

120040-02

봉
독
유
래
멜
리
틴
을
이
용
한
면
역
과
민
반
응
개
선
건
강
기
능
식
품
개
발

2021

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
유용 농생명자원 산업화 기술개발 사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004015-01

봉독 유래 멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품 개발

2022.4.4

주관연구기관 / (주)청진바이오텍
협동연구기관 / 대구가톨릭대학교

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

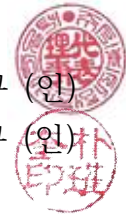
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “봉독 유래 멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품 개발”(개발
기간 : 2020.04.29 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.4.4

주관연구기관명 : (주)청진바이오텍 (대표자) 김 철 구 (인)

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교 (대표자) 박 관 규 (인)



주관연구책임자 : 김 철 구

협동연구책임자 : 박 관 규

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서										보안등급		
										일반[], 보안[]		
중앙행정기관명						사업명						
전문기관명 (해당 시 작성)						내역사업명 (해당 시 작성)						
공고번호						총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
						연구개발과제번호						
기술분류	국가과학기술 표준분류		1순위 소분류 LB0306	100%	2순위 소분류 코드명		%	3순위 소분류 코드명		%		
	농림식품과학기술분류		1순위 소분류 RA0306	50%	2순위 소분류 CA0105		30%	3순위 소분류 PA0201		20%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문										
		영문										
연구개발과제명		국문		봉독 유래 멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품 개발								
		영문		Development of health functional foods using melittin, a major component of bee venom, as a functional ingredient for suppressing immunological hypersensitivity reaction								
주관연구개발기관		기관명		(주)청진바이오텍		사업자등록번호		134-86-29037				
		주소		(우) , 경기도 안산시 단원구 광덕대로 142, 405호		법인등록번호		131411-0178535				
연구책임자		성명		김철구		직위		대표이사				
		연락처		직장전화		휴대전화						
		전자우편				국가연구자번호						
연구개발기간		전체		2020. 04. 29 - 2021. 12. 31(1년 9개월)								
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2020. 04. 29 - 2020. 12. 31(1년 9개월)						
		2단계										
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체		기타()		합계		연구개발 외 지원금
		현금		현금		현물		현금		현물		합계
총계												
1단계		1년차		226,000		7,537		67,830		233,537		67,830
		2년차		302,000		-		101,300		302,000		101,300
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고 역할 기관유형
공동연구개발기관		대구가톨릭대학교 산학협력단		박관규		교수						
위탁연구개발기관												
연구개발기관 외 기관												
연구개발담당자 실무담당자		성명		박정근		직위		과장				
		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 03월 18일

연구책임자: 김철구 (인)

주관연구개발기관의 장: 김철구 (직인)

공동연구개발기관의 장: 박관규 (직인)

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호			
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 LB0306	100 %	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
	농림식품 과학기술분류	1순위 소분류 RA0306	50 %	2순위 소분류 CA0105	30 %	3순위 소분류 PA0201	20 %
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		봉독 유래 멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품 개발					
전체 연구개발기간		2020.04.29. - 2021.12.31					
총 연구개발비		총 704,667 천원 (정부지원연구개발비: 528,000 천원, 기관부담연구개발비 : 176,667 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품 개발 및 시제품 제작			
		전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> ○국내산 정제봉독의 원료 규격화와 멜리틴의 분리 ○원료의 과립, 코팅, 건조 가능한 유동층 코팅기 제작 ○멜리틴과 유산균 추출물(부형제)의 혼합 기술 개발 ○멜리틴의 면역과민반응 완화 기능성 확인 (in vitro) ○멜리틴의 경구투여의 유효성 및 안전성 검증 (in vivo) ○시제품(멜리틴과 유산균 추출물 혼합)의 유효성 및 안전성 검증 (in vivo) ○제품표준분석법 확립 및 제품표준서 작성 			
		1단계 (2020.04.29. ~2021.12.31)		목표	<ul style="list-style-type: none"> ○시제품 개발 ○멜리틴의 면역과민반응 완화 기능성확인 ○제품표준분석법 확립 및 제품표준서 작성 ○시제품의 유효성 및 안전성 검증 		
		내용		<p>(1차년도- 2020년도)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○시제품(BVLS) 개발(주관기관) *국내산 정제봉독의 원료 규격화와 멜리틴의 분리 *원료의 과립, 코팅, 건조 가능한 유동층 코팅기 제작 *봉독 유래 멜리틴과 Lactobacillus spororenes의 혼합 기술 개발 및 시제품(BVLS) 제조 ○멜리틴의 면역과민반응 완화 기능성확인(협동기관) *멜리틴의 경구투여의 유효성 및 안전성 검증(in vivo) <p>(2차년도- 2021년도)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○제품표준분석법 확립 및 제품표준서 작성(주관기관) *시제품(BVLS)에 대한 유효성 및 안전성 시험평가 의뢰 - GLP기관 *표준분석법 확립 및 제품표준서 작성 ○시제품(BVLS)의 유효성 및 안전성 검증(협동기관) *시제품(BVLS)의 유효성 및 안전성 검증 - 협동기관 			
n단계 (해당 시 작성)		목표					
		내용					

연구개발성과	<p>○ 정성적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> *국내산 정제붕독의 원료 규격화와 멜리틴의 분리 공정 확립 *원료의 과립, 코팅, 건조 제조 가능한 유동층 코팅기 제작 *붕독 유래 멜리틴과 Lactobacillus spororenes의 혼합 기술 개발 및 시제품(BVLS) 개발 *멜리틴의 면역과민반응 완화 기능성 확인 (in vitro) *멜리틴의 경구투여의 유효성 및 안전성 검증 (in vivo) *시제품(BVLS)의 유효성(면역증진 효능) 및 안전성(독성 평가) - (협동기관 및 GLP기관) *시제품(BVLS)의 제품표준분석법 확립 및 제품표준서 작성 <p>○ 정량적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> *논문 발표 : 1건(SCI), 학술발표: 4건, 특허 출원 : 2건 *기술실시: 1건, 제품화: 1건(시제품) *인력양성: 4명, 고용창출: 1명 												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>○ 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> -붕독유래 멜리틴과 Lactobacillus spororenes을 혼합하여 원료의 과립, 코팅, 건조에 필요한 유동층 코팅기 제작 및 제조 공정조건 확립 -멜리틴을 이용한 면역학적 약리기전 규명 및 과학적 근거 확보 -멜리틴이 포함된 건강기능식품의 시험법 및 제품표준서 기준 규격 확립 <p>○ 경제적·산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> -붕독 유래 멜리틴을 이용한 고부가가치의 다양한 건강기능식품으로서의 상품 개발에 기반 마련 -멜리틴 함유 건강기능식품의 시험법 및 기준 규격 확립을 통한 개별 인정형 원료로의 식약처 등록을 위한 기반 마련 -붕독 소비시장 확대로 소득 창출 및 붕독 시장 활성화 -제품화를 통한 국내·외 붕독시장 확대 및 해외 홍보를 통한 수출시장 확대 -국내·외 특허출원을 통한 지식재산권 확보로 해외수출 가속화 -붕독 소비의 새로운 시장 개척 및 고부가가치 건강기능식품 산업 육성 <p>○ 사회적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> -유용농생명자원인 곤충자원의 산업화 및 고부가가치 제품 개발에 의한 국내 자원 활용 -붕독 유래 멜리틴의 건강기능식품의 신 시장 창출 -붕독 유래 멜리틴을 활용한 국내 건강기능식품 경쟁력 강화 												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	-												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	제품화	기술실시	학술발표	인력양성	고용창출	생명자원		화합물	신품종		
	1	2	1	1	4	4	1	-	-	-	-	-	
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격(모델명)	수량	구입연월일	구입가격(천원)	구입처(전화)	비고(설치장소)			ZEUS 등록번호		
	-	-	-	-	-	-	-	-			-		
국문핵심어 (5개 이내)	멜리틴		면역과민반응		건강기능식품		유산균추출물		기능성원료				
영문핵심어 (5개 이내)	Melittin		Immunological Hypersensitivity Reaction		Health Functional Food		Lactobacillus Extract		Functional raw materials				

< 목 차 >

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

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발의 목적

- 고령화 사회에 접어들면서 무병장수에 대한 소비자들의 욕구가 국·내외를 막론하고 증대되고 있으며, 이러한 현상으로 건강기능식품은 우리 경제의 중요한 신 성장 동력이 될 것으로 보임. 다른 한편으로는 고부가가치, 고성장의 글로벌 건강기능식품 시장을 선점하기 위한 국가 간 경쟁이 더 치열해질 것으로 예상되어짐. 그러므로 품질과 효능이 우수한 제품을 개발하여 경쟁력을 확보하는 것이 더욱 중요해질 것으로 보이며, 이러한 근거들에 의거하여 봉독 유래물질인 **멜리틴과 면역관련 유산균추출물과 함께 배합하여 보다 효과적인 건강기능식품을 개발**하고자함.
- 알려져 있는 봉독 성분의 효과는 다음과 같음. 1) 강력한 항 염증효과, 2) 면역기능 조절, 3) 신경계 조절, 4) 혈액순환 조절, 5) 생체호르몬 분비 조절, 6) 항산화 기능, 7) 미백 및 주름개선, 8) 항균 효과 등이 있음. 이러한 다양한 봉독의 효과 중에서도 면역기능 조절 효과를 갖는 주요성분인 멜리틴과 면역관련 유산균추출물을 함께 배합하여 보다 효과적인 건강기능식품 개발에 그 목적이 있음. 이에 따른 유효성과 안전성 검증을 위한 체계적인 연구가 필요한 바임. 당사는 **소형실험용 유동층 코팅기를 직접 제작하여 원료를 과립, 코팅, 건조하고 이에 따른 유효성과 안전성을 검증하는 연구를 체계적으로 진행함.**
- 뿐만 아니라 현재 국내 건강기능식품 시장은 해외 원료를 이용한 제품으로 인해 거의 포화 수준에 도달되어 있기 때문에, 앞으로의 판매 방향을 역으로 맞춤형 수출로써 향상시켜야 할 필요성이 절실한 상황임. 따라서 우리나라 고유의 원료를 이용한 제품 개발과 수출 전략 마련이 시급. 그렇기 때문에 당사의 천연 원료인 봉독을 이용하여 외화 절감 및 수출 가능성을 열어두고 있으며, 나아가 **당사의 독창적인 기술로 정제, 분리한 멜리틴을 건강기능식품에 응용하여 기존 건강기능식품 보다 더 업그레이드된 제품을 선보일 수 있을 것**이라고 사료됨.

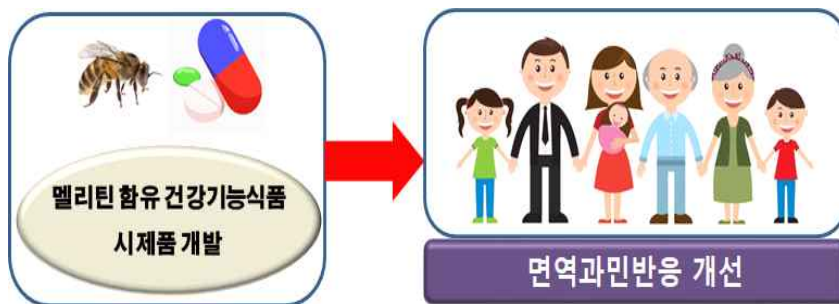


그림 1. 연구개발 개요

나. 연구개발의 필요성

(1) 면역기능의 의의

- 면역은 체내에 존재하는 자기방어체계로서 인체가 외부로부터 침입해 오는 각종 물질이나

생명체를 자기 자신에 대한 이물질로 인식하여 제거하고 대사시키는 과정임. 외부 자극에 의한 손상이나 병원 미생물의 침입으로부터 자신을 방어하기도 하지만, 염증반응 등과 같이 자기 자신의 조직에 손상을 줄 수도 있음.

- 인체 내에 들어온 이물질로부터 우리 몸을 지키고자 하는 인체의 방어작용을 면역반응이라 하는데, 이때 대다수의 사람에게는 별로 해가 없는 이물질에 대해서까지 면역기능이 작용하여 비정상적으로 과민한 반응을 일으킬 때가 있는데, 이를 면역과민반응이라고 함 (그림 2).



그림 2. 면역과민반응

- 면역과민반응은 면역력이 약해서 생기는 현상이 아니라, 면역체계의 이상으로 면역이 불균형해져서 생기는 현상임. 따라서, 면역력을 무조건 증강하는 것이 아니라, 면역균형을 맞춰 주어야 함.



그림 3. 면역균형

(2) 면역과민반응 개선의 중요성

- 산업화, 환경오염, 서구화된 식생활 등으로 인해 면역과민반응에 의해 발생하는 자가면역 질환이 급속히 증가하고 있음. 예를들어, 대표적인 자가면역질환에는 아토피 피부염이 있음.

- 아토피 피부염은 대표적인 만성 피부 질환으로 다양한 인자에 기인한 염증성 면역 반응과 심각한 가려움증을 동반하는 것을 특징으로 함 (그림 4). 아토피 피부염은 원인과 발생기전이 다양하고 호전과 악화를 반복하는 만성질환으로 장기간의 꾸준한 치료가 필요하며, 재발을 반복하는 질병의 특성 상 성인이 된 이후까지 중증화, 난치화되는 경우도 많음.

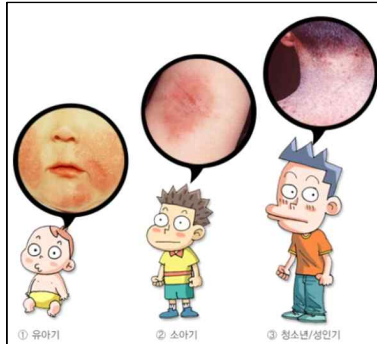


그림 4. 아토피 피부염의 증상

○ 아토피 피부염의 유병률 증가

- 아토피 피부염은 만성 재발성 피부질환으로 대부분의 국가에서 **소아 10~20%, 성인 1~3%** 정도의 유병률을 보이는데, **최근 급격한 증가추세**를 보이는 우리나라의 경우도 이와 유사한 유병률을 나타내고 있음.
- 미국, 중국, 인도 등 주요 9개국의 아토피 피부염 환자 수는 **2022년 1.38억명**으로 증가할 것으로 예상되고 있음 (Atopic dermatitis- Global Drug Forecast and Market Analysis to 2022, 2013).
- **국내 아토피 피부염 환자 수는 90만명 이상**으로 집계되고 있으며(건강보험심사평가원), 이 중에 **소아청소년 환자(0~19세)**가 약 60%를 차지함. 최근에는 소아청소년 환자가 하락하는 데 반해 성인 환자는 크게 상승하는 추세임 (그림 5). 0~19세까지 소아청소년 환자의 경우 5년간 약 16%가 감소한 반면, 20세 이상의 성인 환자는 18%가량 증가하였음.

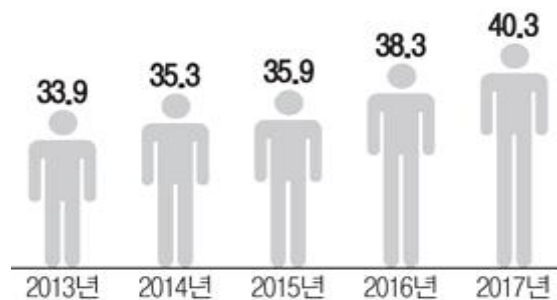


그림 5. 국내 20세 이상 성인 아토피 피부염 환자 수
(건강보험심사평가원, 단위: 만명)

○ 아토피 피부염의 사회·경제적 부담 증가

- 아토피 피부염은 우리나라에서 가장 많이 오진되고 있는 질환 중의 하나로서 불필요한 치료 및 잘못된 치료도 많이 행해지고 있고, 의료비 외에 환경개선 등의 막대한 사회적 및 간접비용이 발생하고 있음.
- 우리나라의 아토피 피부염 질병부담은 **직접의료비로는 연간 1조 원**에 육박하고, 간접비까지 포함하면 1조 원이 넘어선 것으로 추정됨 (J Korean Med Assoc 2014;57(3):205-207).

- 아토피 피부염은 환자의 수면 부족, 친구들의 놀림, 스포츠 참여의 어려움, 자신감 결여 및 우울증 등 신체적, 사회적, 정신적 측면에서 다양한 삶의 질에 저하를 가져올 수 있음.
- 아토피 피부염을 조기에 적극적으로 치료하지 않으면 천식, 비염으로 진행되는 ‘atopic march’가 나타나게 되어 복합적인 문제를 야기하게 됨.
- 또한, 아토피 피부염의 합병증으로 안구에 백내장, 원추각막, 망막박리, 녹내장 등이 동반될 수 있으며, 이외에 영양장애, 성장발달장애, 정신과적인 문제 및 치료약제에 의한 부작용도 흔히 관찰됨.

○ 아토피 피부염 환자는 급격히 증가하고 있는 것에 비해, 치료효과가 우수하면서 장기적인 사용이 가능한 치료제는 없는 실정으로, 미충족 수요가 매우 큰 분야임.

- Datamonitor에서 발표한 아토피 피부염 약물의 안전성-효과별 분포도 자료를 보면, 안전성과 효과 모두 만족스럽지 않은 것으로 평가되고 있음.
- 아토피 피부염의 병인은 매우 복잡한 반면에, 현재까지 개발된 치료제는 그 중 일부 경로만을 차단하기 때문에 큰 치료효과를 기대하기가 어려움.
- 아토피 피부염 환자 중 만성 질환자의 약 70%가 영유아이기 때문에 안전성 문제가 중요한데, 국소 스테로이드제를 비롯한 대부분의 약물들이 심각한 부작용의 위험을 갖고 있어 장기적인 치료가 어렵고, 검증되지 않은 치료법에 많이 의존하고 있음.
- 최근 활발하게 개발되고 있는 바이오의약품인 단클론 항체의 경우 긴 제작기간, 큰 사이즈, 면역원성의 가능성, 고비용 등의 한계를 지니고 있음.

(3) 면역과민반응 개선을 위한 건강기능식품 개발의 필요성

○ “건강기능식품”이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공을 포함한다)한 식품을 말함. “기능성”이란 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말하는데, 건강기능식품의 기능성은 3가지가 있음 (표 1).

기능성 구분	기능성 내용
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용

표 1. 건강기능식품의 기능

○ 대부분의 자가면역질환들은 장기간 체질개선을 통한 맞춤형 적용이 필요함. 따라서 부작용없이 인체의 면역반응을 유도시키는 면역조절 기능성 식품에 대한 관심이 고조되어 왔음. 특히 면역조절 기능성식품은 특이성이 뛰어나면서 부작용이 적을 뿐만 아니라 상품화 기간이 짧고 개발비용이 적어 차세대 건강기능성식품 시장을 주도할 것으로 전망됨.

(4) 봉독의 개요

- 봉독이란 일벌과 여왕벌의 독낭에 저장되어 있는 효소, 폴리펩티드, 작은 분자량을 가진 다양한 물질 등으로 이루어진 복잡한 혼합체로 다른 동물로부터 자신을 보호하기 위한 방어수단으로 사용됨. 봉독은 맑고 투명한 액체로서 강한 쓴 맛이 나는 방향성 물질이며, 비중은 1.1313, 산도(pH)는 5.2 ~ 5.5 범위임. 실온에서 빨리 증발되어 건조되며, 증발 후 봉독 중 30~40%의 결정물로 남음 (그림 6,7).



그림 6. 봉침



그림 7. 건조봉독

- 봉독에 대한 대부분의 약리작용은 전체 독성분 혹은 단일 주요성분들의 활성화에 기인함. 구성성분은 펩타이드와 아미노산, 활성 아민 등을 포함하여 40가지 이상의 물질로 구성되어 있으며 가장 중요한 성분으로 멜리틴, 아파민, MCD-펩타이드 등이 있고 전체적으로 진통, 소염, 항균작용과 함께 뇌하수체 호르몬 분비 촉진, 혈액순환 촉진 등의 작용이 알려져 있음. 그러나 아직도 인체에 대한 봉독의 완전한 작용 기작은 밝혀지지 않았으며 여러 질환에서 아래와 같은 치료 및 예방 효과를 보이고 있음 (표 2).

- ▶ 면역계 질환의 치료 : 대부분 면역성 질환의 치료에 봉독은 효과를 보이는데 이는 봉독이 포유동물의 면역계를 자극해서 질병과 성공적으로 싸울 수 있게 함. 봉독의 두 가지 면역 작용은 유기체의 생체계를 자극하는 것이고 다음 순서로는 생체의 방어력을 증가시키는 것임.
- ▶ 항염증 작용 : 봉독의 주성분들이 염증 억제에 매우 유효하게 작용함. 특히 관절염의 경우 멜리틴과 아파민을 주입했을 경우 현저하게 부종이 억제됨. 단백효소 억제제와 아돌라핀 처리에도 부종이 15-40% 효과를 보임.
- ▶ 신경독 효과 : 벌에 쏘이면 통증과 염증을 유발하는데 이를 유발하는 물질은 포유동물에 있어서는 회피반응 즉 진통제를 개발하는데 있어 효과적으로 사용됨. 특히 봉독 성분 중 아파민의 작용에 의해 진통 작용을 하는데 각종 신경통, 관절염 및 류마티스성 관절염, 통풍, 근육통 등에 진통작용이 강하고 치료효과가 높음.
- ▶ 용혈작용 : 봉독의 작용 중 가장 뛰어난 작용임. 멜리틴, 포스포리파아제 등의 작용에 의해 타박상, 내출혈 등 어혈을 흡수·배설 시키고 조직의 새로운 혈액과 산소 및 영양을 공급하는 치료와 용혈작용을 함.
- ▶ 혈관 확장 작용 : 히스타민(Histamine) 물질의 작용에 의해서 혈압을 내리게 하는 강력한 작용을 함. 특히 2억 5천만분의 1의 농도에서도 혈압강하작용이 있음.
- ▶ 자율신경 조절작용 : 인체에 스트레스를 계속 받게 되면 교감신경과 부교감신경의 자율신경계에 난조가 와서 이것이 많은 병의 원인이 됨. 이 자율신경을 정상화 하는데 필요한 물질인 카테콜아민과 아세틸콜린이 봉독 속에 함유되어 있으며 이 물질은 뇌세포 전달물질이기 때문에 심신증, 갱년기 장애 스트레스성 질환 치료에 효과적임.
- ▶ 항균작용 : 항균 및 항진균 작용이 매우 뛰어나며 바이러스성 종양 등에도 효과적임. 특

히 치주염, 편도선염, 다래끼, 화농성 질환에 치료효과가 높음.

성분		약리적 작용	References
Peptides	Melittin	세포용해작용, 항염증작용, 면역작용	Jentsch(1969)
	Apamin	신경통 완화작용, 진통작용, 항염증작용, 면역작용, 신경독작용	Harbermann등(1965)
	MCD-peptide 401	항염증작용	Hanson등(1974)
	Adolapin	항염증작용, 진통작용, 해열작용	Shkenderov(1982)
	Protease inhibitor	단백질과 에스테르 용해 억제작용, 항염증작용	Shkenderov(1973)
	Secapin	저온증, 진정작용	Gauldie등(1976)
	Tertiapin	비만세포 탈과립 작용	Gauldie등(1978)
	Procamine A, B	방사선 보호성과 관련	Peck등(1978)
Enzymes	Hyaluronidase	조직분해작용, 항원성 성분	Baker(1966)
	Phospholipase A ₂	세포조직의 파괴성, 용혈작용, 촉매작용	Jentsch(1972)
	α - glucosidase	항체역할 증진	Shkenderov등(1979)
	Acid phosphomonoesterase	항체역할 증진	Benton(1965)
	Lysophospholipase	Phospholipase A ₂ 작용 억제	Doery(1964)
Amines	Histamine	혈압강화작용, 장관수축작용, 위산분비 촉진 작용	Owen(1974)
	Dopamine	신경전달 물질	Owen(1971)

표 2. 봉독의 성분 및 약리작용

- 봉독의 다양한 성분 중에 **펩타이드 멜리틴(melittin)**은 건조봉독의 약 50%를 차지하는데, 봉독 성분 중 가장 많은 연구논문이 발표되어 있으며 **봉독의 약리효과에서 가장 중요한 역할을** 하는 것으로 알려져 있음.

(5) 선행연구의 내용 및 결과

- 본 연구개발과제의 주관연구기관인 (주)청진바이오텍은 채취기 판매 농가에 대한 봉독의 일정 수급량을 보유, 당사만의 기술력으로 엄격한 정제과정을 통해 높은 순도와 품질의 봉독을 연구 및 생산하고 있음. 봉독의 수급부터 생산까지 모든 과정을 진행함으로써 특히 비용적인 부분에서 타사와 다른 큰 장점을 보유.
- 당사의 전기충격식 봉독채취기(특허번호: 10-0579899)를 구매한 농가를 대상으로 봉독의 지속적인 생산 장려를 위해 수매를 계약하였으며, 연간 10~15Kg의 채취봉독을 전국 양봉농가로부터 수매한다. 농가로부터 수매한 봉독은 농촌진흥청 국립농업과학원으로부터 기술이전 받은 ‘봉독의 간이 정제법’을 활용하여 약 50-60%의 회수율로 정제함으로써 정제봉독을 생산하기 시작하였고, 중소기업이전기술개발 사업을 통하여 기존의 간이 정제 방

법을 업그레이드하여 고효율, 저비용의 대량정제 시스템을 구축함으로써 75% 이상의 회수율을 이루는 기술을 보유하고 있다. 생산 이력제 (그림 8)를 통한 봉독원료의 안전성 확보와 생산자와 구매자 간의 신뢰관계 구축.


CHUNG JIN BIOTECH CO., Ltd.
A Leading World-Class Brand in Purified Bee Venom and Bee Venom collector

생산 이력원

Product : **Purified Bee Venom**
 Product Code : PBV
 Batch No. : 201605
 Lot No. : 20160516 Date of Issue : 2016-12-20
 Date of Manufacture : 2016-05-16
 Country of Origin : Republic of Korea

Certified By : 

생산자	생산 지역	채집 일시	melittin 함량(%)
김*식	창녕	2013.07 - 2013.08	63.88
김*태	공주	2013.08	60.61
김*규	창녕	2013.07 - 2013.08	62.19
김*식	안성	2013.08	57.18
남*희	상주	2013.08	64.03
류*범	창녕	2013.06 - 2013.08	64.19
박*부	울진	2013.08	61.14
박*신	울진	2013.08	63.91
박*식	군위	2013.08	57.87
배*희	양양	2013.07	63.26
변*섭	창녕	2013.07 - 2013.08	62.6
신*균	군위	2013.06	62.99
유*은	강화	2013.08	50.22
유*옥	공주	2013.07 - 2013.08	63.52
이*섭	마산	2013.08	52.64
이*주	공주	2013.08	58.82
이*길	창녕	2013.08	63.07
최*택	군위	2013.09	61.09
하*훈	창녕	2013.08	60.53
현*우	상주	2013.07	63.14
홍*국	의성	2013.08	58.41

F4, 15 Sungan2-gil, Sangrok-Gu, Ansan-Si, Gyeonggi-Do, Korea
 Phone: 82. 31. 409. 3707 FAX: 82. 31. 409. 3709
 E-mail: younan99@biovenom.com Website: www.biovenom.com

그림 8. 봉독의 생산이력원

- 본 과제에의 주관연구기관인 (주)청진바이오텍은 **봉독을 생산**하고 있음



봉독 원료



정제 봉독



분리정제봉독



멜리틴

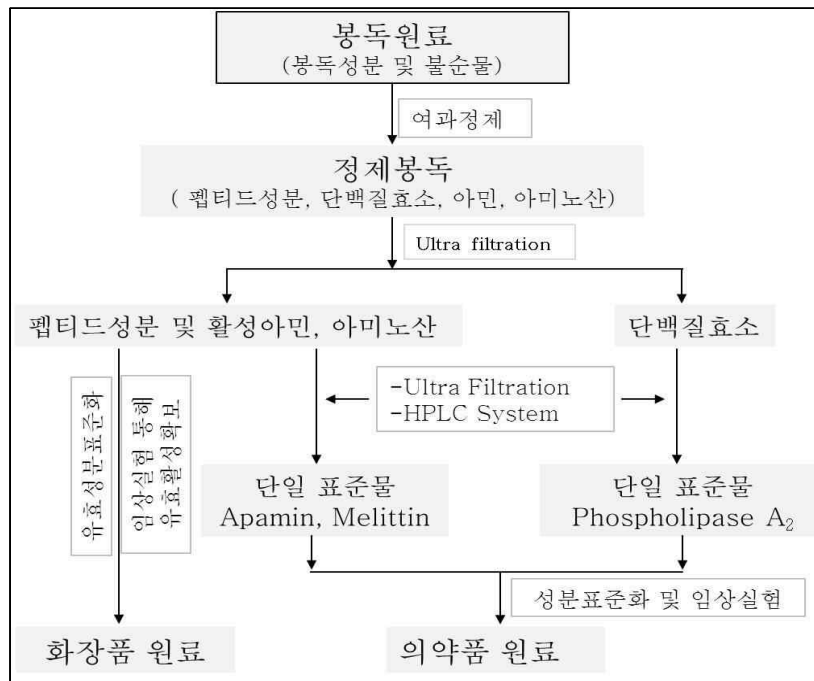


그림 9. 청진바이오텍의 붕독원료 기본 개념도

- ▶ 붕독원료: 당사가 개발한 붕독채취기(특허등록번호: 10-0579899)를 이용하여 살아있는 벌에게 전기적인 충격을 주어 채취한 붕독으로 화분, 프로폴리스, 왁스, 미세곤충, 먼지 등의 성분들이 섞여 있기도 함.
- ▶ 정제붕독: 채취된 붕독원료를 충분히 증류수에 용해시켜 3차 여과를 거쳐 비수용성 물질(화분, 프로폴리스, 왁스, 미세곤충 등), 미세물질(꽃가루, 미세먼지 등), 미생물을 제거(멸균)함. 여과된 여과액을 동결 건조시켜 정제붕독을 생산 및 제품화 함.
- ▶ 분리정제붕독: 붕독의 알레르기 유발물질(포스포리파아제 A2, 히알루로나다아제 등)을 분리하여 붕독 제품에서 유래되는 발열, 두드러기, 기침 등의 알레르기 반응을 낮춤.
- ▶ 붕독의 단일성분: 붕독의 유효성분(멜리틴)만을 분리하여 붕독 연구 및 피부 상처치료 원료로 상품화.

