8180
1302

개고
발양
을이

위코
한로
나
바바
이이
러러
스스

특감
이염
항제
체어
기
개술
발

2020

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( )발간등록번호(O)

농식품연구성과후속지원사업 2020년도 최종보고서

발 간 등 록 번 호
11-1543000-003267-01

고양이 코로나바이러스 감염제어기술 개발을 위한 바이러스 특이항체 개발

2020. 9. 4.

주관연구기관 / 포스트바이오(주)
협동연구기관 / ㈜노터스
위탁연구기관 / ㈜노터스

농 림 축 산 식 품 부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과후속지원사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과후속지원사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "고양이 코로나바이러스 감염제어기술 개발을 위한 특이항체 개발" (개발기간 : 2018. 4. ~ 2020. 3.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 6. 12.

주관연구기관명 : 포스트바이오 천두성 (인)

협동연구기관명 : 노터스 김도형 (인)

참여기관명 : 노터스 김도형 (인)

주관연구책임자 : 천두성
협동연구책임자 : 김도형
참여기관책임자 : 김도형

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

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	81801302	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.4.1 ~2020.3.31	단 계 구 분	(2차년도)/ (2차년도)
연 구 사 업 명	단 위 사 업	농림축산식품연구개발사업			
	사 업 명	농식품연구성과후속지원사업			
연 구 과 제 명	대 과 제 명				
	세부 과제명	고양이 코로나바이러스 감염제어기술 개발을 위한 바이러스 특이항체 개발			
연 구 책 임 자	천 두 성	해당단계 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 4 명 외부: 2 명	해당단계 연구개발비	정부:175,000천원 민간: 58,332천원 계: 233,332천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 4 명 외부: 2 명	총 연구개발비	정부:175,000천원 민간: 58,332천원 계: 233,332천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	포스트바이오			참여기업명 포스트바이오 노터스	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위 탁 연 구	연구기관명: 노터스			연구책임자: 김도형	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

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

<요약문>

연구의 목적 및 내용	□ **고양이 코로나바이러스 특이항체 확보를 통한 감염제어기술 확보** • 국내유행 고양이 코로나바이러스 분석 및 표적항원확보 : 891건의 임상시료와 분리주확보 • 감염제어기술을 위한 바이러스 특이 항체제작 : 11종의 바이러스특이 단클론항체개발 • 코로나바이러스 특이 단클론항체를 이용한 항원진단키트구성 : 항원검출 ELISA 세팅 • 고양이코로나바이러스 특이항체에 대한 임상평가를 통한 유효성검증				
연구개발성과	□ 임상시료확보 및 진단결과 (유행양상파악) • 고양이 위장관염 진단 의뢰된 1928건의 분변검체 중 891건(47.2%)에서 고양이 코로나바이러스 검출 • 고양이 전염성 복막염 진단 의뢰된 118건의 체액샘플 중 44건(37.3%)에서 검출한계 이상의 고양이 코로나바이러스 검출 • 고양이 전염성 복막염진단을 위한 진단법을 개선하여 검출률을 2배이상 향상시킴 (45.7%→95.7%) □ 코로나바이러스 유전자염기서열분석 및 면역항원확보 • 장염 코로나바이러스 30여건 와 고양이 전염성 복막염 양성시료 10여건 총 40여건에 대한 염기서열분석 • 고양이 코로나바이러스 유전자 중 4개 부위(Spike, Matrix, Nucleocapsid, ORF7ab)에 대한 유전자분석을 수행 • 고양이 코로나바이러스 에 친화성이 있는 세포주를 이용하여 고양이 전염성 복막염 케이스로부터 바이러스를 분리 • 초원심분리 등을 통해 고양이 코로나바이러스를 정제하고 불활화 과정을 거쳐 동물의 면역원으로 사용할 항원확보 □ 고양이 코로나바이러스 특이항체제조 및 임상평가를 통한 유효성검증 • 고양이 코로나바이러스 항원을 면역한 면역된 마우스를 이용하여 단크론항체를 제작하였으며 바이러스항원에 특이적으로 반응하는 11개의 단클론 항체 생산 세포주 확보 • 11종의 단클론항체(개발) 및 추가 10여종의 단클론항체 (상용)을 이용하여 5개의 진단용 페어를 확보 • 최종 코로나바이러스 항원 진단법에 대해 고양이 코로나바이러스 양성검체의 진단 성능을 평가한 결과 Ct 25 미만의 검체 62개중 55개에서 양성을 확인 (민감도 88.7%) • 4차례에 걸친 산란계 면역 후 난황항체 정제를 위한 난황확보한 후 IgY 순수정제를 통해 난황항체를 정제, 1:64이상의 중화항체가를 보이는 난황항체를 확보 • 고양이 코로나바이러스 난황항체 급이한 감염모델군에서 대조군에 비해 바이러스 분비량이 11.8% 수준으로 감소 (31 dpi, 10.9 $TCID_{50}$/ml vs 92.5 $TCID_{50}$/ml)				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	□ 고양이 임상분야 활용 • 고양이 임상에서 임상적인 중요성이 높은 코로나바이러스 감염을 원천적으로 감소시키기 위한 의약품 또는 기능성 식품의 경우 고양이를 진료하는 수의사 그리고 고양이를 기르는 보호자의 가장 큰 관심분야로 제품화될 경우 독점적인 시장성을 확보할 수 있음. □ 반려동물 건강기능식품시장에 적용 • 최근 반려동물의 노령화와 핵가족화로 인해 반려동물의 사육두수가 증가하고 이와 더불어 고양이사육에 대한 기호성의 증가로 고양이관련 헬스케어 시장은 평균적인 반려동물 관련 시장의 성장세에 비해 매우 높은 수준으로 확대될 것으로 예상되어 고양이 코로나바이러스의 항바이러스 기능성 식품군 시장은 매우 시장성이 큰 분야로 예상됨.				
국문핵심어 (5개 이내)	고양이	코로나바이러스	단클론항체	난황항체	고양이 전염성복막염
영문핵심어 (5개 이내)	Cat	Coronavirus	Monoclonal antibody	IgY	FIP

<본문목차>

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ····· 8
2. 연구수행 내용 및 결과 ····· 12
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 36
4. 연구결과의 활용 계획 등 ····· 38
붙임. 참고 문헌 ····· 40

<별첨 1> 연구개발보고서 초록
<별첨 2> 자체평가의견서
<별첨 3> 연구성과 활용계획서

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

고양이에서 임상적으로 가장 치명적인 문제를 유발하는 코로나바이러스를 대상으로 야외에서 유행하는 다양한 코로나바이러스에 대한 항체 (단클론항체/난황항체)를 개발하여 신속하고 정확한 면역진단법과 수동면역을 위한 치료항체를 확보하므로서 고양이코로나바이러스 감염을 제어하기 위한 근본적인 기술을 개발함.

2절. 연구개발의 필요성

1. 고양이 전염성 복막염의 임상적인 중요성

- 고양이 전염성 복막염 (Feline Infectious Peritonitis; FIP)은 고양이에서 사형선고와 같은 질병으로 FIP 진단을 받게 되면 거의 치료를 포기하는 임상적인 예후가 매우 좋지 않은 질환군이다.
- 현재까지 알려진 바에 의하면 FIP는 고양이가 장코로나바이러스에 감염된 후 만성으로 감염이 경과하고 이러한 경과중 장코로나바이러스가 항체와 결합하여 백혈구에 탐식되고 백혈구에 탐식된 코로나바이러스가 유전자의 변이를 일으켜 장에서 증식하는 바이러스의 조직친화성이 다른 실질장기에서 증식이 가능한 형태로 조직의 친화성 (Tropism)이 변화하여 발생한다.
- FIP로 질병이 진전되면 다양한 실질장기에서 대식세포, 다핵의 호중구 등이 염증에 관여하여 화농을 동반한 육아종성 염증을 일으키면서 복강이나 흉강내에 체액이 저류되거나 (wet form FIP) 신장, 임파절, 뇌, 간장 등 실질장기에 매스를 형성하지만 체액의 저류를 관찰할 수 없는 형태의 dry form의 FIP로 진전되게 되는데 이러한 경우 치료가 어려워 치사율이 거의 100%에 이르는 것으로 보고되어 있다.
- 이러한 FIP의 임상적인 중요성이 높은 이유로 FIP로 진전된 이후에는 적절한 치료를 수행하기 곤란하므로 장코로나바이러스의 감염을 원천적으로 예방하거나 만성감염시 바이러스의 지속적인 증식을 억제해주는 것이 FIP로 진행되는 중간의 과정을 차단하는 좋은 수단으로서 작용할 수 있다.
- 본 연구는 돼지나 소, 반려견 등에서 실용화한 경험이 있는 항코로나바이러스에 대한 난황항체를 기능성 식품화하여 어린 연령의 반려동물에 공급하므로서 감염이 발생할 수 있는 시점에 수동면역을 강화하여 고양이 코로나바이러스 감염에 대한 확률을 낮추어 줌으로써 결과적으로 고양이 코로나바이러스의 만성감염에 대한 발생빈도를 낮추어 FIP로 진

행되는 빈도를 낮추어 고양이의 치명적인 질환인 FIP로 진행하는 것을 예방하기 위한 중요한 실용화연구로 판단된다.

2. 예방백신은 상용화되었으나 백신의 유용성이 낮음

- 현재 고양이 전염성 복막염에 대한 백신은 한국화이자에서 개발하여 시판중인 프리뮤셀이라는 생독백신이 유일하다.
- 하지만 고양이 코로나바이러스 감염증은 항원항체반응의 대표적인 부작용인 antibody dependent enhancement 반응에 의해 어린 연령에 백신을 하여 생긴 항체로 인해 백신 부작용으로 인한 치사률을 높이는 것으로 알려져 있음.
- 따라서 본 예방접종의 적절한 접종시기는 반려묘의 코로나바이러스에 대한 모체이행항체가 소실되는 16주령 이후 야외감염이 발생하지 않아 반려묘에서 코로나바이이러스 항체가 검출되지 않는 경우로 한정되어 있음.
- 하지만 고양이에서 장코로나바이러스 감염은 매우 흔하고 매우 어린 연령부터 장코로나바이러스 감염에 노출되어 백신의 유효한 접종시기인 16주 이전에 감염되어 만성감염으로 진행되거나 급성감염으로 바이러스가 제거되었다고 하더라고 야외감염으로 인한 항체가 형성되어 있는 관계로 백신을 접종할 수 없어 실제로 백신의 임상적인 유용성이 매우 낮은 것으로 알려져 있음.
- 이러한 이유로 고양이 감염증 중 칼리시바이러스, 범백혈구감소증 바이러스, 허피스바이러스 등은 예방접종에 의한 효과를 기대할 수 있지만 고양이 코로나바이러스는 예방접종에 대한 예방효과를 기대하기 어려워 수동면역의 강화 등 감염을 예방할 수 있는 다른 수단이 매우 필요함.

3. 고양이 관련 기능성 식품의 시장확대

- 향후 반려동물 시장에서의 주요한 트렌드는 고양이의 사육규모에 대한 증가율이 가파르게 증가하는 추세이며 미래에는 고양이와 강아지가 비슷한 비율로 사육될 것임.
- 현재 국내에서 고양이를 사육하는 인구수는 전체인구의 약 4%, 강아지는 약 15%로 이러한 추세를 반영하면 고양이의 사육규모는 기본적으로 시장의 확대규모를 반영하면 현재보다 400%이상 성장할 가능성이 있는 것으로 추정됨.
- 본 연구를 통해서 개발하려고 하는 제품은 고양이 코로나바이러스 감염을 치료하거나 FIP의 증상을 완하시키고자 하는 목적이 아닌 전체 고양이에서 코로나바이러스 감염에 대한 빈도를 낮추는데 그 목적이 있어 건강한 전체의 고양이를 적용대상으로 하여 사육규모의 증가와 비례하여 시장이 형성될 것으로 예상할 수 있음.

3절. 연구개발 범위

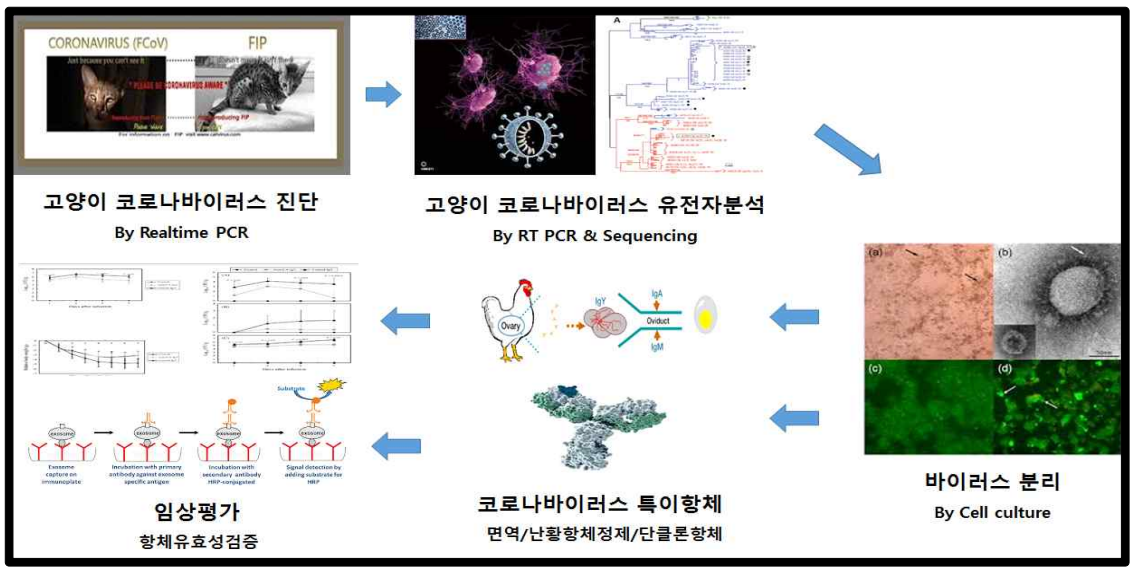
1. 연구개발의 주요내용

- 국내 유행 고양이 코로나바이러스에 대한 실태분석 및 임상경과별 바이러스 유전자분석
- 다양한 고양이 코로나바이러스 분리주 확보
- 코로나바이러스 단클론항체 제조
- 항 코로나바이러스 난황항체 제조
- 임상평가를 통한 유효성검증

2. 연구개발 개요

야외에서 유행하는 다양한 코로나바이러스에 대한 특이항체 (단클론항체 및 난황항체)를 개발하여 고양이코로나바이러스 감염의 신속정확한 면역진단법과 수동면역을 위한 치료항체를 확보하고 임상평가를 통한 유효성을 검증함.

