

117025
-2

플라스미드 DNA 백신 기술을 이용한 반려견 항암 면역치료제 개발 최종 보고서

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

농림식품기술개발사업 제2차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002576-01

플라스미드 DNA 백신 기술을 이용한 반려견 항암 면역치료제 개발 최종보고서

2019. 03. 28.

주관연구기관 / (주)플럼라인생명과학
협동연구기관 / 건국대학교

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “플라스미드 DNA 백신 기술을 이용한 반려견 항암 면역치료제 개발”(개발
기간 : 2017. 04. ~ 2018. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 14.

주관연구기관명 : (주)플럼라인생명과학 (대표자) 김 앤소니 경태 (인)

협동연구기관명 : 건국대학교산학협력단 (대표자) 송 창 선 (인)



주관연구책임자 : 김 은 진

협동연구책임자 : 박 희 명

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

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117025-2	해당 단계 연구 기간	2017.04.21. ~2018.12.31	단계 구분	1단계
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	농림축산식품연구개발사업 (창업·벤처지원 R&D 바우처(신성장형))			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	플라스미드 DNA 백신 기술을 이용한 반려견 항암 면역치료제 개발			
연구책임자	김은진	해당단계 참여연구원 수	총: 7명 내부: 4명 외부: 3명	해당단계 연구개발비	정부: 266,000천원 민간: 89,000천원 계: 355,000천원
		총연구기간 참여연구원 수	총: 7명 내부: 4명 외부: 3명	총연구개발비	정부: 266,000천원 민간: 89,000천원 계: 355,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)플럼라인생명과학 글로벌 R&D Center			참여기업명 (해당 없음)	
국제공동연구	상대국명: (해당 없음)			상대국 연구기관명: (해당 없음)	
위탁연구	연구기관명: (해당 없음)			연구책임자: (해당 없음)	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
----------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

- 플라스미드 DNA 백신 기술을 이용한 반려견 항암면역치료제 개발
- Syncon 기술을 이용한 dTERT (pGX1414) 디자인 및 제작 · 생산
: 미국 VGXi 생산, 연구용 무환수입으로 사용
- Syncon-dTERT (pGX1414)의 용량, 투여주기, 투여 횟수, 적응증 결정
: 세포성면역원성(INF-γ) 분석으로 결정 (10mg, 2주 간격, 4회 투여, 고행암 환축 대상)
- 실험용 목적동물에서의 안전성 및 독성 데이터 확보
: 비글견에서 pGX1414와 전기천공법에 의한 안전성 및 독성 없음을 혈액학적 분석 및 평가표에 의해 확인
- 고행암 환견을 대상으로 안전성 및 효능 테스트 후 임상에서의 적응증 선별
: 환축 모집 (31마리: 투여군 20마리, 대조군 11마리) 및 투여
: 혈액검사, 혈청화학검사, 뇨검사 평가표에 근거해서 평가 후 안전성 데이터 확보 및 세포성면역원성 확인과 생존을 조사로 효능 평가
- 반려견 암조직 또는 혈액 샘플 확보
: 암조직 10개 확보
- 반려견 암조직에서 분자 수준 또는 단백질 수준에서의 dTERT 발현양 측정
: 1차년도에 기초 연구를 진행하였으나 단백질 수준에서의 dTERT를 확인할 수 있는 항체가 없어 전용 항체를 제작하여 확인하였고, Real-time PCR로 분자적 수준에서의 발현양을 측정할 수 있는 프로토콜 확보함
- 설치류 급성독성 데이터 확보
: 100X 고용량 dTERT 투여, 사망률, 임상적 관찰, 체중 변화, 혈액학적 분석

103

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구과제의 최종 목표는 정상세포에서는 발현되지 않으나, 암세포에는 특이적으로 과발현되는 TERT (Telomerase reverse transcriptase, 텔레머라제 역전사효소)를 표적 항원 물질로 사용하여 항암 면역치료제를 개발하고자 함. TERT DNA를 플라스미드 운반체를 통해서 전기천공법으로 세포내로 들어가게 하면 세포내에서 TERT 단백질을 만들어 냄. 이때 세포는 TERT 단백질을 외부에서 침입한 이물질로 인식하고, 활성화된 면역시스템은 T 세포(세포성면역세포)를 활성화시키며, 이들 T 세포는 암 표면에 특이적으로 과발현된 TERT 단백질을 공격하게 되고, TERT 단백질 제거는 암세포 사멸을 야기함. 하지만, 정상세포는 TERT 단백질 발현이 없거나, 발현양이 극히 미미하기 때문에 TERT 단백질을 공격하는 T세포의 영향을 받지 않아 부작용 없이 암세포만을 특이적으로 공격, 사멸시키기 때문에 표적 항암 면역치료제로서 그 가치를 인정받을 수 있음.</p> <p>“플라스미드 DNA 백신 기술을 이용한 반려견 항암 면역치료제 개발”을 위해서 본 연구 과제에서 임상 시험에 필요한 비임상 데이터(목적동물 반려견에서의 안전성 데이터 확보와 효능 평가로 적응증을 결정)를 확보하여, 향후 임상시험을 통한 제품화 그리고 정부로부터 판매허가 승인을 받아 사업화하고자 하는 최종 목표가 있음. 이를 위해서,</p> <p>1. ㈜플럼라인생명과학은 본 연구 개발에 필요한 TERT DNA 플라스미드 설계, 서열 최적화 제작부터 비임상, 임상 시험의 생산 그리고 사업화시 대량생산을 담당할 것임. 또한, 목적동물에서의 약물에 대한 효능 평가를 위한 각종 데이터 생산, 수집 그리고 결과 분석을 통해서 “플라스미드 TERT DNA”의 효능을 검증함.</p> <p>2. 건국대학교 수의과대학에서는 실험용 목적동물을 대상으로는 약물을 투여하고, 혈액으로 여러 안전성 데이터를 확보할 예정이며, 각종 암을 앓고 있는 환축을 대상으로 면역 항암치료제의 효과를 분석하여, 임상시험에서의 적응증을 결정하고자 함</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>본 연구과제는 “플라스미드 DNA 백신 기술을 이용한 반려견 항암 면역치료제 개발”을 위한 비임상 단계의 결과물을 도출하는데 가장 큰 목적이며, 이번 연구개발 성과를 바탕으로 국내에서 대규모 임상 시험을 진행할 수 있는 기초적인 기틀을 마련하는데 의의가 있음.</p> <p>1. 실험용 목적동물에서의 안정성 및 독성 데이터 확보 2. 암환축에 면역 항암치료제 효능테스트 후 임상에서의 적응증 선별</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. 반려견 고형암 (carcinoma 등) 치료제로 사용 2. 전 세계 반려견 항암 치료 시장 대체 효과 3. 동물복지 향상에 기여</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>DNA 백신</p>	<p>텔레머라제 역전사효소</p>	<p>면역치료제</p>	<p>암</p>	<p>플라스미드</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>DNA Vaccine</p>	<p>Telomerase reverse transcriptase (TERT)</p>	<p>Immune therapy</p>	<p>Cancer</p>	<p>Plasmid</p>

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	17
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	95
4. 연구결과의 활용 계획 등	99
붙임. 참고 문헌	102

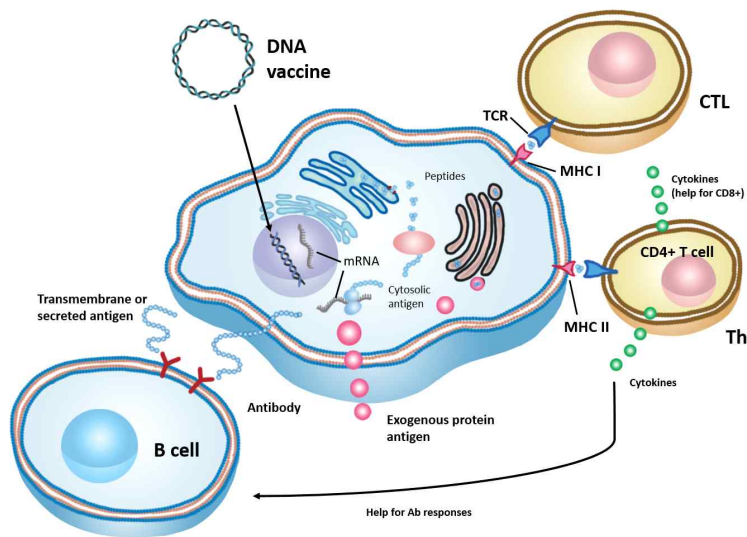
<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

플라스미드 DNA 백신 기술은 단백질을 만드는 유전자(DNA) 서열을 박테리아 플라스미드에 삽입하여 세포 안으로 전달시켜서, 세포 안에서 전달된 유전자(DNA) 서열이 단백질을 만들게 하는 기술을 의미한다. 일반적으로 세포 안에서 만들어진 단백질은 항원 역할(백신)을 하거나, 혹은 단백질 자체가 치료물질(gene therapy)로서 기능을 나타낸다. 바이러스 단백질을 만드는 유전자(DNA) 서열의 플라스미드 백신의 경우 세포내에서 세포성 면역반응과 체액성 면역반응을 모두 활성화할 수 있어서, 플라스미드 DNA 백신 기술을 응용할 수 있는 범위가 기존의 백신보다 더 많다



[그림 1] 플라스미드 DNA 백신에 의한 세포내 면역 반응. 플라스미드 DNA에 의해서 만들어진 단백질은 항체 생산을 위해서 B 세포는 자극시켜서 활성화시키는 것과 동시에 세포내에서 분해된 플라스미드 유래 단백질의 펩타이드는 주요 조직적합 유전자 복합체 (major histocompatibility complex, MHC) I형과 II형과 결합하여 세포성 면역반응을 활성화시킴.

Telomerase reverse transcriptase (TERT, 텔레머라제 역전사효소)의 경우, 정상세포에서는 거의 존재하지 않거나 극히 소량만 발현되는 단백질이지만, 80% 이상의 다양한 종류의 암환자의 암세포에서 특이적으로 발현도가 매우 높은 단백질이다 (1-5). 사람과 유사하게, 반려견 암 종류의 약 90% 이상에서 TERT 단백질의 과발현이 보고되고 있다 (6-10). Nasir 연구진에 의하면 (8), 사람과 같이 반려견에서도 telomerase에 의한 telomere를 유지하는 것은 암세포가 스스로 사멸하지 않고, 번식하는데 중요한 기작 중에 하나이다. TERT 단백질의 발현은 여부는 telomere의 길이 손실을 방지할 뿐만 아니라, 종양세포의 생존과 증식에 관여하는 종양 신호전달 유전자 발현을 조절하는 역할을 담당하고 있다 (11). 이러한 TERT 단백질의 특성 때문에, TERT가 특이적으로 과발현되는 암세포에서 telomerase의 기능의 상실은 세포자멸(apoptosis) 기작에 의해서 암세

포가 사멸하게 된다 (12). Masutomi와 연구진들의 보고에 의하면 (13), hepatocellular carcinoma 환자의 혈액에서 human TERT (hTERT)에 대한 항체를 검출하였으며, hTERT 항체의 혈액 내 양은 hepatocellular carcinoma 진행과 비교하여 증가하였다. 또한, 18명의 정상인에서는 hTERT에 대한 항체가 발견되지 않았으며, 이는 TERT가 자발적으로 정상적인 면역반응을 일으키는 좋은 표적 단백질임을 설명하고 있다. 위의 사실을 종합하면, TERT는 좋은 tumor-associated 항원으로, 항암 면역치료제 개발에 있어서 매우 이상적인 표적 단백질이다 (14-16).

1-1. 연구개발 목적

본 연구과제는 “플라스미드 DNA 백신 기술을 이용한 반려견 항암 면역치료제 개발”을 위한 비임상 단계의 결과물을 도출하는 것이 가장 큰 목적이며, 이번 연구개발성과를 바탕으로 국내에서 대규모 임상시험을 진행할 수 있는 기초적인 기틀을 마련하고자 한다.

1-2. 연구개발의 필요성

가. 경제·산업적 측면

국내 반려동물 산업의 시장의 규모는 최근 3년 동안 80% 성장(1조원에서 1.8조원, 각각 2010년, 2013년)을 하고 있으며, 앞으로 2020년까지 6조원까지 성장을 예상하고 있다(농협경제연구소).

나. 사회·문화 동물복지 측면

반려동물 시장 규모의 성장과 함께, 국내 반려견의 연령대가 어린 강아지에서 노령견으로 증가하는 추세 (2013년 기준 10세 이상 14%, 한국소비자원)를 보이고 있으며, 10세 이상의 노령견의 50% 이상이 인간과 같이 자연적으로 종양이 발생하여 고통 받고 있다. 최근(2016년) 서울의 한 지역에 암전문 동물병원도 개설되고 있는 것처럼 전문적인 반려견 암치료의 필요성이 사회적으로 이슈화되고 있는 추세다. 국내에서의 반려견 항암치료는 대부분 인체용 항암제를 사용하고 있으며, 인간과 반려견 사이의 생리적 차이로 인하여 반려견에 심각한 부작용을 초래하고 있다. 동물전용 항암치료제의 부재로, 항암치료에 있어서 인체용 항암치료제의 사용으로 인한 부작용은 세계적으로도 같은 상황에 처해 있는 현실이다.

특히, 말기 암 환축의 경우, 환축의 건강 상태에 따라서 항암 치료 뿐 만 아니라 외과 수술이 불가능한 경우가 많으며, 수술이 가능하다고 하여도 비용적인 측면에서도 많은 지출이 필요하다. 이에 견주는 치료를 포기하고 환축은 버려져서 유기견이 되는 경우가 빈번하게 발생하고 있어서 동물복지를 위해서도 동물용 항암 치료제 개발이 시급히 필요한 실정이다.

다. 기대효과

플라스미드 DNA 백신 기술을 기반으로 한 항암 면역치료제는 적은 비용으로, 부작용 없이 반려견을 치료할 수 있어서 반려견과 견주의 행복지수 증가에 기여하여 동물 복지뿐만 아니라 사람의 삶의 질 향상도 기대할 수 있다.

세계적으로 동물전용 항암치료제의 부재인 상황에 국내 제품을 개발한다면, 수출을 통한 국가 기술 및 시장 경쟁력을 확보할 수 있으므로, 정부차원의 지원이 가능한 국가연구사업 대상으로도 적합하다.

라. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

플라스미드 DNA 백신기술을 이용한 동물용 (반려동물) 항암 면역치료제는 현재 국내 및 해외에서도 기술을 보유한 회사가 없다. (주)플럼라인생명과학의 기술을 가지고 있는 관련 국내 기업으로는 (주)진원생명과학이 동일 기술을 사용하고 있으나, (주)진원생명과학은 인체 의약품으로 개발을 하고 판매지역도 국내로 국한되고 있다(Invio Inc. 모회사). (주)플럼라인생명과학은 동물용 의약품을 개발하는 동물용 의약품 전문회사다(전 세계 판권 보유). 유사한 기술을 보유한 다른 국내 기업으로 (주)제넥신이 있으며, (주)제넥신은 플라스미드 DNA 백신 기술을 이용하여 자궁경부암 백신 개발을 하고 있으며, 현재 인간임상 2상 결과를 기다리고 있는 중이다..

(2) 시장현황

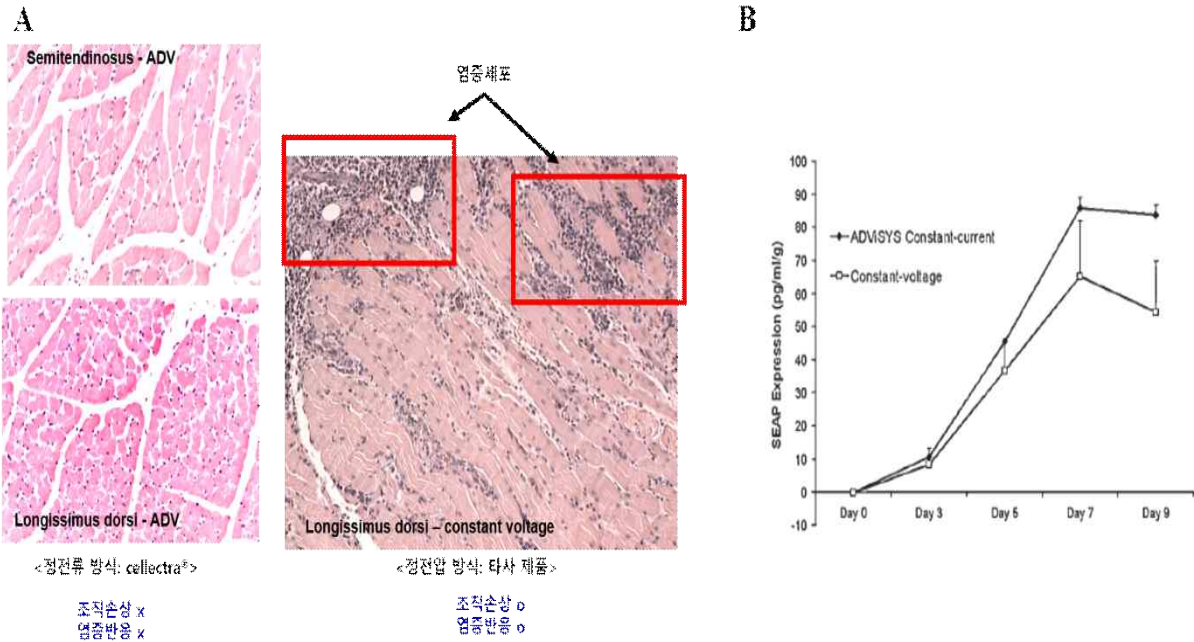
국내 동물용 (반려동물) 항암 치료제 시장규모는 아직 구체적인 통계는 없으나, 농협경제연구소 발표 자료에 따르면 국내 반려동물 산업 규모는 2020년 6조원의 규모를 형성할 것으로 예상하고 있다.

(3) 경쟁기관현황 및 기술의 차이점

직접적인 경쟁기관 혹은 업체는 해당사항 없다.

(주)제넥신의 경우 인간용 의약품을 개발하고 있어서 직접적인 경쟁업체에 해당되지 않는다. 또한 기술적으로도 (주)플럼라인생명과학은 유전자(DNA) 서열이 단백질 발현의 최적화를 위해 “SynCon[®]” 특허 기술을 이용하며, 플라스미드 DNA 세포내 전달 방법인 전기천공기기를 (주)제넥신의 “ICHOR” 기기와 다르게 “Celectra[®]” 기기를 사용한다. “Celectra[®]”의 경우 전기펄스를 일으키는 원리가 “ICHOR”와는 다르며, 시행 후 부작용 없이 세포내로 플라스미드 DNA 백신을 전달하는 효과를 극대화 시켰다. 전기천공법 (Electroporation, EP) 기술은 세포내로 DNA를 효율적으로 운반하는 기술로, 현재 전기신호 (Square wave, 구형파)를 체내 조직으로 전달하는 방법은 일정한 전압 (constant-voltage) 또는 일정한 전류 (constant-current)를 주는 방식이 있다. 기존의 EP 기술인 일정한 전압방식은 EP 과정 중 조직 저항의 변화로 인해 미

리 결정된 전압 펄스는 각 펄스 동안 조직을 통해 흐르는 전류의 조절되지 않은 변화를 유발할 수 있다. 그 결과, 조직 손상 및 DNA 전달 및 발현이 감소한다. 하지만, 플럼라인의 EP 기술인 Collectra® 전기천공장치는 일정한 전류방식을 사용하여 각 조직의 저항성에 고려하여 최적의 전류를 줌으로써 조직의 손상을 최소화하고 전달 효율도 높였다 (17-20).



[그림 2] 기존 EP (constant-voltage)와 플럼라인 EP(constant-current) 기술 비교 (A) 정전압 방식의 EP는 조직의 손상으로 인한 염증반응을 유도하나, 정전류 방식의 Collectra® 전기천공장치는 조직의 손상과 염증반응이 나타나지 않음을 확인함. (B) 정전류 방식 EP가 정전압 방식에 비해 플라스미드의 체내 전달율이 높음 - SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) 유전자를 가진 플라스미드를 EP 방법으로 전달하였을 때 SEAP 발현이 정전압 방식에 비해 54% 높은 발현을 보임 (17-18).

(4) 지식재산권현황

현재 (주)플럼라인생명과학이 보유하고 있는 기술은 국제출원 하여 현재 146개의 국제특허를 보유하고 있으며, 현재 출원하여 심사 중인 특허도 상당수 보유하고 있음 [그림 3], 보유하고 있는 국제 특허 중에서 만료기간이 많이 남지 않은 특허의 경우, 특허 evergreen 전략을 마련하여 재출원 할 예정이며, 이를 통해서 기술에 대한 지식재산권을 보장 받을 계획이다.

특허리스트 1	특허리스트 2	특허리스트 3	
GHRH (7건) VGX-0102: US AVSI-0033: US, CA AVSI-0037: US, CA, EP, TW AVSI-0038: US, CA, EP, TW AVSI-0040: US, CA, EP AVSI-0041: US, CA, EP AVSI-0042: US, AU, CN, EP, MX, NZ, SG, JP Plasmids (2건) AVSI-0023: US, AU, AR, EP, TW AVSI-0043: US	GHRH (7건) AVSI-0007: US, AU, AR, CA, CN, EP, SG, MX, MY, BR, TW AVSI-0008: US, AU, CA, SG, EP, CN, MX, BR, AR, NO AVSI-0009: US, AU, CA, SG, CN, EP, MX, BR, PL, AR, PH AVSI-0011: US, JP, EP, AU, CA AVSI-0017: US, AU, EP, JP, MX, TW, CN, AR, BR, CA AVSI-0019: US, AU, EP, NZ, CA, MX, AR, TW AVSI-0047: US IGF-1 (2건) AVSI-0026: US, AU, CA, EP, JP AVSI-0034: US, CA, EP Promoters (2건) AVSI-0012: US, JP, EP, AU, CA AVSI-0027: AU, CA, TW, EP, MX, AR	Electroporation (22건) AVSI-0010: US, AU, CA, EP, MX, SG, TW, AR AVSI-0048: US, AU, CA, CN, EP, JP, KR, SG, HK, IN GTI-1130: US, AU, CA, EP, JP GTI-1370: US, AU, EP, TW, AR, CA GTI-1530: US, AU, CA, EP, TW GTI-2010: US, AU, CA, CN, EP, HK, IN, JP, KR GTI-3010: US, CA, EP, KR GTI-4010: US, CA, CN, EP, HK, KR GTI-5000: US, AU, CA, CN, EA, EP, KR, MX, NO, NZ, RU, JP, IL GTI-5001: US, AU, CA, CN, EP, HK, IN, RU, JP, MX, ZA, NZ, BR	TI-7001: US, AU, CA, CN, EP, IN, MX, JP, KR GTI-9000: US, AU, CA, CN, EP, HK, JP VGX-0017: US, AU, CA, CN, EP, MX, JP, KR, HK, BR, IN, ZA VGX-0018: US, AU, CA, EP, KR VGX-0123: US, KR, AU, CA, CN, EP, IN, JP GTI-1110: US, AU, EP, CA GTI-1160: US GTI-1200: US, AR, AU, CA, CN, EP, HK, JP, BR, RU, TW GTI-1230: US, AU, CA, EP GTI-1250: US, AU, CA, CN, EP, HK, JP GTI-1360: US, AU, CA, EP GTI-8000: US, AU, CA, EP, JP, KR, NO, IN, CN
기타			
공정 (1건) : US, KR, CN, JP, EP, AU, CA			

[그림 3] (주) 플럼라인생명과학 특허 출원, 보유 현황 리스트

(5) 표준화현황

(주)플럼라인생명과학은 플라스미드 DNA 백신 기술을 이용하여, 2008년과 2012년에 각각 호주와 뉴질랜드에서 임상시험을 통해서 판매허가승인 받은 제품(LifeTide® SW5)을 보유하고 있으며, 이 플라스미드 DNA 백신 기술을 플랫폼 기술로 개발, 발전시켜서 여러 종류의 제품 pipeline을 가지고 있다. 이 플라스미드 DNA 플랫폼 기술을 바탕으로 반려견 항암 면역치료제를 개발할 예정이다.

향후 제품을 상용화하기 위해서는 cGMP 생산 시설이 필요하다. 이를 위하여 (주)플럼라인생명과학은 미국 휴스턴에 cGMP 공장과 CMO 계약을 통해서 시약을 생산하고 있으며, 이 공장은 이미 농림축산검역본부에서 현장 실사를 통해서 제품을 생산하는데 문제가 없음을 검증 받았다.

마. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

(주)플럼라인생명과학은 2014년 Inovio Inc. (USA)에서 분리되어 국내에 설립한 회사이기 때문에 Inovio Inc.와 동일한 플라스미드 DNA 백신 기술을 사용하고 있다. 현재 Inovio는 자궁경부암 치료백신인 VGX-3100이라는 제품에 대해서 임상 2상 시험을 좋은 결과와 함께 끝냈으며, 3상이 2017년 상반기에 시작되었다. VGX-3100은 현재 세계에서 가장 빠르게 그리고 가장 임상 진도가 많이 진행된 인간용 플라스미드 DNA 백신 의약품이다. 또한, hTERT를 이용한 항암 면역치료제 인간 임상 1상(적응증: 유방암, 폐암, 췌장암)을 진행 중이며, 지카나 메르스와 같은 감염성 질환에 대한 백신도 연구 개발하여 현재 남미에서 임상시험 진행 중에 있다.

(2) 시장현황

2015년 기준 미국 동물 치료(vet care) 시장 규모는 약 **\$157억 (\$15.7 billion)** 정도이며, 이중에 반려견 암 치료 시장규모는 약 \$5억 (\$500 million) 정도를 형성하고 있다

1. 반려견 암 진단 비용 (\$1,000 ~ \$2,000)
2. 표준 화학요법 (\$3,000 ~ \$5,000)
3. 방사선 치료 (\$6,000 ~ \$10,000)
4. soft tissue sarcoma 등의 일부 암 수술 및 후속 방사선 치료로 \$9,000
5. 림프종에 대한 골수 이식 비용은 \$16,000 ~ \$25,000

(3) 경쟁기관현황

직접적인 경쟁기관 혹은 업체는 해당사항 없다.

(4) 지식재산권 현황 및 표준화 현황

국내 지식재산권 현황과 동일하다.

1-3. 연구개발 범위

가. 1차년도

(1) 개발 목표

- 주관연구기관 ((주)플럼라인생명과학)

- (a) SynCon-dTERT (pGX1414) 시료 생산 (미국 휴스턴 VGXi 공장 - 검역본부 인증 획득)
- (b) 세포성 면역원성 (INF- γ) 결과 분석방법 정립
- (c) 세포성 면역원성 (INF- γ) 결과를 통한 투여주기 (2주 혹은 3주 간격) 및 투여 횟수 결정
- (d) 각종 반려견 암 조직 혹은 혈액에서 분자 또는 단백질 수준에서의 dTERT 발현량 측정

- 협동연구기관 (건국대학교)

- (a) 목적동물(실험용 비글견)에 SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 및 혈액 채취
- (b) 혈액 분석을 통한 안정성 데이터 확보
- (c) 반려견 암 조직 또는 혈액 샘플 확보

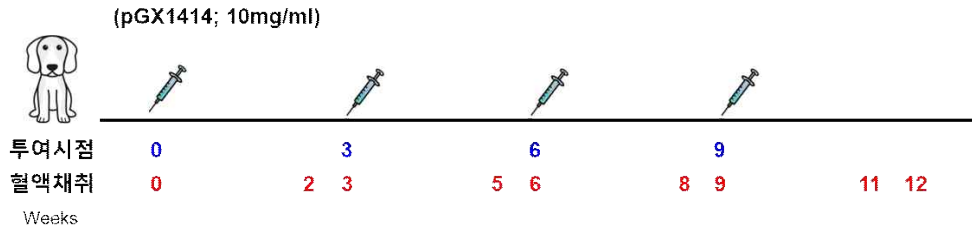
(2) 개발 내용 및 범위

- SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 방법

: 10mg/ml의 pGX1414를 electroporation (EP)을 이용하여 3주 간격으로 4회 실험용 비글견에 투여 후 2주, 3주 간격으로 혈액을 채취 [\[그림 4\]](#)

- EP condition

: 0.5 Amps, 3 pulses, 52 millisecond in duration



[그림 4] pGX1414 투여 간격 및 혈액 채취 일정표

- 주관연구기관 ((주)플럼라인생명과학)

: 목적동물에 대한 전임상과 임상 실험을 위한 SynCon-dTERT (pGX1414) 시료를 농림축산검역본부 인증 공장인 미국 휴스턴 VGXi에서 생산하여 실험에 필요한 충분한 양의 플라스미드 확보 (목적동물 실험 시 필요한 플라스미드 양: 최소 800mg 확보가 필요)
 (임상시험의 경우 환축 한 마리당 40mg의 플라스미드가 사용될 예정)

: 세포성 면역원성 (INF- γ) 결과 분석을 위한 ELISpot Assay protocol 확립하여 SynCon-dTERT (pGX1414) 투여된 목적동물에서의 INF- γ 수치 측정 및 epitope 결정

: INF- γ 수치에 근거하여, SynCon-dTERT (pGX1414)의 투여 주기 (2주 혹은 3주) 그리고 투여 횟수 (1회, 2회, 3회 또는 4회)를 판단하여 임상실험 시 필요한 protocol 정립

: 임상시험 신청 및 임상시험 시 SynCon-dTERT (pGX1414)의 적응증 판단을 위한 데이터 확보를 위하여 각종 반려견 암 조직 혹은 혈액 (건국대학교에서 제공) 을 이용하여 분자 또는 단백질 수준에서의 dTERT 발현량 측정 (Real-time PCR 혹은 IHC 또는 유사한 분자생물학적 방법을 이용)

- 협동연구기관 (건국대학교):

: 목적동물인 실험용 비글견에 EP를 통한 SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 및 혈액 채취

: 각종 반려견 암 조직 혹은 혈액 등 생체 시료 확보

: 임상시험 승인을 위한 안전성 데이터 확보를 위하여 다음에 해당하는 검사 실시[표1, 표2, 표3]

[표 1] dTERT 전기천공법 투여 후 국소 부위 평가표

Assessment	Score
무증상	0
통증	0.5
홍반	1
경결	1
통증 및 홍반	2
통증 및 경결	2
홍반 및 경결	3
심한 궤양 및 통증	5
기타 소견이 있을 경우 기록함	
* 이상 관찰시 유/무를 평가하여 이상이 발생한 개체의 비율을 산출함 이상사례의 발생시, 실례와 지속시간 (지속날짜), 이상 부위의 크기 변화 등에 대한 구체적 제시	

[표 2] dTERT 전기천공법 투여 전 및 투여 후의 vital sign 변화 평가표

Parameters	0	3주	6주	9주	12주
Body weight (Kg)					
Heart rate (bpm)					
Respiratory rate (/min)					
Body condition score (5 scale)					
BodyTemp(°C)					

[표 3] dTERT 전기천공법 투여 전 및 투여 후의 혈액, 혈청화학 및 뇨검사 평가표

Parameters		0	3주	6주	9주	12주
*CBC	WBC(x103/ul)					
	RBC(x106/ul)					
	Hb (gm/dl)					
	PCV (%)					
	MCV (fL)					
	MCH (pg)					
	MCHC (%)					
	PLT(x103/ul)					
*DC	Mono					
	Lympho					
	SegNE					
	BandNE					
	Eosin					
	PLT					
S-Chem	*BUN (mg/dl)					
	*CRSC (mg/dl)					
	*ALT (U/L)					
	*AST (U/L)					
	*ALP (U/L)					
	LDH (U/L)					
	*T P (g/dl)					
	*ALB (g/dl)					
	Ca (mg/dl)					
	P (mg/dl)					
*Elec.	K (mmol/L)					
	Na(mmol/L)					
	Cl(mmol/L)					
Urine	S.G					
	Protein					

나. 2차년도

(1) 개발 목표

- 주관연구기관 ((주)플립라인생명과학): 임상시험에 필요한 임상시험 protocol 및 SOP 확립 그리고 검역본부에 임상 시험 승인 신청,
- 협동연구기관 (전국대학교): 임상시험을 통한 SynCon-dTERT (pGX1414) 효과 테스트
 - (a) 고형암 (carcinoma/sarcoma) 환축을 대상으로 SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 및 효능 판별 : Carcinoma/Sarcoma (n≥10, control group 5, experimental group 5)
 - (b) SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 후 안전성 및 개체변화 측정
 - (c) SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 생존율 조사

(2) 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관 ((주)플립라인생명과학)
 - : 1차년도 결과를 바탕으로 SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 방법 도출
 - : 환축에 SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 시 세포성 면역원성 (INF- γ) 수치 분석
 - : 검역본부와의 협의를 통한 임상시험에 필요한 안정성 데이터 확보 (ex, 급성, 독성 데이터 등)
 - : 임상시험에 필요한 protocol 및 SOP 확립
- 협동연구기관 (전국대학교): 환축을 대상으로 한 SynCon-dTERT (pGX1414) 효과 테스트
 - (a) 고형암 (carcinoma/sarcoma) 환축을 대상으로 SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 및 효능 판별 : Carcinoma/Sarcoma (n≥10, control group 5, experimental group 5)
 - (b) SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 후 안정성 및 개체변화 측정 [표4, 표5, 표6]
 - (c) SynCon-dTERT (pGX1414) 투여 생존율 조사 [표7]

[표 4] dTERT 전기천공법 투여에 따른 개체의 신체검사, 혈액, 혈청검사의 변화 평가

Parameters		투여 전	투여 후
Body weight (Kg)			
Heart rate (bpm)			
Respiratory rate (/min)			
Body condition score (5 scale)			
BodyTemp(°C)			
CBC	WBC(x103/ul)		
	RBC(x106/ul)		
	Hb (gm/dl)		
	PCV (%)		
	MCV (fL)		
	MCH (pg)		
	MCHC (%)		
	PLT(x103/ul)		
DC	Mono		
	Lympho		
	SegNE		
	BandNE		

	Eosin		
	PLT		
S-Chem	*BUN (mg/dl)		
	*CRSC (mg/dl)		
	*ALT (U/L)		
	*AST (U/L)		
	*ALP (U/L)		
	LDH (U/L)		
	*T P (g/dl)		
	*ALB (g/dl)		
	Ca (mg/dl)		
	P (mg/dl)		

