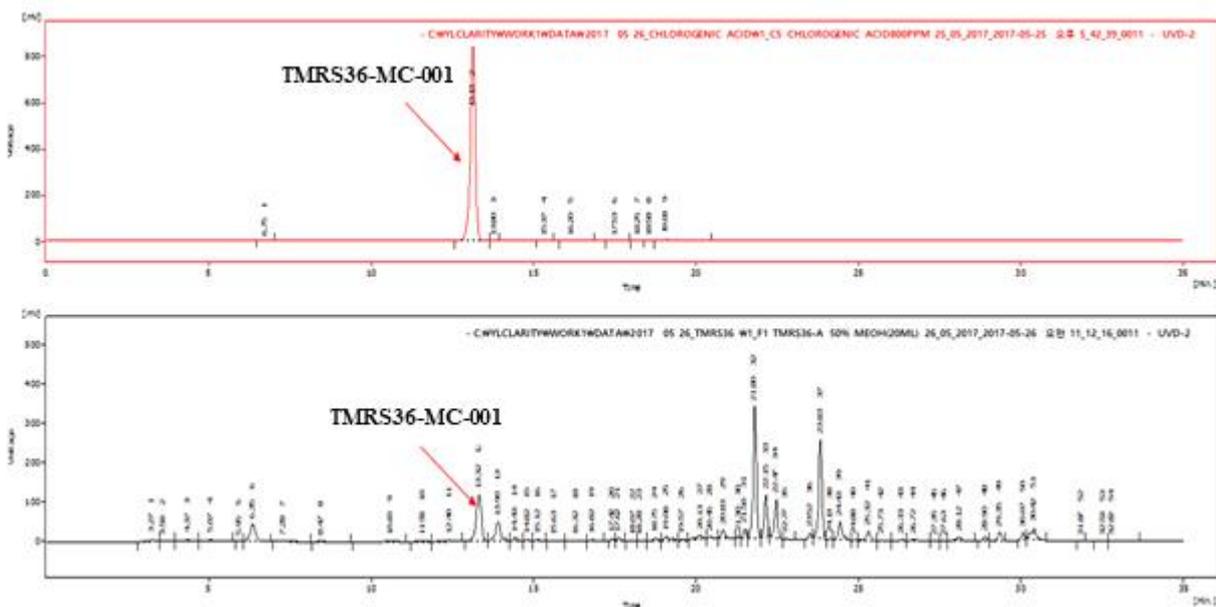


그림3-4-2. TMRS36-MC-001 분석 결과

b.

- TMRS36 추출물 분석 그래프(검은색)에서 TMRS36-MC-001 표준품 분석 그래프(빨간색)와 동일한 TMRS36-MC-001 피크를 확인할 수 있었음. 이를 정량화한 결과, TMRS36 추출물은 TMRS36-MC-001을 약 4.3 mg/g 농도로 함유하고 있었음.

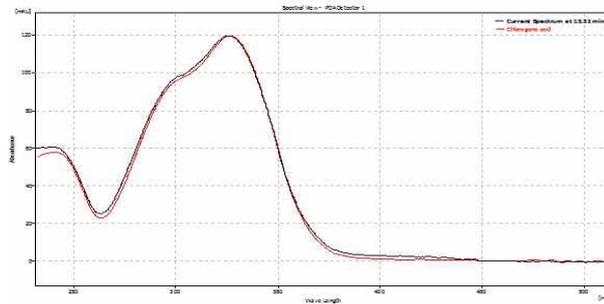


그림3-4-3. PDA detector spectrum 결과  
(TMRS36 추출물 내 TMRS36-MC-001)

ㄴ TMRS36 추출물 중 검출된 peak와 표준물질인 TMRS36-MC-001와의 동일여부를 확인하기 위하여 spectrum을 확인함. 그 결과, TMRS36-MC-001 표준품과 동일한 양상의 spectrum이 확인되어 TMRS36 추출물 내 TMRS36-MC-001가 함유된 것을 확인함. **이를 지표성분 후보군으로 판단함.**

c. TMRS36-MC-002 분석 결과

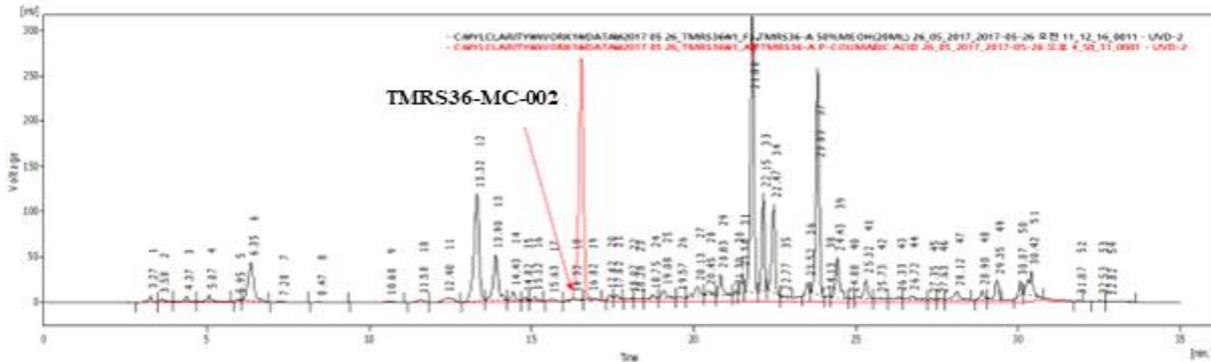


그림3-4-4. TMRS36-MC-002 분석 결과

- TMRS36추출물 분석 그래프(검은색)에서 TMRS36-MC-002 표준품 분석 그래프(빨간색)와 동일한 TMRS36-MC-002 피크를 확인할 수 있었음. 이를 정량화한 결과, TMRS36 추출물은 TMRS36-MC-002을 약 0.04 mg/g 농도로 함유하고 있었음. 미량으로 검출되어 지표성분 후보군에서 제외함.

a. TMRS36-MC-003분석 결과

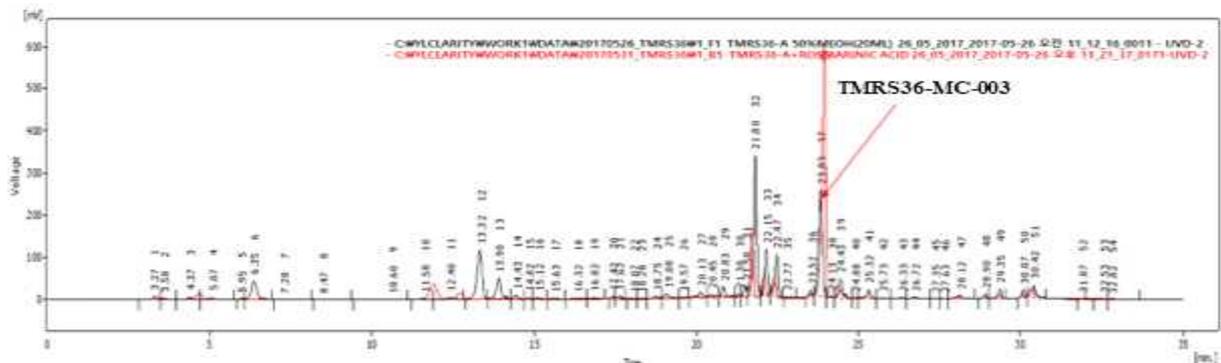


그림3-4-5. TMRS36-MC-003 분석 결과

- TMRS36 추출물 분석 그래프(검은색)에서 TMRS36-MC-003 표준품 분석 그래프(빨간색)와 동일한 TMRS36-MC-003 피크를 확인할 수 있었음. 이를 정량화한 결과, TMRS36 추출물은 TMRS36-MC-003를 약 0.84 mg/g 농도로 함유하고 있었음.

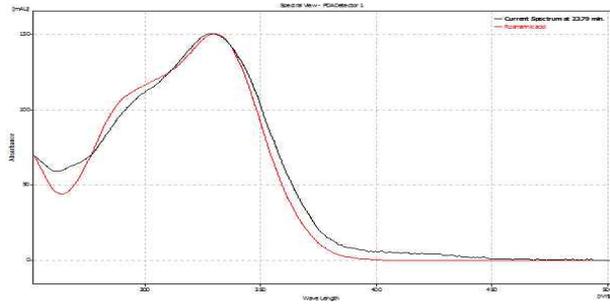


그림3-4-6. PDA detector spectrum 결과  
( TMRS36 내 TMRS36-MC-003)

– TMRS36 추출물 중 검출된 peak와 표준물질인 TMRS36-MC-003와의 동일여부를 확인하기 위하여 spectrum을 확인함. 그 결과, TMRS36-MC-003 표준품과 동일한 양상의 spectrum이 확인되어 **TMRS36 추출물 내 TMRS36-MC-003가 함유된 것을 확인함. 이를 지표성분 후보군으로 판단함.**

(ㄷ) 탈모 예방 및 개선 소재의 안전성, 독성 평가

a. 탈모개선 TMRS36 천연물 소재의 안전성 평가를 위한 조제물 분석 및 일반독성시험

번호	시험명	시험계	시험항목	결과 및 고찰
1	TMRS36의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복 경구투여 용량결정시험	SD랫드	일반증상, 체중, 사료, 혈액, 부검	시험물질 영향없음 고용량 5,000mg/kg 설정
2	HPLC를 이용한 TMRS36의 조제물 분석법 검증	Chlorogenic acid	조제물 분석법(9종)	분석법 적합, 5 or 500mg/mL 조제물 균질
3	TMRS36의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험	SD 랫드	일반증상, 체중, 사료, 안과, 뇨, 혈액학, 혈액생화학, 암컷성주기, 부검, 장기중량, 조직병리학	시험물질 영향없음 NOAEL 5,000mg/kg

b. TMRS36의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복 경구투여 용량결정시험

시 험 계	랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF
시험방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>군구성 : 대조군, 저(1,250mg/kg), 중(2,500mg/kg), 고용량군(5,000mg/kg)</li> <li>투여용량 : 1일 1회 2주간, 위내반복투여</li> <li>평가항목 : 일반증상, 체중, 사료섭취량, 혈액학적, 혈액생화학적, 부검, 장기중량 측정, 조직병리학적 검사</li> </ul>
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>사망유무, 일반증상 : 갈색변 외 특이증상 없었음.</li> <li>체중변화, 사료섭취량 : 투여군, 대조군 간 변화는 관찰되지 않았음.</li> <li>혈액학적, 혈액생화학적 : 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았음.</li> <li>장기중량 : 모든 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았음.</li> <li>부검소견 : 시험물질에 의한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았음.</li> </ul>
결 론	TMRS36의 13주 반복 독성시험 고용량은 5,000 mg/kg으로 설정 가능함.

c. HPLC를 이용한 TMRS36의 조제물 분석법 검증

표 준 품	Chlorogenic acid
분석방법	시스템 적합성, 직선성, 특이성, 일내재현성, 표준원액 안정성, Autosampler 내에서의 안정성, 균질성, 안정성(실온 4시간, 냉장 8일) 등
분석결과	<p>QC 시료 2 ug/mL를 6 회 반복 측정된 피크면적 및 retention time의 정밀성은 2.29 및 0.48%로 판정기준을 모두 만족하였으며, 표준용액 0.5 ~ 10 ug/mL 농도 범위에서 측정된 직선성은 상관계수와 정확성의 판정기준을 모두 만족함. 표준물질의 피크는 분석에 적합한 형상을 나타내며, 이동상, 부형제 등 표준물질 피크에 영향을 미치는 성분은 검출되지 않았음.</p> <p>일내재현성의 결과, 10 및 500 mg/mL 농도의 조제물에서 시험물질의 정밀성 및 정확성은 판정기준을 모두 만족하였으며, 10 및 500 mg/mL 농도의 조제물을 autosampler 내에서 18 시간 동안 방치 후 안정성을 확인한 결과, 시험물질의 정밀성 및 초기농도에 대한 변동률은 판정기준을 모두 만족함.</p> <p>10 및 500 mg/mL 농도의 조제물에서 상, 중, 하층의 균질성은 판정기준을 만족하였으며, 조제물을 실온에서 4 시간 동안 방치 및 8 일간 냉장 조건하에 보관 후 안정성을 확인한 결과, 시험물질의 정밀성 및 초기농도에 대한 변동률은 판정기준을 모두 만족함.</p>
결 론	시험물질 TMRS36의 조제물 농도 분석을 위한 본 분석법은 적합하였으며, 부형제 내에서 10 및 500mg/mL 농도의 조제물은 균질하였고, 실온 4시간 및 냉장 8일간 안정한 것으로 확인됨.

a. TMRS36의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험

시 험 계	랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF
시험방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 군구성 : 대조군, 저(1,250mg/kg), 중(2,500mg/kg), 고용량군(5,000mg/kg)</li> <li>• 투여용량 : 1일 1회 13주간, 반복투여</li> <li>• 평가항목 : 일반증상, 체중, 사료섭취량, 안과학적, 뇨, 혈액학적, 혈액생화학적, 암컷 성주기, 부검, 장기중량, 조직병리학적 검사</li> </ul>
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사망유무 : 시험물질에 의한 사망은 관찰되지 않았음.</li> <li>• 일반증상 : 시험물질 과량투여에 의한 색변(갈색) 외 특이증상 없었음.</li> <li>• 체중변화, 사료섭취량 : 시험군, 대조군 간 유의성 관찰되지 않았음.</li> <li>• 안과학적 : 시험군에서 이상소견 관찰되지 않았음.</li> <li>• 혈액학적, 혈액생화학적 : 시험물질 투여군에서 대조군과 비교 시 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았음.</li> <li>• 장기중량 : 모든 측정 장기중량에서 유의성 있는 변화 관찰되지 않았음.</li> <li>• 부검소견 : 수컷 중용량군, 고용량군에서 위 한계능선 비후가 관찰되었고 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었음.</li> </ul>
결 론	TMRS36의 13주 반복 경구투여 결과, 무독성량 (NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단됨.

(ㄹ) 탈모 예방 및 개선 소재의 전임상 효능 평가

- 위 탈모 소재의 전임상 효능 평가를 위하여 주령의 C57BL/6 수컷 생쥐를 Control군, 양성대조군 (3% Minoxidil sulfate), WMS77군, TMRS36군으로 나누어 제모 후 매일 같은 양의 용액을 30일간 도포한 후 평가함.

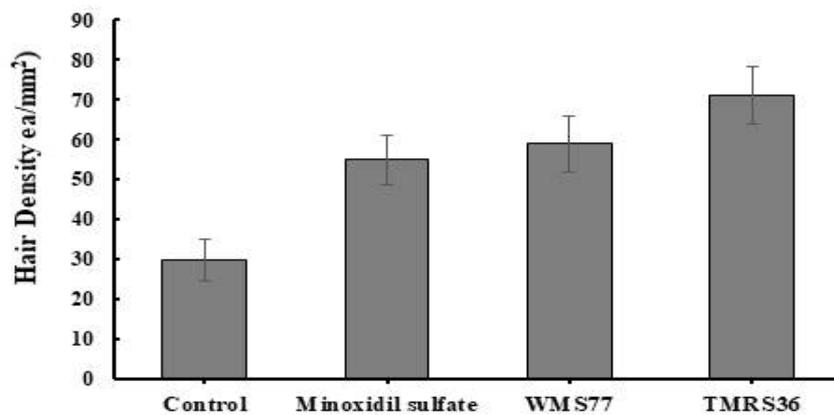


그림3-4-7. 천연물 유래 추출물 도포 후 털 밀도 측정 결과

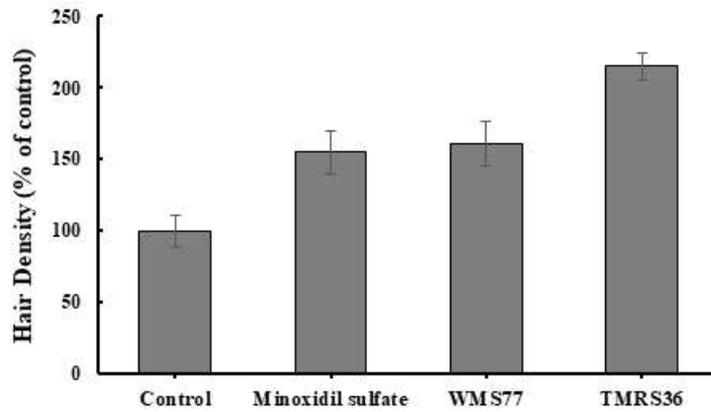


그림3-4-8. 천연물 유래 기능성 추출물 도포 후 대조군 대비 털 밀도 측정 결과 (% of control)

- 위 그림에서 확인할 수 있는 것과 같이 3% Minoxidil sulfate를 도포한 양성대조군은 털의 밀도가 Control군에 비해 약 50% 이상 높게 측정된 것을 확인 할 수 있었음. WMS77을 도포한 제1 실험군은 털의 밀도가 음성대조군에 비해 약 60% 정도 높게 측정되었으며, 새로운 복합 추출물인 TMRS36을 도포한 제2 실험군은 털의 밀도가 음성대조군에 비해 약 210% 높게 측정되었음. 이를 통해 여성건강을 위해서 개발된 WMS77의 발모 효과가 뛰어남을 알 수 있고, 새로운 복합 추출물 중 하나인 TMRS36이 WMS77보다 발모 효과가 좋은 것을 확인할 수 있었음.

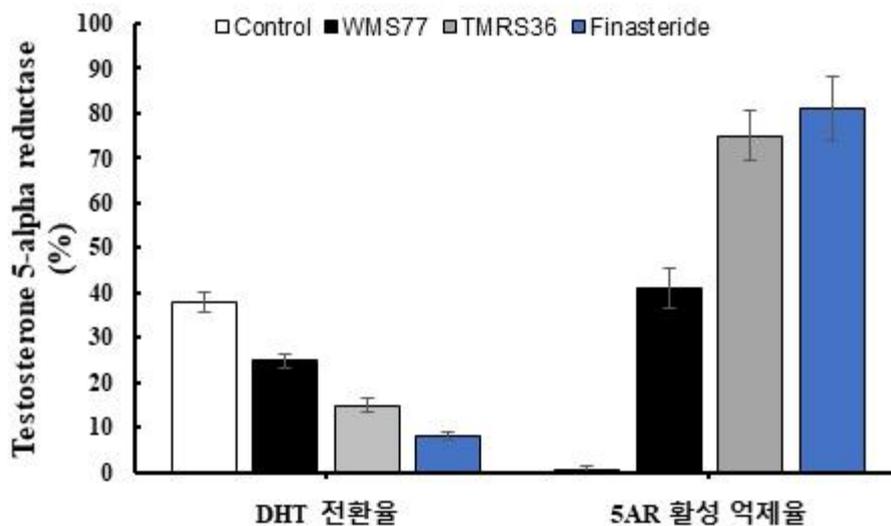


그림3-4-9. Testosterone 5-alpha reductase 활성 전환율 측정

- 이를 통해서 TMRS36과 WMS77의 발모 작용기전을 확인하기 위한 테스토스테론 5-알파 환원효소의 활성 억제 작용을 평가하였음. 5-알파 환원효소는 테스토스테론을 디히드로테스토스테론으로 전환시키는 역할을 하는 것으로 테스토스테론 5-알파 환원효소 저해 활성은 전환율 (% , 테스토스테론에서 디히드로테스토스테론으로의 전환율)을 낮추는 것을 의미하며, 결국 저해도가 높을수록 탈모를 방지하는데 효능이 있는 것으로 알려져 있음. 결과적으로 TMRS36과 WMS77 추출물 섭취를 통해서 성공적으로 테스토스테론 5-알파 환원효소 저해활성도를 높임으로써 탈모 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 예상됨.

(ㄱ) 탈모 예방 및 개선 소재의 인체적용시험 효능 평가

- 시험자의 탈모 개선 육안 평가를 통해서 확인한 결과 아래 표 1에서 기재된 것과 같이 TMRS36과 WMS77를 하루에 2회 아침저녁으로 도포한 실험군에서 탈모증상이 개선되며 발모 및 양모가 진행되는 것을 확인할 수 있었음. 특히 TMRS36 추출물을 도포한 경우 약 8주 이후부터 발모 효

과가 나타났으며 12주동안 지속적으로 도포한 경우 그림 1에서 확인할 수 있는 것과 같이 눈에 띄는 발모, 양모효과가 있음이 확인됨.

**표. 추출물 도포를 통한 탈모 증상 개선 효능 평가**

실험군\기간	0주	4주	8주
대조군	-	0.0	0.1
WMS77	-	0.4	1.0
TMRS36	-	1.1	2.2



**그림3-4-10. 천연물 유래 추출물 도포를 통한 발모 및 양모 효과**

- 실제 4주에서 8주 후에 시험을 수행한 피험자의 자가 평가에서도 표 2에서 나타난것과 같이 WMS77과 TMRS36 추출물 지속적으로 도포한 실험군에서 탈모증상이 호전되었으며 모발의 질 또한 대조군에 비하여 약 2개 이상 개선되는 것으로 자각 또는 관찰되었음.

**표. 천연물 유래 추출물의 지속적 도포를 통한 피험자의 발모 및 양모 평가 결과**

번호	질문	답변	대조군		제1 실험군		제2 실험군	
			4주	8주	4주	8주	4주	8주
1	두정부 탈모 부위의 크기 변화	호전	20	20	20	50	60	80
		변화없음	80	60	80	50	40	20
		악화		20				
2	정수리에서의 탈모	호전		20	20	30	40	100
		변화없음	100	40	80	70	60	
		악화		40				
3	전두부 탈모 변화	호전			10	30	60	100
		변화없음	100	80	90	70	40	
		악화		20				
4	모발 탈락	호전	20	20	30	70	60	100
		변화없음	80	40	70	30	40	
		악화		40				
		호전		20	30	50	40	80

5	모발의 질	변화없음	100	40	70	50	60	20
		악화		40				
6	전체적인 만족도	호전	20	20	40	50	60	100
		변화없음	80	40	60	50	40	
		악화		40				

- 결론적으로 WMS77과 TMRS36을 지속적으로 두피에 도포한 경우 탈모증상이 확실히 개선되며 모발의 질 또한 위약군에 비해서 크게 향상되는 것을 간이 인체적용시험을 통해 확인하였음. 또한 WMS770 소재보다는 TMRS36의 탈모 개선 효능이 더 우수한 것으로 확인되었음.

i. 탈모개선 식의약 소재의 간이 인체적용시험 - TMRS36

인체적용시험 요약		
시험 제목	(주)네이처센스 TMRS36 시험군 안전성과 탈모 증상 완화에 대한 유효성을 평가하기 위한 이중맹검, 대조시료, 단일기관, 무작위배정 간이 인체적용시험	
시험 기관	대한피부과학연구소	
연구 기간	2020.11.11~2021.06.15	
시험 기간	2020.11.16~2021.05.17	
시험 인원	10 명	
시험 방법	시료 수	2 EA (시험, 대조시료)
	시험 인원	10
	처치 방법	연구 대상자 자가 사용
	시험방법(세부)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 연구 대상자 선정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선정기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않는 연구 대상자</li> </ul> </li> <li>2. 시험부위 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 두피</li> </ul> </li> <li>3. 사용방법 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 아침 또는 저녁 1일 1회씩 두피에 연구 대상자 자가 사용</li> </ul> </li> <li>4. 평가 <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 기기평가 : Phototrichogram을 이용한 모발 수 분석</li> <li>2) 피부과 전문의에 의한 육안 평가</li> <li>3) 연구 대상자에 의한 주관적 평가</li> <li>4) 피부과 전문의에 의한 사용 안전성 평가</li> </ol> </li> </ol>
시험 결과 및 결론	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 총 24주간의 시험 기간 동안 탈모를 가지고 있는 11명의 연구 대상자를 대상으로 탈모 개선 평가 시험을 진행함.</li> <li>• (주)네이처센스 “TMRS36 시험군” 시료를 사용한 시험부위는 1차 유효성 평가 지표인 모발수(N/cm<sup>2</sup>)가 시험 16주 후부터 시험 전에 비해 통계적으로 유의한 수준(p&lt;0.05)으로 증가한 반면, 대조 시료를 사용한 대조 부위의 경우 통계적으로 유의한 수준(p&lt;0.05)으로 모발수가 감소함.</li> </ul>	

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 또한 모발수의 그룹 간 비교 대조 결과, 주차별 모발수 변화 양상을 그룹 간 비교한 교호작용 분석에서 시험군과 대조군 모발수의 주차별 변화 양상이 통계적으로 유의한 수준(<math>p &lt; 0.05</math>)의 차이를 가지는 것을 확인함.</li> <li>• 모발수 변화량 비교에서도 16주 경과 이후 시험군과 대조군 간 모발수 변화량이 통계적으로 유의한 수준(<math>p &lt; 0.05</math>)의 차이를 가지는 것을 확인함.</li> <li>• 연구 대상자 자가 평가에서도 수치상으로 대조군보다 시험군의 평가 점수가 더 높음을 확인할 수 있었음.</li> <li>• 시험 중 모든 연구 대상자에서 특별한 이상반응이 관찰되지 않았음(일시적, 개인차 있음).</li> </ul>
--	---

**(ㄴ) 탈모 예방 및 개선 소재의 제품화 및 산업화**

본 연구과제에서 사용된 탈모 예방 및 개선 소재의 제품화 및 이와 관련된 특허 등록을 통하여 산업화에 필요한 기반을 마련함.



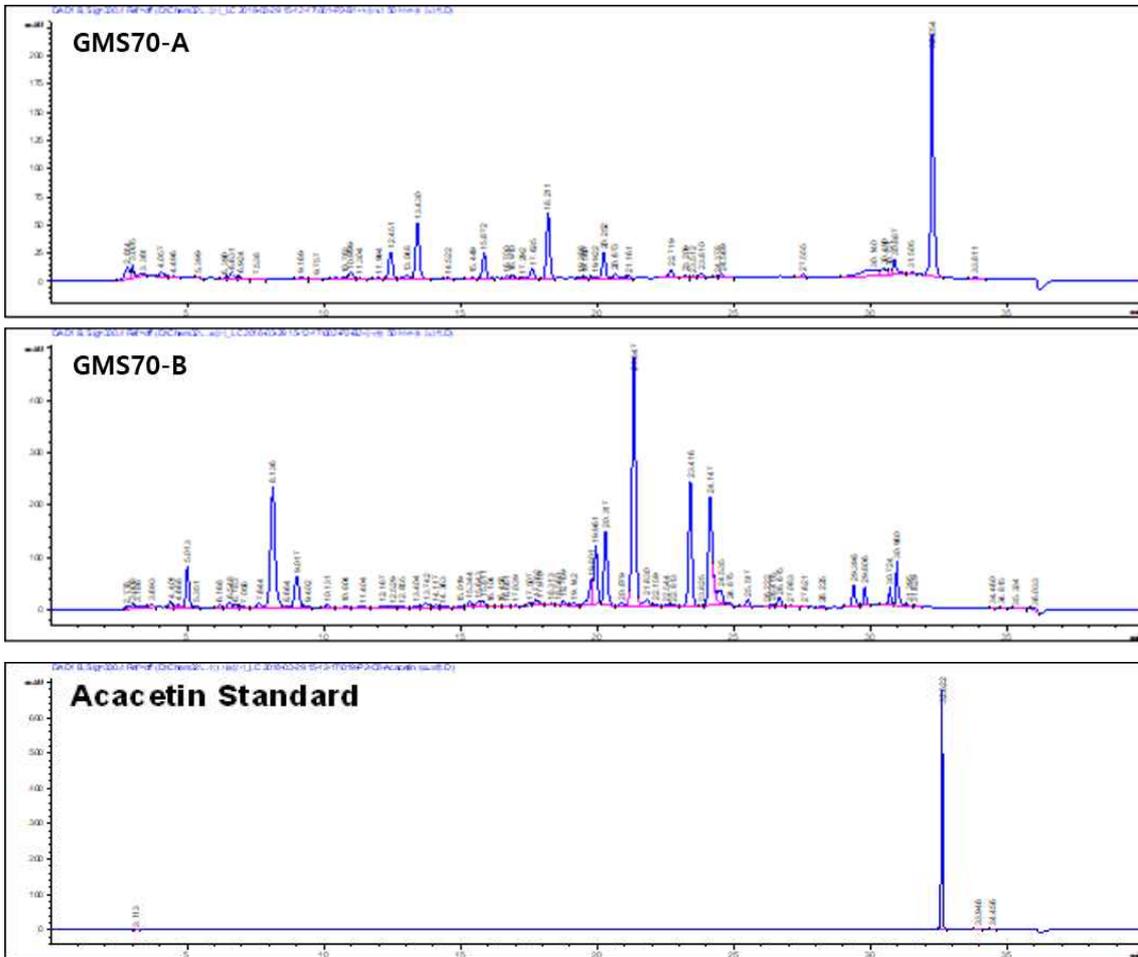
그림3-4-11. 탈모 예방 및 개선 시제품 (앰플, 세럼, 샴푸)

② 정신 건강 개선 기능성 소재

**(ㄱ) GMS70 추출물의 표준화**

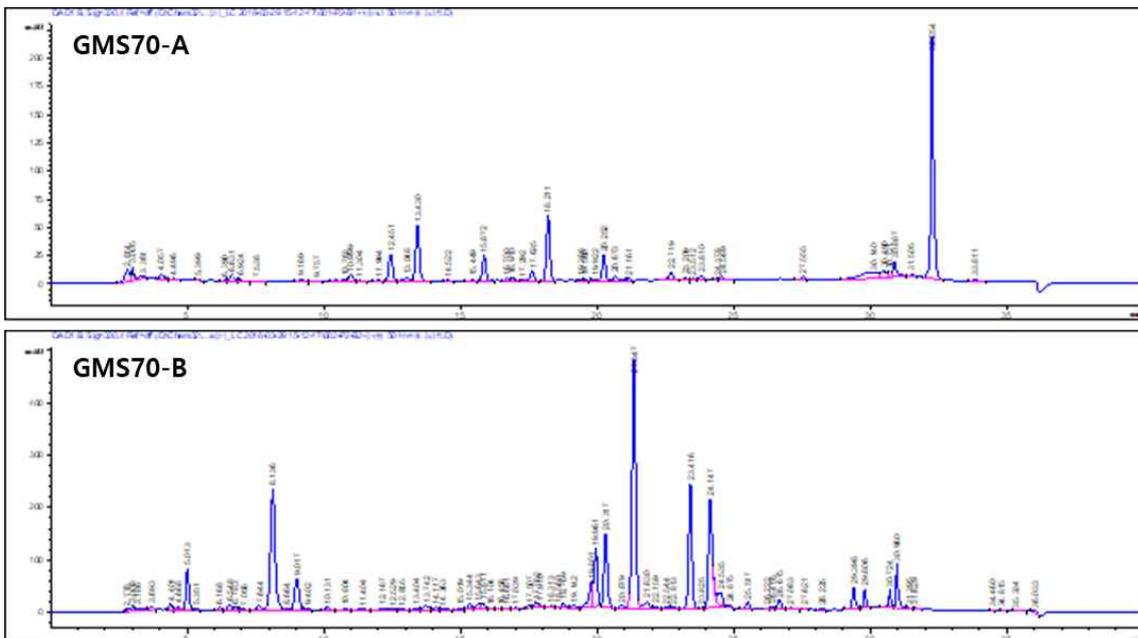
1) GMS70 복합 추출물의 표준화를 위한 지표 성분 연구

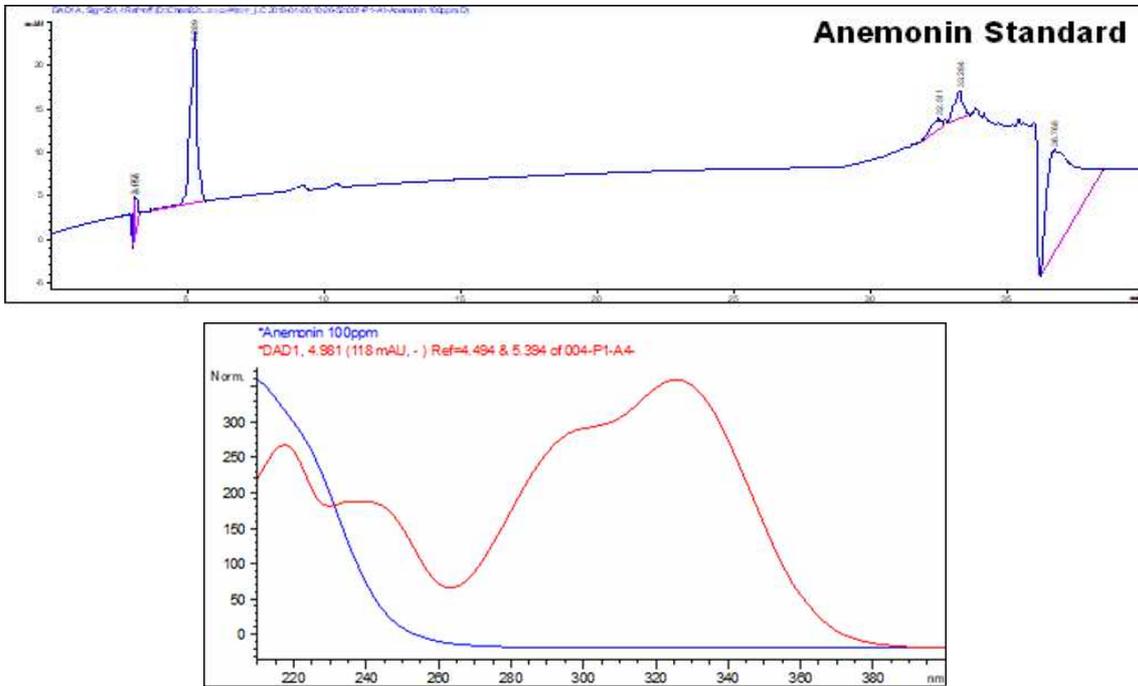
A, Acacetin 분석 검토 실험결과



HPLC 분석결과와 같이 GMS70 추출물을 Acacetin 표준품 분석 그래프와 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 GMS70 추출물에는 Acacetin이 존재하지 않는 것으로 판단하여 지표성분으로 타당하지 않음.

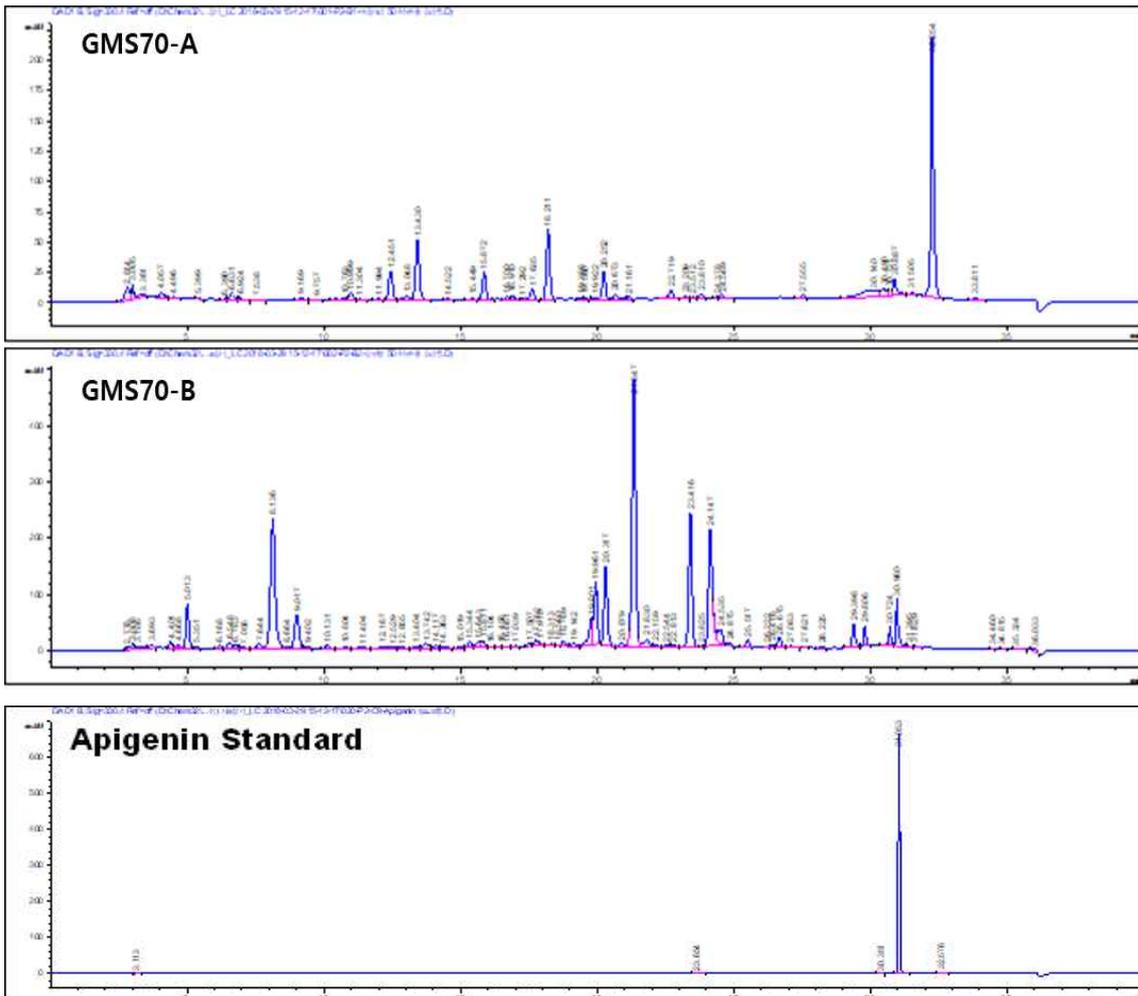
B. Anemonin 분석 검토 실험결과

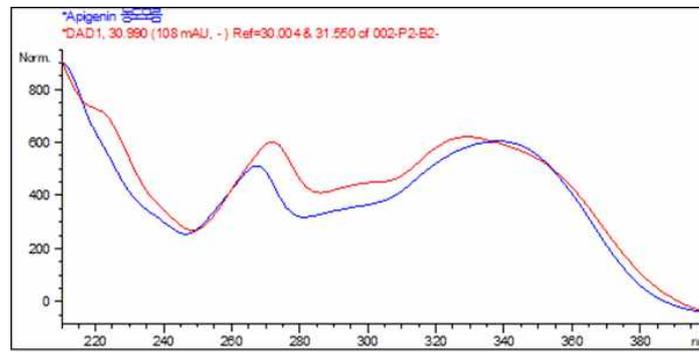




HPLC 분석결과와 같이 GMS70 추출물을 Anemonin 표준품 분석 그래프와 비교 시 GMS70-A추출물의 경우 RT가 일치하지 않았으며 GMS70-B의 경우 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않았음. 결론적 **GMS70에서 Anemonin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.**

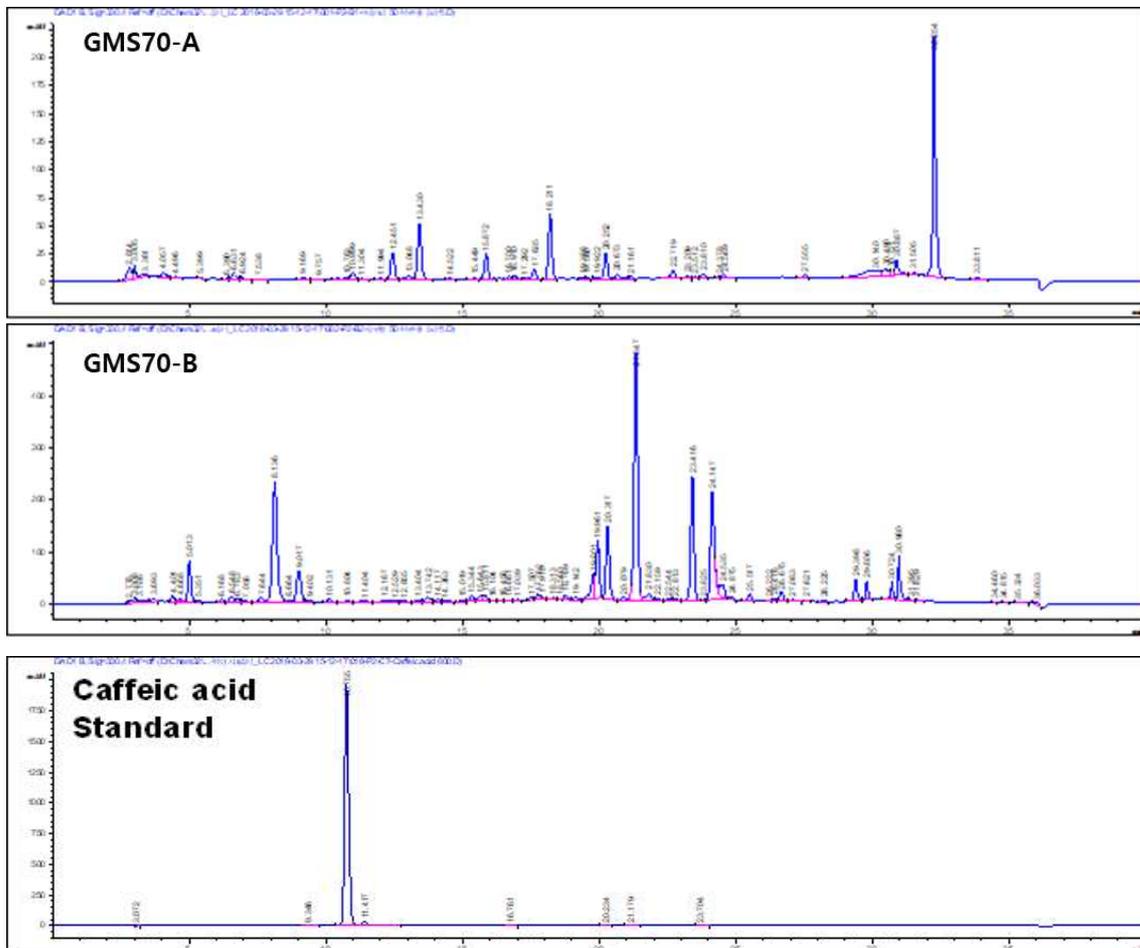
C. Apigenin 분석 검토 실험결과





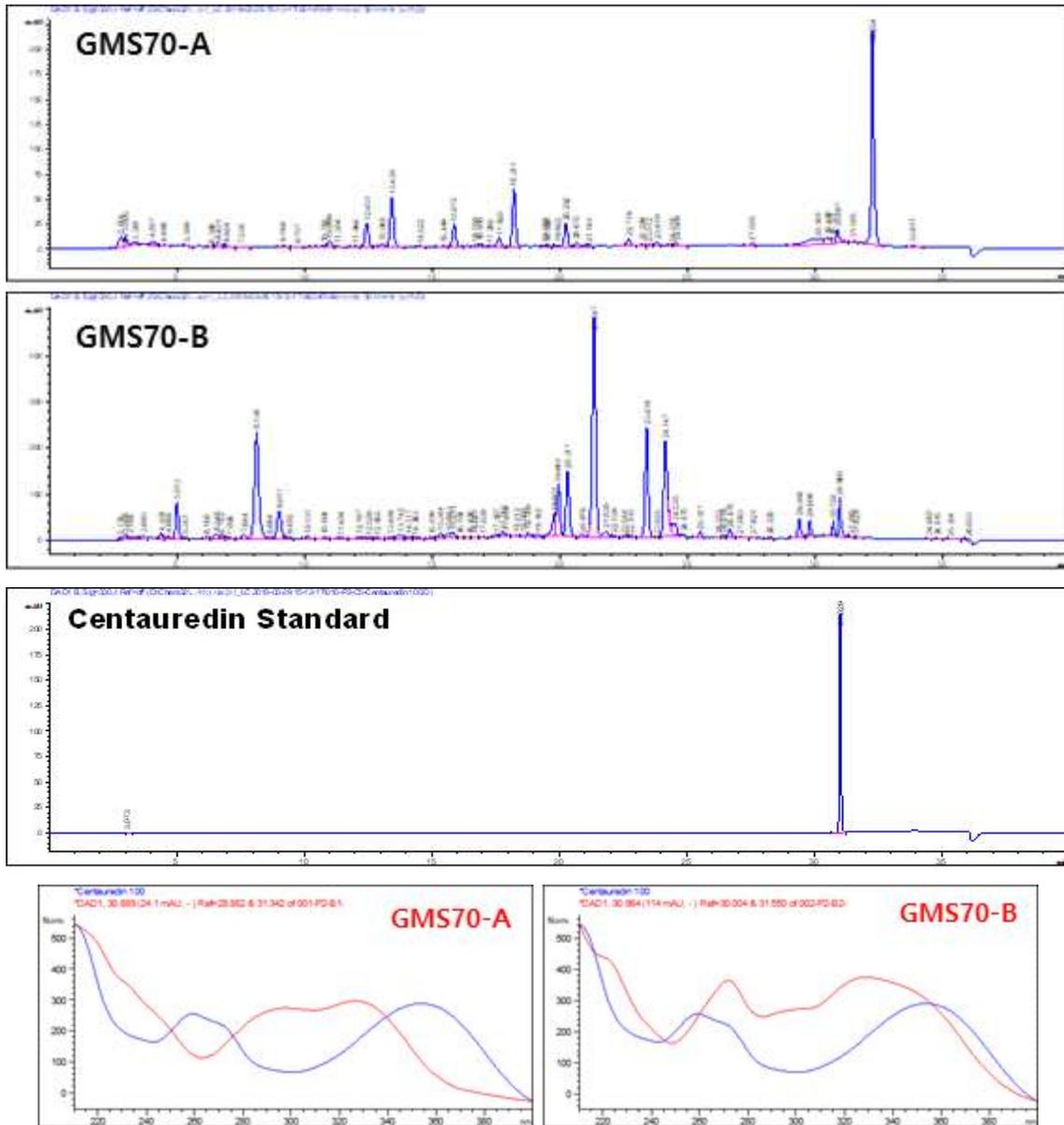
위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A과 Apigenin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 GMS70-A에 Apigenin이 존재하지 않는 것으로 판단. GMS70-B와 Apigenin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하고, UV Spectrum 패턴이 유사하여 Apigenin이 있는 것으로 판단되나, LC-MS 분석을 통해 분자량을 확인한 결과, 결론적으로 함유량이 1.0mg/g 미만의 미량으로 **GMS70의 지표성분으로 Apigenin 타당하지 않다고 판단함.**

#### D. Caffeic acid 분석 검토 실험결과



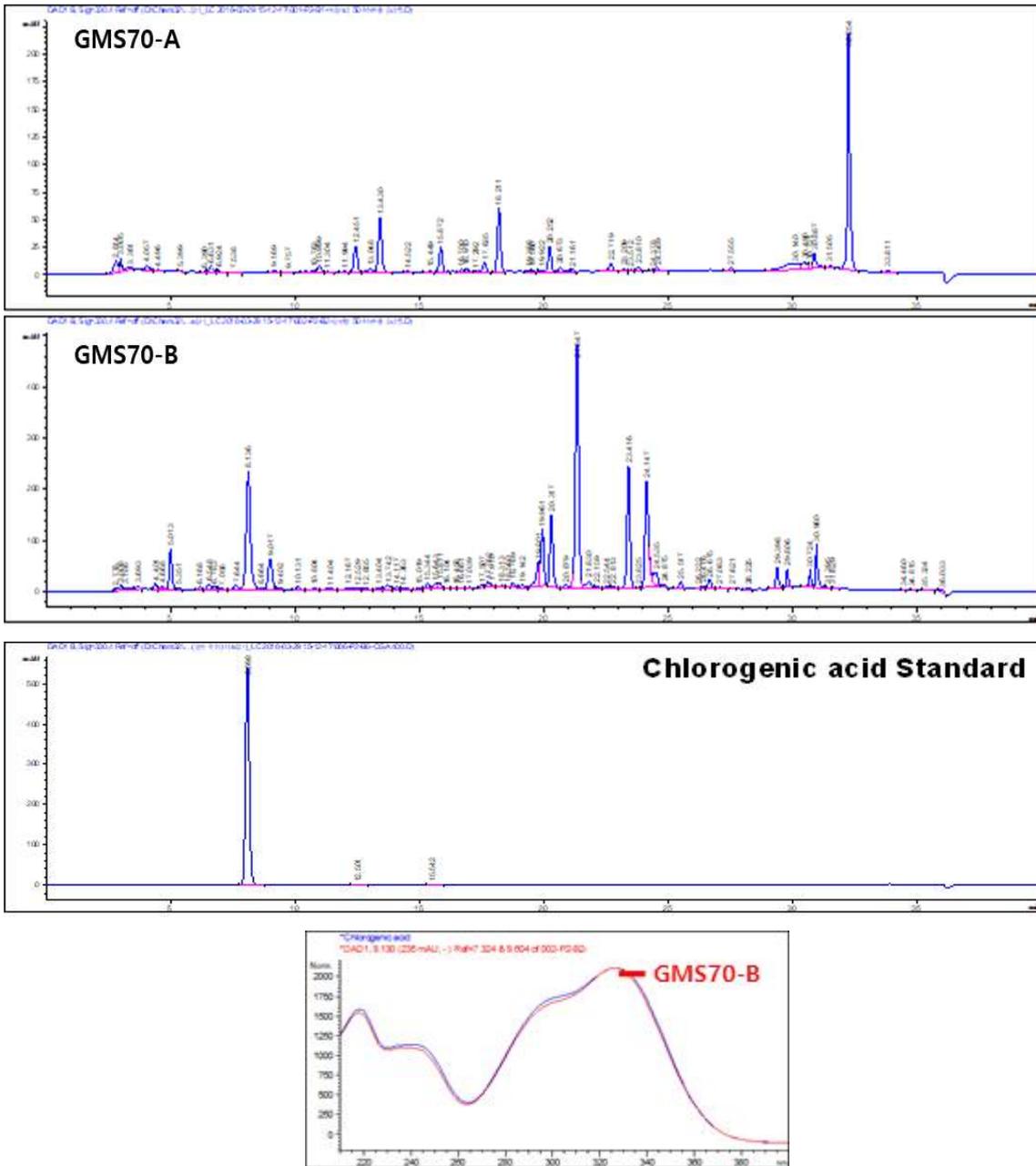
위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A와 GMS70-B 추출물, Caffeic acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 GMS70-A와 GMS70-B 추출물에 Caffeic acid가 존재하지 않는 것으로 판단. **결론적으로 GMS70-A, GMS70-B 추출물에서 Caffeic acid가 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.**

#### E. Centaureidin 분석 검토 실험결과



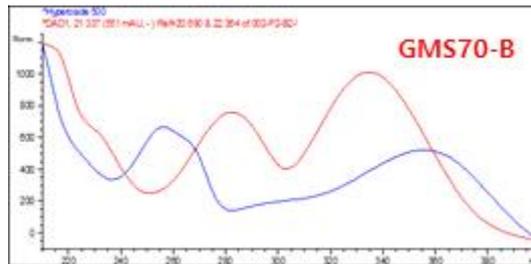
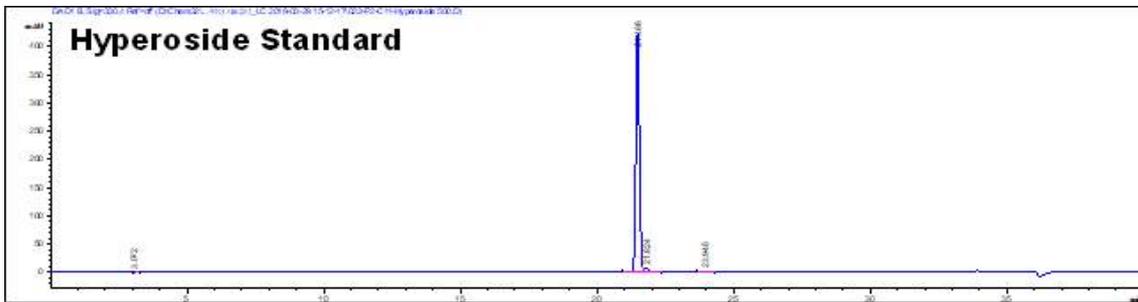
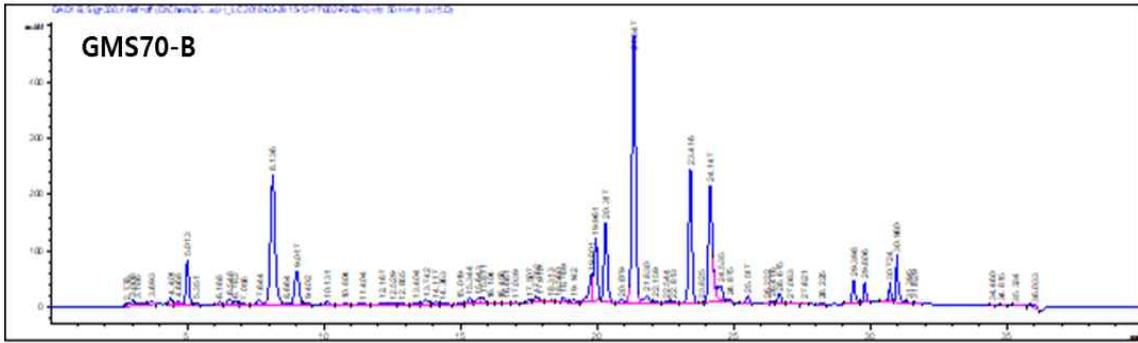
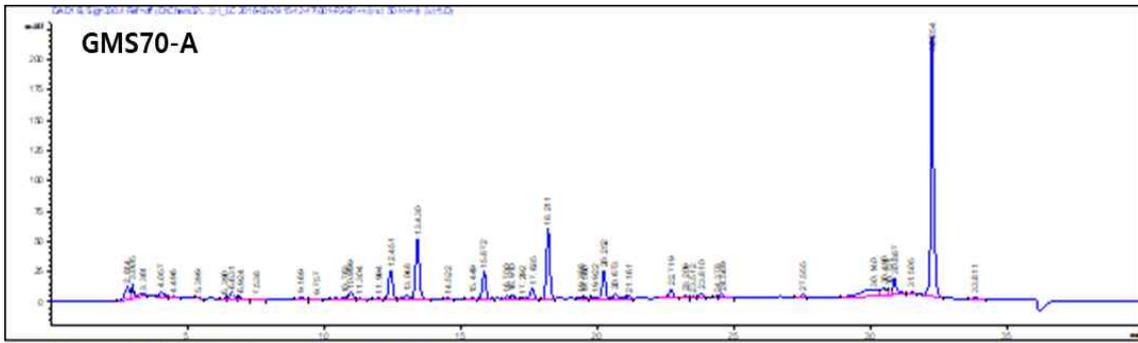
위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A와 Centaureidin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 Centaureidin이 존재하지 않는 것으로 판단. 결론적으로 GMS70에서 Centaureidin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

F. Chlorogenic acid 분석 검토 실험결과



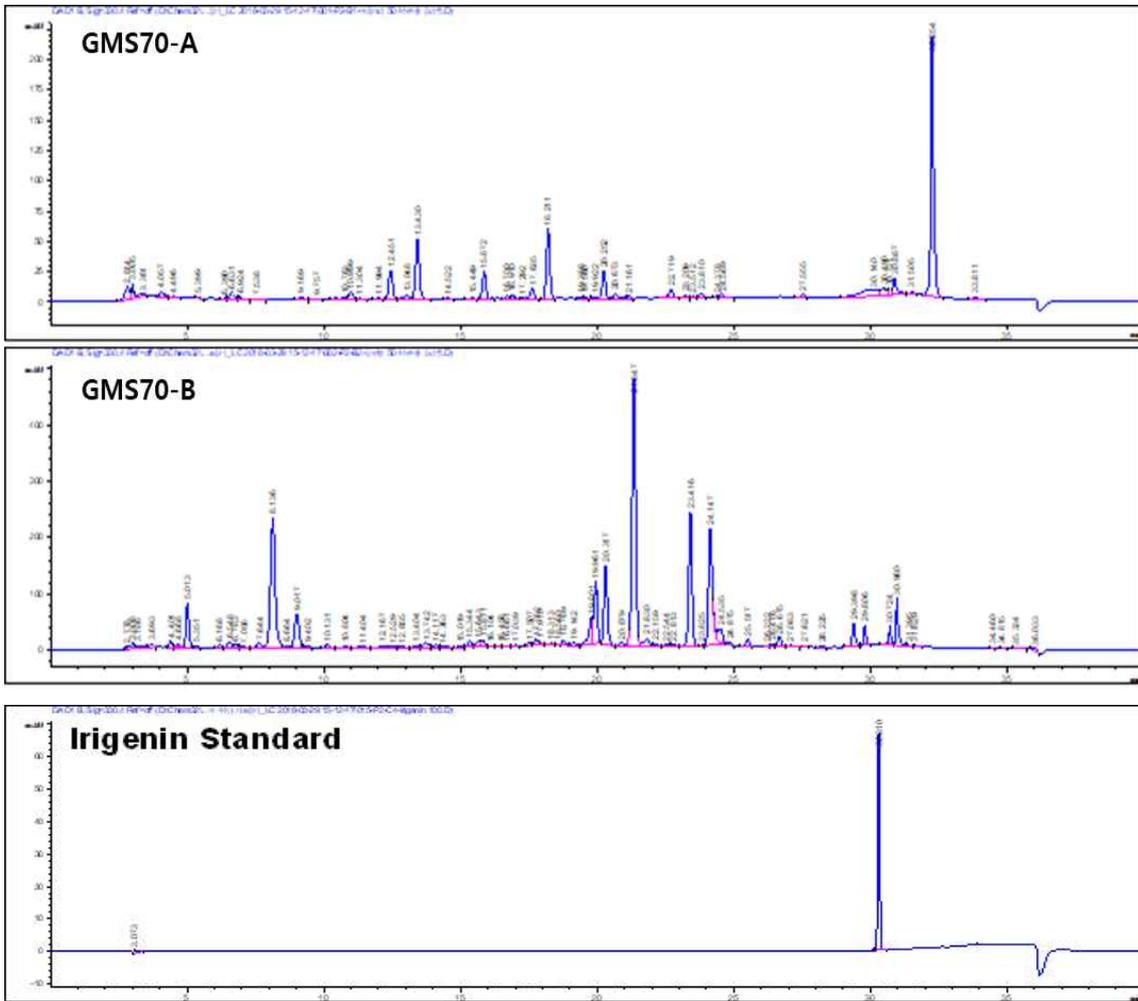
위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70과 Chlorogenic acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 GMS70-A의 경우 RT가 일치하지 않았으며 GMS70-B추출물은 RT와 UV Spectrum의 패턴이 일치함. 이를 정량화한 결과, GMS70-B추출물에서 Chlorogenic acid가 7.4813mg/g 검출됨. 결론적으로 **GMS70-A에서는 검출되지 않았고, GMS70-B추출물에서는 7.4813mg/g 검출되어 GMS70-B추출물의 지표물질로 타당하다고 판단.** 최종적으로 LC-MS 분석을 통해 분자량 확인 필요.

#### G. Hyperoside 분석 검토 실험결과



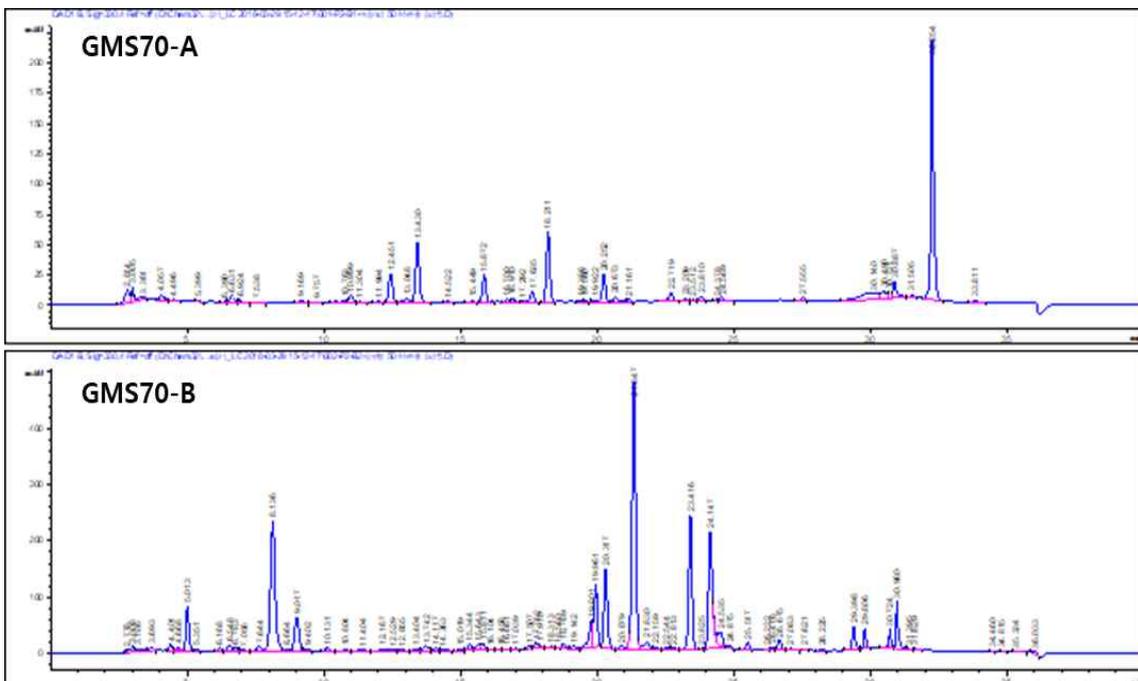
위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A과 Hyperoside 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 GMS70-A에 Hyperoside가 존재하지 않는 것으로 판단. GMS70-B 추출물과 Hyperoside 표준품 분석 그래프의 경우 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 GMS70-B추출물에 Hyperoside가 존재하지 않는 것으로 판단. **결론적으로 GMS70-A, GMS70-B 추출물에서 Hyperoside가 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.**

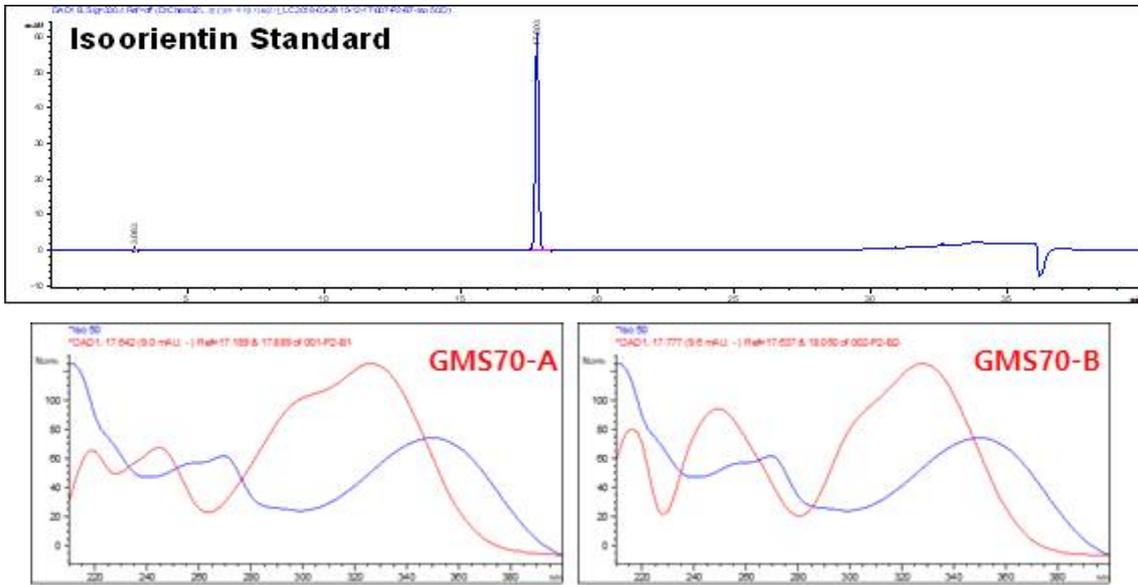
#### H. Iridenin 분석 검토 실험결과



위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A과 GMS70-B추출물, Iriogenin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 GMS70-A, GMS70-B 추출물 모두 RT가 일치하지 않음. 결론적으로 GMS70-A, GMS70-B 추출물에서 Iriogenin이 불검출 되었으므로 **지표성분으로 타당하지 않음.**

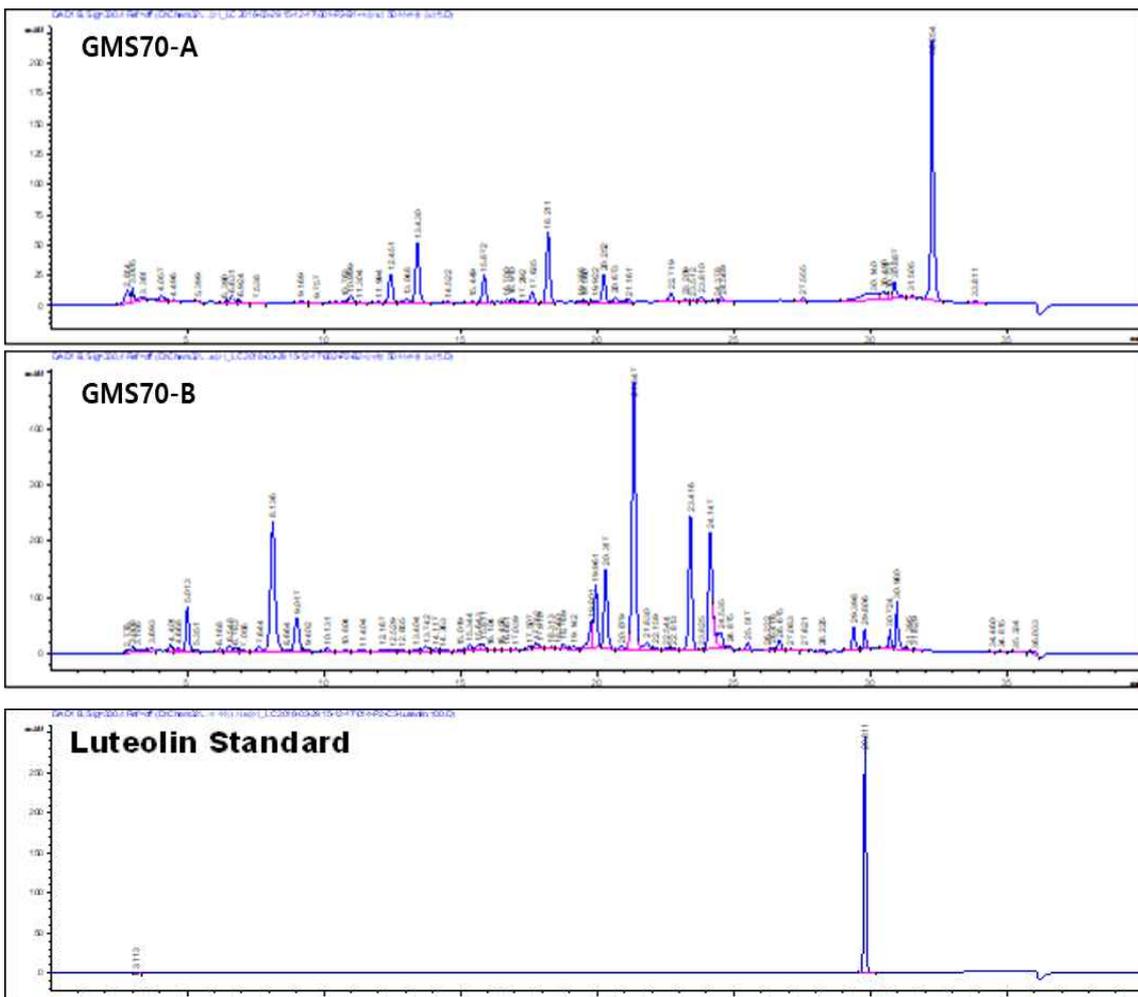
I. Isoorientin 분석 검토 실험결과

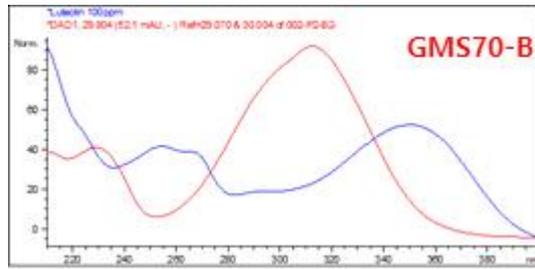




HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A과 GMS70-B 추출물, Isoorientin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 GMS70-A의 경우 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않았으며 GMS70-B 추출물의 경우 RT 및 UV Spectrum의 패턴이 일치 하지 않음. 결론적으로 GMS70-A, GMS70-B 에 Isoorientin이 존재하지 않는 것으로 판단. **지표성분으로 타당하지 않음.**

J. Luteolin 분석 검토 실험결과  
GMS70 내 Luteolin 분석결과



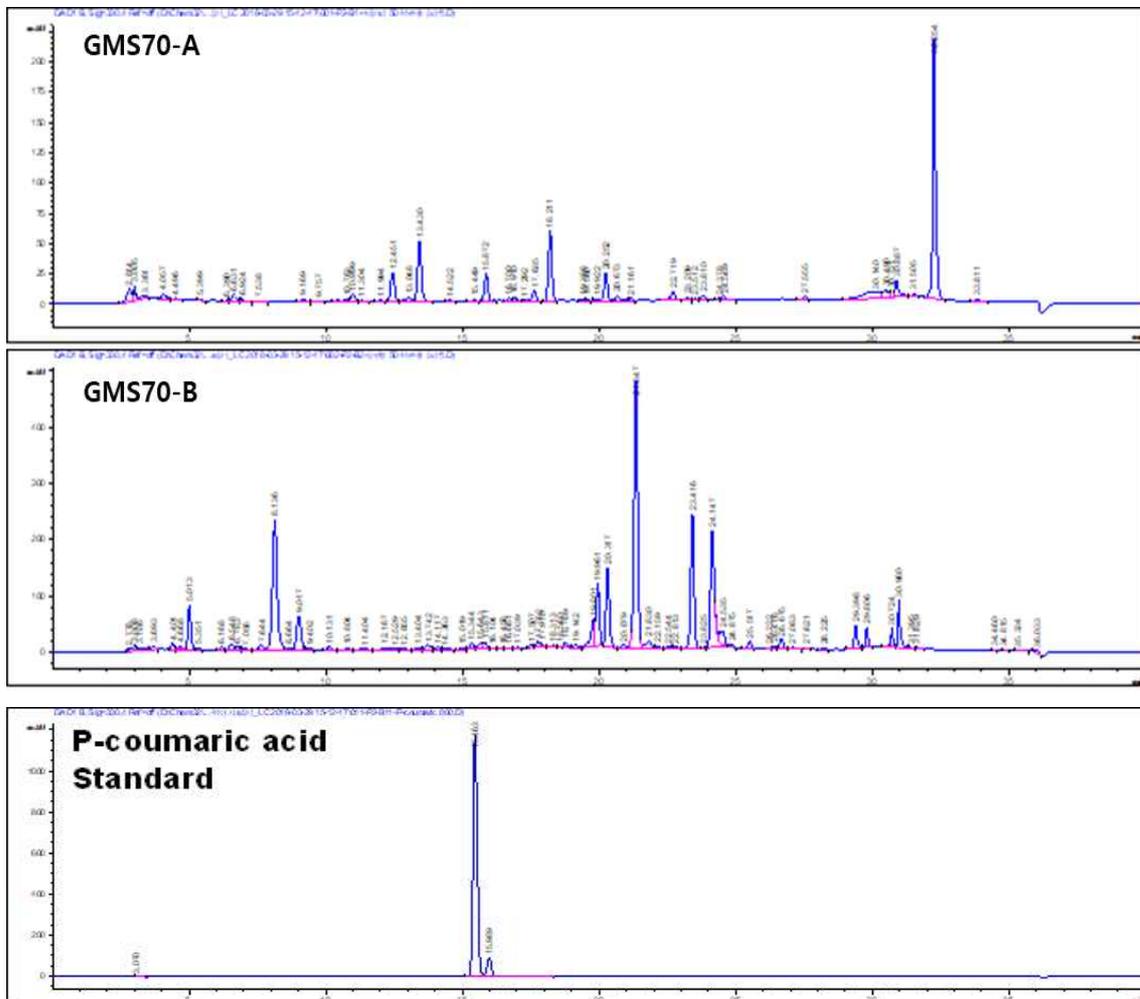


위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A와 Luteolin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 GMS70-A에 Luteolin이 존재하지 않는 것으로 판단.

GMS70-B 추출물과 Luteolin 표준품 분석 그래프의 경우 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 GMS70-B 추출물에 Luteolin이 존재하지 않는 것으로 판단.

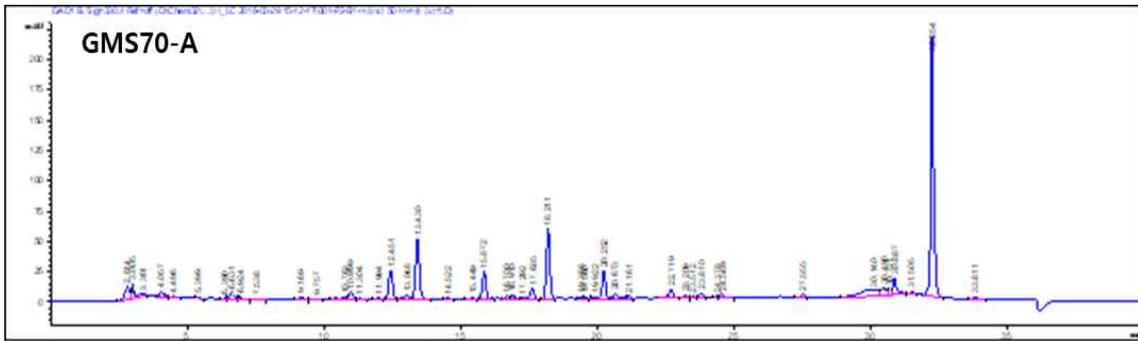
결론적으로 **GMS70-A, GMS70-B 추출물에서 Luteolin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.**

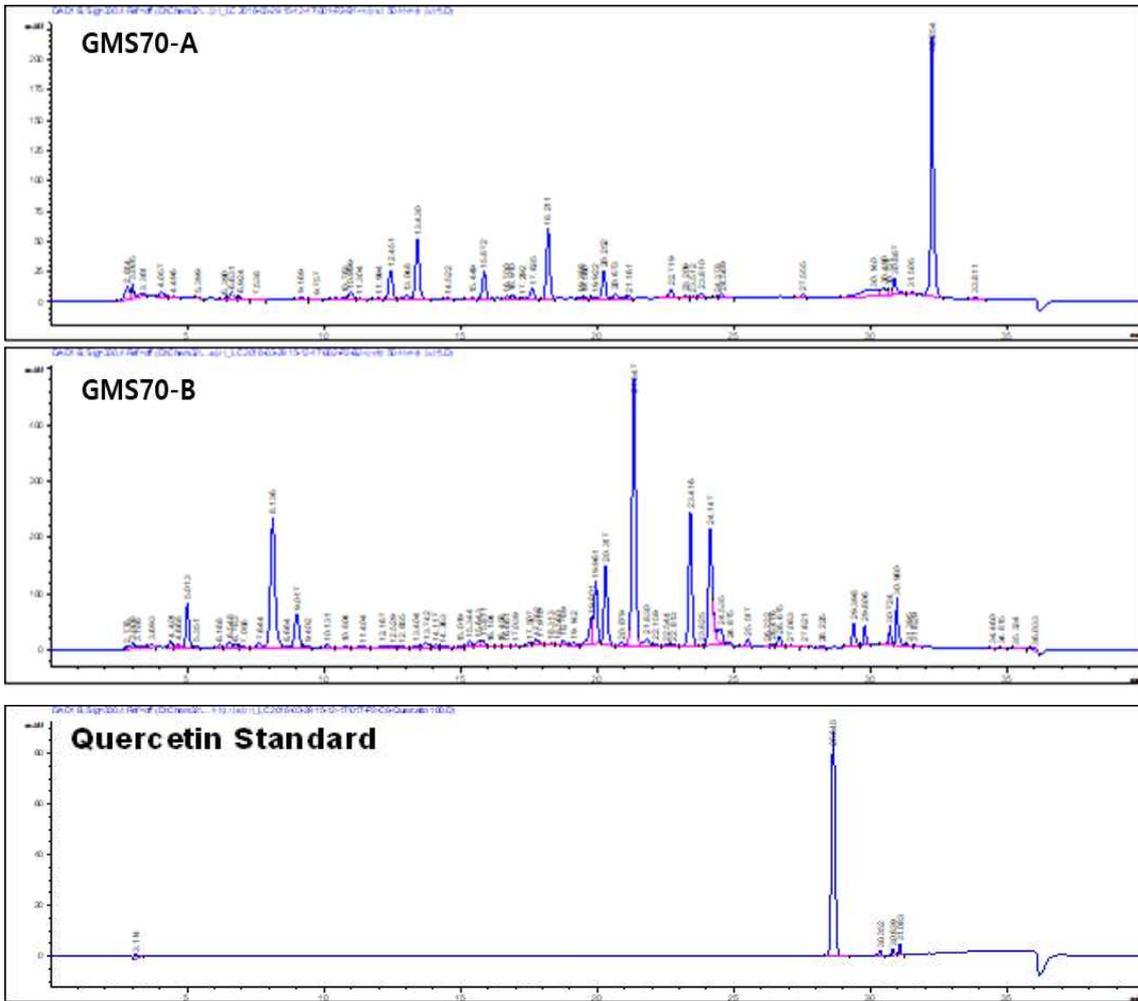
K. p-coumarinic acid 분석 검토 실험결과

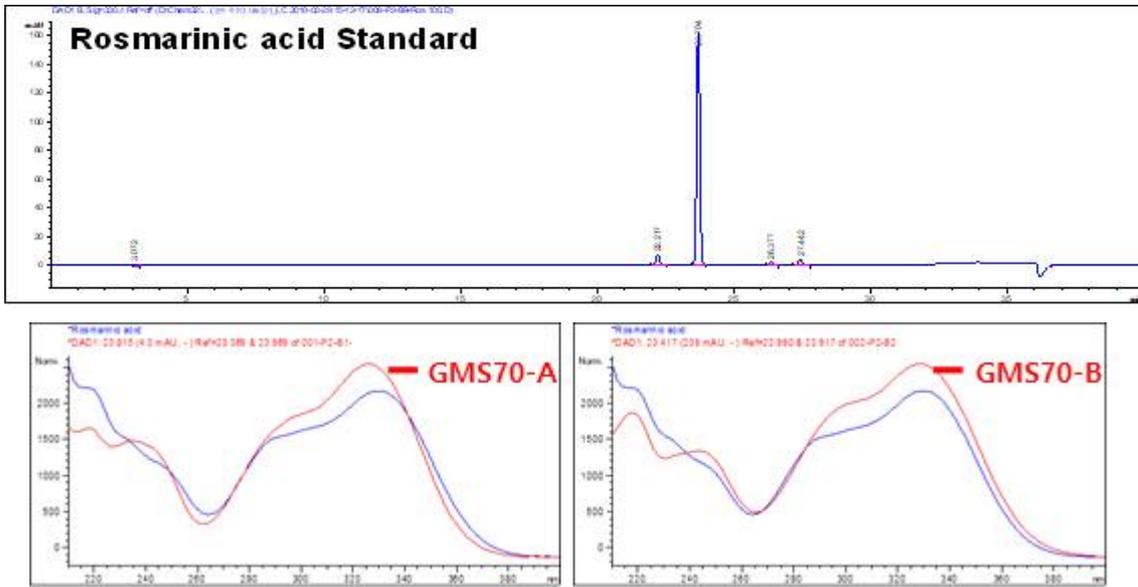


위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A과 GMS70-B 추출물, P-coumaric acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 GMS70-A, GMS70-B 추출물에 P-coumaric acid가 존재하지 않는 것으로 판단. **지표성분으로 타당하지 않음.**

L. Pectolinarin 분석 검토 결과

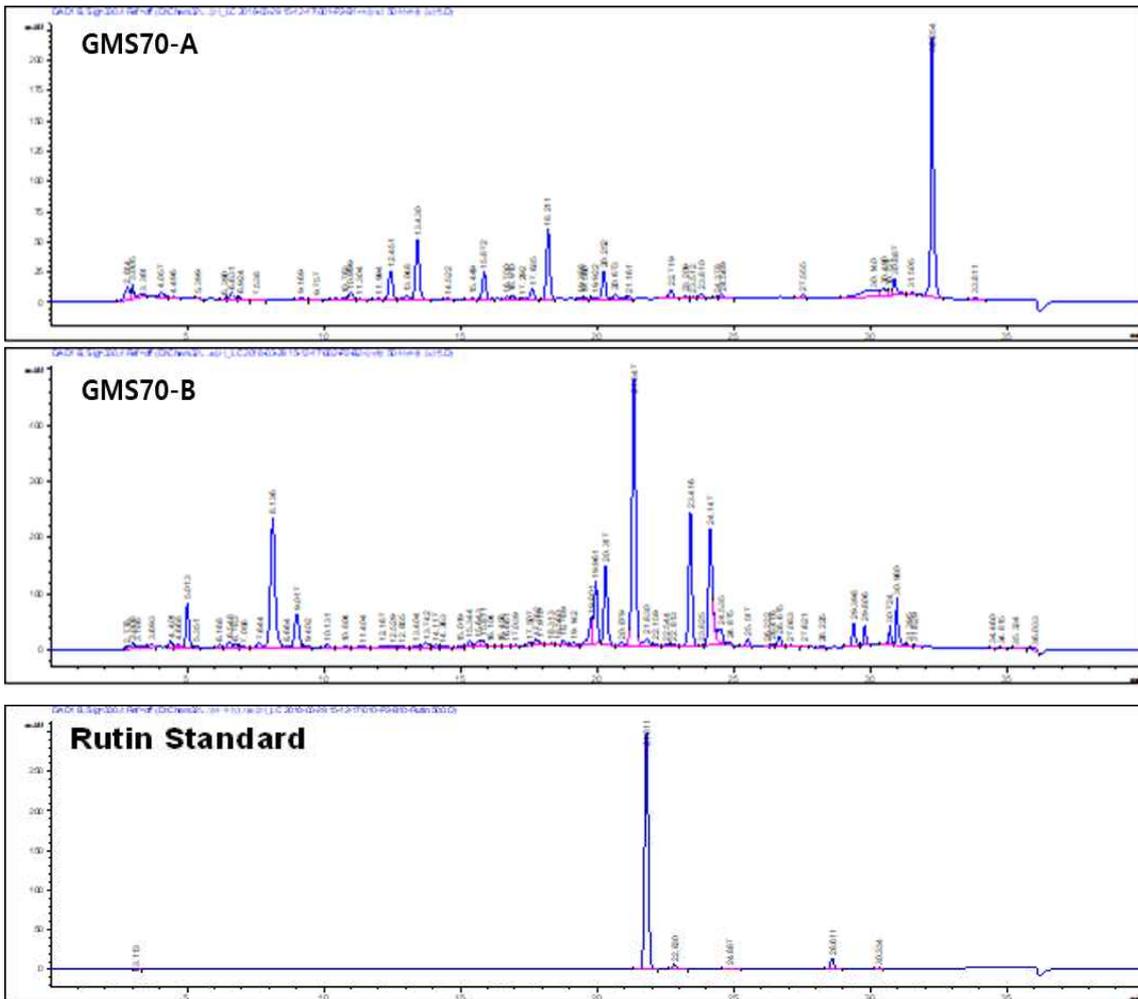


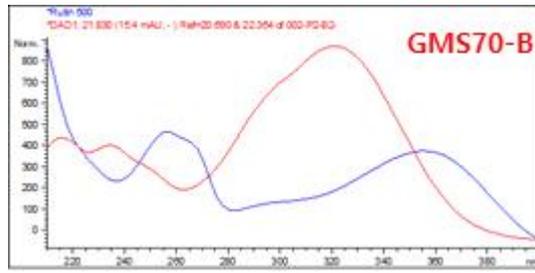




위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A과 GMS70-B 추출물을 Rosmarinic acid 표준품 분석 그래프와 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 GMS70-A과 GMS70-B 추출물에 Rosmarinic acid가 존재하지 않는 것으로 판단. 지표성분으로 타당하지 않음.

O. Rutin 분석 검토 실험결과

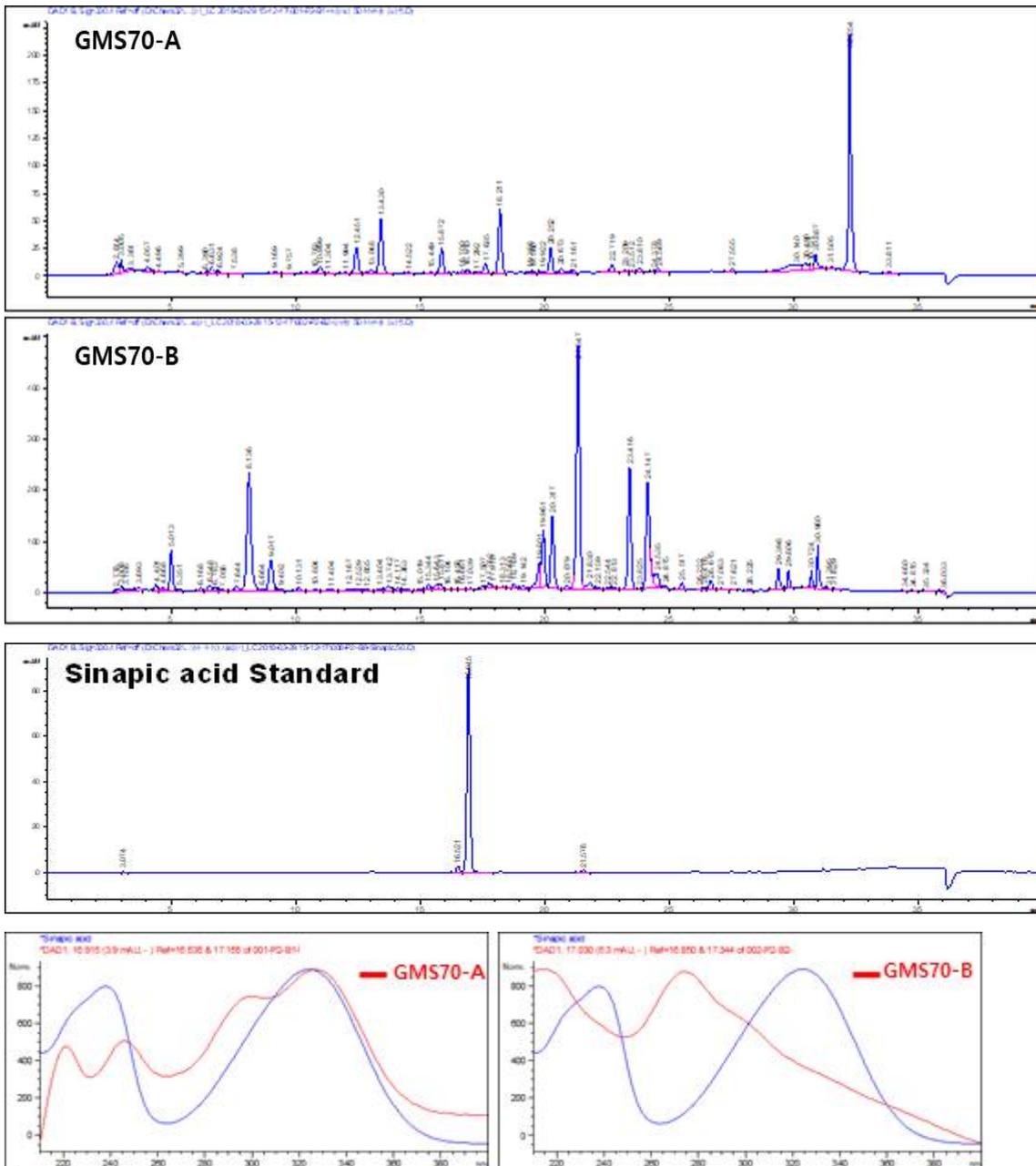




위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A과 Rutin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 GMS70-A에 Rutin이 존재하지 않는 것으로 판단. GMS70-B 추출물과 Rutin 표준품 분석 그래프의 경우 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 GMS70-B 추출물에 Rutin이 존재하지 않는 것으로 판단.

**결론적으로 GMS70-A, GMS70-B 추출물에서 Rutin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.**

P. Sinapic acid 분석 검토 실험결과

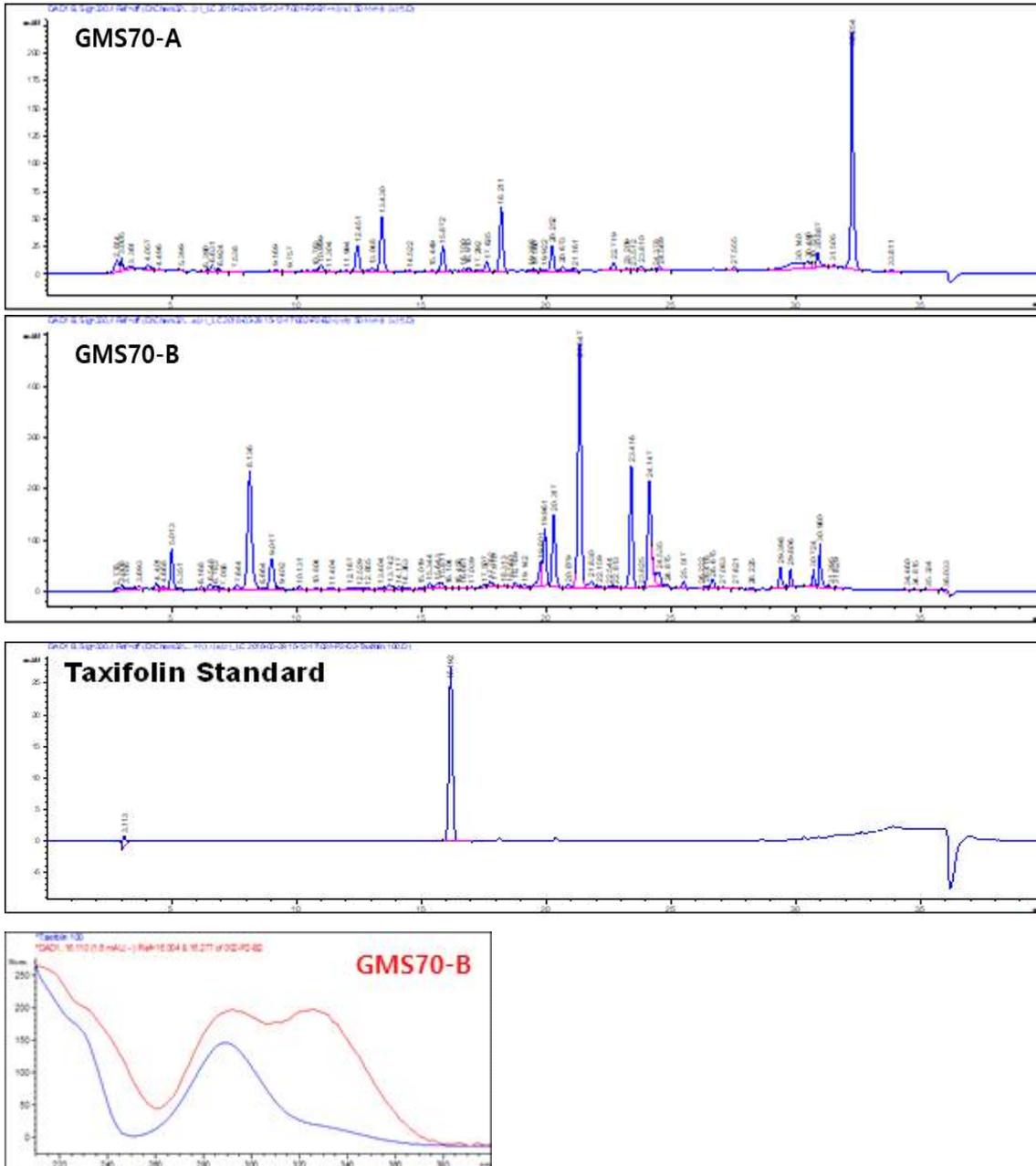


위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A과 Sinapic acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 GMS70-A에 Sinapic acid가 존재하지 않는 것으로 판단. GMS70-B 추출물과 Sinapic acid 표준품 분석 그래프를 비교시 RT와 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않

아 GMS70-B 추출물에 Sinapic acid가 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 GMS70-A, GMS70-B 추출물에서 Sinapic acid가 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

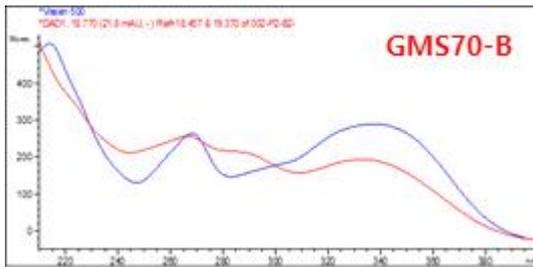
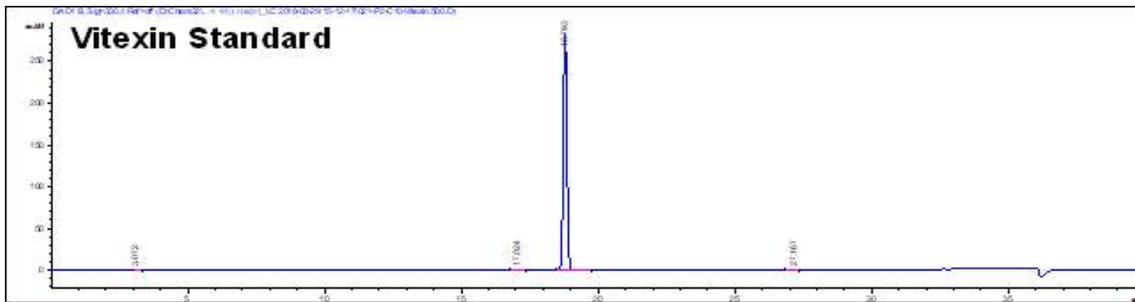
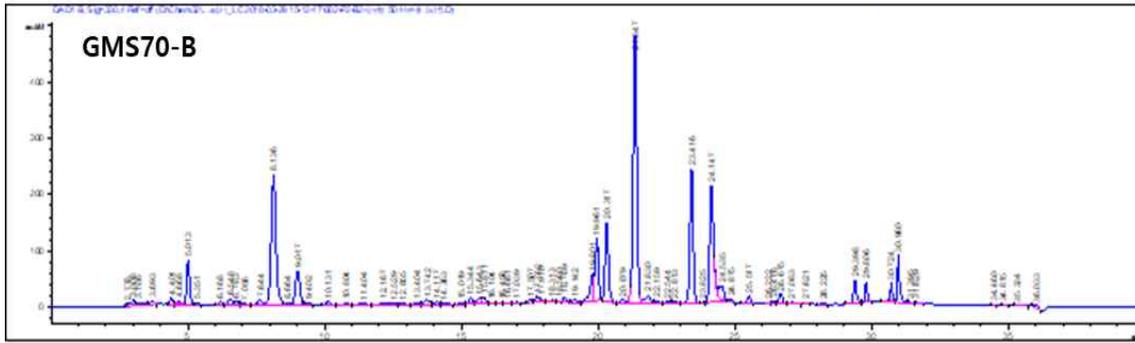
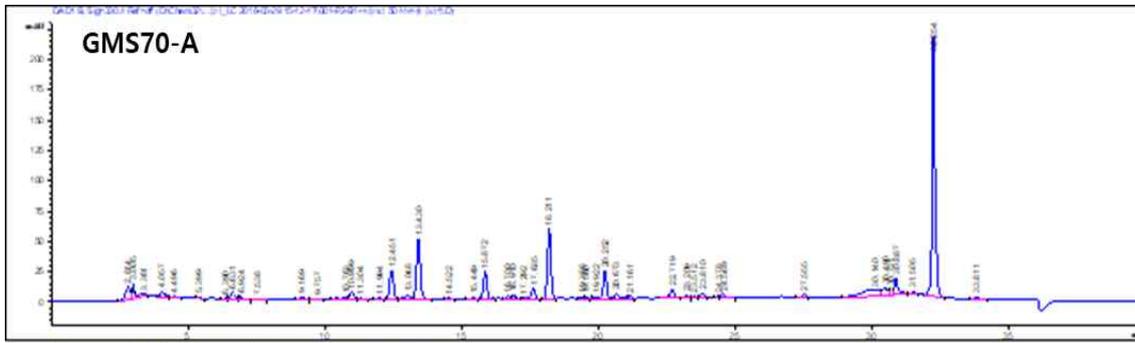
Q. Taxifolin 분석 검토 실험결과



위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A과 Taxifolin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 GMS70-A에 Taxifolin이 존재하지 않는 것으로 판단. GMS70-B 추출물과 Taxifolin 표준품 분석 그래프를 비교 시 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 GMS70-B 추출물에 Taxifolin이 존재하지 않는 것으로 판단. 결론적으로 GMS70 추출물에서 Taxifolin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

R. Vitexin 분석 검토 실험결과

GMS70의 Vitexin 분석결과



HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A과 Vitexin 표준품 분석 그래프를 비교시 RT가 일치하지 않아 GMS70-A에 Vitexin이 존재하지 않는 것으로 판단. GMS70-B 추출물과 Vitexin 표준품 분석 그래프를 비교시 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 GMS70-B 추출물에 Vitexin이 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 GMS70-A, GMS70-B 추출물에서 Vitexin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

## 2) GMS70 복합 추출물의 지표 성분 및 분석 방법

### A. GMS70-A의 지표 성분후보군 (GMS70-A-MC-001)

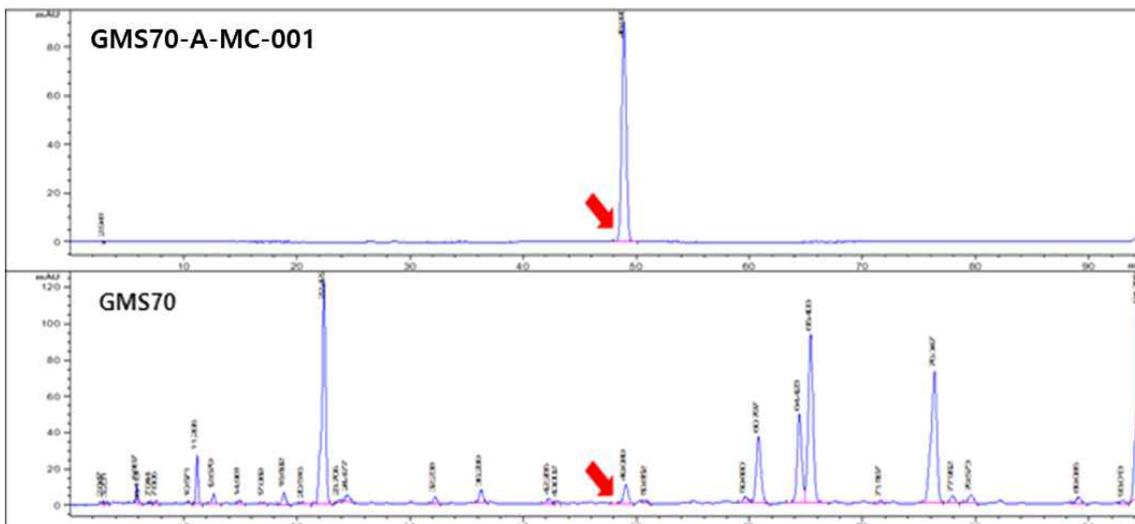
■ 분석 시료추출법

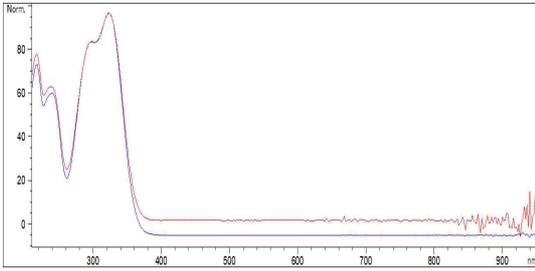
- ① 시료 약 1g을 취한다.
- ② 50 % 메탄올 25 mL을 가한다.
- ③ 위의 용액을 30분 동안 초음파 추출한다.
- ④ 추출이 끝난 후 실온에서 냉각 시킨다.
- ⑤ 0.45  $\mu\text{m}$  filter로 여과 후 시험용액으로 사용한다.

■ HPLC 분석조건	
Instrument:	Agilent HPLC system
Detector:	DAD detector
Wavelength:	320 nm
Column:	Supelco discovery C18(250mm x 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ )
Column temperature:	40 °C
Injection volume:	5 $\mu\text{L}$
Flow rate:	1.0 mL/min
Mobile phase:	Solvent A: 0.1% trifluoroacetic acid in D.W Solvent B: 0.1% trifluoroacetic acid in methanol

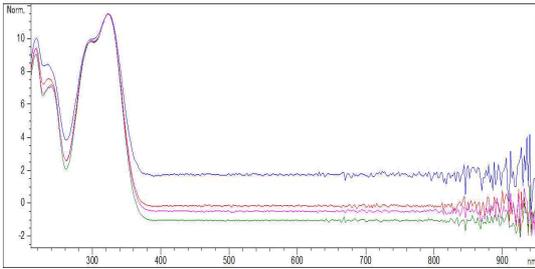
  

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	85	15
90	55	45
91	10	90
95	10	90

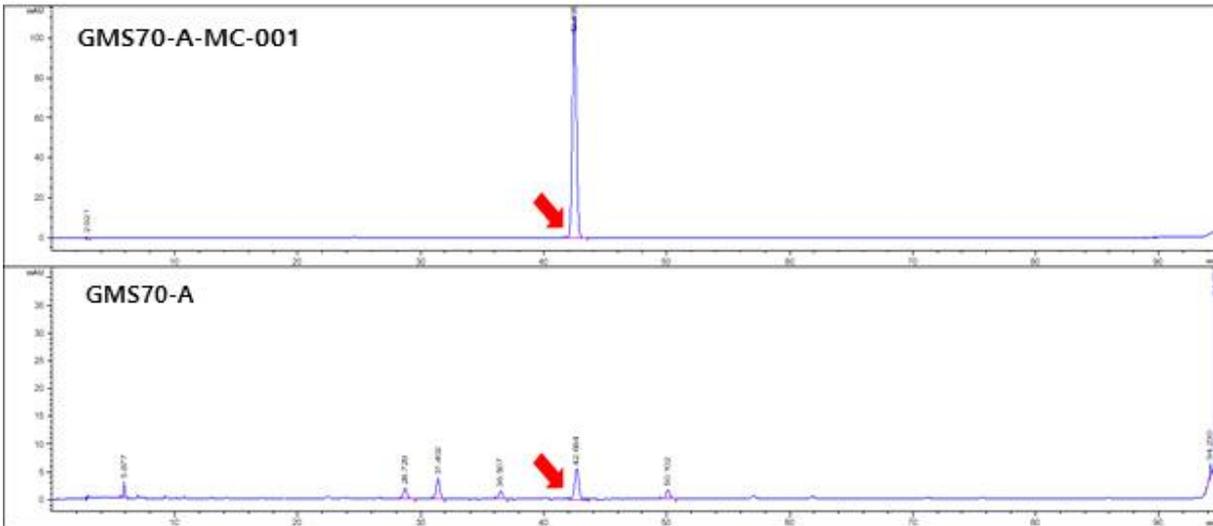




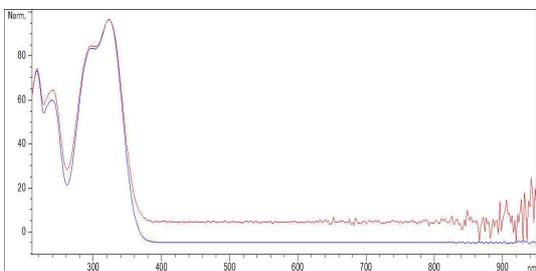
<표준품과 GMS70의 UV Spectrum 비교>



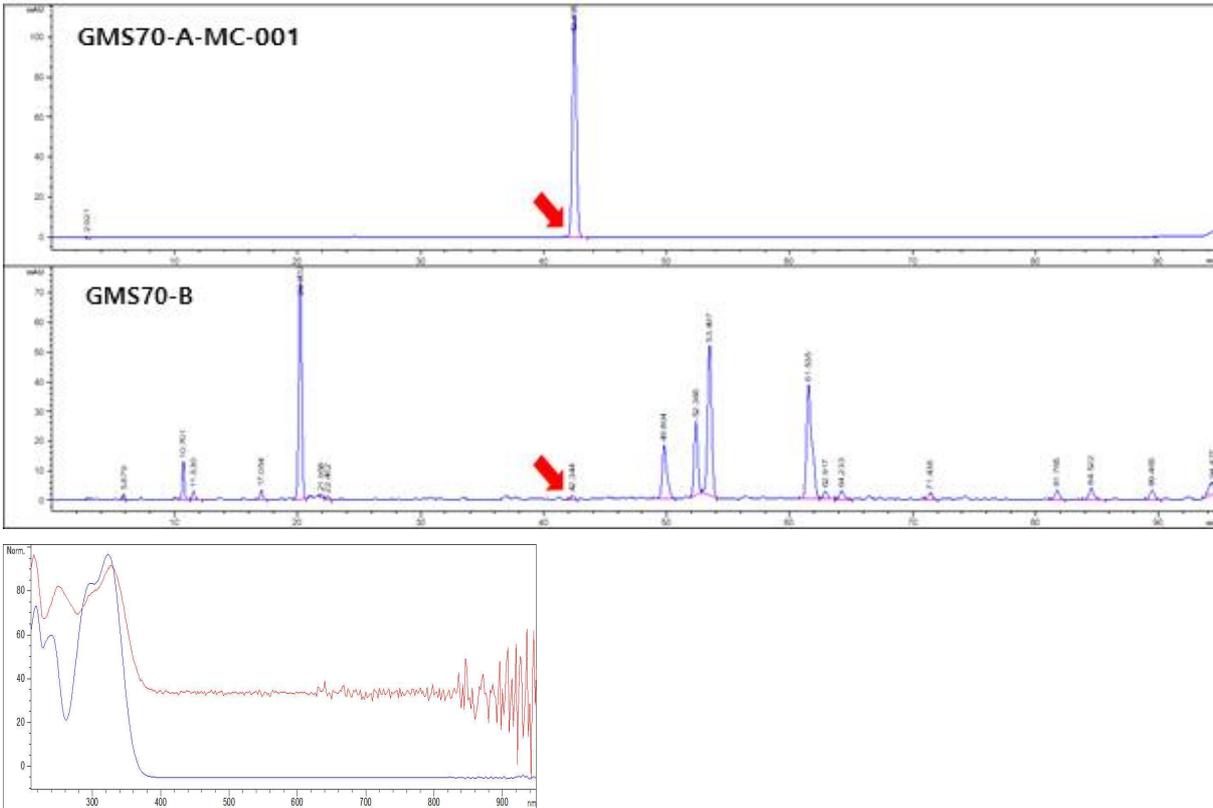
<GMS70-A + GMS70-B UV Spectrum>



<GMS70-A-MC-001와 GMS70-A의 분석결과>



<GMS70-A 중 GMS70-A-MC-001 UV Spectrum>



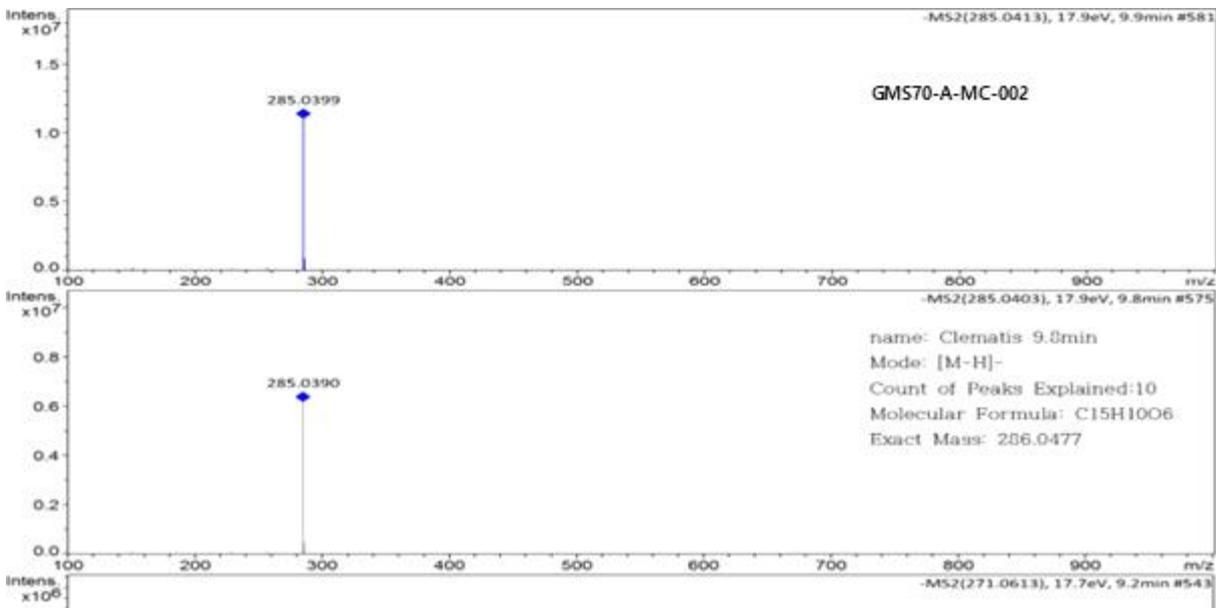
<GMS70-B 에서 GMS70-A-MC-001 와 RT가 동일한 피크의 UV Spectrum>

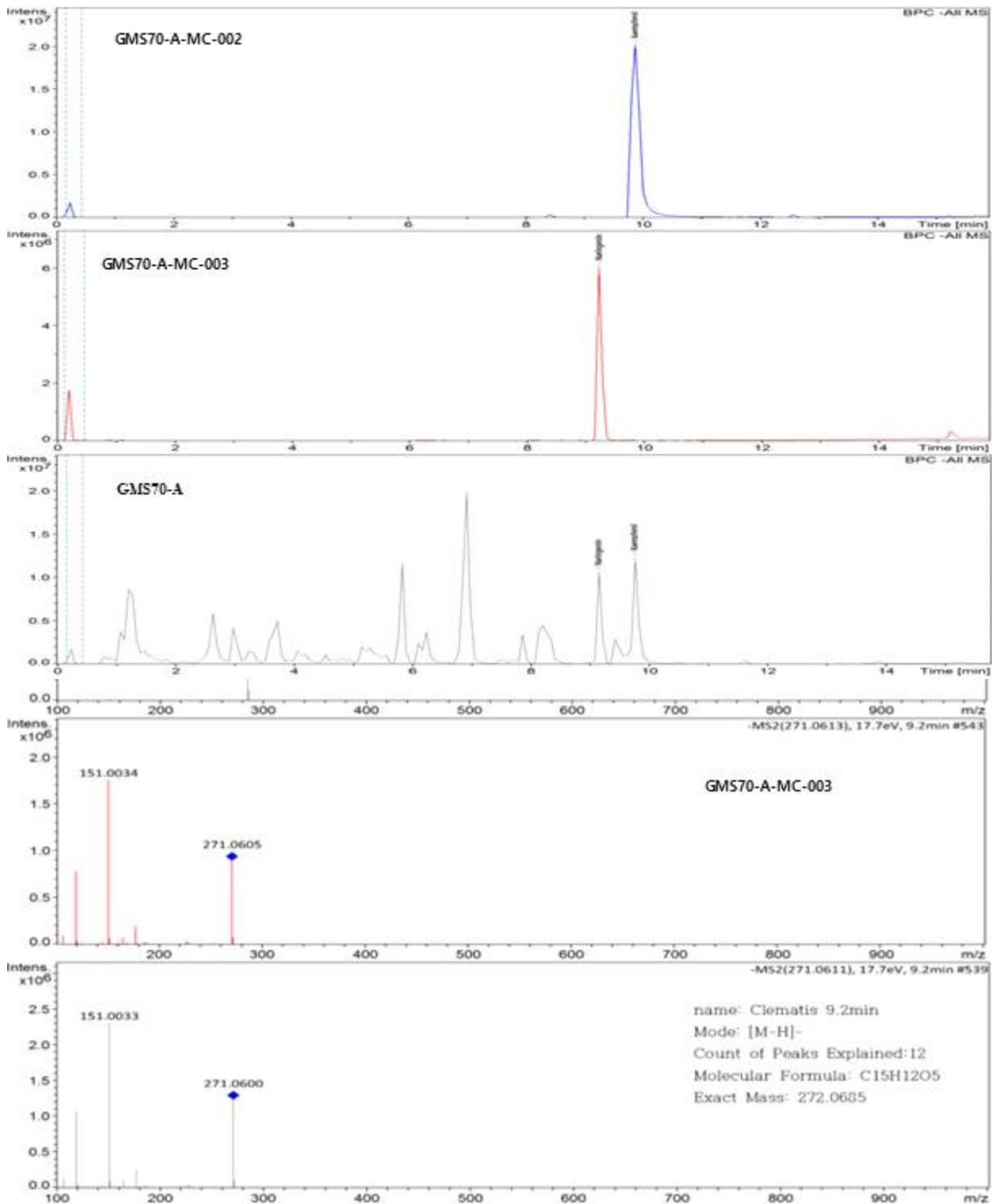
GMS70-A와 GMS70-B 시료 분석 수행 중 isoferulic acid와 RT가 동일한 물질이 발견되었으나 확인결과 GMS70-A와 달리 GMS70-B에서는 UV Spectrum 패턴이 불일치하여 isoferulic acid가 아닌 것으로 밝혀져 GMS70-A-MC-001을 GMS70-A의 지표성분후보군으로 판단함.

B. GMS70-A 의 지표 성분 GMS70-A-MC-002과 GMS70-A-MC-003 분석

B-1) UPLC, Q-TOF를 통한 GMS70-A의 지표성분 후보 설정

UPLC를 통하여 분리 후 Q-TOF에 이어서 분석하였으며 LC-MS/MS 데이터를 얻어 지표 탐색을 진행한 결과, 다음의 2가지 지표성분 후보로 GMS70-A-MC-002과 GMS70-A-MC-003을 확인함.





위 분석결과와 같이 MS Chromatogram, MS/MS Spectrum을 비교한 결과, GMS70-A 추출물은 각 표준품의 머무름 시간(Retention Time)과 MS/MS Spectrum이 일치하여 두 성분을 지표 후보성분으로 선정하게 되었음.

#### B-2) GMS70-A 에서의 GMS70-A-MC-003 함량 평가

- 표준용액 제조

GMS70-A-MC-003 표준품 적당량을 20mL 정용 플라스크에 취한 후 50% 메탄올로 녹여 20mL로 정용, 50% 메탄올을 이용하여 농도별로 희석하여 표준용액으로 사용함.

■ 분석 시료추출법

- ① 시료 약 0.5g을 취한다.
- ② 50 % 메탄올 25 mL을 가한다.
- ③ 위의 용액을 30분 동안 초음파 추출한다.
- ④ 추출이 끝난 후 실온에서 냉각 시킨다.
- ⑤ 0.45 μm filter로 여과 후 시험용액으로 사용한다.

■ HPLC 분석조건

Instrument: Agilent HPLC system

Detector: DAD detector

Wavelength: 370 nm

Column: Capcell pak UG120 C18(250mm x 4.6mm, 5 μm)

Column temperature: 30 °C

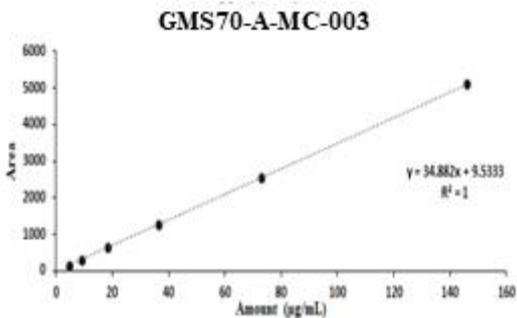
Injection volume: 10 uL

Flow rate: 1.0 mL/min

Mobile phase: Solvent A: 0.5% Phosphoric acid in D.W  
Solvent B: 0.5% Phosphoric acid in Acetonitrile

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	85	15
3	66	34
17	66	34
18	15	85
22	15	85
24	85	15
27	85	15

- GMS70-A-MC-003 분석 결과



GMS70-A-MC-003 Calibration curve

상기 직선성 결과를 적용하여 함량평가 한 결과, GMS70-A 추출물 1g에 GMS70-A-MC-003 1.32 mg을 확인함.

B-3) GMS70-A 에서의 GMS70-A-MC-002 함량평가

- 표준용액 제조

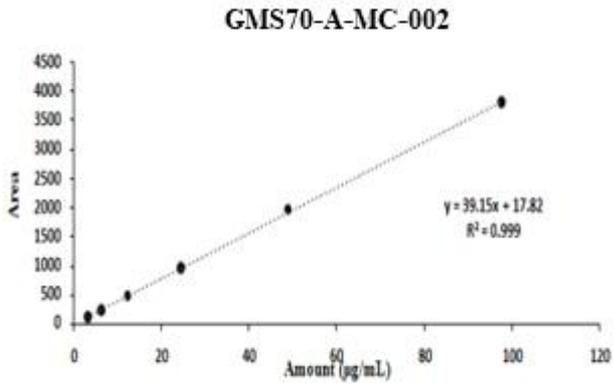
GMS70-A-MC-002 표준품 적당량을 20mL 정용 플라스크에 취한 후 100% 메탄올로 녹여 20mL로 정용, 100% 메탄올을 이용하여 농도별로 희석하여 표준용액으로 사용함.

▣ 분석 시료추출법

- ① 시료 약 0.5g을 취한다.
- ② 50 % 메탄올 25 mL을 가한다.
- ③ 위의 용액을 30분 동안 초음파 추출한다.
- ④ 추출이 끝난 후 실온에서 냉각 시킨다.
- ⑤ 0.45 µm filter로 여과 후 시험용액으로 사용한다.

▣ HPLC 분석조건			
Instrument:	Agilent HPLC system		
Detector:	DAD detector		
Wavelength:	290 nm		
Column:	Capcell pak UG120 C18(250mm x 4.6mm, 5 µm)		
Column temperature:	30 °C		
Injection volume:	10 uL		
Flow rate:	1.0 mL/min		
Mobile phase:	Solvent A: 0.5% Phosphoric acid in D.W Solvent B: 0.5% Phosphoric acid in Acetonitrile		
	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
	0	85	15
	3	68	32
	18	68	32
	19	15	85
	23	15	85
	25	85	15
	28	85	15

- GMS70-A-MC-002 분석 결과



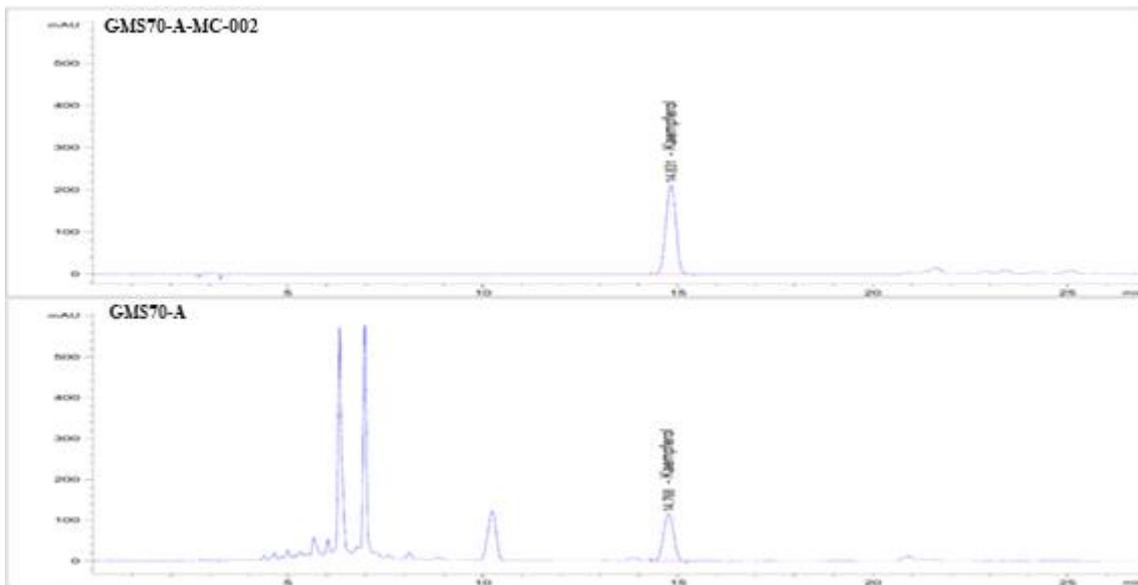
GMS70-A-MC-002 Calibration curve

상기 직선성 결과를 적용하여 함량평가 한 결과, GMS70-A 추출물 1g에 GMS70-A-MC-002 2.58 mg을 확인함.