[기술개발의 스킴]



3. 연구개발의 주요핵심요소

- 반려묘 감염병 진단기술 : 반려묘의 감염질환을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 기술로 특히 본 과제의 대상이 되는 코로나바이러스를 유전자레벨에서 진단하는 실시간 유전자 진단기술 (포스트바이오)
- 동물병원-진단센터네트워크 : 국내 유행하는 고양이 코로나바이러스를 충분히 확보하기 위해 일선 동물병원과 진단센터를 연결하는 유기적인 네트워크 (포스트바이오)
- 특이항체 생산기술 : 대상항원 (고양이코로나바이러스)로부터 양질의 특이항체를 생산하

고 정제하는 기술 (포스트바이오/노터스)

- 항바이러스 효능분석기술 : 생산된 항체를 이용하여 국내분리 고양이 코로나바이러스에 대한 중화능(항바이러스효능)을 분석하는 기술 (포스트바이오)
- 반려동물 전임상수행 노하우 : 항바이러스 식품을 반려동물에서 효능을 평가하는 기술로 설치류이외의 개나 고양이 등 반려동물에 대한 전임상, 임상 등 다양한 경험과 실적이 필요함 (노터스)

2장. 연구수행 내용 및 결과

1절 연구개발의 목표

- 국내유행 고양이 코로나바이러스 분석 및 면역을 위한 표적항원확보
- 감염제어기술을 위한 바이러스 특이 항체제작
- 코로나바이러스 특이 단클론항체를 이용한 항원진단키트구성
- 고양이코로나바이러스 특이항체에 대한 임상평가를 통한 유효성검증

2절 연구개발의 내용 및 결과

1. 코로나바이러스 양성시료 확보

- 팝애니랩에 검사의뢰되는 다양한 검체 중 고양이 위장관염 검체 (분변) 및 고양이 전염성복막염 (FIP) 의심검체를 대상으로 (주) 포스트바이오에서 제공되는 고양이 코로나바이러스 특이 프로브를 사용한 real time RT-qPCR 진단키트를 이용하여 코로나바이러스의 존재여부 및 바이러스의 양을 정량한다.
- 2018년 1월 1일부터 2019년 12월 31일까지 포스트바이오에서 운영중인 반려동물 수탁검사 서비스 (팝애니랩)로 의뢰된 고양이 검체 중 위장관염 검사로 의뢰된 1928건의 분변검체에 대해서 고양이 코로나바이러스의 존재여부를 확인하였으며 검사결과 1928건의 검체 중 891건인 46.2%의 검체에서 고양이 장코로나바이러스가 검출되었음.
- 연도별로 살펴보면 2018년에는 725건의 검체가 의뢰되어 360건에서 고양이 장코로나바이러스가 검출되어 약 49.7%의 검출율이 확인되었고 2019년에는 1203건의 위장관염 검체가 의뢰되어 이중 44.1%인 531건에서 고양이 코로나바이러스가 검출되었으며 검출되었으며 2018-19년 모두 가장 높은 빈도로 고양이 위장관염의 원인 병원체로 확인된 바 있음
- 2018년 1월부터 2019년 12월 사이 위장관염의뢰사례 중 장코로나바이러스 검출된 검체의 수량 및 양성률을 비교분석한 결과 일반적으로 바이러스성 질환이 겨울에 유행하고 세균성 질환이 여름에 유행하는 양상과는 다르게 연중 19.7%에서 69.3%로 시기적으로 양성률의 편차가 매우 크게 존재하였으나 이는 코로나바이러스유행의 계절적인 차이보다 의뢰된 개체에 따라 양성률추이가 변화하는 것으로 예상되며 일반적으로 계절적으로 겨울에 낮은 감염률을 보이는 것으로 확인되었다.

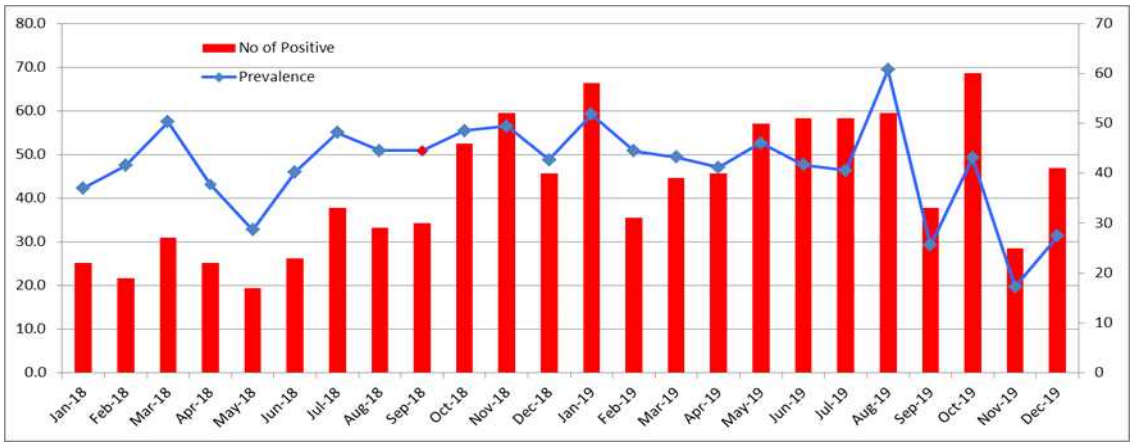


그림 1. 고양이 코로나바이러스감염에 의한 장염의 발생추이
(2018년 1월-2019년 12월, 팝애니랩 검사의뢰)

- 1차년도 연차실적보고에서 2018년 1월 1일부터 11월 30일까지 포스트바이오에서 운영 중인 반려동물 수탁검사 서비스 (팝애니랩)로 의뢰된 고양이 검체 중 고양이 전염성 복막염 (Feline Infectious Peritonitis; FIP) 검사로 의뢰된 43건의 체액(복수 또는 흉수 등)에 고양이 코로나바이러스의 존재여부를 확인하였으며 검사결과 43건의 검체 중 14건에서 고양이 코로나바이러스가 검출되었으며 검출된 코로나바이러스의 검출결과의 Ct의 평균값은 32.68로 확인되었다.
- 장코로나바이러스 검출된 양성시료와 전염성 복막염 양성시료에 대해서 Realtime RT PCR을 이용하여 상대적인 바이러스의 정량값을 비교한 결과 장코로나바이러스 감염증 양성케이스는 전염성 복막염에 비해서 36배 가량 바이러스의 역가가 낮은 것으로 확인되어 전염성 복막염의 경우 만성으로 염증이 진행되어 바이러스의 역가가 낮을 뿐 아니라 임상증상으로는 전염성 복막염이 의심되지만 코로나바이러스가 검출되지 않은 경우도 약 67.4%에 이르는 것으로 확인되었다.

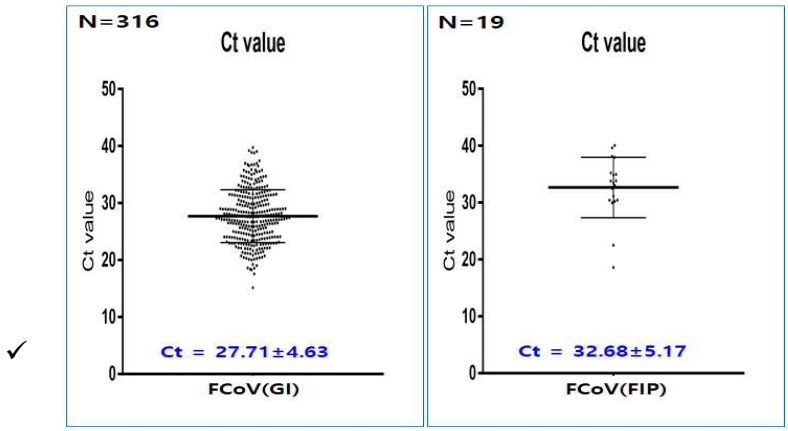


그림 2. 고양이 코로나바이러스 양성시료에 대한 바이러스 검출역가의 차이
(장코로나바이러스 vs FIP)

2. FIP 진단법의 감도개선 (새로운 FIP 바이러스 분자진단법의 개발 및 임상평가)

- 2018년 1월에서 2019년 12월까지 총 118건의 FIP 검사의뢰 케이스를 대상으로 검체 중 코로나바이러스의 유전자의 검출여부를 확인하는 시험을 진행하였다. 검사를 위해서는 장염코로나바이러스를 검출하기 위한 프라이머/프로브를 동일하게 사용하였으며 검사결과 118건의 의뢰검체 중 30건에서만 고양이코로나바이러스가 검출되어 약 25.4%의 검출률을 보이는 것으로 확인되었다.
- 일반적으로 임상적으로 FIP가 의심되는 경우 유전자검사를 통해 FIP의 확진여부를 결정하게 되는데 예상되는 양성결과에 비해 못미치는 양성률을 확인하므로서 장염코로나바이러스와는 다른 FIP를 민감하게 검출하기 위한 새로운 프라이머 및 프로브를 적용할 필요성이 대두되었다.
- 이에 따라서 코로나바이러스의 다른 유전자부위인 ORF7b 부위를 타겟으로 새로운 진단타겟을 설정하였으며 이를 기존의 FIP 검사의뢰된 검체에 적용하여 시험을 수행하였다.
- 2018년부터 2019년사이 FIP로 검사의뢰된 106건의 검체에 대해서 기존의 사용하던 검사법과 신규로 개발된 검사법을 비교평가한 결과 기존의 검사법의 경우 106건의 검체 중 21건이 양성으로 확인된 반면 신규검사법의 경우 44건의 검체에서 코로나바이러스가 검출되어 100%이상 향상된 검출효율을 가진 FIP 검사법을 세팅할 수 있었다. 검사결과 기존의 검사법의 경우 양쪽 중 한가지라도 코로나바이러스 양성인 46건에 대해서 21건 양성으로 45.7%의 민감도를 보이는데 반해 새로운 진단법의 경우 양성 46건에 대해서 44건 양성으로 95.7%의 민감도를 보여 매우 신뢰할 수 있는 진단법이 확립된 것으로 평가할 수 있다.

표 1. 새로운 FIP 진단을 위한 리얼타임피씨알법에 대한 평가결과

		FIP qPCR (New)		
		Pos	Neg	
FIP qPCR (Old)	Pos	19	2	21
	Neg	25	60	85
		44	62	106

2. 고양이 코로나바이러스 유전자 염기서열분석

- 1차년도 연차보고를 통해서 다양한 임상증례에서 확보한 고양이 코로나바이러스의 구조단백질 및 비구조단백질 유전자를 대상으로 RT PCR을 수행한 후 증폭된 산물을 일반적인 염기서열분석방식을 통해 유전자형 및 국내유행하는 고양이 코로나바이러스의 유전자변이를 확인

- 본 실험을 위해 참고문헌 (J Vet Intern Med 2013;27:445-450)의 정보를 참고하여 고양이 코로나바이러스의 비구조단백질 2종과 구조단백질 2종에 대해서 유전자를 증폭하기 위한 RT PCR을 수행하였다. 검사결과는 다음과 같다.