- 본 과제에의 주관연구기관인 (주)청진바이오텍은 멜리틴과 관련하여 고순도 멜리틴, 진세노사이드 Rb1 alc Rg3, 및 생열귀나무 열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 기능성 화장품 조성물 및 이의 제조방법(1019788500000), 정제붕독으로부터 멜리틴을 고순도로 분리하는 멜리틴의 분리방법(1218454690000) **2편의 특허**를 보유하고 있음

- 본 과제에의 주관연구기관인 (주)청진바이오텍은 멜리틴과 관련하여 FDA-DMF(031645)를 보유하고 있음

○ 본 연구개발과제의 주관연구기관인 (주)청진바이오텍은 오랫동안의 연구개발 노하우를 토대로 다음과 같은 소형실험용 유동층 코팅기를 제작함.

- 유동층(Fluid bed) 또는 Air suspension process는 다양한 크기의 입자에 대한 조립

(Granulation/Agglomeration)과 Layering, Coating, Drying process에 이용됨. Fluid bed process는 Spray nozzle의 위치에 따라 Top Spray, Bottom Spray, Tangential Spray 3가지로 분류됨 (그림 10).

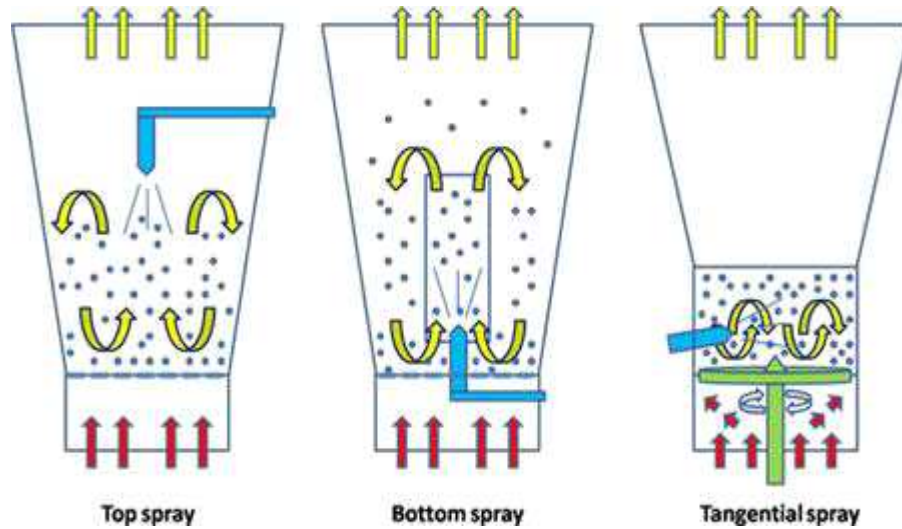


그림 10. 유동층 코팅기

- 유동층에 의한 습식조립은 밀폐된 공간(Chamber)에서 Step별로 이루어지는 조작으로써 의약품제조, 식품, 비료 등에 걸쳐 많은 산업분야에 적용되어 사용하고 있음. 한 용기 안에서 분체의 혼합, 조립, 건조, 코팅이 이루어질 수 있으므로 이 방식은 다른 습식조립보다 원료의 수율이 좋고 공정시간을 단축시킬 수 있음. 타정용 과립제조 외에 Top spray 방식은 물을 잘 흡수할 수 있는 다공성의 구조를 지닌 분산성이 매우 좋은 과립을 만들어줌.

- 유동층은 Powder Coating, Powder layering, Pelletizing에도 이용됨. Bottom spray 방식의 유동층은 다른 코팅기술에 비해 우수한 필름을 형성시켜주므로 약제방출을 조정하거나 통제하는 목적으로 Active Layering과 Coating 목적으로 제약 산업 및 비료산업에 응용되고 있음. Tangential spray(Rotor)방식은 Pelletizing &Layering에 응용효과가 큼.

○ 본 연구개발과제의 협동연구기관인 대구가톨릭대학교 의과대학 연구팀은 10년 전부터 동맥경화증, 간질환, 신장질환, 피부질환 등에 대한 봉독 및 그 주요성분인 멜리틴의 약리효능과 작용기전에 대한 연구를 수행하였음.

- 봉독과 관련하여 35편 이상의 SCI급 논문을 발표하였음

- 본 과제의 주관연구책임자는 봉독 관련 10건의 특허에 발명자로 등록되어 있으며, 특히 봉독의 대량 정제방법 및 피부질환 관련 특허가 다수 포함되어 있음 (표 3).

등록 연도	등록국가	특허 제목	등록 번호
2011	대한민국	봉독과 생약추출물을 유효성분으로 하는 천연항생제 및 이의 제조방법	1010612570000
2012	대한민국	봉독을 함유하는 치주질환, 충치 예방 및 치료용 조성물	1012023020000
2013	대한민국	봉독을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물	1012195510000
2011	대한민국	봉독을 유효성분으로 하는 상처 또는 화상 치료용 조성물	1010995500000
2014	대한민국	봉독을 포함하는 피부 소양증 개선용 조성물	1014241050000
2014	대한민국	피부 노화 억제용 화장료 조성물	1014442320000
2014	대한민국	봉독의 대량 정제방법	1013824040000
2014	대한민국	봉독과 로얄제리를 유효성분으로 함유하는 방사선 방호용 조성물	1013595280000
2014	대한민국	아파민을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 및 치료용 약학 조성물	1014240800000
2014	대한민국	봉독을 유효성분으로 함유하는 호흡기 염증성 질환 예방 및 치료용 약학조성물	1014530600000

표 3. 대구가톨릭대학교 의과대학(협동연구기관) 연구팀이 보유한 봉독 관련 특허

- 본 연구과제의 협동연구기관인 대구가톨릭대학교 의과대학 연구팀은 국내산 정제봉독 및 그 지표물질인 멜리틴(melitin)의 면역과민반응 개선효과를 아토피피부염 동물모델에서 입증하였음.
- 봉독 및 멜리틴은 DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene)-induced atopic dermatitis 모델에서 epidermal & dermal thickness를 감소시켰으며, serum IgE 및 염증성 사이토카인의 농도를 감소시켰음 (그림 11). 이는 봉독이 면역과민반응을 개선하는 효과가 있음을 의미함. 이러한 효과는 또 다른 모델인 ovalbumin-induced atopic dermatitis 모델에서도 유사하게 나타났음.

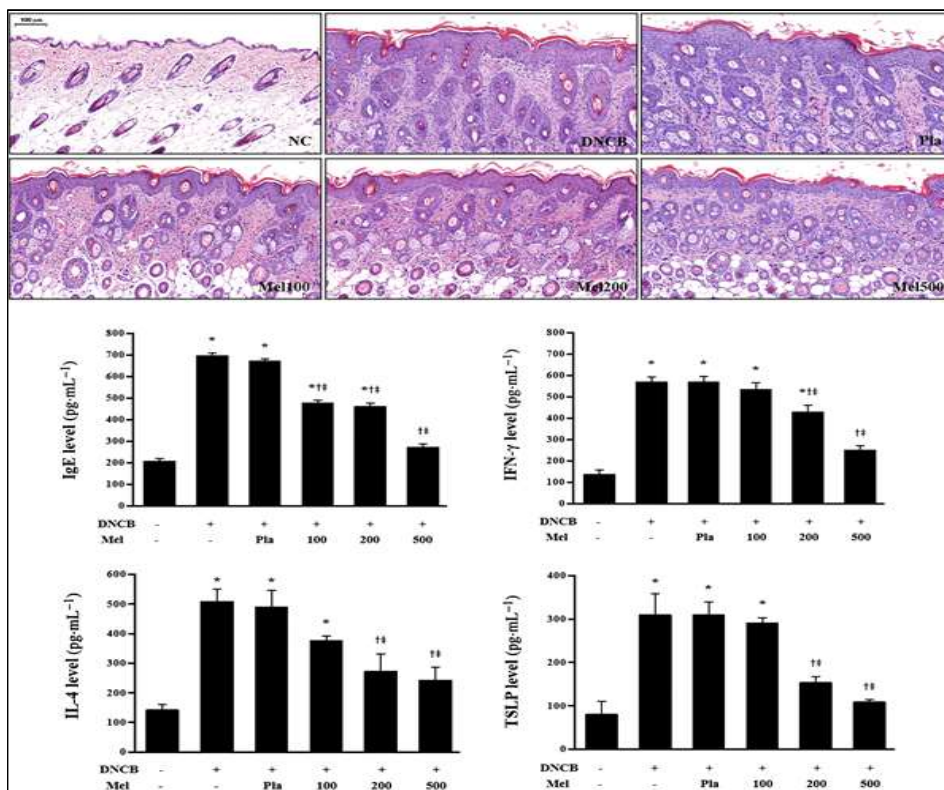


그림 11. 멜리틴의 면역과민반응 개선 효과를 확인하였음

- 봉독 및 멜리틴은 DNCB-induced atopic dermatitis 모델에서 **비만세포의 침착(infiltration) 과 탈과립화(degranulation)을 억제**하였으며 (그림 12), **T세포 침착을 억제**하였음. 이러한 효과는 또 다른 모델인 ovaalbumin-induced atopic dermatitis 모델에서도 유사하게 나타났음.

-비만세포 세포주에 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)와 calcium ionophore(A23187)를 처리하여 염증성 아토피 세포모델을 확립. 봉독 및 멜리틴이 비만 세포에서 TNF- α 의 분비를 감소시킴을 ELISA로 확인하였으며, real-time PCR로 TNF- α , IL-6, IL-8의 mRNA 발현을 감소시킴을 확인하였음.

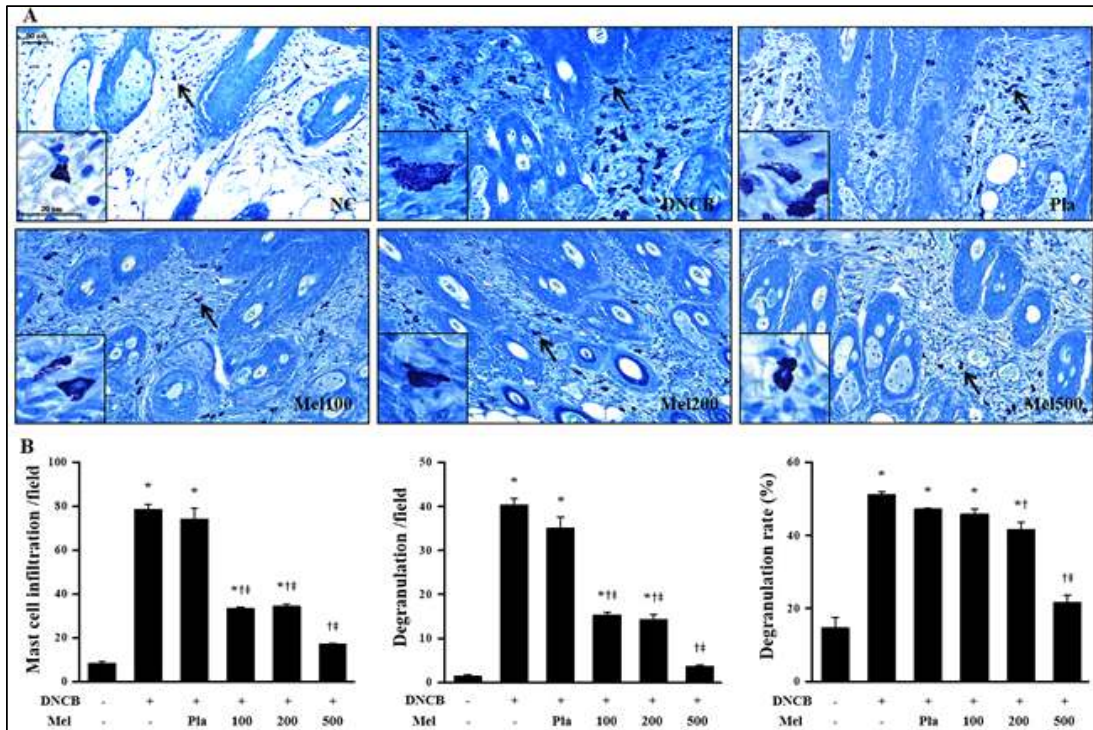


그림 12. 봉독의 비만세포 억제 효과를 확인하였음 (in vivo)

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

<1차년도(2020)>

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(청진바이오텍) : 시제품 개발
- 협동연구기관(대구가톨릭대학교) : 멜리틴의 면역과민반응 완화 기능성 확인

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(청진바이오텍)

1) 국내산 정제봉독의 원료 규격화와 멜리틴의 분리

▶ 정제봉독의 원료 생산

- 봉독 채집 장치를 통해 수거된 봉독을 봉독 무게의 10배 정도 되는 3차 증류수에 충분히 용해시킨 후, 진공 펌프를 사용하여 3 μm 기공 크기의 여과지를 통해 여과하였다. 양봉 농가에서 수거한 봉독에는 먼지, 모래, 미세곤충, 화분, 프로폴리스, 왁스 등의 성분이 함께 포함되어 있어, 이러한 비수용성 물질을 제거하기 위함이다. 이어서, 0.45 μm 막 필터(membrane filter)와 0.2 μm PES(Polyethersulfone, SARTORIUS STEDIM LABS Ltd.)를 이용하여 튜브형 펌프(tubing pump)로 여과하였다. 여과된 정제봉독을 $-56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 내지 $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도로 동결건조한 후, 분말 형태로 병에 담아 밀봉하여 냉동 보관함.

▶ 봉독의 분리 및 분석 공정

- 고속액체크로마토그래피(HPLC)와 고속단백질크로마토그래피(FPLC)를 이용하여 정제봉독의 유효성분인 melittin, apamin, MCD-Peptide 401와 알레르기 유발성분

인 Hyaluronidase, Phospholipase A₂의 분석공정을 확립함. 이를 위해 적절한 column과 분석 용매를 선정하고 elution 시 이용되는 용매들의 극성에 대한 비율을 조절하여 각 성분의 분석에 있어서 분리도를 향상시킴.

▶ **봉독의 유효성분 및 효소류 분리**

- FPLC(Fast Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 Gel-filtration chromatography 방법을 통해 봉독의 유효성분인 멜리틴(Melittin), 아파민(Apamin), 엠씨디 펩타이드(MCD-peptied 401)과 알레르기 유도성분인 히알루로니다아제(Hyaluronidase), 포스포리파아제 A₂(Phospholipase A₂, PLA₂)를 3차 증류수를 이용하여 분리함.
- Column Packing: Bio-Gel P-10 bead 125 g를 0.2 μ m로 filter한 3차 증류수 500mL에 녹여서 50%의 slurry를 만든 후, 고르게 풀어준 50% slurry를 column에 부어준 후 1.5 mL의 flow rate로 흘러주며 packing함. slurry가 packing되어 column내로 내려가면 reservoir를 제거하고 flow adaptor를 연결.
- 안정화: slurry의 최종 위치에서 밑으로 2~3 mm가량 flow adaptor를 내려주고 실험 분석 조건으로 flow rate 1 mL에서 용매를 흘러주며 안정화 시킴.
- 봉독분리 및 수거: 안정화가 끝나면 0.2 μ m로 filter한 봉독 sample를 injection한 후, 동일한 용 매인 0.2 μ m로 filter한 3차 증류수를 1 mL/min 유속으로 흘러주며 봉독 sample를 분리함. 분리되어지는 봉독의 peak는 성분별로 fraction collector로 모음. 각 peak의 성분을 SDS-PAGE 나 HPLC로 확인함.

▶ **Ultra-filtration system을 이용한 알레르기 유발물질 제거 및 멜리틴의 분리**

- Ultra-filtration System (그림13) 방법을 이용하여 봉독의 유효성분인 Melittin, Apamin, MCD-peptied 401과 알레르기 유도성분인 Hyaluronidase, PLA₂를 멸균수를 용매로 분리함. Cut-off size가 다른 Ultra-filtration membrane(10 kDa, 30 kDa, 또는 1kDa)를 이용하여 단계별로 알레르기 유발물질을 분리, 제거함.
- 분자량 13 kDa이상으로 구성된 단백질효소 PLA₂과 Hyaluronidase를 제거 위해 cut-off size 30 kDa의 Ultra-filtration membrane 선정하고, 준비한 정제봉독 수용액을 증류수와 1:100(v/v)으로 희석하여 0.4 MPa의 질소가스 가압필터를 통해 Hyaluronidase와 대부분 의 Phospholipase A₂를 제거함. 더 나아가 PLA₂를 완전히 제거 위해 위의 여과물과 증류수를 1:1000(v/v)으로 희석하고 cut-off size가 10 kDa의 Ultra-filtration membrane을 선정하여 PLA₂를 제거함. 또한 분리 시 시료 농도의 최적 조건을 잡음 (표4).
- 이러한 분리방법은 봉독의 안전성 확보를 목적으로 하여 알레르기 유발성분을 제거할 뿐만 아니라 봉독의 유효성 확보를 위해 cut-off size 1 kDa의 Ultra-filtration membrane으로 선정하고, 10 kDa의 Ultra-filtration membrane을 통해 얻은 여과물을 3:2(상하층 농축액과 여과액의 부피 비, v/v)으로 농축시킨 후, 최종 건조하여 Apamin 6%이상, Melittin 65% 이상의 분리정제봉독을 제조함.

ultra-filter cut off size	30kDa.	10kDa.	1kDa.
봉독 용액의 농도	10g/L	10g/L	1g/L

표 4. Ultra-filtration system의 시료 농도 조건

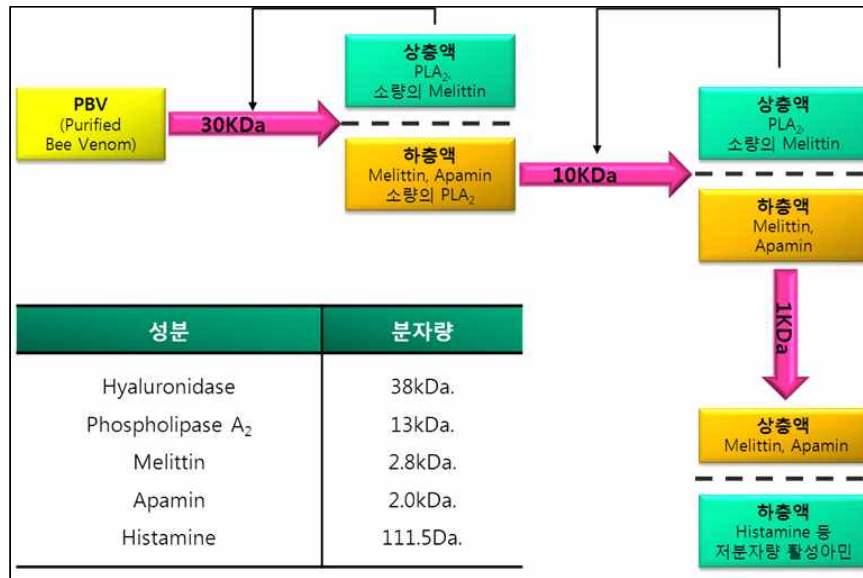


그림 13. Ultra-filtration system의 공정도

▶ Prep-HPLC를 이용한 멜리틴 분리

- 3단계 공정(cut-off size 30, 10, 1 kDa)의 Ultra-filtration membrane 여과 공정을 개선하여, cut-off size 10kDa Ultra-filtration membrane 공정 후 melittin만을 최종적으로 분리하기 위하여, 10kDa의 분리조건을 최적화 한 후 Prep-HPLC (High Performance Liquid chromatography)를 이용하여 분리함. 이때 사용된 용매로는 용매 A: 증류수(0.2% TFA)과 용매 B: 에탄올(0.22% TFA, Ethyl alcohol)을 사용하였다. Column의 안정화 조건으로 column에 유속 6.0 mL/min으로 용매 A:B(50:50%)을 흘려주며 안정화 시킴. 안정화가 끝나면 10kDa 분리 후 동결건조 한 분말을 100mg/mL 농도(증류수에 녹임)로 제조한 용액을 1,000uL injection한 후, 용매의 유속을 6.0 mL/min으로 흘려주면서, A와 B용매를 gradient를 주면서 멜리틴을 분리함 (표5).

Instrument	Pump	Waters 2525u binary HPLC pump
	Detector	Waters 996 photodiode array collector
		Waters 2767u sample manager
	Mobile phase	A: 0.2% TFA in water B: 0.22% TFA in Ethyl alcohol
	UV absorbance	220 nm
	Column	YMC-pack TMS, 12nm, S-10um 250 X 20 mm
	Injection volume	1,000 μ l (100 mg/mL)
	Flow rate	6.0 mL/min
	Gradient	min A(%) / B(%) Ini. 50/50 9분 50/50 10분 20/80 16분 20/80 17분 50/50

표 5. Prep-HPLC를 이용한 멜리틴 분리 조건

2) 원료의 과립, 코팅, 건조 가능한 유동층 코팅기 제작

▶ 유동층 프로세스의 선택

- Spray nozzle의 위치에 따라 Top spray, Bottom spray, Tangential spray 3가지로 분류되며 Spray 분사방식에 따라 Top spray 와 Botton spray방식이 적용됨. Top spray는 분체 과립공정에, Bottom spray는 Top spray에 비해 균질화가 높으므로 분체의 코팅공정에 이용됨.

3) 멜리틴과 유산균 추출물(부형제)의 혼합 기술 개발

▶ 기능성 원료의 유산균추출물(부형제) 선택

- 식약처에 고시되어 있는 건강기능식품의 기준 및 규격의 기능성 원료인 2-51 프로바이오틱스 중 제조기준, 규격, 기능성 내용, 일일섭취량에 따른 선택함.
- 락토바실러스 스포로게네스(Lactobacillus spororenes)는 유산균인 락토바실러스 스포로게네스(Lactobacillus spororenes)는 락토바실러스(Lactobacillus)와 바실러스(bacillus)의 중간형 특성을 가진 균종으로 호모 발효(homo fermentation)에 의해 L(+)-락틱산(L+)-lactic acid)을 생성하는 고온성 균으로 발효와 호흡의 2가지 형태로 에너지를 얻을 수 있는 균종임.
- 락토바실러스 스포로게네스는 혐기적 조건에서 발효성 당(fermentative saccharoid)이 풍부한 배지를 이용하여 발효에 의한 물질대사를 하며, 당의 발효에 의한 유산 생성능이 90% 이상이고, 호기적 조건에서 효모 추출물(yeast extract), 펩톤(peptone)과 같은 단백질 분해물을 이용하여 호흡에 의한 물질대사를 하며 포자를 90% 이상 형성하는 내성이 우수한 유포자성 유산균이다(Kim Y. M., Han Y. H., Paek N. S., Studies on the Ginseng Tea using Spore-Forming Lactic Acid Bacteria, Kor J. Food SCI. Technol. v.34, p661-665, 2002).
- 당사의 정제봉독으로부터 분리한 멜리틴과 식약처에 고시되어 있는 유산균 추출물 Lactobacillus sporogenes를 부형제로 선택함.

▶ 멜리틴과 유산균추출물의 혼합물질 제조

- 멜리틴과 Lactobacillus spororene을 혼합 제조하기 위하여 유동층 코팅기에서 유

산균 추출물을 유동시키면서 제조한 혼합액을 분무하여 혼합물질 제조함.

- 유동화 코팅하는 조건은 흡입공기량, 투입관 온도, 분무압력, 분과립의 무속도 등을 조절하여 최적화 하였으며, 멜리틴과 부형제인 *Lactobacillus sporogenes*의 중량비를 결정함.

- 협동연구기관(대구가톨릭대학교)

1) 멜리틴의 면역과민반응 완화 기능성 확인 (in vitro)

▶ 비만세포(mast cell)에서 FcεRI (Fcε receptor)의 발현 확인

- FcεRI는 비만세포에 존재하면 IgE의 Fc를 인식하여 결합하는 수용체임. 비만세포에서 FcεRI의 발현감소는 IgE로 유도된 면역과민반응의 감소를 의미함.
- FcεRI는 PCR법을 이용하여 측정함. RT-PCR법은 시험물질이 처리된 세포에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후 원심 분리. 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하고 이를 다시 원심 분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조. 추출한 RNA는 DEPC 물에 녹여 first strand cDNA로 합성. 합성된 cDNA에 FcεRI의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭한 후 유전자 발현량을 분석.

▶ 비만세포에서 프로스타글란딘E2(Prostaglandin E2) 생성 확인

- 프로스타글란딘은 생체에서 arichidonic acid로부터 cyclooxygenase에 의해서 합성되는 생리활성물질로서, 면역과민반응 시 활성화된 비만세포는 프로스타글란딘을 분비하여 화학주성과 염증부위 축적을 촉진함.
- 프로스타글란딘의 양은 세포배양 상층액을 ELISA 등을 이용하여 측정함. ELISA법은 항체를 coating 용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4°C에서 overnight. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 세포배양 상층액을 분주. 실온에서 방치한 다음 washing 용액으로 세척하고, antibody Avidin-HRP conjugated를 처리. 실온에서 방치 및 세척한 다음 TMB 기질을 분주하여 어두운 곳에서 방치한 후 stop 용액을 넣고 흡광도 측정.

▶ 비만세포에서 β-hexosaminidase 분비능 확인

- β-hexosaminidase는 비만세포가 활성화되었을 때 분비되는 물질로, 면역과민반응에 관한 연구의 비만세포 탈과립 마커로 사용됨.
- 배양세포에 IgE를 분주한 뒤 시험물질을 세포에 처리. 그 다음 BSA를 처리하여 반응시키고 ice bath에서 반응을 종결시킴. 상층액을 96well ELISA plate에 옮기고 substrate buffer 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 후 각 well당 stop 용액을 첨가하여 반응을 종결시키고 405nm에서 흡광도를 측정.

▶ 비만세포에서 cytokine 분비 확인

- 비만세포에서 생산되는 cytokine은 T림프구 중 Th2 보조 T림프구의 반응을 증가시켜 IL-4, IL-5, IL-13 등의 cytokine 생성을 유도하고 이들은 B세포에 작용하여 IgE의 생산을 촉진시킴으로써 면역과민반응에 기여하게 됨.
- Cytokine은 ELISA, RT-PCR 등을 이용하여 측정.