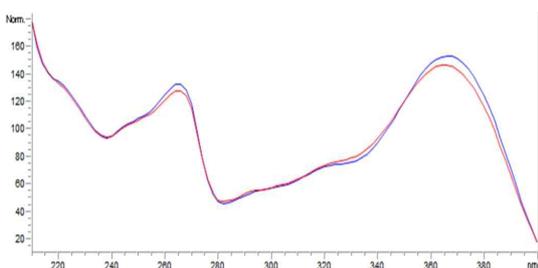
두 지표성분을 정량화 한 결과, GMS70-A-MC-002 함량이 GMS70-A-MC-003 보다 약 2배 높은 것으로 확인하였으며, GMS70-A-MC-002를 GMS70-A의 지표성분후보군으로 판단함.

B-4) GMS70-A 의 지표성분후보군 GMS70-A-MC-002 분석 결과

GMS70-A 추출물 및 GMS70-B 추출물을 각각 또는 두 시료를 혼합하여 HPLC분석을 진행한 결과, GMS70-A 추출물에서만 GMS70-A-MC-002 피크를 확인하였으며 GMS70-B 추출물에서는 해당성분을 찾을 수 없어, 동일 시간 대 간섭은 거의 없다고 판단됨.

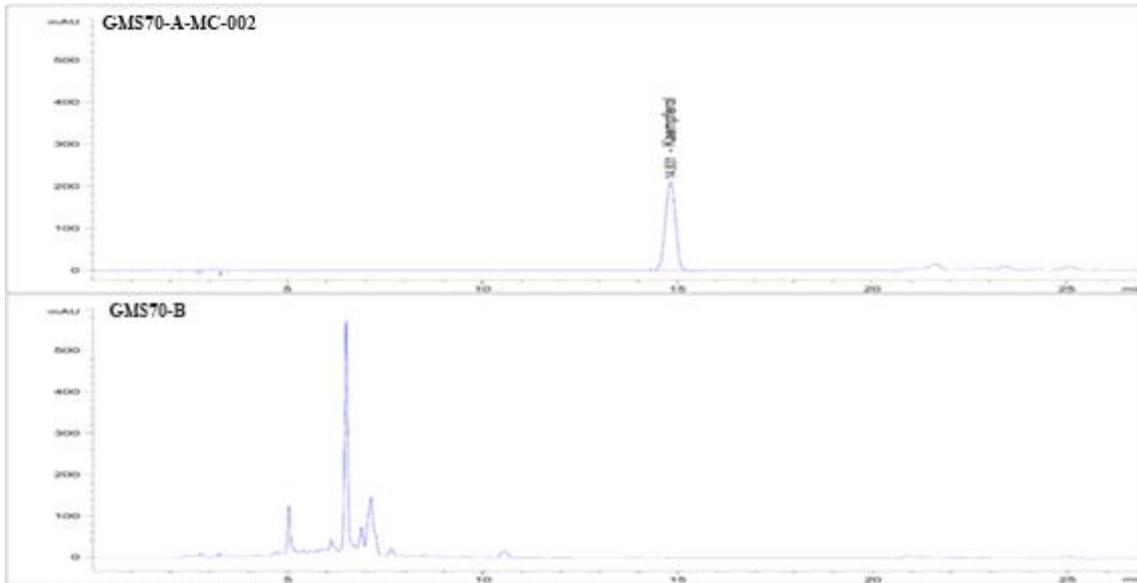


<GMS70-A-MC-002 표준품과 GMS70-A 추출물의 HPLC 분석 chromatogram 비교>



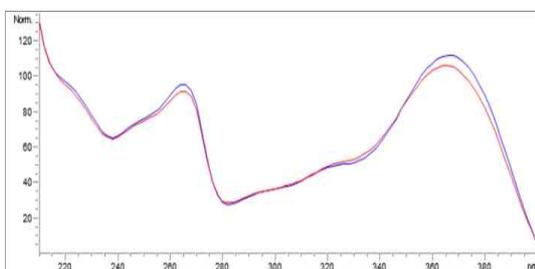
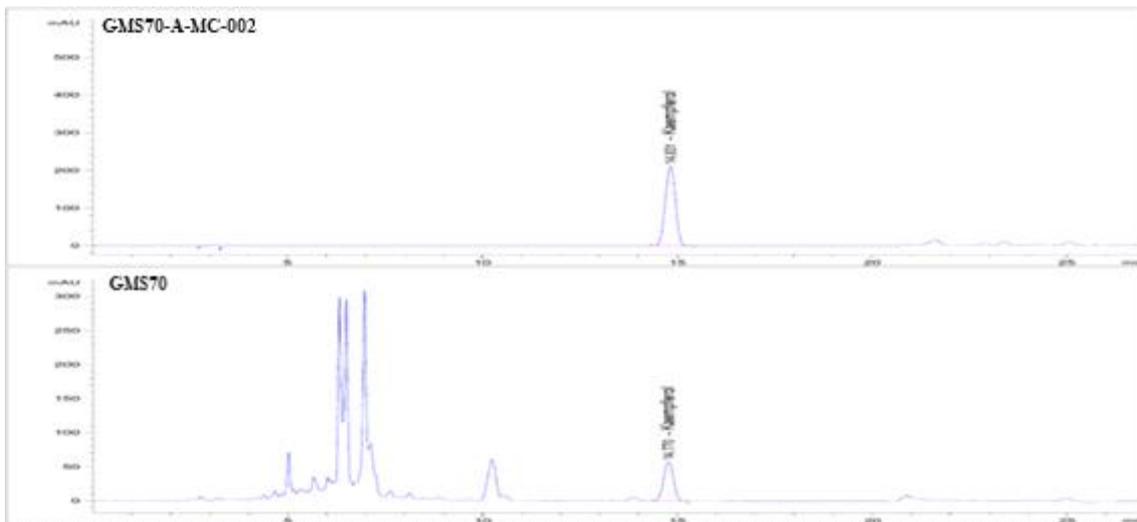
<GMS70-A-MC-002 과 GMS70-A 추출물의 UV Spectrum 비교>

GMS70-A 추출물 또는 GMS70-A-MC-002 단독 분석결과, GMS70-A-MC-002 위치의 peak가 서로 일치 하였으며 UV Spectrum 패턴 또한 동일함을 확인하여, GMS70-A 추출물에서의 GMS70-A-MC-002 함유 를 확인함.



<GMS70-A-MC-002 standard와 GMS70-B 추출물의 HPLC 분석결과>

GMS70-B 추출물 또는 GMS70-A-MC-002 단독 분석결과, GMS70-A-MC-002 위치에서 peak가 발견되 지 않았으므로 GMS70-B 내 GMS70-A-MC-002이 존재하지 않음을 확인함.



<GMS70-A-MC-002과 GMS70 복합물 UV Spectrum>

GMS70-A 추출물과 GMS70-B 추출물 두 시료를 혼합하여 분석한 결과, GMS70-A-MC-002 해당 시간

대에 특별한 간섭없이 peak 분리가 잘 이루어졌으며, UV Spectrum 또한 패턴이 일치하는 것을 확인함.

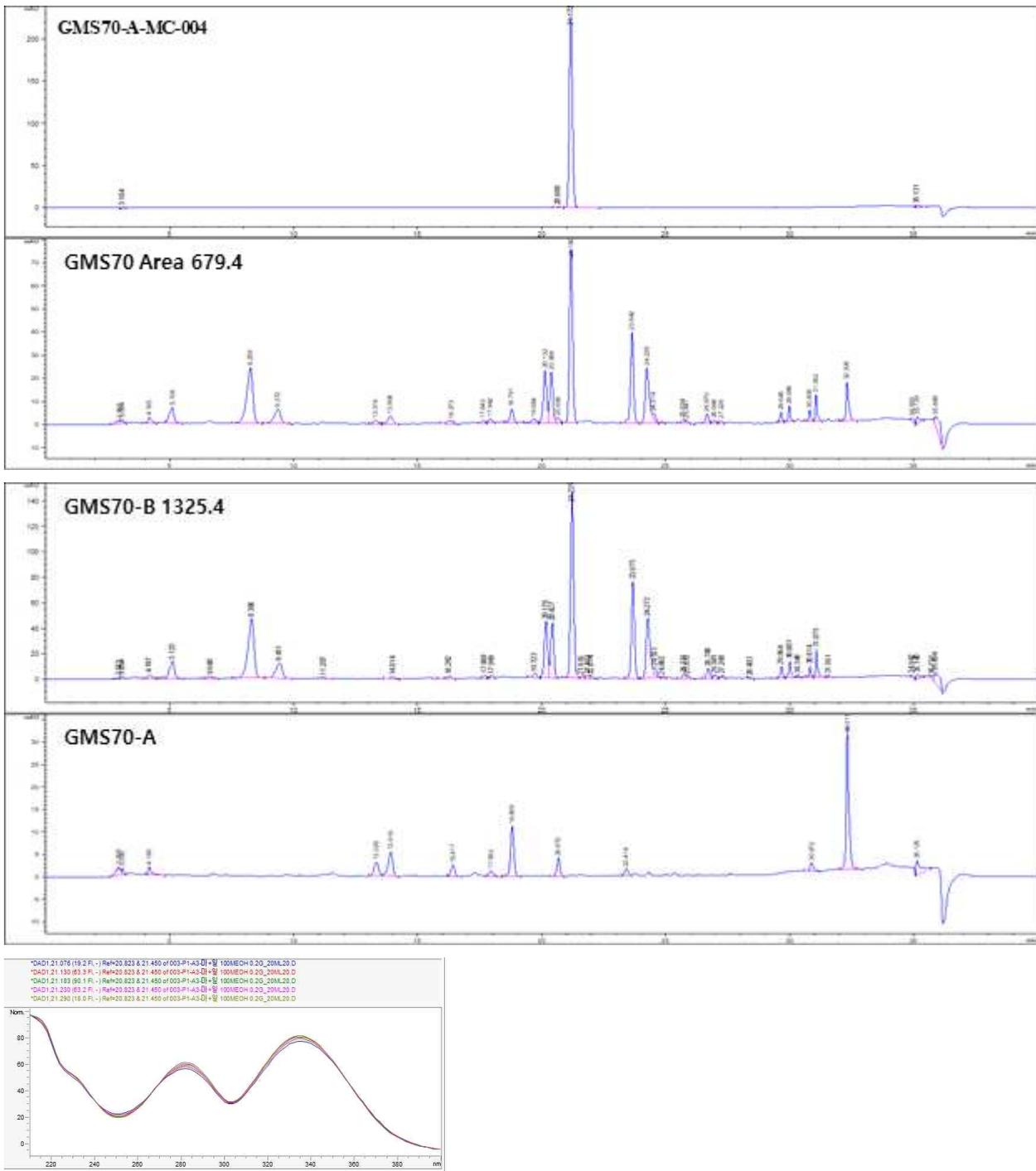
GMS70-A와 GMS70-B 복합물을 상기 방법으로 분석을 진행한 결과, 복합물의 GMS70-A-MC-002의 함량은 1.27 mg/g 이었으며, GMS70-B 추출물은 GMS70-A 추출물에 영향을 주지 않음을 확인하여, GMS70-A-MC-002을 GMS70-A의 지표성분 후보군으로 판단함.

■ 분석 시료추출법

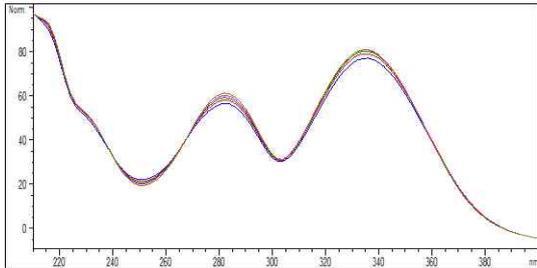
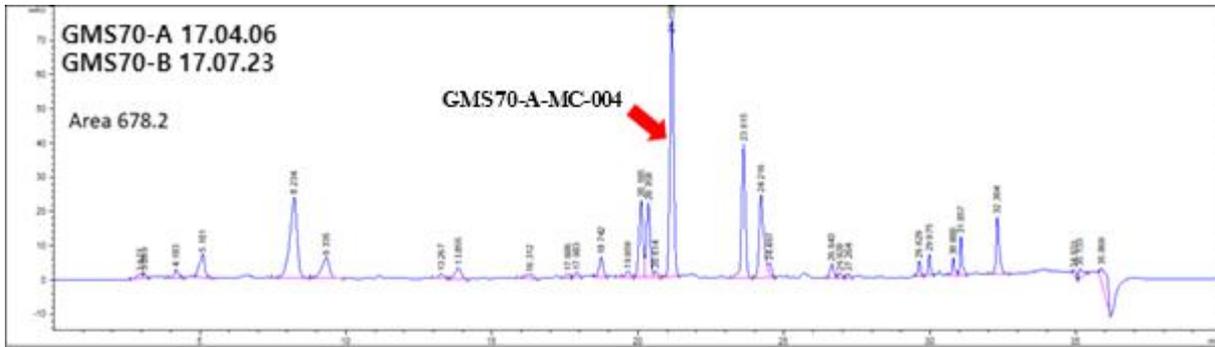
- ① 시료 약 0.2 g을 취한다.
- ② 100 % 메탄올 25 mL을 가한다.
- ③ 위의 용액을 30분 동안 초음파 추출한다.
- ④ 추출이 끝난 후 실온에서 냉각 시킨다.
- ⑤ 0.45 µm filter로 여과 후 시험용액으로 사용한다.

■ HPLC 분석조건			
Instrument:	Agilent HPLC system		
Detector:	PDA detector		
Wavelength:	330 nm		
Column:	Supelco discovery C18 (250mm x 4.6mm, 5µm)		
Column temperature:	30 °C		
Injection volume:	5 uL		
Flow rate:	1.0 mL/min		
Mobile phase:	Solvent A: 0.5% phosphoric acid in D.W Solvent B: 0.5% phosphoric acid in methanol		
	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
	0	75	25
	5	75	25
	25	45	55
	30	0	100
	32	0	100
	33	75	25
	40	75	25

C. GMS70-B의 지표 성분 후보군 GMS70-A-MC-004 분석결과



위 HPLC 분석결과와 같이 GMS70-A-MC-004 표준품 분석 그래프를 GMS70 및 각 추출물 GMS70-A, GMS70-B와 비교한 결과 GMS70 및 GMS70-B에서 RT값이 일치하였음. GMS70-B와 GMS70-A-MC-004 표준품의 UV spectrum의 패턴도 일치하였으며 GMS70-A에서는 검출되지 않았으므로 결론적으로 GMS70-A-MC-004를 GMS70-B의 지표성분후보군으로 판단함.



HPLC 장비를 이용한 반복실험결과 예상한 지표물질인 GMS70-A-MC-004이 검출되었으며, 면적값의 재현성도 확인이 되었음 (배치별, 실험 수행자별로의 반복간의 재현성도 확인됨).

(ㄴ) 정신건강 개선 GMS70의 안전성 , 독성 평가

1) 정신건강 개선 GMS70 소재의 중금속 및 잔류 농약 평가

시 험 항 목	중금속 분석결과
BHC	불검출
Bifenthrin	불검출
Cabofuran	불검출
Chlorfenapyr	불검출
Chlorothalonil	불검출
Chlorpyrifos	불검출
Chlorpyrifos-methyl	불검출
Cyhalothrin	불검출
Cypermethrin	불검출
Cyprodinil	불검출
DDT	불검출
Diazinon	불검출
Dichlorvos	불검출
Dicofol	불검출
Endosulfan	불검출
Fenarimol	불검출
Fenitrothion	불검출
Fenpropathrin	불검출
Fenvalerate	불검출
Fludioxonil	불검출
Imazalil	불검출
Iprodione	불검출
Isoprothiolane	불검출
Malathion	불검출
Methomyl	불검출
Methodathion	불검출
Paclobutrazol	불검출
Parathion	불검출

시 험 항 목	중금속 분석결과
Parathion-methyl	불검출
Permethrin	불검출
Phenthoate	불검출
Phosmet	불검출
Pirimicarb	불검출
Procymidone	불검출
Quintozene	불검출
Triadimefon	불검출
Triflumizole	불검출
Triazophos	불검출
Prochloraz	불검출
Methoxyfenozide	불검출
Boscalid	불검출
Acetamiprid	불검출
Azoxystrobin	불검출
Atrazine	불검출
Ethion	불검출
Iprovalicarb	불검출
Carbaryl	불검출
Captan	불검출
Tolclofos-methyl	불검출
Triflumuron	불검출
Thiamethoxam	불검출
Fenhexamid	불검출
Profenofos	불검출
Flubendiamide	불검출
Flufenoxuron	불검출
Pyraclostrobin	불검출
Pyrimethanil	불검출
Pirimiphos-methyl	불검출
Hexaflmuron	불검출

2) 정신건강 개선 GMS70 소재의 안전성 평가를 위한 독성시험 개요

번호	시험명	시험계	시험항목	결과 및 고찰
1	GMS70의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복 경구 투여 용량결정시험	SD랫드	일반증상, 체중, 사료, 혈액, 부검	시험물질 영향없음 고용량 5,000mg/kg 설정
2	HPLC를 이용한 GMS70의 조제물 분석법 검증	Scutellari n	조제물 분석법(9종)	분석법 적합, 5 or 500mg/mL 조제물 균질
3	GMS70의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구 투여 독성시험	SD 랫드	일반증상, 체중, 사료, 안과, 뇨, 혈액학, 혈액생화학, 암컷성주기, 부검, 장기중량, 조직병리학	시험물질 영향없음 NOAEL 5,000mg/kg
4	GMS70의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험	세균	복귀변이콜로니수, 생육저해, 침전	유전자돌연변이 유발성 음성
5	GMS70의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험	햄스터 세포주	염색체 구조이상 염색체 수적이상	염색체이상 유발성 음성
6	GMS70의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 소핵시험	SD랫드 골수세포	일반증상, 체중, 소핵 유발 출현빈도	골수세포에 대한 소핵유발성 음성

A.. GMS70의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복 경구투여 용량결정시험

시 험 계	랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))
시험방법	군구성 : 대조군, 저(1,250mg/kg), 중(2,500mg/kg), 고용량군(5,000mg/kg) 투여용량 : 1일 1회 2주간, 반복투여 평가항목 : 일반증상, 체중변화, 사료섭취량, 혈액학적, 혈액생화학적, 부검, 장기중량, 조직병리학적 검사
시험결과	사망유무, 일반증상 : 갈색변 외 특이증상 없었음. 체중변화, 사료섭취량 : 시험군, 대조군 간 유의성 관찰되지 않았음. 혈액학적, 혈액생화학적 : 시험물질에 의한 영향 관찰되지 않았음. 장기중량 : 모든 측정 장기중량에서 유의성 있는 변화 관찰되지 않았음. 부검소견 : 시험물질에 의한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았음.
결 론	GMS70의 13주 반복 독성시험 고용량은 5,000 mg/kg으로 설정 가능함.

B. HPLC를 이용한 GMS70의 조제물 분석법 검증시험

표 준 품	Scutellarin
분석방법	시스템 적합성, 직선성, 특이성, 일내재현성, 표준원액 안정성, Autosampler 내에서의 안정성, 균질성, 안정성(실온 4시간, 냉장 8일) 등
분석결과	QC 시료를 6 회 반복 측정한 피크면적 및 retention time의 정밀성은 판정기준을 모두 만족하였으며, 표준용액 0.5 ~ 10 µg/mL 농도 범위에서 측정된 직선성은 상관계수와 정확성의 판정기준을 모두 만족함. 일내재현성의 결과, 5 및 500 mg/mL 농도의 조제물에서 시험물질의 정밀성 및 정확성은 판정기준을 모두 만족하였으며, 5 및 500 mg/mL 농도의 조제물을 autosampler 내에서 18 시간 동안 방치 후 안정성을 확인한 결과, 시험물질의 정밀성 및 초기농도에 대한 변동률은 판정기준을 모두 만족함. 5 및 500 mg/mL 농도의 조제물을 실온에서 4 시간 동안 방치 및 8 일간 냉장 조건하에 보관 후 안정성을 확인한 결과, 시험물질의 정밀성 및 초기농도에 대한 변동률은 판정기준을 모두 만족함.
결 론	시험물질 GMS70의 조제물 농도 분석을 위한 본 분석법은 적합하며, 조제물은 균질하였고, 실온 4시간 및 냉장 8일간 안정한 것으로 확인됨.

C. GMS70의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험

시 험 계	랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))
시험방법	군구성 : 대조군, 저(1,250mg/kg), 중(2,500mg/kg), 고용량군(5,000mg/kg) 투여용량 : 1일 1회 13주간, 반복투여 평가항목 : 일반증상, 체중변화, 사료섭취량, 안과학적, 뇨, 혈액학적, 혈액생화학적, 암컷 성주기, 부검, 장기중량, 조직병리학적 검사
시험결과	사망유무 : 시험물질에 의한 사망은 관찰되지 않았음. 수컷 대조군 1레에서 사망 관찰되었으나 시험물질 영향없음. 일반증상 : 갈색변 외 특이증상 없었음. 체중변화, 사료섭취량 : 시험군, 대조군 간 유의성 관찰되지 않았음. 안과학적 : 이상소견 관찰되지 않았음. 혈액학적, 혈액생화학적 : 시험물질에 의한 영향 관찰되지 않았음. 장기중량 : 모든 측정 장기중량에서 유의성 있는 변화 관찰되지 않았음. 부검소견 : 계획부검 시 이상소견 관찰되지 않았음. 비계획부검 시 수컷 대조군 1레는 시험물질과 무관하게 사망 관찰됨. 암컷 2,500 mg/kg 투여군에서 1레는 단일레에서만 관찰되었으며, 이외의 암컷 시험물질 투여군에서 해당소견 관찰되지 않아 시험물질에 의한 영향은 아니라고 판단됨.
결 론	GMS70의 13주 반복 경구투여 결과, 무독성량 (NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단됨.

D. GMS70의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시 험 계	세균, <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i>
시험방법	균주 : TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA(pKM101)/S9mix(-/+) 용량설정 : 5,000, 2,500, 1,250, 625, 313 ug/plate 평가방법 : 시험물질 처리시 및 복귀변이콜로니수 계측 시 침전관찰, 복귀변이콜로니수의 계측 (자동콜로니 계측기), 미생물에 의한 오염유무확인, 1개 이상의 균주에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비하여 2배 이상 증가하고, 증가에 따른 용량의존성이 있을 경우 양성 판정.
시험결과	복귀변이콜로니수의 계측 : 시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배를 초과하지 않았음. 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 증가함 시험물질에 의한 생육저해 및 침전 : 대사활성화 존재 또는 비존재하 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았음.
결 론	GMS70의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단됨.

E. GMS70의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

시 험 계	세포, Chinese Hamster Lung cells, CHL/IU 세포
시험방법	세포주 : CHL/IU, ATCC Catalog No. CRL-1935, 햄스터 폐, 섬유아세포 용량설정 : 단시간처리법, 연속처리법, 1,250, 625, 313, 156 ug/mL 평가방법 : 검체슬라이드 관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하며, 염색체 이상은 구조이상, 수적이상, 기타로 구분함. 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 하나 이상의 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하거나, 증가에 따른 용량의존성이 있을 경우, 그리고 음성대조군의 historical control data의 관리범위 이상으로 증가할 경우 양성 판정.
시험결과	염색체이상 출현빈도 : 단시간처리법의 대사활성화비존재하 or 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이 확인되지 않았음. 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가가 확인됨.
결 론	GMS70의 염색체이상 유발성은 음성으로 판단됨.

F. GMS70의 Spargue-Dawley 랫드를 이용한 소핵시험

시 험 계	랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))
시험방법	군구성 : 음성, 양성대조군, 저(1,250mg/kg), 중(2,500mg/kg), 고용량군(5,000mg/kg) 투여용량 : 24시간 간격 2회 평가항목 : 일반증상, 체중변화, 검체제작(골수세포), 검체관찰
시험결과	일반증상 : 시험물질군에서 일반증상 이상 관찰되지 않았음. 체중변화 : 시험물질군에서 음성대조군대비 유의한 체중변화 없었음. 소핵 유발 출현빈도 : 소핵다염성적혈구 출현빈도 및 다염성적혈구의 비율은 시험물질군 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었음. 양성대조군에서 소핵다염성적혈구 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가가 확인됨.
결 론	GMS70의 Sprague-Dawley 랫드 골수세포에 대한 소핵 유발성은 음성으로 판단됨.

(ㄷ) 정신건강 개선 GMS70 소재의 전임상 효능 평가

1) Corticosterone에 의해 유도된 인간 신경모세포 SH-SY5Y 세포 사멸에 대한 GMS70의 보호효과  
- 세포시험에서는 neuronal function과 differentiation 연구에 많이 사용되어 온 in vitro model 세포주인 인간의 neuroblastoma SH-SY5Y 세포에 스트레스로 인해 분비되는 glucocorticoid의 한 종류인 corticosterone을 처리한 신경계 관련 스트레스 모델에서 정신건강 개선 소재로 개발한 GMS70의 신경세포 보호 효과를 확인함으로써 기존 동물시험 결과와 함께 천연물 복합 소재인 GMS70이 정신건강에 도움을 주는 소재로 활용될 수 있음을 확인함.

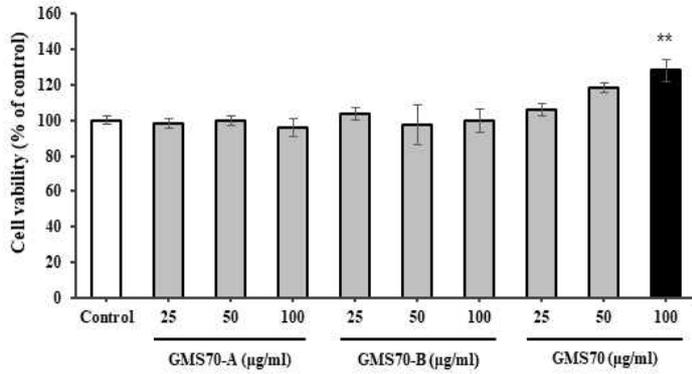


그림3-4-12. SH-SY5Y 세포에서의 시료 독성 평가

- GMS70은 50과 100 µg/ml에서 control 군에 비해 각각 약 120%, 130%의 세포 성장률을 나타냈다. 따라서 SH-SY5Y 세포에서 GMS70-A 및 GMS70-B 추출물 각각의 독성과 이들의 혼합물인 GMS70 대한 자체독성은 나타나지 않았고, SH-SY5Y 세포성장률이 농도 의존적으로 증가하여 세포의 건강도가 농도에 따라 증가됨을 확인하였다.

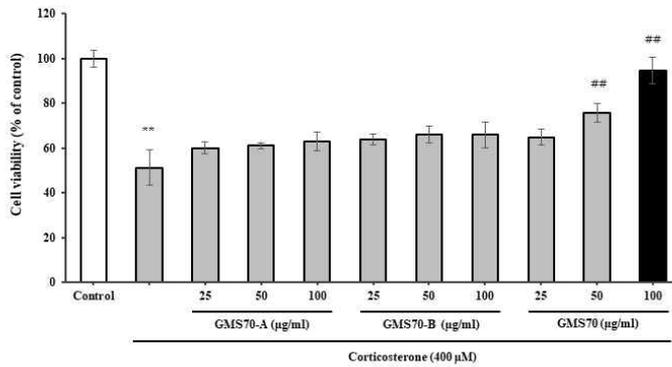


그림3-4-13. Corticosterone 스트레스가 유도된 SH-SY5Y 세포의 보호 효과

- Corticosterone으로부터 유도된 SH-SY5Y 세포사멸에 대한 GMS70의 세포 보호 효과를 확인하기 위하여 GMS70-A 및 GMS70-B 추출물과 GMS70을 25, 50 and 100 µg/ml 농도별로 처리한 후 세포생존율을 측정함. SH-SY5Y 세포에 400 µM의 corticosterone을 처리한 후 GMS70-A 및 GMS70-B 추출물과 GMS70을 각각 농도별로 처리하여 세포생존율을 확인한 결과 대조군과 비교하였을 때, 400 µM의 corticosterone으로 인해 약 50%까지 생존율이 감소하였던 세포들이 50 µg/ml 와 100 µg/ml의 GMS70에 의해 각각 약 75%와 95%까지 증가하여 농도 의존적으로 세포생존율이 증가하는 결과를 나타냄. 이는 corticosterone 독성으로 유도된 세포손상이 GMS70의 처리로 인하여 보호되었음을 보여줌. 그러나 GMS70-A 추출물 및 GMS70-B 추출물을 투여한 세포에서는 세포생존률이 크게 증가하지 않은 결과를 보임. 이러한 결과는 단일물질에서는 세포를 보호하는 효능이 유의적으로 나타나지 않았지만 두 물질을 혼합한 GMS70의 일정 농도부터는 SH-SY5Y 세포를 보호하는 효과를 확인함.

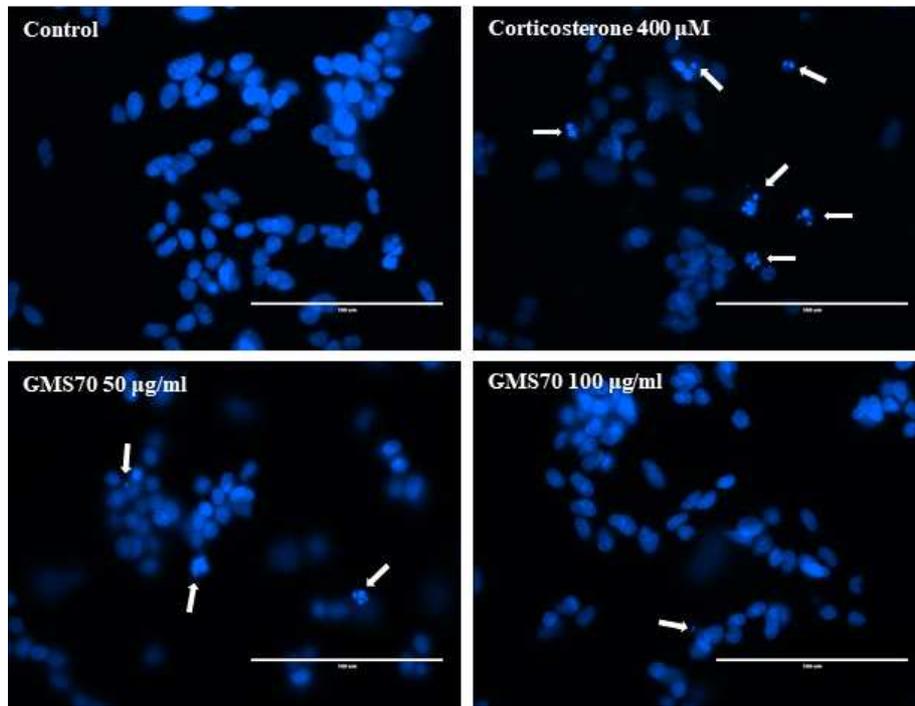


그림3-4-14. Effects of GMS70 on apoptosis induced by corticosterone of SH-SY5Y cells

- Corticosterone으로 유도된 SH-SY5Y 세포의 손상으로 인한 핵의 형태학적 변화를 관찰한 결과 apoptotic body가 관찰됨. 그러나 corticosterone과 GMS70을 함께 처리했을 때에는 농도 의존적으로 apoptotic body가 감소하는 것을 확인함. 따라서 GMS70은 corticosterone 독성에 의해서 유도된 apoptotic cell death를 유의하게 감소시키는 효과가 있음.

(A)

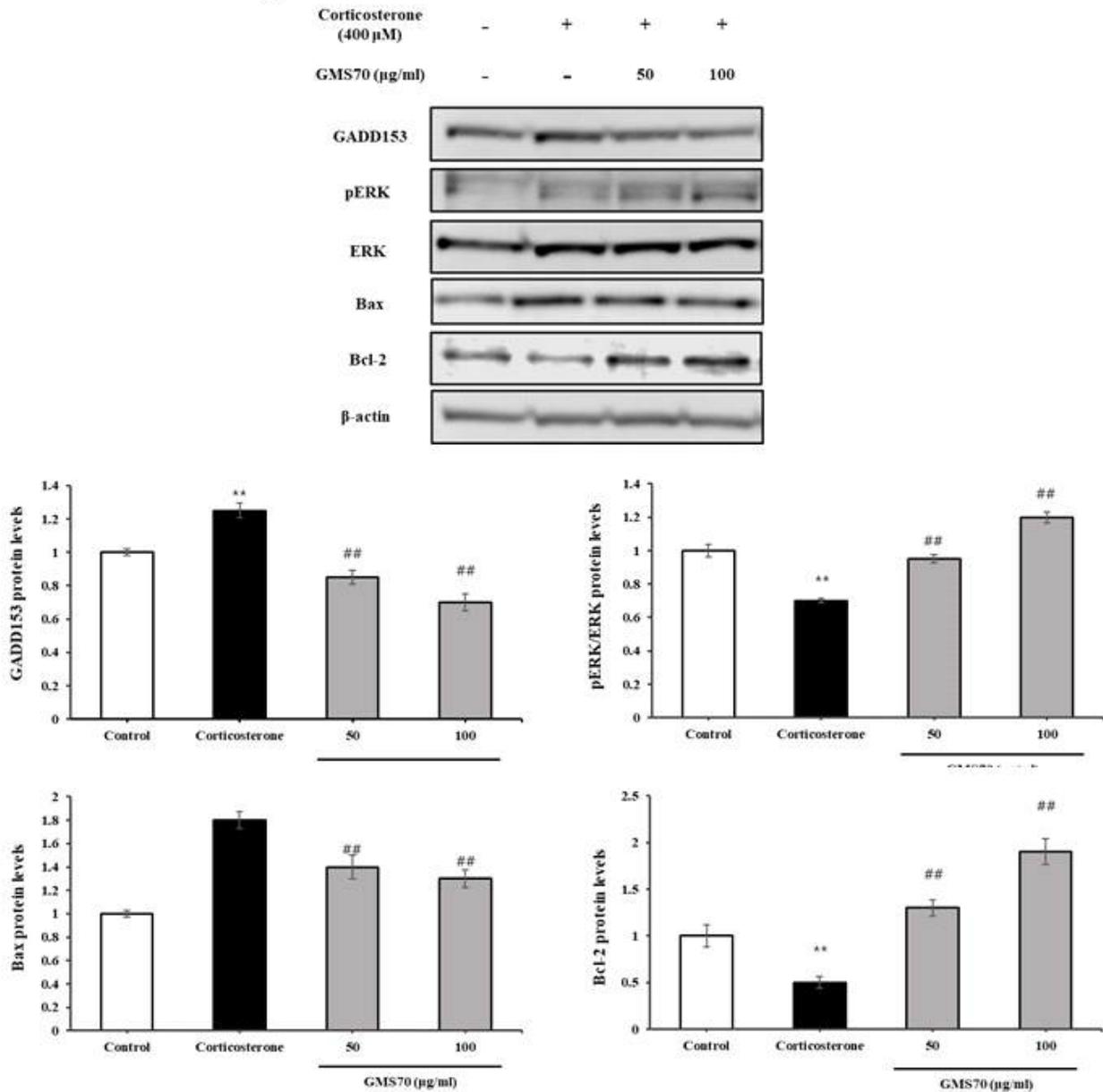


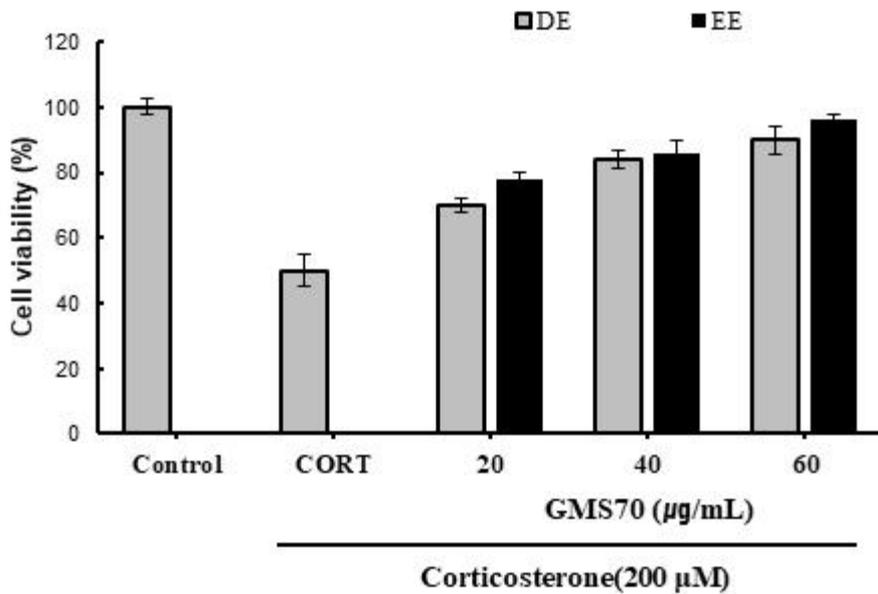
그림3-4-15. Effects of GSM70 on the expressions of GADD153, p-ERK, Bax, Bcl-2 in corticosterone treated SH-SY5Y cells

- Apoptosis는 일반적으로 ER stress와 밀접한 관계를 갖기때문에 따라서 corticosterone 스트레스 유도에 의해 나타나는 apoptosis에서 GSM70의 보호효과 기전을 확인하기 위하여 ER stress의 지표 인자로 잘 알려진 GADD153의 발현량을 측정하였고, 세포자멸사 과정에서 ER stress 감소 효과를 나타내는 것으로 알려진 ERK의 인산화를 측정함. Corticosterone의 처리로 인해 GADD153의 발현량이 control 군과 비교하여 유의적으로 증가함. 100  $\mu$ g/ml GSM70을 처리한 군은 GADD153 발현이 확연히 감소한 결과를 나타냄. ERK의 변화는 100  $\mu$ g/ml GSM70을 처리한 경우, corticosterone만 처리한 군에 비해 현저히 증가된 결과를 보임. 또한 세포자멸사 과정과 관련된 인자인 Bax와 Bcl-2의 발현을 확인함. Proapoptotic protein로 알려진 Bax는 corticosterone만 처리한 군에서 그의 발현양이 control에 비해 약 2배 증가하는 결과를 나타냈으나 100  $\mu$ g/ml GSM70을 처리한 군은 확연히 발현양이 감소한 결과를 나타냄. 반면에 antiapoptotic protein인 Bcl-2를 살펴보면 corticosterone만 처리했을 때 발현이 control에 비해 감소했지만 GSM70을 함께 처리한 군은 그 발현양이 control 군 수준만큼 유지되는 결과를 나타냄.

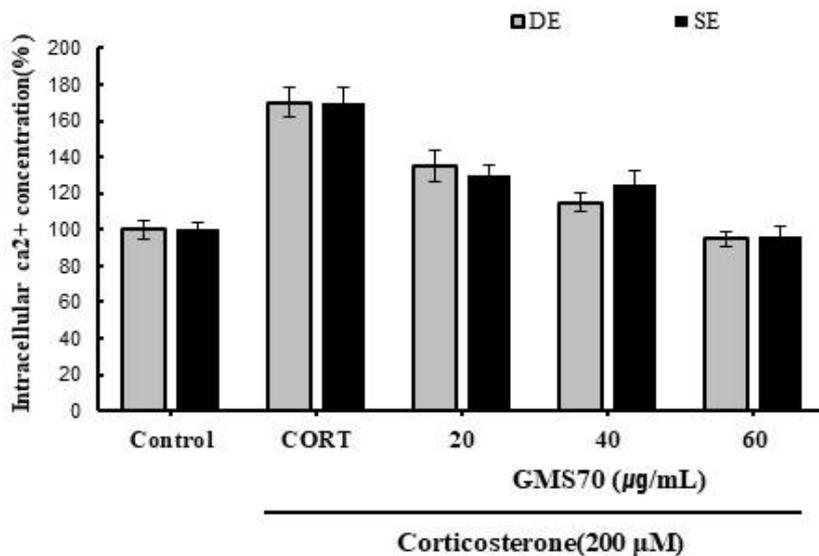
2) Corticosterone에 의해 유도된 신경세포 PC12 세포 사멸에 대한 GSM70의 보호효과

- PC12 세포는 흰쥐 부신수질 갈색세포종양에서 유래된 세포로서, 신경세포의 특성을 나타내어 신경세포

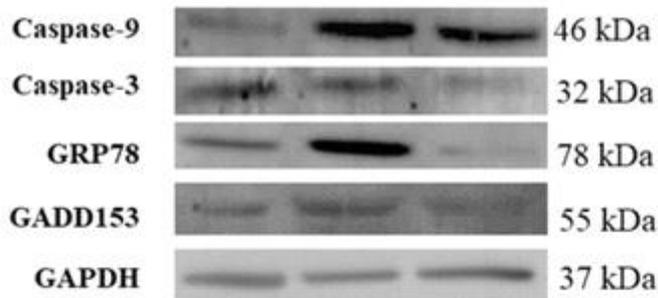
기능을 연구하는데 있어 많이 사용되는 세포이다. PC12 세포에 신경독성인 costicostrone에 의해 유도된 세포자멸사에 대한 GMS70의 세포 보호 효과를 확인함으로써 정신건강 개선 효과를 확인함.



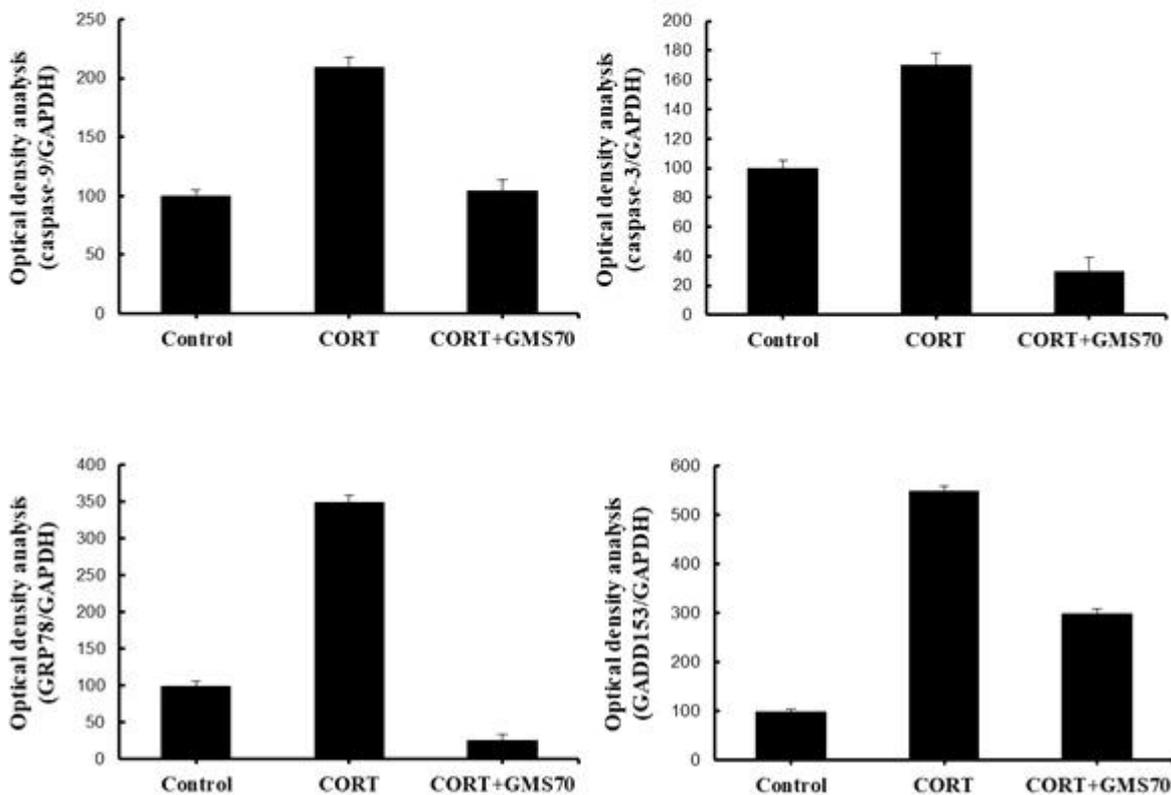
PC12세포를 24시간동안 다른 농도 및 다른 추출용매의 GMS70의 부재 또는 존재하에 200µM Corticosterone으로 처리한 다음 세포생존율을 확인한 결과 Corticosterone에 의해 세포 생존율이 감소한 반면 GMS70을 함께 처리한 경우 세포 생존율이 농도에 따라 증가하는 것을 확인함. 추출용매가 D.W일 때와 Ethanol 일 경우 약간의 차이는 있었으나 모든 군에서 보호효과가 있는 것을 확인함.



Fura-2는 세포막으로부터 투과되고 세포내 유리 칼슘과 결합되어 상이한 강도의 형광을 생성한다. PC12 세포에 200 µM Corticosterone을 24시간 처리하면 대조군에 비해 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>의 농도가 크게 증가함. 반면 200µM Corticosterone 존재하에서 24시간 동안 GMS70을 농도별로 전처리한 경우 GMS70의 농도가 증가함에 따라 control군만큼 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>의 농도가 감소하는 것을 확인함. GMS70이 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>의 과부하를 억제함으로써 세포 보호효과를 가짐을 확인함.



GMS70 (60 µg/mL)	-	-	+
Corticosterone (200 µM)	-	+	+



Apoptosis는 일반적으로 ER stress와 밀접한 관계를 갖기 때문에 전형적인 ER 바이오마커인 GRP78, GADD-153를 확인하였다. corticosterone에 노출된 PC12세포에서 유의하게 증가한 반면 GMS70을 처리한 경우 발현량이 감소하였으며 이는 부분적으로 ER 스트레스 매개 경로를 통해 corticosterone 유도 신경 독성에 대한 GMS70의 세포 보호 효능을 확인하였다. 또한 염증 마커인 caspase9과 caspase3의 발현량이 corticosterone만 처리한 군보다 GMS70을 함께 처리한 경우 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통하여 GMS70은 신경세포인 SH-SY5Y에서뿐만 아니라 PC12세포에서도 효능이 있음을 확인함.

### 3) H2O2에 의해 유도된 근세포 C2C12 세포 사멸에 대한 GMS70의 보호효과

- 스트레스 완화의 소재로서 개발된 GMS70의 피로개선관련 전임상시험으로서 세포시험을 완료하여 기존의 동물시험과 함께 스트레스 완화 효과를 확인 완료함.

- 세포시험에서는 근육 기능 장애 질환 관련한 연구에 많이 사용되어 온 in vitro model 세포주인 근아세포종인 C2C12 세포에 산화적 스트레스에 속하는 H2O2을 처리한 근육 손상 모델에서 스트레스완화 소재로 개발한 GMS70의 근세포 보호 효과를 확인함으로써 기존 동물시험 결과와 함께 천연물 복합 소재인 GMS70이 스트레스 완화 역할 중 피로 개선에 도움을 주는 소재로 활용될 수 있음을 확인함

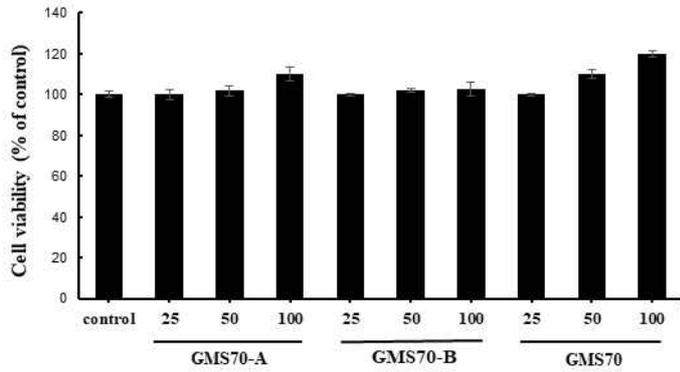


그림 452 C2C12 세포에서의 시료 독성 평가

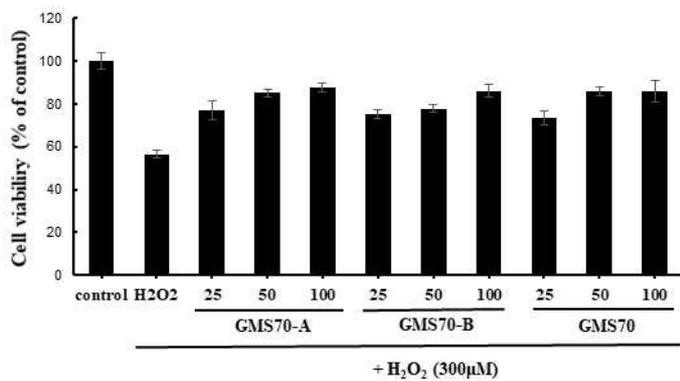


그림3-4-16. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 산화스트레스가 유도된 C2C12 세포의 보호 효과

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 으로부터 유도된 C2C12 cell 세포사멸에 대한 GSM70의 세포 보호 효과를 확인하기 위하여 GSM70-A 및 GSM70-B 추출물과 GSM70을 25, 50 and 100 µg/ml 농도별로 처리한 후 세포생존율을 측정함. C2C12 세포에 300 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 후 GSM70-A 및 GSM70-B 추출물과 GSM70을 각각 농도별로 처리하여 세포생존율을 확인한 결과 대조군과 비교하였을 때, 300 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 인해 약 50%까지 생존율이 감소하였던 세포들이 100 µg/ml의 GSM70에 의해 약 85%까지 증가하여 세포 보호효과를 나타냄. 이는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 독성으로 유도된 세포손상이 GSM70의 처리로 인하여 보호되었음을 보여줌. 이는 정신스트레스 뿐만 아니라 육체스트레스에도 GSM70이 스트레스 완화 효과가 있는 것으로 확인됨.

3) 정신건강 관련 천연물 유래 효능 소재의 스트레스(긴장상태) 모델에서의 작용기전 규명



그림3-4-17. 스트레스(긴장상태) 유도 동물 모델 제작

GMS70의 스트레스 개선 및 예방 효능 평가를 위하여 스트레스 유발 동물모델을 제작하여 스트레스 관련 인자들을 확인함.

첫째로 본 소재를 활용하여 스트레스 실험동물의 체중 대비 부신 및 비장의 무게 변화를 확인하였음. 실제 부신은 스트레스에 민감하게 반응하는 기관으로서 부신피질에는 스트레스에 대응하여 분비되는 코티솔이 분비되고, 부신�수질에서는 카테콜라민계 호르몬이 스트레스에 반응하여 분비됨. 따라서 스트레스에 의해 부신 비대가 관찰되고 체중대비 부신의 중량이 증가하며, 면역과 관련된 비장은 장기 스트레스에 의해 위축되어 비장은 감소되는 것으로 알려져 있음.

1차 동물 모델에서 본 효능 소재인 GMS70 복합추출물의 효능 평가를 위해 부신 및 비장무게 변화를 확인한 결과 다음 그림과 같이 스트레스를 지속적으로 받은 실험동물은 정상대조군에 비해 체중이 감소하고, 부신의 중량은 증가하며, 비장의 중량은 감소하는 것으로 알 수 있음. 그런데 GMS70 복합추출물을 장기간 섭취한 군에서는 스트레스로 인한 체중감소를 보호하고 부신 및 비장의 중량이 정상대조군과 유사한 정도로 유지되는 것을 확인 할 수 있었음.

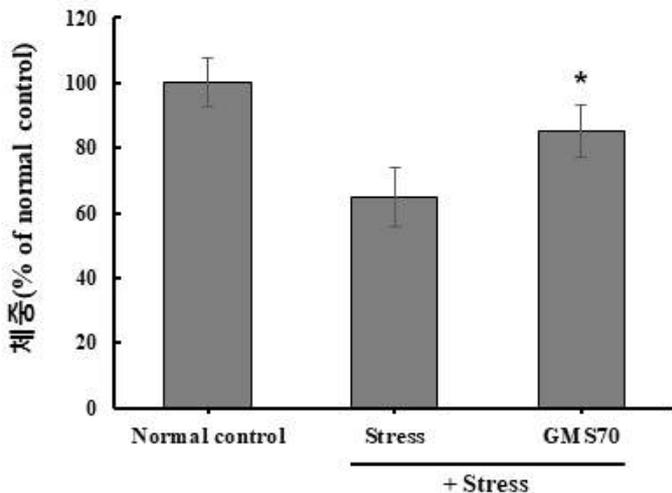


그림3-4-18. 천연유래추출물 GMS70의 스트레스로 인한 체중 감소 억제 효과

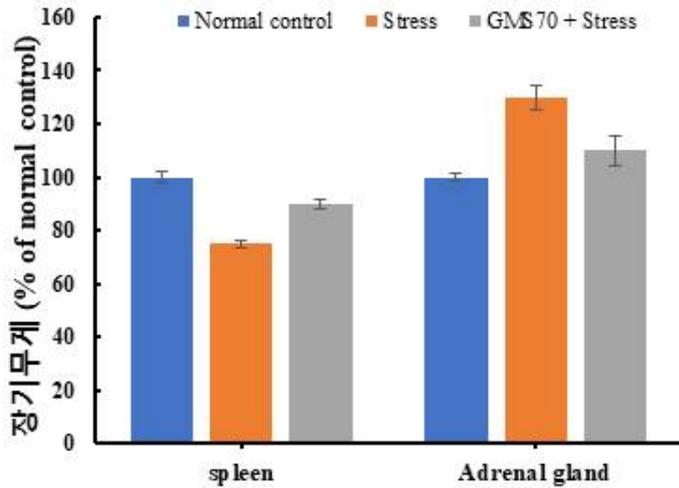


그림3-4-19. 천연유래추출물 GMS70의 스트레스로 인한 장기무게 변화 억제 효과

따라서 GMS70 추출물에 의해 스트레스로 인한 체중감소와 부신 비대 및 비장 위축을 효과적으로 억제시켜 스트레스로부터 호르몬 발란스 유지 및 면역계 관련 장기 건강도를 유지시켜 줄 수 있음을 확인함.

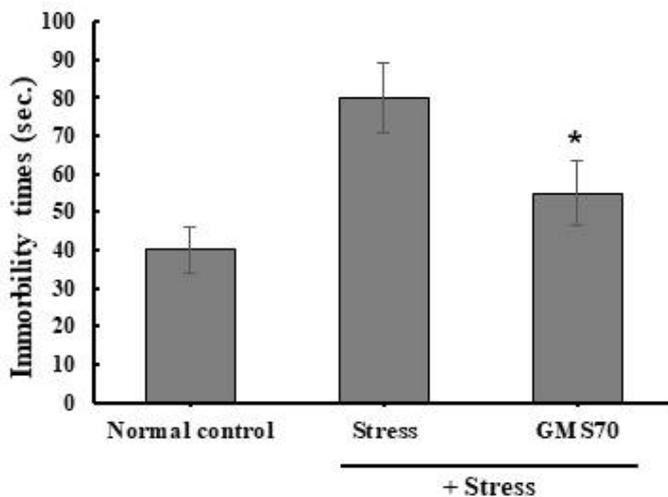


그림3-4-20. 천연유래추출물 GMS70의 스트레스 반응 행동 개선 효과 (꼬리 현수법)

스트레스를 지속적으로 가한 시험 동물을 대상으로 강제수영 시험을 수행하였음. 모든 동물을 6분간 원통형 수조에서 강제로 수영을 하도록 하였으며 시작 후 2분은 적응 시간으로 간주하고, 종료 전 4분간 실험동물이 원통형 수조 안에서 움직이지 않는 총시간 (이하 부동시간이라 함)을 측정하여 기록하였음. 구체적으로 부동시간은 수면위로 머리를 드는 정도의 작은 움직임을 제외하고는 어떠한 움직임도 없는 상태를 의미함. 부동성은 우울증의 절망 지표 중 하나로서, 스트레스 실험동물에서 흔히 볼 수 있는 증상이며, 이런 부동성에 있어서 GMS70 복합추출물 섭취로 인한 효능 확인하였음. 그림에서 확인할 수 있는 것과 같이 스트레스를 받은 동물은 정상 대조군에 비하여 부동시간이 매우 긴 것을 확인 할 수 있었음. 하지만 GMS70 복합추출물을 처리한 경우 스트레스군에 비해서 부동시간이 통계학적으로 유의하게 감소한 것으로 확인할 수 있었음. 따라서 GMS70 복합추출물의 섭취가 스트레스로 인한 우울, 절망 등의 행동 개선을 개선시킬 수 있음을 보여주는 결과임.

꼬리 현수법을 통한 우울증상 개선에 있어서 초기 2분간은 적응시간으로 두고 종료 전 4분 동안 실험동물이 움직이지 않은 시간을 측정하여 기록함으로써 부동시간을 확인한 결과임. 그림에서 확인할 수 있는 것과 같이 스트레스를 받은 실험동물은 꼬리를 매달아 거꾸로 된 상태에서 부동시간이 정상대조군에 비해 긴 것을 확인할 수 있었음. 그러나 GMS70 복합추출물을 지속적으로 섭취한 스트레스 동물의 경우 대조군 대비 부동시간 동안 더 많은 움직임을 확인할 수 있었음. 즉 GMS70 복합추출물에 의해 스트레스로 인한 무기력증 및 좌절 등의 행동이 개선되어 스트레스 예방 및 개선에 도움을 줄 수 있음을 보여주는 것임. GMS70 복합추출물에 의해서 스트레스로 인한 생리적, 감정적 증상 개선이 동물 실험을 통해서 확인되었으며 이런 증상 개선이 어떠한 작용 기전을 통해서 발생하는지 확인하기 위해서 세로토닌 측정 실험을 수행함. 세로토닌은 기분, 행동, 식욕, 수면, 근 수축과 관련된 기능에 관여하는 신경전달물질로서 세로토닌이 저하되면 우울증과 같은 증상이 나타나며 스트레스 상황에서 세로토닌은 극적으로 감소되는 것을 확인할 수 있음.

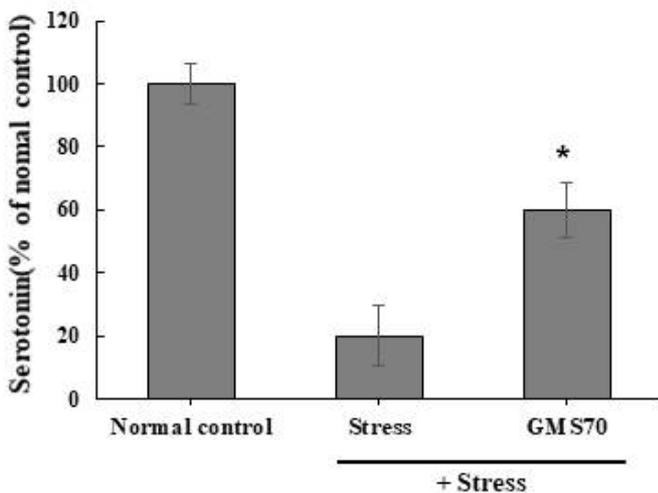
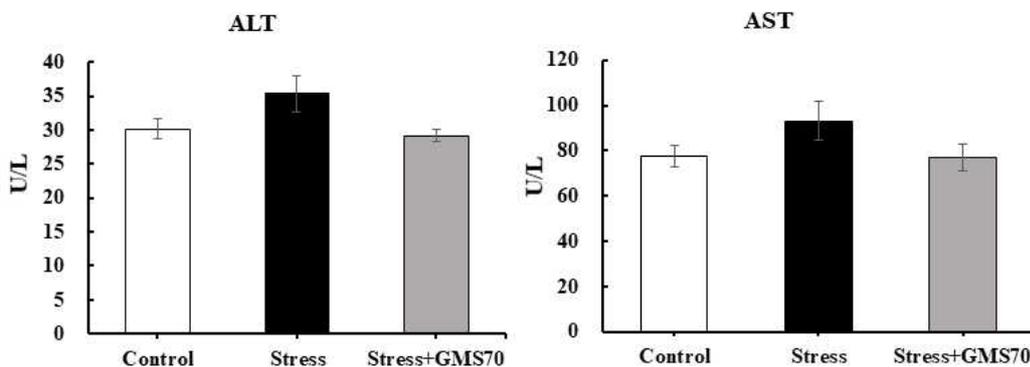


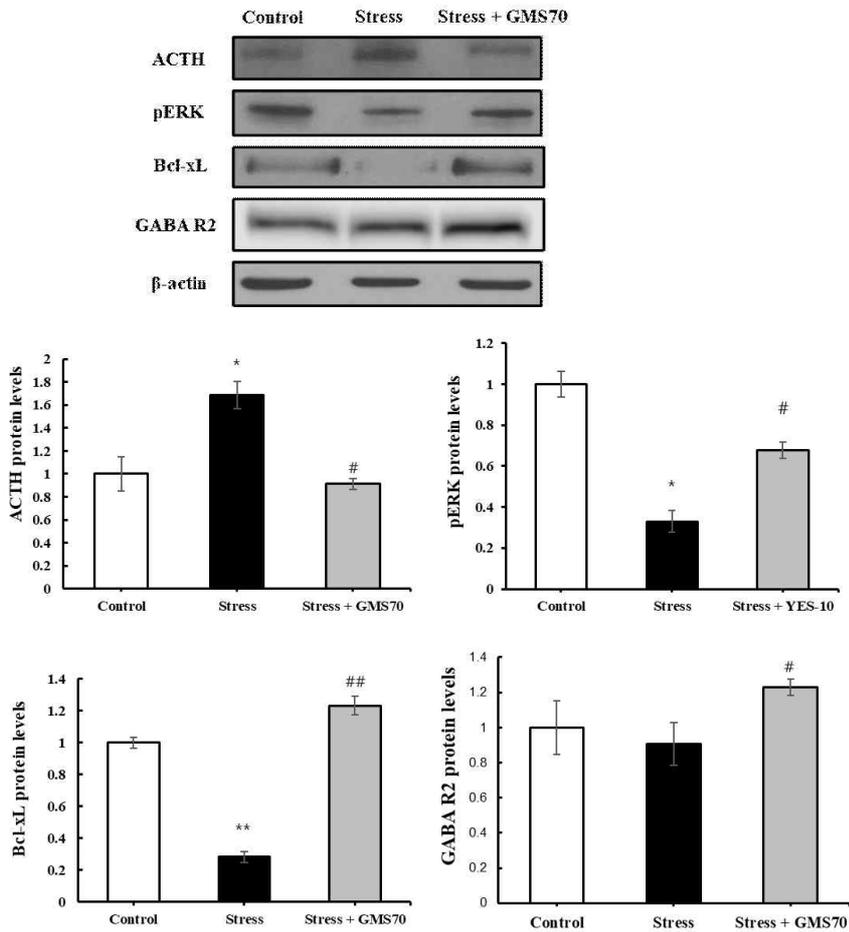
그림3-4-21. 천연유래추출물 GMS70 의 세로토닌 농도 개선 효과

상기 그림에서 확인할 수 있는 것과 같이 스트레스를 받은 실험동물의 해마에서 측정된 세로토닌은 정상대조군에 비해 현저히 낮아져 있는 것을 확인할 수 있었던 반면 GMS70 복합추출물을 지속적으로 투여한 군에서는 스트레스 대조군에 비해 세로토닌 농도가 높게 유지되어 스트레스에 대한 저항성을 향상시키는 것을 확인할 수 있었음. 따라서 GMS70 복합추출물은 스트레스에 의해서 저하되는 세로토닌의 농도를 유지함으로써 스트레스 예방 및 개선을 가능하게 해줄 수 있음을 보여주는 것임.



혈액 내 AST, ALT 분석을 통하여 스트레스가 간효소에 미치는 영향 및 GMS70의 섭취에 의한 간독성 영향을 확인한 결과, 스트레스군에서 간효소가 증가하였으나 GMS70을 섭취한 군에서는 정상군과 비슷한 수준

을 나타냄. 이를 통하여 본 소재의 안전성을 확인할 수 있었음.



지속적인 스트레스를 가한 군에서 분리된 뇌조직에서 Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)분비가 정상 대조군에 비해 증가된 것을 확인할 수 있었으며 중추신경계의 중요한 억제성 신경전달체인 GABA의 농도가 감소한 것을 확인함. 반면 GMS70을 섭취한 군에서는 ACTH의 농도를 낮추고 GABA의 농도를 대조군보다 높은 수준으로 증가시키는 것을 확인함. 또한 세포 보호 인자인 Bcl-xL과 pERK의 수치가 스트레스군과 비교하여 유의적으로 증가한 것을 확인함. 이를 통하여 GMS70의 섭취가 지속적인 스트레스로부터 스트레스 인자를 유의적으로 개선함을 확인함.

#### 4) GMS70 소재의 스트레스 (피로개선) 모델에서의 작용기전 규명

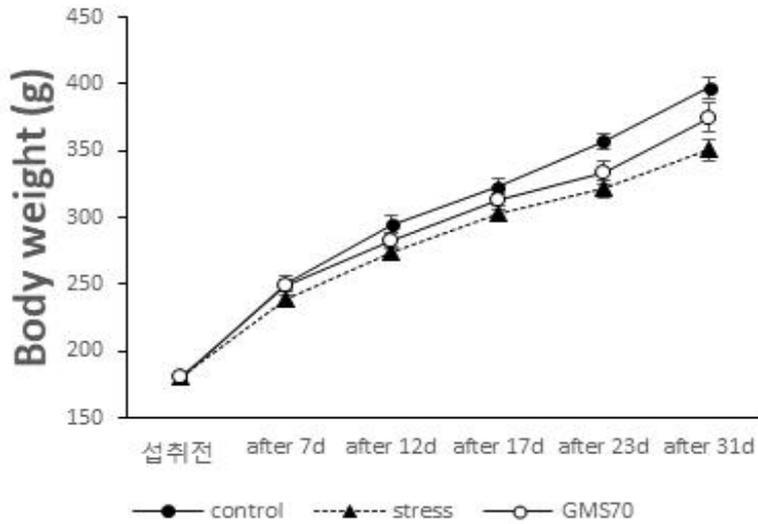


그림3-4-22. 피로 동물모델에서 식의약소재의 체중 개선 효과

피로로 인해 실험동물의 체중 증가 정도가 정상군에 비해 적어짐. 그 스트레스를 유도하며 식의약소재를 투여한 군(스트레스+GMS70)은 체중 증가 정도가 스트레스와 함께 생리식염수를 투여한 군에 비해 큰 것으로 확인됨. 즉, 스트레스로 인한 체중 변화가 식의약소재 투여로 인해 개선됨을 확인함.

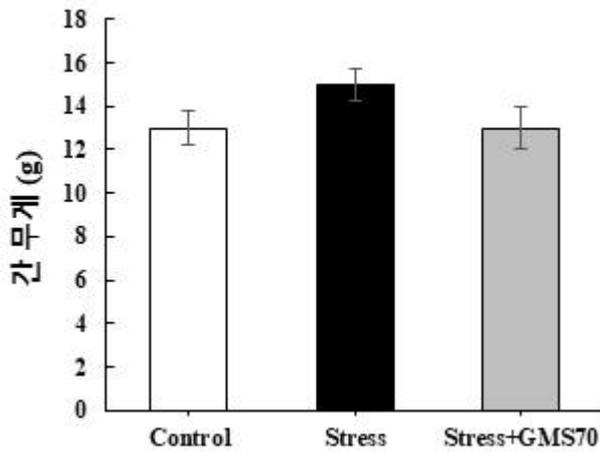
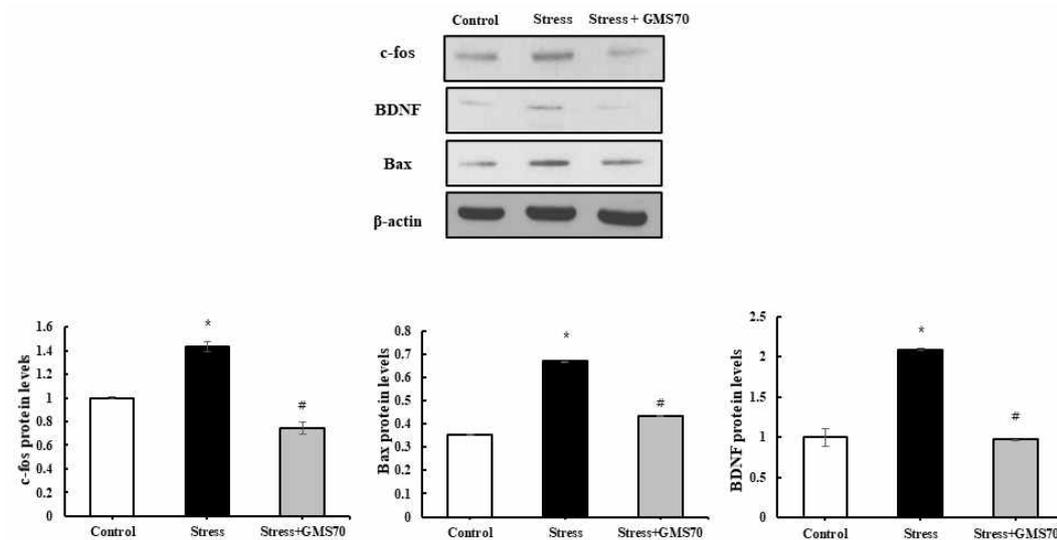


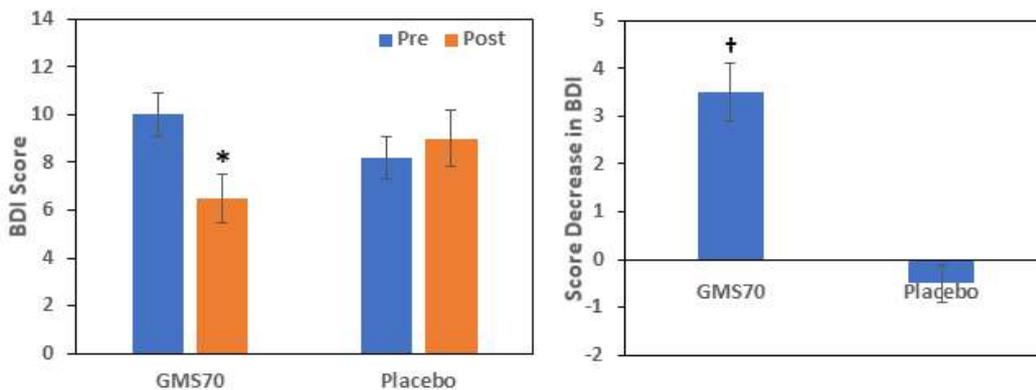
그림3-4-23. 피로 동물모델에서 GMS70 섭취에 따른 간 무게 변화

피로 모델에서 식의약소재 투여군과 스트레스군, 정상군 모두에서 간 무게의 차이가 유의하지 않아 개발 식의약소재가 안전함을 확인함.

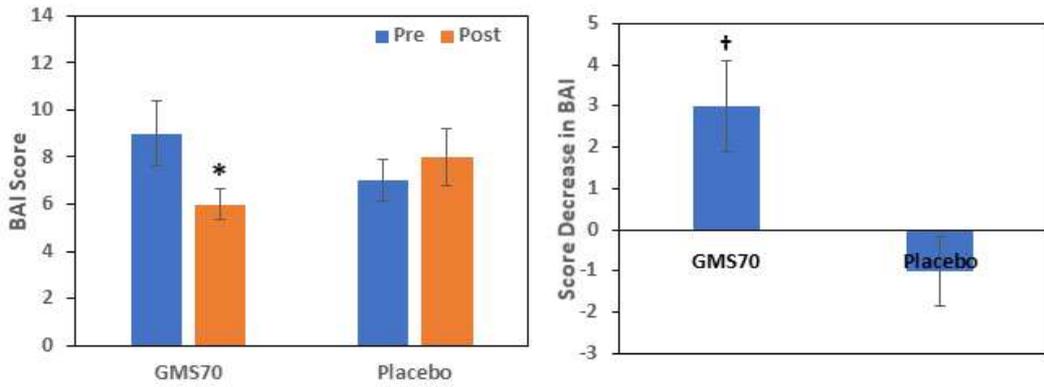


피로를 유도하며 생리식염수를 투여한 군(stress)에서는 BDNF, Bax, c-fos 등의 단백질 발현량이 정상군(control)에 비해 유의하게 증가함. 반면, 연구과제를 통해 개발한 기능성 소재 GMS70을 투여한 군에서는 상기 단백질 지표들의 발현량이 정상대조군과 유사한 정도로 개선된 것을 확인함.

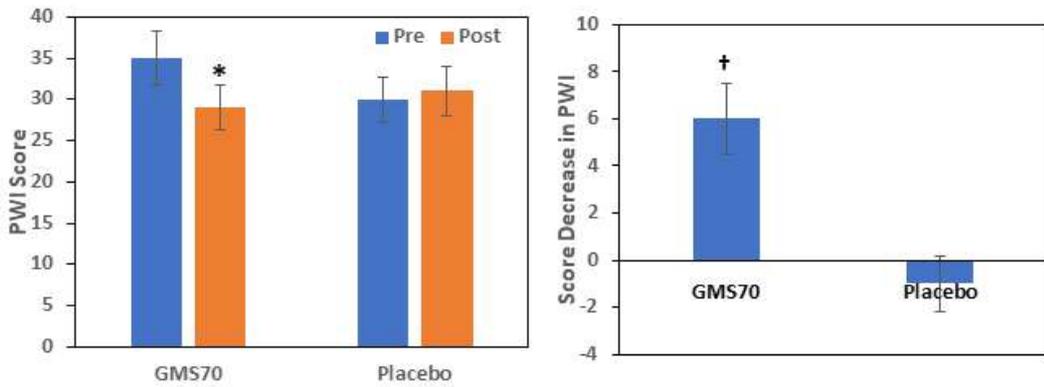
### 3. 정신건강 소재, GMS70의 임상 효능 평가



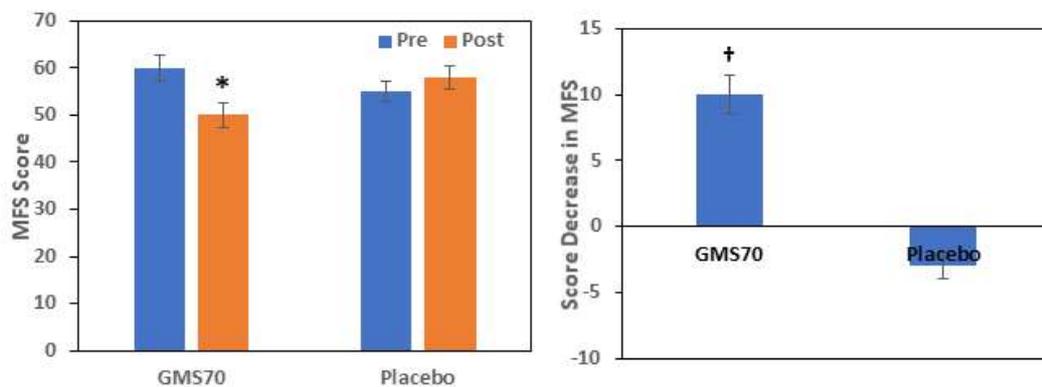
본 과제를 통해서 연구개발된 소재인 GMS70의 인체적용시험을 완료함. 본 소재는 전임상 연구결과를 통해서 피로회복, 정신건강 개선에 도움이 됨을 앞선 연구에서 규명하였으며 인체적용시험중 BDI 설문을 통해서 효능을 확인했음. BDI 설문은 0-64점으로 점수가 높을수록 우울함을 반영함으로써 우울증의 척도임. 남자의 경우 16-19점, 여자의 경우 17-20점이 우울경향이 있는 사람으로 판단됨. 그리고 남자의 경우 20-23, 여자의 경우 21-24점이 우울증, 남자의 경우 24점 이상, 여자의 경우 25점 이상을 심한 우울증으로 분류함. GMS70을 한달간 지속적으로 섭취한 실험군은 약 3.2점 이상의 점수를 통계적으로 유의하게 개선시킴을 확인함. 이는 대조군과 비교해서도 통계적으로 유의미한 개선임.



BAI 설문은 불안(스트레스와 정신건강 척도)을 평가하기 위한 설문으로서 연구 개발된 GMS70 섭취에 의한 불안 증상 개선을 확인하였음. 총 21문항으로 각 문항당 0-3점으로 평가되며, 0-9점을 정상수준, 10-18점은 경한 수준의 불안, 19-30점을 심한 수준의 불안, 31-63점을 매우 심한 수준의 불안으로 구분하고 있음. 따라서 반건강인을 대상으로 한달간 GMS70을 섭취한 경우, 2.8점 이상의 점수가 감소되어 대조군 대비 통계적으로 유의한 개선을 확인하였음. 이는 대조군과 비교해서도 통계적으로 유의한 변화임.



GMS70은 인체적용시험 중 우울증 척도와 불안증 척도의 통계적 유의한 개선을 확인하였음. 그리고 추가로 PWI 설문을 통해서 스트레스-사회심리적 건강평가를 진행했음. PWI는 63점 이상을 고위험집단, 23-62점을 잠재적 스트레스집단, 그리고 22점 이하를 건강집단으로 구분할 수 있으며 본 연구에서 모집된 피험자군은 잠재적 스트레스 집단으로서 반건강인이었음. GMS70을 한달간 지속적으로 섭취한 군의 경우 섭취 전후 약 5점 이상 통계적으로 유의미한 개선이 확인되었으며 위약군과 비교해서도 통계적으로 유의미한 뚜렷한 개선을 확인했음.



이와 같이 GMS70은 정신적 건강개선에 매우 효과적인 천연물유래 소재로서 평가되었으며 추가로 MFS 설문을 통해서도 다차원피로척도를 확인했음. 이 설문은 총 19문항으로 전반적 피로도 8문항, 일상기능장애 6문항, 상황적 피로 5문항으로 나뉘어져있음. 각 문항은 19점에서 133점으로 높을수록 피로정도가 높게

평가됨. GMS70을 한달간 지속적으로 섭취한 경우, 섭취전후 약 9점 이상의 피로도 감소로 통계적으로 유의미한 개선을 확인하였으며 이는 대조군과 비교해서도 의미 있는 개선을 보였음. 더욱이, GMS70의 지속적인 섭취는 혈액검사를 통해서도 확인되었음. 이 과정에서 과로, 피로, 정신건강 등을 반영하는 다양한 바이오마커의 통계적 유의미한 개선도 확인했음.

본 연구팀에서 다음과 같은 설계에 따라 피험자수 선정 및 통계분석을 진행하였다. 천연식의약 소재의 인체적용시험으로 시험결과의 신뢰성을 높이기 위하여 뼈뼉림을 최소화하기 위하여 이중눈가림과 무작위배정으로 설계하였으며 연구설계의 형태, 1차 기능성 평가변수의 형태, 시험집단의 수, 연구기간, 시험군과 대조군의 할당비, 귀무가설, 대립가설, 유의수준, 검정력, 중도탈락율 등을 고려하여 진행되어야 한다.

연구에 적당한 피험자수 산정을 위하여 기능성소재의 섭취에 따른 기존 연구결과를 활용한다. 해당 연구에서 섭취 전후 점수차이에 따라 점수 ± 표준오차의 개체간의 차이값 평균과 오차값을 확인하고, 시험물의 주효과변수의 평균대비 대조위약군에서의 주요변수의 평균 차이값과 분산값을 계산한다.

인체적용시험의 유효한 피험자수를 산정하기 위하여 다음을 가정하였다.

- 1) 두 군간의 평행설계
- 2) 유의수준 (level of significance), 5%, 양측검정
- 3) 제 2종 오류( $\beta$ )는 0.2로 하여 검정력(power of the test)은 80%를 유지
- 4) 시험군과 대조군의 시험예수의 비율은 1
- 5) 시험식품 섭취 후 시험군과 대조군의 기능평 평가변수 비교

가정된 방법에 따라 다음의 변수에 따른 검정식을 사용하여 피험자 수를 산정하였다.

- ① 차이검정 (Inequality test) - 1차 기능성 평가변수가 연속형 변수인 경우

$$n_c = kn_t, n_t = \frac{(z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \sigma^2 (1 + 1/k)}{(\mu_t - \mu_c)^2}$$

- ② 비열등성 검정 (Non-inferiority test) / 우월성 검정 (Superiority test)- 1차 기능성 평가변수가 연속형 변수인 경우

$$n_c = kn_t, n_t = \frac{(z_\alpha + z_\beta)^2 \sigma^2 (1 + 1/k)}{(\mu_t - \mu_c - \delta)^2}$$

- ③ 동등성 검정(Equivalence test) - 1차 기능성 평가변수가 연속형 변수인 경우

$$n_c = kn_t, n_t = \frac{(z_\alpha + z_{\beta/2})^2 \sigma^2 (1 + 1/k)}{(|\mu_t - \mu_c| - \delta)^2}$$

- ④ 차이검정 (Inequality test) - 1차 기능성 평가변수가 이항변수인 경우

$$H_0 : p_t = p_c \text{ vs. } H_1 : p_t \neq p_c$$

$$n_c = kn_t, n_t = \frac{(z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \left[ \frac{p_c(1-p_c)}{k} + p_t(1-p_t) \right]}{(p_t - p_c)^2}$$

- ⑤ 비열등성 검정 (Non-inferiority test)?우월성 검정 (Superiority test) - 1차 기능성 평가변수가 이항변수인 경우

$$H_0 : p_t \leq p_c + \delta \text{ vs. } H_1 : p_t > p_c + \delta$$

- ⑥ 동등성 검정(Equivalence test) - 1차 기능성 평가변수가 이항변수인 경우

$$n_c = kn_t, n_t = \frac{(z_\alpha + z_\beta)^2}{(p_t - p_c)^2} \left[ \frac{p_c(1-p_c)}{k} + p_t(1-p_t) \right]$$

$$H_0 : |p_t - p_c| \geq \delta \text{ vs. } H_0 : |p_t - p_c| < \delta$$

$$n_c = kn_t, n_t = \frac{(z_\alpha + z_{\beta/2})^2}{(p_t - p_c)^2} \left[ \frac{p_c(1-p_c)}{k} + p_t(1-p_t) \right]$$

본 인체적용 시험에 있어서 평행설계-1차 기능성 평가변수가 연속형 변수로 계산을 하여 산출되었으며 탈락율을 예측하여 모집하여 인체적용시험을 진행하였다.

인체적용시험 및 간이임상시험에서 대상피험자는 무작위로 약 30명 대조군 30명 실험군으로 이중맹검방법을 통해 연구되었다.

### 연구결과에 대한 자료 분석 및 통계 분석

인체적용시험의 천연물 식의약 소재의 기능성 평가에 대한 통계 분석 방법은 다음과 같다.

- 통계분석은 SPSS 프로그램(SPSS 12.0 system software)을 이용하였으며, 동일한 군 내의 섭취 전후 비교와 두 군 간의 개선율의 비교를 각각 다음과 같은 방법으로 통계분석하여 P<0.05 일 때 유의한 것으로 판단함.

- 짝지어진 t 검정

- 각 군(실험군 또는 대조군)내에서의 섭취 전후 평균값을 각 군 간 비교
- 동일한 표본을 대상으로 시간 간격을 두고 데이터를 두 번 수집해서 각 데이터 평균 간 차이 검증에 사용하는 방법

$$\bar{D} = \frac{\sum_{i=1}^n (X_{A,i} - X_{B,i})}{n}, S_D = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{A,i} - X_{B,i} - \bar{D})^2}{n-1}}$$

- 이표본 t 검정

- 두 군(실험군과 대조군)의 섭취 후 개선율의 평균값을 두 군 간 비교
- 2개의 독립적인 표본, 즉 상이한 두 집단에 대한 평균을 비교하는 통계분석법

- 등분산이 가정된 경우

$$T = \frac{(\bar{X} - \bar{Y}) - (\mu_1 - \mu_2)}{S_P \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}} \sim t(n+m-2)$$

$$S_P^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 + \sum_{j=1}^m (Y_j - \bar{Y})^2}{(n-1) + (m-1)}$$

- 등분산이 가정되지 않은 경우

$$T = \frac{(\bar{X} - \bar{Y}) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n} + \frac{S_2^2}{m}}} \sim t(\phi)$$

$$\phi = \frac{\left( \frac{S_1^2}{n} + \frac{S_2^2}{m} \right)^2}{\frac{S_1^2}{n} / (n-1) + \frac{S_2^2}{m} / (m-1)}$$

위와 같은 T검정통계량을 각각의 값에 대입하여 t값을 구하고 이를 바탕으로 귀무가설의 기각 여부에 따라 통계 분석이 진행된다.

## ⑤ 제 2-2 협동과제: 천연물 식의약소재 효능 임상검증

### (가) 1차년도

#### □ 여성건강 개선 임상 효능 평가

아래 그림과 같이 여성 갱년기 증상을 보이는 중년의 피험자의 증상이 개선되는 것을 확인할 수 있었으며 12가지 항목을 각각 분석한 결과에서도 전체적으로 통계학적으로 유의하게 개선되는 것을 확인할 수 있었음.

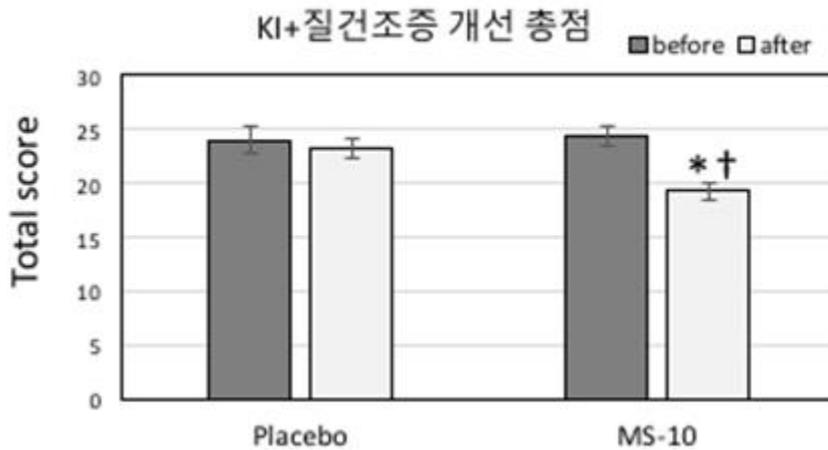


그림3-5-1. 피험자의 쿠퍼만 수치

3개월간 500mg의 천연물 유래 복합 추출물MS-10을 섭취한 결과 쿠퍼만 수치와 질건조증이 개선되는 것을 확인함.

#### □ 비뇨배뇨기능 개선을 위한 인체적용시험

##### ● 전립선증상 점수 설문 방법

I-PSS (International Prostate symptom score, 국제전립선증상점수)는 전립선 건강 저하로 인해 나타날 수 있는 하부 요로 증상 및 그에 따른 삶의 불편함을 객관적으로 평가하기 위해 고안된 검사임. 세계 각국의 언어로 번역되어 타당성이 입증되어 전세계적으로 사용되고 있으며, 국내에서도 검사법의 타당성과 신뢰도가 입증되어 현재 우리나라의 전립선 건강 평가에 사용되는 대표적인 검사법을 사용함.

##### ● 전립선증상 점수 설문 결과

간이 인체적용시험을 통해서 나타난 결과에 따르면 400mg을 매일 섭취한 실험군의 경우 전립선증상 개선이 뚜렷하게 나타나며 전체적으로 비뇨배뇨 장애 증상에 통계학적으로 유의한 개선을 확인할 수 있었음.

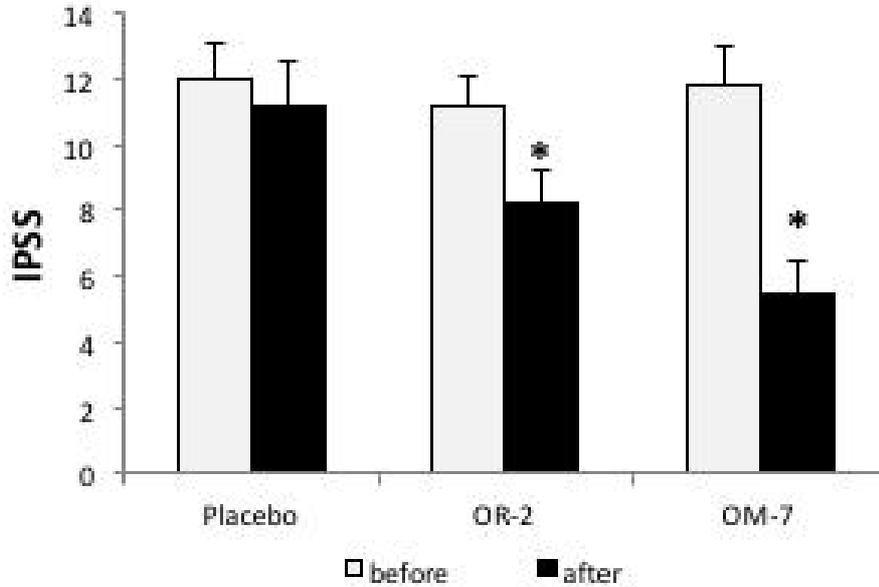


그림3-5-2. 피험자의 IPSS 수치

1개월간 천연물 유래 복합 추출물 400mg/일 섭취한 피험자의 IPSS 결과.

#### □ 전임상 생리적 평가: 질점막 면역증강의 후성유전학적 조절 평가 기술 개발

##### ● 연구의 목적

질 점막의 자연 면역 항상성 유지에 중요한 항균펩티드 human  $\beta$ -defensin-1 (HBD-1)의 전사를 촉진시킬 수 있는 질 내 정상 세균총(normal commensal) 중 *Lactobacillus* spp.의 후성유전적 활성 소재 활용 가능성 연구.

##### ● 연구의 배경

○ 항균펩티드(antimicrobial peptides)는 숙주의 자연 면역 기전에 작용하는 주로 양전하를 띠는 저분자량 펩티드로서, 척추동물의 외부에 노출되는 점막(비뇨생식관, 눈, 구강, 피부, 폐, 기관지), 순환세포(백혈구, 혈소판), 장점막(인간에서는 주로 Paneth cell이 주된 원천임)에서 발현됨.

○ HBD-1 유전자는 인체 genome 상의 8p23.1에 위치하며, 염색체 8p 지역의 빈번한 결실은 전립선암과 신장암 등에서 관찰됨. HBD-1은 유일하게 다른 defensins와 달리 피부, 호흡기, 그리고 비뇨기관을 포함한 다양한 상피 조직에서 constitutive하게 발현되는 특징이 있음. 특히 비뇨기계 종양의 강력한 tumor suppressor 유전자로 인식됨.

○ *Lactobacillus*는 주로 젖산의 생산을 통한 낮은 pH 유지 등으로 세균성 질염(bacterial vaginosis) 등을 일으키는 병원균을 직접 퇴치하는 기능을 담당하고 있으며, 다양한 *Lactobacillus* spp.의 조성은 건강한 질 내 미세 환경의 바이오마커로 간주 가능함.

○ 숙주로서의 인체와 미생물 사이의 상호작용은 병원성 세균 감염 시뿐만 아니라, 특정 기관에서 공생하고 있는 정상균과 숙주 사이에서도 발생함. 특히 병원성 세균들은 주로 감염된 세포에서 histone modification이나 chromatin remodeling을 유도, 궁극적으로 숙주의 선천 면역 반응 체계를 약화시키는 결과를 초래함.

##### ● 연구의 내용 및 방법

○ 인체 정상 질 내에서 세 번째로 많이 존재하는 *Lactobacillus gasseri* 균주를 VK2/E6E7 세포주에 처리한 후, HBD-1 유전자의 발현 변화를 quantitative real-time PCR (qPCR) 방법으로 조사함.

○ 인체 질 상피세포주 VK2/E6E7에 histone deacetylase (HDAC) 저해제 trichostatin A (TSA)를 처

리한 후, HBD-1 유전자의 발현 변화를 qPCR 방법으로 조사함.

○ 상기 세포주를 이용하여 chromatin immunoprecipitation (ChIP) 실험을 수행한 후, HBD-1 프로모터의 특정 위치에서 *L. gasseri* 처리에 의해 변화된 histone modification 여부를 확인함.

● 연구의 결과

○ 인체 질 점막 상피세포주에서 *L. gasseri* 처리에 의해 HBD-1의 발현 변화 여부 및 후성유전적 조절 기전 조사.

○ 질 상피세포주 VK2/E6E7은 노출된 *L. gasseri*의 농도(colony-forming units, CFU) 의존적으로 HBD-1 발현이 증가되며(그림 A), 또한 histone deacetylase (HDAC) 저해제 trichostatin A (TSA) 처리에 의해서도 HBD-1 발현 유도가 관찰됨(그림 B).

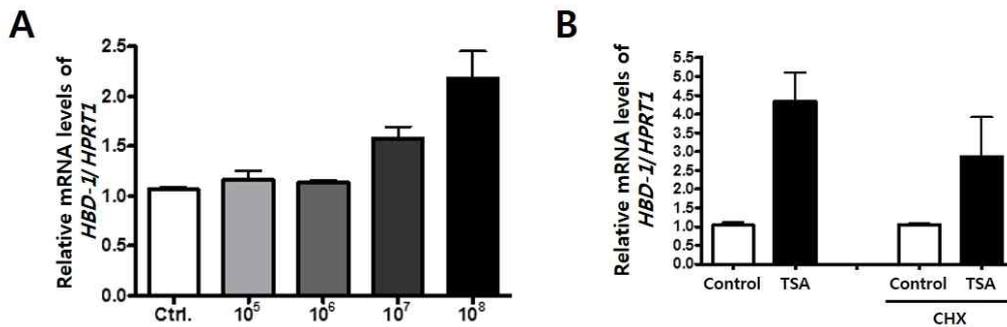


그림3-5-3. 질 상피세포주 VK2/E6E7에서 *L. gasseri* 처리와 histone acetylation 유도에 의한 HBD-1 mRNA의 발현

질 상피세포주 VK2/E6E7에서 *L. gasseri* 처리와 histone acetylation 유도에 의한 HBD-1 mRNA의 증가. HBD-1 mRNA 발현 변화를 단백질 합성 저해제 cycloheximide (CHX) 전처리 유무로 구분해서 qRT-PCR로 확인.

○ 인체 질 점막 상피세포주에서 *L. gasseri* 처리에 의해 유도되는 HBD-1 프로모터의 주요 histone modification 변화 여부 조사.

○ 질 상피세포주 VK2/E6E7은 노출된 *L. gasseri* 처리 후, 활성화된 염색질 마커인 H2A.Z와 lysine 4 잔기가 trimethylation된 H3 (H3K4me3), acetylated H3 (AcH3), 그리고 불활성화된 염색질 마커인 lysine 20 잔기가 trimethylation된 H4 (H4K20me3) 항체를 이용하여 chromatin immunoprecipitation (ChIP) 실험을 수행함

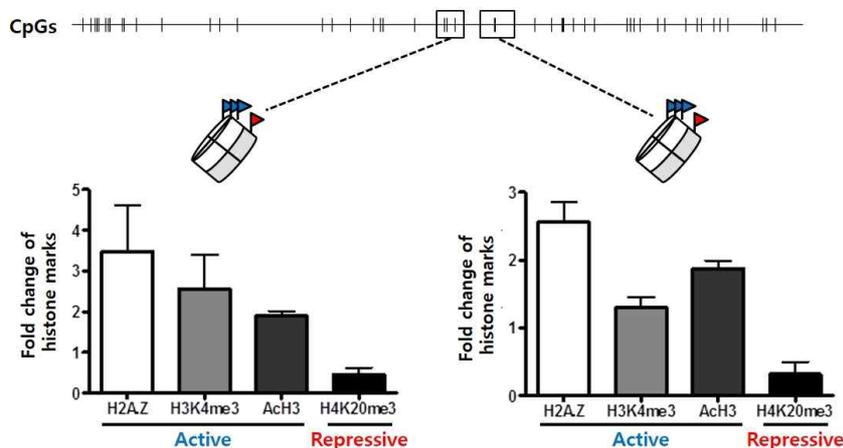


그림3-5-4. 질 상피세포주 VK2/E6E7에서 *L. gasseri* 처리에 의해 유도되는 histone modifications 요약 모식도

□ 전임상 생리적 평가: 피부 상피의 보습 및 방어 단백질의 방어 유전자의 후성유전학적 조절

● 연구의 목적

비정상적인 상피 장벽의 기능 저하로 인해 발생하는 다양한 인체 피부 질환(예를 들어 아토피피부염)에서 유전자 발현 억제를 통해 기능이 소실된 Filaggrin (FLG)의 후성유전적 조절에 관련된 활성 소재 활용 가능성 연구.

● 연구의 배경

○ 피부는 인체의 가장 외부에 존재하는 기관으로 체내 수분을 보호하고 외부 침입 인자(항원, 감염원 등)의 내부 침입을 보호하는 필수적인 장벽 기능을 수행함. Filaggrin은 피부 외층에서 가장 많이 발현되는 단백질로서, 피부장벽의 정상적 기능에 매우 중요한 역할을 함. FLG 유전자의 돌연변이는 가장 흔한 병원성 단일 유전자 이상(single-gene defects) 중 하나이며, 특히 기능 소실(loss-of-function) 돌연변이는 아토피피부염의 강력한 위험 인자로 알려져 있음. Filaggrin 변이들은 아토피피부염, 천식, 알레르기비염의 주 소인으로 보고되었으며, 변이가 있는 경우 좀 더 심하고, 성인 아토피피부염으로 지속되는 임상 양상으로 나타날 수 있는 가능성이 있음.

● 연구의 내용 및 방법

○ 인체 각질형성 세포주 및 표피암 세포주에서 FLG mRNA의 quantitative real-time PCR (qPCR) 분석을 수행함.

○ FLG 발현이 억제되어있는 인체 각질형성 세포주에 DNA 메틸화 효소 저해제를 처리했을 때, methylation 양상이 변화되는 개별적인 CpG 위치를 bisulfite genomic sequencing 실험으로 결정함.

○ 인체 각질형성 세포주(keratinocyte)에 histone deacetylase (HDAC) 저해제 trichostatin A (TSA)를 처리한 후, FLG 유전자의 발현 변화를 quantitative real-time PCR (qPCR) 방법으로 조사함.

○ Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 실험을 이용, FLG 프로모터의 특정 위치에서 TSA 처리에 의해 유도된 histone modification 변화를 확인함.

● 연구의 결과

○ 각질형성 세포주와 표피암 세포주에서 FLG 유전자의 후성유전적 발현 조절.

· 그림 3-5와 같이 FLG mRNA 발현이 저하된 정상 인체 각질형성 세포주 NHEK(normal human embryonic keratinocyte)와 표피암(epidermoid carcinoma) 세포주 A-431에서 DNA demethylation을 통해 FLG 발현 증가가 유도됨을 확인함.

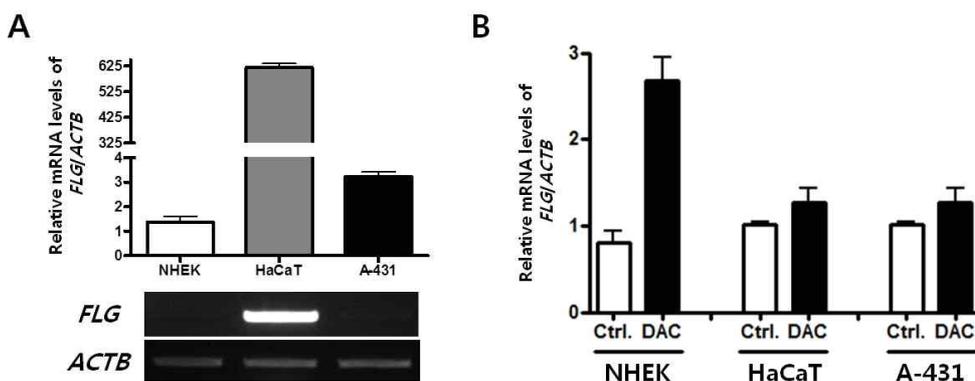


그림3-5-5. 각질형성 세포주와 표피암 세포주에서 DNA methylation 억제에 의한 FLG mRNA 발현

각질형성 세포주와 표피암 세포주에서 DNA methylation 억제에 의한 FLG mRNA 증가. A. NHEK, HaCaT, A-431 세포주에서 FLG mRNA 발현 양상을 조사한 qRT-PCR (upper)과 RT-PCR (lower) 결과. B. 동일 세포주에 DNA methyltransferase (DNMT) 저해제 2'-deoxy-5-azacytidine (DAC) 처리 후, FLG mRNA 발현 변화의 qPCR 조사 결과. (ACTB, β-actin)

○ 인체 각질형성 세포주와 표피암 세포주에서 FLG 유전자의 CpG methylation 정량 분석.

· 그림 6에서와 같이, bisulfite pyrosequencing을 통해 DNA 메틸화 효소의 저해제인 DAC 처리 시 NHEK 세포주에서는 주로 CpG 1과 CpG 3 위치가, 그리고 HaCaT 세포주에서는 CpG 2와 CpG 3 위치가 주로 methylation이 풀리는 것을 확인하였으며, A-431 세포주에서는 CpG 2 위치 특이적으로 methylation이 풀리는 것을 확인하였음.

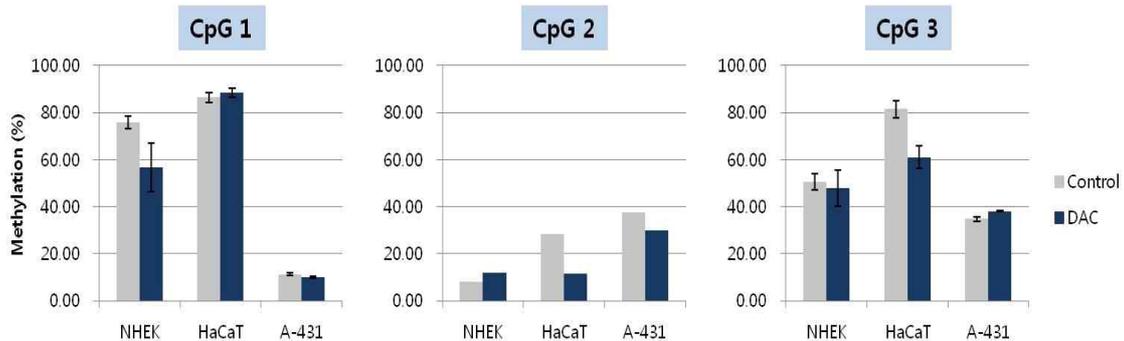


그림3-5-6. 인체 각질형성 세포주와 표피암 세포주에서 FLG 유전자의 프로모터 부위의 CpG 1, CpG 2, 그리고 CpG 3 위치에 대한 bisulfite pyrosequencing 분석

○ 인체 각질형성 세포주에서 FLG 유전자의 histone modification 정량 분석.

· 그림 7에서와 같이, chromatin immunoprecipitation 실험을 통해 히스톤 탈아세틸화 효소의 저해제인 TSA 처리 시 NHEK 세포주에서는 주로 CpG 1, CpG 2, 그리고 CpG 3 위치를 포함한 뉴클레오솜에서의 acetylated histone H3 (AcH3)의 증가를 확인하였음.

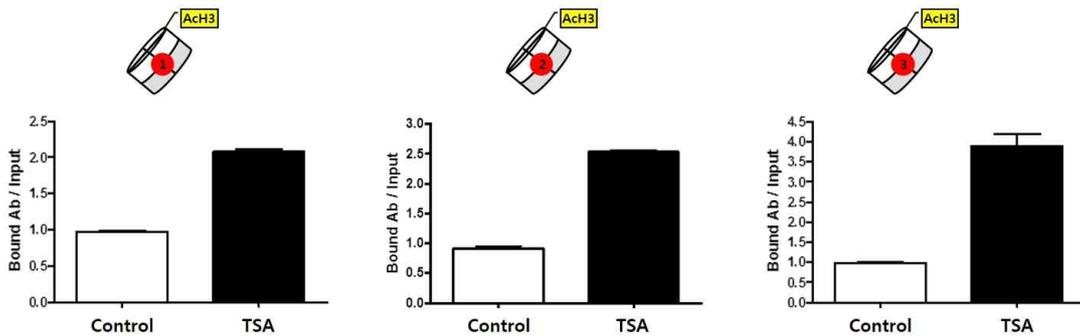


그림3-5-7. 인체 각질형성 세포주 NHEK에서 FLG 유전자의 프로모터 부위의 CpG 1, CpG 2, 그리고 CpG 3 위치에 대한 histone acetylation 분석

(나) 2차년도

□ 여성건강 임상보고서 작성 및 식약처 비노기건강개선 개별인정 신청 협력

- 소재의 여성갱년기 신체/정신 증상 개선 효과 평가
- 갱년기 증후군의 성적 능력 개선 평가
- 혈액검사를 통해 혈액지표 변화 평가
  - 심혈관계 생화학적 지표
  - 근골격계 건강 생화학적 지표
  - 각종 스트레스 지표

□ 보고서 작성 및 IRB 연구결과 보고서 심의 통과

연구보고서명
제1보고서 : MS-10의 질건조 및 여성건강 개선 (MS-10의 여성건강 증진)
제2보고서 : 천연복합추출물 MS-10의 인체 생리활성 및 뼈건강 개선
제3보고서 : 천연복합추출물 MS-10의 여성건강 및 질건조개선

중앙대학교 생명윤리위원회

1쪽



## 결과통지서

2016년 1월 25일에 접수된 연구결과보고 심의 요청서에 대하여 중앙대학교 생명윤리위원회에서 심의하여 다음과 같이 결정하였음을 통지합니다.

과제번호		관리번호	제 2011-10-03호			
연구과제명	천연소재 추출물의 생리활성기능 인체시험					
연구책임자	성명	명순철	소속	의과대학 의학부	직위	교수

심의대상	연구 결과보고서
심의일자	2016.02.23.
심의위원회	중앙대학교 생명윤리위원회
심의종류	<input type="checkbox"/> 정규심의 <input checked="" type="checkbox"/> 신속심의
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 수정후승인 <input type="checkbox"/> 수정후신속심의 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 중지/보류
승인일자	2016.02.24.
승인번호	제 2011-10-03호
심의의견	연구 계획에 따라 연구가 진행되었음을 연구종료 보고서를 심의하여 확인 함.
심의된 서류	- 제1보고서 : MS-10의 질건조 및 여성건강 개선 (MS-10의 여성건강 증진) + Supplementary data 첨부 - 제2보고서 : 천연복합추출물 MS-10의 인체 생리활성 및 뼈건강 개선 (MS-10의 인체생리활성 개선) - 제3보고서 : 천연복합추출물 MS-10의 여성건강 및 질건조개선 + Supplementary data 첨부

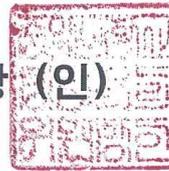
본 통지서에 기재된 사항은 중앙대학교 생명윤리위원회에 기록된 내용과 일치함을 증명합니다.  
 본 중앙대학교 생명윤리위원회는 생명윤리 및 안전에 관한 법률과 관련 법규를 준수합니다.  
 본 연구와 이해상충(Conflict of Interest)이 있는 위원이 있을 경우 연구의 심의에서 배제하였습니다.  
 본 통지서의 사본은 중앙대학교 생명윤리위원회에서 보관합니다.

※ 모든 연구자들은 아래의 사항을 준수하여야 합니다.

- 1) 승인된 계획서에 따라 연구를 수행하여야 합니다.
- 2) 위원회의 승인을 받은 동의서를 사용하여야 합니다.
- 3) 모국어가 한국어가 아닌 연구대상자들에게는 승인된 동의서를 연구대상자의 모국어로 인증된 번역본을 사용할 것이며 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회의 승인을 받아야 합니다.
- 4) 연구진행에 있어 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행하여야 하며 연구대상자들의 보호를 위해 취해진 어떠한 응급상황에서의 변경도 즉각 위원회에 보고하여야 합니다.
- 5) 위원회에서 승인된 계획서에 따라 등록된 어떠한 연구대상자라도 사망, 입원, 심각한 질병에 대하여는 위원회에 서면으로 보고하여야 합니다.
- 6) 연구 또는 연구대상자의 안전에 대해 유해한 영향을 미칠 수 있는 어떠한 새로운 정보도 즉각적으로 위원회에 보고하여야 합니다.
- 7) 위원회의 요구가 있을 때에는 연구의 진행과 관련된 보고를 위원회에 제출하여야 합니다.
- 8) 위원회가 심의한 과제에 대해 조사 및 감독 차원에서 현장점검을 실시할 시 원활한 점검절차 진행을 위해 연구자는 연구진행과 관련된 서류를 준비하고 협조하여야 합니다.
- 9) 연구대상자 모집광고를 사용할 시에는 사용 전에 위원회의 승인을 받아야 합니다.
- 10) 동의는 강제 혹은 부당한 영향이 없는 상태에서 충분한 설명에 근거하여 수행되어야 하며, 잠재적인 연구대상자에게 연구에 참여여부를 고려할 수 있도록 충분히 기회를 제공하여야 합니다.
- 11) 연구계획서 승인을 광고나 홍보에 사용할 수 없습니다.
- 12) 중앙대학교 생명윤리위원회의 심의결과 시정요구에 대해 모두 이행 및 충족될 경우에만 연구를 진행할 수 있습니다.
- 13) 중앙대학교 생명윤리위원회가 시정 및 보완을 요구한 경우 시정·보완 계획을 1개월 이내에 본 위원회에 제출하여야 합니다. 심의일로부터 1년 이내에 시정·보완 계획을 제출하지 않은 경우 심의가 무효화될 수 있습니다.
- 14) 시정계획은 신속심으로 진행되고 보완계획은 정규심으로 진행되며, 승인일과 승인 유효기간은 심의 결과에 따라 결정됩니다.
- 15) 승인기간 이후에도 연구를 지속하기 위해서는 적어도 승인 만료 2개월 전까지 연구의 진행 상황에 대하여 중간보고를 하여야 합니다.
- 16) 연구 종료 후 3개월 이내에 종료보고를 하여야 합니다.
- 17) 연구와 관련된 기록은 연구가 종료된 시점을 기준으로 최소 3년간 보관하여야 합니다.

2016년 2월 24일

중앙대학교 생명윤리위원장 (인)



본 통지서에 기재된 사항은 중앙대학교 생명윤리위원회에 기록된 내용과 일치함을 증명합니다.  
 본 중앙대학교 생명윤리위원회는 생명윤리 및 안전에 관한 법률과 관련 법규를 준수합니다.  
 본 연구와 이해상충(Conflict of Interest)이 있는 위원이 있을 경우 연구의 심의에서 배제합니다.  
 본 통지서의 사본은 중앙대학교 생명윤리위원회에서 보관합니다.

□ 식약처 개별인정 심의 과정중 보완 사항 있어 연구결과 보고서 보완작성 재심의 신청 심의 통과

중앙대학교 생명윤리위원회

1쪽



## 결과통지서

2016년 4월 19일에 접수된 연구결과보고 심의 요청서에 대하여 중앙대학교 생명윤리위원회에서 심의하여 다음과 같이 결정하였음을 통지합니다.

과제번호				관리번호	제 2011-10-03호	
연구과제명	천연소재 추출물의 생리활성기능 인체시험					
연구책임자	성명	명순철	소속	의과대학 의학부	직위	교수

심의대상	연구 결과보고서
심의일자	2016.04.20
심의위원회	중앙대학교 생명윤리위원회
심의종류	<input type="checkbox"/> 정규심의 <input checked="" type="checkbox"/> 신속심의
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 수정후승인 <input type="checkbox"/> 수정후신속심의 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 중지/보류
승인일자	2016.04.22
승인번호	제 2011-10-03호
심의의견	연구 계획에 따라 연구가 진행되었음을 연구종료 보고서를 심의하여 확임 함.
심의된 서류	- 제1보고서 : MS-10의 질건조 및 여성건강 개선 (MS-10의 여성건강 증진) + Supplementary data 첨부 - 제2보고서 : 천연복합추출물 MS-10의 인체 생리활성 및 뼈건강 개선 (MS-10의 인체생리활성 개선) - 제3보고서 : 천연복합추출물 MS-10의 여성건강 및 질건조개선 + Supplementary data 첨부

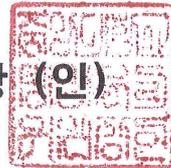
본 통지서에 기재된 사항은 중앙대학교 생명윤리위원회에 기록된 내용과 일치함을 증명합니다.  
 본 중앙대학교 생명윤리위원회는 생명윤리 및 안전에 관한 법률과 관련 법규를 준수합니다.  
 본 연구와 이해상충(Conflict of Interest)이 있는 위원이 있을 경우 연구의 심의에서 배제하였습니다.  
 본 통지서의 사본은 중앙대학교 생명윤리위원회에서 보관합니다.

※ 모든 연구자들은 아래의 사항을 준수하여야 합니다.

- 1) 승인된 계획서에 따라 연구를 수행하여야 합니다.
- 2) 위원회의 승인을 받은 동의서를 사용하여야 합니다.
- 3) 모국어가 한국어가 아닌 연구대상자들에게는 승인된 동의서를 연구대상자의 모국어로 인증된 번역본을 사용할 것이며 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회의 승인을 받아야 합니다.
- 4) 연구진행에 있어 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행하여야 하며 연구대상자들의 보호를 위해 취해진 어떠한 응급상황에서의 변경도 즉각 위원회에 보고하여야 합니다.
- 5) 위원회에서 승인된 계획서에 따라 등록된 어떠한 연구대상자라도 사망, 입원, 심각한 질병에 대하여는 위원회에 서면으로 보고하여야 합니다.
- 6) 연구 또는 연구대상자의 안전에 대해 유해한 영향을 미칠 수 있는 어떠한 새로운 정보도 즉각적으로 위원회에 보고하여야 합니다.
- 7) 위원회의 요구가 있을 때에는 연구의 진행과 관련된 보고를 위원회에 제출하여야 합니다.
- 8) 위원회가 심의한 과제에 대해 조사 및 감독 차원에서 현장점검을 실시할 시 원활한 점검절차 진행을 위해 연구자는 연구진행과 관련된 서류를 준비하고 협조하여야 합니다.
- 9) 연구대상자 모집광고를 사용할 시에는 사용 전에 위원회의 승인을 받아야 합니다.
- 10) 동의는 강제 혹은 부당한 영향이 없는 상태에서 충분한 설명에 근거하여 수행되어야 하며, 잠재적인 연구대상자에게 연구에 참여여부를 고려할 수 있도록 충분히 기회를 제공하여야 합니다.
- 11) 연구계획서 승인을 광고나 홍보에 사용할 수 없습니다.
- 12) 중앙대학교 생명윤리위원회의 심의결과 시정요구에 대해 모두 이행 및 충족될 경우에만 연구를 진행할 수 있습니다.
- 13) 중앙대학교 생명윤리위원회가 시정 및 보완을 요구한 경우 시정·보완 계획을 1개월 이내에 본 위원회에 제출하여야 합니다. 심의일로부터 1년 이내에 시정·보완 계획을 제출하지 않은 경우 심의가 무효화될 수 있습니다.
- 14) 시정계획은 신속심의로 진행되고 보완계획은 정규심의로 진행되며, 승인일과 승인 유효기간은 심의 결과에 따라 결정됩니다.
- 15) 승인기간 이후에도 연구를 지속하기 위해서는 적어도 승인 만료 2개월 전까지 연구의 진행 상황에 대하여 중간보고를 하여야 합니다.
- 16) 연구 종료 후 3개월 이내에 종료보고를 하여야 합니다.
- 17) 연구와 관련된 기록은 연구가 종료된 시점을 기준으로 최소 3년간 보관하여야 합니다.

2016년 4월 22일

중앙대학교 생명윤리위원장 (인)



본 통지서에 기재된 사항은 중앙대학교 생명윤리위원회에 기록된 내용과 일치함을 증명합니다.  
 본 중앙대학교 생명윤리위원회는 생명윤리 및 안전에 관한 법률과 관련 법규를 준수합니다.  
 본 연구와 이해상충(Conflict of Interest)이 있는 위원이 있을 경우 연구의 심의에서 배제합니다.  
 본 통지서의 사본은 중앙대학교 생명윤리위원회에서 보관합니다.

□ 비뇨기건강개선 임상 실험

- 시험 대상자: 여성(대조군 60, 실험군 60), 남성(대조군 30, 실험군 30)에 대하여 시행함.
- 투여량 및 기간: 150 mg/일, 3개월
- 여성: 투여 전후 OAB-V8 설문지

다음항목으로 지난 1달간 생활에 얼마나 지장 받았는지 정도를 해당칸에  표시하여 주십시오.

항목	전혀	약간	이느	꽤	많이	아주
	받지않음	지장	정도	지장	지장	지장
1. 낮에 자주 소변을 보는 것	0	1	2	3	4	5
2. 밤에 자다가 소변을 보는 것	0	1	2	3	4	5
3. 밤에 소변을 보기 위해 깨어나는 것	0	1	2	3	4	5
4. 본의 아니게 약간의 소변을 지리는 것	0	1	2	3	4	5
5. 소변을 보고 싶은 불편한 충동	0	1	2	3	4	5
6. 예고 없이 갑자기 소변을 보고 싶은 충동	0	1	2	3	4	5
7. 억제할수없이 소변을 보고 싶은 충동	0	1	2	3	4	5
8. 소변 보고 싶은 느낌과 함께 소변을 지리는 것	0	1	2	3	4	5

● 남성: 투여 전후 국제전립선증상설문지

국제 전립선 증상점수표							
국제 전립선 증상점수표 International Prostate Symptom Score: IPSS							
병력번호 _____	성명 _____	성별 M/F _____	나이 _____세				
평소 (지난 한 달간) 소변을 볼 때의 경우를 생각하셔서 대략 5번쯤 소변을 본다고 하면 몇 번이나 다음의 불편한 증상이 나타나는가를 생각하셔서 해당 칸에 V표시를 하여 주십시오.							
국제 전립선 증상점수표 (IPSS)							
	전혀 없음	5번 중 한 번	5번 중 1-2번	5번 중 2-3번	5번 중 3-4번	거의 항상	
1. 평소 소변을 볼 때 다 보았는데도 소변이 남아있는 것같이 느끼는 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5	
2. 평소 소변을 본 후 2시간 이내에 다시 소변을 보는 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5	
3. 평소 소변을 볼 때 소변줄기가 끊어져서 다시 힘주어 소변을 보는 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5	
4. 평소 소변을 참기 어려운 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5	
5. 평소 소변줄기가 약하다거나 가늘다고 생각한 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5	
6. 평소 소변을 볼 때 소변이 금방 나오지 않아서 아랫배에 힘을 주어야 하는 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5	
7. 평소 잠자다 일어나서 소변을 보는 경우가 하룻밤에 몇 번이나 있습니까?	0	1	2	3	4	5	
생활 만족도							
	아무 문제 없다	괜찮다	대체로 만족	만족, 불만족 반반	대체로 불만	괴롭다	견딜 수 없다
지금 소변을 보는 상태로 평생을 보낸다면 당신은 어떻게 느껴겠습니까?	0	1	2	3	4	5 6	
총 증상점수 _____점				생활불편점수 _____점			
국제 전립선 증상점수표는 전립선비대증 환자의 증상을 점수로 매겨 증상의 정도를 비교·평가하는 데 사용된다.							

● 결과: 여성

○ 응답에 따라 0 (전혀 지장 받지 않음) 부터 5 (아주 많이 지장 받음)까지 6점의 증상단계로 구분하여 1번부터 8번까지의 문항의 점수를 합산함 (남자의 경우 2점 가산) 8점 이상인 경우 과민성방광증후군으로 진단해야 함.