표 2. 다양한 임상증례의 고양이 코로나바이러스에 대한 유전자증폭검사결과

Serial No.	증상분류	Ct Value	RT PCR 결과			
			NSP3	NSP12	Spike	Membrane
1	FIP	18.59	+		+	
2	FIP	34.86	+		+	
3	FIP	33.87	+		+	
4	FIP	33.50	+		+	
5	FIP	33.80				
6	FIP	32.51				
7	FIP	22.51	+		+	
8	Enteric FCoV	29.22	+		+	
9	Enteric FCoV	23.75	+	+	+	+
10	Enteric FCoV	26.61	+	+	+	
11	Enteric FCoV	19.05	+	+	+	+
12	Enteric FCoV	27.05	+	+	+	
13	Enteric FCoV	24.59	+	+	+	
14	Enteric FCoV	21.67	+	+	+	+
15	Enteric FCoV	26.00	+	+	+	+

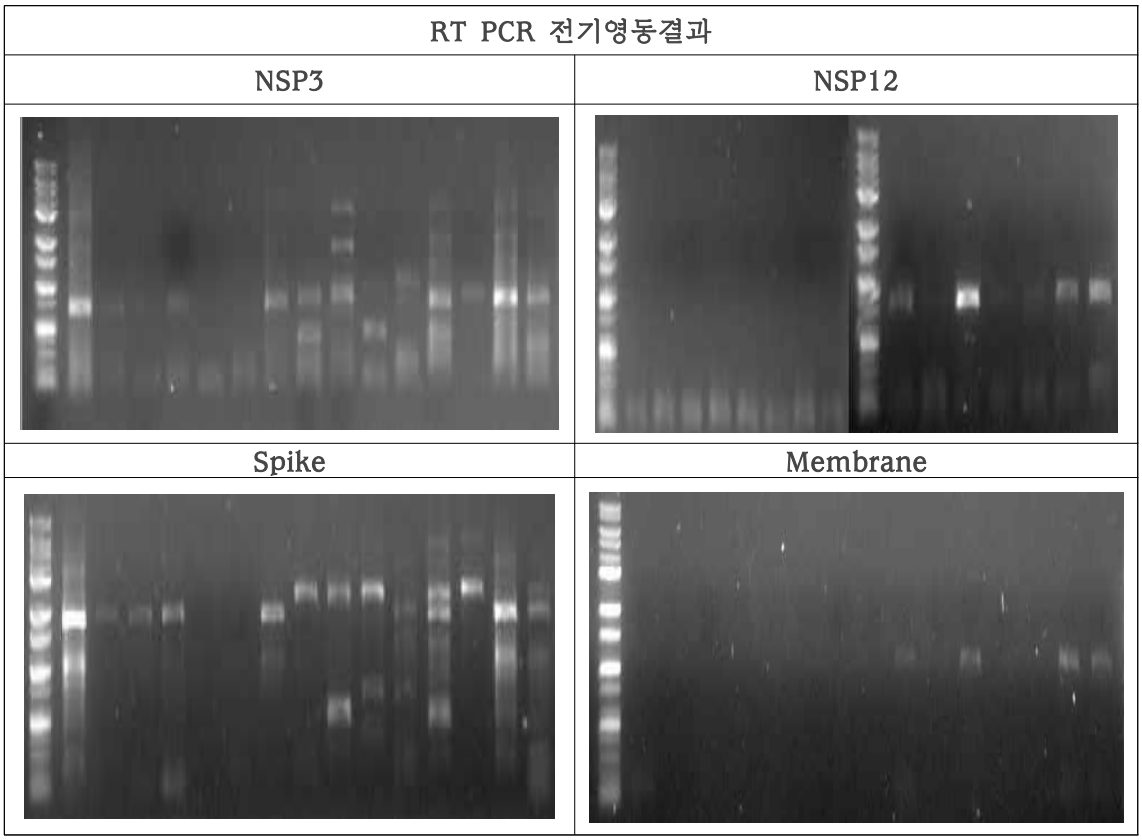
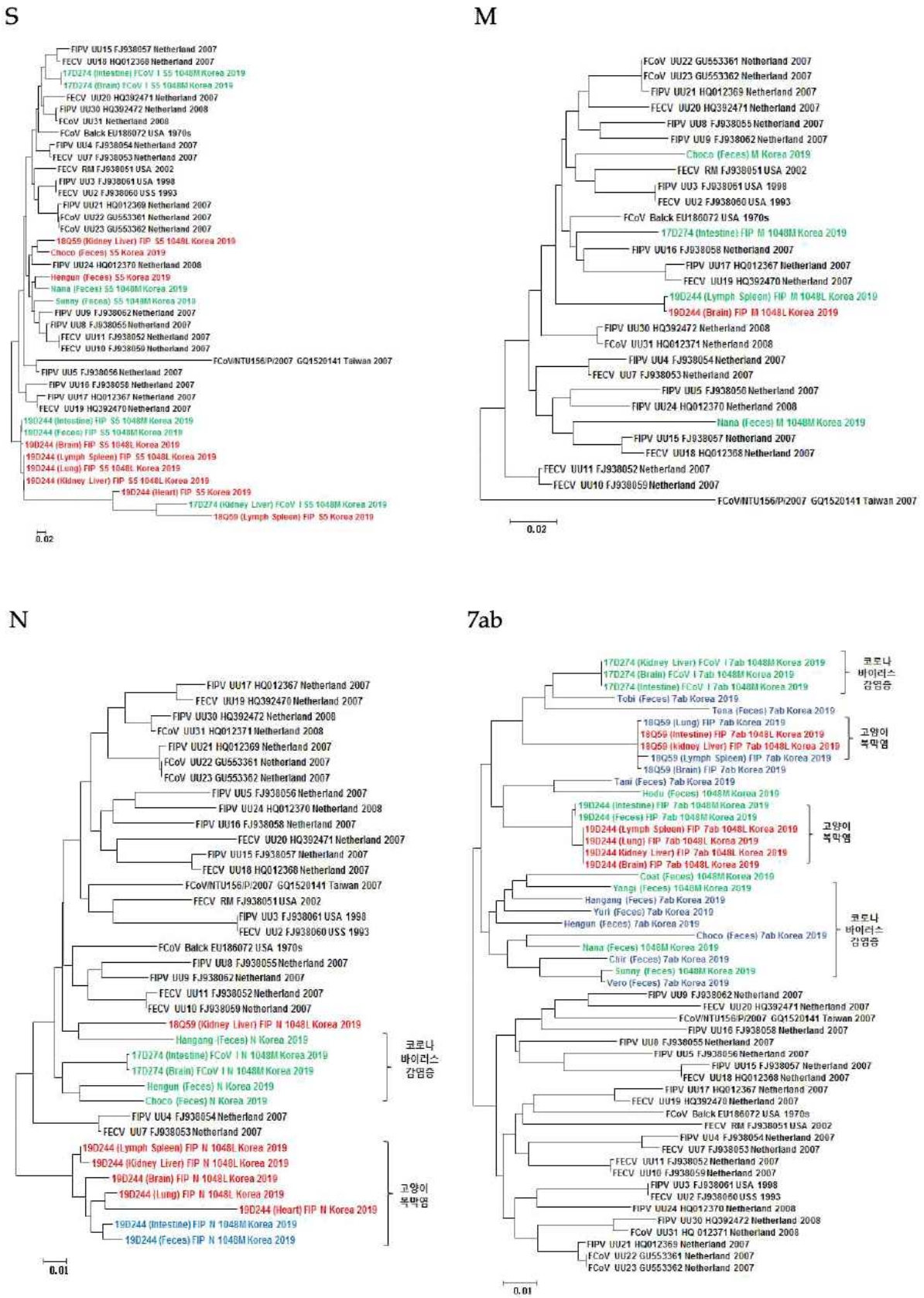


그림 3. 고양이 코로나바이러스 양성시료를 이용한 다양한 유전부위에 대한 RT PCR 검사결과

- 시험에 사용된 두가지 임상증상 (위장관염과 전염성복막염)으로부터 양성으로 확인된 코로나바이러스에 대해서 4개의 유전자에 대해 RT PCR을 수행한 결과 비구조단백질은 NSP3와 구조단백질인 Spike 단백질에 대해서 시험에 사용한 검체 중 두가지 질환군에 대해서 유전자증폭이 되는 것을 확인한 반면 NSP12와 Membrane 단백질의 경우 전염성 복막염 검체에서는 유전자증폭을 확인할 수 없었던 반면 위장관염 검체에서는 유전자의 증폭이 확인되었고 두가지 임상증상례에서 모두 유전자가 검출된 Spike 단백질의 경우 두가지 임상증례에서 모두 유전자가 증폭되었지만 임상검체에 따라서 증폭된 산물의 사이즈가 달라 전염성 복막염과 급성 위장관염에서 검출된 고양이 코로나바이러스 사이에 상당한 유전자 변이가 있을 것으로 예상되었다.
- 2차년도 임상증상별 코로나바이러스에 대한 유전자염기서열분석을 추가적으로 수행하였으며 S, M, ORF7ab 등 세가지 부위에 분석수행결과 특히 ORF7ab부위에서 국내에서 검출된 코로나바이러스가 임상증상별로 별도의 유전자 클러스터를 이루는 것으로 확인되어 ORF7ab 부위를 타겟으로 디자인된 새로운 진단법이 FIP의 진단에 효율적인 이유를 보충해주는 결과를 보여주고 있다.



Red : FIPV(1048M), Green : FECV(1048L), Blue : Not typed

그림 4. 고양이 코로나바이러스 국내 임상주에 대한 4개 유전자에 대한 계통학적 분석결과

3. 고양이 코로나바이러스 분리주확보

- 임상증상 및 계통학적분류 (2가지 이상의 유전자형 확보)를 통해 표적항원제조를 위해 선정된 검체를 이용하여 고양이 코로나바이러스에 감수성 있는 2종의 세포주 (FCWF4, CRFK)를 이용하여 바이러스주를 분리를 시도하였다.
- 바이러스분리를 위해 선정된 검체는 세포배양을 위해 0.2um filter에 여과한 후 미리준비하여 monolayer를 형성하고 있는 두가지 세포주에 접종하고 일주일간 세포변성효과의 발생여부를 확인한다.
- 세포변성효과가 발생하지 않는 경우라도 2회정도의 동결 및 해동과정을 거친 후 다시 준비한 2가지 세포주에 접종한 후 추가적으로 1주일을 관찰한다.
- 다양한 임상증상검체 중 고양이 코로나바이러스 항원양성으로 확인된 검체를 이용하여 세포주에 접종하여 전술한 바대로 바이러스배양을 시도하였으나 고양이 위장관염 검체로 부터는 바이러스배양에 실패하였고 1건의 고양이 전염성 복막염케이스에서 바이러스 배양에 성공하였다.

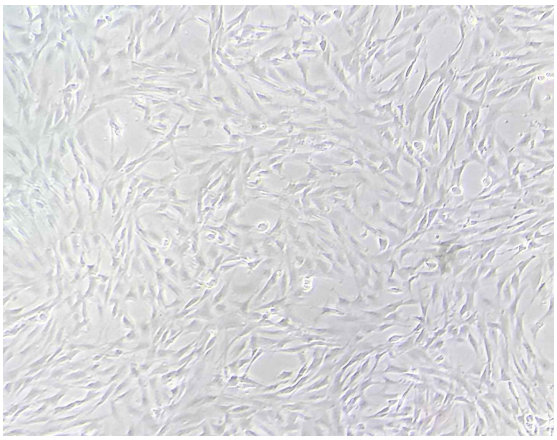
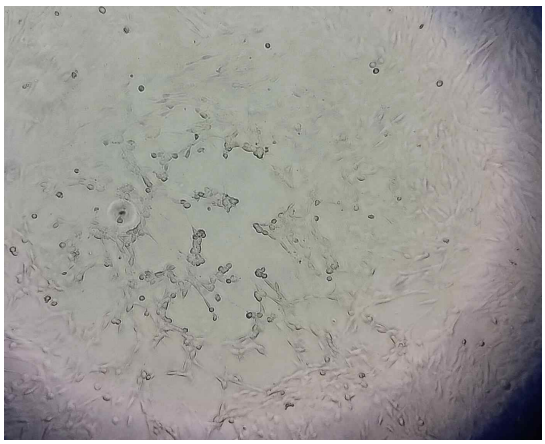
정상세포주(바이러스접종전)	세포변성을 보이는 세포주 (고양이 코로나바이러스감염)
	

그림 5. 고양이 코로나바이러스 양성시료를 CRFK 세포주에 접종한 후 세포변성효과를 보이는 바이러스분리결과

4. 항체제작용 바이러스항원 정제

- 고양이 코로나바이러스분리주를 확보한 후 대량배양을 통해서 바이러스항원을 대량으로 확보하기 위해 초원심분리 및 비중을 이용한 초원심분리과정을 통해 고양이 코로나바이러스 특이 항체제작을 위해 필요한 표적항원을 정제하여 항체의 제작을 위한 면역원으로 활용하였다.

5. 고양이코로나바이러스 특이항체제작

- 전단계를 통해 확보한 다양한 바이러스 항원을 이용하여 마우스면역, 항체라이브러리 기술 등을 이용한 바이러스특이 단클론항체를 제작한다.
- 단클론항체의 제작을 위해 고양이 코로나바이러스 임상분리주로부터 확보한 불활화 항원을 마우스복강내 3차례 면역한 후 미정맥으로 final boosting 하고 일반적으로 알려진 단클론항체 제작방법으로 비장면역세포와 mouse myeloma 세포의 융합 및 양성세포주 스크리닝 과정을 통해 면역원에 반응을 보이는 하이브리도마세포주를 확보하였으며 1차년도 시험결과 ELISA OD 0.6 이상을 보이는 세포주 11주를 확보하여 이후 서브클로닝 및 항체정제 등의 과정을 수행할 예정이다.

