

발간등록번호

11-1543000-004159-01

# 인터페론 람다 및 천연물 유래 물질을 이용한 반려동물 전염성 바이러스 치료제의 시험관 내 유효성·안전성 평가 최종보고서

2022. 09. 14.

건국대학교 산학협력단  
큐벳 (주)

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

최종보고서										보안등급	
										일반[ V ], 보안[ ]	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명			가축질병대응기술개발	
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		동물의약품개발				
공고번호		제 농축2021-23호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
					연구개발과제번호		121004-1				
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0710	40%	2순위 LB0701	40%	3순위 LC0312	20%				
	농림식품과학기술분류	1순위 RB0201	40%	2순위 RB0104	30%	3순위 RB0299	30%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문	인터페론 람다 및 천연물 유래 물질을 이용한 반려동물 전염성 바이러스 치료제의 시험관 내 유효성 · 안전성 평가								
		영문	In vitro evaluation of the efficacy and safety of therapeutics using interferon lambda or natural substance against companion animal viral infection								
주관연구개발기관		기관명	건국대학교 산학협력단			사업자등록번호					
		주소				법인등록번호					
연구책임자		성명	최인수			직위	교수				
		연락처	직장전화			휴대전화					
		전자우편			국가연구자번호						
연구개발기간		전체	2021. 04. 01 - 2022. 03. 31 ( 1년 0개월)								
		단계 (해당 시 작성)	1단계	2021. 04. 01 - 2022. 03. 31 ( 1년 0개월)							
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발 비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계			연구개발 비외 지원금	
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계		
총계		261,000	87,000					261,000	87,000	348,000	
1단계 1년차		261,000	87,000					261,000	87,000	348,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고				
		역할	기관유형								
공동연구개발기관		큐벳	최종철	연구소장							
연구개발담당자 실무담당자		성명	김동휘			직위	박사과정				
		연락처	직장전화			휴대전화					
		전자우편			국가연구자번호						

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

2022 년 08 월 18 일

연구책임자: 최인수

주관연구개발기관의 장: 윤동열 (직인)  
공동연구개발기관의 장: 송주연 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “인터페론 람다 및 천연물 유래 물질을 이용한 반려동물 전염성 바이러스 치료제의 시험관 내 유효성·안전성 평가”(개발기간 : 2021. 04. 01. ~ 2022. 03. 31.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 09. 14.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단

윤동열 (인)

공동연구기관명 : 큐벳 (주)

송주연 (인)

주관연구책임자 : 최인수

공동연구책임자 : 최종철

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

사업명		가축질병대응기술개발				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)		동물의약품개발				연구개발과제번호		121004-1
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0710	40%	2순위 LB0701	40%	3순위 LC0312	20%	
	농림식품 과학기술분류	1순위 RB0201	40%	2순위 RB0104	30%	3순위 RB0299	30%	
총괄연구개발명 (과제선정 후 해당 시 작성)								
연구개발과제명		인터페론 람다 및 천연물 유래 물질을 이용한 반려동물 전염성 바이러스 치료제의 시험관 내 유효성·안전성 평가						
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2022. 03. 31 ( 1 년 0 개월)						
총 연구개발비		총 348,000 천원 (정부지원연구개발비: 261,000 천원, 기관부담연구개발비: 87,000 천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)						
연구개발단계		기초[ V ] 응용[ V ] 개발[ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]			기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점 기준 ( 3단계 ) 종료시점 목표 ( 4단계 )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구개발 목표 및 내용		개, 고양이의 바이러스성 전염병 치료용 항바이러스제 효능 검증						
		<p>○ 1 세부기관</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 생산 및 역가 측정</li> <li>- 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 파보 바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증</li> <li>- 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 디스 템퍼바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증</li> <li>- 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 코로 나바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증</li> </ul> <p>○ 2 세부기관</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연물 유래 항바이러스제의 고양이 복막염 바이러스에 대한 항 바이러스 효능 검증</li> <li>- 천연물 유래 항바이러스제 제형에 따른 항바이러스 효능 검증</li> </ul>						
		<p>○ 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 대량 생 산 및 역가 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개 인터페론 람다 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡 터의 quality control (QC) 확인 및 유전자 서열 확인</li> <li>- 제한 효소를 이용한 재조합 아데노바이러스 벡터 유전자의 linearization 및 Adeno-X 293T 세포주로의 transfection을 통</li> </ul>						

		<p>한 passage 1 (P1) virus 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Infectious unit 측정을 통하여 P1 virus의 역가 측정 및 10 MOI의 P1 virus를 Adeno-X 293T 세포주로의 재감염을 통한 고농도의 P2 virus 확보</li> <li>- Infectious unit 측정을 통한 P2 virus의 역가 측정</li> <li>○ 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 파보바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증</li> <li>- 개 파보바이러스 및 이 바이러스에 대해 감수성이 있는 A72 세포주 확보 (ATCC로부터 분양 계획)</li> <li>- A72 세포주의 계대배양을 통한 세포주 stock 준비</li> <li>- A72 세포주로의 개 파보바이러스 감염을 통한 고농도의 바이러스 확보 및 바이러스 stock</li> <li>- A72 세포주로의 개 파보바이러스 감염 이후 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스 처치를 통한 바이러스 억제 확인/비교</li> <li>○ 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 디스토펜바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증</li> <li>- 개 디스토펜바이러스 및 이 바이러스에 대해 감수성이 있는 MDCK 세포주 확보(ATCC로부터 분양 계획)</li> <li>- MDCK 세포주의 계대배양을 통한 세포주 stock 준비</li> <li>- MDCK 세포주로의 개 디스토펜바이러스 감염을 통한 고농도의 바이러스 확보 및 바이러스 stock</li> <li>- MDCK 세포주로의 개 디스토펜바이러스 감염 이후 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스 처치를 통한 바이러스 억제 확인/비교</li> <li>○ 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 코로나바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증</li> <li>- A72 세포주로의 개 코로나바이러스 감염을 통한 고농도의 바이러스 확보 및 바이러스 stock</li> <li>- A72 세포주로의 개 코로나바이러스 감염 이후 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스 처치를 통한 바이러스 억제 확인/비교</li> <li>○ 천연물 유래 항바이러스제의 제조</li> <li>○ 천연물 유래 항바이러스제의 고양이 복막염 바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증</li> <li>○ 천연물 유래 항바이러스제의 제형에 따른 항바이러스 효능 검증</li> </ul>
--	--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p><b>활용계획</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 반려동물용 바이러스성 전염병 치료제 개발을 위한 연구</li> <li>- 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스 시스템의 이용</li> <li>- 시험관 내 실험을 통하여 치료제에 감수성이 있는 바이러스 선발</li> <li>- 후속 연구를 통해 동물 모델에서 안전성 및 유효성 확보, 치료제에 대해 시제품 제작 및 사업화, 제품화를 통한 동물용 의약품 허가·승인</li> </ul>
----------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p><b>기대효과</b></p> <p><b>1) 기술적 측면</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 반려동물 바이러스성 전염병에 대해 대중적 치료를 대신할 항바이러스제 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 감염을 완화시키는 치료제의 효능 확인</li> <li>- 바이러스성 전염병 치료제 개발 플랫폼 구축</li> </ul> </li> <li>○ 다양한 바이러스에 대해 억제 가능한 인터페론 제제 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 다양한 바이러스에 대한 유효성 평가 실시</li> <li>- 재조합 아데노바이러스 개발 및 적용을 통한 장기적 치료효능 시스템 구축</li> </ul> </li> </ul> <p><b>2) 경제적 측면</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 단가를 낮게 생산할 수 있는 재조합 아데노바이러스 시스템 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생합성 단백질 제제에 비해 공급가를 저하</li> </ul> </li> <li>○ 백신 미접종 유기동물의 증가로 인해 바이러스성 전염병 폭발적 증가 예상 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 반려동물 및 유기동물 대상 치료제 수요의 증가 예상</li> </ul> </li> </ul> <p><b>3) 사회적 측면</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 반려동물 가구의 증가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 반려동물 의약품 시장의 발달</li> <li>- 하지만 현재까지도 반려동물용 바이러스 전염병 치료제 개발 및 보급 미약</li> </ul> </li> <li>○ 광범위하게 작용하며 낮은 단가로 생산할 수 있는 치료제 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 급성장하는 동물시장의 규모에 걸맞는 치료제 개발을 통한 동물복지 향상 기대</li> </ul> </li> </ul>				
국문핵심어 (5개 이내)	반려동물	바이러스성 전염병	인터페론 람다	천연물 유래물질	항바이러스 치료제
영문핵심어 (5개 이내)	Companion animal	Viral infectious disease	Interferon lambda	Natural product derivative	Antiviral therapeutics

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 종질지(80g/m<sup>2</sup>)]

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료

# 1. 연구개발과제의 개요

## ○ 반려동물의 바이러스성 전염병 관리 현황

- 현재 반려동물에서의 바이러스성 질병의 경우, 보편적으로 사용할 수 있는 효과적인 치료제가 개발되어 있지 않으며 백신접종을 통한 예방이 유일한 방어 수단임.
- 강아지에 대한 예방접종의 종류는 종합백신 (DHPPL), 코로나 장염, 켄넬코프, 인플루엔자 바이러스 그리고 광견병 바이러스가 현행되고 있으며 이 중 렙토스피라를 제외한 다른 질병들은 전부 바이러스성 전염병에 속함 (그림 1).
- 고양이에 대한 예방접종의 종류는 혼합백신 (FVRCP), 광견병, 복막염 그리고 백혈병이 현행되고 있으며 이 중 클라미디아를 제외한 다른 질병들은 전부 바이러스성 전염병에 속함 (그림 1).

강아지 예방접종	1차 (6주령)	2차 (8주령)	3차 (10주령)	4차 (12주령)	5차 (14주령)	6차 (16주령)
종합백신	●	●	●	●	●	
코로나 장염	●	●				
켄넬 코프(전염성 기관지염)			●	●		
광견병						●
인플루엔자(강아지독감)					●	●

고양이 예방접종	1차 (9주령)	2차 (12주령)	3차 (15주령)	4차 (18주령)
혼합백신	●	●	●	
광견병			●	● (경우에 따라 4차에 접종)
복막염(선택)			●	●
백혈병(선택)	●	●		

그림 1. 개와 고양이에 대한 예방접종의 종류 및 접종시기

- 하지만 백신을 접종하지 않거나 백신 후 항체가 형성되지 않은 반려동물이 전염성 바이러스에 노출이 되면 질병에 이환되기 쉬우며, 디스템퍼 바이러스, 파보바이러스, 코로나바이러스의 경우 치사율이 매우 높기 때문에 치료가 필요함.
- 현재 효율적인 치료제의 미비로 대증치료를 주로 실시하고 있으나 심한 구토와 설사, 식욕부진, 탈수, 저혈당이 발생하므로 장기간 동안 입원을 통한 적극적인 수액 링거요법이 필요하며, 2차적으로 장손상과 백혈구 감소에 따른 세균감염에 취약하므로 광범위 항생제 처치를 통한 패혈증을 예방하여야 함.
- 따라서 새로운 치료제를 개발한다면 백신과 더불어서 반려동물이 감염될 수 있는 바이러스성 질병을 더 효과적으로 관리할 수 있을 것임.



○ 유기견보호소의 현황 및 전염병으로 인한 피해

- 농림축산검역본부가 발표한 2019년 반려동물 보호·복지 실태조사 결과에 따르면 구조·보호된 유실·유기 동물은 13만 5,791마리로 전년 대비 12% 증가하였으며, 개 75.4%, 고양이 23.5%, 기타 1.1%로 조사됨. 유실·유기동물의 보호형태 현황은 2019년에 135,791마리로, 전년 대비 1만 마리가상 증가함. 구조·보호된 유실·유기동물은 분양 26.4%, 자연사 24.8%, 안락사 21.8%, 소유주 인도 12.1%, 보호 중 11.8% 순이며, 비율은 전년과 유사한 것으로 나타남 (그림 2).

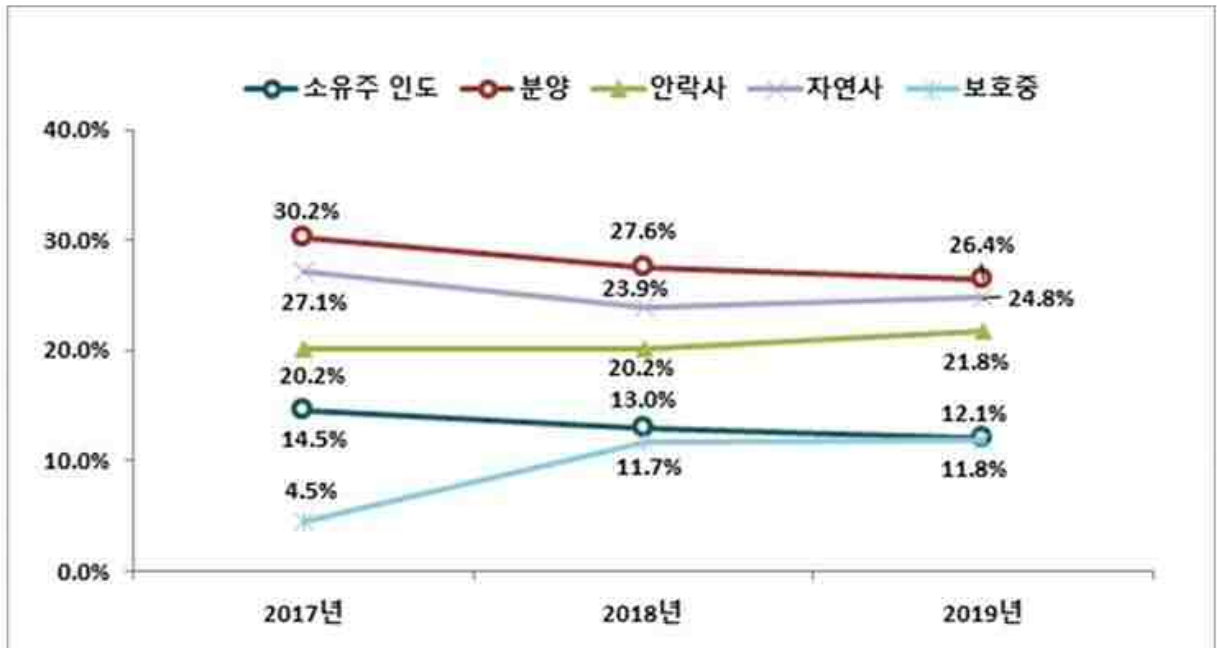


그림 2. 연도별 동물보호센터 유실·유기동물 주요 보호형태 현황

- 구조·보호된 유실·유기 동물은 작년보다 증가되었으며 13만 마리가 이상으로 측정됨. 그 중 분양되거나 보호 중인 개체의 비율은 2018년에 39.3%, 2019년에 38.2% 정도로 높은 수치를 보임. 유기견보호소에 있는 동물들의 경우 백신을 맞지 않은 개체가 많기 때문에 바이러스성 전염병에 취약하여 다양한 종류의 전염성 바이러스 질환에 이환될 가능성이 높음. 따라서 유기견보호소에 바이러스성 전염병이 노출되어 유실·유기 동물을 분양·보호를 하게 될 경우 이미 이환되어 있는 전염병에 대한 치료가 선행되어야 함.
- 서울시에서 농림축산검역본부에 의뢰해 실시한 한국동물구조관리협회 파보 바이러스 검사 결과를 보면 시료 30점 중 21점에서 파보 바이러스가 검출됨 (그림 3). 시료는 동물 시료 14점, 환경 시료 16점을 임의로 채취함. 이처럼 파보 바이러스가 곳곳에 분포하고 있기 때문에 건강한 개들이 보호소에 들어와 파보에 감염되어 폐사하는 경우가 많음. 또한 파보 바이러스의 경우 증상이 본격적으로 드러나지 않는 잠복기에도 개들은 파보 바이러스를 배출하기 때문에 파보 잠복기인 것을 모른 채 다른 곳으로 분양될 경우 이후에 증상이 나타나면 입원치료를 해야하며 치사율이 높기 때문에 보호자의 정신적, 경제적 피해가 큼.

- 따라서 유기견보호소에서 입양되는 동물들의 경우, 파보 바이러스 이외에도 코로나장염 바이러스, 디스토펜 바이러스, 전염성 간염 바이러스 등 여러 종류의 바이러스에 감염되어 있을 확률이 높으며 바이러스 감염 시의 치료를 위한 효율적인 치료제가 없기 때문에 대증치료에 의존해야 함. 새로운 치료제의 개발을 통해 유기견 입양 또는 보호 시에 발생하는 이러한 심각한 문제를 줄일 수 있을 것으로 사료됨.

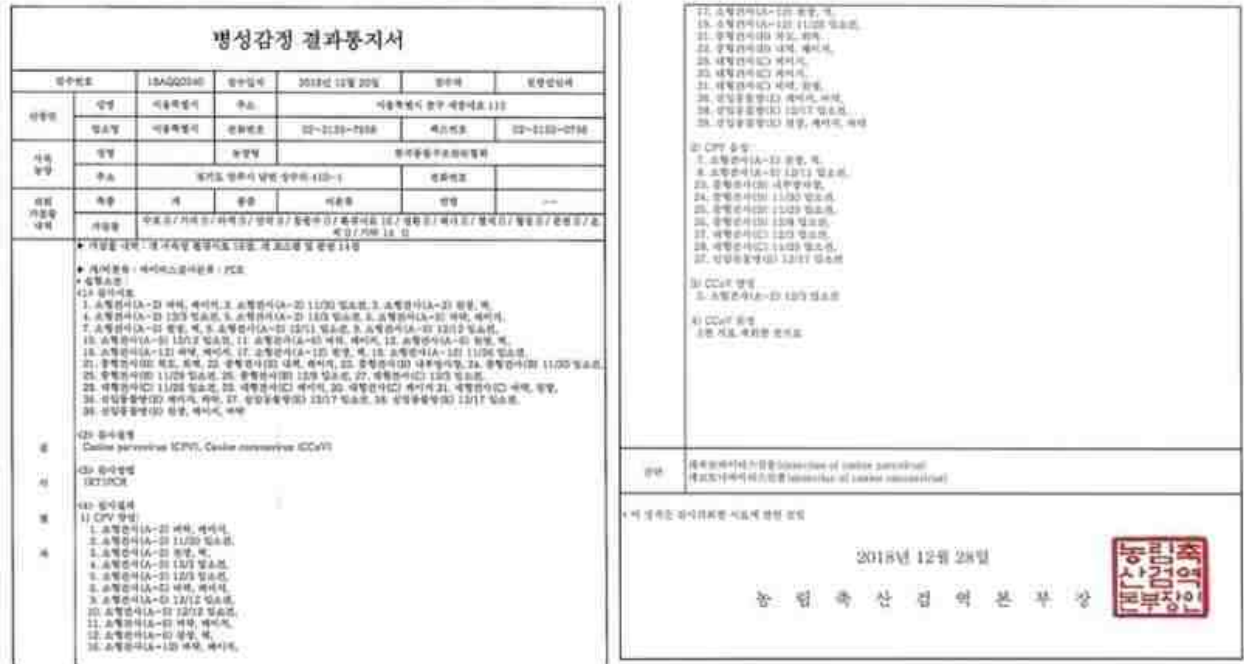


그림 3. 한국동물구조관리협회에서 실시한 바이러스성 전염병 병성감정 결과통지서

○ 새로운 항바이러스제 개발의 필요성

- 바이러스성 질병의 예방에 있어서 백신의 한계점은 1) 효과지속이 한정적이며 2) 변이에 취약하기 때문에 유행하는 혈청형이 변화할 경우 방어율이 낮고 3) 주기적으로 백신 접종을 하지 않으면 항체 형성률이 낮아 감염율이 증가할 수 있고 4) 유기동물 같은 백신 접종을 실시하지 못한 동물들이 질병에 노출될 시 감염에 취약하며 다른 동물들에게 전파시킬 수 있고 5) 아직 개발이 되어있지 않거나 상용화가 이루어지지 않은 질병의 경우 방어가 어렵다는 점임. 백신으로 바이러스성 질병을 예방하기에는 이러한 한계점이 있기 때문에 치료를 위한 항바이러스 치료제가 필요함.