○ OAB-V8 스코어

- NY 추출물; 섭취 전, 6.54 ± 1.21 / 섭취 후, 4.75 ± 0.62로 개선
- Placebo; 섭취 전, 6.12 ± 1.11 / 섭취 후, 5.77 ± 1.01 었음

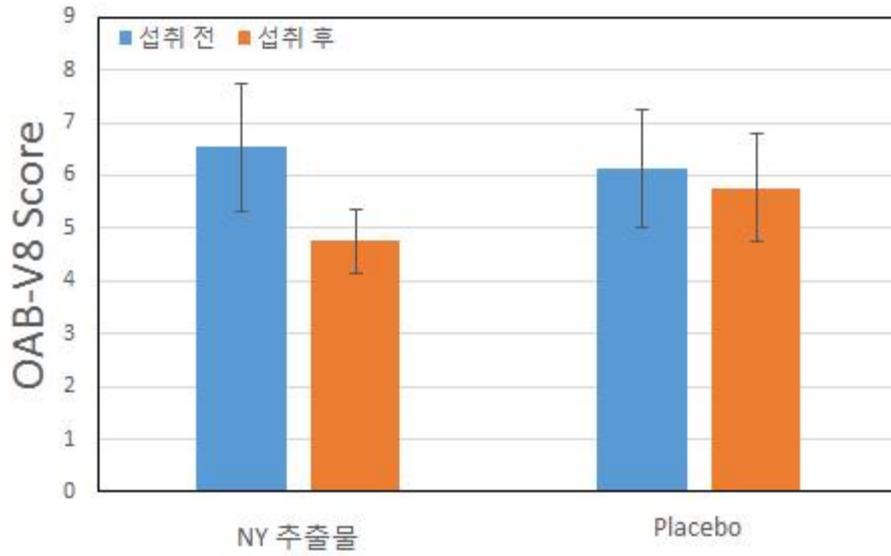


그림 3-5-8. NY 추출물의 OAB-V8 수치 결과

○ OAB-V8 개선율  
 ; NY 추출물, 24.45 ± 5.12 % vs. Placebo, 5.11 ± 4.12 % 였음

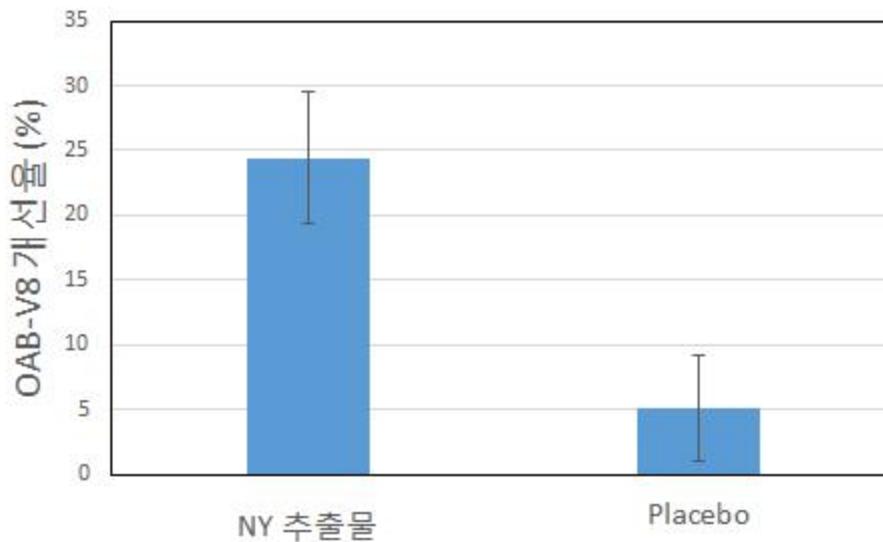


그림 3-5-9. NY 추출물의 OAB-V8 개선률 결과

● 결과:남성

○ IPSS 스코어

- NY 추출물; 섭취 전, 12.14 ± 1.68 / 섭취 후, 8.14 ± 1.24 로 개선
- Placebo; 섭취 전, 13.46 ± 1.65 / 섭취 후, 11.36 ± 1.45 였음

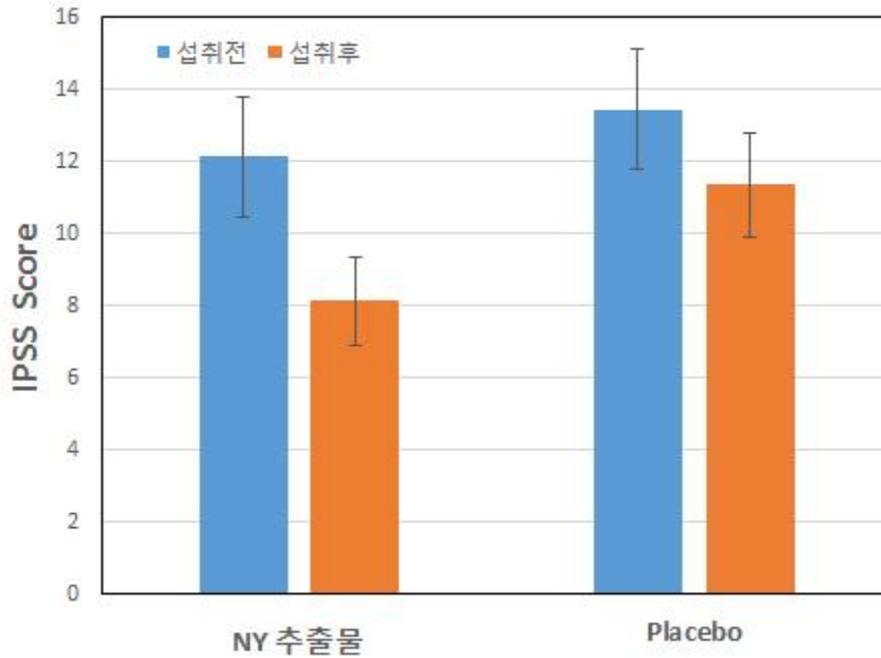


그림 3-5-10. NY 추출물의 IPSS 수치 결과

○ IPSS 개선율  
 ; NY 추출물, 31.02 ± 7.12 vs. Placebo, 10.24 ± 8.42 있음

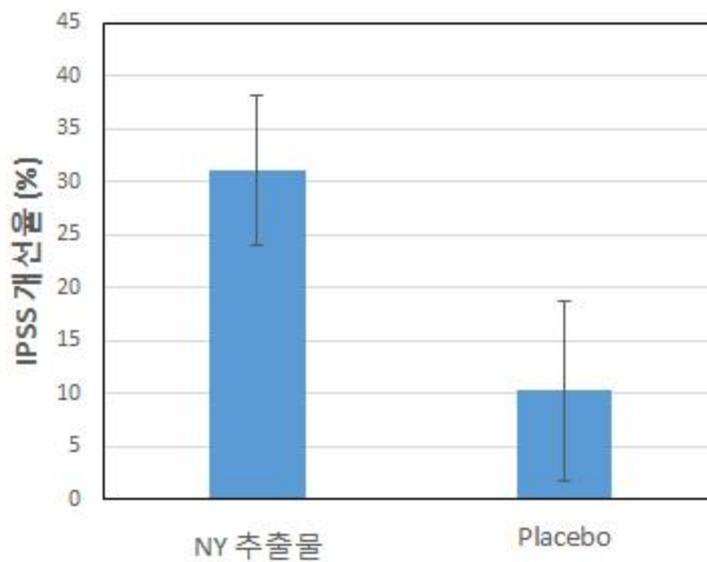
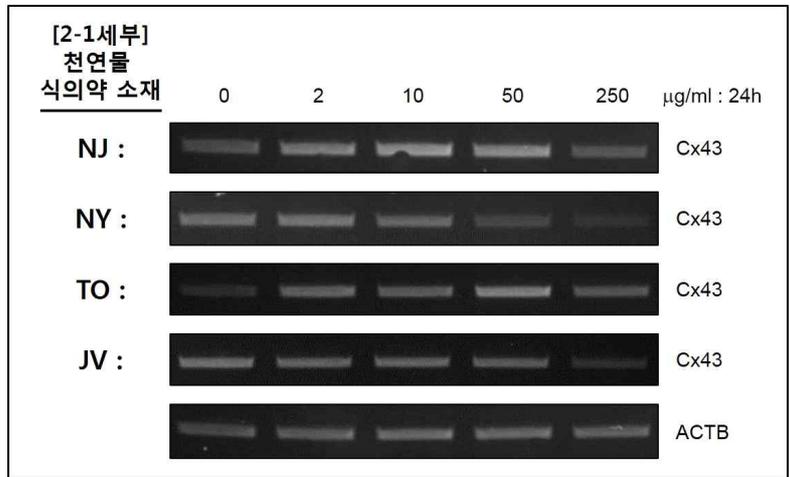


그림 3-5-11. NY 추출물의 IPSS 개선률 결과

□ 천연소재 또는 생물학적 활성물질의 장기 특이적 효능 검증

● 전임상 생리적 평가: [2-1세부]로부터 제공받은 천연물 식의약 소재를 이용하여 방광에서 세극결합 관련 유전자의 조절 활성 연구



[2-1세부]로부터 제공받은 4 종의 천연물 식의약 소재를 방광 평활근세포주 HBdSMC에 처리한 후, Connexin43 (Cx43) 유전자의 발현 변화를 RT-PCR 방법으로 조사한 결과. 4가지 소재 중 NY 소재가 배뇨 건강에 가장 유망한 것으로 추정됨.

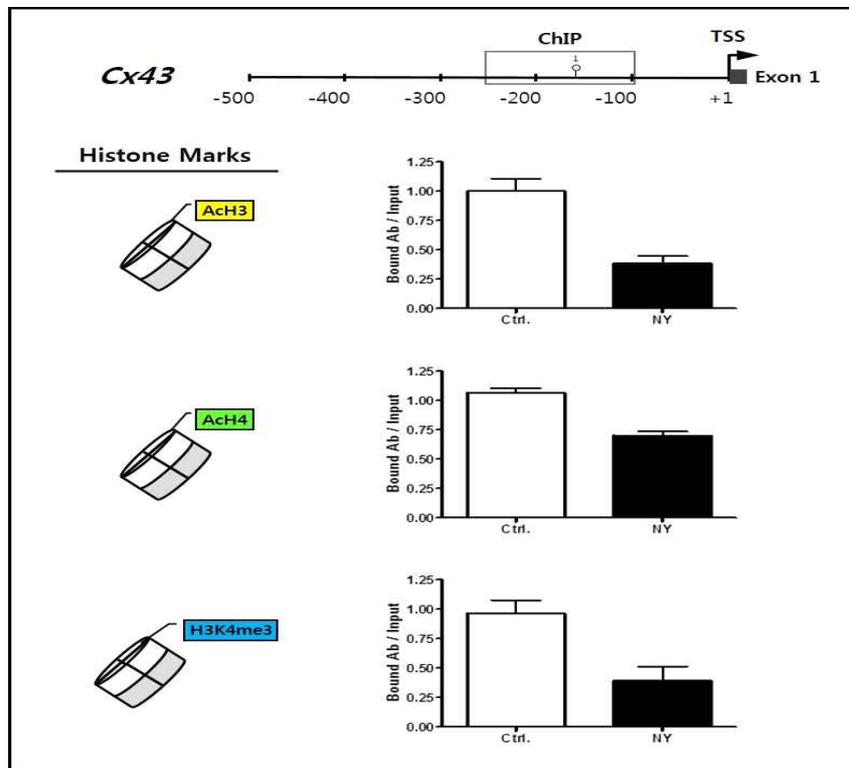


그림3-5-12. 방광 평활근 세포에 천연물 식의약 소재 “NY”를 처리후, Cx43 유전자 프로모터 내ChIP 분석

천연물 식의약 소재 “NY”를 HBdSMC에 처리했을 때, Cx43 유전자 프로모터 내 특정 부위의 활성 히스톤 변형의 감소를 나타내는 ChIP 분석 결과. 처리 시 histone acetylation의 억제 및 active methylation marker인 H3K4me3의 억제 소견을 확인할 수 있었음.

○ 연구의 결과의 의미와 활용도

소재 NY가 connexin 43 발현 억제를 통하여 배뇨건강을 조절하는 활성이 있을 가능성이 높음. 다른 소재 들도 connexin 43을 증가시키거나 억제 시키므로 connexin 43 의존적인 건강 장애에 대한 식의약 소재로서 활용 가능성이 높음

● 전임상 생리적 평가: 질 점막 면역증강의 후성유전학적 조절 평가 기술 개발

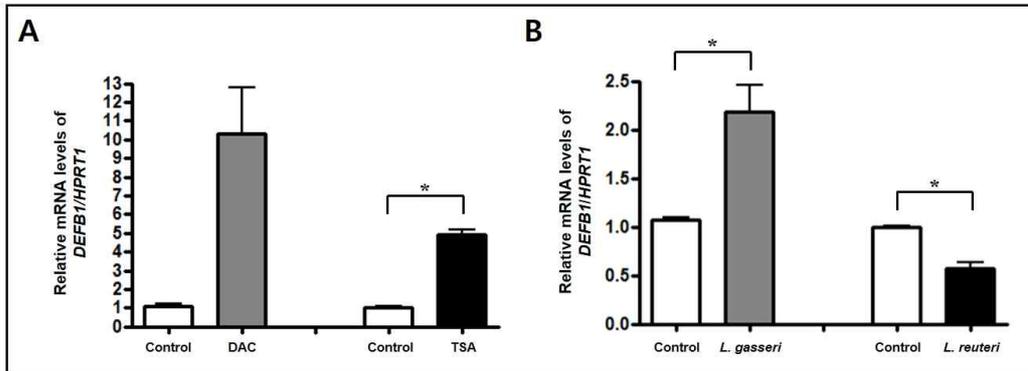


그림3-5-13. 질 상피세포주 VK2/E6E7에서 항균펩티드 유전자 HBD-1의 발현 조절 기전. (A) DNA 탈메틸화와 히스톤 아세틸화 유도에 의한 HBD-1의 발현 증가. (B) 질내 정상 세균총 *Lactobacillus* spp. 처리에 의한 HBD-1의 발현 증가 및 감소

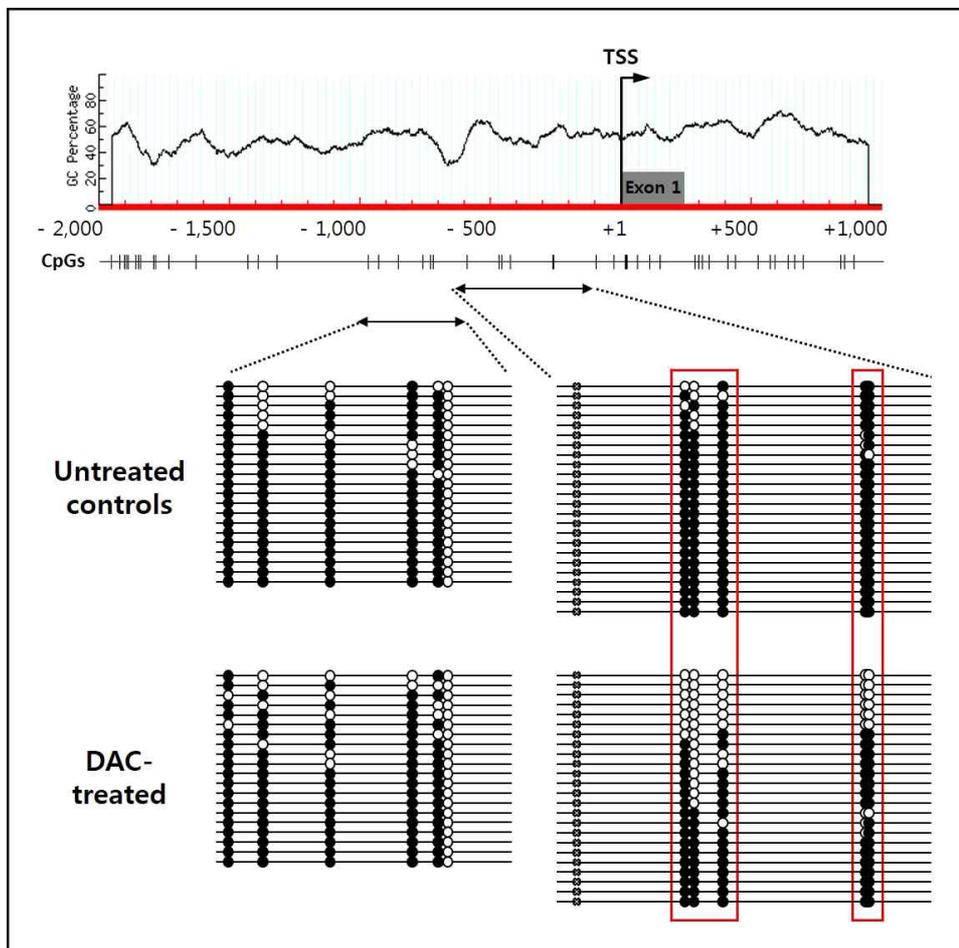


그림3-5-14. VK2/E6E7에 DAC 처리 시, 항균펩티드 HBD-1 유전자의 5' 말단 부위에서 CpG 위치들의 메틸화 변화를 보여주는 bisulfite sequencing 분석 결과

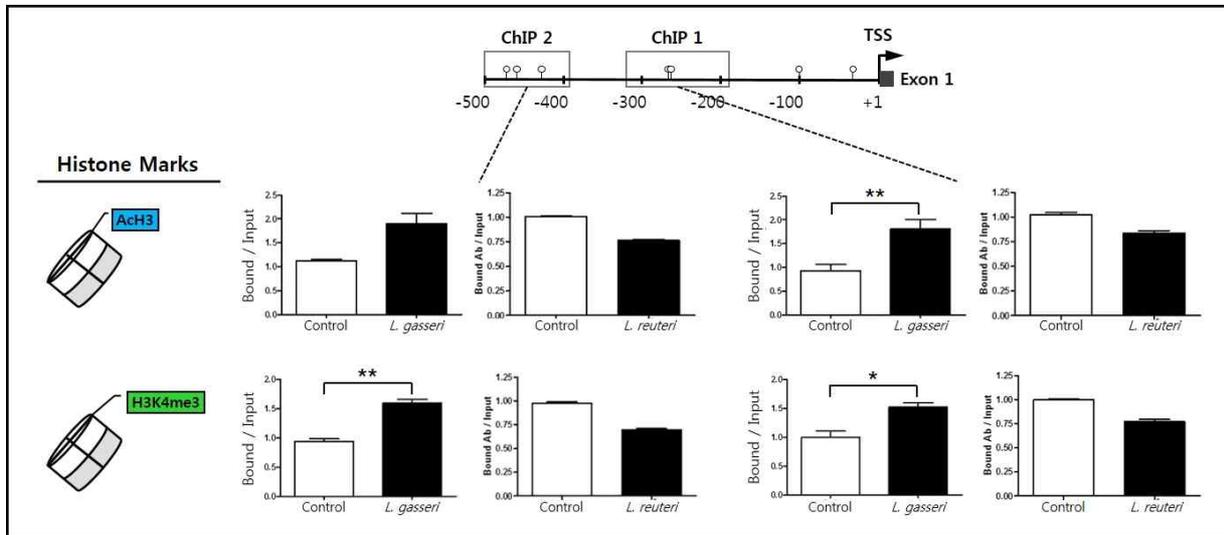


그림3-5-15. VK2/E67에 *L. gasseri*와 *L. reuteri* 각각 처리 시, 항균펩티드 HBD-1 유전자의 5' 말단 부위에서 활성 히스톤 변형의 차이를 보여주는 ChIP 분석 결과

○ 연구의 결과의 의미와 활용도

· 질내 정상균총을 형성하는 세균이 질의 자연 면역을 후성유전적으로 조절함을 최초로 확인한 것이며 지적 재산권 확보가 가능한 추가 균주의 기능성 확인 및 소재의 combination으로 지적 재산권을 확보하고 질건강 제품 개발을 위한 상품 개발에 활용할 수 있음

● 전임상 생리적 평가: 각질형성 상피의 보습 및 방어 단백질 유전자의 후성유전학적 조절

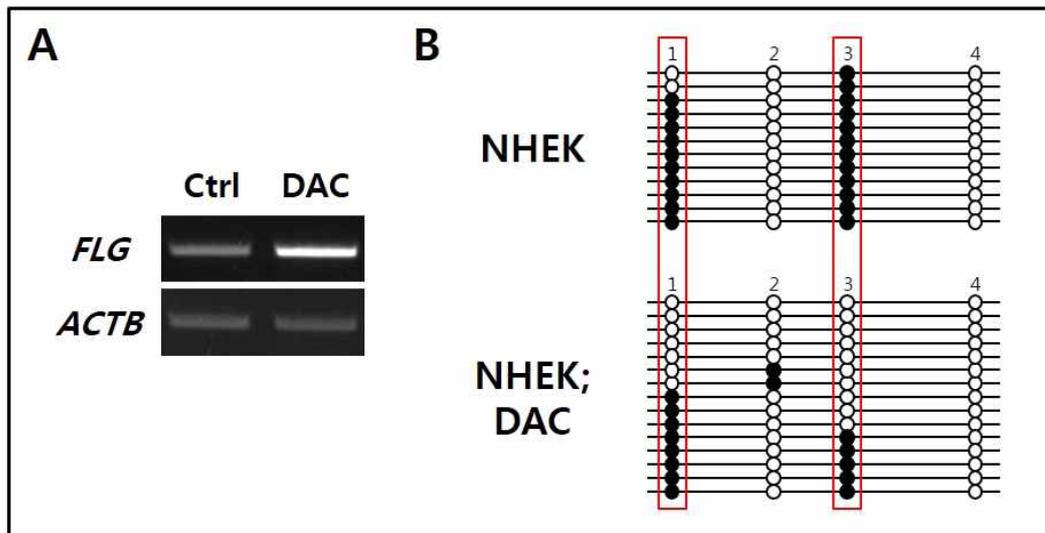


그림3-5-16. NHEK 세포주에 DNA 메틸화 저해제 DAC 처리 시, filaggrin 유전자(FLG) 프로모터 내 CpG 위치들의 메틸화 양상 변화. (A) RT-PCR, (B) bisulfite sequencing 결과

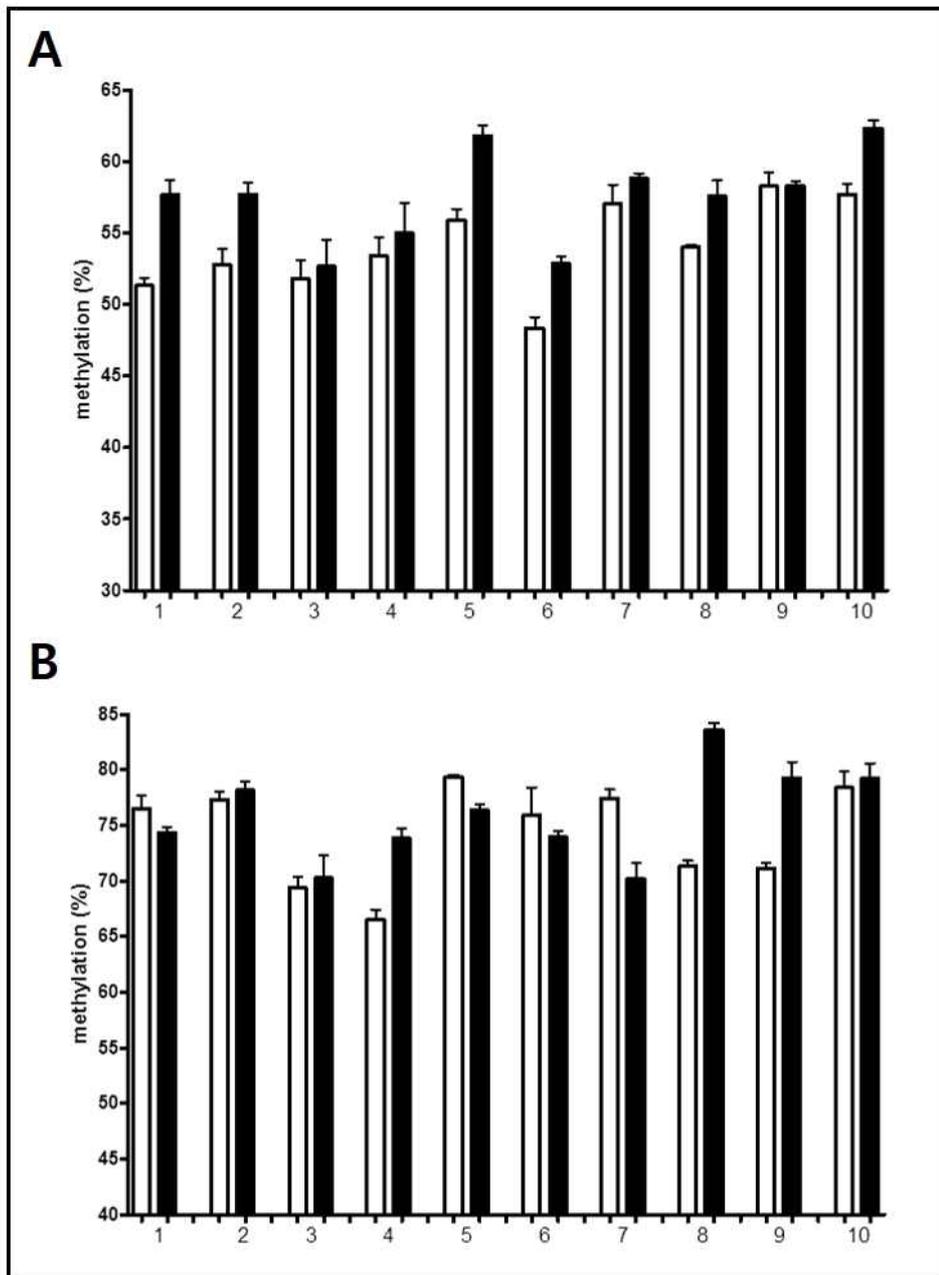


그림3-5-17. 동일한 아토피피부염 환자(n=10)에서 분리한 비병변(흰 막대)과 병변(검은 막대) 부위 사이의 FLG 프로모터 내 (A) CpG 3 (B) CpG 1 위치의 메틸화(%) 차이

○ 연구의 결과의 의미와 활용도: 최초로 filaggrin유전자의 후성유전학적 조절기전을 확인하였으며 filaggrin은 질에서도 발현되므로 이를 활용하여 주요 피부 및 질 건강 소재 스크리닝에 매우 활용도가 높음

● 비뇨기 전임상 효능 및 작용기전 규명을 위한 시스템 구축

○ α1-아드레날린 수용체 차단능 평가

· 전립선의 교감신경계 자극을 차단시켜 근육을 이완하여 소변이 원활하게 배출되도록 함. 대표약물로는 알푸조신, 탐스로신, 테라조신이 있음

· IC50가 가장 낮은 쏘팔메토가 탐스로신 IC50의 약 5.1배 가량 높은 수준에서 효과를 나타냄

· 본 연구에 사용된 시료는 쏘팔메토에 비해 뚜렷한 차단능 효과를 보이지 않음 (탐스로신 > 쏘팔메토 > 참웃 > 갈근 > 발효웃 > 고이퀼갈근 > 비수리)

· 따라서, 현재 구축된 시스템을 이용하여 쏘팔메토를 보다 우수한 자생식물을 선별하고자 함

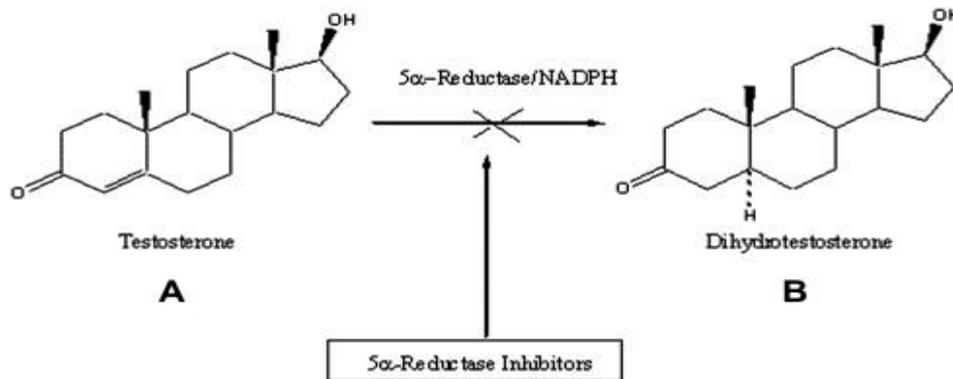
**Adrenergia alpha1A receptor ligand binding assay**

- 대표 비교약물 : alfuzosin, tamsulosin, terazosin
- 전립선의 교감신경계 자극을 차단시켜, 근육이완, 소변 배출 원활

시료명	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	탐스로신 대비
참웃( <i>Rhus verniciflura</i> )	0.000717	79.7
발효참웃( <i>Rhus verniciflura</i> )	0.001056	173.3
비수리( <i>Lespedeza cuneata</i> G.)	0.072000	> 200
갈근( <i>Pueraria lobata</i> Willd. Ohwi)	0.000951	105.7
6-6갈근( <i>Pueraria lobata</i> Willd. Ohwi)	0.001137	126.3
<b>쏘팔메토(<i>Serenoa repens</i>)</b>	<b>0.000046</b> <b>(0.000143 n)</b>	<b>5.1</b>
<b>탐스로신</b>	<b>0.000009</b> <b>(0.000021 nM)</b>	-

○ 5α- 환원효소억제능 시험

· 전립선의 크기를 증가시키는 다이하이드로테스토스테론(DHT) 생성에 관여하는 5-α 환원효소를 억제하여 전립선 크기 감소효과를 확인함. 대표약물로는 피나스테라이드(finasteride)가 있음.



· 테스토스테론(T) → DHT 전환율 비교(%)

- 대조군(100) > 100 μg/ml 발효참(86) > 500 μg/ml 갈근(81) > 100 μg/ml 고이쥬갈근 (77) > 쏘팔메토(73) > 100 μg/ml 갈근(68) > 피나스테라이드(54)

· 5-α환원효소억제능 비교(%)

- 100 μg/ml 갈근(111) > 피나스테라이드(100) > 쏘팔메토(80) > 100 μg/ml 고이쥬갈근(73) > 100 μg/ml 고이쥬갈근(57) > 100 μg/ml 발효참(39.7)

표 3-5-2. 여러시료에 대한 5'-alpha reductase inhibition assay

**5-alpha reductase inhibition assay**

- 대표 비교약물 : finasteride

시료명	처리농도( $\mu\text{g/ml}$ )	DHT 전환율(%)	Inhibition (%)
<b>대조군</b>	-	<b>23.05 <math>\pm</math> 3.29</b>	<b>100.00 <math>\pm</math> 4.27</b>
참쑥( <i>Rhus verniciflora</i> )	500	31.83 $\pm$ 0.41	-
	100	37.20 $\pm$ 5.30	-
발효참쑥( <i>Rhus verniciflora</i> )	500	29.17 $\pm$ 1.02	-
	100	19.93 $\pm$ 1.58	13.47 $\pm$ 5.83
비수리( <i>Lespedeza cuneata</i> G.)*	500	27.20 $\pm$ 2.00	-
갈근( <i>Pueraria lobata</i> Willd. Ohwi)	500	16.40 $\pm$ 3.80	19.17 $\pm$ 3.49
	100	15.70 $\pm$ 1.41	<b>37.95 <math>\pm</math> 1.45</b>
6-6갈근( <i>Pueraria lobata</i> Willd. Ohwi)	100	22.95 $\pm$ 4.65	24.75 $\pm$ 4.25
	100	25.50 $\pm$ 2.89	4.70 $\pm$ 1.38
쏘팔메토( <i>Serenoa repens</i> )	160	27.40 $\pm$ 1.19	-
	32	16.80 $\pm$ 1.00	<b>27.10 <math>\pm</math> 4.30</b>
<b>피나스테라이드(250 nM)</b>	<b>0.0931</b>	<b>15.25 <math>\pm</math> 1.15</b>	<b>33.90 <math>\pm</math> 4.90</b>

- 구축된 두가지 시스템 모두 비교물질인 양성대조군의 시험결과로 각 시스템 확립은 완료된 것으로 판단되며, 기존에 보고된 쏠파메토의 전립선 건강에 미치는 작용기전을 본 연구에서도 확인하였음

○ 무순 추출물에 의한 생식독성 예방효과: in vitro 에서 무순 추출물의 효능 평가

-추출과정에서 에탄올 용매의 %에 따른 항산화능력 측정된 결과 추출물의 항산화능은 항산화제로 알려진 Trolox보다 높음, 90% 에탄올 추출물의 항산화능이 가장 높게 측정.

표 3-5-3. 무순 추출물의 에탄올 용매 %에 따른 항산화능력 측정된 결과

Ethanol extract (%)	ORAC <sub>FE</sub>	Yield (%)
0	1.04 $\pm$ 0.004	20.6
30	1.02 $\pm$ 0.008	19.3
50	1.05 $\pm$ 0.010	17.0
70	1.09 $\pm$ 0.009	9.2
90	1.13 $\pm$ 0.010	11.6
Trolox	1.00 $\pm$ 0.007	-

The data are shown as means  $\pm$  SEM (n = 3).

-전립선비대증 세포에서 무순 추출물의 세포 독성 확인

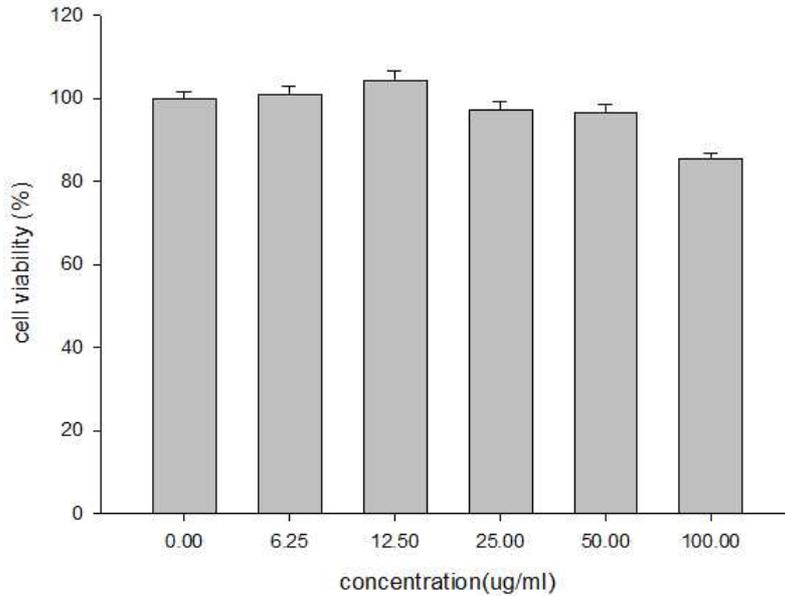


그림3-5-18. 전립선비대증 세포 (BPH-1)에서 무순 추출물의 세포 독성 확인

-항산화효능이 가장 우수한 무순 90% 에탄올 추출물을 이용하여 전립선 비대증세포에서 세포 독성을 확인한 결과, 세포 독성이 없음을 확인하였음

-내분비교란물질인 비스페놀A가 전립선 비대증 세포인 BPH-1에 미치는 영향 확인

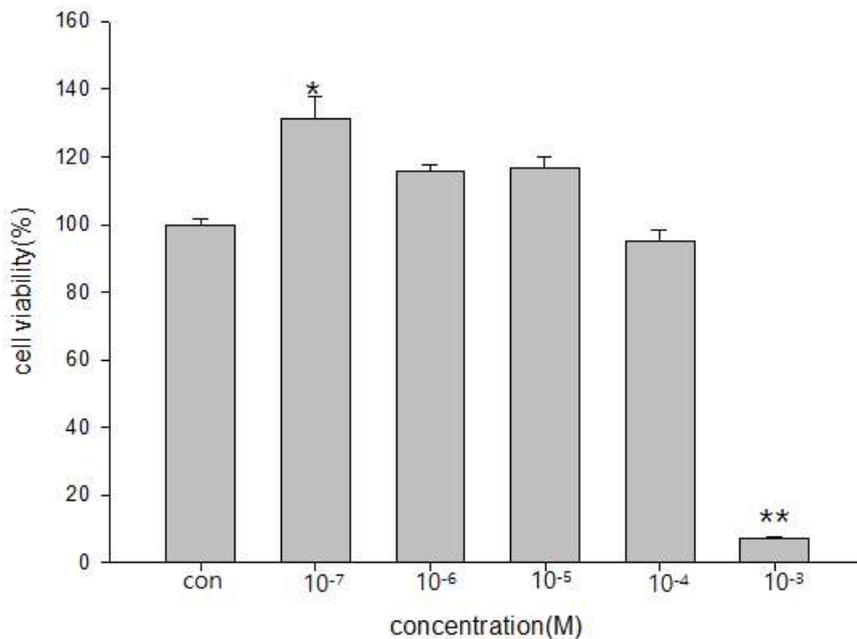


그림3-5-19. 전립선비대증 세포 (BPH-1)에서 비스페놀A (BPA)의 세포 독성 확인

내분비교란물질인 비스페놀A를 10<sup>-3</sup>~10<sup>-7</sup>M로 처리하였을 때, 저농도에서는 전립선비대증 세포의 proliferation이 증가하는 것을 확인하였으며, 고농도에서는 세포 증식을 억제하는 것을 확인하였음. 이에 proliferation억제와 전립선 비대증 세포 독성을 억제할 수 있는 두가지 측면에서 실험을 진행하고자 하였음

-무순 추출물의 전립선비대증세포 보호 효과 확인

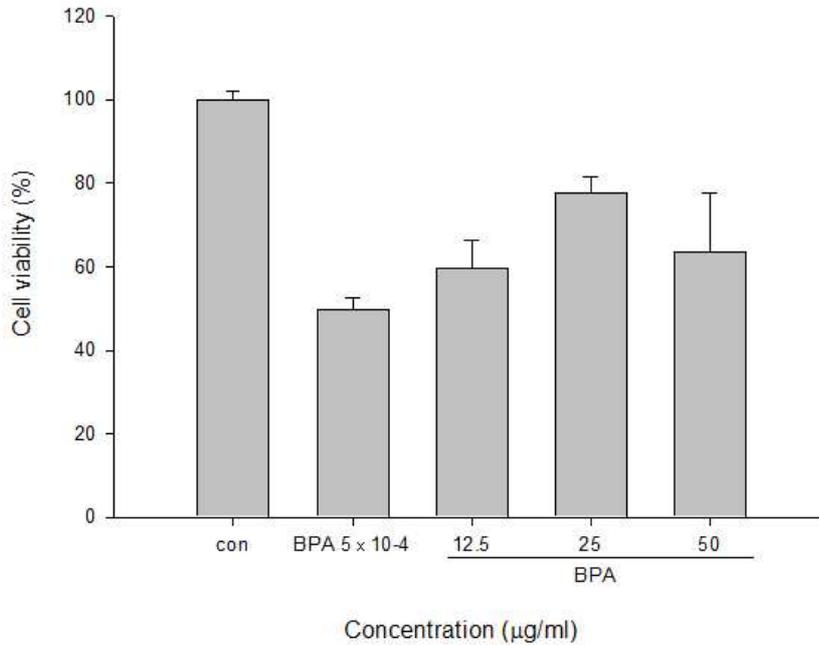


그림3-5-20. 전립선비대증 세포 (BPH-1)에서 무순 추출물에 의한 비스페놀A (BPA)의 세포 독성 보호

무순 90% 에탄올 추출물이 전립선 비대증 세포 보호 효과를 확인하기 위하여, 전립선비대증세포인 BPH-1에 무순 추출물을 1시간동안 농도별로 처리한 후, 내분비교란물질인 비스페놀A의 IC50 값인  $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 로 처리하였을 때, 무순 90% 에탄올 추출물에 의하여 세포 증식억제가 줄어드는 것을 확인하였음. 이에 무순 추출물이 내분비교란물질에 의한 세포 독성을 억제할 수 있을 것으로 보임

-무순 추출물에 의한 전립선비대증 세포 증식 억제 확인

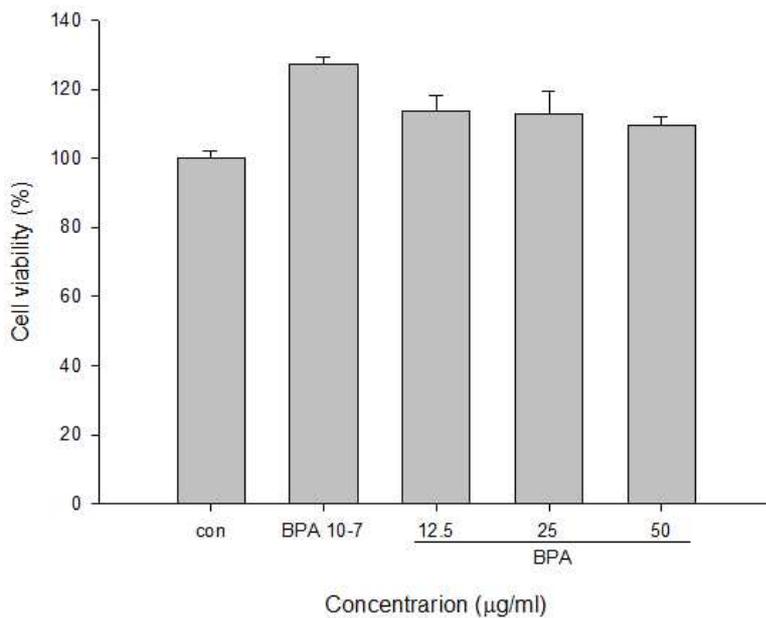


그림3-5-21. 전립선비대증 세포 (BPH-1)에서 무순 추출물에 의한 비스페놀A (BPA)의 세포 증식 억제

저농도로 내분비교란물질인 비스페놀A를 처리하였을 때, 전립선비대증세포의 proliferation이 증가하는 것을 확인하여, 무순 90% 에탄올 추출물의 전립선비대증 proliferation 억제 여부를 확인하고자 하였음. 이에 무순 90% 에탄올 추출물을 농도별로 1시간동안 처리 한 후, 비스페놀A를 저농도로 처리하였음. 그 결과, 무순 90% 에탄올 추출물에 의하여 전립선비대증세포의 proliferation이 감소하는 것을 확인하였음

-무순 추출물에 의한 전립선비대증 세포 증식 억제 확인

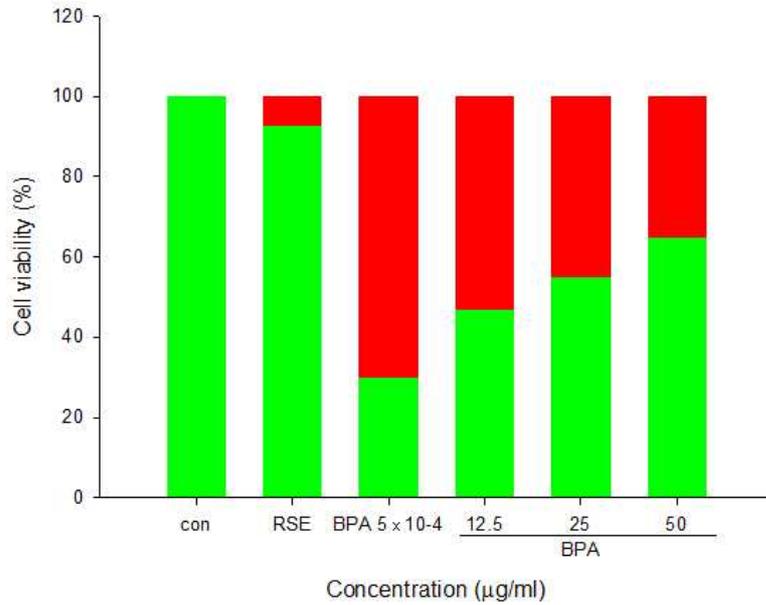


그림3-5-22. 전립선비대증 세포 (BPH-1)에서 무순 추출물에 의한 비스페놀A (BPA)의 Tali assay

Tali assay를 통하여 live cell과 death cell을 측정한 결과, 비스페놀에 의해 증가된 death cell이 무순 추출물에 의하여 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었음

-전립선 관련 바이오마커 측정

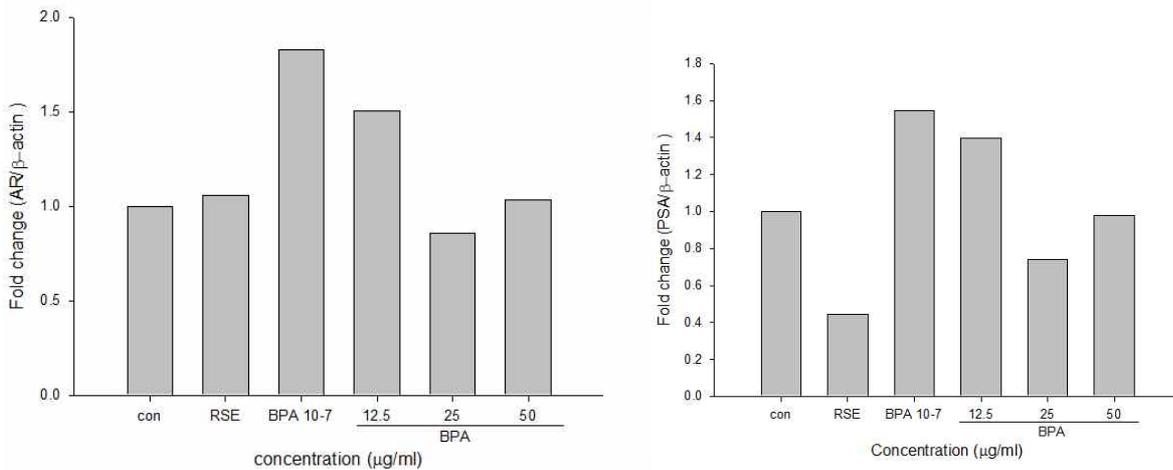


그림3-5-23. 전립선비대증 세포 (BPH-1) 에서 비스페놀A (BPA)의 세포 독성 확인

전립선관련 바이오마커인 AR, PSA 발현 양상 확인하였음. 내분비교란물질인 비스페놀A를 10<sup>-7</sup>M로 처리했을 때, AR과 PSA 모두 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 무순 추출물 12.5, 25ug/ml에 의해 발현이 억제되는 것을 확인하였으나, 50ug/ml로 처리하였을 때 발현이 다시 증가하는 것을 보아 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료됨. 3차년도에 진행할 예정.

○ 무순 추출물에 의한 생식독성 예방효과: in vivo에서 무순 추출물의 효능 평가

표 3-5-4. 무순 추출물에 의한 SD rat의 체중회복 효과

TABLE 2. BODY WEIGHT AND RELATIVE WEIGHT OF THE GENITAL ORGANS OF SD RATS ADMINISTERED *RAPHANUS SATIVUS* L. (RADISH) SPROUT 90% ETHANOLIC EXTRACT (RSE)

	Body weight (g)		Testis (g/kg body weight)	
	Initial	Final	Left	Right
NC	136.6 ± 4.5	240.3 ± 7.5 <sup>b</sup>	22.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	23.6 ± 0.9 <sup>a</sup>
BPA (100 mg/kg)	134.0 ± 1.0	225.1 ± 1.1 <sup>c</sup>	20.7 ± 0.9 <sup>b</sup>	20.1 ± 1.1 <sup>b</sup>
BPA+RSE (25 mg/kg)	138.4 ± 2.7	246.5 ± 7.4 <sup>b</sup>	23.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	22.3 ± 0.9 <sup>a</sup>
BPA+RSE (50 mg/kg)	132.4 ± 3.9	243.7 ± 4.2 <sup>b</sup>	23.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	23.0 ± 0.6 <sup>a</sup>
BPA+RSE (100 mg/kg)	136.4 ± 4.1	244.2 ± 3.4 <sup>b</sup>	22.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	22.1 ± 0.3 <sup>a</sup>
RSE (100 mg/kg)	136.6 ± 6.8	270.5 ± 5.9 <sup>a</sup>	23.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	22.6 ± 0.1 <sup>a</sup>

The data are shown as means ± SEM (n=5). Means with different letters in the same row are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test. RSE and bisphenol A (BPA) were administered orally and intraperitoneally (i.p.), respectively, to the rats daily for 14 days. NC, normal control.

- 내분비교란물질인 비스페놀A 투여에 의해 감소된 체중회복 효과를 관찰함

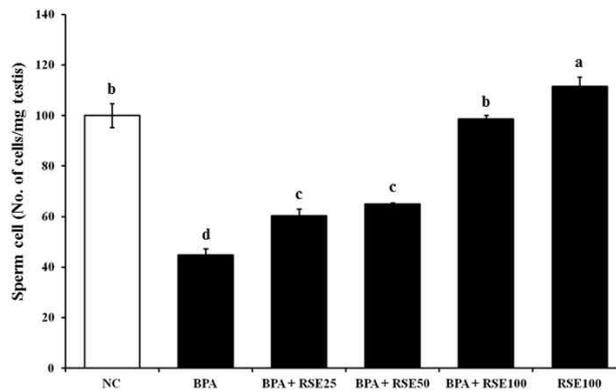


그림3-5-24. 전립선비대증 세포 (BPH-1) 에서 무순 추출물처리시 정자수 확인

내분비교란물질인 비스페놀에 의해 감소된 정자의 수가 무순 추출물에 의해 농도의존적으로 회복되는 것을 확인하였음

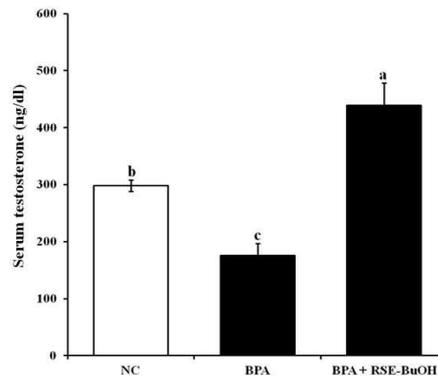


그림3-5-25. 전립선비대증 세포 (BPH-1) 에서 무순 추출물처리시 테스토스테론 확인

내분비교란물질인 비스페놀 투여에 의해 감소된 혈청 테스토스테론이 무순 분획물에 의해 회복되는 것을 확인하였음

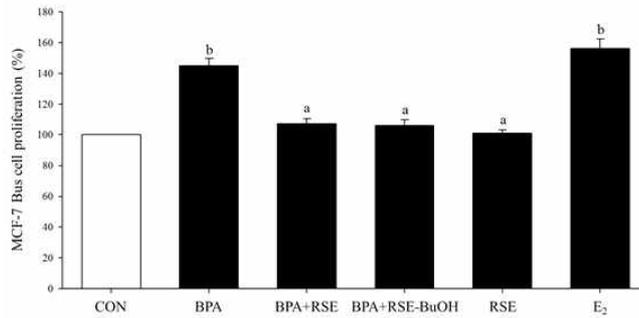


그림3-5-26. 유방암 세포주 (MDF-7) 에서 무순 추출물처리시 세포증식 확인

동물모델에서 비스페놀이 여성호르몬처럼 행동하는 내분비교란상태를 유도하며, 무순 분획물을 투여하였을 때, 정자의 수가 비스페놀 투여군에 비하여 약 3배, 정상군과 비슷한 수치로 회복되는 것으로 보아 내분비교란이 억제되는 것을 확인하였음.

(다) 3차년도

□ 비뇨기 여성건강 임상 자료 작성 공조 및 임상시험 진행

□ 천연소재 또는 생물학적 활성물질의 장기 특이적 효능 검증

● 전임상 생리적 평가: 보유 활성소재의 steroidogenesis 연관 효소인 StAR, Cyp11a1, Cyp17a1와 sirt1, AMPK 경유 기전의 평가

- 보유 소재 12개 중 7건에서 좋은 in vitro활성 확인함
- testosterone 생성 mouse Leydig cell(TM3) 세포주를 통한 소재 검증 및 개발

표3-5-5. qRT-PCR에 사용된 primers의 정보

name of primers	Primer Sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Gene Access number
m-18s rRNA Forward	5'-GAGGCCCTGTAATTGGAATGAG-3'	120 bp	NR_003278.3
m-18s rRNA Reverse	5'-GCAGCAACTTTAATATACGCTATTGG-3'		
m-Cyp11a1 Forward	5'-ACATGGCCAAGATGGTACAGTTG-3'	119 bp	NM_019779
m-Cyp11a1 Reverse	5'-ACGAAGCACCAGGTCATTCAC-3'		
m-Cyp17a1 Forward	5'-CTCCAGCCTGACAGACATTCTG-3'	117 bp	NM_007809
m-Cyp17a1 Reverse	5'-TCTCCCACCGTGACAAGGAT-3'		
m-StAR Forward	5'-TCTCTAGTGCTCCCCTGCATAGC-3'	121 bp	NM_011485
m-StAR Reverse	5'-TTAGCATCCCCTGTTCTGCTAGCT-3'		
m-AMPK Forward	5'-CATTCCCAGGTGACATGCAG-3'	185bp	NM_178143.2
m-AMPK Reverse	5'-TGAGGTGTGCTTGCCATCTA-3'		
m-Sirt1 Forward	5'-GGATGATATGACGCTGTGGC-3'	160bp	NM_019812.3
m-Sirt1 Reverse	5'-ACAGGAGACAGAAACCCAG-3'		

○ 민들레 추출물의 효과(본 연구자들이 개발한 개별인정형 남성갱년기 건강기능식품 포함 소재)

- mouse Leydig cell인 TM3에 민들레 추출물을 24시간동안 처리한 후, total RNA를 추출하여서 qRT-PCR을 실시함. Steroidogenesis 연관 효소인 StAR, Cyp11a1, Cyp17a1의 mRNA와 AMPK, Sirt1의 mRNA 발현이 증가함.

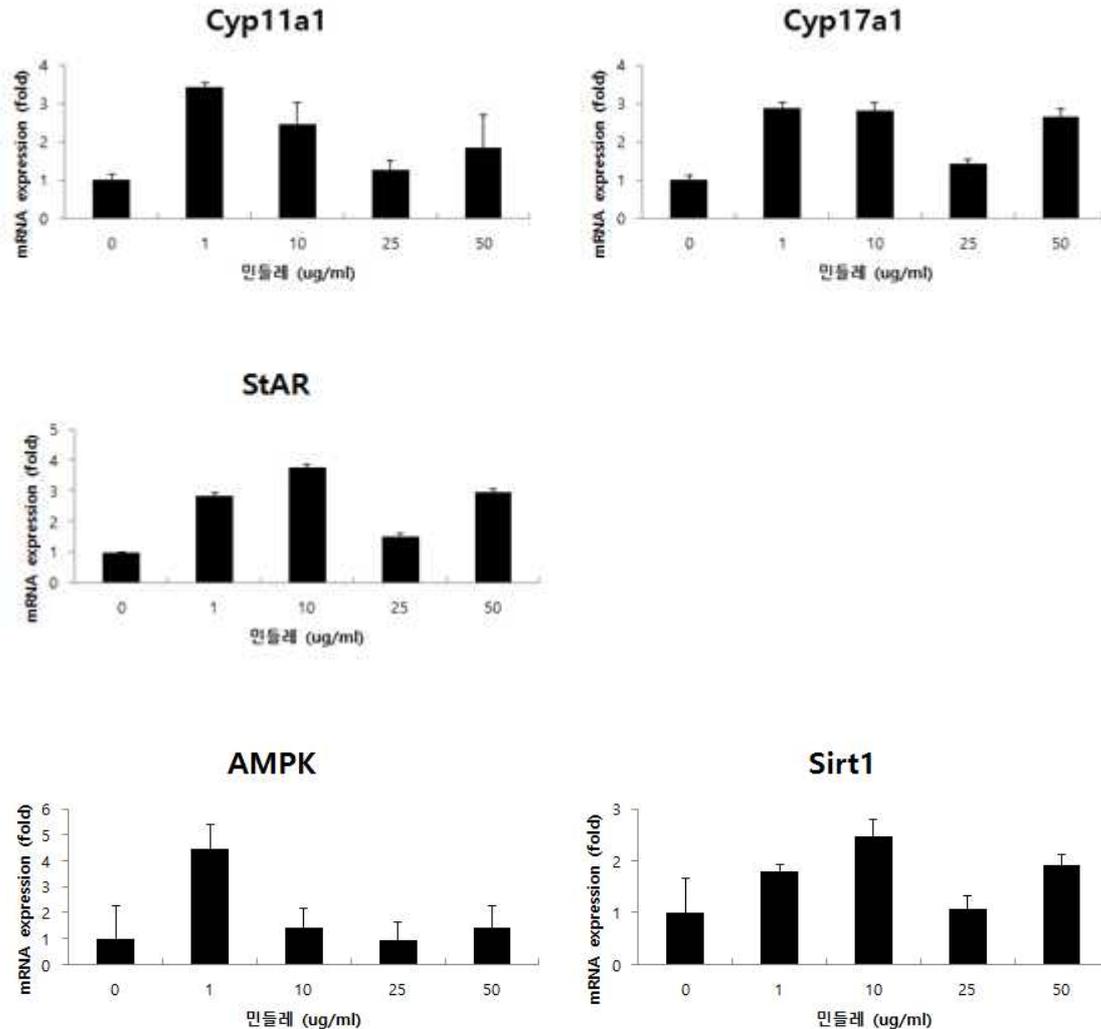


그림3-5-27. TM3 세포의 민들레 추출물 처리에 의한 Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, Sirt1 mRNA 발현 양상

- mouse Leydig cell인 TM3에 민들레 추출물을 48시간동안 처리한 후, 세포에서 total protein을 추출하여서 18s rRNA, Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, p-AMPK, Sirt1의 특정 안티바디를 이용해서 TM3세포내의 이 유전자들의 단백질 발현을 확인함. 또한, 세포상등액에서 testosterone을 ELIASA 방식으로 측정하였음. 민들레 추출물을 처리하였을 때, 이들 유전자들의 단백질 발현과 steroidogenesis의 최종산물인 testosterone이 증가함.

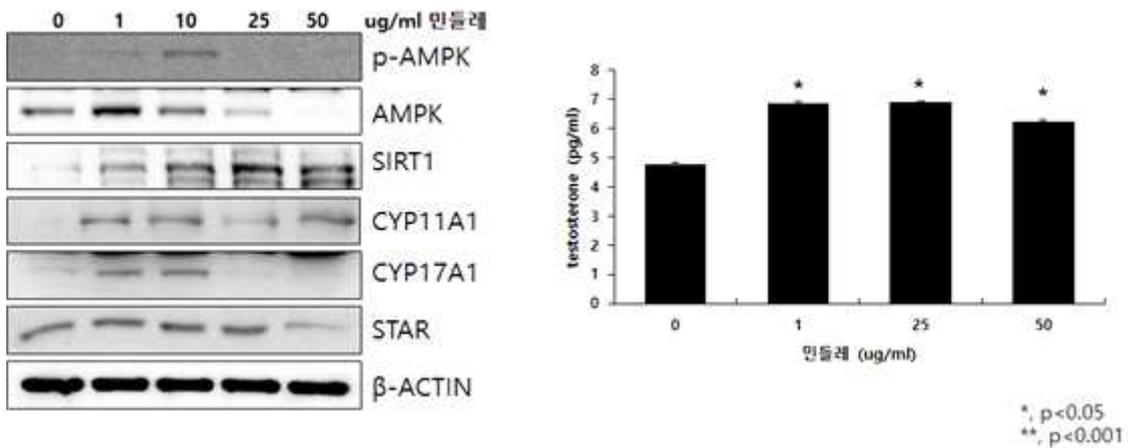


그림3-5-28. TM3 세포의 민들레 추출물 처리에 의한 Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, p-AMPK, Sirt1 단백질 발현양상과 세포상등액에서의 testosterone 측정

○ Mr-10의 효과(본 연구자들이 개발한 개별인정형 남성갱년기 건강기능식품 복합 소재)

- mouse Leydig cell인 TM3에 Mr-10을 24시간동안 처리한 후, total RNA를 추출하여서 qRT-PCR을 실시함. Steroidogenesis 연관 효소인 StAR, Cyp11a1, Cyp17a1의 mRNA와 AMPK, Sirt1의 mRNA 발현이 증가함.

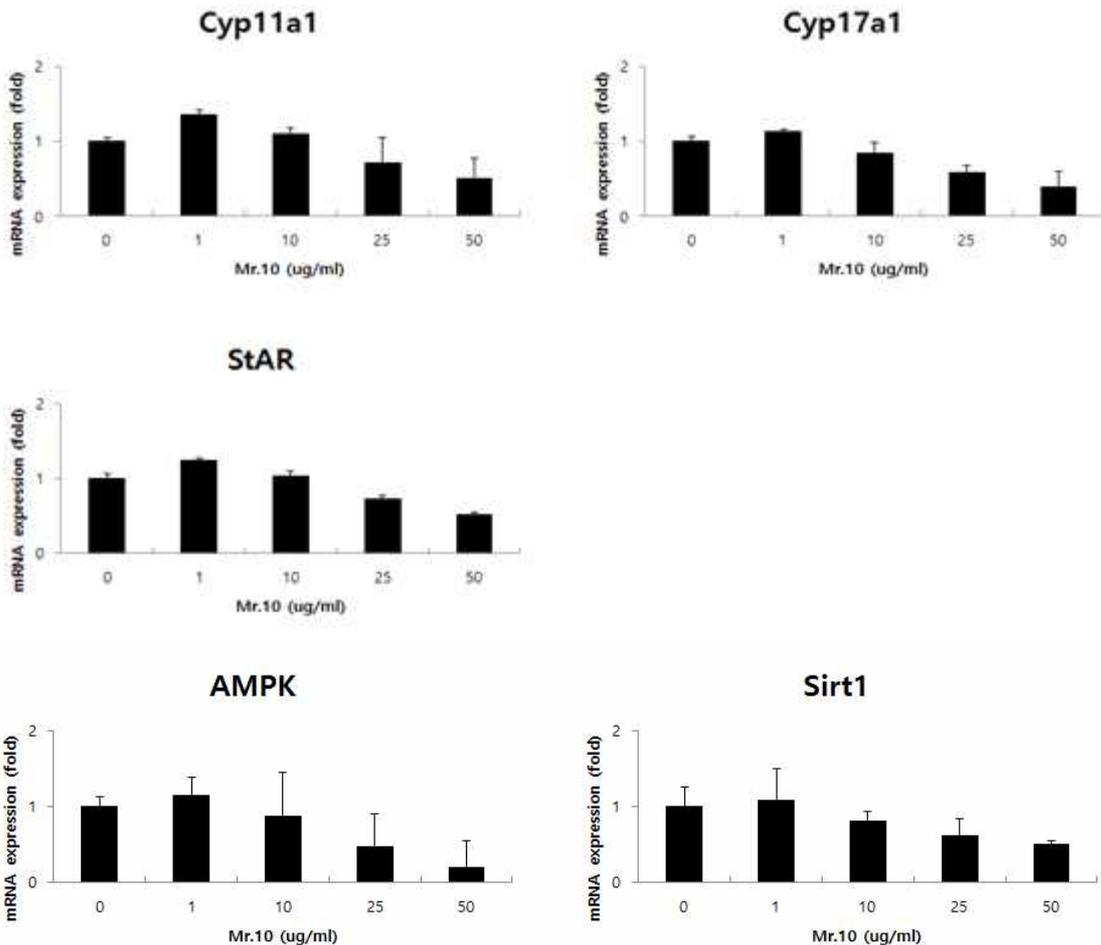


그림3-5-29. TM3 세포의 Mr-10 처리에 의한 Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, Sirt1 mRNA 발현양상

- mouse Leydig cell인 TM3에 Mr-10을 48시간동안 처리한 후, 세포에서 total protein을 추출하여서18s

rRNA, Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, p-AMPK, Sirt1의 특정 안티바디를 이용해서 TM3세포내의 이 유전자들의 단백질 발현을 확인함. 또한, 세포상등액에서 testosterone을 ELIASA 방식으로 측정하였음. Mr-10을 처리하였을 때, 이들 유전자들의 단백질 발현과 steroidogenesis 의 최종산물인 testosterone 이 증가함.

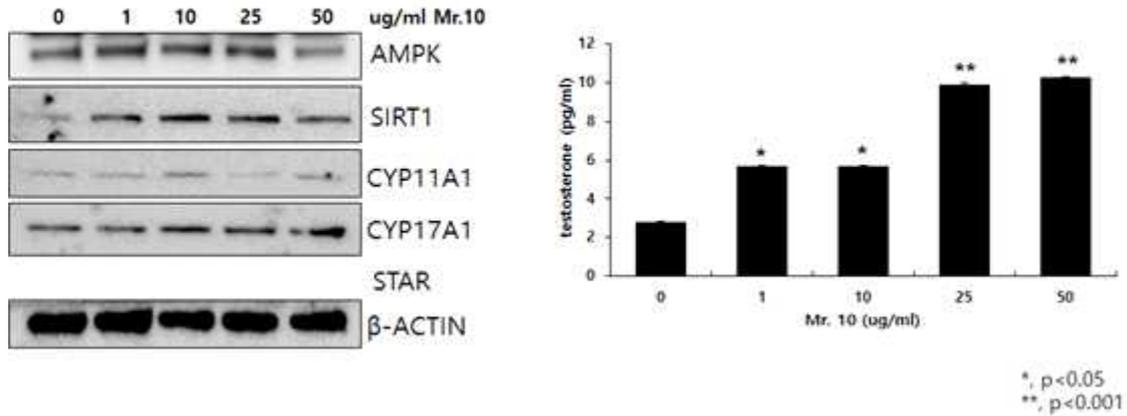
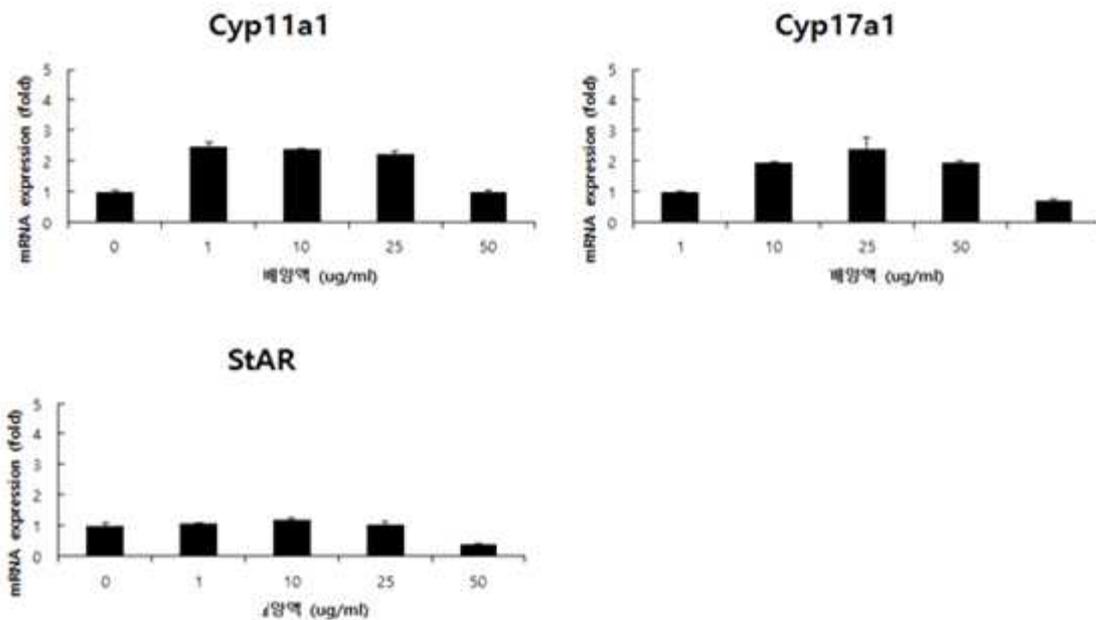


그림3-5-30. TM3 세포의 Mr.10 처리에 의한 Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, p-AMPK, Sirt1 단백질 발현양상과 세포상등액에서의 testosterone 측정

○ SSR의 효과

- mouse Leydig cell인 TM3에 SSR 추출물을 24시간동안 처리한 후, total RNA를 추출하여서 qRT-PCR을 실시함. Steroidogenesis 연관 효소인 StAR, Cyp11a1, Cyp17a1의 mRNA와 AMPK, Sirt1의 mRNA 발현이 증가함.



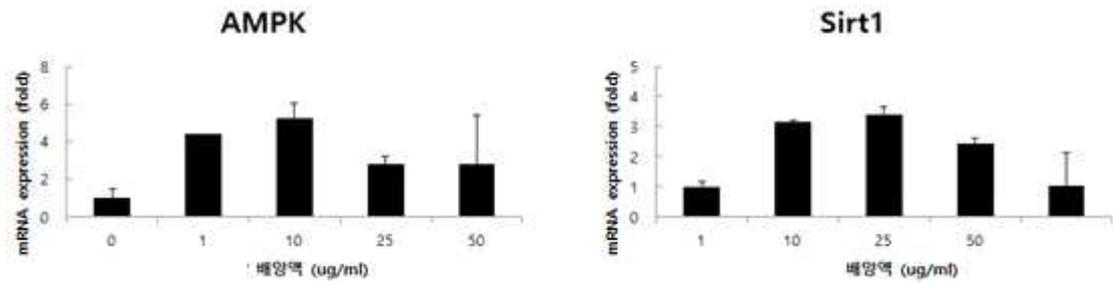


그림3-5-31. TM3 세포의 SSR 처리에 의한 Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, Sirt1 mRNA 발현양상

- mouse Leydig cell인 TM3에 SSR 추출물을 48시간동안 처리한 후, 세포에서 total protein을 추출하여 서18s rRNA, Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, p-AMPK, Sirt1의 특정 안티바디를 이용해서 TM3세포내의 이 유전자들의 단백질 발현을 확인함. 또한, 세포상등액에서 testosterone을 ELIASA 방식으로 측정하였음. 민들레 추출물을 처리하였을 때, 이들 유전자들의 단백질 발현과 steroidogenesis 의 최종산물인 testosterone 이 증가함.

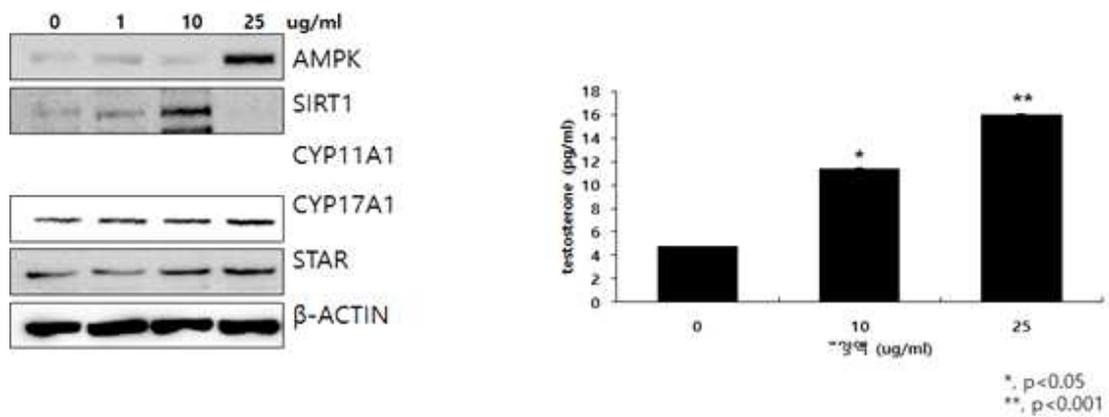


그림3-5-31. TM3 세포의 SSR 처리에 의한 Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, p-AMPK, Sirt1 단백질 발현 양상과 세포상등액에서의 testosterone 측정

○ TRST의 효과

- 처리 24시간 후 AMPK, sirt1을 포함한 mRNA 발현 증가

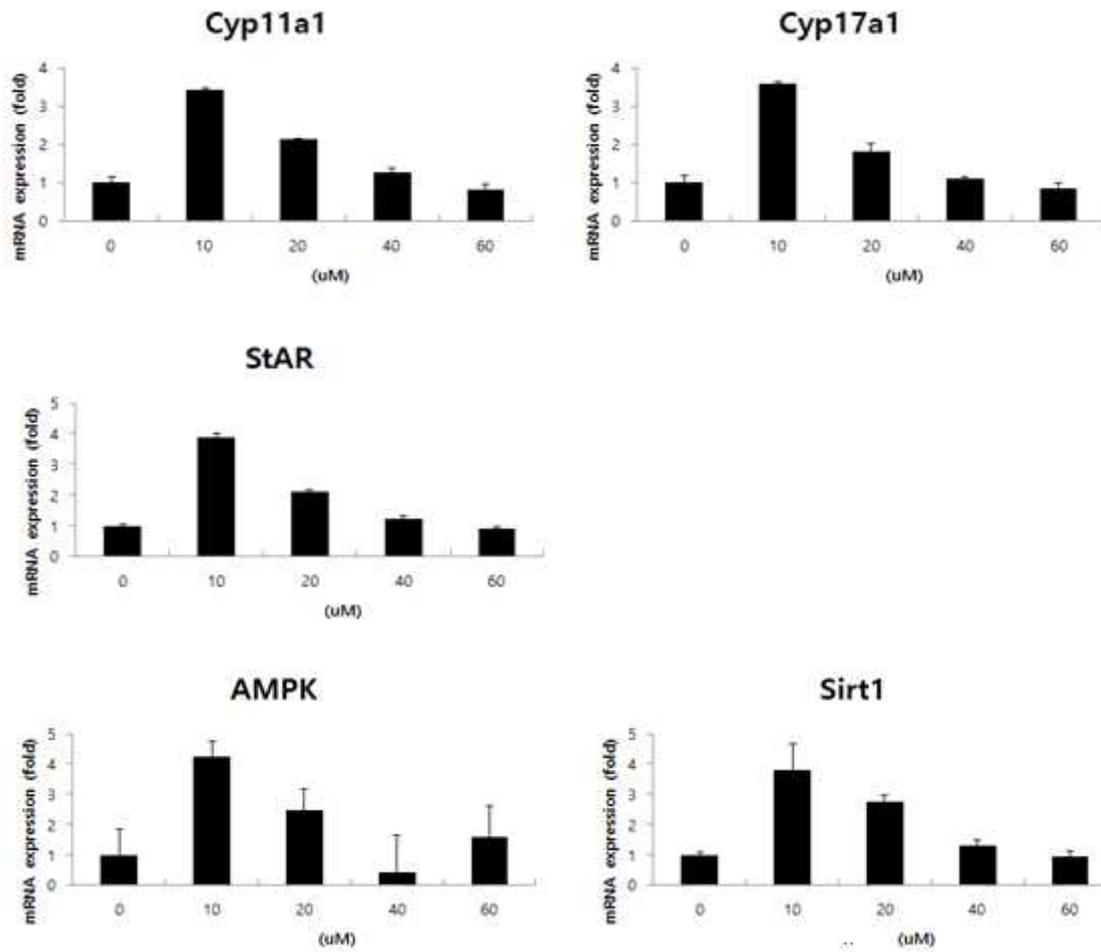
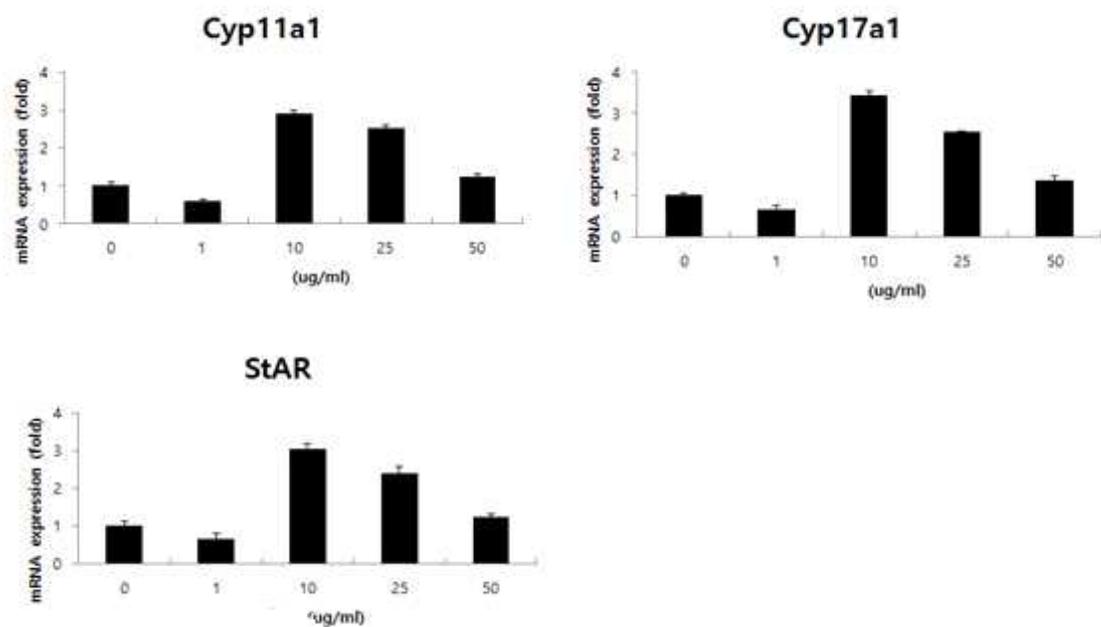


그림3-5-32. TM3 세포의 TRST 처리에 의한 Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, Sirt1 mRNA 발현양상

○ OGK의 효과

- 처리 24시간 후 AMPK, sirt1을 포함한 mRNA 발현 증가



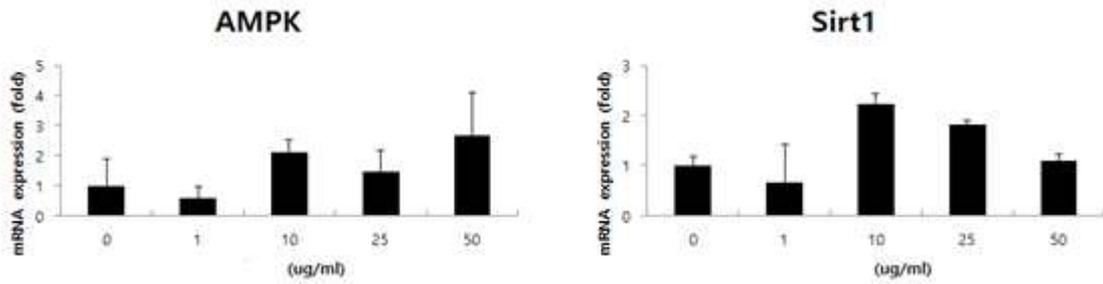


그림3-5-33. TM3 세포의 OGK 처리에 의한 Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, Sirt1 mRNA 발현양상

○ NGR의 효과

- 처리 24시간 후 AMPK, sirt1을 포함한 mRNA 발현 증가

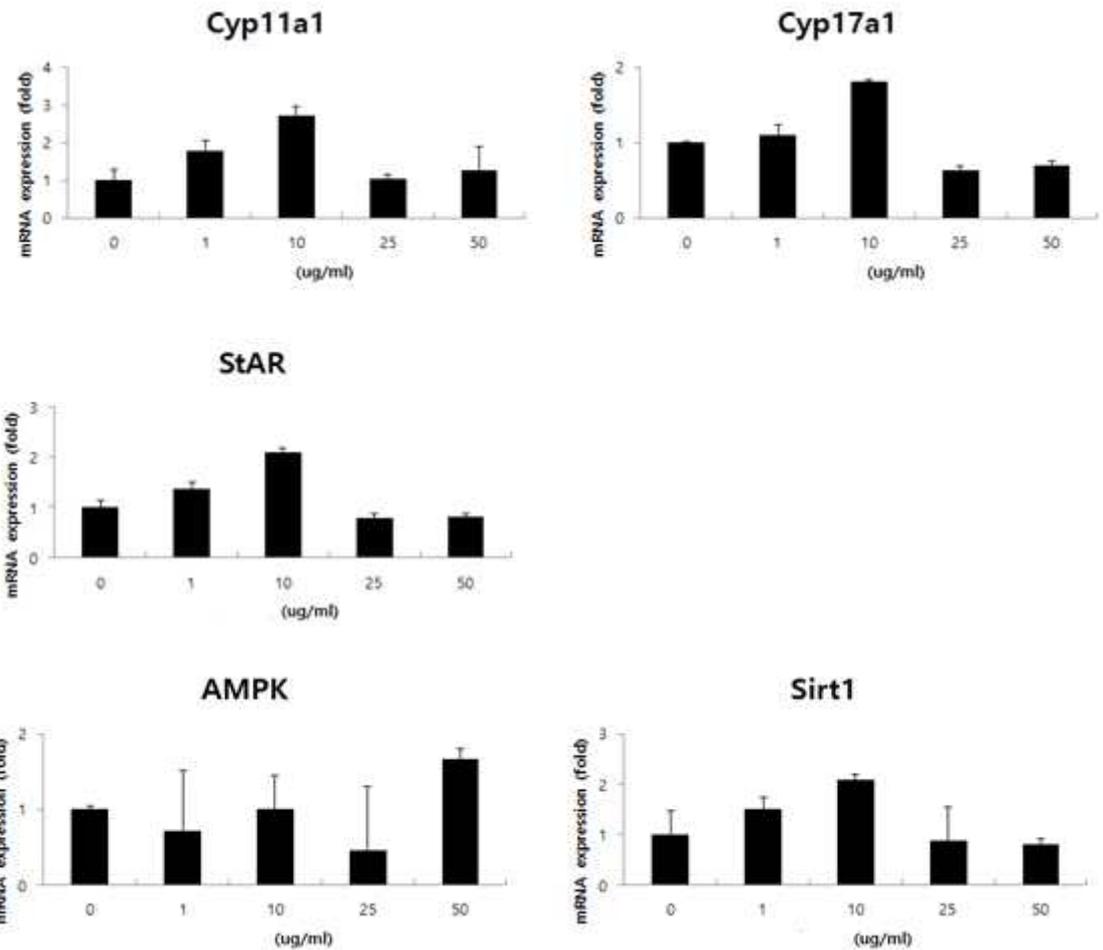


그림3-5-34. TM3 세포의 NGR 처리에 의한 Star, Cyp11a1, Cyp17a, AMPK, Sirt1 mRNA 발현양상

○ RTOL의 효과

- 처리 36시간 후 StAR, Cyp11a1, Cyp17a1 mRNA 발현 증가

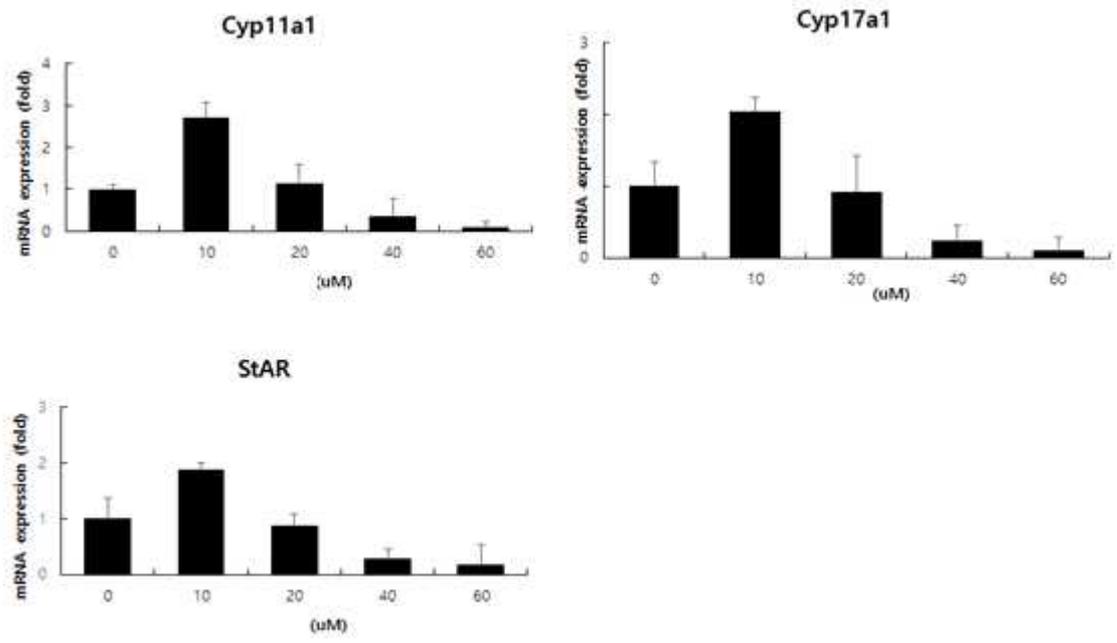


그림3-5-35. TM3 세포의 RTPOL 처리에 의한 Star, Cyp11a1, Cyp17a mRNA 발현양상

◎ 전임상 생리적 평가: 기타 세포주를 통한 소재 검증 및 개발(후성유전적 기전 포함)

○ 소재의 방광평활근(HBdSMC)에서 과민성방광과 관련있는 connexin 43, 44, pannexin1의 발현 변화

소재처리 후 Cx-43, Cx-45, pannexin1 mRNA 발현 검증, EPI-FA-01, 02, 03 활용 가치 있음

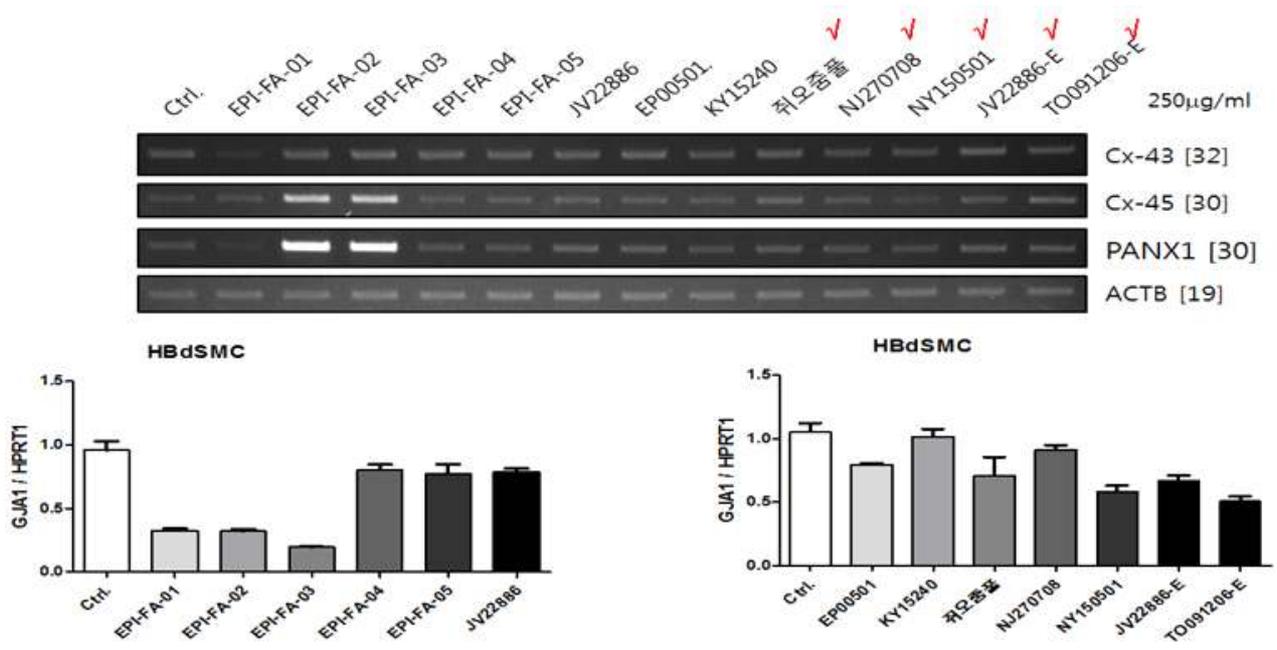


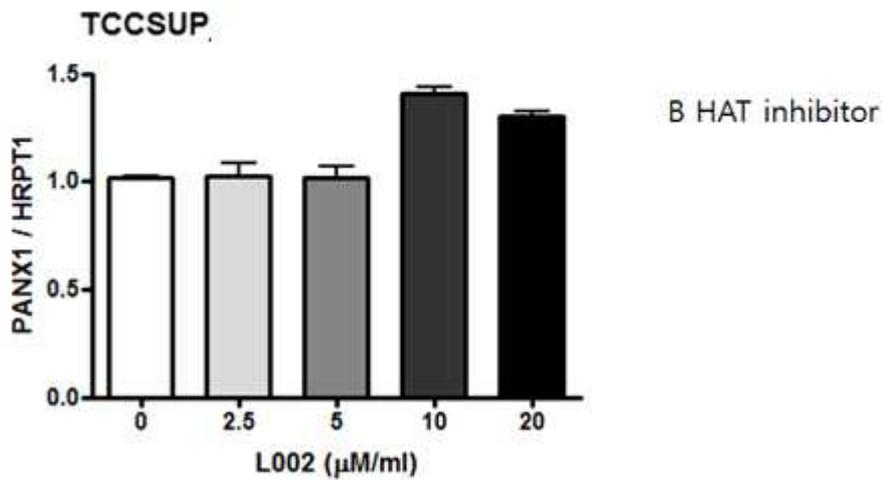
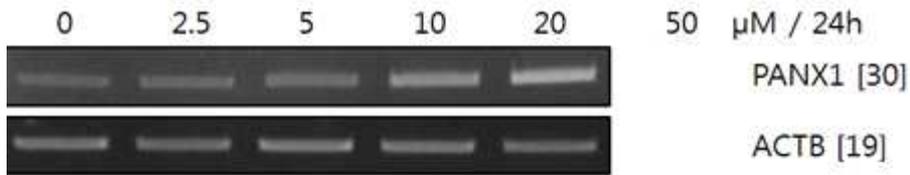
그림3-5-35. T

○ 후성유전 조절인자 histone acetyltransferase(HAT) inhibitor소재의 방광상피세포(HBUC)에서 hemichannel 발현 감소(점막 자극에 관여할 수 있는 타깃)

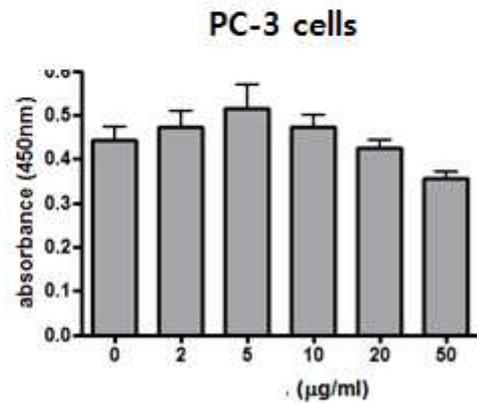
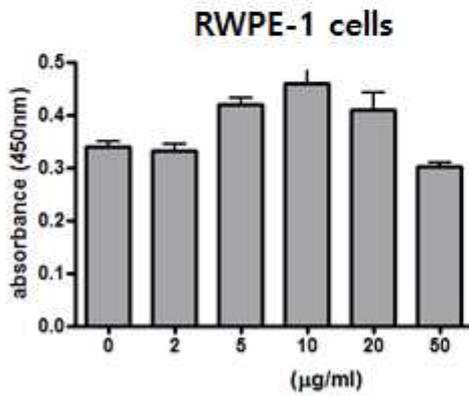
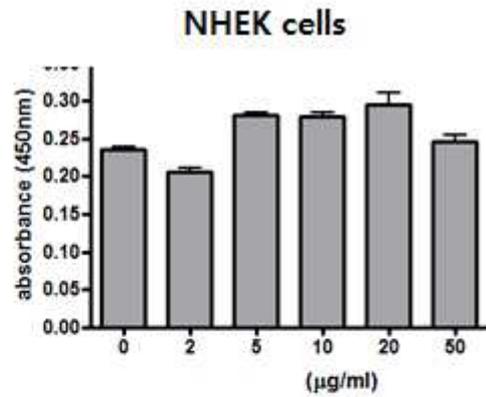
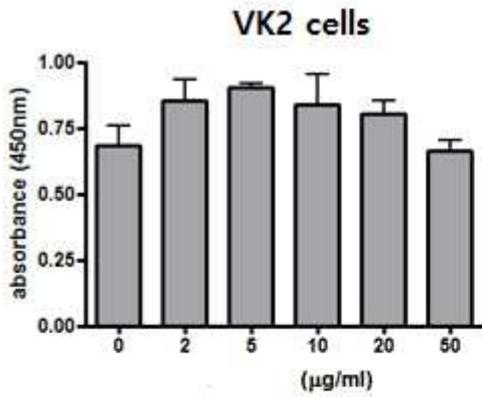
· anacardic acid: a HAT inhibitor



· HAT inhibitor B: PANX1 발현 증가 가능성 있으므로 방광 감각 저하시 활용 가능

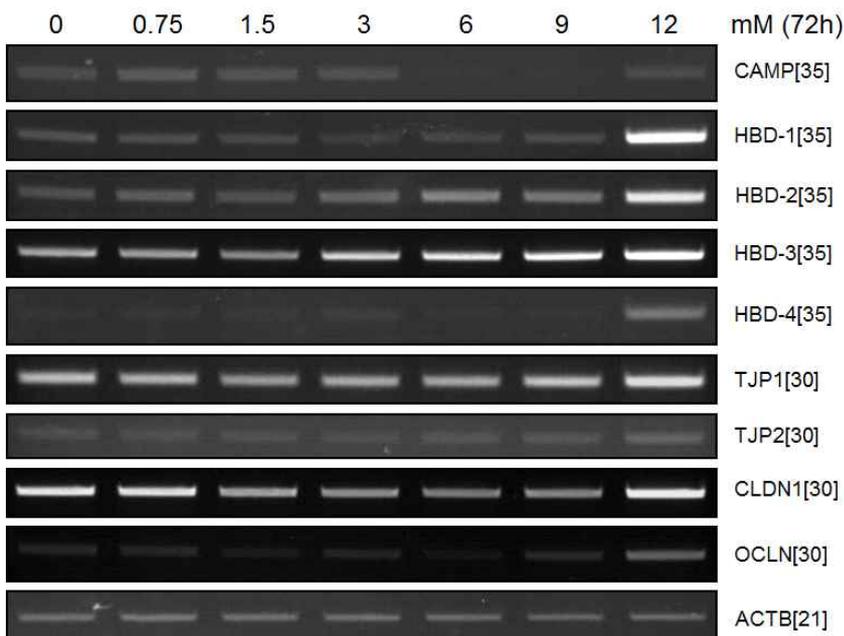


○ stilbenoid 계통의 물질 투여후 VK2(질상피세포), NHEK(피부상피세포), RWPE-1(전립선비대증세포), PC-3(전립선암세포의 증식능을 확인): 피부 및 질 상피 보호효과

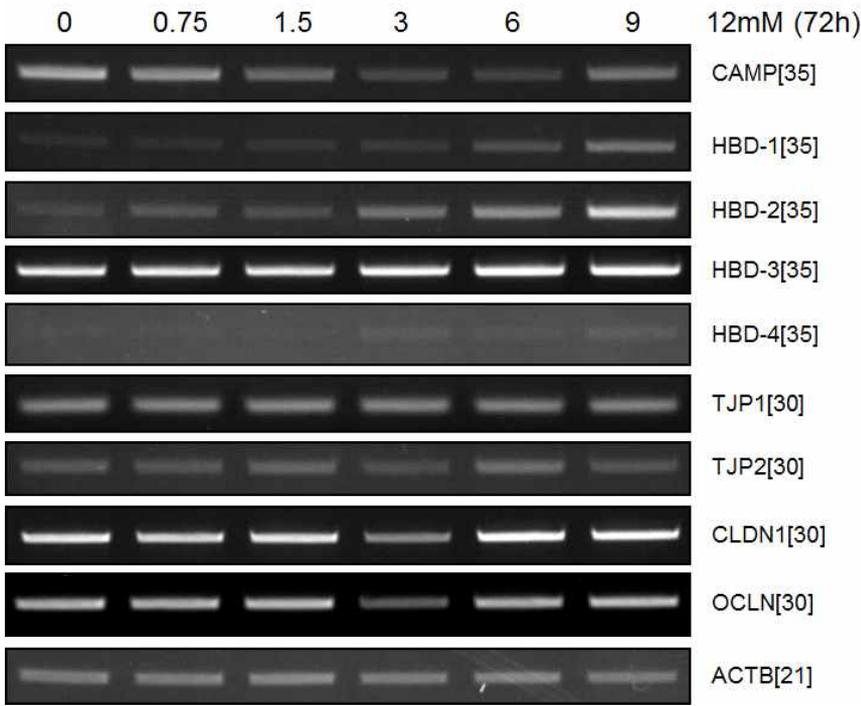


○ BRACD 물질의 편평상피 자연면역 강화효과

· 피부상피세포(NHEK)에 처리하여 피부건강에 매우 중요한 항균 펩티드(HBD-1, HBD-2, HBD-3, HBD4) 현저히 증가함을 확인함

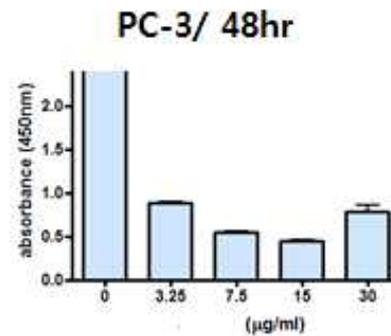
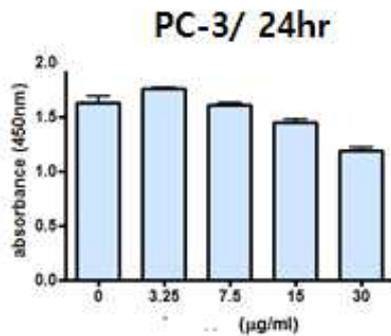
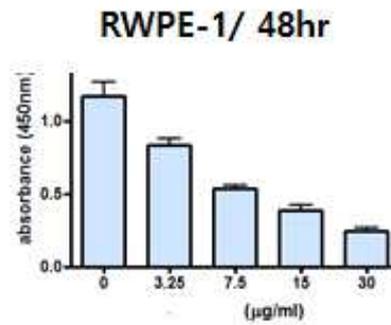
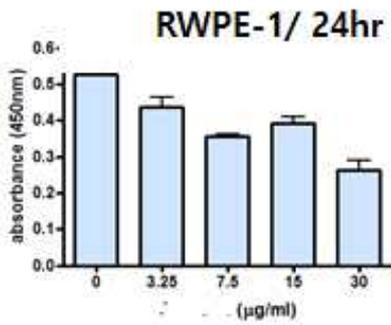


· 질점막세포(VK2)에 처리하여 피부건강에 매우 중요한 항균 펩티드(HBD-1, HBD-2, HBD-3) 현저히 증가함을 확인함



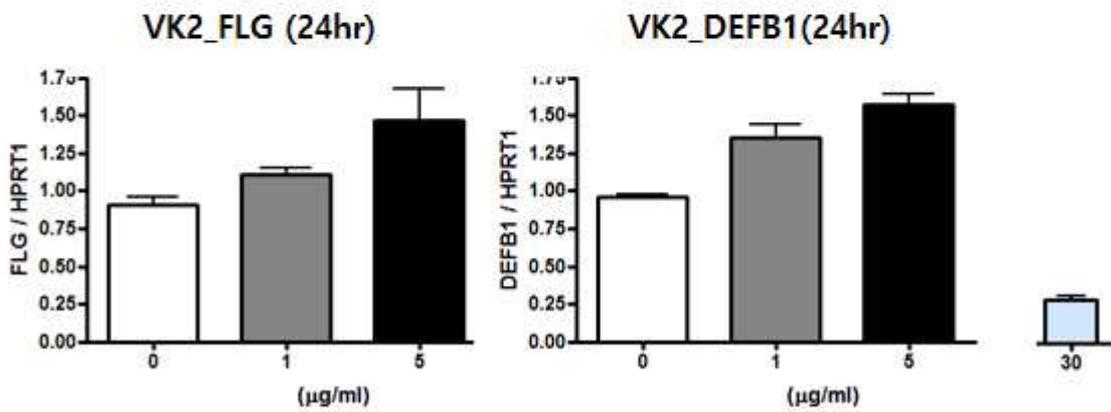
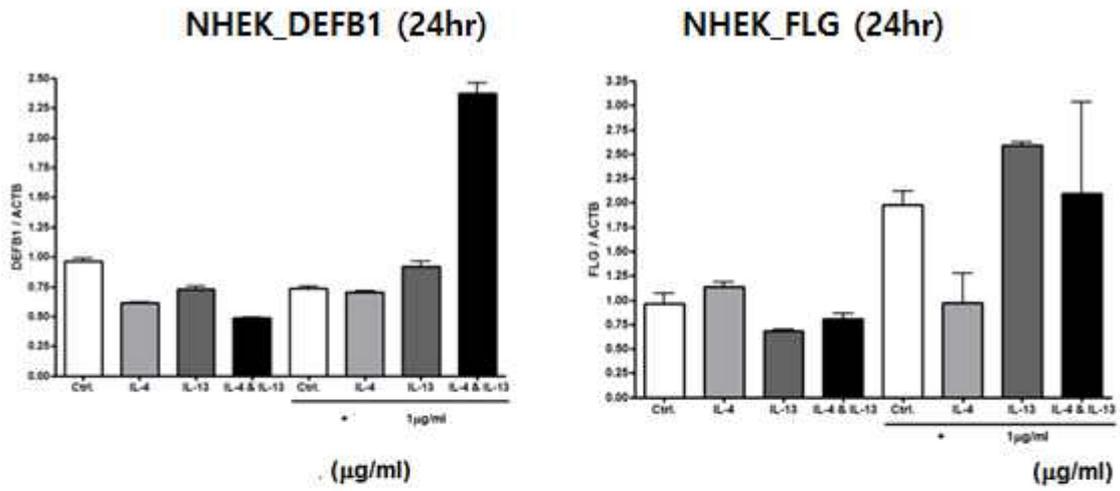
○ OSMT가 전립선질환, 피부 및 질 상피 건강에 유용할 가능성 확인

· 전립선세포 RWPE-1(전립선비대증 세포), PC-3(전립선암세포) 모두 증식을 억제함

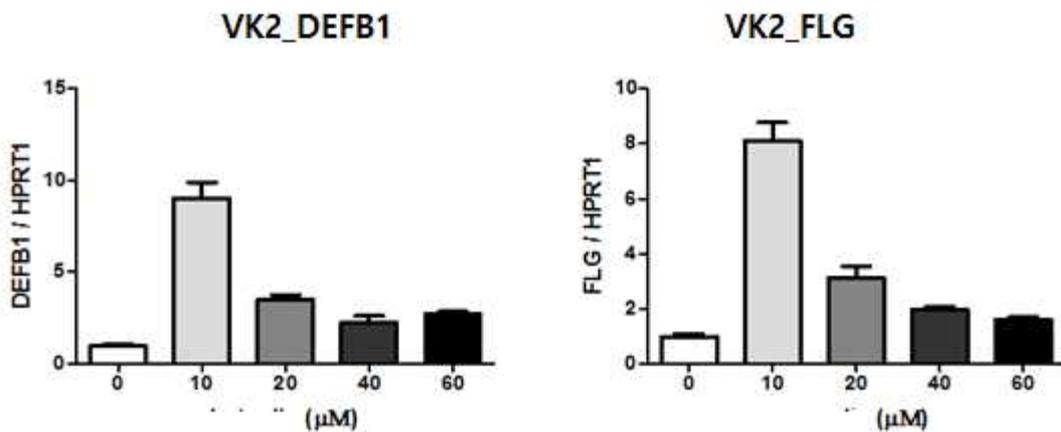


· 피부세포(NHEK)에서 피부염이나 보습에 중요한 항균펩티드 HBD-1과 filaggrin의 발현을 증가시킬 가능성을 확인함. IL-4, IL-13은 피부염을 일으키는 cytokines임

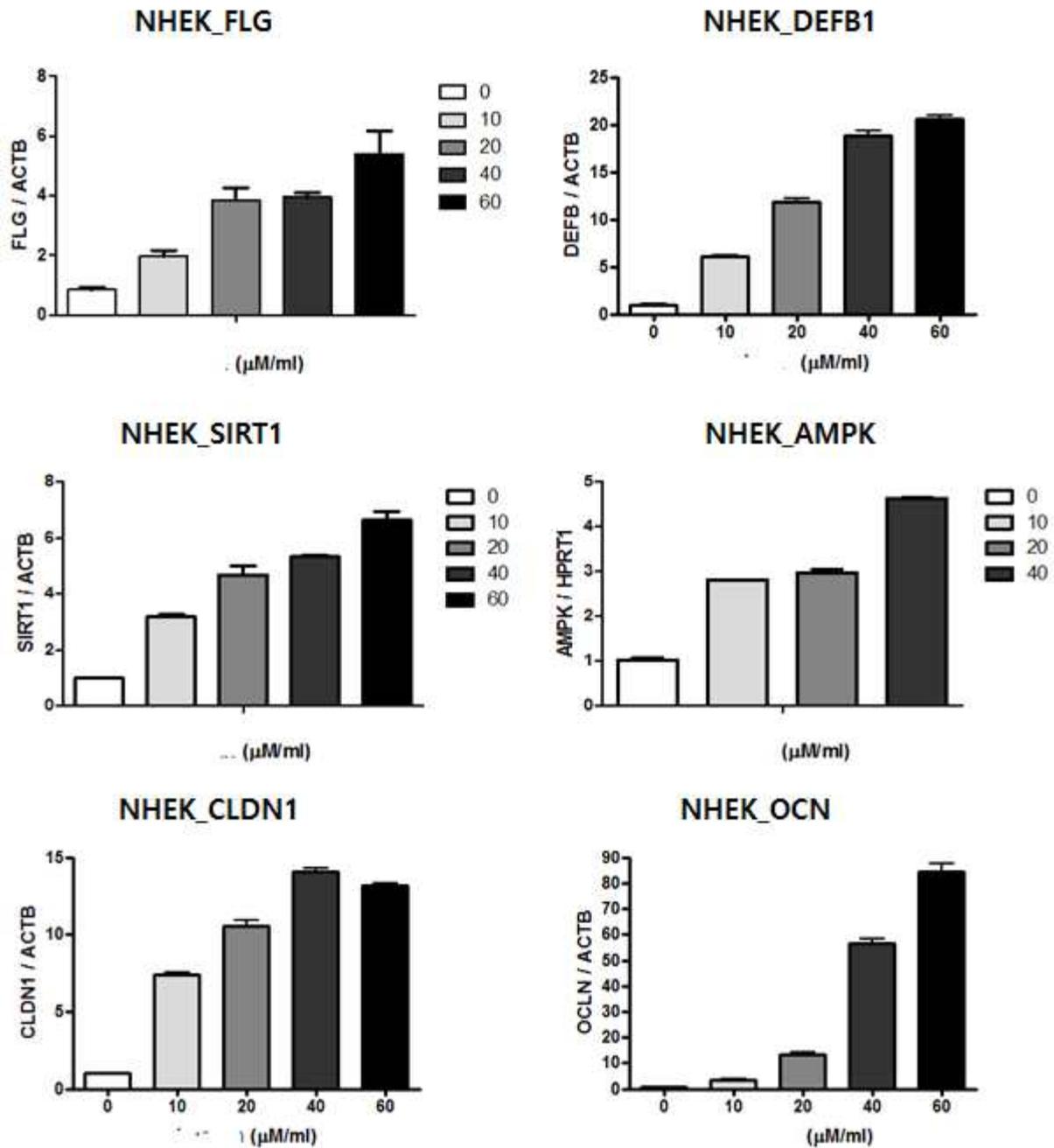
· 질상피세포(VK2)에서 fillaggrin, 항균펩티드 HBD-1발현 증가시킴. 질건강에 활용 가능



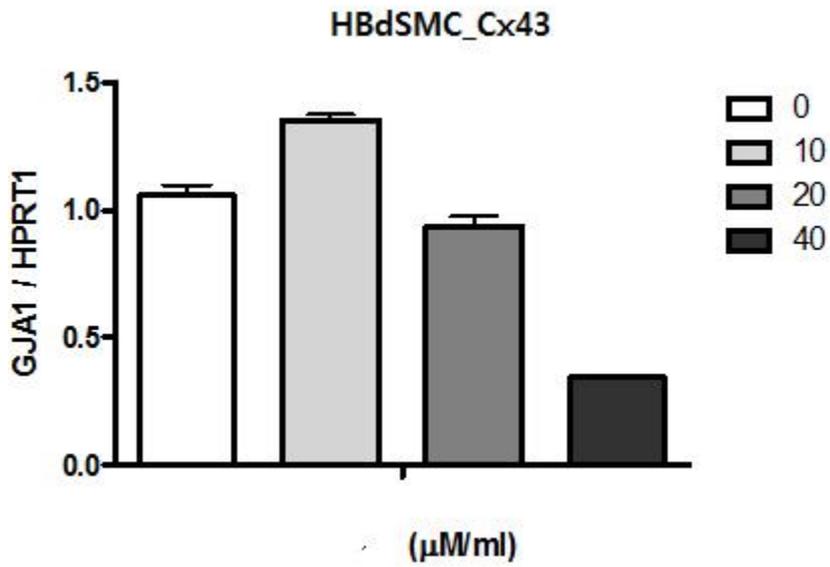
- RTOL의 효과
  - 질 상피세포에서 항균펩티드 발현 증가



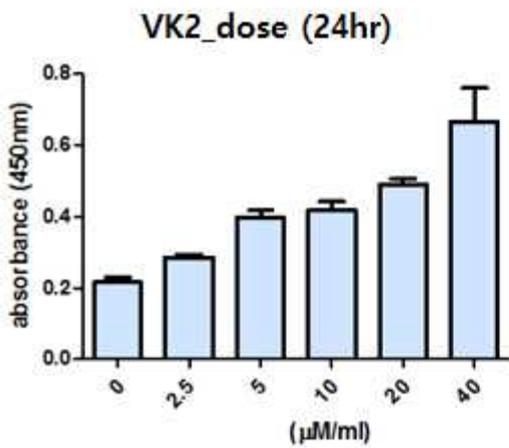
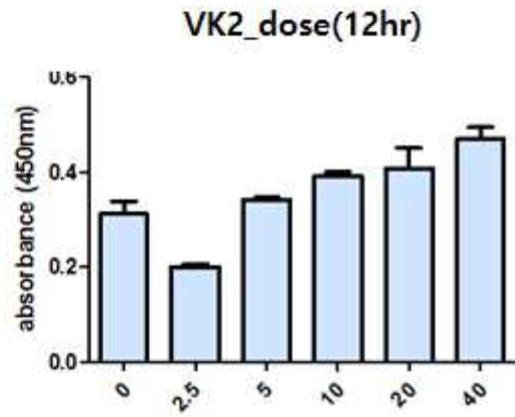
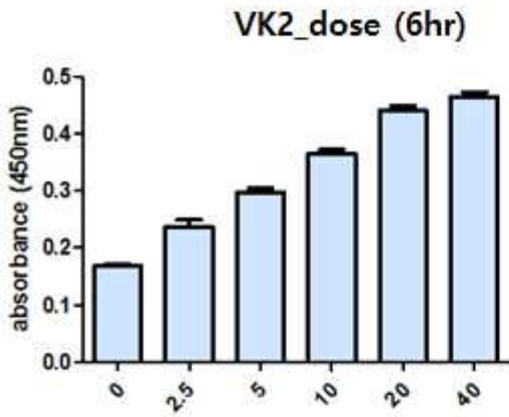
- TRST의 효과
  - 피부세포에서 filaggrin과 HBD-1, sirt1, AMPK, claudin, occludin 증가시켜 피부보호 가능성 높음
  - NFKB p65, acetylated p65, SP-1을 억제함



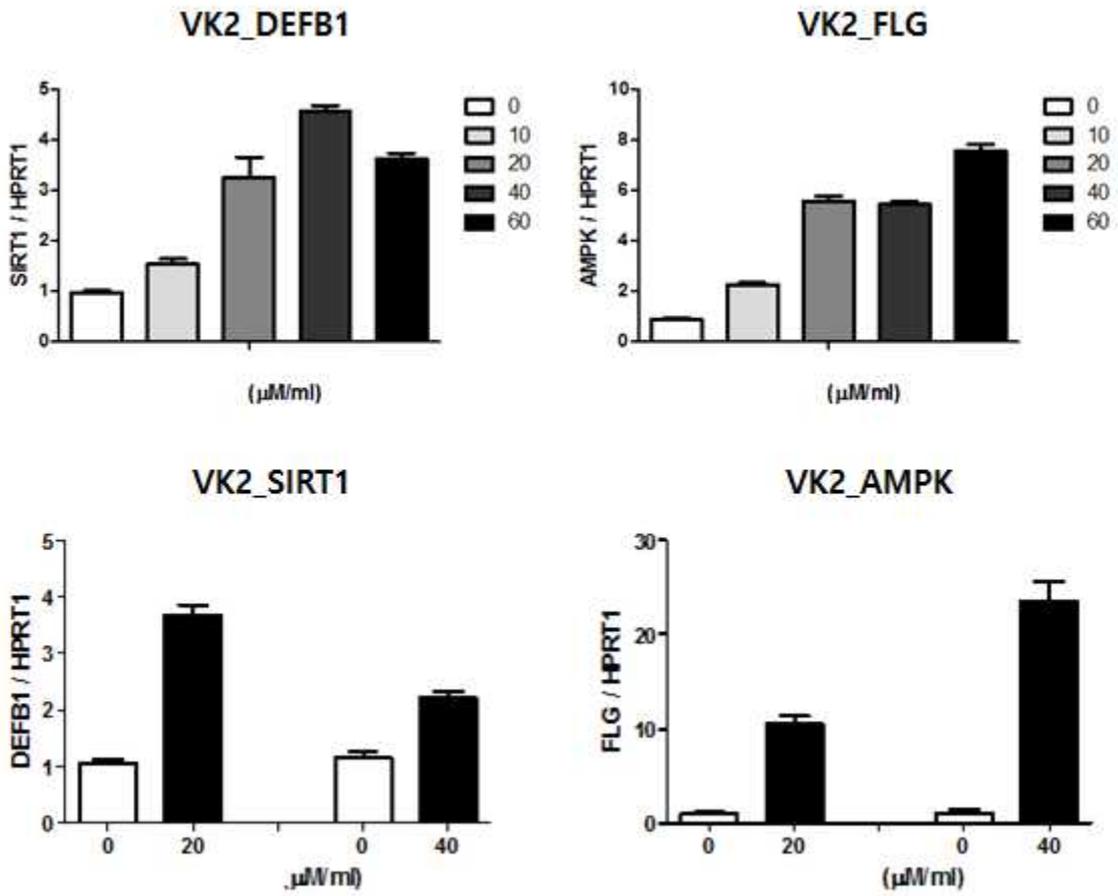
방광평활근에서 connexin-43을 억제하고 pannexin1을 증가시키므로 과민성방광을 억제할 가능성이 있음



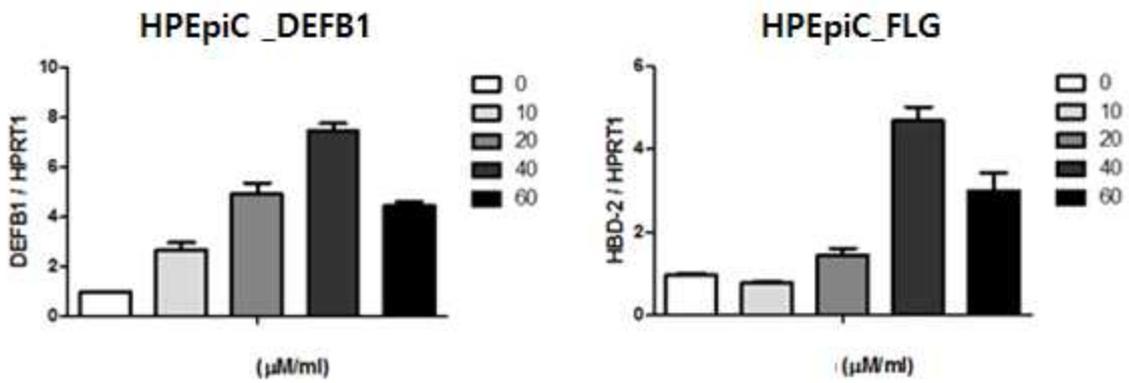
· 질점막세포 보호효과: 증식능 증가, AMPK, sirt1 발현 증가, filaggrin(FLG), HBD-1 발현증가  
 - MTT assay



- real time PCR



· 전립선상피세포에서 항균펩티드 발현 증가: 전립선 면역증강에 효과 있을 가능성



4차 년도

1. testosterone을 생성하는 mouse Leydig cell인 TM3에 A를 처리하여서 남성갱년기 개선 효능 확인하는 실험

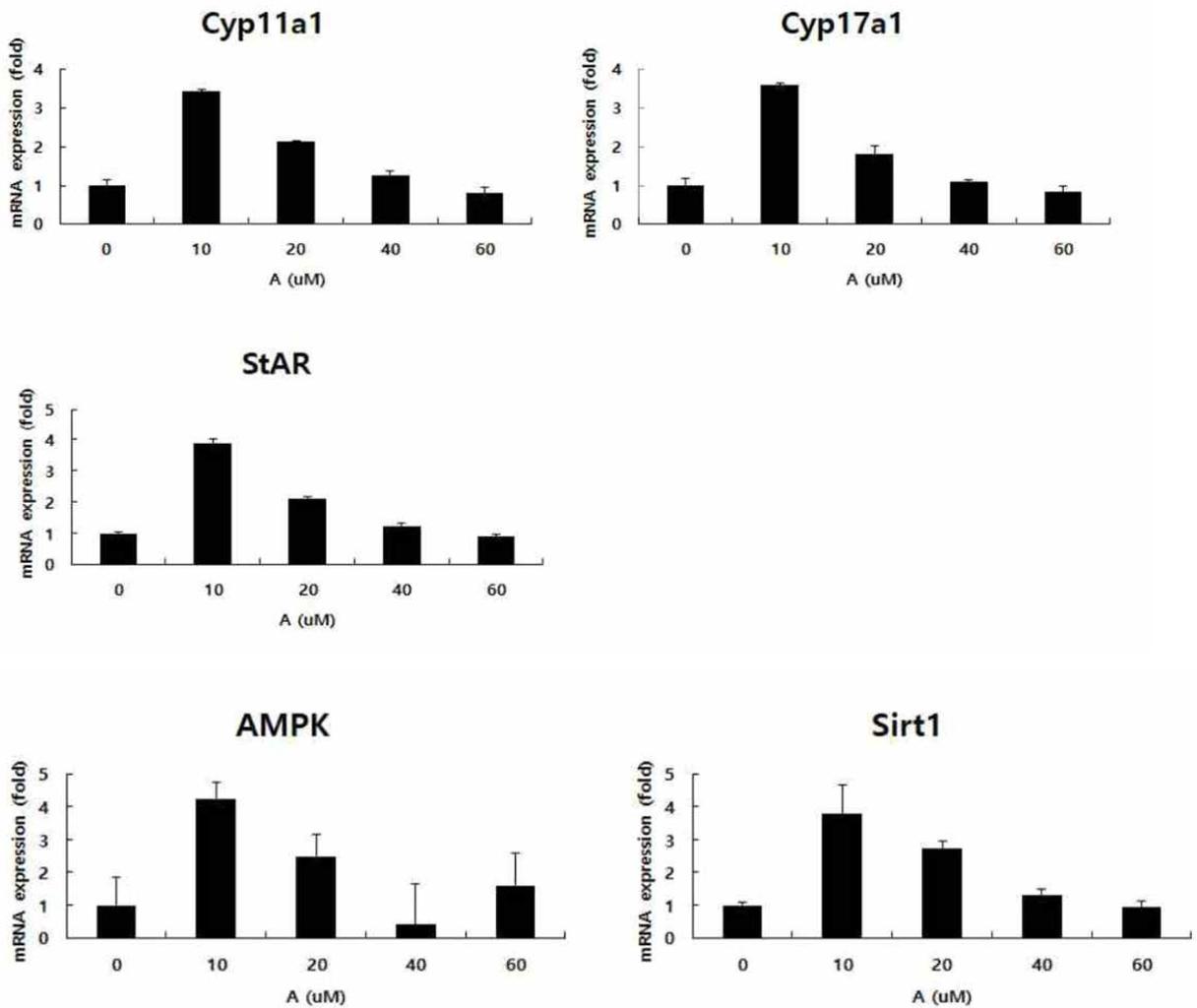


그림3-5-15. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR, AMPK, Sirt1 mRNA양을 측정.

TM3 Leydig 세포에 A 물질 0, 10, 20, 40, 60uM을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA와 노화관련 기작을 확인하고자 주요 유전자인 AMPK, Sirt1 mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 효소인 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR와 노화 관련 AMPK, Sirt1의 mRNA 발현은 A물질 10uM처리시에 유의적으로 증가함.

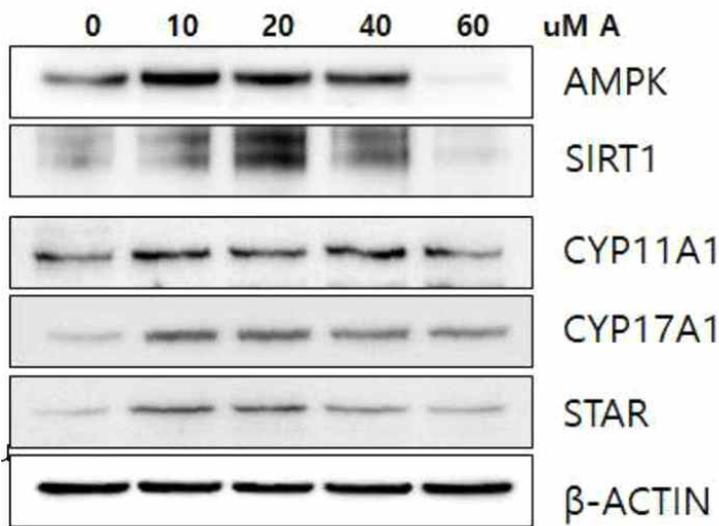


그림3-5-16. CYP11A1, CYP17A1, STAR, AMPK, SIRT1 단백질양 측정.

TM3 Leydig 세포에 A물질 0, 10, 20, 40, 60uM을 48시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양과 노화 관련 AMPK, SIRT1의 단백질양을 Western Blotting을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양이 A물질 20, 40uM 처리시에 증가함. 노화관련 유전자인 AMPK 는 A 물질 10uM 처리시, SIRT1은 A 물질 20uM 처리시에 증가함.

