

122060
-2

신·변종
코로나
19
감염병
예방 및
조기
대응을
위한
동물용
mRNA
백신
개발

최
종
보
고
서

2024

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
가축질병대응기술고도화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004647-01

신·변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신 개발

2024년 6월 18일

주관연구기관 / 중앙대학교 산학협력단
공동연구기관 / (주)엔이에스 바이오테크놀러지
충남대학교 산학협력단
경상국립대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “신변종 코로나19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신 개발”(개발기간 : 2022.04.08 ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.18

주관연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (대표자) 고원석
공동연구기관명 : (주)엔이에스바이오테크놀러지 (대표자) 이진석
충남대학교 산학협력단 (대표자) 임남형
경상국립대학교 산학협력단 (대표자) 정재우 (완)

주관연구책임자 : 배지현
공동연구책임자 : 염지현
박정은
김석



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

최종보고서						보안등급			
						일반[<input checked="" type="checkbox"/> , 보안[<input type="checkbox"/>]			
중앙행정기관명	농림축산식품부		사업명	사업명		가족질병대응기술고도화지원사업			
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)					
공고번호	2022-99		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				연구개발과제번호	122060-2	
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0701	50%	LC0316	30%	LA0703	20%		
	농림식품과학기술분류	RB0202	40%	RB0201	30%	CA0104	30%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	국내외 신변종 바이러스 협력체계 구축							
	영문	Establishment of cooperation system Development for prevention and early response to new and variant infectious diseases							
연구개발과제명	국문	신변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신 개발							
	영문	Development of COVID-19 mRNA animals vaccine for prevention and early response to new and variant infectious diseases							
주관연구개발기관	기관명	중앙대학교 산학협력단		사업자등록번호	108-82-05979				
	주소	(우06064)서울시 동작구 복석로84		법인등록번호	115071-004394				
연구책임자	성명	배지현		직위	교수				
	연락처	직장전화			휴대전화				
		전자우편			국가연구자번호	10120535			
연구개발기간	전체	2022. 04. 08. - 2023. 12. 31. (21개월)							
	단계	1단계							
	(해당 시 작성)	n단계							
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계			연구개발비 외 지원금
		지방 자치 단체	기타						
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계	977,000	24,425	219,825				1,001,425	219,825	1,221,250
1단계	1년차	419,000	10,475	94,275			429,475	94,275	523,750
	2년차	558,000	13,950	125,550			571,950	125,550	697,500
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고			
공동연구개발기관	주연이이스바이 오테크놀로지	염지현	본부장			공동	중소기업		
	충남대학교	박정근	교수			공동	대학		
	경상국립대학교	김석	교수			공동	대학		
위탁연구개발기관									
연구개발기관 외 기관									
연구개발담당자 실무담당자	성명	염지현		직위	본부장				
	연락처	직장전화			휴대전화				
		전자우편			국가연구자번호	10664033			

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024 년 02 월 28 일

연구책임자: 배 지 현



주관연구개발기관의 장: 중앙대학교 산학협력단 고 중 혁



공동연구개발기관의 장: (주)엔이에스바이오테크놀로지 이 강 석



공동연구개발기관의 장: 충남대학교 산학협력단장 임 남 훈



공동연구개발기관의 장: 경상국립대학교 산학협력단장 정 재 우



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중상지(80g/m²)]

(23쪽 중 2쪽)

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술고도화지원사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)									
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		122060-2							
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0701	50%	LC0316	30%	LA0703	20%						
	농림식품 과학기술분류	RB0202	40%	RB0201	30%	CA0104	30%						
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국내외 신변종 바이러스 협력체계 구축											
연구개발과제명		신·변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신 개발											
전체 연구개발기간		2022. 04. 08. - 2023. 12. 31.(21개월)											
총 연구개발비		총 1,221,250 천원 (정부지원연구개발비: 977,000 천원, 기관부담연구개발비 : 244,250 천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)											
연구개발단계		기초[] 응용[√] 개발[] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(3단계) 종료시점 목표(4단계)							
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)		해당 없음											
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)		해당 없음											
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		신·변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신개발									
		전체 내용		1. 금나노입자 핵산 전달 시스템 기반 동물용 mRNA 항원 전달 플랫폼 제작 및 효능 평가 2. 효능 평가를 위한 동물시험 및 비임상 시험 수행 3. 다양한 동물에 적용 가능한 항원 전달 플랫폼의 범용성 확인									
		1단계 (해당 시 작성)	목표	해당 없음									
			내용	해당 없음									
		n단계 (해당 시 작성)	목표	해당 없음									
내용	해당 없음												
연구개발성과		논문 3건, 특허 11건, 학술발표 1건, 전문연구인력양성 4건, 고용창출 11건											
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과		<ul style="list-style-type: none"> 코로나19 감염병에 대한 반려동물용 mRNA 백신을 개발하고, 이를 바탕으로 앞으로 국내 유입이 우려되는 신·변종 감염병에 대한 선제적 예방 플랫폼을 구축 다양한 동물에서 코로나19 바이러스의 작용기전과 숙주 감염능 연구는 코로나19 바이러스에 대한 효율적인 broad-spectrum human vaccine을 개발 본 과제를 통해 연구되는 방법 등을 통해 다른 감염성 바이러스에 대한 연구 분야에 적용하여 활용할 수 있는 기초자료를 제공. 											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수		논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		신품종		
									생명 정보	생물 자원	화합물	정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황		구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			

국문핵심어 (5개 이내)	코로나19	동물	나노입자	전달	백신
영문핵심어 (5개 이내)	COVID19	Animal	Nanoparticle	delivery	vaccine

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)

(23쪽 중 4쪽)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	8
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	15
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	18
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	69
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	70
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	70
별첨 자료 (참고 문헌 등)	71

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 개요

□ COVID-19 pandemic

- 2019년 12월부터 현재까지 전세계적으로 발생중인 SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)에 의한 사람의 호흡기 바이러스 감염증.

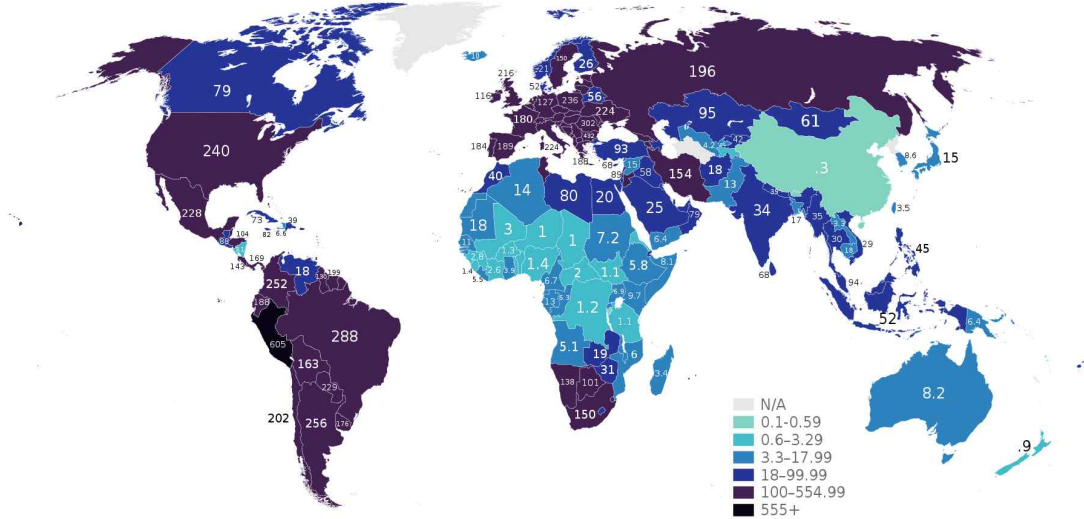


그림 4. COVID-19 발생현황 (2021년 12월)

- 세계보건기구는 2020년 1월 30일에 국제적 공중보건 비상사태를, 2020년 3월 11일에 pandemic을 선언했으며, 2021년 12월 19일 현재 계속되는 pandemic으로 인해 2억 7,400만 건 이상의 사례와 535만명이 사망했음.

	SARS-CoV-2[6-9]	SARS-CoV[10-12]	MERS-CoV[13-15]
Genus	Clade I, lineage B	Clade I, lineage B	Clade II, lineage C
Length of nucleotides	29.9 kilobases	29.75 kilobases	30.11 kilobases
First emergence	7 December 2019, Wuhan, China	16 November 2002, Foshan, China	4 April 2012, Zarqa, Jordan
Virus identification	January 2020	March 2003	June 2012
Causative agent declaration	January 2020	April 2003	September 2012
Recent status	Pandemic ongoing	Completely control	Sporadic continuous
Number of infected cases	Above 12.7 million ^a	8096	2553.
Male-to-female ratio	1.27:1	1:1.13	1.78:1
Number of attributed deaths	Above 566 thousand ^a	774	876
Number of viral Footprint	213 countries or regions ^a	29 countries or regions	27 countries or regions
Case fatal rate	4.4%	9.6%	34.3%

NA Not available. ^a According to the data released by the WHO on 13, July, 2020

그림 5. SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV 비교
(출처 : Zhu et al., Respiratory research)

- 박쥐로부터 유래하였으며 천산갑, 밍크 등의 중간숙주를 거쳐 사람에게 감염하였다고 알려져 있음. SARS-CoV, MERS-CoV에 비해 치명율은 낮으나 높은 전파율을 나타냄. 동물에서는 거의 임상증상을 나타내지 않으나, 사람에서는 가벼운 호흡기 증상에서 급성호흡기부전(ARDS), 폐렴, 신부전, 사망에 이르는 치명적인 임상증상을 나타냄.

□ SARS-CoV-2 변이주 발생

- 2019년 12월 중국 우한에서 SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1) 가 처음 확인된 후 시간이 지남에 따

라 다양한 SARS-CoV-2 변종이 보고되었음. WHO는 코로나바이러스를 더 위험하게 만들 수 있는 변종바이러스 4종 (알파, 베타, 감마, 델타) 을 우려 변종 (Variants of concern, VOC)로 지정하였음.

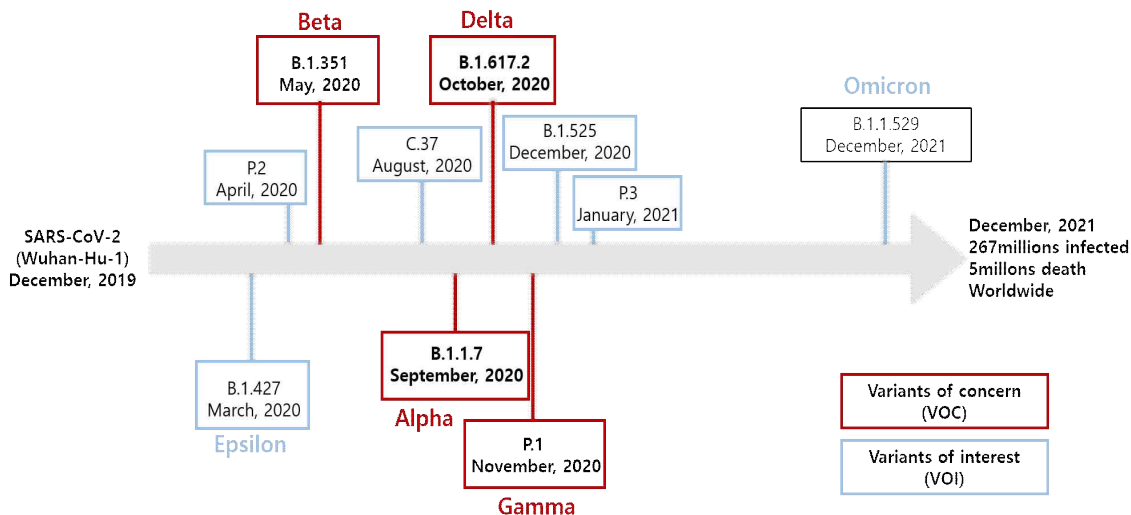


그림 6. SARS-CoV-2 변이주 발생 추이

- 변이주 바이러스는 이전에 확인된 바이러스 균주보다 더 전염성이 있는 것으로 관찰되었으며 백신 및 일부 단일클론항체의 활성을 억제하여 Alpha, Delta 등의 변이주가 우세종으로 작용함.

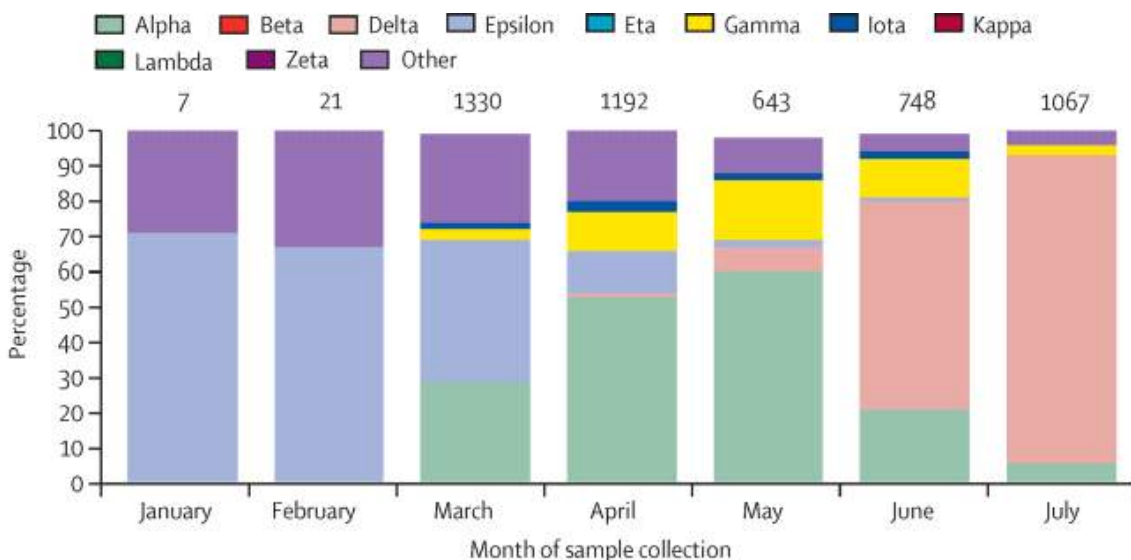


그림 7. 2021년 상반기 SARS-CoV-2 VOC 분포 (출처 : Tartof et al., The Lancet)

2021년 11월 26일 omicron (B.1.1.529)가 세계보건기구에서 우려 변종으로 선언됨. 변이체에는 많은 수의 돌연변이가 관찰되었으며 기존 바이러스 및 다른 변이주에 비해 높은 전염성을 가진 것으로 알려져 있으나 정확한 바이러스의 특성에 대한 연구는 진행중임.

□ SARS-CoV-2 동물감염

- SARS-CoV-2는 종 장벽을 넘어 인간과 다른 동물 종을 감염시켰으며 감염된 인간은 동물에 대한 역동물성 전염을 촉진할 수 있음.
- 최근 실험 연구에 따르면 고양이, 개, 제방들쥐, 페럿, 과일박쥐, 햄스터, 밍크, 돼지, 토끼, 너구리, 두더지, 흰꼬리사슴 등 많은 포유류가 코로나바이러스에 감염될 수 있는 것으로 나타났으며, 고양이, 페럿, 과일박쥐, 햄스터, 너구리, 흰꼬리사슴은 실험실 환경에서 같은 종의 다른 동물에

게 감염을 전파한다고 보고되었음.

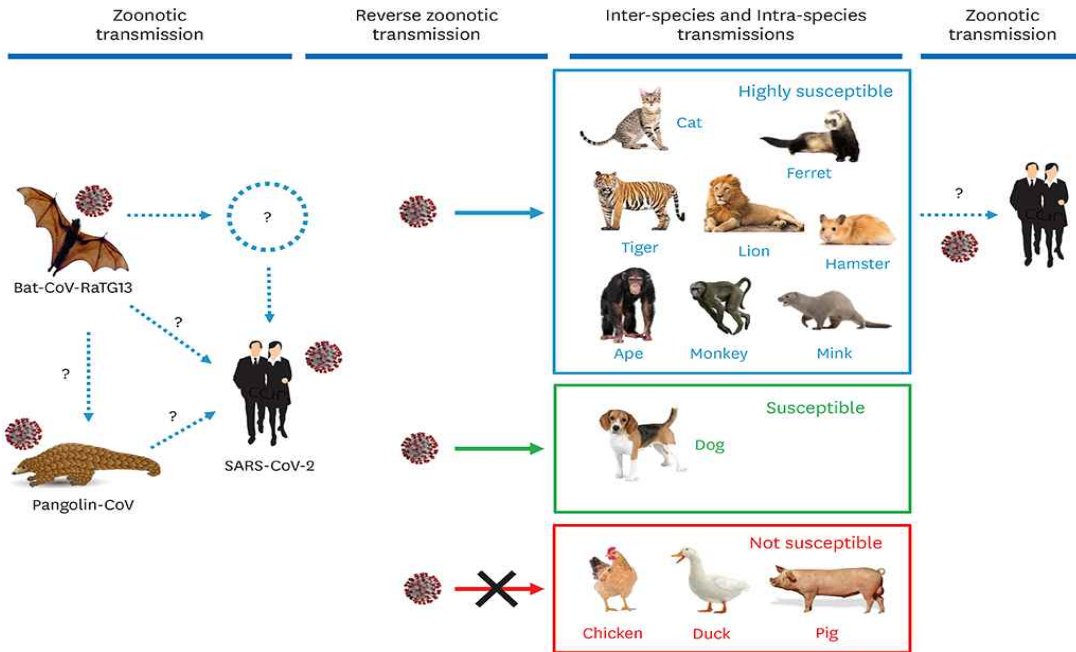


그림 8. Possible origin of SARS-CoV-2 and transboundary transmissions between humans and animals (출처: Yoo et al., 2020)

- 실험실 환경에서 리서스원숭이, 긴꼬리원숭이, 개코원숭이, 그리빗, 일반 마모셋 등이 SARS-CoV-2에 감염되어 증상이 나타난 바 있으며, 인간 감염에 대한 동물실험 모델로 활용되고 있음.
- SARS-CoV-2의 원형 (Wuhan-Hu-1) 바이러스에 감염되지 않던 실험용 생쥐가 새로운 변이주 (alpha, beta, gamma variant) 바이러스에는 감염될 수 있다고 보고됨.
- 연구 결과에 근거하면 닭과 오리는 감염되거나 감염을 전파하지 않는 것으로 생각됨.
- 사람에 의한 동물의 SARS-CoV-2 감염은 세계적으로 보고되고 있으며, 감염 동물의 대부분은 COVID-19에 감염된 사람(동물 주인, 관리인 또는 밀접하게 접촉한 다른 사람)과 접촉한 후 감염되었음.
- 질병관리청과 농림축산식품부로부터 제출받은 자료에 따르면, 지난 2021년 8월 30일 기준으로 국내에서 개 56마리, 고양이 36마리가 확진판정을 받았음.
- 현재로서는 동물이 COVID-19 유발 바이러스인 SARS-CoV-2를 사람에게 전염시키는 데 유의미한 역할을 한다는 증거는 적으나, **다양한 동물이 SARS-CoV-2에 영향을 받는지 그리고 어떻게 영향을 받는지에 대한 추가 연구 및 선제적인 대응체계 (백신) 구축이 필요함.**
- SARS-CoV-2 변이주의 지속적인 발생가능성을 고려해 볼 때, **반려동물에서의 SARS-CoV-2 감염성의 평가는 원형 바이러스뿐만 아니라 변이주 바이러스를 포함하여 이루어져야 하며 동물감염의 주요 인자로 작용하는 바이러스 S 변이를 규명하는 것이 필요함.** 실제로 마우스 및 밍크에서 원형 바이러스보다 변이주 바이러스에 의해 높은 감염이 확인되었음.
 - ✓ Y453F 변이는 밍크 사이에서의 SARS-CoV-2 확산과 연관성이 있다고 알려짐.
 - ✓ N501Y 변이는 인간 숙주에 대한 추가 적응의 결과로 발생한 것으로 추측되며 알파, 베타 및 감마 변이체에서 확인되었음. 최근 연구에 따르면 N501Y 돌연변이가 RBD와 hACE2의 상호작용을 향상시키는 것으로 나타났음. 또한, 이 돌연변이는 S 단백질이 마우스와 쥐의 ACE2를 활용할 수 있게 하는 것으로 알려짐.
- 반려동물에서의 COVID-19 감염성 및 임상증상이 최근 논문(Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: Pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats)에서 보고됨.
- 개와 고양이 모두에서 임상증상이나 병리소견은 관찰되지 않았음.

- 고양이의 경우 임상증상은 나타나지 않았으나 감염후 5일동안 비강과 구강을 통해 바이러스의 shedding이 관찰되었음. 또한, 비강과 구강을 통해 분비된 바이러스가 건강한 고양이를 감염시킨다는 것이 확인되었음.

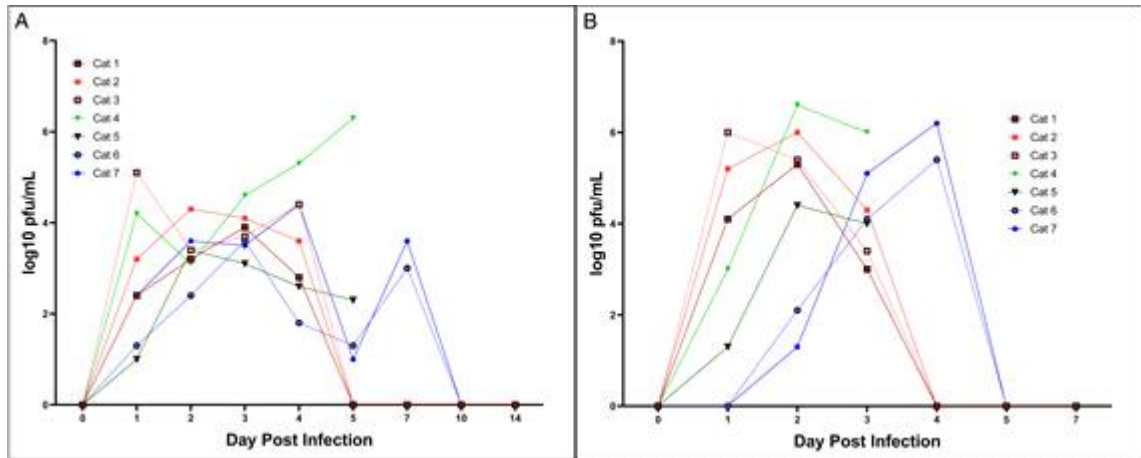


그림 9. 감염된 고양이의 비강 및 구강 내 바이러스 역가

□ 인수공통감염병과 원헬스(One Health)의 중요성

- 인수공통감염병(zoonosis)이란 동물과 사람 사이에 상호 전파되는 병원체에 의하여 발생하는 전염병으로서 최근 인간 거주 영역의 확대로 인하여 야생동물 서식지가 축소되고 이로 인해 동물-사람간의 접촉 증대로 인해 중간 감염병 전파가 증가하고 있음.
- 현재 전 세계적으로 사람의 건강이 동식물, 환경과 하나로 연계되어 있음을 인식하고, 모두에게 최적의 건강을 제공하기 위해 다부처, 다학제 협력을 추구하는 원헬스(One Health) 전략을 도입하고 있으며, 이러한 전략을 위해 인체감염병, 인수공통감염병, 생활습관질환, 환경보건, 독성물질, 손상, 산업보건 등 다양한 건강, 질병 관련 분야를 모두 총괄하는 대응 전략이 요구되고 있음.
- 특히 인수공통감염병의 발생이 증가 하면서 원헬스적 시각에 입각한 대응체계의 중요성은 점차 증가하고 있음. 20세기 이후 발생한 신종 감염병의 75% 이상이 야생동물로부터 유래하기 때문에 앞으로 출현할 감염병 대비에 있어 원헬스적 접근은 매우 중요함.
- 바이러스는 종(種) 사이를 뛰어넘을 수 있어 스스로 유전적 변화를 통해 숙주 세포에 결합하는 능력을 획득하기 때문에, 박쥐에서 사향고양이를 거쳐 사람에게 전염된 사스(SARS)나 박쥐에서 낙타를 거쳐 사람으로 전염된 메르스(MERS) 바이러스와 유사하게 코로나19 바이러스도 유전적으로 진화하는 변화를 거쳐 인체 감염 능력을 갖추게 된 것임을 밝혔으며 더불어 자연 숙주(박쥐 등 야생동물)와 인간에서 **코로나바이러스에 대한 지속적인 감시체계의 구축 및 조기 대응을 위한 빠른 백신의 개발은 신종 코로나 바이러스 발생을 신속하게 통제하도록 하는 핵심 기술임.**

1-2. 국내외 기술개발 동향 및 문제점

□ 동물용 백신 개발 시장 동향

- 돼지 인플루엔자, 광견병, 조류 인플루엔자를 비롯한 질병들의 빈번한 발병으로 인해 반려동물, 가축, 가금, 수산양식 동물을 비롯한 다양한 분야에서 선진 기술 기반의 백신에 대한 수요가 전 세계적으로 증가하고 있음. 기술별 동물용 백신 시장은 약독화 생백신, 불활화 백신, 독소이드 백신, 재조합 백신, 기타 백신(DNA·접합·아단위체 백신)으로 세분화됨.
- 2019년 동물용 백신 시장에서는 약독화 생백신 부문이 44.0%로 가장 높은 점유율을 차지했음. 약독화 생백신 부문은 예상 기간 중 5.7%의 CAGR로 2020년 34억7810만 USD에서 2025년 45억8080만 USD에 도달할것으로 예상됨. 이들 백신이 제공하는 투여 용이성과 장기간 면역성은 약독화 생백신 시장의 성장을 주도하고 있음.

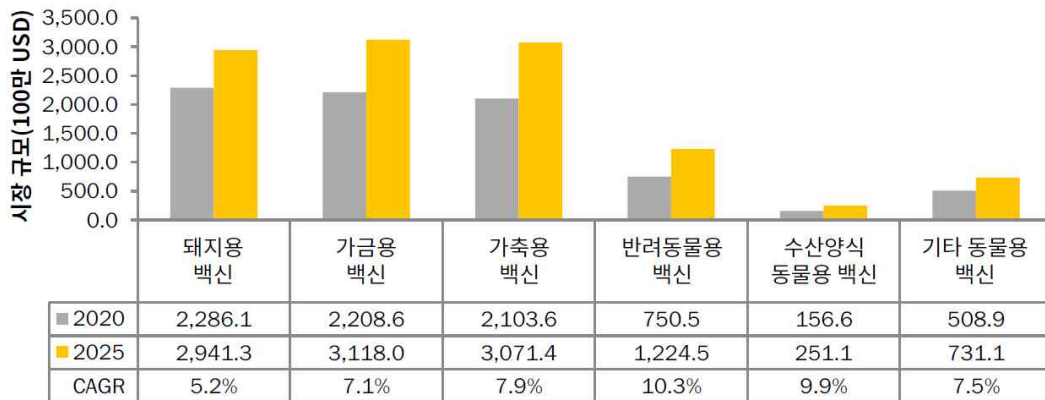
- 세계 동물용 백신 시장은 2020년에서 2025년 사이 7.2%의 CAGR로 2020년 80억 1420만 USD에서 2025년 113억3750만 USD에 도달할 것으로 예상 됨. 반려동물양육두수의 증가, 인수공통전염병 발생률의 증가, 다양한 정부 기관 및 동물 협회에서 동물 보건 유지를 취지로 추진하는 사업, 동물성 식품에 대한 수요 증가와 같은 요인이 이 시장의 성장을 주도하고 있음. 반면, 백신의 높은 저장 비용은 시장 성장을 제한하고 있음.

기술	2018년	2019년	2020년	2025년	CAGR(2020-2025년)
약독화 생백신	3,195.8	3,332.0	3,478.2	4,581.4	5.7%
불활화 백신	2,360.7	2,511.3	2,675.7	3,927.0	8.0%
독소이드 백신	647.8	685.2	725.9	1,036.4	7.4%
재조합 백신	510.0	554.0	602.8	983.2	10.3%
기타 백신	462.2	495.3	531.6	809.5	8.8%
총계	7,176.5	7,577.8	8,014.2	11,337.5	7.2%

참고: 기타 백신(DNA·접합·아단위체 백신)

출처: WSPA, AHI, APPA, FAO, OIE, 축산부, MOAC, FAVA, TVMA, 연례 보고서, 언론 보도, 투자 설명회, 전문가 면담, MarketsandMarkets 분석

그림 10. 2018-2025년 기술별 동물용 백신시장 (100만 USD)



참고: 기타 동물용 백신에는 말, 사슴, 코끼리, 낙타, 토끼용 백신이 포함된다.

출처: WSPA, AHI, APPA, FAO, OIE, 축산부, MOAC, FAVA, TVMA, 연례 보고서, 언론 보도, 투자 설명회, 전문가 면담, MarketsandMarkets 분석

그림 11. 2020년 대 2025년 유형별 동물용 백신시장 비교 (100만 USD)

□ 동물용 백신 개발 연구 동향

- **약독화 생백신 (Live attenuated vaccine, LAV):** 지정된 조건에서 실험실에서 약독화하거나 약화시킨 살아있는 미생물로 구성된 백신. 질병을 유발하는 병원체인 이 살아있는 미생물들은 예방접종 후에 면역반응을 발생시킴. LAV는 체액성 면역과 세포성 면역 둘 다의 반응을 촉진하여, 장기간 면역성을 제공하며, 또한 투여가 용이함. 주사나 자연 경로(경구 또는 호흡)를 통해 투여할 수 있으나, LAV에 사용되는 살아있는 바이러스가 유전자 회복을 통해 질병을 유발하거나 면역상태가 약화된 숙주에서 감염을 일으킬 수 있어 안전성 문제가 제기되며, 이 유형의 백신은 저장 비용이 높고 저장 방법도 까다로움.
- **불활화 백신 :** 비활성/사멸한 미생물(바이러스 및 세균)로 이루어진 백신. 불활화는 대체로 열이나 포르말데히드, β-프로피오락톤과 같은 화학물질을 통해 이루어 짐. 불활화 백신은 체액성 면역반응의 발달에 가장 효과적이며, LAV에 비해 안정적 이지만, 이들 백신의 높은 비용, 충분한 면역반응을 획득하기까지 여러 차례의 투여를 요하는 요건, 단기간 면역성과 같은 단점들은

최종사용자의 채택을 제한하고 있음.

- **재조합 백신** : 재조합 기술을 사용하여 개발한 백신으로, 질병을 유발하는 미생물에 대한 노출과 관련된 위험 없이 원하는 면역반응을 형성하기 위해 미생물의 유전자 물질을 인공적으로 조작하거나 다른 미생물에서 얻은 특정 유전자와 재조합한 백신. 재조합 백신이 제공하는 주된 장점은 면역보조제가 필요하지 않다는 점과 실온에서도 효능을 유지하는 안정성 임. 또한, 병원체 오염이 일어나지 않고, 예방접종 후 이상반응을 나타내지 않으며, 병원체로부터 질병을 얻을 위험이 없기 때문에 안전성이 높음.
- **기타 백신** : 이 부문에는 아단위체, DNA, 접합 백신이 포함됨. DNA 백신은 돼지, 가금, 가축 질병의 발병 예방 및 치료에 개발되고 있으며, RNA 백신은 현재 코로나 백신을 기반으로 동물용 백신이 개발되고 있음. RNA 백신은 DNA 백신과 달리, 세포 내에서 핵으로 들어가야 할 필요가 없으므로 안전성이 높고 소량으로도 충분한 효과를 볼 수 있을 뿐만 아니라, 기존 백신과 대비하여 소규모의 시설로도 생산이 가능한 장점을 보유하고 있음
- **백신생산은 생백신 위주에서 첨단 생명과학기술을 이용한 RNA 백신 기술이 생산시스템 설계, 효능, 운영 측면에서 기존 시스템보다 우위에 있지만 현재 동물용 백신 기술 개발은 미흡한 상태임.**

1-3. 연구개발의 필요성

신·변종 감염병 출현에 대한 예방 및 조기 대응을 위한 효율적 백신 개발이 필요함

- 동물용 백신의 개발은 전염성이 강하고 치사율이 높아 사회, 경제적으로 피해가 큰 동물 전염병을 예방이 가능한 질병의 99%까지 효과적으로 발병을 줄일 수 있는 비용 대비 효과가 가장 큰 의약품으로서 축산의 생산성을 보장하고, 특별히 인수공통전염병의 발병 시 동물에서의 감염을 예방하여 전염원을 차단함으로써 인류에 크게 기여함.
- 최근 WTO, FTA 등 세계 무역환경의 변화로 인한 인적, 물적 교류의 증가와 지구 기후환경 변화에 따른 야생동물과 인간과의 상호작용으로 세계 각지에서 인수공통질병의 보균자인 가축 및 생산물, 야생동물이 빈번하게 이동하고 있어 새로운 신·변종 감염병의 전파 위험이 증대되고 있음.
- 현재 축산 산업에서 항생제 남용에 대한 국제적인 규제 증가로 인해 동물용 백신 개발의 중요도가 증가하고 있으며, 특히 이러한 신·변종 질병들은 진단법이나 예방대책이 확립되어 있지 않아 방역 당국에 엄청난 혼란을 야기할 수 있음. 특히 최근 문제가 되고 있는 코로나19의 대유행은 사람에서 동물로 전파가 가능하며, 이에 대한 백신 개발은 현안문제로 대두되고 있음.
- 미국 질병통제예방센터(CDC)는 "아직까지 동물이 사람에게 코로나바이러스를 전파할 가능성은 낮다"고 발표한 바 있으나, 인간 사회에서 집단면역이 형성되는 동안 바이러스가 변이하면서 반려동물과 가축 등으로 옮겨가 이들을 대규모로 감염시키고, 일정 기간 뒤 바이러스가 다시 인간에게로 옮겨오는 악순환이 발생할 수 있음.
- 코로나19와 같이 끊임없이 변종을 만들어내는 인수공통 감염질환의 경우, 이는 결국 인간에게 위험을 초래할것으로 예측되며, 따라서 신·변종 감염병의 동물 백신 개발이 필요함. 본 연구 과제를 통하여, **코로나19 감염병에 대한 반려동물용 mRNA 백신을 개발하고, 이를 바탕으로 앞으로 국내 유입이 우려되는 신·변종 감염병에 대한 선제적 예방 플랫폼을 구축하고자 함.**

1-4. 본 연구개발과제의 혁신성 및 차별성

- 선행연구를 통하여 금나노블록 기반 전달시스템은 다양한 핵산 분자를 용이하게 탑재하여 동물세포(in vivo 동물모델 포함) 내로 전달할 수 있는 플랫폼으로 입증됨.

