

# 최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <div data-bbox="183 1413 392 1529" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;">주 의 (편집순서 8)</div> <p>(15 포인트 고딕체열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>	<p>과 제 번 호</p> <p>구 제 역</p> <p>대 응</p> <p>면 역 증 강</p> <p>바 이 오 폴 리 머 의</p> <p>임 상 실 험</p> <p>검 증</p> <p>농 림 수 산 식 품 부</p>	<p>(앞면)</p> <p>보안과제( ), 일반과제( O ) 과제번호 5cm</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;"><b>구제역 대응 면역증강 바이오폴리머의 임상실험 검증</b></p> <p style="text-align: center;">Clinical Approach of Immune-Stimulating Biopolymer against Foot and Mouse disease Virus</p> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;"><b>충남대학교</b></p> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;"><b>농림축산식품부</b></p>
---	---	--

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “구제역 대응 면역증강 바이오폴리머의 임상실험 검증에 관한 연구” 과제의  
보고서로 제출합니다.

2013 년 12 월 일

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 김 철 중

세부연구책임자 : 홍 승 표

연 구 원 : 이 종 수

연 구 원 : 박 종 현

연 구 원 : 초 두 리

연 구 원 : 멜 분

연 구 원 : 노 종 복

연 구 원 : 프라사나

연 구 원 : 프라부타

연 구 원 : 리 루 이

연 구 원 : 이 현 철

# 요 약 문

## I. 제 목

구제역 대응 면역증강 바이오폴리머의 임상실험 검증

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 가. 국내외 관련연구의 현황 및 문제점

#### 1) 구제역 (Foot and Mouth Disease; FMD)

- 구제역 (Foot and Mouth Disease)이란 소, 돼지, 양, 염소, 사슴 등 발굽이 둘로 갈라진 동물(우제류)에 감염되는 질병으로 전염성이 매우 강하며 입술, 혀, 잇몸, 코, 발굽 사이 등에 물집(수포)이 생기며, 체온이 급격히 상승되고 식욕이 저하되어 심하게 앓거나 죽게 되는 질병으로 국제수역사무국(OIE)에서 A급 질병 (전파력이 빠르고 국제교역상 경제피해가 매우 큰 질병)으로 분류하며 우리나라 제1종 가축전염병으로 지정되어 있음.
- 구제역 바이러스는 Picornaviridae Aphthovirus속의 작은 RNA 바이러스로서 이는 7개의 혈청형 즉 A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3형으로 분류되며 이 주요 혈청형은 다시 80 여가지의 아형으로 나뉘어짐.
- 구제역 바이러스는 냉장 및 냉동조건하에서는 오래 보존되고, pH 6.0이하 또는 9.0이상 조건에서, 그리고 2% 가성소다, 4% 탄산소다 및 0.2% 구연산 등의 소독제에 불활화됨.
- 구제역 바이러스는 감염동물의 수포(물집)액이나 침, 유즙, 정액, 호흡공기 및 분변등과의 접촉이나 감염 동물유래의 오염축산물 및 이를 함유한 식품등에 의한 전파(직접전파)되며, 감염지역내 사람(목부, 의사, 인공수정사등), 차량, 의복, 물, 사료, 기구 및 동물등에 의한 전파(간접접촉전파)되기도 하며, 공기를 통한 전파(공기전파)이며 공기는 육지에서는 50km, 바다를 통해서는 250km 이상까지 전파될 수 있음.
- 구제역에 의한 우제류의 증상으로는 소의 경우에 체온상승, 식욕부진, 침울, 우유생산량의 급격한 감소 등이 나타남. 발병후 24시간 이내에 침을 심하게 흘리고, 혀와 잇몸 등에 물집이 생긴 것을 관찰할 수 있으며, 입맛 다시는 소리를 내기도 함. 물집은 발굽의 사이와 제관부, 젖꼭지 등에서도 관찰된다. 물집은 곧 터져서 피부가 드러나고 짓무르고 헐게 됨.
- 구제역 바이러스에 감염된 6개월 미만의 송아지에서는 심근염에 의해 죽는 경우가 있으며,

일반적으로 이환율은 높고 폐사율은 낮은 편이나 어린 송아지의 경우 성우에 비하여 폐사율이 높으며 임신우에서는 유산을 초래되기도 함. 감염된 소들은 1주 이상 거의 먹지 못하며, 절뚝거리며 유방염, 산유량 격감 등의 경제적 피해가 발생.

- 돼지의 경우에도 역시 절뚝거리며, 발굽의 심한 병변과 고통으로 인해 제대로 서거나 걷지 못하고 절뚝거리거나 무릎으로 기어 다님. 발굽의 물질이 터져 피부가 벗겨진 자리에 세균에 의한 2차 감염이 일어나고 이로 인해 발톱이 탈락되기도 함.

## 2) 구제역 예방 방법

- 현재 구제역 발생에 대한 특별한 치료방법은 없으므로 유사증상이 발견되면 국가기관에 신속히 신고하여야 함.
- 구제역 예방을 위해서 전세계적으로 구제역 백신의 접종을 함. 구제역 백신의 제조는 구제역 바이러스를 특수 시설하에서 증식한 후 이를 순수하게 정제 고농축 하여 화학제품(Binary Etheleneimine)을 사용하여 불활화 시킴. 이렇게 순수정제 농축한 불활화 바이러스(항원)를 mineral oil로 섞어 미세한 입자로 만든 것이 구제역 불활화 백신임.
- 국내에서 구제역백신의 제조 기술이 없기 때문에 만들 수 없는 것이 아니라 백신을 만들면 오히려 구제역전파의 원인이 될 수 있기 때문에 백신을 만들지 않고 있으며, 세계적으로 영국, 프랑스, 네덜란드, 독일 등 극히 일부 국가에서만 제조하고 있음.
- 현재 우리나라가 관련을 맺고 있는 국제회사는 Merial사(다국적기업: 프랑스, 영국), Intervet(네덜란드)임. 우리의 항원은 현재 영국에 있는 Merial사에 보관해 놓고 있으며 국내에서 필요시 요청만 하면 신속히 백신으로 제조하여 단계적으로 도입토록 되어 있음. 현재 계약항원은 O형, A형, Asia 1형으로 항원형 및 보관물량은 국내외 발생동향 등을 종합적으로 검토하여 결정토록 하고 있음.
- 구제역이 언제 국내에서 발생한지도 모르는 상황이므로 매년 수십 만두분의 예방약(6PD50/두)을 비축해 놓고 있음. 이는 동시에 한 두 지역에서 발생할 때에 쓸 수 있는 최소한의 분량임.
- 구제역 백신의 접종 방법은 1차 백신접종 후 한달 후 보강접종, 그 후 6개월마다 계속적인 접종이 이루어져야 함.

## 3) 최근 구제역 발생 현황 및 문제점

- 최근 국내에서는 2000년, 2002년 그리고 2010년 구제역이 발생을 하였음.

- 2000년에는 3월 24일부터 4월 15일까지 경기도 파주, 충남 홍성등을 포함하는 3개도 6개 시군에서 발생하여 2216마리의 소가 살처분되어 약 3006억원의 경제적 손실을 입었음.
- 2002년도에는 5월 2일부터 6월 23일까지 경기도 안성을 포함하는 2개도 4개시에서 발생을 하여 돼지와 소를 포함한 16만 155마리가 살처분되어 1434억원의 경제적 손실을 입었음.
- 2010년 발생한 구제역은 2009년 11월29일 경북 안동에서 처음 양성판정이 나온 뒤 현재까지 11개 시.도의 75개 군에서 150건이 발생하여 소의 경우 15만871마리, 돼지는 331만7천864마리, 염소 7천535마리, 사슴 3천243마리 등 6천250개 농가에서 총 347만9천513마리의 가축이 살처분되어 매몰이 되었음.
- 구제역의 발생으로 인하여 가축의 손실뿐 아니라 전국에서 85개소의 가축시장이 폐쇄되고, 매몰처리 및 구제역 확산을 막기 위해서 막대한 인원과 장비도 투입되었음. 공무원 48만9천140명을 비롯해 군인 33만8천862명, 경찰 14만6천158명, 소방공무원 30만6천157명, 민간인 69만3천738명 등 총 197만4천55명이 투입이 되었고, 이 과정에 방역작업에 참여했던 공무원 8명이 목숨을 잃기도 했음. 구제역으로 인한 경제적인 손실액은 매몰보상비 1조8천억원을 비롯해 3조원 가까이 되었음.
- 구제역 발생 및 확산의 원인에는 발생초기의 대응미숙, 방역조직체제 허술등을 포함하여 여러 가지 다양한 문제가 있었음. 이러한 발생당시의 문제점들과 더불어 구제역 예방을 위한 백신접종의 대응문제가 있었음.
- 앞서서도 언급을 했듯이 현재 우리나라에서 사용하고 있는 백신의 경우 Merial사에 보관이 된 항원을 기초로 생산이 되거나 비슷한 혈청형의 바이러스를 항원으로 사용한 백신을 사용하고 있음.
- 구제역 바이러스는 변형이 매우 쉽게 일어나기 때문에 수많은 혈청 형(아형)이 생성이 될 수 있고, 혈청형이 다른 백신의 경우 그 효능이 낮아 혈청형이 맞는 예방약의 사용이 중요함. 그러나 혈청형이 맞는 백신의 제조 및 생산 보급등은 많은 시간이 소요가 되므로 발생당시에 맞춤형의 백신접종은 거의 불가능함.
- 따라서 구제역 예방을 위해서는 백신의 접종과 더불어 위생적인 사육시설 관리 및 가축의 면역을 증강시켜 주어 구제역 바이러스의 감염을 억제시켜줄 수 있는 면역증강용 바이러스 억제제의 보조적인 예방법이 필요함.
- 구제역 바이러스 억제제를 개발하여 농가에 보급한다면, 직접적으로는 구제역에 대한 예방 및 확산의 방지에 중요한 방법이 될 수 있음.

## 나. 기술도입의 타당성

- 앞서 설명을 하였듯 구제역의 발생은 가축의 손실뿐 아니라 경제적인 손실을 포함한 사회 전반에 걸친 재앙이며 이를 막기 위해 백신을 비롯한 다양한 예방적 방법들이 구제역의 발생과 확산방지를 위해서 적용이 되어야함.
- 백신접종이 가장 좋은 구제역의 예방 및 확산방지를 위한 방법임에도 불구하고, 구제역 바이러스의 수많은 혈청형(아형) 생성등에 따른 백신의 효율성 문제가 현재까지도 중요한 문제로 대두가 되고 있음.

- 이러한 백신의 문제를 보완해 줄 수 있는 구제역 예방용 바이러스 억제제의 개발 및 보급은 중요한 사항이며, 이를 위해 구제역 바이러스에 대한 초기 방어시스템인 생체내 선천적 면역시스템을 자극하여 개체 동물의 면역력을 높여주는 예방제제의 발굴 및 개발은 중요한 제제 개발 방법이 될 수 있음.
- 즉, 빠른 증식성 및 확산성이 있는 구제역바이러스에 대한 예방 효율의 한계를 총체적으로 예방 및 처치할 수 있는 신개념의 예방제제 개발은 전세계적으로 주요한 연구개발의 방향이 되고 있음.
- 본 “구제역 대응 면역증강 바이오폐리머의 임상실험 검증” 연구에서는 생체내 선천적 면역시스템을 자극하여 바이러스의 증식 및 감염을 막는 바이오폐리머인 폴리감마글루탐산을 이용하여 구제역 바이러스들에 효과적인 예방 및 면역증강제제를 개발하고자 함.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 가. 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 억제 효능 검증 (*In vitro*)

- 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위한 *In vitro* 마우스 면역세포 자극실험 연구
  - 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위해 면역세포인 mouse macrophage 세포에 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 (1) 인터페론 및 염증관련 유전자의 발현 유도여부 등을 확인, (2) 인터페론의 분비여부등을 확인하여 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능의 가능성 및 면역활성 여부를 연구
- 형광물질 (GFP)이 융합된 RNA 바이러스들을 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (*In vitro*)
  - 형광물질 (GFP)이 융합된 RNA 바이러스들(Influenza-gfp, Vesicular Stomatitis virus-gfp, Coxsackivirus)을 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효능 검증을 확인하기 위해 mouse macrophage 세포에 폴리감마글루탐산을 전처리한 후 바이러스 감염시 바이러스의 증식 억제 효능 검증 연구
- 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 마우스 면역세포의 구제역바이러스 억제효능 검증 연구
  - 폴리감마글루탐산의 구제역 바이러스 감염 억제 효능 검증을 확인하기 위해 mouse macrophage 세포에 폴리감마글루탐산을 전처리한 후 구제역바이러스 감염시 바이러스의 증식 억제 효능 검증 연구
- 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 마우스 면역세포의 상등액을 이용한 상피세포에서의 형광물질 (GFP)이 융합된 RNA 바이러스 억제효능 검증 연구
  - 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 mouse macrophage 세포의 상등액에 분비된 인터페론등의 면역활성 사이토카인에 의해 자극된 상피세포의 RNA 바이러스 억제 효능검증 연구
- 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위한 *In vitro* 돼지 면역세포 자극 연구
  - 돼지 면역세포에 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위해 돼지의 Alveolar macrophage cell과 Bone marrow macrophage cell을 분리 culture한 후 이들 세포에 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 인터페론의 분비여부, 염증성 cytokine들의 분비여부 등을 확인하여 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능의 가능성 및 면역활성 여부를 검증 연구
- 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지 면역세포의 구제역바이러스 억제 효능 검증 연구
  - 폴리감마글루탐산의 구제역 바이러스 감염 억제 효능 검증을 확인하기 위해 돼지의 면역세포인 Alveolar macrophage cell과 Bone marrow macrophage cell에 폴리감마글루탐산을 전처리한 후 구제역바이러스 감염시 바이러스의 증식 억제 효능 검증 연구
- 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지 면역세포의 상등액을 이용한 상피세포에서의 구제역바이러스 억제 효능 검증 연구

- 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지의 면역세포 Alveolar macrophage cell과 Bone marrow macrophage cell의 상등액에 분비된 인터페론등의 면역활성 싸이토카인에 의해 자극된 구제역 바이러스 민감 상피세포에서의 구제역바이러스 억제 효능검증 연구

## 나. 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 억제 효능 검증 (*In vivo*) 연구

- ◎ 고분자 폴리감마글루탐산의 *In vivo* 구제역바이러스 감염 억제 효능을 확인하기 위해 생후 1개월령의 SPF mini-pig (이유자돈)에 폴리감마글루탐산 (PGA)을 근육투여후 transmission 방법에 의한 challenge 시험 수행
- ◎ 고분자 폴리감마글루탐산의 *In vivo* 구제역바이러스 감염 억제 효능을 확인하기 위해 생후 1개월령의 SPF mini-pig (이유자돈)에 폴리감마글루탐산 (PGA)을 근육투여후 direct infection방법에 의한 challenge 시험 수행

## 다. 구제역바이러스 예방용 면역증강제제 제품화 연구

- 폴리감마글루탐산 동물용의약품 주사제형 확립 연구
- 폴리감마글루탐산 제품 생산공정 최적화 및 완제품 제조
  - 고순도 폴리감마글루탐산의 동물용의약품 주사액제 생산 공정 시스템구축 및 완제품 제조
- 일반 기준 규격, 시험법 및 자체 설정 (분자량 및 함량 측정법 등) 규격 확립
  - 고분자량 폴리감마글루탐산의 평균분자량 측정법을 겔여과법과 광산란법을 이용하여 바이러스 감염억제 활성 보유 평균분자량 측정 및 기준규격 확립
  - 고분자량 폴리감마글루탐산의 유효성분 함량 기준 확립을 위하여 아미노산 측정법 및 겔여과법을 상호 보완하여 유효성분 함량 기준규격을 확립함
- 바이러스 감염억제 활성검증 시험법 확립 및 시설 보안
  - 고분자량 폴리감마글루탐산의 제품 규격 및 품질관리를 위하여 바이러스 감염억제 활성 측정법 확립
  - 대식세포를 이용한 TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$  cytokine 분비 활성 분석법 확립
  - 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 액상 제형의 품질 확보를 위하여 크린부스를 설치
  - 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 액상 제형의 보관을 위한 cooling container 설치
- 폴리감마글루탐산의 안전성 시험
  - ◎ 국소독성시험으로 토끼를 이용하여 피부자극시험, 2주간 연속피부자극성시험, 안자극시험을 시험
  - ◎ 면역독성시험으로 기니픽을 이용하여 광감작시험과 피부감작성시험
  - ◎ 광독성시험으로 기니픽을 이용하여 수행



◎ 폴리감마글루탐산의 닭에 대한 근육투여 용량에 대한 안전성 시험

● 폴리감마글루탐산의 독성 시험

◎ 마우스와 비글견을 이용한 근육주사 독성시험

◎ 랫트와 토끼를 이용한 생식독성(최기형성) 시험

● 폴리감마글루탐산의 약리, 잔류, 대사 시험

◎ ICP-MS를 이용한 체내에서 Gd이 부착된 폴리감마<sup>®</sup>의 정량화를 통한 잔류 및 대사시험 수행

라. 폴리감마글루탐산의 현장적용 기술

● 구제역 백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 백신효능 증강 시험 연구

◎ 구제역 바이러스 백신과의 병용투여에 의한 폴리감마글루탐산의 면역증강 및 백신효능 증가 효과 검증 연구

## IV. 연구개발결과

### 가. 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 억제 효능 검증 (*In vitro*)

#### ● 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위한 *In vitro* 마우스 면역세포 자극실험 연구

- 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위해 면역세포인 mouse macrophage 세포에 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 (1) 인터페론 및 염증관련 유전자의 발현 유도여부 등을 확인하였으며, (2) 인터페론의 분비여부등을 확인하여 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능의 가능성 및 면역활성 여부를 검증하였음.

#### ● 형광물질 (GFP)이 융합된 RNA 바이러스들을 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (*In vitro*)

- 형광물질 (GFP)이 융합된 RNA 바이러스들(Influenza-gfp, Vesicular Stomatitis virus-gfp, Coxsackivirus)을 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 효능 검증을 확인하기 위해 mouse macrophage 세포에 폴리감마글루탐산을 전처리한 후 바이러스 감염시 바이러스의 증식 억제 효능을 확인하였음.

#### ● 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 마우스 면역세포의 구제역바이러스 억제효능 검증

- 폴리감마글루탐산의 구제역 바이러스 감염 억제 효능 검증을 확인하기 위해 mouse macrophage 세포에 폴리감마글루탐산을 전처리한 후 다양한 구제역바이러스 감염시 바이러스의 증식 억제 효능 시험을 수행하였으나 구제역바이러스가 mouse macrophage cell에서 증식하지 않음으로 인해 그 효능을 확인할 수 없었음.

#### ● 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 마우스 면역세포의 상등액을 이용한 상피세포에서의 형광물질 (GFP)이 융합된 RNA 바이러스 억제효능 검증

- 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 mouse macrophage 세포의 상등액에 분비된 인터페론등의 면역활성 사이토카인에 의해 자극된 상피세포의 RNA 바이러스 억제 효능을 확인하였음. 즉, 폴리감마글루탐산의 자극을 받은 mouse macrophage cell의 상등액내 인터페론과 같은 면역사이토카인이 BHK-21 cell을 자극하여 항바이러스 status로 세포를 활성화 시킨 것이라 사료됨.

#### ● 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위한 *In vitro* 돼지 면역세포 자극 연구

- 돼지 면역세포에 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위해 돼지의 Alveolar macrophage cell과 Bone marrow macrophage cell을 분리 culture한 후 이들 세포에 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 인터페론의 분비여부, 염증성 cytokine들의 분비여부 등을 확인하여 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능의 가능성 및 면역활성 여부를 검증하였음.

#### ● 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지 면역세포의 구제역바이러스 억제 효능 검증

- 폴리감마글루탐산의 구제역 바이러스 감염 억제 효능 검증을 확인하기 위해 돼지의 면역세포인 Alveolar macrophage cell과 Bone marrow macrophage cell에 폴리감마글루탐산을 전처리한 후 구제

역바이러스 감염시 바이러스의 증식 억제 효능 검증 시험을 수행하였으나 구제역바이러스가 돼지 면역세포에서 증식하지 않음으로 인해 그 효능을 확인할 수 없었음.

● **폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지 면역세포의 상등액을 이용한 상피세포에서의 구제역바이러스 억제 효능 검증**

- 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지의 면역세포 Alveolar macrophage cell과 Bone marrow macrophage cell의 상등액에 분비된 인터페론등의 면역활성 싸이토카인에 의해 자극된 구제역 바이러스 민감 상피세포에서의 구제역바이러스 억제 효능을 확인하였음. 즉, 폴리감마글루탐산의 자극을 받은 돼지 면역세포들의 상등액내 인터페론과 같은 면역싸이토카인이 상피세포들을 자극하여 항바이러스 status로 세포를 활성화 시킨 것이라 사료됨.

