

116102-3

보안 과제(), 일반 과제() / 공개(), 비공개() 발간등록번호()
가축질병대응기술개발사업 제3차 연도 최종 보고서

발간등록번호

11-1543000-002917-01

주요 축산 바이러스에 대한 항바이러스 제제의 적용과 개발

최종보고서

2019. 11. 24.

주관연구기관 / (주) 동방
협동연구기관 / 계명대학교
전북대학교

주요 축산 바이러스에 대한 항바이러스 제제의 적용과 개발
최종보고서

2019

농림축산식품부
농림축산식품기술기획평가원

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “주요 축산 바이러스에 대한 항바이러스 제제의 적용과 개발”(개발기간 :
2016. 09. 05 ~ 2019. 09. 04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 10. 18.

주관연구기관명 : ㈜ 동방

(대표자) 이지훈

협동연구기관명 : 계명대학교 산학협력단

(대표자) 남재열

전북대학교 산학협력단

(대표자) 조재영



주관연구책임자 : 이지훈

제1 협동연구책임자 : 서영호

제2 협동연구책임자 : 김원일

위탁기관책임자 : 탁동섭

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116102-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.09.05 ~ 2019.09.04	단 계 구 분	(총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	주요 축산 바이러스에 대한 항바이러스 제제의 적용과 개발			
	세부 과제명				
연구책임자	이지훈	해당단계 참여연구원 수	총: 20명 내부: 5명 외부: 15명	해당단계 연구개발비	정부: 352,000천원 민간: 118,000천원 계: 470,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 20명 내부: 5명 외부: 15명	총 연구개발비	정부: 897,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,197,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주) 동방 기업부설연구소			참여기업명 (주) 동방	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 전북대학교			연구책임자: 탁동섭	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및	일반과제				

사유	
----	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

(1세부)

- 구제역바이러스에 대한 세포에서 항바이러스 효능 평가결과 1종(PSY4-59)의 천연물 유도체가 바이러스억제 효능을 나타냄
- 닭을 이용한 조류인플루엔자바이러스에 대한 예방 및 항바이러스 효능 평가 결과 1종(CMA2-153)의 천연물 유도체에서 바이러스 억제 가능성이 확인됨
- KVGMP 인증시설에서 제조공정 확립
- 선발 및 개선 물질의 제형 확립(주사제, 사료첨가제, 음수첨가제 등) 및 대량 공급 경로 확보

(1협동)

- 니트로-피리딘 구조를 바탕으로 화합물 합성
- 천연물 기반 찰콘 화합물 유도체 합성
- HDACs 단백질의 구조정보를 이용하여 새로운 화합물들을 설계하여 다수의 유도체를 합성
- Benzimidazole 유도체를 합성하기 위해 imidazole을 중심으로 amine에 다양한 alkyl기를 도입하여 화합물 합성
- 항바이러스 제제로 최종 선별된 3종 물질 CMA-2-153, PSY-4-59, DiNap의 약물동역학 수행

(2협동)

- 신규 합성된 33종의 화합물 중 PED 바이러스에 대해 5종의 유도체 (CMA-2-150, -152, -153, -154와 PSY-4-59)를 유효 항바이러스 제제로 선발
- PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 결과PSY-4-59 유도체가 항바이러스 제제로 선발
- 자돈공격접종 실험을 통해 PSY4-59의 PRRSV 공격접종에 대한 항바이러스 효능 증명
- 자돈공격접종 실험을 통해 CMA-153과 CoV-3CLP 유도체의 PEDV 공격접종에 대한 항바이러스 효능 평가 진행

보고서 면수

85

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기 선발 또는 신규 천연물 또는 천연물 유도체의 항바이러스 제제의 구제역, AI, PRRS, PED에 대한 효능 평가 ○ 효능 평가를 바탕으로 제제의 개선 및 추가 물질 개발 ○ 구제역, Avian Influenza, PRRS, PED 등의 주요 바이러스 병원체에 대한 항바이러스 제제 4종 이상 개발
<p>연구개발성과</p>	<p>(1세부)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 구제역바이러스에 대한 세포에서 항바이러스 효능 평가결과 1종(PSY4-59)의 천연물 유도체가 바이러스억제 효능을 나타냄 - 닭을 이용한 조류인플루엔자바이러스에 대한 예방 및 항바이러스 효능 평가 결과 1종(CMA2-153)의 천연물 유도체에서 바이러스 억제 가능성이 확인됨 - KVGMP 인증시설에서 제조공정 확립 - 선발 및 개선 물질의 제형 확립(주사제, 사료첨가제, 음수첨가제 등) 및 대량 공급 경로 확보 <p>(1협동)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 니트로-피리딘 구조를 바탕으로 화합물 합성 - 천연물 기반 찰콘 화합물 유도체 합성 - HDACs 단백질의 구조정보를 이용하여 새로운 화합물들을 설계하여 다수의 유도체를 합성 - Benzimidazole 유도체를 합성하기 위해 imidazole을 중심으로 amine에 다양한 alkyl기를 도입하여 화합물 합성 - 항바이러스 제제로 최종 선별된 3종 물질 CMA-2-153, PSY-4-59, DiNap의 약물동역학 수행 <p>(2협동)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 신규 합성된 33종의 화합물 중 PED 바이러스에 대해 5종의 유도체(CMA-2-150, -152, -153, -154와 PSY-4-59)를 유효 항바이러스 제제로 선발 - PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 결과PSY-4-59 유도체가 항바이러스 제제로 선발 - 자돈공격접종 실험을 통해 PSY4-59의 PRRSV 공격접종에 대한 항바이러스 효능 증명 - 자돈공격접종 실험을 통해 CMA-153과 CoV-3CLP 유도체의 PEDV 공격접종에 대한 항바이러스 효능 평가 진행
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 4종 이상의 주요 축산 바이러스 신규 치료 물질 선발을 통한 향후 축산 질병 치료제 개발의 사업화에 활용 ○ 국내 축산업에 막대한 피해를 주고 있는 주요 바이러스 질병에 대한 치료제 개발은 국내 축산산업에 큰 경제적인 이익을 줄 것으로 기대 ○ 질병발생 감소를 통하여 폐사율 감소 효과와 사육비의 절감효과를

	<p>유발하여 축산농가 소득에 크게 기여하게 될 것임.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 항생제 사용 감소를 유도하여 보다 안전한 축산물 생산에 기여하여 축산물 소비를 증가 ○ 개발된 항바이러스 제제는 해당 과제에서 제안된 바이러스 이외에도 다양한 바이러스성 질병에도 적용이 가능할 것이므로 글로벌 시장으로 진출하기 위한 충분한 원천기술이 될 것임 				
국문핵심어 (5개 이내)	구제역	조류인플루엔 자	돼지생식기호 흡기증후군	돼지유행성설 사병	항바이러스
영문핵심어 (5개 이내)	Foot and Mouth Disease	Avian influenza	PRRS	PED	Antivirals

<본문목차>

< 목 차 >

제 1장. 연구개발과제의 개요	1
제 1절. 연구개발 목적	1
제 2절. 연구개발의 필요성	3
제 3절. 연구개발 범위	11
제 2장. 연구수행 내용 및 결과	12
제 1절. 제 1세부 연구수행 내용 및 결과	12
제 2절. 제 1협동 연구수행 내용 및 결과	38
제 3절. 제 2협동 연구수행 내용 및 결과	49
제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	81
제 1절. 목표	81
제 2절. 목표 달성여부	81
제 3절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성) ...	83
제 4장. 연구결과의 활용 계획 등	84

제 1장. 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발 목적

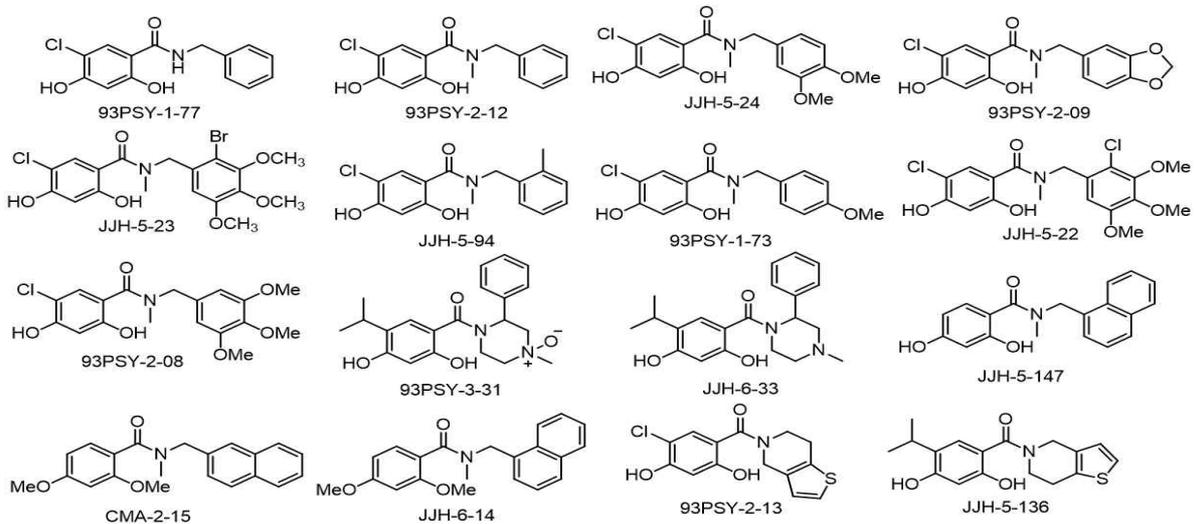
1. 구제역, 조류인플루엔자, PRRS, PED 바이러스 억제 항바이러스 물질 개발

세포평가 : FMD, AI, PRRS, PED 바이러스에 대한 억제효능 및 안전성 평가

동물실험 : 목적동물을 이용한 선발 항바이러스 물질의 평가와 개선

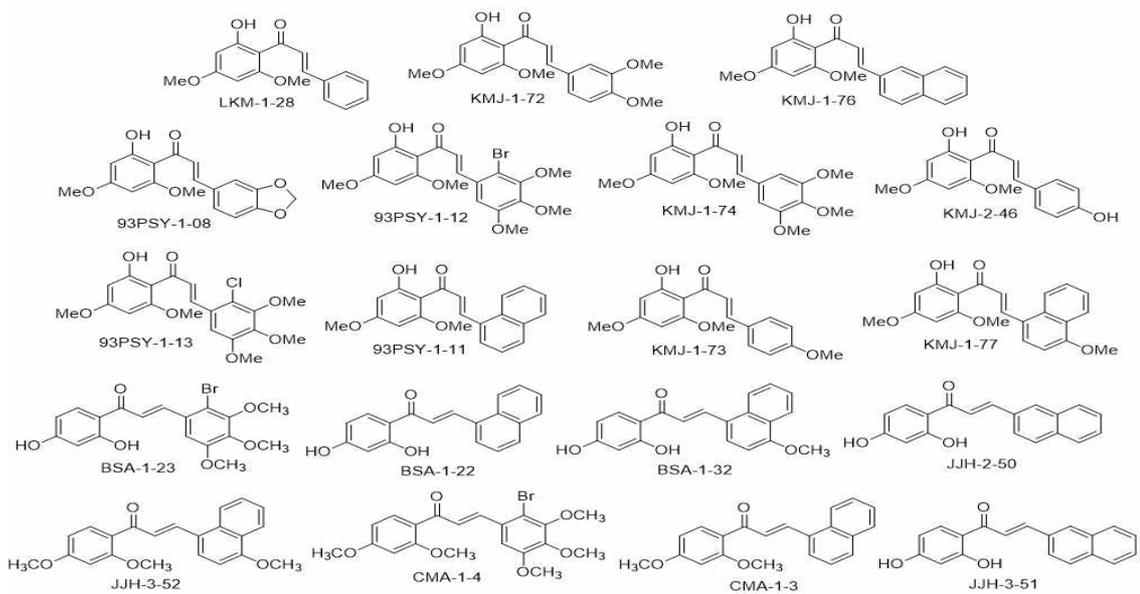
가. 선행 연구에 의해 구축한 항바이러스 물질 평가

- (1) 최근 다수의 연구팀에서 Hsp90 숙주 단백질이 바이러스 증식에 중요한 역할을 수행한다고 보고되었으며, Hsp90 저해를 통한 항바이러스 약물 개발의 연구가 진행됨.
- (2) 본 연구팀에서도 Hsp90 단백질의 구조와 약물의 구조정보를 이용해서 단백질 저해가 가능한 수십 종의 화합물 라이브러리를 구축.
- (3) 구축된 라이브러리중 수종의 화합물이 PRRSV에 대해 뛰어난 항바이러스 활성을 나타냄.
- (4) 단백질 3차구조 분석을 바탕으로 다양한 바이러스들의 증식에 중요한 역할을 하는 공통 단백질의 기능을 억제 하는 물질을 합성하여 축산 주요 바이러스들에 적용.



나. 선행연구에 의해 효과가 증명된 천연물질 평가

- (1) 본 연구팀에서는 천연물 부턴 등의 chalcone 구조를 가진 천연물의 유도체를 합성 라이브러리를 구축하여 PRRSV 항바이러스 활성을 평가하였음.
- (2) 이중 다수의 화합물이 뛰어난 항바이러스 활성을 나타냄.
- (3) 구조적으로 나프틸 구조를 함유한 유도체에서 좋은 항바이러스 활성을 나타냄.
- (4) PRRSV 바이러스 이외에도 다양한 다른 종류의 바이러스 (FMD, influenza, PED) 증식 억제 활성 검색의 필요성이 제시됨.



Chalcone 구조의 천연물 유도체 라이브러리

다. 바이러스 증식에 중요한 단백질의 기능을 억제하는 물질의 합성 및 평가

2. 세포 및 동물실험을 통한 효능 평가를 바탕으로 제제의 개선 및 추가 물질 개발
3. 구제역, Avian Influenza, PRRS, PED 등의 주요 바이러스 병원체에 대한 항바이러스 제제 4종 이상 개발

제 2절. 연구개발의 필요성

1. 국내 기술 수준 및 시장 현황

가. 기술 현황

- (1) 국내에서 항바이러스 기능증대를 위하여 유도체 합성을 시도한 사례가 적으며, 또한 실제 생체 내 적용이나 관련 산업에 적용한 사례가 적어서 이에 대한 연구개발을 통해 기술의 국산화가 필요함.
- (2) 일동제약과 생명공학연구원이 공동으로 개발한 *Streptomyces* sp.에 의한 α -glucosidase 저해제인 1-deoxynojirimycin를 생산하였는데, 연구의 목적은 당뇨병 치료제, 바이러스 억제제, 암세포전이 억제제, 당대사 치료제 등의 목적으로 응용하기 위한 연구가 수행되었음.
- (3) Foot-and mouth disease 바이러스에 대한 기술현황



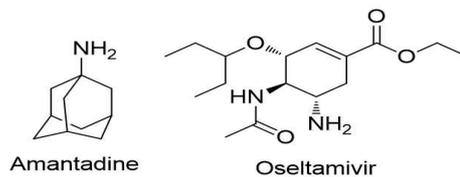
뉴클레오시드 항바이러스제

- (가) 구제역 발생 시 질병확산 억제를 위해 감수성 개체에 구제역 사독항원을 접종하여 감염축 내의 면역원성을 높여 치료하는 방법이 일반적이지만, 이 경우 혈청형간 효과적인 교차방어가 성립되지 않기 때문에 혈청형별로 백신을 접종해야하는 어려움이 있으며, 백신 접종 후에 감염축에서 배출되는 바이러스로 인해 동거축이 감염될 수 있는 부작용이 존재함.
- (나) 이를 극복하기 위해, 5-fluorouracil (FU), 5-azacytidine (AZC), 6-azauridine, ribavirin(RBV), favipiravir (T-705)와 같은 변이원성 뉴클레오시드 약물들이 항바이러스제로 제한적으로 사용됨.
- (다) 최근에는 구제역의 증식에 필수적인 단백질의 기능을 억제하는 물질을 구조분석과 컴퓨터 모델링을 통해 설계하고 합성하여 다양한 항바이러스 물질의 개발이 활발히 이루어지고 있음.

(4) PRRS 바이러스에 대한 기술현황

- (가) 능동적으로 증식하지 않는 불활화 백신 또는 ORF5 단백질 등의 일부 바이러스 단백질을 이용한 recombinant 백신은 효과적인 방어면역을 유도하지 못함으로 약독화 백신이 많이 사용되고 있지만, 시판되는 약독 백신들은 매우 빠르게 강독의 야외주 바이러스로 회귀해 버려 백신을 사용한 농장에 전파되어 또 다른 문제를 야기함.
- (나) 본 연구진은 이러한 약독 백신들의 야외주 바이러스의 회귀에 대한 연구를 바탕으로 PRRS 바이러스의 독력을 결정하는 유전자를 찾아내었고, 이들 유전자를 PRRS 바이러스 infectious cDNA clone에 도입하여 백신 platform을 개발하였지만 안정성이 높은 백신을 생산하기 위하여서는 약독화 백신의 강독 바이러스로의 변이를 막아내는 방법에 대한 연구가 시급함.
- (다) 백신의 문제점을 극복하기 위해 약물을 이용한 바이러스 치료제가 개발이 필요성이 제기됨.

(5) Avian Influenza(AI) 바이러스에 대한 기술현황



임상 사용 허가된 항바이러스제

- (가) AI의 예방백신이 개발되어 있지만 아직 임상적으로 사용이 불가능 하고 효과가 불분명함.
- (나) AI 치료제인 adamantanes는 ion channel inhibitor로서 강력한 항바이러스 효과를 나타내지만 CNS에 심각한 부작용을 일으키는 것이 알려짐.
- (다) 또한, 1999년에 승인된 약물인 oseltamivir은 influenza A와 B 바이러스에 감염된 개체에 사용되는 항바이러스제로, neuraminidase inhibitor로 작용하여 감염 세포 내 바이러스의 신생합성을 방해함.
- (라) 그러나 최근 oseltamivir에 내성을 가진 바이러스가 나타남에 따라 내성 극복을 위한 새로운 항 바이러스제 개발이 요구되어짐.

(6) Porcine Epidemic diarrhea(PED) 바이러스에 대한 기술현황

- (가) PED바이러스는 형태학적으로 코로나바이러스(coronavirus)와 매우 유사하며 1978년 영국에서 처음 보고 되어, 우리나라에서는 1992년 처음 분리된 이후 양돈장에서 빈번하게 발생하고 있는 질병임.
- (나) PED가 발생하였을 시 적당한 치료법이 아직 개발되지 않았으며 항생제요법도 별 도움이 되지 않아 예방이 중요함.
- (다) 최근 연구에서 PED바이러스 확산에 중요한 역할을 하는 3C-like Protease(3CL^{pro})의 단백질 구조가 밝혀짐으로서 새로운 항바이러스제의 개발이 진행 중임.

나. 시장 현황

- (1) 항바이러스제와 성격은 다르지만 면역력 증강을 위한 면역보조제의 주사제로 국내에서 생산하는 제품은 (주)대성미생물연구소의 이뮤노스티와 녹십자수의약품(주)의 녹수이뮤가드가 있는데, 이들은 모두 포도상구균 화학추출물과 보르데텔라균 화학추출물을 주성분으로 하고 있다. 이 제품들은 모두 비특이적 면역증강에 의한 전염성 질병의 발생을 경감시킬 목적으로 사용하는 것으로 범위가 너무 광범위하여 효과를 입증하기가 어려운 실정이다. 따라서 이 제품들의 판매금액은 이뮤노스티의 경우 2010년에는 12,575천원, 2011년에는 14,647천원(출처:한국동물약품협회)이며, 녹수이뮤가드의 경우 2010년에는 35,732천원, 2011년에는 24,598천원(출처:한국동물약품협회)으로 시장규모는 지극히 미미한 실정임.
- (2) 또한 **주관연구기관인 (주)동방**에서 개발하고 판매중인 면역증강제인 피닉스는 폴리감마글루탐산을 주성분으로 하는데, 돼지와 소의 바이러스성 질병에 대한 면역증강을 목적으로 사용하고 있다. 2015년 판매금액은 149,091천원임.
- (3) 일부 보조사료 첨가제 형태로 판매되는 제품들이 바이러스 증식 억제 효과가 있다고 주장하지만 그 효과를 입증하기가 어려우며, 동물약품이 아니므로 정확한 판매금액은 알기 힘든 실정.
- (4) 가축에서의 바이러스 질병은 축종을 불문하고 농장내 지속적으로 만연되어 있으며, 특히 양돈산업에서는 40%이상 바이러스 질병으로 매년 폐사가 되고 있음.
- (5) 2010년 바이러스질병인 구제역발병으로 인하여 전국 11개 시도 75개시군에서 150건이 발생하였으며, 국내 양돈, 축우 등 축산농가에서 살처분된 가축수는 소 15만 마리, 돼지 331만마리 등 총 매물가축수 347만 3,000여 마리로 집계되었으며, 국가재정이 농식품부 2조원, 환경부 8000억원 등 3조원 가까운 재정이 투입되었음. 현재 가축바이러스질병으로 국내 축산시장은 매우 어려운 시기를 겪고 있음.

- (6) 가금류에 있어서는 인수공통전염병이며 제1종 전염병인 가금인플레인지자(avian influenza, AI)로 인하여 실제 전북 익산과 김제에서는 2006년 AI 발병으로 352억원의 피해를 냈고, 276농가에서 사육 중이던 가금류 116만 마리가 살처분 됨. 2008년에는 익산과 김제, 정읍, 순창에서 AI가 발병해 2년 전의 3배 가량인 1000억원의 피해를 냈고, 살처분 수도 554만 마리에 피해농가만 618농가에 이룸. 또한도 익산지역에서 AI가 발병해 10만 마리의 닭이 살처분 되는 피해가 발생했으며, 감염 확산 여부에 따라 피해는 훨씬 늘어날 우려를 낳고 있음.
- (7) 국립수의과학검역원 질병진단센터에 따르면 최근 3년간 돼지질병검사에서 16-22주령 육성 및 비육돈에 성장지연, 식욕감퇴, 발열, 기침 및 호흡곤란 등을 일으키는 돼지호흡기복합증후군(PRDC, porcine respiratory disease complex)이 증가하고 있는 것으로 나타남. PRDC의 증가원인은 PRRS 바이러스가 변이가 일으킨 것으로 유전자분석으로 확인되었음.
- (8) 현재 국내 양돈장의 질병발생 양상은 더욱 복잡 다양해지고 있으며, 질병의 양상 또한 혼합감염으로 인하여 진단 및 처방에 어려움이 가중됨. 돼지췌코바이러스 관련 질병(PCVAD)의 주요 원인체로는 PCV2이고, 그 외 PRRSV, SIV 등 바이러스와 HPS, PM, APP, Sal 등의 세균이 복합 감염되는 양상임.
- (9) 정부가 중점적으로 관리하는 주요 가축전염병은 제1종 법정전염병 중에서 4종, 제2종에서 9종 그리고 제3종에서 1종을 포함하여 총 14개종이며, 이들의 발병 현황은 매월 집계하여 「가축전염병발생월보」를 통해 발표하고 있음(단, 구제역의 경우에는 별도로 집계하여 관리하고 있음). 이 중에서 본 과제에서 개발하고자 하는 항바이러스제로 억제가능한 정부중점관리 제1종 법정전염병 중에서 2종이나 포함되어 있음(표 1)

표 1. 정부중점관리 대상 가축전염병

전염병 등급구분	주요 전염병
제1종 법정가축전염병(4종)	구제역, 돼지열병(콜레라), 뉴캐슬병, 고병원성조류인플루엔자
제2종 법정가축전염병(9종)	탄저, 기종저, 소브루셀라병, 결핵병, 소해면상뇌증(BSE), 돼지오제스키병, 추백리, 가금티푸스, 광견병
제3종 법정가축전염병(1종)	저병원성가금인플루엔자

출처 : 농식품산업과 농업 · 농촌의 신성장동력, 7장. 주요 가축전염병의 발생동향과 대응과제

- (10) 매년 발생하는 주요 소모성 가축질병 발생으로 인한 농가의 직접손실액을 계측한 결과에 따르면, 소의 경우는 매년 평균 약 1천 1백억 원, 돼지는 약 80억 원 그리고 닭은 8억 8천만 원으로 추정되었음 (표 2).

표 2. 가축질병별 농가 직접손실액 추정

(단위 : 억원)

구 분		피해 금액	총피해액
소	브루셀라병	673.9	1,117.9
	소결핵병	5.2	
	요네병	438.8	
돼지	돼지열병(콜레라)	16.6	79.4
	돼지생식기호흡기증후군(PRRS)	9.5	
	돼지유행성설사병(PED)	53.3	
닭	뉴캐슬병(ND)	8.6	8.77
	추백리	0.17	

출처 : 송주호 외 (2006), 가축 질병의 경제적 영향분석

다. 경쟁기관 현황

- (1) 면역증강제를 생산하고 있는 대성미생물연구소(주)와 녹십자수의약품(주)을 경쟁기관으로 들 수 있음.
- (2) 타미플루의 원료 합성기술 등 타미플루 복제약 생산기술 확보(대웅제약).
- (3) 로타/코로나 바이러스 등의 직접 감염을 억제하는 소재나 감염 후 염증을 유발하는 주된 신호전달 경로(톨유사수용체 및 non-TLR)를 조절할 수 있는 신개념의 항바이러스제제를 개발 중.
- (4) 슈퍼컴퓨터 그리드 망을 활용한 e-사이언스 연구(EGEE 프로젝트)를 통해 AI, 탱기열 치료물질 개발 중에 있음(전남대).

라. 지식재산권 현황

- (1) 현재 국내에서는 AI, 사람 인플루엔자 및 신종인플루엔자 저해제 개발에 집중적인 투자가 이루어지고 있으나, 생물소재로부터 타미플루와 동일한 기작의 저해제인 “KW-100”만이 유일하게 개발되었음(한국생명공학연구원).

마. 표준화 현황

- (1) 아직까지 국내의 치료제는 대부분 연구개발 단계이며 산업화 및 표준화는 이루어지지 않은 현실임.

2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

가. 기술현황

- (1) 인플루엔자 바이러스를 중심으로 치료제 개발이 활발하게 이루어짐.
- (2) 미국, 일본 등 주요국은 산학연 연계로 바이러스 치료제 개발 연구 수행.
- (3) 아시아 지역은 한국과 일본, 중국이 바이러스 치료제 개발에 많은 투자를 진행 중이며 개도국의 경우 선진국에 약효평가를 의뢰.
- (4) 조류 인플루엔자 예방용 천연 및 신소재 개발이 이루어졌으며 산업화를 위한 후보물질들이 발굴되었으며 동물용 제품 상용화가 이루어지고 있음.
- (5) 가축질병의 치료제 탐색을 위해 i) 단백질의 3차 구조 기반 저해제 설계, ii) 생물소재 유래 탐색, iii) 기존에 시판중인 저해제의 새로운 용도 탐색, iv) 다양한 학문의 융합 연구를 통한 방법이 모색 중.
- (6) 구조-기반 저해제 탐색 : SARS 바이러스 복제에 필수적인 단백질분해효소(3CL 프로테아제)의 3차 구조에 기반 활성부위의 맞춤형저해제를 개발 중임.
- (7) 기존에 시판중인 저해제의 용도 탐색 : 현재 시판중인 면역조절물질(인터페론 유도체), 항바이러스제(리바비린) 및 RNA 복제효소 저해제 개발 등을 전혀 다른 용도인 구제역 치료제 연구에도 적용중임.
- (8) 융합연구를 통한 탐색 : 다제간 융합연구(BINT)를 통해 새로운 표적 단백질의 신규 면역증강물질 탐색 및 개발이 가속화되고 있음.
- (9) 슈퍼컴퓨터 활용한 탐색: 또 다른 접근법으로 슈퍼컴퓨터의 빠른 처리속도를 활용하여 신·변종 가축질병의 신속한 저해제 탐색과 잦은 돌연변이에 대응한 치료제를 개발 중임(WISDOM, 유럽).

