

11-1543
000-001
480-01

발간등록번호

11-1543000-001480-01

구제역바이러스

비구조단백질을

표적으로

하는

항바이러스제

개발

최종보고서

2016

농림축산식품부

가축질병대응기술개발사업 R&D Report

구제역바이러스 비구조단백질을 표적으로 하는 항바이러스제 개발 최종보고서

2016. 12. 6.

주관연구기관 / 경기과학기술진흥원
협동연구기관 / 농림축산검역본부
(주)씨티씨바이오
건국대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “구제역바이러스 비구조단백질을 표적으로 하는 항바이러스제 개발” (개발기간 : 2013. 8. 26 ~ 2016. 8. 25)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. 6.

주관연구기관명 : (재)경기과학기술진흥원	곽재원
협동연구기관명 : 농림축산검역본부	박봉균
(주)씨티씨바이오	조호연
	우성섭
	성기홍
건국대학교 산학협력단	서정향

주관연구책임자 : 정귀완

협동연구책임자 : 김수미

최대건

류영수

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	313015-3	해 당 단 계 연구 기 간	3년	단 계 구 분	1/1
연구사업명	중 사업명	가축질병대응기술개발사업			
	세부 사업명				
연구과제명	대 과제명				
	세부 과제명	구제역바이러스 비구조단백질을 표적으로 하는 항바이러스제 개발			
연구책임자	정귀완	해당단계 참 여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구 개발 비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 36명 내부: 명 외부: 명		총 연구개발비
연구기관명 및 소속부서명	경기과학기술진흥원 기업화사업팀			참여기업명 : (주) 씨티씨바이오	
위탁연구	연구기관명: 충남대학교 산학협력단			연구책임자: 강남숙	
<ul style="list-style-type: none"> ■ 본 과제는 구제역 발생 시 가축, 특히 구제역 바이러스를 다량으로 배출하는 돼지 체내에서 바이러스 생산을 억제하고 신속한 효과를 나타내는 “구제역 항바이러스제”를 개발하고 제품화하는 데 목적이 있다. ■ 구제역 항바이러스 효과가 있는 화합물인 AMTI (Aminothiazole)와, 그로부터 유도된 BAMTI (Benzaminothiazole) 화합물의 구조최적화 연구를 통해 다양한 유도체를 합성하고 약물성, 약동력, 독성 및 안전성 평가, 작용기전 탐색, 세포 및 소동물에서의 구제역억제 효능평가를 실시하여 임상후보물질을 개발하였다. ■ 항바이러스 효능이 알려진 ribavirin 및 합성된 전구물질 (ribavirin-TA)의 약동력, 독성 및 안전성 평가, 세포, 소동물 및 목적동물에서의 구제역 억제 효능평가를 실시하여 임상후보물질을 개발하였다. ■ 임상후보물질로서 효능이 탁월한 ribavirin에 대한 경구투여용 산제 시제품을 제조하고 안정성 시험을 실시하였다. ■ Ribavirin과 각종 부형제를 혼합하여 소동물 및 목적동물에서 항바이러스 효능 평가를 실시하여 최적의 ribavirin 용량과 부형제를 확정하였다. ■ 구제역 발생 시 백신과 병용 투여가 가능한, 두당 1.8 g ribavirin과 ISA-206 부형제를 DOE (double oil emulsion) 형태로 혼합하여 만든 주사제 “RIBA-DOE”를 개발하고 검정기준을 확립하였다. ■ 시제품에 대하여 돼지에서 효능, 약동력, 독성, 안전성, 잔류 평가를 실시하고 시험분석 자료를 토대로 야외 임상시험 계획서 제출 예정이다. ■ 본 과제를 통해 개발된 “RIBA-DOE” 주사제는 백신과 함께 1회 투여로 구제역 발생 시 면역공백 동안 돼지 체내에서 신속히 바이러스 증식을 억제함으로써 구제역 확산 억제 효과를 나타낼 것으로 기대되며, 긴급 상황에서 사용을 위해 관계 당국의 사용허가 검토 및 방역 지침 개정이 요구된다. 				보고서 면수 184면	

요 약 문

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구의 배경 <ul style="list-style-type: none"> - 2010년 발생한 구제역으로 전국적으로 347만 마리의 가축이 살처분되고 직접피해액만 3조원 이상에 달하는 피해가 발생되었다. 그 후 6년 동안 모든 우제류 가축에 예방백신 투여가 의무화되고 구제역 긴급 행동지침이 정비되어, 구제역은 현재까지 대유행 (pandemic) 없이 국지적, 산발적으로 발생해 오고 있으며 현재는 백신접종 청정국 지위를 회복하기 위해 노력하고 있다. 백신은 다양한 혈청형과 아형의 구제역 바이러스를 모두 막을 수 없고 백신의 효과가 나타나기 까지 2주 정도의 면역공백이 있으므로, 감염초기대응이 무엇보다도 중요한 구제역을 방어하는 데 한계가 있다. 따라서 구제역 발생 시 백신의 효과를 보완하여 면역공백 기간 동안 구제역 확산을 초기에 억제할 수 있는 구제역 항바이러스제의 개발이 필요하다. ○ 연구의 목적 및 내용 <ul style="list-style-type: none"> - 본 과제는 구제역 발생 시 가축, 특히 구제역 바이러스를 다량으로 배출하는 돼지 체내에서 바이러스 생산을 억제하고 신속한 효과를 나타내는 “구제역 항바이러스제”를 개발하고 제품화하는 데 목적이 있다. - 구제역 바이러스 비구조단백질을 표적으로 하는 항바이러스제 선도물질을 발굴하여 구조최적화연구를 통해 약물성과 효능이 입증된 시제품으로 개발하고, 시제품에 대한 효능, 안전성/잔류 평가 후 시험분석 자료를 토대로 제품화를 위한 동물약품 품목허가 검토의뢰서 제출을 목표로 하였다. 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 임상후보물질 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 구제역 항바이러스 효과가 있는 화합물인 AMTI (Aminothiazole)와, 그로부터 유도된 BAMTI (Benzaminothiazole) 화합물의 구조최적화 연구를 통해 다양한 유도체를 합성하고 약물성, 약동력, 독성 및 안전성 평가, 작용기전 탐색, 세포 및 소동물에서의 구제역억제 효능평가를 실시하여 임상후보물질을 개발하였다. - 항바이러스 효능이 알려진 ribavirin 및 합성된 전구물질 (ribavirin-TA)의 약동력, 독성 및 안전성 평가, 세포, 소동물 및 목적동물에서의 구제역 억제 효능평가를 실시하여 임상후보물질을 개발하였다. ○ 시제품 개발 및 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 임상후보물질로서 효능이 탁월한 ribavirin에 대한 경구투여용 산제 시제품을 제조하고 안정성 시험을 실시하였다. - Ribavirin과 각종 부형제를 혼합하여 소동물 및 목적동물에서 항바이러스 효능 평가를 실시하여 최적의 ribavirin 용량과 부형제를 확정하였다. - 구제역 발생 시 백신과 병용 투여가 가능한 두당 1.8 g ribavirin과 ISA-206 부형제를 DOE (double oil emulsion) 형태로 혼합하여 만든 주사제 시제품 “RIBA-DOE”를 개발하고 검정기준을 확립하였다. - 시제품에 대하여 돼지에서 효능, 약동력, 독성, 안전성, 잔류 평가를 실시하고 시험분석 자료를 토대로 야외 임상시험 계획서 제출 예정이다. 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 실용화·산업화 방안 <ul style="list-style-type: none"> - 내수 : 정부 (지자체)와 개발기업 간 관납, 상시비축으로 만일의 사태 대비 - 수출 : 추후연구를 통해 국제기준에 부합하는 치료효과 및 안전성 입증 시 구제역 청정국에 비축용, 상재국에 치료용으로 판로 개척 가능 ○ 연구개발 성과의 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구를 통해 개발된 구제역 항바이러스 주사제 “RIBA-DOE”는 혈청형과 아형의 제약을 받지 않는 범용 항바이러스제로서 구제역 발생 시 백신과 함께 1회 접종으로 병용 투여 가능 - 면역공백 기간 동안 돼지 체내에서 신속하게 바이러스 증식을 억제함으로써 바이러스배출을 최소화하고 인접 가축과 농가에 구제역 확산을 막는 용도로 사용 ○ 기대 효과 <ul style="list-style-type: none"> - 구제역 확산억제로 축산농가 피해 최소화하고 방역, 피해보상, 살처분 등 사후처리에 따른 사회적 비용 절감 - 살처분 감소로 지하수, 토양 등 2차 환경오염 피해 감소 - 생명존중 의식 확산, 농민의 정신적 고통 경감 				
중심어 (5개 이내)	구제역	구제역바이러스	항바이러스제	리바비린	주사제

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ In 2010~2011, foot-and-mouth (FMD) disease caused tremendous damage to Korea by which 3.5 million livestock was killed and US\$3 billion was lost. Since then, preventive vaccination has been obligated for all the cloven-hoofed livestock and emergency response system has been rebuilt whereby FMD occurred sporadically without pandemic. At present, our nation has tried eagerly to restore FMD-free status with vaccination. Since vaccines are unable to control all the serotypes and subtypes of FMD virus (FMDV) and to show effect for around 2 weeks after inoculation, so called 'immunity gap', they have limited in use for initial countermeasure against FMD outbreak. Therefore, it is necessary to develop antiviral agents to supplement vaccines during the immunity gap and to prevent virus dissemination in the early phase of FMD outbreak. ○ The aim of this project is to develop and manufacture an effective and fast-acting antiviral agent which is able to reduce FMDV titer in pigs infected with FMD. We discovered lead compounds targeting non-structural protein of FMDV and developed experimental products proved in terms of efficacy and pharmacological properties through the structure optimization studies. For manufacturing license, we applied a request for licensing review based on the test results of efficacy, safety and residue analysis. 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of clinical candidate <ul style="list-style-type: none"> - We synthesized various derivative compounds containing AMTI (Aminothiazole) and BAMTI (Benzaminothiazole) scaffolds in the course of studies on structure-activity and structure-property relationships (SAR/SPR). We examined whether the compounds were qualified as clinical candidates by assessing physico-chemical properties, metabolic stability, pharmacokinetics, toxicity & safety, mode of action and efficacy test in cells and mice. - We also evaluated ribavirin, an antiviral drug used for chronic hepatitis C patients, and their prodrugs as clinical candidates by analyzing pharmacokinetics, toxicity & safety and efficacy test in cells, mice and pigs. ○ Development of experimental and commercialized product <ul style="list-style-type: none"> - We manufactured an experimental product of powdered ribavirin for oral use and conducted various stability tests. - We fixed dosage and adjuvant of ribavirin by testing antiviral efficacy in mice and pigs. - We developed a prototypical injectable product, "RIBA-DOE", formulated with 1.8 g of ribavirin and ISA-206 adjuvant in double oil emulsion (DOE) which enable it to be used in combination with vaccines and established standards of exam. - We conducted experimental tests to evaluate efficacy, pharmacokinetics, toxicity & safety, efficacy test and residue in pigs. Based on the data, we applied a request for field test. 				
Plan for Practical Use & Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Plans for commercialization and industrialization <ul style="list-style-type: none"> - Domestic demand : To conclude an purchasing and permanent storage agreement between government and company - Exportation : To find new market opening for provisional or therapeutic use if the product met global standard in terms of efficacy or safety. ○ Technological expected effect <ul style="list-style-type: none"> - Development of broad-spectrum anti-FMDV agent not limited in specific sero- or subtype - Fast-acting and effective agent supplementing 'immunity gap' of emergency vaccination - Improved convenience by injecting once in combination with vaccines ○ Social and economical ripple effect <ul style="list-style-type: none"> - To minimize damage on stockbreeding farmhouses by controlling FMD dissemination and to reduce social cost spent in disease control, compensation for the loss and mass culling - To decrease secondary environmental pollution by reducing mass culling - To proliferate life respect will and to reduce mental distress of farmers 				
Keywords	Foot-and-mouth disease (FMD)	Foot-and-mouth disease virus (FMDV)	Antiviral	Ribavirin	Injection

< Contents >

1. Outline of Project	7
2. Current Status of Technique	12
3. Contents and Results of Research and Development	15
4. Establishment of Project and Relative Contribution	168
5. Application of Results in Advance	173
6. Collected Research Information from Overseas	174
7. Security level of Research Outcome	176
8. Research Facilities and Equipments registered in NTIS	177
9. Actual Implementation of Safety Measures	178
10. Representative Research Outcome	180
11. Other Matters	181
12. References	182

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	12
3. 연구수행 내용 및 결과	15
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	168
5. 연구결과의 활용계획 등	173
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	174
7. 연구개발성과의 보안등급	176
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	177
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	178
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	180
11. 기타사항	181
12. 참고문헌	182

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1 연구개발 목적

- 구제역바이러스의 확산을 억제하고 구제역 치료가 가능한 구제역바이러스 비구조단백질을 작용점으로 하는 항바이러스제 개발 및 동물약품 품목 허가 검토의뢰서 제출
- 일본에서 개발된 항구제역바이러스제인 T-1105보다 질환 유발된 돼지에서의 효능이 좋은 제품 개발

1-2 연구개발의 배경 및 필요성

가. 구제역 (Foot-and-mouth disease, FMD)

- 소, 돼지, 염소, 양, 사슴 등 발굽이 둘로 갈라진 형태의 동물(우제류)에 감염되는 질병으로 치사율은 그리 높지 않으나 (5~55%) 입술, 혀, 코, 발굽 사이 등에 수포가 생성되고 식욕 부진, 체온 상승, 발육 저하, 운동능력 저하, 젖소의 경우 우유 생산 감소가 일어나 가축의 상품가치가 크게 떨어짐.
- 전염성이 매우 강하여 국제수역사무국 (OIE) List 질병 (전파력이 빠르고 국제교역 상경제 피해가 매우 큰 질병)으로 분류하며 우리나라에서도 제1종 가축전염병으로 지정되어 있음.

나. 구제역 바이러스

- FMDV (FMD virus)로 통칭되는 Picornaviridae Aphthovirus에 의해 전파됨. 작은 RNA 바이러스로서 이는 7개의 혈청형 즉 A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3형으로 분류되며 이 주요 혈청형은 다시 80여 가지의 아형으로 나누어짐.
- 구제역 바이러스는 냉장 및 냉동조건하에서는 오래 보존되고, 50℃ 이상에서는 서서히, pH 6.0 이하 또는 9.0 이상 조건에서, 그리고 2% 가성소다, 4% 탄산소다 및 0.2% 구연산 등의 소독제에 불활성화 됨.
- 구제역 바이러스가 숙주세포의 수용체에 결합하여 세포내로 유입되면 외피단백질이 벗겨져 약 8,000개의 염기쌍으로 이루어진 바이러스 유전자로부터 전사와 번역이 시작되어 우선 단백질 중합체인 polyprotein 형태로 합성되고, 이어서 바이러스가 합성한 L과 3C protease에 의해 잘려져서 바이러스의 구조 형성, 바이러스 유전자 합성, 숙주인

자와의 상호작용 등 각각의 기능을 가지고 있는 단백질이 만들어짐.

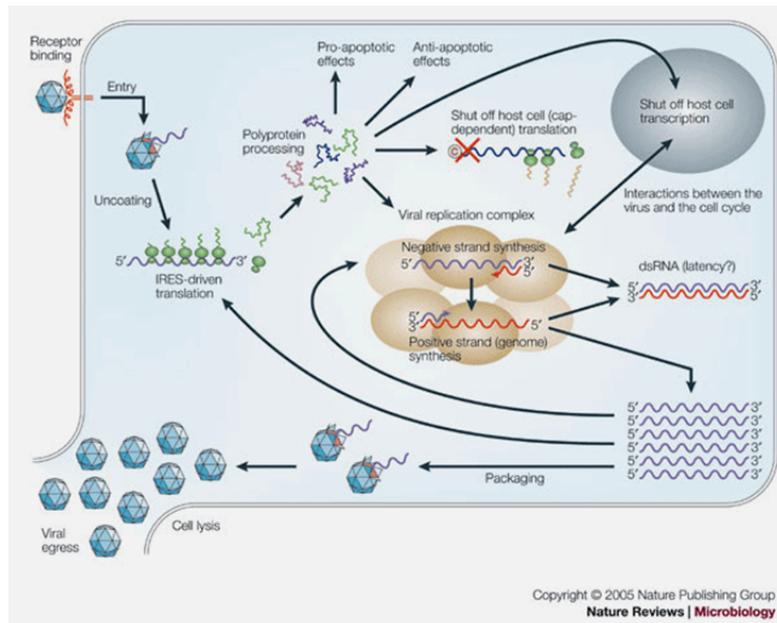


그림 1. 구제역바이러스의 life cycle (Whitton JL et al. 2005, Nat Rev Microbiol)

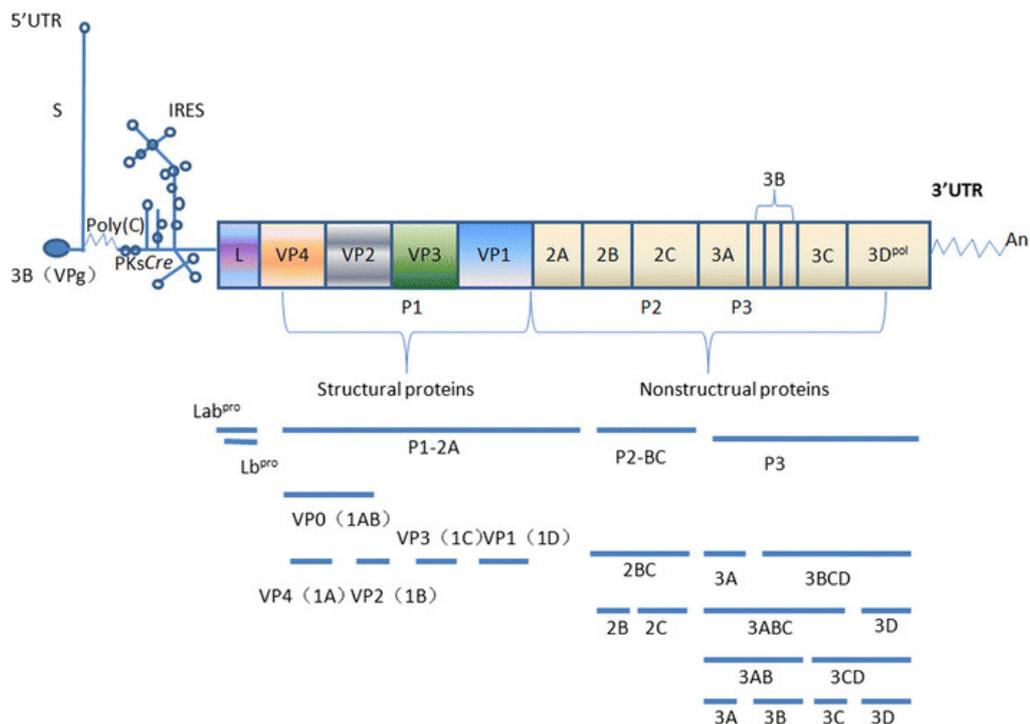


그림 2. 구제역바이러스 유전자 구조와 polyprotein process (Liu Y et al. 2015, Vet Res)

Genomic region	Protein designation	Genus	Protein function
L	Leader	<i>Aphthovirus, Erbovirus</i>	Papain-like cysteine protease implicated in virus-host interaction
P1	VP2, VP3, VP1 VP4	All Majority	Major capsid proteins Small capsid protein implicated in virion uncoating that is present in viruses of most genera
P2	2A	<i>Cardiovirus Aphthovirus Parechovirus Senecavirus Erbovirus Teschovirus</i>	Small protein whose synthesis is accompanied by termination and re-initiation of translation to separate 2A and 2B proteins
	2B	All	Membrane-anchoring protein for the virus replication complex
	2C	All	Multifunctional protein with ATPase and predicted helicase activity implicated in capsid assembly, virion uncoating, and RNA synthesis
P3	3A	<i>Enterovirus and likely all</i>	Membrane-anchoring protein for the virus replication complex; inhibits ER to Golgi membrane and secretory traffic
	3B VPg	All	Protein primer for the initiation of RNA-synthesis
	3C	All	Chymotrypsin-like cysteine protease mediating most cleavages in polyprotein
	3D	All	RNA-dependent RNA polymerase

그림 3. 구제역 바이러스가 생산하는 단백질의 종류와 기능

다. 구제역 백신

- 현재 개발된 구제역 예방 및 치료 방법은 백신이 유일하나 백신에 의한 바이러스 간 교차 보호 정도가 매우 약하여 혈청형과 아형에 따라 다른 백신을 적용해야 하고, 백신에 의한 보호효과가 약 6개월로 오래 지속되지 않아 수시로 접종해야 함. 뿐만 아니라 백신은 실제 질병에 의해 생성된 항체와 똑같은 항체를 생성하므로 혈액 검사로 감염된 가축과 백신 접종한 가축을 구별하기 어려움. 따라서 백신접종 후 백신미접종 구제역 청정국이 되기 위해서는 백신을 접종한 모든 가축이 도축되어야 함.
- 2010년 말 발생한 구제역이 전국적으로 확산될 가능성이 높아 전국적으로 백신을 사용하여 구제역 확산을 막은 사례가 있었는데, 긴급 백신 접종 시 돼지의 경우 3주 후, 소의 경우는 2주 후부터 구제역 발생률이 현저하게 낮아지는 것을 확인함. 가장 강력한 긴급백신도 효과가 나타나기 까지 1주일이 걸리는 것으로 보고되고 있음. 이와 같이 백신 접종 후 효과가 나타나기까지의 시간이 오래 걸리므로 (면역공백, immunity gap), 바이러스의 빠른 전파 속도를 백신이 따라잡을 수 없음.

라. 구제역 예방 백신 사용과 문제점

- 농림축산식품부에서는 “구제역 재발 방지 및 청정화 대책”을 수립하고 사실 상 구제역 청정국보다 한 단계 낮은 예방백신 청정국을 유지하기로 결정하였으며 6개월마다 한 번씩 모든 우제류 가축에 예방접종을 실시하고 있음.
- 백신의 효과를 기대하기 위해서는 혈청형 (serotype)과 아형 (subtype)이 충분히 고려

되어야 하므로 현재 백신 접종이 이루어지고 있는 O, A, Asia 1 형 이외의 혈청형이 유입되었을 경우 여러 가지 혈청형의 구제역 바이러스를 신속하게 억제하는 초동 대응 전략이 필요

- 향후 백신 접종정책이 종료되는 경우에도 신속한 바이러스 전파 억제 수단이 필요하게 됨

마. 저분자 항바이러스제의 개발 필요성

- 이와 같이 백신은 면역공백, 혈청형 및 아형 특이성 등의 한계점이 내재해 있고 예방 백신으로 구제역을 사전에 차단하더라도 유전자가 변이된 바이러스의 출현과 다른 혈청형 바이러스의 유입으로 완벽하게 구제역 발생을 막을 수는 없음.
- 따라서 바이러스 전파를 초기에 신속하게 차단할 수 있는 보조수단이 반드시 필요하며, 이에 따라 효능과 선택성이 좋고 부작용인 적은 항바이러스제제의 개발이 시급함

1-3 연구개발 범위

단계	연구개발 범위	연구개발 내용
1단계 임상후 보물질 개발	선도물질 구조최적화 통한 임상후보물질 도출	<ul style="list-style-type: none"> - 선도물질 구조최적화 연구 - 효소기반 활성 평가 - Docking model 구축, QSAR 연구 (위탁) - 물리화학적 약물성 평가 (용해도, 이온화도, 친지질도, 안정성 등) - eADME/PK 시험 : 대사안정성, 막투과성 등 - 세포 독성평가 - 신규 화합물 발굴/스크리닝 (화합물은행 활용)
	선도물질의 구제역 억제 효 능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 선도물질의 IBRS-2 세포에서의 억제효과 비교 (O/SKR/2002 strain 사용) - 효과가 우수한 선도물질의 혈청형별 효과 비교 - 포유마우스에서의 항바이러스 효과 측정
	원료 분석 및 특성확인	<ul style="list-style-type: none"> - 사료첨가용 산제 적용을 위한 원료 분석 및 특성 확인 - 음수첨가용 액제 적용을 위한 원료 분석 및 특성 확인
	선도물질의 소동물 독성 평 가	<ul style="list-style-type: none"> - 선도물질에 대한 소동물 독성시험 : 단회 투여 독성 - 선도물질에 대한 소동물 PK시험
2단계 시제품 개발	임상 후보물질 구조 최적 화 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 동물실험 결과 및 안정성 평가로부터 요구되는 임상 후 보물질의 효능 및 물성을 개선하기 위한 구조최적화 연 구
	임상 후보물질 (2가지)의 세포 및 소동물에서 구제 역억제 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> - 임상후보물질의 세포에서 구제역 억제 효과 시험 - 임상 후보물질의 성체 마우스를 이용한 구제역 억제 효 능 평가
	임상 후보물질의 부형제 선 정, 안정성 평가 및 시제품 생산	<ul style="list-style-type: none"> - 부형제에 따른 배합도 평가를 통한 제품 균질성 확인 - 임상 후보물질에 대하여 부형제별 (2종 이상) 안정성 평 가 - 임상 후보물질의 용해도 평가
	임상후보물질의 소동물 적용 PK 시험 및 독성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 마우스 PK/BA 시험 - 임상 후보물질의 마우스 적용 독성 및 임상증상 평가
3단계 제품화	시제품의 목적동물 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품의 유효 용량 범위 내 SPF 미니 돼지에서 감염억제 또는 바이러스 배출 감소 등 유효성 검증
	시제품 자돈 적용 PK 시험	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품의 자돈 적용 PK 정량 분석
	시제품 자돈 적용 장기 잔류 및 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품의 자돈 적용 혈액 및 장기 내 잔류 시험
	대량생산 및 검정기준 확 립, 허가 신청	<ul style="list-style-type: none"> - 원료 대량 생산 위탁 및 수입 검토 - 개발 신약의 품질관리를 위한 제품 안정성 시험기준 및 방법 제시 - 제품 부표 작성 - 동물약품 품목허가 검토의뢰서 작성 및 제출

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

- 항바이러스제는 면역공백 기간 동안 빠른 시간 내에 효과적으로 바이러스의 증식을 억제시키기 위한 목적으로 개발되고 있으며, 유전자 간섭을 이용한 항바이러스제, 인터페론과 같은 면역 증강제, 저분자 항바이러스제 등으로 크게 나눌 수 있음.

2-1 국내 현황

- 국내 FMDV 증식억제제에 관한 연구는 구제역바이러스를 일반실험실에서 다루기에는 전염의 위험이 크므로 생물 안전 3등급 이상의 시설을 갖추고 외부와 격리된 실험 환경을 갖추고 있는 농림축산검역본부의 구제역 진단과에서 FMDV 증식억제 물질에 관한 연구 전반을 수행하고 있음. 최근 유전자 간섭 (siRNA)을 이용한 치료용 백신 연구 개발을 활발히 진행하고 있음. 예를 들어 U6 프로모터와 CMV 프로모터를 조합하여 2B, 3C 서열에 대한 간섭유전자를 전사할 수 있는 아데노바이러스를 만들어 구제역바이러스가 감염된 돼지 신장세포 (IBRS-2)에 접종한 결과 효과적으로 바이러스의 증식을 억제하였으며 구제역바이러스가 감염된 포유마우스의 생존율을 향상시켰다는 연구 결과를 얻음 (Kim SM et al. 2008, Ativiral Res).
- 또한, 돼지 인터페론 알파를 발현하는 아데노바이러스 (Ad-porcine IFN- α), guanidine-hydrochloride, ribavirin, 6-azauridine 등 약물의 구제역 항바이러스 효과를 세포와 포유마우스에서 확인한 결과를 국제 저널에 발표한 바 있음 (Kim SM et al. 2012, Ativiral Res).

2-2 국외 현황

- 2004년 중국과 이스라엘에서 siRNA에 의한 구제역바이러스 증식억제 효과를 각각 보고한 후 현재 대한민국을 포함하여 중국, 인도를 중심으로 이 분야에 대한 연구가 진행되고 있음.
- 반면 인터페론 형태의 면역증강제에 대한 연구는 미국을 중심으로 활발하게 진행되고 있으며 타입 I과 II 인터페론 (IFN α/γ)이 돼지에서 구제역바이러스 증식억제 효과를 보인다는 결과가 2000년대 초반부터 보고되고 있고 2012년에 보고된 최근 연구결과에 의하면 타입 III 인터페론 (IFN λ 3)이 소에서 구제역바이러스 증식을 억제하였음 (Perez-Martin E et al. 2012, J virol).
- 저분자 화합물 형태의 증식억제제는 영국, 일본, 미국 등을 중심으로 개발되고 있고 주로 3C protease, 3D polymerase 등 효소활성이 있는 비구조 단백질이 타겟이 되고 있음. 두 단백질 모두 3차원 입체 구조가 규명되어 있기 때문에 이를 이용한 분자모델

링과 가상검색 (in silico screening)이 가능함.

- 3C protease 저해 물질 검색 분야에서는 영국 임페리얼 칼리지의 Robin Leatherbarrow 교수가 Fluorescence resonance energy transfer (FRET)을 이용한 화합물 검색계를 개발하여 활발한 연구를 수행하고 있음. FMDV 3C protease 저해 물질에 대해서는 아직 등록된 특허가 파악되지 않으나 유사한 구조의 HAV, SARS, HRV의 3C protease 저해제가 대학에서 분자모델링과 의약화학 분야에서 연구가 꾸준히 진행되고 있음 (Jaulent AM et al. 2007, Anal Biochem).
- 3D polymerase 저해 물질 검색 분야에서는 미국 미주리대의 Stefan G. Sarafianos 교수가 RNA 복제 과정의 피로인산기를 luciferase assay를 이용하여 측정하는 검색법을 고안하였고 (Durk RC et al. 2010, PLoS One), 미국 콜로라도 주립대의 Olve B Peerson 교수는 FMDV와 유사한 poliovirus의 3D polymerase와 PETE로 명명된 형광 표지 RNA를 이용하여 형광 편광 분석법 (Fluorescence polarization)을 개발하여 저해 물질 검색에 응용한 바 있음 (Mestas SP et al. 2007, Anal Biochem).
- Sakamoto K 등에 의하면 T-1105라는 3D polymerase 저해물질이 in vitro에서 10 μM의 EC₅₀ 값을 가지며 돼지에서 FMDV 감염 1시간 후 200 mg/kg 용량으로 6일 동안 하루 2회 씩 투약한 결과 임상소견 상 매우 효과적인 구제역 치료효과와 바이러스 증식억제 효과를 보였음 (Furuta Y et al. 2009, Antiviral Res). 이 물질은 일본 동물위생 연구소와 토야마 화학이 공동개발하여 2007년 유럽특허를 등록하였고, 미국 미주리대에서 발굴한 몇 개의 화합물이 PCT 특허등록 후 기술이전을 기다리고 있는 것으로 파악됨.

Pharmacokinetics				Plasma viral titre			
Plasma concentration (μg/mL)				Pig No.	Days after virus inoculation		
	2 hrs after administration	8 hrs after administration	1		3		
Pigs	75.0	36.4	T-1105 administered group	1	<0.14	<0.14	
Sheep	30.9	10.2		2	<0.14	<0.14	
Cattle	7.86	0.173	T-1105 non-administered group	3	<0.14	34891	
				4	0.18	282.7	

Unit: TCID₅₀/μL

Clinical symptom	Pig No.	Days after virus inoculation								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
T-1105 administered group	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	+	++	++	++	++	++	++
T-1105 non-administered group	4	-	-	-	+	+	++	++	++	++

-: normal, +: lameness, ++: astasia

Nasal excretion	Pig No.	Days after virus inoculation	
		1	3
T-1105 administered group	1	<0.07	<0.07
	2	<0.07	<0.07
	3	<0.07	160
T-1105 non-administered group	4	<0.07	0.66

Unit: TCID₅₀/μL of swab solution



그림 4. T-1105 화합물의 돼지에서 구제역 바이러스 억제 및 치료 효과

- 현재까지 구제역 바이러스 증식 억제에 효과가 있다고 알려진 약물은 다음 표에 요약한 바와 같음.

표 1. 연구개발중인 구제역 항바이러스제 현황

종 류	약 물	효 과
비특이적 항바이러스제 : 숙주의 면역력 증가를 목표로 한 약물로서 실험실에서의 효과는 증명되었으나 실제 필드에서의 효과는 검증이 필요함	Interferon inducer (poly-IC)	돼지의 구제역 백신의 면역반응 증진
	Ad5-PoIFN-α	돼지의 type I interferon을 발현하는 아데노바이러스를 투여하고 24시간 안에 구제역으로부터 보호되고 효과가 3~5일 동안 지속
	Combination of type I and II interferon	in vitro, in vivo에서 FMDV 복제를 상호상승적으로 억제
	Combination of Ad5-PoIFN-α and capsid subunit vaccine	돼지와 소 모두에서 한 번 투여로 효과가 오래 지속
선택적 항바이러스제 : FMDV의 비구조 단백질을 타겟으로 하여 바이러스의 복제를 억제하는 약물	CpG ODN	싸이토카인 합성을 증가시켜 자연면역력을 높임. 감염후 12시간 후에 투여하여 14일 동안 보호 효과가 지속됨
	Ribavirin	바이러스 복제 시 에러 발생 확률을 높임과 동시에 IMP dehydrogenase를 저해함으로써 증식 억제
	5-Fluorouracil, 5-Azacytidine	RNA 프로세싱과 번역과정 저해하여 바이러스에 돌연변이 유도
	2'-C-Methylcytidine	RdRp를 타겟으로 하며 7개 FMDV 혈청형에 모두 효과를 보임
T-1105	pyrazinecarboxamide의 유도체로서 돼지에서의 in vivo 효과가 발표됨	

2-3 연구결과의 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- 현재까지 구제역 발생현장에서 바이러스 확산 억제 목적으로 사용된 항바이러스제는 보고된 바 없으며, 본 과제를 통해 개발된 RIBA-DOE 제품은 세포 및 마우스에서는 효과가 확인되었으나 실제 우제류 동물에서는 구제역 항바이러스 효과가 확인된 바 없는 ribavirin을, 돼지에서 구제역 억제효과가 뛰어나고 사용 편의성이 높은 제품으로 개발하였다는데 의미가 있으며, 품목허가 완료 시 구제역 발생 지역에 바로 적용 가능하도록 대량 생산 및 비축할 예정임. 향후 추가연구를 통해 독성 문제가 해결되고 현장 적용에서 구제역 확산 억제 효과가 확인된다면 해외시장 진출도 모색할 수 있으며, 구제역 항바이러스제 분야의 획기적인 기술개발 사례가 될 것으로 사료됨.

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

3-1 연구개발 추진전략 및 추진체계

가. 연구개발 추진전략

(1) 연구과제의 구성 및 관련정보 확보 전략

- 유망한 두 작용점을 선정하여 연구과제를 구성하였으며, 연구과제의 진행상황에 따라 선택과 집중을 통한 유기적 운영을 통해 사업 성공 가능성을 극대화함.
- 신약개발 과제의 특성 상 주(主) 개발 물질의 성공 가능성을 장담할 수 없으므로 “Drug repurposing”을 포함한 후속 물질 발굴 전략 구상
- 기술정보 수집 방안으로 허가 업무 담당 정부기관 (농림축산검역본부), 산업체 (동물약품 제조 회사), 제약부문 전문 연구기관 (경기과학기술진흥원), 임상연구 부문 특화 대학 (건국대 수의대) 등 각계의 전문가 모임과 세미나, 워크샵 등을 통해 연구 추진 방향 및 학계·업계 동향을 지속적으로 모니터링함.
- 구제역 치료제 개발 관련 해외 학회, 세미나에 참관하여 국외 연구, 기술정보를 지속적으로 파악함.
- 연구진행에 따라 타 기관과의 협조가 필요할 시 연구원 파견을 통한 기술연수, 협력연구 추진
- 경기과학기술진흥원의 경기도 제약/바이오 기업 네트워크 활용
 - 경기바이오센터 입주 기업을 비롯한 도내 제약/바이오 기업, CRO 등의 신약 연구개발 기능을 적극 활용

(2) 연구개발방법론

- 다중 타겟 전략 : 현재 개발된 물질이 있어 ‘proof of mechanism’이 증명된 3D polymerase와 치료제 개발이 유망한 타겟인 3C protease 등 구제역바이러스 비구조 단백질 2종에 대한 개발시스템을 구축하여 치료제 표적 범위를 확대함으로써 성공 가능성 제고
- 의약합성 및 분자설계 기법 도입: 경기바이오센터의 의약합성 전문가 활용, 필요에 따라 HTS와 분자모델링 기법을 활용한 가상탐색연구의 병렬적 활용으로 유효물질 및

신규 골격 발굴, 구조 최적화 연구 효율 극대화

○ 화합물 설계 / 합성연구

- 초기 후보물질 최적화 연구 및 신규골격 발굴

- Linker의 거리를 조정하는 방법, bioisostere로 바꾸는 방법, cyclic 도입 등 conformationally restricted 화합물을 만드는 방법 등을 이용하여 구조변화에 의해 효력의 상승 및 바람직하지 않은 성질의 개선으로 최적화된 화합물을 도출함.
- 알려진 화합물들의 Pharmacophore 분석, 3차원적인 구조-활성 상관관계 (3D-QSAR) 방법 및 fragment-based 골격분석 전략을 통해 유도체 합성 우선순위 결정
- Homology 모델링을 통해 구축된 표적의 3차원 구조 기반으로 리간드와 수용체 간 결합 모드의 다양한 분석을 통한 신규 화합물의 디자인 및 설계를 추진함.

- 약물성 연구

- 화합물에 대한 기초 특성 연구를 통한 전임상 합성 연구에 대한 용해도, 막투과도, 화합물안정성, pKa 등 기초 데이터 확보
- 결정형 분석 및 염 연구를 통한 화합물 최적화 연구

- 공정개선 연구

- 전임상 후보물질의 최적 합성 경로 설계, 각 단계별 반응 최적화 및 주요 중간체의 규격설정 등을 통하여 경제적이고 대량공급이 가능한 합성 공정을 확립
- 생산 단가를 낮추기 위한 반응공정 간소화 및 단가 고려한 수입 검토
- 분석법 및 품질규격 설정 : 각 단계별 핵심 중간체 분석을 통하여 최종 품질 확립

- 전임상 연구용 시료 생산

- 공정 개선 연구를 통해 확립된 합성공정을 이용하여, kg 스케일의 고품질 전임상 연구 원료 제조 (약 10 kg)
- 원료 및 제제 분석을 위한 내부 표준품 제조
- 배치 별 중간체 및 시료 품질 분석

- 후속물질 (back-up) 합성연구

- 후보물질의 도출에서 축적된 구조-활성 상관성(Structure-Activity Relationship)정보 분석, 후속물질의 목표 기준설정
- 새로운 화학 골격의 신규 화합물 설계, 합성 및 in vitro 약효평가를 통한 선도물질 군 도출

○ 구제역 바이러스 억제 물질의 원료 특성 분석

- 구제역 바이러스 억제 물질의 원료 특성 분석을 통하여 이에 적합한 부형물질 선정
- 원료 단계에서의 분석 결과를 통해 원료 단계에서의 위해물질 (엔도톡신, 중금속 등) 존재 여부 확인

○ 구제역 바이러스 억제 물질의 경구제용 제형 확립

- 구제역 바이러스 억제 물질에 다양한 부형제 (유당, 백당, 만니톨, 소르비톨, Calcium

phosphate, Aluminum silicate, Calcium sulfate 등) 적용 후 안정성 평가를 통해 최적화된 부형제 혼합비 선정

- 해당 부형제군을 적용하는 시험에서 안정성이 확보되지 못한 경우 (주)씨티씨바이오 인체 제약사업부와의 협업을 통해 안정제를 적용하여 안정성을 높인 제형 확립

○ 구제역 바이러스 억제 물질의 주사제용 제형확립

- 돼지에 주사 시 사용편의성을 감안하여 오일 형태의 부형제 적용
- 돼지의 선천면역을 높일 수 있는 adjuvant 혼합
- 백신과 병용 또는 혼합 투여 고려

○ 제품의 제형을 사료첨가용 산제 및 음수첨가용 액제 또는 주사제로 다각화하여 연구함으로써 사용자 편의성, 효능 향상을 고려함과 동시에 제품 유형 다양성 확대

나. 연구개발 추진체계

○ 과제의 성공적이고 원활한 추진을 위하여 주관기관인 경기과학기술진흥원과 협동연구기관인 농림축산검역본부, (주)씨티씨바이오, 건국대학교로 연구팀을 구성하여 추진함.

○ 주관기관에서는 효능과 약물성 향상을 위한 선도물질 구조최적화 연구를 수행하여 임상후보물질을 개발하고, 임상후보물질에 대한 작용기전 규명을 위한 연구를 수행함. 아울러 임상후보물질 및 시제품에 대한 약동학, 잔류 정량 분석 연구를 수행함.

○ 농림축산검역본부에서는 각종 물질에 대한 세포, 소동물, 미니돼지에서 구제역 억제 효능 평가를 및 ribavirin의 제형 연구를 수행함.

○ 씨티씨바이오에서는 임상후보물질 및 시제품을 생산하고 안정성 평가 및 제형 연구를 수행함.

○ 건국대학교에서는 임상후보물질 및 시제품에 대한 소동물, 자돈 적용 PK 시험 및 독성/안전성, 잔류 평가를 담당함.

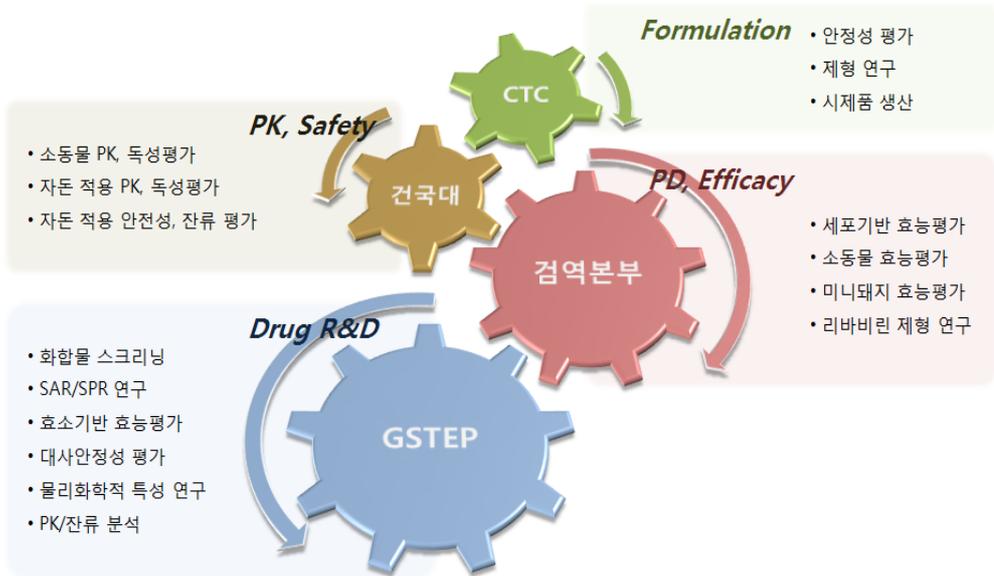


그림 5. 연구개발 추진체계

다. 연구개발 추진일정

구분	목표	세부내용	1차년도				2차년도				3차년도			
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
제 1 세부	AMTI 화합물 구조최적화 통 한 임상후보물 질 개발	유도체 합성 및 활성평가												
		약물대사 연구												
		세포 독성 평가												
		물리화학적 특성 연구												
		선도물질 저해기전 연구												
	BAMTI 화합물 구조최적화 통 한 임상후보물 질 개발 및 PK 분석	백업 화합물 스크리닝												
		유도체 합성 및 활성평가												
		약물대사 연구												
		세포독성 평가												
		물리화학적 특성 연구												
ribavirin 유도체 합성 및 PK/잔 류 정량분석	분자모델링													
	소동물 PK 분석													
	전구물질 및 유도체 합성													
	소동물 PK 분석													
제 1 협동	AMTI 화합물의 세포 및 동물 효능평가	자돈 적용 PK 분석												
		자돈 적용 잔류 분석												
	BAMTI 화합물 의 세포 및 동 물 효능평가	세포기반 효능평가												
		세포기반 효능평가												
		혈청형별 효능평가												
	Ribavirin과 유 도체의 세포 및 동물 효능 평가	포유/성체마우스 효능평가												
		세포기반 효능평가												
	성체마우스 효능평가													
	미니피그 효능평가													

제 2 협동	사료첨가용 산제 및 액제 적용을 위한 원료 분석	사료첨가용 산제 적용을 위한 원료 분석 및 특성 확인	■	■	■															
		음수첨가용 액제 적용을 위한 원료 분석 및 특성 확인		■	■	■														
	ribavirin 산제 / 액제 안정성 평가 및 시제품 생산	사료첨가용 산제 부형제 선정 및 안정성 평가				■	■	■												
		음수첨가용 액제 제형 확립 과 안정성 평가				■	■	■												
		시제품 생산							■	■										
	ribavirin 주사제 안정성 평가 및 시제품 생산	주사제 안정성 평가									■	■	■							
시제품 대량 생산													■	■	■					
검정기준 확립 및 부표작성																		■	■	
	자료 취합 및 동물약품 품목 허가 검토의뢰서 작성																	■	■	
제 3 협동	BAMTI 화합물에 대한 소동물 PK 및 독성 평가	BAMTI 화합물에 대한 마우스 PK 시험			■	■	■	■												
		BAMTI 화합물에 대한 마우스 독성 시험			■	■	■	■												
	Ribavirin에 대한 소동물 PK 및 독성 평가	Ribavirin에 대한 마우스 PK/BA 시험								■	■	■	■							
		Ribavirin에 대한 마우스 급성/아급성 독성 시험								■	■	■	■							
	Ribavirin 시제품에 대한 자돈 적용 PK, 안전성, 잔류량 평가	Ribavirin에 대한 자돈 적용 PK 시험 (경구/주사제)												■	■	■	■			
		Ribavirin에 대한 자돈 적용 안전성 평가 (경구/주사제)													■	■	■	■		
	Ribavirin에 대한 자돈 적용 잔류량 평가 (경구/주사제)														■	■	■	■		

3-2 연구개발 성과

가. 논문 게재 : SCI 논문 3 건 (2건 게재 완료, 1건 심사제출 완료)

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Synthesis and in vitro evaluation of 2-Amino-4-arythiazole as inhibitor of 3D polymerase against Foot-and-mouth disease (FMD)	European journal of medicinal chemistry	정귀완 구진모	102	EU	Elsevier	SCI
2	'Hematological adverse effects and pharmacokinetics of ribavirin in pigs following intramuscular administration'	Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics	류영수	submitted	EU	Wiley	SCI
3	Compositions for Complete Protection against Foot-and-Mouth Disease with Ribavirin and Its Analog	Vaccine	최주형 박종현	submitted	EU	Elsevier	SCI

나. 특허 성과 : 출원 3건, 등록 2건

번호	지식재산권 등 명칭	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	구제역 치료 또는 예방용 약학 조성물	대한민국	구진모 정귀완 노재성 이정현 박선미 정대연 최동화	2014.6.24	10-2014-0077072				
2	구제역 치료 또는 예방용 약학 조성물	대한민국				구진모 정귀완 노재성 이정현 박선미 정대연 최동화	2015.1.6	10-1481795	

3	구제역 치료 또는 예방용 약학 조성물	대한민국	구진모 정귀완 김수현 박중재 노이정 이선미 박정연 이광녕 최주형	2015.6.24	10-2015-0090031				
4	구제역 치료 또는 예방용 약학 조성물	대한민국				구진모 정귀완 김수현 박중재 노이정 이선미 박정연 이광녕 최주형	2016.9.20	10-1659952	
5	구제역 감염을 억제하는 예방 및 치료물질의 구성 및 적용방법	대한민국	박중현 이광녕 김수민 김병환 최주형 정귀완 구진모 정대연 정승영	2016.10.26	10-2016-0140426				

다. 국내 및 국제 학술회의 발표 : 국내 학술회의 10건

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2014 대한수의학회 춘계학술 심포지움	최주형	2014.05.22	농림축산검역 본부	대한민국
2	한국질량분석학회	정귀완	2014.8.20	제주 국제컨 벤션센터	대한민국
3	대한화학회 추계 학술대회	정대연	2014.10.16	광주 김대중 컨벤션센터	대한민국
4	대한수의학회 추계 학술대회	최주형	2014.10.17	제주 국제컨 벤션센터	대한민국
5	대한수의학회 춘계 학술대회	최주형	2015.4.29	서울대 삼성 컨벤션센터	대한민국
6	대한약학회 추계 학술대회	구진모	2015.10.22	대구 인터볼 고 엑스포	대한민국
7	대한약학회 추계 학술대회	이정현	2015.10.22	대구 인터볼 고 엑스포	대한민국
8	대한수의학회 추계 학술대회	최주형	2015.10.29	더케이호텔 경주	대한민국
9	대한수의학회 추계 학술대회	이동욱	2016.10.28	진주 MBC 컨벤션센터	대한민국
10	대한바이러스학회, 한국미생 물학회 연합 국제학술대회	이동욱	2016.11.03	일산 킨텍스	대한민국

라. 인력활용/양성 : 석사 1명

번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	건국대학교	2016		1					1				

마. 제품화 : 후보물질 개발 2건

번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용 창출	R&D 기여율
1	Ribavirin 산제	99.9% 이상의 ribavirin 원말을 무수포도당 말에 1%로 첨가하여 제조한 산제 또는 첨가용 산제	(주)씨티씨바이오	야외임상시험허가 신청 예정				100
2	RIBA-DOE	Ribavirin과 ISA-206을 혼합하여 DOE 형태로 제조한 산제	(주)씨티씨바이오	야외임상시험허가 신청 예정				100

바. 기술이전 : 기술이전 1건 예정

번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	통상실시권 이전	리바비린 또는 그 유도체를 포함하는 구제역 치료용 조성물	(주)씨티씨바이오	2016.12.01	실시료 건적액

3-3 연구 결과

■ Aminothiazole을 중심구조로 하는 신규 저분자 구제역 항바이러스제 개발

가. 구제역 바이러스 비구조단백질 3Dpol (3D polymerase) 저해물질 검색 및 구조 최적화 연구를 통한 AMTI/BAMTI 화합물 발굴

(1) 검색계 구축 및 스크리닝

(가) 3Dpol 염기서열 확보 및 단백질 정제

- 2010년 안동에서 발생한 구제역 바이러스의 3Dpol 염기 서열을 농림축산검역본부로부터 확보하여 다른 아형의 3Dpol와 아미노산 서열 상동성 비교한 결과 유사성이 97% 이상에 이를 정도로 유사하여 (그림 5) 박테리아 발현벡터에 클로닝 후 affinity chromatography를 이용하여 재조합단백질을 정제하였다 (그림 6, 7).

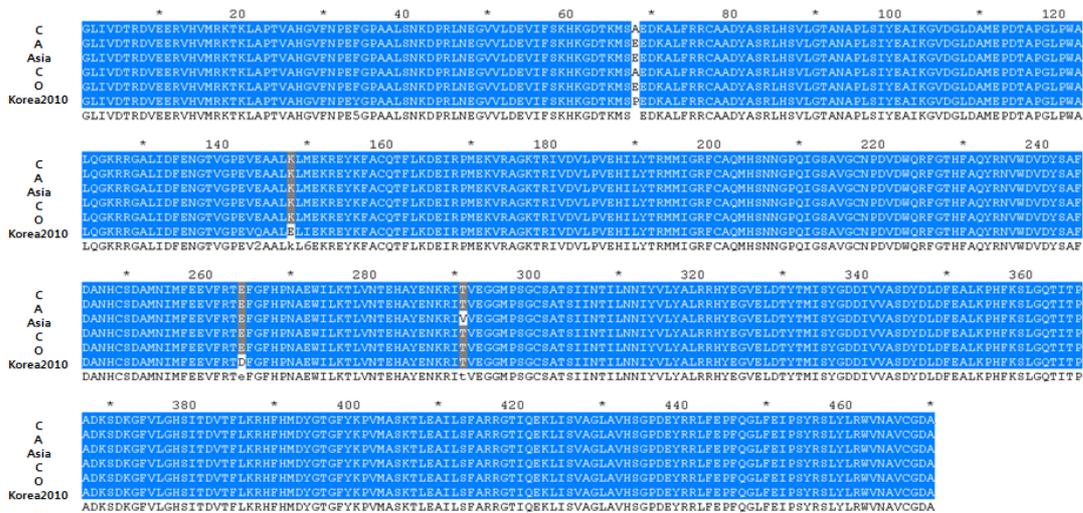
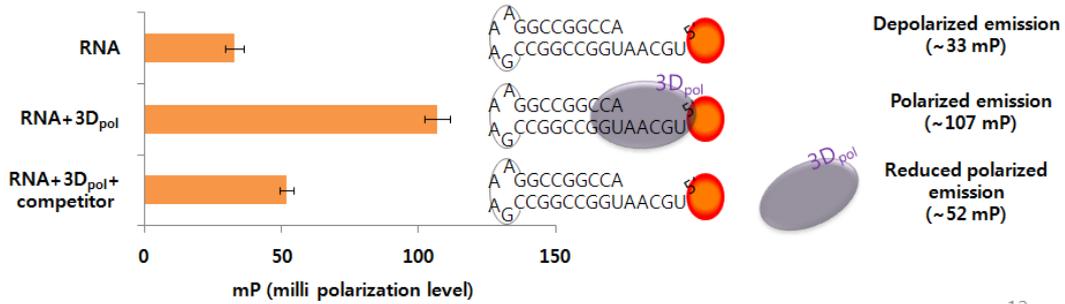
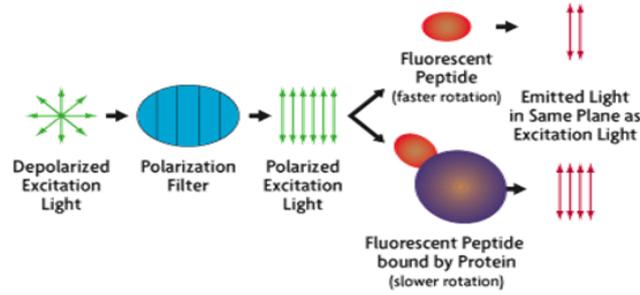


그림 5. 3Dpol의 구제역바이러스 혈청형 별 아미노산 서열 분석



12

그림 8. 형광편광의 이론적 원리 (상)와 PETE assay의 모식도 (하)

- 3Dpol과 RNA 기질의 결합 증명 : 정제한 3Dpol과 RNA 기질 (Biotin-PETE)의 결합과 unlabelled RNA에 의한 competition 효과를 SPR (Surface plasmon resonance) 기법을 이용하여 재확인하였다.
- Ligand immobilization : 100 nM 농도의 Biotin-PETE를 30 μ l/min 속도로 300초간 NLC chip에 150 μ l 흘려보내 준 결과 약 20 RU의 리간드가 immobilization 되었다 (그림 9).
- Analyte binding : 0~10 μ M의 농도 구배를 주고 50 μ l/min의 속도로 240초 간 200 μ l의 3Dpol을 흘려 준 결과, 농도에 따라 결합이 증가함이 확인되었다 (그림 10).
- Binding inhibition : 3Dpol 1 μ M에 0~3 μ M 까지 Non-labeled competitor RNA를 50 μ l/min 속도로 흘려준 결과 농도에 따라 저해효과도 따라서 증가하였다 (그림 11). 이로써 3Dpol과 PETE의 직접적인 결합을 증명하였다.

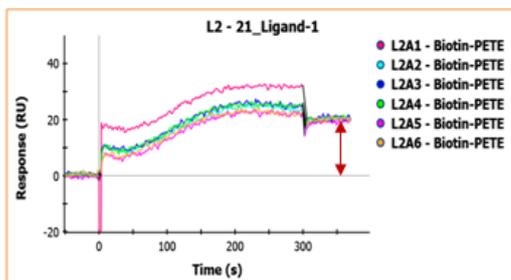


그림 9. PETE immobilization

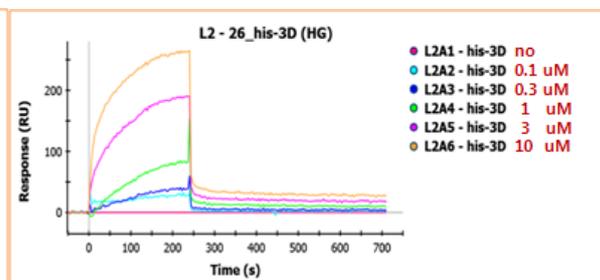


그림 10. 3Dpol과 PETE 간 결합

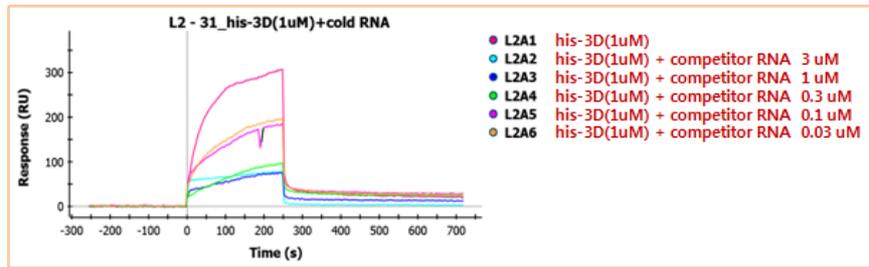


그림 11. competitor RNA에 의한 Binding inhibition

○ HTS adaptation : 최적의 기질 및 효소 농도, 시간, 온도 등의 반응 조건을 확립하였고 (그림 12), 양성 대조 물질인 competitor RNA에 의한 농도 의존적 저해효과를 확인하였다 (그림 13).

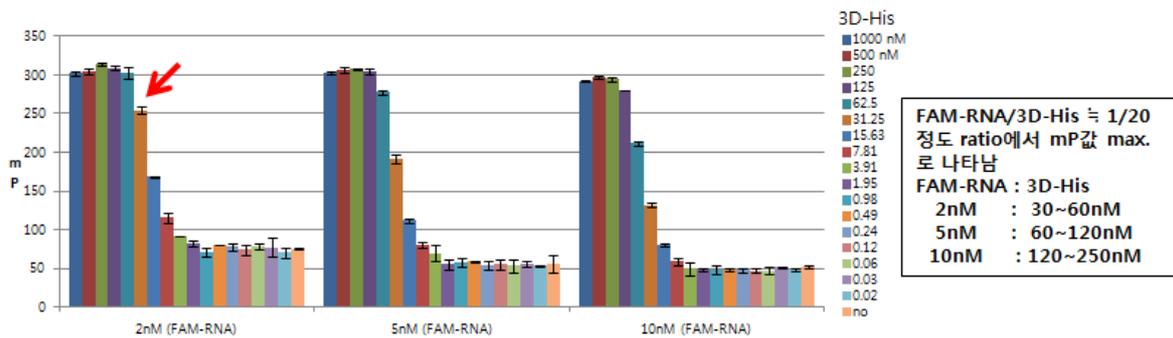


그림 12. 기질 및 효소 농도 최적화

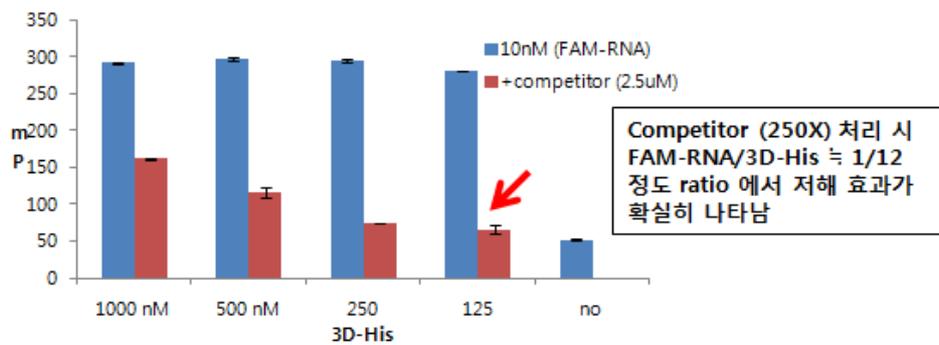


그림 13. 양성대조군 competitor RNA 농도 최적화

< HTS SOP >

- PETE 농도 : 2 nM
- 3Dpol 농도 : 30 nM
- 시간 : preincubation 30분, mix 후 바로 reading
- 온도 : RT
- 양성대조군 : Competitor RNA 200 nM (100X)
- Assay buffer : 50 mM HEPES pH 7.0, 10% glycerol
- Plate : 384 well Non-binding micro black plates (cat# 781900, Greiner)
- 실험수순 : compound dilution 5 μ l + polymerase dilution 15 μ l mix 후 30 분 간 preincubation, substrate dilution 20 μ l mix 후 read-out

< Envision[®] setting >

- Label : FP fluorescein dual
- Top mirror : FITC FP
- Excitation Filter : FITC FP 480
- Emission Filter : FITC P-pol 535 (1st), FITC S-pol 535 (2nd)

(다) Functional luciferase assay 구축

- 3Dpol에 의한 PolyrA/OligodT에서 rUTP incorporation을 luminescence로 측정하는 검색법을 구축하였으며 (그림 14), 이 방법은 효소/기질 결합 저해 물질 뿐 아니라 효소 활성 저해 물질을 검색할 수 있다. 차후 유도체 활성평가 및 DRC 실험에 활용하였다.

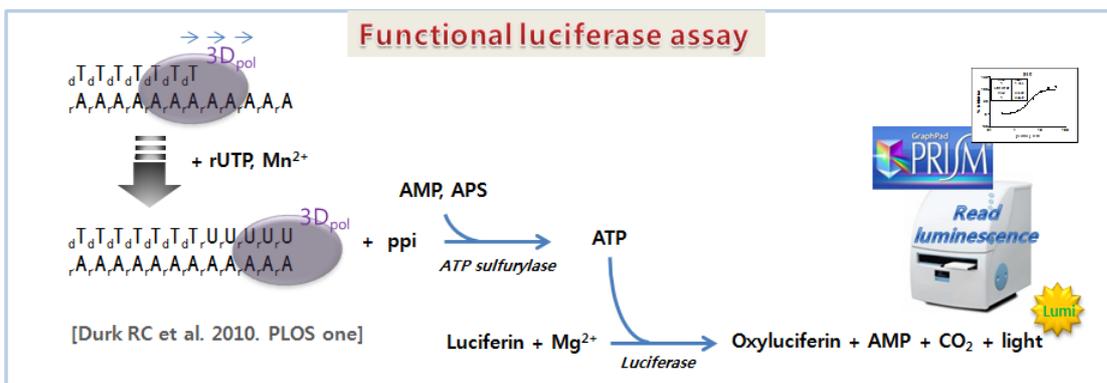


그림 14. Functional luciferase assay의 개요

- 최적의 기질 및 효소 농도, 시간, 온도 등의 반응 조건을 확립하였다 (그림 15).