**나. 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 억제 효능 검증 (In vivo)**

- 고분자 폴리감마글루탐산의 *In vivo* 구제역바이러스 감염 억제 효능을 확인하기 위해 생후 1개월령의 SPF mini-pig (이유자돈)에 폴리감마글루탐산 (PGA)을 근육투여후 transmission 방법에 의한 challenge 시험을 두차례 수행하였으나 유의차를 확인할 수 없었음.

- 고분자 폴리감마글루탐산의 *In vivo* 구제역바이러스 감염 억제 효능을 확인하기 위해 생후 1개월령의 SPF mini-pig (이유자돈)에 폴리감마글루탐산 (PGA)을 근육투여후 direct infection방법에 의한 challenge 시험을 수행하였으나 유의차를 확인할 수 없었음.

**다. 구제역바이러스 예방용 면역증강제제 제품화**

● **폴리감마글루탐산 동물용의약품 주사제형을 확립하였음**

● **폴리감마글루탐산 제품 생산공정 최적화 및 완제품 제조**

- 고순도 폴리감마글루탐산의 동물용의약품 주사액제 생산 공정 시스템을 구축하였으며, 완제품을 위한 시제품을 제조하였음.

● **일반 기준 규격, 시험법 및 자체 설정 (분자량 및 함량 측정법 등) 규격 확립**

- 고분자량 폴리감마글루탐산의 평균분자량 측정법을 겔여과법과 광산란법을 이용하여 바이러스 감염억제 활성 보유 평균분자량 측정 및 기준규격을 확립하였음.
- 고분자량 폴리감마글루탐산의 유효성분 함량 기준 확립을 위하여 아미노산 측정법 및 겔여과법을 상호 보완하여 유효성분 함량 기준규격을 확립함

● **바이러스 감염억제 활성검증 시험법 확립 및 시설 보안**

- 고분자량 폴리감마글루탐산의 제품 규격 및 품질관리를 위하여 바이러스 감염억제 활성 측정법을 확립하였음.
- 대식세포를 이용한 TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$  cytokine 분비 활성 분석법을 확립하였음
- 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 액상 제형의 품질 확보를 위하여 크린부스를 설치하였음.

○ 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 액상 제형의 보관을 위한 cooling container을 설치하였음.

● **폴리감마글루탐산의 안전성 시험**

- ◎ 국소독성시험으로 토끼를 이용하여 피부자극시험, 2주간 연속피부자극성시험, 안자극시험을 시험을 수행하였음.
- ◎ 면역독성시험으로 기니픽을 이용하여 광감작시험과 피부감작성시험을 수행하였음.
- ◎ 광독성시험으로 기니픽을 이용하여 수행하였음.
- ◎ 폴리감마글루탐산의 닭에 대한 근육투여 용량에 대한 안전성 시험을 수행하였음.

● **폴리감마글루탐산의 독성 시험**

- ◎ 마우스와 비글견을 이용한 근육주사 독성시험을 수행하였음.
- ◎ 랫트와 토끼를 이용한 생식독성(최기형성) 시험을 수행하였음.

● **폴리감마글루탐산의 약리, 잔류, 대사 시험**

- ◎ ICP-MS를 이용한 체내에서 Gd이 부착된 폴리감마<sup>®</sup>의 정량화를 통한 잔류 및 대사시험 수행하였음.

**라. 폴리감마글루탐산의 현장적용 기술**

● **구제역 백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 백신효능 증강 시험**

- ◎ 구제역 바이러스 백신과의 폴리감마글루탐산의 전투여, 병용투여, 후투여등에 의한 폴리감마글루탐산의 면역증강 및 백신효능 증가 효과를 검증하였음.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### ● 연구성과 및 활용계획

- ◎ 동물의 질병 억제를 위한 동물의 선천 면역 증강 유도 방법은 병원체의 다양한 변이와 병원체에 대한 지속적인 기술 개발의 요구를 새로운 방법으로 해결할 수 있는 방법으로 전 세계적으로 다양한 바이러스 질병 예방 및 퇴치를 위해 시도되고 있음.
- ◎ 특히 TLRs은 병원체를 인식하는 최첨단의 세포 방어 molecules 이며 이를 이용한 새로운 agonist의 개발은 직접적인 면역 유도 증강은 물론 새로운 백신의 효능 증강을 위해서 연구되어지고 있고, 기술의 개발은 다양한 활용성이 있음.
- ◎ 본 연구의 폴리감마글루탐산은 *Bacillus subtilis*가 분비하는 고분자 biopolymer 로서 TLR 4를 매개로 하는 특이 작용 및 이를 이용한 면역 증강 효과 그리고 항바이러스 효과를 본 연구진이 세계 최초로 규명하였고, 다양한 동물의 바이러스성 질병에 적용하고자 하였으며 특히 우리나라에 큰 피해를 일으키고 있는 인플루엔자, 돼지생식기호흡기증후군 바이러스에 대해서는 그 효과가 입증되어 구제역바이러스에 적용될 수 있는지를 확인하였음.
- ◎ 본 연구는 폴리감마글루탐산의 면역 활성화 유도능을 다시 한 번 확인하였으며 특히, 돼지 면역세포에 대한 선천면역 유도능을 확인한 연구성과는 폴리감마글루탐산을 이용하여 다양한 돼지의 소모성, 바이러스성 질병에 대한 면역증강제제 개발의 기초가 될 수 있음.
- ◎ 본 폴리감마글루탐산에 의한 구제역바이러스의 감염 억제 연구 결과는 비록 In vivo challenge 시험에서 구제역바이러스의 high virulence와 증식속도 그리고 선천면역 물질에 대한 challenge 시험 protocol의 부재에 의해서 그 효능을 확인할 수 없었으나 In vitro 연구에서는 폴리감마글루탐산의 자극에 의해 유도된 돼지 면역세포에서 분비된 면역활성 molecules에 의해 자극을 받은 상피세포들이 구제역바이러스의 감염 및 증식을 억제시킬 수 있음을 확인하였음. 이러한 결과는 향후 면역증강제제들을 이용한 구제역 예방제제 개발에 있어 참고가 될 수 있음. 특히, 선천면역 물질에 대한 challenge 시험 protocol의 개발을 위해서 참고가 될 수 있음.
- ◎ 본 연구에 의해 개발된 폴리감마글루탐산의 제형화 및 제제화 개발 연구결과들은 낮은 생산비용, 안정성 및 사양이 용이하고 비용이 저렴한 이점들을 가지고 있어 바이오폴리머제제의 개발에 있어 경제적 이점을 갖고 있음.
- ◎ 본 연구에 의해 개발된 폴리감마글루탐산의 대동물 산업으로의 응용 및 사용은 항생제 사용감소에 따른 항생제 오남용으로 인한 양계농가의 항생제잔류 및 내성문제를 해결할 수 있는 대안을 확보할 것으로 기대됨.

- ◎ 대단위의 산업동물의 면역유도를 통한 바이오폴리머제제의 개발은 투여 방법의 개선 및 사양관리의 용이성으로 인해 산업적으로 큰 경제적 이익을 추구할 수 있음 또한 제형에 따른 효능 효과에 차이로 인해 신물질의 적용 제형 개발에 활용할 수 있음.
- ◎ 연구개발의 결과로 생산되는 항바이러스 억제제 제품의 제품화는 국내 동물약품회사의 매출증대에 기여함은 물론, 국내자원을 이용한 안정적인 공급량 확보로 수입동물약품에 비해 경제적 측면에서 양계농가의 부담을 덜어줄 수 있으며, 동물약품의 수입대체 효과 및 해외 수출을 통한 국부창출이라는 이중 효과를 거둘 것으로 기대됨.
- ◎ 폴리감마글루탐산을 이용한 바이러스 억제제 개발은 축산을 비롯한 인간의 바이러스성 질병을 억제하기 위하여 활용할 수 있는 기술을 확립함으로써 고부가가치의 생명과학 제품 개발의 활성화 및 원천기술 확보에 따른 이 분야에 대한 국제경쟁력 강화를 통한 시장선점이 기대됨.
- ◎ 본 연구결과에서 보는 바와 같이 폴리감마글루탐산을 기존 백신에 추가함은 백신의 면역 유도능을 증가 시켜주어 면역증강제로 활용될 수 있음을 보여주었고, 이를 활용하여 다양한 산업동물 백신으로의 적용이 기대됨.

## SUMMARY

### (영문요약문)

In the first line of defense against viruses, innate immune responses including type 1 interferons and cytokines (IL-1 $\beta$ ) initiate host antiviral responses. The discovery in 2000 that two proteins from vaccinia virus interfere with Toll-like receptor (TLR) signalling was the first indication that TLRs might be important in the sensing of viruses. Ligands for TLRs are conserved structural motifs on microbes termed pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). These PAMPs include lipopolysaccharide (LPS), flagellin, lipoproteins, glycolipids and nucleic acids of bacteria, virus, parasitic or fungal origins. After recognition of these PAMPs by TLRs, turn on the signal pathway for type 1 interferons and pro-inflammatory cytokines and ultimately, induce IFNs and cytokines. In addition, signalling promotes the maturation of antigen-presenting cells (APCs). Importantly, TLR ligands may influence the differentiation of naive T-helper cell towards either a TH1 or TH2 phenotype, conferring protective immunity in the host. According to these ability, TLR ligands have led to their exploitation as both prophylactic agents for enhancing host immune response against pathogens and vaccine adjuvants to help robust immune response against vaccines.

Aside from development of antiviral drugs and vaccines, natural substances especially, TLR ligands are being investigated recently for their ability to inhibit or prevent virus infection. One such natural substance to discuss on this study is poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA).  $\gamma$ -PGA was first discovered from *Chungkookjang*, a traditional Korean fermented soybean food. Recent studies revealed that  $\gamma$ -PGA has a safe and satisfactory adjuvant function, innate immune inducible role, antitumor effect, among others. According to our early findings, the high molecular weight (5,000 kDa)  $\gamma$ -PGA induces type I IFNs through the TLR4 signal pathway in murine macrophage cells, thus this compound has been hypothesized to be involved with the antiviral state in cells.

In this projects, we evaluates the following items,

- ◎ We confirmed anti-FMDV activities of  $\gamma$ -PGA using in murine macrophage and porcine bone-marrow macrophage cells.
- ◎ We confirmed that  $\gamma$ -PGA can induce the antiviral status (Induction of genes and proteins for Type I interferons and cytokines) of murine macrophage and porcine bone-marrow macrophage cells and inhibits virus replication.
- ◎ We tested anti-FMDV activities of  $\gamma$ -PGA using FMDV challenge model which containing high virulence Andong strain and SPF-mini Pigs.
- ◎ We established the production process and test standard for production of  $\gamma$ -PGA
- ◎ We evaluated the adjuvant function of  $\gamma$ -PGA using the commercialized FMDV vaccine in swine farms.

CONTENTS  
(영 문 목 차)

Chapter 1 : Introduction

Chapter 2 : Status of Technical Development

Chapter 3 : Procedures and Results of Technical Development

Chapter 4 : Establishment of Project and Relative Contribution

Chapter 5 : Application of Results in Advance

Chapter 6 : Foreign Research Information in Process

Chapter 7 : Research Facility and Equipments

Chapter 8 : References



# 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 연구시설·장비 현황
- 제 8 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

- 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산을 이용하여 구제역 재발방지 및 예방을 위한 면역증강제 개발
- 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 면역증강효능 검증을 위한 임상실험
- 면역증강제제의 인허가 추진 및 제품화 추진

## 제 2 절 연구의 필요성 및 범위

### 1. 국내외 관련연구의 현황 및 문제점

#### 1) 구제역 (Foot and Mouth Disease; FMD)

- 구제역 (Foot and Mouth Disease)이란 소, 돼지, 양, 염소, 사슴 등 발굽이 둘로 갈라진 동물(우제류)에 감염되는 질병으로 전염성이 매우 강하며 입술, 혀, 잇몸, 코, 발굽 사이 등에 물집(수포)이 생기며, 체온이 급격히 상승되고 식욕이 저하되어 심하게 앓거나 죽게 되는 질병으로 국제수역사무국(OIE)에서 A급 질병 (전파력이 빠르고 국제교역상 경제피해가 매우 큰 질병)으로 분류하며 우리나라 제1종 가축전염병으로 지정되어 있음.
- 구제역 바이러스는 Picornaviridae Aphthovirus속의 작은 RNA 바이러스로서 이는 7개의 혈청형 즉 A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3형으로 분류되며 이 주요 혈청형은 다시 80 여가지의 아형으로 나뉘어짐.
- 구제역 바이러스는 냉장 및 냉동조건하에서는 오래 보존되고, pH 6.0이하 또는 9.0이상 조건에서, 그리고 2% 가성소다, 4% 탄산소다 및 0.2% 구연산 등의 소독제에 불활화됨.
- 구제역 바이러스는 감염동물의 수포(물집)액이나 침, 유즙, 정액, 호흡공기 및 분변등과의 접촉이나 감염 동물유래의 오염축산물 및 이를 함유한 식품등에 의한 전파(직접전파)되며, 감염지역내 사람(목부, 의사, 인공수정사등), 차량, 의복, 물, 사료, 기구 및 동물등에 의한 전파(간접접촉전파)되기도 하며, 공기를 통한 전파(공기전파)이며 공기는 육지에서는 50km, 바다를 통해서는 250km 이상까지 전파될 수 있음.
- 구제역에 의한 우제류의 증상으로는 소의 경우에 체온상승, 식욕부진, 침울, 우유생산량의 급격한 감소 등이 나타남. 발병후 24시간 이내에 침을 심하게 흘리고, 혀와 잇몸 등에 물집이 생긴 것을 관찰할 수 있으며, 입맛 다시는 소리를 내기도 함. 물집은 발굽의 사이와 제

관부, 젖꼭지 등에서도 관찰된다. 물질은 곧 터져서 피부가 드러나고 짓무르고 헐게 됨.

- 구제역 바이러스에 감염된 6개월 미만의 송아지에서는 심근염에 의해 죽는 경우가 있으며, 일반적으로 이환율은 높고 폐사율은 낮은 편이나 어린 송아지의 경우 성우에 비하여 폐사율이 높으며 임신우에서는 유산을 초래되기도 함. 감염된 소들은 1주 이상 거의 먹지 못하며, 절뚝거리며 유방염, 산유량 격감 등의 경제적 피해가 발생.
- 돼지의 경우에도 역시 절뚝거림, 발굽의 심한 병변과 고통으로 인해 제대로 서거나 걷지 못하고 절뚝거리거나 무릎으로 기어 다님. 발굽의 물질이 터져 피부가 벗겨진 자리에 세균에 의한 2차 감염이 일어나고 이로 인해 발톱이 탈락되기도 함.

## 2) 구제역 예방 방법

- 현재 구제역 발생에 대한 특별한 치료방법은 없으므로 유사증상이 발견되면 국가기관에 신속히 신고하여야 함.
- 구제역 예방을 위해서 전세계적으로 구제역 백신의 접종을 함. 구제역 백신의 제조는 구제역 바이러스를 특수 시설하에서 증식한 후 이를 순수하게 정제 고농축 하여 화학제품(Binary Etheleneimine)을 사용하여 불활화 시킴. 이렇게 순수정제 농축한 불활화 바이러스(항원)를 mineral oil로 섞어 미세한 입자로 만든 것이 구제역 불활화 백신임.
- 국내에서 구제역백신의 제조 기술이 없기 때문에 만들 수 없는 것이 아니라 백신을 만들면 오히려 구제역전파의 원인이 될 수 있기 때문에 백신을 만들지 않고 있으며, 세계적으로 영국, 프랑스, 네덜란드, 독일 등 극히 일부 국가에서만 제조하고 있음.
- 현재 우리나라가 관련을 맺고 있는 국제회사는 Merial사(다국적기업: 프랑스, 영국), Intervet(네덜란드)임. 우리의 항원은 현재 영국에 있는 Merial사에 보관해 놓고 있으며 국내에서 필요시 요청만 하면 신속히 백신으로 제조하여 단계적으로 도입토록 되어 있음. 현재 계약항원은 O형, A형, Asia 1형으로 항원형 및 보관물량은 국내외 발생동향 등을 종합적으로 검토하여 결정토록 하고 있음.
- 구제역이 언제 국내에서 발생한지도 모르는 상황이므로 매년 수십 만두분의 예방약(6PD50/두)을 비축해 놓고 있음. 이는 동시에 한 두 지역에서 발생할 때에 쓸 수 있는 최소한의 분량임.
- 구제역 백신의 접종 방법은 1차 백신접종 후 한달 후 보강접종, 그 후 6개월마다 계속적인 접종이 이루어져야 함.

## 3) 최근 구제역 발생 현황 및 문제점

- 최근 국내에서는 2000년, 2002년 그리고 2010년 구제역이 발생을 하였음.
- 2000년에는 3월 24일부터 4월 15일까지 경기도 파주, 충남 홍성등을 포함하는 3개도 6개 시군에서 발생하여 2216마리의 소가 살처분되어 약 3006억원의 경제적 손실을 입었음.
- 2002년도에는 5월 2일부터 6월 23일까지 경기도 안성을 포함하는 2개도 4개시에서 발생을 하여 돼지와 소를 포함한 16만 155마리가 살처분되어 1434억원의 경제적 손실을 입었음.
- 2010년 발생한 구제역은 2009년 11월29일 경북 안동에서 처음 양성판정이 나온 뒤 현재까지 11개 시.도의 75개 군에서 150건이 발생하여 소의 경우 15만871마리, 돼지는 331만7천864마리, 염소 7천535마리, 사슴 3천243마리 등 6천250개 농가에서 총 347만9천513마리의 가축이 살처분되어 매몰이 되었음.
- 구제역의 발생으로 인하여 가축의 손실뿐 아니라 전국에서 85개소의 가축시장이 폐쇄되고, 매몰처리 및 구제역 확산을 막기 위해서 막대한 인원과 장비도 투입되었음. 공무원 48만9천140명을 비롯해 군인 33만8천862명, 경찰 14만6천158명, 소방공무원 30만6천157명, 민간인 69만3천738명 등 총 197만4천55명이 투입이 되었고, 이 과정에 방역작업에 참여했던 공무원 8명이 목숨을 잃기도 했음. 구제역으로 인한 경제적인 손실액은 매몰보상비 1조8천억원을 비롯해 3조원 가까이 되었음.
- 구제역 발생 및 확산의 원인에는 발생초기의 대응미숙, 방역조직체제 허술등을 포함하여 여러 가지 다양한 문제가 있었음. 이러한 발생당시의 문제점들과 더불어 구제역 예방을 위한 백신접종의 대응문제가 있었음.
- 앞서서도 언급을 했듯이 현재 우리나라에서 사용하고 있는 백신의 경우 Merial사에 보관이 된 항원을 기초로 생산이 되거나 비슷한 혈청형의 바이러스를 항원으로 사용한 백신을 사용하고 있음.
- 구제역 바이러스는 변형이 매우 쉽게 일어나기 때문에 수많은 혈청 형(아형)이 생성이 될 수 있고, 혈청형이 다른 백신의 경우 그 효능이 낮아 혈청형이 맞는 예방약의 사용이 중요함. 그러나 혈청형이 맞는 백신의 제조 및 생산 보급등은 많은 시간이 소요가 되므로 발생당시에 맞춤형의 백신접종은 거의 불가능함.
- 따라서 구제역 예방을 위해서는 백신의 접종과 더불어 위생적인 사육시설 관리 및 가축의 면역을 증강시켜 주어 구제역 바이러스의 감염을 억제시켜줄 수 있는 면역증강용 바이러스 억제제의 보조적인 예방법이 필요함.
- 구제역 바이러스 억제제를 개발하여 농가에 보급한다면, 직접적으로는 구제역에 대한 예방 및 확산의 방지에 중요한 방법이 될 수 있음.

## 나. 기술도입의 타당성

- 앞서 설명을 하였듯 구제역의 발생은 가축의 손실뿐 아니라 경제적인 손실을 포함한 사회 전반에 걸친 재앙이며 이를 막기 위해 백신을 비롯한 다양한 예방적 방법들이 구제역의 발생과 확산방지를 위해서 적용이 되어야함.
- 백신접종이 가장 좋은 구제역의 예방 및 확산방지를 위한 방법임에도 불구하고, 구제역 바이러스의 수많은 혈청형(아형) 생성등에 따른 백신의 효율성 문제가 현재까지도 중요한 문제로 대두가 되고 있음.

