

코로나19 치료제 *in vivo* 효력시험법

민원인 안내서

2022. 8.



식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭

코로나19 치료제 *in vivo* 효력시험법 (민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	≡ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 단순 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
≡ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서 · 안내서 구분	<input type="checkbox"/> 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(≡지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술했는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(≡안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	≡ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2022년 8월 일		
담당자 확 인(부서장)		박 성 혜 최 선 옥

이 안내서는 식품의약품안전평가원의 연구사업 결과와 국내외 문헌을 참고하여 작성되었으며, 코로나19 치료제 개발 시 *in vivo* 효력시험법에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전평가원의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식(‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 보다 나은 시험법이 확립되었을 경우나 제품의 특성에 따라 다른 시험법을 적용할 수 있음을 알려드립니다.

그간 코로나19의 대처를 위하여 식품의약품안전평가원은 많은 노력을 하였고, 그 일환으로 연구사업을 통하여 코로나19 치료제 개발 시 사용되는 *in vitro* 가이드라인을 발간한 바 있으며, 실험동물을 이용한 효력시험법의 시험원리, 시험방법, 평가방법 및 결과분석에 대하여 제시하였습니다.

본 안내서를 통해 *in vivo* 효력시험법에 대한 상세한 내용을 제시함으로써 개발자의 효력시험 확립에 필요한 시간과 노력을 절감할 수 있으며, 보다 우수한 코로나19 치료제 개발에 도움이 되어 코로나 팬데믹 상황 극복에 도움을 줄 수 있길 기대합니다.

※ “민원인 안내서”란 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 약리연구과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-5213

팩스번호: 043-719-5200

머리말

코로나바이러스감염증19 (코로나19, SARS-CoV-2)는 2019년 발견된 이래로 전 세계적으로 급속도로 확산함에 따라, 코로나19 종식을 위하여 세계 각국에서 백신 및 치료제 개발에 몰두하고 있으며 지금도 보건, 사회, 경제 등 전반에 걸쳐 코로나19의 위협에서 벗어나기 위해 노력하고 있습니다. 코로나19 등 신종 바이러스의 출현은 새로운 변종 바이러스로 발생할 가능성이 있으며 대유행 종식을 위해 신속한 치료제 개발이 요구되고 있습니다.

이에 식약처에서는 신규 코로나19 치료제 후보물질의 임상시험 진입에 소요되는 시간을 최소화하기 위해 치료제 개발의 초기단계에 필요한 비임상 효력시험법의 확립을 통한 치료제 개발을 앞당길 수 있는 방안을 마련하기 위해 노력하고 있습니다.

따라서, 본 안내서는 코로나19 치료제 후보물질의 신속한 개발을 위하여 *in vitro* 가이드라인을 발간하데 이어서, 실험동물의 행동 및 임상증상, 병리·면역조직학적 시험 등 *in vivo* (생체 내) 시험법에 대한 자세한 내용을 기술함으로써 치료제 개발을 앞당기는 데 도움을 주고자 마련하였습니다.

앞으로도 우리 원은 변화하는 시대에 발맞춰 시험연구를 지속적으로 발전·강화하여 과학적 지원이 원활히 진행됨으로써 국민의 건강과 안전을 위해 최선을 다해 노력하겠습니다.

감사합니다.

2022년 8월

식품의약품안전평가원장 서경원

개정 이력서

코로나19 치료제 *in vivo* 효력시험법 (민원인 안내서)

제·개정번호	승인일자	주요내용
안내서-1216-01	2022.8.	코로나19 치료제 <i>in vivo</i> 효력시험법 (민원인 안내서) 제정

목 차

I. 일반사항

1. 목적	1
2. 용어정의	2
3. 적용범위	4

II. 실험동물 선정 및 고려사항

1. 실험동물 선정	5
1.1. 마우스 모델	5
1.2. 햄스터 모델	6
2. 실험동물의 마취	7
2.1. 마취제	7
3. 반수치사량(LD ₅₀) 시험	8
3.1. 반수치사량	8
3.2. 시험 방법	8
4. 고려사항	10

III. 코로나19 치료제 *in vivo* 효력시험법(예시)

1. 실험동물의 행동 및 임상증상 관찰	11
1.1. 시험원리	11
1.2. 재료 및 기기	11
1.3. 배양 및 시험물질	12
1.4. 시험방법	13
1.5. 평가방법	13
1.6. 결과분석	14



2. 항바이러스 효력 시험법	16
2.1. 바이러스 유전자 정량 시험법	16
2.1.1. 시험원리	16
2.1.2. 재료 및 기기	16
2.1.3. 시험방법	17
2.1.4. 평가방법	19
2.1.5. 결과분석	20
2.2. 조직병리학적 시험법	21
2.2.1. 시험원리	21
2.2.2. 재료 및 기기	21
2.2.3. 시험방법	22
2.2.4. 평가방법	23
2.2.5. 결과분석	26
2.3. 면역조직화학적 시험법	26
2.3.1. 시험원리	26
2.3.2. 재료 및 기기	26
2.3.3. 시험방법	28
2.3.4. 평가방법	29
2.3.5. 결과분석	30
3. 항염증 활성 시험법	31
3.1. 시험원리	31
3.2. 재료 및 기기	32
3.3. 시험방법	34
3.4. 평가방법	35
3.5. 결과분석	36
IV. 평가 시 고려사항	37
V. 참고문헌	38

I

일반사항

1 ▶ 목적

제2형 중증급성호흡기증후군 바이러스 2(SARS-CoV-2)는 중증 호흡기 증후군인 코로나바이러스감염증19 (코로나19)를 일으키는 원인 바이러스로 2019년 발견된 이래 다양한 변이바이러스가 출몰하며 전 세계적으로 급속히 확산하였다.

SARS-CoV-2의 변이주 및 신종 바이러스로 인한 감염증에 대응하기 위한 새로운 치료제 개발이 요구됨에 따라, 치료제 효과를 평가할 수 있는 시험법의 개발이 필요하다. 치료제의 임상시험 수행을 위해 표적치료 및 그 작용기전에 대한 연구만으로 인체 내에서의 작용을 설명하기에는 한계가 있으므로 임상시험 진입 전에 비임상시험 자료로써 *in vitro* (생체 외) 및 *in vivo* (생체 내) 효력시험을 모두 수행하여 치료제의 효력을 뒷받침하는 것이 필요하다 [1].

SARS-CoV-2로 인한 코로나19의 효과적인 치료제 후보물질 스크리닝을 위해서 1차적으로 *in vitro* 시험을 실시하여 항바이러스 활성을 확인한 후, *in vivo* 시험으로 그 효력을 평가하는 것이 권장된다. 특히, 항염증 작용기전을 목표로 하는 경우에는 약리기전에 따른 염증 억제 정도를 평가하는 *in vitro* 효력시험뿐만 아니라 바이러스 감염 동물 모델에서의 *in vivo* 효력시험을 수행하여야 한다.

식약처는 신규 코로나19 치료제 후보물질의 임상시험계획서를 신속하게 심사하고, 임상시험 진입에 소요되는 시간을 최소화하여 치료제 개발을 앞당길 수 있는 방안을 마련하기 위해 노력하고 있으며, 그 일환으로 올해 3월 항바이러스, 항염증 활성 등의 효력시험을 담은 “코로나19 치료제 *in vitro* 효력시험법”을 민원인 안내서로 발간한 바 있다.

본 안내서는 코로나19 치료제 후보물질의 신속한 스크리닝을 위하여 *in vivo* 시험법에 대한 자세한 내용을 기술함으로써 치료제 개발 단계에서 후보물질의 안전성과 유효성을 평가하는 데에 도움을 주고자 마련하였다.

코로나19 치료제의 비임상시험과 관련하여 동물모델을 이용한 *in vivo* 효력시험 수행 시, SARS-CoV-2 감염 동물 모델의 선정, 실험동물에서의 임상증상 관찰, 바이러스 정량, 조직병리학적, 면역조직화적 평가 등을 통한 항바이러스 효력 및 바이러스로 인한 염증을 억제하는 효력을 평가하기 위한 시험 항목과 시험 방법을 제시한다.

그동안 식약처에서 코로나19 치료제 개발을 위해 발간한 ‘코로나19 감염 동물모델 사례집’ 등과 ‘코로나19 치료제 *in vitro* 효력시험법’에 이은 본 안내서의 *in vivo* 효력시험법을 활용하여 치료제 개발자의 시행착오를 최소화하고 코로나19 치료제의 개발 기간을 단축할 수 있게 되기를 기대한다.

2 ▶ 용어정의

■ 코로나19

코로나바이러스-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2)에 의한 중증급성호흡기 감염증

■ 효력시험

의약품 개발 가능성을 탐색하는 시험으로, 치료 표적이나 작용기전에 대한 생체 외 및 생체 내 시험을 포함

■ *in vitro* (생체 외) 시험

생체 외에서, 시험관 내에서 시험관이나 배양기 등의 인공 환경 내에서의 시험

■ *in vivo* (생체 내) 시험

살아 있는 생체 내 혹은 세포 내에서의 시험

■ 동물모델

인간 질병의 연구 및 시험(비임상 시험)에 사용되는 살아있는 동물

■ 플라크(Plaque)

바이러스가 세포 용해를 일으켜 주변 세포가 감염되고 세포 단층이 탈락된 영역

■ 플라크 형성 단위(Plaque forming unit; PFU)

단층 배양된 세포에서 한 개의 플라크를 형성하는 바이러스의 감염 단위

■ 조직배양감염용량(tissue culture infectious dose; TCID)

세포 배양에서 세포를 감염시켜 세포변성을 나타낼 수 있는 바이러스 양

■ 반수치사량(Lethal dose for 50% kill; LD₅₀)

바이러스를 접종하였을 때 50%의 동물이 사망할 것으로 예측되는 통계적인 단위 용량. 실험동물의 단위체중당 시험물질의 중량(mg/kg)으로 표기

■ 바이러스 부하(Viral loads)

생물학적 표본에서 주어진 체적 부피의 바이러스 양

■ 실시간 정량 역전사 PCR (Real-time qRT-PCR)

역전사 중합효소연쇄반응법으로 PCR 과정 중에 증폭되는 산물을 실시간으로 모니터링하여 시료에 존재하는 초기 DNA량을 계산할 수 있는 방법

■ 역치 사이클(Cycle threshold ; Ct)

증폭신호의 증가 양상이 뚜렷하게 구분되는 시점(역치)과 DNA 증폭 곡선 사이의 교차점

■ 양성대조군(바이러스 접종 후 치료제 처리군, Positive control; PC)

시험 결과에서 코로나19 치료제에 의한 효력을 예측할 수 있는 대조군으로써 바이러스를 접종한 후 치료제를 처리한 군

■ 음성대조군(바이러스 접종군, Negative control; NC)

시험 결과에서 코로나19 치료제에 의한 효력이 관찰되지 않을 것으로 예측되는 대조군으로써 바이러스를 접종한 후 치료제를 처리하지 않은 군

■ 무처리대조군(Non-treatment control; NTC)

바이러스 및 치료제를 처리하지 않은 군

3 ▶ 적용범위

코로나19 치료제는 SARS-CoV-2의 인체 내 감염이나 증식을 억제하는 약물로써, 효과발현의 작용기전을 뒷받침하는 약리작용을 규명하기 위해 바이러스 감염 동물모델을 이용한 *in vivo* 효력시험이 필요하다. 코로나19 치료제에 대한 *in vivo* 효력시험은 「코로나19 치료제 개발 시 고려사항(민원인 안내서)」에 따라 SARS-CoV-2 감염 동물 모델에서 수행하는 것이 원칙이나 SARS-CoV-2와 유사성이 높은 바이러스 또는 감염 후 표적기관이 유사한 바이러스를 이용한 동물모델에서의 시험 결과가 고려될 수 있다.

현재, 「코로나19 감염 동물모델 사례집(민원인 안내서)」에서 다양한 동물 모델이 제시되어 있다[2]. 이 중 영장류 모델이 사람과 코로나19 감염 증상 가장 유사한 모델이나, 동물 확보 및 유지 관리가 어려워 제한점이 많아 본 안내서에서는 마우스, 햄스터와 같은 소동물 모델을 이용한 효력시험에 대한 예시를 제시하였다.