확장성	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 금나노블록은 13~15 nm의 금나노입자에 약물 결합 기능을 갖는 카고 DNA서열이 결합된 복합체임. ▪ 카고(cargo) DNA 염기서열에 의해 금나노입자에 탑재 가능한 물질의 범위가
------------	--

	<p>결정되며, 카고 DNA의 크기 및 염기서열의 한계는 없음.</p> <ul style="list-style-type: none"> DNA, RNA와 같은 핵산은 상보적인 염기서열을 갖는 카고 DNA를 사용하여 금나노입자에 로딩 가능하며, 핵산 외 단백질은 특이적으로 결합 가능한 2차 구조를 갖는 aptamer를 카고 DNA로 사용하여 금나노블록 전달체로 사용 가능함.
신속성	<ul style="list-style-type: none"> 모더나의 코로나-19 mRNA 백신의 경우 항원 제작부터 IND 신청까지 대략 40일 정도 소요되었으며, 임상2상과 3상 시작까지 각각 5개월과 7개월이 소요되어 신속 백신개발 플랫폼으로 이용 가능성을 확인함. 금나노블록을 사용한 mRNA 백신 전달 시스템은 탑재하는 핵산의 디자인과 생산, 유전자 발현 효율을 수월하게 조절할 수 있으며, 이를 통해 코로나19를 비롯한 새로운 감염성 질환의 출현에 신속하게 대응 가능.
안전성	<ul style="list-style-type: none"> mRNA 백신 전달에 사용되는 금나노블록은 감염이나 genomic DNA로의 삽입에 의한 돌연변이 유발 위험성이 없음. 세포 내 대사과정을 통한 분해가 가능함. 금나노블록에 활용되는 13~15 nm 크기의 금나노입자는 세포독성이 없다는 것이 in vivo 동물모델 뿐만 아니라, 유사한 물질을 활용한 치료제를 사람을 대상으로 실험에서도 입증되었음(PCT/US2009/065822, NCT03020017 Early phase 1). GLP기관에서 수행한 금나노블록 기본물질의 비임상 독성 시험에서도 생체 독성이 없음을 확인함.
효율성	<ul style="list-style-type: none"> 금나노블록을 사용한 mRNA 백신 전달 시스템은 기존 mRNA 백신의 전달시스템(예, LNP, 리포좀 기반 전달 시스템)의 주요 한계(특허권 독점, 공정의 복잡성, 심근염 및 아나필락시스 등의 부작용)를 극복할 수 있음. 이 시스템은 세포막 뿐만 아니라 핵막을 통과하여 핵산 분자를 전달할 수 있음을 선행연구를 통하여 입증하였음. COVID-19 이외 mRNA 백신은 암백신, 다제내성균 감염에 대한 백신으로 개발 가능하며, 관련 연구를 진행 중에 있음.
생산성	<ul style="list-style-type: none"> 단순한 설비와 저비용으로 신속하게 NES 바이오테크놀로지 기업부설연구소에서 대량생산이 가능함. 현재 다양한 감염병에 대한 mRNA 백신 개발이 진행 중이며 COVID-19 mRNA 백신의 경우 10여종의 후보물질이 개발되어 있으며, 이중 2종이 2021년 현재 비임상 독성시험 및 작용기전(ADME 등)에 대한 연구 진행 중임. 임상용 물질 생산은 나노의약품 전문 CDMO 기업에 의뢰 예정.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. 연구개발과제의 최종 목표

최종목표	신·변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신 개발	
세부목표	1. 금나노입자 핵산 전달 시스템 기반 동물용 mRNA 항원 전달 플랫폼 제작 및 효능 평가 2. 효능 평가를 위한 동물시험 및 비임상 시험 수행 3. 다양한 동물에 적용 가능한 항원 전달 플랫폼의 범용성 확인	
연차별목표	1년차 (2022)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 신규 mRNA 항원 제작 및 NES 핵산전달체 기반 플랫폼 적용 ▪ NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 세포주 및 다양한 동물 전달능 및 면역원성 평가 ▪ 변이주의 숙주 특이성 및 감염성 평가
	2년차 (2023)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 다양한 항원 mRNA 종을 이용한 금나노입자 기반 mRNA 백신 전달 플랫폼의 범용성 평가 ▪ 코로나 바이러스의 인수간 전파기전 규명

2-2. 연구개발과제의 내용

□ 1차년도(2022년)

- (주관연구개발과제): 중앙대학교 : 동물용 mRNA 항원 결정, 효능 평가
 - 연구개발 내용 1: 신규 항원 mRNA 제작
 - ✓ 항원 mRNA 선별, 최적화 및 제작
 - 연구개발 내용 2: 항원의 NES 핵산전달체 기반 플랫폼 적용
 - ✓ NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체 제작
 - ✓ NES 핵산전달체-항원 mRNA의 in vitro 전달능 평가
- (공동연구개발과제 1) ㈜엔이에스바이오테크놀러지 : 항원 전달 플랫폼 제작 및 안전성 평가
 - 연구개발 내용 1: NES 핵산전달체 플랫폼 제작
 - ✓ 13~15nm 금나노입자 합성 SOP 확립
 - ✓ mRNA 전달용 NES 핵산전달체 최적화 및 제작
 - 연구개발 내용 2: NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 안정성 평가
 - ✓ 투과전자현미경을 이용한 NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 크기 및 모양 분석
 - ✓ UV-vis 및 Dark Field Scattering Spectroscopy를 활용한 나노입자의 광학 특성 분석
 - ✓ zeta potential 등을 활용한 나노입자의 표면 전하 및 표면 분자 성분, 구조 등 표면 특성 분석
 - ✓ 다양한 보관 조건에 따른 NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 안정성 평가
- (공동연구개발과제 2) 충남대학교 : SARS-CoV-2 변이주 숙주특이성 평가
 - 연구개발 내용 1: SARS-CoV-2 변이주의 반려동물 감염성 평가
 - ✓ Canine 및 feline ACE2 발현 세포주 확보
 - ✓ Canine 및 feline ACE2 발현 세포주에서의 변이주 슈도바이러스 감염능 평가
 - ✓ Canine 및 feline ACE2 발현 세포주에서의 SARS-CoV-2 변이주 감염능 평가

- 연구개발 내용 2: 변이주 S 단백질과 반려동물 ACE2 binding affinity 측정
 - ✓ SARS-CoV-2 S1-Fc 확보
 - ✓ IP 및 SPR을 이용한 변이주 스파이크 단백질의 ACE2 binding affinity 측정
- (공동연구개발과제 3) 경상국립대학교 : NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 동물 전달효능 및 면역원성 평가
 - 연구개발 내용 1: 개 유래 세포주(MDCK-NBL2 등)를 이용 후보 백신의 면역원성 및 독성 평가
 - ✓ 발굴 백신후보물질의 면역세포주 (MDCK-NBL2 등) 이용 백신효과 및 면역반응 평가
 - 면역세포주(MDCK-NBL2 등) 이용한 평가 : 농도별 cytokine 생성양상 분석
 - 세포독성평가 : 농도별 세포의 증식성, apoptosis 관련 유전자 발현 양상 등
 - ✓ 면역세포주(MDCK-NBL2 등)에서 발굴백신후보물질에 의해서 발현 유도되는 유전자의 특성 분석
 - Microarray 또는 NGS 기법을 활용하여 특이 발현 유전자 발굴 및 특성 분석
 - 연구개발 내용 2: 후보 동물용 백신의 비설치류 동물(개) 면역원성 및 효능 평가(식약처'예방용 mRNA 백신 평가 가이드라인'에 준하여 평가)
 - ✓ 발굴 백신후보물질에 대한 비설치류 동물(개)에서 면역반응 평가(IM 접종)
 - 접종방법: 성견 (Beagles), 1회/2주 (4주간 총 3회), 시험 군당 각 2두 설정, 군당 1두는 회복군 설정 (4주)
 - 시험군: 후보물질 시험군 (2군 이상), 대조군(1군)
 - 농도 설정: 세포 및 실험동물 비독성 농도
 - 안전성평가:
 - 시험 중: 일반증상, 체중 및 사료섭취량 측정, 체온측정 등
 - 시험 종료 후: 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검 시 육안적 검사, 조직병리학적 검사 및 국소내성검사 등
 - 면역원성 평가: 면역매개물질 (cytokine 등), 면역세포 분석, 항체 형성능(IgA, IgG 등), 면역기관 (spleen 등) 면역세포 분포 및 기능 분석 등
 - ✓ 발굴 백신후보물질에 대한 비설치류 동물(개)에서 효능평가
 - 슈도바이러스 및 authentic SARS-CoV-2를 이용한 중화항체가 측정

□ 2차년도(2023년)

- (주관연구개발과제): 중앙대학교 : 항체 면역원성 및 안정성 평가
 - 연구개발 내용 1: NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 실험용 동물에서 면역원성 평가
 - ✓ NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체 투여 농도별·시간별 면역세포 분포 변화 분석
 - ✓ 항체생산 분석 : 혈액에서 항원-특이적인 total IgG, subclasses 측정
 - ✓ 중화항체가 측정 : PRNT (Plaque reduction neutralization Test), Plaque reduction assay
 - ✓ 싸이토카인 발현 분석 : Th1/Th2/Th17면역반응 분석
 - 연구개발 내용 2: NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 안전성 평가
 - ✓ 소동물 모델에서 여러 농도의 NES 핵산전달체-mRNA 결합체 투여 후 일반 증상 관찰 및 체중 측정하여 안전성 평가
 - ✓ 소동물에서 유효 농도의 NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 생체 독성 평가

- ✓ 유도결합플라즈마 분광-질량 분석(ICP-MS)을 활용한 소동물에서 NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 생체 내 분포 및 배출 평가를 통한 PK/PD 시험 분석

○ (공동연구개발과제 1) (주) 엔이에스바이오테크놀러지 : 동물용 백신 생산

- 연구개발 내용 1: NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 비임상용 백신 생산
 - ✓ 감염성 질환 타겟 항원 선정 및 mRNA 후보 제작 10건
 - ✓ 감염성 질환 타겟 항원 생산 플라스미드 구축 10건
 - ✓ 감염성 질환 타겟 동물실험용 시료 생산 3건

○ (공동연구개발과제 2) 충남대학교 : SARS-CoV-2 인수간 전파기전 규명

- 연구개발 내용 1: SARS-CoV-2 변이주 숙주특이성에 영향을 미치는 주요 아미노산 식별
 - ✓ 아미노산 분석 및 돌연변이 S 단백질 확보
 - ✓ 돌연변이 변이 S 단백질의 ACE2 binding affinity 측정
 - ✓ 반려동물 감염을 매개하는 핵심 돌연변이 선정
- 연구개발 내용 2: 핵심 돌연변이 발현 바이러스를 이용한 감염성 평가
 - ✓ 핵심 돌연변이 발현 슈도바이러스를 이용한 감염성 평가
 - ✓ 핵심 돌연변이 발현 재조합바이러스를 이용한 감염성 평가

○ (공동연구개발과제 3) 경상국립대학교 : 다양한 항원 mRNA 종을 이용한 NES 핵산전달체 기반 mRNA 백신 전달 플랫폼의 범용성 평가

- 연구개발 내용 1: 개발된 동물용 백신의 안전성 및 방어능 평가(식약처'예방용 mRNA 백신 평가 가이드라인'에 준하여 평가)
 - ✓ 개발된 백신의 비설치류 동물(개)에서 안전성 조사
 - 접종방법: 성견 (Beagles), 1회/2주 (4주간 총 3회), 시험 군당 각 5두 설정, 군당 2두는 회복군 설정 (4주)
 - 시험군: 후보물질 시험군 (1군), 대조군(1군)
 - 안전성평가:
 - 시험중: 일반증상, 체중 및 사료섭취량 측정, 체온측정 등
 - 시험 종료 후: 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검 시 육안적 검사, 조직병리학적 검사 및 국소내성검사 등
 - 면역원성 평가: 면역매개물질 (cytokine 등), 면역세포 분석, 항체 형성능(IgA, IgG 등), 면역기관 (spleen 등) 면역세포 분포 및 기능 분석 등
 - ✓ 개발된 백신의 비설치류 동물(개)에서 방어능 평가
 - 슈도바이러스 및 authentic SARS-CoV-2를 이용한 중화항체가 측정

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

가. 1차년도 연구 결과

○ (주관연구개발과제): 중앙대학교 : 동물용 mRNA 항원 결정, 효능 평가

- 연구개발 내용 1: 신규 항원 mRNA 제작 : 항원 mRNA 선별, 최적화 및 제작

- 신규 항원 mRNA는 현재 팬데믹 진행 중인 코로나19 바이러스(이하 SARS-CoV-2)에 의해 발병하는 코로나19를 적응증으로 하여 델타 돌연변이주를 사용함.
- SARS-CoV-2는 숙주세포로 침투할 때, 바이러스 표면에 존재하는 스파이크 단백질의 수용체결합도메인(RBD)이 인간 세포의 수용체(hACE2, human angiotensin-converting enzyme 2)와 결합 후 일련의 과정으로 숙주세포에 침투 한다고 알려져 있음. SARS-CoV-2의 RBD 도메인과 스파이크 도메인 전체 Full-mRNA를 항원 mRNA로, mRNA의 암호화 서열은 델타 변이의 RBD 염기서열을 참고하여 제작함.

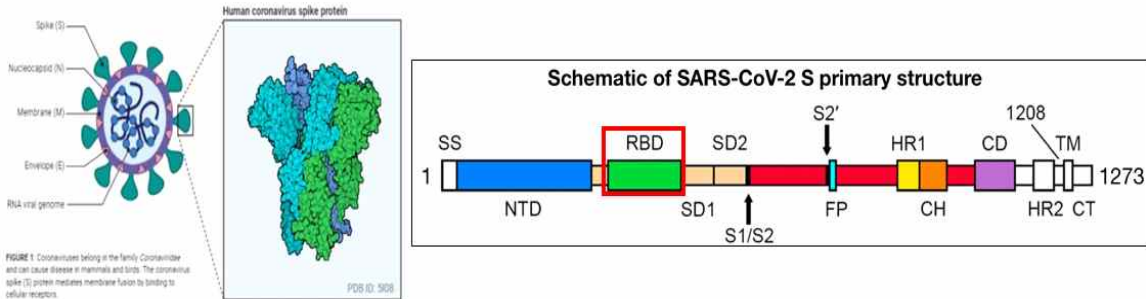


그림 9. 금나노블록 플랫폼에 활용할 항원 부위 선정

- mRNA는 암호화 서열에 인접한 5' 및 3' 비번역 구간, 5' cap 구조, 다중 아데노신 꼬리 및 G:C 함량, kozak 서열 및 뉴클레오티드 변형 유무에 의해 안정성 및 번역 효율이 크게 영향을 받음. 본 과제에서 이용할 SARS-CoV-2 RBD mRNA는 발현량 증강을 위해 RNA 서열을 최적화 하여 제작함.



그림 10. 항원 mRNA 모식도

- 합성한 mRNA를 agarose gel에 로딩하여 확인

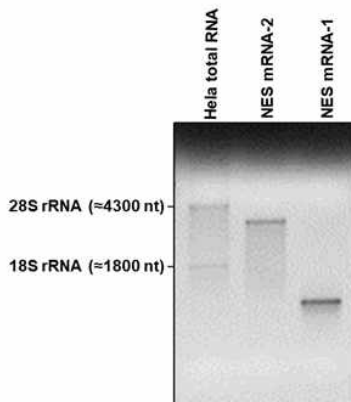


그림 11. mRNA 합성 확인

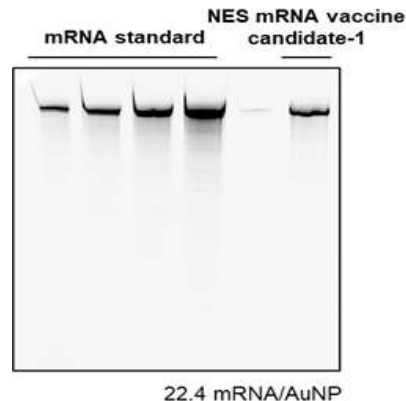


그림 12. 헥산 전달체-mRNA 결합체 제작

- 연구개발 내용 2: 항원의 NES 핵산전달체 기반 플랫폼 적용

① NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체 제작:

- 금나노블록-항원 mRNA 결합체는 PBS 버퍼에서 salt의 농도와 반응 온도를 조절하여 결합 조건을 최적화하여 제작.
- 금나노블록-mRNA 결합체는 원심분리를 통해 반응액으로부터 금나노입자를 분리 후 8M Urea acrylamide gel에 전기영동하여 RNA 결합 정도를 평가함.

② NES 핵산전달체-항원 mRNA의 in vitro 전달능 평가

- 금나노블록-형광 표지된 mRNA 결합체를 인간세포주 제노그래프트 튜머에 처리한 후, 형광 표지된 mRNA의 전달을 공초점형광현미경으로 평가함.

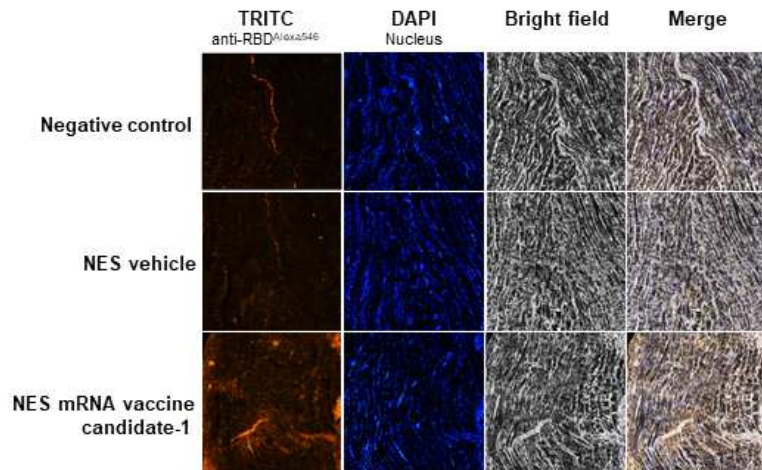


그림 13. mRNA 결합체를 인간세포주 제노그래프트 튜머에 전달후 확인

○ (공동연구개발과제 1) (주)엔이에스바이오테크놀러지 : 항원 전달 플랫폼 제작 및 안전성 평가

- 연구개발 내용 1: NES 핵산전달체 플랫폼 제작 :

- 금나노블록은 세포 내 전달체 역할을 갖는 금나노입자와 항원 mRNA와 직접적으로 결합하는 카고 DNA로 구성됨.
- 카고 DNA는 진핵세포의 mRNA가 본래 가지고 있는 다중 아데노신 꼬리와 결합할 수 있는 티미딘 중합체를 이용할 계획임. 또는, mRNA에 존재하는 비인간서열을 타겟하여, 이에 상보적인 서열을 카고 DNA로 사용할 수도 있음.
- 카고 DNA는 말단에 thiol기를 가지고 있어 금나노입자와 Au-S 결합함.

① 13~15nm 금나노입자 합성 SOP 확립: 다음과 같은 NES 핵산전달체 SOP를 확립함.

- 1. 540 mL TDW를 3-neckflask에 넣고 heating mantle에서 100°C까지 가열, 1000 rpm.
2. 100 mM Gold(III) chloride trihydrate 5 mL 첨가.
3. 10분 가열.
4. 388 mM sodium citrate 5 mL 첨가.
5. 15분 가열.
6. RT로 식힌 뒤, 4°C 보관.

② mRNA 전달용 NES 핵산전달체 최적화 및 제작

1. 96 well plate에 샘플 첨가.
2. 합성한 금 나노 입자 용액 100 μ l +T.D.W. 100 μ l
3. 측정 모드: Absorbance 측정, Spectral scanning (400~900 nm, 1nm간격으로 측정), 25°C
4. 측정 기계: BioTek사의SynergeH1 hybrid Multi-Mode Reader

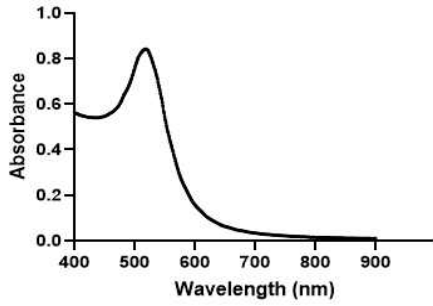


그림 14. mRNA 전달용 NES 핵산전달체 최적화 확인

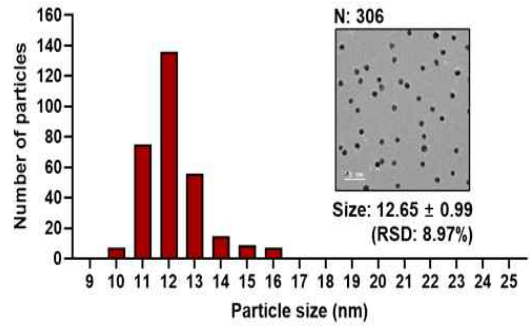


그림 15. mRNA 전달용 NES 핵산전달체 최적화 확인

- 연구개발 내용 2: NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 안정성 평가

- ① 투과전자현미경을 이용한 NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 크기 및 모양 분석: 투과전자현미경(transmission electron microscopy, TEM)을 이용해 크기 분포와 모양을 분석하고, 그 외에 dynamic light scattering(DLS)를 이용해 개략적인 크기와 모양을 분석
- ② 다양한 보관 조건에 따른 NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 안정성 평가



그림 16. 금나노블록에 탑재된 mRNA의 안정성 분석

- 연구개발 내용 3: 소동물 모델에서 금나노블록-항원 mRNA 결합체에 의한 면역원성 평가

▪ 면역원성 평가

- (1) 마우스에 총 2~3회 금나노블록-항원 mRNA 결합체를 투여 (3개 농도)
- (2) 투여 후 마우스의 혈액 및 비장에서 혈청 및 면역세포를 분리
- (3) 혈청에서 항원 mRNA 유래 단백질에 대한 항체 생성을 항원 단백질이 표지되어 있는 플레이트를 이용하여 ELISA 방법으로 평가함.

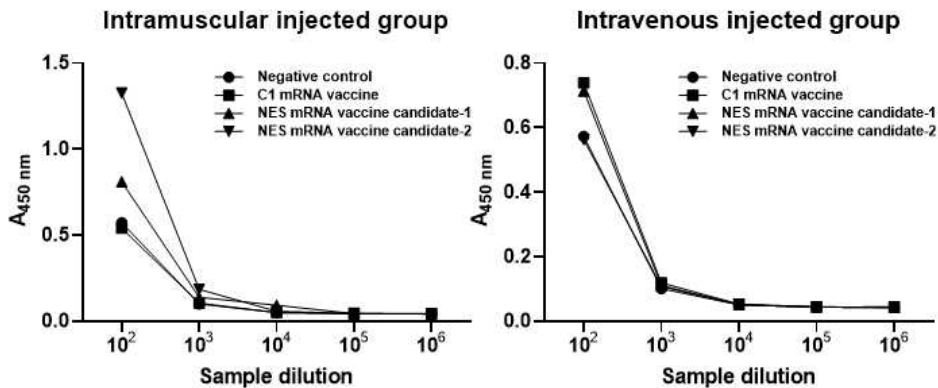


그림 17. 동물 모델에서 금나노블록-항원 mRNA 결합체에 의한 면역원성 평가

□ SARS-CoV-2 변이주의 반려동물 감염성 평가

○ Canine 및 feline ACE2 발현 세포주 확보

- Canine ACE2 (cACE2, NM_001165260) 및 feline ACE2 (fACE2, NM_001039456) 유전자서열은 NCBI로부터 확보하였으며 Genscript에서 합성하였음. 단백질 발현 확인을 위해 C-terminal end에 C9 tagging 단백질을 추가하여 pcDNA3.1(+) vector에 BamHI과 XhoI을 이용하여 클로

닝함. Human ACE2는 기보유종인 클론을 연구에 활용하였음.

Canine ACE2 - C9 (Gene Locus: NM_001165260)

GGATCCGCCACCatgctcaggctcttctggctccttctcagccttgcctgctctaaactgctgctcaatccaccactgaggatctgtgcaagacatctttggagaagt
ttaactatgaagctgaagagctgtctatcaaaagctcacttgccttcttgaattataacatcaatattaccgacgagaatgtccaaaagatgaataatgctgggccc
tggctgctctttatgaagaacgtccaagcttgccttcttgaattataacatcaatattaccgacgagaatgtccaaaagatgaataatgctgggccc
atcatcagtgctctcagcagacaagaaccaacgattgaacacaatcctaattcaatgagcactgtctacagctggaagccttgaacccaagtaatcctcagg
agtgttattacttgaaccaggcttggatgacataatggaacacagcaaacactacaatgagaggctctggcctggggaagctgaggtctgaggtcggcaagc
agctgagccattatagagatgatgtggccctgaaaaatgagatggaagagcaaacatattgaggactatgggattattggagaggagattatgaagagg
agtgggaaaacggctataactatgcccgaaccagttgattgatgagtggaactcacctcacacagattatgccattgatcaacatcttcatgcttatgtgaggac
aaagtgtgacacactctctatcagcccaactggatgctcctcccaagctcatttgccttggatgataatgtgggtagatttggacaacatctgaccccttgacag
tcccccttggacaacccaacatagatgtaactatgcaatggtgaaccagctgggatgcaaggagatattcaaggaggctgagaattcttctgtctgtg
gcctccaacatgactcaagaattctggggaactccatgtaactgagccaagtgacagccggaagtgctgcccacccacagcttgggacctagggaag
ggtagctcaggatcaagatgtgcacaaggtaacgatggatgacttctgacagccatcatgagatgggacacatccagatgacatggcatatgccgacaa
ccctctgtaagaaatggagctaatgagggctccatgagctgttgggaaatcatgtcacttctcagctacacccaaccattgaaaaacattggctcttctgc
ctctagtctttcgaagacagtgaacagaataaacttctactcaaacagcacttaacattgttgaactctaccattactacatgttagaaaagtggaggtgg
atgctcttaagggtgaaatcccagaagcagctggtgaaactctgtgggagatgaaagcgaatataatgctggggtggggaacctgtcccctgatgaaacat
actgagccctgcatctctgttccatgttctaatgattactcattcatgactacacaagaccattatcaattcagttcaagaagcccttctgcaaatagctaa
acatgaaggtcccctacacaagtgtatctcctaattcagtgaaagctgggcagaagctgctgaaatgctgaaactggaaaatcaaacctggacctacgctt
tggaaattgttagagcaaaagaatgagatgtaagaccactgcttaactacttgaacccctgtttacctggctgaaagagcaaaaatggaattctttgtgggatgg
aacactgactggagctcattacgctgacaaaagcattaaagtggagataagcctaaatcagccttgggaaaaagcattatgaatggaatacaatgaaatgactt
gttccggctactatgcatatgcatatgacagatattttcagaagcaaaaaccagacgactcttgggagataacgtgtgggtgagcattgaaaccaaga
atctcctcaacttctgactcactgcaatgtgctgacatcattcagcaactggaagctgaaagagccatcaggtatgaccgggacctatcaatgctaatgtttt
ccgctggatgacaacacccctggagtcttggggtgactgacccaaccggacccttatgagccacctgtaccatctggctgattgtttgggctgtgatgg
gagtggtggtggtgattgtctgctcacttctctgggatcaggaatcgaaggaagaatgatcaagcaagaggtgaagaaaatccttactcctcctggacttg
agttaaagggaataatccaggattccaagcgggtgatgatgtcagactctgtt**GGGGGC**ACTGAAACCAGCCAGGTCGCTCCAGCT
GCTtagCTCGAG

GGATCC BamHI site (5')
GCCACC Kozak sequence
GGGGGC Linker
ACTGAAACCAGCCAGGTCGCTCCAGCT C9 tag
CTCGAG XhoI site (3')

그림 18. Canine ACE2 염기서열

Feline ACE2-C9 (LOCUS NM_001039456)

GGATCCGCCACCatgctcaggctcttctggctccttctcagccttgcctgctttaaactgctgctcaatccaccactgaagaactgg
ccaagacatctttggagaagtttaacctgaagccgaagagctgtcttatcaaaagctcacttgccttcttgaattataacaccaacat
cacagacgagaatgtccaaaaatgaatgaggccggggccaaatggctgctctttatgaagaacagtccaagcttgccttcttga
cttaccgctagcagaaatcacaataaccaccgtcaaacgtcaattgcaggccctcagcagagtggttcatcagtgtctcagc
agacaagagccaacgattgaacacaatcctaagcaatgagcagctacagctggaagccttgaacccaacatc
cacaggagtgttattacttgaaccaggcttggatgacatcatggaaaacagcaaaagactacaacagagaggctctgggcttggg
aaggctggagggctgaggtcggcaagcagctgaggccattatgaagagtagctggccctgaaaaatgagatggcaagagc
aaacaattatgaggtatggagatttggagaggagattatgaagaggatggacagatggctataactatgcccagccagcca
gttgattaagagcgtggaacatacctcacacagattagaacactgtcaaacatcttcatgcttactgagggcaaggttggg
tacctaccctcccgtatcagcccaactggatgctcctcctgccatttgccttggcgatgtggggctgatttggacaaatctgtacc
ctttgacagtcccccttggacagaaaacccaacatagatgttactgatcaatgggtgaaccagagctgggatgcaaggaggatatt
caaggaagctgagaaaatcttgtgtctgttggccttccaacatgactcaaggattctgggaaaactccatgtaaccgagccag
gagacagccggaaagtgtctgccacccacagcttgggacctagggaaaggtgacttcaggatcaagatgtgcacaaggt
gacgatgtagactcctgacggcccatcagagatgggacacatccagatgacatggcatatggcctgcaacccttctgcta
agaaatggagctaatgaggggttccatgaagctgtcggggagatcatgctacttctgctgctacaccatctgcaaaaacca
ttgtctctgtcactggtttttcgaagacagcgaaacagaataaacttctactcaaacagcacttacaattgttgaacgcta
ccgttacttataatgttagaaaagtggaggtggatggtctttaaaggtgaaattccaaggagcagtgatgcaaaaagtgtggga
gatgaagcagagatagctgggggtggagcctgtgccccatgatgaaacatactgtgacctgcatctctgttccatgttgc
atgattacttactcagatactacacaaggaccattatcaattcagttcaagaagcccttgcgaatagctaaacatgaaggt
ccccgcacaaatgtgatatcctcaaatccagtgaagccgggaagagctgctcctcaaatgtgacccttggaaaatcaaaagccc
tggaccttagcattggaacatgtttaggagaaaagaaatgaaatgtaacaccactgctcaagctttagcccttgtttacctgg
ctgaaagagcagaacaggaattcttttgggatggaacactgactggcgtccatgtgaccaaagcattaaagtgaggataa
gcctaaaatcagctctggagacgaagcatatgaatggaatgacaatgaaatgacttgttccggctcatctgttgcatacgcctga
gagaatattttcacaagtcacaaaaccagacgattccttttggaggataacgtgtgggtgagcaatttgaacccaaggatctcct
caacttcttgcactgcatcgaaaaatgtgtctgacgtcattcctagaagtgaagtgaagaggccatcaggatgtcccggagcc
gtatcaatgatgcttccgctggatgacaacagcctggagtttctgggtattcagcccaactctgtcacccttaccagacctgt
caccatattggctgattgttttgggctgtgaggtgtggtaggttggattgtcctgctcactgctcgggatcagaaaatcgaag
gaagaacaatcaagcaagaagtgaagaaaatccttacgctcctggacttgatgaaggaagaaataatccaggattccaac
atgctgatgatgtcagactcattt**GGGGGC**ACTGAAACCAGCCAGGTCGCTCCAGCTtagCTCGAG

GGATCC BamHI site (5')
GCCACC Kozak sequence
GGGGGC Linker
ACTGAAACCAGCCAGGTCGCTCCAGCT C9 tag
CTCGAG XhoI site (3')

그림 19. Feline ACE2 염기서열

- 단백질의 발현을 확인하기 위해 HeLa세포에 pcDNA3.1-hACE2, pcDNA3.1-cACE2, pcDNA3.1-fACE2 및 pcDNA3.1를 PEI를 이용하여 형질전환하고 48시간 후 monoclonal anti-C9 antibody를 이용하여 western blot을 수행하였음.
- 그 결과, pcDNA3.1-hACE2, pcDNA3.1-cACE2, pcDNA3.1-fACE2를 형질전환시킨 세포에서 약 100 kDa의 특이적인 밴드가 관찰됨.

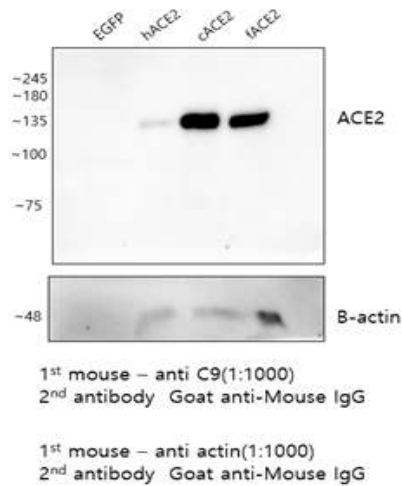


그림 20. Canine 및 Feline ACE2 발현 확인

- Canine 및 feline ACE2 발현 세포주에서의 변이주 슈도바이러스 감염능 평가
 - Canine 및 feline ACE2에 의한 SARS-CoV-2 감염력을 확인하기 위해, 다양한 변이주 스파이크 단백질을 발현하는 슈도바이러스를 제작함.
 - 최근 유행중인 변이주의 특성을 분석하기 위해, wuhan-hu-1(V0), D614G(V1), Delta (B.1.617.2, V8), Omicron (B.1.1.529, V11) 및 Stealth omicron (BA2, V12) S 단백질을 발현하는 클론을 확보하였음. 단백질의 발현을 확인하기 위해 HEK293T세포에 SARS-CoV-2 S plasmid를 PEI를 이용하여 형질전환하고 48시간 후 polyclonal anti-SARS-CoV/SARS-CoV-2 S antibody를 이용하여 western blot을 수행하였음.
 - 그 결과, SARS-CoV와 SARS-CoV-2 S를 발현하는 플라스미드를 형질전환시킨 세포에서 약 180 kDa (uncleaved), 90 (cleaved, S2)의 특이적인 밴드가 관찰됨. S2는 SARS-CoV S 및 SARS-CoV-2 omicron (V11, V12) 변이주에서는 감소하는 경향을 보였음.

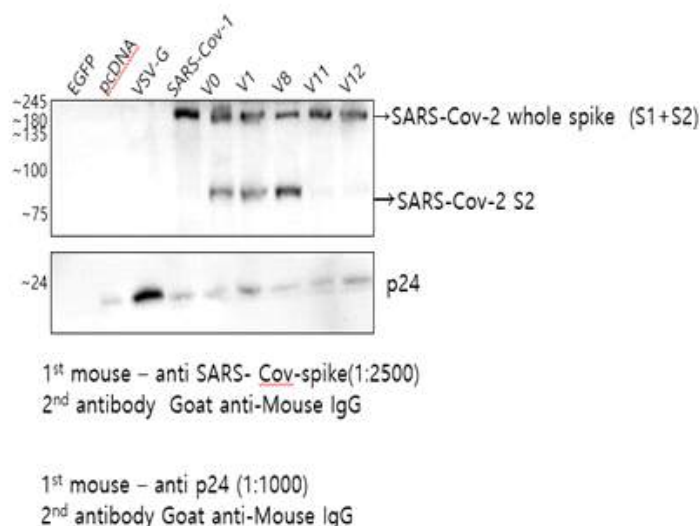


그림 21. HEK293T 세포에서의 SARS-CoV-2 S 발현 확인

- 슈도바이러스 제작을 위해 HEK293T 세포에 SARS-CoV-2 S를 발현하는 plasmid와 HIVluc

core protein을 발현하는 plasmid를 함께 형질전환하고 48시간 후 상층액을 회수하였음. 회수한 상층액은 원심분리를 통해 농축하고 슈도바이러스 내 SARS-CoV-2 S 및 HIV p24 발현을 western blot을 이용하여 확인함.

- 그 결과, SARS-CoV와 SARS-CoV-2 S를 발현하는 플라스미드를 형질전환시킨 세포에서 약 180 kDa (uncleaved), 90 (cleaved, S2)의 특이적인 밴드가 관찰됨. S2는 SARS-CoV S 및 SARS-CoV-2 omicron 변이주에서는 감소하는 경향을 보였음.
- ACE2 발현에 따른 감염력 확인을 위해, HeLa 세포에 hACE2, cACE2, fACE2를 발현시킨 후 SARS-CoV-2 슈도바이러스를 transduction함. Transduction 48시간 후, 상층액을 제거하고 세포 내 luciferase accumulation을 luciferase assay를 통해 확인함. 음성대조군인 pcDNA3.1 및 양성대조군인 hACE2와 비교하여 감염력을 평가함.
- 그 결과, hACE2에 비해 cACE2를 발현하는 세포에서 바이러스 감염이 전반적으로 증가한다는 것을 관찰할 수 있었음. hACE2와 fACE2를 발현하는 세포에서의 바이러스 감염성을 거의 유사하게 나타냄. 세포내 ACE2 발현율을 고려해 볼 때, cACE2 및 fACE2를 발현하는 세포에서의 SARS-CoV-2 감염은 hACE2를 발현하는 세포에서의 SARS-CoV-2 감염에 비해 낮다고 생각됨. 또한, cACE2와 fACE2를 비교해 볼 땐, cACE2를 발현하는 세포에서의 SARS-CoV-2 감염은 fACE2를 발현하는 세포에서의 SARS-CoV-2 감염에 비해 높다고 생각됨.
- 변이에 따른 감염력의 차이는 거의 나타나지 않았으나, 모든 변이주를 이용한 실험에서 wuhan-hu-1에 비해 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었음.

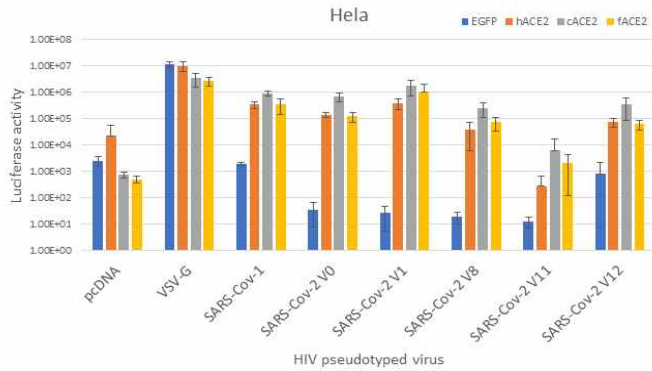


그림 22. Canine 및 feline ACE2에 의한 슈도바이러스 감염능 확인

○ Canine 및 feline ACE2 발현 세포주에서의 SARS-CoV-2 변이주 감염능 평가 (진행 중)

- Authentic SARS-CoV-2 변이주를 이용한 연구수행은 중국 광저우 의과대학에서 실시할 예정이었음. 이를 위해, 중국 광저우 의과대학과 연구협약을 체결함.

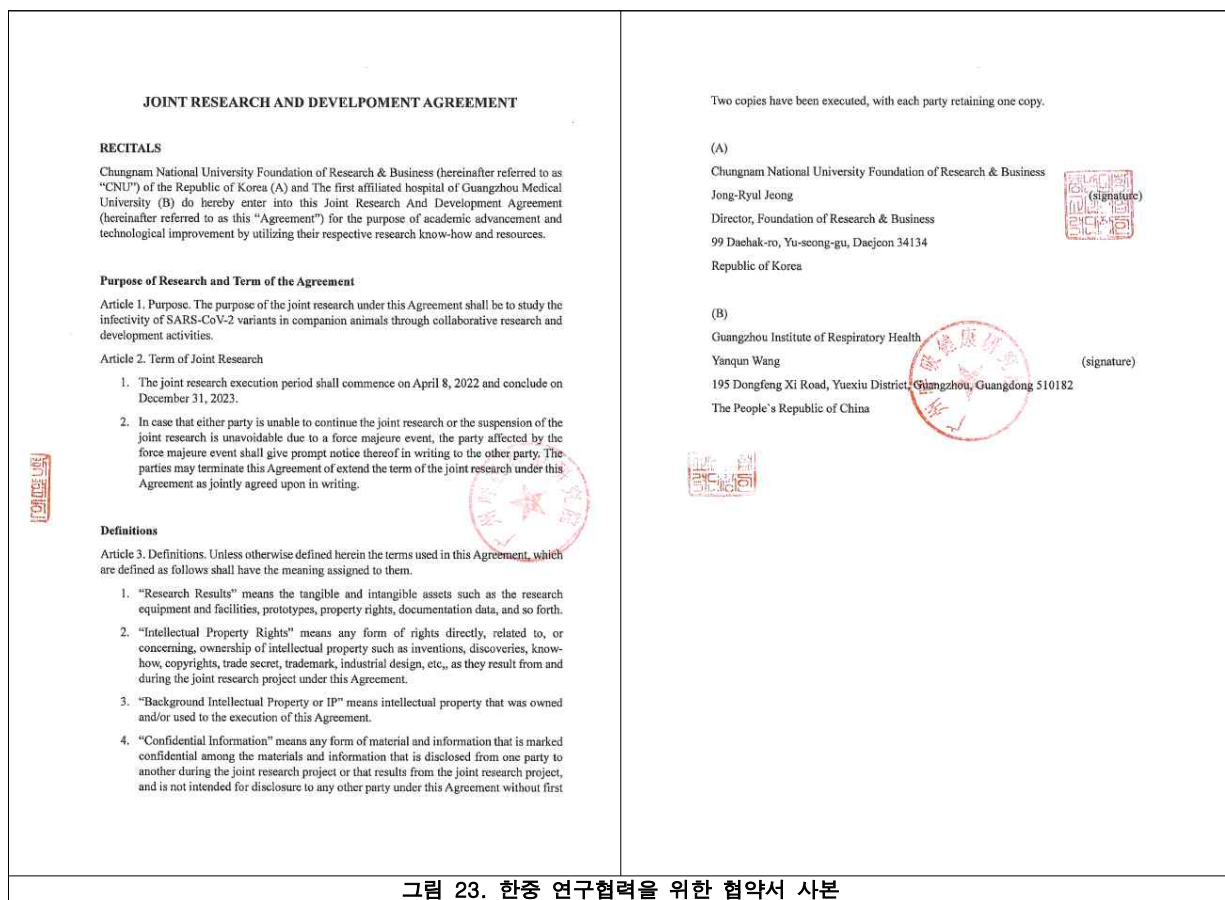


그림 23. 한중 연구협력을 위한 협약서 사본

- 충남대학교에서 확보한 canine 및 feline ACE2 클론을 중국측에 전달하여 SARS-CoV-2 변이주에 대한 평가를 수행하려고 계획했으나, 코로나19 pandemic으로 인해 현재 중국과의 물자 교환이 불가능해 중국측에서 자체적으로 canine 및 feline ACE2 클론을 확보하여 연구를 수행하기로 논의하였으며 이를 이용하여 SARS-CoV-2 변이주 감염능 평가를 수행중에 있음.

□ 변이주 S 단백질과 반려동물 ACE2 binding affinity 측정

○ SARS-CoV-2 S1-Fc 확보

- 변이주 S 단백질과 반려동물 ACE2 사이의 binding affinity를 측정하기 위해 S 단백질의 receptor binding domain을 포함하고 있는 S1에 Fc를 결합시킨 S1-Fc를 제작함. S1-Fc은 기존의 확보한 클론을 이용하여 PCR을 수행한 후 gibson assembly를 이용하여 제작함. 사용한 프라이머의 정보는 다음과 같음.

Name	Primer sequences (5' to 3')
SARS2-S1-Fc For	S1(1-678) ATCATTTTTGGCAAAGAATTCGCCACCAatgtttgtgttcttg
SARS2-S1-Fc Rev	S1(1-678) GATATACTTACCTGTggtttgagtttgata
SARS2-S1-Fc hFc For	ACAGGTAAGTATATCGATGGGGAGCCCA
SARS2-S1-Fc hFc Rev	ATGACGCCTCGAGCTAGCAGATCTTTT

그림 24. S1-Fc 제작을 위해 사용한 프라이머 정보

- 단백질의 발현을 확인하기 위해 HEK293T세포에 SARS-CoV-2 S1-Fc plasmid를 PEI를 이용하여 형질전환하고 48시간 후 HRP conjugated anti-human IgG antibody를 이용하여 western blot을 수행하였음.
- 그 결과, 약 130kDa에서 특이적인 밴드가 관찰됨.

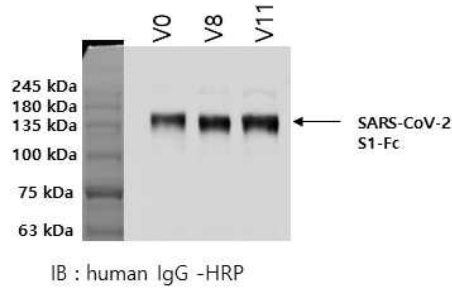


그림 25. HEK293T세포에서의 SARS-CoV-2 S1-Fc 발현 확인

○ IP 및 SPR을 이용한 변이주 스파이크 단백질의 ACE2 binding affinity 측정

- SARS-CoV-2 S1-Fc와 ACE2와의 결합력을 평가하기 위해 IP를 수행하였음. HEK293T 세포에 hACE2, cACE2, fACE2, 또는 SARS-CoV-2 S1-Fc를 발현함. SARS-CoV S1-Fc를 음성대조군으로, SARS-CoV S1-Fc를 양성대조군으로 포함시킴. 48시간 후 cell lysate를 혼합하고 Fc tag를 이용하여 IP를 수행함. Fc tag 및 C9(ACE2)에 대한 western blotting을 수행함.

- SARS-CoV-2 RBD(invivogen에서 구입)와 ACE2와의 결합력을 평가를 위한 SPR analysis는 연세대학교 변재철 교수팀과의 연구협력을 통해 수행.

○ (공동연구개발과제 경상국립대학교 : NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 동물 전달효능 및 면역원성 평가

□ NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 동물 전달효능 및 면역반응 평가

1) 개 유래 세포주(MDCK)를 이용 후보 백신의 면역원성 및 독성 평가

(1) RNA 백신 후보 물질

① 세포독성: 6종의 RNA 백신 후보물질(RBD-A, RBD-AGA, S1-AGA, mRNA-RBD, mRNA-S1, mRNA-S)을 선발하여 개 유래 MDCK 세포주에 대한 세포독성을 평가해본 결과 다양한 농도에서 세포독성이 확인되지 않아 안전한 것으로 확인 되었다(그림 26).