[표 5] dTERT 전기천공법 투여에 따른 개체 변화 평가

평가 지표		투여 전	투여 후
Behavior	0 apathetic		
	1 aggressive		
	2 Excited		
	3 normal		
Mentation	0 stupor		
	1 depressed		
	2 moderate		
	3 alert		
Appetite	0먹이에대한관심없음		
	1간식에만반응을보임		
	2보통		
	3식욕 좋음		
Vomiting	0severe(주당3회넘음)		
	1moderate(주당2-3회)		
	2mild(주당1회)		
	3정상		
Defecation status	0물과같은설사		
	1매우무른변		
	2약간무른변		
	3정상		
Defecation frequency	0현저한증가(1일5회넘음)		
	1중등도증가(1일4-5회)		
	2경미한증가(1일2-3회)		
	3정상		
Weight loss	0현저한감소(10%넘음)		
	1중등도감소(5-10%)		
	2경미한감소(5%미만)		
	3없음		
PU/PD	0음수량/소변량증가(10%넘음)		
	1음수량/소변량증가(5-10%)		
	2음수량/소변량증가(5%미만)		
	3음수량/소변량정상		

[표 6] dTERT 전기천공법 투여에 따른 부작용 평가표

전신반응	<input type="checkbox"/> 발열 <input type="checkbox"/> 졸림 <input type="checkbox"/> 행동과다	<input type="checkbox"/> 식욕감퇴 <input type="checkbox"/> 빈맥	<input type="checkbox"/> 불안 <input type="checkbox"/> 기타 ()	<input type="checkbox"/>
피부 반응	<input type="checkbox"/> 두드러기 <input type="checkbox"/> 기타()	<input type="checkbox"/> 탈모	<input type="checkbox"/> 가려움증	
소화기 증상	<input type="checkbox"/> 설사 <input type="checkbox"/> 기타()	<input type="checkbox"/> 오심/구토	<input type="checkbox"/> 변비	
혈액학적 이상유무	<input type="checkbox"/> 백혈구증가/감소 <input type="checkbox"/> 혈소판감소증	<input type="checkbox"/> 빈혈 <input type="checkbox"/> 기타 ()	<input type="checkbox"/> 응고장애	
혈청학적 이상유무	<input type="checkbox"/> BUN/Cre증가 <input type="checkbox"/> Bilirubin증가 <input type="checkbox"/> 기타()	<input type="checkbox"/> 간수치 상승 <input type="checkbox"/> 혈당 증가		
응급 처치 및 치료	<input type="checkbox"/> 응급처치 내역 <input type="checkbox"/> 실시하지 않음			
회복	<input type="checkbox"/> _____ 일만에회복 <input type="checkbox"/> 회복되지않음 ⇒ <input type="checkbox"/> 부작용이 _____ 일째 지속되고있음 <input type="checkbox"/> 사망			

[표 7] dTERT 전기천공법 투여에 따른 생존률 평가표 (최장 6개월 평가)

생존 여부	<input type="checkbox"/> 생존 <input type="checkbox"/> 폐사
생존일수	<input type="checkbox"/> 진단 후 _____ 일
폐사 이유	<input type="checkbox"/> 종양으로 인한 폐사 <input type="checkbox"/> 종양으로 인한 안락사 <input type="checkbox"/> 종양과 무관한 폐사 (폐사원인:)

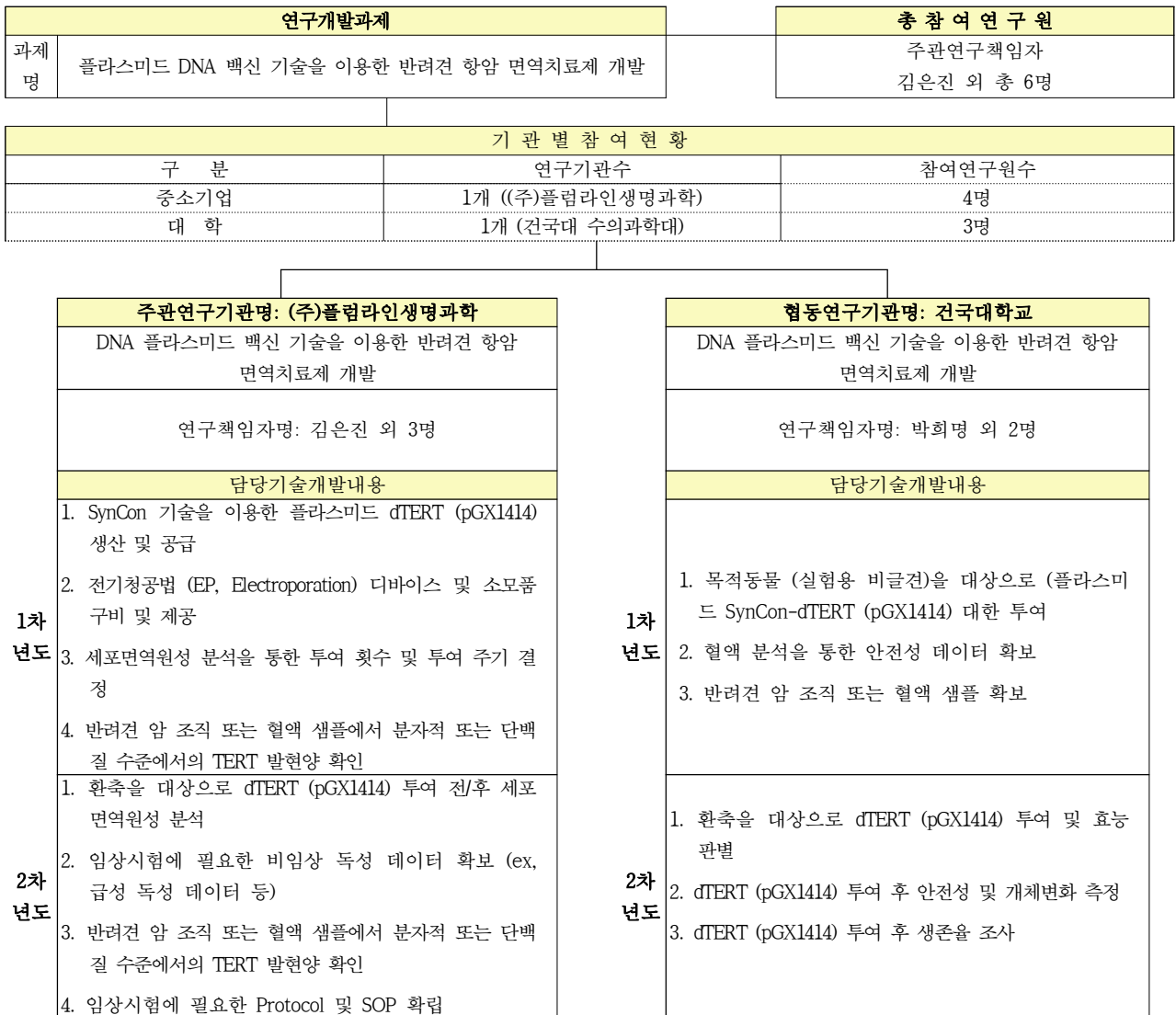
2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발 추진 전략 및 방법

플라스미드 DNA 백신 기술을 이용한 반려견 항암 면역 치료제 개발을 위해서 다음과 같이 양 기관의 역할을 분담하여 추진할 예정이다.

- **(주)플러플라이생명과학**은 연구에 사용될 (1) 플라스미드 생산 및 안정적으로 공급 (2) 전기천공법 (electroporation, EP) 사용에 대한 기술 전수 (3) 연구과제시 수행되는 목적동물 및 환축대상 면역원성 검증 (4) 반려견 암 조직 또는 혈액 샘플에서 dog TERT 발현 확인할 것이다.
- **건국대학교**는 연구과제에서 수행 될 (1) 목적동물(실험용 비글견) 및 환축대상으로 (2) 안전성 평가 (3) 효능평가를 담당할 것이다.

2-2. 연구개발 추진체계



2-3 연구개발 추진일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	dTERT 플라스미드 생산	■	■	■											51,000	김은진 (플럼라인 생명과학)
2	세포면역원성 실험 구축		■	■												
3	면역원성 확인 epitope 결정				■	■	■	■	■	■						
4	dTERT 발현량 확인								■	■						
5	목적동물 투여 및 채혈				■	■	■	■	■	■				51,000	박희명 (건국대학 교)	
6	목적동물 안전성 데이터 분석				■	■	■	■	■	■						
7	암조직 및 혈액 수집			■	■	■	■	■	■	■	■					

2차년도																
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	임상시험 SOP 확립	■	■												82,000	김은진 (플럼라인 생명과학)
2	환측 면역원성 확인		■	■	■	■	■	■	■	■	■					
3	독성 안전성 데이터 확보		■	■	■	■	■									
4	임상시험계획서 작성												■			
5	연구 대상 (고형암 환측)의 모집	■	■	■	■	■	■	■	■	■				82,000	박희명 (건국대학 교)	
6	고형암 환측에 약물 투여 및 안전성 평가			■	■	■	■	■	■	■	■					
7	고형암 환측에 약물 투여 후 개체변화 평가			■	■	■	■	■	■	■	■					
8	약물 투여 개체의 생존율 평가						■	■	■	■	■	■				

2-4. 연구범위 및 연구 수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1. SynCon 기술을 이용한 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 제작 및 생산	<ul style="list-style-type: none"> • (주)플럼라인생명과학의 관계사인 Inovio의 SynCon 기술을 이용한 dTERT DNA 서열 optimization 	<ul style="list-style-type: none"> • 동물종별 TERT DNA 서열을 computational analysis 방법을 통하여 dog 특이적 DNA 서열로 optimization 하고, 투여 후 독성을 제거하기 위하여 몇몇 DNA 서열을 modify 하였음. (2-5 연구결과 참조)
2. 세포성면역원성 (INF- γ) 분석을 통한 Epitope, 투여주기 및 투여 횟수 결정	<ul style="list-style-type: none"> • 투여된 dTERT 플라스미드 (pGX1414)에서 유래된 단백질은 세포내에서 항원으로 작용 • 세포내 dTERT 항원을 제거하기 위해서 체내의 세포성면역세포 (INF-γ)를 활성화 시키며, 이들 면역세포가 암조직에 특이적으로 많이 존재하는 TERT 단백질을 제거하여 암세포를 사멸시킴 • 세포성면역세포 (INF-γ)를 활성화 정도를 ELISpot assay 방법으로 측정하여 항암 면역치료제와의 약효를 예측함 	<ul style="list-style-type: none"> • 세포면역원성 (INF-γ) 분석을 위한 ELISpot Assay 방법 구축 • 세포성면역세포 (INF-γ)를 활성화를 측정하는 방법으로는 15개의 dog-TERT amino acids peptides pool을 이용하여 ELISpot assay 수행하여 INF-γ 활성화 및 Epitope를 결정한다. dTERT 플라스미드(pGX1414)는 2주 간격 4회 투여로 투여 주기와 횟수 결정하였음. (2-5 연구결과 참조)
3. 각종 반려견 암 조직 혹은 혈액에서 분자 또는 단백질 수준에서의 dTERT 발현양 측정	<ul style="list-style-type: none"> • 상용화 human TERT (hTERT) 항체를 이용한 dTERT발현 확인 (a) • Real-time PCR을 이용한 분자적 수준에서의 dTERT 발현양 측정(b) 	<ul style="list-style-type: none"> • (a) 판매되고 있는 dog specific TERT 항체가 없어 western blot을 수행하는데 어려움이 있어, 현재 dog specific TERT 항체를 업체에 의뢰하여 제작 중에 있음. 판매되고 있는 human specific TERT 항체는 dTERT 단백질 검출이 불가능. 항체 제작이 완료되면 실험 진행 예정 • (b) 분자적 수준에서의 dTERT 발현양 측정을 위해서 real-time PCR에 필요한 프라이머 제작과 검증이 완료된 상태이며, dTERT 발현양 측정을 진행함. (2-5 연구결과 참조)
4. dTERT 플라스미드(pGX1414)투여	<ul style="list-style-type: none"> • 10mg/ml의 dTERT 플라스미드 (pGX1414)를 electroporation (EP)을 이용하여 투여 • 실험 동물은 건강한 실험개체 13마리를 이용하였으며, 실험군 10마리와 대조군 3마리로 분류하여 진행 	<ul style="list-style-type: none"> • 목적동물인 실험용 비글견에 pGX1414를 EP를 이용하여 3주 간격으로 4회 투여함 • 투여 시 EP condition은 0.5 Amps, 3 pulses, 52 millisecond in duration • 약물 투여부위인 양측 뒷다리부위의 삭모를 진행하여 약물을 투여하고, 추후 주사부위 반응성을 확인 (2-5 연구결과 참조)

연구 범위		연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1차년도 (2017)	5. dTERT 플라스미드 (pGX1414)투여 전과 후에 혈액을 채취하여 안전성 데이터 확보	<ul style="list-style-type: none"> dTERT 플라스미드 (pGX1414)투여 전과 투여 후 2주째와 3주째 동물에서 혈액을 채취함 투여한 개체의 안전성 평가를 위하여, 다양한 검사를 시행 	<ul style="list-style-type: none"> 목적동물인 실험용 비글견의 jugular vein에서 채혈을 실시함 혈액검사, 혈청화학검사, 뇨검사 등을 통하여 투여 전과 후의 개체 변화를 평가 모든 개체는 약물 투여 전과 투여 후 신체검사를 실시하여 개체의 변화를 평가 약물 투여 부위는 주사 이후 지속적으로 주사부위를 평가하여, 약물 투여 이후 국소 부작용 (2-5 연구결과 참조)
2차년도 (2018)	1. 환축 모집 및 dTERT 플라스미드 투여 방법 도출 (투여 주기, 횟수)	<ul style="list-style-type: none"> 건국대학교 동물병원 외 2차 동물병원 2곳에서 환축 모집 실험에 참여한 환축 투여군 20마리, 대조군 11마리 1차년도 연구 결과를 바탕으로 dTERT 투여 방법 도출 	<ul style="list-style-type: none"> dTERT 플라스미드(pGX1414)는 1차년도 결과에 따라 2주 간격 4회 투여 실시함 내원한 환축 대상으로 고형암 (Sarcoma/ carcinoma)과 lymphoma로 진단 받은 환축에 대해 전기천공법을 통한 투여 적합성 환축 모집 (2-5 연구결과 참조)
	2. 환축 대상 dTERT 플라스미드 (pGX1414)투여 및 세포 면역원성 분석	<ul style="list-style-type: none"> 환축대상 1차년도 확립한 ELISpot Assay 방법으로 세포면역원성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 선정된 환축에 pGX1414를 EP를 이용하여 2주 간격으로 4회 투여함 투여 시 EP condition: 0.5 Amps, 3 pulses, 52 millisecond in duration 약물 투여부위인 양측 뒷다리부위의 삭모를 진행하여 약물을 투여하고, 추후 주사부위 반응성을 확인 1차년도 확립한 ELISpot Assay 방법으로 세포면역원성 분석 (2-5 연구결과 참조)
	3. 환축 대상 dTERT 플라스미드 (pGX1414)투여 전과 후에 혈액을 채취하여 안전성 데이터 확보 및 생존율 조사	<ul style="list-style-type: none"> 환축대상 투여한 개체의 안전성 평가를 위하여, 다양한 검사를 시행 (표1,표2,표3 사용) 투여 후 효능 및 생존율 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 환축대상에 대해 채혈을 실시함. 약물 투여 부위는 주사 이후 지속적으로 주사부위를 평가하여, 약물 투여 이후 국소 부작용에 대해 평가 혈액검사, 혈청화학검사, 뇨검사 등을 통하여 투여 전과 후의 개체 변화를 평가 모든 개체는 약물 투여 전과 투여 후 신체검사를 실시하여 개체의 변화를 평가 (2-5 연구결과 참조)

연구 범위		연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
2차년도 (2018)	4. 각종 반려견 암 조직 혹은 혈액에서 분자 또는 단백질 수준에서의 dTERT 발현양 측정	<ul style="list-style-type: none"> • dog TERT 항체 제작 완료 및 발현 확인(a) • Real-time PCR을 이용한 분자적 수준에서의 dTERT 발현양 측정(b) 	<ul style="list-style-type: none"> • (a) 분자적 수준에서의 dTERT 발현양 측정을 위해서 real-time PCR에 필요한 프라이머 제작 및 검증이 완료된 상태이며, 다양한 고형암(n=12) 조직으로 부터 dTERT 발현양을 확인함. • b) 현재 dog specific TERT 항체를 업체에 의뢰하여 제작 완료하였음. 제작된 항체로 dTERT 단백질 발현양 검증함. (2-5 연구결과 참조)
	5. 임상시험에 필요한 설치류 비임상 독성 데이터 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 설치류 대상 dTERT 플라스미드의 급성독성평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 고용량의 dTERT (100X) 투여 후 사망률, 임상적 관찰, 체중/조직 변화 및 혈액학적분석 실시 (2-5 연구결과 참조)

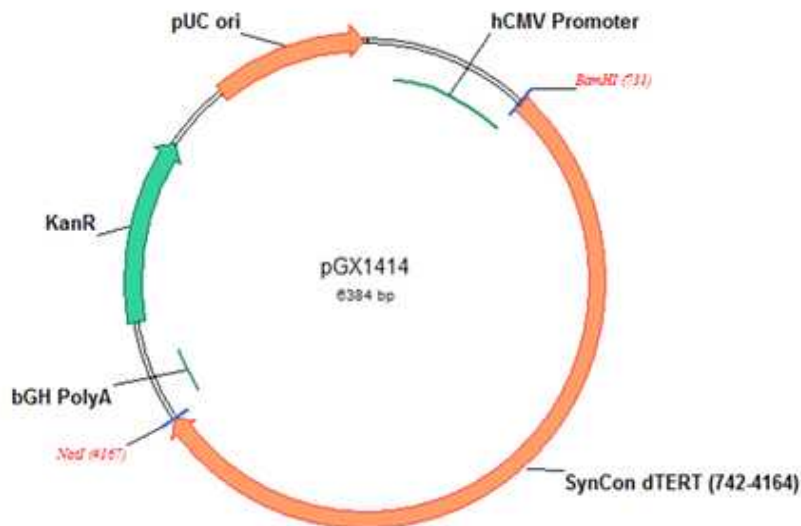
2-5. 연구 결과

가. 1차년도 연구결과

(1) dTERT 플라스미드 (pGX1414) 제작 및 생산

(1)-1. SynCon Technology 기술을 이용한 dTERT 플라스미드 제작

본 과제에서 개발하려고 하는 DNA 백신기반 항암 면역치료제인 dTERT 플라스미드(pGX1414)는 dog Telomerase Reverse Transcriptase (dTERT, 개 역전사효소)의 DNA 서열을 (주)플러림라인 생명과학 관계사인 미국 Inovio 사의 SynCon 기술을 바탕으로 dog-specific TERT DNA 서열을 codon/RNA optimization (dTERT)하여 제작하였다. dTERT 플라스미드(pGX1414)는 human CMV 프로모터에 의해서 단백질로 발현되며, the bovine growth hormone 3' end poly-adenylation signal (bGH polyA)을 가지고 있다. SynCon 기술에 의해서 제작된 dTERT DNA 서열은 카나마이신 저항 유전자(KanR)와 플라스미드 origin of replication (pUC ori)을 가지고 있는 pGX0001 (pVAX1 운반체를 (주)플러림라인생명과학이 자체적으로 수정한 운반체) 운반체내로 클로닝하였다 [그림 5].



[그림 5]. SynCon dTERT 플라스미드 (pGX1414) 구조. SynCon dTERT DNA는 *BamHI* and *NotI* 제한효소를 사용하여 pGX0001 (LifeTechnologies로 구입한 pVAX1 운반체를 자체적으로 수정하여 제작된 운반체) 운반체로 클로닝함. (hCMV 프로모터: 137-724bp, SynCon dTERT: 742-4164bp, bGH PolyA: 4215-4439bp, KanR: 4612-5406bp, pUC Ori: 5705-6378bp)

보존적인 dTERT DNA 서열을 찾기 위해서, 19개의 TERT DNA 서열을 GenBank로부터 가져왔으며 (NP_001026800, XP_004411686, XP_004768446, XP_004812556, EFB14781, XP_004812554, XP_004768447, XP_004440093, XP_004411687, XP_004812555, XP_004274558, NP_937983,

AAC51724, NP_001177896, XP_004380340, NP_001039707, XP_003950543, NP_001231229, DAA17756.), SynCon 기술을 이용하여 dTERT DNA 서열을 획득하였다. 이렇게 제작된 dTERT DNA 서열은 면역학적 내성에 의해서 dTERT 단백질 항원이 세포성면역 반응을 활성화시키지 못하는 것을 방지하기 위해서, 두 개의 dTERT 아미노산(R579Y, D996Y)을 바꾸었으며, 5개의 아미노산 변이(K633A, R638A, D719A, Y724A, D876A)들은 추가로 만들어 세포내에서 dTERT 단백질이 활성도를 나타내는 것을 억제하는 역할을 한다 [그림 6]. SynCon에 의해서 만들어진 dTERT DNA 서열은 자연적으로 존재하는 TERT(native TERT)와 95.4%의 상동성을 갖고 있다. 세포내에서 dTERT의 단백질 발현양을 증가시키기 위해서, TERT 단백질 N-terminal 앞쪽에 (DNA의 경우 5 ‘-ATG 앞부분) Kozak DNA 서열과 IgE leader 서열을 추가하였으며, 포유동물 codon bias에 따라서 dTERT 서열을 최적화시켰다 [그림 6]. 마지막으로, 최적화된 DNA 서열이 RNA로 전사가 잘 이루어지도록 internal TATA box, chi-sites 그리고 ribosomal entry sites와 같은 cis-acting 서열은 사용하지 않았다. 또한 GC 서열의 경우, 전체 서열 중에 >80% 혹은 <30%가 되지 않도록 SynCon dTERT DNA 서열을 제작하였으며, *Bam*HI and *Not*I 제한효소를 사용하여 pGX0001 운반체로 클로닝하였다.

```

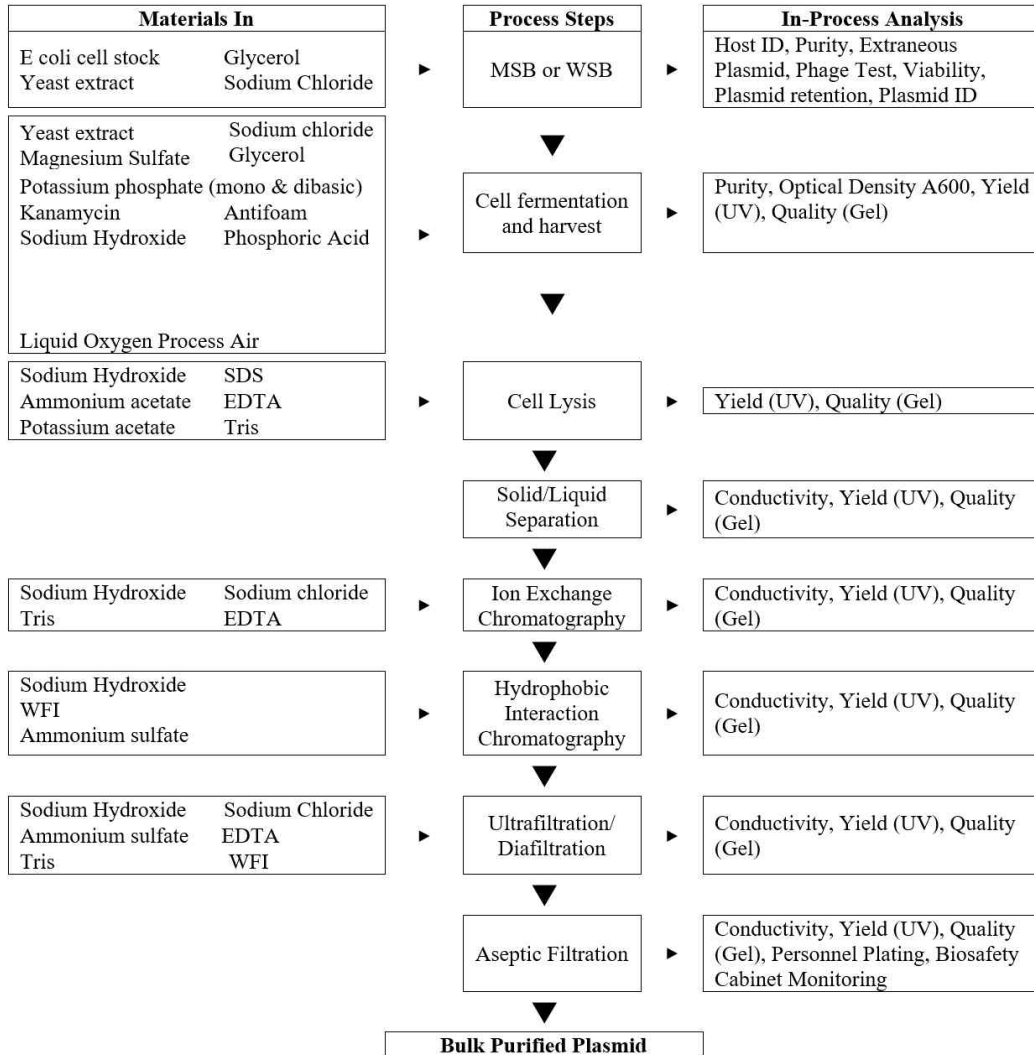
1 MDWTWILFLV AAATRVHSPR APRCRAVRAL LRGRYREVLV LATFLRRLGP QGRRLVRRGD
61 PAAFRALVAQ CLVCPWDAR PPPAAPSFRQ VSCLKELVAR VVQRLCERGA RNVLAFGFAL
121 LDGARGGPPV AFTTSVRSYL PNTVTETLRG SGAWGLLLRR VGDDVLTHLL ARCALYLLVA
181 PSCAYQVCGP PLYDLCAPAS LPLPAPGLPG LPGLPGLGHG AGTSADLRPT RQAQNSGARR
241 RRGSPGSSVP LAKRPRRSVA PEPERGAHRS FPRAHQPPVS EPPAVTPARA AAEAASWEGG
301 PPGTRPSTPA WHYPYGPQGV PHDPAHPETK HFLYCSGGRE RLRPSFLLSA LPPSLTGARK
361 LVETIFLQSA POKPGAARRM RRLPARYWRM RPLFQELLGN HARCPYRALL RTHCPLRAMA
421 AKEASGNQAH RGVGICPLER PVAAPPEEQTD PRRLVQLLRQ HSSPWQVYAF LRACLCLRVP
481 TGLWGSRHNO RRFLRNVKKF ISLGKHAKLS LQELTWKMKV QDCAWLRGSP GACCVPAAEH
541 RRREEILARF LVWLMGHIYV VELLRSFFYV TETTFQKNL FFYRKSVWSQ LQSIGIRQHF
601 NSVHLRELSE AEVRRHREAR PALLTSRLRF LPAPSGLAPI VNMDYVMGAR TFHRDKKVQH
661 LTSQVKTLFS VLNYERARRP SLLGASVLGM DDIHRAWRTF VLRVRAQDPA PQLYFVKVAV
721 TGAADALPQD RLVEVIANVI RPQENTYCVR HYAVVRR TAR GHVRKSFKRH VSTFTDLQPY
781 MRQFVERLQE TSSLRDAVVI EQSSSLNEAG SGLFHLFLRL VHNHVIRIGG KSYIQCQGIP
841 QGSILSTLLC SLCYGMERR LFPGIQQDGV LLRLVADFLV VTPHLTQAQA FLRTLVRGVP
901 EYGCRANLQK TAVNFPVEDG ALGSAAPLQL PAHCLFPWCG LLLDTRTLEV SCDYSSYART
961 SIRASLTFSQ GAKPGRNMRR KLFVLRLLKC CALFLQLQVN SIHTVYMNKY KIFLLQAYRF
1021 HACVLQLPFN QPVRKNPSFF LRVISDTASC CYSLLKARNA GMSLGAKGAS GLFPSEARW
1081 LCLHAFLKLL ARHSGTYRCL LGALRAAKAH LSRQLPRGTL AALEAAADPS LTADFKTILD
1141 *

```

[그림 6]. SynCon dTERT 아미노산 서열과 특징. SynCon 기술에 의해서 제작된 dTERT 아미노산 서열로서 IgE leader 서열과 변이된 부분의 아미노산을 나타내고 있다. (노란색박스: leader sequence, 초록색박스: R579Y와 D996Y, 회색박스: K633A, R638A, D719A, Y724A, D876A)

(1)-2. dTERT 플라스미드 (pGX1414) 생산

SynCon 기술을 바탕으로 제작된 dTERT 플라스미드 (pGX1414)는 미국 휴스턴에 위치한 VGXi, Inc. (2700 Research Forest Drive, Suite 180, The Woodlands, TX 77381 USA) 공장에서 대량생산을 주문하여 [그림 7]에서와 같은 방법으로 생산하였다. 생산된 플라스미드는 슈퍼코일 형태의 플라스미드 함량이 99% 이상 그리고 내독소 함량이 2.5EU/mg 이하로 정제되어, 10mg/vial으로 fill & finish 하여 총 178 vials를 국내로 무환 수입 하였다.



[그림 7]. SynCon dTERT 플라스미드 (pGX1414) 대량생산 공정도

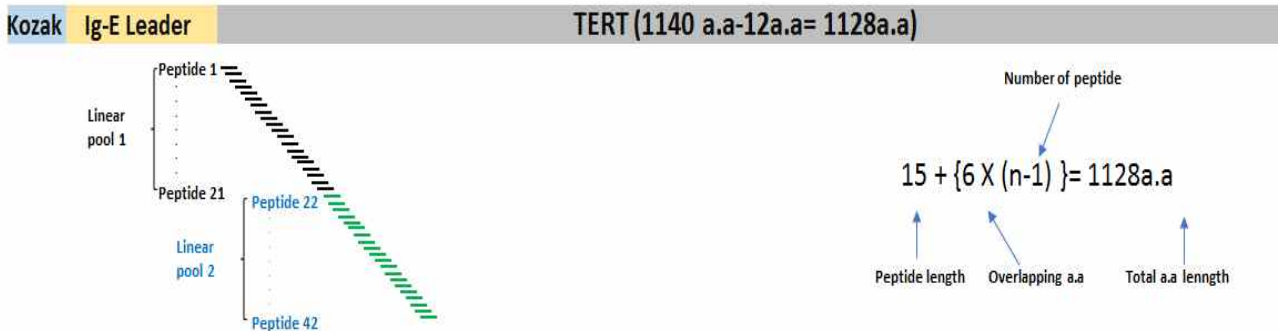
(2). 세포성면역원성 (INF- γ) 분석을 위한 ELISpot Assay 방법 구축

(2)-1. ELISpot Assay 방법

본 실험에서 dTERT 플라스미드 (pGX1414)에 의해서 활성화된 세포성면역원성은 증가된 INF- γ 수치를 통해서 확인하였다. INF- γ 수치는 실험동물인 비글견에 dTERT 플라스미드(pGX1414)를 투여한 후 채혈한 혈액에서 측정된 것으로 dTERT 플라스미드(pGX1414)가 투여되지 않은 비글견의 혈액의 INF- γ 수치를 대조군으로 비교하였다. INF- γ 수치는 채혈된 비글견 혈액에서 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) 세포를 분리하여, ELISpot Assay를 통해서 측정하였다. PBMC 세포들은 lymphocytes (T 세포, B 세포, NK 세포)와 monocytes로 구성되어진 세포로서, 본 실험에서 측정하고자하는 INF- γ 를 생성하는 T세포와 NK 세포를 포함하고 있기 때문에 본 실험에 (DNA 백신에 의해서 활성화된 세포성면역원성 확인에) 적합한 샘플이다. 이러한 PBMC 세포는 ficoll을 이용하여 다음과 같은 방법으로 혈액에서 분리하여 사용하였다.

- ① Fill a new 15ml conical tube with 5ml R10 buffer.
- ② Soak the isolated spleen in the above 15ml tube.
- ③ Pour isolated spleen into stomacher bag
- ④ Homogenize spleen using the Stomacher.
- ⑤ Place the homogenized spleen onto a Cell strainer attached to a new 50ml conical tube.
- ⑥ Rinse the Stomacher bag with 10ml PBS.
- ⑦ Centrifuge at 1500 rpm for 10min.
- ⑧ Remove the supernatant.
- ⑨ Resuspend cells with 5ml ACK lysis buffer and Incubate for 5min*.
(*Do not allow the lysis reaction for more than 5min)
- ⑩ Fill the conical tube with excess PBS, mix, and centrifuge. (1,500 rpm, 10min, 20°C)
- ⑪ Remove the supernatant.
- ⑫ Resuspend cells with 20ml R10 buffer.
- ⑬ Place the Resuspend cells onto a Cell strainer attached to a new 50ml conical Tube
- ⑭ Perform a cell count and viability check.
- ⑮ Adapt to a concentration 2×10^6 cell/ml for ELISPOT assay

위와 같은 방법으로 분리된 PMBC 세포들은 ELISpot Assay를 통해서 활성화된 INF- γ 수치를 측정하게 된다. ELISpot Assay를 이용하여 dTERT에 의해서 활성화된 INF- γ 수치를 측정하기 위해서 15 mer로 구성된 dTERT 펩타이드로 제작하였다. 15 mer 구성된 펩타이드는 전체 dTERT 아미노산 서열을 커버할 수 있도록 187개를 제작하였으며, 각각의 이웃한 펩타이드는 9 mer가 서로 공유되도록 제작하여, dTERT에 의해서 활성화된 세포성면역원성의 epitope를 결정하는데 이용하였다 [그림 8]. 연속되는 21개 펩타이드들을 펩타이드 풀(pool)로 구성하여 결과를 분석하는 데 용이하게 사용하였다 [표 8].