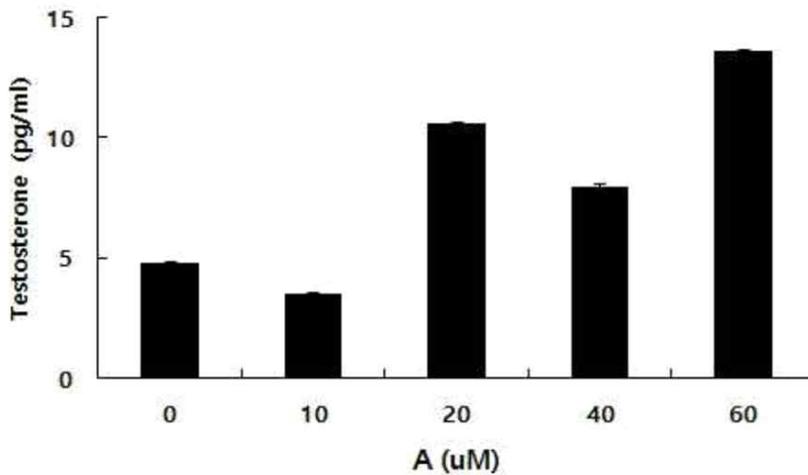


그림3-5-17. TM3 Leydig 세포 상등액에서 생성된 테스토스테론의 양 측정

TM3 Leydig 세포에 A물질 0, 10, 20, 60uM을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정.

### 3. 질상피세포에 A 물질을 처리하여서 케라틴결합단백질 (Filaggrin, FLG)의 발현양상을 확인하는 실험

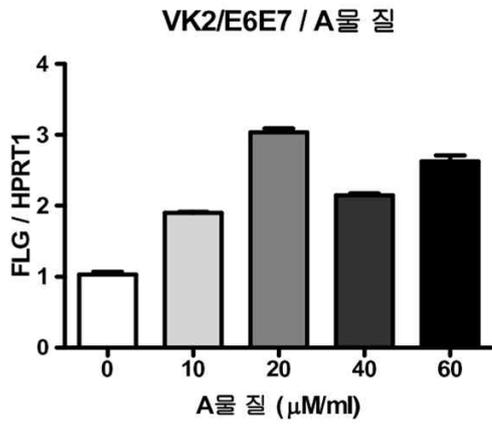


그림3-5-18. 질상피세포에서 A물질에 의한 케라틴결합단백질 (Filaggrin, FLG)의 mRNA발현 양상  
 질상피세포에 A 물질 0, 10, 20, 40, 60uM을 24시간 처리하여서 mRNA 발현 양상을 qRT-PCR로 확인.  
 A 물질 20uM 처리시 FLG의 mRNA발현양이 증가함.

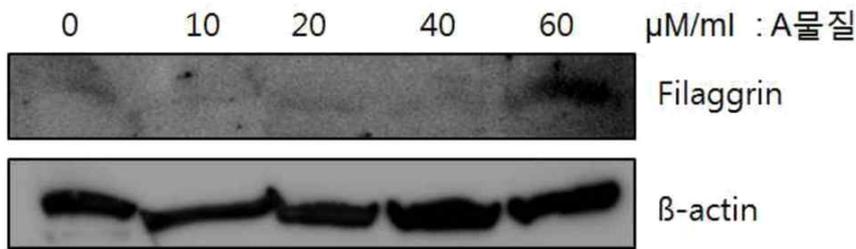


그림 4. 질상피세포에서 A물질에 의한 케라틴결합단백질 (Filaggrin, FLG)의 단백질 발현 양상  
 질상피세포에 A 물질 0, 10, 20, 40, 60uM을 24시간 처리하여서 단백질발현 양상을 Western blotting로  
 확인. A 물질 60uM 처리시 FLG의 단백질발현양이 증가함.

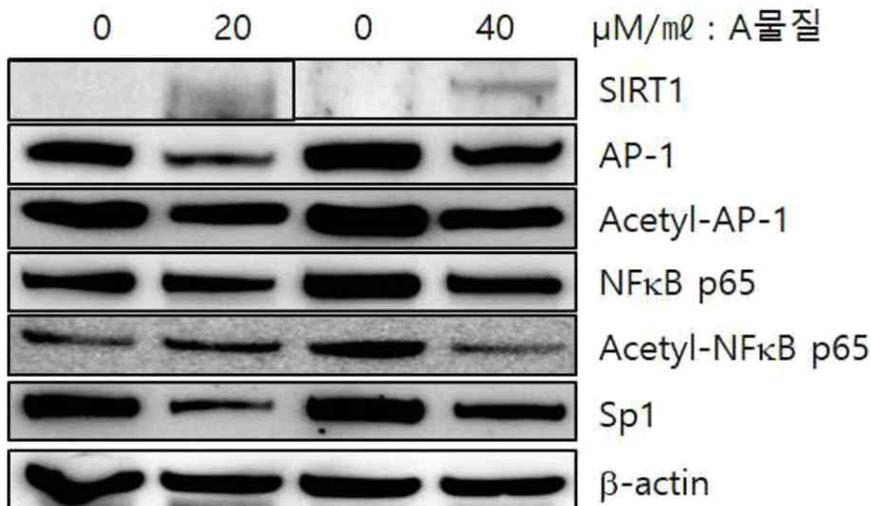


그림3-5-19. 질상피세포에서 A물질에 의한 케라틴결합단백질 (Filaggrin, FLG), Sirt1, NFκB, acetylated  
 NFκB p65, AP-1, acetylated AP-1의 단백질 발현 양상,  
 질상피세포에 A 물질 0, 10, 20, 40, 60uM을 24시간 처리하여서 단백질발현 양상을 Western blotting로  
 확인. A 물질 60uM 처리시 FLG, sirt1의 단백질발현양이 증가함. NFκB, acetylated NFκB p65, AP-1,  
 acetylated AP-1발현은 감소함

4. testosterone을 생성하는 mouse Leydig cell인 TM3에 B를 처리하여서 남성 갱년기 개선 효능 확인하는 실험

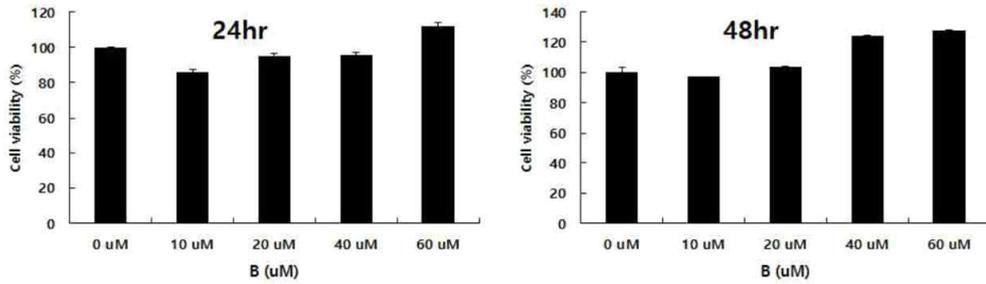


그림3-5-20. B 물질을 처리한 TM3 Leydig 세포 생존력 측정.

B 물질의 다양한 농도, 0, 10, 20, 40, 60uM을 TM3세포에 24시간과 48시간동안 처리하여서 세포 생존력을 MTT assay를 통해서 확인. B 물질은 세포증식에 유의적으로 증가하지 않았음.

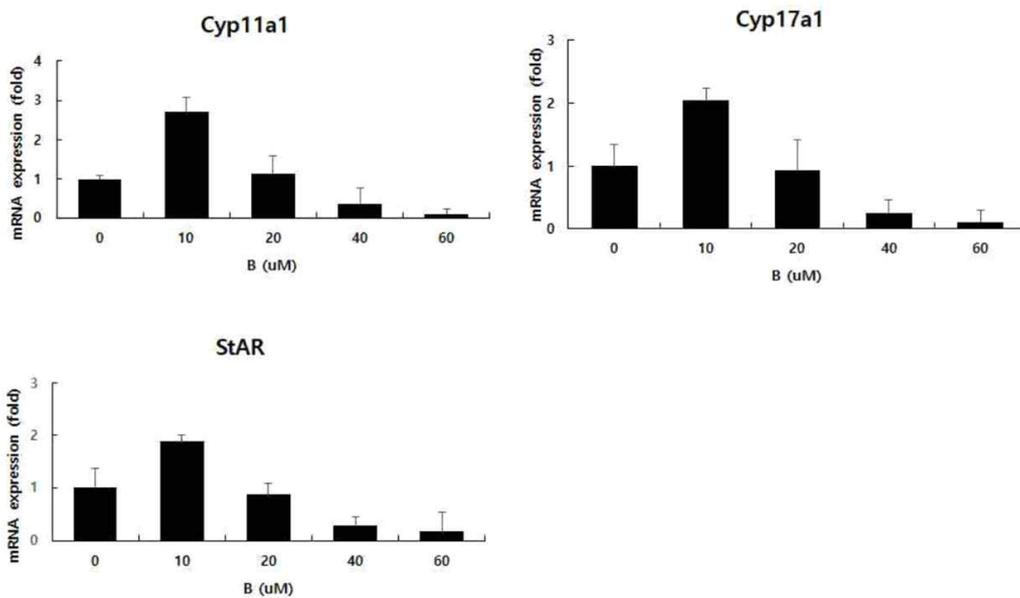


그림3-5-21. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA양을 측정.

TM3 Leydig 세포에 B 물질 0, 10, 20, 40, 60uM을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 효소인 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR의 mRNA 발현은 B 물질10uM처리시에 증가함.

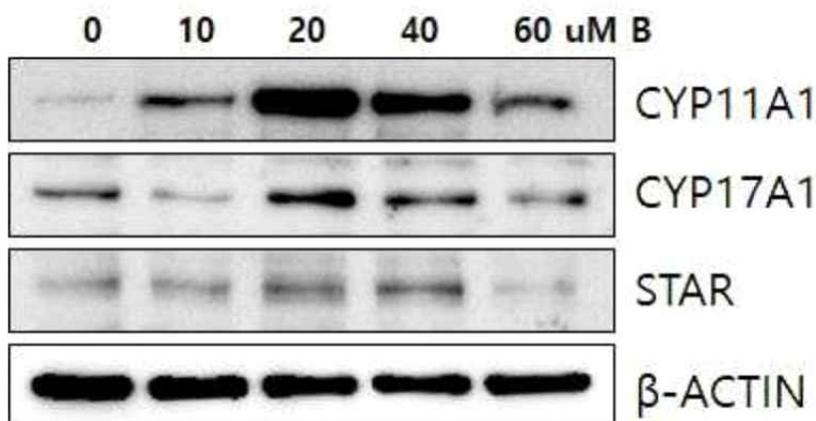


그림3-5-22. CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양 측정.

TM3 Leydig 세포에 B 물질 0, 10, 20, 40, 60uM을 48시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양을 Western Blotting을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양이 B 물질 20, 40uM 처리시에 증가함.

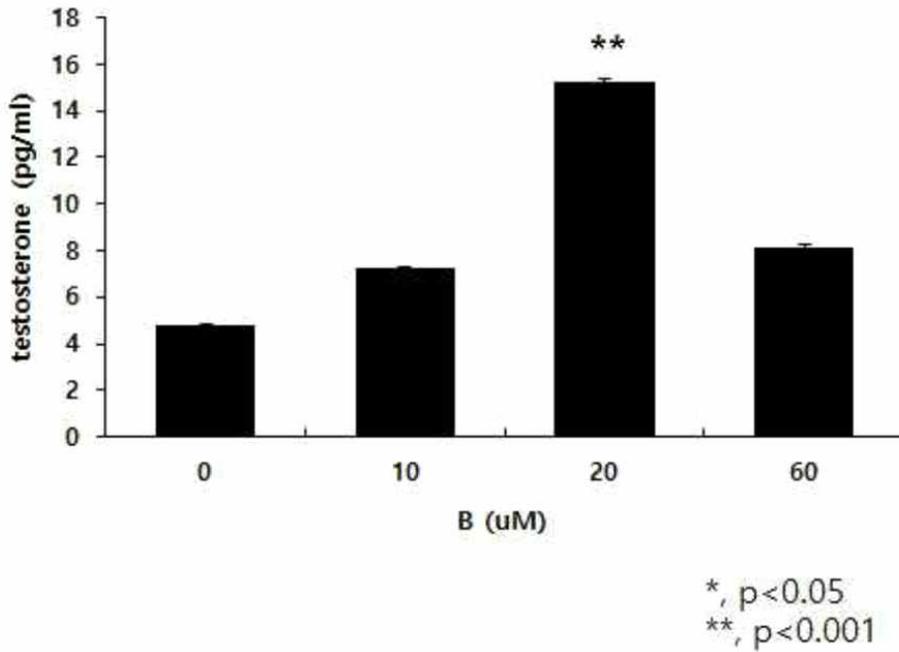


그림3-5-23. TM3 Leydig 세포 상등액에서 생성된 테스토스테론의 양 측정

TM3 Leydig 세포에 B 물질 0, 10, 20, 60uM을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정. B 물질 20uM처리군에서 testosterone의 생성이 유의적으로 증가함.

© 5차년도

1. 여성갱년기 인체실험 완료: 임상시험 종료보고서 제출 및 종료 승인 득함. 개별인전형 건강기능식품 승인 신청(산업체 결과 보고 참조)

2. 전임상 생리 기전/영향 평가

testosterone을 생성하는 mouse Leydig cell인 TM3에 GC, YK, MS 천연물 소재를 처리하여서 남성갱년기 개선 효능 확인하는 실험(3가지 소재 특허 출원 예정)

1) GC가 남성갱년기 기전에 미치는 영향 연구

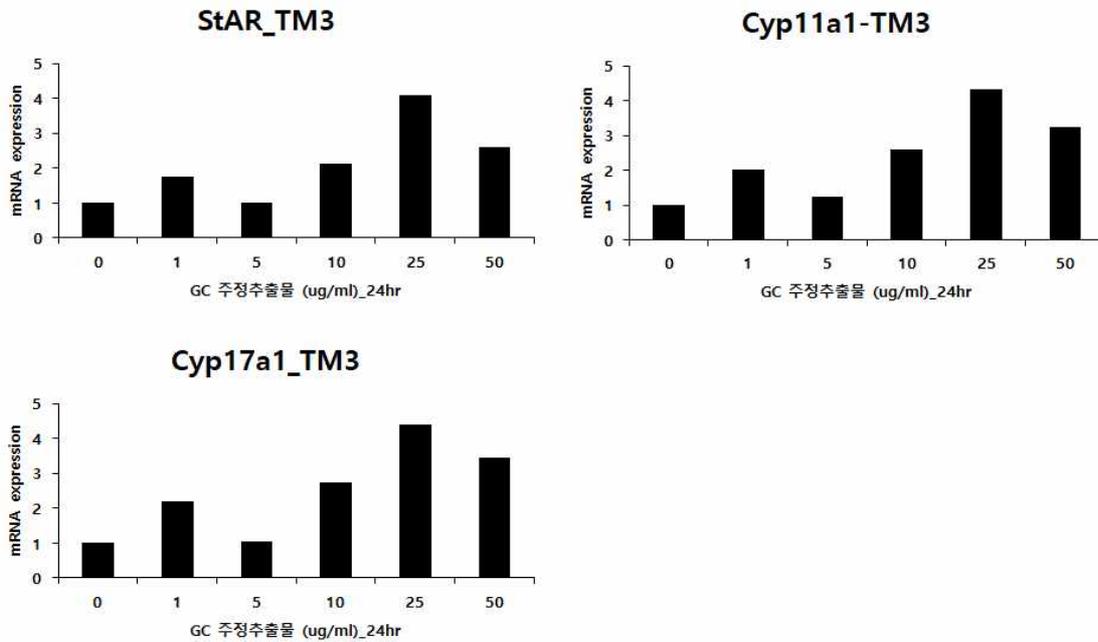


그림3-5-26. StAR, Cyp11a1, Cyp17a1 mRNA양을 측정.

TM3 Leydig 세포에 GC 물질 0, 1, 5, 10, 25, 50 ug/ml을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 StAR, Cyp11a1, Cyp17a1 mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. GC 농도 의존적으로 처리시 남성호르몬의 중요한 효소인 StAR, Cyp11a1, Cyp17a1 mRNA 발현은 증가함.

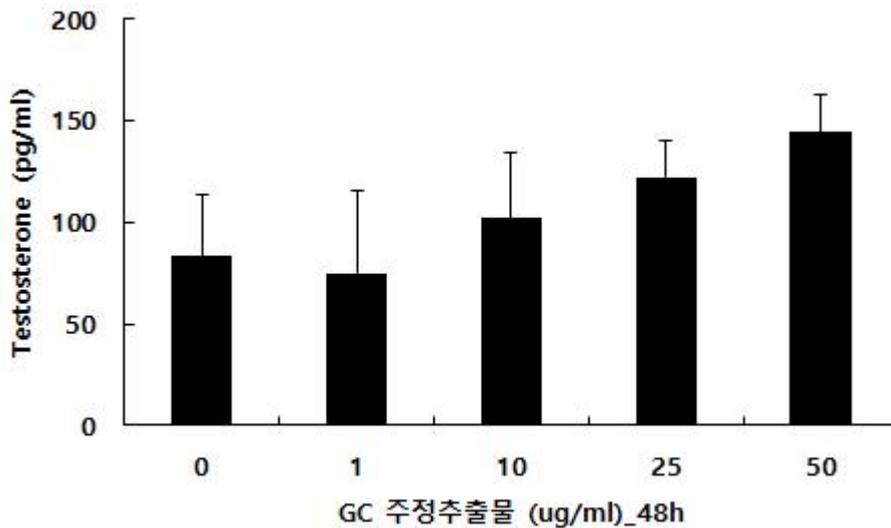


그림3-5-27. TM3 Leydig 세포 상등액에서 생성된 테스토스테론의 양 측정

TM3 Leydig 세포에 GC물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/ml을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정 농도 의존적으로 증가함.

2) YK가 남성갱년기 기전에 미치는 영향 연구

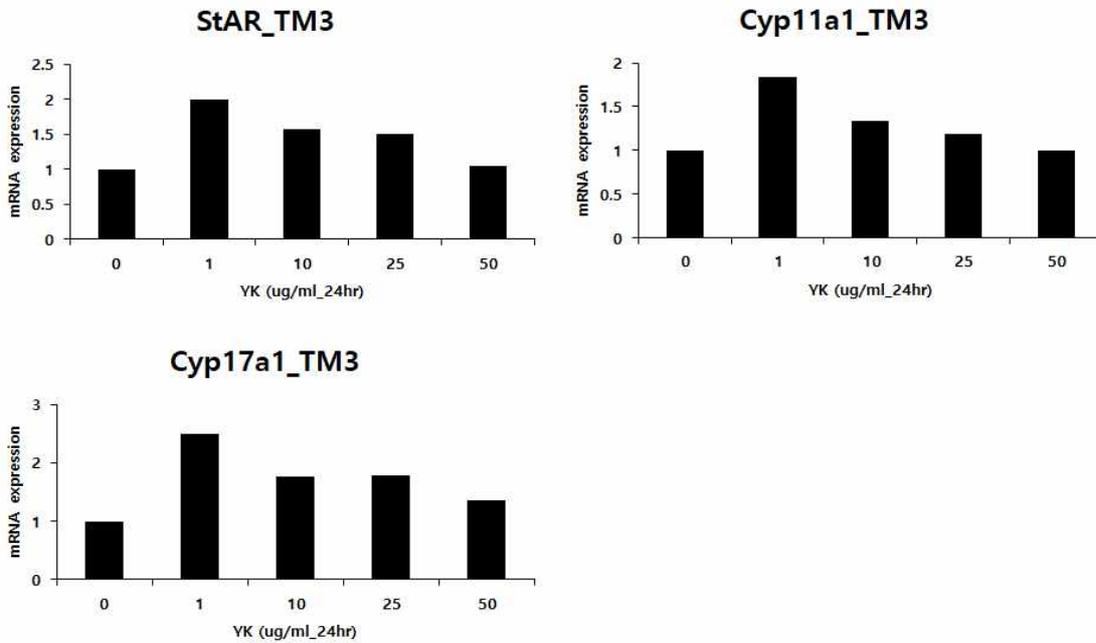


그림3-5-28. StAR, Cyp11a1, Cyp17a1 mRNA양을 측정.

TM3 Leydig 세포에 YK물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/ml을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 StAR, Cyp11a1, Cyp17a1 mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 효소인 StAR, Cyp11a1, Cyp17a1의 mRNA 발현 YK물질 1ug/ml 처리시에 유의적으로 증가함.

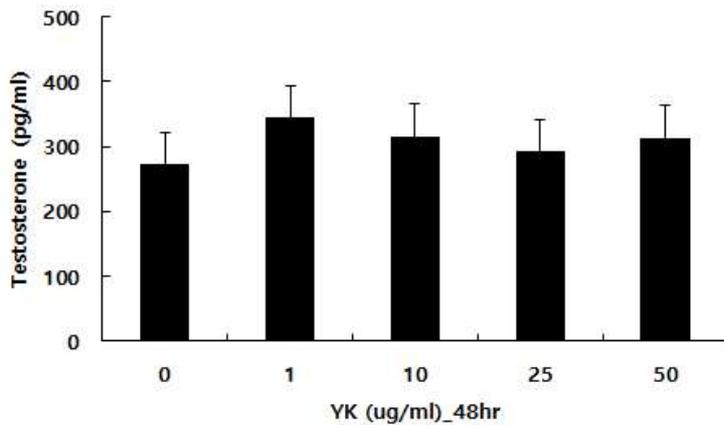


그림3-5-29. TM3 Leydig 세포 상등액에서 생성된 테스토스테론의 양 측정

TM3 Leydig 세포에 YK물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/ml을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정. 1ug/ml 처리시에 테스토스테론이 증가함을 확인함.

3) MS가 남성갱년기 기전에 미치는 영향 연구.

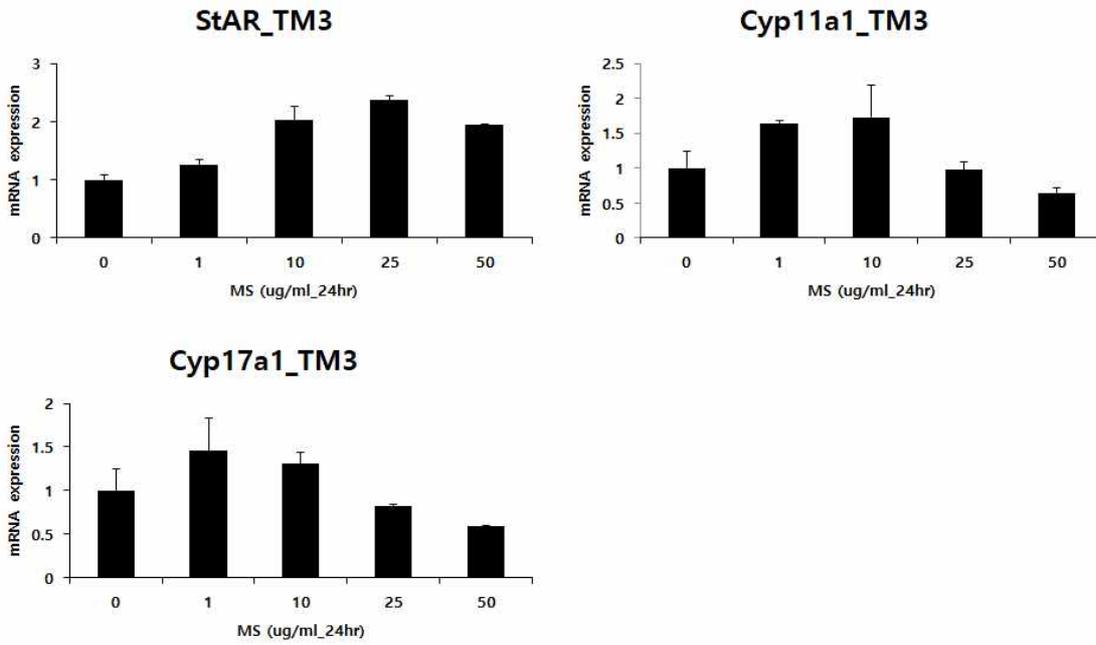


그림30. StAR, Cyp11a1, Cyp17a1 mRNA양을 측정.

TM3 Leydig 세포에 MS물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/ml을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 StAR, Cyp11a1, Cyp17a1 mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인.

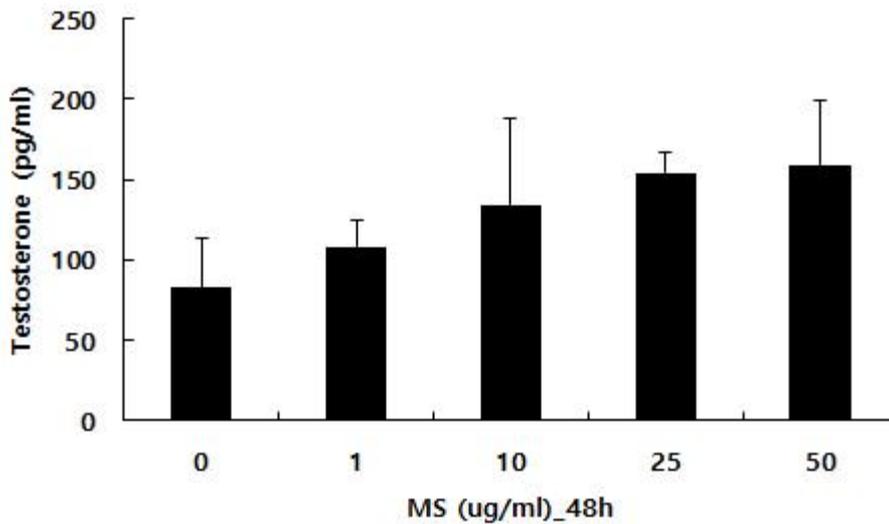


그림3-5-31. TM3 Leydig 세포 상등액에서 생성된 테스토스테론의 양 측정

TM3 Leydig 세포에 MS 물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/ml을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정 MS물질 농도의존적으로 증가함.

3. 제품의 시장 장악력을 높이기 위한 생리 연구: Heat inactivated bacteria를 활용한 질건강 소재 검증 및 후성유전학적 연구

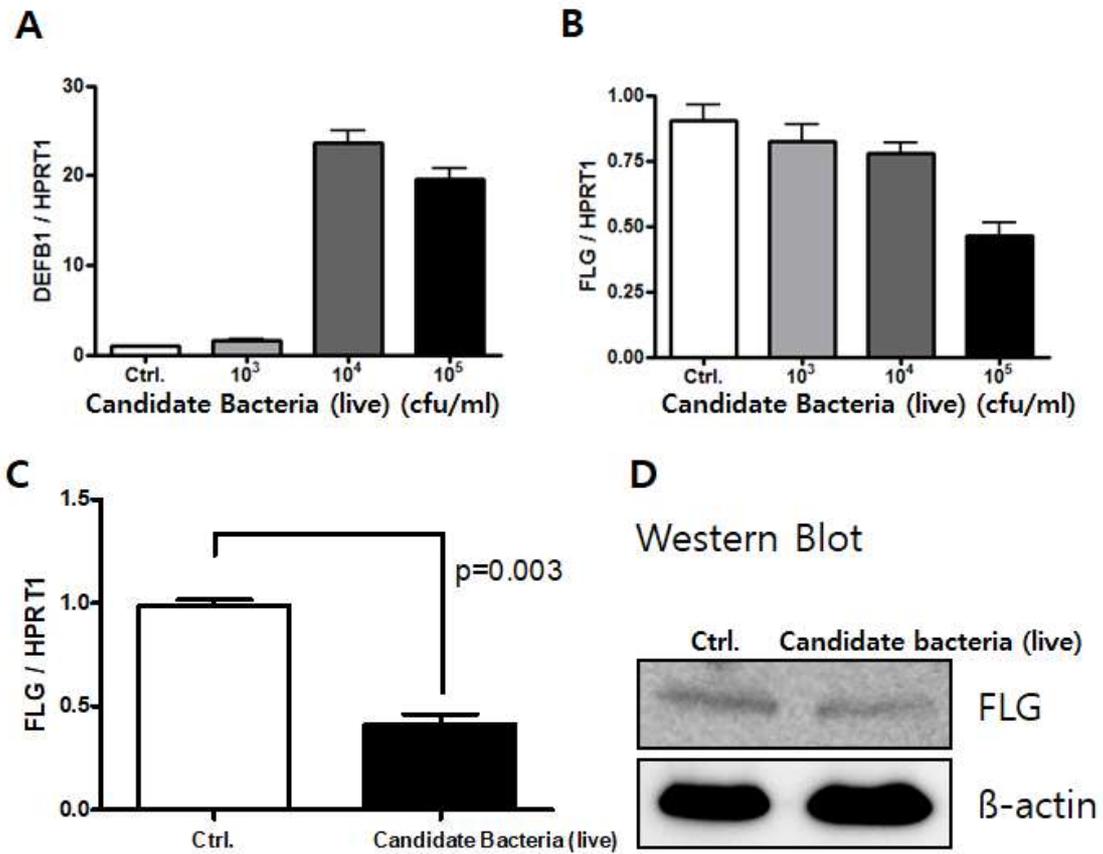


그림3-5-32. 질 상피세포 (VK2)에 live candidate bacteria 처리시 DEFEB1과 FLG mRNA 와 단백질 발현 양상

질상피 세포에 live candidate bacteria 를 처리하였음. 0, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> cfu/ml 로 처리하여서 DEFEB1(constitutive for antimicrobial peptide, human beta-defensin-1)(A)과 filaggrin(FLG, barrier protein)(B) mRNA 발현 양상을 확인하였음. 케라틴 결합 단백질인 FLG의 mRNA 의 발현이 유의적으로 감소함을 확인함(C). FLG의 단백질 발현도 감소함을 확인함. HBD-1은 증가함.

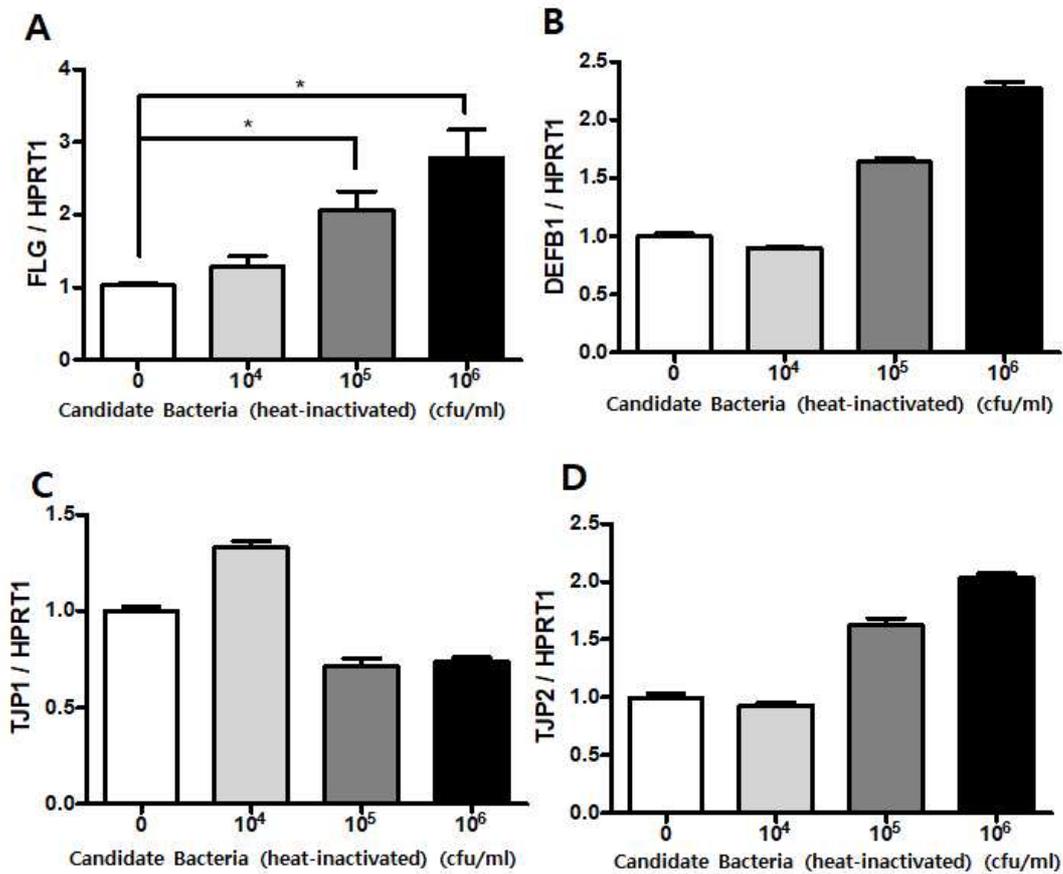


그림3-5-33. 질 상피세포 (VK2)에 candidate bacteria (heat-inactivated) 처리시 DEFB1, FLG, TJP1과 TJP2 mRNA 발현 양상

질상피 세포에 candidate bacteria (heat-inactivated)를 처리하였음. 0, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> cfu/ml 로 처리하여서 FLG(A), DEFB1(B) 와 tight junction단백질인 TJP1(C), TJP2(D) mRNA 발현 양상을 확인하였음. FLG의 mRNA 의 발현이 유의적으로 증가함을 확인함(A). DEFB1, tight junction protein 1(TJP1), tight junction protein 2(TJP2)의 mRNA발현도 증가함을 확인함. 즉 사균을 처리했을 때 epithelial barrier protein의 발현이 증가됨을 확인함.

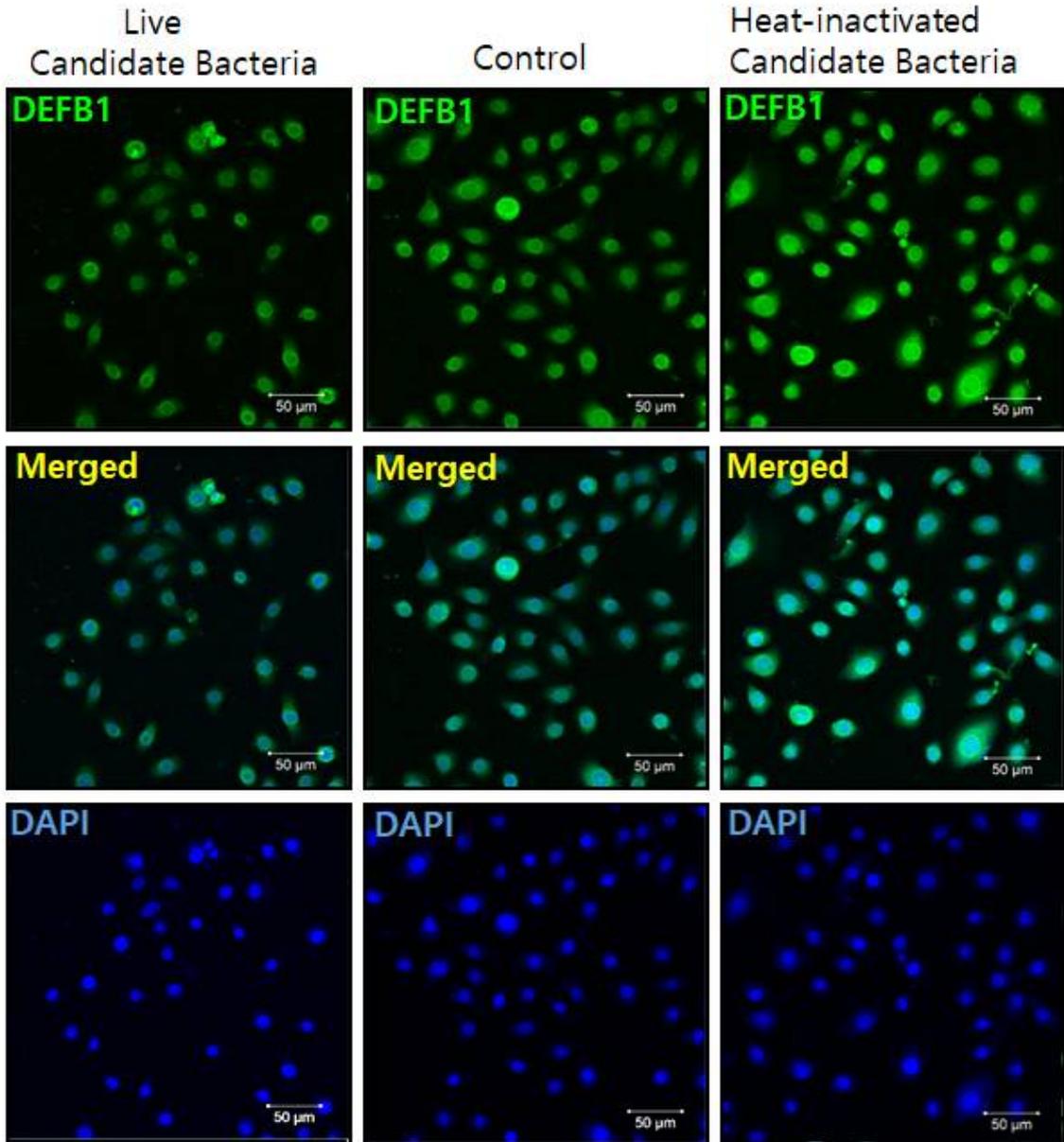


그림3-5-34. DEFB1 immunocytochemistry

질 상피세포 (VK2)에 candidate bacteria의 live와 heat-inactivated 처리 후, DEFB1 의 발현을 confocal microscopy analysis으로 확인함. 질상피 세포에 live candidate bacteria와 heat-inactivated candidate bacteria를 처리하였음. DEFB1(green) live bacteria에서는 물론 heat-inactivation시에도 발현이 여전히 증가되어 질건강 소재로 candidate bacteria 사균을 활용할 수 있음을 확인함.

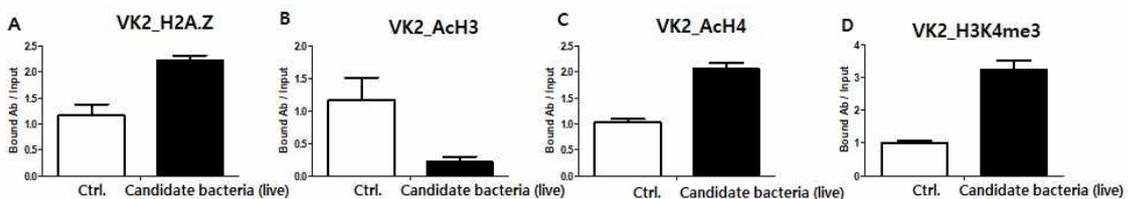


그림3-5-35. 질상피세포(VK2)의 FGL promoter region의 CpG site (-410bp)의 ChIP2 결과

질상피세포(VK2)에 live candidate bacteria 처리 후, 케라틴 결합단백질인 FLG의 유전자 발현의 감소가

histone modification에 의한 조절인지를 확인하고자 chromatin immunoprecipitation(ChIP)을 수행하였다. Histone modification의 active marker로서 H2A.Z (A), AcH3 (B), AcH4 (C), H3K4me3 (D) 항체를 이용하였다. AcH3 ChIP을 한 결과에서 만 감소를 보였다. 질상피세포에 live candidate bacteria에 의해서 케라틴 결합단백질인 FLG의 발현 감소가 histone modification에 의한 가능성이 있으나 다른 histone marker는 증가되었음.

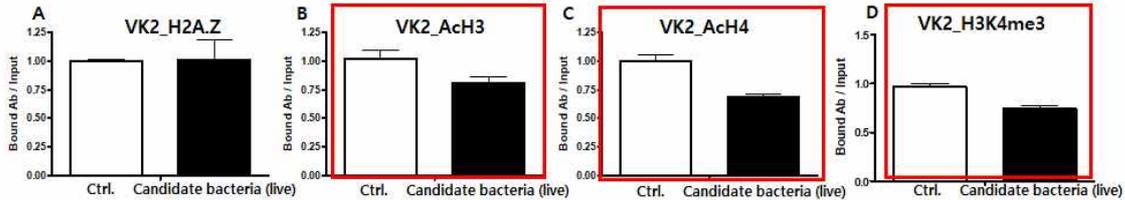


그림3-5-36. 질상피세포(VK2)의 FGL promoter region의 CpG site (-410bp) 부위 및 CpG site (-702bp) 의 ChIP을 시행

질상피세포(VK2)에 live candidate bacteria 처리 후, 케라틴 결합단백질인 FLG의 유전자 발현의 감소함에 있어서 그것이 histone modification에 의한 조절인지를 확인하고자 ChIP방법을 수행하였다. Histone modification의 active marker로서 H2A.Z (A), AcH3 (B), AcH4 (C), H3K4me3 (D) 항체를 사용하여서 확인하였다. FLG발현 감소가 CpG site (-702bp) 부위의 histone modification에 의한 조절 가능성을 시사함.

㉠ 6차년도

1. Testosterone을 생성하는 mouse Leydig cell인 TM3에 BRSS를 처리하여서 남성갱년기 개선 효능 연구

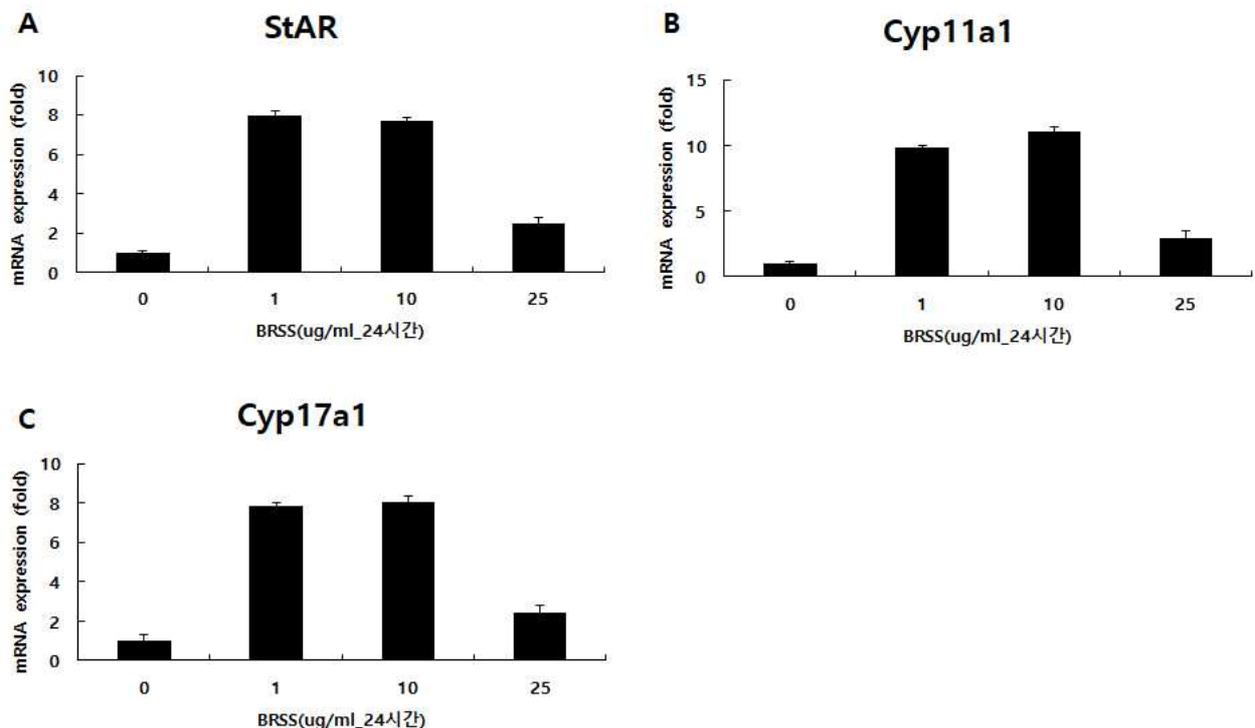


그림3-5-37. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA양을 측정

TM3 Leydig 세포에 BRSS물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/mL을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 효소인 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR의 mRNA 발현은 BRSS 10ug/mL 처리시에 유의적으로 증가함

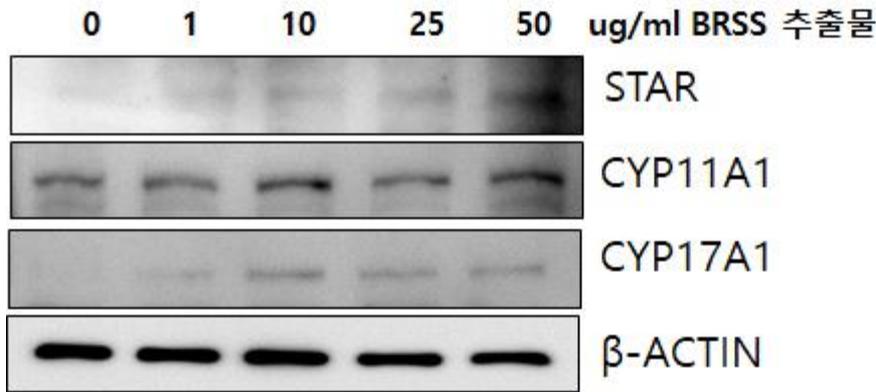


그림3-5-38. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR 단백질양 측정

TM3 Leydig 세포에 BRSS물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/mL을 48시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양을 Western Blotting을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양이 BRSS물질 농도 의존적으로 증가함.

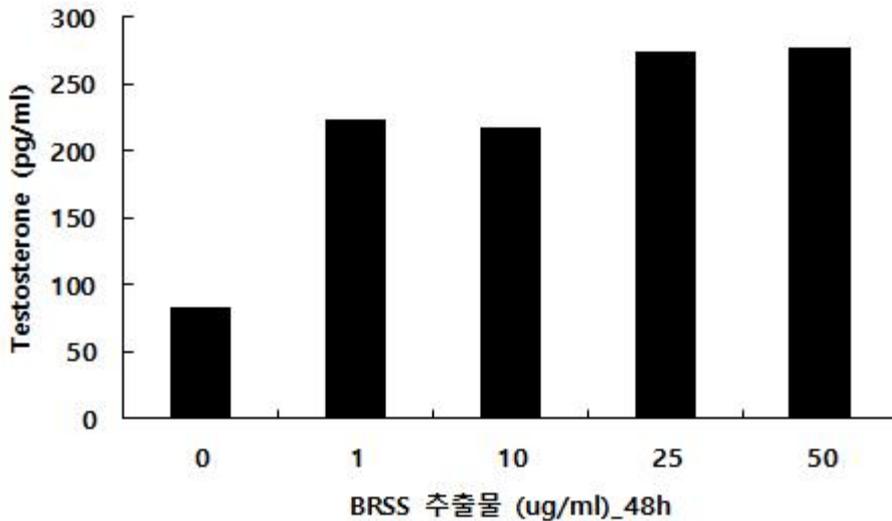


그림3-5-39. TM3 Leydig 세포 상등액에서 생성된 테스토스테론의 양 측정

TM3 Leydig 세포에 BRSS물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/mL을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정 농도 의존적으로 증가함.

2. Testosterone을 생성하는 mouse Leydig cell인 TM3에 UGK를 처리하여서 남성갱년기개선 효능 연구

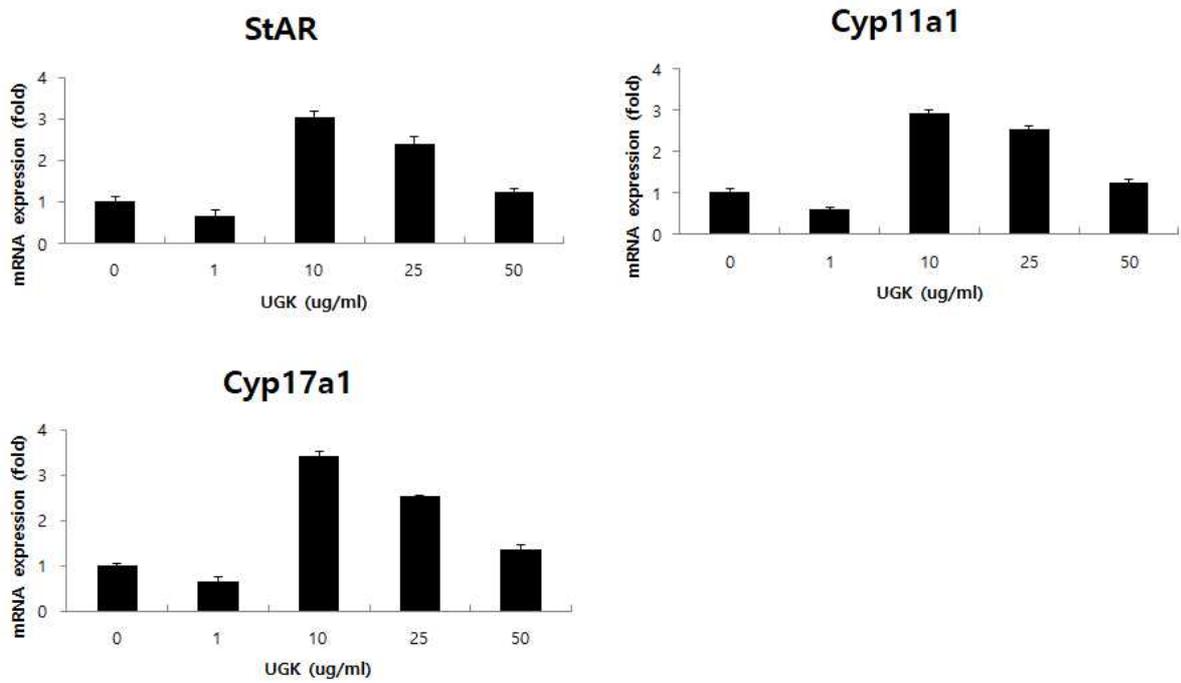


그림3-5-40. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA양 측정

TM3 Leydig 세포에 UGK물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/mL을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 효소인 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR의 mRNA 발현 UGK물질 10ug/mL처리시에 유의적으로 증가함.

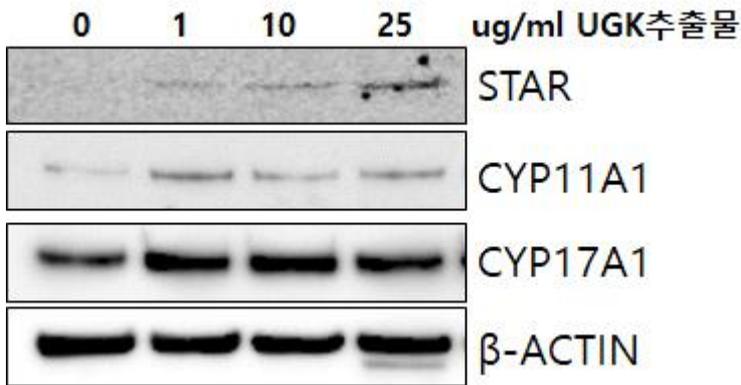


그림3-5-41. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR 단백질양 측정

TM3 Leydig 세포에 UGK물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/mL을 48시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양을 Western Blotting을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양이 UGK물질 농도 의존적으로 증가함.

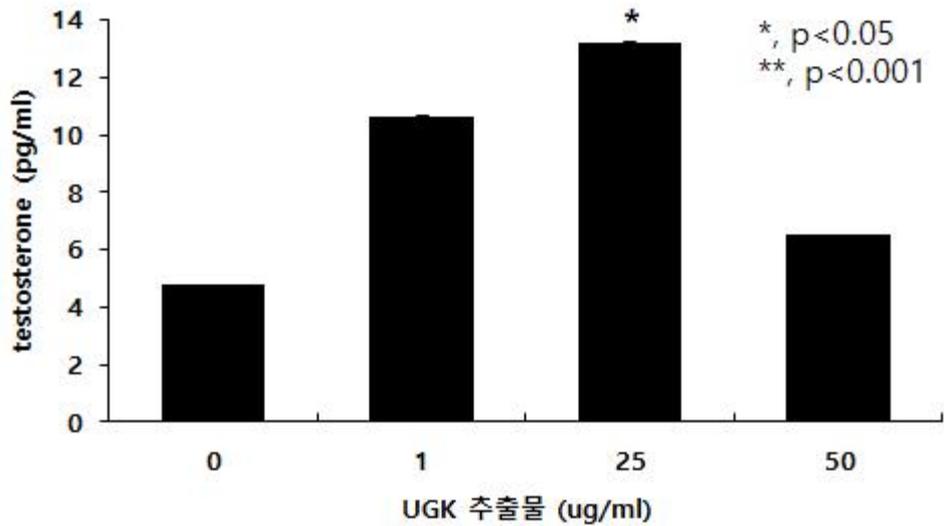


그림3-5-42. TM3 Leydig 세포 상등액에서 생성된 테스토스테론 양 측정

TM3 Leydig 세포에 UGK물질 0, 1, 25, 50 ug/mL을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정 UGK물질 25ug/ml 처리시 유의적으로 증가함.

3. Testosterone을 생성하는 mouse Leydig cell인 TM3에 BZ를 처리하여서 남성갱년기 개선 효능 연구

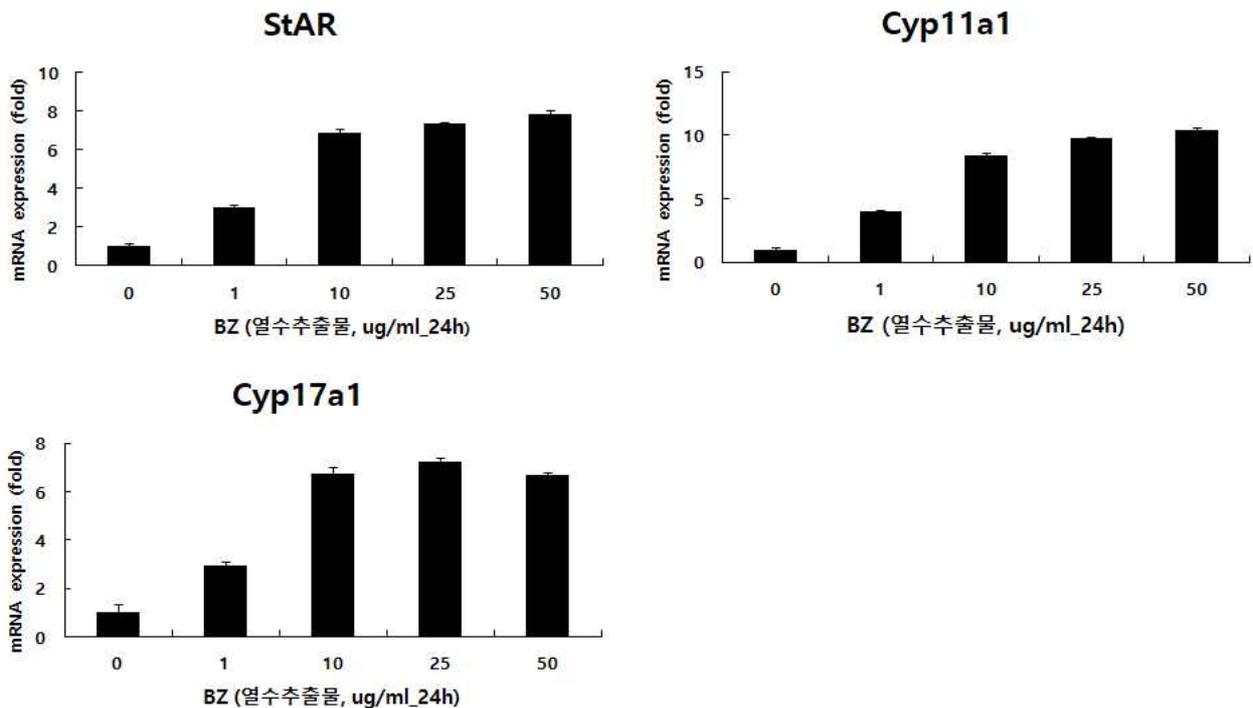


그림3-5-43. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA양 측정

TM3 Leydig 세포에 BZ물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/mL을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 효소인 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR의 mRNA 발현은 BZ물질 농도 의존적으로 증가함.

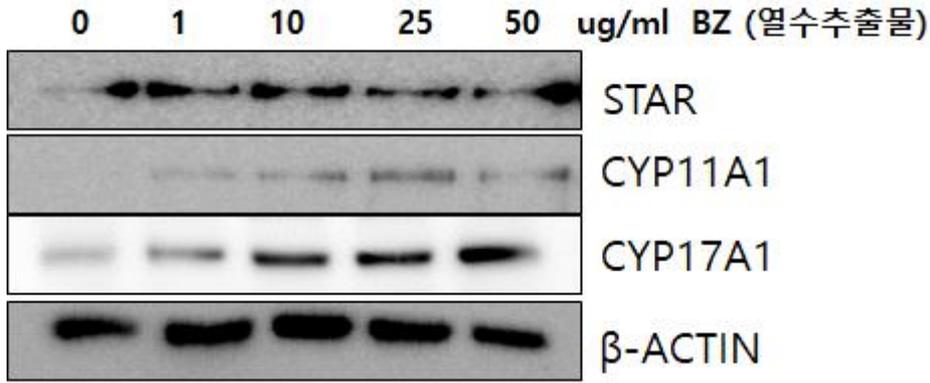


그림3-5-44. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR 단백질양 측정

TM3 Leydig 세포에 BZ물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/mL을 48시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양을 Western Blotting을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 CYP11A1, CYP17A1, STAR 단백질양이 BZ물질 농도의존적으로 증가함.

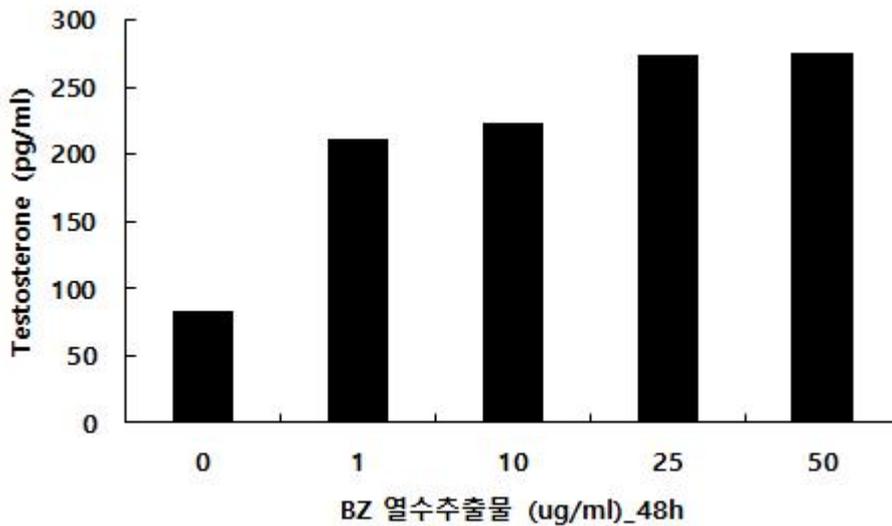


그림3-5-45. TM3 Leydig 세포 상등액에서 생성된 테스토스테론 양 측정

TM3 Leydig 세포에 BZ물질 0, 1, 10, 25, 50 ug/mL을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정 BZ물질 농도의존적으로 증가함.

4. NHEK세포 (Normal Human Epidermal Keratinocyte)에 T물질을 처리하여서 케라틴 결합단백질 (Filaggrin, FLG)의 발현양상을 확인

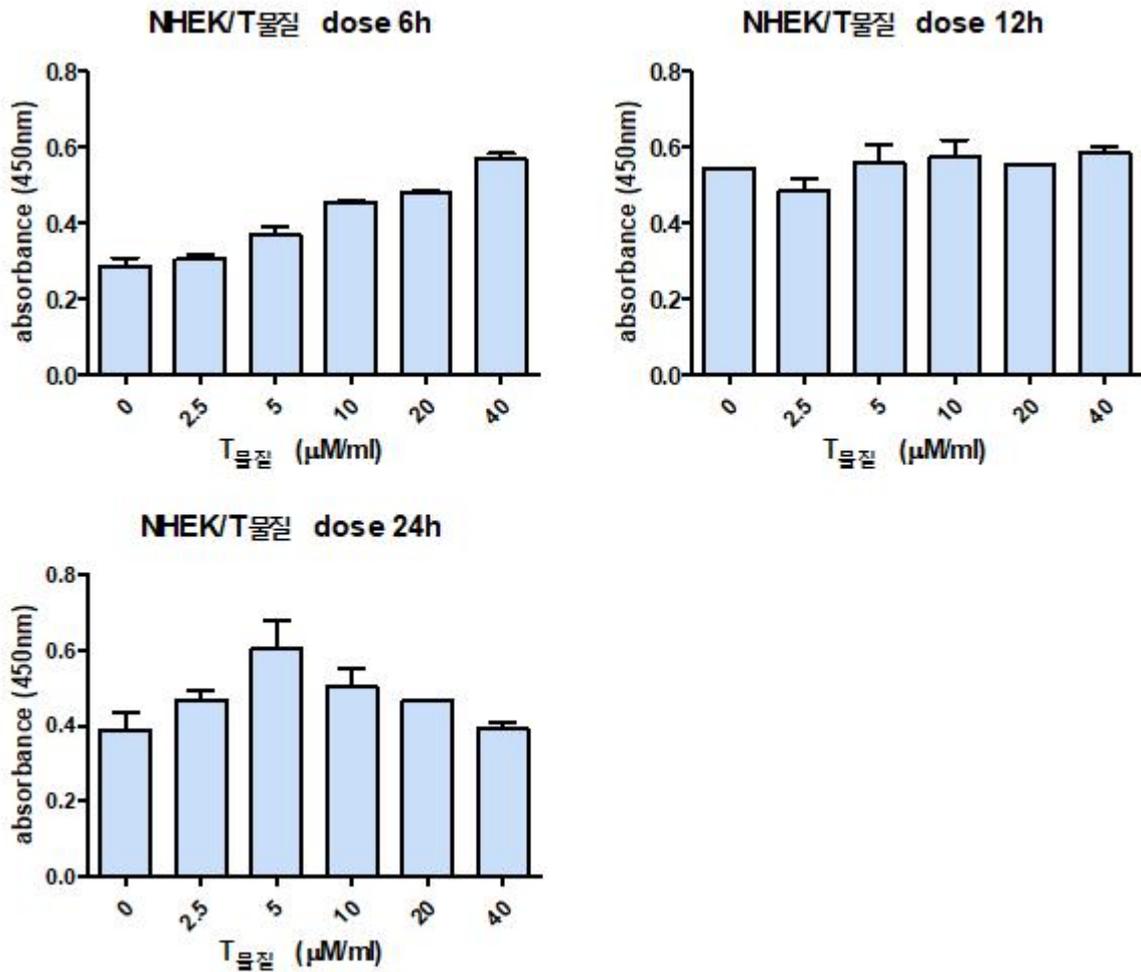


그림3-5-46. NHEK세포에서 T물질에 의한 세포증식 양상

NHEK세포에 T물질 0, 2.5, 5, 10, 20, 40uM을 6, 12, 24시간 처리하여서 MTT assay를 통해서 세포증식을 확인하였다. 특히 24시간 처리시 10uM 이상 처리시 세포증식이 감소함.

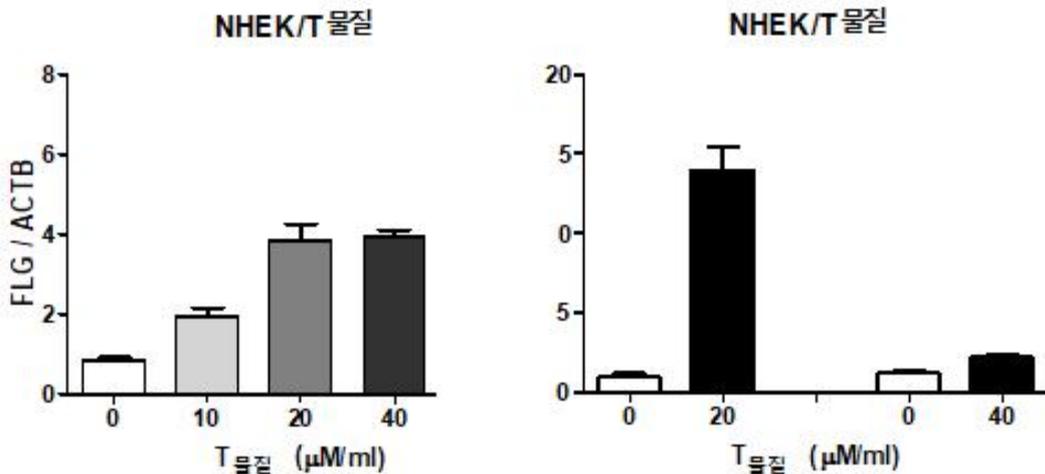


그림3-5-47. NHEK세포에서 T물질에 의한 케라틴결합단백질 (Filaggrin, FLG)의 mRNA발현 양상

NHEK세포에 T물질 0, 10, 20, 40uM을 24시간 처리하여서 FLG mRNA 발현 양상을 qRT-PCR로 확인. T물질 20, 40uM 처리시 FLG의 mRNA발현양이 증가함.

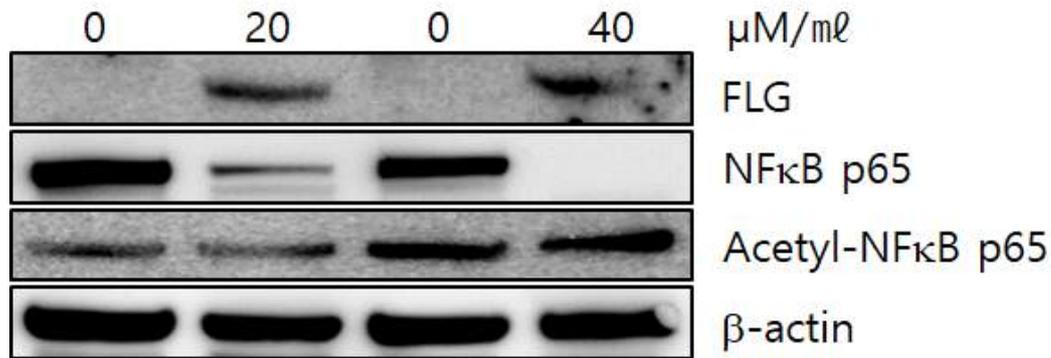


그림3-5-48 NHEK세포에서 T물질에 의한 케라틴결합단백질 (Filaggrin, FLG), NFκB, acetylated NFκB p65,의 단백질 발현 양상

NHEK세포에 T물질 0, 20, 40uM을 24시간 처리하여서 단백질발현 양상을 Western blotting로 확인. T 물질 20, 40uM 처리시 FLG의 단백질발현량이 증가함. 반면에 NFκB 감소하였으며, acetylated NFκB p65 발현은 증가함.

㊦ 7차년도

1. Testosterone을 생성하는 mouse Leydig cell인 TM3에 호박씨 추출물질을 처리하여서 남성갱년기개선 효능 연구

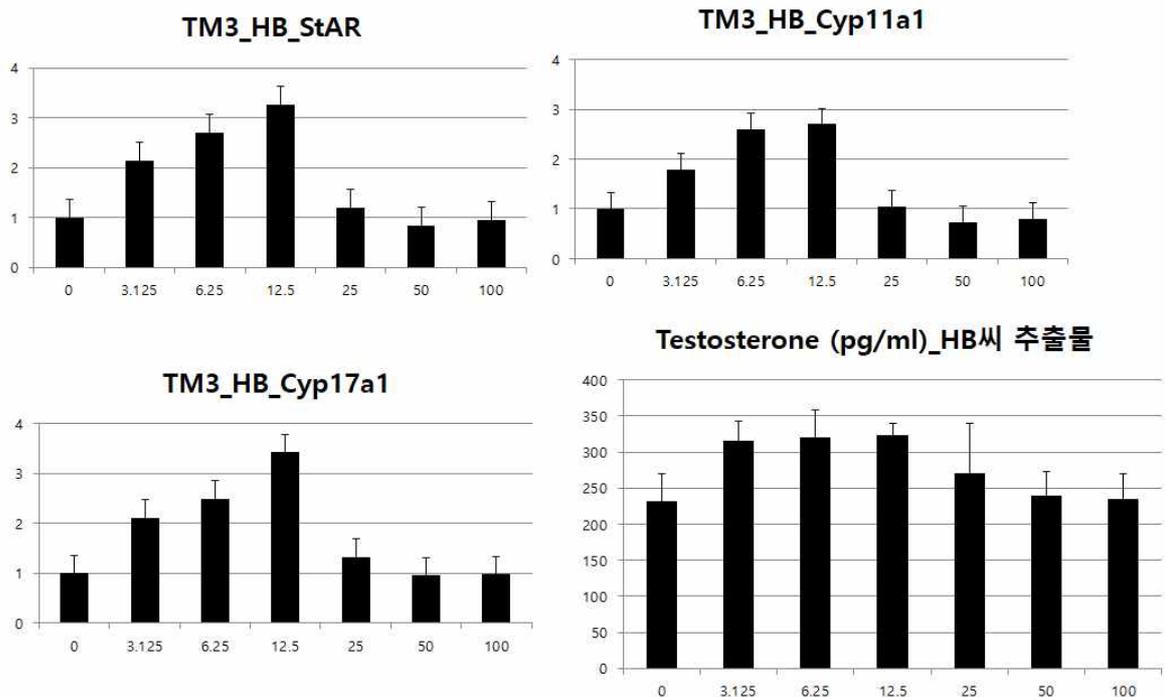


그림3-5-49. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA양 측정과 생성된 테스토스테론 양 측정

TM3 Leydig 세포에 HB 추출물질 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 효소인 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR의 mRNA 발현은 HB 추출물질 농도 의존적으로 증가함.

TM3 Leydig 세포에 HB 추출물질 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정 HB 추출물질 농도의존적으로 증가함.

2. Testosterone을 생성하는 mouse Leydig cell인 TM3에 BL 추출물질을 처리하여서 남성갱년기 개선 효능 연구

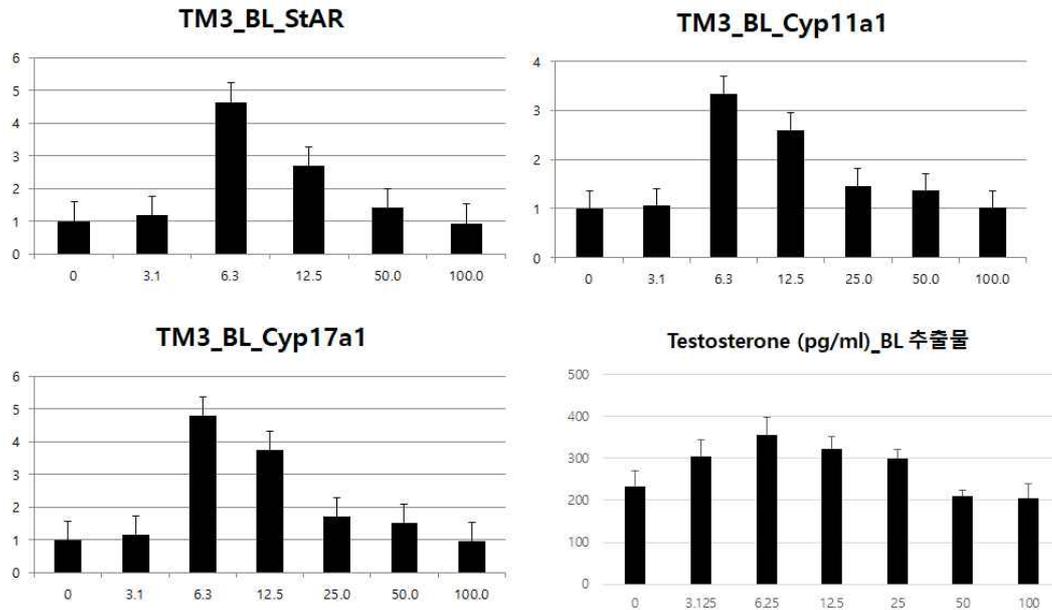


그림3-5-50. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA양 측정과 생성된 테스토스테론 양 측정

TM3 Leydig 세포에 BL 추출물질 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 효소인 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR의 mRNA 발현은 BL 추출물질 농도 의존적으로 증가함.

TM3 Leydig 세포에 BL 추출물질 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정 BL 추출물질 농도의존적으로 증가함.

3. Testosterone을 생성하는 mouse Leydig cell인 TM3에 MG 추출물질을 처리하여서 남성갱년기 개선 효능 연구

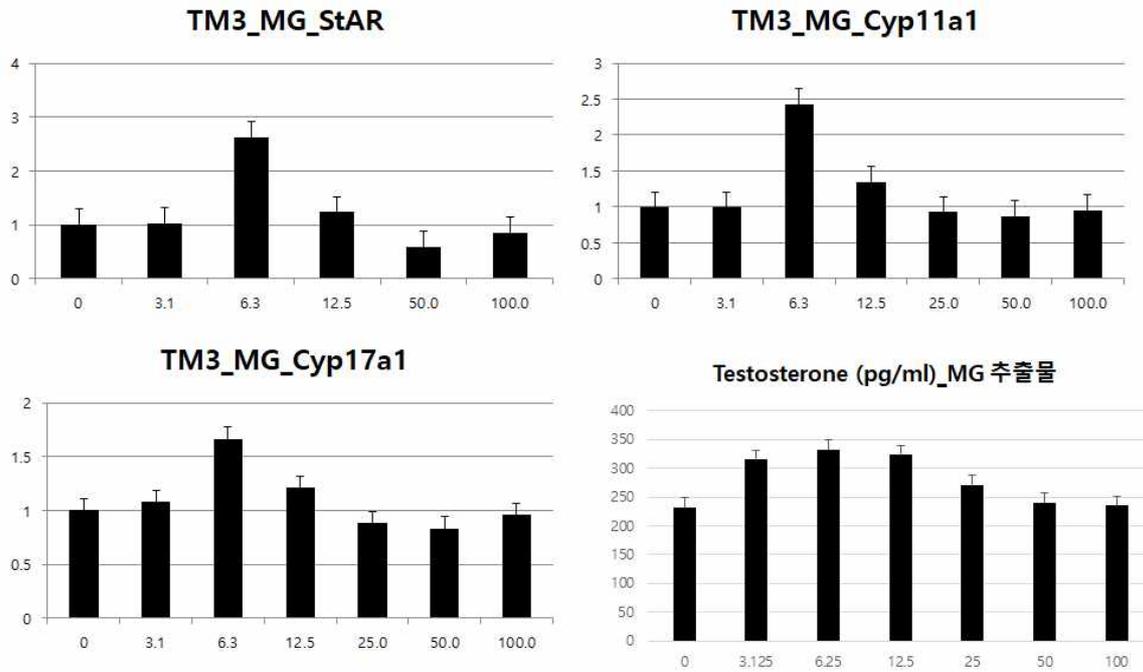


그림3-5-51. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA양 측정과 생성된 테스토스테론 양 측정

TM3 Leydig 세포에 MG 추출물질 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 효소인 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR의 mRNA 발현은 MG 추출물질 농도 의존적으로 증가함.

TM3 Leydig 세포에 메리골드 추출물질 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정 MG 추출물질 농도 의존적으로 증가함.

#### 4. Testosterone을 생성하는 mouse Leydig cell인 TM3에 YB 추출물질을 처리하여서 남성갱년기 개선 효능 연구

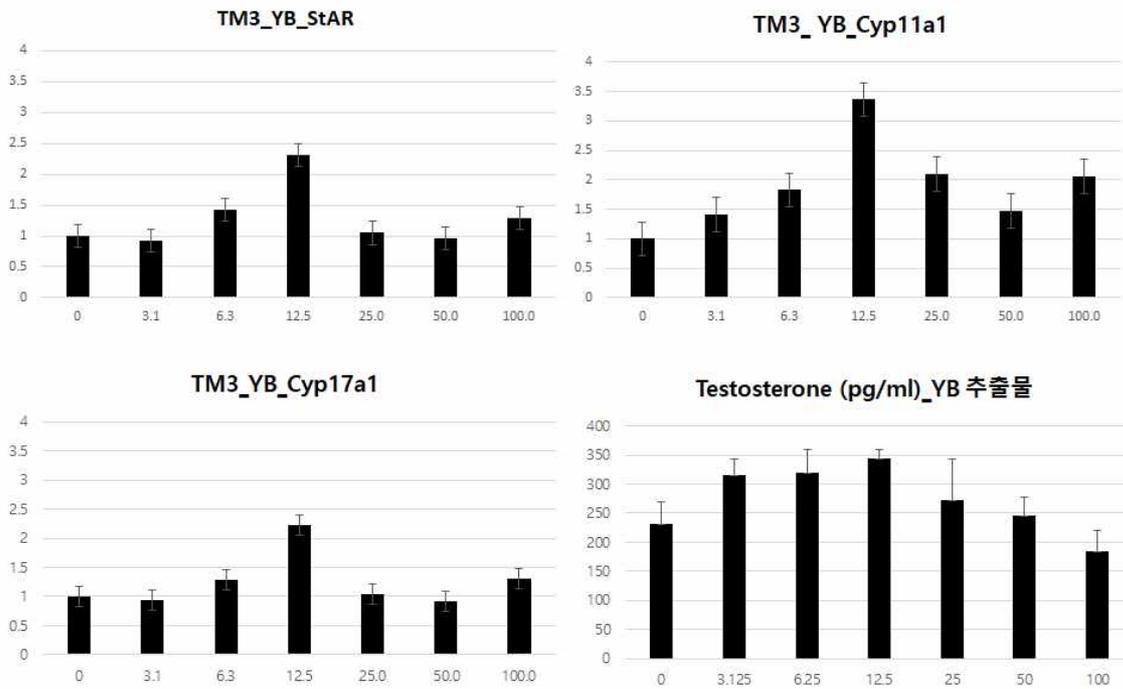
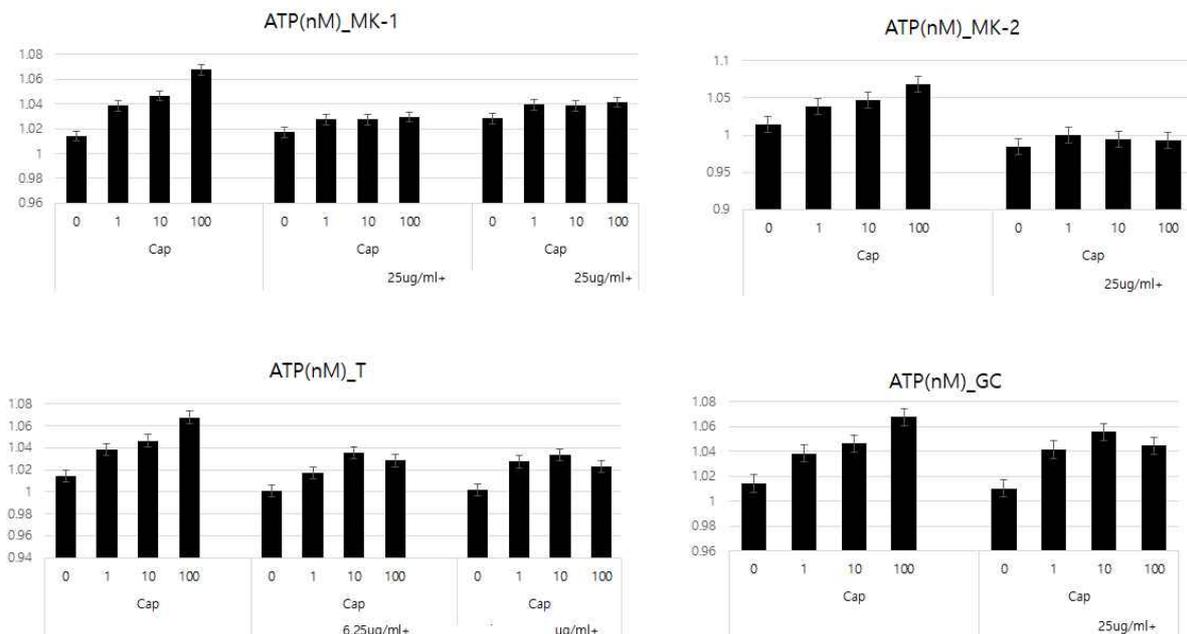


그림3-5-52. Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA양 측정과 생성된 테스토스테론 양 측정

TM3 Leydig 세포에 YB 추출물질 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL을 24시간동안 처리하여서 남성 호르몬 관련 유전자 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR mRNA를 qRT-PCR을 통해서 확인. 남성호르몬의 중요한 효소인 Cyp11a1, Cyp17a1, StAR의 mRNA 발현은 YB 추출물질 농도 의존적으로 증가함. TM3 Leydig 세포에 일년봉 추출물질 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL을 48시간동안 처리한 후, 세포 상등액에서 생성되는 테스토스테론의 양을 ELISA방법을 통해 측정 YB 추출물질 농도의존적으로 증가함.

5. 방광 평활근이나 방광 상피 세포에서 소재가 intercellular channel proteins 또는 mechanical barrier proteins 발현에 미치는 영향 검증



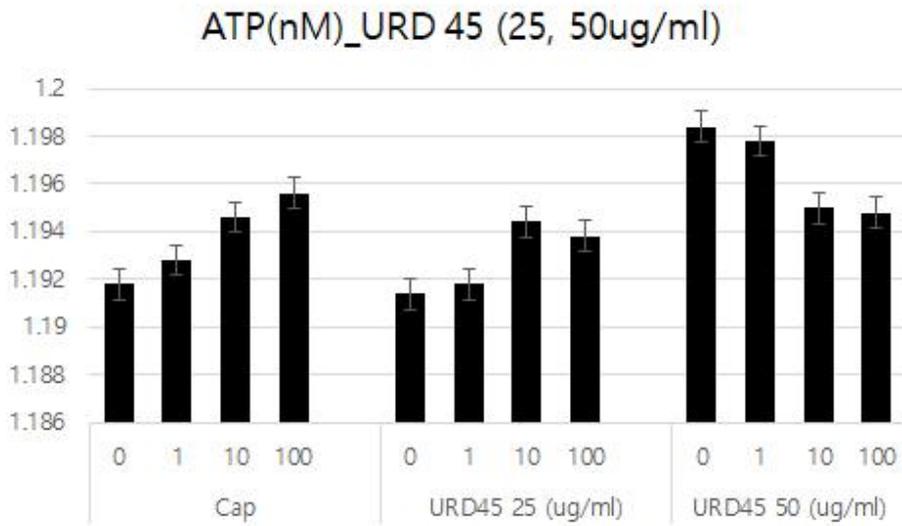
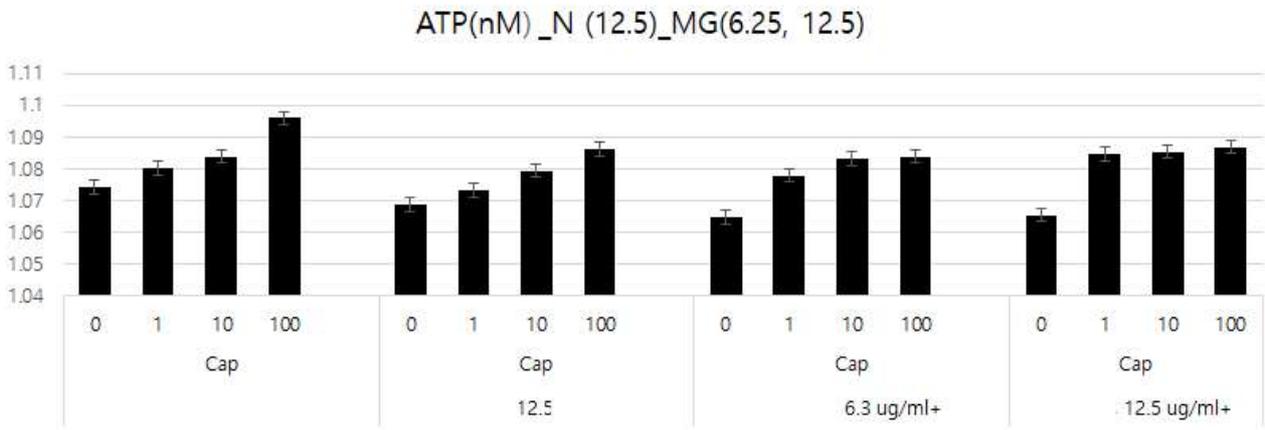


그림3-5-53. 방광 상피세포 (TCCSUP)에서의 여러 소재들을 처리후 ATP의 양 측정

방광 상피세포에서 ATP 유리를 감소하는 소재들 스크린함. 방광 상피세포 (TCCSUP) 에 T, GC, HB, MK, N, MG, URS45 물질들을 처리하여서 세포상등액에 유리된 ATP양을 측정하였음.

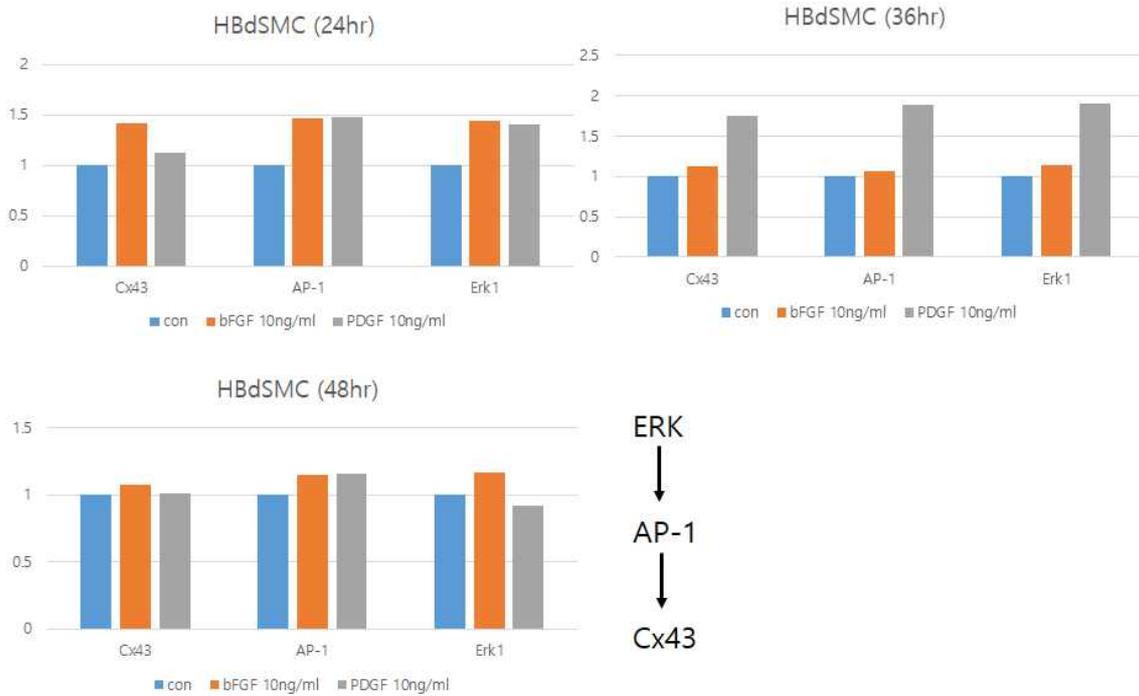


그림3-5-54. 방광 평활근세포 (HBdSMC)에서의 bFGF, PDGF-BB를 처리후 Cx43, Ap-1, Erk mRNA 발현 양상

방광 평활근세포에서 소재 (URD 45)가 intercellular channel proteins 또는 mechanical barrier proteins 발현에 미치는 영향 검증하고자 Cx43, Ap-1, Erk pathway와 연관있음을 확인하였음. 방광 평활근세포 (HBdSMC)에 bFGF, PDGF-BB를 처리한 후, 소재 URD45를 처리하여서 Cx43의 mRNA, 단백질 발현양상을 확인함.

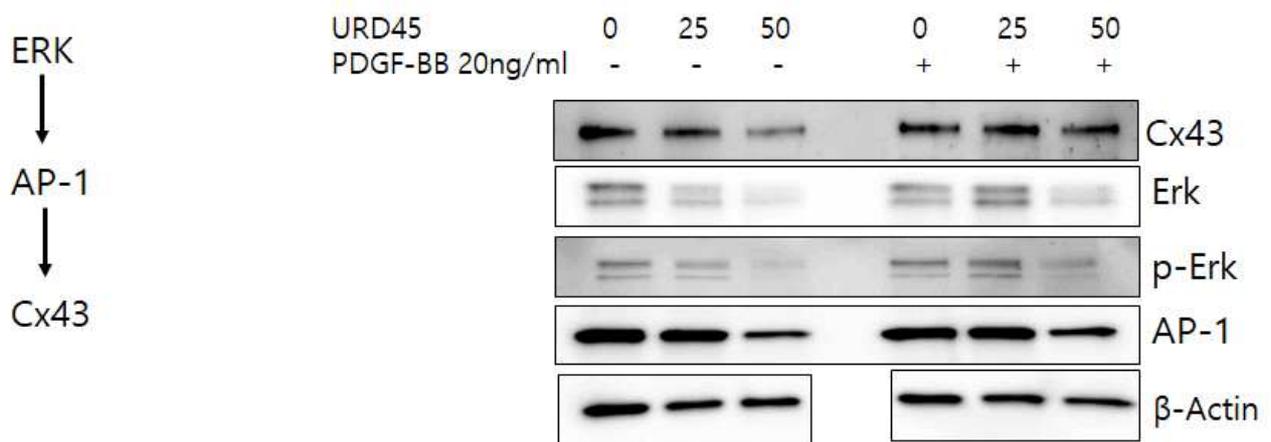


그림3-5-55. 방광 평활근세포 (HBdSMC)에서의 Cx43, Ap-1, Erk 단백질 발현 양상

방광 평활근세포 (HBdSMC)에 염증유발 인자인 PDGF-BB를 처리한 후, 소재 URD45를 처리하였을 때, intercellular channel protein인 Cx43이 PDGF-BB에 의해 증가하였다가 URD45에 의해서 감소함을 확인함. 또한 Cx43, Ap-1, Erk pathway와 연관있음을 확인하였음.



그림3-5-56 방광 평활근세포 (HBdSMC)에서의 PDGF-BB를 처리후 Cx43-Ap-1-Erk axis pathway 확인.

방광 평활근세포 (HBdSMC)에 염증유발 인자인 PDGF-BB를 처리한 후, intercellular channel protein인 Cx43이 Erk-Ap-1-Cx43 axis pathway와 연관있음을 확인하고자 Erk inhibitor 인 PD98059를 처리하여서 Erk pathway와 연관이 있음을 확임함.

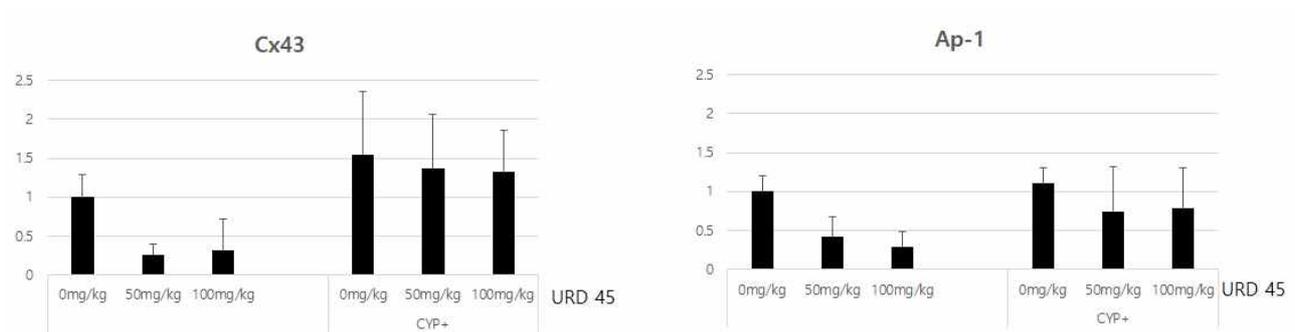


그림3-5-57. 마우스 방광 조직에서의 Cx43, Ap-1, PDE4, PDE5 mRNA 발현 양상

9주된 female 마우스에 방광염(Crytitis)을 유발시키기 위해서 Cyclophosphamide 300mg/kg를 주사하였음. 소재 URD45는 50, 100mg/kg로 물에 섞어서 실험중에 계속 공급하였음. 마우스 방광을 꺼내서 cellular total RNA를 추출하여서 real time PCR을 실시하였음. CYP에 의한 방광염이 유발된 그룹은 Cx43의 발현이 증가하였으며, 소재 URD45를 준 그룹에서 Cx43의 발현이 감소함을 확인함.

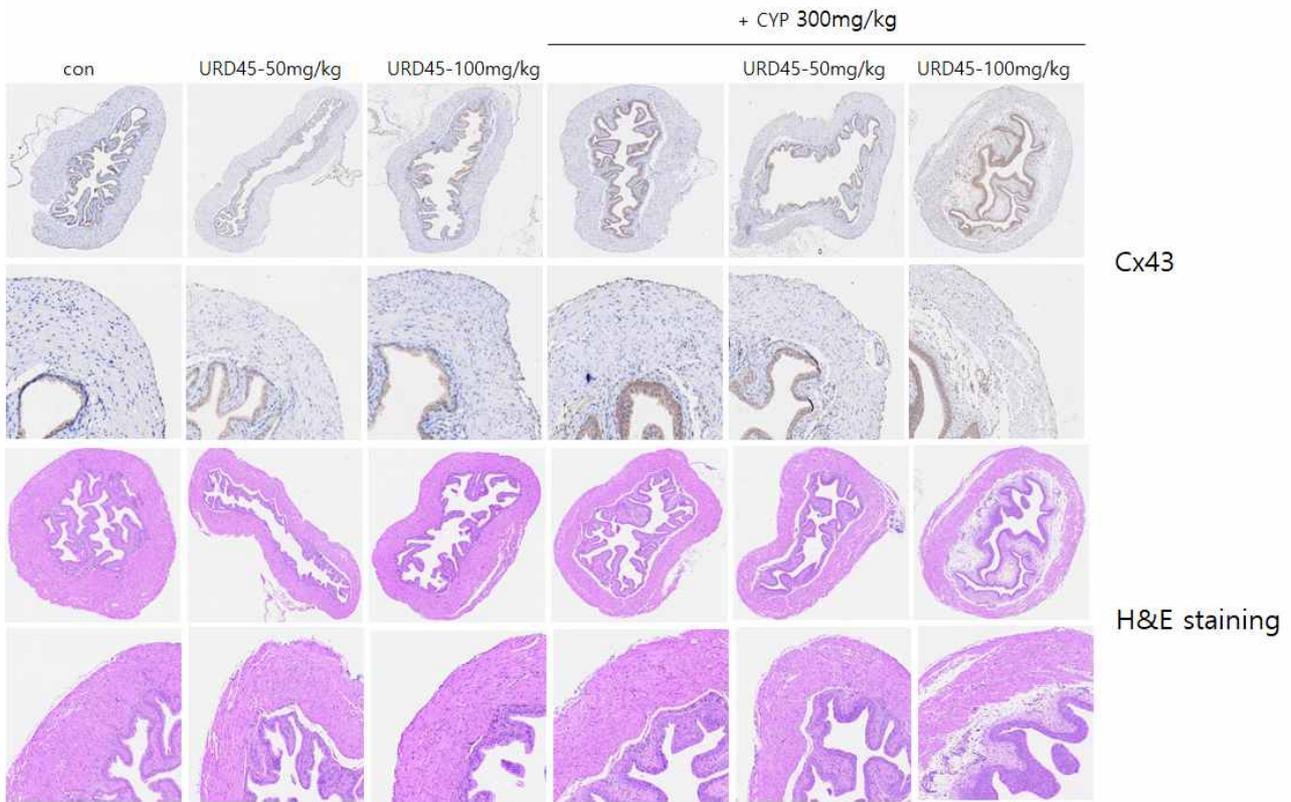


그림3-5-58. 마우스 방광 조직에서의 Cx43의 조직면역학 염색.

9주된 female 마우스에 방광염(Cyrititis)을 유발시키기 위해서 Cyclophosphamide 300mg/kg를 주사하였음. 소재 URD45는 50, 100mg/kg로 물에 섞어서 실험중에 계속 공급하였음. 마우스 방광을 꺼내서 고정을 하고, 조직 면역학 염색법 (Immunohistochemistry staining)을 통해서 Cx43의 발현 양상을 확인함. CYP에 의한 방광염이 유발된 그룹은 Cx43의 발현이 증가하였으며, 소재 URD45를 준 그룹에서 Cx43의 발현이 감소함을 확인함.

그림3-5-59. 여성 질건강 소재에 supplementation할 수 있는 소재 가능성 확인과 상피 barrier 기능 강화 확인

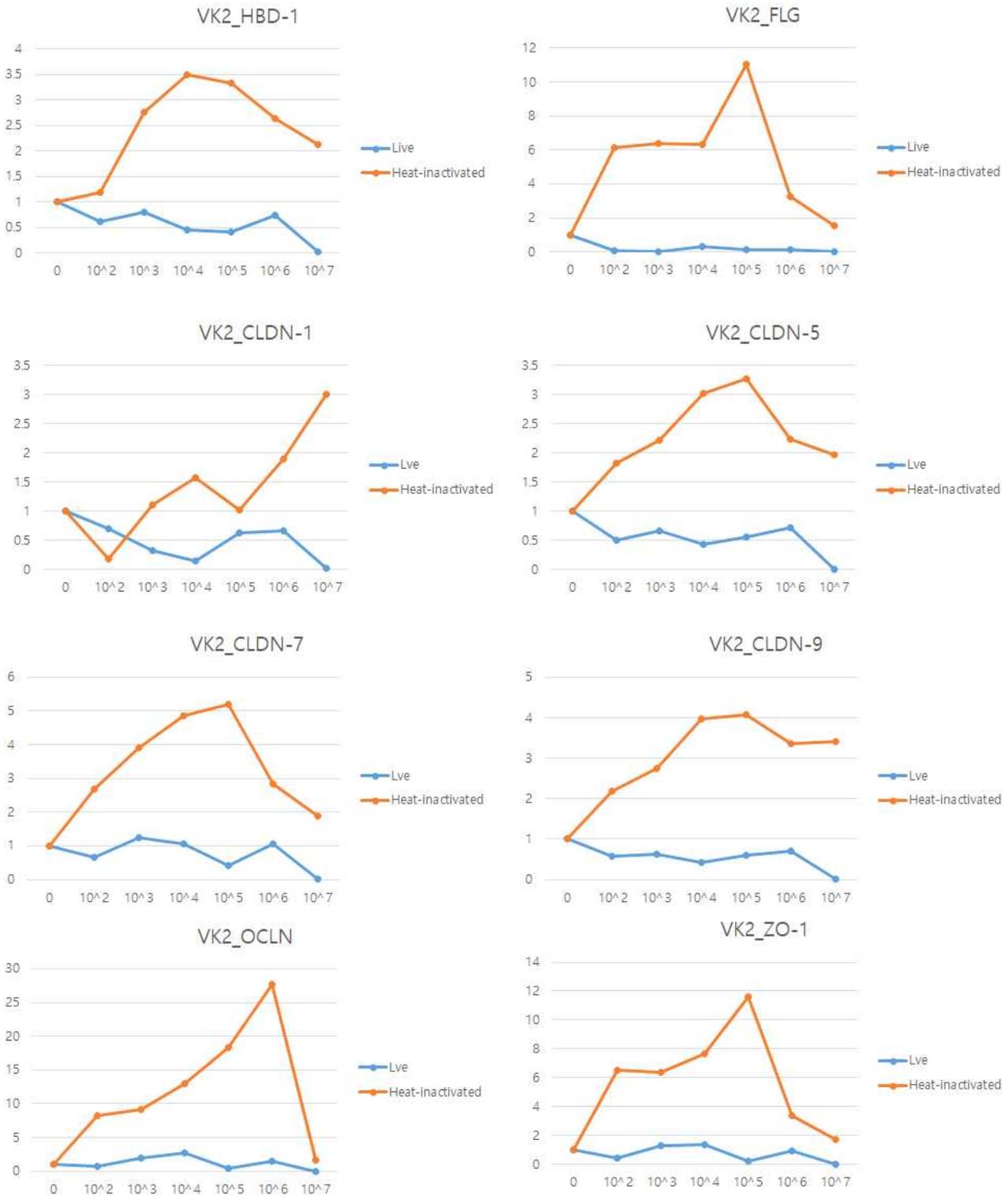


그림3-5-60. VK2 세포에 질내 염증 유발 bacteria (live, heat inactivated) 처리시. HBD-1, FLG, tight junction molecules mRNA 발현양상

여성 질건강에 효능이 있는 소재의 가능성을 확인하고자 여성 질내 염증을 유발시키는 Candidate bacteria의 생균과 사균 (56℃, 30분)을 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>의 CFU를 VK2 세포에 처리하여서 질내 상피 barrier의 기능의 강화 여부를 확인하고자 HBD-1, FLG, tight junction molecules (CLDN-1, 5, 7, 9, OCC, ZO-1)의 발현량을 확인하였음. 생균에서는 이들 유전자들이 감소하는 반면에, 사균을 처리하였을때는 이들 유전자들의 발현이 증가함을 확인함. 이것은 질내 염증을 유발시키는 Candidate bacteria의 사균이 질내의 barrier의 강화에 효능이 있음을 확임함.

⑥ 제 3-1 세부과제: 형질전환 식물을 이용한 비동물성 성장인자 개발

○ 주요연구 성과

- 1, 2단계에서 상피세포성장인자 (Epidermal Growth Factor, EGF)와 인간 알부민(human Serum Albumin, HSA), PTD-VEGF 고생산 세포주 개발, 분리정제 기술 확립 및 산업화를 추진하였으며, 연차별 연구결과를 최종산물인 EGF, HSA, PTD-VEGF로 구분하여 해당내용을 정리하였음

EGF 고생산 세포주 개발 및 제품화

○ hEGF 유전자의 발현벡터 제작

- 인간 유래의 epidermal growth factor (hEGF) 유전자를 단자엽 고발현 시스템인 벼에서 발현하기 위하여 hEGF의 유전자 코돈을 벼 발현에 최적화된 코돈으로 치환시킨 후 유전자를 합성하였음  
 - pGEM-B1 벡터에 클로닝한 EGF를 XbaI과 KpnI으로 제한효소 처리하여 5'UTR-3Dsp-EGF 부분을 얻어 rice alpha- amylase 3D promoter(RAmy3D promoter) 와 3'-UTR terminator가 포함되어 있는 식물 발현벡터 pJKS131을 제작하였음

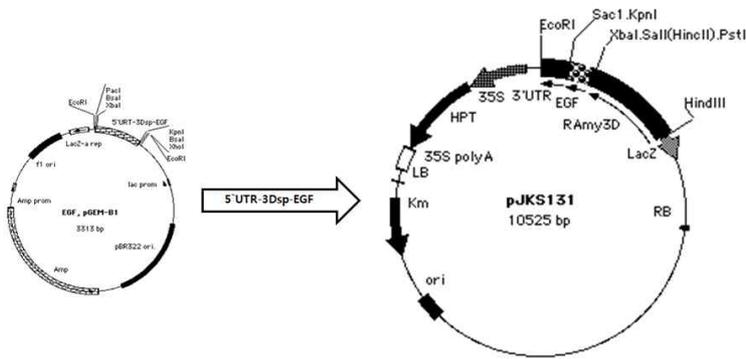


그림3-6-1. hEGF 유전자가 삽입된 식물 발현벡터 제작 >

○ 벼 형질전환 및 고생산 세포주 선발

- Agrobacterium-mediated 식물 형질전환을 수행하기 앞서 상기의 pJKS131 식물발현벡터를 tri-parental mating 방법으로 Agrobacterium tumefaciens LBA4404 에 형질 전환하였음  
 - pJKS131은 Agrobacterium-mediated 방법을 사용하여 벼 캘러스로 형질전환하여 hygromycin B 항생제가 포함된 선택배지에서 EGF 유전자가 도입되어 새롭게 형성되어 나오는 신생하는 캘러스 23개를 선발하였음

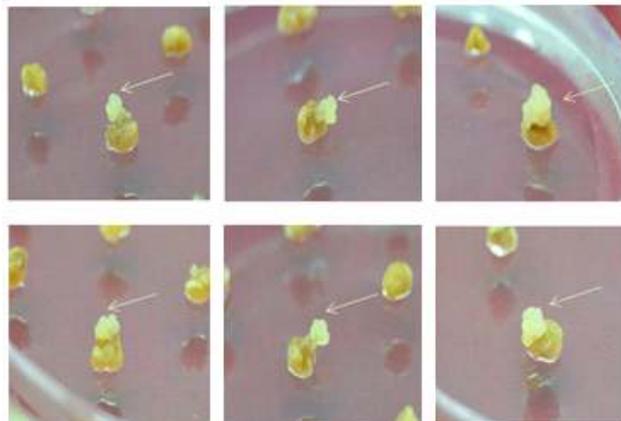


그림3-6-2. pJKS131 형질전환체의 신생 캘러스 선발 >

○ EGF 고생산 세포주 선발

- 상기의 하이그로마이신 포함 배지에서 생육하는 캘러스로부터 EGF고생산 세포주를 선발하기 위하여 Real-Time PCR을 수행하였으며, 이 결과 최종적으로 S131-2(R), S131-4(R), S131-15(R), S131-18(R)의 4개 세포주를 선발하였음

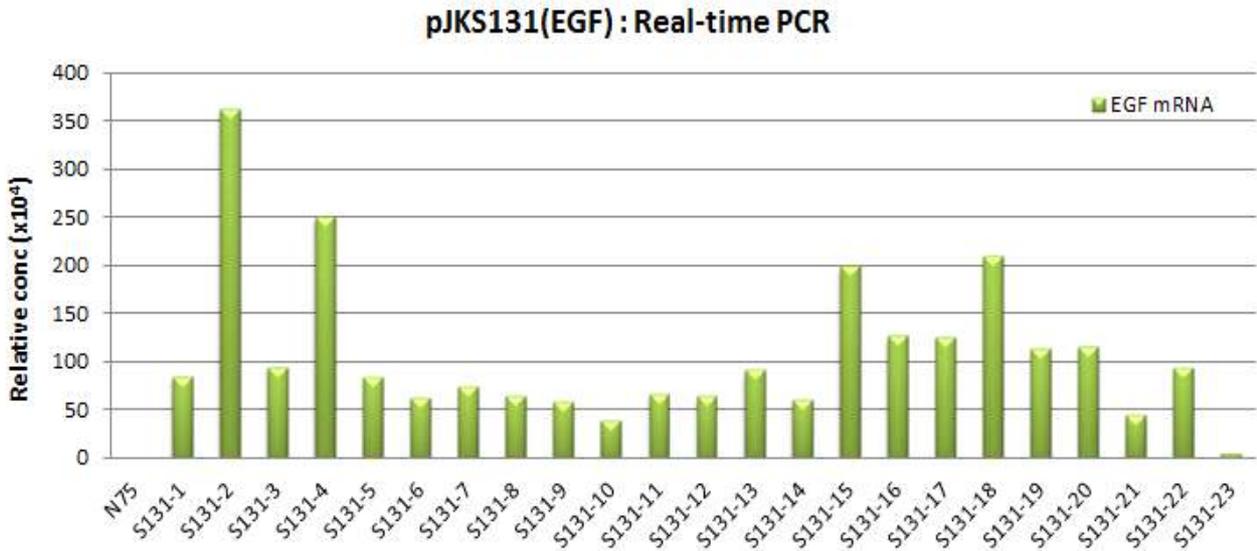


그림3-6-3. Real-Time PCR을 통한 EGF 식물 세포주 선발 >

○ 형질전환 식물체의 copy number를 확인

- 전체 지놈시퀀싱은 평균 500bp shotgun library를 제작하여 Illumina/ HiSeq2500 NGS platform에서 2x150bp paired end sequencing으로 하였다. T-DNA 삽입위치를 찾는 분석은 Yang 등 (2013)이 전체지놈과 형질전환에 사용한 plasmid vector에 mapping하여 비교하는 방법을 이용하였다. 전체지놈 시퀀싱 데이터를 벼 지놈 reference(phytozome v9)에 mapping하고 또한 pJKS131 plasmid vector에 mapping하였다. Illumina 시퀀싱 단편의 양쪽 데이터가 지놈과 T-DNA에 각각 mapping 된 단편(그림 11)을 조사하여 형질전환 위치 후보를 조사하였음

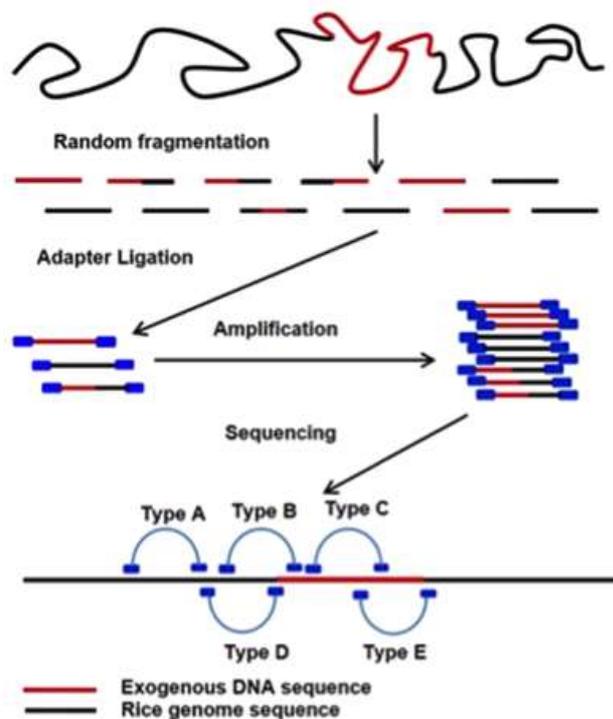


그림3-6-4. Paired-end whole genome re-sequencing을 이용한 transgenic site의 구분 >

- 벼 지놈 reference 및 vector sequence에 성공적으로 mapping되었고 단편의 양말단 sequence가 rice 지

놈과 vector sequence에 각각 mapping된 read는 594개로 조사되었다. 이중 vector sequence의 target gene 근처에 있는 RAmy3D 유전자와 chromosome 8번에 존재하는 유전자와 동일한 염기서열을 갖고 있어서 transgenic site를 찾는 방법으로서 시퀀싱 단편의 양말단이 벼지놈과 vector지놈에 존재하는 것을 선별하는 과정에서 제거하였다 (그림 13). Vector 시퀀스에 reads가 mapping된 분포는 형질전환 target 유전자가 포함된 EGF 유전자 양쪽 2Kb 전후의 유전자 근처에서 많이 발견되었다(그림 14). False positive read 및 site를 제거하고 정확하게 지놈의 inserted site로 예측되는 chromosome 위치가 확인되었다.

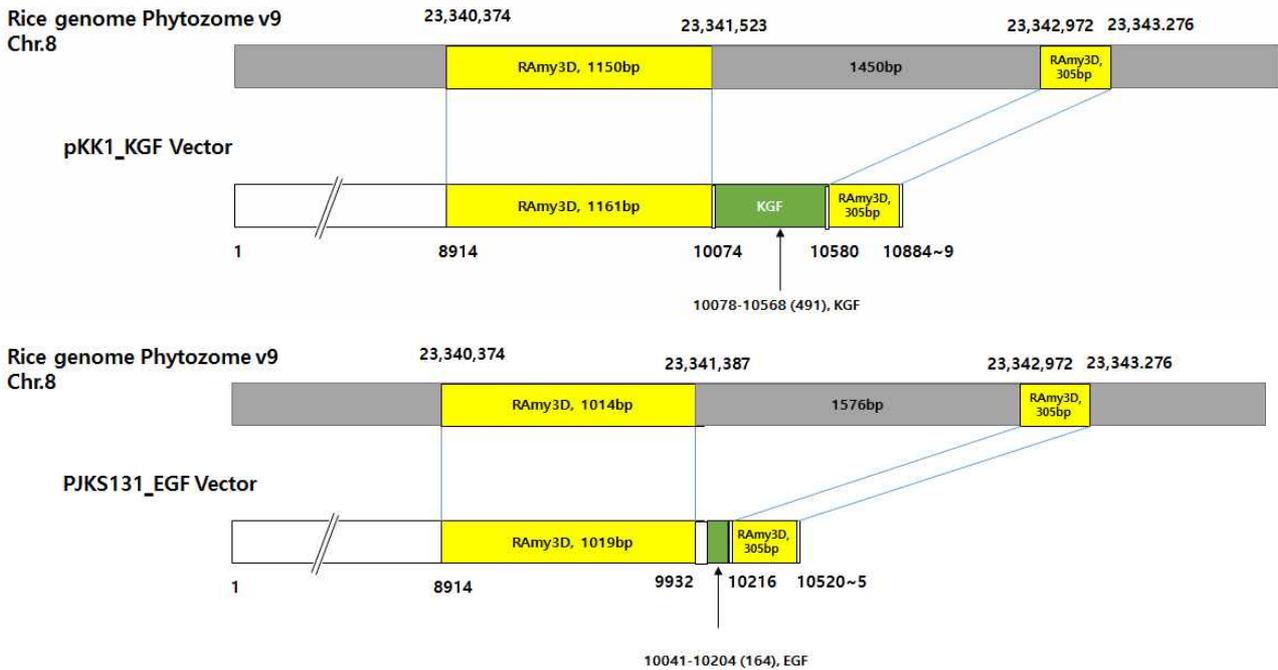
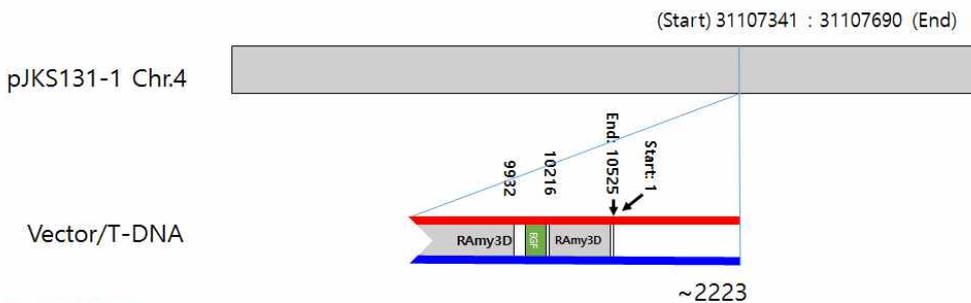


그림3-6-5. Compare of the genome sequence between the vector and chr8 region including RAmy3D gene with same sequence on the both site. A: comparing of the chr8 and pJKS131\_EGF vector, B: comparing of the chr8 and pKK1 >



Red: T-DNA  
 Black: Rice chromosome

```
GAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGAAATAGAGTAGATGCCGACCGGGAT
CTGTCGATCGACAAGCTCGAGTTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTTCAGATAAGGGAATTAGGGTTCTATAGGG
TTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTAGTATGTGATGCAAGTAAACAATTATGGATTCTACTTATGTTTCT
TTTCCTTTTCTGACTTGGGTTGCAGGTATGAGAAGAGGCATTCCAACATTCCGGCTCACGTCTCCCCATGCTTCCGTG
TCAAGGAAGGTGACCATGTCATCATTGGCCAGTGCAGGTAACAACTTAACCTCCATACCTTAGTTTTGACTCCTTAGAA
TCATCTAAATAACAGAGGTGCTATTAGTTCAAACATTATCAGTTCACCCAGCTAGTACTATGAGATTTGGTTGCTGAA
GTACAATTTCTGCATTTTCAACAGGCCGCTGTCGAAAACCTGTGAGGTTCAACGTCTGAAGGTCATCCCAGCTGGATCC
ACCGCGGCAGCGCGGCAAGAAGGCCTTCACCG
```

그림3-6-6. PCR sequence conformation using T-DNA target specific primers >

- pJKS131-2시료는 NGS mapping과 PCR검증으로 4번염색체에서 T-DNA 삽입이 확인 되었고 삽입된 염색체 위치는 4번염색체 31107341 위치 앞쪽으로 되어있다. T-DNA 삽입 검증용 PCR 증폭 primer는 P1(5'-TAC CTG CAT GCT GCG GTG AAG-3')과 P2(5'-AGG GCT GTG TAG AAG TAC TCG C-3')이다.

- 본 과제에서 선발한 EGF 고발현 세포주 S131-2의 재분화 식물체로부터 T1 종자를 확보한 후 이를 200ppm 하이그로마이신을 포함하는 배지에서 성장이 양호한 개체를 선발하여 연구용 LMO 온실에서 총 100주를 재배하여 멘델리즘을 분석하여 homoline을 선발하였음

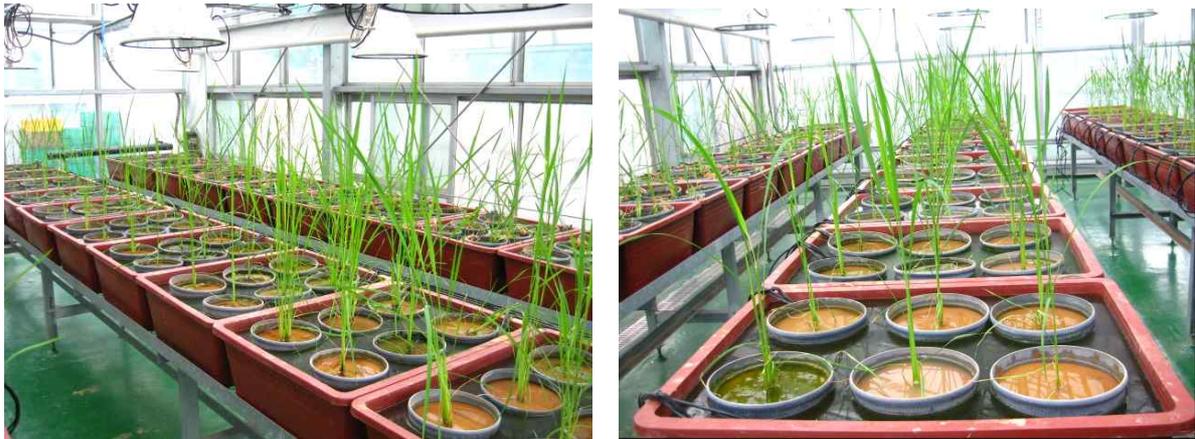


그림3-6-7. EGF 고발현 세포주 S131-2의 재분화 식물체의 T2종자 확보를 위한 식물체 재배 >

○ EGF 발현 벼 세포주의 단백질 수준에서의 분석

- 앞선 실험을 통해 선발한 세포주 pJKS131 #2(R), #4(R) 로부터 일정량의 캘러스를 취하여 벼 현탁세포 배양을 확립하고 EGF의 생산여부를 Western blot analysis를 이용하여 확인하였다.

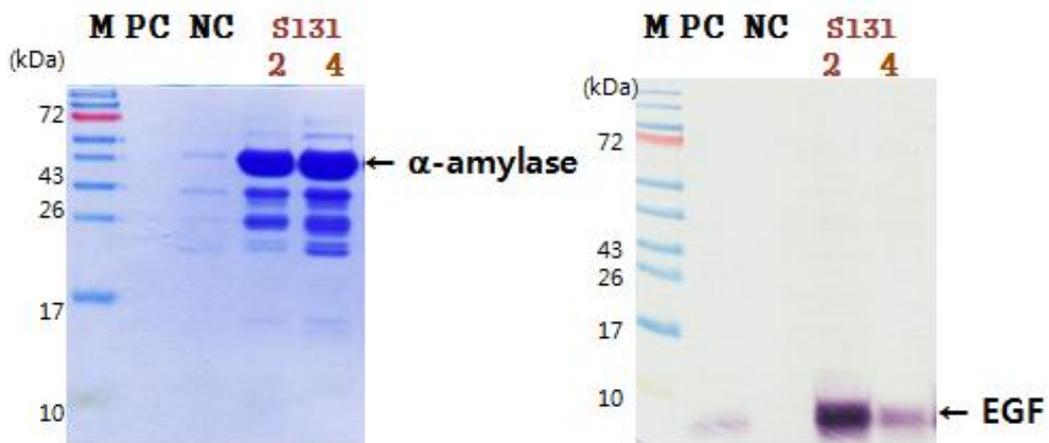


그림3-6-8. Western blot을 통한 EGF 단백질 발현 확인 >

- ELISA를 이용한 EGF 발현수준 확인

• ELISA 수행 결과 pJKS131-#2(R)은 3일 당결핍했을 때 평균 2.73mg/L, 5일째는 3.61mg/L, 7일은 3.54mg/L의 EGF 발현이 확인되었고, pJKS131-#4(R)은 3일 당결핍했을 때 평균 1.86mg/L, 5일째는 2.6mg/L, 7일은 2.67mg/L의 EGF 발현이 확인되었다

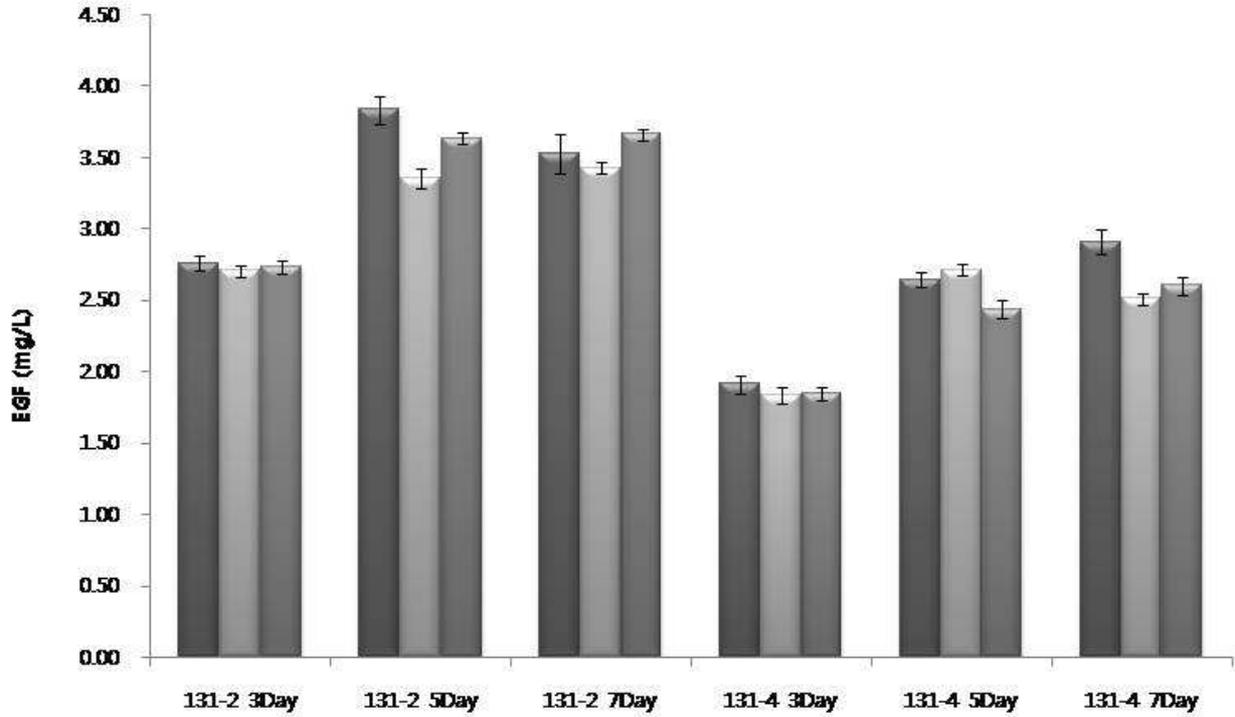


그림3-6-9. ELISA를 이용한 EGF 발현 확인 >

○ 벼 유래 EGF의 구조적 평가

- 발현된 EGF는 extracellular space나 plasma membrane에 위치하며 당화나 인산화 등의 post translational modification은 일어나지 않는다. 배지로 분비된 EGF가 RAmy3D signal peptide와 EGF mature peptide 사이에 정확한 위치의 아미노산에서 끊어졌는지 확인하기 위해 N-term sequencing을 수행하였다. 전기영동이 끝난 젤을 PVDF membrane 으로 transfer 하여 membrane으로 이동한 단백질을 PTH-column chromatogram을 통해 N-term Sequencing을 진행하였다. N-term Sequencing 결과 RAmy3D signal peptide가 정확히 떨어져 나가고 EGF mature peptide의 N-term 시작 부분인 N-S-D-S-E 가 확인 되어 구조적 변화가 없음을 알 수 있었다.