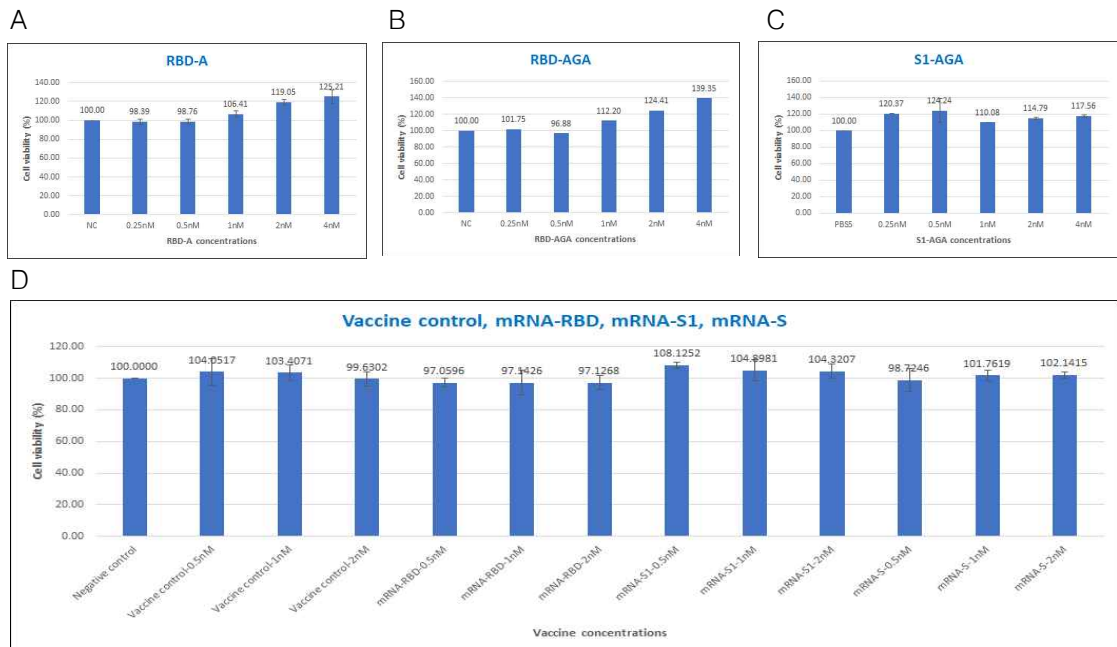


그림 26. RNA 백신 후보물질(RBD-A, RBD-AGA, S1-AGA, mRNA-RBD, mRNA-S1, mRNA-S)의 개 유래 세포 MDCK에 대한 세포독성 평가. A; RBD-A, B;RBD-AGA, C; S1-AGA, D; mRNA-RBD, mRNA-S1, mRNA-s

② 면역발현 유전자: 6종의 RNA 백신 후보물질(RBD-A, RBD-AGA, S1-AGA, mRNA-RBD, mRNA-S1, mRNA-S)을 선발하여 개 유래 MDCK 세포주에 1 nM/well의 농도로 처리하여 48시간 경과 후 면역관련 유전자에 대한 발현을 확인해본 결과 비처리군과 비교하여 비슷하거나 다소 높게 발현되었으며, 양성대조군으로 사용된 LPS 처리 군과 비교하여 다소 낮은 발현이 확인 되었다(그림 27~28).

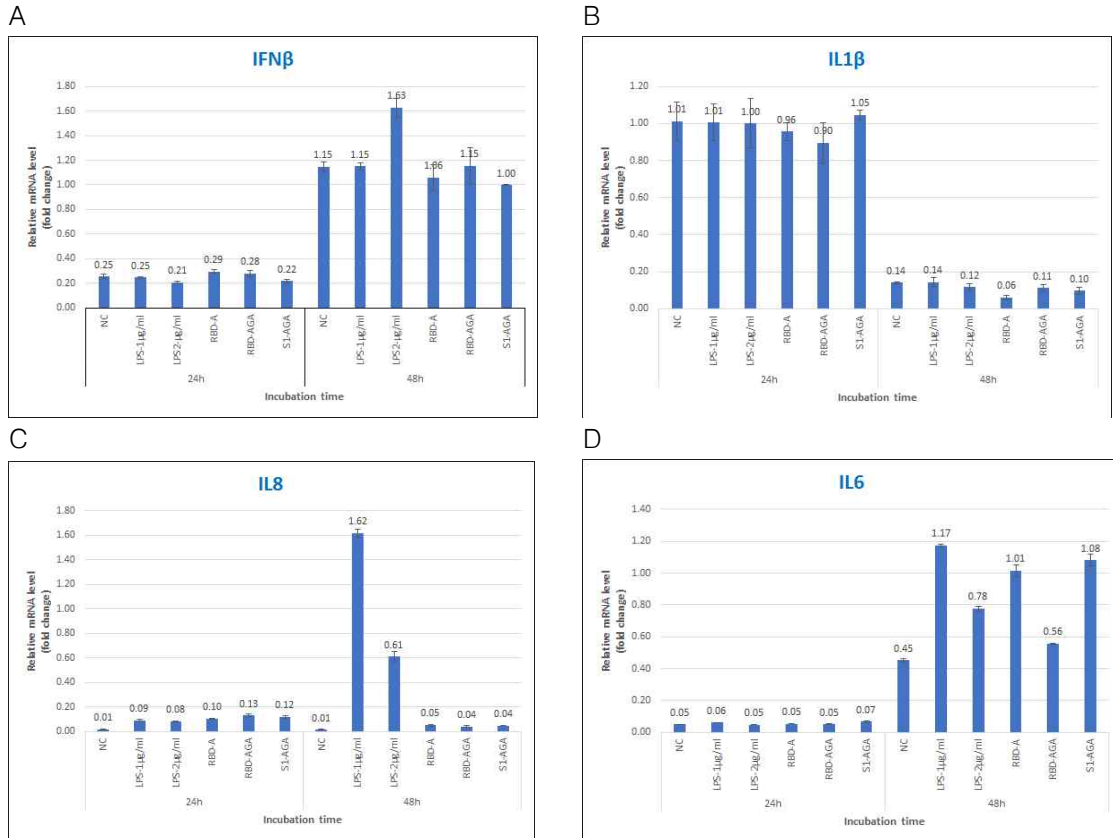
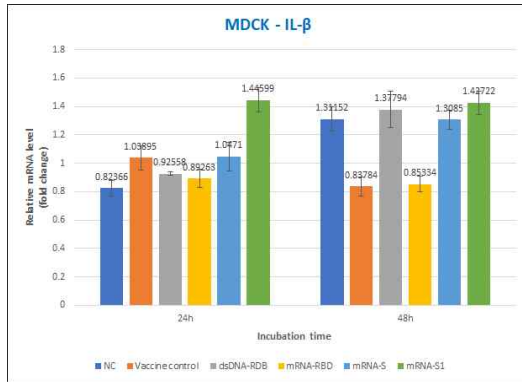
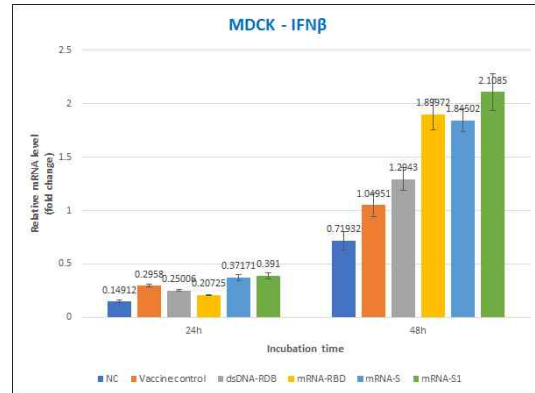


그림 27. RNA 백신 후보물질 3종 (RBD-A, RBD-AGA, S1-AGA)의 개유래 세포 MDCK에 대한 면역관련 유전자 발현 평가. A; IL-β, B;IFNβ, C; IL-8, D; IL-6

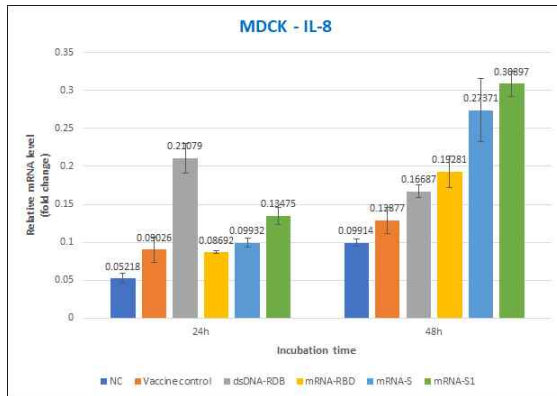
A



B



C



D

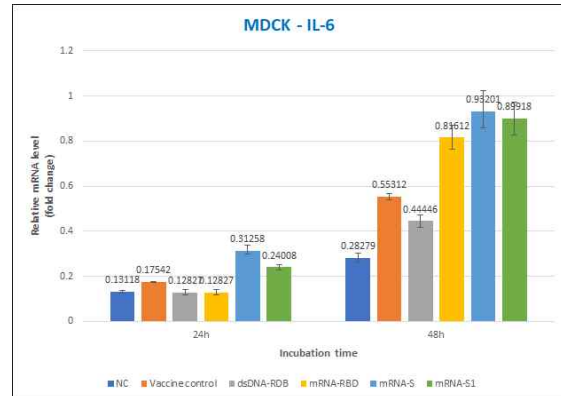


그림 28. RNA 백신 후보물질 3종 (mRNA-RBD, mRNA-S1, mRNA-S)의 개유래 세포 MDCK에 대한 면역관련 유전자 발현 평가. A; IL- β , B; IFN β , C; IL-8, D; IL-6

2) 고양이 유래 세포주(CRFK)를 이용 후보 백신의 면역반응 및 독성 평가

(1) RNA 백신 후보 물질

- ① 세포독성: 6종의 RNA 백신 후보물질(RBD-A, RBD-AGA, S1-AGA, mRNA-RBD, mRNA-S1, mRNA-S)을 선발하여 고양이 유래 세포주(CRFK)에 대한 세포독성을 평가해본 결과 다양한 농도에서 세포독성이 확인되지 않아 안전한 것으로 확인 되었다 (그림 29-30).

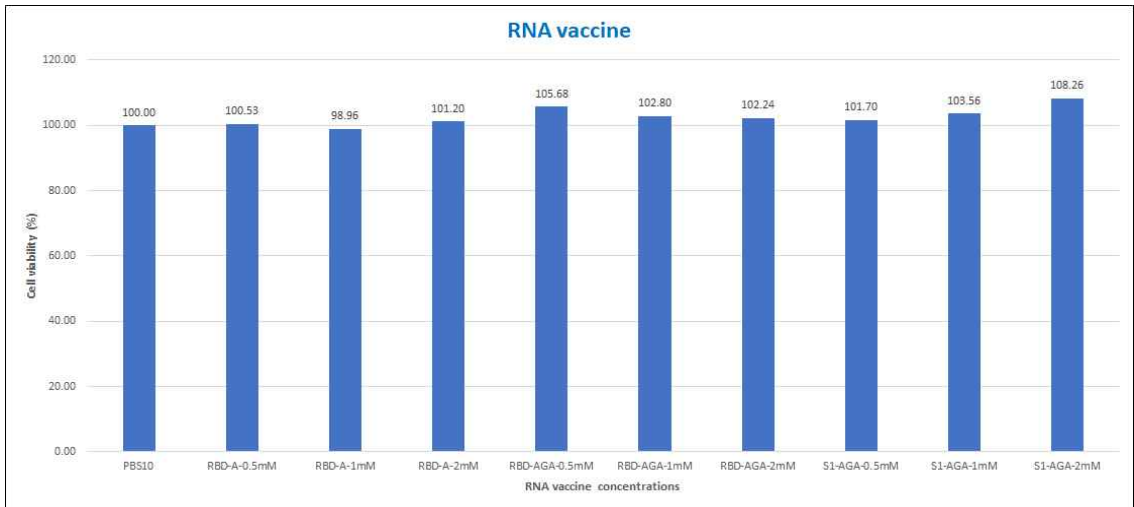


그림 29. RNA 백신 후보물질 3종 (RBD-A, RBD-AGA, S1-AGA)의 고양이 유래 세포 CRFK에 대한 세포독성 평가

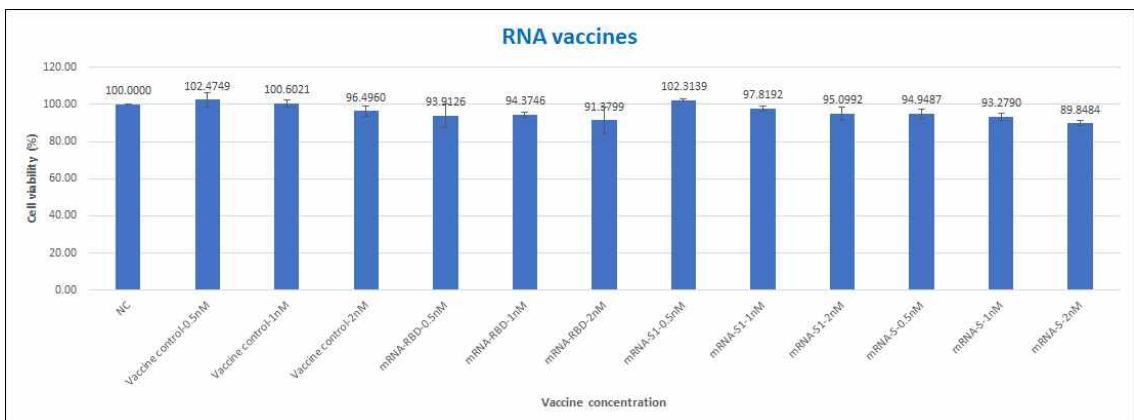


그림 30. RNA 백신 후보물질 3종 (mRNA-RBD, mRNA-S1, mRNA-S)의 고양이 유래 세포 CRFK에 대한 세포독성 평가

- ② 면역발현 유전자: 6종의 RNA 백신 후보물질(RBD-A, RBD-AGA, S1-AGA, mRNA-RBD, mRNA-S1, mRNA-S)을 선발하여 고양이 유래 세포주(CRFK)에 1 nM/well의 농도로 처리하여 48시간 경과 후 면역관련 유전자에 대한 발현을 확인해본 결과 비처리군과 비교하여 비슷하거나 다소 높게 발현되었으며, 양성대조군으로 사용된 LPS 처리 군과 비교하여 다소 낮은 발현이 확인 되었다(그림 31-32).

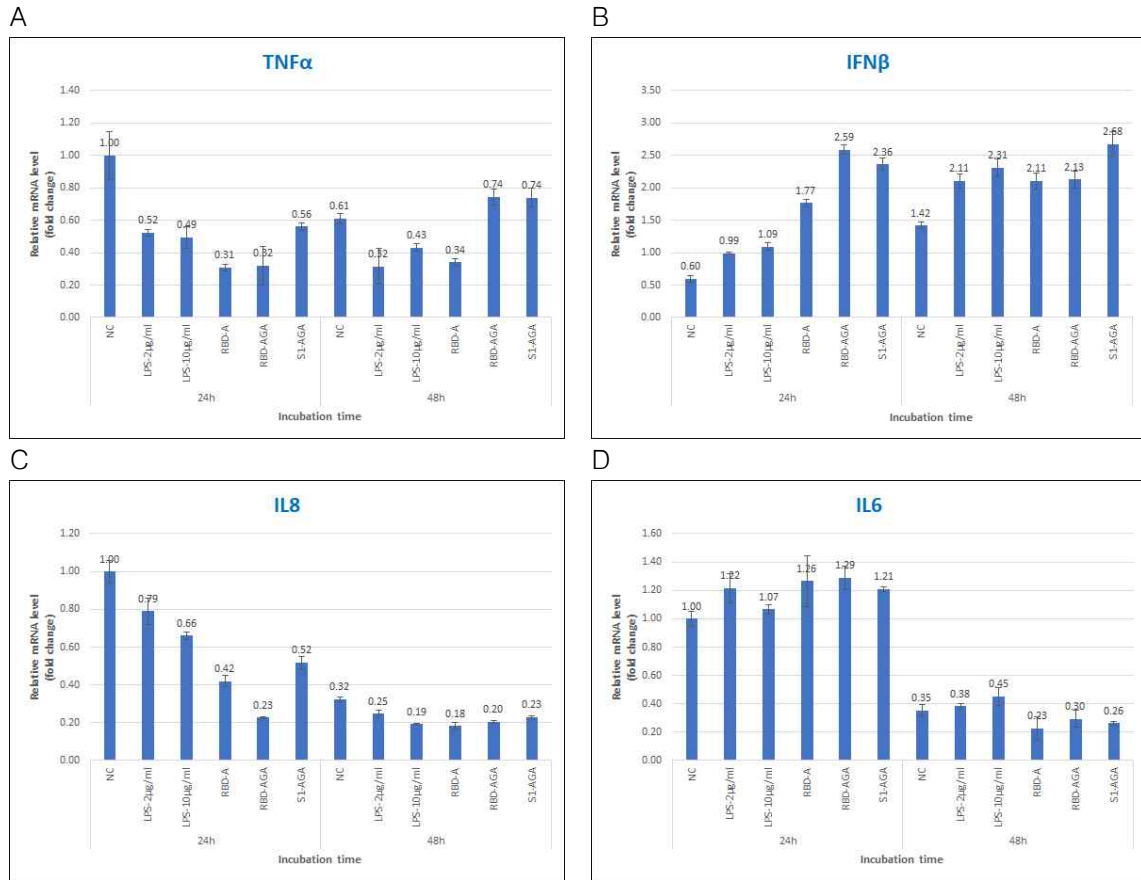


그림 31. RNA 백신 후보물질 3종 (RBD-A, RBD-AGA, S1-AGA)의 고양이 유래 세포 CRFK에 대한 면역관련 유전자 발현 평가. A; TNF- α , B;IFN β , C; IL-8, D; IL-6

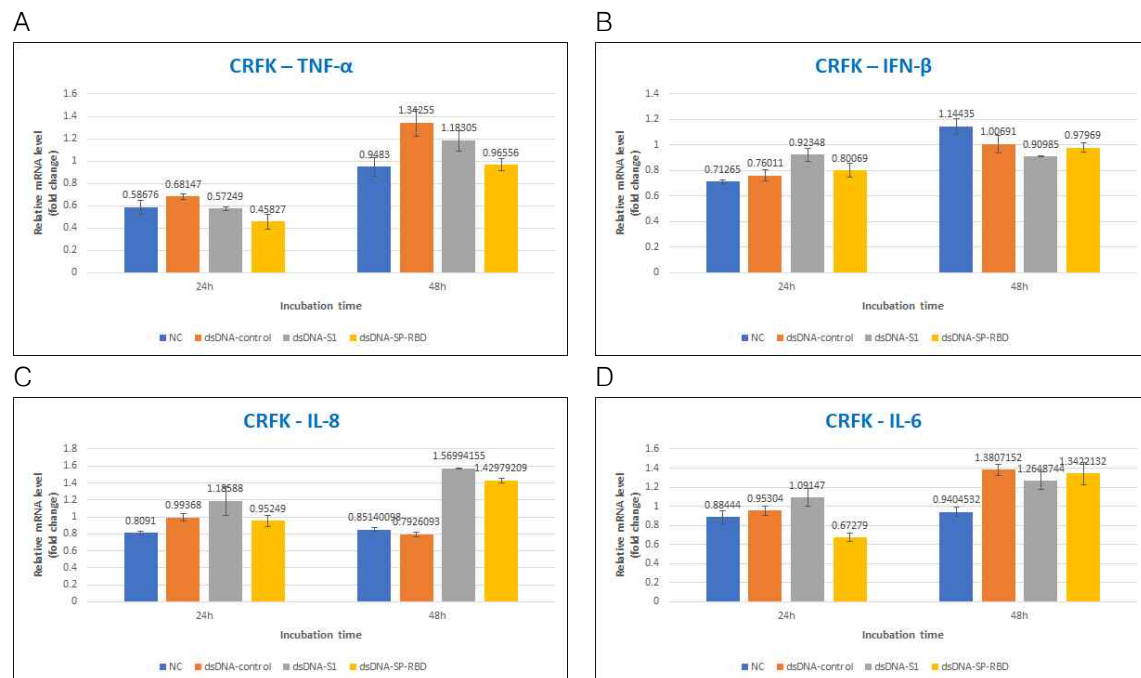


그림 32. RNA 백신 후보물질 3종 (mRNA-RBD, mRNA-S1, mRNA-S)의 고양이 유래 세포 CRFK에 대한 면역관련 유전자 발현 평가. A; TNF- α , B;IFN β , C; IL-8, D; IL-6

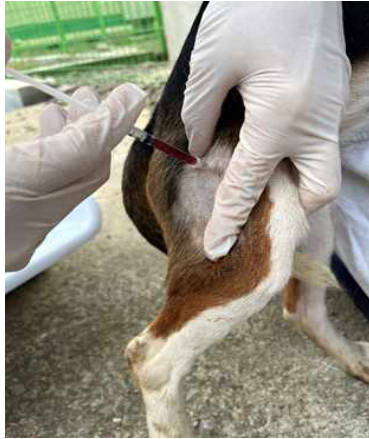
3) 후보 동물용 백신의 비설치류 동물(개) 면역반응 및 효능 평가

(1) RNA 백신 후보물질

- ① RNA 백신 후보물질 선발 및 백신 접종: RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 6두에 (비접종군 2두, 벡터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두;

7.5, 15, 30 μg 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 6주간 수행), 매주 체중변화, 분변 및 혈중 면역글로부린, 사이토카인, 면역 분화 세포 등 분석을 수행함(그림 33-34).

A



B



그림 33. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 수행

A



B



C



D



그림 34. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한후 접종부위의 피부 병변 조사

- ② RNA 백신접종에 따른 혈액검사 결과: RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 4두에 (백터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두; 7.5, 15, 30 μg 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 6주간 수행) 비접종군 2두와 함께 채혈을 통해 혈액검사를 수행한 결과 특이적인 이상이 확인되지 않음 (그림 35)

A

진료 내역

Client : 영상의학실 Address : 경상내과교 동물의료원 Tel :	Client No : 220285
Patient : 진형 Breed : BEAGLE(비견) Sex : Castrated Male Color :	Species : Canine Birth : 1899-12-30

Lab Examination

Date/Time : 2022-11-21 오후 5:16:48 Performed By (Catalyst_DX)

Name	Unit	Min	Max	Result	Normal
Glucose	mg/dL	70	143	83	NORMAL
Creatinine	mg/dL	0.5	1.8	0.6	NORMAL
BUN	mg/dL	7	27	13	NORMAL
BUN/CREA				20	
Phosphorus-Inorganic	mg/dL	2.5	6.8	3.6	NORMAL
Calcium	mg/dL	7.9	12	9.6	NORMAL
Protein-Total	g/dL	5.2	8.2	6.2	NORMAL
Albumin	g/dL	2.2	3.9	3	NORMAL
Globulin	g/dL	2.5	4.5	3.3	NORMAL
ALB/GLOB				0.9	
ALT	U/L	10	125	59	NORMAL
ALP	U/L	23	212	21	LOW
GGT	U/L	0	11	0	NORMAL
Bilirubin-Total	mg/dL	0	0.9	0.2	NORMAL
Cholesterol-Total	mg/dL	110	300	126	NORMAL
Amylase	U/L	500	1500	490	LOW
Lipase	U/L	200	1800	534	NORMAL

B

진료 내역

Client : 영상의학실 Address : 경상내과교 동물의료원 Tel :	Client No : 220285
Patient : 종형 Breed : BEAGLE(비견) Sex : Castrated Male Color :	Species : Canine Birth : 1899-12-30

Lab Examination

Date/Time : 2022-11-21 오후 5:20:39 Performed By (Catalyst_DX)

Name	Unit	Min	Max	Result	Normal
Glucose	mg/dL	70	143	109	NORMAL
Creatinine	mg/dL	0.5	1.8	0.6	NORMAL
BUN	mg/dL	7	27	13	NORMAL
BUN/CREA				21	
Phosphorus-Inorganic	mg/dL	2.5	6.8	3.2	NORMAL
Calcium	mg/dL	7.9	12	9.8	NORMAL
Protein-Total	g/dL	5.2	8.2	6.2	NORMAL
Albumin	g/dL	2.2	3.9	3	NORMAL
Globulin	g/dL	2.5	4.5	3.1	NORMAL
ALB/GLOB				1	
ALT	U/L	10	125	41	NORMAL
ALP	U/L	23	212	48	NORMAL
GGT	U/L	0	11	0	NORMAL
Bilirubin-Total	mg/dL	0	0.9	< 0.1	UNDET
Cholesterol-Total	mg/dL	110	300	184	NORMAL
Amylase	U/L	500	1500	610	NORMAL
Lipase	U/L	200	1800	952	NORMAL

C

진료 내역

Client : 영상의학실 Address : 경상내과교 동물의료원 Tel :	Client No : 220285
Patient : 우우 Breed : BEAGLE(비견) Sex : Male Color :	Species : Canine Birth : 2019-11-02(3Y26D)

Lab Examination

Date/Time : 2022-11-28 오전 10:24:09 Performed By (Catalyst_DX)

Name	Unit	Min	Max	Result	Normal
Glucose	mg/dL	74	143	143	NORMAL
Creatinine	mg/dL	0.5	1.8	0.7	NORMAL
BUN	mg/dL	7	27	13	NORMAL
BUN/CREA				19	
Phosphorus-Inorganic	mg/dL	2.5	6.8	3.3	NORMAL
Calcium	mg/dL	7.9	12	9.8	NORMAL
Protein-Total	g/dL	5.2	8.2	6.4	NORMAL
Albumin	g/dL	2.3	4	2.9	NORMAL
Globulin	g/dL	2.5	4.5	3.4	NORMAL
ALB/GLOB				0.9	
ALT	U/L	10	125	268	HIGH
ALP	U/L	23	212	18	NORMAL
GGT	U/L	0	11	1	NORMAL
Bilirubin-Total	mg/dL	0	0.9	0.2	NORMAL
Cholesterol-Total	mg/dL	110	300	136	NORMAL
Amylase	U/L	500	1500	299	NORMAL
Lipase	U/L	200	1800	704	NORMAL

D

진료 내역

Client : 영상의학실 Address : 경상내과교 동물의료원 Tel :	Client No : 220285
Patient : 낙낙 Breed : BEAGLE(비견) Sex : Castrated Male Color :	Species : Canine Birth : 2019-11-02(3Y26D)

Lab Examination

Date/Time : 2022-11-28 오전 10:34:38 Performed By (Catalyst_DX)

Name	Unit	Min	Max	Result	Normal
Glucose	mg/dL	74	143	105	NORMAL
Creatinine	mg/dL	0.5	1.8	0.6	NORMAL
BUN	mg/dL	7	27	12	NORMAL
BUN/CREA				20	
Phosphorus-Inorganic	mg/dL	2.5	6.8	3.8	NORMAL
Calcium	mg/dL	7.9	12	10.1	NORMAL
Protein-Total	g/dL	5.2	8.2	6.4	NORMAL
Albumin	g/dL	2.3	4	3.1	NORMAL
Globulin	g/dL	2.5	4.5	3.5	NORMAL
ALB/GLOB				0.8	
ALT	U/L	10	125	41	NORMAL
ALP	U/L	23	212	63	NORMAL
GGT	U/L	0	11	0	NORMAL
Bilirubin-Total	mg/dL	0	0.9	< 0.1	UNDET
Cholesterol-Total	mg/dL	110	300	160	NORMAL
Amylase	U/L	500	1500	410	LOW
Lipase	U/L	200	1800	282	NORMAL

E

진료 내역

Client : 영상의학실 Address : 경상내과교 동물의료원 Tel :	Client No : 220285
Patient : VAC1-03 Breed : BEAGLE(비견) Sex : Female Color :	Species : Canine Birth : 2021-11-02(1Y26D)

Lab Examination

Date/Time : 2022-11-28 오전 10:20:52 Performed By (ProCyte_DX)

Name	Unit	Min	Max	Result	Normal
RBC	10 ¹² /L	5.0	12.0	11.1	NORMAL
Hemoglobin(Hb)	%	22.0	37.0	27.7	NORMAL
Hemoglobin(Hct)	g/dL	13.1	26.5	16.5	NORMAL
MCV	fL	69.6	73.5	87.1	NORMAL
MCH	pg	23.2	29.2	29.2	NORMAL
MCHC	g/dL	32	37.9	34.9	NORMAL
RDW	%	19.6	21.7	18.3	NORMAL
Reticulocyte(Ret)	%			1.8	
Anticoagulant	1000/L	10	10	100	HIGH
ATPC-Hgb	pg	22.3	29.9	28.9	NORMAL
WBC	10 ⁹ /L	5.0	16.0	12.0	NORMAL
WBC-Neutrophil	%			52.8	
WBC-Lymphocyte	%			33.9	
WBC-Monocyte	%			13.7	
WBC-Eosinophil	%			2.7	
WBC-Basophil	%			2.8	
WBC-Neutrophil	10 ⁶ /L	206	11.66	637	NORMAL
WBC-Monocyte	10 ⁶ /L	125	5.1	2.49	NORMAL
WBC-Lymphocyte	10 ⁶ /L	516	1.32	671	NORMAL
WBC-Eosinophil	10 ⁶ /L	696	1.22	63.2	NORMAL
WBC-Basophil	10 ⁶ /L	0	0.1	0.56	NORMAL
Platelet	10 ⁹ /L	160	484	207	NORMAL
MPV	fL	8.7	13.2	15.8	NORMAL
PDW	%	9.1	18.4	14.5	NORMAL
PCT	%	0.14	0.46	0.41	NORMAL

F

진료 내역

Client : 영상의학실 Address : 경상내과교 동물의료원 Tel :	Client No : 220285
Patient : VAC1-04 Breed : BEAGLE(비견) Sex : Female Color :	Species : Canine Birth : 2021-11-02(1Y26D)

Lab Examination

Date/Time : 2022-11-21 오후 4:36:04 Performed By (Catalyst_DX)

Name	Unit	Min	Max	Result	Normal
Glucose	mg/dL	74	143	103	NORMAL
Creatinine	mg/dL	0.5	1.8	0.7	NORMAL
BUN	mg/dL	7	27	24	NORMAL
BUN/CREA				36	
Phosphorus-Inorganic	mg/dL	2.5	6.8	5.1	NORMAL
Calcium	mg/dL	7.9	12	10.2	NORMAL
Protein-Total	g/dL	5.2	8.2	6.1	NORMAL
Albumin	g/dL	2.3	4	3	NORMAL
Globulin	g/dL	2.5	4.5	3.2	NORMAL
ALB/GLOB				0.9	
ALT	U/L	10	125	55	NORMAL
ALP	U/L	23	212	56	NORMAL
GGT	U/L	0	11	0	NORMAL
Bilirubin-Total	mg/dL	0	0.9	0.2	NORMAL
Cholesterol-Total	mg/dL	110	300	130	NORMAL
Amylase	U/L	500	1500	616	NORMAL
Lipase	U/L	200	1800	607	NORMAL

그림 35. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한후 채혈을 통해 혈액 분석 수행. A와 B: 비접종군, C: 벡터 접종, D, E와 F (각 7.5, 15, 30 mg씩 접종)

③ RNA 백신접종에 따른 혈액검사 결과: RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 4두에 (벡터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두; 7.5, 15, 30 µg 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 6주간 수행) 신체 검사를 수행한 결과 특이적인 이상이 확인되지 않음 (그림 36)

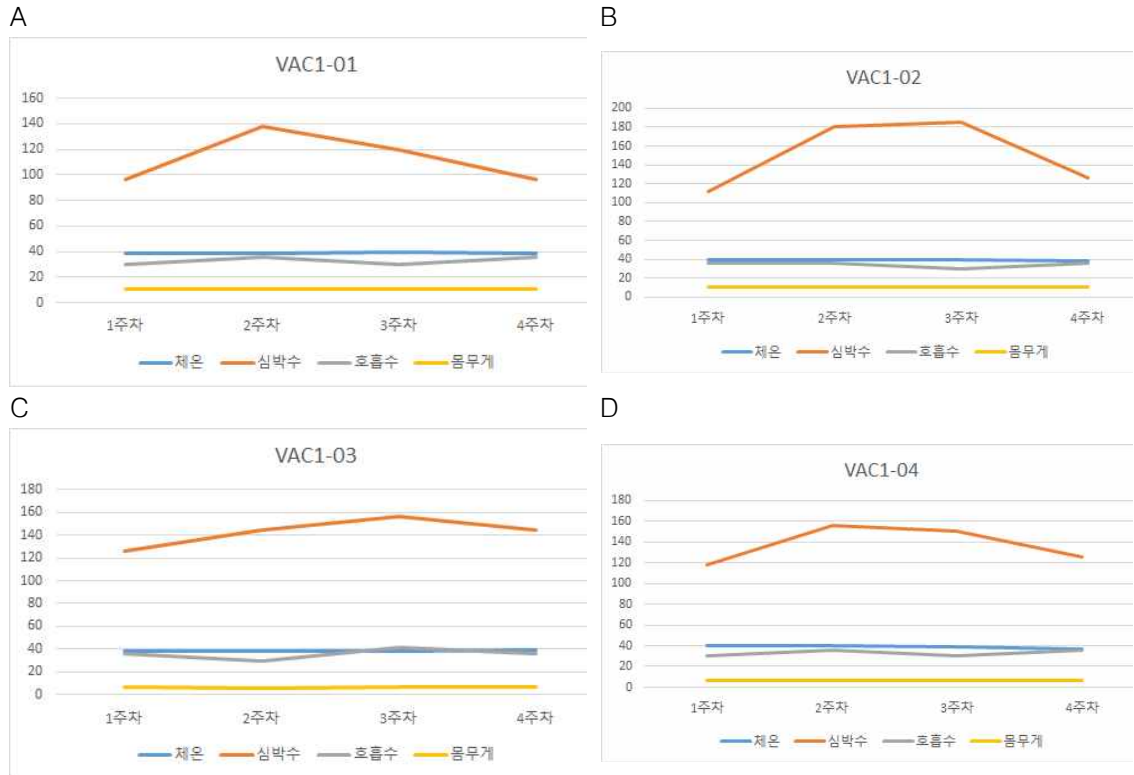


그림 36. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한후 신체검사 분석 수행. A와 B; B종군, A: 벡터 접종, B, C와 D (각 7.5, 15, 30 mg씩 접종)

④ RNA 백신접종에 따른 혈중 면역글로부린 평가: RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 4두에 (벡터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두; 7.5, 15, 30 μg 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 6주간 수행) 혈중 면역글로부린 평가를 수행한 결과 벡터 접종군과 낮은농도(7.5 μg)의 접종 견에서 4주 동안 높은 IgA 및 IgG농도가 확인 되었다 (그림 37-38)

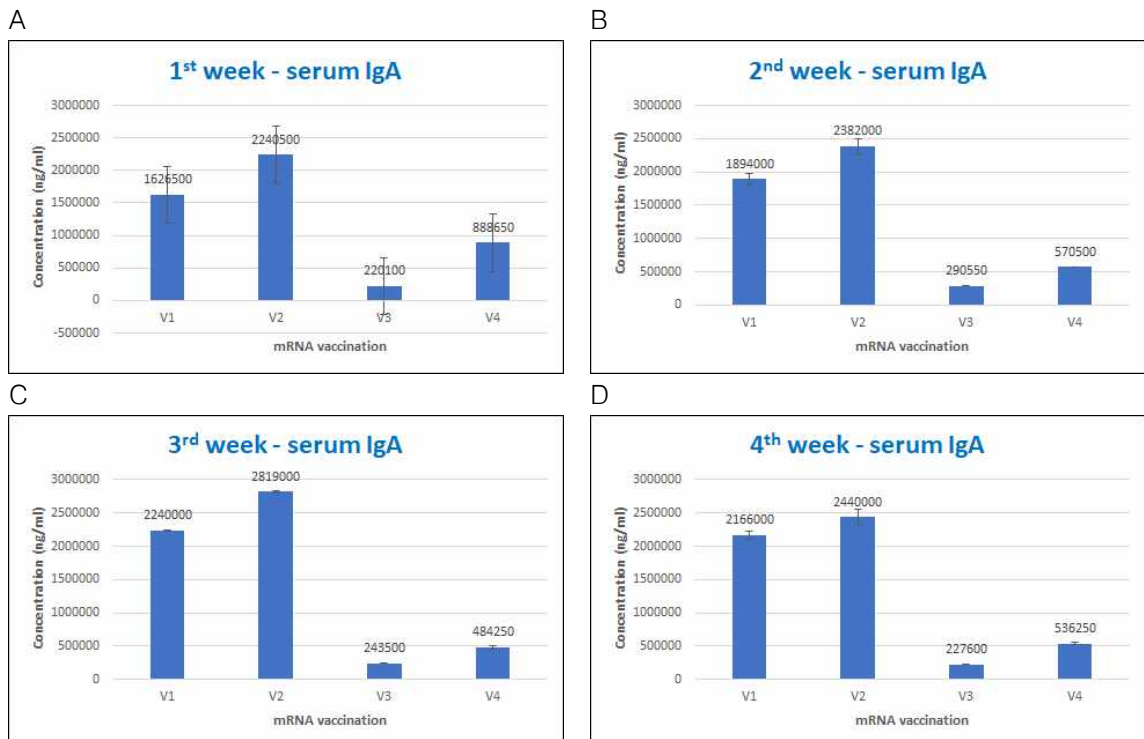


그림 37. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 접종 후 4주 동안 나타나는 혈중 IgA농도 변화 (V1; 벡터, V2; 7.5 mg, V3; 15 mg, V4; 30 mg). A; 1주, B; 2주, C; 3주, D; 4주

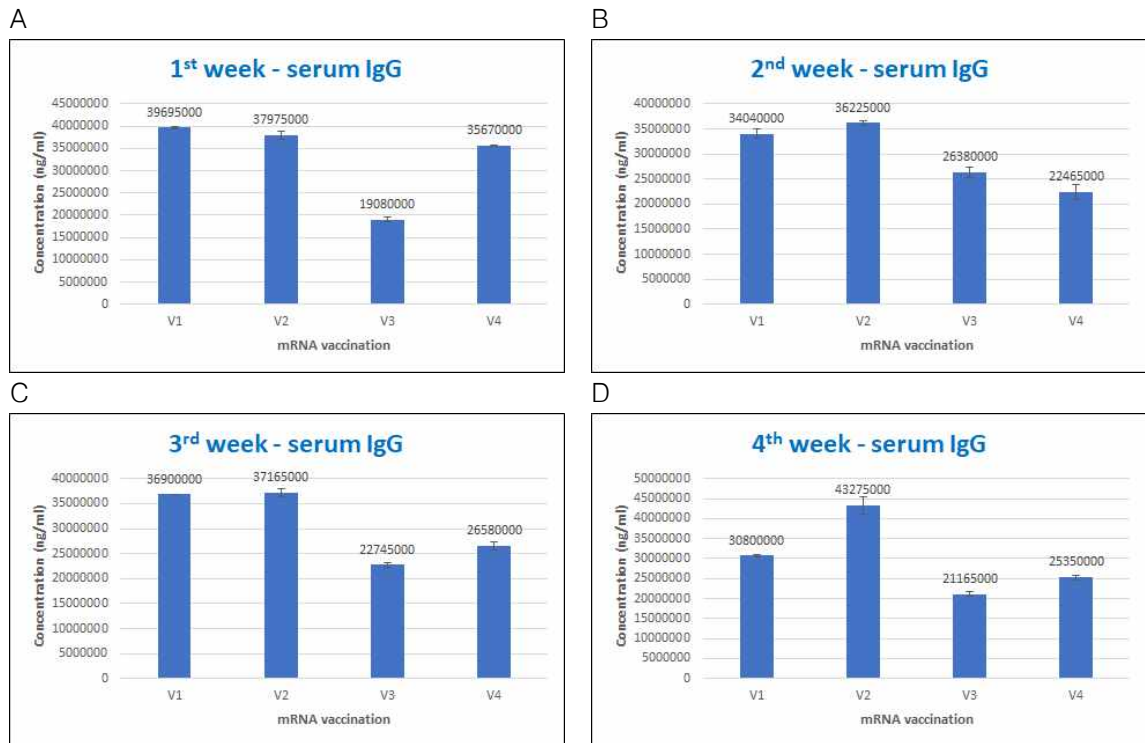


그림 38. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 접종 후 4주 동안 나타나는 혈중 IgA농도 변화 (V1; 벡터, V2; 7.5 mg, V3; 15 mg, V4; 30 mg). A; 1주, B; 2주, C; 3주, D; 4주

⑤ RNA 백신접종에 따른 혈중 면역관련 유전자 활성화: RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 4두에 (벡터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두; 7.5, 15, 30 μ g 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 6주간 수행) 혈중 면역관련 유전자가 1주차에는 음성대조군과 비슷하였으나, 4주 이후에는 높게 발현되는 것이 확인 되었다 (그림 39-42).