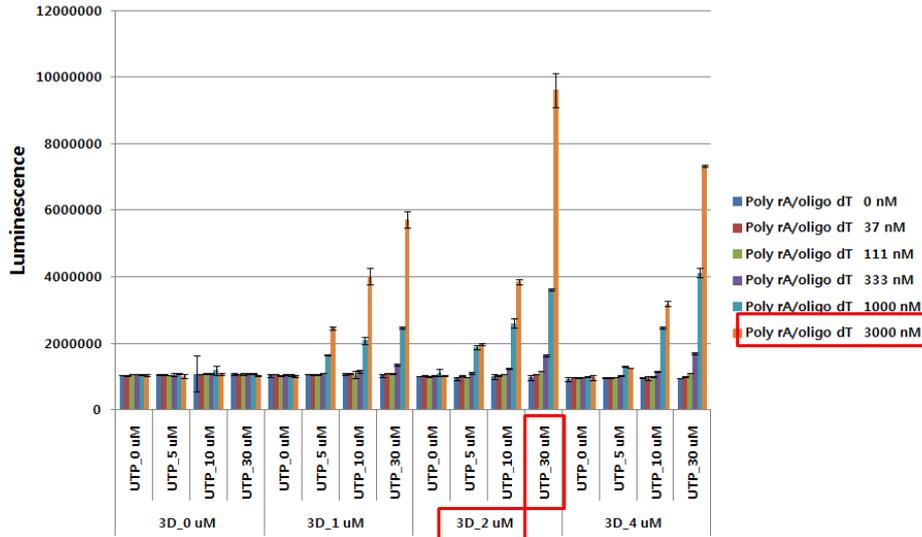


그림 15. Functional luciferase assay의 반응조건 최적화 실험 결과

< Procedure >

- 기질 농도 : OligodT 0.12 μ M, PolyrA 1.2 μ M, rUTP 30 μ M
- 3Dpol 농도 : 1 μ M
- 시간 : 1 h 반응
- 온도 : 37 $^{\circ}$ C
- Assay buffer : 25 mM Tris-Cl, pH7.8, 25 mM KCl, 1 mM MnCl₂
- Annealing buffer : 25 mM Tris-Cl, pH7.8, 25 mM KCl
- T/P aneling : 98 $^{\circ}$ C에서 4분간 denaturation 후 ice에서 급랭하여 random annealing
- Plate : 384 well micro white plate (cat# 781080, Greiner)
- 실험수순 : Assay mixture (containing rUTP and 3D-His) 10 μ l + compound dilution 10 μ l + Annealed T/P 5 μ l mix 후 1시간 반응, PPLight (Lonza) converting reagent 12 μ l 넣고 30 분, PPLight Detection reagent 12 μ l 넣고 30 분 배양 후 read-out
- Envision[®] setting : Ultra luminescence 384 format

○ System inhibition assay : ATP sulfurylase 또는 luciferase를 저해하는 위양성 화합물을 골라내기 위하여 Pyrophosphate를 이용한 PPLight assay를 parallel하게 수행하여 IC₅₀ 산출, Functional luciferase assay 결과 값과 비교하여 system inhibition이 결과 값에 영향을 주었는지 분석하여 데이터의 신뢰도 확보. 아래 결과를 보면 좌측의 결과

는 system inhibition이 영향을 준 사례이고 우측은 그렇지 않은 사례이다 (그림 16).

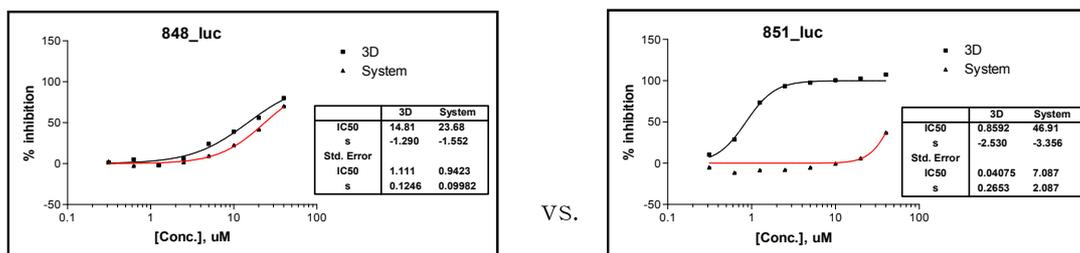


그림 16. System inhibition을 보이는 화합물(좌)과 보이지 않는 화합물(우)의 DRC 예

(라) Gel-based primer extension assay (GBPE assay) 구축

- Staggered end를 갖는 oligomer duplex 상에서 3Dpol의 nucleotide incorporation (extension) 활성을 denaturing PAGE를 이용하여 시각화할 수 있는 실험법으로 반응 조건 및 실험 수순은 아래와 같다 (그림 17).

< Procedure >

- 기질 농도 : 5'FAM-Oligo(dT) 50 nM, Poly(rA) 1.2 μM, rUTP 60 μM
- 효소 농도 : 3D-His 0.5 μM
- Cofactor 농도 : MnCl2 1 mM
- Assay buffer (5X) : 250 mM Tris-Cl pH7.8, 300 mM KCl, 0.05% BSA, 5 mM DTT, 0.5% NP-40
- T/P annealing : 98 °C에서 4분간 denaturation 후 ice에서 급랭하여 random annealing
- 실험수순 : 효소 • rUTP • Cofactor가 포함된 assay mixture 10 μl + compound dilution 10 μl mix 후 30 분간 preincubation, annealed T/P 5 μl mix 후 37 °C에서 1시간 반응, 2X formamide gel loading buffer 넣고 90 °C에서 4분간 끓인 후 Urea-denaturing PAGE 실시, LAS4000 기기로 gel imaging, ImageJ software를 이용하여 densitometry 수행하고 IC50 산출

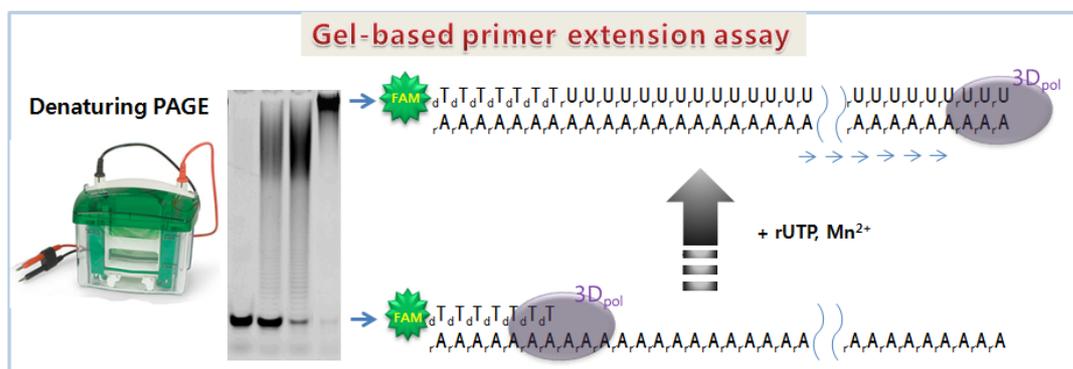


그림 17. GBPE assay의 원리

- 실험 결과 : 아래 그림과 같이 5'FAM-Oligo(dT)는 gel의 아래 부분에 위치하고 divalent cation (Mn^{2+}) 존재 하에 Poly(rA)를 template로 하여 primer extension이 일어나 gel의 윗부분으로 mobility shift가 발생한다. 이를 억제하여 gel의 아랫부분에 primer band가 머무르게 할 경우 화합물이 3Dpol 활성을 억제하였다고 판정한다. 또한 gel 윗부분의 fully extended product를 imageJ software를 이용하여 정량화하면 대략적인 IC_{50} 도 계산할 수 있다. 아래 그림에서는 빨간색으로 표시된 6개 화합물이 3Dpol 억제 활성을 보였으며 대략적인 IC_{50} 는 녹색으로 나타나 있다 (그림 18).

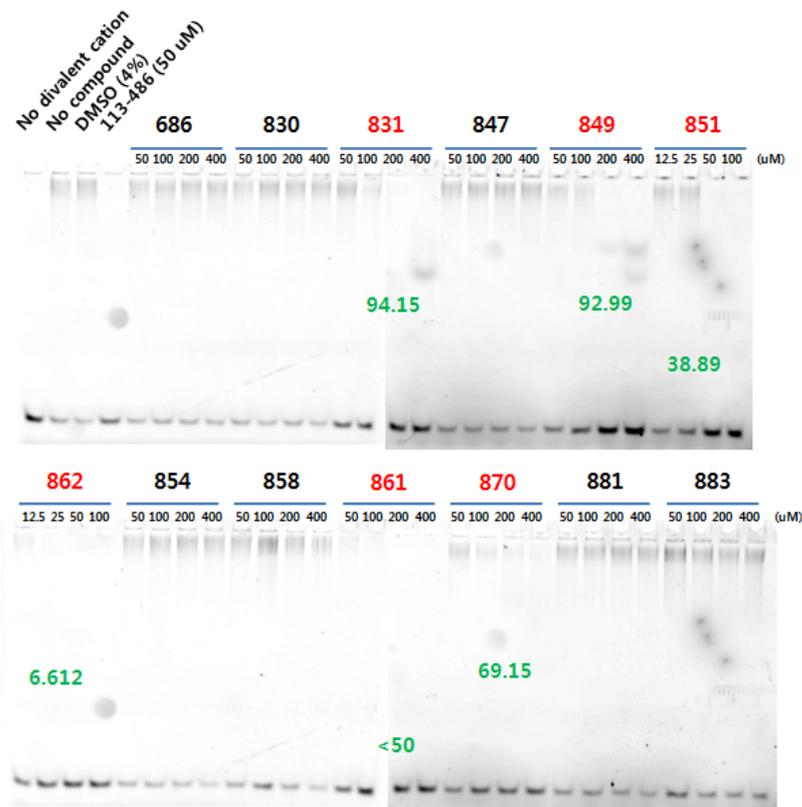


그림 18. GBPE assay 결과

(마) 세포내 구제역 바이러스 증식 억제 활성 평가를 위한 cytopathic effect (CPE) 측정

- 반응 조건 및 실험 수순 : IBRS2 세포를 96well plate에 seed하고 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 하루 동안 배양시켰다. 1×10^2 TCID₅₀의 O/SKR/2010을 1시간 동안 감염시킨 후에 상층액을 버리고 농도별 (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μ M)로 희석한 화합물을 처리하였다. 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양 후 EC₅₀을 측정하기 위하여 세포에 MTS assay 시약 (Promega 社)을 처리 후 microplate reader (Molecular device 社)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 결과로부터 GraphPad Prism 5 소프트웨어를 이용하여 EC₅₀을 산출하였다. CC₅₀를 측정

하기 위하여 바이러스를 감염시키지 않은 세포에 화합물을 같은 농도로 처리하여 위와 같은 방법으로 CC_{50} 를 측정하였다.

- 결과 해석 : EC_{50} 값은 바이러스에 대하여 세포의 생존율을 50% 저해하는 화합물의 농도로 나타낸 것이다. EC_{50} 값이 낮을수록 낮은 농도의 화합물에서도 항바이러스 효과가 높다는 의미이다. EC_{50} 값이 산출되어지지 않는다면 화합물의 항바이러스 효과가 낮거나 없다고 해석된다.

(바) HTS 및 유효물질 선정

- HTS : 5만개 화합물 25 μ M 농도로 처리하고 40% 이상 저해 화합물을 1차 유효물질로 선정하였다 (그림 19).

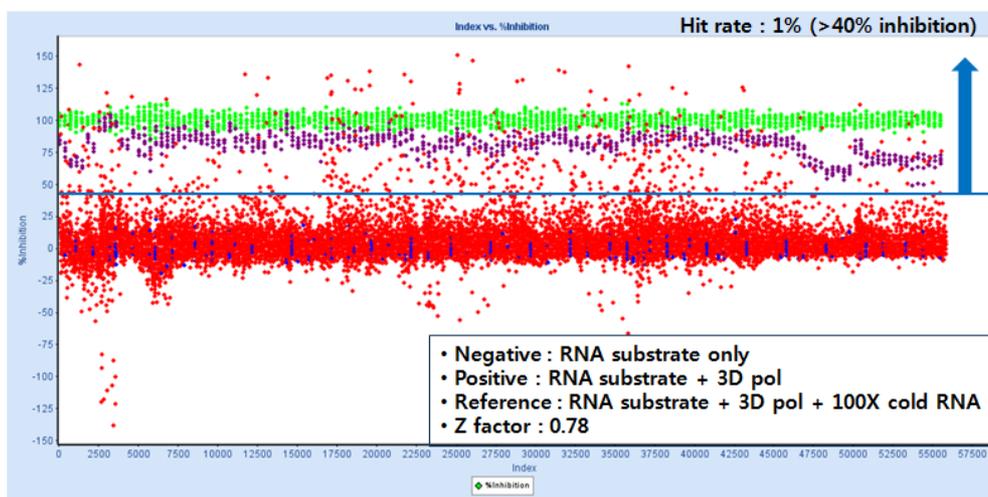


그림 19. 3Dpol 저해물질 HTS 결과 (FP assay)

- Confirmation 스크리닝 : 530개 화합물을 선정하여 10, 25 μ M 두 가지 농도로 각각 처리하고 25 μ M 농도에서 40% 이상 저해하는 화합물 95개를 선별하였다 (그림 20).

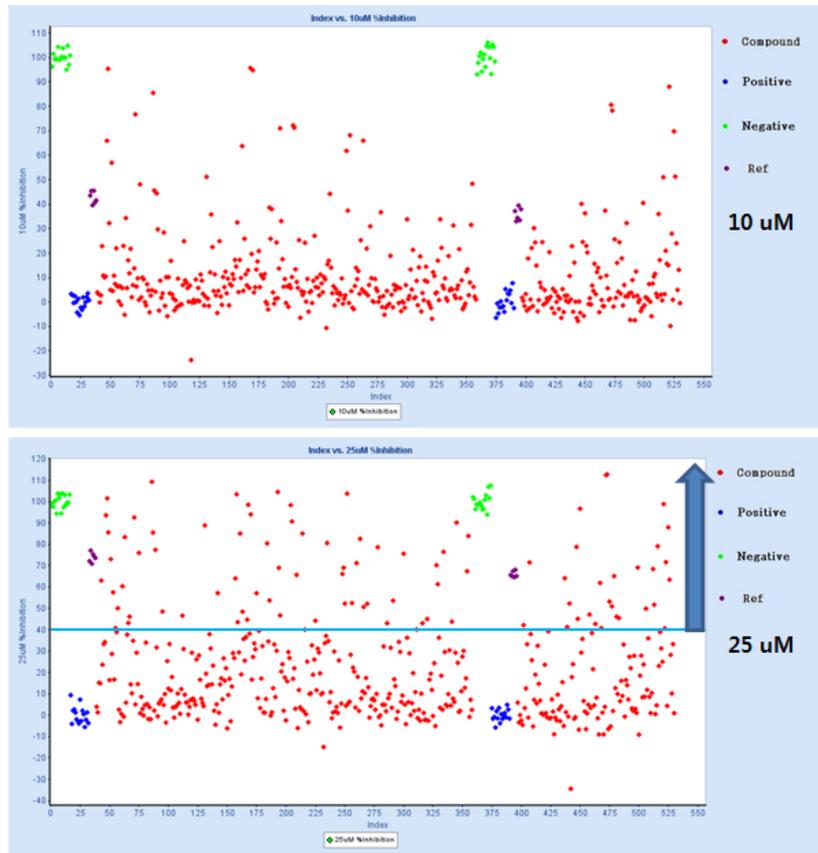


그림 20. 3Dpol 저해물질 95개의 활성 재확인 실험 결과

- Clustering & DRC : 120개 화합물, 8 dose (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.3, 0.6, 0.3 μ M)
 - Confirmation screening에서 선별된 95개 화합물을 구조유사성에 근거하여 7개 cluster (10 single hits)로 묶고, 이 cluster에 속하는 미검색 라이브러리 화합물 포함하여 총 120개 화합물을 DRC 실험한 후, AMS (Assay data management system)를 통한 IC₅₀ 분석 결과 49개 화합물에서 농도 비례 활성이 나타났다.
 - 이 중 5개 cluster와 5개 single hit는 자체 형광을 띠는 물질 (fluorophore)로 false positive로 판명되었고, 2개 cluster 5개 single hit를 포함하는 13개 화합물을 최종 유효물질로 선정하였다 (그림 21).
 - 13개 화합물에 대하여 cross screening으로서 functional luciferase assay를 수행하여 RNA polymerase의 저해효과를 확인하였고 세포독성, 검색계를 간섭할 수 있는 형광 물질, 낮은 화학적 안정성을 갖는 물질들을 제외하였으며, 또한 nonspecific protein binding을 하는 frequent hitter, false positive를 제외함으로써 유효물질 선정에 신뢰도를 향상시켰다. 최종적으로 Hit 12 화합물을 유효물질로 선정하고 기본 골격에서 유래한 화합물 코드 (AMTI)를 부여하였다 (표 2).

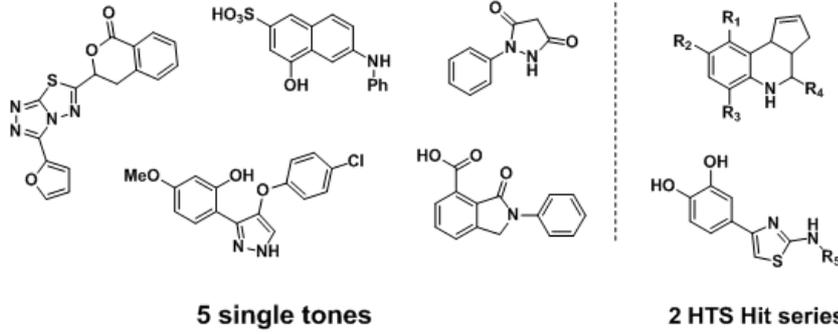


그림 21. HTS hits (13개)의 구조적 특징에 따른 분류

표 2. HTS hit 화합물의 유효물질 검증

번호	화학 구조	약리활성/독성/광학특성 /화학적안정성	유효물질 선정 의견
Hit 1		IC ₅₀ 4.3 μM 세포독성 없음 40 μM 형광 >90 % 순도	Frequent hitter
Hit 2		IC ₅₀ 7.5 μM 세포독성 없음 형광 90%>순도>50%	형광, 낮은 순도 낮은화학적안정성
Hit 3		IC ₅₀ 7.8 μM 세포독성없음 > 50% 순도	낮은 순도 tautomerization 낮은 화학적 안정성
Hit 4		IC ₅₀ 9.3 μM 세포독성 없음 형광 > 90% 순도	형광물질
Hit 5		IC ₅₀ 9.3 μM 독성측정 불가. 형광 > 50% 순도	비우호적 기본골격 형광물질 낮은 화학적안정성
Hit 6		IC ₅₀ 9.3 μM 세포독성 없음 형광 > 50% 순도	비우호적 기본골격 형광물질 낮은 화학적 안정성
Hit 7		IC ₅₀ 2.8 μM 세포독성 없음 형광 >50% 순도	비우호적 기본골격 형광물질 낮은 화학적 안정성
Hit 8		IC ₅₀ 18.5 μM 100 μM 세포독성 90%>순도>50%	비우호적 기본골격 세포독성 낮은 화학적 안정성

Hit 9		IC ₅₀ 32.7 μM 세포독성 없음 90%>순도>50%	비우호적 기본골격 낮은 화학적 안정성
Hit 10		IC ₅₀ 33.5 μM 세포독성 없음 > 50% 순도	비우호적 기본골격 낮은 화학적 안정성
Hit 11		IC ₅₀ 15.8 μM 100 μM 세포독성 90% 순도 형광	세포독성 낮은 화학적 안정성 낮은 기능활성 형광
Hit 12		IC ₅₀ 6.2 μM 세포독성 없음 >90 % 순도	유효물질선정 AMTI 코드화
Hit 13		IC ₅₀ 24.9 μM 세포독성없음 >90 % 순도	고농도에서 형광

(2) AMTI 화합물의 hit-to-lead generation

(가) AMTI 화합물의 합성 최적화

- AMTI 화합물의 다양한 유도체를 합성하기 위해 AMTI 화합물을 A와 B를 갖는 chloroacetyl과 thiourea로 cyclization 시키는 방법 1과 isothiocyanate와 amine으로 cyclization 시키는 방법 2를 포함하는 convergent synthesis를 최적화시켰다 (그림 22). 또한 유도체에 해당되는 thiourea는 4가지 체법을 통해 얻을 수 있었다 (그림 23).

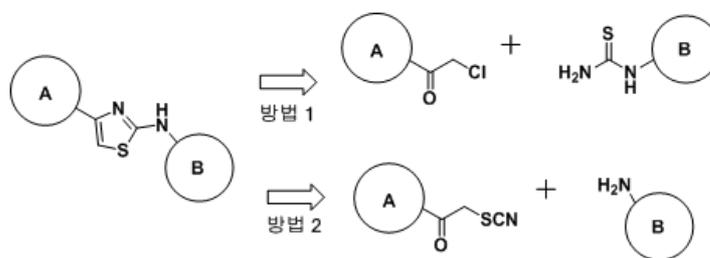


그림 22. AMTI 화합물의 convergent synthesis

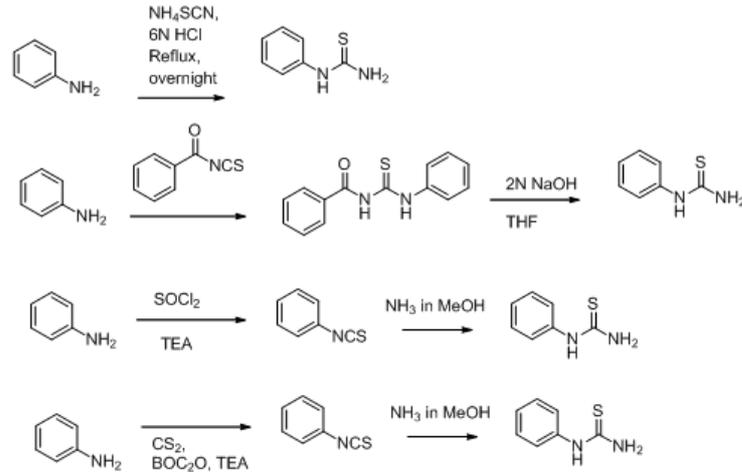
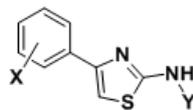


그림 23. Thiourea의 제법

(나) AMTI의 구조-활성 상관관계 연구

○ AMTI 화합물의 초기 구조활성 상관관계를 알아보기 위해 경기과학기술진흥원에서 보유한 20만 종의 화합물 중 기본 골격 유사 구조를 갖는 111종의 화합물을 추출하였고 이를 통해 AMTI의 3Dpol inhibition에 필요한 functional group을 확인하였다. 아래와 같이 X 치환체가 mono- 또는 di-substituted aliphatic chain이나 mono-, di-substituted halogen, amino (NH₂), NHAc와 같은 치환체를 갖게 되는 경우 효소 저해효과가 나타나지 않았으며 Y 치환체가 piperazine, acetyl, furanylmethyl 의 경우 마찬가지로 효소 저해효과가 나타나지 않음을 확인하였으나 극히 부분적인 치환체에 한정되어 본격적인 구조-활성 상관관계 연구가 요구되었다 (그림 24).



X = mono-, di-substituted aliphatic chain
mono-, di-substituted halogen
mono substituted NH₂ / NHAc

Y = piperazine
COCH₃
furanylmethyl

그림 24. 경기과학기술진흥원 보유 AMTI 유사화합물 중 효소저해 비활성 화합물

○ AMTI의 유도체는 1차적으로 3Dpol 저해효과 향상과 세포독성 개선을 목표로 설계되고 합성되었다. 이를 위해 3Dpol 저해효과 향상을 위해 AMTI-1의 part A에 위치한 catechol (dihydroxyphenyl)은 수소결합 donor, acceptor로 작용하며 electron donating group이며 경우에 따라 oxidation/reduction에 민감하여 분해나 변성이 쉬워 hydroxy를 제거하거나 bioisostere를 도입하여 효소저해 활성을 2배 높인 화합물 AMTI-8과 Part B의 NHAc를 다양한 치환체로 변화를 주어 2.5배의 효소저해 활성 향상을 보인

AMTI-41을 얻었다. 더 나아가 part A와 part B를 조합함으로써 약리활성을 높은 AMTI 유도체 28종을 발굴할 수 있었다. (그림 25)

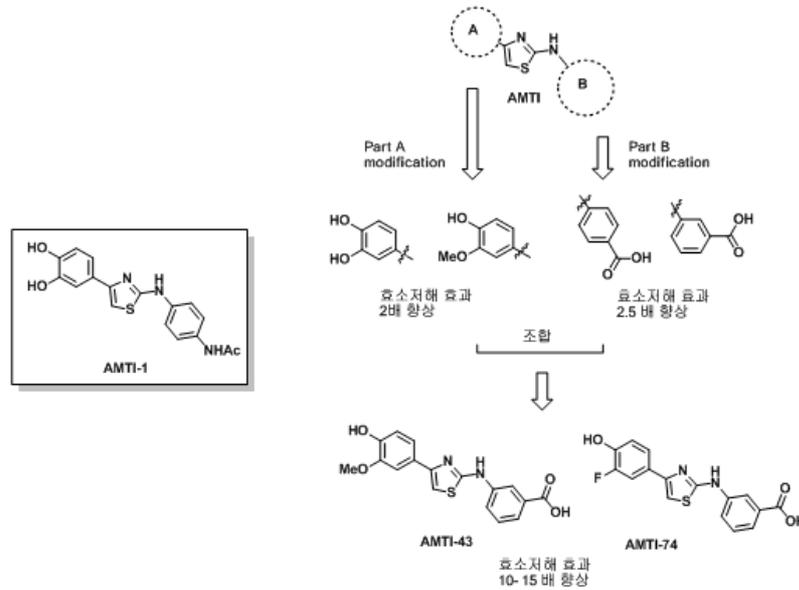


그림 25. AMTI-1의 구조와 구조최적화 전략

- 또한 다양한 유도체의 세포독성 실험을 통해 치환체가 미치는 독성상관관계를 정리하였으며 part A에 halogen, methoxy를 부분 치환하고 part B에 carboxylic acid를 도입함으로써 세포독성이 없는 유도체를 도출하였다. (그림 26)
- 최종적으로 μM 이하의 높은 3Dpol 저해효과를 가지며 세포독성으로부터 자유로운 AMTI 유도체 8종을 개발하였으며 이 물질들은 1상/2상 대사에 안정적이기 때문에 세포 및 동물실험에서 지속적이고 효과적인 약물로서 가능성을 제시하였다.

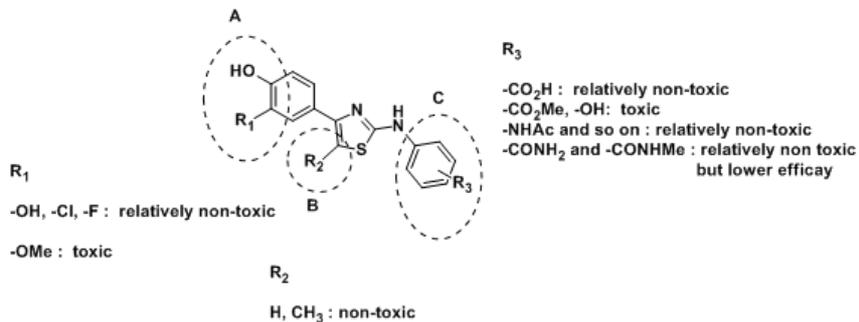


그림 26. AMTI 유도체의 구조-세포독성 상관관계

(3) BAMTI 화합물의 hit-to-lead generation

(가) BAMTI의 화합물 설계 아이디어

- BAMTI 화합물은 AMTI 화합물의 구조적 특징을 고려하여 양쪽 말단의 aromatic ring을 연결하는 thiazole의 방향성을 바꿔줌으로써 새로운 3Dpol inhibitor를 위한 설계를 통해 고안되었다. BAMTI-147은 AMTI-16으로부터 구조 변경되었으며 새로운 화합물 코드인 BAMTI (Benzylaminobenzothiazole)를 사용하였고 AMTI 화합물과 병행하여 연구 수행하였다 (그림 27).

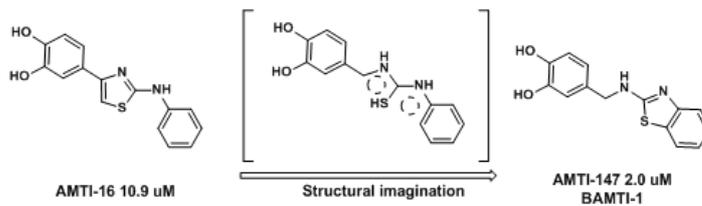


그림 27. BAMTI 구조의 유래

(나) BAMTI 화합물의 합성 최적화

- BAMTI 화합물은 benzothiazole의 2번 위치에 benzyl group이 도입되어 있는 구조로서 크게 2-halobenzothiazole과 benzylamine을 결합반응을 수행하여 얻는 방법과 2-aminobenzothiazole과 benzylalcohol의 산화적 결합반응을 통해 합성하는 방법, 그리고 2-aminobenzothiazole과 benzaldehyde의 환원적 아민화반응에 의한 합성법 등 세 가지로 나뉜다. 이 때 요구되는 aminothiazole이 구매가능하지 않은 경우 thiourea를 경유한 고리화반응을 통해 합성할 수 있었다 (그림 28).

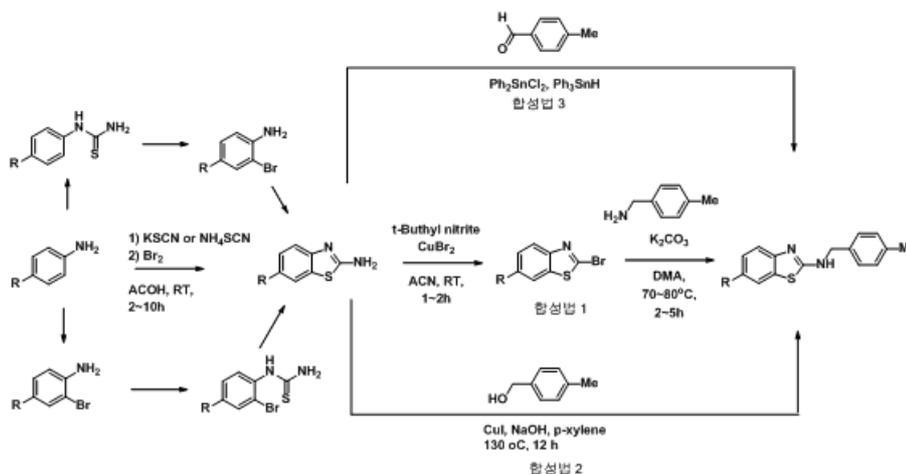


그림 28. BAMTI 화합물의 일반적 합성법

○ BAMTI-1의 초기 구조최적화를 위해 benzothiazole의 4번, 5번, 6번 위치에 다양한 치환체를 도입하여 수소가 최적의 치환체임을 밝혀냈다. Benzyl 주변에 소수성 결합부위의 크기를 알아보기 위해 t-butyl, isobutyl, vinyl을 도입하여 linear chain이 branched chain보다 높은 약리활성을 보였다. 이후 용해도 개선을 위해 1차 알코올, 2차 알코올 형태의 유도체를 통해 용해도를 개선하고 사슬의 말단에 electron donating/withdraw group을 도입함으로써 전자효과 또는 수소결합 여부를 판단한 결과 electron donating, 수소결합 공여 치환체가 효소저해에 유리함을 확인하였다. 또한 1차 도입된 치환체 중 수소보다는 낮지만 효소저해 활성을 보인 5-hydroxy group을 도입하였을 경우 마찬가지로 효소저해 활성이 떨어짐을 확인함으로써 최적화된 화합물을 검증하였다 (그림 29).

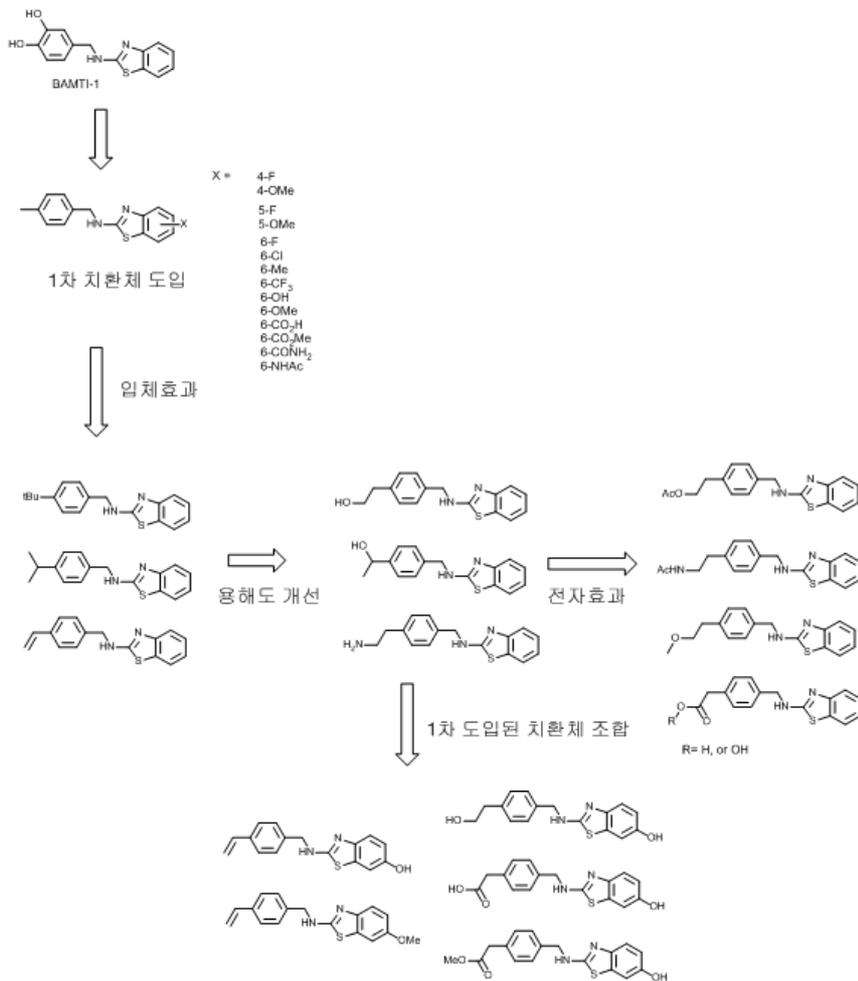


그림 29. BAMTI-147의 구조최적화 전략 및 유도체

(다) BAMTI-225의 발견

- BAMTI-225는 BAMTI-147의 양 말단의 aromatic system의 거리를 조절하고자 설계된 화합물이다. BAMTI-225는 AMTI 화합물과 초기 BAMTI 화합물과 비해 효소저해 효과가 뛰어나며 세포독성이 상대적으로 낮은 물질로 구체적인 구조최적화가 요구되었다 (그림 30).

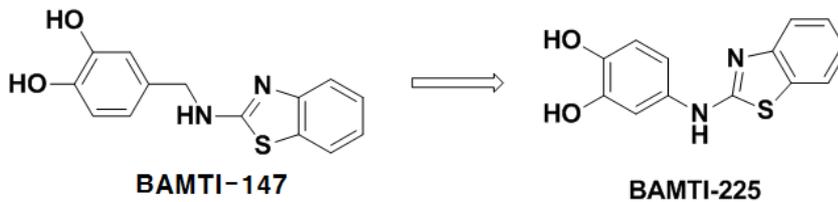


그림 30. BAMTI-147과 BAMTI-225의 화학적 구조

① BAMTI-225의 구조최적화

- BAMTI-225는 aniline과 benzothiazole이 결합하여 2차 아민의 형태를 띠고 있다. 이러한 BAMTI-225의 구조최적화를 위해 aniline에 한 개 또는 두 개의 hydroxyl group을 도입하여 효소저해효과가 사라지는 결과를 바탕으로 catechol이 약리활성에 중요한 부분임을 인지하였다. 이에 catechol을 대체할 수 있는 bioisostere를 포함하는 benzothiazole, benzoxazole, bezimidazole을 설계하였고 또한 benzothiazole의 열린 구조인 thiourea를 설계하여 약리활성을 비교하고자 하였다. 또한 구조 단순화와 다양한 치환체 도입이 가능하게 하기 위해 benzothiazole을 thiazole로 변형시킨 화합물을 합성하였다.

② BAMTI-225의 구조활성 상관관계

- BAMTI-225의 fused system을 benzothiazole과 benzoxazole, benzimidazole로 구조 변화를 주었을 때 세 구조 모두 ortho 위치에 치환된 유도체만 functional luciferase assay에서 저해활성을 보였고 X 치환체가 OH, OMe, F인 경우 유사하거나 개선된 저해활성을 나타내었다. Fused heteroaromatic ring을 thiourea로 변형시켰을 경우 역시 같은 저해활성 경향을 보였으며 nonfused aromatic 구조인 thiazole로 구조를 축소시켰을 때 보다 다양한 치환체에서 저해활성을 보임으로써 계속된 구조 최적화 연구가 요구되었다 (그림 31).

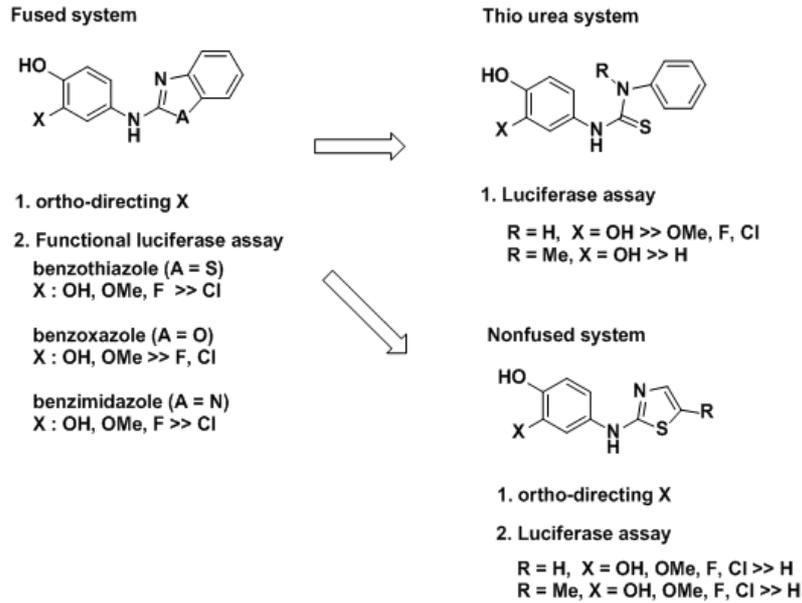


그림 31. BAMTI 225의 유도체 및 구조활성 상관관계

(라) BAMTI 화합물의 기본 골격 다양화

- 유도체의 다양성을 부여하기 위해 2-aminobenzothiazole (fused), thiourea (ring opened), 2-thiazole (non-fused)로 구분하고 치환체에 따른 효소저해 활성과의 관계를 규명하였다 (그림 32). 이 가운데 thiourea는 3Dpol 저해활성이 없었으며 2-thiazole 유도체의 경우 우수한 저해 활성을 보임에도 독성이 높고 화학적 안정성이 낮아 구조최적화에서 배제하였다 (표 3).

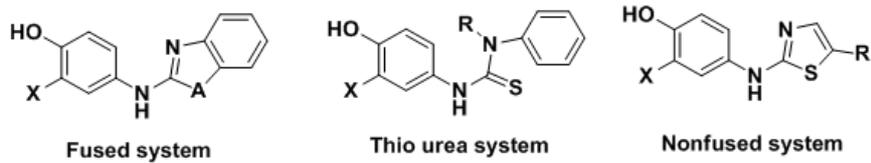
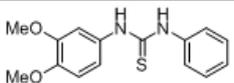
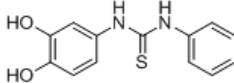
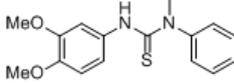
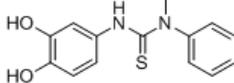
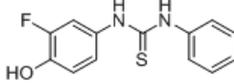
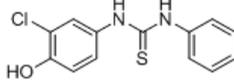
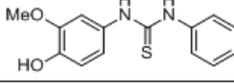
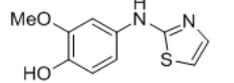
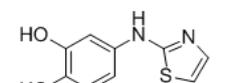
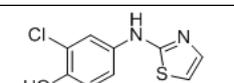
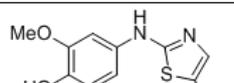
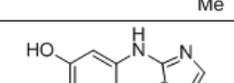
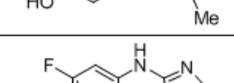
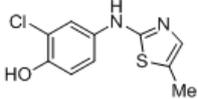


그림 32. BAMTI 화합물의 대표 아날로그 3종의 화학구조

표 3. Thiourea와 2-thiazole 계열 대표화합물의 구조와 약리활성

BAMTI No.	구조	효소저해 활성 (μM)	세포독성 (IBRS-2) (μM)	세포활성평가	
				바이러스 억제효과 EC ₅₀ (μM)	선택성 지수 (CC ₅₀ /EC ₅₀)
248		NA			
249		0.37	11.54	NA	
257		NA			
258		0.43	49.48	NA	
266		NA			
267					
268		10.6			
269		0.4	137.8	toxic	
270		0.4	400	131.40	3.04
271		0.6	337.45	173.05	1.95
273		0.44	60.8	toxic	
274		0.27	400	108.15	3.70
275		0.39	329.55	138.72	2.38

276		0.40	195.05	117.70	1.66
-----	---	------	--------	--------	------

(마) Bioisoterism을 응용한 유도체화

○ BAMTI 화합물에서 효소저해활성에 현저한 영향을 미치는 치환체인 catechol 이나 hydrogen bonding donor/acceptor를 대체할 수 있는 bioisostere를 도입하였다. Bioisostere는 구조적으로는 상이하나 생물학적 활성에 유사한 영향을 미치는 치환기를 말한다. 이 때 도입된 bioisostere는 그림 33과 같으며 이러한 구조들은 catechol의 화학적 불안정성은 해결되었으나 3Dpol 저해 활성이 나타나지 않았다.

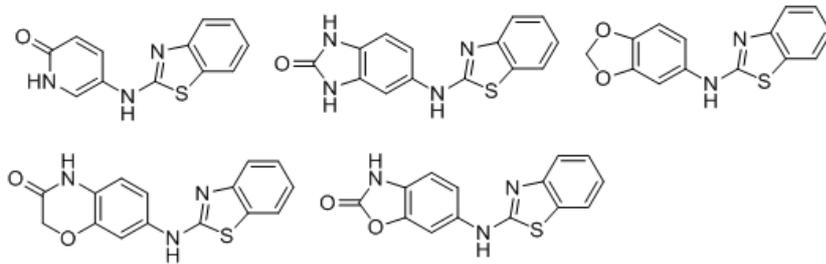


그림 33. Bioisostere를 도입한 유도체의 화학구조

(바) 화학적 안정성 개선 및 물리화학적 물성 개선

○ 1차년도 연구를 통해 도출된 BAMTI-237의 효소저해 활성, 독성 및 세포 수준 항바이러스 억제효과는 확인하였으나 상온에서 화합물의 변성이 관찰되고 (그림 34), 효능 대비 독성이 높아 이를 해결하기 위한 추가의 최적화 연구와 염 연구가 요구되었다.

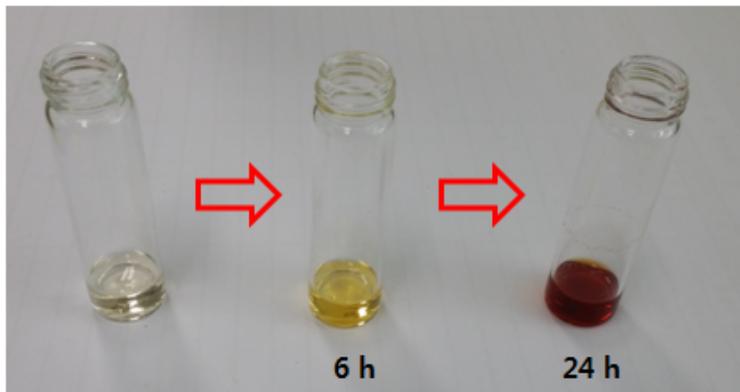


그림 34. BAMTI-237 의 상온에서 화합물 변성

○ BAMTI-237은 DMSO, 상온 하에서 가수분해 산물 A와 수산화기가 치환된 화합물 B, phenolic alcohol의 분자간 치환반응을 통해 얻어진 화합물 C, fluoride가 없어진 화합물

D로 변성되었으며 이러한 현상은 phenyl group에 치환된 F 원자의 반응성이 높아 치환되거나 가수분해가 된 것으로 확인되었다 (그림 35, 36).

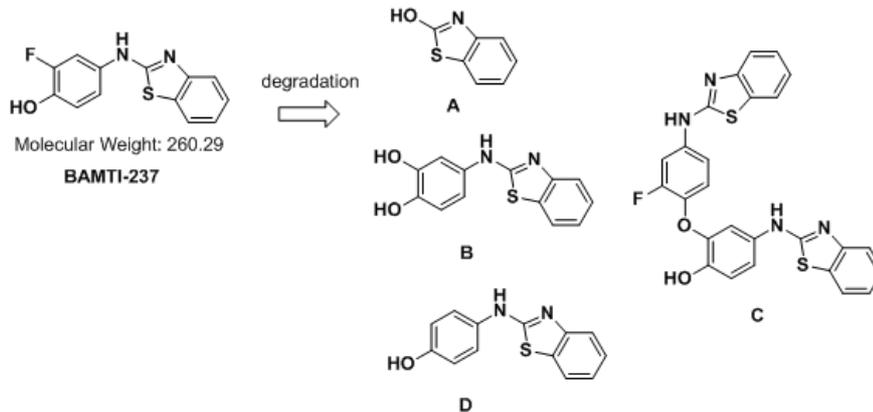


그림 35. BAMTI-237의 변성에 의한 화합물의 구조

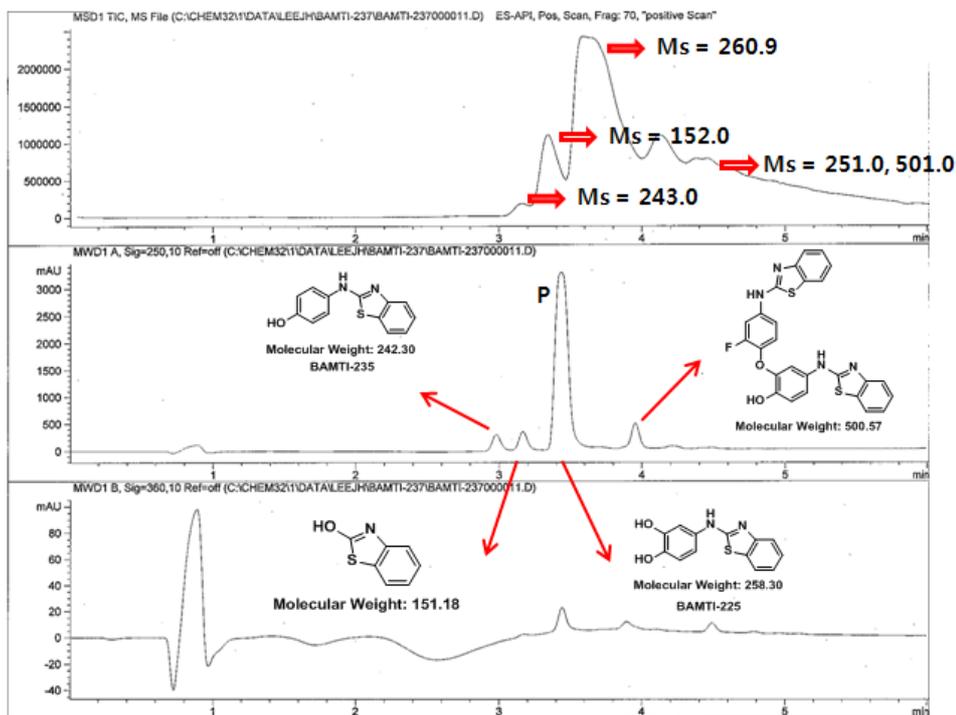


그림 36. BAMTI-237의 변성을 확인한 LC/MS chromatogram

○ 이에 따라 BAMTI-237 화합물의 화학적 안정성 및 활성 개선을 위한 구조변경을 계획하였다. BAMTI 화합물의 구조를 약리작용단으로서 효소활성 억제에 중요한 영향을 미치는 A section과 상대적으로 구조 변화에 덜 민감한 B section으로 구분하였다. 이때 B section은 효소와 화합물의 결합 상태에서 외부로 노출되는 부분이라 여겨 우선

A section의 구조 변경, 특히 F 원자를 대체할 수 있는 X 치환체의 도입을 통한 약리 활성 및 화학적 안정성 향상에 중점을 두었다 (그림 37).

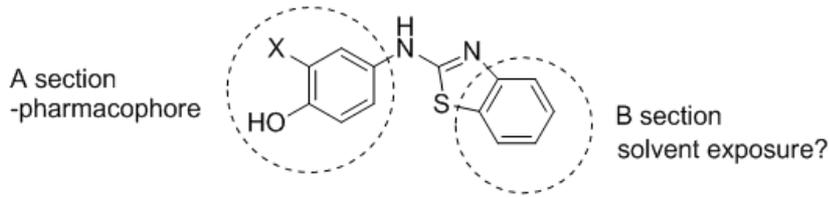


그림 37. BAMTI-237의 구조최적화 접근 방향

① BAMTI 화합물의 A section 구조 변화

- BAMTI-237이 용매 내 물 분자 또는 동일 분자의 분자간 반응이 일어나는 것은 F 원자의 반응성이 높기 때문으로 판단되어 F 원자를 대체할 수 있는 화합물을 설계하고 합성하였다.
- F 원자를 다른 할로젠 원자인 Cl (BAMTI-243)이나 같은 electron withdrawing 그룹인 carboxylic acid (BAMTI-294), F 원자의 위치나 개수에 변화를 주어 phenyl의 전자 밀도에 변화를 준 화합물 (BAMTI-300, 301), 그리고 알킬 그룹을 도입한 화합물 (BAMTI-313, 339, 338)을 합성하여 3Dpol에 의한 RNA 합성 저해 효과를 single digit micromolar에서 확인하였으나 세포수준 항바이러스 억제효과의 선택성 지수는 BAMTI-298의 경우 최고 2.11로 약물로 개발할 만큼 유의미한 수치를 보여주지 못하였다 (그림 38, 표 4).

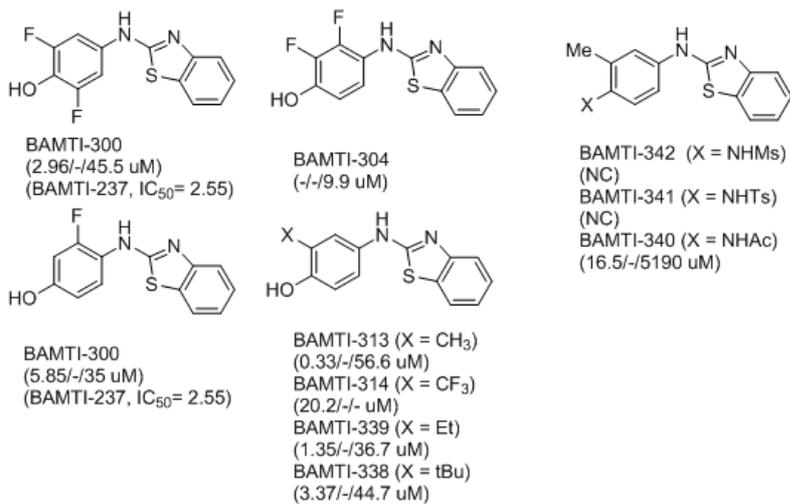
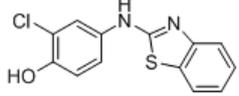
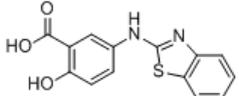
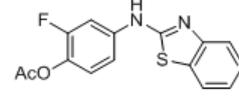
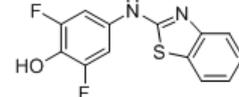
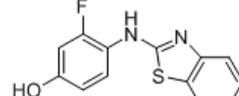
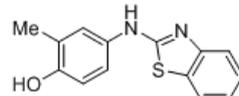
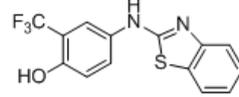
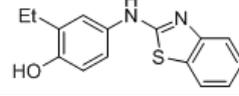
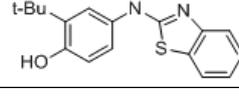


그림 38. BAMTI 화합물의 A section 구조 변화에 따른 유도체와 효소억제활성

표 4. A section 치환체 화합물의 구조와 약리활성

BAMTI No.	구조	효소저해 활성 (μM)	세포독성 (IBRS-2) (μM)	세포활성평가	
				바이러스 억제효과 EC ₅₀ (μM)	선택성 지수 (CC ₅₀ /EC ₅₀)
243		3.56	77.84	-	-
294		50.38	-	-	-
298		5.34	209.25	99.35	2.11
300		2.96	-	-	-
301		5.85	-	-	-
313		0.33	77.82	49.77	1.56
314		20.27	-	-	-
339		1.35	-	-	--
338		3.37	-	-	-

② BAMTI 화합물의 B section 구조 변화

○ 전술한 바와 같이 BAMTI 화합물의 B section은 효소-리간드 결합 상태에서 외부로 노출된 지역이라 예상하고 benzothiazole의 5번 탄소에 hydroxy, methoxy 기를 갖는 유도체와 ester, amide 결합을 갖는 유도체로 확장하고자 하였다. 이 때 A section에서 최적화된 치환기를 도입함으로써 효소억제 활성뿐만 아니라 물성 및 안정성에도 기여하고자 하였다 (그림 39).

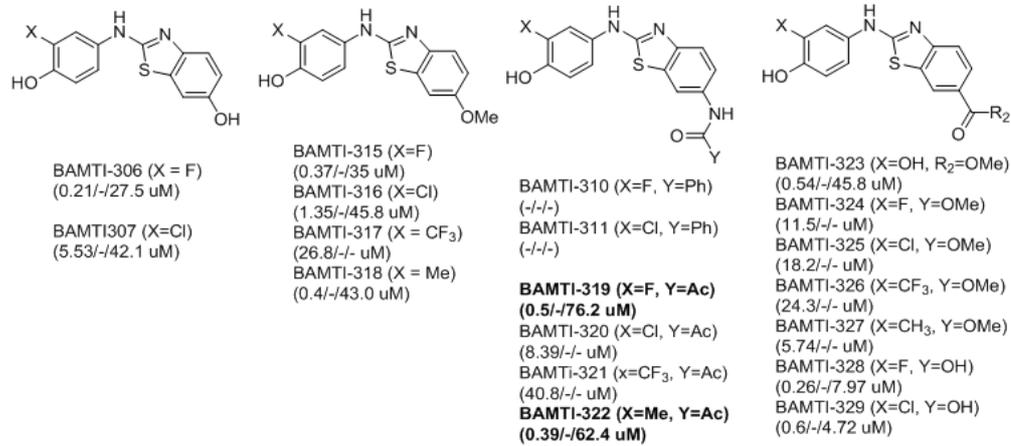
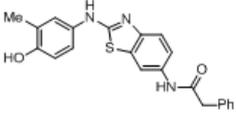


그림 39. 최적화된 section A를 도입한 section B의 유도체

○ 위 화합물 중 benzothiazole의 5번 위치에 amide 결합을 갖는 BAMTI-319와 BAMTI-322에서 0.39–0.5 μ M 수준의 효소활성 억제효과가 뛰어나 말단 부위의 크기와 길이를 조절한 BAMTI 화합물을 2차로 합성하였다. 그러나 우수한 효소 활성이 있었음에도 바이러스에 감염시킨 IBRS2 세포에서는 CPE 억제효과가 75–126 μ M에서 나타나기는 했으나 화합물 자체의 독성으로 인해 세포가 사멸하는 것이 관찰되었다. 그러나 BAMTI-337의 경우 상대적으로 높은 효소저해활성 (2.97 μ M)을 보였지만 CPE 억제효과가 7.5 μ M에서 나타나고 독성대비활성의 척도가 되는 선택성 지수가 4.63이 되어 후보물질로 고려하였다 (표 5).

표 5. Amide 결합을 갖는 BAMTI 화합물의 2차 유도체화

BAMTI No.	구조	효소저해 활성 (μ M)	세포독성 (IBRS-2) (μ M)	세포활성평가	
				바이러스 억제효과 EC ₅₀ (μ M)	선택성 지수 (CC ₅₀ /EC ₅₀)
333		0.67	152.15	126.95	1.20
334		1.51	89.01	74.31	1.20
335		5.46	92.02	65.17	1.41
336		1.26	452.55	-	-

337		2.97	35.1	7.58	4.63
-----	---	------	------	------	------

③ 염 제조에 의한 안정성 개선

- 그림 34에서 보여진 바와 같이 BAMTI-237의 상온 안정성이 낮은 이유를 확인하고자 용매, 온도, 산도에 따른 안정성을 측정하였다. BAMTI-237은 극성 용매에 민감하게 불안정하며 상온 이상에서부터 dimer가 생성되는 것을 관찰하였다 (표 6, 7). 산도에 따른 영향을 살펴본 결과 BAMTI-237은 강한 염기에 불안정하였으며 이러한 조건에서 BAMTI-237의 가수분해 또는 분자 간 반응이 촉진되는 것을 확인하였다 (표 8).
- 이러한 현상은 BAMTI-237이 약한 염기성을 띠는 2차 amine과 약산성을 갖는 phenol의 치환반응 때문이라 가정하여 HCl 염을 제안하고 BAMTI-299를 제조하였다. BAMTI-299의 효소활성은 0.84-1.28 μM 에서 유지되었으며 바이러스에 감염된 IBRS2 세포의 CPE 억제효과 측면에서도 BAMTI-237과 유사한 수준이었다 (표 9). 또한 상온에서의 안정성이 보다 향상되었으며 보관 시 변성된 산물이 검출되지 않았다.

표 6. BAMTI-237 화합물의 용매에 따른 변성

Entry	Parent	dimer	Dehalogenation	Degradation	Color
MeOH	89.89 %	3.34 %	-	-	-
Acetonitrile	93.41 %	6.59 %	-	-	-
Ethyl Acetate	95.57 %	3.46 %	-	-	Yellow
Diethyl ether	100 %	0 %	-	-	-
Acetone	95.72 %	4.27 %	-	-	Yellow
DMSO	78.76 %	21.23 %	-	-	-

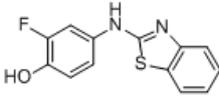
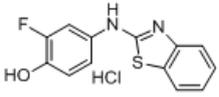
표 7. BAMTI-237 화합물의 온도에 따른 변성

Entry	Parent	dimer	Dehalogenated	Degradation	Hour	Color
0 °C	99.98 %	0.02 %	-	-	12h	Transparent
RT	87.75 %	12.24 %	-	-	12h	Transparent
50 °C	56.74 %	40.32 %	-	-	12h	Transparent
100 °C	17.36 %	61.50 %	-	-	12h	Transparent

표 8. BAMTI-237 화합물의 산도에 따른 변성

Entry	Parent	dimer	Dehalogenated	Degradation	Hour	etc
SA (acetic acid)	100 %	-	-	-	12h	suspension
HA (1N HCl)	100 %	-	-	-	12h	suspension
Neutral (H2O)	100 %	-	-	-	12h	suspension
SB (NaHCO3)	100 %	-	-	-	12h	Yellow clean
HB (1N NaOH)	79 %	20 %	-	-	12h	Red clean

표 9. BAMTI-237과 염 화합물 (BAMTI-299)의 효소 및 세포 수준 항바이러스 효과

BAMTI No.	구조	효소저해 활성 (μM)	세포독성 (IBRS-2) (μM)	세포활성평가	
				바이러스 억제효과 EC ₅₀ (μM)	선택성 지수 (CC ₅₀ /EC ₅₀)
237		0.84	118.9	19.2	5.3
299		1.28	168.8	38.29	4.41

④ 대량 합성

○ 물리화학적 특성 분석, PK 분석, 효능 평가, 독성 평가 등에 사용하기 위하여 다음 합성 scheme에 준하여 BAMTI-299를 대량 합성하였다 (그림 40).

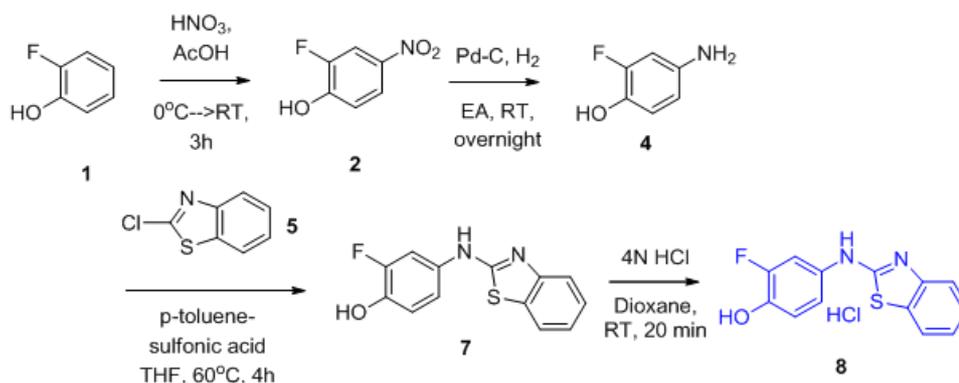


그림 40. BAMTI-299 화합물의 대량 합성 scheme

※ 다음은 AMTI/BAMTI 구조최적화 연구를 통해 합성된 유도체의 리스트와 각 화합물에 대한 효능과 물성 프로파일을 요약한 표이다.