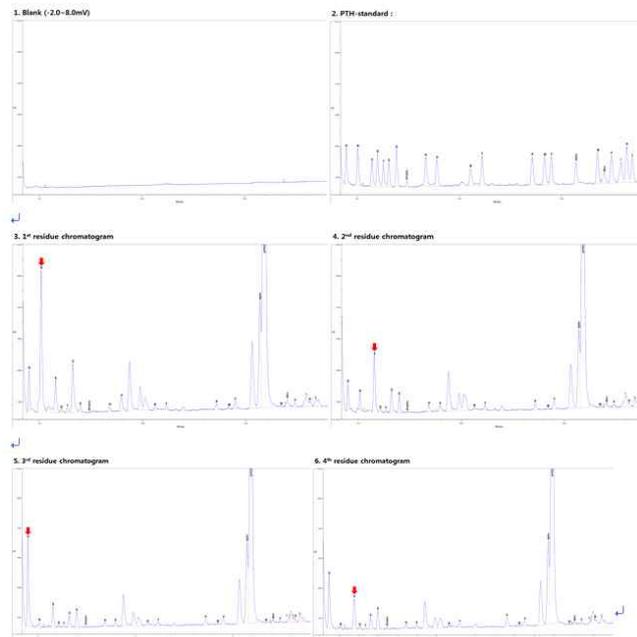


그림3-6-10. 벼 유래 EGF의 PTH-column chromatogram Peak >

○ hEGF 고생산 세포주의 현탁세포주 구축

- 1차년도에 선발한 EGF 고생산 세포주를 50mL N6 액체배지를 포함하는 250mL 플라스크에 접종하고 1주 간격으로 계대배양 하면서 현탁세포를 유도하였음
- 2개월 후 2L 규모의 플라스크에 접종하고 세포가 굼어지지 않도록 sieving 하면서 현탁세포를 구축하였음

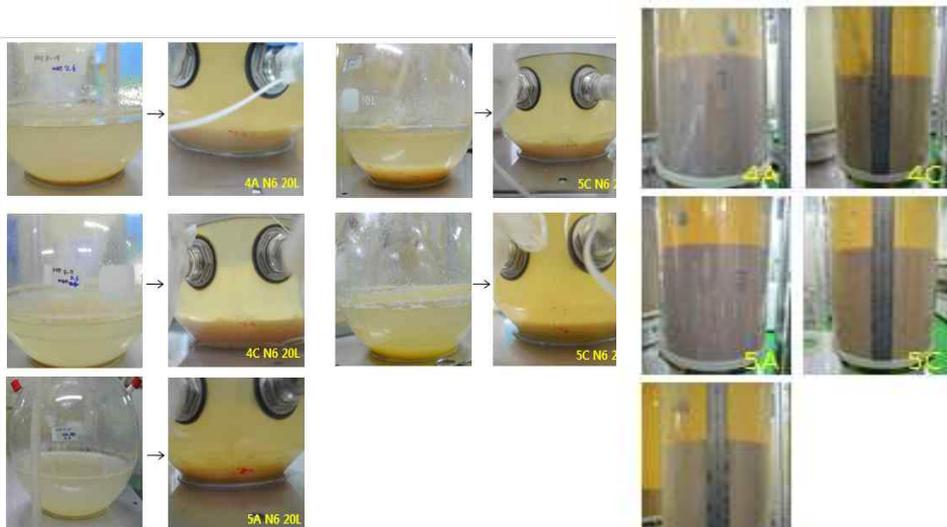


1L 플라스크에 30g의 cell mass 와 N6,3% sucrose 배지, 30ml를 넣고 7일간 suspension culture.

그림3-6-11. 벼 현탁세포주 구축 >

○ EGF 식물 발현 식물 세포주의 대량 배양

- EGF 생산 세포주인 S131-2 세포주를 2L 규모의 플라스크에서 배양
- 80L 리액터 5기에 각각 20L의 N6,3% sucrose를 넣고 3주간 배양한 현탁세포 3L를 접종하여 cell mass를 증가시킴.
- 배양 초기에는 리액터에 적응하는 시간이 있어서 천천히 성장을 하다 2일 후부터 정상적으로 잘 성장함.
- 리액터 1기에 약 5kg의 cell mass를 확보함.



10L 바이오 리액터에서 3주간 배양한 후 약 3L 를 80L 리액터에 각각 접종하고 N6, 3% scurose 배지 20L를 첨가하여 7일간 배양→7일 간격으로 N6, 3% sucrose 배지를 점차 20L 씩 늘려 가며 교체 해 주고 60L가 되면 40L 씩 교체해 주며 총 2개월 배양

Seed culture 2 하고 2개월 후 확보한 cell mass (약 5kg/reactor)

- 2개월간 배양하여 cell mass, 약 50kg/reactor를 확보한 5기의 reactor에서 각각 20L씩 현탁세포 배

양액을 뽑아 새로운 5기의 reactor에 cell mass를 옮기고 10기 전체에 40L의 N6, 3% sucrose 배지를 넣고 7일간 배양한 결과 cell mass 약 50kg/ reactor를 확보 함

- 앞 선 실험에서 약 9일 배양 하였을 때 약 1mg/L 의 EGF 를 생산 하였고 그 이후에는 점점 감소하는 경향이 있어서 9일까지 배양함.

- 약 500L의 배양액을 95% 이상 고순도 분리 정제를 수행함.



그림3-6-12. EGF 생산 세포주의 대량배양 체계 구축 >

- 형질전환이 확인된 EGF 고생산 벼 세포주를 50ml 액체 N6S 배지(300ml flask)로 옮겨주고 점차 1L flask, 2L flask, 10L flask로 배양 부피를 점진적으로 늘려서 최종적으로 250L 대량배양기에서 배양하였다

○ 벼 유래 EGF의 분리정제

- Cation exchange chromatography 수행

·8일간 배양한 배양액을 0.45 um cartridge를 사용하여 여과한 후에 30kDa cartridge를 사용하여 final vol., 약 100 mL로 cut-off하였고 이를 GE healthcare사의 30kDa cartridge)를 사용하여 cut-off한 결과 hEGF가 농축액에 존재함을 확인하였음

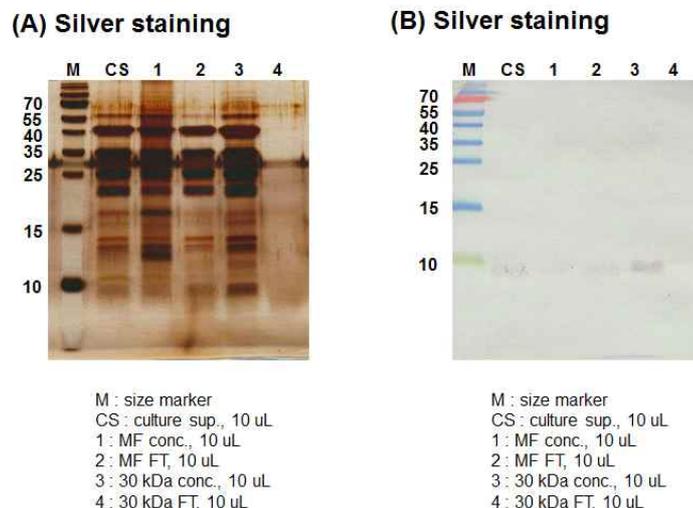


그림3-6-13. 인간상피세포성장인자(hEGF) 배양액의 cut-off 결과 >

·Primeview evaluation program을 사용하여 Affinity chromatography를 분석한 결과 Buffer A와 B의

gradient의 약 10%에서 peak가 증가하기 시작함.

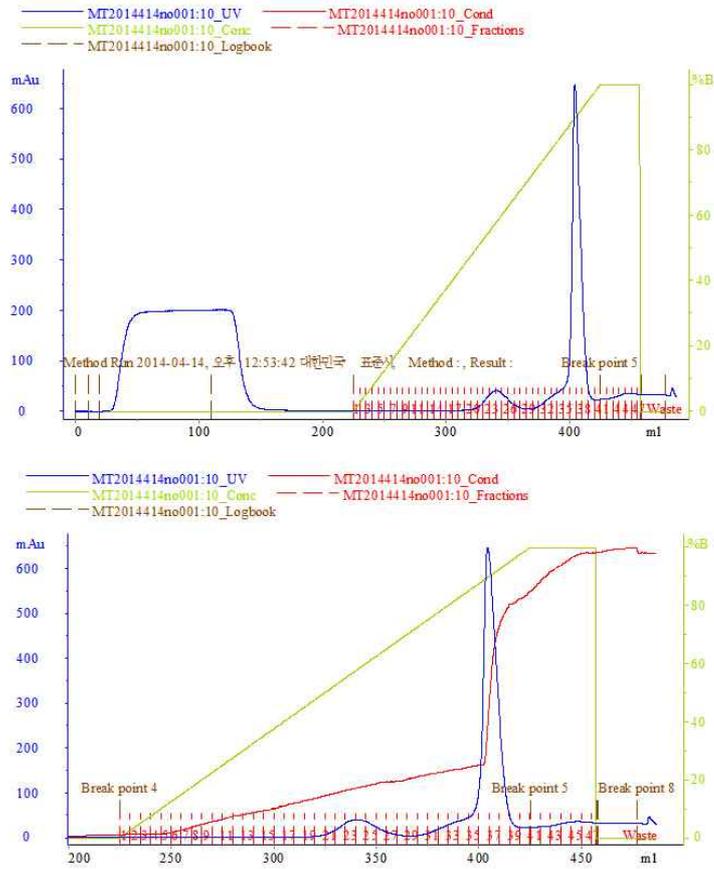


그림3-6-14. 인간상피세포성장인자 (hEGF) 배양액을 Cation-exchange chromatography 수행 >

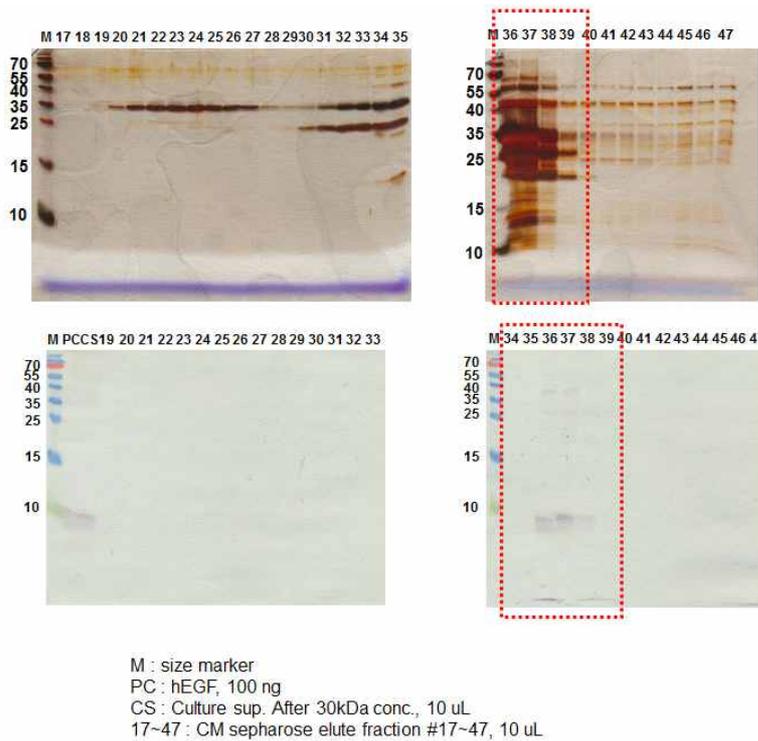


그림3-6-15. 인간상피세포성장인자 (hEGF) 배양액을 ion-exchange chromatography 수행 후 SDS-PAGE와 western blot >

- Anion exchange chromatography 수행
  - GE healthcare사의 DEAE sepharose fast flow resin, Hiprep DEAE 16/20 FF resin을 사용하여 ion-exchange chromatography를 수행하였음
  - anion-exchange chromatography를 수행한 결과 target 단백질 hEGF 대부분이 column의 resin에 결합하고 salt strength에 의해서 elution 됨.
  - 12% acrylamide gel run하여 silver staining과 western blot을 수행한 결과 elute fraction #15~20에서 hEGF의 band를 확인 할 수 있었음.

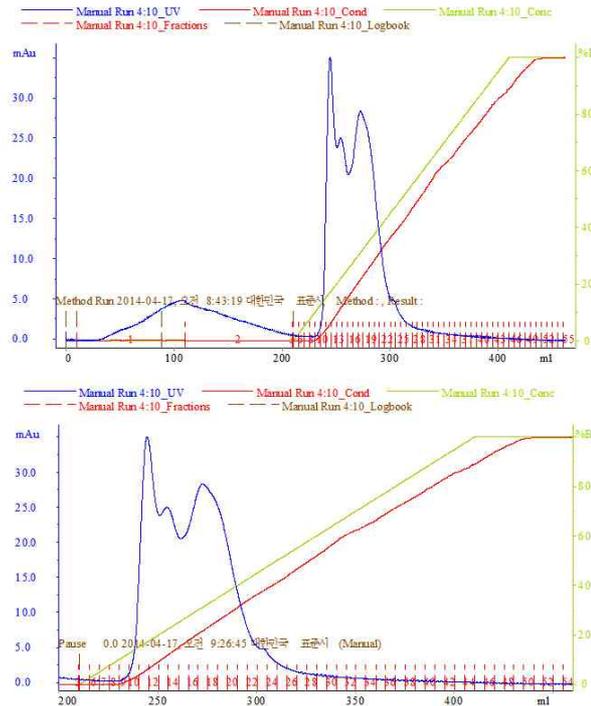


그림3-6-16. 인간상피세포성장인자 (hEGF)의 anion-exchange chromatography 수행 >

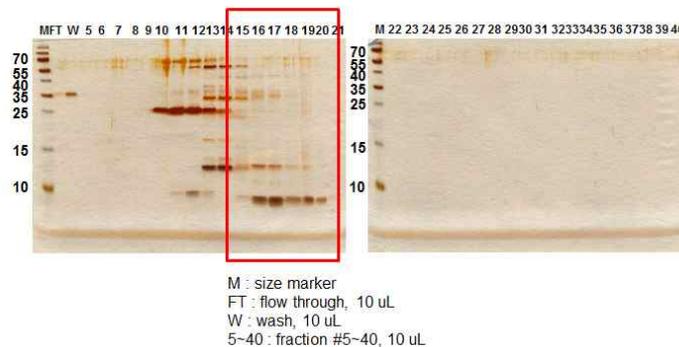


그림3-6-17. Anion-exchange chromatography 수행 후 SDS-PAGE 와 western blot 수행 >

- Size-exclusion chromatography
  - 95% 이상 고순도의 hEGF를 정제하기 위해 size-exclusion chromatography를 수행함.
  - SEC 수행한 결과 95%이상 고순도의 hEGF 정제 확인
  - 12% acrylamide gel run하여 silver staining으로 확인한 결과 fraction #20~22에서 hEGF band를 확인 함.

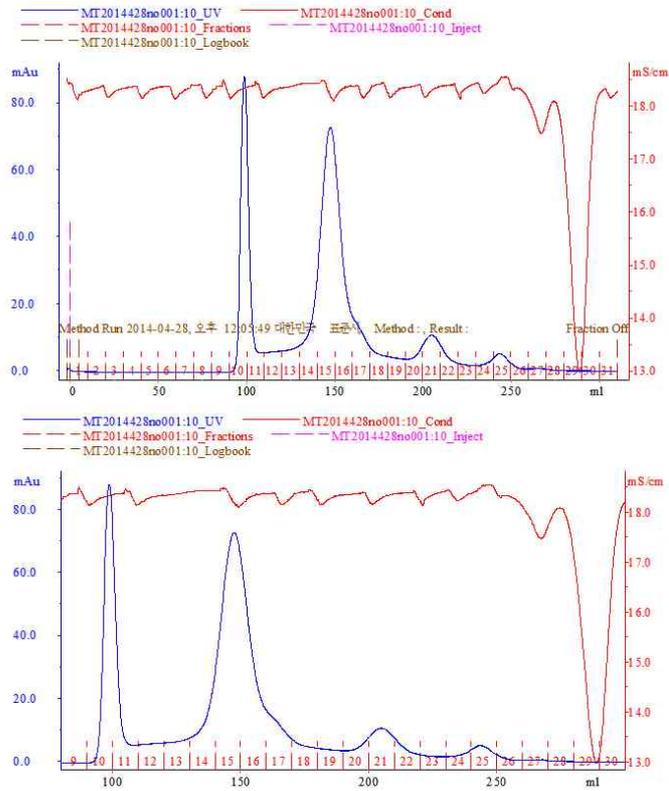


그림3-6-18. 인간상피세포성장인자 (hEGF)의 size-exclusion chromatography 수행 >

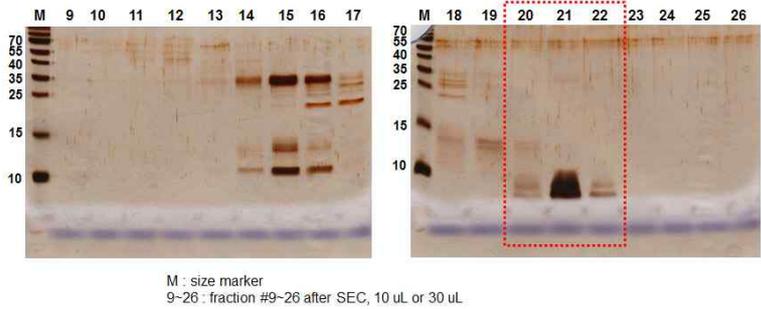


그림3-6-19.인간상피세포성장인자 (hEGF)의 size-exclusion chromatography 수행 후 SDS-PAGE >

.95% 이상 고순도의 hEGF를 정제한 sample을 최종 제품으로 포장하기 위해 salt를 제거하기 위해 desalting을 수행하여 SEC 수행 후 elute fraction에 존재하는 salt를 완전히 제거하고 12% acrylamide gel run하여 silver staining으로 확인한 결과 hEGF band를 확인하였고 이를 동결건조를 수행하여 제품을 완성 하였음

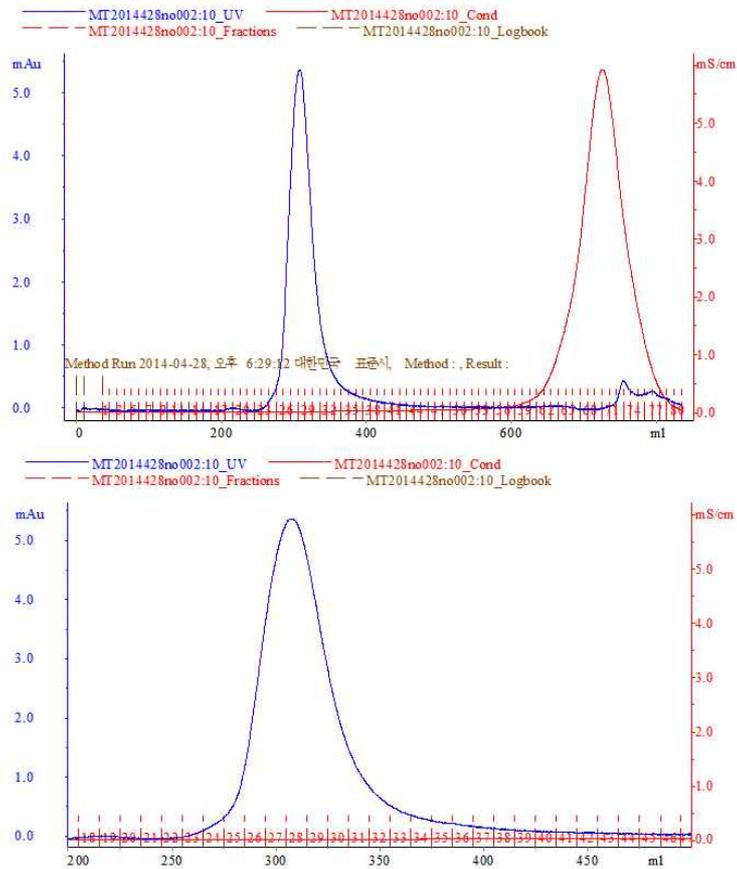
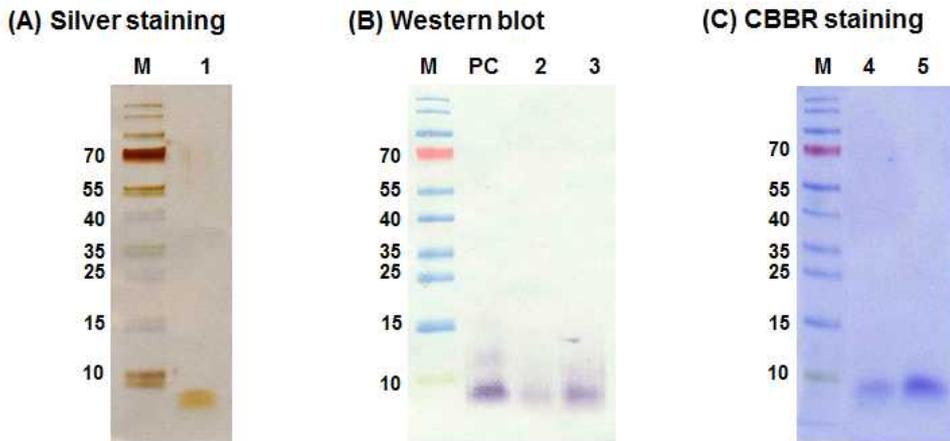


그림3-6-20. Gel filtration 결과 >

·상기의 분리정제한 벼 현탁세포 유래 EGF의 순도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE와 western blot을 수행한 결과 95% 이상 purity가 되는 것을 확인함



M : size marker  
 PC : recombinant EGF (RayBiotech, 228-10360-1), 500 ng  
 1 : Recombinant human EGF form *Oryza Sativa*, 4 ug  
 2 : Recombinant human EGF from *Oryza Sativa*, 200 ng  
 3 : Recombinant human EGF from *Oryza Sativa*, 500 ng  
 4 : Recombinant human EGF from *Oryza Sativa*, 10 ug  
 5 : Recombinant human EGF from *Oryza Sativa*, 20 ug

그림3-6-21. 벼 현탁세포 유래 EGF의 순도확인을 위한 SDS-PAGE와 western blot analysis >

○ HPLC를 이용한 벼 현탁세포 유래 EGF의 순도 확인

- HPLC를 이용하여 벼 현탁세포유래 EGF의 순도를 확인한 결과 약 95% 이상의 순도를 확인하였다

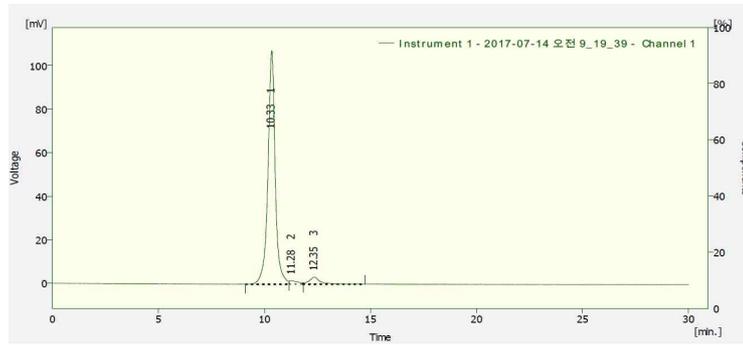


그림3-6-22. HPLC를 이용한 벼 현탁세포유래 EGF의 순도 확인 >

○ 벼 현탁세포 유래 재조합 인간 상피세포성장인자 (Epidermal growth factor, EGF)의 endotoxin level 확인

- 벼 캘러스로부터 생산한 재조합 인간 상피세포성장인자 (hEGF)에 대한 박테리아 endotoxin을 측정하기 위해 horseshoe crab(Limulus polyphemus 또는 Tachypleus tridentatus)로부터 amoebocyte lysate를 사용하여 endotoxin의 양을 측정한 결과 최소 0.105 EU/ug으로 확인 하였으며, 식물세포를 이용한 재조합 단백질을 생산할 경우 엔도톡신은 1EU/ug 이하로 대장균 유래의 EGF와 비교하여 매우 낮은 농도임을 확인하였음

○ 정제된 hEGF의 생물학적 활성 확인

- 분리정제 단계를 거쳐 생산된 순도 90% 이상의 정제된 hEGF의 생물학적 활성을 확인하기 위하여 BALB/3T3 동물세포주를 이용하여 hEGF의 처리 농도별 동물세포주의 세포 증식 능력을 측정하였다

- BALB/3T3 세포주의 proliferation assay 결과를 바탕으로 ED50 값은 3ng/ml과 같거나 낮은 것으로 확인되었고 PC와 비교해서 NBM EGF1과 NBM EGF2 모두 유사한 생물학적 활성을 가지는 것을 확인하였다

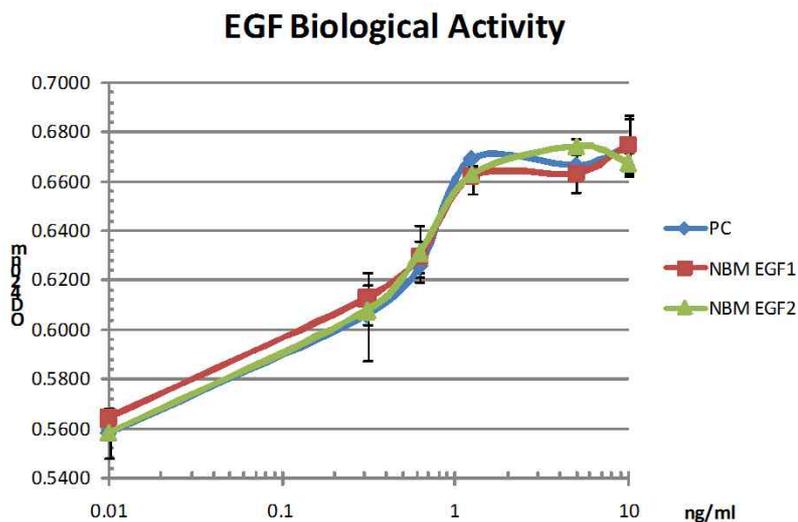


그림3-6-23. 벼 현탁세포 유래 EGF의 생리활성 확인 >

○ 벼 유래 EGF의 시제품 제작

·hEGF는 수분이 약하기 때문에 동결건조 분말제형이 가장 이상적임. 따라서 각각의 vial에 1mg씩 분주하고 동결건조 하여 제품을 포장하여 시제품을 제작하였음



그림3-6-24. hEGF 제품 포장 과정과 완제품 >

HSA 고생산 세포주 개발 및 제품화

○ HSA 유전자의 발현벡터 제작

- HSA유전자 코돈의 최적화 및 유전자 합성

• 인간 유래의 serum albumin (HSA) 유전자를 단자엽 고발현 시스템인 벼에서 발현하기 위하여 유전자 분석을 수행하였다. 본 연구에서 목적으로하는 HSA 유전자는 인간 유래이며, 단백질 발현 시스템으로는 단자엽 식물인 벼를 사용하고 있다. 일반적으로 이와 같은 경우에, 인간과 벼에서 사용하는 codon usage의 차이에 의해, 벼에서 낮은 빈도로 사용되는 codon usage가 목적 유전자에 사용되었을 경우, 그 유전자의 단백질 발현 효율 또는 정밀도가 낮아진다고 보고되어 있으므로, HSA의 codon usage를 확인하고 벼에서 사용되어지는 codon usage로 codon 최적화하기 위하여 <http://pombe.kaist.ac.kr/codon/> 의 database에서 제공하는 SynBioCodonOpt 프로그램을 이용하여 *Oriza sativa*에 맞게 codon을 최적화하여 유전자를 합성하였다

- RAmy3D promoter를 이용한 HSA 식물 발현 벡터 제작

• 합성된 HSA 유전자는 rice alpha- amylase 3D promoter(RAmy3D promoter) 와 3'-UTR terminator가 포함되어 있는 식물 발현벡터에 도입하여 발현벡터 pKH1과 pKH2를 완성하였음

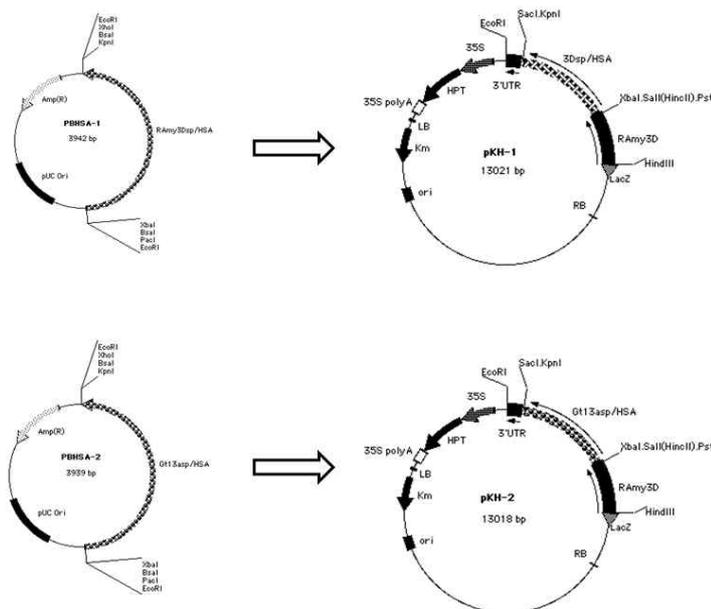


그림3-6-25. HSA 유전자가 삽입된 식물 발현벡터 제작 >

○ 벼 형질전환

- Agrobacterium-mediated 식물 형질전환을 수행하기 앞서 상기의 pKH1과 pKH2 식물발현벡터를 tri-parental mating 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 에 형질 전환하였음

- pH1과 pH2는 Agrobacterium-mediated 방법을 사용하여 벼 캘러스로 형질전환하여 hygromycin B 항생제가 포함된 선택배지에서 HSA 유전자가 도입되어 새롭게 형성되어 나오는 신생하는 캘러스를 선발하고 PCR을 이용하여 HSA유전자를 검출함으로써 형질전환을 확인 하였다.

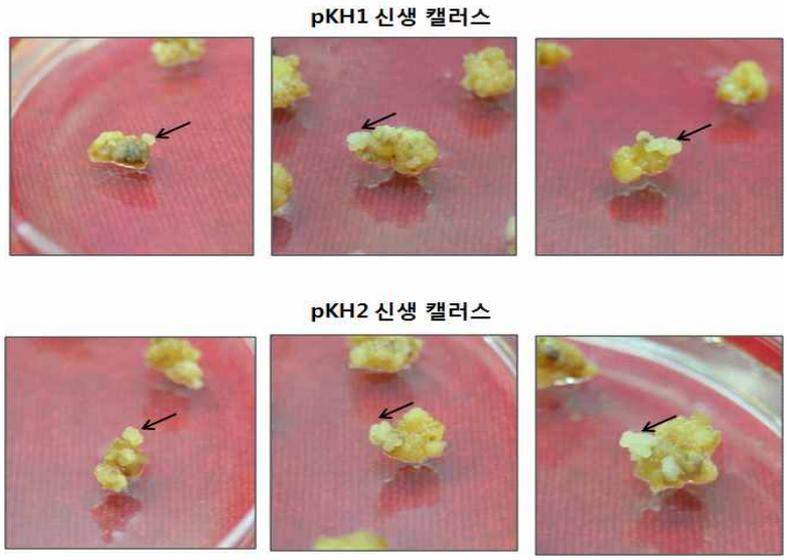


그림3-6-26. pH1과 pH2 형질전환체의 신생 캘러스 선발 >

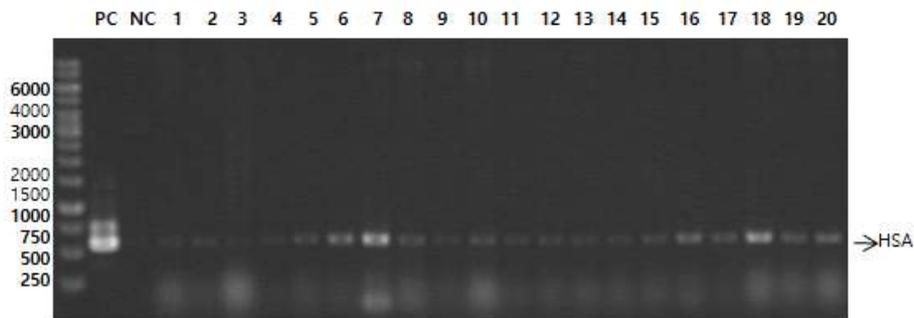


그림3-6-27. PCR을 이용한 형질전환 캘러스의 hSA 유전자 도입확인 >

○ hSA 고발현 세포주의 선발

- hSA의 유전자 도입이 확인된 20개 세포주를 이용하여 Western blot analysis를 수행한 결과, 20개 세포주 모두에서 hSA 단백질의 발현을 확인할 수 있었다

- 이중  $\alpha$ -amylase 발현량을 기초로하여 hSA의 발현량을 분석하여 2, 6, 9, 13, 16, 20번 세포주에서 hSA 단백질이 강하게 발현됨을 확인하고 상기 6개 세포주를 잠정적으로 hSA 고생산 세포주로 선발하였으며 이의 결과는 아래에 제시하였다.

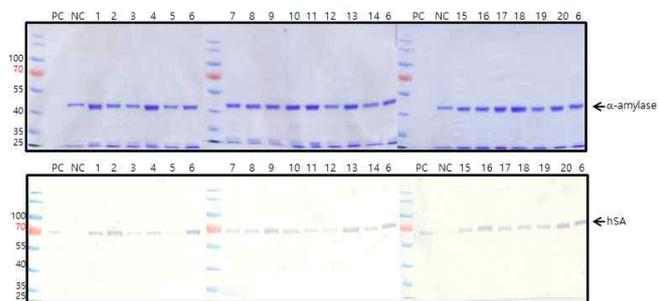


그림3-6-28.hSA 유전자 도입 세포주의 hSA 발현확인 >

- 상기의 선발된 6종의 hSA 발현 세포주를 더욱 상세히 분석하여 고생산 세포주를 선발하고자 추가적으로 induction 배지인 sucrose가 배제된 배지(N6-S)에서 7일과 10일간 배양하여 배양액만을 취하여 Western blot analysis를 수행하였으며, Western blot analysis 결과와 배양중인 현탁 세포주의 캘러스 상태를 바탕으로 하여 pH1 세포주- 2, 9, 20를 최종 선발하였고 이의 결과를 아래에 제시하였다.

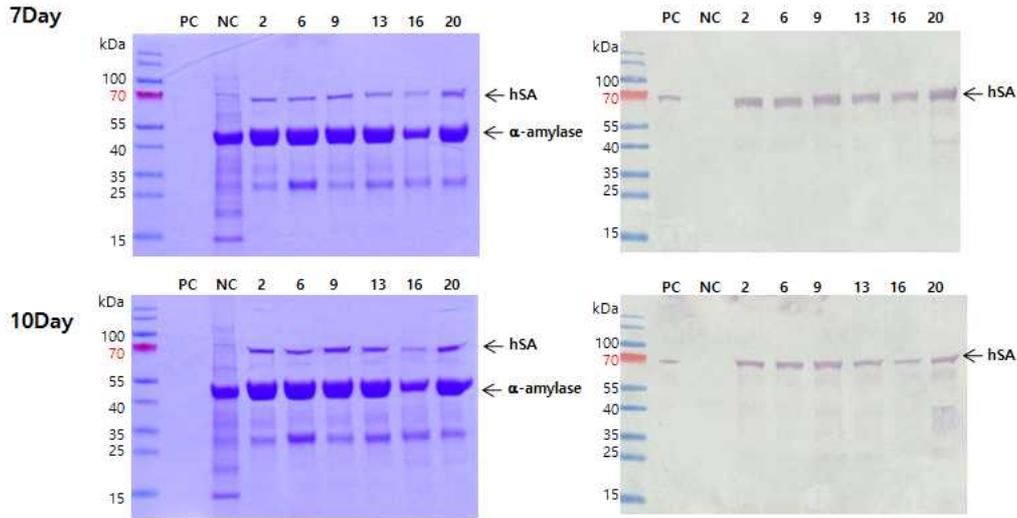


그림3-6-29. hSA 고생산 세포주의 선발 >

○ hSA 고생산 세포주의 발현수율 확인

- 선발된 3개의 hSA 발현 세포주 중 hSA 단백질 발현이 가장 높다고 판단되는 H1-9 세포주를 당결핍 배지에서 7일간 배양한 후 Western blot analysis를 실시하였다. 대조구의 농도와 비교한 결과 대적으로 H1-9 세포주는  $\mu\text{l}$  당 50mg/L의 수율로 hSA 단백질을 발현시킴을 예측할 수 있었다

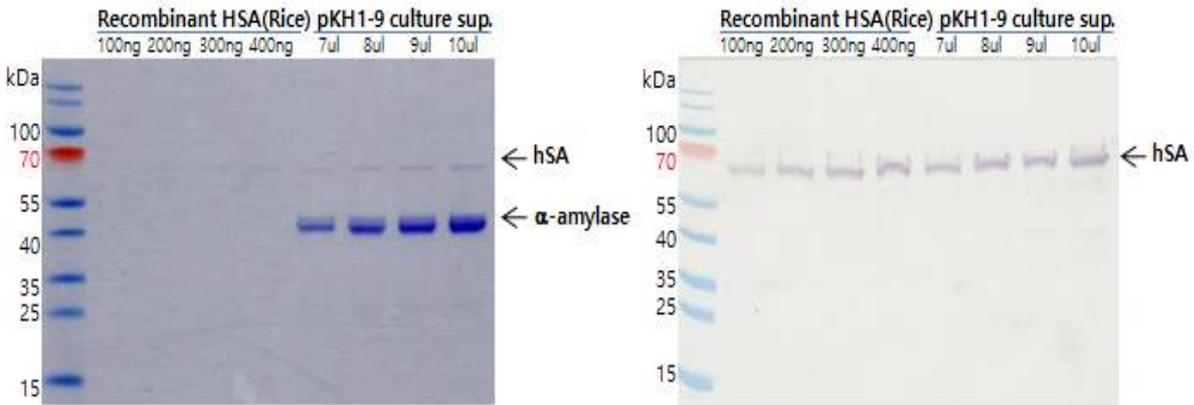


그림3-6-30. H1-9 세포주의 shSA의 발현수율 확인 >

○ hSA 고생산 세포주의 현탁세포주 구축 및 대량배양(10L 규모)

- 최종적으로 선발한 hSA 고생산 세포주 H1-9 세포주 텔러스를 50mL N6 액체배지를 포함하는 250mL 플라스크에 접종하고 1주 간격으로 계대배양 하면서 현탁세포를 유도하였음

- 2개월 후 2L 규모의 플라스크에 접종하고 세포가 굵어지지 않도록 sieving 하면서 현탁세포를 구축하였음

- hSA 고생산 세포주인 H1-9 캘러스를 이용하여 구축한 현탁세포를 N6 액체 배양배지에 접종하고 증식한 현탁세포주를 1L flask, 2L flask로 배양 규모를 점진적으로 늘려서 최종적으로 10L/reactor 규모의 배양기에서 생육하는 현탁세포를 확보하였다.

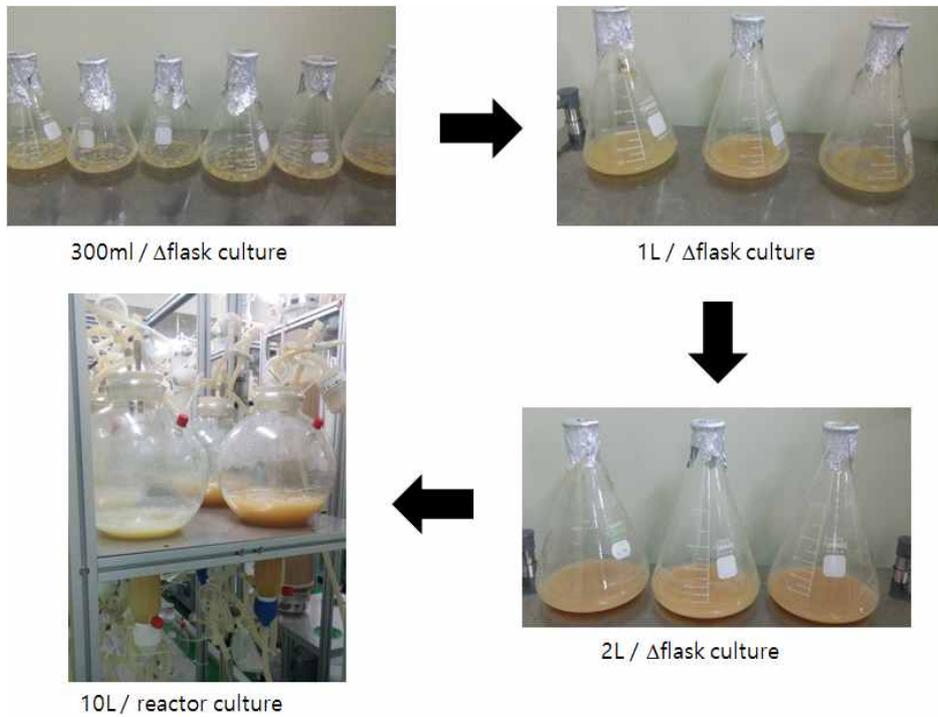


그림3-6-31. hSA 고생산 세포주의 대량배양>

○ 벼 현탁세포 유래 HSA의 분리정제

- 배양액을 UF 시스템을 이용하여 50 kDa으로 cut-off 하여 작은 사이즈의 단백질을 제거함과 동시에 HSA를 농축 한 후에 GE healthcare사의 DEAE sepharose fast flow resin, Hiprep DEAE 16/20 FF resin 을 사용하여 ion-exchange chromatography를 수행하였음
- anion-exchange chromatography를 수행한 결과 target 단백질 HSA 대부분이 column의 resin에 결합하고 salt strength에 의해서 elution 됨.
- 12% acrylamide gel run하여 western blot을 수행한 결과 elute fraction #3~6에서 HSA의 band를 확인 할 수 있었음.

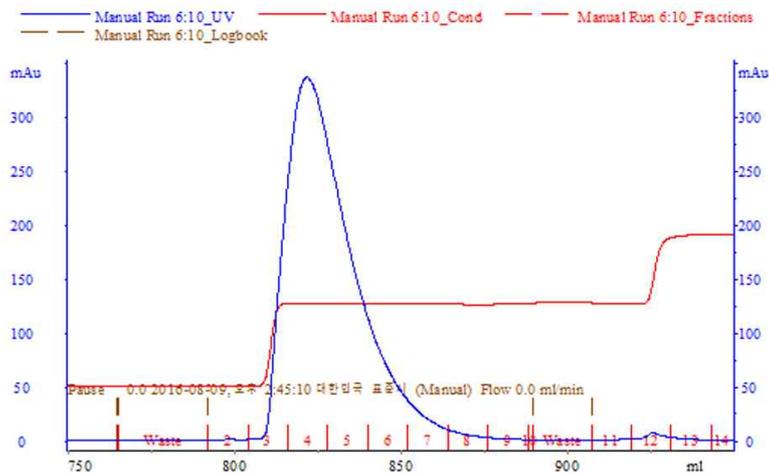


그림3-6-32. HSA의 anion-exchange chromatography 수행 >

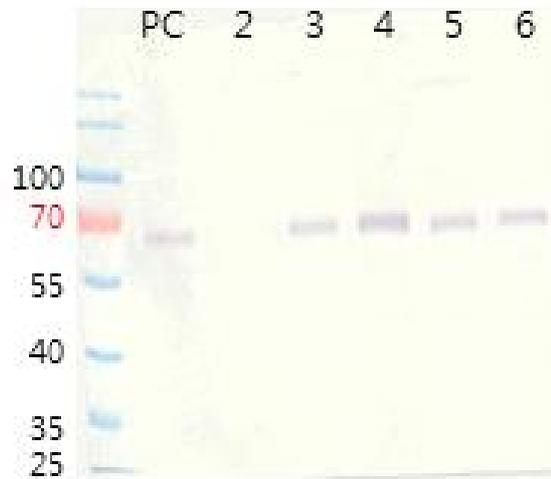


그림3-6-33. HSA의 anion-exchange chromatography fraction 확인 >

○ 벼 현탁세포 유래 hSA의 N-말단 아미노산 분석

- 발현된 HSA가 RAmy3D signal peptide와 HSA mature peptide 사이에 정확한 위치의 아미노산에서 끊어졌는지 확인하기 위해 N-term sequencing을 수행하였다. 전기영동이 끝난 젤을 PVDF membrane 으로 transfer 하여 membrane으로 이동한 단백질을 PTH-column chromatogram을 통해 N-term Sequencing을 진행하였다. N-term Sequencing 결과 RAmy3D signal peptide가 정확히 떨어져 나가고 HSA mature peptide의 N-term 시작 부분인 R-G-V-F-R가 확인 되어 구조적 변화가 없음을 알 수 있었다.

○ 벼 현탁세포 유래 HSA의 순도 확인

- SDS-PAGE를 이용하여 벼 현탁세포유래 HSA의 순도를 농도별로 확인한 결과 다른 마이너 밴드를 확인할 수 없었다.

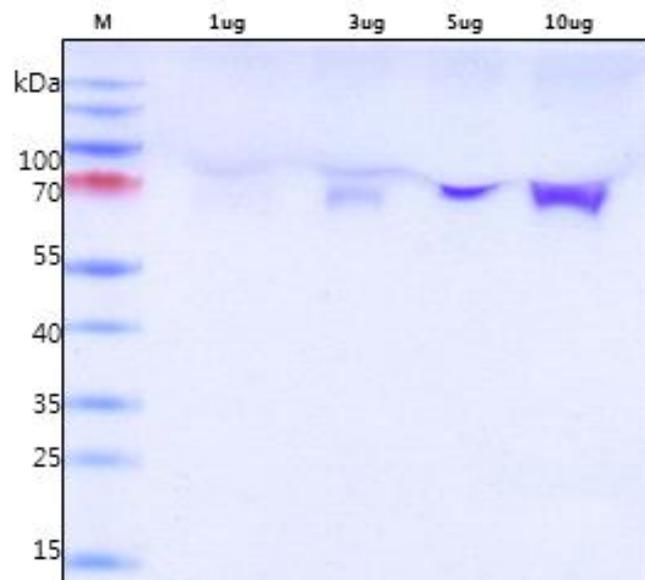


그림3-6-34. SDS-PAGE를 이용한 순도확인 >

- HPLC를 이용하여 벼 현탁세포유래 HSA의 순도를 확인한 결과 약 96.5% 이상의 순도를 확인하였다

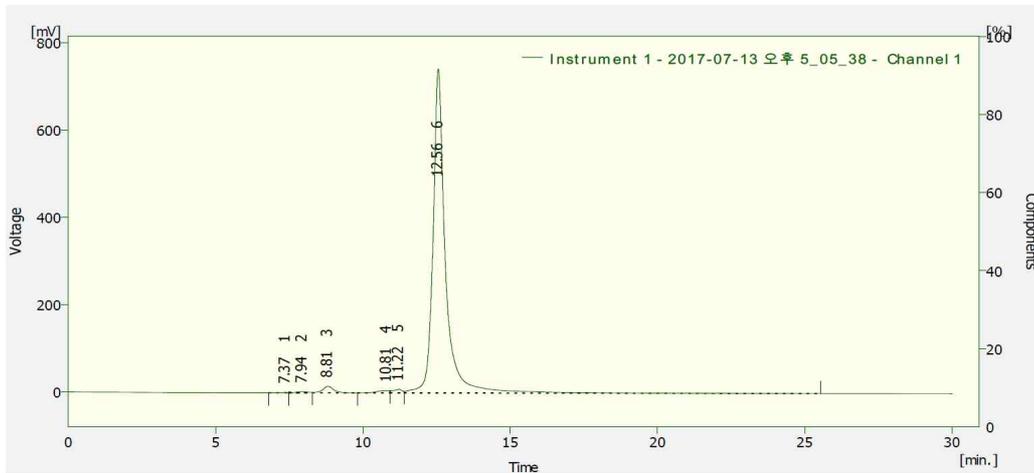


그림3-6-35. HPLC를 이용한 벼 현탁세포유래 HSA의 순도 확인 >

○ 벼 현탁세포 유래 HSA의 endotoxin level 확인

- 벼 캘러스로부터 생산한 재조합 HSA에 대한 박테리아 endotoxin을 측정하기 위해 horseshoe crab(Limulus polyphemus 또는 Tachypleus tridentatus)로부터 amoebocyte lysate를 사용하여 endotoxin의 양을 측정한 결과 최소 0.05 EU/ug으로 확인 하였다.

○ 벼 현탁세포 유래 HSA의 시제품화

- 벼유래 HSA의 순도와 생화학적 특성 및 엔도톡신 농도가 확인 제품은 100mg, 500mg, 1g 및 10g 규격으로 포장하여 시제품을 완성하였음



그림3-6-36. 벼 현탁세포유래 HSA 시제품 >

PTD-VEGF 고생산 세포주 개발 및 제품화

○ PTD 융합 VEGF165 (PTD-VEGF) 유전자 합성

- PTD-VEGF 유전자 분석 및 최적화

·hVEGF의 codon usage를 확인하고 벼에서 사용되어지는 codon usage로 codon 최적화를 하기 위하



- PTD-VEGF 유전자 도입을 위한 발현벡터 제작

·벼 현탁세포 배양을 통하여 PTD-hVEGF 단백질을 배지내로 분비시켜 고발현 시키고자 rice alpha-amylase 3D promoter (RAmy3D promoter) 와 3'-UTR terminator가 포함되어 있는 식물 발현벡터 (pKV31)에 PTD-hVEGF 유전자를 클로닝 하여 최종적으로 발현벡터 pKV23을 제작하였음

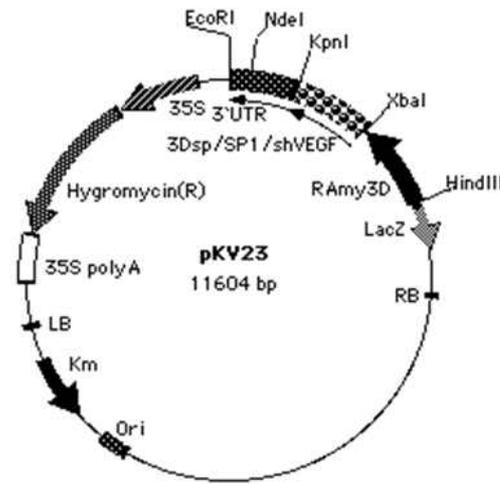


그림3-6-38. PTD-VEGF 발현벡터 >

○ 벼에 형질전환

- PTD-VEGF 유전자의 벼로 형질전환

·벼 형질전환을 위해 sucrose, 4.4g의 N6 salt, 1g의 casamino acid와 2,4-D가 포함된 N6CI 배지에서 캘러스를 유도하였다

·캘러스 유도 3주 후, 지름 3-4mm 정도 크기의 유백색 캘러스만을 분리하여 LBA4404에 감염시켜 형질전환을 실시하였고, 3-4주 정도 배양 후 항생제 저항성을 보이며 자라난 캘러스만을 분리하여 새로운 배지로 옮겨주었다.

·PTD-VEGF 유전자를 포함하는 Agrobacterium을 이용하여 형질전환을 실시하고 하이그로마이신 항생제를 포함하는 선택배지에서 형성된 신생 캘러스만을 계대하여 증식하였음

○ PTD-VEGF165 고발현 형질전환체 선발

- PTD-VEGF165 유전자 도입 형질전환체의 선발

·PTD-VEGF 유전자를 포함하는 Agrobacterium을 이용하여 형질전환을 실시하고 있으며, 하이그로마이신 항생제를 포함하는 선택배지에서 생육하는 신생 캘러스를 선발하였음

·3주 간격으로 항생제 하이그로마이신을 포함하는 새로운 배지에 계대배양을 하였으며, 최종적으로 KV23 유전자가 도입된 캘러스 15 라인, KV24 유전자가 도입된 라인 21 라인을 선발하였음

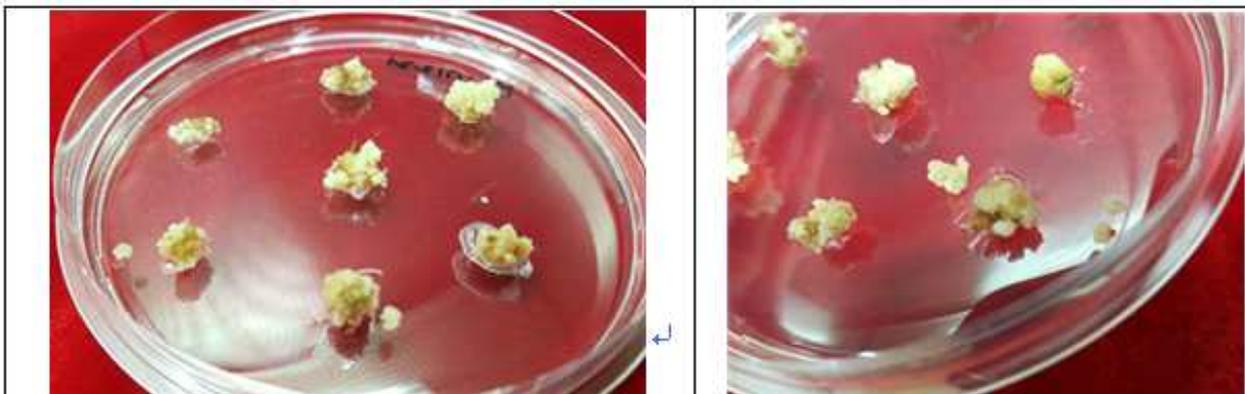


그림3-6-39. pKV23 형질전환 캘러스 선발>

○ 형질전환체의 분자생물학적 분석

- PCR을 이용한 유전자 도입확인

·하이그로마이신 항생제에서 생육하는 캘러스로부터 genomic DNA를 추출하고, PTD-VEGF165 유전자에 특이적인 프라이머 5` UTR F: 5`- GCA GCA ACT CAC TAT CGA ACA CGG TTT CAG -3`, 3` UTR R1: 5`- TTG AAT TCA TAA AAA CTC ACT GAT C-3을 이용하여 PCR을 실시하여 PTD-VEGF165 유전자의 증폭을 통하여 유전자 도입을 확인하였음

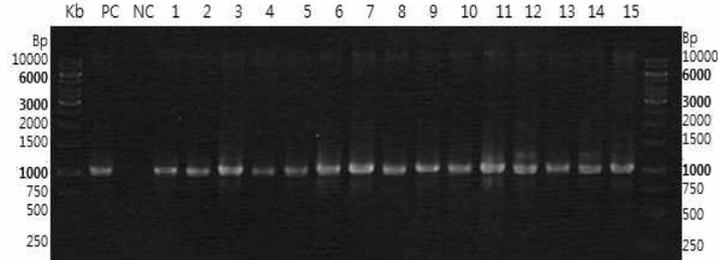


그림3-6-40. pKV23 형질전환체 PCR 분석>

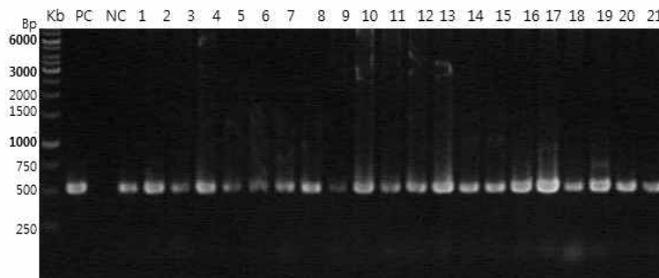
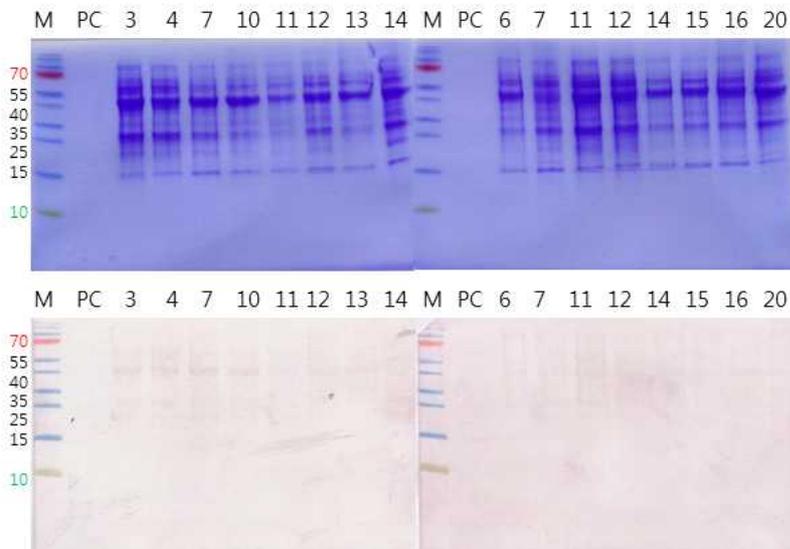


그림3-6-41. pKV24 형질전환체 PCR 분석>

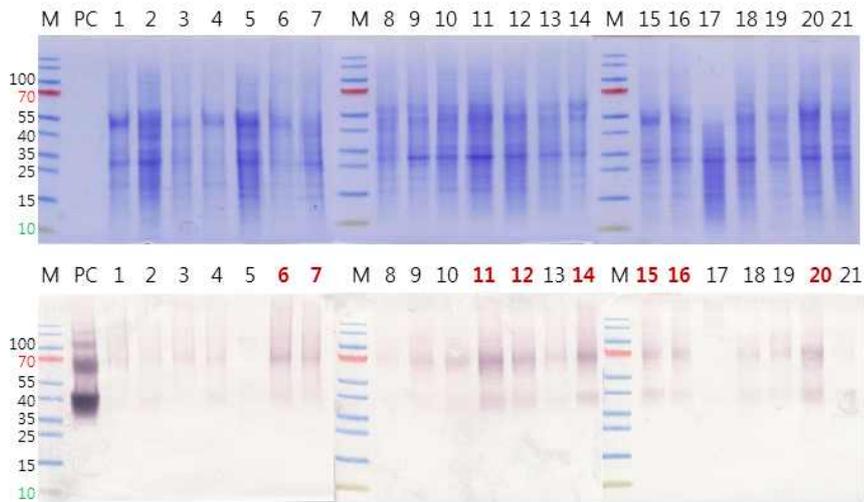
- VEGF165에 특이적인 항체를 이용한 Western blot analysis를 수행

·상기 PCR 분석을 통하여 PTD-VEGF165 유전자의 도입이 확인된 캘러스의 PTD-VEGF165 단백질 발현수준을 확인하고자 VEGF165에 특이적인 항체를 이용하여 Western blot analysis를 수행한 결과 KV23 유전자가 도입된 캘러스 10, 11, 13, 14라인을, KV24 유전자가 도입된 6, 7, 11, 12, 14, 15, 16, 20번 라인을 고생산 세포주로 1차 선발하였음

**KV23(SP1-hVEGF) and KV24 (SP1-hVEGF-his6) callus 각 8개에 대한 단백질 발현 확인 (Reducing Condition, 14%)**



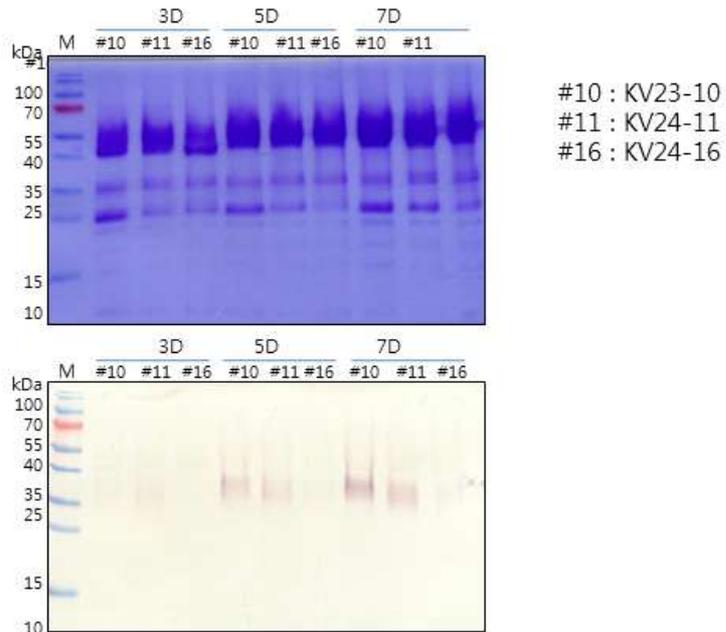
**KV24 (SP1-hVEGF-his6) callus 21개에 대한 단백질 발현 확인  
(Non-Reducing Condition, 10%)**



·상기에서 선발한 각각의 세포주로부터 현탁세포를 유도하고 이를 이용하여 PTD-VEGF165의 생산수준을 확인하여 KV23-10, KV24-11번 세포주를 고생산 세포주로서 최종 선발을 하였음

**KV23(SP1-hVEGF) 와 KV24(SP1-hVEGF-H6) induction 배양액에 대한  
단백질 발현 확인 -액체 배지induction 시료**

(Non-Reducing conditions, 14% gel)



○ 현탁세포 유도 및 생산성 확인

- ELISA 분석을 이용한 생산성 확인

·KV23-10, KV24-11번 현탁세포주의 생산성을 확인하기 위하여 현재 10L 규모의 리액터에 치상하여 증식 중에 있음



## KV23-10, KV24-11 현탁세포주의 증식

·현탁세포가 증식 후 생산배지를 첨가하여 14일간 배양하면서 PTD-VEGF165의 생산을 유도하고 이후 ELISA를 이용하여 생산성을 확인한 결과 KV23-10 세포주는 5.5 mg/L, KV24-11번 세포주는 3.8 mg/L의 생산성을 확인하였음

### ○ PTD-VEGF165 국제화장품원료집 등재

- 식물유래 PTD-VEGF165에 대한 국제화장품원료집 등록 추진

·식물유래 PTD-VEGF165를 국제화장품협회 (INCI)의 절차에 따라서 국제화장품원료집 (ICID) 화장품 원료 등록심사를 거쳐 최종 등록이 완료되었음

The image shows two pages of an application form from the Personal Care Products Council. The left page is a letter dated December 18, 2018, addressed to the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INC). It discusses the application for PTD-VEGF165 and includes a warning about the potential for publication of the data. The right page is the application form itself, dated December 18, 2018, with application number 5-08-2018-6277. It contains fields for 'Submitted By', 'Manufactured By', 'Trade Name', and 'Assigned INCI Name'.

## 국제화장품원료집 등재 증명서

### ○ 기 확보하고 있는 VEGF165 세포주의 대량배양 및 생산

- VEGF165 생산 세포주의 대용량 배양 및 고순도 분리정제

·4차년도 평가위원의 의견을 반영하여 VEGF165 고생산 세포주를 80리터 대용량 리액터를 이용하여 대량배양하고 기존에 확립한 분리정제 SOP를 이용하여 고순도 분리정제를 실시하였음

·변형현탁세포유래 VEGF165의 순도는 coomassie blue staining과 silver staining 염색을 통하여 확인한 결과 약 95% 이상으로 판단하였음



VEGF165 고생산 현탁세포주의 대량배양

### hVEGF<sub>165</sub> 정제

hVEGF<sub>165</sub> induction 배양액



MF (0.45um filter) FT



30kDa conc.



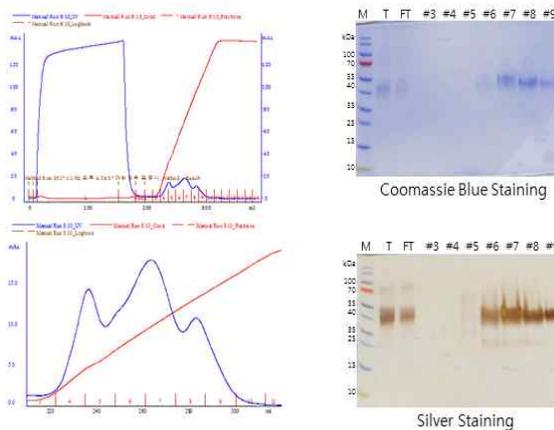
**Ion-exchange chromatography**

Midi-Q sepharose BPX 50/ 500, 1L  
20mM Tris, 20mM NaCl, pH8.0



**Heparin affinity chromatography**

### VEGF165 분리정제 과정



양이온크로마토그래피 결과

·상기에서 순도를 확인한 비현탁세포유래 VEGF165를 유리 vial에 1mg/mL 농도로 분주하여 동결건조를 실시하여 제품을 완성하였음

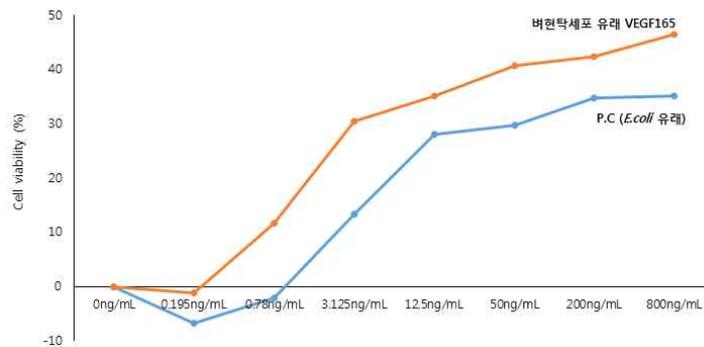


동결보존상태의 비현탁세포유래 VEGF165 제품

- 생리활성 확인 및 시제품 생산

·식물유래 VEGF165의 생리활성은 HUVEC 세포주를 이용하여 VEGF165 농도별 처리 후 생존율을 구하여 확인하였음

·모든 처리구에서 대조구로 사용한 E.coli 유래 VEGF165와 비교하여 약 1.2배 이상의 높은 활성을 확인하였으며, 이는 식물유래 VEGF165에 활성형인 dimer의 비율이 높기 때문으로 판단됨



○ 분리정제 체계 확립

- PTD-VEGF165 고생산 세포주의 대량배양 (0.5 ton/batch)

·최종적으로 선발한 KV23-15, KV24-21 세포주로부터 현탁세포를 유도하였음

·각각의 현탁세포는 1L, 10L, 80L 규모로 증식시켜 가면서 배양을 하였으며, 최종적으로는 80L 배양기 10대를 이용하여 PTD-VEGF165 고생산 세포주를 대량배양 (0.5 ton/batch)하였음



< 1. 1L 삼각플라스크 배양 >



< 2. 10L round reactor 배양 >



< 3. 80L round reactor 배양 접종 후 >

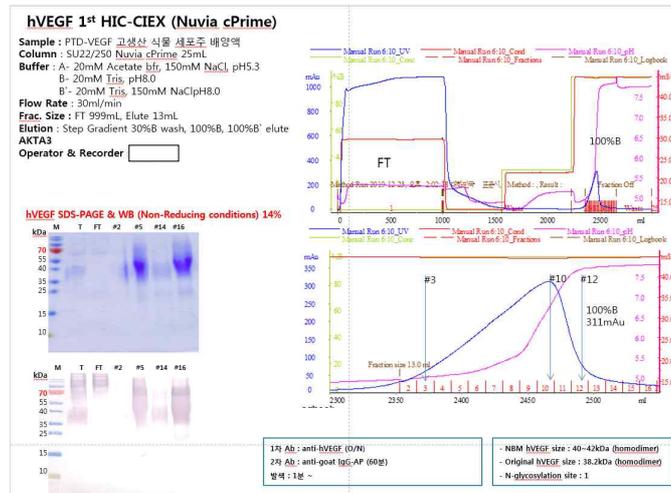


< 4. 80L round reactor 배양 후기 >

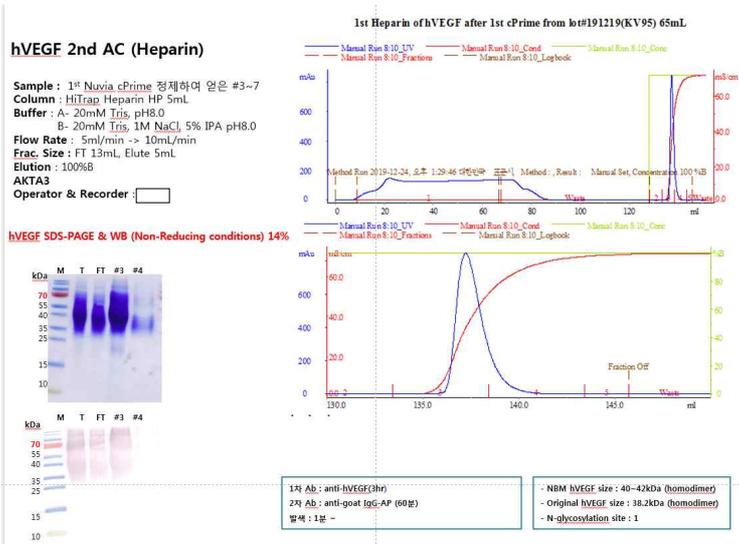
- 고순도 분리정제 체계 확립

·HIC-CIEX 컬럼을 이용한 정제: 80L 대용량 배양기를 이용하여 생산한 후 PTD-VEGF165는 HIC-CIEX 컬럼을 이용하여 1차 정제를 실시하였음

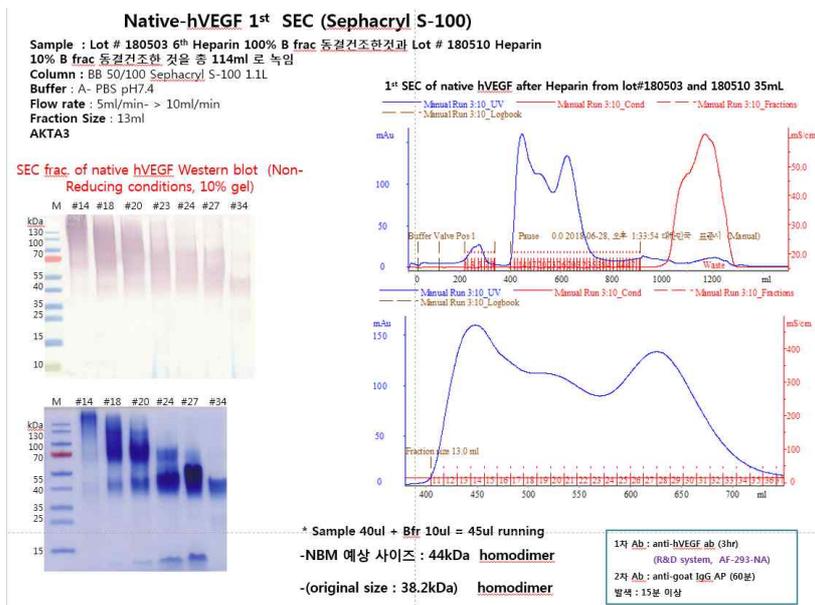
·HIC-CIEX 크로마토그래피 이후 SDS-PAGE를 이용한 Western blot analysis를 이용하여 PTD-VEGF165가 들어있는 분획을 확인하였음



·Heparine 컬럼을 이용한 정제: PTD-VEGF165를 포함하는 HIC-CIEX 크로마토그래피 분획을 Sepadex G25를 이용하여 Heparin buffer로 치환한 후 Heparine 컬럼을 이용한 2차 정제를 실시하였으며, heparine 크로마토그래피 이후 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 이용하여 PTD-VEGF165가 들어있는 분획을 확인하였음

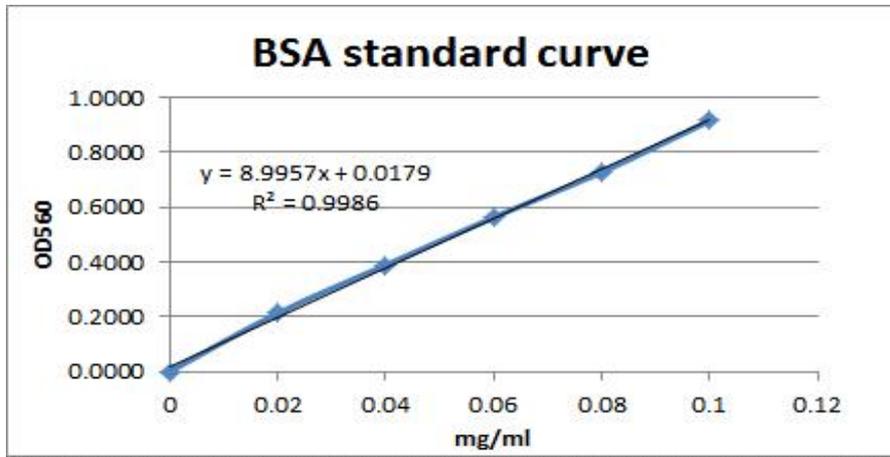


·SEC를 이용한 순수분리: Heparine 크로마토그래피 이후 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 이용하여 PTD-VEGF165를 확인 한 결과 multimer가 혼재하고 있음이 확인되어 dimer의 VEGF를 분리정제하고자 Sephacryl S-100을 이용한 Size Exclusion chromatography를 실시하였으며, Sephacryl S-100을 이용한 Size Exclusion chromatography를 실시하여 순수한 PTD-VEGF를 분리하였음



- 단백질 정량 및 시제품 생산

·고순도의 PTD-VEGF가 포함되어 있는 분획을 제품화 하기 위하여 5% mannitol을 포함하는 PBS buffer로 교환한 후에 BCA 정량하고 Endotoxin을 측정 한 후에 vial에 10mg, 1mg 씩 소분하여 얼린 다음 동결건조를 수행하여 시제품을 생산하였음



dilution	A560nm		A560nm-Blank		Average	$X = (y - 0.017) / 8.995$	dilution factor	mg/ml
2	0.6170	0.6200	0.51	0.508	0.51	0.054419122	1.0883824	1.09

그림3-6-42. 단백질 정량 >



그림3-6-43. PTD-VEGF 시제품>

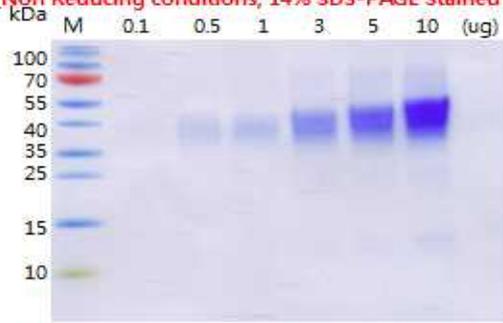
○ 순도 및 생리활성 확인

- SDS-PAGE를 이용한 순도확인

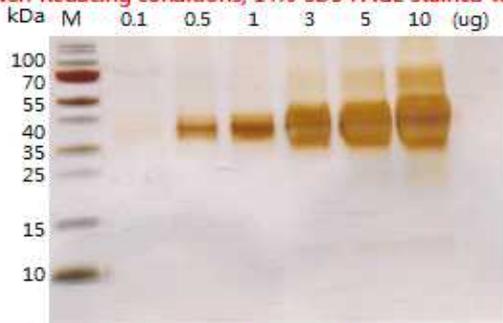
·Coomassie blue와 silver staining에 의한 순도검정: Size Exclusion chromatography를 실시하여 순수 분리정제 한 PTD-VEGF의 순도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 수행한 후 이를 Coomassie blue staining을 하여 순도를 확인하였음. 순수 분리정제 한 PTD-VEGF를 농도별로 SDS-PAGE를 실시하고 이를 PTD-VEGF에 특이적인 항체를 이용하여 Western blot analysis를 수행한 결과 5mcg 이상부터 약 13kDa 크기의 불순물이 혼재되어 있음이 확인 되었으며, intensity로 추정 할 때 순도는 약 85% 이상으로 추정되었음

## Quality Control

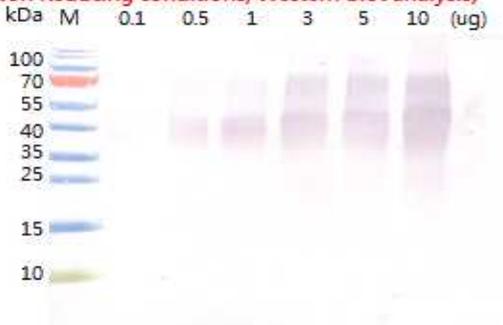
(Non Reducing conditions, 14% SDS-PAGE Stained with CBBR)



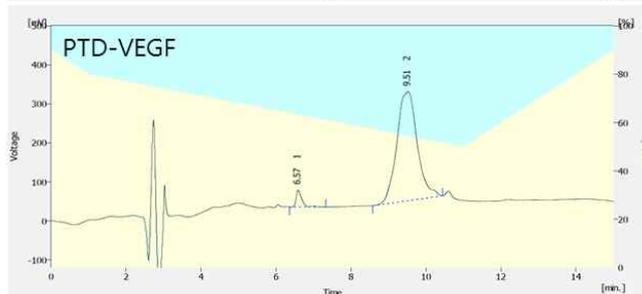
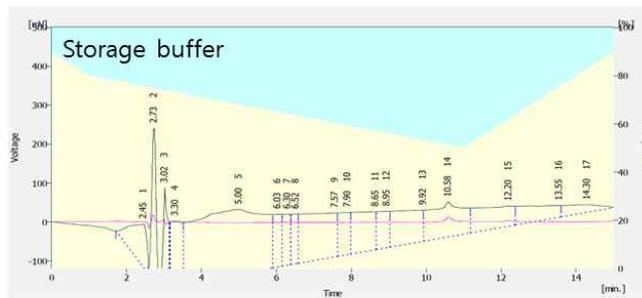
(Non Reducing conditions, 14% SDS-PAGE Stained with Silver)



(Non Reducing conditions, Western blot analysis)

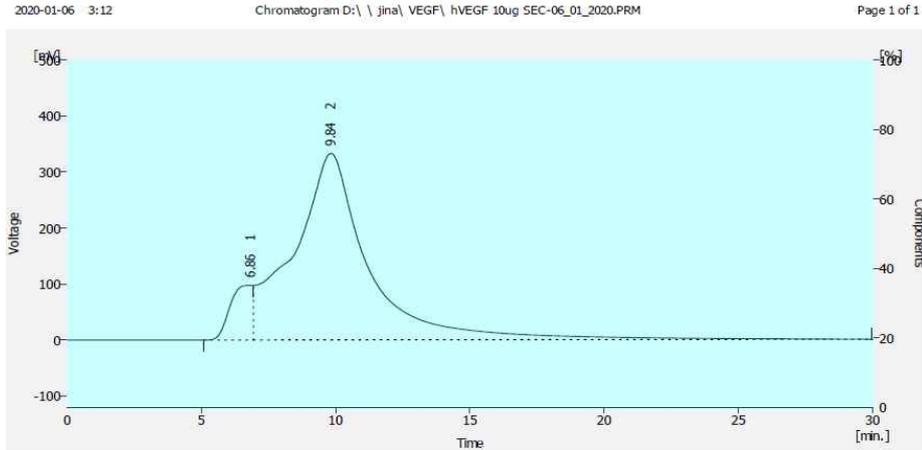


·RP-HPLC를 이용한 순도검정: RP-HPLC를 이용하여 식물유래 PTD-VEGF의 순도를 확인한 결과 95.9%로 확인되었음



Result Table						
	Area [mV.s]	Height [mV]	Area (%)	Height (%)	Width [min]	Compound Name
1	451.398	43.486	4.1	13.4	0.15	
2	10777.902	200.094	95.9	86.6	0.55	
	11029.300	323.581	100.0	100.0		

·Size-exclusion chromatographydp 의한 순도검정: Size Exclusion chromatography를 실시하여 순수 분리정제 한 PTD-VEGF의 순도를 SEC-HPLC를 이용하여 확인하였음. retention time 6.86분에 나타난 피크는 SDS-PAGE상에서 확인된 multimer로 추정됨



Result Table (Uncal - D: | jina | VEGF | hVEGF 10ug SEC-06\_01\_2020 - Channel 1)

	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	5576.196	97.871	7.9	22.7	0.95	
2	65024.264	332.995	92.1	77.3	2.30	
	70600.459	430.866	100.0	100.0		

○ Endotoxin 농도확인

- LAL 방법을 이용한 endo-toxin 검정

·PTD-hVEGF의 endotoxin level을 찰스리버 endotoxin test 기기(Endosafe portable test system, Charles river laboratories, USA)와 Limulus ameocyte lysate (LAL) 카트리리지( sensitivity 5-0.05 EU/mL)를 사용하여 측정하였으며 PTD-VEGF 제품의 엔도톡신 농도는 0.646 EU/ug로 확인 되었음

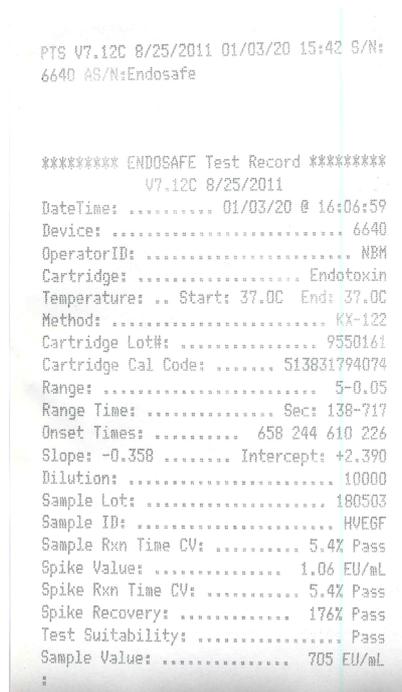


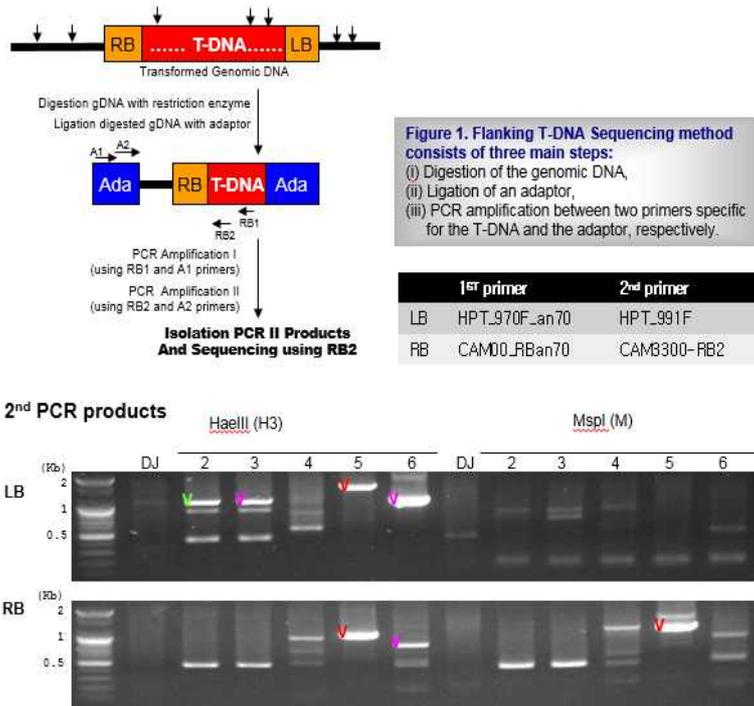
그림3-6-44. 엔도톡신 분석결과>

○ 산업용 LMO 위해성자료 확보

- 도입위치 확인

·산업용 LMO 위해성자료 확보를 위하여 도입위치는 flanking sequencing기술을 이용하여 확인하였음.

도입위치를 확인한 결과 PTD-VEGF 고발현 세포주 KV24-9(a) 라인은 벼 1번 chromosome의 7140116과 7139623사이의 hypothetical gene에 intergenic 상태로 1 copy가 도입되어 있음을 확인하였음



- 유전자의 독성/ 알러젠 함유여부 등 분석

·도입 유전자를 식물세포로 운반하는 pMYN75의 염기서열 내에 유해 염기서열이 포함되어 있는지 확인하기 위하여 NCBI의 Basic Local Alignment Search Tool, BLASTX 2.2.31+를 이용하여 pMYN75의 염기서열을 분석한 결과 pMYN75 벡터내의 염기서열에서 번역되는 단백질들과 독소 아미노산 사이에는 유의성 있는 상동성을 가지지 않는 것으로 확인이 되었음

·알레르겐과의 상동성 분석은 Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP)의 FAO/WHO Allergenicity Rules based on Sequence Homology를 통해 수행한 결과 운반체 pMYN75과 알레르겐과의 상동성 분석에서는 서열 상동성이 17% 이상은 나타나지 않았고 연속하여 8개 이상 아미노산이 일치하는 부분도 확인 할 수 없었음

그림3-6-45. pMYN75의 독성 아미노산과의 상동성 분석 >

RepV/ Toxin	GenBank/UniProt KB Accession #	Max Score	Total Score	Query coverag e	E-Value	Max Ident ities
보툴리눔A (BoNT/A)	ABD65472	17,3	17,3	3%	2,5	58%
보툴리눔B (BoNT/B)	ADF42614	-	-	-	-	-
보툴리눔C1 (BoNT/C1)	P18640	20,0	36,2	10%	0,39	38%
보툴리눔C2 (BoNT/C2)	YP009082499	18,1	18,1	6%	0,68	33%
보툴리눔D (BoNT/D)	P19321	24,3	42,7	28%	0,016	26%
보툴리눔E (BoNT/E)	ADF42615	18,5	52,0	17%	1,1	45%
보툴리눔F (BoNT/F)	CAA57358	20,0	87,8	40%	0,38	24%
파상풍 독소 (tetanus toxin)	WP011100836	16,9	33,1	10%	3,4	31%
미질 독소 (Shige toxin)	CAC12887	16,9	16,9	7%	0,78	31%
디프테리아 독소 (Diphtheria toxin)	BAL14546	14,6	14,6	2%	7,5	40%
pVSI/Toxin	GenBank/UniProt KB Accession #	Max Score	Total Score	Query coverag e	E-Value	Max Ident ities
보툴리눔A (BoNT/A)	ABD65472	17,3	17,3	3%	2,5	58%
보툴리눔B (BoNT/B)	ADF42614	15,4	15,4	4%	10,0	29%
보툴리눔C1 (BoNT/C1)	P18640	20,4	36,6	10%	0,30	38%
보툴리눔C2 (BoNT/C2)	YP009082499	18,1	18,1	6%	0,70	33%
보툴리눔D (BoNT/D)	P19321	24,3	42,7	28%	0,016	26%
보툴리눔E (BoNT/E)	ADF42615	18,5	50,4	17%	1,1	45%
보툴리눔F (BoNT/F)	CAA57358	20,0	71,6	31%	0,38	24%
파상풍 독소 (tetanus toxin)	WP011100836	16,9	33,1	10%	3,4	31%
미질 독소 (Shige toxin)	CAC12887	16,9	16,9	7%	0,73	31%
디프테리아 독소 (Diphtheria toxin)	BAL14546	14,6	14,6	2%	7,6	40%
6xHis-GFP-FLAG/ Toxin	GenBank/UniProt KB Accession #	Max Score	Total Score	Query coverag e	E-Value	Max Ident ities
보툴리눔A (BoNT/A)	ABD65472	17,7	17,7	3%	4,8	29%
보툴리눔B (BoNT/B)	ADF42614	19,2	19,2	4%	1,5	34%
보툴리눔C1 (BoNT/C1)	P18640	20,4	145	23%	0,76	21%
보툴리눔C2 (BoNT/C2)	YP009082499	17,3	17,3	2%	3,3	36%
보툴리눔D (BoNT/D)	P19321	-	-	-	-	-
보툴리눔E (BoNT/E)	ADF42615	20,4	20,4	3%	0,61	37%
보툴리눔F (BoNT/F)	CAA57358	18,9	37,3	19%	2,2	36%

그림3-6-46. pMYN75의 Allergen 상동성 분석 >

<b>RepV/ Alligen</b>	<b>GenBank Accession #</b>	<b>Sequence identities</b>
Jug r 4.0101	Q2TPW5	17.09 (61/357)
Pyr c 5	AAC24001	11.20 (40/357)
Car l 4.0101	ABW86978	16.81 (60/357)
Gly m 6.0401	Q9SB11	8.12 (29/357)
Pis v 3.0101	EF116865	8.68 (31/357)
Sin a 1	CAA62912	3.92 (14/357)
Sin a 1	CAA62910	3.92 (14/357)
<b>pYSI/ Alligen</b>	<b>GenBank Accession #</b>	<b>Sequence identities</b>
Jug r 4.0101	Q2TPW5	17.09 (61/357)
Pyr c 5	AAC24001	11.20 (40/357)
Car l 4.0101	ABW86978	16.81 (60/357)
Gly m 6.0401	Q9SB11	8.12 (29/357)
Der f 7	Q26456	8.68 (31/357)
Sin a 1	CAA62912	3.92 (14/357)
Sin a 1	CAA62910	3.92 (14/357)
Pis v 3.0101	EF116865	8.68 (31/357)
Ory s TAI	BAA07772	6.44 (23/357)
Api m 5.0101	B2DOJ4	6.72 (24/357)
Ory s TAI	BAA01996	7.00 (25/357)
Ory s TAI	BAA07712	7.00 (25/357)
Ory s TAI	BAA07713	7.28 (26/357)
<b>GdH-GFP/ Alligen</b>	<b>GenBank Accession #</b>	<b>Sequence identities</b>
Cup a 4.0101	ABP87672	3.90 (31/794)
Gal d 3	CAA26040	6.55 (52/794)
Gal d 3	P02789	6.55 (52/794)
Car b 1.0301	CAB02216	4.16 (33/794)
Vesp m 5	P81657	4.91 (39/794)
Cla h 5.0101	CAA55067	2.02 (16/794)
Cla h 5.0101	P42039	2.02 (16/794)
Der f 22.0101	ABG76195	2.14 (17/794)
Api m 9.0101	NP_001152775	6.05 (48/794)
Bla g 4	P54962	2.77 (22/794)
Mal d 1	P43211	3.65 (29/794)
Mal d 1	AAD26548	3.78 (30/794)
Mal d 1	AAD26547	3.78 (30/794)
Mal d 1	AAD26558	3.40 (27/794)
Mal d 1	CAA58646	3.65 (29/794)
Alta 3	AAB48043	3.02 (24/794)
<b>Retroviral signal/ Alligen</b>	<b>GenBank Accession #</b>	<b>Sequence identities</b>
Sola t 4	CAA45723	3.10 (31/1000)
Sola t 4	P30941	2.80 (28/1000)
Mala s 8	CAA09886	2.00 (20/1000)
Sol l 1.0101	AAT95008	4.30 (43/1000)
Hom a 3.0101	EH115965	3.50 (35/1000)
Per a 1.0104	AAC34737	2.60 (26/1000)
Tri a glutenin	CAA44473	4.80 (48/1000)

·상기 한 바와 같이 운반체 pMYN75의 전사 해독 프레임을 확인하였고, 이에 대한 독성 및 알레르겐과의 상동성 분석을 수행 한 결과 유해한 염기서열은 포함하고 있지 않음을 확인하였음

·본 계획서 제출일 현재 보건복지용 LMO 심사 신청에 필요한 자료를 작성 완료하고 본 심사 신청 전 질병관리본부의 심사 담당간사와 사전검토를 진행하고 있으며, 사전검토 이후 수정사항이 있을 경우 이를 보완하여 본 심사를 신청할 예정임

유전자변형생물체 위해성심사신청서

농림·축산용                     산업용                     보건의료용  
 환경정화용                     해양수산물                     식품·의료기기용

\* 비평가이 어두운 칸은 신청인이 적지 않으며, [ ]에는 해당되는 곳에 구호를 씁니다. (일부적)

접수번호	접수일	처리기간	270일
------	-----	------	------

신청인	상호	주식회사 진셀바이오텍	사업자등록번호(법인등록번호)	[REDACTED]
	대표자 성명	권 대 호	전화번호	[REDACTED]
	사업장 주소	전북 [REDACTED]		
	팩스번호	[REDACTED]	전자메일주소	[REDACTED]
개발자	개발자명	권 대 호		
	주소	[REDACTED]		

유전자변형생물체 위해성심사 신청내용

유전자변형생물체	모종명	벼(稻, 水稻, rice)	학명	<i>Oryza sativa</i> L.	계통명	KV24-9
	부여된 특성	- 인간 혈관내피세포성장인자(VEGF165) 생산 능력 부여 - 엘리스 상대로 존지 (재분화 능력 상실)	도입유전자	인간 혈관내피세포성장인자(VEGF165)		
심사목적	<input type="checkbox"/> 수입승인 <input type="checkbox"/> 생산승인 <input checked="" type="checkbox"/> 이용승인					
최종용도	보건의료용(화장품 원료)으로 필요한 인간 혈관내피세포성장인자 생산을 위한 생산공정에 이용					

「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률」 제7조의2제1항, 같은 법 시행령 제4조의2제2항 및 같은 법 시행규칙 제1조의2제1항에 따라 위와 같이 유전자변형생물체의 위해성심사를 신청합니다.

2021 년 02 월 11 일

신청인 ㈜진셀바이오텍 대표이사 [Redacted]

보건복지부장관 귀하

첨부서류	위탁 참조	위탁의 수수료 참조
------	-------	------------

210mm×297mm[백상지 80g/㎡]



< 심사신청서 >

< 심사자료 >

## ⑦ 제 3-1 협동과제: 형질전환 식물을 이용한 돼지 설사병 예방백신 개발 연도별 연구성과

### \* 1차년도

#### 주요 연구목표

- PEDV 백신 개발을 위한 항원 형질전환체/항원 단백질 발현 식물체 확보
- 항원 단백질 고발현 형질전환체의 유전적 분석
- 항원 단백질의 생산성 증가/대량생산을 위한 식물 발현 최적화 조건 확립
- 백신 개발 효용성 증가를 위한 타 선행연구의 백신 플랫폼 활용(연구 계획서외 추가 연구)

#### 세부 연구내용

- PEDV 항원유전자 고발현 *N. tobaccum* 식물체 확보를 위한 형질전환 및 형질전환체의 유전적 특성 분석

#### 연구결과

- 유전자 및 벡터 제작: 식물 발현 벡터 제작 및 형질전환용 토양균 확보: 두 가지 항원 유전자(S1D 항원 및 CTB-S1D)를 식물 발현용 binary vector에 subcloning하여 pMYV717(S1D)와 pMYV719(CTB-S1D)를 각각 확보하고 *Agrobacteria*에 도입시킴(그림 1)
- 담배 핵 형질전환: 두 품종의 담배(*Nicotiana Tobaccum cv.Havana* 및 *cv. Maryland*) 항원 유전자를 도입시킴

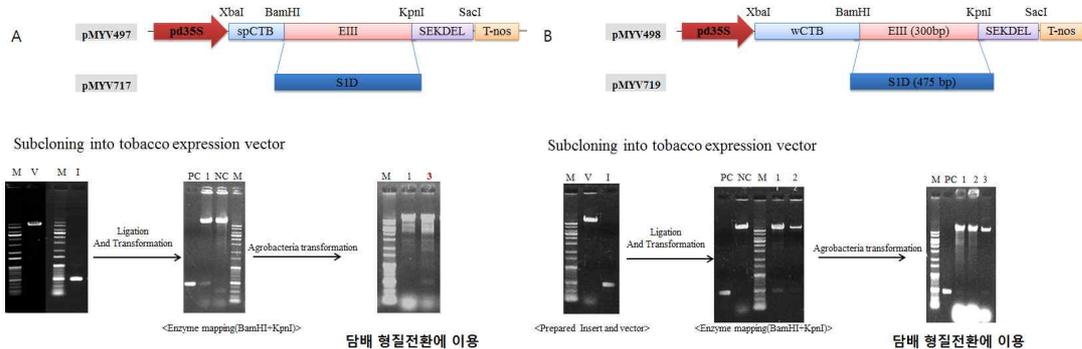


그림3-7-1. SID(A) 및 CTB-SID(B) 항원 유전자의 T-vector 클로닝, 식물 발현 벡터로의 클로닝 및 *Agrobacteria* 형질전환과 제한효소 절단 방법을 이용한 클론 확인>

- 형질전환체 선발: 항생제에 의한 1차 선발 및 genomic DNA PCR을 통한 2차 형질전환체 선발(그림 2)

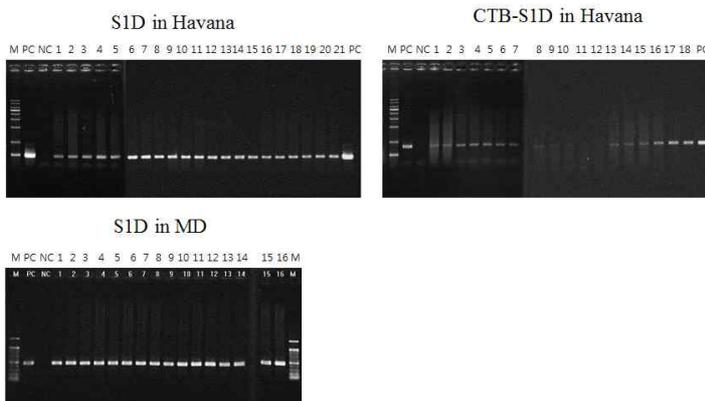
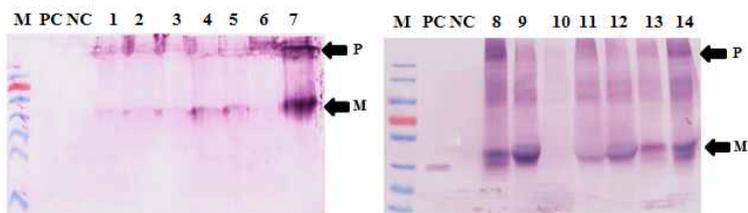


그림3-7-2. genomic DNA PCR을 통한 형질전환체 선발

- 단백질 발현 확인: genomic DNA PCR로 항원 유전자가 증폭된 형질전환체로부터 수용성 단백질을 추출하여 Western blot analysis 수행한 결과, 총 13개의 Havana 식물체에서 CTB-S1D의 발현을 확인(그림 3)

### CTB-S1D in Havana



PC: CTB antigen sigma  
Ab: 1<sup>st</sup> CT antibody  
2<sup>nd</sup> Anti-rabbit antibody AP

그림3-7-3. Havana 식물체의 CTB-S1D가 발현 분석

### 세부 연구내용

- single copy integration 형질전환 식물체를 선발

### 연구결과

- 형질전환체의 single copy 분석: 항원 단백질이 발현된 식물체를 선발하여 quantitative real-time PCR을 수행 한 결과, 5개의 cell line(#2, 4, 7, 8, 11)이 single copy로 intergration 됨을 확인(그림 4)

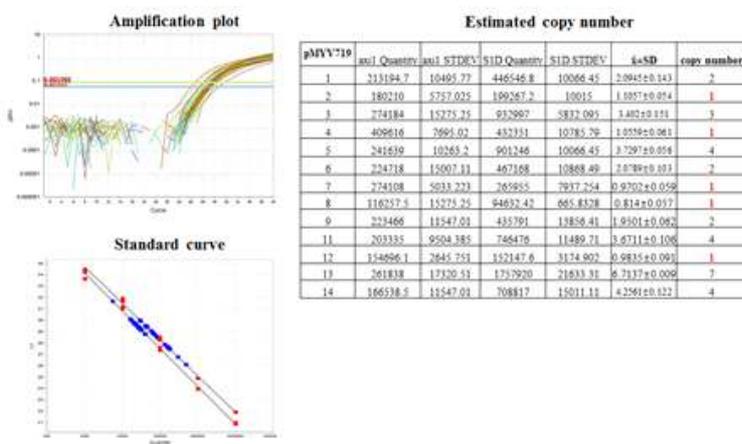


그림3-7-4. qreal-time PCR을 통한 gene copy number 분석

### 세부 연구내용

- Insertion site 확인을 통한 intergenic insertion line 선발

### 연구결과

- Flanking sequencing을 통해 gene insertion site를 확인하는 과정에 있으므로 2 차년 결과 참조

### 세부 연구내용

- Agroinfiltration을 이용한 PEDV 항원 단백질의 대량생산 조건 확립

### 연구결과

- 고발현 최적화 조건을 확립: viral 및 binary vector를 활용한 고발현 조건 분석

- binary vector 활용: (그림 1)에서 확보된 S1D(pMYV717) 및 CTB-S1D(pMYV719)를 활용함

- viral vector 활용: T-vector cloning과 sequence를 확인한 후 각각의 vector에 subcloning 함(그림 5)

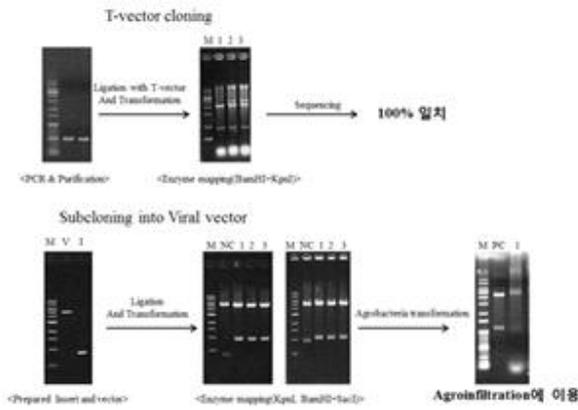


그림3-7-5. CTB-S1D의 viral vector로의 cloning 및 Agrobacteria의 형질전환

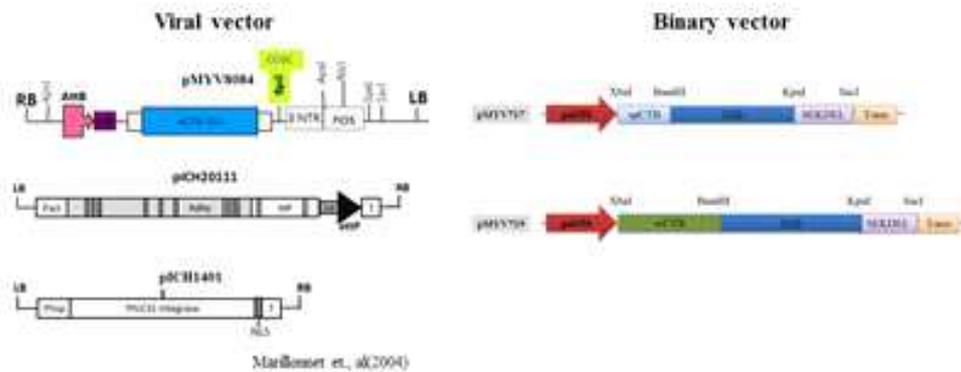


그림3-7-6. Agrobacterium을 위한 유전자 구조: viral-vector 기반 구조와(좌) binary vector 기반 구조(우)

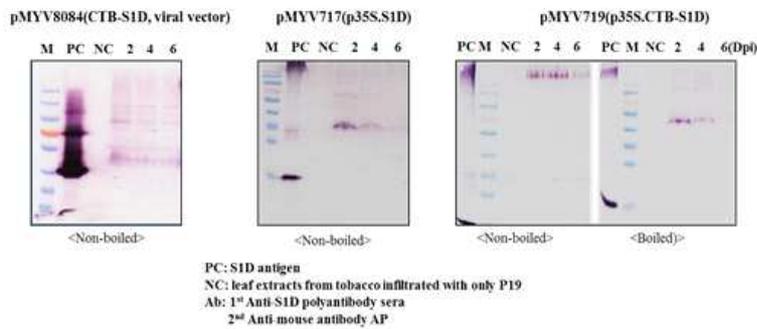
- 식물세포 도입을 위한 토양균 확보: 상기 발현벡터가 형질전환된 *Agrobacterium*을 확보함
- 고발현 조건 분석: (그림 6)과 같은 viral(V808) 및 binary(V717, V719) 발현벡터가 도입된 *Agrobacterium*을 *Nicotiana benthamiana* 식물체에 infiltration시키고 이를 간격으로 sampling하여 Western blot을 수행한 결과, V719(CTB-S1D)가 infiltration 된 4일 째 sample에서 가장 발현이 높은 것을 확인(그림 7)

세부 연구내용

- gene silencing suppressor(p19)의 co-expression을 통한 항원 단백질 발현 향상 조건 확립

연구결과

- Western blot 분석: Expression level이 가장 높은 것으로 확인된 V719(CTB-S1D, Binary)과 P19을 syringe infiltration으로 co-expression 시켜 sampling 한 후 Western blot 수행해본 결과, (그림 9)과 같이 발현률이 향상됨을 확인함



Comparison among the constructs

Name	V8084	V717	V719
Construct	CTB-S1D	SID	CTB-S1D
Vector	Viral	Binary	Binary
Expression level	Low	Medium	High

그림3-7-7. Western blot analysis를 통한 Viral vector 기반(V8084: CTB-S1D) 및 binary vector 기반(V717:SID, V719:CTB-S1D) 항원단백질 발현 양상 비교>

- GM1 ELISA 분석: CTB가 융합된 항원 단백질의 functionality 분석(GM1 ELISA)에서도 P19를 공동 발현시켰을 때 약 5배 수준의 발현률 향상이 일어남을 확인(그림 8)

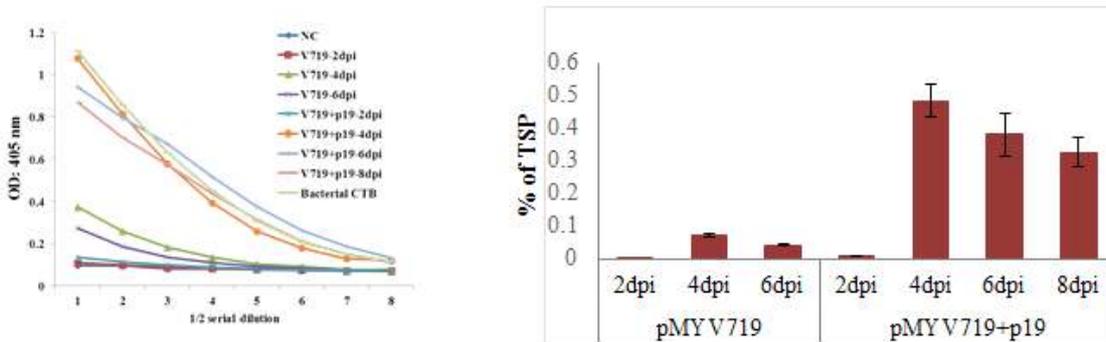


그림3-7-8. syringe infiltration으로 V719와 p19과 공동발현 시킴으로써 향상된 항원 단백질의 GM1 결합능력 분석>

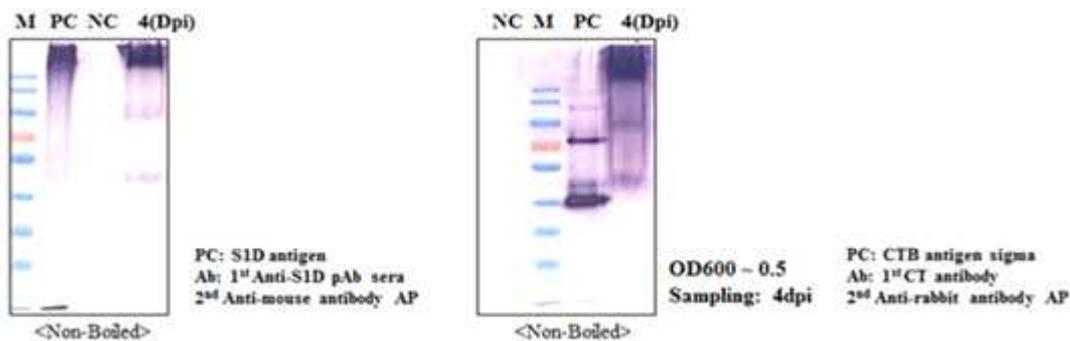


그림3-7-9. V719+P19를 vacuum infiltration으로 을 통해 담배 식물체에 주입하였을 때의 PEDV 항원단백질 발현 양상을 보여주는 western blot 결과>

- GM1 ELISA 분석: CTB가 융합된 항원 단백질의 functionality 분석(GM1 ELISA)에서도 P19를 공동 발현 시켰을 때 약 5배 수준의 발현률 향상이 일어남을 확인(그림 10)

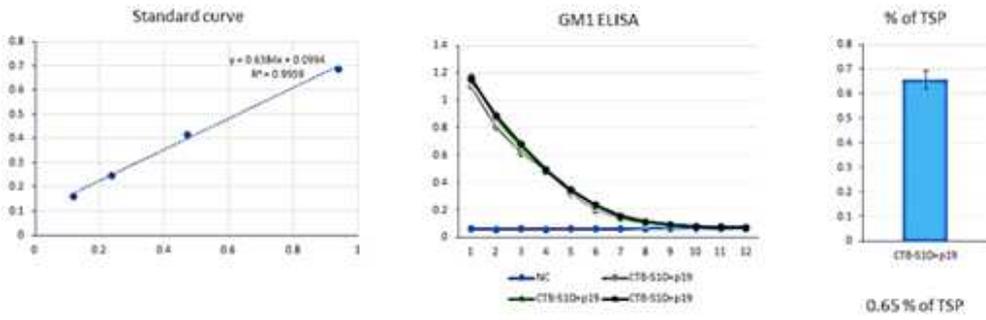


그림3-7-10. vacuum infiltration으로 V719+P19를 공동발현 시켜 측정된 GM1 결합능 분석>

- Vacuum infiltration의 단백질 발현분석: 항원 단백질의 대량 발현을 위한 Vacuum infiltration 방법으로 P19과 공동 발현시키는 조건을 적용한 후 Western blot analysis로 단백질 발현 정도를 확인한 결과, (그림 11)과 같이 높은 수준의 단백질 발현 확인함

목적조건	V719+P19											
	0.3		0.4		0.5		0.6		0.7			
목적 유전자를 가지는 Agrobacteria의 농도 (OD600)	0.3		0.4		0.5		0.6		0.7			
P19를 가지는 Agrobacteria의 농도 (OD600)	0.7		0.6		0.5		0.4		0.3			
Agrobacteria의 비율	3:7		4:6		5:5		6:4		7:3			
수확일자(Dpi)	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	4	6
발현률(% TSP)	0.00	0.21	0.20	0.00	0.23	0.21	0.01	0.49	0.38	0.01	0.35	0.18
	0.00	0.11	0.11	0.00	0.11	0.11	0.00	0.11	0.11	0.00	0.11	0.11

그림3-7-11. agroinfiltration 방법을 이용한 PEDV 항원단백질을 고발현 조건 분석 결과>

세부 연구내용

- PEDV 항원유전자의 벼(*O. sativa*) 형질전환 및 형질전환체의 분자생물학적 분석

연구결과

- cloning 및 토양균 확보: PEDV S1D/CTB-S1D 항원유전자의 T-vector cloning 및 sequence 확인 후 binary vector에 subcloning하여 plant expression vector인 pMYV8076(SID)과 pMYV8073(CTB-S1D)를 construction하고 Agrobacteria에 도입시킴 (그림 12와 13)

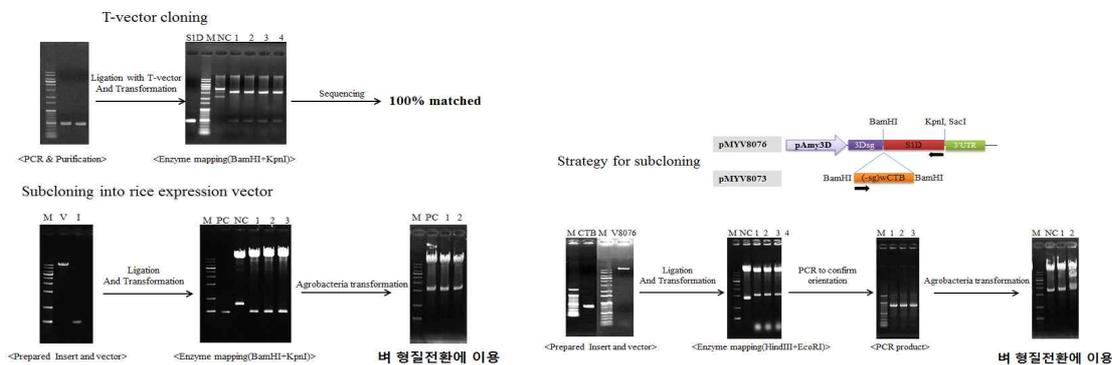


그림3-7-12. S1D와 CTB-S1D의 벼 발현 벡터 클로닝 및 형질전환된 Agrobacteria 확보>

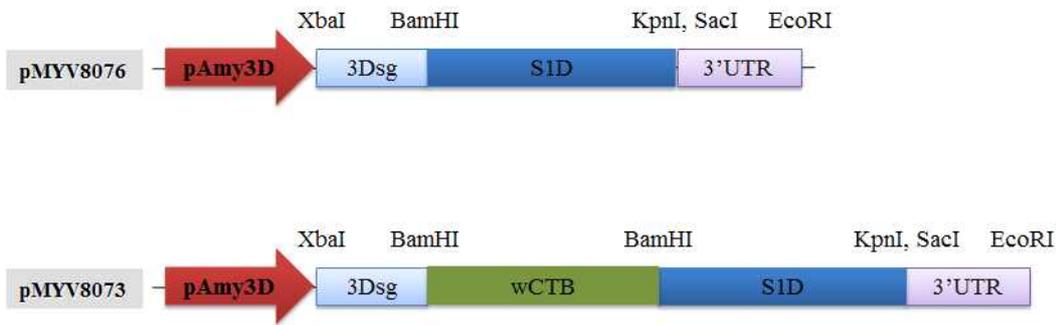


그림3-7-13. V8076(S1D)과 V8073(CTB-S1D)의 벡터 발현 벡터

- 벡터 형질전환: 항원 발현벡터가 도입된 Agrobacteria를 2주의 발아 과정을 거친 rice embryogenic callus 에 infection 시킨 후 3~5일간 암조건에서 co-culture 시킴
- 형질전환체 1차 선발: 항생제(hygromycin B) 배지에서 4주간 배양하여 세포 번식을 보여준 cell line을 선발함
- 형질전환체 2차 선발: 1차 선발된 cell line으로부터 genomic DNA를 추출한 후 항원 유전자 특이적 PCR을 수행하여 각각의 항원 유전자에 대해 (그림 14)와 같이 형질전환체를 확보함

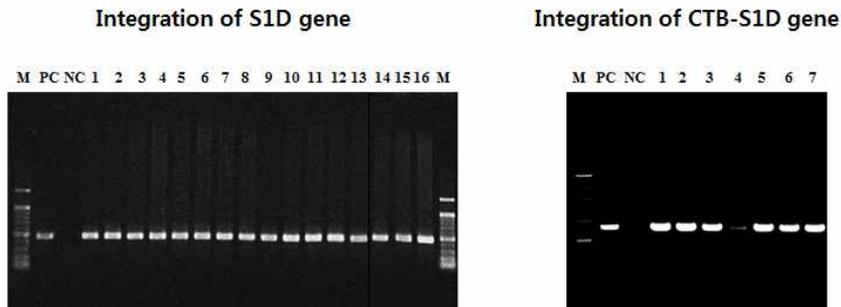


그림3-7-14. PEDV S1D/CTB-S1D가 형질전환된 추정 벡 세포의 genomic DNA PCR 분석

- 형질전환체의 항원 단백질 발현 확인: 항원 유전자가 integration된 형질전환 추정 cell line을 sucrose free 배지에서 induction 시킨 후 수용성 단백질 추출로 Western blot을 분석한 결과, (그림 15)과 같이 단백질 발현을 성공적으로 확인 함

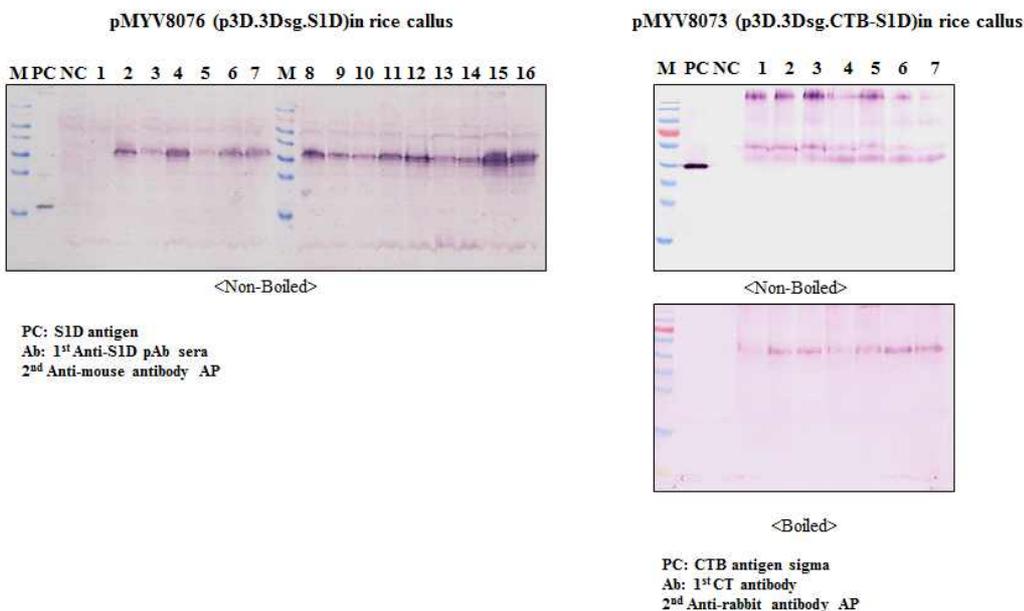


그림3-7-15. 벡터 형질전환 세포주의 항원 단백질 발현 확인을 위한 Western blot analysis

세부 연구내용

- 면역복합체 백신 플랫폼(ERICs)을 활용한 항원성 증진방법 개발(연구계획 외 추가)

연구결과

- ERICs 백신 플랫폼 및 항원유전자 벡터 확보: COE-PERICs/SID-PERICs 항원 유전자의 viral vector로의 클로닝
- 두 가지 virial vector 활용: Gemini-viral vector와 Icos-viral vector에 각각의 백신 플랫폼 융합 항원 유전자를 subcloning하여 식물 발현벡터 제작(그림 16)