[그림 8]. dTERT 펩타이드 (peptide) 제작에 대한 모식도

[표 8]. 각 펩타이드 풀 (Linear pool)에 해당하는 펩타이드

Peptide pool (Linear pool)	Peptide number
Pool 1	Peptide 1-21
Pool 2	Peptide 22-42
Pool 3	Peptide 43-63
Pool 4	Peptide 64-84
Pool 5	Peptide 85-105
Pool 6	Peptide 106-126
Pool 7	Peptide 127-147
Pool 8	Peptide 148-168
Pool 9	Peptide 169-187

ELISpot Assay는 자극된 PBMC 세포들에서 생성된 INF- γ 를 항원-항체 반응을 이용하여 발색반응(Spot)을 통해서 INF- γ 수치 (Spot 수)를 측정하는 방법이기 때문에, 세포를 자극하는 약물의 농도와 마지막 단계에서 발색 시간은 spot 수 (INF- γ 수치)에 영향을 미치기 때문에 본 실험전에 최적의 약물 농도와 발색시간을 정하기 위한 예비실험을 실시하였다. 예비실험에 결과에 따르면, 500X cell stimulation cocktail은 0.1X와 1X 농도로 희석하여 사용하였을 경우 1X 농도로 처리하였을 때, 가장 선명한 spot을 관찰 할 수 있었다. Spot의 발색은 BCIP/NBT 시약을 사용하였는데, 발색시간이 60분을 넘기면 spot의 색깔이 saturation되어 spot 수 측정이 어렵고, 유의미한 결과를 얻기 어렵다고 판단하여 발색시간을 60분 내로 결정하고, 10분, 20분, 30분, 60

분에 대한 spot 수를 관찰하였다. 결과에 의하면, 30분 발색시에 가장 선명한 spot을 확보, 수를 측정하기가 용이하여 발색 시간은 30분으로 결정하였으며 [그림 9] 다음과 같은 실험 방법으로 본 실험에서의 INF- γ 수치를 확인하였다.

[1일]

1. Make ELISPOT plate layouts and buffers.
2. Reconstitute capture antibody with 1ml PBS and dilute capture antibody 1:60 in PBS.
3. Immediately add 100ul of diluted capture antibody per well.
4. Cover plates in plastic wrap and incubate at 4°C overnight.

[2일]

1. Discard capture antibody and wash 3 or 4 times with PBS (200ul/well)
2. After the final wash, remove any remaining liquid by inverting plate.
3. Add 200ul of blocking buffer per well and incubate at room temperature for 2hr*
(*Recommend more than 30min)
4. Discard blocking buffer.
5. Fill well with 200ul R10 until cells* are ready to be plated.
(*Cell: Splenocyte, PBMC etc)
6. Dilute peptide pools (1mg/ml) 1:100 in R10 and cell stimulation cocktail (500X) 1:500 in R10
7. Remove R10 buffer
8. Add 100ul of cells per well (2×10^6 cell/ml \rightarrow 100ul, 2×10^5 cell/well)
9. Add 100ul of diluted peptide and cell stimulation cocktail to appropriate well.
10. Incubate plates at 37°C 5% CO₂ incubator for at least 18hr.

[3일]

1. Discard cell and wash 4 times with PBS by dunking*.
(*Dunking: Put the plate in tray filled with PBS)
2. Reconstitute detection antibody with 1ml dilution buffer and dilute capture antibody 1:60

in dilution buffer.

3. Add 100ul of diluted detection antibody per well.
4. Cover plates in plastic wrap incubate at 4°C overnight.

[4일]

1. Discard cell and wash 4 times with PBS by dunking.
2. Dilute Streptavidin-AP 1:60 in dilution buffer.
3. Add 100ul of diluted STREP-AP per well and incubate at room temperature in the dark for 2hr.
4. Wash 4 times with PBS by dunking*.
5. Add 100ul of BCIP/NBT (filter before using) and cover plates in plastic wrap.
6. Incubate at room temperature in the dark and develop until spots emerge.

(Incubation time must be determined empirically)

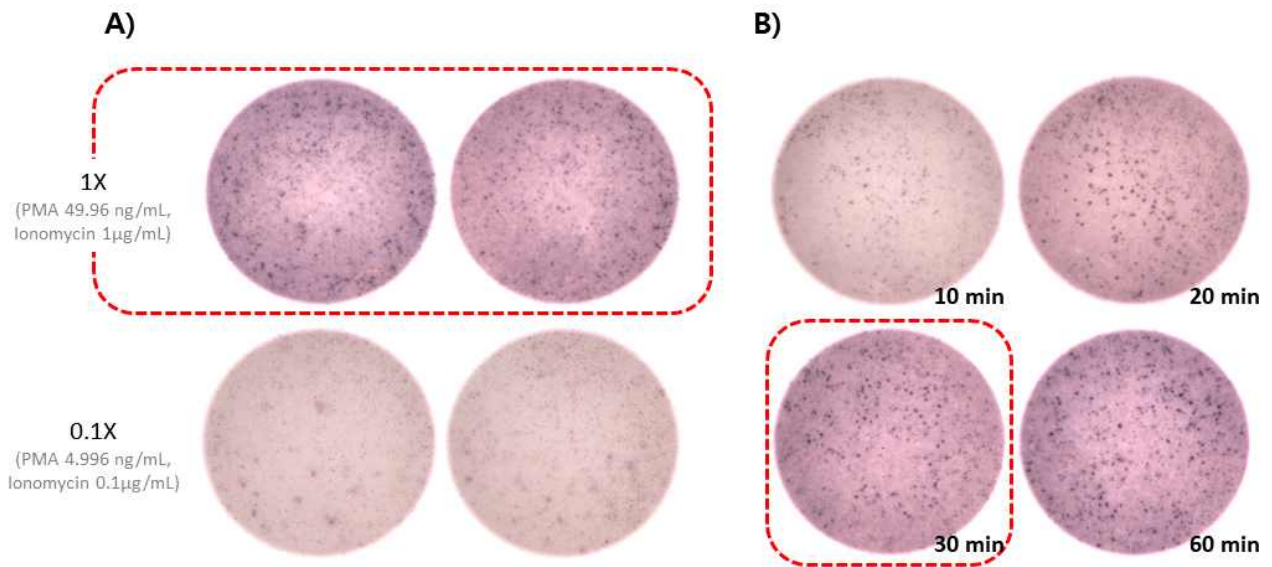
7. Stop spot development by washing thoroughly in tap water, remove back of plate and wash back of membrane.
8. Allow the plate upside down on bench top to dry at room temperature overnight*.

(*It is important to dry completely. Spot is not accurately read if plate is wet)

9. Store plates at room temperature in the dark.

[5일]

1. Scan plate, count spots and QC



[그림 9]. ELISpot Assay 실험조건 최적화 실험결과. (A) Positive control 발색 반응을 위한 cell stimulation cocktail 농도 최적화 실험결과로 1X로 희석하여 사용하였을 때 선명한 spot을 나타내고 있음. (B) 발색 시간대(10분, 20분, 30분 그리고 60분)별 Spot의 선명도를 조사한 결과 30분동안 발색하였을 때 가장 선명한 spot을 구분할 수 있었음.

(3) 목적동물(실험용 비글견)을 대상으로 플라스미드 SynCon-dTERT (pGX1414) 대한 투여

(3)-1. 개체

본 실험에 이용되는 모든 실험적 방법과 실험건의 관리는 실험동물윤리위원회 (IACUC)의 승인 하에 실시하였다.

임상적으로 건강한 13마리의 수컷 비글견이 실험에 사용되었다. 몸무게는 8-14kg 내외이며, 실험 시작 전 모든 개체는 전반적인 신체검사를 포함한 건강 검진을 진행하며, 이후 1 주간 동일한 실험 사육 시설에서 적응기간을 가졌다. 사료는 동일한 브랜드의 건사료를 하루 2회 일정한 시간에 급이하였으며, 물은 상시 급이할 수 있도록 하였다. 실험동물이 머무는 사육 시설은 일정 온도와 습도, 인공적인 조도를 일정하게 유지하도록 되어있었다. 실험동물의 사육 및 관리는 모두 동물실험윤리위원회의 허가를 받고 규정에 맞게 진행하였다.

(3)-2. 실험 설계

실험건은 무작위로 2 그룹으로 나뉘었다. 각 그룹은 그룹 1 (대조군), 그룹 2 (투여군)으로 나뉘었으며 그룹 1은 3마리 그룹 2는 10마리를 배정하였다.

모든 실험건은 약물 투여 용량 외에는 동일한 조건 하에 사육되도록 하였다.

(3)-3. 실험 과정

실험 시작 전, 모든 실험견에 기본 신체검사를 실시하였으며, 혈액검사 (전혈구검사, 혈청화학 및 전해질 검사), 뇨검사를 통해 이상이 없는 것을 확인하였다.

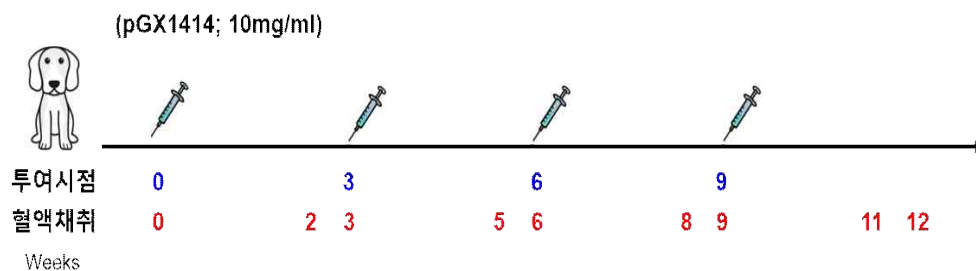
총 12 주간 dTERT 플라스미드 (pGX1414, 10 mg/ml)를 전기천공법 (EP, Electroporation)을 통해 1 ml 왼쪽 뒷다리 대퇴부에 근육주사하였다, 각 그룹에 투여된 약물의 용량은 다음 [표 9] 과 같다.

[표 9]. 각 실험 그룹의 개체 수 및 약물투여 용량/기간

그룹	개체 수	약물용량	투여 방법	투여 기간
1	3 마리	0.9% 생리식염수 1 ml	근육주사, EP (0.5 Amps, 3 pulses, 52 millisecond in duration)	총 12주간 3주 간격으로 총 4회 주사
2	10 마리	pGX1414 (10 mg/ml) 1 ml	근육주사, EP (0.5 Amps, 3 pulses, 52 millisecond in duration)	

(4) dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여에 따른 실험견의 세포성면역원성 (INF- γ) 분석

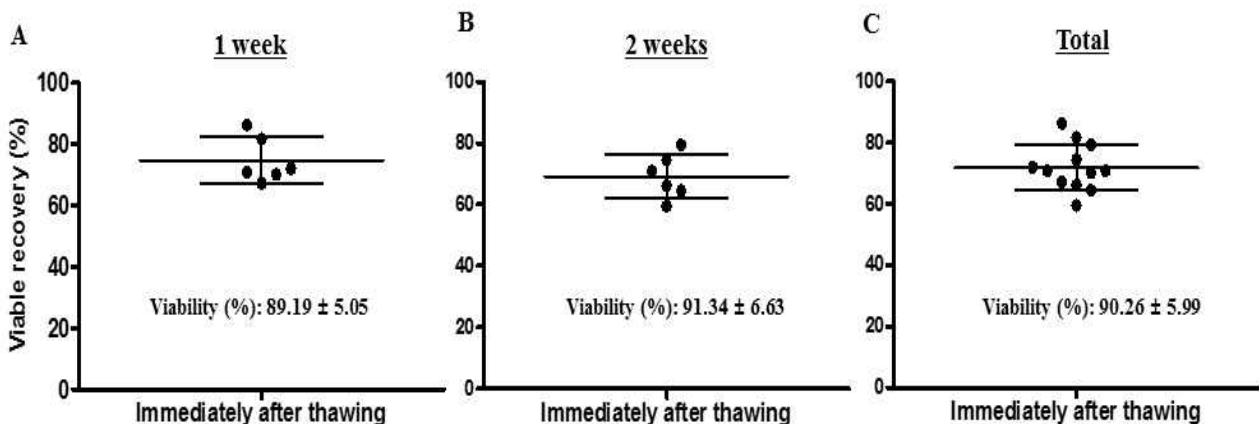
dTERT 플라스미드 (pGX1414)가 약물로서 암세포를 공격할 수 있는 충분한 양의 세포성면역원성(INF- γ)을 생산하는지 관찰하기 위해서 건강한 동물실험용 비글견 10마리(Donor 1~10)에 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 10mg/ml를 3주 간격으로 4회, 3마리 대조군 (Donor 11~13)에는 1ml의 0.9% 생리식염수를 전기천공법 (electroporation, EP) 방법을 사용하여 근육세포내로 투여하였다. dTERT 플라스미드(pGX1414) 투여 후 2주와 3주 후에는 혈액을 채혈하여 혈액내의 PBMC를 분리하여 ELISpot Assay 방법을 이용하여 활성화된 INF- γ 의 수치를 확인하였다 [그림 10].



[그림 10] dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여주기 및 채혈시기. dTERT 플라스미드 (pGX1414)는 3주 간격으로 3주(파란색), 6주(파란색) 그리고 9주(파란색)에 투여하였으며, 채혈은 0주 (투여 전, 빨간색), 2주, 3주(1차 투여 후, 빨간색), 5주, 6주(2차 투여 후, 빨간색), 8주, 9주(3차 투여 후, 빨간색) 그리고 11주, 12주(4차 투여 후, 빨간색)에 이루어졌음.

(4)-1. 임상혈액에서 분리한 PBMC 샘플 보관을 위한 SOP 구축

본 실험은 실험건이 아닌 일반 반려견을 대상으로 임상시험 또는 동물용의약품 허가 이후 병원에서 치료제가 실제로 사용할 경우, dTERT 플라스미드(pGX1414) 약물에 대한 치료 효과를 확인하기 위해서 채혈하여 INF- γ 수치 측정 시에 일정한 주기로 혈액을 공급받을 수 있을 것이라는 보장이 없기 때문에 혈액을 채혈할 때 마다 전혈에서 PBMC를 분리하여 액체질소에 냉동 보관해야한다. 분리된 PBMC의 냉동 보관 기간 또한 일정하지 않을 수 있기 때문에 액체질소에 보관하는 기간에 따른 cell viability를 측정하여, 향후 반려견 대상으로 임상시험 혹은 치료 시에 PBMC의 냉동보관 기간에 따른 반려견 혈액 세포(PBMC)의 생존율 및 회수율을 설정하였다. Cell viability 측정을 위하여, 전혈에서 PBMC를 분리하여 세포동결용액에 세포를 풀어서 cell freezing container에 넣고 -80°C에 O/N 보관 후 액체질소 탱크에 옮겨서 보관하였다. 냉동 보관 후 1주, 2주 뒤에 PBMC세포를 녹여서, LUNA-FL Dual Fluorescence Cell Counter (Logos Biosystems, Model: L20001)을 이용하여 Cell 회수율(viable cell recovery)과 생존율(viability)를 확인하였다. 결과 [그림11]에 의하면 액체질소에 보관 후 1주, 2주 후 PBMC의 평균 회수율과 생존율은 각각 $71.99\% \pm 7.29$ 과 $90.26\% \pm 5.99$ 로 나타났다. 따라서 ELISpot Assay를 통한 INF- γ 수치 측정하기에 문제가 없는 것으로 판단되었으며, 1달 이상 장기 보관된 PBMC에 대한 실험도 진행할 예정에 있다.

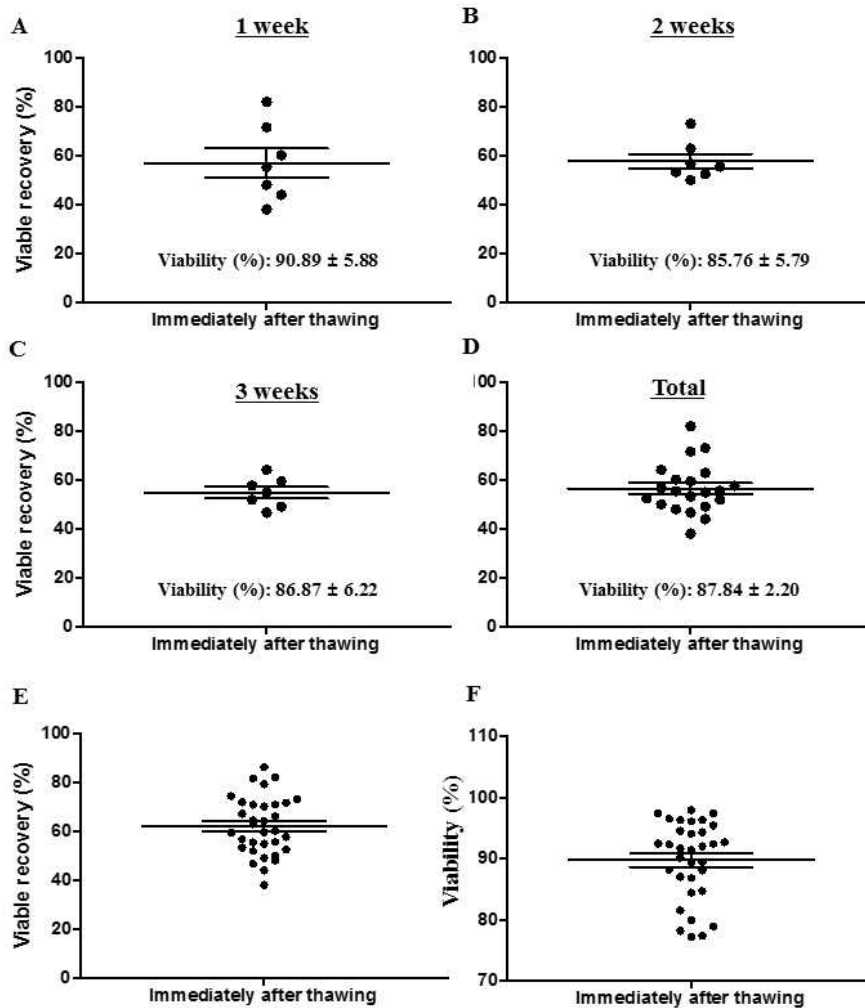


[그림 11]. PBMC 세포 viability 실험결과 (A) 액체질소에 1주일 보관 후 해동 한 PBMC 세포는 평균 $74.78\% \pm 6.88$ 회수율과 $89.19\% \pm 5.05$ 생존율을 나타냄. (B) 액체질소에 2주일 보관 후 해동 한 PBMC 세포는 평균 $69.20\% \pm 6.58$ 회수율과 $91.34\% \pm 6.63$ 회수율을 보임. (C) 전체 평균 PBMC 세포의 회수율과 생존율은 각각 $71.99\% \pm 7.29$ 과 90.26 ± 5.99 .

● 후속추가실험 - 장기 냉동 보관된(1, 2, 3개월) PBMC세포의 회수율과 생존율측정

냉동보관 된 PBMC세포를 1개월, 2개월, 3개월 뒤에 녹여서 Cell 회수율(viable cell recovery)과 생존율(viability)를 확인하였다. 결과 [그림12]에 의하면 액체질소에 보관 후 1,2,3 개월 후 PBMC의 평균 회수율과 생존율은 각각 $54.21\% \pm 2.76$ 과 $87.84\% \pm 2.20$ 로 나타났다. 단기 (1주, 2주) 및 장기(1,2,3 개월) 냉동보관에 따른 PBMC세포의 전체 평균 회수율은 $60.67\% \pm 12.43$, 평균 생존율은 $88.72\% \pm 6.34$ 을 보였다 [그림 12 E, F]. 결론적으로 충분히 안정된 세포 (88%이상의

높은 생존율)를 장기냉동 보관 시에도 이용가능하며, 앞으로 ELISpot Assay를 통한 세포면역반응(INF- γ 수치)을 측정하기에 전혀 문제가 되지 않는 것으로 판단된다.

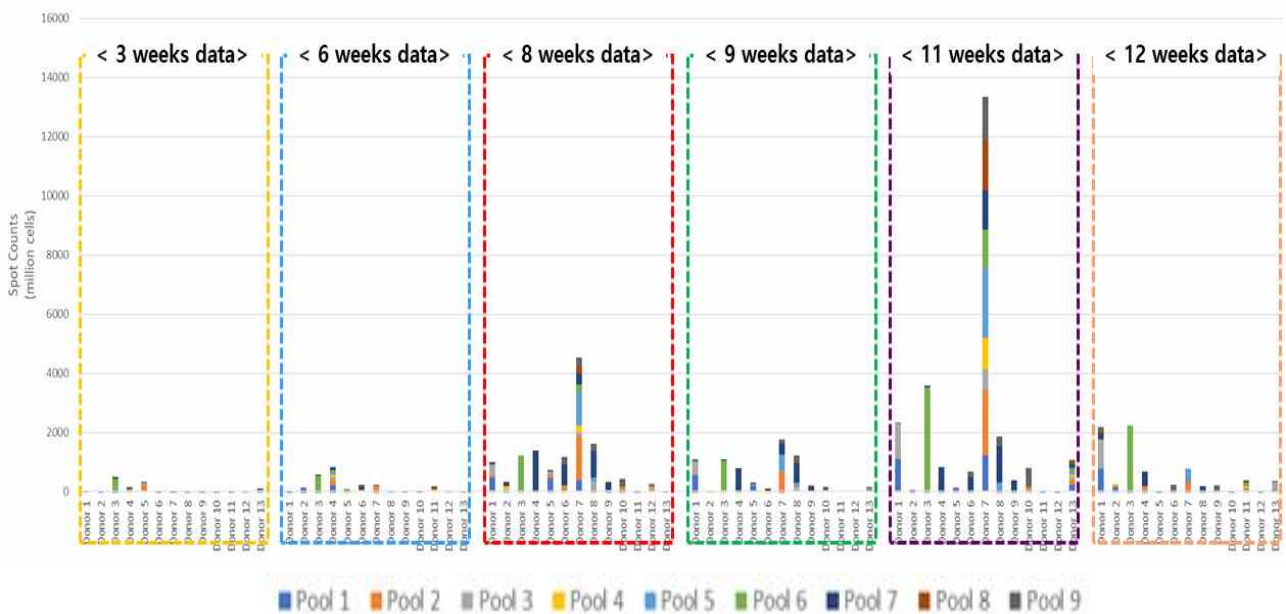


[그림 12]. PBMC 세포 viability 실험결과 (A) 액체질소에 1개월 보관 후 해동 한 PBMC 세포는 평균 57.14%±14.45 회수율과 90.89%±5.88 생존율을 나타냄. (B) 액체질소에 2개월 보관 후 해동 한 PBMC 세포는 평균 50.51%±5.38 회수율과 85.76%±5.79 회수율을 보임. (C) 액체질소에 3개월 보관 후 해동 한 PBMC 세포는 평균 54.97%±5.65 회수율과 86.87%±6.22 회수율을 보임. (D) 1,2,3 개월 전체 평균 PBMC세포의 회수율과 생존율은 각각 54.21%±2.76과 87.84%±2.20. (E), (F) 세포의 회수율과 생존율 종합 결과: PBMC세포 1주 ~ 3개월 보관 후

(4)-2. 실험건의 세포면역원성 (INF- γ) 분석

ELISpot Assay 결과에 따르면, dTERT 플라스미드(pGX1414) 단일 투여는 의미가 없으며, 최소 2회 투여 후 INF- γ 수치(6주)가 증가되는 것을 관찰할 수 있으며, 3회 투여 이후에는 개체별로 차이는 있으나, 대조군에 비하여 많은 양의 INF- γ 수치(8주)가 증가되는 것을 관찰할 수 있다 [그림 13, 8 weeks data]. 다만 개체별로 증가된 INF- γ 수치가 많은 차이를 보이는 이유는, 실험용 비글견은 실험용 마우스(통제되고 조절된 유전적 배경(genetic background)을 가진 마우스

끼리 교배에 의해서 만들어졌음)와 다르게 각각의 동물실험용 비글견은 자연교배에 의한 개체이기 때문에 상당한 차이의 유전자 배경을 가지고 있기 때문으로 해석할 수 있다, 이러한 유전적 요인 때문에 개체별 차이는 있으나, 3회 투여 이후 1회 추가 투여 시 INF- γ 수치(11주)가 증가되는 boosting 효과를 볼 수 있다 [그림 13, 11 weeks data]. 흥미로운 결과로 dTERT 플라스미드(pGX1414) 투여 후 2주 후가 3주 후 보다 INF- γ 수치가 높게 나타나고 있는 것을 볼 수 있다. 3차 투여 후 8주차 INF- γ 수치가 9주차 보다 높으며, 4차 투여 후 11주차 INF- γ 수치가 12주차 INF- γ 수치 보다 높다 [그림 13, 8, 9, 11, 12 weeks data]. 이 결과는 dTERT 플라스미드(pGX1414) 투여 후 dTERT 단백질에 대한 세포성 면역원성반응은 2주 후가 가장 활발하게 나타난다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과가 나오는 또 다른 이유로는 dTERT 플라스미드(pGX1414)에 사용된 CMV 프로모터가 2주후에 메틸화가 진행되어서 더 이상 dTERT DNA가 항원 단백질로 발현이 힘들기 때문이다. 이러한 결과로 dTERT 플라스미드(pGX1414)의 투여횟수는 4회로 2주 간격으로 투여했을 때 최대의 약효를 나타낼 수 있다.



[그림 13]. 실험견 개체별 INF- γ 수치 (Spot 수) 분석과 펩타이드 풀에 따른 면역원성 epitope 분석결과. dTERT 플라스미드(pGX1414)를 비글견에 투여 후 투여군(Donor 1-10)과 대조군(Donor 11-13) 사이에서의 INF- γ 수치 (Spot 수) 변화를 보여주고 있음. 그래프에서 서로 다른 색깔은 INF- γ 활성화에 영향을 준 펩타이드 풀(pool)을 나타낸다. 2주차 실험결과는 반응이 거의 나타나지 않아서 제외하였음.

(4)-3. Epitope 분석

일반적인 면역 치료제와 다른 DNA 백신의 장점 중 하나가 면역반응을 일으키기 위해서 전체 단백질의 특정 부분을 펩타이드를 이용하는 것이 아니고 전체 단백질을 이용한다는 것이다. 즉, dTERT 플라스미드(pGX1414)는 세포내에서 전체 단백질로 발현이 되며, 이 전체 native 한 단백질이 항원으로 작용하여 면역반응을 활성화 시키는 것으로, 실제 세포내에서 일어나는 면역반응이기 때문에 질병을 치료하는데 보다 더 효과적인 결과를 가져올 수 있다. [그림 13]에서 보여주는 것과 같이 개체별 INF- γ 수치 (Spot 수) 변화는 막대그래프로 나타내고 있으며, 각 막대그래프는 서로 다른 색깔로 구성되어지고 있다. 각기 다른 색깔은 서로 다른 펩타이드 풀(pool)을 의미하며, 이는 전체 dTERT 단백질에서 항원으로 작용한 부위의 펩타이드를 상징하는 것으로 INF- γ 수치 증가에 영향을 준 펩타이드를 보여준다. [그림 13]에서와 같이 개체별로 INF- γ 수치 (Spot 수) 변화에 영향을 준 펩타이드 풀(pool)이 서로 다른 것을 볼 수 있으며, 이런 결과는 비글견의 유전적 배경이 다르기 때문이다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 일반적인 면역 치료제는 개체별로 그 치료효과가 다를 수 있지만, DNA 백신을 이용한 면역치료제는 항상 보다 더 일정한 치료효과를 효율적으로 볼 수 있다고 사료된다.

(5) 목적동물 (실험용 비글견)을 대상 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 대한 투여에 대한 안전성 평가

dTERT 플라스미드 (pGX1414, 10 mg/ml) 투여 전/후에 따른 실험견의 안전성을 평가하고자 투여 부위 국소평가, 신체검사, 혈액검사 및 뇨검사를 실시하였다.

앞서 언급하였듯이 본 실험에는 1년령 이상의 수컷 비글견 13마리가 선발되었다. 모든 개체는 실험 전 1 주일의 환경 적응 기간을 거쳤으며, 신체검사 및 기타 실험실 검사에서 문제가 없는 건강한 개체로 선발하였다. 실험에 이용된 실험 개체의 특징은 [표 10] 에 제시한다.

[표 10] 전체 개체 (13마리)의 실험 전 (pre-examination) 특성

Characteristics	Dogs
Number	13
Gender	13 Males
Body weight (Kg), mean ± SD (Range)	9.6 ± 0.77
Heart rate (bpm), mean ± SD	110 ± 8
Respiratory rate (/min), mean ± SD	18 ± 5
Body temperature (°C), mean ± SD	38.6 ± 0.3
Hematologic evaluations	
WBC (x10 ³ /ul)	9.9 ± 3.5
RBC (x10 ⁶ /ul)	7.0 ± 0.7
Hb (gm/dl)	15.6 ± 1.3
PCV (%)	49.3 ± 4.3
PLT (x10 ³ /ul)	273 ± 52
Monocyte (%)	5.7 ± 2.8
Lymphocyte (%)	24.6 ± 3.4
SegNE (%)	66.3 ± 4.6
Eosin (%)	3.2 ± 2.6

(5)-1 폐사율/이환율 (Mortality/Morbidity)

총 12주간의 실험기간 중 매일 실험견을 관찰하였으며, 폐사하거나 질병에 이환된 실험견은 관찰되지 않았으며, 기력저하, 과민반응, 소화기 부작용 등의 약물 부작용도 관찰되지 않았다.

(5)-2 dTERT EP 투여 후 국소부위 평가

모든 개체에서 전기천공법 투여 시 3번의 pulse가 흐를 때마다 흥분, 고통을 보였으나 투여 이후 지속된 고통을 표현하지는 않았다. 총 12주간의 실험기간 중 매일 실험견의 주사부위를 관찰하였으며, 경결, 심한 궤양이 생긴 실험견은 관찰되지 않았으며 투여 당일 통증과 흥반을 보인 개체가 있었으나 7일 이내 모두 회복하였다. 국소 부위 변화는 [표 11]에 제시한다.

[표 11] dTERT 전기천공법 투여 전 및 투여 국소 부위 평가표

	0주	3주	6주	9주	12주
통증 발생 비율	31%	38%	31%	46%	-
Score	0.15±0.24	0.19±0.25	0.23±0.25	0.15±0.24	-



투여 직후



투여 7일 뒤

[그림 14] 전기 천공법 투여 전, 투여 후 투여부위 사진.

(5)-3 신체검사 (Physical examination)

실험 기간 동안 측정 시점에 따른 신체 검사 결과의 변화는 [표 12] 에 제시한다. 실험기간 동안 개체의 체중, 심박수, 호흡수 및 체온의 경우 특이할 만한 변화가 관찰되지 않았다. 모든 수치는 참고범위 이내에 존재하였다.

[표 12] dTERT 전기천공법 투여 전 및 투여 후의 vital sign 변화

그룹 1	Week 0	Week 3	Week 6	Week 9	Week 12
BW(Kg)	9.9±0.3	9.86±0.4	9.73±0.4	9.66±0.7	10.3±0.5
HR(bpm)	112±6.9	104±3.5	110±9.16	108±10.3	112±9.1
RR(/min)	18±6	20±3.5	24±0	20±6.9	20±6.9
BT (°C)	38.5±0.2	38.8±0.2	38.5±0.2	38.5±0.2	38.5±0.2
그룹 2	Week 0	Week 3	Week 6	Week 9	Week 12
BW(Kg)	9.5±0.8	9.4±0.7	9.2±0.4	9.3±0.5	10.3±0.9
HR(bpm)	110±8.5	116±9.5	113±6.6	113±6.6	113±5.9
RR(/min)	17.4±4.4	19.8±4.9	22.8±2.5	20.4±5.1	20.4±5.0
BT (°C)	38.6±0.2	38.8±0.2	38.6±0.21	38.6±0.21	38.6±0.2

* BW, body weight; HR, heart rate; RR, respiratory rate; BT, body temperature.

(5)-4 혈액검사 (Blood examination)

실험기간 동안 측정 시점에 따른 혈액 검사 결과의 변화는 [표 13] 에 제시하였다. 실험기간 동안 개체의 전혈구 검사, 혈청화학 및 전해질 검사상 특이할 만한 변화는 관찰되지 않았다. 모든 수치는 참고범위 이내에 존재하였다.

