

검증보고서

은 함유 필터의 코로나바이러스 불활화 효과 검증

시험 의뢰기관 : (주)코리아엠씨

시험 수행기관 : (주)바이오피에스

시험 번호 : BioPS-CX-2023

보고서 발행일 : 2020년 12월 30일

보고서 승인

시 험 제 목 : 은 함유 필터의 코로나바이러스 불활화 효과 검증

시 험 물 질 : 은 함유 필터

시 험 기 관 : (주)바이오피에스

(CRO)

대전광역시 유성구 유성대로 1646

한남대학교 대덕밸리캠퍼스 720161호

Tel) 042-629-8754

시 험 책 임 자 :

(Study Director)

배재은

(Name)

2020. 12. 30

(Approval Date)

[Signature]

(Signature)

시 험 의뢰 기 관 : (주)코리아엠씨

(Client)

경기도 안산시 단원구 시화대로 8, 시화공단4다 101호(성곡동)

대표이사 김 현 숙



의뢰기관확인자: 소속/직위

(Confirmer)

원소재 개발팀 부장

성 명

김성인

상기 본인은 본 보고서를 승인합니다.

김성인

(Name)

2020. 12. 30

(Approval Date)

[Signature]

(Signature)



Contract Research Organization

BIOPS

바이오의약품안전성검증센터

Center for Biopharmaceuticals Safety Validation
Tel: 042)629-8754 Fax: 042)629-8891

시험결과 요약

본 시험에서는 은 함유 필터에 의한 코로나바이러스 불활화 효과를 시험하였다. 이를 위해 은 함유 필터에 의한 Human coronavirus OC43의 불활화 효과를 접촉 시간별(10분, 30분, 60분)로 측정하였다.

은 함유 필터에 의한 불활화 효과 확인시험에서 spiking한 HCoV-OC43은 은 함유 필터 sample에 10분 접촉 시 75.26 %가 불활화 되었고, 30분 접촉 시 79.06 %가 불활화 되었으며, 60분 접촉 시 95.52 %가 불활화 되었다.

Inactivation (%)	EXP. 1	EXP. 2	Average
Sample treated on Argental filter for 10 min	76.53	73.98	75.26
Sample treated on Argental filter for 30 min	78.53	79.59	79.06
Sample treated on Argental filter for 60 min	97.09	93.95	95.52

목 차

보고서 승인	2
시험결과 요약	3
목 차	4
1. 시험의 목적	5
2. 대상 바이러스 및 세포주	5
3. 재료 및 방법	5
3.1 Hardware	5
3.2 시험물질 및 대조물질	6
3.3. 세포 배양 및 바이러스 배양 배지	6
3.4. Human coronavirus (HCoV)-OC43의 배양	6
3.5. 은 함유 필터의 코로나바이러스 불활화 효과 검증시험	6
3.6. Human coronavirus OC43의 titration (농도 정량 분석)	7
3.7. TCID ₅₀ 분석의 통계학적 원리	9
3.8. 바이러스 감소인수의 계산	11
4. 결과	12
4.1. 은 함유 필터에 의한 HCoV-OC43 불활화 효과 확인	12
5. 요약 및 결론	14
6. 기록의 보존	15
7. 시험 기간	15
8. 참고문헌	15

1. 시험의 목적

본 시험의 목적은 은 함유 필터의 코로나바이러스 불활화 효과를 검증하는데 있다. 이를 위해 은 함유 필터에 HCoV-OC43을 spiking 한 후 접촉 시간(10분, 30분, 60분)에 따른 불활화 정도를 확인하였다.

2. 대상 바이러스 및 세포주

은 함유 필터의 코로나바이러스 불활화 효과를 검증하기 위한 대상 바이러스로 COVID-19를 일으키는 SARS-CoV-2의 모델 바이러스인 Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43)을 사용하였다(Table 1). Human coronavirus OC43은 병원성바이러스은행 (Korea Bank for Pathogenic Viruses)으로부터 분양을 받았다.