- 이러한 백신의 문제를 보완해 줄 수 있는 구제역 예방용 바이러스 억제제의 개발 및 보급은 중요한 사항이며, 이를 위해 구제역 바이러스에 대한 초기 방어시스템인 생체내 선천적 면역시스템을 자극하여 개체 동물의 면역력을 높여주는 예방제제의 발굴 및 개발은 중요한 제제 개발 방법이 될 수 있음.
- 즉, 빠른 증식성 및 확산성이 있는 구제역바이러스에 대한 예방 효율의 한계를 총체적으로 예방 및 처치할 수 있는 신개념의 예방제제 개발은 전세계적으로 주요한 연구개발의 방향이 되고 있음.
- 본 “구제역 대응 면역증강 바이오폐리머의 임상실험 검증” 연구에서는 생체내 선천적 면역시스템을 자극하여 바이러스의 증식 및 감염을 막는 바이오폐리머인 폴리감마글루탐산을 이용하여 구제역 바이러스들에 효과적인 예방 및 면역증강제제를 개발하고자 함.

### 제 3 절 연구개발 추진전략 및 추진체계

#### 1. 연구개발의 추진전략·방법

- 본 과제인 “구제역 대응 면역증강 바이오폴리머의 임상실험 검증”의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 다음과 같이 주관기관인 충남대학교 수의과대학과 협동연구기관인 (주)바이오리더스 기술연구소연구소 및 농림수산검역검사본부로 구성하여 연구를 수행하고자 함.



그림 1. 바이오폴리머 이용 구제역바이러스 예방제제 개발 추진전략

- 주관기관 (제1세부과제)인 충남대학교(연구책임자: 김철중)에서는 “**바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 억제 효능 검증 (*In Vitro, In Vivo*)**” 연구를 수행함에 있어서 제2세부과제 기관인 바이오리더스에서 바이오폴리머 (분자량별 폴리감마글루탐산)를 제공받아 바이오폴리머의 구제역바이러스 억제 효능 검증 (*In Vitro*) 및 면역활성기전을 효율적이고 체계적으로 수행할 계획임.
- 특히, 국내 실정상 구제역바이러스의 실험실내 처리의 문제로 인하여 베트남의 하노이대학과 공동연구에 의해 실험실내에서 바이오폴리머의 구제역바이러스 억제 효능 검증을 확인할 계획임.
- 제1협동과제 주관기관인 (주)바이오리더스(연구책임자: 홍승표)에서는 “**폴리감마글루탐산의 항구제역 면역증강제제 제품화**” 연구를 수행함에 있어서 폴리감마글루탐산의 생산공정의 최적화를 통하여 동물용 의약품 개발을 위해 노력을 할 것이며, 개발 생산된 분자량별 폴리감마글루탐산을 충남대학교 및 농림수산검역검사본부에 제공하여 구제역바이러스 억제 효능 검증 (*In Vitro, In Vivo*) 연구가 원활히 수행될 수 있도록 제공할 예정임.
- 본 연구의 최종적 목적달성인 “**구제역 대응 면역증강 바이오폴리머의 임상실험 검증**”을 위해 농림수산검역검사본부에서 임상실험을 수행할 예정이며, 연구의 성공을 위해 각 기관의 유기적 협력체계를 수립할 계획임.

○ 위 세부과제별 연관성은 다음과 같음



그림 2. 세부과제별 효율적 연관성을 통한 추진전략

○ 본 과제의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 다음과 같은 추진체계를 수립하여 연구를 수행할 계획임.

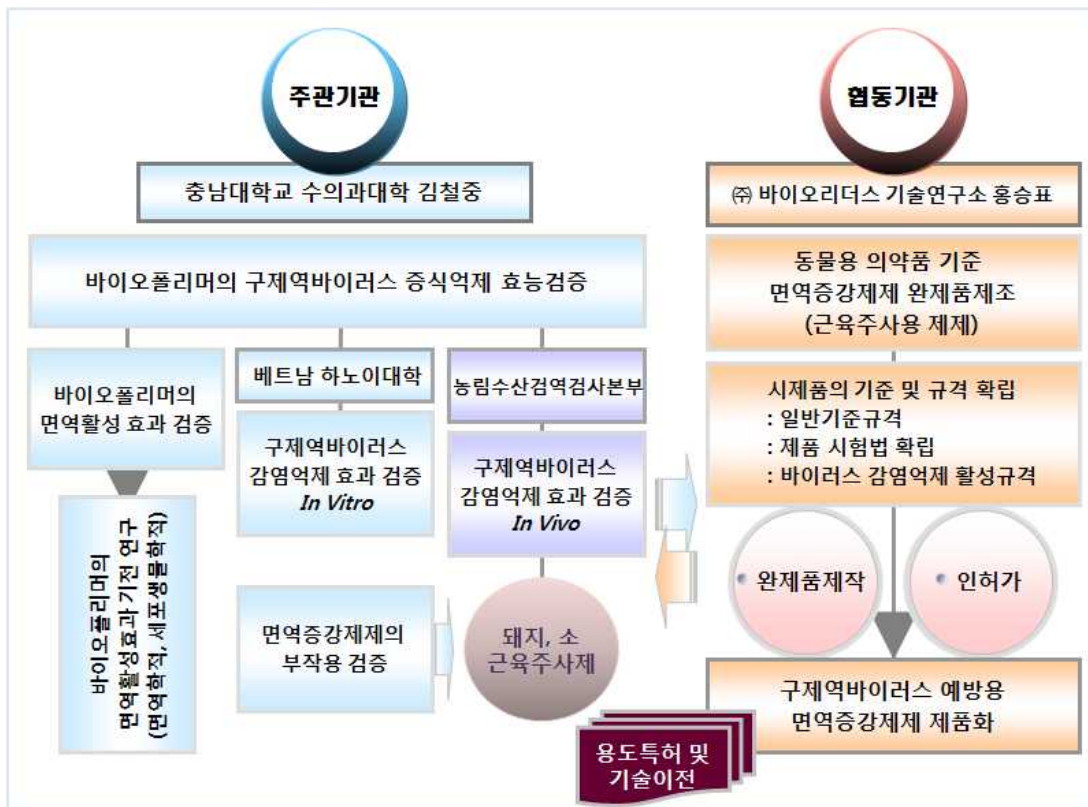


그림 3. 구제역 대응 면역증강 바이오폴리머의 임상실험 연구를 위한 추진체계

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

#### 1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
폴리감마글루탐산 이용 바이러스 감염억제제 생산 기술	한국	70%	80%	90%	
항 FMD virus 제제	미국, 유럽, 일본	60%	60%	80%	

#### 가. 특허분석 측면

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

#### 나. 논문분석 측면

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



#### 다. 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 구제역에 대한 치료제는 생산 및 판매가 없으며, 이 질병을 예방하기 위한 국외백신이 수입되고 있음. 본 연구과제에서는 구제역 바이러스의 감염억제제 제품을 개발 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

### 제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- 최근 동물이나 인간의 감염병에 대한 방어 능력을 증진시키기 위한 새로운 연구 전략이 다양하게 수립되고 있음 특히 바이러스 감염 억제를 위한 기존의 예방 백신이나 특정 부위를 대상으로한 항바이러스제는 바이러스의 다양한 변이로 인한 백신의 무력화나 약제에 대한 내성 발현으로 인한 효과 감소 등으로 인하여 질병 예방 및 퇴치에 한계가 있음
- 이러한 기존 질병 예방 및 치료에 대한 전략의 실패로 인해 최근의 세계적인 연구 방향 중에 가장 활발히 추진되고 있는 부분은 생체내에서 병원체 감염에 초기에 대응 하기 위해 동원되는 선천 면역을 증진하고 이를 통해 병원체 감염을 억제하거나 획득면역의 증진을 통한 이후 감염을 제어하려는 방법을 찾고자 다양한 연구가 진행되고 있음
- 특히 최근에 Toll-like receptor 의 기능이 잇달아 밝혀짐에 따라 인간의 바이러스 감염증은 물론 동물에서도 TLR agonist 를 활용한 다양한 동물 질병 억제를 위한 시도가 이루어지고 있음 인간에서는 TLR 3 나 TLR 7 agonist 등이 개발 되어 임상 시험에 돌입한 경우가 있음 (Langford RE et al: 2013: Gastroenterology 144: 1608) 그러나 동물에 적용은 아직 초보적인 수준으로 LPS 나 병원체 단백질을 이용하여 TLR4 와의 반응을 통한 면역증진 및 항 바이러스 기능 증진 등에 대한 연구가 진행되고 있으나 독성으로 인한 문제점 등으로 기초 기전 연구가 수행되고 있음 (Mohamed F et al : Antiviral research 92(2011) 346, Micheal ST et al: Vaccine 30(2012) 4524, Kyoko S et al: Virology J 2011: 8 97)
- 다양한 천연물을 이용한 면역 기능 향진 연구 역시 활발히 수행되고 있으나 천연물의 특성상 대부분 단일 물질이 아닌 혼합 또는 복합물로 인해 주된 기능 활성 물질에 대한 규명이 어려우며 제제 개발 단계에서의 생산상 및 일관성이 유지되기 어려움 이로 인한 품질관리에서 대부분 실패로 인정 받기 어려움 또한 아직 정확한 면역 증진 기전이나 생체내 대사, 흡수 , 배출 (Pharmacokinetics) 등에 대한 연구가 어려운 단점이 대두되고 있음
- 본 연구는 국내에서 개발된 유익세균인 Bacillus subtilis 에서 분비되는 단일 biopolymer 인 폴리감마글루탐산의 TLR4 agonist 작용을 통한 선천 면역 증강 및 획득 면역 증강 작용을 이용한 항바이러스 제제의 개발을 통해 동물에서 주로 빈발하는 바이러스 억제제 및 면역 증강제를 개발하였음

- 본 연구결과는 최근의 감염병 예방을 위한 가장 중요하게 대두되고 있는 미래 적용형 기술 개발로 다양한 형태의 제형 및 제제로 향후 개발 될 수 있으며 현 사람에서는 human papillomavirus 감염에 의한 여성의 자궁경부암 1단계 질환을 치료할 수 있는 기전 및 연구 결과로 임상 2상 (Phase II) 연구가 진행되고 있어 새로운 국내 개발 신약으로의 가능성이 높은 상황임
- 이와 같은 결과는 세계적으로도 TLR를 매개로 면역 증강을 통한 신약 개발에 매우 선도적인 역할을 하고 있음 또한 다양한 바이러스 감염증에 대한 적용 실험을 통해 그 적용 범위를 확대할 수 있어 가능성이 높음

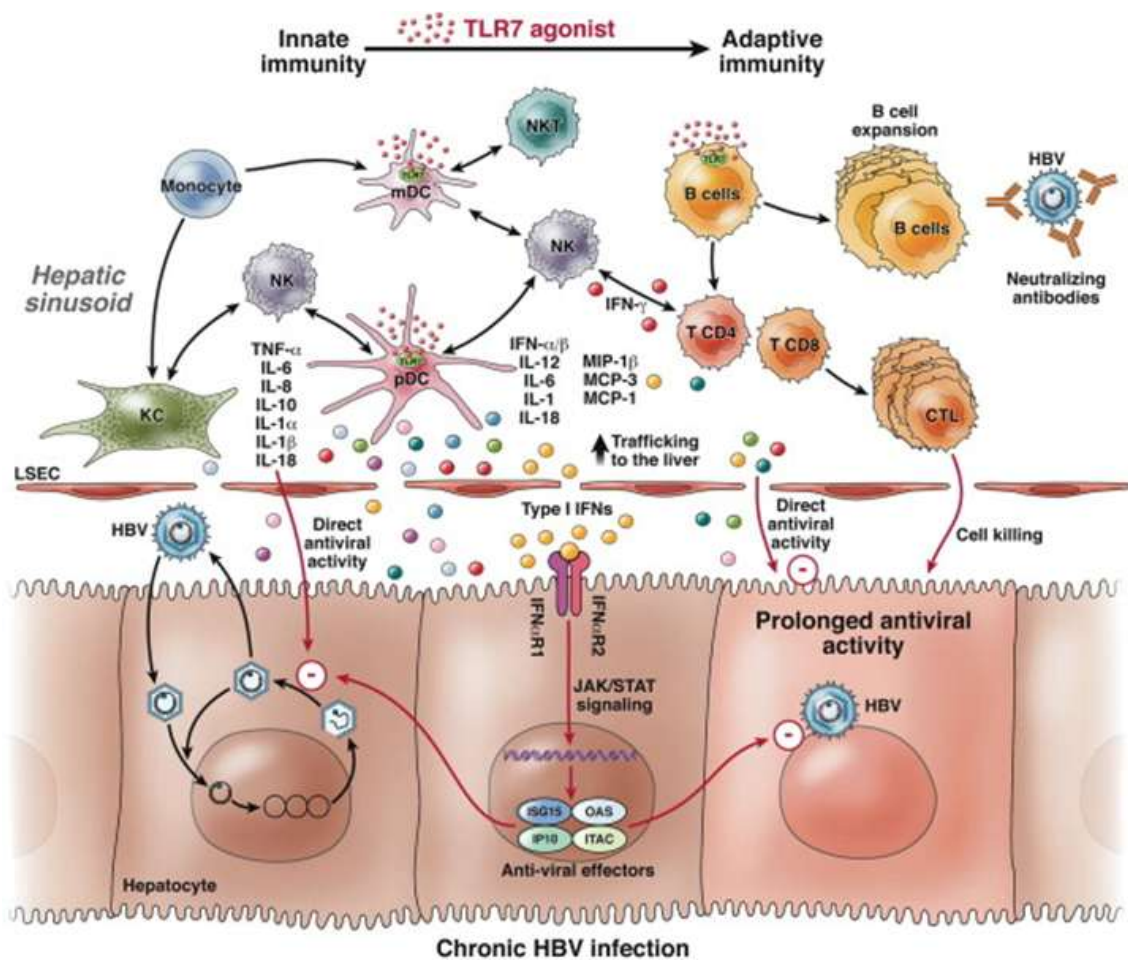


그림 4. TLR agonist를 이용한 항바이러스 제제의 작용 기전

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 억제 효능 검증

#### 1. 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증 및 항바이러스 효능 검증

- 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위한 In vitro 마우스 면역세포 자극 실험연구
- ◎ 우선적으로 다양한 농도의 고분자 폴리감마글루탐산을 면역세포인 mouse macrophage cell line (RAW 264.7)에 12시간 자극을 시킨 후 분비되는 면역활성 사이토카인의 측정을 통해 세포독성이 없고, 면역활성이 높은 최적의 폴리감마글루탐산 농도를 선택하였음.
- ◎ 선택된 0.1%의 고분자 폴리감마글루탐산을 면역세포인 mouse macrophage cell line (RAW 264.7)에 자극시킨 후 자극된 면역세포에서의 인터페론관련 유전자의 발현 유도여부를 확인한 결과 그림 5에서와 같이 다양한 인터페론 관련 유전자들의 발현이 시간이 지남에 따라서 유도 및 증가됨을 확인하였음.

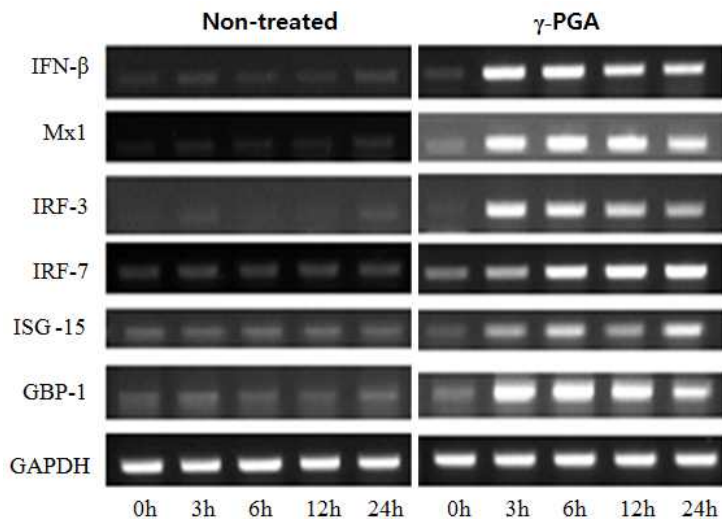


그림 5. 폴리감마글루탐산에 의한 면역세포에서의 인터페론관련 유전자발현

- ◎ 마우스 Macrophage 세포에 고분자의 폴리감마글루탐산을 자극시킨 후 자극된 면역세포에서 분비되는 인터페론 베타 (IFN-β)의 분비여부를 ELISA를 이용하여 확인한 결과 그림 6에서와 같이 LPS와 비슷하게 IFN-β의 분비됨을 확인하였음.

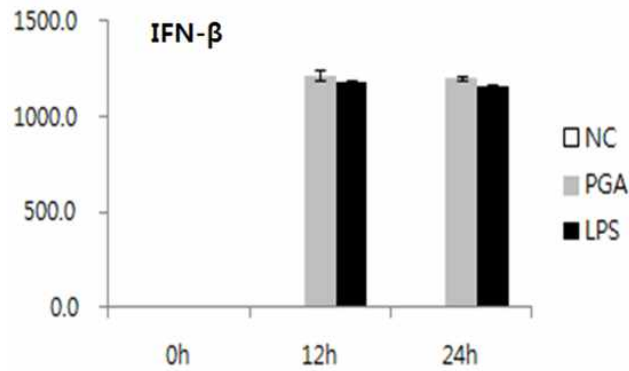


그림 6. 폴리감마글루탐산에 의한 마우스 면역세포에서의 IFN-β의 분비발현

- ◎ 형광물질 (GFP)이 융합된 RNA 바이러스들을 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (*In vitro*)
- ◎ 0.1%의 고분자 폴리감마글루탐산을 면역세포인 mouse macrophage cell line (RAW 264.7)에 12시간 자극을 시킨 후 형광물질 (GFP)을 감염시 발현하는 RNA 바이러스들 [Influenza Virus (PR8-gfp), Vesicular Stomatitis Virus (VSV-gfp)]를 각각 MOI 1로 감염시킨 후 각각의 RNA 바이러스의 감염 억제 효능을 GFP 발현으로 확인하였음. 그림 7은 GFP의 세포내 발현양상을 형광현미경으로 확인한 결과로 그림에서 보는바와 같이 control에 비해 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 세포에서 Interferon으로 자극시킨 세포와 같이 바이러스의 감염 및 증식이 억제 되었음.

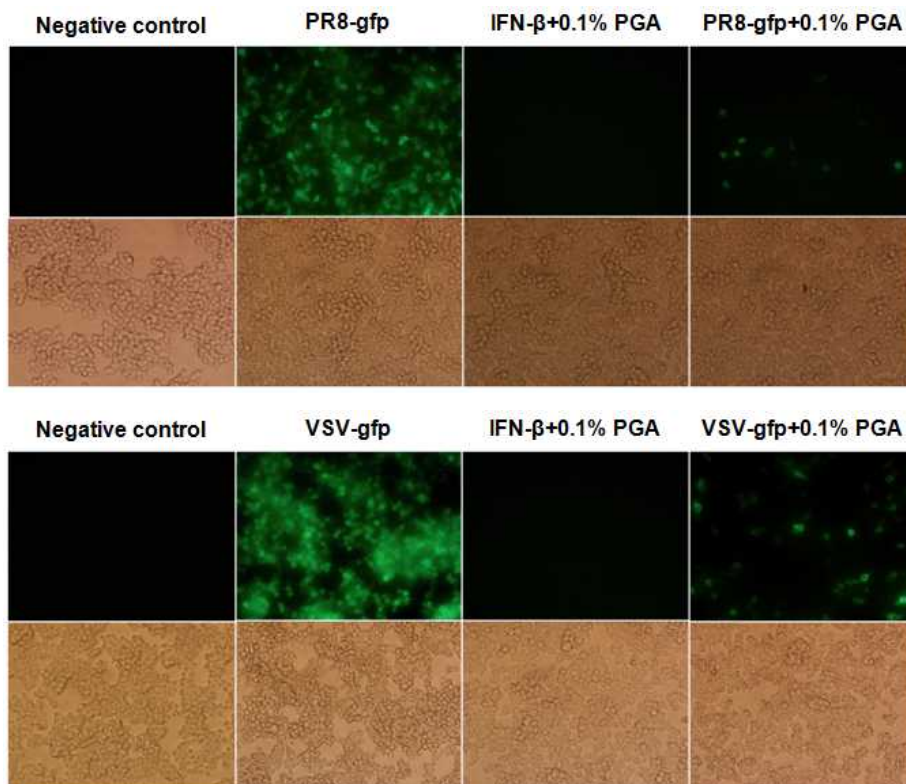


그림 7. 폴리감마글루탐산의 RNA 바이러스 억제 효능

◎ 또한, 0.1%의 고분자 폴리감마글루탐산을 면역세포인 mouse macrophage cell line (RAW 264.7)에 12시간 자극을 시킨 후 RNA 바이러스인 다양한 종류의 Picornaviridae family의 virus들 (Echovirus, Coxsackie virus, Rhinovirus, Enterovirus)을 각각 MOI 1로 감염시킨 후 각각의 RNA 바이러스의 감염 억제 효능을 virus 감염에 따른 cell viability로 확인하였음. 그림 8는 cell viability를 나타내는 그래프와 현미경으로 관찰된 cell viability를 확인한 결과로 그림에서 보는바와 같이 control에 비해 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 세포에서 바이러스의 감염 및 증식에 의한 cell death가 억제되었음을 확인하였음.