표 3. 마우스 항원면역후 실시한 바이러스 특이 항원에 대한 ELISA 결과

	Normal mouse serum	4차 면역후serum _1	4차 면역후serum _2
NC	0.047	0.047	0.048
10^-3	0.278	0.735	0.739
10^-4	0.102	0.367	0.338
10^-5	0.112	0.397	0.364
10^-6	0.086	0.102	0.087

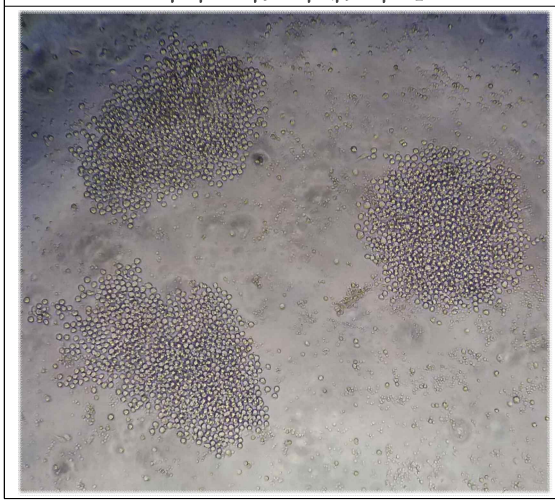
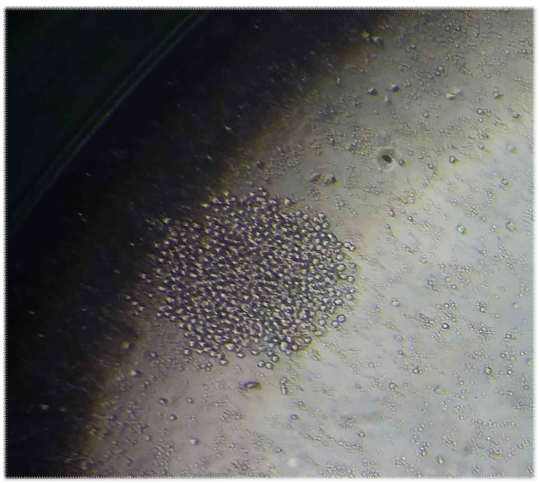
단클론항체를 생산하는 하이브리도마세포주 1	단클론항체를 생산하는 하이브리도마세포주 2
	

그림 6. 고양이 코로나바이러스 항원에 대해 반응성을 보이는 단클론항체를 생산하는 하이브리도마세포주

표 4. 고양이 코로나바이러스 특이 항체를 생산하는 하이브리도마세포주의 상층액을 이용하여 반응성을 확인한 검사결과 (11종의 항체생산세포주 확보)

Serial No	Clone name	OD
1	FIP A6	0.635
2	FIP A9	1.089
3	FIP A16	0.613
4	FIP A17	0.844
5	FIP A24	1.757
6	FIP A25	1.057
7	FIP A29	0.726
8	FIP A30	0.707
9	FIP A41	0.802
10	FIP A50	0.687
11	FIP A59	1.377
	P.C	1.628
	N.C	0.334

- 바이러스항원을 이용하여 닭에 수차례에 걸쳐 접종하고 충분한 면역항체가가 확보되면 면역한 닭으로부터 확보한 계란의 난황으로부터 코로나바이러스에 특이적인 난황항체를 확보한다.

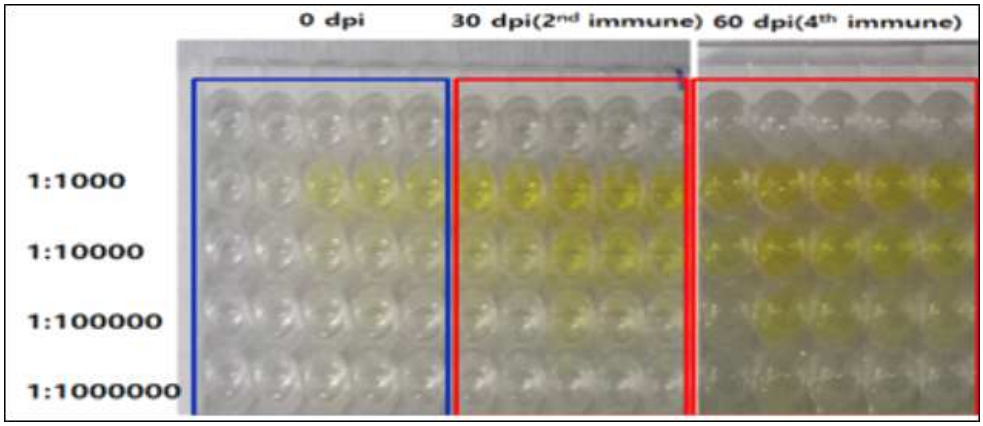
산란계 면역
(4회 코로나바이러스 불활화항원면역)

4차 면역 후 난황항체
확보를 위해 계란수집

그림 7. 산란계 면역방법 및 면역후 확보된 계란수집과정

- 코로나바이러스 항원은 5수의 산란계에 4차례에 걸쳐 면역하였으며 면역 전, 2차면역 후 그리고 4차 면역 후에 채혈하여 산란계의 면역정도를 평가하였다. 평가결과 아래의 데이터에서 보이는 것처럼 혈청 중 바이러스 특이항체가가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

ELISA Data 1



ELISA Data 2

	Normal Chicken_Serum					2차 면역후_Serum					4차 면역후_Serum				
	FIP-Chic1	FIP-Chic2	FIP-Chic3	FIP-Chic4	FIP-Chic5	FIP-Chic1	FIP-Chic2	FIP-Chic3	FIP-Chic4	FIP-Chic5	FIP-Chic1	FIP-Chic2	FIP-Chic3	FIP-Chic4	FIP-Chic5
Blank	0.037	0.04	0.045	0.045	0.045	0.048	0.047	0.045	0.048	0.046	0.051	0.048	0.042	0.043	0.043
10^-3	0.045	0.091	0.43	0.473	0.51	1.528	1.538	2.439	2.015	2.17	1.902	2.679	2.571	2.365	2.406
10^-4	0.038	0.066	0.118	0.121	0.129	0.27	0.251	0.648	0.594	0.578	0.546	1.852	0.966	0.854	0.563
10^-5	0.037	0.038	0.086	0.096	0.071	0.127	0.082	0.226	0.136	0.139	0.127	0.502	0.333	0.188	0.194
10^-6	0.036	0.043	0.069	0.063	0.061	0.066	0.065	0.077	0.078	0.078	0.083	0.127	0.093	0.087	0.064

그림 8. 산란계 4차 면역 후 실시한 바이러스 특이 항원에 대한 ELISA 결과

6. 고양이 코로나바이러스에 대한 난황항체 제조

- 분리정제한 고양이코로나바이러스 항원을 adjuvant와 혼합하여 닭 등 조류에 3-4차례 면역한 후 면역이 종료된 조류의 알에서 난황을 분리한 후 난황중 IgY를 정제하는 키트를 이용하여 항코로나바이러스 항체를 포함하는 난황항체를 정제
- Chiken IgY Purification Kit를 이용하여 제조사의 프로토콜을 따라서 IgY를 정제한 후 난황항체의 항코로나바이러스 효능분석 등에 활용한다.

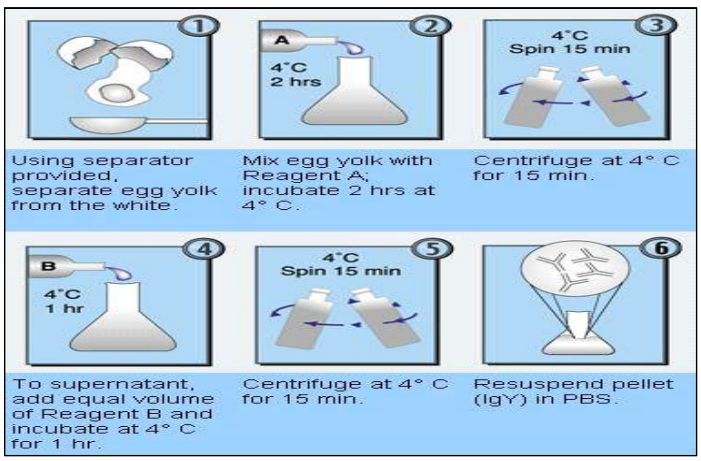


그림 9. 계란에서 난황내에 존재하는 난황항체(IgY)를 정제하는 방법

7. 난황항체의 항코로나바이러스 효능분석 (in vitro)

- 코로나바이러스 불활화항원을 접종한 닭에서 채취한 난황을 IgY 정제키트를 이용하여 정제한 후 퀴아젠 단백질정량장비(QIAxpert)와 단백질을 이용하여 농도를 측정한 결과 IgY의 농도는 4.30mg/ml로 확인되었다.

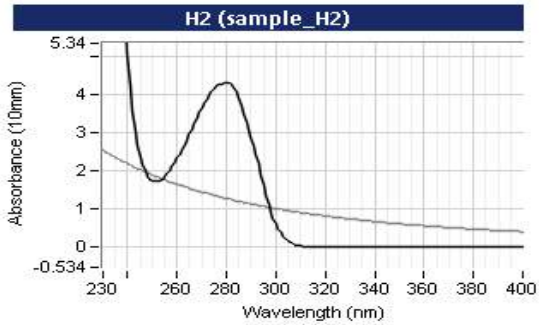


그림10 . 단백질정량장치와 정량을 위한 1회용 단백질칩 (퀴아젠, QIAxpert)	그림 11. 정제된 IgY에 대한 정량데이터 실제 (퀴아젠, QIAxpert)

- 분석대상은 표적항원으로 사용된 코로나바이러스에 대한 항체역가를 ELISA법을 및 중화시험을 통해서 결정하였으며 시험결과 ELISA기반으로 1:10000의 역가에서 ELISA 양성으로 확인되었으며 중화항체시험결과 정제한 IgY는 약 1:64의 역가까지 바이러스의 중화가 되어 중화항체역가는 64배로 결정하였다.

8. 고양이코로나바이러스 특이 단클론항체를 이용한 항원진단키트구성 및 임상평가

- 1차년도 마우스면역 후 단클론항체 제작 등을 통해 고양이 코로나바이러스에 반응하는 11종의 단클론항체를 확보하였으며 추가적으로 상업적으로 구매가능한 단클론항체 및 다클론항체 등을 10여종 구입하여 본 과제를 통해 확보한 단클론항체와 페어의 형태로 Antigen Capturing ELISA를 구현하였으며 고역가의 바이러스배양액을 이용하여 검사를 수행하여 가장 반응성이 좋은 5개의 페어를 선택하였으며 이중 최종후보인 27번 페어를 이용하여 임상평가를 실시하기로 하였다.

표 5. 고양이 코로나바이러스 단클론항체 페어를 이용한 진단키트 패널구성 및 결과

Pair No	ELISA OD	Real time PCR Ct
1	0.067	18.9
2	0.427	
3	0.112	
4	1.029	
5	1.118	
6	0.128	
7	0.264	
8	0.126	
9	0.348	
10	0.789	
11	0.156	
12	0.330	
13	0.168	
14	0.235	
15	0.059	
16	0.364	
17	0.370	
18	0.109	
19	0.123	
20	1.090	
21	0.820	
22	0.790	
23	0.590	
24	0.600	
25	0.460	
26	0.490	
27	1.970	
28	1.470	
29	1.276	
30	0.401	
31	0.351	
32	0.243	
33	0.728	
34	0.49	
35	0.451	
36	0.396	
37	0.631	
38	0.618	
39	0.941	
40	1.149	
41	0.277	
42	0.228	
43	0.436	
44	0.59	

- 바이러스항원진단키트의 경우 기존 바이러스의 핵산검출을 위해 사용하였던 real time RT PCR 결과를 통해 결과를 알고 있는 임상시료 200건 정도를 대상으로 민감도와 특이도 등을 검증한다. 검사에 사용된 검체는 항원양성으로 확인된 검체 127개, 음성으로 확인된 검체 73개를 사용하였으며 시험에 사용된 검체는 하기와 같다.

표 6. 코로나바이러스 항원검출 ELISA를 위해 사용된 시료리스트

Serial No	Sample ID	의뢰일	환축명	검사 분류	검사항목	결과	Ct value
FCoV_P1	5	2019-01-03	태태	FGI	Feline corona virus	양성	32.79
FCoV_P2	9	2019-01-03	초촐	FGI	Feline corona virus	양성	32.46
FCoV_P3	14	2019-01-04	보테	FGI	Feline corona virus	양성	25.44
FCoV_P4	15	2019-01-04	베네	FGI	Feline corona virus	양성	26.16
FCoV_P5	21	2019-01-04	보리	FGI	Feline corona virus	양성	21.79
FCoV_P6	23	2019-01-04	솔이	FGI	Feline corona virus	양성	24.93
FCoV_P7	24	2019-01-04	요나	FGI	Feline corona virus	양성	31.67
FCoV_P8	29	2019-01-05	코코	FGI	Feline corona virus	양성	27.89
FCoV_P9	31	2019-01-05	푸리	FGI	Feline corona virus	양성	25.81
FCoV_P10	32	2019-01-05	꼬량	FGI	Feline corona virus	양성	25.22
FCoV_P11	35	2019-01-05	즈미	FGI	Feline corona virus	양성	19.96
FCoV_P12	39	2019-01-08	도토	FGI	Feline corona virus	양성	30.1
FCoV_P13	41	2019-01-08	밤톨	FGI	Feline corona virus	양성	26.35
FCoV_P14	44	2019-01-08	먼지	FGI	Feline corona virus	양성	28.29
FCoV_P15	52	2019-01-09	봄	FGI	Feline corona virus	양성	30.02
FCoV_P16	54	2019-01-09	키루	FGI	Feline corona virus	양성	25.66
FCoV_P17	55	2019-01-10	미니	FGI	Feline corona virus	양성	30.19
FCoV_P18	61	2019-01-10	뭉치	FGI	Feline corona virus	양성	29.23
FCoV_P19	66	2019-01-11	양갱이	FGI	Feline corona virus	양성	21.48
FCoV_P20	67	2019-01-11	양이	FGI	Feline corona virus	양성	31.64
FCoV_P21	71	2019-01-12	우동이	FGI	Feline corona virus	양성	19.15
FCoV_P22	77	2019-01-14	깨꿍	FGI	Feline corona virus	양성	27.73
FCoV_P23	79	2019-01-14	라온	FGI	Feline corona virus	양성	18.1
FCoV_P24	80	2019-01-15	치지	FGI	Feline corona virus	양성	30.19
FCoV_P25	85	2019-01-15	유꼬	FGI	Feline corona virus	양성	31.8
FCoV_P26	86	2019-01-15	찡이	FGI	Feline corona virus	양성	18.21
FCoV_P27	87	2019-01-15	사랑	FGI	Feline corona virus	양성	25.5
FCoV_P28	93	2019-01-17	김뎅이	FGI	Feline corona virus	양성	28.71
FCoV_P29	94	2019-01-18	모마	FGI	Feline corona virus	양성	29.43
FCoV_P30	103	2019-01-21	모찌	FGI	Feline corona virus	양성	28.39
FCoV_P31	104	2019-01-21	망고	FGI	Feline corona virus	양성	21.76
FCoV_P32	106	2019-01-21	큐큐	FGI	Feline corona virus	양성	29.3
FCoV_P33	107	2019-01-22	벨라	FGI	Feline corona virus	양성	28.97
FCoV_P34	110	2019-01-22	부	FGI	Feline corona virus	양성	26.6
FCoV_P35	123	2019-01-24	청	FGI	Feline corona virus	양성	30.91
FCoV_P36	125	2019-01-24	먹구	FGI	Feline corona virus	양성	24.52
FCoV_P37	134	2019-01-26	혜교	FGI	Feline corona virus	양성	31.94
FCoV_P38	138	2019-01-28	먹구	FGI	Feline corona virus	양성	25.09
FCoV_P39	140	2019-01-28	크링	FGI	Feline corona virus	양성	28.9
FCoV_P40	141	2019-01-28	샤샤	FGI	Feline corona virus	양성	26.34
FCoV_P41	142	2019-01-28	모모	FGI	Feline corona virus	양성	28.79
FCoV_P42	147	2019-01-29	은하	FGI	Feline corona virus	양성	31.32
FCoV_P43	153	2019-01-30	방울이	FGI	Feline corona virus	양성	28.28
FCoV_P44	154	2019-01-30	동팔	FGI	Feline corona virus	양성	24.54
FCoV_P45	160	2019-01-31	밤톨	FGI	Feline corona virus	양성	27.41
FCoV_P46	165	2019-02-01	우주	FGI	Feline corona virus	양성	18.22
FCoV_P47	166	2019-02-01	아루	FGI	Feline corona virus	양성	24.66
FCoV_P48	168	2019-02-01	고로	FGI	Feline corona virus	양성	28.9
FCoV_P49	174	2019-02-02	구름이	FGI	Feline corona virus	양성	23.12
FCoV_P50	180	2019-02-07	라떼	FGI	Feline corona virus	양성	21.23