- 치료용으로 효과가 입증되어 사용되고 있는 동물용의약품 중 항생제 및 항진균제가 있으나 바이러스성 감염의 치료에 대한 효과적인 동물용의약품은 상용화되어있지 않음. 따라서 다양한 바이러스에 사용가능한 광범위 항바이러스 치료제가 개발되어야 할 필요성이 있음.

2) 본 연구 기술의 우수성

- 본 연구에서 항바이러스 물질로 사용하고자 하는 인터페론은 바이러스가 감염되면 가장 먼저 발현되는 사이토카인으로 광범위하게 항바이러스성 기작들을 활성화시킴으로써 선천성 및 후천성 면역반응의 발현에 가장 중요한 영향을 미치는 사이토카인임.

- Type I 인터페론 (IFN-alpha, beta)은 바이러스 감염에 의해 발생이 유도되며, 인터페론 자극 유전자(Interferon stimulated gene, ISG) 발현을 유도함으로써 여러 종류의 항바이러스 단백질을 생성을 유도함. Type II 인터페론 (IFN-gamma)은 바이러스 감염에 저항하는 체액성 및 세포성 면역을 통해 후천성 면역을 유도하는 것으로 알려져 있음. Type III 인터페론 (IFN-lambda)은 바이러스 감염에 의해 발현이 유도되며, 특히 상피세포 계통에서 ISG를 유도할 수 있다는 것이 밝혀짐. 특히 type I IFN에 의해 유발될 수 있는 부작용이 감소하면서도 상피세포에서 강력한 항바이러스 작용을 유발하는 것으로 알려져 있음 (그림 4).

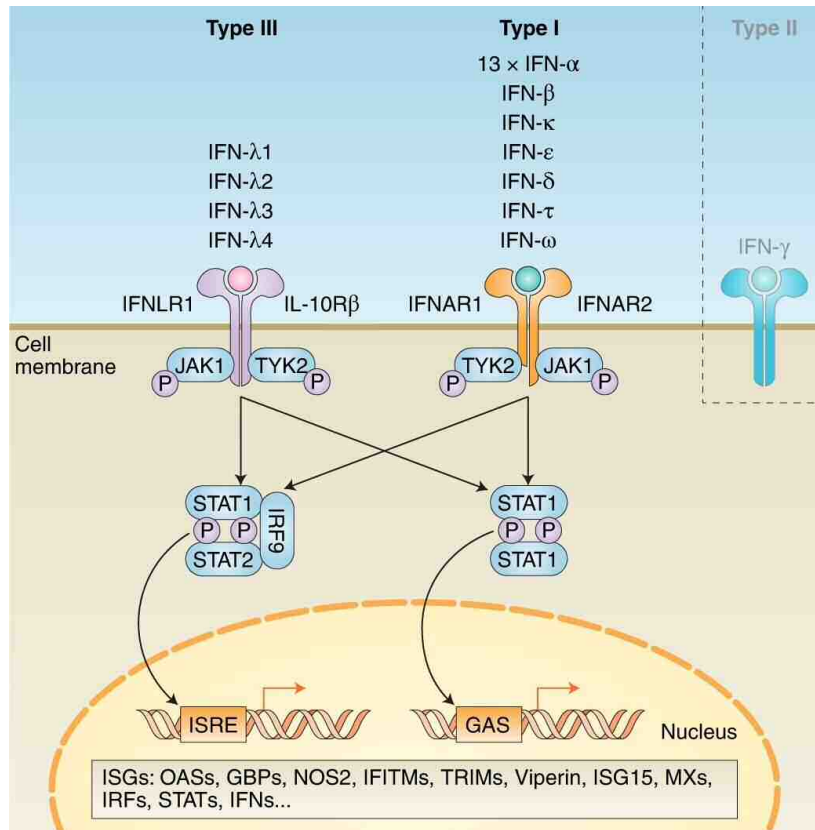
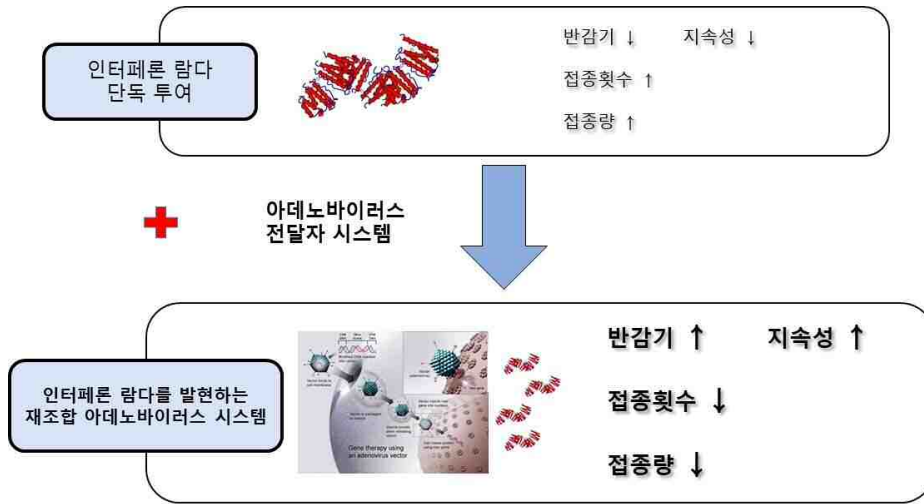


그림 4. Type I , Type III 인터페론의 신호 전달 체계

- Type I 인터페론이 부착하는 리셉터는 거의 모든 조직에 분포해 있기 때문에 전신적으로 선천성 면역 반응을 유도하여 과도한 염증반응에 의한 독감 유사증상, 두통 발열, 오한 등의 부작용이 유발될 수 있음.
- Type III 인터페론의 반응은 리셉터가 존재하는 상피세포와 면역세포에서 광범위하게 유발됨. Type III 인터페론인 인터페론 람다는 type I 인터페론과 유사하게 선천성 면역반응을 유도하여 항바이러스 기능을 발휘한다는 점과 불필요하게 과도한 염증 유발 등의 부작용이 발생할 가능성이 매우 적다는 장점이 있음.
- 본 연구를 통해 부작용이 최소화 되면서 강력한 선천성 면역반응을 효과적으로 유도 할 수 있는 type III 인터페론인 인터페론 람다를 단백질 제제가 아닌 아데노바이러스 벡터 시스템을 활용하여 광범위 항바이러스제 동물용의약품을 개발의 초석을 다지고자 함. 아데노바이러스 벡터 시스템을 이용하는 유전자 치료제의 경우 반감기가 짧은 생합성 단백질 제제의 단점을 보완할 수 있

으며 외래 단백질을 직접적으로 주입하는 방식이 아니라 체내에 존재하는 세포들이 단백질을 만들어 내도록 유도하는 방식이기에 인터페론에 대한 항체 형성이 될 가능성이 낮음.



- 2 세부기관 (큐벳(주))에서는 천연물인 말로터스 필리펜시스(mallotus philippensis)에서 항바이러스 효능이 있는 추출물을 분리하여 나노화, 리포솜화, PDA 코팅을 통해 안전성 및 유효성이 확보된 제제를 개발하였음.



그림5. 말로터스 필리펜시스 (mallotus philippensis)

### 3) 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 국내에서 동물용의약품으로 사용이 허가된 제품은 고양이 유래 재조합 오메가 인터페론인 항바이러스성, 항증식성, 면역조절 화합물인 Virbagen® Omega (Virbac)이 유일함 (그림 6).



그림 6. 국내에서 동물용의약품으로 승인된 인터페론 제제 Virbagen® Omega

- Virbagen® Omega는 개의 파보바이러스의 사망률과 임상 증상을 감소시키는 데에 사용되고, FeLV(Feline Leukemia Virus) 그리고 FIV(Feline Immunodeficiency Virus)에 감염된 고양이 치료하는 데에 사용됨.
- 유전자 조작에 의해 생산되는 고양이 유래 재조합 오메가 인터페론은 알파 인터페론과 관련된 제1형 인터페론임. 재조합 오메가 인터페론 작용의 정확한 메커니즘은 잘 알려져 있지 않지만 비특이적 방어역할을 포함할 수 있음. 하지만 개에 특이적으로 적용할 수 있는 인터페론 제제의 개발은 이루어지지 않음. 본 연구팀에서 개발한 항바이러스제와 기존에 출시된 Virbagen® Omega의 효능을 비교할 예정임.
- 그 외 반려동물 치료용으로 효과가 입증되어 사용되고 있는 동물용의약품은 항진균제 및 항생제 등이 있음. 세균성 및 진균성 감염병 치료를 위한 항생제 및 항진균제가 많이 개발되어 쓰이고 있지만 바이러스성 감염병의 치료를 위한 동물용의약품은 연구가 부진한 현황임.

○ 시장현황

- 국내 동물용의약품 등 시장 규모는 지난 해 약 1조원으로 2011년 대비 60% 이상 대폭 성장하였음 (그림 6).



그림 7. 동물용의약품 시장의 성장률 및 국내외 주요 통계

- 하지만 반려동물 시장규모에 비해 반려동물에 대한 동물용의약품 시장은 국내에서 비중이 낮음.

바이러스성 전염병에 대한 치료제 시장의 비율은 극히 낮은 편으로 급성장하는 반려동물 시장규모에 어울려 치료제의 개발이 필요한 실정임 (그림 8).



그림 8. 반려동물 시장규모는 급성장하고 있지만 국내 반려동물 의약품 시장은 낮게 측정됨

### ○ 지식재산권현황

- 국내 학회 및 학술지에 게재된 논문을 “인터페론 항바이러스제”로 검색한 결과(Google scholar) 약 4,100개가 검색됨. 하지만 “반려동물 항바이러스제”로 검색결과는 9개 뿐이며 주제가 정확히 일치하는 논문이 1개 있음.
- 반려동물 중 가장 많은 비중을 차지하고 있는 개와 고양이에게 치명적인 질병을 유발하는 바이러스 즉, canine distemper virus (CDV), canine parvovirus (CPV), feline calicivirus (FCV)에 대하여 항바이러스 활성을 갖는 천연물질에 대한 연구들을 조사한 논문이 있음 (Kang, B. K., et al, 2019).
- 그 외에 ‘항바이러스제’에 관한 논문들은 대부분 간염 바이러스, 코로나 바이러스 그리고 인플루엔자 바이러스의 치료제 또는 항바이러스 스크리닝 방법에 관한 것임.
- 항바이러스제에 관한 국내출원 특허를 검색한 결과 동물 세포 감염 바이러스에 대한 항바이러스제가 등록되어 있음 (출원번호/일자 : 1020070094861 (2007.09.18.)).
- 그 외에도 항바이러스 효과를 발휘하는 것으로 확인된 화합물(바이러스 헤마글루티닌 및/또는 뉴라미니다제 효소 활성의 모듈레이터)에 관한 특허(출원번호/일자 : 1020177009217 (2015.09.07.))와 바이러스 복제, 특히 C형 간염 바이러스 복제의 강력하고 및/또는 선택적인 억제제인 4-아미노-4-옥소부타노일 펩티드에 관한 특허(출원번호/일자 : 1020117015962 (2009.12.10.))가 있음.
- 반려동물 분야에서 쓰일 수 있는 항바이러스제에 대한 연구가 거의 진행되어 있지 않음. 반려동물 시장의 성장에 맞추어 반려동물에게 최적화된 새로운 항바이러스 치료제에 대한 연구가 더욱 진행되어야 함.

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 인터페론의 항바이러스 효과는 많은 연구를 통하여 인체에 감염하는 바이러스 치료제로 검증된 바가 있음. 연구를 통하여 검증된 인터페론 항바이러스 제제들은 개발단계와 임상시험 단계 중에 있음 (표 1).

표 1. 연구를 통하여 검증된 인터페론 항바이러스 제제

Interferon	Form	Clinical Uses	Status	Reference
IFN-α-2a	recombinant	leukemia, melanoma, kaposi's sarcoma	approved (Roferon-A)	(Cascinelli et al., 2001)
IFN-α-2a	pegylated	chronic HBV, chronic HCV, HPV (condylomata acuminata)	approved (Pegasys)	(McHutchison et al., 2009; Reichard et al., 1998)
IFN-α-2b	recombinant	leukemia, melanoma, multiple myeloma, carcinoid tumor, chronic HBV, chronic HCV, Bechet's disease	approved (Intron-A)	(Janassen et al., 2005; Yao et al., 2017)
IFN-α-2b	pegylated	chronic HCV, melanoma	approved (Pegintron)	(Eggermont et al., 2006; Hansson et al., 2011; Lau et al., 2005; Manns et al., 2001; McHutchison et al., 2009)
IFN-β-1a	recombinant	multiple sclerosis	approved (Avonex, Rebif)	(Hauser et al., 2017; Kappos et al., 2015)
IFN-β-1a	pegylated	multiple sclerosis	approved (Plegridy)	(Khan et al., 2015; Newsome et al., 2016)
IFN-β-1b	recombinant	multiple sclerosis	approved (Betaseron, Actoferon)	(Bayas and Gold, 2003)
IFN-λ-1a	pegylated	chronic HDV	phase 2, completed 12/18	NCT02765802
IFN-λ-1	pegylated	chronic HCV	phase 1, completed 10/09	NCT00565539
IFN-λ-1	pegylated	HBV	phase 2, completed 12/13	NCT01204762 (Phillips et al., 2017)

- 인체에 쓰이는 인터페론은 재조합 단백질에 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol, PEG)이라는 고분자에 결합시켜 인터페론의 안정성을 높이는 방식을 이용함.
- 인터페론을 포함한 항바이러스제는 반려동물에서 실험적으로 사용되고 있음. 주로 인체용으로 허가가 되어있는 인터페론을 포함한 다양한 항바이러스제를 실험적으로 반려동물 및 산업동물에 약물의 농도를 줄여 투여하여 그 효능을 평가하고 있음 (표 2). 즉, 반려동물에 최적화 되어 있는 동물용의약품의 개발은 부진한 상황임. 본 연구진에서는 동물에서 나타날 수 있는 다양한 바이러스성 질환에 대해 항바이러스 효과가 입증된 인터페론 제제를 응용하여 반려동물에 대한 특이적인 동물용의약품을 개발하고자 함 (표 3).

표 2. 인체용으로 개발된 항바이러스제 중 반려동물에 사용가능한 항바이러스제의 종류 및 적용

Drug	Viral target	Viral indication	Brand
Idoxuridine	Herpesvirus	- Herpetic keratitis	Stoxil®, Herplex®, Dendrid® (human)
Vidarabine	DNA viruses selected RNA tumor viruses	- Herpetic keratitis	Vira-A® (human)
Acyclovir	DNA viruses Herpesvirus	- Pacheco's disease in birds - Feline corneal or conjunctival herpes infections.	Zovirax® (human)
Ribavirin	DNA and RNA viruses (Broad spectrum)	- Feline calicivirus	Rebetol®, Ribasphere®, RibaPak® (human) Riboxcare® (doxycycline+ribavirin)

			/pig, cow, chicken)
Zidovudine (AZT)	Retrovirus	- Feline immunodeficiency virus (FIV) - Feline leukemia virus (FeLV)	Retrovir® (human)
Oseltamivir	Influenza virus A, B		Tamiflu® (human)
Interferon alpha-2 (human recombinant)		- Non-neoplastic feline leukemia virus-FeLV associated disease (low dose) - Feline infectious peritonitis (FIP) - Ocular herpes	Roferon-A® (human) Intron A® (human) Pegasys® (human)
Interferon bovine beta		- Non-neoplastic FeLV-associated disease (high dose) - Feline infectious peritonitis - Acute feline herpesvirus in kittens	
Interferon, feline recombinant		immunostimulation Canine parvovirus (CPV) FeLV and or FIV	Virbagen® Omega (dog, cat)

표 3. 인터페론의 항바이러스성 효능 평가 실험

Virus	Compound	Animals	Route of administration	Findings	Reference
BVDV	Human IFN- $\alpha$	Five Holstein PI heifers	Intramuscular	No antiviral activity detected. Development of microcytic anemia in treated animals	Peek <i>et al.</i> (2004b)
BVDV	Human IFN- $\alpha$	Six Holstein PI cows	Orally or intramuscular	No decrease in mean viral titer detected	Kohara <i>et al.</i> (2009)
BVDV	Bovine IFN- $\tau$	Six Holstein PI cows	Subcutaneous	Transient decrease in mean viral titer in treated cows	Kohara <i>et al.</i> (2012)
BVDV	DB772	Six PI crossbred beef calves	Intravenous	Virus could not be isolated from treated calves for 3–14 days. Virus isolated during treatment was resistant to the compound	Newcomer <i>et al.</i> (2012a)
BVDV	DB772	Eight miniature crossbred calves	Intravenous	Infection was prevented for at least 14 days in treated calves. Treatment associated with a risk of renal toxicity	Newcomer <i>et al.</i> (2013a)
FMDV	Bovine IFN- $\alpha$	Three Holstein calves	Adenovirus vector	No antiviral activity detected	Wu, <i>et al.</i> (2003)
FMDV	Porcine IFN- $\alpha$	Nine Holstein calves	Adenovirus vector	Clinical disease delayed and severity moderated in treated animals	
FMDV	Bovine IFN- $\lambda$	Four Holstein bulls	Adenovirus vector	Treatment induced a general antiviral state through the up-regulation of IFN-stimulated gene expression	Diaz-San Segundo <i>et al.</i> (2011)
FMDV	Bovine IFN- $\lambda$	26 Holstein steers	Adenovirus vector	Treatment-delayed disease for at least 6 days following intradermolingual challenge, and 9 days following aerosol challenge	Perez-Martin <i>et al.</i> (2012)
BHV-1	IFN- $\alpha$ or IFN- $\gamma$	20 Holstein or Hereford calves	Intravenous or intramuscular	Diminished suppression of natural cell-mediated cytotoxicity following viral challenge in treated animals	Ohmann and Babiuk (1985)
BHV-1	Bovine IFN- $\alpha$	Hereford calves	Intranasal	Treatment increased animals' ability to withstand secondary bacterial challenge	Babiuk <i>et al.</i> (1985)
BHV-1	HPMPC	11 Friesian bull calves	Subcutaneous	Treatment reduced disease severity but did not prevent viral shedding or establishment of latency	Gilliam and Field (1993)
BHV-1	Bovine IL-1	56 crossbred beef calves	Subcutaneous	Treatment increased number and activity of leukocytes but no difference in disease progression or severity	Baca-Estrada <i>et al.</i> (1995)
BLV	P2	35 cows and heifers	Intramuscular	Transient decrease in lymphocyte count; significant retraction of lymph nodes in 12 of 15 animals with lymphadenopathy	Marin <i>et al.</i> (1978)
BLV	Bovine IFN- $\tau$	Ten Japanese Black cows	Subcutaneous	Decrease in viral titer during treatment period or following treatment	Kohara and Yokomizo (2007)

BHV-1, bovine herpesvirus 1; BLV, bovine leukemia virus; BVDV, bovine viral diarrhea virus; FMDV, foot and mouth disease virus; IFN, interferon; IL, interleukin.