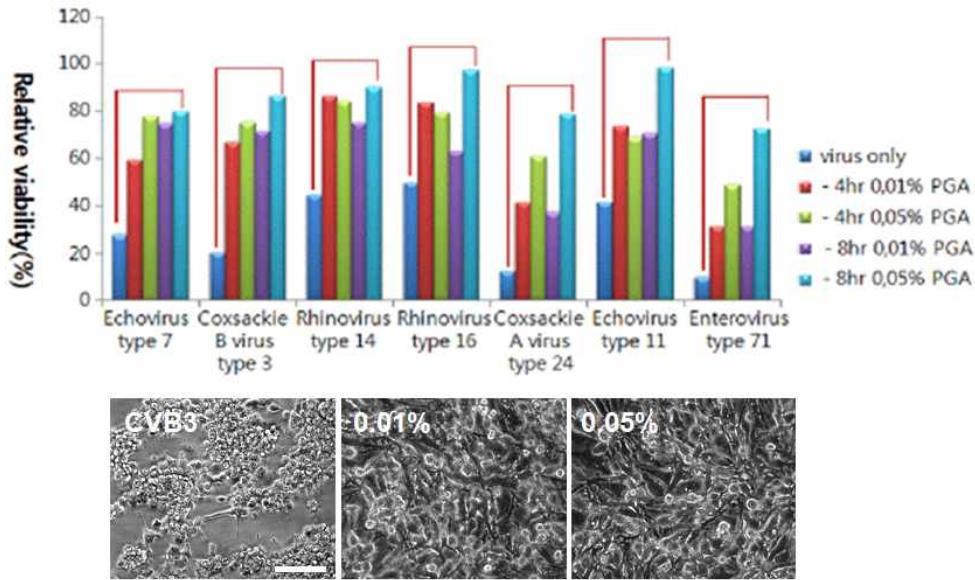


그림 8. 폴리감마글루탐산의 RNA 바이러스 억제 효능

◎ 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 마우스면역세포의 구제역 바이러스 억제 효능

◎ 0.1%의 고분자 폴리감마글루탐산을 면역세포인 mouse macrophage cell line (RAW 264.7)에 12시간 자극을 시킨 후 다음의 표1에서 나타낸 다양한 구제역 바이러스를 감염시킨후 각각의 구제역 바이러스의 감염 억제 효능을 감염된 세포의 상등액과 세포내에서의 구제역 바이러스 유전자 검출 및 감염에 따른 cell cytotoxic effect를 통해 확인을 하였고, 감염시킨 세포의 상등액을 새로운 세포에 감염시켜 virus의 전달감염을 확인하였음 (표 2, 그림 9).

Strain	특징
O/Manisa	O형 표준백신주
O/KOR/Yangju/2010	2010년 O형 양주지역 분리주
O/KOR/Andong/2010	2010년 O형 안동지역 분리주
A/KOR/Pocheon/2010	2010년 A형 포천지역 분리주
Asia1/MOG/2005	Asia1형 몽골 분리주

표1. 감염시킨 구제역 바이러스들

	Virus Strains	Detection after infection in Raw cell							
		RT-PCR (Supernatants, Hour post infection)				CPE (Hour post infection)			
		0	2	6	18	0	2	6	18
1	O/ Manisa	Yes	No	No	No	No	No	No	No
2	O/KOR/ Yangju/2010	Yes	No	No	No	No	No	No	No
3	O/KOR/ Andong/2010	Yes	No	No	No	No	No	No	No
4	A/KOR/ Pocheon/2010	Yes	No	No	No	No	No	No	No
5	Asia1/MOG/2005	Yes	No	No	No	No	No	No	No

	Virus Strains	Detection after Passage in Raw cell					
		RT-PCR (for RNA in Cell lysate)			CPE (Hour post infection)		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3
1	O/ Manisa	No	No	No	No	No	No
2	O/KOR/ Yangju/2010	Yes	No	No	No	No	No
3	O/KOR/ Andong/2010	Yes	No	No	No	No	No
4	A/KOR/ Pocheon/2010	No	No	No	No	No	No
5	Asia1/MOG/2005	Yes	No	No	No	No	No

표2. 구제역 바이러스의 감염 억제 효능 검증

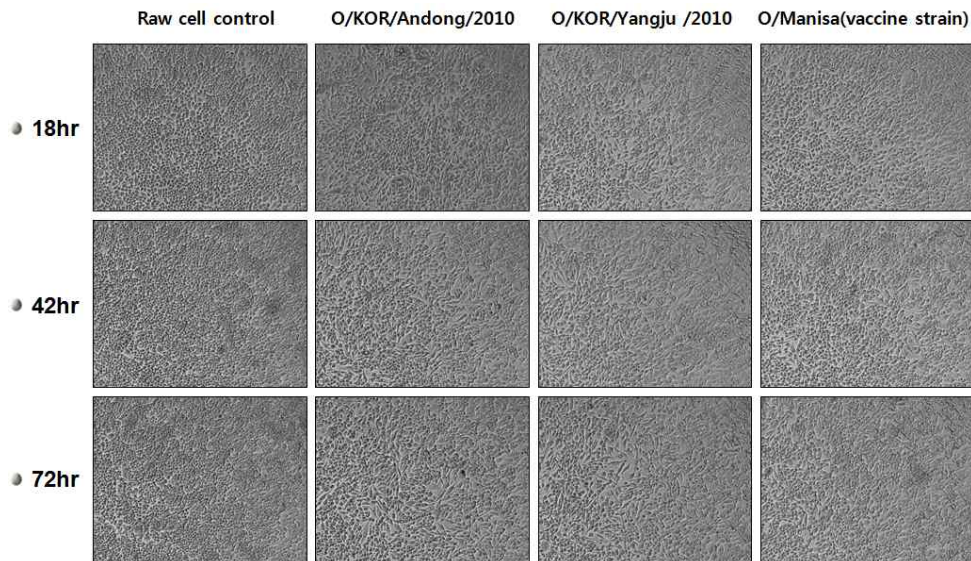


그림 9. 마우스 macrophage cell의 구제역바이러스 감염

◎ 표 2에서 보는 바와 같이 폴리감마글루탐산으로 자극된 마우스 면역세포의 경우 폴리감마글루탐산에 의해 다양한 구제역바이러스가 감염이 억제되었다기 보다 구제역바이러스가 mouse macrophage cell에서 증식하지 않음을 확인하였음. 따라서 폴리감마글루탐산에 의한 구제역바이러스 억제 효능은 다른 실험방법으로 검증을 수행함.

● 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 마우스 면역세포의 상등액을 이용한 상피세포에서의 형광물질 (GFP)이 융합된 RNA 바이러스억제효능검증

◎ Baby Hamster Kidney (BHK-21) cell은 구제역바이러스의 증식을 위해 흔히 사용하는 cell line으로 폴리감마글루탐산의 자극을 받은 BHK-21 cell에 의해 구제역바이러스의 증식 억제효능을 확인하기 위해 우선적으로 0.1%의 고분자 폴리감마글루탐산을 BHK-21 cell에 12시간 자극을 시킨

후 RNA 바이러스인 VSV-gfp를 감염시킨 결과 그림 6에서와 같이 폴리감마글루탐산의 자극을 받은 BHK-21 cell의 경우 mouse macrophage cell과는 다르게 VSV-gfp의 감염증식을 억제하지 않았음. 이는 이전 연구에서 밝혔듯 TLR4를 자극하여 면역활성을 나타내는 폴리감마글루탐산의 자극 효과의 원인으로 BHK-21 cell이 경우 TLR4 receptor의 발현이 극히 낮기 때문에 폴리감마글루탐산에 의해 자극을 받지 않은 것이라 고려됨.

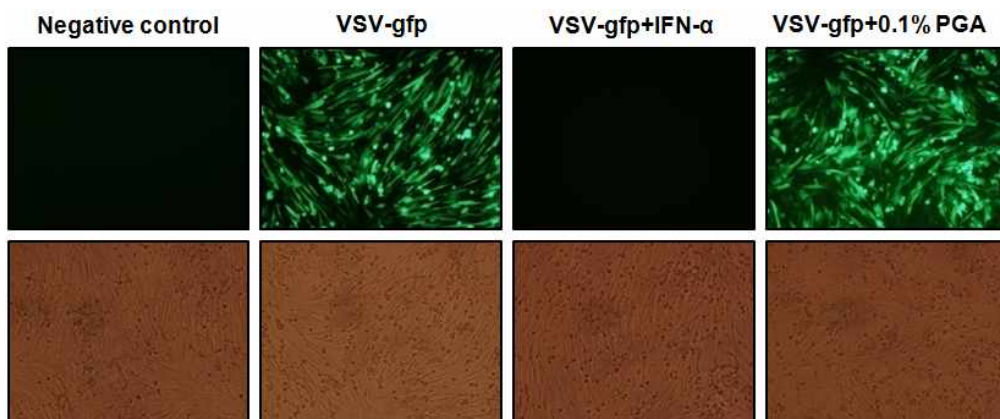


그림 10. BHK-21 세포에서의 폴리감마글루탐산에 의한 RNA 바이러스 감염억제

◎ 그러나 0.1%의 고분자 폴리감마글루탐산을 면역세포인 mouse macrophage cell line (RAW 264.7)에 12시간 자극을 시킨 후 세포의 상등액을 BHK-21 cell에 자극을 시킨 후 VSV-gfp를 감염시킨 결과 그림 7에서와 같이 폴리감마글루탐산의 자극을 받은 mouse macrophage cell의 상등액으로 다시 자극을 받은 BHK-21 cell에서는 VSV-gfp의 증식이 억제되었음. 이는 폴리감마글루탐산의 자극을 받은 mouse macrophage cell의 상등액내 인터페론과 같은 면역사이토카인이 BHK-21 cell을 자극하여 항바이러스 status로 세포를 활성화 시킨 것이라 고려됨.

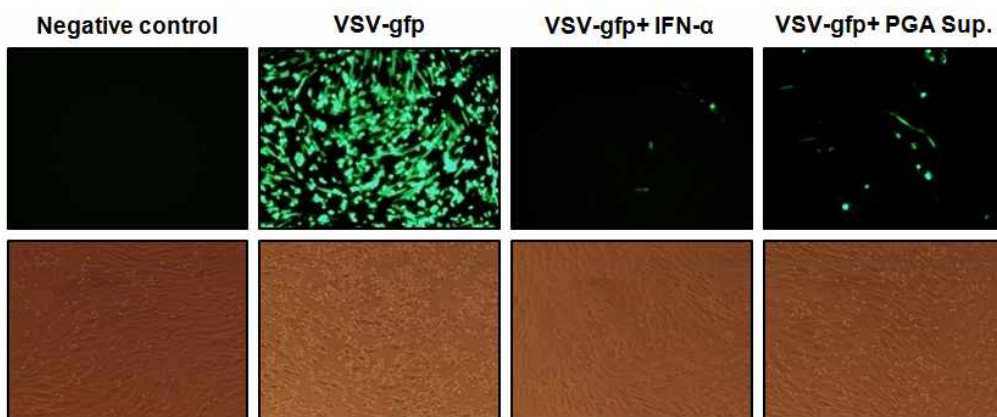


그림 11. 폴리감마글루탐산에 의해 유도된 면역활성물질로 자극을 받은 BHK-21 세포에서의 RNA 바이러스 감염억제

- ◎ 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위한 In vitro 돼지 면역세포 자극 실험 연구
- ◎ 돼지 면역세포에서의 폴리감마글루탐산 면역활성 효과 검증을 위해 자돈으로부터 Alveolar macrophage cell과 Bone marrow macrophage cell을 분리 culture한 후 이들 세포에 0.1%의 폴리감

마글루탐산을 자극시킨 후 인터페론의 분비여부, 염증성 cytokine들의 분비여부 등을 확인한 결과, 그림 12에서 보는 바와 같이 mouse macrophage cell line에서와 비슷하게 면역활성 사이토카인이 분비가 되었음.

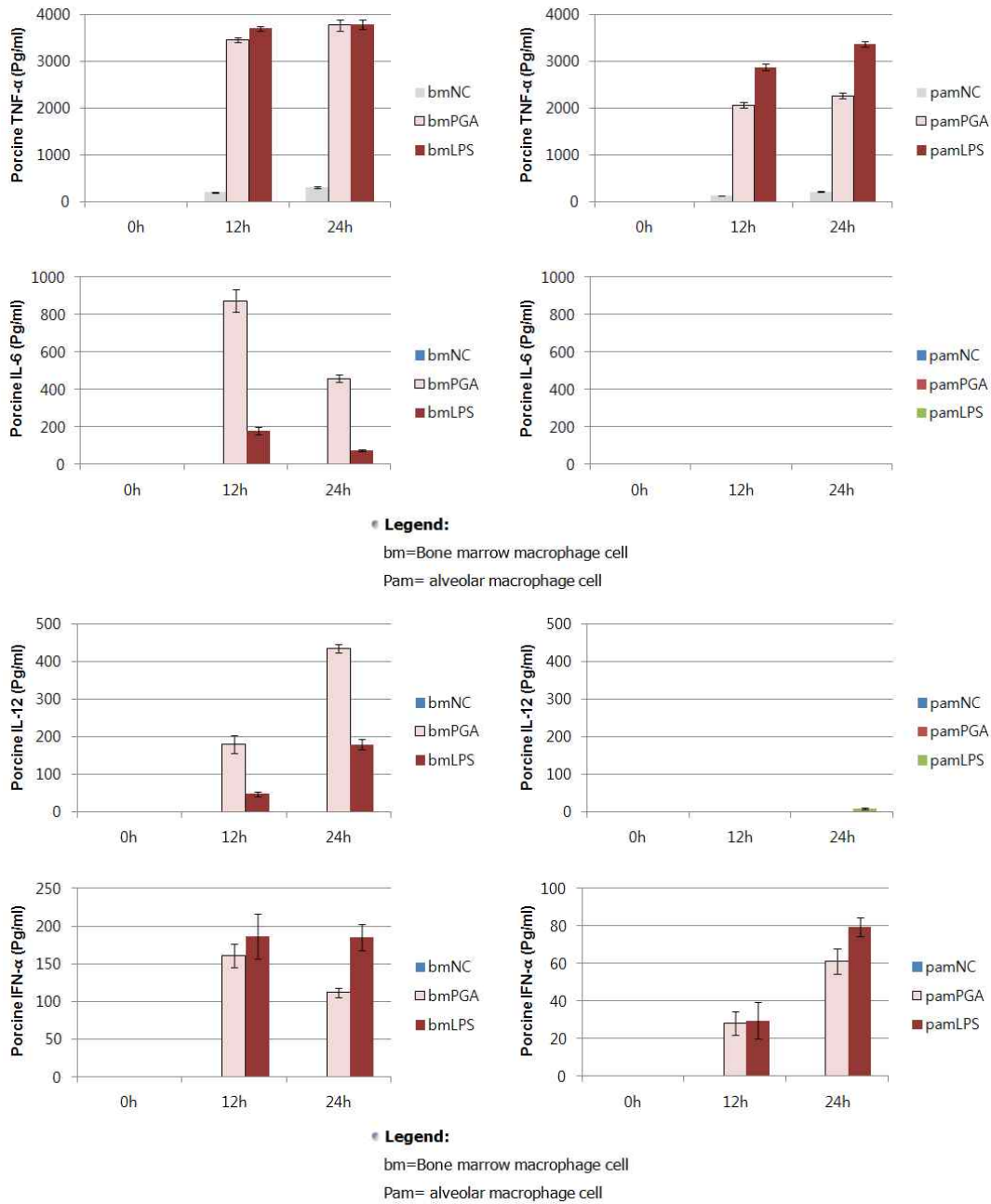


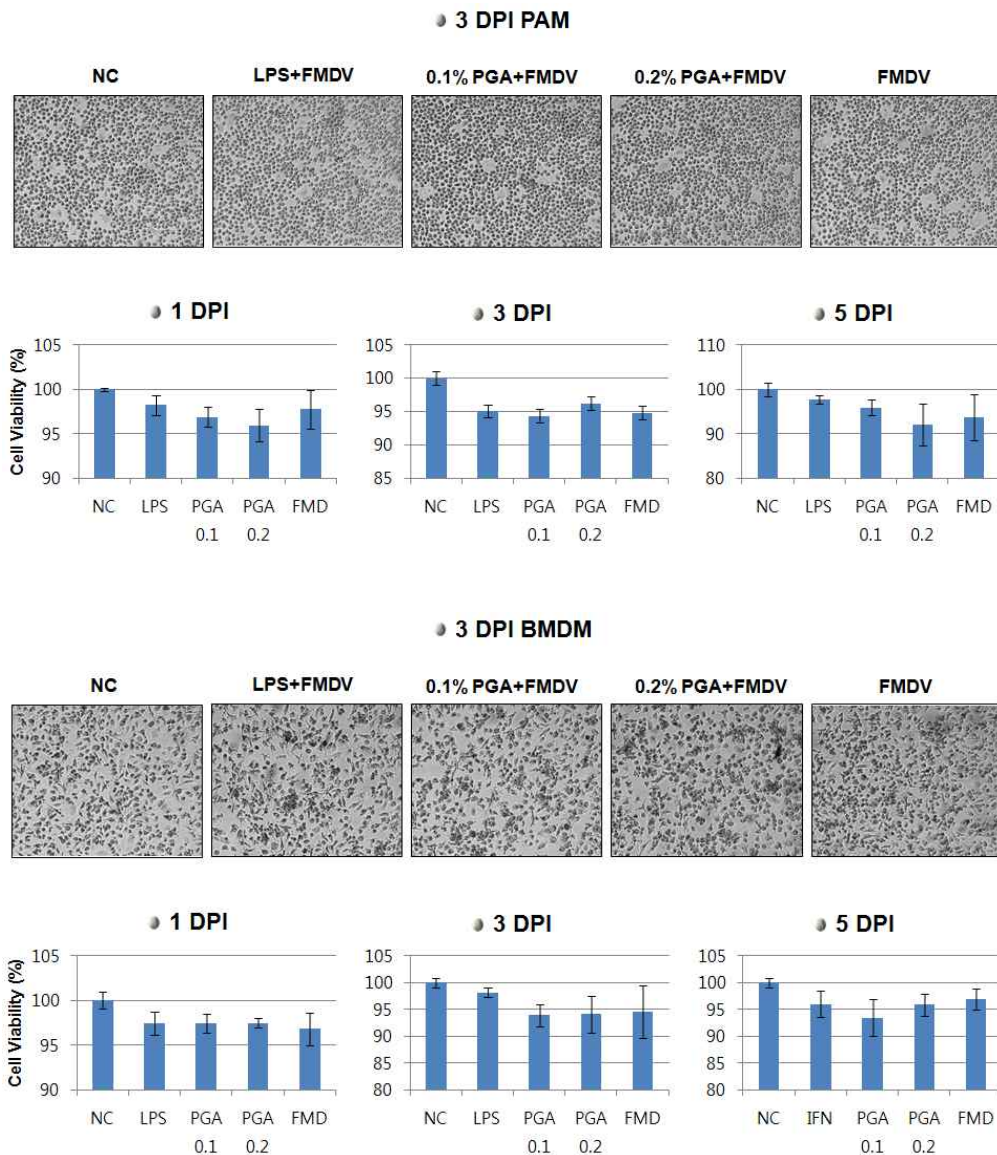
그림 12. 폴리감마글루탐산에 의한 돼지 면역세포에서의 IFN-β 및 염증사이토카인 분비발현

● 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지면역세포의 구제역바이러스억제효능검증

◎ 0.1% 및 0.2%의 고분자 폴리감마글루탐산을 돼지 면역세포인 Alveolar macrophage cell과 Bone marrow macrophage cell에 12시간 자극을 시킨 후 구제역 바이러스인 O/KOR/Andong/2010 strain을 감염시킨후 구제역 바이러스의 감염 억제 효능을 감염된 세포의 상등액과 세포내에서의 구제역 바이러스 유전자 검출 (Real-time PCR) 및 감염에 따른 cell cytotoxic effect



를 통해 확인을 확인하였음 (그림 13).