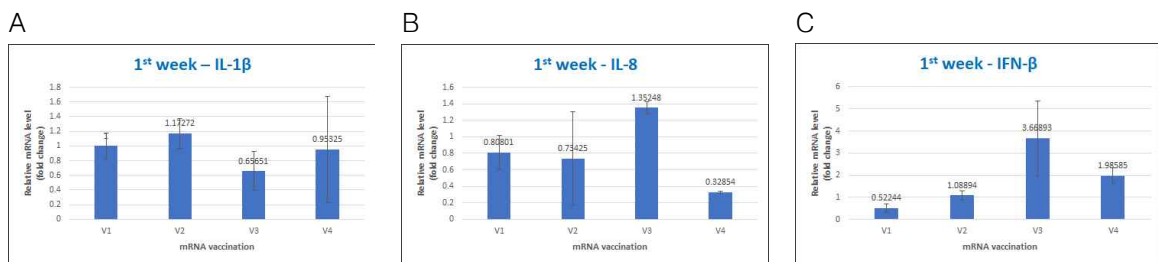


그림 39. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 1주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A; IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

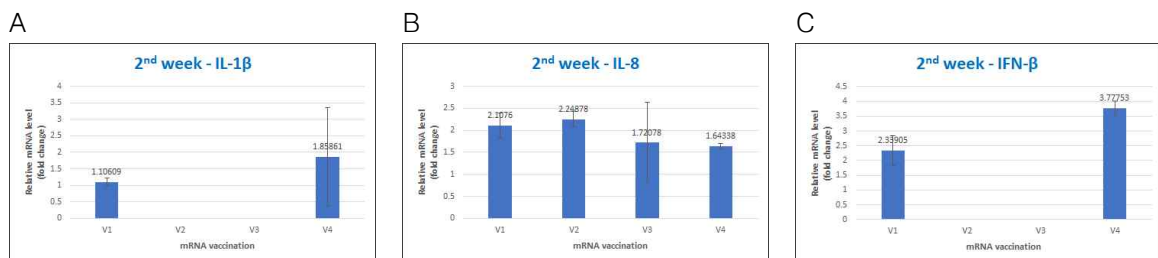


그림 40. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 2주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A; IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

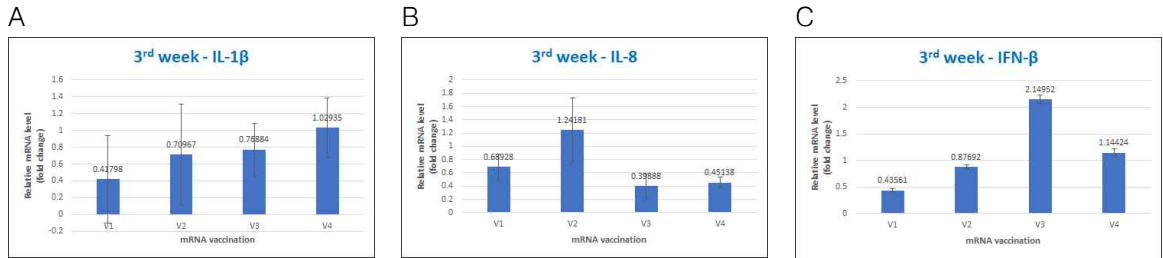


그림 41. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 3주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A:IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

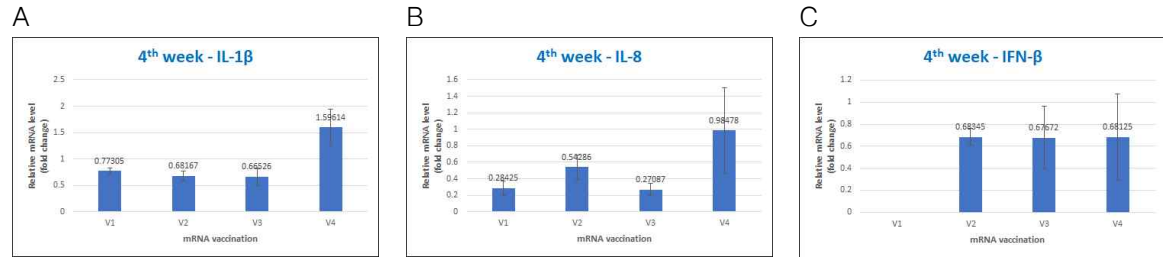


그림 42. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 4주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A:IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

⑥ RNA 백신접종에 따른 혈중 면역세포 분화 평가: RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 4두에 (벡터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두; 7.5, 15, 30 μ g 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 6주간 수행) 혈중 면역세포 분화정도를 평가해본 결과 1주차에는 음성대조군과 비슷하였으나, 3주 이후에는 평가한 면역세포 (CD4, CD8, CD14 세포)가 높게 분화되는 것이 확인 되었다 (그림 43-44).

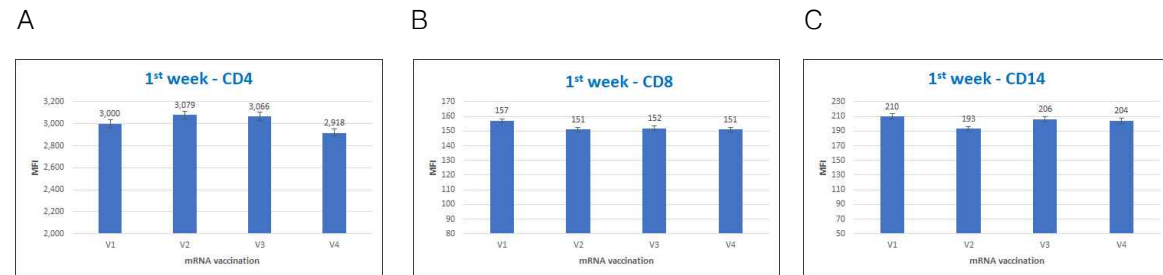


그림 43. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 1주 차 채혈을 통해 면역세포 분화 정도를 flow cytometric assessment 법으로 측정. A:CD-4, B; CD-8, C; CD-14

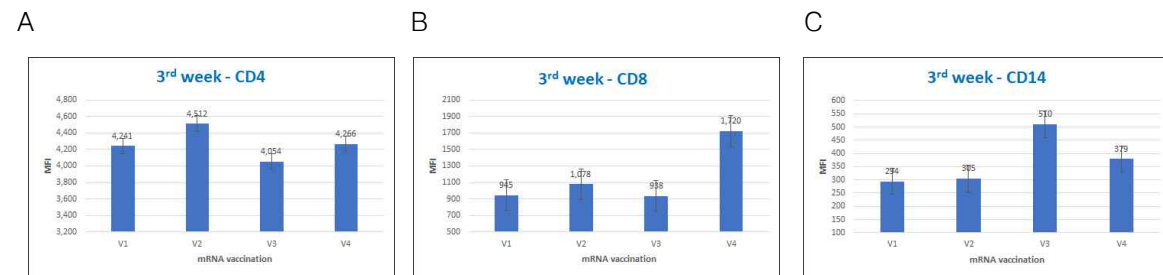


그림 44. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 3주 차 채혈을 통해 면역세포 분화 정도를 flow cytometric assessment 법으로 측정. A:CD-4, B; CD-8, C; CD-14

나. 2차년도 연구 결과

○ (주관연구개발과제): 중앙대학교 : 항체 면역반응 및 안정성 평가

- 연구개발 내용 1: NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 실험용 동물(마우스)에서 면역반응 평가

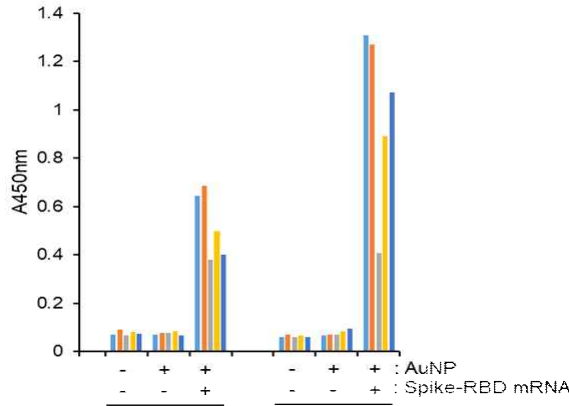


그림 45. RBD-mRNA 접종에 의한 결합항체가 분석

✓ 중화항체가 측정 : PRNT (Plaque reduction neutralization Test), Plaque reduction assay

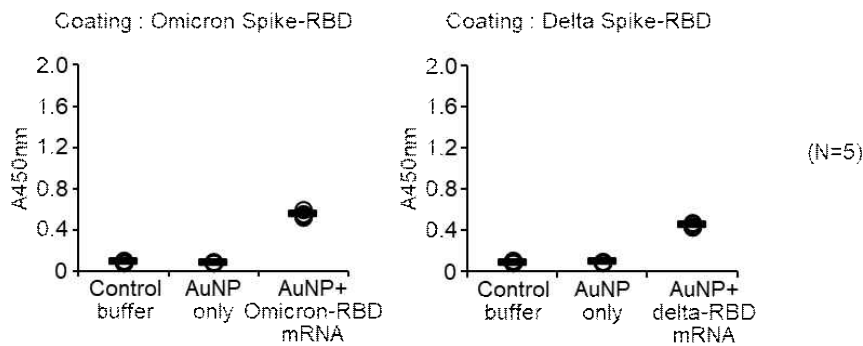


그림 46. RBD-mRNA 접종에 의한 중화항체가 분석

✓ 사이토카인 발현 분석 : Th1/Th2/Th17면역반응 분석 (경상대학교에서 분석 완료)

- 연구개발 내용 2: NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 안전성 평가-**바이오독스텍사와 디티앤씨알오사 (GLP 준수 및 AAALAC 인증 CRO)**에서 랫드를 사용한 **단회 근육투여 독성 시험과 4주반복 (1회/2주, 총 3회) 근육투여 독성 시험 및 4주 회복 시험을 완료함.**

✓ 소동물 모델에서 여러 농도의 NES 핵산전달체-mRNA 결합체 투여 후 일반 증상 관찰 및 체중 측정하여 안전성 및 생체 독성 평가 - RBD mRNA 결합체의 독성 평가를 함께 완료함. 랫드에 4주간 반복 (1 회/2 주, 총 3 회) 근육투여한 결과, 암수 256 µg/animal 투여군에서 시험물질에 의한 독성영향이 관찰되지 않음. 무독성량 (No-Observed-Adverse-Effect-Level, NOAEL)은 암수 모두 256µg/animal 로 판단함.

✓ 유도결합플라즈마 분광-질량 분석(ICP-MS)을 활용한 소동물에서 NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 생체 내 분포 및 배출 평가를 통한 PK/PD 시험 분석

AuNP conc (ng/g)		IM injection		IV injection	
장기	개체	buffer injection	AuNP injection	buffer injection	AuNP injection
비장	1	0	0	0	1179.28
	2	-	0	0	533.9
	3	-	36.77	-	3541.32
	average	0	12.25666667	0	1751.5
	stdev	0	21.2291694	0	1583.262632
간	1	0.00	0.93	0.00	13284.35
	2	-	0.03	0.00	16997.53
	3	-	3.32	-	24419.42
	average	0	1.430258469	0	18233.76718
	stdev	0	1.700782557	0	5669.53514
폐	1	0.00	0.00	0.00	6.19
	2	-	0.00	0.00	55.21
	3	-	0.00	-	74.48
	average	0.00	0.00	0.00	45.30
	stdev	0	0	0	35.2079353
심장	1	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	-	0.00	0.00	8.72
	3	-	153.08	-	912.60
	average	0.00	51.03	0.00	307.11
	stdev	0	88.37812488	0	524.391891
신장	1	0.00	0.00	0.00	23.00
	2	-	0.00	0.00	61.84
	3	-	0.37	-	985.30
	average	0.00	0.12	0.00	356.71
	stdev	0	0.215848314	0	544.7203331
뇌	1	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	-	0.00	0.00	4.55
	3	-	1.68	-	67.77
	average	0.00	0.56	0.00	24.11
	stdev	0	0.96866227	0	37.87955824
전혈	1	0.00	0.00	0.00	2.40
	2	-	0.00	0.00	3.38
	3	-	0.06	-	13.66
	average	0.00	0.02	0.00	6.48
	stdev	0	0.033537563	0	6.238364399
대퇴근육	1	0	3942.81298		
	2	0	5609.16097		
	average	0	4775.986975		
	stdev	0	1178.285964		

그림 47. 장기내 금나노입자 분포 확인

AuNP conc (ng/g)		IM injection		IV injection	
노 채취 시간	개체	buffer injection	AuNP injection	buffer injection	AuNP injection
채 노 12h	1	0	0	0	1.45202908
	2	-	0	0	0
	3	-	0	-	0
	average	0	0	0	0.484009693
	stdev	0	0	0	0.83832938
채 노 24h	1	0	0	0	0.677537569
	2	-	0	0	0
	3	-	0	-	0
	average	0	0	0	0.225845856
	stdev	0	0	0	0.391176498
채 노 48h	1	0	0	0	0
	2	-	0	0	0
	3	-	0	-	0
	average	0	0	0	0
	stdev	0	0	0	0
채 노 7d	1	0	0	0	0.482533599
	2	-	0	0	0.722558372
	3	-	0	-	1.063841156
	average	0	0	0	0.756311042
	stdev	0	0	0	0.292119926
채 노 14d	1	0	0	0	3.500094696
	2	-	0	0	4.176510865
	3	-	0	-	23.18512901
	average	0	0	0	10.28724486
	stdev	0	0	0	11.17501438
채 노 28d	1	0	0	0	6.902549706
	2	-	0.161013637	0	8.448286117
	3	-	0	-	26.73432482
	average	0	0.053671212	0	14.02838688
	stdev	0	0.092961267	0	11.03077374

그림 48. 금나노입자 노로 배출 확인

AuNP conc (ng/ml)	IM-AuNP injection	IV-AuNP injection
채변 12h	17.53	787.81
채변 24h	3.70	50.95
채변 48h	0.00	1.41
채변 7d	0.00	5.76
채변 14d	0.00	1.80
채변 28d	0.00	0.00

그림 49. 금나노입자 변으로 배출 확인

- (공동연구개발과제 1) (주) 엔이에스바이오테크놀러지 : 동물용 백신 생산
 - 연구개발 내용 1: NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 비임상용 백신 생산
- ✓ 감염성 질환 타겟 항원 선정 및 mRNA 후보 제작 10건 : 감염성 질환 타겟 항원 선정 및 mRNA 후보 제작 완료
 - mRNA candidates 1: Sars-CoV-2-RBD mRNA(δ)-GA
 - mRNA candidates 2: Sars-CoV-2-RBD mRNA(δ)-AG
 - mRNA candidates 3: Sars-CoV-2-RBD mRNA(δ)-AGA
 - mRNA candidates 4: Sars-CoV-2-RBD mRNA(δ)-A
 - mRNA candidates 5: Sars-CoV-2-S (full-length) mRNA(δ)-A

- mRNA candidates 6: Sars-CoV-2-RBD mRNA(o)-GA
- mRNA candidates 7: Sars-CoV-2-RBD mRNA(o)-AG
- mRNA candidates 8: Sars-CoV-2-RBD mRNA(o)-AGA
- mRNA candidates 9: Sars-CoV-2-RBD mRNA(o)-A
- mRNA candidates 10: Sars-CoV-2-S (full-length) mRNA(o)-A

- ✓ 감염성 질환 타겟 항원 생산 플라스미드 구축 10건 : 감염성 질환 타겟 항원 생산 플라스미드 구축 완료
- ✓ 감염성 질환 타겟 동물실험용 시료 생산 3건 : 마우스, 패럿, 개 실험용 시료 생산 3건 완료 및 공동 연구 과제에서 사용완료

○ (공동연구개발과제 2) 충남대학교 : SARS-CoV-2 인수간 전파기전 규명

- 연구개발 내용 1: SARS-CoV-2 변이주 숙주특이성에 영향을 미치는 주요 아미노산 식별

○ 아미노산 분석 및 돌연변이 S 단백질 확보

- 아래 그림에서 볼 수 있듯이, 개와 고양이의 ACE2는 인간의 ACE2와 매우 높은 유사성을 보이고 있음. SARS-CoV-2 스파이크 단백질과의 결합에 관여하는 아미노산으로 알려진 10개의 아미노산 중 9개가 개와 고양이에서 사람과 동일하고, 82번 methionine에서만 차이를 나타냄. 따라서, 차이를 보이는 methionine을 threonine으로 치환한 MT mutant hACE2를 사용하여 2차년도 연구를 수행함.

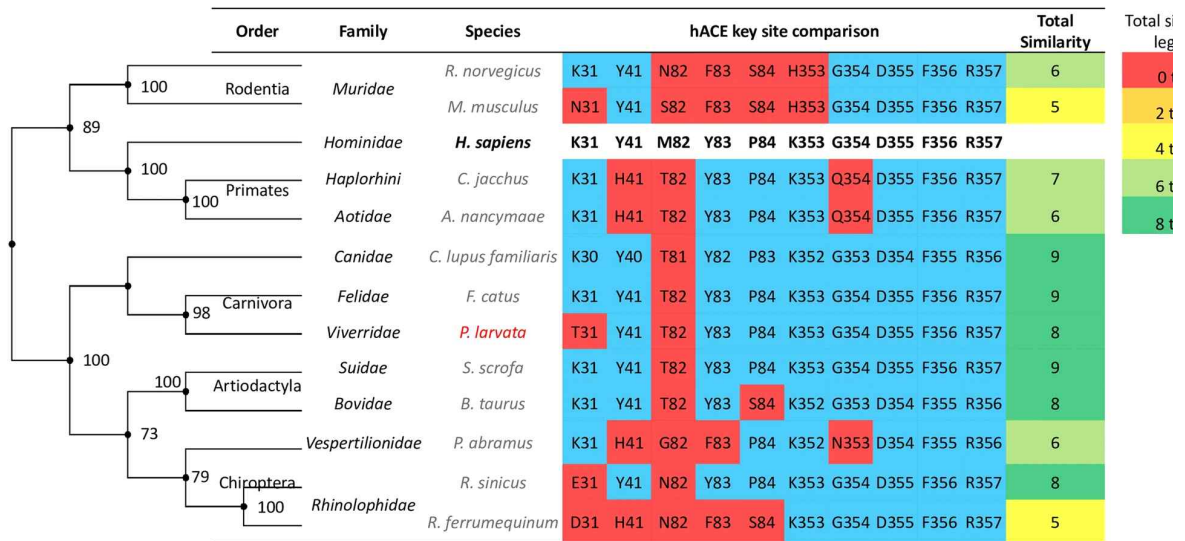


그림 50. 사람 및 다른 포유류 ACE2 아미노산 서열 비교

- 돌연변이 hACE2 단백질은 direct-site mutagenesis kit를 사용하여 제작하고 Sanger sequencing을 통해 확인함. 단백질의 발현을 확인하기 위해 HEK293T세포에 WT 및 MT mutant hACE2를 PEI를 이용하여 형질전환하고 48시간 후 western blot을 수행하였음. 그 결과, 약 120 kDa에서 특이적인 밴드가 관찰됨.

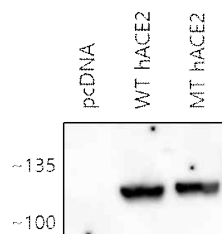


그림 51. WT 및 MT hACE2 발현 test

○ S 단백질과 mutant ACE2 binding affinity 측정

- SARS-CoV-2 S1-Fc와 ACE2와의 결합력을 평가하기 위해 IP를 수행하였음. HEK293T

세포에 WT 및 MT mutant hACE2 또는 SARS-CoV-2 S1-Fc를 발현함. 48시간 후 cell lysate를 혼합하고 Fc tag을 이용하여 IP를 수행함. Fc tag 및 C9(ACE2)에 대한 western blotting을 수행함.

- 그 결과, WT에 비해 MT mutant hACE2가 SARS-CoV-2 S와 낮은 결합을 보인다는 것을 관찰함.

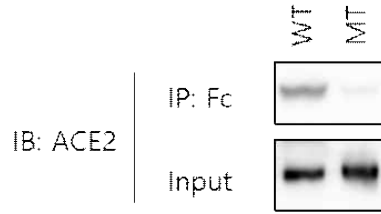


그림 52. WT 및 MT hACE2와 SARS-CoV-2 S1-Fc Co-IP

- 연구개발 내용 2: 핵심 돌연변이 발현 바이러스를 이용한 감염성 평가

○ 슈도바이러스를 이용한 감염성 평가

- WT 및 MT hACE2를 발현하는 Hela 세포에 SARS-CoV-2 슈도바이러스를 transduction 함. Transduction 48시간 후, 상층액을 제거하고 세포 내 luciferase accumulation을 luciferase assay를 통해 확인함. 음성대조군인 pcDNA3.1 및 양성대조군인 hACE2와 비교하여 감염력을 평가함.

- 그 결과, VSV 슈도바이러스의 감염력은 WT와 MT hACE2에서 모두 큰 차이를 보이지 않았지만, SARS-CoV-2 슈도바이러스의 감염력은 MT hACE2를 발현하는 세포에서 유의하게 감소하였음.

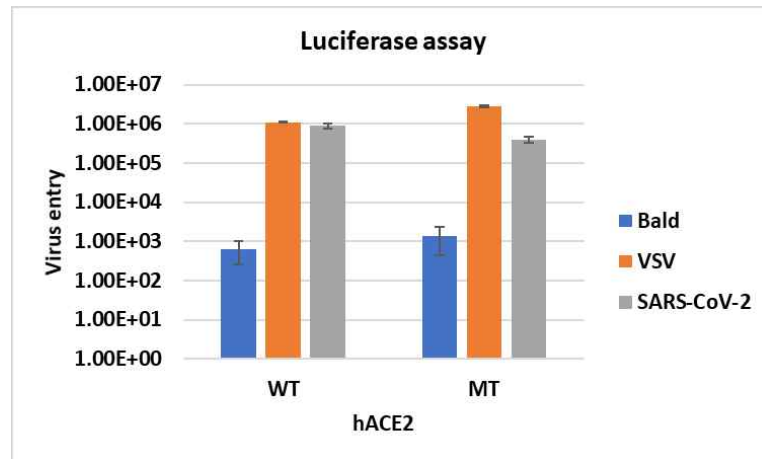


그림 53. WT 및 MT hACE2 세포주에서의 슈도바이러스 감염력 평가

○ 아데노바이러스 기반 ACE2 발현 형질전환 마우스를 이용한 감염성 평가

- 동물유래 ACE2가 in vivo 상에서의 바이러스 감염에 미치는 영향을 직접적으로 평가하고 in vivo내에 존재하는 다른 factor에 의한 영향을 배제하기 위하여 아데노바이러스 기반 ACE2 발현 형질전환 마우스를 제작함.

- 이를 위해 hACE2, cACE2, fACE2를 발현하는 adeovirus type 5 (Ad5)를 제작함.

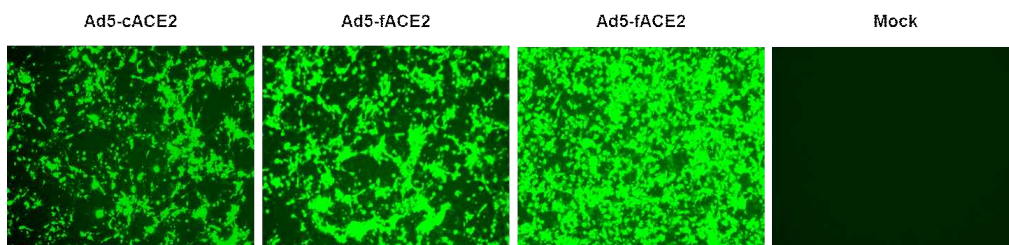


그림 54. Ad5-ACE2 infected HEK293A cells

- Ad5-hACE2, Ad5-cACE2, Ad5-fACE2를 Balb/C 마우스에 비강을 통해 접종하고 바이러스 접종 5일 후, SARS-CoV-2를 비강을 통해 접종함. 바이러스 접종 3일 후 마우스로부터 폐를 채취하고 폐 조직 내 바이러스의 양을 plaque assay를 통해 측정함. 그 결과, 세포수준에서의 실험 결과와 유사하게 hACE2를 발현하는 마우스에서 cACE2 및 fACE2를 발현하는 마우스에 비해 높은 감염율을 나타냄.

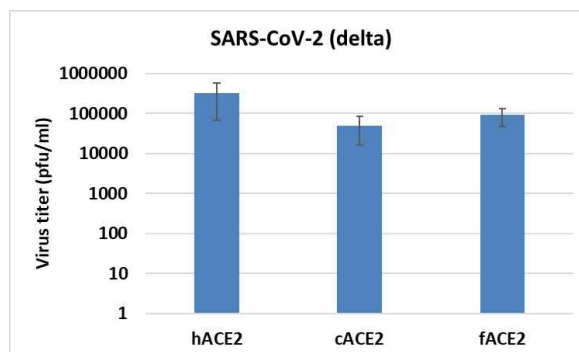


그림 55. Ad5-ACE2 infected mouse에서의 SARS-CoV-2 (delta) 감염능

- MT hACE2를 발현하는 Ad5 바이러스를 이용하여 동일한 실험을 수행함. 그 결과, 세포실험에서와 마찬가지로 MT hACE2를 발현하는 마우스에서 WT hACE2를 발현하는 마우스에 비해 낮은 감염율을 나타냄.

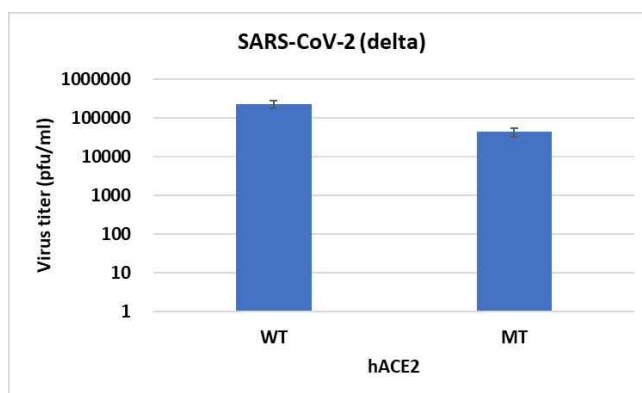


그림 56. WT, MT hACE2 infected mouse에서의 SARS-CoV-2 (delta) 감염능

- (공동연구개발과제 3) 경상국립대학교 : 다양한 항원 mRNA 종을 이용한 NES 핵산전달체 기반 mRNA 백신 전달 플랫폼의 범용성 평가
- ③ RNA 백신접종에 따른 혈액검사 결과: RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 4두에 (벡터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두; 7.5, 15, 30 μ g 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 접종 후 10주간 시험) 신체 검사를 수행한 결과 특이적인 이상이 확인되지 않음 (그림 57)

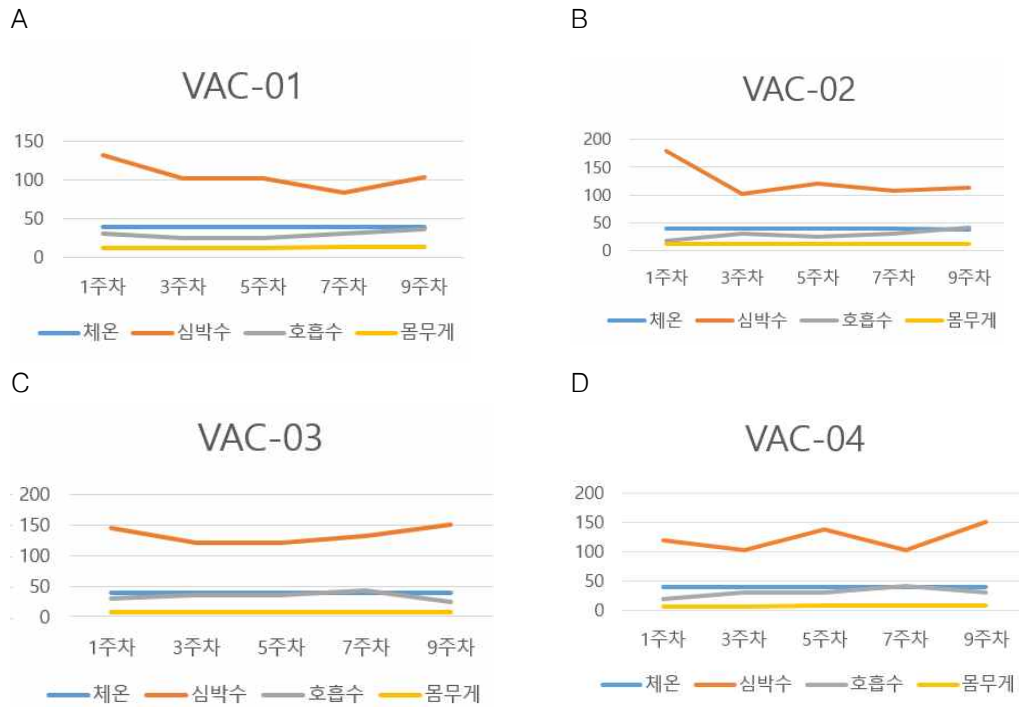
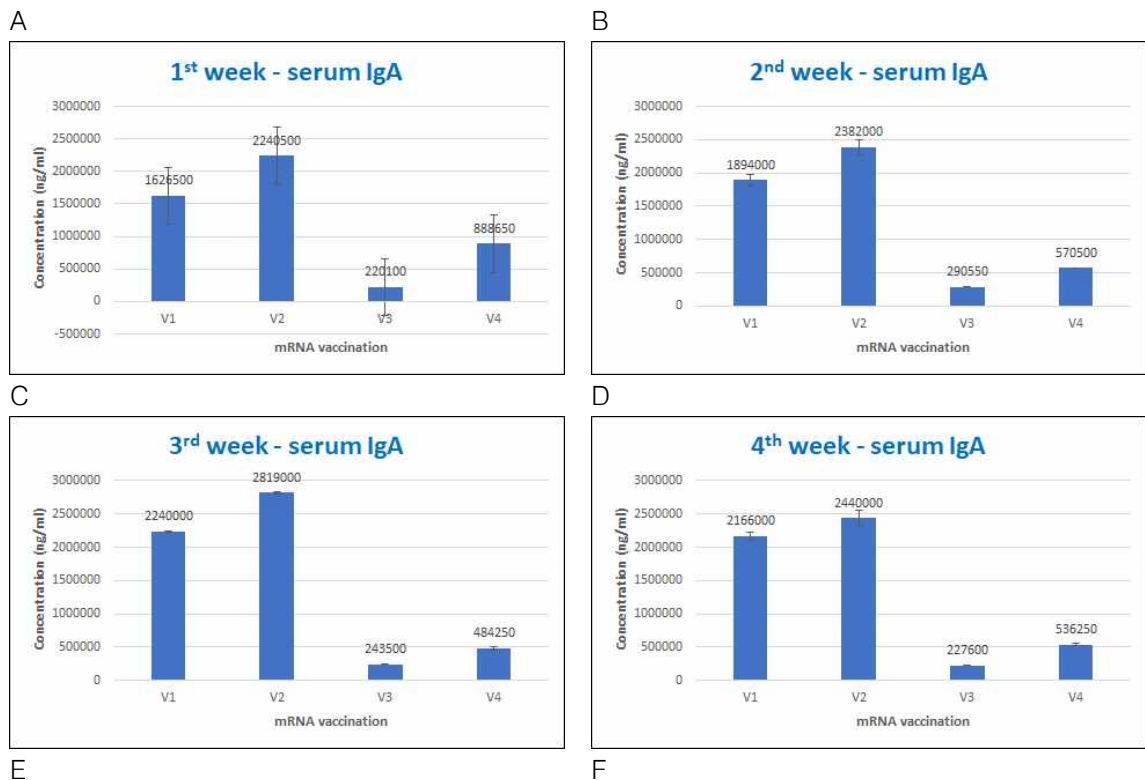


그림 57. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한후 신체검사 분석 수행. A와 B; 비접종군, A: 벡터 접종, B, C와 D (각 7.5, 15, 30 mg씩 접종)

④ RNA 백신접종에 따른 혈중 면역글로부린 평가: RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 4두에 (벡터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두; 7.5, 15, 30 μg 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 접종 후 11주간 시험) 혈중 면역글로부린 평가를 수행한 결과 벡터 접종군과 낮은농도(7.5 μg)의 접종 견에서 10주 동안 높은 IgA 및 IgG농도가 확인 되었음 (그림 58-59)



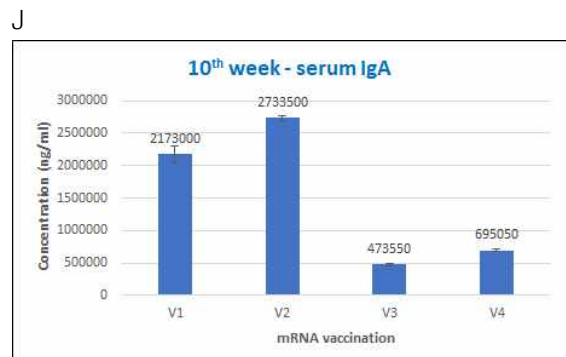
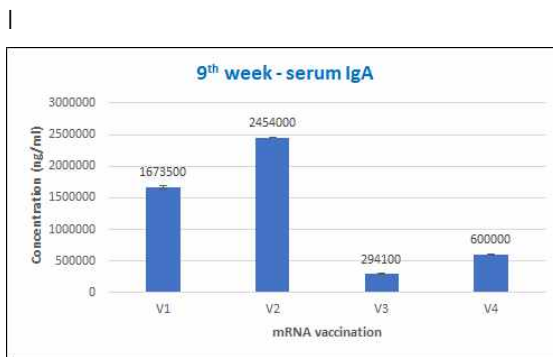
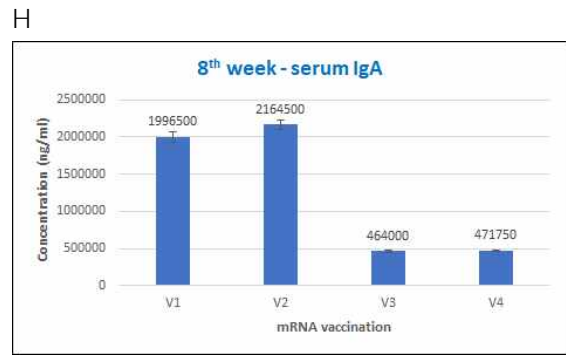
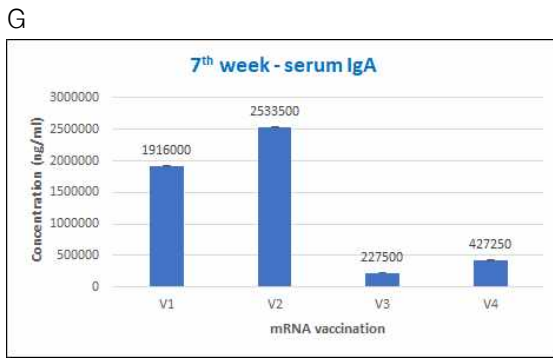
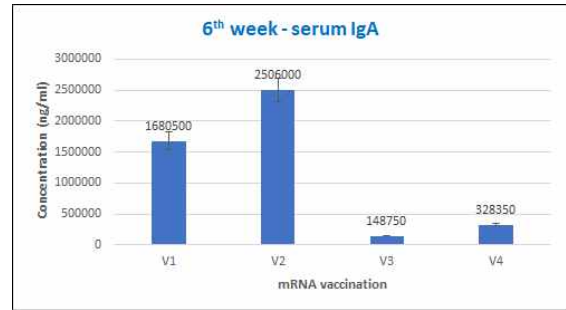
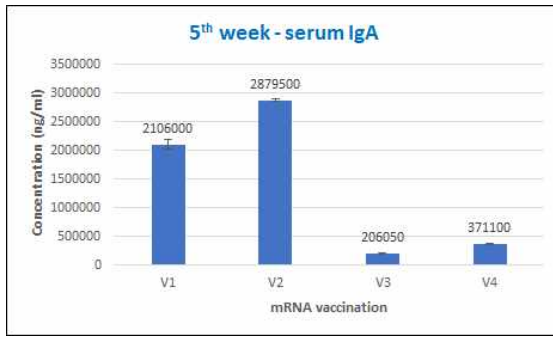
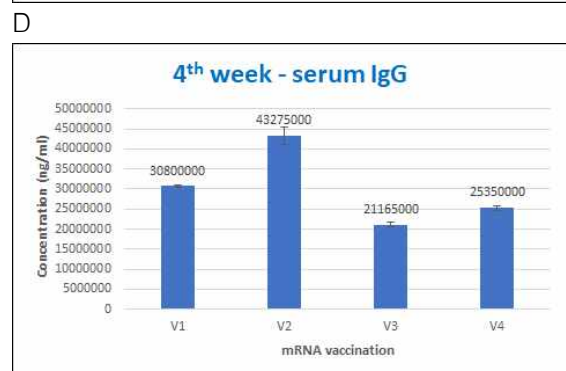
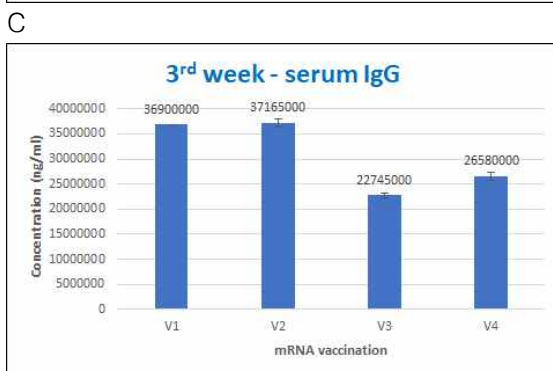
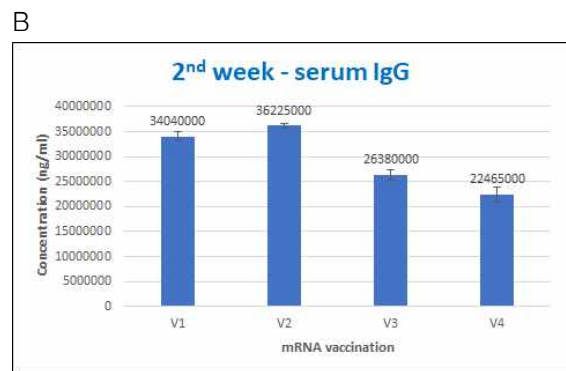
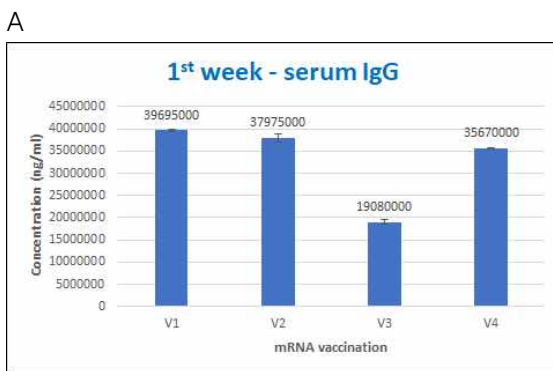
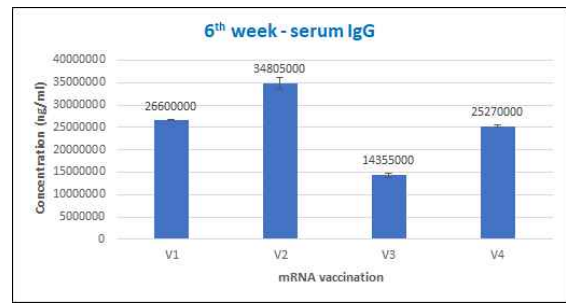
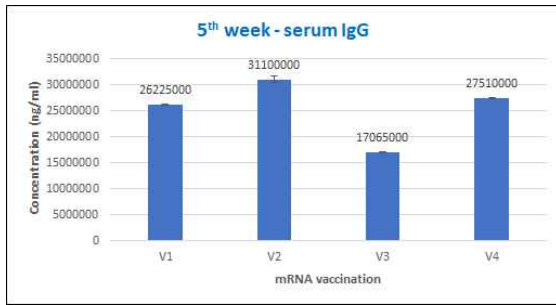


그림 58. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선별하여 비글견 접종 후 10주 동안 나타나는 혈중 IgA농도 변화 (V1; 벡터, V2; 7.5 mg, V3; 15 mg, V4; 30 mg).