치료제 개발을 위하여 실험동물을 이용한 효력시험이 필수적이지만, 생명을 희생시키는 일이므로 충분한 검토를 통하여 동물의 희생을 최소화하여야 한다. 그러므로 *in vitro* 효력시험에서 유효성과 안전성(독성)을 평가하고, 시험물질의 특징에 따라 적절한 실험동물의 종을 선정하여, 치료제의 투여방법 및 투여용량을 설정하는 등의 선행 시험 및 시험 설계가 수반되어야 한다. 또한, 치료제의 특성과 시험계의 특성이 모두 고려될 수 있도록 개발자와 시험자의 충분한 논의를 통하여 최적의 *in vivo* 효력시험을 설계하고 시험을 수행한다.

본 안내서는 SARS-CoV-2 감염 동물 모델을 이용한 임상병리학적 평가, 항바이러스 및 항염증 활성 등에 대한 시험방법을 다루고 있으며, 본 안내서에서 제시한 방법은 연구사업 결과 및 국내외 문헌을 참조하여 효력시험 방법 중 일부 시험을 안내하는 것으로, 코로나19 치료제 후보물질의 특성을 고려하여 적합한 다른 동물 모델 및 시험방법을 적절하게 선택할 수 있다. 또한, 임상시험계획 승인 또는 품목허가를 위한 효력 자료로서의 적절성은 사전에 식약처와 충분한 논의가 필요하다.

II

실험동물 선정 및 고려사항

1 ▶ 실험동물 선정

실험동물은 「실험동물에 관한 법률」에 따라 ‘동물실험을 목적으로 사용 또는 사육되는 척추동물’로 정의하고 있으며, 같은 법 시행령에서 규정한 ‘우선 사용대상 실험동물’로는 마우스, 랫드, 기니피그, 햄스터, 저빌, 토끼, 개, 돼지, 원숭이가 이에 해당 된다 [3].

실험동물의 개체 선택에 우선적으로 고려하는 기준은 연령이며, 같은 연령이라도 체중의 차이가 있고 각 개체에 따라 감수성이 다르기 때문에 동물실험은 연령과 체중 등의 신체적 조건이 비슷한 실험동물들을 여러 마리 사용하여 실시한다.

1.1. 마우스 모델

마우스 모델은 코로나19에 대한 항바이러스 연구에 적합한 감염 동물 모델로 알려져 있으며, 일반적으로 이용되고 있는 실험동물이다. 현재는 인간 안지오텐신 전환효소2(Angiotensin-converting enzyme 2; ACE2) 유전자를 변형한 마우스가 개발되어 있으며, 상용화되어 있어 확보가 용이하다. ACE2 유전자 변형 마우스 실험동물로는 K18-hACE2 transgenic in B6 mouse 또는 FVB mouse, CCSP-hACE2 Transgenic in FVB mouse, SFTPB-hACE2 Transgenic in FVB mouse, 그리고 CAG-hACE2 Transgenic in FVB mouse 등이 있으며 국내·외 코로나19 치료제 및 백신의 효력 평가를 위한 감염 동물모델로 이용되고 있다 [2].

본 안내서는 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV에 감수성이 있는 K18-hACE2 유전자 변형 마우스를 코로나19 감염 동물 모델로 선정하였다. K18-hACE2 마우스는 인간 케라틴 18 프로모터(human cytokeratin 18 (K18) promoter)에 특이적인 인간 ACE2를 발현하도록 형질전환을 이용하여 제작된 마우스 모델이며, SARS-CoV가 세포 진입을 위해 사용하는 수용체인 인간 ACE2가 마우스 상피조직에 발현이 유도되기 때문에 코로나19 및 SARS에 대한 항바이러스 효력을 연구하는 데 유용하다 [4-5].

K18-hACE2 유전자 변형 마우스의 특징은 아래의 표와 같다.

[표 1] 유전자 변형 마우스 모델

시험계	B6.Cg-Tg (K18-ACE2)2PrImn/J 또는 CAG-hACE2 Transgenic in FVB mouse
주령 및 성별	5 ~ 16 주령, 수컷
바이러스	■ 폐 조직에서 Plaque assay 혹은 TCID 분석에서, 바이러스 감염 2 ~ 4일 후 최대량 도달 후 감소 시작
임상증상	<ul style="list-style-type: none"> ■ 체중 감소 : 감염 후 10~20% 감소 ■ 바이러스 접종 5 ~ 6일 후부터 사망개체 발생 ■ 활동성 저하가 관찰되며 체온은 변화 없음
병리학	<ul style="list-style-type: none"> ■ 폐 병변: 중증도의 병변이 관찰됨 - Lung (inflammation, edema, capillary dilatation) (필요시, 비장(spleen)의 백수(White pulp) 유착 관찰)
중증도	<ul style="list-style-type: none"> ■ 바이러스 투여량에 의존적인 병변 증가 관찰 ■ 임상증상 고려 시 예측되는 중증도 (□ 경증 □ 중등증 ■ 중증)

1.2. 햄스터 모델

SARS-CoV-2 및 SARS-CoV 감염 햄스터 모델로는 골든 시리안 및 차이니스 햄스터 등이 보고되어 있다 [6-8].

골든 시리안 햄스터는 다른 설치류와는 달리, 감염 이후 SARS-CoV-2 바이러스의 복제가 이루어지며, 폐를 중심으로 바이러스가 대량 분포되어 있는 것이 발견되었다. 또한 빠른 호흡과 체중 감소, 호흡기 및 폐에서 조직 병변이 관찰된다. 바이러스 감염 7일에 임상증상 및 폐 병변이 최고에 이르지만, 이후에 정상 회복되어 사망에 이르지 않는다. 야생 골든 시리안 햄스터는 유전자 변형 없이 이용이 가능한 코로나19 감염 동물 모델이며, 그 특징은 아래의 표와 같다.

[표 2] 골든 시리안 햄스터 모델

시험계	골든 시리안 햄스터
주령 및 성별	6-10주령, 수컷
바이러스	<ul style="list-style-type: none"> ■ 바이러스 역가(Viral titer)는 폐에서 가장 높음 (Ct 값) ■ 5 dpi*에 최대량 도달 후 감소, 14 dpi에 회복
임상증상	<ul style="list-style-type: none"> ■ 체중 감소: 7 dpi까지 10% 감소 ■ 체온 변화, 호흡기 증상(콧물, 기침), 기력 저하 등은 관찰되지 않음
병리학	<ul style="list-style-type: none"> ■ 폐 병변: 감염 후 시간이 경과할수록(2-7 dpi) 병리학적 점수가 증가하는 경향 ■ 혈관 및 기관지 주변 및 중격 조직의 염증세포 침윤 확산
중증도	<ul style="list-style-type: none"> ■ 경미한 체중감소, 활동성 감소 등은 관찰되지 않음. ■ 임상증상 고려 시 예측되는 중증도 (□ 경증 ■ 중등증 □ 중증)

(dpi*: days post infection, 일 감염 후)

2 ▶ 실험동물의 마취

동물실험에 있어서 적절한 보정과 마취는 동물복지를 위해서 뿐만 아니라, 재현성 있고 과학적인 실험을 수행하기 위해서도 필요하다. 일반적으로 적절한 보정은 동물에게 주는 고통 또는 불쾌감을 현저히 경감시키고, 실험에서의 조작을 용이하게 하며, 또 사람에게 대한 위험을 방지하기 위해서도 필요하다. 실험동물에 대한 마취약제와 마취방법의 선택은 동물의 종, 나이, 성별, 크기, 건강상태 등에 따라서 다르기 때문에 수의학적, 약리학적 지식 및 기술을 필요로 하므로 실험자는 적극적으로 전문가의 지도를 따른다 [9].

2.1. 마취제

실험동물에 일반적으로 사용되는 마취제는 염산케타민, 졸레틸 등의 주사제와 에테르, 이산화질소 등의 흡입마취제가 있다. 주사마취제는 마취적기(수술적기)로의 도입이 비교적 쉽고 안정된 마취상태를 유지할 수 있으므로 간단한 수술이나 흡입마취 전의 마취유도제로 사용된다. 마취약제는 기관의 동물실험윤리위원회에서 승인 및 사용이 가능한 것으로 선정한다.

※ 예시: 마우스 주사마취제 투여 권장량 [발췌: IACUC 표준운영 가이드라인]

약제	투여량(mg/kg)	투여경로
Zoletil [®] 50(Tiletamine + Zolazepam) + Xylazine	40~50 + 5~10	복강 주사
Pentobarbital	40 ~ 50	복강 주사
Ketamine	100	복강 주사
Ketamine + Xylazine	80~100 + 5~10	복강 + 복강 주사

3 ▶ 반수치사량(LD₅₀) 시험

3.1. 반수치사량

코로나19 치료제의 효력을 평가하는 동물실험에 앞서, 실험동물에 투여하기 위한 SARS-CoV-2의 양을 정하기 위해서 반수치사량(Lethal dose for 50% kill; LD₅₀)을 측정한다. 반수치사량 시험의 목적은 SARS-CoV-2 감염 동물 모델 (예시: K18-hACE2 유전자 변형 마우스)이 같은 양의 바이러스에 감염이 되었더라도 개체마다 사망에 이르는 양이 각기 다르기 때문에 50%가 사망하는 투여량의 평균값을 결정하여 실험에 사용하는 투여량을 정하기 위함이다. 이는 동물대체시험법 가이드라인에 따라, 반수치사량 평가는 과도한 실험동물의 수를 줄이고 고통을 경감시킬 수 있는 시험이다 [9].

SARS-CoV-2에 의한 감염 증상은 감염 후 10일까지 나타나며 이를 기준으로 생존 및 폐사율을 결정한다. 다만, 골든 시리안 햄스터의 경우 마우스 감염 동물 모델과 달리 임상증상은 관찰되지만 폐사하지 않으므로 반수치사량 측정이 불가능하다. 따라서 골든 시리안 햄스터의 경우에는 최대 임상증상(체중감소~10% 등 [표 2. 골든 시리안 햄스터 모델] 참조)으로 대체하여 반수치사량을 결정할 수 있다.

3.2. 시험 방법

1) 바이러스 투여

SARS-CoV-2는 변이주에 따라 임상증상 및 폐사율이 다르므로 여기에서는 우한 바이러스주와 델타 변이주 바이러스를 특정한다.

SARS-CoV-2는 Vero-E6 세포에 접종하고 3일 동안 배양 후, 배양 상층액으로부터 바이러스를 수확하여 다음 사용까지 -80°C 에 저장, 보관한다. 시험을 수행하기 전에 SARS-CoV-2 바이러스는 연속적으로 단계 희석된 농도로 Vero-E6 세포에 감염시킨 후, 플라크 시험법에 따라 생성된 플라크를 계수하여 역가(titer)를 산출한다.

SARS-CoV-2(역가 1×10^6 PFU/mL) 원액은 생리식염수로 단계 희석하여 적당량을 준비한다(예시: 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 또는 1×10^2 PFU/mL). 단계 희석된 바이러스는 30 μL 를 취하여 각 시험군(최소 5 마리)의 마우스에 비강 내로 주입한다.

2) 실험동물 관찰 및 기록

감염 후 14일 동안 실험동물의 임상증상(예시: 체중 측정)과 폐사 여부를 관찰하여 기록한다. 시험 종료 후, 폐사한 실험동물의 수를 시험군 전체의 실험동물의 수로 나누어 폐사율(%)을 계산한다.

3) 반수치사량 결과 및 계산

시험군의 마우스 수의 50%가 폐사한 바이러스의 희석도를 찾아서 Spearman-Kärber법을 사용하여 반수치사량을 계산한다 [10].

Spearman-Kärber 계산법 : $\log LD_{50} = \log(m) + 0.5 - \Delta/p$

① m = 100% 폐사한 최대 희석 배수의 로그 값 ($\log(m)$)

② Δ = 폐사 마우스의 총수

③ p = 시험군의 마우스 수

※ 결과 및 계산 예시

반수치사량 시험 결과는 아래와 같다.

바이러스 희석 배수(로그값)	폐사한 마우스 (마리, 수)	생존한 마우스 (마리, 수)
원액 (10^0)	5	0
1/10 (10^{-1})	4	1
1/100 (10^{-2})	3	2
1/1,000 (10^{-3})	2	3
1/10,000 (10^{-4})	1	4
1/100,000 (10^{-5})	0	5

$$\begin{aligned}\log LD_{50} &= \log(m) + 0.5 - d/p \\ &= \log(10^0) + 0.5 - (15)/(5) \\ &= -2.5\end{aligned}$$

* 바이러스 원액의 농도는 1×10^6 PFU/mL, 희석 배수가 $10^{-2.5}$ 이며, 마우스 1 개체당 투여량이 30 μ L 이므로, 1 LD_{50} 는 1×10^6 (PFU/mL) / $10^{-2.5} \times 0.03$ (mL) = 9.5×10 PFU/마우스로 계산된다. 20 g의 마우스에 9.5×10 PFU의 바이러스를 투여한 결과이므로, 이를 kg 으로 환산하면 9.5×10 PFU \times 1000 / 20 (kg) = 4.75×10^3 PFU/kg가 된다.