### ○ 시장현황

- 세계 동물용의약품 시장은 2015년에 \$12,614.3 million 규모로 집계되었으며 2022년까지 연간 7.7%의 성장을 보일 것으로 예측됨 (Global Animal Pharmaceuticals Market Size, Share, Development, Growth and Demand Forecast to 2022 발취) (그림 9).

- 세계 동물약품사료첨가제 시장의 규모는 지속적으로 증가하고 있으며, 평균 3.8%의 성장률을



보일 것으로 예측됨. 동물 관련 시장의 성장세는 2024년까지 평균 6.3%로 예측됨 (Regulations Trends & Global Forecasts; data bridge market research).

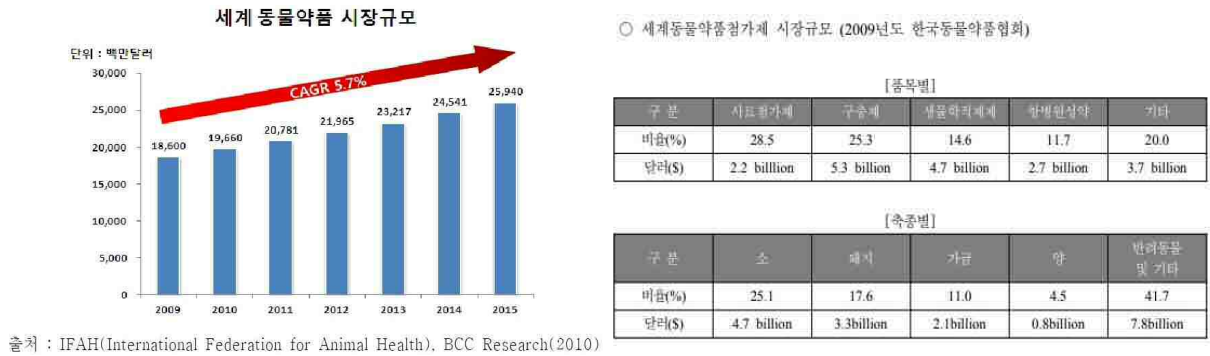


그림 9. 세계 동물용의약품, 약품첨가제 시장 예측  
(보건산업기술이전센터 2014; 한국동물약품협회, 2009)

- 중국은 2008년 이후 동물용의약품 관련시장이 매년 30%의 가파른 성장을 보임. 지난 2012년 동물용의약품 관련 생산판매액 및 총 생산액이 800억 위안(약14조원)에 달하였으며, 2014년에는 한국 시장보다 60배나 큰 35조원 규모에 달함. 이에 따라 중국으로 진출하는 다국적 기업의 경쟁이 치열함 (그림 10).

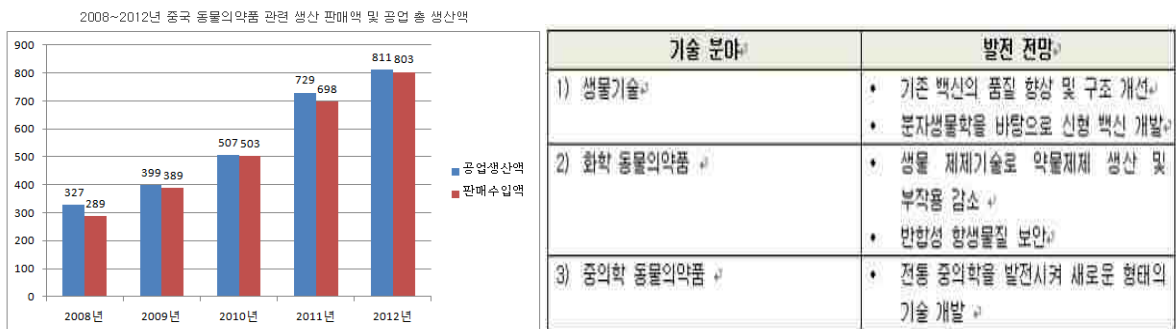


그림 10. 중국 동물용의약품 성장 및 기술 성장 전망  
(중국 QIAN ZHAN 산업연구원, 2014)

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### · 1세부과제 (연구기관 건국대학교)

#### 가. 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 대량 생산 및 역가 측정

○ 개 인터페론 람다 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터의 QC 확인 및 유전자 서열 확인

- 본 연구진에서는 선행연구를 통하여 개 인터페론 람다 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 생산하였음.

- 대장균 내에 재조합 아데노바이러스 벡터 유전자가 plasmid DNA 형태로 저장되어 있는 형태이며, 본 과제를 수행하기 위하여 대장균을 증폭시킨 후, maxiprep 과정을 통하여 대량의 plasmid DNA를 확보하였음.

- Maxiprep으로 추출한 plasmid DNA에 대한 퀄리티 확인 (QC) 및 유전자 서열 확인 (sequencing)을 진행하였음.

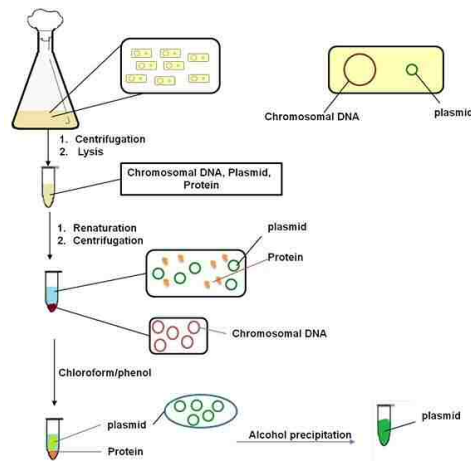


그림 11. 재조합 아데노바이러스 plasmid DNA를 대량으로 확보하기 위한 maxiprep 과정

○ 제한 효소를 이용한 재조합 아데노바이러스 벡터 유전자의 linearization 및 Adeno-X 293T 세포주로의 transfection을 통한 P1 virus 확보

- Maxiprep으로 추출한 plasmid DNA에는 대장균 내 증폭을 위한 유전자를 포함한 원형의 DNA 상태임.

- 이를 감염력이 있는 아데노바이러스 유전자 (Infectious cDNA)로 변환시키기 위하여 제한 효소를 이용해야함.

- 본 연구진에서 선행연구를 통하여 만든 재조합 아데노바이러스 벡터 plasmid의 경우, Pac I 제한효소 처리를 하면, 양 끝 말단에 inverted terminal repeats (ITR) 염기서열이 노출되어 감염력이 있는 아데노바이러스 유전자로 변환시킬 수 있음.

- Pac I 제한효소를 통해 선형화시킨 재조합 아데노바이러스 유전자를 transfection reagent (GenePORTER 3000)을 통해 Adeno-X 293T 세포주에 감염시켰음.

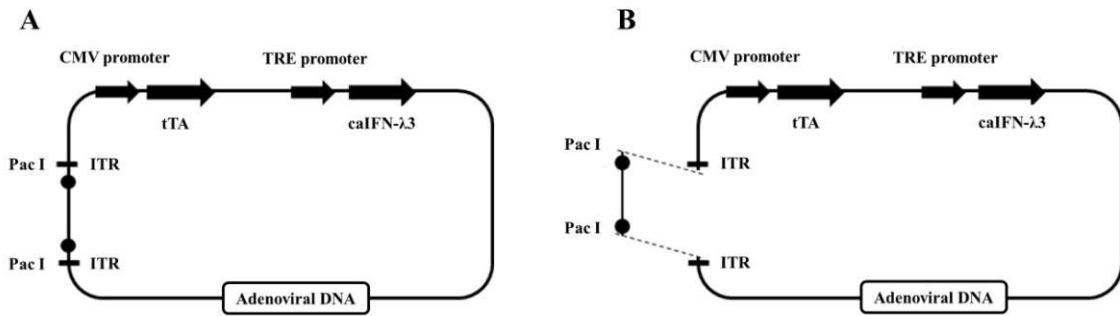


그림 12. 본 연구진에서 제작한 tetracycline operator system이 적용된 아데노바이러스 벡터의 모식도 (A). Pac I 제한효소를 이용하여 Adeno 293T 세포주에 감염력이 있는 재조합 아데노바이러스에 대한 cDNA를 생산할 수 있음 (B).

○ Infectious unit 측정을 통하여 P1 virus의 역가 측정 및 10 MOI (10 ifu/cell)의 P1 virus를 Adeno-X 293T 세포주로의 재감염을 통한 고농도의 P2 virus 확보

- Adeno-X 293T 세포주에 선형화시킨 재조합 아데노바이러스 유전자 감염 7일 후, 원심분리를 이용하여 cell pellet을 PBS 500 $\mu$ l에 농축한 후 freeze-thaw cycle 3회를 통해 세포 내부에 있는 재조합 아데노바이러스를 확보함 (P0).

- Adeno-X 293T 세포주가 70~80% 정도 자란 25T flask에 P0 바이러스 250 $\mu$ l를 접종한 후 세포변성효과(CPE)가 50% 이상 나타나면 바이러스를 수거함. 이를 P1 바이러스라 칭함.

- P1 바이러스의 역가를 측정하기 위하여 Adeno-X Rapid Titer Kit (Cat. No. 632250, Clonetech)을 이용함. 이는 anti-hexon 항체를 이용하여 직접적으로 재조합 아데노바이러스 입자를 수치화 할 수 있는 키트로 infectious unit을 산정할 수 있음.

- Infectious unit 측정을 완료한 P1 virus를 통해 10 MOI의 농도로 새로운 Adeno-X 293T 세포주에 바이러스를 감염시킴. 이 때 아데노바이러스의 수득율을 높이기 위해 doxycycline을 10 ng/ml 처리하여 개 인터페론 램다의 발현을 억제함. MOI는 세포 1개당 10개의 바이러스 입자를 감염시키는 것을 의미함.

○ Infectious unit 측정을 통한 P2 virus의 역가 측정

- P1을 Adeno-X 293T 세포주에 감염시켜 얻은 P2의 역가를 측정함. 이 때 아데노바이러스의 수득율을 높이기 위해 doxycycline을 10 ng/ml 처리하여 개 인터페론 램다의 발현을 억제함. 최종적으로 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> IFU/ml의 P2 바이러스를 확보할 수 있도록 함.

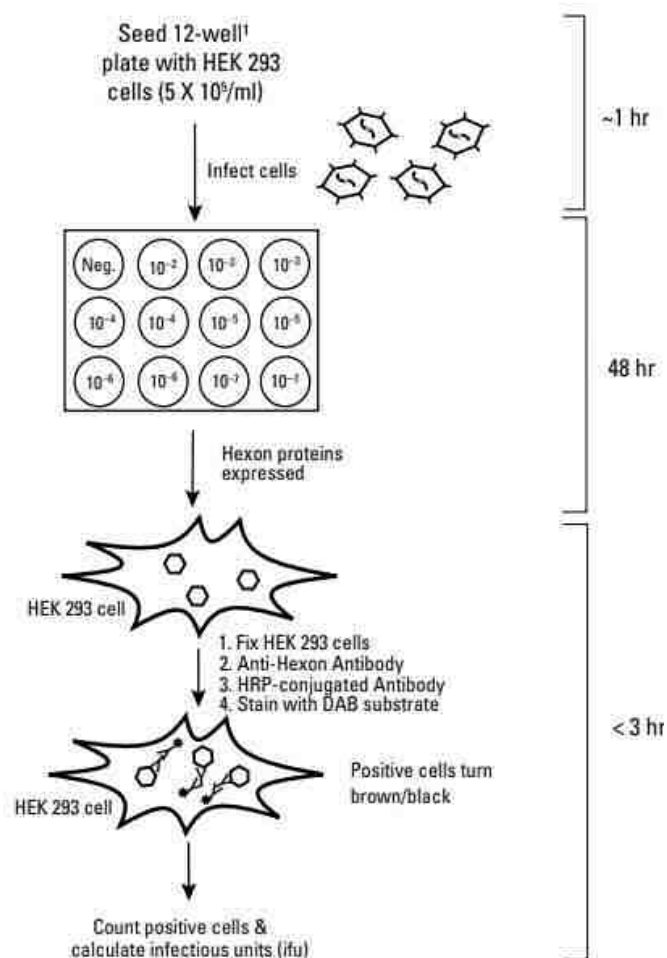


그림 13. Adeno-X Rapid Titer Kit를 이용한 infectious unit의 측정 방법

나. 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 파보바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증

- 개 파보바이러스의 분양 및 이 바이러스에 대해 감수성이 있는 A72 세포주 분양
  - 시험관 내 개 파보바이러스에 대한 감염 실험을 위하여 개 파보바이러스와 A72 세포주를 분양받았음.
  - 개 파보바이러스 1형에서 변이가 되어 현재 문제시 되고 있는 개 파보바이러스 2형을 분양 받아 실험을 진행할 예정이며, 개의 종양(fibroma)에서 분리한 A72 세포주를 분양받아서 감염 실험을 진행하였음.
  
- A72 세포주의 계대배양을 통한 세포주 stock 준비
  - 지속적인 감염 실험을 진행하기 위하여 분양받은 A72 세포주를 계대배양하여 10 vial 이상 (vial 당 1mL) 생산 후, 질소탱크 내에 저장하였음.
  
- A72 세포주로의 개 파보바이러스 감염을 통한 고농도의 바이러스 확보 ( >10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml ) 및 바이러스 stock
  - 0.01 ~ 0.1 MOI의 농도로 개 파보바이러스를 A72 세포주에 감염 후, 2~3일 뒤 개 파보바이러스를 분리·농축하였음.

- 최종적으로  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml 이상의 바이러스를 확보하였음.

○ A72 세포주로의 개 파보바이러스 감염 이후 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스 처치를 통한 안전성 및 바이러스 억제 확인/비교

- 0.001 ~ 0.05 MOI의 농도로 A72 세포주에 개 파보바이러스를 감염

- 개 파보바이러스 감염시간을 기준으로 1일 전, 같은 시간대, 1일 후에 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 10 ~ 100 MOI의 농도로 처리하였음.

- A72 세포주로의 재조합 아데노바이러스 처리 3일 후, MTT 기법을 이용하여 세포 독성 평가를 진행하였음.

- 개 파보바이러스 감염 3일 후, 세포 상층액과 세포를 수거하여 real-time qPCR을 통해 바이러스 유전체의 양을 비교하여 TCID<sub>50</sub>을 통해 활성이 있는 바이러스의 역가를 비교하였음.

다. 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 디스토펜바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증

○ 개 디스토펜바이러스의 분양 및 이 바이러스에 대해 감수성이 있는 MDCK 세포주 분양

- 시험관 내 개 디스토펜바이러스에 대한 감염 실험을 위하여 개 디스토펜바이러스와 MDCK 세포주를 분양받음.

- 시험관 내 실험에 적용할 수 있는 cell culture-adapted 개 디스토펜바이러스를 분양받아 실험을 진행할 예정이며, 개 신장에서 유래한 종양세포인 MDCK 세포주를 분양받아서 감염 실험을 진행하였음.

○ MDCK 세포주의 계대배양을 통한 세포주 stock 준비

- 지속적인 감염 실험을 진행하기 위하여 분양받은 MDCK 세포주를 계대배양하여 10 vial 이상 (vial 당 1mL) 생산 후, 질소탱크 내에 저장하였음.

○ MDCK 세포주로의 개 디스토펜바이러스 감염을 통한 고농도의 바이러스 확보 ( $>10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml) 및 바이러스 stock

- 0.01 ~ 0.1 MOI의 농도로 개 디스토펜바이러스를 MDCK 세포주에 감염 후, 2~3일 뒤 개 디스토펜바이러스를 분리·농축하였음.

- 최종적으로  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml 이상의 바이러스를 확보하였음.

○ MDCK 세포주로의 개 디스토펜바이러스 감염 이후 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스 처치를 통한 안전성 및 바이러스 억제 확인/비교

- 0.001 ~ 0.05 MOI의 농도로 MDCK 세포주에 개 디스토펜바이러스를 감염

- 개 디스토펜바이러스 감염시간을 기준으로 1일 전, 같은 시간대, 1일 후에 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 10 ~ 100 MOI의 농도로 처리하였음.

- MDCK 세포주로의 재조합 아데노바이러스 처리 3일 후, MTT 기법을 이용하여 세포 독성 평가를 진행하였음.

- 개 디스토펜바이러스 감염 3일 후, 세포 상층액과 세포를 수거하여 real-time qPCR을 통해

바이러스 유전체의 양을 비교하고 TCID<sub>50</sub>을 통해 활성이 있는 바이러스의 역가를 비교하였음.

라. 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 코로나바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증

○ A72 세포주로의 개 코로나바이러스 감염을 통한 고농도의 바이러스 확보 ( >10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml ) 및 바이러스 stock

- 시험관 내 개 코로나바이러스에 대한 감염 실험을 위하여 개 코로나바이러스와 A72 세포주를 분양받음.

- 코로나 장염을 유발할 수 있는 *alphacoronavirus*에 속하는 개 코로나바이러스를 분양받음.

- 0.01 ~ 0.1 MOI의 농도로 개 코로나바이러스를 A72 세포주에 감염 후, 2~3일 뒤 개 코로나바이러스를 분리·농축하였음.

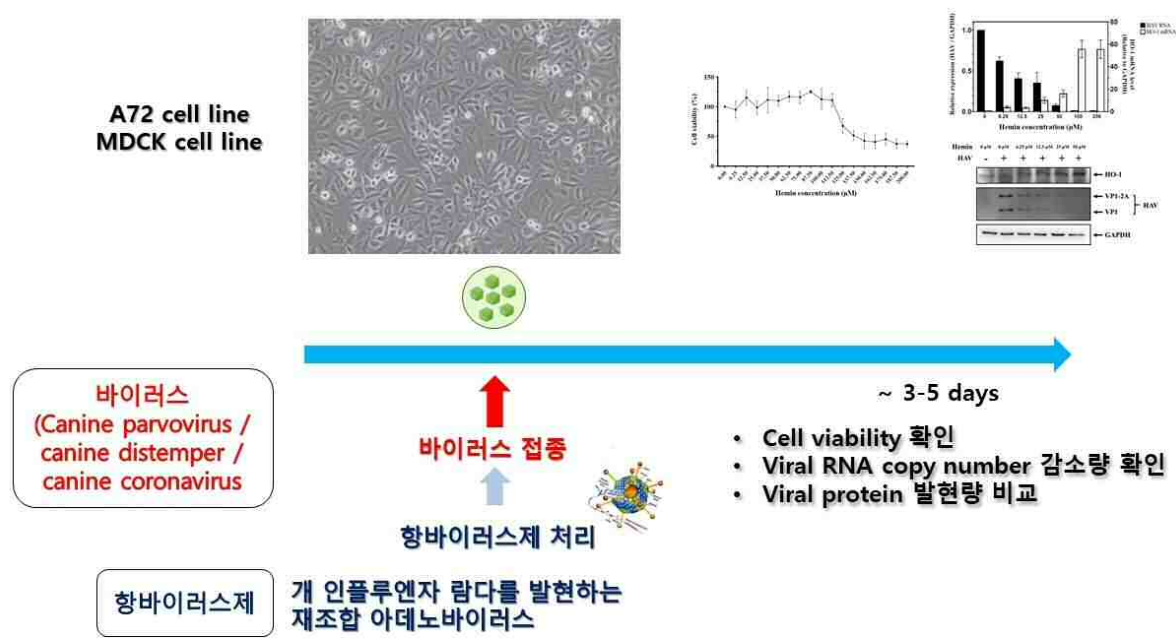
- 최종적으로 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml 이상의 바이러스를 확보하였음.