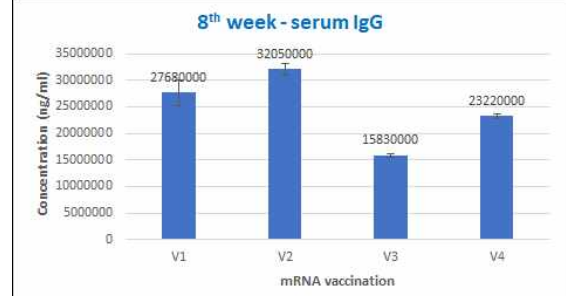
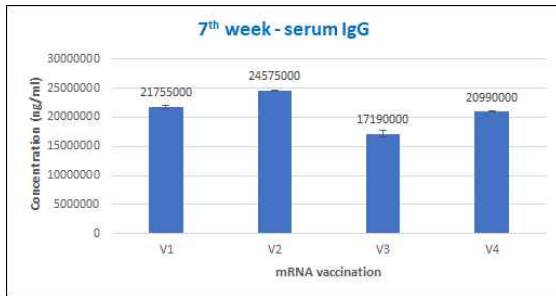
E

F



G

H



I

J

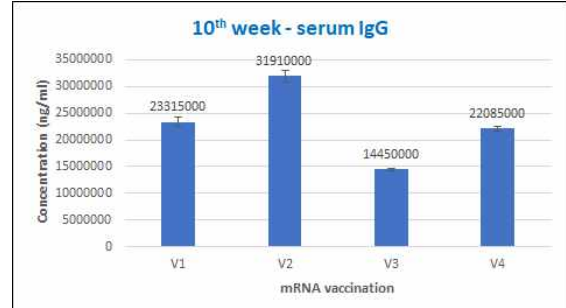
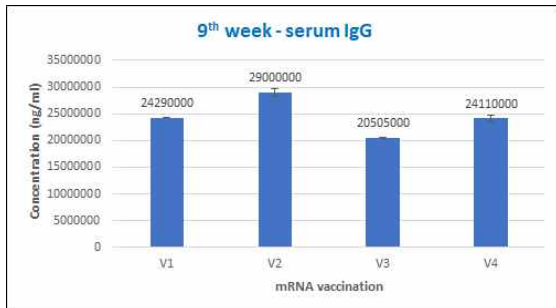
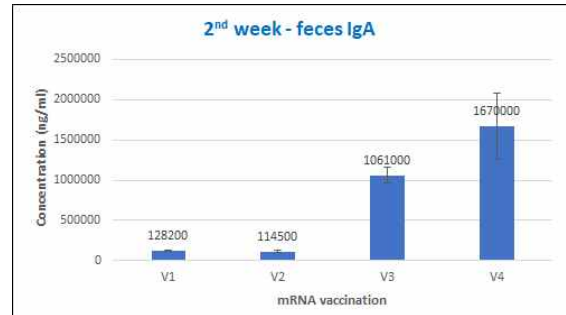
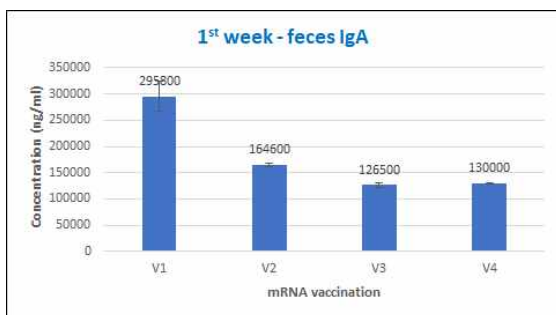


그림 59. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 접종 후 10주 동안 나타나는 혈중 IgG농도 변화 (V1; 벡터, V2; 7.5 mg, V3; 15 mg, V4; 30 mg). A; 1주, B; 2주, C; 3주, D; 4주

- ⑤ RNA 백신접종에 따른 분변중 면역글로부린 평가: RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 4두에 (벡터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두; 7.5, 15, 30 μ g 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 접종 후 11주간 시험) 분변중 면역글로부린 평가를 수행한 결과 벡터 접종군과 낮은농도(7.5 μ g)의 접종군에서 10주 동안 높은 IgA 및 IgG농도가 확인 되었음 (그림 60-61)

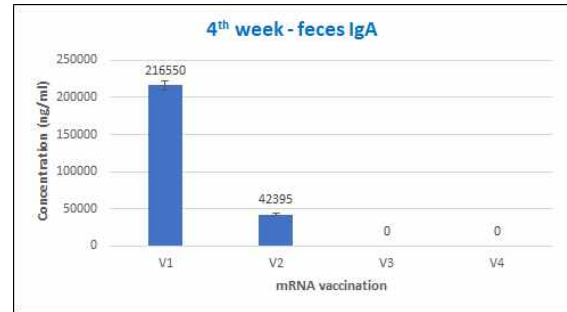
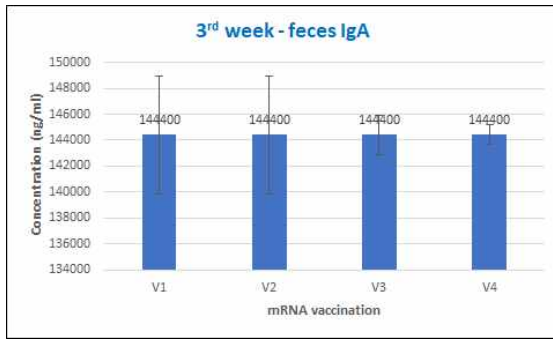
A

B



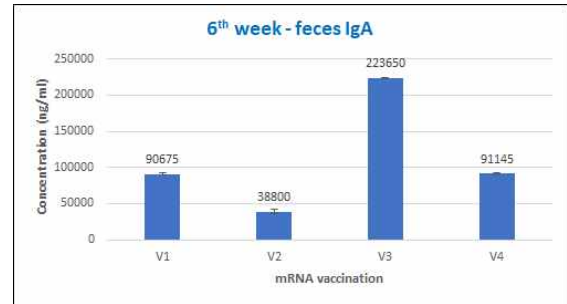
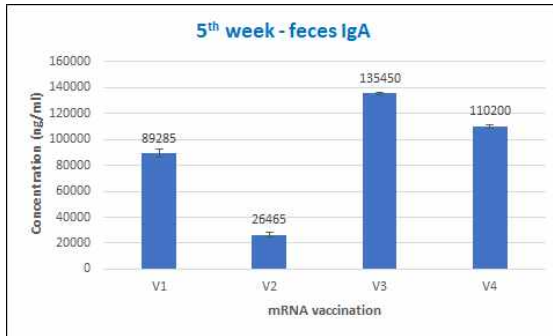
C

D



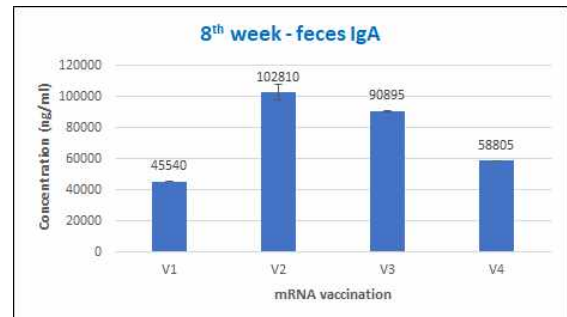
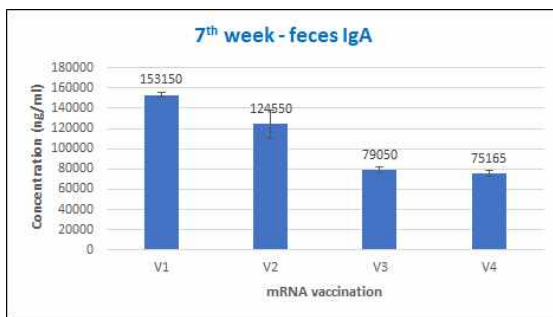
E

F



G

H



I

J

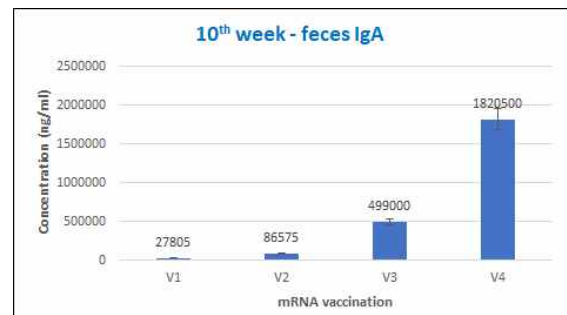
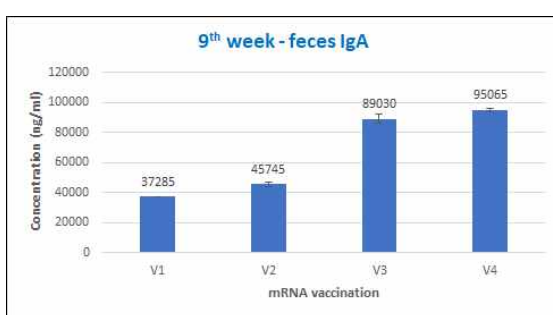


그림 60. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 접종 후 10주 동안 나타나는 분변중 IgA농도 변화 (V1; 벡터, V2; 7.5 mg, V3; 15 mg, V4; 30 mg).

A

B

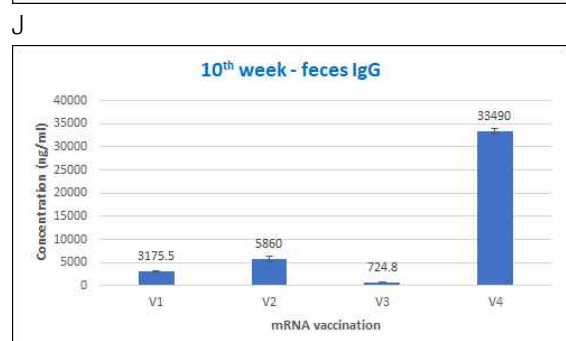
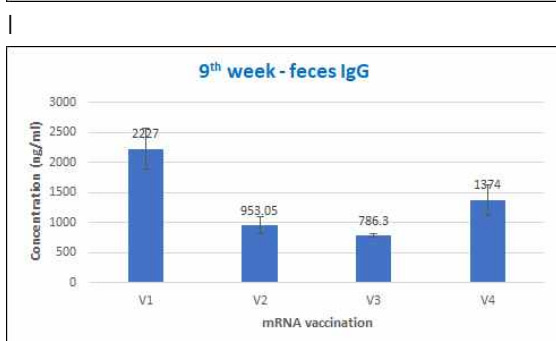
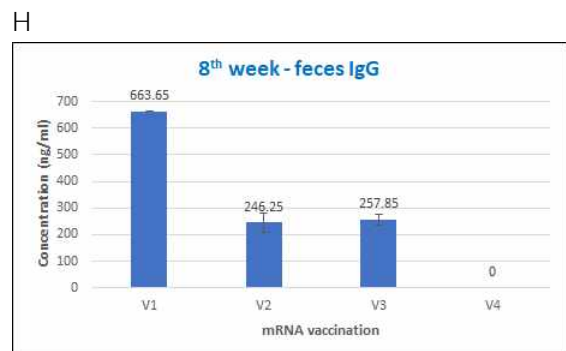
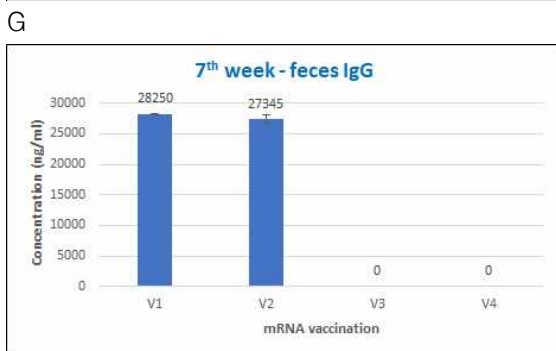
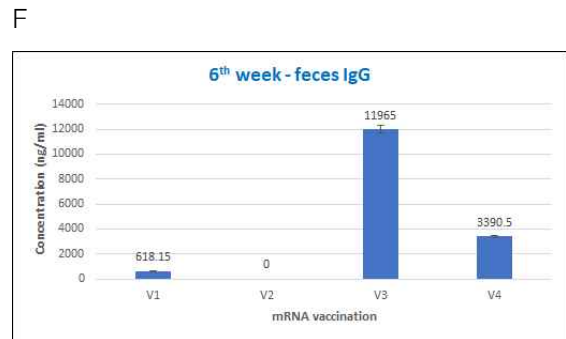
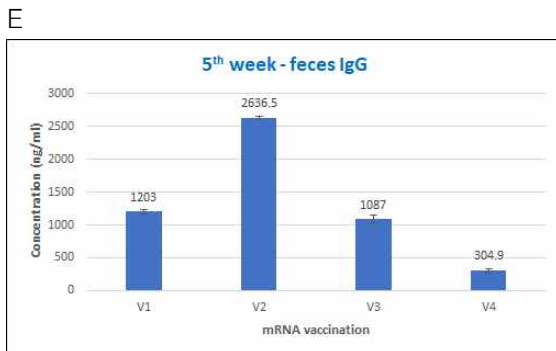
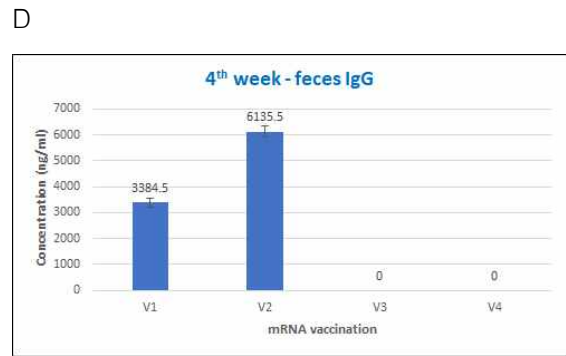
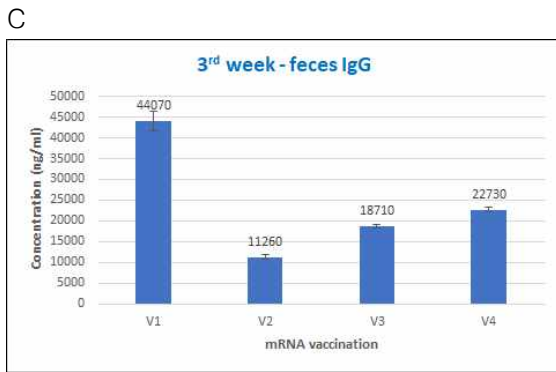
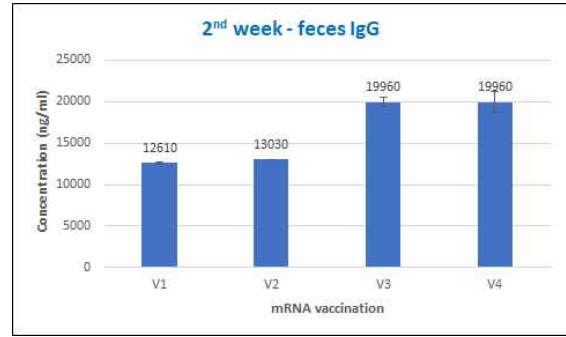
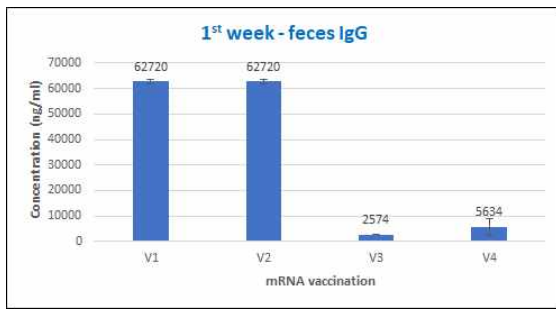


그림 61. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 접종 후 10주 동안 나타나는 분변 중 IgG 농도 변화 (V1; 벡터, V2; 7.5 mg, V3; 15 mg, V4; 30 mg). A; 1주, B; 2주, C; 3주, D; 4주

⑥ RNA 백신접종에 따른 혈중 면역관련 유전자 활성화: RNA 백신 후보물질 중

delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 4두에 (벡터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두; 7.5, 15, 30 μg 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 접종 후 11주간 시험) 혈중 면역관련 유전자가 1주차에는 음성대조군과 비슷하였으나, 4주 이후에는 높게 발현되는 것이 확인 되었음 (그림 62-71).

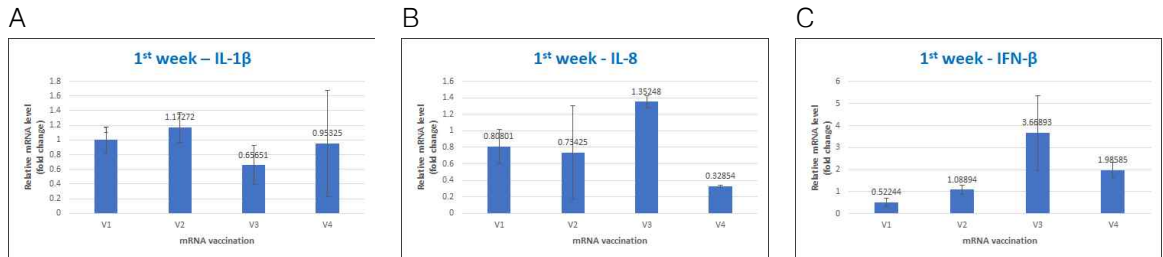


그림 62. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 1주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A;IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

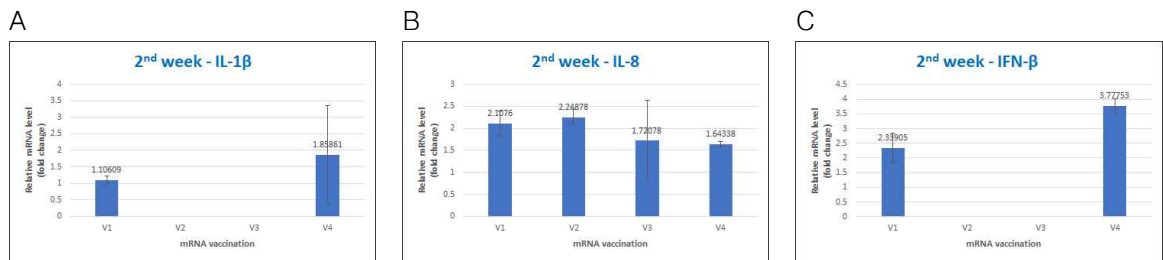


그림 63. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 2주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A;IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

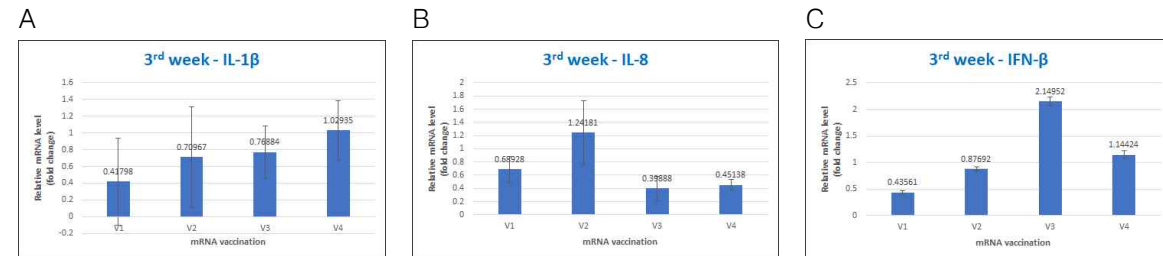


그림 64. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 3주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A;IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

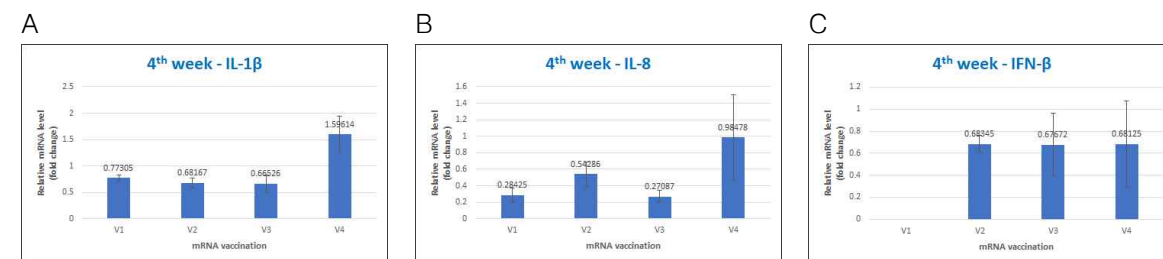


그림 65. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 4주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A;IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

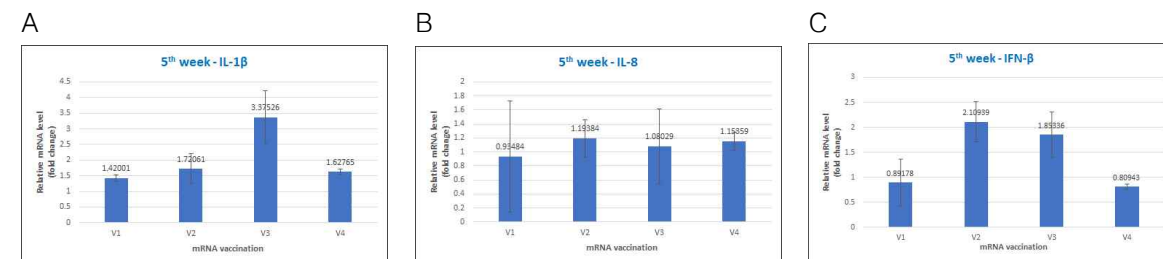


그림 66. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 5주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A;IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

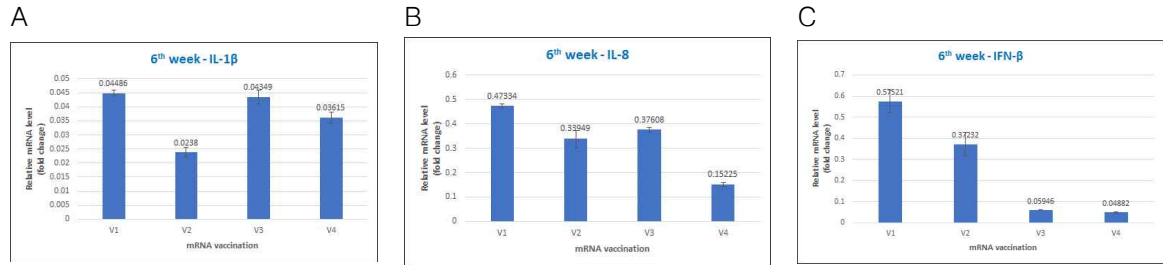


그림 67. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 6주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A;IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

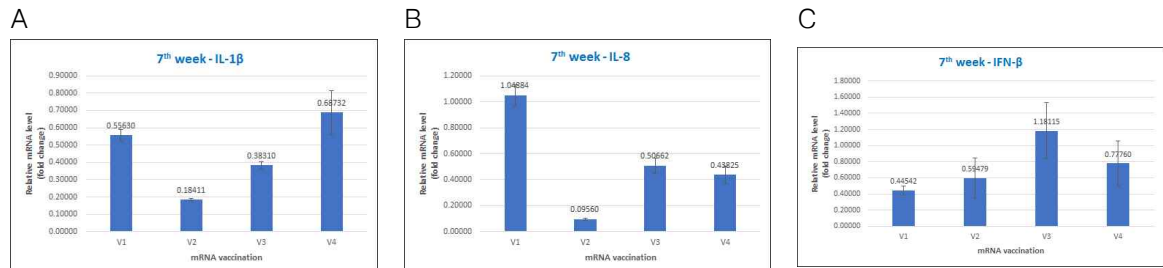


그림 68. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 7주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A;IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

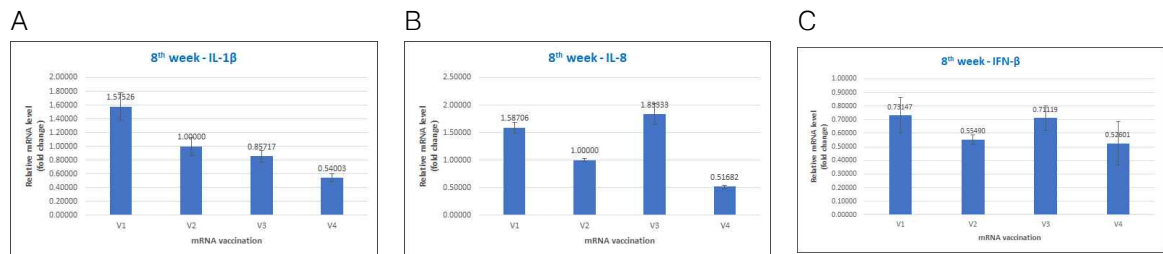


그림 69. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 8주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A;IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

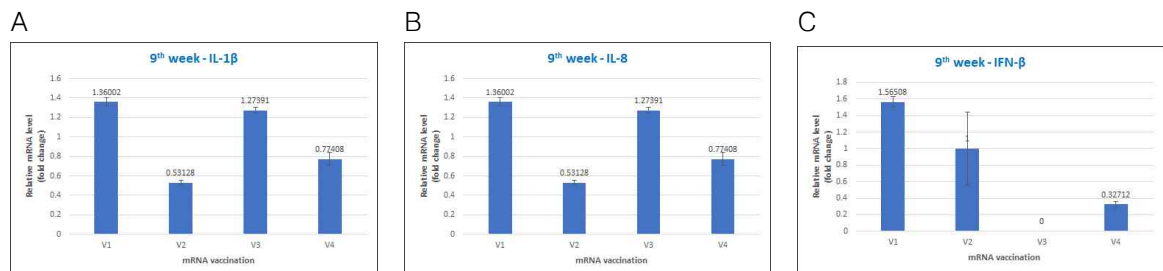


그림 70. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 9주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A;IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

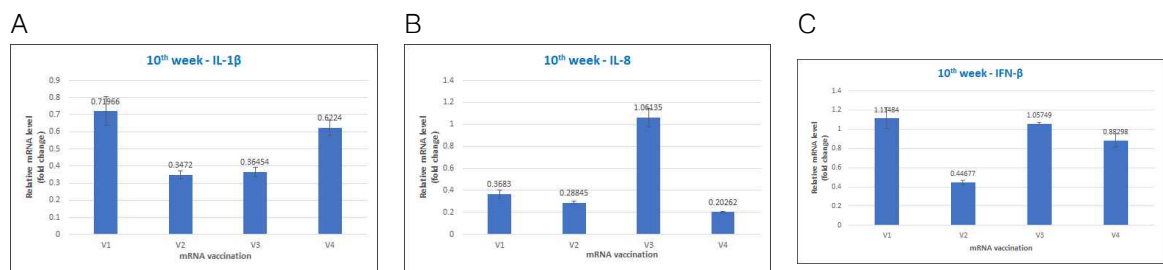


그림 71. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 10주 차 채혈을 통해 면역관련 유전자에 대한 발현을 qRT-PCR 방법으로 측정. A;IL-1 β , B; IL-8, C; IFN- β

⑦ RNA 백신접종에 따른 혈중 면역세포 분화 평가: RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견 4두에 (벡터접종군 1두; 음성대조군, 백신 접종군 3두; 7.5, 15, 30 μ g 각 1두씩) 3회 수행하고(2주에 1회씩 접종 후 11주간 시험) 혈중 면역세포 분화정도를 평가해본 결과 1주차에는 음성대조군과 비슷하였으나, 3주 이후에는 평가 한 면역세포 (CD4, CD8, CD14 세포)가 높게 분화되는 것이 확인되었다 (그림 72-77).

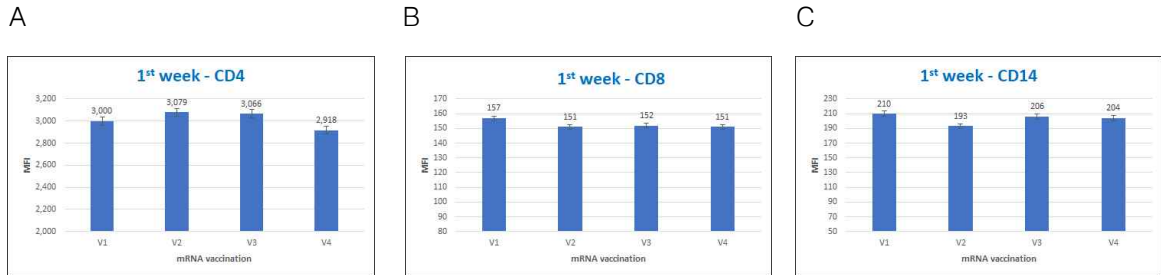


그림 72. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 1주 차 채혈을 통해 면역세포 분화 정도를 flow cytometric assessment 법으로 측정. A;CD-4, B; CD-8, C; CD-14

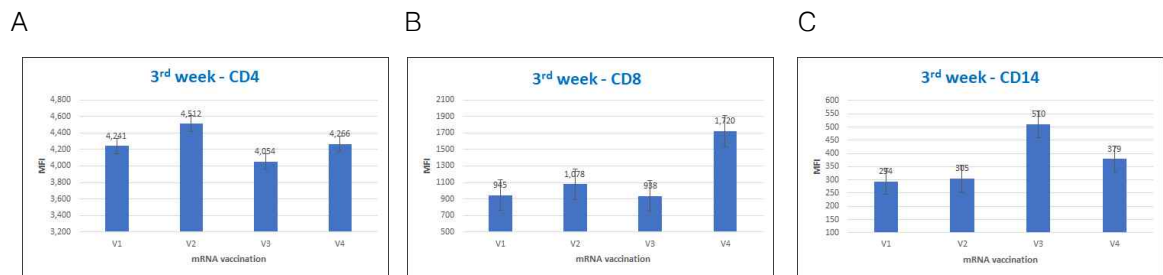


그림 73. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 3주 차 채혈을 통해 면역세포 분화 정도를 flow cytometric assessment 법으로 측정. A;CD-4, B; CD-8, C; CD-14

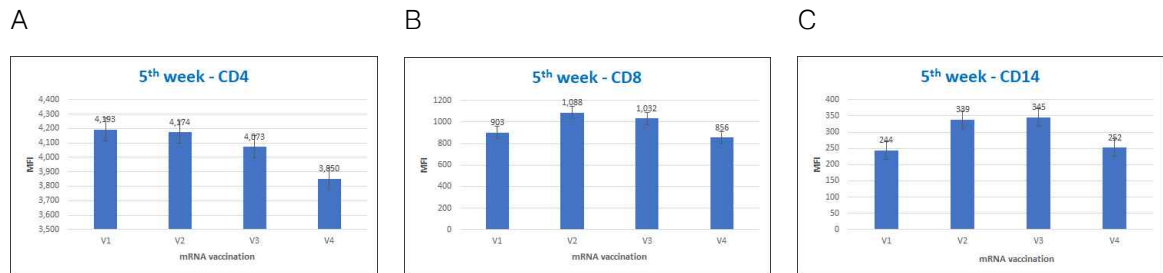


그림 74. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 5주 차 채혈을 통해 면역세포 분화 정도를 flow cytometric assessment 법으로 측정. A;CD-4, B; CD-8, C; CD-14

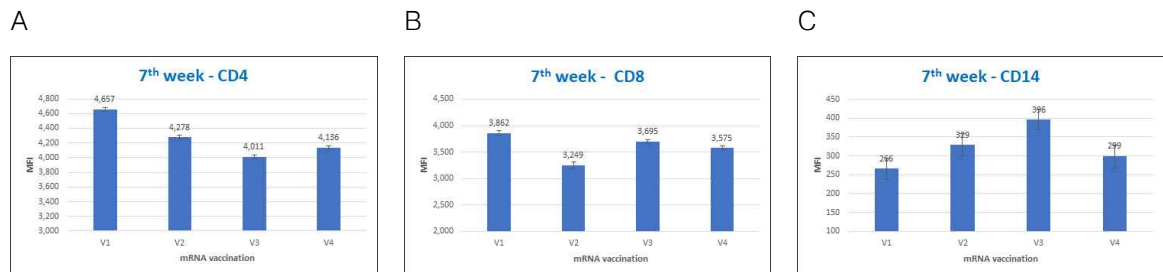


그림 75. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 7주 차 채혈을 통해 면역세포 분화 정도를 flow cytometric assessment 법으로 측정. A;CD-4, B; CD-8, C; CD-14

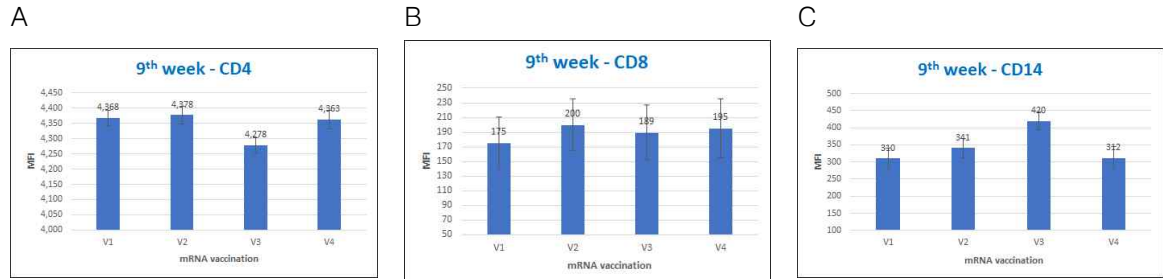


그림 76. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 9주 차 채혈을 통해 면역세포 분화 정도를 flow cytometric assessment 법으로 측정. A;CD-4, B; CD-8, C; CD-14

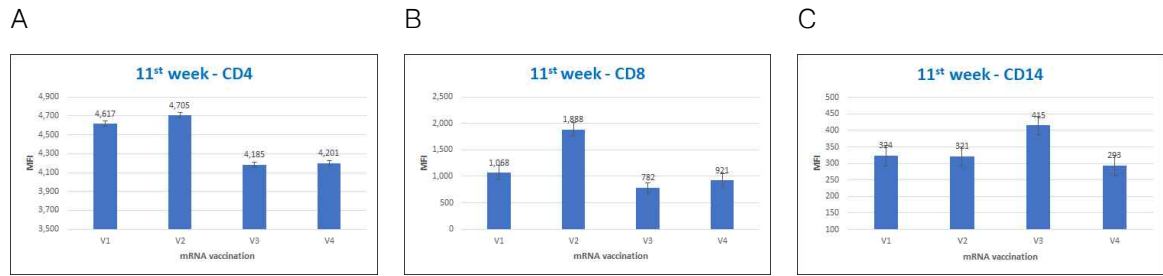


그림 77. RNA 백신 후보물질 중 delta-S(mRNA)를 선발하여 비글견에 접종 한 후 11주 차 채혈을 통해 면역세포 분화 정도를 flow cytometric assessment 법으로 측정. A;CD-4, B; CD-8, C; CD-14

4) 후보 동물용 백신의 비설치류 동물(페렛) 면역반응 및 효능 평가

(1) RNA 백신후보물질

- ① RNA 백신후보물질 선발 및 백신 접종: RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페렛 8두에 (비접종군 2두, 벡터접종군 2두; 음성대조군, 저용량 백신 접종군; 3 pMol 2두, 고용량 백신 접종군; 6 pMol 2두) 10회 수행하고(2주에 1회씩 20주간 수행), 매주 체중변화, 분변 및 혈중 면역글로부린, 사이토카인, 면역 분화 세포 등 분석을 수행함(그림 78, 79).