나. 시장현황

- (1) 항바이러스제와 성격은 다르지만 면역보조제 주사제로 수입되는 외국제품의 경우는 (주)버박코리아의 울트라콘주사가 가장 대표적이다. 이 제품은 코리네박테리움 화학처리물을 주성분으로 하며 세균, 바이러스 기타 미생물에 기인한 호흡기 또는 소화기 질병의 예방 및 보조치료를 목적으로 하고 있다. 이 제품의 판매금액은 2010년에는 435,605천원, 2011년에는 759,259천원(출처:한국동물약품협회)으로 국내 제품보다는 많이 판매하고 있음.
- (2) 항바이러스 치료제에 대한 세계시장규모는 2005년부터 매해 15%씩 성장하여 2015년

에는 8조원 규모의 시장형성이 예측됨.

다. 경쟁기관현황

- (1) 특히 Roche사의 “타미플루”는 인플루엔자 치료제 분야를 주도하고 있고, 2008년 4억6천4백만 달러의 시장을 형성중임.
- (2) 면역조절치료제 시장 규모는 2003년 340억 달러규모로 매해 8.2% 성장하여 2010년에는 579억 달러의 시장이 형성됨.
- (3) 2005년 코코엔터社에서 가축용 면역 증강제인 ‘임뮤포르테’를 출시함.
- (4) 악성 바이러스성 질병을 예방하는 물질로, 조류독감과 같은 바이러스 감염증에 대하여 37배의 숙주 면역력이 증가하는 등 숙주의 면역력을 크게 증가 시키는 효과가 인정되어 미국의 회사에 기술이 이전됨.
- (5) 미국의 가축질병을 포함하는 연구개발 사용액은 약 \$1.8 billion으로 공공(약 \$ 1.3 billion)이 민간(약 \$ 0.5 billion)보다 많은 투자를 하고 있음.
- (6) 일본은 조류인플루엔자, BSE, 구제역 등의 진단기술, 항바이러스약제 실용화 등 효율적인 위험 저감기술개발을 위하여 6억 5458만엔 투자(2011년 기준).

라. 지식재산권현황

- (1) 진단 및 예방관련 기술의 연도별 주요국(한국, 미국, 일본, 유럽) 특허 출원 건수의 추세 및 증가율을 살펴보면, 2002년부터 2014년까지 연간 20~50건 수준의 특허 출원을 유지하고 있음.
- (2) 본 기술에 있어 특허 출원 건수가 가장 많은 국가는 한국으로 12년간(‘02년~’13년)까지 496건이 출원되었으며, 이는 유럽의 약 2배이고, 미국, 및 일본하고는 유사하게 출원되고 있는 것으로 조사되었음.
- (3) 2002년부터 2013년까지의 특허 건수를 통하여 연평균 성장률을 살펴본 결과, 한국이 약 10%의 성장률을 보이고 있으나, 미국, 일본, 유럽은 감소추세를 보이고 있는 것으로 조사되었음.
- (4) 미국의 경우 관련 기술의 개발이 지속적으로 유지되고 있으며, 2007년과 2010년에는 최대 규모의 출원이 이루어졌으며, 이후 출원 증가율은 이전에 비하여 둔화되었으나, 매년 일정 수준으로 유지되고 있음을 알 수 있음.
- (5) 일본의 경우 관련 기술이 꾸준히 이루어지고 있어, 미국과 같이 일정 수준으로 유지되고 있음.

- (6) 유럽의 특허는 2000년대 초반 활발한 기술개발이 이루어졌으나, 2000년 후반부부터 급격한 감소를 보이고 있음.

마. 표준화현황

- (1) 아직까지 축산의 바이러스 치료제에 대한 별도의 산업화 및 표준화 기준은 설정되어 있지 않음.

3. 연구개발의 중요성

가. 2000년 이후 고병원성 조류인플루엔자(5회 발생, 누적 피해액 약 1조원) 및 구제역(6회 발생, 누적 피해액 약 5조원) 발생으로 약 6조원 피해 발생.

나. 가축전염병 발생으로 인한 손실액 증가 예상.

- (1) 가축질병으로 인한 경제적 피해 규모는 생산시스템, 사육규모, 질병 발생상황 등에 따라 다양하지만 OIE에서는 축산물 생산액의 약 20%로 추정하고 있음.

- (2) 이를 국내 상황에 적용해보면 질병으로 인한 피해 금액은 약 1조원이 될 것으로 추산됨.

다. 농림업 생산액은 지속적으로 상승 추세이나 축산업은 국가재난형 가축질병의 발생으로 '11년 이후 정체.

- (1) 농림업 생산액(조원) : 19('90) → 33('00) → 44('10) → 46('13)

- (2) 축산업 생산액(조원) : 4('90) → 8('00) → 17('10) → 16('13)

라. 1980년대 후반에 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)가 확인된 이후로 연간 국내에서만 5천억원 이상의 경제적인 피해를 끼치는 것으로 분석되었고 20년이 넘게 연구가 진행되었으나 현재 까지도 PRRSV 감염에 의한 병원성 및 면역반응을 완벽하게 이해하지 못하고 있으며 효과적인 백신의 개발도 아직까지는 어려운 상황임.

마. PED 감염증은 발병 시 포유자돈에서 100%에 가까운 폐사율을 보이는 경제적인 피해가 막대한 질병이며 2013-2014에 청정지역이던 미국에 발생한 이래로 새로운 PED 변이주가 유입되어 기존의 백신으로 예방하는 데 한계를 보이고 있음.

바. 따라서 구제역, avian Influenza, PRRS, PED 등의 바이러스 질병은 백신만을 가지고 질병발생을 효율적으로 방어하기가 어려우므로 이러한 주요 바이러스에 대한 항바이러스 제제의 개발은 초기 질병 발생과 같은 비상 상황 시에 농장 또는 지역으로의 전파를 효과적으로 막을 수 있는 방법이 될 것임.

제 3절. 연구개발 범위

1. 항바이러스 제제와 천연물 유도체의 구제역, AI, PRRS, PED 바이러스에 대한 평가

가. 항바이러스 제제와 천연물 유도체 물질의 세포를 이용한 항바이러스 효능 평가

나. 실험실적인 평가에서 선발된 물질의 동물실험을 통한 치료 및 방어 효능 평가

다. 효능 및 안전성 평가에 따른 각 제제의 효능 및 안전성 개선 연구

2. 바이러스의 생존에 필수적인 역할을 하는 공통 단백질의 기능을 억제할 수 있는 물질의 설계 및 합성

가. 다양한 바이러스들의 공통적인 필수 단백질들의 기능을 억제하는 치료 물질의 화학적 합성

나. 실험실적 방법을 이용한 생산 물질의 항바이러스성 효능 평가

다. 약물동역학적 성질, in vitro/in vivo 효능의 관계를 밝히고, 약물의 효능 및 안전성을 개선함

3. 항바이러스 물질의 대량 생산법 및 대량 공급 경로 확립

가. 선발 및 개선 물질의 대량 생산법 연구

나. 선발 및 개선 물질의 제형 확립(주사제, 사료첨가제, 음수첨가제 등) 및 대량 공급 경로 확보

다. 선발 물질의 제품화 및 사업화를 위한 인허가 준비 확립

제 2장. 연구수행 내용 및 결과

제 1절. 항바이러스 제제의 구제역과 Avian Influenza에 대한 평가 (제 1세부)

[1차년도]

1. 세포주를 이용한 구제역 및 Avian Influenza 바이러스에 대한 항바이러스 제제의 평가

가. 고병원성 Avian Influenza 분리 동정

- (1) 야외분리 Avian Influenza의 H 및 N 형 분석결과 H5N6 고병원성 조류인플루엔자로 규명되어, 항바이러스제제 평가시 현재 국내에서 유행중인 바이러스에 대한 평가가 가능하게 됨.



H 형 분석



N 형 분석

- (2) 이번 연구 수행 중 분리된 바이러스는 야생철새의 분변으로부터 분리된 것으로 분변을 통한 해당 철새종류를 아래의 유전자 분석을 통해 흰뺨검둥오리/청둥오리에 감염된 것으로 판명됨에 따라 2017년 현재 국내에서 유행하고 있는 Avian Influenza virus에 대한 유효한 항바이러스제제의 평가 수행이 가능해짐.

```
TCGATGACTATTTTCTACCAATCACAAAGACATCGGCACTCTATACCTTATCT
TCGGGGCATGAGCCGAATAATTGGCACAGCACTCAGCCTACTGATCCGGGCAG
AACTAGGCCAGCCAGGGACCCTCCTGGGCGACGACCAAATTTATAACGTGATCG
TCACCGCTCACGCCTTCGTAATAATCTTCTTCATGGTAATGCCCATCATAATT
GGAGGGTTCGGCAACTGATTGGTCCCCCTGATAATCGGTGCCCCCGACATAGCA
TTCCACGAATAAACAACATAAGCTTCTGACTCCTCCCACCATCATTCTCCTT
CTACTCGCCTCATCCACTGTAGAAGCTGGCGCTGGTACGGGTTGAACCGTATAC
CCACCTCTAGCAGGCAACCTAGCCCACGCCGGAGCCTCAGTGGACCTGGCTATC
TTCTCACTTCACCTGGCTGGTGTCTCCTCCATCCTCGGAGCCATTAACCTCATT
ACCACAGCCATCAACATAAAACCCCCGCACTCTACAATACCAAACCCCACTT
TTCGTCTGATCAGTCCTAATTACCGCCATCCTGCTCCTCCTATCACTCCCCGTC
CTCGCCGCCGGCATCACGAATGCTACTAACCGACCG
```

(3) 고병원성 조류인플루엔자바이러스를 분리함에 따라 본 연구는 농림축산검역본부와는 별도로 독자적으로 연구를 수행할 수 있게 되었으며, 농림축산검역본부로부터 분양 받은 저병원성 조류인플루엔자 (H9N2)의 경우도 본 연구에 사용하고자 함.

나. 항바이러스 평가용 조류인플루엔자바이러스 역가 측정

- (1) 10일령 계태아란에 0.2ml씩 접종한 다음 3일간 관찰(3일내 계태아 폐사)한 결과 $10^{8.0}EID_{50}/0.2ml$ 이상의 역가를 나타냄. 세포에서의 바이러스 역가 측정결과 비교한 후 항바이러스제제 물질(표 2) 투여세포에서의 항바이러스 효능평가를 수행하고자 함.
- (2) 단, 고병원성조류인플루엔자의 경우 생물안전3등급시설에서 시험을 수행해야함으로 저병원성 조류인플루엔자바이러스(H9N2)를 이용 항바이러스제제의 평가를 수행하고 이후 고병원성 조류인플루엔자바이러스에 대한 항바이러스 억제 효과를 비교 평가 함.

표 1. 종독 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 역가

log of virus dilution	Infected test unit	Cumulative infected (A)	Cumulative non-infected (B)	A/(A+B)	% infected
-1	2/2	21	0	1.0	100
-2	3/3	19	0	1.0	100
-3	3/3	16	0	1.0	100
-4	3/3	13	0	1.0	100
-5	3/3	10	0	1.0	100
-6	2/3	7	1	0.9	88
-7	3/3	5	1	0.8	83
-8	2/2	2	1	0.7	67

다. 구제역바이러스를 이용한 항바이러스제제 평가

- (1) 구제역바이러스를 이용한 항바이러스제제평가는 농림축산검역부의 협조가 필수 사항으로 농림축산검역본부와 협력하여 구제역백신연구센터 내 생물안전3등급(BSL3) 시설에서 표2에 나열된 32종에 대한 항바이러스성 평가가 진행됨.
- (2) 구제역바이러스를 이용한 항바이러스제제 평가는 세계동물보건기구(OIE) 에서 제시된 시험법에 준하여 수행함.

표 2. 평가 대상 천연물 유도체 및 분자량

분류	천연물 유도체	분자량(MW)	합성농도 (mM)
그룹2 (5종)	CMA-2-150	284.27	20, 100ul
	CMA-2-151	285.26	20, 100ul
	CMA-2-152	298.30	20, 100ul
	CMA-2-153	312.33	20, 100ul
	CMA-2-154	326.35	20, 100ul
그룹3 (14종)	CMA-3-8	300.27	20, 100ul
	CMA-3-10	285.26	20, 100ul
	CMA-3-11	285.26	20, 100ul
	CMA-3-13	284.27	20, 100ul
	CMA-3-18	284.27	20, 100ul
	CMA-3-20	283.29	20, 100ul
	CMA-3-21	283.29	20, 100ul
	CMA-3-22	286.25	20, 100ul
	CMA-3-23	285.26	20, 100ul
	CMA-3-25	299.29	20, 100ul
	CMA-3-66	298.30	20, 100ul
	CMA-3-67	312.33	20, 100ul
	CMA-3-68	326.35	20, 100ul
	CMA-3-72	326.35	20, 100ul
그룹4 (13종)	CMA-4-35	253.26	20, 100ul
	CMA-4-36	254.24	20, 100ul
	CMA-4-37	270.31	20, 100ul
	CMA-4-122	267.28	20, 100ul
	PSY-4-58	254.24	20, 100ul
	PSY-4-59	270.31	20, 100ul
	PSY-4-85	253.26	20, 100ul
	PSY-4-86	295.34	20, 100ul
	PSY-4-87	309.36	20, 100ul
	PSY-4-88	281.31	20, 100ul
	PSY-4-135	309.36	20, 100ul
PSY-4-136	295.34	20, 100ul	
PSY-4-141	267.28	20, 100ul	

2. 선발 물질의 대량 생산법 및 대량 공급경로를 확보

가. 동물실험을 통해 효능이 입증된 항바이러스제에 대해 KVGMP 인증 시설에서 제조 공정법 확립 및 현장 적용함.

나. 실험실적인 평가에서 선발된 물질의 동물실험을 통한 치료 및 방어 효능 평가 (검역본부와 협력 연구) 함.

다. 선발 물질의 대량 생산법 및 대량 공급경로 확보함.

[2차년도]

1. 항바이러스제제의 구제역과 Avian Influenza에 대한 평가 (특수시설을 활용한 항바이러스 물질 평가)

가. 세포주를 이용한 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 제제의 평가

- (1) 제1협동(계명대학교)에서 합성된 29종의 천연물 유도체와 2종의 천연 추출물(그룹 6)을 대상으로(표1) MDCK 세포를 이용하여 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가를 실시함.

표 1. 평가대상 천연물 유도체 목록 및 합성 농도

분류	천연물 유도체	합성농도 (mM)
그룹2 (4종)	CMA-2-150	20
	CMA-2-152	20
	CMA-2-153	20
	CMA-2-154	20
그룹3 (12종)	CMA-3-12	20
	CMA-3-13	20
	CMA-3-18	20
	CMA-3-19	20
	CMA-3-21	20
	CMA-3-22	20
	CMA-3-23	20
	CMA-3-25	20
	CMA-3-66	20
	CMA-3-67	20
	CMA-3-68	20
CMA-3-72	20	
그룹4 (13종)	CMA-4-35	20
	CMA-4-36	20
	CMA-4-37	20
	CMA-4-122	20
	PSY-4-58	20
	PSY-4-59	20
	PSY-4-85	20
	PSY-4-86	20
	PSY-4-87	20
	PSY-4-88	20
	PSY-4-135	20
	PSY-4-136	20
PSY-4-141	20	
그룹5 (6종)	CMA-2-151	-
	CMA-3-8	-
	CMA-3-10	-
	CMA-3-11	-
	CMA-3-20	-
	CMA-4-121	-
그룹6 (2종)	KYJ-1	-
	KYJ-2	-

(2) 그룹 2의 4종의 후보물질의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 평가한 결과 CMA-2-153은 40 μ M의 농도에서 바이러스의 증식이 억제되는 것으로 확인되었으며, 처리군과 낮은 농도의 유도물질에서도 시간의 경과에 따라 바이러스의 증식이 억제됨이 조사되었다. 또한 CMA-2-150 물질 역시 CMA-2-153 물질과 유사한 패턴의 결과를 얻을 수 있었음 (그림 1).

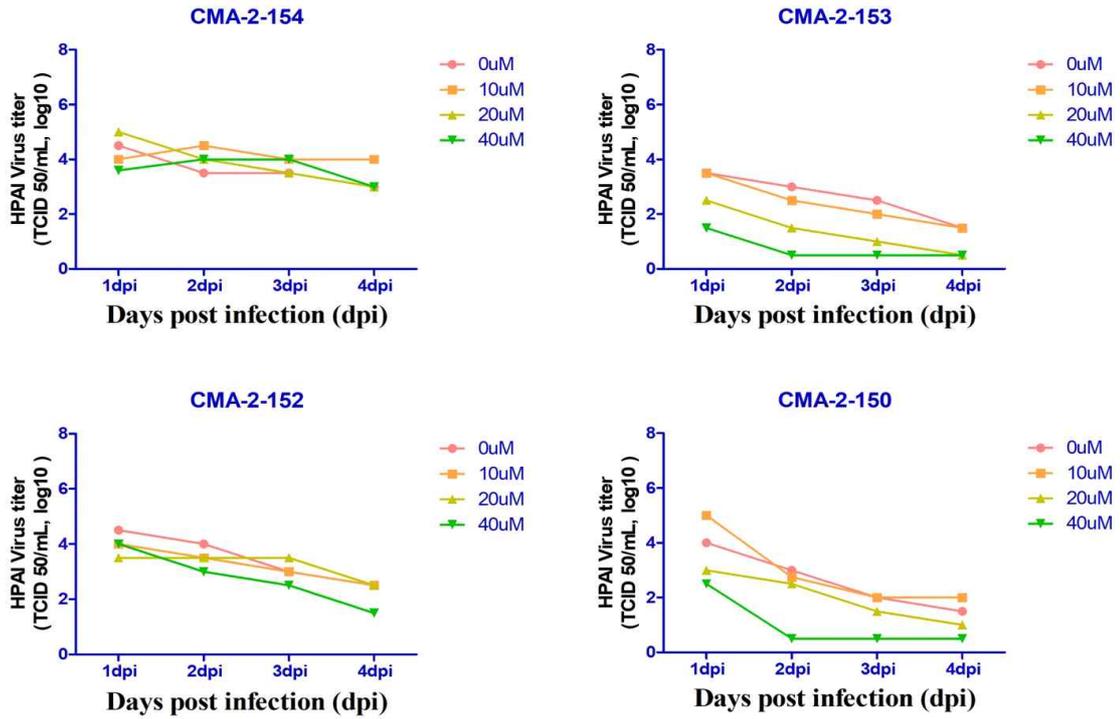


그림 1. 그룹 2 천연 유도물질들의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과

(3) 그룹 3의 12종의 천연물질 유도체에 대한 평가결과 무처리군 및 농도별 처리군에서 유의성 있는 항바이러스 효과의 차이를 확인할 수 없었음 (그림 2와 3).

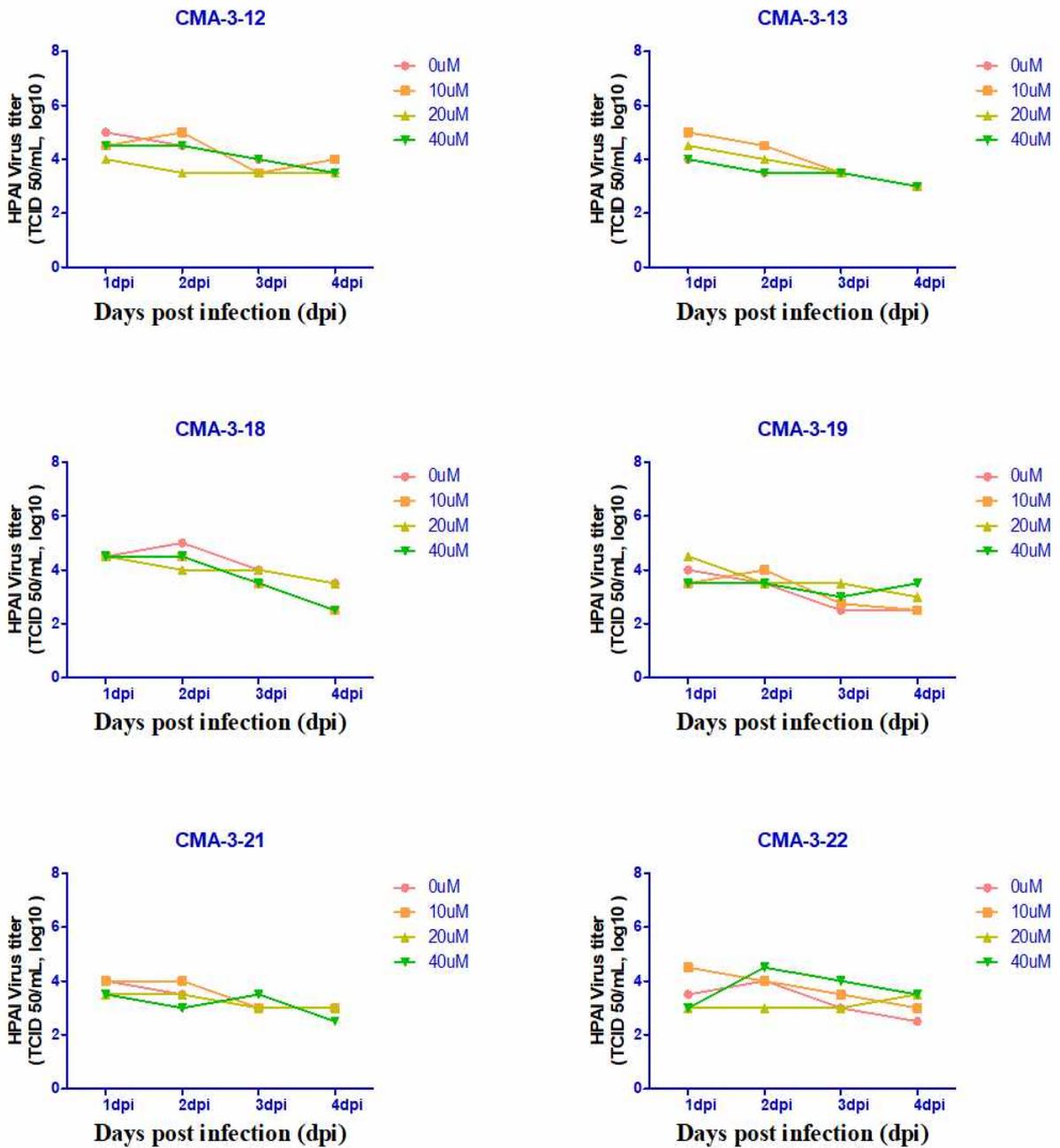


그림 2. 그룹 3 천연 유도물질들의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(1)

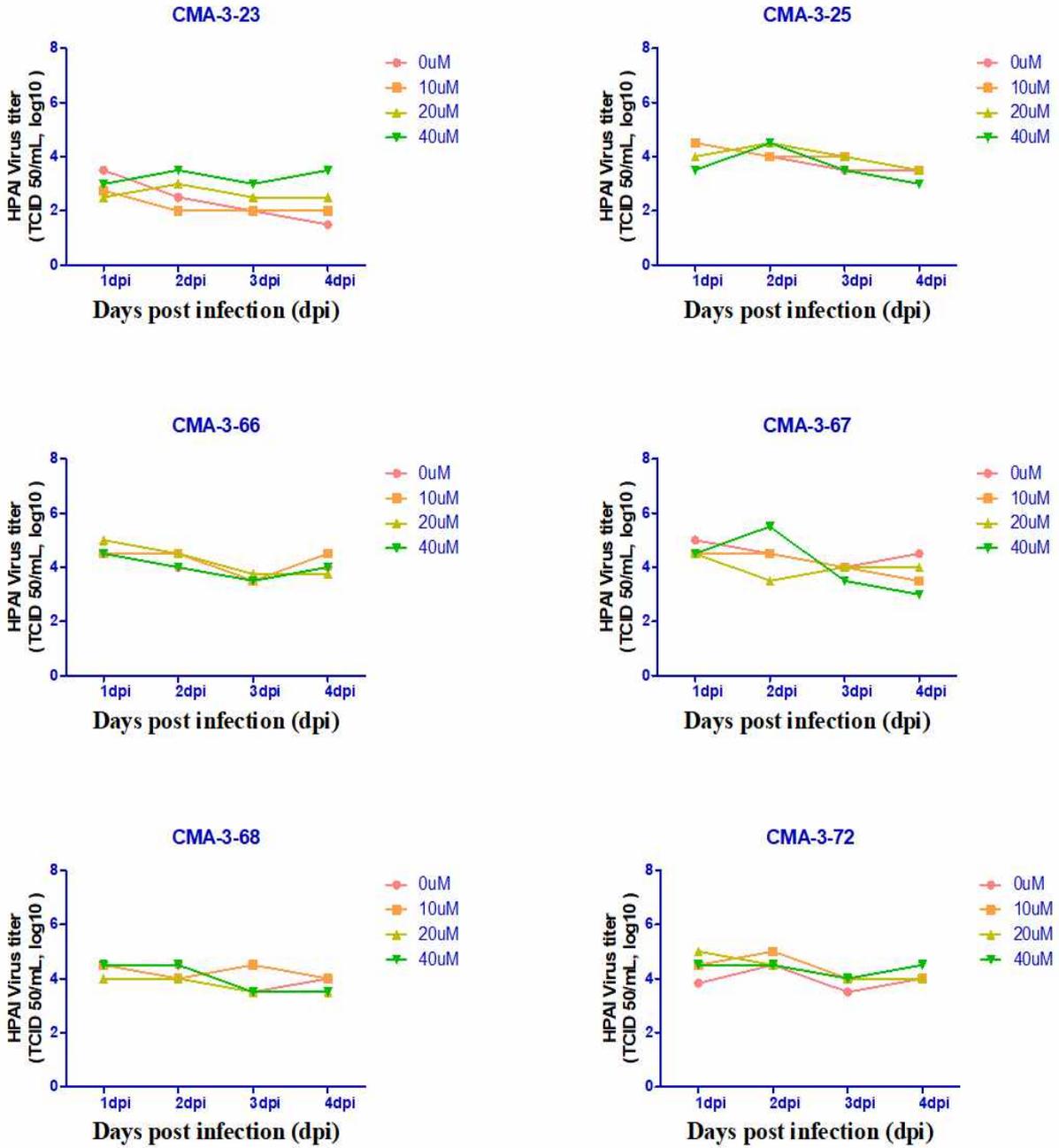


그림 3. 그룹 3 천연 유도물질들의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(2)

(4) 그룹 4의 13종의 항바이러스 효능평가 결과 항바이러스 효능 CMA4-36, 37을 제외한 모든 합성제제들이 유효한 항바이러스 효과를 보이지 않았고(그림 4와 5) CMA4-36, 37는 40 μ M의 이상의 농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 농도의존적인 반응을 보임에 따라 물질의 농도를 높인다면 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었음 (그림 4).