Table 1. 시험에 사용한 바이러스와 세포주

바이러스	세포주	비고
Human coronavirus OC43 (KBPV-VR-8)	HCT-8 (KCLB-10244)	- COVID-19를 일으키는 SARS-CoV-2의 모델 바이러스 - Betacoronaviruses 속 바이러스 (+)ssRNA virus - Enveloped virus - 인수공통 바이러스

3. 재료 및 방법

3.1. Hardware

- Biological safety cabinet (ESCO®, Airstream S-series class II, USA)
- CO₂ incubator (SANYO, MCO-19AIC, Japan)
- Water bath (JEIO TECH, CW-20G, Korea/DAIHAN Scientific, WiseCircu®, Korea)
- Centrifuge (Hanil, Combi-514R, Korea/Vision Scientific, VS-550, Korea)
- Deep freezer (SANYO, MDF-U73V, Japan)

- Refrigerator (SAMSUNG, SR482YC, Korea)
- Microscopy (OLYMPUS, CKX41, Japan/Nicon, ECLIPES Ti Series, Japan)
- Autoclave (Vision Science, VS-1321-80, Korea)

3.2. 시험물질 및 대조물질

시료명	Lot No	입수일	보관 조건	공급원
은 함유 필터	-	2020.11.30	실온	(주)코리아엠씨
일반 필터	-	2020.11.30	실온	(주)코리아엠씨

3.3. 세포 배양 및 바이러스 배양 배지

- 세포 배양 배지 : RPMI + 10 % fetal bovine serum
- 바이러스 배양 배지 : DMEM + 2 % fetal bovine serum

3.4. Human coronavirus (HCoV)-OC43의 배양

HCT-8 cell (KCLB-10244)을 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. T-150 flask에 배양된 monolayer cell에 HCoV-OC43를 감염시킨 후 바이러스 배양 배지를 넣어주고 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하면서 주기적으로 CPE (cytopathic effect)를 관찰하였다. CPE가 명백하게 관찰될 때 배양액과 cell debris를 수거한 다음 동결과 해빙과정을 3번 거쳐 세포를 파쇄하고 원심분리로 cell debris를 제거하였다. 원심 상등액을 0.45 µm filter로 여과한 후 소분하여 -70 °C에 보관하였다.

3.5. 은 함유 필터의 코로나 바이러스 불활화 효과 검증시험

은 함유 필터의 항 코로나바이러스 효과를 검증하고자 은 함유 필터와의 접촉 시간에 따른 HCoV-OC43의 불활화 효과를 일반 필터와 비교하였다.

3×10^4 cell/mL 농도의 HCT-8 세포를 24-well plate에 각 well 당 1 mL씩 첨가하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다.

대조군으로 바이러스 stock solution을 용해하여 바로 정량하였다(Virus stock solution).

1 × 1 cm² 크기의 은 함유 필터 sample 20 조각을 1세트로 하여 총 3세트를 준비하였다. 각 세트마다 0.2 mL의 HCoV-OC43을 spiking 하여 1분 동안 바이러스를 흡착시

켰다. 바이러스 흡착이 완료 된 시료를 실온에서 반응시키면서 10분, 30분, 60분에 이를 때 마다 하나의 세트를 회수하여 각 시료에 존재하는 바이러스를 즉시 정량하였다 (Sample treated on Argental filter for 10 min/30 min/60 min).

대조군으로 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 크기의 일반 필터 sample 20 조각에 0.2 mL의 HCoV-OC43를 spiking 하여 1분 동안 바이러스를 흡착시켰다. 바이러스 흡착이 완료 된 시료를 실온에서 반응시키면서 60분에 이를 때 시료를 회수하여 시료에 존재하는 바이러스를 즉시 정량하였다(Sample treated on normal filter for 60 min).

각 시료로부터 바이러스를 회수한 방법은 다음과 같다. 반응이 완료 된 시료를 conical tube에 옮긴 후 2.8 mL의 바이러스 배양 배지를 주입하고, 1분씩 3회에 걸쳐 vortex mixer로 격렬하게 혼합해 주었다. 이후 회수액을 0.45 μm filter로 여과한 후 곧 바로 정량하였다(Table 2).

각 시료는 duplicate로 준비하여 수행하였다.