○ A72 세포주로의 개 코로나바이러스 감염 이후 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스 처치를 통한 바이러스 억제 확인/비교

- 0.001 ~ 0.05 MOI의 농도로 A72 세포주에 개 코로나바이러스를 감염

- 개 코로나바이러스 감염시간을 기준으로 1일 전, 같은 시간대, 1일 후에 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 10 ~ 100 MOI의 농도로 처리하였음.

- 개 코로나바이러스 감염 3일 후, 세포 상층액과 세포를 수거하여 real-time qPCR을 통해 바이러스 유전체의 양을 비교하고 TCID<sub>50</sub>을 통해 활성이 있는 바이러스의 역가를 비교하였음.

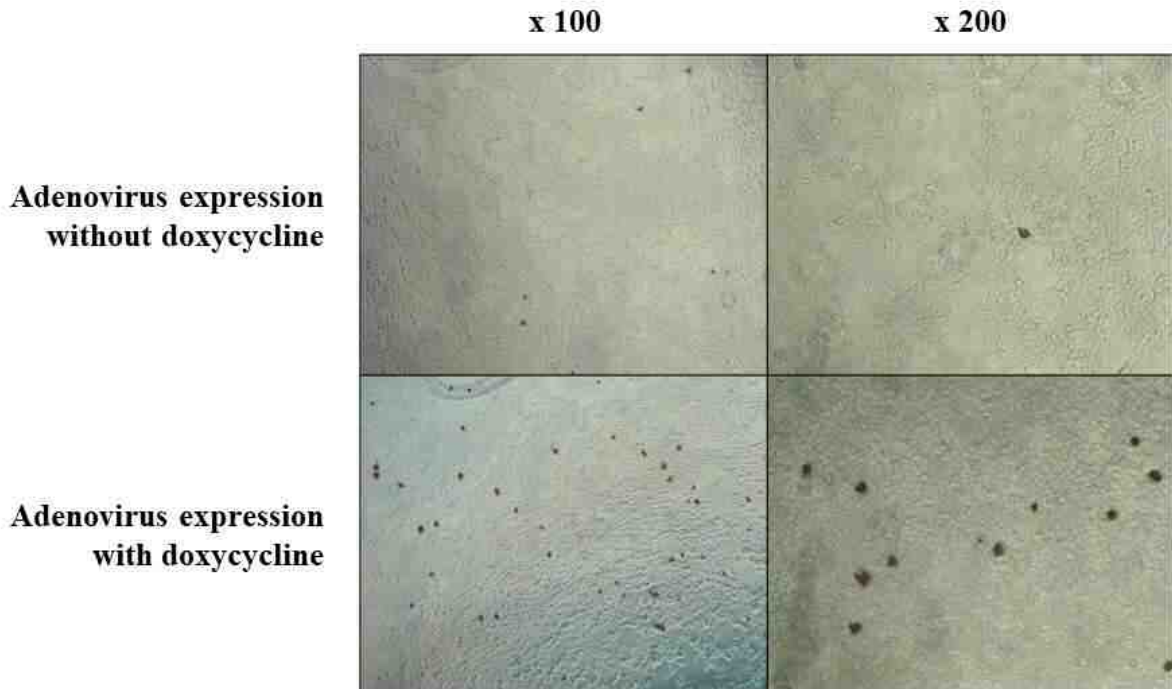


### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

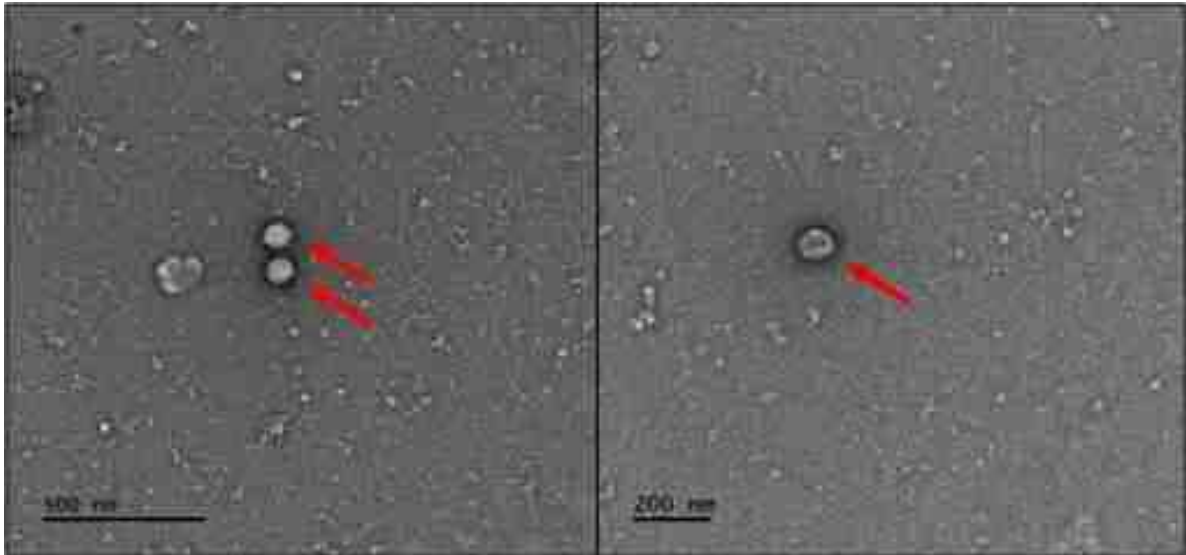
- 재조합 아데노바이러스의 제작 및 면역화학염색법을 통한 Adeno 293 세포주에서의 아데노바이러스 단백질 확인
  - 개의 인터페론 람다-3을 함유하고 있는 재조합 아데노바이러스를 Adeno 293 세포주를 통하여 생성하였음.
  - 세포변성효과(CPE, Cytopathic effect)가 나타나는 것을 통하여 충분한 양의 재조합 아데노바이러스가 형성되었음을 예상하였으며 면역화학염색법(IHC, Immunohistochemistry)를 이용하여 감염력이 있는 재조합 아데노바이러스의 입자 수(IFU, Infectious unit)를 계산하였음.
  - 발현되는 개의 인터페론 람다-3 단백질에 의하여 재조합 아데노바이러스의 수율이 감소하는 현상을 방지하기 위하여 고수율의 아데노바이러스를 확보하기 위하여 doxycycline을 1 µg/ml의 농도로 처리하였음.
  - 결과적으로 doxycycline을 처리하지 않은 Adeno 293 세포주 및 doxycycline을 1 µg/ml의 농도로 처리한 Adeno 293 세포주에서 모두 재조합 아데노바이러스의 단백질이 IHC를 통하여 확인이 되었음.
  - Doxycycline을 통하여 인터페론의 발현을 억제한 Adeno 293 세포주에서 더 많은 양의 재조합 아데노바이러스가 형성된 것을 확인할 수 있었음. 이를 통해 약  $5 \times 10^8$  IFU/ml의 재조합 아데노바이러스를 확보하였음.



< IHC를 통하여 확인한 재조합 아데노바이러스 단백질의 발현. Doxycycline을 처방할 경우 더 많은 양의 재조합 아데노바이러스를 확보할 수 있었음 >

■ 투과전자현미경(TEM, Transmission electron microscope)을 이용한 재조합 아데노바이러스 입자 형성 확인

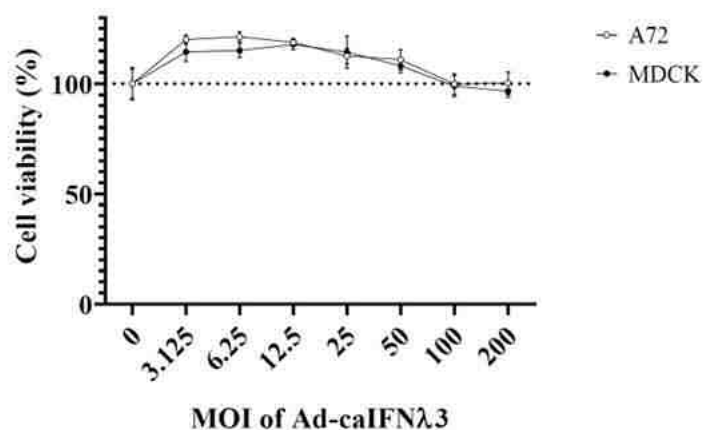
- 전자현미경 상 재조합 아데노바이러스 입자 형성을 확인하기 위하여 TEM을 이용하였음.
- 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 TEM을 촬영하였으며 약 80 ~ 100nm 정도 입자 크기의 재조합 아데노바이러스가 형성되었음을 확인할 수 있었음.



< TEM을 이용하여 확인한 재조합 아데노바이러스 입자 >

■ 재조합 아데노바이러스에 의한 목적 세포에서의 세포 독성 확인

- 본 연구과제를 통하여 생산한 재조합 아데노바이러스는 자체적으로 복제를 진행할 수 없는 독성이 없는 바이러스임. 이는 복제에 필수적인 요소가 함유되어 있는 Adeno 293 세포주에서만 복제가 가능함.
- 하지만 재조합 아데노바이러스의 복제 기능이 돌아오거나 (RCA), 생성되는 개 인터페론 람다 단백질의 독성에 의하여 목적 세포에서 독성이 유발될 수 있음.
- 치료제 효능을 확인하고자 하는 개 유래 타겟 세포(A72 세포주 및 MDCK 세포주)에서 재조합 아데노바이러스에 의한 독성이 유발되는 지를 확인하기 위하여 MTT assay를 진행하였음.
- 결과적으로 200 MOI의 농도에서까지 재조합 아데노바이러스의 독성이 관찰되지 않았음.

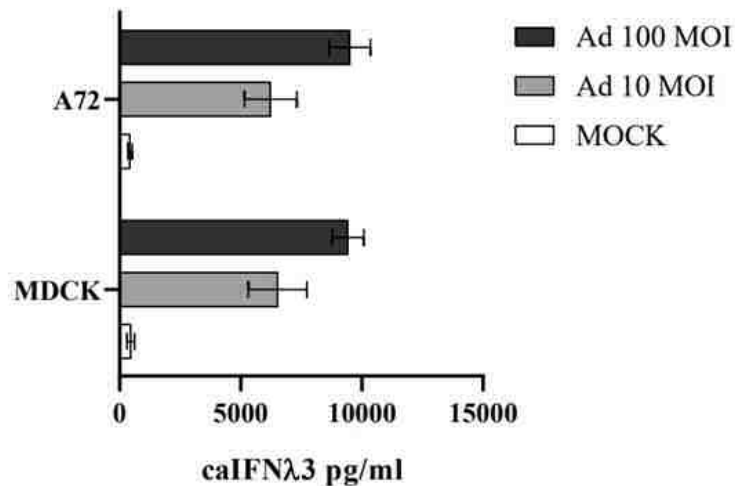


< 목적세포인 A72 및 MDCK 세포주에서의 재조합 아데노바이러스에 의한 독성 평가 >



■ 목적 세포에서의 재조합 아데노바이러스에 의한 개 인터페론 람다-3 발현의 확인

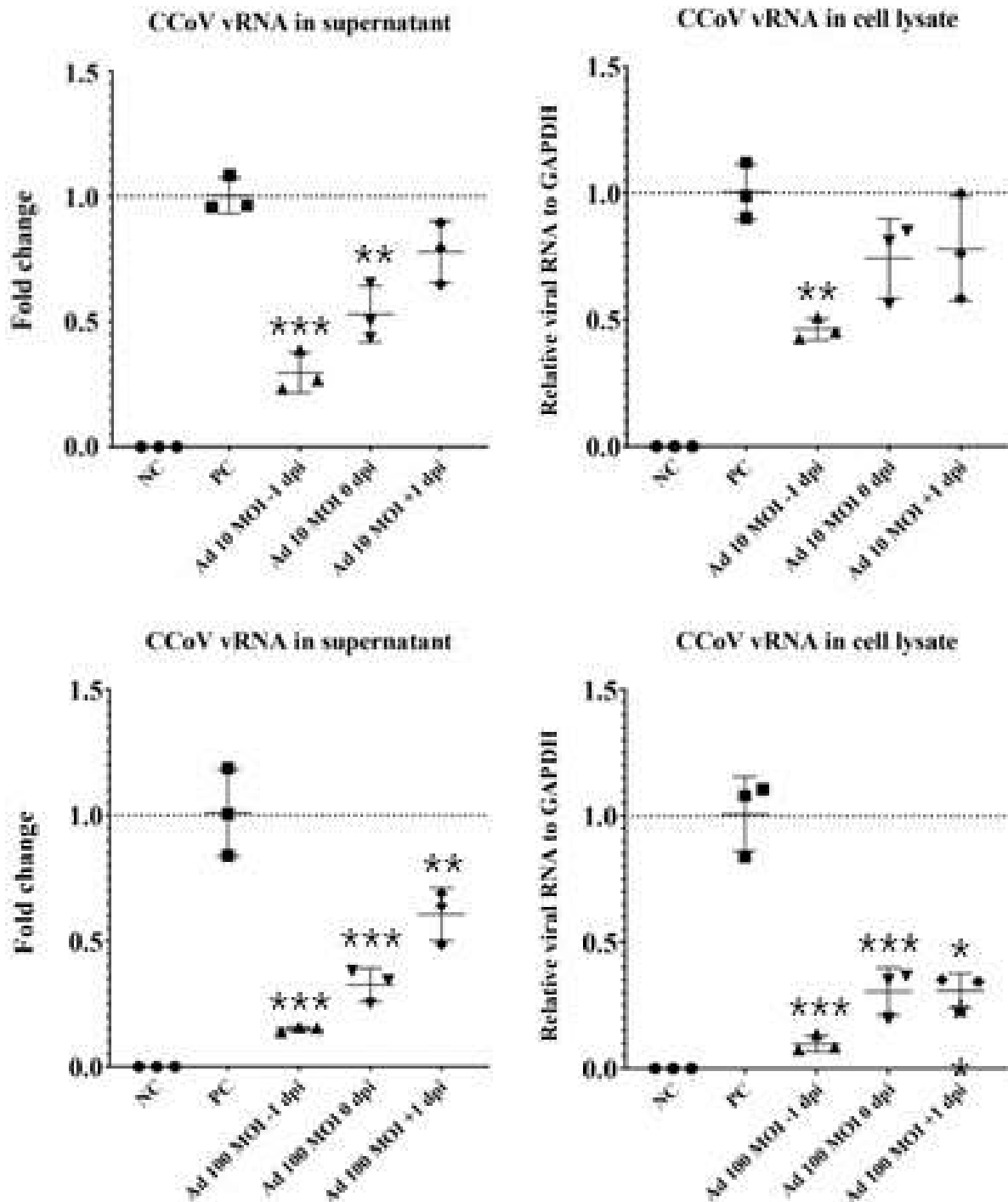
- 재조합 아데노바이러스를 목적세포에 10 MOI 및 100 MOI를 처리하여 함유하고 있는 개의 인터페론 람다-3 단백질이 발현되는지를 확인하였음. 개의 인터페론 람다-3는 MyBioSource사의 MBS090056 제품을 이용하여 ELISA 기법을 이용하여 측정하였음.
- A72 및 MDCK 세포주에 10 MOI의 재조합 아데노바이러스를 처리한 경우 약 6,000 pg/ml의 개 인터페론 람다-3가 검출되었으며 100 MOI의 재조합 아데노바이러스를 처리한 경우 약 9,500 pg/ml의 개 인터페론 람다-3가 검출되었음.



< A72 및 MDCK 세포주에서 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 인터페론 람다-3 단백질 형성 확인 >

■ 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 코로나바이러스 vRNA 감소 확인

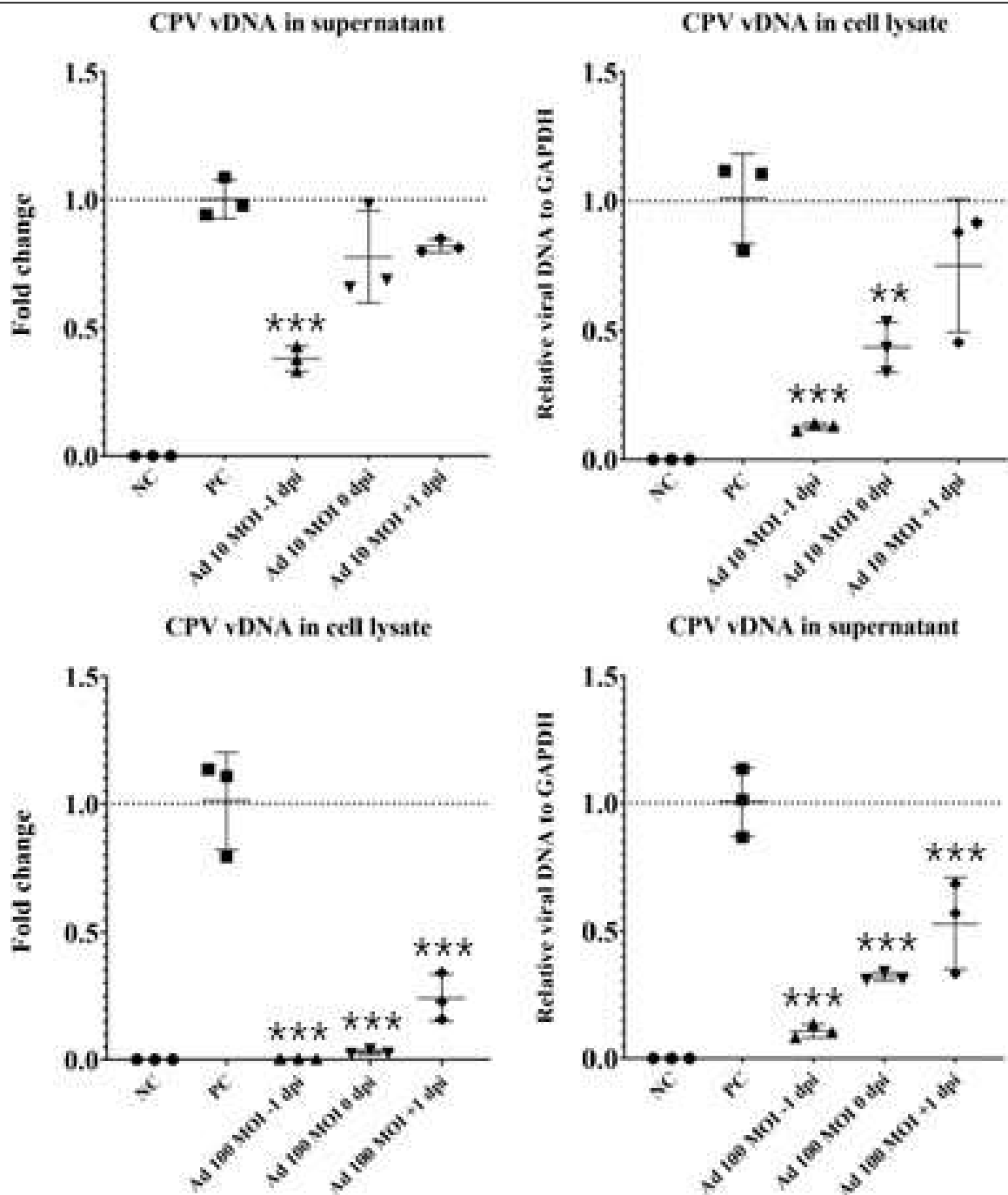
- 재조합 아데노바이러스에 의해 발현된 개의 인터페론 람다-3 단백질에 의하여 개 코로나바이러스의 감염력이 감소하는지를 확인하였음.
- 바이러스 감염 1일 전 (-1 dpi), 감염 당일 (0 dpi), 감염 1일 후 (1 dpi)에 재조합 아데노바이러스를 10 MOI 및 100 MOI의 농도로 처리하였음.
- 감염 3일 후 감염 세포 내 및 상층액에서 바이러스의 RNA량을 비교하였음.
- 바이러스의 RNA 양은 조건에 따라 다양하게 나타났으며 그 중 -1 dpi의 경우 세 종류의 바이러스에서 모두 유의미한 ( $p < 0.001$ ) 바이러스의 RNA량의 감소가 확인되었으며 상층액에 비하여 세포 내에서 더 큰 감소량을 확인할 수 있었음.