2) 멜리틴 경구투여의 유효성 검증 (in vivo)

▶ 혈액에서 호산구, 호중구, 총 백혈구, 단핵백혈구 및 림프구 수 확인

- 호산구는 IgE 생성을 유발시키는 항원에 대한 면역반응에 관여함. 호중구는 대식세포

포가 갖는 식균작용과 분해기능을 수행하며, 대식세포에 의해 생성된 cytokine에 자극되어 급성 염증반응을 유발.

- 혈액자동분석기를 이용하여 호산구, 호중구, 총 백혈구, 단핵백혈구 및 림프구를 계수.

▶ **혈액에서 프로스타글란딘과 히스타민 확인**

- 프로스타글란딘과 히스타민의 양은 실험동물의 혈액에서 ELISA 등을 이용하여 측정.

▶ **피부조직에서 FcεRI (Fcε receptor)의 발현 확인**

- 실험동물의 피부조직에서 RT-PCR, 면역조직화학 염색 등을 통해 확인.

▶ **피부조직에서 비만세포 수 확인**

- 비만세포는 결합조직 중에 존재하며 천식, 아토피성 습진 등의 면역과민반응을 유발하는 세포임. 세포질에는 헤파린, 히스타민, 때로는 세로토닌 등 활성아민 등이 함유되어 있음. Fc수용체를 갖고 있으며 이와 결합한 IgE를 통해서 도입된 항원에 반응하고 활성아민을 방출하며 또한 프로스타글란딘 등을 생산함.
- 비만세포 수의 측정은 피부조직을 toluidine blue로 염색한 후, 현미경으로 관찰하여 측정.

▶ **피부조직에서 비만세포 탈과립률 확인**

- 비만세포는 활성화 되었을 경우 면역과민반응에 의해서 탈과립 현상을 통해 히스타민이나 β-hexosaminidase, 대사산물, 염증성 cytokine 등을 분비함.
- 비만세포 탈과립률은 비만세포의 형태가 원형 또는 난원형으로 세포윤곽이 뚜렷하고 세포질 내에 광굴절률이 높은 과립들로 충만된 상태를 정상 비만세포로 구분함. 반면에 세포윤곽이 불분명하고 세포질 내 과립들이 세포표면으로 돌출되거나 세포 주위에 흩어져 있는 경우를 탈과립형으로 구분하여, 그 수를 실험군당 임의로 선택한 시야에서 계수하고, 탈과립률을 계산.

3) **멜리틴 경구투여의 안전성 검증 (in vivo)**

▶ **In vivo toxicity 여부 확인**

- 일반증상 및 사망률 관찰
- 체중측정, 사료 및 음수섭취량 측정
- 장기중량 측정
- 주요 장기에 대한 병리학적 검사
- 혈액생화학적 검사

(AST, ALT, ALP, T-bilirubin, T-protein, A/G ratio, BUN, creatinine, LDH 등)

<2차년도(2021)>

○ **연구개발 목표**

- 주관연구기관(청진바이오텍) : 제품표준분석법 확립 및 제품표준서 작성
- 협동연구기관(대구가톨릭대학교) : 시제품의 유효성 및 안전성 검증

○ **개발 내용 및 범위**

- 주관연구기관(청진바이오텍)

1) 시제품(멜리틴과 유산균 추출물 혼합)에 대한 시험평가 의뢰

- ▶ 식약처에 고시된 건강기능식품 인증을 위한 우수실험실관리기준(GLP)에 적합한 기관인 (주)바이오텍스텍에 시제품에 대한 독성평가 및 유효성 평가 의뢰함.

2) 제품표준분석법 확립 및 제품표준서 작성

- ▶ 식약처에 고시된 건강기능식품 인증을 위한 원료표준화를 통해 제품표준분석법 기준을 설정하고 제품표준서를 작성함.
 - 제품의 타당한 method 작성을 통한 분석법 및 제조법 확립
 - 독성평가(GLP): 협동연구기관 하에 안전성 검증 실험에 대한 자체 평가 및 의뢰 결과를 통해 기반 마련
 - 작용기작: 협동연구기관 하에 유효성 검증 실험에 대한 자체 평가 및 의뢰를 통해 기반 마련(세포실험 및 동물실험)

- 협동연구기관(대구가톨릭대학교)

1) 시제품(멜리틴과 유산균 추출물 혼합)의 유효성 검증

- ▶ 혈액에서 호산구, 호중구, 총 백혈구, 단핵백혈구 및 림프구 수 확인
- ▶ 혈액에서 프로스타글란딘과 히스타민 확인
- ▶ 피부조직에서 FcεRI (Fcε receptor)의 발현 확인
- ▶ 피부조직에서 비만세포 수 확인
- ▶ 피부조직에서 비만세포 탈과립률 확인

2) 시제품(멜리틴과 유산균 추출물 혼합)의 안전성 검증

- ▶ In vivo toxicity 여부 확인
 - 일반증상 및 사망률 관찰
 - 체중측정, 사료 및 음수섭취량 측정
 - 장기중량 측정
 - 주요 장기에 대한 병리학적 검사
 - 혈액생화학적 검사
(AST, ALT, ALP, T-bilirubin, T-protein, A/G ratio, BUN, creatinine, LDH 등)

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

<1차년도(2020)>

-주관연구기관(청진바이오텍) : 시제품 개발

○ 국내산 정제봉독의 원료 규격화


- ▶ 국내산 정제봉독의 원료 규격화 - 단일유효성분인 멜리틴의 분리와 분석을 위해 원료 봉독을 정제 봉독으로 정제함. 당사의 봉독채집장치를 이용하여 봉독 원료(Crude

Bee Venom)를 수집하고, 이는 불순물을 다량 포함하고 있기 때문에 다시 정제수로 용해시킨 후, 여과를 거쳐 동결건조를 진행함 (그림 14). 최종으로 정제봉독(PBV, Purified Bee Venom)의 유효 성분검사, 물리적 및 화학적 특성과 내독소 함량, 히스타민 함량 등을 종합하여 시험성적서를 발급함으로써 원료의 신뢰성 확인함 (그림 15). 이는 채취한 봉독원료의 지역별, 채취시기, 보관 방법(온도)에 따른 편차를 줄이고 일정한 품질을 유지하기 위하여 정제봉독 중 멜리틴 함량 기준(45 ~ 65%)에 미달되는 봉독은 폐기함.



그림 14. 원료 봉독으로부터 정제봉독으로 만들어지기까지의 과정

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product :	Purified Bee Venom		
Product Code :	PBV		
Batch No. :	202005	Date of Issue :	2020-05-26
Lot No. :	202005		
Date of Manufacture :	2020-05-25		
Date of Analysis :	2020-05-26		
Country of Origin :	Republic of Korea	Certified By :	

Test	Specification	Method	Result
Physical Assay			
Appearance	Clear powder	Visual	Pass
color	Beige	Visual	Pass
Solubility	Soluble in water		Pass
Density	1.1-1.4		1.13
pH Value	5.1~5.5	Orion pH meter	5.26
Chemical Assay			
Melittin	45~65 %	HPLC	51.47%
Apamin	2.0~3.0 %	HPLC	2.48%
PLA ₂	11.0~13.0 %	HPLC	12.47%
Heavy Metals	≤ 1.0 ppm	AOAC	Conform
Total Ash	≤4.0 %	AOAC	Conform
Microbial Assay			
Aerobic Plate Count	Negate	Petrfilm 3M	Conform
Mold & Yeast	Negate	Petrfilm 3M	Conform
<i>S. aureus</i>	Negate	Petrfilm 3M	Conform
Histamine content		Histamine Enzymatic assay kit	1.75ppm
Endotoxin test*	<0.25 EU/mL	EndoSafe®-PTS	Conform

The Endosafe®-PTS Endotoxin test utilizes existing FDA-licensed LAL formulation.



#405, 142 Gwangdeok-daero, Danwon-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea
 Phone: 82. 31. 409. 3707 FAX: 82. 31. 409. 3709
 E-mail: younan99@biovenom.com Website: www.biovenom.com

그림 15. 원료 정제봉독의 시험성적서

○ 멜리틴의 분리 공정

▶ FPLC 이용한 멜리틴의 분리

- 정제된 봉독의 알레르기 유발물질(Hyaluronidase, PLA₂)을 분리하기 위해 FPLC의 Gel-filtration chromatography 방법을 사용함. 정제된 봉독 15 mg/mL을 injection 하였고, Gel-filtration chromatography의 원리에 따라 분자량이 큰 알레르기 유발물질인 Hyaluronidase(MW: 38 kDa)와 PLA₂(MW: 19 kDa)는 먼저 분리되며, 분자량이 작고 봉독의 유효성분인 Melittin(MW: 2.8 kDa), Apamin(MW: 2 kDa)은 늦게 분리되어 나옴. Running time에 따라 분획별로 collector에 모아 동결 건조하여 봉독의 유효성분 및 효소류를 얻을 수 있었음 (그림 16).

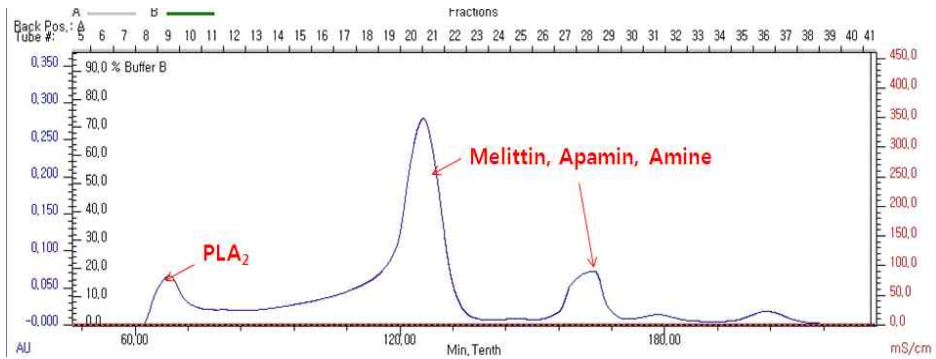


그림 16. FPLC에 의한 유효성분 및 효소류 분리

▶ Ultra-filtration을 이용한 알레르기 유발물질 제거 및 멜리틴의 분리

- 기존 ultra filtration 으로 55 ~ 65% 순도의 멜리틴을 얻기 위해서는, 3단계 공정 (30 kDa, 10 kDa, 1 kDa)을 수행하여 최종적으로 1 kDa 멤브레인 여과액의 상층액 (아파민, 멜리틴)을 거쳐야 함. 또한, 멜리틴 이외에도 4 ~ 6 % 아파민(apamin) 까지 포함되어 있으며, 비용이나 시간적인 측면에서 비효율적임.
- 이에 여과 공정을 1단계로 단순화 시키고, 봉독의 유효성분인 멜리틴과 알레르기 유도성분인 히알루로니다제(Hyaluronidase), 포스포리파아제 A2 등 13 kDa 이상인 단백질을 분리하기 위하여 분자량 차이를 이용하여 cut-off size가 10 kDa 인 ultra filtration membrane으로 여과하여 멜리틴을 분리함.
- cut-off size 10kDa ultra filtration membrane을 이용하여 정제봉독의 농도를 10 mg/mL보다 더 낮은 농도인 1 - 2 mg/mL의 농도로 분리시 멜리틴 회수율이 상대적으로 높게 나왔음. 농도가 낮음에 따라 1회 분리량이 10 mg/mL 제조시보다 적고, 증류수의 비율이 많아져 대량으로 생산 시 용액의 농축 시간 및 동결건조 시간이 길어져 문제점이 발생함. 또한, 이보다 높은 농도로 제조시 단백질 침전 및 변형이 발생하였으며, 포스포리파아제 A2가 완전히 제거되지 않았다 (표 6).

농도 (mg/mL)	멜리틴 평균 함량 (%)	1회 분리량 (한외 여과 후 동결건조 중량) (mg)	멜리틴 회수율 (%)
20.0	7.8	12079	4.7
10.0	20.1	9872	19.8
2.0	48.0	1098	26.4
1.0	54.3	528	28.7

표 6. 20-40 psi 조건에서 한외여과를 실시하는 경우

- 봉독 내 유효성분인 멜리틴을 효과적으로 분리하기 위해 ultra filtration 분리시 정제 봉독 농도의 최적 조건을 아래와 같이 확인함 (표 7).

농도 (mg/mL)	멜리틴 평균 함량 (%)	1회 분리량 (한외 여과 후 동결건조 중량) (mg)	멜리틴 회수율 (%)
20.0	8.1	13688	5.5
10.0	34.2	9951	34.0
2.0	42.6	1455	31.0
1.0	57.5	548	31.5

표 7. 5-10 psi 조건에서 한외여과를 실시하는 경우

■ 10mg/mL농도에서 멜리틴 회수율이 가장 높게 나왔으며(표 7)., 이에 봉독용액을 10mg/mL의 농도로 제조 후 분리 함. Ultra-filtration 으로 분리한 정제봉독의 HPLC 분석 결과 알레르기 유발성분인 Phospholipase A₂의 함량이 대부분 제거 되었음을 확인함 (그림 17).

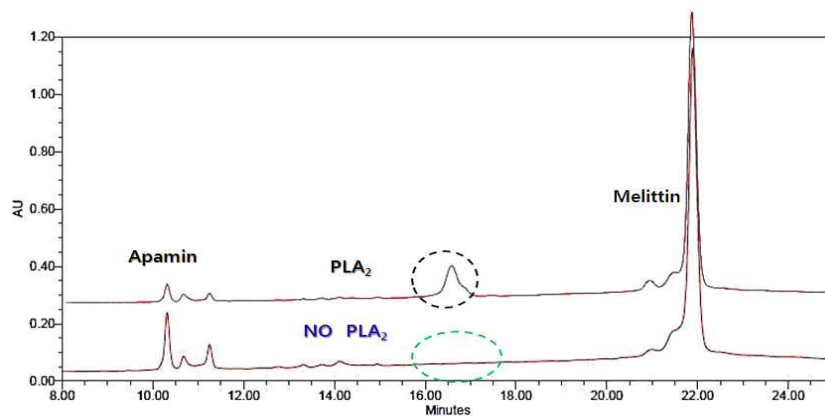


그림 17. cut-off size 10kDa Ultra Filtration membrane 을 이용하여 PLA2 제거

▶10kDa Ultra-filtration을 통해 분리한 정제봉독의 Prep-HPLC을 통한 멜리틴 분리

■ 멜리틴 분리 전, 시제품 생산의 원료로 쓰일 것을 감안하여 용매를 인체에 무해한 식용 주정(Ethanol) 95%와 정제수를 용매로 사용함. 이동상인 식용 주정을 Gradient로 사용하여 cut-off size 10kDa으로 분리한 분리정제 중 봉독의 주성분인 Melittin만을 분리함. 용출된 분획들 중 멜리틴 피크(13분-15분 구간에서 용출)만 분획물 수집기(fraction collector)로 모았으며 (그림 18), 에틸알코올(ethyl alcohol)과 TFA(trifluoroacetic acid)를 진공회전농축기로 제거하였다. -75 °C 온도로 동결 건조하고 분말 형태의 함량의 멜리틴 분획물을 얻었다. . 분리된 멜리틴 분획물의 크로마토그래피 상 피크를 시그마의 아파민, PLA₂, 멜리틴 표준품(standard)과 비교하여 HPLC로 순도를 확인함 (65 - 75%) (그림 19).

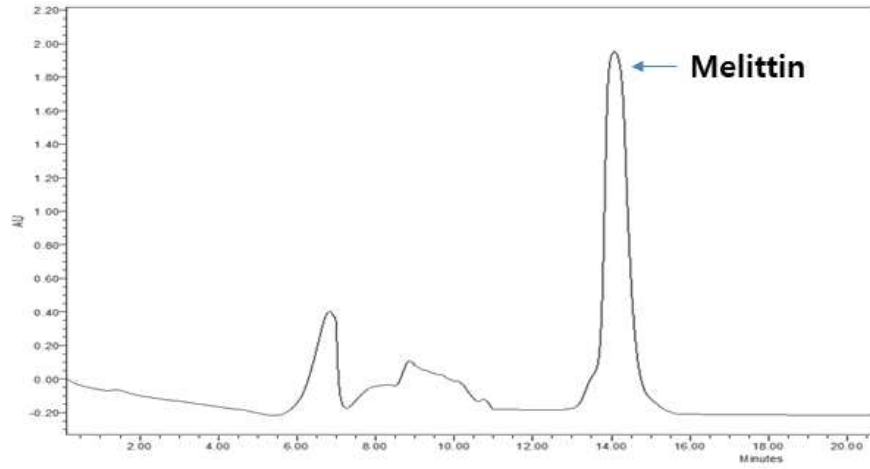


그림 18. prep - HPLC를 통한 멜리틴 생산

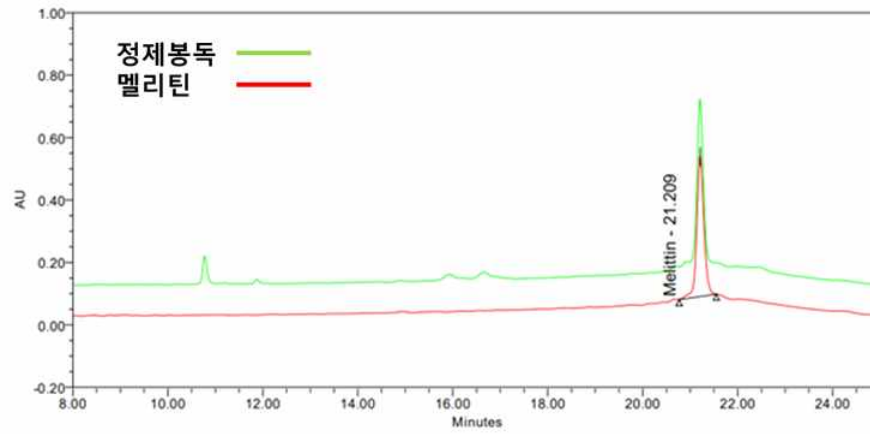


그림 19. 멜리틴과 멜리틴 표준품과의 HPLC 비교 크로마토그램

- 최종적으로 수득한 멜리틴 분획물을 시제품 제작의 원료로 사용하였으며, 구체적인 melittin 분리 공정을 확립함 (그림 20).

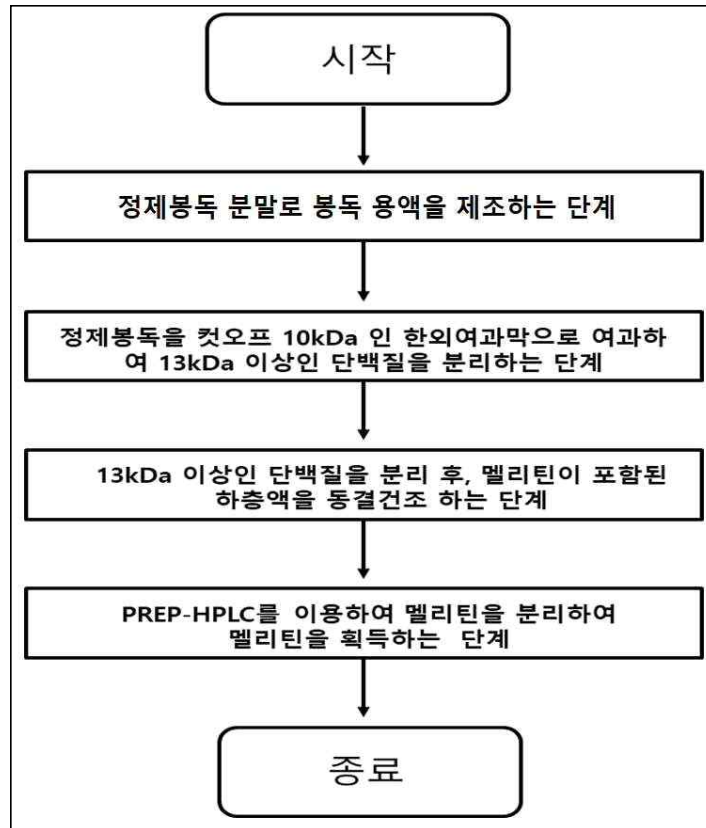


그림 20. 10kDa ultra-filtration 및 Prep-HPL을 통한 melittin 분리 공정 확립

○ 원료의 과립, 코팅, 건조 가능한 유동층 코팅기 제작

▶ 유동층 코팅기 제작

- 과립을 제조하는 공정 중 하나인 유동층 공정(Fluid bed process)은 스프레이 노즐의 위치에 따라 top spray, bottom spray, tangential spray 3가지로 분류된다. 유동층에 의한 습식조립은 밀폐된 공간(Chamber)에서 단계별로 이루어지는 조작으로서, 의약품 제조, 식품, 비료 등에 걸쳐 많은 산업분야에 적용되어 사용하고 있다.
- 한 용기 안에서 분체의 혼합, 조립, 건조, 코팅이 이루어질 수 있으므로 이 방식은 다른 습식조립보다 원료의 수율이 좋고 공정시간을 단축시킬 수 있다. 타정용 과립 제조 외에 Top spray 방식은 물을 잘 흡수할 수 있는 다공성의 구조를 지닌 분산성이 매우 좋은 과립을 만들어준다. 그런 과립은 분말식품, 영양제, 화학제품 등에 응용된다. 유동층은 분말 코팅(Powder Coating), 분말 레이어링(Powder layering), 펠릿화(Pelletizing)에도 이용된다. Bottom spray 방식의 유동층은 다른 코팅기술에 비해 우수한 필름을 형성시켜주므로 약제방출을 조정하거나 통제하는 목적으로 Active Layering과 Coating 목적으로 제약산업 및 비료산업에 응용되고 있다. Tangential spray(Rotor)방식은 Pelletizing & Layering에 응용효과가 크다.
- 균질화가 높은 유동층 프로세스를 선택하여, 분체의 코팅공정을 이용하여 원료의 과립, 코팅, 건조가 가능한 유동층 코팅기 (모델명: Fluid-Bed Granulator)는 ㈜서원 ENG 에 의뢰하여 제작하였으며, 본 연구의 시제품 제조 실험에 사용함 (그림 21).



그림 21. 제작한 유동층 코팅기 및 트윈 휠터타입 챔버(chamber)

■ 본 연구에 사용된 유동층 코팅기의 특징은 bottom spray 방식의 트윈 휠터 타입의 챔버 (chamber)로 제작하여 유동화 공기에 의해 휠터포에 누적된 분진을 교대로 털면서 연속적으로 과립 또는 코팅작업을 할수 있도록 하였으며 Bottom nozzle 위에 별도의 파티션을 구비하여 코팅액 spray시 일정하게 분사하고 유동화 공기의 흐름이 원활하도록 구성하였다. 또한 90 x 70 x 185 (가로 x 세로 x 높이, cm) 크기의 소형으로 제작하여, 연구용 시제품 제조에 적합하도록 제작함으로써 경제적으로 효율적임. 과립또는 코팅의 생산 능력은 1배치(Batch)당 약 300g을 생산하며 전력은 약 1.5kw 소비됨.

○ 멜리틴과 유산균(Lactobacillus sporogenes)의 혼합 기술 개발

▶ 장용성 제제

■ 경구 투여용 장용성 제제는 제제가 경구 투여 후 위에서 봉해되지 않고 소장에도달해서야 봉해되어 흡수되도록 설계한 제제이다. 따라서 이 제제를 복용할 때 씹거나 분할해서는 안 된다. 특히 주성분이 위산에 의해 불활성화 되거나 위장자극을 유발하는 경우에 적용하는 가장 기초적이고도 고전적인 약물전달 기술이다.

▶ 멜리틴과 유산균의 혼합물질 제조 및

■ 멜리틴과 유산균 (Lactobacillus sporogenes) 혼합물의 과립을 제조하기 위하여 유동층 코팅기에서 유산균을 유동시키면서 제조한 혼합액을 분무하여 혼합물질 제조함. 유동화 코팅하는 조건은 흡입공기량, 투입관 온도, 분무압력, 분과립의 분무속도등을 조절하여 최적화 함.

■ 유동층 코팅기 챔버안에 유당수화물(lactose hydrate) 500.0 g을 넣은 후, 봉독 유래 멜리틴 분말 1.0 g 과 유산균 분말 1000.0 g 을 유동층 코팅기 챔버 안으로 일정한 속도로 분사하여 투입함.

■ 결합제 히드록시프로필셀룰로오스 27.5 g 이 포함된 정제수를 70 ~ 80 ml을 분무하여 유당수화물에 봉독 유래 멜리틴 분말과 유산균 분말을 코팅함.

- 장용성 코팅을 위해 정제수 600 ~ 1000ml 에 190.0 ~ 210.0 g 의 히프로멜로오스, 43.0g 카보머(폴리머), 이산화규소 1.2g 및 소량의 활택제 등을 녹여 장용성 코팅액 조제후, 장용성 코팅액을 유동층 코팅기에 주입한 뒤, 유동층 코팅기에 분부하여 멜리틴과 유산균이 코팅된 유당수화물에 장용성 코팅을 하였다. 조건: 투입온도 (30℃), 건조온도(40 ~ 50 ℃)에서 약 70 분(분무수행시간(40분 ~ 50분), 선별 시간(약 10분)), (평균 과립 크기 0.9 mm ~ 1.0mm 의 16메쉬(mesh)), 총 수행시간 (약 2시간) 정도의 제조공정시간이 소요되었다.
- 당사의 정제봉독으로부터 분리한 멜리틴과 식약처에 고시되어 있는 유산균 *Lactobacillus sporogenes*(viable cell count 가 3.8×10^{10} cfu/g 이상 포함)을 부형제로 선택하여 과립형태로 제작함 (그림 22). 유동화 코팅하는 조건은 흡입공기량, 투입관 온도, 분무압력, 분과립의 무속도등을 조절하여 최적화 하였으며, 다양한 농도 조합으로 봉독 유래 멜리틴 분말(60 ~ 65%)과 부형제인 유산균의 중량비가 1 : 1,000 일 때, 과립형태가 가장 좋은 것으로 판정되어서 제조함 (표 8).