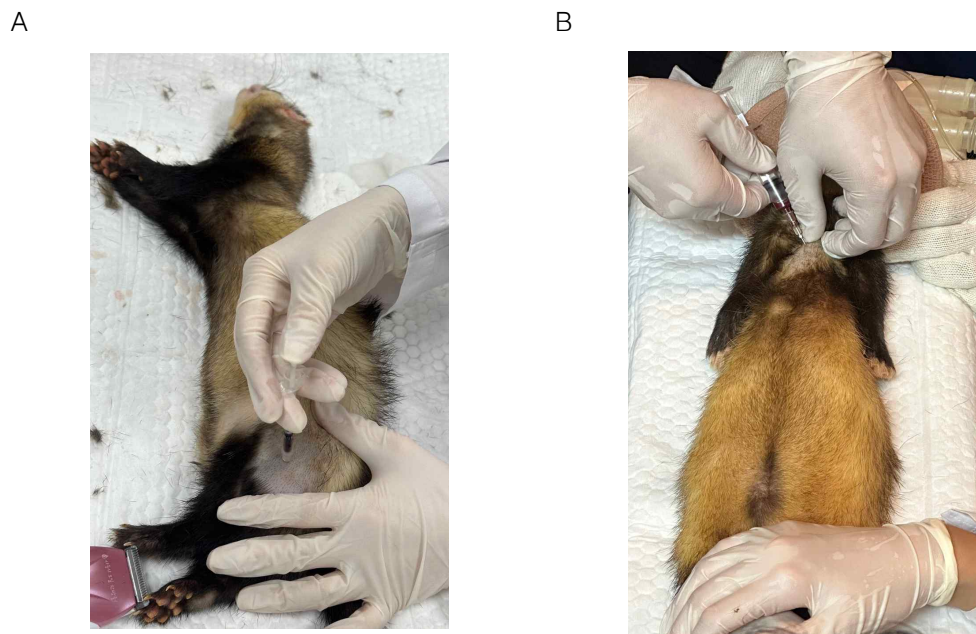


그림 78. RNA/DNA 백신 후보물질을 선발하여 페렛에 접종 및 채혈

A



B



그림 79. RNA/DNA 백신 후보물질을 선발하여 페릿에 접종 한 후 접종부위의 피부 병변 조사

② RNA 백신접종에 따른 혈액검사 결과: RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페릿 8두에 (비접종군 2두, 벡터접종군 2두; 음성대조군, 저용량 백신 접종군; 3 pMol 2두, 고용량 백신 접종군; 6 pMol 2두) 10회 수행하고(2주에 1회씩 20주간 수행)하고 비접종군 2두와 함께 채혈을 통해 혈액검사를 수행하였음. 비접종 군에서는 약간의 빈혈과 MCHC의 증가 및 MCV의 감소가 확인되었고, 혈청화학검사에서 2두 모두 알부민은 소량 감소했으며, 글로불린이 10회 모두에서 증가된 것이 확인되었으나, 유의적인 차이는 인정되지 않았음. AuNP 벡터만 접종한 페릿에서는 분석 결과 혈구검사에서 2두는 경미한 빈혈이 지속적으로 발생하였고, 또한 혈구검사 결과 2두에서 경미한 MCHC의 증가 및 MCV의 감소가 확인되었음. AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 접종한 페릿에서는 분석결과 저용량 백신 접종군(3 pMol)과 고용량 백신 접종군(6 pMol) 모두에서 경미한 빈혈이 관찰되었고, 혈구검사 결과 4두 모두 MCHC의 증가 및 MCV의 감소가 확인되었고, 혈청화학검사에서 4두 모두 알부민은 소량 감소했으며, 글로불린이 10회 모두에서 증가된 것이 확인되었음 (그림 80, 81)

A

	2023-08-16 오후 8:19:10	2023-08-30 오후 5:11:33	2023-09-14 오후 5:06:07	2023-09-26 오후 4:00:07	2023-10-11 오후 4:55:45	2023-10-25 오후 5:16:38	2023-11-08 오후 4:24:07	2023-11-20 오후 5:16:29	2023-12-06 오후 5:19:41
Catalyst One									
Albumin	2.6-3.8 (g/dL)	2.9	2.3 (▼)	2.6	2.1 (▼)	2.4	2.4 (▼)	2.6	2.7
ALP	9-84 (U/L)	<10	37	55	33	33	41	47	28
ALT	80-289 (U/L)	108	160	144	123	117	113	130	117
Amylase	(U/L)	45	46	46	39	47	61	67	51
BUN	10-45 (mg/dL)	34	33	29	31	25	35	25	34
Calcium	8.0-11.8 (mg/dL)	9.3	8.9	9.3	8.5	8.8	9	8.8	8.5
Cholesterol-Total	64-296 (mg/dL)	195	181	191	144	163	170	159	177
Creatinine	0.4-0.9 (mg/dL)	0.4	0.6	0.3 (▼)	0.4	0.5	0.5	0.6	0.3 (▼)
GGT	(U/L)	2	0	0	0	0	0	0	2
Globulin	1.8-3.1 (g/dL)	4.4 (▲)	3.8 (▲)	3.6 (▲)	3.2 (▲)	3.7 (▲)	3.8 (▲)	4.0 (▲)	3.9 (▲)
Glucose	94-207 (mg/dL)	158	123	133	160	115	121	168	119
Lipase	(U/L)	1727	1587	1452	1329	1929	2017	1993	1978
Protein-Total	5.2-7.3 (g/dL)	7.2	6.2	5.3	6.4	6.3	6.6	6.4	6.7
ALBU/GLOB	0	0.6	0.6	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.6
BUN/CREA	0	89	56	85	78	62	56	63	73
ProCyt Dx									
Hematocrit(Ht)	37.0-50.0 (%)	38.4	38	38.5	43.5	40.2	39.3 (▼)	2.5 (▼)	39.7
Hemoglobin(Hb)	11.0-17.0 (g/dL)	13.6	14.1	14.8	15.6	14.9	13.3	10 (▼)	13.7
MCV	140-180 (fL)	135	152	155	153	152	151	163	151
MCHC	32.0-35.0 (g/dL)	33.4 (▲)	37.1 (▲)	37.5 (▲)	35.9 (▲)	37.1 (▲)	36.6 (▲)	40.0 (▲)	37.6 (▲)
MCV	45.0-50.0 (fL)	63.3 (▼)	60.9 (▼)	41.5 (▼)	42.6 (▼)	40.9 (▼)	40.0 (▼)	37.3 (▼)	42.6 (▼)
MPV	80-120 (fL)	121 (▲)	121 (▲)	121 (▲)	117	121 (▲)	117	89	115
PCT	(%)	0.25	0.63	0.46	0.19	0.49	0.49	0.05	0.49
Platelet	270-880 (1000/L)	207 (▼)	520	*175	*144 (▼)	397	422	35 (▼)	*420
PLT	<200*10 ³ /L	937	929	937	1022	942	887	895 (▼)	939
WBC		6.33	9.47	7.43	8.75	7.11	7.35	5.81	6.25

B

	2023-08-16 오후 8:21:34	2023-08-30 오후 5:15:05	2023-09-14 오후 5:28:58	2023-09-26 오후 4:41:35	2023-10-11 오후 5:14:38	2023-10-25 오후 5:13:56	2023-11-08 오후 4:20:09	2023-11-20 오후 4:00:38	2023-12-04 오후 5:21:08
Catalyst One									
Albumin	2.6-3.8 (g/dL)	2.0 (▼)	2.1 (▼)	2.3 (▼)	2.2 (▼)	2.1 (▼)	2.3 (▼)	2.1 (▼)	2.0 (▼)
ALP	9-84 (U/L)	23	14	28	39	25	21	27	42
ALT	80-289 (U/L)	72 (▼)	93	95	102	107	85	79 (▼)	89
Amylase	(U/L)	28	46	36	46	43	45	48	56
BUN	10-45 (mg/dL)	25	29	26	29	30	27	18	23
Calcium	8.0-11.8 (mg/dL)	8.8	9.3	9.1	9.2	9	8.6	8.5	8.4
Cholesterol-Total	64-296 (mg/dL)	198	159	172	154	150	145	159	209
Creatinine	0.4-0.9 (mg/dL)	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.2 (▼)	0.2 (▼)	0.3 (▼)
GGT	(U/L)	0	0	0	0	0	0	0	3
Globulin	1.8-3.1 (g/dL)	3.1 (▲)	3.9 (▲)	4.1 (▲)	3.9 (▲)	4.0 (▲)	3.8 (▲)	3.9 (▲)	4.0 (▲)
Glucose	94-207 (mg/dL)	186	123	125	117	133	129	155	117
Lipase	(U/L)	1273	1340	1544	1417	1477	1805	1777	2025
Protein-Total	5.2-7.3 (g/dL)	5.4	6	6.4	6.1	6.1	6.2	5.9	6
ALBU/GLOB	0	0.6	0.5	0.6	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5
BUN/CREA	0	64	60	54	59	76	140	111	82
ProCyt Dx									
Hematocrit(Ht)	37.0-50.0 (%)	29.2 (▼)	29.3 (▼)	36.9 (▼)	32.5 (▼)	30.3 (▼)	36.9 (▼)	27.6 (▼)	25.4 (▼)
Hemoglobin(Hb)	11.0-17.0 (g/dL)	10.8 (▼)	11	13.4	12.1	11.6	13.1	9.9 (▼)	9.5 (▼)
MCH	14.0-18.0 (pg)	16.1	16.4	16.3	16.1	15.7	15.3	15.3	15.2
MCHC	32.0-35.0 (g/dL)	37.0 (▲)	37.5 (▲)	36.3 (▲)	37.2 (▲)	38.3 (▲)	35.6 (▲)	36.7 (▲)	37.4 (▲)
MCV	45.0-50.0 (fL)	43.5 (▼)	43.7 (▼)	44.9 (▼)	43.3 (▼)	41.0 (▼)	42.0 (▼)	41.7 (▼)	40.8 (▼)
MPV	8.0-12.0 (fL)	*113	11.4	*115	11.3	12.6 (▲)	11.5	11.8	12.5 (▲)
PCT	(%)	*0.48	0.64	*0.33	0.64	0.42	0.84	0.83	0.42
Platelet	270-880 (1000/L)	*426	505	*286	506	330	727	780	332
PLT	<200*10 ³ /L	6271	67	822	751	729	855	647	625 (▼)
WBC		*7.41	6.6	*6.30	7.1	7.31	6.05	5.35	4

C

D

	2023-08-16	2023-08-30	2023-09-14	2023-09-28	2023-10-11	2023-10-25	2023-11-08	2023-11-20	2023-12-06	2024-01-03																																																																																																																																																																																
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="11">Catalyst One</th> </tr> <tr> <th>Albumin</th> <td>2.6</td> <td>2.4</td> <td>2.3</td> <td>2.1</td> <td>2.1</td> <td>2.1</td> <td>2.2</td> <td>2.2</td> <td>2.1</td> <td>2.3</td> </tr> <tr> <th>ALP</th> <td>9</td> <td>6</td> <td>4</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>4</td> </tr> <tr> <th>ALT</th> <td>113</td> <td>131</td> <td>150</td> <td>139</td> <td>140</td> <td>136</td> <td>150</td> <td>123</td> <td>136</td> <td>114</td> </tr> <tr> <th>Amplase</th> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <th>BUN</th> <td>31</td> <td>29</td> <td>31</td> <td>31</td> <td>31</td> <td>31</td> <td>31</td> <td>31</td> <td>27</td> <td>32</td> </tr> <tr> <th>Calcium</th> <td>8.8</td> <td>8.7</td> <td>8.2</td> <td>8.3</td> <td>8.6</td> <td>8.2</td> <td>8.7</td> <td>8.5</td> <td>8.3</td> <td>8.2</td> </tr> <tr> <th>Cholesterol Total</th> <td>135</td> <td>167</td> <td>155</td> <td>127</td> <td>158</td> <td>152</td> <td>130</td> <td>142</td> <td>134</td> <td>140</td> </tr> <tr> <th>Creatinine</th> <td>0.4</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> <td>0.6</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <th>GGT</th> <td>0.0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <th>Globulin</th> <td>18-31 (g/dL)</td> <td>4.1(A)</td> <td>4.2(A)</td> <td>3.7(A)</td> <td>3.8(A)</td> <td>4.2(A)</td> <td>4.3(A)</td> <td>3.9(A)</td> <td>4.1(A)</td> <td>4.2(A)</td> </tr> <tr> <th>Glucose</th> <td>94-207 (mg/dL)</td> <td>99</td> <td>107</td> <td>106</td> <td>101</td> <td>119</td> <td>114</td> <td>124</td> <td>121</td> <td>115</td> </tr> <tr> <th>Lipase</th> <td>0.0</td> <td>1.041</td> <td>1.056</td> <td>0.92</td> <td>0.94</td> <td>1.035</td> <td>0.90</td> <td>1.099</td> <td>1.125</td> <td>1.142</td> </tr> <tr> <th>Protein Total</th> <td>5.2-7.3 (g/dL)</td> <td>7.2(A)</td> <td>6.6</td> <td>6.1</td> <td>5.7</td> <td>6.5</td> <td>6.6</td> <td>6.5</td> <td>6.1</td> <td>6.8</td> </tr> <tr> <th>ALB/GLOB</th> <td>0</td> <td>0.5</td> <td>0.6</td> <td>0.6</td> <td>0.6</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> <td>0.6</td> <td>0.6</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <th>BUN/CREA</th> <td>0</td> <td>63</td> <td>74</td> <td>84</td> <td>60</td> <td>68</td> <td>70</td> <td>67</td> <td>56</td> <td>59</td> </tr> </thead></table>											Catalyst One											Albumin	2.6	2.4	2.3	2.1	2.1	2.1	2.2	2.2	2.1	2.3	ALP	9	6	4	3	3	3	3	3	3	4	ALT	113	131	150	139	140	136	150	123	136	114	Amplase	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	BUN	31	29	31	31	31	31	31	31	27	32	Calcium	8.8	8.7	8.2	8.3	8.6	8.2	8.7	8.5	8.3	8.2	Cholesterol Total	135	167	155	127	158	152	130	142	134	140	Creatinine	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	GGT	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Globulin	18-31 (g/dL)	4.1(A)	4.2(A)	3.7(A)	3.8(A)	4.2(A)	4.3(A)	3.9(A)	4.1(A)	4.2(A)	Glucose	94-207 (mg/dL)	99	107	106	101	119	114	124	121	115	Lipase	0.0	1.041	1.056	0.92	0.94	1.035	0.90	1.099	1.125	1.142	Protein Total	5.2-7.3 (g/dL)	7.2(A)	6.6	6.1	5.7	6.5	6.6	6.5	6.1	6.8	ALB/GLOB	0	0.5	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6	0.5	BUN/CREA	0	63	74	84	60	68	70	67	56	59
Catalyst One																																																																																																																																																																																										
Albumin	2.6	2.4	2.3	2.1	2.1	2.1	2.2	2.2	2.1	2.3																																																																																																																																																																																
ALP	9	6	4	3	3	3	3	3	3	4																																																																																																																																																																																
ALT	113	131	150	139	140	136	150	123	136	114																																																																																																																																																																																
Amplase	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																																																																																																																																																																																
BUN	31	29	31	31	31	31	31	31	27	32																																																																																																																																																																																
Calcium	8.8	8.7	8.2	8.3	8.6	8.2	8.7	8.5	8.3	8.2																																																																																																																																																																																
Cholesterol Total	135	167	155	127	158	152	130	142	134	140																																																																																																																																																																																
Creatinine	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5																																																																																																																																																																																
GGT	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																																																																																																																																																
Globulin	18-31 (g/dL)	4.1(A)	4.2(A)	3.7(A)	3.8(A)	4.2(A)	4.3(A)	3.9(A)	4.1(A)	4.2(A)																																																																																																																																																																																
Glucose	94-207 (mg/dL)	99	107	106	101	119	114	124	121	115																																																																																																																																																																																
Lipase	0.0	1.041	1.056	0.92	0.94	1.035	0.90	1.099	1.125	1.142																																																																																																																																																																																
Protein Total	5.2-7.3 (g/dL)	7.2(A)	6.6	6.1	5.7	6.5	6.6	6.5	6.1	6.8																																																																																																																																																																																
ALB/GLOB	0	0.5	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6	0.5																																																																																																																																																																																
BUN/CREA	0	63	74	84	60	68	70	67	56	59																																																																																																																																																																																

| | Catalyst One | | | | | | | | | | | |-------------------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------| | Albumin | 2.6 | 2.4 | 2.3 | 2.1 | 2.1 | 2.1 | 2.2 | 2.2 | 2.1 | 2.3 | | ALP | 9 | 6 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | | ALT | 113 | 131 | 150 | 139 | 140 | 136 | 150 | 123 | 136 | 114 | | Amplase | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | BUN | 31 | 29 | 31 | 31 | 31 | 31 | 31 | 31 | 27 | 32 | | Calcium | 8.8 | 8.7 | 8.2 | 8.3 | 8.6 | 8.2 | 8.7 | 8.5 | 8.3 | 8.2 | | Cholesterol Total | 135 | 167 | 155 | 127 | 158 | 152 | 130 | 142 | 134 | 140 | | Creatinine | 0.4 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 0.5 | 0.5 | | GGT | 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | Globulin | 18-31 (g/dL) | 4.1(A) | 4.2(A) | 3.7(A) | 3.8(A) | 4.2(A) | 4.3(A) | 3.9(A) | 4.1(A) | 4.2(A) | | Glucose | 94-207 (mg/dL) | 99 | 107 | 106 | 101 | 119 | 114 | 124 | 121 | 115 | | Lipase | 0.0 | 1.041 | 1.056 | 0.92 | 0.94 | 1.035 | 0.90 | 1.099 | 1.125 | 1.142 | | Protein Total | 5.2-7.3 (g/dL) | 7.2(A) | 6.6 | 6.1 | 5.7 | 6.5 | 6.6 | 6.5 | 6.1 | 6.8 | | ALB/GLOB | 0 | 0.5 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 0.6 | 0.5 | | BUN/CREA | 0 | 63 | 74 | 84 | 60 | 68 | 70 | 67 | 56 | 59 | | | | | | | | | | | |

E

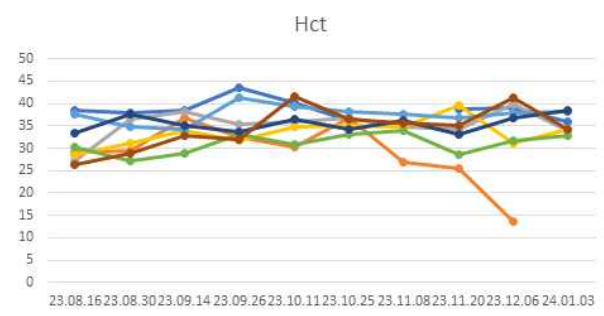
F

G

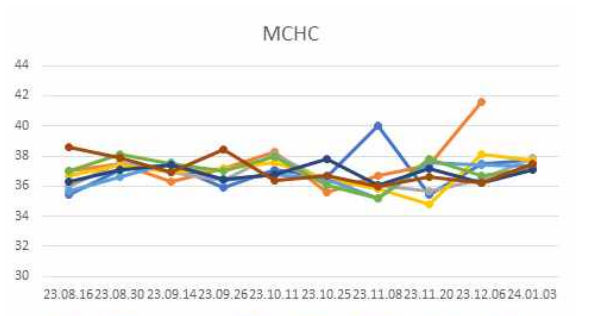
H

그림 80. RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선별하여 페릿에 접종 한 후 채혈을 통해 혈액 수행. A와 B; 비접종군, C; 벡터 접종, E, F; 저용량(3 pMol), G, H; 고용량(6 pMol) 접종 페릿

A



B



C

D

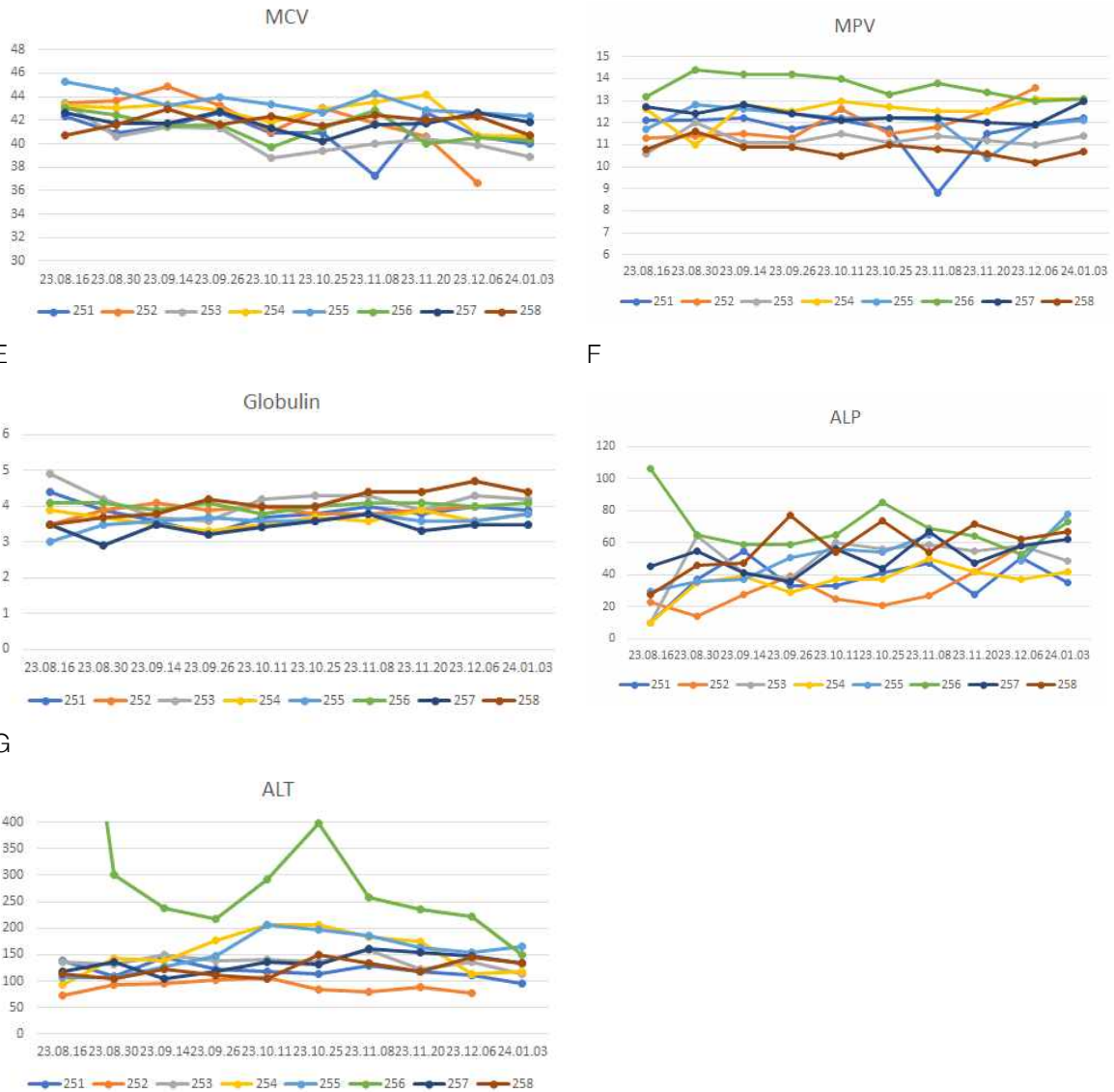


그림 81. RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페렛에 접종 한 후 채혈을 통해 혈액 분석 수행 (P251과 P252; 비접종, P253과 P254; AuNP벡터, P255과 P256; AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 저용량(3 pMol), P257과 P258 AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 고용량(6 pMol)).

③ 투약 10회 종료 후 (20주차) 부검 전 전신 CT를 촬영하여 전신의 변화 확인함. 비접종 2두 모두 전반적인 림프절(prescapula, cranial mediastinal, jejunal, popliteal 림프절)의 비대가 확인되며, 주사 부위인 양측 후지 근육에서 특이소견은 확인되지 않았음. 하지만 접종 페렛 1두의 경우 방사선 및 초음파 검사에서 복수가 확인되었고, jejunal 림프절의 심한 비대가 확인되었음 (그림 82 A, B). 벡터만 접종한 2두 모두 전반적인 림프절(prescapula, cranial mediastinal, jejunal, popliteal 림프절)의 비대가 확인되며, 2두 모두에서 특히 jejunal 림프절의 두드러진 비대가 확인됨. 주사 부위인 양측 후지 근육에서 특이소견은 확인되지 않았음. 폐실질에서 결절들이 확인됨(그림 82 C, D). 저용량 및 고용량 AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 접종한 페렛에서는 모두 전반적인 림프절(prescapula, cranial mediastinal, jejunal, popliteal)의 비대가 확인되며, 4두 모두에서 특히 jejunal 림프절의 두드러진 비대가 확인되었고, 주사 부위인 양측 후지 근육에서 특이소견은 확인되지 않았으며 폐실질에서 저농도의 경우 폐결절이 거의 확인되지 않았지만(그림 82 E, F), 고농도 그룹 중 1두에서 다수의 폐 결절이 폐엽 전반에 걸쳐 확인됨(그림 82 G, H).

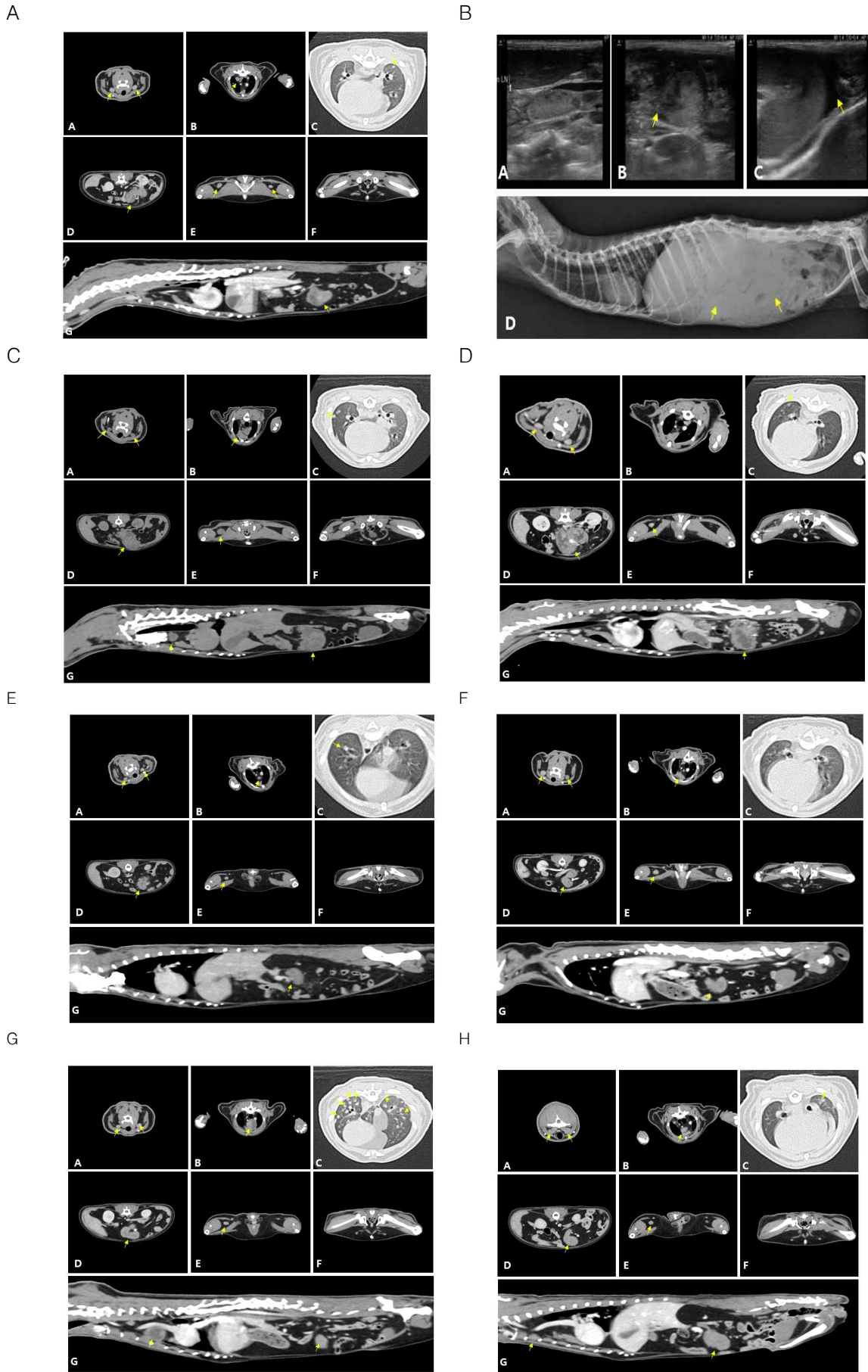


그림 82. RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페렛에 접종 한 후 CT를 촬영하여 전신의 변화를 확인. A와 B; 비접종군, C, D; 벡터 접종, E, F; 저용량(3 pMol), G, H; 고용량(6 pMol) 접종 페렛

④ RNA 백신접종에 따른 혈중 면역글로부린 평가: RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페렛 8두에 (비접종군 2두, 벡터접종군 2두; 음성대조군, 저용량 백신 접종군; 3 pMol 2두, 고용량 백신 접종군; 6 pMol 2두) 5회 수행하고(2주에 1회씩 10주간 수행)하고 비접종군 2두와 함께 혈중 면역글로부린 평가를 수행한 결과 비접종군과 비교하여 초기 2주까지는 미약하게 증가하는 경향을 보였지만, 전체적으로 다소 감소하는 경향을 보임 (그림 83)



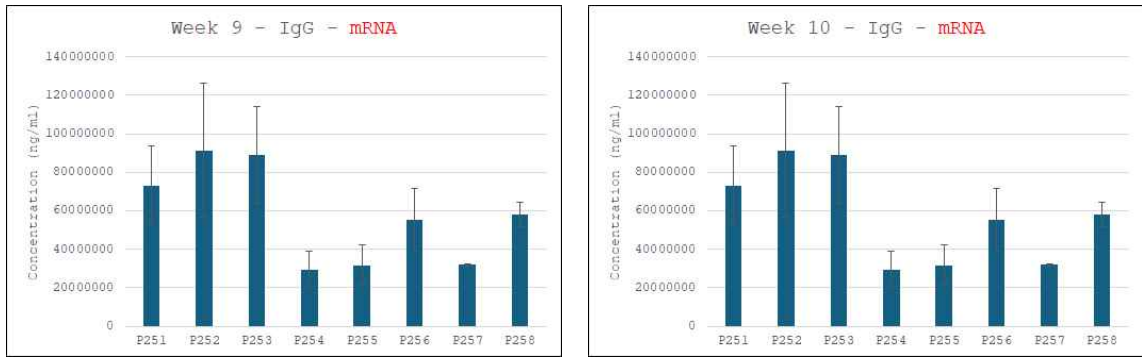


그림 83. RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페렛에 접종 한 후 10주 동안 나타나는 혈중 IgG농도 변화 (P251과 P252; 비접종군, P253과 P254; AuNP백터, P255과 P256; AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 저용량(3 pMol), P257과 P258 AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 고용량(6 pMol))

⑤ RNA 백신접종에 따른 분변 중 면역글로부린 평가: RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페렛 8두에 (비접종군 2두, 벡터접종군 2두; 음성대조군, 저용량 백신 접종군; 3 pMol 2두, 고용량 백신 접종군; 6 pMol 2두) 4회 수행하고 (2주에 1회씩 8주간 수행)하고 비접종군 2두와 함께 분변중 면역글로부린 평가를 수행한 결과 비접종군과 비교하여 초기 2주까지는 미약하게 증가하는 경향을 보였지만, 전체적으로 다소 감소하는 경향을 보임 (그림 84)

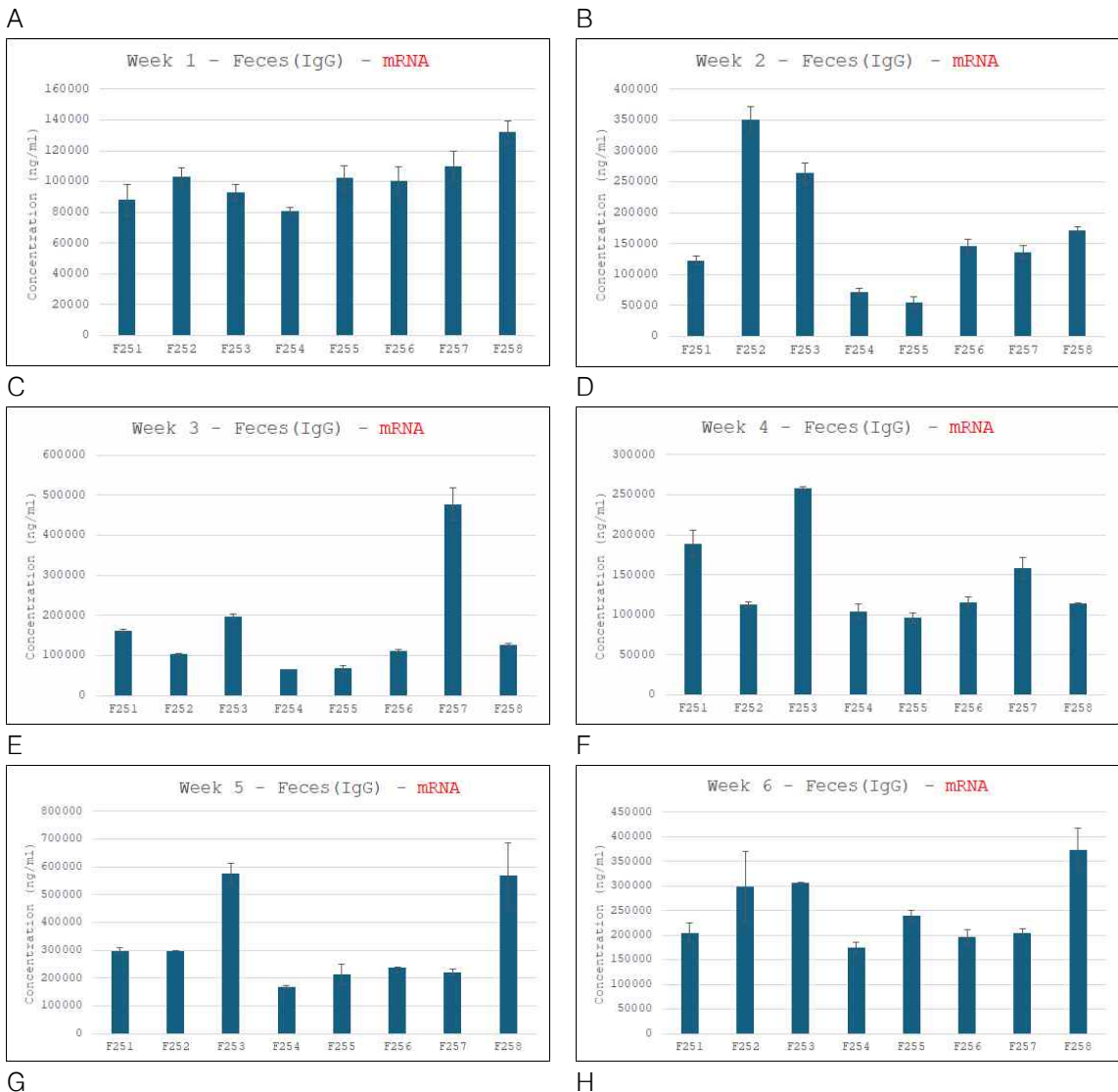




그림 84. RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페릿에 접종 한 후 8주 동안 나타나는 분변 중 IgA농도 변화 (P251과 P252; 비접종, P253과 P254; AuNP백터, P255과 P256; AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 저용량(3 pMol), P257과 P258 AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 고용량(6 pMol)

- ⑤ RNA 백신접종에 따른 혈중 면역관련 유전자 활성화: RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페릿 8주에 (비접종군 2두, 벡터접종군 2두; 음성대조군, 저용량 백신 접종군; 3 pMol 2두, 고용량 백신 접종군; 6 pMol 2두) 5회 수행하고 (2주에 1회씩 10주간 수행)하고 비접종군 2두와 함께 RT-PCR을 통해 혈중 면역관련 유전자 6종 (IFN β , ILg, TNF α , CD4, CD8a, CD8b)의 발현정도를 평가해본 결과 8주차까지 음성대조군에 비해 미약하게 높게 나타났으며, 8주 이후에는 비슷하게 발현 됨 (그림 85-84).

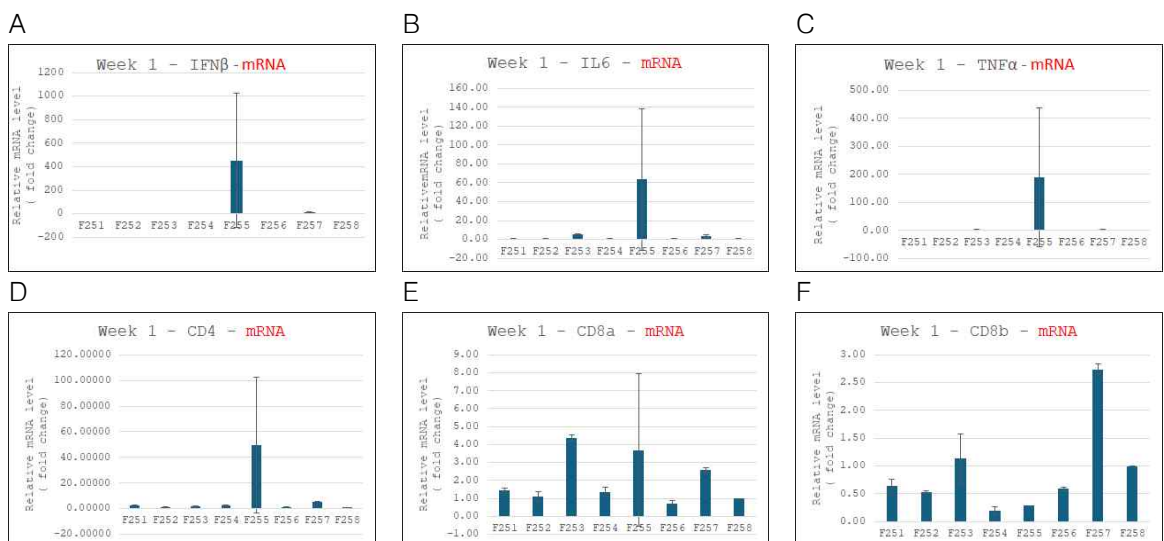


그림 85. 접종 1주 후 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화. RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페릿에 접종 한 후 10주 동안 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화를 RT-PCR을 통해 측정 (P251과 P252; 비접종, P253과 P254; AuNP백터, P255과 P256; AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 저용량(3 pMol), P257과 P258 AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 고용량(6 pMol)

A

B

C

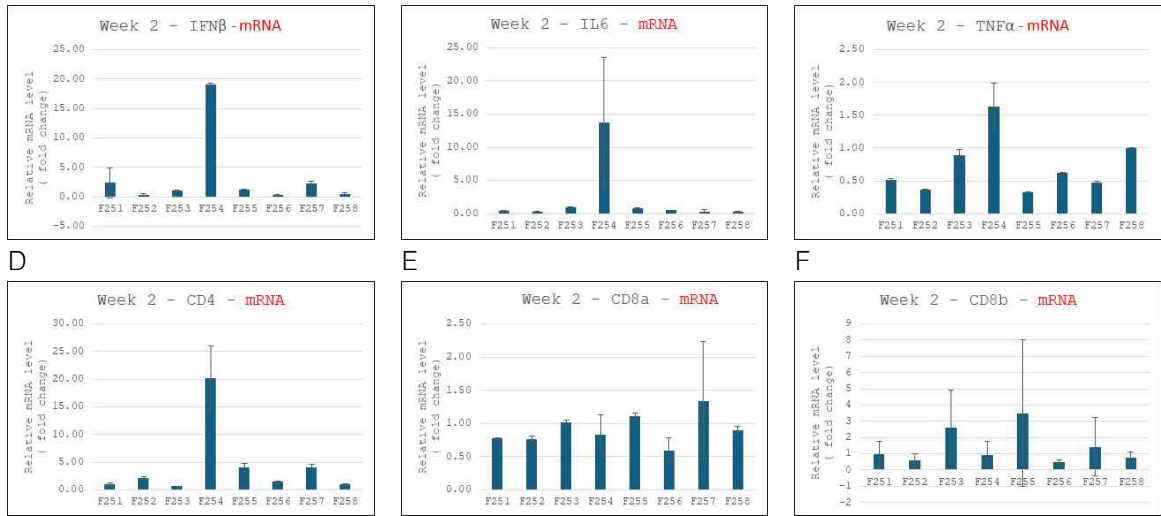


그림 86. 접종 2주 후 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화.

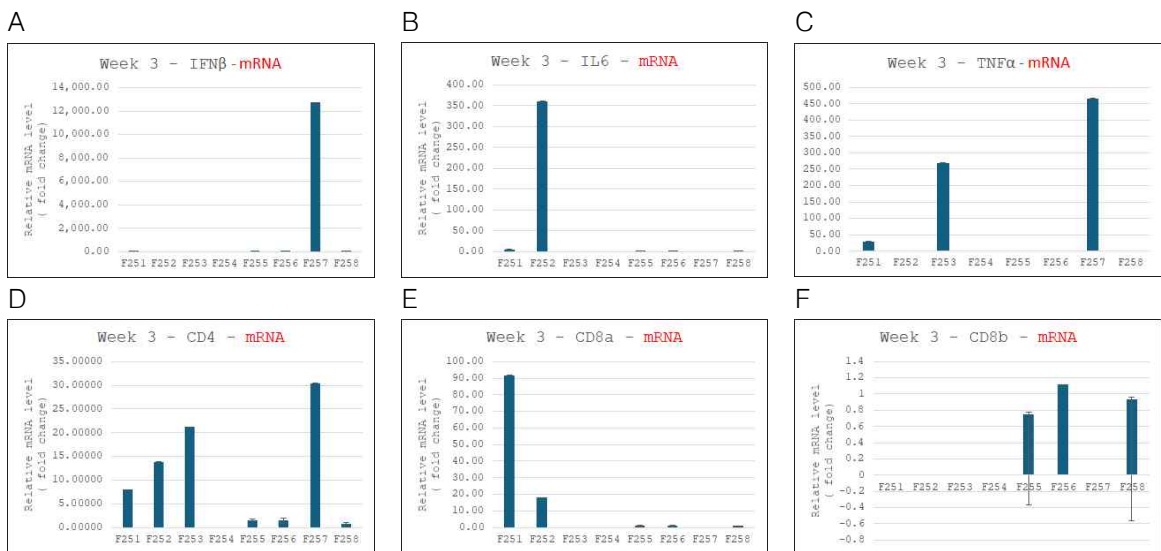


그림 87. 접종 3주 후 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화.

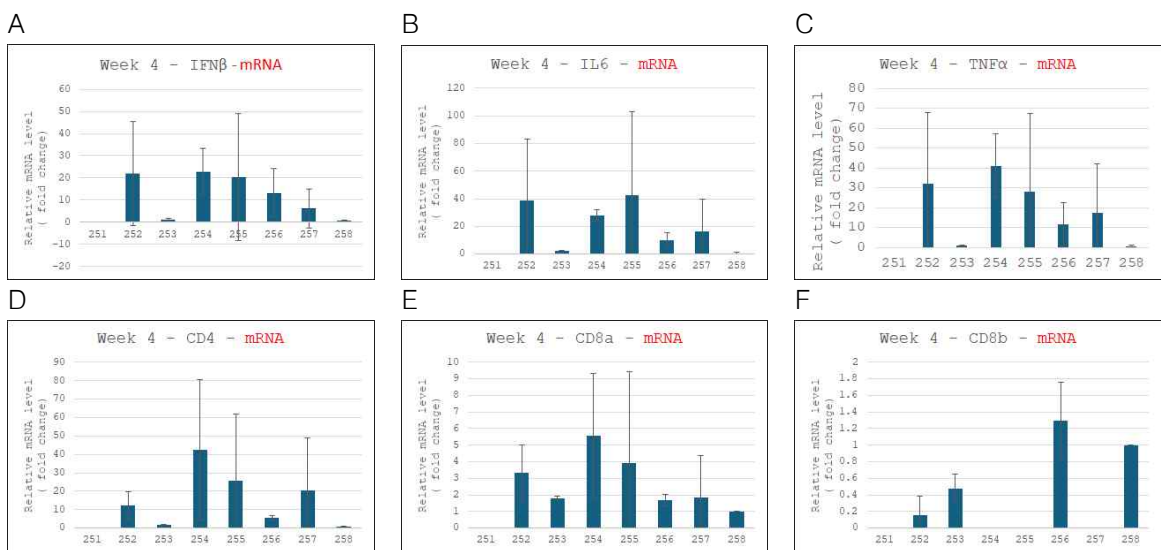


그림 88. 접종 4주 후 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화.