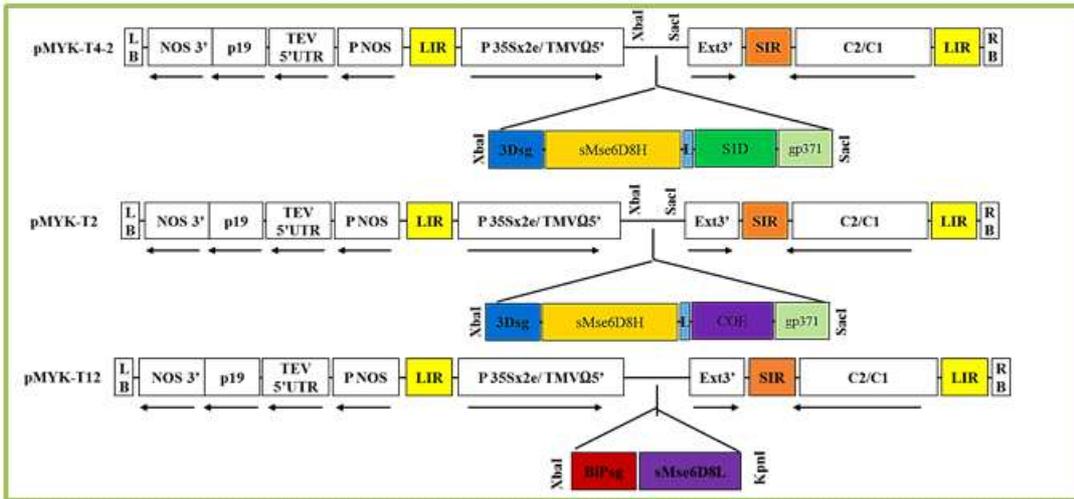


그림3-7-16. 항원성 향상을 위한 P-ERICs 벡터의 구조>

- P-ERICs 확보를 위한 cloning 수행: PEDV의 항원인 COE와 S1D를 각각 Ebola Recombinant Immune Complexes(ERICs)와 융합하여 돼지설사병 항원-에볼라 재조합 면역복합체(PERICs) 유전자 제작(그림 17 ~ 19)

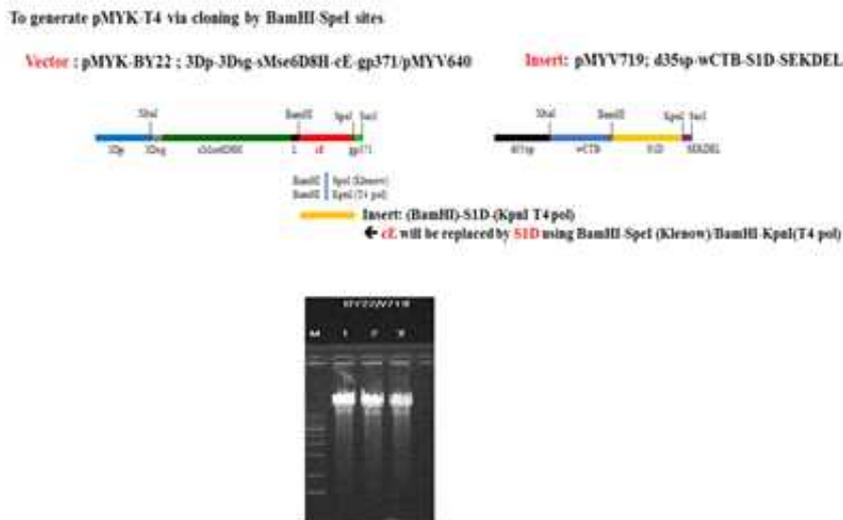


그림3-7-17. 백신 플랫폼 ERICs에 PEDV 항원이 융합된 벡터 구조 및 plasmid DNA 확인>

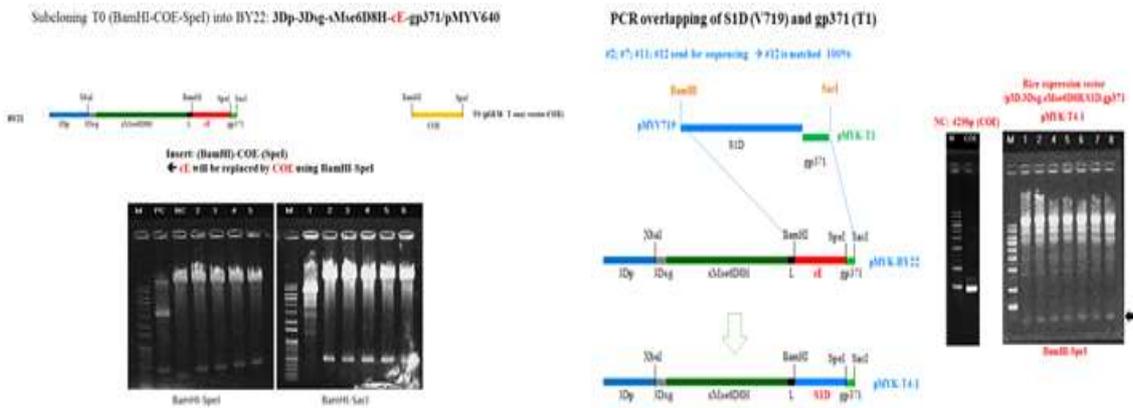


그림3-7-18. COE-ERICs와 S1D-ERICs 각 항원의 gemmini viral vector cloning>

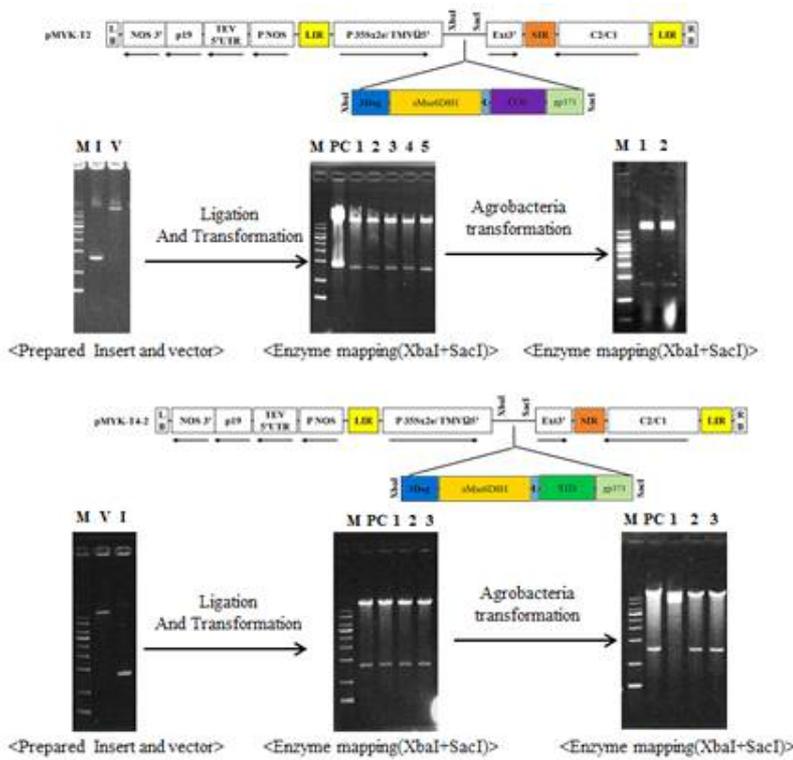


그림3-7-19. COE-PERICs 및 S1D-PERICs의 Gemini-viral vector로의 cloning 및 Agrobacteria의 형질전환>

- Gemini-viral vector 발현 벡터 확보 및 토양균 확보: cloning된 COE 및 S1D-gp371을 Gemini-viral vector에 삽입한 후 제한효소 절단을 통해 다시 확인 하고, Agrobacteria에 형질전환 함
- P-ERICs 발현을 위한 light chain 확보: 식물세포에서 ERICs 플랫폼을 활용한 Immune complex 형성에 필요한 light chain을 gemini-viral vector에 클로닝하고 agrobacteria에 형질전환함(그림 20)

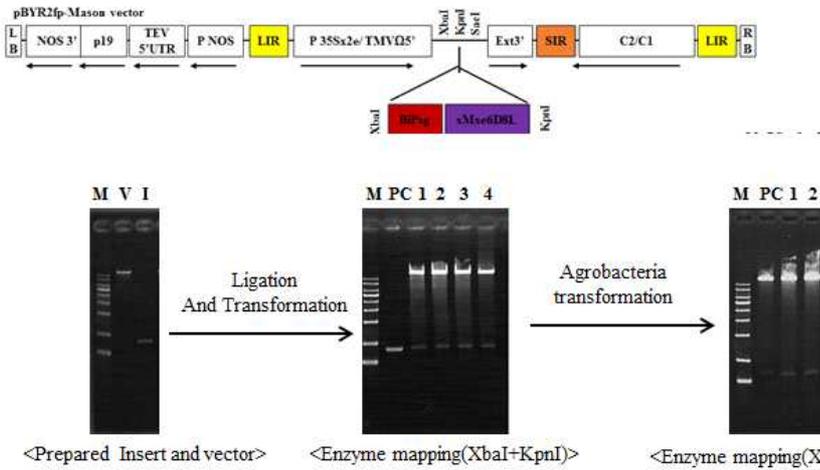
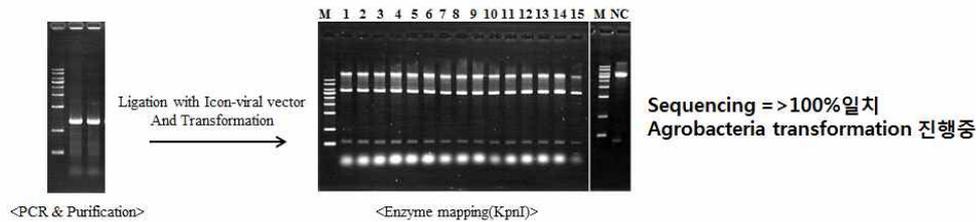


그림3-7-20. P-ERICs의 식물체 내 polymerization을 위한 light chain 발현을 위한 cloning 및 형질전환 agrobacterium 확보>

- Icon viral vector 활용: Icon-viral vector cloning을 위하여 bsaI 제한효소 절단 부위를 primer 제작 및 PCR 방법으로 추가시킨 후 Icon-viral vector에 subcloning하여 벡터를 제작하여 Agrobacteria에 형질전환 시킴(그림 21)

COE-PERICs cloning



S1D-PERICs cloning

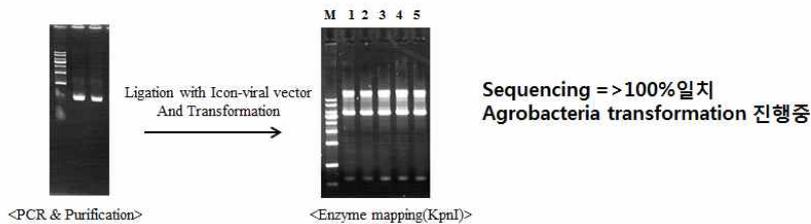


그림3-7-21. COE-PERICs와 S1D-PERICs의 Icon-viral vector cloing>

세부 연구내용

- 면역복합체 백신 플랫폼(PIGS)을 활용한 항원성 증진방법 개발(연구계획 외 추가)

연구결과

- COE-PIGS/SID-PIGS 항원 유전자의 viral vector 제작: PEDV 항원(COE와 S1D)를 각각 또 다른 형태의 백신 플랫폼인 Polymeric Immunoglobulin Scaffold(PIGS)와 융합시키기 위한 cloning 수행
- Gemini viral vecotr 활용: PEDV의 두 가지 항원이 각각 PIGS에 융합된 P-PIGS, 즉 COE-PIGS와 S1D-PIGS를 gemini viral vector에 subcloning 함(그림 22)

**PPIGS**

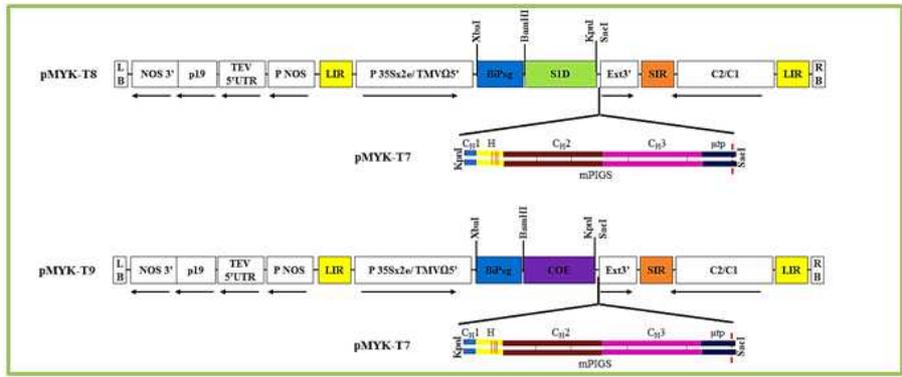


그림3-7-22. 두 가지 항원에 대한 P-PIGS 구조>

- Icon viral vecotr 활용: PEDV의 두 가지 항원이 각각 PIGS에 융합된 P-PIGS, 즉 COE-PIGS와 S1D-PIGS를 ICO viral vector에 subcloing하고 식물 세포 도입을 위한 토양균 확보(그림 23과 24)

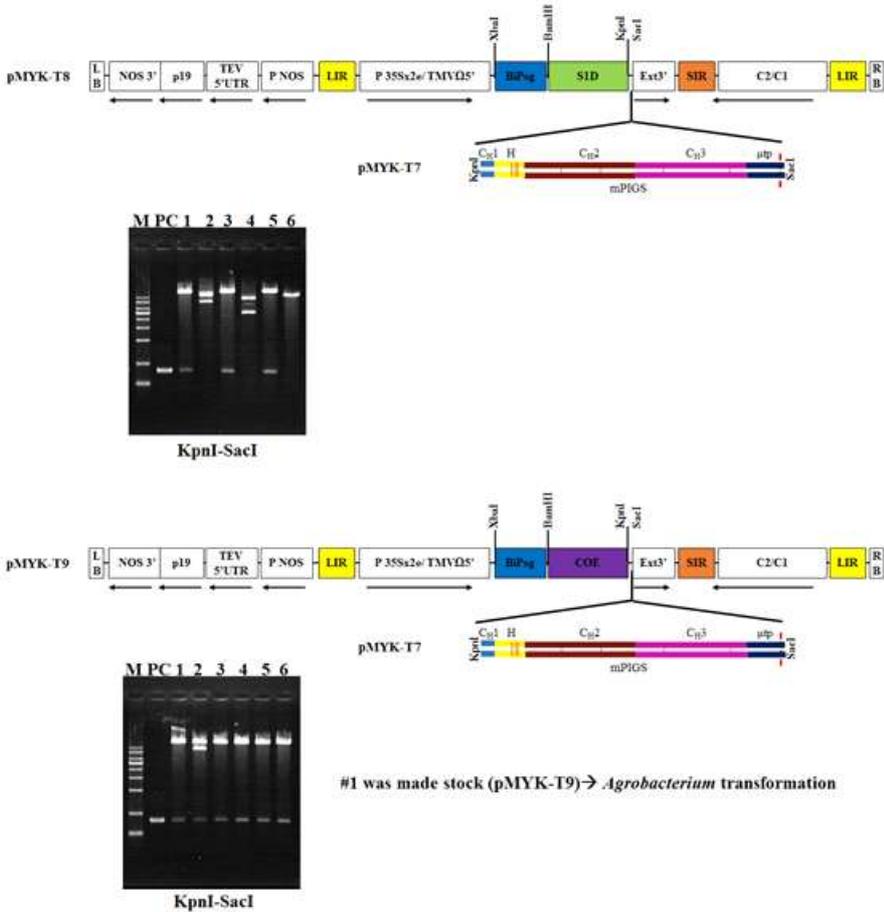


그림3-7-23. S1D-PIGS 및 COE-PIGS의 gemini viral vector 구조>

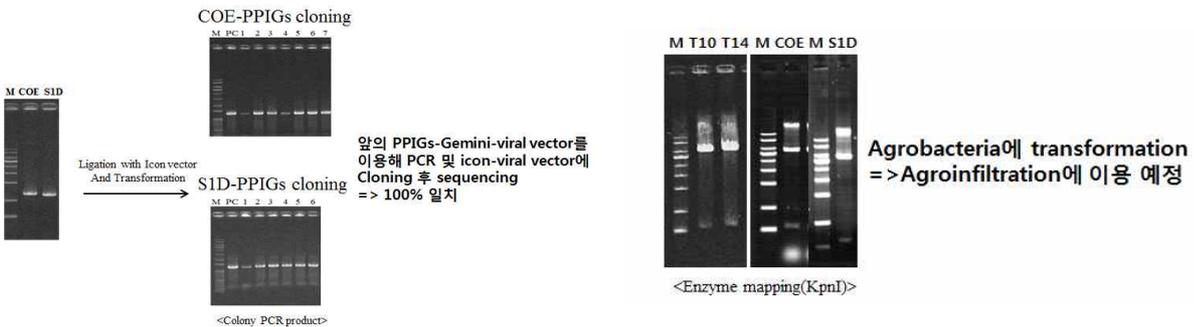


그림3-7-24. COE-PIGS 및 S1D-PIGS 벡터 제작을 위한 cloning 및 토양균 형질전환>

**\* 2차년도 결과**

주요 연구목표

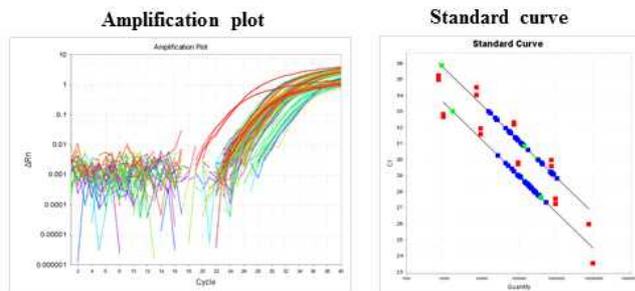
- 핵/엽록체 형질전환 및 이의 호모 라인 선발을 위한 연구
- 항원 단백질 생산성 증가를 위한 다양한 기법의 활용에 관한 연구

세부 연구내용

- 항원 유전자의 호모 라인 선발을 위한 quantitative real time PCR, flanking sequencing, 형질전환체의 세대 전개

연구결과

- qRT-PCR 분석을 통한 담배 핵 형질전환체의 호모라인 선발: quantitative real time PCR(qRT-PCR) 분석 결과 각각의 항원 구조에서 2개 이상의 형질전환체에서 single copy로 삽입된 것을 (그림 25)와 확보함
- 또한, 각각의 항원 구조마다 1 개체 이상에서 intergenic insertion됨을 확인함



**Estimated copy number**

Tobacco	Genes	Line#	Axi1	Axi1-	S1D	S1D	x3SD	copy number
			Quantity mean	Quantity SD	Quantity mean	Quantity SD		
Tobacco	(V717) S1D	2	1659297.15	91984.5	833753.5	10288.8	1.0049±0.093	1
		11	1839274.25	83841.8	968966.5	10155.3	1.0514±0.085	1
		32	1951360.06	973160	1004051.5	23295.4	1.0290±0.017	1
Havana	(V719) CTB-S1D	3	1759337.31	82042.3	1219325.5	9945.5	1.3861±0.090	1-2
		7	1871430.01	90239.1	1238932.9	9337.1	1.3140±0.092	1-2
		18	1800426.12	108634.9	909967.3	10307.5	1.0108±0.0718	1
		20	1665037.25	97428.1	908377.5	11520.9	1.0911±0.0838	1
		1	1764038.05	84728.1	828377.5	10320.9	0.9391±0.083	1
MD	(V717) S1D	2	1664152.31	93869.7	912488.5	11845.5	1.0966±0.070	1
		8	1603581.11	96774.3	1044145.5	12984.7	1.3022±0.096	1-2
		14	1673267.21	97519.8	799429.3	10077.5	0.9555±0.073	1
		16	1951360.16	87316.0	1004051.7	12325.4	1.029±0.057	1

그림3-7-25. single copy line 선발>

- 호모 라인 선발을 위한 세대 전개: T3 세대까지 형질전환체를 전개하고, 항생제가 포함된 배지에서 선발함(그림 26)

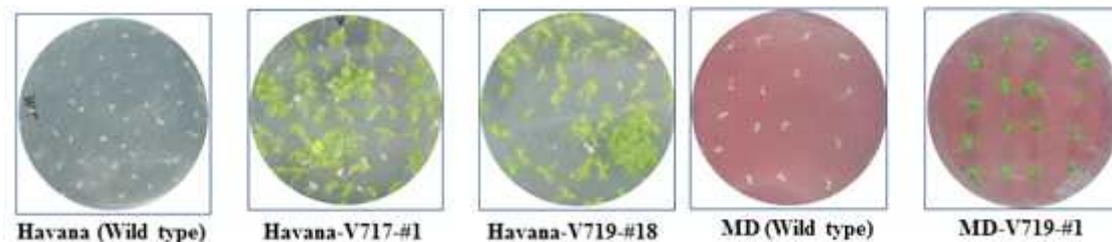


그림3-7-26. T3 세대 screening: 항생제 선발을 통한 세대전개 및 호모라인 선발과정>

세부 연구내용

- 항원 단백질 발현 효율 향상을 위한 담배 엽록체 형질전환 및 형질전환체의 분자생물학적 분석

연구결과

- 엽록체 형질전환체 확보: 선행실험에서 개발한 두 가지 항원 유전자(S1D, CTB-S1D)의 발현효율을 보통의 엽록체 발현률 보다 더욱 증가시키기 위하여 T7g10과 pbsA 5'UTR sequence를 도입한 후 엽록체 형질전환용 벡터를 subclong으로 제작하고 확보함

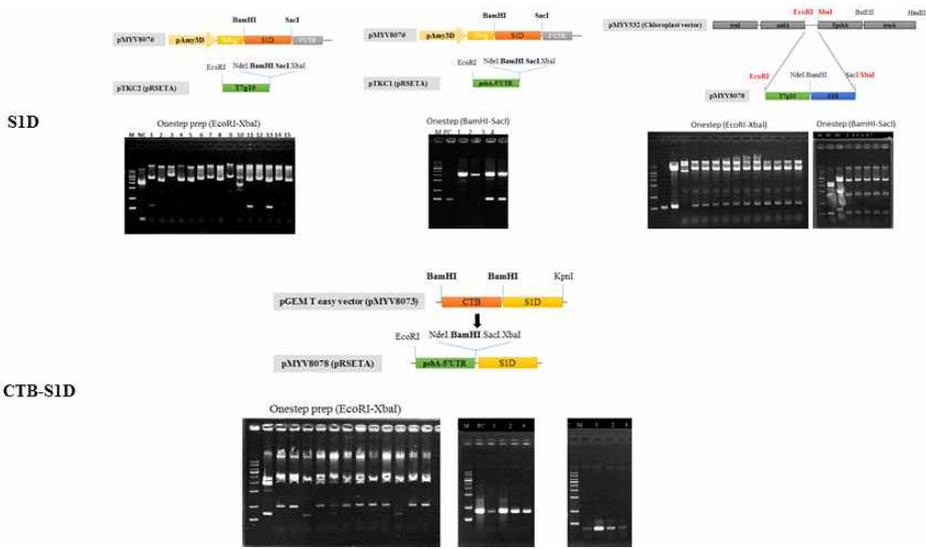


그림3-7-27 항원 단백질 향상을 위한 5'UTR 도입 및 형질전환 벡터 제작>

세부 연구내용

- 유전자총을 이용한 엽록체 형질전환 및 형질전환체 선발

연구결과

- 엽록체 형질전환: 두 가지 종류의 담배(Havana와 MD) 엽록체체에 항원 유전자를 도입시키는 형질전환을 gene gun-mediate transformation 방법으로 수행하고 항생제가 없는 co-culture 배지에서 암배양
- 1차 형질전환체 선발: 항생제(spectinomycin) 배지에서 6주 이상 배양하여 각각의 항원 구조마다 5개체씩 형질전환 추정 식물체를 선발함
- 엽록체 특이적 형질전환체 선발: 엽록체 및 삽입 유전자 특이적 primer를 이용하여 엽록체에 성공적으로 삽입됨을 확인함(그림28)

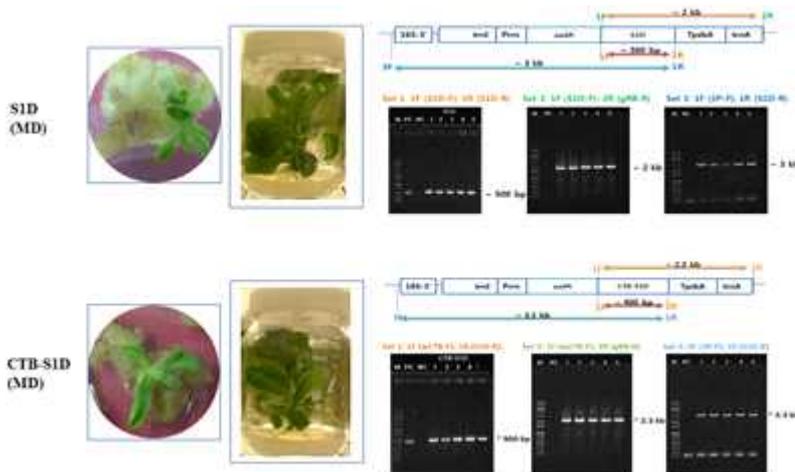


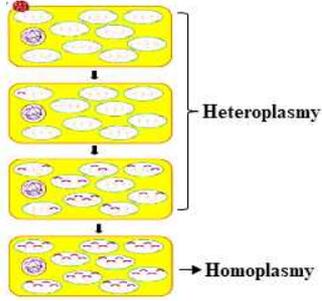
그림3-7-28. 엽록체 형질전환 추정 식물 및 조직 특이적 삽입 확인을 위한 PCR 분석>

- 호모라인 선발: 모계 유전하는 형질전환 담배잎을 항생제 배지에 치상하여 3차까지 재분화시켜 Southern blot analysis 수행함
- S1D 항원 유전자는 heteroplasmy 상태인 반면, CTB-S1D 항원 유전자가 삽입된 형질전환체는 homoplasmy임을 확인함(그림 29)

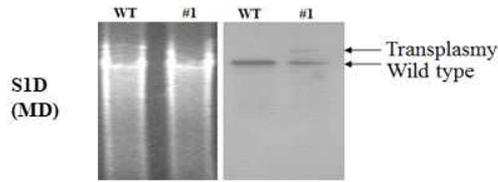
세부 연구내용

- 항원 단백질 발현 베티 형질전환체 선발

<Selection of homoplasmy>



▶ 3차 재분화 식물체의 Southern 분석



<Regeneration cycle>

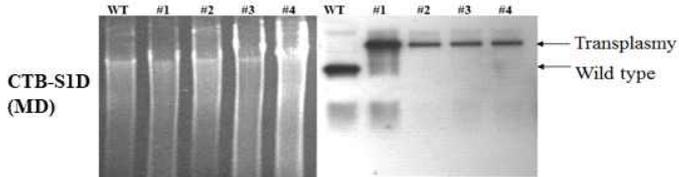
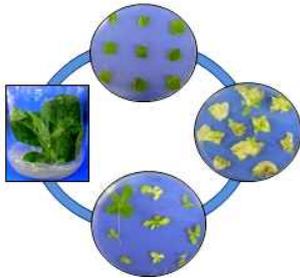


그림3-7-29. 엽록체 형질전환체의 3차 screening 및 재분화 식물체의 Southern blot 분석>  
연구결과

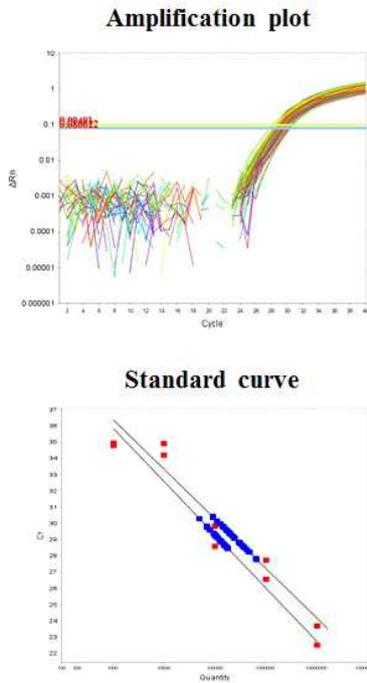
- Western blot analysis에 의한 고발현 단백질 분석: Genomic DNA PCR 결과에서 target band가 확인된 line들을 sucrose-free medium에 치상하여 단백질 발현을 유도한 뒤 세포를 갈아 단백질 추출물을 획득 및 이를 이용해 Western blot을 수행하여 V8076에서 15개, V8073에서 7개의 cell line에서 PEDV 항원 단백질 발현을 확인함

세부 연구내용

- 형질전환 벼 세포의 homo line 선발

연구결과

- 삽입 유전자의 copy 수와 insertion 결정을 통하여 적정 형질전환체의 호모 라인을 다음과 같이 선발함
- qRT-PCR 수행을 통해 (그림 30)과 같이 V8076에서 3개(#6, 12, 15), V8073에서 3개(#2, 5, 6)의 cell line에 single copy의 유전자 도입이 일어난 것을 확인함으로써 각각의 항원 유전자에 대해 3개체의 single copy 삽입 세포주를 확보함
- 각각의 항원마다 1 개체 이상에서 intergenic insertion을 확인함



**Estimated copy number**

pMYV8076	SPS Quantity	SPS-STDEV	S1D Quantity	S1D-STDEV	$\bar{x} \pm SD$	copy number
2	151311.7	15011.11	486078.8	15275.25	3.2124±0.076	3
3	171424.4	8082.904	387396.4	11547.01	2.2599±0.102	2
4	82177.99	1527.525	466699.2	28867.51	5.6791±0.087	6
5	197662.4	5291.503	327662.4	15275.25	1.6577±0.108	2
6	173721.2	20100.08	173814.8	8660.254	1.0005±0.042	1
7	99857.1	1732.051	160111.4	5507.571	1.6034±0.098	2
8	50348.32	1789.786	167625.6	10503.97	3.3293±0.138	3
9	100977.7	10263.2	194659.2	10408.33	1.9277±0.089	2
10	95178.26	1154.701	643341.1	17320.51	6.7593±0.169	7
11	108025.9	5773.503	192014.1	10148.89	1.7775±0.058	2
12	139304.1	2309.401	128430.1	1154.701	0.9219±0.037	1
13	114630.4	10150.37	207427.5	6429.101	1.8095±0.098	2
14	104846.2	11547.01	242082.8	3607.4	2.3089±0.120	2
15	127634.1	11216.65	142205.1	5131.601	1.1142±0.079	1
16	70116.75	1205.543	243015.2	3785.939	3.4659±0.087	3

pMYV8073	SPS Quantity	SPS-STDEV	S1D Quantity	S1D-STDEV	$\bar{x} \pm SD$	copy number
1	126578.8	10392.3	377705.5	6350.853	2.984±0.098	3
2	139304.1	2309.401	128430.1	1154.701	0.9219±0.037	1
3	174880.8	6350.853	674242.2	8082.904	3.8554±0.086	4
4	152679.3	10148.89	257662.4	6928.203	1.6876±0.089	2
5	242164	1732.051	249483	6806.859	1.0302±0.098	1
6	154696.1	2643.751	152147.6	3174.902	0.9835±0.091	1
7	170504.4	5507.571	318923.5	1732.051	1.8705±0.106	2

그림3-7-30. qRT-PCR을 통한 V8076(S1D)와 V8073(CTB-S1D)의 gene copy number 분석

세부 연구내용

- 세대 배양을 통한 형질전환 벼 호모 라인 선발

연구결과

- 세대 전개: 항생제가 포함된 배지에 형질전환 벼 종자(T0와 T1)를 멸균 치상하여 (그림 31)과 같이 세대 전개를 수행함
- 그 결과, 아직 호모 라인 선발 단계에는 이르지 못하였으나 후속 세대 전개를 통하여 확보할 것으로 기대함

▶ T1 세대 형질전환체 선발

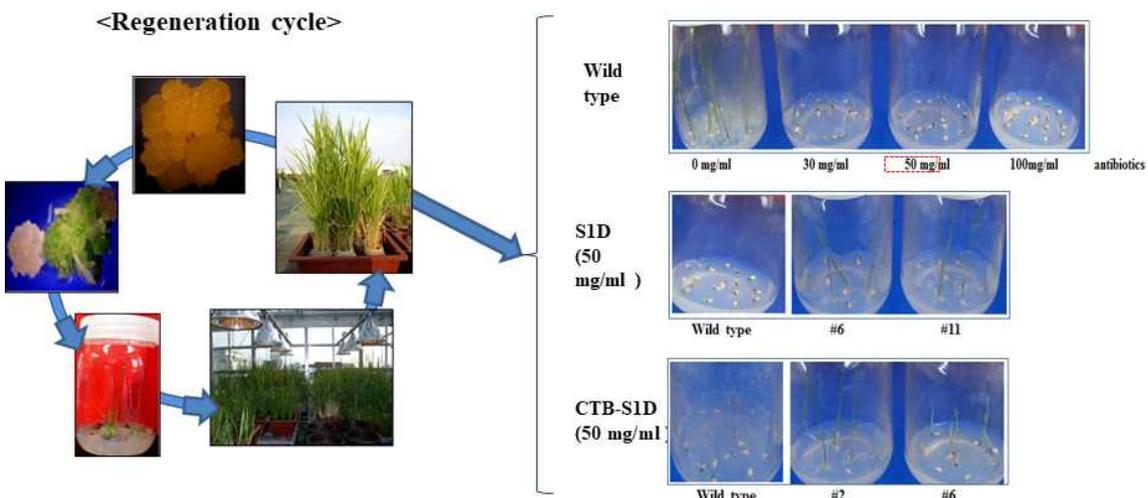


그림3-7-31. T1세대 형질전환체 screening>

세부 연구내용

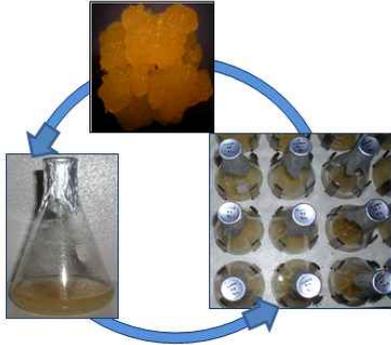
PEDV S1D/CTB-S1D 항원 유전자 고발현 벼 세포로부터 캘러스 및 현탁세포 유도

연구결과

- 항원의 고발현 세포의 현탁배양: PEDV S1D/CTB-S1D 항원 유전자 고발현 벼 세포로부터 캘러스를 유도하여 현탁배양에 적합한 세포로 유도하고 100 ml culture를 수행함(그림 32, 좌)

- 배양 최적화 조건 확립: 항원 단백질의 대량생산을 위한 테스트베드 수준의 배양 최적화 조건 확립을 위하여 (그림 32, 우)과 같이 수행함

▶ 항원단백질 발현 세포의 현탁배양



▶ 5L 생물반응기 배양 조건 확립



그림3-7-32. 벼 현탁 세포 유도 및 5L 생물반응기 배양의 최적화>

세부 연구내용

- 항원 단백질 생산성 향상을 위한 siRNA 기법 활용의 선행연구

연구결과

- 목적 단백질의 생산성 증가기술 개발: siRNA 기법을 벼 형질전환 세포주에 적용하여 rice amylase와 cystein protease가 감소 됨을 확인함(그림 33)

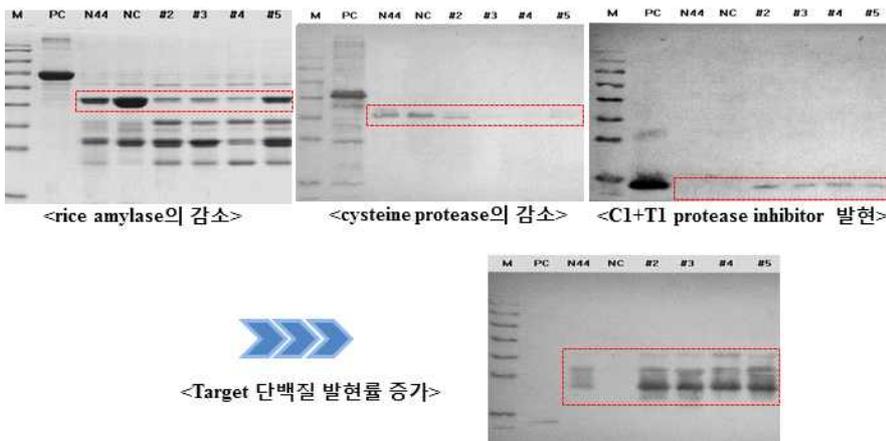


그림3-7-33. siRNA 및 단백질 분해효소 억제기술 융합 적용을 통한 목적 단백질 생산성 향상 결과>

- 또한, 식물세포의 주요 단백질 분해효소인 cystein과 trypsin을 억제시키는 기술을 융합시킨 결과 목적 단백질의 생산이 (그림 33)과 같이 향상됨을 확인함

세부 연구내용

- 대체 탄소원 이용을 통한 목적 단백질 생산성 향상을 위한 기술 확립

연구결과

- 여러가지 유사 탄소원들을 벼 세포배양에 적용하고 삼투압 조절을 통하여 (그림 34)와 같이목적 단백질의 생산성이 증가됨을 확인함
- 따라서, 상기 예비 실험의 다양한 생산성 증가 기법을 PEDV 항원 단백질 발현 증가기술로 활용하고자 함

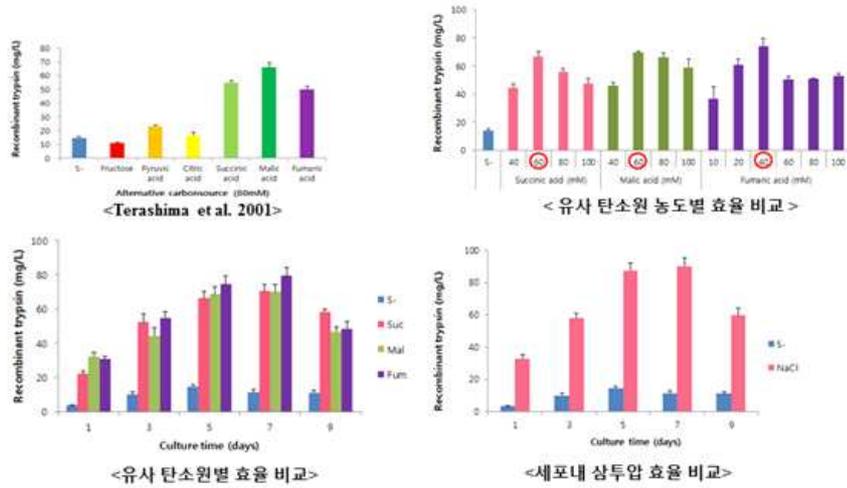


그림3-7-34 대체 유사탄소원을 이용한 고발현 생산 기술 확립>

**\* 3차년도 결과**

주요 연구목표

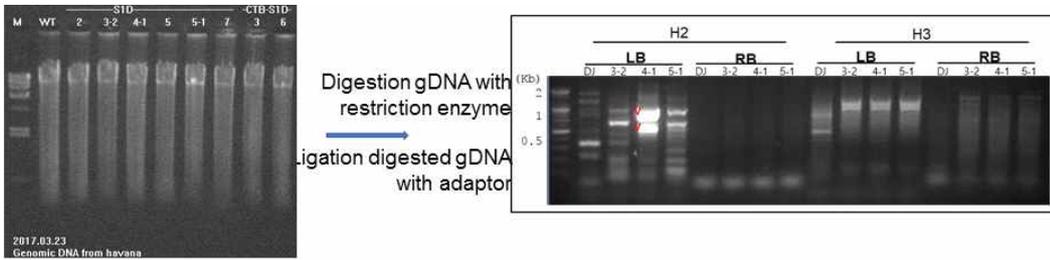
- 형질전환 식물체의 호모 라인 선발을 위한 연계 연구
- 2차년 예비연구 적용을 통한 항원 단백질 생산성 증가 연구
- 항원 단백질 정제 조건 확립

세부 연구내용

- 담배 핵 형질전환체의 유전자간 삽입 확인

연구결과

- 담배 핵 형질전환 식물체의 유전자간 삽입체 확보 실패(그림 35와 36)
- 실패이유: 유전자간 삽입 위치를 확인하기 위해서는 형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 T-DNA flanking sequencing을 수행해야 하는데 이를 위하여 전문회사에 의뢰하여 2 차례 수행하였으나 회사 측에서 sequencing 분석에 실패함



Query Name	A/NA	Read	length	T-DNA	end	Insert	from	Insert	to	Adaptor	st	Insert	length(bp)
TS1D-4-1H2-L-A_pB1121-LB2	A		859		18		19	859		-1		841	Matched to Pnos and NptII regions.
TS1D-4-1H2-L-B_pB1121-LB2	A		452		120		121	452		-1		332	Matched to LB and backbone.

그림3-7-35. sample 분석 의뢰 후 1차 flanking sequencing 분석>

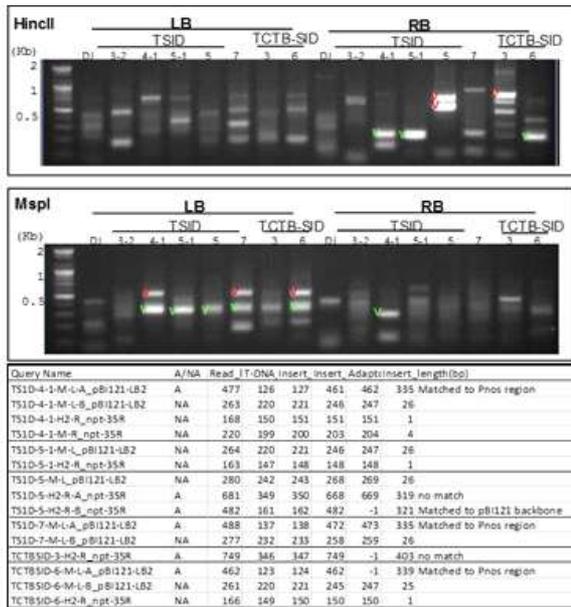


그림3-7-36. sample 분석 의뢰 후 2차 flanking sequencing 분석>

세부 연구내용

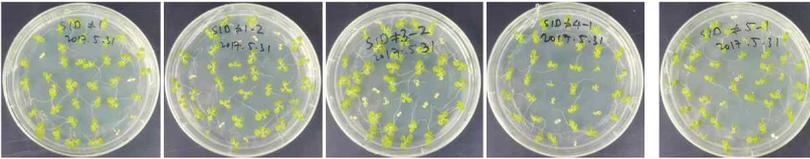
- 1 copy number로 삽입된 핵/엽록체 형질전환체의 호모 라인 확보를 위한 연구
- 연구결과
- 세대 전개: (그림 37)과 같이 후속 세대 배양을 전개함



그림3-7-37. 항생제 선발 후 T5 세대 위한 종자 확보>

- 1 copy 수 삽입 담배 핵 형질전환체의 세대 전개 (~T5)한 결과, 1세대 전개 과정을 지속적으로 수행하여 호모 라인을 선발 할 것으로 기대함(그림 38)

SID in tobacco plants



CTB-SID in tobacco plants

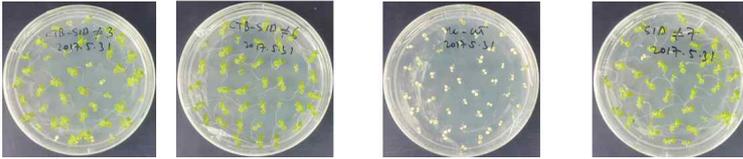


그림3-7-38. 항생제 선발을 통한 세대 전개(T5) 및 선발 과정>

- S1D 및 CTB-S1D 항원 유전자의 염색체 형질전환 및 호모 라인 확보(그림 39)

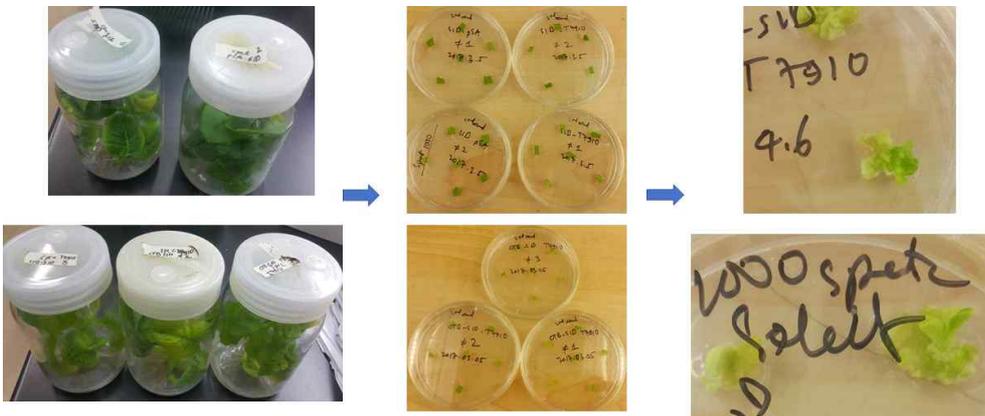


그림3-7-39. 항원 유전자 삽입 호모 라인 선발을 위한 항생제 선발 과정>

- 호모 라인 선발을 위한 유전자 삽입 수 분석: genomic DNA 추출 후 Southern blot analysis를 수행한 결과, 3kb의 control(WT)와 달리 5.7kb의 염색체 특이적 유전자 삽입을 확인함으로써 homoplasmly line 를 확보함(그림 40)

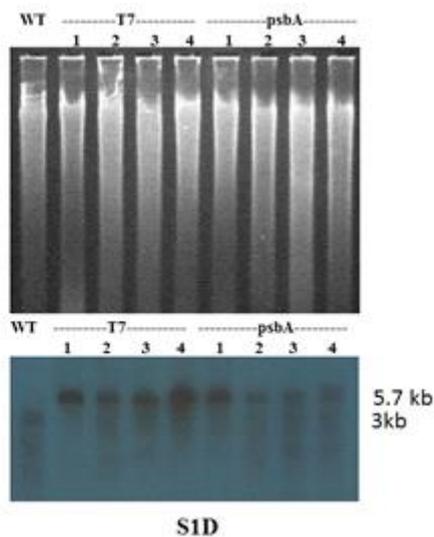
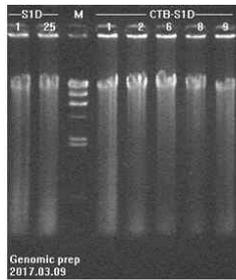
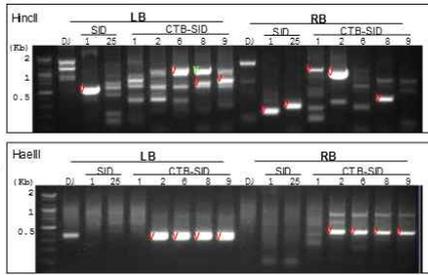


그림3-7-40. genomic DNA southern blot 분석을 이용한 homoplasmly line 선발>

- 벼 핵 형질전환체의 호모 라인 선발을 위한 유전자 삽입 수 분석: 1 copy 수로 항원 유전자가 삽입된 벼세포 형질전환체의 유전자간 삽입 라인 확보(그림 41)



Digestion gDNA with restriction enzyme  
 Ligation digested gDNA with adaptor



Query Name	A/N	Read T-DN	Inser	Adas	Inser	Chromo	matc	matc	quer	chr	chr_start	chr_end	type	gene_id	description	
S1D-1-H2-L_T35-122F	A	508	-1	1	508	-1	508	chr05	100	489	1	489	6185837	6185349	Intergenic	Ox08r0199100-01 upstr Similar to NDR1/HN1-like protein 2.
S1D-1-H2-R_CAM3300-RB2	A	158	13	14	141	142	128	chr01	100	128	13	140	19068139	19068326	Intergenic	Ox01t0530100-01 down Conserved hypothetical protein.
S1D-25-H2-R_CAM3300-RB2	A	205	11	14	190	191	177	chr01	100	175	11	185	19068139	19068373	Intergenic	Ox01t0530100-01 down Conserved hypothetical protein.
CTBS1D-1-H2-R_CAM3300-RB2	A	501	-1	1	501	-1	501	chr11	100	476	7	482	12575170	12574696	Intergenic	Ox11r0412484-01 upstr Hypothetical conserved gene.
CTBS1D-2-H2-R_CAM3300-RB2	A	292	23	24	292	-1	269	chr03	89	225	40	290	32649893	32649643	Intergenic	Ox03r0786400-01 upstr C2H2 zinc finger transcription factor, Drought and salt tolerance
CTBS1D-2-H3-L_T35-122F	A	309	155	156	293	294	138	Matched to CTB-flagellin fusion protein gene.								
CTBS1D-2-H3-R_CAM3300-RB2	A	411	14	17	411	-1	395	Matched to LB-T355-hptII								
CTBS1D-6-H2-L_T35-122F	A	647	136	137	647	-1	511	chr05	100	511	136	646	542172	541662	5'Upstream	Ox05r0110100-02 upstr Heat shock protein DnaI, cysteine-rich domain domain con
CTBS1D-6-H3-L_T35-122F	A	307	153	154	291	292	138	Matched to CTB-flagellin fusion protein gene.								
CTBS1D-8-H3-R_CAM3300-RB2	A	416	-1	1	401	402	401	Matched to LB-T355-hptII								
CTBS1D-8-H2-L_R_T35-122F	A	393	149	146	393	-1	294	Matched to RB region								
CTBS1D-8-H3-L_T35-122F	A	325	169	170	325	-1	156	Matched to CTB-flagellin fusion protein gene.								
CTBS1D-8-H2-R_CAM3300-RB2	A	296	14	17	279	280	263	matched to LB-T355								
CTBS1D-8-H3-R_CAM3300-RB2	A	425	13	16	425	-1	410	Matched to LB-T355-hptII								
CTBS1D-9-H2-L_T35-122F	A	262	138	157	262	-1	106	chr05	99	124	138	261	542169	542046	5'Upstream	Ox05r0110100-02 upstr Heat shock protein DnaI, cysteine-rich domain domain con
CTBS1D-9-H3-L_T35-122F	A	308	154	155	292	293	138	Matched to CTB-flagellin fusion protein gene.								
CTBS1D-9-H3-R_CAM3300-RB2	A	414	14	16	414	-1	399	Matched to LB-T355-hptII								

S1D #1: RB:Chr01, LB:Chr05: intergenic  
 S1D#25: RB:Chr01: intergenic  
 CTB-S1D #1: RB:Chr11, intergenic  
 CTB-S1D#2: RB:Chr03: intergenic  
 CTB-S1D #6, CTB-S1D#9: same result  
 LB: Chr05, upstream heat shock protein

그림3-7-41. flanking sequencing 분석 결과 유전자 간 삽입 라인 확보>

세부 연구내용

- PEDV 항원 단백질 생산성 증가를 위한 siRNA 활용 선행연구 기술 응용

연구결과

- CTB-S1D 항원 고발현 세포주의 p141 벡터의 공동발현: PEDV 항원 단백질이 발현된 벡터 세포에 cystein protease 발현 억제 벡터(p141: siRNA 기술응용)의 추가 형질전환 한 후 세포 선발
- genomic DNA PCR 수행: p141이 추가 형질전환 된 공동발현 세포주 확보(그림42)

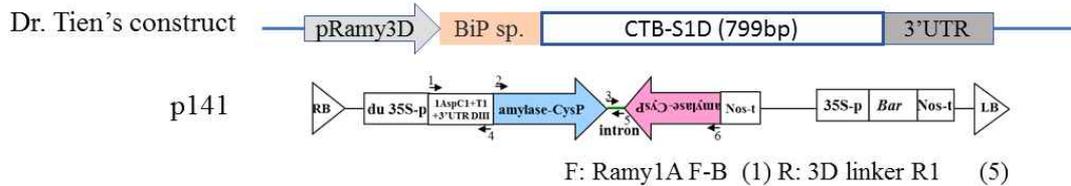


그림3-7-42. 항원유전자 특이적 프라이머를 이용한 genomic DNA PCR>

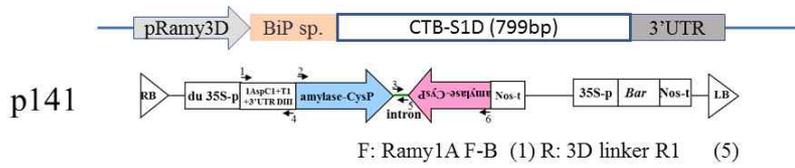


그림3-7-43. siRNA 삽입 벡터 특이적 프라이머를 이용한 genomic DNA PCR>

### 세부 연구내용

- siRNA 적용 형질전환 세포주의 단백질 발현 확인

### 연구결과

- siRNA 활용 기술을 적용한 항원 유전자 형질전환체의 단백질 분석 결과, (그림 44)와 같이 control(#6)에서 발현되었던 항원 단백질이 더이상 발현되지 않음

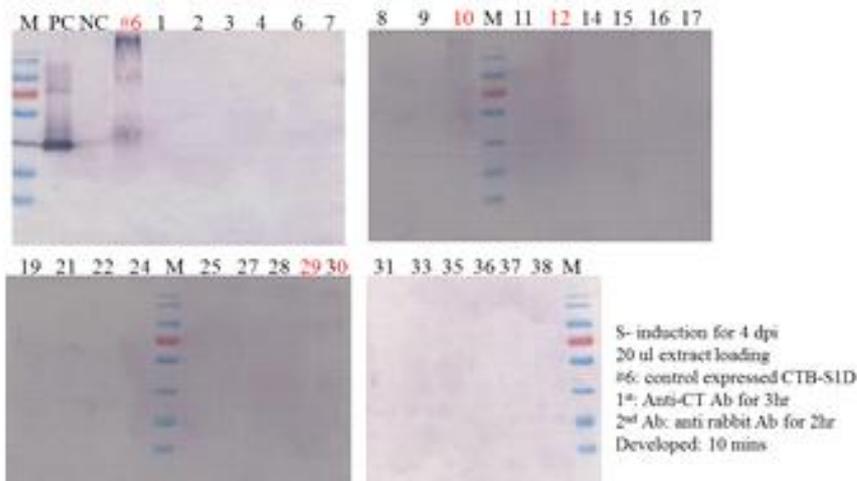


그림3-7-44. siRNA 기술이 적용된 항원 단백질 발현 분석>

- 문제점 개선책: 세포배양 배지 내로 단백질 분비량을 증가시키기 위하여 벡터 3D signal peptide로 치환하여 다시 분석하는 방법을 시도함
- signal peptide 치환 벡터 제작: 3D 및 33K signal peptide가 삽입된 벡터 세포 발현벡터 설계(그림 45)

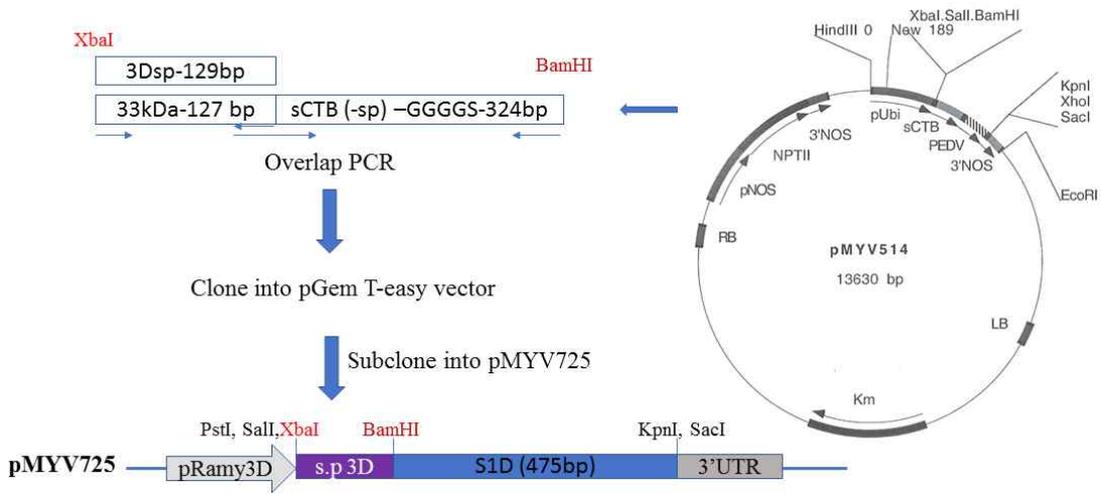


그림3-7-45. signal peptide 치환 벡터 제작

- cloning: 3D 및 33K signal peptide와 융합된 항원 유전자 확보를 위한 클로닝 및 100% match된 유전자 클론 확보(그림 46)

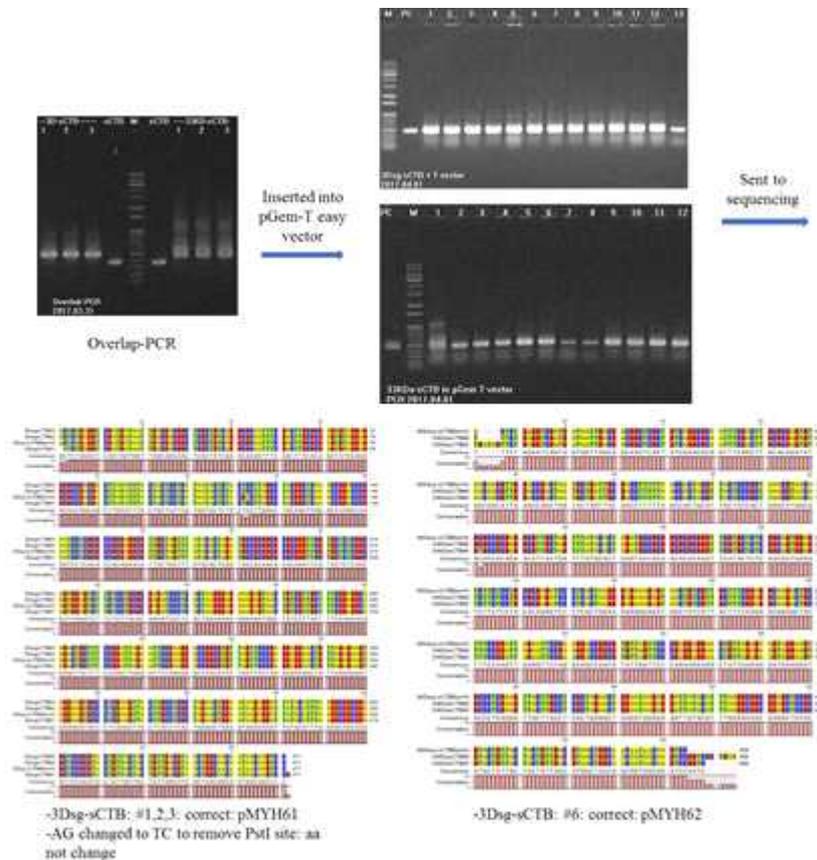


그림3-7-46. T-vector cloning 및 sequence 확인

- signal peptide로 치환 벡터 제작: 3D 및 33K signal peptide와 융합된 항원 유전자가 융합된 벡터 발현 벡터 제작을 위한 cloning 수행(그림 47)

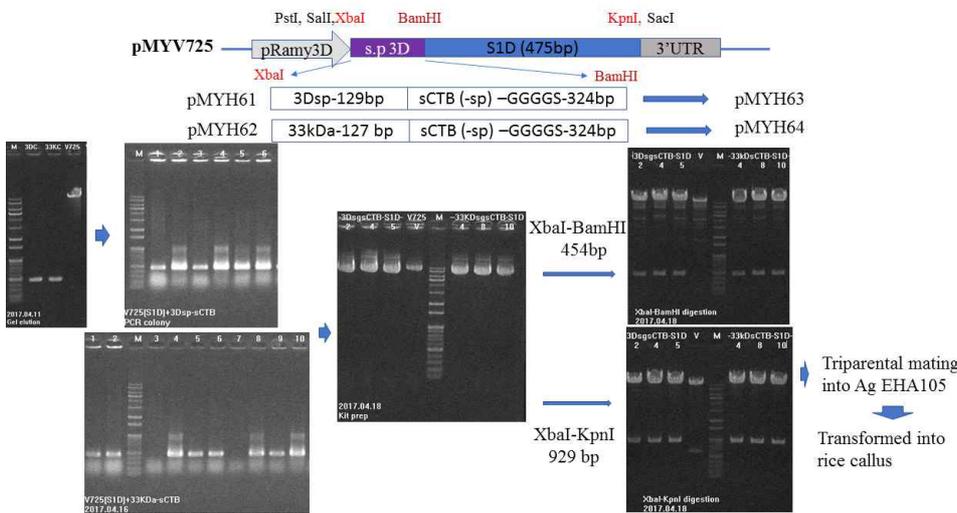


그림3-7-47. 3D 및 33K signal peptide로 치환된 벡터 발현벡터 cloning>

- 단백질 발현벡터 분석: 3D 및 33K signal peptide와 융합된 항원 단백질 발현의 Western blot 분석
- 결과, (그림 48)과 같이 3D signal peptide로 치환된 경우(pMYH63)와 pMYH63+p141 공동발현의 경우는 항원 단백질 발현이 되지 않음을 확인함
- 하지만, 33K signal peptide로 치환된 경우(pMYH64)는 9개 세포주 모두에서 단백질이 발현됨을 확인함 (그림 48)

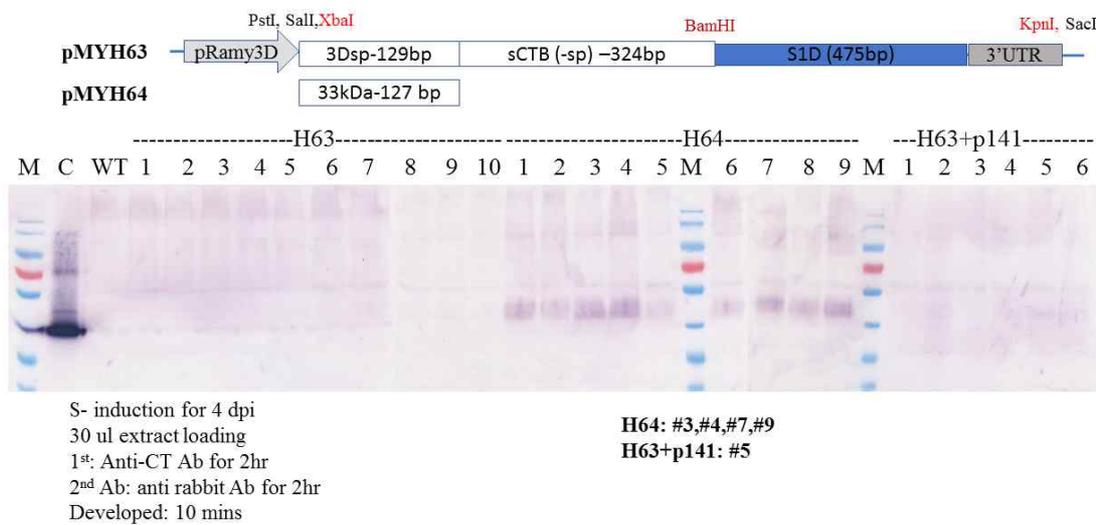


그림3-7-48. 3D 및 33K signal peptide 치환 후 단백질 발현 분석>

- S1D 항원 고발현 세포주의 p141 벡터의 공동발현: PEDV S1D 항원 단백질이 발현된 벡터 세포(pMYV725)에 cystein protease 발현억제 벡터(p141)의 추가 형질전환 한 후 세포 선발
- 단백질 발현 유도 과정을 거쳐 확보된 세포주로부터 수용성 단백질을 추출하여 Western blot analysis를 수행한 결과, p141과 항원을 공동 발현시킨 세포주(#3,8,10,11)에서 발현률이 증가됨을 확인함(그림 49)

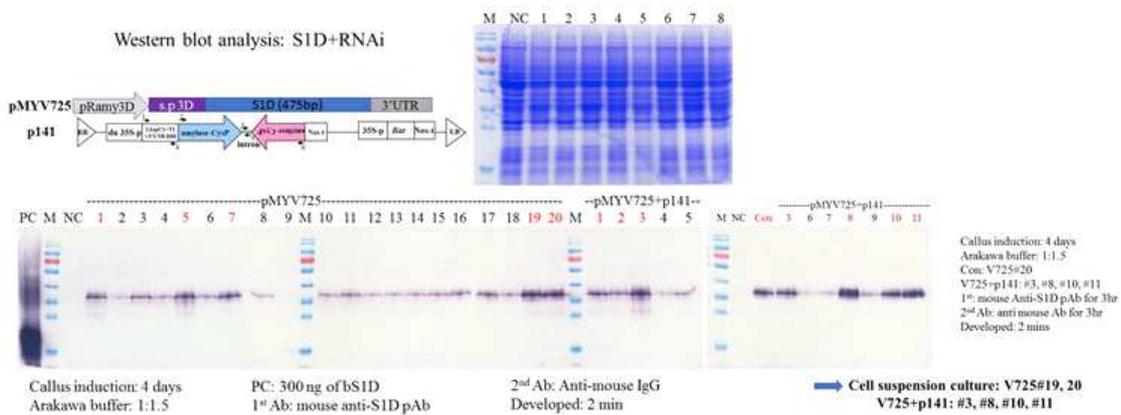


그림3-7-49. siRNA 기법이 적용된 S1D 항원 단백질 발현 및 생산성 증가 확인>

- COE 항원 고발현 세포주의 p141 벡터의 공동발현: PEDV COE 항원 단백질이 발현된 벼 세포 (pMYV733)에 cystein protease 발현억제 벡터(p141)의 추가 형질전환 한 후 세포 선별
- 단백질 발현 유도 과정을 거쳐 확보된 세포주로부터 수용성 단백질을 추출하여 Western blot analysis를 수행한 결과, p141과 항원을 공동 발현시킨 세포주(#12)에서 약간의 발현양 증가를 알 수 있었으나 전반적으로 항원 단백질 향상성 효과는 보지 못함(그림 50)

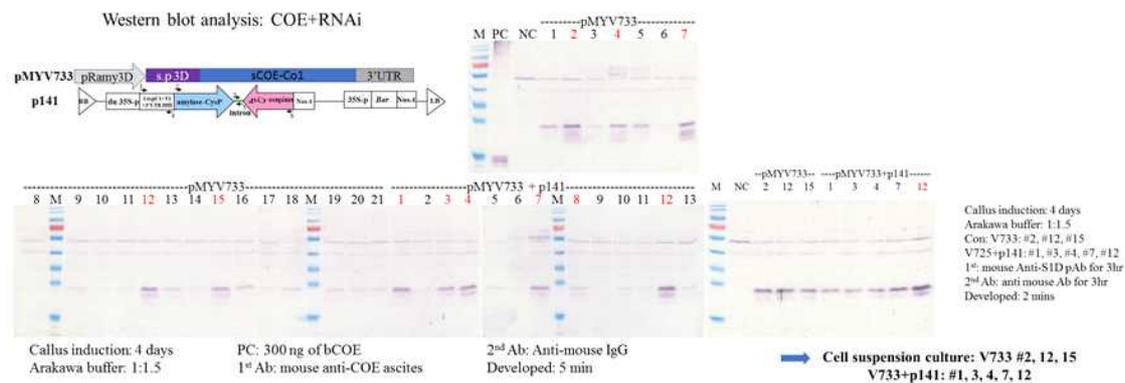


그림3-7-50. siRNA 기법이 적용된 COE 항원 단백질의 발현 향상성 분석>

- 형질전환 식물체 번식 및 배양: 두 가지 항원 단백질의 분리정제를 위한 식물체 확보(그림 51)

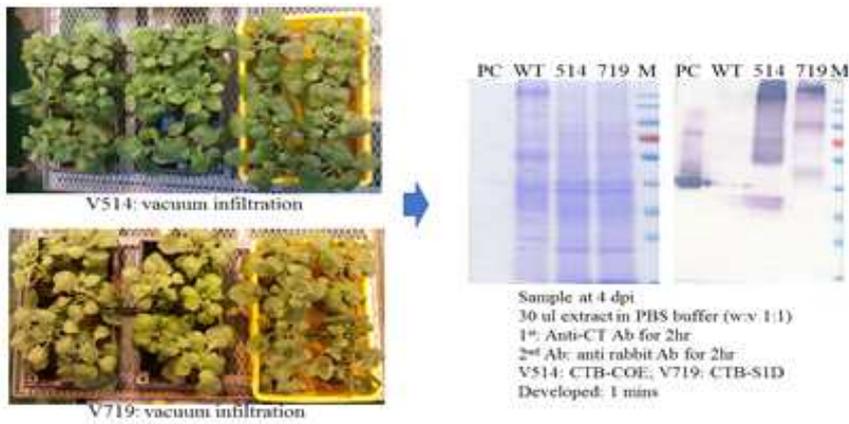


그림3-7-51. 항원 단백질의 분리정제를 위한 형질전환 식물체 확보 및 단백질 분석>

- CTB 융합 항원 단백질의 분리정제: CTB-COE 및 CTB-S1D의 두 가지 항원 단백질을 식물 세포로부터 정제하기 위하여 Ni-NTA 및 cobalt affinity chromatography 방법을 활용함
- mini scale purification 수행 결과, (그림 52)와 같이 두 가지 항원 모두 Ni-NTA column chromatography 방법으로 단백질을 정제 할 수 있었음
- CTB 융합 단백질은 이외에도 D-galactose affinity chromatography 방법을 활용할 수 있다는 보고를 참고하여 이후 정제 실험을 수행하는 것으로 함



그림3-7-52. 친화성 크로마토그래피 방법을 이용한 항원 단백질 분리정제 후 분석>

- 정제 조건 확립: 두 가지 친화성 크로마토그래피 방법을 이용한 두 가지 항원 단백질(CTB-COE 및 CTB-S1D)의 분리정제 조건 확립(그림 53과 54)

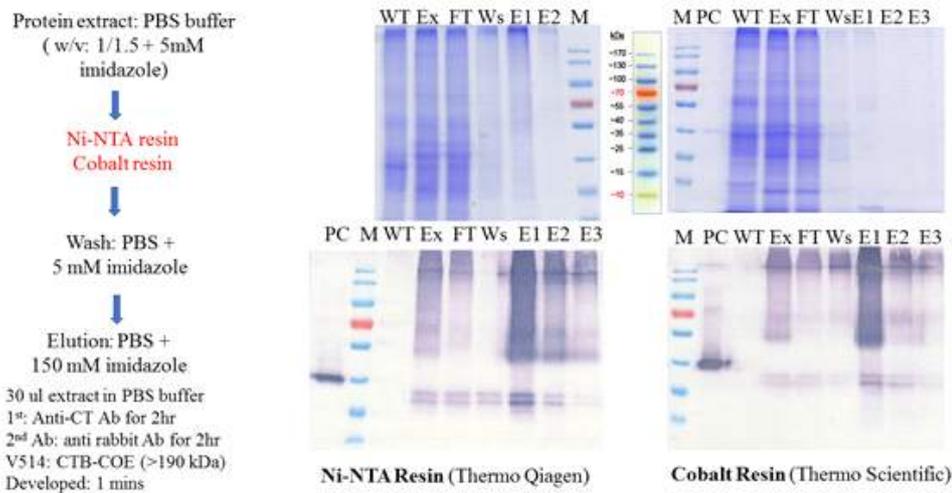


그림3-7-53. 두 가지 친화성 크로마토그래피 방법을 이용한 CTB-COE 분리 및 단백질 분석>

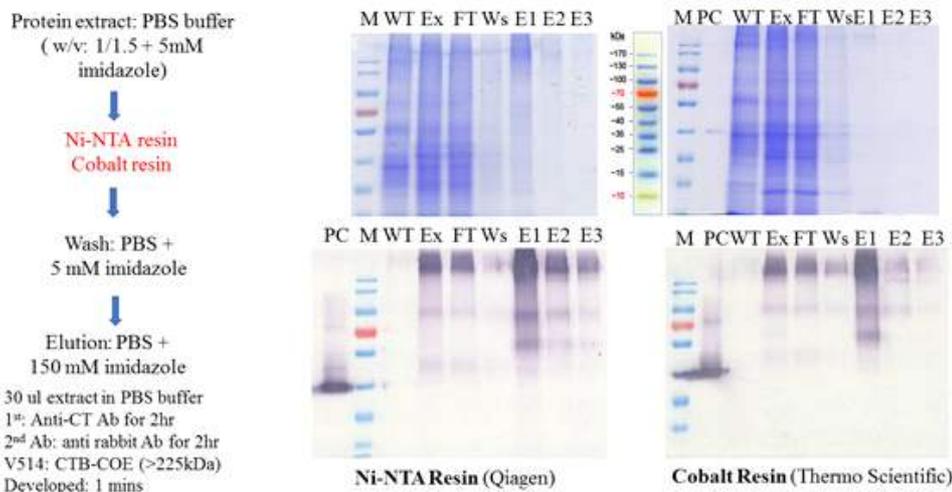


그림3-7-54. 두 가지 친화성 크로마토그래피 방법을 이용한 CTB-S1D 분리 및 단백질 분석>

**\* 4차년도결과**

주요 연구목표

- 실험동물(마우스)의 경구 면역화 최적화 연구를 위한 연구
- S1D/CTB-S1D 항원의 마우스 경구면역 유도 능력 검증
- 항원 단백질의 면역반응 효율 증진 향상기술 개발(연구 계획서 외 추가)

세부 연구내용

- 동물실험을 위한 다량의 항원 단백질 발현 식물체 확보

연구결과

- 호모 라인 형질전환 식물체 발아 및 증식: S1D 및 CTB-S1D 항원 단백질 발현 식물체 증식
- 형질전환 식물체 확보: 항원 단백질 발현을 위한 다량의 식물체 확보 (그림 55)



그림3-7-55. 향원 단백질 발현 호모 라인 식물체 다량 증식>

세부 연구내용

- 향원 단백질 생산 증가법을 적용한 향원 단백질 발현 식물체 확보

연구결과

- 향원 단백질의 생산성 증가를 위하여 선행연구에서 확립한 조건(p19 gene silencing suppressor 공동 발현 및 단백질의 일시적 발현 최적화)을 적용
- 향원 유전자: S1D(pMYV717)/CTB-S1D(pMYV719) 각각 향원 유전자 + p19 공동 또는 단독 발현
- 최적화된 일시적 단백질 발현 조건 적용: OD600이 0.5로 적정된 향원 유전자와 gene silencing suppressor(P19)를 1:1 비율로 공동발현 시킨 4일째 되는 날 수확(그림 56)

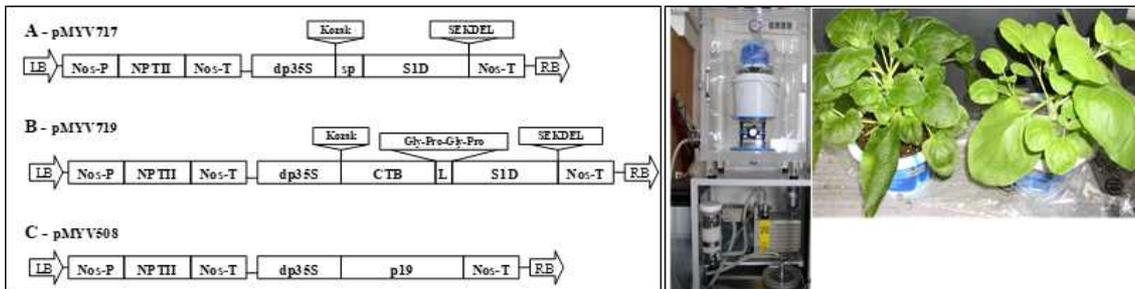


그림3-7-56. 목적 단백질의 발현을 향상을 위한 최적화 조건 적용>

- S1D 향원 단백질의 향상성 발현분석: 상기 최적화 방법을 도입시켜 확보한 식물체로부터 단백질을 추출하여 향원 특이적 단백질 발현을 분석한 결과, (그림 57)과 같이 p19 공동 발현체로부터 단백질 발현이 향상됨을 확인하였고 이를 동물실험 시료로 확보함
- CTB-S1D 향원 단백질의 향상성 발현분석: 상기 최적화 방법을 도입시켜 확보한 식물체로부터 단백질을 추출하여 향원 특이적 단백질 발현을 분석한 결과, (그림 58)과 같이 p19 공동 발현체로부터 polymer화 단백질 발현이 향상됨을 확인하였으며 이를 동물실험 시료로 확보함

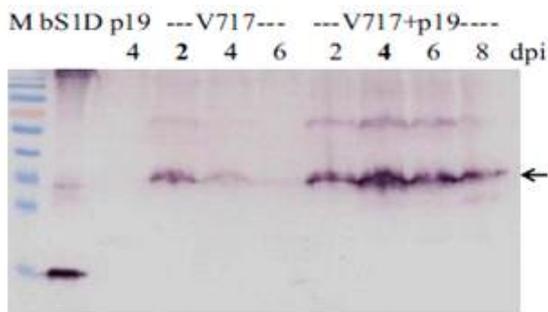


그림3-7-57. 항-S1D 항체를 이용한 단백질 발현 증가 분석>

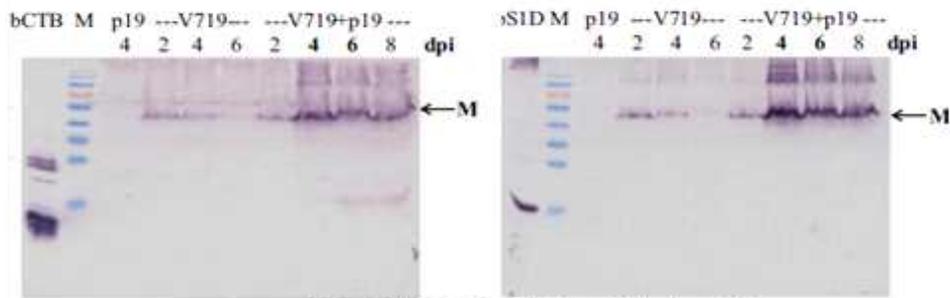


그림3-7-58. 항-CTB(좌) 및 항-S1D(우) 항체를 이용한 단백질 발현 증가 분석>

세부 연구내용

- 향상된 항원 단백질의 biological functionality 분석

연구결과

- 식물세포에 발현된 상기 CTB-S1D의 GM1 결합능력을 항-CTB(좌) 및 항-S1D(우) 항체를 이용하여 확인(그림 59)
- 그 결과, 상기 Western blot analysis와 마찬가지로 두 항체 모두 p19과 공동 발현시킴으로써 생물활성이 높은 항원 단백질을 확보할 수 있었음

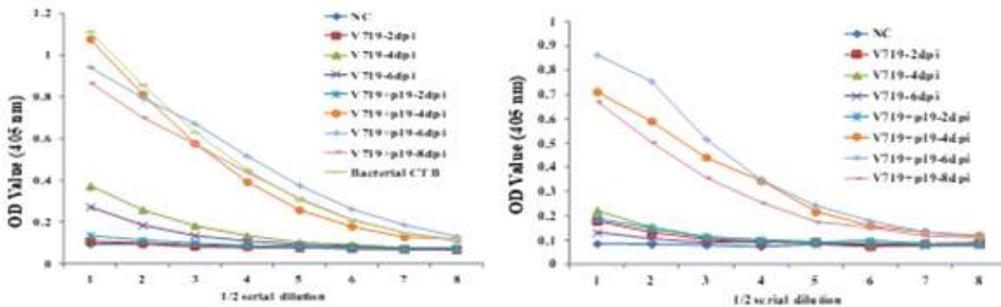


그림3-7-59. 항-CTB(좌) 및 항-S1D(우) 항체를 이용한 GM1 결합력 증가 분석>

세부 연구내용

- 마우스 경구접종 최적화를 위한 시료 준비를 위한 연구

연구결과

- (그림 60)과 같이, 항원 단백질 발현 식물체를 일반 사료와 유사한 형태로 준비하여 mouse feeding을 계획 함



그림3-7-60. 항원 단백질을 포함한 식물체의 pellet화>

- (그림 61)과 같이, mouse 개체별로 경구접종하는 방법을 확립함



그림3-7-61. pellet화 된 항원 단백질 발현 식물체의 경구접종>

세부 연구내용

- 두 가지 제형에 대한 mouse 경구접종 및 면역화 유도 분석

연구결과

- 항원 발현 식물체를 경구 접종하여 효율적으로 면역반응을 유도 시킬 수 있는 백신 제형을 하기와 같이 연구함

방법1: 펠릿형으로 제조하여 마우스가 직접 섭취하는 방법(그림 60)

방법2: PBS 버퍼에 현탁하여 gavage로 방법으로 수행(그림 62)

그룹	재료	방법
그룹 1	WT	Pellet
그룹 2	S1D	Gavage
그룹 3	S1D	Pellet
그룹 4	CTB-S1D	Gavage
그룹 5	CTB-S1D	Pellet



펠릿형 섭취



Gavage 주입

그림3-7-62. 마우스 경구접종에 의한 면역 유도>

- (그림 62)와 같이 경구 면역화를 유도 시켜 항원 특이적 항체 유도반응을 분석함
- 결과, pellet형 및 gavage 경구접종 후 S1D 항원에 대한 항체는 control group(wild type 식물 시료)보다 아주 경미한 양의 항체가 유도됨을 확인함
- 반면에, CTB에 대해서는 뚜렷한 항체 반응 유도도가 있음을 확인함
- 경구접종 형태에 대한 결과는 개체별 섭취를 차이가 있는 pellet형 보다는 균일한 양을 접종할 수 있는 gavage 투여 방법이 효율적인 것으로 사려됨
- 상기 내용을 종합해보면, adjuvanticity와 carrier 기능이 있는 CTB 융합형이 항원(S1D) 단독형보다 더 효율적으로 면역반응을 유도하는 것으로 보이므로 CTB와 융합시킨 형태로 백신을 개발하는 것이 효율적임을 확인함

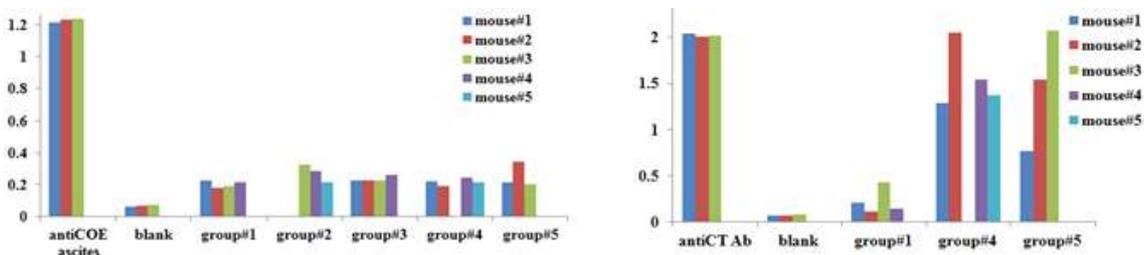


그림3-7-63. 항원 특이적 IgG 항체 유도반응 분석: 항-S1D(좌) 및 항-CTB(우)>

세부 연구내용

- 적정 항원 양 전달을 위한 경구접종 방법 연구

연구결과

- 항원의 저발현 효율을 극복하고 적정량의 항원 단백질을 투여하기 위한 방법으로 식물체 추출물을 암모늄살파이드로 농축시키고 마우스에 gavage 투여 실험을 수행함

- 4주 및 6주 투여 후, 항원 특이적 IgG 및 IgA 항체를 분석한 결과 면역반응 유도에 실패함(그림 64)

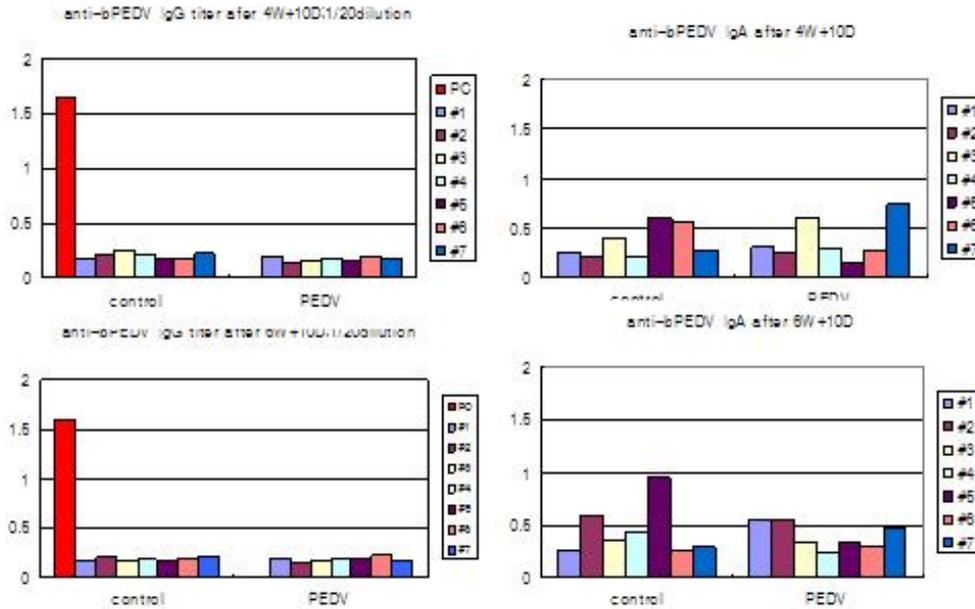


그림3-7-64. 항원 단백질이 농축화된 시료의 경구투여 후 항원 특이적 IgG 및 IgA 항체 유도반응 분석>

세부 연구내용

- 경구 면역유도 향상을 위한 adjuvant 활용

연구결과

- 면역보조제 병용: 이전 마우스 경구 면역화 실험으로 도출된 CTB-S1D 항원의 효용성을 극대화 시키기 위하여 면역보조제를 병행하는 동물실험을 수행함
- 면역보조제: 일반적으로 면역보조 효과가 널리 알려진 콜레라 독소(bCT)를 control group으로 하고 식물 세포에 발현된 비독성/저독성 콜레라 독소(rCTX) 실험군으로 하여 (그림 65)와 같은 면역화를 수행함

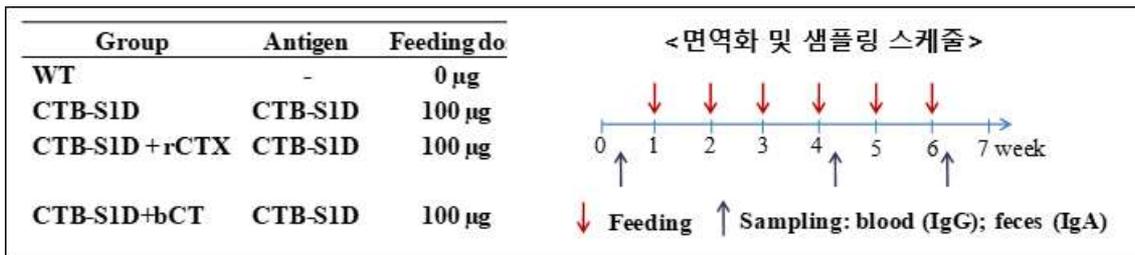


그림3-7-65. 경구접종 그룹 및 항원 접종량(좌)과 면역 유도 및 항체 분석을 위한 전략 >

- 그 결과, (그림 66, 좌)와 같이 접종 4주 후부터 CTB 융합 단백질은 모든 그룹에서 항원 특이적 IgG 항체를 유도하였으며 6주 후에 항체가의 증가를 확인함
- 또한, CTB 융합 단백질은 IgG 항체 유도반응과 같이 4주 후부터 모든 그룹에서 항원 특이적 IgA 항체를 유도하였으며 6주 후에 더욱 증가 생산됨(그림 66, 우)
- 상기 연구의 결과로써 면역보조제 특히, 콜레라 독소를 활용하여 돼지 설사병 경구백신 개발이 가능함을 확인함
- 벼 캘러스에 발현된 콜레라 독소는 아미노산을 변이시켜 독성을 낮춘 단백질로 생산되는 형태이며 이를 CTB-S1D 항원발현 식물과 같이 혼용하여 경구투여한 경우, 상용되는 콜레라 독소와 혼용한 그룹에 상응한 항체 유도반응 결과를 획득함
- 따라서, PEDV 항원 발현 및 면역보조제로서 저독성 콜레라 독소의 두 가지 단백질이 식물체 내에서 생산됨으로써 돼지 설사병 백신 개발에 성공 가능성을 확인함

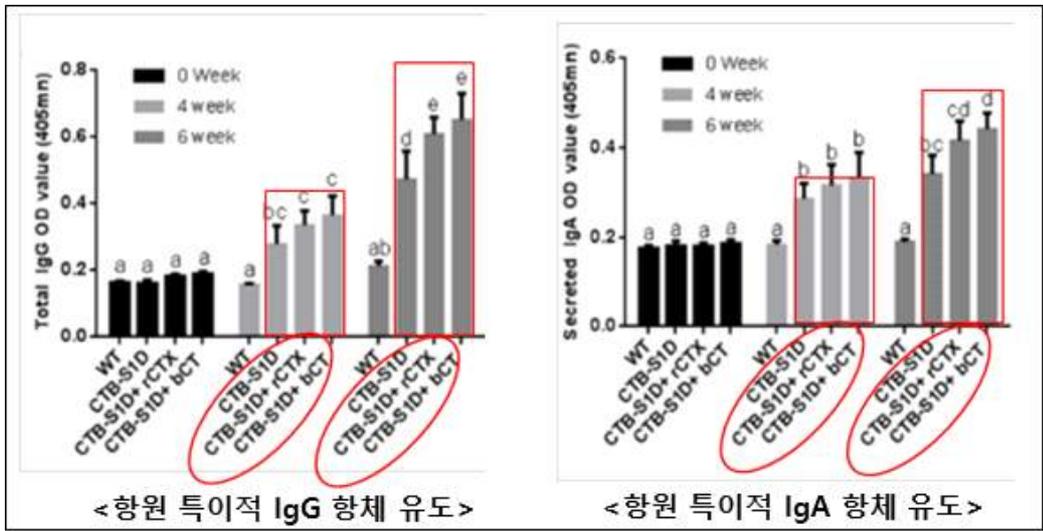


그림3-7-66. 면역보조제 병용 후 항원 특이적 IgG 및 IgA 항체 유도분석>

세부 연구내용

- 동물실험을 위한 다량의 항원 단백질(COE-PIGS, S1D-PIGS) 발현 식물 재료 확보

연구결과

- 면역계에서 항원을 유입함으로써 면역반응을 유도하는 항원제시세포에 직접 표적화하는 방법으로 백신의 효율성을 증가시키고자 PIGS분자를 활용하여 연구를 수행함(그림 67)
- PIGS는 자연면역계의 면역복합체를 응용한 구조로서 분자공학으로 제작하여 식물체에 발현시키고자함
- PIGS에 융합된 PEDV항원은 (그림 67)에서 보는 바와 같이 식물세포에서 항체와 같은 2가 형태로 조립되고 더 나아가 다가 복합형으로 발현됨으로써 PIGS의 기본이 되는 Fc 항체 부분이 면역세포의 항체 수용체에 결합할 수 있는 능력을 가짐

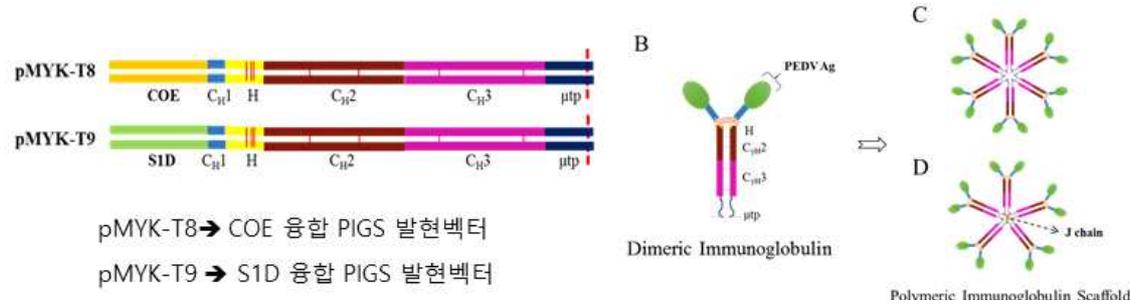


그림3-7-67. PIGS 융합 항원 유전자 벡터 및 다가형 복합체 형성 구조>

- 이를 위하여, PIGS 융합 항원 도입을 위한 식물체를 (그림 68)과 같이 증식함



그림3-7-68. PIGS 융합 항원 단백질 발현 식물체 증식>

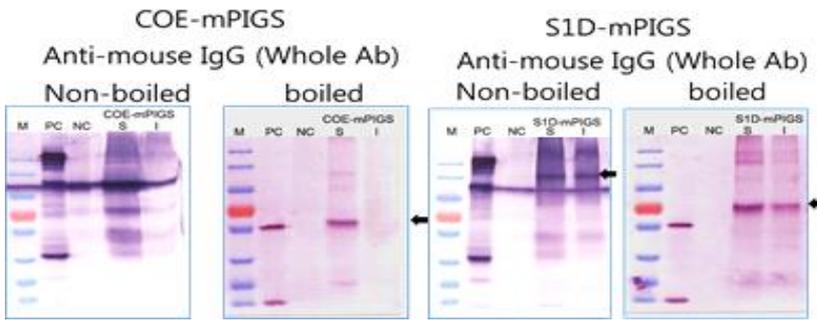


그림3-7-69.. PIGS 융합 항원 단백질 발현분석>

- PIGS 융합 항원 단백질 발현분석: PEDV 융합 PIGS 단백질을 agroinfiltration 방법으로 식물체에 도입시킨 후, 항원 단백질의 발현을 Western blot analysis를 통하여 (그림 69)와 같이 각각 확인함
- 이로써, 차년도에 수행 할 동물실험을 위하여 다량의 식물체를 추가적으로 확보

**\* 5차년도 결과**

주요 연구목표

- 면역반응 효율 증진 기술을 적용한 마우스 동물실험 및 이의 면역반응 유도 특성 분석
- 고순도 항원 단백질의 대량생산 기술 조건 확립

세부 연구내용

- 동물실험에 이용될 면역성 증진을 위한 백신 구조: PEDV 항원과 PIGS 백신 전달체와의 융합(COE-PIGS 와 S1D-PIGS)
- PIGS 백신 전달체 장점: IgG 항체의 Fc를 기본 골격으로 하면서 IgM의 mu-tail piece를 차용하여 polymer 구조로 형성시킴으로써 면역세포인 항원제시세포에 직접 항원을 전달시킴과 동시에 고친화성 뿐만 아니라 저친화성 항체 수용체에 결합력을 증가시킴으로써 면역반응 유도 효율을 신속하게 강화시킬 수 있음(그림 70)
- 상기 항원 구조를 식물세포에 고발현시키고 단백질을 분석

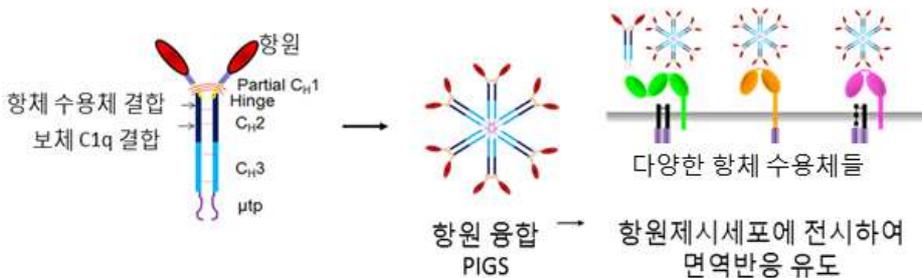


그림3-7-70. PIGS 백신 전달체 구조 및 장점에 관한 모식도>

연구결과

- 마우스 버전의 PEDV 항원 및 백신 전달체(PIGS) 융합 구조: 마우스의 면역세포(항원제시세포)에 적용 가능한 마우스 버전의 두 가지 PEDV 항원 (그림 71)과 같은 구조로 융합시킴(COE-PIGS, S1D-PIGS)

- 상기 항원 구조의 식물발현 벡터 구조: (그림 72)와 같이 식물체의 일시적 발현 방법으로 단백질을 생산할 수 있는 벡터를 확보함(그림 72)

- 식물체로의 도입: 식물체 발현을 위한 agro-infiltration 수행 후 재료 확보
- 항원 단백질 발현분석: 식물체에 도입된 항원 유전자의 발현 양상을 분석하기 위해 두 가지 항체(항-IgG

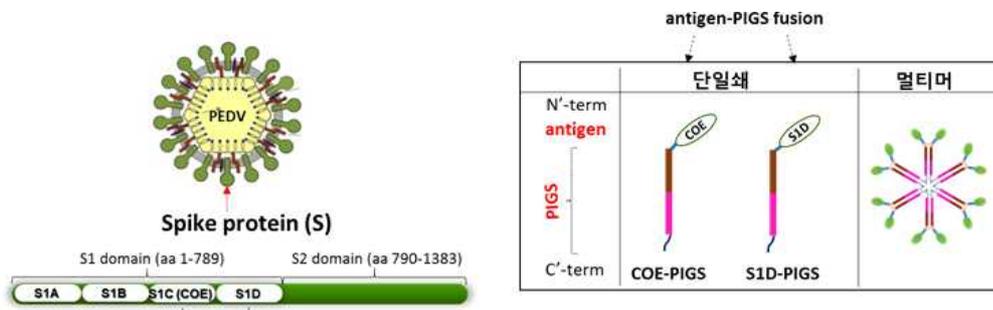


그림3-7-71. PEDV 항원 및 PIGS 융합형 타겟 항원 모식도>

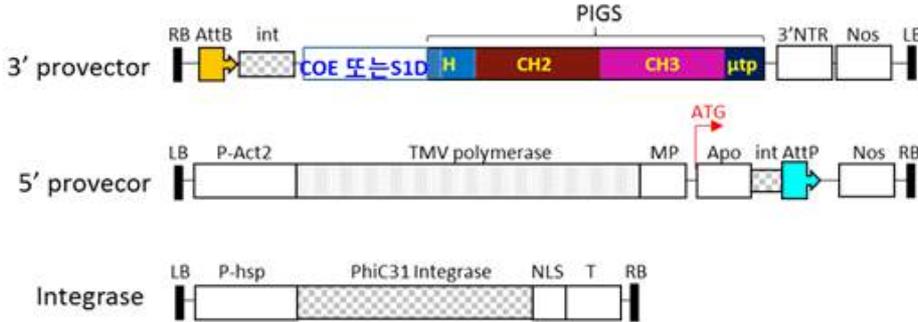


그림3-7-72. Pro-vecotr 발현 시스템 활용을 위한 PIGS 융합 식물 벡터 구조>

- 와 항-COE/S1D 항체)를 이용하여 비환원 및 환원조건으로 Western blot analysis를 수행함(그림 73)
- 그 결과, 두 가지 항원 모두 infiltration 후 6일째 수확한 식물체에서 고발현 및 멀티머 구조 형성 효율이 높은 것으로 확인함(비환원 조건)
  - 환원 조건으로 수행한 결과, 항-COE 또는 S1D 항체로 단일쇄 크기의 COE-PIGS와 S1D-PIGS를 각각 확인함
  - 따라서, 면역반응 증진을 위한 항원 융합 단백질의 식물체 발현이 성공적으로 확인됨

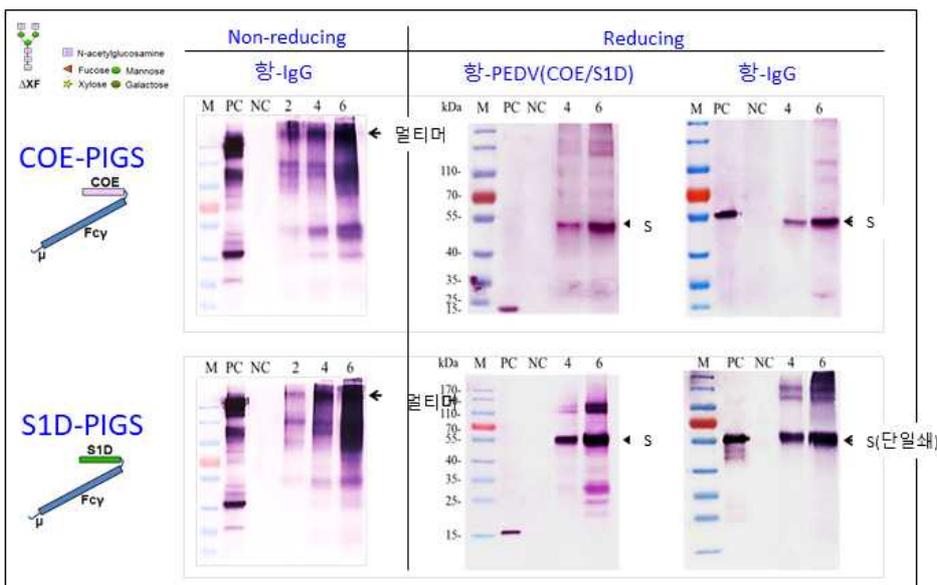


그림3-7-73. Western blot analysis에 의한 PIGS 융합 단백질의 발현분석>

- 항원 단백질의 식물체 발현률 분석: 항-IgG 항체로 식물체 추출물에 함유된 항원 단백질의 양을 측정함 (그림 74)
- 그 결과, COE-PIGS는 총수용성 단백질의 0.71%로 발현됨을 확인함
- S1D-PIGS는 총수용성 단백질의 0.94%로 발현됨을 확인함
- 상기 결과는 산업화 가능한 생산량으로 충분히 고발현됨을 제시함

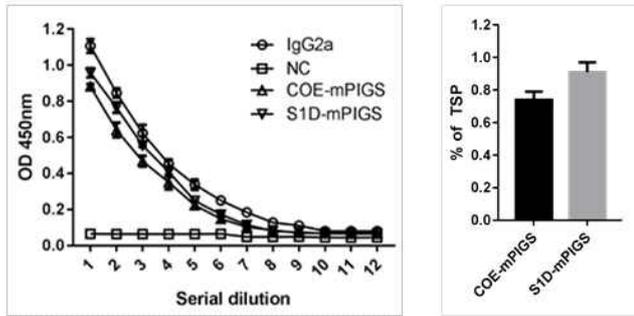
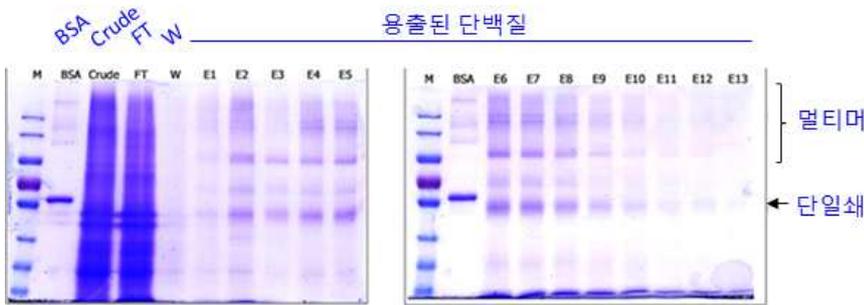


그림3-7-74. Indirect ELISA 방법을 이용한 항원 단백질 발현을 분석>  
세부 연구내용

- 항원 단백질의 분리정제 조건 확립을 위한 연구

연구결과

- affinity chromatography 수행: protein A/P에 대한 PIGS의 Fc 결합 특성을 활용한 단백질 정제를 수행함
- COE-PIGS 단백질 정제 후 SDS-PAGE 분석: (그림 75)와 같이 단일쇄 및 멀티머 구조의 항원 단백질을 분리함



<그림 753. 정제된 COE-PIGS의 SDS-PAGE 분석>

- S1D-PIGS 단백질 정제 후 SDS-PAGE 분석: (그림 76)과 같이 단일쇄 및 멀티머 구조의 항원 단백질을 분리함

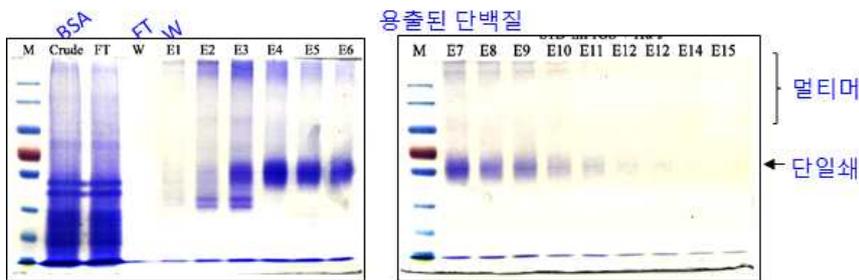


그림3-7-76. S1D-PIGS의 SDS-PAGE 분석>

- 상대적으로 고발현된 S1D-PIGS의 경우, 단일쇄 단백질의 고량과 커다란 분자로 중합된 멀티머가 COE-PIGS보다 많은 양으로 존재함을 확인함(그림 75와 76)
- 멀티머로 중합되어야 효율성이 높아지는 PIGS 특성을 극대화 시킬 수 있는 추가 연구 필요

세부 연구내용

- 항원 융합 PIGS 단백질의 in vitro 기능성 분석

연구결과

- C1q 결합 능력 분석: 멀티머로 중합되는 PIGS 융합 단백질의 존재를 확인하기 위하여 보체 성분인 C1q binding ability를 ELISA 방법으로 분석함
- 그 결과, 두 가지 항원 융합 단백질 모두 C1q 결합능력이 현저함을 확인함으로써 멀티머의 존재를 검

증합(그림 77)

- 일반 mimeric IgG 항체는 C1q 보체 성분과의 결합능력이 현저히 떨어짐을 (그림 77)에서 control로 확인함
- 따라서, COE-PIGS과 S1D-PIGS 항원 단백질의 polymer 기능을 긍정적으로 기대함

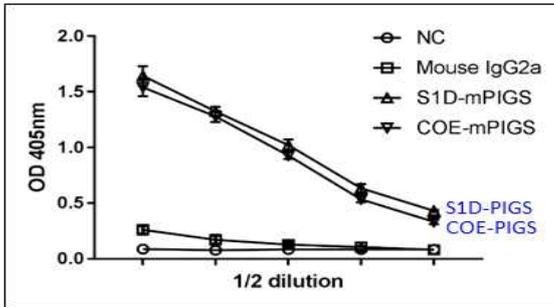


그림3-7-77. multimeric PIGS 용합 단백질의 C1q 결합능력 분석>

- Fc-g 항체 수용체 결합능력 분석: PIGS의 Fc가 이의 항체 수용체에 대한 결합능력을 갖는지 확인하고자 마우스 대식세포(J744) 배양 및 증식으로 수확한 세포에 항원 용합 단백질을 처리 후 FICT conjugated anti-IgG 항체로 detection하는 FACS analysis를 수행함(그림 78)
- 그 결과, control인 monomeric IgG 항체에 비해, 두 가지 PIGS 용합 항원 모두 항원제시세포 표면에 존재하는 항체 수용체에 대한 결합능력이 증가하는 것을 확인함
- Positive control로 사용된 Dengue-PIGS(Dengue-PIGS) 및 TB 면역복합 유사체(TB-Immune Complex Mimic) 단백질과 유사한 결합능력이 있음을 확인함
- 고친화성 및 저친화성 항체 수용체에 대한 결합능력은 PIGS 분자의 당화구조에 영향을 받으며 특히, 푸코스가 부재한 경우 저친화성 항체 수용체에 대해서 친화력이 거의 없는 모노머보다 현저히 높은 친화력을 갖는 증명을 타 연구과제에서 증명하였음
- 상기 내용의 친화력 향상을 위하여 푸코스 및 자일로스가 부재하는 식물체에서 PIGS 용합 단백질을 발현시키는 것이 매우 중요하므로 Delta XF 식물세포에 항원 단백질을 발현시킴
- 이로써, PIGS 백신 전달체에 용합된 PEDV 항원이 효율적으로 항원제시세포에 제시되어 면역반응의 유도 효율을 증강 시킬 것으로 기대함

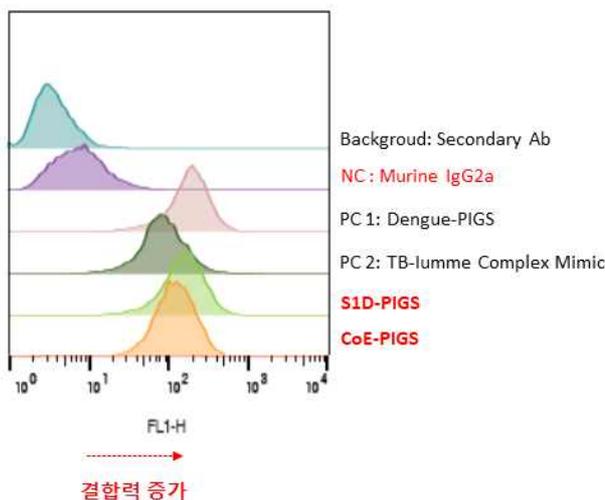


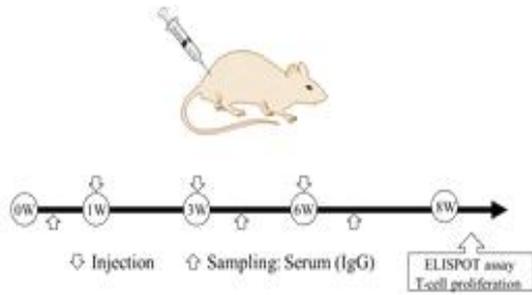
그림3-7-78. 마우스 버전의 PIGS 용합 단백질의 항체 수용체 결합능력 분석>

세부 연구내용

- 항원 용합 PIGS 단백질의 생체 내 기능성 분석(마우스 면역화 실험: needle 접종)

**연구결과**

- 항원 융합 PIGS의 증강된 면역반응 유도 능력 및 특성을 분석하기 위하여 정제된 두 가지 항원을 (그림 79)와 같은 접종 전략으로 마우스 면역화 실험을 수행함



Groups	Antigen	Feeding dose (µg)	Adjuvant (5 µg)
PBS	-	-	-
bCOE	bCOE	3	-
COE-mPIGS	COE-mPIGS	10	-
COE-mPIGS + bCT	COE-mPIGS	10	bCT: Bacterial cholera toxin (Sigma)

Groups	Antigen	Feeding dose (µg)	Adjuvant (5 µg)
PBS	-	-	-
bSID	bSID	2.8	-
S1D-mPIGS	S1D-mPIGS	10	-
S1D-mPIGS + bCT	S1D-mPIGS	10	bCT: Bacterial cholera toxin (Sigma)

그림3-7-79. 항원성 검증을 위한 마우스 주사접종>

- COE 또는 S1D 항원 단독으로 피하 주사한 그룹을 PIGS 융합 항원의 면역원성 증강 비교 그룹으로 이용함
- PIGS 백신 전달체의 자가-면역보조성(self-adjuvancity)를 확인하기 위하여 마우스 버전의 두 항원 (COE-PIGS와 S1D-PIGS)을 단독으로 피하주사 한 그룹과 콜레라 독소(bCT)를 external adjuvant로 사용한 그룹을 비교 분석함
- 그 결과, 두 항원 모두 COE 또는 S1D 항원만 주사했을 때보다 현저히 높은 항원 특이적 항체를 유도함 (그림 80)
- 두 항원 모두 1번 boosting으로도 각각의 항원에 대한 항원 특이적 IgG 항체가 유도됨을 확인하였으며, 2번의 boosting 후 항체가 더욱 증가됨을 확인함(그림 81)
- 측정된 항원 특이적 항체역가는 COE-PIGS와 S1D-PIGS 각각 1:5,100과 1:10,200임
- 상기 항체역가는 면역보강제인 콜레라 독소(CT, 10 µg)와 혼용하여 주사할 경우와 거의 유사하게 높은 항체가 유도됨을 확인함

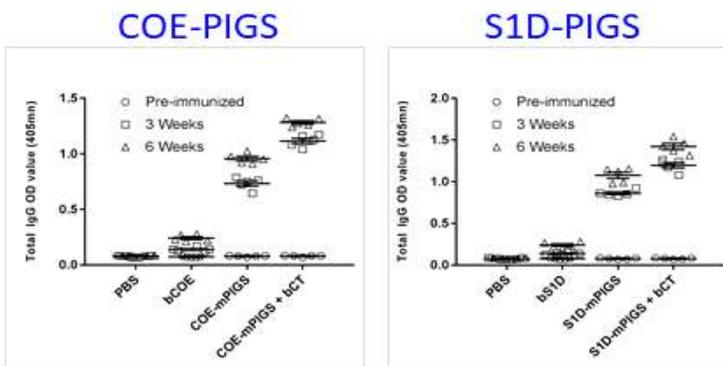


그림3-7-80. 항원 특이적 IgG 항체 유도 분석>

- 상기 두 항원 모두 면역보강제 CT의 혼용으로 항체가를 각각 약 4배로 증강 시켰음

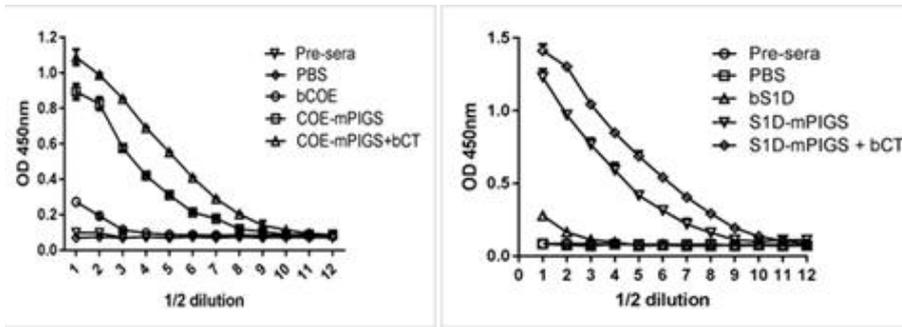


그림3-7-81. 각각의 항원에 대하여 특이적으로 유도된 IgG 항체역가 분석>

- 따라서, 본 연구 결과는 PIGS 융합 항원은 외부 면역보강제의 부재시에도 COE 또는 S1D 항원만 주사했을 때보다 더욱 효율적으로 항체 유도반응을 일으킴으로서 자체적으로 면역 보강성을 갖는 분자임을 확인함
- COE-PIGS로 면역화된 마우스 그룹의 세포 매개성 면역 유도반응 분석: COE-PIGS 및 COE-PIGS+CT로 면역화된 마우스 그룹은 COE 항원으로 B-세포 및 T-세포를 자극시킨 결과 현저히 활성화됨을 확인함(그림 82)

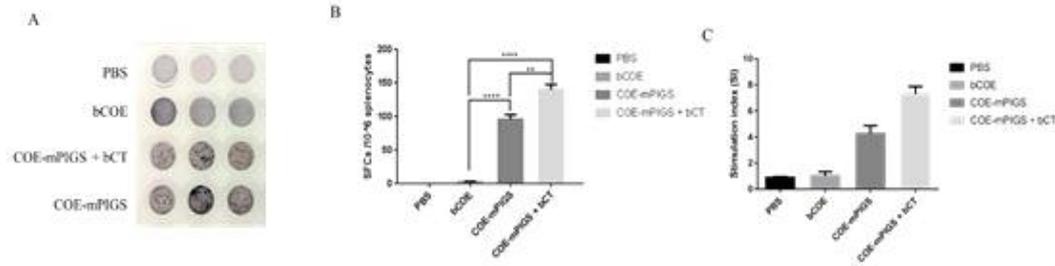


그림3-7-82. COE-PIGS의 세포 매개성 면역반응 분석>

- S1D-PIGS로 면역화된 마우스 그룹의 세포 매개성 면역 유도반응 분석: S1D-PIGS 및 S1D-PIGS+CT로 면역화된 마우스 그룹은 S1D 항원으로 B-세포 및 T-세포를 자극시킨 결과 현저히 활성화됨을 확인함(그림 83)

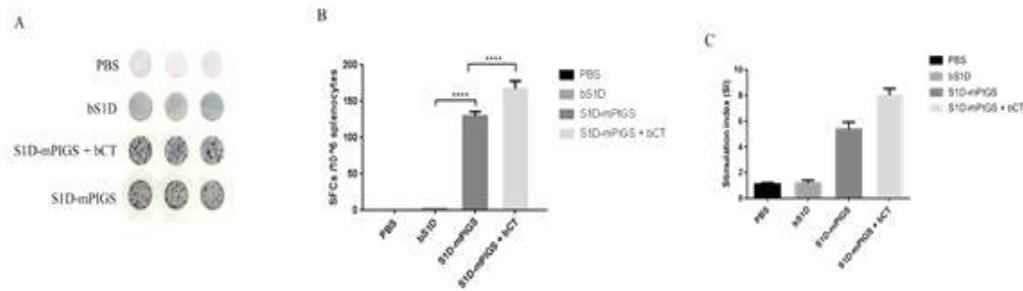


그림3-7-83. S1D-PIGS의 세포 매개성 면역반응 분석>

- 상기결과의 세포 매개성 면역반응 유도 확인은 감염된 병원균에 대한 방어 작용으로서 체액성 면역 반응(항체반응)에만 의존한 경우보다 훨씬 효율적인 백신 물질로 개발될 가능성을 높임
- 또한, 외부 면역보강제를 사용했을 때 백신 단가가 상승하는 것을 감안하면, PIGS 융합 백신 물질은 효율성뿐만 아니라 경제성에서도 개발에 유리한 요소로 고려될 수 있음

세부 연구내용

- 상기 연구 결과는 PIGS 융합 항원이 면역반응 효율성을 증진시키고 자체적으로 면역보조성을 갖는 백신 물질로 개발될 가능성을 제시함
- 따라서, 본 연구는 돼지 유행성 설사병에 대한 백신 개발을 최종목표로 하므로 마우스 버전의 PIGS 백신 전달체를 돼지 버전의 PIGS로 응용 개발하여 돼지 면역세포에 존재하는 항체 수용체 결합능력을 갖도록



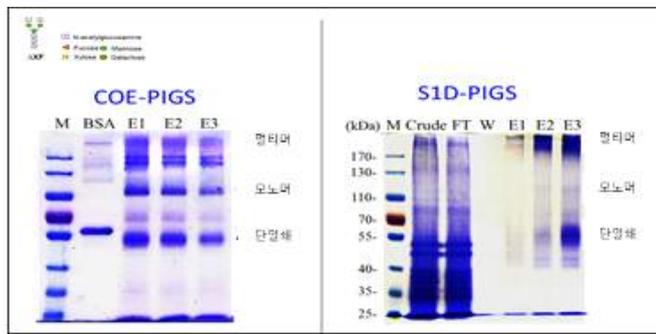


그림3-7-86. 마우스 버전 PIGS 융합 단백질의 Protein A/P agarose를 이용한 1차 chromatography 수행 후 SDS-PAGE 분석>

- 2차 정제: 1차 정제 단백질을 HPLC 분석기기에 적용하여 단백질 크기에 의한 2차 분리 정제를 수행함
- (그림 87)과 같이 두 가지 항원 단백질은 분자 크기를 알 수 있는 표준 단백질과 비교하여 용출되는 시간 별로 2차 정제를 수행함

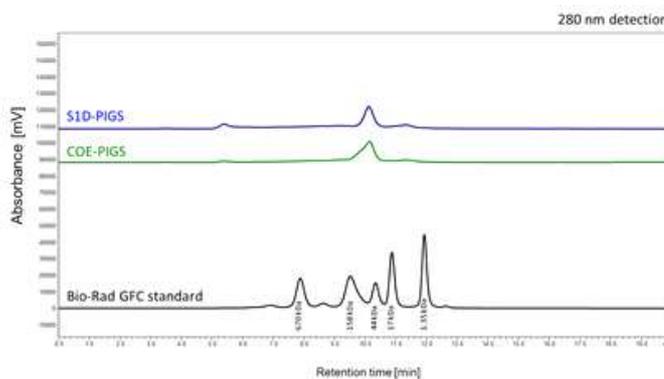


그림3-7-87. 마우스 버전 PIGS 융합 단백질의 Size chromatography 방법에 의한 항원 단백질의 2차 분리>

- 따라서, 상기와 같이 2 단계 분리 정제법을 적용함으로써 98% 이상의 고순도 항원 단백질 확보 방법을 확립함

**\*6차년도 결과**

주요 연구목표

- 마우스 버전 PEDV 항원 융합 PIGS의 경구 백신 개발 가능성 검증
- 돼지 버전 PEDV 항원 융합 PIGS의 in vitro 기능성 검증
- virus-like particle(VLP)형의 PEDV 백신 개발 가능성 검증(연구 계획서 외 추가)

세부 연구내용

- COE-PIGS 항원 단백질 발현 식물세포를 이용한 PEDV 경구 백신 개발 가능성 연구

연구결과

- 5차년도에 확보한 항원(COE-PIGS) 발현 식물체를 동결건조하여 마우스 실험 재료로 확보함
- 상기 시료를 정제하지 않고 식물세포 자체로 마우스에 gavage 접종하여 경구백신 개발 가능성을 시험함
- 마우스 경구 면역화 스케줄: (그림 88)과 같이 control로서 wild type 식물(WT)와 COE 단독 그룹을 배정하고, PIGS 융합 항원의 경구 면역원성 검증을 위하여 COE-PIGS 단독/면역보조제(사포닌 혼용)을 포함하는 그룹을 배정함
- 식물세포 시료 준비: 개체별로 각 항원이 100 µg씩 발현되는 동결건조 powder를 1회분으로 준비하여 경구접종 당일 PBS buffer에 현탁시켜 gavage 투여함
- serum과 feces을 sampling하여 IgG 및 IgA 항체 유도 반응을 분석함