Serial No	Sample ID	의뢰일	환축명	검사분류	검사항목	결과	Ct value
FCoV_P51	198	2019-02-11	하루	FGI	Feline corona virus	양성	22.26
FCoV_P52	202	2019-02-12	코코	FGI	Feline corona virus	양성	29.6
FCoV_P53	211	2019-02-14	코코	FGI	Feline corona virus	양성	27.6
FCoV_P54	213	2019-02-14	제리	FGI	Feline corona virus	양성	32.59
FCoV_P55	214	2019-02-14	희영	FGI	Feline corona virus	양성	30.55
FCoV_P56	219	2019-02-15	이봉자	FGI	Feline corona virus	양성	21.23
FCoV_P57	240	2019-02-21	범이	FGI	Feline corona virus	양성	29.02
FCoV_P58	246	2019-02-22	오토	FGI	Feline corona virus	양성	26.99
FCoV_P59	247	2019-02-22	달리	FGI	Feline corona virus	양성	25.76
FCoV_P60	248	2019-02-22	구찌	FGI	Feline corona virus	양성	23.42
FCoV_P61	249	2019-02-22	먹구	FGI	Feline corona virus	양성	23.9
FCoV_P62	254	2019-02-23	해리	FGI	Feline corona virus	양성	24.6
FCoV_P63	259	2019-02-23	조이	FGI	Feline corona virus	양성	30.54
FCoV_P64	262	2019-02-25	로키	FGI	Feline corona virus	양성	25.54
FCoV_P65	267	2019-02-25	크림	FGI	Feline corona virus	양성	28.64
FCoV_P66	274	2019-02-26	파도	FGI	Feline corona virus	양성	29.45
FCoV_P67	278	2019-02-27	토르	FGI	Feline corona virus	양성	26.88
FCoV_P68	281	2019-02-27	봉구	FGI	Feline corona virus	양성	23.48
FCoV_P69	284	2019-02-28	먼지	FGI	Feline corona virus	양성	26.64
FCoV_P70	292	2019-03-02	뿌링	FGI	Feline corona virus	양성	32.82
FCoV_P71	294	2019-03-02	로즈	FGI	Feline corona virus	양성	24.63
FCoV_P72	306	2019-03-06	테오	FGI	Feline corona virus	양성	24.67
FCoV_P73	307	2019-03-06	나나	FGI	Feline corona virus	양성	29.22
FCoV_P74	314	2019-03-07	김치냥	FGI	Feline corona virus	양성	26.4
FCoV_P75	315	2019-03-08	복실이	FGI	Feline corona virus	양성	20.64
FCoV_P76	320	2019-03-09	울냥이	FGI	Feline corona virus	양성	20.51
FCoV_P77	322	2019-03-09	콩	FGI	Feline corona virus	양성	24.63
FCoV_P78	323	2019-03-09	마고	FGI	Feline corona virus	양성	17.6
FCoV_P79	324	2019-03-09	레이	FGI	Feline corona virus	양성	19.69
FCoV_P80	327	2019-03-09	삐삐	FGI	Feline corona virus	양성	30.43
FCoV_P81	329	2019-03-11	웰빙	FGI	Feline corona virus	양성	25.09
FCoV_P82	330	2019-03-11	서롱이	FGI	Feline corona virus	양성	24.87
FCoV_P83	339	2019-03-13	애플	FGI	Feline corona virus	양성	32.12
FCoV_P84	341	2019-03-13	쭈	FGI	Feline corona virus	양성	23.66
FCoV_P85	345	2019-03-14	로엘	FGI	Feline corona virus	양성	23.67
FCoV_P86	346	2019-03-14	토르	FGI	Feline corona virus	양성	27.27
FCoV_P87	348	2019-03-14	조이	FGI	Feline corona virus	양성	30.25
FCoV_P88	364	2019-03-18	크림	FGI	Feline corona virus	양성	24.65
FCoV_P89	366	2019-03-18	서롱이	FGI	Feline corona virus	양성	27.34
FCoV_P90	373	2019-03-19	고양이+	FGI	Feline corona virus	양성	24.94
FCoV_P91	383	2019-03-20	백설기	FGI	Feline corona virus	양성	19.59
FCoV_P92	390	2019-03-22	콩이	FGI	Feline corona virus	양성	31.62
FCoV_P93	404	2019-03-25	하나	FGI	Feline corona virus	양성	17.69
FCoV_P94	406	2019-03-25	아비	FGI	Feline corona virus	양성	26.36
FCoV_P95	411	2019-03-26	넬	FGI	Feline corona virus	양성	24.65
FCoV_P96	414	2019-03-27	단비	FGI	Feline corona virus	양성	19.78
FCoV_P97	415	2019-03-27	롱이	FGI	Feline corona virus	양성	26.55
FCoV_P98	421	2019-03-28	사랑	FGI	Feline corona virus	양성	23.76
FCoV_P99	432	2019-03-29	쿠키	FGI	Feline corona virus	양성	26.49
FCoV_P100	451	2019-04-03	진배	FGI	Feline corona virus	양성	21.53

Serial No	Sample ID	의뢰일	환축명	검사분류	검사항목	결과	Ct value
FCoV_P101	452	2019-04-03	마루	FGI	Feline corona virus	양성	20.5
FCoV_P102	459	2019-04-06	고미	FGI	Feline corona virus	양성	28.88
FCoV_P103	461	2019-04-06	진	FGI	Feline corona virus	양성	26.57
FCoV_P104	471	2019-04-08	빵	FGI	Feline corona virus	양성	31.68
FCoV_P105	473	2019-04-08	오디	FGI	Feline corona virus	양성	25.55
FCoV_P106	487	2019-04-09	보리	FGI	Feline corona virus	양성	24.14
FCoV_P107	488	2019-04-09	아리	FGI	Feline corona virus	양성	20.14
FCoV_P108	492	2019-04-10	꾸꾸	FGI	Feline corona virus	양성	22.69
FCoV_P109	496	2019-04-10	나나	FGI	Feline corona virus	양성	23.57
FCoV_P110	509	2019-04-13	후추	FGI	Feline corona virus	양성	30.34
FCoV_P111	514	2019-04-13	체리	FGI	Feline corona virus	양성	18.03
FCoV_P112	521	2019-04-15	홍원	FGI	Feline corona virus	양성	30
FCoV_P113	529	2019-04-16	조이	FGI	Feline corona virus	양성	20.48
FCoV_P114	535	2019-04-16	코코	FGI	Feline corona virus	양성	20.15
FCoV_P115	538	2019-04-17	미유	FGI	Feline corona virus	양성	18.04
FCoV_P116	556	2019-04-20	애플	FGI	Feline corona virus	양성	22.59
FCoV_P117	563	2019-04-22	라떼	FGI	Feline corona virus	양성	26.41
FCoV_P118	566	2019-04-23	롱이	FGI	Feline corona virus	양성	19.88
FCoV_P119	570	2019-04-24	몰리	FGI	Feline corona virus	양성	27.96
FCoV_P120	578	2019-04-26	블루	FGI	Feline corona virus	양성	32.66
FCoV_P121	595	2019-04-29	성북이	FGI	Feline corona virus	양성	24.23
FCoV_P122	603	2019-04-30	고양이+	FGI	Feline corona virus	양성	25.89
FCoV_P123	605	2019-04-30	코난	FGI	Feline corona virus	양성	25.3
FCoV_P124	607	2019-04-30	쉐도우	FGI	Feline corona virus	양성	23.61
FCoV_P125	610	2019-05-02	초리	FGI	Feline corona virus	양성	24.74
FCoV_P126	618	2019-05-03	아키	FGI	Feline corona virus	양성	27.42
FCoV_P127	625	2019-05-04	호두	FGI	Feline corona virus	양성	25.87
FCoV_N1	22	2019-01-04	맥주	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N2	70	2019-01-12	뭉치	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N3	73	2019-01-12	바벨	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N4	83	2019-01-15	국밥	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N5	88	2019-01-16	피노키오	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N6	96	2019-01-19	미아	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N7	109	2019-01-22	엠버	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N8	119	2019-01-23	식빵	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N9	120	2019-01-24	보석이	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N10	143	2019-01-28	치치	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N11	163	2019-01-31	진저	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N12	164	2019-01-31	유키	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N13	181	2019-02-07	송뽁뽁	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N14	186	2019-02-08	딸기	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N15	200	2019-02-12	유자	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N16	209	2019-02-14	보리	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N17	221	2019-02-16	요나	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N18	232	2019-02-19	깐돌	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N19	236	2019-02-20	루비	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N20	245	2019-02-22	몽땅이	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N21	261	2019-02-25	미니	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N22	317	2019-03-08	순이	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N23	336	2019-03-12	이니	FGI	Feline corona virus	음성	

Serial No	Sample ID	의뢰일	환축명	검사분류	검사항목	결과	Ct value
FCoV_N24	344	2019-03-14	쭈니	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N25	351	2019-03-14	먼지	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N26	353	2019-03-14	밍키	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N27	356	2019-03-15	만두	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N28	370	2019-03-18	새미	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N29	374	2019-03-19	희봉이	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N30	375	2019-03-19	그루	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N31	377	2019-03-19	초록	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N32	381	2019-03-19	로니	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N33	392	2019-03-23	미미	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N34	395	2019-03-23	단풍+	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N35	403	2019-03-25	봉	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N36	416	2019-03-27	구름이	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N37	425	2019-03-28	호비	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N38	430	2019-03-28	루비	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N39	444	2019-04-02	호야	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N40	448	2019-04-03	노랑	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N41	456	2019-04-05	이쁜	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N42	462	2019-04-06	야옹+	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N43	463	2019-04-06	귤이	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N44	464	2019-04-06	멕	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N45	494	2019-04-10	도로시	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N46	503	2019-04-11	미미	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N47	512	2019-04-13	뱅갈	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N48	520	2019-04-15	아루	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N49	524	2019-04-15	초콜렛	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N50	534	2019-04-16	호야+	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N51	541	2019-04-18	무너	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N52	555	2019-04-20	순구+	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N53	557	2019-04-20	장미	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N54	558	2019-04-22	미미	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N55	565	2019-04-23	나르+	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N56	579	2019-04-26	오봉	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N57	581	2019-04-26	대박이	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N58	586	2019-04-27	콩이	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N59	588	2019-04-27	하나	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N60	589	2019-04-27	유자	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N61	590	2019-04-27	나라	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N62	600	2019-04-30	권망난	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N63	601	2019-04-30	권조딩	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N64	602	2019-04-30	심바	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N65	613	2019-05-03	나비	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N66	630	2019-05-07	기춘	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N67	638	2019-05-08	해리	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N68	662	2019-05-10	둥이	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N69	664	2019-05-11	망투	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N70	665	2019-05-11	먼지	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N71	673	2019-05-11	플리	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N72	683	2019-05-14	보리	FGI	Feline corona virus	음성	
FCoV_N73	694	2019-05-16	미미	FGI	Feline corona virus	음성	

- 200건의 검체를 대상으로 최종 후보로 선정된 27번 페어에 대한 바이러스항원진단검사를 실시한 결과 73건의 음성검체에 대해서는 모두 음성으로 확인되었고 127건의 양성검체에 대해서는 54건에 대해서만 항원양성을 확인할 수 있어 43.9%의 민감도를 보여 임상적으로 낮은 민감도를 보이는 것으로 확인되었다.
- 하지만 급성감염으로 바이러스의 배설량이 매우 많은 바이러스위장관염의 특징과는 다르게 고양이 코로나바이러스감염의 경우 만성으로 진행되는 경우가 약 50%에 이르고 만성으로 진행되는 경우 바이러스의 배설량이 매우 다양하여 매우 낮은 수준으로 바이러스를 배설하는 경우도 매우 많이 있을 수 있다.
- 따라서 127건의 임상검체를 바이러스의 양에 대한 지표인 리얼타임피씨알의 Ct값을 기준으로 다시 분석하였다. 분석결과 비교적 바이러스양이 매우 많다고 생각되는 Ct 20이하의 검체에서는 12개의 검체 모두에서 항원이 검출되어 92.3%, Ct 20-25사이의 검체 39개에 대해서는 33개의 검체에서 항원양성으로 확인되어 약 84.6%의 민감도를 보이는 것으로 확인되었다. 반면 바이러스의 양이 상대적으로 적다고 생각되는 25이상의 검체에 대해서는 75개의 검체 중 8개에서만 항원양성으로 확인되어 바이러스의 양에 의존하여 항원검출의 민감도가 결정되고 있는 것을 확인할 수 있었다.