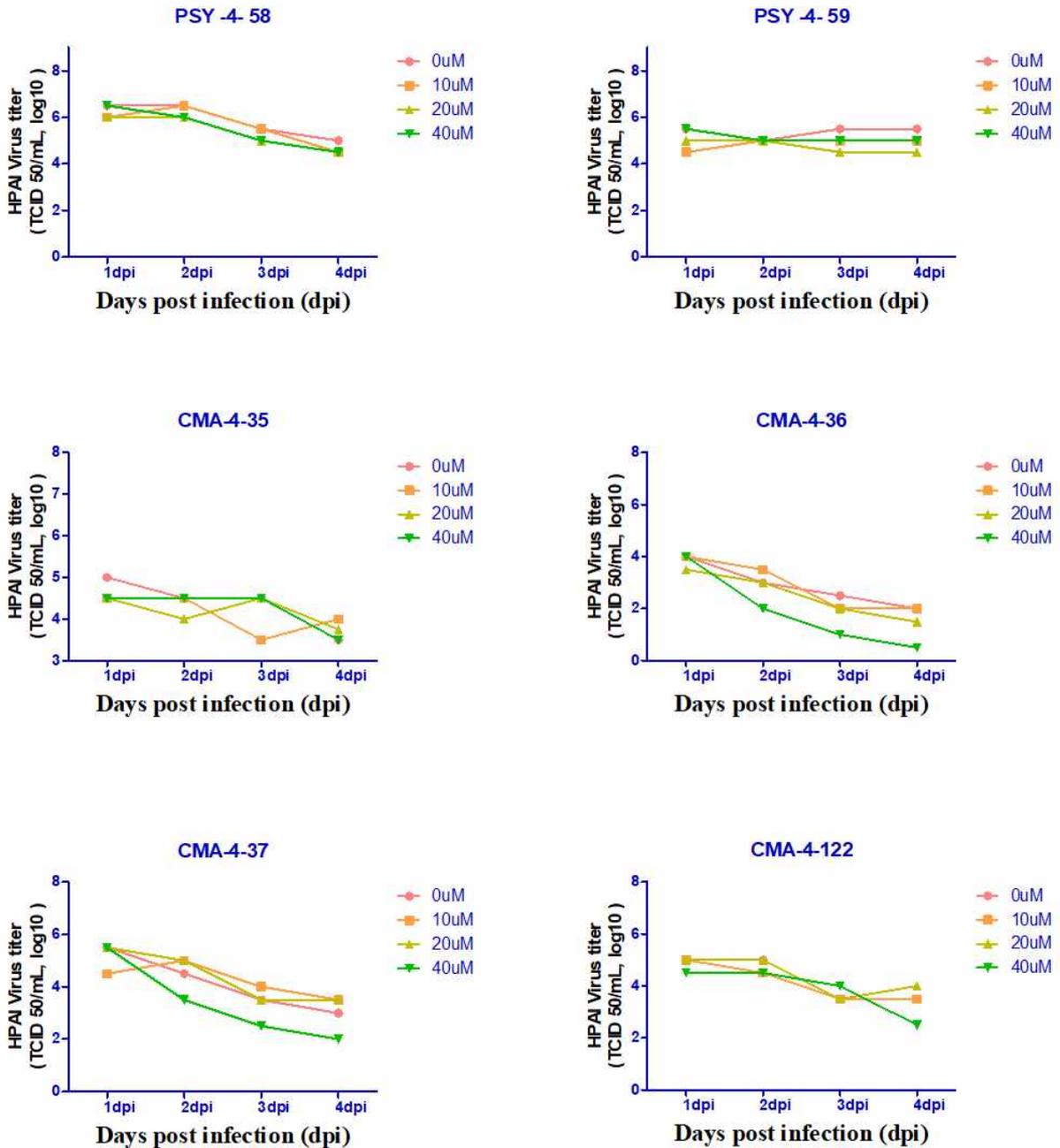


그림 4. 그룹 4 천연 유도물질들의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(1)

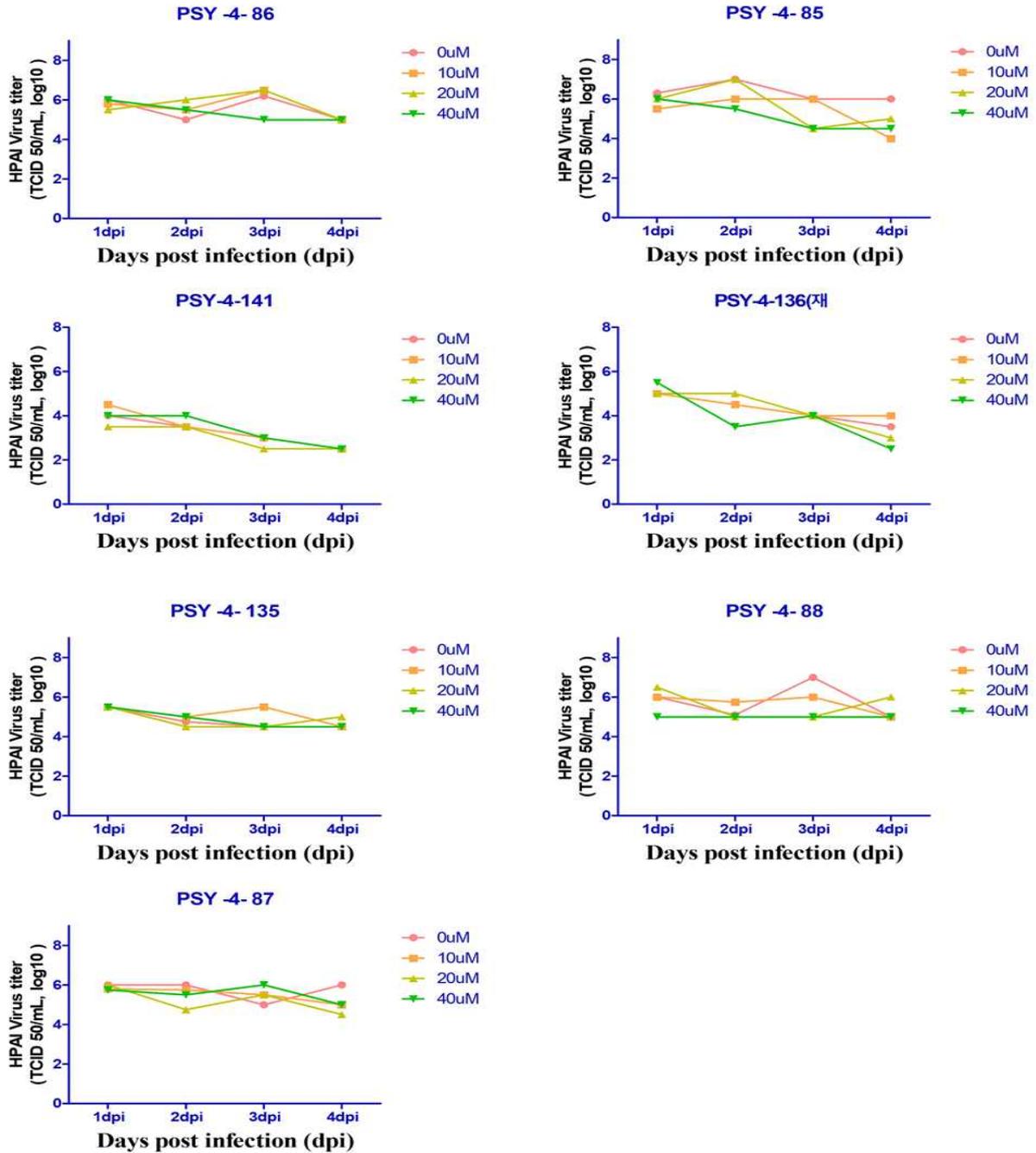


그림 5. 그룹 4 천연 유도물질들의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(2)

(5) 그룹 6의 2종의 항바이러스 효능평가 결과 KYJ-1, 2는 모두 원액, 10배, 100배, 500배 희석액에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내어(그림 6) 가장 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었으며 KYJ-1의 48시간 처리한 다음 세포독성 평가를 진행함 (그림 7).

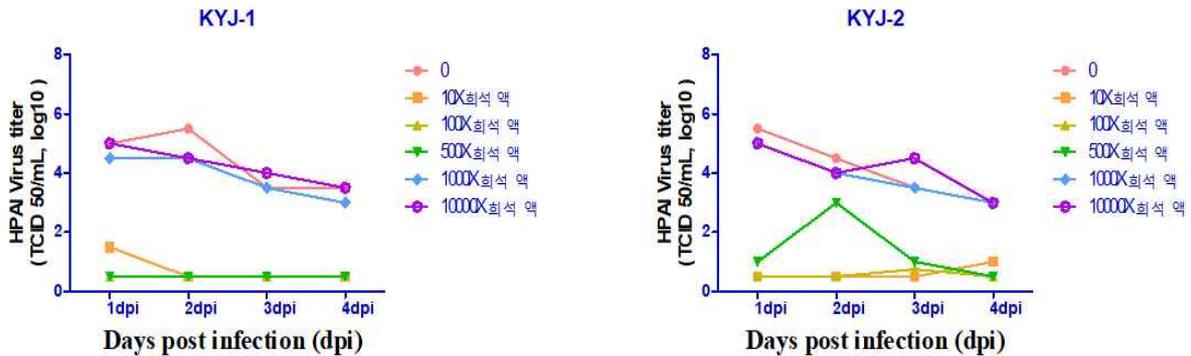


그림 6. 그룹 6 천연 유도물질들의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과

(6) 그룹 6의 2종의 물질 KYJ-1, 2는 모두 500배 희석액까지 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 가장 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었으며 그중에서도 KYJ-1의 세포독성평가 진행 결과(그림 7) 바이러스 억제능을 보이는 500배 희석액 처리군에서 대조군의 80%에 해당하는 세포생존률을 보였다. 따라서 세포 독성이 가장 낮은 유효희석배수를 찾고자 하며, 3차년도에서는 동물실험을 통해 유효성 여부를 확인하고자 함.

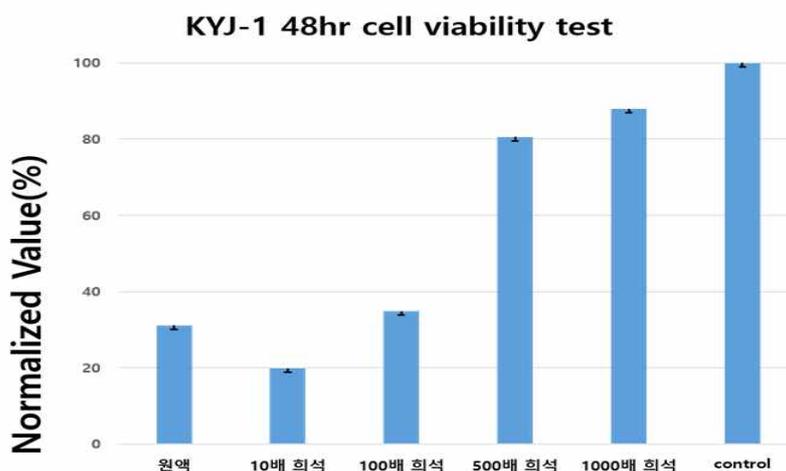


그림 7. 그룹 6 천연 유도물질 KYJ-1의 MDCK Cell에 대한 48시간 세포독성 평가 결과

(7) 1차년도에 합성된 총 35종 천연물 유도체 중 29종의 물질의 고병원성 조류인플루엔자

바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가결과 CMA-2-153은 40 μ M의 농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 모든 그룹의 합성제제들 중 가장 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었으며 CMA-4-36, CMA-4-37 등의 2종의 천연물 유도체도 고농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 총 3종의 유도체가 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 제제로 선발되었으므로(표4) 향후 추가적인 세포독성 평가 및 동물실험을 하고자 함.

표 4. 고병원성 조류인플루엔자바이러스(HPAI)에 대한 29종 천연물 유도체의 항바이러스 효능 평가 결과 요약

분류	천연물 유도체	유효 효과농도
그룹2 (4종)	CMA-2-150	
	CMA-2-152	
	CMA-2-153	40mM 이상
	CMA-2-154	
그룹3 (12종)	CMA-3-12	
	CMA-3-13	
	CMA-3-18	
	CMA-3-19	
	CMA-3-21	
	CMA-3-22	
	CMA-3-23	
	CMA-3-25	
	CMA-3-66	
	CMA-3-67	
	CMA-3-68	
	CMA-3-72	
그룹4 (13종)	CMA-4-35	
	CMA-4-36	40mM 이상
	CMA-4-37	40mM 이상
	CMA-4-122	
	PSY-4-58	
	PSY-4-59	
	PSY-4-85	
	PSY-4-86	
	PSY-4-87	
	PSY-4-88	
	PSY-4-135	
	PSY-4-136	
	PSY-4-141	
그룹5 (6종)	CMA-2-151	
	CMA-3-8	
	CMA-3-10	
	CMA-3-11	
	CMA-3-20	
	CMA-4-121	
그룹6 (2종)	KYJ-1	500배 희석액
	KYJ-2	500배 희석액

[3차년도]

1. 구제역바이러스를 이용한 3종의 천연물 유도체에 대한 항바이러스 효능평가

가. 제 1협동기관인 계명대학교에서 합성된 33종의 천연물 유도체 중 세포를 이용한 바이러스에 대한 항바이러스 효과가 인정된 3종의 천연물 유도체(CMA-4-36, CMA-2-153 및 PSY-4-49)를 선발함.

나. 선발된 3종의 천연물 유도체에 대해 구제역바이러스(진천주, 농림축산검역본부 제공)를 이용하여 BHK-21세포에서 항바이러스 효능평가를 실시하였음 (그림 1).

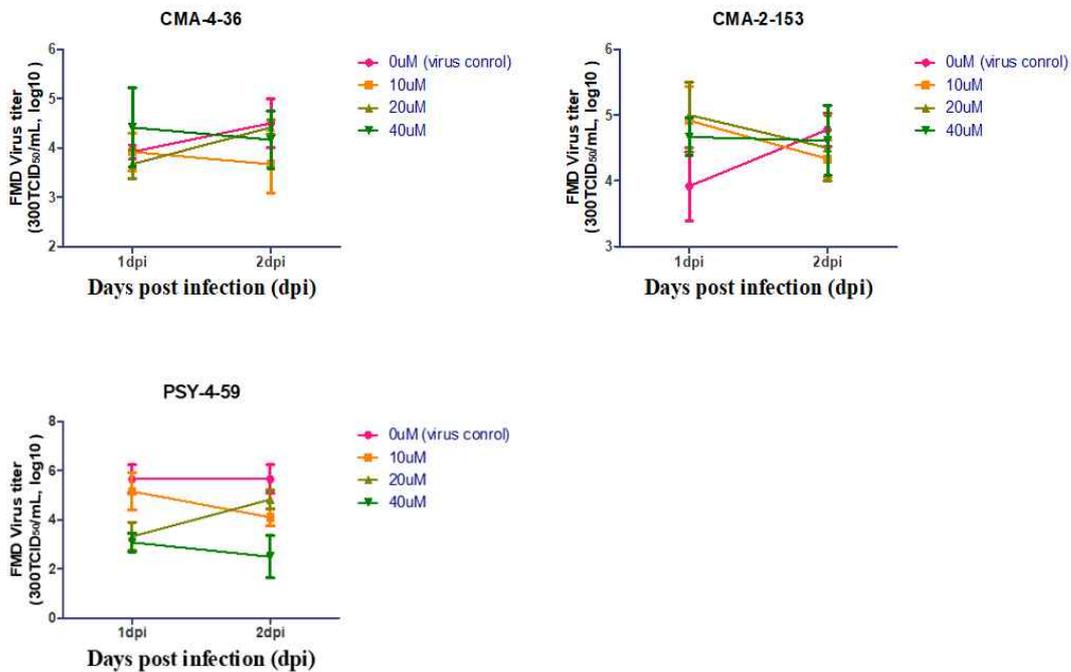


그림 1. 3종 천연 유도물질(CMA-4-36, CMA-2-153 및 PSY-4-49)들의 구제역바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과

다. CMA-4-36 및 CMA-2-153 물질의 경우 10uM의 농도에서 접종 1일째 보다 2일째에 바이러스 억제 효과를 보이는 경향이 있었으나, 전체적으로 대조에 비해 유의성 있는 억제 경향을 확인 할 수 없었음.

라. 반면 PSY-4-59 물질의 경우 상기의 두 물질에 비해 10uM과 40uM 농도에서 2일째 대조($10^{5.6}$ TCID₅₀/mL)는 1일째 대비($10^{5.6}$ TCID₅₀/mL) 역가에서 변화가 없었으나, 10uM의 경우 1일째 ($10^{5.16}$ TCID₅₀/mL) 대비 2일째 ($10^{4.1}$ TCID₅₀/mL)에 10배 정도 억제함을 확인

할 수 있었고, 40uM의 경우 1일째 ($10^{3.08}$ TCID₅₀/mL)대비 2일째 ($10^{2.5}$ TCID₅₀/mL)에 2배 정도 바이러스 증식을 억제하는 것으로 조사되었음.

마. 위의 결과를 종합하면 CMA-4-36 및 CMA-2-153 물질의 경우 세포수준에서 다른 바이러스에 대해서는 바이러스 증식억제 효능이 다소 인정되었으나 구제역 바이러스에 대해서는 억제능이 거의 없는 것으로 밝혀짐.

바. PSY-4-59 물질은 CMA-4-36 및 CMA-2-153 물질 대비 구제역바이러스에 대해 항바이러스 억제효능이 인정되었으나, 동물접종을 통한 억제효능을 기대할 수 있을 정도는 아닌 것으로 판단되었음. 따라서, PSY-4-59는 다른 바이러스(ex. PRRSV)에 대한 항바이러스 제제로 일단 집중적으로 평가하고 시제품으로 대량생산하여 구제역에 대한 항바이러스 제제로 보완 개선할 예정임.

2. 닭을 이용한 조류 인플루엔자 바이러스(H9N2)의 접종에 따른 천연물 유도체의 항바이러스 효능 평가

가. 연구수행 내용 및 결과

(1) 주요내용

(가) 세포를 이용한 조류인플루엔자바이러스에 대한 항바이러스 억제제능이 입증된 물질에 대해 닭에서의 효능입증.

(나) 항바이러스물질을 닭에 투여한 다음 저병원성 조류인플루엔자(H9N2) 바이러스를 도전 감염시킨 닭의 항문 및 구강에서 바이러스 배출량, 혈액 내 항체가 조사, 그리고 임상 증상 조사.

(2) 방법

(가) 공시 닭 : SPF 닭 36수

① 대조군

㉠ E 그룹 : 희석액 (4수)

㉡ EC 그룹 : 접촉군 (2수)

② 실험군 1

㉠ A 그룹 : 합성물질 CMA2-153 (4수) - 1mg/kg 복강 접종

㉡ AC 그룹 : 접촉군 (4수)

③ 실험군 2

㉠ B 그룹 : 합성물질 CMA2-153 (4수) - 5mg/kg 복강 접종

㉡ BC 그룹 : 접촉군 (4수)

④ 실험군 3

- ㉠ C 그룹 : 굿가시나무 추출액 (4수) - 원액 10배 희석액
- ㉡ CC 그룹 : 접촉군 (4수)

⑤ 실험군 4

- ㉠ D 그룹 : 굿가시나무 추출액 (4수) - 원액 100배 희석액
- ㉡ DC 그룹 : 접촉군 (4수)

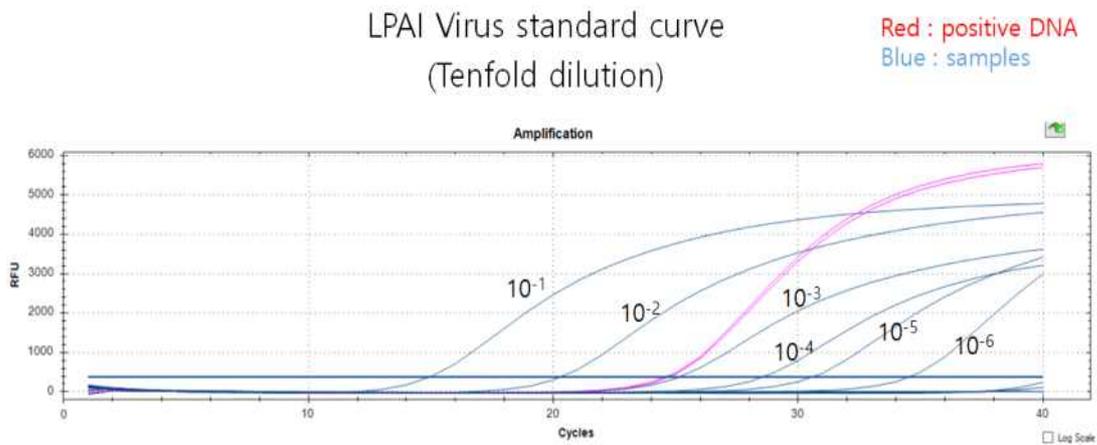
(나) 연구방법

- ① 닭의 복강 투여경로를 이용 항바이러스물질 (합성물질 CMA2-153, 굿가시나무 추출액을 접종한 다음 비강 경로로 조류인플루엔자바이러스(H9N2)를 감염시킴.
 - ㉠ 접촉군은 조류인플루엔자바이러스 도전감염하지 않음.
 - * 항바이러스물질은 바이러스 접종 0, 1, 2, 3일째 총 4차례 투여.
- ② 조류인플루엔자바이러스가 감염된 닭 및 동거 닭의 항문 및 구강에서 바이러스 배출량(감염 1, 5, 7 일차) 및 임상 증상 조사, 그리고 닭의 혈액 내 항체가(접종전, 접종 후 9, 14, 21일차) 조사.
- ③ 그룹별로 공격접종군 및 접촉전파군의 구강 및 총 배설강에서의 조류인플루엔자 바이러스의 배출여부를 real time RT-PCR을 이용하여 측정.
- ④ 공격접종 0, 9, 14, 21일 후 그룹별로 채혈하여 혈구응집억제반응시험을 통해 혈청학적 양전을 평가.

나. 연구결과

- (1) LPAI (H9N2) 바이러스의 희석배수에 따른 real-time RT-PCR을 이용한 표준값 설정
 - (가) 실험에 사용한 바이러스는 농림축산검역본부로부터 분양받은 조류인플루엔자바이러스(LPAI, H9N2)를 사용하였음.
 - (나) $10^{9.0}EID_{50}/0.2ml$ 이상의 바이러스 원액을 PBS로 1,000배 희석한 다음 real-time RT-PCR (AIV H9 qRT-PCR, Median Diagnostics)을 이용하여 역가를 측정함. 아래와 같은 결과를 얻었음.
 - (다) 따라서 닭 실험군의 접종 바이러스는 $10^{6.0}EID_{50}/0.2ml$ 의 조류인플루엔자바이러스를 사용함.

희석배수 (Log EID ⁵⁰ /ml)	Ct value
10 ⁻¹	14.98
10 ⁻²	20.30
10 ⁻³	25.17
10 ⁻⁴	28.57
10 ⁻⁵	30.59
10 ⁻⁶	34.53



* H9N2 검출키트 : Median diagnostics사

- ① 공격접종후 1일차 공격접종군과 접촉전파군의 구강 내 및 총배설장에서의 조류인플루엔자바이러스 배출량 확인.
- ㉠ 10⁶EID₅₀/0.2ml의 조류인플루엔자바이러스 비강으로 0.2ml씩 접종하고 1일, 5일 그리고 7일째 구강 및 배설장내 샘플을 채취하여 바이러스 검출유무를 확인함.
- ㉡ 실험군은 총 5 group(방법 참조)으로 group내에서는 각각 공격접종군과 접촉전파군으로 구분하여 실험을 실시함.
- ㉢ 비강접종후 1일차(표 1-4)에서는 공격접종군의 대조군 4수 중 2수의 구강내에서만 바이러스가 검출되고 총배설장으로는 바이러스의 배출을 확인할 수 없었음.
- √ 구강내 검출바이러스는 접종 바이러스가 비강을 통해 구강으로 이동한 접종바이러스가 검출된 것으로 사료됨.

표 1. 공격접종 1 일 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
AC	4	0/4	-	-
BC	4	0/4	-	-
CC	4	0/4	-	-
DC	4	0/4	-	-
EC	2	0/2	-	-

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

표 2. 공격접종 1 일 후 공격접종군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
A	4	0/4	-	-
B	4	0/4	-	-
C	4	0/4	-	-
D	4	0/4	-	-
E	4	2/4	35.26	5.317443

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

표 3. 공격접종 1 일 후 접촉전파군의 총배설장 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
AC	4	0/4	-	-
BC	4	0/4	-	-
CC	4	0/4	-	-
DC	4	0/4	-	-
EC	2	0/2	-	-

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

표 4. 공격접종 1 일 후 공격접종군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
A	4	0/4	-	-
B	4	0/4	-	-
C	4	0/4	-	-
D	4	0/4	-	-
E	4	0/4	-	-

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

- ② 공격접종 5일 후 공격접종군과 접촉전과군의 구강 내 및 총배설강에서의 AIV 배출량 확인.
- ㉠ 접종 후 5일째에 공격접종 그룹의 닭 구강(표 5)에서 전 그룹에서 50~100% 바이러스 검출이 확인되어 전체적으로 바이러스 감염이 잘 이루어진 것으로 조사됨.
- ㉡ 접촉군의 구강(표 6)에서도 바이러스가 배출됨이 확인되었으나 오히려 항바이러스 물질을 투여하지 않은 대조 접촉군에서는 바이러스 검출되지 않았음.
- ✓ 접촉 대조군에서 바이러스가 검출되지 않은 이유는 PCR 검출한계와 관련되었을 것으로 추측되며, 혈청학적 검사에서는 항체의 양전이 확인됨에 따라 접촉 감염이 성립되었음이 확인되었음.
- ㉢ 공격접종 5일 후 총배설강에서 바이러스 검출(표 7 ~ 8)이 확인됨(0~25%)에 따라 시험군의 체내에서 바이러스 증식이 이루어졌음을 확인할 수 있었으며, 항바이러스 물질을 투여한 군 사이에서는 유의성 있는 바이러스 억제능을 확인할 수 없었음.
- ㉣ B그룹의 경우 공격접종 5일후에도 총배설강내에서 바이러스의 검출이 확인되지 않았으나, 접촉군에서는 구강 및 총배설강에서 바이러스 검출됨이 확인되어서 항바이러스 물질 투여군의 경우 바이러스 증식을 억제함이 확인되었으나 소량의 바이러스가 배출 또는 구강내 바이러스가 접촉군에 노출되어 감염이 성립된 것으로 추측됨.
- ✓ CMA-2-153을 5mg/kg 량으로 투여할 경우 바이러스의 배출을 감소시키며, 전 계군에 투여 시 바이러스의 전파를 차단시킬 수 있음을 제시하고 있음.

표 5. 공격접종 5 일 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
AC	4	2/4	31.39	0.8061017
BC	4	3/4	32.93	3.9551991
CC	4	4/4	31.4425	3.1421794
DC	4	4/4	29.1675	1.4042169
EC	2	0/2	-	-

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

표 6. 공격접종 5 일 후 공격접종군 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
A	4	2/4	32.95	1.8526198
B	4	4/4	29.4075	0.5748261
C	4	4/4	28.6225	2.139336
D	4	4/4	28.3925	2.6840191
E	4	2/4	29.255	1.2374369

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

표 7. 공격접종 5 일 후 접촉전파군의 총배설장 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
AC	4	1/4	29.61	-
BC	4	2/4	29.115	14.446192
CC	4	1/4	26.43	-
DC	4	2/4	34.39	9.2489567
EC	2	0/2	-	-

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

표 8. 공격접종 5 일 후 공격접종군 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
A	4	2/4	33.36	7.1700628
B	4	0/4	-	-
C	4	4/4	26.5125	6.705681
D	4	1/4	39.49	-
E	4	1/4	24.07	-

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

- ③ 공격접종 7일 후 공격접종군과 접촉전파군의 구강 내 및 총배설강에서의 AIV 배출량 확인.
 - ㉔ 공격접종 7일 경과후 구강내 바이러스 검출률이 낮아지는 반면 총배설강에서의 바이러스 검출은 증가하는 경향을 그룹별로 보임.
 - ㉕ 그룹 B의 경우 경구 및 총배설강에서 바이러스 검출이 되지않아 더 이상의 바이러스 증식이 일어나지 않음을 확인하여 다른 그룹에 비해 항바이러스의 효과가 인정됨.
- √ 5일째 실험군 전체(4수)에서 바이러스가 검출된 반면 7일째부터는 모두에서 바이러스 검출이 되지 않음.