- 총 6회 투여 후 면역화된 마우스로부터 speen을 채취하여 cellular response를 분석함

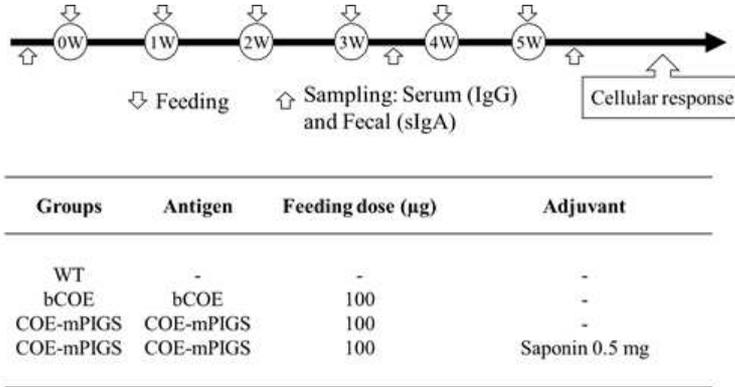


그림3-7-88. 항원 발현 식물세포의 마우스 경구접종을 통한 면역화 스케줄>

- 결과, control 그룹(WT)의 마우스는 항원 특이적 항체 유도가 되지 않은 반면에 COE 항원 단독의 경구 주입 그룹 마우스는 아주 경미한 양의 serum IgG 및 fecal IgA 항체가 유도 됨(그림 89 및 90)
- 4주 차 경구접종 후, PIGS 융합 그룹들은 항원 특이적 serum IgG 및 fecal IgA 항체를 유사한 양으로 유도함
- 6주차 경구접종 후, PIGS 융합 그룹들은 4주차 보다 높은 항체가로 생성함
- PIGS 융합 단독 경구접종 그룹은 면역보조제(saponin)를 혼용한 PIGS 융합 그룹과 유사한 양의 항체가 유도함으로써 경구 백신화로도 자가-면역보조 효과를 확인함

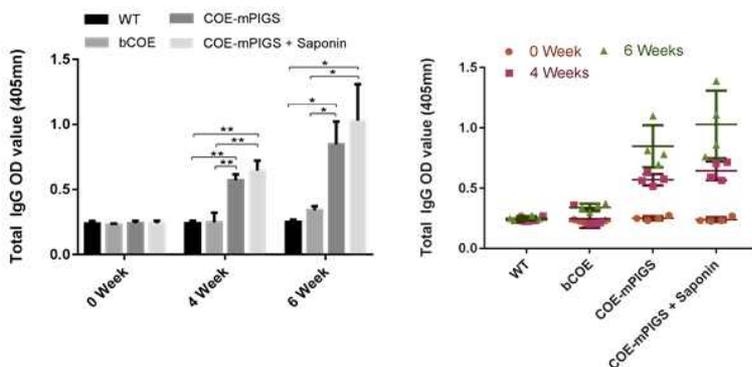


그림3-7-89. 경구접종 후 항원 특이적 serum IgG 항체 유도 분석>

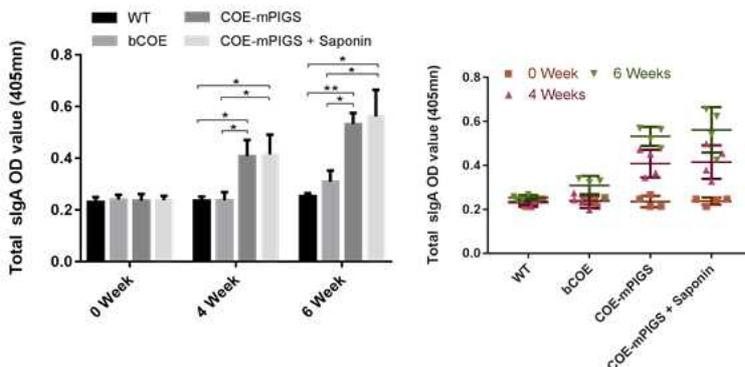


그림3-7-90. 경구접종 후 항원 특이적 fecal IgA 항체 유도 분석>

- 상기 그림과 같이 PIGS가 융합된 PEDV 항원의 경구면역원성을 확인함
- 정제된 단백질 형태가 아닌, 항원 발현 식물세포를 경구투여하여도 높은 항체가로 면역반응이 유도될 수 있음을 확인함
- 특히, 면역보조제와의 혼용 없이도 자가-면역보강성을 갖는 PIGS 융합 백신의 개발 가능성이 기대됨
- 가축백신에 허용되는 면역보조제(사포닌)과의 혼용 형태는 항체유도 형성에 도움이 되므로 접종횟수 및 접종량의 감소효과를 볼 수 있을 것으로 기대함

세부 연구내용

- S1D-PIGS의 점막 백신 개발 가능성을 위한 연구(in vitro 기능성 분석)

연구결과

- 항원 단백질의 식물체 발현: 접종 횟수를 최소화하는 점막 백신 개발 가능성을 확인하기 위해서 정제된 단백질이 필요하여 이를 위한 다량의 항원 발현 식물체를 확보함(그림91)



그림3-7-91. 일시적 고발현 방법을 통한 항원 단백질 발현체 확보>

- 항원 단백질 발현 확인: Western blot analysis를 통한 S1D-PIGS 항원 단백질 발현 확인(그림 92)

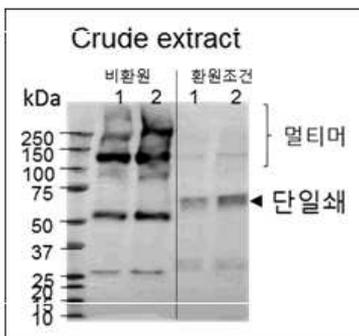


그림3-7-92. 단백질 확인을 위한 Western blot analysis>

- 단백질 분리정제 및 다량의 면역화용 단백질 확보: ProteinA/P agarose column chromatography 방법을 이용하여 단백질을 정제함
- SDS-PAGE 분석: 정제된 단백질을 (그림 93)과 같이 SDS-PAGE로 분석한 결과 비환원 조건에서의 멀티머가 환원조건에서 single chain 및 monomer 형태로 분리되는 것을 확인함

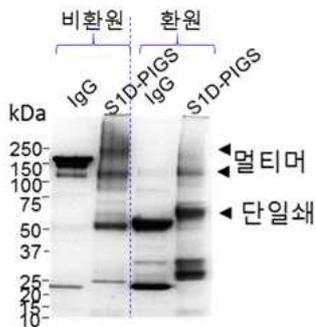


그림3-7-93. 정제된 S1D-PIGS 항원 단백질의 SDS-PAGE 분석>

- S1D-PIGS 분자는 9개의 N-glycosylation site가 존재
- S1D-PIGS 분자는 9개의 N-glycosylation site가 존재하므로 이를 확인하기 위하여 de-N-glycosylation 후 단백질 크기를 비교하는 Western blot analysis를 수행함

- 그 결과, (그림 94)와 같이 약 63 kDa의 single chain이 약 45 kDa의 single chain으로 de-glycosylation 되는 것을 확인함으로써 glycosylation 여부를 확인함

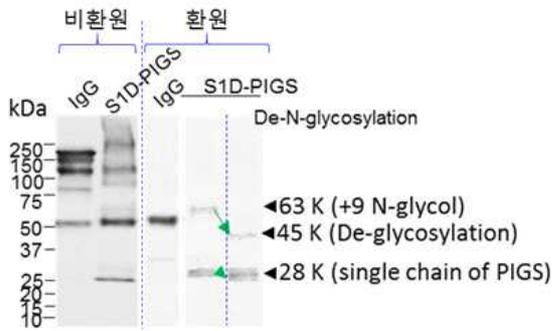


그림3-7-94. De-N-glycosylation 후 Western blot 분석>

- S1D-PIGS 분자 특성 분석: zeta sizer로 S1D-PIGS 분자의 크기를 측정한 결과, 150 kDa의 monomeric IgG(약 12 d.nm) 보다 63kDa single chain S1D-PIGS 단백질이 약 27 d.nm로 측정됨으로써 multimerization된 분자임을 확인함(그림 95)

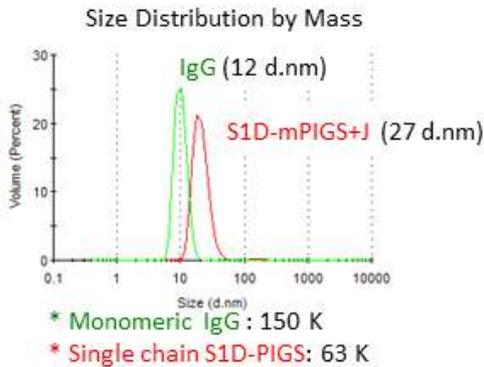


그림3-7-95. Zeta size 측정에 의한 polymeric S1D-PIGS 분자 분석>

- Polymeric S1D-PIGS 확인: 멀티머인 면역복합체 (항원-항체결합)만 결합 가능한 C1q 보체성분에 강한 결합능력이 있는 구조로 만들어진 polymeric protein임을 확인(그림 96)

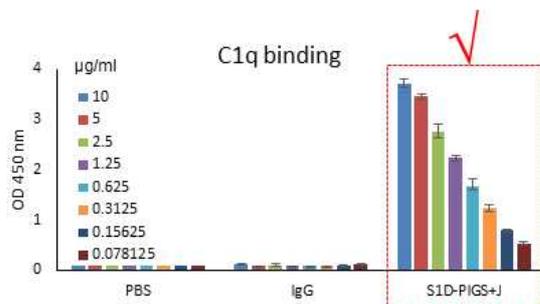


그림3-7-96. Polymeric S1D-PIGS 분자의 C1q 결합능력 분석>

- S1D-PIGS의 Fc 항체 수용체 결합능력 분석: 마우스 항체 수용체를 발현하는 마우스 대식세포 라인 (J774)에 항원 단백질이 결합하는지의 FACS 분석을 한 결과, PIGS 융합 단백질 단독 발현 또는 J chain 과 공동 발현한 단백질 모두 secondary antibody와 비교하여 결합력이 증가됨을 확인함(그림 97)

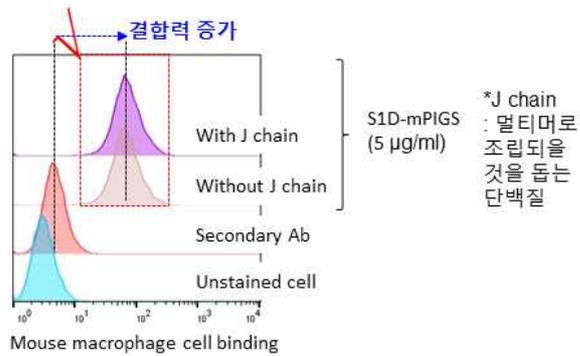


그림3-7-97. FACS analysis를 통한 PIGS 융합 단백질의 항체 수용체 결합력 분석>

- 따라서, 단백질 구조 및 기능이 확인된 상기 항원 단백질은 차년도에 수행할 점막 백신 개발 가능성 연구(마우스 면역화 실험)에 사용될 것임

세부 연구내용

- 돼지 버전 S1D-PIGS 융합 구조 벡터 제작: 5차년도에 확보한 합성 유전자 swPIGS를 S1D 항원과 융합시킨 후 S1D-swPIGS 생성

연구결과

- S1D-swPIGS 융합 유전자 및 이의 발현벡터 제작: S1D와 swPIGS를 융합시키기 위한 PCR amplification 수행 후 제한효소 처리 및 ligation과정 등의 subcloning을 수행함
- (그림 98)과 같이 pMYS3(#12)을 식물발현 벡터로 확보함
- 이를 식물에 발현시키기 위하여 agrobacterium strain (GV31010/pMP90RK)에 electrophoresis 방법으로 형질전환시켜 cell을 확보함

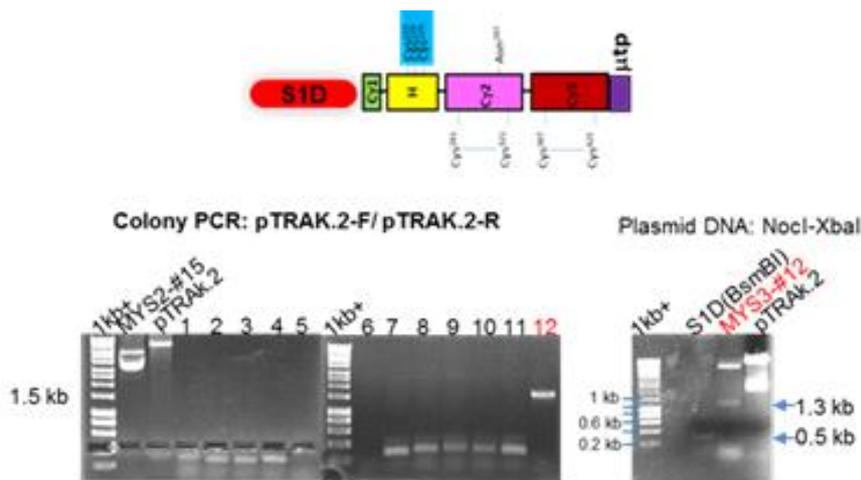


그림3-7-98. 돼지 버전 S1D-swPIGS 식물발현 벡터 확보>

- S1D-swPIGS 발현 식물체 확보: 선발된 토양균 세균을 syringe infiltration 시켜 항원 단백질 발현 식물체를 확보함
- S1D-swPIGS 단백질 발현 분석: infiltration 7일째 식물체를 확보하여 단백질 추출 후 Western blot analysis를 수행하여 발현 여부를 분석한 결과, 환원 및 비환원 조건에서 수행된 Western 결과에서 단일쇄(63 kDa) 및 멀티머(120 kDa 이상의 크기) 구조의 단백질이 성공적으로 발현됨을 확인함(그림 99)
- 특히, 돼지버전 swPIGS가 돼지 항체에는 결합하지만 인간 또는 마우스 항체에는 결합하지 않는 기주 특이적 단백질로 생산되었음을 확인함
- 이로써, 성공적인 유전자 설계 및 확보를 평가함

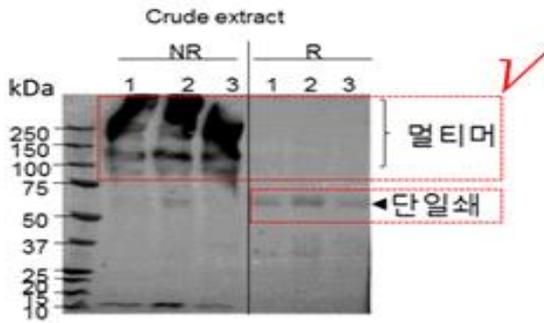


그림3-7-99. Western blot 방법에 의한 S1D-swPIGS 단백질 발현 분석>

- S1D-swPIGS 단백질의 C1q 결합력 분석: 식물세포에서 추출한 총 단백질을 C1q에 처리하여 분석한 결과, 세 식물체 모두에서 강한 결합력이 있는 polymer 형태로 만들어짐을 확인함(그림 100)

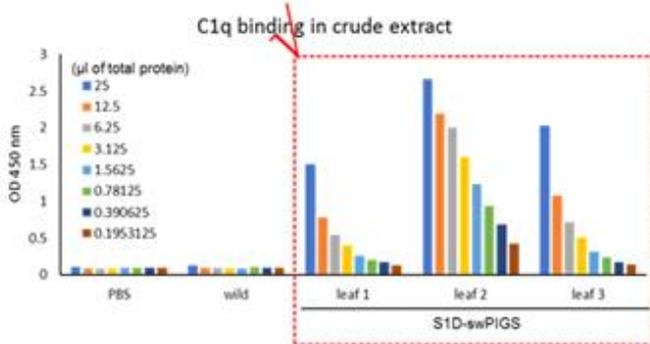


그림3-7-100. 식물 추출액을 이용한 S1D-swPIGS 단백질의 C1q 결합능력 분석>

- S1D-swPIGS 단백질 정제 및 분석: *in vitro* 기능성 검증을 위하여 다량의 식물체에 항원 단백질을 발현시키고 상기 정제 방법(Protein A/P agarose chromatography)으로 단백질을 추출함
- 정제 단백질 분석: polymeric 및 single chain S1D-swPIGS 단백질 구조 형성 확인을 위하여 Western blot analysis를 수행하여 분석한 결과, (그림 101)과 같이 비환원 조건에서의 polymer와 환원 조건에서의 single chain 및 monomer 크기의 단백질을 확인함

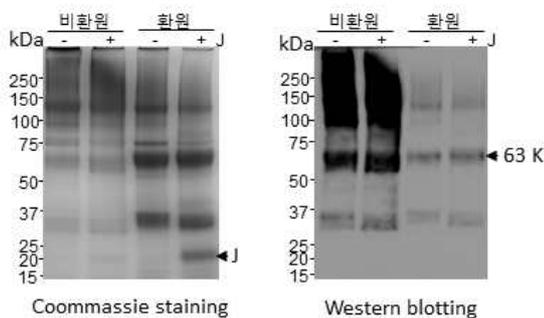


그림3-7-101. S1D-swPIGS 정제 단백질의 SDS-PAGE(좌) 및 Western blot analysis (우)>

- S1D-swPIGS 정제 단백질의 C1q 결합력 분석: 단백질 정제 후에도 C1q에 결합능력이 J chain 단백질의 유무와 관계없이 polymer로 형성됨을 확인함(그림 102)

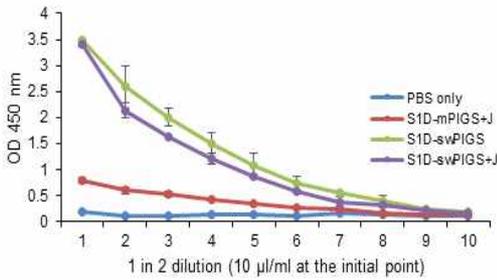


그림3-7-102. 농도별 S1D-swPIGS 정제 단백질의 C1q 결합력>

- 이로써, 상기 항원 분자구조는 돼지 면역화 실험에 성공적으로 이용할 수 있음을 검증함

세부 연구내용

- 식물 유래 바이러스 유사 입자(VLP) 구조의 PEDV 백신 개발(연구 계획서 외 추가)

연구결과

- VLP 유전자 합성 및 확보: PEDV는 총 4개의 구조단백질을 가지며, 이중 Spike(S) protein, Membrane(M) protein, Envelop(E) protein이 VLP의 형성에 필수적인 역할을 함이 알려짐에 따라 해당 유전자 서열을 담배의 Codon Usage에 맞게 Optimization 하여 유전자를 합성함

**▪ VLPs (Virus-like Particles )**

- 바이러스와 유사한 구조를 가지지만 유전자를 포함하지 않는 입자.
- 바이러스와 동일한 방법으로 면역반응을 유도 가능.
- 기존의 사백신, 약독백신에서 야기되는 잔존 바이러스로 인한 감염 우려가 없음.
- 최근에 요구되는 DIVA 백신의 요구에 적절한 형태의 PEDV 백신으로 이용이 가능

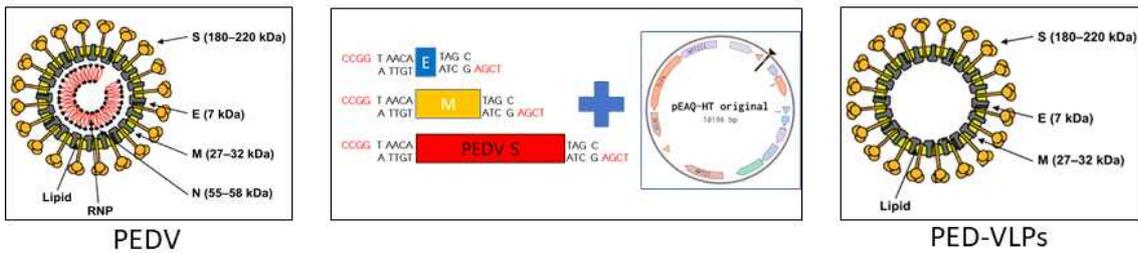


그림3-7-103. PED VLP 형성에 필요한 유전자>

- 식물 고발현 벡터 제작: 영국의 George Lomonosoff 교수로부터 담배에서 단백질 고발현에 유리한 pEAQ-HT vector를 분양 받아, PEDV 구조단백질 형성 유전자 및 C-말단에 Histidine이 표지된 각각의 구조단백질에 대한 유전자를 삽입하는 subcloning을 수행하여 벡터를 확보함(그림 104)

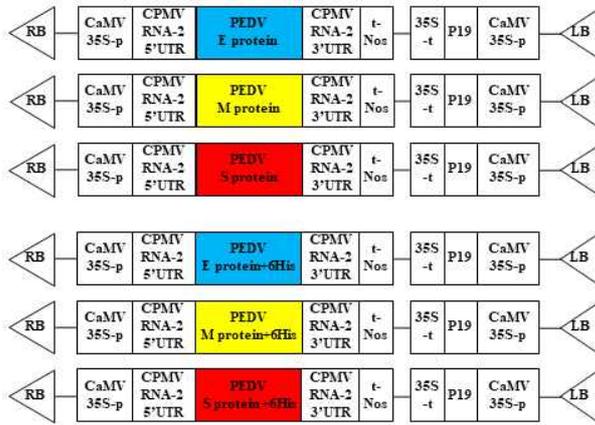


그림3-7-104. 각각의 구조단백질 발현 Vector의 구조>

- PED VLP 발현을 위한 식물체로의 도입: 각각의 유전자가 agrobacterium에 형질전환된 세포를 확보하여 식물세포에 infiltration시킴
- 단백질 추출: Agroinfiltration 후 6일 째에 수확한 담배잎으로부터 Bead ruptor와 1.5% Triton X-100이 첨가된 extraction buffer를 이용하여 단백질을 추출함
- Western blot analysis에 의한 단백질 발현 분석: PEDV의 구조단백질 발현 확인을 위해 Western blot을 수행한 결과, E와 S 단백질은 6DPI에서 발현이 확인되었으나, M 단백질은 단백질 발현확인이 되지 않았으며, 잎이 크게 손상되었음을 확인(그림 105)

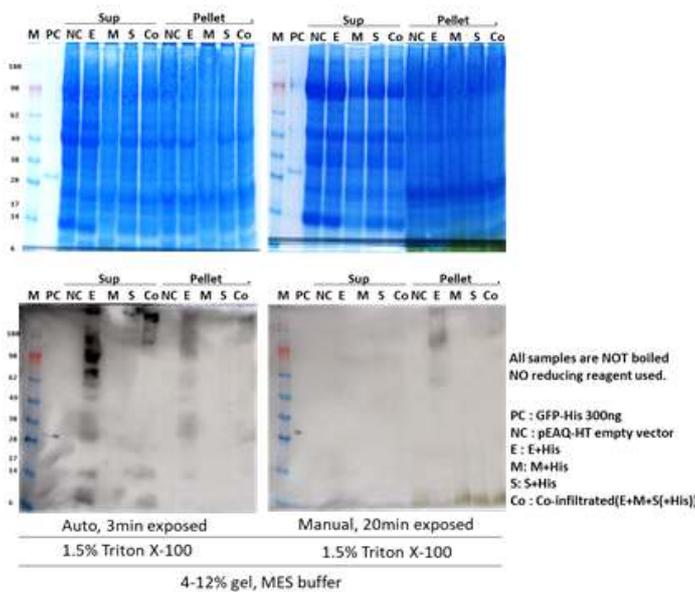


그림3-7-105. Anti-tetraHis 항체를 이용한 E 및 S 단백질 발현 확인>

- infiltration 후 4일째까지의 발현 양상을 보기 위해 담배 잎을 수확하여 Western blot analysis를 수행한 결과, M 단백질의 경우 4일째에 성공적으로 발현됨을 확인함

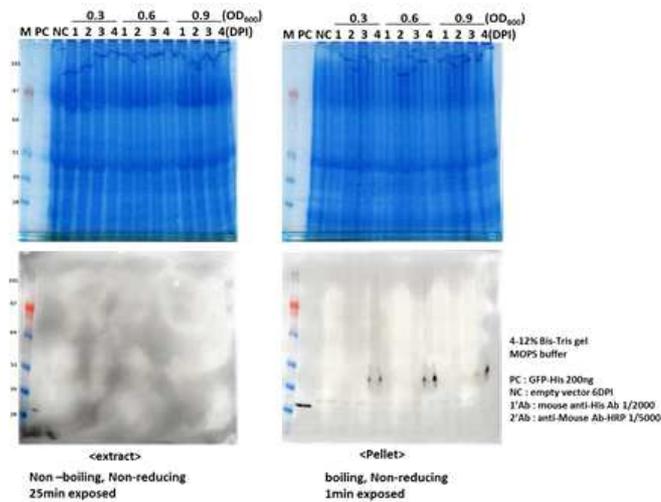


그림3-7-106. Anti-TetraHis 항체를 이용한 PEDV M 단백질의 발현 시간별 확인>

**\*7차년도 결과**

주요 연구목표

- 마우스 실험동물의 면역화를 통한 PEDV 점막백신 개발 효능 분석
- 돼지 목적 동물의 면역화를 통한 PEDV 점막백신 개발 효능 분석

세부 연구내용

- target 항원 및 마우스 **점막 면역 유도** 및 반응 분석: S1D-PIGS의 점막 백신 개발 가능성을 위한 연구 (마우스 면역화 및 유도 특성 분석)

연구결과

- S1D-PIGS의 마우스 면역화: 6차년도에 항원 단백질의 구조 및 *in vitro* 기능을 검증하였으므로 이후 정제 단백질을 마우스에 비강 또는 주사/비강 혼합접종 방법으로 마우스에 면역화 실험을 수행함(그림 107)
- 면역화 그룹: PBS 대조군 및 S1D-PIGS 실험군
- 접종량: 30 µg 항원량을 개체별 일회 투여분으로 하되, 면역증강 효과 비교를 위하여 10 µg의 QuilA를 면역보조제로 사용함
- 면역화 방법: 1회 피하주사 priming/2회 비강 접종 boosting 또는, 3회 피하주사/비강접종
- 총 3회 면역화 후 sampling 하여 면역 유도 능력을 분석함

Group	Immunization	S1D-mPIGS dose ( $\mu\text{g}$ )	Adjuvant (10 $\mu\text{g}$ )
PBS	1 피하주사/2 비강	-	-
1	3 피하주사	30	QuilA
2	3 비강	30	QuilA
3	1 피하주사/2 비강	30	QuilA

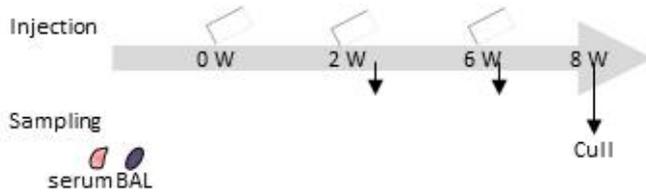


그림3-7-107. 주사 및 비강 접종법에 의한 면역화 스케줄>

- 결과, 3회 주사 접종했을 때 가장 높은 항원 특이적 Serum IgG를 유도하였고, saponine과 함께 3회 비강 접종해도 IgG 항체가 유도됨(그림 108)
- 중요하게도, saponine과 함께 1회 주사접종 후 2회 비강 접종했을 때 IgG뿐만 아니라 기관지 세척액으로부터 IgA 항체도 유도됨으로써 호흡기 질환인 PEDV 점막 백신 개발 가능성을 고무 시킴(그림 109)

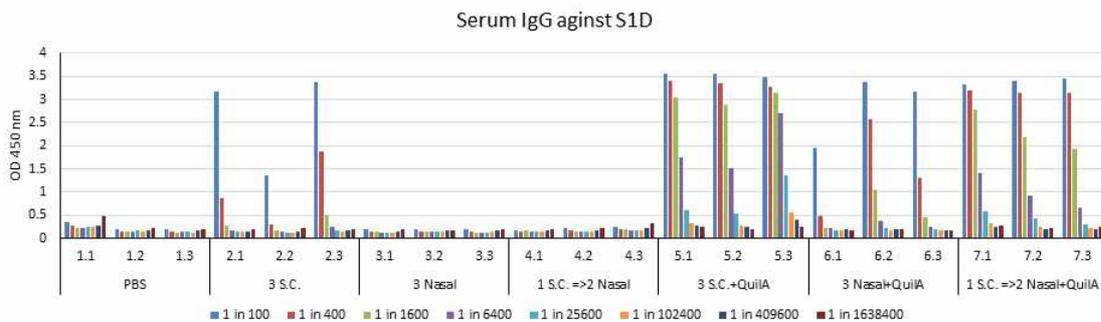


그림3-7-108. 마우스 면역화 후 serum IgG 항체 유도 분석>

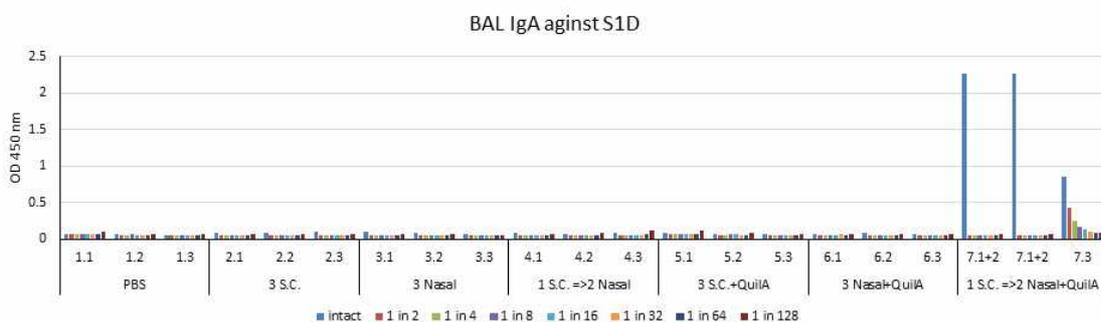


그림3-7-109. 마우스 면역화 후 BAL IgA 항체 유도 분석>

- 세포매개성 면역반응 분석: S1D-PIGS 단독 및 QuilA와 혼용하여 면역화시킨 그룹의 마우스로부터 splenocytes를 분리하여 항원으로 자극한 뒤 분비된 사이토카인을 분석함
- 그 결과, PBS 면역화 그룹과 비교하면 S1D-PIGS 단독 또는 QuilA와 혼용 그룹에서 INF-g, IL4 및 IL-10이 뚜렷하게 증가되었고 상대적으로 적은 양의 IL-2을 분비함을 알 수 있었음(그림 110)

- 이로써, S1D-PIGS에 의해 균형있는 T cell 반응(Th1/Th2)이 유도됨을 확인함
- 또한, S1D-PIGS가 항원-제시세포에서 발현되는 공동 자극 단백질 CD40에 결합하는 것을 확인 함으로써 항원제시세포를 활성화시킬 수 있음을 검증함(그림 111)

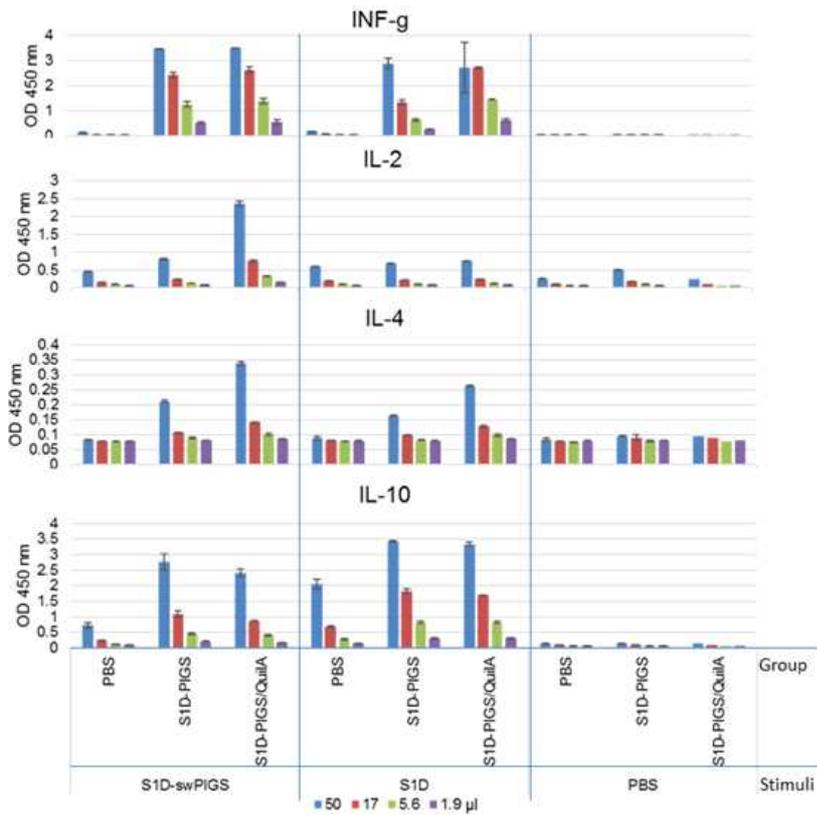
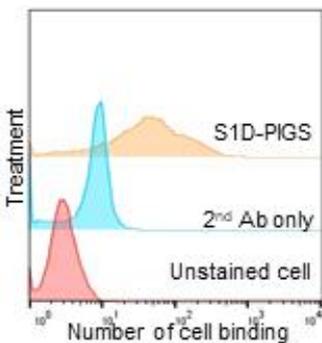


그림3-7-110. 항원 자극으로 분비된 사이토카인 분석>



CD40 staining in J774 cells (5 μg/ml)

그림3-7-111. CD40 결합을 통한 S1D-PIGS의 항원제시세포 활성화 능력 검증>

세부 연구내용

- S1D-swPIGS 생산의 산업화를 위한 최적화 연구

연구결과

- signal peptide 부분이 절단에 대한 computational analysis: (그림 112)와 같이 signal peptide 부분이 절단됨을 분석함

Predicted proteins

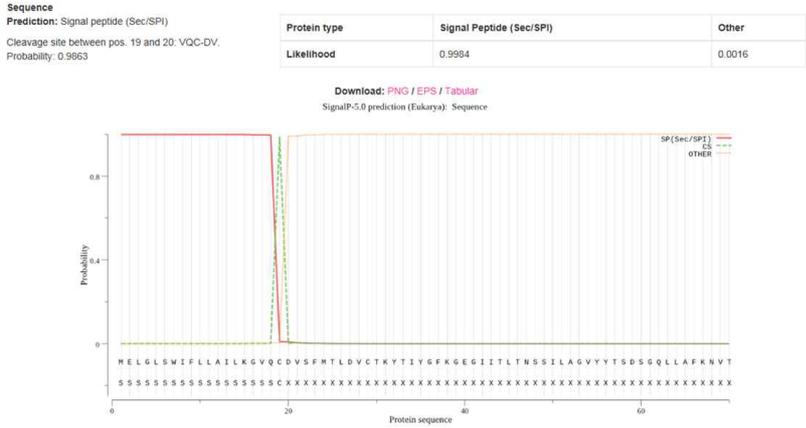


그림3-7-112. signal peptide 절단이 예상되는 부위 분석>

- N-glycosylation에 대한 computational analysis:(그림 113)과 같이 9개의 N-glycosylation이 예측되는 부분을 확인함

Name: Sequence Length: 412

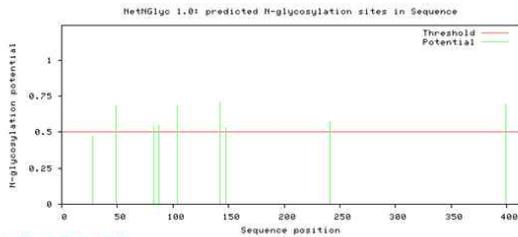
```

DVSFMTLDVCTKYTIYGFKGGEGIIITLNSSILAGVYVTS DSGQLLAFKNVTLSNSITFNTRELPGFFYHSNDGNSCTEPFLVLYSNIGVCKSGSIOYVFSQYQVKIAPTGTGNSIPIFNFSMSIATTRKVD
LSNSITFNTRELPGFFYHSNDGNSCTEPFLVLYSNIGVCKSGSIOYVFSQYQVKIAPTGTGNSIPIFNFSMSIATTRKVD
KRVGIRHQPTCPICPGCEVAGPVSFIFFPFKPDTLMIQTPEVTCVVVDVSRHAEVQFSMYVDGVEVHTAETRPKEQF
NSTYRVVSLPIQSDWLEKGEFKRNNVDLPAPITRTLSKAIQGSREPVVTLPPFAEELSRSKVTLTCLVIQFPYPPD
IEVWKSNGPPEFENTYRTTFEQVDGTFPLYSKLAVDKRWDBDREKAVMHEALNHTYKSIKTYQKRPFLXNVS
SIVLSDASTCY
    
```

.....N..... 80  
 ..N..N.....N.....N.....N..... 160  
 ..... 240  
 N.....N..... 320  
 ..... 400  
 ..... 480

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	28	NSSI 0.4743	(5/9)	-
Sequence	49	NPTS 0.6844	(9/9)	++
Sequence	83	NSTP 0.5390	(6/9)	+
Sequence	87	NNTR 0.5499	(6/9)	+
Sequence	104	NCTE 0.6882	(9/9)	++
Sequence	142	NISE 0.7103	(9/9)	++
Sequence	148	NFSM 0.5301	(6/9)	+
Sequence	241	NSTY 0.5794	(7/9)	+
Sequence	399	NVSL 0.6904	(9/9)	++



Graphics in PostScript

그림3-7-113. N-glycosylation이 예측 분석>

- 산업화를 위한 담배세포 형질전환: 선행연구에서 확립한 세포 헌탁배양의 대량 생산조건을 활용하기 위하여 돼지 버전의 S1D-swPIGS 유전자를 담배세포에 형질전환 시킴
- 형질전환체 선발: 형질전환 추정 재분화 담배 식물체를 항생제 배지에서 1차 선발하여 genomic DNA를 수행하여 선발함
- 단백질 추출물을 이용한 항원 단백질 발현 분석: Western blot analysis 수행한 결과, (그림 114)와 같이 발현을 확인하고 #14, 18, 19, 22, 30을 cell line으로 선발함

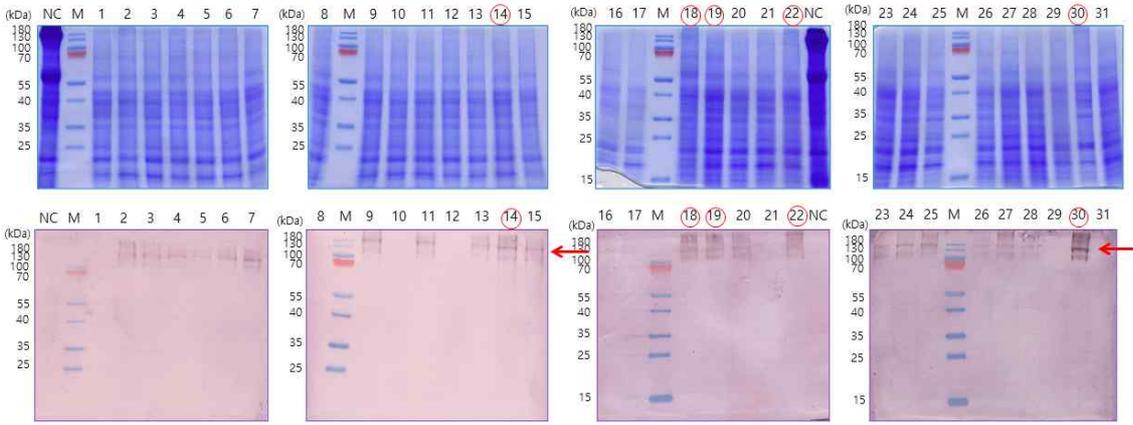


그림3-7-114. Western blot analysis에 의한 단백질 발현 확인 및 고발현 세포주 선발>

- 상기 cell line의 형질전환 식물체로부터 세포 현탁배양을 위한 callus를 유도하고 종자확보를 위해 식물체의 순화 과정을 거쳐 토양 재배를 함(그림115)

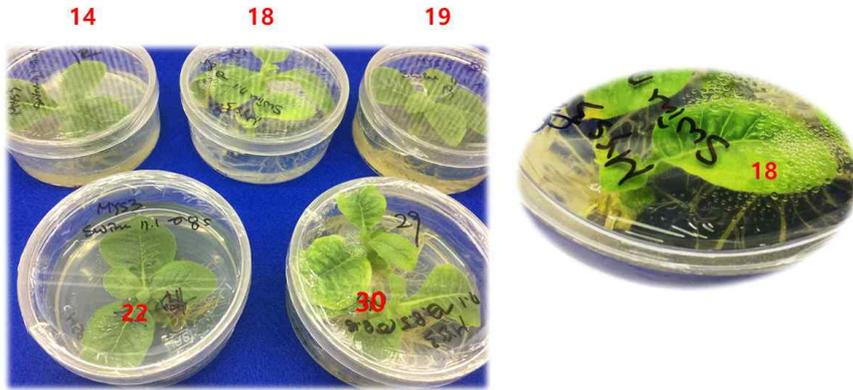


그림3-7-115. 선발된 형질전환 재분화 식물체 및 callus 유도 line>

- 그림3-7-116. PEDV infiltration을 하기 위해 재배한 *N. benthamiana*



그림3-7-117. PEDV infiltration한 후의 *N. benthamiana*

세부 연구내용

- S1D-swPIGS의 돼지 면역화를 위한 시료 준비

연구결과

- 상기 식물세포로부터 단백질 정제: 돼지 목적 실험을 위하여 proteinA affinity chromatography 방법을 이용하여 총 5mg의 항원을 정제함 (그림 118)



Figure 1.

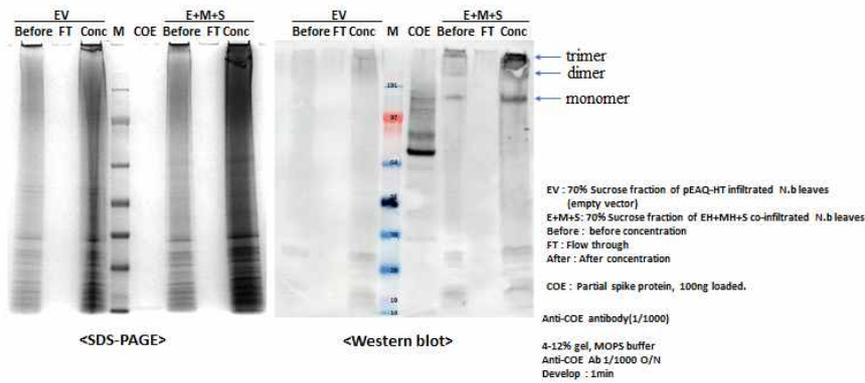
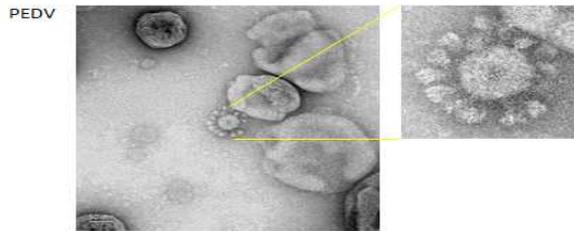


Figure 2.



- PEDV 항원의 돼지 면역화를 위한 시험

연구결과

- PEDV 항원 단백질이 발현되는 싼캘러스를 경구 접종하여 분만자돈을 평가함
- 경구접종: 8마리의 분만 5주전 모돈을 4 그룹으로 2마리 씩 나누어 표1과 같이 PEDV 단백질을 발현한 싼캘러스 및 일반 싼캘러스와 경구용 백신을 투여함. 싼캘러스 또는 백신 투여 전(0d)과 분만 3주 전(14d) 또는 분만 1주 후(42d)에 총 3회에 걸쳐 전 모돈에서 채혈을 실시하고 분만 직후 모든 모돈에서 초유를 채취함

표1. 임신모돈에 대한 평가물질 경구 투여

그룹	개체 수	처치
Vaccine	2	일반 경구용 PED 백신을 분만 5주 및 3주 전 2회 급여
Wild	2	분만 5. 4. 3주 전에 일반 싼캘러스 3회(110g/회) 급여
V733	2	분만 5. 4. 3주 전에 V733 발현 싼캘러스 3회(110g/회) 급여
V110	2	분만 5. 4. 3주 전에 V110 발현 싼캘러스 3회(110g/회) 급여

- 분만자돈 평가: 40마리의 포유자돈을 전북대 동물실험축사에서 평가물질 투여 그룹 별로 10마리씩 4개의 돈방에 나누어 사육하고 2일 후 모든 포유자돈에 PEDV의 RNA가  $1 \times 10^6$  copies/ml로 검출되도록 PBS로 희석한 장내용물을 자돈당 1 ml씩 경구투여함. PED 바이러스 투여 전(0d)에는 혈액과 분변을, PED 바이러스 투여 후 3, 5, 7일에는 분변을 채취하고 바이러스 투여 10일 후에 생존한 모든 포유자돈을 안락사한 후 부검을 실시함
- 그 결과, 모돈에 백신 또는 PEDV 단백질 발현 싼캘러스를 경구 투여한 후 2주 후에 PEDV 특이 항체가가 검출되기 시작하였으며 경구 투여 6주(42d) 후에 백신과 V110 투여 모돈의 항체가가 특히 계속 증가하는 것으로 보였고 V733 투여 모돈은 2주에 가장 높은 수준의 항체가를 보인 후 6주에도 비슷한 수준의 높은 항체가를 보여 전체 그룹 중에서 가장 높은 수준의 PEDV 특이 항체가가 검출됨(그림 116, 좌)

- 이와 유사하게 V733를 투여한 모돈에서 채취한 초유에서 가장 높은 수준의 PEDV 특이 항체가 검출되었고 백신과 V110을 투여한 모돈의 초유에서는 서로 비슷한 수준의 항체를 보였고 일반 싯켈러스를 투여한 모돈(Wild 그룹)과 비교해서 높은 수준의( $p < 0.05$ ) 항체를 보임(그림 120, 우)

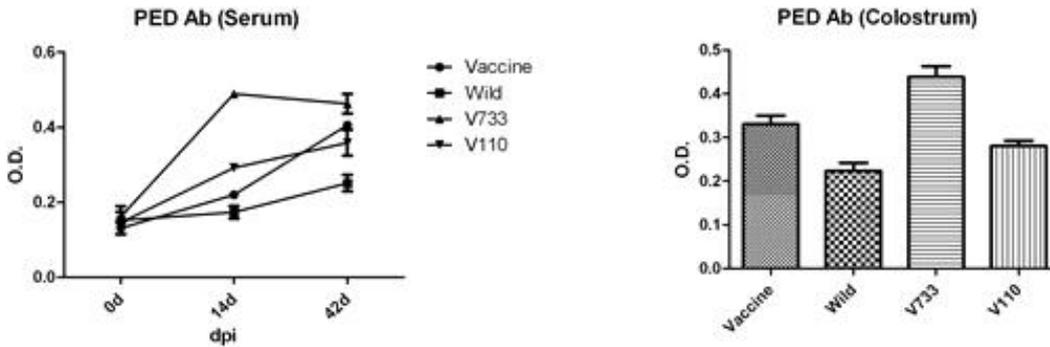


그림3-7-120. 모돈의 경구 투여 전 후 serum IgG항체가(좌) 및 초유의 항체가(우)

- 분만자돈의 PED 공격접종 후 임상증상: PEDV 공격접종 2일 후부터 설사하는 개체들이 관찰되기 시작하였고 3일에는 모든 그룹의 자돈들에게서 설사가 관찰되었고 실험이 종료된 10일까지도 설사가 지속됨
- 분만자돈의 PED 공격접종 후 폐사율: 실험이 종료된 10일 이전까지 일반 싯켈러스 급여 그룹(Wild그룹)의 자돈 중 7마리가 폐사 되어 70%의 폐사율을 보였으며 백신그룹과 V733그룹에서는 각각 4마리의 자돈이 폐사하여 40%의 폐사율을, V110그룹은 5마리의 폐사가 관찰되어 50%의 폐사율이 관찰되었는데, Wild과 V110 그룹의 자돈의 폐사가 3일부터 지속적으로 관찰되는 반면 백신과 V733 그룹은 5일 후에 대부분의 폐사가 집중되는 양상을 보임
- 분만자돈의 PEDV 공격접종 후 분변의 PEDV 배출량 측정: 채취한 분변에서 RNA를 추출하여 정량 RT-PCR로 PEDV의 RNA를 검출한 결과 3일까지는 모든 자돈에서 약  $10^6$  copies/ml의 RNA가 검출되었고, V733 그룹은 공격접종 5일 후에  $10^5$  copies/ml 전 후의 RNA가 검출되어 약간의 감소가 관찰되다가 7일에는  $10^2$  copies/ml의 PEDV RNA가 검출되어 비교 그룹 중 가장 낮은 PEDV의 배출이 관찰됨. V110그룹 또한 7일에  $10^4$  copies/ml 전 후의 RNA가 검출되어 백신과 Wild그룹과 비교해 다소 낮은 수준의 PEDV의 배출이 관찰된 반면 백신과 Wild그룹의 자돈에서는 7일까지도  $10^5$  copies/ml 전 후의 RNA가 검출되어 5일의 배출량( $10^6$  copies/ml) 보다 바이러스 배출이 다소 감소되었으나 여전히 높은 수준의 바이러스 배출이 관찰됨(그림 121)

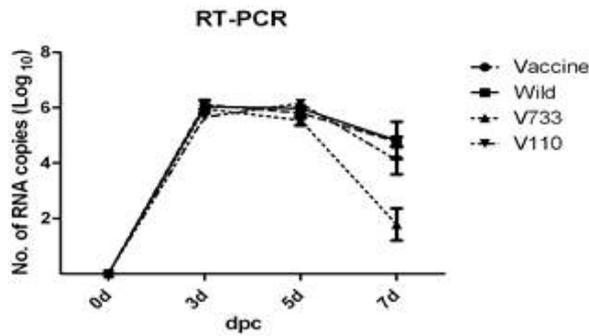


그림3-7-121. 분만자돈의 PEDV 공격접종 후 분변의 PEDV 배출량>

- 분만자돈의 PEDV 특이 항체가 측정: V733그룹의 자돈들에게서 가장 높은 수준의 항체가가 검출되었으며 Wild그룹과 백신 및 V110그룹과 비교하여서도 유의성 있는 ( $p < 0.05$ ) 높은 수준의 PEDV 특이 항체가가 검출되었으며, V110과 백신그룹은 서로 유사한 수준의 PEDV 특이 항체가가 관찰되었고 Wild그룹과 비교하여 유의성 있는 ( $p < 0.05$ ) 높은 수준의 항체가가 검출됨(그림 122)
- 분만자돈의 PEDV 공격접종 후 부검 결과: 폐사돈을 포함한 모든 그룹의 자돈에서 소장외 전 반적인 용모 상실이 관찰되었고 PEDV 특이적인 수양성 설사를 보이는 것으로 관찰되었으며 그룹간의 유의성 있는 병변의 차이는 관찰되지 않음(그림 123)

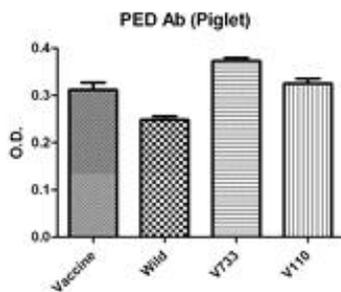


그림3-7-122. 분만자돈의 PEDV 특이 항체가>



그림3-7-123. 분만자돈의 소장에서 PEDV 특이 병변 관찰>

#### 세부 연구내용(위탁과제 수행내용)

- PEDV 예방 효능 검정을 위하여 challenge test를 통한 S1D-swPIGS의 돼지 접종 실험

#### 연구결과

- 마우스 동물실험 결과(그림 107 ~ 110)로 점막 백신 개발 가능성을 확인고 목적 동물인 돼지실험에서 효능이 확인(그림 120 - 123)되었다. 따라서 목적 동물인 돼지에서 S1D-swPIGS를 백신접종하고 challenge test를 통하여 PEDV예방 효능을 검정하는 야외시험을 수행 중임
- 돼지 확보 및 접종: 돼지를 3 그룹으로 나누어 대조군(PBS주사), S1D-swPIGS PEDV 항원 단백질, 현재 시판되고있는 PEDV백신(중앙백신)을 2주간격으로 주사후 2주 후에 challenge test를 통하여 면역반응과 PEDV에 대한 방어능을 확인함

⑧(전) 제 1-2 세부과제: 천연물 식의약소재 작용기전 및 전문인력양성 체계구축

- 식의약 소재 관련 전공 교과목 개발 및 전공개설 준비
  - 1-1 세부과제와 공조하여 관련 교과목을 개발하였고, 전공 개설 신청함.
  - 2016년에 전공 개설 목표
  -

표3-7-1. 기존 교과목 중 활용될 천연물 식의약 소재 전공 교과목

교과목 명	과목 설명
실험통계학	식품영양학에 관련된 통계기법에 대한 지식을 습득한다. 정규분포, 상관관계, 분산·분석 등의 내용을 포함한다.
연구방법론	연구 계획을 위한 문헌고찰, 연구 설계와 연구 결과의 해석, 보고서 및 논문 작성, 발표하는 방법을 학습한다.
식품생화학	식품의 주요 성분인 탄수화물, 지질, 단백질과 관련된 식품가공 중 생화학적인 변화를 공부한다.
식품물성학	식품 재료의 물성적 성질의 정의, 분석, 측정에 대하여 공부한다.
식품첨가물학	식품의 품질과 가공에 관련된 식품첨가물의 유래, 분류, 기능에 대하여 공부한다.
식품저장학	열처리, 화학적 처리 등의 식품저장 방법에 대한 이론을 공부한다.
식품탄수화물학	이 과목은 탄수화물 대사와 해당 작용, 시트르산 회로, 당신생, 글리옥실산 대사과정, 펜토스 인산 대사과정, 시토크롬 시스템을 포함하는 생물학적 분자들의 분자구조와 기능을 다루게 될 것이다.
식품단백질학	식품단백질의 화학 및 물리적 성질, 분포, 기능, 변성 그리고 독성 및 영양품질에 관하여 공부한다.
식품가공학	식품가공에 관한 주요 관심사에 대하여 토론한다.
식품유지학	유지의 구성 및 구조 와 식품에 있어서의 물리적 및 화학적 성질을 공부한다.
식품문제연구	식품학의 특정 주제를 토의한다.
식품향미화학	식품가공 및 저장 중 직면하게 될 향미 화학적 문제를 해결하기 위해 향 추출법, 분석법 및 정량법을 배우고, 식품향의 생성기작 및 화학적 변화에 대해 강의한다.
건강기능식품학	건강기능식품의 원리, 기능성 성분들의 화학, 만성질환감소의 역할, 건강기능식품의 개발에 대하여 공부한다.
식품화학	식품의 가공, 저장, 제조와 이에 관련된 영양적, 관능적 품질 및 안전성에 관여하는 화학적 반응과 물리적 현상에 관한 열, 햇빛, 산소, 수분활성도의 영향 등의 기초 와 개념을 학습한다.

표3-7-2. 천연물 식의약 소재 전공 신규 교과목

교과목 명	과목 설명
연구방법론	연구 계획을 위한 문헌고찰, 연구 설계와 연구 결과의 해석, 보고서 및 논문 작성, 발표하는 방법을 학습한다.
식품관련법규	<b>식품의 원료, 가공, 공중보건, 환경 등 식품에 관련된 국내외법과 건강기능식품법 등을 공부한다.</b>
기기 분석학 특론	초고속액체크로마토그래피(HPLC), 적외선 분광학(IR), 자외선분광학, 질량분석법(MS) 및 핵자기 공명분광학(MR) 등 기기분석의 원리를 이해하고 식품 및 동, 식물 분석에서의 활용방법을 습득한다.
식품 마케팅	식의약산업의 신기술, 기술개발동향, 시장전망 및 분석 등 식의약 관련 개발, 제조, 유통산업의 동향에 대한 전반적인 지식을 습득한다.
식품 독성학	식품 및 천연자원의 독성물질과 이들의 성질, 작용현상 및 기전에 대하여 학습한다.
천연물소재개발	천연물 식의약 소재 개발에 필요한 전반적인 연구 분야에 대한 과목으로 식의약품 개발, 분석법 개발, 품질관리 등에 대한 최근 연구동향 및 천연물 식의약 소재 개발 현황을 조사, 분석함으로써 천연물 식의약 소재 개발에 응용할 수 있도록 한다.
약물 전달체학	약물전달시스템에 의한 조직을 재생하는 원리와 방법 및 사용되는 물질/소재에 대해 알아보고 효과적인 약물 전달시스템을 설계하고 개발할 수 있도록 학습한다.
의과학 총론	과학적인 접근 방법에 의한 의학의 기본개념을 습득하고 분자 의과학, 바이오 나노과학, 융합생명정보과학과 관련된 분야별 특성을 파악한다.
미용기능식품학	시대적, 사회적 변천에 따른 미용 과학 분야의 확대 및 발전에 부응하기 위해 기본적 미용 내용을 이해하고, 미용에 대한 기본지식을 습득한 후 식품과의 연관성에 대하여 학습한다.
특허법	특허법의 목적을 시작으로 발명의 요건 침해와 소송까지 특허 제도의 전반적인 내용을 학습한다.
마케팅	<b>Marketing의 기본적인 개념과 지식을 올바르게 이해하는 학문적 이론과 국내외 마케팅 적용 사례를 살펴봄으로써 기업의 마케팅 활동에 대한 전반적인 이해를 도모하고자 학습목표와 방향을 갖고 학습한다.</b>

## 대학원 교과목 개설 제안신청서

식품영양학과 식의약소재 전공

시행시기: 2015 학년도 학기부터

※교과목표에 아님 경우 세무연구 반드시 기재

(한국)교과목명	연구방법론	교과목번호			
(영문)교과목명	Research Planning	이수구분 (○표기)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
학점 / 시간	( 3 )학점 ( 3 )시간	강좌유형 (○표기)	강의( ),	연구( )	실험/실습( ), 실기( )
<b>교 과 목 해 설</b>					
국 문	연구 계획을 위한 문헌고찰, 연구 설계와 연구 결과의 해석, 보고서 및 논문 작성, 발표하는 방법을 학습한다.				
영 문	This course deals with literature review, experiment design and for research planning and interpretation(discussion), preparation of paper(report and/or thesis) and presentation of the research results.				

+ 영문교과목해설은 필수사항임

※ 교육과정표에 등재될 신규교과목에 해당될(연구지도교목은 "OO세미나1" 과목만 기록)

학 인	전 입 교 원							
	주임교수	정윤화	문헌경	김우경	장혜자	김미숙	이영순	김기람

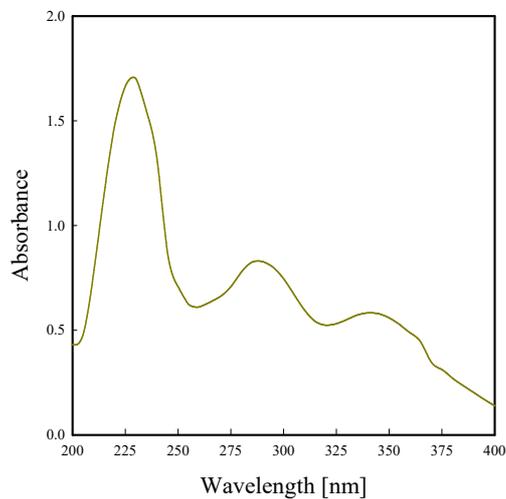
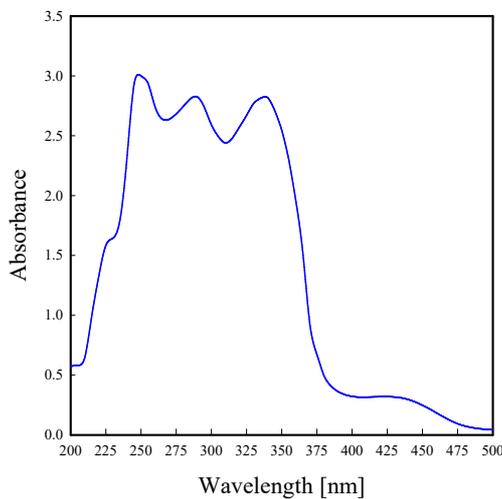
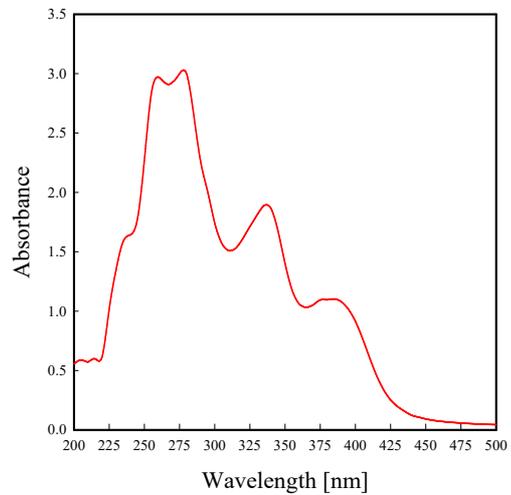
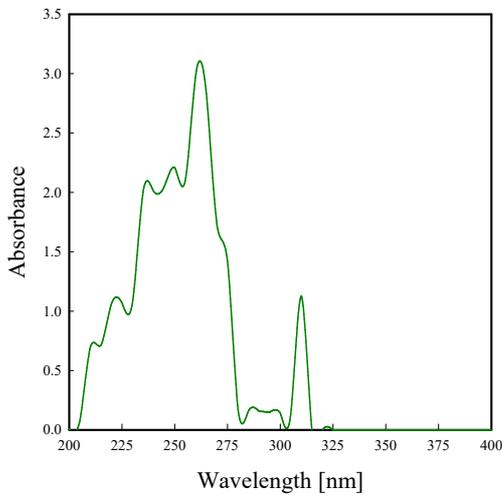
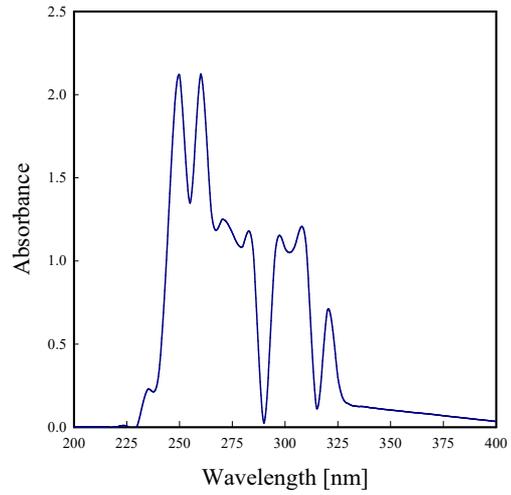
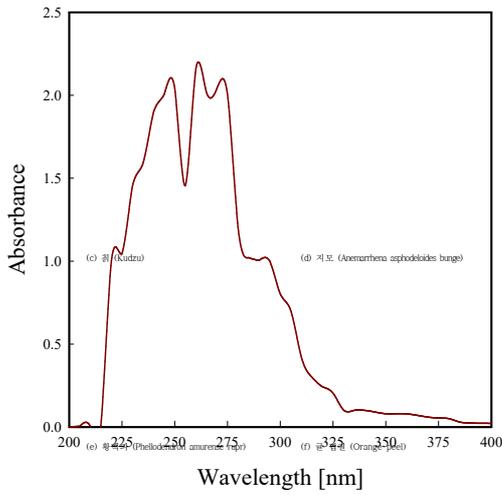
식품영양학과 주임교수 : 정 윤 화 (서명)

대 학 원 장 귀하

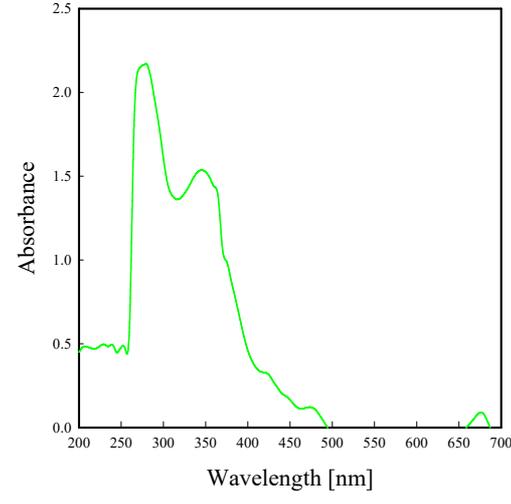
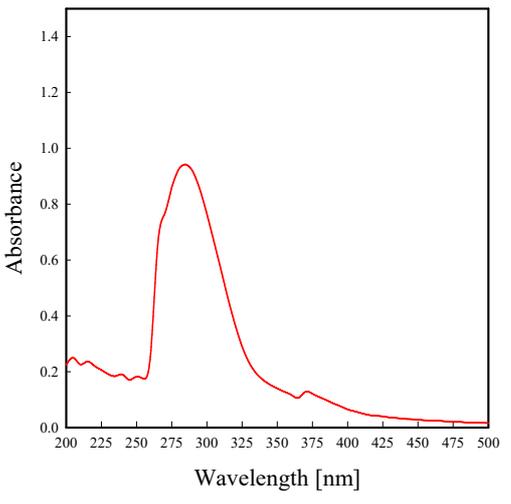
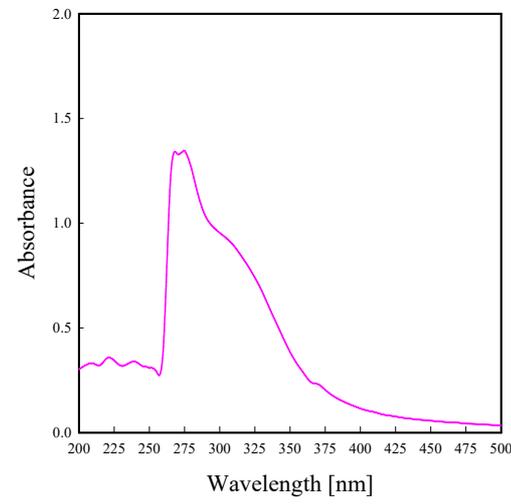
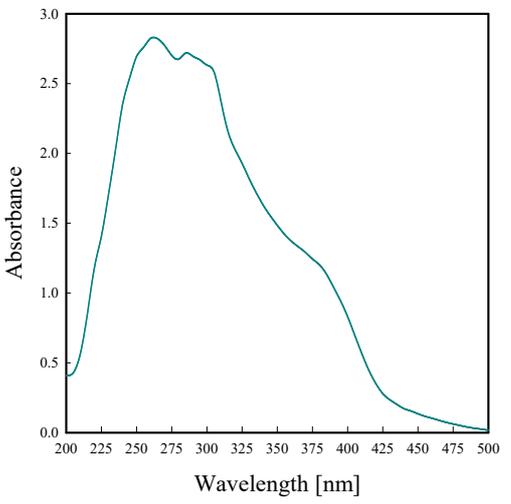
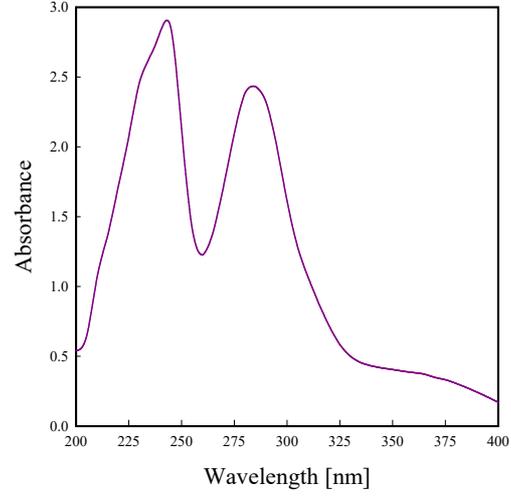
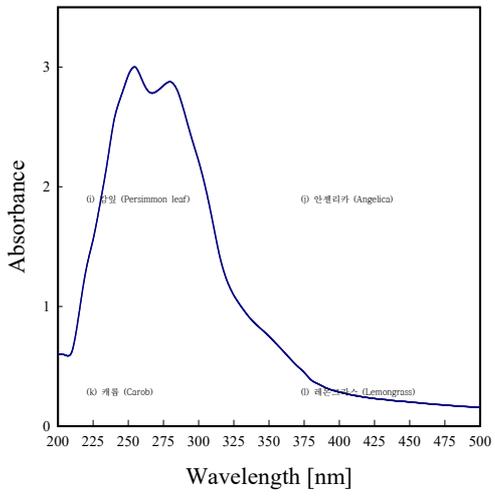
- 식의약 소재 관련 연구
  - *Momordica charantia* L. 발효물의 기능성
  - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*로 발효한 결과 항산화 물질들과 항산화 활성을 높이고, 탄수화물 분해 효소인  $\alpha$ -amylase 와  $\alpha$ -glucosidase에서 억제 활성을 확인함.
- 기술이전
  - 식의약 소재 관련 연구로 출원한 특허 1건 기술이전 협의 중
  - 여성 호르몬 조절 질환의 예방, 치료 또는 개선용 약학 조성물 및 식품용 조성물 (출원번호 10-2014-0028980)
  - 1차년도 종결 전 협의 완료할 예정임
- 인력양성 및 취업
  - 박선영: ㈜다인소재의 생활건강사업부/연구원
  - 서유진: 식품의약품안전처/연구원

⑨(전) 제 1-4 세부과제: 천연물 최적화 추출 공정 확립

○ 천연유용물질 중 기능성 성분 분석 (UV Spectroscopy)

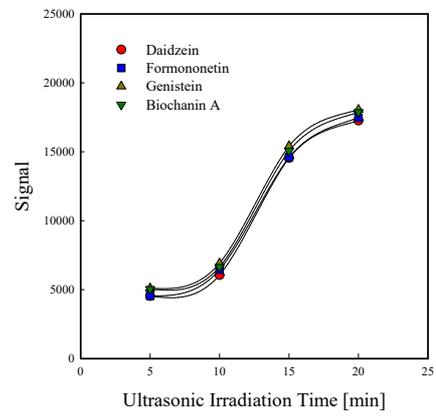
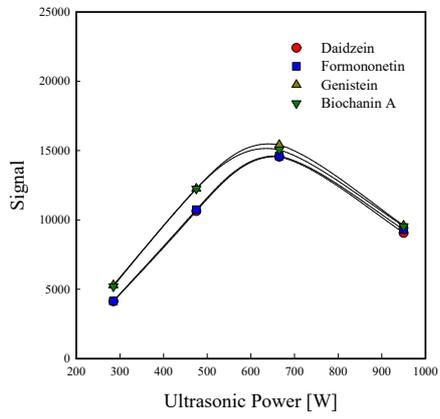
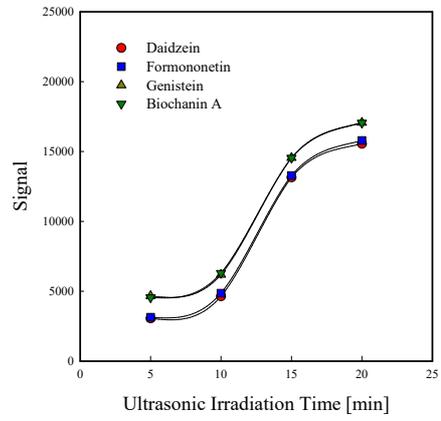
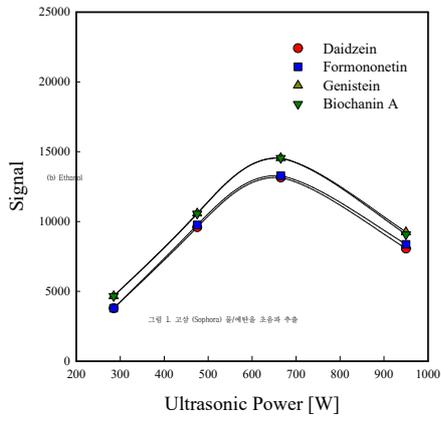


(

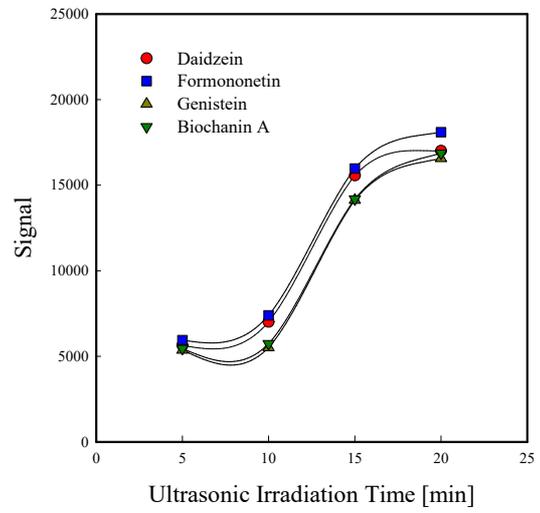
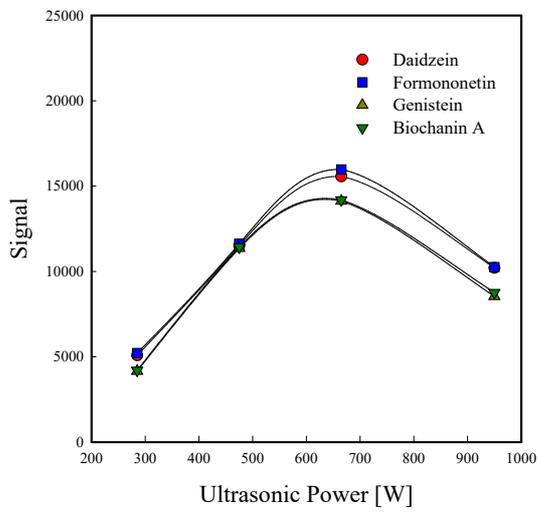
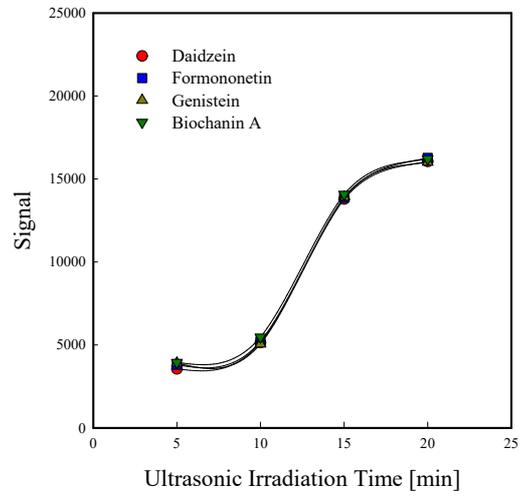
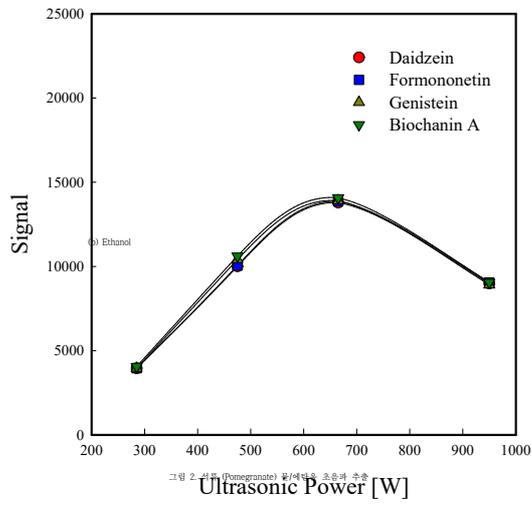




(a) Water



(a) Water



(a) Water

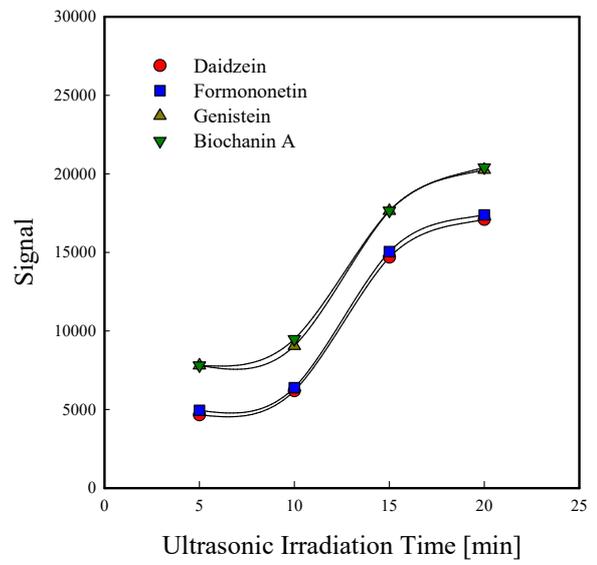
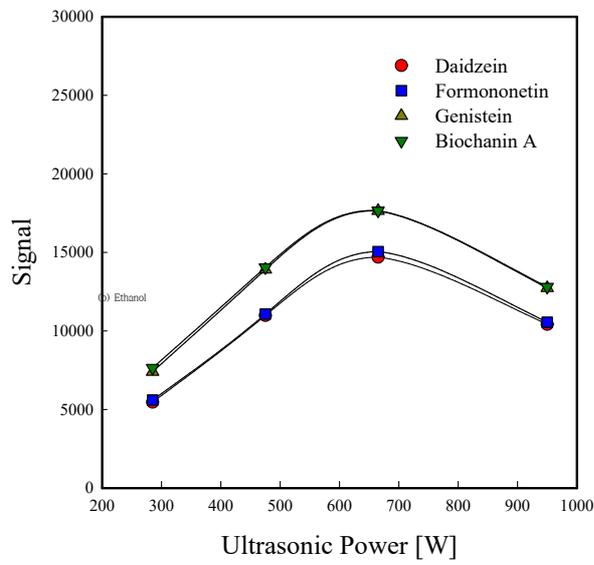
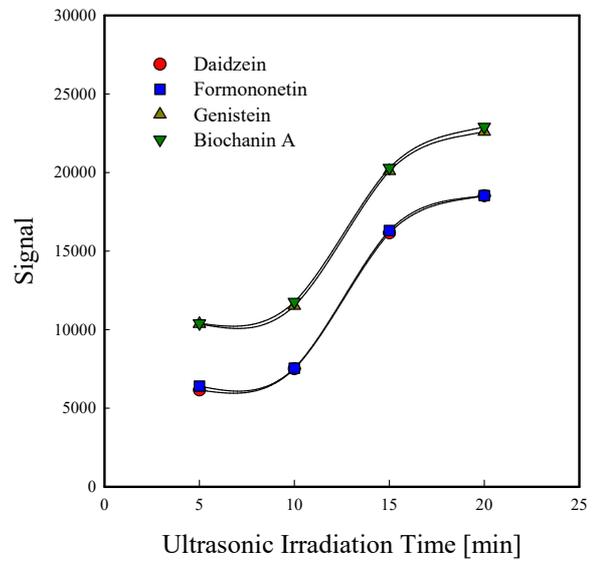
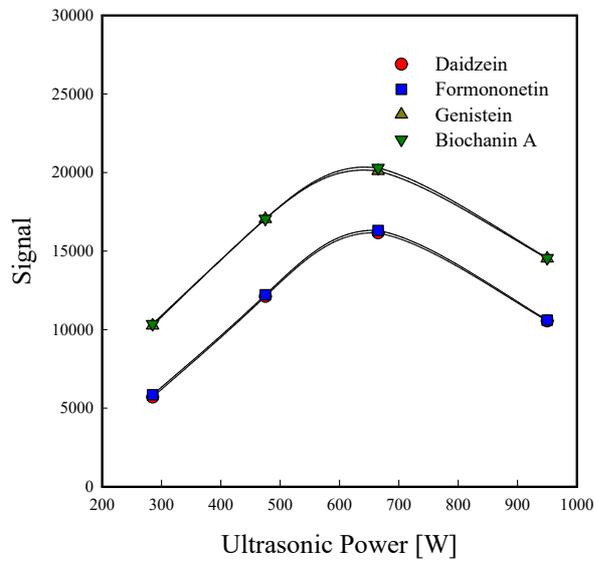


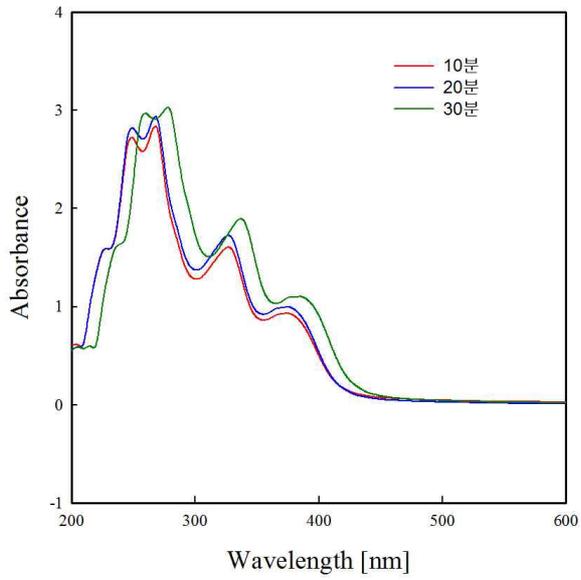
그림 3. 쉐 (Kudzu) 물/에탄올 초음파 추출



## 2) 고온추출법 (마이크로웨이브 에너지를 이용한 추출법)

- 마이크로웨이브는 센티파라고도 하며, 파장이 센티미터 단위로 불리는 전자파의 일종임. 마이크로웨이브를 정확하게 구분하기는 힘들지만 대략적으로 1000 MHz에서 30 GHz까지의 전자파를 가리키며, 개방회로의 사용이 불가능하여 도파관을 통해서만 전달이 가능한 경우를 마이크로웨이브라 함. 마이크로웨이브는 2차 세계대전 중에 레이더로서 널리 이용되었지만 이를 유전체의 가열에 응용하기 시작하면서 식품, 고무, 목재, 제지 등의 여러 분야에 응용되어 왔음. 마이크로웨이브를 이용한 용매추출은 기존의 용매추출과도 유사하지만 다만 가열방식이 마이크로웨이브에 의해 이루어짐. 용매추출 공정 중 혹은 공정 전에 마이크로웨이브를 이용하면 용매 안에서 시료가 직접 가열이 되고 또한 온도 변화가 급격히 일어남. 특히 시료내의 수분이 가열되어 수증기가 발생되며, 수증기 puffing 효과에 의하여 시료 내의 조직이 파열됨. 이와 같이 조직의 파괴에 의하여 용질의 이동거리가 짧아지고 확산저항이 감소하여 추출효율이 향상됨. 따라서 마이크로웨이브 용매추출의 장점으로서는 용매 사용의 최소화, 에너지의 절약, 그리고 공정시간의 단축에 따른 시간의 절약 효과 등을 들 수 있음.
- 대기압 하에서 용매는 마이크로웨이브를 잘 투과시켜야 함. 이때 투과된 에너지는 피조사체인 시료성분과 함유하고 있는 수분에 조사되어 온도가 상승하고 주위의 용매는 낮은 온도로 유지되어 냉각효과와 성분의 분리를 용이하게 할 수 있음. 마이크로웨이브 가열에 관련된 온도 특성 및 마이크로웨이브 흡수 특성이 규명될 수 있도록 함.
- 마이크로웨이브 에너지를 이용한 고온추출법
  - 마이크로웨이브 에너지의 효과를 알아보기 위하여 마이크로웨이브 조사장치는 (주)선일아이라의 마이크로웨이브 반응시스템을 사용함. 마이크로웨이브 조사장치는 2450 MHz의 주파수로 최대 630 W의 마이크로웨이브 에너지를 조사할 수 있음. 마이크로웨이브 반응기의 압력은 대기압으로 유지하였으며, 불균일한 가열을 막기 위하여 반응기는 내부에서 회전판을 이용하여 회전시킴. 마이크로웨이브 반응기는 마이크로웨이브의 투과율이 높은 teflon perfluoroalkoxy의 재질로 이루어진 안쪽 몸체와 polyetherimide로 만들어진 외체로 구성되어 있음. 용매추출과 마찬가지로 n-hexane을 추출용매로 사용하여 추출물을 추출하며, 조사된 마이크로웨이브 power는 325~585 W로 30분 동안 추출함. 추출된 추출물은 진공증류 (vacuum distillation)에 의해 추출용매와 분리함.

(a) Water



(b) Ethanol

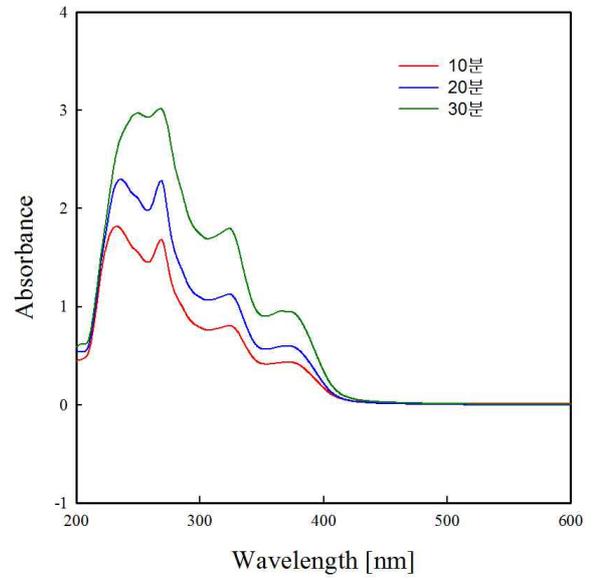
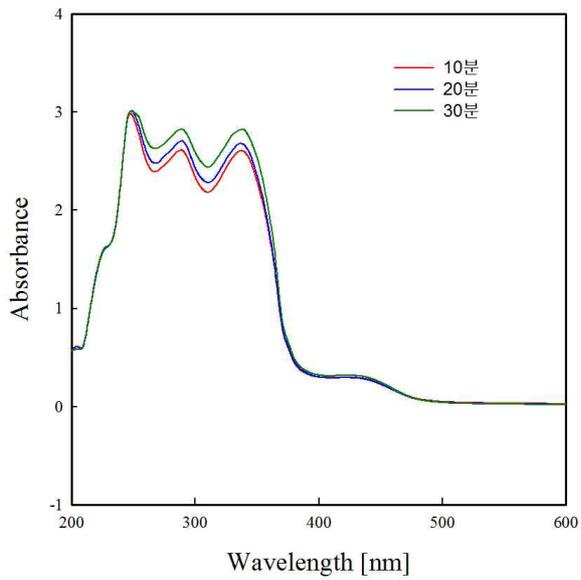


그림3-9-4. 지모 물/에탄올 시간에 따른 마이크로웨이브 추출

(a) Water



(b) Ethanol

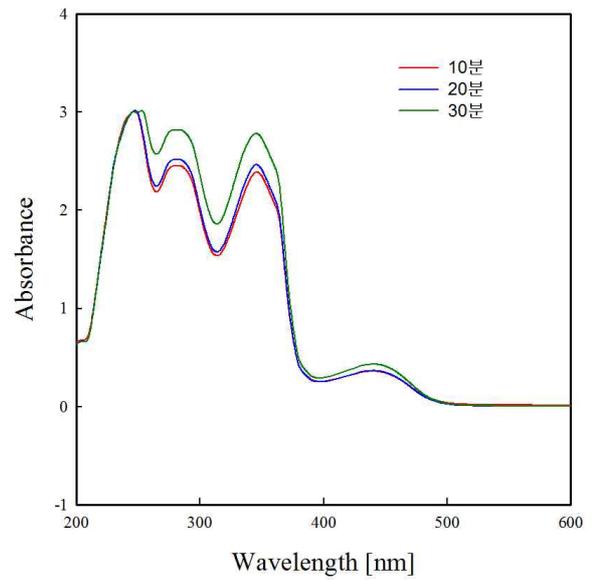
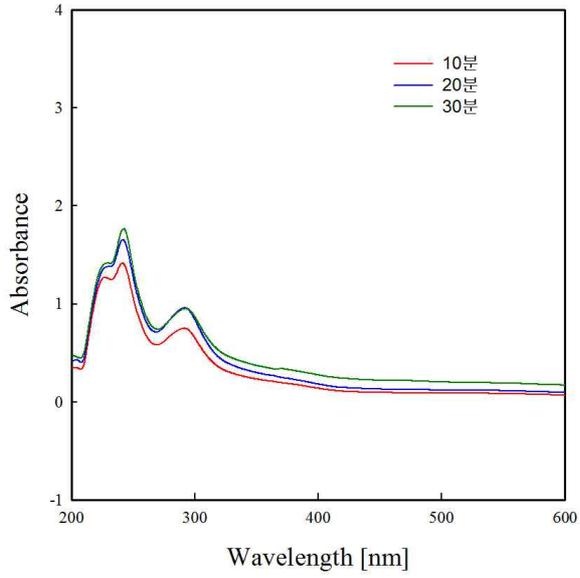


그림3-9-5. 황백피 물/에탄올 시간에 따른 마이크로웨이브 추출

(a) Water



(b) Ethanol

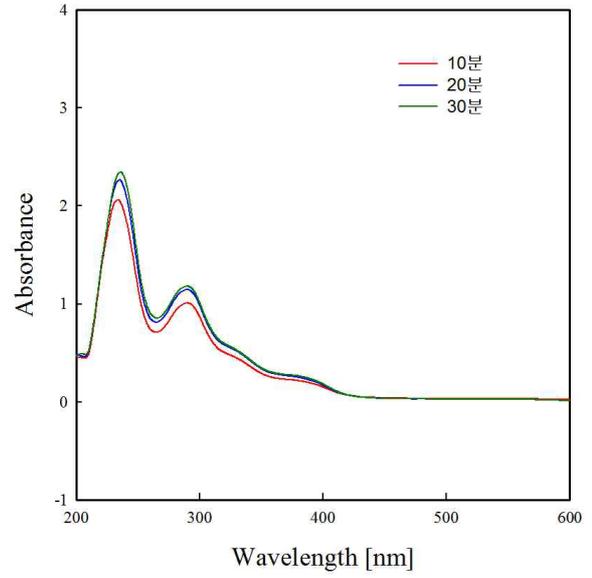


그림3-9-6. 크랜베리 물/에탄올 시간에 따른 마이크로웨이브 추출



그림 3-9-7. 초음파 장치



그림3-9-8. 마이크로웨이브 장치

○ 천연유용물질 중 기능성 분석

	Extract [mg/g]	ORAC	DPPH	FRAP	Phenol	Flavonoi d
안젤리카	83	5.28	40.79	185.00	34.87	0.48
케롭	540	1.72	49.11	132.50	12.06	-
뉴그린	253	0.21	3.37	12.50	1.60	-
레몬그라스	324	4.75	53.89	259.33	20.55	2.61
건조 밀싹	275	1.25	6.48	41.83	3.51	-

⑩(전) 제 2-4 세부과제: 비노기건강과 탈모개선 전임상 및 기전연구

비노기건강 개선 및 치료 천연물 식의약 소재의 전임상 효능 평가

전립선건강 건강기능식품 소재 개발을 위한 소재 선별

1차 screening결과 선택된 아드레날린 수용체와의 결합 억제능 시험 (Adrenergic alpha 1A receptor ligand binding assay kit, cisbio) : 최종 2종 선별

선별소재로부터 testosterone 유도 전립선비대증 동물모델에서의 유효성 검토

실험동물 : Wistar rat (10주령, male)

전립선비대증 유도 : 고환적출술 시행 후 testosterone 10 mg/kg 피하주사

양성대조군 : Finasteride 10 mg/kg

군 설정 (군당 최소 6마리)

표 3-10-1. 비노기건강 전임상 실험군 설정

No.	Group	전립선비대증 유도
1	Sham control	No
2	Control	Yes
3	Positive control	
4	선별소재 Low dose	
5	선별소재 Middle dose	
6	선별소재 High dose	

**6주 후 전립선 무게 측정 및 조직병리 검사**

탈모개선 식품 소재개발을 위한 소재 선별

1차 선별된 천연식물자원 소재로 부터 Human hair dermal papilla (HHDPc) 및 human keratinocyte (HaCaT) cell에서의 세포 증식능 평가 : 최종 2종 선별

선별소재로부터 hair 제거 동물모델을 활용한 전임상 효능 규명

실험동물 : C57BL/6 mouse (6주령, male)

C57BL/6 mouse는 생후부터 모든 모낭이 모발성장주기의 성장기로 들어가 털이 자라기 시작하였다가 생 후 약 3주경 휴지기로 전이된 다음 바로 2차 성장기로 접어들며, 6-8 주경 다시 모든 모낭이 휴지기로 전이되어 약 4주간 이상 지속되므로 실험물질의 효과를 평가하기 위한 시간적 여유가 있다는 장점이 있음  
소동물용 clipper를 이용하여 털을 깎은 후 시중에 판매되는 제모제를 이용하여 각 군의 등쪽 피부에 도포 하여 털을 완전히 제거한 후 흐르는 물로 남은 제모제를 수세

양성대조군 : 5% minoxidil

군 설정 (군당 최소 6마리)

연차별 결과

○ 탈모 억제 및 개선에 대한 천연물 소재의 효능 평가

탈모는 최근 환경 및 스트레스 영향에 의해서 성별, 연령에 상관없이 발생하는 증상으로 양모제, 육모제, 탈모방지제, 발모제 등의 용어로 그 효능 및 효과의 범위에 따라서 화장품, 의약품, 의약품 등으로 분류하여 그 효능을 승인받을 수 있음. 탈모의 경우 다양한 제제, 제형으로 적용 가능하기 때문에 그 적용 기준을 다양하게 해서 C57BL/6 마우스를 이용하여 모발 성장기 유도 효과 평가, 퇴행기 억제 효과 평가 등을 거쳐서 최적의 제제제형을 선정하고 임상 효능 평가를 단계적이고 체계적으로 평가하고 인정받게 됨.

탈모는 아직까지 개별인정 사례가 없는 기능성이지만 노화, 스트레스 등 다양한 원인에 의해 발생하는 증

상으로서 사전에 예방과 진행의 억제가 가능하고 해외에서는 이미 탈모, 양모에 도움이 되는 다수의 소재가 개발되어 관련 제품들이 다양한 형태로 판매되고 있음. 따라서 최초 개별인정 소재의 연구개발 전문성과 경험을 통해 과학적/ 의학적 검증과정과 풍부한 임상 결과 축적을 통해서 국내외 기능성 인정을 받을 수 있도록 진행해야함.

이에 본 연구 과제를 통하여 탈모개선 식품 소재 개발 및 유효성 평가를 진행하고자 하였음.

○ 탈모개선 식품 소재개발을 위한 소재 선별

소재 선별을 위한 천연물추출물의 발모 및 육모 효능 결과

C57BL/6 마우스의 등 부위를 제모여 hair 제거 동물모델을 유도한 후 천연물 추출물을 2주동안 도포하여 발모 및 육모의 효능을 평가함. 18종 천연물 추출물 중 발모 효과가 우수한 4종을 선정하였음

No.	약명	Efficiency rate
1	<i>Medicago sativa</i> L.	+++
2	<i>Phryma leptostachya</i> var. <i>asiatica</i>	+++
3	<i>Impatiens textori</i> var. <i>textori</i>	++
4	<i>Lindera obtusiloba</i> Blume var. <i>obtusiloba</i>	++
5	<i>Euonymus japonicus</i> Thunb	++
6	<i>Euonymus sachalinensis</i> (F. Schmidt) Maxim	+
7	<i>Larix kaempferi</i> (Lamb) Carriere	++
8	<i>Indigofera pseudotinctoria</i> Matsum	++
9	<i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai	+++
10	<i>Aster yomena</i> (Kitam.) Honda	++
11	<i>Acer pictum</i> subsp. <i>mono</i> (Maxim.) Ohashi	++
12	<i>Potentilla cryptotaeniae</i> Maxim.	++
13	<i>Pimpinella brachycarpa</i> (Kom.) Nakai	++
14	<i>Symplocarpus nipponicus</i> Makino	+++
15	<i>Cornus controversa</i> Hemsl. ex Prain	++
16	<i>Picrasma quassioides</i> (D.Don) Benn	++
17	<i>Acer barbinerve</i> MAX	++
18	<i>Youngia sonchifolia</i>	+

한약재 추출물의 발모 및 육모 효능 결과

C57BL/6 마우스의 등 부위를 제모여 hair 제거 동물모델을 유도한 후 한약재 추출물을 2주 동안 도포하여 발모 및 육모의 효능을 평가함. 52종 천연물 추출물 중 발모 효과가 우수한 13종을 선정하였음

No.	학명	Efficiency rate
1	<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	++
2	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.	+
3	<i>Euphorbia kansui</i> Liou ex Wang	++
4	<i>Dalbergia odorifera</i> T. Chen.	+
5	<b><i>Castanea crenata</i> Sieb. et Zucc.</b>	+++
6	<i>Mucunae Caulis</i>	+++
7	<i>Angelica tenuissima</i> Nakai	++
8	<i>Viscum album</i> L. var. <i>coloratum</i> Ohwi	++
9	<i>Caragana sinica</i> (Buchoz) Rehder	++
10	<i>Agastache rugosa</i> (Fisc.r et Mey.) Kuntze	++
11	<b><i>Sophora japonica</i> L.</b>	+++
12	<i>Dianthus chinensis</i> L.	+
13	<i>Chrysanthemum zawadskii</i> var. <i>latilobum</i>	+
14	<b><i>Euonymus alatus</i> Sieb.</b>	+++
15	<i>Selaginella tamariscina</i> Spring	+
16	<i>Euphorbia fischeriana</i> Steudel	+
17	<i>Phragmites communis</i> Trinius	+
18	<b><i>Fructus Liquidambaris</i></b>	+++



Con 1 2 3 4 5



6 7 8 9 10



11 12 13 14 15



16 17 18 Minoxidil

No.	학명	Efficiency rate
19	<i>Vespaee Nidus</i>	++
20	<b><i>Aloe</i></b>	+++
21	<b><i>Althaea rosea</i> Cavanil</b>	+++
22	<i>Echinops setifer</i>	+
23	<i>Campsis grandiflora</i>	-
24	<b><i>Cirsium japonicum</i> De Candole</b>	+++
25	<i>Isatis indigotica</i> Fort	++
26	<i>Benincasa hispida</i> Cogriaux	++
27	<i>Malva verticillata</i> Linne	++
28	<i>Gordyceps sinensis</i> Sacc	++
29	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv	+
30	<i>Portulaca oleracea</i> Linne	-
31	<b><i>Verbena officinalis</i> Linne</b>	+++
32	<b><i>Ephedra sinica</i> Stapf</b>	+++
33	<i>Gossypium nanking</i> Meyen	++
34	<i>Chaenomeles sienesis</i> Koehne	+
35	<i>Hibiscus syriacus</i> Linne	-
36	<i>Equisetum hyemale</i> Linne	-



Con 19 20 21 22 23 24



21 22 23 24 25 26 27 28



29 30 31 32 33 34 35 36 Minoxidil

No.	약명	Efficiency rate
37	<i>Aucklandia lappa</i> Decne	++
38	<i>Buddleja officinalis</i> Maximowicz	+
39	<i>Sinimanium acutum</i> Rehder et wilson	++
40	<i>Diospyros kaki</i>	+
41	<b>Litharge</b>	+++
42	<b>Scutellaria barbata</b> D. Don	+++
43	<i>Chelidonium majus</i> Linne	++
44	<i>Bletilla striata</i> (Thunberg) Reichenbach fil	++
45	<i>Pulsatilla koreana</i> Nakai	++
46	<i>Ampelopsis japonica</i> Makino	++
47	<b>Aconitum Koreanum</b> Raymond	+++
48	<i>Lilium</i>	+
49	<i>Oldenlandia diffusa</i>	+
50	<b>Psoralea corylifolia</b> Linne	+++
51	<i>Poria cocos</i> Wolf	+
52	<i>Triticum aestivum</i> Linne	+

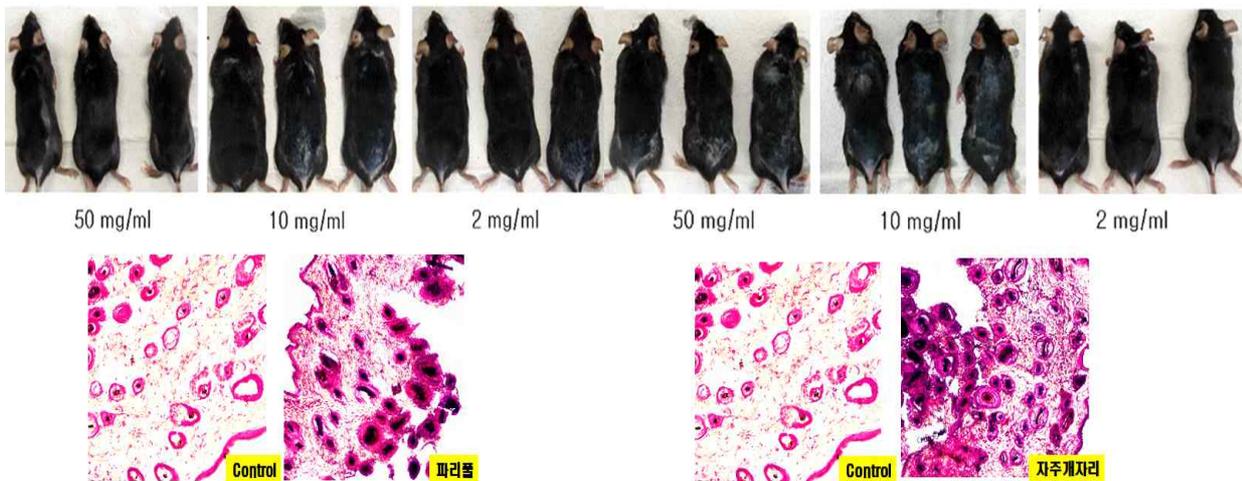
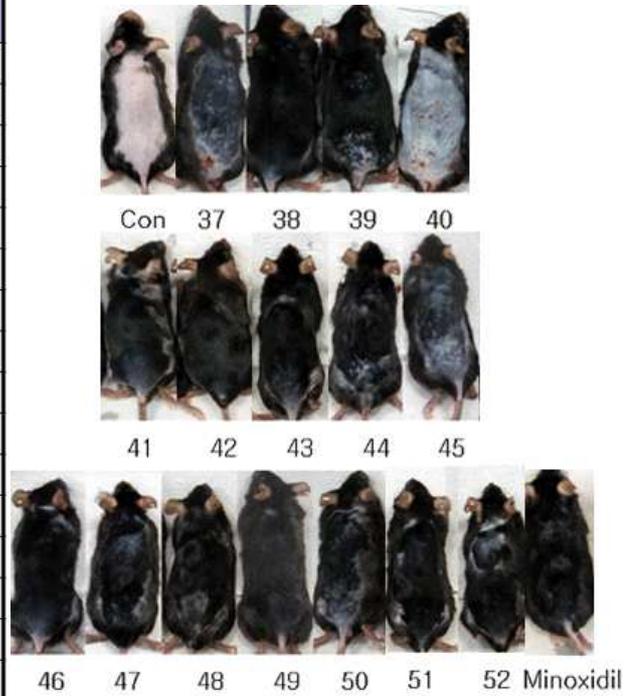


그림3-10-1. 천연물 추출물의 hair follicle 증가 효과

선정된 추출물을 저,중,고 농도별로 도포하여 발모 및 육모 효능을 평가함. 농도 의존적으로 효능이 증가하는 것이 확인됨.

#### ○천연추출물의 발모 및 육모 효능 결과

C57BL/6 mouse의 등 부위를 제모하여 hair 제거 동물모델을 유도한 후, 본 세부기관에 공급받은 천연추출물 3종을 3주간 도포한 뒤, 발모 및 육모 효능을 평가함. 양성대조군으로는 발모치료제인 Minoxidil을 도포함. 실험 결과, 3980412C 추출물을 도포한 군에서 음성 대조군 또는 다른 추출물 도포군에 비해 발모 효과가 뛰어난 것으로 확인됨.

<천연추출물의 발모 효과>

	0일차	1일차	3일차	5일차	7일차	9일차	11일차	13일차	15일차	
Control	-	-	-	-	-	-	+/-	+	+	
	-	-	-	-	-	+/-	+	++	++	
	-	-	-	-	-	+/-	+	+	++	
	-	-	-	-	-	+/-	+	++	++	
Minoxidil	-	-	-	-	+	+	++	++	+++	
	-	+/-	+	++	++	+++	+++	+++	+++	
	-	-	-	-	+	+	+	++	+++	
	-	-	-	+/-	+	+	+	++	+++	
C	-	-	-	+	+	++	++	+++	+++	
	-	-	-	+	+	++	++	+++	+++	
	-	-	-	+	+	++	++	+++	+++	
	-	-	-	+/-	+	++	++	+++	+++	
M	-	-	-	-	-	-	+	++	++	
	-	-	-	+/-	+	++	+++	+++	+++	
	-	-	-	-	-	+/-	+	+	++	
	-	-	-	-	-	+/-	+	++	+++	
T	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	
	-	-	-	-	-	+/-	+	++	++	
	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	
	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	

피부의 현미경적 소견 평가 (H&E staining) 결과, 3980412C 추출물을 도포한 군과 양성대조군(Minoxidil)은 음성 대조군(vehicle)에 비해 hair follicle의 수가 많아 보이는 것이 뚜렷하게 관찰됨

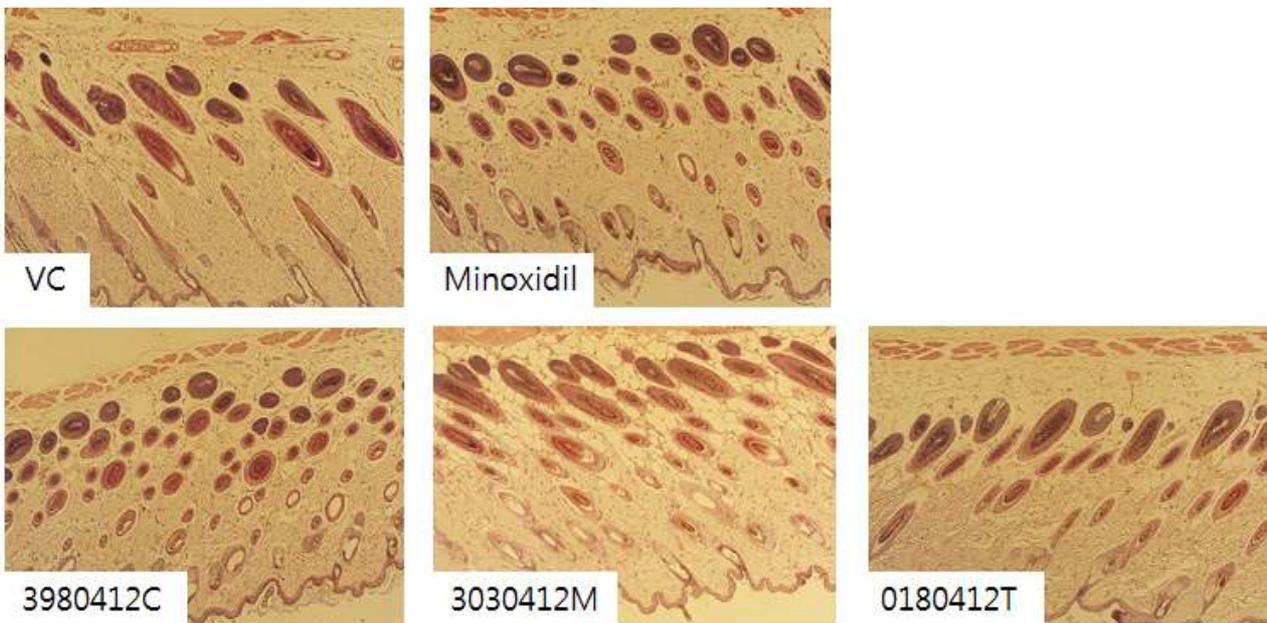


그림3-10-2. 천연물 추출물의 hair follicle 증가 효과

탈모를 예방하거나 치료하기 위해서는 세포성장인자인 EGF, VEGF 등의 발현 증가가 필요함. 따라서 천연물 추출물을 도포한 쥐의 피부를 면역조직염색법으로 분석하여 EGF 및 VEGF의 발현량을 확인함. 면역조직염색 결과, 3980412C 추출물을 도포한 군에서 EGF 및 VEGF 발현이 음성대조군과 다른 추출물 도포군에 비해 증가된 것을 확인함

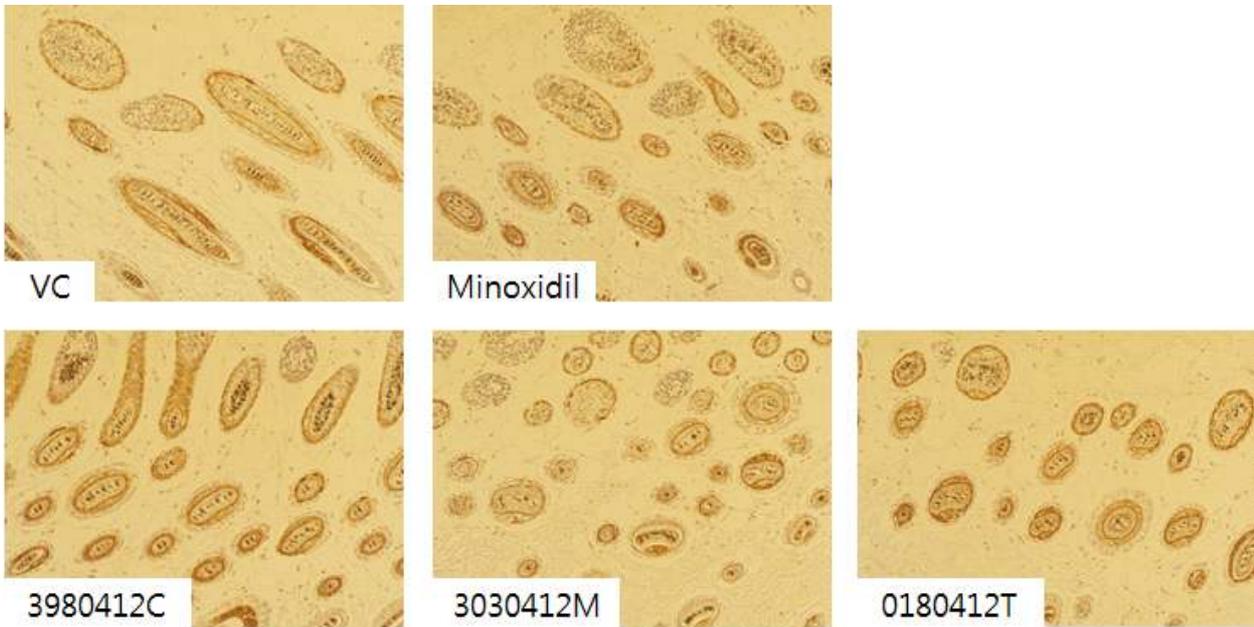


그림3-10-3. 천연물 추출물의 탈모 관련 마커 EGF 발현 증가 효과

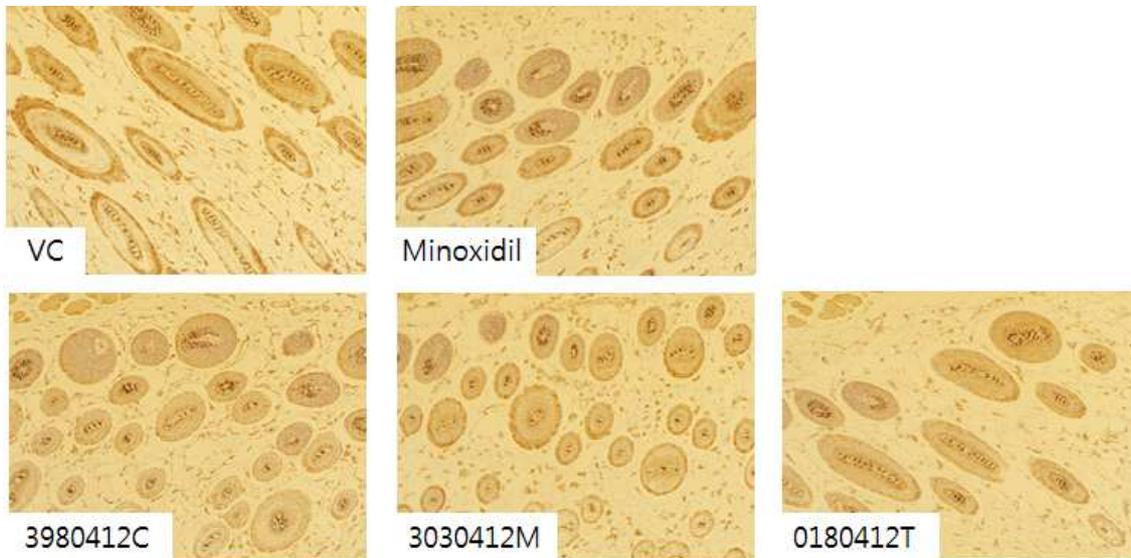


그림3-10-4. 천연물 추출물의 탈모 관련 마커 VEGF 발현 증가 효과

HHDPC cell은 피부유두세포로서 탈모 치료제 처리 시, 증식이 증가하는 것으로 알려져 있음. 따라서 선별된 2종의 추출물을 도포한 군 HHDPC cell line의 증식에 미치는 영향 확인을 통해 탈모 개선 및 치료 효능을 평가함. 실험 결과, 각 각 선별된 추출물 2종 모두 HHDPC cell의 증식을 증가시키는 효과가 있음이 확인됨.