[표 13] dTERT 전기천공법 투여 전 및 투여 후 혈액, 혈청화학 변화

그룹 1		Week 0	Week 3	Week 6	Week 9	Week 12
CBC	WBC (x103/ul)	7.1±0.9	7.2±2.6	7.4±2.0	9.3±1.8	11.1±1.4
	RBC (x106/ul)	6.3±0.3	7.2±0.5	6.7±0.9	6.5±0.6	6.6±0.8
	Hb (gm/dl)	14.5±0.9	16.2±1.4	15.2±1.8	14.9±1.2	15.3±1.7
	HCT (%)	45.9±2.5	52.4±1.6	49.8±6.6	49.7±3.6	49.2±5.7
	MCV (fL)	70.5±0.2	70.3±0.2	70.3±0.2	70.3±0.8	70.4±0.3
	MCH (pg)	22.8±0.7	22.4±0.4	22.6±0.9	23.0±0.9	23.0±0.9
	MCHC (%)	31.6±0.3	31.8±0.2	31.8±0.6	31.4±0.0	31.0±0.2
	PLT (x103/ul)	310±30.2	241.3±76.3	319±112.	260±69.2	293±118.
Serum	TP (g/dL)	5.8±0.2	6.2±0.1	5.6±0.2	5.9±0.3	5.7±0.4
Chem-istry	ALB (g/dL)	3.1±0.0	3.2±0.2	3.1±0.1	3.2±0.0	3.1±0.0
	BUN (mg/dL)	16.3±4.9	18.7±3.1	11.3±2.2	14.2±2.8	21.1±4.4
	CREA (mg/dL)	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.5±0.0	0.5±0.0
	AST (U/L)	32.3±1.1	24±3.6	31.6±3.0	28.6±2.5	26±4.3
	ALT (U/L)	57.±5.50	43.±17.9	56±16.3	40.±11.1	37.±5.85
	ALP (U/L)	54.6±1.52	59±2.64	61.3±7.76	80.3±39.2	91.3±33.7
	LDH (U/L)	128.3±36.7	103.3±60.3	139.6±28.8	94.33±68.9	114.6±18.3
	Ca (mg/dl)	10.3±0.4	10.6±0.4	10.1±0.3	10.7±0.2	10.1±0.1
	P (mg/dl)	4.7±0.1	5.6±0.4	3.8±0.5	5.7±0.1	5.5±0.5
	Na (mmol/L)	146.6±2.0	147.4±1.4	147.7±1.2	153.0±0.6	150.5±4.6
	K (mmol/L)	4.5±0.3	4.9±0.0	4.7±0.2	4.9±0.1	5.2±0.0
	Cl (mmol/L)	111.6±0.5	115.8±0.2	113±1.5	115±0.8	114.6±1.3
그룹 2		Week 0	Week 3	Week 6	Week 9	Week 12
CBC	WBC (x103/ul)	9.7±2.2	8.2±1.1	9.3±2.4	9.7±2.4	11.9±1.9
	RBC (x106/ul)	7.2±0.6	7.5±0.6	7.1±0.4	7.1±0.4	7.1±0.3
	Hb (gm/dl)	15.9±1.2	16.7±1.2	15.6±0.8	15.8±1.0	16.0±1.0
	HCT (%)	50.4±4.3	52.8±2.7	51±2.5	52.9±3.4	52.2±3.7
	MCV (fL)	69.9±1.0	70.3±0.4	70.3±0.7	70.8±0.4	70.4±0.6
	MCH (pg)	22.2±0.4	22.2±0.5	22.0±0.6	22.2±0.7	22.4±0.6
	MCHC (%)	31.9±0.4	31.8±0.4	31.4±0.3	31.4±0.7	31.4±0.2
	PLT (x103/ul)	262±53.3	235.2±51.5	303.7±54.0	254.3±59.1	281.9±96.0
Serum	TP (g/dL)	5.9±0.2	6.0±0.3	5.5±0.2	6±0.2	5.8±0.4
Chem-istry	ALB (g/dL)	3.1±0.1	3.2±0.1	3.1±0.0	3.3±0.0	3.1±0.1
	BUN (mg/dL)	21.2±3.9	18.0±2.6	11.2±2.4	16±4.2	21.2±4.4
	CREA (mg/dL)	0.7±0.0	0.7±0.1	0.6±0.0	0.6±0.0	0.5±0.0
	AST (U/L)	28.5±6.6	25±4.9	31.2±6.7	30.1±5.9	27±4.9
	ALT (U/L)	47.±12.3	33.±10.6	73±62.9	34.±8.30	33.±9.06
	ALP (U/L)	80.1±26.8	78.4±52.2	70.6±30.1	64.7±24.4	78.8±41.1
	LDH (U/L)	110.5±40.0	177.7±94.8	209.2±122.	127.4±84.3	166±81.2
	Ca (mg/dl)	10.2±0.3	10.5±0.3	10.0±0.1	10.8±0.2	10.2±0.3
	P (mg/dl)	4.8±0.7	5.2±0.6	3.9±0.8	5.8±0.3	5.6±0.4
	Na (mmol/L)	147.0±2.4	147.0±2.2	148.7±2.7	149.0±3.3	151.9±1.7
	K (mmol/L)	4.7±0.2	4.8±0.3	5.0±0.2	5.1±0.2	5.1±0.1
	Cl (mmol/L)	113.8±1.5	112.1±2.6	113.6±1.4	114.8±0.8	114.1±1.8

*CBC, complete blood count; WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; Hb, haemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular haemoglobin;

MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; PLT, platelets; TP, total protein; ALB, albumin; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; LDH, lactate dehydrogenase; Ca, calcium; P, phosphate; Na, sodium; K, potassium; Cl, Chloride.

(5)-5 뇨 검사 (Urinalysis)

실험기간 동안 모든 실험견에 대해 뇨 비중 (Urine specific gravity; USG), 뇨 스틱 검사 (Urine dip stick), Wet preparation 및 세포검사 (Cytology)를 실시하였으며, 각 그룹 별 뇨 검사 결과는 다음 [표 14] 와 같다. 실험기간 전체 동안 뇨 검사상 이상소견은 발견되지 않았으며, 모든 수치는 참고범위 이내에 존재하였다.

[표 14] dTERT 투여 전 및 투여 후 뇨검사 변화

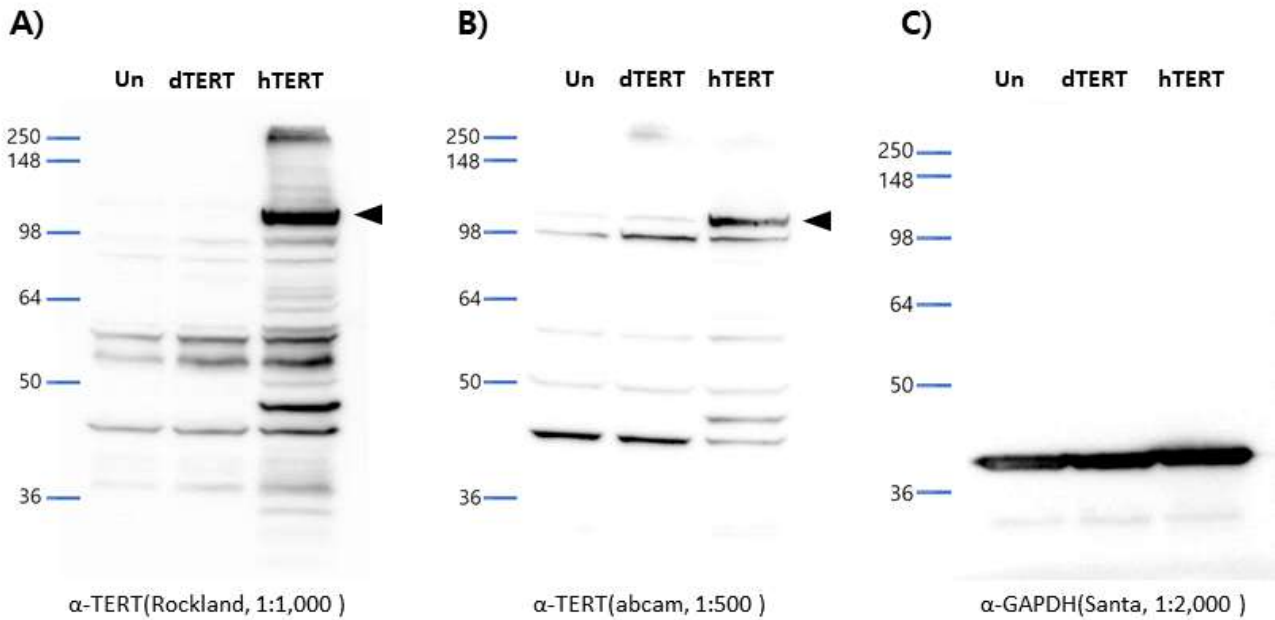
그룹 1 (대조군)		Week 0	Week 3	Week 6	Week 9	Week 12
Urinalysis	S.G.	1.036±0.005	1.037±0.005	1.038±0.002	1.040±0.004	1.024±0.020
	Dip stick	-	-	-	-	-
	Wet	-	-	-	-	-
	Cytology	-	-	-	-	-
그룹 2 (약물 투약군)		Week 0	Week 3	Week 6	Week 9	Week 12
Urinalysis	S.G.	1.035±0.007	1.040±0.002	1.040±0.004	1.038±0.005	1.040±0.003
	Dip stick	-	-	-	-	-
	Wet	-	-	-	-	-
	Cytology	-	-	-	-	-

*S.G., specific gravity; No remarkable finding was indicated as “-” .

(6) 반려견 고형암 조직 혹은 혈액에서 분자 또는 단백질 수준에서의 dTERT 발현량 측정

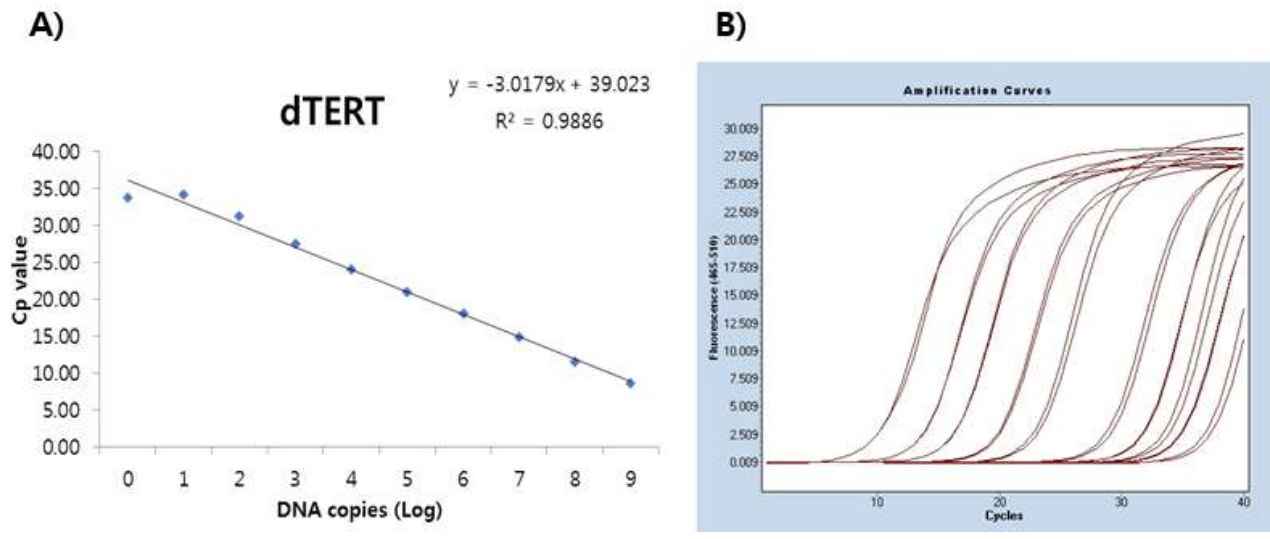
1차년도 실험을 진행하면서 dTERT 플라스미드 (pGX1414)의 적응증을 찾기 위한 2차년도 실험의 예비결과를 확보하기 위하여, 반려견 고형암 조직 혹은 혈액에서 분자 또는 단백질 수준에서의 dTERT 발현량 측정 실험을 진행하였다. 적응증 후보 고형암 환견의 혈액을 건국대학교 수의과대학에서 공급받아서 진행하였다. 혈액을 대상으로 단백질 수준에서의 dTERT 발현량을 western blot 방법으로 측정하기 위해서 시중에 공급되고 있는 두 개의 TERT 항체를 구입하여 예비실험을 하였다. 문제는 현재 판매되고 있는 모든 TERT 항체는 h(Human)TERT에 대한 항체이기 때문에 hTERT 항체가 dTERT 단백질을 검출할 수 있는지에 대한 여부가 필요하여, HEK293 세포주에 dTERT 플라스미드(pGX1414)와 hTERT 플라스미를 형질 전환하여 2개의 서로 다른 α -hTERT 항체로 검출 여부를 확인하였다. 기존의 hTERT 항체는 western blot 실험 시 dTERT 단백질을 검출하지 못하였다 [그림 15]. 이러한 이유로 현재 dTERT 단백질에 특이

적으로 반응할 수 있는 dTERT 펩타이드 항체를 제작 중에 있으나, 제작 기간이 3개월 정도 소요되기 이유로 아직 고형암 환건의 혈액내에서 단백질 수준에서의 dTERT 발현량을 측정은 완료하지 못하였다. dTERT 항체 제작이 끝나는 대로 해당 실험은 계속 진행 할 예정이다 [2차년도 결과 참조].



[그림 15]. HEK293 세포주를 이용한 dTERT 단백질 검출 실험결과 Rockland(A)사와 abcam(B)사의 hTERT 항체 모두 dTERT 단백질을 검출할 수 있다고 설명하여 있으나, dTERT 단백질 검출은 할 수 없었다. Positive 대조군으로는 hTERT 단백질을 사용하였다 (C). (Un: untransfected cell, dTERT: dog-TERT 플라스미드 transfected cells, hTERT: human-TERT 플라스미드 transfected cells, 화살표: 예상 dTERT 단백질)

단백질 수준에서의 dTERT 발현량 측정이 항체 문제로 힘든 이유로, 항체 제작과 동시에 분자 수준에서의 발현량 측정을 위해서 real-time PCR 이용하기로 하였다. 이를 위해서 dTERT를 검출할 수 있는 real-time PCR용 프라이머를 제작하고, 본 실험에 앞서서 프라이머 검증작업을 수행하였다. 프라이머 검증은 dTERT expression plasmid의 copy 수를 계산하여 0 copy ~ 9 copies 까지 serial dilution 한 후, 제작한 프라이머로 real-time PCR (Roche, LightCycler 480) 시행하였다. Real-Time PCR 결과로 나온 Cp값과 template로 넣어준 DNA의 copy 수를 이용하여 standard curve, R²값 그리고 amplification curve를 확인하여 프라이머를 검증하였다 [그림 16]. 현재 프라이머 검증까지 완료된 상태이며, 2차년도에 각종 반려견 암 조직 혹은 혈액 등 생체시료를 확보하여 분자수준에서 dTERT 발현량을 측정할 것이다 [2차년도 결과 참조].



[그림 16]. Real-Time PCR을 위한 프라이머 검증 실험결과 고형암 환견 조직 또는 혈액에서 분자적 수준의 dTERT 발현량 측정하기 위해서 Real-Time qPCR용 primer를 제작하여 검증 실험을 수행하였다. (A) standard curve, R²값 (B) amplification curve

(7) 1차년도 연구결과 성과

첫째로 (주)플럼라인생명과학의 1차년도 본 실험을 통하여, 반려견 항암 면역치료제로 사용할 수 있는 DNA 백신 플라스미드인 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 제작, 생산, 세포성면역원성 (INF- γ) 활성 여부 그리고 dTERT 플라스미드(pGX1414)의 투여횟수 및 주기를 결정하는데 가장 큰 목적이 있었다.

이를 위해서 2017년 5월 과제 시작과 동시에, DNA 백신으로 사용할 수 있는 dTERT DNA 서열 SynCon 기술을 이용하여 최적화하여 dTERT 플라스미드 (pGX1414)를 제작하여 VGXi에 플라스미드 대량 생산하여 본 실험에 필요한 고품질의 충분한 양의 dTERT 플라스미드(pGX1414)를 확보하였다.

생산된 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 전기천공법에 의하여 실험견(비글견) 근육세포내로 투여하였으며, 혈액 채혈을 통해서 고형암 치료에 필요한 충분한 양의 세포성면역원성(INF- γ) 활성을 확인하였으며, 이를 통하여 앞으로 진행할 예정인 환건에서의 적응증 실험 그리고 판매허가를 위한 농림축산검역본부 임상실험에서 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여 횟수와 주기는 각각 4회, 2주 간격으로 결정하였다.

둘째로 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 약물의 목적동물에서의 안전성 실험을 통하여, dTERT 전기천공법 투여가 개에게 미칠 수 있는 부작용과 이상소견의 여부에 대해 평가하고자 하였다.

안전성 평가를 위해 폐사율/이환율을 확인하였으며, 총 12주간의 실험기간 중 폐사하거나 질병에 이환된 실험견은 관찰되지 않았다. 또한 기력저하, 과민반응, 소화기 증상 등의 약물 부작용도 관찰되지 않았다.

실험 기간 동안 개체의 전기천공법 투여 부위에 대한 국소 부위 평가를 실시하였다. 투여 시 전기천공법에 의한 전류가 흐르는 3번의 pulse때의 흥분과 고통 이외에 지속되는 고통이나 이상 소견은 보이지 않았다. 투여 이후 통증을 보이는 개체가 몇몇 보였으나 2-3일 후 개선되었다.

실험 기간 동안 0주, 3주, 6주, 9주, 12주에 개체의 체중, 심박수, 호흡수 및 체온의 기본 신체 검사를 실시하였으며, 특이할 만한 변화가 관찰되지 않았다.

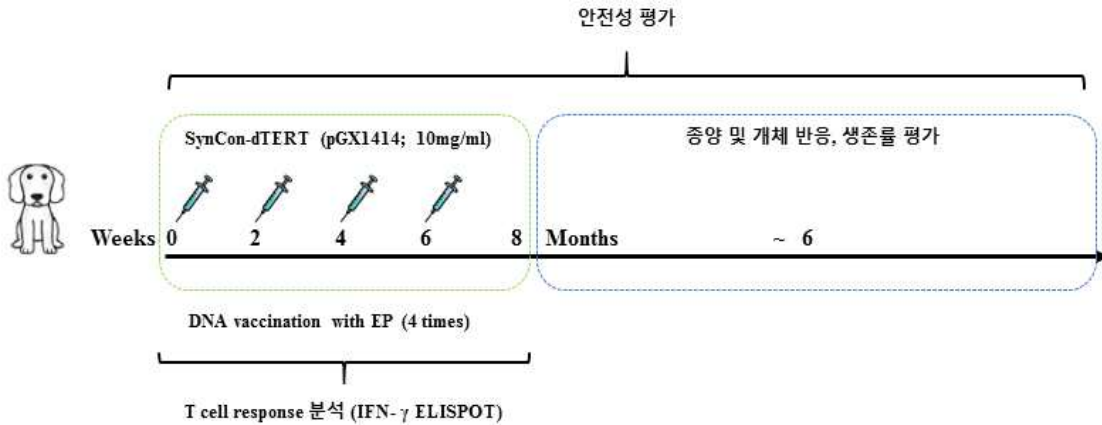
실험기간 동안 개체의 전혈구 검사, 혈청화학 및 전해질 검사를 0주, 3주, 6주, 9주, 12주에 실시하였으며, 검사상 특이할 만한 변화는 관찰되지 않았다. 모든 수치는 참고범위 이내에 존재하였다.

실험 기간 동안 모든 실험견에 대해 0주, 3주, 6주, 9주, 12주에 뇨 비중 (Urine specific gravity; USG), 뇨 스틱 검사 (Urine dip stick), Wet preparation 및 세포검사 (Cytology)를 실시하였으며, 그룹1과 그룹2와 유의적인 차이나 이상 소견을 발견되지 않았다. 실험기간 전체 동안 뇨 검사상 이상소견은 발견되지 않았으며, 모든 수치는 참고범위 이내에 존재하였다.

따라서, 본 연구에서 사용된 dTERT 전기천공법은 개에게 투여하였을 때 특이적인 부작용 없이 사용될 수 있는 안전한 약물로 판단되지만 투여 당시 전기천공법에 의한 흥분, 놀람 고통의 경감이 필요할 것으로 보인다.

나. 2차년도 연구결과

(1) dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여 방법 도출 및 환축 모집



[그림 17] 환축 대상 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여 및 효능 과 안전성평가 전체 모식도

(1)-1 투여 방법 결정

실험견(비글견) 대상 1차년도 연구결과를 바탕으로 2주 간격 총 4회 투여로 결정하였으며 매회 투여 전/후 채혈을 실시하여 세포면역반응을 측정한다. 각 개체에 대한 투여 전/후 안전성평가를 위해 신체검사, 혈액/혈청검사, 부작용등을 평가하며 투여완료 후 종양 및 개체 반응, 생존율을 평가하고자 한다 [그림 17].

(1)-2 환축모집

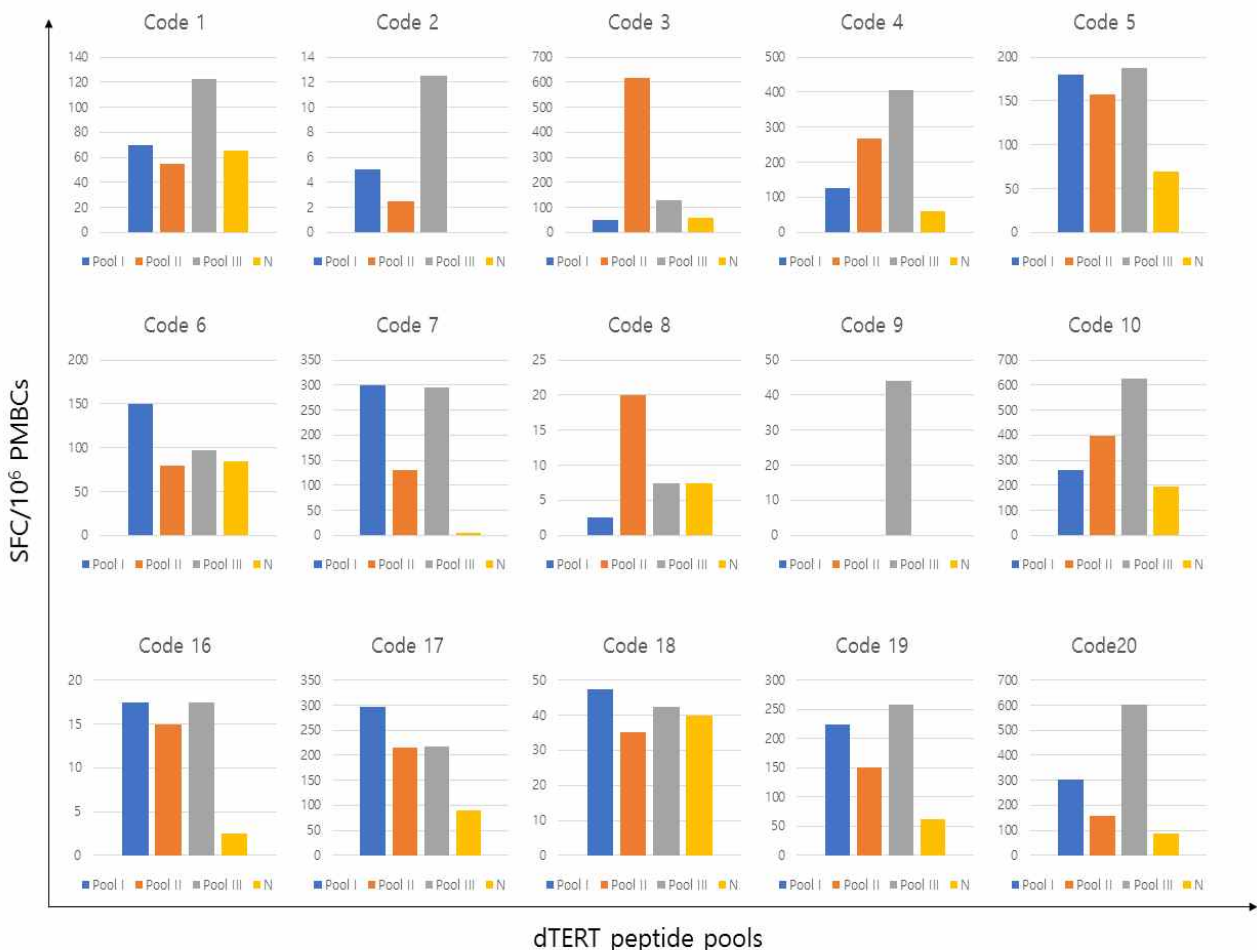
건국대학교 부속 동물병원 외 2차 동물병원 2 곳에 내원한 환축 중 고형암(Carcinoma/Sarcoma) 및 lymphoma로 진단 받은 환축을 대상으로 모집하였으며, 모든 과정은 실험동물 허가를 득한 후 수의사와 보호자의 동의를 얻은 뒤 진행되었다. 시험에 참여한 환축은 투여군 20마리와 대조군 11마리로 전체 31마리를 선별하였으며, 선별된 환축은 종양 종류에 따라 lymphoma 9마리와 고형암(Carcinoma/Sarcoma) 22마리로 나뉜다 [표 15].

[표 15] 시험에 참여한 환축 정보

Code	Age/years (나이)	Breed/sex (견종/성별)	Immunophenotype/Tumor (진단명)	Chemotherapy/Treatment (치료)	Number of dTERT vaccination
투여군					
1	15	Shih Tzu/SF	Mammary gland tumor	Mastectomy	3
2	16	Cocker Spaniel/SF	Melanoma	Palliative Tx	4(+2)
3	11	Maltese/CM	Nasal tumor	Palliative Tx	4(+1)
4	6	Maltese/IF	Mammary gland tumor	Mastectomy	4
5	8	Maltese/	Lipoma	Surgery	3
6	10	Spitz/CM	Heart base tumor	Palliative Tx	4
7	3	Borzoï/SF	Nasal tumor	Palliative Tx, Chemotherapy, Surgery, RadioTx	3
8	8	Mixed/CM	B-cell lymphoma	CHOP	3
9	7	Schnauzer/SF	B-cell lymphoma	CHOP	3
10	11	Golden Retriever/CM	B-cell lymphoma	CHOP+Hydroxyurea	4
11	15	Cocker Spaniel/IF	Liver and spleen mass	Palliative Tx	1
12	12	Maltese/IF	Mammary gland tumor	Palliative Tx	1
13	18	Cocker Spaniel/SF	Melanoma	Palliative Tx	1
14	13	Shih tzu/SF	Nasal tumor	Palliative Tx	1
15	5	German Shepherd/CM	B-cell lymphoma	CHOP	2
16	9	Shih Tzu/IF	Hepatocellular carcinoma	Hepatectomy, Chemotherapy (gemcitabin)	4
17	16	Maltese/CM	Nasal Squamous cell carcinoma	Palliative Tx	4
18	13	Maltese/CM	Anal sac carcinoma	Palliative Tx	4
19	15	Mixed/IM	Oral melanoma	Palliative Tx	4
20	4	Papillon/CM	Hemangiosarcoma	Palliative Tx	4
대조군					
21	14	Cocker Spaniel/SF	Hemophagocytic histiocytic sarcoma, Hemangiosarcoma	Chemotherapy (Doxorubicin, Lomustine)	
22	12	Maltese/CM	Mast cell tumor	Chemotherapy (toceranib, vincristine)	
23	9	Shih Tzu/SF	Squamous cell carcinoma	Surgery, Retinoid acid, Chemotherapy (Cyclophosphamide, Toceranib)	
24	10	Papillon/CM	Mast cell tumor	Chemo (Toceranib+vin+PDS). (vin+PDS+triamcinolone, intralesional injection)	
25	14	Cocker Spaniel/CM	Adenocarcinoma	Chemotherapy (carboplatin)	
26	7	Mixed/SF	Adenocarcinoma	Chemotherapy (carboplatin)	
27	14	Jack Russel Terrier/SF	B-cell lymphoma	CHOP	
28	5	Coton de Tulear/SF	B-cell lymphoma	CHOP	
29	16	Shih Tzu/CM	B-cell lymphoma	CHOP	
30	12	Shih Tzu/SF	B-cell lymphoma	CHOP	
31	12	Schnauzer/SF	B-cell lymphoma	CHOP	

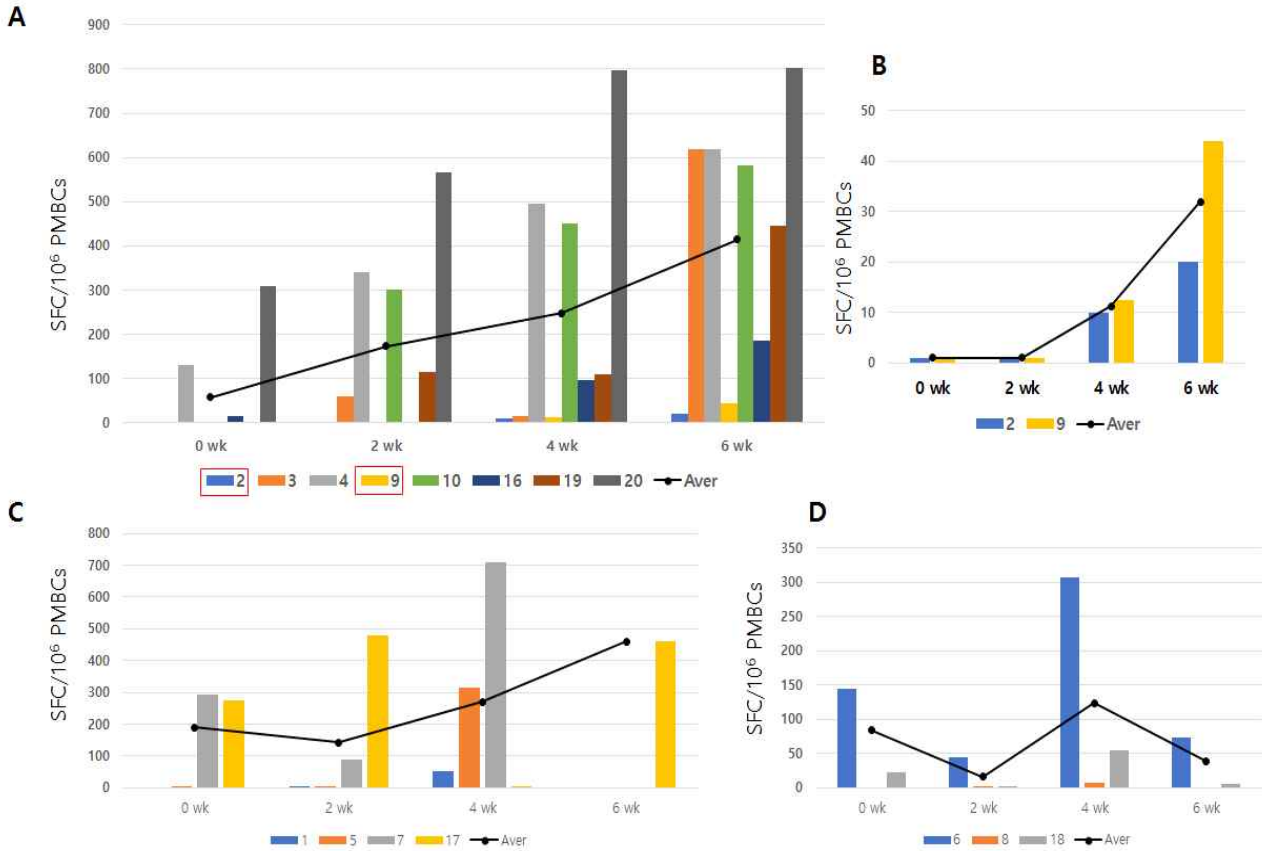
(2) 환축의 세포성 면역원성 (INF- γ) 분석

투여군 20마리 중 계획된 접종 횟수 총 4회를 모두 완료한 환축은 10마리이며 최소 3회이상 투여 완료한 환축은 15마리이다. 나머지 5마리는 투여시기에 폐사하였거나, 보호자의 개인사정으로 투여를 완료하지 못하였다 [표 15 참조]. 1차년도 peptide pool 9를 3개의 pool로 합쳐 세포면역원성을 분석하였다 (환축의 소량 채혈로 인해 분석하기 충분한 양의 PBMC 확보가 어려워 pool을 3개로 줄임). 최소 3회 이상 투여한 환축(n=15)을 대상으로 투여 완료 후 (3회 투여 후 2주 뒤) 혈액의 PBMC로부터 세포면역반응을 확인해 보았을 때, 15마리 환자 중 12마리(80%)에서 dTERT에 대한 세포면역반응을 보였고 그 중 10마리(66.6%)는 강한 세포면역반응을 보였다. 3마리는 세포면역 반응을 보이지 않았다. Peptide pool 별 세포면역반응을 유도하는 epitope을 분석하였을 때, 4마리 환축(code 5,7,16,17)은 Peptide pool 1,2,3 모두에서 세포면역반응을 나타내었고, 3마리 환축(code4,19,20)은 Peptide pool 1,2,3 중 2개에서, 5마리 환축(code1,2,3,9,10)은 Pool 2 또는 3에서만 특이적(dominant epitope)으로 세포면역반응을 나타내었다. 이러한 결과는 환축별 유전적 다양성으로 인해 예상되듯이 환축별 multi-epitope response를 가지고 있다는 것을 보여준다 [그림 18].



[그림 18] 환축대상 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여 후 Peptide pool 별 세포면역원성 분석
 Peptide pool 1 (pool1,2,3), Peptide pool 2 (pool3,4,5), Peptide Pool 3(pool7,8,9) - [표 8 참조]
 dTERT 플라스미드 (pGX1414)를 환축에 투여 후 각 환축별(code) INF- γ 수치 (Spot 수) 변화를 나타냄. 그래프에서 서로 다른 색깔은 INF- γ 활성에 영향을 준 펩타이드 풀(pool)을 나타냄. N

(no peptide), 자극하지 않은 세포 대비 최소 3배 이상의 spot수를 가진 개체를 양성 세포면역 반응으로 판단함



[그림 19] 환축대상 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여 주기 별 세포면역원성 분석

dTERT 플라스미드 (pGX1414)를 환축에 투여 후 주기별 각 환축별(code) INF- γ 수치 (Spot 수) 변화를 나타냄. 그래프에서 서로 다른 색깔은 각 환축의 세포면역반응을 나타내며, 그 값은 peptide pool 1,2,3 의 모든 INF- γ 수치 (Spot 수) 합한 값을 의미함. (a) 투여 횟수에 따라 지속적으로 세포면역성이 증가하는 그룹임. (b) (a)에서 환축 2와 9의 세포면역반응을 따로 나타낸 결과임. (c) 최소 3회 투여 후 세포면역반응이 나타나는 그룹임. (d) 세포면역반응이 나타나지 않은 그룹임. 전체 세포면역반응 수: $\sum(\text{Peptide pool 1} + \text{peptide pool 2} + \text{peptide pool 3}) - 3 \times N$ (non peptide)

각 환축에 대한 투여 시기별 세포면역반응을 분석해 본 결과 투여 전 2.5~310 (평균, 58) SFC였으며 투여 3회 투여 후 20~802 (평균, 414) 증가하여 투여 전 대비 환축별로 적게는 2.5배 많게는 500배 이상 세포면역반응 증가를 보였다. 15마리 투여 환자 중 8마리는 투여 횟수가 증가함에 따라 세포면역반응이 높게 나타났고 4마리는 최소 3회 투여 이후, 세포면역반응이 나타났다. 나머지 3마리 투여 전/후 횟수에 관계없이 세포면역반응이 나타나지 않았다 **[그림 19]**.

(3) dTERT 플라스미드 안전성 및 효능/생존을 확인

본 실험에는 Lymphoma로 진단된 환축 9마리와 Carcinoma/Sarcoma로 진단된 환축 21마리가 선발되었다. 모든 개체는 치료 전 신체검사 및 기타 실험실 검사를 실시하였다. 실험에 이용된 개체의 특징은 [표 16, 17] 에 제시한다.