A B C

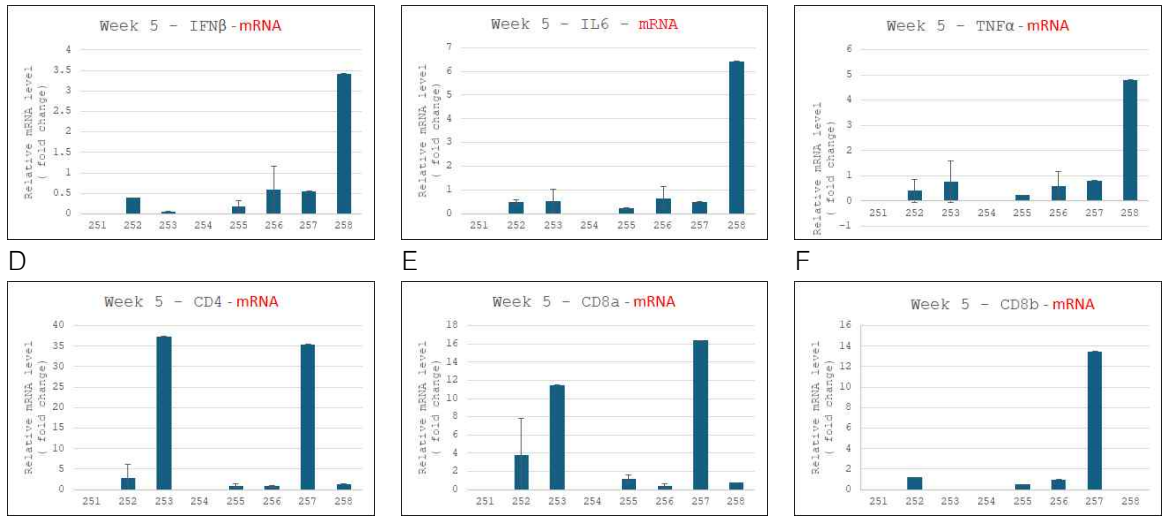


그림 89. 접종 5주 후 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화.

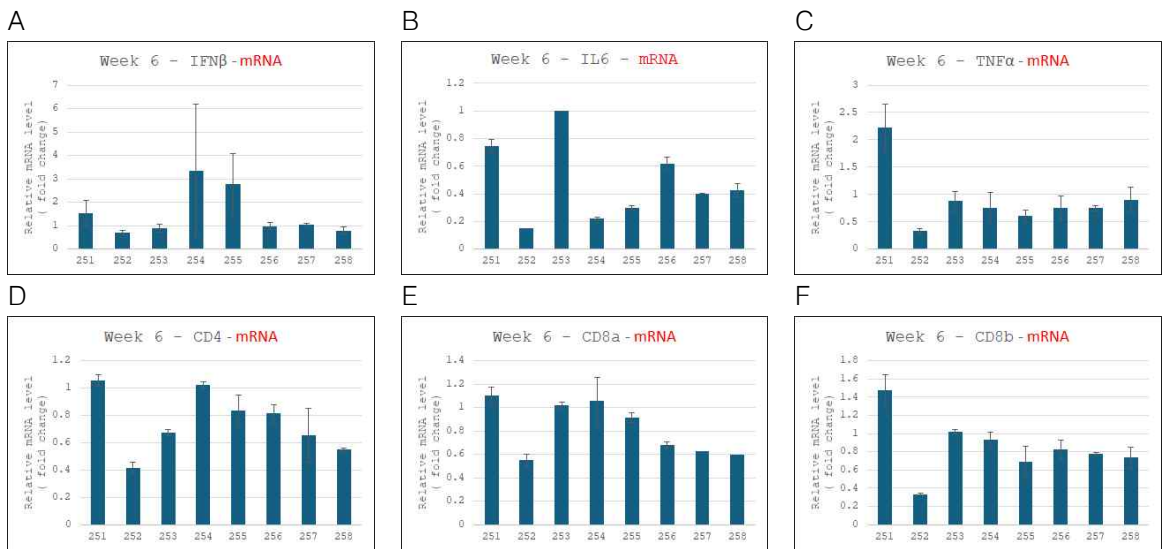


그림 90. 접종 6주 후 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화.

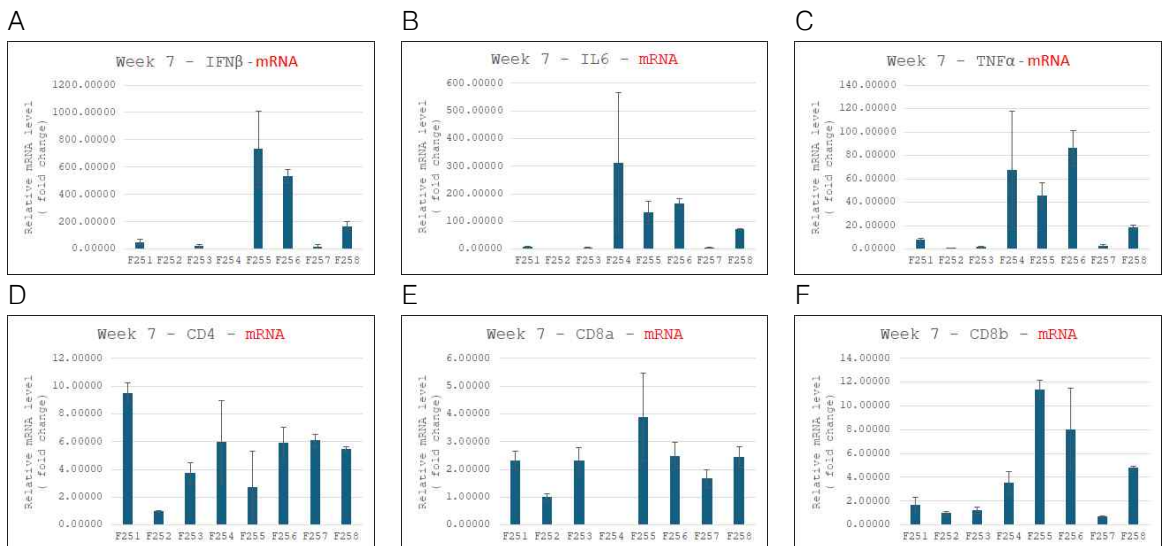


그림 91. 접종 7주 후 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화.

A B C

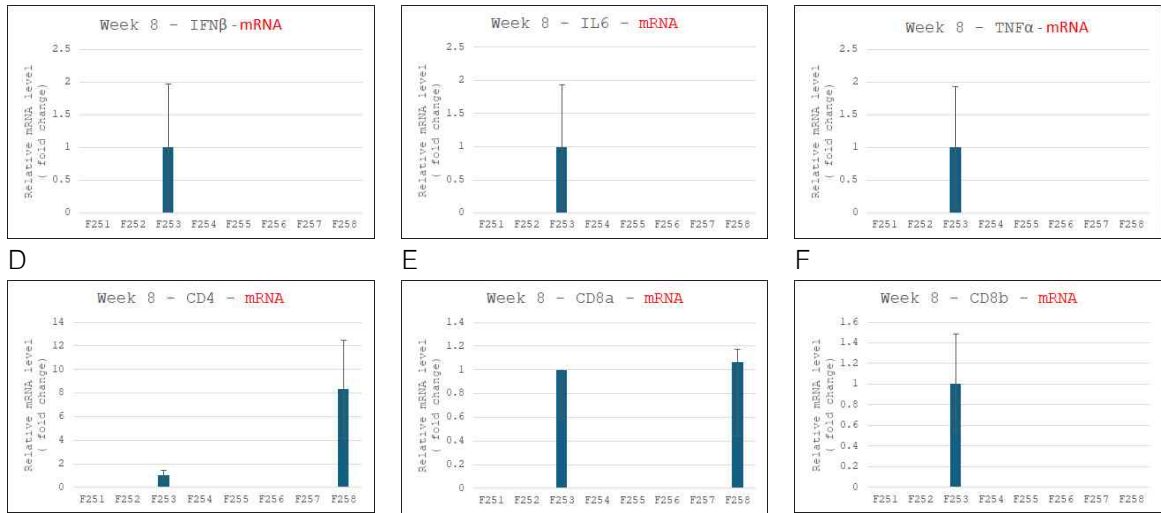


그림 92. 접종 8주 후 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화.

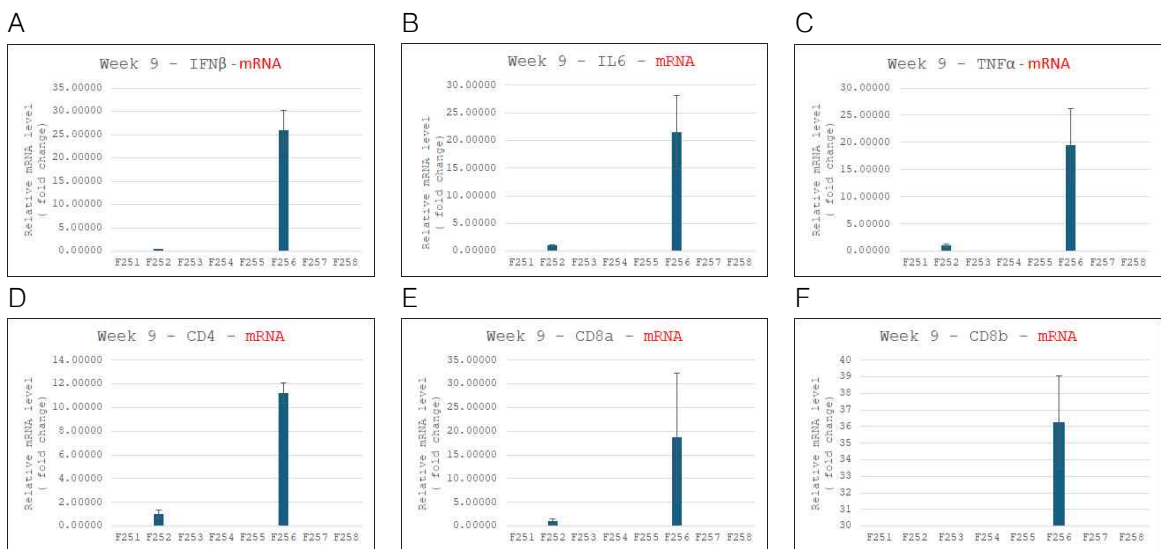


그림 93. 접종 9주 후 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화.

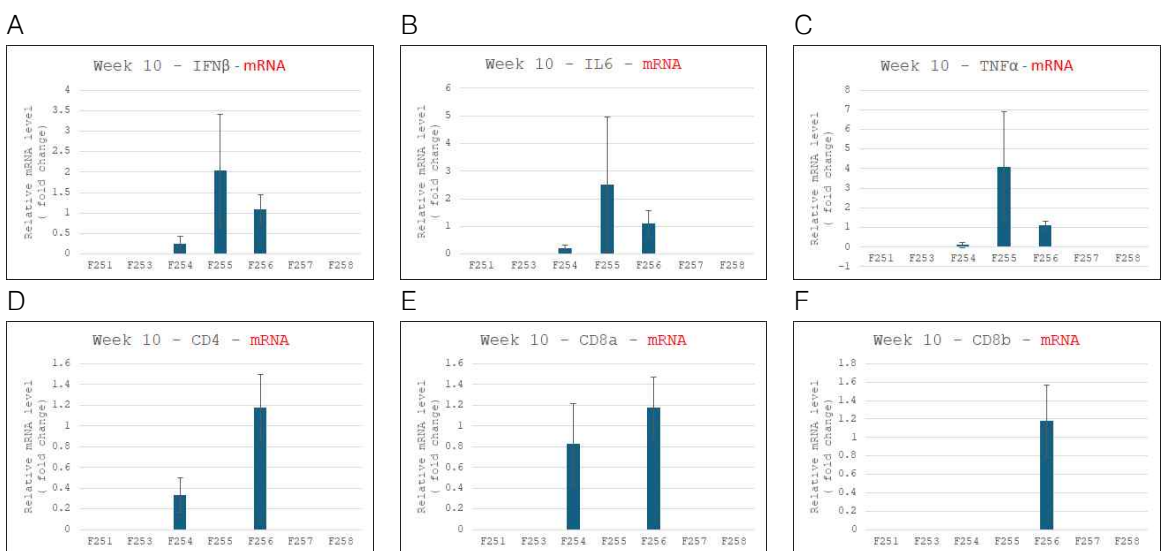


그림 94. 접종 10주 후 나타나는 면역관련 유전자 발현 변화.

⑥ RNA 백신접종에 따른 혈중 면역세포 분화 평가: RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페릿 8두에 (비접종군 2두, 벡터접종군 2두; 음성대조군, 저용량 백신 접종군; 3 pMol 2두, 고용량 백신 접종군; 6 pMol 2두) 5회 수행하고 (2주에 1회씩 10주간 수행)하고 비접종군 2두와 함께 혈중 면역세포

분화정도를 평가해본 결과 시험 전체 구간에서 면역세포 (CD4, CD8 세포)가 비접종군과 비교하여 미약하게 높게 분화되는 것이 확인 됨 (그림 95, 96).



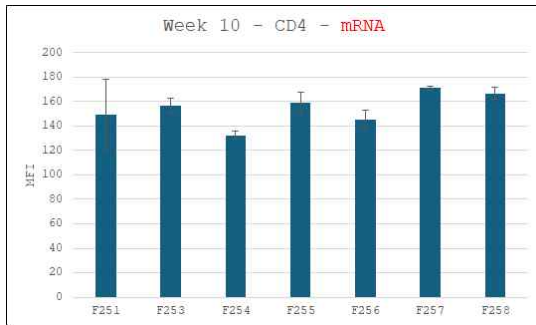
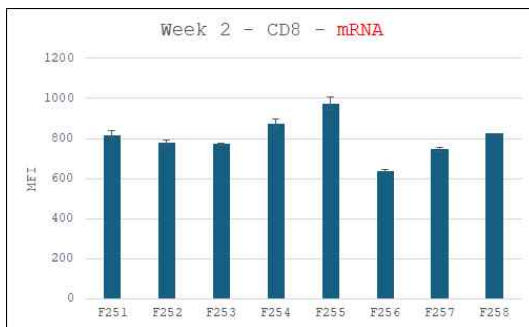
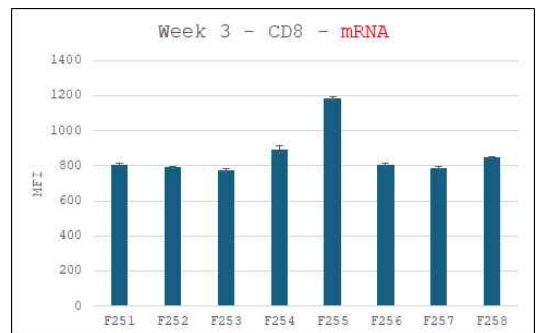


그림 95. RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페릿에 접종 한 후 10주 동안 나타나는 면역세포(CD4) 분화 정도를 flow cytometric assessment 법으로 측정 (P251과 P252; 비접종, P253과 P254; AuNP백터, P255과 P256; AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 저용량(3 pMol), P257 과 P258 AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 고용량(6 pMol)

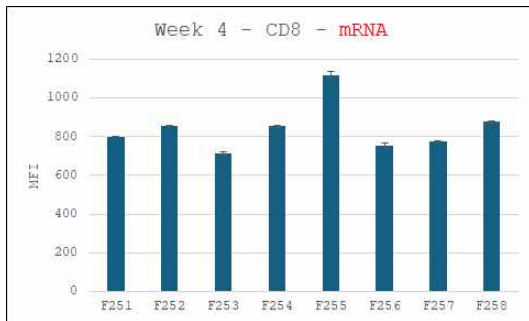
A



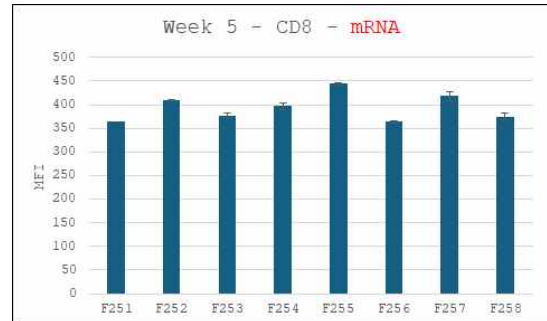
B



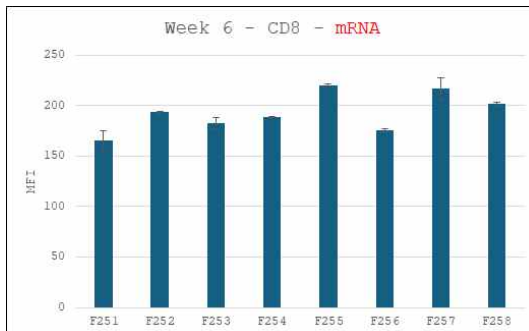
C



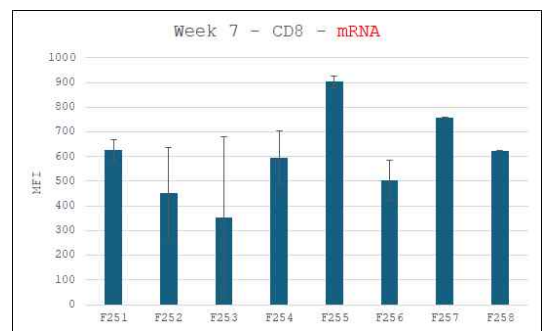
D



E



F



G

H

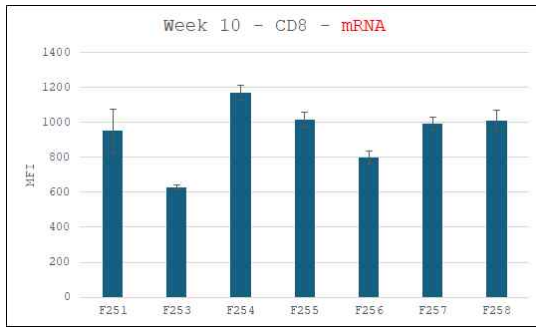
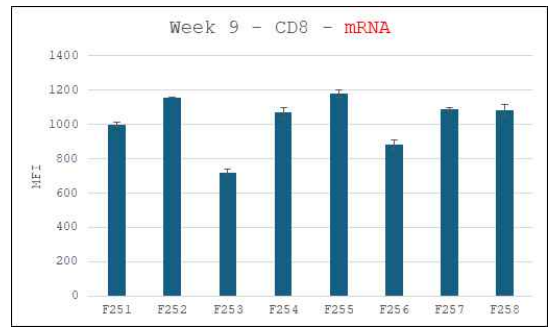
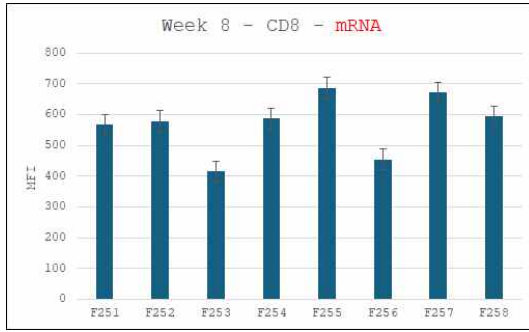


그림 96. RNA 백신 후보물질 중 AuNP-mRNA (RBD omicron variant)를 선발하여 페릿에 접종 한 후 10주 동안 나타나는 면역세포(CD8) 분화 정도를 flow cytometric assessment 법으로 측정 (P251과 P252; 비접종, P253과 P254; AuNP백터, P255과 P256; AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 저용량(3 pMol), P257 과 P258 AuNP-mRNA (RBD omicron variant) 고용량(6 pMol))

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1년차 (2022년)	2년차 (2023년)	계	가중치 (%)
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	특허출원	목표(단계별)	0	1	1	20
		실적(누적)	5(출원)	5(출원)/1(등록)	11	
	기술실시 (이전)	목표(단계별)		1	1	20
		실적(누적)		0	0	
	고용창출	목표(단계별)	1		1	20
		실적(누적)	7	4	11	
	논문	목표(단계별)	1	3	4	
		실적(누적)	0	3	3	
	논문평균IF	목표(단계별)	5	7	12	20
		실적(누적)	3.0	8.8	11.8	
	학술발표	목표(단계별)	1	1	2	10
		실적(누적)	0	1	1	
	인력양성	목표(단계별)	3	3	6	10
		실적(누적)	3	1	4	
계	목표(단계별)	6	9	15		
	실적(누적)	15	15	30		

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신품종 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다

(연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Development of DNA aptamers specific for small therapeutic peptides using a modified SELEX method	Journal of Microbiology	Jeehyeon Bae	60	Republic of Korea	The microbial Society of Korea	SCIE	2022-07-01	1225-8873	30%
2	Aptamer-conjugated gold nanoparticles platform as the intracellular delivery of antibodies for cancer therapy	Journal of Industrial and Engineering Chemistry	Ji-Hyun Yeom; Eunkyong Shin; Hanyong Jin; Kangseok Lee; Jeehyeon Bae	126	Republic of Korea	Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry	SCIE	2023-10-25	1226-086X	10%
3	A multiplex real time RT-qPCR for simultaneous detection of PEDV, PDCoV, and SADS-CoV	Archives of Virology	백지혜, 이유민, Ngoc Duong Vu, 김민희	-	Austria	Springer	SCIE	in press	0304-8608	50%
4	GALNT2 broadly restricts respiratory virus infections through modulating O-linked glycosylation	Science	Wei Ran	-	USA	AMER ASSOC ADVANCEMENT SCIENCE	SCIE	under revision	0036-8075	10%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	17 th Vaccine Congress	박정은	2023.09.24. ~2023.09.27	Hilton Glasgow	스코틀랜드

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	나노 입자-CRISPR 결합체를 기반으로 하는 유전자 조작 및 이의 제조 방법	한국	㈜엔이에스 바이오 테크놀러지	2022.12.26	10-2022 -018434 8	㈜엔이에스 바이오 테크놀러지			50%	미활 용	
2	금나노입자-엡타머 결합체를 기반으로 하는 항균 단백질 전달체 및 이의 제조 방법	한국		2022.12.26	10-2022 -018435 6				50%	미활 용	
3	나노 입자 및 5'-tRH 복합체 및 이를 포함하는 항암용 조성물	한국		2022.12.26	10-2022 -018452 1				50%	미활 용	
4	안정화를 위한 3'UTR 서열을 포함하는 mRNA 구조체	한국		2022.12.26	10-2022 -018430 8				50%	미활 용	
5	이중 나선DNA가 결합된 금 나노 입자 운반체를 포함하는 백신 조성물	한국		2022.12.26	10-2022 -018429 5				50%	미활 용	
6	나노 입자-CRISPR 결합체를 기반으로 하는 유전자 조작 및 이의 제조 방법	국제		2023.05.16	PCT/KR2 023/006 602				50%	미활 용	
7	나노입자-올리고T 결합체를 기반으로 하는 메신저 RNA 운반체	국제		2023.05.23	PCT-KR2 023-007 006				50 %	미활 용	
8	나노 입자 및 5'-tRH 복합체 및 이를 포함하는 항암용 조성물	국제		2023.11.10	PCT/KR2 023/018 060				50%	미활 용	
9	이중 나선DNA가 결합된 금 나노 입자 운반체를 포함하는 백신 조성물	국제		2023.12.26	PCT/KR2 023/021 565				50%	미활 용	
10	금나노입자-엡타머 결합체를 기반으로 하는 항균 단백질 전달체 및 이의 제조 방법	국제		2023.05.30	PCT-KR2 023-007 375				50%	미활 용	
11	나노입자-올리고T 결합체를 기반으로 하는 메신저 RNA 운반체	한국		2022.05.24	10-2022 -006349 3			2023.01.27	10-249 4402	50%	미활 용

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
	√								√	

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1	가죽질병대응기술고도화지원사업	(주)엔이에스바이오테크놀러지	7	4	7
합계			7	4	11

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2022	1	2			1	2	3				
2		2023	1				1		1				

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당없음)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당없음)

(23쪽 중 12쪽)

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 금나노입자 핵산 전달 시스템 기반 동물용 mRNA 항원 전달 플랫폼 제작 및 효능 평가	○ 신규 mRNA 항원 제작 및 NES 핵산전달체 기반 플랫폼 적용 완료 ○ NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 세포주 및 다양한 동물 전달능 및 면역원성 평가 완료	100%
○ 효능 평가를 위한 동물시험 및 비임상 시험 수행	○ NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 독성, 안정성 및 효능 평가 완료	100%
○ 다양한 동물에 적용 가능한 항원 전달 플랫폼의 범용성 확인	○ 변이주의 다양한 항원 mRNA 종을 이용한 금나노입자 기반 mRNA 백신 전달 플랫폼의 범용성 평가 완료 ○ 숙주 특이성 및 감염성 평가 완료	100%

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

- 관련 mRNA 백신의 생체내 분포 실험은 장기 결과 축적이 필요한 상태로 현재 샘플 확보중임. 추후 관련 연구비 확보 및 최종 결과를 업데이트 할 계획임.
 - 국내 분리 균주 및 WHO 제시 균주 JN1에 대한 추가 실험 및 후속 연구 준비중.
 - 실험용 mouse 및 효능 평가 대상인 개, 패럿에서 도전 감염 실험 준비중.
 - 논문 1편은 리뷰 중 및 1편 논문 투고 준비중으로 2024년 내 성과 달성을 목표로 함.
 - **사업화 계획** : 세포내 또는 동물 생체 내 핵산을 전달할 수 있는 나노블록 전달 플랫폼의 제약회사 기술이전을 목표로 함. 본 전달 시스템은 세포 내 사용 및 동물 실험에서 세포독성을 보이지 않는 특징을 가지며 다양한 생물분야로 범용적 활용이 가능함. 이를 기반으로 차세대 동물용 백신 제형 완성 및 2026년도 비임상 시험 완료를 목표(최적화 핵산 발현기술을 개발 / 금나노입자 기반 백신 제형 확립 / 동물용 표준 제조기술 확립 / 비임상 시험 성공적 완료) 하여 연구개발을 진행하고 있음.
 - **비즈니스 모델** : 당사는 제노스코/오스코텍의 레이저티닙의 성공 사례를 벤치마킹하여 사업화 전략을 수립함. 레이저티닙의 사례처럼 다년간글로벌 파트너들과 기술이전, 공동개발을 수행하며 노하우를 축적한 국내 제약사들과 오픈이노베이션을 수행하며 기술도입 및 공동 연구개발을 수행할 것을 계획함.
 - **기술이전 계획** : mRNA 백신 관련 국제특허 등록을 완료하여, 국내 관련 업체와 다국적 제약회사(얀센, 아스트라제네카, 모더나, 화이자 등)에 기술이전을 도모함. 또한, 미국에 기술 홍보 및 이전과 상장을 위한 자회사를 2024년에 설립하여, 다국적 제약회사로의 기술이전을 촉진하고자 함. 설립되는 자회사는 현재 당사 기술자문위원회의 리더인 스탠퍼드 대학교의 Stanley N. Cohen 교수와 바이오산업 컨설팅 회사 대표인 Roxanne Cohen 박사와 함께 joint venture 형태이며, 기술이전을 추진할 계획임.
-

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- **코로나 19 백신 및 다양한 감염성 질환에 대한 백신개발에 상용화될 수 있는 플랫폼 기술 개발**
 - ✓ 다양한 동물에서 코로나19 바이러스의 작용기전과 숙주 감염능 연구는 **코로나19 바이러스에 대한 효율적인 broad-spectrum human vaccine**을 개발하는데 큰 도움을 줄 수 있음.
 - ✓ 본 과제를 통해 연구되는 방법 등을 통해 다른 감염성 바이러스에 대한 연구 분야에 적용하여 활용할 수 있는 기초자료를 제공.
- **국제 연구 교류를 통한 우수 연구인력 확보**
 - ✓ 국내 바이러스 전문 연구인력의 부족과 학업인력의 부족이 심각하게 대두되고 있으며 국제 공동연구를 통해 해외 우수인력의 유입을 유도하고 및 국내 연구인력의 학업의욕을 고취함.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >			
구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	1	
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
제품화		1	
고용창출		1	
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서
2. 기타	1) 성과 관련 증빙 첨부

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 증질지(80g/m²)
(23쪽 중 14쪽)]

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업 국내외 신변종 바이러스 협력체계 구축 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

본 연구에서 개발한 금나노입자 기반 핵산 전달체는 LNP 기술에 의존하는 방법에 비해 합성이 용이하고 범용성이 뛰어난 기술적 장점을 가지고 있어 상업적으로도 중요할 뿐만 아니라 나노물질 기반 핵산 전달체 개발에 관한 새로운 개발 방법을 제공할 것으로 예측. LNP 기반 RNA 백신 기술을 대체할 수 있는 혁신적인 게임체인저(game chnger)기술이 될 수 있을 것으로 기대됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

본 연구과제의 수행으로, 기존의 백신 산업 구조의 단점을 극복, 개선 발전시키는 신산업 성장의 단초가 될 것으로 예상.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

기존 백신 개발기술에서 사용하지 않았던 새로운 전달체 기술을 적용하여 mRNA 분자의 체내 전달 및 유전자 발현 효율을 증가시켜 안전한 백신개발의 플랫폼을 창출가능. 또한 신변종 감염병의 출현에 신속한 대응이 가능

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

연구 계획서에서 목표한 일련의 실험을 진행하여 소정의 결과를 획득하였으므로 성실도 높은 연구수행이 이루어졌다고 자체 평가함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

본 연구를 통하여 SCI 상위 20% 내 논문 1건을 포함한 논문 3건 게재 완료 및 특허 10건 출원, 1건 등록 완료

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 금나노입자 핵산 전달 시스템 기반 동물용 mRNA 항원 전달 플랫폼 제작 및 효능 평가	25	100%	○ 신규 mRNA 항원 제작 및 NES 핵산전달체 기반 플랫폼 적용 완료 ○ NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 세포주 및 다양한 동물 전달능 및 면역원성 평가 완료
○ 효능 평가를 위한 동물시험 및 비임상 시험 수행	25	100%	○ NES 핵산전달체-항원 mRNA 결합체의 독성, 안정성 및 효능 평가 완료
○ 다양한 동물에 적용 가능한 항원 전달 플랫폼의 범용성 확인	50	100%	○ 변이주의 다양한 항원 mRNA 종을 이용한 금나노입자 기반 mRNA 백신 전달 플랫폼의 범용성 평가 완료 ○ 숙주 특이성 및 감염성 평가 완료
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구 과제를 통하여, 코로나19 감염병에 대한 반려동물용 mRNA 백신 플랫폼을 개발완료 하였고, 이를 바탕으로 앞으로 국내 유입이 우려되는 신·변종 감염병에 대한 선제적 예방 플랫폼을 구축하였다고 자체 평가함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구를 통하여 개발된 물질은 신변종 감염병 신속대응 및 백신자급화를 위해 특허 회피가 가능하고 in vivo 및 in vitro 발현과 안정성 및 안전성 등이 확인된 국내개발 mRNA 백신용 전달체임을 자체 평가함

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구를 통하여 개발된 물질은 LNP 기술과 특허를 넘어서는 독자적인 핵심기술로서 향후 국산 mRNA 백신 개발을 통한 백신주권을 확보하는 난제를 해결하는 핵심요소라 자체 평가함.

IV. 보안성 검토

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구개발기관 자체의 검토결과


연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	✓	
변조	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	✓	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	✓	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	✓	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	✓	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	✓	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	✓	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	✓	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	✓	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	✓	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	✓	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	✓	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 02 . 28 .

기관명 : 중앙대학교 산학협력단
 점검자 : 배지현 

농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	✓	
변조	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	✓	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	✓	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	✓	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 길이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	✓	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	✓	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	✓	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	✓	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	✓	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	✓	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	✓	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	✓	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 길이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	✓	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인 될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 02 . 28 .

기관명 : (주)엔이에스바이오테크놀러지

점검자 : 염지현



농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	○	
변조	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	○	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	○	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 길이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	○	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	○	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	○	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	○	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	○	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	○	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	○	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 길이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 02 . 28 .

기관명 : 충남대학교 산학협력단

점검자 : 박정은

(서명) 

농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	√	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	√	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	√	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	√	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	√	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	√	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	√	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 길이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	√	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	√	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	√	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	√	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	√	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	√	
부당한 중복 계재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	√	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	√	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 길이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	√	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024. 2. 28 .

기관명 : 경상국립대학교 산학협력단

점검자 : 김 석

(서명)

농림식품기술기획평가원장 귀하

PROTOCOL

Development of DNA aptamers specific for small therapeutic peptides using a modified SELEX method

Jaemin Lee^{1†}, Minkyung Ryu^{1,2†}, Dayeong Bae^{1,2},
Hong-Man Kim^{1,2}, Seong-il Eyun¹,
Jeehyeon Bae^{2,3*}, and Kangseok Lee^{1,2*}

¹Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 06974, Republic of Korea

²NES biotechnology, Seoul 06974, Republic of Korea

³Department of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 06974, Republic of Korea

(Received May 26, 2022 / Accepted May 27, 2022)

Aptamers are short single-stranded DNA or RNA oligonucleotides capable of binding with high affinity and specificity to target molecules. Because of their durability and ease of synthesis, aptamers are used in a wide range of biomedical fields, including the diagnosis of diseases and targeted delivery of therapeutic agents. The aptamers were selected using a process called systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), which has been improved for various research purposes since its development in 1990. In this protocol, we describe a modified SELEX method that rapidly produces high aptamer screening yields using two types of magnetic beads. Using this method, we isolated an aptamer that specifically binds to an antimicrobial peptide. We suggest that by conjugating a small therapeutic-specific aptamer to a gold nanoparticle-based delivery system, which enhances the stability and intracellular delivery of peptides, aptamers selected by our method can be used for the development of therapeutic agents utilizing small therapeutic peptides.

Keywords: aptamer, antimicrobial peptide, multidrug-resistant bacteria, SELEX, magnetic beads, next-generation sequencing

Overview

Aptamers are short single-stranded DNA or RNA (ssDNA or ssRNA) molecules that can bind to specific targets, in-

cluding proteins, peptides, carbohydrates, small molecules, toxins, and live cells, with high affinity and selectivity (for a recent review, see Zhuo *et al.*, 2017). The aptamer is usually compared with antibodies, owing to its target molecule binding characteristics, and has advantageous properties: it is more durable in living systems and easier to modify to improve stability and targeting ability, and has a longer half-life and lower or no immunogenicity. It has been used in various applications, including gene therapy, drug delivery, diagnostics, and biosensing (for a recent review, see Darmostuk *et al.*, 2015).

For identifying aptamers for molecules of interest, a method called systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) has been used (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990). The SELEX procedure generally consists of the following of steps (Aquino-Jarquín and Toscano-Garibay, 2011; Cibiel *et al.*, 2011; Kong and Byun, 2013): The nucleic acid library is mixed with the target material to form a complex, and the bound nucleic acids are collected from the unbound batch using separation material (partition). Thereafter, the complex-formed nucleic acids are eluted from the bound target to amplify the aptamer candidates (amplification), and the ssDNA is separated from the other strand to proceed to the next SELEX round (separation). These cycles are repeated until nucleic acid molecules with high binding affinities and specificities for the target are isolated.

In the SELEX procedure, extracting true aptamer molecules from non-specifically isolated nucleic acids is essential to successful selection. Since 1990, when SELEX technology was first introduced (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990), various techniques have been developed to increase selection specificity. Generally, the traditional SELEX methods are based on “filtration” and “column purification,” where the filtration method uses the nitrocellulose membrane as an affinity material and eliminates unbound nucleic acid molecules with a filter. The column purification method uses a column with an immobilized target that captures aptamer candidates in a passing nucleic acid library flow. These techniques have limitations, such as the possibility of non-specific interaction of nucleic acids with affinity material that results in low yield and purity and the high demand for labor and time. In the attempts to overcome these limitations, modified versions of SELEX have been developed to increase the purity and yield of isolated aptamers and facilitate each SELEX step (Ellington and Szostak, 1992; Yang *et al.*, 2007).

When the target molecule is attached to an immobilization matrix, some sequences may undesirably interact with

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence. (K. Lee) E-mail: kangseok@cau.ac.kr; Tel.: +82-2-820-5241; Fax: +82-2-825-5206 / (J. Bae) E-mail: jeehyeon@cau.ac.kr; Tel.: +82-2-820-5604; Fax: +82-2-816-7338

Copyright © 2022, Author(s) under the exclusive license with the Microbiological Society of Korea

Acknowledgements

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Advancement Support Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) [grant number: 122060-02-1-CG000 to J. B.] and the National Research Foundation of Korea [NRF-2021R1A2C3008934 to K. L.]. This research was also supported by Chung-Ang University Graduate Research Scholarship grants in 2020.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Aquino-Jarquín, G. and Toscano-Garibay, J.D. 2011. RNA aptamer evolution: two decades of SELEction. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 9155–9171.

Blind, M. and Blank, M. 2015. Aptamer selection technology and recent advances. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **4**, e223.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., and Madden, T.L. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, 421.

Cibiel, A., Dupont, D.M., and Ducongé, F. 2011. Methods to identify aptamers against cell surface biomarkers. *Pharmaceuticals* **4**, 1216–1235.

Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., and Ruml, T. 2015. Current approaches in SELEX: an update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1141–1161.

Deslouches, B., Gonzalez, I.A., DeAlmeida, D., Islam, K., Steele, C., Montelaro, R.C., and Mietzner, T.A. 2007. De novo-derived cationic antimicrobial peptide activity in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 669–672.

Ellington, A.D. and Szostak, J.W. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822.

Ellington, A.D. and Szostak, J.W. 1992. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* **355**, 850–852.

Huang, Y.F., Shangguan, D., Liu, H., Phillips, J.A., Zhang, X., Chen, Y., and Tan, W. 2009. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *ChemBiochem* **10**, 862–868.

Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A., and Polisky, B. 1994. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* **263**, 1425–1429.

Jing, M. and Bowser, M.T. 2011. Isolation of DNA aptamers using micro free flow electrophoresis. *Lab Chip* **11**, 3703–3709.

Kong, H.Y. and Byun, J. 2013. Nucleic acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science. *Biomol. Ther.* **21**, 423–434.

Lee, B., Park, J., Ryu, M., Kim, S., Joo, M., Yeom, J.H., Kim, S., Park, Y., Lee, K., and Bae, J. 2017. Antimicrobial peptide-loaded gold nanoparticle-DNA aptamer conjugates as highly effective antibacterial therapeutics against *Vibrio vulnificus*. *Sci. Rep.* **7**, 13572.

Luo, Y.L., Shiao, Y.S., and Huang, Y.F. 2011. Release of photoacti-

vatable drugs from plasmonic nanoparticles for targeted cancer therapy. *ACS Nano* **5**, 7796–7804.

Mahlapuu, M., Häkansson, J., Ringstad, L., and Björn, C. 2016. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, 194.

Makabenta, J.M.V., Nabawy, A., Li, C.H., Schmidt-Malan, S., Patel, R., and Rotello, V.M. 2021. Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 23–36.

Mendonça, S.D. and Bowser, M.T. 2004. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **76**, 5387–5392.

Nimjee, S.M., Rusconi, C.P., and Sullenger, B.A. 2005. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu. Rev. Med.* **56**, 555–583.

Park, J., Shin, E., Yeom, J.H., Choi, Y., Joo, M., Lee, M., Kim, J.H., Bae, J., and Lee, K. 2022. Gold nanoparticle-DNA aptamer-assisted delivery of antimicrobial peptide effectively inhibits *Acinetobacter baumannii* infection in mice. *J. Microbiol.* **60**, 128–136.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **4**, e2584.

Ryu, M., Park, J., Yeom, J.H., Joo, M., and Lee, K. 2021. Rediscovery of antimicrobial peptides as therapeutic agents. *J. Microbiol.* **59**, 113–123.

Setlem, K., Mondal, B., Ramlal, S., and Kingston, J. 2016. Immuno affinity SELEX for simple, rapid, and cost-effective aptamer enrichment and identification against aflatoxin B1. *Front. Microbiol.* **7**, 1909.

Song, Y., Zhu, Z., An, Y., Zhang, W., Zhang, H., Liu, D., Yu, C., Duan, W., and Yang, C.J. 2013. Selection of DNA aptamers against epithelial cell adhesion molecule for cancer cell imaging and circulating tumor cell capture. *Anal. Chem.* **85**, 4141–4149.

Stoltenburg, R., Reinemann, C., and Strehlitz, B. 2005. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal. Bioanal. Chem.* **383**, 83–91.

Tuerk, C. and Gold, L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510.

Wan, Y., Kim, Y., Li, N., Cho, S.K., Bachoo, R., Ellington, A.D., and Iqbal, S.M. 2010. Surface-immobilized aptamers for cancer cell isolation and microscopic cytology. *Cancer Res.* **70**, 9371–9380.

Yang, Y., Yang, D., Schluesener, H.J., and Zhang, Z. 2007. Advances in SELEX and application of aptamers in the central nervous system. *Biomol. Eng.* **24**, 583–592.