3.6. Human coronavirus OC43의 titration (농도 정량 분석)

바이러스 배양액과 각 시료로부터 회수한 회수액을 0.45 μm filter로 여과한 후 7배수로 $7^0 - 7^8$ 까지 serial dilution하였다. 희석한 시료들을 준비해 둔 cell plate에 0.25 mL씩 8개 well에 접종하였고, 음성대조군으로 바이러스가 spiking 되지 않은 바이러스 배양 배지를 cell plate에 0.25 mL씩 8개 well에 접종하였다. 1시간 동안 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양한 후 1 mL의 바이러스 배양 배지를 주입하고, 14일 동안 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하면서 주기적으로 CPE 반응이 나타나는 well을 확인하였다. 바이러스 titer를 TCID₅₀로 분석하였다.

Table 2. List of the samples collected during virus spiking experiment for the validation of Argental filter

Target material	Sample code	Sample description	Titration range
Argental filter	Ag.HCoV1.C	Virus stock solution	$7^0 - 7^8$
	Ag.HCoV1.P1	Sample treated on Argental filter for 10 min	$7^0 - 7^8$
	Ag.HCoV1.P2	Sample treated on Argental filter for 30 min	$7^0 - 7^8$
	Ag.HCoV1.P3	Sample treated on Argental filter for 60 min	$7^0 - 7^8$
	NF.HCoV1.P	Sample treated on Normal filter for 60 min	$7^0 - 7^8$
	Ag.HCoV2.C	Virus stock solution	$7^0 - 7^8$
	Ag.HCoV2.P1	Sample treated on Argental filter for 10 min	$7^0 - 7^8$
	Ag.HCoV2.P2	Sample treated on Argental filter for 30 min	$7^0 - 7^8$
	Ag.HCoV2.P3	Sample treated on Argental filter for 60 min	$7^0 - 7^8$
	NF.HCoV2.P	Sample treated on Normal filter for 60 min	$7^0 - 7^8$

3.7. TCID₅₀ 분석의 통계학적 원리

3.7.1. Kärber 공식에 따른 TCID₅₀ 계산법

Virus titration을 위해 test material을 serial dilution하고, 각각의 dilution을 동일한 여러 개의 반복적인 tissue culture well에 접종한다. 각각의 culture는 양성 또는 음성으로 기록한다. 이상적인 virus dilution을 했다면, 이들을 접종했을 때 replicate culture group에서는 음성과 양성이 관찰되는 culture well이 정확하게 균형을 이루게 된다. TCID₅₀ (tissue culture infected dose)는 단지 통계적인 수치로써 test된 well의 1/2에 해당하는 well에서만 양성이 나오게 하는 virus의 양으로 정의한다. End point는 50 %에 가장 근접하게 이를 수 있도록 많은 수의 replicate tissue를 사용할수록 좋다. 이렇게 나온 data는 Kärber method로 TCID₅₀를 계산할 수 있다. Kärber 공식은 아래와 같다.

$$\log_{10} 50 \% \text{ end point dilution } (-\log_{10} \text{TCID}_{50}) = - [X_0 - (d/2) + d(\sum(r_i/n_i))]$$

where : X_0 = $\log_{10}$ of the reciprocal of the lowest dilution (highest concentration) at which all test inocula are positive

d = $\log_{10}$ of the dilution factor (i.e. the difference between the log dilution intervals)

n_i = number of inocula used at each individual dilution (after discounting accidental losses)

r_i = number of positive test inocula (out of n_i)

$\sum(r_i/n_i) = \sum(P) =$ sum of the proportion of positive tests beginning at lowest dilution showing 100% positive result.

Summation is started at dilution X_0

다음의 보기는 전형적인 실험 예를 보여준다. 우선 이 sample은 3의 배수로 희석을 했으며 각 희석배수에 대해 실험한 replicate well들은 각각 8 개씩이다. 그리고 각 well의 volume 은 1 mL이다. 만약 적당한 배양기간 후 CPE를 관찰하여 결과를 얻었다면, 통계적인 처리에 의해서 다음과 같은 titer의 결과를 구할 수 있다.

