

최 종 보 고 서

<p>(뒷면)</p> <p>주 의 (편집순서 8)</p> <p>(15 포인트 고딕계열)</p> <p>↑ 6cm ↓</p>	<p>암 항원을 이용한 식물 유래 대장암 수지상 세포 백신 및 경구 백신 실용화 기반 기술 개발에 관한 연구</p> <p>농림축산식품부</p> <p>↑ 3cm ↓</p>	<p>(앞면)</p> <p>발간등록번호 11-1543000-000772-01</p> <p>5cm ↓</p> <p>암 항원을 이용한 식물유래 대장암 수지상세포백신 및 경구백신 실용화 기반기술 개발에 관한 연구</p> <p>(Development of dendritic cell vaccine and oral vaccine for colorectal carcinoma using plant-derived tumor antigen)</p> <p>중앙대학교 산학협력단</p> <p>↑ 9cm ↓</p> <p>농 립 축 산 식 품 부</p> <p>↑ 4cm ↓</p>
---	--	--

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “암 항원을 이용한 식물유래 대장암 수지상세포백신 및 경구백신 실용화 기반 기술 개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2015 년 2 월 9 일

주관연구기관명 : 중앙대학교

주관연구책임자 : 고기성

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 정인식

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 강형식

참여연구기관명 : 다이노나

참여연구책임자 : 윤상순

요 약 문

I. 제 목

암 항원을 이용한 식물유래 대장암 수지상세포백신 및 경구백신 실용화 기반기술 개발에 대한 최종 연구보고서

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- ‘농촌진흥청 바이오그린 21 사업 식의약소재연구단’ 과제(2007-2010)였던 “식물최적화 발현 시스템을 통한 대장암 예방 및 치료용 단백질 대량생산에 관한 연구”를 통해 대장암 항원단백질을 최적화로 발현할 수 있는 식물을 확보하였음.
- 특히, 대장암 예방용 재조합 단백질 GA733 혹은 GA733-Fc 항원-항체 복합 재조합백신 단백질의 발현율이 높은 식물을 확보하였음.
- 또한, 식물에서 높게 발현하는 GA733-Fc의 경우 in vitro와 in vivo 실험을 통하여 상업화되어 동물세포에서 얻은 GA733-Fc 보다 높은 항암면역반응을 보였음.
- 하지만, 식물유래 GA733-Fc의 높은 항암면역반응에 대한 세밀한 기작의 검증이 되어야만 실용화가 될 수 있음.
- 특히, 식물유래 GA733-Fc을 이용하여 대장암 예방용 수지상세포백신 및 재조합경구백신 실용화가 본 연구개발의 중요성임.
- 본 연구팀은 이전에 수행한 바이오그린 연구사업 수행 결과, 대장에서 발현되는 2종의 대장암 치료용 표적 수용체단백질을 개발하였음.
- 즉, 대장에서 GA733 대장암항원의 발현을 억제시켜 항암효능을 나타내거나 GA733 대장암항원의 발현과는 무관하게 대장암세포의 성장과 전이를 억제하여 항암활성을 갖는 신기능성 수용체단백질의 항암기능 및 기작을 규명하였음.
- 따라서 본 연구의 수행 기회가 GA733, GA733-Fc와 함께 이 신기능성 수용체단백질을 활용한 점막면역기능 증진기술로 경구 또는 edible 백신개발 및 실용화 목표가 달성될 수 있어, 본 연구의 수행이 절실히 필요함.

III. 연구개발 내용 및 범위

제1세부: 대장암 항원-항체 재조합 단백질인 GA733-Fc 형질전환 식물의 대량재배를 통한 homozygous line의 seed bank 확보 및 대장암 예방용 수지상세포백신 효능 검증으로 예방용 재조합백신 실용화

1. 면역효과가 확인된 GA733-Fc with KDEL과 without KDEL 대장암 백신 단백질을 높은 수준으로 발현하는 형질전환 식물을 대량 재배
2. 대장암 백신 단백질을 발현하는 형질전환 식물의 최적 homozygous line 선별
3. 식물에서 발현된 백신 단백질을 정제 및 당구조정밀분석 data를 확보하고, 수지상세포와 NK세포를 이용한 동물실험 모델에서 면역 활성화 확인
4. 실용화를 위한 식물소재 seed bank 구축 및 수지상세포백신과 식물유래 암예방용 경구용 백신의 실용화 기반 기술 확립