제조예	체 크기 (16 mesh) 0.9~1mm	봉독 유래 멜리틴 분말 (g)	유산균 분말 (<i>Lactobacillus sporogenes</i>) (g)	장용성 제제, 결합제, 유동화제, 활택제 등 (%)
1	부적합	1	20,000	7.2%
2	부적합	1	10,000	7.2%
3	부적합	1	5,000	7.2%
4	부적합	1	4,000	7.2%
5	부적합	1	3,000	7.2%
6	적합	1	1000	7.3%
7	부적합	1	500	7.5%
8	부적합	1	100	8.6%

표 8. 멜리틴과 *Lactobacillus sporogenes* 유산균의 혼합 비율

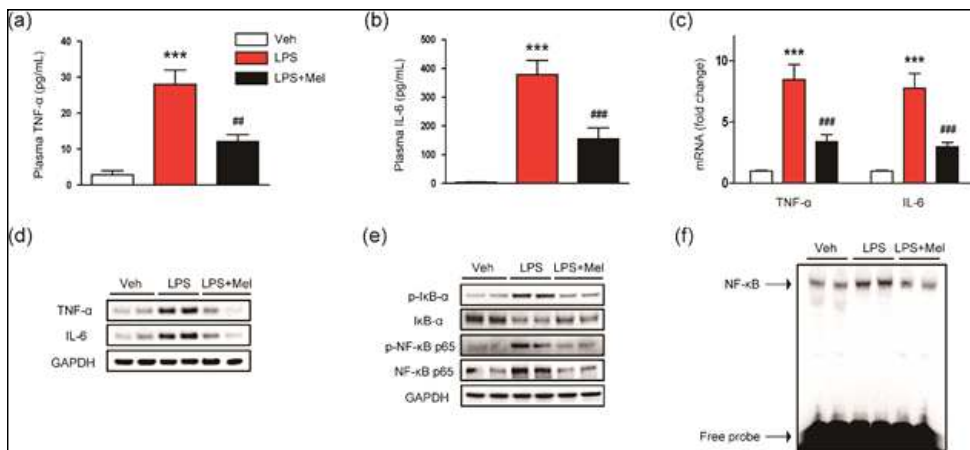


그림 22. 멜리틴과 *Lactobacillus sporogenes* 유산균의 혼합물의 과립화한 시제품(BVLS)

-협동연구기관(대구가톨릭대학교) : 멜리틴의 면역과민반응 완화 기능성 확인

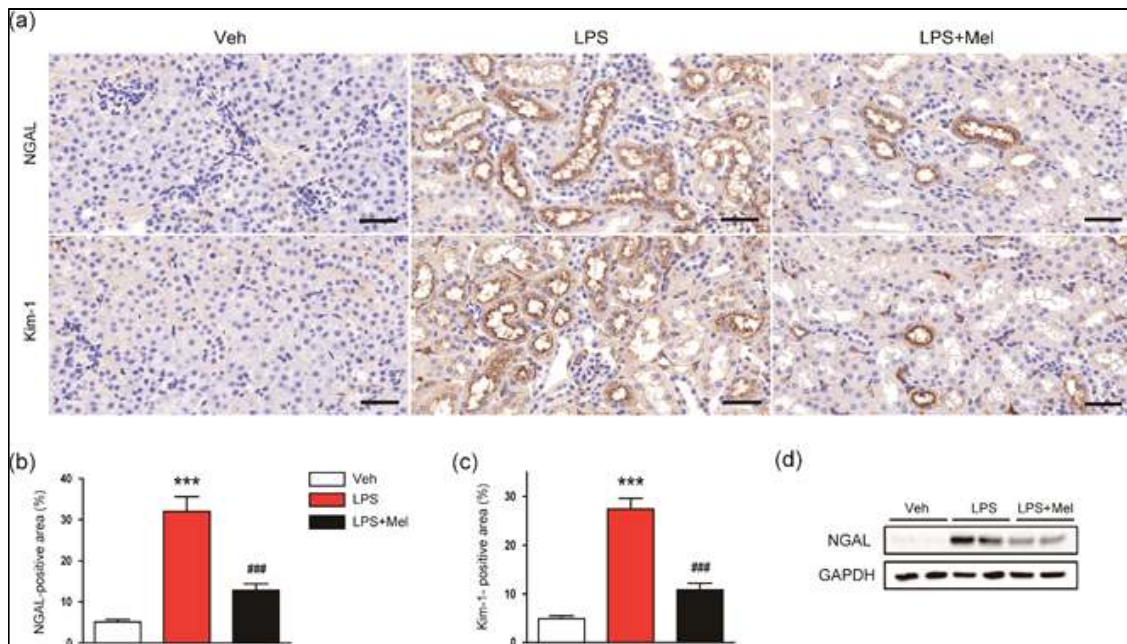
○ 멜리틴 경구투여의 유효성 검증 (in vivo)

▶ 멜리틴의 효능을 확인하기 위하여 마우스에 LPS를 주사하여 손상모델을 확립하고 ELISA를 통해 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6의 혈장수준 변화를 확인하여 멜리틴의 효능을 평가함. LPS에 의해 증가한 혈장 내 TNF- α , IL-6의 발현은 멜리틴에 의해 현저하게 감소하는 것을 확인함. 또한 mRNA 수준의 TNF- α , IL-6의 발현이 멜리틴에 의해 감소하는 것을 확인하였음. 멜리틴이 내독소인 LPS로 유도된 NF- κ B 신호전달 경로에 미치는 효능을 평가하기 위해 western blot과 EMSA를 수행하여 NF- κ B 신호전달 경로 인자들의 발현변화를 확인한 결과 멜리틴은 NF- κ B 신호전달 경로를 유의하게 조절하는 것을 확인함 (그림 23).



<그림 23.>

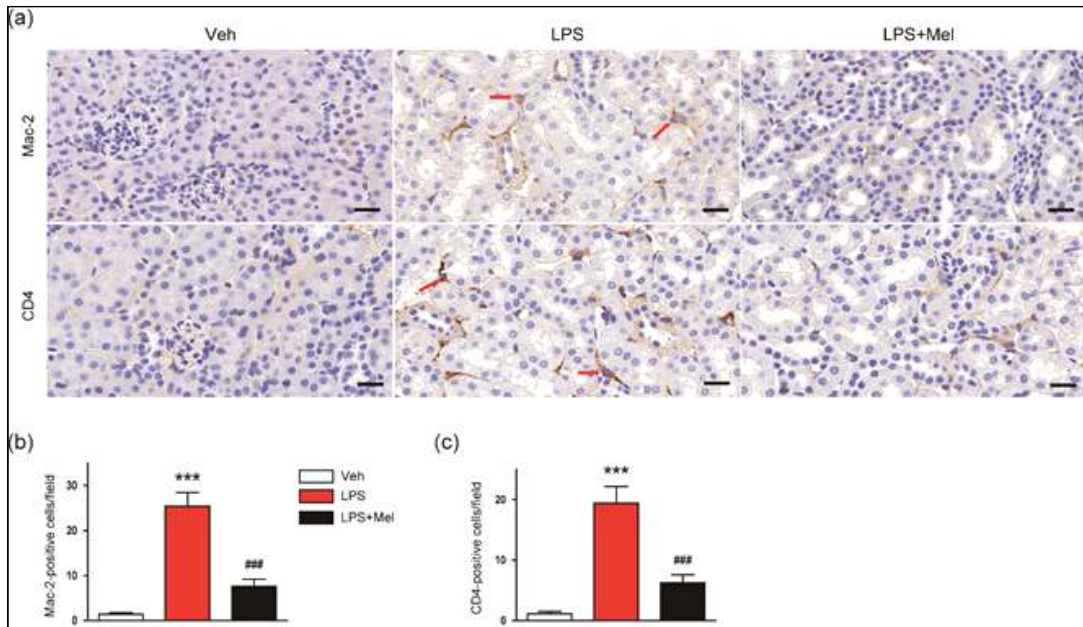
▶ 면역조직화학 염색을 통하여 관상 손상 마커인 NGAL과 Kim-1을 확인하여 멜리틴의 효능을 확인함. LPS 처리로 증가한 NGAL과 Kim-1의 발현은 멜리틴에 의해 유의하게 억제됨. 이들의 발현은 단백질 수준에서도 멜리틴에 의해 억제되는 것을 확인함 (그림 24).



<그림 24.>

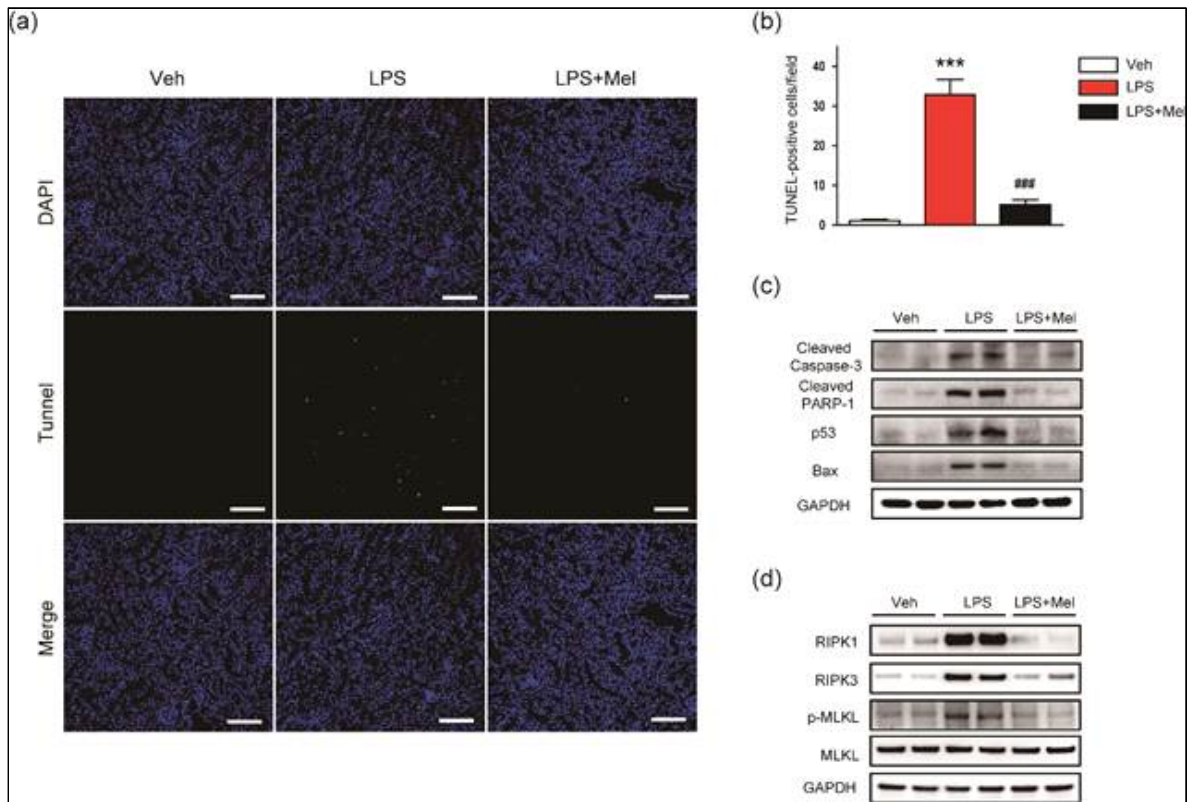
○ 멜리틴 경구투여의 안전성 검증 (in vivo)

▶ 마우스에 멜리틴과 LPS를 복강 주사하여 대식세포 마커인 Mac-2와 CD4 면역세포의 발현변화를 확인함으로써 멜리틴의 효능을 확인함. LPS 처리로 증가한 Mac-2와 CD4의 발현은 멜리틴에 의해 현저하게 감소되었으며, 이는 멜리틴이 면역세포 침투를 억제하는 것을 확인함 (그림 25).



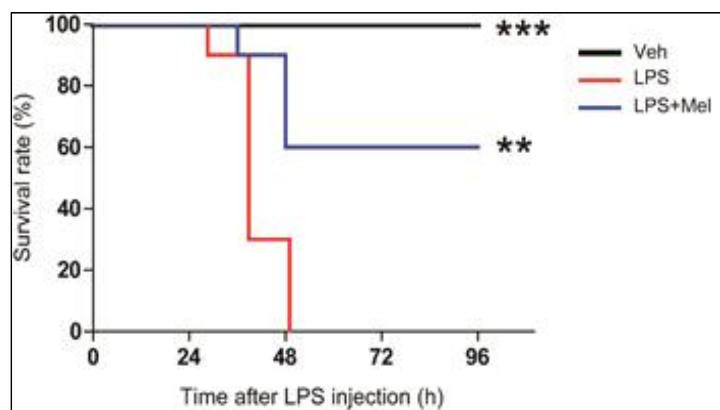
<그림 25.>

▶ 멜리틴이 LPS로 유도된 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여 TUNEL과 세포사멸 관련 인자들의 western blot 실험을 수행하여 멜리틴의 효능을 확인함. 세포사멸은 내독소에 의한 신장 손상의 병태생리학에 기여하므로 내독소인 LPS에 의해 유도된 세포사멸에 멜리틴의 효능을 확인함. LPS처리로 증가한 세포사멸은 멜리틴에 의해 현저하게 감소되는 것을 확인하였고, 세포사멸 관련 발현인자인 caspase-3, PARP1, p53, BAX의 단백질 수준의 발현양도 멜리틴에 의해 감소되었음. 또한 세포사멸의 또 다른 형태인 necroptosis에 멜리틴의 효능을 평가하기 위하여 확인한 necroptosis 발현 인자들인 RIPK1, RIPK3, p-MLKL의 발현양이 LPS에 의하여 증가하였고 이는 멜리틴 처리로 현저하게 감소하는 것을 확인함 (그림 26).



<그림 26.>

▶ LPS 처리 후 생존율에 대한 멜리틴의 효능을 확인하기 위하여 LPS (20 mg/kg) 주사 1시간 전에 멜리틴(0.01 mg/kg)을 복강 내 투여하여 마우스의 생존율에 미치는 영향을 확인함. 멜리틴은 LPS를 처리하여 손상을 유발시킨 마우스에서 생존율을 크게 향상 시켰음 (그림 27).



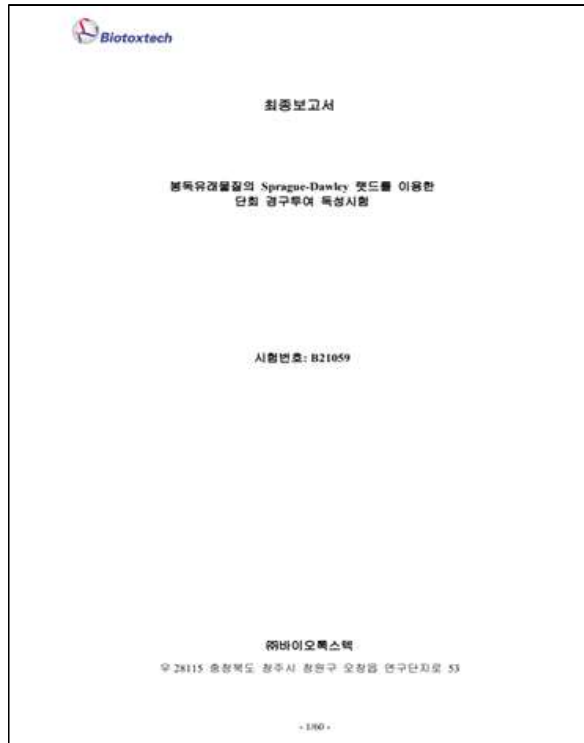
<그림 27.>

<2차년도(2021)>

-주관연구기관(청진바이오텍) : 제품표준분석법 확립 및 제품표준서 작성

○ 시제품 (BVLS_ 봉독유래 멜리틴과 유산균 혼합)에 대한 시험평가 의뢰

- ▶ 식약처에 고시된 건강기능식품 인증 기반을 위한 우수실험실관리기준(GLP)에 적합한 기관에 독성평가 및 유효성 평가를 의뢰함.
- 당사가 제조한 면역 증진 개선용 장용성 과립의 시제품명을 **BVLS**라 명명하고, 단회 경구투여 시 나타나는 **독성 평가와 면역증진 효능시험**을 위해 GLP 인증 기관인 (주)바이오텍스텍에 시험평가 의뢰함.



- 단회 경구투여 시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시함. 군구성은 장용성 과립 5,000 mg/kg 투여군의 1개 용량과 대조군 (주사용수)를 설정하고, 군당 암수 각 5마리에 단회 경구투여 하였다 (표 9). 투여 후 14일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였다.

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물 수	
			수컷	암컷
대조군(G1)	0	10	5	5
시험물질 투여군(G2)	5,000	10	5	5

표 9. 시제품(BVLS)의 독성평가

- 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망사례는 관찰되지 않았다. 또한, 일반증상 및 부검에서 시험물질 투여군 투여에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교 시 유의성 있는 체중변화는 없는 것으로

확인함 (그림 28). 본 시험의 조건 하에서 봉독 유래성분 및 유산균을 포함하는 장용성 과립을 랫트(Rat)에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 모두 5,000 mg/kg 이상으로 확인함.

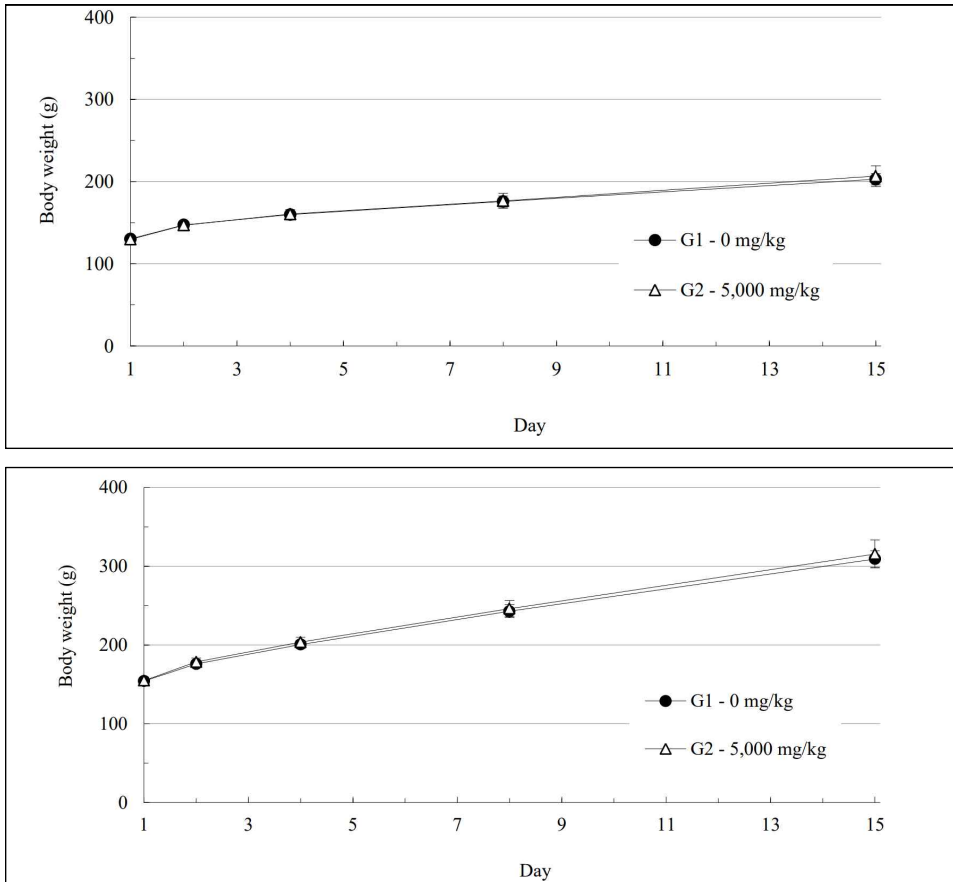


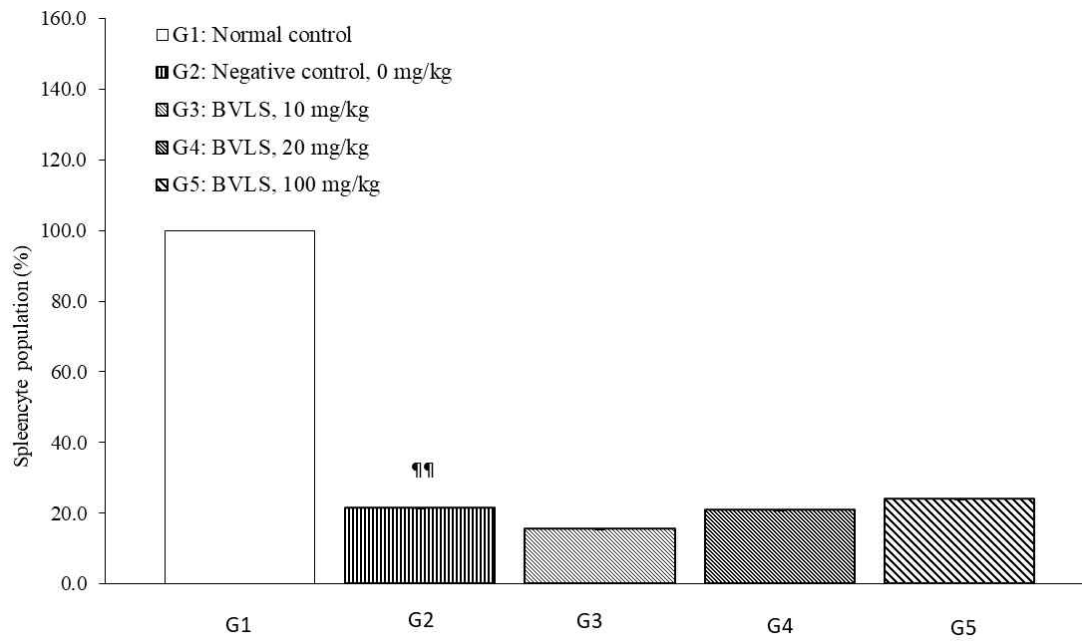
그림 28. 시제품(BVLS)의 독성평가

- 면역억제제(Cyclophosphamide)를 투여하여 면역저하를 유발한 수컷 BALB/c 마우스에 봉독 유래성분 및 유산균을 포함하는 장용성 과립(BVLS)을 경구투여하여 면역증진효과를 평가하고자 실시함.
- 군 구성은 정상대조군(G1), 음성대조군(G2), 10 mg/kg 용량의 장용성 과립(BVLS) 투여군(G3), 20 mg/kg 용량의 장용성 과립(BVLS) 투여군(G4), 100 mg/kg 용량의 장용성 과립(BVLS) 투여군(G5)으로 구성함 (표 10).

군	투여경로	투여용량 (mg/kg)	투여액량(CP) (mL/kg)	동물수	조제농도 (mg/mL)
정상대조군(G1)	-	-	-	8	-
음성대조군(G2)	P.O.	0	10	8	0
시험물질 투여군1(G3)	P.O.	10	10	8	1
시험물질 투여군2(G4)	P.O.	20	10	8	2
시험물질 투여군3(G5)	P.O.	100	10	8	10

표 10. 시제품(BVLS)의 면역증진 효능시험

- 자료의 통계처리 - 실험에서 얻어진 체중 및 면역분석 결과는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. 체중 및 면역분석 결과는 Bartlett's test 를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산성인 경우 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시 (유의수준: 0.05) 하여 유의성이 관찰되면 음성대조군 (G2)에 대한 각 시험군 (G3~G5) 간의 유의성을 확인하기 위해 Dunnett's t-test 의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 단측 0.05 및 0.01). 등분산성이 기각되면 Kruskal-wallis test 를 실시 (유의수준: 0.05) 하여 유의성이 관찰되면 음성대조군 (G2)에 대한 각 시험군 (G3~G5) 간의 유의성을 확인하기 위해 Steel's test 의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 단측 0.05 및 0.01).
- 관찰기간 동안 매일 1 회 일반증상을 관찰하였고, 동물의 체중은 주 2회, 유발물질은 시험물질 투여 후 8 및 11 일째 투여하였고, 면역저하유발확인은 1, 11, 18 일 및 부검일에 채혈하여 확인함. 부검일에 채혈하여 Serum을 분리하였고, 림프절(Lymph node)을 적출함.
- 면역증진효과의 평가는 면역증진효과의 평가는 Complete blood count(CBC), 비장세포 증식능력, 비장 및 Lymph node 의 무게, Serum cytokine profile 및 Immune Profile analysis 를 확인하여 평가하였다. 백혈구의 총 수 및 비율이 음성대조군과 비교하여 증가하게 되면 면역증진효과가 있는 것으로 판정하였고, splenocyte 증식능력이 음성대조군과 비교하여 증가하게 되면 면역증진효과가 있는 것으로 판정하였다. 비장 및 Lymph node 의 무게가 음성대조군과 비교하여 증가하면 면역증진효과가 있는 것으로 판정하였고, Serum cytokine profile 에서 음성대조군과 비교하여 cytokine 의 비율이 증가하면 면역증진효과가 있는 것으로 판정하였다. Immune Profile analysis 를 통하여 음성대조군과 비교하여 면역세포의 비율이 증가하면 면역증진효과가 있는 것으로 판정함.
- 정상 Balb/c 마우스에 Cyclophosphamide 를 투여하여 면역억제 모델을 제작하였으며, 각 Parameter 별 정상대조군(G1)과 비교하여 음성대조군(G2)의 변화를 통하여 음성대조군 유발을 확인하였다. Complete blood count(CBC)에서 정상대조군(G1) 대비하여 음성대조군(G2)의 White blood cell, neutrophil 및 Lymphocyte 의 측정 수치가 낮아진 것으로 면역억제가 되었다고 판정하였고, Mitogen induced - Splenocyte proliferation 에서는 정상대조군(G1)과 비교하여 음성대조군(G2)가 감소되면 면역억제가 되었다고 판정하였다. 비장 및 Lymph node 의 무게는 정상대조군(G1)과 비교하여 감소하면 면역억제가 되었다고 판정하였다. Serum cytokine profile 에서는 cytokine 의 농도가 정상대조군(G1)과 비교하여 감소하면 면역억제가 되었다고 판정하였다. Immune Profile Analysis 에서 정상대조군(G1)과 비교하여 감소하면 면역억제가 되었다고 판정하였다.
- Spleen 에서 Mitogen induced-splenocyte proliferation 을 측정하였고, 음성대조군 (G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소했으며, 음성대조군(G2)와 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하지 않았다 (그림 29).



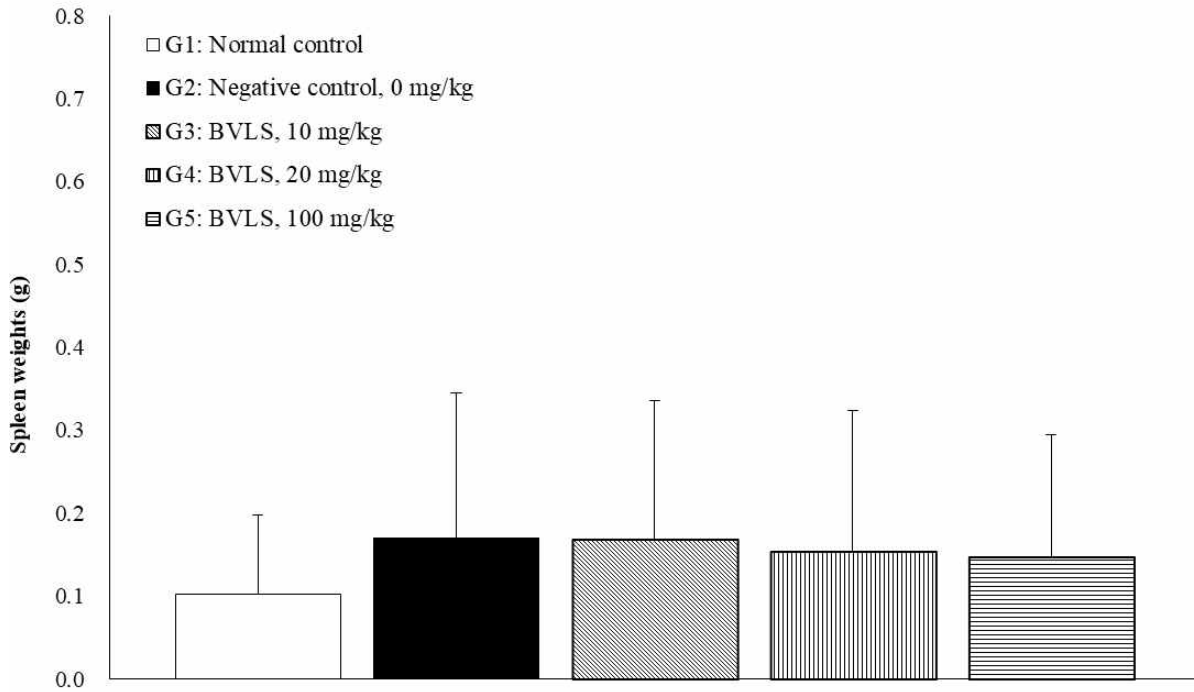
Each point represents the mean + S.D. (n=8)

**p<0.01, Significant difference from the normal control group (G1) by t-test.

Figure 4. Mitogen induced - splenocyte proliferation

그림 29. Mitogen induced-splenocyte proliferation

- 관찰종료일에 적출한 Spleen 무게는 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 유의하게 감소하지 않았다. Spleen 무게가 정상대조군(G1)에 비해 음성대조군(G2)에서 감소하지 않은 결과가 보고된 바 있으며, 감소하지 않은 이유는 면역억제에 대한 방어기작으로 사료된다 (그림 30).