**그림 13. 돼지 면역세포에서의 구제역바이러스 감염억제 검증**

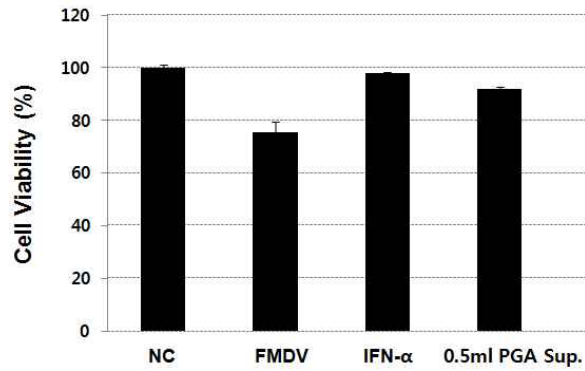
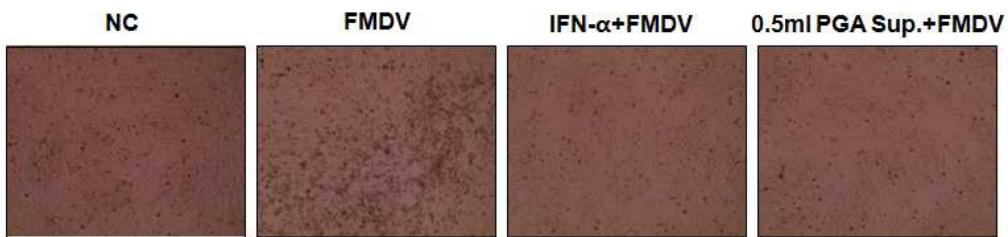
◎ 구제역 바이러스인 O/KOR/Andong/2010 strain을 control cell과 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 세포에 감염시킨후 감염된 세포의 상등액과 세포내에서 구제역 바이러스의 증식을 확인하기위해 Real-time PCR을 수행한 결과 폴리감마글루탐산에 의한 구제역바이러스의 증식 억제 효과는 확인할 수 없었음. 그림13에서 보는 바와 같이 구제역바이러스에 의한 세포 독성 효과에 있어서 폴리감마글루탐산으로 자극된 돼지 면역세포의 경우 마우스 면역세포와 같이 폴리감마글루탐산에 의해 구제역바이러스가 감염이 억제되었다기 보다 구제역바이러스가 돼지 면역 세포에서 증식하지 않음을 확인하였음. 따라서 폴리감마글루탐산에 의한 구제역바이러스 억제 효능은 다른 실험방법으로 검증을 수행하였음.

● 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지 면역세포의 상등액으로 자극시킨 상피세포에서의 구제역 바이러스억제효능검증

◎ BHK-21 cell 및 IBRS2 cell은 구제역바이러스의 증식을 위해 흔히 사용하는 cell line으로

0.1%의 고분자 폴리감마글루탐산을 돼지 면역세포인 Alveolar macrophage cell과 Bone marrow macrophage cell에 12시간 자극을 시킨 후 세포의 상층액을 BHK-21 cell 및 IBRS2 cell에 자극 시킨 후 구제역 바이러스인 O/KOR/Andong/2010 strain을 감염시킴. 감염후 1일후와 2일후 구제역바이러스에 의한 세포독성을 측정 한 결과 그림 10과 11에서 보는 바와 같이 돼지 면역세포의 상층액으로 자극시킨 BHK-21 cell 및 IBRS2 cell세포에서 구제역 바이러스 증식에 의한 세포독성이 억제되었음을 확인할 수 있음.

● 1 DPI BHK-21



● 2 DPI BHK-21

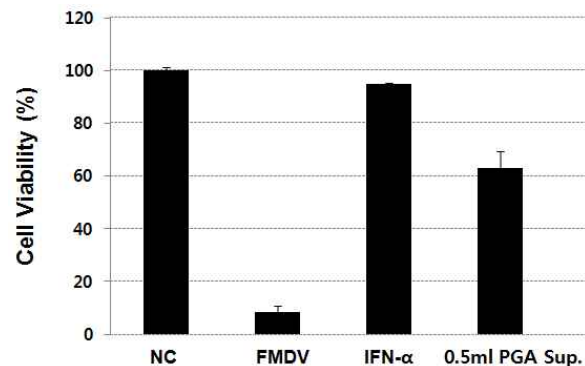
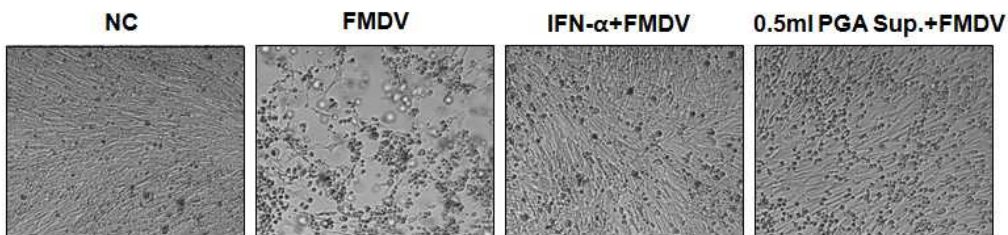


그림 14. 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지 면역세포의 상등액으로 자극시킨 BHK-21 세포에서의 구제역 바이러스 억제 효능검증

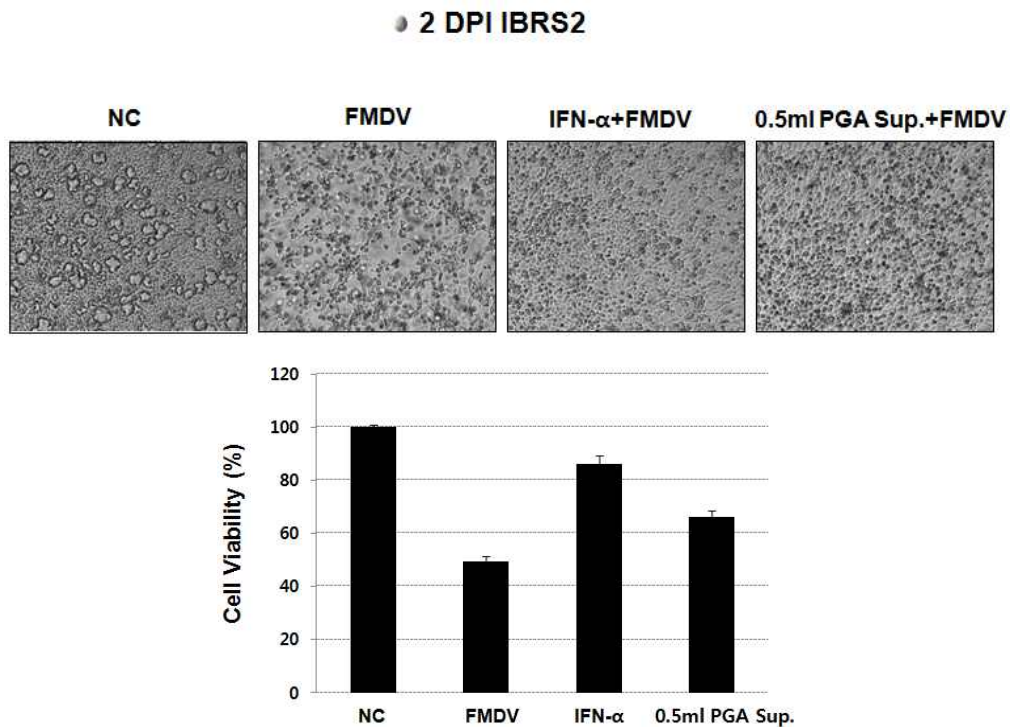
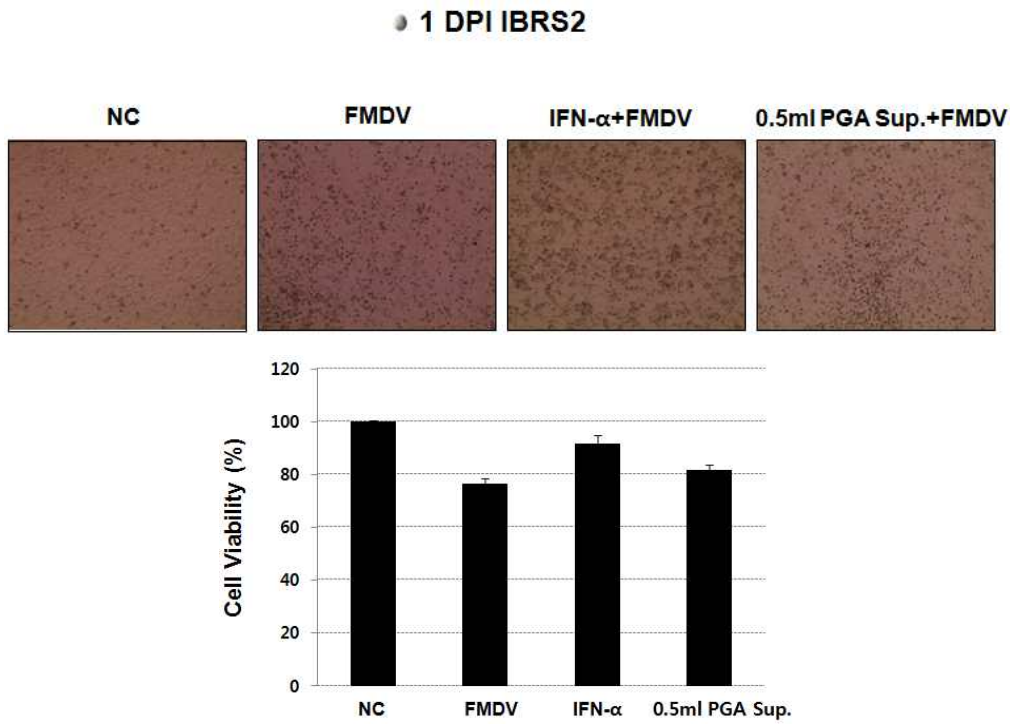


그림 15. 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지 면역세포의 상등액으로 자극시킨 IBRS2세포에서의 구제역 바이러스 억제 효능검증

- 결론적으로 폴리감마글루탐산은 돼지의 면역세포를 자극하여 인터페론을 비롯한 면역활성 사이토카인들을 분비시키고 분비된 인터페론 및 면역 사이토카인들이 주위의 세포에 자극을 주어 항바이러스 상태로 유도를 함으로써 구제역 바이러스의 침입을 억제할 있을 것으로 사료됨.

## 2. 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 감염 억제 효과 검증 (*In vivo*)

- ◎ 고분자 폴리감마글루탐산의 *In vivo* 구제역바이러스 감염 억제 효능을 확인하기 위해 그림과 같은 *In vivo* 실험방법을 계획하였음.
  - ① 우선 생후 1개월령의 SPF mini-pig (이유자돈) 9 마리, 2% 폴리감마글루탐산 (PGA) 그리고 challenge virus로서 FMDV Andong strain을 준비함.
  - ② Mini-pig에 Infection하는 방식은 구제역 vaccine의 efficacy를 확인할 때 사용하는 transmission 방법을 사용하였음. 즉, Transmission 방법은 한 마리의 mini-pig 발바닥에 10<sup>5</sup> titer의 Andong strain 100ul를 접종한 후 36-48시간뒤 증상이 나타나기 시작하면 다른 실험 group의 대상 mini-pig들과 한 방에서 접촉을 18시간동안 유도하여 자연적인 virus의 transmission를 유도하고, ③ 접촉뒤 각각의 군을 나누어 증상, 혈청내 virus등을 측정한 후 증상에 따라 살처분하는 방식으로 실험이 진행되었음.
  - ④ 다음의 표에서와 같은 방법으로 control group과 PGA를 하루에 한번씩 5회 근육투여한 group 그리고 PGA를 하루에 한번씩 7회 근육투여한 group으로 나누어 FMDV Andong strain을 감염시킨 mini-pig와 합사시킨 후 각각 group의 pig로부터 serum, oral swab sample을 취하여 FMDV에 대한 specific primer로 real-time PCR를 수행하였고, 매일 body temperature를 측정함과 동시에 수포 및 물집과 같은 임상증상을 관찰하여 구제역바이러스 감염정도를 확인한 후 그 경중에 따라 살처분을 하였음.

### ● 1<sup>st</sup> Challenge Exp.

Group	D-5 (03-18)	D-4 (03-19)	D-3 (03-20)	D-2 (03-21)	D-1 (03-22)	D0 (03-23)	D1 (03-24)	D2 (03-25)	D3 (03-26)	D4 (03-27)	D5 (03-29)	D6 (03-30)
				Virus 감염 (1 head)		Virus Infected Pig 합사						
1	Negative control					Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab
2	1 <sup>st</sup> PGA Injection	2 <sup>nd</sup> PGA Injection	3 <sup>rd</sup> PGA Injection	4 <sup>th</sup> PGA Injection	5 <sup>th</sup> PGA Injection	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab
3	1 <sup>st</sup> PGA Injection	2 <sup>nd</sup> PGA Injection	3 <sup>rd</sup> PGA Injection	4 <sup>th</sup> PGA Injection	5 <sup>th</sup> PGA Injection	6 <sup>th</sup> PGA Injection Serum Oral swab	7 <sup>th</sup> PGA Injection Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab

표 3. 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 challenge 실험 schedule

- ◎ 구제역바이러스의 challenge후 매일 body temperature를 측정한 결과 표4에서 보는 바와 같이 control group을 포함한 모든 group의 pig 체온이 비슷한 경향으로 상승함을 확인하였음.

		3월23일	3월24일	3월25일	3월26일	3월27일	3월29일	3월30일
No. 1	Group 1	39.8	39.9	39.7	39.7	39.1	38.8	38.7
No. 2		39.8	40	39.8	40	39.4	38.7	38.7
No. 3	Group 2	40.1	39.3	39.6	36.9	dead		
No. 4		39.9	39.8	39.7	40.7	40.6	39/kill	
No. 5		40.1	39.9	39.7	39.5	40.5	40/kill	
No. 6	Group 3	39.6	39.8	39.4	39.6	39.5	38.8	39.1
No. 7		40.3	40.3(설사)	39.8	39.7	39.1	38.7	38.8
No. 8		40.4	40	39.6	39.8	39.1	38.8	38.9

표 4. 구제역바이러스 challenge 후의 체온변화

◎ 구제역바이러스의 challenge 후 각각 group의 pig로부터 serum 및 oral swab sample을 채취하여 그로부터 viral RNA를 추출하고, FMDV에 대한 specific primer로 real-time PCR를 수행한 결과 표5에서 보는 바와 같이 control group과 PGA로 근육투여한 group간의 virus titer 차이가 없었음.

Oral swab		3월23일	3월24일	3월25일	3월26일	3월27일	3월29일	3월30일
No. 1	Group 1		31.26					
No. 2			38.32					
No. 3	Group 2		36.98	27.46	26.75	23.75		
No. 4			41.20	39.20	26.15	28.94	25.44	
No. 5				32.12				
No. 6	Group 3		36.36				34.46	
No. 7			39.28					
No. 8				36.84				

Serum		3월23일	3월24일	3월25일	3월26일	3월27일	3월29일	3월30일
No. 1	Group 1							
No. 2								
No. 3	Group 2			34.19	27.53	25.79		
No. 4					29.11	31.15	29.12	
No. 5						38.78		
No. 6	Group 3							
No. 7								
No. 8								

표 5. 구제역바이러스 challenge 후의 구제역바이러스 titer

◎ 그림 16는 구제역바이러스의 challenge 후 5-6일 후에 pig에 나타난 임상증상 (수포등) 사진으로 control group과 PGA로 근육투여한 group간의 임상증상차이는 보이지 않았고, 비슷한 시기에 살처분이 되었음.



그림 16. 구제역바이러스 challenge 후 mini-pig의 임상증상

- ◎ 결과적으로 1<sup>st</sup> challenge test의 경우에는 control group과 PGA로 근육투여한 group간의 차이가 없었음. 즉, PGA에 투여에 의한 항-구제역바이러스 효능은 확인할 수 없었음.
- ◎ 고분자 폴리감마글루탐산의 *In vivo* 구제역바이러스 감염 억제 효능을 다시 한번 확인하기 위해 그림과 같은 *In vivo* 실험방법을 계획하였음.
  - ① 우선 생후 2개월령의 SPF mini-pig (이유자돈-약 10kg) 12 마리, 2% 폴리감마글루탐산 (PGA) 그리고 challenge virus로서 FMDV Andong strain을 준비함.
  - ② 상기의 방법과 동일한 transmission 방법을 infection 방법으로 사용하였음. 한 마리 mini-pig 발바닥에 10<sup>5</sup> titer의 Andong strain 100ul를 접종한 후 36-48시간뒤 증상이 나타나기 시작하면 다른 실험 group의 대상 mini-pig들과 한방에서 접촉을 18시간동안 유도하여 자연적인 virus의 transmission를 유도하고, ③ 접촉뒤 각각의 군을 나누어 증상, 혈청내 virus등을 측정한 후 증상에 따라 살처분하는 방식으로 실험이 진행되었음.
  - ④ 다음의 표에서와 같은 방법으로 control group과 PGA를 하루에 한번씩 3회 근육투여한 group 그리고 PGA를 하루에 한번씩 5회 근육투여한 group으로 나누어 FMDV Andong strain을 감염시킨 mini-pig와 합사시킨 후 각각 group의 pig로부터 serum, oral swab sample을 취하여 FMDV에 대한 specific primer로 real-time PCR를 수행하였고, 매일 body temperature를 측정함과 동시에 수포 및 물집과 같은 임상증상을 관찰하여 구제역바이러스 감염정도를 확인한 후 그 경중에 따라 살처분을 하였음.

● 2<sup>nd</sup> Challenge Exp.

Group	D-3 (05-09)	D-2 (05-10)	D-1 (05-11)	D0 (05-12)	D1 (05-13)	D2 (05-14)	D3 (05-15)	D4 (05-16)	D5 (05-17)	D6 (05-18)
	Virus 감염 (1 head)			Virus Infected Pig 합사						
1	Negative control			Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab
2	1 <sup>st</sup> PGA Injection	2 <sup>nd</sup> PGA Injection	3 <sup>rd</sup> PGA Injection	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab
3	1 <sup>st</sup> PGA Injection	2 <sup>nd</sup> PGA Injection	3 <sup>rd</sup> PGA Injection	4 <sup>th</sup> PGA Injection	5 <sup>th</sup> PGA Injection	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab

표 6. 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 challenge 실험 schedule

◎ 구제역바이러스의 challenge 후 매일 body temperature를 측정한 결과 표 7에서 보는 바와 같이 control group을 포함한 모든 group의 pig 체온이 비슷한 경향으로 상승함을 확인하였음.

		5월12일	5월13일	5월14일	5월15일	5월16일	5월17일	5월18일
No. 1	Group 1	40	39.2	39.4	40	39.5		
No. 2		40.3	38.9	39.7	39.4	40.7		
No. 3		40.4	39.7	39.5	38.9	39.5	40.5	
No. 4	Group 2	39.4	39.4	39.4	40.3	40		
No. 5		39.2	38.9	39	39.2	39.5	40	
No. 6		39.2	39.4	39.1	39	39.6	40.8	
No. 7		39	39.4	39.6	39.4	39	40.8	
No. 8	Group 3	40	39.7	39.3	40	40.5		
No. 9		39.5	39.2	39.2	38.3	39.4	39.4	40.5
No. 10		39.9	39.7	39.5	38.9	39.7	39.7	
No. 11		39.7	39.6	39.1	39.1	39.4	39.8	

표 7. 구제역바이러스 challenge 후의 체온변화

◎ 구제역바이러스의 challenge 후 각각 group의 pig로부터 serum 및 oral swab sample을 채취하여 그로부터 viral RNA를 추출하고, FMDV에 대한 specific primer로 real-time PCR를 수행한 결과 표 8에서 보는 바와 같이 1<sup>st</sup> test와는 다르게 PGA로 근육투여한 group의 virus detection이 control group 보다 약 1일 뒤에 detection이 되었음.