표 10. 구조최적화 연구를 통해 합성된 AMTI-1 유도체 리스트와 효능/물성 프로파일

No.	GGBC code	Chem code	MW	Functional luciferase assay		Permeability		Cytotoxicity		Metabolic stability			Cell based assay (Effective dose or EC ₅₀ μM)	FP assay (IC ₅₀ , μM)	
				IC ₅₀ (μM)	Sys. inh. (IC ₅₀ , μM)	PAMPA		Cell perm.	Judge	CC ₅₀ (μM)	Phase I t _{1/2} (min)	Phase I/glcrrn t _{1/2} (min)			Phase II (S9) t _{1/2} (min)
						Judge	LogPe								
1	GGBC-113-00-453	AMTI-1	341.38	6.8		No	-7.6		Non toxic	265.8	10~30		142.2 SI=1.9	5.82	
2	GGBC-113-00-454	AMTI-4	325.38	18.3										NC	
3	GGBC-113-00-455	AMTI-5	309.39	NC										NC	
4	GGBC-113-00-457	AMTI-13	329.33	16.3											
5	GGBC-113-00-458	AMTI-14	299.35	9.9					Non toxic	NC				4.69	
6	GGBC-113-00-459	AMTI-15	399.46	32.8											
7	GGBC-113-00-460	AMTI-16	284.33	10.8					Less toxic	154.1				3.07	
8	GGBC-113-00-461	AMTI-23	296.34	25.0											
9	GGBC-113-00-462	AMTI-24	312.34	17.2											
10	GGBC-113-00-463	AMTI-7	353.39	32.3											
11	GGBC-113-00-464	AMTI-10	327.38	45.9											
12	GGBC-113-00-465	AMTI-6	369.44	28.1											
13	GGBC-113-00-466	AMTI-18	355.41	9.3					Non toxic	205.4				5.42	
14	GGBC-113-00-467	AMTI-19	403.45	32.8											
15	GGBC-113-00-468	AMTI-20	369.44	11.3					Less toxic	181.7				5.99	
16	GGBC-113-00-469	AMTI-21	371.41	7.2										10.56	
17	GGBC-113-00-470	AMTI-22	341.38	7.4					Non toxic	NC				8.87	
18	GGBC-113-00-471	AMTI-36	372.46	12.6											
19	GGBC-113-00-472	AMTI-8	355.41	3.8										36.55	
20	GGBC-113-00-473	AMTI-9	369.44	46.2											
21	GGBC-113-00-474	AMTI-17	341.38	5.9										6.68	
22	GGBC-113-00-475	AMTI-11	327.38	NC											
23	GGBC-113-00-476	AMTI-12	345.37	NC											
24	GGBC-113-00-477	AMTI-26	303.33	3.5					Less toxic	181.4				4.65	
25	GGBC-113-00-478	AMTI-27	328.39	21.5											
26	GGBC-113-00-479	AMTI-28	328.39	20.7											
27	GGBC-113-00-480	AMTI-29	314.36	3.3										56.25	
28	GGBC-113-00-481	AMTI-30	284.33	2.9										58.10	
29	GGBC-113-00-482	AMTI-31	286.32	10.8											

30	GGBC-113-00-483	AMTI-32	286.32	18.4															
31	GGBC-113-00-484	AMTI-33	304.31	15.1															
32	GGBC-113-00-485	AMTI-34	268.33	15.5															
33	GGBC-113-00-487	AMTI-35	355.41	7.9															71.48
34	GGBC-113-00-488	AMTI-39	290.38	13.3															
35	GGBC-113-00-496	AMTI-38	366.44	29.1															
36	GGBC-113-00-497	AMTI-37	366.44	17.5															
37	GGBC-113-00-498	AMTI-41	328.34	1.6					Non toxic	206.3		10~30					140.5 SI=1.5		2.31
38	GGBC-113-00-499	AMTI-42	342.37	4.2															48.24
39	GGBC-113-00-500	AMTI-43	342.37	0.7		Bad	-6.8				>60	<10					No		51.55
40	GGBC-113-00-501	AMTI-45	353.39	16.7															
41	GGBC-113-00-502	AMTI-44	353.39	18.6															
42	GGBC-113-00-503	AMTI-46	405.51	50.7															
43	GGBC-113-00-504	AMTI-47	341.86	52.2															
44	GGBC-113-00-506	AMTI-48	328.34	0.7					Non toxic	NC							129.5 SI>3.1		5.38
45	GGBC-113-00-507	AMTI-49	342.37	1.4															73.46
46	GGBC-113-00-508	AMTI-50	342.37	2.5															53.44
47	GGBC-113-00-509	AMTI-51	353.39	9.1															
48	GGBC-113-00-510	AMTI-52	353.39	4.2					Non toxic	232.8									1.33
49	GGBC-113-00-511	AMTI-53	355.41	2.5															47.76
50	GGBC-113-00-512	AMTI-54	355.41	4.9															
51	GGBC-113-00-513	AMTI-55	341.38	2.6															21.83
52	GGBC-113-00-514	AMTI-56	355.41	1.9		Good	-5.9				30~60	<10							44.36
53	GGBC-113-00-515	AMTI-57	355.41	2.5															NC
54	GGBC-113-00-516	AMTI-58	305.4	NC															
55	GGBC-113-00-518	AMTI-59	311.36	6.5	33.1				Non toxic	NC	>120	>120					65.1 SI=1.5		2.71
56	GGBC-113-00-519	AMTI-60	311.36	6.2															41.53
57	GGBC-113-00-520	AMTI-61	311.36	27.6					Non toxic	NC									36.05
58	GGBC-113-00-521	AMTI-62	415.46	10.8															
59	GGBC-113-00-522	AMTI-63	381.45	2.9															78.01
60	GGBC-113-00-523	AMTI-64	367.42	10.8															
61	GGBC-113-00-524	AMTI-65	415.46	0.6							<10							>100	44.58
62	GGBC-113-00-525	AMTI-66	381.45	16.5															
63	GGBC-113-00-526	AMTI-67	367.42	10.0															
64	GGBC-113-00-532	AMTI-68	341.38	1.9														>200	27.42

65	GGBC-113-00-533	AMTI-69	341.38	3.4															
66	GGBC-113-00-534	AMTI-70	327.36	2.8	67.0				Non toxic	208						No		2.46	
67	GGBC-113-00-535	AMTI-71	327.36	2.3					Non toxic	NC									
68	GGBC-113-00-536	AMTI-72	389.45	13.6															
69	GGBC-113-00-537	AMTI-73	389.45	4.3														57.49	
70	GGBC-113-00-538	AMTI-74	330.33	0.4	26.9	Bad	-6.8		Non toxic	NC	>60					No		19.70	
71	GGBC-113-00-539	AMTI-75	330.33	2.5												No		143.7	
72	GGBC-113-00-540	AMTI-76	328.34	4.4														24.50	
73	GGBC-113-00-541	AMTI-77	328.34	4.0															
74	GGBC-113-00-542	AMTI-78	356.4	1.4		Good	-5.7									No		3.55	
75	GGBC-113-00-543	AMTI-79	368.41	18.5															
76	GGBC-113-00-544	AMTI-80	384.48	9.5															
77	GGBC-113-00-545	AMTI-81	325.38	22.0															
78	GGBC-113-00-546	AMTI-82	368.41	17.2															
79	GGBC-113-00-547	AMTI-83	384.48	21.4															
80	GGBC-113-00-548	AMTI-84	325.38	13.8															
81	GGBC-113-00-549	AMTI-85	368.41	21.8															
82	GGBC-113-00-550	AMTI-86	384.48	25.2															
83	GGBC-113-00-551	AMTI-87	325.38	25.5															
84	GGBC-113-00-552	AMTI-88	353.35	30.3															
85	GGBC-113-00-553	AMTI-89	363.39	4.2	22.6				Non toxic	214.1						No		1.83	
86	GGBC-113-00-554	AMTI-90	344.36	0.6		Not bad	-6.3		Very toxic	41.6	>60					13.1 SI=3.2			
87	GGBC-113-00-555	AMTI-91	356.4	0.6		Excellent	-5.2		Non toxic		>60					219.7 SI>1.8		NC	
88	GGBC-113-00-556	AMTI-92	356.4	0.7		?			Toxic	53.95	>60					20.7 SI=2.6			
89	GGBC-113-00-557	AMTI-93	356.4	0.5		Good	-5.9		Non toxic							208.9 SI>1.9		44.90	
90	GGBC-113-00-558	AMTI-94	356.4	21.0															
91	GGBC-113-00-559	AMTI-95	353.35	20.9															
92	GGBC-113-00-560	AMTI-96	354.38	1.4		No	-7.2		Non toxic	NC	30-60	30-60				No		9.48	
93	GGBC-113-00-561	AMTI-97	354.38	1.9					Non toxic	NC						No		6.27	
94	GGBC-113-00-562	AMTI-98	368.41	2.5														37.89	
95	GGBC-113-00-563	AMTI-99	368.41	1.2															
96	GGBC-113-00-564	AMTI-100	357.34	3.0														50.27	
97	GGBC-113-00-565	AMTI-101	327.36	10.1															
98	GGBC-113-00-566	AMTI-102	346.79	0.4	31.0	Not bad	-6.3		Non toxic	NC	>120	10-30				144.7 SI>2.8		8.85	
99	GGBC-113-00-567	AMTI-103	346.79	1.0														58.44	

135	GGBC-113-00-666	AMTI-139	356.46	NC												
136	GGBC-113-00-667	AMTI-140	424.45	NC												
137	GGBC-113-00-668	AMTI-141	372.91	12.6												
138	GGBC-113-00-669	AMTI-142	440.91	NC												
139	GGBC-113-00-670	AMTI-143	407.36	NC												
140	GGBC-113-00-671	AMTI-144	475.35	NC												
141	GGBC-113-00-684	AMTI-145	311.33	1.4			Not bad	-6.0		Toxic	57.33	10-30				19.18
142	GGBC-113-00-685	AMTI-146	354.36	0.6	249.7	Excellent	-5.2	0	Non toxic	835.1	>60				245.1 SI=3.4	22.06
143	GGBC-113-00-688	AMTI-149	344.36	2.4	58.24	Good	-5.9		Non toxic	3451						
144	GGBC-113-00-689	AMTI-150	358.39	3.7	48.23	Not bad	-6.3		Toxic	62.94						
145	GGBC-113-00-696	AMTI-151	343.44	N.C						Toxic	65.43					

표 11. 구조최적화연구를 통해 합성된 BAMTI-147 유도체 리스트와 효능/물성 프로파일

No.	GGBC code	Chem code	MW	Functional luciferase assay		Permeability		Cytotoxicity		Metabolic stability			Cell based assay (Effective dose or EC ₅₀ , μM)	FP assay (IC ₅₀ , μM)	
				IC ₅₀ (μM)	Sys. inh. (IC ₅₀ , μM)	PAMPA		Cell perm. (%)	Judge	CC ₅₀ (μM)	Phase I t _{1/2} (min)	Phase I/glicrn t _{1/2} (min)			Phase II (S9) t _{1/2} (min)
						Judge	LogPe								
1	GGBC-113-000-686	BAMTI-147	272.32	2.0	20.5	Excellent	-5.2	8	Non toxic	3451	>60		10-30	245.7 SI=16	42.91
2	GGBC-113-000-687	BAMTI-148	274.31	8.3											
3	GGBC-113-000-704	BAMTI-152	406.32	N.C											
4	GGBC-113-000-705	BAMTI-153	240.32	17.9											
5	GGBC-113-000-706	BAMTI-154	254.35	0.4	0.38	No	-7.4	82-88	Non toxic	2219	30-60		>120	No	NC
6	GGBC-113-000-707	BAMTI-155	308.32	7.7		Not bad	-6.1		Non toxic	448.2					
7	GGBC-113-000-708	BAMTI-156	309.21	N.C											
8	GGBC-113-000-709	BAMTI-157	312.39	21.3											
9	GGBC-113-000-710	BAMTI-158	283.39	N.C											
10	GGBC-113-000-711	BAMTI-159	284.38	N.C											
11	GGBC-113-000-712	BAMTI-160	284.33	6.7											
12	GGBC-113-000-713	BAMTI-161	150.2	8.6											
13	GGBC-113-000-714	BAMTI-162	164.23	NC											
14	GGBC-113-000-715	BAMTI-163	241.31	4.1	5.84	Excellent	-4.8		Non toxic	482				No	
15	GGBC-113-000-716	BAMTI-164	241.31	25.5											
16	GGBC-113-000-717	BAMTI-165	241.31	49.4											
17	GGBC-113-000-718	BAMTI-166	256.32	2.7	2.62	Excellent	-5.3	9.8	less toxic	143.2				>50	NC

18	GGBC-113-000-719	BAMTI-167	268.33	1.4	13.2	Good	-5.7		less toxic	123.8							NC
19	GGBC-113-000-720	BAMTI-168	268.38	78.3					Non toxic	10408							
20	GGBC-113-000-721	BAMTI-169	270.35	2.5	0.92	Not bad	-6.3	?	Non toxic	277.4							63.57
21	GGBC-113-000-722	BAMTI-170	270.35	35.0													
22	GGBC-113-000-723	BAMTI-171	258.31	7.8													NC
23	GGBC-113-000-724	BAMTI-172	274.77	42.1													
24	GGBC-113-000-725	BAMTI-173	206.31	15.0													
25	GGBC-113-000-726	BAMTI-174	254.35	NC													
26	GGBC-113-000-727	BAMTI-175	284.33	NC													
27	GGBC-113-000-728	BAMTI-176	283.35	NC													
28	GGBC-113-000-729	BAMTI-177	270.35	2.5	1.66	Good	-5.5	2.2	Non toxic	446.4	>60				No		55.62
29	GGBC-113-000-730	BAMTI-178	290.33	2.2	3.69	Bad	-6.7	1012	Non toxic	1011					No		53.79
30	GGBC-113-000-731	BAMTI-179	274.77	16.4													
31	GGBC-113-000-732	BAMTI-180	274.77	NC													
32	GGBC-113-000-733	BAMTI-181	254.35	NC													
33	GGBC-113-000-734	BAMTI-182	270.35	2.5	0.44	Excellent	-5.3	33.7	Non toxic	455.8					No		NC
34	GGBC-113-000-735	BAMTI-183	268.38	0.4	0.1	No	-7.4	323.9	Non toxic	NC			60~120		No		NC
35	GGBC-113-000-736	BAMTI-184	272.34	4.34	4.98												
36	GGBC-113-000-737	BAMTI-185	268.38	18.8													
37	GGBC-113-000-738	BAMTI-186	255.33	51.3													
38	GGBC-113-000-739	BAMTI-187	258.31	15.4													
39	GGBC-113-000-740	BAMTI-188	258.31	51.9													
40	GGBC-113-000-741	BAMTI-189	246.37	26.4													
41	GGBC-113-000-742	BAMTI-190	297.37	28.7													
42	GGBC-113-000-743	BAMTI-191	266.36	1.01	0.72	No	-7.3	231.5	Non toxic	NC					No		56.79
43	GGBC-113-000-744	BAMTI-192	284.38	0.3	0.33	Excellent	-5.4	6.9	Non toxic	500.3	>60	>60	>120	>100			NC
44	GGBC-113-000-745	BAMTI-193	296.43	6.4													
45	GGBC-113-000-746	BAMTI-194	320.2	NC													
46	GGBC-113-000-747	BAMTI-195	268.38	NC													
47	GGBC-113-000-748	BAMTI-196	288.8	NC													
48	GGBC-113-000-749	BAMTI-197	326.41	NC													
49	GGBC-113-000-750	BAMTI-198	298.36	4.0	4.53	Bad	-6.8	0	Non toxic	350.6					No		22.60
50	GGBC-113-000-751	BAMTI-199	297.37	NC													
51	GGBC-113-000-752	BAMTI-200	311.4	NC													
52	GGBC-113-000-753	BAMTI-201	272.34	20.9													

53	GGBC-113-000-754	BAMTI-202	270.35	1.53	1	Not bad	-6.2	10.9	less toxic	181.6	>60	<10		>50	21.59
54	GGBC-113-000-755	BAMTI-203	284.38	10.2											
55	GGBC-113-000-756	BAMTI-204	282.4	2.57	1.62	No	-7.7	?	Non toxic	NC				No	
56	GGBC-113-000-757	BAMTI-205	284.38	2.17	1.31	Excellent	-4.9	2.2	Non toxic	466.2	>60			No	409.4
57	GGBC-113-000-759	BAMTI-206	272.34	27.7											
58	GGBC-113-000-760	BAMTI-207	272.34	11.3											
59	GGBC-113-000-761	BAMTI-208	284.38	NC											
60	GGBC-113-000-762	BAMTI-209	284.38	22.7											
61	GGBC-113-000-763	BAMTI-210	326.37	NC										>100	
62	GGBC-113-000-764	BAMTI-211	319.22	3.03	2.8										101.1
63	GGBC-113-000-765	BAMTI-212	269.36	NC											
64	GGBC-113-000-777	BAMTI-213	298.4	48.6										>200	79.31
65	GGBC-113-000-778	BAMTI-214	326.41	7.75											45.93
66	GGBC-114-000-786	BAMTI-215	296.39	18.0										No	
67	GGBC-114-000-787	BAMTI-216	296.34	100											
68	GGBC-114-000-788	BAMTI-217	328.39	3.49	1.65										50.98
69	GGBC-114-000-789	BAMTI-218	314.36	28.6											
70	GGBC-114-000-790	BAMTI-219	300.38	1.75	1.09									No	57.55
71	GGBC-114-000-795	BAMTI-220	390.44	67.5											
72	GGBC-114-000-796	BAMTI-221	334.33	48.0											
73	GGBC-114-000-797	BAMTI-222	408.43	61.3											
74	GGBC-114-000-798	BAMTI-223	352.32	78.0										No	
75	GGBC-114-000-832	BAMTI-226	314.36	NC											
76	GGBC-114-000-833	BAMTI-227	300.33	NC											
77	GGBC-114-000-834	BAMTI-228	286.35	44.6											
78	GGBC-114-000-835	BAMTI-229	286.35	35.5											
79	GGBC-114-000-836	BAMTI-230	356.4	NC											
80	GGBC-114-000-839	BAMTI-231	326.41	7.04	30.7										
81	GGBC-114-000-840	BAMTI-232	298.36	3.44	42.8						>120			SI=4.62	
82	GGBC-114-000-841	BAMTI-233	256.26	5.53	NC						>120			SI=11.42	
83	GGBC-114-000-844	BAMTI-236	286.35	4.34	3.61										
84	GGBC-114-000-871	BAMTI-259	255.27	23.5											

표 12. 구조최적화 연구를 통해 합성된 BAMTI-225 유도체 리스트와 효능/물성 프로파일

No.	GGBC code	Chem	MW	Functional	Permeability	Cytotoxicity	Metabolic stability	Cell	GBPE
-----	-----------	------	----	------------	--------------	--------------	---------------------	------	------

		code	luciferase assay		PAMPA		Cell perm. (%)	Judge	CC50 (µM)	Phase I t1/2 (min)	Phase I/glicrn t1/2 (min)	Phase II (S9) t1/2 (min)	based assay (Effective dose or EC50, µM)	assay (IC50, µM)
			IC50 (µM)	Sys. inh. (IC50, µM)	Judge	LogPe								
1	GGBC-114-000-830	BAMTI-224	286.35	NC										NC
2	GGBC-114-000-831	BAMTI-225	258.3	0.29	18.7			Very toxic	46.79	>120			SI=8.4	94.15
3	GGBC-114-000-842	BAMTI-234	242.3	16.1	28.1									
4	GGBC-114-000-843	BAMTI-235	242.3	2.00	21.8			less toxic	163.6				SI=7.1	
5	GGBC-114-000-847	BAMTI-237	260.29	0.84	46.6			less toxic	118.9	>120			SI=17	NC
6	GGBC-114-000-848	BAMTI-238	270.28	14.8	23.7									
7	GGBC-114-000-849	BAMTI-239	242.23	0.42	45.7			Toxic	61.62				SI=6.5	92.99
8	GGBC-114-000-850	BAMTI-240	269.3	44.3										
9	GGBC-114-000-851	BAMTI-241	241.25	0.86	46.9			less toxic	192.5					38.89
10	GGBC-114-000-854	BAMTI-242	272.32	0.26	208			less toxic	184.7				SI=2.4	NC
11	GGBC-114-000-855	BAMTI-243	276.74	3.56	123			Toxic	77.84					
12	GGBC-114-000-856	BAMTI-244	244.22	7.35	48.4			less toxic	117.2					
13	GGBC-114-000-857	BAMTI-245	260.68	14.6	32.8									
14	GGBC-114-000-858	BAMTI-246	243.24	0.51	19.6			less toxic	197.6				SI=5.8	NC
15	GGBC-114-000-859	BAMTI-247	259.69	7.88	18.8			less toxic	128.7					
16	GGBC-114-000-860	BAMTI-248	288.36	NC										
17	GGBC-114-000-861	BAMTI-249	260.31	0.37	11.5			Very toxic	24.53				SI=3.3	<50
18	GGBC-114-000-862	BAMTI-250	277.71	0.20	59.5			Toxic	89.72				SI=4.7	6.612
19	GGBC-114-000-863	BAMTI-251	272.32	16.5										
20	GGBC-114-000-864	BAMTI-252	276.74	14.9										
21	GGBC-114-000-865	BAMTI-253	260.29	15.5										
22	GGBC-114-000-866	BAMTI-254	256.26	32.2										
23	GGBC-114-000-867	BAMTI-255	260.68	14.5										
24	GGBC-114-000-868	BAMTI-256	244.23	8.01	22.9			Non toxic	245.8					
25	GGBC-114-000-869	BAMTI-257	302.39	NC										
26	GGBC-114-000-870	BAMTI-258	274.34	0.43	136			Very toxic	49.48					69.15
27	GGBC-114-000-871	BAMTI-259	255.27	23.5										
28	GGBC-114-000-878	BAMTI-260	262.28	NC										
29	GGBC-114-000-879	BAMTI-261	246.22	NC										
30	GGBC-114-000-880	BAMTI-262	245.23	NC										
31	GGBC-114-000-881	BAMTI-263	256.26	0.61	34.7			Non toxic	203.4					NC
32	GGBC-114-	BAMTI-	255	0.64	44.4			less	196.4					

	000-882	264	.28							toxic						
33	GGBC-114-000-883	BAMTI-265	291.73	0.60	28.1					less toxic	190.3					NC
34	GGBC-114-000-884	BAMTI-266	262.3	NC												
35	GGBC-114-000-885	BAMTI-267	278.75	NC												
36	GGBC-114-000-886	BAMTI-268	274.34	10.6												
37	GGBC-114-000-887	BAMTI-269	222.26	0.37	70.6					less toxic	137.8					
38	GGBC-114-000-888	BAMTI-270	208.23	0.34	58.0					Very toxic	31.01				131.4	
39	GGBC-114-000-889	BAMTI-271	226.68	0.08	57.8					less toxic	157.4				173.1	
40	GGBC-114-000-890	BAMTI-272	212.22	NC												
41	GGBC-114-000-891	BAMTI-273	236.29	0.44	19.3					Toxic	60.8					
42	GGBC-114-000-892	BAMTI-274	222.26	0.27	60.6					Very toxic	24.86				108.2	
43	GGBC-114-000-893	BAMTI-275	224.25	0.39	73.8					Toxic	92.88				138.7	
44	GGBC-114-000-894	BAMTI-276	240.71	0.40	134.					Toxic	96.81				117.7	
45	GGBC-114-000-895	BAMTI-277	226.24	NC												
46	GGBC-114-000-896	BAMTI-278	210.23	NC						Non toxic	217.5					
47	GGBC-114-000-903	BAMTI-279	243.28	NC												
48	GGBC-114-000-904	BAMTI-280	283.31	NC												
49	GGBC-114-000-905	BAMTI-281	282.32	NC												
50	GGBC-114-000-906	BAMTI-282	297.33	NC												
51	GGBC-114-000-907	BAMTI-283	270.31	NC												
52	GGBC-114-000-908	BAMTI-284	216.68	NC												
53	GGBC-114-000-915	BAMTI-285	298.36	7.86												
54	GGBC-114-000-916	BAMTI-286	270.31	8.21	47.98											
55	GGBC-114-000-917	BAMTI-287	286.31	28.90	17.55											
56	GGBC-114-000-918	BAMTI-288	248.3	45.54												
57	GGBC-114-000-919	BAMTI-289	220.25	NC												
58	GGBC-114-000-920	BAMTI-290	236.25	NC												
59	GGBC-114-000-921	BAMTI-291	262.33	25.41												
60	GGBC-114-000-922	BAMTI-292	234.27	NC												
61	GGBC-114-000-923	BAMTI-293	250.27	NC												
62	GGBC-114-000-924	BAMTI-294	286.31	50.38												
63	GGBC-114-000-925	BAMTI-295	264.3	NC												
64	GGBC-114-000-926	BAMTI-296	278.33	NC												
65	GGBC-114-000-927	BAMTI-297	274.31	501						Non toxic	2243					
66	GGBC-114-000-928	BAMTI-298	302.32	5.34						Non toxic	209.25				99.35 SI=2.3	
67	GGBC-114-	BAMTI-	296	1.28	586.2					less	168.80				38.29	

	000-942	299	.74							toxic						SI=17	
68	GGBC-114-000-943	BAMTI-300	278.28	2.96	53.27												
69	GGBC-114-000-944	BAMTI-301	260.29	5.85	45.52												
70	GGBC-114-000-950	BAMTI-302	273.31	3.19	35.04												
71	GGBC-114-000-951	BAMTI-303	275.3	78.62													
72	GGBC-114-000-952	BAMTI-304	278.28	9.95													
73	GGBC-114-000-958	BAMTI-305	290.31	21.62													
74	GGBC-114-000-959	BAMTI-306	276.29	5.53	27.46											No	
75	GGBC-114-000-960	BAMTI-307	292.74	NC	42.15												
76	GGBC-114-000-961	BAMTI-308	332.35	NC													
77	GGBC-114-000-962	BAMTI-309	380.44	NC													
78	GGBC-114-000-963	BAMTI-310	379.41	19.35													
79	GGBC-114-000-964	BAMTI-311	395.86	23.35													
80	GGBC-114-000-965	BAMTI-312	405.47	37.70													
81	GGBC-114-000-966	BAMTI-313	256.32	0.33	56.66											No	
82	GGBC-114-000-967	BAMTI-314	310.29	20.27													
83	GGBC-114-000-968	BAMTI-315	290.31	0.37	35.08											No	
84	GGBC-114-000-969	BAMTI-316	306.76	1.35	45.87											No	
85	GGBC-114-000-970	BAMTI-317	340.32	26.89													
86	GGBC-114-000-971	BAMTI-318	286.35	0.40	43.02											>100	
87	GGBC-114-000-972	BAMTI-319	317.34	0.50	76.28											<50	
88	GGBC-114-000-973	BAMTI-320	333.79	8.39													
89	GGBC-114-000-974	BAMTI-321	367.35	40.81													
90	GGBC-114-000-975	BAMTI-322	313.38	0.39	62.45											<50	
91	GGBC-114-000-986	BAMTI-323	330.36	0.54	45.88												
92	GGBC-114-000-987	BAMTI-324	332.35	11.51													
93	GGBC-114-000-988	BAMTI-325	348.8	18.20													
94	GGBC-114-000-989	BAMTI-326	382.36	24.33													
95	GGBC-114-000-990	BAMTI-327	328.39	5.74													
96	GGBC-114-000-991	BAMTI-328	304.3	0.26	7.97												
97	GGBC-114-000-992	BAMTI-329	320.75	0.60	4.72												
98	GGBC-114-000-999	BAMTI-333	327.4	0.67	35.65												
99	GGBC-114-000-1000	BAMTI-334	341.43	1.51	42.81												
100	GGBC-114-000-1001	BAMTI-335	355.46	5.46	50.46												
101	GGBC-114-000-1002	BAMTI-336	343.4	1.26	54.57												
102	GGBC-114-	BAMTI-	389	2.97	55.69												

	000-1003	337	.47												
103	GGBC-114-000-1006	BAMTI-338	298.4	3.37	44.75										
104	GGBC-114-000-1007	BAMTI-339	270.35	1.35	36.72										
105	GGBC-114-000-1008	BAMTI-340	297.37	16.56	5190										
106	GGBC-114-000-1009	BAMTI-341	409.52	NC											
107	GGBC-114-000-1010	BAMTI-342	333.43	NC											

나. AMTI/BAMTI 화합물의 물리화학적 특성연구

(1) 물리화학적 특성연구 시험법 구축

- 세포투과도, 세포독성, 대사 안정성 등 화합물의 물리화학적 특성연구 시험법을 자체 구축하여 구조-물성 상관관계 (SPR, Structure-property relationship) 연구와 접목하여 빠르고 효율적인 구조최적화 연구를 가능하게 하였다.

(가) 화합물 세포투과성 예측 및 측정 실험법

① 세포막 투과도 예측법 - PAMPA (Parallel artificial membrane permeability assay)

- 기존의 permeability 측정기술인 caco-2 및 MDCK 방법은 cell을 배양하여 측정을 해야 하므로 시간과 비용이 많이 들어가는 단점이 있으나 PAMPA 방법은 acceptor plate 와 donor plate에 lipid solution으로 인공지질막을 형성시켜 측정하는 방법으로 cell과 같은 능동수송의 효과를 측정할 수는 없지만 비교적 저렴하고 빠른 시간에 막 투과성을 측정할 수 있다 (그림 41).
- Millipore 및 Sigma-aldrich에서 판매하는 PAMPA 실험재료를 이용하여 실험법 세팅 하였으며 LogPe 값이 알려진 화합물을 이용하여 assay validation을 수행한 후 (그림 42), 대표적인 AMTI 유도체에 대하여 PAMPA를 수행하여 세포막 투과도를 예측하였다 (그림 43).

Figure 1: Individual Donor/Acceptor Well Assembly Before and After Incubation

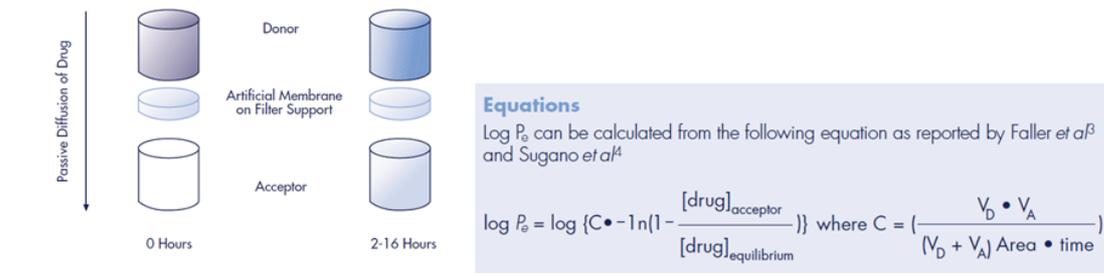


Table 1: Description of variables used to calculate Log P_e

Term	Definition	Notes
V_D	Volume of donor compartment	Expressed in cm^3 , 150 $\mu L = 0.15 cm^3$
V_A	Volume of acceptor compartment	Expressed in cm^3 , 300 $\mu L = 0.30 cm^3$
Area	Active surface area of membrane	Defined as membrane area x porosity. For the membrane in MultiScreen Permeability Filter Plate, area = .24 $cm^2 \times 100\%$; or 0.24 cm^2
Time	Incubation time for the assay	Expressed in seconds, 1 hr = 3600 s
$[drug]_{acceptor}$	Concentration of compound in the acceptor compartment at the completion of the assay	The absorbance of the sample as recorded by the SoftMax Pro Software
$[drug]_{equilibrium}$	Concentration of compound at theoretical equilibrium from step 9 above	The absorbance of the equilibrium sample as recorded by the SoftMax Pro Software

그림 41. PAMPA의 개요 및 log P_e 값 계산법

○ 실험재료 및 실험수준

< 실험 재료 >

번호	품명	제조사	품목번호
1	Lecithin	Sigma-aldrich	P3556-500MG
2	MultiScreen transport receiver plate	Millipore	MATRNPS50
3	MultiScreen-IP plate	Millipore	MAIPNTR10
4	Dodecane	Sigma-aldrich	D221104-100 ml
5	Conning 96 well plates, UV-transparent	Sigma-aldrich	CLS3635-50EA

< 실험 수준 >

번호	실험방법	비고
1	Prepare a 1% solution (w/v) of lecithin in dodecane (~500 μl /plate) and sonicate the mixture to ensure complete dissolution.	(10 mg/ml), Sonicate 5 min, Typically it is necessary to sonicate the lipid mixture until the solution approaches the clarity of water (using a probe typically used for cell lysis takes about 2 minutes). The lecithin solution will clarify greatly but will never be completely clear. This solution should be used immediately. The lecithin will begin to aggregate and become turbid again after a few minutes.

2	Carefully pipette 5 μ l of the lecithin/dodecane mixture into each Donor plate (MAIPNTR10) well, avoiding pipette tip contact with the membrane.	
3	Immediately after the application of the artificial membrane (within 10 minutes maximum), add 150 μ l of drug-containing donor solutions (drugs dissolved in 5% DMSO, PBS) to each well of the Donor plate.	500 μ M, 25 μ l of 10 mM stock per 475 μ l PBS for triplicate
4	Add 300 μ l of aqueous buffer to each well of the PTFE Acceptor plate. (MATRNPS50)	5% DMSO in PBS, pH 7.4
5	Prepare solution for theoretical equilibrium (TE) Absorbance determination	Make 300 μ l of 167 μ M solution (5 μ l of 10 mM compound + 10 μ l DMSO + 285 μ l PBS)
6	Slowly and carefully place the drug-filled Donor plate into the Acceptor plate, making sure the underside of the membrane is in contact with the buffer in all wells.	
7	Replace the plate lid and incubate at room temperature for 16 hours.	To avoid evaporation, the plate should be placed in humidity controlled environment such as a sealed container with wet paper towels during incubation.
8	After incubation, analyze the acceptor plate for compound concentration using Flexstation™. Aliquot and measure 250 μ l of acceptor plate samples and TE samples in UV-transparent plate. (Corning, CLS3635)	Generally sample analysis using a 96 well UV/Vis plate reader is recommended. Sample quantification techniques such as scanning over a broad absorbance range (e.g. 250–500 nm), a single wavelength (λ_{max}) or a summation of pre-selected fixed wavelengths are all suitable for analysis. (Set Endpoint, spectrum (250–500 nM), AUC reduction)

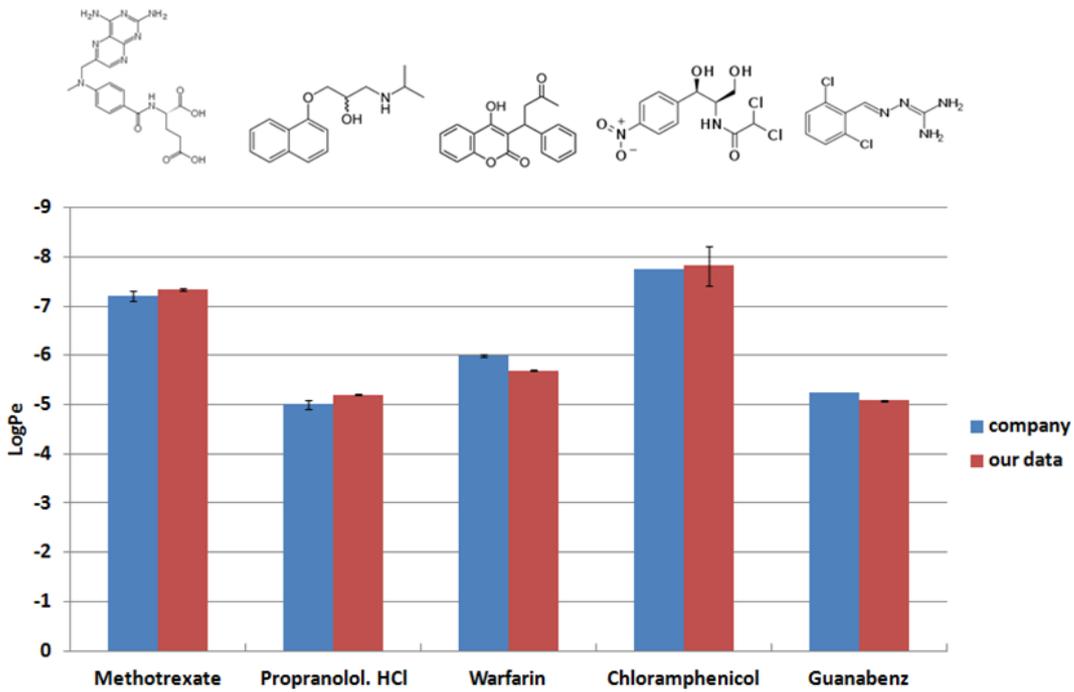


그림 42. LogPe 값이 알려진 reference 화합물 이용한 PAMPA validation

PAMPA
 < -5.5 Excellent
 -5.5 ~ -6 Good
 -6 ~ -6.5 Not good
 -6.5 ~ 7 Bad
 > 7 No

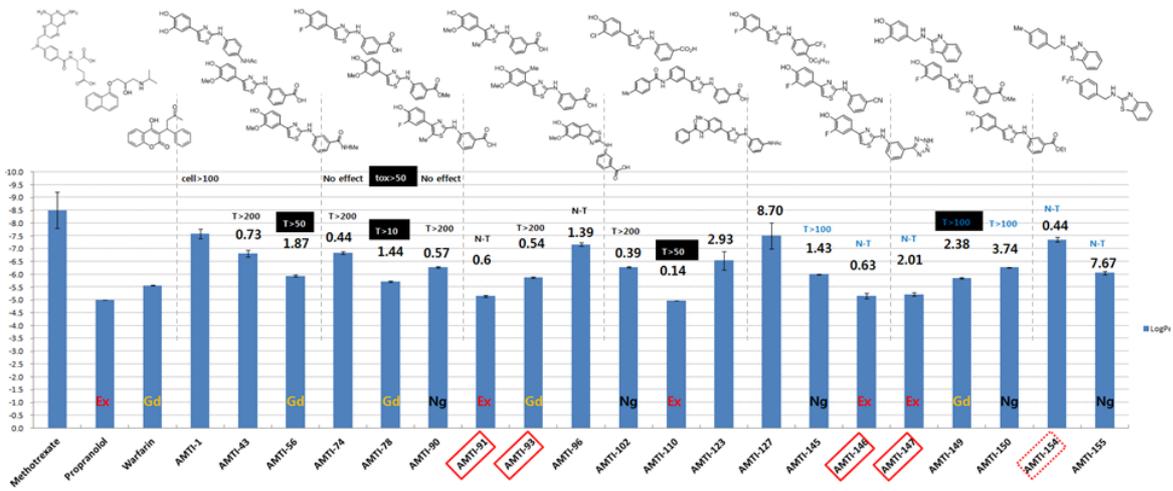


그림 43. 대표적인 AMTI 유도체 화합물의 PAMPA assay 결과

② 세포막 투과도 정량분석법 - Cell permeability assay

○ PAMPA 결과는 예측 값일 뿐 실제 투과도를 직접적으로 반영하지 못한다. 따라서 PAMPA data와 실제값 간 차이를 알아보기 위하여 IBRS-2 세포를 이용한 Cell

permeability assay를 고안하여 수행하였다.

- Media에 남아있는 화합물 및 세포 분해 후 lysate에 존재하는 (흡수된) 화합물을 LC-MS를 이용하여 상대 정량하였다 (그림 44).

< 실험수순 >

[Day 1]

α -MEM media에서 배양하는 IBRS-2 세포를 100 π plate에 1×10^6 cells/plate 준비

[Day 2]

새로운 α -MEM media에 10 mM stock 화합물을 최종 농도 20 μ M로 넣고, 각각의 plate에 조심스럽게 처리하여 24시간 배양

* 대조군으로 DMSO처리 샘플과, 세포 없는 샘플을 추가로 준비하여 동일조건 배양

[Day 3]

세포배양액내에 남아있는 화합물의 양과, 세포내로 투과 된 화합물의 양을 측정하기 위한 각각의 샘플 준비

- Cell media (세포배양액)

- 세포배양액 300 μ l에 1 : 1 비율의 Acetonitrile + MeOH solution 600 μ l (contained 20 μ M tolbutamide를 섞어 vortexing 5분 후, 최고속도 원심분리 10분
- 상층액 500 μ l를 새 튜브에 옮김

- Cell lysate

- media를 제거하고, PBS washing 4회
- 5% NP-40 in DW (lysis buffer) 1 ml을 넣고, sonication 5초씩 2회
- 원심분리기 최고속도, 4 $^{\circ}$ C로 10분
- 상층액 300 μ l에 1 : 1 비율의 Acetonitrile + MeOH solution 600 μ l (contained 20 μ M tolbutamide를 섞어 vortexing 5분 후, 최고속도 원심분리 10분
- 상층액 500 μ l를 새 튜브에 옮김

< LC-MS setting >

① LC Method

-
1. Chromatography Waters ACQUITY
 2. Mass spectrometry Micromass QuattroMicro API
 3. Column ACQUITY BEH C18, 1.7 μ m, 50*2.1mm
 4. Solvent A : DW(0.1% Formic acid)
B : Acetonitrile(0.1% Formic acid)

5. Elution condition	Time	Flow rate(ml/min)	A	B
	0.0	0.5	99	1
	0.5	0.5	99	1
	2.0	0.5	2	70
	2.5	0.5	0	100
	3.5	0.5	0	100
	4.0	0.5	99	1
	5.0	0.5	99	1

6. Injection Vol. 10 μ l(Full loop)
 7. Column Temp. 40 $^{\circ}$ C
-

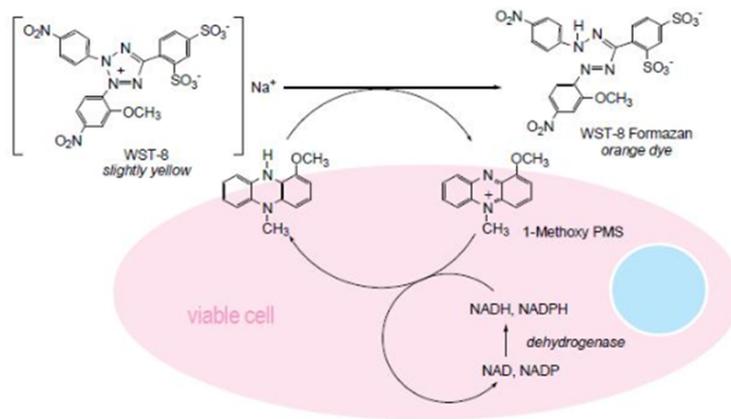
② MS Method

-
1. Detection ion mode Positive ion([M+H]⁺)
 2. Capillary voltage 3.5 kV
 3. Source Temp. 120 $^{\circ}$ C
 4. Desolvation Temp. 300 $^{\circ}$ C
 5. Software MassLynx
-

그림 44. 세포막 투과도 정량분석을 위한 LC 및 MS method setting 조건

(나) 세포독성 측정 실험법

- 돼지의 신장세포주인 IBRS-2 세포에서 화합물의 독성이 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CCK-8 assay를 이용하여 측정하였다 (그림 45).
- 화합물 처리 농도는 최고 200 μ M로부터 1/2 씩 희석하여 8개의 농도에서 세포독성 실험을 수행하였다.



Cell viability detection mechanism with CCK-8

그림 45. CCK-8 assay의 원리

< 실험수순 >

[Day 1]

α -MEM media에서 배양하는 IBRS-2 세포를 384 well plate에 2,500 cells/well 준비

[Day 2]

안정화 된 IBRS-2 세포에 새로운 α -MEM media에 10 mM stock 화합물을 최고 농도 200 μ M에서 1/2씩 희석하며 8개의 농도로 50 μ l 씩 well에 조심스럽게 처리하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 24시간 배양

[Day 3]

α -MEM media와 CCK-8을 1:1로 혼합하여 각 well에 10 μ l씩 분주하여, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응 후, 470 nm에서 흡광도 측정

(다) 약물 대사 안정성 시험

- 약물이 목적동물인 돼지의 체내에 들어가면 소화기, 혈액을 거쳐 간으로 들어가게 되며, 간의 세포질 및 microsome에 있는 산화, 환원, 가수분해 등 다양한 대사 반응을 거쳐 변형되어 최종 배설된다 (그림 46).
- 약물의 독특한 구조 차이에 의해 대사효소에 의해 반응이 잘 일어나기도 하고 그렇지 않기도 하므로 구조변경을 통해 대사반응 속도를 늦춤으로서 약물의 체내잔류 시간을 늘려 효과가 오래 지속되도록 하는 것이 중요하다.
- 반면 체내에서 너무 안정하게 되면 배설이 안 되어 체내에 축적되어 잔류하게 되므로 적당한 체내 반감기를 가지도록 설계하는 것이 필요하다.

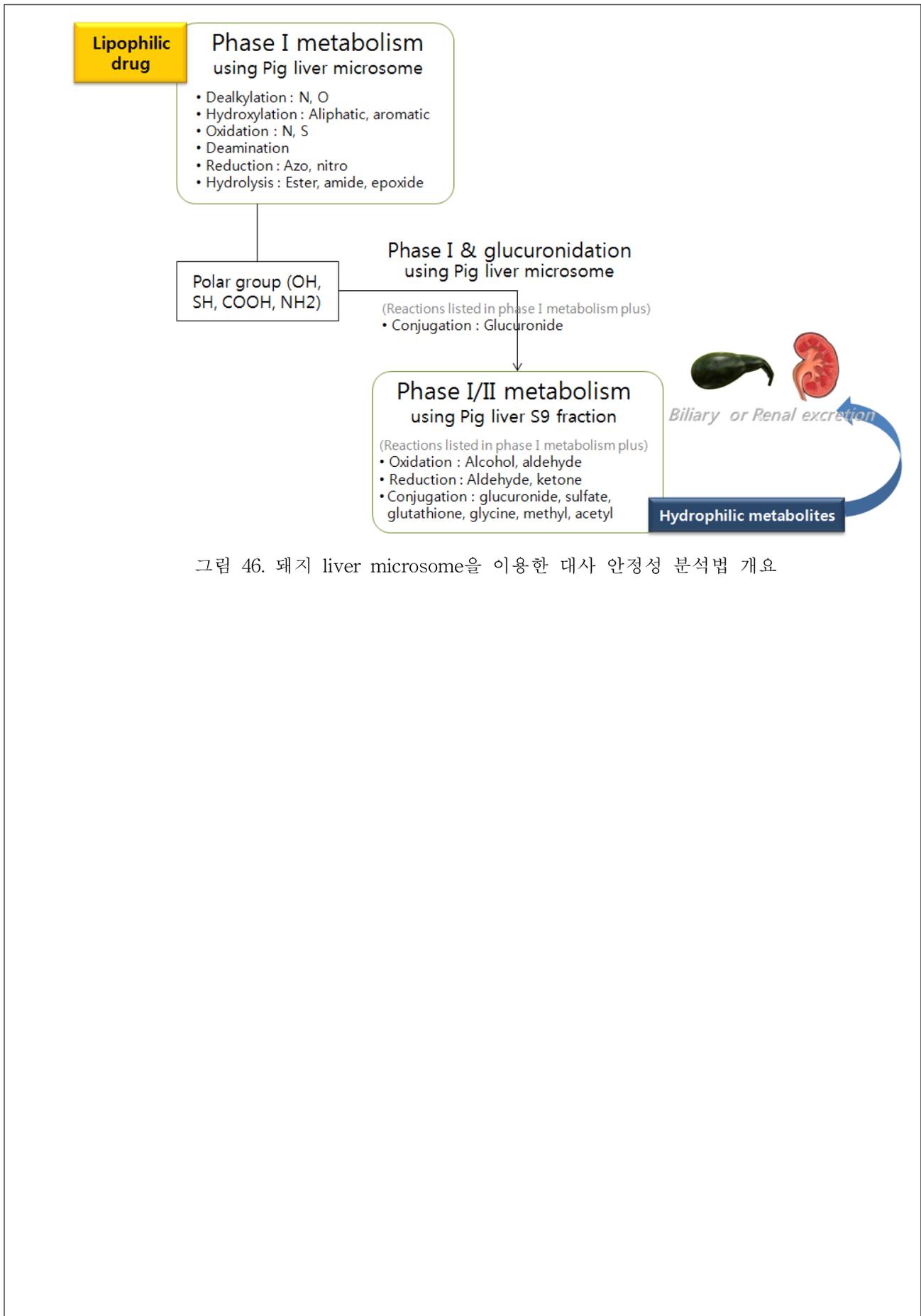


그림 46. 돼지 liver microsome을 이용한 대사 안정성 분석법 개요

① 정량 분석 조건 및 MRM 세팅

① LC Method

1. Chromatography	Waters ACQUITY			
2. Mass spectrometry	Micromass QuattroMicro API			
3. Column	ACQUITY BEH C18, 1.7um, 50*2.1mm			
4. Solvent	A : DW(0.1% Formic acid) B : Acetonitrile(0.1% Formic acid)			
5. Elution condition	Time	Flow rate(ml/min)	A	B
	0.0	0.5	99	1
	0.5	0.5	99	1
	2.0	0.5	2	70
	2.5	0.5	0	100
	3.5	0.5	0	100
	4.0	0.5	99	1
	5.0	0.5	99	1
6. Injection Vol.	10 ul(Full loop)			
7. Column Temp.	40 °C			

② MS Method

1. Detection ion mode	Positive ion([M+H] ⁺)
2. Capillary voltage	3.5 kV
3. Source Temp.	120 °C
4. Desolvation Temp.	300 °C
5. Software	MassLynx

③ MRM MS

Standards	RT (min)	Precusor Mass	Product Mass	Cone Voltage(CV)	Collision Energy(CID)
Acetaminophen	1.25	152.18[M+H] ⁺	110.1[M+H] ⁺	30	14
Verapamil-HCl	1.94	455.41[M+H] ⁺	165.2[M+H] ⁺	40	26
Tolbutamide	2.08	272.29[M+H] ⁺	74.1[M+H] ⁺	25	14

MS Chromatogram

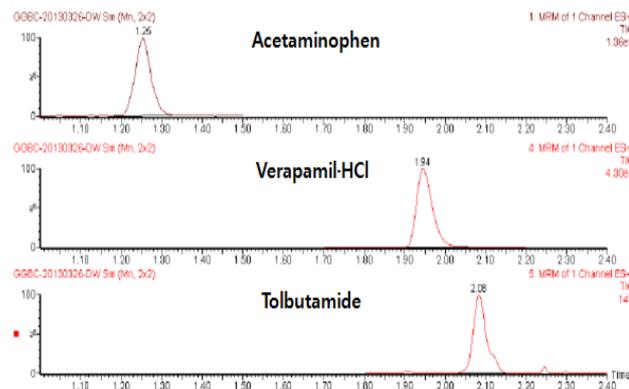


그림 47. Acetaminophen과 Verapamil을 이용한 실험 및 분석법의 유효성 검증

② Standard curve 작성

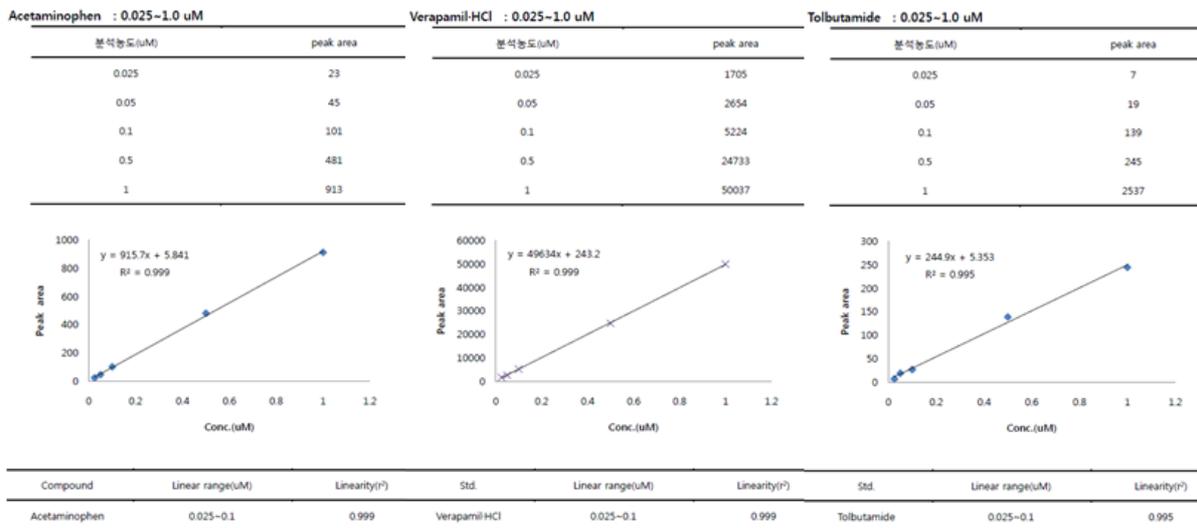


그림 48. Acetaminophen, Verapamil, Tolbutamide의 standard curve

③ Phase I metabolism

- Verapamil은 half life ($t_{1/2}$)가 10분 미만으로 대사안정성이 낮으며 Acetaminophen은 대사안정성이 매우 높은 화합물로 알려져 있다.
- 개발된 assay의 validation을 위해 두 물질을 다음의 실험방법에 의거 실험 후 LC-MS/MS를 이용하여 정량 분석하였다. Internal control로는 tolbutamide를 사용하였다.

< 실험수순 >

	Reagent	Stock conc.	Final conc.	Addition vol. (uL)
Mixture A	시험물질	10mM	10 uM	0.5
	Microsome	20 mg/mL	1 mg/mL	25
	Tris B (pH7.4)	500 mM	100 mM	100
	G-6-P	1 M	10 mM	5
	G-6-P dehydrogenase	100 U/mL	0.2 U/mL	1
	DW			118.5
Mixture B	NADPH	50 mg/mL	1 mg/mL	10
	DW			240
Total vol (uL)				500

- Mixture A를 준비하여 37 °C에서 5분간 미리 반응
 - * 반복 실험을 위하여 각 화합물 당 2개의 1.5 ml tube (0분과 10/ 30/ 60/ 120 분)를 2배수로 준비

- 0분 반응의 경우 stop buffer (tolbutamide in acetonitrile) 500 μ l를 먼저 넣고, Mixture B 250 μ l를 분주. 10/ 30/ 60/ 120분 샘플은 Mixture B를 250 μ l 씩 넣고 37 $^{\circ}$ C 에서 반응
- 각각의 반응 시간이 지나면 100 μ l 씩 새로운 튜브로 옮겨, 100 μ l의 stop buffer를 분주
 - * Stop buffer를 넣어줄 때는 internal standard (tolbutamide)가 잘 섞이지 않으면 결과 값의 차이가 커지므로 vortexing
- 반응이 마무리 된 샘플은 5분 간 vortexing 하여 10분 간 최대 속도 원심분리
- 200 μ l의 상등액을 새 튜브에 옮겨 -20 $^{\circ}$ C에 보관하여 분석

○ 유효성 검증 : microsome에 의한 대사안정성이 알려진 대조화합물인 Acetaminophen (안정)과 Verapamil(불안정)의 Phase I metabolism 실험으로 실험법의 유효성을 검증하였다 (그림 49).

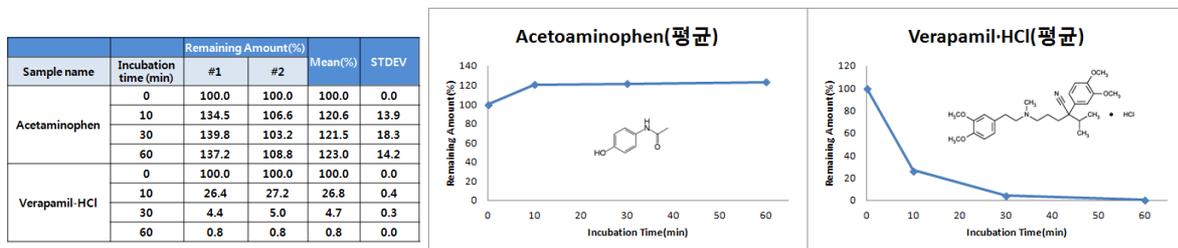


그림 49. Acetaminophen, Verapamil의 pig liver microsome을 이용한 Phase I metabolism 실험 결과

④ Phase I/Glucuronidation metabolism

○ Phase I metabolism에서 $t_{1/2}$ 이 60 분 이상으로 안정하지만 hydroxyl, carboxyl group 등 Phase II metabolism, 특히 glucuronidation에 취약한 구조를 가지고 있는 화합물에 대하여 Phase I metabolism 과 glucuronidation을 동시에 측정할 수 있는 assay를 개발하여 적용하였다.

< 실험수순 >

	Reagent	Stock conc.	Final conc.	Addition vol. (uL)
Mixture A	시험물질	10mM	10 uM	0.5
	Microsome (mini pig)	20 mg/mL	1 mg/mL	25
	Tris B (pH7.4)	500 mM	100 mM	100
	G-6-P	1 M	10 mM	5
	G-6-P dehydrogenase	100 U/mL	0.2 U/mL	1
	Alamethicin	20 mg/mL	25 ug/mL	0.625
	DW			118.375
Mixture B	NADPH	50 mg/mL	1 mg/mL	10
	UDPGA	100 mM	5 mM	25
	DW			215
Total vol (uL)				500

- Mixture A를 준비하여 37 °C에서 5분간 미리 반응
 - * 반복 실험을 위하여 각 화합물 당 2개의 1.5 ml tube (0분과 10/ 30/ 60/ 120 분)를 2배수로 준비
- 0분 반응의 경우 stop buffer (tolbutamide in acetonitrile) 500 µl를 먼저 넣고, Mixture B 250 µl를 분주 10/ 30/ 60/ 120분 샘플은 Mixture B를 250 µl 씩 넣고 37 °C 에서 반응
- 각각의 반응 시간이 지나면 100 µl 씩 새로운 튜브로 옮겨, 100 µl의 stop buffer를 분주
 - * Stop buffer를 넣어줄 때는 internal standard (tolbutamide)가 잘 섞이지 않으면 결과 값의 차이가 커지므로 vortexing
- 반응이 마무리 된 샘플은 5분 간 vortexing 하여 10분 간 최대 속도 원심분리
- 200 µl의 상등액을 새 튜브에 옮겨 -20°C에 보관하여 분석

○ 유효성 검증 : AMTI-43 화합물의 경우 Phase I metabolism에 대해서는 매우 안정하지만 Phase I/glucuronidation 에 대해서는 매우 불안정하였다. UDPGA를 넣지 않은 실험에서 분해가 되지 않는 것으로 보아 glucuronidation에 의한 대사임이 확인되었다 (그림 50).

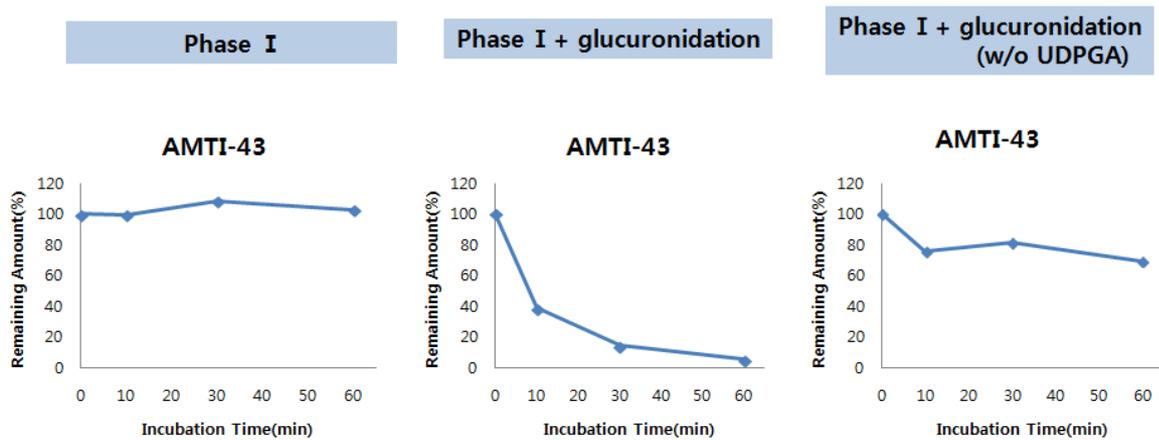


그림 50. AMTI-43 화합물의 Phase I/glucuronidation metabolism assay 결과

⑤ Phase II metabolism

○ Glucuronidation 외 sulfation, glutathion conjugation, methylation, acetylation 등의 phase II metabolism 여부를 알아보기 위하여 pig liver S9 fraction과 다양한 cofactor를 조합하여 다음과 같이 assay를 개발, 적용하였다.

< 실험수준 >

	Reagent	Stock conc.	Final conc.	Add vol. (uL)
Mixture A	시험물질	10 mM	10uM	0.5
	S9 fraction	20 mg/mL	1 mg/mL	12.5
	Tris B (pH7.4)	1M	200 mM	100
	G-6-P	1 M	10 mM	5
	G-6-P dehydrogenase	100 U/mL	0.2 U/mL	1
	MgCl ₂	1 M	5 mM	2.5
	DW			128.5
Mixture B	NADPH	50 mg/mL	1 mg/mL	10
	UDPGA	100 mM	5 mM	25
	GSH	100 mM	5 mM	25
	SAM	100 mM	0.2 mM	1
	PAPS	5 mM	0.1 mM	10
	Acetyl CoA	5 mM	0.1 mM	10
	DW			169
Total vol (uL)				500

- Mixture A를 준비하여 37 °C에서 5분간 미리 반응
 - * 반복 실험을 위하여 각 화합물 당 2개의 1.5 ml tube (0분과 10/ 30/ 60/ 120 분)를 2배수로 준비
- 0분 반응의 경우 stop buffer (tolbutamide in acetonitrile) 500 µl를 먼저 넣고, Mixture B 250 µl를 분주 10/ 30/ 60/ 120분 샘플은 Mixture B를 250 µl 씩 넣고 37 °C 에서 반응
- 각각의 반응 시간이 지나면 100 µl 씩 새로운 튜브로 옮겨, 100 µl의 stop buffer를 분주
 - * Stop buffer를 넣어줄 때는 internal standard (tolbutamide)가 잘 섞이지 않으면 결과 값의 차이가 커지므로 vortexing
- 반응이 마무리 된 샘플은 5분 간 vortexing 하여 10분 간 최대 속도 원심분리
- 200 µl의 상등액을 새 튜브에 옮겨 -20°C에 보관하여 분석
 - * GSH : Glutathione reduced
 - * PAPS : Adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate lithium salt hydrate
 - * SAM : S-(5'-Adenosyl)-L-methionine

(2) 주요 BAMTI 화합물의 물리화학적 특성 분석

(가) 화합물 이온화도 (pKa) 및 친지질도 (logP) 측정

- 다양한 pH에서 화합물의 물리화학적 거동을 예측할 수 있으며 화합물의 이온화상태와 중성상태가 동일할 때의 pH를 측정하였다. 또한 T3 장비를 이용하여 친지질도를 측정하여 흡수, 대사, 분배 및 배설 등의 약동학적 프로파일과 통합 분석하였다 (표 13).
- BAMTI 화합물은 기본 골격에서부터 비롯한 양쪽성 이온물질로서 약산과 약염기 하에 염의 형태로 가능함을 확인하였고 (그림 51), 이러한 성질은 용해도를 높이고 합성, 분리, 정제 및 제제에 유리하며 LogP가 2~3 사이에 나타남으로 druglikeness를 만족하

였다 (그림 52).