< 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 코로나바이러스 vRNA의 변화량 >

■ 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 파보바이러스 vDNA 감소 확인

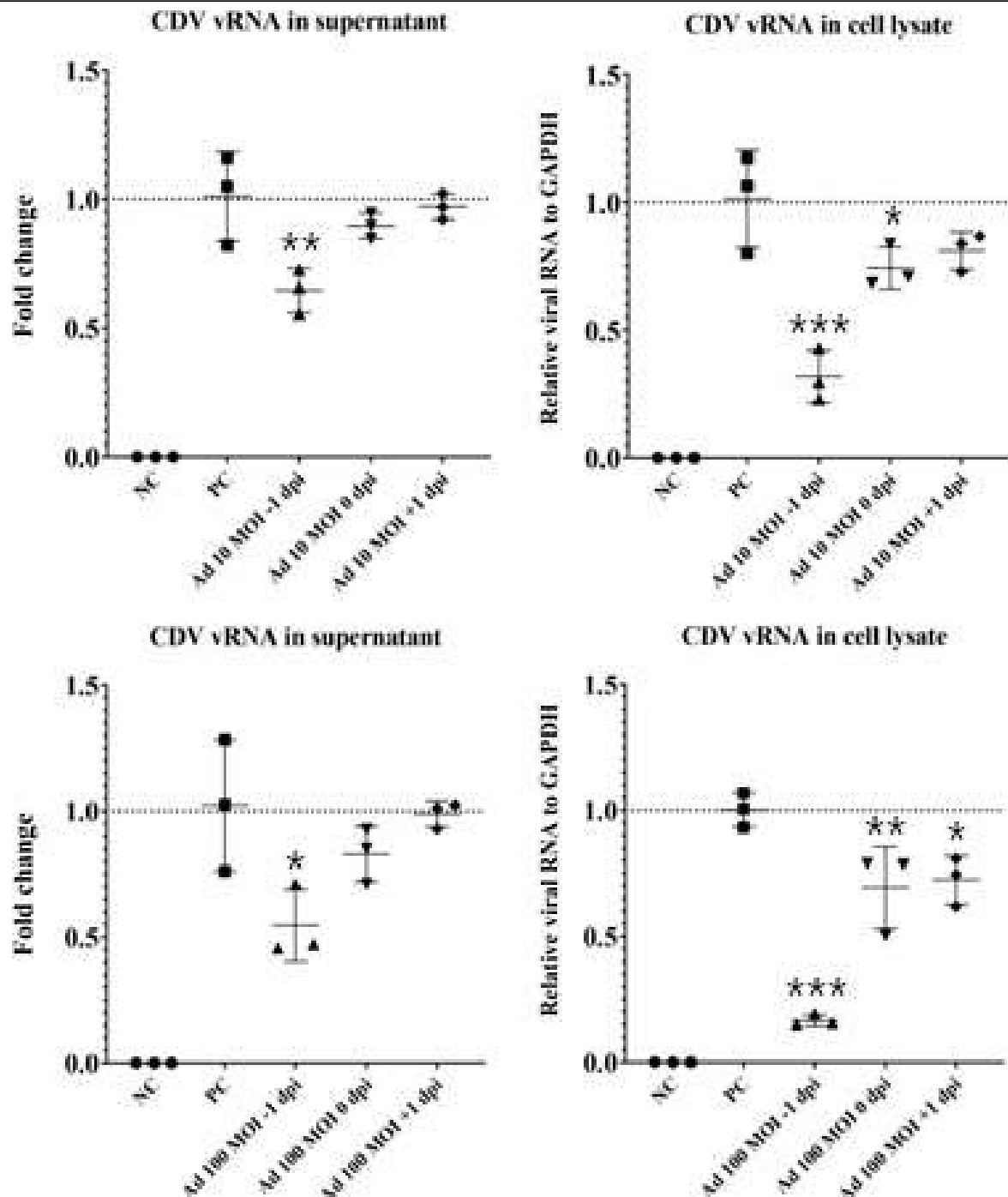
- 재조합 아데노바이러스에 의해 발현된 개의 인터페론 람다-3 단백질에 의하여 개 파보바이러스의 감염력이 감소하는지를 확인하였음.
- 바이러스 감염 1일 전 (-1 dpi), 감염 당일 (0 dpi), 감염 1일 후 (1 dpi)에 재조합 아데노바이러스를 10 MOI 및 100 MOI의 농도로 처리하였음.
- 감염 3일 후 감염 세포 내 및 상층액에서 바이러스의 DNA량을 비교하였음.
- 바이러스의 DNA 양은 조건에 따라 다양하게 나타났으며 그 중 -1 dpi의 경우 세 종류의 바이러스에서 모두 유의미한 ( $p < 0.001$ ) 바이러스의 DNA량의 감소가 확인되었으며 상층액에 비하여 세포 내에서 더 큰 감소량을 확인할 수 있었음.



< 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 파보바이러스 vDNA의 변화량 >

■ 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 디스토펜바이러스의 vRNA 감소 확인

- 재조합 아데노바이러스에 의해 발현된 개의 인터페론 람다-3 단백질에 의하여 개 디스토펜바이러스의 감염력이 감소하는지를 확인하였음.
- 바이러스 감염 1일 전 (-1 dpi), 감염 당일 (0 dpi), 감염 1일 후 (1 dpi)에 재조합 아데노바이러스를 10 MOI 및 100 MOI의 농도로 처리하였음.
- 감염 3일 후 감염 세포 내 및 상층액에서 바이러스의 RNA량을 비교하였음.
- 바이러스의 RNA량은 조건에 따라 다양하게 나타났으며 그 중 -1 dpi의 경우 세 종류의 바이러스에서 모두 유의미한 ( $p < 0.001$ ) 바이러스의 RNA량의 감소가 확인되었으며 상층액에 비하여 세포 내에서 더 큰 감소량을 확인할 수 있었음.

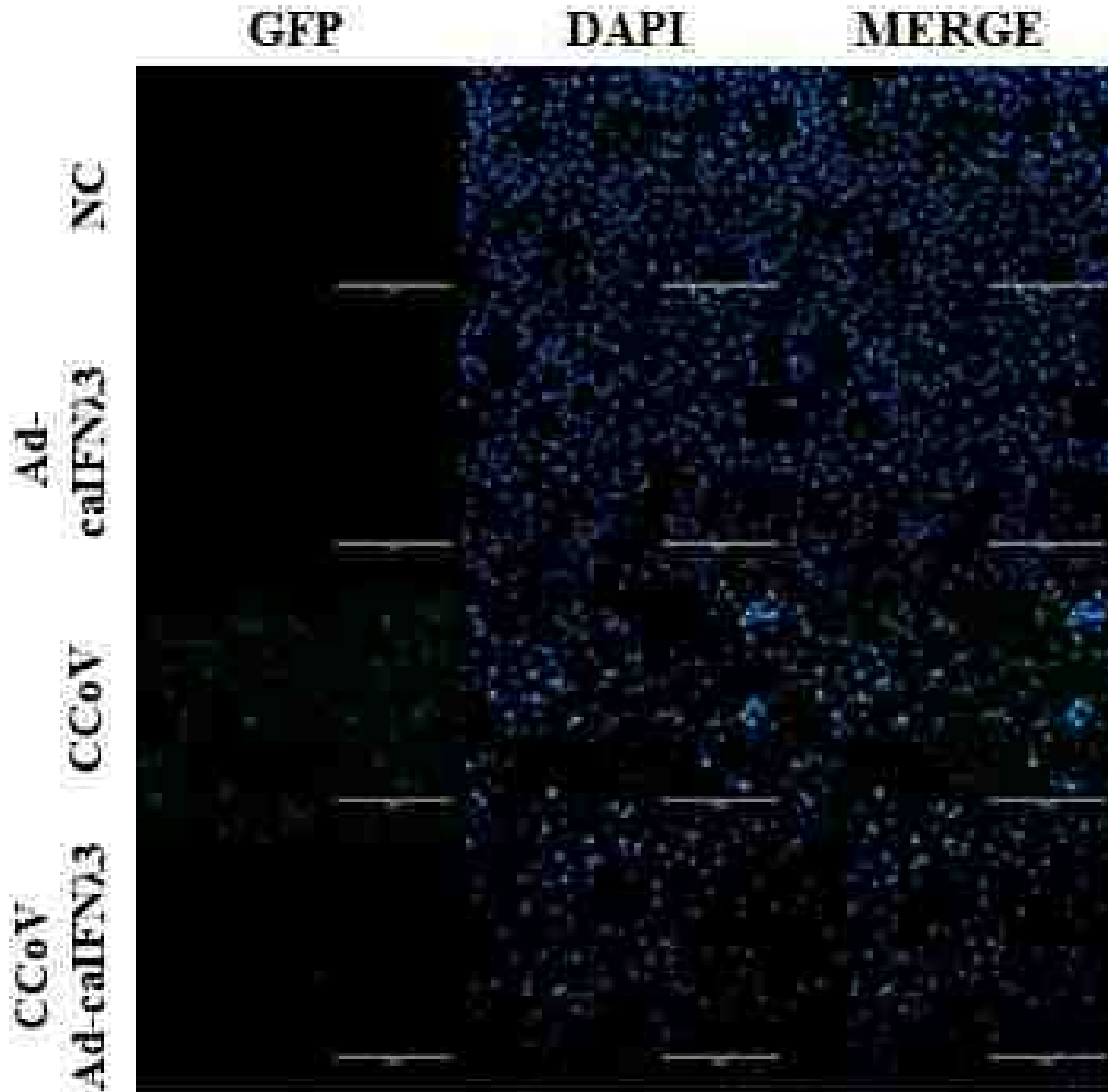


< 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 디스템퍼바이러스 vRNA의 변화량 >

■ 면역형광염색법을 이용한 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 코로나바이러스의 단백질 감소 확인

- 재조합 아데노바이러스에 의해 발현된 개의 인터페론 람다-3 단백질에 의하여 개 코로나바이러스의 감염력이 감소하는지를 확인하였음.
- 면역형광염색법(IFA, Immunofluorescence assay)을 통한 단백질 분석을 위하여 바이러스 감염 1일 전 (-1 dpi)에 재조합 아데노바이러스를 100 MOI의 농도로 처리하였음.
- 감염 1일 후 감염 세포 내에서의 바이러스의 단백질량을 IFA를 이용하여 비교하였음.
- 음성 대조군 및 재조합 아데노바이러스만 처리한 경우에는 바이러스 단백질이 확인되지 않았으며 개 코로나바이러스만 감염시킨 세포들에 비하여 -1 dpi에 재조합 아데노바이러스를 100 MOI 처리한 경우 바이러스 단백질의 형광이 감소한 것을 확인할 수 있었음.

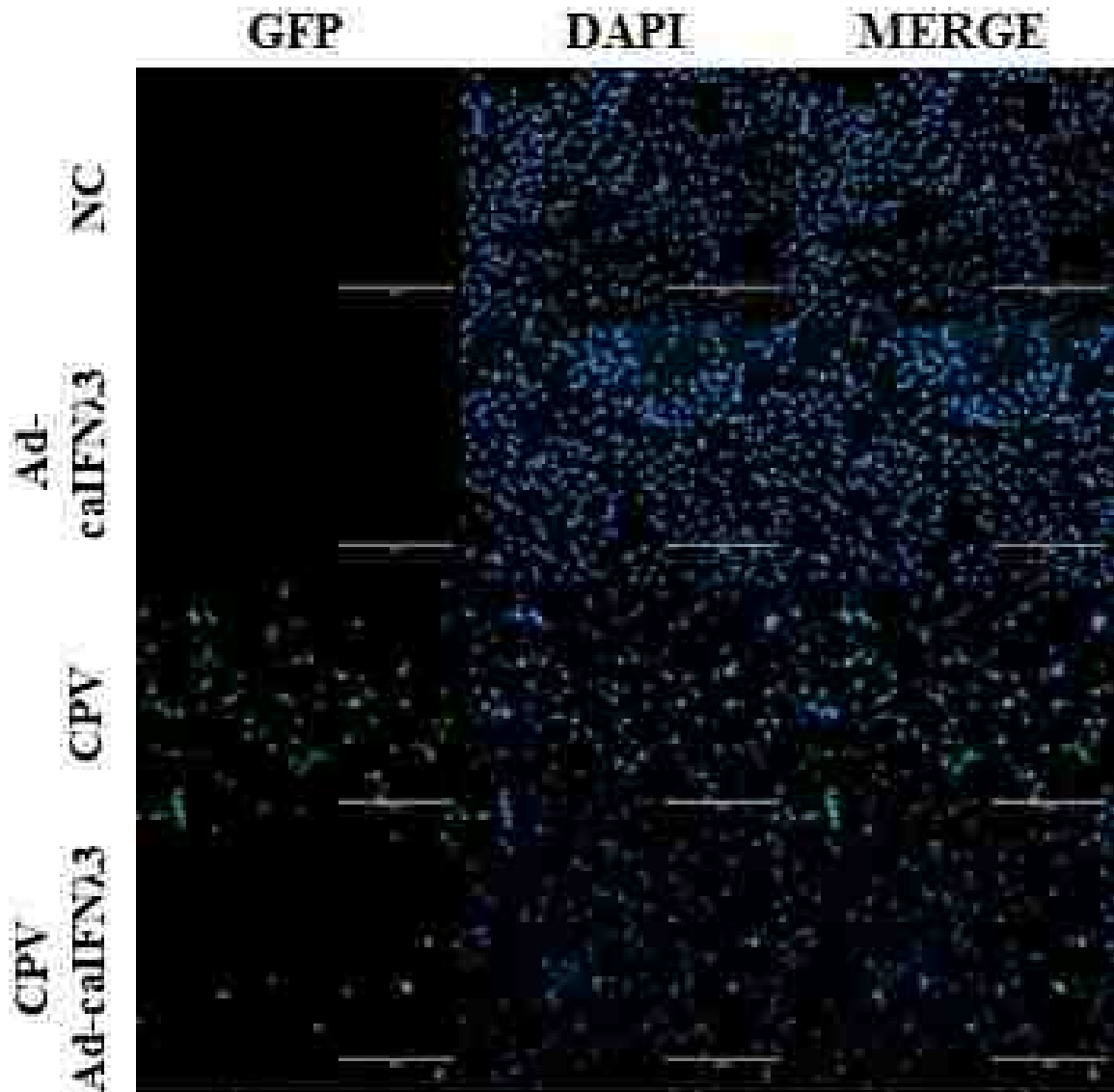
- 개 코로나바이러스를 -1 dpi에서 감염한 그룹에서 확인한 바이러스 단백질의 감소가 확인되었으며 0 dpi, 1 dpi에서는 미약한 감소만을 확인할 수 있었음.



< IFA를 이용한 개 코로나바이러스 단백질의 감소량 확인 >

■ 면역형광염색법을 이용한 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 파보바이러스의 단백질 감소 확인

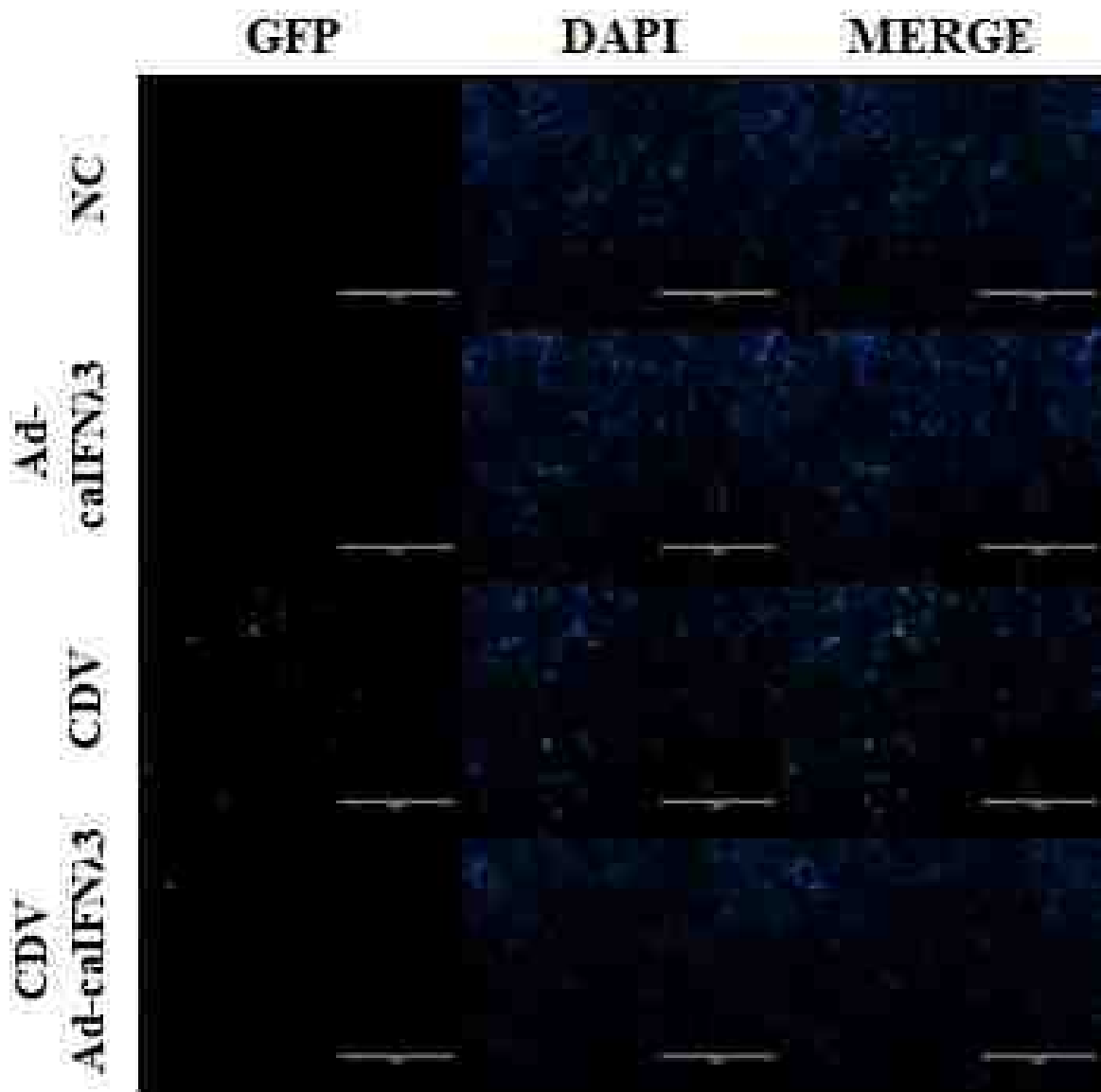
- 재조합 아데노바이러스에 의해 발현된 개의 인터페론 람다-3 단백질에 의하여 개 파보바이러스의 감염력이 감소하는지를 확인하였음.
- 면역형광염색법(IFA, Immunofluorescence assay)을 통한 단백질 분석을 위하여 바이러스 감염 1일 전 (-1 dpi)에 재조합 아데노바이러스를 100 MOI의 농도로 처리하였음.
- 감염 1일 후 감염 세포 내에서의 바이러스의 단백질량을 IFA를 이용하여 비교하였음.
- 음성 대조군 및 재조합 아데노바이러스만 처리한 경우에는 바이러스 단백질이 확인되지 않았으며 개 파보바이러스만 감염시킨 세포들에 비하여 -1 dpi에 재조합 아데노바이러스를 100 MOI 처리한 경우 바이러스 단백질의 형광이 감소한 것을 확인할 수 있었음.
- 개 파보바이러스의 경우 모두 -1 dpi에서 확인한 바이러스 단백질의 감소가 확인되었으며 0 dpi, 1 dpi에서는 미약한 감소만을 확인할 수 있었음.