## (2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	연도			가중치 (%)	
		1단계 (2014~2017)	2단계 (2017~2022)	계		
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	특허출원	목표(단계별)	15	9	24	0.143
		실적(누적)	24	26	50	
	특허등록	목표(단계별)	8	15	23	0.143
		실적(누적)	11	13	24	
	품종출원 등록	목표(단계별)		1	1	0.143
		실적(누적)		1	0	
	논문 (SCIE)	목표(단계별)	26	31	57	
		실적(누적)	15	24	39	
	논문 (비SCIE)	목표(단계별)	13	17	30	
		실적(누적)	4	13	17	
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	기술이전 (실시)	목표(단계별)	5	11	16	0.143
		실적(누적)	7	3	10	
	기술사업화	목표(단계별)	4	5	9	0.143
		실적(누적)	5	5	10	
	우수연구인력(박사)	목표(단계별)	10	15	25	0.143
		실적(누적)	6	5	11	
	우수연구인력(석사)	목표(단계별)	23	35	58	
		실적(누적)	38	66	104	
	전문인력채용	목표(단계별)	13	13	26	0.143
		실적(누적)	11	19	30	
계						

핵심과제별 연구개발성과표

성과지표명	연도	연도				총합
		계획	1핵심	2핵심	3핵심	
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	특허출원	24	1	42	7	50
	특허등록	23	0	17	7	24
	품종출원 등록	1	0	0	0	0
	논문 (SCIE)	57	10	16	12	38
	논문 (비SCIE)	30	17	1	0	18
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	기술이전(실시)	16	1	8	1	10
	기술사업화	9	0	5	5	10
	우수연구인력(박사)	25	4	1	6	11
	우수연구인력(석사)	58	90	4	10	104
	전문인력채용	26	0	11	19	30

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Glycyrrhiza glabra L. Extract Inhibits LPS-Induced Inflammation in RAW Macrophages	Journal of Nutritional Science and Vitaminology	Chunmei Li	61(5)	국외		SCIE	2015-12-04	1881-7742	100
2	Nicotine in High Concentration Causes Contraction of Isolated Strips of Rabbit Corpus Cavernosum	The Korean journal of physiology pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology	Hoai Bac Nguyen	19(3)	국내		SCIE	2015-04-30	1226-4512	100
3	Production and immunogenicity of Actinobacillus pleuropneumoniae ApxIIA protein in transgenic rice callus	Protein Expression and Purification	Mi-young Kim	-16	국외		SCIE	2016-05-20	s1046-5928	100
4	Production and immunogenicity of Actinobacillus pleuropneumoniae ApxIIA protein in transgenic rice callus	Protein expression and purification	Kim, M.Y	132	국외		SCIE	2016-05-20	1046-5928	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
5	Expression and assembly of cholera toxin B subunit and domain III of dengue virus 2 envelope fusion protein in transgenic potatoes	Protein Expression and Purification	Mi-Young Kim	-16	국외		SCIE	2016-06-19	S1046-5928	100
6	Synthesis and assembly of dengue virus envelope protein fused to cholera toxin B subunit into biologically active oligomers in transgenic tomato (Solanum lycopersicum)	Plant biotechnology reports	양문식	10	국외		SCIE	2016-06-28	1863-5466	100
7	The effect of air flow in coffee roasting for antioxidant activity and total polyphenol content	Food control	곽한섭	71	국외		SCIE	2016-07-01	0956-7135	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
8	Immunogenicity of an S1D epitope from porcine epidemic diarrhea virus and cholera toxin B subunit fusion protein transiently expressed in infiltrated <i>Nicotiana benthamiana</i> leaves	Plant Cell, Tissue and Organ Culture	Nguyen-Xuan Huy	127(2)	국외		SCIE	2016-08-23	1573-0544	100
9	Zinc induces LPS-mediated upregulation of HBD-2 via ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in human prostate epithelial cells	ANIMAL CELLS AND SYSTEMS	Min Su Kim	20(6)	국외		SCIE	2016-11-01	2151-2485	100
10	AMACR polymorphisms are associated with prostate cancer risk and aggressiveness in a Korean study population	International Journal of Clinical and Experimental Pathology	Jun-Hyun Han	9(12)	국외		SCIE	2016-12-30	1940-5901	33
11	Production of recombinant human acid $\alpha$ -glucosidase with high-mannose glycans in <i>gnt1</i> rice for the treatment of Pompe disease	Journal of biotechnology	Jae-Wan Jung	249	국외		SCIE	2017-03-29	0168-1656	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
12	Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coffee Extracts with Different Roasting Levels	Journal of medicinal food	Soo Han Jung	20(6)	국외		SCIE	2017-04-17	1096-620X	100
13	Distinct Histone Modifications Modulate <i>DEFB1</i> Expression in Human Vaginal Keratinocytes in Response to <i>Lactobacillus</i> spp.	Probiotics and antimicrobial proteins	이재혁	9(4)	국외		SCIE	2017-05-15	1867-1306	100
14	Epigenetic suppression of the anti-aging gene <i>KLOTHO</i> in human prostate cancer cell lines	Animal cells and systems	서민규	21(4)	국외		SCIE	2017-06-22	1976-8354	100
15	<i>Mammea longifolia</i> Planch. and Triana Fruit Extract Induces Cell Death in the Human Colon Cancer Cell Line, SW480, via Mitochondria-Related Apoptosis and Activation of p53	Journal of medicinal food	Chunmei Li	20(5)	국외		SCIE	2017-08-24	1096-620X	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
16	Overexpression and oral immunogenicity of a dengue antigen transiently expressed in <i>Nicotiana benthamiana</i>	Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)	Nguyen-Xuan Huy	1	국외		SCIE	2017-09-30	0167-6857	50
17	Promoter DNA methylation contributes to human $\beta$ -defensin-1 deficiency in atopic dermatitis	Animal Cells and Systems	Yoo-Hun Noh	22	국내		SCIE	2018-05-24	1976-8354	100
18	Protective effect of ethanolic extract of <i>C. terniflora</i> against corticosterone-induced neuronal damage via the AKT and ERK1/2 pathway	BMB Reports	Yoo-hun Noh, Seungui Cheon	51(8)	국외		SCIE	2018-06-12	1976-6696	100
19	Improved expression of porcine epidemic diarrhea antigen by fusion with cholera toxin B subunit and chloroplast transformation in <i>Nicotiana tabacum</i>	Plant cell, tissue and organ culture	Nguyen-Quang-Duc Tien	137(2)	국외		SCIE	2018-07-23	0167-6857	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
20	Steroidogenic effects of Taraxacum officinale extract on the levels of steroidogenic enzymes in mouse Leydig cells	Animal Cells and Systems	Hyun Joo Chung	22(6)	국외		SCIE	2018-11-08	1976-8354	100
21	Ginsenoside Rb1 Enhances Keratinocyte Migration by a Sphingosine-1-Phosphate-Dependent Mechanism	Journal of medicinal food	Kyong-Oh Shin	21(11)	국외		SCIE	2018-11-15	1096-620X	100
22	MR-10 Enhances Men's Health by Improving Endogenous Male Sex Hormone Generation	Journal of medicinal food	노유현	21(12)	국외		SCIE	2018-12-12	1288-1294	100
23	The effects of MS-10 dietary supplement, mixture of Korean thistle and thyme extracts, on bone health, and symptoms in menopausal women	Journal of Functional Foods	Noh Yoo-Hun	52	국외		SCIE	2019-01-01	1756-4646	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
24	Bioactivity of Fermented Green Coffee Bean Extract Containing High Chlorogenic Acid and Surfactin	Journal of medicinal food	Boyong Kim	22(3)	국외		SCIE	2019-03-15	1096-620X	100
25	Production of recombinant human acid $\beta$ -glucosidase with high mannosetypetype N-glycans in rice gnt1 mutant for potential treatment of Gaucher disease	Protein Expression and Purification	Jae-Wan Jung	158	국외		SCIE	2019-04-01	1046-5928	100
26	Epigenetic Regulation of Filaggrin Gene Expression in Human Epidermal Keratinocytes	Annals of Dermatology	명순철	19-175	국외		SCIE	2019-12-11	2505-2521	100
27	Determining nicotine-related behavior changes in juvenile female rats through long-term maternal nicotine exposure	Behavioural pharmacology	장민지	31(1)	국외		SCIE	2020-02-01	0955-8810	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
28	Topical Application of Aronia melanocarpa Extract Rich in Chlorogenic Acid and Rutin Reduces UVB-Induced Skin Damage via Attenuating Collagen Disruption in Mice	Molecules a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry	Young Her	25(19)	국외		SCIE	2020-09-10	1420-3049	100
29	Optimization of Extraction Conditions for Antioxidant Activity of Acer tegmentosum Using Response Surface Methodology	Applied sciences	김인용	11(3)	국외		SCIE	2021-01-26	2076-3417	100
30	Physicochemical characteristics of Ethiopian Coffea arabica cv. Heirloom coffee extracts with various roasting conditions	Food science and biotechnology	김인용, 정선윤	30(2)	국외		SCIE	2021-02-01	1226-7708	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
31	Systemic and Oral Immunogenicity of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Antigen Fused to Poly-Fc of Immunoglobulin G and Expressed in ΔXT/FT Nicotiana benthamiana Plants	Frontiers in pharmacology	Nguyen-Quang-Duc Tien	12	국외		SCIE	2021-04-30	1663-9812	100
32	Systemic and Oral Immunogenicity of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Antigen Fused to poly-Fc of Immunoglobulin G and Expressed in XT/FT Nicotiana venthamiana Plants	Frontiers in Pharmacology	Nguyen-Quang-Duc Tien	13	국외	Committee on Publication Ethics	SCIE	2021-04-30	1663-9812	100
33	The Natural Substance MS-10 Improves and Prevents Menopausal Symptoms, Including Colpoxerosis, in Clinical Research	Journal of medicinal food	노유현	19(3)	국외		SCIE	2016-03-17	1096-620X	25

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
34	Effects of Phytochemicals on Blood Pressure and Neuroprotection Mediated Via Brain Renin-Angiotensin System	Nutrients	김혜린	11	국외		SCIE	20119-11-14	2072-6643	33
35	감압, 영경귀, 뉴그린으로부터 플라보노이드성분의 추출 천연물로	한국공업화학회	홍인권	27(3)	국내		비SCIE	2016-04-05	1225-0112	100
36	천연물로부터 여성갱년기 증상완화를 위한 식물성 에스트로겐의 추출 특성 천연소재	Applied chemistry for engineering	이승범	27(2)	국내		비SCI	2016-04-10	1225-0112	100
37	MS-10의 에스트로겐 수용체 조절을 통한 여성건강 증진	한국식품과학회지	노유현	45(6)	국내		비SCI	2016-06-01	1266-3311	25
38	마이크로웨이브 에너지를 이용한 안젤리카로부터 유효성분의 추출	Applied chemistry for engineering	이승범	27(3)	국내		비SCI	2016-06-01	1225-0112	100
39	소리쟁이 뿌리 추출물과 분획물의 항산화 활성	한국식품영양과학회	김인용, 이지연	47(12)	국내		비SCI	2018-12-31	1226-3311	100
40	질면조 순 추출물의 항산화 활성	한국식품영양과학회지	김인용, 지석근	48(1)	국내		비SCI	2019-01-01	1226-3311	100
41	갯기름나무 뿌리 추출물의 항산화 활성	한국식품영양과학회	김인용, 임현화	48(1)	국내		비SCI	2019-01-31	1226-3311	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
42	로스팅 조건에 따른 브라질산 Coffea arabica cv. Catuai 커피의 이화학적 특성	한국식품영양과학회지	김은경, 정윤화	48(7)	국내		비SCIE	2019-07-31	1226-3311	100
43	국내산 감자의 품종에 따른 스펀지케이크의 품질 특성	한국식품영양과학회	성희영, 여성순	48(7)	국내		비SCIE	2019-07-31	1226-3311	20
44	로스팅 조건에 따른 브라질산 Coffea arabica cv. Catuai 커피의 항산화 활성	한국식품영양과학회	김은경	48(8)	국내		비SCIE	2019-08-31	1226-3311	100
45	로스팅 조건에 따른 Ethiopian Coffea arabica cv. Heirloom 커피의 항산화 활성	한국식품영양과학회지	김은경, 송가영	48(12)	국내		비SCIE	2019-12-31	1226-3311	100
46	로스팅 조건에 따른 엘살바도르산 Coffea arabica cv. Bourbon 커피의 항산화 활성	한국식품영양과학회지	김은경, 송가영	48(12)	국내		비SCIE	2019-12-31	1226-3311	100
47	Physical and Sensory Characteristics of Sponge Cake Added with <i>Pueraria lovata</i> Extract	한국식품영양과학회지	김인용	50(2)	국내		비SCIE	2019-12-31	1226-3311	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
48	Antioxidant Activities of Colombian Coffea arabica cv. Typica Caturra Coffee Extracts with Different Roasting Conditions	한국식품영양과학회지	김은경, 송가영	49(2)	국내		비SCIE	2020-02-29	1226-3311	100
49	로스팅 조건에 따른 엘살바도르산 Coffea arabica cv. Bourbon 커피의 이화학적 특성	Korean journal of food science and technology	김인용, 정선윤	52(3)	국내		비SCIE	2020-06-30	0367-6293	100
50	Anti-inflammatory Effect of Hot Water Extracts of Acer tegmentosum Maxim Extracted Under Optimal Conditions for Antioxidant Activity on LPS-Induced RAW 264.7 Cells	한국지역사회생활과학회지	김인용	32(2)	국내		비SCIE	2021-05-24	1229-8656	100
51	Emulsifying Solution Prepared by an AI-based Drug Delivery System (AIDDS™) Enhances Bioavailability of Silymarin	Food Suppl Biomater Health	홍준기	1(2)	국외		비SCIE	2021-06-28	2765-4362	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
52	Inactivation of the xylosyltransferase and fucosyltransferase gene in rice by multiplex CRISPR/Cas9 strategy	Plant Cell Reports	S. Kim	40	국외		SCI	2021-02-06	0721-7714	60
53	YES-10 Improves Stress, Tension, and Fatigue by Reducing Cortisol and IL-6 Levels	Journal of medicinal food	Yoo-Hun Noh	25(2)	United States	Larchmont, NY : Mary Ann Liebert, Inc.	SCI	2022. 02	1096-620X	100
54	Pinus thunbergii bark extract rich in flavonoids promotes hair growth in dorsal skin by regulating inflammatory cytokines and increasing growth factors in mice	Molecular medicine reports	Young Her, Tae-Kyeong Lee	25(3)	Greece	Athens, Greece : D. A. Spandidos	SCI	2022. 03	1791-2997	100
55	A Complex of Cirsium japonicum var. maackii (Maxim.) Matsum. and Thymus vulgaris L. Improves Menopausal Symptoms and Supports Healthy Aging in Women	Journal of medicinal food	Yoo-Hun Noh, Junkee Hong	25(3)	United States	Larchmont, NY : Mary Ann Liebert, Inc.	SCI	2022. 03	1096-620X	100

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
56	The Improvement of Attention, Long-term and Short-term Memory by Brain Factor-7™(BF-7™)	Food Supplements and Biomaterials for Health	Junkee Hong	2(1)	Korea	Health Supplements Future Forum	SCI	2022. 03. 17	2765-4362	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2015한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회	Chunmei Li	2015-08-26	Alpensia Convention Center, 강원도 평창	대한민국
2	2015년 한국식품과학회 정기학술대회	Suin Park	2015-06-04	부산 벅스코	대한민국
3	2015년 한국식품과학회 정기학술대회	Yoohun Noh	2015-08-26	부산 벅스코	대한민국
4	Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology,	이재혁, 명순철	2015-05-27	Cold Spring Harbor Laboratory, USA	USA
5	ASIATOX 2015	Se Chan Kang	2015-06-25	제주국제컨벤션센터	대한민국
6	Asian Federation Of Biotechnology regional symposium 2015	양문식	2015-05-27	Universitas Indonesia, Depok, Indonesia	Indonesia
7	2014 한국공업화학회 추계 학술대회	홍인권, 이승범	2014-11-13	대구 그랜드 호텔 엑스코	대한민국
8	2015 한국공업화학회 춘계 총회 및 학술대회	박보라, 전길송, 홍인권, 이승범	2015-04-30	부산 벅스코	대한민국
9	2015 한국공업화학회 춘계 총회 및 학술대회	박소연, 김선태, 홍인권, 이승범	2015-04-30	부산 벅스코	대한민국
10	2015 한국공업화학회 춘계 총회 및 학술대회	이승민, 전길송, 홍인권, 이승범	2015-04-30	부산 벅스코	대한민국
11	2015 한국공업화학회 춘계 총회 및 학술대회	전길송, 홍인권, 이승범	2015-04-30	부산 벅스코	대한민국
12	2015 한국공업화학회 추계 학술대회	김훈기, 이승범, 홍인권	2015-11-06	제주 국제컨벤션센터	대한민국
13	2015 한국공업화학회 추계 학술대회	박보라, 이승범, 홍인권, 김형진	2015-11-06	제주 국제컨벤션센터	대한민국
14	2015 한국공업화학회 추계 학술대회	전길송, 이승범, 홍인권	2015-11-06	제주 국제컨벤션센터	대한민국
15	2015 한국공업화학회 추계 학술대회	김훈기	2015-11-04	제주 국제컨벤션센터	대한민국
16	2015 한국공업화학회 추계 학술대회	박보라	2015-11-04	제주 국제컨벤션센터	대한민국
17	한국식품과학회 국제 심포지엄	천승익	2016-08-17	대구 EXCO	대한민국
18	2015 한국공업화학회 추계 학술대회	전길송	2015-11-04	제주국제컨벤션센터	대한민국
19	한국공업화학회 2016 춘계 학술대회	전길송	2016-05-02	여수엑스포컨벤션	대한민국
20	한국공업화학회 2016 춘계 학술대회	김훈기	2016-05-02	여수엑스포컨벤션	대한민국
21	한국공업화학회 2016 춘계 학술대회	장현식	2016-05-02	여수엑스포컨벤션	대한민국
22	대한체질인류학회 59회 학술대회	노유현, 김도희	2016-05-19	경상남도 대명리조트 거제마리나	대한민국
23	대한피부연구학회 학술대회	이재혁, 명순철	2016-03-25	서울	대한민국

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
24	KSBMB International Conference 2016	이재혁, 명순철	2016-05-20	서울	대한민국
25	international society for plant molecular faming	Mi-young K.,	2016-05-25	Ghent University, in Technologiepark 927, Gent-Zwijnaarde.	벨기에
26	international society for plant molecular faming	Jung J.W, Yang M.S	2016-05-25	Ghent University, in Technologiepark 927, Gent-Zwijnaarde.	벨기에
27	international society for plant molecular faming	Tien N. Q. D., Kim M. y. and Yang M.s.	2016-05-25	Ghent University, in Technologiepark 927, Gent-Zwijnaarde.	벨기에
28	Asia-pacific conference on life Science and engineering Internationa	Sun-Hee Jang, Tae-Ho Kwon	2015-11-18	Chiang Mai, Thailand	태국
29	conference on life science and Biological engineering I2016	Sun-Hee Jang	2016-12-06	Tokyo, Japan	일본
30	한국생물공학회 춘계 학술발표대회	권태호	2016-04-20	경주화컨벤션센터	대한민국
31	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	임현화, 최영기, 천승의, 윤혜연, 김인용, 윤무원, 정윤화	2016-11-02	제주 컨벤션센터	대한민국
32	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	배영훈, 편가영, 최영기, 윤혜연	2016-11-02	제주 컨벤션센터	대한민국
33	한국식품과학회 국제 학술대회	윤혜연 김인용 윤무원 이승협 린지아이 이경화 이영승 김미숙 정윤화	2017-06-23	제주 ICC	대한민국
34	한국식품과학회 국제 학술대회	천승의 김인용 윤혜연 김요섭 손은정 이영승 김미숙 정윤화	2017-06-23	제주 ICC	대한민국
35	한국식품과학회 국제 학술대회	윤혜연 천승의 김인용 김요섭 손은정 이영승 김미숙 정윤화	2017-06-23	제주 ICC	대한민국
36	PBVAB	Nguyen-Xuan Huy 구경모, 김경운,	2017-06-21	Honolulu, Hawaii	USA
37	한국식품생명공학회	모자히드모하메드아드 난	2018-06-01	여수엑스포컨벤션 센터	대한민국
38	대한화학회 학술대회	윤성복	2018-04-19	제주	대한민국
39	대한화학회 학술대회	정재훈	2018-04-19	제주	대한민국
40	international Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology international	김인혜, 노유현, 천승의, 이승아, 김성수	2018-09-17	서울 코엑스	대한민국
41	international Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology international	천승의, 노유현, 김인혜, 이승아, 이지원	2018-09-17	서울 코엑스	대한민국
42	한국식품과학회 국제 학술대회	김보용	2018-06-27	부산 벅스코	대한민국
43	한국식품영양과학회 국제 학술대회	이승협, 최지원, 이경화, 구선영, 김인용, 윤혜연, 김보용, 정윤화	2018-11-02	부산 벅스코	대한민국
44	한국식품영양과학회 국제 학술대회	최지원	2018-11-02	부산 벅스코	대한민국
45	한국식품영양과학회 국제 학술대회	이경화	2018-11-02	부산 벅스코	대한민국
46	2019년 생화학분자생물학학회 학술대회	김인혜, 천승의, 김은혜, 김상우, 이승아, 정재훈, 노유현	2019-06-04	ICC Jeju	대한민국

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
47	한국식품과학회 학술대회	최지원	2019-06-27	인천 송도 convensia	대한민국
48	한국식품영양과학회국 제심포지엄	김나연, 김은경, 김요섭, 성기훈, 송가영, 하정현, 이영승, 정윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
49	한국식품영양과학회국 제심포지엄	김요섭, 트란카휘, 이승협, 송가영, 김인용, 하정현, 이영승, 정윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
50	한국식품영양과학회국 제심포지엄	구선영, 김은경, 이요나, 이채연, 송가영, 강권 수, 정원영, 하정현, 김 기영, 정윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
51	한국식품영양과학회국 제심포지엄	김요섭, 조성민, 트란카 휘, 이은정, 성기훈, 김 지우, 유재식, 김인용, 정윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
52	한국식품영양과학회국 제심포지엄	김요섭, 김은경, 김나연, 송가영, 손희경, 하정 현, 김미숙, 김기영, 정 윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
53	한국식품영양과학회국 제심포지엄	이승협, 송가영, 윤혜연, 김인용, 김미숙, 정윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
54	한국식품영양과학회국 제심포지엄	구선영, 김은경, 서민영, 송가영, 윤혜연, 김인 용, 김미숙, 김기영, 정 윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
55	한국식품영양과학회국 제심포지엄	최지원, 조찬희, 권유진, 서민영, 윤혜연, 손희 경, 김인용, 이영승, 정 윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
56	한국식품영양과학회국 제심포지엄	이경화, 이강민, 이채연, 윤혜연, 유재식, 강권 수, 손희경, 하정현, 정 윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
57	한국식품영양과학회국 제심포지엄	최지원, 이경화, 김나연, 윤혜연, 권유진, 강권 수, 이영승, 하정현, 정 윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
58	한국식품영양과학회국 제심포지엄	이경화, 최지원, 김나연, 윤혜연, 이영승, 하정현, 정윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
59	한국식품영양과학회국 제심포지엄	구선영, 이승협, 송가영, 김인용, 김미숙, 김요 섭, 정윤희	2019-10-23	제주 ICC	대한민국
60	2019 분자세포 생물 학회	이채은	2019-09-30	코엑스	대한민국
61	2019년 생화학분자생물학회 학술대회	주식회사 네이처센스	2019-06-04	제주 ICC	대한민국
62	한국식품과학회 학술대회	이경화	2019-06-27	인천 송도 convensia	대한민국
63	한국식품과학회 학술대회	구선영	2019-06-28	인천 송도 convensia	대한민국
64	한국식품생명공학회 정기학술대회	김경운	2019-06-13	농촌진흥청 농업과학도서관	대한민국
65	제27회 기초의학 학술대회	김인혜	2019-06-28	전북대학교 의과대학 및 간호대학	대한민국
66	한국식품영양과학회국 제학술대회	김요섭	2020-10-23	제주 ICC	대한민국
67	한국식품영양과학회 국제학술대회	이요나	2020-10-23	제주 ICC	대한민국
68	대한미뇨기과 추계학술대회	이재혁	2016-10-13	the K-hotel, seoul	대한민국
69	한국분자세포생물학회	이채은, 정현주, 이정환, 김진욱, 고기성, 명순철	2020-10-05	온라인개최	대한민국

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
70	The 1st Asian Conference for Plant-made Pharmaceuticals.	Inhwan Hwang, Julian Ma, Qiang Chen	2017-09-22	Biotech center, POSTECH(Korea)	대한민국
71	한국식품과학회국제 학술대회	Hee-Kyoung Son, Yosub Kim	2020-07-03	광주 김대중컨벤션센터	대한민국
72	식품영양과학회국제 학술대회	Hyung-Jae Lim	2021-10-28	부산 BEXCO	대한민국
73	AFOB regional Symposium 2015	T. G. Kim and M. S. Yang	2015 May 27	Depok, Universitas Indonesia	Indonesia
74	AFOB regional Symposium 2015	M. S. Yang	2015 May 27	Depok, Universitas Indonesia	Indonesia
75	AFOB regional Symposium 2016	Nguyen D. Tien and M. S. Yang	2016 Jan 28	Hue, Hue University	Vietnam
76	the 7thAFOB Regional Symposium 2016.	M.S. Yang	2016 Jan 28	Hue, Hue University	Vietnam
77	대한화학회	노유현	2015. 06. 05	부산 벅스코	대한민국
78	생화학분자생물학회	김인혜, 천승의, 김은혜, 김상우, 이승아, 정재훈, 노유현	2019. 06. 04	제주 ICC	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호
2015	데이터베이스	2015-09-04	

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	기억력 개선, 인지기능장애 및 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국	주식회사 파미니티	2015-03-12	10-2015-0034274	주식회사 파미니티	2019-02-01	10-1946818-0000	100		
2	남성 갱년기 증상의 예방 또는 개선용 조성물	대한민국	주식회사 파미니티	2015-03-18	10-2015-0037589	주식회사 파미니티	2016-05-09	10-1621072-0000	100		
3	남성 갱년기 증상의 예방 또는 개선용 조성물	일본	주식회사 파미니티	2016-03-16	P2017-535679	주식회사 파미니티	2018-03-23	p6309175	100		
4						주식회사 파미니티	2017-07-03	2017535679	100		
5	COMPOSITION FOR PREVENTING OR IMPROVING MALE MENOPAUSE SYMPTOMS	PCT	FAMENITY CO., LTD	2016.03.18	PCT/KR2016/002789	FAMENITY CO., LTD	2016.09.22	2016148545	100		
6	Filaggrin 유전자 프로모터의 메틸화 여부 검출 방법 및 이를 이용한 염증성 피부질환 진단용 조성물	대한민국	명순철	2015-05-21	10-2015-0071261	중앙대학교 산학협력단	2016-04-28	10-1618332-0000	100		

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
7	Filaggrin 유전자 프로모터의 히스톤 변형 검출 방법 및 이를 이용한 염증성 피부질환 진단용 조성물	대한민국	명순철	2015-05-22	10-2015-0071824		중앙대학교 산학협력 단	2016-01-26	10-1590450-0000	100	
8	스트레스의 완화용 조성물	대한민국	주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2015-06-24	10-2015-0089789		주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2016-07-18	10-1641902-0000	100	
9	탈모 예방 및 개선용 조성물	대한민국	주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2015-07-22	10-2015-0103834		주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2016-10-06	101665319	100	
10	NEWHEN	대한민국	(주)엔비 엠	2015-11-04	410337063					100	
11	PROVIDENCE	대한민국	(주)엔비 엠	2015-12-16	410338149					100	
12	如碧玉(35류),如碧玉(3 류)	중국	(주)엔비 엠	2016-10-21	17875824					100	
13	월경전 증후군 예방 및 개선용 조성물	대한민국	주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2017-04-27	10-2017-0054494		주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2017-07-28	10-1764639-0000	100	
14		PCT	주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2017-12-29	PCT/KR 2017/01 5717					100	
15	폐경 여자들이 있는 에스트로겐 결핍의 개선과 방지를 위한 기능적인 조성물	일본	파미니티 이지원 김성수	2015-10-19	PCT/KR 2015/01 1018					100	
16	폐경 여자들이 있는 에스트로겐 결핍의 개선과 방지를 위한 기능적인 조성물	유럽	파미니티 이지원 김성수	2015-10-19	PCT/KR 2015/01 1018					100	
17	폐경 여자들이 있는 에스트로겐 결핍의 개선과 방지를 위한 기능적인 조성물	중국	파미니티 이지원 김성수	2015-10-19	PCT/KR 2015/01 1018					100	
18	스트레스 및 피로 관련 질환의 예방 및 개선용 조성물	PCT	주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2018-02-13	PCT/KR 2017/01 5610					100	
19	HR-10 03류	대한민국	주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2018-06-08	2018-0077694					100	
20	헤어나리 HAIRNARI 03류	대한민국	주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2018-06-08	2018-0077691		주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2018-06-08	40-1536814-0000	100	
21	헤어나리 HAIRNARI 29류/30류	대한민국	주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2018-06-08	2018-0077689					100	

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
22	HR-10 29류/30류	대한민국	주식회사 네이처센 스 농업회사 법인	2018-06 -08	2018-00 77699					100	
23	현장 표층 재생 아스팔트 포장장치의 프리히터 장비	대한민국	김도희	2016-05 -09	10-2016 -008641 9					100	
24	스트레스 관련 질환 예방 및 개선용 조성물	대한민국	주식회사 네이처센 스 농업회사 법인	2018.02 .13	10-2018 -001765 8	주식회사 네이처센 스 농업회사 법인	2019.09. 04	10-2020 642-000 0	100		
25						주식회사 네이처센 스 농업회사 법인	2019.09. 04	10-2020 644-000	100		
26	벗짚 추출물을 포함하는 남성 갱년기 증후군 예방 또는 조성물	대한민국	중앙대학 교 산학협력 단	2019-04 -02	10-2019 -003864 9	중앙대학 교 산학협력 단	2021-03 -17	10-2231 164-000 0	100		
27	새싹보리 추출물을 포함하는 남성 갱년기 증후군 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	중앙대학 교 산학협력 단	2019-04 -25	10-2019 -004890 4				100		
28	YES-10	유럽	주식회사 네이처센 스 농업회사 법인	2019-05 -06	EPO-20 124				100		
29	YES-10	인도	주식회사 네이처센 스 농업회사 법인	2019-03 -05	4166037				100		
30	YES-10	일본	주식회사 네이처센 스 농업회사 법인	2019-05 -09	CP0215 1						
31	MS-10	호주	주식회사 파미니티	2019-05 -08	won195 495						
32	MS-10	인도	주식회사 파미니티	2019-05 -08	4166036						
33	MS-10	싱가포르	주식회사 파미니티	2019-05 -10	4020190 9850W						
34	MR-10	호주	주식회사 파미니티	2019-05 -08	won195 494						
35	MR-10	인도	주식회사 파미니티	2019-05 -08	4166035						
36	MR-10	싱가포르	주식회사 파미니티	2019-05 -10	4020190 9849T						
37	NEWHEN(35류)	대한민국	(주)엔비 엠	2014-09 -19	41-2014 -003797 3	(주)엔비 엠	2015-11 -04	41-0337 063-000 0			
38	NEWHEN(42류)	대한민국	(주)엔비 엠	2015-04 -06	4.12015 E+12	(주)엔비 엠	2015-06 -25	41-0325 471-000 0			
39	NEWHEN(3류)	대한민국	(주)엔비 엠	2014-09 -18	4.02014 E+12	(주)엔비 엠	2015-05 -04	40-1103 597-000 0			

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
40	FUNCTIONAL COMPOSITION FOR IMPROVEMENT AND PREVENTION OF ESTROGEN DEFICIENCY IN MENOPAUSAL WOMEN	유럽	주식회사 파미니티	2015-10-19	EP15906744.6		주식회사 파미니티	2020-02-05	EP15906744.6		
41	FUNCTIONAL COMPOSITION FOR IMPROVEMENT AND PREVENTION OF ESTROGEN DEFICIENCY IN MENOPAUSAL WOMEN	일본	주식회사 파미니티	2019-09-20	p2019-171331		주식회사 파미니티	2021-02-25	p6842782		
42	FUNCTIONAL COMPOSITION FOR IMPROVEMENT AND PREVENTION OF ESTROGEN DEFICIENCY IN MENOPAUSAL WOMEN	미국	주식회사 파미니티	2015-10-19	15748502		주식회사 파미니티	2020-12-22	10869495		
43	피로 예방 및 개선용 조성물	대한민국	주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2016-07-07	10-2016-0086389						
44	아나카디산을 유효성분으로 하는 배뇨 장애 예방 및 치료용 조성물		중앙대학교 산학협력단	2016-07-20	10-2016-0091974		중앙대학교 산학협력단	2017-11-17	10-1800834-0000		
45	폼페병치료를 위한 고만노스 당사슬을 가진 재조합 인간 산성 알파 글루코시다제의 대량생산용 형질전환 벡터 플라스미드의 제조방법 및 상기방법에 의해 제조된 인간 산성 알파 글루코시다제 대량생산용 형질전환 벡터 플라스미드		전북대학교 산학협력단	2017-08-24	10-2017-0107101		전북대학교 산학협력단	2018-10-02	10-1906463-0000		
46	감초 추출물을 포함하는 남성갱년기 증후군 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	중앙대학교 산학협력단	2020-03-12	10-2020-0030838						
47	말뚝 추출물을 포함하는 남성 갱년기 증후군 예방 또는 치료용 조성물		중앙대학교 산학협력단	2020-03-12	10-2020-0030851						
48	뉴그린 추출물 및 엉겅퀴 추출물을 포함하는 항균, 항염, 항바이러스 및 면역기능 개선용 조성물	대한민국	주식회사 파미니티	2020-03-13	10-2020-0031067						
49	곤달비 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균, 항염, 항바이러스 및 면역기능 개선용 조성물	대한민국	주식회사 네이처센스 농업회사 법인	2020-03-13	10-2020-0031068						

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
50	항원전달용 폴리펩타이드, 이를 포함하는 Fc-융합단백질 및 이의 응용 전북대학교 산학협력단, 세인지조지 유니버시티 런던	대한민국	전북대학교 산학협력단	2021-03-22	10-2018-0082238						
51	NATURESENSE YES-10	일본	주식회사 네이처센스 농업회사법인	2020-06-24	T2019-66631	주식회사 네이처센스 농업회사법인	2020-06-24	T6262831			
52	루꼴라 추출물을 함유하는 노인성 황반변성 예방, 개선 및 치료용 조성물	대한민국	단국대학교 산학협력단	2021-04-20	10-2021-0051266						
53	식물특이적 N-당사슬이 제거된 당단백질을 생산하는 유전체교정 식물세포의 제조방법	대한민국				양문식, 정재완, 이경열	2022.02.28	10-2370615	50%	미활용	
54	상피 장벽 기능 평가를 위한 Filaggrin 유전자의 Histone 바이오마커	대한민국	중앙대학교 산학협력단	2016-01-15	10-2015-0071824						

**○ 지식재산권 활용 유형**

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

**□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)**

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

**□ 신기술 지정**

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

**□ 기술 및 제품 인증**

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		
1	녹색인증	농림축산식품부	식물세포 발현기술을 이용한 산업용 효소 대량 생산기술	GT-15-00198	2015-10-14	대한민국
2	원료등록	pPERSONAL CARE PRODUCTS COUNCIL	RICE SP1-VEGF165		2018-12-19	USA
3	건강기능식품개별인증	식품의약품안전처	MS-10영경퀴등복합추출물	Jun-20	2020-05-21	대한민국
4	NDI	Food and Drug Administration	MS-10	1119	2019.09.19	미국
5	PL (Product License)	Health Canada	MS-10	80106716	2020.12.04	캐나다
6	녹색기술제품확인	농림축산식품부	산업용효소 등	GTP-15-00238	2015.10.14	한국

□ 표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

- \* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

- \* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	한빛기억플러스		주식회사 네이처센스농업회사법인	주식회사 네이처센스농업회사법인				
2	Toscare (shampoo type)		주식회사 네이처센스농업회사법인	주식회사 네이처센스농업회사법인				
3	시제품개발 (Hair serum)		주식회사 네이처센스농업회사법인	주식회사 네이처센스농업회사법인				
4	시제품개발 (헤어앰플)		주식회사 네이처센스농업회사법인	주식회사 네이처센스농업회사법인				

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시	기억력 개선, 인지기능장애 및 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	(주)센츨팜	2016-04-11	7,858,582	7,858,582
2	통상실시	'스트레스의 완화용 조성물' 특허 사용 계약	(주)엔에스웰니스	2016-05-10	8,185,597	8,185,597
3	통상실시	남성 갱년기 증상의 예방 또는 개선용 조성물	(주)센츨팜	2016-05-30	7,858,582	7,858,582
4	통상실시	Acid alpha-glucosidase (GAA) 생산 벼세포의 대량배양 및 GAA의 고순도 분리정제	(주)엔비엠	2016-06-17	1,680,000	1,680,000
5	기술이전	돼지설서병바이러스의 유사바이러스체를 이용한 돼지설서병 예방백신	(주)도시농부	2020. 01.21	1,000,000	1,000,000
6	기술실시	남성 갱년기 증상의 예방 또는 개선용 조성물	(주)파미니티	2022.04.26.	8,246,000	예정
7	기술실시	피부건강에 도움이 되는 마스크팩	(주)파미니티	2022.04.26.	2,483,600	예정
8	기술실시	갱년기 여성의 에스트로겐 저하증의 개선 및 예방용 기능성조성물	(주)파미니티	2022.04.26.	9,889,600	예정
9	기술실시	스트레스의 완화용 조성물	(주)네이처센스	2016.03.30	0원	
10	기술실시	탈모 예방 및 개선용 조성물	(주)네이처센스	2017.08.21.	0원	

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

#### □ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
천연물 식의약소재의 국내외 인허가 산업화	2016	122100		122100	매출액
천연물 식의약소재의 국내외 인허가 산업화	2017	206719		206719	매출액
천연물 식의약소재의 국내외 인허가 산업화	2019	427803.9		427803.9	매출액
탈모개선, 정신건강 식의약소재 인허가 산업화	2015	7500		7500	매출액
형질전환 식물을 이용한 비동물성 성장인자 개발	2015	117000		117000	매출액
형질전환 식물을 이용한 비동물성 성장인자 개발	2016	19800		19800	매출액
형질전환 식물을 이용한 비동물성 성장인자 개발	2018	7602.55		7602.55	매출액
형질전환 식물을 이용한 비동물성 성장인자 개발	2019	12749		12749	매출액
형질전환 식물을 이용한 비동물성 성장인자 개발	2020	2379		2379	매출액
형질전환 식물을 이용한 비동물성 성장인자 개발	2021	58274.75		58274.75	매출액
합계				#REF!	

#### □ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)							합계		
			2014년	2015년	2016년	2017년	2018년	2019년	2020년		2021년	
1	천연물 식의약소재의 국내외 인허가 산업화	주식회사 파미너티			1				6			7
2	탈모개선,정신건강 개선 식의약 소재 인허가 산업화	주식회사 네이처센스		2					2			4
3	형질전환 식물	(주)엔비엠	2	3	4	1	1	2	2	4	19	
합계			2	3	5	1	1	10	2	4	30	

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2015	0	8	0	0	2	6	8	0	0	0	0
2		2016	1	6	5	0	6	5	8	0	0	3	0
3		2017	3	10	4	0	8	9	0	14	0	3	0
4		2018	1	2	0	0	2	1	0	2	0	1	0
5		2019	1	18	0	0	3	16	0	18	0	1	0
6		2020	1	4	0	0	1	4	0	1	0	4	0
7		2021	1	12	0	0	5	8	0	12	0	1	0
8		2022	0	11	0	0	0	3	0	3	0	0	0

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용
1	지침	신규	식물유래 유전자재조합 생 물의약품 평가 가이드라인 표준화	2019년 12월	식물유래 유전자재조 합 생물의약품 평가 가이드라인

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원
1	인턴교육	건강기능식품 기능성 평가 가이드	네이처센스	22	176	1
2	전공현장실습	원광대학교 생명과학전공 이재국 천연물	엔비엠	60	480	1
3	연구개발 성과홍보 실무교육	식의약소재 산업화 연구센터 산학연계 인력양성 프로그램에 따른 연구개발 실무교육	단국대학교 파미너티	10	60	2
4	천연물 임상연구	실무천연물 식의약소재 산업화 연구센터 산학연계 인력양성 프로그램에 따른 임상연구	단국대학교 네이처센스	10	60	2
5	비뇨기과학실습	비뇨기질환에 이해도 높은 비의사 기초 연구인력 양성	중앙대학교	10	60	2

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원
6	천연물 식의약소재 기능성평가 실무교육	연구개발 실무교육	파미너티	100	800	1
7	전공현장실습	전주대학교 스마트 Agro ICT융합학과 양창명	엔비엠	20	160	1
8	농업기술인 대상 교육	단국대학교 천연물식의약소재 산업화연구센터 세미나	단국대학교 파미너티	4	16	25
9	산학연계 인력양성 프로그램	연구개발 실무교육	단국대학교 네이처센스	25	200	2
10	천연물 식의약소재 산업화 실무 교육	연구개발 실무교육	단국대학교 파미너티	38	300	2
11	전공현장실습	우석대학교 식품생명공학과 임수민	엔비엠	28	160	1
12	천연물 식의약소재 기능성평가 실무교육	연구개발 실무교육	단국대학교 파미너티	50	250	2
13	천연물 식의약소재 산업화 실무 교육	연구개발 실무교육	단국대학교 네이처센스	40	200	2
14	천연물 식의약소재 기능성평가 실무교육	연구개발 실무교육	단국대학교 파미너티	10	60	2
15	천연물 식의약소재 산업화 실무 교육	연구개발 실무교육	단국대학교 네이처센스	8	48	2
16	천연물 식의약소재 기능성평가 실무교육	연구개발 실무교육	단국대학교 파미너티	10	60	2
17	천연물 식의약소재 산업화 실무 교육	연구개발 실무교육	단국대학교 네이처센스	8	48	2
18	전공현장실습	우석대학교 식품생명공학과 최정원	엔비엠	39	155	1
19	전공현장실습	건국대학교 의학전문대학원 곽혜원	엔비엠	15	120	1
20	세미나	건강기능식품 인증제도	단국대학교	1	2	50
21	세미나	Development and industrialization for the functional ingredient of pomegranate juice concentrate	단국대학교	1	2	34

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원
22	세미나	LEA, DATIN HUMAN&INVERT EBRATE CELLS PDLSC (PERIODONTAL LIGAMENT STEM CELL	단국대학교	1	2	10
23	세미나	농업, 대한민국 새로운 미래를 열다	단국대학교, 파미니티	1	2	10
24	세미나	Ocular inflammation and ER stress are attenuated by supplementation	단국대학교	1	2	10
25	세미나	건강기능식품의 올바른 섭취	단국대학교	1	2	16
26	세미나	재미있는 식품이야기	단국대학교	1	2	10
27	세미나	Cellular Defense by Red Ginseng oil against Oxidative Stress and Hair Loss	단국대학교	1	2	20
28	세미나	exercise nutrition	단국대학교	1	2	20
29	교육컨설팅	농업기술원 전문가 기술교육	전북대학교	1	6	70
30	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	작용기전 규명을 위한 과학적 접근법	단국대학교	1	2	17
31	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	천연물 분석 - LC	단국대학교	1	2	10
32	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	천연물 분석 - GC	단국대학교	1	2	10
33	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	천연물 분석 -FT-IR	단국대학교	1	2	16
34	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	기능의학관점에서 바라 본 식품영양학	단국대학교	1	2	13
35	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	소비자와 마케팅 전략	단국대학교	1	2	17
36	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	건강기능식품개발	단국대학교	1	2	16
37	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	건강기능식품의 인체적용시험	단국대학교	1	2	16

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원
38	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	빅데이터를 활용한 식품의 미래와 정밀의학	단국대학교	1	2	15
39	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	천연물 기전연구 관련 분석장비 사용교육1	단국대학교	1	2	15
40	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	천연물 기전연구 관련 분석장비 사용교육2	단국대학교	1	2	15
41	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	건강기능식품 기능성 인정 절차 및 현황	단국대학교	1	2	15
42	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	건강기능식품정책 방향	단국대학교	1	2	15
43	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	건강기능식품개발 사례	단국대학교	1	2	15
44	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	Nutrition Therapy & Functional Foods	단국대학교	1	2	15
45	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	건강기능식품시장 동향	단국대학교	1	2	15
46	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	기능성소재 개발 (Peanut sprouts rich in p-coumaric acid attenuates high fat diet-induced obesity and adipocyte inflammation which is accompanied with brown adipocyte activation)	단국대학교	1	2	15
47	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	건강기능식품의 인체적용시험사례 : 체중조절 기능성	단국대학교	1	2	15
48	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	건강기능식품 기능성 표시, 광고 심의 가이드라인	단국대학교	1	2	15
49	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	해외직구 식품 안전관리	단국대학교	1	2	15

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원
50	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	천연물 활용연구	단국대학교	1	2	15
51	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	건강기능식품개발 사례	단국대학교	1	2	15
52	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	건강기능식품 마케팅	단국대학교	1	2	15
53	천연물식의약소재 산업화 전문인력양성 프로그램	감귤 콤부차 발효에 의한 성분변화 및 기능특성	단국대학교	1	2	15

### □ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용
1	파견	2021.08-2022.08	영국	박사	식물분자생물학	
2	파견	2019.07-2022.07	영국	박사	식물분자생물학	

### □ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	신문	전북도민일보	세계 최초 버 이용한 백혈병 치료제 개발	2014-10-02
2	신문	news1	전북도, 버에서 백혈병 치료제 생산기술 개발	2014-10-02
3	신문	의학신문	전북도, 백혈구 증식인자 생산기술 개발	2014-10-06
4	신문	농민신문	세계 최초 버 이용 백혈병 치료제 개발	2014-10-13
5	중앙일간지	파이낸셜뉴스	단국대, 천연물 식의약소재 산업화 연구센터	2014-12-29
6	중앙일간지	서울경제	단국대, 천연물 식의약소재 산업화 연구센터	2014-12-29
7	지방일간지	중부매일	단국대, '천연물 식의약소재' 연구사업 본격	2014-12-29
8	지방일간지	대전투데이	단국대, '천연물 식의약소재' 연구사업 본격	2014-12-29
9	지방일간지	충청투데이	단국대 웰빙시대 선도 160억 투입 천연물	2014-12-30
10	지방일간지	충남일보	단국대, '천연물 식의약소재' 연구사업 본격	2014-12-30
11	지방일간지	기호일보	단국대, 천연물 식의약소재 산업화 연구센터	2014-12-30
12	지방일간지	중부일보	단국대, '천연물 식의약소재' 연구메카로 든	2014-12-30
13	지방일간지	경기일보	단국대 천안캠퍼스, 식의약소재 연구센터 개	2014-12-31
14	신문	새전북신문	전북창조경제센터-식품 4개 창업기업 협약	2015-07-06
15	신문	헤럴드경제	전북혁신센터, 4개 창업기업과 MOU체결	2015-07-06
16	신문	아주경제	전북창조센터, 4개 창업기업과 MOU 체결	2015-07-06

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
17	신문	아시아뉴스통신	전북창조경제센터, 식품 4개 창업기업과 MOU	2015-07-06
18	신문	일요신문	전북혁신센터장, 4개 창업기업들과 협약 체결	2015-07-06
19	신문	의학신문	전북혁신센터, 4개 식의약품사와 MOU	2015-07-07
20	중앙일간지	뉴스천지	단국대, 천연물 식의약소재 연구사업	2015-12-29
21	지방일간지	동양일보	단국대 천연물 식의약소재 연구센터 개소	2015-12-29
22	중앙일간지	아시아뉴스통신	단국대, 천연물 식의약소재 연구사업	2015-12-29
23	중앙전문지	농민신문	본격화 [농협중앙회 농민신문 공동기획] '창조농업	2016-10-31
24	중앙전문지	농민신문	[인터뷰]대상 받은 '파미니티' - 농민신	2016-10-31
25	중앙전문지	농민신문	농식품 파란창업 아이디어 캠프 결선대회 이	2016-12-05
26	Internet/PC통신	이투데이뉴스	[농업미래다]농업지원센 터, 농가 아이디어	2016-12-29
27	Internet/PC통신	cubnews	경기도경제과학진흥원, '바이오코리아 2017	2017-04-12
28	지방일간지	인천일보	경기경제과학원, 도내 제약 바이오산업 우수	2017-04-12
29	중앙TV방송	acrofan	파미니티, 2017바이오코리아서	2017-04-13
30	중앙전문지	약업신문	'보건산업기 파미니티.	2017-04-13
31	지방일간지	수원일보	'보건산업기술진흥 유공표창' 수	2017-04-13
32	Internet/PC통신	지밸리	경기도경제과학원, 도내 8개 기업과 '바이오	2017-04-19
33	Internet/PC통신	newsis	천연 식의약소재 연구개발 전문기업 파미니	2017-04-19
34	중앙전문지	머니투데이	농식품 아이디어 경연대회 대상 현지 설명회	2017-06-29
35	Internet/PC통신	newsis	농협, 국내산 쌀로 만든 건강기능식품 미국	2017-06-29
36	Internet/PC통신	아시아뉴스통신	농협, 쌀 활용 제조회사 파미니티 美설명회	2017-06-29
37	중앙일간지	연합뉴스	농협창조지원센터, (주)파미니티 미국 진출	2017-06-29
38	지방일간지	한국농업신문	파미니티, 미국 현지 설명회	2017-06-29
39	중앙전문지	농민신문	쌀 가공 기업 미국 진출 박차	2017-07-02
40	중앙TV방송	연합뉴스	우수 기술로 무장한 농업벤처기업, 미국 진	2017-07-05
41	지방전문지	topclass	한아세안포럼, 내달ASEAN 진출 방안	2017-10-22
42	중앙일간지	식품산업경제뉴스	모색 토 남아도는 쌀, 화장품으로	2017-11-01
43	지방일간지	KNS	해결한다 파미니티 김성수대표	2017-11-08
44	중앙일간지	문화일보 경제	"국내 건강기능식품 정 한국정보산업의 아세안	2017-11-08
45	중앙일간지	dang A.com	시장개척을 심포지 창업, 경영, 금융 컨설팅	2017-11-28
46	중앙전문지	환경미디어	465건.'쌀 마스크' 한국인삼공사 등 5곳,	2017-12-07
47	중앙전문지	전업농신문	우수 연구소 둔 기업 우수한 R&D 역량을 갖춘	2017-12-07
48	지방전문지	우먼컨슈머	기업연구소 본격 육 수출 농업 패러다임	2017-12-09
49	지방일간지	디지털타임스	전환으로 1억 2천만불 한아세안포럼 파미니티,	2017-12-12
50	지방일간지	이뉴스투데이	다양 지방정부초청 (주)파미니티, 과학기술정보통신부 지정	2017-12-12
			'우 서울 YWCA, 건강기능식품 허위, 과장광고 피	2017-12-18

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
51	지방전문지	한국농업신문	국내 동업벤처 미국 진출기회 확대	2018-01-17
52	중앙일간지	연합인포맥스	"땀다하면 대박".. '월성부름' 바이오 벤처	2018-02-27
53	지방일간지	이뉴스투데이	우수 기업부설연구소 지정	2018-04-16
54	지방일간지	정책브리핑	대상 의료분야로 2018년도 상반기	2018-04-16
55	지방일간지	식품음료신문	우수기업연구소 지정제도 '바이오코리아2018'헬스케어 산업 미래제시	2018-05-09
56	중앙일간지	헤럴드경제	건강기능식품 천연물	2018-06-08
57	지방일간지	식품음료신문	안정성 확보방안 모색 소비자 니즈 자극 특특	2018-06-11
58	지방일간지	Yakup.com	튀는 제품들 선보여 파미니티, 2017 경기도	2018-06-12
59	지방일간지	식품저널인터넷식품신문	유망중소기업 선정 스위스 건강식품 박람회	2018-06-18
60	지방일간지	경기일보	'Vitafood' 9개 수 [경기도의 내일을 만드는	2019-01-15
61	Internet/PC통신	조선비즈	'경기도 유망중소 2022년까지 국내	2019-07-03
62	중앙TV방송	Yakup.com	21개병원 '바이오 헬스데이	2019-07-08
63	중앙일간지	MK뉴스	제약바이오 최대 기술이전 장 '인터비즈 투	2019-08-26
64	중앙일간지	헤럴드경제	[바이오]'깜빡깜빡' 기억력, 영양제 한 알로	2019-10-09
65	지방일간지	내외뉴스통신	건강식품 활용 천연물 안정성 평가로 상용화	2019-10-11
66	지방전문지	Yakup	김성수 파미니티 대표, 친미친선교휴 발전	2019-12-12
			파미니티, 바이오메디컬 분야 수출유공자 표	

#### □ 전시회 박람회

번호	연도	행사명칭	전시품목	유형	장소
1	2014	Bio Korea 2015	갱년기개선제품	전시회	서울 COEX
2	2014	in-cosmetics ASIA 2014	EGF, HAS, vEGF	전시회	태국 방콕
3	2015	2015 해외바이어 초청 수출상담회	EGF, HAS, vEGF	수출상담회	63컨벤션 그랜드볼룸
4	2015	Cosmoprof Asia 2015	EGF, HAS, vEGF	전시회	홍콩
5	2015	in-cosmetics EUROPE 2015	EGF, HAS, vEGF	전시회	스페인 바르셀로나
6	2015	헬스앤뷰티 2015 국제건강산업박람회	갱년기개선제품	전시회	서울 COEX
7	2016	2016 서울 국제 화장품·미용 산업 박람회	EGF, HAS, vEGF	전시회	서울 코엑스
8	2016	BIOKOREA	갱년기개선제품	박람회	서울 COEX
9	2016	Cosmoprof Asia 2016	EGF, HAS, vEGF	전시회	홍콩
10	2016	Food ingredients	갱년기개선제품	박람회	shanghai, china
11	2016	HEALTH INDUSTRY EXPO 2016	갱년기개선제품	전시회	서울 COEX
12	2016	in-cosmetics Europe 2016	EGF, HAS, vEGF	전시회	프랑스 파리
13	2017	BIO KOREA	남성건강	전시회	서울 COEX

			천연식의약품		
14	2017	Cosmoprof Asia 2017	EGF, HAS, vEGF	전시회	홍콩
15	2017	FACT 농식품기술, 제품 해외진출지원사업 2017	남성건강 천연식의약품	전시회	베트남 하노이
16	2017	Health&beauty week 2017	남성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	서울 COEX
17	2017	Hi (Health ingredients) Japan 2017	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	일본 도쿄
18	2017	Vietfood&Beverage - Propack Expo 2017	남성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	베트남 하노이
19	2017	Vitafoods Europe 2017	남성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	스위스 제네바
20	2017	농업기술박람회 2017	두뇌건강 천연식의약품	전시회	서울 COEX
21	2018	2018 농생명기술실용화 대전	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	서울 COEX
22	2018	2018 대한민국 소비재 수출대전	항노화 천연식의약품	전시회	서울 COEX
23	2018	BIO KOREA 2018	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	서울 COEX
24	2018	Cosmoprof Asia 2018	EGF, HAS, vEGF	전시회	홍콩
25	2018	THIS (Tokyo Health Industry Show) 2018	항노화 천연식의약품	전시회	일본, 도쿄
26	2018	Vitafoods Europe 2018	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	스위스 제네바
27	2019	2018 International Conference: Korean Society for Molecular	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	기타	서울 COEX
28	2019	2019 ASEAN DAY 수출상담회	바이어상담	제품설명회	수원 컨벤션센터
29	2019	2019 소비재 수출대전	식의약품	전시회	서울 COEX
30	2019	2019 인터비즈 포럼	제약, 의료용소재, 화장품, 건강기능성식품	제품설명회	제주도
31	2019	2019G-trade 헬스케어 수출상담회	EGF, HAS, vEGF	수출상담회	대한민국
32	2019	Boom Up Gyeonggi 2019 Business Plaza (2019 봄업 경기 수출상담회)	EGF, HAS, vEGF	수출상담회	대한민국
33	2019	Cosmoprof Asia 2019	EGF, HAS, vEGF	전시회	홍콩

34	2019	CPhiKorea	남성건강 천연식의약품	전시회	서울 COEX
35	2019	G-FAIR KOREA	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	베트남 호치민
36	2019	G-FAIR KOREA 2019	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	
37	2019	G-trade 헬스케어 수출상담회	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	기타	고양 엠블호텔
38	2019	G-trade 헬스케어 수출상담회	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	박람회	수원 노보텔 샴페인홀
39	2019	K-Beauty in New York	여성건강 식의약품	박람회	미국 뉴욕
40	2019	ssw-eXPO 2019	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	미국 뉴욕
41	2019	SUPPIYSIDE WEST 2018	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	박람회	미국 라스베가스
42	2019	Supplyside west	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	라스베가스 Mandalay bay
43	2019	Vitafoods Europe 2019	생리활성소재	전시회	스위스 제네바
44	2019	국제심포지엄 및 정기학술대회	항노화 천연식의약품	전시회	
45	2019	글로벌 비즈니스 소싱페어	업체소개	박람회	킨텍스 제1전시관
46	2019	바이오헬스케어 i-con 유망 기업소개	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	서울 COEX
47	2021	G-FAIR KOREA (대한민국우수상품 전시회)	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	전시회	일산 킨텍스
48	2021	한국식품영양과학 회 정기학술대회 전시부스	남성,여성건강 두뇌건강 천연식의약품	학술대회 전시부스	부산 벅스코

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 천연물 식의약소재 전문인력양성	○ 천연물 식의약소재 교육 프로그램 개발 ○ 산학연계 교육 수행 ○ 천연물 식의약소재 산업화 전문가 교육과정 수행	○100 ○100 ○100
○	○	○
○ 비노배뇨 건강 개선 평가를 위한 천연물 식의약 소재 선정	○ 비노배뇨 건강 개선을 위한 천연물 소재 스크리닝 소재 개발에 활용한 천연물 소재 선정	○100
○ 비노배뇨 건강 개선 인체적용시험 평가 수행	○ 비노배뇨 건강 개선 효능 평가용 시제품을 생산하여 농도별 효능 평가를 수행하였고, 유효성 평가와 안전성 평가 완료	○100
○ 비노배뇨 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 소재 인허가	○ 비노배뇨 건강 개선 소재의 인허가를 위한 지표성분 분석 및 표준화와 기준 빛 규격 설정 완료, 식약처에 비노배뇨 건강 개선 개별인정 신청 준비	○100
○ 여성갱년기 건강 개선 평가를 위한 천연물 식의약 소재 선정	○ 여성갱년기 건강 개선을 위한 천연물 소재 스크리닝 소재 개발에 활용한 천연물 소재 선정	○100
○ 여성 건강 관련 전임상 효능 분석 및 작용기전 규명	○ 에스트로겐 수용체 발현 세포를 통해 여성갱년기 개선 기능성 작용기전 규명, 난소 적출 여성갱년기 동물 모델을 통한 기능성 평가 완료	○100
○ 여성갱년기 건강 개선 인체적용시험 평가 수행	○ 여성갱년기 건강 개선 효능 평가용 시제품을 생산하여 농도별 효능 평가를 수행하였고, 유효성 평가와 안전성 평가 완료	○100
○ 여성갱년기 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 소재 인허가	○ 여성갱년기 건강 개선 소재의 인허가를 위한 지표성분 분석 및 표준화와 기준 빛 규격 설정 완료, 식약처에 여성갱년기 건강 개선 개별인정 승인 완료, 미국 FDA NDI 승인 및 Health Canada 승인 완료	○100
○ 여성 건강에 도움을 줄 수 있는 소재의 제품화 및 산업화	○ 여성갱년기 건강 개선에 효능이 있는 소재의 제품화 완료, 홈쇼핑을 포함한 여러 유통채널을 통해 제품의 사업화 진행 완료	○100
○ 탈모건강개선 신소재 연구개발 및 산업화	○ 기능성 소재 스크리닝 및 전임상 효능 평가를 통한 바이오마커 탐색 및 구축 ○ 탈모개선 제품의 임상시험 평가 및 피부 자극 안정성, 독성평가를 통한 안전성 확보 ○ 지표분석을 통한 제품화 및 기준 규격 설정 ○ 선정 천연물을 이용한 탈모 예방 시제품화	○95
○ 정신건강개선 및 피로회복 개선 소재 연구개발 제품화	○ 스트레스 및 우울증, 정신건강 관련 기능성 소재 스크리닝 및 소재 선정 ○ 정신건강 및 피로개선 식의약 소재의 전임상 효능 평가를 통한 바이오마커 및 작용기전 규명 ○ 지표분석을 통한 제품화 및 기준 규격 설정 ○ 인체적용시험 효능 및 안전성 평가를 통한 임상평가 확보 ○ 고기능성 추출물의 지표성분 분석을 통한 제품 표준화 및 기준 규격 설정. ○ 천연물 소재의 시제품화	○100

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ GMO를 활용하여 의약 및 향장소재로 널리 사용되어지고 있는 상피세포성장인자 (Epidermal Growth Factor, EGF)와 인간 알부민(human Serum Albumin)의 대량생산체계와 고순도(95% 이상) 및 분리정제 기술을 확립하여 의약소재를 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 의약 및 향장소재로 널리 사용되어지고 있는 상피세포성장인자 (Epidermal Growth Factor, EGF)와 인간 알부민(human Serum Albumin)의 대량생산체계와 고순도(95% 이상) 및 분리정제 기술을 확립하여 의약소재를 개발하고 산업화를 완성</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 돼지설사병바이러스(PEDV) 항원 유전자 고발현 담배 특성분석</li> <li>○PEDV 항원유전자 베타 형질전환 및 분석</li> <li>○형질전환 베타 호모라인 설정</li> <li>○형질전환 베타 현탁배양을 이용한 고순도 분리정제조건 확립</li> <li>○고순도 PEDV항원 단백질의 대량생산 조건 확립</li> <li>○고순도고용량 생산</li> <li>○고순도 PEDV항원 단백질의 실험동물에서 면역원성 확인</li> <li>○고순도 PEDV항원 단백질의 돼지에서 면역원성 확인</li> <li>○고순도 PEDV항원 단백질의 돼지 challenge test를 통한 예방효과 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○분자생물학적 기법을 이용하여 도입유전자 copy수와 insertion site 확인</li> <li>○베타 형질전환 및 형질전환체 선발</li> <li>○형질전환 베타에서 고발현주 선발</li> <li>○고발현주를 이용한 호모라인 선발</li> <li>○크로마토그래피 기법을 이용한 고순도(90% 이상)의 분리정제 기술 확립</li> <li>○선발된 elite line을 이용한 대량생산 조건 확립</li> <li>○대량생산 조건 및 고순도 분리정제 조건을 이용한 동물실험용 항원단백질 생산</li> <li>○고순도로 생산된 항원단백질을 이용하여 마우스에서 면역원성을 확인</li> <li>○고순도로 생산된 항원단백질을 이용하여 자돈에서 항원성 확인</li> <li>○자돈 실험에서 확인된 적정량 및 adjuvant를 이용하여 돼지에서 면역원성 및 challenge 실험을 통한 바이러스 감염 예방 효과 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>100</li> <li>100</li> <li>100</li> <li>100</li> <li>100</li> <li>100</li> <li>100</li> <li>100</li> <li>100</li> </ul>

## 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

#### ○ 정량성과 중 인력양성(박사) 목표치 미달성

- 대학원 진학률이 과제시작 시점대비 감소하였음
- 그 중 일반대학원 박사과정 진학자가 감소하였음

#### ○ 정량성과 중 논문성과가 목표대비 부족

- 연구과제 자체평가 및 단계평가를 통해 연구과제의 목표가 기초연구분야에서 산업화와 인력양성 분야로 조정하였음
- 연구과제 특성상 세부과제간 연구를 협동연구 형식으로 수행함에 따라 연구성과(논문)이 각 세부과제 공동으로 발생되나 센터로 수합하였을 경우 단일 정량성으로 계산됨
- 지적소유권은 산업화에 있어서 주요한 성과로 해외 특허 등록을 먼저 마무리 한 후 본 연구의 핵심기술이 기반된 논문을 게재하고자 하였음. 이 과정에서 논문투고가 늦어졌으며 현재 투고 하여 심사과정 중에 있음. 과제 종료 후 산업화를 위한 논문이 추가적으로 게재될 것임.

#### ○ 복합학문단위 학과가 개설되지 못함

- 학령인구 감소로 인하여 정부정책이 대학구조개혁 정책을 추진함
- 대학구조개혁 내용 중 '구조개혁 실적'을 평가하며 이를 통해 기존 개설학과의 통폐합이 진행되고 있는 실정임
- 단국대학교의 경우 본교, 분교의 학과 통폐합과 더불어 정원감축이 진행되어 신규학과개설이 불가한 상황임
- 신규학과개설과 관련하여 신청수요를 조사하였으나 단국대학교 일반대학원에서는 수요부족을 이유로 융복합대학원(의생명산업학과) 개설을 불허함

#### ○ 기술이전(실시) 성과가 목표대비 부족

- 연구과제 시작시점 대비 기술이전(실시)의 평가기준이 변경됨에 따라 달성이 어려움

#### ○ 동물백신 제품화가 지연됨

- 동물대상 백신 제품화를 위한 임상시험의 기준이 강화됨에 따라 당초 계획대비 임상시험이 추가로 진행되어야 함
-

## 2) 자체 보완활동

---

○ **정량성과 중 인력양성(박사) 목표치 미달성**

- 대학원 박사과정 진학자를 우선 지원대상자로 선정함
- 석사과정 인력양성 참여자를 대상으로 박사과정 진학유도

○ **정량성과 중 논문성과가 목표대비 부족**

- 산업화 관련지표(특허출원, 특허등록, 산업화, 매출액 발생 등)의 초과달성 지원
- 시장 친화적인 제품화를 위한 제형제제 연구를 수행중임. 또한 국내외 지적재산권을 위한 특허중이어서 기술보호를 위해 논문은 특허 등록 후에 투고할 것임. 논문 투고를 위한 메뉴스크립트 작성중임

○ **복합학문단위 학과가 개설되지 못함**

- 천연물 기능성소재 연구와 관련된 학과(식품영양학과, 식품공학과, 화학공학과, 화학과, 생명과학과, 약학과, 제약공학과 등)을 대상으로 천연물 기능성 소재의 건강기능식품 제품화 단계에 해당하는 과정에 대해 학습할 수 있도록 교육프로그램을 개발함
- 교육 프로그램 참여 학생 중 인원을 선별하여 산학연계 교육을 수행하며, 해당기관과 연계하여 천연물 기능성소재 개발 분야로 취업을 유도함

○ **기술이전(실시) 성과가 목표대비 부족**

- 본 과제로 발생한 기술에 대해 자체실시형식으로 제품화하여 현재 제품을 출시하였으며 매출액이 발생하고 있음

○ **동물백신 제품화가 지연됨**

- 임상시험(3상)에 대해 과제 종료 후 예산확보하여 과제를 진행할 예정임
- 

## 3) 연구개발 과정의 성실성

○ 산업화 지표에 맞춰 비뇨기건강, 탈모예방, 남성갱년기 여성갱년기, 정신건강관련 기능성 소재 개발 및 개별인정형 인정, 미국 식품소재 등록 등 연구소재의 산업화가 완료되었으며 매출이 발생하고 있음.

○ 천연물 기능성소재 분야 인력양성을 정기적으로 수행하고 있으며, 매년 양성인력이 발생하고 있음

○ 본 연구진은 연구 개발의 과정에서 목표로 제시하였던 성과 중 많은 부분을 충분히 달성하였으며, 특히 천연물 유래 소재인 탈모 및 정신건강 소재의 인허가를 위하여 원물 표준화 및 전임상, 임상 기능성 효능 평가, 안전성 등의 자료를 모두 확보함. 또한 정신건강 개선 소재는 피로개선의 전임상 효능까지 확대하여 연구함. 국내외 산업화를 위하여 글로벌 인증 또는 품목보고를 위하여 글로벌 시장 수요 조사 및 네트워크 구축과 국내외 박람회 참여하여 성과 확산 및 산업화 진행중임.

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

- 비뇨배뇨 및 여성갱년기 건강 개선 소재의 인체적용시험 효능 평가 및 작용기전 규명
  - 여성갱년기 건강 개선 소재의 안정성 및 효능의 국내외 공식적인 인정
  - 여성갱년기 건강 개선 소재를 포함하는 여성 건강 개선 제품화 및 사업화를 통한 국내외 건강기능 식품 시장에서의 우수한 효능으로서의 국가 경쟁력 확보
  - 전임상 효능 평가 및 작용기전 규명을 통하여 탈모 예방 및 정신건강 개선 소재의 지속적인 천연물 소재 발굴을 위한 연구기법을 확립함. 또한 국내 임상 연구를 기반으로 하여 한국인에 최적화된 기능성 평가 바이오마커를 구축하고 기준안을 확립함에 따라 다양한 천연소재 개발 시스템을 구축함. 국내 천연물 유래 탈모 및 정신건강 개선 효능을 갖는 소재를 개발하여 고부가가치화 및 다양한 제품군으로 개발이 가능함. 현재 본 연구진은 기능성 식품 및 일반식품, 샴푸와 같은 화장품 등으로 제품을 개발하고 있으며 이를 통한 시장확보에 기여함. 기능성 작물 보급을 통한 국내 농가 수익 및 고용창출 확보로서 국토 균형 발전에 기여함.
  - 1990년 초부터 식물에서 유용 단백질을 생산하는 분자농업 기술의 개발이 시작되어 현재에는 다양한 식물을 이용한 고부가가치 재조합 단백질(생물의약품, 백신, 산업용 효소 등)의 산업화가 이루어지고 있으나 일반적으로 낮은 생산성으로 인하여 산업화가 늦어지고 있음
  - 최근에는 독일, 미국 등의 연구기관과 회사에 의하여 식물바이러스를 기반으로 한 발현벡터가 개발되어 활발히 산업화가 추진되고 있으며, 최근에는 국내에서도 식물을 이용한 생물의약품, 백신 및 산업용 원료 등을 산업화하고자 하는 기업이 증가하고 있으나 고발현벡터의 부재, 특허침해 등과 같은 문제로 산업화에 어려움이 있어 특허분쟁이 없는 신규의 고발현벡터의 개발 필요성이 매우 높은 상황임
  - 상기와 같은 상황에서 (주)진셀바이오텍은 본 연구를 통하여 “벼 현탁세포 특이적 고발현 벡터를 이용한 외래유전자 고발현 시스템”과 “벼 대용량 (80L/reactor) 현탁배양 기술”을 개발하고 이를 국내의 관련 기관에 기술이전 등을 실시하여 전 세계적으로 높은 관심 속에 기술개발 경쟁이 치열한 분자농업 관련 분야에서 국내의 경쟁력을 확보하는데 기여하였음
  - 본 연구를 통하여 백신에 효율적으로 쓰일 차세대 면역증강 내재 플랫폼을 개발하여 영국의 세인트 조지 런던대학에서 효능을 검증하였다 따라서 동물용 백신뿐만 아니라 인간 백신에서도 백신개발을 위한 플랫폼으로 사용함으로써 백신주권을 확립하는데 기여할것으로 기대함
  - 본 시험결과를 바탕으로 전임상시험과 임상시험을 거쳐 사업화될 경우 우리나라 돼지설사병 예방을 통하여 축산업 발전에 크게 기여하리라 기대함
-

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 천연물식의약소재산업화연구센터는 과제 종료 이후 단국대학교 내 부설연구소로 자립화하였으며, 과제 종료 후 연구개발성과의 관리, 산업체 컨설팅, 산학 공동연구개발, 천연물 식의약소재 전문인력 교육을 수행하고 있음

○ 비노배뇨 건강 및 여성갱년기 개선 소재를 기반으로 건강기능식품 실용화-제품화 소재를 안정적으로 추출하고 제품으로 제조하기 위한 안정적인 원물의 확보와 관리 대량생산 과정에서 다양한 노하우를 축적하고 이를 기반으로 새로운 소재를 개발하고자 하는 다양한 연구기관 및 산업체와 협력체계 유지

□ 비노배뇨 건강 및 여성갱년기 개선 소재 개발 과정을 일련의 스크리닝 및 효능 검증을 위한 시스템으로 구축하여 과학적 성과를 국가기관 및 평가기관과 공유하고 국가 경쟁력 향상으로 연계될 수 있는 협력체계 구축 소재의 스크리닝 및 효능 소재의 프로파일링 단계에서 구축된 자료를 기반으로 데이터베이스화 하고 일반에 제공함으로써 국가의 관련 산업의 동반 발전 방안을 제시함.

○ 비노배뇨 건강 및 여성갱년기 개선 소재 연구개발을 통한 신성장 동력화 기존의 비노배뇨 건강 및 여성갱년기 개선 기능성의 진보형태인 차세대 개별인정형 소재 개발을 통해서 침체되어 있는 국내 건강기능식품 시장의 활력을 불어일으킴으로서 산업의 전반적인 활성화에 기여할 수 있음

국내 기술력을 기반으로 새로운 기능성 소재의 연구개발 노하우 구축 개별인정형 천연물 유래 신소재 원천기술개발을 통해서 생산과 산업화까지 전 과정 기술을 확보할 수 있음.

일반식품 및 천연물의 고부가가치화를 통해서 건강기능식품에 대한 인식의 전환 계기를 제공 천연물을 기반으로 한 고부가가치 식품의 개발을 통해서 국내 농가 소득 뿐 아니라 농업의 6차 산업화를 위한 고부가가치식품 미래원천기술을 확보함.

○ 산업화 성과 도출을 통해 장기적 신산업 및 신고용 창출 효과

새로운 비노배뇨 건강 및 여성갱년기 개선 건강기능식품 소재의 개발과 제품화를 통해서 직간접적으로 파생되는 새로운 영역의 업무 창출 및 고용 증대

소재의 안정적인 수매와 농가 재배 확대를 통해서 장기적으로 안정적인 특수 작물 산업을 유도함으로써 새로운 농업분야를 창출하고 동시에 고용 창출 효과

비노배뇨 건강 및 여성갱년기 개선 소재의 산업화 과정에서 건강기능식품 시장 뿐만 아니라 기술이전 등을 통해서 일반적으로 접하는 식품과 결합한 새로운 상품의 산업화를 통해서 기존의 산업분야를 성장시키고 이를 통해서 안정적인 신고용 창출 효과를 가져올 수 있음.

○ 신규 천연물 소재의 추출에 대한 지표성분 분석법 개발 및 대량 생산 안전 기술 개발로 안정적인 원물 확보와 관리를 통하여 제품의 표준화하고 이를 통하여 탈모 및 정신건강 개선 건강기능식품, 기능성 화장품 등으로 실용화 및 산업화를 확보함. 소재의 스크리닝 및 효능 평가 관련 전임상, 임상 연구를 통해 다양한 천연물 소재의 효능 평가 수행에 활용할 예정임. 도출된 연구 결과를 활용하여 논문 및 지적재산권을 확보하였으며 이를 통하여 국내 식약처 인정 원료 개발의 데이터로 활용할 예정임. 또한 현재 국제적 인증을 받고 있어 추후 국제적 제품화로 활용할 계획임. 또한 개발된 소재를 국내 농업생명산업으로 확대 발전하여 약용작물로서 농가에 보급하고 (주)네이처센스를 통해서 농가와 함께 작물을 재배하고 보급함으로써 식의약산업과 농업을 동반 성장시킬 수 있는 우수한 모델로 활용할 예정임.

○ (주)진셀바이오텍은 본 연구개발을 통하여 “벼 현탁세포 특이적 고발현 벡터를 이용한 외래유전자 고발현 시스템”을 개발하고 이를 이용하여 벼 대용량 (80L/reactor) 현탁배양 기술을 확립하였음

- 현재 (주)진셀바이오텍은 본 연구결과에서 확립 된 식물세포배양기술을 더욱 개량하여 KvGMP 기준에 적합한 330L/reactor 규모의 배양기를 개발하고 이의 운용기술을 확립하였으며, 이 배양설비와 고순도 분리정제 설비, 제제화 설비 등 동물의약품 생산에 필요한 KvGMP 시설(건평 2,000평)을 완공하여 시운전을 하고 있음

- (주)진셀바이오텍은 상기의 “벼 현탁세포 특이적 고발현 벡터를 이용한 외래유전자 고발현 시스템”과 “벼 대용량 (330L/reactor) 현탁배양 기술”을 활용하여 생물의약품, 산업용 효소 등과 같은 다

양한 고부가가치 재조합 단백질의 산업화에 적용하고 있음

· (주)진셀바이오텍은 상기의 “벼 현탁세포 특이적 고발현 벡터를 이용한 외래유전자 고발현 시스템”과 “벼 대용량 (330L/reactor) 현탁배양 기술”을 활용하여 애완견 저단백혈증 치료제를 생산하고 이의 임상을 진행하고 있음

· (주)진셀바이오텍은 상기의 “벼 현탁세포 특이적 고발현 벡터를 이용한 외래유전자 고발현 시스템”과 “벼 대용량 (330L/reactor) 현탁배양 기술”을 활용하여 돼지 열병백신을 생산하고 이의 임상을 진행하고 있음

· (주)진셀바이오텍은 상기의 “벼 현탁세포 특이적 고발현 벡터를 이용한 외래유전자 고발현 시스템”과 “벼 대용량 (330L/reactor) 현탁배양 기술”을 활용하여 배양육 생산에 필요한 다양한 성장인자의 생산기술을 개발하고 있음

○ 본 연구에서 확인된 돼지설사병바이러스 예방 백신은 목적 동물인 돼지에서 면역성이 확인되었으며 전임상시험 및 임상시험을 포함한 시험을 통하여 핵심연구과제에 같이 참여한 (주)엔비엠에서 사업화 예정임

○ 본 연구에서 개발된 면역증강 내재 차세대 백신 플랫폼은 돼지 설사병 바이러스 예방 백신뿐만 아니라 어느 백신개발에도 사용될수 있으며 현재 전북대학교, (주)엔비엠과 영국 세인트조지 런던대학교 공동으로 Covid-19백신 개발에도 응용되고 있다. 또한 (주)엔비엠에서 독자적으로 개발하고 있는 구제역백신 및 돼지열병백신 개발에도 사용되도 있을정도로 새로운 백신 개발의 플랫폼으로 사용되고 있음

○ 면역증강 내재 차세대 백신 플랫폼은 동물요 백신 개발뿐만 아니라 인간백신 개발에도 효율적인 백신 플랫폼으로 사용될수 있을것으로 예측됨

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	7	
	비SCIE	3	
	계	10	
국내논문	SCIE	7	
	비SCIE	4	
	계	11	
특허출원	국내	5	
	국외	4	
	계	9	
특허등록	국내	5	
	국외	4	
	계	9	
인력양성	학사	0	
	석사	9	
	박사	0	
	계	9	
사업화	상품출시	1	
	기술이전	2	
	공정개발		
제품개발	시제품개발	1	
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	1건
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술융합창의인재양성사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술융합창의인재양성사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

# 자체평가의견서

## 1. 과제현황

		과제번호		714001-07	
사업구분	농식품기술융합창의인재양성사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농식품기술융합창의인재양성사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	-
과제명	천연물 식의약소재 산업화 기반기술 구축 및 전문인력 양성			과제유형	개발
연구개발기관	단국대학교 산학협력단			연구책임자	정윤화
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.09.18. - 2015.09.17	975,000	334,000	1,309,000
	2차년도	2015.09.18. - 2016.09.17	975,000	334,000	1,309,000
	3차년도	2016.09.18. - 2017.09.17	975,000	334,000	1,309,000
	4차년도	2017.09.18. - 2018.07.17	812,000	278,300	1,090,300
	5차년도	2018.07.18. - 2019.05.17	812,000	278,300	1,090,300
	6차년도	2019.05.18. - 2020.03.17	785,000	270,800	1,055,800
	7차년도	2020.03.18. - 2022.03.17	1,464,000	501,100	1,965,100
계	2014.09.18. - 2022.03.17	6,798,000	2,330,500	9,128,500	
참여기업	(주)파미니티, (주)네이처센스, (주)엔비엠, 전북대학교, 중앙대학교				
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

## 2. 평가일 :

## 3. 평가자(연구책임자) : 단국대학교 정윤화

소속	직위	성명
단국대학교	교수	정윤화

## 4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	--

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

연구개발을 통해 기능성 소재의 산업화 및 건강기능식품 개별인정형을 획득하였음( MS-10, MR-10) EGF, HSA, vEGF 생산기술을 위한 녹색인증을 획득하였음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

연구를 통하여 생산된 제품의 산업화로 매출액이 꾸준히 발생되고 있으면 일부 제품군의 경우 해외매출도 발생하였음

연구 종료 후 제품화완료를 통하여 매출이 추가로 발생할 예정으로 건강기능식품 시장 확대에 영향을 미쳤음

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

현재 기술개발을 통하여 현재 사업화가 완료되었으며 매출이 발생하고 있음

소재별 다양한 형태에 제품개발을 진행하고 있으며, 타 업체의 소재를 제공하여 각 기능성 분야의 시장을 확대하고 있음

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

연구과제의 수행을 위하여 기능성 소재의 스크리닝, 기전연구, 전임상 및 임상연구를 수행하였음

학문적 연구결과를 토대로 특허출원, 등록을 진행하였으며 소재 개발인정형 획득, 미국 식품소재등록, 녹색인증 획득 등을 통하여 소재의 우수성을 입증함.

전문인력 양성을 위하여 교육프로그램을 개발 운영하여 우수 전문인력 배출함

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

기전연구, 소재 스크리닝, 소재 생산 최적화 등의 연구를 수행하여 논문을 출판함.

연구수행 결과를 바탕으로 논문발표, 특허를 다수 발표하였음.

최신 연구동향에 대해 연구인력, 산업체 인력을 대상으로 발표회를 개최하였음.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체 평가
특허 출원/등록	30	120	
논문	20	70	
기술이전	20	50	
인력양성	30	95	
합계	100점		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

#### IV. 보안성 검토

해당없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

본 연구는 일반연구로 보안과 관련하여 해당없음

##### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과

# 연구성과 활용계획서

## 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	천연물 식의약소재 산업화 기반기술 구축 및 전문인력 양성			
주관연구개발기관	단국대학교 산학협력단		주관연구책임자	정운화
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	6,798,000,000	2,330,500,000	0	9,128,500,000
연구개발기간	2014.09.18. - 2022.03.17			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타( 산업화 ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:			

## 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 비뇨배뇨 및 여성 건강 개선 기능을 갖는 천연물 소재 선정	본 연구기관의 천연물 소재 효능 확인과 관련한 오랜 연구 노하우와 천연물 데이터베이스를 적극 활용하여 연구에 활용할 천연물 소재를 비뇨배뇨와 여성 건강 각각 선정하여 연구 수행에 수월하게 사용하였음.
② 비뇨배뇨 및 여성 건강 개선 기능을 갖는 천연물 소재의 지표물질 표준화	다양한 천연물 소재의 분석경험을 바탕으로 하여 선정된 여러 가지 소재에 대한 지표물질을 선정하였고, 각각 표준화 하였음.
③ 비뇨배뇨 및 여성 건강 개선 효능 평가를 위한 인체적용시험 수행	선정된 천연물 소재를 추출복합물로 만들어서 섭취하기 쉬운 제형의 캡슐로 제작하였고, 수행기관인 중앙대학교 병원 IRB의 심의를 받아 비뇨배뇨와 여성 갱년기 건강 개선 관련 인체적용시험을 성공적으로 수행하였음. 여성 건강 개선 인체적용시험에서는 갱년기 관련 증상들이 유의적으로 완화되었고, 건강 지표들이 전반적으로 향상되는 결과를 확인하였음.
④ 비뇨배뇨 및 여성 건강 개선 기능을 갖는 천연물 소재의 국내외 인허가	본 연구에서 효능이 확인된 비뇨배뇨 및 여성 건강 개선 기능을 갖는 소재에 대한 미국 FDA의 NDI 승인이 완료되었음. 또한 여성 건강 개선 기능 소재에 대해서는 캐나다의 Health Canada PL을 등록을 받았고, 국내 식품의약품안전처의 건강기능식품 개별 인정형 기능성 원료로서의 인정을 승인받았음.
⑤ 개발된 소재를 활용한 상품화 및 산업화	본 연구를 통해 개발한 여성 건강 개선 기능을 갖는 소재를 활용하여 갱년기 여성의 건강을 증진 시킬 수 있는 제품을 개발하였음. 이와 같이 개발된 제품은 홈쇼핑이나 온라인 샵 및 백화점에 입점하여 판매가 진행되었으므로 개발된 소재의 산업화를 성공적으로 이뤄냈음.
⑥ TMRS36 추출복합물을 통한 탈모개선 효능	TMRS36 추출 복합물의 전임상, 임상 평가를 통하여 탈모 개선 효능 확인완료

⑦ TMRS36 소재를 활용하여 다양한 헤어관련 분야에 적용하여 제품화 확대	연구개발된 TNRS36 추출복합물을 통해서 샴푸, 앰플, 세럼등 다양한 헤어관련 분야에 적용하기 위한 제품화 기술을 완료 함.
⑧ GMS70 추출복합물을 통한 정신건강 개선 효능	개발 소재의 전임상, 임상시험을 통한 정신건강 (스트레스) 개선 효능 확인완료.
⑨ 신경세포 보호 및 신경전달물질 활성 기술	다양한 신경세포에서 바이오마커 개선을 통한 신경세포 보호 및 serotonin등 신경전달물질 개선을 통한 정신스트레스 개선 기술을 확보함
⑩ 개발 소재를 기반으로 한 3종 이상의 정신건강 개선 건강기능식품 제품화	소재를 기반으로 3종의 시제품을 연구개발하였으나 개별인정승인 후 본제품으로 산업화할 계획임.
⑪ 개발 소재 효능 확대를 통한 피로개선 효능	전임상 평가를 통하여 피로개선관련 근육세포의 보호 및 염증관련 인자의 감소 억제 확인
⑫ 개발 소재의 안전성 확보	개발 소재인 TMRS36과 GMS70의 독성평가 및 인체 적용 시험 등을 통하여 제품의 안전성 확보 완료.
⑬ GMO를 활용하여 의약 및 향장소재로 널리 사용되어지고 있는 상피세포성장인자 (Epidermal Growth Factor, EGF)와 인간 알부민(human Serum Albumin)의 대량생산체계와 고순도(95% 이상) 및 분리정제 기술을 확립하여 의약소재를 개발	- 의약 및 향장소재로 널리 사용되어지고 있는 상피세포성장인자 (Epidermal Growth Factor, EGF)와 인간 알부민(human Serum Albumin)의 대량생산체계와 고순도(95% 이상) 및 분리정제 기술을 확립하여 의약소재를 개발하고 산업화를 완성
⑭ VEGF의 피부 투과율을 높이기 위하여 PTD (protein transduction domain)가 융합된 PTD-VEGF 고생산 식물 세포주 개발, 대량생산체계, 고순도 분리정제 기술을 확립하여 의약소재를 개발	- 의약 및 향장소재로 널리 사용되어지고 있는 피부 투과율을 높인 PTD (protein transduction domain)가 융합된 PTD-VEGF의 고생산 식물 세포주를 개발하고 대량생산체계와 고순도 분리정제 기술을 확립하여 사업화의 기반을 구축
⑮ 형질전환 벼 현탁배양을 이용한 대량생산 조건 확립	형질전환 벼 현탁배양을 이용한 대량배양(50g/L) 조건 확립
⑯ 형질전환 벼 현탁배양을 이용한 대량생산된 항체의 고순도 분리정제 조건 확립	대량생산된 재조합 항원을 크로마티법을 이용하여 90%이상의 고순도 분리조건 확립
⑰ 재조합항원을 이용한 돼지실험을 통한 백신효능 확인	분리정제된 재조합항원을 이용하여 돼지 실험을 통한 백신 효능 확인

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액)
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI	논문평균 I-F						
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치																				
최종 목표	24	23	1		16		9			26		57	30	-	63	83				
당해 년도	목표																			
	실적	50	24	1		11		10		30		39	17		78	541	79		48	

달성률 (%)	208	104	100		69		111		115		68	57		-	858	-		-
---------	-----	-----	-----	--	----	--	-----	--	-----	--	----	----	--	---	-----	---	--	---

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	국내 천연물을 활용한 비뇨배뇨 및 여성 건강 개선 효능 소재 개발
②	비뇨배뇨 및 여성 건강 개선 기능 소재 국내외 인허가
③	여성 건강 개선 기능 소재의 제품화 및 산업화
⑥	TMRS36 추출복합물을 통한 탈모개선 기능성 소재
⑦	GMS70 추출복합물을 통한 정신건강 개선 기능성 식의약품 소재
⑪	벼 대용량 (80L/reactor) 현탁배양 기술
⑫	벼 현탁세포 특이적 고발현 벡터
⑬	벼 현탁세포를 이용한 피부성장인자(EGF, VEGF165) 생산기술
⑮	형질전환 벼 현탁배양을 이용한 대량생산 조건 확립
⑯	형질전환 벼 현탁배양을 이용한 대량생산된 항체의 고순도 분리정제 조건 확립
⑰	재조합항원을 이용한 돼지실험을 통한 백신효능 확인

#### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		√				√	√			
②의 기술	√	√					√			
③의 기술		√					√			
⑥의 기술	√	√				√				
⑦의 기술	√	√				√				
⑪의 기술	√						√	√		
⑫의 기술		√					√	√		
⑬의 기술	√						√	√		
⑮의 기술	√									
⑯의 기술	√									
⑰의 기술		√								

\* 각 해당란에 √ 표시

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	국내 천연물 자원 활용을 확대 적용하여 기능성 소재를 개발하고 그에 따른 고부가가치 자원 확보
②의 기술	건강기능식품 소재를 개발함에 있어서 소재의 인허가를 통해 안전성과 기능성의 우수함을 인정받을 수 있음
③의 기술	여성 건강 증진 제품 개발과 산업화를 통해 국내 건강기능식품 산업의 선진화를 이룰 수 있고 더 나아가 국외의 건강기능식품 시장에서도 효능이 우수한 소재로서의 국가 경쟁력을 확보
⑥의 기술	국내외 기능성 인증을 통하여 제품화 (건강기능식품, 일반식품, 화장품 등)
⑦의 기술	국내외 기능성 인증을 통하여 제품화 (건강기능식품, 일반식품, 화장품 등)
⑪의 기술	- 당사는 본 연구개발을 통하여 “벼 대용량 (80L/reactor) 현탁배양 기술”을 확립하였으며, 현재 당사는 본 기술을 더욱 개량하여 300L/reactor 규모의 배양기 운용기술을 확립하고 본 기술을 적용한 KvGMP 시설을 완공하여 시운전을 하고 있음
⑫의 기술	- 당사는 본 연구개발을 통하여 “벼 현탁세포 특이적 고발현 벡터”를 이용한 유용한 고부가가치 재조합 단백질의 대량생산 기술을 확립하였으며, 본 기술은 다양한 재조합 단백질의 생산에 활용할 예정임 - 현재 당사는 본 기술을 적용하여 개 저알부민혈증 치료제의 개발을 완료하고 현재 전임상을 진행하고 있음
⑬의 기술	- 당사는 본 연구개발을 통하여 “벼 현탁세포를 이용한 피부성장인자(EGF, VEGF165) 생산기술”을 확립하였으며, 본 기술을 이용하여 생산한 제품은 미국 화장품협회에 화장품원료 등록을 완료하고 마케팅을 전개하고 있음
⑮의 기술	국내외 특허 출원 예정
⑯의 기술	국내외 특허 출원 예정
⑰의 기술	핵심과제에 참여한 기업을 통하여 비임상 및 임상 실험후 상품화 계획

### 7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI	논문평균IF						
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	명	건	건		
가중치	15																			
최종목표	24	23	1		16		9			26		57	30	-	63	83				
연구기간내 달성실적	50	24	1		11		10			30		39	17	78	541	79		48		
연구종료후 성과창출 계획	9	9			2		1					10	11			9				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	벼 현탁세포 유래 인간 EGF 생산기술		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	0 천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (자체사업화 실시)		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	사업화 실시
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	해당사항 없음 (자체사업화 실시)		

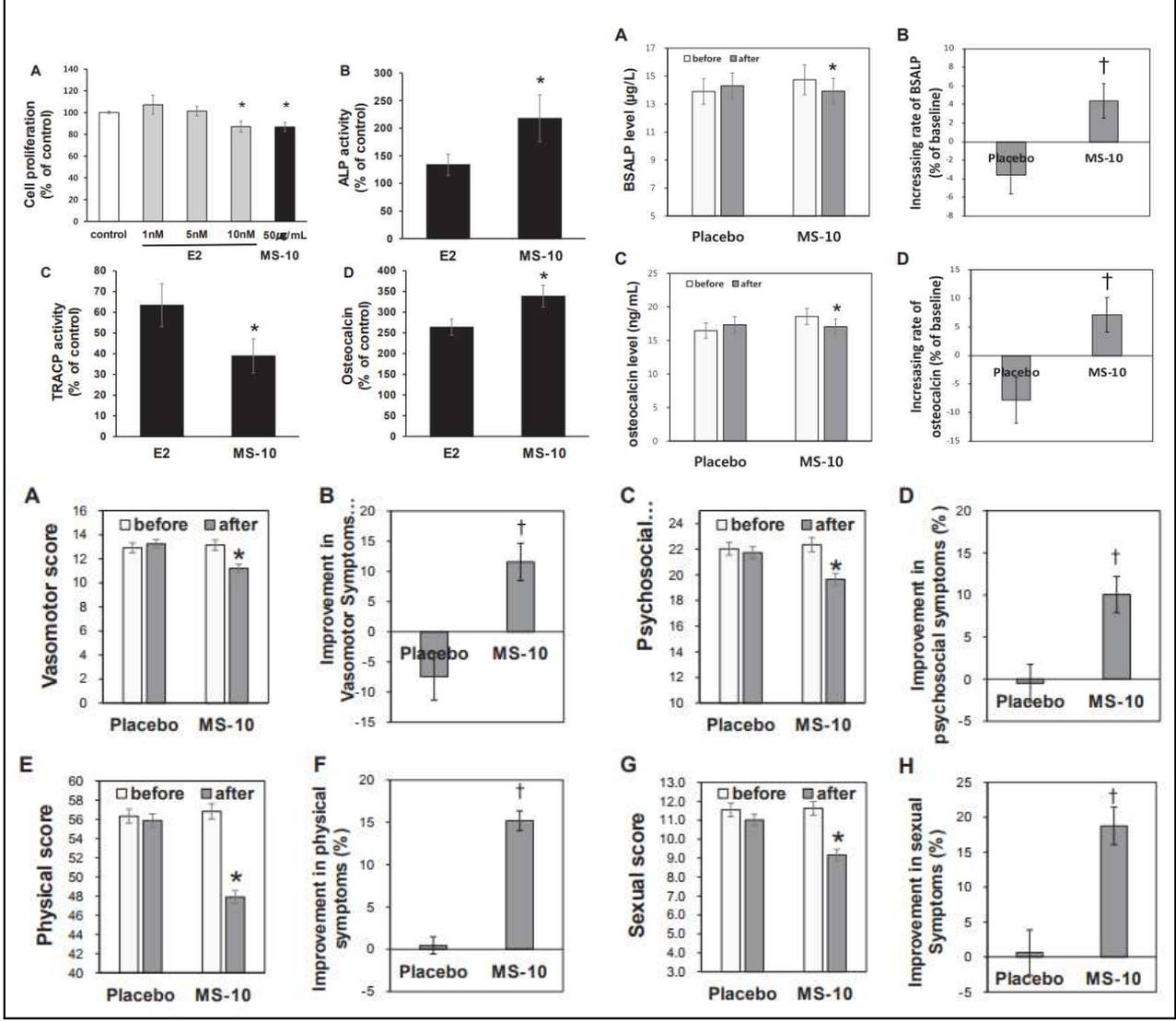
핵심기술명 <sup>1)</sup>	벼 현탁세포 유래 인간 VEGF 생산기술		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	0 천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (자체사업화 실시)		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	사업화 실시
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	해당사항 없음 (자체사업화 실시)		

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

# 연구개발과제 대표적 연구실적

대표적 연구 업적 요약문	
연구 업적 제목	The effects of MS-10 dietary supplement, mixture of Korean thistle and thyme extracts, on bone health, and symptoms in menopausal women
연구업적 유형	논문 ( o ) 특허 ( )
과제 책임자	홍준기 (2-1 세부)
논문게재지	Journal of Functional Foods
게재지 권 호	2019; 52:680-689

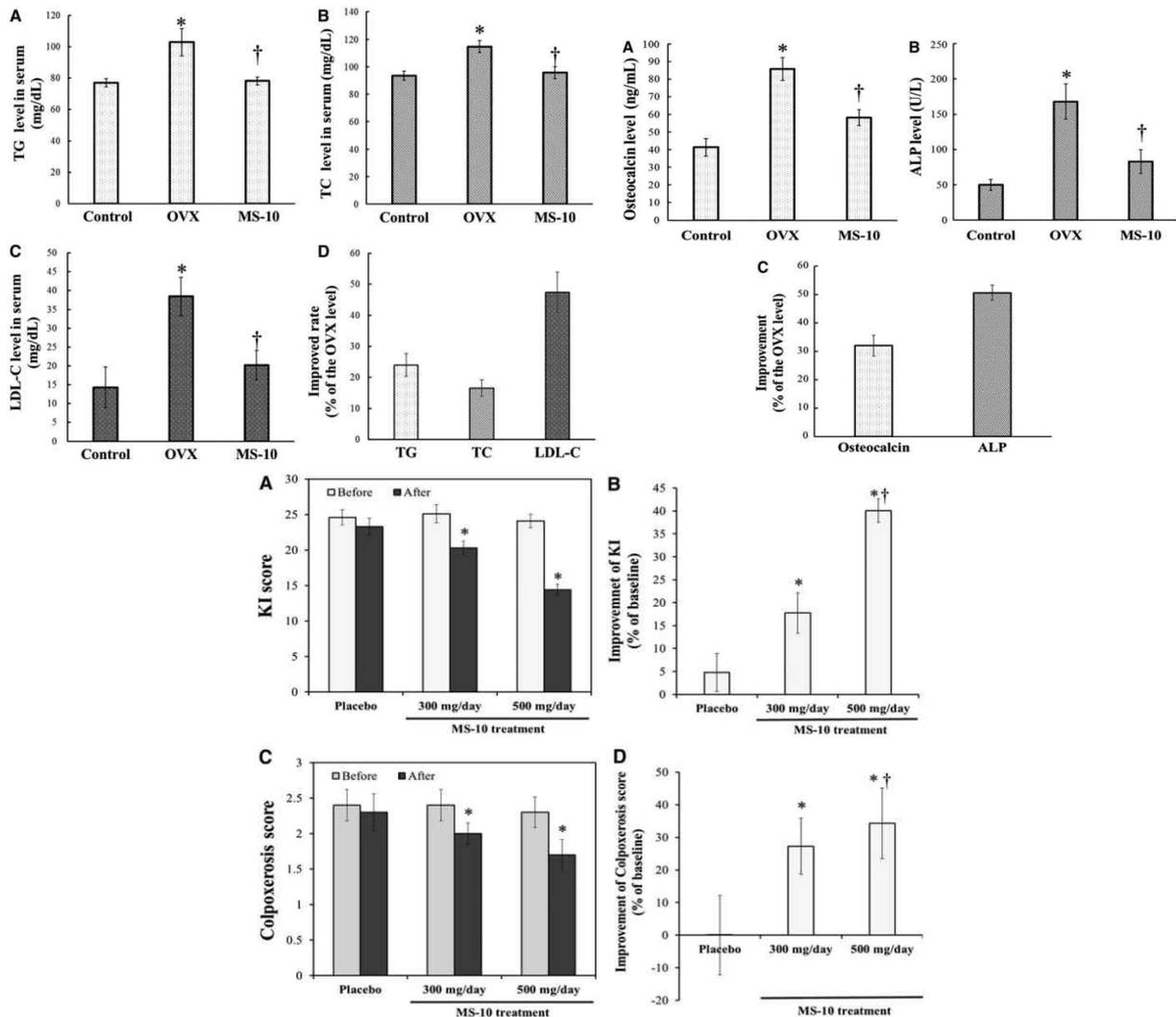
In menopausal women, estrogen deficiency closely affects bone health. Previous studies report that MS-10, a combined extract of *Cirsium japonicum* and *Thymus vulgaris*, increases the efficiency of estrogen by activating the estrogen receptor. Here, the ability of MS-10 to enhance bone health and quality of life in women with menopausal symptoms was tested. Treatment with MS-10 induced alterations in the gene expression profile related with bone health of SaOS-2 osteoblast-like cells. MS-10 increased alkaline phosphatase (ALP) activity and osteocalcin, and reduced tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) activity in osteoblast-like cells. A clinical study showed that treatment with MS-10 (500 mg/day for 3 months) led to a significant decrease in ALP and osteocalcin levels. Also, women's scores on the Menopause-Specific Quality of Life questionnaire that takes into account vasomotor, psychosocial, physical, and sexual health, improved by 18.8%. In conclusion, the herbal material MS-10 may improve menopausal symptoms, including bone health.



대표적 연구 업적 요약문

연구 업적 제목	The Natural Substance MS-10 Improves and Prevents Menopausal Symptoms, Including Colpoxerosis, in Clinical Research
연구업적 유형	논문 ( o ) 특허 ( )
과제 책임자	홍준기 (2-1 세부)
논문게재지	Journal of medicinal food
게재지 권 호	2016; 19(3):228-237

Many natural substances were screened to develop nutraceuticals that reduce menopausal symptoms. A complex of *Cirsium japonicum* var. *maackii* and *Thymus vulgaris* extracts, named MS-10, had significant positive effects. Under a low concentration of estrogen, which represents postmenopausal physiological conditions, MS-10 had beneficial effects on estrogen receptor-expressing MCF-7 cells by reversibly enhancing estrogen activity. In addition, in the ovariectomized rat model, changes in bone-specific alkaline phosphatase activity and osteocalcin, as well as low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride levels were significantly decreased by MS-10. These results show that MS-10 protected bone health and reduced metabolic disturbances. Furthermore, in a clinical study, all menopausal symptoms, including hot flashes, parenthesis, insomnia, nervousness, melancholia, vertigo, fatigue, rheumatic pain, palpitations, formication, and headache, as well as colpoxerosis, were significantly improved by taking MS-10 for 90 days. Therefore, the evidence supports that MS-10 is an effective natural substance that can safely improve menopausal symptoms, including colpoxerosis.



대표적 연구 업적 요약문

연구 업적 제목 여성 건강 개선 소재 WMS77의 건강기능식품 기능성 원료 인정 완료

연구업적 유형 논문 ( ) 특허 ( ) 사업화 ( o )

과제 책임자 홍준기 (2-1 세부)

본 과제를 수행하면서 여성 건강 개선 소재인 WMS77(가칭)을 모든 효능 평가와 안정성 및 안정성 평가를 거쳐 개발하여 국내 식품의약품안전처 건강기능식품 개별인정형 기능성 원료 인정을 신청하였고, 신청 결과 2020년 6월 승인되어 WMS77에 대한 효능과 안전성을 개별인정형 기능성 원료로서 입증 받았습니다. 또한 동시에 WMS77 소재의 미국 포함 여러 해외로의 진출을 위해 미국 FDA NDI 등재와 캐나다 Health Canada PL을 등록받음.



[별지 제3호서식] (앞쪽)

건강기능식품 기능성 원료 인정서	국내	수입
	o	
제2020-6호		
대표자: [REDACTED]		
업체명 또는 기관명: (주)파라데이		
소재지: [REDACTED]		
원료명: MS-10 열경피동복합추출물		
수출국: 수출국 제조회사명: 수출국 제조회사 소재지:		
「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제10조제1항에 따라 건강기능식품 기능성 원료로 인정합니다.		
2020년 5월 27일		
식품의약품안전처장 인		
* 판입서류 1. 원료명 2. 제조기준(원재료, 제조방법, 기능성분(또는 지표성분), 제조 시 유의사항) 3. 규격 4. 제품의 요건(기능성 내용, 일일 섭취량, 섭취 시 주의사항, 기타사항) 5. 시험방법		

210mm×297mm[일반용지 60g/㎡(재활용품)]



SEP 19 2019



Product Licence  
Licence de mise en marché

Product Number/Numéro de produit: 80106716  
Brand Name/ Marque nominative: MS-10  
Issued to/Émise à:  
Name of licensee/Nom du titulaire:

Authorized for the following/Autorisé pour ce qui suit:

Dosage form/Forme posologique: Capsule  
Recommended route of administration/Voie d'administration recommandée:

Oral  
Recommended dose/Dose recommandée:

Adults: Take 1 capsule, 1 time per day.

Recommended duration of use/Durée d'utilisation recommandée:

Consult a health care practitioner for use beyond 12 weeks.

Recommended use or purpose/Usage ou les fins recommandés:

Helps to reduce symptoms of menopause such as facial flushing, night sweats, sleep disturbances and nervousness. Clinically shown to help relieve symptoms of menopause such as facial flushing, night sweats, sleep disturbances and nervousness.

Risk Information/Renseignements sur les risques:

Cautions and Warnings

Consult a healthcare practitioner prior to use if you are pregnant, breastfeeding, or if symptoms persist or worsen. Do not use this product if you are taking anticoagulants.

This letter is to inform you that the Food and Drug Administration (FDA) filed your notification that you submitted to FDA on behalf of Famenity Co. Ltd., pursuant to 21 United States Code (U.S.C.) § 350b(a)(2) (section 413(a)(2) of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (the Act)), on July 8, 2019. Your notification concerns your new dietary ingredient, which is an extract of "Korean thistle (whole plant of *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum)" that you intend to market in a dietary supplement under that trade name, "MS-10."

In accordance with 21 CFR 190.6 (c), FDA must acknowledge its receipt of a notification for a new dietary ingredient. For 75 days after the filing date, you must not introduce or deliver for introduction into interstate commerce any dietary supplement that contains the new dietary ingredient that is the subject of this notification. Please note that acceptance of this notification for filing is a procedural matter, and thus, does not constitute a finding by FDA that the new dietary ingredient or supplement that contains the new dietary ingredient is safe or is not adulterated under 21 U.S.C. § 342. FDA is not precluded from taking action in the future against any dietary supplement containing your new dietary ingredient if it is found to be unsafe, adulterated, or misbranded.

Your notification will be kept confidential for 90 days after the filing date of July 8, 2019. After the 90-day date, the notification will be placed on public display at [www.regulations.gov](http://www.regulations.gov) as new dietary ingredient notification report number 1119. Prior to that date, you may wish to identify in writing specifically what information you believe is trade secret or confidential commercial information and include an explanation of the basis for this belief.

Deputy Director  
Office of Dietary Supplement Programs  
Center for Food Safety  
and Applied Nutrition

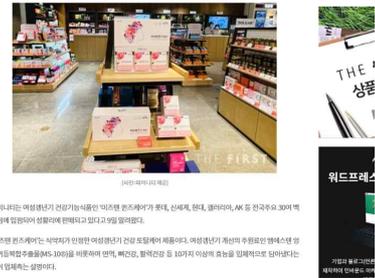
## 대표적 연구 업적 요약문

연구 업적 제목	갱년기 여성 건강 증진을 위한 WMS77 소재의 제품 개발
연구업적 유형	논문 ( ) 특허 ( ) 사업화 ( o )
과제 책임자	홍준기 (2-1 세부)

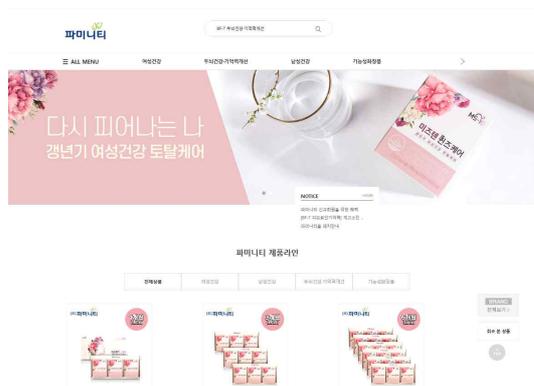
2021년 3월에 본 과제를 통해 개발된 소개인 WMS77(가칭)이 주원료로 포함된 갱년기 여성건강 토탈케어 '미즈텐 퀴즈케어' 제품을 출시하여 홈쇼핑, 온라인, 약국, 백화점 등에서 판매되고 있고, 홈쇼핑의 경우 GS 홈쇼핑, 롯데홈쇼핑 런칭 되었으며 CJ홈쇼핑, SK스토아에 런칭하였고, 전국 주요 30여 백화점에 입점해 있음. 현재 자사몰 또는 네이버 스마트스토어팜을 통해 온라인 판매를 진행하고 있음.



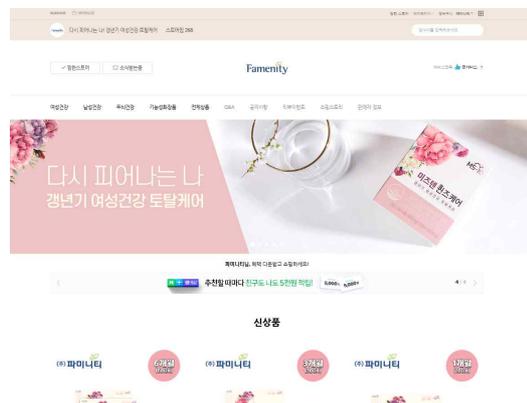
홈쇼핑(GS, 롯데, CJ, SK)



롯데백화점, 현대백화점, AK, 갤러리아 등 30곳 입점



자사몰(www.famenitymall.com)



네이버 스마트스토어 (https://smartstore.naver.com/famenity)

대표적 연구 업적 요약문

연구 업적 제목

탈모 예방 및 개선용 조성물

연구업적 유형

논문 ( ) 특허 ( o )

과제 책임자

전병주 (2-1협동)

출원번호

10-2015-0103834

등록번호

10-1665319

출원인

주식회사 네이처센스 농업회사법인

요약

본 발명은 탈모 예방 및 개선용 조성물에 관한 것으로, 일년봉 추출물을 유효성분으로 포함한다. 이에 따라, 신체 거부반응이나 부작용을 최소화시킬 수 있고, 일반적인 화학 약품에 비해 뛰어난 양모 효과가 있다.

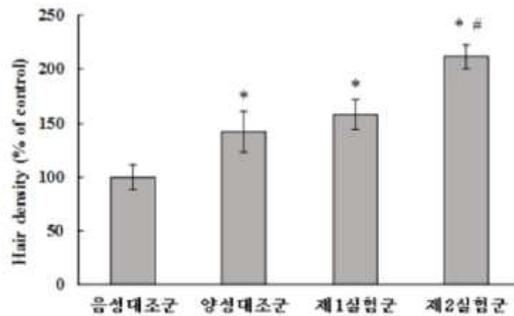
탈모 개선  
식의약 인허가  
및 산업화

표 4

번호	질문	답변	대조군		제1 실험군		제2 실험군	
			4주	8주	4주	8주	4주	8주
1	두정부 탈모 부위의 크기 변화	호전	20	20	20	60	60	80
		변화없음	80	60	80	40	40	20
		악화		20				
2	경수리에서의 탈모	호전		20	20	40	40	100
		변화없음	100	40	80	60	60	
		악화		40				
3	전두부 탈모 변화	호전				40	60	100
		변화없음	100	80	100	60	40	
		악화		20				
4	모발 탈락	호전	20	20	40	80	60	100
		변화없음	80	40	60	20	40	
		악화		40				
5	모발의 질	호전		20	20	40	40	80
		변화없음	100	40	80	60	60	20
		악화		40				
6	전체적인 만족도	호전	20	20	40	60	60	100
		변화없음	80	40	60	40	40	
		악화		40				

도면

도면1



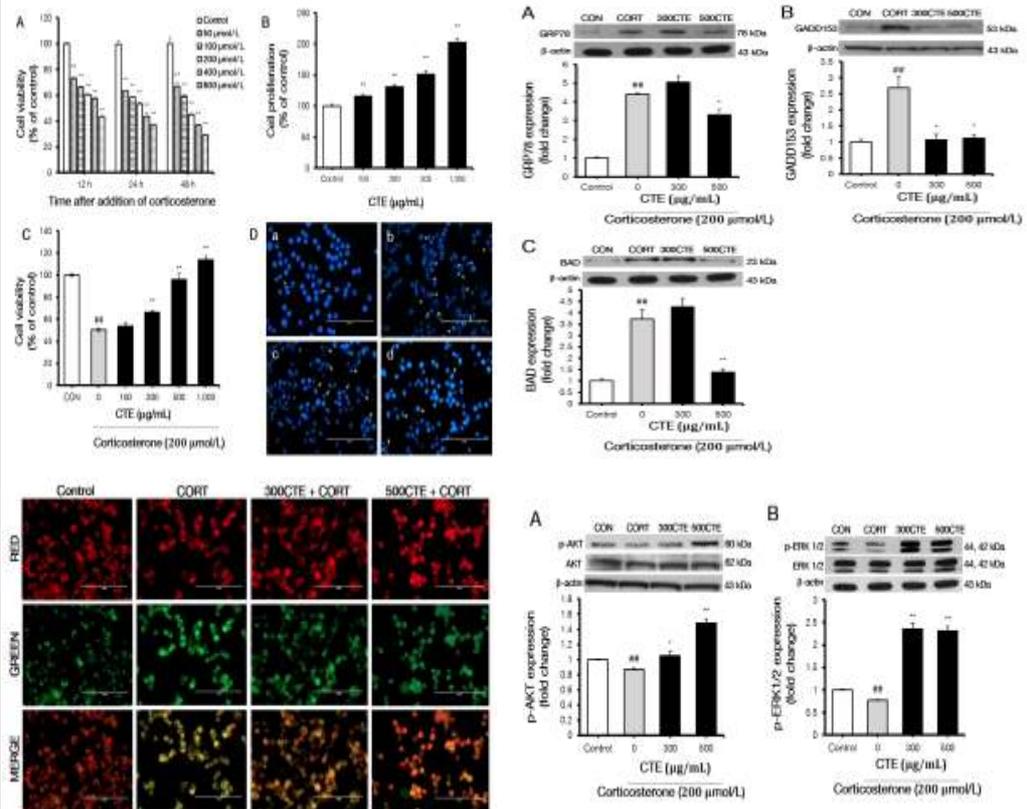
대표적 연구 업적 요약문

연구 업적 제목	The protective effects of ethanolic extract of Clematis terniflora against corticosterone-induced neuronal damage via the AKT and ERK1/2 pathway
연구업적 유형	논문 ( o ) 특허 ( )
과제 책임자	전병주 (2-1협동)

논문게재지	BMB Reports
게재지 권 호	2018; 51(8): 400-405

Chronic stress induces neuronal cell death, which can cause nervous system disorders including Parkinson's disease and Alzheimer's disease. In this study, we evaluated the neuroprotective effects of Clematis terniflora extract (CTE) against corticosterone-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells, and also investigated the underlying molecular mechanisms. At concentrations of 300 and 500  $\mu$ g/ml, CTE significantly decreased apoptotic cell death and mitochondrial damage induced by 200  $\mu$ M corticosterone. CTE decreased the expression levels of endoplasmic reticulum (ER) stress proteins GRP78, GADD153, and mitochondrial damage-related protein BAD, suggesting that it downregulates ER stress evoked by corticosterone. Furthermore, our results suggested that these protective effects were mediated by the upregulation of p-AKT and p-ERK1/2, which are involved in cell survival signaling. Collectively, our results indicate that CTE can lessen neural damage caused by chronic stress.

정신 건강개선  
식의약 인허가  
및 산업화



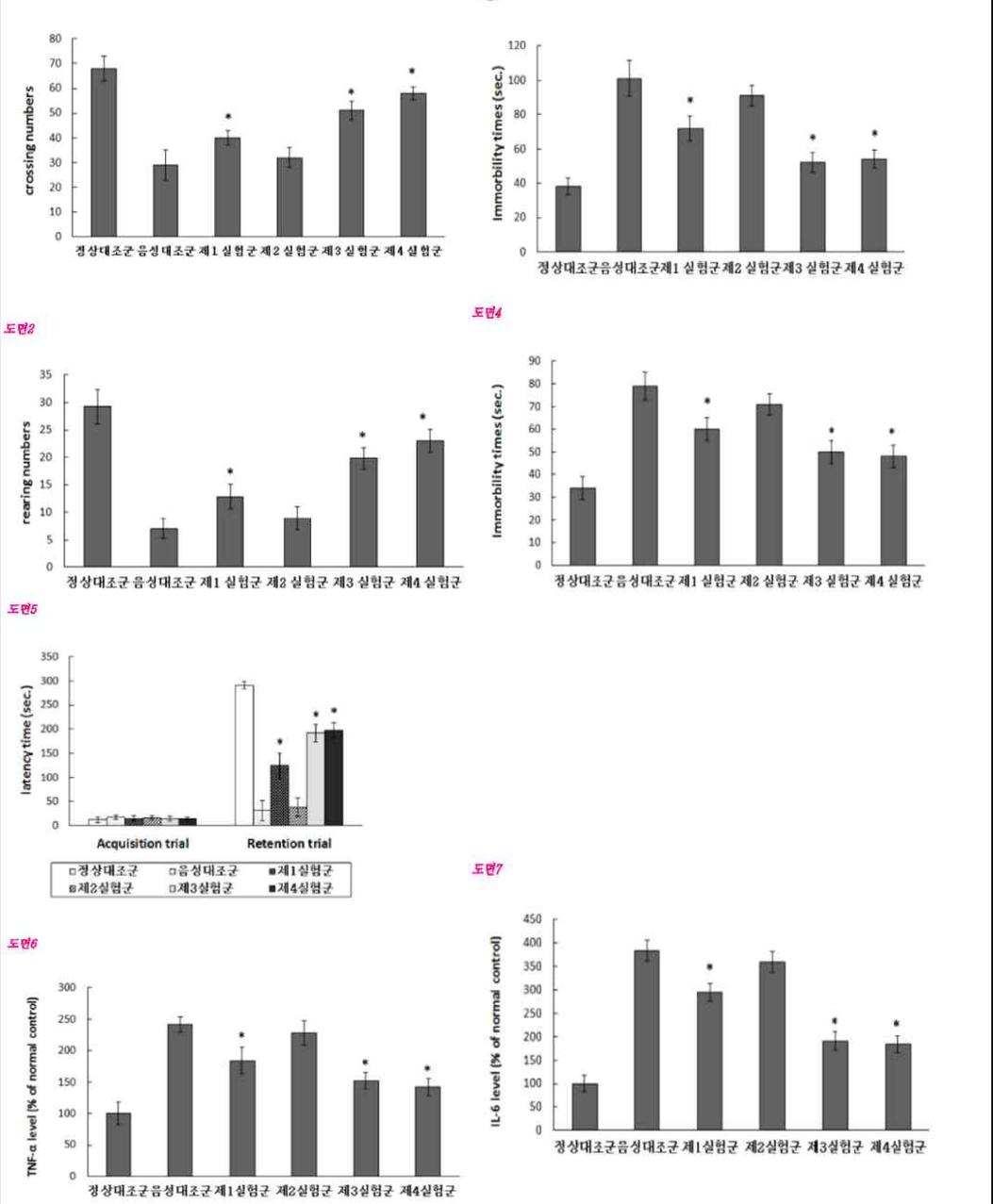
대표적 연구 업적 요약문

연구 업적 제목	스트레스의 완화용 조성물		
연구업적 유형	논문 ( ) 특허 ( o )		
과제 책임자	전병주 (2-1협동)		

출원번호	10-2015-0089789	등록번호	10-1641902
출원인	주식회사 네이처센스 농업회사법인		

**요약**  
 일년봉 및 브로콜리 추출물을 유효성분으로 함유하는 스트레스의 완화용 조성물은 천연 약재를 이용하여 스트레스를 완화시키고, 스트레스로 인해 발생하는 증상(질환)들을 예방하거나 부작용없이 효율적으로 개선시킬 수 있음에 대한 특허 출원 및 등록 완료

정신 건강개선  
 식의약 인허가  
 및 산업화



대표적 연구 업적 요약문																																
연구 업적 제목	스트레스 관련 질환 예방 및 개선용 조성물																															
연구업적 유형	논문 ( ) 특허 ( o )																															
과제 책임자	전병주 (2-1협동)																															
	출원번호	10-2016-0086419	등록번호 10-2020644																													
	출원인	주식회사 네이처센스 농업회사법인																														
정신 건강개선 식의약 인허가 및 산업화	<p><b>요약</b> 본 발명은 스트레스 관련 질환 예방 및 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예에 따른 스트레스 관련 질환 예방 및 개선용 조성물은 가는돌쩌귀 추출물, 가는잎할미꽃 추출물, 가는줄돌쩌귀 추출물, 가지복수초 추출물, 각시투구꽃 추출물, 개구리갓 추출물, 개구리미나리 추출물, 마음가리 추출물, 꿩의다리 추출물, 미나리아재비 추출물, 왜젓들기락풀 추출물, 복수초 추출물, 사위질빵 추출물, 할미꽃 추출물, 바람꽃 추출물 및 이들의 혼합물로 이루어진 식물 추출물 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 것이다.</p>																															
	<table border="1"> <caption>체중 (% of normal control)</caption> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Weight Gain (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>정상대조군</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>스트레스대조군</td> <td>~60</td> </tr> <tr> <td>마음가리</td> <td>~85*</td> </tr> </tbody> </table>			Group	Weight Gain (%)	정상대조군	100	스트레스대조군	~60	마음가리	~85*																					
	Group	Weight Gain (%)																														
	정상대조군	100																														
	스트레스대조군	~60																														
마음가리	~85*																															
<table border="1"> <caption>장기 무게 (% of normal control)</caption> <thead> <tr> <th>Condition</th> <th>Group</th> <th>Weight Gain (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">비장</td> <td>정상대조군</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>스트레스대조군</td> <td>~75</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">부신</td> <td>정상대조군</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>스트레스대조군</td> <td>~100</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">부신</td> <td>마음가리</td> <td>~105*</td> </tr> </tbody> </table>			Condition	Group	Weight Gain (%)	비장	정상대조군	100	스트레스대조군	~75	부신	정상대조군	100	스트레스대조군	~100	부신	마음가리	~105*														
Condition	Group	Weight Gain (%)																														
비장	정상대조군	100																														
	스트레스대조군	~75																														
부신	정상대조군	100																														
	스트레스대조군	~100																														
부신	마음가리	~105*																														
	<table border="1"> <caption>Immobility times (sec)</caption> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Immobility times (sec)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>정상대조군</td> <td>~40</td> </tr> <tr> <td>스트레스대조군</td> <td>~110</td> </tr> <tr> <td>마음가리</td> <td>~60*</td> </tr> </tbody> </table>			Group	Immobility times (sec)	정상대조군	~40	스트레스대조군	~110	마음가리	~60*																					
Group	Immobility times (sec)																															
정상대조군	~40																															
스트레스대조군	~110																															
마음가리	~60*																															
<table border="1"> <caption>serotonin (% of normal control)</caption> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Serotonin (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>정상대조군</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>스트레스대조군</td> <td>~25</td> </tr> <tr> <td>마음가리</td> <td>~60*</td> </tr> </tbody> </table>			Group	Serotonin (%)	정상대조군	100	스트레스대조군	~25	마음가리	~60*																						
Group	Serotonin (%)																															
정상대조군	100																															
스트레스대조군	~25																															
마음가리	~60*																															
<table border="1"> <caption>스트레스 증상 개선율 (%)</caption> <thead> <tr> <th>Symptom</th> <th>대조군 (%)</th> <th>실험군 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>신체화</td> <td>~8</td> <td>~35*</td> </tr> <tr> <td>강박증</td> <td>~9</td> <td>~40*</td> </tr> <tr> <td>대인예민성</td> <td>~2</td> <td>~38*</td> </tr> <tr> <td>우울증</td> <td>~9</td> <td>~55*</td> </tr> <tr> <td>불안증</td> <td>~2</td> <td>~58*</td> </tr> <tr> <td>적대감</td> <td>~8</td> <td>~50*</td> </tr> <tr> <td>공포불안</td> <td>~5</td> <td>~48*</td> </tr> <tr> <td>편집증</td> <td>~5</td> <td>~38*</td> </tr> <tr> <td>정신증</td> <td>~5</td> <td>~48*</td> </tr> </tbody> </table>			Symptom	대조군 (%)	실험군 (%)	신체화	~8	~35*	강박증	~9	~40*	대인예민성	~2	~38*	우울증	~9	~55*	불안증	~2	~58*	적대감	~8	~50*	공포불안	~5	~48*	편집증	~5	~38*	정신증	~5	~48*
Symptom	대조군 (%)	실험군 (%)																														
신체화	~8	~35*																														
강박증	~9	~40*																														
대인예민성	~2	~38*																														
우울증	~9	~55*																														
불안증	~2	~58*																														
적대감	~8	~50*																														
공포불안	~5	~48*																														
편집증	~5	~38*																														
정신증	~5	~48*																														

대표 연구업적 요약문

연구업적 제목	식물유래 EGF 생산 식물세포주 LMO 승인 및 녹색기술 인증
연구업적 유형	논문( ) 특허( ) 기타(LMO 승인, 녹색기술 인증)
과제 책임자	권태호(3-1 협동, (주)진셀바이오텍 (이전 (주)엔비엠)

▣ 연구업적의 주요 내용

- 본 연구개발을 통하여 세계최초로 생산한 식물유래 EGF를 생산하기 위하여서는 관련 법에 유전자변형생물체 위해성심사를 받아야 하며, 본 과제를 통하여 개발한 EGF 고생산 식물세포주에 대하여 산업통상자원부로부터 유전자변형생물체 위해성 심사받고 국내최초로 식물을 이용한 산업용 LMO 이용승인을 받았음
- 본 연구개발을 통하여 확립한 식물유래 EGF 생산기술은 녹색기술로 인정받았으며, 식물유래 EGF는 녹색제품으로 인증을 받았음

유전자변형생물체 위해성심사신청서

농림 축산물  산업용  보건의약품  
 환경정화용  해양수산물  식물 의약품/기공

농림축산식품부 (농·축·수) | 환경부 (환경) | 해양수산부 (해양) | 식품의약품안전처 (식품·의약품)

신청번호: [ ] 접수일: [ ] 처리기간: 30일

신청인: [ ] 대표자: [ ] 사업장 주소: [ ]

개발자: [ ] 주소: [ ]

유전자변형생물체 위해성심사 신청내용

유전자변형 생물체: 유전자변형 생물체 (Genetically Modified Organism) (GMO) (Genetically Modified Organism) (GMO)

위해성 목적: 유전자변형 생물체 (Genetically Modified Organism) (GMO) (Genetically Modified Organism) (GMO)

심사목적:  수입승인  생산승인  이용승인

최종결정: 유전자변형 생물체 (Genetically Modified Organism) (GMO) (Genetically Modified Organism) (GMO)

2018년 02월 16일

신청인: 유전자변형생물체 개발회사 (주)진셀바이오텍

보건복지부장관 귀하

첨부서류: [ ]

< LMO 위해성 승인 >



< 녹색기술 인증서 >

▣ 승인 및 등록기관

- LMO 위해성 승인: 산업통상자원부
- 녹색기술 인증: 농림수산식품부

▣ 관련 과제

- 제 3-1 세부: 형질전환 식물을 이용한 비동물성 성장인자 생산 ((주)진셀바이오텍 권태호)

대표 연구업적 요약문

연구업적 제목	식물유래 EGF의 미국 INCI 등록
연구업적 유형	논문( ) 특허( ) 기타(국제 화장품 원료 사전 등재)
과제 책임자	권태호(3-1 협동, (주)진셀바이오텍 (이전 (주)엔비엠)

■ 연구업적의 주요 내용

- 본 연구개발을 통하여 세계최초로 생산한 식물유래 PTD-VEGF를 화장품 원료로 세계시장에 판매하기 위하여는 미국 화장품 미국 화장품 협회(PCPC)의 심사를 거쳐 '국제화장품원료집 (International Cosmetic Ingredient Dictionary (ICID))에 등재를 하여야 함
- 식물유래 PTD-VEGF165를 미국 화장품 협회의 심사를 받고 국제화장품원료집 (ICID)에 등록되었음



< 국제화장품원료집 (ICID) 등재 증명서 >

■ 등록기관

- 미국 화장품 협회 (The Personal Care Products Council)

■ 관련 과제

- 제 3-1 세부: 형질전환 식물을 이용한 비동물성 성장인자 생산 ((주)진셀바이오텍 권 태호)