표 13. BAMTI 화합물의 이온화도와 친지질도 측정 결과

측정항목	측정방법	시료명	측정값	comment
pKa (이온화도)	T3 (pH-metric)	BAMTI-147	3.55/10.39	* pKa 측정범위 : 1.8-12.0
		BAMTI-160	3.27	
		BAMTI-225	2.97/10.20	
		BAMTI-299	2.90/9.53	
logP (친지질도)	T3 (pH - metric)	BAMTI-147	2.95	
		BAMTI-160	2.89	
		BAMTI-225	2.33	
		BAMTI-299	2.77	

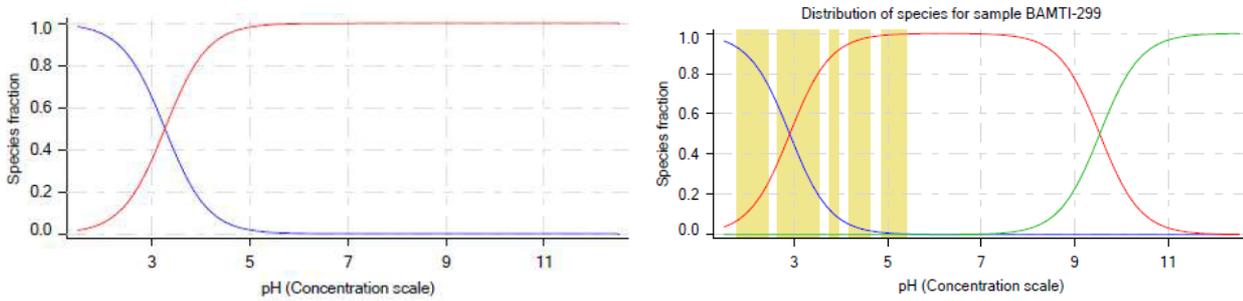


그림 51. BAMTI-147, BAMTI-299의 이온화상수 측정

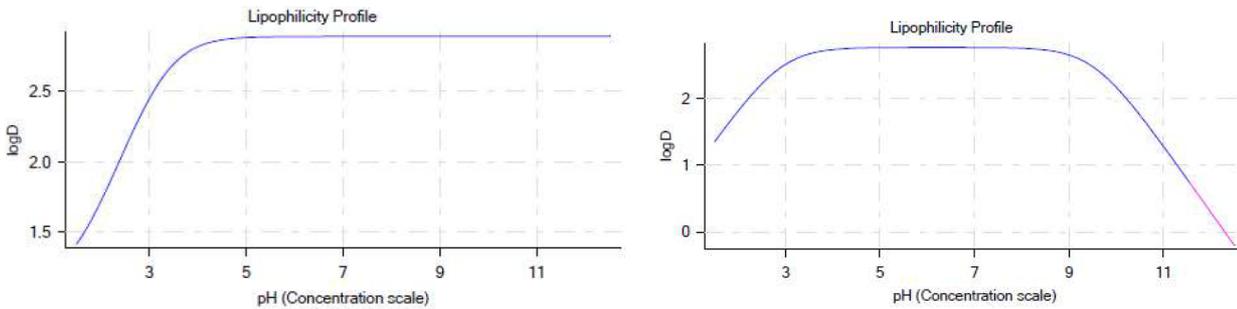


그림 52. BAMTI-147의 logP 측정

(나) Kinetic solubility, Equilibrium solubility 측정

○ 용해도는 신약개발 후보물질의 결정적인 특성으로서 낮은 용해도는 경구 투여 후 흡수를 저해하고 생리 활성평가에서 화합물의 활성이 본래의 활성보다 낮게 평가되는 원인을 제공하므로 초기 단계에 확인하였다.

○ Kinetic solubility는 nephelometry를 이용하여 용액 내 녹지 않는 입자에 의한 빛의 산

란을 측정하여 용액의 용해도를 구하며, 개발단계의 후보물질 평가에 중요하게 고려된다. Equilibrium solubility는 formulation 단계에서 주로 많이 사용되며 crystalline 상태 화합물의 용매에 대한 용해도를 shake-flask 방법을 사용하여 측정한다.

○ BAMTI 화합물은 kinetic solubility가 높음에도 낮은 equilibrium solubility를 보여 formulation 연구나 prodrug 접근이 요구되었으나 BAMTI-225, BAMTI-299와 같이 용해도가 증가된 화합물을 발굴함으로써 흡수 및 분배에 유리하고 세포 및 동물실험에 적합할 것으로 예상되었다 (표 14, 그림 53, 54).

<측정방법>

- 과량의 화합물 (1 mM, in 1 ml)을 용매에 넣어 shaking시킨다. (n=3, 24 h, 1000 rpm)
- 화합물을 DMSO에 녹여 UPLC로 측정한 후 calibration curve를 그린다.
- 24시간 용매에서 shake-flask법으로 포화 시킨 화합물을, syringe filter (0.2 μm)에 통과시킨 후 UPLC로 측정하여 calibration curve에 대입시켜 농도를 계산한다.

표 14. BAMTI 화합물의 kinetic solubility와 equilibrium solubility 측정 결과

측정항목	측정방법	시료명	측정값	comment
Solubility (Kinetic)	Nephelometry	BAMTI-147	500 μM	5% DMSO / WATER
		BAMTI-160	140.8 ± 2.0 μM	
		BAMTI-225	203.9 ± 1.5 μM	
		BAMTI-299	500 μM 이상	
Solubility (Equilibrium)	Shake-flask	BAMTI-147	측정불가	25°C, Water
		BAMTI-160	측정불가	
		BAMTI-225	184 ± 23.7 μM	
		BAMTI-299	297 ± 10.8 μM	

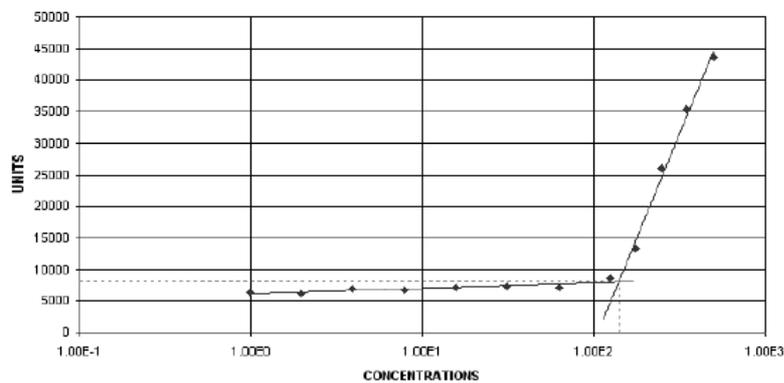


그림 53. BAMTI-147의 kinetic solubility 측정 (nephelometric graph)

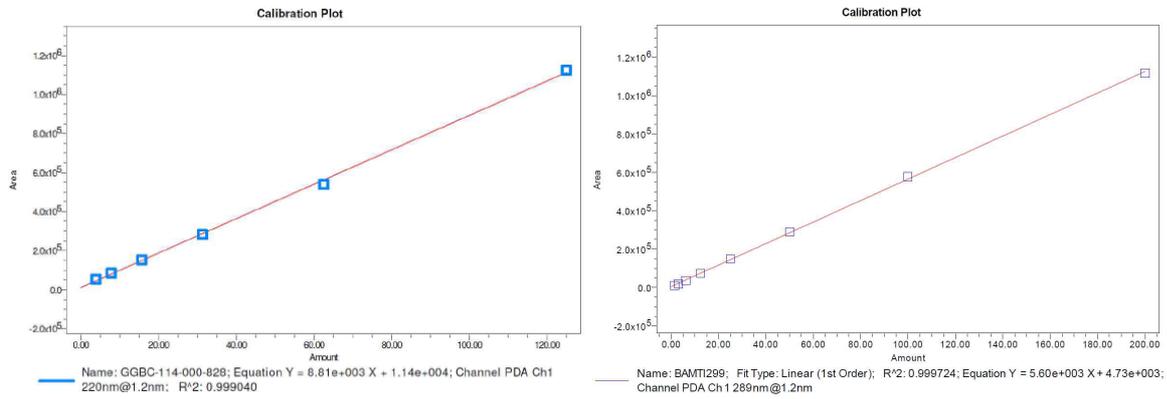


그림 54. BAMTI-147, BAMTI-299의 equilibrium solubility 측정을 위한 calibration plot

(다) Chemical stability (화학적 안정성) 측정

- 화합물의 안정성을 시험하기 위해 일정량의 화합물을 물에 녹인 후 37 °C에서 일정 시간별로 UPLC를 이용하여 purity 변화를 측정하여 안정성을 판별하였고 BAMTI 화합물은 해당 조건에서 변성되지 않고 안정함을 확인하였다 (표 15, 그림 55).

표 15. BAMTI 화합물의 화학적 안정성 측정 결과

측정항목	측정방법	시료명	측정값	comment
안정성 (stability)	UPLC	BAMTI-147	100 % → 100 %	37 °C, 24hr, water
		BAMTI-160	100 % → 100 %	
		BAMTI-225	100 % → 100 %	
		BAMTI-299	100 % → 100 %	

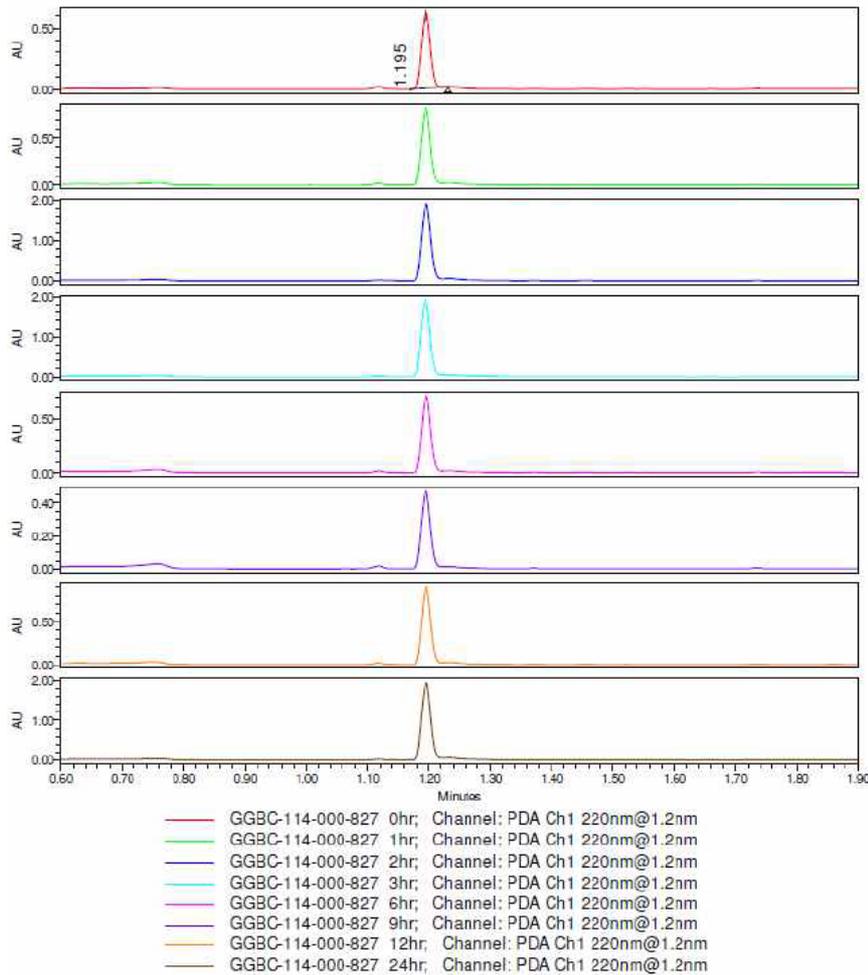


그림 55. 시간에 따른 BAMTI 화합물의 농도변화를 보여주는 UPLC 측정결과

(라) BAMTI-299의 막투과도 예측 시험 (PAMPA)

○ 기존의 permeability 측정기술인 caco-2 및 MDCK 방법은 cell을 배양하여 측정해야 하므로 시간과 비용이 많이 들어가는 단점이 있으나 PAMPA 방법은 인공지질막을 형성시켜 측정하는 방법으로 cell과 같은 능동수송의 효과를 측정할 수는 없지만 비교적 저렴하고 빠른 시간에 막 투과성을 측정할 수 있다. BAMTI-299는 측정값이 -4.20을 나타내며 중간 정도의 투과를 보이는 것을 확인하였다 (표 16).

표 16. BAMTI-299 화합물의 막투과도 측정

화합물	측정항목	측정방법	측정값	comment
BAMTI-299	Permeability (막투과도)	PAMPA	-4.20 ± 0.048 (grade : medium)	high: > -4.07 medium:-4.07 ~ -4.87 low: < -4.87

(마) BAMTI-299 대사안정성 연구 (mouse S9 fraction)

○ BAMTI-299의 mouse 및 minipig 의 S9 fraction을 이용한 대사안정성 시험 결과 (그림 56), 반감기가 10분 이내로 매우 짧았다 (그림 57). BAMTI-299의 화학적 안정성은 비교적 높은 반면 대사 효소에 대해서는 반응성이 높은 fluorine 또는 alcohol 작용기로 인해 대사 안정성이 낮아졌다고 추측되었다.

	Reagent	Stock conc.	Final conc.	Add vol. (uL)
Mixture A	BAMTI-299/ Verapamil	10 mM	10uM	0.5
	S9 fraction	20 mg/mL	2 mg/mL	25
	Tris B (pH7.4)	1M	200 mM	100
	G-6-P	1 M	10 mM	5
	G-6-P dehydrogenase	100 U/mL	0.2 U/mL	1
	MgCl2	1 M	5 mM	2.5
Mixture B	DW			116
	NADPH	50 mg/mL	1 mg/mL	10
	UDPGA	100 mM	5 mM	25
	GSH	100 mM	5 mM	25
	SAM	100 mM	0.2 mM	1
	PAPS	5 mM	0.1 mM	10
	Acetyl CoA	5 mM	0.1 mM	10
	DW			169
Total vol (uL)				500

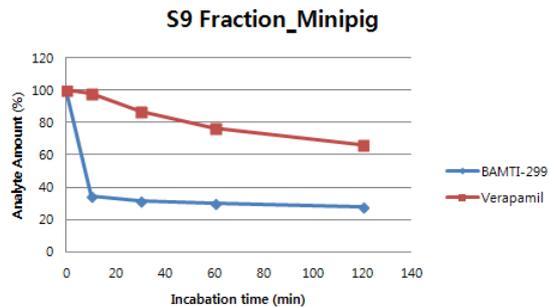
Procedures

1. Prepare "Mixture A" on ice and pre-incubate at 37°C for 5 min.
2. Prepare and add "Mixture B" .
3. Incubate at 37°C and withdraw 100 uL after 10, 30, 60, 120 min.
4. Add 500ul/100 uL of acetonitrile containing 20 uM tolbutamide to each fraction and keep on ice.
5. Vortex mix for 5 min and centrifuge at 13,300 rpm. for 10 min.
6. Withdraw and analyze 150 uL supernatant

- * GSH : Glutathione reduced
- * PAPS : Adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate lithium salt hydrate
- * SAM : S-(5'-Adenosyl)-L-methionine chloride dihydrochloride

그림 56. BAMTI-299의 S9 fraction 대사안정성 시험 방법

S9 Fraction_Minipig			
		BAMTI-299	Verapamil
Average	0	100	100
	10	34.77	97.80
	30	31.42	86.78
	60	30.31	76.38
	120	27.70	66.36
STDEV	0	0	0
	10	6.53	1.1
	30	6.10	1.6
	60	8.91	3.1
	120	7.59	1.0



S9 Fraction_Mouse			
		BAMTI-299	Verapamil
Average	0	100	100
	10	38.30	93.86
	30	33.32	86.41
	60	31.90	76.37
	120	27.47	72.02
STDEV	0	0	0
	10	2.62	8.4
	30	2.47	13.4
	60	1.19	12.6
	120	0.36	10.7

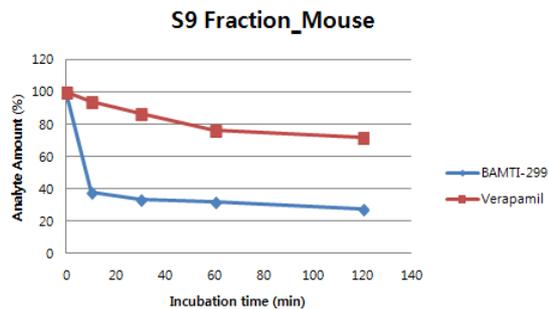


그림 57. BAMTI-299의 S9 fraction 대사안정성 시험 결과

다. AMTI/BAMTI 화합물의 3Dpol 저해 기전 연구

(1) SPR을 통한 화합물-효소 간 결합의 간접 확인

- 화합물이 3Dpol과 primer/template 복합체 기질 간의 결합을 저해하는 것이 주요 저해 기전임을 알아보기 위하여 SPR 기법을 적용하였다.
- SPR은 금속에서 나타나는 광-전자 효과로서 특정 파장의 광이 금속에 조사되면 광 에너지가 자유전자로 전이되는 공명현상임. 금속칩에 부착된 기질에 단백질, 혹은 부착된 항원에 항체의 결합이 강하게 일어날수록 공명 파장의 이동이 증가하여 이를 정량화할 수 있다 (그림 58).

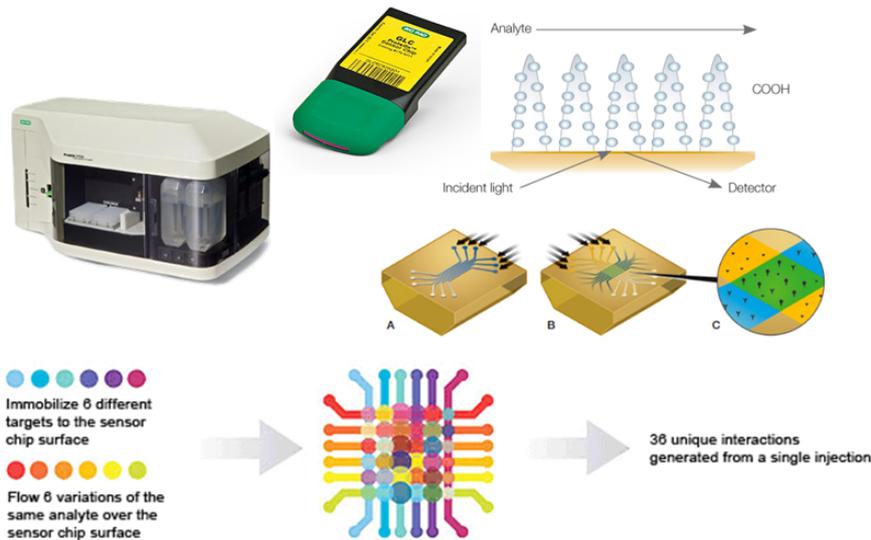
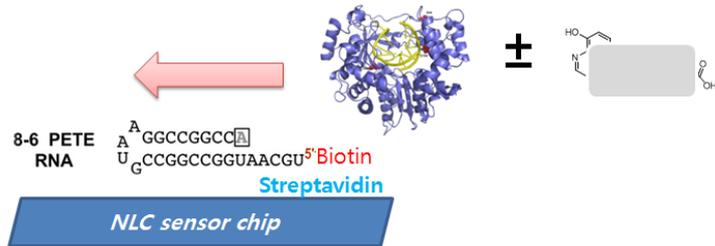


그림 58. ProteOn XPR36 기기의 작동 원리

- FP assay에서 쓰인 PETE RNA 5'말단에 biotin labeling하고 streptavidin 코팅된 NLC sensor chip에 부착한 후 3Dpol을 흘려 보내주면 결합이 일어나고, sensogram 상에서 response가 나타나 peak이 형성됨. 이 때 결합을 저해하는 화합물을 같이 흘려보내주면 response가 줄어들어 peak이 점점 낮아진다 (그림 59).

➤ PETE RNA immobilization and analyte (3Dpol) running



➤ Sensogram

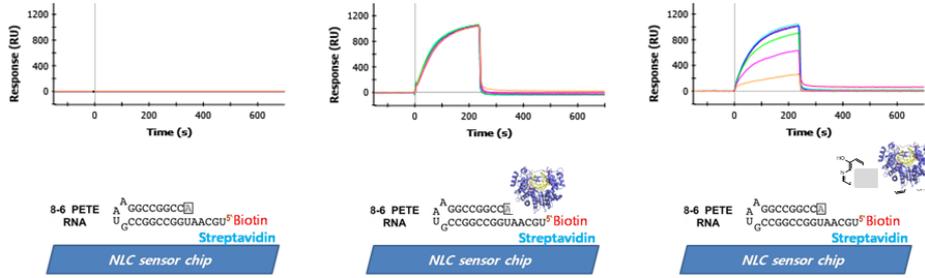


그림 59. SPR을 이용한 PETE와 3Dpol의 결합 분석 원리

○ 실험결과

- 3Dpol 1 μ M 과 AMTI 화합물 (GGBC code로 표기) 100 μ M을 동시에 흘려 보내주었을 때 일부 화합물에서 3Dpol의 결합이 약해지는 것을 관찰하였다 (그림 60).

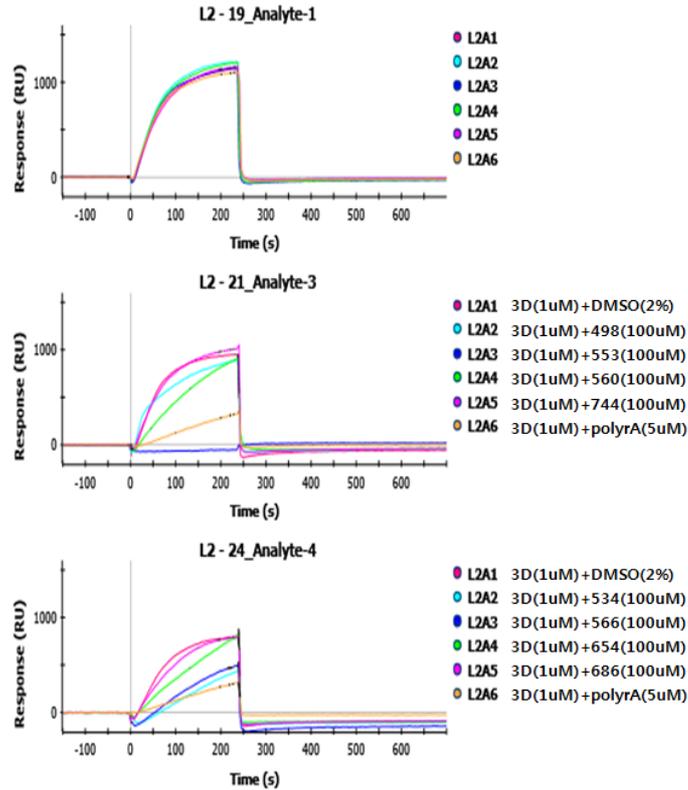


그림 60. AMTI 화합물 8종의 3Dpol-PETE 간 결합 저해 효능 비교 (Sensogram)

- 위 두 실험셋에서 DMSO control의 평균 RU값 (RUavr)을 기준으로 각각의 화합물의 RUavr를 계산하여 그래프로 나타내면 다음과 같다 (그림 61).

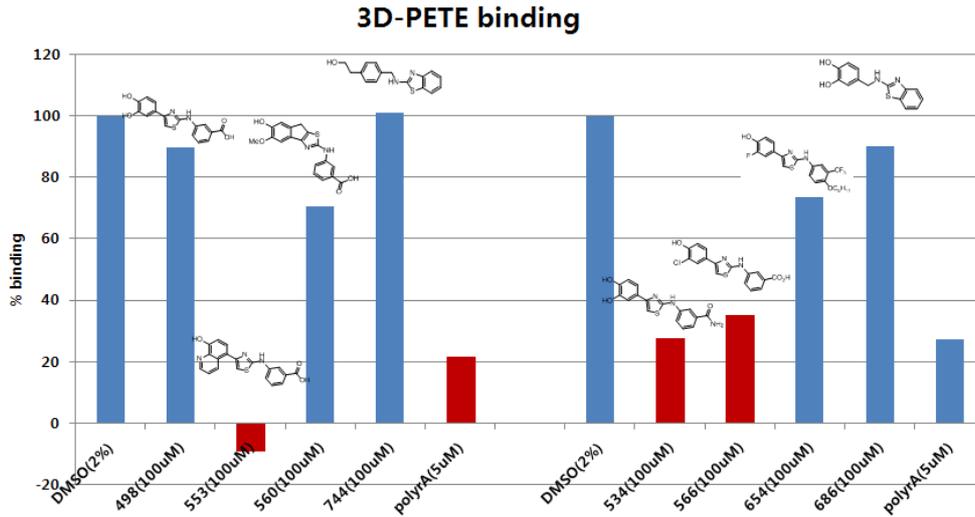


그림 61. AMTI 화합물 8종의 3Dpol-PETE 간 결합 저해 효능 비교 (Bar graph)

- 6개 화합물의 Dose response를 실험한 결과 10~100 μ M 사이에서 농도 의존적 결합 저해를 관찰하였다 (그림 62, 63).

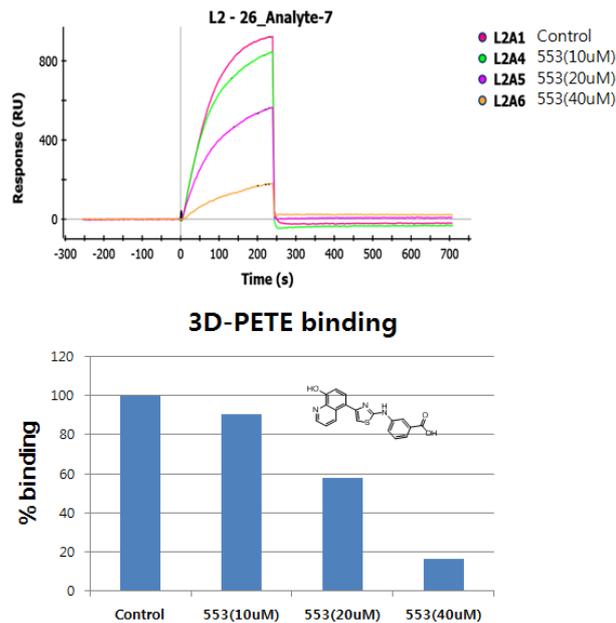


그림 62. AMTI-89 (GGBC-113-000-553) 화합물의 농도 증가에 따른 3Dpol-PETE 결합 저해

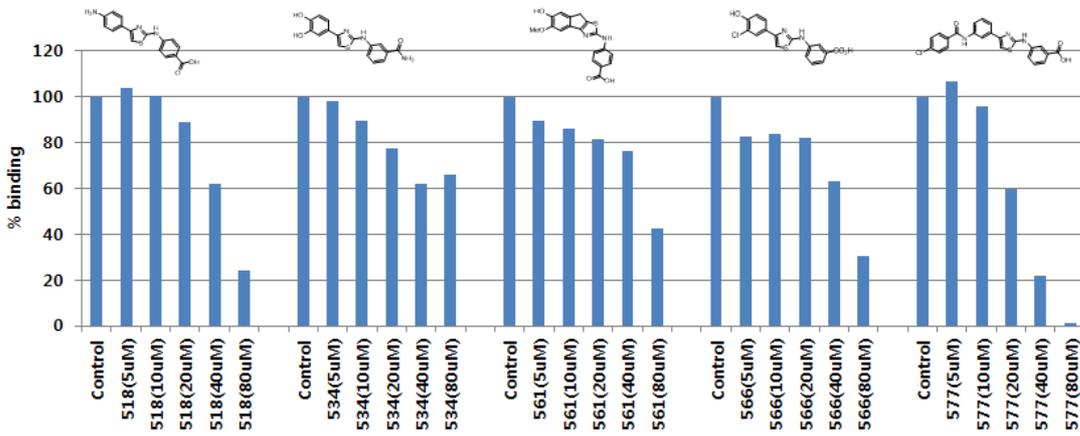
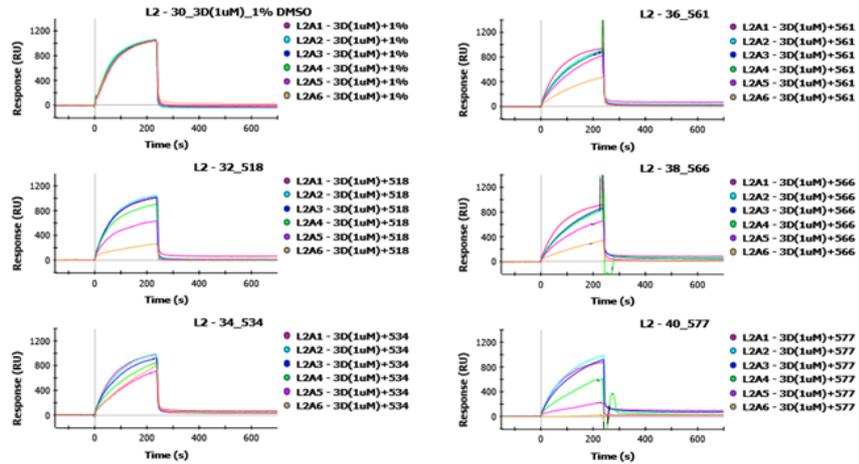


그림 63. AMTI 화합물들의 농도 증가에 따른 3Dpol-PETE 결합 저해 효능 비교

(2) 분자모델링을 통한 결합 모드 예측

○ Ferrer-Orta C 등에 의해 2004년 Journal of Biological Chemistry 저널에 발표된 FMDV 3Dpol 분자구조를 바탕으로, Ribavirin-TP, UTP 와 3Dpol 간의 결합구조가 Ferrer-Orta C et al. 2007, Proc. Natl. Acad. Sci 논문에 발표되었다 (PDB id : 2E9R, 2E9Z) (그림 64).

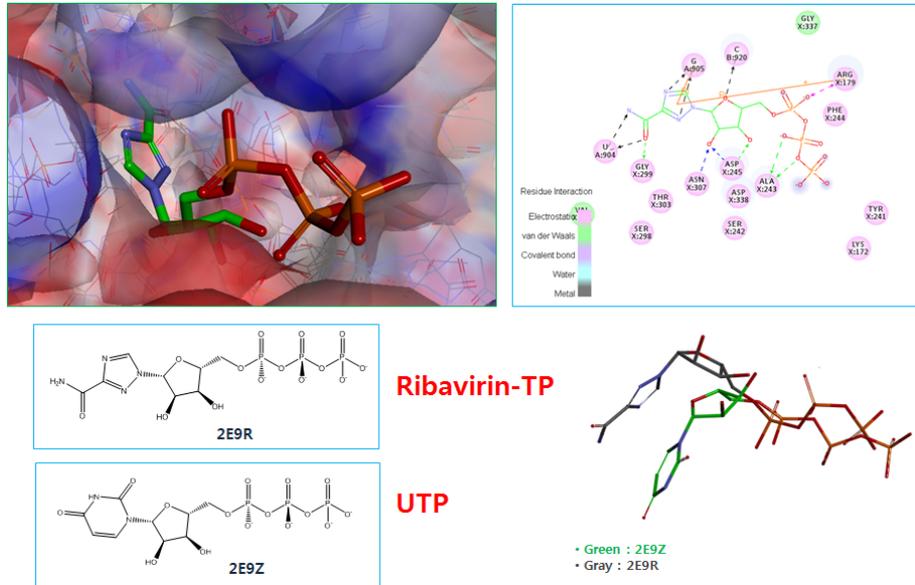


그림 64. Ribavirin-TP와 UTP의 3Dpol 결합 위치와 상호작용

- 이러한 결합구조를 토대로 BAMTI 화합물을 superimpose 시켜 중요 functional group 과 3Dpol의 amino acid residue의 side chain간 결합 모드를 예측하였다.
- BAMTI-183의 경우 가운데 hinge region의 nitrogen이 3Dpol의 D338 잔기와 수소결합을 형성하고 benzyl group은 K172 잔기와 Pi interaction을 할 것으로 예상되었다 (그림 65).

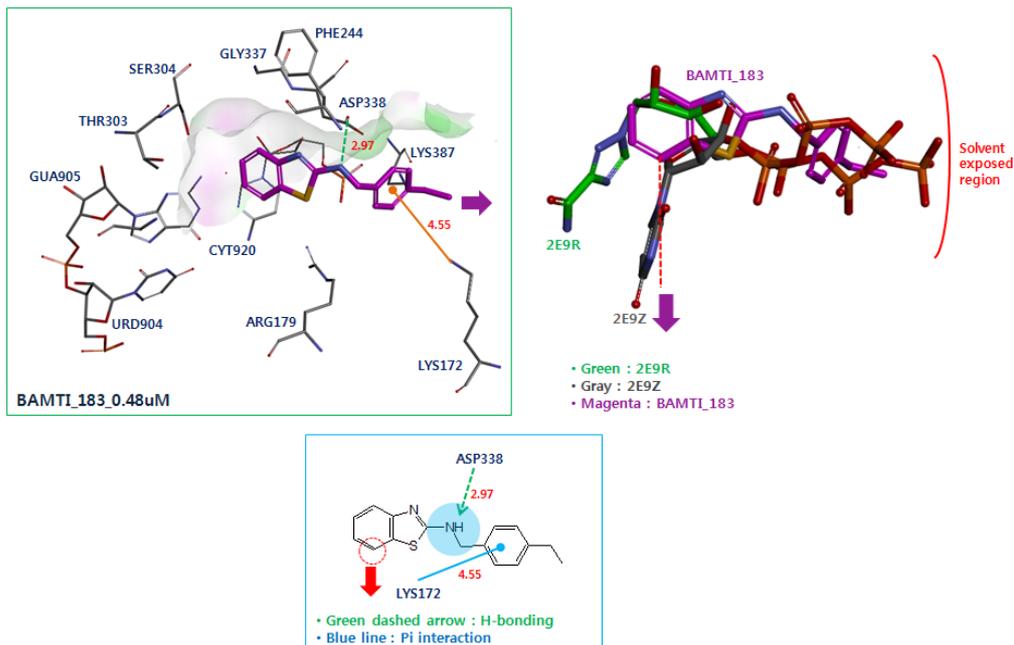


그림 65. BAMTI-183 화합물과 3Dpol 아미노산 잔기 간 결합모드 예측

- BAMTI-192의 경우 가운데 hinge region의 nitrogen이 역시 3Dpol의 D338 잔기와 수

소결합을 형성하고 benzyl group은 K59 잔기와 Pi interaction을 할 것으로 예상되었다. 또한 hydroxy group은 T178, K177 잔기와 수소결합을 형성할 것으로 예상되었다 (그림 66).

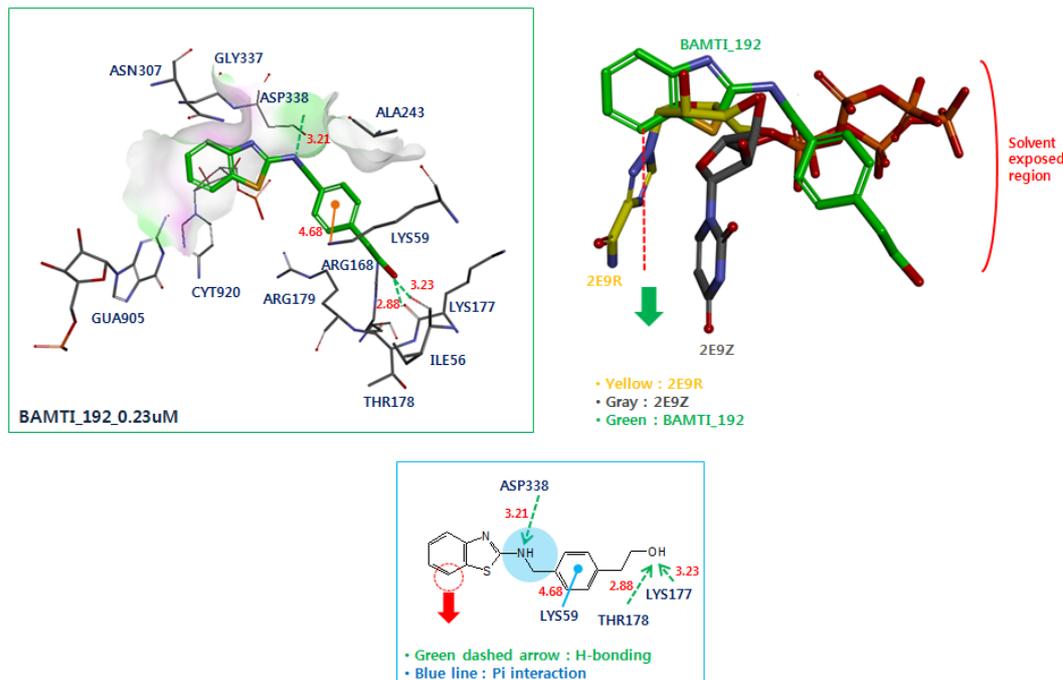


그림 66. BAMTI-192 화합물과 3Dpol 아미노산 잔기 간 결합모드 예측

- 모델링에 사용된 두 화합물 모두 공간 배열 상 benzothiazole 의 aromatic ring에서 뺄어나가 구조변경을 할 수 있는 여지가 많은 것으로 분석되어 차후 이 부분을 고려한 SAR이 요구된다.

(3) 효소반응 속도론 (Enzyme kinetics) 연구

- 효소반응 속도론은 어떤 화합물이 효소를 저해할 때 어떤 결합자리에 어떠한 모드로 결합하며, 기질과 경쟁적으로 혹은 비경쟁적으로 결합하는지 등의 약물설계에 중요한 정보를 얻을 수 있는 연구방법이다.
- 본 실험에서는 Functional luciferase assay를 기반으로 하여 효소 농도를 고정하고 UTP와 화합물의 농도를 변화시켰을 때 얻어지는 결과값을 hyperbolic curve로 나타내 각 반응 조건별 반응최고속도 (Vmax)와 Michaelis 상수 (Km)를 Non-linear regression을 이용하여 구하고, 이중역수 그래프인 Lineweaver-Burk plot으로 도시하여 그래프 패턴을 분석하였다.
- 다음은 효소반응 저해 모드와 그래프 형태의 상호연관성을 보여주는 모식도이다.

Michaelis-Menten plot으로부터 구한 K_m 값, V_{max} 값과, Lineweaver-Burk plot의 X절편, Y절편, 기울기가 저해화합물 존재 하에 어떻게 변화하는지 관찰해 보면 화합물의 결합모드, 저해방식을 유추해 볼 수 있다 (그림 67).

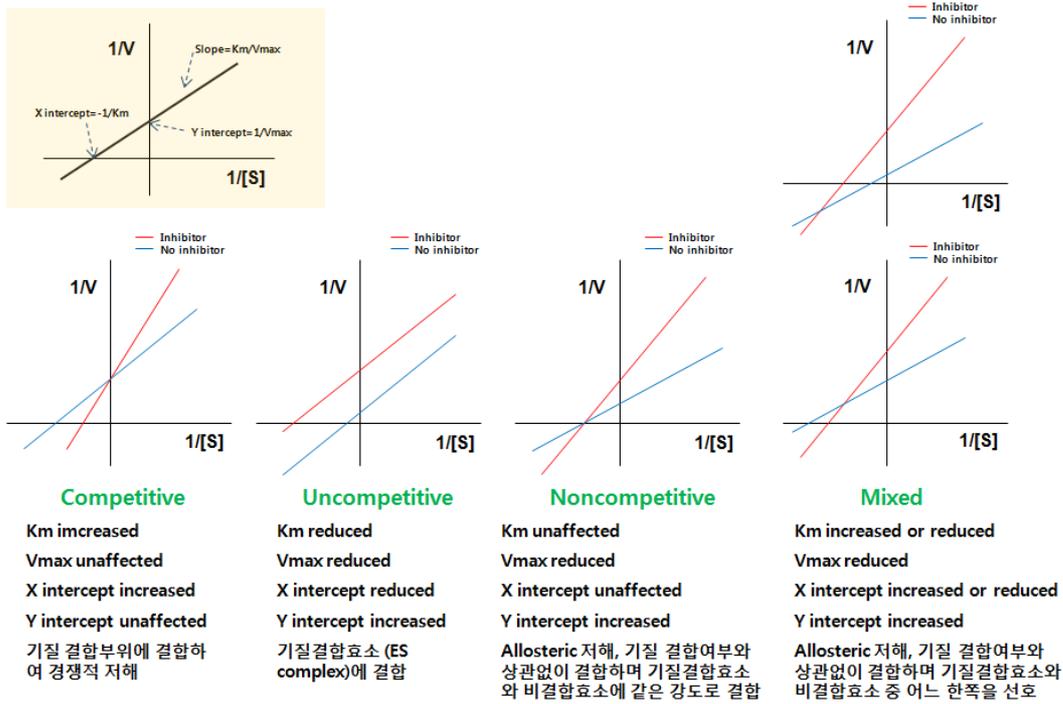


그림 67. Enzyme kinetics 해석에 사용되는 효소반응 저해 기전 별 Lineweaver-Burk plot 예시

○ 아래 그림 68에서 보여지는 바와 같이 BAMTI 유도체 화합물이 3Dpol를 저해하는 방식은 주로 Mixed inhibition 방식을 취한다. 즉 Allosteric inhibition 형태로 기질 결합여부와 상관없이 결합하며 기질결합효소 또는 비결합효소 중 어느 한쪽을 선호하게 된다. 흥미로운 것은 BAMTI-237 화합물에서는 화합물 처리 시 기울기가 변하지 않고 X절편 감소, Y절편은 증가하는 전형적인 uncompetitive inhibition 패턴을 보인 것이다 (그림 68). 더욱 검증해 보아야겠지만 화합물 결합을 위해서는 UTP 결합이 일어나야 하는 방식으로 약물의 저해기전으로서는 흔하지 않으나 저해 강도 (Efficacy) 측면에서는 매우 유리하여 향후 임상후보물질로서 기대되는 유도체이다.

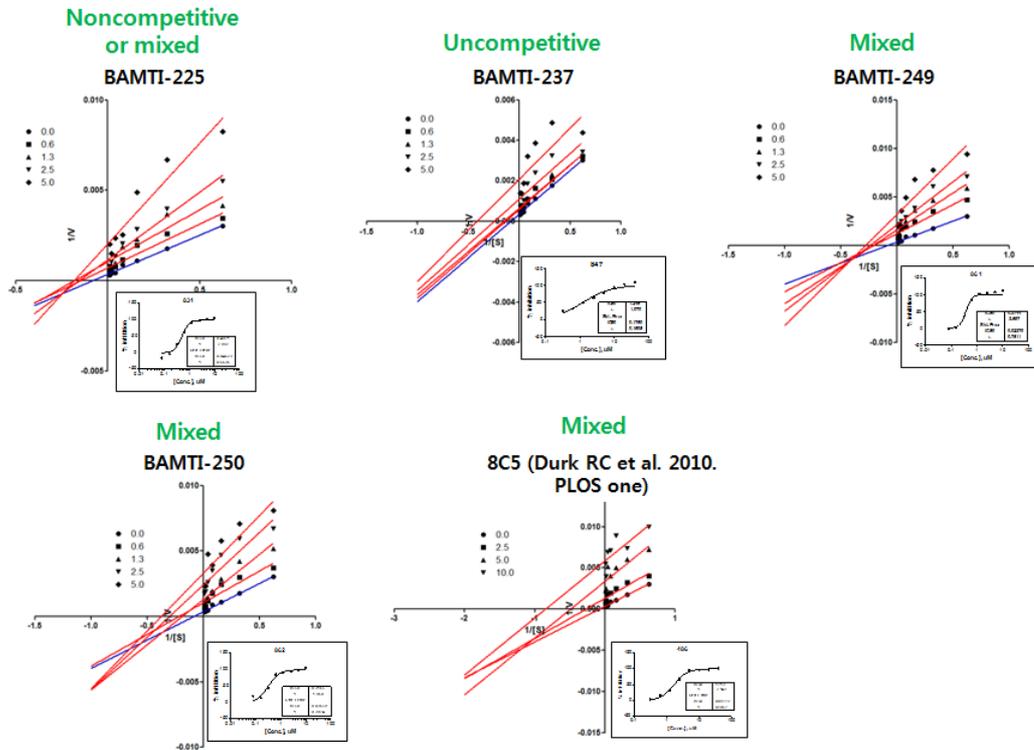


그림 68. 대표적인 BAMTI 화합물의 Lineweaver-Burk plot과 효소반응 저해 기전 해석

라. AMTI/BAMTI 화합물의 약동력학 (Pharmacokinetics, PK) 및 생체이용률 (Bioavailability, BA) 분석

(1) BAMTI-147, BAMTI-225 마우스 PK 시험

○ 선도물질인 BAMTI-147의 소동물 유효성 평가에 앞서 마우스 체내 동태를 알아보기 위해 CD-1 마우스 복강에 10 mg/kg 용량으로 화합물을 투여하여 시간별 (10 point)로 혈중 화합물 농도를 측정하였다. 시험화합물은 10% DMSO / 10% CremophorELP 에 solution 으로 준비하여 복강으로 10 mg/kg을 투여하였다. WinNonLin 프로그램을 이용하여 non-compartment model 을 적용하여 약물동태학적 파라미터를 구하였다.

○ 실험 수순 : 5 주령 male CD-1 mouse 를 반입 후, 일주일 이상 내부 순화하고 시험 전날 12 시간 동안 절식시켰다. 시험 중 사료는 투여 후 2 시간째에 다시 공급하였고, 물은 자유로이 섭취시켰다. 시험 개체는 투여 전 체중을 측정하여 30~35 g 의 mouse 를 선택하였다. BAMTI 화합물의 복강 투여 용액은 10% DMSO / 10% CremophorELP 에 solution 으로 만든 후 10 ml/kg 부피로 10 mg/kg 을 복강으로 투여하였다. 투여 후 각 채혈 시간에 heparin 처리가 되어 있는 capillary를 이용하여 꼬리채혈하였다. 채혈된 혈액은 5,000 rpm (1,500 g) 4°C에서 5 분간 원심 분리하여 혈장을 채취하고 드라이아이스가 들어있는 box 에서 급속 냉동시킨 후, 시료 전처리 전까지 -80°C에서 보관하였

다. 분석은 Triple Quad 5500 mass spectrometer (AB/SCIEX)를 이용하여 MRM mode 로 진행하였고, LC column 은 Agilent, Eclipse plus RRHT, C18, 1.8 μ m, 2.1x50 mm 이고, LC-pump 는 A 에 0.1% formic acid, B 에 0.1% formic acid/ACN 으로 사용하였다.

○ 결과 분석

- BAMTI-147의 10 mg/kg 으로 복강 투여 후 AUClast 는 11,981 hr*ng/ml 이고, 반감기는 19.69 h으로 시험화합물이 혈중에서 계속 유지되고 있어 배설이 잘 일어나지 않고 있음을 보여 주고 있다. Cmax 는 871 ng/ml 이고, Tmax는 2 h 이다. 혈중 농도가 0.33 h 까지 혈중 농도가 감소되었다가 다시 올라가는 현상이 나타나는데 이는 화합물의 용해도가 낮아 복강 내에서 침전이 된 후 서서히 흡수되었을 것이라 예상된다 (표 17, 그림 69).
- BAMTI-225의 경우 AUClast 는 1,520 hr*ng/ml 이고, 반감기는 3.20 h이고, Cmax 는 942 ng/ml 이고, Tmax 는 0.17 h로서 BAMTI-147과 비교하여 낮은 혈액 내 총 농도와 상대적으로 짧은 반감기를 가지며 약물의 유효시간이 짧고 배설이 상대적으로 빠를 것으로 예상하나 혈중 최고농도와 이에 이르는 도달시간이 짧아 속효성을 보일 것으로 예상되었다 (표 17, 그림 69).

표 17. BAMTI 화합물 2종의 마우스 PK parameter 측정치

	Route	Dose (mg/kg)	Tmax (hr)	Cmax (ng/ml)	AUClast (hr*ng/ml)	T1/2 (h)
BAMTI-147	복강투여	10	2.00±0.00	871±19	11,981±269	19.69±1.759
BAMTI-225	복강투여	10	0.17±0.00	942±61	1,520±111	3.20±0.32

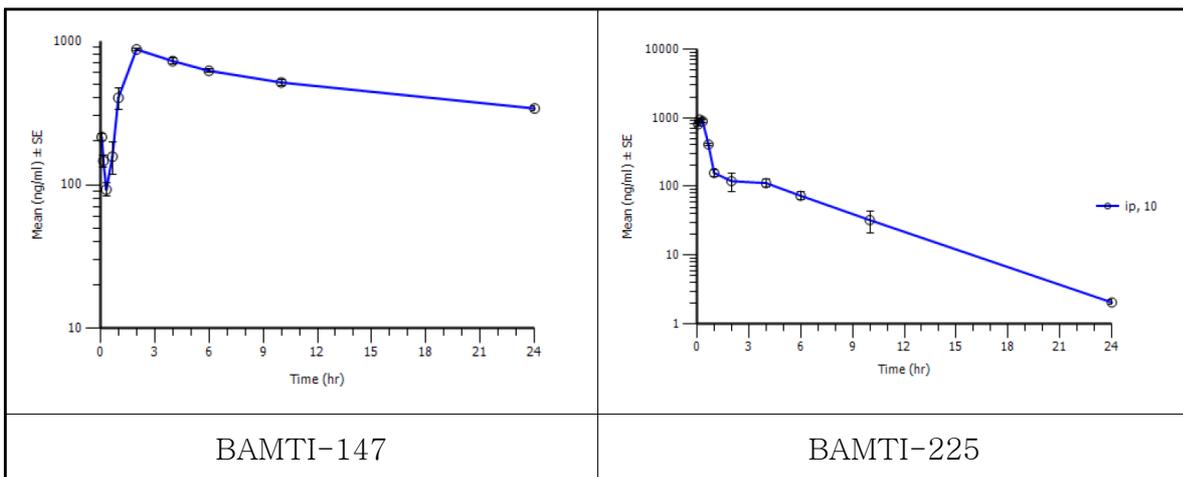
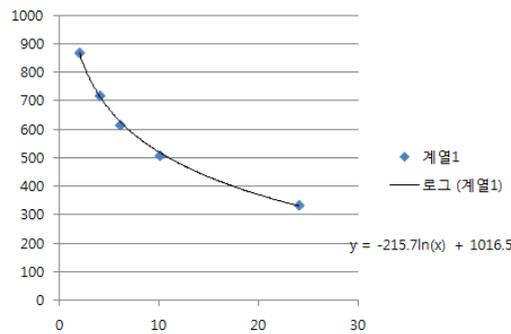


그림 69. BAMTI 화합물의 복강 투여 후 평균 혈장 농도 곡선

○ Raw data를 기반으로 Excel을 이용하여 BAMTI-147의 decay rate를 추정하기 위한 non-linear regression curve를 그려 보았으며 이를 바탕으로 실험기간 (7일) 동안 투여

용량 및 횟수 별 혈중농도 추정치를 계산하여 표로 나타내었다 (그림 70). 이를 통해 화합물의 3Dpol 저해에 요구되는 농도를 유지하기 위한 투여량 및 투여횟수를 추산할 수 있다.



10 mpk, ip, 1일1회 투여, 로그추세										20 mpk, ip, 1일1회 투여, 로그추세											
hour	0.08	0.17	0.33	0.67	1	2	4	6	10	24	hour	0.08	0.17	0.33	0.67	1	2	4	6	10	24
Day1	0.8	0.5	0.3	0.6	1.5	3.2	2.7	2.3	1.9	1.2	Day1	1.6	1.1	0.7	1.2	3.0	6.4	5.3	4.6	3.8	2.5
Day2	2.0	1.7	1.5	1.8	2.7	4.4	3.8	3.3	2.8	1.9	Day2	4.0	3.5	3.1	3.5	5.3	8.7	7.5	6.6	5.7	3.8
Day3	2.7	2.4	2.2	2.4	3.3	5.0	4.4	3.9	3.3	2.3	Day3	5.3	4.8	4.4	4.9	6.6	10.0	8.7	7.8	6.7	4.5
Day4	3.0	2.8	2.5	2.8	3.6	5.3	4.7	4.2	3.6	2.4	Day4	6.0	5.5	5.1	5.5	7.3	10.6	9.3	8.3	7.2	4.8
Day5	3.1	2.9	2.7	2.9	3.8	5.4	4.7	4.2	3.6	2.4	Day5	6.3	5.7	5.3	5.8	7.5	10.8	9.5	8.5	7.3	4.8
Day6	3.1	2.9	2.7	2.9	3.8	5.4	4.7	4.2	3.6	2.4	Day6	6.3	5.7	5.3	5.8	7.5	10.8	9.5	8.5	7.3	4.8
10 mpk, ip, 2일1회 투여, 로그추세										20 mpk, ip, 2일1회 투여, 로그추세											
hour	0.08	0.17	0.33	0.67	1	2	4	6	10	24	hour	0.08	0.17	0.33	0.67	1	2	4	6	10	24
Day1	0.8	0.5	0.3	0.6	1.5	3.2	2.7	2.3	1.9	1.2	Day1	1.6	1.1	0.7	1.2	3.0	6.4	5.3	4.6	3.8	2.5
Day2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.1	1.0	0.9	0.7	Day2	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.3	2.2	2.1	1.9	1.3
Day3	1.5	1.2	1.0	1.2	2.1	3.8	3.3	2.8	2.4	1.6	Day3	2.9	2.4	2.0	2.5	4.3	7.7	6.5	5.7	4.8	3.2
Day4	1.6	1.6	1.5	1.5	1.5	1.5	1.4	1.3	1.2	0.8	Day4	3.1	3.1	3.1	3.1	3.0	3.0	2.8	2.6	2.4	1.6
Day5	1.6	1.3	1.1	1.3	2.2	3.9	3.3	2.9	2.4	1.6	Day5	3.1	2.6	2.2	2.7	4.5	7.9	6.7	5.8	4.9	3.2
Day6	1.6	1.6	1.5	1.5	1.5	1.5	1.4	1.3	1.2	0.8	Day6	3.1	3.1	3.1	3.1	3.0	3.0	2.8	2.6	2.4	1.6
Day7	1.6	1.3	1.1	1.3	2.2	3.9	3.3	2.9	2.4	1.6	Day7	3.1	2.6	2.2	2.7	4.5	7.9	6.7	5.8	4.9	3.2
10 mpk, ip, 3일1회 투여, 로그추세										20 mpk, ip, 3일1회 투여, 로그추세											
hour	0.08	0.17	0.33	0.67	1	2	4	6	10	24	hour	0.08	0.17	0.33	0.67	1	2	4	6	10	24
Day1	0.8	0.5	0.3	0.6	1.5	3.2	2.7	2.3	1.9	1.2	Day1	1.6	1.1	0.7	1.2	3.0	6.4	5.3	4.6	3.8	2.5
Day2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.1	1.0	0.9	0.7	Day2	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.3	2.2	2.1	1.9	1.3
Day3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.5	0.3	Day3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.2	1.1	1.0	0.7
Day4	1.1	0.9	0.7	0.9	1.8	3.5	3.0	2.6	2.1	1.4	Day4	2.3	1.8	1.4	1.8	3.6	7.1	5.9	5.1	4.3	2.7
Day5	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.2	1.1	1.0	0.7	Day5	2.7	2.7	2.6	2.6	2.6	2.5	2.4	2.2	2.0	1.3
Day6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.5	0.3	Day6	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.2	1.1	1.0	0.7
Day7	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1	Day7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.5	0.2	

그림 70. BAMTI-147 PK 프로파일을 통해 추제한 regression curve (상)와 실험 기간 동안 투여 용량 및 투여 횟수 별 혈중 농도 추정치 (하)

(2) BAMTI-299 마우스 PK/BA 시험

○ BAMTI-299의 mouse에서 경구 투여 흡수율을 보기 위해 CD-1 mouse 에 5 mg/kg 으로 경구 투여 및 2 mg/kg 로 정맥 투여하여 생체이용률 (bioavailability)을 측정하였다.

(가) 실험방법

○ 동물실험

- 5 주령 male CD-1 mouse 를 반입 후, 일주일 이상 내부 순화하고 사육 중이던 14 주령차 mouse를 시험 전날 12 시간 동안 절식시켰다. 시험 중 사료는 투여 후 1 시간 쯤에 다시 공급하였고, 물은 자유로이 섭취시켰다. 시험 개체는 투여 전 체중을 측정하였다. 시험 화합물의 투여 용액은 10% DMSO / 9% CremophorELP 에 solution 으로 만든 후 1 ml/kg 부피로 2 mg/kg 를 꼬리 정맥으로 투여하였고, 경구 투여 용액

은 5 ml/kg 부피로 5 mg/kg 을 마우스용 존대로 투여하였다. 투여 후 각 채혈 시간에 heparin 처리가 되어 있는 capillary를 이용하여 꼬리채혈 하였다. 채혈된 혈액은 5,000 rpm (1,500 g) 4°C에서 5 분간 원심 분리하여 혈장을 채취하고 드라이아이스가 들어있는 box 에서 급속 냉동 시킨 후, 시료 전처리 전까지 -80°C에서 보관하였다 (표 18).

표 18. Mouse BA 동물 시험 요약

투여 물질	BAMTI-299 (NNM11067)	
	정맥	경구
투여 경로		
투여 용량 (API 기준)	2mg/kg	5mg/kg
투여 부피	1mL/kg	5mL/kg
용매 (Vehicle)	10% DMSO/9% CremophorELP	10%DMSO/9% CremophorELP
투여용액상태	Solution	Solution
채혈시간 (10 points)	0.08, 0.17, 0.33, 0.67, 1, 2, 4, 6, 10, 24hr	0, 0.33, 0.67, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 24hr
개체수 (n)	3	3
채혈 방법	꼬리채혈	꼬리채혈
항응고제	Sodium heparin	Sodium heparin

○ 실험 동물 사육 조건

- 검역, 순화, 사육 기간 중 동물은 온도 23±3°C, 상대습도 40~60%, 명암은 1 일 12 시간 (오전 7시~오후 7시)씩 교대하였다. 동물의 수용은 개별 공조가 되는 케이지를 사용하였으며, 사료와 물은 살균, 소독하여 절식 전까지 자유로이 섭취시켰다.

○ 시료 전처리 방법

- Calibration curve 용 표준액은 각 시험화합물을 각각 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000, 30000 ng/ml 농도로 working standard solution 을 만든 후, working standard solution 과 mouse plasma 를 1:9 (v/v)로 혼합하여 표준용액 농도는 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 ng/ml 이 되게 spike 하였다. Spike 된 calibration curve 용 표준액과 채혈된 sample 은 IS (diclofenac) 50 ng/ml이 포함된 85% ACN 을 1:19 (v/v)로 혼합한 후 5 분 동안 vortex 하였고, 16,000 rpm (27,000 g)으로 4°C에서 10 분간 원심 분리하였다. 상층액 중 80 µl 를 분리하여 LC/MS/MS MRM mode 로 분석하였다.

○ 분석 방법

- 이 시험은 Triple Quad 5500 LC/MS/MS (AB/SCIEX)를 이용하여 MRM mode 로 진행되었다. LC column 은 Agilent, Eclipse plus RRHT C18, 1.8 µm, 2.1x50 mm 이고, mobile phase 는 A 에 0.1% formic acid, B 에 0.1% formic acid/ACN 으로 사용하였다.

○ Data Analysis

- 시간대별 혈장 중 농도 data 를 이용하여 WinNonlin software (Pharsight, ver. 6.2) 로 noncompartmental analysis 로 약물동태학적 파라미터를 구하였다.

(나) 실험결과

- BAMTI-299 (NNM11067)를 2 mg/kg 으로 정맥 투여 후의 AUCall 는 1,285 hr*ng/ml이며 반감기는 0.55 시간, 최대농도 도달시간은 0.39 시간이며 이때 농도는 16,867 ng/ml이다. 5 mg/kg 으로 경구 투여 후 AUCall 는 163 hr*ng/ml 이며 최대농도 도달시간은 2.78 시간이고 이 때 농도는 20 ng/ml으로 혈액으로의 화합물의 전달이 미미했음을 알 수 있었다. 최종적으로 경구 투여 대비 정맥투여의 비를 나타내는 bioavailability 는 약 0.3%이다 (표 19, 그림 71).