표 9. 공격접종 7 일 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
AC	4	4/4	31.1275	2.262232
BC	4	1/4	31.35	
CC	4	3/4	29.68	1.876619
DC	4	3/4	35.00333	4.801274
EC	2	1/2	29.03	

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

표 10. 공격접종 7 일 후 공격접종군 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
A	4	1/4	36.38	-
B	4	0/4	-	-
C	4	4/4	31.7925	1.972619
D	4	3/4	28.69333	2.62443
E	4	0/4	-	-

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

표 11. 공격접종 7 일 후 접촉전파군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
AC	4	2/4	25.5	1.979899
BC	4	2/4	24.67	1.131371
CC	4	4/4	27.7175	7.452876
DC	4	1/4	36.19	-
EC	2	1/2	31.99	-

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

표 12. 공격접종 7 일 후 공격접종군 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	No. of chicks	positive rate ^A	Ct value ^B	
			Mean	SD
A	4	2/4	28.22	6.717514
B	4	0/4	-	-
C	4	4/4	28.92	5.346444
D	4	4/4	23.2	6.569876
E	4	2/4	33.27	2.177889

^A양성수수/시험수수

^BReal time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준편차

(2) 조류인플루엔자 바이러스의 접종에 따른 그룹별 항체형성능 평가

(가) 조류인플루엔자바이러스 감염 후 각 그룹별 항체양전현상 평가한 결과 접종 전

전 그룹에서 혈구응집억제항체가 음성임을 확인하였음.

(나) 조류인플루엔자바이러스접종 9일후 표14에서와 같이 공격접종군 모두에서 항체가 형성됨을 확인할 수 있었음.

√ 일부 그룹에서 바이러스 접종 후 바이러스가 검출되지 않은 그룹이 있었으나 혈청 중 항체검사 결과 모두 양성으로 판정됨에 따라 공격접종에 의해 전 그룹에 바이러스 감염이 성립되었음이 증명된 반면 바이러스 검출법의 민감도 또는 시료처리과정중의 차이로 인해 바이러스의 검출이 확인되지 않은 것으로 추측됨.

(다) 그룹 B의 경우 다른 그룹에 비해 공격접종군의 항체수준이 5일째 평균적으로 가장 낮았으며 ($\text{Log}^{23.75 \pm 0.9}$) 이후 접종군의 항체수준 역시 14일 및 21일째 가장 낮은 것으로 조사되어 CMA-2-153이 5mg/kg이상 투여될 경우 조류인플루엔자 바이러스의 증식 및 전파를 감소시킬 수 있을 것이라는 가능성을 제시하고 있음.

표 13. 공격접종 전 혈청 내 항체가

Group	No. of chicks	positive rate ^A	HI titer	
			Mean	SD
A	4	0/4	-	-
AC	4	0/4	-	-
B	4	0/4	-	-
BC	4	0/4	-	-
C	4	0/4	-	-
CC	4	0/4	-	-
D	4	0/4	-	-
DC	4	0/4	-	-
E	4	0/4	-	-
EC	2	0/2	-	-

^A양성수수/시험수수

표 14. 공격접종 9일 후 혈청 내 항체가

Group	No. of chicks	positive rate ^A	HI titer	
			Mean	SD
A	4	4/4	4	0.816497
AC	4	0/4	-	-
B	4	4/4	3.75	0.957427
BC	4	0/4	-	-
C	4	4/4	5.25	0.5
CC	4	1/4	4	-
D	4	4/4	5.25	0.5
DC	4	2/4	3	-
E	4	4/4	4.25	0.957427
EC	2	1/2	1	-

^A양성수수/시험수수

표 15. 공격접종 14일 후 혈청내 항체가

Group	No. of chicks	positive rate ^A	HI titer	
			Mean	SD
A	4	4/4	6.25	0.957427
AC	4	4/4	6.25	0.5
B	4	4/4	7.25	0.957427
BC	4	4/4	5	1.632993
C	4	4/4	7.75	0.5
CC	4	4/4	6.75	0.5
D	4	4/4	6.5	1.290994
DC	4	4/4	7	0
E	4	4/4	7	0
EC	2	2/2	7.5	0.707107

^A양성수수/시험수수

표 16. 공격집종 21일 후 혈청 내 항체가

Group	No. of chicks	positive rate ^A	HI titer	
			Mean	SD
A	4	4/4	4.5	1
AC	4	4/4	4.5	0.57735
B	4	4/4	4.5	0.57735
BC	4	4/4	4	0.816497
C	4	4/4	5.75	0.5
CC	4	4/4	4.75	0.5
D	4	4/4	5	0
DC	4	4/4	5	0.816497
E	4	4/4	5.25	0.5
EC	2	2/2	5	1.414214

^A양성수수/시험수수

제 2절. 단백질의 구조정보를 이용한 항바이러스 물질 설계 및 합성
(제 1협동)

[1차년도]

1. 단백질의 구조정보를 이용한 항바이러스 물질 설계 및 합성함.

entry	R	yield (%)	product
1	Methyl	86	1a
2	Ethyl	76	1b
3	Propyl	91	1c
4	Butyl	87	1d
5	Dimethyl	69	1e
6	Isopropyl	76	1f
7	Sec-butyl	100	1g
8	Isobutyl	100	1h

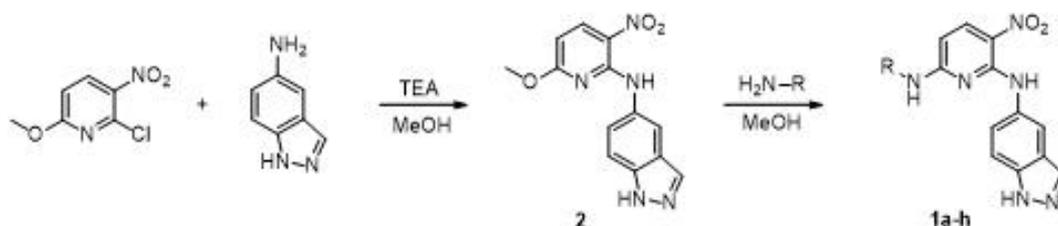


그림 1. Indazole을 기본 골격으로 한 저해제 합성 (1)

2. 설계된 화합물을 다양한 유기합성법을 통해 합성이 시도됨.
3. Indazole의 유도체를 합성하기 위해 pyridine을 중심으로 methylamine에 다양한 alkyl기를 도입하여 화합물을 합성함.
4. Alkyl기를 도입하기위한합성은, nitropyridine과 indazole을 염기조건하에 합성하여 중간 물질 2를 만들고 methyl기 이외 7가지 alkyl기를 합성하여 화합물 1a-h를 합성함.

entry	R	yield (%)	product
1	Methoxylamine	41	4a
2	Methylhydrazine	67	4b

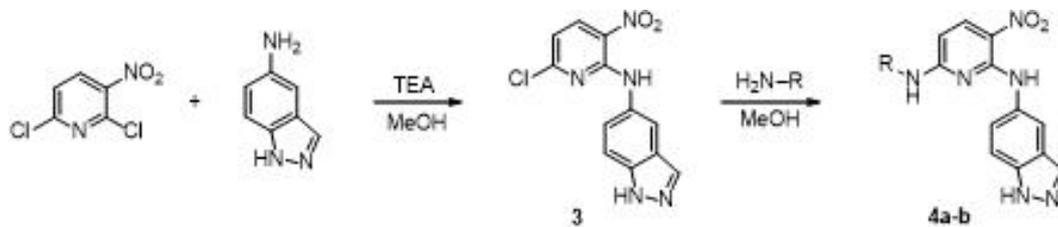


그림 2. Indazole을 기본 골격으로 한 저해제 합성 (2)

5. 반응성이 더 좋은 중간 물질 3을 만들기 위해 methoxy 대신 -Cl이 붙어있는 물질을 사용하여 염기조건하에서 합성함.

6. 중간물질 3에 methoxyamine과 methyl-drzine을 합성하여 물질 4a-b를 합성함.

entry	R ₂	yield (%)	Product
1		44	5a
2		61	5b
3		76	5c
4		90	5d
5		61	5e
6		78	6a
7		100	6b
8		60	6c
9		64	6d
10		75	6e

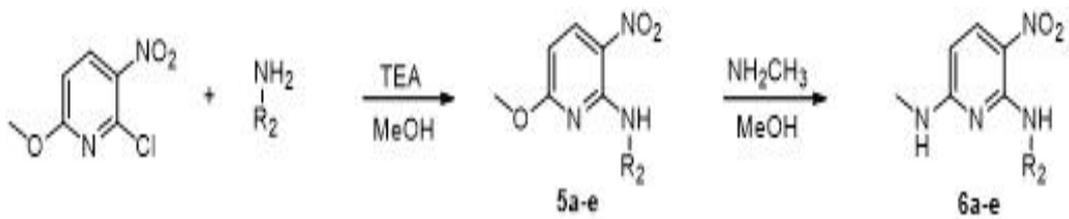
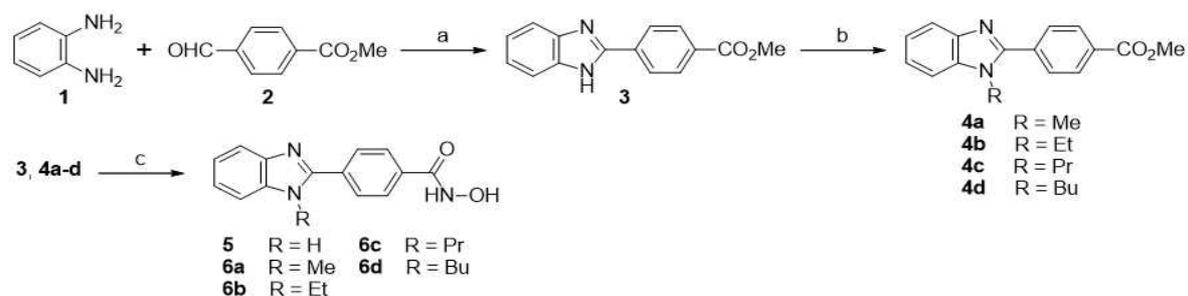


그림 3. Pyridine을 기본 골격으로 한 저해제 합성 (3)

7. Indazole부분이 다른 유도체를 합성하기 위해 다양한 indazole, indole유도체들을 가진 10가지 화합물을 합성함.
8. (1)의 합성 방법과 동일하게 합성을 진행함. amine에 존재하는 10가지 물질을 염기 조건에서 합성하여 중간물질 5a-e를 만들고 methylamine을 합성하여 화합물 6a-e를 합성함.
9. 합성된 화합물은 활성평가를 위해 제 2협동 기관인 전북대학교에 전달하여 활성평가를 실시함.

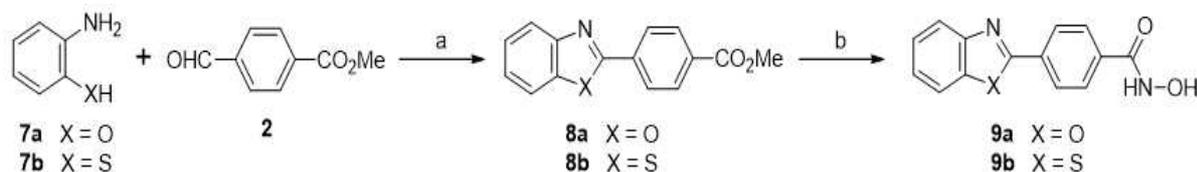
[2차년도]

1. Epigenetic 변형을 일으키는 HDACs 단백질이 최근 바이러스 감염에 중요한 역할을 한다는 보고가 있으며, 이를 통한 항바이러스 약물개발이 많은 연구팀에서 진행되고 있음.
2. HDACs 단백질의 구조정보를 이용하여 새로운 화합물들을 설계하여 다음과 같은 유기합성법을 통해 다수의 유도체를 합성함.



시약 및 반응조건: (a) 10% H₂O in DMF, 80°C, 36h, 88%; (b) NaH, alkyl iodide, DMF, rt, 10 h, 45-70%; (c) NH₂OH, KOH, MeOH, 0 °C, 3 h, 36-51%.

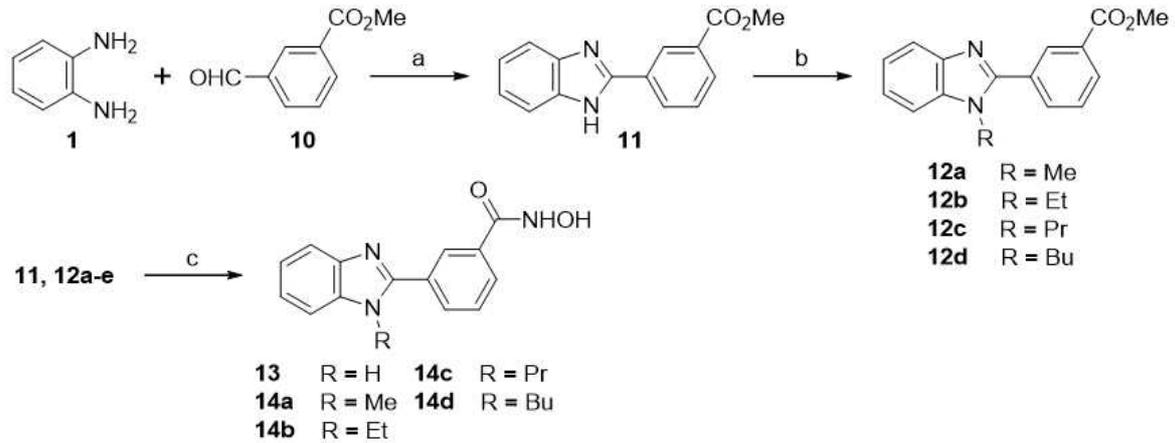
3. 설계된 화합물을 다양한 유기합성법을 통해 합성이 시도
4. Benzimidazole 유도체를 합성하기 위해 imidazole을 중심으로 amine에 다양한 alkyl기를 도입하여 화합물을 합성함.
5. 이후 NH₂OH 시약을 염기조건하에서 반응물과 반응시켜, 최종적으로 5가지 alkyl기를 합성하여 화합물 5, 6a-d를 합성함.



시약 및 반응조건: (a) I₂, DCM, rt, 3 h, 32% for 8a, 35% for 8b; (b) NH₂OH, KOH, MeOH, 0 °C, 3 h, 45% for 9a, 42% for 9b.

6. Benzimidazole 유도체의 아민기를 산소와 황으로 치환시킨 Benzoxazole과 Benzothiazole 화합물을 합성하기 위해서 알데이드 화합물 2와 반응시켜 중간체 8a-b를 합성함.

7. 이후 NH_2OH 시약을 염기조건하에서 반응물과 반응시켜, 최종적으로 2가지 Benzoxazole과 Benzothiazole 화합물 9a-d를 합성함.



시약 및 반응조건: (a) 10% H_2O in DMF, 80 °C, 48 h, 86%; (b) NaH, alkyl iodide, DMF, rt, 10 h, 11-91%; © NH_2OH , KOH, MeOH, 0 °C, 3h, 33-55%

8. Meta 치환기를 도입하기 위해서 새로운 방법으로 유도체 합성.
9. Meta 유도체를 합성하기 위해 다양한 diamine과 알데히드를 반응시켜 중간체 11 화합물을 합성함.
10. 11 화합물을 이용하여 염기조건하에서 알킬기를 다양하게 도입하여 다수의 유도체 일 12a-d를 만들고 MPCL를 이용하여 정제 분리함.
11. 이후 NH_2OH 시약을 염기조건하에서 반응물과 반응시켜, 최종적으로 5가지 화합물 13, 14a-d를 합성함.
12. 합성된 화합물은 활성평가를 위해 제 2협동기관인 전북대학교에 전달하여 활성평가를 실시함.

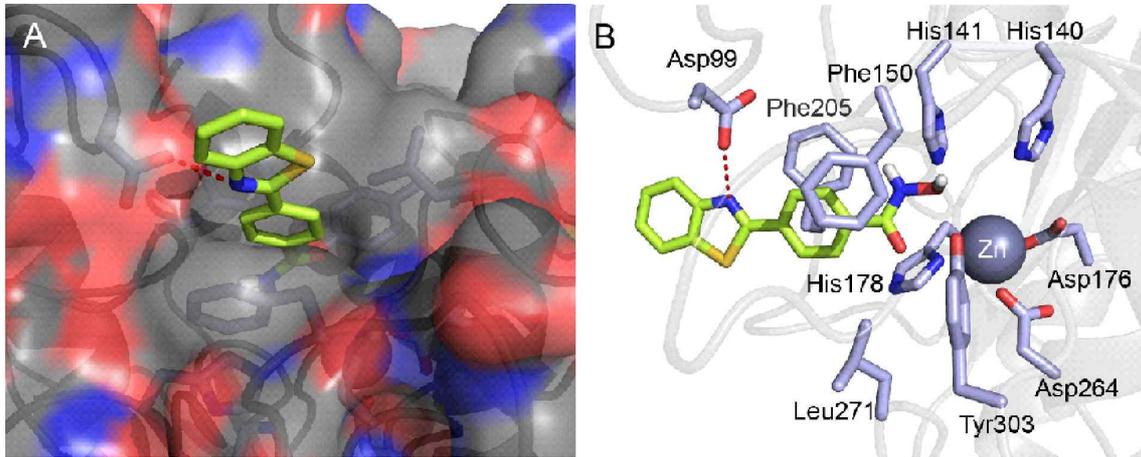


그림 1. 화합물과 단백질과의 도킹 실험

13. 숙주세포에 존재하는 HDACs 단백질은 바이러스 증식의 매우 중요하게 작용하여, 항바이러스 표적으로 중요한 의미를 지님.
14. 본 연구팀에서는 HDACs 단백질 구조와 합성된 화합물을 이용하여 도킹 실험을 진행함.

[3차년도]

1. 1, 2차년도에 개발된 화합물들의 최적화 및 대량생산 준비

가. 1, 2차년도 연구를 통해 최종 선별된 3종 물질 CMA-2-153, PSY-4-59, DiNap들의 대량 합성.

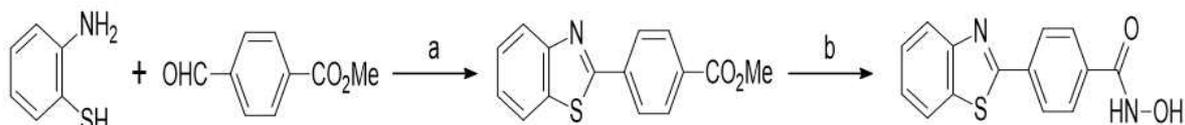


그림 1. PSY-4-59 화합물의 대량합성.

반응조건; (a) I₂, DCM, r t, 3 h, 35%; (b) NH₂OH, KOH, MeOH, 0 °C, 3 h, 42%

- (1) 요오드 화합물을 촉매로 이용하여 DCM 용매에서 실온에서 3시간 반응시켜 중간체 화합물 벤조싸이아졸 화합물을 얻음.
- (2) 말단에 존재하는 에스터 그룹을 염기조건에서 하이드록시아민을 첨가하여 hydroxamic acid 그룹으로 전환시켜 최종적으로 PSY-4-59 화합물을 합성.
- (3) 95% 순도의 물질 확보를 위해 MPLC를 이용하여 물질을 정해함.
- (4) 이후 NMR, MS를 이용하여 화합물의 순도 및 구조를 확인.
- (5) gram 단위의 화합물을 얻기 위해서 동일 반응을 여러 번 반복함.

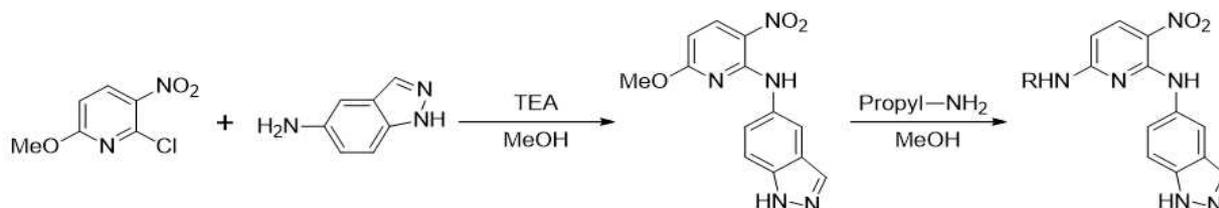


그림 2. CMA-2-153 화합물의 대량합성

- (6) 트리아에틸아민을 촉매로 이용하여 인다졸 화합물을 피리딘 알파위치에 도입함.
- (7) 이후, 프로필아민 시약을 이용하여 최종화합물 CMA-2-153을 합성함.
- (8) 95% 순도의 물질 확보를 위해 MPLC를 이용하여 물질을 정해함.

(9) 이후 NMR, MS를 이용하여 화합물의 순도 및 구조를 확인.

(10) gram 단위의 화합물을 얻기 위해서 동일 반응을 여러 번 반복함.

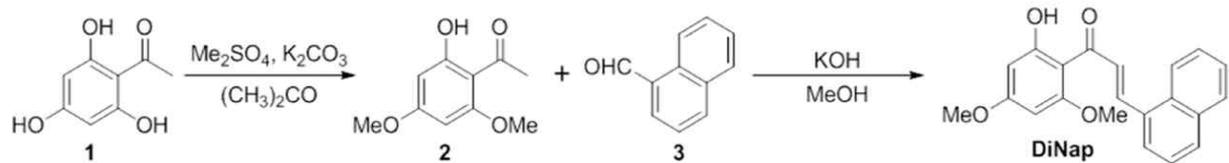


그림 3. DiNap 화합물의 대량합성

(11) 다이메틸설페이트 시약을 염기조건하에서 반응시켜 중간체 화합물 2번을 완성함.

(12) 프탈알데하이드 화합물과 알돌반응을 진행시켜 최종화합물 DiNap을 합성함.

(13) 95% 순도의 물질 확보를 위해 MPLC를 이용하여 물질을 정해함.

(14) 이후 NMR, MS를 이용하여 화합물의 순도 및 구조를 확인.

(15) gram 단위의 화합물을 얻기 위해서 동일 반응을 여러 번 반복함.

2. 선별된 3종의 물질들의 약물동역학(PK) 실험 수행

(1) PK parameter of CMA-2-153 in Rat

Table 3. PK Parameter after intravenous injection at a dose of 1 mg/kg (n=4)

Subject	T _{1/2} (hr)	AUC _{last} (hr*ng/ml)	AUC _{INF} _obs (hr*ng/ml)	%AUC Extrap	CL _{obs} (ml/min /kg)	MRT _{INF} _obs (hr)	V _{ss} _obs (L/kg)
1	0.3	130.2	131.1	0.7	127.1	0.4	2.9
2	2.0	65.4	73.0	10.5	228.2	2.5	33.7
3	0.2	114.8	118.2	2.9	141.0	0.3	2.3
4	0.3	136.7	137.5	0.6	121.2	0.4	2.7
Mean	0.7	111.8	115.0	3.7	154.4	0.9	10.4
SD	0.9	32.3	29.1	4.7	49.9	1.1	15.5

Table 4. PK Parameter after oral administration at a dose of 10 mg/kg (n=4)

Subject	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{last} (hr*ng/ml)	AUC _{INF} _obs (hr*ng/ml)	%AUC Extrap	MRT _{INF} _obs (hr)
1	1.9	0.5	61.3	223.7	245.2	8.8	3.6
2	2.4	0.5	44.4	113.5	172.2	34.1	3.7
3	1.0	0.5	155.8	274.0	279.0	1.8	1.5
4	2.3	0.5	41.5	93.8	111.3	15.7	3.1
Mean	1.9	0.5	75.7	176.3	201.9	15.1	3.0
SD	0.7	0.0	54.1	86.7	75.1	13.9	1.0

생체이용률 (BA): 15.8%

그림 4. CMA-2-153 약물의 PK 데이터 결과

- (가) CMA-2-153 약물을 Rat에서 1과 10 mg/Kg 용량으로 각각 정맥과 경구로 투여한 후에 약물의 혈중 농도를 LC-MS/MS로 분석함.
- (나) 정맥투여 결과 0.7 h의 반감기를 나타내었으며, 높은 추출률을 보였음.
- (다) 생체이용률은 15.8%를 나타냄.

(2) PK parameter of PSY-4-59 in Rat

Table 3. PK Parameter after intravenous injection at a dose of 1 mg/kg (n=4)

Subject	T _{1/2} (hr)	AUClast (hr*ng/ml)	AUCINF _obs (hr*ng/ml)	%AUC Extrap	CLobs (ml/min /kg)	MRTINF _obs (hr)	Vss_obs (L/kg)
1	0.3	130.2	131.1	0.7	127.1	0.4	2.9
2	2.0	65.4	73.0	10.5	228.2	2.5	33.7
3	0.2	114.8	118.2	2.9	141.0	0.3	2.3
4	0.3	136.7	137.5	0.6	121.2	0.4	2.7
Mean	0.7	111.8	115.0	3.7	154.4	0.9	10.4
SD	0.9	32.3	29.1	4.7	49.9	1.1	15.5

Table 4. PK Parameter after oral administration at a dose of 10 mg/kg (n=4)

Subject	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C _{max} (ng/ml)	AUClast (hr*ng/ml)	AUCINF _obs (hr*ng/ml)	%AUC Extrap	MRTINF _obs (hr)
1	1.9	0.5	61.3	223.7	245.2	8.8	3.6
2	2.4	0.5	44.4	113.5	172.2	34.1	3.7
3	1.0	0.5	155.8	274.0	279.0	1.8	1.5
4	2.3	0.5	41.5	93.8	111.3	15.7	3.1
Mean	1.9	0.5	75.7	176.3	201.9	15.1	3.0
SD	0.7	0.0	54.1	86.7	75.1	13.9	1.0

생체이용률 (BA): 15.8%

그림 5. PSY-4-59 약물의 PK 데이터 결과

(가) PSY-4-59 약물을 Rat에서 1과 10 mg/Kg 용량으로 각각 정맥과 경구로 투여한 후에 약물의 혈중 농도를 LC-MS/MS로 분석함

(나) 정맥투여 결과 0.5 h의 반감기를 나타내었으며, 높은 추출률을 보였음.

(다) 상대적으로 낮은 생체이용률은 4.4%를 나타냄.