Each point represents the mean + S.D. (n=8)

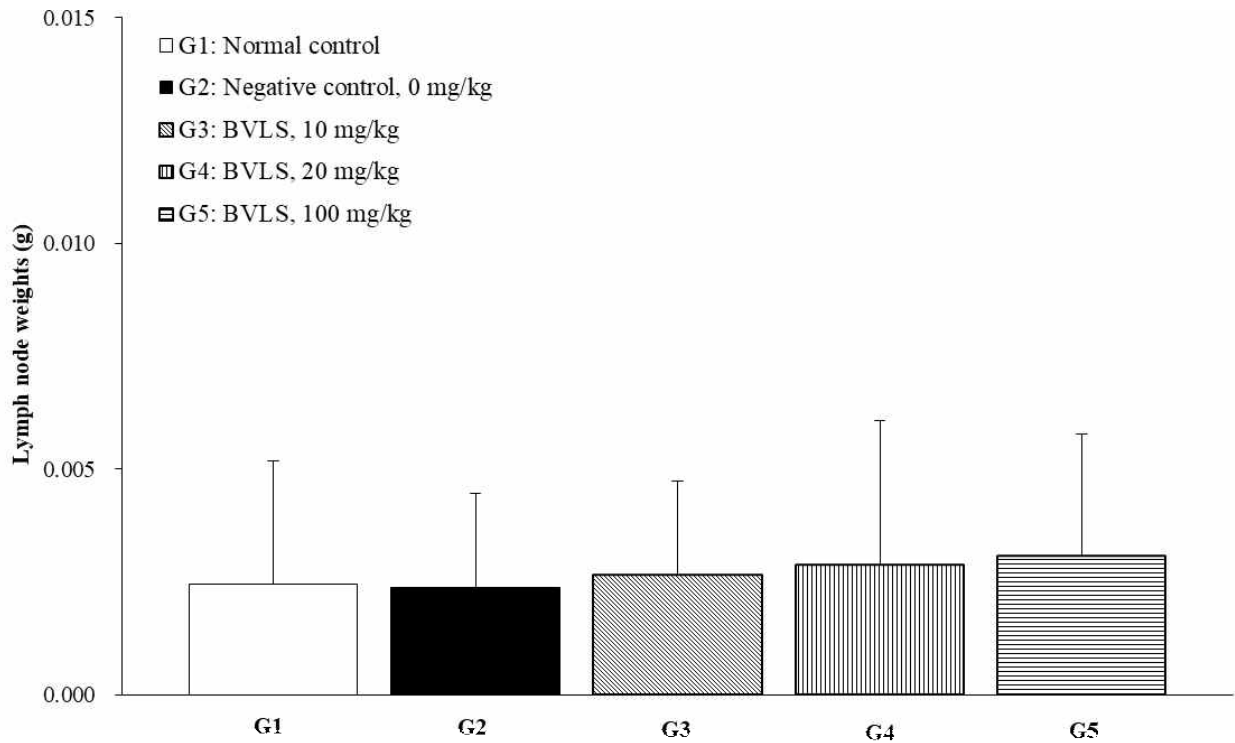
[#]p<0.01, Significant difference from the normal control group (G1) by t-test.

* p<0.05, Significant difference from the negative control group (G2) by Dunnett's t-test.

**p<0.01, Significant difference from the negative control group (G2) by Dunnett's t-test.

그림 30. Spleen weight

- Lymph node 의 무게는 정상대조군(G1)과 비교하여 음성대조군(G2)에서 통계학적 유의성이 나타나지 않았다. 음성대조군(G2)과 비교하여 시험물질 투여군(G3~G5)의 Lymph node 무게가 증가하였다 (그림 31).

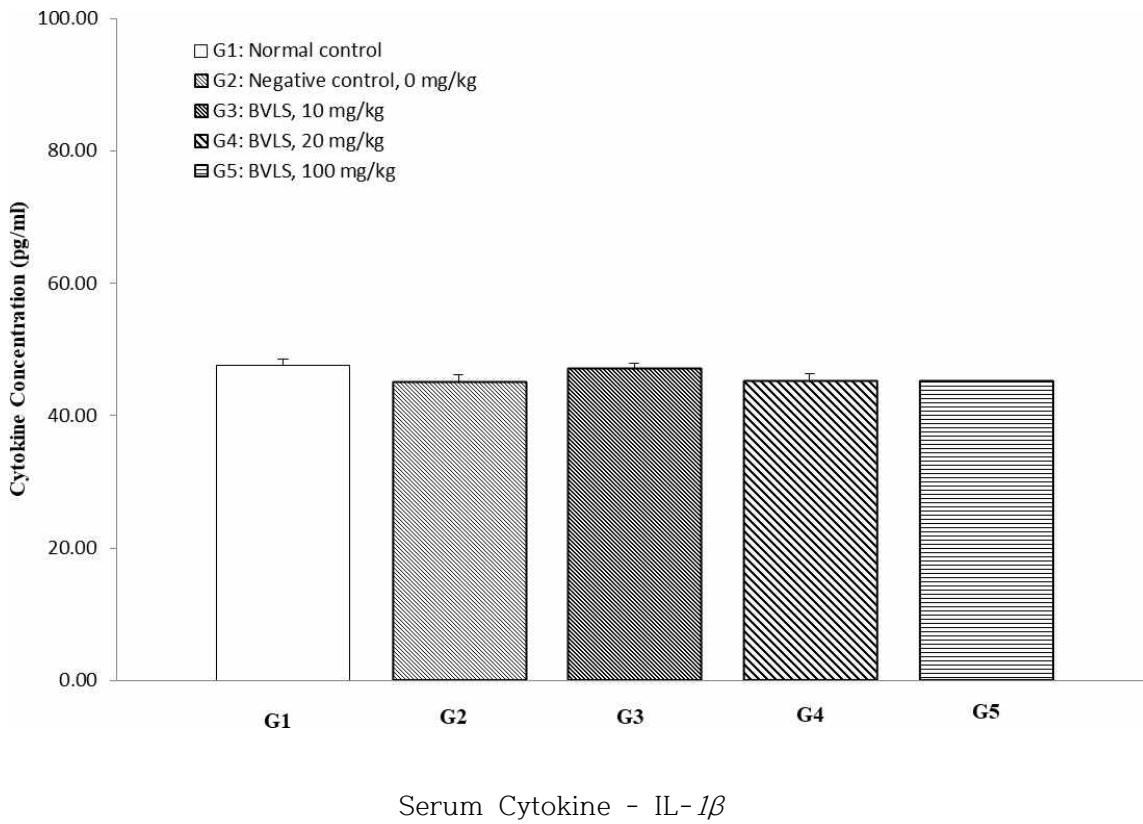
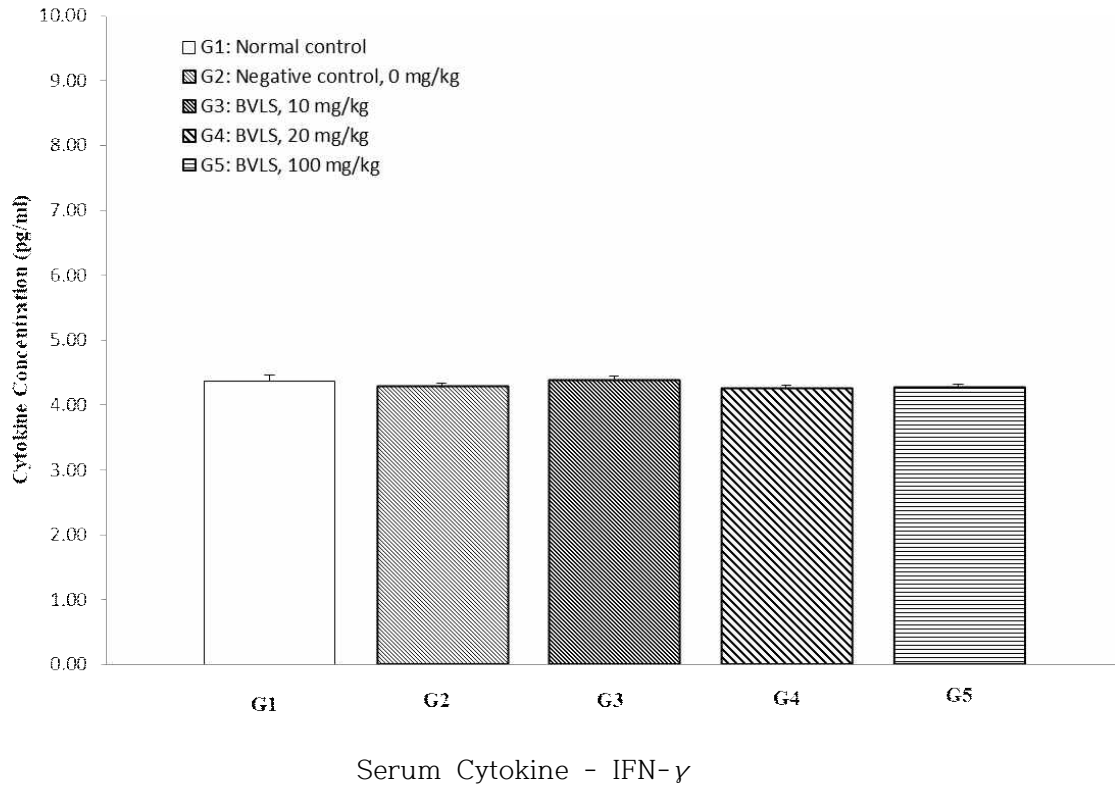


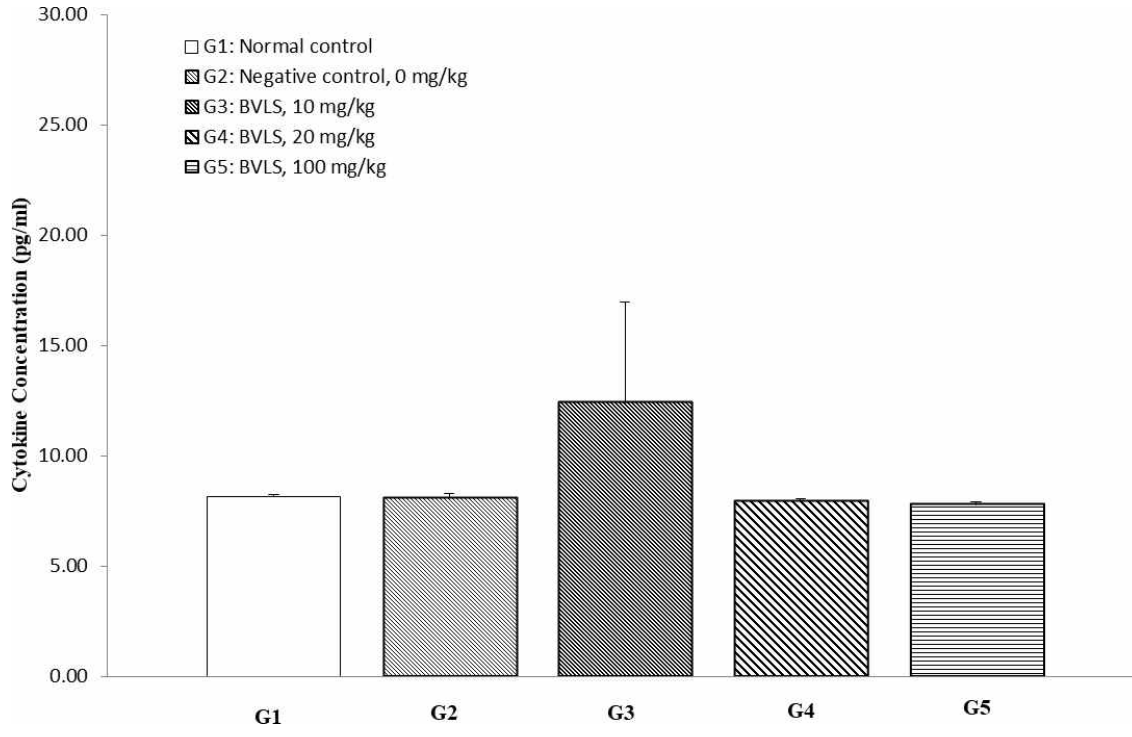
Each point represents the mean + S.D. (n=8)

No statistically significant differences was noted in the substance groups from the normal control group (G1) ($p > 0.05$, t-test).

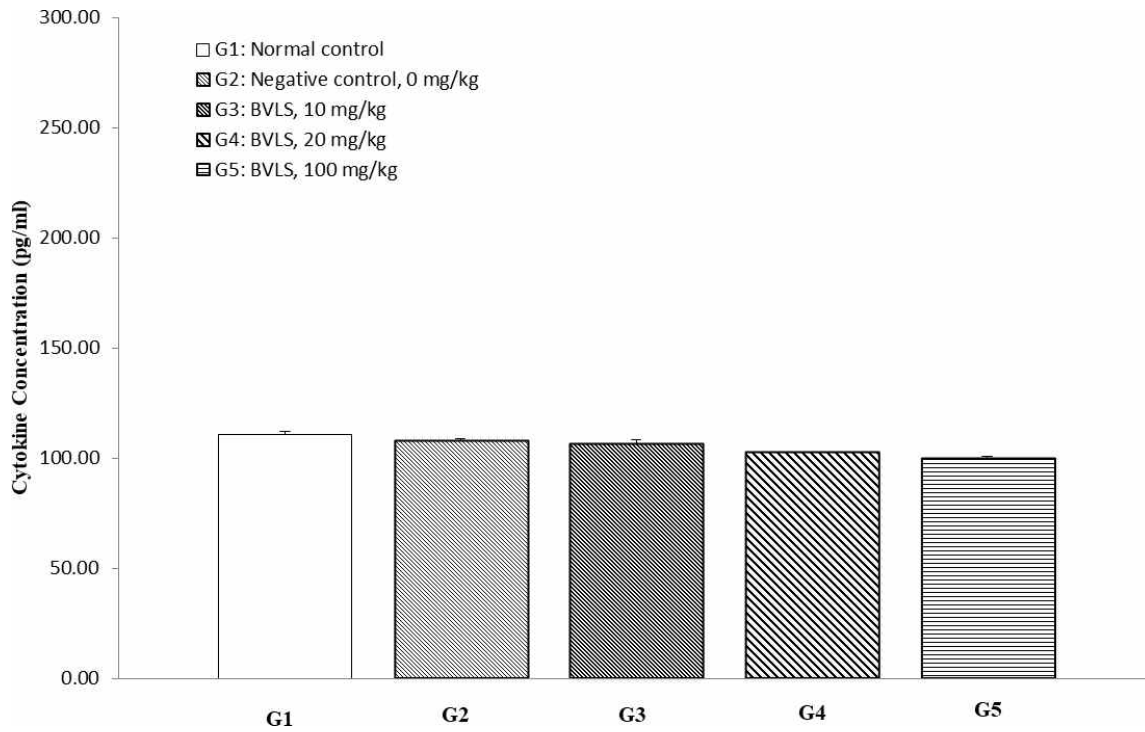
그림 31. Lymph node weight

- 관찰종료일에 채혈한 혈액에서의 Serum cytokine profile 을 측정 한 결과, 통계학적 유의성이 나타나지 않았다. 면역억제제를 투여하였을 때 정상대조군과 음성대조군의 cytokine 의 농도의 변화가 없었는데, 이는 이미 정상 동물의 혈중 cytokine 이 basal level 수준으로 유지되기 때문인 것으로 사료된다. 또한 시험물질 시험물질 투여가 혈중 cytokine 농도의 증가를 유발하지 않음을 확인함 (그림 32).

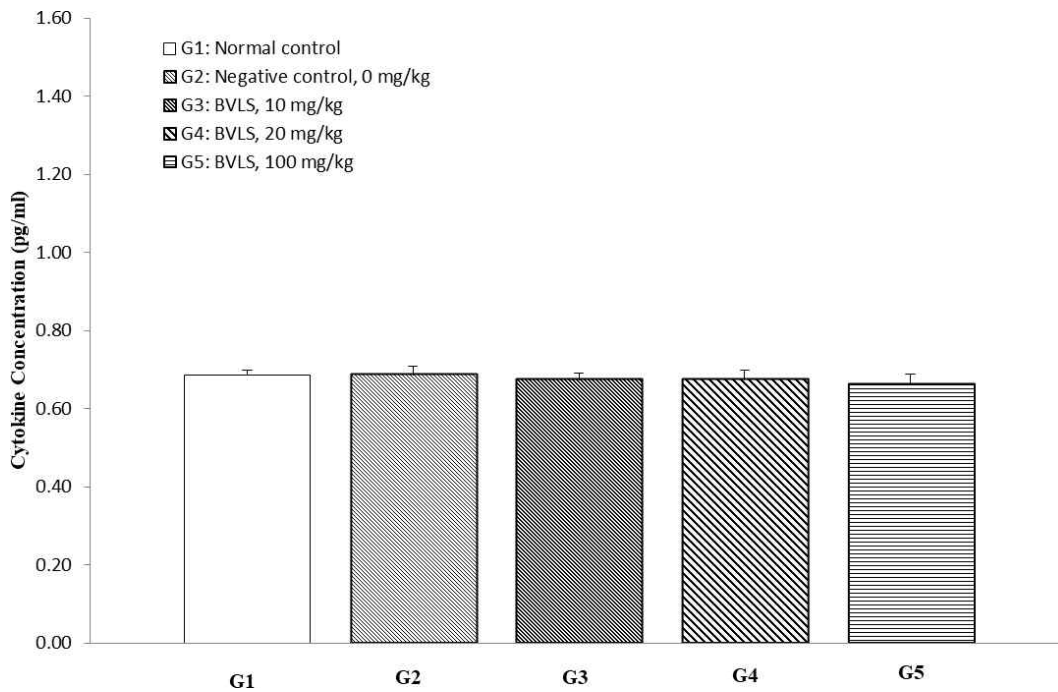




Serum Cytokine - IL-2



Serum Cytokine - IL-4



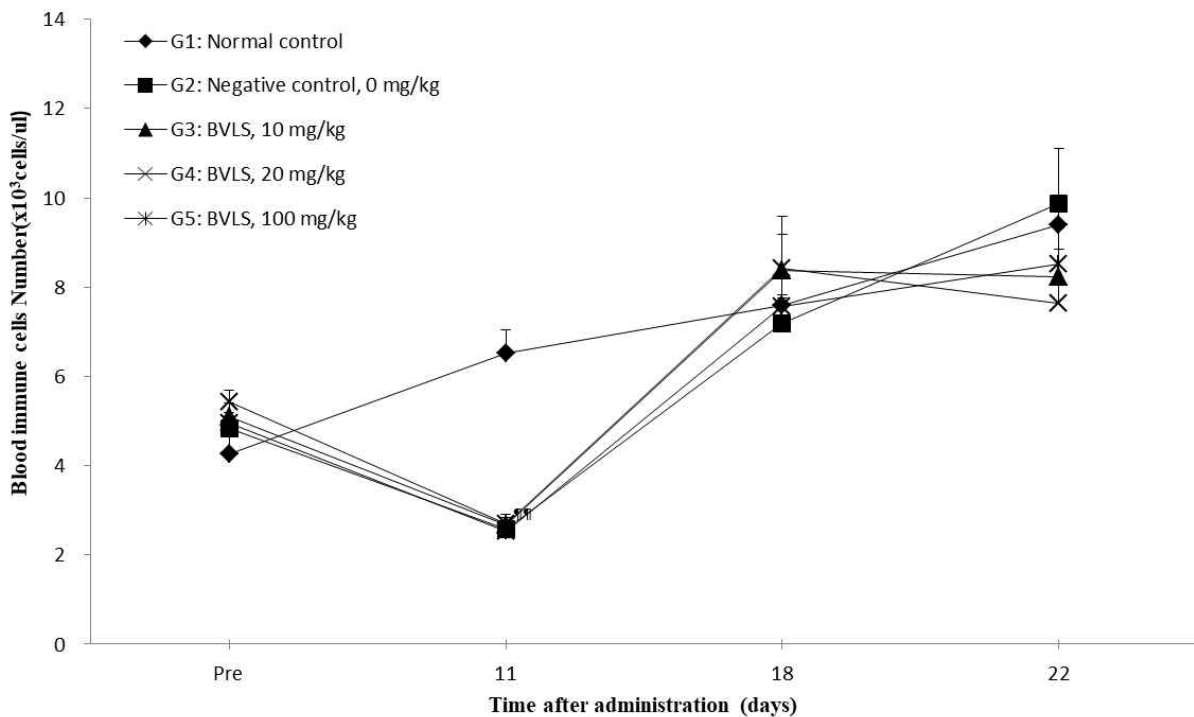
Serum Cytokine - TNF- α

Each point represents the mean + S.D. (n=8)

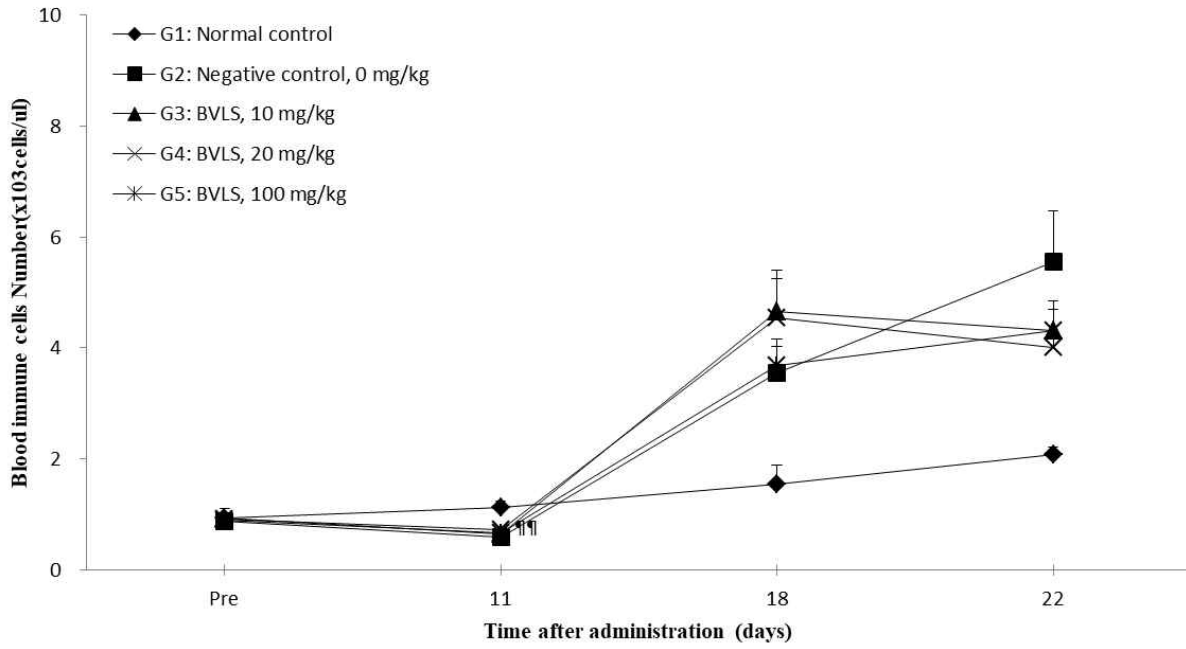
No statistically significant differences was noted in the substance groups from the normal control group (G1) ($p > 0.05$, t-test).

그림 32. Serum cytokine profile

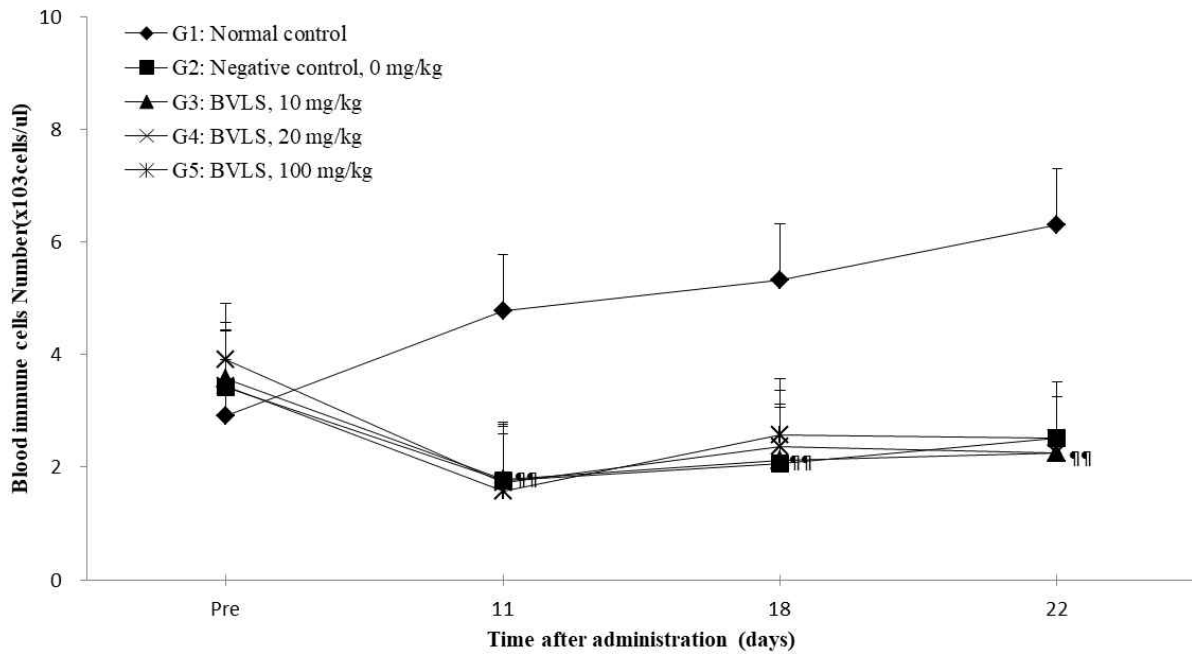
■ Complete blood count(CBC) 측정된 결과, White blood cell count 는 1 차 Cyclophosphamide 투여일에 음성대조군(G2)이 정상대조군과 비교하여 감소하였고, 시간이 지남에 따라 증가하였다. 일부 측정시점에서 정상대조군(G1)과 비교하여 음성대조군(G2)에서 통계학적 유의하게 감소하였으며, 시험물질 투여군(G3~G5)과 음성대조군(G2)의 통계학적인 차이가 나타나지 않았다. Neutrophil count 는 1 차 Cyclophosphamide 투여일에 음성대조군(G2)이 정상대조군(G1)과 비교하여 감소하였고, 일부 측정 시점에서 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소하였으며, 시험물질 투여군(G3~G5)과 음성대조군(G2)의 통계학적인 차이가 나타나지 않았다. Lymphocyte count 는 1 차 Cyclophosphamide 투여일에 음성대조군(G2)이 정상대조군(G1)과 비교하여 감소하였고, 일부 측정시점에서 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다. 시험물질투여군과 음성대조군(G2)의 통계학적인 차이가 나타나지 않았다 (그림 33).



White blood cell



Neutrophil



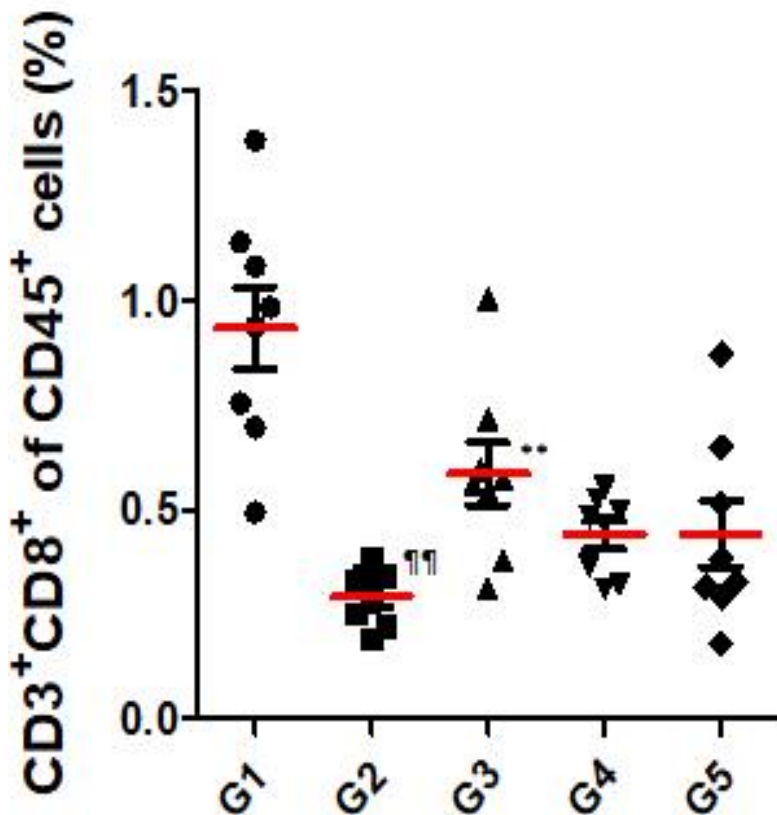
Lymphocyte

Each point represents the mean + S.D. (n=8)

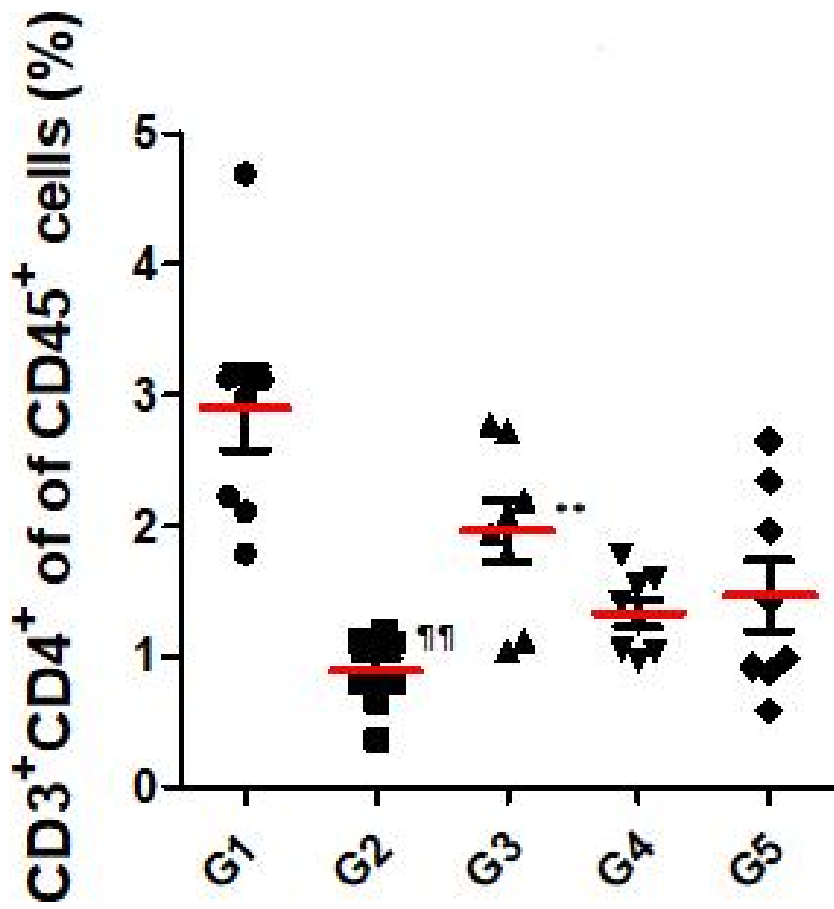
* $p < 0.01$, Significant difference from the normal control group (G1) by t-test.