표 19. BAMTI-299 mouse BA 실험의 약물동태학적 파라미터 및 결과 요약

Compound	Route	Dose (mg/kg)	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{all} (hr*ng/ml)	F _t (%)
BAMTI-299 (NNM11067)	iv	2	0.55	0.39	16,867	21,285	0.3
	po	5	NC	2.78	20	163	

NC : Not Calculable

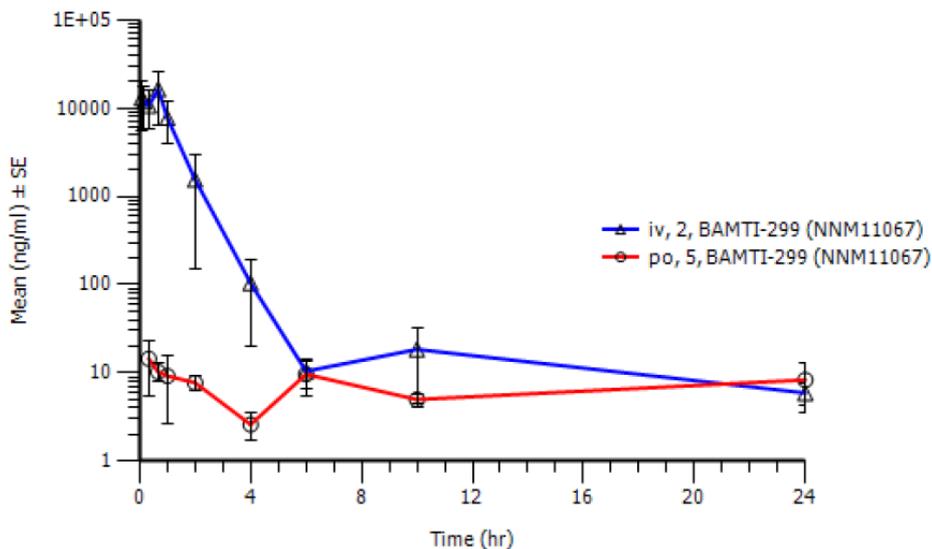


그림 71. BAMTI-299의 mouse 정맥 및 경구 투여 후 평균 혈장 농도 곡선 (log plot)

마. AMTI/BAMTI 화합물의 in vivo 독성 및 안전성 평가

(1) 연구 재료 및 방법

○ 실험동물

- 3주령의 ICR 계통 SPF(Specific pathogen free) 마우스 수컷 30 마리, 암컷 30 마리 (생산 : 샘타코 바이오코리아)

○ 투여 시료

- 구제역바이러스 비구조단백질을 타겟으로 하는 항바이러스제제 후보물질 BAMTI-299 화합물을 0.9% NaCl 수용액과 DMSO를 1:1로 혼합한 용액에 현탁하여 개체 별, 투여 당 200 μ l씩 접종하였다. DMSO의 경우 마우스에서의 LD₅₀이 7,920 mg/kg으로, 본 시험의 마우스에 적용한 용량에서 독성을 나타내지 않을 것으로 판단되었다.

○ 투여 용량 설정

- 사전 연구 결과 및 기존에 보고된 유사 물질의 해외 연구 결과를 참조하여 투여 용량을 설정하였다 (Sidwell RW et al. 2005, Antiviral Res).

○ 투여 경로 설정

- ‘농림수산검역검사본부 고시 제2011-11호 동물용의약품등 독성시험지침’에 준하여, 실제 적용 예정 임상경로를 경구투여로 설정하고, 비경구투여의 경우 복강투여를 실시하였다. 경구투여는 존데를 이용한 강제급여 방법을 사용하였다.

○ 실험동물 그룹 별 투여량 및 경로 설정

- 급성독성 시험에는 300 mg/kg을 그룹 별 투여경로대로 개체 당 단회, 아급성 독성 시험에는 그룹 별로 37.5 mg/kg/day, 75 mg/kg/day, 150 mg/kg/day을 경구투여로 개체 당 1일 1회, 7일 간 접종하였다. 각 그룹을 암컷과 수컷을 나누어 암수 각 5 마리씩 서로 다른 케이지에서 사육하였다 (표 14).

표 20. 실험에 이용된 실험동물 그룹별 투여약물 및 경로

실험그룹		투여 약물/경로	두수
급성독성 시험	급성-경구	BAMTI-299 화합물 300 mg/kg 경구 투여	10두
	급성-복강	BAMTI-299 화합물 300 mg/kg 복강 접종	10두
아급성독성시험	아급성	BAMTI-299 화합물 37.5 mg/kg/d 경구 투여	10두
	아급성	BAMTI-299 화합물 75 mg/kg/d 경구 투여	10두
	아급성	BAMTI-299 화합물 150 mg/kg/d 경구 투여	10두
대조군	대조군	희석액 200 µl/d 경구 투여	10두

○ 독성 및 안전성 관찰 사항

- 급성독성시험의 경구투여군에서는 2주 간, 복강투여군에서는 1주 간 임상증상을 관찰하고 관찰 기간 내 3회 체중측정을 실시하였다. 아급성독성시험에서는 3주 간 임상증상을 관찰하고 체중을 주 2회, 사료섭취량을 주 2회 관찰하였다. 모든 동물은 폐사 또는 관찰기간 종료 시 부검하여 모든 기관, 조직을 육안으로 관찰하였다 (표 21).

표 21. 독성 시험 진행 스케줄표

실험일		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
급성경구	시료 투여	■																					
	임상증상 관찰	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■								
	체중측정	■						■															
	부검														■								
급성복강	시료 투여	■																					
	임상증상 관찰	■	■	■	■	■	■	■															
	체중측정	■			■			■															
	부검																						
아급성	시료 투여	■	■	■	■	■	■	■															
	임상증상 관찰	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	체중측정	■			■			■			■			■		■			■		■		■
	부검																						■

(2) 시험 결과

○ 임상증상

- 어떤 실험 그룹의 어떤 개체에서도 폐사, 투여 직후 쇼크, 급성 아나필락틱 반응, 운동능력의 이상, 호흡기 또는 소화기의 이상, 신경증상 등의 임상증상을 나타내지 않았다.

○ 체중

- 급성, 아급성, 투여경로별, 투여용량별 모든 실험 그룹에서 후보 물질 BAMTI-299 투여로 인한 유의적인 체중 감소를 관찰할 수 없었다 (표 22~24, 그림 72~75).

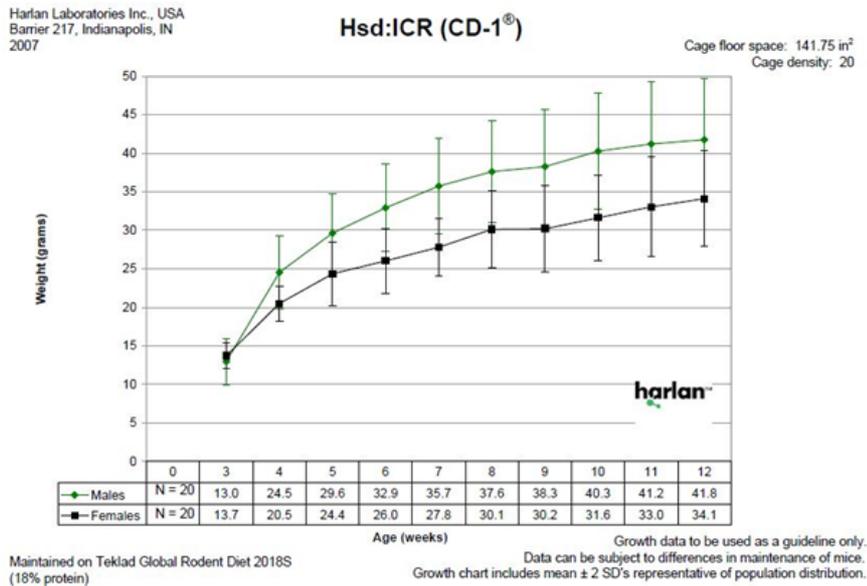


그림 72. ICR 계통 마우스의 성장 곡선 (Harlan 社 제공)

- 급성-경구 투여군

표 22. 급성독성시험 경구 투여 그룹의 체중 변화

	급성-경구-암컷	급성-경구-수컷	대조-암컷	대조-수컷
Day 1	13.6	12.8	13.4	12.6
Day 8	22	20.6	17.1	17.2
Day 15	23.5	22.8	20.5	22.3

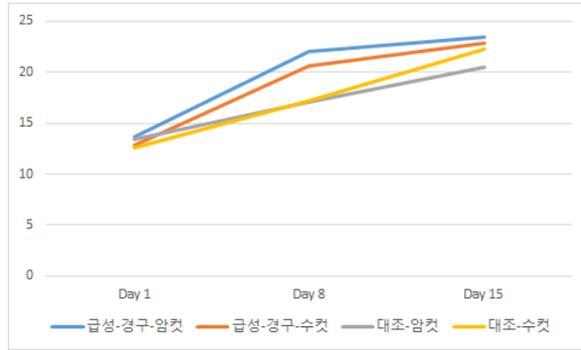


그림 73. 급성독성시험 경구 투여 그룹의 체중 변화 그래프

- 급성-복강 투여군

표 23. 급성독성시험 복강 투여 그룹의 체중 변화

	급성-복강-암컷	급성-복강-수컷	대조-암컷	대조-수컷
Day 1	13.56	12.42	13.4	12.6
Day 4	16.32	16.46	17.1	17.2
Day 8	19.86	23.5	20.5	22.3

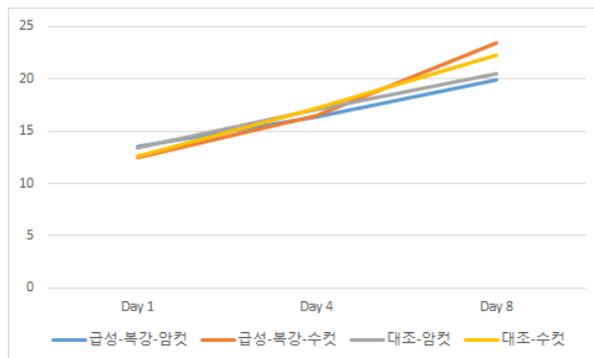


그림 74. 급성독성시험 복강 투여 그룹의 체중 변화 그래프

- 아급성 투여군

표 24. 아급성독성시험 투여 용량별 체중 변화

	150mg/kg 암컷	150mg/kg 수컷	75mg/kg 암컷	75mg/kg 수컷	37.5mg/kg 암컷	37.5mg/kg 수컷	대조 암컷	대조 수컷
Day 1	13.68	12.14	13.4	12.7	13.48	12.66	13.4	12.6
Day 4	16.42	16.14	15.16	16.24	16.04	16.8	17.1	17.2
Day 8	20.66	21.3	18.92	21.6	20.16	22.46	20.5	22.3
Day 11	24.8	25.8	23.6	25	22.8	27.4	23.7	26.1
Day 15	25	27.6	24.2	27.6	25	28.4	24.7	27.9
Day 18	25.6	29.2	25.2	28.8	25.6	29.8	25.5	29.3
Day 21	26.3	30.36	25.88	29	26.08	30.52	26.1	29.9

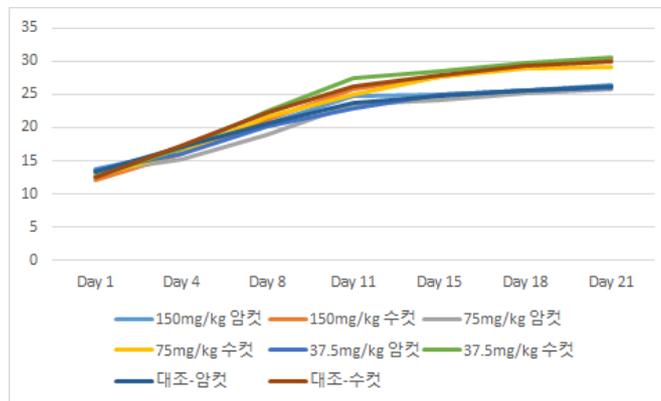
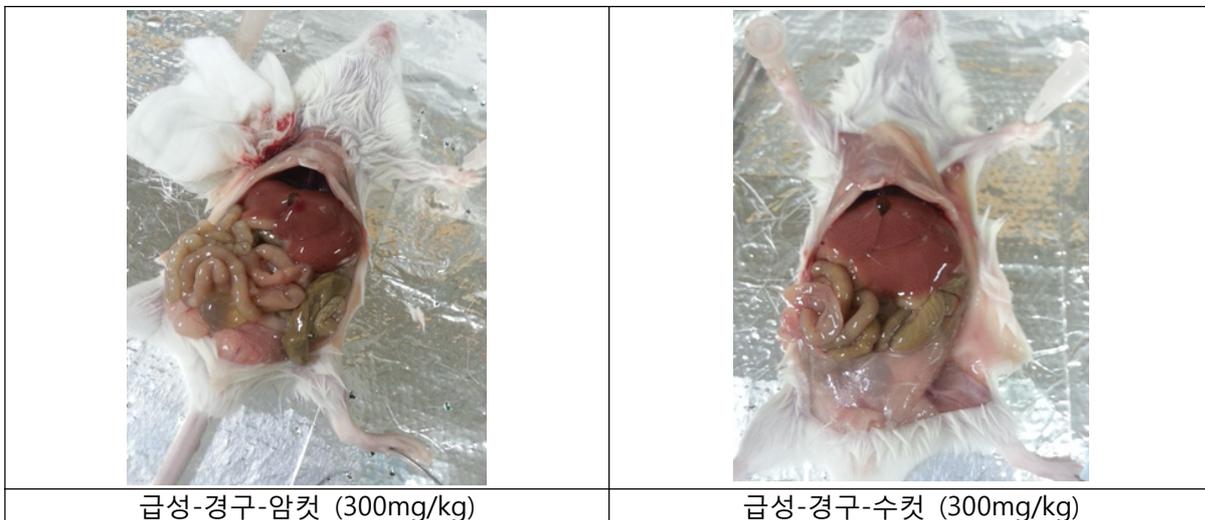


그림 75. 아급성독성시험 투여 용량별 체중 변화 그래프

○ 부검 소견

- 급성-복강-암컷 그룹을 제외한 모든 그룹에서 외견 관찰 및 개흉, 개복 후 내장 기관 관찰 시 뚜렷한 육안적 병리변화를 관찰할 수 없었다. 급성-복강-암컷 그룹의 경우 간 관찰 소견에서 약간의 지방간(Fatty liver) 및 부종성(Edema) 소견을 보였다 (그림 76).



급성-경구-암컷 (300mg/kg)

급성-경구-수컷 (300mg/kg)



급성-복강-암컷 (300mg/kg)



급성-복강-수컷 (300mg/kg)



아급성 암컷 (150mg/kg)



아급성 수컷 (150mg/kg)

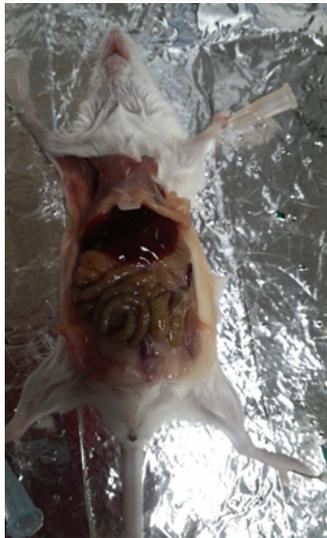




그림 76. 급성 아급성 독성 시험 부검 사진

(3) 결론

- 본 시험의 급성 독성 시험의 경우, 경구 및 복강 투여의 경로로 BAMTI-299를 300 mg/kg 용량으로 ICR 마우스에 단회 투여한 결과, 경구 투여군에서 2주 간, 복강 투여군에서 1주 간 폐사가 발생하지 않았으며, 체중 역시 대조군 및 일반적으로 알려진 ICR 마우스의 성장 속도와 유의적인 차이가 발생하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 그 외에 소화기계, 호흡기계, 신경계, 안과적, 근골격계 등과 관련된 육안 관찰 가능한 임상 징후도 나타나지 않았다. 다만 복강 투여군 실험 종료 부검 결과 암컷 5두 중 2두, 수컷 5두 중 3두에서 간의 지방성 및 부종성 변화가 관찰되었다. 과량을 비경구 경로로 투여

할 시 간 독성이 나타날 수 있음을 시사하나, 이로 인한 폐사나 체중 감소, 기타 임상증상이 관찰되지는 않은 것으로 미루어보아 해당 투여 용량에서 심각한 독성을 갖는다고 단정할 수는 없다.

○ 아급성 시험에서는 37.5 mg/kg, 75 mg/kg, 150 mg/kg 경구 투여 그룹 모두에서 폐사 및 임상증상을 관찰할 수 없었다. 부검소견 및 체중 역시 대조군 및 일반적 ICR 마우스의 경우와 차이를 보이지 않았다.

○ 위와 같은 실험 결과를 종합하였을 때, 화합물 BAMTI-299는 마우스에서의 독성이 낮다고 판단되며, 타겟 동물인 돼지에서도 독성을 가질 확률이 높지 않음을 추정할 수 있다.

바. AMTI/BAMTI 화합물의 in vitro/in vivo 유효성 평가

(1) AMTI/BAMTI 선도물질의 세포내 억제효과 시험

○ 3Dpol inhibitor로서 항바이러스제 선도물질을 스크리닝하기 위하여 돼지 신장세포 유래 IBRS-2 세포에 화합물을 처리하고 FMDV, O/SKR/2002 주를 감염시킨 후 MTS assay를 이용하여 CC₅₀, EC₅₀, selectivity index (SI)를 구하였다. Ribavirin과 T-1105는 구제역바이러스 억제효과가 있는 것으로 알려진 화합물로 대조 물질로 사용하였다. 그 결과 일부 물질에서는 세포가 모두 파괴되는 현상을 보여 구제역바이러스 억제 효과를 관찰할 수 없었으나, 효과를 보이는 나머지 물질의 SI를 비교한 결과 BAMTI-147, BAMTI-237 화합물이 비교적 높은 값을 나타내었다 (표 25).

표 25. FMDV, O/SKR/2002에 대한 AMTI, BAMTI 화합물의 억제 효과

Agent ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	EC ₅₀ (μM) ^c	Selectivity Index (CC ₅₀ /EC ₅₀)
Ribavirin	29070.0 ± 3125.4 ^d	1367.0 ± 16.9	21.2
T-1105	500.2 ± 17.47	346.95 ± 156.6	1.4
BAMTI 147	245.7 ± 6.65	15.2 ± 4.8	16.1
BAMTI 237	102.7 ± 2.3	19.2 ± 0.3	5.3
BAMTI 250	267.7 ± 3.2	106.9 ± 5.1	2.5
AMTI 59	95.1 ± 16.1	65.1 ± 8.5	1.5
AMTI 113	73.3 ± 14.5	33.2 ± 5.2	2.2
AMTI 41	191.2 ± 4.5	153.1 ± 18.0	1.2
AMTI 108	178.2 ± 16.1	50.7 ± 0.2	3.5
AMTI 110	95.2 ± 6.3	26.5 ± 0.6	3.6
BAMTI 225	163.9 ± 37.1	67.9 ± 7.2	2.4
BAMTI 239	288.1 ± 3.0	169.2 ± 62.4	1.7
BAMTI 246	236.6 ± 2.7	149.6 ± 16.7	1.6

^a IBRS-2 세포에 100 TCID₅₀ 의 FMDV, O/SKR/2002을 1시간 동안 감염시킨 뒤 배양액을 제거하고 약물을 처리하였다.

^b control value를 기준으로 정상세포가 50%가 되는 세포독성 농도

^c control value를 기준으로 CPE가 50%가 되는 유효 농도

^d 데이터는 평균값 ± 표준편차 (SD)를 나타낸다.

(2) AMTI/BAMTI 선도물질의 구제역바이러스 혈청형 별 효과 시험

(가) CPE 측정 및 SI 계산

○ FMDV, O/SKR/2002 strain에 대한 효과가 입증된 BAMTI-147, BAMTI-237에 대하여 구제역의 7가지 혈청형의 다양한 strain에 대한 효과를 테스트 하였다. 여기에는 2010년 발생주인 O/Andong/SKR/2010 strain을 포함시켰다.

표 26. BAMTI-147, BAMTI-237 의 7가지 혈청형 구제역바이러스에 대한 억제효과

Agent ^a	Strains of FMDV	CC ₅₀ (μM) ^b	EC ₅₀ (μM)	Selectivity Index (CC ₅₀ /EC ₅₀)
BAMTI-147	O/Andong/SKR/2010	245.7 ± 6.6 ^b	30.6 ± 0.6	8.0
	A22/IRQ 24/64		5.1 ± 1.5	47.8
	Asia 1/ MOG/05		13.2 ± 2.6	18.6
	C3/Resende		119.2 ± 20.2	2.1
	SAT1/BOT 1/68		191.6 ± 0.5	1.3
	SAT2/ZIM 5/81		11.6 ± 4.9	21.1
	SAT3/ZIM 4/81		106.6 ± 3.2	2.3
BAMTI-237	O/Andong/SKR/2010	102.6 ± 2.3	23.5 ± 1.4	4.4
	A22/IRQ 24/64		3.2 ± 0.3	32.2
	Asia 1/ MOG/05		5.4 ± 0.04	19.1
	C3/Resende		23.5 ± 6.7	4.4
	SAT1/BOT 1/68		39.6 ± 4.1	2.6
	SAT2/ZIM 5/81		24.2 ± 1.7	4.2
	SAT3/ZIM 4/81		29.3 ± 1.7	3.5

^a IBRS-2 세포에 100 TCID₅₀ 의 FMDV, O/SKR/2002을 1시간 동안 감염시킨 뒤 배양액을 제거하고 약물을 처리하였다.

^b CC₅₀는 7가지 혈청형의 구제역바이러스 감염에 사용했던 IBRS-2 세포에서 측정되었다.

○ BAMTI-147과 BAMTI-237 모두 7가지 혈청형에 억제 효과를 보였다. 그러나 억제 효율에는 차이를 보여 아시아 지역에서 주로 발생하는 혈청형인 O, A, Asia1 형에서는 높은 SI를 나타냈고 O, A, Asia1 형의 대표 strain 중 A22/IRQ 24/64에 대한 효과가 가장 우수하였다. 그러나 BAMTI-147을 처리한 세포에서는 SA 2에 대한 억제효과도 우수하게 나타난 것을 제외하고 C, SAT1, SAT2, SAT3 형에서는 O, A, Asia1 형에서보다 비교적 낮은 SI를 나타냈다. 2가지 약물을 비교하였을 때 BAMTI-237이 더 낮은 농도에서 세포독성을 나타내고, 억제효과를 나타내는 유효 농도도 더 낮은 양상을 보였다 (표 26).

(나) Real-time PCR 분석

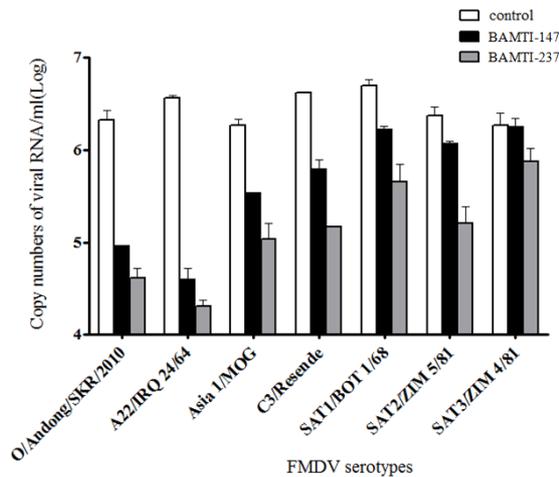


그림 77. 50 μ M 의 BAMTI-147과 BAMTI-237의 구제역 7가지 혈청형에서의 효과 비교

○ IBRS-2 세포는 100 TCID₅₀ 의 구제역바이러스를 1시간 동안 감염시킨 뒤 배양액을 제거하고 약물을 처리하였다. 48 시간 후 배양액을 수거하여 RNA 추출과 real-time PCR을 실시하였다. Error bar는 표준편차 (SD)를 나타낸다.

○ 7가지 혈청형에서의 BAMTI-147 과 BAMTI-237 50 μ M 농도에서의 구제역바이러스에 대한 증식 억제 정도를 Real-time PCR로 분석한 결과, BAMTI-147 처리군에서 SAT3를 접종한 군을 제외한 모든 혈청형에서의 억제 효과가 우수하였으나 ($P < 0.05$, t-test) 이중 O형과 A형에 대한 억제 효과가 비교적 뛰어난 것으로 나타났다. 상대적으로 SAT형에 대한 억제효과는 낮아 좀 더 높은 농도의 약물 처리가 필요할 것으로 예상되었다. 2가지 약물을 비교하면 BAMTI-237에서 동일한 농도 (50 μ M) 처리 시 BAMTI-147 보다 구제역바이러스 억제 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 이것은 표 26에서 BAMTI-237에서의 EC₅₀가 상대적으로 낮은 결과와도 일치하였다 (그림 77).

(다) 약물의 혈청형별 예방효과 실험

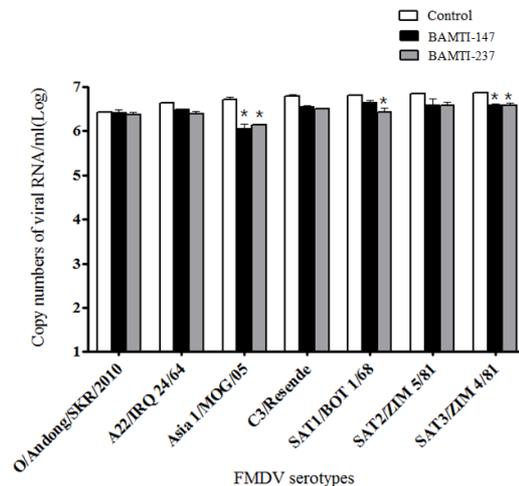


그림 78. 100 μ M BAMTI-147과 BAMTI-237 의 구제역 7가지 혈청형에서의 예방적 효과 비교

- IBRS-2 세포에 화합물을 처리하고 18시간 후 배양액을 제거, 100TCID₅₀의 구제역바이러스를 1시간 동안 감염시켰다. 배지를 갈아준 후 48시간 동안 정치시키고 배양액을 수거하여 RNA 추출과 real-time PCR을 실시하였다. Error bar는 표준편차 (SD)를 나타낸다.
- BAMTI-147 과 BAMTI-237을 18시간 전에 세포에 먼저 적용한 뒤 구제역바이러스를 접종한 경우 약물의 농도를 2배 높였음에도 불구하고 구제역바이러스 접종 1시간 후 적용한 경우보다 억제 효과가 적게 나타남을 확인하였다 (그림 78). Ribavirin이나 T-1105의 경우 nucleoside 계열 항바이러스제로 세포 내에서 다단계 효소반응에 의해 triphosphorylation되어 약효를 발휘하고, 이렇게 변환된 형태는 다시 세포 밖으로 유출되지 않아 세포 내에 일정 농도가 유지된다. 그러나 BAMTI 계열의 화합물은 세포에 들어가도 변환되지 않고 세포 내외부에서 동적 평형상태를 유지하게 된다. 배양액 제거 시 세포 안에 있던 BAMTI 화합물은 세포 외부로 유출되고 평형상태를 유지하게 되어 효과를 나타내는 농도 이하로 희석되므로 약효가 나타나지 않은 것으로 설명할 수 있다.

(3) AMTI/BAMTI 선도물질의 포유마우스 억제효과 시험

(가) 실험 방법

- 선도물질의 포유마우스에서의 구제역 방어 효능 및 적정 농도를 선정하기 위하여 7일령 포유마우스에 ribavirin, T-1105, BAMTI-147 화합물 및 vehicle (PBS)을 0.1 mg 복강접종 하였다. 6시간 뒤 구제역바이러스 125LD₅₀ (O/SKR/2002)를 복강접종 하였다. 최초 접종 3일 후에 동일 양의 약제를 1회 투여하였다. 포유마우스는 5일 간 생존율을 모니터링 하였다 (그림 79A).
- 0.025, 0.05, 0.1, 또는 0.2 mg의 BAMTI-147과 vehicle (PBS)을 복강접종하고 6시간 뒤 구제역바이러스 125LD₅₀ (O/SKR/2002)를 복강접종 하였다. 다음날부터 4일 간 매일 BAMTI-147을 농도별로 최초접종과 동일 양을 투여하고 5일 간 생존율을 모니터링 하였다 (그림 79B).
- 0.05 mg의 BAMTI-147, BAMTI-237, BAMTI-250과 대조약물 ribavirin, T-1105 및 vehicle (PBS)을 복강접종하고 6시간 뒤 구제역바이러스 125LD₅₀ (O/SKR/2002)를 복강접종 하였다. 3일 후 최초접종과 동일 양으로 1회 투여하고 5일 간 생존율을 모니터링 하였다(그림 79C).
- 0.005 mg의 BAMTI-147, BAMTI-237과 대조약물 ribavirin, T-1105 및 vehicle (PBS)을 복강접종하고 6시간 뒤 구제역바이러스 125LD₅₀ (O/SKR/2002)를 복강접종 하였다. 3일 후 0.05mg 의 약물을 1회 투여하고 5일 간 생존율을 모니터링 하였다(그림

79D).

(나) 실험 결과

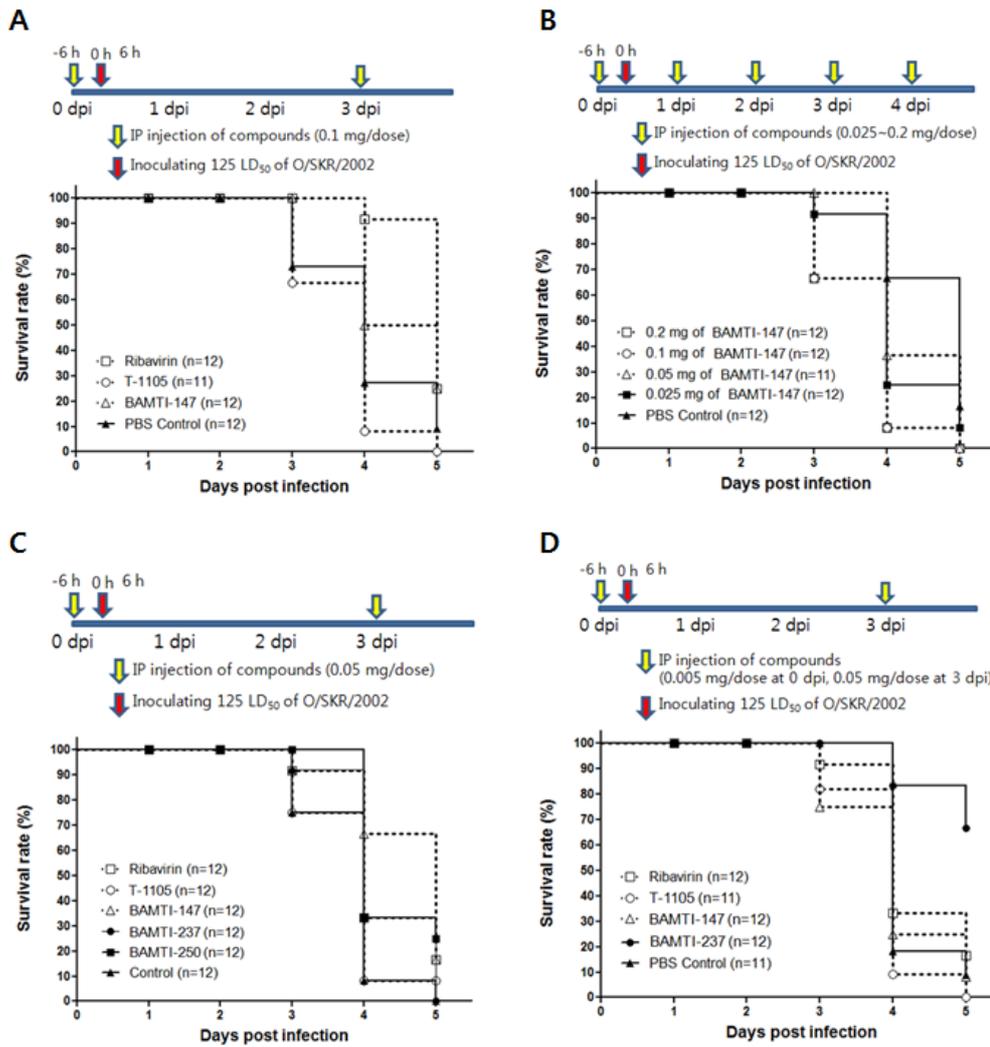


그림 79. AMTI/BAMTI 선도물질의 포유마우스 억제효과 시험 결과

○ 구제역 공격접종 6시간 전 (예방적 투여)에 마리당 0.1 mg의 BAMTI-147 투여군은 PBS control 그룹보다 향상된 생존율을 보였다 (그림 1. $P < 0.05$, log rank test). 또한 구제역 공격접종 3일째와 4일째의 생존율을 비교하였을 때, BAMTI-147 그룹은 비교 그룹인 T-1105 보다는 높고 Ribavirin 보다는 다소 낮은 생존율 (4dpi : 50%)을 보였다 (그림 79A).

○ BAMTI-147에 대한 억제효과 및 독성을 알아보기 위해 농도별로 접종 실험을 실시한 결과 구제역바이러스 접종 4일째부터 독성을 나타내어 PBS control 보다 낮은 생존율을 나타내었다. 다만 항바이러스제 접종 3일째까지는 마리당 0.05 mg 투여군에서 가장 높은 생존율을 관찰할 수 있었다. 마우스 실험에서 접종 빈도수와 농도가 증가함으로 인하여 독성 또한 같이 증가하는 것으로 보였다 (그림 79B).

○ 3가지 항바이러스제 후보물질에 대한 마우스 실험을 마리당 0.05 mg 접종 2회로 실시하였다. 그 결과 이 농도에서는 BAMTI-147 투여군의 생존율 (67%)이 가장 높았고 Ribavirin (33%) 보다 높은 생존율을 보였다. 따라서 B의 결과에서는 BAMTI-147의 독성이 다소 존재했던 것으로 예상되었다. 그 외 BAMTI-250 의 효과도 다소 존재함이 확인되었다 (그림 79C).

○ 세포에서 가장 효과가 우수하였던 BAMTI-147과 BAMTI-237 에 대한 마우스 실험을 농도를 낮추어 실시하였다. 그 결과 BAMTI-237 투여군의 생존율이 다른 비교군에 비해 월등히 높았고, 특히 구제역 공격접종 5일째에도 67% 의 생존율을 유지하였다. 따라서 BAMTI-237이 효력 (potency) 측면에서 BAMTI-147 뿐만 아니라 ribavirin, T-1105 보다 우수함이 확인되었다 (그림 79D).

(4) BAMTI-299 화합물의 성체 마우스에서 바이러스 억제효과 실험

○ 포유마우스는 약제해독 기능을 담당하는 여러 가지 효소들이 부족하여 약제의 독성에 민감하게 반응하므로, 구제역바이러스 감염에 의한 폐사인지 약제 독성에 의한 것인지 구분이 모호한 경우가 있다. 따라서 100LD₅₀ 용량의 Asia1/Shamir 구제역바이러스에 감수성을 나타내는 생후 7주령 C57BL/6 성체 마우스를 이용하여 약제의 효능 평가를 실시하기로 하였다.

○ BAMTI-299는 BAMTI-237과 화학구조는 같으나 염산염 형태로 제조하여 화학적 안정성을 향상시킨 약제이다.

(가) 실험 방법

○ 7주령 마우스에 BAMTI-147와 BAMTI-299를 비롯한 약제를 3 mg 씩 복강접종 하고 6시간 뒤 100LD₅₀ Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종 하였다. 처음 약제 접종 시간을 기준으로 12시간 간격 3일 간 동일 양을 투여하고 5일 간 생존율을 모니터링 하였다 (그림 80A).

○ 7주령 마우스에 BAMTI-299를 1, 1.5, 3, 6 mg 씩 복강접종 하였다. 6시간 뒤 구제역 바이러스 100LD₅₀ Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종 하였다. 처음 약제 접종 시간을 기준으로 2일 간 총 5회 동일 양을 투여하고 5일 간 생존율을 모니터링 하였다 (그림 80B).

(나) 실험 결과

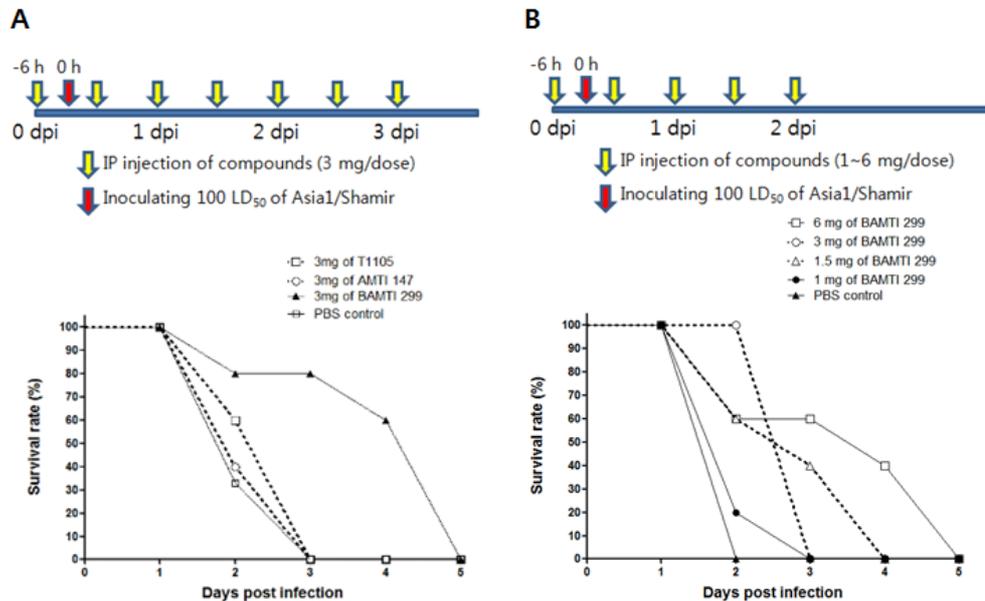


그림 80. BAMTI-299 화합물의 성체 마우스에서 바이러스 억제효과 실험 결과

○ 구제역 공격접종 6시간 전 (예방적 투여)에 마리당 3 mg을 투여하였을 때, 4일째까지 BAMTI-299 투여군은 다른 그룹 및 PBS control 그룹보다 생존율이 높았다. 그러나 5dpi에 모든 마우스가 폐사한 것으로 보아 BAMTI-299가 구제역에 대해 항바이러스 효과는 높지 않다고 판단되었다 (그림 80A).

○ 구제역 공격접종 6시간 전 (예방적 투여)에 마리당 6 mg을 투여하였을 때 다른 농도로 투여한 그룹보다 마우스의 생존율이 높았다. 3dpi와 4dpi를 비교하였을 때, BAMTI-299의 투여 농도를 높일수록 생존을 연장시키지만 1dpi와 2dpi 사이(생존율 약 40% 감소)에 마우스의 폐사가 일어나는 것으로 보아 초기 구제역 항바이러스 효과는 낮은 것으로 판단되었다 (그림 80B).

(5) BAMTI-337 화합물의 성체 마우스에서 바이러스 억제효과 실험

○ BAMTI-337은 BAMTI-237의 화학적 안정성 향상을 위하여 구조 변경하였으며 CPE 억제 효과가 높고, SI 값이 상대적으로 높아 세포 독성이 적은 장점이 있어 후보물질로 고려, 동물 효능평가를 수행하였다.

(가) 실험 방법

○ 7주령 마우스에 BAMTI-337을 3 mg 씩 복강접종 하였다. 6시간 뒤 50LD₅₀ Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종 하였다. 바이러스 접종 용량은 화합물의 효과를 잘 드러나게 하기 위해 앞선 실험에 비해 반으로 줄였다. 접종 용량이 반으로 줄어도 PBS control 그룹에서 3일 만에 전부 폐사하는 것으로 보아 실험하기에 충분한 바이러스양임을 알 수 있다. 처음 화합물 접종 시간을 기준으로 12시간 간격 3일 간 동일

양을 투여하였다. 마우스는 7일 간 생존율을 모니터링 하였다 (그림 81).

(나) 실험 결과

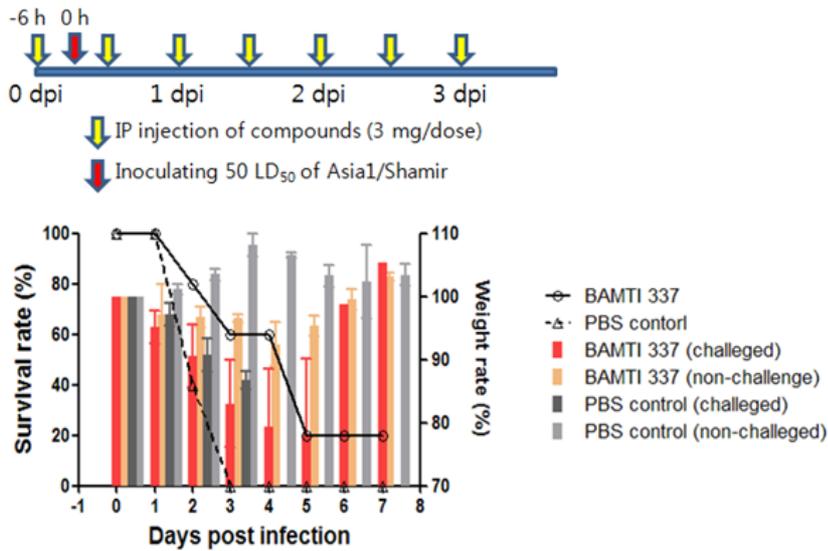
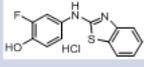
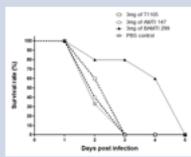
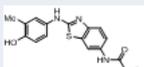
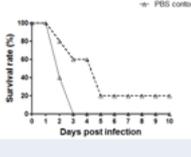


그림 81. BAMTI-337 화합물의 성체 마우스에서 바이러스 억제효과 실험 결과

○ 구제역 공격접종 후 3~4일째까지 PBS control 그룹은 전부 폐사한 반면, BAMTI-337 을 3 mg 투여한 그룹은 60% 까지 생존율을 유지시켰으나 5일이 지나서는 생존율이 20%로 감소하였다. 생존한 마우스는 100% 완치되었으나 생존율을 고려할 때 약제의 치료 효과는 기대수준을 만족하지 못하였다 (그림 81).

(6) 임상 후보 물질로서 BAMTI 시리즈 화합물의 한계

표 27. BAMTI-299와 BAMTI-337의 약물성 지표

Structure	In vitro	Physicochem.	DMPK	Toxicity	In vivo efficacy
 BAMTI-299	<ul style="list-style-type: none"> Enzyme -IC₅₀ = 0.5uM on 3Dpol -IC₅₀ = 46 uM on Lucif O/SKR/2002 -EC₅₀ = 19 uM -CC₅₀ = 120 uM SI = 5.3 	<ul style="list-style-type: none"> pKa : 2.90/9.53 LogP : 2.77 Sk : 500 uM < (148 ug/ml) Seq : 297 uM (88 ug/ml) PAMPA : -4.20 Stable (37°C, 24h, H₂O) 	<ul style="list-style-type: none"> F : 0.3% t_{1/2} = 0.5h Metabolic stability (S9 fraction) : t_{1/2} < 10 min 	<ul style="list-style-type: none"> Mouse acute (300 mpk) Mouse subacute (< 150 mpk) → Nontoxic 	<ul style="list-style-type: none"> Treatment : C57BL/6, 120 mpk, twice per day for 3d Infection : Asia1/Shamir, 100LD₅₀ Result : 생존 지연, 3dpi (80%) cf. control 0% at 3 dpi, 투여 중단 시 폐사, 치료제로서 효과 미미 
 BAMTI-337	<ul style="list-style-type: none"> Enzyme -IC₅₀ = 2.9uM on 3Dpol -IC₅₀ = 55uM on Lucif O/SKR/2002 -EC₅₀ = 7.6 uM -CC₅₀ = 35.1uM SI = 4.6 	-	-	-	<ul style="list-style-type: none"> Treatment : C57BL/6, 120 mpk, twice per day for 3d Infection : Asia1/Shamir, 100LD₅₀ Result : 생존 지연, 3dpi (60%) cf. control 0% at 3 dpi, 투여 중단 시 폐사, 치료제로서 효과 미미 

- BAMTI-299는 BAMTI-237의 염산염 형태로 화학적 안정성을 높인 화합물로서 0.5 μ M의 효소 억제활성을 갖으며 O/SKR/2002 형 바이러스에 대해 19 μ M의 CPE 억제 효과와 5.3의 SI를 갖는다. 산도, 지질도, 용해도 측면에서 약물의 물리화학적 성질이 유리하며 세포 투과성도 높다. 또한 300 mg/kg 용량의 소동물 급성독성, 150 mg/kg 이하 용량의 소동물 아급성독성 시험에서 뚜렷한 독성증상이 나타나지 않아 임상후보물질로 고려되었다. 그러나 mouse 및 minipig 간 (liver)의 S9 fraction을 이용한 2상 대사안정성 시험에서 반감기가 10분 이내로 짧고, 경구 투여 후 약물이 혈액으로 반영되는 비율인 생체이용률 (bioavailability)이 0.3%로 매우 낮으며, 체내반감기가 30분 수준으로 짧아 약물로 개발하기에 한계가 보였다. 특히 Asia1/Shamir 구제역바이러스에 감염된 C57BL/6 성체 마우스에 150 mg/kg, 3일 동안 2회씩 복강 투여하여 마우스의 생존율을 관찰한 결과 예상과는 달리 초기 방어 효과가 떨어져 3일 간 약물 투여 후 약물 투여를 중단하면 바이러스 증식을 막지 못하여 5일째 거의 폐사하는 실험결과를 얻었다.
- BAMTI-337은 B section에 amide 결합을 갖는 화합물로서 상대적으로 3Dpol 저해효과 ($IC_{50}=2.9 \mu$ M)는 낮았으나 SI는 BAMTI-299와 유사했고 CPE 억제효과 ($EC_{50}=7.6 \mu$ M)는 오히려 높아 동물대상 실험을 계획하였다. Asia1/Shamir 구제역바이러스에 감염된 성체마우스를 대상으로 바이러스 접종 용량을 반으로 줄여 위와 동일한 실험 방법으로 마우스의 생존율을 관찰한 결과 BAMTI-299의 실험결과와 유사하게 약물 투여 중단 시 더 이상 항바이러스 효과를 나타내지 못하여 5일째 거의 폐사하는 결과를 얻었다.
- BAMTI 시리즈 중에서 최종 선택된 두 화합물 BAMTI-299와 BAMTI-337이 구제역 바이러스 감염된 마우스의 생존율을 증가시킬 수 있는지를 확인하고 약물개발에 필요한 다양한 연구를 수행하여 개발 가능성을 타진하였으나, 바이러스 증식 억제를 위한 체내 유효농도를 꾸준히 유지할 수 없어 기대수준의 치료효과를 나타내지 못하는 한계점에 다다르게 되었다. 이는 화합물 자체가 가진 PK 프로파일의 내재적 한계성, 즉 체내반감기가 짧고 구조적으로 각종 대사효소의 작용에 의해 체외배설이 빠르게 진행되는 점에 기인한 것으로 예상된다. 이러한 저조한 PK 프로파일에도 불구하고 체내 유효농도를 유지하기 위해서는 지속적인 약물 투여를 해야 하나, 이는 필드에서 용인되는 실용적 한계범위를 벗어나게 되므로 무리가 있다. 이외의 다른 구조의 BAMTI 화합물도 효능-독성-PK-안정성의 밸런스를 잘 맞춘 좋은 화합물이 없었으므로 BAMTI에 대한 항바이러스제 개발은 중단하기로 결정하였다. 한편으로는 그러한 최악의 PK 프로파일 속에서도 투여기간 중에는 구제역 걸린 마우스의 생존율을 높이고 항바이러스 효과를 나타냈다는 점에서 향후 제형 연구, 전구 약물 개발 등을 통해서 PK 문제를 해결할 수 있다면 구제역 항바이러스제로서 개발이 가능할 것으로 여겨진다.

■ Ribavirin으로부터 유도된 임상후보물질 및 시제품 개발

가. Ribavirin, ribavirin 전구 약물 (prodrug) 개발 및 임상효능평가

(1) Ribavirin과 6-azauridine의 약물 재창출 (drug repurposing) 전략

- Ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide)은 1970년대 HCV 저해제로서 합성된 구아노신 유사체이다 (그림 83). 각종 RNA, DNA 바이러스에 대하여 광범위한 항바이러스 효과를 가지고 있으나, 단독요법으로는 완치를 기대하기 어렵다. 그러나 인터페론과 하루 두 번 경구투여 시 SVR을 30~40% 가량 낮추는 효과가 있어 1998년 인터페론 알파와 병용투여 (1000~1200 mg/day) 조건으로 C형 간염 치료제로서 판매 허가되었다.
- Ribavirin이 세포 내로 들어가면 ribavirin monophosphate (RMP), ribavirin diphosphate (RDP), ribavirin triphosphate (RTP)로 순차적인 인산화과정을 겪게 되며 다음과 같은 작용기전을 통해 약효를 발휘하게 된다 (그림 82).
 - i) Ribavirin은 Th2 (체액성 면역)로부터 Th1(세포성 면역)으로 표현형 전환을 유도하여 인터페론 분비와 염증성 면역반응을 활성화시킨다.
 - ii) RMP는 inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH)를 저해하여 세포내 GTP를 고갈시킨다.
 - iii) 인터페론 의존성 유전자의 발현을 조절한다.
 - iv) RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)에 의한 RTP의 misincorporation을 유도하여 바이러스 복제를 저해한다.
 - v) 잘못 끼어들어간 RTP에 의해 바이러스 유전자의 돌연변이를 유발하여 바이러스 생존율을 저하시킨다.

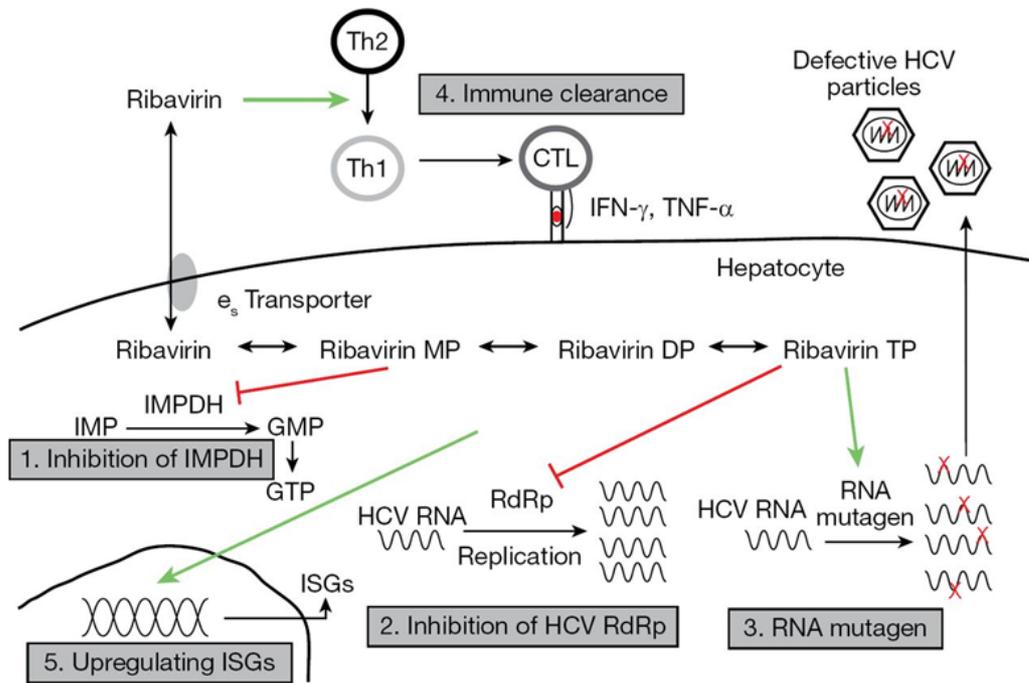


그림 82. Ribavirin의 항바이러스 작용 기전 (Thomas E. 2013. Antivir Chem Chemother)

- 이렇게 다양한 작용기전을 갖는 ribavirin이지만 사람에게 장기간 반복투여는 심각한 부작용을 초래하기도 한다. 대표적인 부작용 사례는 용혈성 빈혈이다. 따라서 인체 적용 시 심장 질환이 있는 환자에는 사용을 금지하고 있다. Ribavirin 자체는 세포표면 핵산 수송체 (CNT 또는 ENT)를 통해 자유롭게 세포 내외부를 왕래할 수 있지만, 인산화된 ribavirin (특히 RTP)은 세포 밖으로 나올 수 없다. 특히 무핵세포인 적혈구세포는 탈인산화효소가 부족하여 RTP가 적혈구에 축적되게 되어 결국 용혈이 일어나고 빈혈이 발생한다.
- Ribavirin은 본 연구팀에서 2012년 발표한 논문 (SM Kim et al. 2012, Antiviral Res)에 언급된 바와 같이 구제역 바이러스에 대한 CPE 억제활성 (EC_{50})이 $27.3 \mu\text{M}$ 로 나타났으며 SI도 35.2를 보여 효능을 나타내는 농도와 독성을 나타내는 농도와의 간격이 큰 항바이러스제로 알려져 있다. 더욱이 경구 투여된 약물이 혈장으로 높은 비율 (생체이용률 : 64%)로 전달되어 약물의 높은 효율을 기대할 수 있으며, 동물대상 독성 평가에서 마우스에 경구 투여할 경우 LD_{50} 이 2 g/kg , 복강 투여시 $0.9\sim 1.3 \text{ g/kg}$ 로서 비교적 안전한 약물로 평가되어 본 과제에 적합한 선도물질로 선정하였다.

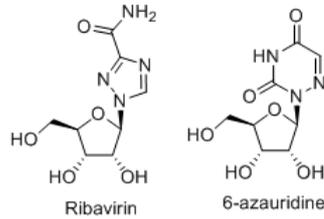


그림 83. Ribavirin과 6-azauridine의 화학구조

- 6-azauridine (그림 83)은 1950~60년에 항종양 활성 물질로 연구되었고 이후 정맥주사 용으로 균상식육종 (fungoid mycosis)에 효과적이라 알려져 있고, Chikungunya virus, Semliki Forest virus, human coronavirus 등 RNA 바이러스의 복제를 억제하는 활성 또한 보고되었다. 경구 투여 시 소장에서 6-azauracil로 변화되어 중추신경계 독성을 일으킨다고 알려져 있다. 본 연구팀의 선행연구 결과, 구제역 바이러스에 대한 항바이러스 활성은 ribavirin의 90 배 이상이며 약동력적 특성상 반감기가 6~8시간으로 유리하고, 동물 독성평가 시 마우스 복강 투여 시 11 g/kg, 개 경구투여 시 3.4 g/kg의 LD₅₀를 가지므로 독성이 낮다고 판단되어 ribavirin과 함께 선도물질로 고려하였다.
- 이상의 두 화합물은 세포수준에서의 구제역 바이러스 증식 억제 효능이 검증되었고, 실제 인체 적용 범용 항바이러스제로 사용 또는 고려되고 있으나 아직 동물 특히 구제역에 걸린 가축에 적용한 사례는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구팀은 두 화합물을 'drug repurposing' 및 대사 전구물질 합성 전략에 근거하여 구제역에 적용하기 위한 연구를 계획하였다.

표 28. Ribavirin과 6-azauridine의 세포내 구제역바이러스 억제활성, 물리화학적 특성, 약동학 및 독성 프로파일

	Ribavirin	6-Azauridine
In vitro	EC50 : 27.3 uM, CC50 : 960 uM (SI, 35)	EC50 : 0.3 uM, CC50 : 11.2 uM (SI, 35)
PhyChem	White crystalline powder Mp. 174-176 °C 142 mg/mL Slightly soluble in alcohol logP: -1.85 log Kow = -1.85	Crystals from ether, ethanol m.p. 158 deg C S: 82.8 mg/L log Kow = -2.14 pKa = 6.63 (pKa: 6.7 /Triacetyl deriv.)
DMPK	cl=26 L/h, F = 64% (human)	Tmax: 2 to 4 hr, T1/2 : 6 to 8 hr
Toxicity	LD50 Rat oral 5.3 g/kg LD50 Mouse oral 2 g/kg LD50 Mouse ip 0.9-1.3 g/kg LD50 Rat ip 2 g/kg	LD50 Cat ip 2.4 g/kg LD50 Dog ip 3.4 g/kg LD50 Mouse ip 11 g/kg LD50 Rat ip 9.4 g/kg LD50 Mouse oral 7.8 g/kg /6-AZAURIDINE TRIACETYL LD50 Rat oral 12.0 g/kg /6-AZAURIDINE TRIACETYL
Price	1g/20,000원	1 g/25,000원
Manuf.	Synthesis: Acid-catalyzed fusion of methyl 1,2,4-triazole-3-carboxylate and 1,2,3,5-tetra-O-acetyl--d-ribofuranose or 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl--d-ribofuranose yields blocked methyl ester nucleosides. Ribavirin is obtained after treatment of the blocked nucleoside with methanolic NH3	BIOSYNTHESIS BY E COLI IN PRESENCE OF 6-AZAURACIL.
Ther. Uses	Antimetabolites; Antiviral Agents	Rabies virus (in vitro/vivo) Paramyxovirus

(2) 선도물질 선정을 위한 예비연구

① 알려진 항바이러스제의 구제역 억제효과 비교 연구

○ Ribavirin과 6-azauridine은 효소수준 활성 저해 효과에서 큰 차이를 보였을 뿐 선택성 지수 (SI=35), 독성 (LD₅₀, 2~3 g/kg)과 물리화학적 특성이 druglikeness에 부합되는 측면에서 상당히 유사성을 나타냈다. 본 연구팀은 두 화합물의 선도물질 가능성 여부를 확인하기 위해 두 화합물 외에 일본에서 개발한 경쟁약물인 T-1105, 재조합 adenovirus 등에 대한 구제역바이러스 증식억제 효과를 C57BL/6 성체 마우스를 대상으로 테스트하여 비교하였다.

○ 실험 방법 : 성체 마우스에 1일 2회 3일 동안 ribavirin을 비롯한 약제를 각각 3 mg/200 μl 복강접종 하였다. 처음 약제가 투여되고 6시간 후에 100LD₅₀의 Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종 하였다. 양성 대조군으로서 5X10⁸TCID₅₀의 재조합 adenovirus Ad-3siRNA, Ad-IFN-α_γ를 구제역바이러스 접종 하루 전에 근육접종 하고 Day 0에 50LD₅₀의 Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종 하였다. 모든 마우스는 10일 간 생존율을 모니터링 하였다.

○ 실험 결과 : 10일까지 생존율을 모니터링 한 결과, Azauridine과 T-1105는 negative control 그룹과 유사하게 3일 만에 모두 폐사하여 같은 용량의 다른 약제에 비해 마우스 모델에서 구제역 방어 효과가 없음을 확인하였다. Adenovirus 중 Ad-IFN_{αγ}를 접종하였을 때 생존율은 40%, Ad-3siRNA는 80%를 보였다. Ribavirin을 3 mg 씩 1일 2회 0일에서 3일까지 투여하였을 경우, 모든 마우스가 생존하였다 (그림 84A).

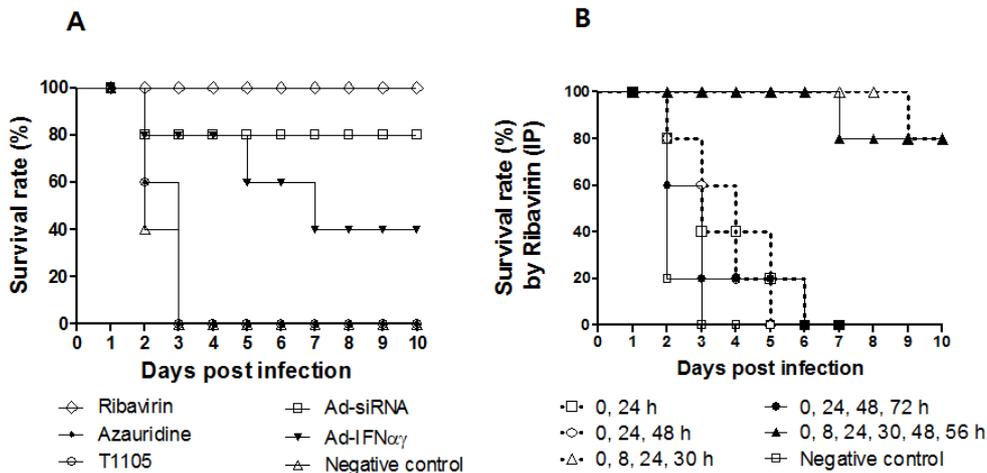


그림 84. 알려진 항바이러스제의 구제역 억제효과 비교 실험 결과 (A) 및 ribavirin의 투여 횟수 별 생존율 비교 실험 결과 (B)

② Ribavirin 투여 회수 별 생존율 비교 연구

- 실험 방법 : 다섯 개의 그룹으로 나누어 1.5 mg의 ribavirin을 투여시간을 달리하여 성체마우스에 복강접종 하였다. 첫 번째 그룹은 0, 24 시간에, 두 번째 그룹은 0, 24, 48 시간에, 세 번째 그룹은 0, 8, 24, 30 시간에, 네 번째 그룹은 0, 24, 48, 72 시간에, 다섯 번째 그룹은 0, 8, 24, 30, 48, 56 시간에 복강접종 하였다. Negative control을 포함한 모든 그룹은 처음 ribavirin이 투여되고 6시간 후에 100LD₅₀의 Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종 하였다. 마우스는 10일 간 생존율을 모니터링 하였다.

- 실험 결과 : 하루에 한번 접종한 그룹 (0, 24 h/ 0, 24, 48 h/ 0, 24, 48, 72 h)들은 1일에서 4일 사이에 마우스의 생존율이 급격하게 감소하여 5~6일에 모두 폐사하였다. 1일 2회 ribavirin 접종 그룹 (0, 8, 24, 30 h/ 0, 8, 24, 30, 48, 56 h)은 최종 생존율이 80%가 관찰되었다. Ribavirin 투여 시간을 달리하여 성체 마우스에 접종한 결과 1일 2회 2일 이상 접종해야 80% 이상의 생존율을 보였다. 이와 같은 결과로 미루어 바이러스 감염 초기에 ribavirin을 집중 투여하여 바이러스의 증식을 억제하여야 구제역 치료효과가 있음을 알 수 있다 (그림 84B).

- T-1105 개발자들이 2008년 EU-FMD 학회에서 발표한 자료에 따르면 T-1105의 방어효과는 O/JPN/2000 바이러스에는 효과가 뛰어난 반면, 이보다 병원성이 높은 O/Taiwan/97 바이러스에서는 'partial protection' 하는 결과에 머무르고 있다 (그림 85). 본 연구팀의 실험결과에서도 T-1105는 우리나라에서 많이 발생하고 있는 O형 바이러스 (O/SKR/2002, O/Andong/SKR/2010)에 대한 세포 실험에서 거의 항바이러스 효과를 나타내지 못하였다 (표 29, 예비실험결과). 뿐만 아니라 Asia1 형 바이러스 (Asia1/Shamir/89)에 대하여 거의 방어효과를 나타내지 못하였다 (그림 84A). 반면 ribavirin은 A, O, Asia1 형 등 우리나라에서 많이 발생하고 있는 구제역바이러스 혈청형에 대한 예비실험 결과 EC₅₀=20~60 μM, SI=30~90 정도로 고무 효과를 나타내고, 예비 동물실험에서 효과가 뛰어나 3 mg/day 3일 간 복강투여로 100% 방어가 가능하였다 (그림 84A). 이러한 실험결과를 바탕으로 ribavirin과 약물성 향상을 위한 유도체 및 전구 약물 (prodrug)을 탐색하고 구제역 항바이러스제로서 적용하기 위한 연구를 진행하였다.