(3) PK parameter of DiNaP in Rat

2) PK Parameter of DiNaP in Rat

Table 3. PK Parameter after intravenous injection at a dose of 1 mg/kg (n=4)

Subject	T _{1/2} (hr)	AUC _{Iast} (hr*ng/ml)	AUC _{INF} _obs (hr*ng/ml)	%AUC Extrap	CL _{Obs} (ml/min /kg)	MRT _{INF} _obs (hr)	V _{ss} _obs (L/kg)
1	2.8	180.1	187.3	3.8	89.0	1.4	7.3
2	3.2	162.6	171.9	5.4	96.9	1.7	10.0
3	3.3	145.8	155.0	5.9	107.6	1.8	11.4
4	2.5	132.1	136.9	3.5	121.7	1.4	9.9
Mean	2.9	155.2	162.8	4.7	103.8	1.6	9.7
SD	0.4	20.8	21.7	1.2	14.2	0.2	1.7

Table 4. PK Parameter after oral administration at a dose of 10 mg/kg (n=4)

Subject	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{Iast} (hr*ng/ml)	AUC _{INF} _obs (hr*ng/ml)	%AUC Extrap	MRT _{INF} _obs (hr)
1	-	6.0	50.9	223.2	-	-	-
2	5.4	6.0	45.0	258.9	437.0	40.8	9.0
3	-	6.0	39.8	152.5	-	-	-
4	5.6	0.3	55.5	181.0	326.7	44.6	9.5
Mean	5.5	4.6	47.8	203.9	381.8	42.7	9.3
SD	0.1	2.9	6.8	46.8	78.0	2.7	0.4

생체이용률 (BA): 13.1%

그림 6. DiNap 약물의 PK 데이터 결과

(가) DiNap 약물을 Rat에서 1과 10 mg/Kg 용량으로 각각 정맥과 경구로 투여한 후에 약물의 혈중 농도를 LC-MS/MS로 분석함

(나) 2.9 h의 반감기를 나타내었으며, 높은 추출률을 보였음.

(다) 생체이용률은 13.1%를 나타냄.

제 3절. 항바이러스 제제의 PED와 PRRS 바이러스에 대한 평가
(제 2협동)

[1차년도]

1. 세포주를 이용한 PED 바이러스에 대한 항바이러스제제의 평가

가. 1차년도에 계명대에서 합성된 33종의 천연물 유도체를 대상으로(표1) Vero 세포를 이용하여 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가를 실시함.

표 1. 평가 대상 천연물 유도체 목록 및 합성 농도

분류	천연물 유도체	합성농도 (mM)
그룹2 (4종)	CMA-2-150	20
	CMA-2-152	20
	CMA-2-153	20
	CMA-2-154	20
그룹3 (15종)	CMA-3-10	20
	CMA-3-12	20
	CMA-3-13	20
	CMA-3-18	20
	CMA-3-19	20
	CMA-3-20	20
	CMA-3-21	20
	CMA-3-22	20
	CMA-3-23	20
	CMA-3-25	20
	CMA-3-66	20
	CMA-3-67	20
	CMA-3-68	20
	CMA-3-72	20
CMA-3-08	10	
그룹4 (14종)	CMA-4-35	20
	CMA-4-36	20
	CMA-4-37	20
	CMA-4-121	20
	CMA-4-122	20
	PSY-4-58	20
	PSY-4-59	20
	PSY-4-85	20
	PSY-4-86	20
	PSY-4-87	20
	PSY-4-88	20
	PSY-4-135	20
	PSY-4-136	20
PSY-4-141	20	

나. 그룹 2 화합물은 니트로-피리딘 골격에 모두 인다졸 화합물이 치환된 골격을 지니며, 그룹 3 화합물은 니트로-피리딘 골격에 인돌, 인다졸, 벤지트리아졸, 벤지이미다졸 등이 다양하게 치환된 화합물임.

다. 그룹 4 화합물은 그룹 2, 3과 달리 니트로-피리딘 골격을 가지지 않으며, 한쪽 말단에 하드라시믹 산을 가지고 있음.

라. 그룹 2의 4종의 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 평가한 결과 모두 40 μ M의 농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내었으며 특히 CMA2-150, -152, -153은 20 μ M의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 보다 효과적인 항바이러스 후보 제제가 될 것으로 평가됨 (그림1).

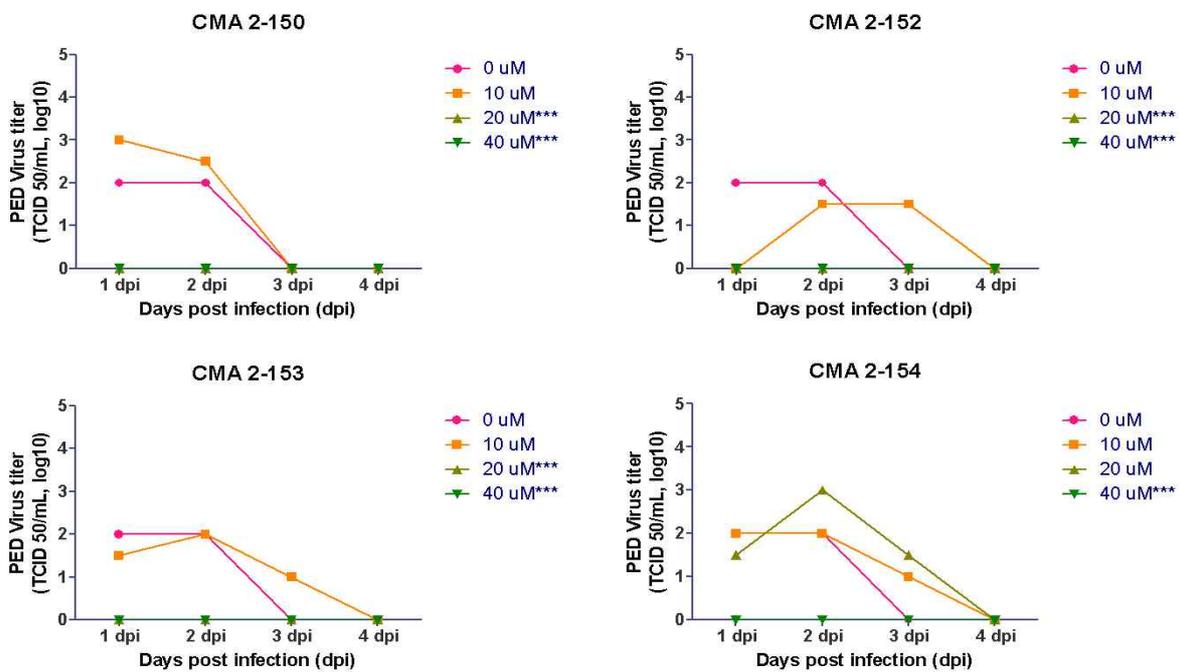


그림 1. 그룹 2 천연 유도물질들의 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과

마. 그룹 3의 15종의 항바이러스 효능평가 결과 모두 40 μ M의 농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내었으며 (그림 2와 3) 특히 CMA3-21은 20 μ M의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 보다 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었음(그림3).

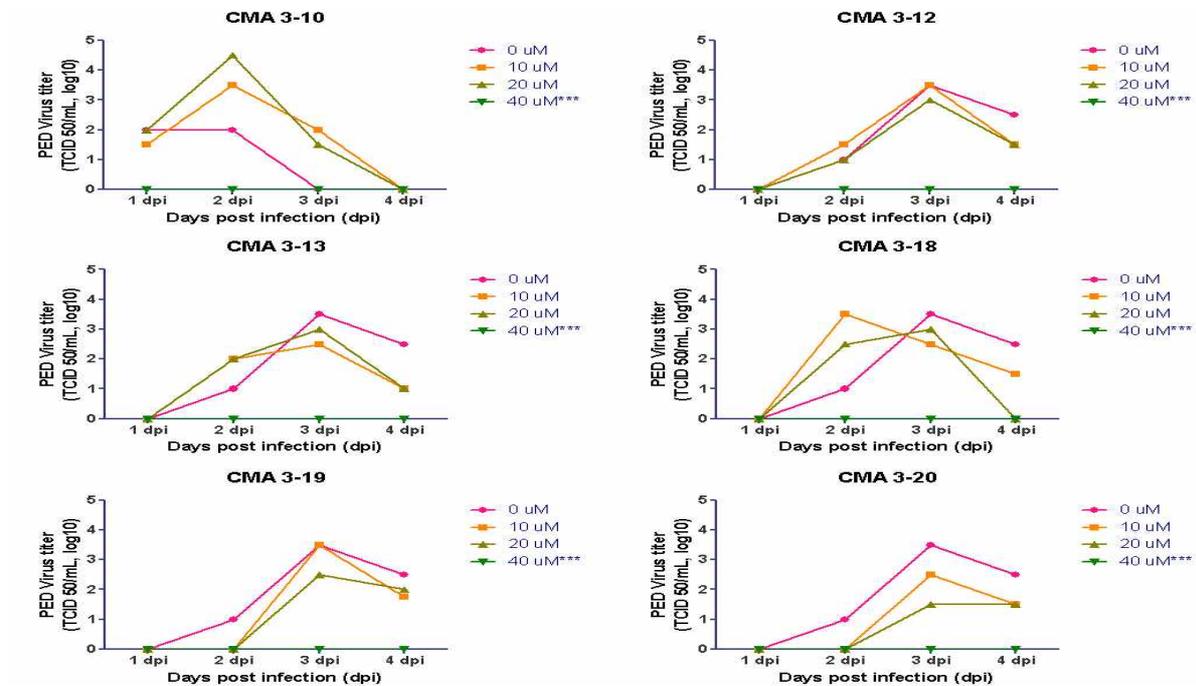


그림 2. 그룹 3 천연 유도물질들의 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(1)

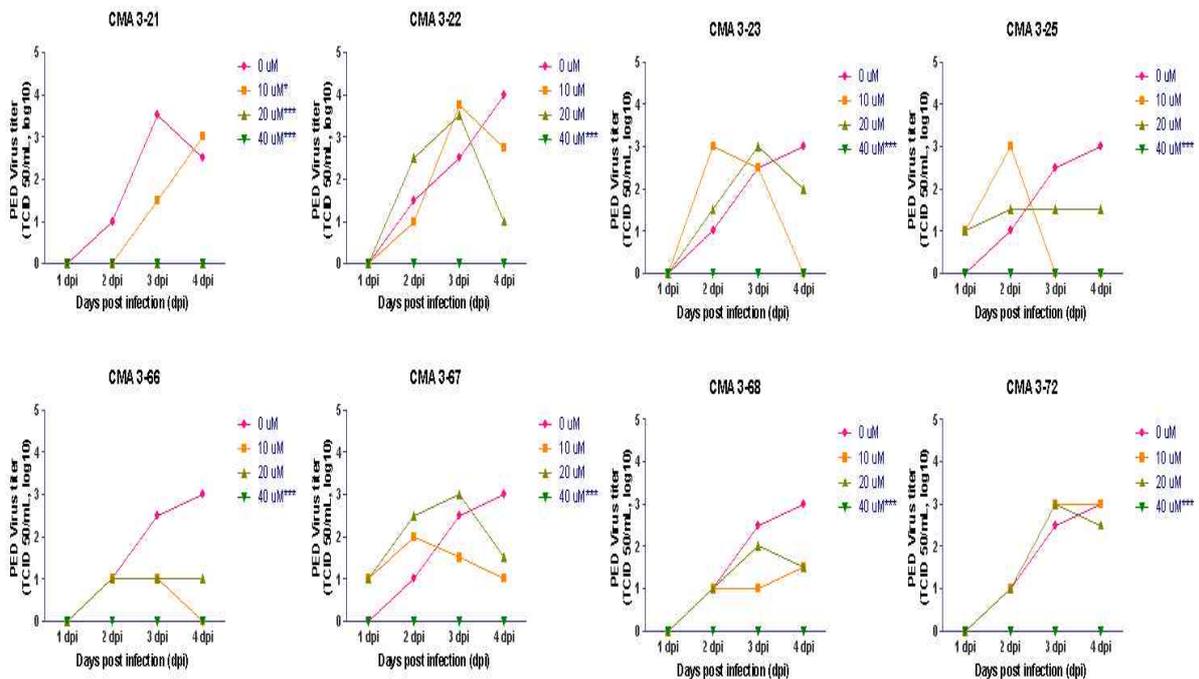


그림 3. 그룹 3 천연 유도물질들의 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(2)

바. 그룹 4의 14종의 항바이러스 효능평가 결과 CMA4-37을 제외한 모든 합성제제들이 40 μ M의 농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내었으며(그림 4와 5) 특히 CMA4-59는 10 μ M의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 모든 그룹의 합성제제들

중 가장 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가됨 (그림4).

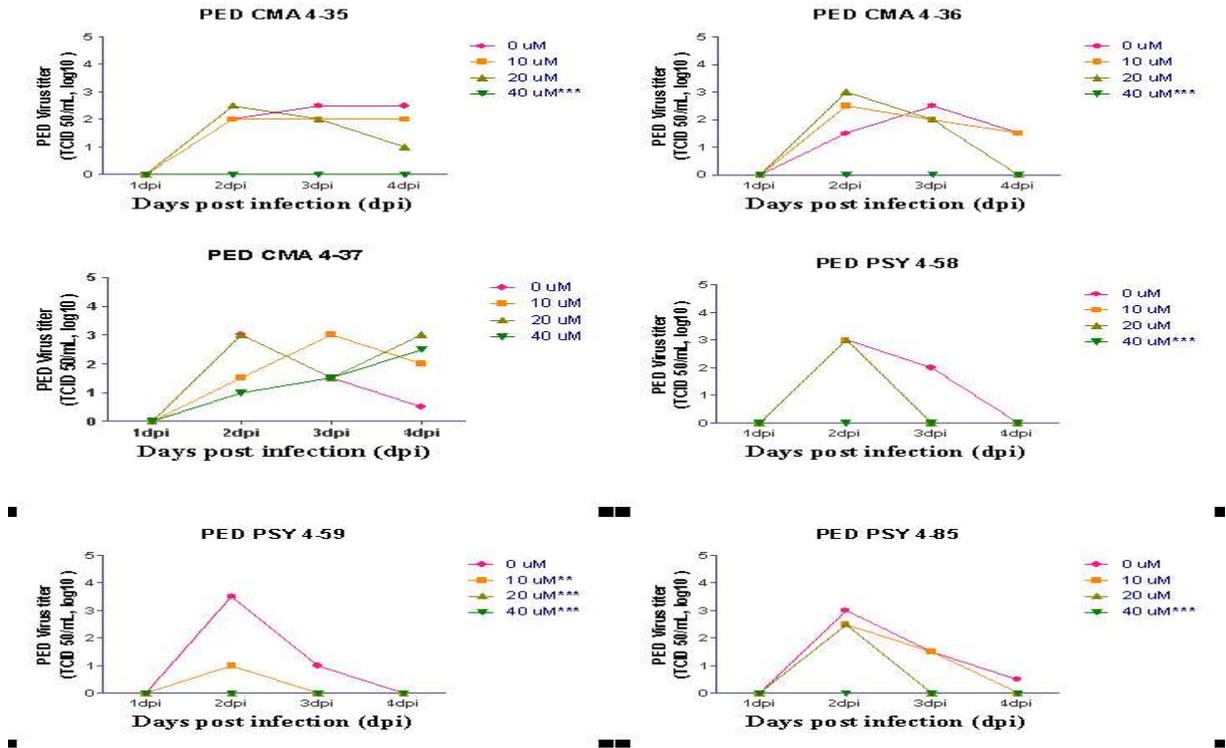


그림 4. 그룹 4 천연 유도물질들의 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(1)

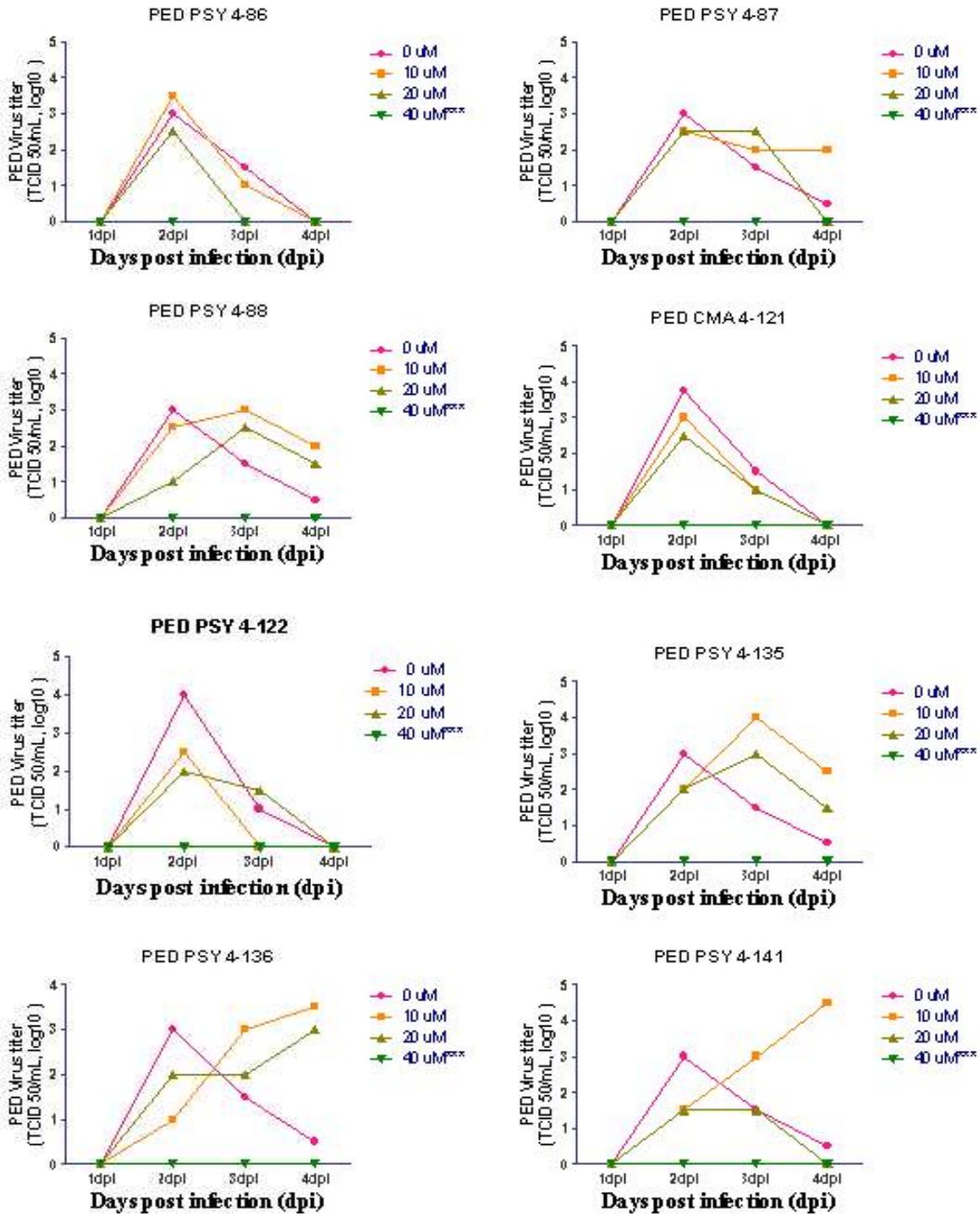


그림 5. 그룹 4 천연 유도물질들의 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(2)

사. 1차년도에 합성된 총 33종의 천연물 유도체의 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가결과 CMA4-59가 10 μM의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 모든 그룹의 합성체들 중 가장 효과적인 항바이러스 후보체제가 될 것으로 평가되었으며 CMA2-150, CMA2-152, CMA2-153, CMA3-21 등의 4종의 천연물 유도체도 20 μM의

농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 총 5종의 유도체가 PED 바이러스에 대한 항바이러스 제제로 선발되었으므로(표2) 충분한 양으로 합성하여 3차년도에 세부적인 항바이러스 효과와 세포독성 평가가 이루어질 예정임.

표 2. PED 바이러스에 대한 33종 천연물 유도체의 항바이러스 효능 평가 결과 요약

분류	천연물 유도체	항바이러스 효과 유효 농도 (μM)
그룹2 (4종)	CMA-2-150	≥ 20
	CMA-2-152	≥ 20
	CMA-2-153	≥ 20
	CMA-2-154	≥ 40
그룹3 (15종)	CMA-3-10	≥ 40
	CMA-3-12	≥ 40
	CMA-3-13	≥ 40
	CMA-3-18	≥ 40
	CMA-3-19	≥ 40
	CMA-3-20	≥ 40
	CMA-3-21	≥ 20
	CMA-3-22	≥ 40
	CMA-3-23	≥ 40
	CMA-3-25	≥ 40
	CMA-3-66	≥ 40
	CMA-3-67	≥ 40
	CMA-3-68	≥ 40
	CMA-3-72	≥ 40
	CMA-3-08	평가중
그룹4 (14종)	CMA-4-35	≥ 40
	CMA-4-36	≥ 40
	CMA-4-37	≥ 40
	CMA-4-121	≥ 40
	CMA-4-122	≥ 40
	PSY-4-58	≥ 40
	PSY-4-59	≥ 10
	PSY-4-85	≥ 40
	PSY-4-86	≥ 40
	PSY-4-87	≥ 40
	PSY-4-88	≥ 40
	PSY-4-135	≥ 40
	PSY-4-136	≥ 40
	PSY-4-141	≥ 40

2. 세포주를 이용한 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스제제의 평가

가. 1차년도에 계명대에서 합성된 33종의 천연물 유도체를 대상으로(표3) MARC-145 세포를 이용하여 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가를 실시함.

나. 그룹 2의 4종의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 평가한 결과 모두 40 μM 의 농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내었으며 특히 CMA2-152, -153, -154는 20 μM 의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 보다 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가됨 (그림6).

다. 이러한 그룹 2 화합물은 니트로-피리딘 골격을 가지고 있으며, 2번 위치에 알킬 아민기가 도입된 화합물로 추가적인 최적화 과정을 통해 더욱 뛰어난 활성물질로 개선이 용이할 것으로 사료됨.

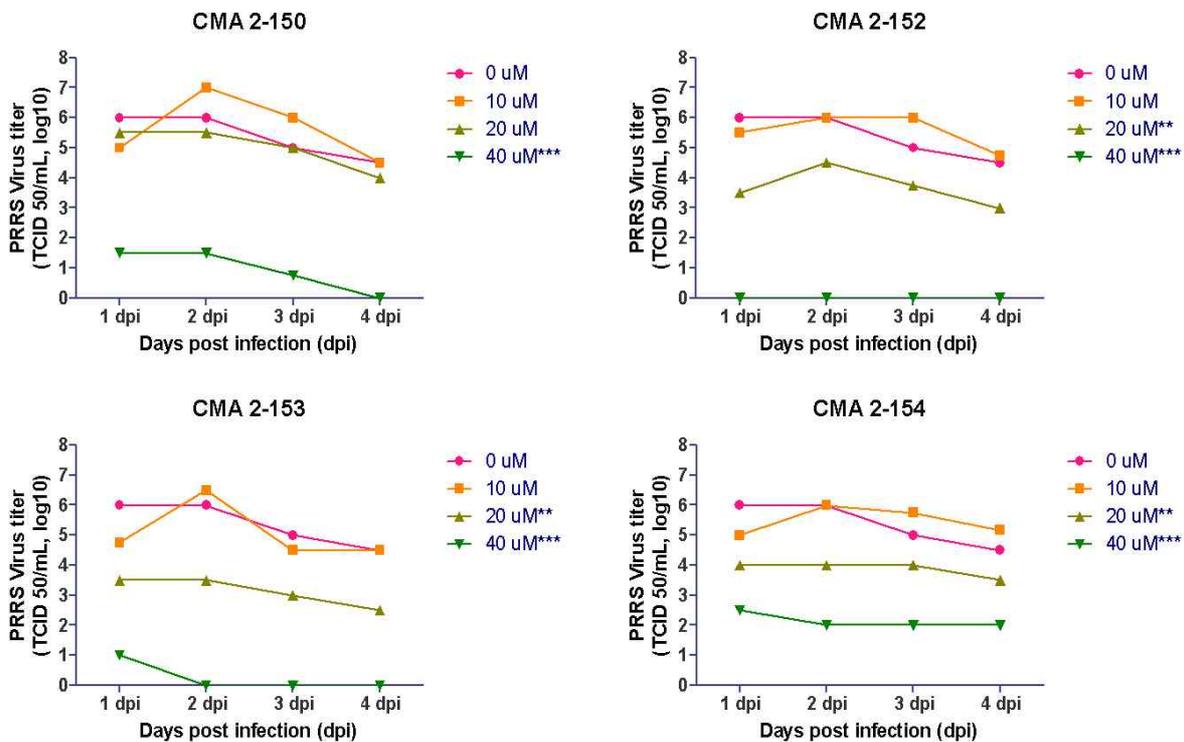


그림 6. 그룹 2 천연 유도물질들의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과

라. 그룹 3의 15종의 항바이러스 효능평가 결과 모두 40 μM 의 농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내었으며(그림 7와 8) 특히 CMA3-13, -18, 19는 10 μM 의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 모든 그룹의 합성제제들 중 가장 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었으며 CMA3-12, -20, -21, -23, -25, -66, -68는 20 μM 의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었음.