< IFA를 이용한 개 파보바이러스 단백질의 감소량 확인 >

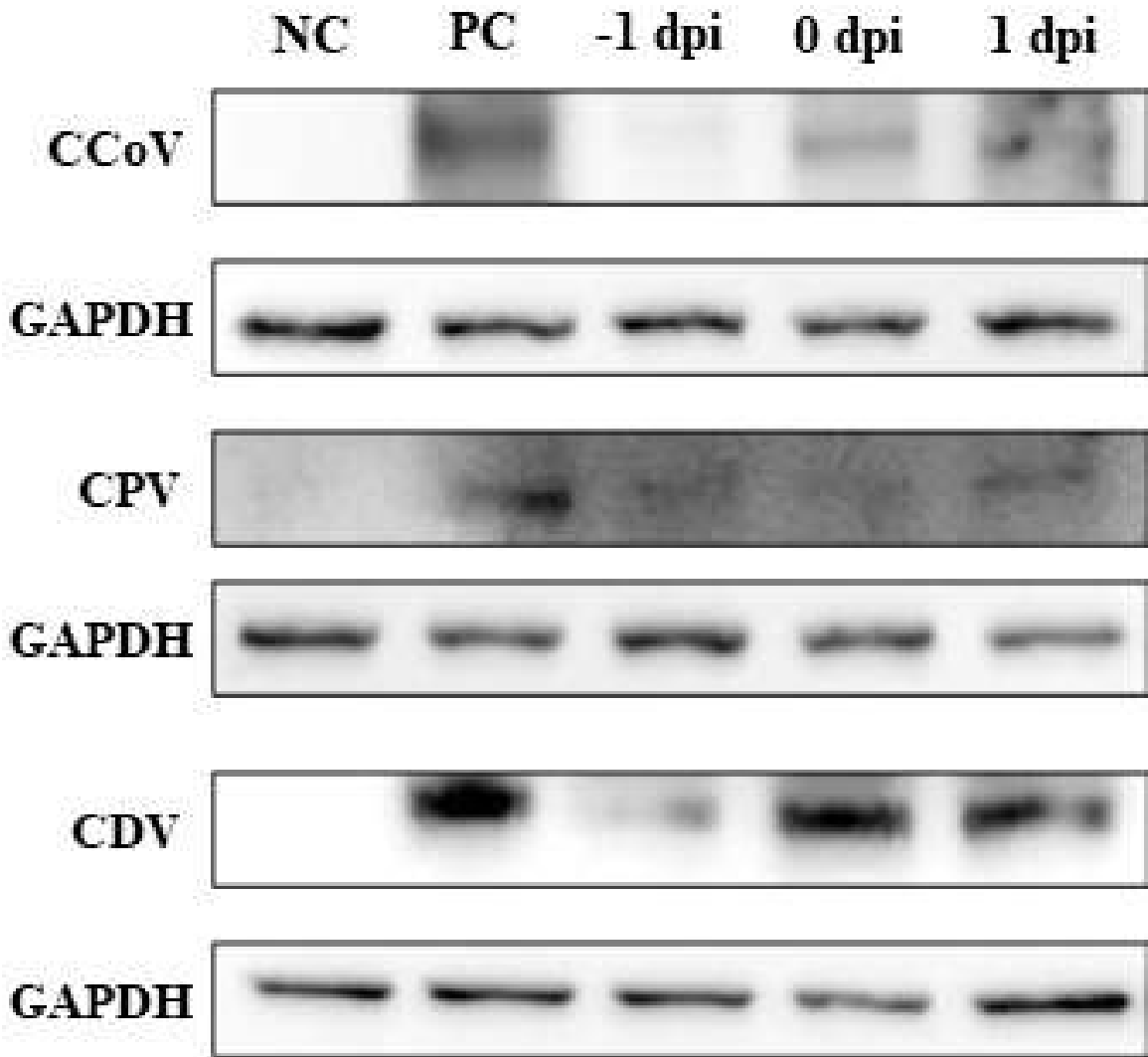
■ 면역형광염색법을 이용한 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 디스토펙퍼바이러스의 단백질 감소 확인

- 재조합 아데노바이러스에 의해 발현된 개의 인터페론 람다-3 단백질에 의하여 개 디스토펙퍼바이러스의 감염력이 감소하는지를 확인하였음.
- 면역형광염색법(IFA, Immunofluorescence assay)을 통한 단백질 분석을 위하여 바이러스 감염 1일 전 (-1 dpi)에 재조합 아데노바이러스를 100 MOI의 농도로 처리하였음.
- 감염 1일 후 감염 세포 내에서의 바이러스의 단백질량을 IFA를 이용하여 비교하였음.
- 음성 대조군 및 재조합 아데노바이러스만 처리한 경우에는 바이러스 단백질이 확인되지 않았으며 개 디스토펙퍼바이러스만 감염시킨 세포들에 비하여 -1 dpi에 재조합 아데노바이러스를 100 MOI 처리한 경우 바이러스 단백질의 형광이 감소한 것을 확인할 수 있었음.
- 개 디스토펙퍼바이러스의 경우 모두 -1 dpi에서 확인한 바이러스 단백질의 감소가 확인되었으며 0 dpi, 1 dpi에서는 미약한 감소만을 확인할 수 있었음.



< IFA를 이용한 개 디스토펜바이러스 단백질의 감소량 확인 >

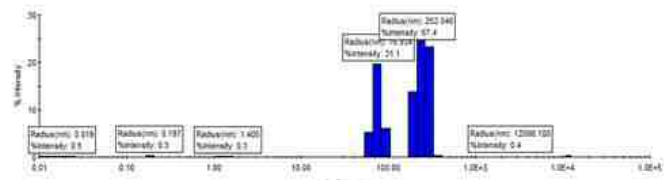
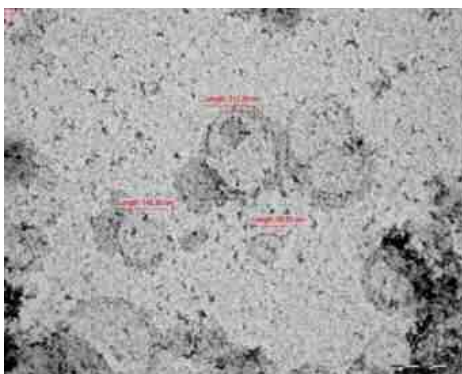
- Western blotting을 통한 재조합 아데노바이러스 처리에 의한 개 코로나바이러스, 개 파보바이러스, 개 디스토펜바이러스의 단백질 감소 확인
  - 재조합 아데노바이러스에 의해 발현된 개의 인터페론 람다-3 단백질에 의하여 개 코로나바이러스, 개 파보바이러스, 개 디스토펜바이러스의 감염력이 감소하는지를 확인하였음.
  - Western blotting을 통한 단백질 분석을 위하여 바이러스 감염 1일 전 (-1 dpi), 감염 당일 (0 dpi), 감염 1일 후 (1 dpi)에 재조합 아데노바이러스를 100 MOI의 농도로 처리하였음.
  - 감염 2일 후 감염 세포 내에서의 바이러스의 단백질량을 western blotting을 이용하여 비교하였음. 동일한 세포량을 처리함을 확인하기 위하여 housekeeping protein인 GAPDH를 이용하였음.
  - 개 코로나바이러스, 개 파보바이러스, 개 디스토펜바이러스의 경우 모두 -1 dpi에서 확인한 바이러스 단백질의 감소가 확인되었으며 0 dpi, 1 dpi에서는 미약한 감소만을 확인할 수 있었음.



< Western blotting을 이용한 바이러스 단백질의 감소량 확인 >

■ 천연물 유래 항바이러스 성분 QV01270을 이용한 나노입자 제작 및 공정 안정화

- 본 연구팀은 QV01270의 용해도와 체내 전달 효율을 높이기 위해서 리포솜에 QV01270을 봉입하는 것으로 QV01270-Liposome 나노입자를 만들어내는 방법에 관하여 연구를 진행했음.
- 또한 반복 시험을 통해서 최적의 구성 성분 및 조성에 관한 수치를 확보하였으며, 해당 내용을 이용하여 약물의 기준 및 규격을 확보함.



Item	Radius (nm)	Mv-R (kD)	%Intensity	%Mass
Peak 1	0.018	17.6399	0.000299	0.5
Peak 2	0.197	9.31316	0.074929	0.3
Peak 3	1.405	10.2084	7.45595	0.3
Peak 4	76.934	13.964	87161	31.1
Peak 5	252.046	16.8509	1.40E+06	67.4
Peak 6	12098.1	0	1.20E+10	0.4

< QV01270-Liposome 나노입자 제법 확립 및 기준 및 규격 확보 >

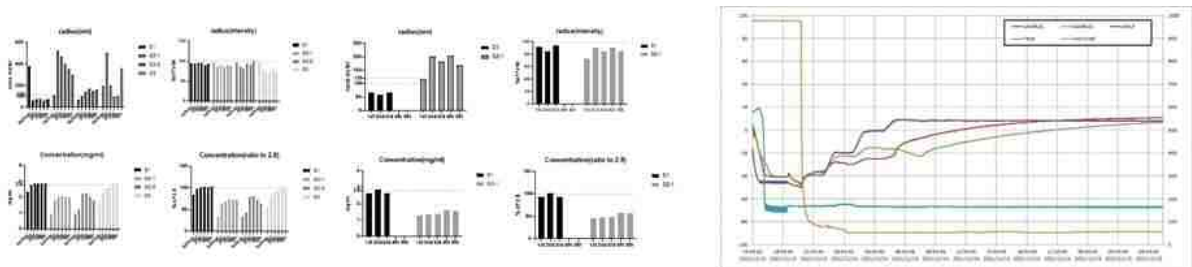


- 약물의 기준 및 규격을 확보한 후, 해당 규격대로 대량 생산할 수 있는 공정을 확보하기 위하여 “고압 균질기”를 중심으로 하는 공정을 설계함.



< 고압 균질기를 중심으로 하는 QV01270-Liposome 대량 생산 공정 >

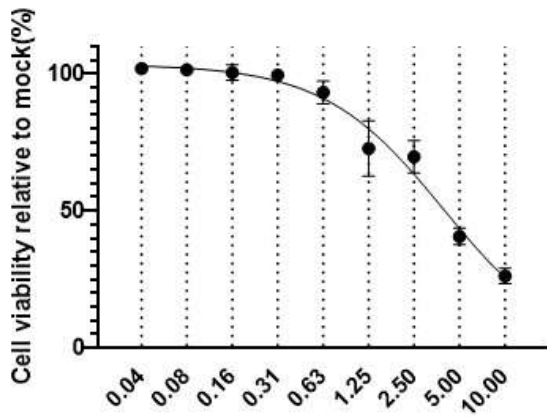
- 공정 설계에 대하여 반복적인 시험 가동을 통해, 설비의 가동 조건에 관하여 비교하여 최적의 가동 조건을 확보함.



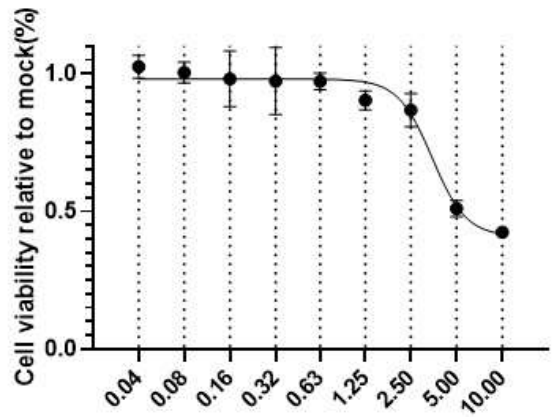
< 고압 균질기의 가동 조건에 관한 반복 시험 및 최적 가동 조건 확보 >

■ QV01270 및 QV01270-Liposome 나노입자의 고양이 복막염바이러스 억제 효능 확인 시험

- 최종적으로 확보된 QV01270과 QV01270-Liposome의 고양이 복막염 바이러스(FIPV)에 관한 억제 효능을 확인하기 위하여 세포 수준의 억제 시험을 진행하고, 최종적으로 약물의 바이러스 억제 능력을 확인하였음.
- 먼저 세포 수준 시험에 사용할 CRFK 세포주에 대한 우리 약물 QV01270, QV01270-Liposome에 관한 독성 대역을 측정하기 위하여 CC50 수치를 측정함.



**QV01270(uM)**  
 CC<sub>50</sub>: 3.90uM, R<sup>2</sup>: 0.95

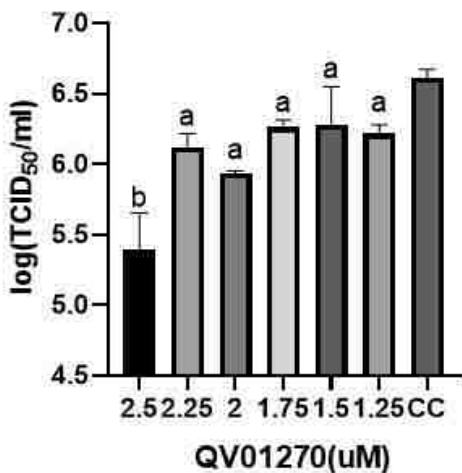


**QV01270-Liposome(uM)**  
 CC<sub>50</sub>: 3.45uM, R<sup>2</sup>: 0.96

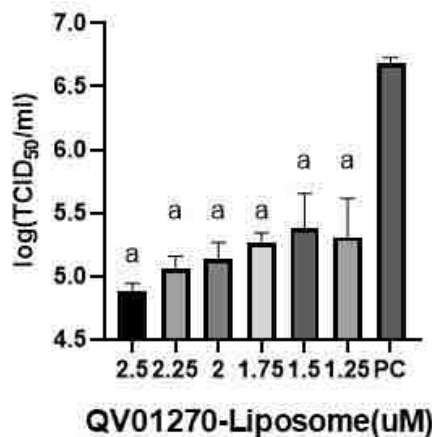
< QV01270 및 QV01270-Liposome의 CRFK 세포주에 대한 독성 범위 >

- 그 결과, CC50 수치는 각각 3.9uM, 3.45uM로 측정되었으며 이를 기준으로 하여 사용할 수 있는 약물의 농도 대역을 2.5uM 이하 대역으로 설정함.
- 그 후, 고양이 복막염바이러스 표준 스트레인(VR-990)을 모델 바이러스로 사용하여 QV01270 및 QV01270-Liposome의 바이러스 억제 능력에 대하여 확인 시험을 진행함.
- 먼저 2.5uM의 농도에서 순차적으로 희석하여 1.25uM의 농도까지 다양한 농도의 약물을 세포에 투입하고, 동시에 표준 고양이 복막염 바이러스를 감염시킨 후, 회수하여 리얼타임 PCR기법으로 바이러스 유전체의 복제 수준을 비교함.

**FIPV RNA replication inhibition test**



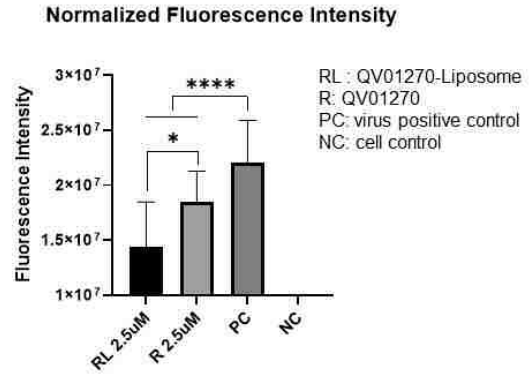
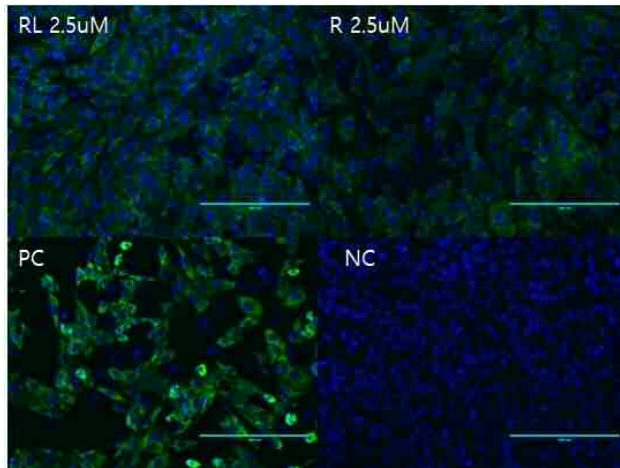
**FIPV RNA replication inhibition test**



< QV01270 및 QV01270-Liposome의 바이러스 RNA 복제 억제 수준 비교 >

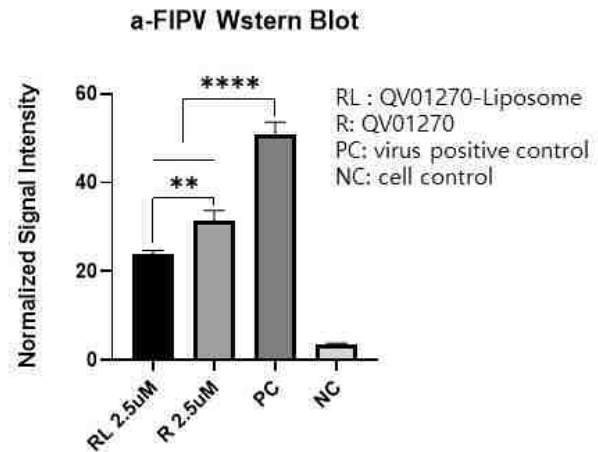
- 그 결과 약물이 같은 농도인 경우 QV01270 보다는 QV01270-Liposome 나노 입자의 억제 효능이 높게 나타났고, QV01270은 2.5uM에서 최대 90% 억제능력을 보여주었고, QV01270-Liposome은 2.5uM에서 최대 97%의 억제능력을 보여주었음.
- RNA 리플리케이션 억제 능력을 확인 한 후, 단백질 수준에서도 억제가 일어나는지 확인 하기 위하여 면역형광염색 기법으로 FIP바이러스 입자를(녹색) 검출하고 신호의 수준을

비교하였음.