Summary of clinical signs in O/JPN/2000 infection										Summary of clinical signs in O/Taiwan/97 infection											
Pig No.	Days post infection									Pig No.	Days post infection										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
T-1105 Admin.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T-1105 Admin.	2	-	+	+	+	++	++	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-		3	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-		4	No Lameness / No Difficulty in standing								
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-		5	-	+	+	+	++	++	-	-	-
5	-	-	+	++	++	++	++	++	++	Non-admin.		1	+	+	++	++	++	++	++	++	++
6	-	-	-	+	+	++	++	++	++		6	+	+	++	++	++	++	++	++	++	

+ Creation of vesicular lesion
 ++ Rupture of vesicle
 Lameness / Difficulty in standing

그림 85. T-1105의 두 가지 지역형 바이러스에 대한 돼지에서의 방어효과 (Sakamoto K 등 2008 EU-FMD 학회 발표자료에서 발췌)

(3) Ribavirin 전구 약물의 개발

(가) Ribavirin 전구 화합물 합성

○ Ribavirin은 마우스 대상 구제역 바이러스의 항바이러스 활성이 확인되었으나 1주 간 투여 후 2주 동안 생존율을 관찰한 결과 투여가 종료되는 7일 이후로 생존율이 감소하는 현상이 발견되었다. 이에 ribavirin의 반감기와 흡수율, 생체이용률을 증가시켜 약물의 약효성이 일정기간 유지되는 약물을 개발하고자 전구 약물을 설계하고 합성하였다 (그림 86).

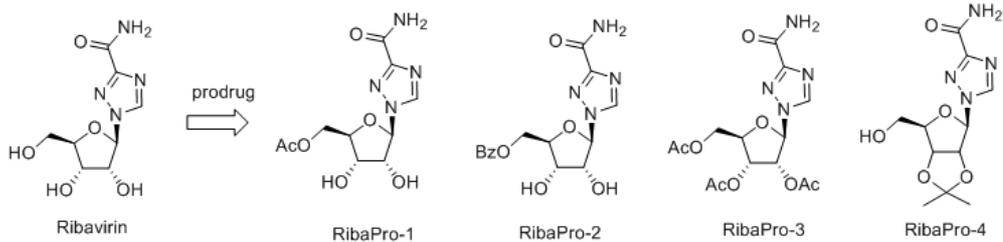


그림 86. Ribavirin과 ribavirin 전구 화합물 (RibaPro)의 구조

○ Ribavirin의 친지질도를 나타내는 logP값은 -1.85로서 소수성보다 친수성이 큰 물질이다. 친수성 약물의 위장관 내 낮은 흡수율은 전구약물을 연구하는 주요한 이유로서 친수성 치환체를 소수성 치환체로 바꾸는 연구를 수행하였다. RibaPro-1, 2, 3, 4는 아래 그림과 같은 화학적 합성법을 이용하여 1차 alcohol을 ester로, 두 개의 2차 alcohol을 acetonide로 전환하였다 (그림 87).

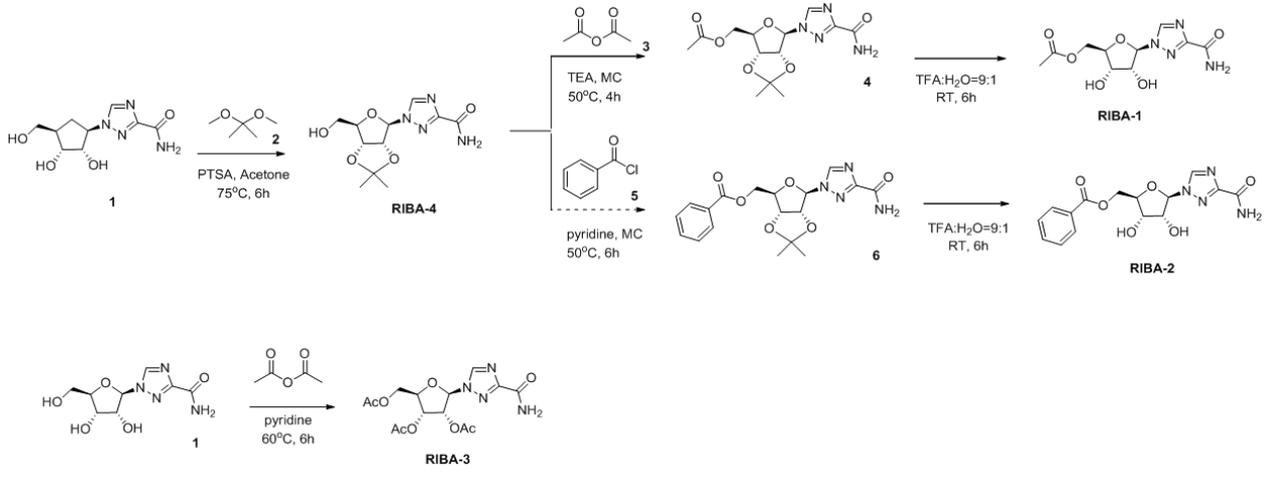


그림 87. Ribavirin 전구 약물 합성방법

(나) Ribavirin 전구 화합물의 세포내 바이러스 억제효과 시험

○ 실험 방법 : Ribavirin 및 전구 화합물의 세포내 바이러스 억제효과 시험을 위하여 FMDV (O/SKR/2002) 주를 100TCID₅₀ 용량으로 1시간 동안 감염시킨 IBRS2 세포에 화합물을 처리하여 48시간 후에 MTS assay를 통해 CPE를 측정하였다. 감염세포에서 화합물에 대한 EC₅₀를 측정하고 비감염세포에도 화합물을 처리하여 CC₅₀를 측정한 다음, SI를 구하였다.

표 29. FMDV, O/SKR/2002에 대한 억제 효과

Agent ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	EC ₅₀ (μM) ^c	Selectivity Index (CC ₅₀ /EC ₅₀)
Ribavirin	1898.50 ± 299.11 ^d	28.09 ± 3.03	67.59
RibaPro-1	6148.00 ± 301.23	128.10 ± 28.00	47.99
RibaPro-2	682.00 ± 4.95	22.37 ± 1.96	30.49
RibaPro-3	18190.00 ± 2701.15	1730.50 ± 160.51	10.51
RibaPro-4	15105.00 ± 91.92	22.37 ± 1.96	675.39
Azauridine	1893.00 ± 154.15	343.70 ± 16.12	5.51
T-1105	341.05 ± 126.50	68.65 ± 2.64	4.97

^a IBRS-2 세포에 100 TCID₅₀ 의 FMDV (O/SKR/2002) 주를 1시간동안 감염시킨 뒤 상층액을 제거하고 약제를 처리하였다.

^b control value를 기준으로 정상세포가 50%가 되는 세포독성 농도

^c control value를 기준으로 CPE가 50%가 되는 유효 농도

^d 데이터는 평균값 ± 표준편차 (SD)를 나타낸다.

○ 실험 결과 : EC₅₀는 RibaPro-2와 4가 22 μM 정도로 가장 높게 나타났고, SI는 RibaPro-4가 가장 높았다. RibaPro-3는 EC₅₀가 1730 μM로 다른 prodrug에 비해 현저

하게 낮은 수치를 기록했는데 그 이유는 ribavirin의 세 개의 hydroxyl 그룹을 보호하고 있는 ester 기를 가수분해하는 esterase 효소가 세포 내에 상대적으로 적게 분포하기 때문에 functional한 ribavirin으로의 환원이 적게 일어나 나타난 현상으로 분석된다. 경쟁 약물인 T-1105는 $EC_{50}=68 \mu M$, $SI=5$ 정도로 ribavirin 및 전구 화합물에 비하여 상대적으로 낮은 활성과 선택성 지수를 보였다. 앞선 Asia1/shamir 바이러스를 이용한 성체 마우스 공격접종 실험 결과와 유사하게 T-1105는 ribavirin 및 그 prodrug보다 in vitro 실험에서 조차 구제역바이러스에 대한 억제효과가 현저히 떨어지는 것을 볼 수 있다 (표 29).

- 한편 이러한 세포실험 결과가 전구 약물의 효능을 정확히 나타낸다고 보기는 어렵다. 왜냐하면 전구 약물의 개념 상 개체 내 대사효소의 생화학반응을 받아야 실제 효과를 나타내는 약물로 변환되기 때문에 세포보다는 동물을 대상으로 한 효능평가가 더 합리적인 데이터를 보여줄 수 있다. 따라서 이 후 실험에서는 동물을 대상으로 한 효능평가 실험을 통해 ribavirin과 전구 약물의 효과를 측정하여 보았다.

(다) 임상후보물질 (Ribavirin 및 전구 약물)의 마우스 공격접종 테스트

① Ribavirin과 Ribavirin 전구 약물의 구제역 억제효과 비교

㉠ 존데를 이용한 경구투여

- 실험 방법 : 앞선 데이터에서 ribavirin 3 mg을 1일 2회, 3일 간 복강 투여 후 7일 간 생존율 100%를 유지하였는데 이러한 효과가 경구 투여에서도 유지되는 지 확인하기 위하여 ribavirin과 전구 화합물 4종을 7주령 마우스에 3 mg 씩 존데를 이용하여 경구 투여 하였다. 약물 투여 6시간 뒤 구제역바이러스 50LD₅₀ 용량의Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종 하였다. 처음 약제 접종 시간을 기준으로 12시간 간격 7일 간 동일 양을 경구 투여하고 10일 간 생존율을 모니터링 하였다.

- 실험 결과 : RibaPro-1은 7dpi에 20%, RibaPro-3는 40%의 생존율을 보였으며, 8dpi에서 10dpi까지 생존율이 20%로 감소되었다. RibaPro-3의 7dpi의 생존율이 40%로 관찰되는 것으로 보아 ribavirin보다 효능이 높을 것으로 예상되었다. 또한, ribavirin 3 mg 씩을 주사접종 하였을 때에는 7dpi까지 100% 생존하였으나, 존데로 경구투여 하였을 경우에는 4dpi에 모두 폐사하였다 (그림 88A). 복강접종과 경구투여 방법의 체내 흡수 차이에 의해 약제의 효과가 달리 나타났다고 예상된다. 사람에서 생체이용률이 64%로 측정되었으나 마우스에서는 대사율이 높아 이보다 낮은 수치로 예상된다. 따라서 3 mg/dose 용량으로 존데를 이용한 투여는 바이러스 억제를 위한 유효농도에 도달하지 못한다고 추정된다.

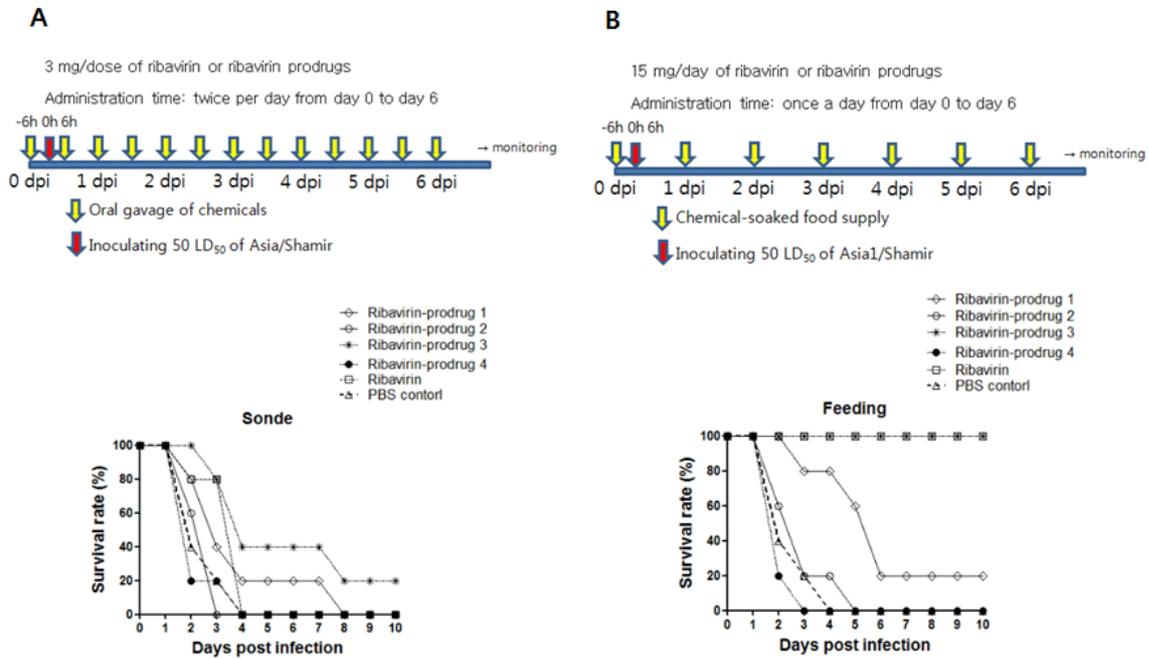


그림 88. Ribavirin과 Ribavirin 전구 약물의 경구 투여 방법 별 구제역 억제효과 비교 실험 결과

㉠ 사료에 침적 후 일정량 자유급식 (*ad libitum*)투여

○ 실험 방법 : Ribavirin을 사람에게 적용 시 음식과 함께 섭취하면 흡수율이 높아진다는 보고가 있으므로 (Wade JR et al. 2006, Br J Clin Pharmacol) 본 실험에서는 사료 펠릿에 ribavirin을 침적하여 정해진 양을 자유급식토록 하였다. 7주령 마우스에 ribavirin 및 4종류의 ribavirin 전구 화합물을 하루에 15mg씩 사료와 함께 7일 동안 섭취하도록 하였다. 처음 약제를 제공하고 6시간 뒤 50LD₅₀ Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종 하였다. 마우스는 10일 간 생존율을 모니터링 하였다.

○ 실험 결과 : RibaPro-1은 3dpi 이후로 생존율이 감소되어 6dpi부터 20%의 생존율이 관찰되었다. Ribavirin과 RibaPro-3는 10일 간 100%의 생존율이 관찰되었다. RibaPro-2와 RibaPro-4는 PBS control 그룹과 유사하여 바이러스 억제효과가 나타나지 않았다 (그림 88B). 실험한 투여 용량에서는 존대로 투여하는 경우 RibaPro-3이 ribavirin보다 효과가 우수하고, 사료와 함께 섭취하는 경우 두 화합물이 유사한 효과를 나타내었다 (그림 88).

㉡ Ribavirin과 ribavirin-TA의 투여 경로 및 용량 별 구제역 억제효과 비교

○ RibaPro-3 화합물의 구제역 바이러스 억제 효능이 성체 마우스에서 검증되었으므로 ribavirin-TA (2',3',5'-Tri-O-acetyl-1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carbozamide)로 재명명하고 임상후보물질로 선정하여 추가 연구를 수행하였다.

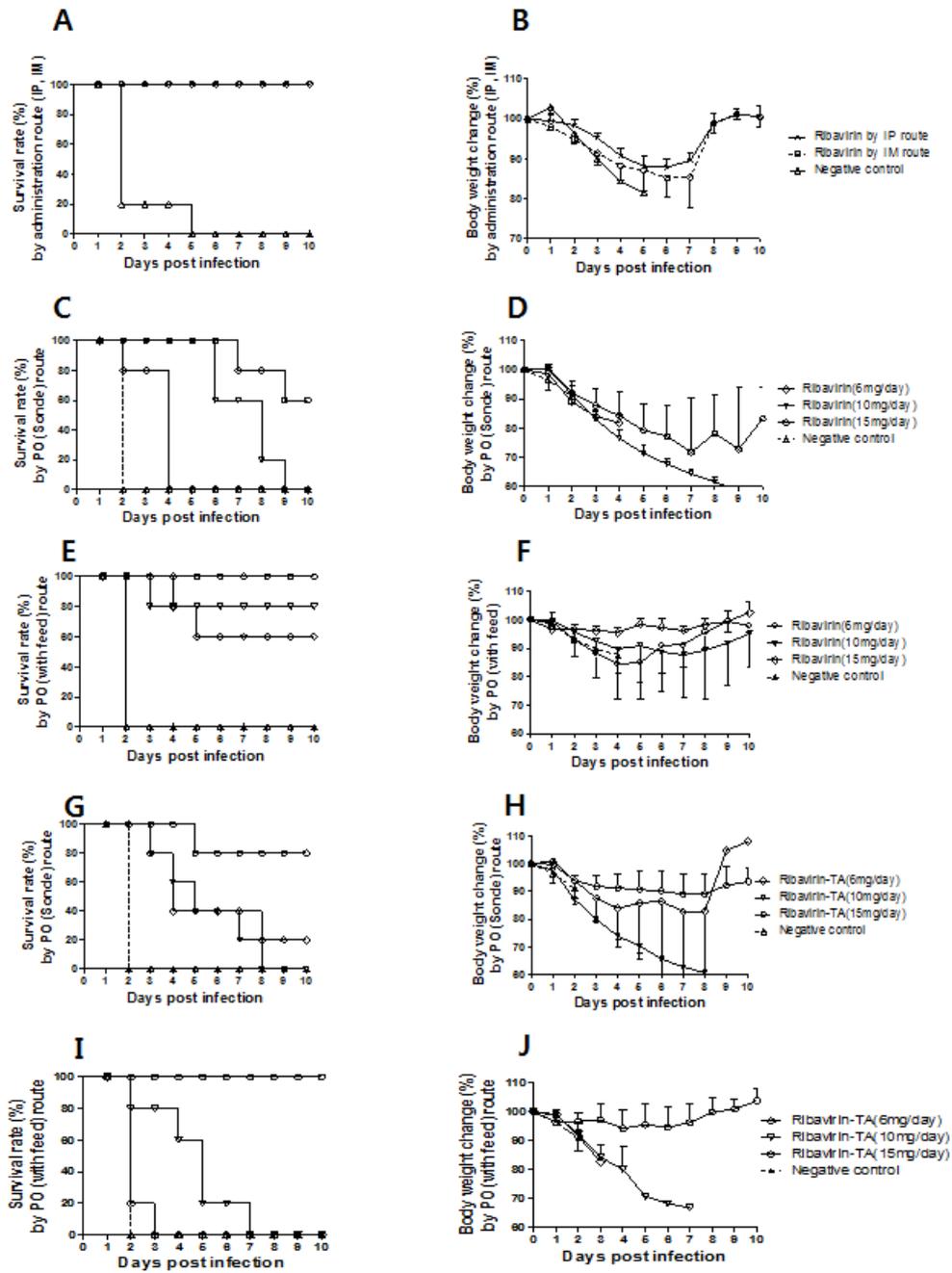


그림 89. Ribavirin과 ribavirin-TA의 투여 경로 및 용량 별 구제역 억제효과 비교 실험 결과

㉔ Ribavirin의 투여 경로에 따른 효과 비교 실험 (복강 vs 근육)

○ 실험 방법 : 하루에 10 mg의 ribavirin을 day 0 to 3까지 복강 또는 근육접종 하였다. 처음 약제를 투여하고 6시간 후에 모든 그룹에 50LD₅₀의 Asial/Shamir 구제역바이러스로 공격접종 하였다. 모든 마우스는 10일 간 동물의 체중변화와 생존율을 모니터링 하였다.

○ 실험 결과 : 복강, 근육접종 방법 모두 100%의 마우스 생존율을 보였다 (그림 89A).

그러나 마우스의 체중 변화율을 비교하였을 때, 복강접종의 경우 5~7일에 체중변화가 심하게 나타났으며, 근육접종의 경우에도 6~7일에 가장 큰 체중 변화율을 보였고 전체적으로 복강접종이 근육접종보다 체중변화가 적어 구제역 바이러스 방어에 효과적인 것으로 확인되었다 (그림 89B).

㉞ Ribavirin, ribavirin-TA의 경구투여 방법 및 투여 용량 별 효과 비교 실험 (존데 vs 사료 침적)

○ 실험 방법 : 하루에 6, 10, 15 mg의 ribavirin 또는 ribavirin-TA를 0일에서 6일까지 존대로 경구투여하거나 시약을 흡수시킨 사료를 성체 마우스에게 자유급식하였다. 처음 약제를 급여하고 6시간 후에 50LD₅₀의 Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종 하였다. 마우스는 10일 간 동물의 체중변화와 생존율을 모니터링 하였다.

○ 실험 결과

- 존대를 이용하거나 약제를 사료에 침적 후 경구투여 하였을 때 구제역 바이러스 억제효과가 있는지 실험한 결과, 용량이 증가할수록 마우스의 생존율도 함께 증가하여 하루에 15 mg의 ribavirin을 존대로 경구투여 한 경우 10일 후 60%, 사료와 함께 자유급식 하였을 때 10일 후 100%의 생존율을 보였다. 동일 용량의 ribavirin을 사료와 함께 먹인 경우 존대를 이용한 경구투여보다 1.7배 높은 생존율을 나타냈다 (그림 89C, 89E). 또한 성체 마우스 체중 변화는 존대를 이용하였을 때 구제역 바이러스 접종 후 1~4일에 체중변화가 크게 변화되었지만 사료와 함께 경구투여 하였을 때에는 큰 체중변화를 보이지 않았다 (그림 89D, 89F).

- Ribavirin-TA 또한 전반적으로 섭취 용량이 증가할수록 마우스의 생존율이 증가하는 경향을 보였다. 하루에 15mg의 ribavirin을 존대로 경구투여 한 경우 10일 후 80%, 사료와 함께 경구투여 하였을 때 10일 후 100%의 생존율을 나타냈다 (그림 89G, 89I). 또한 성체 마우스 체중 변화를 비교하면 15 mg의 ribavirin-TA를 사료와 함께 경구투여 하였을 때에는 존대를 이용한 경구투여와 비교하여 구제역 바이러스에 접종되어도 큰 체중 변화가 없었다 (그림 89H, 89J).

○ 주사접종의 경우 3 mg/day 용량의 ribavirin으로도 구제역 방어 효능을 보였으나 경구투여에서는 15 mg/day 이상을 투여하였을 때 성체 마우스에서 100%의 생존율을 나타내는 구제역 방어 효과를 볼 수 있었다. Ribavirin은 복강접종, 근육접종, 경구투여 방법 모두 구제역바이러스를 방어 할 수 있었다. 주사접종의 경우 복강투여 방법이 근육투여보다 체중 감소 등 부작용이 적어 구제역 바이러스 방어에 더 효과적이었으며, 경구투여의 경우 사료와 함께 섭취하도록 하는 경우 존대를 이용한 방법보다 효능 및 독성 측면에서 유리하였다. Ribavirin-TA는 투여 경로와 용량 모두 ribavirin과 유사한 방어효과를 나타내었다.

㉟ 구제역백신과 병용 투여된 항바이러스제의 방어효과 (백신 + 사료침적, 생존율 측정 및

바이러스 정량 분석)

○ Ribavirin과 ribavirin-TA 가 구제역 바이러스 증식 방어에 효과가 있다는 것을 확인하였다. 구제역 백신을 접종하고 두 가지 약물을 사료에 침적하여 경구투여 함으로써 실제 구제역 발생 상황에서 백신과 항바이러스제를 병용 투여하는 요법을 성체 마우스를 이용하여 시뮬레이션해 보았다. 백신과 병용 투여로 ribavirin의 사용 용량을 줄일 수 있으면 ribavirin에 의해 나타나는 독성 또한 줄일 수 있으므로 앞서 방어효과가 불완전하였던 6, 10 mg의 ribavirin에 백신을 함께 사용하여 방어효과가 온전히 나타나는지 알아보았다. 아울러 day0에 1차 바이러스 접종에 이은 day10에 2차 접종으로 항체 형성에 따른 구제역 방어 능력도 확인하였다. 날짜별 체중 측정으로 독성 여부를 판단하였고, 혈청 내 바이러스 RNA 양을 정량하여 실제 바이러스 증식 억제 여부를 확인하였다.

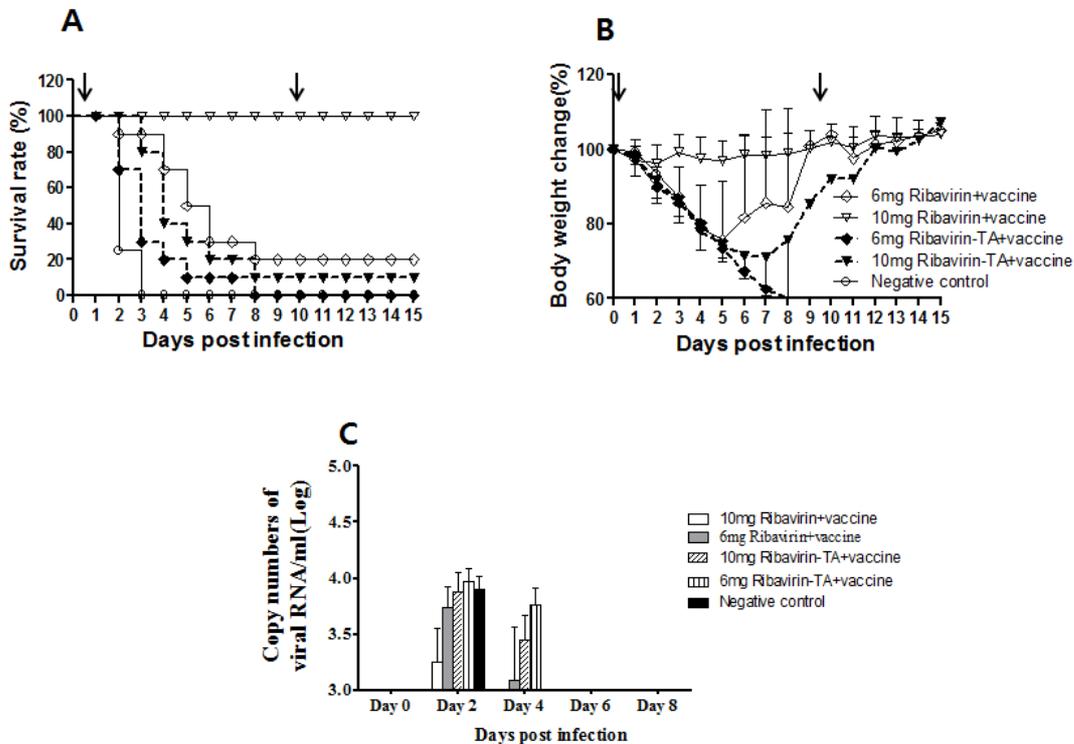


그림 90. 구제역 백신과 병용 투여된 Ribavirin과 ribavirin-TA의 구제역 억제효과 비교 실험 결과

○ 실험 방법 : 7주령 마우스에 구제역 백신접종을 하고 하루에 6 mg 또는 10 mg의 ribavirin 또는 ribavirin-TA를 사료에 흡수시켜 6일 동안 급여하였다. 백신과 약물이 흡착된 사료가 제공된 지 6시간 후에 50LD₅₀의 Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종하였다. 이후 day10에 50LD₅₀의 같은 바이러스를 re-challenge 하였다. 마우스는 15일간 동물의 체중변화와 생존율을 모니터링 하였다. Day0, 2, 4, 6, 8일에 혈청 분리 후 MagNa pure LC 96 System (Roche, Switzerland)를 이용하여 RNA를 추출하고 실시간 유전자 정량법 (Real-time RT-PCR)으로 바이러스를 정량하였다.

○ 실험 결과

- 앞선 실험에서 ribavirin 또는 ribavirin-TA를 성체 마우스에 경구투여 할 경우 생존율이 100%가 되지 않았던 용량 (6, 10 mg)의 그룹에 백신을 함께 접종하였다. Day0에 백신을 접종하고 사료에 흡착시킨 10 mg의 ribavirin을 6일 동안 경구투여 하였을 때 마우스는 100%의 생존율 ($P < 0.0001$, 도 5A)을 보였으며, 마우스의 공격접종 후 체중 변화율도 5% 이내로 유의한 차이를 보이지 않았다. 6 mg/day의 ribavirin, 6 mg/day의 ribavirin-TA, 또는 10 mg/day의 ribavirin-TA를 사료와 함께 경구투여 하였을 때와 백신만 접종한 그룹에서는 생존율이 낮거나 모두 폐사하였다. Day10에 같은 용량의 구제역 바이러스로 마우스에 2차 challenge 한 결과, 생존율에는 변화가 없었지만 체중 변화가 정체하거나 감소하였다가 증가하는 경향을 보였다 (그림 90A, 90B).
- Ribavirin 또는 ribavirin-TA를 경구투여한 그룹은 day2에 음성 대조군과 비슷하거나 적은 구제역 바이러스가 검출되었으며, 4일째에는 모든 그룹에서 약물의 투여용량에 비례하여 바이러스 양이 감소하였다 (그림 90C).

○ 종합적으로, 마우스에 백신 접종을 한 날부터 6일 간 연속으로 10 mg/day의 ribavirin을 사료와 함께 경구투여 한 결과, 구제역 바이러스 체내 증식억제, 항체형성 및 치료효과를 확인하였다. Ribavirin 단독으로 사용하였을 때보다 백신과 함께 사용하여, 약제의 사용 용량을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 몸무게 변화가 거의 없었고 생존율 증가로 치료효과를 기대할 수 있었다. Day10에 동량의 2차 바이러스 접종에도 불구하고 생존율에 영향을 주지 않아 성숙 마우스에 백신에 의한 항체가 형성되었음을 가늠할 수 있었다.

④ 구제역백신과 병용 투여된 항바이러스제의 방어효과 (백신 + 사료침적, 항체형성 확인)

○ 실험 방법 : 항바이러스제가 침적된 사료는 용량을 달리 하여 앞선 실험과 동일하게 6일 간 급여하고, 바이러스 접종 0, 10, 16일 후에 PrioCHECK FMDV NSP (Prionics AG, Schliern-Zurich, Switzerland)를 이용한 ELISA 방법으로 구제역바이러스 비구조단백질 (Non-structural protein, NSP)에 대한 항체를 검출하였다.

○ 실험 결과 : 바이러스 접종 10일 후에는 15 mg/day 의 ribavirin-TA를 경구투여한 그룹에서, 16일 후에는 10, 15 mg/day의 ribavirin을 경구 투여한 그룹에서 바이러스에 대한 항체가 형성되었음을 확인하였다. 항체가 형성 되었다는 것은 항바이러스제가 바이러스를 억제하지 못하여 바이러스의 단백질이 많이 만들어졌다는 의미이므로, 항체형성과 약제의 효능은 역상관 관계에 있다. 백신과 함께 접종한 6 mg ribavirin 그룹에서는 항체가 형성되지 않았는데, 이는 적은 양의 ribavirin으로도 백신과 함께 사용하면 상승작용으로 바이러스를 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 암시한다. 반면 ribavirin-TA는 6, 10 mg 투여 그룹에서 음성 대조군과 비슷하게 10dpi 이전에 모두 폐사하는 결과를 보여 적은 양의 ribavirin-TA는 바이러스 억제 효능이 떨어짐을 알 수 있다 (표 30).

표 30. Ribavirin 또는 Ribavirin-TA를 경구 투여한 마우스에서 항체 검출

Anti-FMDV agents (doses)	Positivity to structural protein antibody		
	0 DPI ^a	10 DPI	16 DPI
Ribavirin (10 mg)	- ^b	-	+ ^c
Ribavirin (15 mg)	-	-	+
Ribavirin-TA (15 mg)	-	+	+
Ribavirin with vaccine (6 mg)	-	-	-
Ribavirin-TA with vaccine (6 mg)	-	N.A. ^d	N.A.
Ribavirin-TA with vaccine (10 mg)	-	N.A.	N.A.
Negative control	-	N.A	N.A

^a 감염후 일자 DPI, Days post infection

^b 음성 (FMDV type Asia 1 ELISA), PI ≤ 50%

^c 양성 (FMDV type Asia 1 ELISA), PI > 50%

^d 마우스 폐사로 결과 확인 불가 N. A

⑤ 백신과 여러 adjuvant를 포함한 ribavirin 제제의 항바이러스 효과 (부형제 ± 복강 1회 접종 ± 백신)

○ 백신 내의 부형제 또는 adjuvant로 인하여 백신 항원이 목적동물 체내에서 체류시간이 늘어나고 선천면역을 증가시켜 백신의 효능을 높이는 것과 유사하게, ribavirin 또는 ribavirin-TA와 부형제가 함께 사용되어 약물의 효능을 향상시키는지 여부를 확인하고자 하였다. 또한 1회 주사접종에 의하여 마우스에서 구제역 방어가 가능한지 여부도 함께 조사하였다.

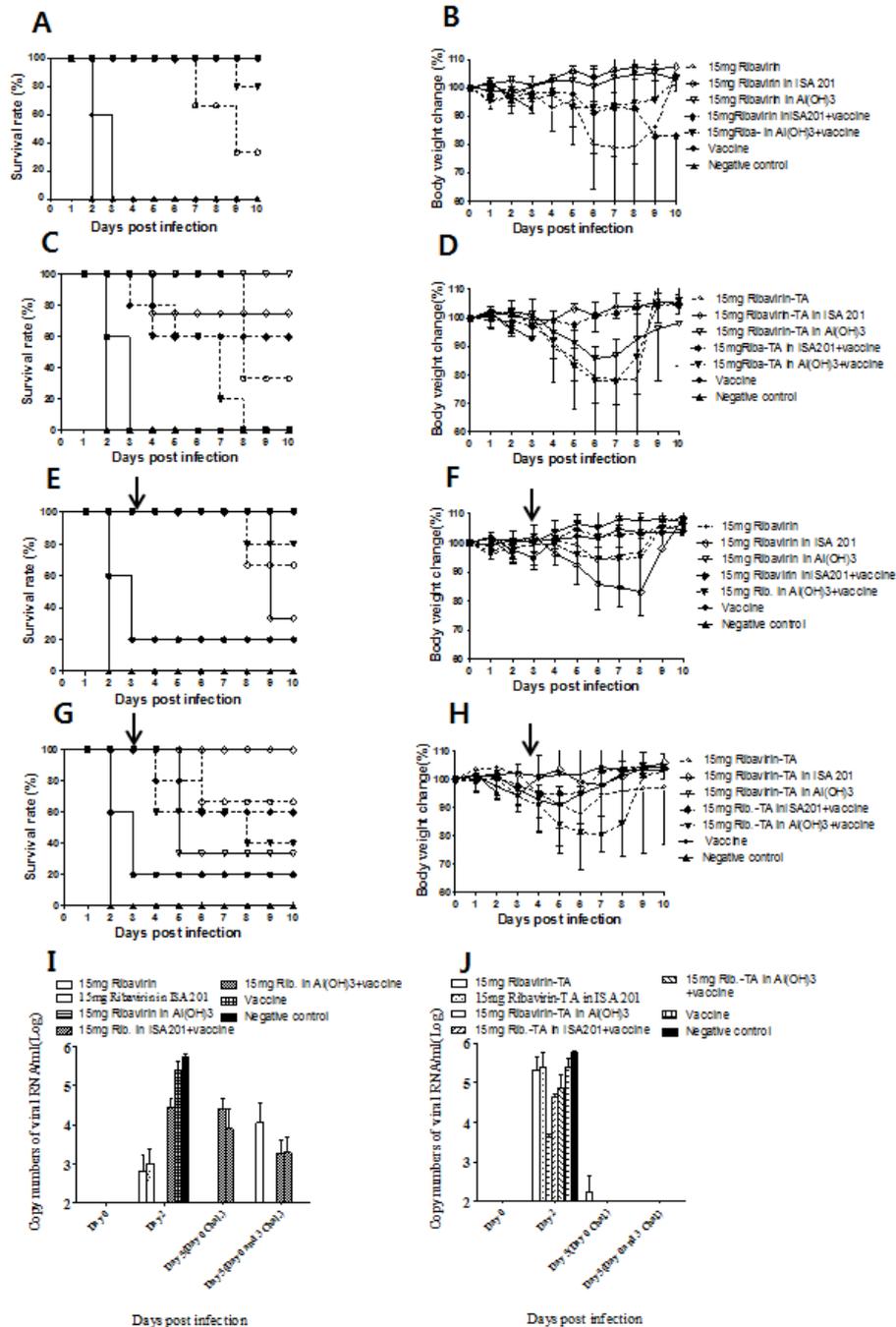


그림 91. 백신과 여러 adjuvant를 포함한 ribavirin 제제의 구제역 억제효과 비교 실험 결과

○ 실험 방법 : 부형제는 Montanide ISA201 VG (SEPPIC, Paris) 또는 Aluminum Hydroxide (Al(OH)₃)을 사용하였다. 15 mg의 ribavirin 또는 ribavirin-TA를 부형제와 섞어 1회 접종하고 6시간 후에 50LD₅₀의 Asia1/Shamir 구제역바이러스를 복강접종 하였다. 이와 같은 조건의 또 다른 그룹에는 약제 접종 후 6시간 후 뿐만 아니라 day3에 동일 용량의 바이러스를 2차 접종 하였다. 마우스는 10일 간 체중변화와 생존율을 모니터링 하였다. 또한 바이러스 접종 0, 2, 3일 후 채혈하여 혈청분리한 다음, 앞서 설명한 방법에 의해 RNA 추출 후 real-time PCR을 이용하여 바이러스를 정량하였다.

○ 실험 결과

- 백신만 단독 접종 하였을 때에는 음성 대조군과 별 차이 없는 폐사율을 보였다 ($P>0.5$). Ribavirin과 부형제인 ISA-201 또는 aluminum Hydroxide 젤을 섞어 접종하였다. 백신만 단독 접종 하였을 때에는 음성 대조군과 차이가 없으나 ($P>0.5$), ribavirin과 부형제, 부형제와 백신을 함께 접종하였을 때에는 음성 대조군보다 생존율이 증가하였다 ($P<0.01$). 또한, 구제역 바이러스가 성체 마우스에 한 번 (day0) 접종 되었을 때가 두 번 (day0, day3) 접종되었을 때보다 성체 마우스의 생존율이 더 높거나 유사한 경향을 보였다. 모든 접종 그룹에서 Ribavirin-TA는 ribavirin과 유사한 방어능력을 보여주었다 (그림 91A~H).
- 성체 마우스 혈청 내의 구제역 바이러스 양을 측정한 결과, 두 가지 약제를 접종한 모든 그룹의 바이러스 양이 음성 대조군보다 낮거나 검출되지 않았다. 특히, ribavirin-TA와 부형제 또는 부형제와 백신을 함께 접종하였을 때에 부형제와 함께 접종하지 않은 그룹보다 구제역바이러스 양이 빠르게 감소하는 경향을 보였다 (그림 91I, 91J).

○ 이 실험으로부터 백신 단독 사용보다는 ribavirin 또는 ribavirin-TA를 부형제와 함께 사용하면 마리 당 15 mg, 1회 접종만으로도 구제역바이러스로부터 마우스를 보호하여 생존율을 높이고 바이러스의 양도 빠르게 감소함을 확인하였다. 이는 부형제가 ribavirin 또는 ribavirin-TA 효능을 지속시키는 효과를 가지며 돼지에서도 이와 같은 효과가 반복된다면 구제역 발생 시 긴급백신과 병용 투여하여 사용편의성이 증대되고 백신 단독 사용에 의한 면역공백을 효과적으로 보완할 수 있는 중요한 구제역 억제요법이 될 수 있음을 시사한다.

(라) Ribavirin 및 전구 약물의 SPF 미니돼지에 대한 효능 평가

① Ribavirin-TA 의 투여 후 혈액 내 잔류 및 항바이러스 효과 확인

- 목적동물에서 ribavirin-TA가 구제역바이러스 방어 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 우선 SPF 미니돼지에 ribavirin-TA를 투여하고 혈청을 분리하여 혈청에 약제의 효능이 남아있는지 알아보았다.
- 마우스에서 구제역 바이러스 억제효과가 우수한 것으로 확인된 ribavirin-TA에 대하여 SPF 미니돼지에 구제역에 대한 항바이러스 효과 실험을 실시하였다. 돼지는 12~15주령이고 몸무게는 평균 13 kg이다. 약제는 12시간 간격으로 투여하였다.
- 1×10^5 TCID₅₀의 FMDV (O/Jincheon/2014) 주를 donor SPF 미니돼지에 접종 후 다른 SPF 미니돼지에 접촉감염 시켰다. 하루에 1.5g의 ribavirin-TA를 동거 전날부터 4dpi까지 약제를 투여하였다. 투여 방법은 근육주사 또는 사료와 동시 섭취 방법을 택하였다.

혈청 내에 ribavirin-TA가 남아 있는지 확인하기 위하여 IBRS-2 세포에 1×10^2 TCID₅₀ O/SKR/2002 구제역바이러스를 1시간 동안 접종 시킨 후 SPF 돼지의 혈청을 처리하였다. 3일 후 CPE를 관찰하여 혈청 내에 잔류 ribavirin-TA 및 효능 발현 여부를 확인하였다 (그림 92).

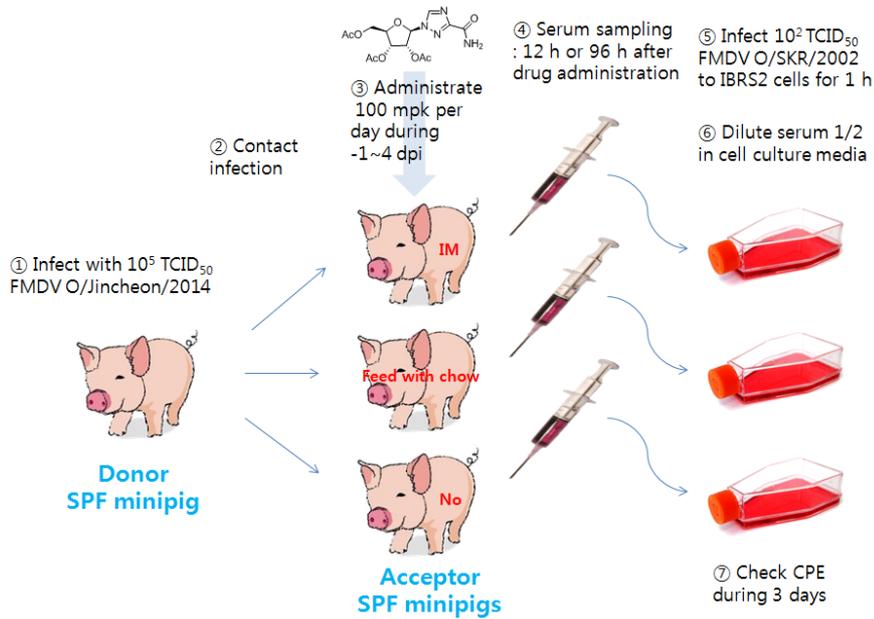


그림 92. Ribavirin-TA의 투여 후 혈액 내 잔류 및 효과 확인을 위한 실험 스킴

표 31. Ribavirin-TA의 투여 방법에 따른 혈청의 항바이러스 효과 확인

Dilution ^a	Route	12 h ^b	96 h ^c
1/2	IM ^d	- / - / - / - ^e	+ / - / - / -
	Feeding ^f	+ / + / + / +	- / - / - / -
	Control ^g	+ / +	+ / +

^a IBRS-2 세포에 100 TCID₅₀ 의 FMDV, O/SKR/2002을 1시간동안 감염시킨 뒤 상층액을 제거하고 SPF 돼지 혈청을 1/2로 희석하여 처리하였다.

^b 처음 약제를 SPF 돼지에 투여한 후 12시간 후에 채혈하였다.

^c 처음 약제를 SPF 돼지에 투여한 후 96시간 후에 채혈하였다.

^d intramuscular 접종

^e 각 개체별 CPE 억제 여부

-: control value를 기준으로 CPE가 50% 이상억제 (바이러스 증식 억제)

+: control value를 기준으로 CPE가 50% 미만억제 (바이러스 증식 미억제)

^f 사료와 Ribavirin prodrug3을 같이 제공

^g 바이러스 감염은 시켰으나 약제를 투여 하지 않은 그룹

○ Ribavirin-TA를 투여하고 12시간 후에는 근육투여한 그룹에서만 혈청 내에 잔류되어

있음을 확인하였다. 근육투여를 통한 약물이 경구투여 (Feeding)보다 체내 순환계에 빠르게 도달하므로 효과가 빨리 나타난 것으로 예상된다. 아울러 세포실험에서 ribavirin-TA의 효과가 높지 않았던 점을 고려해 볼 때 12시간 동안 체내를 순환하면서 세포에서도 활성이 높은 ribavirin 또는 인산화 대사체 (RMP, RDP, RTP)로 효소에 의한 구조변화가 일어났음을 짐작할 수 있다. 지속적인 ribavirin-TA 투여 (96시간째)에 의해서 근육과 경구투여 모두에서 CPE가 관찰되지 않는 것으로 보아 혈청 내에서 활성이 있는 ribavirin 또는 인산화 대사체로 변환되어 체내를 순환하며, 이를 통해 구제역 항바이러스 효과를 나타냄을 짐작할 수 있다 (표 31).

② Ribavirin-TA의 SPF 미니돼지에서 항바이러스 효과

○ 3개월령 SPF 미니돼지를 ribavirin-TA를 섭취한 그룹과 섭취하지 않은 그룹 (음성 대조군)으로 나누었다. Ribavirin-TA를 하루에 750mg 씩 0dpi에서 4dpi까지 사료와 함께 공급하였다. 0dpi에 1×10^5 TCID₅₀의 Asia1/Shamir 구제역바이러스를 접종하였다. SPF 미니돼지는 8일 간 발굽, 구강, 섭식, 보행 등의 임상증상을 관찰하고 임상지수 평가표의 기준에 따라 모니터링 하였다 (그림 93). 임상 증상은 표 32의 임상지수 평가표에 의거하여 점수를 매기고 그래프로 나타내었다.

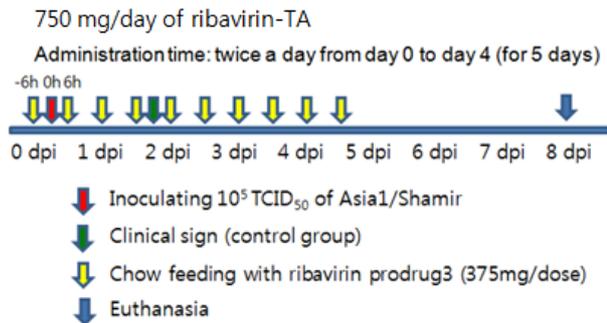


그림 93. Ribavirin-TA를 사료에 첨가하여 투여 시 SPF 미니돼지에서 구제역바이러스 공격접종에 대한 생존율 측정을 위한 실험 스킴

표 32. 돼지의 구제역 임상 증상에 따른 임상지수 평가표

측정항목	측정결과	Score	비고
체온	40.0℃	1	
	40.5℃	2	
	41.0℃	3	
사료섭취	식욕감소	1	
	사료섭취X or 사료남김	2	
보행	과행	1	
	주저앉음	2	

제관염	제관부 열감 및 통증	1	
	제관염으로 인한 기립불능	2	
발굽수포	우측 전지	1	
	좌측 전지	1	
	우측 후지	1	
	좌측 후지	1	
수포	혀 수포	1	
	잇몸, 입	1	
	주둥이(코 돌출부)	1	

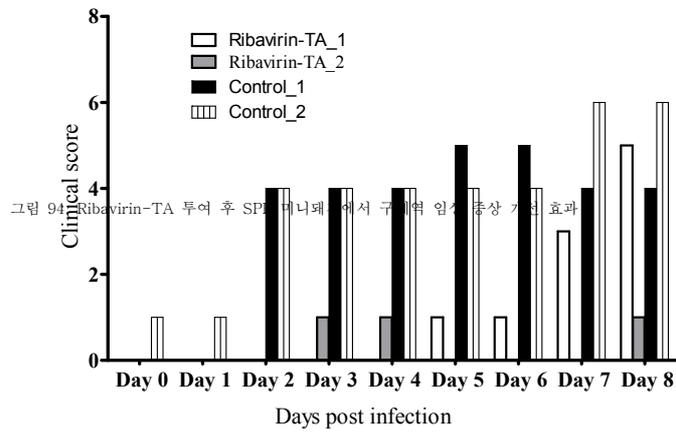


그림 95. ribavirin-TA 투여 후 SPF 미니돼지에서 구제역 임상 증상 개선 효과를 보여주는 사진

○ 구제역바이러스 공격접종 6시간 전 (예방적 투여)에 마리당 375 mg을 사료와 함께 급

여하였다. Ribavirin-TA를 사료와 함께 섭취하지 않은 음성 대조군에서는 2dpi에 전형적인 수포 발생 등 임상증상을 보였다. 그러나 ribavirin-TA를 사료와 함께 섭취한 그룹에서는 증상 발현이 지연되어 5dpi에 한 마리, 8dpi에 나머지 한 마리가 발굽에 수포가 발생하였다 (그림 94, 95). 이 결과로부터 ribavirin-TA가 항바이러스제로서 구제역 임상증상을 지연 및 낮추는 효과를 나타냈다고 볼 수 있다. 그러나 약제 투여 중단 후 임상 증상이 나타나기 시작하는 것으로 보아 추후 실험을 통하여 적정 농도 및 투여 방법의 수정이 요구된다.

나. Ribavirin 및 ribavirin 전구 약물의 PK, 독성 안전성 분석

(1) Ribavirin 임상후보물질의 Mouse PK 시험

- Ribavirin은 생체 이용률 (bioavailability, BA)이 높아 정맥투여 대비 경구투여의 효율이 좋으나 간독성, 또는 적혈구의 extravascular hemolysis를 유발시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 현상은 ribavirin의 활성상태인 ribavirin triphosphate가 적혈구에 축적되어 혈장 내 농도의 60배 이상 이르고 이로 인해 적혈구의 ATP 소모에 따른 항산화 방어기능이 저하 되어 결국 용혈(hemolysis)을 유발하기 때문이다 (De Franceschi L et al. 2000, Hepatology).
- 이에 따라 구제역 바이러스에 치료효과를 보인 ribavirin의 전구 약물을 설계하고 약동학적 파라미터를 개선하고자 하였다. Ribavirin의 전구 약물은 혈장, 조직 및 gastrointestinal (GI) track 등에서 상대적으로 쉽게 가수분해되는 ester 화합물로 설계되었으며, 마우스를 대상으로 한 구제역 억제효능 평가 성적이 가장 좋았던 ribavirin-TA의 PK 및 생체 이용률을 분석하여 임상후보물질 적합성 여부를 확인하였다.

(가) 연구 재료 및 방법

① 동물 실험

- Ribavirin과 전구 약물인 ribavirin-TA의 마우스 생체 이용률 및 ribavirin-TA 투여 후 전환되는 ribavirin의 혈중 농도를 측정하기 위해 5주령 male CD-1 mouse를 사용하였다.
- CD-1 mouse는 반입 후, 일주일 이상 내부 순화하고 7주령에 시험 전날 12시간 동안 절식시켰다. 시험 중 사료는 투여 후 1시간째부터 다시 공급하였고, 물은 자유로이 섭취시켰다. 시험 개체는 투여 전 체중을 측정하였다.

- 투여 용액은 10% DMSO / 9% cremophor 용액으로 제조한 후 정맥투여는 2 mg/kg, 경구투여는 10 mg/kg 용량으로 투여하였다.
- 투여 후 각 채혈 시간에 heparin 처리가 되어 있는 capillary를 이용하여 꼬리채혈 하였고, 모든 개체를 대상으로 이상행동 및 임상증상 발현여부를 관찰하였다.
- 채혈된 혈액은 5,000 rpm (1,500 g) 4°C에서 5분간 원심 분리하여 혈장을 채취하고 드라이아이스가 들어있는 박스에서 급속 냉동시킨 후, 시료 전처리 전까지 -80°C에서 보관하였다.

표 33. Mouse PK 동물 실험 방법 요약

투여물질	Ribavirin & Ribavirin-TA	
투여경로	경구(PO)	꼬리정맥(IV)
투여용량 (API 기준)	10 mg/kg	2 mg/kg
투여부피	10 ml/kg	2.5 ml/kg
용매(Vehicle)	10% DMSO / 9% Cremophore	
투여용액상태	Solution	
채혈시간 (11 points/IV, 9 points/PO)	0, 20, 40, 60, 90 min, 2, 4, 6, 8 h	0, 5, 10, 20, 40, 60, 90 min 2, 4, 6, 8 h
개체수(n)	3	
채혈방법	꼬리채혈	쇄골하정맥
항응고제	Sodium heparin	

② 시험물질 준비

- 시험물질인 ribavirin과 ribavirin-TA는 powder 상태를 사용하였으며, 시험 전까지 -20°C에서 보관하였다.
- 마우스 투여 전 Ribavirin과 ribavirin-TA를 미량저울을 사용하여 필요량만큼 측정하여 DMSO에 6 mg/ml 농도가 되도록 stock solution을 제조하였고, Calibration curve용 표준액은 stock solution을 acetonitrile에 희석하여 각각 3.0, 9.1, 27.4, 82.3, 247, 741, 2222, 6667, 20000 ng/ml 농도로 working standard solution을 만든 후, working standard solution과 mouse plasma를 5 µl : 45 µl 비율로 혼합하여 표준용액 농도가 0.3, 0.91, 2.74, 8.23, 24.7, 74.1, 222.2, 666.7, 2000 ng/ml이 되게 spike하였다.

③ 혈액 샘플 전처리 및 데이터 분석

- Spike된 calibration curve용 표준액과 채혈된 sample은 Internal standard (IS : Diclofenac) 100 ng/ml이 포함된 acetonitrile을 5 μ l : 100 μ l 비로 혼합한 후 상온에서 10초 동안 vigorous vortex한 후 16,000 rpm (27,000 g)으로 4°C에서 10분 간 원심분리 하였다. 상층액 중 80 μ l를 분리하여 5°C autosampler에 보관하여 LC MRM mode로 분석하였다. 시료 처리의 모든 과정은 얼음 또는 아이스팩 위에서 진행되었다.
- QTRAP 4000 LC/MS/MS (AB/SCIEX)의 MRM mode를 이용하여 동시분석하는 방법을 개발하여 진행되었으며, 시간대별 혈장 중 농도 data를 이용하여 WinNonlin software (Pharsight, ver. 6.2)를 이용한 noncompartmental analysis로 약물동태학적 파라미터를 구하였다.

(나) 실험결과

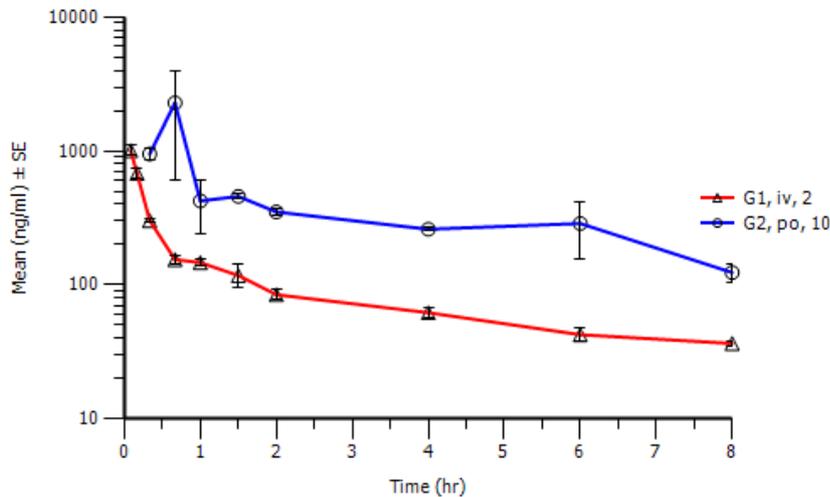


그림 96. 마우스에 Ribavirin 투여 후 혈장 내 ribavirin 농도 변화 곡선 (Ribavirin iv 2 mg/kg & po 10 mg/kg)

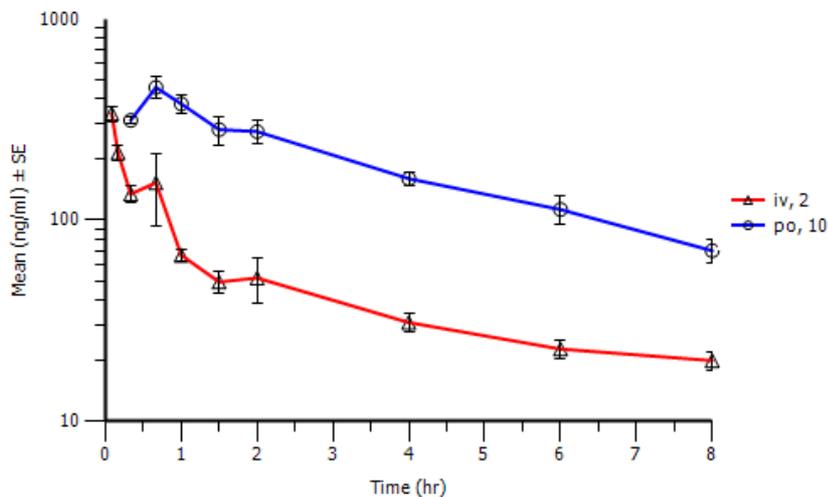


그림 97. 마우스에 Ribavirin-TA 투여 후 혈장 내 ribavirin 농도 변화 곡선

표 34. Ribavirin 및 ribavirin-TA에 대한 마우스 PK 시험 결과 요약

그룹명	투여 시험물질*	분석 물질*	투여 경로	투여 용량 (mg/kg)	Half-life (hr)	Tmax (hr)	Cmax (ng/ml)	AUC 0-8h (hr*ng/ml)	AUC 0-24h predict (hr*ng/ml)	BA (%)
G1	A	A	iv	2	4.54±0.296	0.08±0.00	1,007±87	767±38	991±46	-
G2	A	A	po	10	4.36±0.963	0.44±0.11	2,506±1570	3,142±531	4,173±855	84
G3	P	P	iv	2	NA	NA	NA	NA	NA	-
	P	A	iv	2	5.51±1.423	0.08±0.00	340±29	385±9	541±43	-
G4	P	P	po	10	NA	NA	NA	NA	NA	-
	P	A	po	10	3.11±0.048	0.67±0.00	458±58	1,520±149	1,836±191	68

* A : Ribavirin,
P : Ribavirin-TA

○ 시험 물질 투여 후 모든 개체에서 이상 행동 및 임상 증상은 관찰되지 않았으며, Ribavirin 투여 후 혈장 내 ribavirin 농도는 그림 96에 표시하였고 ribavirin-TA 투여 후 혈장 내 ribavirin 농도는 그림 97에 표시하였다. Ribavirin-TA는 투여 경로와 무관하게 투여 후 혈장 내에서 약물이 검출되지 않았으며, Ribavirin 투여 마우스에서의 BA는 84%로 나타났다. 전체적인 시험 결과는 표 34에 요약하였다.

○ Ribavirin-TA는 경구, 정맥 투여 시 혈장 내 잔존하는 양을 확인할 수 없었다. 이러한 이유는 크게 i) 대사속도가 빨라 ribavirin으로 급속히 전환되거나, ii) 조직으로 신속히 확산되는 경우를 들 수 있다. 그러나 본 실험에서 ribavirin-TA 투여 후 ribavirin이 혈장 내에서 과량 검출되는 것으로 보아 ribavirin-TA가 ribavirin으로 전환되는 것을 유추할 수 있었다. Ribavirin의 생체이용률이 84%인 것에 비해 ribavirin-TA는 68% (ribavirin 검출량 기준)로 상대적으로 낮은 값을 보였으며, 반감기는 ribavirin (4.5시간)과 유사하지만 특정시간의 최고농도를 알려주는 Cmax가 340 ng/ml로 ribavirin (1007 ng/ml)보다 현저히 낮았다.

○ 초기 바이러스 감염상태에서 구제역 바이러스의 억제를 위해서는 고농도의 ribavirin이 요구되며, ribavirin-TA의 낮은 Cmax는 앞서 구제역 방어효능이 확인된 부형제 첨가 1회 주사접종 요법에 적용하기에 적합하지 않았다. 그러나 급격한 혈장 농도 증가에 따른 급성 독성 및 부작용을 막을 수 있다는 장점이 기대되므로, 향후 이 부분을 검증할 수 있는 독성 평가가 수반되어야 한다.

(2) Ribavirin 임상후보물질의 돼지 PK, 독성, 안전성 평가

○ Ribavirin은 농도 의존적 독성이 있어 경구투여 시 여러 돼지들에게 사료와 함께 안전한 범위의 동일한 양을 섭취시켜야 하는 제약이 따른다. 그러나 사료와 함께 혼합하여 급여하는 경구 투여방법은 개체 간 사료 섭취량의 편차가 생길 수 있어 과다섭취 시 독성이 나타날 수 있다는 단점이 있다. 근육 주사는 인력이 추가로 투입된다는 단점이 있으나, 개체별 고른 투여가 가능하고 기존의 백신과 병용투여로 적용가능하기 때문에 농장에서 손쉽게 적용할 수 있다. 이에 따라 ribavirin의 경구와 근육 투여에 따른 약동

학적 파라미터를 비교하기 위하여 정해진 시간에 채혈 후 혈장 내 ribavirin을 정량 분석함으로써 생체이용률을 계산하였다.

(가) 투여 경로 및 용량 설정

Table 1: Conversion of Animal Doses to Human Equivalent Doses Based on Body Surface Area			
Species	To Convert Animal Dose in mg/kg to Dose in mg/m ² , Multiply by k _m	To Convert Animal Dose in mg/kg to HED ^a in mg/kg, Either:	
		Divide Animal Dose By	Multiply Animal Dose By
Human	37	---	---
Child (20 kg) ^b	25	---	---
Mouse	3	12.3	0.08
Hamster	5	7.4	0.13
Rat	6	6.2	0.16
Ferret	7	5.3	0.19
Guinea pig	8	4.6	0.22
Rabbit	12	3.1	0.32
Dog	20	1.8	0.54
Primates:			
Monkeys ^c	12	3.1	0.32
Marmoset	6	6.2	0.16
Squirrel monkey	7	5.3	0.19
Baboon	20	1.8	0.54
Micro-pig	27	1.4	0.73
Mini-pig	35	1.1	0.95

^a Assumes 60 kg human. For species not listed or for weights outside the standard ranges, HED can be calculated from the following formula:

$$HED = \text{animal dose in mg/kg} \times (\text{animal weight in kg} / \text{human weight in kg})^{0.33}$$

^b This k_m value is provided for reference only since healthy children will rarely be volunteers for phase 1 trials.

^c For example, cynomolgus, rhesus, and stump-tail.