위 계산식에 따라, 반수치사량은 몸무게 20 g의 마우스를 50% 폐사 가능한 바이러스의 양을 반영하여, 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\text{마우스 } LD_{50} = 4.75 \times 10^3 \text{ PFU/kg}$$

4 ▶ 고려사항

동물실험은 「동물보호법」 및 「실험동물에 관한 법률」에 따라 과학적·윤리적 이용을 도모하고 동물의 복지를 보장하며, 동물을 이용한 실험에 관하여 원칙을 준수하여 수행한다. 동물실험의 원칙은 인류의 복지증진과 동물 생명의 존엄성 고려, 동물실험을 대체할 수 있는 방법을 우선 고려하여 실험 최소화, 실험동물의 고통이 수반되는 실험은 감각이 낮은 동물 사용, 진통·마취제 등 사용, 실험이 끝난 후 해당동물이 회복할 수 없는 경우 고통을 주지 않는 방법으로 처리 등으로 요약할 수 있다.

동물실험에서 고통, 통증 및 불편을 최소화시키거나, 과학적 목적에 적합한 종료시점을 미리 설정하여 적용하는 것이 바람직하다. 다만, 감염실험의 경우 20% 체중감소, 4℃ 이상 체온 저하로 종료시점을 결정할 수 있다. 동물실험의 종료시점의 적용을 위한 일반적 고려사항은 [한국실험동물수의사회, “설치류의 인도적 실험종료 기준”(2014.12)]을 따른다 [11].

그밖에, 실험동물의 사육 및 시설관리에 관한 동물실험시설, 실험동물의 사육설비, 그리고 시설의 환경 등은 「농림축산검역본부·식품의약품안전처 공동 동물실험 및/또는 실험동물 관련 위원회(IACUC) 표준운영 가이드라인」을 따른다 [9].

III

코로나19 치료제 *in vivo* 효력시험법(예시)

의약품을 개발하는 단계에서 비임상 효력시험은 *in vitro* 시험과 *in vivo* 시험을 모두 수행하여 치료제의 효능을 평가하는 것이 원칙이다.

코로나19 치료제 후보물질의 *in vivo* 효력시험은 코로나19 감염 동물 모델을 선정하고, 감염 동물 모델을 이용하여 임상병리학적 평가, 항바이러스제 효력시험과 항염증 활성 시험을 실시하여 평가한다. 본 안내서의 *in vivo* 효력시험 방법으로 실험동물의 임상증상 관찰, 바이러스 부하 측정, 조직병리학적 시험, 면역조직화학적 시험 및 사이토카인 유전자의 정량 측정을 이용한 항염증 활성 시험을 제시하고자 한다.

1 ▶ 실험동물의 행동 및 임상증상 관찰

1.1. 시험원리

실험동물에서의 바이러스 증식, 임상적 악화 시점 및 자연회복 여부 등의 결과 자료는 효력시험의 중요한 지표 또는 평가항목이 된다. 따라서, 치료제의 특성과 사용하는 감염 동물 모델의 임상적 특징을 고려하여 동물실험을 수행한다.

코로나19 감염 동물 모델은 행동 저하와 체중감소 등의 임상증상이 관찰되는 특징이 있으므로, SARS-CoV-2 감염 및 치료제 투여 이후의 실험동물의 행동과 임상증상을 관찰하여 치료제의 효력을 평가할 수 있다.

1.2. 재료 및 기기

1.2.1. 세포와 바이러스

- Vero-E6 세포(ATCC, CRL-1586) : *Cercopithecus aethiops*, kidney cell line
- SARS-CoV-2 (BetaCoV/Korea/KCDC03/2020, NCCP#43326)
- SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2, NCCP#43390)

1.2.2. 실험동물

- B6.Cg-Tg (K18-ACE2)2PrImn/J 마우스(예시: The Jackson Laboratory, USA)
- 골든 시리안 햄스터(예시: The Central Lab Animal, 한국)

1.2.3. 시약 및 재료

- 양성대조물질(코로나19 치료제, 예시: 몰누피라비르(molnupiravir))
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
- Fetal bovine serum
- Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM
- Penicillin/Streptomycin
- 동물마취제(예시: Zoletil[®] 50, Virbac, France)
- tert-amyl alcohol (2-methyl-2-butanol) (예시: Sigma-Aldrich, USA)
- 생리식염수
- 1 mL syringe

1.2.4. 기기 및 장비

- 생물안전작업대(세포 및 바이러스 처리)
- 저울(실험동물 몸무게 측정)
- 직장체온계(실험동물 체온 측정)
- 단일채널 피펫(시약 및 액체 검체 분주)

1.3. 배양 및 시험물질

1.3.1. 세포와 바이러스 배양

Vero-E6 세포는 DMEM 배양액(10% FBS, 1% Pen/Strep 포함)을 이용하여 2.5×10^6 /mL로 현탁하고, 6 well 플레이트에 2 mL씩 분주한다. 세포가 분주된 6 well 플레이트를 37°C, CO₂ 배양기에서 16시간 배양한다.

SARS-CoV-2는 Vero-E6 세포에 접종하고 배양, 증식하여 사용한다. 배양 상층액으로부터 수확된 바이러스는 다음 사용까지 -80°C에 저장, 보관한다.

시험을 수행하기 전에 SARS-CoV-2는 연속적으로 단계 희석된 농도로 Vero-E6 세포에 감염시킨 후, 생성된 플라크를 계수하여 역가(titer)를 산출한다.

1.3.2. 시험물질 조제

1) 바이러스 희석액 준비

SARS-CoV-2는 냉동된 바이러스 스톱을 실온에서 10분간 해동한 후, 생리식염수를 희석하여 준비한다. 미리 측정하여 계산된 LD₅₀ 값을 이용하여, 10~30 LD₅₀/마우스로 감염시킬 수 있게 한다(30 LD₅₀ 예시: 마우스 LD₅₀ = 1.5×10^4 PFU/Kg인 경우, 20 g의 마우스에 9.0×10^3 PFU/30 μ L를 준비한다).

$$30 \times 1.5 \times 10^4 = 45 \times 10^4 \text{ PFU/Kg} \rightarrow (20\text{g}) 45 \times 10^4 \times 0.02 = 9 \times 10^3$$

2) 양성대조물질 및 시험물질의 조제

DMEM을 이용하여 양성대조물질 및 시험물질을 희석하여 조제한다.

1.4. 시험방법

1.4.1. 실험동물 준비

바이러스 접종 3일 전, 실험동물을 ABSL3 시설로 이동하여 적응을 시킨다.

1.4.2. 바이러스 접종 및 치료제 투여

실험동물에 접종할 SARS-CoV-2는 동물 두수(마리)당 30 LD₅₀(100 PFU/ 30 μ L)로 준비하고, 실험동물은 마취제를 주사하여 바이러스 접종을 준비한다. 마취된 실험동물에 바이러스를 비강 내 투여한다. 시험하는 치료제의 임상적 투여경로와 용법용량을 고려하여, 동일경로 및 용량반응성을 평가할 수 있는 다양한 용량과 횟수를 고려하여 치료제를 투여한다.

1.5. 평가방법

코로나19 치료제 투여 후에 실험동물의 행동 및 임상증상을 관찰하여 효력을 평가한다. 다음의 지표를 이용하여 실험동물을 관찰하여 기록한다.

- 1) 체중 변화: 체중 측정, 체중증가량의 변화
- 2) 사료 및 음수 섭취 변화
- 3) 외형 변화
- 4) 임상 증상 : 심박수, 호흡수 등
- 5) 자극하지 않았을 때 행동 변화(고통 및 통증의 유의한 행동지표)
 - 감소 : 털 고르기, 췌바퀴 달리기, 사료섭취, 음수섭취, 기어오르기 등
 - 증가 : 휴식, 행동정지, 긁기(만성 통증 시)
- 6) 외부 자극(소음, 빛 자극, 물리적 자극 등) 시 행동 반응
- 7) 감염실험 등에서 저체온증
 - 저체온증은 동물상태 악화의 중요한 지표임
 - 감염 마우스는 34℃ 이하 시 치명적임

1.6. 결과분석

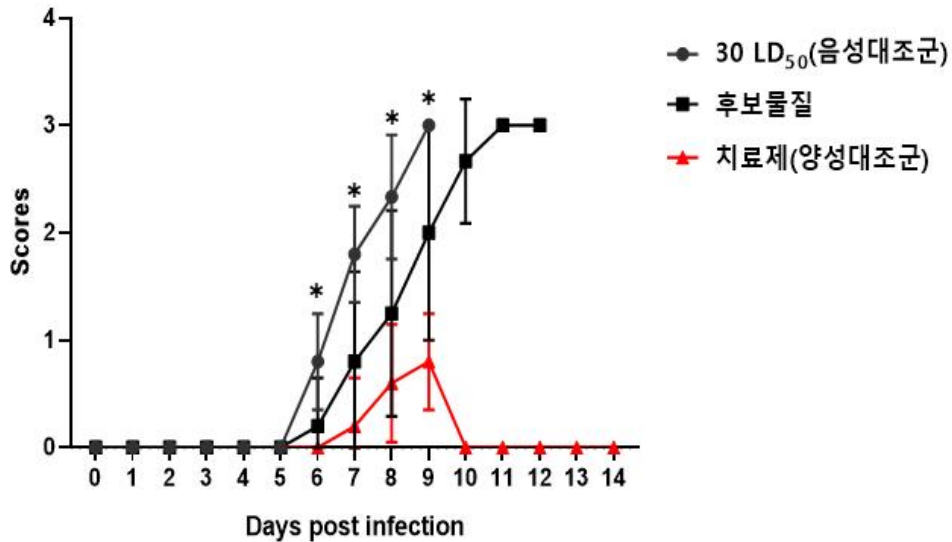
동물관찰 지표에 대한 scoring system을 적용하여 점수화 할 수 있다(예시) [9].

※ Scoring system 예시(설치류)

점수	체중변화	털 (hair coat)	눈과 코	행동	
				움직임 (activity)	자세 (posture)
0	정상체중	정상	정상	정상	정상
1	10% 감소	털 상태 거침	실눈을 뜨거나 눈이 감겨있음	약한 자극에 대한 반응 및 활동성 감소	자세가 굽은 상태로 앓음
2	10~20% 감소	털 상태 거칠고 단정하지 않음, 탈모 발생	실눈을 뜨거나 눈이 감겨있음. 눈 주변이 부풀어 있음, porphyrin staining 발견됨	자극에 대한 반응 및 움직임 없음	굽은 상태로 바닥에 앓음, 머리가 바닥에 위치
3	20% 이상 감소				바닥에 자주 누워 있음

※ 예시: 동물관찰 및 scoring 결과

바이러스 감염과 치료제 투여 이후, 14일 동안 동물의 행동과 임상증상을 관찰하고 기록한다. 관찰 결과는 지표에 따라 scoring하여 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[그림 1] 동물관찰 지표 예시 (*: $p < 0.05$)

* 각 시험군의 마우스는 SARS-CoV-2를 30 LD₅₀로 접종하고, 치료제를 정맥으로 투여하여 14일 동안 관찰하였다. 음성대조군에서 감염 후 6일에 임상증상이 관찰되기 시작하였고, 동물관찰 지표에 따라 1점 이상의 점수를 보이는 마우스 개체가 발생하였다. 감염 후 9일에 3점으로 최고 점수를 보이며 10일에 모두 폐사하였다. 양성대조군에서는 감염 9일에 1점으로 시험군에서의 최고 점수를 보였으며, 10일 이후 동물관찰 점수 0점이 기록되며 정상 회복되었다. 후보물질이 투여된 시험군에서는 감염 11~12일에 3점이었으며, 13일에 모두 폐사하였다. 동물관찰 지표 scoring에 따라, 2점 이상에서 마우스가 사망하며, 3점 도달 시 사망으로 간주할 수 있다. 또한, 관찰 기간 동안 최고점수가 1점인 경우에는 정상으로 회복되어 사망 개체가 발생하지 않았으므로 치료제의 효력으로 판단할 수 있다.