표 7. 고양이코로나바이러스의 양에 따른 항원검출 ELISA 결과

		FeCoV RT qPCR							
		< Ct 20		Ct20-25		>Ct25		Total	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
FeCoV Ag ELISA	Positive	12	0	33	0	8	0	53	
	Negative	1	0	6	0	67	0	74	73

9. 고양이코로나바이러스 특이 난황항체의 제형화

- ✓ 1차년도 4차 면역을 통해 확보한 닭에서의 난황을 이용하여 고양이에게 경구로 급이할 수 있는 난황항체의 제형화를 시도하였다.
- ✓ 확보한 난황항체와 우유를 동량으로 혼합한 후 이를 잘 섞이도록 1시간 이상 혼합하고 국립 제주대학교 공동기기실의 Spray Dryer (Buchi, Mini Spray Dryer B-290)를 이용하여 6시간 이상 건조하여 건조된 파우더를 시제품으로 제조하였다.

Spray Dryer	난황혼합액을 분사	건조분말의 포집

그림 12. 고양이코로나바이러스에 대한 난황항체혼합액을 Spray Dryer를 이용하여 분말로 건조하는 기기 및 과정

난황건조분말의 성상	시제품(20g)	시제품라벨

그림 13. 고양이코로나바이러스에 대한 난황항체 건조분말을 이용한 시제품

10. 고양이코로나바이러스 특이 난황항체 건조분말의 임상시험

- 고양이코로나바이러스의 난황항체를 포함하는 건조분말시제품을 이용하여 고양이 코로나바이러스에 감염된 고양이에 대해서 경구섭취후 바이러스의 중화를 통한 바이러스의 배설이 있는지 확인하기 위해 실험용 고양이 10수를 이용하여 임상시험을 진행하였다.
- 고양이 임상시험은 크게 2단계로 나누어 고양이 코로나바이러스 양성시료를 이용한 감염모델의 확립과 이후 고양이 코로나바이러스에 감염된 고양이에 고양이 코로나바이러

스 난황항체분말 시제품을 경구로 급이한 후 분변을 통해 고양이 코로나바이러스의 배설이 감소하는지를 비교하는 임상시험을 진행하였다.

- 임상시험을 위한 개요는 하기의 내용과 같고 임상시험을 위한 동물시험은 유효성전문 CRO인 주식회사 노터스에서 수행하였고 이후 분변중 코로나바이러스 검출량을 분석하기 위한 실험은 포스트바이오에서 리얼타임피씨알을 통해 수행하였으며 이를 이용하여 분변 중 코로나바이러스의 분비량을 계산하였다.

고양이 코로나바이러스 난황항체 시험 (개요)

1. 공시동물
   고양이 10수

2. 예비검사
   혈액과 분변채취하여 고양이 코로나바이러스 항체가와 분변 중 코로나바이러스 배설여부 확인

3. 시험군분류
   고양이 코로나바이러스 감염여부에 따라서 시험군 분류
   감염군은 바로 항코로나바이러스 난황항체 투약 (1g 난황)
   감염군이 8마리 이상인 경우 2마리는 대조군으로 진행
   감염군이 8마리 이하인 경우 공격접종 시행
   ① 시험군 1 (코로나바이러스 항원 양성, 항코로나난황항체 투약군 n = 4)
   ② 시험군 2 (코로나바이러스 항원 양성, 일반난황항체 투약군 n = 4)
   ③ 시험군 3 (코로나바이러스 항원 음성, 항코로나난황항체 투약군 n=2)

4. 고양이 코로나바이러스 공격접종
   고양이 코로나바이러스 항원음성인 고양이를 대상으로 고역가 고양이 코로나바이러스 항원 양성 분변을 구강으로 감염시킨다.
   감염후 3일째 감염여부확인하여 시험군분류

5. 항 고양이코로나 난황항체 투약
   고양이 코로나바이러스 감염이 확인된 고양이는 난황항체투약군 (항코로나바이러스 난황항체와 일반난황)으로 분류하여 난황을 매일 1g씩 투약하고 4주간 분변 중 코로나바이러스 분비여부 및 바이러스역가를 측정한다.

※ 노터스 임상시험계획서 별첨첨부

- 동물시험은 코로나바이러스를 감염시키고 고양이코로나바이러스 난황항체를 급이한 그룹 (처치군 Group I, n=4), 코로나바이러스 감염후 고양이코로나바일러스가 포함되지 않은 일반 난황항체를 급이한 그룹 (대조군 1, Group II, n=4), 아무런 처치도 하지 않고 독립적으로 사육한 그룹 (대조군 2, Group III, n=2)으로 분류하여 시험을 진행하였음.
- 각 그룹에 대해서 감염전 (0dpi), 감염 후 1,4,7,10,14,17,21,24,28,31,35일에 분변을 채취하여 고양이 코로나바이러스에 특이적으로 반응하는 리얼타임피씨알을 수행하여 각 시기별, 그룹별 바이러스의 검출여부 및 분비량을 시험하였다.
- 각 개체별 그룹별 바이러스의 검출에 따른 리얼타임피씨알의 로우데이터는 하기의 표와 같다.

표 7. 고양이코로나바이러스 난황을 급이한 고양이 감염실험의 코로나바이러스 분비량 검사결과

Group	Cat ID	0dpi	1dpi	4dpi	7dpi	10dpi	14dpi	17dpi	21dpi	24dpi	28dpi	31dpi	35dpi
I	1		32.80	31.86	32.81	31.52	32.06	33.48	31.82	33.08	33.45	37.46	37.22
	2		34.02	37.81	31.05	32.28	35.14	33.04	33.62	30.96	30.19	30.26	35.56
	3		34.39	29.89	29.81	28.04	31.60	31.40	32.10	31.56	29.62	32.06	31.42
	4				29.53	38.18	34.25	29.02	32.07	33.44	31.91	33.03	35.67
	mean		**33.74**	**33.19**	**30.80**	**32.51**	**33.26**	**31.74**	**32.40**	**32.26**	**31.29**	**33.20**	**34.97**
II	5		39.94	34.65	30.67	34.09	32.04	33.70	30.77	33.83	32.50	28.74	30.28
	6		32.95	29.81	24.01	30.72	29.23	30.00	28.65	31.70	31.73	33.04	35.69
	7	36.02	33.95	29.42	34.04	27.34	32.62	29.45	32.55	29.15	28.74	29.24	30.11
	8		29.71	28.52	30.13	34.43	34.11	31.30	33.07	33.27	30.42	31.37	33.58
	mean		**34.14**	**30.60**	**29.71**	**31.65**	**32.00**	**31.11**	**31.26**	**31.99**	**30.85**	**30.60**	**32.42**
III	9	30.68	32.34	31.56	29.93	31.41	29.83	30.54	32.04	31.36	28.15	31.72	28
	10												

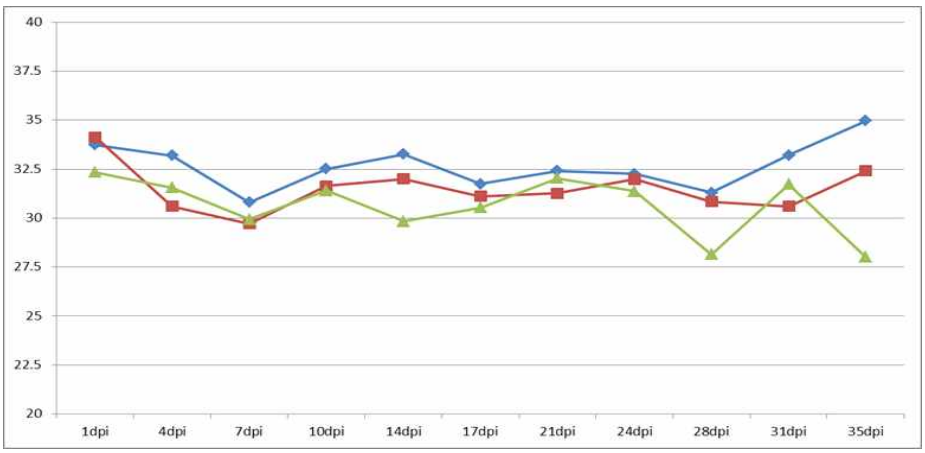


그림 14. 고양이코로나바이러스 난황을 급이한 고양이 감염실험의 코로나바이러스 분비량의 경시별 검사결과 (고양이코로나바이러스 리얼타임피씨알 Ct값을 기준으로)

- ✓ 검사결과를 살펴보면 10마리의 시험용 고양이 중 감염전 코로나바이러스가 검출된 개체는 2개체였으며 시험군 중 Group I, II에 대해서 고양이 코로나바이러스가 고역가로 포함되어 있는 분변시료를 구강으로 접종한 후 감염여부를 살펴본 결과 8마리 모두 감염이 이루어 졌으며 감염후 바이러스가 분변중으로 검출되는 시기는 대부분 감염후 1일차부터 바이러스가 다양한 농도로 검출되기 시작하였으며 8마리 감염군 중 1마리는 감염후 4일째는 바이러스가 검출되지 않았고 7일째부터 바이러스가 검출된 것을 확인할 수 있었다.
- ✓ 고양이 코로나바이러스 난황항체의 경구급이에 대한 바이러스 수동면역효과를 보기 위해 Group I, II에 대해서 경시적으로 채취한 분변에서 고양이 코로나바이러스에 반응하는 리얼타임피씨알을 수행하여 분석한 결과 두 그룹간에 확연한 바이러스의 분비차이는 확인할 수 없었으나 감염초기(감염후 4일)와 30일 이후 약 10배가량의 바이러스분비량의 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다.
- ✓ 이를 다시 감염 후 10일, 21일, 31일로 나누어 살펴보면 고양이 코로나바이러스의 난황항체를 급이한 시험군이 시간이 지날수록 현저한 차이는 아니지만 바이러스의 분비량이 감소(1dpi, 9.1 $TCID_{50}$/ml → 10dpi, 29.8 $TCID_{50}$/ml → 21dpi, 30.1 $TCID_{50}$/ml → 31dpi, 10.9 $TCID_{50}$/ml)하는 것을 확인할 수 있는 반면 일반 난황항체를 급이한 대조군의 경우 시간이 지날수록 바이러스의 분비량이 증가하고 있는 양상이 확인되었다. (1dpi, 5.4 $TCID_{50}$/ml → 31dpi, 92.5 $TCID_{50}$/ml)

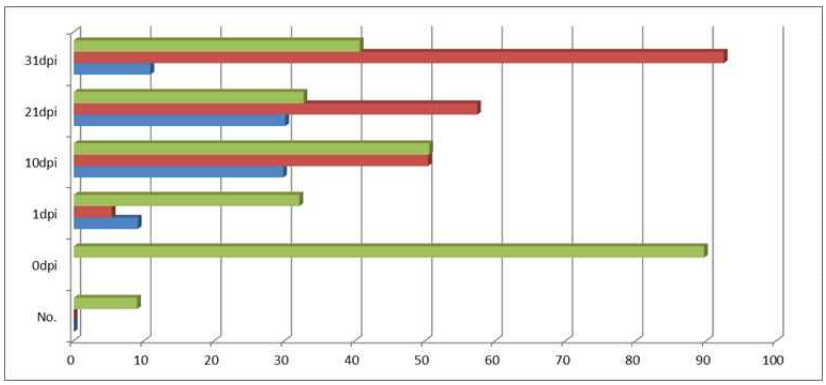


그림. 시험군 및 대조군 별 고양이 코로나바이러스 난황항체를 급이에 따른 바이러스 분비량의 변화

3절 연구개발의 성과

1. 논문게재성과

- Clinical features and molecular detection of selected fecal enteropathogens in diarrheic cats in South Korea, Veterinary Medicine and Science (IDVMS3-2019-Jun-0127.R1), (Under minor revison)

2. 특허성과

- 고양이 코로나바이러스에 대한 난황항체 제조방법 및 이에 의해 제조된 난황항체
  출원번호, 10-2020-0059068 (접수번호 1-1-2020-0498269-37)
- 고양이 코로나바이러스 검출을 위한 RT-PCR용 조성물
  출원번호 10-2020-0059068 (접수번호 1-1-2020-0498269-37)