Log		Positive	Total wells	Proportion		P(1-p)
Dilution		Wells	Tested	Positive		
0.00		8	8	1		0.000
-0.48		8	8	1		0.000
-0.95		8	8	1		0.000
-1.43		8	8	1		0.000
-1.91		6	8	0.75		0.188
-2.39		4	8	0.5		0.25
-2.86		1	8	0.125		0.109
-3.34		0	8	0		0.000
			SUM:	5.375	SUM:	0.547
Log dilution at 50% infection = -2.32 Titer per mL = 2.1E+02 TCID ₅₀ units mL ⁻¹ Standard error at 95% probability = 0.26 log						

위에서와 같은 결과를 얻었을 때 Log Dilution = $-\log(3 \text{의 거듭제곱})$ 이 되고, proportion positive는 Positive well수를 전체 각 희석배수에 대한 전체 test well 수로 나눈 값이다. P는 positive well이 발생할 수 있는 확률을 의미하며, (1-p)는 positive well이 발생하지 않을 확률, 결국 negative well이 발생할 수 있는 확률을 의미한다. 결과적으로 TCID₅₀는 test 된 8개의 well중에서 4개의 well에서 positive 결과가 나타나는 희석 배수를 결정하는 실험방법이다. 따라서 위의 data에서 TCID₅₀가 존재할 수 있는 범위는 Log dilution -1.91과 -2.39사이의 희석 농도일 것이다.

실제 Log dilution at 50 % infection을 구하는 계산식을 사용해서 계산하면

$$\begin{aligned}
 \log 50\% \text{ end point dilution} &= -[X_0 - (d/2) + d(\sum(r_i/n_i))] \\
 &= -[1.43 - \log(3)/2 + \log(3) \times (8/8 + 6/8 + 4/8 + 1/8)] \\
 &= -2.32 \text{ 되고,}
 \end{aligned}$$

여기서 $10^{-2.32}$ 는 tissue culture well을 50 % 감염시키는 희석배수가 된다. 그 역수인 $10^{2.32}$ 는 단위 볼륨 당 감염성을 갖는 바이러스 titer를 의미한다. 본 예시에서 각 well에 접종한 볼륨은 1 mL 이므로, 바이러스 titer는 $10^{2.32} \text{ TCID}_{50}/1 \text{ mL} = 10^{2.32} \text{ TCID}_{50}/\text{mL} \approx 2.1\text{E} + 0.2 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ 가 된다.

3.8. 바이러스 감소율(%)의 계산

HCoV-OC43 감소율(%)을 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{감소율 (\%)} = \{(A-B)/A\} \times 100$$

- A : 대조군의 HCoV-OC43 titer
- B : 시험군의 HCoV-OC43 titer

본 실험에서 대조군은 virus stock solution을 의미하며, 시험군은 은 함유 필터로부터 회수한 회수액을 의미한다.

4. 결과

4.1. 은 함유 필터에 의한 HCoV-OC43 불활화 효과 확인

은 함유 필터에 HCoV-OC43을 흡착시킨 후 10분, 30분 및 60분 동안 실온에서 반응시키면서 각 시간에 이를 때 마다 sample로부터 바이러스를 회수·정량하였다.

첫 번째 HCoV-OC43 spiking 실험에서 7.50×10^6 TCID₅₀ HCoV-OC43을 spiking하여 10분 동안 반응시킨 후 회수하였을 때 HCoV-OC43 titer가 1.76×10^6 TCID₅₀이었으며, 30분 반응 후의 titer는 1.61×10^6 TCID₅₀이었으며, 60분 반응 후의 titer는 2.18×10^5 TCID₅₀이었다.

두 번째 HCoV-OC43 spiking 실험에서 5.88×10^6 TCID₅₀ HCoV-OC43을 spiking하여 10분 동안 반응시킨 후 회수하였을 때 HCoV-OC43 titer가 1.53×10^6 TCID₅₀이었으며, 30분 반응 후의 titer는 1.20×10^6 TCID₅₀이었으며, 60분 반응 후의 titer는 3.56×10^5 TCID₅₀이었다.