2 ▶ 항바이러스 효력 시험법

2.1. 바이러스 유전자 정량(quantification) 시험법

2.1.1 시험 원리

SARS-CoV-2는 호흡기 감염을 일으키는 바이러스로써, 바이러스에 감염된 동물 모델은 SARS-CoV의 표적기관인 폐에 병변 현상이 나타나며 폐 조직에서는 바이러스가 검출된다.

바이러스 정량은 조직 내 바이러스의 존재 유무를 판단할 수 있을 뿐 아니라 바이러스의 양을 측정할 수 있는 방법으로써 Plaque assay, TCID 또는 실시간 정량 역전사 PCR (Real-time qRT-PCR) 등을 이용한다.

여기에서는 실시간 정량 역전사 PCR 방법을 예시로, 실험동물의 조직에서 바이러스 RNA를 분리, 정제하고 특이적인 프라이머를 이용하여 바이러스 유전자를 증폭한다 [12].

폐 조직에서의 SARS-CoV-2 유전자 중 Nucleocapsid gene을 실시간 정량 역전사 PCR을 수행하여 유전자를 정량하여 바이러스 양을 측정한다. qRT-PCR 실험 결과는 PCR 특정 cycle 수 값을 의미하는 Ct (cycle threshold)로 얻어진다.

2.1.2. 재료 및 기기

2.1.2.1. 세포와 바이러스

- Vero-E6 세포(ATCC, CRL-1586) : *Cercopithecus aethiops*, kidney cell line
- SARS-CoV-2 (BetaCoV/Korea/KCDC03/2020, NCCP#43326)
- SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2, NCCP#43390)

2.1.2.2. 실험동물

- B6.Cg-Tg (K18-ACE2)2PrImn/J 마우스(예시: The Jackson Laboratory, USA)
- 골든 시리안 햄스터(예시: The Central Lab Animal, 한국)

2.1.2.3. 시약 및 재료

- 양성대조물질(코로나19 치료제, 예시: 몰누피라비르(molnupiravir))
- 음성대조물질(예시: SARS-CoV-2 Nucleocapsid의 cDNA)

- 동물마취제(예시: Zoletil[®] 50, Virbac, France)
- ert-amyl alcohol (2-methyl-2-butanol) (예시: Sigma-Aldrich, USA)
- 생리식염수
- 1 mL syringe
- RNA 추출액(예시: Trizol solution (Invitrogen Life Technologies, USA))
- RNeasy Mini Kit (예시: QIAGEN, Germany)
- Ethyl alcohol (예시: DUKSAN, Korea)
- SuperScriptII Reverse Transcriptase (예시: Invitrogen, USA)
- Green Advantage qPCR Premix (예시: Takara, Japan)
- SARS-CoV-2 Nucleocapsid gene detection primer sets

Target	Primer	Nucleotide Sequence
SARS-CoV-2, N	Forward	5'-AATCAGCGAAATGCACCCCGCATTACGTTT-3'
	Reverse	5'-AAACCTTGGGGCCGACGTTGTTTTGATCGC-3'

2.1.2.4 기기 및 장비

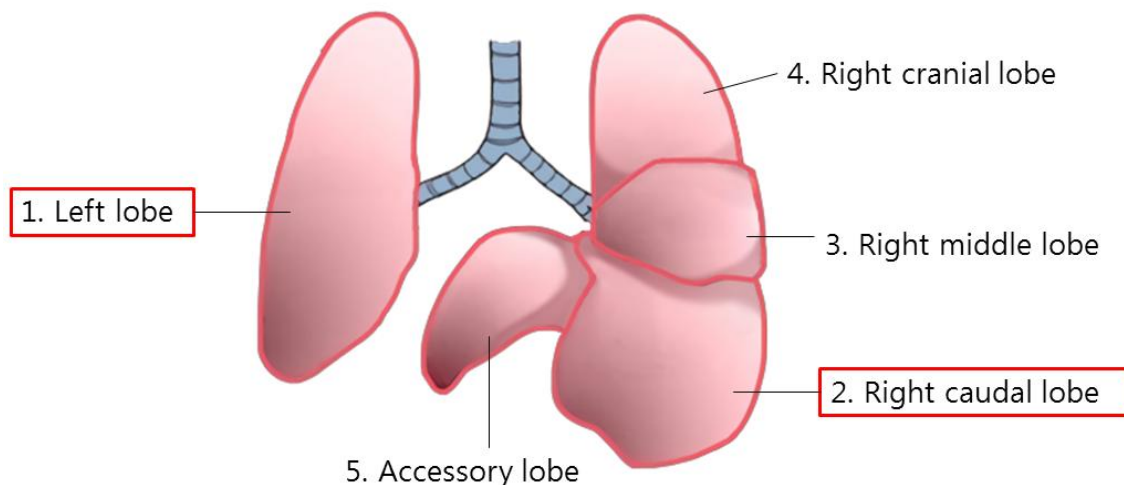
- 생물안전작업대(세포 및 바이러스 처리)
- 원심분리기
- 유전자증폭장치(예시: AB 7500 Real-Time instrument system
(Thermo Fisher Scientific, USA))
- Spectrophotometer (RNA 정량)
- 단일채널 피펫(시약 및 액체 검체 분주)

2.1.3. 시험방법

2.1.3.1. 폐 조직 적출 및 total RNA 분리

바이러스 접종 후 7일과 14일에 각 실험동물의 폐를 적출하고, 그림1의 'Left lobe'와 'Right caudal lobe' 부위를 잘라서 RNA 추출에 사용한다. 나머지 폐의 부위는 조직 관찰에 사용한다 [13].

적출한 폐 조직은 RNA 추출액 또는 상용화된 RNA 분리키트를 사용하여 total RNA를 분리하고, Spectrophotometer로 정량한다.



[그림 2] 폐(폐엽)의 명칭과 RNA 추출에 사용하는 부위

2.1.3.2. Real-time qRT-PCR

2.1.3.1.에서 분리된 total RNA 2 μ g의 total RNA와 Random hexamer를 이용하여 single strand cDNA를 합성한다. 특이적 프라이머를 사용하여 Real-time qRT-PCR 반응을 수행한다(예시). 시험의 흐름도는 그림2와 같다.

※ 예시

Real-time qRT-PCR 방법

- ① total RNA 2 μ g과 random hexamer 10 pmole를 혼합한다.
- ② 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 신속히 얼음에 둔다.
- ③ 반응액에 5× first strand buffer 4 μ L, 10 mM dNTPs 1 μ L, 0.1 M Dithiothreitol 2 μ L, SuperScript II Reverse Transcriptase 1 μ L를 첨가한다.
- ④ cDNA 2 μ L, 2× TB Green Advantage qPCR Premix 10 μ L, primer (10 μ M) 각 0.4 μ L를 포함하여 20 μ L 반응액 제조한다.
- ⑤ StepOnePlus Real-time PCR System을 사용하여 PCR 수행(95℃, 30초 최초 변성반응; 95℃ 3초, 60℃ 25초 40회 반복; 95℃ 15초, 60℃ 1분, 95℃ 15초)

2.1.4. 평가방법

Real-Time qRT-PCR 수행 후, 결과 값으로 나타난 시험물질 처리군, 양성대조군과 음성대조군에서의 copy 수 값을 비교한다.

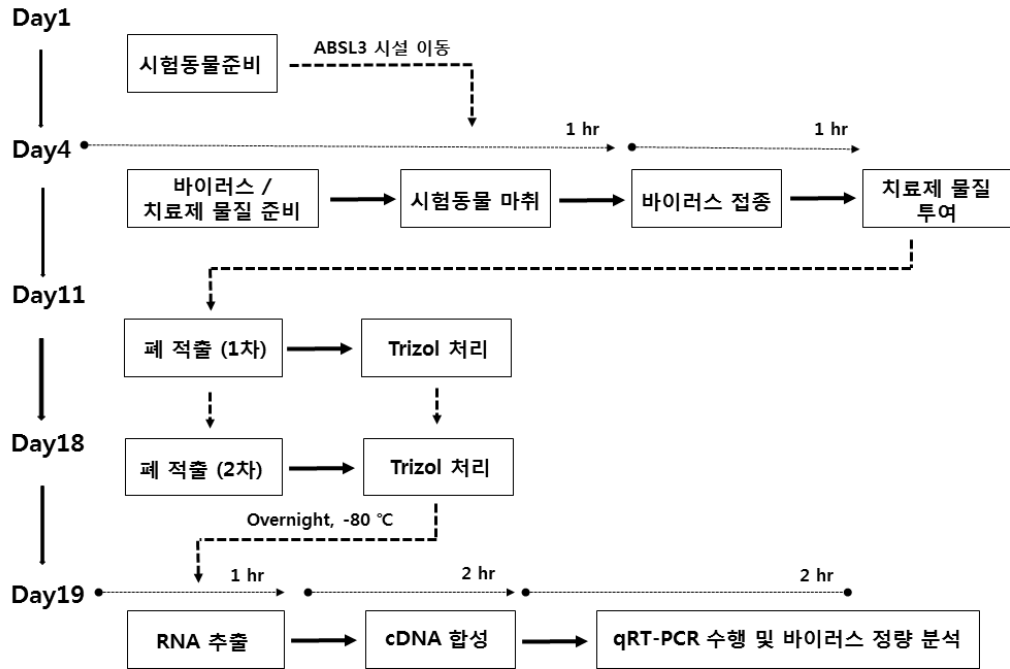
바이러스의 양은 유전자 copy 수를 이미 알고 있는 표준 샘플(예: DNA control template)을 이용하여 미지의 절대적인 양을 결정하는 절대정량 방법으로 결과를 산출한다. 시험군 및 대조군의 유전자 copy 수를 정량하기 위해서는 먼저 표준 곡선을 만든 다음 각 시험군과 대조군의 유전자 copy 수를 표준 곡선과 비교하여 값을 계산한다.

표준곡선은 음성대조물질(예시: SARS-CoV-2 Nucleocapsid의 cDNA)을 최소 5개의 10배 단계 희석한 DNA를 이용하여 만든다(예시: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). 단계 희석한 각 DNA의 copy 수는 다음과 같이 계산한다.

$$\text{DNA copy 수 계산법 : } \frac{A \text{ (ng)} \times 6.0221 \times 10^{23} \text{ (molecules/mole)}}{B \text{ (bp)} \times 660 \text{ g/mole} \times 1 \times 10^9}$$

- ① A = dsDNA의 양 (ng)
- ② B = dsDNA의 길이 (bp)
- ③ 6.0221×10^{23} = 아보가드로 수
- ④ 660 g/mole = 1 bp ds DNA의 평균 질량

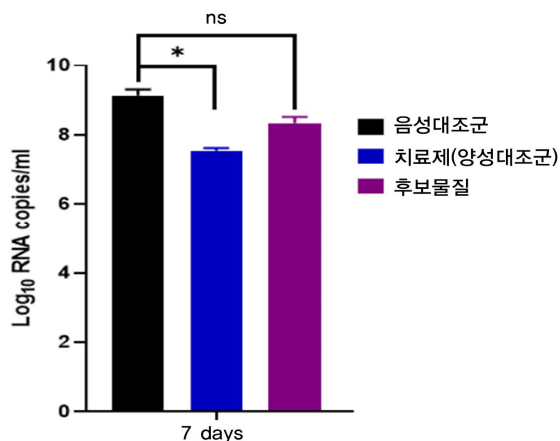
지수함수적으로 증폭되는 실시간 PCR의 DNA 증폭량의 log 값을 취해 X축은 희석배수, Y축은 Ct 값으로 표시하여 표준곡선을 만든다. 일반적으로 유전자증폭장치 내 프로그램에서 DNA의 copy 수를 입력하여 표준곡선을 만들고, 이때에 얻어진 값을 이용하여 시험군의 바이러스의 양을 산출하며, 바이러스의 부하는 1 mL 당 바이러스의 수(copies/mL)로 나타낸다.



[그림 3] 바이러스 정량 시험의 작업 흐름도

2.1.5. 결과분석

바이러스의 양이 많다는 것은 실험동물의 체내에서 SARS-CoV-2가 증식했다는 의미이며, 바이러스 감염에 따른 증상이 심할 수 있다는 것을 예측할 수 있는 결과이다. 반면, 낮은 바이러스의 양은 바이러스가 증식하지 않았다는 것과 시험물질(치료제)의 항바이러스 효력이 존재한다는 것으로 판단할 수 있다.