[표 16] Lymphoma (n=9)와 Carcinoma/Sarcoma (n=21) 환자의 실험 전 (pre-examination) 특성

Characteristics	Lymphoma		Solid tumor		
	Control	Treatment 1	Control	Treatment 1	Treatment 2
Number	5	4	6	10	5
Sex					
Intact male	0	0	0	0	1
Castrated male	1	3	3	2	3
Intact female	0	0	0	3	1
Spayed female	4	1	3	4	0
Age (Year)	11.8±4.15	7.75±2.5	11±2.83	10.7±4.69	11.4±4.93
Body weight (Kg)	4±0.9	20.25±11.32	7.68±5.52	8.54±5.29	6.57±2.31
Heart rate (bpm)	127±13.08	142.5±37.43	106.17±20.73	130.3±41.93	151.2±27.63
Respiratory rate (/min)	27.6±3.29	79.5±46.83	24.17±6.01	35.8±12.63	38.4±9.1
Body temperature (°C)	39.03±0.49	39.53±0.83	38.27±0.51	3.6±0.7	39.06±0.4
Body condition scores (5)	3±0	3.5±0.58	3.33±0.52	38.26±0.86	3.4±0.55

[표 17] Lymphoma (n=9)와 Carcinoma/Sarcoma (n=21) 환자의 실험 전 혈액, 혈청학적 특성

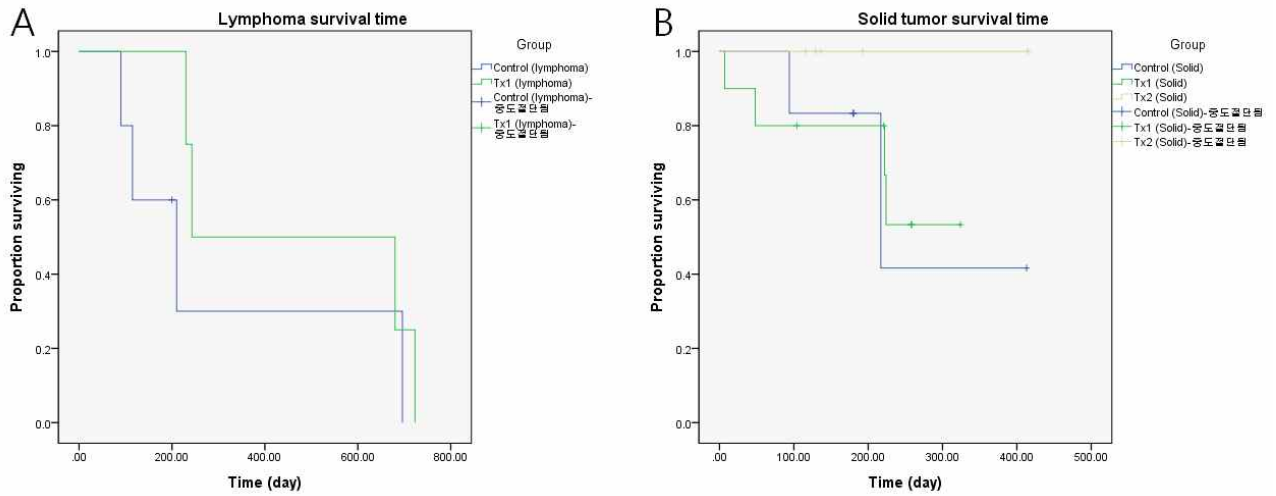
Parameters	Lymphoma		Solid tumor			Reference.
	Control	Treatment 1	Control	Treatment 1	Treatment 2	
WBC (/ul)	19.35±17.69	15.75±12.09	10.84±3.93	15.8±8.88	15.43±4.21	6~17x10 ³
RBC (/ul)	5.45±1.28	5.55±1.1	6.55±1.59	5.93±0.67	6.38±0.92	5.5~8.5x10 ⁶
Hb (gm/dl)	12.55±3.4	12.95±2.98	14.18±3.81	13.34±2.02	13.58±2.97	12~18
PCV (%)	36.28±9.19	38.48±9.22	40.47±11.33	40.17±5.95	43.78±8.11	37~55
MCV (fL)	66.45±3.31	69.13±4.78	61.17±4.42	65.28±9.38	68.56±8.61	60~74
MCH (pg)	22.9±0.84	23.28±2	21.48±1.21	21.58±3.32	21.26±3.49	19.5~24.5
MCHC (%)	34.53±1.89	33.68±1.05	35.22±0.74	32.65±2.22	30.86±1.41	31~36
PLT (/ul)	324.25±361.38	320.5±105.17	334±190.94	412.7±163.78	597.4±126.32	200~500x10 ³
Mono	4±2.71	4±4.42	2.83±2.32	5.65±2.16	8.6±3.85	0~3
Lympho	37.75±22.25	12.55±6.35	14.33±11.69	11.53±4.86	11±2.45	12~30

SegNE	55.75±19.75	79.05±9.86	80.17±12.17	79.86±8.42	78±4.3	60-80
BandNE	0±0	0.13±0.1	0.5±1	0.11±0.31	0±0	0-1
Eosin	2.5±1.91	3.6±5.64	2.67±2.8	2.84±2.04	2.4±1.14	2~10
PLT	8.5±6.45	12±5.29	19.33±12.68	13.7±6.02	15.8±2.59	13-30
BUN (mg/dl)	24.43±7.54	16.03±5.7	28.67±19.19	21.97±13.94	17.76±11.16	8~26
CRSC (mg/dl)	0.73±0.2	0.85±0.31	0.85±0.45	1.11±0.52	0.84±0.23	0.5~1.3
ALT (U/L)	258.75±418.21	90.25±104.71	56.83±30.7	49.7±38.27	158±209.42	19~70
AST (U/L)	119.25±129.6	73.25±90.6	30.8±8.7	42.9±32.91	54.6±26.94	15~43
ALP (U/L)	477.75±716.16	565±497.87	108±55.77	235.9±383.1	1470.4±879.3 8	15~127
LDH (U/L)	679.67±638.86	267.25±122.01	246.6±217.56	216.44±135.78	436.6±338.67	0-200
TP (g/dl)	7.28±0.86	5.58±0.91	7±0.53	6.36±1.19	6.92±0.4	5.4~7.4
ALB (g/dl)	2.87±0.35	2.63±0.4	3.22±0.17	3.05±1.11	2.54±0.9	2.9~4.2
Ca (mg/dl)	9.78±0.64	9.08±0.88	9.13±1.11	10.22±2.16	11.42±4.36	7.8-12
P (mg/dl)	4.59±1.37	3.83±0.56	4.18±2.01	4.22±1.14	4.76±2.26	3-6.2

*CBC, complete blood count; WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; Hb, haemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; PLT, platelets; TP, total protein; ALB, albumin; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; LDH, lactate dehydrogenase; Ca, calcium; P, phosphate.

(3)-1 dTERT 플라스미드 투여 후 생존율 평가

총 12주간의 실험기간 동안 Lymphoma로 진단된 환축 9마리와 Carcinoma/Sarcoma로 진단된 환축 21마리가 평가되었다. 폐사된 환축이나 자세한 사항은 [표 18, 19] 에 제시한다. Lymphoma 환자 (n=9)의 경우 유의적 차이는 확인되지 않았지만 dTERT를 추가로 적용한 환자에서 생존율이 더 높은 경향을 보이는 것을 확인했다. Solid tumor (Carcinoma/Sarcoma) 환자의 경우 dTERT, dGHRH를 병용 투여한 환축의 경우에서 높은 생존율을 보였고 dTERT만 투여한 환축의 경우에도 dTERT를 투여하지 않은 대조군에 비해 더 높은 생존율을 보였다[그림 20]. 하지만 유의적인 차이를 보이지는 않았으며 환축의 폐사 전에 과제 평가가 끝나 추후 추적 관찰이 필요하다.



[그림 20] Lymphoma (n=9), Solid tumor (sarcoma/carcinoma, n=21) 환축의 생존율 그래프.

A; Lymphoma (n=9) 환축에 대한 생존율 그래프, (p=0.284)

B; Solid tumor (n=21) 환축에 대한 생존율 그래프.

(Control-Tx 1 p=0.805, Control-Tx 2 p=0.251, Tx1-Tx2 p=0.236)

[표 18] Lymphoma (n=9) 환자들의 종양 타입과 치료, 생존기간 평가

Code	Age/years	Breed/sex	Immunophenotype	Type of chemotherapy	Type of vaccination	Immune response	Survival (day)
8	8	Mixed/CM	B-cell	CHOP	dTERT	Negative	230
9	7	Schnauzer/SF	B-cell	CHOP	dTERT	Positive (+++)	680
10	11	Golden Retriever/CM	B-cell	CHOP+Hydroxyurea	dTERT	Positive (+)	723
15	5	German Shepherd/CM	B-cell	CHOP	dTERT	N/D (not determined)	243
27	14	Jack Russel Terrier/SF	B-cell	CHOP	X		115
28	5	Coton de Tulear/SF	B-cell	CHOP	X		696
29	16	Shih Tzu/CM	B-cell	CHOP	X		210
30	12	Shih Tzu/SF	T-cell	Interferon-alpha	X		>200
31	12	Schnauzer/SF	B-cell	CHOP	X		90

*> ; 과제 종료 시에도 생존

*CHOP: Cyclophosphamide, doxorubicin, Oncovin, and prednisone based chemotherapy protocol - 림프종에서 사용하는 기본적인 항암 프로토콜

*** Immune responses were scored positive when they were at least three times higher than background reactivity (no peptide). +; low, ++; middle, +++, high

[표 19] Sarcoma/Carcinoma (n=21) 환축들의 종양 타입과 치료, 생존기간 평가

code	Age/years	Breed/sex	Tumor	Treatment	Type of vaccination	Immune response	Survival (day)
1	15	Shih Tzu/SF	Mammary gland tumor	Mastectomy	dTERT	Positive (+)	>258
2	16	Cocker Spanial/SF	Melanoma	Palliative Tx	dTERT	Positive (++)	224
3	11	Maltese/CM	Nasal tumor	Palliative Tx	dTERT	Positive (+++)	>221
4	6	Maltese/IF	Mammary gland tumor	Mastectomy	dTERT	Positive (++)	>258
5	8	Maltese/	Lipoma	Surgery	dTERT	Positive (+)	>258
6	10	Spitz/CM	Heart base tumor	Palliative Tx	dTERT	Negative	222
7	3	Borzoi/SF	Nasal tumor	Palliative Tx Chemotherapy Surgery Radio Tx	dTERT	Positive (+++)	>104
11	15	Cocker Spanial/IF	Liver and spleen mass	Palliative Tx	dTERT	N/D (not determined)	7
12	12	Maltese/IF	Mammary gland tumor	Palliative Tx	dTERT	N/D	>324
13	18	Cocker Spanial/SF	Melanoma	Palliative Tx	dTERT	N/D	48

16	9	Shih Tzu/IF	Hepatocellular carcinoma	Hepatectomy Chemotherapy (gemcitabin)	dTERT+dGHRH	Positive (+++)	>415
17	16	Maltese/CM	Nasal Squamous cell carcinoma	Palliative Tx	dTERT+dGHRH	Positive (++)	>136
18	13	Maltese/CM	Anal sac carcinoma	Palliative Tx	dTERT+dGHRH	Negative	>193
19	15	Mixed/IM	Oral melanoma	Palliative Tx	dTERT+dGHRH	Positive (++)	>129
20	4	Papillon/CM	Hemangiosarcoma	Palliative Tx	dTERT+dGHRH	Positive (+++)	>116
21	14	Cocker Spaniel/SF	Hemophagocytic histiocytic sarcoma Hemangiosarcoma	Chemotherapy	X		94
22	12	Maltese/CM	Mast cell tumor	Chemotherapy	X		>154
23	9	Shih Tzu/SF	Squamous cell carcinoma	Surgery Chomotherapy	X		>455
24	10	Papillon/CM	Mast cell tumor	Chemotherapy	X		>142
25	14	Cocker Spaniel/CM	Adenocarcinoma	Chemotherapy	X		217
26	7	Mixed/SF	Adenocarcinoma	Chemotherapy	X		>413

*> ; 과제 종료 시에도 생존

**Palliative Tx, Palliative treatment (대증 처치); Radio Tx, Radiation treatment (방사선 처치); Mastectomy, 유선제거술; Hepatectomy, 간엽제거술

*** Immune responses were scored positive when they were at least three times higher than background reactivity (no peptide).

+, low, ++, middle, +++, high

(3)-2 dTERT 플라스미드 투여 후 부작용 평가

Lymphoma 환축 중 대조군 (n=5)은 치료 전 발열, 백혈구 증가/감소, 빈혈, 혈소판 감소, BUN/Cre 증가, 간수치 상승을 보였으나 일반적인 항암 치료 후로 발열, 백혈구 증가/감소, 혈소판감소 등 증상이 줄어들었다. 이와 유사하게 dTERT 치료 군 (n=4) 또한 종양으로 인한 BUN/Cre 증가 이외에 EP 투여로 인한 부작용은 보이지 않았다 [표 20].

Carcinoma/Sarcoma 환자 중 대조군 (n=6)은 종양의 악화로 치료 전 보다 치료 후에 백혈구 증가/감소한 환축의 수가 2마리 늘었다. 일반적인 치료에 더하여 dTERT 단독 투여군 (n=10)의 경우에는 치료 전보다 기침, 불안, BUN/Cre 증가 등이 더 생겼지만 투여에 의한 부작용이 아닌 종양의 악화로 인한 증상으로 보인다, dTERT와 dGHRH 병용 투여군 (n=5)은 치료 전후 사라진 증상 (기침), 생긴 증상 (식욕감퇴, 오심/구토, Ca 수치 증가)를 보였지만 종양에 의한 변화로 보였다 [표 21].

Lymphoma, Carcinoma/Sarcoma 두 그룹에서 모두 dTERT, dGHRH 투여에 부작용을 보이지 않았으며 투여 부위 역시 이상이 없었다 [그림 21].



[그림 21] dTERT 플라스미드 투여부위 사진

[표 20]. Lymphoma 전기천공법 투여에 따른 부작용 평가

Parameters	Control		Treatment 1 (dTERT)	
	Before	After	Before	After
전신반응	발열 (n=2)	X	발열 (n=1) 식욕감퇴 (n=1)	발열 (n=1) 식욕감퇴 (n=2)
피부 반응	X	X	X	X
소화기 증상	X	X	설사 (n=1)	X
혈액학적 이상유무	백혈구 증가/감소 (n=2) 빈혈 (n=3) 혈소판감소 (n=1)	백혈구 증가/감소 (n=1) 빈혈 (n=3)	백혈구 증가/감소 (n=3) 빈혈 (n=1) 혈소판감소 (n=1)	백혈구 증가/감소 (n=2) 빈혈 (n=3) 혈소판감소 (n=1)
혈청학적 이상유무	BUN/Cre증가 (n=2) 간수치 상승 (n=4)	BUN/Cre증가 (n=2) 간수치 상승 (n=4)	간수치 상승 (n=3)	BUN/Cre증가 (n=2) 간수치 상승 (n=3)

[표 21]. Carcinoma/Sarcoma 환자 전기천공법 투여에 따른 부작용 평가

Parameters	Control		Treatment 1 (dTERT)		Treatment 2 (dTERT+dGHRH)	
	Before	After	Before	After	Before	After
전신반응	X	X	코피 (n=1) 식욕감퇴 (n=1)	기침 (n=1) 코피 (n=1) 식욕감퇴 (n=2) 불안 (n=1)	기침 (n=1)	식욕감퇴 (n=1)
피부 반응	X	X	X	X	X	X
소화기 증상	X	X	설사 (n=1) 오심/구토 (n=1)	설사 (n=1) 오심/구토 (n=1)	설사 (n=1)	설사 (n=1) 오심/구토 (n=1)
혈액학적 이상유무	빈혈 (n=1)	백혈구 증가/감소 (n=2) 빈혈 (n=1)	백혈구 증가/감소 (n=2) 빈혈 (n=1)	백혈구 증가/감소 (n=1) 빈혈 (n=2)	X	Ca 수치 증가 (n=1)
혈청학적 이상유무	BUN/Cre증가 (n=2)	BUN/Cre증가 (n=2)	간수치 상승 (n=2)	BUN/Cre증가 (n=1) 간수치 상승 (n=1)	X	X

(3)-3 dTERT 플라스미드 투여 전·후 신체검사 (Physical examination)

dTERT, dGHRH의 단독 혹은 병용 투여 전·후의 체중, 심박수, 호흡수, 체온 등 신체검사 평가를 실시하였다. Lymphoma 환축의 경우 (대조군 n=5, 투여군 n=4), 대조군과 투여군 모두 치료 전과 후에 유의적인 차이가 없었다 [표 22]. Carcinoma/Sarcoma 환축의 경우 (대조군 n=6, 투여군1 n=10, 투여군2 n=5) 에도 각 군 별로 치료 전과 후에 유의적인 차이를 보이지 않았다 [표 23].

[표 22]. Lymphoma 환자 전기천공법 투여에 따른 신체 변화

Parameters	Control		Treatment 1 (dTERT)	
	Before	After	Before	After
Body weight (Kg)	4±0.9	3.76±0.8	20.25±11.32	19.62±11.16
Heart rate (bpm)	127±13.08	132.8±11.88	142.5±37.43	132±12.96
Respiratory rate (/min)	27.6±3.29	25.6±4.34	79.5±46.83	54±44.36
Body temperature (°C)	39.03±0.49	38.38±0.4	39.53±0.83	39.48±1.19
Body condition scores	3±0	3±0	3.5±0.58	3±0.82

[표 23]. Carcinoma/Sarcoma 환자 전기천공법 투여에 따른 신체 변화

Parameters	Control		Treatment 1 (dTERT)		Treatment 2 (dTERT+dGHRH)	
	Before	After	Before	After	Before	After
Body weight (Kg)	7.68±5.52	7.29±4.32	8.54±5.29	8.29±5.42	6.57±2.31	6.74±2.34
Heart rate (bpm)	106.17±20.73	121±5.9	130.3±41.93	116.2±18.38	151.2±27.63	141.6±25.67
Respiratory rate (/min)	24.17±6.01	36.8±20.13	35.8±12.63	45.2±30.31	38.4±9.1	36±4.24
Body temperature (°C)	38.27±0.51	38.38±0.48	38.26±0.86	37.31±2.97	39.06±0.4	39.12±0.33
Body condition scores	3.33±0.52	3.17±0.41	3.6±0.7	3.4±0.84	3.4±0.55	3.4±0.55

(3)-4 dTERT 플라스미드 투여 전·후 혈액검사 (Blood examination)

dTERT, dGHRH의 단독 혹은 병용 투여 전과 후에 전혈구검사 (CBC), 감별계산 (DC, differential count), 혈청화학검사 (BUN, Cre, ALT, AST, ALP, LDH, TP, Alb, Ca, P)를 실시하여 이상 유무를 확인하였다 [표 24, 25].

[표 24]. Lymphoma 환자 전기천공법 투여에 따른 혈액학적 변화

Parameters	Control		Treatment 1		
	Before	After	Before	After	
CBC	WBC (/ul)	22.52±16.89	10.1±4.17	15.75±12.09	23.12±23.39
	RBC (/ul)	5.17±1.26	4.97±1.59	5.55±1.1	4.38±1.77
	Hb (gm/dl)	11.88±3.3	11.14±3.79	12.95±2.98	10.33±4.26
	PCV (%)	34.12±9.3	31.78±10.38	38.48±9.22	32.5±11.73
	MCV (fL)	65.62±3.42	64.04±3.4	69.13±4.78	75.35±5.71
	MCH (pg)	22.86±0.73	22.38±1.41	23.28±2	23.55±2.01
	MCHC (%)	34.92±1.86	34.92±0.93	33.68±1.05	31.35±2.65
	PLT (/ul)	311.2±314.32	479.8±122.71	320.5±105.17	477.75±389.3
DC	Mono	3.2±2.95	3.6±3.97	4±4.42	4.58±0.76
	Lympho	40±19.91	20.8±10.52	12.55±6.35	11.15±5.41
	SegNE	54.8±17.24	72.2±8.64	79.05±9.86	81.28±7.59
	BandNE	0±0	0±0	0.13±0.1	0.35±0.26
	Eosin	2±2	1.2±0.84	3.6±5.64	2.6±2.97
	PLT	10.2±6.76	18.4±7.3	12±5.29	11.5±6.19
Serum Chemistry	BUN (mg/dl)	22.14±8.29	21.2±8.58	16.03±5.7	24.2±11.18
	CRSC (mg/dl)	0.7±0.18	0.46±0.05	0.85±0.31	0.93±0.57
	ALT (U/L)	312±381.25	154±107.95	90.25±104.71	901±1652.85
	AST (U/L)	110.4±113.97	35.8±9.52	73.25±90.6	652.25±1265.19
	ALP (U/L)	654±734.84	292±164.83	565±497.87	1636.5±1254.53
	LDH (U/L)	734±532.82	222.5±54.08	267.25±122.01	157.5±47.11
	TP (g/dl)	7.08±0.87	6.2±0.8	5.58±0.91	5.93±1.09
	ALB (g/dl)	2.82±0.33	3.16±0.61	2.63±0.4	2.85±0.39
	Ca (mg/dl)	9.58±0.7	7.7±2.36	9.08±0.88	9.33±1.5
P (mg/dl)	4.49±1.21	3.86±0.95	3.83±0.56	4.58±1.66	

*CBC, complete blood count; WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; Hb, haemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; PLT, platelets; TP, total protein; ALB, albumin; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; LDH, lactate dehydrogenase; Ca, calcium; P, phosphate; Na, sodium; K, potassium; Cl, Chloride.

[표 25]. Carcinoma/Sarcoma 환자 전기천공법 투여에 따른 혈액학적 변화

Parameters	Control		Treatment 1		Treatment 2		
	Before	After	Before	After	Before	After	
CBC	WBC (/ul)	10.84±3.93	9.79±5.83	15.8±8.88	16.37±8.08	15.43±4.21	28.95±22.39
	RBC (/ul)	6.55±1.59	6.19±0.76	5.93±0.67	5.98±1.13	6.38±0.92	5.16±1.04
	Hb (gm/dl)	14.18±3.81	13.4±1.96	13.34±2.02	13.47±2.55	13.58±2.97	10.57±3.35
	PCV (%)	40.47±11.33	38±5.69	40.17±5.95	40.86±8.05	43.78±8.11	37.1±10.05
	MCV (fL)	61.17±4.42	60.57±5.05	65.28±9.38	68.01±7.13	68.56±8.61	66.47±7.31
	MCH (pg)	21.48±1.21	21.37±1.65	21.58±3.32	22.56±1.79	21.26±3.49	20.2±2.36
	MCHC (%)	35.22±0.74	35.27±0.71	32.65±2.22	31.73±3.3	30.86±1.41	30.37±0.68
	PLT (/ul)	334±190.94	441.67±211.08	412.7±163.78	345.4±194.24	597.4±126.32	648±136.5
DC	Mono	2.83±2.32	1.67±1.51	5.65±2.16	6.56±1.93	8.6±3.85	7.67±5.51
	Lympho	14.33±11.69	19.5±12.8	11.53±4.86	13.9±6.26	11±2.45	8.67±2.52
	SegNE	80.17±12.17	75.33±13.11	79.86±8.42	75.28±8.3	78±4.3	82±5.57
	BandNE	0.5±1	0±0	0.11±0.31	0±0	0±0	0±0
	Eosin	2.67±2.8	2±3.95	2.84±2.04	4.16±3.5	2.4±1.14	1.67±0.58
	PLT	19.33±12.68	21.33±8.69	13.7±6.02	28.8±54.62	15.8±2.59	17±2.65
Serum Chemistry	BUN (mg/dl)	10.84±3.93	9.79±5.83	21.97±13.94	36.83±32.25	15.43±4.21	28.95±22.39
	CRSC (mg/dl)	6.55±1.59	6.19±0.76	1.11±0.52	0.99±0.76	6.38±0.92	5.16±1.04
	ALT (U/L)	14.18±3.81	13.4±1.96	49.7±38.27	52±35.27	13.58±2.97	10.57±3.35
	AST (U/L)	40.47±11.33	38±5.69	42.9±32.91	35±26.67	43.78±8.11	37.1±10.05
	ALP (U/L)	61.17±4.42	60.57±5.05	235.9±383.1	182.6±220.12	68.56±8.61	66.47±7.31
	LDH (U/L)	21.48±1.21	21.37±1.65	216.44±135.78	218.22±189.01	21.26±3.49	20.2±2.36
	TP (g/dl)	35.22±0.74	35.27±0.71	6.36±1.19	6.16±2.23	30.86±1.41	30.37±0.68
	ALB (g/dl)	334±190.94	441.67±211.08	3.05±1.11	3.18±1.38	597.4±126.32	648±136.5
	Ca (mg/dl)	2.83±2.32	1.67±1.51	10.22±2.16	9.32±2.98	8.6±3.85	7.67±5.51
	P (mg/dl)	14.33±11.69	19.5±12.8	4.22±1.14	4.2±1.24	11±2.45	8.67±2.52

*CBC, complete blood count; WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; Hb, haemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; PLT, platelets; TP, total protein; ALB, albumin; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; LDH, lactate dehydrogenase; Ca, calcium; P, phosphate; Na, sodium; K, potassium; Cl, Chloride.

Lymphoma 환자와 Carcinoma/Sarcoma 환자 모두 대조군, 투여군 1, 투여군 2에서 유의적으로 차이가 나는 항목은 없었다. 몇몇 개체에서 치료 전과 후의 간수치의 상승이 나타났었는데 약물 투여로 인한 상승 이외에 종양으로 인한 상승으로 보였다. 이와 반대로 몇몇 개체에서는 치료 전과 후 간수치의 감소가 보였는데 투약으로 인한 효과인지 추후 추적관찰 및 더 많은 수의 임상 실험이 필요할 것으로 보인다.

(3)-5 dTERT 플라스미드 투여 전·후 개체 변화 평가

dTERT의 투여 전과 후에 행동, 정신, 식욕, 소화기, 체중, 음수량과 소변량에 대한 평가를 실시하여 이상 유무를 확인했다 [표 26, 27].

[표 26]. Lymphoma 환자 전기천공법 투여에 따른 개체 변화

Parameters	Control		Treatment 1	
	Before	After	Before	After
Behavior	2.5±1	3±0	3±0	3±0
Mentation	1.5±1	2.6±0.89	3±0	2.25±0.96
Appetite	3±0	2.4±0.55	1.5±0.58	2±1.41
Vomiting	2.25±1.5	3±0	3±0	3±0
Defecation status	3±0	3±0	2.75±0.5	3±0
Defecation frequency	3±0	3±0	3±0	3±0
Weight loss	2.5±1	2.4±0.55	3±0	2.75±0.5
PU/PD	2.5±1	2.8±0.45	3±0	3±0

[표 27]. Carcinoma/Sarcoma 환자 전기천공법 투여에 따른 개체 변화

Parameters	Control		Treatment 1		Treatment 2	
	Before	After	Before	After	Before	After
Behavior	2.5±1.22	2.5±1.22	2.6±0.84	2.5±1.08	3±0	3±0
Mentation	2.67±0.82	2.67±0.82	2.9±0.32	2.6±0.84	3±0	2.6±0.89
Appetite	2±0.89	2.5±0.55	2.2±0.79	2±1.15	2.2±0.45	1.4±0.89
Vomiting	2.5±1.22	2.5±1.22	2.6±0.7	2.5±0.97	3±0	2.2±1.3
Defecation status	3±0	2.83±0.41	2.9±0.32	2.9±0.32	2.8±0.45	3±0
Defecation frequency	3±0	3±0	2.8±0.63	2.8±0.63	3±0	3±0
Weight loss	2.83±0.41	2.67±0.52	2.9±0.32	2.3±1.25	3±0	3±0
PU/PD	3±0	3±0	2.7±0.95	2.7±0.95	3±0	3±0

(3)-6 Health-related Quality of Life

dTERT, dGHRH의 단독 혹은 병용 투여 전·후 건강과 관련된 삶의 질의 변화 (Health-related Quality of Life)를 2005년 Yazbek과 Dnise의 방법으로 평가하여 삶의 질의 개선정도를 확인하였다 [표 28].

[표 28]. 본 중앙 연구에 사용한 Health-related quality of life 설문조사표이며 각 질문에 대한 점수의 총합을 더하여 표기한다.

질문	점수			
	0	1	2	3
1. 종양이 당신의 반려견의 삶의 질을 얼마나 저하시켰다고 생각하십니까?	매우 많이	많이	조금	전혀
2. 좋아하던 것들을 여전히 하고 싶어합니까? (예, 놀이, 산책)	전혀	거의 안 함	가끔	이전과 비슷
3. 반려견의 기분은 어떻게 보이십니까?	매우 다름	바뀜	조금 바뀜	이전과 비슷
4. 반려견이 자신의 청결을 지키는 습관을 지속합니까?	지속하지 않음	거의 하지 않음	줄어듦	지속함
5. 당신의 반려견이 고통을 느끼는 순간은 언제입니까?	계속	자주	가끔	고통 없음
6. 반려견의 식욕은 어떻습니까?	식욕 없음	강제급여	식욕 감소	이전과 비슷
7. 반려견이 지치고 힘들어 합니까?	항상	자주	가끔	이전과 비슷
8. 반려견의 수면은 어떻습니까?	못잠	힘들어함	불편해함	잘 잠
9. 반려견이 구토를 합니까?	항상	자주	가끔	하지 않음
10. 반려견의 장 기능은 어떻습니까? (예, 정상변, 설사)	매우 안 좋음	안 좋음	거의 정상	정상
11. 반려견이 소변이나 배변을 볼 때 자세를 취할 수 있습니까?	못함	자주 못함	종종 못함	잘 함
12. 반려견이 당신과 당신의 가족에게 반응을 보이고 교감합니까?	관심 없음	흥미를 조금 보임	관심과 애정을 더 요구함	이전과 비슷

Lymphoma 환자의 경우 대조군에서 치료 전과 후의 삶의 질 점수의 평균값이 증가하였지만 유의적인 차이는 없었으며 치료에 따른 상승이라고 판단되었다. 치료군의 경우 치료 전과 후의 삶의 질 점수의 차이는 크지 않았다. 적은 개체 수와 개체별 차이로 인해 유의적인 차이를 보이지 않은 것으로 보인다 [표 29, 그림 22].

Carcinoma/Sarcoma 환자의 경우 대조군, 치료군 2는 치료 전·후에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 치료군 1에서 치료 전과 후의 삶의 질의 점수 증가를 확인 할 수 있었다. 유의적인 차이는 없었으나 추후 더 많은 환자와 장기 평가 시 더 정밀한 평가가 가능할 것으로 보인다

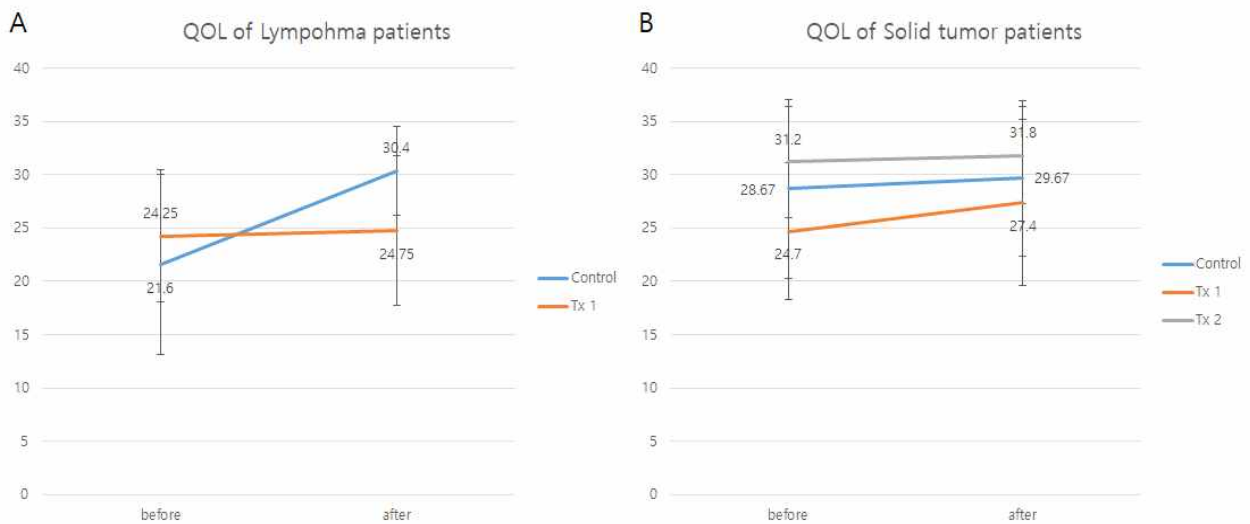
[표 30, 그림 22].

[표 29]. Lymphoma 환자의 건강과 관련된 삶의 질 변화

Parameters	Control		Treatment 1	
	Before	After	Before	After
QOL	21.6±8.44	30.4±4.16	24.25±6.18	24.75±7.04

[표 30]. Carcinoma/Sarcoma 환자와 건강과 관련된 삶의 질 변화

Parameters	Control		Treatment 1		Treatment 2	
	Before	After	Before	After	Before	After
QOL	28.67±8.43	29.67±7.28	24.7±6.45	27.4±7.75	31.2±5.22	31.8±4.55



[그림 22] 건강과 관련된 삶의 질 그래프 (A; Lymphoma, B; Carcinoma/Sarcoma)

(3)-7 dTERT 플라스미드 투여 후 Lymphoma efficacy

dTERT 투여 전과 후의 항암 치료 효율을 확인하였다. 대조군 5마리 중 CHOP Chemotherapy를 진행하지 않은 환측 case 30은 제외하고 진행하였다 [표 31].

대조군과 치료군 사이에 첫 번째 치료 반응 보인 기간은 두 군 사이 유의적인 차이를 보이지 않았고 병 없이 지내는 기간이나 전체 생존 기간 역시 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 치료 반응 중 완치 (Complete remission)를 보이는 환측 비율이 치료군이 높은 것을 확인 할 수 있었다. 더 정확한 치료 효율과 생존 기간을 확인하고 평가하기 위해서는 장기적인 추적 관찰이 필요할 것으로 보인다.