그림 98. 체표면적을 이용한 동물에 적용한 용량을 사람에게 적용하는 방법 (발췌 : Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers -미국 FDA 약물평가연구센터 자료)

- 그림 98은 동물에게 적용된 용량을 사람에게 적용할 수 있는 용량으로 환산하는 계산에 대해 기술되어 있다. 이를 역산하여 사람에게 임상적으로 처방되는 용량을 돼지에 적용할 수 있도록 계산하였다.
- 투여 용량 설정에 있어 돼지에 다양한 농도를 적용한 참고 문헌이 없어 사람에게서 적용되는 용량을 돼지에 적용할 수 있도록 환산하는 계산법 (그림 99)과 동물 투여 최대용량 참고문헌에 근거하여 설정하였다 (그림 100).

Formula for Dose Translation Based on BSA
HED (mg/kg) = Animal dose (mg/kg) multiplied by $\frac{\text{Animal Km}}{\text{Human Km}}$

그림 99. 동물에 적용된 용량을 인체에 환산하는 방법 (Reagan-Shaw S et al. 2007, FASEB J)

Table 1. Administration volumes considered good practice (and possible maximal dose volumes)^a

Species	Route and volumes (ml kg ⁻¹)					
	Oral	s.c.	i.p.	i.m.	i.v. (bolus)	i.v. (slow inj.)
Mouse	10 (50)	10 (40)	20 (80)	0.05 ^b (0.1) ^b	5	(25)
Rat	10 (40)	5 (10)	10 (20)	0.1 ^b (0.2) ^b	5	(20)
Rabbit	10 (15)	1 (2)	5 (20)	0.25 (0.5)	2	(10)
Dog	5 (15)	1 (2)	1 (20)	0.25 (0.5)	2.5	(5)
Macaque	5 (15)	2 (5)	^c (10)	0.25 (0.5)	2	^c
Marmoset	10 (15)	2 (5)	^c (20)	0.25 (0.5)	2.5	(10)
Minipig	10 (15)	1 (2)	1 (20)	0.25 (0.5)	2.5	(5)

^aFor non-aqueous injectates, consideration must be given to time of absorption before re-dosing. No more than two intramuscular sites should be used per day. Subcutaneous sites should be limited to two or three sites per day. The subcutaneous site does *not* include Freund's adjuvant administration.

^bValues in millilitres per site.

^cData not available.

그림 100. 동물에게 투여할 수 있는 최대 용량 (Diehl K et al. 2001, J Appl Toxicol)

① 경구 투여

- 사람에게서 적용되는 용량 : WHO 권장 투여량 기준에 의하면 급성 열성질환에 이환된 사람의 경우, 증상 발현 4일 뒤 유아 기준 starting dose는 30 mg/kg/day 로 권장.
- 돼지에 적용될 용량(1 kg 기준) : 21.43 mg/kg
- 평균 돼지 무게 : 15 kg
- 예상 용량 : 321.45 mg
- 투여 방법 : 10 ml Phosphate Buffered Saline(PBS)에 321.45 mg의 ribavirin을 희석하여 주사기를 이용하여 돼지에게 급여

② 근육 주사

- 레서스 원숭이(Rhesus monkey)의 Lassa fever protection model의 치료 시작 용량이 50 mg/kg이다. 이를 환산하여 돼지에서 적용할 용량을 구하였다.
- 돼지에 적용될 용량(1kg 기준) : 17.14 mg/kg
- 평균 돼지 무게 : 15 kg
- 예상 용량 : 257.1 mg
- 투여 방법 : 3 ml PBS에 ribavirin을 희석한 후 이근부 (귀 뒷부분의 목살 부위)에 접종

(나) 실험동물 선정 및 계획

- 실험에 사용할 돼지의 연령은 6주령으로 평균 15 kg 내외의 몸무게를 나타낸다. 양돈 현장에서 구제역 백신을 6주에서 8주 사이에 접종하는 것과 휴약 기간 6개월을 고려하여 6주령 돼지를 실험에 사용하였다.
- 근육 투여군 2마리, 경구 투여군 2마리로 설정하였다. 각 군별 1마리 씩 총 2마리는 24시간에 안락사 후 부검을 실시하여 장기를 채취하였으며, 남은 2마리는 접종 후 48시간까지 관찰 후 안락사 및 부검을 실시하였다. 근육 투여 후 10분, 20분, 40분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 16시간, 24시간, 36시간, 48시간에 혈액샘플 채취 및 부작용을 관찰하였다. 접종 부위의 열감, 발적, 부종 등의 부작용과 식욕 부진, 우울 등의 증상을 관찰하였으며 체온을 함께 측정하여 발열을 확인하였다.

(다) 실험 결과

① 체온 측정

- 체온 변화 데이터를 보면 접종 혹은 투여 후 1시간까지 약간의 체온 상승이 보인다 (그림 101, 102, 표 35). 돼지의 정상 체온이 39~42°C 이기 때문에 이상 소견으로 보이지 않는다. 이는 낮선 환경에 처음 온 것과 약물 투여를 위한 돼지 보정 및 주사 과정에 생긴 일시적인 스트레스로 인한 체온 상승으로 보인다.

표 35. Ribavirin의 근육 주사 혹은 사료와 함께 급여 후 체온의 변화 추적

		접종 후 경과 시간										
		10분	20분	40분	1시간	2시간	4시간	8시간	16시간	24시간	36시간	48시간
근육 주사	돼지1	40.1°C	40.6°C	41.0°C	40.2°C	39.5°C	39.6°C	39.5°C	39.2°C	39.6°C	39.4°C	39.7°C
	돼지2	39.7°C	40.3°C	40.5°C	39.8°C	39.7°C	39.4°C	39.6°C	39.6°C	39.7°C		
경구 투여	돼지3	39.5°C	40°C	40.2°C	39.9°C	39.5°C	39.6°C	39.6°C	39.5°C	39.7°C	39.6°C	39.8°C
	돼지4	40.0°C	39.9°C	40.1°C	39.7°C	39.5°C	39.7°C	39.6°C	39.4°C	39.5°C		

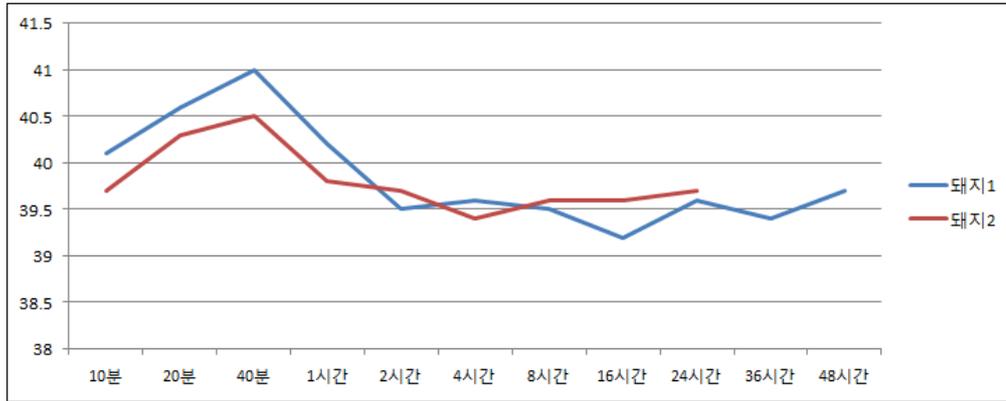


그림 101. Ribavirin을 근육 주사한 돼지 2마리의 체온 추적 그래프

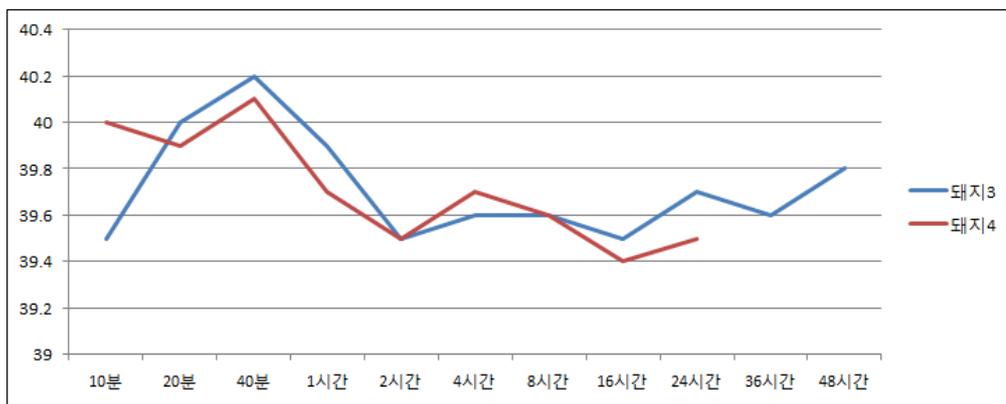


그림 102. Ribavirin을 경구 투여한 돼지 2마리의 체온 추적 그래프

② 부작용

- 접종 후 48시간 관찰을 통한 각종 임상증상에서 부작용은 나타나지 않았다. 사료 섭취 및 음수를 정상적으로 하였고 우울 증상도 보이지 않았다. 근육 주사한 그룹에서 접종 부위 관찰 결과 열감, 발적, 부종 같은 접종 부작용을 관찰할 수 없었다 (그림 103, 104).



그림 103. 돼지1의 근육 주사 후 1시간 뒤 접종 부위 사진



그림 104. 돼지2의 근육 주사 후 1시간 뒤 접종 부위 사진

③ Complete Blood Cell Count (CBC)

- Ribavirin을 주사 또는 급여 후 주된 부작용인 급성 빈혈이 올 수 있는지에 대해 확인하고자 CBC를 시행하였다. 근육 주사한 돼지를 보면 투여 1시간 후 약간의 빈혈을 보였다 (표 36). 이는 채혈이 짧은 간격으로 연속되어 나타난 일시적인 현상으로 보였다. 두 그룹 모두 적혈구에 관련된 수치가 정상범위의 최저 한계선에 인접해 있다. 최저 한계선보다 조금 높거나 낮은 수준으로, 빈혈을 지시하는 수치 중 특이적이거나 눈에 띄게 저하된 수치가 나타나지 않은 것으로 보아 이것 또한 채혈에 의한 영향으로 볼 수 있다. 따라서 ribavirin이 돼지에게 적용되었을 때 빈혈에 관한 초기 독성 반응이 보이지 않는 것으로 판단되었다.

표 36. Ribavirin 근육 주사 후 빈혈 검사

항목*	정상 범위	근육 내 주사 후 경과 시간							
		1시간	2시간	4시간	8시간	16시간	24시간	36시간	48시간
RBC	5 ~ 8 (10x12/L)	4.36	5.98	6.9	5.9	6.19	6.48	5.28	5.12
HGB	10.7 ~ 16.7 (g/dL)	8.4	12.7	13.2	10.7	11.7	11.7	10.4	10
HCT	32 ~ 50 (%)	26.13	35.2	40.33	32.11	35.4	35.23	35.2	33.8
MCV	50 ~ 68 (fL)	60	59	58	54	57	54	66.7	66
MCH	17 ~ 21 (pg)	19.3	21.2	19.1	18.2	18.9	18	19.7	19.5
MCHC	30 ~ 34 (g/dL)	32.2	36	32.7	33.4	33.1	33.1	29.5	29.6

* RBC : Red Blood Cell (적혈구)
 HGB : Hemoglobin (헤모글로빈)
 HCT : Hematocrit (헤모토크리트)
 MCV : Mean corpuscular volume
 MCH : Mean corpuscular hemoglobin
 MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration

표 37. Ribavirin 경구 투여 후 빈혈 검사

항목	레퍼런스	경구 투여 후 경과 시							
		1시간	2시간	4시간	8시간	16시간	24시간	36시간	48시간
RBC	5 ~ 8 (10x12/L)	6.46	4.51	7.92	6.25	6.58	6.89	6.26	5.97
HGB	10.7 ~ 16.7 (g/dL)	12.4	8.6	14.8	11.6	11.7	12.3	10.9	10.6
HCT	32 ~ 50 (%)	35.12	24.7	43.03	33.58	35.23	36.82	37.9	37.1
MCV	50 ~ 68 (fL)	54	55	54	53	54	53	60.5	62.1
MCH	17 ~ 21 (pg)	19.1	19.1	18.7	18.5	17.8	17.8	17.4	17.8
MCHC	30 ~ 34 (g/dL)	35.2	34.9	34.4	34.6	33.3	33.3	28.8	28.6

④ 약동학적 평가

○ Ribavirin을 돼지에 단회 경구 및 근육 투여 후 정해진 시간에 채혈하여 분리한 혈장 샘플을 이용하여 분석함으로써 근육 주사 대비 경구 투여 생체이용률을 확인하기 위하여 실시하였다.

○ 시험 결과, 근육 주사의 경우 최고농도에 도달하는 시간이 0.17시간으로 경구 투여(4시간)보다 빨랐으며, 도달농도도 17700 ng/ml으로 경구 투여의 경우 (8740 ng/ml)보다 높았다. 또한 반감기는 투여경로와 무관하게 약 24시간으로 동일하였고, 근육 주사 대비 경구 투여에 대한 생체이용률은 AUC INF_prediction 기준으로 77.6%에 이르렀다 (그림 105, 표 38).

Pig PK (Ribavirin im & po 1 mpk)

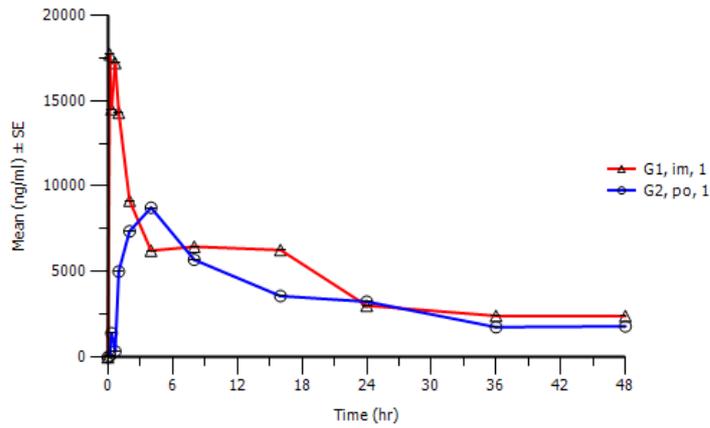


그림 105. 돼지에 ribavirin의 경구 투여 및 근육 주사 후 평균 혈장 농도 곡선

표 38. 돼지에서 ribavirin의 근육 및 경구 투여 시 약동학 시험 결과

Parameters	근육주사 (IM)	경구투여 (PO)
Dosage (mg/head)	257.1	321.45
C_{max} (ng/ml)	17700	8740
T_{max} (hr)	0.17	4.00
AUC_{inf} (hr*ng/ml)_predicted	284655	220556
AUC_{all} (hr*ng/ml)	216867	168393
$t_{1/2}$ (hr)	23.64	23.64

(라) 결론

- 투여경로 별 독성 및 PK 프로파일을 알아보기 위해, 돼지에 ribavirin을 경구투여 혹은 근육주사 하였다. 경구투여와 근육주사를 비교하기 위해 사람과 원숭이에서 사용하는 치료 용량을 기준으로 돼지에 접종하였다. 환산된 용량을 투여하였을 경우, 경구, 경구투여와 근육주사 모두 초기 부작용을 나타내지는 않았다.
- 약동학적 평가는 경구투여보다 ribavirin의 근육주사가 돼지에서 더 효과적인 것을 볼 수 있었다. 또한 현장에서 돼지가 구제역이 감염되면 입술포진으로 인한 활동저하 및 식욕감퇴를 보인다. 이러한 증상을 보일 경우, 항바이러스제를 물에 타서 음수공급한다고 하더라도 돼지에서 효과적인 ribavirin 흡수를 기대하기는 어렵다.
- 주사제로서 사용편의성은 약간 떨어지나, 백신과 병용투여 고려, 정량 투여로 독성 발현의 감소, 약동학적 우수성 등 장점이 많으므로 근육 투여 주사요법이 돼지 구제역 확산방지 목적으로는 더 유리한 것으로 확인되었다.

다. Ribavirin 시제품 제형 연구 및 안정성 평가

(1) 사료 첨가용 산제 및 음수 첨가용 액제 제형 연구

(가) 사료 첨가용 산제로써의 특성을 고려한 부형제 선정

- 왕겨, 석회석분 (탄산칼슘), 옥분, 무수결정포도당을 구제역 항바이러스 후보물질의 사료 첨가용 산제 형태에 부형제로 사용할 물질로 확정하고, 해당 물질들에 대한 특성 분석 및 시험 기준을 확립하였다 (표 39).

표 39. 사료첨가제 부형제 원료의 시험 결과 및 기준 설정

원료명 (사료첨가용 부형제 원료)	시험 항목		측정치 (평균)	시험 기준설정
왕겨	성분%	Moisture	6.8	함습도 10% 이하
		Cellulose	43.8	
		Ash	12.8	
	입도분포%	30 mesh on	35.9	10호체에 95% 이상 통과
		50-80 mesh on	58.6	
		80-100 mesh on	4.9	
		100 mesh pass	0.7	
석회 석분	성분%	CaO	53.4	칼슘염 정성반응 확인
		Fe2O3	0.6	
		MgO	1.9	
		SiO2	1.7	
		Al2O3	0.45	
	입도분포%	30 mesh on	27.5	
		30-60 mesh on	39.3	
		60-150 mesh on	21.0	
		150-325 mesh on	29.5	
		325 mesh pass	3.7	
	건조감량		0.1	3.0% 이하
	중금속		0.0	3 ppm 이하
무수결정포도당	성분%	회분	0.006	0.1% 이하
		텍스트린분	0.8	1.5% 이하
	pH		5.7	4.5-6.5
	건조감량		0.08	1.0% 이하
	중금속		0.0	4 ppm 이하

옥분 (G3)	성분%	수분	12.67	함습도 14% 이하
		조단백	8.1	
		조지방	0.48	
	입도분포%	30 mesh on	28.1	≥40 mesh : 30% 이상 ≥30 mesh : 25% 이상
		40 mesh on	33.7	
		50 mesh on	34.7	
60 mesh on		3.4		
60 mesh pass	0.1			
옥분 (F5)	성분%	수분	12.13	
		조단백	7.83	
		조지방	1.71	
	입도분포%	40 mesh on	0.0	50호체에서 90% 이상 통과
		50 mesh on	0.1	
		60 mesh on	2.4	
		60 mesh pass	97.5	
	건조감량		9.4	건조감량 13% 이하

○ 일반적으로 항생제나 생균제 등의 사료 첨가용 산제 제형에서, 원료 산제의 목적 동물에서의 기호성이 떨어지는 경우에는 감미 증진을 위하여 무수결정포도당을 사용하는 경우가 많고, 감미 증진이 필요하지 않은 경우에는 좀 더 좋은 섞임성 (mixability)과 pH의 보다 안정적인 유지를 목적으로 왕겨, 석회석분, 옥분을 주로 사용한다. 본 연구에서는 표 40과 같은 조성의 두 가지 혼합물을 ribavirin의 사료 첨가용 산제의 부형제로 선정하였다.

표 40. 부형제 별 성분

부형제 A		부형제 B	
물질	비율(무게)	물질	비율(무게)
옥분	55%	무수결정포도당	100%
왕겨	40%		
석회석분	5%		

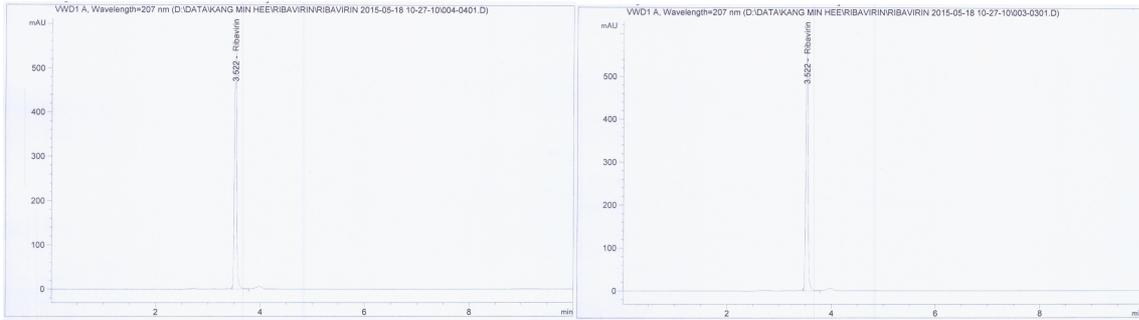
○ 각각의 부형제에 ribavirin 순수물질을 무게 1% 농도로 혼합하여 제품 균질성 확인 시험 및 안정성 시험에 사용하였다.

(나) 배합도 평가를 통한 제품 균질성 확인

○ Ribavirin과 부형제 A, 부형제 B 각각을 혼합한 혼합물 1000 g 씩 제조하고 교반기를

통하여 충분히 혼합한 후 혼합 용기 내의 4곳에서 무작위로 샘플을 채취하였다. 각 부분에서 채취한 샘플에 대하여 LC 분석을 실시하였다.

○ 그림 106과 그림 107에서 측정된 바와 같이, 교반기를 통하여 충분히 혼합 시, 부형제 A와 부형제 B 모두에서 매우 우수한 섞임성이 보장됨을 알 수 있다.



Area : 1639.2 mAU

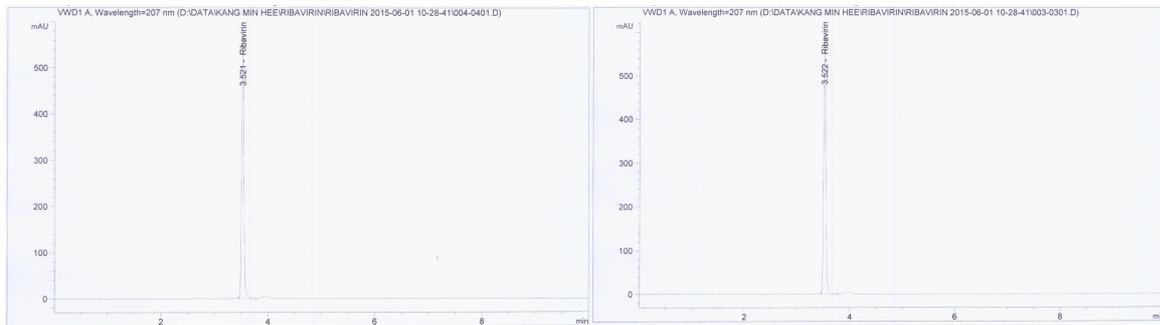
Area : 1644.1 mAU



Area : 1623.2 mAU

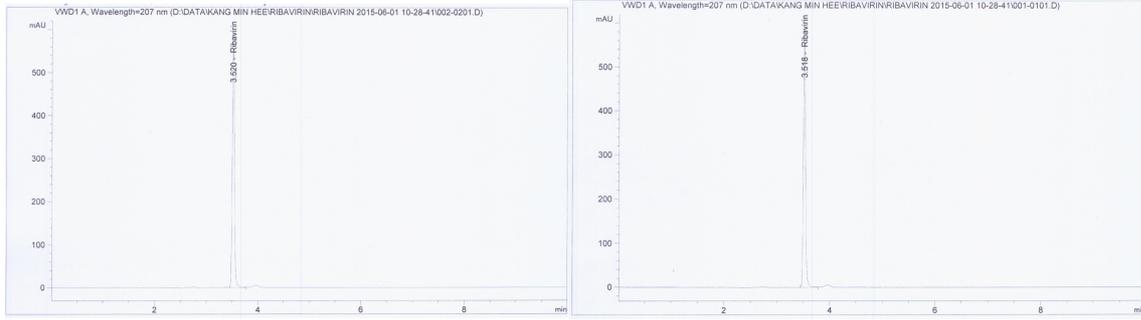
Area : 1638.8 mAU

그림 106. 부형제 A와 혼합 후 ribavirin 정량 분석



Area : 1667.7 mAU

Area : 1637.2 mAU



Area : 1648.2 mAU

Area : 1668.5 mAU

그림 107. 부형제 B와 혼합 후 ribavirin 정량 분석

(2) 사료 첨가용 산제 및 음수 첨가용 액제 안정성 평가

(가) 사료첨가용 산제 안정성 평가

① 시험 방법

- 가속조건 안정성 시험 : 온도 40℃, 습도 75% 환경에서 부형제 A와 B 각각의 ribavirin 혼합물에 대해 보관 안정성 시험을 실시하였다. 각각의 혼합물에 대해 0일, 1주, 2주, 4주, 6주, 8주, 12주째에 시료를 샘플링하였다. 부형제 A의 경우, 구성 물질인 옥분, 왕겨, 석회석분의 용해도가 매우 낮으므로 단순 여과 후 LC로 분석하였고, 부형제 B의 경우, 용액에 녹은 ribavirin과 무수결정포도당을 분리하기가 매우 어려우므로 바로 LC 분석 진행하였다.
- 가속조건 안정성 시험 : 온도 60℃, 습도 75% 환경에서 부형제 A와 B 각각의 ribavirin 혼합물에 대해 보관 안정성 시험을 실시하였다. 샘플링 간격 및 부형제 별 LC 분석 방법 등은 가속조건 안정성 시험 항목과 동일하다.

② 시험 결과

표 41. 사료첨가용 산제의 가속 및 가혹 안정성 시험 raw data

조건	부형제	구분	0주차	1주차	2주차	4주차	6주차	8주차
실온	A	Area(mAU)	1665.852	1658.608	1650.781	1625.388	1665.937	1660.433
		Percentage		99.6%	99.1%	97.6%	100.0%	99.7%
	B	Area(mAU)	1689.25	1682.963	1600.714	1671.137	1652.033	1652.253
		Percentage		99.6%	94.8%	98.9%	97.8%	97.8%
가속	A	Area(mAU)		1661.98	1673.382	1610.323	1604.954	1602.693
		Percentage		98.4%	99.1%	95.3%	95.0%	94.9%
	B	Area(mAU)		1694.675	1686.739	1668.852	1649.97	1654.163
		Percentage		100.3%	99.9%	98.8%	97.7%	97.9%
가혹	A	Area(mAU)		1641.113	1640.418	1681.668	1666.588	1635.492
		Percentage		97.2%	97.1%	99.6%	98.7%	96.8%
	B	Area(mAU)		1666.7	1656.395	1660.258	1659.909	1658.652
		Percentage		98.7%	98.1%	98.3%	98.3%	98.2%

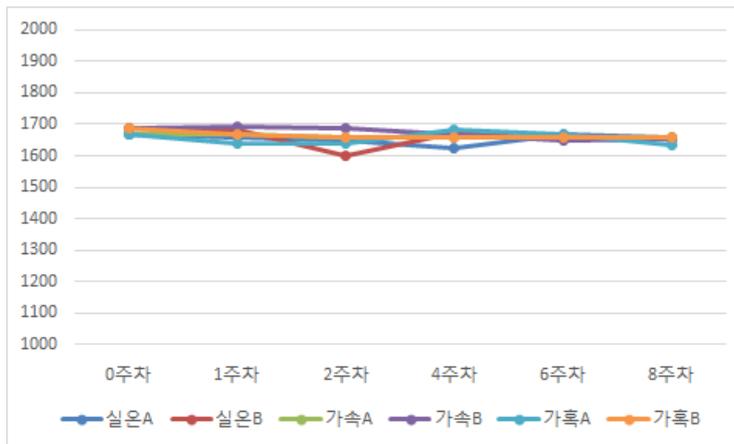


그림 108. 사료첨가용 산제의 가속 및 가혹 안정성 시험 결과

○ 사료 첨가용 산제 제형의 ribavirin 제제에 대해 실온조건 및 가속, 가혹조건에서 안정성을 측정하였을 때, 모든 그룹에서 최후 측정일인 8주까지 물질의 안정성이 매우 우수하게 유지되는 것을 확인하였다. 가속 및 가혹조건 모두에서 부형제 B를 사용한 경우의 안정성이 미미하게 높게 나타났으나, 부형제 A를 사용했을 경우와 통계적인 유의성은 발견되지 않았다 (표 41, 그림 108).

(나) 음수첨가용 액제 안정성 평가

① 시험 방법

○ 용해도 평가

- 용해도 : 100 g의 용매에 녹을 수 있는 최대 용질의 양
- 용질 : ribavirin 순수물질(순도 99.9% 이상)
- 용매 : 증류수
- 측정온도 : 25℃
- Ribavirin 과량을 시험관에 넣고 증류수 80 ml 첨가
- 측정온도를 유지할 수 있는 항온 배양조 안에서 1시간 동안 교반
- 고체상태의 용질이 관찰되지 않는 부분에서 20 ml 샘플링
- 샘플링 된 20 ml을 여과하여 용해되지 않은 ribavirin 제거
- 증발용기의 무게를 정확히 측정한 후 20 ml 용액을 넣어 가열
- 용액이 모두 증발된 후 측정온도까지 냉각 후 무게를 측정
- 아래와 같은 계산식을 통하여 ribavirin의 용해도를 측정

$$\frac{S}{100} = \frac{[m_2 - m_0]}{[m_1 - m_2]}$$

S : 용해도 (g/100g 용매)

m₀ : 증발 용기의 질량 (g)

m₁ : 용기 및 포화용액의 질량 (g)

m₂ : 증발, 건조 후 질량 (g)

- 위와 같은 방법으로 3회 반복 측정

- 가속 및 가혹 조건 안정성 시험은 증류수에 무게 비율 1%로 ribavirin 용해 후, 사료 첨가용 산제와 동일한 방법으로 진행하였다.

① 시험 결과

- 용해도 : 증류수 100 g (100 ml) 당 ribavirin 16.8 g이 용해 가능하여, 용해도가 매우 높은 것을 확인하였다 (표 42).

표 42. 사료첨가용 산제의 용해도 시험 결과

항목	반복 1	반복 2	반복 3
측정온도	25℃		
용해도	15.3	18.2	16.8
평균 용해도	16.8 (g/100g)		

○ 가속 및 가혹 조건 안정성 평가 : 음수 첨가용 액제 제형의 ribavirin 제제에 대해 실온조건 및 가속, 가혹조건에서 ribavirin의 안정성을 측정하였을 때, 모든 그룹에서 최후 측정일인 8주까지 물질의 안정성이 매우 우수하게 유지되는 것을 확인하였다 (표 43, 그림 109).

표 43. 음수첨가용 액제의 가속 및 가혹 안정성 시험 raw data

조건	구분	0주차	1주차	2주차	4주차	6주차	8주차
실온	Area(mAU)	1680.52	1673.612	1653.181	1635.528	1645.921	1630.522
	Percentage		99.59%	98.37%	97.32%	97.94%	97.02%
가속	Area(mAU)		1641.468	1683.522	1660.783	1634.554	1642.93
	Percentage		97.68%	100.18%	98.83%	97.26%	97.76%
가혹	Area(mAU)		1631.734	1620.148	1631.645	1663.554	1635.332
	Percentage		97.10%	96.41%	97.09%	98.99%	97.31%

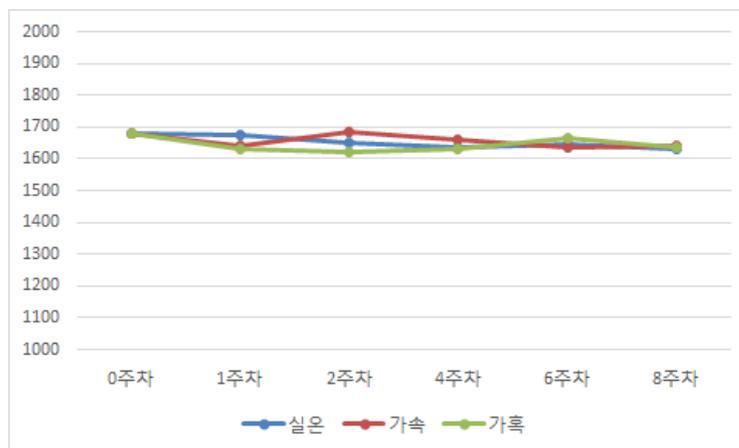


그림 109. 음수첨가용 액제의 가속 및 가혹 안정성 시험 결과

(3) 사료 및 음수 첨가용 산제 시제품 생산

- 부형제 A와 부형제 B 간의 섞임성 및 안정성 측정 결과 통계학적인 유의성을 발견할 수 없었으므로, 제품 생산의 간편성 (단가), 목적동물 섭취 시의 기호성을 고려하여 부형제 B (무수포도당)를 시제품 생산 시 부형제로 선택하였다. 순도 99.9% 이상의 ribavirin 원말을 무수포도당 분말에 1%로 첨가하여 시제품 1 kg을 제작하였다 (그림 110). (자돈 120두 1회 섭취 가능량)



그림 110. Ribavirin 사료첨가용 산제 시제품 사진

- Ribavirin의 용해도 실험 결과, 사료 첨가용 산제를 추가적인 제형 변화 없이 급수 라인이나 저수통에 첨가하여 사용하여도 충분히 가능할 정도로 높은 용해도임을 관찰하였다. 사료 첨가용 산제에서 부형제로 사용되는 포도당 역시 알려진 용해도가 매우 높으므로, 음수 첨가용 액제 제형을 따로 제작 및 생산할 필요가 없다고 판단되어 음수 첨가용 액제의 시제품 및 이후 본 제품을 사료 첨가용 산제 제형으로 통일하였다.

■ Ribavirin 시제품 생산 및 평가

가. Ribavirin 시제품의 SPF 미니돼지에서 구제역 억제 효능 평가

(1) Ribavirin과 adjuvant 혼합 제형의 결정

- 마우스 실험에서는 ISA-201 adjuvant를 사용하여 ribavirin의 구제역 억제 효과를 확인하였다 (그림 91). Adjuvant는 선천면역을 증가시켜 항바이러스 효과를 높이고 ribavirin의 체내 흡수를 지연시켜 PK 프로파일이나 안전성을 향상시킬 것으로 예상되었다. Ribavirin 시제품을 제조하기 전 ribavirin의 주사접종에 의한 구제역 억제 효과를 높이기 위하여 혼합할 adjuvant를 결정하기 위하여 ISA-201과 ISA-206 등 두 가지 adjuvant에 대하여 SPF 미니돼지를 이용한 구제역 억제 효능평가를 실시하였다.
- 실험 방법 : ISA-201 또는 ISA-206 adjuvant를 1.8 g의 ribavirin과 혼합하여 3개월령 SPF 미니돼지에 근육 투여한 다음, 1×10^5 TCID₅₀ Asia1/Shamir 구제역바이러스를 발바닥에 접종하였다. 8일 간 구제역에 의해 나타나는 임상증상을 관찰하고 표 32의 기준에 따라 점수를 매겨 기록하였다.

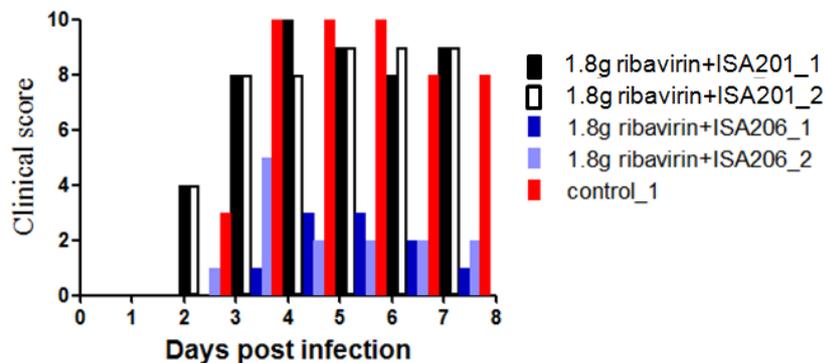


그림 111. Ribavirin과 adjuvant 혼합 제형 결정을 위한 SPF 미니돼지 효능평가 결과

- 실험 결과 : 동일 양의 ribavirin을 투여하였으나 ISA-206 혼합제형이 ISA-201 혼합제형에 비하여 더 낮은 구제역 임상점수를 보이는 것으로 보아 ISA-206이 ISA-201에 비하여 adjuvant로써 높은 효과를 나타내었다고 볼 수 있다 (그림 111). 따라서 시제품은 ISA-206을 이용하여 제조하기로 결정하였다.

(2) Ribavirin 시제품 효능 평가

- 생산된 ribavirin 시제품 (RIBA-DOE)을 이용하여 구제역 억제 효능평가를 실시하였다. 실제 구제역 발생 상황을 가정하여 ribavirin 시제품 단독 투여와 백신과 병용투여 시 효과를 비교하여 보았다.

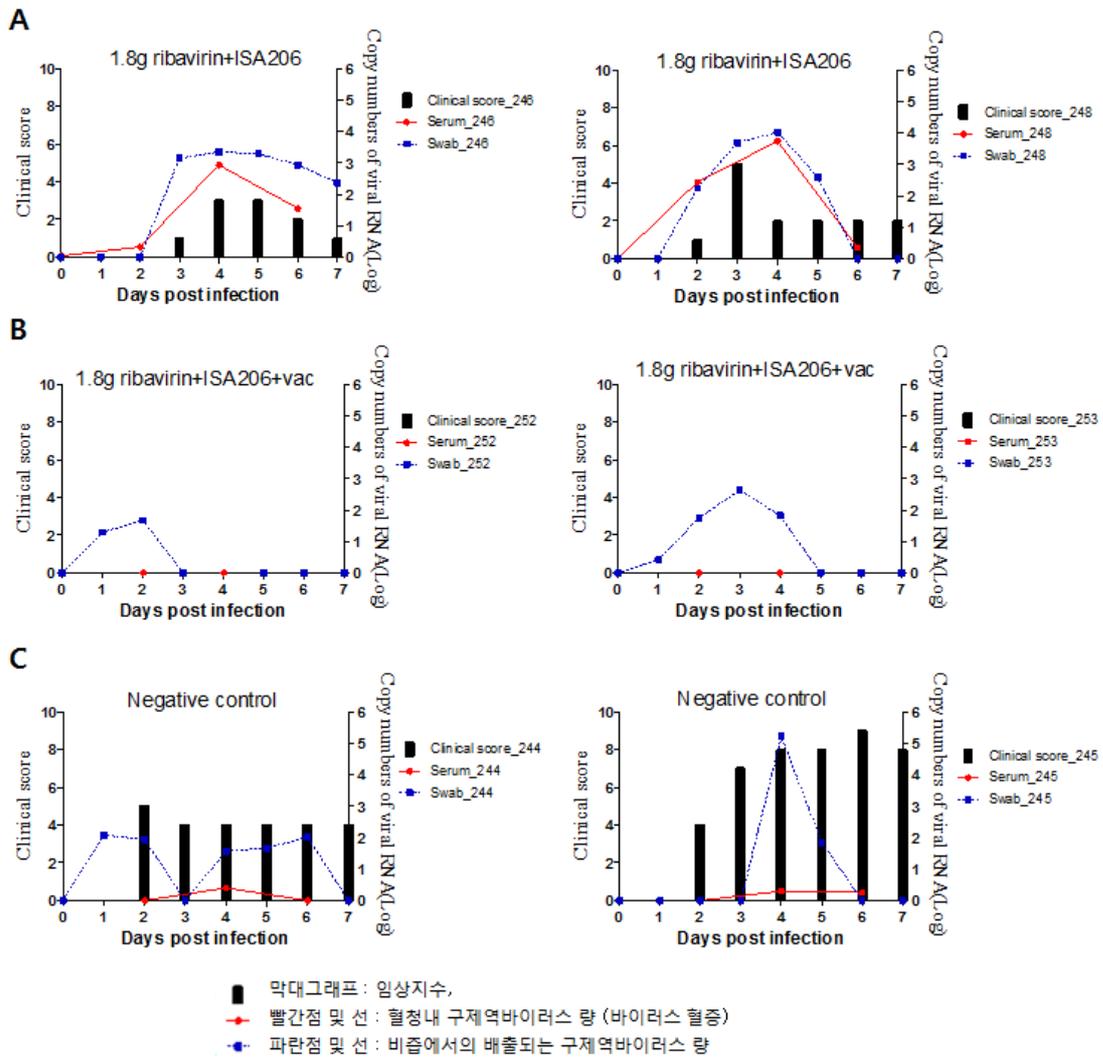


그림 112. Ribavirin 시제품의 SPF 미니돼지에서 구제역 억제 효능평가 실험 결과 (그래프)



그림 113. Ribavirin 시제품의 SPF 미니돼지에서 구제역 억제 효능평가 실험 결과 (사진)

- 실험 방법 : SPF 미니돼지를 이용하여 각 그룹 당 2두 씩 RIBA-DOE (1.8 g ribavirin + ISA-206) 균 (그룹 1)과 RIBA-DOE와 백신 접종 균 (그룹 2), 대조군 (그룹 3)으로 나누고, 약제 근육 투여 후 1×10^5 TCID₅₀ Asia1/Shamir 구제역바이러스를 발바닥에 접종하여 7일 간 임상증상을 관찰하였다. 임상증상을 표 32에 의거 지수화하였다. 혈액 내 혈청과 비구강 스왑 샘플로부터 바이러스를 분리하고 real-time RT PCR을 이용하여 바이러스 양을 정량하였다.
- 실험 결과 : 그룹 1에서는 임상지수가 최고 3일 만에 최고 5점까지 형성되었으며, 바이러스 혈증과 바이러스 배출이 3일 또는 4일째에 최고치를 나타내었고, 바이러스 양은 약 1×10^5 의 비교적 높은 양이 배출/검출되었다. 그룹 2에서는 그림 119의 사진에서 보이는 바와 같이 발굽 수포 형성 등 임상증상이 전혀 보이지 않았으며, 혈액 내 바이러스 또한 검출되지 않았다. 2~3일 만에 $1 \times 10^{2 \sim 3}$ 의 비교적 낮은 양의 바이러스만이 배출되는 것으로 보아 바이러스가 인접 동물로 전파, 감염될 확률이 현저히 낮음을 유추할 수 있다. 음성 대조군인 그룹 3의 경우 약 1×10^6 의 매우 높은 양의 바이러스가 배출된 것을 확인하여 구제역바이러스 증식이 활발하게 일어나고 있음을 알 수 있다. (그림 112, 113).

나. 시제품 생산 및 검정기준 확립

(1) 원료수입 및 순도 확인

(가) 원료 수입

표 44. Ribavirin 수입 내역

제조원	UBEI YITAI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (중국)
수입대행	트리언인터내셔널 (대한민국)
수입물질	Ribavirin
제조번호(Batch number)	150201
수입량	50kg

- 위와 같은 내용으로 2015년 12월, 농림축산검역본부에 수입신고서를 제출하였으며, 제조사인 HUBEI YITAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.로부터 수입을 진행하는 batch (150201)에 대한 CoA (Certification of analysis)를 전달받고 해당 CoA에 대한 내용을 검토 및 확인 후 수입을 진행하였다 (그림 114).



그림 114. 수입 완료된 Ribavirin 원료 사진

(나) 원료의 순도(purity) 확인

- HUBEI YITAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.의 CoA에 의하면, 적외선 흡수 스펙트럼 시험 및 Thin-layer chromatography로 분석하였을 때, 99.3%의 순도임을 확인하였다.
- 그 외의 수소이온농도(pH) 시험, 수분함량, 중금속 함량 등 전 항목에서 사용 적합한 품질임을 확인하였다.
- 위와 같은 내용으로 2016년 1월, ribavirin 50kg의 수입이 완료되었으며, 시제품 제작 단계 전 HUBEI YITAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.의 CoA와 유사한 항목들에 대한 자체 분석을 실시하여, CoA의 내용이 정확함을 확인하였다 (Data not shown).

湖北益泰药业有限公司检验报告

利巴韦林

HUBEI YITAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
ANALYSIS CERTIFICATE FOR RIBAVIRIN



制造日期 MEG. DATE	2015.02.14	检验编号 ANALYSIS REGISTER	15002
批号 BATCH NO.	150201	检验日期 ANALYSIS DATE	2015.02.15
数量 QUANTITY	1000KG	质量标准 QUALITY STANDARD	USP36
检验项目 Analysis Items	标准规定 Standard		检测结果 Results
比旋度 Specific tests	-33.5° ~ -37.0°		-36.0°
【鉴别】 Identification 1. 红外光谱 IR	红外光谱应与对照品的红外光谱一致 The infrared absorption spectrum of Sample compare with the RS exhibits similar intensities of absorption at the same wave numbers.		符合规定 Conform
2. 薄层色谱 TLC	供试品溶液中主斑点的 Rf 与标准品溶液主斑点的 Rf 一致 The Rf value of the principal spot obtained from the test solution corresponds to that obtained from the standard solution		符合规定 Conform
pH	4.0-6.5		5.8
有关物质 Impurities	单个杂质 Any individual impurity	≤0.25%	0.1%
	总杂质 Total impurities	≤1.0%	0.1%
干燥失重 Loss on drying	≤0.5%		0.1%
炽灼残渣 Residue on ignition	≤0.25%		0.20%
重金属 Heavy metals	≤10ug/g		符合规定 Conform
【含量】 Assay	按干品计, 含利巴韦林 (C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅) 98.9%~101.0% Calculated on the dried basis, contains 98.9%~101.0% of (C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅)		99.3%
结论: 本品按规定标准检验符合规定 Result: Conform to the requirements of standard		有效期: 2017年02月13日 Expiry date: 2017.02.13	

THE DIRECTOR

OF THE QUALITY

LAB SECTION 曹红

审核

EXAMINER 陈雄兵

检验

ANALYST 张瑜梅

그림 115. Hubei-Yitai사에서 제공한 품질보증서

(2) Ribavirin 주사제 시제품의 개발 및 생산

(가) 주사제 형태의 시제품 개발의 배경

- 산제 형태의 시제품에 대하여 화학적 분석, 구제역 바이러스 공격접종에 대한 억제 효능, 소동물 및 자돈에서의 안전성 및 독성, 안정성 등을 평가한 결과, 안정성과 화학적 특성에서는 큰 문제가 발견되지 않았으나, 동물에 경구 투여 시 효능에 비해 독성이 지나치게 높게 나타나는 문제점을 확인하였다 (예비실험 결과, data not shown).

- 또한 사료첨가제 형태의 시제품의 경우, 구제역 미감염 정상 동물에서는 구제역에 대한 예방 효과를 나타낼 수 있으나, 구제역에 감염되어 증상이 발현된 동물의 경우 구강 수포형성 및 우울증세로 사료 섭취량이 극히 낮아진다는 점을 감안하였을 때, 실제 구제역 감염 후 확산방지 및 치료용으로 사용 시 실효성이 높지 않을 수 있다. 따라서 구제역 감염 동물에 적용이 쉽고 독성이 나타나지 않는 범위 내 정량 투여가 가능한 주사제 형태의 ribavirin 시제품을 개발하기로 하였다.
- 마우스와 돼지에서 효능이 확인된 Ribavirin-TA 시제품 또한 주사제 형태로 만들어 효능 및 안전성 평가를 수행하고자 하였으나, 이는 과제 종료 후 추후 연구를 통해 진행하기로 하였다.

(나) 부형제의 선정

- 부형제 선정을 위하여 다양한 주사제 부형제를 아래와 같은 기준에 의해 검토하였다.
 - i) Ribavirin의 효능을 높일 수 있도록 장시간에 걸쳐 방출되고, 유효 혈중농도에 도달 후 일정시간 지속되며 투여횟수를 줄일 수 있도록 서방 효과 (Proloned drug release)를 나타낼 것
 - ii) 부가적인 선천 면역 반응을 유도하는 immunoadjuvant 기능을 가질 것
 - iii) 추가적인 시험이 필요하지 않도록 상업적으로 이미 쓰이고 있는 부형제일 것
- 위와 같이 검토한 결과 및 SPF 미니돼지를 이용한 효능평가 결과를 토대로 프랑스 Seppic 社의 ISA-206을 ribavirin 주사제 시제품의 부형제로 선정하였다. Seppic 社의 경우 동물약품 업계에서 세계 최대의 부형제 생산업체이며, ISA-206은 Merial 社의 구제역 백신 제조에 오랜 기간 쓰여 오며 안전성과 신뢰성을 확보하였다. Double oil emersion (DOE)의 Oil-Water-Oil 형태의 부형제로서, 원료 물질의 혈중 흡수 속도를 늦추는 능력 역시 탁월한 것으로 알려져 있다 (Bartett PV et al. 1996, Vaccine). 구제역 백신과 혼합하여 사용하게 될 경우에도, 백신과 동일한 부형제를 사용하기 때문에 부형제 간 간섭현상이 없을 것이므로 유리하다고 판단하였다. 무엇보다도 ribavirin과 혼합 적용 부형제 선정을 위한 예비실험 결과 ISA-201, alumium hydroxide 젤 등 다른 부형제를 사용한 경우에 비해 돼지에서 구제역 방어효과가 높다는 장점이 있었다.

(다) Ribavirin 유효용량 및 시제품 제조방법의 결정

- Seppic 社의 프로토콜에 따라 Ribavirin+ISA-206 혼합물을 다양한 용량의 ribavirin dose로 제조하여 자돈에서 구제역 바이러스 공격접종 예비실험을 실시하였으며 (data not shown), 그 결과를 토대로 자돈 1두 당 ribavirin의 함량 및 제조방법 등을 결정하였다. 상세한 시제품의 제조방법은 아래와 같다. 시제품의 명명은 “RIBA-DOE (Ribavirin + Double oil emersion)”로 결정하였다.

표 45. RIBA-DOE의 원료약품 및 분량 (10두분 - 50 ml)

성분	합량
Ribavirin	18 g
PBS	22 ml
Montanide ISA-206	38 ml

○ RIBA-DOE 제조방법 (그림 116~118)

- 65℃의 멸균 PBS (Phosphate buffered saline) 22 ml에 18 g의 Ribavirin을 용해한다.
 - 용액의 온도를 31℃로 낮춘다.
 - 용액에 같은 온도의 ISA-206 38 ml 첨가 후 overhead stirrer에서 350 rpm의 속도로 5분간 교반한다.
- * 대량 제조 시에는 각 성분의 합량만 증가하며 과정은 동일하다.

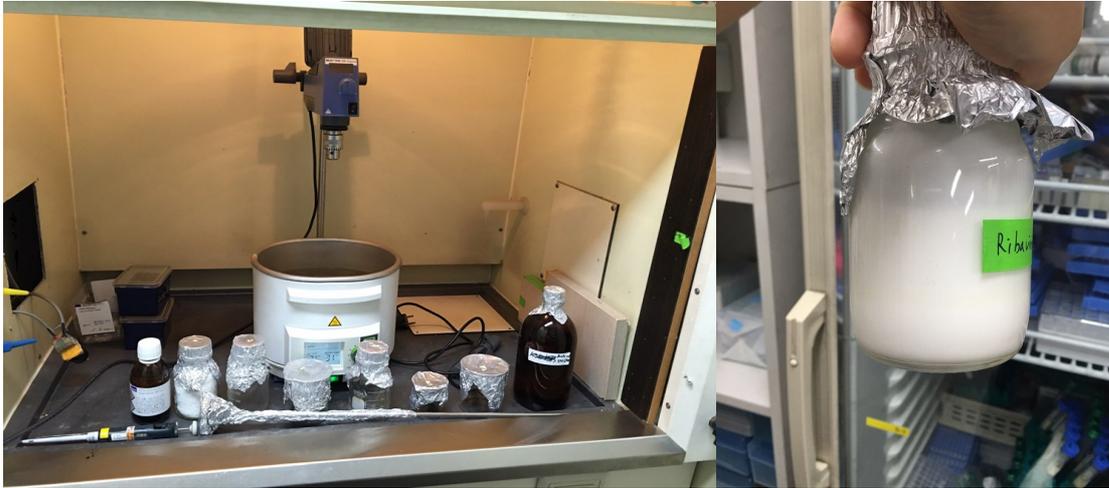


그림 116. Overhead stirrer를 사용한 Ribavirin과 ISA-206의 혼합제조와, 혼합된 Riba-DOE 벌크

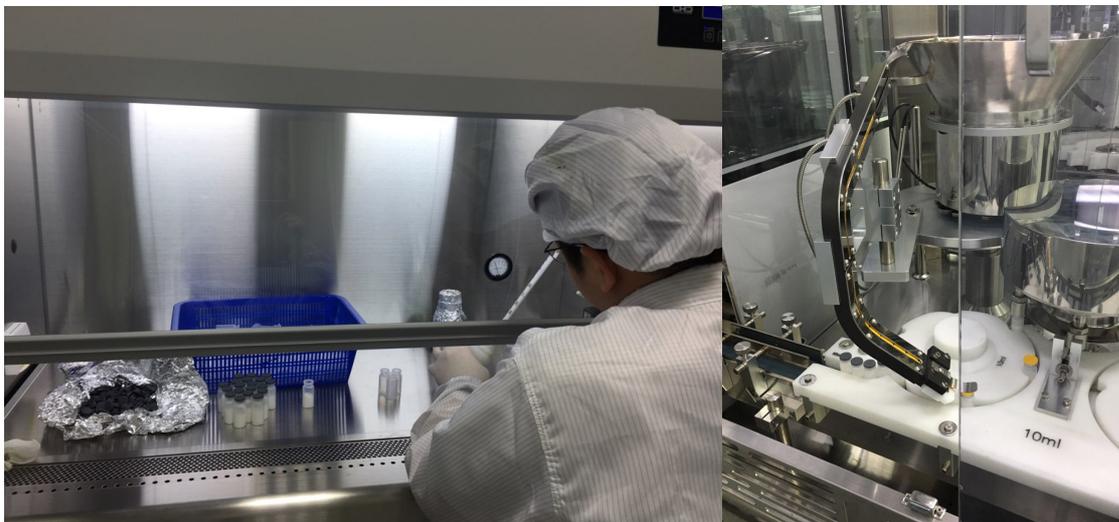


그림 117. Riba-DOE 벌크의 소분 및 Capping Machine을 이용한 소분병의 Capping



그림 118. 소분 후 Capping 완료된 Riba-DOE와, 라벨링이 완료된 Riba-DOE 최종 시제품

(라) 시제품 생산 결과

- 상기한 성분 및 제조방법에 의해 3배치 (각 30, 30, 40병; 병 당 50 ml, 10두분)의 RIBA-DOE를 생산하였으며, 효능평가, PK 분석, 독성 및 잔류 평가, 검정기준 확립 연구, 보관안정성 시험 등 추가적인 시험을 위하여 사용하였다.

(3) 검정기준의 확립

- RIBA-DOE의 보관안정성 시험 및 그 결과에 따른 유효기간 산정을 위하여 RIBA-DOE의 효능을 보증할 수 있는 검정기준의 확립이 필요하였으며, 아래와 같은 검정기준을 제시하였다.

(가) 시험법의 종류 및 기준

① 특성시험

- RIBA-DOE에 대하여 색조, 투명도 (혼탁도), 이물, 이취, 내용물의 균일성을 검사한다. RIBA-DOE를 25℃ 상태에서 아래 항목에 대한 검사를 실시한다.
 - 색조시험 : 자연광 또는 1,000 Lux 이상의 백색광원 아래에서 RIBA-DOE의 색조를 관찰한다.
 - 이물시험 : 자연광 또는 1,000 Lux 이상의 백색광원 아래에서 육안으로 관찰한다.
 - 이취시험 : 코를 이용하여 RIBA-DOE의 냄새를 맡아본다.
 - 판정 : RIBA-DOE는 최초 제조 상태와 동일한 본래의 조성을 지녀야 하며, 색조, 이물, 이취에 대하여 이상이 없어야 한다.



그림 119. 특성시험 진행을 위한 유리병의 예

② 무균시험

- 제품의 개봉 : 시험은 무균실에서 엄격한 무균 조작법에 의하여 실시한다. RIBA-DOE의 개봉 시에는 내용물이 오염되거나 소독제가 내부에 침입하지 않도록 주의하여야 한다.
- 배지 : 배지는 nutrient 배지와 액체 thioglycolate 배지를 사용한다. 액체 thioglycolate 배지의 상부에서 30% 이상이 핑크색으로 변한 것은 사용하여서는 안 되며 가열하여 산소를 제거하였을 때에는 무방하다.
- 배양재료 : 3개 이상의 RIBA-DOE에 대하여 다음 표와 같이 배양한다.

표 46. 무균시험 배양 조건

배지	배양량	배지개수	배양내역
Nutrient agar 25 ml	0.4 ml	4개	각 0.1 ml - 4개
Nutrient broth 10 ml	4 ml	4개	각 1 ml - 4개
Thioglycollate broth 10 ml	4 ml	4개	각 1 ml - 4개

- 배양 : 접종 후 배양 시험관을 양분하여 35℃ 및 25℃에서 각각 7일 간 배양 관찰한다. 세균 또는 곰팡이 등의 발육이 의심될 때 또는 제제에 의하여 배지가 혼탁할 경우 등 필요하다고 인정될 때에는 새로운 배지에 이식하여 관찰할 수 있다.
- 판정 : 시험의 결과 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 안 된다.

③ 수소이온농도시험

- 수소이온농도 (pH)의 측정 : 수소이온농도 측정기기를 이용하여 측정한다. 기기는 validation 및 calibration을 수행한지 3개월 이내의 기기를 사용하여야 한다. pH 표준용액 및 RIBA-DOE의 온도는 모두 37°C로 일치시킨 후 측정을 실시한다.
- 판정 : RIBA-DOE의 pH는 6.5~8.0의 범위 내에 해당하여야 한다.

④ Ribavirin 함량시험

- 기지 농도의 ribavirin에 대한 UV spectrum integration 값으로부터 얻어진 calibration curve를 얻고 이를 통해 미지 농도의 시료를 정량분석을 실시한다.
- Ribavirin 농도 표준곡선 작성 : 표준용액으로써 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 µM의 ribavirin 용액을 증류수에 희석하여 제조하고 Liquid chromatography (LC)를 실시하여 ribavirin에 대한 표준곡선을 작성한다. LC 시험 조건은 아래 표와 같다.

표 47. Ribavirin 함량 시험을 위한 LC 시험 조건

Chemical formula	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅
Molecular weight	244.2
Column	4.6 mm × 25 cm column; 5 µm packing L1
Detector	UV 207 nm
Buffer	Sodium dihydrogen phosphate (pH5.0)
Solvent	30% Acetonitrile solution in water
Flow rate	1 ml/min
Run time	10 min
Injection volume	20 µl

Concentration (μM)	AUC (mAU)
10	12525
5	7124
2	3621
1	2520
0.5	2019.5
0.1	1639.3

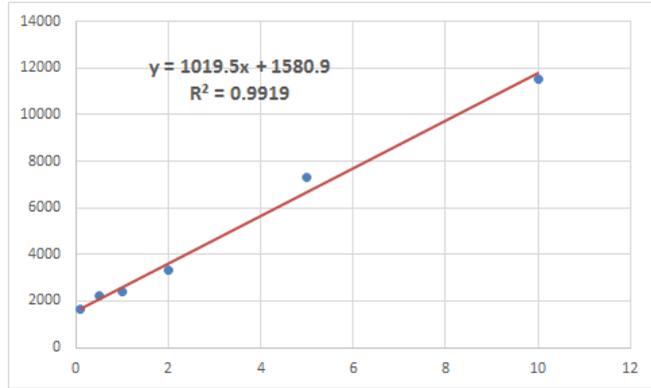


그림 120. Ribavirin 농도별 AUC 수치와 표준곡선

- RIBA-DOE 내 Ribavirin 함량 측정 : RIBA-DOE를 증류수에 10진 희석하여 10⁶배 희석한 시료를 LC 분석에 사용한다. LC 결과, 3.6~3.7 min 내의 범위에서 나타나는 peak를 ribavirin으로 판단하며, 해당 peak의 AUC (Area under curve) 값을 통하여 표준곡선에 대입하여 ribavirin의 농도 (μM 단위)를 산출한다 (그림 120).
- 판정 : ribavirin 목적 함량의 95~105% 범위의 결과인 1.40~1.55 μM의 결과값을 획득한 경우 합격으로 판단한다.

(나) 보관안정성 시험 및 시험결과

① 보관안정성 시험방법의 설정

- 생산된 3배치의 RIBA-DOE 시제품에 대해 3개월 단위 (시제품 생산 후 0개월, 3개월, 6개월)의 보관안정성 시험을, 장기보존시험, 가속시험의 두 가지 조건 하에 실시하였다. 각 시험조건에 대한 보관 온도 및 습도 기준은 아래 표와 같다. (농림축산검역본부 고시 <동물용의약품등 안정성 시험지침> 참조)

표 48. 보관안정성 시험의 온도 및 습도 기준

보관조건	온도	습도
장기보존시험	5℃	10%
가속시험	25℃	60%

- 안정성시험 수행 시에는 상술한 검정기준을 적용하여 보관시간에 따른 RIBA-DOE의 안정성을 평가하였고, 해당 안정성 평가 결과를 농림축산검역본부 고시 <동물용의약품등 안정성 시험지침>에 적용하여 시제품의 유효기간을 설정하였다.

② 장기보존시험 결과

○ 장기보존시험 결과는 표 49~52에 나타난 바와 같다.

표 49. 특성시험 결과

	0개월	3개월	6개월
배치1	적합	적합	적합
배치2	적합	적합	적합
배치3	적합	적합	적합

표 50. 무균시험 결과

	0개월	3개월	6개월
배치1	적합	적합	적합
배치2	적합	적합	적합
배치3	적합	적합	적합

표 51. 수소이온농도시험 결과

	0개월		3개월		6개월	
배치1	pH 6.8 / 7.0 / 6.7	적합	pH 6.9 / 7.1 / 6.7	적합	pH 6.8 / 7.0 / 6.8	적합
배치2	pH 7.0 / 6.7 / 6.9	적합	pH 7.0 / 6.9 / 6.8	적합	pH 6.9 / 6.9 / 6.8	적합
배치3	pH 7.2 / 6.5 / 6.6	적합	pH 7.1 / 6.5 / 6.5	적합	pH 7.0 / 6.7 / 6.7	적합

표 52. Ribavirin 함량시험 결과

	0개월			3개월			6개월		
	AUC	농도(μM)	판정	AUC	농도(μM)	판정	AUC	농도(μM)	판정
배치1	3059.13	1.45	적합	3050.12	1.44	적합	3030.34	1.42	적합
배치2	3118.15	1.51	적합	3115.23	1.50	적합	3092.10	1.48	적합
배치3	3079.70	1.47	적합	3045.66	1.44	적합	3054.39	1.45	적합

③ 가속시험 결과

○ 가속시험 결과는 표 53~56에 나타난 바와 같다.