제1협동: 당쇄화 개선을 통한 GA733-Fc의 치료 효과를 극대화할 수 있는 기반기술 개발 및 독성 평가 검사

1. β -1,4-galactosyltransferase 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선(1단계 당쇄화 개선)된

- GA733-Fc의 생산, 항암치료 효과 및 *in vitro* 독성 평가
- 1단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc의 항암치료 효과 검증과 *in vitro* 독성 평가
2. β -1,2-xylosyltransferase와 α -1,3-fucosyltransferase 유전자의 동시 knock-down에 의해 당쇄화 개선(2단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc의 생산 및 *in vivo* 독성 평가
- 2단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc의 동물실험을 통한 *in vivo* 독성 평가(알러지 관련 독성 포함)
 - β -1,2-xylosyltransferase와 α -1,3-fucosyltransferase 유전자의 동시 knock-down 및 β -1,4-galactosyltransferase 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선(3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc의 생산
3. β -1,2-xylosyltransferase와 α -1,3-fucosyltransferase 유전자의 동시 knock-down 및 β -1,4-galactosyltransferase 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선(3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc의 치료효과 검증, *in vivo* 급성독성 평가 연구
- 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc 시료의 대량 조제
 - 당쇄화 개선된 GA733-Fc의 항암치료 효과 검증과 *in vivo* 급성독성 평가 연구

제2협동: 식물유래 암항원을 이용한 대장암 경구백신 실용화 기반기술 개발 및 대장암 백신 생산형 질 전환 토마토 품종 개발

1. 대장암백신 생산 형질전환 토마토 개발
- 상용화 토마토 품종을 이용한 대장암 항원-항체 재조합 단백질인 GA733-Fc 발현하는 형질전환 토마토 개발
 - 형질전환 토마토 line에서 삽입 유전자가 대량 발현되는 엘리트 line을 선별
 - 선별된 엘리트 line에서 후대 육성을 통해 homo line으로 개발하고 LMO 안전성 평가서 작성을 위한 이벤트 개발
2. 식물유래 암항원을 이용한 대장암 경구용 백신 실용화 기반기술 개발
- 대장암세포 및 대장세포에서 GA733과 GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 항암/항염효능 검증
 - 대장암 및 만성염증성장질환(IBD) mouse 모델에서 GA733과 GA733-Fc와 신기능성 수용체단백질들의 체액성, 세포매개면역 및 점막면역기능 등 항암/항염효능 검증
 - 대장암 및 IBD 예방/치료용 경구백신 실용화 기반기술 개발
 - 전임상을 위한 최적의 항암/항염 조건확립으로 mouse에서 항암/항염 증진 방법 구축
 - 대장암 및 IBD의 예방 또는 치료효율, 유효성 및 안정성 향상으로 경구백신 실용화 기반기술 개발

IV. 연구개발결과

1세부: 대장암 항원-항체 재조합 단백질인 GA733-Fc 형질전환 식물의 대량재배를 통한 homozygous line의 seed bank 확보 및 대장암 예방용 수지상세포백신 효능 검증으로 예방용 재조합백신 실용화

- GA733-Fc with KDEL을 발현하는 형질전환 식물의 백신단백질 발현유무 확인. 하우스에서 대량재배한 형질전환 식물을 무작위로 선별하여 유전자 발현 유무를 확인하였음.
- GA733-Fc 백신단백질을 발현하는 식물 중 높은 수준의 발현량을 보이는 형질전환 식물을 대량생산 하기 위하여 대형 비닐하우스에 대량 재배하여 실험에 사용할 material 대량 확보하였음.