< 면역형광염색 기법을 이용하여 FIP바이러스 단백질 생산 억제 수준 비교 >

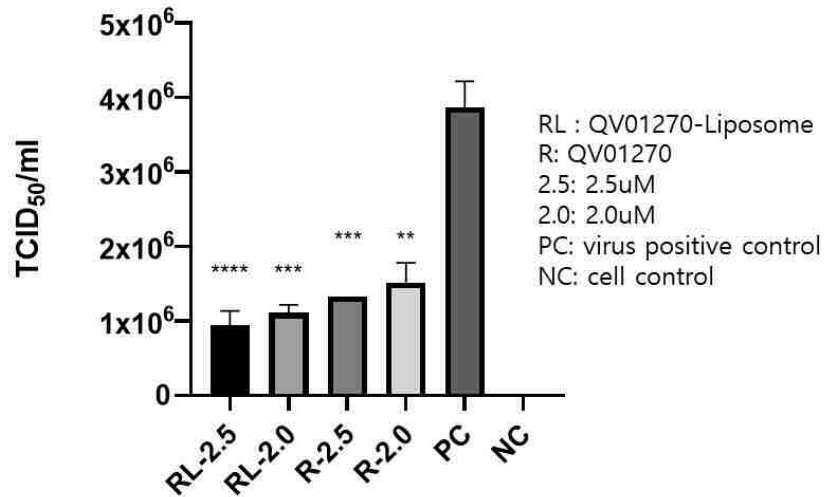
- 그 결과, 약물 처리군에서 바이러스 단백질 생성을 억제하는 효능이 확인되었고, QV01270 및 QV01270-Liposome 두 가지 약물의 비교 결과 QV01270-Liposome 나노입자의 바이러스 단백질 생산 억제 능력이 유의미한 수준 우월한 것으로 확인됨.



< 웨스턴 블롯 기법을 이용하여 FIP바이러스 단백질 생산 억제 수준 비교 >

- 바이러스 단백질 생성 억제 능력에 대해서 웨스턴블롯 기법으로 추가 확인한 결과, 형광 염색시험 결과와 동일하게 약물 처리군에서 바이러스 단백질 생성을 억제하는 효능이 확인되었고, QV01270 및 QV01270-Liposome 두 가지 약물의 비교 결과 QV01270-Liposome 나노입자의 바이러스 단백질 생산 억제 능력이 유의미한 수준 우월한 것으로 확인됨.
- 최종적으로, 바이러스 복제 결과 형성되는 자식 바이러스 생성 능력에 관한 억제 능력을 확인하기 위하여, 위의 시험과 동일한 조건으로 약물 및 바이러스를 세포에 접종하고 3 일 후에 회수하여, 생성된 고양이 복막염 바이러스의 역가를 측정함.

## Titration



< 바이러스 역가 측정법을 이용하여 FIP바이러스 억제 능력 확인 >

- 그 결과, 최종적으로 생성되는 바이러스가 약물을 처리한 경우 통계학적으로 유의미한 수준으로 억제되어서 75% 줄여주는 것으로 확인되었고, 약물의 종류가 농도에 따른 경향성이 확인되어서 QV01270보다는 QV01270-Liposome의 효능이 더 좋은 것으로 확인되지만, 통계적인 유의차는 없었음.

### ■ QV01270-Liposome의 안전성 시험

- QV01270-Liposome의 임상적 적용을 위하여 안전성 시험을 한국건설생활환경시험연구원(KCL)과 협의하여 GLP 급으로 진행한 결과, 설치류 단회투여 독성시험, 복귀돌연변이 시험, 체외 염색체이상 시험, 소핵시험, 4주 반복 투여 시험 등이 진행되었음.
- 시험 항목의 기준은 농림축산검역본부 안전성 평가 기준에 따름.
- 먼저, 약물의 변이원성(유전자에 변이를 유발할 수 있는 위험)에 관한 평가를 위하여 복귀돌연변이 시험, 염색체이상시험, 소핵시험 등이 진행되었으며, 세 가지 모든 시험에서 변이원성 음성으로 확인됨.
- 복귀돌연변이 시험(내부 시험 번호: GT21-00127)은 세균 시험 계통(S.typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 / E.coli WP2uvrA)을 대상으로 QV01270 약물(0 ~ 2000ug/plate)을 처리 후 돌연변이 유전자가 복귀하는 세균의 숫자를 대조군과 비교하는 방식으로 진행되었음.

# 최종보고서

## 박테리아를 이용한 Rottlerin의 복귀돌연변이시험

(시험번호 : GT21-00127)



2022년 02월

the way to trust KCL 한국건설생활환경시험연구원  
Korea Conformity Laboratories

### 1. 요약

시험물질 (명칭 : Rottlerin)의 안전성시험을 위한 돌연변이 유발성 여부를 확인하기 위해 최소한의 포유성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1538, TA1537과 무성균 균주인 *Escherichia coli* W3102를 사용하여 계통별과 대사활성별로 복귀돌연변이시험을 실시하였다.

시험은 *Preincubation* 방법을 이용하였다. 시험물질은 DMSO에 용해하여, 최고 농도의 시험물질용 고제형 다음 이를 다시 DMSO에 단계별 희석하는 방법으로 낮은 농도의 시험물질용을 조제하였다. 분시험에서의 계통별과 계통별 시험은 0, 25, 74, 232, 687, 2000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  농도로 하여 농도별시험을 실시하였다.

농도별시험 결과, 계통별의 경우 TA98, TA100, TA1538, TA1537 균주에서 역돌연변이 관찰되었고(05 ~ 2000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ), W3102에서 25  $\mu\text{g}/\text{plate}$  이상에서 역돌연변이 관찰되었다. 대사활성제의 경우 TA98, TA100, TA1537 균주에서 역돌연변이 관찰되었고(007, 2000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ), TA1538 균주는 2000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  농도에서 역돌연변이 관찰되었다. 계통별의 경우 시험물질에 의한 돌연변이 관찰되지 않았고, 대사활성제의 경우 007, 2000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  농도에서 시험물질에 의한 돌연변이 관찰되었다. 계통별 TA98, TA100, TA1538, TA1537 균주의 경우 분시험에서 계통별과 농도별을 위해 농도별시험(역시험)을 수행하였다.

농도별시험(역시험) 결과, 계통별 TA98, TA100 균주의 경우 0.2, 25  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 TA1538, TA1537 균주의 경우 25  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 역돌연변이 관찰되었다. 이를 바탕으로, 발해 3 리 5 단계 농도로 아래의 같이 분시험을 실시하였다.

- H9 mix (1)의 경우  
TA98, TA100  
0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.2  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
TA1538, TA1537  
0, 0.3, 0.9, 2.7, 8.2, 25  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
W3102-A  
0, 0.8, 2.2, 6.2, 25, 74  $\mu\text{g}/\text{plate}$
- H9 mix (1)의 경우  
TA98, TA100, TA1537  
0, 0.2, 25, 74, 232, 687  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
TA1538, W3102-A  
0, 25, 74, 232, 687, 2000  $\mu\text{g}/\text{plate}$

### < 복귀돌연변이 시험 최종보고서 >

- 그 결과, QV01270 약물을 처리한 세균에서 대조군 대비 복귀 세균의 숫자에 차이가 없었으며, 이에 따라 복귀돌연변이 음성으로 판정됨.
- 체외 염색체이상 시험(내부 시험 번호: GT21-00128)은 포유류 세포 시험 계통(CHO cell)을 대상으로 QV01270 약물(2.35 ~ 21.11ug/ml)을 처리 후 세포 염색체의 이상증기상, 배수성 등을 대조군과 비교하는 방식으로 진행되었음.

# 최종보고서

포유류 배양세포를 이용한  
Rottlerin의 체외 염색체이상시험

(시험번호 : GT21-00128)



2022. 11. 02 일

the way to trust **KCL** 한국건설생활환경시험연구원  
Korea Conformity Laboratories

## 1. 요약

Bottlerin의 유전독성을 평가하기 위하여 Chinese hamster 오vary의 난소유세포 (CHO-K1 cell)를 이용하여 대사활성화제 (DHAP)를 적용한 대사활성화법 (+50 nM) 및 적용하지 않은 (대조군) (+0 nM)에서 염색체이상시험을 실시하였다. 시험물질은 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시킨 후 시험관에 주사하였다.

본시험의 시험물질 처리농도를 결정하기 위해 세포독성시험을 수행한 다음, 본 시험을 위한 시험물질 최고처리농도를 결정하여 용액 3회 30 분씩 농도순으로 사용 하였다.

계량법 (+50 nM, 24 시간 연속처리군) : 2.30, 7.04, 21.11 µg/ml  
계량법 (+50 nM, 4 시간 처리 18 시간 회복군) : 2.30, 7.04, 21.11 µg/ml  
대사활성법 (+50 nM, 4 시간 처리 18 시간 회복군) : 2.30, 7.04, 21.11 µg/ml

본시험 결과 대사활성화를 적용하지 않음 조건에서는 24 시간 연속처리군 및 4 시간 처리 18 시간 회복군과 모두 이상염색체의 빈도가 음성대조군과 비교하여 모든 처리농도에서 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었다.

대사활성법 18 시간 회복 30 시간 회복군의 경우, 모든 처리군에 있어서 이상염색체의 빈도는 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었다.

계량법 및 대사활성법에 있어서 배수성체 획득 비율의 빈도 또한 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 보이지 않았다.

이상의 결과를 종합할 때, Bottlerin은 본 시험 조건에서 CHO-K1 세포에 대해 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

### < 체외 염색체 이상 시험 최종보고서 >

- 그 결과, QV01270 약물을 처리한 세포에서 대조군 대비 염색체의 이상중기상, 배수성 등이 차이가 없었으며, 이에 따라 체외 염색체이상 음성으로 판정됨.
- 체내 소핵시험(내부 시험 번호: GT21-00129)은 설치류 시험 계통(ICR 마우스)을 대상으로 QV01270 약물(12.5 ~ 50mg/kg)을 처리 후 골수세포에 소핵 유발 여부를 대조군과 비교 하는 방식으로 진행되었음.

# 최종보고서

설치류 조혈세포를 이용한  
Rottlerin의 체내 소핵시험

(시험번호 : GT21-00129)



the way to trust **KCL** 한국건설생활환경시험연구원  
Korea Conformity Laboratories

## 1. 요약

시험물질 Rottlerin에 의한 발암성 유발 용·투 용량의 기초 자료를 얻기 위하여 유전 독성시험 중 DNA 이주스 검출세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

경구 투여 시험에 사용된 시험물질 Rottlerin은 50 mg/kg/day, 25 mg/kg/day, 12.5 mg/kg/day의 용량으로 경구 투여하였고, 투여 후 18~24 시간의 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도와 핵분열수를 평가하였다. 본 시험에서 개체 당 약 4,000 개의 다핵형세포 (PCN)를 관찰하고 소핵이 관찰되는 다핵형세포 (MNPCN)의 수를 계수할 경우 모든 시험물질 투여군 (50 mg/kg/day, 25 mg/kg/day, 12.5 mg/kg/day)에서 양성제 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 한편, 양성 대조군의 소핵유발빈도는 부정적 대조군과 비교 시 통계적 차이가 관찰되었다 (p<0.01).

세포독성의 지표인 500 개미 세포수 중 다핵형세포 (PCN/PCN+NCCN)의 비율은 모든 시험물질 투여군에서 부정적 대조군과 비교 시 뚜렷한 감소로써 유의적 차이는 나타나지 않았다.

부정적 대조군과 양성대조군의 소핵유발빈도와 핵분열수 중 다핵형 세포수의 비율은 historical control data (Ames 11회 병행)에 있었다. 그러므로 이 시험은 적절한 수행되었다.

이상의 결과로 본 시험 조건하에서 Rottlerin은 DNA 이주스 검출세포에 의한 소핵을 유발하지 않는 것으로 나타났다.

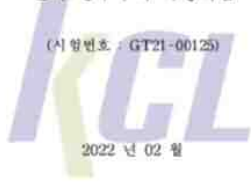
### < 체내 소핵시험 최종보고서 >

- 그 결과, QV01270 약물을 처리한 마우스에서 대조군 대비 소핵유발, 골수억제, 일반 임상 증상 유발 등이 차이가 없었으며, 이에 따라 체내 소핵시험 음성으로 판정됨.
- 다음으로, 체내 투여 후 나타날 수 있는 일반 독성에 관한 평가를 위해서 설치류 단회투여 시험, 설치류 4주 반복 투여 시험 등이 진행되었으며 두 가지 시험 모두에서 독성이 없는 것으로 확인되었음.
- 설치류 단회투여 시험(내부 시험 번호: GT21-00125)은 설치류 시험 계통(SD rat)을 대상으로 QV01270 약물(50 ~ 200mg/kg)을 경구로 1회 처리 후 일반 독성 증상의 유발 여부를 2주일 동안 관찰하는 방식으로 진행되었음.

# 최종보고서

Sprague-Dawley 랫드를 이용한  
Rotlerin의  
단회 경구투여 독성시험

(시험번호 : GT21-00125)



2022년 02월



## 1. 요약

본 시험은 시험물질 Rotlerin의 단회 경구투여에 의한 독성증상과 치사량 (치사량 (Approximate Lethal Dose, ALD))을 조사하기 위하여 실시되었다. Sprague-Dawley(SD) 계통 암-수 랫드를 이용하여 100 (저용량군), 1000 (중용량군) 및 2000 (고용량군) mg/kg의 용량으로 시험물을 투여하고 투여량 대조군과 비교하였으며, 시험기간 동안 사망동물의 발생유무, 임상증상, 해부검사 및 부검소견을 관찰하였다.

1) 시험기간 동안 암-수 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았으나 시험물질 투여 3일후부터 2 일제까지 암-수 30, 100 및 200 mg/kg 투여군에서 경사(akimbia) 및 좌측부 고형(lesion peritoneal region)이 용량-반응 상관성치 관찰을 보이며 관찰되었다가 이후 정상으로 회복되었다.

2) 저용량일 경우, 암-수 30, 100 및 200 mg/kg 투여군에서 시험물질 투여 1 일제 제왕이 용량-반응 상관성의 경향을 나타내며 투여량 대조군에 비하여 골격질이 감소하였으며, 주변 300 mg/kg 투여군에서는 투여 3 일제까지 감소경향이 지속되었다.

3) 임상증상 및 경관동물의 부검결과, 암-수 모든 시험군에서 특이한 육안적 이상 소견이 관찰되지 않았다.

여성의 결과로 보아 본 시험조건에서 시험물질 Rotlerin은 SD 랫드에 단회 경구 투여 하였을 때, 50 mg/kg 이상의 용량에서 살아 및 골격질 저하 같은 증상이 나타나며 치사량 치사량은 200 mg/kg을 초과하는 것으로 판단된다.

### < 설치류 단회 경구투여시험 최종보고서 >

- 그 결과, QV01270 약물을 투여한 랫드에서 2주일 동안 독성으로 평가할 만한 일반 증상이 관찰되지 않았으므로, ALD(계략적치사량)은 200mg/kg 이상으로 판정되었음.
- 설치류 4주 반복 투여 시험(내부 시험 번호: NT21-00079)은 설치류 시험 계통(SD rat)을 대상으로 QV01270 약물(5 ~ 20mg/kg)을 경구로 4주 동안 매일 처리 후 일반 독성 증상의 유발 여부를 4주일 동안 관찰하는 방식으로 진행되었음.



## 최 종 보 고 서

Sprague-Dawley 랫드를 이용한  
Rottlerin의  
4 주 반복 경구투여 용량결정시험



the way to trust **KCL** 한국간섭생물형성시험연구원  
Korea Conformity Laboratories

Sprague-Dawley 랫드를 이용한 Rottlerin의 4 주 반복 경구투여 용량결정시험

### 1. 요약

본 시험은 시험물질 Rottlerin을 4 주간 반복 경구투여 독성을 평가하기 위하여 실시된 실험 보고서이고 13 주 반복 경구투여 독성시험의 투여용량을 결정하기 위하여 실시되었다. Sprague-Dawley(SD) 계통 암-수 랫드를 이용하여 50%용량군, 100%용량군 및 200%용량군(30 mg/kg/day)의 용량으로 시험군을 설정하고 무형제 대조군과 비교하였으며, 실험기간 동안 신장중량, 말초중량, 체중변화, 사료 및 음수량, 혈액학적 검사, 혈액생화학의 검사, 알기중량 측정, 부검 시 육안소견 관찰을 실시하였다.

1) 주어진 기간 동안 모든 시험군에서 사망률 및 시험물질에 의한 독성학적 발현을 나타내지 않았다.

2) 체중, 사료 및 음수량 측정 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

3) 혈액학적 검사 결과, 시험물질과 관련된 독성학적 변화는 관찰되지 않았다.

4) 혈액생화학적 검사 결과, 암-수 30 mg/kg/day 투여군의 ALT, BUN, urea nitrogen 및 BUN(Blood Urea Nitrogen) 수치가 증가하였다.

5) 알기중량 측정 결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

6) 부검 결과, 시험물질과 관련된 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

여섯째 결과로 보여 본 시험 조건에서 시험물질 Rottlerin을 SD 랫드에 4 주간 반복 경구투여한 결과, 암-수 30 mg/kg/day 투여용량에서 ALT 및 BUN 수치가 증가하는 것으로 판단된다. 따라서 13 주 반복 경구투여 독성시험에서는 연평균 투여기간을 고려하여 시험물질에 의한 발현이 나타날 것으로 예상되는 10 mg/kg/day 용 고용량으로 설정하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

NT21-00079 the way to trust **KCL** 한국간섭생물형성시험연구원 Korea Conformity Laboratories - 1/79 -

### < 설치류 4주 반복 경구투여 시험 최종보고서 >

- 그 결과, QV01270 약물을 투여한 랫드에서 4주일 동안 독성으로 평가할 만한 일반 증상이 관찰되지 않았으므로, NOAEL은 20mg/kg 이상으로 판정되었으며, 이는 실제 임상 사용용량(0.2mg/kg)의 100배에 해당함.

- 총 5가지의 시험으로 QV01270은 약물로 사용하기에 독성이 없는 것으로 판정되었으며, 향후 약물의 등록을 위하여 추가적인 검증 시험이 필요함.