그림 33. Complete blood count(CBC)

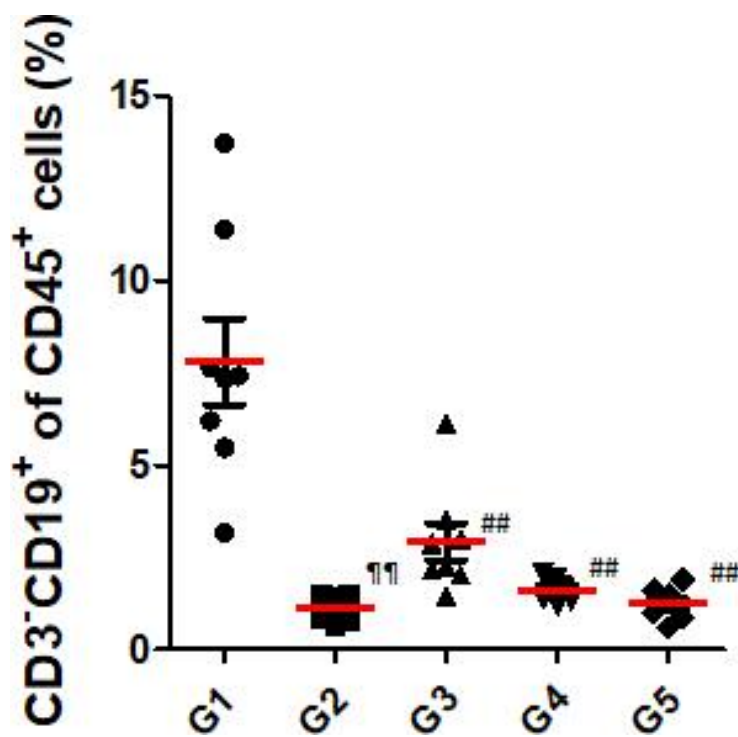
■ 관찰종료일에 채취한 혈액에서의 Immune Profile Analysis 를 진행한 결과, Cytotoxic T cell population 비율은 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소했으며, 음성대조군(G2)과 비교하여 10 mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G3)에서 통계학적으로 유의하게 증가했다. Helper T cell population 비율은 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소했으며, 음성대조군(G2)과 비교하여 10mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G3)에서 통계학적으로 유의하게 증가했다. B cell population 비율은 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소했고, 음성대조군(G2)과 비교하여 10mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G3), 20 mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G4) 및 100 mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G5)에서 통계학적으로 유의하게 증가했다. NK cell population 비율은 각 군 별 통계학적 유의성이 나타나지 않았다 (그림 34).



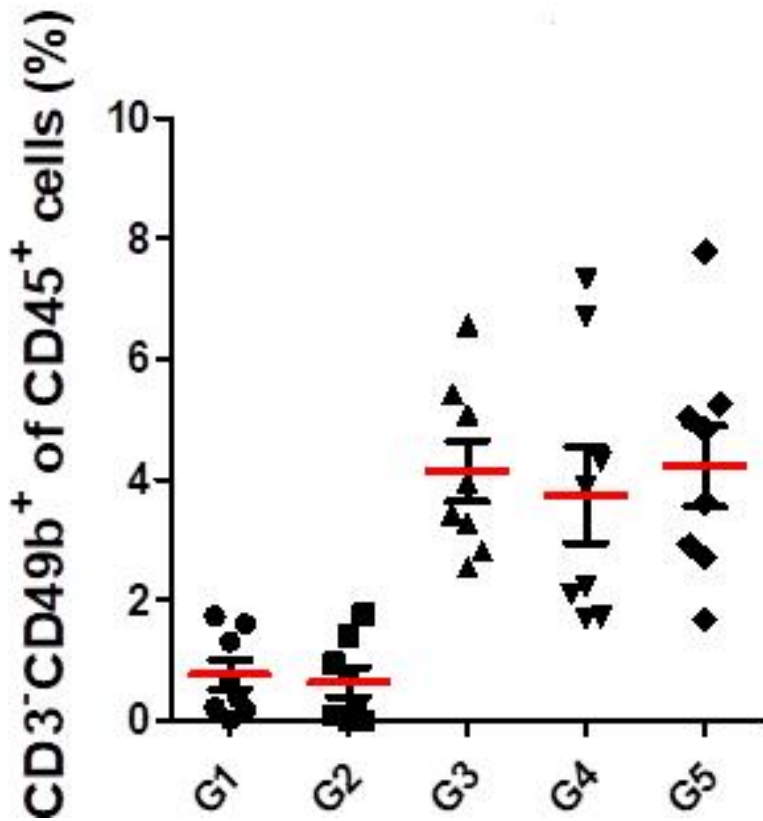
Cytotoxic T(Tc) cell population of CD45+ immune cells



Helper T(Th) cell population of CD45+ immune cells



B cell population of CD45+ immune cells



NK cell population of CD45+ immune cells

Each point represents the mean + S.D. (n=8)

¶ p<0.01, Significant difference from the normal control group (G1) by t-test.

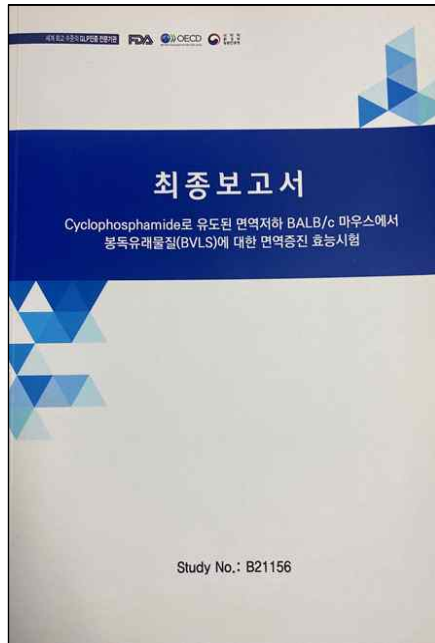
**p<0.01, Significant difference from the negative control group (G2) by Dunnett t-test.

그림 34. Immune Profile Analysis

■ 요컨대, 면역억제제(Cyclophosphamide)를 투여하여 면역저하를 유발한 수컷 BALB/c 마우스를 이용한 면역증진시험에서 Complete blood count(CBC)에서 음성대조군(G2)과 대비하여 시험물질 투여군(G3~G5)에서의 차이가 나타나지 않았으며, Mitogen induced- splenocyte proliferation 에서 음성대조군(G2)과 대비하여 차이가 나타나지 않았다. Spleen 의 무게는 음성대조군(G2)과 비교하여 차이가 나타나지 않았으며, Lymph node 의 무게는 음성대조군(G2)과 비교하여 증가하였다. Serum cytokine profile 에서 정상대조군과 음성대조군의 cytokine 농도의 차이가 나타나지 않았다. Immune cell profile Analysis 에서 CD45+ immune cell 의 NK cell population 비율이 정상대조군 및 음성대조군과 대비하여 시험물질 투여군(G3~G5)이 높게 나왔고, Cytotoxic T cell, Helper T cell 및 B cell 의 population 비율이 음성대조군과 대비하여 회복하는 경향을 나타냈다.

■ 결론적으로 면역억제제(Cyclophosphamide)를 투여하여 면역저하를 유발한 수컷 BALB/c 마우스를 이용한 면역증진시험에서 시험물질인 봉독유래물질(BVLS)의 경구 투여는 Lymph node 의 무게는 통계학적 유의성이 나타나지 않았지만 음

성대조군(G2)과 비교하여 시험물질 투여군(G3~G5)의 lymph node 의 무게가 증가하였고, Cytotoxic T cell, Helper T cell 및 B cell 비율이 통계학적으로 유의한 증가를 나타냈고, NK cell 비율은 시험물질 투여군(G3~G5)의 증가하는 경향을 나타냄. 종합적으로, **봉독유래물질(BVLS)은 면역증진효과 개선효과를 나타내는 것으로 사료됨.**



BTT Study No.: B21156 Report

요약

본 시험은 면역억제제(Cyclophosphamide)를 투여하여 면역저하를 유발할 수 있는 BALB/c 마우스에 시험물질인 봉독유래물질(BVLS)을 경구투여하여 면역증진효과를 평가하고자 실시하였다.

군구성원 정상대조군(G1), 음성대조군(G2), 10 mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G3), 20 mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G4) 및 100 mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G5)으로 구성하였다.

관찰기간 동안 매일 1 회 일반증상을 관찰하였고, 동물의 체중은 주 2 회, 유발물질인 시험물질 투여 후 8 및 11 일째 투여하였고, 면역저하유발확인은 1, 11, 18 일 및 무관할에 관찰하여 확인하였다. 무관할에 관찰하여 Serum 및 림프구, spleen 및 lymph node 를 측정하였다.

면역증진효과의 평가는 Complete blood count(CBC), splenocyte 증식능, Spleen 및 Lymph node 의 무게, Serum cytokine profile 및 Immune Profile analysis 를 확인하여 평가하였다. 백혈구의 총 수 및 비율이 음성대조군과 비교하여 증가하게 되면 면역증진효과가 있는 것으로 판정하였고, splenocyte 증식능이 음성대조군과 비교하여 증가하게 되면 면역증진효과가 있는 것으로 판정하였다. Spleen 및 Lymph node 의 무게가 음성대조군과 비교하여 증가하면 면역증진효과가 있는 것으로 판정하였고, Serum cytokine profile 에서 음성대조군과 비교하여 cytokine 의 비율이 증가하면 면역증진효과가 있는 것으로 판정하였다. Immune Profile analysis 를 통하여 음성대조군과 비교하여 면역세포의 비율이 증가하면 면역증진효과가 있는 것으로 판정하였다.

Spleen 에서 Mitogen induced-splenocyte proliferation 을 측정할 결과, 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소했으며, 시험물질 투여군(G3~G5)에서는 음성대조군(G2)과 비교하여 통계학적 유의성이 나타나지 않았다.

관찰종말에 채출한 Spleen 무게는 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 유의성이 나타나지 않았다. Spleen 무게가 음성대조군(G1)에 비해 음성대조군(G2) 에서 감소하지 않은 결과가 얻고된 바 있으며, 감소하지 않은 이유는 면역억제에 대한 방어기작으로 해석된다. Lymph node 의 무게는 정상대조군(G1)과 비교하여 음성대조군(G2)에서 통계학적 유의성이 나타나지 않았다. 음성대조군(G2)과 비교하여 시험물질 투여군(G3~G5)의 Lymph node 무게가 증가하였다.

관찰종말에 채출한 혈액에서의 Serum cytokine profile 를 측정할 결과, 통계학적 유의성이 나타나지 않았다. 면역저하를 유발했을 때의 음성대조군과 음성대조군의 cytokine 의 농도의 변화가 없었으며, 시험물질 투여로 인한 cytokine 농도의 증가도 관찰 되지 않았다. Complete Blood count(CBC) 측정할 결과, White blood cell count 는 각 군 별 통계학적으로 유의성이 나타나지 않았다. Neutrophil count 는 일부 측정 시험에서 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소하였으며, Lymphocyte count 는 일부 측정시험에서 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다.

관찰종말에 채출한 혈액에서의 immune Profile Analysis 를 진행할 결과, Cytotoxic T cell population 비율은 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소했으며, 음성대조군(G2)과 비교하여 10 mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G3)에서

BTT Study No.: B21156 Report

통계학적으로 유의하게 증가했다. Helper T cell population 비율은 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소했으며, 음성대조군(G2)과 비교하여 10mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G3)에서 통계학적으로 유의하게 증가했다. B cell population 비율은 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소했고, 음성대조군(G2)과 비교하여 10mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G3), 20 mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G4) 및 100 mg/kg 용량의 BVLS 투여군(G5)에서 통계학적으로 유의하게 증가했다. NK cell population 비율은 각 군 별 통계학적 유의성이 나타나지 않았다.

결론적으로 면역억제제(Cyclophosphamide)를 투여하여 면역저하를 유발할 수 있는 BALB/c 마우스를 이용한 면역증진시험에서 시험물질인 봉독유래물질(BVLS)의 경구 투여는 Lymph node 의 무게는 통계학적 유의성이 나타나지 않았지만 음성대조군(G2)과 비교하여 시험물질 투여군(G3~G5)의 lymph node 의 무게가 증가하였고, Cytotoxic T cell, Helper T cell 및 B cell 비율이 통계학적인 차이를 나타냈고, NK cell 비율은 통계학적인 유의성이 나타나지는 않았지만 시험물질 투여군(G3~G5)의 비율이 높게 나온 것으로 보아 면역증진효과 개선효과가 보이는 것으로 사료된다.

그림 35. 면역증진 효능시험 최종보고서 ((주)바이오톡스텍)

○ 제품표준분석법 확립 및 제품표준서 작성

▶ 식약처에 고시된 건강기능식품 인증을 위한 원료표준화를 통해 제품표준분석법 기준을 설정하고 제품표준서를 작성

- 시제품 BVLS의 장용성 실험 분석법 - 제조된 봉독 유래성분 및 유산균을 포함하는 장용성 과립의 장용성을 평가하고자, pH 3.4의 위장내 환경 및 pH 6.8의 소장내 환경을 제조하여 용해도를 실시하였다. 실험 결과, 상기 과립은 pH 6.8의 소장내 환경에서는 4분만에 봉해가 완료되었으나, pH 3.4의 위장내 환경에서는 24시간 후에도 봉해되지 않는 것을 확인함 (그림 36).

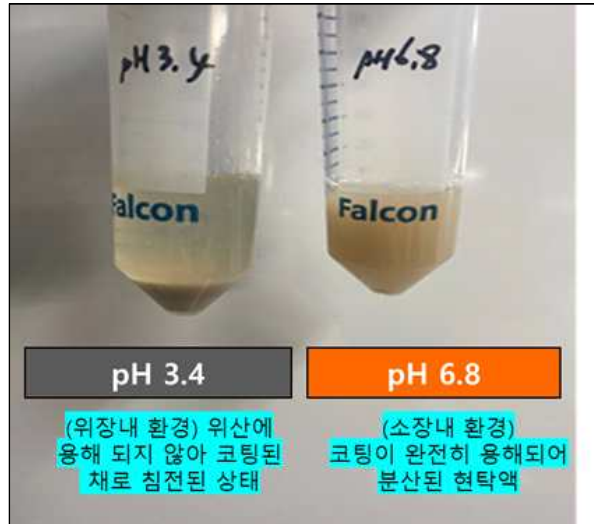


그림 36. 시제품 BVLS의 pH별 물성 변화

- 건강기능식품 인증 기반을 마련하기 위하여 시제품의 원료, 제조방법, 함량, 색상, 형태, pH 등에 관한 기준을 설정하였으며, 제품 표준서를 확립함 (그림 37).

BVLS 제품 표준서

Version 1.0
Print Date: 12.17.2021

(주) 청진바이오택

목적	본 제품 제조
1. 원료명	장용성 과립(시제품)
2. 원재료	장용성 과립(시제품) ... 및의 특성에 들어있는 것
3. 용해도 (시약성분)	용해성
4. 제조 방법	원재료 → 정제수 용해 → 여과 → 농축 건조 → HPLC로 분도 및 성분 함유량 확인 → 장용성 과립(시제품)으로 포장 → 운반 및 포장 → 인장 완료
5. 용해도 및 시험방법	<ul style="list-style-type: none"> 과립(시제품)의 장용성 기준 시험 용액: 정제수 용액 용액량: 100mL 용액 온도: 37°C 시험 용액 pH: 3.4, 6.8 시험 용액 용해 시간: 4분 시험 용액 온도: 37°C 시험 용액 용해 시간: 4분
6. 포장 방법	<ul style="list-style-type: none"> 과립(시제품) 과립(시제품) ... 및의 특성에 들어있는 것

제조 방법	<ul style="list-style-type: none"> 과립(시제품)의 장용성 기준 시험 용액: 정제수 용액 용액량: 100mL 용액 온도: 37°C 시험 용액 pH: 3.4, 6.8 시험 용액 용해 시간: 4분 시험 용액 온도: 37°C 시험 용액 용해 시간: 4분
시험 방법	<ul style="list-style-type: none"> 과립(시제품)의 장용성 기준 시험 용액: 정제수 용액 용액량: 100mL 용액 온도: 37°C 시험 용액 pH: 3.4, 6.8 시험 용액 용해 시간: 4분 시험 용액 온도: 37°C 시험 용액 용해 시간: 4분

그림 37. 시제품(BVLS)의 제품표준서

■ 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

1. 봉독의 기원
2. 개발경위
3. 국내외 인정/허가 현황
4. 국내외 사용 현황(유통량 근거자료 포함)

■ 제조방법에 관한 자료

1. 제조공정표
2. 원재료부터 단위공정별 제조방법 설명
3. 사용된 원료 첨가물이 건강기능식품의 기준 및 규격, 식품의 기준 규격, 식품첨가품의 기준 및 규격에 적합한지 여부
4. 주요 제조단계별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화
5. 주요 제조단계별 수율변화

■ 원료의 특성에 관한 자료

항 목	1. 주요 내용	
1. 원료명	정제봉독(멜리틴)	
2. 원재료	정제봉독(멜리틴) - 벌의 독낭에 들어있는 독	
3.기능 (지표)성분	멜리틴	
4. 제조 공정	원재료 → 정제수 용해 → 여과 → 동결건조 → HPLC로 순도 및 성분 함유량확인 → 정제봉독(정제봉독으로부터 분리한 멜리틴) → 신청 원료	
5. 규격 및 시험방법	◆ (주)청진바이오텍 정제봉독 기준 1) 색상 : 동결건조된 분말 2) 색상 : 옅은 황색 3) 비중 : 1.1-1.4 4) pH : 5.1-5.5 5) 순도 : ≥98% 6) 총 단백질 : ≥90% 7) 활성 단백질 : ≥75% 8) 용해도 : 3차 증류수 (수용성 물질: ≥98%)	
	기능(지표) 성분 시험법	<input type="checkbox"/> 공인시험방법 <input checked="" type="checkbox"/> 자사시험방법 HPLC 자료(특이성, 정확도, 정밀도, 직선성) ⇒ 적합
	규격 외 잔류농약/중 금속	<input type="checkbox"/> 신청원료에 대한 잔류농약 검사 진행 예정 <input type="checkbox"/> 신청원료에 대한 중금속 검사 진행 예정
6. 안전성	의사결정도	신청원료는 국내에서 섭취경험이 없으나 국외에서는 섭취경험이 있는 원재료를

		<p>열수추출, 여과, 농축, 건조하여 제조된 것으로 단순추출에 해당되나 섭취량 변화 여부를 판단할 수 없어 의사결정도 '다'에 해당함</p>
	<p>섭취 근거</p>	<p>○ 인정현황 [국내] (원재료) - 식품공전 : 없음 (유사원료) - 없음</p> <p>[국외] (원재료) - 미국 : 청진바이오텍의 정제붕독이 FDA DMF 등록(DMF 27321) 청진바이오텍의 정제붕독이 FDA DMF 등록(DMF 031645)</p> <p>(신청원료) - 뉴질랜드 : 매일 500mg 캡슐(각 캡슐 당 25µg의 붕독이 함유) 2~3개 복용(딥블루헬스/뉴질랜드)</p> <p>○ 사용현황 (신청원료: 청진바이오텍 정제붕독) - 국내 : 신청원료를 한의원과 농가에 주사액으로 유통·판매되고 있음 - 국외 : 오스트레일리아에 화장품 원료로 수출</p>
	<p>안전성 정보</p>	<p>○ 붕독은 알레르기 반응에 의한 아낙필라시스 등이 보고되어 있으나, 알레르기를 유발하는 성분인 PLA2를 제거한 정제붕독에 대한 보고는 없음. 하지만 원재료가 붕독인만큼 알레르기 성분임을 표기하여 소비자에게 성분에 대한 섭취 시 주의사항에 정보를 전달.</p>
	<p>섭취량 평가</p>	<p>○ 신청원료의 제안 섭취량 - 국내에서 정해진 바 없음</p> <p>○ 전통적 약재로서의 사용량 - 없음</p> <p>○ 국외 유통제품 섭취량 - 신청원료로서 매일 500mg 캡슐(각 캡슐 당 25µg의 붕독이 함유) 2~3개 복용(딥블루헬스/뉴질랜드)</p> <p>○ 원재료 섭취량(국민영양통계) : 미정.</p> <p>○ 섭취량 평가 : 미정.</p>

	인체적용시험	○ 추후 예정
	독성 시험	[신청원료: 봉독유래물질(BVLS)/ Lot No.: 20201016 /Batch NO.: 202010] 성상: 분말형태 ○ 단회 경구투여 독성시험에서 사망례 및 시험물질 투여에 의한 독성반응이 관찰되지 않음 - 암수 최소 치사량 5,000 mg/kg.bw 이상으로 판단됨 ○ 유전독성시험 결과, 독성이 관찰되지 않았음
	기타 사항	- 특이사항이 관찰되지 않음
	섭취 시 주의사항	○ 영유아, 어린이, 임산부 및 수유부는 섭취에 주의 ○ 특정질환(벌 독 알레르기 체질 등)이 있는 분은 섭취에 주의 ○ 이상사례 발생 시 섭취를 중단하고 병의원에 방문하여 조치를 취할 것 ※ 설정 근거를 기재
7. 기능성	신청 기능성	면역증진에 도움을 줄 수 있음
	신청 일일섭취량	정제된 봉독으로 10mg/kg.day
	시험관시험	[신청원료(생산 Lot : #2020_10)] ○ OO 세포, mg/mL 처리 - OO : 유의적 증가(대조군 대비, p<0.05)
	동물시험	[신청원료(생산 Lot : #2020_10)] ◦ BALB/c/40 mice, 10mg/20mg/100mg/kg, 3주(21회), 경구투여 - 음성대조군보다 시험물질 투여군의 lymph node의 무게 증가 - NK cell 비율은 음성대조군보다 시험물질 투여군의 비율이 높게 나옴으로 면역증진효과 개선효과가 보이는 것으로 사료됨
	인체적용시험	○ 추후 예정
	기타 사항	- 특이사항, 참작사항 등을 기재

- 면역증진 효능을 가진 BVLS 시제품 - 봉독 유래 멜리틴과 *Lactobacillus sporogenes*와 적정범위의 함량으로 배합하여 장용성 제제를 제조 후 (그림 38), 공인 인증시험기관(GLP)에서 독성평가 및 면역증진 효능을 확인 하고 시제품 개발 (제품 출시 확인서)을 완료함 (그림 39).



그림 38. 봉독유래 멜리틴을 함유한 장용성 제제(BVLS)의 제품화(캡슐포장)

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	분독 유래 멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품 개발			
주관연구기관	(사)청진바이오텍	참여기관	(사)청진바이오텍	
연구책임자	김철구	연구기간	2020년 04월 ~ 2021년 12월(총 2년)	
총 정부출연금	528,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	(o)	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
BVLS		면역기능개선 장용성 건강기능 식품(캡슐)	2020.10.16	100
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제 조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2021년 12월 30일

연구책임자 : 김철구(서명인)

그림 39. BVLS 시제품 (제품 출시 확인서)

-협동연구기관(대구가톨릭대학교) : 시제품의 유효성 및 안전성 검증

○시제품 (멜리틴과 유산균 추출물 혼합) 경구투여의 유효성 검증 (in vivo)

- 군 구성은 정상대조군(NC), 음성대조군(LPS), 정상대조군(NC)과 10 mg/kg 용량의 장용성 과립(BVLS) 투여군(NC+BVLS), 음성대조군(LPS)과 10 mg/kg 용량의 장용성 과립(BVLS) 투여군(LSP+BVLS)으로 구성하였다 (그림 40, 표11).

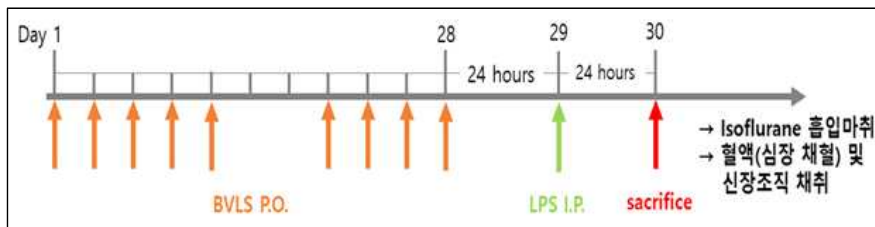
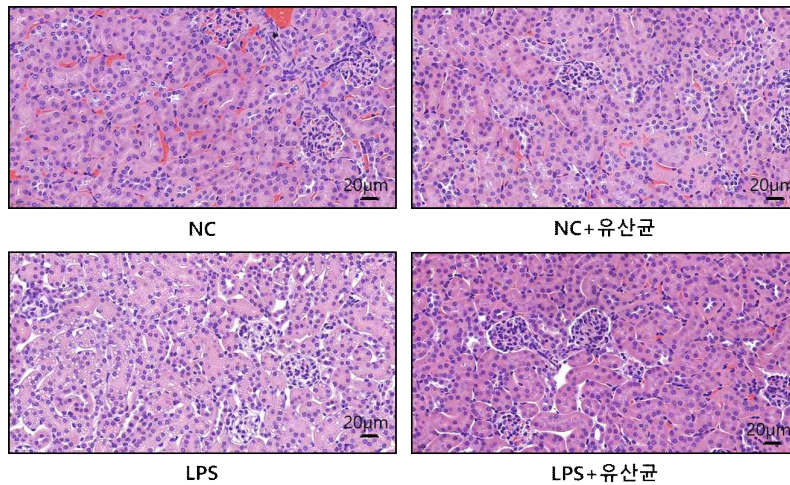


그림 40. 시제품(BVLS)의 유효성 검증 (in vivo)

군	투여경로	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (LPS) (mg/kg)
정상대조군(NC)	-	-	-
음성대조군(LPS)	-	-	10
시험물질 투여군(NC +BVLS)	PO.	10	-
시험물질 투여군(LPS+BVLS)	PO.	10	10

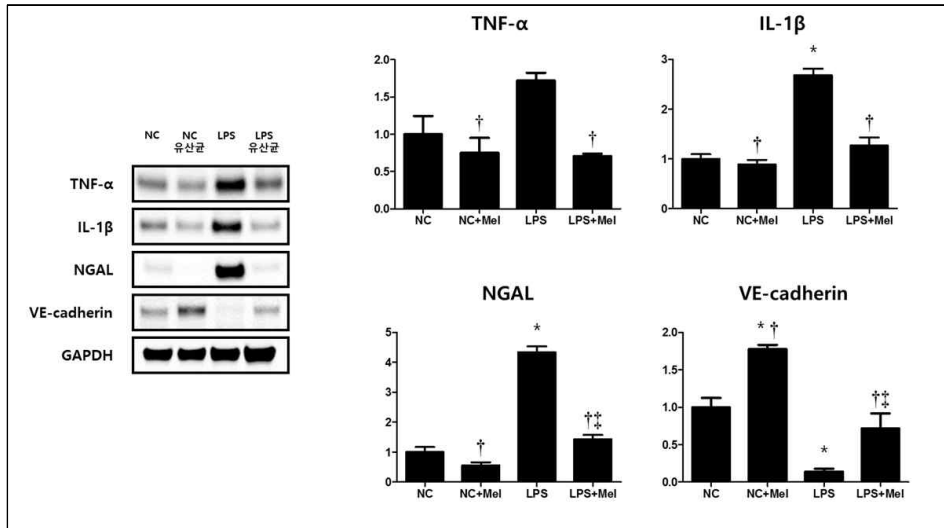
표 11. 시제품(BVLS)의 유효성 검증 (in vivo)

▶시제품의 효능을 확인하기 위하여 마우스에 LPS를 주사하여 손상모델을 확립함. LPS로 유도된 조직병리학적 변화를 확인한 결과, H&E 염색은 LPS를 주사한 마우스에 관형 상피 세포의 팽창 및 관 확장을 포함하는 조직병리학적 변화를 나타내는 것을 확인함 (그림 41).