Yazdian-Robati, R., Ramezani, M., Khedri, M., Ansari, N., Abnous, K., and Taghdisi, S.M. 2017. An aptamer for recognizing the transmembrane protein PDL-1 (programmed death-ligand 1), and its application to fluorometric single cell detection of human ovarian carcinoma cells. *Microchim. Acta* **184**, 4029–4035.

Yeom, J.H., Lee, B., Kim, D., Lee, J., Kim, S., Bae, J., Park, Y., and Lee, K. 2016. Gold nanoparticle-DNA aptamer conjugate-assisted delivery of antimicrobial peptide effectively eliminates intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biomaterials* **104**, 43–51.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. 2014. PEAR: a fast and accurate Illumina paired-end reAd mergeR. *Bioinformatics* **30**, 614–620.

Zhou, J. and Rossi, J. 2017. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 181–202.

Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Wu, X., Lu, A., Zhang, G., and Zhang, B. 2017. Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2142.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Industrial and Engineering Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jiec



Aptamer-conjugated gold nanoparticles platform as the intracellular delivery of antibodies for cancer therapy



Ji-Hyun Yeom^{a,b,1}, Eunyoung Shin^{a,1}, Hanyong Jin^{c,1}, Haifeng Liu^d, Yongyang Luo^d, Youngwoo Nam^a, Minkyung Ryu^b, Wooseok Song^b, Heeyoun Chi^d, Jeongkyu Kim^a, Kangseok Lee^{a,b,3}, Jeehyeon Bae^{b,d,3}

^a Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 06974, Republic of Korea

^b NES Biotechnology, Seoul 06974, Republic of Korea

^c Key Laboratory of Natural Medicines of the Changbai Mountain, Ministry of Education, College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin Province, China

^d School of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 06974, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 March 2023

Revised 4 June 2023

Accepted 18 June 2023

Available online 24 June 2023

Keywords:

Gold nanoparticles

DNA aptamer

Antibody therapeutics

Intracellular antibody delivery

Mutant oncogene

Chemotherapeutics

ABSTRACT

Antibodies are being increasingly used for therapeutic purposes due to their remarkable target specificity and affinity. However, currently available antibody therapies are restricted to target proteins in the outer cell membrane or in the extracellular fluids because of the lack of technologies for effective intracellular delivery of antibodies. Here, we report an efficient and versatile intracellular antibody delivery system. This system is based on gold nanoparticles (AuNPs) conjugated with DNA aptamers (Apt) against the Fc region of IgG (AuNP-Apt^{IG}), allowing to load any antibodies onto the AuNP-Apt^{IG} by simple mixing. This AuNP-Apt^{IG}-Ab platform was effective for cytosolic delivery of antibodies to clinically important mutant proteins via scavenger receptors and caveolae-mediated endocytosis. Specifically, cancer cells expressing BRAF^{V600E}, a variant of BRAF identified in numerous types of cancers, exhibited reduced cell viability by 70% when BRAF^{V600E} antibodies were intracellularly delivered using the AuNP-Apt^{IG} (AuNP-Apt^{IG}- α BRAF^{V600E}). In addition, subcutaneous injection of AuNP-Apt^{IG}- α BRAF^{V600E} into *in vivo* xenografted melanoma tumors expressing BRAF^{V600E} resulted in both inhibition of proliferation and induction of apoptosis, leading to tumor regression in mice. Thus, our findings indicate that the AuNP-Apt^{IG}-Ab system can serve as a promising platform for effective intracellular delivery of antibodies for therapeutic purposes.

© 2023 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Antibodies have inherent properties enabling them to identify and bind their targets with low toxicity, and therefore, they are widely used in pharmaceutical, biotechnological, and industrial applications. Since the mid-1990s, antibodies have become an important modality for the treatment of serious diseases including cancer, autoimmune, and infectious diseases [1–3]. The heightened interest is mainly due to the ability of antibodies to bind to epitopes with high specificity and affinity, enabling targeted therapy and minimizing undesirable side effects. Since the first monoclonal antibody (mAb), muromonab-CD3 (Orthoclone OKT-3), was fully licensed in 1986 for therapeutic use, ~100 monoclonal antibodies have been approved by the United States Food and Drug Adminis-

tration (US FDA) for therapeutic purposes [4]. Based on the figures for sales in 2019, therapeutic antibodies comprised 9 of the top 20 therapeutics by sales volume, and the cumulative earnings of these 9 antibodies reached US\$75 billion [4].

Importantly, the current antibodies used as therapeutic options in clinical settings are limited to target antigens that are secreted or expressed on the cell surface. The reason for this limited application of therapeutic antibodies is the lack of efficient methods for delivering antibodies intracellularly [5,6]. Large numbers of oncogenic proteins reside in the cytoplasm of cells. Therefore, the development of an effective delivery system to load antibodies and penetrate the extracellular membranes of cells will enable the targeting of numerous oncogenes which can be neutralized, and consequently, therapeutic efficacy would be achieved. As an example, B-Raf (BRAF) is a cytoplasmic proto-oncogene and plays an important role in cell growth regulation [7–10]. The mutant version BRAF^{V600E}, with valine changed to glutamic acid at amino acid position 600, is an oncogenic protein that is frequently found in

* Corresponding authors.

E-mail addresses: kangseok@cau.ac.kr (K. Lee), jeehyeon@cau.ac.kr (J. Bae).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2023.06.036>

1226-086X/© 2023 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

(Fig. 6d and e). Therefore, our AuNP-Apt^{hCG} platform provides a promising platform for the expansion of antibody-based therapeutics as it enables the delivery of antibodies to the cytosol to target disease-associated mutant proteins. Selection of DNA aptamers specifically interact with therapeutic antibodies will facilitate development of such a system [61].

Conclusion

Here, we developed a highly efficient intracellular antibody delivery platform using a specific DNA aptamer against the Fc region of IgG (Apt^{hCG}) conjugated to gold nanoparticles (AuNPs). Our AuNP-Apt^{hCG} platform showed a high capacity to load various antibodies and efficiently deliver antibodies to the cytosol of different human cancer cell types. In addition, we demonstrated that our AuNP-Apt^{hCG}-Ab platform is capable of targeted and selective inhibition of disease-associated mutant proteins present intracellularly in human cells. Therefore, our AuNP-Apt^{hCG} platform provides a promising opportunity for expansion of the antibody therapeutics field as it enables the delivery of antibodies to target numerous disease-associated cytosolic mutant proteins.

Declaration of Competing Interest

J.-H. Yeom, M. Ryou, and W. Song are employees of NES Biotechnology. K. Lee and J. Bae have participated on the board of directors for NES Biotechnology. Patents related to this study have been submitted. The remaining authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

We thank Shirley Myint, Thet Myat Noe, and Jed Y. Lee for their technical assistance with animal care and experiments and thank Dr. Sangmoon Lee for performing the TEM analysis. This study was supported by grants from the National Research Foundation (NRF) of Korea funded by the Korean government (2021R1A2C2094730 to B. J., 2021R1A2C3008934 to K. L. and 2021R1I1A1A01056162 to J.-H. Y.), the Tech Incubator Program for Startup (S2841276) funded by the Ministry of SMEs and Startups (MSS, Korea), the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (HV22C0062), the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Advancement Support Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (122060-02-1-CG000), and the Next Generation Bio Green 21 Program (SSAC, Grant No.: PJ013365), Rural Development Administration of Korea.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2023.06.036>.

References

[1] A.M. Scott, J.D. Wolchok, L.J. Old, *Nat. Rev. Cancer* 12 (2012) 278–287.
 [2] L. Steinman, *J. Clin. Immunol.* 10 (1990) 305–385, discussion 385–395.
 [3] A. Casadevall, E. Dadachova, L.A. Pirofski, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 695–703.
 [4] A. Mullard, *Nat. Rev. Drug Discov.* 20 (2021) 491–495.
 [5] R.K. Jain, *Cancer Metastasis Rev.* 6 (1987) 559–593.
 [6] R.K. Jain, *Cancer Res.* 50 (1990) 8145–8195.
 [7] C. Hagemann, U.R. Rapp, *Exp. Cell Res.* 253 (1999) 34–46.
 [8] P. Erhardt, E.J. Schremser, G.M. Cooper, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 5308–5315.
 [9] M.J. Garnett, R. Marais, *Cancer Cell* 6 (2004) 313–319.

[10] M.A. Belesaua, I. Jung, C. Braicu, D. Milutin, S. Gurzu, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021).
 [11] H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, P.A. Futreal, *Nature* 417 (2002) 949–954.
 [12] G. Freund, A.P. Sibley, D. Desplancq, M. Oulad-Abdelghani, M. Vigneron, J. Gannon, M.H. Van Regenmortel, E. Weiss, *MAbs* 5 (2013) 518–522.
 [13] R. Chakrabarti, D.E. Wylie, S.M. Schuster, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 15494–15500.
 [14] D. Zhang, P. Wadsworth, P.K. Hepler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 8820–8824.
 [15] H. Amthofer, O. Haller, *EMBO J.* 7 (1988) 1315–1320.
 [16] H.Y. Chiu, W. Deng, H. Engelke, J. Helma, H. Leonhardt, T. Bein, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25019.
 [17] Z. Song, L. Liu, X. Wang, Y. Deng, Q. Nian, G. Wang, S. Zhu, X. Li, H. Zhou, T. Jiang, X. Xu, R. Tang, C. Qin, *Chem. Commun. (Camb)* 52 (2016) 1879–1882.
 [18] M. Kristensen, D. Birch, H. Mørck Nielsen, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016).
 [19] A. Bolhassani, B.S. Jafarzade, G. Mardani, *Peptides* 87 (2017) 50–63.
 [20] A. Abrahim, U. Natraj, A.A. Karande, A. Gulati, M.R. Murthy, S. Murugesan, P. Mukunda, H.S. Savithri, *Sci. Rep.* 6 (2016) 21803.
 [21] G. Liu, S. Ma, S. Li, R. Cheng, F. Meng, H. Liu, Z. Zhong, *Biomaterials* 31 (2010) 7575–7585.
 [22] B. Chatin, M. Mevel, J. Devalliere, L. Dallet, T. Haudebourg, P. Peuziat, T. Colombani, M. Berchel, O. Lambert, A. Edelman, B. Pitard, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 4 (2015) e244.
 [23] S. Du, S.S. Liew, C.W. Zhang, W. Du, W. Lang, C.C.Y. Yao, L. Li, J. Ge, S.Q. Yao, *ACS Cent. Sci.* 6 (2020) 2362–2376.
 [24] E. Boissefier, D. Astruc, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 1759–1782.
 [25] D.R. Mould, B. Meibohm, *BioDrugs* 30 (2016) 275–293.
 [26] Q. Wang, C.Y. Chung, S. Chough, M.J. Betenbaugh, *Biotechnol. Bioeng.* 115 (2018) 1378–1393.
 [27] J. Ma, M.G. Wang, A.H. Mao, J.Y. Zeng, Y.Q. Liu, X.Q. Wang, J. Ma, Y.J. Tian, N. Ma, N. Yang, L. Wang, S.Q. Liao, *Genet. Mol. Res.* 12 (2013) 1399–1410.
 [28] N.L. Rossi, D.A. Göljohann, C.S. Thaxton, A.K. Lytton-Jean, M.S. Han, C.A. Mirkin, *Science* 312 (2006) 1027–1030.
 [29] J.-H. Yeom, B. Lee, D. Kim, J.-K. Lee, S. Kim, J. Bae, Y. Park, K. Lee, *Biomaterials* 104 (2016) 43–51.
 [30] W. Song, M. Joo, J.H. Yeom, E. Shin, M. Lee, H.K. Choi, J. Hwang, Y.I. Kim, R. Seo, J.E. Lee, C.J. Moore, Y.H. Kim, S.I. Eyun, Y. Hahn, J. Bae, K. Lee, *Nat. Microbiol.* 4 (2019) 515–526.
 [31] T. Dull, R. Zufferey, M. Kelly, R.J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono, L. Naldini, *J. Virol.* 72 (1998) 8463–8471.
 [32] B. Guan, T.L. Wang, M. Shih, *Cancer Res.* 71 (2011) 6718–6727.
 [33] M. Park, D.S. Suh, K. Lee, J. Bae, *Fertil. Steril.* 102 (847–855) (2014) e841.
 [34] E. Shin, H. Jin, D.S. Suh, Y. Luo, H.J. Ha, T.H. Kim, Y. Hahn, S. Hyun, K. Lee, J. Bae, *EMBO J.* 39 (2020) e104719.
 [35] A.R. Bradbury, S. Sidhu, S. Dubel, J. McCafferty, *Nat. Biotechnol.* 29 (2011) 245–254.
 [36] P.J. Carter, G.A. Lazar, *Nat. Rev. Drug Discov.* 17 (2018) 197–223.
 [37] M. Uhlen, L. Fagerberg, B.M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A. Szegedy, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takam, S. Huber, T. Alm, P.H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J.M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwaahlen, G. von Hejne, J. Nielsen, F. Ponten, *Science (New York, N.Y.)* 347 (2015).
 [38] L. Novellino, C. Castelli, G. Parmiani, *Cancer Immunol. Immunother.* 54 (2005) 187–207.
 [39] L. Kou, Y.D. Bhunia, Q. Yao, Z. He, J. Sun, V. Ganapathy, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 27.
 [40] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 941–951.
 [41] M.C. Johnston, C.J. Scott, *Drug Discov. Today Technol.* 30 (2018) 63–69.
 [42] T. Ramasamy, H.B. Ruttala, B. Gupta, B.K. Poudel, H.G. Choi, C.S. Yong, J.O. Kim, *J. Control. Release* 258 (2017) 226–253.
 [43] T. Ramasamy, H.B. Ruttala, S. Munusamy, N. Chakraborty, J.O. Kim, *J. Control. Release* 352 (2022) 861–878.
 [44] B.K. Poudel, Z.C. Soe, H.B. Ruttala, B. Gupta, T. Ramasamy, R.K. Thapa, M. Gautam, W. Ou, H.T. Nguyen, J.H. Jeong, S.G. Jin, H.G. Choi, C.S. Yong, J.O. Kim, *Int. J. Pharm.* 548 (2018) 92–103.
 [45] T. Ramasamy, S. Munusamy, H.B. Ruttala, J.O. Kim, *Biotechnol. J.* 16 (2021) e1900408.
 [46] C.Z. Yu, T. Ramasamy, M. Fazzari, X. Chen, B. Freeman, J.J. Pacella, *Nanotheranostics* 6 (2022) 215–229.
 [47] T.A. Slastnikova, A.V. Ulasov, A.A. Rosenkranz, A.S. Sobolev, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1208.
 [48] Z.R. Goddard, M.J. Marin, D.A. Russell, M. Searcey, *Chem. Soc. Rev.* 49 (2020) 8774–8789.
 [49] S.M. Ryou, J.H. Yeom, H.J. Kang, M. Won, J.S. Kim, B. Lee, M.J. Seong, N.C. Ha, J. Bae, K. Lee, *J. Control. Release* 196 (2014) 287–294.
 [50] F. Snusa, P. Castro, P. Fonte, P.J. Kennedy, M.T. Neves-Petersen, B. Sarmiento, *Expert Opin. Drug Deliv.* 14 (2017) 1163–1176.

<학술발표>

17th Vaccine Congress

24–27 September 2023 • Hilton Glasgow, Scotland



Certificate of Presentation

We hereby confirm that

Jung-Eun Park

Chungnam National University, Republic of Korea

attended and gave the following presentation

Immunogenicity of a chimeric SARS-CoV-2 virus-like particle in mice

at the 17th Vaccine Congress

24-27 September 2023, Hilton Glasgow, Scotland

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Morley'.

Marie-Claire Morley
For and on behalf of Elsevier Ltd



<지적재산권_특허 1>

2022-12-26

【서지사항】

【서유명】	특허출원서
【참조번호】	PDPC222258k1
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	주식회사 엔이에스바이오테크놀러지
【특허고객번호】	1-2020-087726-9
【지분】	70.00/100
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【특허고객번호】	3-1999-034166-5
【지분】	30.00/100
【대리인】	
【명칭】	파도특허법인 유한회사
【대리인번호】	9-2021-100021-9
【지정된변리사】	양석주
【포괄위임등록번호】	2022-020343-8
【발명의 국문명칭】	나노 입자-CRISPR 결합체를 기반으로 하는 유전자 조작 및 이의 제조 방법
【발명의 영문명칭】	Genetic manipulation and manufacturing method based on gold nanoparticle-CRISPR conjugate

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】	1545026672
【과제번호】	12206002198010
【부처명】	농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】	농림식품기술기획평가원
【연구사업명】	가축질병대응기술고도화지원
【연구과제명】	신·변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물 용 mRNA 백신 개발
【기여율】	1/2
【과제수행기관명】	중앙대학교 산학협력단
【연구기간】	2022.04.08 ~ 2023.12.31

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.12.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(PDPC222258k1)
출원번호 10-2022-0184348 (접수번호 1-1-2022-1397483-14)
(DAS접근코드C210)
출원인명칭 주식회사 엔이에스바이오테크놀러지(1-2020-087726-9) 외 1명
대리인성명 파도특허법인 유한회사(9-2021-100021-9)
발명자성명 이강석 배지현 염지현 주민주 유민경 현하나 심세훈 김차영 박성철 정재철 정유정
발명의명칭 나노 입자-CRISPR 결합체를 기반으로 하는 유전자 조작 및 이의 제조 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr> 지식재산제도

【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【참조번호】 PDP0222257k1
【출원구분】 특허출원
【출원인】
【명칭】 주식회사 엔이에스바이오테크놀러지
【특허고객번호】 1-2020-087726-9
【대리인】
【명칭】 파도특허법인 유한회사
【대리인번호】 9-2021-100021-9
【지정된변리사】 양석주
【포괄위임등록번호】 2022-020343-8
【발명의 국문명칭】 금나노입자-앵타머 결합체를 기반으로 하는 항균 단백질 전 달체 및 이의 제조 방법
【발명의 영문명칭】 Antimicrobial peptide delivery system and manufacturing method based on gold nanoparticle s-aptamer conjugate

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1545026672
【과제번호】 122060021S8010
【부처명】 농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원
【연구사업명】 가축질병대응기술고도화지원
【연구과제명】 신·변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신 개발
【기여율】 1/2
【과제수행기관명】 중앙대학교 산학협력단
【연구기간】 2022.04.08 ~ 2023.12.31

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.12.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(PDPC222257k1)
출원번호 10-2022-0184356 (접수번호 1-1-2022-1397522-07)
(DAS접근코드3638)
출원인명칭 주식회사 엔이에스바이오테크놀러지(1-2020-087726-9)
대리인성명 파도특허법인 유한회사(9-2021-100021-9)
발명자성명 이강석 배지현 염지현 심세훈 주민주 배다영 이재민
발명의명칭 금나노입자-엡타머 결합체를 기반으로 하는 항균 단백질 전달체 및 이의 제조 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

- | |
|---|
| <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.</p> <p>2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.</p> <p>※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호</p> <p>3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.</p> <p>4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.</p> <p>※ 심사제도 안내 : https://www.kipo.go.kr 지식재산제도</p> |
|---|

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	PDPC222508k1
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	주식회사 엔이에스바이오테크놀러지
【특허고객번호】	1-2020-087726-9
【대리인】	
【명칭】	파도특허법인 유한회사
【대리인번호】	9-2021-100021-9
【지정된변리사】	양석주
【포괄위임등록번호】	2022-020343-8
【발명의 국문명칭】	나노 입자 및 5'-tRH 복합체 및 이를 포함하는 항암용 조성물
【발명의 영문명칭】	Anticancer Composition Containing Nanoparticle-tRH Conjugate

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】	1545026672
【과제번호】	1220600218B010
【부처명】	농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】	농림식품기술기획평가원
【연구사업명】	가축질병대응기술고도화지원
【연구과제명】	신·변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신 개발
【기여율】	1/2
【과제수행기관명】	중앙대학교 산학협력단
【연구기간】	2022.04.08 ~ 2023.12.31

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.12.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(PDPC222508k1)
출원번호 10-2022-0184521 (접수번호 1-1-2022-1398502-62)
(DAS접근코드31F6)
출원인명칭 주식회사 엔이에스바이오테크놀러지(1-2020-087726-9)
대리인성명 파도특허법인 유한회사(9-2021-100021-9)
발명자성명 이강석 배지현 염지현 심세훈 주민주 신은경 하윤지 김홍만 유민경
발명의명칭 나노 입자 및 5'-RH 복합체 및 이를 포함하는 항암용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr> 지식재산제도

【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【참조번호】 PDP0225020
【출원구분】 특허출원
【출원인】
【명칭】 주식회사 엔이에스바이오테크놀러지
【특허고객번호】 1-2020-087726-9
【대리인】
【명칭】 파도특허법인 유한회사
【대리인번호】 9-2021-100021-9
【지정된변리사】 양석주
【포괄위임등록번호】 2022-020343-8
【발명의 국문명칭】 안정화를 위한 3'UTR 서열을 포함하는 mRNA 구조체
【발명의 영문명칭】 mRNA construct containing 3'UTR sequence for stabilization

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1545026672
【과제번호】 122060021S8010
【부처명】 농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원
【연구사업명】 가축질병대응기술고도화지원
【연구과제명】 신·변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신 개발
【기여율】 1/2
【과제수행기관명】 중앙대학교 산학협력단
【연구기간】 2022.04.08 ~ 2023.12.31

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.12.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(PDPC225020)
출원번호 10-2022-0184308 (접수번호 1-1-2022-1397244-19)
(DAS접근코드0297)
출원인명칭 주식회사 엔이에스바이오테크놀러지(1-2020-087726-9)
대리인성명 파도특허법인 유한회사(9-2021-100021-9)
발명자성명 이강석 배지현 엄지현 심세훈 송우석 유민경 전현
발명의명칭 안정화를 위한 3'UTR 서열을 포함하는 mRNA 구조체

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr> 지식재산제도

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	PDPC225021
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	주식회사 엔이에스바이오테크놀러지
【특허고객번호】	1-2020-087726-9
【대리인】	
【명칭】	파도특허법인 유한회사
【대리인번호】	9-2021-100021-9
【지정된변리사】	양석주
【포괄위임등록번호】	2022-020343-8
【발명의 국문명칭】	이중 나선DNA가 결합된 금 나노 입자 운반체를 포함하는 백신 조성물
【발명의 영문명칭】	Vaccine comprising double-stranded DNA bound gold nanoparticle carrier

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】	1545026672
【과제번호】	122060021S8010
【부처명】	농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】	농림식품기술기획평가원
【연구사업명】	가축질병대응기술고도화지원
【연구과제명】	신·변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신 개발
【기여율】	1/2
【과제수행기관명】	중앙대학교 산학협력단
【연구기간】	2022.04.08 ~ 2023.12.31

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.12.26
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(PDPC225021)
출원번호 10-2022-0184295 (접수번호 1-1-2022-1397176-02)
(DAS접근코드449D)
출원인명칭 주식회사 엔이에스바이오테크놀러지(1-2020-087726-9)
대리인성명 파도특허법인 유한회사(9-2021-100021-9)
발명자성명 이강석 배지현 염지현 심세훈 김홍만 유민경 송우석
발명의명칭 이중 나선DNA가 결합된 금 나노 입자 운반체를 포함하는 백신 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>


1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로
홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가
까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하
여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에
문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr> 지식재산제도



출원사실증명원 CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	한국생명공학연구원 KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY	주민번호 Residence No	
	주소	대한민국 34141 대전광역시 유성구 과학로 125	전화번호	+82-6677-4044
	성명 Name	주식회사 엔이에스바이오테크놀러지 NES BIOTECHNOLOGY CO., LTD.	주민번호 Residence No	
	주소	대한민국 06974 서울특별시 동작구 흑석로 84, 104관 507호	전화번호	+82-6677-4044
발명자 Inventor	성명 Name	이강석 LEE, Kangseok	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	배지현 BAE, Jeehyeon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	염지현 YEOM, Jihyun	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	주민주 JOO, Minju	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	유민경 RYU, Minkyung	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	현하나 HYEON, Hana	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	심세훈 SIM, Sehoon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
성명 Name	김차영 KIM, Chayoung	주민번호 Residence No		
주소	[REDACTED]	전화번호		
성명	박성철	주민번호		

<지적재산권_특허 6>

	Name	PARK, Sungchul	Residence No	
	주 소		전 화 번 호	
	성 명 Name	정재철 JEONG, Jaecheol	주 민 번 호 Residence No	
	주 소		전 화 번 호	
	성 명 Name	정유정 JEONG, Yujeong	주 민 번 호 Residence No	
	주 소		전 화 번 호	
대 리 인 Agent	성 명	파도특허법인유한회사	대리인 번호	9-2021-100021-9
	주 소	대한민국 06194 서울특별시 강남구 테헤란로78길 16, 9층		
출 원 번 호 Application Number		PCT/KR2023/006602	출 원 일 자 Filing Date	2023년 05월 16일 MAY 16, 2023
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상품(서비스업)류 구분 Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark		나노 입자-CRISPR 결합체를 기반으로 하는 유전자 조작 및 이의 제조 방법		
용 도	확인용	IPC 분류		
최 종 처 분 상 태		최종처분일		
<p>위 사실을 증명함.</p> <p>This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office</p> <p>2023년 09월 25일</p> <p>특 허 청 COMMISSIONER</p> 				

◆ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)의 '특허로-증명서 발급' 메뉴를 통해 발급번호 또는 문서하단의 바코드로 내용의 위·변조 여부를 확인해 주십시오. 단, 발급번호를 통한 확인은 90일까지 가능합니다.

발급번호 : 5-5-2023-054453480



출원사실증명원 CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	주식회사 엔이에스바이오테크놀로지 NES BIOTECHNOLOGY CO., LTD.	주민번호 Residence No	
	주소	대한민국 06974 서울특별시 동작구 흑석로 84, 104관 507호	전화번호	+82-6677-4044
발명자 Inventor	성명 Name	이강석 LEE, Kangseok	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	배지현 BAE, Jeehyeon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	열지현 YEOM, Jihyun	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	심세훈 SIM, Sehoon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	김홍만 KIM, Hongman	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	송우석 SONG, Wooseok	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	전현 JUN, Hyeon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
대리인 Agent	성명	파도특허법인유한회사	대리인 번호	9-2021-100021-9
	주소	대한민국 06194 서울특별시 강남구 테헤란로78길 16, 9층		
출원번호 Application Number		PCT/KR2023/007006	출원일자 Filing Date	2023년 05월 23일 MAY 23, 2023
Title of Invention,		나노입자-올리고T 결합체를 기반으로 하는 메신저 RNA 운반체		

<지적재산권_특허 7>

Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark			
종 도	확인용	IPC 분류	
최종 처분 상태		최종 처분일	
<p>위 사실을 증명함.</p> <p>This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office</p> <p>2023년 09월 25일</p> <p>특 허 청 COMMISSIONER</p> 			

◆ 본 증명서는 인화본으로 발급되었으며, 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)의 '특허-증명서 발급' 메뉴를 통해 발급번호 또는 문서하단의 바코드로 내용의 위·변조 여부를 확인해 주십시오. 단, 발급번호를 통한 확인은 90일까지 가능합니다.

발급번호 : 5-5-2024-001380774



출원사실증명원 CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	주식회사 엔이에스바이오테크놀로지 NES BIOTECHNOLOGY CO., LTD.	주민번호 Residence No	
	주소	대한민국 06974 서울특별시 동작구 흑석로 84, 104관 507호	전화번호	+82-6677-4044
발명자 Inventor	성명 Name	이강석 LEE, Kangseok	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	배지현 BAE, Jeehyeon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	염지현 YEOM, Jihyun	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	심세훈 SIM, Sehoon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	주민주 JOO, Minju	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	신은경 SHIN, Eunkyong	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	하윤지 HA, Yoonjie	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	김홍만 KIM, Hongman	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
성명 Name	유민경 RYU, Minkyung	주민번호 Residence No		
주소	[REDACTED]	전화번호		
대리인	성명	파도특허법인유한회사	대리인 번호	9-2021-100021-9

<지적재산권_특허 8>

주 소			
출원 번호 Application Number	PCT/KR2023/018060	출원 일자 Filing Date	2023년 11월 10일 NOV 10, 2023
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상품(서비스업)류 구분 Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark	나노 입자 및 5'-TRH 복합체 및 이를 포함하는 항암용 조성물		
용 도	확인용	IPC 분류	
최종 처분 상태		최종 처분일	
<p>위 사실을 증명함.</p> <p>This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office.</p> <p>2024년 01월 08일</p> <p>특 허 청 COMMISSIONER</p> 			

◆본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)의 '특허-증명서 발급' 메뉴를 통해 발급번호 또는 문서하단의 바코드로 내용의 위·변조 여부를 확인해 주십시오. 단, 발급번호를 통한 확인은 90일까지 가능합니다.

발급번호 : 5-5-2024-001371763



출원사실증명원 CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	주식회사 엔이에스바이오테크놀로지 NES BIOTECHNOLOGY CO., LTD.	주민번호 Residence No	
	주소	대한민국 06974 서울특별시 동작구 흑석로 84, 104관 507호	전화번호	+82-6677-4044
발명자 Inventor	성명 Name	이강석 LEE, Kangseok	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	배지현 BAE, Jeehyeon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	염지현 YEOM, Jihyun	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	심세훈 SIM, Sehoon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	김홍만 KIM, Hongman	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	유민경 RYU, Minkyung	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	송우석 SONG, Wooseok	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
대리인 Agent	성명	파도특허법인유한회사	대리인 번호	9-2021-100021-9
	주소	대한민국 06194 서울특별시 강남구 테헤란로78길 16, 9층		
출원번호 Application Number		PCT/KR2023/021565	출원일자 Filing Date	2023년 12월 26일 DEC 26, 2023
Title of Invention.		이중나선 DNA가 결합된 금 나노 입자 운반체를 포함하는 백신 조성물		

<지적재산권_특허 9>

Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark			
용	도	특안용	IPC 분류
최종처분상태		최종처분일	
<p>위 사실을 증명함.</p> <p>This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office</p> <p>2024년 01월 08일</p> <p>특 허 청 COMMISSIONER</p> 			

◆ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)의 '특허권-증명서 발급' 메뉴를 통해 발급번호 또는 문서해당인 바코드로 내용의 위·변조 여부를 확인해 주십시오. 단, 발급번호를 통한 확인은 90일까지 가능합니다.



출원사실증명원 CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	주식회사 엔이에스바이오테크놀로지 NES BIOTECHNOLOGY CO., LTD.	주민번호 Residence No	
	주소	대한민국 06974 서울특별시 동작구 흑석로 84, 104관 507호	전화번호	+82-6677-4044
발명자 Inventor	성명 Name	이강석 LEE, Kangseok	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	배지현 BAE, Jeehyeon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	염지현 YEOM, Jihyun	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	심세훈 SIM, Sehoon	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	주민주 JOO, Minju	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	배다영 BAE, Dayeong	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
	성명 Name	이재민 LEE, Jaemin	주민번호 Residence No	
	주소	[REDACTED]	전화번호	
대리인 Agent	성명	파도특허법인유한회사	대리인 번호	9-2021-100021-9
	주소	대한민국 06194 서울특별시 강남구 테헤란로78길 16, 9층		
출원번호 Application Number		PCT/KR2023/007375	출원일자 Filing Date	2023년 05월 30일 MAY 30, 2023
Title of Invention,		금나노입자-애타머 결합체를 기반으로 하는 항균 단백질 전달체 및 이의 제조 방법		

<지적재산권_특허 10>

Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark			
용도	확인용	IPC 분류	
최종처분상태		최종처분일	
<p>위 사실을 증명함.</p> <p>This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office</p> <p>2023년 09월 25일</p> <p>특 허 청 COMMISSIONER</p> 			

◆ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)의 '특허로-증명서 발급' 메뉴를 통해 발급번호 또는 문서하단의 바코드로 내용의 위·변조 여부를 확인해 주십시오. 단, 발급번호를 통한 확인은 90일까지 가능합니다.

<지적재산권_특허 11>

제출 일자 : 2023-06-29 10-2022-0063493

【서지사항】

【서류명】 보정서
【보정구분】 출원서등 보정
【제출처】 특허청장
【제출인】
【명칭】 주식회사 엔이에스바이오테크놀러지
【특허고객번호】 1-2020-087726-9
【사건과의 관계】 출원인

【대리인】

【명칭】 파도특허법인 유한회사
【대리인번호】 9-2021-100021-9
【지정된변리사】 양석주
【포괄위임등록번호】 2022-020343-8

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2022-0063493

【제출원인이 된 서류의 접수번호】 1-1-2022-0548682-67

【보정할 서류】 특허출원서

【보정할 사항】

【보정대상항목】 이 발명을 지원한 국가연구개발사업

【보정방법】 정정

【보정내용】

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1545026672

【과제번호】 122060021SB010

【부처명】 농림축산식품부

【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원

【연구사업명】 가축질병대응기술고도화지원

【연구과제명】 신·변종 코로나 19 감염병 예방 및 조기 대응을 위한 동물용 mRNA 백신 개발

【기여율】 1/2

【과제수행기관명】 중앙대학교 산학협력단

【연구기간】 2022.04.08 ~ 2023.12.31

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.05.24
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(PDPC222256)
출원번호 10-2022-0063493 (접수번호 1-1-2022-0548682-67)
(DAS접근코드F27B)
출원인명칭 주식회사 엔이에스바이오테크놀로지(1-2020-087726-9)
대리인성명 파도특허법인 유한회사(9-2021-100021-9)
발명자성명 이강석 배지현 염지현 심세훈 김홍만 송우석 전현
발명의명칭 나노입자-올리고 결합체를 기반으로 하는 메신저 RNA 운반체

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도



발명의 명칭 Title of the Invention
나노입자-올리고T 결합체를 기반으로 하는 메신저 RNA 운반체

특허권자 Patentee
주식회사 엔이에스바이오테크놀러지(110111-*****)
서울특별시 동작구 흑석로 84, 중앙대학교104관507호(흑석동)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2023년 01월 27일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

이 인 실



QR코드로 현재기준
등록사항을 확인하세요



제 SAA07701 호

박사학위수여예정증명서

성 명 : 루오용양
생년월일 : XXXXXXXXXX
대 학 원 : 대학원
학 과(부) : 약학과
전 공 : 보건사회임상약학전공
학 위 명 : 약학박사
학위수여예정일자 : 2023. 2. 13. 수여예정

위의 사실을 증명합니다.

2022년 12월 21일

중 앙 대 학 교 교 무 처 장



* 이 증명은 자동발급기에서 발급된 것임.

<전문 연구 인력 양성 1>

문서확인번호 ■ XDE7-7C7C-7C2D-00E0 ■ 제출처: 연구소 용도: 회사제출용



00000 서울특별시 동대문구 흑석로 147 (전원: 02)

제 IWB021467 호

석사학위수여증명서

성 명 : 남영우
생년월일 : XXXXXXXXXX
대 학 원 : 대학원
학 과(부) : 생명과학과
전 공 : 분자생물학전공
학 위 명 : 이학석사
학위수여일자 : 2023. 2. 13.
학위등록번호 : 중앙대2022(석) 0237

위의 사실을 증명합니다.

2023년 4월 15일

중 앙 대 학 교 교 무 처 장



<전문 연구 인력 양성 1>

문서확인번호 ■ XD0B-04D3-08A2-89E4 ■

06974 | 서훈명세서 | 훈격구 | 훈서종 | 04 | (문종) | 02 | 020-00/05 | 0035 |

제 1WB022205 호

석사학위수여증명서

성 명 : 현하나
생년월일 : XXXXXXXXXX
대 학 원 : 대학원
학 과(부) : 생명과학과
전 공 : 분자생물학전공
학 위 명 : 이학석사
학위수여일자 : 2023. 2. 13.
학위등록번호 : 중앙대2022(석) 0242

위의 사실을 증명합니다.

2023년 4월 17일

중 앙 대 학 교 교 무 처



제 IWB113775 호

박사학위수여예정증명서

성 명 : Haifeng Liu
 생 년 월 일 : ██████████
 대 학 원 : 대학원
 학 과(부) : 약학과
 전 공 : 보건사회임상약학전공
 학 위 명 : 약학박사
 학위수여예정일자 : 2024. 2. 19. 수여예정



위의 사실을 증명합니다.

2023년 12월 12일

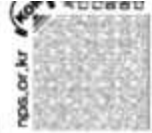
중앙대학교 교무처장



<고용창출>

NPS 함께 나누고 함께 누려요

(1/3 페이지)



국민연금 사업장 가입자 명부

발급번호	20240119-H326-335373	발급일자	2024-01-19	검정번호	6B51
------	----------------------	------	------------	------	------

■ 사업장 기본사항

사업장 명칭	주식회사엔이에스바이오테크놀로지				
사업장관리번호	743-68-01220-0	사용자 약칭	이강표	사용자 생년월일	[REDACTED]
사업장 소재지	서울특별시 영등포구 통진로 109길 102관 지하 (영등포, 영등대초교)				

■ 출퇴근시간

출퇴근위	전체	조퇴기간	2023년 1월 ~ 2023년 12월
------	----	------	----------------------

■ 사업장 도입/보유/종단부호명

단위당 보유		단위당 보유		단위당 보유	
월수	보유	월수	보유	월수	보유
개월	#####	개월	#####	개월	#####

■ 사업장 가입자 현황

순번	성명	생년월일	보유종류 보유종류	보유종류 보유종류	상태	기업소득 월액(원)	월보장료 (원)	사업장가입 기간(연월일)	연령 수준
1	이상민	[REDACTED]	2022-03-01 2022-03-01	2023-12-01	상업	*****	**	***** ***** *****	
2	송우표	[REDACTED]	2020-04-01 2020-04-01	2023-12-01	상업	*****	**	***** ***** *****	
3	유민경	[REDACTED]	2021-06-07 2021-06-07	2023-11-01	상업	*****	**	***** ***** *****	

■ 사업장 가입자 현황

순번	이름	생년월일	최초취득일 최종취득일	비고 상실일	상태	기준소득 월액(원)	월보험료 (원)	사용자부담금 근로자기여금 퇴직금전환금	수령 금액
4	김현	[REDACTED]	2022-01-10 2022-01-10	2023-03-01	상실	*****	**	***** ***** *****	
5	박영우	[REDACTED]	2020-12-28 2022-05-01	2023-03-01	상실	*****	**	***** ***** *****	
6	박민아	[REDACTED]	2020-04-01 2020-04-01		취직	*****	**	***** ***** *****	
7	김상현	[REDACTED]	2022-10-01 2022-10-01		취직	*****	**	***** ***** *****	
8	이진형	[REDACTED]	2021-02-08 2021-02-08		취직	*****	**	***** ***** *****	
9	김광만	[REDACTED]	2020-09-01 2020-09-01		취직	*****	**	***** ***** *****	
10	김세현	[REDACTED]	2022-03-01 2022-03-01		취직	*****	**	***** ***** *****	
11	윤지현	[REDACTED]	2022-03-01 2022-03-01		취직	*****	**	***** ***** *****	
12	주민주	[REDACTED]	2022-03-01 2022-03-01		취직	*****	**	***** ***** *****	
13	윤혜진	[REDACTED]	2021-09-28 2021-09-28		취직	*****	**	***** ***** *****	



■ 사업장 가입자 현황

순번	성명	생년월일	최초취득일 최종취득일	보험상입일	성별	기업소득 유무(원)	월보장액 (원)	사용자부담금 근로자기여금 보험료기전액(원)	수령 보험 금
14	김지현	[REDACTED]	2023-03-20 2023-03-20		여성	*****	**	***** ***** *****	
15	최연주	[REDACTED]	2022-01-13 2022-01-13		여성	*****	**	***** ***** *****	
16	최윤경	[REDACTED]	2022-06-01 2022-06-01		여성	*****	**	***** ***** *****	
17	신종연	[REDACTED]	2022-05-09 2022-05-09		여성	*****	**	***** ***** *****	
18	박소영	[REDACTED]	2023-04-03 2023-04-03		여성	*****	**	***** ***** *****	
19	이수진	[REDACTED]	2023-03-20 2023-03-20		여성	*****	**	***** ***** *****	
20	안규미	[REDACTED]	2023-04-10 2023-04-10		여성	*****	**	***** ***** *****	

* 개인사업장 사용자의 국민연금 보험료는 사용자부담금과 근로자기여금으로 구분하여 표기하였습니다.

* 이 증명서는 소득확인 자료로 사용할 수 없습니다.

위와 같이 국민연금 사업장 가입자 가입내역을 증명합니다.

국민연금공단 이사장



주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.