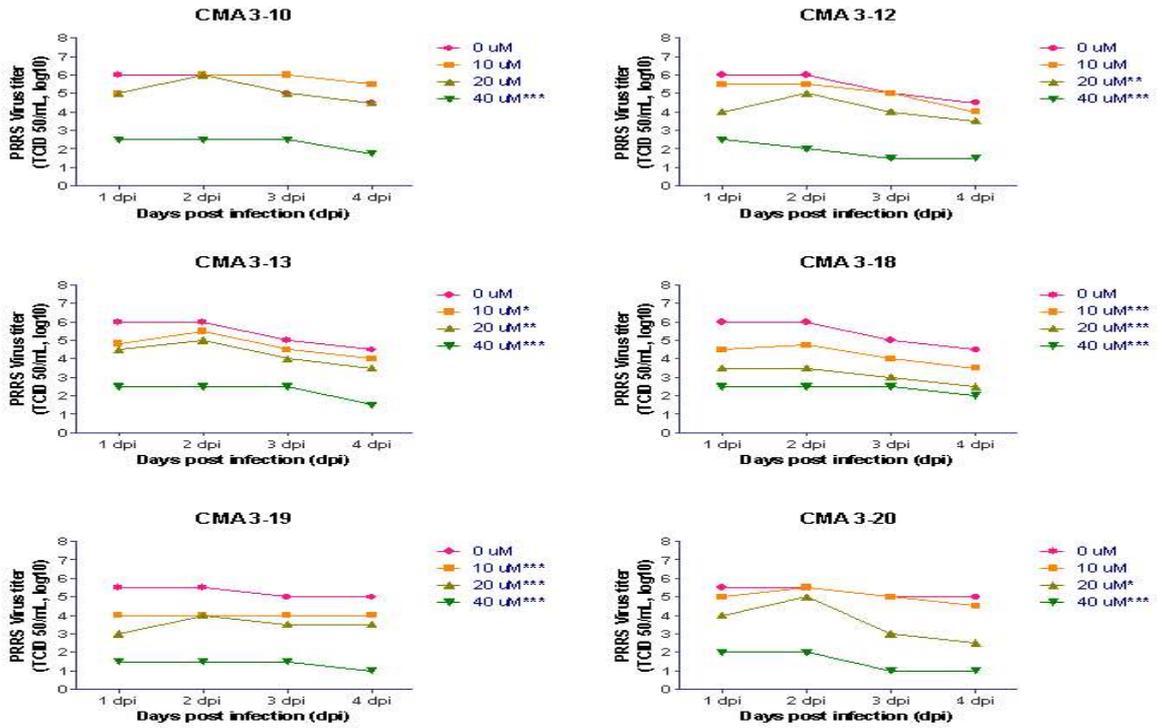


그림 7. 그룹 3 천연 유도물질들의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(1)

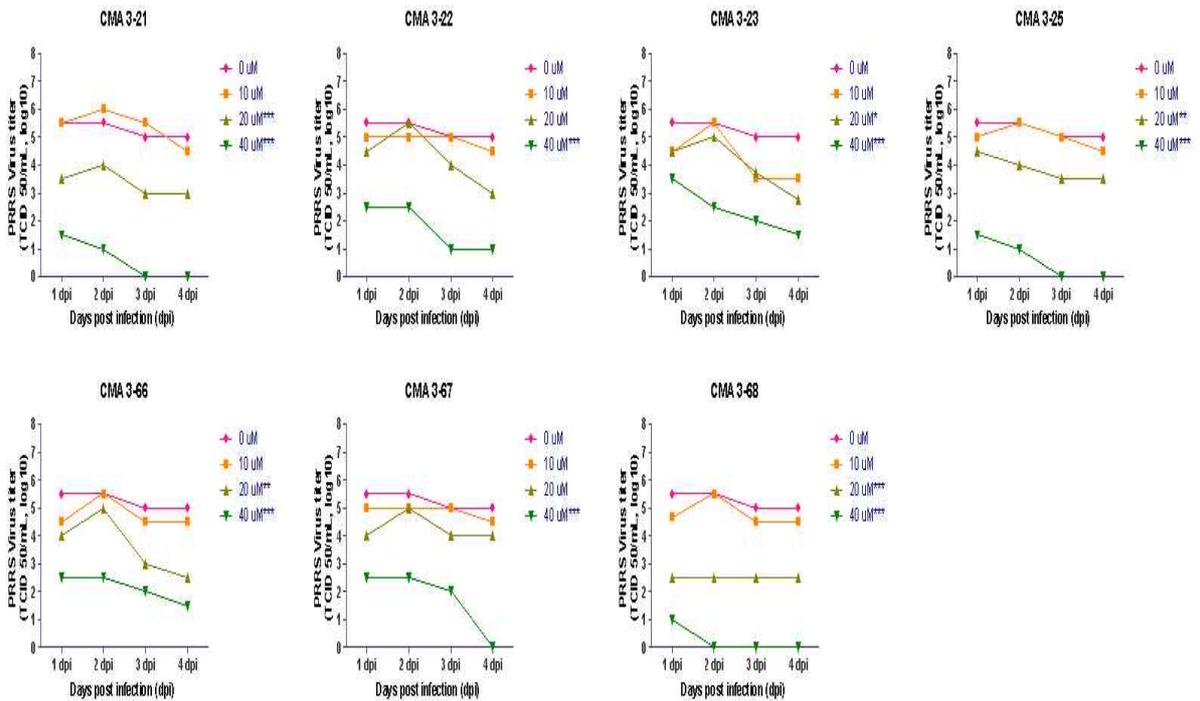


그림 8. 그룹 3 천연 유도물질들의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(2)

마. 그룹 4의 14종의 항바이러스 효능평가 결과 모든 합성제제들이 40 μM 의 농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내었으며(그림 9) 특히 CMA4-141은 20 μM 의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었음.

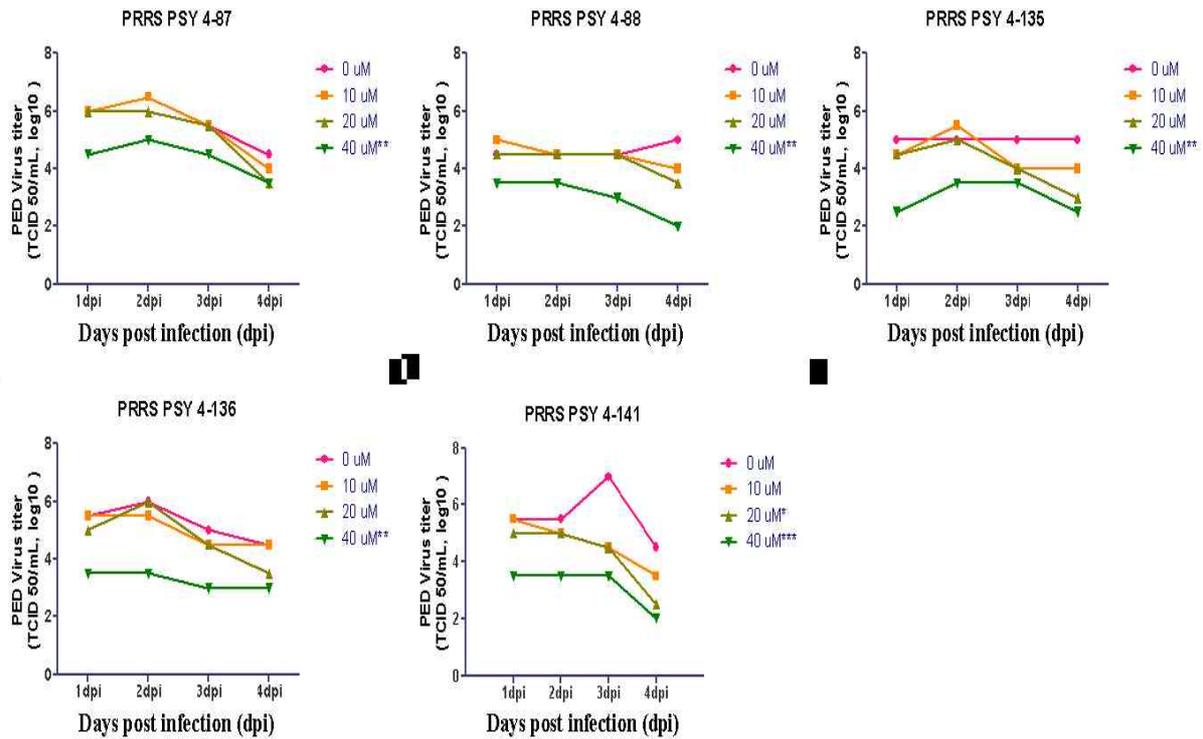


그림 9. 그룹 4 천연 유도물질들의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과

바. 1차년도에 합성된 총 33종의 천연물 유도체의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가결과 CMA3-13, CMA3-18, CMA3-19가 10 μM 의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 모든 그룹의 합성제제들 중 가장 효과적인 PRRSV 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었으므로(표3) 충분한 양으로 합성하여 9월까지 보다 세부적인 항바이러스 효과와 세포독성 평가가 이루어질 예정이다. 또한 CMA2-152, CMA2-153, CMA2-154, CMA3-12, CMA3-20, CMA3-21, CMA3-23 등 11종 이상의 제제들도 20 μM 의 농도에서 유효한 항바이러스 효과가 관찰되므로 구조의 공통점 등을 바탕으로 최적화된 유도체로 개선하여 향후 평가에 이용할 예정이다.

표 5. PRRS 바이러스에 대한 33종 천연물 유도체의 항바이러스 효능 평가 결과 요약

분류	천연물 유도체	항바이러스 효과 유효 농도 (μM)
그룹2 (4종)	CMA-2-150	≥ 40
	CMA-2-152	≥ 20
	CMA-2-153	≥ 20
	CMA-2-154	≥ 20
그룹3 (15종)	CMA-3-10	≥ 40
	CMA-3-12	≥ 40
	CMA-3-13	≥ 10
	CMA-3-18	≥ 10
	CMA-3-19	≥ 10
	CMA-3-20	≥ 20
	CMA-3-21	≥ 20
	CMA-3-22	≥ 40
	CMA-3-23	≥ 20
	CMA-3-25	≥ 20
	CMA-3-66	≥ 20
	CMA-3-67	≥ 40
	CMA-3-68	≥ 20
	CMA-3-72	평가중
	CMA-3-08	평가중
그룹4 (14종)	CMA-4-35	평가중
	CMA-4-36	평가중
	CMA-4-37	평가중
	CMA-4-121	평가중
	CMA-4-122	평가중
	PSY-4-58	평가중
	PSY-4-59	평가중
	PSY-4-85	평가중
	PSY-4-86	평가중
	PSY-4-87	≥ 40
	PSY-4-88	≥ 40
	PSY-4-135	≥ 40
PSY-4-136	≥ 40	
PSY-4-141	≥ 20	

3. 자돈을 이용한 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 제제의 평가

가. 효능 및 안전성 평가 방법

- (1) 기존 실험실적 평가에서 선발된 항바이러스 물질(CBNU1)의 자돈에 사료 또는 음수 첨가 방법을 통한 경구 투여를 실시하여 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 및 안전성을 평가함.
- (2) PRRS 음성인 4주령 자돈 20두를 구입하여 그룹 당 5두씩 4개의 그룹으로 나누어 사육함.
- (3) 사료첨가용 항바이러스 물질 투여 그룹(사료첨가군), 음수용 항바이러스 물질 투여 그룹(음수투여군), 일반사료 투여 후 바이러스 공격접종 그룹(양성대조군), 일반 사료 급여 후 바이러스 비접종 그룹(음성대조군)으로 지정하여 각 그룹 당 처치를 공격접종 전 1 주일과 공격접종 후 2주간 실시함.
 - (가) 사료첨가용 항바이러스 물질은 한 마리당 일일 800 mg/kg을 섭취할 수 있도록 사료에 첨가하고 (20 kg 사료에 200 g의 항바이러스 물질 첨가), 음수용 항바이러스 물질은 1:500 배로 희석하여 투여(5 L 음수에 10 ml 항바이러스 물질 첨가)
- (4) 물질 투여 전, 물질 투여 후 1주일 간 채혈 및 체중을 측정함.
- (5) 그룹 당 처치 후 1 주일에 VR2332를 음성대조군을 제외하고 10^3 TCID₅₀/ml의 역가로 2 ml 씩 비강접종을 실시 함.
- (6) 공격접종 후 14일까지 매일 임상증상 및 공격접종 후 0, 7, 14일에 채혈 및 체중 측정함.
- (7) 공격접종 후 14일에 부검을 실시하고 조직 채취 및 병리조직학적 평가함.
 - (가) 모든 폐는 오염을 최소화하여 적출
 - (나) 적출한 폐에서의 바이러스 역가 측정 및 조직병리학적 실험 실시
 - (다) 적출한 폐는 전체적인 임상 증상 확인 후 각 엽마다 병변 스코어링을 실시
 - (라) 적출한 폐의 각 엽의 일부를 10% 포르말린에 고정시킨 뒤 절편한 후 병리조직학적 병변 스코어링
- (8) 채취한 혈액 및 폐에서 바이러스 역가 측정 및 항체가 측정

나. 평가 결과

- (1) 사료첨가용 또는 음수용 항바이러스 물질과 일반사료를 각각 1주일 간 투여한 후 1주일간의 일당증체율을 분석한 결과 일반사료를 공급한 일반사료 투여 대조군이 가장 높은 체중증체를 보였고 특히 음수제제 투여군과 비교하여 유의성있게 높은 수준의

체중증체를 보이므로 항바이러스 물질의 사료 또는 음수 첨가에 의해 사료 섭취가 다소 감소되는 것으로 관찰되어 식이성에 대한 개선이 필요할 것으로 판단됨 (그림 10).

- (2) PRRS 바이러스 공격감염 2주 후에 체중증체율을 그룹당 비교해본 결과 바이러스 공격접종을 하지 않은 음성대조군이 일당 0.5 kg의 증체율을 보여 가장 높았으며 다른 처치군에서는 0.4 kg 전 후의 증체율을 보여 다소 낮은 증체율을 보였으나 그룹당 통계적인 유의성이 관찰되지는 않아 증체율 측정에는 2주이상의 사육기간이 필요한 것으로 판단됨 (그림 10).

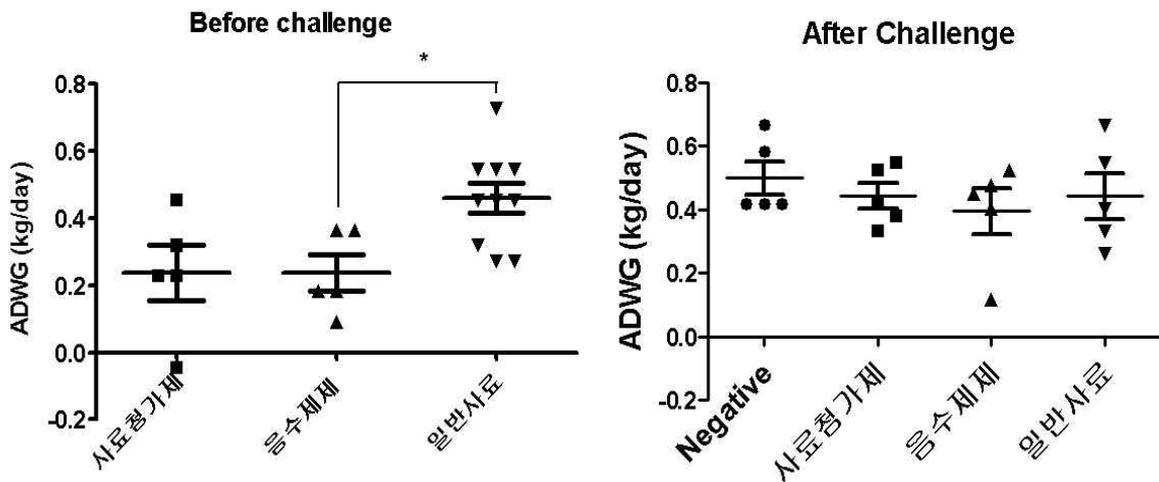


그림 10. 항바이러스 제제 처치 전 후 일당체중증체량(ADWG)

- (3) 공격접종 후 각 그룹의 자돈들의 혈중바이러스역가를 측정해 본 결과 음성대조군을 제외하고 모든 그룹의 자돈에서 공격접종 후 3일부터 혈중바이러스가 관찰되었고 실험 마지막인 공격접종 후 4일까지 검출되었으나 처치 그룹간의 통계적 유의성 있는 차이는 관찰되지 않음 (그림 11).

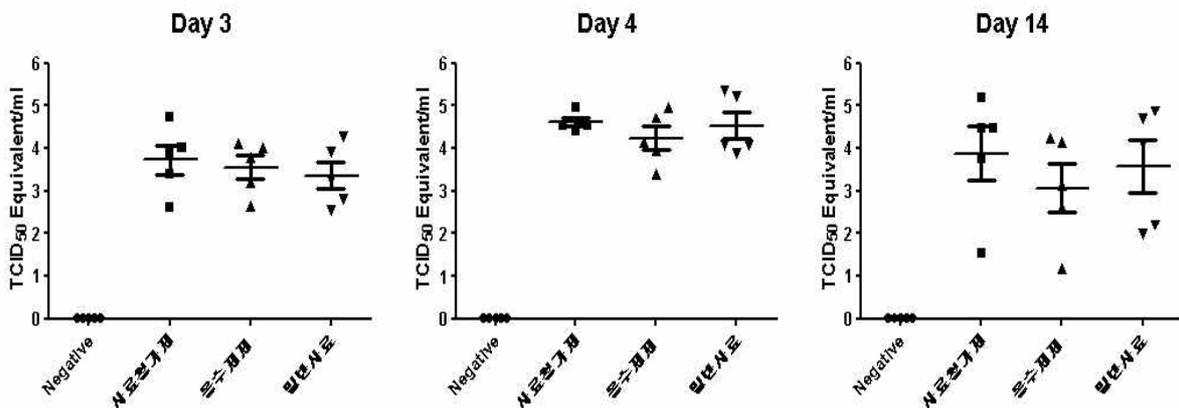


그림 11. 항바이러스 제제 처치 후 혈중 바이러스 농도

- (4) 또한 공격접종 후 14일에 모든 그룹의 자돈을 안락하고 부검을 실시한 결과 일반사료 공급 그룹에서 가장 높은 육안적 폐병변이 관찰되었으나 다른 그룹과 비교하여 통계적인 유의성 있는 차이는 관찰되지 않음 (그림 12).

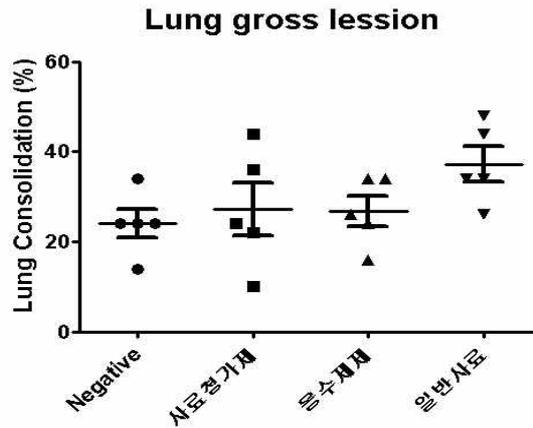


그림 12. 항바이러스 제제 처치 후 폐병변 수치

- (5) 자돈을 이용한 선발 항바이러스 물질(CBNU1)의 사료 또는 음수 첨가 방법에 의한 경구 투여를 통한 항바이러스 효능을 평가한 결과 증체율, 혈중바이러스역가 및 폐병변 분석결과에서 치료군과 비치료군 간에 유의성 있는 차이가 관찰되지 않아 선발 항바이러스 물질의 경구투여에 의한 적용은 항바이러스 효능에 유의성 있는 효과가 없는 것으로 판단되었다. 하지만, 선발 항바이러스 물질의 경구투여를 통한 의미 있는 부작용은 관찰되지 않음.

[2차년도]

1. 세포주를 이용한 PED 바이러스에 대한 항바이러스 제제의 평가

가. 1차년도에 제 1협동기관인 계명대학교에서 합성된 33종의 천연물 유도체를 평가한 결과를 바탕으로 총 18종의 천연물 유도체를 더 높은 농도로 합성하여 (표1) Vero 세포를 이용하여 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능과 세포독성 평가를 실시함.

표 1. 2차년도 평가 대상 천연물 유도체 정보

분류	천연물 유도체	분자량 (MW)	합성량 (20 mM)
그룹2 (5종)	CMA-2-150	284.27	300 ul
	CMA-2-151	285.26	40 ul
	CMA-2-152	298.30	300 ul
	CMA-2-153	312.33	300 ul
	CMA-2-154	326.35	300 ul
그룹3 (11종)	CMA-3-11	285.26	40 ul
	CMA-3-12		
	CMA-3-13	284.27	300 ul
	CMA-3-18	284.27	300 ul
	CMA-3-19		
	CMA-3-20	283.29	300 ul
	CMA-3-21	283.29	300 ul
	CMA-3-23	285.26	300 ul
	CMA-3-25	299.29	300 ul
	CMA-3-66	298.30	300 ul
	CMA-3-68	326.35	300 ul
그룹4 (2종)	PSY-4-59	270.31	300 ul
	PSY-4-141	267.28	300 ul

나. 그룹 2 화합물은 니트로-피리딘 골격에 모두 인다졸 화합물이 치환된 골격을 지니며, 그룹 3 화합물은 니트로-피리딘 골격에 인돌, 인다졸, 벤지트리아졸, 벤지이미다졸 등이 다양하게 치환된 화합물임.

다. 그룹 4 화합물은 그룹 2, 3과 달리 니트로-피리딘 골격을 가지지 않으며, 한쪽 말단에 하드라시믹 산을 가지고 있음.

- 라. 그룹 2의 5종 천연물 유도체의 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 평가한 결과 모두 CMA2-151을 제외한 다른 4종의 천연물 유도체들은 (CMA2-150, -152, -153, -154) 10-40 μM 의 농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내었으며 특히 CMA2-153은 10 μM 의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 보다 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었다(그림 1, 표 2). 모든 그룹 2의 천연물 유도체는 유의미한 수준의 세포독성을 일으키지는 않는 것으로 평가됨 (그림 2).
- 마. 그룹 3의 11종 천연물 유도체의 항바이러스 효능평가 결과 유효한 항바이러스 효과를 관찰할 수 없어서 향후 평가에서 제외되었다(그림 1). 모든 그룹 3의 천연물 유도체는 유의미한 수준의 세포독성을 일으키지는 않는 것으로 평가됨 (그림 2).
- 바. 그룹 4의 2종 천연물 유도체 중 PSY-4-59가 40 μM 의 농도에서 유효한 항바이러스 효과를 나타내어서 효과적인 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가되었다 (그림1). 모든 그룹 4의 천연물 유도체는 유의미한 수준의 세포독성을 일으키지는 않는 것으로 평가됨 (그림 2).
- 사. 2차년도에 고농도로 합성된 총 18종의 천연물 유도체의 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능과 세포독성에 대한 평가결과 (CMA2-150, -152, -153, -154)와 PSY4-59가 PED 바이러스에 대한 유효한 항바이러스 효과를 나타내었으며 이중 PRRS 바이러스에도 항바이러스 효능을 보인 PSY4-59를 대량 합성하여 3차년도에 동물실험을 이용한 평가가 이루어질 예정이다.

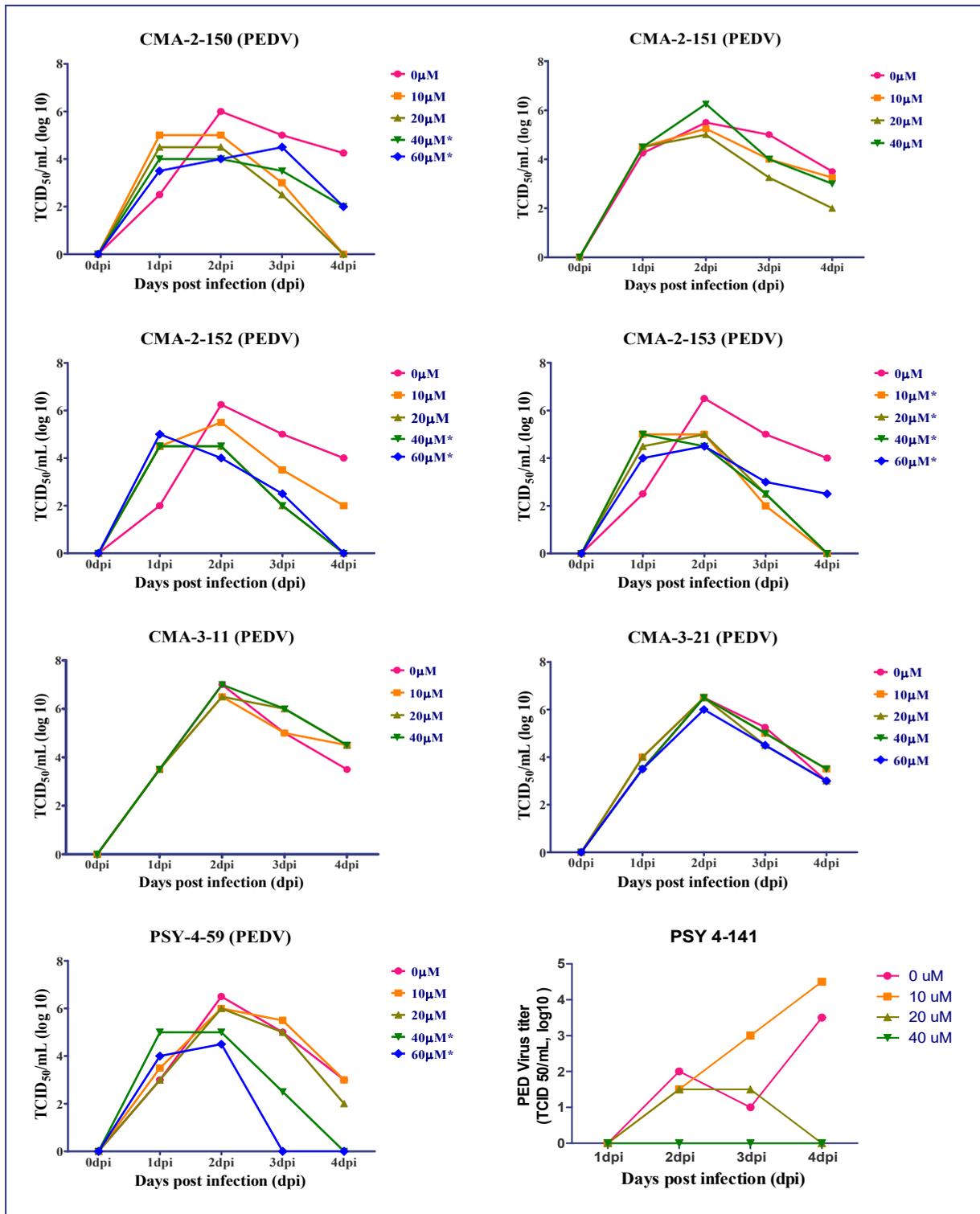


그림 1. 천연 유도물질들의 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과

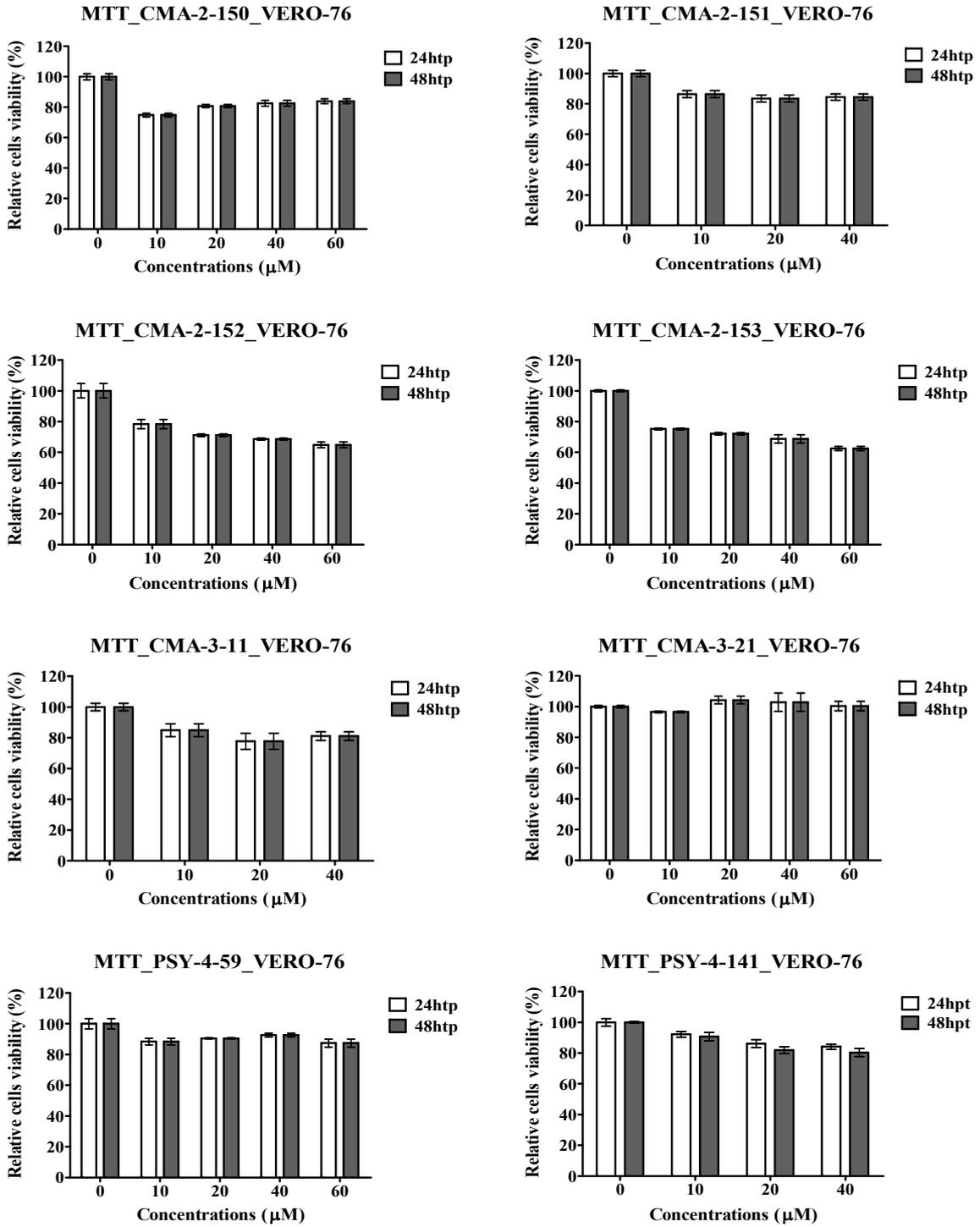


그림 2. 천연 유도물질들의 PEDV 배양세포(Vero) 독성 평가 결과

표 2. PED 바이러스에 대한 33종 천연물 유도체의 항바이러스 효능 평가 결과 요약

분류	천연물 유도체	항바이러스 효과 유효 농도 (μM)
그룹2 (5종)	CMA-2-150	≥ 40
	CMA-2-151	-
	CMA-2-152	≥ 20
	CMA-2-153	≥ 10
	CMA-2-154	≥ 20
그룹3 (11종)	CMA-3-11	-
	CMA-3-12	-
	CMA-3-13	-
	CMA-3-18	-
	CMA-3-19	-
	CMA-3-20	-
	CMA-3-21	-
	CMA-3-23	-
	CMA-3-25	-
	CMA-3-66	-
	CMA-3-68	-
그룹4 (2종)	PSY-4-59	≥ 40
	PSY-4-141	-

2. 세포주를 이용한 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 제제의 평가

가. 1차년도에 제 1협동기관인 계명대학교에서 합성된 33종의 천연물 유도체 중 선발된 18종의 천연물 유도체를 MARC-145 세포를 이용하여 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능과 세포독성 평가를 실시함 (표 1).