[표 31]. 연구에 포함된 Lymphoma 환측 (n=8)의 항암 치료 반응률

	Control (n = 4)	Treatment 1 (n = 4)
Response rate	4 (100%)	4 (100%)
Overall (CR + PR)	4 (100%)	4 (100%)
CR	1 (25%)	2 (50%)
PR	3 (75%)	2 (50%)
First remission duration	85.75±52.35	93.5±45.8
Disease free time	89.5±155.7	89±111.31
Overall survival time	267.25±286.33	305.25±262.21

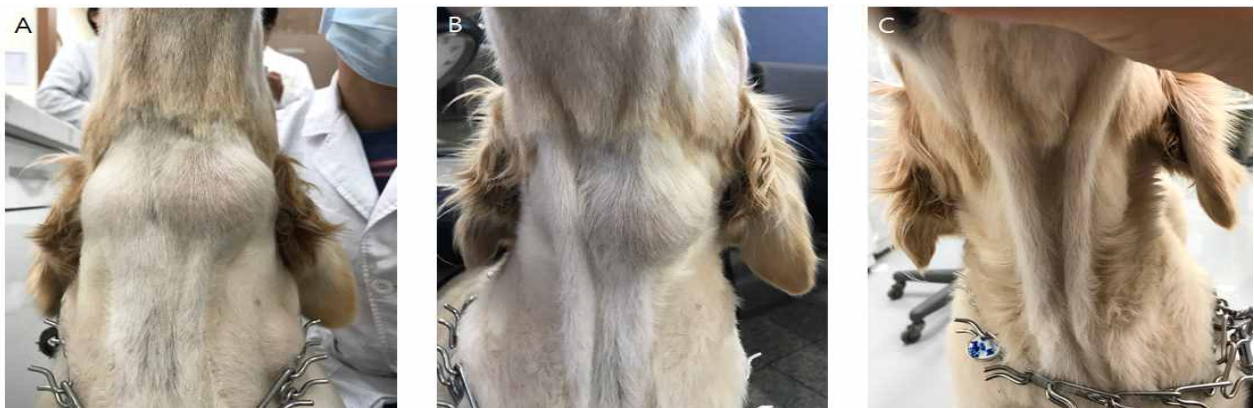
*Response rate, 항암 치료에 반응이 있는 비율

*CR, Complete remission (완전한 반응); PR, Partial remission (부분적인 반응)

*First remission duration, CR, PR 등 첫 반응이 있기까지의 기간

*Disease free time, 치료에 반응하여 lymphoma가 재발 하기 전까지의 기간

*Overall survival time, 전체 생존 기간



[그림 23] Lymphoma 환측 (case No.10) 의 치료 경과 사진. (A; 치료 전, B; 치료 중, C; 치료 후)

(3)-8 dTERT 플라스미드 안전성 및 효능의 종합결과

본 연구의 목적은 항암 면역 치료제로서의 TERT (Telomerase reverse transcriptase, 텔리머라제 역전사효소)의 효능과 부작용을 임상적으로 확인하는 것이다.

실험에 사용된 총 환축의 수는 31마리이며 림프종 (lymphoma) 환축 9마리, 고형암 (Carcinoma/Sarcoma) 22마리를 대상으로 하였다. 두 종양 별로 dTERT와 dGHRH의 투여 여부에 따라 그룹 1 (대조군), 그룹 2 (dTERT 단독 투여), 그룹 3 (dTERT, dGHRH 병용 투여)로 나누어 평가하였다.

실험 시작 전 모든 환축은 신체검사, 혈액검사 (전혈구검사, 혈청화학), 개체별 검사 (행동, 정신, 식욕 등)를 진행하였으며 12주간 3주 간격으로 전기천공법 (EP, Electroporation)을 통해 dTERT, dGHRH을 단독 혹은 병행하여 뒷다리 대퇴부에 1ml 근육주사 하였다.

실험기간 동안 생존율, 전기천공법을 통한 dTERT, dGHRH 투여 부작용, 신체검사, 혈액검사, 개체 변화 (행동, 정신, 식욕, 소화기, 체중, 음수량, 소변량), 건강과 관련된 삶의 질, 종양 치료 효과에 대한 평가를 진행하였다.

실험 전 검사에서 종양 환자인 만큼 혈액검사 상 백혈구 증가, 간수치 증가 등 이상을 보이는 개체가 있었지만 치료 전과 후에 큰 차이를 보이는 개체는 많지 않았다.

전기천공법 투여에 따른 혈액학적, 개체 변화, 삶의 질 등 치료 전과 후로 Lymphoma, Carcinoma/Sarcoma 종양 환자에서 대조군과 치료군 1, 치료군 2 사이에 유의적인 차이는 보이지 않았다. dTERT, dGHRH 투여로 인한 부작용은 없는 것을 확인 할 수 있었다.

주사부위에 대한 부작용 없이 일반적인 주사에 대한 상처 및 회복 이외에는 보이지 않았다.

생존 기간을 보았을 때 Lymphoma 환자의 경우 dTERT를 추가로 투여한 군이 대조군보다 더 오래 사는 경향을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 유의적인 차이는 없지만 추후 더 많은 환축을 대상으로 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다. 고형암 (Carcinoma/Sarcoma)의 경우 대조군에 비해 dTERT 단독 투여군 및 dTERT, dGHRH 병용 투여군의 생존기간이 더 긴 것을 볼 수 있었으며 병용 투여군이 단독 투여군보다 더 길었다. 하지만 유의적인 차이를 보이지 않아 추가적인 추적 관찰과 개체수를 늘려 평가하는 것이 필요하다.

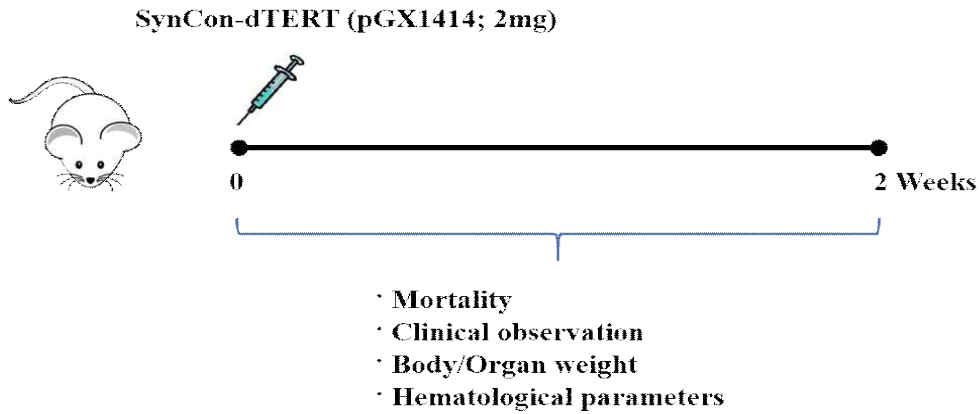
dTERT와 dGHRH 의 전기천공법을 통한 투여는 임상평가 상 부작용은 없는 것으로 보이며 추후 일반적인 치료 (항암 및 대증치료)와 병행 시 생존기간을 늘려주는 것으로 보인다. 따라서 추후 장기간 많은 환자에 적용하여 효능을 확인하는 것이 필요할 것 같다.

현재 사용되고 있는 국내 항암 치료 방법으로는 화학 항암 치료, 수술적 제거가 대부분이다. 특히 대부분 반려동물 종양은 사전 인지가 어려워 종양이 진행이 많이 경과된 경우가 많다. 특히 화학항암제의 경우 종양세포의 사멸에도 기여하지만 정상적인 골수세포나 기타 세포의 사멸에도 기여하기 때문에 사용 후 빈혈, 혈소판감소에 의한 출혈, 백혈구 감소에 의한 패혈증 등이 발생하는 경우가 많아 수혈 및 혈장투여와 같은 치료가 동반되는 경우가 많다.

따라서 항암 면역 치료제로서 dTERT (Telomerase reverse transcriptase, 텔리머라제 역전사효

소)의 효능을 확인하기 위해서 본 연구가 진행되었으며 부작용 없이 혈액암인 lymphoma와 고형암인 Carcinoma/Sarcoma 종양 환자에서 생존 기간의 증가를 확인 할 수 있었다. 아울러 면역학적으로 증가한 면역원성을 볼 수 있었다. 이는 화학적 항암 치료와 수술적 제거의 치료 효과를 높일 뿐 아니라 환자와 보호자의 사정으로 화학적, 수술적 치료가 불가할 경우 선택할 수 있는 대체적 치료가 될 수 있다. 좀 더 대규모의 치료이후의 조사가 이루어진다면 이후 단독 투여 및 각 종양별로의 적용과 효능의 평가를 통해 면역 항암 치료제로서의 dTERT가 가진 잠재력과 우수성을 입증할 수 있을 것으로 생각된다.

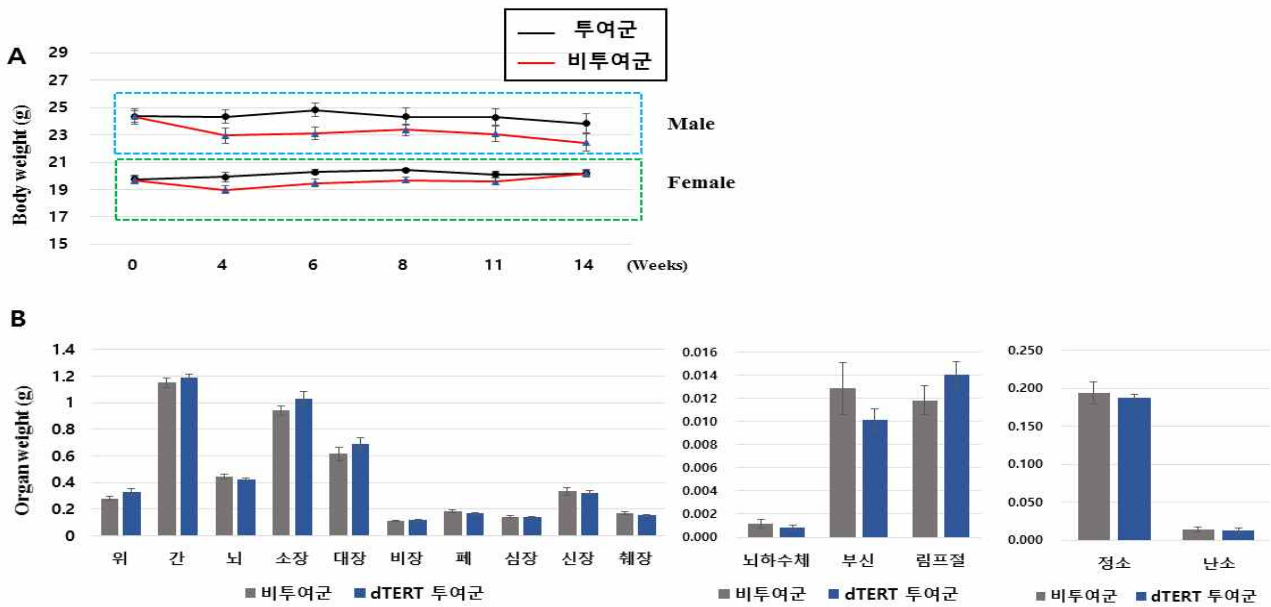
(4). 설치류 급성 독성 실험 - Acute toxicity of dTERT plasmid in mouse



dTERT (pGX1414)	적용예상용량	고용량(100x)
목적동물 (Dog, 10kg기준)	10mg	1000mg
실험동물 (Mouse, 20g기준)	20ug	2mg

[그림 24] 설치류의 dTERT 플라스미드 (pGX1414)에 대한 급성 독성실험 모식도

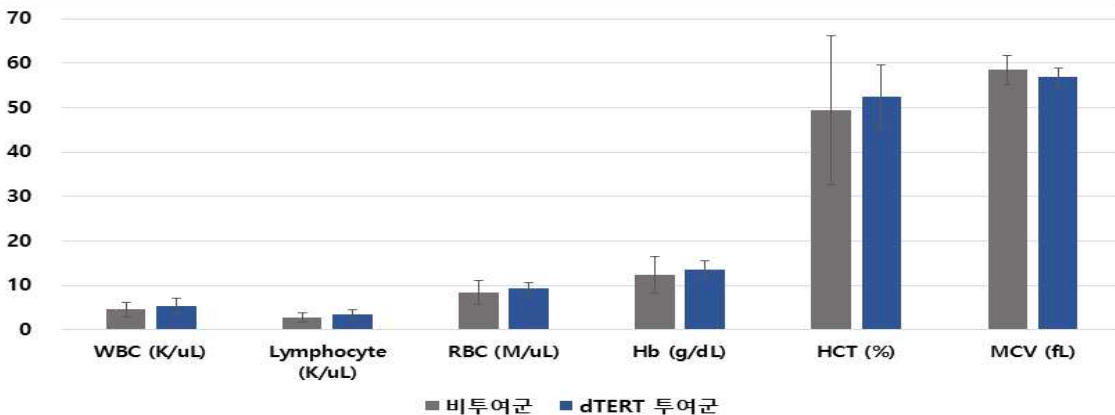
비임상 단계에서 설치류 대상 dTERT 플라스미드 (pGX1414)의 독성을 평가하기 위해 BALB/c 마우스 (8주령)에 고용량의 dTERT 약물을 투여하여 사망률, 임상적 관찰(Clinical observation), 체중/조직 무게 변화, 혈액학적 분석을 실시하였다. 용량결정은 목적동물인 Dog 임상적용기준 (10mg/10kg)을 기준으로 몸무게에 대비하여 (allometric dosing) 마우스(20g) 당 20ug으로 설정하여 고농도 투여는 (100배) 마우스 당 2mg으로 투여하였다. 고농도 1회 투여 후 2주간의 독성평가를 실시하였다. 전체실험군은 대조군 10마리 (암/수 각 5마리)와 고농도 투여군 10마리(암/수 각 5마리) 포함 20마리로 진행되었다 [그림 24].



[그림 25] 설치류의 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여 후 체중 및 주요 14개 장기조직의 무게 변화 측정 (A) 투여 후 2주간의 체중변화를 측정함. (B) 투여 후 2주 뒤 각 장기조직의 무게 변화를 측정함.

고농도 투여 후 투여군에서 특정한 임상적 관찰이나 사망은 관찰되지 않았으며 대조군과 비교하여 체중, 장기무게에서 유의미한 변화나 차이는 관찰되지 않았다. 다만, male 그룹에서 투여 후 체중 감소가 관찰되었으나, 유의미한 차이는 아니라 dTERT 플라스미드 (pGX1414)에 의한 영향은 아닌 것으로 판단되었다 [그림 25]. 또한 투여로 인한 두 그룹 간에 혈액학적 유의미한 증가나 감소 변화도 나타나지 않았으며 WBC, RBC, Hb HCT 등 모두 정상수치 범위 안에 포함되었다 [그림 26].

Parameter (Units)	비투여군	dTERT 투여군	Normal Range
WBC (K/uL)	4.57±1.69	5.35±1.70	1.8 - 10.7
Lymphocyte (K/uL)	2.81±1.12	3.431±0.98	0.9 - 9.3
RBC (M/uL)	8.33±2.70	9.23±1.32	6.36 - 9.42
Hb (g/dL)	12.38±4.02	13.63±1.81	11.0 - 15.1
HCT (%)	49.38±9.83	52.44±7.27	35.1 - 45.4
MCV (fL)	58.49±3.30	56.91±1.95	45.4 - 60.3



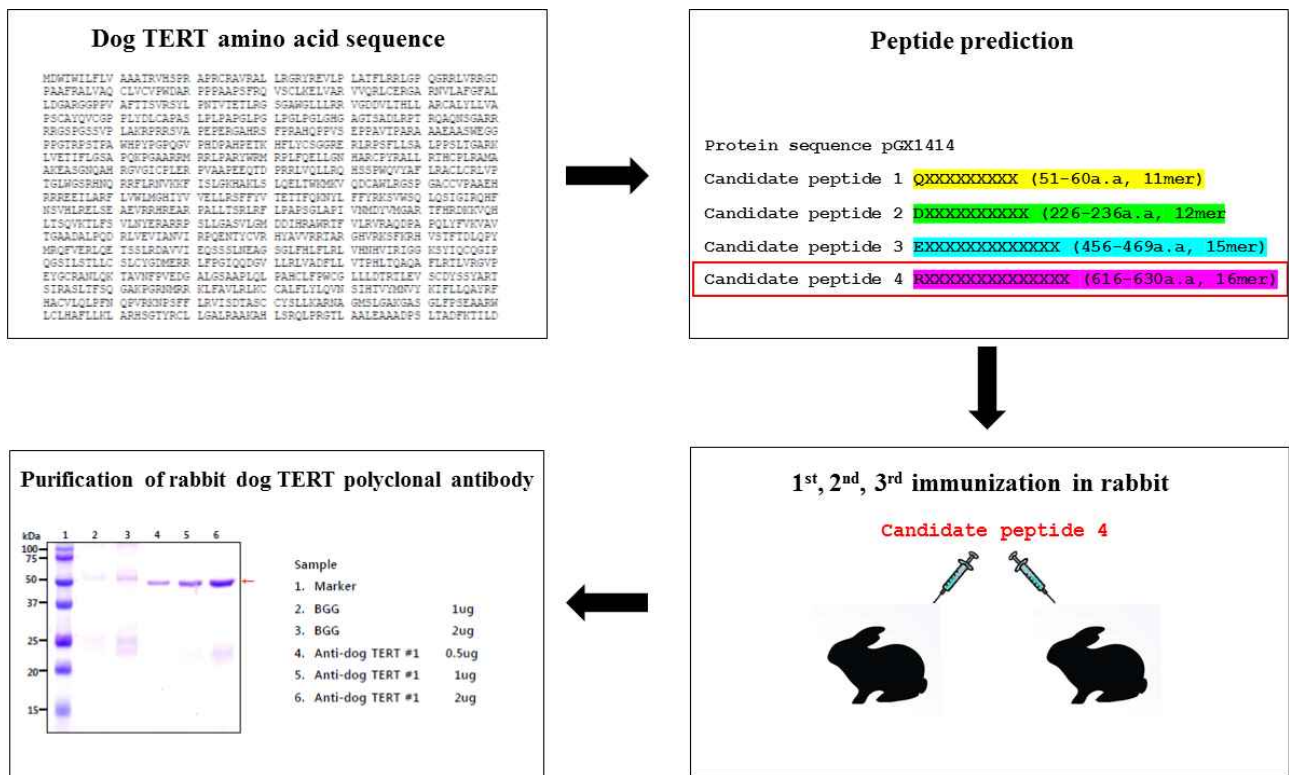
[그림 26] 설치류의 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여 후 혈액학적 변화 측정

(5) 반려견(환축) 고형암 조직 혹은 혈액에서 분자 또는 단백질 수준에서의 Dog TERT 발현 확인

(5)-1. Dog TERT 항체 제작

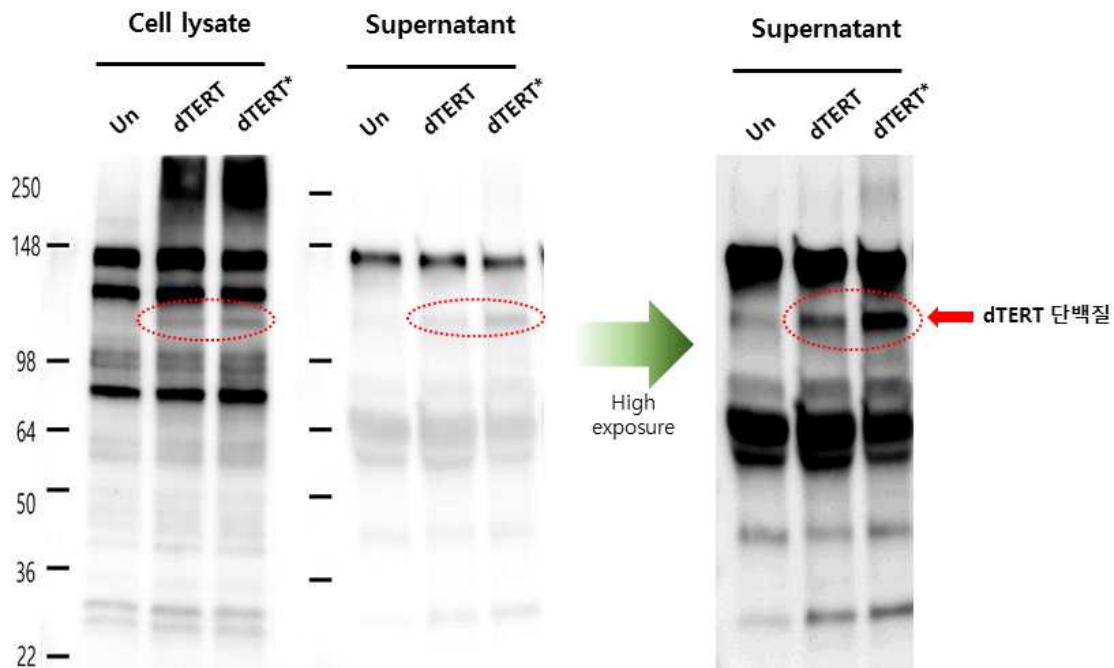
반려견의 고형암 조직과 정상조직에서 TERT 발현 정도 차이를 확인하기 위해 1차년도에 상업적으로 이용 가능한 여러 human TERT (homology 71%) 항체를 이용하였으나 human TERT 항체로는 검출하기가 적합하지 않았다 (1차년도 결과 참조). 단백질 수준에서 특정 유전자의 발현을 보기 위해서는 항체의 quality가 매우 중요하다. 따라서 정확한 dog TERT를 검출하기 위해 dog TERT 항체를 자체 개발하기로 하였다. 항체개발은 제조 회사를 통해 제작의뢰 하였다.

단클론(monoclonal) 항체를 개발하기에는 시간과 비용이 많이 드는 점을 고려하여 polyclonal 항체를 제작 의뢰하였다. dog TERT 유전자의 아미노산 서열을 확보하고 아미노산 서열 중 항원성과 면역원성이 높은 peptide를 분석하여 후보 peptide를 선정하였다. 선정된 4개의 peptide 중 dTERT 플라스미드의 아미노산 서열과 일치하는 peptide를 항원으로 하여 rabbit polyclonal dog TERT 항체를 제작하였다 [그림 27].



(5)-2. Rabbit polyclonal dog TERT 항체 검증

제작된 dog TERT 항체를 가지고 반려견의 고형암 조직과 정상조직에서 발현차이 정도를 확인하기 전에 western blot 방법으로 제작된 항체가 dog TERT 단백질을 검출할 수 있는지 확인하기 위해 in vitro로 dTERT 플라스미드 (pGX1414)를 과발현 시킨 세포에서 얻은 lysate와 culture supernatant(sup)에서 dTERT 플라스미드 단백질이 검출되는지 확인하였다 [그림 28]. (제작된 rabbit dog TERT항체의 dog TERT 결합부위는 endogenous dog TERT와 dTERT 플라스미드 (pGX1414)의 공통된 peptide 부위에 대한 항체로 제작되었음) 그 결과, dTERT 플라스미드를 과발현 시켰을 때, cell lysate와 culture sup에서 모두 dTERT 플라스미드 단백질을 검출할 수 있었다 [그림 28]. 이로써 endogenous dog TERT를 검출할 수 있는 rabbit polyclonal dTERT 항체로 단백질 수준의 dTERT 발현을 확인할 수 있어 중요한 항체를 자체 확보했다는 것에 의의가 크다. Binding specificity를 증가시키기 위해 단일항체를 제작해서 후속 연구를 진행한다면 진단에서의 새로운 연구로 확장될 수 있을 것이다.



[그림 28] 제작된 dog TERT 항체 검증 - in vitro에서 dog TERT 단백질 발현을 확인함.

(5)-3. 반려견 고형암 조직 혹은 혈액에서 분자(mRNA) 수준에서의 dTERT 발현량 측정

일부 특정암에서 dog의 암조직에서 TERT가 정상조직에 비해 과발현되어 있다고 보고되어 있다 (6-10). 본 연구에서는 10여종의 암조직을 확보하여 TERT 발현을 분자수준에서 확인하고자 방법을 정립하고자 한다.

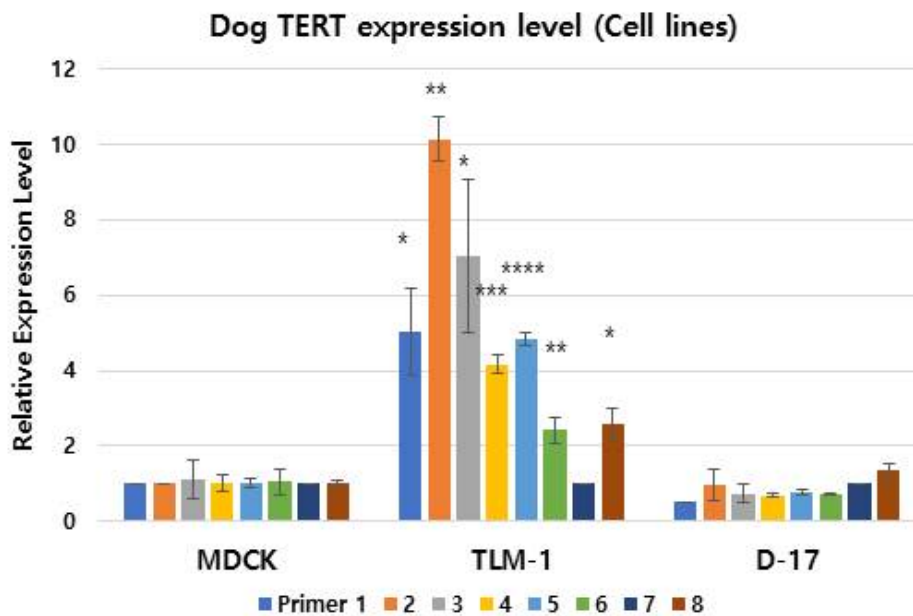
반려견 고형암 조직에서 dTERT 과발현 정도를 qPCR 방법을 이용하여 분자(mRNA)수준에서 확인했다. 1차년도에 확보한 고형암 조직으로 dog TERT 발현 검증에 앞서 dog 암세포주를 이

용하여 정상세포와의 발현 비교 실험을 진행했다. TLM-1 (Canine melanoma cell line) 세포주와 D-17 (Canine osteosarcoma cell line) 세포주를 각각 kerafast와 ATCC에서 구매하였고, 비교 검증을 위해 정상세포인 MDCK (adult canine normal kidney cell line) 세포주도 ATCC에서 구매하였다. 각 세포주로부터 추출된 RNA로부터 cDNA를 합성, 7개의 primer [그림 29]을 이용하여 qPCR해 본 결과, MDCK, 정상세포주에 비해 TLM-1, melanoma 세포주에서 primer에 따라 정도의 차이가 있지만 2.4~10배 (평균, 5.2 ± 2.7) dTERT가 과발현 되어있는 것을 확인하였고, 모두 유의미한 증가를 보였다 [그림 29].

A

Dog TERT primer list			
Primer NO.		Sequence	Amplicon (bp)
1	Forward	AGC ACG CTA AGC TCT CCC T	124
	Reverse	ATC TCC TCT CTC CGA CGG T	
2	Forward	TTC CAT TCA ACC AGC CAG T	147
	Reverse	CAG AAG GAA ACA GGC CAG A	
3	Forward	GTC GTG CTG CTA CTC CCT TC	122
	Reverse	TGA GCA GGA AGG CGT GGA	
4	Forward	AGC ACG CTA AGC TCT CCC TGC	126
	Reverse	GGA TCT CCT CTC TCC GAC GGT G	
5	Forward	CCC CTC CTT CTT CCT CCG TGT	119
	Reverse	CAG AAG GAA ACA GGC CAG AGG C	
6	Forward	GCA AGG CCT TCA AAA GAC AC	196
	Reverse	CCG ATC CTT ACG ACG TGA TT	
7	Forward	GAC GTG GAA GAT GAA GGT GC	157
	Reverse	TGA CCT GAG CAG CTT AAC CA	

B



[그림 29] Dog 암세포주로부터 dog TERT 발현을 분자수준에서 확인 - (A) dog TERT 발현을 확인하기 위해 사용된 qPCR primer list (B) 7개의 primer를 이용하여 정상세포주 (MDCK)와 두 암세포주 (TLM-1, D-17)에서의 dog TERT 발현 정도를 확인함 (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001).

D-17, osteosarcoma 세포주는 MDCK, 정상세포주에 비해 발현증가가 관찰되지 않았다. human의 경우 85%이상의 암종에서 TERT가 과발현 되어있지만 (1-5), 일부 암종은 (예, Osteosarcoma)에서는 TERT의 발현정도와 암과의 상관관계가 없는 것으로 나타났다 (21).

TERT 과발현 암종을 타겟으로 치료제를 개발하는 관점에서 본다면 Osteosarcoma는 TERT 면역항암제에는 반응성이 없을 것이라 예측되나, 암조직으로 확인해 보면 더 정확한 결과를 알 수 있을 것이다.

반복실험을 통해 7개의 primer set 중에서 일정하게 유의미한 증가를 보인 Primer 5 set을 최종 적합한 primer로 사용하여 반려견 암조직에서의 dTERT 발현을 확인하였다.

1차년도에 확보한 10여개의 고형암조직 Sarcoma (n=2), carcinoma (n=4), melanoma (n=1), adenoma(n=2), hemangiopericytoma (n=1), epithelioma (n=1), Tricoblastoma (n=1)에서 dTERT 발현을 확인하였고, 비교군인 정상조직은 복부 muscle (n=1) 과 Ovary (n=1)를 사용하여 발현을 비교하였다 [표 32].

Tumor Tissue List	
Tumor No.	Tumor type (Cancer)
T1	Leiomyosarcoma
T2	Cutaneous hemangiopericytoma
T3	Anal sac carcinoma
T4	Tricoblastoma
T5	Intracutaneous cornifying epithelioma
T6	Mammary gland carcinoma (high grade)
T7	Splenic fibro sarcoma
T8	Mammary gland carcinoma (high grade)
T9	Oral melanoma
T10	Mammary gland tumor
T11	Ovarian papillary adenoma
T12	Ovarian adenocarcinoma

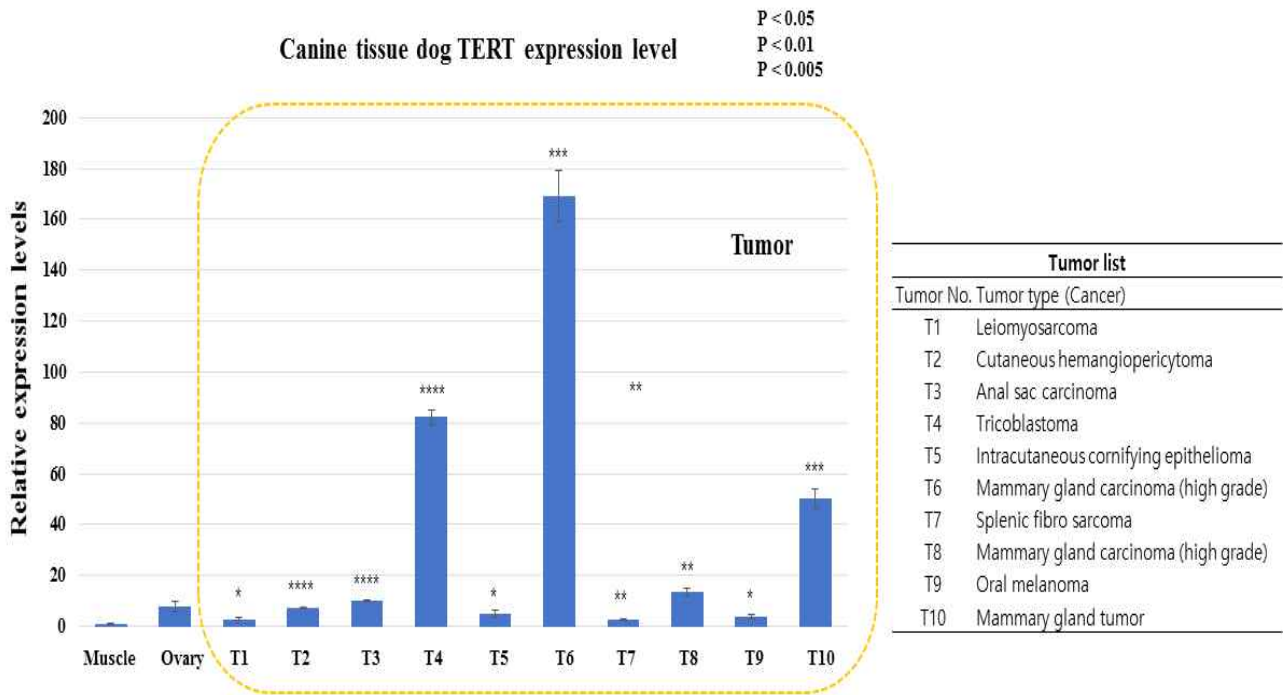
[표 32] Dog TERT 발현정도를 확인하기 위해 사용된 반려견 고형암 조직

조직별 자체 TERT 발현과 activity 가 달라, 각 부위의 정상조직을 확보하여 대조군으로 비교해야 정확한 실험이 될 수 있을 것이다. 하지만, 각 암종별 정상조직을 확보하는 것이 힘들어, 본 실험에서는 복부근육 정상조직을 대조군으로 사용하여 TERT 발현을 확인하는 기초 데이터를 마련하였다.

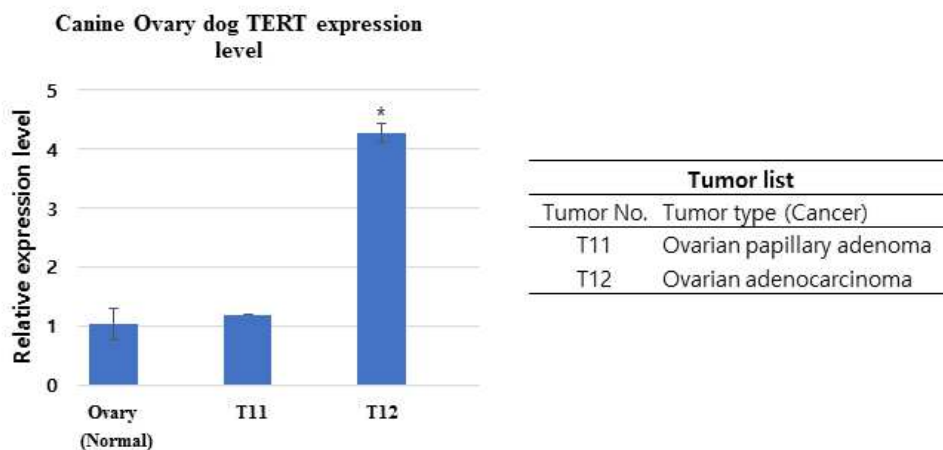
실험 결과, 복부근육 정상조직 (muscle)에 비교할 때, 암종에 따라서 차이는 많게는 160배 적게는 3배정도 발현이 증가되는 것으로 확인되어 (평균, 34.7 ± 54.0), 분석된 10여종의 암종에서 모두 dog TERT가 유의미하게 증가(과발현)되어 있음을 확인할 수 있었다 [그림 29]. 복부근육 정상조직 (muscle) 대비 난소정상조직(Ovary)에서는 7.6배 발현이 높게 나타나는데, 예측한 바와 같이 세포분열이 계속 일어나는 조직(예, 생식세포나 줄기세포 등)에서는 정상세포에서도

TERT 발현양이 높다는 것을 확인할 수 있었다. [그림 30].