[그림 4] 바이러스 정량 측정의 예시 (*: $p < 0.05$, ns: $p > 0.05$)

* 결과에서 음성대조군의 바이러스 양은 2×10^9 copies/mL, 양성대조군은 5×10^7 copies/mL으로 나타난 경우, 치료제에 의해 바이러스 증식이 억제된 것으로 판단할 수 있다. 후보물질을 투여한 시험군에서의 바이러스 양은 3×10^8 copies/mL으로 바이러스 증식 억제 효력을 보이지만 양성대조군보다는 효력이 낮다고 할 수 있다.

2.2. 조직병리학적 시험법

2.2.1. 시험원리

SARS-CoV-2에 감염된 동물 모델은 폐 조직에 염증이 증가하여 폐병변이 나타난다. 실험동물의 폐에서 조직병리학적 검사를 실시하여 코로나19 치료제에 대한 효력을 평가할 수 있다.

조직병리학적 검사는 실험동물의 폐를 적출하여 조직의 병소 부위를 적절하게 잘라내어 포름알데하이드(Formaldehyde)로 고정시킨 다음, 파라핀 블록으로 만들어 얇게 절단하여 슬라이드에 부착 후 염색하여 현미경에서 관찰하는 시험법이다. SARS-CoV-2에 감염된 폐 조직은 폐포 공간의 호중구 세포의 수가 많아지고, 폐포 중격이 비후되는 등의 세포사이의 공간이 줄어든다. 관찰된 폐 조직의 손상을 조직학적 점수(Histological score)로 산출하여 치료제에 대한 효능을 평가할 수 있다 [14].

2.2.2. 재료 및 기기

2.2.2.1. 세포와 바이러스

- Vero-E6 세포(ATCC, CRL-1586) : *Cercopithecus aethiops*, kidney cell line
- SARS-CoV-2 (BetaCoV/Korea/KCDC03/2020, NCCP#43326)
- SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2, NCCP#43390)

2.2.2.2. 실험동물

- B6.Cg-Tg (K18-ACE2)2PrImn/J 마우스(예시: The Jackson Laboratory, USA)
- 골든 시리안 햄스터(예시: The Central Lab Animal, 한국)

2.2.2.3. 시약 및 재료

- 양성대조물질(코로나19 치료제, 예시: 몰누피라비르(molnupiravir))
- 동물마취제(예시: Zoletil[®] 50, Virbac, France)

- tert-amyl alcohol (2-methyl-2-butanol) (예시: Sigma-Aldrich, USA)
- 생리식염수
- 1 mL syringe
- Formaldehyde (HCHO)(예시: Sigma-Aldrich, USA)
- Ethyl alcohol (예시: Duksan, 한국)
- Hematoxylin Solution (예시: Sigma-Aldrich, USA)
- Eosin Y (예시: Sigma-Aldrich, USA)
- Xylene (예시: Sigma-Aldrich, USA)
- 봉입제(예시: PermOUNT, Fisher Scientific, USA)

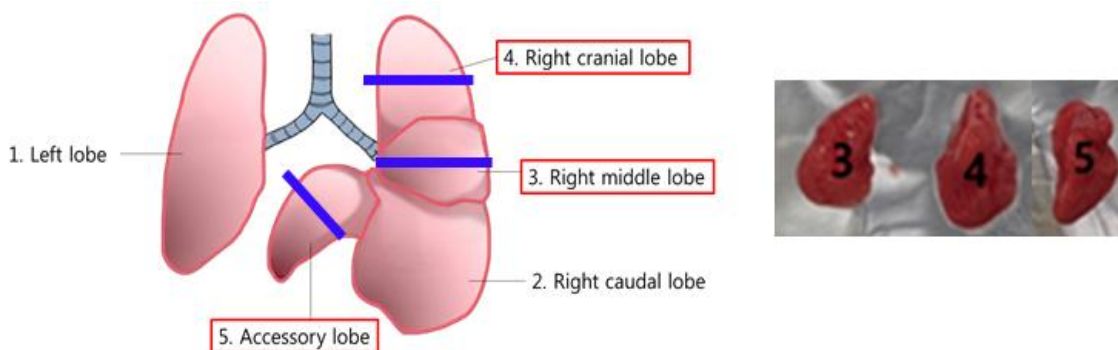
2.2.2.4. 기기 및 장비

- 생물안전작업대(세포 및 바이러스 처리)
- 자동표본조직처리기(예시: 폐 조직 전처리)
- 자동분배기(Tissue Embedding system) (예시: 파라핀 블록 제작)
- 조직절편기(Microtome) (파라핀 블록 절단)
- 광학현미경(조직 관찰)

2.2.3. 시험방법

2.2.3.1. 폐 조직 적출 및 파라핀 블록 제작

바이러스 접종 후 7일과 14일에 각 실험동물의 폐를 적출하여 각 폐 조직을 절취한다. 바이러스에 의한 폐 손상을 정확하게 관찰하기 위하여, 폐 조직은 세기관지 폐포 접합부와 주 기관지를 포함하여 아래의 그림3에서와 같이 절취 한다 [13].



[그림 5] 조직병리학 시험을 위한 폐 조직 절취

폐 조직은 자동표본조직처리기에서 포름알데하이드와 70% 에탄올에 전 처리되고, 자동적으로 고정, 탈수 및 파라핀 침투가 된다. 자동표본조직처리가 완료되면 자동분배기를 사용하여 파라핀 블록을 제작한다. 파라핀 블록은 조직절편기를 사용하여 4 μ m의 두께로 절편을 만들어 슬라이드에 부착한다.

2.2.3.2. 염색 및 관찰

조직 슬라이드는 현미경 관찰이 가능하도록 탈파라핀, 함수, 수세, 염색, 탈수, 봉입 과정을 거쳐 헤마톡실린과 에오신(H&E) 염색을 한다 (예시).

※ 예시

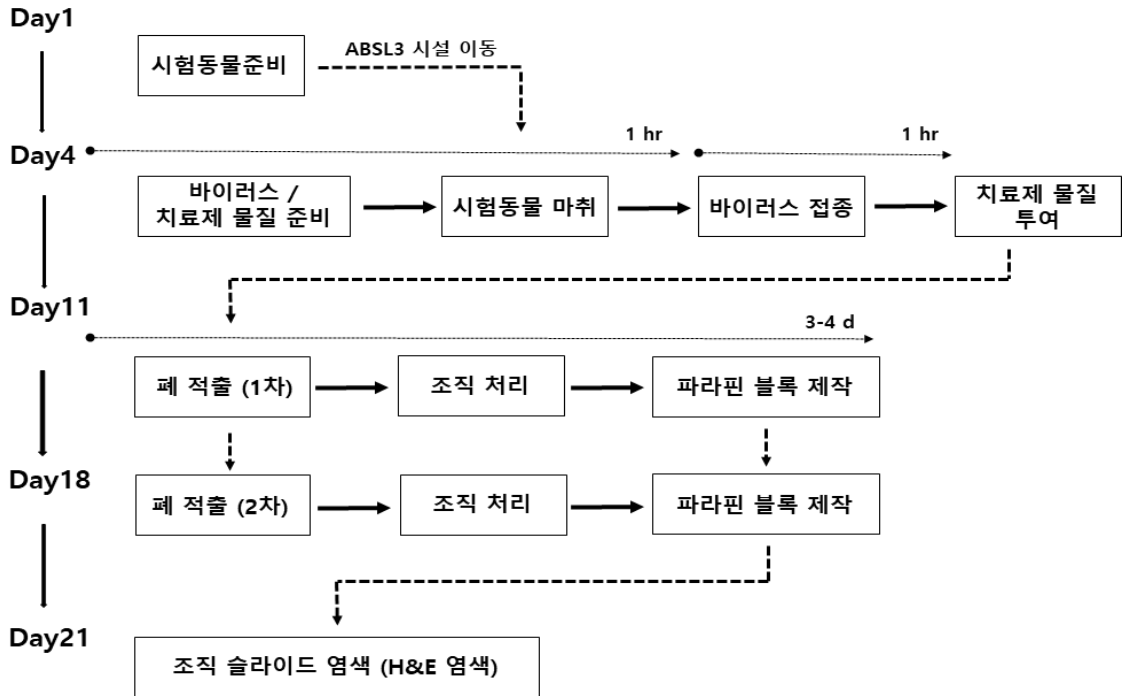
H&E 염색 방법

- ① 탈파라핀 : 조직 슬라이드를 Xylene에 넣고 5분씩 3번 처리하여 파라핀을 제거한다.
- ② Xylene 제거 및 함수 : 100% 에탄올부터 50% 에탄올까지 단계적으로 5분씩 처리하여 Xylene을 제거한다.
- ③ 헤마톡실린 염색 : 헤마톡실린 용액에 100 초 동안 처리하여 조직 내의 핵을 염색한다.
- ④ 감별 탈색 : 0.3% HCl-Alcohol로 1~2회 처리 후 흐르는 물에 수세한다.
- ⑤ 중화 현색 : 0.3% 암모니아 수로 처리 후 흐르는 물에 수세한다.
- ⑥ 에오신 염색 : 에오신 용액에 20초간 처리하여 세포질을 염색(대조염색)한다.
- ⑦ 탈수 : 50% 에탄올부터 100% 에탄올까지 단계적으로 3회 처리하여 탈수한다.
- ⑧ 투명 : 조직 슬라이드를 Xylene 3분씩 3번 처리하여 알코올을 제거한다.
- ⑨ 봉입 : 염색이 완료된 조직 슬라이드를 봉입제와 커버 글라스를 사용하여 덮는다.

2.2.4. 평가방법

코로나19 감염 동물 모델에서 바이러스 감염 후 폐병변이 가장 중증으로 예측되는 7일째의 폐 조직과 동물 실험의 종료일인 14일째의 폐병변을 관찰한다. 폐 조직은 무작위로 3개의 필드를 선택하여 현미경 하에서 600X 배율로 관찰하며, 조직학적 점수로 평가한다 [14-16].

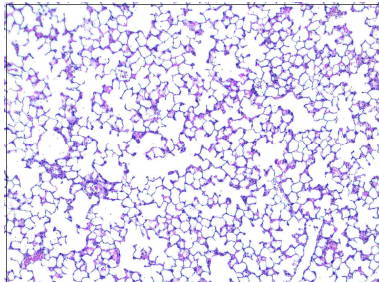
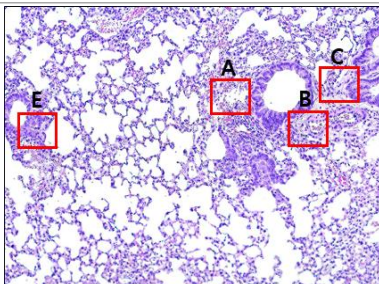
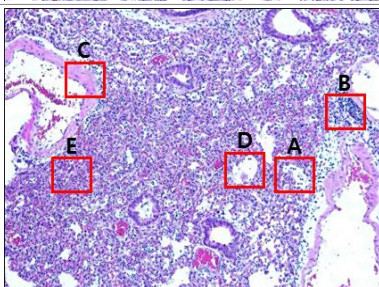
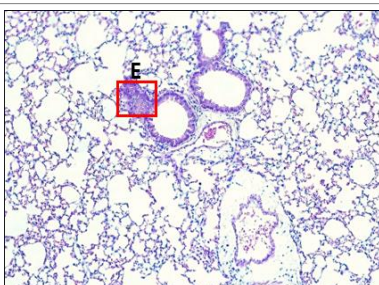
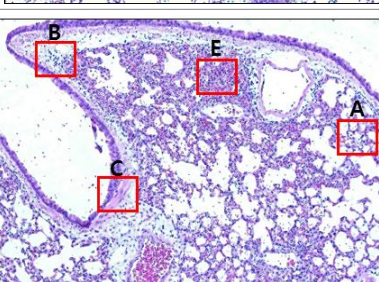
조직학적 점수는 Acute lung injury (ALI) 채점 시스템을 따르며, 다음의 예시와 같이 매개변수를 이용하여 분석할 수 있다. 최종 점수는 마우스(조직) 당 3개의 필드를 평균하여 얻는다.