나. 그룹 2의 5종 천연물 유도체들의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 평가한 결과 모두 유효한 항바이러스 효과를 보이지 않음 (그림 3).

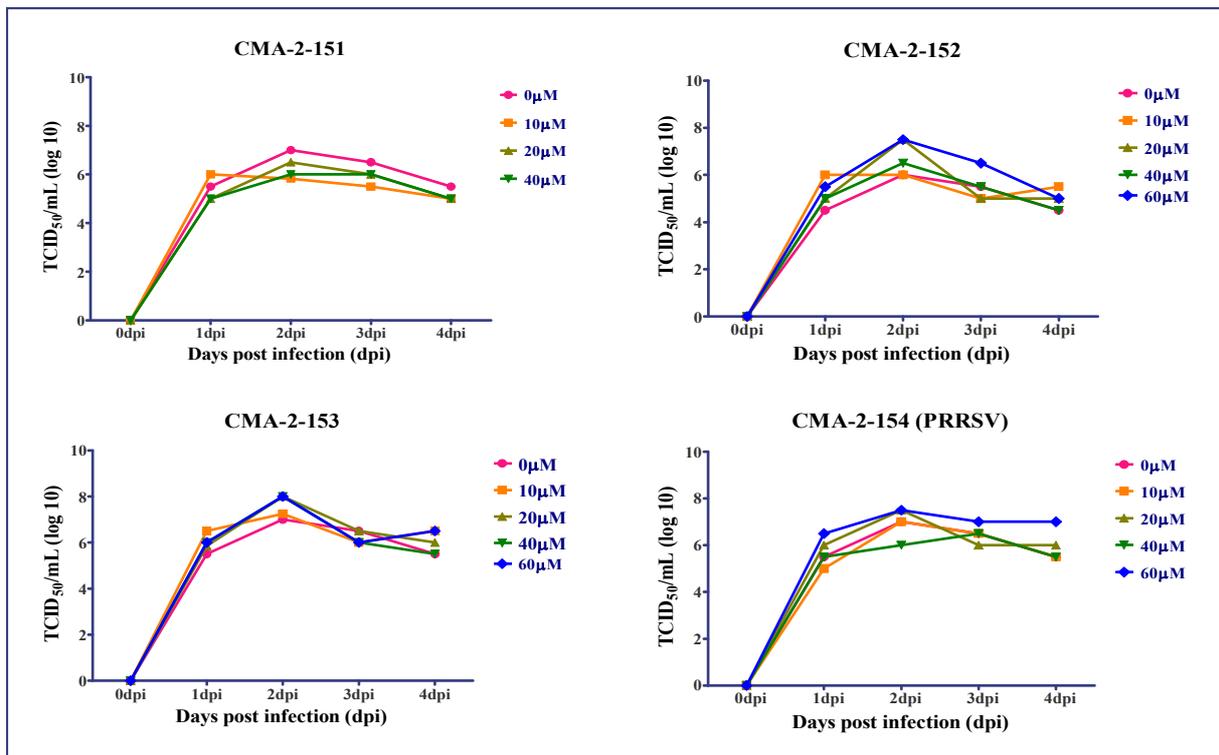


그림 3. 그룹 2 천연 유도물질들의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과

다. 그룹 3의 11종 천연물 유도체들의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 평가한 결과 모두 유효한 항바이러스 효과를 보이지 않음 (그림 4와 그림 5).

라. 그룹 4의 2종 천연물 유도체들의 항바이러스 효능을 평가한 결과 PSY4-59만이 20 μM의 농도에서도 유효한 항바이러스 효과를 나타내어 모든 그룹의 합성제제들 중 가장 효과적인 PRRSV 항바이러스 후보제제가 될 것으로 평가됨 (그림 6, 표 3)

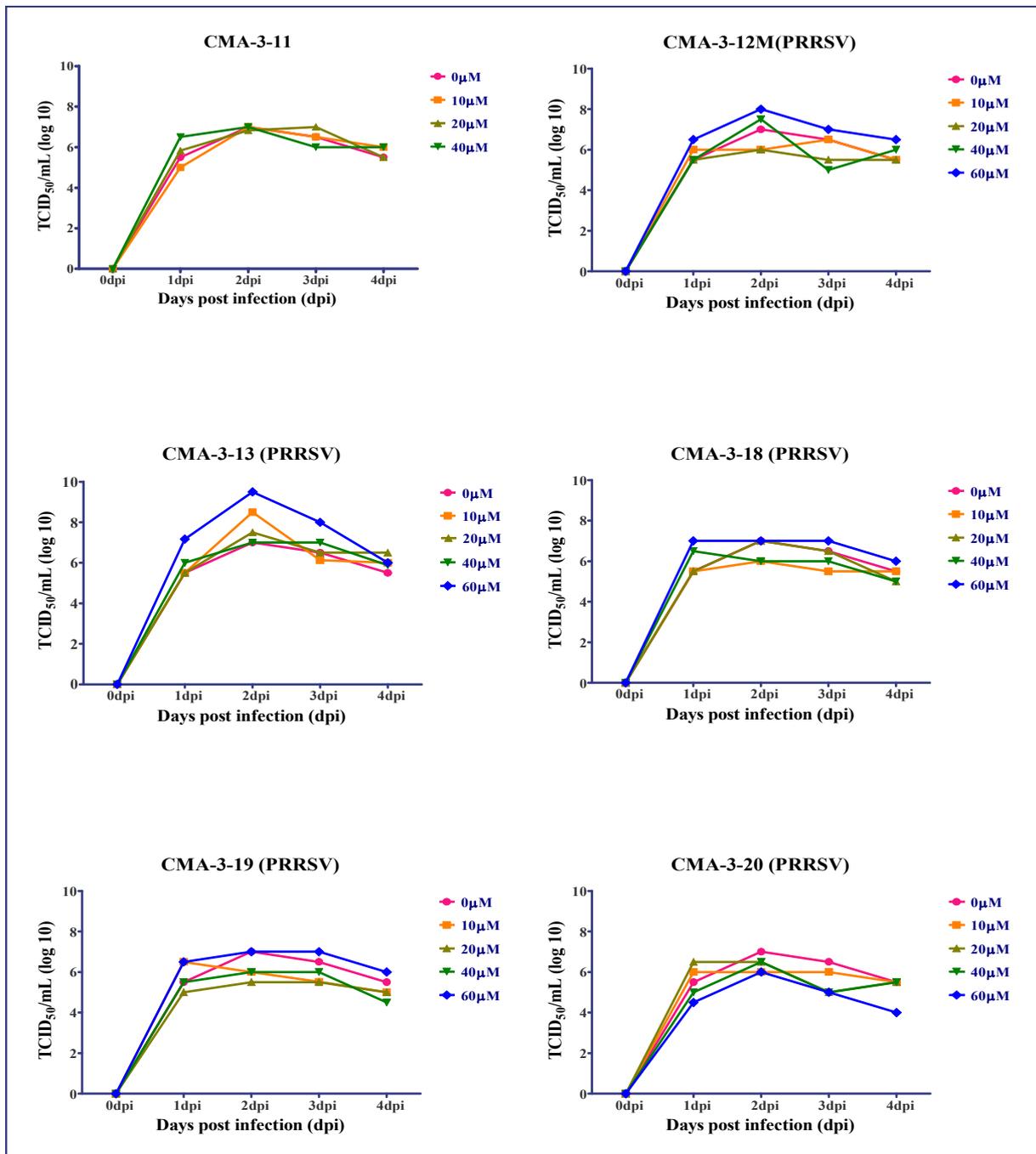


그림 4. 그룹 3 천연 유도물질들의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(1)

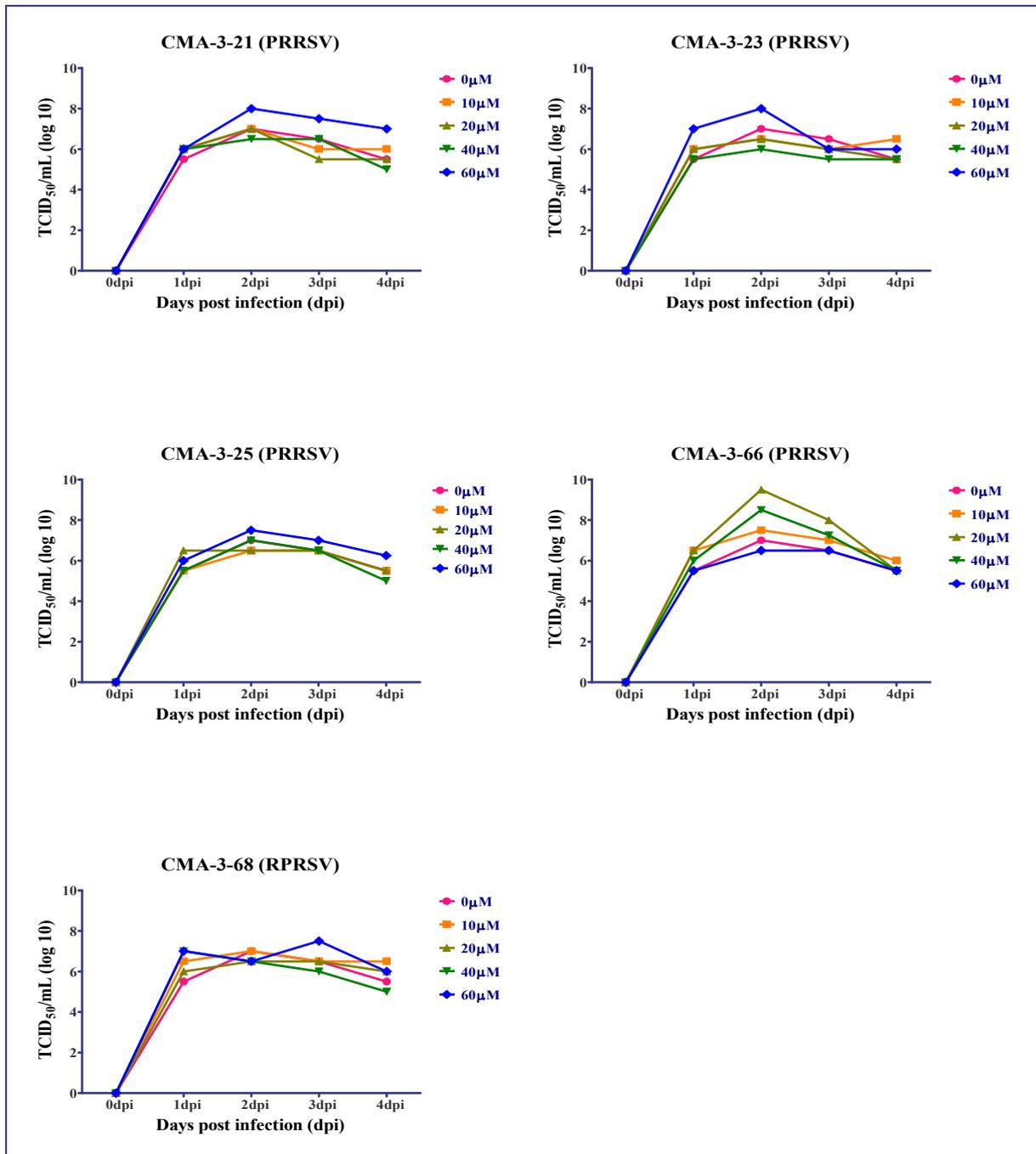


그림 5. 그룹 3 천연 유도물질들의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과(2)

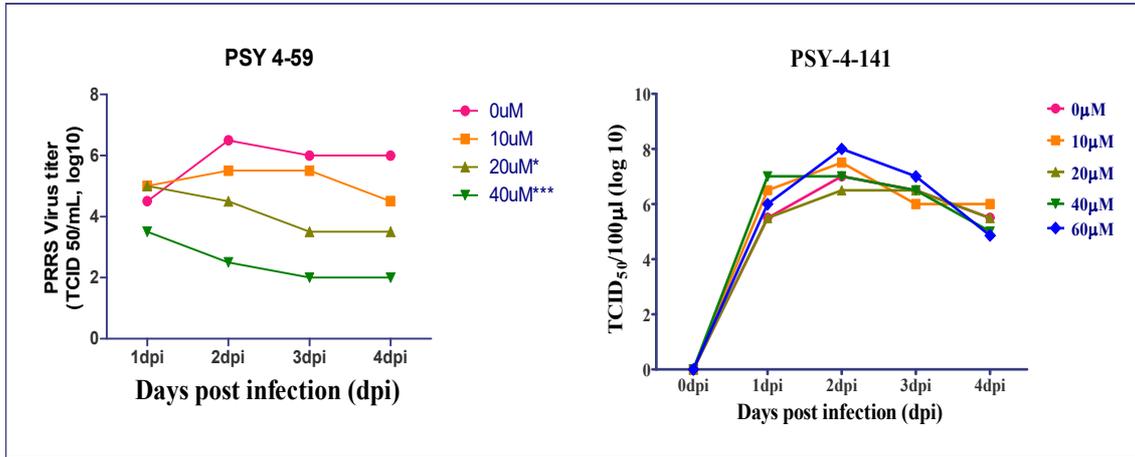


그림 6. 그룹 4 천연 유도물질들의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 평가 결과

표 3. PRRS 바이러스에 대한 18종 천연물 유도체의 항바이러스 효능 평가 결과 요약

분류	천연물 유도체	항바이러스 효과 유효 농도 (µM)
그룹2 (5종)	CMA-2-150	-
	CMA-2-151	-
	CMA-2-152	-
	CMA-2-153	-
	CMA-2-154	-
그룹3 (11종)	CMA-3-11	-
	CMA-3-12	-
	CMA-3-13	-
	CMA-3-18	-
	CMA-3-19	-
	CMA-3-20	-
	CMA-3-21	-
	CMA-3-23	-
	CMA-3-25	-
	CMA-3-66	-
	CMA-3-68	-
그룹4 (2종)	PSY-4-59	≥20
	PSY-4-141	-

마. 2차년도에 고농도로 합성된 총 18종의 천연물 유도체의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능과 세포독성에 대한 평가결과 PSY4-59만이 PRRS 바이러스에 대한 유효한 항바이러스 효과를 나타내었으므로 PSY4-59를 대량 합성하여 3차년도에 동물실험을 이용한 평가가 이루어질 예정이다.

3. 기존 선발된 천연물 평가

가. 천연물질 정보

- (1) ㈜동방 천연물질 (YKB) : 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)가 산생하는 천연의 거대분자 폴리머로서 세포밖다당류(extracellular polysaccharide) 임.
- (2) 황금추출물 (Scutellaria baicalensis Georgi, SB), 생물전환 황금추출물 (Bioconversion of Scutellaria baicalensis Georgi, SBC)

나. 평가방법

- (1) 선발된 ㈜동방의 천연물질(YKB)을 0-75 ug의 농도로 준비하여 MARC-145 세포와 Vero 세포를 이용하여 PRRS와 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능과 세포독성 평가를 실시함.
- (2) 황금추출물(SB)와 생물전환 황금추출물(SBC)은 아래와 같은 조성의 천연화합물로 분석되었으며 원액 및 PBS로 10-1,000배로 희석한 조건에서 MARC-145 세포와 Vero 세포를 이용하여 PRRS와 PED 바이러스에 대한 항바이러스 효능과 세포독성 평가를 실시함.

(3) SB 희석배율 별 성분 농도

SB	Baicalin (ppm)	Wogonoside (ppm)	Baicalein (ppm)	Wogonin (ppm)	총 합 (ppm)
원액	4299	7814	889	2125	15126
10X	429.9	781.4	88.9	212.5	1512.6
100X	43.0	78.1	8.9	21.3	151.3
250X	17.2	31.3	3.6	8.5	60.5
500X	8.6	15.6	1.8	4.3	30.3
1000X	4.3	7.8	0.9	2.1	15.1

(4) SBC 희석배율 별 성분 농도

SBC	Baicalin (ppm)	Wogonoside (ppm)	Baicalein (ppm)	Wogonin (ppm)	총 합 (ppm)
원액	485	216	4165	5397	10263
10X	48.5	21.6	416.5	539.7	1026.29
100X	4.9	2.2	41.7	54.0	102.63
250X	1.9	0.9	16.7	21.6	41.05
500X	1.0	0.4	8.3	10.8	20.53
1000X	0.5	0.2	4.2	5.4	10.26

다. 평가 결과

- (1) 선발된 (주)동방의 천연물질(YKB)은 다양한 바이러스에 대한 항바이러스 작용이 보고되었음에도 불구하고 PRRS와 PED 바이러스에 대해서는 유의미한 항바이러스 효과가 관찰되지 않음 (그림 7)

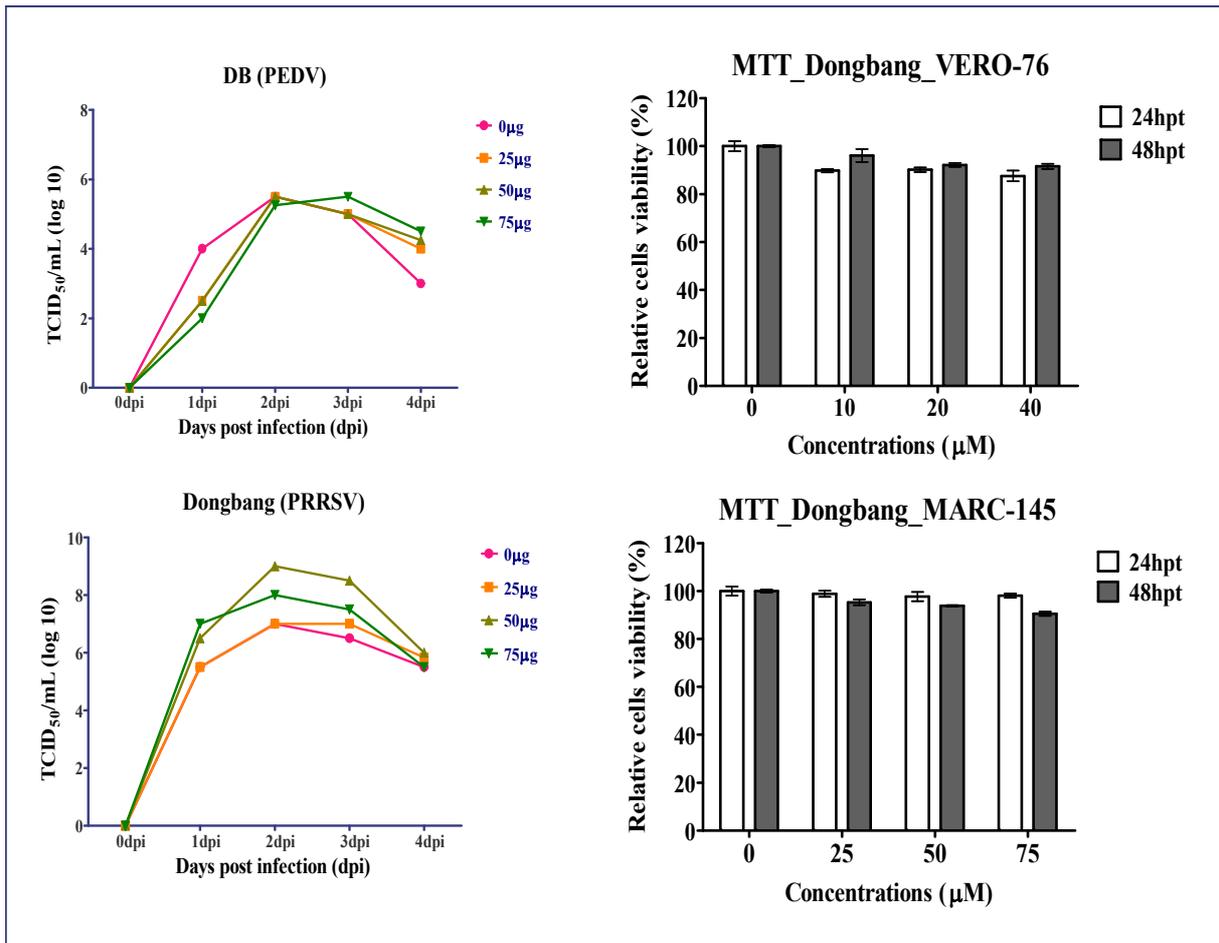


그림 7. 선발 천연물질(YKB)에 대한 항바이러스 효과 와 세포독성 평가결과

- (2) SBC 250배와 100배 희석배율에서 돼지 유행성 설사병 (PED) 바이러스의 증식을 100% 억제하였음을 확인하였으므로 3차년도에 동물실험을 통한 항바이러스 효능과 안전성을 평가할 예정임.
- (3) 평가물질의 PED 바이러스에 대한 효력시험은 2회 반복 실험하였으며 SB 처치군에서는 유의성 있는 항바이러스 효과가 관찰되지 않았음.

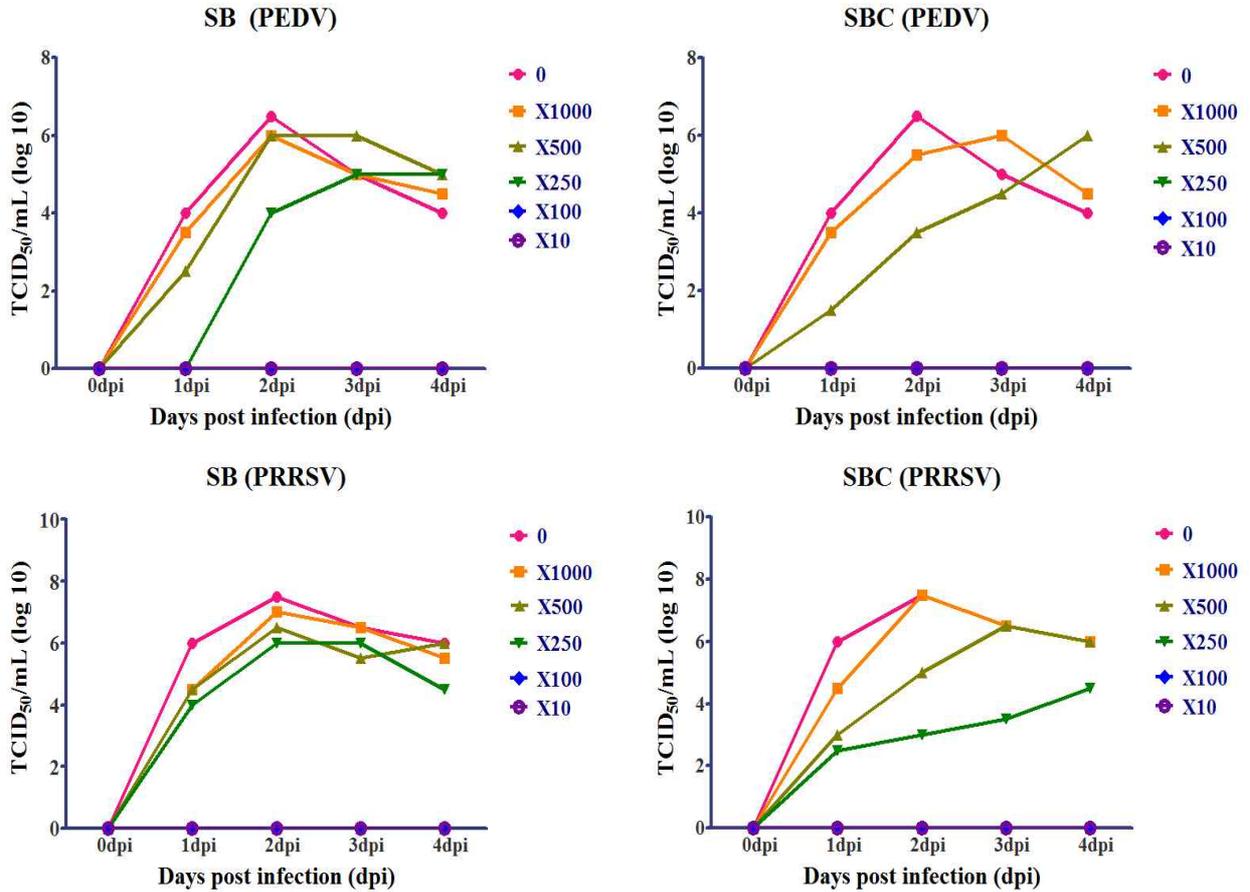


그림 8. 황금추출물의 PED와 PRRSV에 대한 항바이러스 효과 평가결과

(4) SB는 100배 희석배율에서 PRRS 바이러스의 증식을 100% 억제하였음.

(5) SBC는 100배 희석배율에서 100%의 바이러스 증식 억제가 관찰되었으며 250배 희석 배율에서 50-5000배의 바이러스 증식억제가 관찰되었으므로 3차년도에 동물실험을 통한 항바이러스 효능과 안전성을 평가할 예정임.