Oral swab		5월12일	5월13일	5월14일	5월15일	5월16일	5월17일	5월18일
No. 1	Group 1			42.84	28.72	29.47		
No. 2				26.21	24.12	27.96		
No. 3				29.00	28.97	27.70	25.45	
No. 4	Group 2			24.55	28.13	28.8		
No. 5					26.04	24.00	24.28	
No. 6					36.54	31.56	27.10	
No. 7					32.64	25.02	23.89	
No. 8	Group 3				31.58	28.72		
No. 9					42.61	44.95	32.56	29.9
No. 10					31.10	26.67	26.01	
No. 11				33.2	28.04	27.13	26.7	

Serum		5월12일	5월13일	5월14일	5월15일	5월16일	5월17일	5월18일
No. 1	Group 1			28.57	20.12	25.87/kill		
No. 2				28.66	26.86	20.96/kill		
No. 3				33.15	30.03	25.49	29.85/kill	
No. 4	Group 2			29.83	20.70	26.77/kill		
No. 5					32.51	30.32	24.28/kill	
No. 6					36.94	30.69	26.75/kill	
No. 7					28.42	26.40	33.64/kill	
No. 8	Group 3			29.72	28.00	23.55/kill		
No. 9					32.94	26.49	25.22	35.52/kill
No. 10					35.45	28.56	23.22/kill	
No. 11					30.09	24.07	26.06/kill	

표 8. 구제역바이러스 challenge 후의 구제역바이러스 titer

- ◎ 그림 17는 구제역바이러스의 challenge-후 5-6일 후에 pig에 나타난 임상증상 (수포등) 사진으로 real-time PCR 결과와는 무관하게 control group과 PGA로 근육투여한 group간의 임상증상적 차이는 보이지 않았고, 비슷한 시기에 수포가 발생을 하여 살처분을 하였음.
- ◎ 결과적으로 2<sup>nd</sup> challenge test의 경우에는 control group보다 PGA로 근육투여한 group의 oral swab 및 serum내 virus의 titer가 하루정도 늦게 detection되었으나 구제역바이러스의 증식 및 임상증상적 차이는 확인할 수 없었음. 이러한 결과로부터 PGA의 근육주사에 의해 유도되는 선천면역 증강효능이 구제역바이러스의 증식을 억제하기는 하지만 구제역바이러스의 빠른 증식력을 방어하기에는 약하다 사료됨.





그림 17. 구제역바이러스 challenge 후 mini-pig의 임상증상

- ◎ 세 번째 *In vivo* challenge test로서 고분자 폴리감마글루탐산의 *In vivo* 구제역바이러스 감염 억제 효능을 다시 한번 확인하기 위해 그림과 같은 *In vivo* 실험방법을 계획하였음.
- ① 생후 2개월령의 SPF mini-pig (이유자돈-약 10kg) 6 마리, 2% 폴리감마글루탐산 (PGA) 그리고 challenge virus로서 FMDV Andong strain을 준비함.
  - ② 상기의 방법과는 다르게 direct infection method를 사용하였음. 즉, 접촉에 의한 구제역바이러스의 전파와는 다르게 각각의 개체에 바이러스를 직접 접종하여 PGA에 의한 항-구제역바이러스 효능을 검증하고자 실험을 수행하였음. 개개의 mini-pig 발바닥에  $10^3$  titer의 Andong strain 100ul를 접종한 후 ③ 각각의 군별 pig의 증상, 혈청내 virus등을 측정한 후 증상에 따라 살처분하는 방식으로 실험이 진행되었음.
  - ④ 다음의 표에서와 같은 방법으로 control group과 PGA를 하루에 한번씩 2회 근육투여한 group으로 나누어 FMDV Andong strain을 감염시킨 후 serum, oral swab sample을 취하여 FMDV에 대한 specific primer로 real-time PCR를 수행하였고, 매일 body temperature를 측정함과 동시에 수포 및 물집과 같은 임상증상을 관찰하여 구제역바이러스 감염정도를 확인한 후 그 경중에 따라 살처분을 하였음.

● 3<sup>rd</sup> Challenge Exp.

Group	D-1 (08-05)	D0 (08-06)	D1 (08-07)	D2 (08-08)	D3 (08-09)
1	Negative control	Virus Infection	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab
2	1 <sup>st</sup> PGA Injection	2 <sup>nd</sup> PGA Injection - Virus Infection	Serum Oral swab	Serum Oral swab	Serum Oral swab

표 9. 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 challenge 실험 schedule

		8월05일	8월06일	8월07일	8월08일	8월09일
No. 1	Group 1	38.4	38.8	38.8	38.0 증상	39.5 Kill
No. 2		38.2	39.0	39.0	38.6 증상	40.2 Kill
No. 3		38.5	39.0	39.1	38.8 증상	39.9 Kill
No. 4	Group 2	37.9	38.7	38.5	38.5 증상	39.8 Kill
No. 5		37.9	39.0	38.5	38.7 증상	39.9 Kill
No. 6		39.2	39.0	38.9	39.9 증상	39.5 Kill

표 10. 구제역바이러스 challenge 후의 체온변화

- ◎ 구제역바이러스의 challenge 후 매일 body temperature를 측정한 결과 표 10에서 보는 바와 같이 control group을 포함한 모든 group의 pig 체온이 비슷한 경향으로 상승함을 확인하였음.
- ◎ 구제역바이러스의 challenge 후 각각 group의 pig로부터 serum 및 oral swab sample을 채취하여 그로부터 viral RNA를 추출하고, FMDV에 대한 specific primer로 real-time PCR를 수행한 결과 그림 18에서 보는 바와 같이 비슷한 양상으로 virus가 detection 되었음.

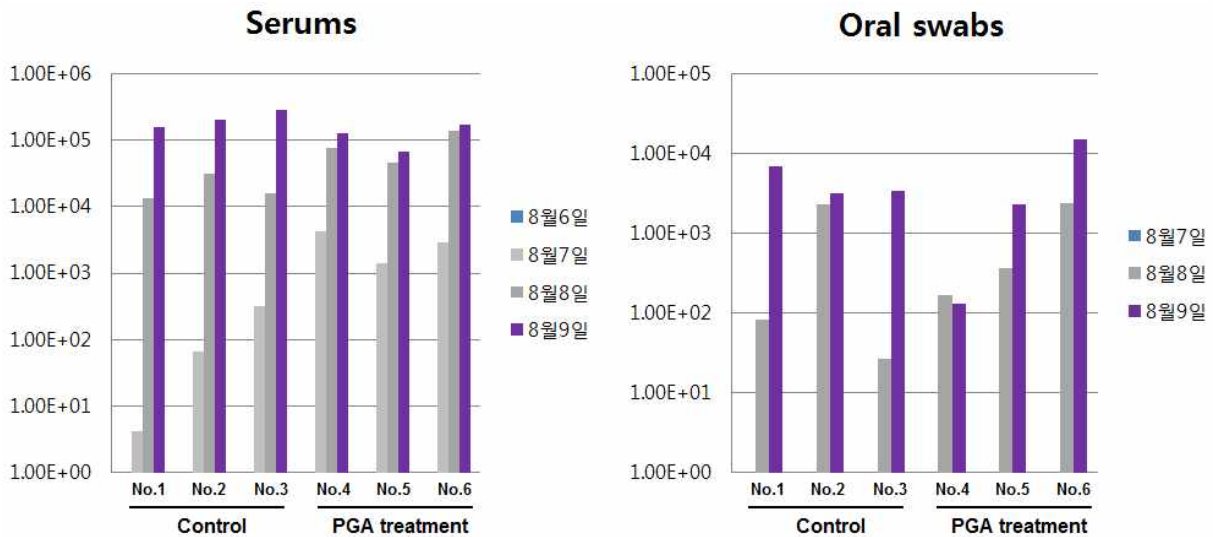


그림 18. 구제역바이러스 challenge 후의 구제역바이러스 titer

- ◎ 그림 19는 구제역바이러스의 challenge 후 5-6일 후에 pig에 나타난 임상증상 (수포등) 사진으로 control group과 PGA로 근육투여한 group간의 임상증상차이는 보이지 않았고, 비슷한 시기에 살처분이 되었음.

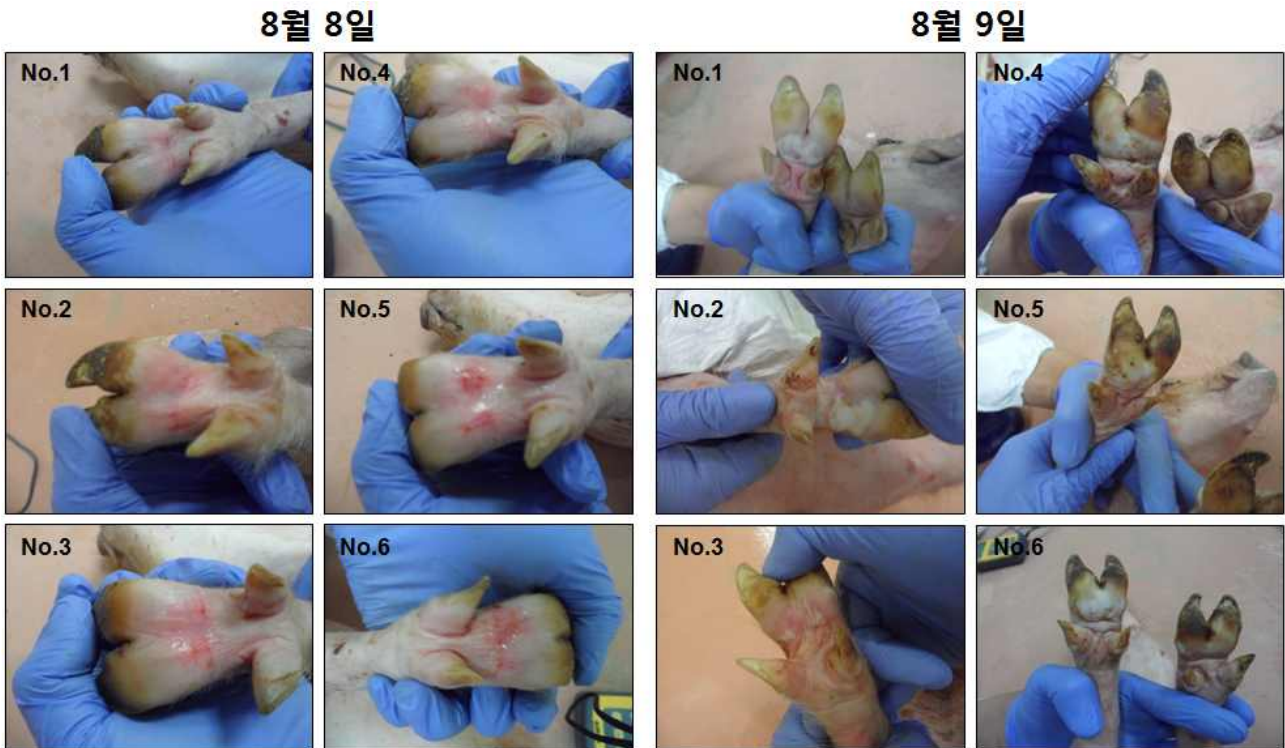


그림 19. 구제역바이러스 challenge 후 mini-pig의 임상증상

◎ 결과적으로 본 challenge test의 경우에는 control group과 PGA로 근육투여한 group간의 차이가 없었음. 즉, PGA에 투여에 의한 항-구제역바이러스 효능은 확인할 수 없었음.

◎ 실험결과에 대한 고려점

1. 본 구제역바이러스를 이용한 pig에서의 challenge test는 백신을 위해 준비된 challenge test로 면역증강제제를 위한 challenge test의 준비가 필요함 (Mini-pig의 가격에 의해서 다양한 조건의 test를 수행하지 못하였음)
2. 본 challenge test에서 사용한 안동 strain의 경우 high virulence strain으로 바이러스의 증식속도 및 전파등이 아주 강한 바이러스로 본 연구에서 사용한 고분자 폴리감마글루탐산의 선천면역 유도기능에 의해서는 방어 효능을 확인할 수 없었음.
3. 향후 구제역바이러스를 이용한 pig에서의 challenge test을 다양한 조건에서 수행할 계획임.

## 제 2 절 구제역바이러스 예방용 면역증강제제 제품화

### ◎ 폴리감마글루탐산 동물용의약품 주사제형 확립

◎ 동물용 의약품 폴리감마글루탐산의 최적 제형을 검토하기 위해 염종류에 따른 폴리감마글루탐산의 면역활성 및 항바이러스 활성을 분석한 결과, 폴리감마글루탐산칼륨이 TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$  및 항바이러스 활성이 타 제형과 비교하여 우수한 것을 확인함 (그림 20).

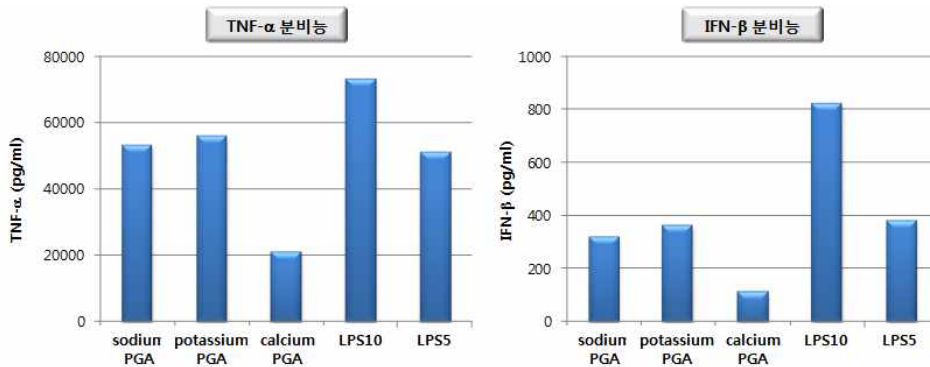


그림 20. 폴리감마글루탐산 제형별 면역활성 비교

### ◎ 폴리감마글루탐산 제품 생산공정 최적화 및 완제품 제조

◎ 동물용 의약품 폴리감마글루탐산은 바실러스 서브틸리스 청국장 균주를 액상발효한 후 순수 정제 공정을 거쳐 얻어지는 고형물을 용액화하여 제조함. 고순도의 액상 폴리감마글루탐산은 생산까지 총 7일이 소요되며, 1주일 단위 연속생산이 가능함 (그림 21).

: 원효의약품 생산은 (주)바이오리더스 생산시설을 이용하여 제조하고, 용액화 및 무균여과를 통한 주사제형 완제품생산은 (주)동방의 vGMP 제조시설을 이용함.

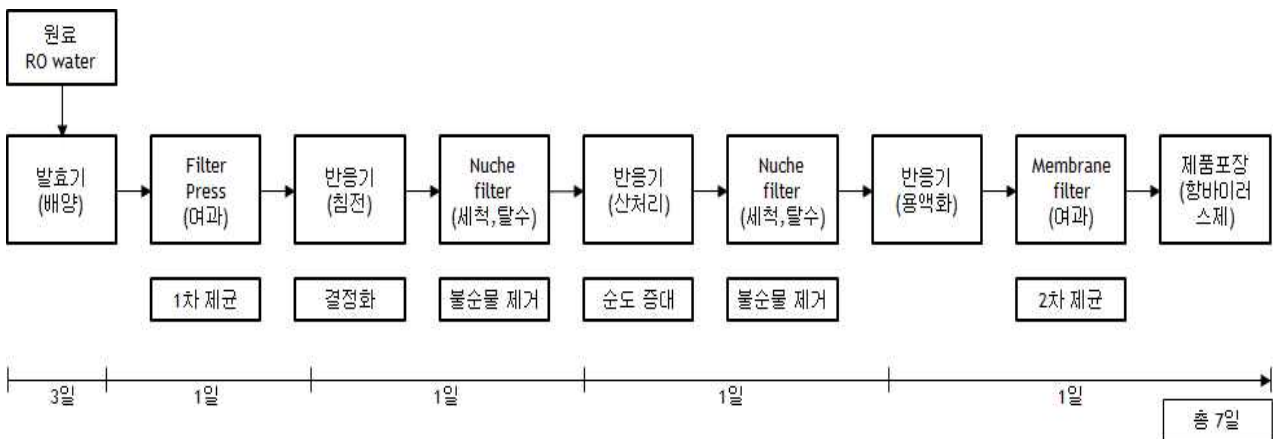


그림 21. 동물용 의약품 고순도 폴리감마글루탐산 액상 제형 생산공정

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

(그림 22).

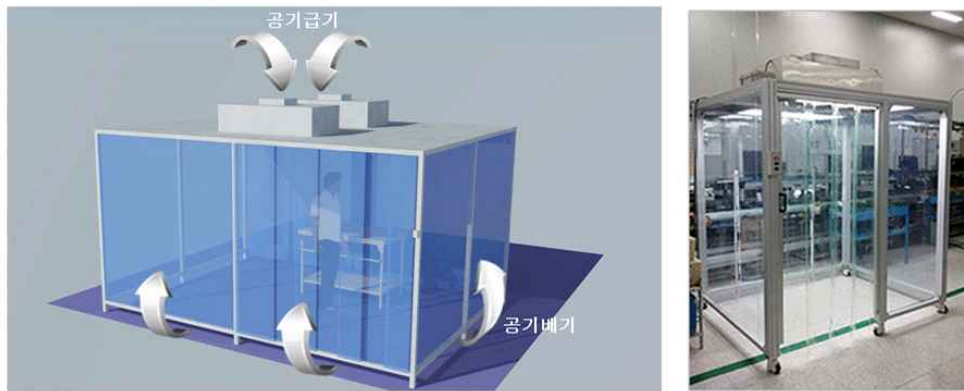


그림 22. 무균 상태 유지를 위한 크린부스 시스템

◎ 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 생산 제품의 안정적인 관리를 위해 0℃~4℃로 보관 가능한 cooling container를 비치하여 제품의 품질 유지가 가능함 (그림 23).



그림 23. 동물용 의약품 보관용 cooling container

◎ 폴리감마글루탐산의 동물용의약품 시제품 생산

◎ 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 최적 제형 검토를 통하여 검증된 제형으로 고순도 폴리감마글루탐산 생산공정 시스템으로 액상 제형의 시제품을 제조하였음 (그림 24).



그림 24. 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 시제품

◎ 생산된 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 완제제품은 규격뿐만 아니라 세부적인 분석을 수행하여 동물용 의약품 원료로써의 품질에 문제가 없음을 확인함 (표 3).

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

표 3. 동물용 의약품 폴리감마글루탐산 시제품 규격

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

(1) 폴리감마글루탐산 함량(정량) 분석을 위한 HPLC 분석법

○ 시험물질 약 1g을 정밀히 달아 물 100ml에 녹인 액을 시험용액으로 한다. 시험용액 일정량을 취하여 아래의 조작조건에 따라 액체크로마토그램법에 따라 시험한다.

① 표준액의 조제: 표준물질 100.0mg 취하여 0.1N NaOH 수용액에 녹여 표준원액 1% 용액을 제조한 후 이를 적절히 희석하여 표준액으로 사용함

② 조작: 검액 및 표준액 20 $\mu$ l를 취하여 다음 실험조건에서 액체크로마토그램법에 따라 시험함

<액체크로마토그램법의 조작조건>

- 검출기(detector) : 자외부흡광광도계 (측정파장 220nm)

- 컬럼(column) : 안지름 약 4.6mm, 길이 250mm인 스테인레스관에 5 $\mu$ m의 액체크로마토그래프용 옥타데실실릴화한 실리카 겔을 충전한다. [Shiseido capcellpak C18 UG120(6.0mm×250mm, ODS, Japan) 또는 이와 동등한 것]

- 이동상 : A 용매 - 20mM sodium phosphate monobasic (pH 7.0), 10N NaOH 수용액으로 조절), B 용매 - 5% acetonitrile 수용액

- 유속/온도/주입량 : 1.0ml/분, 35 $^{\circ}$ C, 20 $\mu$ l

- 농도구배 :

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

(3) HPLC 분석법 이용 폴리감마글루탐산 함량(정량) 분석

○ 표준검량선(Standard curve)의 제작

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

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

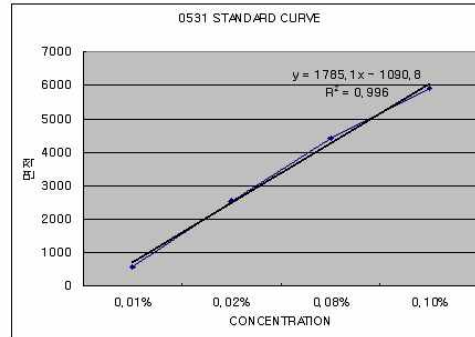


그림 25. 폴리감마글루탐산 검량선.