3. 기술요약정보

기술명	요약내용	완성도	특허상황
고양이 코로나바이러스 검출을 위한 리얼타임피씨알 조성	고양이 코로나바이러스 감염증 (FIP)의 민감도를 개선한 리얼타임피씨알의 조성 및 반응조건	실용화단계	특허출원
고양이 코로나바이러스에 대한 난황항체 제조방법 및 이에 의해 제조된 난황항체	고양이코로나바이러스에 중화력이 있는 난황항체의 제조	기술개발 진행중	특허출원
고양이 코로나바이러스 특이항체 기반 항원 검출 ELISA	고양이 분변에서 코로나바이러스를 고감도로 검출하는 ELISA 기법개발	기술개발 진행중	특허준비중

4절. 사업화성과

1. 사업화성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.0184억원
			향후 3년간 매출	1.5억원
		관련제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	1.5억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 20% 국외 : 0.2%
			향후 3년간 매출	국내 : 50% 국외 : 1%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 50% 국외 : 1%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위(FIP 진단)		4위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위(FIP 진단)		2위

2. 사업화계획 및 매출실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2년		
	소요예산(백만원)		300백만원		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0.0184	3	5
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	20	50	70
		국외	0.2	1	2
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		0.0184	1.5	2.5
	수 출		0	1.5	2.5

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 연구의 최종목표

□ 고양이 코로나바이러스 특이항체 확보를 통한 감염제어기술 확보

- 코로나바이러스 특이항체 10종 이상 확보로 면역진단키트 구성을 완료
- 코로나바이러스에 대한 난황항체를 확보하고 이를 감염된 개체에 수동면역을 유도할 수 있는 치료항체로 활용

2절. 목표 달성여부

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
임상시료확보 및 진단결과 (유행양상파악)	2018년도 급성위장관염 또는 고양이 전염성복막염 (FIP) 진단을 위해 팝애니랩에 검사의뢰된 642건의 검체를 대상으로 Realtime RT PCR법 기반의 유전자진단수행	● 고양이 위장관염 진단 의뢰된 1928건의 분변검체 중 891건(47.2%)에서 고양이코로나바이러스 검출 ● 고양이 전염성 복막염 진단 의뢰된 118건의 체액샘플 중 44건(37.3%)에서 검출한계 이상의 고양이 코로나바이러스 검출 ● 고양이 전염성 복막염진단을 위한 진단법을 개선하여 검출률을 2배이상 향상시킴 (45.7%→95.7%)	100%
코로나바이러스 유전자염기서열 확보	유전자진단을 통해 확보한 임상검체에 대해 다양한 유전자 부위에 대한 염기서열분석 수행	● 장염 코로나바이러스 30여건 와 고양이 전염성 복막염 양성시료 10여건 총 40여건에 대한 염기서열분석 ● 고양이 코로나바이러스 유전자 중 4개 부위(Spike, Matrix, Nucleocapsid, ORF7ab)에 대한 유전자분석을 수행	100%
면역을 위한 표적항원확보	임상검체로부터 분리한 고양이 코로나바이러스배양 및 정제를 동물면역을 위한 바이러스 항원확보	● 고양이 코로나바이러스 에 친화성이 있는 세포주를 이용하여 고양이 전염성 복막염케이스로부터 바이러스를 분리 ● 초원심분리 등을 통해 고양이 코로나바이러스를 정제하고 불활화 과정을 거쳐 동물의 면역원으로 사용할 항원 확보	100%
고양이 코로나바이러스 특이항체제조	마우스 면역을 통해 단클론항체제작을 산란계 면역을 통해 항혈청 및 고양이 코로나바이러스에 결합하는 난황항체를 확보	● 면역된 마우스에서 채취한 비장세포를 이용하여 단크론항체를 제작하였으며 바이러스에 특이적으로 반응하는 11개의 단클론 항체 생산 세포주 확보 ● 4차례에 걸친 산란계 면역 후 난황항체 정제를 위한 난황확보한 후 IgY 순수정제를 통해 난황항체를 정제하였으며 1:64이상의 중화항체가를 보이는 난황항체를 확보	100%
고양이 코로나바이러스 특이항체의 임상적 유효성검증	단클론항체 페어를 이용하여 항원검출진단법을 세팅하고 이를 고양이 코로나바이러스 양성으로 확인된 분변에 적용 고양이 코로나바이러스 항체가 포함된 난황항체를 이용하여 코로나바이러스에 감염된 고양이에 수동면역의 효율을 검증	● 11종의 단클론항체(개발) 및 추가 10여종의 단클론항체(상용)을 이용하여 5개의 진단용 페어를 확보 ● 최종 코로나바이러스 항원 진단법에 대해 고양이 코로나바이러스 양성검체의 진단성능을 평가한 결과 Ct 25 미만의 검체 62개중 55개에서 양성을 확인 (민감도 88.7%) ● 고양이 코로나바이러스 난황항체 급이한 감염모델군에서 대조군에 비해 바이러스분비량이 11.8% 수준으로 감소 (31 dpi, 10.9 $TCID_{50}$/ml vs 92.5 $TCID_{50}$/ml)	70%

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

1. 미달성연구목표

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도
고양이 코로나바이러스 특이항체의 임상적 유효성검증	단클론항체 페어를 이용하여 항원검출진단법을 세팅하고 이를 고양이 코로나바이러스 양성으로 확인된 분변에 적용 고양이 코로나바이러스 항체가 포함된 난황항체를 이용하여 코로나바이러스에 감염된 고양이에 수동면역의 효율을 검증	● 11종의 단클론항체(개발) 및 추가 10여종의 단클론항체(상용)을 이용하여 5개의 진단용 페어를 확보 ● 최종 코로나바이러스 항원 진단법에 대해 고양이 코로나바이러스 양성검체의 진단성능을 평가한 결과 Ct 25 미만의 검체 62개중 55개에서 양성을 확인 (민감도 88.7%) ● 고양이 코로나바이러스 난황항체 급이한 감염모델군에서 대조군에 비해 바이러스분비량이 11.8% 수준으로 감소 (31 dpi, 10.9 $TCID_{50}$/ml vs 92.5 $TCID_{50}$/ml)	70%

2. 세부목표의 미달성사유 및 차후대책

설정목표	목표 미달성 사유	차후대책
● **임상평가를 통한 유효성검증** 수동면역을 위한 난황항체 : 바이러스 감염기간 감소 (10% 이상), 부작용률 10% 미만 고양이 코로나바이러스 항원검출키트 : 리얼타임 피씨알대비 80프로 민감도	고양이 코로나바이러스 난황을 급이한 그룹에서 대조군에 비해 바이러스배설량의 감소는 확인하였으나 **30일 이상의 급여에도 불구하고 바이러스의 배설량이 음성으로 전환되지 않음** Ct 25 미만의 검체에 대해서는 민감도 88.7%를 보였으나 **전체 양성검체를 대상으로 한 경우 민감도는 127건 중 53건으로 41.7%로 감소하여 낮은 역가의 바이러스항원을 검출**하는데 문제가 있음.	● 고역가의 고양이코로나바이러스 난황항체 확보가 요구됨 =>면역원성을 강화하기 위한 접종방법의 개선연구 요망 ● 낮은 바이러스역가 시료에 대한 민감도 개선이 요구됨 => 형광기반 등 기술적으로 민감도를 보완해줄 수 있는 진단시스템의 보완연구 요망

4장. 연구결과의 활용 계획 등

1절. 연구개발 결과의 활용방안

1. 제품화 및 시장확대

- 고양이 임상분야 활용 : 고양이 임상에서 임상적인 중요성이 높은 코로나바이러스 감염을 원천적으로 감소시키기 위한 의약품 또는 기능성 식품의 경우 고양이를 진료하는 수의사 그리고 고양이를 기르는 보호자의 가장 큰 관심분야로 제품화될 경우 독점적인 시장성을 확보할 수 있음.
- 최근 반려동물의 노령화와 핵가족화로 인해 반려동물의 사육두수가 증가하고 이와 더불어 고양이사육에 대한 기호성의 증가로 고양이관련 헬스케어 시장은 평균적인 반려동물 관련 시장의 성장세에 비해 매우 높은 수준으로 확대될 것으로 예상되어 고양이 코로나바이러스의 항바이러스 기능성 식품군 시장은 매우 시장성이 큰 분야로 예상됨.

2 기술이전 및 제품업그레이드를 위한 후속연구

- 고양이에서 장코로나바이러스 감염이외에 상부호흡기감염이나 구강감염을 통해서 전염될 수 있는 임상적 중요성이 높은 감염질환은 고양이 허피스바이러스, 칼리시바이러스, 범백혈구감소증 바이러스 등의 질환 등이 있으며 이들 또한 수동면역요법을 통해 감염의 빈도를 줄여주므로서 이들 질환군의 감염으로 인한 경제적 비용의 감소와 관련 기능성 식품산업의 확대에 기여할 것으로 예상됨.
- 또한 고양이 코로나바이러스 감염에 대한 신속-정확한 진단의 경우 현재 일부 개발된 제품이 있지만 성능이 현저히 떨어져 야외에서 유행하고 있는 코로나바이러스를 검출하지 못하는 경우가 많아 임상적인 중요성이 강조되는 고양이코로나바이러스감염을 현장에서 진단하는 것에 어려움이 많으나 본 과제를 통해 성능이 우수한 진단키트개발 등 실용화로 이행될 수 있고 정확한 진단후 난황항체 등의 급이를 통한 수동면역유도로 감염에 대한 만성화율을 감소시키는 것으로 본 과제를 통해 확보된 두가지 바이러스 특이항체는 실용화의 가능성이 높을 뿐아니라 상품의 시장규모역시 긍정적이고 성장성이 매우 기대됨.
- 따라서 본 연구 이후 후속연구를 위해 고양이의 항바이러스성 기능성 식품에 대한 제품의 업그레이드가 가능하고 이는 제품의 시장성 확대로 연결될 수 있음.

2절 기대성과 및 파급효과

1. 기술적 측면

- 고양이 감염성 질환에 대한 진단기술, 분석기술 및 유용한 임상분리주의 확보 등이 미흡하여 현재까지 고양이 코로나바이러스에 대한 정확한 병원체진단 및 치료항체 등의 제품이 개발되어 있지 않은 바 본 과제를 통해 고양이 코로나바이러스 감염증을 효과적으로 제어하기 위한 원천기술의 확보를 통해 고양이 관련 헬스케어제품의 원천기반기술을 제공할 것으로 예상되고
- 본 과제를 통해 도출된 결과정보 및 임상분리주 등은 향후 예방백신의 개선, 고양이 코로나바이러스 항바이러스제의 개발 등에도 활용될 수 있는 잠재적인 가치를 가지고 있음.

2 경제적·산업적 측면

- 고양이 코로나바이러스 감염은 만성감염으로 진행하여 고양이에서 가장 임상적으로 위중한 질환인 전염성 복막염을 유발하고 이로 인해 상당수의 고양이가 폐사하고 있는 실정임.
- 따라서 본 연구를 통해 개발된 고양이 코로나바이러스 감염을 예방하기 위한 항코로나바이러스 기능성 식품은 고양이 코로나바이러스 감염률을 낮추어 장기적으로 만성감염률과 FIP로의 이환률을 낮추므로서 고양이의 평균수명확대에 기여하고 이를 통해 고양이관련 헬스케어 시장의 확대에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대됨.
- 또한 FIP에 효과적일 수 있는 식품군, 의약품군의 개발은 고양이를 키우는 애묘인들에게 고양이 코로나바이러스에 대한 막연한 공포심을 감소시킴으로서 향후 고양이를 사육하는 인구수의 증가에도 영향을 주어 규모상에서의 고양이 헬스케어관련 시장의 확대에 기여할 수 있는 가능성이 있음.
- 그리고 본 연구가 성공적으로 완료되어 제품이 출시되는 경우 전세계적으로 선두의 연구결과 및 실용화과정을 확보하는 것으로 향후 전세계적인 고양이관련 현장진단 및 기능식품분야에서 막강한 브렌드이미지를 형성하고 이로 인해 향후 기업 및 관련제품군의 미래가치가 상승하여 막대한 부가가치를 창출할 수 있을 것으로 예상됨.

붙임. 참고문헌

1. Sabshin SJ, Levy JK, Tupler T, Tucker SJ, Greiner EC, Leutenegger CM. Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2012;241:331-37.

2. Andersen L, Levy J, McManus C, McGorray S, Leutenegger C, Piccione J, Blackwelder L, Tucker S. Prevalence of enteropathogens in cats with and without diarrhea in four different management models for unowned cats in the southeast United States. The Veterinary Journal. 2018;236:49-55.

3. Gong X-H, Wu H-Y, Li J, Xiao W-J, Zhang X, Chen M, Teng Z, Pan H, Yuan Z-A. Epidemiology, aetiology and seasonality of infectious diarrhoea in adult outpatients through active surveillance in Shanghai, China, 2012–2016: a cross-sectional study. BMJ open. 2018;8:e019699.

4. Decaro N, Pratelli A, Campolo M, Elia G, Martella V, Tempesta M, Buonavoglia C. Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. Journal of virological methods. 2004;119:145-50.