표 53. 특성시험 결과

	0개월	3개월	6개월
배치1	적합	적합	적합
배치2	적합	적합	적합
배치3	적합	적합	적합

표 54. 무균시험 결과

	0개월	3개월	6개월
배치1	적합	적합	적합
배치2	적합	적합	적합
배치3	적합	적합	적합

표 55. 수소이온농도시험 결과

	0개월		3개월		6개월	
배치1	pH 7.0 / 6.9 / 6.7	적합	pH 7.1 / 7.0 / 7.0	적합	pH 7.2 / 7.0 / 7.1	적합
배치2	pH 7.0 / 7.1 / 6.8	적합	pH 6.9 / 6.9 / 6.7	적합	pH 6.7 / 7.0 / 6.9	적합
배치3	pH 6.6 / 7.1 / 6.9	적합	pH 7.0 / 6.9 / 6.9	적합	pH 7.1 / 6.8 / 7.1	적합

표 56. Ribavirin 함량시험 결과

	0개월			3개월			6개월		
	AUC	농도(μ M)	판정	AUC	농도(μ M)	판정	AUC	농도(μ M)	판정
배치1	3039.45	1.43	적합	3015.03	1.41	적합	3013.38	1.41	적합
배치2	3088.62	1.48	적합	3082.43	1.47	적합	3101.74	1.49	적합
배치3	3079.72	1.47	적합	3080.77	1.47	적합	3087.16	1.48	적합

다. Ribavirin 시제품의 돼지 PK, 독성, 안전성, 잔류 평가

○ 시제품 : 실제 목적동물 효능평가 시 우수한 결과를 보인 RIBA-DOE 주사제

(1) 실험방법

(가) 실험동물 (실험동물윤리위원회 인증번호: IACUC KU 16108)

○ 약 15 kg의 5주령 돼지 16두를 이용하여 ribavirin 주사제의 안전성을 확인하였다. 그룹 당 4마리 씩, 4 그룹으로 돼지를 나누었다. 그룹 1 (DOE 그룹)은 ribavirin 1.8 g/dose와 ISA-206을 섞어 DOE 형태로 만든 주사제 (RIBA-DOE)를 근육투여 하였으며, 그룹 2 (gel 그룹)는 ribavirin과 aluminum hydroxide gel을 섞은 형태의 주사제 (RIBA-Gel)를 근육 투여하였다. 그룹3 (PBS 그룹) 은 control 그룹으로 PBS를 근육투여 하였으며, 그룹 4 (Oil 그룹)는 부형제 (ISA-206)를 단독으로 근육투여 하였다.

(나) 임상증상 평가

○ 시험물질 투여 기간 동안 각 실험동물에 대하여 최소 1일 1회 이상 관찰하여 특이적인 임상증상을 관찰하여 기록하였다. 기록사항으로는 증상 발현시기 및 지속기간을 포함하며 다음 표의 항목을 주요 관찰대상으로 하였고, 임상증상을 수치화 하였다

표 57. 임상증상 관찰 항목

일반적인 각종 임상증상,활동성 및 식이불량	1일 2회 관찰
체온 측정	1일 1회 측정
체중 측정	0dpi, 1dpi, 2dpi, 4dpi, 8dpi, 12dpi, 16dpi 에 측정
일반 외양 (General appearance)	1일 1회 관찰
호흡기 및 소화기 평가	1일 1회 관찰

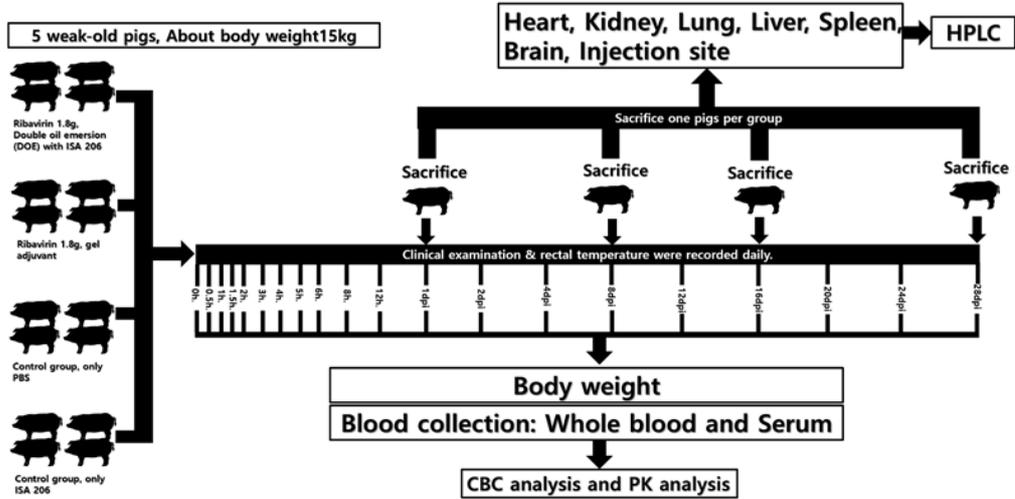


그림 121. Ribavirin 시제품의 돼지에서 PK, 독성, 안전성, 잔류 평가 실험 스케줄

표 58. 수치화된 일반 외양

Scoring system of general appearance in weaned pigs		
Classification	Clinical observations	Score
Normal	Alert, active, eating and drinking well, coat normal, well-hydrated	0
Mildly depressed	Eats and drinks but does not move as quickly as normal, coat may be rough	1
Moderately depressed	Able to stand but inactive, head down, gaunt but still drinking, may be dehydrated	2
Severely depressed	Reluctant to stand, not eating or drinking, gaunt, dehydrated	3
Moribund	Unable to stand, not eating or drinking	4

(다) CBC 검사

- 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사항목은 가능한 많은 항목을 포함하는 것이 바람직하며, 각 항목의 측정에는 각각 국제적으로 널리 이용되는 방법 및 측정단위를 채용한다.

(라) 조직 및 접종부위 평가

- 주사 후, 1일, 8일, 16일, 28일 순으로 그룹 당 한 마리의 돼지를 안락사 및 부검하여, 심장, 폐, 간, 비장, 신장, 뇌, 접종부위 근육을 채취하였다.

(마) 약동학적 검사

- Ribavirin의 약동학적 평가와 조직 내 잔류를 보기 위해, 주사 전, 주사 후 30분, 1시간, 1.5시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 8시간, 12시간, 1일, 2일, 4일, 8일, 12일, 16일,

20일, 24일, 28일에 채혈을 실시하였다.

(바) 시료 전처리

- 분석물질인 ribavirin은 미량저울을 사용하여 필요량만큼 측정하여 DMSO 용액에 30 mg/ml 농도가 되도록 stock solution 을 만들었다. Calibration curve 용 표준액은 stock solution 을 acetonitrile 에 희석하여 각각 741, 2222, 6667, 20000, 60000, 200000, 500000 ng/ml 농도로 working standard solution 을 만든 후, working standard solution 과 pig plasma 를 5 μ l : 45 μ l 비율로 혼합하여 표준용액 농도가 74.1, 222, 667, 2000, 6000, 20000, 50000 ng/ml이 되게 spike하였다. Spike 된 calibration curve 용 표준액과 채혈된 sample 은 IS (verapamil) 50 ng/ml 이 포함된 90% acetonitrile 을 5 μ l : 1200 μ l 비로 혼합하였다. 상온에서 5 분 동안 vortex 하고 15,000 rpm (22,000 g)으로 4°C 에서 5분 간 원심 분리하였다. 상층액 중 200 μ l 를 분리 후 5°C autosampler 에 보관하여 LC/MS/MS MRM mode 로 분석하였다. 시료 전처리의 모든 과정은 얼음 또는 아이스 팩 위에서 진행되었다.

(사) 분석 방법

- 이 시험은 TQ5500 LC/MS/MS (AB/SCIEX)를 이용하여 MRM mode로 진행되었다. 주요 분석 조건은 표 1과 표 2에 요약되어 있으며, LC method는 plasma 및 blood 분석 용과 tissue 분석용으로 별도로 개발하였다. Tissue에는 mass-spec parameter가 동일한 noise peak이 매우 높게 나타나고 있어서 별도의 분석법 개발이 필요하였다.
- 시간대 별 혈장 내 농도 data를 이용하여 WinNonlin software (Pharsight, ver. 6.2) 로 non-compartmental analysis 로 약물동태학적 파라미터를 구하였다.

Analyst	Rivavirin (NNM11601)	IS (Diclofenac)
Mass-spectrometry		
MS Type	Triple Quadrupole	
Model	Triple Quad 5500	
Manufacturer	AB/Sciex	
MS Method		
Ion source	ESI	
Source type	Turbo Spray	
TEM	650 °C	
CUR	50	
IS	5500 V	
GS1	50	
GS2	50	
CAD	8	
MRM parameters	245.2 > 112.9	455.6 > 165.1
DP	36	296
EP	10	10
CE	17	35
CXP	8	12

LC method (plasma, blood)			
LC model	Agilent 1200		
Column	Agilent HILIC 2.1 x 100 mm, 3.5 um		
Buffer A	50% Acetonitrile/0.1% Formic acid		
Buffer B	90% Acetonitrile/0.1% Formic acid		
Column Temp	40 °C		
Injection Vol	2 uL		
Autosampler Temp	7 °C		
LC Gradient			
Time (min)	Flow rate (uL/min)	%A	%B
0.00	500	0	100
1.00	500	100	0
3.00	500	100	0
3.01	700	0	100
5.00	700	0	100
LC method (tissue)			
LC model	Agilent 1200		
Column	Agilent Eclipse plus Phenyl-hexyl 3 x 150 mm, 3.5 um		
Buffer A	0.1% Formic acid		
Buffer B	Acetonitrile/0.1% Formic acid		
Column Temp	40 °C		
Injection Vol	4 uL		
Autosampler Temp	7 °C		
LC Gradient			
Time (min)	Flow rate (uL/min)	%A	%B
0.00	900	95	5
1.00	900	95	5
1.01	1000	0	100
1.50	1000	0	100
1.51	1000	95	5
3.00	1000	95	5

그림 122. 약동학적 검사에 적용된 Mass-spec 및 LC parameters

(2) 실험결과

(가) 증체량 및 체온

- 증체량의 경우, DOE group은 8dpi, 12dpi에서 특이적인 average daily weight gain (ADG) 감소가 보이며, gel group에서는 2dpi, 4dpi, 8dpi에서 특이적인 ADG 감소가 보였다. 전체적으로 PBS나 부형제가 단독으로 투여된 control 그룹에 비해 ADG가 매우 낮은 양상을 보였다. 그러나 ribavirin 접종 후, 실험 기간 동안 체온은 통계학적으로 유의한 변화 양상은 관찰되지 않았다 (그림 123, 124).

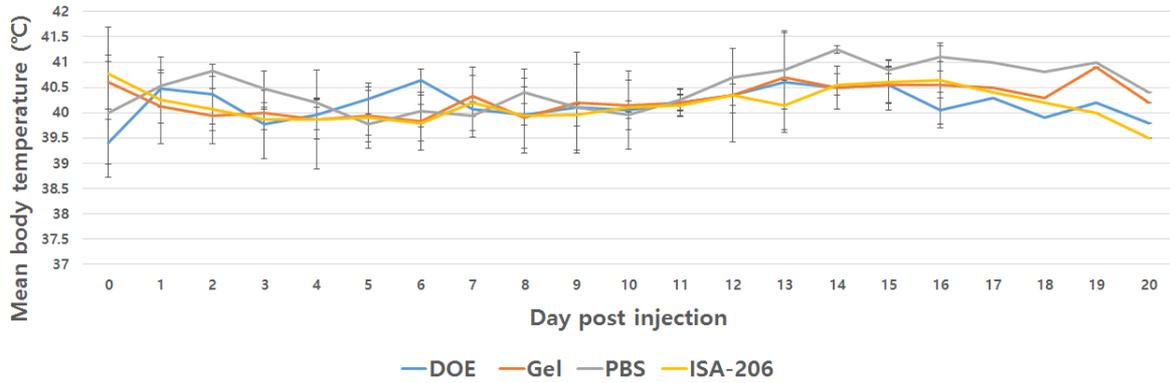


그림 123. Ribavirin 시제품 및 대조 물질을 투여한 돼지의 체온 변화 곡선

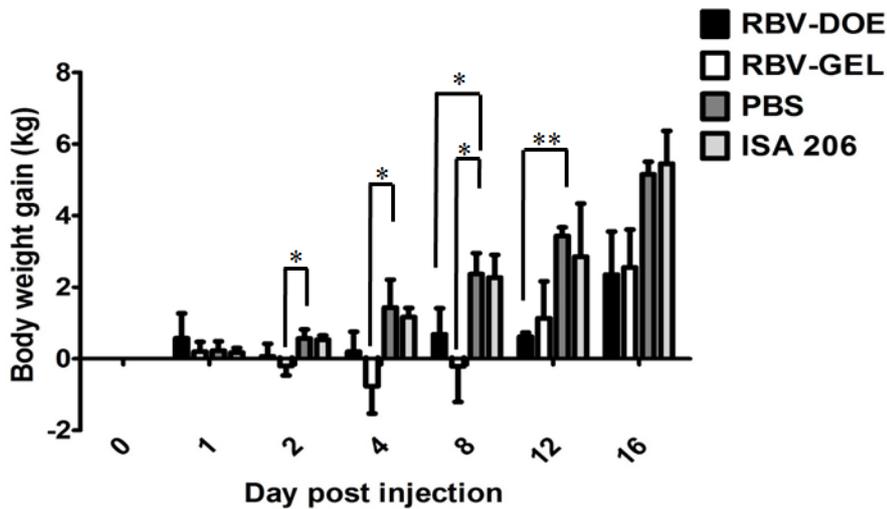


그림 124. Ribavirin 시제품 및 대조 물질을 투여한 돼지의 증체량 변화 그래프

(나) 임상적 평가

○ Ribavirin을 투여한 모든 그룹은 접종 후 5일까지 호흡 곤란 (dyspnea), 식욕 부진 (anorexia), 쇠약 (weakness), 우울 (depression) 증상 등을 보였고, 그 중 DOE 처리한 한 돼지에서 접종 후 12일까지 쇠약, 우울, 식욕 부진, 설사 (diarrhea) 증상을 보였다. 그러나 ribavirin을 투여하지 않은 그룹은 특별한 임상증상이 관찰되지 않았다. 그림 125는 ribavirin을 투여한 그룹과 control 그룹의 임상적 차이를 나타내는 사진이고, 그림 126은 임상학적 평가를 수치화하여 나타내었다.



그림 125. 실험 및 대조군의 접종 후 임상증상 변화를 보여주는 사진

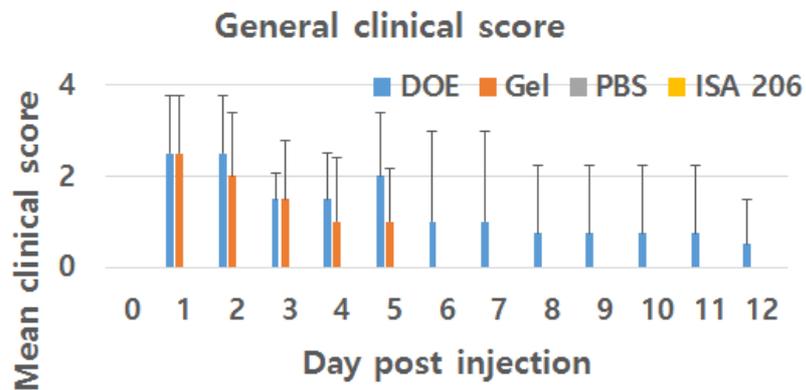


그림 126. 수치화된 임상학적 평가

(다) 장기 및 접종부위 병변

- 부검을 통한 장기의 병변 및 접종 부위의 병변을 확인하였다. 모든 그룹에서 심장, 폐, 간, 비장, 신장, 뇌와 같은 주요 장기에서 병변이 관찰되지 않았다. 접종 부위를 관찰하였을 때, DOE group에서 병변이 관찰되었다. 8dpi까지는 혈종 (hematoma)이 관찰되다가 16dpi 이후부터는 육아종 (granuloma) 형태의 접종 부위 부작용이 관찰되었다 (그림 127).

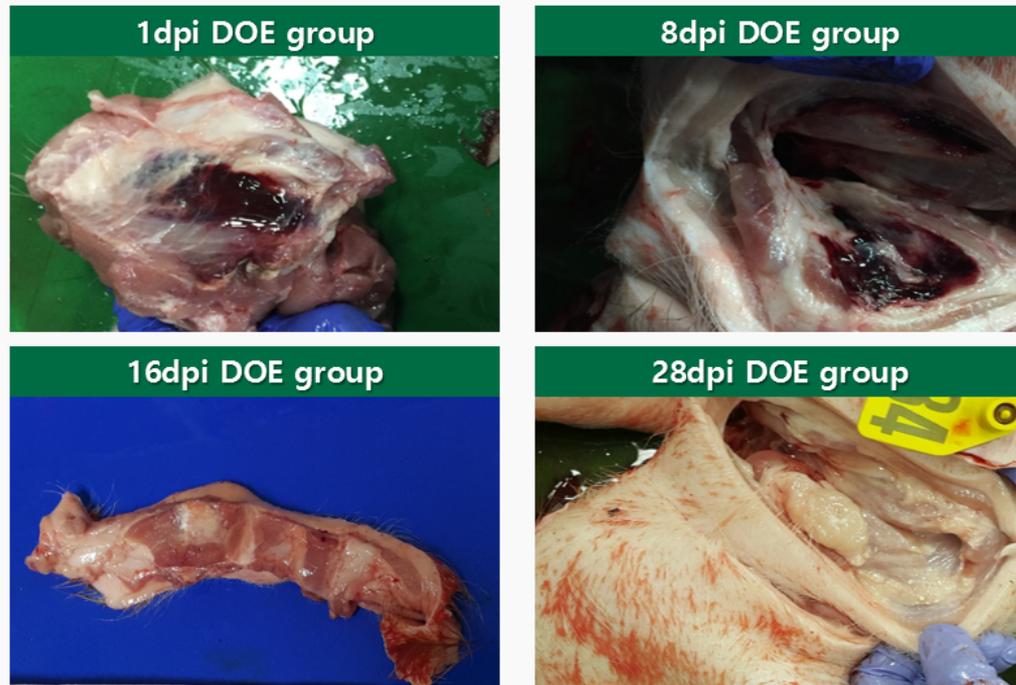


그림 127. DOE 그룹의 접종 부위 병변

(라) CBC 검사

○ Ribavirin의 주요 부작용인 용혈성 빈혈을 확인하기 위해 혈중 적혈구 수치와 헤모글로빈 수치를 확인하였다. 적혈구 수치는, DOE 접종 그룹은 접종 후 12, 24, 48, 96, 192 시간에서 control 그룹과 비교하여 특이적인 감소를 보였다. Gel 그룹은 5, 12, 24, 48, 96 시간에서 control 그룹과 비교하여 특이적인 감소를 보였다. 헤모글로빈 수치는, DOE 그룹과 gel 그룹에서 접종 후 5, 12, 24, 48, 96, 192 시간에 헤모글로빈의 특이적 감소를 보였다 (그림 128).

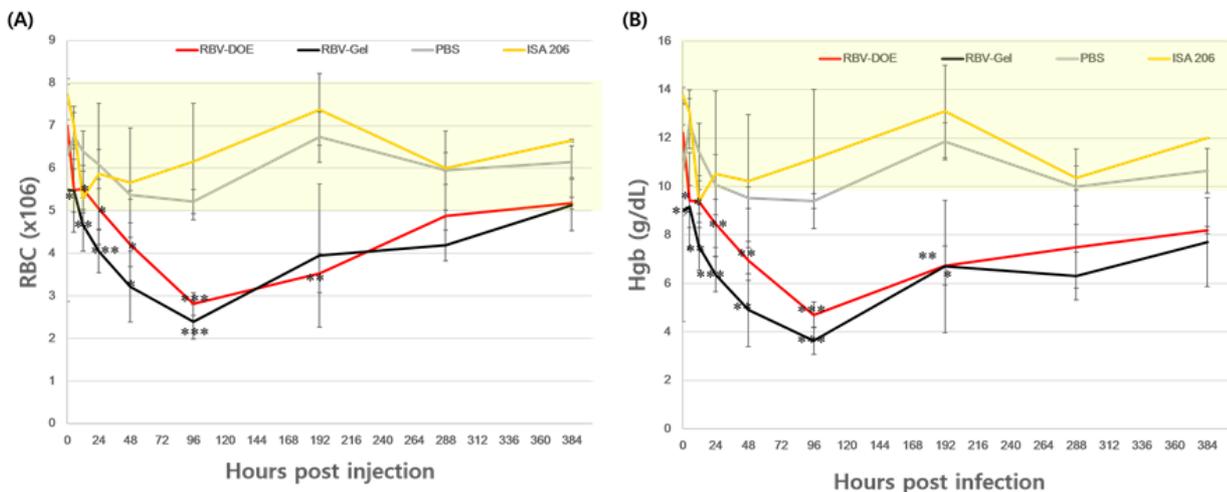


그림 128. 시간에 따른 적혈구 수치 및 헤모글로빈 수치

(마) 약동학적 평가

○ 최고 농도 (C_{MAX})에 달하는 시간은 DOE 그룹과 gel 그룹에서 모두 접종 후 약 1시간 뒤 최고 농도에 달했다. 최고 농도의 수치는 DOE 그룹보다 gel 그룹이 더 높았다. 그러나 AUC와 반감기는 DOE 그룹이 gel 그룹보다 약간 낮았다. 이는 DOE 형태의 주사제의 경우, ribavirin의 안정성 또는 DOE yield가 낮을 가능성을 보여주었다 (그림 129, 표 59).

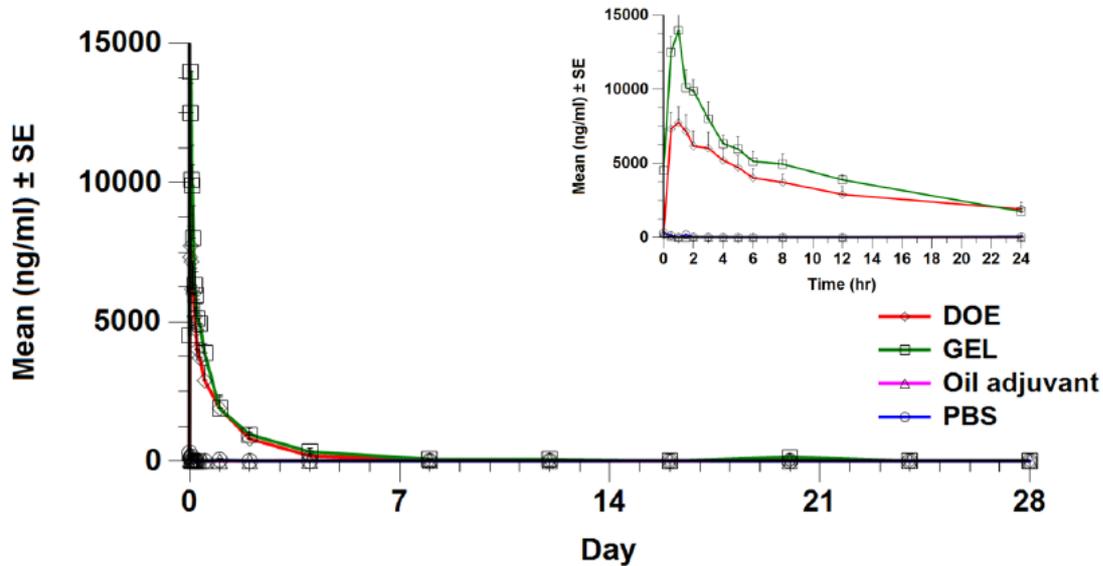


그림 129. 돼지에 시험물질의 근육 주사 후 평균 혈장 농도 곡선

표 59. DOE 그룹과 gel 그룹의 ribavirin에 대한 약동력 프로파일

Parameters	RIBA-DOE (Mean±SD)	RIBA-Gel (Mean±SD)
C_{max} (ng/ml)	8393±1047	14550±1710
T_{max} (hr)	1.00±0.29	1.13±0.31
AUC_{inf_pred} (hr*ng/ml)	144865±33424	190961±40277
AUC_{all} (hr*ng/ml)	139340±37357	185910±43186
$t_{1/2}$ (hr)	33.79±10.114	41.09±12.400
CL/F (ml/hr/g)	12234.35±4013.024	9155.434±2399.25

(바) 조직 내 잔류

○ Ribavirin 투여 후 16 일째 조직 내 잔류 약물의 농도는 혈중 농도가 상대적으로 높은 DOE 및 gel 그룹에서 유사하게 높은 편이었고 특히 신장 내 농도가 다른 장기에 비해 높았으나 모두 LLOQ (최소정량한계) 보다 낮은 범위였고 투여 후 28 일째에는 더욱 낮아지는 경향이였다. 따라서 ribavirin 투여 후 28일 정도 경과 후에는 혈청, 혈액 내 잔

류 농도가 미미할 뿐 아니라 주요 조직 내 약물의 잔류량도 미미할 정도로 배출 (clearance)이 일어나고 있음을 알 수 있다 (표 60).

표 60. 시험화합물의 근육 주사 후 조직 내 잔류 약물 농도 (ng/g tissue)

Day	Formulation	Liver	Heart	Brain	Kidney	Spleen	Muscle	Lung
Day 16	DOE-4	91	27	34	269	56	0	93
	GEL-4	144	1	13	242	54	41	97
	PBS-4	0	15	0	8	38	0	90
	OIL-4	28	0	0	1	2	8	74
Day 28	DOE-4	8	20	0	21	90	266	97
	GEL-4	0	9	0	6	82	0	84
	PBS-4	36	1	0	0	11	8	73
	OIL-4	0	13	0	0	90	12	73

(3) 결론

○ 독성 및 안전성 평가

- 현장에서 적용 가능한 ribavirin과 ISA-206의 혼합주사제 (RIBA-DOE) 및 Aluminium hydroxide gel 혼합주사제 (RIBA-Gel)를 돼지에 투여했을 때 나타나는 독성 및 부작용을 관찰하였다. 투여용량은 ribavirin이 구제역바이러스를 방어하는 용량인 1.8 g/dose을 투여하였다. 증체량을 봤을 때, ribavirin을 투여한 그룹에서 혼합된 부형제 종류와 상관 없이 모두 확인한 증체량 감소를 확인하였다. 또한 ribavirin 투여 그룹의 돼지는 호흡 곤란, 쇠약 증상을 보이며, 심할 경우 설사까지 보이는 것을 확인하였다. 장기에서는 특별한 병변이 확인되지 않았지만, DOE 그룹에서는 혈중 및 육아종이 발견되었다. 접종 부위 병변은 DOE의 자체적 특징으로 ribavirin과는 무관한 것으로 보인다. 또한 혈액검사를 결과 투여 후 4일째까지 적혈구, 헤모글로빈의 급격한 감소를 확인하여, ribavirin의 주요 부작용인 용혈성 빈혈이 돼지에서도 나타난다는 것을 확인하였다.
- 결론적으로 ribavirin을 구제역바이러스를 억제하는 용량으로 투여할 경우, 돼지에서 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 본 연구에서 나타난 독성을 줄이고 효능을 높이는 ribavirin 제형에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한 DOE 제형의 안정성과 yield에 대한 평가도 필요한 것으로 생각된다.

○ 약동력학 평가

- DOE 및 gel 부형제를 혼합한 ribavirin에 대한 약동학 시험에서는 Tmax가 두 제형 모두 1시간 정도로 나타났고, ribavirin을 PBS에 섞어 주사한 경우 Tmax는 0.17 시간 이므로 (그림 105, 표 34) 혈장 내 최고농도에 다다른 속도는 부형제를 썼을 경우 6배 정도 느려졌다고 볼 수 있다. 또한 투여 용량이 7배 증가했음에도 불구하고 Cmax 값은 절반으로 떨어져 약물이 혈장으로 들어가는 속도가 현저히 감소했음을 알 수 있다. Ribavirin을 PBS에 섞어 주사한 경우 반감기 ($t_{1/2}$)는 약 24시간으로, DOE (약 34

시간) 및 gel (약 41시간) 부형제 사용 시 각각 42%, 70% 정도 반감기가 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 DOE 및 gel 부형제는 ribavirin의 서방 효과 (prolonged drug release)를 유도하였다고 볼 수 있다.

표 61. Ribavirin과 RIBA-DOE의 약동력학 분석 결과 비교

Parameters	Ribavirin	RIBA-DOE
Dosage (mg/head)	257	1800
C _{max} (ng/ml)	17700	8393±1047
T _{max} (hr)	0.17	1.00±0.29
AUC _{inf} (hr*ng/ml)_predicted	284655	144865±33424
AUC _{all} (hr*ng/ml)	216867	139340±37357
t _{1/2} (hr)	23.64	33.79±10.114

○ 잔류량 평가

- 6대 장기 및 집중부위의 ribavirin 잔류량을 분석한 결과 28일 정도 경과 후에는 혈액을 포함하여 조직 내 잔류량도 미미할 정도로 배출 (clearance)이 이루어지고 있음이 확인되었다. 이러한 사실로 미루어 구제역 발생에 대한 긴급방역대책으로서 ribavirin을 사용할 경우 최소 1달 정도의 휴약기간이 필요함을 알 수 있다.

3-4 사업화 성과 및 매출 실적

가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	75 억원 예상
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - 국외 : -
			향후 3년간 매출	국내 : 100% 국외 : 40%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		-
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		2위

나. 사업화 계획 및 향후 일정

(1) 사업화 계획 및 예상 매출실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	현재까지 3년 및 추가 1년 예상			
	소요예산(백만원)	200			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		-	25	25	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	100	100
국외		-	40	60	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	구제역백신과 ribavirin을 혼합하여 백신+ 항바이러스제 혼합 형태의 제제 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	-	20	50	

(2) 향후 사업화 추진 계획 및 일정

(가) 농림축산검역본부, 경기과학기술진흥원 보유 특허 기술이전 진행

- 특허출원번호 제10-2016-0140426호 “리바비린 또는 그 유도체를 포함하는 구제역 치료용 조성물” 출원 중 특허에 대한 씨티씨바이오로의 기술이전을 2016년 연내까지 진행 예정
- 상기의 출원 중 특허의 등록을 위한 추가 시험에 대하여 협력 지원

(나) 제품화를 위한 안전성 관련 추가 연구

- 일반적 부작용에 대한 연구
 - 높은 비율로 발생하는 투여 시 증체량 감소, 헤모글로빈 수치 감소, 낮은 비율로 발생하는 호흡 곤란, 쇠약, 설사 등의 부작용에 대한 경감 방안 연구
- 접종 부위 부작용에 대한 연구
 - 접종 부위의 혈종, 육아종 발생 경감 방안 연구

(다) 동물용의약품 품목허가 위한 야외임상시험 및 기술검토서류 접수

- 임상시험계획서 접수: 기존 수행된 연구 내용에 안전성 연구 결과를 추가하여 임상시험계획서 농림축산검역본부 동물약품관리과에 제출(2018년 1사분기)
- 야외임상시험 수행: 승인된 임상시험계획에 따라 양돈농가 3개소를 대상으로 야외 임상시험을 수행한다. (2018년 2-4사분기)
- 품목허가서류 기술검토서류 접수 및 보완(2019년 1사분기)

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

4-1. 목표달성도

○ 최종 성과 목표

최종 목표	평가 방법	개발내용 및 범위	가중치	달성도	비고
구제역 바이러스의 확산을 억제하고 구제역 치료가 가능한 구제역 바이러스 비구조단백질 효능을 향상시키는 항바이러스제 및 동물약품 허가제출	항바이러스제 제품화 및 제품목허가 검토의뢰서 제출 여부	<ul style="list-style-type: none"> 세포에서 구제역 바이러스 증식 억제 효과를 보이는 유효물질의 효능과 약물성을 높이기 위하여 분자설계와 유도체 합성을 포함하는 구조 최적화 연구를 통해 임상 후보 물질 도출 동물약품 허가기준을 충족하기 위한 독성, 잔류량, 약동력학, 안정성 평가 후 제형화 및 대량 생산 공정 개발이 완료된 시제품 생산 및 허가 검토의뢰서 제출 	70	80%	
일본에서 개발된 구제역 항바이러스제인 T-1105보다 질환 유발된 돼지에서 효능이 좋은 제품 개발	T-1105와 비교하여 돼지에서 효능이 우수에 있는지 여부	<ul style="list-style-type: none"> 임상 후보 물질에 대하여 바이러스를 감염시킨 소동물 또는 목적 동물 포함 질환유발 동물에서의 효과 검증 	30	100%	

○ 단계 (연차) 별 성과 목표

단계	단계 목표	평가 방법	개발내용 및 범위	가중치	달성도	비고
1 단계 (임상 후보물질 개발)	선도물질 구조 최적화 통한 임상 후보물질 도출	임상 후보물질이 도출 2종 이상 여부	<ul style="list-style-type: none"> - 선도물질 구조최적화 연구 - 효소기반 활성 평가 - docking model 구축, QSAR 연구 (위탁) - 물리화학적 약물성 평가 (용해도, 이온화도, 친지질도, 안정성 등) - eADME/PK 시험 : 대사안정성, 막투과성 등 - 세포 독성평가 - 신규 화합물 발굴/스크리닝 (화합물은행 활용) 	30	100%	
	선도물질의 구제역 억제 효과 평가	선도물질의 구제역 억제 효과를 통한 2종 이상 도출	<ul style="list-style-type: none"> - 선도물질의 IBRS-2 세포에서의 억제효과 비교(O/SKR/2002 strain 사용) - 효과가 우수한 선도물질의 혈청형별 효과 비교 - 포유마우스에서의 항바이러스 효과 측정 	30	100%	
	원료 분석 및 특성확인	산재 및 액제 원료 분석 및 특성확인 여부	<ul style="list-style-type: none"> - 사료첨가용 산재 적용을 위한 원료 분석 및 특성 확인 - 음수첨가용 액제 적용을 위한 원료 분석 및 특성 확인 	20	100%	
	선도물질의 소동물 독성 평가	선도물질 2종 이상 독성평가	<ul style="list-style-type: none"> - 선도물질에 대한 소동물 독성 시험 : 단회 투여 독성 - 선도물질에 대한 소동물 PK시험 	20	100%	
2 단계 (시제품 개발)	임상 후보물질 구조 최적화 연구	임상 후보물질 구조 최적화 연구를 통한 시제품 개발 완료	<ul style="list-style-type: none"> - 동물실험 결과 및 안정성 평가로부터 요구되는 임상 후보물질의 효능 및 물성을 개선하기 위한 구조최적화 연구 	20	100%	
	임상 후보물질 (2가지)의 세포 및 소동물에서 구제역 억제 효과 평가	임상 후보물질 2종 이상 소동물에서 구제역 억제 효과 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 임상후보물질의 세포에서 구제역 억제 효과 시험 - 임상 후보물질의 성체 마우스를 이용한 구제역 억제 효과 평가 	30	100%	
	임상 후보물질의 부형제 선정, 안정성 평가 및 시제품 생산	임상 후보물질의 부형제 선정 후 시제품 생산 여부	<ul style="list-style-type: none"> - 부형제에 따른 배합도 평가를 통한 제품 균질성 확인 - 임상 후보물질에 대하여 부형제별 (2종 이상) 안정성 평가 - 임상 후보물질의 용해도 평가 	30	100%	
	임상 후보물질의 소동물 적용 PK 시험 및 독성 평가	임상 후보물질 2종 이상 소동물 PK 시험 및 독성 평가 여부	<ul style="list-style-type: none"> - 마우스 PK/BA 시험 - 임상 후보물질의 마우스 적용 독성 및 임상증상 평가 	20	100%	

3단계 (제품 화)	시제품의 목적 동물 유효성 평 가	시제품의 목적 적동물 유효 성 확인	- 시제품의 유효 용량 범위 내 SPF 미니 돼지에서 감염억제 또는 바이러스 배출 감소 등 유효성 검증	30	100%	
	시제품 자돈 적 용 PK 시험	시제품에 대 한 자돈 PK 시험 완료	- 시제품의 자돈 적용 PK 정량 분석	20	100%	
	시제품 자돈 적 용 장기 잔류 및 안전성 평가	시제품 자돈 적용 장기 잔 류 및 안전성 평가 완료	- 시제품의 자돈 적용 혈액 및 장기 내 잔류 시험	20	100%	
	대량생산 및 검 정기준 확립, 허 가 신청	검정기준 확 립 및 허가 신청 여부	- 원료 대량 생산 위탁 및 수입 검토 - 개발 신약의 품질관리를 위한 제품 안정성 시험기준 및 방법 제시 - 제품 부표 작성 - 동물약품 품목허가 검토의뢰 서 작성 및 제출	30	80%	

4-2. 관련분야 기여도

- 현재 전세계적으로 수의약품 분야에서 정식으로 인증 및 등록되어 사용되고 있는 항바이러스제는 feline interferon-omega가 유일하고, 그 외 사용되는 항바이러스제는 idoxuridine, trifluoridine, trifluoridine, zidovudine으로 인의약품을 동물에 적용하여 사용하고 있는 경우이다. 지금까지 수의학에서 항바이러스제 사용은 다음과 같은 이유로 개발 및 사용이 제한되었다.
 - 새로운 약물 개발에 소요되는 막대한 비용 (특히, 산업동물의 경우)
 - 각각의 동물 종 및 바이러스 중에 국한되는 한계점
 - 독성이 적은 광범위 항바이러스제의 개발의 어려움
 - 급성 질병의 경우, 제제 특성 상 정확하고 신속한 진단을 통해 빠른 투여가 필요하지만 이를 뒷받침할 수 있는 진단기술의 부재
- 그러나 최근 들어 동물에서의 항바이러스제의 연구 및 개발이 활발해지고 있는데, 이는 사람의 바이러스와 유사한 특성을 가진 동물바이러스를 이용하는 동물실험의 활성화 (예를 들어, 사람의 hepatitis C virus의 경우 bovine viral diarrhea virus가, Human immunodeficiency virus의 경우 Feline immunodeficiency virus), 반려동물 의료기술의 고 급화, 그리고 가축전염병 확산을 막기 위한 살처분 정책으로 발생하는 경제손실의 최소화 노력과 관련이 있다. 실제로 구제역이 발생할 경우, 전염성이 강한 바이러스 특성을 감안 해 발생부근 인근의 감수성 동물을 살처분하게 되는데, 이로 인한 생산성 저하, 농가보상 문제, 사체처리로 인한 국가의 경제손실 및 환경오염으로 인한 피해는 실로 막대하다.
- 위와 같은 수의 항바이러스제 연구개발 환경에서, 본 과제는 구제역 백신을 보완하여 구 제역 발생 시 돼지에 긴급 백신과 병용 투여하여 약 2주 간의 면역공백 기간 동안 돼지 체내에서 효과적이고 신속하게 구제역바이러스 증식을 억제함으로써, 바이러스 배출을 최

소화하고 인접 가축과 농가에 구제역이 확산되지 않도록 하는 항바이러스제에 대한 연구 개발에 착수하였다.

- AMTI/BAMTI 화합물의 구조최적화 연구를 통해 총 336개의 유도체를 합성하고 3Dpol 효소에 대한 저해 활성을 확인하였으며, 그 중 일부 활성이 뛰어난 화합물에 대하여 약물 대사, 물리화학적 성질, 약동력학, 독성 및 안전성 평가, 세포 및 소동물에서의 구제역 억제 효능 평가 등을 수행하여 효능이 뛰어나고 독성이 적은 임상후보물질 및 시제품으로 개발하고자 하였다. 그러나 임상후보물질로 계획하였던 화합물의 마우스 PK 프로파일이 예상보다 저조하여 (BA=0.3%, $t_{1/2}$ =0.5 h), 세포 및 소동물에서 구제역바이러스 억제 효과는 분명하였으나 치료 효과가 미미하여 연구개발 지속여부 (Go or No go)를 판단할 수밖에 없었다. 결국 백업화합물 스크리닝으로부터 확보된 물질과 항바이러스 효과가 알려진 기존 물질 중 세포와 소동물에서 구제역 억제 효과가 높은 ribavirin을 선택하여 후속연구를 진행하게 되었다.
- Ribavirin은 1970년대부터 HCV 감염에 의한 C형 간염의 치료 용도로 사용되고 있는 범용 항바이러스제로, 구제역바이러스 억제 효과가 본 과제 연구진에 의해 보고된 바 있고(Kim SM et al. 2012, Antiviral Res), 생산단가가 저렴하므로 가축에 바로 적용할 수 있다는 장점이 있어, ribavirin을 대상으로 한 약물 재창출 (Drug repurposing) 전략을 선택하여 연구를 진행하였다. Ribavirin은 적혈구에 침착되어 용혈성 빈혈을 일으킨다는 부작용이 사람에게서 보고된 바 있으며, 효과를 나타나게 하기 위하여 과량을 투여해야 한다는 단점이 있으므로, 생체이용률 및 흡수율이 개선된 전구 약물 (prodrug)을 합성하고 평가하였다.
- 합성된 전구 약물 중 ribavirin-TA는 생체 내 가수분해 작용에 의해 ribavirin으로 전환된 후 약효를 발휘하게 된다. 소동물 및 목적동물을 대상으로 한 구제역 억제효능 평가에서 ribavirin과 유사한 치료 효과를 보였고, PK 프로파일 측면에서도 ribavirin과 비교하여 크게 개선되지는 않았다. 그러나 한 가지 눈여겨 볼 점은 투여 후 혈장 내 최고 농도인 C_{max} 가 ribavirin보다 낮아 혈장 내에 서서히 방출될 것 (slow release)으로 예측되어 ribavirin의 급격한 혈장 농도 상승에 의한 부작용 및 독성을 개선할 수 있을 것으로 기대되므로, ribavirin-TA에 대한 제품 개발 및 평가에 대하여 후속 연구가 필요하다.
- 연구개발 진행 과정 중 축적한 노하우를 바탕으로 미처 개발 단계까지 진입하지 못한 AMTI/BAMTI 화합물 및 ribavirin-TA와 같은 ribavirin 전구물질은 후속 연구를 통해 구제역 또는 관련 바이러스 매개 전염병에 대한 치료제 개발로 이어질 수 있기를 기대한다.
- RIBA-DOE는 SPF 미니돼지를 이용한 구제역 억제 효능평가 결과 바이러스 증식 및 배출을 억제하고 구제역으로 인한 임상증상을 효과적으로 개선하여 탁월한 치료효과를 나타내었다. Ribavirin의 DOE 제형으로 돼지 체내 흡수 속도를 늦추고 반감기를 늘려 효과를 지속시키고 독성을 낮추려는 시도를 하였으나, 돼지에서 독성 평가 결과 투여 초기에 약 5일 동안

빈혈, 식욕부진, 쇠약, 우울 등의 독성이 나타났으나 시간이 지나면서 건강을 회복하였다. 잔류 분석에서도 28일 후 검출한계 이하 수준으로 분해 및 배출되어 출하 시 1달 정도의 휴약기간이 필요함을 확인하였다.

- 본 과제는 가축을 대상으로 하는 항바이러스제 개발 연구를 국내에서 최초로 시도하였으며, 인의약품 개발 프로세스를 수의약품에까지 확대하여 체계적으로 적용한 최초의 연구로서 의미가 있다. RIBA-DOE는 구제역 발생 상황에서 돼지에 1회 주사접종으로 백신과 함께 사용함으로써 면역공백을 해소하고 효과 빠르게 바이러스 증식 및 배출을 억제하며, 다양한 혈청형에 적용이 가능한 국내에서 최초로 개발된 구제역 항바이러스제로 일본에서 개발한 구제역 항바이러스제인 T-1105와 비교하여 월등한 효능을 지닌 제품을 개발하였다는 데 의미가 크며 향후 관련 수의약 산업에 크게 기여할 것으로 기대된다.

5. 연구결과의 활용계획

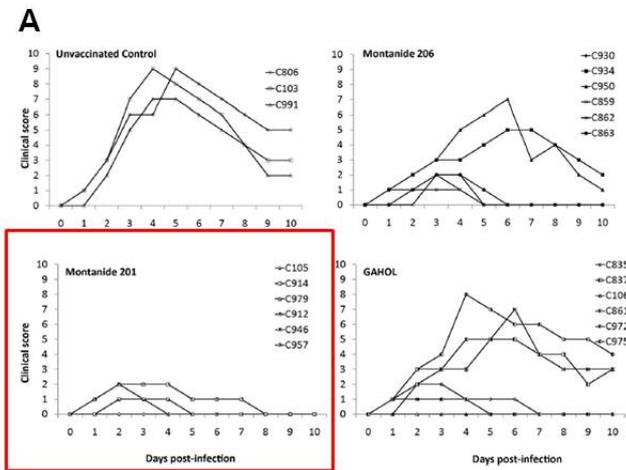
코드번호	D-07
------	------

- AMTI/BAMTI 화합물의 합성 및 효소 저해 활성 평가, 약물성, 독성 및 안전성, 약동력학, 세포 및 소동물 대상 효능 평가 자료는 향후 다른 바이러스 감염병에 대한 치료제 연구개발에 중요한 본보기로 활용될 수 있다. 연구 결과를 토대로 2건 씩의 특허출원 및 등록, 1편의 SCI 논문 게재 등의 성과를 창출하였다. 향후 AMTI/BAMTI 화합물의 구체역 바이러스 억제 효능을 높이며 독성을 최소화하고, 생산단가를 낮추기 위한 추가적인 구조 최적화 연구가 요구된다.
- 본 연구를 통해 Ribavirin과 adjuvant인 ISA-206을 double oil emulsion (DOE) 형태로 혼합하여 만든 구체역 항바이러스 주사제 "RIBA-DOE"를 개발하였다. 이는 구체역 백신을 보완하여 구체역 발생 시 돼지에 긴급 백신과 병용 투여하여 면역공백 기간 동안 돼지 체내에서 신속하게 바이러스 증식을 억제함으로써, 바이러스 배출을 최소화하고 인접 가축과 농가에 구체역이 확산되지 않도록 하는 "구제역 확산 억제제"의 용도로 개발되었다. 이 약품은 백신과 함께 1회 투여로 효과를 나타낼 것으로 기대되며, 긴급 상황에서 사용을 위해 관계 당국의 사용허가 검토 및 방역 지침 개정이 요구된다. 향후 생산공정 연구를 통해 백신과 혼합된 단독 제제로 개발이 가능하여 사용편의성을 보다 증진시킬 수 있다. RIBA-DOE에 대한 연구개발 결과를 토대로 특허출원 1건 (진행 중), SCI 논문 2 편 (투고 중)의 성과를 얻었으며, 특허출원 후 참여기업인 (주)씨티씨바이오와 협의하여 기술이전을 추진하고 있다.
- 긴급 상황 시 상기한 ribavirin 주사제 투여를 통해 구체역 확산을 억제할 수 있겠으나, 본 연구를 통해 밝힌 바와 같이 ribavirin 주사제는 돼지에 빈혈을 일으켜 독성 임상증상을 발현시킬 수 있으므로, 구체역 상재국에 치료목적으로는 수출이 불가능하다. 따라서 ribavirin과 유사한 효능을 보이지만, 독성 및 안전성 측면에서 유리할 것으로 예측되는 Ribavirin의 전구 약물 Ribavirin-TA의 효능 및 독성/안전성 평가에 대한 추가 연구가 요구된다. 안정성을 입증할 수 있으면 해외 수출을 통해 국부창출을 기대할 수 있다.
- 본 연구를 통해 개발된 RIBA-DOE를 구체역 발생지역 가축에 투여하여 구체역 확산을 억제할 수 있으며, 이를 통해 축산농가의 피해를 최소화하고 방역, 피해보상, 살처분 등 사후처리에 따른 사회적 비용을 절감할 수 있다. 또한 살처분 감소로 지하수, 토양 등 2차 환경오염 피해를 감소시킬 수 있고, 생명존중 의식을 확산시키며 농민들의 정신적 고통을 경감시킬 수 있다.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호 D-08

○ 시제품 개발 시 ribavirin과 혼합하여 사용할 adjuvant 후보로는 여러 종류가 있었으나 Alumium hydroxide gel, ISA-201, ISA-206, ISA-207, IMS-1313, ED (Emulsigen-D)로 압축하여 마우스 공격접종 실험을 실시한 결과, ISA-201과 ISA-206이 가장 좋은 효과를 나타내었다 (data not shown). SPF 미니돼지에서 선발된 두 adjuvant에 대하여 실험해 본 결과 ISA-206의 효과가 더 우수하였기 때문에 최종적으로 ISA-206을 선택하여 RIBA-DOE 시제품을 개발하게 되었다. 그러나 백신 접종에 관해서는 ISA-201이 더 우수하다는 연구결과가 다수 보고되었다. 본 연구팀에서도 2014년 ISA-201로 제조한 백신과 ISA-206 백신을 비교한 연구결과를 Vaccine 저널에 발표한 바 있으며 결과를 보면 ISA-201이 역시 비교우위에 있었다 (Park ME et al. 2014, Vaccine)



B

Table 1. The FMD clinical incidence after challenge.

Groups	Pig No & clinical incidence									
206 (1/1)	3051	(-)	3056	(-)	3057	(-)	3076	(-)	3098	(-)
206 (1/3)	4441	(-)	3074	(-)	3047	(-)	3075	(-)	3077	(-)
206 (1/9)	3072	(-)	3060	(+)	3063	(-)	3065	(+)	3083	(-)
201 (1/1)	3058	(-)	3059	(-)	4477	(-)	3079	(-)	3086	(-)
201 (1/3)	3097	(-)	3073	(-)	3094	(-)	3082	(-)	3043	(-)
201 (1/9)	3064	(-)	3092	(-)	3081	(-)	3070	(-)	3069	(-)
PBS (1/1)	3055	(-)	3067	(-)	3093	(+)	3084	(+)	3089	(+)
PBS (1/3)	3054	(-)	3061	(+)	3095	(+)	3068	(-)	3088	(+)
PBS (1/9)	3044	(+)	3090	(+)	3087	(+)	3085	(+)	3096	(+)
Control	3099	(+)	1040	(+)	1439	(+)	3080	(+)	3071	(+)

Note: (+) means FMD clinic signs appeared.

C

Table-5: Summary for the previous results of the onset and duration of immunity in vaccinated calves with inactivated trivalent FMD vaccine with different oil adjuvants against serotypes (O, A and SAT2).

Type of vaccine	Onset at week	SNT antibody titer			ELISA antibody titer			Peak at week	SNT antibody titer			ELISA antibody titer			Duration of immunity
		O	A	SAT2	O	A	SAT2		O	A	SAT2	O	A	SAT2	
Montanide ISA 201 oil vaccine	2 nd	1.62	1.59	1.71	1.8	1.836	1.96	12 th	3.1	3	3.09	3.32	3.276	3.34	34
Montanide ISA 206 oil vaccine	2 nd	1.5	1.56	1.5	1.84	1.818	1.81	14 th	2.79	2.73	2.79	3.026	2.966	3.03	32
Montanide ISA 61 oil vaccine	3 rd	1.59	1.53	1.5	1.9	1.83	1.84	14 th	3.21	3.24	3.27	3.472	3.488	3.53	36
Montanide ISA 50 oil vaccine	3 rd	1.59	1.68	1.65	1.8	1.916	1.9	16 th	3.26	3.21	3.24	3.506	3.446	3.49	38

FMD=Foot and mouth disease, SNT=Serum neutralization test, ELISA=Enzyme linked immune sorbent assay

그림 130. 구제역 백신에서 ISA-201 adjuvant 의 우수성을 증명한 연구 사례

- 그림 130A의 연구 사례를 보면 ISA-201, ISA-206, GAHOL로 만든 구제역 백신을 소에게 접종하고 구제역 바이러스를 감염시키면 ISA-201로 만든 백신 투여 그룹에서 현저하게 구제역 임상증상이 개선되는 것을 확인할 수 있다 (Dar P et al. 2013, Vaccine)
- 그림 130B의 연구 사례에서는 ISA-201과 ISA-206으로 만든 구제역 백신을 돼지에게 접종한 결과 ISA-201 백신 접종 그룹에서는 구제역 증상을 보이는 돼지가 전혀 나오지 않음을 확인할 수 있다 (Li D et al. 2013, J Biosci Med).
- 그림 130C의 사례에서는 ISA-50, IS-61, ISA-201, ISA-206을 만든 백신을 소에 투여하고 면역 형성 시작일과, 면역이 최고조로 형성된 날짜, 면역 지속기간, 형성된 항체의 양을 비교한 결과 역시 ISA-201이 상대적으로 우위에 있었다 (Ibrahim EE. 2015, Vet World).

○ 이상의 결과를 종합해보면 구제역 백신의 효과를 높이기 위해서는 ISA-201이 우수하고, 본 과제의 연구결과에서 ribavirin의 효과를 높이기 위해서는 ISA-206이 더 우수했으므로, 향후 adjuvant 및 제형에 대한 추가적인 연구를 통해 백신과 RIBA-DOE 혼합 제제 단독투여를 위한 부형제 개발이 요구된다.

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
해당없음	

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
	해당없음							

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
<p>○ 소동물 독성 평가</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 건국대학교 동물실험윤리위원회(IACUC)의 심의를 거침 (IACUC No. KU14101) 2. 본 실험에서 동물이 경험하는 통증 및 스트레스의 정도는 고통등급 D에 해당하므로 동물의 통증 혹은 스트레스 경감을 위하여 다음과 같은 방법으로 시행 <ul style="list-style-type: none"> 가. 마취제 혹은 진통제가 사용되어야 했지만 물질의 독성 및 안전성 평가를 위한 실험으로 진정제, 진통제, 마취제 등의 약물이 평가 대상 약물의 효과에 영향이 있을 수 있다고 판단되어 해당 약물들을 적용하지 않음 나. 경구투여의 경우 고압고온멸균 과정을 거친 존데를 사용하여 투여로 인한 감염을 방지하고 숙달된 실시자가 투여함 다. 존데를 이용한 투여 시 식도로 정확히 투여하여 기도로 존데를 삽입하지 않도록 함 라. 복강투여의 경우 일회용 멸균주사기를 개체 당 하나씩 사용, 교차 감염을 방지함 마. 투여부위에 주사로 인한 염증 등 부작용 발생 시 해당 개체에서의 실험을 중단함. 3. 다음에서 정한 기준에 대해서 안락사를 실시 <ul style="list-style-type: none"> 가. 시험을 실시하지 않는 동일연령대 실험동물 평균 체중의 25%이상의 감소가 나타날 때 나. 기립불능이 존재하여 스스로 식음이 불가능할 경우 다. 호흡곤란 또는 지속적 고통으로 인한 복식호흡, 노력호흡이 관찰될 경우 라. 기타 정상적 실험 진행에 지장이 있을 정도의, 고통으로 인한 임상증상이 실험동물에서 관찰될 경우 4. 실험동물 보정 및 케어 시 적절한 마스크, 장갑 등을 착용하여 실험자를 위한 작업환경의 안정성 확보 	
<p>○ 돼지 PK, 독성, 안정성 평가</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 건국대학교 동물실험윤리위원회(IACUC)의 심의를 거침 (IACUC No. KU16108) 2. 본 실험은 동물이 경험하는 통증 및 스트레스의 정도는 고통등급 E에 해당하나 채혈에 소요되는 시간이 1분 내외로 짧고 항 바이러스 제제의 혈중 PK값을 확인하고자 하는 실험이므로, 진통제 투여로 인한 실험결과에 미치는 영향이 예상되어 진통제/마취제 비투여 3. 다음에서 정한 기준에 대해서 안락사를 실시 및 원인 규명 <ul style="list-style-type: none"> 가. 극심한 스트레스로 사료 섭취를 못할 경우 : 입사 기준으로 체중 20% 감소 나. 스트레스 혹은 잘못된 급여로 호흡곤란이 와 황와를 보이는 경우 다. 돈사 내에서 골절이 일어나 기립 불능일 경우 라. 질병으로 인한 혼수 상태일 경우 4. 안락사 방법 :N2 (60%) CO2 (30%) 혼합 가스를 분당 10~20% 속도로 안락사 챔버를 서서히 채우는 속도로 주입 후 신경반사 관찰 후 방혈 5. 사체처리방법 (보관 장소 및 사체처리업체명) : 사체 보관 후 (주)부국크린을 통하여 처리 6. 실험동물 보정 및 케어 시 적절한 마스크, 장갑 등을 착용하여 실험자를 위한 작업환경의 안정성 확보 	

○ 마우스 및 SPF 미니돼지 효능평가

- 질병관리본부의 인가로 농림축산검역본부는 BL3 실험실 인증 (2016. 04)을 획득하였고, 자체 SOP의 절차에 따른 실험법 준수와 안전조치를 이행하고 있으며, 실험실에 들어가기 전 및 신규직원에게 수시 안전교육을 시행하고 있다.

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	구제역 치료 또는 예방용 약학 조성물	경기과학 기술진흥 원		대한민국		2015.01.06	단독사사	
2	특허	구제역 치료 또는 예방용 약학 조성물	경기과학 기술진흥 원		대한민국		2016.09.20	단독사사	
3	특허	구제역 감염을 억제하는 예방 및 치료물질의 구성 및 적용방법	농림축산 검역본부 /경기과 학기술진 흥원		대한민국		출원완료	단독사사	
4	논문	Synthesis and in vitro evaluation of 2-Amino-4-arythiazole as inhibitor of 3D polymerase against Foot-and-mouth disease (FMD)	경기과학 기술진흥 원	제1저 자/교신 저자	European journal of medicinal chemistry		2015.08.12	단독사사	SCI
5	논문	'Hematological adverse effects and pharmacokinetics of ribavirin in pigs following intramuscular administration'	건국대학 교	제1저 자/교신 저자	Journal of Veterinary Pharmacol ogy and Therapeuti cs		투고완료	단독사사	SCI

11. 기타사항

코드번호	D-13
해당 없음	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
1. Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers : 미국 FDA 약물평가연구센터 자료	
2. Barnett, P.V., Pullen, L., Williams, L., Doel, T.R., 1996. International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. <i>Vaccine</i> 14, 1187-1198.	
3. Dar, P., Kalaivanan, R., Sied, N., Mamo, B., Kishore, S., Suryanarayana, V.V., Kondabattula, G., 2013. Montanide ISA 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle. <i>Vaccine</i> 31, 3327-3332.	
4. De Franceschi, L., Fattovich, G., Turrini, F., Ayi, K., Brugnara, C., Manzato, F., Noventa, F., Stanzial, A.M., Solero, P., Corrocher, R., 2000. Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. <i>Hepatology</i> 31, 997-1004.	
5. Diehl, K.H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.M., van de Vorstenbosch, C., 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. <i>J Appl Toxicol</i> 21, 15-23.	
6. Durk, R.C., Singh, K., Cornelison, C.A., Rai, D.K., Matzek, K.B., Leslie, M.D., Schafer, E., Marchand, B., Adedeji, A., Michailidis, E., Dorst, C.A., Moran, J., Pautler, C., Rodriguez, L.L., McIntosh, M.A., Rieder, E., Sarafianos, S.G., 2010. Inhibitors of foot and mouth disease virus targeting a novel pocket of the RNA-dependent RNA polymerase. <i>PLoS One</i> 5, e15049.	
7. Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., Verdaguer, N., 2004. Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. <i>J Biol Chem</i> 279, 47212-47221.	
8. Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., Verdaguer, N., 2007. Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 104, 9463-9468.	
9. Furuta, Y., Takahashi, K., Shiraki, K., Sakamoto, K., Smee, D.F., Barnard, D.L.,	

- Gowen, B.B., Julander, J.G., Morrey, J.D., 2009. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res* 82, 95-102.
10. Ibrahim, E.-S., Gamal, W.M., Hassan, A.I., Mahdy, Sel-D., Hegazy, A.Z., Abdel-Atty, M.M., 2015. Comparative study on the immunopotentiator effect of ISA 201, ISA 61, ISA 50, ISA 206 used in trivalent foot and mouth disease vaccine. *Vet World* 8, 1189-1198.
11. Jaulent, A.M., Fahy, A.S., Knox, S.R., Birtley, J.R., Roque-Rosell, N., Curry, S., Leatherbarrow, R.J., 2007. A continuous assay for foot-and-mouth disease virus 3C protease activity. *Anal Biochem* 368, 130-137.
12. Kim, S.M., Lee, K.N., Park, J.Y., Ko, Y.J., Joo, Y.S., Kim, H.S., Park, J.H., 2008. Therapeutic application of RNA interference against foot-and-mouth disease virus in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 80, 178-184.
13. Kim, S.M., Park, J.H., Lee, K.N., Kim, S.K., Ko, Y.J., Lee, H.S., Cho, I.S., 2012. Enhanced inhibition of foot-and-mouth disease virus by combinations of porcine interferon-alpha and antiviral agents. *Antiviral Res* 96, 213-220.
14. Li, D., Zhou, C., She, D., Li, P., Sun, P., Bai, X., Chen, Y., Xie, B., Liu, Z., 2013. The comparison of the efficacy of swine FMD vaccine emulsified with oil adjuvant of ISA 201 VG or ISA 206 VG. *J Biosci Med* 1, 22-25.
15. Liu, Y., Zhu, Z., Zhang, M., Zheng, H., 2015. Multifunctional roles of leader protein of foot-and-mouth disease viruses in suppressing host antiviral responses. *Vet Res* 46, 127.
16. Mestas, S.P., Sholders, A.J., Peersen, O.B., 2007. A fluorescence polarization-based screening assay for nucleic acid polymerase elongation activity. *Anal Biochem* 365, 194-200.
17. Park, M.E., Lee, S.Y., Kim, R.H., Ko, M.K., Lee, K.N., Kim, S.M., Kim, B.K., Lee, J.S., Kim, B., Park, J.H., 2014. Enhanced immune responses of foot-and-mouth disease vaccine using new oil/gel adjuvant mixtures in pigs and goats. *Vaccine* 32, 5221-5227.
18. Perez-Martin, E., Weiss, M., Diaz-San Segundo, F., Pacheco, J.M., Arzt, J., Grubman, M.J., de los Santos, T., 2012. Bovine type III interferon significantly delays and reduces the severity of foot-and-mouth disease in cattle. *J Virol* 86, 4477-4487.

19. Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22, 659-661
20. Sidwell, R.W., Bailey, K.W., Wong, M.H., Barnard, D.L., Smee, D.F., 2005. In vitro and in vivo influenza virus-inhibitory effects of viremide. *Antiviral Res* 68, 10-17.
21. Thomas, E., Ghany, M.G., Liang, T.J., 2013. The application and mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antivir Chem Chemother* 23, 1-12.
22. Wade, J.R., Snoeck, E., Duff, F., Lamb, M., Jorga, K., 2006. Pharmacokinetics of ribavirin in patients with hepatitis C virus. *Br J Clin Pharmacol* 62, 710-714.
23. Whitton, J.L., Cornell, C.T., Feuer, R., 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol* 3, 765-776.

주 의

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