- 재배된 대장암 백신 단백질 GA733-Fc with KDEL의 형질전환 식물의 대량재배를 통한 homozygous line의 상업화목적의 seed bank 확보함.
- 확보된 material을 이용하여 Protein G affinity column을 이용한 식물유래 대장암 항원-항체 재조합 단백질 GA733-Fc의 정제 확보함.
- MALDI-TOF를 이용하여 정제된 식물유래 대장암 항원-항체 재조합 단백질 GA733-Fc의 당구조 분석 및 백신단백질의 기능성 모색
- PNGase F를 처리하여 당사슬을 절단한 후 SDS-PAGE를 이용한 protein size변화와 MALDI-TOF를 이용한 당사슬 구조 분석을 수행한 결과 PNGase F를 처리 하였을 때 당사슬이 절단되어 protein의 size가 줄어드는 것을 확인함.
- 당구조 분석을 통한 당단백질의 당사슬 프로파일을 확인한 결과 KDEL retention signal 효과로 인한 ER 상에서 만들어지는 high-mannose type의 당구조를 확인 할 수 있었음.
- 정제 된 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질과 동일한 양의 동물유래 GA733-Fc를 SDS-PAGE를 통해 비교 분석한 결과, 동물유래의 GA733-Fc와 거의 동일한 순도의 식물 단백질 정제할 수 있는 정제법 확립 확인.
- 형질전환 식물로부터 정제된 GA733-Fc with KDEL 백신단백질이 항원으로서 기능을 가지는지 확인하기 위해 Surface plasmon resonance assay (SPR)을 통해 항원-항체 binding activity를 수행하였고 그 결과 식물에서 얻은 GA733-Fc with KDEL과 동물유래 GA733 항체가 서로 interaction이 있는 것으로 확인함.
- 또한, 백신단백질이 항원으로서 기능을 가지는지 확인하기 위해 적출한 비장의 수지상세포 (dendritic cell)를 이용하여 germinal center (GC) B cell을 분석하였고 그 결과 대표적인 B cell activation marker Fas와 GL-7인자의 cell population percentage를 분석을 통해 식물 유래 GA733-Fc with KDEL가 동물유래 GA733-Fc 보다 GC B cell이 더 많이 분화되었음을 확인하였음..
- 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질을 주입한 mouse의 비장의 NK cell에서 cytokine factor 분석 결과 Th2 cell의 분화에 관여하는 IL-4와 IL-10 cytokine을 확인하였고, 동물유래 GA733-Fc 보다 더 많은 cytokine을 분비함을 확인하였음.

제1협동: 당쇄화 개선을 통한 GA733-Fc의 치료 효과를 극대화할 수 있는 기반기술 개발 및 독성 평가 검사

- 식물에서 당쇄가 변형된 GA733-Fc 단백질을 생산하기 위한 발현 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*을 담배 식물체에 형질전환시킨 후 GA733-Fc 단백질 및 β -1,4-galactosyltransferase (GalT) 유전자의 과발현에 의해 당쇄화가 변형된 1단계 당쇄화 개선 GA733-Fc 단백질 (GA733-Fc + GalT 단백질)의 발현을 확인하였고 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제한 후 GA733-Fc 단백질들의 당쇄화 구조를 MALDI-TOF 분석을 통해 확인함.
- GalT 유전자가 과발현된 경우 생성된 1단계 당쇄화 개선 GA733-Fc + GalT 단백질은 담배 식물체에서 생산된 GA733-2-Fc 단백질에 비해 high mannose type의 당쇄를 많이 함유하였음.
- 대장암종 MC38 세포가 이식된 실험동물 C57BL/6 마우스에서 종양의 생성 및 성장을 확인하여 GA733-Fc 단백질의 항암효과를 검증하기 위한 대장암종 동물실험 시스템을 확립하였고 GA733-Fc 단백질 및 1단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc + GalT 단백질이 처리된 수지상세포가 대장암종 MC38 세포에 의해 유도되는 종양의 증식에 미치는 영향을 확인함.