[그림 6] 조직병리학적 시험법의 작업 흐름도

※ 조직병리학적 점수(Acute lung injury 채점 시스템)의 예시 [16]

	관찰 항목	점수
A	폐포 공간의 호중구 (neutrophils in the alveolar space)	없음 = 0 1-5개 세포 = 1 5개 이상 = 2
B	간질/중격의 호중구 (neutrophils in the interstitial space/septae)	없음 = 0 1-5 세포 = 1 5개 이상 = 2
C	유리막 (hyaline membranes)	없음 = 0 하나의 막 = 1 2개 이상 = 2
D	공기 공간의 단백질성 파편 (proteinaceous debris in air spaces)	없음 = 0 1개 = 1 2개 이상 = 2
E	폐포 중격 비후 (alveolar septal thickening)	정상조직 두께의 2배 = 0 정상조직 두께의 2-4배 = 1 정상조직 두께의 4배 이상 = 2

일 감염 후 (dpi)	폐조직 관찰	조직학적 점수		
0 dpi (정상 폐조직)		정상 조직 소견	A	0
			B	0
			C	0
			D	0
			E	0
			합계	0
7 dpi (양성대조군)		폐포 공간의 호중구 1개 이상, 중격의 호중구 5개 이상, 유리막 1개 이상, 폐포의 정상조직의 2-4배 두께 관찰	A	1
			B	2
			C	1
			D	0
			E	1
			합계	4
7 dpi (음성대조군; 바이러스 접종군)		폐포 공간의 호중구 5개 이상, 중격의 호중구 5개 이상, 유리막 2개 이상, 단백질 파편 2개 이상, 폐포 중격이 정상조직의 4배 이상	A	2
			B	2
			C	2
			D	2
			E	2
			합계	10
14 dpi (양성대조군)		정상 조직 소견, 폐포의 정상조직의 2-4배 두께 관찰	A	0
			B	0
			C	0
			D	0
			E	1
			합계	1
14 dpi (음성대조군; 바이러스 접종군)		폐포 공간의 호중구 1개 이상, 중격의 호중구 1개 이상, 유리막 1개, 폐포 중격이 정상조직의 4배 이상	A	1
			B	1
			C	1
			D	0
			E	2
			합계	5

*K-18 ACE2 마우스에서 시험

2.2.5. 결과분석

급성폐손상 시 폐조직에서 호중구가 증가되고, 호중구가 폐포 상피세포를 지나 폐포강내로 이동하며 유리막 형성 및 호중구의 침윤현상이 나타나게 된다. 호중구 침윤은 폐렴으로 이어지며, 중증 폐렴이 유발되면 폐 기능이 상실되고 사망에 이르게 된다. 폐손상에 대한 조직학적 특징을 이용하여 시험군과 치료제를 투여하지 않은 음성대조군의 조직학적 점수를 비교함으로써 항바이러스 효력을 판단할 수 있다.

조직학적 점수 채점 결과, 양성대조군은 총점이 0~1 점이고, 음성대조군에서는 총점이 4~5 점으로 평가되는 경우에, 후보물질을 투여한 시험군의 조직학적 점수가 1 점이면 코로나19 치료제의 효력이 존재한다고 판단 할 수 있다.

2.3. 면역조직화학적 시험법

2.3.1. 시험원리

면역조직화학 시험법은 항원-항체 반응을 염색에 도입한 방법으로, 조직 내에 있는 항원에 대하여 항체를 사용하여 항원-항체 반응을 유도하고 이를 검출하는 방식이다. 검출 방식에 따라 형광물질, 효소, 방사성 동위원소 등을 항체에 표지하여 검출할 수 있다. 특히, 효소를 이용한 표지는 특정한 시험 시설과 도구 등이 필요하지 않으며 장기간 유지 보관할 수 있는 장점이 있어서 일반적으로 사용되고 있다.

SARS-CoV-2 Nucleocapsid(N) 단백질에 대한 특이 항체와 반응하는 폐조직에서의 N 단백질 항원을 검출하여 바이러스에 감염된 세포 및 조직을 식별할 수 있다. 폐조직 검체는 1차로 SARS-CoV-2 N 항체를 사용하여 반응시키고, 이후에 효소가 표지된 2차 항체와 결합시킨 후 기질을 첨가하여 조직내의 N 단백질을 염색한다. 조직 슬라이드를 관찰하여 바이러스 감염에 의한 염색된 조직을 확인하여 조직학적 점수를 분석할 수 있다.

2.3.2. 재료 및 기기

2.3.2.1. 세포와 바이러스

- Vero-E6 세포(ATCC, CRL-1586) : *Cercopithecus aethiops*, kidney cell line
- SARS-CoV-2 (BetaCoV/Korea/KCDC03/2020, NCCP#43326)
- SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2, NCCP#43390)

2.3.2.2. 실험동물

- B6.Cg-Tg (K18-ACE2)2PrImn/J 마우스(예시: The Jackson Laboratory, USA)
- 골든 시리안 햄스터(예시: The Central Lab Animal, 한국)

2.3.2.3. 시약 및 재료

- 양성대조물질(코로나19 치료제, 예시: 몰누피라비르(molnupiravir))
- 동물마취제(예시: Zoletil[®] 50, Virbac, France)
- tert-amyl alcohol (2-methyl-2-butanol) (예시: Sigma-Aldrich, USA)
- 생리식염수
- 1 mL syringe
- Formaldehyde (HCHO)(예시: Sigma-Aldrich, USA)
- Ethyl alcohol (예시: Duksan, 한국)
- Xylene (예시: Sigma-Aldrich, USA)
- 구연산(Sodium citrate, 예시: Sigma-Aldrich, USA)
- 과산화수소(예시: Sigma-Aldrich, USA)
- 1차 항체(예시: SARS-CoV-2 Nucleocapsid antibody, Novus, USA)
- 2차 항체(예시: Goat anti-rabbit IgG HRP, Abcam, UK)
- Hematoxylin Solution (예시: Sigma-Aldrich, USA)
- Diaminobenzidine (DAB) (예시: Takara, Japan)
- 봉입제(예시: Permount, Fisher Scientific, USA)

2.3.2.4. 기기 및 장비

- 생물안전작업대(세포 및 바이러스 처리)
- 자동표본조직처리기(예시: 폐 조직 전처리)
- 자동분배기(Tissue Embedding system) (예시: 파라핀 블록 제작)
- 조직절편기(Microtome)(파라핀 블록 절단)
- 광학현미경(조직 관찰)

2.3.3. 시험방법

2.3.3.1. 폐 조직 적출 및 파라핀 블록 제작

바이러스 접종 후 7일과 14일에 각 실험동물의 폐를 적출하여 각 폐 조직을 절취한다. 바이러스에 의한 폐 손상을 정확하게 관찰하기 위하여, 폐 조직은 세기관지(bronchiole) 폐포 접합부와 주기관지를 포함하여 아래의 그림3에서와 같이 절취 한다 [13]. 폐 조직은 자동표본조직처리기에서 포름알데하이드와 70% 에탄올에 전 처리되고, 자동적으로 고정, 탈수, 투명 및 파라핀 침투가 된다.

자동표본조직처리가 완료되면 자동분배기를 사용하여 파라핀 블록을 제작한다. 파라핀 블록은 조직절편기를 사용하여 4 μm 의 두께로 절편을 만들어 슬라이드에 부착한다.

2.3.3.2. 항원성 복구

조직 슬라이드의 항원은 여러 과정을 거치는 동안 화학물질과 고온에 노출되어 항원성이 약해져있으므로, 항원성을 복구한 후 항체와 반응시키는 다음 단계를 수행하여야 한다. 항원은 열처리를 이용하여 복구하며, 전자레인지 또는 압력솥을 사용하여 강력한 열을 짧은 시간 내(20분)에 가하여 항원성을 부활시킨다.

2.3.3.3. 염색 방법

조직 슬라이드를 염색하는 방법은 직접법과 간접법이 있다. 직접법은 표지물질 (형광 또는 효소)로 표지된 1차 항체를 조직의 항원에 결합시켜 항원을 검출하는 방법이며, 간접법은 비표지 1차 항체를 조직의 항원에 결합시킨 후 표지물질이 결합된 2차 항체를 결합시켜 특정 항원을 검출할 수 있는 방법이다.

여기서는 간접 염색법을 예시로써 효소가 결합된 2차 항체를 사용하여 기질과 반응시켜 표적 단백질의 발색 반응을 관찰하는 방법을 제시한다.

※ 예시

면역조직화학적(IHC) 염색 방법

- ① 탈파라핀 : 조직 슬라이드를 Xylene에 넣고 5분씩 3번 처리하여 파라핀을 제거한다.
- ② Xylene 제거 및 함수 : 100% 에탄올부터 90% 에탄올까지 단계적으로 5분씩 처리하여 Xylene을 제거한다.
- ③ 항원성 복구 : 탈파라핀 조직슬라이드를 10 mM 구연산 완충용액(pH 6.0)에 넣고 전자레인지에서 10분, 압력솥에서 10분간 가열 후 30분간 식혀 준다.
- ④ Peroxidase 차단 : 3% 과산화수소로 10분간 처리하고, 3번 수세한다.
- ⑤ 비특이적 결합 차단 : 5% normal goat serum를 함유한 차단 용액을 1시간 처리한다.
- ⑥ 1차 항체 반응 : 비표지 1차 항체를 4℃도에서 16시간 반응시킨다.
- ⑦ 2차 항체 반응 : 표지 물질(효소)이 결합된 2차 항체를 1시간 반응시킨다.
- ⑧ 효소-기질 반응 : 기질(Diaminobenezidine, DAB)을 처리한다.
- ⑨ 대조 염색 : 헤마톡실린 용액을 사용하여 대조 염색을 한다.
- ⑩ 탈수 : 70% 에탄올부터 100% 에탄올까지 단계적으로 3회 처리하여 탈수한다.
- ⑪ 투명 : 조직 슬라이드를 Xylene 3분씩 3번 처리하여 알코올을 제거한다.
- ⑫ 봉입 : 염색이 완료된 조직 슬라이드를 봉입제와 커버 글라스를 사용하여 덮는다.

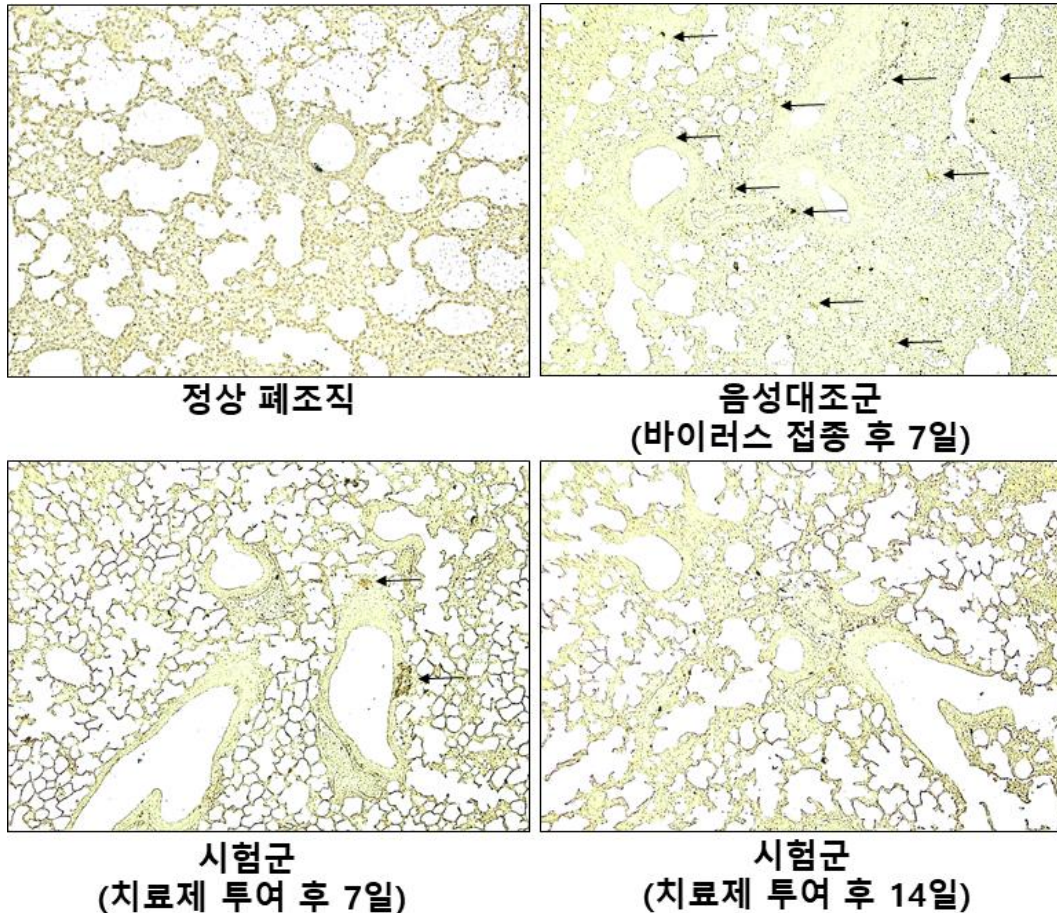
2.3.4. 평가방법

코로나19 감염 동물 모델에서 바이러스 감염 후 폐병변이 가장 중증으로 예측되는 7일째의 폐 조직과 동물 실험의 종료일인 14일째의 폐병변을 관찰한다.