은 함유 필터에 의한 코로나바이러스 불활화 효과를 감소율 (%)로 계산하였다. 두 실험에서 은 함유 필터에 10분 반응 후 HCoV-OC43 평균 감소율은 75.26 %이었고, 30분 반응 후 평균 감소율은 79.06 %이었으며, 60분 반응 후의 평균 감소율은 95.52 % 이었다 (Table 3).

Table 3. Inactivation (%) of HCoV-OC43 on Argental filter

Sample description	Virus titer (TCID ₅₀ /mL)	Volume (mL)	Total virus (TCID ₅₀)	Inactivation (%)
Virus stock solution	3.75×10^7	0.2	7.50×10^6	-
Sample treated on Argental filter for 10 min	7.65×10^5	2.3	1.76×10^6	76.53
Sample treated on Argental filter for 30 min	7.65×10^5	2.1	1.61×10^6	78.53
Sample treated on Argental filter for 60 min	1.09×10^5	2	2.18×10^5	97.09
Sample treated on Normal filter for 60 min	9.76×10^5	2	1.95×10^6	74.00
Virus stock solution	2.94×10^7	0.2	5.88×10^6	-
Sample treated on Argental filter for 10 min	7.65×10^5	2	1.53×10^6	73.98
Sample treated on Argental filter for 30 min	6.00×10^5	2	1.20×10^6	79.59
Sample treated on Argental filter for 60 min	1.78×10^5	2	3.56×10^5	93.95
Sample treated on Normal filter for 60 min	6.00×10^5	2.4	1.44×10^6	75.51

Inactivation (%)	EXP. 1	EXP. 2	Average
Sample treated on Argental filter for 10 min	76.53	73.98	75.26
Sample treated on Argental filter for 30 min	78.53	79.59	79.06
Sample treated on Argental filter for 60 min	97.09	93.95	95.52
Sample treated on Normal filter for 60 min	74.00	75.51	74.76

5. 요약 및 결론

본 시험에서는 은 함유 필터에 의한 코로나바이러스 불활화 효과를 확인하고자 하였다. 이를 위해 은 함유 필터에 접촉한 시간(10분, 30분, 60분)에 따른 Human coronavirus (HCoV)-OC43의 불활화 효과를 측정하였다.

은 함유 필터에 의한 불활화 효과 확인시험에서 spiking한 HCoV-OC43은 은 함유 필터에서 10분 흡착 후 HCoV-OC43 평균 감소율은 75.26 %가 불활화 되었고, 30분 흡착 후 평균 감소율은 79.06 %가 불활화 되었으며, 60분 흡착 후의 평균 감소율은 95.52 %가 불활화 되었다.

Table 4. Summary of results: Inactivation (%) of HCoV-OC43 on the Argental filter

Inactivation (%)	EXP. 1	EXP. 2	Average
Sample treated on Argental filter for 10 min	76.53	73.98	75.26
Sample treated on Argental filter for 30 min	78.53	79.59	79.06
Sample treated on Argental filter for 60 min	97.09	93.95	95.52

6. 기록의 보존

시험계획서 원본, 시험계획서 변경관련기록, 최종보고서 초안 및 원본, virus titration에 관한 모든 기초 자료, 기록서, 통계처리 자료, SOP 등은 (주)바이오피에스에 보관한다. 본 검증시험에 관한 모든 자료는 시험 종료 후 5년간 시험기관인 (주)바이오피에스가 보관한다. 그 후 보관에 관해서는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

7. 시험 기간

시험 개시일	2020. 12. 07.
시험 종료일	2020. 12. 23.
보고서 발행일	2020. 12. 30.

8. 참고문헌

- 1) Lim, Y.X., Ng, Y.L., Tam, J.P., and Liu, D.X. 2016. Human Coronaviruses: A Review of Virus - Host Interactions. *Diseases* 4(3): 26.
- 2) Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S., de Groot, R.J., Drosten, C., Gulyaeva, A.A., et al. 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2". *Nature Microbiology* 5(4): 536-544.
- 3) Owczarek, K., Szczepanski, A., Milewska, A., Baster, Z., Rajfur, Z., Sarna, M., and Pyrc, K. 2018. *Scientific Report* 8: 7124.