난소정상조직이 확보되어 있어, Ovary 정상조직 대비 Ovary tumor 조직 (n=2)에서 TERT 발현량 차이를 비교해 보았다. Ovary 정상조직 대비 Ovarian papillary adenoma (T11)는 발현차이가 없었고, Ovarian adenocarcinoma (T12)는 4.2배 발현이 증가되어 있었다 [그림 31].



[그림 30] 다양한 고형암 조직으로부터 dog TERT 발현 확인. 10개의 반려견 고형암 조직으로부터 근육정상조직 (muscle) 대비 상대적인 dog TERT 발현양을 분자수준에서 확인함 (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001)



[그림 31] Ovary 정상조직과 Ovary tumor 조직 간의 dog TERT 발현량 비교 (*P < 0.05)

이와 같이, 다양한 반려견 고형암(sarcoma/melanoma/carcinoma)에서 TERT의 발현이 유의미하게 증가되어 있음을 확인할 수 있었고, 생식기암의 경우에는 동일부위 정상조직과의 비교에서도 carcinoma가 adenoma 보다는 TERT 발현이 더 높다는 결과를 확인할 수 있었다. 비록 검체의 숫자가 적기는 하지만, TERT 발현의 정도의 차이를 확인할 수 있었고 정상조직간에도 차이가 있을 것이라는 예측도 확인할 수 있는 결과들을 직접 확인할 수 있었다는 것이 큰 성과이다. 향후 다양한 암조직과 암종별 정상조직들을 확보한다면 좀 더 정밀하고 예측 가능한 분자진단의 가능성을 보여 주는 기초 데이터를 마련했다고 본다.

(6). 2차년도 연구 결과 성과

1차년도 3주간격, 4회 투여, 채혈구간은 투여 후 2주와 3주차에 의한 연구 결과 분석을 통해 dTERT 플라스미드 투여 방법은 2주 간격 4회 투여로 결정하였다. 환축 모집을 시행하여, 모집된 총 환축의 수는 31마리로 림프종 (lymphoma) 환축 9마리, 고형암 (Carcinoma/Sarcoma) 22마리를 시험대상으로 선정하였다.

안전성과 혈액 분석 등 임상적 효능은 건국대에서 진행하였고 투여와 세포면역원성 분석은 (주)플럼라인생명과학에서 진행하였다.

세포면역원성 결과는 최소 3회 이상 투여한 환축에 대해서만 분석하였고 결과는 80% (12/15) 환축에서 양성 반응을 보였고, 그 중 67%(10/15)는 강한 세포면역반응을 확인할 수 있었다. Epitope은 환축별 유전적 다양성을 가진다는 측면을 고려할 때 예측대로 Multi-epitope response를 보여준다.

dTERT 플라스미드 안전성 확인 실험에서 객관적인 평가항목에 의해 안전성은 확인되었고 부작용은 없는 것으로 확인 되었다. 생존율 확인 실험에서는Lymphoma 환축에서 유의적 차이는 확인되지 않았지만 dTERT를 추가로 적용한 환자에서 생존율이 더 높은 경향을 보이는 것을 확인했다. 고형암 환축은 과제 종료시점까지만 비교했을 때 동일한 패턴을 보이거나 폐사까지 추적 관찰이 필요하다고 연구자는 평가한다.

CHOP Chemotherapy를 진행한 Lymphoma 환축에서 Overall survival time이나 Disease Free time에는 유의적 차이를 보이지 않지만, 치료반응 중 Complete remission을 보이는 비율이 높은 것으로 나타났다. 더 많은 환축과 장기적인 후속연구로 확인해 볼 필요가 있다고 본다.

설치류의 dTERT 플라스미드 고농도 급성 독성 실험에서 체중변화나 장기 조직 무게 변화를 측정하고 혈액학적 변화도 확인하였으나 정상수치 범위 안에 포함되어 독성이 없는 것으로 확인되었다.


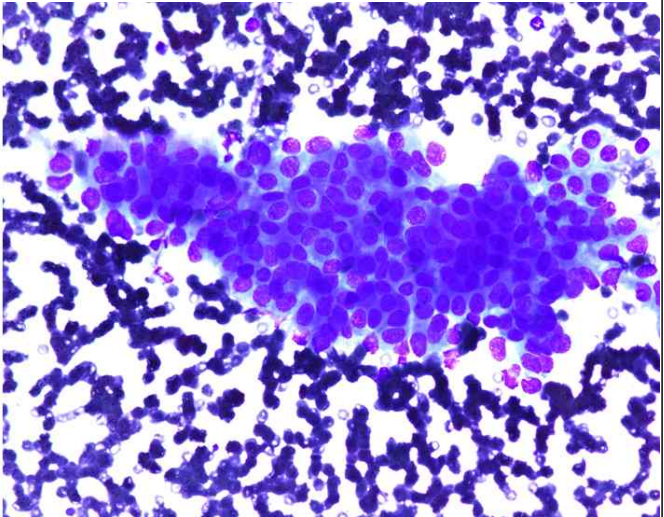
1차년도에 진행되었으나 항체가 dTERT 발현을 검출하지 못해 2차년도에 마무리를 하게 된 고형암 조직에서 분자 또는 단백질 수준에서의 Dog TERT 발현 확인 연구의 결과이다. Rabbit polyclonal dog TERT 항체를 제작하여 dTERT 단백질 발현 정도를 확인하였고, 암종별로 mRNA 수준에서 TERT가 발현되는 것을 확인할 수 있는 Primer set을 확보하고 조건을 정립했다. 샘플 수의 한계로 기준을 잡기에는 미흡하지만 향후 분자 진단 키트 개발의 가능성도 보이는 기초데이터를 확인했다는 점이 큰 성과이다.


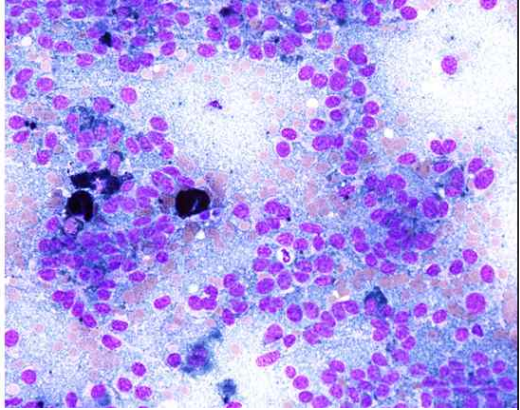
위와 같이, 시험대상 환축의 숫자가 암종별로 충분하지는 않아 추적 관찰이나 추가 실험으로 검증해야 하겠지만, dTERT (pGX1414)는 설치류와 목적 동물에서 안전하고 독성이 없으며 80% 환축에서 세포면역원성이 양성으로 확인되어졌고, 생존율에서도 유의하지는 않지만 치료군의

생존율이 길다는 관찰과 Lymphoma 환자에서 완전 치료(Complete remission)가 2배로 증가된 결과 등을 통해 효능이 있다고 보여 진다. 플라스미드 DNA 백신 기반의 반려견 항암 면역치료제 개발의 가능성은 높아져 임상시험을 진행하거나 추가 Proof of concept 시험을 진행할 수 있을 것으로 본다.

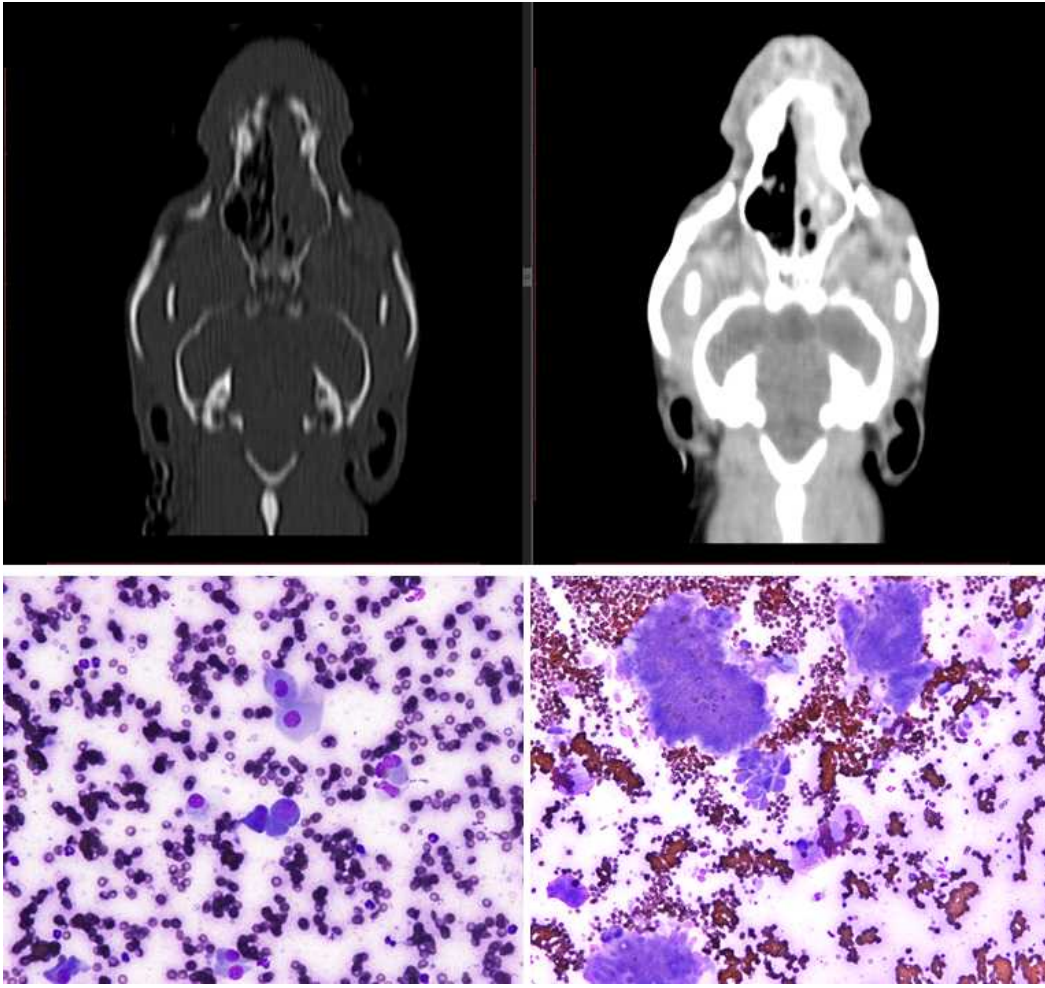
본 연구에서 기초 연구 결과를 확인한 TERT 발현에 관한 연구는 향후 진단키트의 개발을 진행해 성공적인 환자선별 기준이 마련된다면, 치료에 적합한 환축들에게만 투여되어 항암 면역치료제 효능이 더 높게 평가될 수 있고 반응이 없는 환축에게는 투여되지 않아 고통이 절감되어 동물 복지 증진에도 기여할 것이다.

<연구에 포함된 Case 정보>

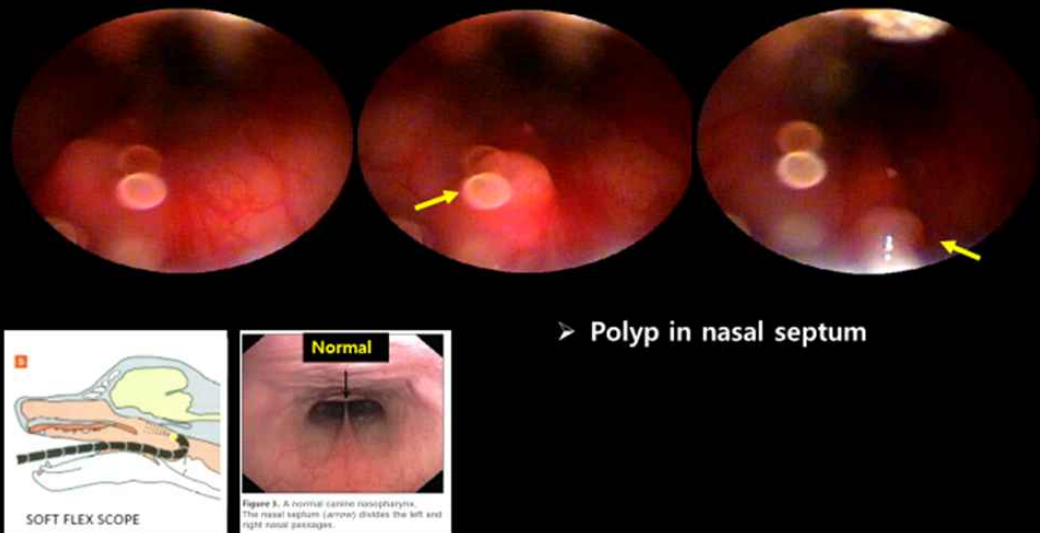
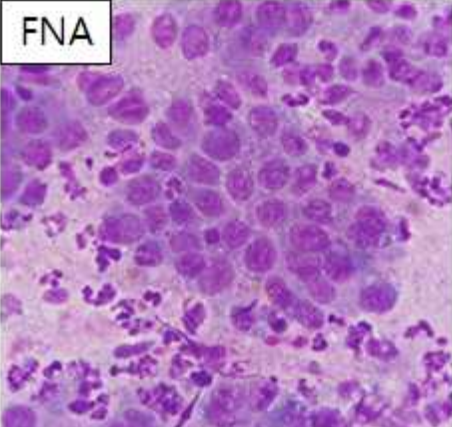
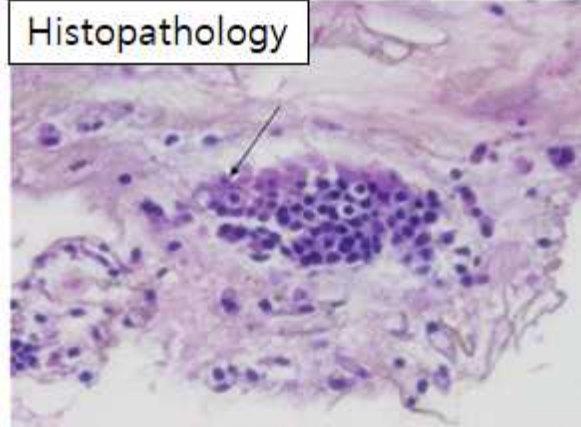
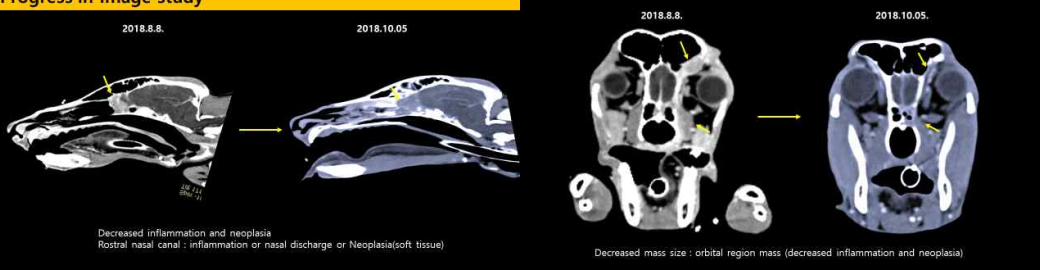
Code No.1							
Name	딸기	Age	15Y	Sex	SF	Breed	Shih tzu
Assessment							
	<ul style="list-style-type: none"> - Firm mass on left 5th mammary gland - Fine-needle aspiration (FNA) <li style="padding-left: 20px;">: Epithelial cell clusters, Anisocytosis, Anisokaryosis. 						
Diagnosis	Mammary gland tumor						
Treatment	Mastectomy dTERT (EP)						



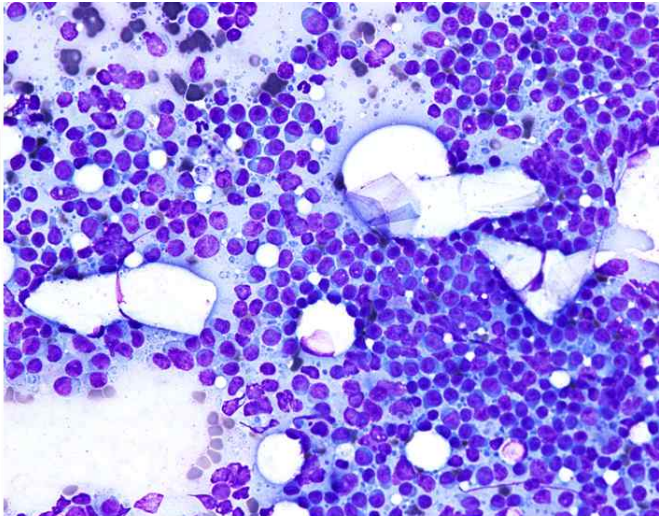
Code No.2							
Name	상순이	Age	16Y	Sex	SF	Breed	Cocker spaniel
Assessment							
	<ul style="list-style-type: none"> - Firm black mass on right side of mandibul - Fine-needle aspiration (FNA) <li style="padding-left: 20px;">: Melanocytes showing the marked atypia. <li style="padding-left: 20px;">: Melanin granules are present in most cell 						
Diagnosis	Melanoma dTERT (EP)						
Treatment	Palliative treatment						

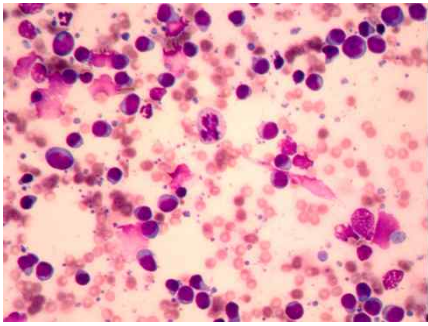

Code No.3

Name	민음	Age	11Y	Sex	CM	Breed	Maltese
Assessment	 <p>- Left nasal epistaxis, obstruction, stenosis - Fine-needle aspiration (FNA) : A cluster of atypical cells and Anisokaryosis : Cell gigantism and abundant basophilic cytoplasm</p>						
Diagnosis	Nasal cavity cancer (Adenocarcinoma)						
Treatment	Palliative treatment dTERT (EP)						

Code No.7

Name	루시	Age	3Y	Sex	SF	Breed	Borzoi
Assessment	<p>Rhinocopy</p>  <p>➤ Polyp in nasal septum</p>						
	<p>FNA</p>  <p>Histopathology</p> 						
	<p>Progress in Image study</p>  <p>Decreased inflammation and neoplasia Rostral nasal canal : inflammation or nasal discharge or Neoplasia(soft tissue)</p> <p>Decreased mass size : orbital region mass (decreased inflammation and neoplasia)</p>						
	<ul style="list-style-type: none"> - OS, mild exophthalmos; Nictitating membrane extrusion (bilateral) - Rhinoscopy, polyp in nasal septum - FNA, Clusters of epithelial cells, anisocytosis, anisokaryosis - Histopathology, sinonasal adenocarcinoma - CT, Rostral nasal canal, neplasia & inflammation - Progress, decreased inflammation & neoplasia after treatment 						
Diagnosis	Nasal cavity tumor (Sinonasal adenocarcinoma)						
Treatment	Chemotherapy & Surgery & Radiation therapy & Palliative therapy dTERT (EP)						

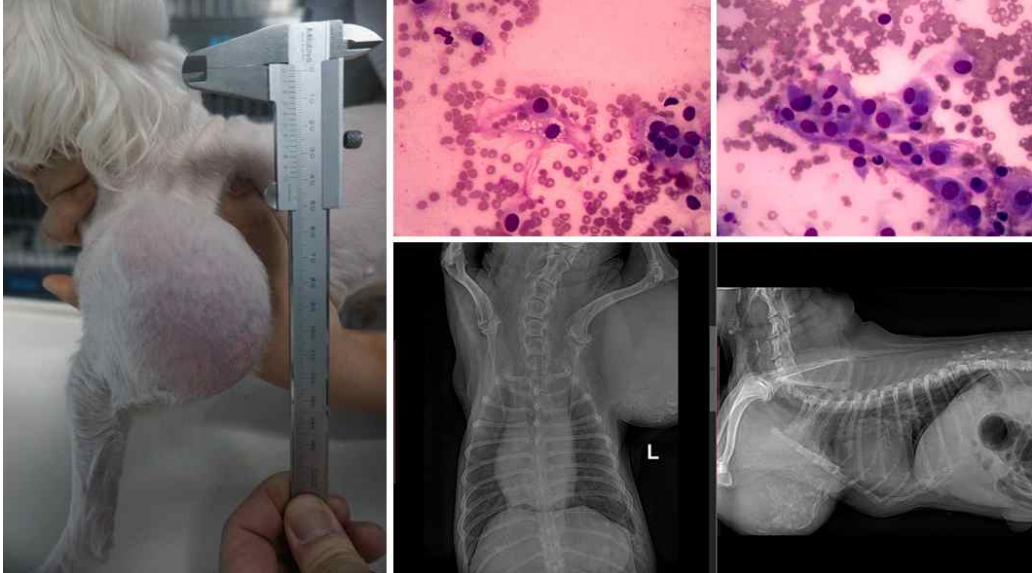
Code No.8							
Name	희망	Age	8Y	Sex	CM	Breed	Mixed
Assessment	 						
Diagnosis	Multicentric Lymphoma (G4)						
Treatment	Chemotherapy (CHOP) dTERT (EP) CHOP: Cyclophosphamide, doxorubicin, Oncovin, and prednisone based chemotherapy protocol						

Code No.9							
Name	공주	Age	7Y	Sex	SF	Breed	Schnauzer
Assessment							
Diagnosis	Multicentric Lymphoma (G4)						
Treatment	Chemotherapy (CHOP) dTERT (EP) CHOP: Cyclophosphamide, doxorubicin, Oncovin, and prednisone based chemotherapy protocol						

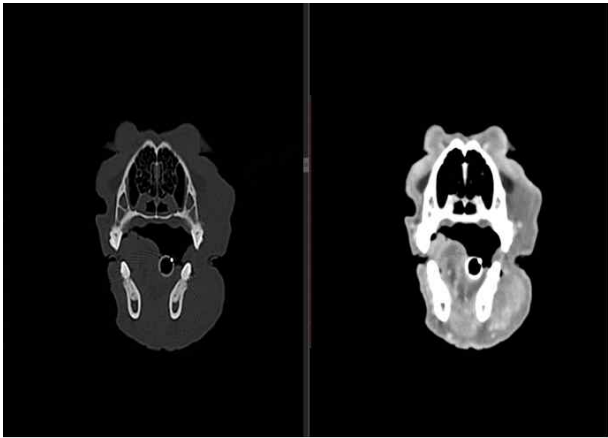
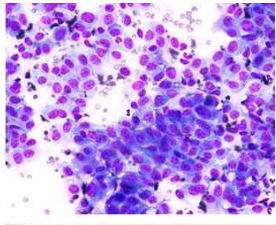

Code No.10

Name	리버	Age	11Y	Sex	CM	Breed	Golden Retriever
Assessment	<div style="text-align: right; font-size: small;"> C: Cyclophosphamide P: PDS V: Vincristine L: Lemustine (CCNU) </div> <p style="text-align: center;">Monitoring of Lymphoma</p>						
Diagnosis	Multicentric Lymphoma (G4) & Meningioma						
Treatment	<p style="text-align: center;">Chemotherapy (Hydroxyurea & COP) dTERT (EP)</p> <p>CHOP: Cyclophosphamide, Oncovin, and prednisone based chemotherapy protocol</p>						

Code No.12

Name	플플이	Age	12Y	Sex	IF	Breed	Maltese
Assessment							
	<ul style="list-style-type: none"> - Left axillary mass, mass on mammary gland - FNA, malignant spindle cells - X-ray, mass on left axillary, calcification. 						
Diagnosis	<p style="text-align: center;">Spindle cell tumor Mammary gland tumor</p>						
Treatment	<p style="text-align: center;">Palliative therapy dTERT (EP)</p>						


Code No.13

Name	구름	Age	18Y	Sex	SF	Breed	Cocker spanial
Assessment	   <ul style="list-style-type: none"> - Oral melanoma mass, Anorexia - Fine-needle aspiration (FNA) <ul style="list-style-type: none"> : Melanocytes showing the marked atypia. : Melanin granules are present in most cell 						
Diagnosis	Melanoma						
Treatment	Palliative therapy dTERT (EP)						


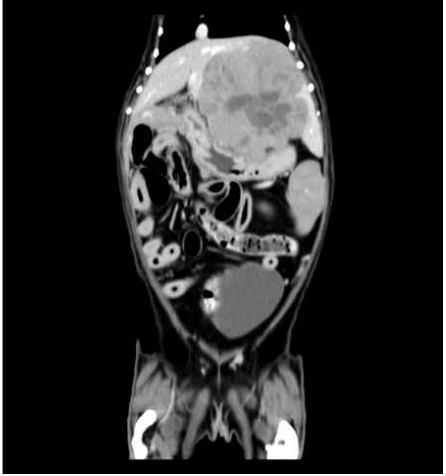
Case No.14

Name	최몽실	Age	13Y	Sex	SF	Breed	Shih tzu
Assessment	<p> - Dyspnea (open mouth breathing), anorexia, seizure - CT, contrast enhanced nasal cavity mass </p>						
Diagnosis	Nasal tumor						
Treatment	Palliative therapy dTERT (EP)						

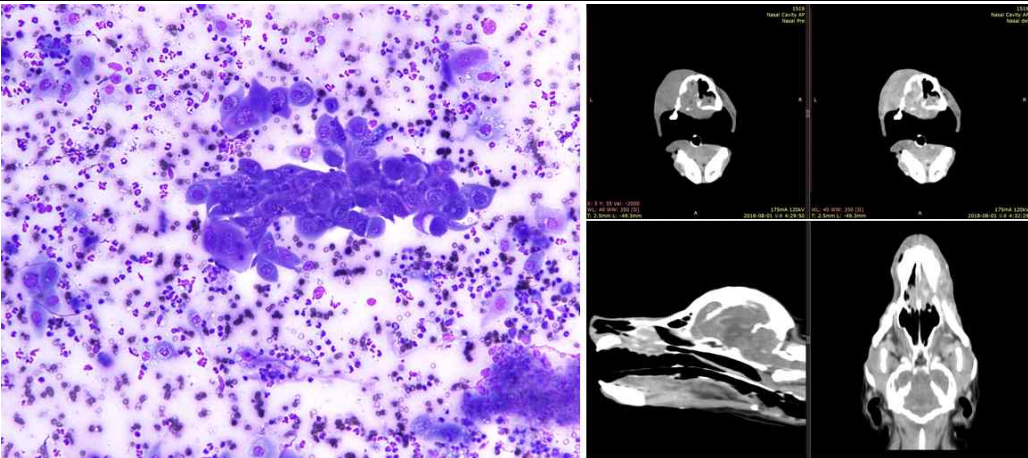
Case No.15

Name	사일러	Age	5Y	Sex	CM	Breed	German shepherd
Assessment	 <ul style="list-style-type: none"> - Several superficial lymph node enlargement - FNA, (lympho node) lymphoma. 						
Diagnosis	Multicentric Lymphoma (G3)						
Treatment	Chemotherapy (Cyclophosphamide, vincristine, mitoxantrone) dTERT (EP)						


Code No.16


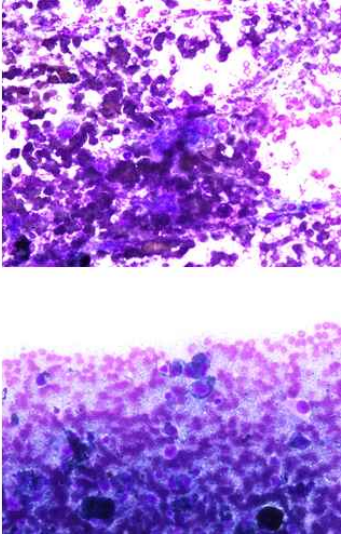
Name	다룩이	Age	9Y	Sex	IF	Breed	Shih tzu
Assessment	 		<ul style="list-style-type: none"> - Melena, Liver mass - Computed tomography, Liver mass - Histopathology, hepatocellular carcinoma 				
Diagnosis	Hepatocellular carcinoma						
Treatment	Surgery & Chemotherapy (Gencitabin) dTERT & dGHRH (EP)						

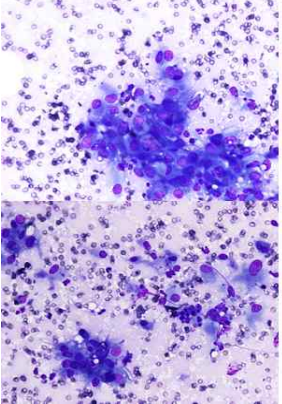
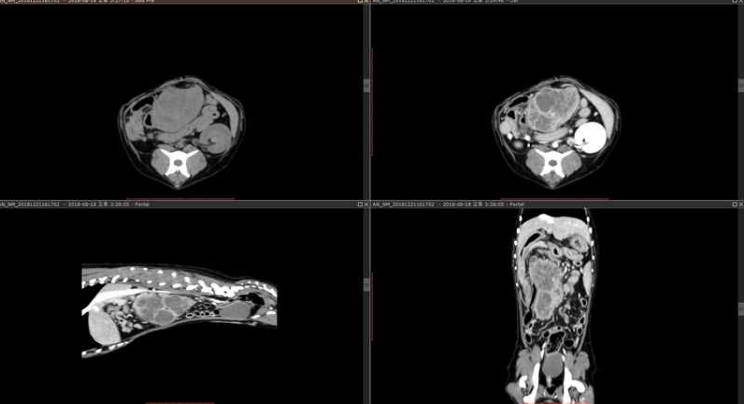
Code No.17

Name	복수	Age	16Y	Sex	CM	Breed	Maltese
Assessment							
	<ul style="list-style-type: none"> - Hematemesis, sneezing - Computed tomography, nasal tumor - FNA (cytology), squamous cell carcinoma 						
Diagnosis	Nasal cavity tumor (Squamous cell carcinoma)						
Treatment	Palliative therapy dTERT & dGHRH (EP)						

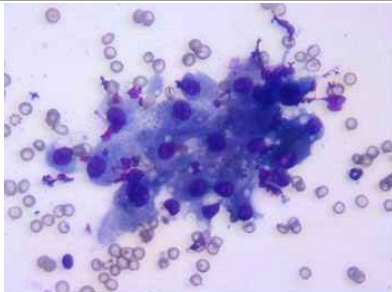
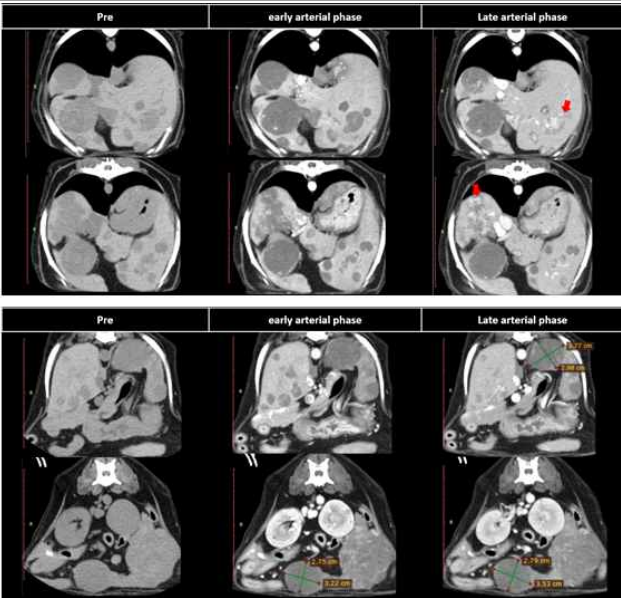
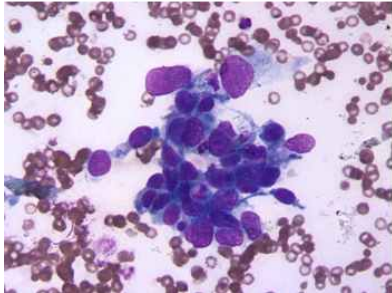
Code No.18

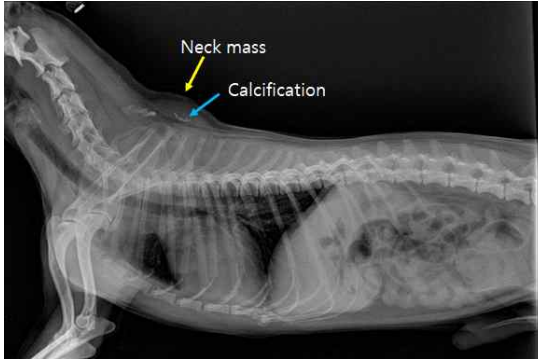

Name	꼬맹이	Age	13Y	Sex	CM	Breed	Maltese
Assessment	 <p>- Mass on anal sac - FNA (cytology), Clusters of epithelial cell. Carcinoma cells</p>						
Diagnosis	Anal sac carcinoma						
Treatment	Palliative therapy dTERT & dGHRH (EP)						


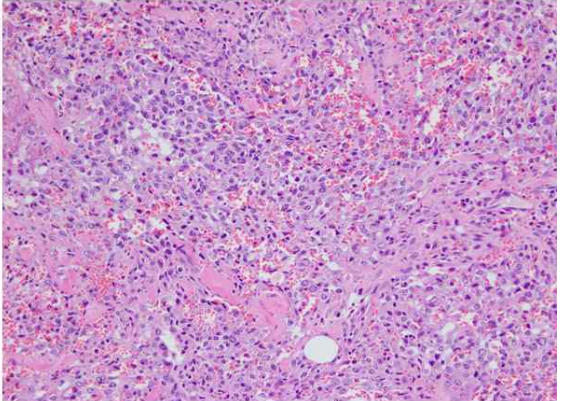
Code No.19							
Name	푸푸	Age	15Y	Sex	IM	Breed	Mixed
Assessment	 		<ul style="list-style-type: none"> - Black firm mass on oral cavity - FNA (cytology) <ul style="list-style-type: none"> : Melanocytes showing the marked atypia. : Melanin granules are present in most cell 				
Diagnosis	Oral melanoma						
Treatment	Palliative therapy dTERT & dGHRH (EP)						