염색이 완료된 조직 슬라이드를 광학현미경에서 관찰하여, 조직 내의 양성반응을 확인한다. 양성반응은 발색제의 종류에 따라 갈색, 적갈색, 적색, 검정색 등으로 나타난다. 대조염색제로 사용하는 헤마톡실린의 청색과 대조가 되어 쉽게 구분할 수 있다.

시험군 조직에서의 SARS-CoV-2 N 단백질의 발현은 염색(양성반응)을 점수화하여 평가할 수 있다. 폐 조직에 염색된 양성 세포가 10% 이하로 존재하는 경우 1점, 10~50%인 경우 2점, 50% 이상의 경우 3점으로 채점한다.

※ 예시: 면역조직화학적 시험 결과



[그림 8] 면역조직화학 염색 예시

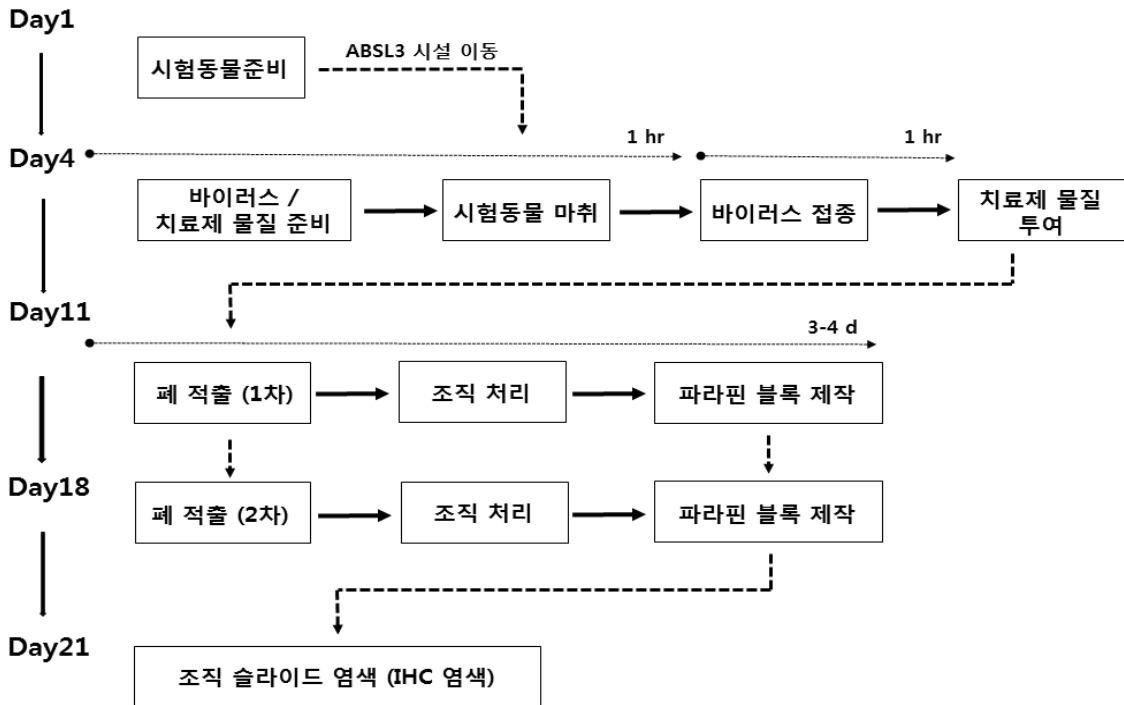
* SARS-CoV-2 감염 및 치료제 투여 후, 7일과 14일의 결과는 폐조직에서 갈색으로 나타나는 바이러스에 감염된 세포를 관찰하여 확인할 수 있다. 정상 폐조직에서는 갈색으로 염색된 부분이 없으며, 음성대조군에서는 갈색반점(화살표)이 다수 관찰된다. 치료제 투여 7일에서는 염색(화살표)이 관찰되었으나 14일에 정상으로 회복되어 갈색으로 염색된 부분을 관찰할 수 없었다.

2.3.5. 결과분석

양성대조군과 음성대조군에서의 면역화조직학적 점수와 시험군의 점수를 비교함으로써 항바이러스 효력을 판단할 수 있다. 면역화조직학적 점수 채점 결과, 양성대조군은 총점이

0~1점이고, 음성대조군에서는 총점이 3점으로 평가되는 경우에, 시험군의 면역화학조직학적 점수가 1점이면 코로나19 치료제의 효력이 존재한다고 판단 할 수 있다.

면역조직화학 염색이 고도의 특이성을 지닌 반응에 근거하고 있다고 하더라도, 위양성과 위음성을 고려해야 한다. 위양성은 기술적인 면의 착오나 항체 상호간의 교차반응, 지나친 배경 염색, 조직에 따른 과염색, 조직에 존재하는 내인성 단백질 때문에 발생할 수 있다. 또한 위음성은 조직을 고정할 때 사용하는 포르말린이 항원의 단백질과 결합하여 메틸렌 가교를 형성하여 염색을 방해하여 발생할 수 있다. 이러한 위양성 및 위음성을 감별하기 위해 양성대조군 또는 음성대조군을 포함하여 시험한다.



[그림 7] 면역조직화학적 시험법의 작업 흐름도

3 ▶ 항염증 활성 시험법

3.1. 시험원리

코로나19 치료제의 항염증 활성을 평가하기 위한 *in vivo* 시험의 일종으로 염증 반응에 관여하는 사이토카인 유전자의 변화량을 측정한다. 이를 위해 실험동물의 폐조직으로부터 추출한 RNA 이용, Real-time qRT-PCR를 수행하여 사이토카인 유전자를 정량적으로 검출, 비교함으로써 평가할 수 있다 [17-19].

Real-time qRT-PCR을 이용한 정량분석은 절대 정량 또는 상대 정량으로 수행할 수 있으며, 본 시험에서는 상대 정량분석을 적용하여 염증 관련 사이토카인의 발현량을 측정한다 [20-21]. 증폭을 수행하는 동안 RNA 무결성 및 역전사 효율과 같은 변수에 대한 정규화(normalization)를 위하여 housekeeping gene으로 잘 알려진 표준물질(예시: GAPDH)을 사용한다.

※ 사용한 염증 반응 관련 사이토카인의 종류(8종)

1	TNF- α
2	IL-1 α
3	IL-1 β
4	IL-2
5	IL-4
6	IL-6
7	IL-10
8	IL-12

3.2. 재료 및 기기

3.2.1. 세포와 바이러스

- Vero-E6 세포(ATCC, CRL-1586) : *Cercopithecus aethiops*, kidney cell line
- SARS-CoV-2 (BetaCoV/Korea/KCDC03/2020, NCCP#43326)
- SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2, NCCP#43390)

3.2.2. 실험동물

- B6.Cg-Tg (K18-ACE2)2Prlmn/J 마우스(예시: The Jackson Laboratory, USA)
- 골든 시리안 햄스터(예시: The Central Lab Animal, 한국)

3.2.3. 시약 및 재료

- 양성대조물질(코로나19 치료제, 예시: 몰누피라비르(molnupiravir))
- 음성대조물질(예시: SARS-CoV-2 Nucleocapsid의 cDNA)
- 동물마취제(예시: Zoletil[®] 50, Virbac, France)
- tert-amyl alcohol (2-methyl-2-butanol) (예시: Sigma-Aldrich, USA)

- 생리식염수
- 1ml syringe
- RNA 추출액(예시: Trizol solution (Invitrogen Life Technologies, USA))
- RNeasy Mini Kit (예시: QIAGEN, Germany)
- Ethyl alcohol (예시: DUKSAN, Korea)
- SuperScriptII Reverse Transcriptase (예시: Invitrogen, USA)
- Green Advantage qPCR Premix (예시: Takara, Japan)
- SARS-CoV-2 Nucleocapsid gene detection primer sets

※ 사용한 염증 반응 관련 사이토카인 검출용 프라이머

Target	Primer	Nucleotide Sequence
TNF- α	Forward	5'-AGCCCCCAGTGTGTATCCTT-3'
	Reverse	5'-ACAGTCCAGGTCACTGTCCC-3'
IL-1 α	Forward	5'-CCATAACCCATGATCTGGAAGAG-3'
	Reverse	5'-GCTTCAGTTTGTATCTCAAATCAC-3'
IL-1 β	Forward	5'-CTTCAGGCAGGCAGTATCACTC-3'
	Reverse	5'-TTGTTGTTTCATCTCGGAGCC-3'
IL-2	Forward	5'-GCGGCATGTTCTGGATTTGACTC-3'
	Reverse	5'-CCACCACAGTTGCTGACTCATC-3'
IL-4	Forward	5'-AGATGGATGTGCCAAACGTCCTCA-3'
	Reverse	5'-AATATGCGAAGCACCTTGAAGCC-3'
IL-6	Forward	5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'
	Reverse	5'-TCCACGATTTCAGAGAAC-3'
IL-10	Forward	5'-CGGGAAGACAATAACTGCACCC-3'
	Reverse	5'-CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC-3'
IL-12	Forward	5'-AGGACTTGAAGATGTACCAG-3'
	Reverse	5'-CTATCTGTGTGAGGAGGG-3'
GAPDH*	Forward	5'-CTGACTTCAACAGCGACACC-3'
	Reverse	5'-TAGCCAAATTCGTTGTCATACC-3'

* Housekeeping gene

3.2.4. 기기 및 장비

- 생물안전작업대(세포 및 바이러스 처리)
- 원심분리기
- 유전자증폭장치(예시: AB 7500 Real-Time instrument system (Thermo Fisher Scientific, USA))
- Spectrophotometer (RNA 정량)
- 단일채널 피펫(시약 및 액체 검체 분주)

3.3. 시험방법

3.3.1. 폐 조직 적출 및 total RNA 분리

바이러스 접종 후 7일과 14일에 각 실험동물의 폐를 적출하고, 그림1의 'Left lobe'와 'Right caudal lobe' 부위를 잘라서 RNA 추출에 사용한다. 나머지 폐의 부위는 조직 관찰에 사용 한다.

적출한 폐 조직은 RNA 추출액 또는 상용화된 RNA 분리키트를 사용하여 total RNA를 분리하고, Spectrophotometer로 정량한다.

3.3.2. Real-time qRT-PCR

3.3.1.에서 분리된 total RNA 2 μ g의 total RNA와 Random hexamer를 이용하여 single strand cDNA를 합성한다. 특이적 프라이머를 사용하여 Real-time qRT-PCR 반응을 수행한다(예시). 시험의 흐름도는 그림5과 같다.

※ 예시

Real-time qRT-PCR 방법

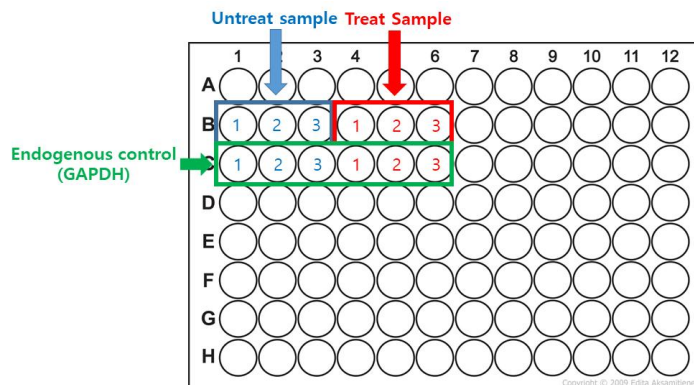
- ① total RNA 2 μ g과 random hexamer 10 pmole를 혼합한다.
- ② 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 신속히 얼음에 둔다.
- ③ 반응액에 5× first strand buffer 4 μ L, 10 mM dNTPs 1 μ L, 0.1 M Dithiothreitol 2 μ L, SuperScript II Reverse Transcriptase 1 μ L를 첨가한다.
- ④ cDNA 2 μ L, 2× TB Green Advantage qPCR Premix 10 μ L, primer (10 μ M) 각 0.4 μ L를 포함하여 20 μ L 반응액 제조한다.
- ⑤ StepOnePlus Real-time PCR System을 사용하여 PCR 수행(95℃, 30초 최초 변성반응; 95℃ 3초, 60℃ 25초 40회 반복; 95℃ 15초, 60℃ 1분, 95℃ 15초)

3.4. 평가방법

Real-Time qRT-PCR 수행 후, 결과 값으로 나타난 시험물질 처리군과 음성대조군에서의 유전자 발현량을 비교하는 상대 정량을 실시한다. 또한 GAPDH 유전자의 발현량을 결과 값의 기준으로 이용한다. qPCR 과정에서 중간에 형광 신호가 검출되는 역치를 넘는 순간의 cycle을 Ct 값이라고 한다. ΔCt 값은 시험물질 처리군 또는 음성대조군의 Ct 값에서 GAPDH Ct 값을 뺀 값으로 계산한다. 유전자 발현량($\Delta \Delta Ct$)은 시험물질 처리군의 ΔCt 값에서 음성대조군의 ΔCt 값을 뺀 값으로 계산하여 $2^{(-\Delta \Delta Ct)}$ 로 나타낸다[22-24]. 세 번의 반복 실험을 수행하여 얻은 데이터를 통계 분석한다.