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

① 평균분자량 (GPC) 분석법 <액체크로마토그래프법의 조작조건>

- 검출기 : RI detector
- 컬럼 : Viscotek GMPWXL (7.6 mm ID X 300mm)
- 이동상 : 0.1 M NaNO<sub>3</sub> (pH 7.0)
- 유속 : 0.8 ml/분
- 온도 : 40 °C
- 주입량 : 100 ml

② 물질 분포 (FPLC) 분석법 <액체크로마토그래프법의 조작조건>

- 검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 215nm)
- 컬럼 : 안지름 약 70mm, 길이 600mm인 유리관에 47 um의 액체크로마토그래프용 Sephacryl S-500을 충전한다.
- 이동상 : 0.25M NaCl 또는 0.25M NH<sub>4</sub>Cl
- 유속 : 15 ml/분
- 온도 : 25 °C
- 주입량 : 3 ml

◎ 폴리감마글루탐산의 제형개발 및 제형별 기준 확립

(1) 일반기준 항목 설정

◎ 폴리감마글루탐산 동물용 의약품의 일반기준규격 설정을 위한 시험 항목 결정

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

◎ 폴리감마글루탐산 동물용 의약품 제품의 내부 시험성적서

**제품 시험 성적서 (내부)**

비이오리디스  
Tel. 042-934-7871/2  
Fax. 042-934-7870  
대전 유성구 영성로 359

제조일	2012. 04. 09
생산지	비이오리디스
Lot No.	FILD02095
시험일	2012. 04. 09

QA담당    QA중괄

상기 시험일에 관계에 대한 분석결과를 다음과 같이 보고합니다.

번호	항 목	분석 결과	비 고	분석자
1	제품 종류	solution		
2	A600	0.001		김미용
3	T600	99.0		
4	함량	22.3 mg/ml	HPLC method	
5	pH	6.70		
6	점도	480 cP	63 spindle, 60 rpm	
7	평균분자량 (kDa) [PD]	3000 kDa (B.3)		
8	일반생균수	not detected	5일 결과	
9	색도	92.0 -2.4, 2.0	L*a*b*	
10	endotoxin	26 EU/ml	LAL assay kit	
11	enterotoxin	측정 예정 (4월 3주)	Bacillus diarrhoeal enterotoxin visual immunoassay	
12	Anti-viral effect	98 % inhibition	0.025% 처리	서수경
13	IFN-β stimulation	LPS10 대비 49 %	Mouse IFN Beta ELISA (0.025% 처리)	김지연 서수경
14	TNF-α stimulation	LPS10 대비 3 %	Mouse TNF Alpha ELISA (0.005% 처리)	
15	중금속	N.D.		김미용
16	비소	N.D.		
17	강열잔분			

**제품 시험 성적서 (내부)**

제조일	2012. 04. 09
생산지	비이오리디스
Lot No.	FILD02095
시험일	2012. 04. 09

[TNF-α 면역활성 결과]

[IFN-β 면역활성 결과]

\*분석자: 서수경  
\*분석일: 04/13

**제품 시험 성적서 (내부)**

제조일	2012. 04. 09
생산지	비이오리디스
Lot No.	FILD02095
시험일	2012. 04. 09

[anti-viral effect] (0.025%)

2012/04/13 분석 결과  
[서수경]


(2) 기준 및 시험법 확립





◎ 동물용 의약품 원료 제품의 기준 및 시험법 확립



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

◎ 동물용 의약품 원료 제품의 제품성적서 (Certificate of analysis)







  
**BioLeaders Corporation**  
 559 Yongsan-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea  
 Tel : 042-994-7671/7672, Fax: 042-994-7670  
<http://www.bioleaders.com>

## Certificate of Analysis

**1. Product name : BLS-PGA solution**  
**2. Lot number : FILD0209S**  
**3. Manufacture date : April. 9. 2012**

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

Date: April. 16. 2012.

---

**Jae-Chul Choi**  
 Q/A  
 BioLeaders Corporation

◎ 바이러스 감염억제 활성검증 시험법 확립 및 시설 보안

1) 항바이러스 활성 분석법 확립

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

2) 대식세포를 이용한 TNF- $\alpha$  cytokine 분비 활성 분석법 확립

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

3) 대식세포를 이용한 IFN- $\beta$  cytokine 분비 활성 분석법 확립

- ◎ cell line : RAW264.7 macrophage cell line
- ◎ 원리 :  $\gamma$ -PGA를 처리한 Raw cell 264.7에서 분비되는 IFN- $\beta$  측정
- ◎ 측정방법
- ① 24 well plate에 1well 당  $2 \times 10^5$  cell (in 500  $\mu$ l DMEM media) 준비  
\*DMEM media 구성 : DMEM + 10% FBS + antibiotic/anti-mycotic
- ② 16시간 후 PGA을 FBS가 없는 DMEM로 0.025%로 희석하여 Plate에 처리

- ③ 9시간 incubation
- ④ 상층액을 centrifuge (13000rpm, 10min) 후 상층액 확보
- ⑤ IFN- $\beta$  ELISA 수행 (Mouse IFN beta ELISA Kit, PBL 42400-1)

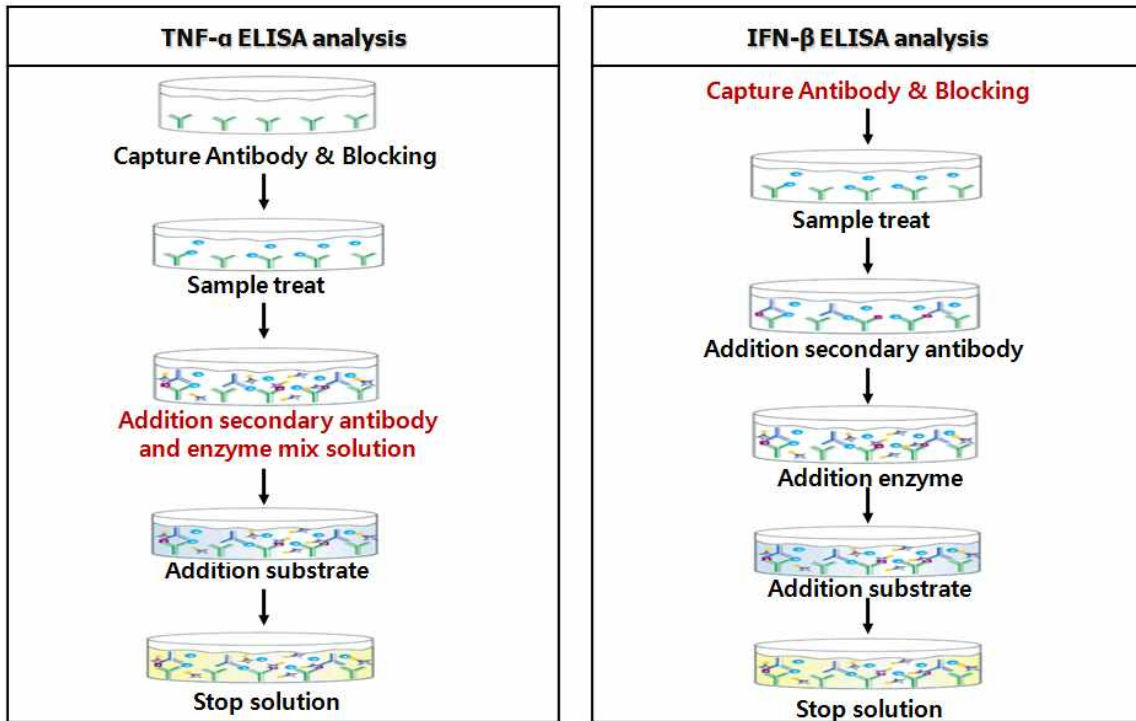


그림 26. TNF- $\alpha$  및 IFN- $\beta$  ELISA 분석 모식도

◎ 폴리감마글루탐산의 독성 시험

가. 마우스와 비글견을 이용한 근육주사 독성 시험

(1) 마우스를 이용한 근육주사 독성 시험

- ICR계 마우스에서 폴리감마글루탐산의 급성독성을 알아보기 위하여 암·수 마우스에 2,000 mg/kg를 1회 근육 주사하였다. 음성대조군에는 생리식염수를 1 mL/kg 주사하였다. 관찰기간 동안 시험물질 투여에 기인한 치사동물 및 일반 중독증상은 관찰되지 않았음. 시험물질 투여 후 체중은 음성대조군 및 시험군에서 시간경과에 따라 정상적인 증가하였다. 부검결과 육안적인 이상소견은 관찰되지 않았음.
- 따라서 폴리감마글루탐산을 ICR계 마우스에 1회 근육 주사한 결과, 2,000 mg/kg에서 급성독성이 관찰되지 않았으므로 폴리감마글루탐산의 LD<sub>50</sub>은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 판단됨.

(2) 비글견을 이용한 근육주사 독성 시험

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

- 따라서 폴리감마글루탐산을 비글견에 1회 근육 주사한 결과, 1000 mg/kg에서 급성독성이 관찰되지 않았으므로 폴리감마글루탐산의 LD<sub>50</sub>은 1000 mg/kg 이상인 것으로 판단됨.

## 나. 랫트와 토끼를 이용한 생식독성(최기형성) 시험

### (1) 랫트를 이용한 생식독성(최기형성) 시험

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

### (2) 토끼를 이용한 생식독성(최기형성) 시험

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

## 3. 폴리감마글루탐산의 약리, 잔류, 대사 시험

- 폴리감마글루탐산을 근육주사 투여 방법을 이용하여 마우스에 투입한 후에, 6시간, 1일, 3일,

7일, 14일이 경과한 후에 폴리감마글루탐산의 생체 내 장기별 분포를 분석함으로써, 체내에서의 대사거동을 분석함 : 근육주사 마우스 15마리 (시간별 3마리) x 4개의 장기 (간, 비장, 폐, 신장)

- 투여된 폴리감마글루탐산의 정량분석을 위해, 폴리감마글루탐산에 Gd 성분을 부착함으로써, ICP-MS(Inductivity Coupled Plasma Mass Spectrometer, X-series, Thermo Elemental, 한국기초과학지원 연구원 환경과학연구부)를 이용하여 정량화 가능, 투여 방법은 근육주사로 함.
- 근육주사로 투입된 폴리감마글루탐산을 6시간, 1일, 3일, 7일, 14일이 경과한 후에 4개의 장기 (간, 비장, 폐, 신장)를 적출한 후, 건조하고, 건조된 각각의 장기를 ICP-MS를 이용하여 폴리감마글루탐산의 정량 분석 실시.

○ **시험결과를 요약하면,**

- 폴리감마글루탐산(분자량 6000kDa)을 대상으로 마우스에, 근육주사를 통하여 투여한 결과, 일반 중독 증상은 관찰되지 않았음.
- 근육주사를 통하여 투여하였을 때, 모든 장기에서의 이상 소견은 발견되지 않았음.
- 근육주사를 통하여 투여하였을 때, 간, 비장, 폐, 신장에서의 건조된 각 장기의 무게를 기준으로 Gd 이온의 농도를 ICP-MS를 이용하여 측정하였음.
- 근육주사 전에 폴리감마글루탐산에 부착되어 있는 Gd 의 농도를 ICP-MS를 이용하여 측정 한 결과 약 24 %의 부착률을 확인하였음.
- 이러한 분석결과를 바탕으로, 근육주사에 시간에 따른 각 장기에 분포하는 폴리감마글루탐산의 양을 정량화 할 수 있었음.
- 근육주사를 통하여 마우스내에 도입된 폴리감마글루탐산은 초기에 대부분이 간에 축적되었으며, 2주동안 관찰결과, 시간에 따라 간에 축적된 양이 점점 감소하는 경향을 보였다. 비장과 폐에서도 비슷한 경향이 관찰되었음.
- 근육주사를 통하여 마우스에 도입된 폴리감마글루탐산이 시간에 따라서, 신장을 통하여 배출되는 꾸준히 배출되는 것을 ICP-MS를 통하여 확인할 수 있었으며, 시간에 따라서 배출되는 양이 점점 감소되는 경향을 통하여, 체내의 간, 비장, 폐 등에 축적되었던 폴리감마글루탐산이 생체 내의 대사작용이나 분해에 의해 신장을 통하여 배출된다는 것을 확인할 수 있었음.

### 제 3 절 폴리감마글루탐산의 현장적용 기술

#### 1. 구제역 백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 백신효능 증강 시험

- 고분자 폴리감마글루탐산의 구제역 백신 접종에 대한 면역반응 증가 효능을 검사하기 위하여 3차례 구제역백신과의 병용투여에 의한 항구제역바이러스 항체를 경기도축산위생연구소에서 FMDV ELISA를 수행하여 확인하였음.
- 1차실험으로 약 120일령의 돼지 40두를 대상으로 다음과 같은 group를 나누어 실험을 수행함.
  - ① 대조군 (구제역백신 단독투여군) - 10두
  - ② 구제역백신 투여 3일전 폴리감마글루탐산 투여군 - 10두
  - ③ 구제역백신과 폴리감마글루탐산의 동시투여군 - 10두
  - ④ 구제역백신 투여 3일후 폴리감마글루탐산 투여군 - 10두
- 투여 2주후 모든 군에서의 돼지 혈청을 채취하여 FMDV ELISA를 수행한 후 구제역 항체 양성율을 확인한 결과 그림-에서 보는 바와 같이 대조군 즉 구제역백신을 단독투여한 군의 돼지들 보다 폴리감마글루탐산을 병용투여한 군의 돼지들에서 보다 높은 항체생성율을 확인하였음. 특히, 구제역백신 투여 3일전 폴리감마글루탐산 투여군에서 항체생성율이 보다 높게 확인되었음.

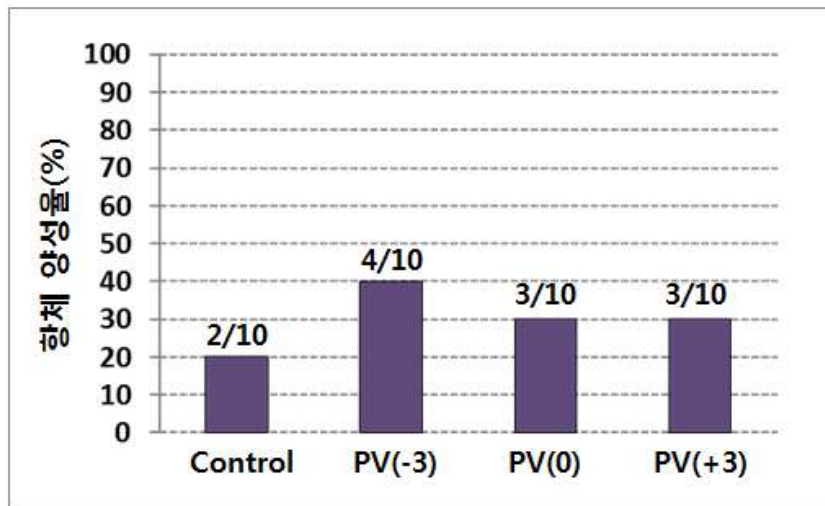


그림 27. 구제역백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 항체생성을 검증

- 2차실험으로 약 100일령의 돼지 40두를 대상으로 다음과 같은 group를 나누어 실험을 수행함.
  - ① 대조군 (구제역백신 단독투여군) - 10두
  - ② 구제역백신 투여 3일전 폴리감마글루탐산 투여군 - 10두
  - ③ 구제역백신과 폴리감마글루탐산의 동시투여군 - 10두
  - ④ 구제역백신 투여 3일후 폴리감마글루탐산 투여군 - 10두
- 투여 4주후 모든 군에서의 돼지 혈청을 채취하여 FMDV ELISA를 수행한 후 구제역 항체 양성율을 확인한 결과 그림-에서 보는 바와 같이 대조군 즉 구제역백신을 단독투여한 군의 돼지들 보다 폴리

감마글루탐산을 병용투여한 군의 돼지들에서 보다 높은 항체생성율을 확인하였음. 특히, 구제역백신 투여 3일전 폴리감마글루탐산 투여군에서 항체생성율이 보다 높게 확인되었음.

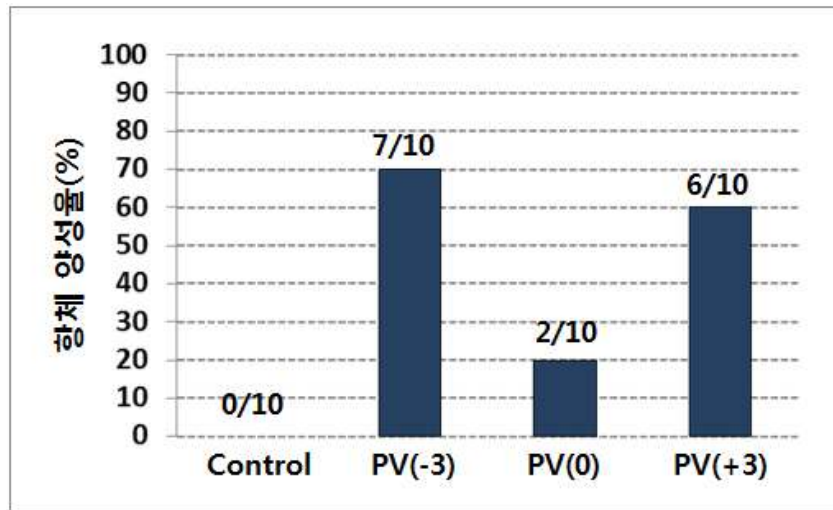


그림 28. 구제역백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 항체생성을 검증

○ 3차실험으로 약 140일령의 돼지 96두를 대상으로 다음과 같은 group를 나누어 실험을 수행함.

- ① 대조군 (구제역백신 단독투여군) - 25두
- ② 구제역백신 투여 3일전 폴리감마글루탐산 투여군 - 21두
- ③ 구제역백신과 폴리감마글루탐산의 동시투여군 - 23두
- ④ 구제역백신 투여 3일후 폴리감마글루탐산 투여군 - 27두

○ 투여 8주후 모든 군에서의 돼지 혈청을 채취하여 FMDV ELISA를 수행한 후 구제역 항체 양성율을 확인한 결과 그림-에서 보는 바와 같이 대조군 즉 구제역백신을 단독투여한 군의 돼지들 보다 폴리감마글루탐산을 병용투여한 군의 돼지들에서 보다 높은 항체생성율을 확인하였음. 특히, 구제역백신 투여 3일전 폴리감마글루탐산 투여군에서 항체생성율이 보다 높게 확인되었음.