5.. Cook AK. Feline infectious diarrhea. Topics in companion animal medicine. 2008;23:169-76.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 고양이코로나바이러스 특이 난황항체를 이용한 건강보조식품개발 (영문) Development of Virus Specific Antibody for Control Feline Coronavirus Infections in Cat				
주관연구기관	포스트바이오		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 포스트바이오	
참 여 기 업	노터스			(성명) 천두성	
총연구개발비 (233,332천원)	계	233,332천원	총 연 구 기 간	2018. 4.~ 2020. 3.(2년 월)	
	정부출연 연구개발비	175,000천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	6명
	기업부담금	58,332천원		내부인원	4명
	연구기관부담금			외부인원	2명

○ 연구개발 목표 및 성과

□ 고양이 코로나바이러스 특이항체 확보를 통한 감염제어기술 확보

- 국내유행 고양이 코로나바이러스 분석 및 표적항원확보 : 891건의 임상시료와 분리주확보
- 감염제어기술을 위한 바이러스 특이 항체제작 : 11종의 바이러스특이 단클론항체개발
- 코로나바이러스 특이 단클론항체를 이용한 항원진단키트구성 : 항원검출 ELISA 세팅
- 고양이코로나바이러스 특이항체에 대한 임상평가를 통한 유효성검증

○ 연구내용 및 결과

□ 임상시료확보 및 진단결과 (유행양상파악)

- 고양이 위장관염 진단 의뢰된 1928건의 분변검체 중 891건(47.2%)에서 고양이코로나바이러스 검출
- 고양이 전염성 복막염 진단 의뢰된 118건의 체액샘플 중 44건(37.3%)에서 검출한계 이상의 고양이 코로나바이러스 검출
- 고양이 전염성 복막염진단을 위한 진단법을 개선하여 검출률을 2배이상 향상시킴 (45.7%→95.7%)

□ 코로나바이러스 유전자염기서열분석 및 면역항원확보

- 장염 코로나바이러스 30여건 와 고양이 전염성 복막염 양성시료 10여건 총 40여건에 대한 염기서열분석
- 고양이 코로나바이러스 유전자 중 4개 부위(Spike, Matrix, Nucleocapsid, ORF7ab)에 대한 유전자분석을 수행
- 고양이 코로나바이러스 에 친화성이 있는 세포주를 이용하여 고양이 전염성 복막염케이스로부터 바이러스를 분리
- 초원심분리 등을 통해 고양이 코로나바이러스를 정제하고 불활화 과정을 거쳐 동물의 면역원으로 사용할 항원확보

□ 고양이 코로나바이러스 특이항체제조 및 임상평가를 통한 유효성검증

- 고양이 코로나바이러스 항원을 면역한 면역된 마우스를 이용하여 단크론항체를 제작하였으며 바이러스항원에 특이적으로 반응하는 11개의 단클론 항체 생산 세포주 확보
- 11종의 단클론항체(개발) 및 추가 10여종의 단클론항체 (상용)을 이용하여 5개의 진단용 페어를 확보
- 최종 코로나바이러스 항원 진단법에 대해 고양이 코로나바이러스 양성검체의 진단성능을 평가한 결과 Ct 25 미만의 검체 62개중 55개에서 양성을 확인 (민감도 88.7%)
- 4차례에 걸친 산란계 면역 후 난황항체 정제를 위한 난황확보한 후 IgY 순수정제를 통해 난황항체를 정제, 1:64이상의 중화항체가를 보이는 난황항체를 확보
- 고양이 코로나바이러스 난황항체 급이한 감염모델군에서 대조군에 비해 바이러스분비량이 11.8% 수준으로 감소 (31 dpi, 10.9 $TCID_{50}$/ml vs 92.5 $TCID_{50}$/ml)

○ 연구성과 활용실적 및 계획

□ 고양이 임상분야 활용

- 고양이 임상에서 임상적인 중요성이 높은 코로나바이러스 감염을 원천적으로 감소시키기 위한 의약품 또는 기능성 식품의 경우 고양이를 진료하는 수의사 그리고 고양이를 기르는 보호자의 가장 큰 관심분야로 제품화될 경우 독점적인 시장성을 확보할 수 있음.

□ 반려동물 건강기능식품시장에 적용

- 최근 반려동물의 노령화와 핵가족화로 인해 반려동물의 사육두수가 증가하고 이와 더불어 고양이사육에 대한 기호성의 증가로 고양이관련 헬스케어 시장은 평균적인 반려동물 관련 시장의 성장세에 비해 매우 높은 수준으로 확대될 것으로 예상되어 고양이 코로나바이러스의 항바이러스 기능성 식품군 시장은 매우 시장성이 큰 분야로 예상됨.

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		81801302	
사업구분					
연구분야				과제구분	단위
사 업 명	농식품연구성과후속지원사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	고양이 코로나바이러스 감염제어기술 개발을 위한 바이러스 특이항체 개발			과제유형	(기초,응용,**개발**)
연구기관	포스트바이오			연구책임자	천두성
연구기간 연 구 비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.4-2018.12	77,000	25,666	102,666
	2차년도	2019.1-2020.3	98,000	32,666	130,666
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계		175,000	58,332	233,332
참여기업	포스트바이오 노터스				
상 대 국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020년 6월 12일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
포스트바이오	대표이사	천두성

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	

Ⅰ. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

고양이의 감염성 질환중 임상적으로 중요성이 매우 큰 코로나바이러스 감염증에 대해 연구를 활성화하기 위한 다양한 임상검체의 확보, 진단을 위한 단클론항체의 개발과 감염된 고양이의 임상적용을 위한 수동면역용 난황항체의 개발 및 임상시험결과의 확보 등 향후 고양이 코로나바이러스 감염증의 제어기술을 개발하기 위한 기반연구에 도움이 되는 연구결과들을 도출함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

고양이 코로나바이러스 감염증과 관련한 다양한 임상검체의 확보, 진단을 위한 단클론항체의 개발과 감염된 고양이의 임상적용을 위한 수동면역용 난황항체의 개발 및 임상시험결과의 확보 등의 연구개발결과는 고양이 감염증의 연구의 활성화 및 반려동물산업전반에 미치는 파급효과가 적지 않을 것으로 예상됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

여러 가지 연구개발결과 중 FIP의 고감도 진단을 위한 리얼타임피씨알법은 현재 바로 임상에 적용이 가능한 수준으로 고양이 임상에 실질적인 파급효과가 있을 것으로 판단되며 그 외 단클론항체를 이용한 진단법이나 난황항체를 이용한 수동면역치료제의 개발연구는 차후 추가적인 연구를 통해 반려묘 설사증의 진단키트 및 건강기능식품의 상용화로 이어질 가능성이 높음

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

2년이라는 짧은 연구개발기간 동안 약 2년간의 코로나바이러스 유행양상의 파악, 임상검체 확보 등 꾸준한 연구를 수행하였고 본 연구의 주된 목적인 고양이 코로나바이러스에 대한 제어기술개발을 위해 단클론항체와 난황항체 등의 개발 및 임상평가 등의 다양한 연구를 수행하여 연구수행이라는 측면에서 매우 성실하게 연구를 수행한 것으로 판단됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, **보통**, 미흡, 불량)

연구개발을 통해 2건의 특허출원 1건의 특허등록, SCI 논문 1편을 연구기간 중 완료해야하나 결과의 도출이 다소간 지연되어 연구개발종료시점에서 2건의 특허출원과 SCI 논문투고만이 진행되어어 다소간 성과면에서 아쉬운 점이 있으나 연구개발 종료 1-2년에에 특허등록 2건과 연구논문 1편의 등재는 문안하게 진행될 것으로 예상됨.

Ⅱ. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
임상시료확보 및 진단결과 (유행양상파악)	20	100%	유행양상의 파악 및 임상시료의 확보 등은 100% 완료되었고 추가적으로 FIP 신규진단법의 개발 및 평가 등 기존 목표대시 초과하여 달성됨
코로나바이러스 유전자염기서열확보	15	100%	연구개발을 위해 충분히 목표달성됨
면역을 위한 표적항원확보	15	100%	//
고양이 코로나바이러스 특이항체제조	30	100%	//
고양이 코로나바이러스 특이항체의 임상적 유효성검증	30	70%	성실하게 연구를 수행하여 연구내용은 모두 수행하였으나 기존의 목표에 비해서 다소간 부족한 점이 있음.
합계	100점	91점	

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

고양이의 감염성 질환중 임상적으로 중요성이 매우 큰 코로나바이러스 감염증에 대해 연구를 활성화하기 위한 다양한 임상검체의 확보, 진단을 위한 단클론항체의 개발과 감염된 고양이의 임상적용을 위한 수동면역용 난황항체의 개발 및 임상시험결과의 확보 등 향후 고양이 코로나바이러스 감염증의 제어기술을 개발하기 위한 기반연구에 도움이 되는 연구결과들을 도출함.
이러한 연구개발결과는 고양이 감염증의 연구의 활성화 및 반려동물산업전반에 미치는 파급효과가 적지 않을 것으로 예상되며 특히 FIP의 고감도 진단을 위한 리얼타임피씨알법은 현재 바로 임상에 적용이 가능한 수준으로 고양이 임상에 실질적인 파급효과가 있으며 그 외 단클론항체를 이용한 진단법이나 난황항체를 이용한 수동면역치료제의 개발연구는 차후 추가적인 연구를 통해 반려묘 설사증의 진단키트 및 건강기능식품의 상용화로 이어질 가능성이 높음
마지막으로 연구결과상 다소 미흡한 점은 성실하게 연구를 수행하여 연구내용은 모두 수행하였으나 고양이 코로나바이러스 항원검출법 이나 수동면역의 유도를 위한 난황항체의 개발에 있어 기존의 목표에 비해서 다소간 부족한 점이 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

Ⅳ. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	■자유응모과제 □지정공모과제	분 야		
연 구 과 제 명	고양이 코로나바이러스 감염제어기술 개발을 위한 바이러스 특이항체 개발			
주관연구기관	포스트바이오		주관연구책임자	천두성
연 구 개 발 비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	175,000	58,332		233,332
연구개발기간	2018.4-2020.3			
주요활용유형	■산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( ) □미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 임상시료확보 및 진단결과 (유행양상파악)	• 고양이 위장관염 진단 의뢰된 1928건의 분변검체 중 891건(47.2%)에서 고양이코로나바이러스 검출 • 고양이 전염성 복막염 진단 의뢰된 118건의 체액샘플 중 44건(37.3%)에서 검출한계 이상의 고양이 코로나바이러스 검출 • 고양이 전염성 복막염진단을 위한 진단법을 개선하여 검출률을 2배이상 향상시킴 (45.7%→95.7%)
② 코로나바이러스 유전자염기서열분석 및 면역항원확보	• 장염 코로나바이러스 30여건 와 고양이 전염성 복막염 양성시료 10여건 총 40여건에 대한 염기서열분석 • 고양이 코로나바이러스 유전자 중 4개 부위(Spike, Matrix, Nucleocapsid, ORF7ab)에 대한 유전자분석을 수행 • 고양이 코로나바이러스 에 친화성이 있는 세포주를 이용하여 고양이 전염성 복막염케이스로부터 바이러스를 분리 • 초원심분리 등을 통해 고양이 코로나바이러스를 정제하고 불활화 과정을 거쳐 동물의 면역원으로 사용할 항원확보
③ 고양이 코로나바이러스 특이항체제조 및 임상평가를 통한 유효성검증	• 고양이 코로나바이러스 항원을 면역한 면역된 마우스를 이용하여 단크론항체를 제작하였으며 바이러스항원에 특이적으로 반응하는 11개의 단클론 항체 생산 세포주 확보 • 11종의 단클론항체(개발) 및 추가 10여종의 단클론항체 (상용)을 이용하여 5개의 진단용 페어를 확보 • 최종 코로나바이러스 항원 진단법에 대해 고양이 코로나바이러스 양성검체의 진단성능을 평가한 결과 Ct 25 미만의 검체 62개중 55개에서 양성을 확인 (민감도 88.7%) • 4차례에 걸친 산란계 면역 후 난황항체 정제를 위한 난황확보한 후 IgY 순수정제를 통해 난황항체를 정제, 1:64이상의 중화항체가를 보이는 난황항체를 확보 • 고양이 코로나바이러스 난황항체 급이한 감염모델군에서 대조군에 비해 바이러스분비량이 11.8% 수준으로 감소 (31 dpi, 10.9 $TCID_{50}$/ml vs 92.5 $TCID_{50}$/ml)

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위	2건	2건	건	1건	500 백만원	1건	4000 백만원	2000 백만원	명	백만원	건	1건	건		건		명	건	건	
가중치	50	50	0	0																
최종목표	2	2		1	500	1	4000	2000				1								
연구기간내 달성실적	2	0		0		2	1.84													
달성율(%)	100%	0		0	0	200%	0	0				0								

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	고양이 코로나바이러스 검출을 위한 리얼타임피씨알 조성
②	고양이 코로나바이러스에 대한 난황항체 제조방법 및 이에 의해 제조된 난황항체
③	고양이 코로나바이러스 특이항체 기반 항원 검출 ELISA

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계최초	국내최초	외국기술복제	외국기술소화·흡수	외국기술개선·개량	특허출원	산업체이전(상품화)	현장애로해결	정책자료	기타
①의 기술		V				V				
②의 기술					V	V	V			
③의 기술		V					V	V		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	국내외 반려동물병원 대상 고양이 전염성 복막염 유전자진단에 활용
②의 기술	반려묘 대상 건강기능식품 (코로나바이러스 IgY 함유)으로 출시
③의 기술	반려동물대상 수탁기관 및 반려동물병원 POCT 진단키트로 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위	2건	2건	건	1건	500 백만원	1건	4000 백만원	2000 백만원	명	백만원	건	1건	건		건		명			
가중치	50	50	0	0																
최종목표	2	2		1	500	1	4000	2000				1								
연구기간내 달성실적	2	0		0		2	1.84													
달성율(%)	100 %	0		0	0	200 %	0	0				0								

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명[1]			
이전형태	□무상 □유상	기술료 예정액	천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기[3]	
기술이전시 선행조건[4]			

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)