### (2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

#### < 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (2021 ~ 2022)	비고	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	특허 출원	목표	1		60
		실적(누적)	1		60
	논문(SCI)	목표	1		
		실적(누적)	0	2022년 6월 투고 예정	
	학술발표	목표	2		40
		실적(누적)	1		20
계		목표	4		100
		실적(누적)	2		80

### (3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2022년도 한국분자세포생물학회 제33회 동계학술대회	김동휘	2022.02.17	용평리조트 그린피아콘도	대한민국
2	International Union of Microbiological Societies 2022 (IUMS 2002)	최종철	2022. 07. 21 (예정)	Rotterdam, Netherlands & Online	네덜란드

국내 및 국제 학술회의 발표 증빙자료 1)

**The 33rd KSMCB Winter Conference 2022**

2022년도  
한국분자·세포생물학회  
**제33회 동계학술대회**  
KSMCB Winter Conference 2022

2022년 2월 16일(수) ~ 18일(금)  
용평리조트 그린피아콘도  
하이브리드 개최

**KSMCB**

The image shows several abstracts from the conference. The abstracts are titled: 'Meta-analysis of microarray-based transcriptome profiling in smokers and non-smokers', 'The mitochondrial HSP70 TRAP1 regulate hypoxic tumor microenvironment', 'Anti-influenza Effects of Abietane diterpenoids via Blocks the Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt and ERK Signaling Pathway', and 'Nucleolar effector of potato late blight induces cell death disrupts ribosome biogenesis causing nucleolar stress'. The abstracts include author names, affiliations, and brief summaries of their research.

**calFN3 expression with tet-operator system**

To amplify the recombinant adenovirus ...

To produce interferon ...

**Conclusion**

Ad-calFN3 that could be obtained with a high yield using tetracycline operator system was developed in our laboratory. Ad-calFN3 transduction to target cell could suppress the replication of infectious viruses such as CCoV and CPV by inducing antiviral state. We expect these findings could significantly contribute to the development of therapeutic drugs for viral disease in dogs.

**References**

[1] Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2011). Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 41(6), 1121-1132.  
 [2] Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus—a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology*, 155(1), 1-12.  
 [3] Kim, D. H., Park, B. J., Ahn, H. S., Go, H. J., Kim, D. Y., Kim, J. H., ... & Choi, I. S. (2021). Canine interferon lambda3 expressed using an adenoviral vector effectively induces antiviral activity against canine influenza virus. *Virus Research*, 296, 196342.

**Acknowledgment**

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry(PET) through Animal Disease Management Technology Development Program(Or Project), funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA) (grant number :[121004-1](#))

**Figure 1.** Ad-calFN3 titration using immunocytochemistry assay. The graph shows relative vRNA to GAPDH for CCoV vRNA in cell lysate and supernatant across different MOI values (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256).

**Figure 2.** Cytotoxicity of Ad-calFN3 against A72 cells. The graph shows MOI (A72 / Ad-calFN3) on the x-axis and relative vRNA to GAPDH on the y-axis.

**Figure 3a.** Antiviral activity of Ad-calFN3 against CCoV. The graph shows fold change in relative vRNA to GAPDH for CCoV vRNA in supernatant and cell lysate.

**Figure 3b.** Antiviral activity of Ad-calFN3 against CPV. The graph shows fold change in relative vRNA to GAPDH for CPV vRNA in supernatant and cell lysate.



My abstracts

If you re-open your abstract, please make sure to check all author affiliations are correct before re-submitting

In Progress (0)

You don't have any files.

Submitted (1)

#745	INHIBITION OF FELINE INFECTIOUS PERITONITIS VIRUS REPLICATION BY NATURAL EXTRACTS OF MALLOWUS PHILIPPENSIS Modified: 05-16-2022 Topic: A502 Antiviral immunity Type: Late Breaking Abstract Submission	
------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Deleted (0)

You don't have any files.



[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 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	개 인터페론 람다-3를 발현하는 재조합 아데노 바이러스 벡터	대한민국	건국대학교 산학협력단	2021-06-18	10-2021-007949-3					100	

지식재산권 증빙자료 1)

제출 일자 : 2021-10-26    10-2021-0079493

관인생략

**출원번호통지서**

출원 일자 2021.06.18  
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1069088)  
 출원 번호 10-2021-0079493 (접수번호 1-1-2021-0706197-52)  
 (DAS접근코드6988)  
 출원인 명칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)  
 대리인 성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)  
 발명자 성명 최인수 김동휘 고현정 안희섭 김다윤 김재형 박병주 박승용 송창선 이상원 이종복  
 발명의 명칭 개 인터페론 람다-3를 발현하는 재조합 아데노 바이러스 벡터

**【과제고유번호】** 1545022890  
**【과제번호】** 121004-1 (1210040118B010)  
**【부처명】** 농림축산식품부  
**【과제관리(정문)기관명】** 농림식품기술기획평가원  
**【연구사업명】** 가축질병대응기술개발사업  
**【연구과제명】** 재조합 아데노바이러스를 통해 발현한 개 인터페론 람다의 개 전염성 바이러스 억제 유효성 평가  
**【기여율】** 1/1  
**【과제수행기관명】** 건국대학교 산학협력단  
**【연구기간】** 2021.04.01 ~ 2022.03.31

**특 허 청 장**

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행사항은 출원번호를 이용하여 특허포털페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.  
 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동행된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호: 01(이공코드) + 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☎ 1544-8080에 문의하여 주시기 바랍니다.  
 ※ 심사제도 안내 - http://www.kipo.go.kr-지식재산제도

**【취지】** 위와 같이 특허청장(특허심판원장, 심판장)에게 제출합니다.  
 대리인 특허법인이플리온 (서명 또는 인)

**【수수료】**  
**【보정료】** 0 원  
**【기타 수수료】** 0 원  
**【합계】** 0 원

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 생산 및 역가 측정	○ $10^{8\sim 9}$ IFU의 재조합 아데노바이러스 형성 및 확인	○ 100
○ 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 파보바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증	○ qPCR 기반 세포 내 및 상층액 상의 CPV DNA 감소, IFA 기반 세포 내 CPV 단백질의 감소, western blotting 기반 세포 내 CPV 단백질의 감소 확인	○ 100
○ 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 디스템퍼바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증	○ qPCR 기반 세포 내 및 상층액 상의 CDV RNA 감소, IFA 기반 세포 내 CDV 단백질의 감소, western blotting 기반 세포 내 CDV 단백질의 감소 확인	○ 100
○ 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 코로나바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증	○ qPCR 기반 세포 내 및 상층액 상의 CCoV RNA 감소, IFA 기반 세포 내 CCoV 단백질의 감소, western blotting 기반 세포 내 CCoV 단백질의 감소 확인	○ 100
○ 천연물 유래 항바이러스 약물의 제작 및 효능 평가	○ 천연물 유래 항바이러스 약물을 나노입자로 생산하는 기법을 정립하였으며, 세포 수준에서 고양이 복막염 바이러스에 관한 억제 효능을 평가한 결과 최대 95%의 억제 효능이 확인되었음.	○ 100
○ 천연물 유래 항바이러스 약물의 안전성 평가	○ 천연물질 나노입자에 관한 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험, 단회경구투여시험, 4주반복투여시험 등을 진행하였으며, 독성이 발견되지 않음	○ 100

#### 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

- 정량적 연구성과 중, SCI 논문 1건에 대하여는 최종 결과 정리 및 데이터 해석이 22년 6월에 마무리되어 투고가 진행되었음. 22.08.19 기준 revision 진행 중이며 당해 accept 및 publish 될 것으로 사료됨.
  - 정량적 연구성과 중, 학술발표 포스터 발표는 22년 7월 진행되었으며 연구 기간 내 결과가 도출되었으나 적합한 학술대회가 연구기간 종료 이후에 개최되어 성과가 뒤늦게 이루어 졌음.
- 

##### 2) 자체 보완활동

---

- 해당없음
-

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

#### 1. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

##### 1) 실험실 안전 점검

위험등급	점검주기	분류 기준
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

##### 2) 실험실 정밀안전진단 실시

실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험정도에 따라, A,B,C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전무기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시함.

#### 2. 당초 연구개발계획에 기반한 연구 진행

- 추진목표에 따른 연구 내용 달성
  - 선정된 바이러스 별 유효성 및 안전성 평가 완료
  - 논문 작성을 위한 데이터 확보 및 2022년 6월 투고 예정, 본 연구과제를 통해 확보한 자료를 이용한 포스터 발표 진행, 해당 기술을 이용한 특허 출원 완료
-

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

### 가. 기술적 측면

- 현재 보편적으로 사용되는 반려동물 바이러스성 전염병에 대한 치료제가 없으며 대증 치료만 시행하는 상황임. 바이러스 이환 이후 감염을 완화시킬 수 있는 치료제의 효능 확인을 통해 바이러스성 전염병에 대한 치료제 개발의 초석을 다질 수 있음.
- 광범위한 바이러스에 대해 억제할 수 있는 인터페론 제제의 장점을 지니기 때문에 다양한 바이러스에 대한 유효성 평가를 실시할 수 있음. 또한 재조합 아데노바이러스 유전자 치료제 시스템의 적용으로 높은 반감기를 확보할 수 있기 때문에 접종 횟수를 낮출 수 있음.

### 나. 경제적 측면

- 단가를 낮게 생산할 수 있는 재조합 아데노바이러스 시스템을 이용하기 때문에 생합성 단백질 제제에 비해 공급가를 낮출 수 있음
- 유기동물의 증가로 인해 항체 미형성군의 개체 수가 늘어날 확률이 높아 치료제의 수요가 증가할 것으로 판단됨.

### 다. 사회적 측면

- 반려동물을 기르는 가구가 증가함에 따라 반려동물에 대한 의약품 시장이 발달하고 있음. 하지만 현재까지도 반려동물용 바이러스 전염병 치료제 시장이 발달되어 있지 않음.
  - 광범위하게 작용할 수 있으며 낮은 단가로 생산할 수 있는 재조합 아데노바이러스 유전자 치료제 시스템을 적용한 인터페론 람다 제제를 통해 급성장하는 동물시장의 규모에 걸맞는 복지를 제공할 수 있음.
-



## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 반려동물용 바이러스성 전염병 치료제 개발을 위한 연구 : 기존에 개 인플루엔자에 대해 효능을 입증한 개 인터페론 램다를 발현하는 재조합 아데노바이러스 시스템을 이용하여 반려동물에 이환될 수 있는 다양한 바이러스성 전염병에 대한 억제력을 확인할 예정이다. 본 연구과제를 통해 확인된 재조합 아데노바이러스 치료제의 항바이러스능을 응용하여 후속 연구를 통해 동물 모델에서의 안전성 및 유효성 평가를 실시할 예정이다.
- 동물 모델에서 안전성 및 유효성이 확보된 치료제에 대해 시제품 제작 및 사업화를 계획할 예정이다. 제품화를 통해 동물용 의약품 허가를 위한 절차를 밟을 예정이다.
- 아데노바이러스에 대한 면역이 형성된 개체에 대한 전략
  - 후속연구에서 생체 내 재조합 아데노바이러스 치료제 적용 시, 아데노바이러스에 대한 면역이 형성된 개체에 대해서는 효과가 떨어질 수 있음. 이에 대하여 항체가 형성되어있는 개체에게는 면역억제제인 rapamycin을 병용 투여하여 재조합 아데노바이러스에 대한 치료효과를 비교 평가할 예정이다.

< 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	1	
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시	1	
	기술이전	1	
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서

# 자체평가의견서

## 1. 과제현황

		과제번호		121004-1	
사업구분	가축질병대응기술개발				
연구분야	수의/수의예방/동물질병관리			과제구분	단위
사업명	동물의약품개발				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	인터페론 람다 및 천연물 유래 물질을 이용한 반려동물 전염성 바이러스 치료제의 시험관 내 유효성·안전성 평가			과제유형	기초,응용
연구개발기관	건국대학교 산학협력단			연구책임자	최인수
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2021. 04. 01. - 2022. 03. 31.	261,000	29,000	290,000
	계		261,000	29,000	290,000
참여기업	(주) 큐벳				
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

## 2. 평가일 :

## 3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
건국대학교 수의과대학	교수	최인수

## 4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	최인수
----	-----

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

- 본 연구를 통해 부작용이 최소화 되면서 강력한 선천성 면역반응을 효과적으로 유도 할 수 있는 type III 인터페론인 인터페론 람다를 단백질 제제가 아닌 아데노바이러스 벡터 시스템을 활용하여 개 코로나바이러스, 개 파보바이러스, 개 디스토펜바이러스에 대한 항바이러스 효능을 확인하였음. 이를 통하여 광범위 항바이러스제 동물용의약품 개발의 초석을 다짐. 아데노바이러스 벡터 시스템을 이용하는 유전자 치료제의 경우 반감기가 짧은 생합성 단백질 제제의 단점을 보완할 수 있으며 외래 단백질을 직접적으로 주입하는 방식이 아니라 체내에 존재하는 세포들이 단백질을 만들어 내도록 유도하는 방식이기에 인터페론에 대한 항체 형성이 될 가능성이 낮음.
- 2 세부기관 (큐벳(주))에서는 천연물인 말로투스 필리펜시스(mallotus philippensis)에서 항바이러스 효능이 있는 추출물을 분리하여 리포솜화 코팅을 통해 안전성 및 유효성이 확보된 제제를 개발하였으며 실험적으로 FIP 유발 바이러스에 대한 항바이러스 효능을 입증하였음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

- 광범위하게 작용할 수 있으며 낮은 단가로 생산할 수 있는 재조합 아데노바이러스 유전자 치료제 시스템을 적용한 인터페론 람다 제제를 통해 급성장하는 동물시장의 규모에 걸맞는 복지를 제공할 수 있음.
- 천연물 유래 항바이러스제의 이용 및 liposome 코팅화를 통한 응용에 기반하여 반려동물용 항바이러스 제제의 개발의 진척에 기여함.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

- 현재 보편적으로 사용되는 반려동물 바이러스성 전염병에 대한 치료제가 없으며 대증 치료만 시행하는 상황임. 바이러스 이환 이후 감염을 완화시킬 수 있는 치료제의 효능 확인을 통해 바이러스성 전염병에 대한 치료제 개발의 초석을 다질 수 있음.
- 광범위한 바이러스에 대해 억제할 수 있는 인터페론 제제의 장점을 지니기 때문에 다양한 바이러스에 대한 유효성 평가를 실시할 수 있음. 또한 재조합 아데노바이러스 유전자 치료제 시스템의 적용으로 높은 반감기를 확보할 수 있기 때문에 접종 횟수를 낮출 수 있음.
- 고압 균질기를 통한 대량 생산 공정 확보 및 공정 설계에 대한 반복적인 시험 가동을 통하여 최적 가동 조건을 확보함으로써 천연물질 유래 항바이러스 제제의 최적 생산 공정 조건을 마련함.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

- 추진목표에 따른 연구 내용 달성하였으며 당초 연구개발계획에 근거하여 선정된 바이러스 별 유효성 및 안전성 평가 완료하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

- 논문 작성을 위한 데이터를 확보하였으며 2022년 6월에 해당 내용에 대한 연구 결과를 투고할 예정임. 본 연구과제를 통해 확보한 자료를 이용한 포스터 발표 진행하였으며, 해당 기술을 이용한 특허 출원 완료하였음.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 생산 및 역가 측정	10	100	10 <sup>8-9</sup> IFU의 재조합 아데노바이러스 형성 및 확인하였음
개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 파보바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증	20	100	qPCR 기반 세포 내 및 상층액 상의 CPV DNA 감소, IFA 기반 세포 내 CPV 단백질의 감소, western blotting 기반 세포 내 CPV 단백질의 감소 확인하였음
개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 디스토펙퍼바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증	20	100	qPCR 기반 세포 내 및 상층액 상의 CDV RNA 감소, IFA 기반 세포 내 CDV 단백질의 감소, western blotting 기반 세포 내 CDV 단백질의 감소 확인하였음
개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 개 코로나바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증	20	100	qPCR 기반 세포 내 및 상층액 상의 CCoV RNA 감소, IFA 기반 세포 내 CCoV 단백질의 감소, western blotting 기반 세포 내 CCoV 단백질의 감소 확인하였음
천연물 유래 항바이러스 약물의 제작 및 효능 평가	20	100	천연물 유래 항바이러스 약물을 나노입자로 생산하는 기법을 정립하였으며, 세포 수준에서 고양이 복막염 바이러스에 관한 억제 효능을 평가한 결과 최대 95%의 억제 효능이 확인하였음
천연물 유래 항바이러스 약물의 안전성 평가	10	100	천연물질 나노입자에 관한 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험, 단회경구투여시험, 4주반복투여시험 등을 진행하였으며, 독성이 발견되지 않음.
합계	100점		

### Ⅲ. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구과제를 통하여 세포 수준에서의 항바이러스 후보 제제의 유효성 및 안전성을 확보하였으며, 이는 반려동물용 항바이러스 제제 개발에 기여할 수 있을 것으로 사료됨.  
- 항바이러스제의 임상적 사용을 위하여 생체 내 유효성 및 안전성이 추가적으로 확보되어야하며 동물용 의약품 허가를 위한 추가적인 연구가 진행되어야함.  
- 임상에서의 유효성 및 안전성 연구가 추가적으로 진행되어야하며 완제 의약품 조성에 대한 연구도 추가적으로 진행되어야 하는 것으로 판단됨.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 해당 없음

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 동물용 의약품으로써의 활용을 위하여, 세포 수준의 결과에 의거하여 추가적으로 임상적 이용에서의 유효성 및 안전성의 확보가 선행되어야함.

#### IV. 보안성 검토

- 해당 없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

- 해당 없음

##### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과

- 해당 없음





### 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타연구활용액) (이전)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용	
											SCI		비 SCI	논 문 평 가 I F					
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건		
가중치	0.6													0.4					
최종 목표	1											1		2					
당해 년도	목표	1										1		2					
	실적	1										0		1					
달성률 (%)	100											0		50					

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	개 인터페론 람다-3를 발현하는 재조합 아데노 바이러스 벡터

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	1									

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 반려동물용 바이러스성 전염병 치료제 개발을 위한 연구 : 기존에 개 인플루엔자에 대해 효능을 입증한 개 인터페론 람다를 발현하는 재조합 아데노바이러스 시스템을 이용하여 반려동물에 이환될 수 있는 다양한 바이러스성 전염병에 대한 억제를 확인할 예정임. 1년의 시험관 내 실험을 통하여 치료제가 유효하게 작용할 수 있는 바이러스군을 확보한 후, 후속 연구를 통해 동물 모델에서의 안전성 및 유효성 평가를 실시할 예정임.</li> <li>○ 동물 모델에서 안전성 및 유효성이 확보된 치료제에 대해 시제품 제작 및 사업화를 계획할 예정임. 제품화를 통해 동물용 의약품 허가를 위한 절차를 밟을 예정임.</li> <li>○ 아데노바이러스에 대한 면역이 형성된 개체에 대한 전략             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 후속연구에서 생체 내 재조합 아데노바이러스 치료제 적용 시, 아데노바이러스에 대한 면역이 형성된 개체에 대해서는 효과가 떨어질 수 있음. 이에 대하여 항체가 형성되어있는 개체에게는 면역억제제인 rapamycin을 병용 투여하여 재조합 아데노바이러스에 대한 치료효과를 비교 평가할 예정임.</li> </ul> </li> </ul>

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용액)(0)
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	0.6													0.4						
최종목표	1											1		2						
연구기간내 달성실적	1											0		1						
연구종료후 성과장출 계획	1	1			1	5	1	50	50	1					1	1	1			

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업 인터페론 람다 및 천연물 유래 물질을 이용한 반려동물 전염성 바이러스 치료제의 시험관 내 유효성·안전성 평가 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 인터페론 람다 및 천연물 유래 물질을 이용한 반려동물 전염성 바이러스 치료제의 시험관 내 유효성·안전성 평가 연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.