<그림 41>

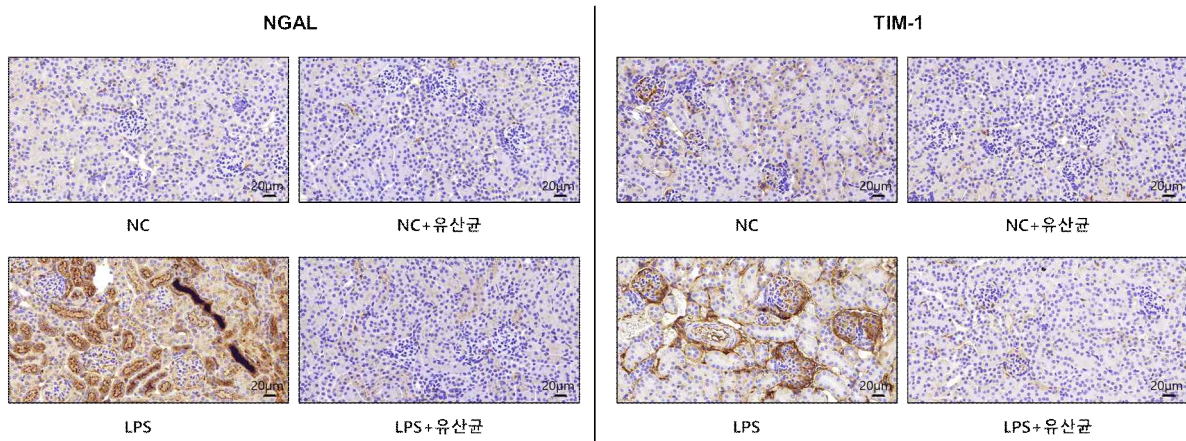
▶염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 의 단백질수준 변화를 확인하여 시제품의 효능을 평가함. LPS에 의해 증가한 TNF- α , IL-1 β 의 발현은 시제품에 의해 현저하게 감소하는 것을 확인함. 시제품이 내독소인 LPS로 유도된 섬유화에 미치는 효능을 평가함. 섬유화와 관련한 인자들의 발현변화를 확인한 결과, 시제품은 혈관내피세포 마커인 VE-cadherin과 관상손상마커인 NGAL 유의하게 조절하는 것을 확인함 (그림 42).



<그림 42.>

○시제품 (멜리틴과 유산균 추출물 혼합) 경구투여의 안전성 검증 (in vivo)

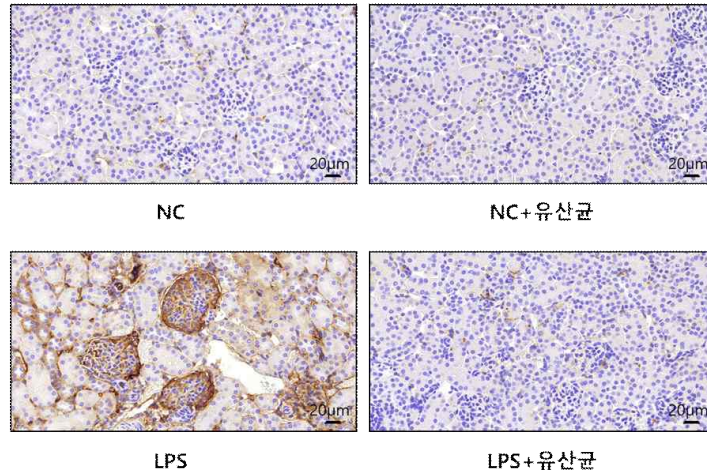
▶면역조직화학 염색을 통하여 관상 손상 마커인 NGAL과 Kim-1을 확인하여 시제품의 효능을 확인함. LPS 처리로 증가한 NGAL과 Kim-1의 발현은 시제품에 의해 유의하게 억제됨. 이들의 발현은 단백질 수준에서도 시제품에 의해 억제되는 것을 확인함 (그림 43).



<그림 43.>

▶면역조직화학 염색을 통하여 섬유화 마커인 Galectin 3 발현을 확인하여 시제품의 효능을 확인함. LPS 처리로 증가한 Galectin 3의 발현은 시제품에 의해 유의하게 억제됨. 이들의 발현은 단백질 수준에서도 시제품에 의해 억제되는 것을 확인함 (그림 44).

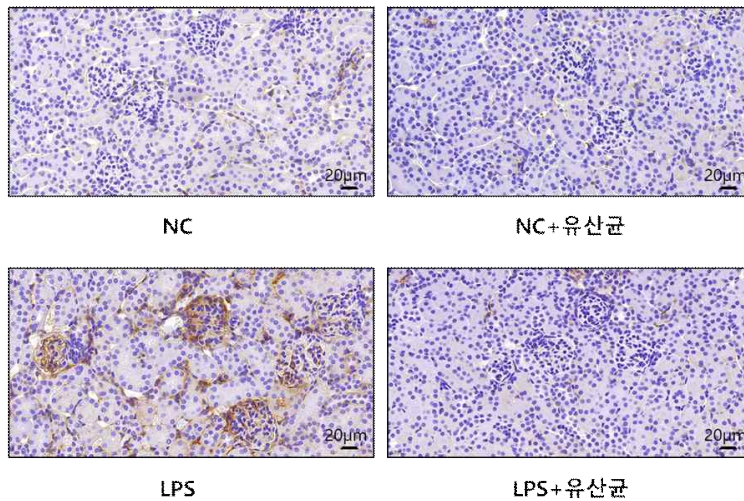
Galectin3



<그림 44.>

▶마우스에 시제품과 LPS를 복강 주사하여 대식세포 마커인 CD4 면역세포의 발현변화를 확인함으로써 시제품의 효능을 확인함. LPS 처리로 증가한 CD4의 발현은 시제품에 의해 현저하게 감소되었으며, 이는 시제품이 면역세포 침투를 억제하는 것을 확인함 (그림 45).

CD4



<그림 45.>

○기술이전과 대량생산을 위한 scale up factor 도출 연구 - 과립화 공정의 생산규모 확대에 따른 위험성 저감 전략

실험실 규모			대량생산 규모(기술이전 시 필요)			
장비 및 공정 조건		설정값 및 운전범위	장비 및 공정 조건			장비변수에 따른 위험성 저감을 위한 초기설정
장비	변수		장비	변수	운전가능범위	
유동층 과립기	급기유량	10 m ³ /hr	유동층 과립기	급기유량	0 ~ 500 m ³ /hr	90 m ³ /hr
	투입온도	30 °C		투입온도	0 ~ 110 °C	35 °C
	건조온도	40 ~ 50 °C		건조온도	0 ~ 90 °C	65 °C
	선별 시간	10 분		선별 시간	5시간	30분
	Microclimate 압력	0.2 bar		Microclimate 압력	0~ 0.2 bar	0.2 bar
	건 노즐 크기	0.5 mm		건 노즐 크기	1.0 mm	1.0 mm
	Bottom plate 면적	0.02 m ²		Bottom plate 면적	0.1 m ²	0.1 m ²
	건 갯수	1		건 갯수	2	1
	체 사이즈	16 mesh		체 사이즈	16 mesh	16 mesh
	회전속도	10 rmp		회전속도	400 rpm	250 rpm
위험 요소			저감 방법			
생산 규모가 확대됨에 따라 유기용매 사용량이 증가하여 이에 따른 잔류용매의 확인이 필요함			반제품의 잔류용매 농도를 확인하여 대량생산 규모의 설계공간 내에서 잔류용매의 수준이 적절히 관리가능한지 확인하고 검증함			
대량생산 규모 장비의 외벽 재질의 특성에 따른 열손실을 고려하여 급기온도의 조절이 필요함			생산 규모의 제조설비의 규모 확대에 따른 변동을 고려하여 급기온도의 대량생산규모에서의 운전범위를 설정하고 이에 따른 반제품과 완제품의 핵심품질 특성을 확인함			
생산 규모가 확대됨에 따른 건 개수의 증가로 결합액 투입속도에 대한 추가적인 최적화 연구가 필요함			사전 예비실험 결과와 시생산 규모에서의 제조시간을 고려하여 결합액 투입속도의 대량생산규모에 대한 적절한 범위를 설정하고 이에 대한 영향을 검증하고 건강기능식품의 핵심품질특성을 확인함			

표 12. 과립화 공정의 생산규모 확대에 따른 위험성 저감 전략

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

*논문 발표 : 1건(SCI), 학술발표: 4건, 특허 출원 : 2건

*기술실시: 1건, 제품화: 1건(시제품)

*인력양성: 4명, 고용창출: 1명

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		1단계 (2020~2021)	n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
	전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문(SCI)	목표(단계별)	1	-	1
실적(누적)			1	-	1	-
학술발표		목표(단계별)	3	-	3	10
		실적(누적)	4	-	4	10
특허		목표(단계별)	2	-	2	10
		실적(누적)	2	-	2	10
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	인력양성	목표(단계별)	4	-	4	10
		실적(누적)	4	-	4	10
	고용창출	목표(단계별)	1	-	1	20
		실적(누적)	1	-	1	20
	사업화(제품화)	목표(단계별)	1	-	1	50
		실적(누적)	1	-	1	50
	기술실시	목표(단계별)	0	-	0	-
		실적(누적)	1	-	1	-
계	목표(단계별)	12	-	12	100	
	실적(누적)	14	-	14	100	

- * 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구 시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신공종 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.
- * 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도, 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

- * 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.
- * 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(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	Apamin inhibits renal fibrosis via suppressing TGF-β1 and STAT3 signaling in vivo and in vitro	Journal of molecular medicine	권미경	99	독일	Berlin : Springer International	SCIE	2021.05.24	0946-2716	

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021년 제 37차 한국양봉학회 동계 학술대회 및 국제심포지엄	구혜민	2021.02.24. ~ 2021.02.25.	온라인 학회	대한민국
2	2021년 37차 한국양봉학회 하계 학술대회	구혜민	2021.08.26. ~ 2021.08.27.	천안 상록리조트 (온라인병행)	대한민국
3	90th Annual meeting	박관규	2021.10.14	Doubletree Hilton Hotel Burlington, Vermont	미국
4	2021년 제37차 한국양봉학회 동계 학술대회 및 국제심포지엄	김철구	2021.02.24. ~ 2021.02.25.	온라인 학회	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

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	봉독 유래 멜리틴 함유 조성물 및 이의 용도	대한민국	청진바이 오텍	2021-02- 26	10-2021- 002632 6	-					
2	봉독 유래성분 및 유산균을 포함하는 장용성 과립 조성물	대한민국	청진바이 오텍	2021-12- 30	10-2021- 019224 4	-					

○ 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		

□ 표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	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 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	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	BVLS	2020-10-16	청진바이오텍	-	면역기능개선 장용성 건강기능 식품(캡슐)			

□ 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	직접 실시	장용성 건강기능 식품 개발	청진바이오텍	2021-12-30	3,546,662원	

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내 국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1	유용 농생명자원 산업화 기술개발 (곤충자원을 활용한 고부가가치 제품개발)	청진바이오텍	1	-	1
합계			1	-	1

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	-
		생산인력	-
	개발 후	연구인력	-
		생산인력	-

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

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

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2020		1				1			1		
2		2021	3					3			3		

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·조직 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 시제품 개발(BVLS)	○ 국내산 정제봉독의 원료 규격화와 멜리틴 분리 ○ 원료의 과립, 코팅, 건조 가능한 유동층 코팅기 제작	○ 100
○ 멜리틴 경구투여의 유효성 및 안전성 검증	○ 봉독 유래 멜리틴과 <i>Lactobacillus spororenes</i> 의 혼합 기술 개발 및 시제품 제조	○ 100
○ 제품표준분석법 확립 및 제품표준서 작성	○ 멜리틴의 면역과민반응 완화 기능성 확인 (in vitro) ○ 멜리틴 경구투여의 유효성 검증 (in vivo) ○ 멜리틴 경구투여의 안전성 검증 (in vivo)	○ 100
○ 시제품(BVLS)의 유효성 및 안전성 검증	○ 시제품(BVLS)에 대한 유효성 및 안전성 시험평가 의뢰 - GLP기관 ○ 표준분석법 확립 및 제품표준서 작성 ○ 시제품(BVLS) 경구투여의 유효성 검증 (in vivo) ○ 시제품(BVLS) 경구투여의 안전성 검증 (in vivo)	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- ▶면역기능 기능성은 '면역기능 증진'과 '면역과민반응 완화'에 관련된 바이오마커의 개선을 의미함. '면역기능 증진'은 면역을 조절하여 생체방어 능력을 증강시키는 기능을 의미하며, '면역과민반응 완화'의 기능성은 외부 물질에 반응하여 초래되는 알레르기 반응, 자기항원 또는 변형된 자기항원에 대한 반응 등 바람직하지 않게 증가된 면역반응을 억제시키기 위한 기능을 의미함
- ▶건강기능식품은 식약처 건강기능식품공전에 기준 및 규격으로 고시된 원료와 개별적으로 식약처 심사를 거쳐 인정받은 업자만이 사용할 수 있는 개별인정 원료로 나눌 수 있으며 2014년 기준 고시된 원료는 60종, 개별인정 원료는 243종에 달함
- ▶ 면역기능개선에 대한 기능성 원료 현황은 다음과 같음

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량
1	게르마늄 효모	제2007-15호	생리활성기능 3등급	게르마늄	1.2g/일
2	금사상항버섯	제2008-32호	생리활성기능 2등급	베타글루칸	3.3g/일
3	당귀혼합추출물	제2006-17호	생리활성기능 2등급	① nodakenin ② paeoniflorin ③ chlorogenic acid	20~40g/일
4	L-글루타민	제2007-1호 제2008-7호	생리활성기능 2등급	L-글루타민	3~5g/일
5	표고버섯균사체	제2006-5호 제2008-34호	생리활성기능 3등급	α-1,4 glucan	1.8~3.6g/일
		제2008-78호	생리활성기능 2등급	α-glucan	
6	스피루리나	제2010-4호	생리활성기능 3등급	총 엽록소	67~72mg/일
7	클로렐라	제2010-52호	생리활성기능 2등급	총엽록소	125mg/일
8	청국장균배양정제물	제2012-25호	생리활성기능 2등급	폴리감마글루탐산칼륨	1,000mg/일
9	동충하초주정추출물	제2013-34호	생리활성기능 2등급	Cordycepin	1.5g/일
10	효모베타글루칸	제2013-34호	생리활성기능 2등급	베타글루칸	250mg/일

표 12. '면역기능 증진' 기능성 원료 현황

- ▶상기 표에서 나타난 것과 같이 면역기능개선 건강기능식품은 다수 출시되었음. 그러나 멜리틴과 같은 봉독 성분을 이용한 기능성 식품은 없음.

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량
1	Enterococcus faecalis 가열처리 건조분말	제2006-23호	생리활성기능 3등급	① Enterococcus faecalis FK-23 사균체 ② Cis-박센산	1g/일
		제2008-31호	생리활성기능 2등급	Vaccenic acid	
2	구아바잎 추출물등 복합물	제2009-16호	생리활성기능 2등급	① Ellagic acid ② EGCG ③ Gallic acid	800mg /일
3	다래추출물	제2009-18호	생리활성기능 2등급	① Quinicacid ② Citric acid	2g/일
		제2009-58호			1.4~1.7g/일
4	소엽추출물	제2010-48호	생리활성기능 3등급	로즈마린산	-
5	피카오프레토 분말등 복합물	제2010-28호	생리활성기능 2등급	① 총폴리페놀 ② 비타민 C ③ 클로로겐산 ④ 카페산	1.350 mg/일
6	합성 PLAG	제2013-35호	생리활성기능 3등급	1-palmitoyl--linoleoyl-3-acetyl-rac-glycerol	1g/일

표 13. '면역과민반응 완화' 기능성 원료 현황

▶면역과민반응을 개선하는 건강기능식품으로는 다래추출물, 구아바잎 추출물 등을 함유한 제품들이 시장에 출시되어 있음. 그러나 당사에서 연구하려는 멜리틴과 관련된 면역기능개선 건강기능식품은 아직 출시되지 않음.

▶표준화 현황 - 2015년 12월 고시된 '원료의약품 등록에 관한 규정'에 의하면 '건조밀 봉독'은 원료의약품 등록제도(Drug Master File, DMF)에 의해 등록대상 원료의약품*으로 지정함. 제조시설, 공정, 품질관리, 포장, 보관 등에 관한 상세한 세부자료 및 CTD(Common Technical Document, 국제 기술문서)를 식약처에 제출하여야 완제 의약품 제조에 사용할 수 있음

*등록대상 원료의약품(DMF, Drug Master File): '의약품 등의 안전에 관한 규칙' 제15조에 따라 식약처장이 등록대상으로 지정 고시한 원료의약품으로 원료의약품 제조·품질관리의 적정성을 검토함으로써 일정 수준 이하의 원료의약품 유입을 차단하기 위함

▶표준화 현황 - 2015년 12월 고시된 '원료의약품 등록에 관한 규정'에 의하면 '건조밀 봉독'은 원료의약품 등록제도(Drug Master File, DMF)에 의해 등록대상 원료의약품*으로 지정함. 제조시설, 공정, 품질관리, 포장, 보관 등에 관한 상세한 세부자료 및 CTD(Common Technical Document, 국제 기술문서)를 식약처에 제출하여야 완제 의약품 제조에 사용할 수 있음

▶당사는 기술개발과 연구를 통해 봉독 원료 3종의 미국 FDA DMF에 등록 완료함으로써, 의약품 제조원료뿐만 아니라 화장품 원료, 동물의약품 원료 등에 사용될수 있도록 기반을 마련함 (그림 42).



그림 42. 봉독 원료 3종의 미국 FDA DMF 등록 현황

- ▶본 연구개발성과를 통해 봉독 원료를 사용한 면역기능개선용 건강기능식품 시장에서 우월한 지위를 차지할 수 있는 성과를 기여함
 - 봉독유래 분을 이용한 건강기능식품 개발의 과학적 근거 확보에 기여함
 - 멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품의 사업화에 기여함
 - 국내특허 출원을 통한 다양한 분야의 제품화 기반 마련에 기여함
 - 제품기술에 대한 해외 홍보 및 수출시장 확보에 기여함
 - 국제저명 학술지 투고 및 발표를 통해 봉독유래 생리활성 성분을 이용한 면역기능 개선 식의약 소재개발의 기반구축에 기여함

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 본 연구개발성과를 통해 얻은 면역증진효능의 유효성 및 안전성 자료들을 활용해, 봉독의 기능성원료 등록을 위한 임상시험 계획임
- GMP 생산시설을 갖춘 건강기능식품 업체에 시제품 제조기술 이전 계획임
- 봉독 원료의 생산원가 및 수율 증대를 위해 봉독에서 분리공정 개선 개발 계획임
- 캡슐 제제 이외에 다양한 제형 시제품 개발 계획임
- 국내외 식품원료 및 식품 전시회 참석 계획임
- 해외 지사 및 당사 영문 홈페이지에 홍보할 계획임
- 연구성과를 활용해 국내외 저명 학술지 게재 및 학술발표 - 봉독유래 건강기능식품 인지도 제고 예정임

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내 매년 목표치
국외논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
국내논문	SCIE	
	비SCIE	1건
	계	
특허출원	국내	
	국외	
	계	
특허등록	국내	2건
	국외	
	계	
인력양성	학사	1명
	석사	1명
	박사	
사업화	상품출시	1건(기능성원료 등록을 위한 임상시험 준비)
	기술이전	1건(기능성 식품 생산업체 기술이전)
	공정개발	1건(봉독에서 분리공정 개선 개발)
제품개발	시제품개발	1건(캡슐 이외에 다양한 제형 시제품 개발)
비임상시험 실시		
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상
		2상
		3상
	의료기기	
진료지침개발		
신의료기술개발		
성과홍보		2건(전시회 및 자사 홈페이지 등록)
포상 및 수상실적		
정성적 성과 주요 내용		

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서 2) 연구성과 활용계획서 3)*논문 발표 : 1건(SCI), 학술발표: 4건, 특허 출원 : 2건 *기술실시: 1건, 제품화: 1건(시제품) *인력양성: 4명, 고용창출: 1명
2.	1) 2)

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호			
사업구분	유용농생명자원 산업화 기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	유용농생명자원 산업화 기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	봉독 유래 멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	청진바이오텍			연구책임자	김철구
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020.04.29- 2020.12.31	226,000	75,367	301,367
	2차년도	2021.01.01- 2021.12.31	302,000	101,300	403,300
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계	2020.04.29- 2021.12.31	528,000	176,667	704,667
참여기업	공동연구개발기관 : 대구가톨릭대학교 산학협력단				
상대국		상대국연구개발기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022년도 02월 10일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)청진바이오텍	대표이사	김철구

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

봉독유래 생리활성 성분을 이용한 면역기능개선 식의약 소재개발의 기반구축함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

-국제저명 학술지 투고 및 발표를 통해 봉독 유래 생리활성 성분을 이용한 건강기능식품 개발의 과학적 근거 확보하였으며, 관련 분야의 전문 연구인력을 양성함

-봉독유래 원료를 사용한 건강기능식품 시장에서 우월한 지위를 차지할 수 있는 성과를 기여함

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

-독성평가 및 작용기작에 대한 유효성 검증 실험결과를 통해 건강기능식품으로 정책수립을 위한 기반 마련 및 SCI급 국내외 저명 학술지 게재 및 학술발표로 봉독유래 생리활성 성분이 포함된 건강기능식품 인지도 제고함

-기술개발의 특허 출원 및 기술실시를 통해 사업화 기반 마련함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

-국제저명 학술지 투고 및 발표를 통해 봉독 유래 생리활성 성분을 이용한 건강기능식품 개발의 과학적 근거를 확보함

-관련 연구인력 양성 및 고용창출에 기여함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

특허 출원, 국제저명 학술지 투고 및 발표를 통해 봉독 유래 생리활성 성분을 이용한 건강기능식품 개발의 과학적 근거를 확보함

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
논문 (SCI)	-	100	우수
학술발표	10	100	우수
인력양성	10	100	우수
제품화(사업화) 및 기술실시	50	100	우수
고용창출	20	100	우수
특허 등록(출원)	10	100	우수
합계	100점	100	우수

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

-봉독유래 생리활성 성분을 이용한 면역기능개선 식의약 소재개발의 기반구축함으로써 국제 저명 학술지 투고 및 발표를 통해 봉독 유래 생리활성 성분을 이용한 건강기능식품 개발의 과학적 근거 확보하였으며 관련 분야의 전문 연구인력을 양성함

-우수한 대학연구기관 및 GLP시험기관에서 유효성 및 안전성 자료를 확보함으로 봉독유래 원료를 사용한 건강기능식품 시장에서 우월한 지위를 차지할 수 있는 성과를 마련함

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○본 연구개발성과를 통해 얻은 면역증진효능의 유효성 및 안전성 자료들을 활용해, 봉독의 기능성원료 등록을 위한 임상시험 계획임

○GMP 생산시설을 갖춘 건강기능식품 업체에 시제품 제조기술 이전 계획임

○캡슐 제제 이외에 다양한 제형 시제품 개발 계획임

-식품원료의 한시적 인정제도 신청을 위한 식품원료 인정기준, 자료들을 준비할 계획임

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

--

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	봉독 유래 멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품 개발			
주관연구개발기관	(주)청진바이오텍		주관연구책임자	김 철 구
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	528,000	176,667	-	704,667
연구개발기간	2020.04.29. - 2021.12.31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(건강기능식품 원료 등록) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 시제품 개발	-원료의 규격화와 원료분리 -시제품 제작에 필요한 유동층 코팅기 제작 -혼합기술 개발 및 시제품 개발
② 멜리틴 및 시제품의 유효성 및 안전성 검증	-유효성 및 안전성 검증(in vivo, 대학연구소 및 GLP 기관)
③ 시제품의 표준분석법 확립 및 제품표준서 작성	-제품표준서 작성 및 기능원원료 인증기반 마련

* 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 (타연구 활용비) (0/100)		
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문	SCI	비 SCI			논문 평 가 관 - I F	학 술 발 표		정 책 활 용	홍 보 전 시
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건				
가중치	-	10			-	-	50			20					10	10						

최종 목표	-	2			-	-	1			1			1			3	4		
당해 년도	목표	-	2			-	-	1			1			1			3	4	
	실적	2	-			1	354 만원	1			1			1			4	4	
달성률 (%)	100	-						100			100			100			100	100	

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	봉독 유래성분 및 유산균을 포함하는 장용성 과립 조성물
②	
③	

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		√			√	√	√			기술실시-제품화
②의 기술										
③의 기술										
·										
·										

* 각 해당란에 √ 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	*면역기능개선 장용성 과립제조 및 봉독 건강기능식품 시제품 출시 *봉독 소비의 새로운 시장 개척(국내, 해외) *건강기능식품 신 시장 창출
②의 기술	
③의 기술	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(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 (타연구 활용등) (%)	
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표		2					1						1					2		
연구기간내 달성실적																				
연구종료후 성과창출 계획																				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

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 선행조건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)



Apamin inhibits renal fibrosis via suppressing TGF- β 1 and STAT3 signaling in vivo and in vitro

Mi-Gyeong Gwon¹ · Hyun-Jin An¹ · Hyemin Gu¹ · Young-Ah Kim¹ · Sang Mi Han² · Kwan-Kyu Park¹

Received: 7 December 2020 / Revised: 30 April 2021 / Accepted: 4 May 2021 / Published online: 24 May 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Renal fibrosis is a progressive and chronic process that influences kidneys with chronic kidney disease (CKD), irrespective of cause, leading to irreversible failure of renal function and end-stage kidney disease. Among the signaling related to renal fibrosis, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) signaling is a major pathway that induces the activation of myofibroblasts and the production of extracellular matrix (ECM) molecules. Apamin, a component of bee venom (BV), has been studied in relation to various diseases. However, the effect of apamin on renal interstitial fibrosis has not been investigated. The aim of this study was to estimate the beneficial effect of apamin in unilateral ureteral obstruction (UUO)-induced renal fibrosis and TGF- β 1-induced renal fibroblast activation. This study revealed that obstructive kidney injury induced an inflammatory response, tubular atrophy, and ECM accumulation. However, apamin treatment suppressed the increased expression of fibrotic-related genes, including α -SMA, vimentin, and fibronectin. Administration of apamin also attenuated the renal tubular cells injury and tubular atrophy. In addition, apamin attenuated fibroblast activation, ECM synthesis, and inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6 by suppressing the TGF- β 1-canonical and non-canonical signaling pathways. This study showed that apamin inhibits UUO-induced renal fibrosis in vivo and TGF- β 1-induced renal fibroblasts activation in vitro. Apamin inhibited the inflammatory response, tubular atrophy, ECM accumulation, fibroblast activation, and renal interstitial fibrosis through suppression of TGF- β 1/Smad2/3 and STAT3 signaling pathways. These results suggest that apamin might be a potential therapeutic agent for renal fibrosis.