※ 예시

- 1) Real-Time qRT-PCR 장비 내의 시스템에서 시험물질 처리군(treat sample), 무처리대조군(Non-treatment control), 그리고 표준물질(Endogenous control; GAPDH)을 아래와 같이 설정하여 PCR을 수행한다.



[Comparative CT ($\Delta \Delta Ct$) 설정]

- 2) 시험 결과를 엑셀 형식으로 변환한다.

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	RQ	RQ Min	RQ Max	Cr	Cr Mean
A1	IL6-1h drug NTC	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				9.0171719	9.0171719
A2	IL6-1h drug 43326	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				36.319084	36.319084
A3	IL6-1h drug 43381	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				38.88364	38.88364
A4	IL6-1h drug 43382	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				34.193207	33.825432
A5	IL6-1h drug 43388	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				37.098057	37.098057
A6	IL6-1h drug 43390	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				36.568424	36.568424
A7	GAPDH-1h drug NTC	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				18.814173	18.814173
A8	GAPDH-1h drug 4332	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				19.623632	19.623632
A9	GAPDH-1h drug 4338	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				19.28055	19.28055
A10	GAPDH-1h drug 4338	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				18.215828	18.215828
A11	GAPDH-1h drug 4338	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				19.256496	19.256496
A12	GAPDH-1h drug 4339	Target 1	UNKNOWN	SYBR	None				18.616087	18.616087

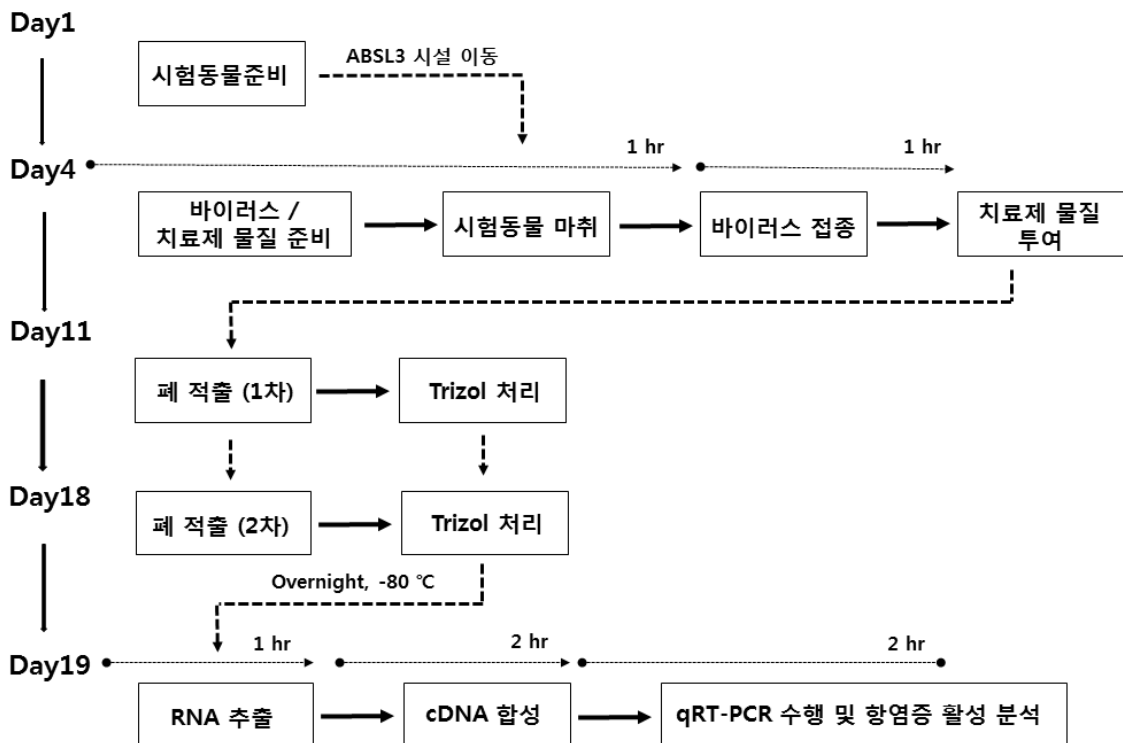
[엑셀 형식의 qPCR 결과 데이터]

3) ΔCt 값(시험물질 처리군의 Ct 값 - GAPDH Ct 값)을 계산한 다음, $\Delta \Delta Ct$ 값 (시험물질 처리군의 ΔCt 값 - GAPDH ΔCt 값)을 계산한다.

4) $\Delta \Delta Ct$ 값을 $2^{(-\Delta \Delta Ct)}$ 수식으로 변환하여 유전자의 발현을 정량 값으로 나타낸다.

3.5. 결과분석

Real-time qRT-PCR 수행으로 40 cycles 혹은 36 cycles 이하에서 타깃 유전자가 증폭이 되는 것을 관찰할 수 있다. 유전자 검출이 되지 않는 한계점의 기준은 무처리대조군과 비교하여 상대적 Ct 값으로 결정한다. 무처리대조군의 Ct 값이 35 이상에서 타깃 사이토카인 유전자의 Ct 값이 10 또는 25로 나타났다면, Ct 값이 10인 경우의 샘플의 유전자 발현량이 25인 경우보다 높은 것으로 판정할 수 있다. 시험 결과로부터 산출된 결과 값($2^{(-\Delta \Delta Ct)}$)은 GraphPad prism(GraphPad Software, USA) 등을 이용하여 통계 분석할 수 있다.



[그림 9] 항염증 활성 시험법의 작업 흐름도

IV

평가 시 고려사항

국내 동물실험과 관련하여 「실험동물에 관한 법률」은 실험동물 및 동물실험의 적절한 관리를 통하여 동물실험에 대한 윤리성 및 신뢰성을 높여 생명과학 발전과 국민보건 향상에 이바지함을 목적으로 제정된 법률이다.

동물실험은 「실험동물에 관한 법률」 시행령 제2조 동물실험시설에 따라 동물실험시설을 등록한 기관에서 수행한다. 또한 동물실험윤리위원회와 실험동물운영위원회는 동물실험계획서에 따라 동물실험이 적절히 진행되는지 심의한다.

동물보호법 제23조에 따라, 동물실험은 인류의 복지증진과 동물 생명의 존엄성 고려, 동물실험을 하려는 경우 이를 대체할 수 있는 방법 우선 고려하여 실험 최소화, 실험동물의 고통이 수반되는 실험은 감각이 낮은 동물 사용, 진통·마취제 등 사용, 그리고 실험이 끝난 후 해당 동물이 회복할 수 없는 경우 고통을 주지 않는 방법으로 처리함이 원칙이다. 따라서 위의 규정과 원칙을 준수하여 *in vivo* 에서 치료제 효력을 평가하기 위한 동물실험을 계획하고 수행한다.

코로나19 치료제의 *in vivo* 효력시험 시 사용되는 SARS-CoV-2는 고위험등급의 바이러스이므로 생물안전 3등급(BL3) 실험실에서 취급 및 실험을 수행해야 한다. 또한 SARS-CoV-2 감염 동물모델(실험동물)의 사육 및 동물실험은 동물 생물안전 3등급 실험실(ABL3)에서 수행되어야 한다.

이상에서 안내한 코로나19 치료제의 *in vivo* 효력시험 방법은 앞서 발간된 「코로나19 치료제 *in vitro* 효력시험법(민원인 안내서)」과 함께 활용하여, 개발된 제품 특성에 적절한 시험법으로 효력을 평가할 수 있다.

V

참고문헌

1. 코로나19 치료제 개발 시 고려사항, 식품의약품안전평가원, 2020.
2. 코로나19 감염 동물모델 사례집(민원인 안내서), 식품의약품안전평가원, 2021.
3. 동물실험 관련 국내 법령 제도 등에 관한 종합 안내서, 식품의약품안전처, 2021
4. Fatai S. Oladunni, et al., Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice, Nat. Comm. 11; 6122, 2020.
5. Yushun Wan, et al., Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus, J Virol. 17; 94(7): e00127-20, 2020.
6. Cui J, et al., Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nat. Rev. Microbiol. 17:181-92, 2019.
7. Song Z, et al., From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. Viruses 11: 59, 2019.
8. So-Hee Hong, et al., Lessons Learned from SARS-CoV and MERS-CoV: Preparation for SARS-CoV-2 induced COVID-19. J. Bacteriol. Virol. 50(2): 1144923, 2020.
9. 동물실험 및/또는 실험동물 관련 위원회(IACUC) 표준운영 가이드라인, 농림축산검역본부·식품의약품안전처 공동, 2020.
10. Chengfeng Lei, et al., On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity, Virologica Sinica 36; 141-144, 2021.
11. 설치류의 인도적 실험종료 기준, 한국실험동물수의사회, 2014.
12. Shi-Hui Sun, et al., A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis, Cell Host & Microbe 28; 124-33, 2020.
13. 실험동물 임상병리학, 권영일 외, 아카데미아, 2009.

14. Gustavo Matute-Bello, et al., American Thoracic Society Documents An Official American Thoracic Society Workshop Report: Features and Measurements of Experimental Acute Lung Injury in Animals, *Am J Respir Cell Mol Biol* 44; 725-738, 2011.
15. Weiqi Hong, et al., A mouse model for SARS-CoV-2-induced acute respiratory distress syndrome, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6, 2021.
16. Sarah R.Leist, et al., A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice, *Cell* 183(4); 1070-1085, e12, 2020.
17. S. R. Carding, et al., A polymerase chain reaction assay for the detection and quantitation of cytokine gene expression in small numbers of cells. *J Immunol Methods*. 151(1-2); 277-87, 1992.
18. Amy L. Strong, et al., Analysis of the Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Secreted by Adult Stem Cells during Differentiation. *Stem Cells Int.* 412467, 2015.
19. David Itiro Kasahara, et al., Acrolein Inhalation Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokine Production but Does Not Affect Acute Airways Neutrophilia *J Immunol* 181:736-745, 2008.
20. Hue, E.S., et al., Development and Validation of a Quantitative PCR Method for Equid Herpesvirus-2 Diagnostics in Respiratory Fluids. *J. Vis. Exp.* 109, 2016.
21. Patricia C. Stepp, et al., Comparing H1N1 Virus Quantification with a Unique Flow Cytometer and Quantitative PCR, *BioProcess International* 9(8) 2011.
22. Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method, *Methods*, 25(4); 402-8, 2001.
23. Pfaffl MW, Quantification strategies in real-time PCR, *The Real-Time PCR Encyclopedia A-Z of Quantitative PCR*, International University Line, 87-112, 2004.
24. Xiayu Rao, et al., An improvement of the 2^(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis, *Biostat Bioinforma Biomath*, 3(3); 71-85, 2013.

“코로나19 치료제 *in vivo* 효력시험법 (민원인 안내서)”

발 행 일 2022. 8.

발 행 인 서 경 원

편 집 위 원 장 정 자 영

편 집 위 원 최선옥, 권찬혁, 김도정, 박수정, 박성혜, 김관수, 임나영(약리연구과)
이희정(건국대학교)

자 문 위 원 김영림, 백주현(중앙향생약품과), 정지원, 도희정, 최민정(유전자재조합약품과)
김희성, 송영미(신속심사과)

최장훈(질병관리청), 김영봉, 최양규(건국대학교), 송대섭(서울대학교)

발 행 처 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 약리연구과

[전화 : 043-719-5213, 팩스 043-719-5200]