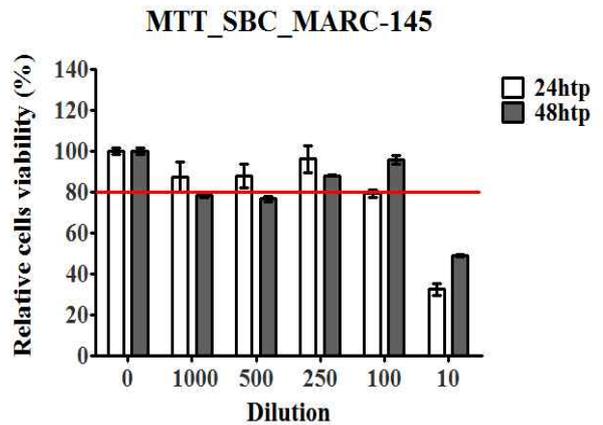
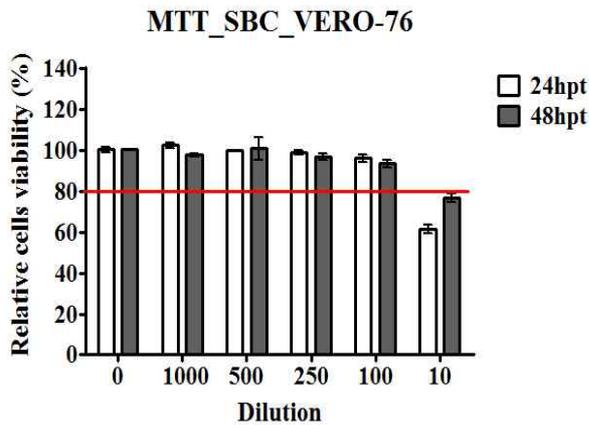
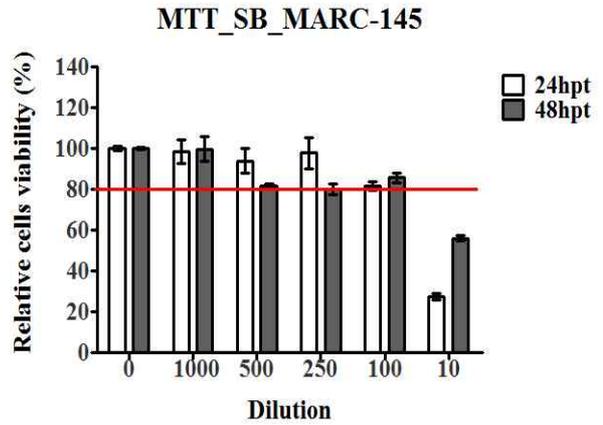
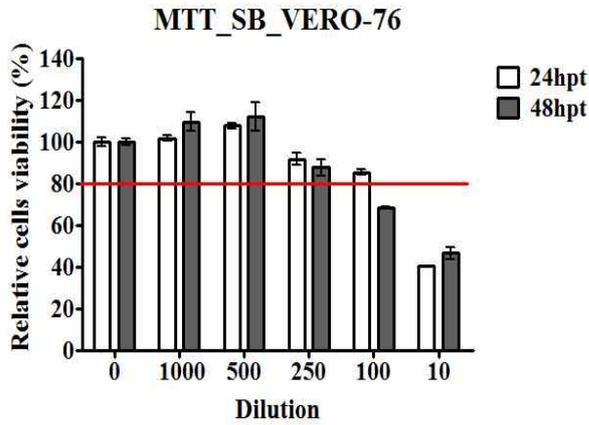


그림 9. 황금추출물의 Vero 세포와 MARC-145 세포에서의 세포독성 평가결과

- (6) SB는 10배 희석배율에서 Vero세포와 MARC-145세포 모두에서 높은 세포독성이 관찰 되었으며 100배 희석배율에서는 Vero세포에 대해 높은 세포독성이 관찰되었음.
- (7) SBC는 10배 희석배율에서 Vero세포와 MARC-145세포 모두에서 높은 세포독성이 관찰되었음.

[3차년도]

1. 세포주를 이용한 천연물 및 천연물 유도체의 PRRSV와 PEDV에 대한 항바이러스 효능 및 세포독성 평가

가. 주관기관인 (주)동방과 제1 협동기관인 계명대학교에서 제공한 5종의 천연물 또는 천연물 유도체를 (표1) Vero 세포를 이용하여 PRRSV와 PEDV에 대한 항바이러스 효능과 세포독성 평가를 실시함.

표 1. 3차년도 효능 및 세포독성 평가 대상 천연물 및 천연물 유도체 정보

천연물 유도체	특성
CoV-3CLP	Coronavirus의 3C-like protease의 활성을 억제하는 후보 천연물 유도체
Japanese plum	Herpesvirus, influenza virus, HIV virus 및 Hepatitis A virus에 대한 항바이러스 효능이 보고된 천연물
citric acid anhydrous	Japanese plum의 후보 천연물 유도체1
5-hydroxymethyl-2-furaldehyde	Japanese plum의 후보 천연물 유도체2
DB1	동방에서 제공한 미생물 배양액

나. 평가 결과

- (1) 선발된 5종의 천연물 및 천연물 유도체의 PRRSV에 대한 항바이러스 효과를 확인한 결과 DB1이 1/10로 희석한 농도에서 PRRSV의 증식을 완전히 억제하는 것으로 관찰됨.
- (2) 선발된 5종의 천연물 및 천연물 유도체의 PEDV에 대한 항바이러스 효과를 확인한 결과 CoV-3CLP이 25-100ug 전 실험 농도에서 PEDV의 증식을 완전히 억제하는 것으로 관찰되었으며 DB1도 1/10로 희석한 농도에서 PEDV의 증식을 완전히 억제하는 것으로 관찰됨(그림 1).

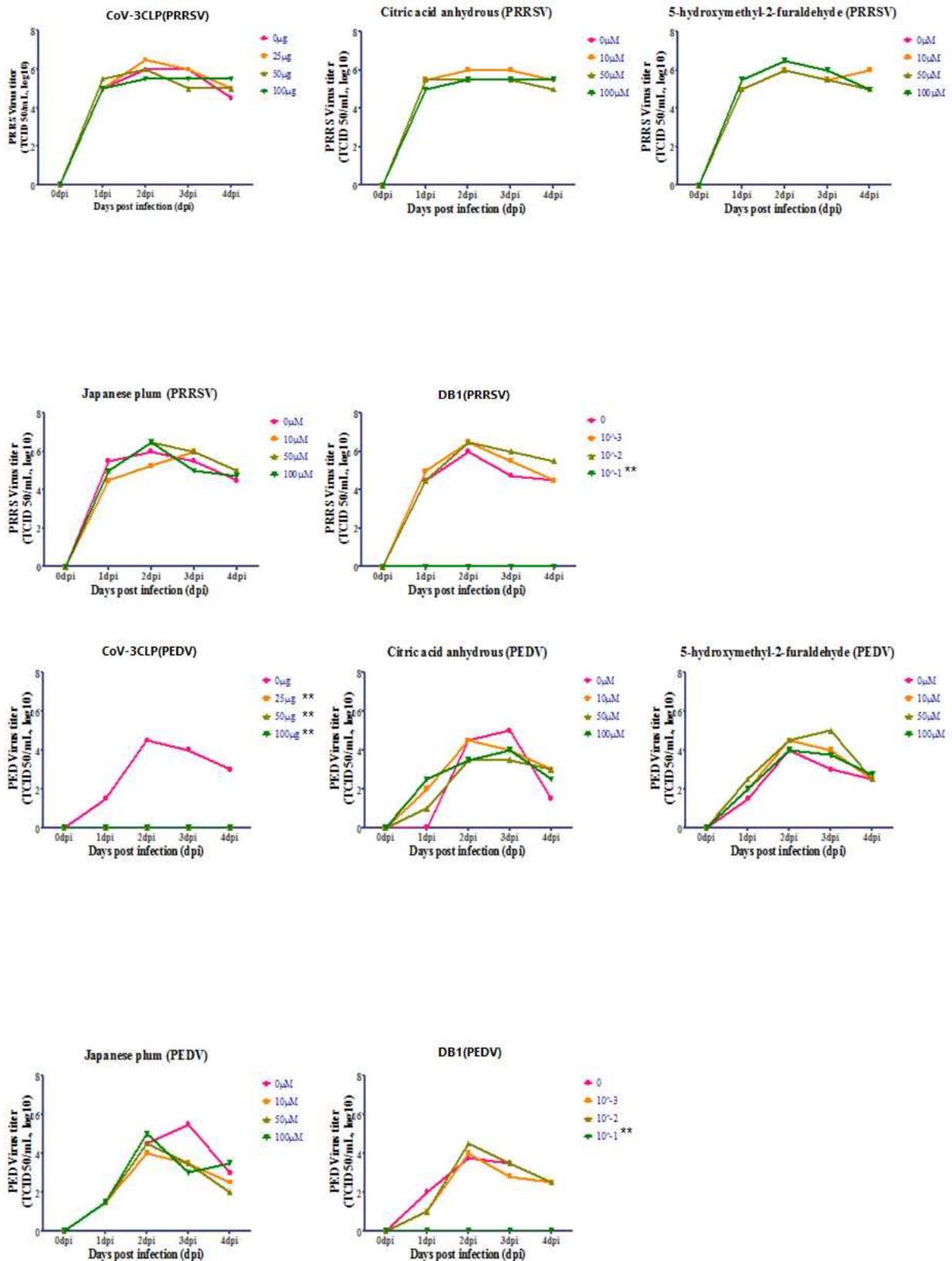


그림 1. 천연물 유도체에 대한 PRRSV와 PEDV에 대한 항바이러스 효과 평가결과

(3) 항바이러스 효능이 확인된 CoV-3CLP와 DB1를 항바이러스 효능검사와 동일한 농도로 준비하여 MARC-145와 VERO-76 세포에 적용 후 24시간 및 48시간 동안의 세포 독성을 확인할 결과 DB1을 1/10 농도로 희석한 샘플을 적용한 후 48시간에 20% 이상의 세포사멸이 관찰되어 세포독성이 증명되었으나 이외의 다른 모든 시험군에서는 유의성 있는 독성이 관찰되지 않았음(그림2).

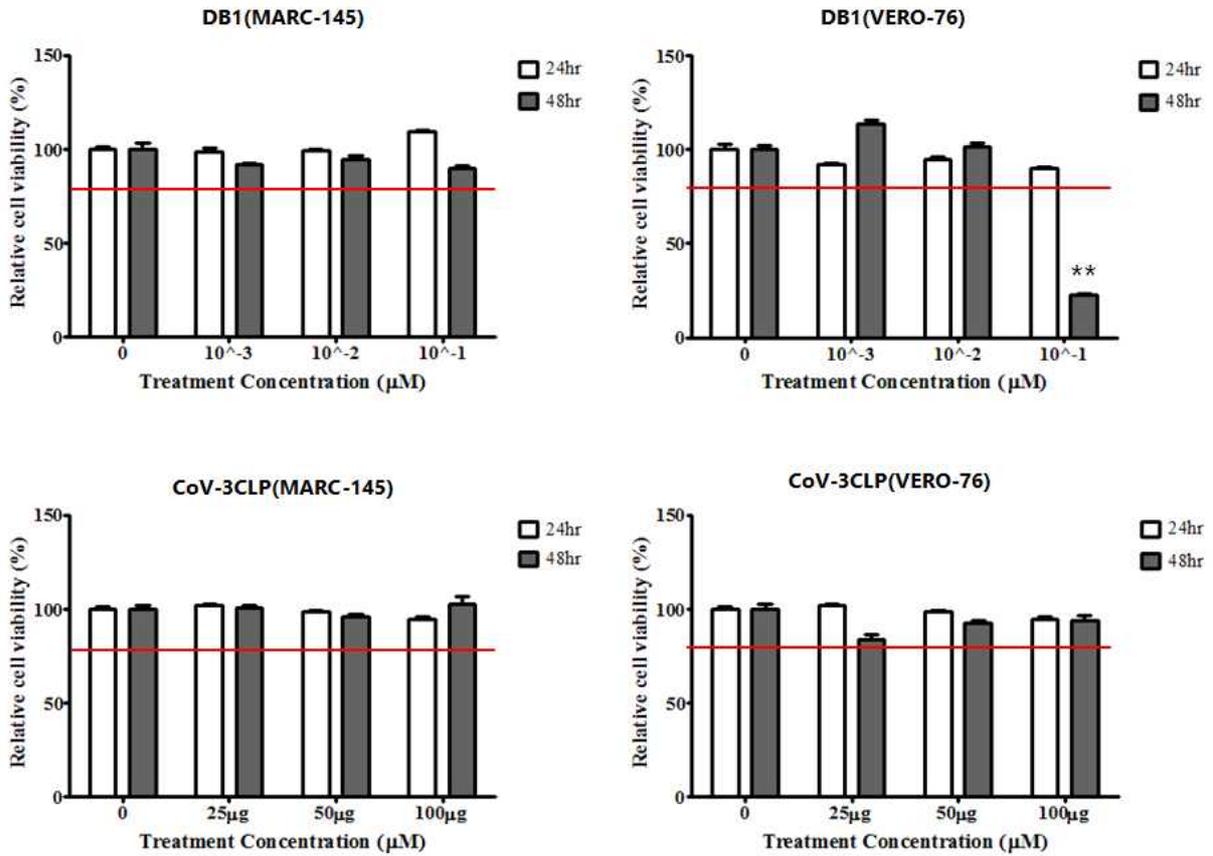


그림 2. 천연물 유도체의 Vero 세포와 MARC-145 세포에서의 세포독성 평가결과

2. 동물실험을 통한 천연물 유도체 SY029의 항바이러스 효능 및 안전성 평가

가. 2차년도 세포를 이용한 평가에서 PRRSV에 대한 항바이러스 효과가 증명된 SY029의 4주령 자돈을 이용한 동물실험을 실시하여 실제 돼지에서의 항바이러스 효과 및 독성을 평가하였음.

- (1) PRRS 음성인 4주령 자돈 6두를 구입하여 그룹 당 3두씩 SY029투여군과 비처치대조군 2개의 그룹으로 나누어 사육함.
- (2) SY029투여군에 SY029를 1Kg 당 5 mg의 농도로 이근부에 접종하고 항바이러스 처치 6시간 후에 VR2332를 10^3 TCID₅₀/ml의 역가로 2 ml 씩 모든 자돈에 비강접종을 실시 함.
- (3) 바이러스 공격접종 후 1일과 2일에 24시간 간격으로 SY029를 같은 방법으로 2회 추가 접종함.
- (4) 공격접종 후 7일까지 매일 임상증상 및 공격접종 후 0, 3, 7일에 채혈 및 체중 측정함.
- (5) 공격접종 후 7일에 부검을 실시하고 조직 채취 및 병리조직학적 평가함.
 - (가) 모든 폐는 오염을 최소화하여 적출
 - (나) 적출한 폐에서의 바이러스 역가 측정 및 조직병리학적 실험 실시
 - (다) 적출한 폐는 전체적인 임상 증상 확인 후 각 엽마다 병변 스코어링을 실시
 - (라) 적출한 폐의 각 엽의 일부를 10% 포르말린에 고정시킨 뒤 절편한 후 병리조직학적 병변 스코어링

나. 평가 결과

- (1) 효능 평가 결과
 - (가) SY029를 투여한 그룹과 비처치대조군의 혈중바이러스농도를 분석한 결과 통계적으로 유의성있는 차이가 관찰되지 않았고(그림 3) 이하 체중변화 및 병리검사 분석에서도 유의성있는 차이가 관찰되지 않아 SY029의 의미있는 항바이러스 효능이 관찰되지 않았음.
- (2) 안전성 평가 결과
 - (가) SY029를 투여 후 특별한 임상증상 및 국소과민반응 등 유의미한 부작용은 관찰되지 않았으나 부검 시 약물을 투여한 이근부의 근육에 다량의 약제가 석출되는 것이 관찰되었음.

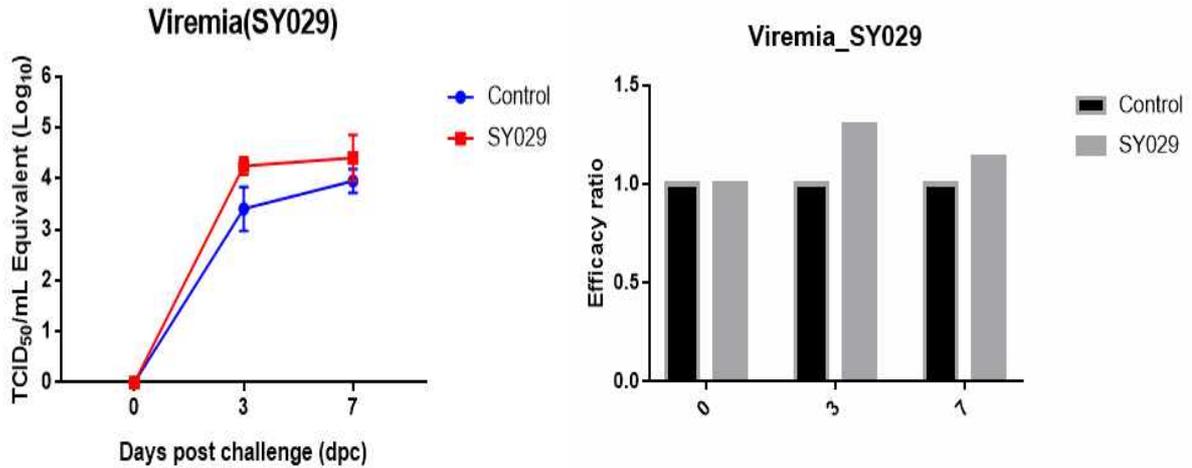


그림 3. 천연물 유도체 SY029의 자돈에서의 항바이러스 효능 평가결과

3. 동물실험을 통한 천연물 유도체 PSY4-59의 항바이러스 효능 및 안전성 평가

가. 2차년도 세포를 이용한 평가에서 PRRSV에 대한 항바이러스 효과가 증명된 PSY029의 4주령 자돈을 이용한 동물실험을 실시하여 실제 돼지에서의 항바이러스 효과 및 독성을 평가하였음.

- (1) PRRS 음성인 4주령 자돈 6두를 구입하여 그룹 당 3두씩 PSY029투여군과 비처치대조군 2개의 그룹으로 나누어 사육함.
- (2) PSY4-59투여군에 PSY4-59를 1Kg 당 5 mg의 농도로 이근부에 접종하고 항바이러스 처치 6시간 후에 VR2332를 10^3 TCID₅₀/ml의 역가로 2 ml 씩 모든 자돈에 비강접종을 실시 함.
- (3) 바이러스 공격접종 후 1일과 2일에 24시간 간격으로 PSY4-59를 같은 방법으로 2회 추가 접종함.
- (4) 공격접종 후 7일까지 매일 임상증상 및 공격접종 후 0, 3, 7일에 채혈 및 체중 측정함.
- (5) 공격접종 후 7일에 부검을 실시하고 조직 채취 및 병리조직학적 평가함.
 - (가) 모든 폐는 오염을 최소화하여 적출
 - (나) 적출한 폐에서의 바이러스 역가 측정 및 조직병리학적 실험 실시
 - (다) 적출한 폐는 전체적인 임상 증상 확인 후 각 엽마다 병변 스코어링을 실시
 - (라) 적출한 폐의 각 엽의 일부를 10% 포르말린에 고정시킨 뒤 절편한 후 병리조직학적 병변 스코어링

나. 평가 결과

(1) 효능 평가 결과

(가) PSY4-59를 투여한 그룹과 비처치대조군의 혈중바이러스농도를 분석한 결과 바이러스 공격접종 후 3일에 PSY4-59를 투여한 자돈들에서 통계적으로 유의성 있게 낮은 수준의 혈중바이러스농도가 관찰되었으나 공격접종 후 7일에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았음(그림 4). 따라서 PSY4-59의 항바이러스 효능이 관찰되나 약효의 지속기간은 다소 짧은 것으로 판단됨. 효능의 지속기간이 짧은 이유로 체중변화 및 병리검사 분석에서는 처치군과 대조군의 비교 시 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았음.

(2) 안전성 평가 결과

(가) PSY4-59를 투여 후 특별한 임상증상 및 국소과민반응 등 유의미한 부작용은 관찰되지 않았으나 약물을 근육접종 시 상당한 통증을 수반하는 것을 관찰할 수 있었으므로 통증을 완화하기 위한 방안이 마련되어야 할 것으로 판단됨.

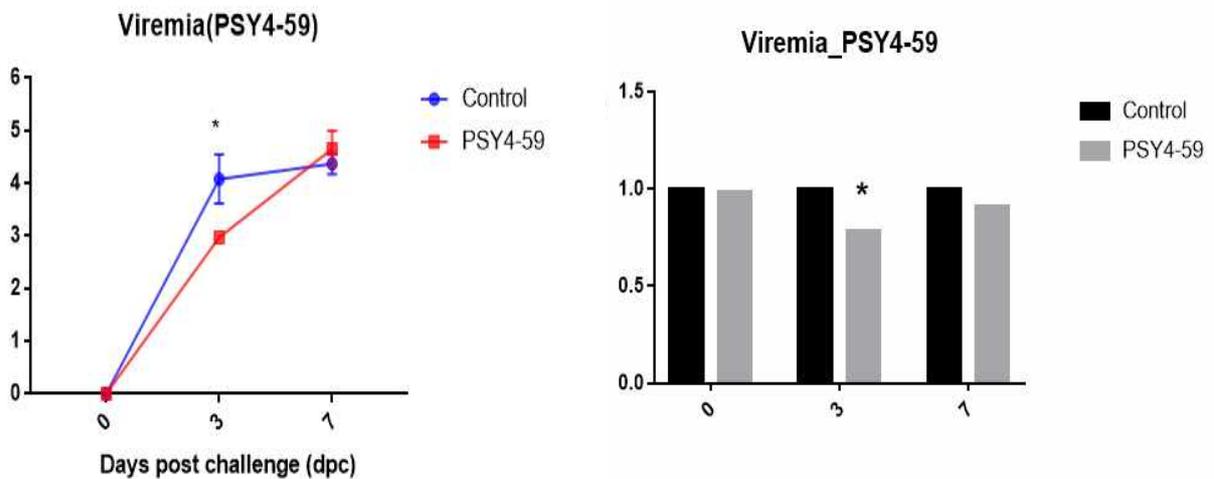


그림 4. 천연물 유도체 PSY4-59의 자돈에서의 항바이러스 효능 평가결과

제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1절. 목표

1. 기 선발된 항바이러스 제제의 구제역, AI, PRRS, PED에 대한 효능 평가
2. 효능 평가를 바탕으로 제제의 개선 및 추가 물질 개발
3. 구제역, Avian Influenza, PRRS, PED 등의 주요 바이러스 병원체에 대한 항바이러스 제제 4종 이상 개발

제 2절. 목표 달성여부

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용 및 결과
항바이러스 제제의 구제역과 Avian Influenza에 대한 평가 (1세부)	선행연구 선발 항바이러스 제제와 천연물의 세포를 이용한 항바이러스 효능 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> - 고병원성, 저병원성 조류인플루엔자를 확보하고 바이러스억제 효능을 검증한 결과 4종의 천연물 유도체에서 항바이러스 효능이 있었음 - 구제역바이러스에 대하여 1종의 천연물 유도체에서 바이러스억제 효능을 나타냄
	실험실적인 평가에서 선발된 물질의 동물실험을 통한 치료 및 방어 효능 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> - 닭을 이용한 조류인플루엔자바이러스에 대한 예방 및 항바이러스 효능 평가 결과 1종의 천연물 유도체에서 바이러스 억제 가능성이 확인됨
	선발 물질의 대량 생산법 및 대량 공급경로를 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> - KVGMP 인증시설에서 제조공정 확립 - 선발 및 개선 물질의 제형 확립(주사제, 사료첨가제, 음수첨가제 등) 및 대량 공급 경로 확보 - PSY-4-59를 동물실험과 농장실험 등 세부 실험을 진행과 동물약품 허가를 위한 평가를 위해 시제품(안티비라) 생산
천연물 유도체 합성을 통한 항바이러스 라이브러리 구축 (1협동)	항바이러스 활성이 보고된 천연물들의 유도체 합성	100	<ul style="list-style-type: none"> - 니트로-피리딘 구조를 바탕으로 화합물 합성 - 천연물 기반 찰콘 화합물 유도체 합성
	천연물 유도체 합성을 통한 100여종의	100	<ul style="list-style-type: none"> - 유기 합성을 통해 신규 화합물 100여종의 라이브러리 구축 - 100여종의 라이브러리 구조정보 구축

	라이브러리 구축		
	구축된 라이브러리의 in vitro 효능 평가와 이를 통한 유도체의 재합성	100	- 제 2협동기관인 전북대학교와 협동 연구를 통해 PED와 PRRS 바이러스에서 활성 평가 수행
	구축된 라이브러리의 구조-활성 관계 (SAR)를 이용한 선도물질 최적화	100	- 구축된 라이브러리의 구조-활성 관계 구축 - 제 1세부인 (주)동방의 결과를 바탕으로 2종의 화합물을 선발하여 최적화 함
	바이러스 단백질 표적의 선별과 구조정보 분석	100	- 숙주세포에 존재하는 HDACs 단백질은 바이러스 증식에 매우 중요하게 작용하여 항바이러스 표적으로 중요한 의미를 지니며, 이의 단백질 구조를 분석함 - HDACs 단백질의 구조정보를 이용하여 새로운 화합물들을 설계하여 다수의 유도체를 합성함
	분석된 단백질의 구조정보를 이용한 치료물질의 합리적 설계 및 합성	100	- 개발된 화합물의 HDACs 단백질의 구조정보를 이용한 도킹 수행 - Benzimidazole 유도체를 합성하기 위해 imidazole을 중심으로 amine에 다양한 alkyl기를 도입하여 화합물 합성함
	1, 2차년도에서 선별된 화합물들의 효능 및 안전성 개선	100	- 항바이러스 제제로 최종 선별된 3종 물질 CMA-2-153, PSY-4-59, DiNap의 대량 합성 수행 - 선별된 3종의 물질의 약물동역학 수행하여 약물의 혈중농도를 LC-MS/MS로 분석함 - 최종 선별된 화합물의 동물실험을 위한 화합물의 대량 생산 후 제2협동 연구기관인 전북대학교 연구팀과의 공동연구를 통한 in vivo 활성 평가
항바이러스 제제의 PRRS와 PED 바이러스에 대한 평가 (2협동)	선행연구 선발 항바이러스 제제와 천연물의 MARC-145, Porcine alveolar macrophages (PMA), Vero 세포를 이용한 항바이러스 효능 평가 및	100	- 신규 합성된 33종의 화합물 중 PED 바이러스에 대해 5종의 유도체 (CMA-2-150, -152, -153, -154와 PSY-4-59)가 유효 항바이러스 제제로 선발되었으며, 선별된 5종의 유도체는 세포독성을 일으키지 않음 - PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능 결과 3종의 유도체가 항바이러스 제제로 선발되었으며, 정밀 평가 결과 PSY-4-59 유도체가 항바이러스 제제로 선발되었으며, 세포독성도 일으키지 않음

	세포독성 평가		
	실험실 평가에서 선발된 물질의 동물실험을 통한 치료 및 방어 효능 평가		- 세포실험에서 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능이 증명된 SY029와 PSY-4-59 유도체의 항바이러스 효능을 자돈에서 바이러스 공격접종을 통해 평가하였고 PSY4-59를 투여한 자돈들에서 PRRSV 공격접종 후 유의성 있게 낮은 수준의 혈중바이러스농도가 관찰되었음

제 3절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

제 4장. 연구결과의 활용 계획 등

1. 4종 이상의 주요 축산 바이러스 신규 치료 물질 선발을 통한 향후 축산 질병 치료제 개발의 사업화에 활용.
2. 국내 축산업에 막대한 피해를 주고 있는 주요 바이러스 질병에 대한 치료제 개발은 국내 축산산업에 큰 경제적인 이익을 줄 것으로 기대.
3. 질병발생 감소를 통하여 폐사율 감소 효과와 사육비의 절감효과를 유발하여 축산농가 소득에 크게 기여하게 될 것임.
4. 항생제 사용 감소를 유도하여 보다 안전한 축산물 생산에 기여하여 축산물 소비를 증가.
5. 개발된 항바이러스 제제는 해당 과제에서 제안된 바이러스 이외에도 다양한 바이러스성 질병에도 적용이 가능할 것이므로 글로벌 시장으로 진출하기 위한 충분한 원천.

주 의

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