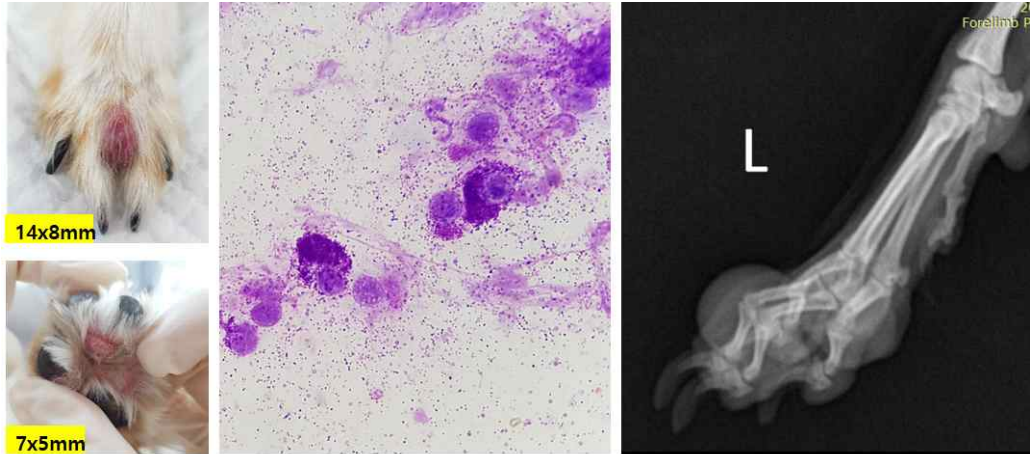
Code No.20							
Name	달	Age	4Y	Sex	CM	Breed	Papillon
Assessment	 		<ul style="list-style-type: none"> - Vomiting, Anorexia - Computed tomography, Abdominal mass - FNA (cytology) <ul style="list-style-type: none"> : Malignant sarcoma. 				
Diagnosis	Hemangiosarcoma						
Treatment	Palliative therapy dTERT & dGHRH (EP)						

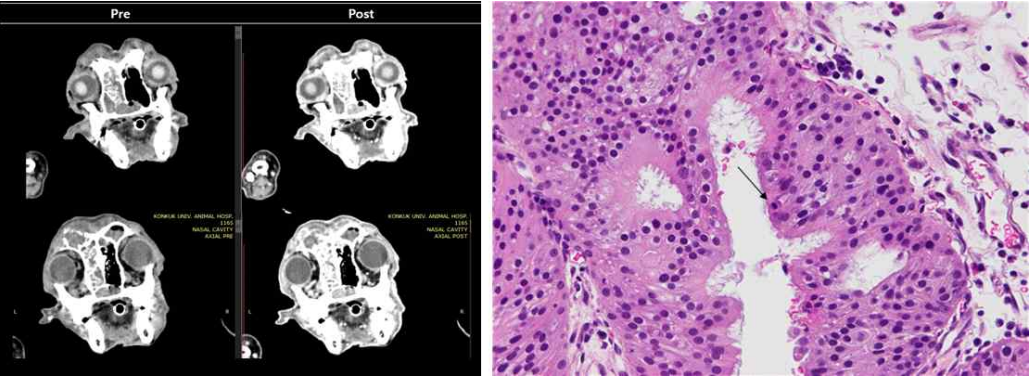
Code No.21

Name	콜라	Age	14Y	Sex	SF	Breed	Cocker spanial
Assessment							
							
	<ul style="list-style-type: none"> - Anorexia, Spleen mass - Computed tomography, Abdominal mass (spleen, liver) - FNA (cytology) <ul style="list-style-type: none"> : Anisokaryosis, anisocytosis, prominent nucleoli, binucleated cells : Basophilic, multiple vacuolated cytoplasm 						
Diagnosis	Hemophagocytic histiocytic sarcoma or Hemangiosarcoma						
Treatment	Chemotherapy (Doxorubicin, Lomustine) & Palliative therapy						

Code No.22							
Name	다복	Age	12Y	Sex	CM	Breed	Maltese
Assessment	  <ul style="list-style-type: none"> - Inter scapular mass - X-ray, neck mass with calcification - Histopathology <ul style="list-style-type: none"> : Granules in neoplastic round cells & eosinophil infiltration : Moderate-poor distribution of granules & differentiation : Mitotic figure 2/10 HPF & Multinucleated cell 4/10 HPF --> Mast cell tumor, Grade 2, High grade 						
Diagnosis	Mast cell tumor (grade 2, high grade)						
Treatment	Chemotherapy (Toceranib, Vinblastine, Prednisone)						

Code No.23							
Name	하니	Age	9Y	Sex	SF	Breed	Shih tzu
Assessment	  <ul style="list-style-type: none"> - Cutaneous mass (Left sub-mandibular lymph node, Tail) - Histopathology <ul style="list-style-type: none"> : Lt. sub-mandibular lymph node, epitheloid hemangiosarcoma : Tail, Squamous cell carcinoma 						
Diagnosis	Epitheloid hemangiosarcoma, squamous cell carcinoma						
Treatment	Surgery & Retinoid acid & Cyclophosphamide & Tocernib						

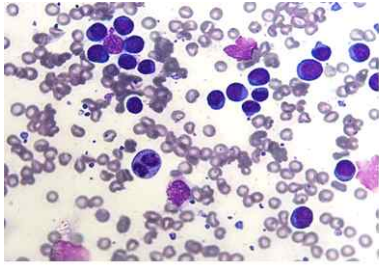



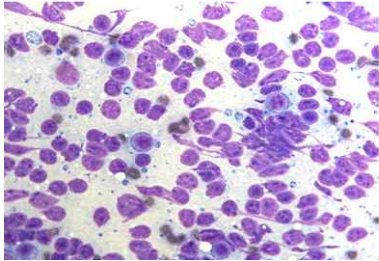
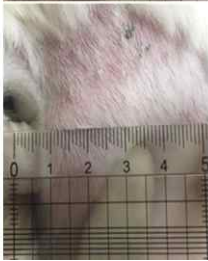


Code No.24							
Name	삐용이	Age	14Y	Sex	CM	Breed	Papillon
Assessment	 <ul style="list-style-type: none"> - Left fore limb paw mass - Fine needle aspiration (FNA) <ul style="list-style-type: none"> : Staining of many granules, uniform small nuclei : Basophilic intracytoplasmic granules : Atypic cells, moderately pleomorphic - X-ray, Lt. front paw 3rd & 4th interdigital space 						
Diagnosis	Mast cell tumor (grade 2, high grade)						
Treatment	Chemotherapy (Tocernib, Vinblastine, PDS) Intralesional injection (Triamcinolone)						

Code No.25							
Name	보노	Age	14Y	Sex	CM	Breed	Cocker spaniel
Assessment	 <ul style="list-style-type: none"> - Nasal discharge, epistaxis (Left side), Left eye (OS) discharge - Computed tomography <ul style="list-style-type: none"> : Left nasal cavity, mineralized soft tissue amss & fluid attenuated materials, bone lysis - Histopathology <ul style="list-style-type: none"> : Papillary frond lining cells, anisokaryosis, pleomorphism : Mitotic figure 3/10 HPF --> low grade adenocarcinoma (Papillary type) 						
Diagnosis	Nasal cavity adenocarcinoma						
Treatment	Chemotherapy (Carboplatin)						

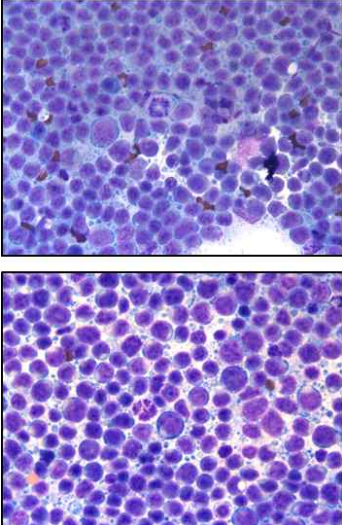


Code No.26							
Name	하루	Age	7Y	Sex	SF	Breed	Mixed
Assessment							
	<ul style="list-style-type: none"> - Seizure - MRI <ul style="list-style-type: none"> : Right nasal cavity, T2 Hyperintense, T1 isointense : T1 post hyperintense, Right nasal cavity tumor - Rhinoscopy <ul style="list-style-type: none"> : Tumor, angiogenesis - Histopathology <ul style="list-style-type: none"> : Mucous layer gland & epithelial cell neoplasia : Nasal carcinoma 						
Diagnosis	Nasal cavity carcinoma						
Treatment	Chemotherapy (Carboplatin)						

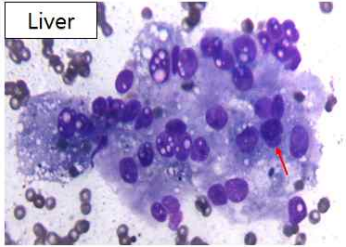

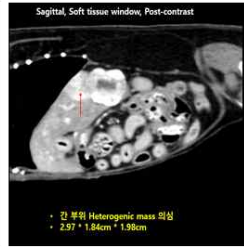
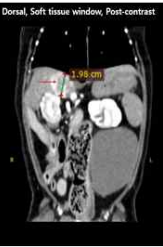
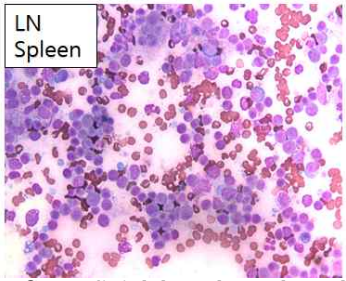
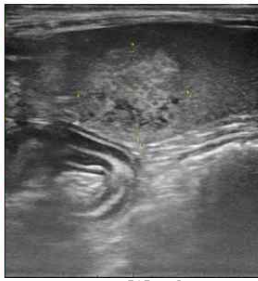
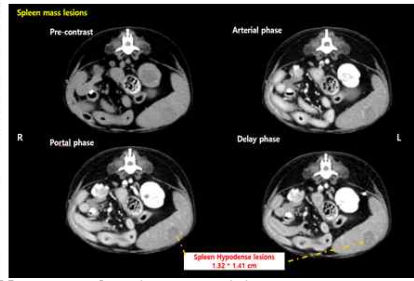
Code No.27							
Name	버블	Age	14Y	Sex	SF	Breed	Jack Russel Terrier
Assessment							
	<ul style="list-style-type: none"> - Superficial lymph node enlargement, Dyspnea, Weakness - Fine needle aspiration (lymph node) <ul style="list-style-type: none"> : Immature, neoplastic lymphocytes (Intermediated and large lymphocyte) : Prominent nucleoli are nuclei from lysed cells - Ultrasonography, Hepatic, Splenic metastasis (honey comb) 						
Diagnosis	Multicentric lymphoma (Grade IV)						
Treatment	CHOP: Cyclophosphamide, Oncovin, and prednisone based chemotherapy protocol						

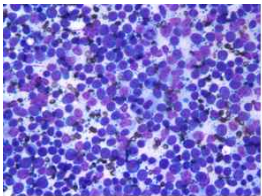



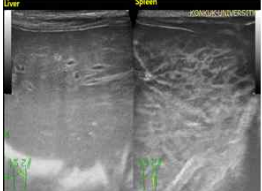


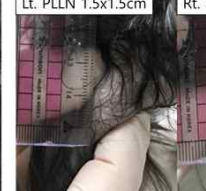

Code No.28

Name	양꼬	Age	14Y	Sex		SF		Breed	Coton de Tulear
Assessment									
									
	<ul style="list-style-type: none"> - Superficial lymph node enlargement, Weakness - Fine needle aspiration (lymph node) <ul style="list-style-type: none"> : Intermediate to large lymphocytes : Eccentric placement of nuclei - Ultrasonography, Hepatic, Splenic metastasis (honey comb) 								
Diagnosis	Multicentric lymphoma (Grade IV)								
Treatment	Chemotherapy (CHOP) CHOP: Cyclophosphamide, Oncovin, and prednisone based chemotherapy protocol								

Code No.29

Name	우깡	Age	16Y	Sex	CM	Breed	Shih tzu
Assessment							
	<ul style="list-style-type: none"> - Superficial lymph node enlargement, Diarrhea, Anorexia, Lethargy - Fine needle aspiration (lymph node) <ul style="list-style-type: none"> : Intermediate to large lymphocytes : Mitotic figure - Ultrasonography, Splenic metastasis (honey comb) 						
Diagnosis	Multicentric lymphoma (Grade V)						
Treatment	Chemotherapy (CHOP)						
	CHOP: Cyclophosphamide, Oncovin, and prednisone based chemotherapy protocol						

Code No.30							
Name	짜루	Age	12Y	Sex	SF	Breed	Shih tzu
Assessment	Liver						
	LN Spleen						
	<ul style="list-style-type: none"> - Superficial lymph node enlargement, Weakness, Hematochezia, vomiting - Fine needle aspiration (lymph node) <ul style="list-style-type: none"> : Lymphocyte, nuclear pleomorphisma, cytoplasmic tailing : Atypical change small lymphocytes, medium-size lymphocyte - Ultrasonography & Computed tomography <ul style="list-style-type: none"> : Hepatocellular carcinoma, Mammary gland tumor 						
Diagnosis	Multicentric lymphoma (Grade IV-V), Hepatocellular carcinoma, Mammary gland tumor						
Treatment	Interferon-alpha						

Code No.31							
Name	까미	Age	12Y	Sex	SF	Breed	Schnauzer
Assessment							
							
	<ul style="list-style-type: none"> - Superficial lymph node enlargement, Coughing - Fine needle aspiration (lymph node) <ul style="list-style-type: none"> : Medium to large lymphocytes increased : Numerous mitotic figures, prominent, multiple nucleoli - Ultrasonography <ul style="list-style-type: none"> : Liver, Spleen metastasis (honey comb sign) 						
Diagnosis	Multicentric lymphoma (Grade IV-V)						
Treatment	Chemotherapy (CHOP) CHOP: Cyclophosphamide, Oncovin, and prednisone based chemotherapy protocol						

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 1차년도 목표

- (1) dTERT 플라스미드 (pGX1414) 제작 및 생산
: SynCon 기술을 이용한 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 제작 및 VGXi에서 플라스미드 생산하여 무환수입을 통해서 국내로 운송
- (2) 세포면역원성 (INF- γ) 측정 및 Epitope 분석
: 세포면역원성 (INF- γ) 측정을 통한 투여 주기 및 횟수를 결정하였으며, 1차년도 연구결과 보고서 작성
- (3) 반려견 암조직 또는 혈액 샘플에서 dTERT 발현량 측정
: dTERT 단백질 발현량 측정을 위해서 dog specific TERT 항체를 제작하고 있으며, 분자적 수준에서의 dTERT 발현량 측정을 위해서 real-time PCR에 필요한 프라이머 제작과 검증이 완료된 상태이며, dTERT 발현량 측정은 2차년도에 완료
- (4) dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여 전과 후에 혈액을 채취하여 안전성 데이터 확보
: 안전성 평가 및 결과서 작성
- (5) 반려견 암조직 또는 혈액 샘플 확보
: 10두의 암 확정 반려견의 조직 샘플 확보

나. 2차년도 목표

- (6) 환축 모집 및 dTERT 플라스미드 투여 방법 도출 (투여 주기, 횟수)
: 건국대학교 동물병원 및 2차 동물병원 2곳에서 환축 모집 진행하여 투여군 20마리, 대조군 11마리 확보하여 1차년도 연구 결과를 바탕으로 2주 간격 4회 투여로 투여주기와 횟수 결정
- (7) 환축 대상 dTERT 플라스미드(pGX1414)투여 및 세포 면역원성 분석
: 선정된 환축에 pGX1414를 전기천공법으로 2주간격으로 4회 투여한 후, 1차년도에서 확립한 ELISpot Assay 방법으로 세포면역원성 분석
- (8) 환축 대상 dTERT 플라스미드(pGX1414)투여 전과 후에 혈액을 채취하여 안전성 데이터 확보 및 생존율 조사
: 환축대상으로 약물 투여부위 부작용 및 혈액검사, 혈청화학검사, 뇨검사를 평가표를 통해 평가
- (9) 각종 반려견 암 조직 혹은 혈액에서 분자 또는 단백질 수준에서의 dTERT 발현량 측정

: 1차년도에 확보한 암조직들에서 단백질 수준에서의 TERT 발현율을 확인하기 위해 dog TERT 항체를 제작하여 발현을 확인하였고, Real-time PCR을 이용한 분자적 수준에서의 dTERT 발현량 측정 진행

(10) 비임상시험에 필요한 설치류 비임상 독성 데이터 확보

: 설치류 대상으로 100X 고용량 dTERT 투여 후 사망률, 임상적 관찰, 체중 변화 및 혈액학적 분석 실시

3-2. 목표 달성여부

가. 성과 목표에 대한 자체 평가

성과목표	자 체 평 가
1. SynCon 기술을 이용한 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 제작 및 생산	기존 계획에 맞추어 SynCon 기술을 이용하여 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 제작하여 VGXi 공장에서 생산하였음 (100% 실시)
2. 세포면역원성(INF- γ) 분석을 통한 Epitope, 투여주기 및 투여횟수 결정	기존 계획에 맞추어 ELISpot assay 방법을 구축하여, 세포면역원성(INF- γ) 분석을 시행하였음 (100% 실시)
3. 각종 반려견 암 조직 혹은 혈액에서 분자 또는 단백질 수준에서의 dTERT 발현량 측정	1차년도에 90% 실시되었던 부분을 2차년도 9번 목표에서 실시함
4. dTERT 플라스미드(pGX1414)투여 및 혈액 분석을 통한 안전성 데이터 확보	기존 계획에 맞추어 dTERT 플라스미드 (pGX1414) 투여 및 혈액 채취가 실시됨 (100% 실시) 이에 정해진 평가표에 근거하여 안전성 데이터를 확보함 (100% 실시)
5. 반려견 암조직 또는 혈액 샘플 확보	조직 진단을 통하여, carcinoma로 확진된 반려동물 10두의 조직 샘플 확보 (100% 실시)
6. 환축 모집 및 dTERT 플라스미드 투여 방법 도출 (투여 주기, 횟수)	투여군 20마리, 대조군 11마리 환축을 모집하여 1차년도 연구 결과를 바탕으로 2주 간격 4회 투여로 투여주기와 횟수 결정함 (100% 실시)
7. 환축 대상 dTERT 플라스미드 (pGX1414)투여 및 세포면역원성 분석	선정된 환축에 pGX1414를 전기천공법으로 2주간격으로 4회 투여한 후, ELISpot Assay로 세포면역원성 분석함(100% 실시)
8. 환축 대상 dTERT 플라스미드 (pGX1414)투여 전과 후에 혈액을 채취하여 안전성 데이터 확보 및 생존율 조사	환축대상으로 약물 투여부위 부작용 및 혈액검사, 혈청화학 검사, 뇨검사를 평가표를 통해 평가해 안전성 데이터 확보 및 생존율 조사 (100% 실시)
9. 각종 반려견 암 조직 혹은 혈액에서 분자 또는 단백질 수준에서의 dTERT 발현량 측정	상용 항체는 dTERT 단백질 발현을 확인하기가 어려워 dTERT 전용 항체를 제작하여 시험을 진행하였고, Real-time PCR로 분자적 수준에서의 발현량도 측정함 (100% 실시)
10. 비임상시험에 필요한 설치류 비임상 독성 데이터 확보	설치류 대상으로 100X 고용량 dTERT 투여 후 사망률, 임상적 관찰, 체중 변화 및 혈액학적 분석 실시함 (100% 실시)

나. 정량적 지표에 따른 목표 및 실적표

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 진 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치								20	40					10	10	10			10	
최종목표								2	1000		1			2	2	2			2	
1 차 년 도	목 표							1	1000						1	1			1	
	실 적							3	635					1	2	1			1	
2 차 년 도	목 표							1			1			2	1	1			1	
	실 적								1780										2	
소 계	목 표							2	1000		1			2	2	2			2	
	실 적							3	2415					1	2	1			3	
종료 1차년도		1				1				1										
종료 2차년도		1					6000	6000												
종료 3차년도							1800 0	1800 0												
종료 4차년도																				
종료 5차년도																				
소 계	1	1				1	2400 0	2400 0		1										
합 계	1	1				1	240 00	240 00	2	1000	1	1		2	2	2			2	

다. 연구성과

(1) 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	대한수의학회 2017 추계국제학술대회	양주성	2017.10.26-27	전라남도 여수 디오션리조트	반려동물에서의 항암면역 치료제 동향

(2) 전문연구 인력양성

No 1	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1		2017			√			√	√					

(3) 사업화 투자실적

No	추가 R&D 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자자금 성격
1			유상증자(2017.07)	635,000 천원	투자유치
2			유상증자(2018.03)	1,430,000 천원	투자유치
3			유상증자(2018.03)	350,000 천원	투자유치

(4) 고용 창출

No	고용형태	고용년도	고용인원	고용창출내용
1	정규직	2017	3	연구 업무 수행을 위한 신규 인력 고용

(5) 교육지도

No	고용형태	교육년도	교육인원	교육내용
1	이공계 전문기술연수사업 바이오인턴십 13기	2017	2	플라스미드 DNA 백신 개발에 필요한 전반적인 이론 숙지 및 실습

(6) 기타: 연구개발 협력 성과 (계약체결)

No	계약대상	계약내용
1	APIAM사 (호주)	동물용의약품 라이프타이드(LifeTide® SW5) 독점판매계약 체결, 반려견 항암 면역치료제 우선협상을 통해 호주 및 뉴질랜드 반려동물시장 진출 대비 공동개발
2	(주)더쥬	반려견 항암 면역치료제 국내임상 CRO 계약
3	Wistar (미국)	DNA 플라스미드 기술을 이용한 동물용의약품 공동개발 (반려견 항암 면역치료제 등)

- (주) 플럼라인생명과학 & 호주 APIAM사 독점판매계약

- (주) 플럼라인생명과학 & (주) 더쥬: 반려견 항암 면역치료제 국내임상 CRO 계약

- (주) 플럼라인생명과학 & 미국 Wistar 연구소 공동연구 활동

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

연구 성과 목표를 연구 내용 항목으로 평가해 보면 100% 실시해서 결과를 확인하였기에 목표 미달성 항목에 해당사항이 없다. 하지만, 정량적 지표에 따른 목표로 보면 미달성 항목이 2개이고 초과달성 항목이 3개로 나타난다. 미달성 항목은 학술발표 1건과 인력양성 1명이다. 연구 내용상 1차년도 실험 목적동물의 안전성 및 면역원성 결과를 발표하는 것은 큰 의미가 없어 2차년도 결과가 마무리 되어야 공개 발표를 할 수 있는 데이터를 확보할 수 있다고 생각한다. 과제 종료 후, 건국대학교 박희명교수님의 학술 발표가 예정이 되어 있어 종료 후 1년 이내에 목표는 달성될 수 있을 것이다. 인력양성 또한 과제에 참여하고 있는 박사과정 학생의 졸업이 진행된다면 달성될 수 있는 항목이다.

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 연구 결과의 활용 계획

플라스미드 DNA 백신 기술을 이용한 반려견 항암 면역치료제 개발을 위해 1차년도에 실험동물에서 안전성과 면역원성을 검증한 프로토콜로 2차년도에는 환축을 이용하여 고형암 및 Lymphoma에서의 안전성과 면역원성을 검증하여 임상시험계획을 위한 비임상자료를 확보하였다. 이 자료들을 향후 임상시험계획 승인을 위한 자료들로 활용할 예정이다.

과제 종료 후 임상시험계획서를 제출하기 위해 국내임상CRO와 계약도 맺었으나, 동물용의약품의 category가 세분화 되면서 국내에서 물질생산에 관한 CMC 자료를 확보할 수 없게 되었다. 1차년도에 미국에서 생산한 시료를 무환수입 승인을 받아 국내에 들여와 이 과제를 진행해 왔으나, 2018년 2월 22일에 품목이 세분화 되어 기존의 생산시설에서는 국내 임상을 위한 물질을

당장 생산할 수 없어 여러 방안을 모색 중이다. 한 가지는 해외에서 임상시험을 진행해서 수입 품목허가를 받는 방법이고 두 번째는 국내에서 품목허가를 받을 생산업체와의 파트너십, 또 하나는 자체 생산시설 확보가 있을 수 있다.

(1) 생산 계획

(주)플러플라인생명과학은 플라스미드 DNA를 대량 생산할 수 있는 자체 생산시설을 보유하고 있지 않다. SynCon-dTERT (pGX1414) 개발 및 상업화를 위한 플라스미드 대량생산은 cGMP 생산시설이 구축된 플라스미드 DNA 업체를 선정하여 위탁생산할 계획을 가지고 있다. 해외 위탁 생산업체로는 2016년 11월 농림축산검역본부로부터 플라스미드 DNA 생산 능력에 대한 실사 검증을 받은 미국 텍사스주 휴스턴 소재 VGXi를 고려하고 있다.

국내 생산을 위해서는 위탁 생산을 국내 업체를 통해 진행하고자 했으나, 2018년 동물용의약품 등 안전성·유효성 심사에 관한 규정이 2018년 2월 22일에 개정이 되어 농림축산검역본부 고시 제2018-5호로 고지되었다. 이에 생물학적제제가 4개의 새로운 품목(생물학적제제, 세포치료제, 유전자치료제, 유전자재조합의약품, 세포배양의약품)으로 나뉘게 되어 유전자치료제 항목으로 품목허가를 받은 기관에서만 위탁 생산이 가능하다. 하지만, 현재 국내에서는 유전자치료제로 품목허가를 받은 생산업체가 없기에 위탁 생산 자체가 불가능하다는 현실적인 어려움이 있다. 원료물질을 수입해서 사용할 수 있다는 조항이 법령에는 기재되어 있으나 시행된 적이 없는 법률안은 있어 이에 따른 해석을 관련 기관과 상의해 풀어야 할 현안이 되었다.

(2) 투자 유치 계획

현재의 연구 과제를 수행이후에도 (주)플러플라인생명과학은 제품을 안정적이며 지속적으로 개발상용화하기 위해서 충분한 자금 확보가 필요해, 2017년도 6억3500원과 2018년도 17억8000원의 투자를 유치했다. 코넥스 시장에서 코스닥 시장으로의 IPO를 통해서 지속적인 연구 개발, 상용화를 위한 자금을 확보할 계획으로 진행하고 있다.

(주)플러플라인생명과학은 향후 제품의 판매량의 증가에 따라서 플라스미드 DNA 위탁생산보다 자체 공장가동이 생산원가를 절감할 수 있다고 판단되는 시점에서는 생산시설을 국내에 건설하여 고용 창출을 통해서 국가 경제에 이바지할 확고한 목표는 가지고 있으나, 회사의 규모와 현재 제품의 개발 단계에서는 구체적으로 생산시설에 대한 투자 유치를 설정하기에는 다소 무리가 있다고 판단된다. 하지만, 2018년 2월 22일 개정된 고시안에 의해 국내에 위탁생산 시설을 사용할 수가 없다는 점에서 새로운 사업화 전략이 필요한 시점이라고 생각해서 다각적인 방향으로 생산시설에 대한 논의는 진행되고 있고 이에 따른 투자유치 계획도 병행될 것으로 생각된다.

(3) 사업화 전략

국내에서는 2021년 농림축산검역본부 승인을 목표로 2019년에 임상시험을 진행하고자 하며, 국

내 항암제 판매처로는 더 줌(The Zoom)과 국내 사업화를 진행하고자 한다. 더 줌은 현재 20개 대형병원을 확보하고 있으며 2021년까지는 100여개로 확대할 예정인 반려동물 전문 프랜차이즈 병원 기업으로, 판매 승인 후 3년간 독점판매권을 부여할 계획이다. 국내 승인 직후 미국 임상 및 라이선싱 아웃 계약을 추진하면 2022년부터 매출이 발생될 것으로 예상하고 있다. 미국은 반려견 B-Cell Lymphoma 치료 건수가 연간 20만 건에 이르러 연간 항암치료시장이 7천 억 원에서 2조 원에 이른다. McKinsey 보고서의 신약의 연도별 평균 시장점유율 적용해 2022년도에 미국 시장의 4.4 % 점유 목표로 산정하면 132억 원의 매출이 발생할 것으로 예측되어 진다.

반려견 항암치료제의 상용화를 위해 라이선스를 통한 판권 계약 방식으로도 진행이 가능하다.

2018년 6월 호주 APIAM에 라이프타이드를 독점판매계약을 수주하면서 향후 반려견 암치료제가 개발될 것으로 전망해 이에 관한 항목도 함께 추가해서 진행했다. 향후 국가별 라이선스 전략으로 사업화를 진행하고자 한다.

(4) 사업화를 위한 비즈니스 모델

국내·외 반려동물 시장은 지속적인 성장 추세에 있고 국외 시장은 내수 시장에 비해 100배 이상의 수요가 있다. 하지만, 개발된 반려동물의 항암제는 아직 1~2개에 불과하고 그 효과도 미미하여 여전히 인체 의약품의 용량을 줄여서 사용하는 것이 현실적이다. 비용적으로도 부담이 되고 부작용 또한 심해서 적극적인 치료를 받지 못하는 안타까운 상황에 반려견의 유전자를 이용하여 부작용이 없는 면역항암제가 개발이 된다면 동물복지를 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 황무지인 반려동물 항암제 의약품 시장에 큰 선택제가 될 수 있을 것이다. 면역조절제인 라이프타이드의 허가로, 관련 허가 기준이 마련되어 있는 호주와 뉴질랜드에서부터 반려견 항암제 시장을 먼저 점유하고 이 후 전 세계적으로 점유율을 넓혀가는 방법이 벤처인 (주)플럼라인생명과학이 가진 세계적인 기술을 전 세계에 있는 환견들에게 좋은 의료혜택이 전해질 수 있게 하는 가장 빠른 방법이 될 것으로 사료된다. 투자유치에 따른 여러 여건들을 충분히 고려한 최선의 비즈니스 모델로 반려견 항암제의 성공적인 개발과 판매가 이루어진다면 국가 이익에도 기여할 수 있을 것이다.

나. 후속 연계 연구의 필요성

본 연구 과제로 암 환축을 대상으로 다양한 데이터를 확보하게 되었다는 점에서 큰 의의가 있다고 하겠다. 환축에서는 세포면역성이 나타나는 시기가 개체별로 달라 TERT의 진단법과 병행해서 환축의 선별에 대한 기준을 잡는 후속 연계 연구를 해 보면 훨씬 유의미한 자료를 확보할 수 있어 TERT 발현 진단용 KIT로도 개발할 수 있는 가능성이 있다.

또한 허가당국의 법령 개정으로 (주)플럼라인생명과학의 개발 전략에 따라 임상시험 시행국과 시료 생산국 등이 정해지는 동안 TERT 단독 투여가 아닌 면역관문조절제나 dMab 과의 병용 투여에 대한 연구가 진행될 수 있다면 후속 연구 및 임상시험 결과에 대해 좀 더 확실한 대안을 확보할 수 있을 것이라 생각된다.

붙임. 참고문헌

1. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994; 266:2011-5
2. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33:787-91.
3. Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett* 2003; 194:221-33.
4. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 1987; 51:887-98.
5. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990; 346:866-8.
6. Argyle DJ, Nasir L. Telomerase: a potential diagnostic and therapeutic tool in canine oncology. *Vet Pathol* 2003; 40:1-7.
7. Nasir L. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance in dogs. *Vet J* 2008; 175:155-163.
8. Nasir L, Devlin P, McKeivitt T, Rutteman G, Argyle DJ. Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues: a potential model system to study human telomere and telomerase biology. *Neoplasia* 2001; 3:351-359.
9. Yazawa M, Okuda M, Setoguchi A, Iwabuchi S, Nishimura R, Sasaki N, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Telomere length and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Am J Vet Res* 2001; 62:1539-1543.
10. Yazawa M, Okuda M, Setoguchi A, Nishimura R, Sasaki N, Hasegawa A, Watari T, Tsujimoto H. Measurement of telomerase activity in dog tumors. *J Vet Med Sci* 1999; 61:1125-1129.
11. Li Y, Tergaonkar V. Noncanonical functions of telomerase: implications in telomerase-targeted cancer therapies. *Cancer Res*. 2014; 74:1639-44.
12. Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:828-39.
13. Masutomi K, Kaneko S, Yasukawa M, Arai K, Murakami S, Kobayashi K. Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2002; 21:5946-50.

14. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:167-79.
15. Beatty GL, Vonderheide RH. Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2008; 7:881-7.
16. Shaw VE, Naisbitt DJ, Costello E, Greenhalf W, Park BK, Neoptolemos JP, Middleton GW. Current status of GV1001 and other telomerase vaccination strategies in the treatment of cancer. *Expert Rev Vaccines* 2010; 9:1007-16.
17. Draghia-Akli R, Khan AS, Pope MA, Brown PA. Innovative electroporation for therapeutic and vaccination applications. *Gene Therapy and Molecular Biology* 2005; 9:329-38.
18. Khan AS, Pope MA, Draghia-Akli R. Highly Efficient Constant Current Electroporation Increases In vivo Plasmid Expression. *DNA Cell Biol.* 2005; Dec;24(12):810-8.
19. Prud'homme GJ, Glinka Y, Khan AS, Draghia-Akli R. Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. *Curr Gene Ther.* 2006; Apr;6(2):243-73.
20. Diehl MC, Lee JC, Daniels SE, Tebas P, Khan AS, Giffear M, Sardesai NY, Bagarazzi ML. Tolerability of intramuscular and intradermal delivery by CELLECTRA(®) adaptive constant current electroporation device in healthy volunteers. *Hum Vaccin Immunother.* 2013; Oct;9(10):2246-52.
21. Zanetti M. A second chance for telomerase reverse transcriptase in anticancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017; Feb;14(2):115-128