Key messages

- UUO injury can induce renal dysfunction; however, apamin administration prevents renal failure in UUO mice.
- Apamin inhibited renal inflammatory response and ECM deposition in UUO-injured mice.
- Apamin suppressed the activation of myofibroblasts in vivo and in vitro.
- Apamin has the anti-fibrotic effect on renal fibrosis via regulation of TGF- β 1 canonical and non-canonical signaling.

Keywords Renal fibrosis · Apamin · Myofibroblast · TGF- β 1 · STAT3

Introduction

Renal fibrosis is the ultimate common manifestation of progressive chronic kidney disease (CKD) leading to the irreversible destruction of kidney parenchyma and end-stage of renal failure [1, 2]. Renal fibrosis is characterized by the demolition of renal tubules, tubular atrophy, infiltration of immune cells, accumulation of myofibroblasts, and overproduction of extracellular matrix (ECM) resulting in renal tubular cell apoptosis and necrosis [3–5].

Among these characteristics, inflammatory response plays an important role in the progression of numerous acute and

✉ Kwan-Kyu Park
kklpark@cu.ac.kr

¹ Department of Pathology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, 33, Duryugongwon-ro 17-gil, Nam-gu, 42472 Daegu, Republic of Korea

² National Academy of Agricultural Science, Jeonju, Jeonbuk 54875, Republic of Korea



Inhibitory effects of bee venom in *Propionibacterium acnes*- and IGF-1-induced lipogenesis

Hyemin Gu¹, Hyun-Jin An¹, Mi-Gyeong Gwon¹, Seongjae Bae¹, Sang Mi Han², and Kwan-Kyu Park^{1*}

¹Department of Pathology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, 42472, Republic of Korea
²Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Wanju, 55365, Republic of Korea

Abstract

BV has been used as a treatment for a wide variety of ailments such as inflammatory diseases in eastern countries. Despite its well documented anti-inflammatory property, there are no reports regarding the influence of BV against *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which promote follicular inflammation (inflammatory acne) and lipogenesis. This study evaluated the anti-inflammatory and anti-lipogenesis property of BV against *P. acnes* in vivo and IGF-1 in vitro. To induce inflammation and lipid synthesis in vivo using *P. acnes*, 1×10^8 CFU of living *P. acnes* were intradermally injected into the ear of mice. BV (1, 10, 100 μ g) in vaseline was applied epicutaneously on the ear injected with *P. acnes*-induced ear swelling. Epicutaneous administration of DV with *P. acnes* decreased the number of detected bacteria in the ear, thereby relieving *P. acnes*-induced ear swelling and granulomatous inflammation, especially 100 μ g of BV. In this report, we demonstrated the therapeutic effects of BV on *P. acnes*-induced inflammation and lipid synthesis in vivo using the mouse ear model. Similarly, expression of IGF-1 induced lipogenic factors was also significantly reduced by DV. These data highlight the potential of using BV as an alternative treatment to the antibiotic therapy of acne vulgaris.

Materials and Methods



ICR mice were randomly subdivided into 6 groups (5 mice/group) and were maintained under various conditions. NC: normal control, PA: Living *P. acnes* (1.0×10^8 CFU/20 μ l in PBS) were intradermally injected into the left ears. PA/BV1, PA/BV10, and PA/BV100: Living *P. acnes* were intradermally injected into both left and right ears. After injection, bee venom (1, 10, and 100 μ g in mixed with 0.05 g vaseline) was applied in the surface of the right ear skin of each group. At the end of each treatment period (24 h later), the animals were sacrificed by cervical dislocation and the ears were excised.

Results

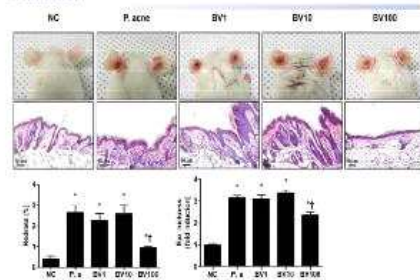


Fig 1. Effects of bee venom on *P. acnes*-induced inflammation. Morphologically, *P. acnes* injection induces acne-like redness in ear. Increase of ear thickness surrounding the injection site of *P. acnes* were observed by H&E staining. Representative images from each study group. NC: Normal control, P. acne: Living *P. acnes* injected group, BV 1, 10, and 100: Living *P. acnes* injected with 1, 10, and 100 μ g of bee venom mixed vaseline was applied group. Magnification x 100, Scale bar, 50 μ m. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent determinations. * $p < 0.05$ compared to the NC.



Fig 2. BV reduces *P. acnes*-induced lipogenic transcription factors. BV inhibited the increased expression of transcription factor, such as SREBP-1 and PPAR- γ induced by *P. acnes*. NC: Normal control, PA: Living *P. acnes* injected group, PA/VAS: Living *P. acnes* injected with vaseline was applied group, PA/BV1: Living *P. acnes* injected with 1 μ g of bee venom mixed vaseline was applied group.

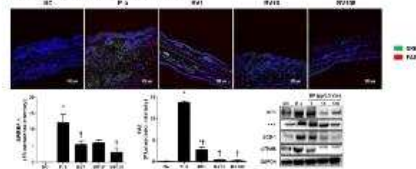


Fig 3. Effect of BV on *P. acnes*-induced lipogenesis-specific gene. Representative immunofluorescence images show that bee venom treatment suppresses SREBP-1 (labeled with FITC, green) and FAS (labeled with Texas red, red) in *P. acnes*-induced lipogenesis. NC: Normal control, PA: Living *P. acnes* injected group, PA/VAS: Living *P. acnes* injected with vaseline was applied group, PA/BV1: Living *P. acnes* injected with 1 μ g of bee venom mixed vaseline was applied group.

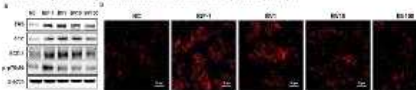


Fig 4. Effect of BV on IGF-1-induced lipogenesis-specific gene. Representative immunofluorescence images show that bee venom treatment suppresses lipogenesis. NC: Normal control, PA: Living *P. acnes* injected group, PA/VAS: Living *P. acnes* injected with vaseline was applied group, PA/BV1: Living *P. acnes* injected with 1 μ g of bee venom mixed vaseline was applied group.

Conclusion

Bee venom is a natural toxin produced by honeybees, and has been widely used as a traditional medicine for various diseases including arthritis, rheumatism, pain, cancerous tumors, and skin diseases. However, the anti-lipogenesis effects of BV on *acnes* disease animal model have not been reported. In this study, we investigated the effects of bee venom in *P. acnes*-induced lipogenesis in vivo and IGF-1-induced lipogenesis in vitro. *Acne* is one of the most common skin disorders affecting millions of people. *P. acnes* and IGF-1 contribute to the lipogenesis of *acne* by inducing expression of transcription factor to produce lipid synthesis. Our results indicate that bee venom exerts the inhibitory effect on the *P. acnes*- and IGF-1-induced lipogenesis. In conclusion, we demonstrated that the therapeutic effects on *P. acnes*- and IGF-1 induced lipogenesis in vivo and in vitro. The obtained data highlight the potential of using bee venom as an alternative treatment option to the antibiotic therapy *acne* vulgaris.

References

- [1] Lee WK, Kim KD, An JD et al. (2014) The protective effects of Melittin on *Propionibacterium acnes* induced inflammatory responses in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 134:1922-30
- [2] Nagy I, Pivaresi A, Kis K et al. (2006) *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect* 8:2195-205



Inhibitory effects of melittin in *Cutibacterium acnes*- and IGF-1-induced lipogenesis

Hyemin Gu¹, Hyun-Jin An¹, Mi-Gyeong Gwon¹, Seongjae Bae¹, Sang Mi Han², and Kwan-Kyu Park^{1*}

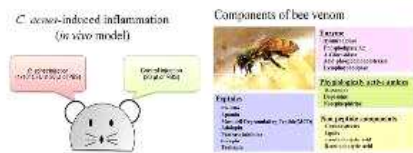
¹Department of Pathology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, 42472, Republic of Korea

²Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Wanju, 55365, Republic of Korea

Abstract

Melittin, a component of bee venom, has been studied in relation to various diseases. Despite its well-documented anti-inflammatory property, there are no reports regarding the influence of melittin against *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which promote follicular inflammation (inflammatory acne) and lipogenesis. This study evaluated the anti-inflammatory and anti-lipogenesis property of melittin against *C. acnes* and IGF-1 in vivo. To induce inflammation and lipid synthesis in vivo using *C. acnes*, 1×10^7 CFU of living *C. acnes* were intradermally injected into the ear of mice. melittin (1, 10, 100 µg) in vaseline was applied epicutaneously on the ear injected with *C. acnes*-induced ear swelling. Epicutaneous administration of melittin with *C. acnes* decreased the number of detected bacteria in the ear, thereby relieving *C. acnes*-induced ear swelling and granulomatous inflammation, especially 100 µg of melittin. In this report, we demonstrated the therapeutic effects of melittin on *C. acnes*-induced inflammation and lipid synthesis in vivo using the mouse ear model. Similarly, expression of IGF-1-induced lipogenic factors was also significantly reduced by melittin. These data highlight the potential of using melittin as an alternative treatment to the antibiotic therapy of acne vulgaris.

Materials and Methods



ICR mice were randomly subdivided into 6 groups (5 mice/group) and were maintained under various conditions. NC: normal control. CA: Living *C. acnes* (1.0×10^7 CFU/20 µl in PBS) were intradermally injected into the left ears. CA/Mel1, CA/Mel10, and CA/Mel100: Living *C. acnes* were intradermally injected into both left and right ears. After injection, melittin (1, 10, and 100 µg in mixed with 0.05 g vaseline) was applied to the surface of the right ear skin of each group. At the end of each treatment period (24 h later), the animals were sacrificed by cervical dislocation and the ears were excised.

Results

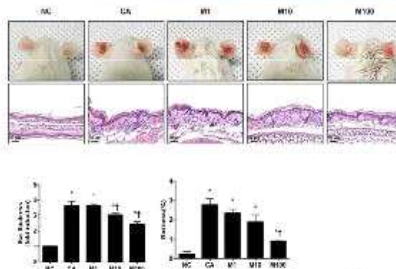


Fig. 1. Effects of Melittin on *C. acnes*-induced inflammation. Macroscopically, *C. acnes* injection induces acne-like redness in ear. Increase of ear thickness surrounding the injection site of *C. acnes* were observed by H&E staining. Representative images from each study group NC: Normal control, CA: Living *C. acnes* injected with vaseline was applied group, Mel1, 10, and 100: Living *C. acnes* injected with 1, 10, and 100 µg of melittin mixed vaseline was applied group. Scale bar=50 µm. Results are expressed as mean ± SEM of three independent determinations.

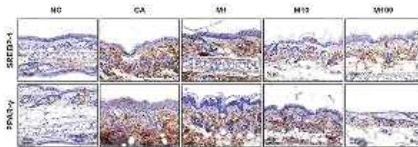


Fig. 2. Melittin reduces *C. acnes*-induced lipogenic transcription factors. melittin inhibited the increased expression of transcription factor, such as SREBP-1 and PPAR-γ induced by *C. acnes*. NC: Normal control, CA: Living *C. acnes* injected with vaseline was applied group, Mel1, 10, and 100: Living *C. acnes* injected with 1, 10, and 100 µg of melittin mixed vaseline was applied group.

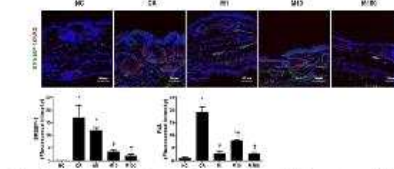


Fig. 3. Effect of melittin on *C. acnes*-induced lipogenesis-specific gene. Representative immunofluorescence images show that melittin treatment suppresses SREBP-1 (labeled with FITC, green) and PPAR-γ (labeled with Texas red, red) in *C. acnes*-induced lipogenesis. NC: Normal control, CA: Living *C. acnes* injected with vaseline was applied group, Mel1, 10, and 100: Living *C. acnes* injected with 1, 10, and 100 µg of melittin mixed vaseline was applied group.

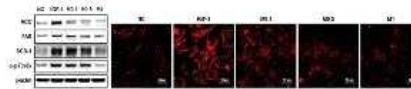


Fig. 4. Effect of melittin on IGF-1-induced lipogenesis-specific gene. Representative immunofluorescence images show that melittin treatment suppresses lipogenesis. NC: Normal control, IGF-1: IGF-1 was treated group, Mel0.1, 0.5, and 1: IGF-1 treated with 0.1, 0.5, and 1 µg/ml of melittin was applied group.

Conclusion

Melittin is a natural toxin produced by honeybees, and has been widely used as a traditional medicine for various diseases including arthritis, rheumatism, pain, cancerous tumors, and skin diseases. However, the anti-lipogenesis effects of mel on *C. acnes* disease animal model have not been reported. In this study, we investigated the effects of melittin on *C. acnes*-induced lipogenesis in vivo and IGF-1-induced lipogenesis in vitro. *C. acnes* and IGF-1 contribute to the lipogenesis of acne by inducing expression of transcription factor to produce lipid synthesis. Our results indicate that melittin exerts the inhibitory effect on the *C. acnes*- and IGF-1 induced lipogenesis. In conclusion, we demonstrated that the therapeutic effects on *C. acnes*- and IGF-1 induced lipogenesis in vivo and in vitro. The obtained data highlight the potential of using melittin as an alternative treatment option to the antibiotic therapy acne vulgaris.

References

- [1] Lee WR, Kim KH, An HI et al. (2014) The protective effects of Melittin on Propionibacterium acnes-induced inflammatory responses in vitro and in vivo. J Invest Dermatol 134:1922-30
- [2] Nagy I, Pivarcsi A, Kis K et al. (2006) Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. Microbes Infect 8:2195-205

[NEAUA Main Site](#) | [NEAUA Virtual](#) | [Past & Future Meetings](#)



Preliminary Program

[Program & Abstracts](#) | [Concurrent Basic Comprehension Course](#)

THURSDAY, OCTOBER 14, 2021

- 7:00 am - 5:00 pm **REGISTRATION DESK**
Diamond Ballroom Foyer
- 7:00 am - 5:00 pm **SPEAKER READY ROOM**
Carleton Boardroom
- 7:30 am - 8:30 am **CONTINENTAL BREAKFAST**
Diamond Ballroom Foyer
- 8:00 am - 8:15 am **INTRODUCTION & WELCOME**
Emerald Ballroom III
Ernest M. Bove, MD; *President*
New England Section of the American Urological Association
- Edward Messing, MD
AUA President-Elect
- 8:15 am - 9:35 am **SCIENTIFIC SESSION I: ONCOLOGY I**
Emerald Ballroom III (6 minute presentation, 2 minute discussion)
Moderators: David Canes, MD; Benjamin T. Ristau, MD
- 8:15 am - 8:23 am  ***1. Radical Cystectomy versus Trimodality Therapy for Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder**
Kenneth A. Softness, MD¹, Sumedh Kaul, MS¹, Aaron Fleishman, MPH¹, Jason A. Efstathiou, MD, PhD², Joaquim Bellmunt, MD, PhD¹, Simon P. Kim, MD³, Ruslan Korets, MD¹, Peter F. Chang, MD, MPH¹, Andrew A. Wagner, MD¹, Aria F. Olumi, MD¹, Boris Gershman, MD¹.
¹Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA, USA, ²Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA, ³University of Colorado, Aurora, CO, USA.
- 8:23 am - 8:31 am **2. Pre-Nephroureterectomy Diagnosis of Low-Grade Urothelial Carcinoma Does Not Predict Low Grade Disease On Final Pathology**
Mohammad H. Hout, MD, Broivoj Golijanin, BS, Chris Tocchi, MS, RN, Frances Kazal, BS, Timothy O'Rourke, Jr, MD, David Sobel, MD, Gyan Pareek, MD, Dragan Golijanin, MD
Brown University, Providence, RI, USA.
- 8:31 am - 8:39 am **3. Standard Versus Extended Lymph Node Dissection at the Time of Radical Cystectomy for Bladder Cancer: Emulation of a Clinical Trial**
Alejandro Abello, MD MPH¹, Sumedh Kaul, MS¹, Aaron Fleishman, MPH¹, Joaquim Bellmunt, MD MPH¹, Irving Kaplan, MD¹, Simon Kim, MD², Peter Chang, MD MPH¹, Andrew Wagner, MD¹, Ruslan Korets,

- 3:15 pm - 3:20 pm **P13. A standardized serum bank for obtaining microRNA signatures for assessing prostate cancer risk.**
Scott Perrapato, DO FACOS, Nicholas Farina, PhD, Adrian Berg, MD, Marcia Wills, MD, Jane Lian, PhD.
University of Vermont, Burlington, VT, USA.
- 3:20 pm - 3:25 pm **P14. Inhibitory effects of STAT3 transcription factor by synthetic decoy ODNs on autophagy in renal fibrosis**
Kwan-Kyu Park, Professor, Young-Ah Kim, Researcher.
College of Medicine, Catholic university of Daegu, Daegu, Korea, Republic of.
- 3:25 pm - 3:30 pm ***P15. Creation and Validation of the Harmonized Arabic Version of the Expanded Practice Index Composite for Clinical Practice (EPIC-CP)**
Mohannad Awad, MD Luke Hallgarth, MD Ghassan Barayan, MD, Mohammed Shahait, MD, Ramiz Abu-Hijli, MD, Ala'a Farkouh, MD, Raed Azhar, MD, Musab Alghmadi, MD, Ahmad Bugis, MD, Said Yaiesh, MD, Saad Aldousari, MD, Alaeddin Barham, MD, Mohamed Saed, MD, Ayman Moussa, MD, Waleed Hassen, MD, Shelly Naud, MS, PhD, Mark Plante, MD, Richard Grunert, MD.
University of Vermont Medical Center, BURLINGTON, VT, USA, King Hussein Cancer Center, Amman, Jordan, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia, Mubarak Al-Kabeer Hospital, Kuwait, Kuwait Kuwait University, Kuwait, Kuwait, Surgical Subspecialties Institute, Cleveland Clinic, Abu Dhabi, United Arab Emirates, University of Vermont, BURLINGTON, VT, USA.
- 3:30 pm - 7:00 pm **EXHIBIT HALL**
Lake Champlain Exhibition Hall
- 3:30 pm - 4:00 pm **COFFEE BREAK**
Lake Champlain Exhibition Hall
- 4:00 pm - 4:15 pm **Research Scholar Award**
Emerald Ballroom III
Chromatin Compaction by the Polycomb Group Protein CBX2 in the Male Germ Line
Jongmin Kim, PhD
- 4:15 pm - 4:30 pm **JU Update**
Emerald Ballroom III
Martin S. Gross, MD
- 4:30 pm - 5:00 pm **The Critical Role of the Urologist in Trimodal Therapy for Muscle Invasive Bladder Cancer**
Emerald Ballroom III
Adam S. Feldman, MD
- 5:00 pm - 5:30 pm **Interesting Cases I: Urothelial Carcinoma**
Emerald Ballroom III
Moderator: Scott Perrapato, MD
- C1. Management dilemmas in a case of a single kidney patient with significant ureteric tumor**
Babak Kazemzadeh Azad, MD
St. Elizabeth's Hospital, Boston, MA
- C2. WITHDRAWN**
- C3. Urothelial Carcinoma of the Bladder and Upper Tract in a Patient with Muir-Torre Syndrome**
Jason R. Gee, MD
Emerson Hospital, Concord, MA
- 5:30 pm - 7:00 pm **WELCOME RECEPTION IN EXHIBIT HALL**
Lake Champlain Exhibition Hall

FRIDAY, OCTOBER 15, 2021

- 7:30 am - 5:00 pm **REGISTRATION DESK**
Ballroom Foyer
- 7:30 am - 5:00 pm **SPEAKER READY ROOM**
Carleton Boardroom



고순도멜리틴 펩타이드와 정제붕독이 함유된 기능성 화장품 개발



박정규¹, 강미라¹, 이슬아¹, 김철규¹, 한상미²

1. (주) 청진바이오테크 중앙연구소
2. 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과

연구목적

1. 붕독으로부터 붕독정제기술과 고순도 멜리틴의 분리 및 정제 기술 확보
2. 고순도로 분리된 멜리틴 펩타이드에 대한 안전성 및 안정성 평가
3. 위 결과를 이용한 기능성 화장품의 제작 및 제품화 마케팅

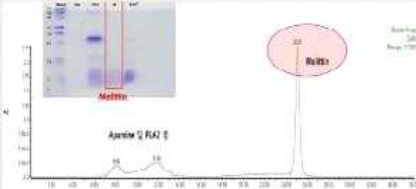
원료 개발 과정: 정제붕독



<Fig.1. 붕독 원료에서부터 정제붕독으로 되어지기까지의 과정>

당사의 붕독채집장치를 이용하여 붕독 원료(Crude Bee Venom)를 수집하고, 이는 불순물을 다량 포함하고 있기 때문에 다시 정제수로 용해시킨 후, 여과를 거쳐 중열 건조를 진행함. 이후 당사의 품질관리 절차를 거쳐 최종으로 정제붕독(PBV, Purified Bee Venom)이 만들어짐.

원료 개발 과정: 멜리틴의 분리 및 정제



<Fig.2. Prep-HPLC System을 이용하여 고순도의 멜리틴 펩타이드만을 획득>

Prep-HPLC를 통해 붕독에서 고순도 멜리틴 펩타이드를 분리한 뒤 함유하고 있는 멜리틴 함(25.0%)을 측정하고 이어진 SDS-PAGE 시험에서 >1IU와 비교하여 추출된 양분이 멜리틴임을 재확인.

멜리틴의 안정성 시험

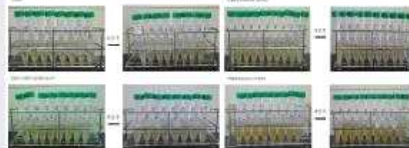


정제붕독(PBV)에 비하여 상온에서 보관했을 경우 뛰어난 안정성을 나타냄

<Fig.3. 수송역상에서의 열화된 안정성 시험>

※사사 연구수행에 도움을 주신 (주)엔 고스맥슈, 원광대학교 및 관계자분들께 감사의 말씀드립니다.

정제붕독의 항균 효과 검증 - MIC / MBC법



<Fig.4. 정제붕독의 항균효과 검증 시험>

Minimum inhibitory concentration (MIC)	Minimum bactericidal concentration (MBC)		
MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)		
<i>C. coli</i>	264	99.3	129
<i>S. aureus</i>	316	99.5	NA
<i>S. typhimurium</i>	264	99.9	64
<i>S. melonia</i>	264	99.9	129

<Table 1. 정제붕독의 항균효과 검증 결과>

90% 이상의 박테리아 억제율을 보임으로써 우수한 항균력을 나타내는 것을 확인됨

제품의 안전성 평가

FDA-DMF 통해 시, 정제붕독의 cytotoxicity를 분석함. HRP1피부 자극역스레 테스트 완료.

당사는 붕독 자체 연구개발과 14년간 국가연구개발사업들을 수행한 결과, 기능성 정제붕독 화장품들을 시제품 제작하여 공인인증기관에서의 임상평가를 안전하게 통과

정제붕독의 뛰어난 효과와 높은 안전성을 가져 미려한 천연 향에도 동등한 안전한 성분임

청진바이오테크의 R&D 과제 시제품 및 기능성 화장품

- > 원단 품질 평가가 어려운 붕독은 10~20%를 차지하는 정제붕독을 핵심소재로써 연구 수확량을 극대화하여 안정적이고 효율적인 제품으로, 국산연구 재원 기능성 화장품
- > 임상적인 효능검증 4회 (2021년)에서 정제붕독의 수확과 정제과정에서 수확된 붕독이 높은 활성을 지니고 있다. 또한 우수 수확량에 따라, 국산소재로 30% 사용될 수 있는 30%의 작은 용기 (45ml) 제품 제작
- > 예민한 피부는 시용 직후 붕독 보습과 유효성분을 포함한 저 사용량 사용
- > FDA 승인 제품 출몰이 많아 사생활이 걱정
- > 저가대, 우수한 향기성, 우수한 피부 유효성분으로 미소그 시트 필터 효능으로 민감 피부
- > 정제붕독 함유로 강력한 항균, 항염증 효과
- > 피부에 잘 흡수하여 피부 탄력성이 높음
- > 화장품에서 유용한 유효성분(멜리틴) 성분으로 수확적인 저 사용량
- > 미국 FDA DMF 2722 인증 정제붕독 사용

*특허출원

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.02.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P20200484KR)
출원번호 10-2021-0026326 (접수번호 1-1-2021-0235156-76)
(DAS접근코드CE68)
출원인명칭 주식회사 청진바이오텍(1-2006-007239-9)
대리인성명 특허법인지담(9-2018-100261-1)
발명자성명 박정근 임지희 이슬아 김주연 강미란 김철구 박관규
발명의명칭 분독 유래 멜리틴 함유 조성물 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통통된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.12.30
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P20210544KR)
 출원번호 10-2021-0192244 (접수번호 1-1-2021-1527199-78)
 (DAS접근코드CCC5)
 출원인명칭 주식회사 정진바이오텍(1-2006-007239-9)
 대리인성명 특허법인지담(9-2018-100261-1)
 발명자성명 박정근 강미란 임지희 이슬아 김주연 김철구 박관규 구해민 배성재 권미경 안현진
 발명의명칭 봉독 유래성분 및 유산균을 포함하는 장용성 과립 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
 ※ 심사제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-지식재산제도


*기술실시

기술실시보고서						
(단위 : 원)						
연구개발과제 현황	사업명	유용농생명자원산업화기술개발사업		연구과제번호	120040-02	
	연구과제명	붕독 유래 멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품 개발				
	연구개발기관명	㈜청진바이오텍	연구책임자	김철구	참여기업명	㈜청진바이오텍
	연구협약일	2020.04.29	연구기간	2020.04.29. ~ 2021.12.31. (총 21개월)		
	연구개발비	정부지원연구개발비	기관부담연구개발비	기타 ()	계	
	528,000원	176,667원	-	704,667원		
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	장용성 건강기능 식품 개발				
	계약(활용)일	2021.02.26	실시(활용)기간	2021.02.26.~2026.02.26		
	지재권 종류	특허출원		실시권 유형	직접 실시	
	* 지재권이 특허(출원,등록)인 경우	명 칭	붕독 유래 멜리틴 함유 조성물 및 이의 용도			
		번호	10-2021-0026326		일 자	2021.02.26
	실시(활용)기관	기관명	청진바이오텍		기관유형	중소기업
		주 소	안산시 단원구 광덕대로 142, 405호(크리스탈 빌딩)		대 표 자	김철구
사업자번호		134-86-29037		전화번호	031-409-3707	
부새담당자		박정근		e-mail	kjp33mtar@biovenom.com	
기술료산정내역	정부출연금 528,000천원 중 (주)청진바이오텍의 정부출연금 253,333천원 중 * 10%(중소기업) * 20%(참여 중소기업 김면) * 70%(일시납부 감면) = 3,546,662원					
기 술 료	정액기술료		경상기술료		기타 조건	
	정수(납부)예정일	정수(납부)금액	학수기본료	정수(납부)예정일		정수(납부)금액
	2021-12-30	3,546,662 원	매출에 따른 기술료	정수(납부)시작일	결산월	
				정수(납부)종료일	정수율	
	계				매출액의 ()%	
기타특기사항						
<p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시) 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시) 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p style="text-align: center;">2021년 12 월 28 일 연구개발기관 (주)청진바이오텍 의 대표 김 철 구 [직 농림식품기술기획평가원장 귀하</p>						


*제품화(시제품)

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	분독 유래 멜리틴을 이용한 면역과민반응 개선 건강기능식품 개발			
주관연구기관	(주)청진바이오텍	참여기관	(주)청진바이오텍	
연구책임자	김 철 구	연구기간	2020년 04월 ~ 2021년 12월(총 2년)	
총 정부출연금	528,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	(o)	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
BVLS		면역기능개선 장용성 건강기능 식품(캡슐)	2020.10.16	100
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2021 년 12 월 30 일

연구책임자 : 김 철 구(서명  인)

*인력양성

*고용창출(신규채용)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 유용 농생명자원 산업화 기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 유용 농생명자원 산업화 기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.