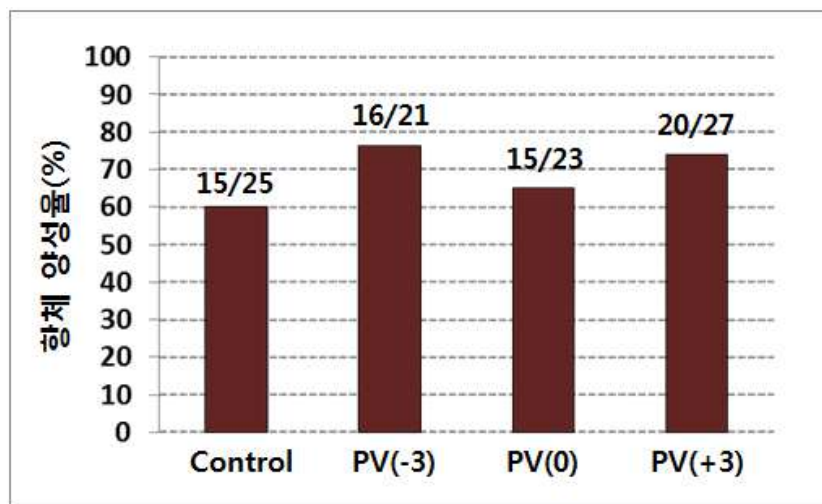


그림 29. 구제역백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 항체생성을 검증

○ 결과적으로 폴리감마글루탐산(rPGA)를 구제역백신과 병용투여하였을 경우 구제역백신과

단독투여시 보다 높은 항체가를 유도할 수 있었음. 특히, 구제역백신 투여 3일전 폴리감마글루탐산 투여군에서 항체생성율이 보다 높게 확인되었음.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발목표의 달성도

세부연구목표		달성도 (%)	연구개발 수행내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 억제 효능 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 구제역바이러스 억제 효능 검증 (<i>In vitro, In vivo</i>)</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 마우스 면역세포의 구제역바이러스 억제효능 검증</li> <li>● 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지 면역세포의 구제역바이러스 억제 효능 검증</li> <li>● 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 돼지 면역세포의 상등액을 이용한 상피세포에서의 구제역바이러스 억제 효능 검증</li> <li>● 고분자 폴리감마글루탐산의 <i>In vivo</i> 구제역바이러스 감염 억제 효능 검증</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 선천성 면역증강 효과 검증 및 기전 연구</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위한 <i>In vitro</i> 마우스 면역세포 자극실험 연구</li> <li>● 형광물질 (GFP)이 융합된 RNA 바이러스들을 이용한 폴리감마글루탐산의 감염 억제 연구 (<i>In vitro</i>)</li> <li>● 폴리감마글루탐산으로 자극시킨 마우스 면역세포의 상등액을 이용한 상피세포에서의 형광물질 (GFP)이 융합된 RNA 바이러스 억제효능 검증</li> <li>● 폴리감마글루탐산의 면역활성 효과 검증을 위한 <i>In vitro</i> 돼지 면역세포 자극 연구</li> <li>● 폴리감마글루탐산의 면역활성 효능 검증에 대한 연구 결과를 Antiviral Research (IF 4.4) 논문에 게재하였음.</li> </ul>

	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
● 구제역바이러스 예방용 면역증강제 제품화	◎ 일반 기준 규격, 시험법 및 자체 설정 (분자량 및 함량측정법등) 규격 연구	100%	◎ 일반 기준 규격, 시험법 및 자체 설정 (분자량 및 함량 측정법 등) 규격 확립
	◎ 폴리감마글루탐산 제형 확립	100%	◎ 동물용 의약품 폴리감마글루탐산의 최적 제형을 검토하기 위해 염종류에 따른 폴리감마글루탐산의 면역활성 및 항바이러스 활성을 분석
	◎ 폴리감마글루탐산 제품 생산공정 최적화	100%	◎ 동물용 의약품을 위한 고순도의 액상 폴리감마글루탐산의 생산 공정 최적화
	◎ 폴리감마글루탐산의 동물용의약품 시제품 생산	100%	◎ 고순도 폴리감마글루탐산 생산공정 시스템으로 액상 제형의 시제품을 제조
	◎ 일반기준규격, 시험법 및 자체규격 (분자량 측정) 확립	100%	◎ 폴리감마글루탐산 동물용 의약품의 일반기준규격 설정을 위한 시험 항목 결정, 내부 시험성적서, 시험법 확립, 제품성적서 (Certificate of analysis) 결정
	◎ 바이러스 감염억제 활성 검증 시험법 확립 및 시설 보안	100%	◎ 항바이러스 활성 분석법 확립 ◎ 바이러스 감염억제 활성검증 시험법 확립 및 시설 보안
	◎ 폴리감마글루탐산의 안전성 시험	100%	◎ 국소독성시험으로 토끼를 이용하여 피부자극시험, 2주간 연속피부자극성 시험, 안자극시험을 시험 ◎ 면역독성시험으로 기니피그를 이용하여 광감작시험과 피부감작성시험 ◎ 광독성시험
	◎ 폴리감마글루탐산의 독성 시험	100%	◎ 마우스와 비글견을 이용한 근육주사 독성시험 ◎ 랫트와 토끼를 이용한 생식독성(최기형성) 시험
◎ 폴리감마글루탐산의 약리, 잔류, 대사 시험	100%	◎ ICP-MS를 이용한 체내에서 Gd이 부착된 폴리감마 <sup>®</sup> 의 정량화를 통한 잔류 및 대사시험 수행	

세부연구목표		달성도 (%)	연구개발 수행내용
● 바이오폴리머의 면역유도 및 현장 적용 기술	● 구제역 백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여에 의한 백신효능 증강 시험	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎ 구제역 백신과 폴리감마글루탐산의 병용투여 (백신투여전 투여, 동시투여, 백신투여후 투여)에 의한 백신의 항체양성을 측정해 의한 효능 증강 시험</li> <li>◎ 폴리감마글루탐산의 면역보보제로서의 역할 검증에 대한 연구 결과를 Veterinary Microbiology (IF: 3.12)에 게재하였음.</li> </ul>

## 제 2 절 관련분야의 기술발전의 기여도

- ◎ 동물의 질병 억제를 위한 동물의 선천 면역 증강 유도 방법은 병원체의 다양한 변이와 병원체에 대한 지속적인 기술 개발의 요구를 새로운 방법으로 해결할 수 있는 방법으로 전 세계적으로 다양한 바이러스 질병 예방 및 퇴치를 위해 시도되고 있음.
- ◎ 특히 TLRs은 병원체를 인식하는 최첨단의 세포 방어 molecules 이며 이를 이용한 새로운 agonist의 개발은 직접적인 면역 유도 증강은 물론 새로운 백신의 효능 증강을 위해서 연구되어지고 있고, 기술의 개발은 다양한 활용성이 있음.
- ◎ 본 연구의 폴리감마글루탐산은 *Bacillus subtilis*가 분비하는 고분자 biopolymer 로서 TLR 4를 매개로 하는 특이 작용 및 이를 이용한 면역 증강 효과 그리고 항바이러스 효과를 본 연구진이 세계 최초로 규명하였고, 다양한 동물의 바이러스성 질병에 적용하고자 하였으며 특히 우리나라에 큰 피해를 일으키고 있는 인플루엔자, 돼지생식기호흡기증후군 바이러스에 대해서는 그 효과가 입증되어 구제역바이러스에 적용될 수 있는지를 확인하였음.
- ◎ 본 연구는 폴리감마글루탐산의 면역 활성화 유도능을 다시 한 번 확인하였으며 특히, 돼지 면역세포에 대한 선천면역 유도능을 확인한 연구성과는 폴리감마글루탐산을 이용하여 다양한 돼지의 소모성, 바이러스성 질병에 대한 면역증강제제 개발의 기초가 될 수 있음.
- ◎ 본 폴리감마글루탐산에 의한 구제역바이러스의 감염 억제 연구 결과는 비록 In vivo challenge 시험에서 구제역바이러스의 high virulence와 증식속도 그리고 선천면역 물질에 대한 challenge 시험 protocol의 부재에 의해서 그 효능을 확인할 수 없었으나 In vitro 연구에서는 폴리감마글루탐산의 자극에 의해 유도된 돼지 면역세포에서 분비된 면역활성 molecules에 의해 자극을 받은 상피세포들이 구제역바이러스의 감염 및 증식을 억제시킬 수 있음을 확인하였음. 이러한 결과는 향후 면역증강제제들을 이용한 구제역 예방제제 개발

에 있어 참고가 될 수 있음. 특히, 선천면역 물질에 대한 challenge 시험 protocol의 개발을 위해서 참고가 될 수 있음.

- ◎ 본 연구에 의해 개발된 폴리감마글루탐산의 제형화 및 제제화 개발 연구결과들은 낮은 생산비용, 안정성 및 사양이 용이하고 비용이 저렴한 이점들을 가지고 있어 바이오폴리머제제의 개발에 있어 경제적 이점을 갖고 있음.
- ◎ 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능 검증 및 대량생산, 제품화 기술개발은 첨단 바이오 소재개발을 위한 범용기반 기술로 자리 잡을 수 있을 것으로 판단되며 첨단 바이오소재 산업에 다양한 접근방법을 제공함으로써 바이오소재 산업의 다변화 및 신규 응용 상품의 개발을 통한 바이오산업 전반의 활성화에 기여할 수 있음
- ◎ 대단위의 산업동물의 면역유도를 통한 바이오폴리머제제의 개발은 투여 방법의 개선 및 사양관리의 용이성으로 인해 산업적으로 큰 경제적 이익을 추구할 수 있음 또한 제형에 따른 효능 효과에 차이로 인해 신물질의 적용 제형 개발에 활용할 수 있음.
- ◎ 연구개발의 결과로 생산되는 항바이러스 억제제 제품의 제품화는 국내 동물약품회사의 매출증대에 기여함은 물론, 국내자원을 이용한 안정적인 공급량 확보로 수입동물약품에 비해 경제적 측면에서 양계농가의 부담을 덜어줄 수 있으며, 동물약품의 수입대체 효과 및 해외 수출을 통한 국부창출이라는 이중 효과를 거둘 것으로 기대됨.
- ◎ 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 바이러스 감염에 대한 억제제 제품화 기술개발은 바이오 소재를 이용한 동물용 의약품의 제형 개발기술 노하우를 축적시킬 수 있는 계기가 될 것으로 기대됨.
- ◎ 본 연구 개발 결과 및 노하우는 가금이외 더 나아가 축산을 비롯한 인간의 면역을 증강시키기 위해 활용할 수 있는 기술을 확립함으로써 이 분야에 대한 국제경쟁력 강화 및 고부가가치의 생명과학산업 및 바이오벤처산업의 육성 및 활성화를 이룰 수 있음.
- ◎ 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산을 이용한 바이러스 감염에 대한 억제제 개발기술은 종래의 백신제형과 다르게 투여가 용이하도록 제형의 개발을 통한 효능의 극대화를 이룰 수 있고, 바이러스등의 병원체 감염을 직접적으로 방어할 수 있는 인터페론과 연관된 innate 면역체계를 동원함으로써 기존의 백신 및 예방제와는 효능 면에서도 차이를 나타낼 수 있고 그 성과를 기대할 수 있는 기술로 축산분야에 많은 기여를 할 것이라 기대됨.

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 실용화 · 산업화 계획

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

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	150	300	450	600	900	
경제적 파급효과	300	500	1000	2000	3000	
부가가치 창출액						
합 계	450	800	1450	2600	3900	

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

- ※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- ※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

- 산출근거
  - : 우제류 1500만두 기준으로 5% 산정 - 75만두
  - : 구제역 예방제제 2000원/두

## 제 2 절 교육 · 지도 · 홍보 등 기술확산 계획 등

- 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 항바이러스 효능은 바이러스를 직접 target으로 하는 다른 여러 항바이러스 물질이나 백신과는 달리 체내의 면역계를 증가시킴으로 인한 바이러스 감염억제의 개념이므로 본 과제에서 제시하는 기술개발은 가축에 있어서의 다양한 바이러스성 질병 및 소모성질병들을 예방, 관리하기 위한 중요 기술로 활용될 수 있음.
- 상기의 기술은 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산의 바이러스 감염억제 효능을 확인한 후, 기술의 특허출원 및 제품화에 그 목적이 있고, 산업화를 위해서 국내의 동물약품회사인 (주)동방을 통하여 상품화로 농가에 보급될 수 있도록 추진할 계획에 있음.
- 또한, 상기의 기술에 의한 바이러스 감염 억제제는 백신으로의 접목뿐 만아니라 사료를 통한 가축으로의 전달로 농장에 직접 보급, 전달되어 다양한 질병의 예방에 적용될 수 있음
- 본 기술은 축산에의 적용이외에 궁극적으로 인간의 다양한 질병을 예방하기 위해 활용될 수 있는 기술임

### ● 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

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

## 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

### 1. 연구성과목표

(단위 : 건수)

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

\* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

## 2. 특허

- ① Composition for Stimulating Immune Response Containing Poly-g-glutamic acid. Nov. 2011. JAPAN Patent Registration [Patent No. JP4860109].
- ② Composition for Adjuvant Containing Poly-g-glutamic acid. Jan. 2013. China Patent Registration [Patent No. ZL 200580048734.6].

## 3. 연구논문

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

## 제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

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

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

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 7 장 연구시설·장비 현황

- 본 연구과제를 수행하면서 새로 구입한 연구시설 및 장비는 없음

### 제 8 장 참고문헌

1. Bae, R.S., Park, C., Choi, J.C., Poo, H.Y., Kim, C.J., Sung, H.S. 2010. Effects of Ultra high Molecular Weight Poly-glutamic Acid from *Bacillus subtilis* (chungkookjang) on corneal wound healing. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(4): 803-808.
2. Fenton, M.J., and Golenbock, D.T. 1998. LPS-binding proteins and receptors. *J. Leukoc. Biol.* 63:25-32.
3. Hailman, E., Lichenstein, H.S., Wurfel, M.M., Miller, D.S., Johnson, D.A., Kelley, M., Busse, L.A., Zukowski, M.M., Wright, S.D., 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* 179:269-277.
4. Ali, H.A., Sawada, T., Hatakeyama, H., Ohtsuki N., Itoh, O. 2004. Characterization of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology* 100:43-53.
5. Azim A.C., Cao H., Gao X., Joo M.S., Malik A.B., Breemen R.B., Sadikot R.T., Park G.Y., and Christman J.W. 2007. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by small GTPase Rac2 in bone marrow macrophages. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 293:L668-L673.
6. Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi, P.S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42: 145-151.



7. Jarasvech Chinsangaram, Maria E. Piconne, Marvin J. Grubman. 1999. Ability of Foot-and-Mouth Disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/Beta interferon. *Journal of Virology* 73(12):9891-9898.
8. Reinhard Ahl and Annegret rump. 1976. Assay of bovine interferons in cultures of the porcine cell line IB-RS-2. *Infection and Immunity* 14(3):603-606.
9. Hongmei Wang, Xiao Liu, Jianming Wu, Gang Wu, Li Yu, Chenqiang He, Huiting Yang, Weixin Xie, Xianzhu Xia, Hongbin He. 2013. Bovine fetal epithelium cells expressing shRNA targeting viral VP1 gene resisted against foot-and-mouth disease virus. *Virology* 439:115-121.
10. Eva Perez-Martin, Marcelo Weiss, Fayna Diaz-San Segundo, Juan M. Pacheco, Jonathan Arzt, Marvin J. Grubman, Teresa de los Santos. 2012. Bovine Type III interferon significantly delays and reduces the severity of Foot-and-Mouth Disease in cattle. *Journal of Virology* 86(8):4477-4487.
11. Jie Yeun Park, Hyun Soo Kim, Sang Heui Seo. 2008. Characterization of interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Porcine dendritic cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(10):1709-1716.
12. Su-Mi Kim, Jong-Hyeon Park, Kwang-Nyeong Lee, Se-Kyung Kim, Young-Joon Ko, Hyang-Sim Lee, In-Soo Cho. 2012. Enhanced inhibition of Foot-and-Mouth disease virus by combinations of porcine interferon- $\alpha$  and antiviral agents. *Antiviral Research* 96:213-220.
13. Dang Wang, Liurong Fang, Kui Li, Huijuan Zhong, Jinxiu Fan, Chao Ouyang, Huan Zhang, Erzhen Duan, Rui Luo, Zhongming Zhang, Xiangtao Liu, Huanchun Chen, Shaobo Xiao. 2012. Foot-and-Mouth Disease virus 3C protease cleaves NEMO to impair innate immune signaling. *Journal of Virology* 86(17):9311-9322.
14. Bo Hu, Chang Li, Huijun Lu, Zhanbo Zhu, Shouwen Du, Ming Ye, Lei Tan, Dayong Ren, Jiali Han, Shifu Kan, Jing Wang, Ningyi Jin. 2010. Immune responses to the oral administration of recombinant *Bacillus subtilis* expressing multi-epitopes of Foot-and-Mouth Disease virus and a cholera toxin B subunit. *Journal of Virological Methods* 171(1):272-279.
15. Jarasvech Chinsangaram, Marla Koster, Marvin J. Grubman. 2001. Inhibition of L-Deleted Foot-and-Mouth Disease Virus Replication by Alpha/Beta Interferon Involves Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase. *Journal of Virology* 75(12):5498-5503.

16. Yu-Tang Peng, Hso-Chi Chaung, Hsiu-luan Chang, Hsueh-Chen Chang, Wen-Bin Chung. 2008. Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology* 136(3-4):359-365.
17. Jarasvech Chinsangaram, Mauro P. Moraes, Marla Koster, Marvin J. Grubman. 2003. Novel viral disease control strategy: Adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from Foot-and-Mouth Disease. *Journal of Virology* 77(2):1621-1625.
18. Ronan Kapetanovic, Lynsey Fairbairn, Dario Beraldi, David P. Sester, Alan L. Archibald, Christopher K. Tuggle, David A. Hume. 2012. Pig bone marrow-derived macrophages resemble human macrophages in their response to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Immunology* 188(7):3382-3394.
19. Laurence Guzylack-Piriou, Fabio Bergamin, Markus Gerber, Kenneth C. McCullough, Artur Summerfield. 2006. Plasmacytoid dendritic cell activation by Foot-and-Mouth Disease virus requires immune complexes. *European Journal of Immunology* 36(7):1674-1683.
20. Yimei Cao, Zengjun Lu, Yanli Li, Pu Sun, Dong Li, Pinghua Li, Xingwen Bai, Yuanfang Fu, Huifang Bao, Chunxue Zhou, Baoxia Xie, Yingli Chen, Zaixin Liu. 2013. Poly(I:C) combined with multi-epitope protein vaccine completely protects against virulent Foot-and-Mouth Disease virus challenge in pigs. *Antiviral Research* 97(2):145-153.
21. Søren Kamstrup, Tine Holland Frimann, Annette Malene Barfoed, 2006. Protection of Balb/c mice against infection with FMDV by immunostimulation with CpG oligonucleotides. *Antiviral Research* 72:42-48.
22. Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin P., Mann, N., Mudd S. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743-748.
23. Iliev, D.B., Roach J.C., Mackenzie, S., Planas, J.V., and Goetz F.W. 2005. Endotoxin recognition: in fish or not in fish? *FEBS Lett.* 579: 6519-6528.
24. Kagan, J. C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov. 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon. *Nat.*

*Immunol.* 9:361–368.

25. Kaiser, MG., Cheeseman, JH., Kaiser,P., and Lamont, SJ. 2005. Cytokine Expression in Chicken Peripheral Blood Mononuclear Cells after In Vitro Exposure to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poultry Science* 85:1907–1911.
26. Kim T.W., Lee T.Y., Bae H.C., Hahm J.H., Kim Y.H., Park C., Kang T.H., Kim C.J., Sung M.H., Poo HY. 2007. Oral administration of high molecular mass poly- $\gamma$ -glutamate induces NK cell-mediated antitumor immunity. *Journal of Immunology* 179:775–780.
27. Lee T.Y., Kim Y.H., Yoon S.W., Choi J.C., Yang, J.M., Kim C.J., Schiller J.T., Sung M.H., Poo H.Y. 2009. Oral administration of poly- $\gamma$ -glutamate induces TLR4-and dendritic cell-dependent antitumor effect. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 58(11):1781–1794.
28. Moon, H.J., Lee J.S., Choi, Y.K., Park, J.Y., Talactac, M.R., Chowdhury, M.Y.E., Poo, H.Y., Sung, M.H., Lee, J.H., Jung, J.A., and Kim, CJ. 2012. Induction of Type I interferon by high molecular poly- $\gamma$ -glutamate protects B6.A2G-*Mx1* mice against influenza A virus. *Antiviral Research* 10:1016.
29. Palsson-McDe rmott, E. M., and L. A. O’Neill. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113:153–162.
30. Poo, H.Y., Park, C., Kwak, M.S., Choi, D.Y., Hong, S.P., Lee, H.H., Lim, Y.T., Choi, Y.K., Bae, S.R., Uyama, H., Kim, C.J., Sung, M.H. 2010. New biological Functions and Applications of High-Molecular-Mass Poly- $\gamma$ -glutamic Acid. *Chemistry and Biodiversity*. Vol. 7.
31. Reed, J.R., Leon, R.P., Hall, M.K., and Schwertfeger, K.L. 2009. Interleukin-1beta and fibroblast growth factor receptor 1 cooperate to induce cyclooxygenase-2 during early mammary Tumourigenesis. *Breast Cancer Research*. 11:R21(doi:10.1186/bcr2246).
32. Sato M, Suemori H, Hata N, *et al.* 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- $\alpha$ /beta gene induction. *Immunity* 13:539–548.
33. Shin S.M., Kwon J.H, Lee S., Kong H.S., Lee S.J., Lee C.K., Cho K.H., Ha N.J., Kim K.J. 2010. Immunostimulatory Effects of Cordyceps militaris on macrophages through enhanced production of cytokines via the activation of NF $\kappa$ B. *Immune*

*Network*. 10:2:pp 55-63.

34. Sung, M.H., Park, C., Kim, C.J., Poo, H.Y., Kenji, S., Ashiuchi, M. 2005. Natural and edible Biopolymer Poly- $\gamma$ -glutamic Acid: Synthesis, Production and Applications. *The Chemical Record*. 5: 352-366.
35. Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S., and Miyake, K. 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368: 94-99.
36. Wadsworth, T.L., and Koop, D.R. 1999. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Inflammation and Immunopharmacology* 57:941-949.
37. Weiss, J., 2003. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 31:785-790.
38. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
39. Yamamoto, M., S. Sato, Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira S. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4:1144-115.
40. Yamanouchi, K., Barrett T., Ka, C. 1998. New approaches to the development of virus vaccines for veterinary use *Rev.sci.tech.Off.int.Epi.* 17:641-653.