- GA733-Fc 단백질이 첨가된 배지에서 배양된 수지상세포가 투여된 경우 종양의 증식은 대조군에 비해 감소하였으며 1단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc + GalT 단백질이 처리된 수지상세포가 투여된 경우 종양의 증식은 더욱 감소하는 것으로 확인되었음.
- 또한 1단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc + GalT 단백질 투여량의 최적조건 도출과 관련한 *in vitro* 독성 평가 실험에서 형질전환된 담배에서 분리 정제된 GA733-Fc 단백질은 세포 독성을 지니지 않는 것으로 확인됨.
- β -1,2-xylosyltransferase(*XylT*)와 α -1,3-fucosyltransferase(*FucT*) 유전자가 동시에 knock-down된 식물체에서 2단계 당쇄화 개선 GA733-Fc 단백질(GA733-Fc + *XylT*/*FucT* KD 단백질)을 생산하기 위한 pFGC5941/*XylT*-*FucT* RNAi 벡터시스템을 구축하고 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*을 확보하였으며 담배 식물체에 형질전환시킨 후 각 유전자의 발현이 억제되는 것을 RT-PCR을 통해 확인함.
- 또한 pFGC5941/*XylT*-*FucT* RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*을 담배 잎 절편체에 형질전환시키고 선별 배지에서 재분화를 유도하여 pFGC5941/*XylT*-*FucT* RNAi 벡터가 형질전환된 담배 식물체를 확보하였음. *XylT*와 *FucT* 유전자의 발현이 억제된 담배 식물체에서 2단계 당쇄화 개선 GA733-Fc + *XylT*/*FucT* KD 단백질의 발현을 확인하였고 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제하고 당쇄화 구조를 MALDI-TOF 분석을 통해 확인함.
- GA733-Fc 및 1, 2단계 당쇄화 개선 GA733-Fc(GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + *XylT*/*FucT* KD) 단백질을 실험 마우스의 복강에 투여하여 면역반응을 유도하고 혈청에 존재하는 GA733-Fc 특이 IgG 및 IgE 항체의 존재를 효소면역측정법으로 분석하고 실험 마우스의 비장세포에서 GA733-Fc 항원에 의한 cytokine IFN- γ 및 IL-4, IL-5, IL-10의 분비를 효소면역측정법으로 확인함.
- *XylT*와 *FucT* 유전자의 발현이 knock-down되고 *GalT* 유전자가 과발현된 식물체에서 3단계 당쇄화 개선 GA733-Fc(GA733-Fc + GalT + *XylT*/*FucT* KD) 단백질을 생산하고 당쇄화 구조를 MALDI-TOF 분석을 통해 확인함.
- 실험동물 마우스에서 추출한 수지상세포에 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질을 처리하여 수지상세포의 성숙을 유도하고 대장암세포가 투여된 마우스에 첨가하여 1, 2, 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질(GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + *XylT*/*FucT* KD, GA733-Fc + GalT + *XylT*/*FucT* KD 단백질)에 의한 종양의 성장에 미치는 영향을 검증함.
- 당쇄화 변형된 GA733-Fc 단백질이 첨가된 배지에서 성숙이 유도된 수지상세포가 투여된 경우 PBS 대조군 및 정상적인 GA733-Fc 단백질이 처리된 수지상세포 처리군에 비해 종양의 성장이 억제되었음.
- 또한 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질의 종양성장 억제 효과를 검증하기 위해 GA733-Fc 단백질 및 1, 2, 3 단계 당쇄화 변형된 GA733-Fc 단백질을 실험동물 마우스의 복강 면역하여 항체의 생성을 유도하고 대장암 CT-26 세포를 피하 주사를 하여 종양의 성장을 유도하고 GA733-Fc 단백질에 의한 종양 성장 억제 효과를 확인함.
- GA733-Fc 단백질이 면역된 실험동물 마우스에서 대장암 CT-26 세포에 의한 종양 성장은 대조군 PBS에 비해 억제되었고 가장 큰 억제 효과는 GA733-Fc + GalT 단백질이 면역된 실험동물 마우스에서 보였음.
- 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질의 *in vivo* 급성 독성 평가를 위한 동물실험에서 GA733-Fc 단백질의 과량 투여에 의한 시각적인 이상 증상, 체중 저하, 장기 이상 등의 증

상은 관찰되지 않았음.

제 2협동: 식물유래 암항원을 이용한 대장암 경구백신 실용화기반기술개발 및 대장암 백신 생산 형질전환 토마토 품종개발

1. 대장암백신 생산 형질전환 토마토 개발

- 다양한 식물발현벡터들 중에서 GA733단백질이 발현되는 것은 pBINPLUS 와 clean vector 였고, ER signal peptide와 ER retention codon이 반드시 있어야 안정적으로 발현되고 또 축적되는 것으로 확인됨.
- Ammonium sulfate를 처리하여 농도별 구간의 단백질을 얻었고, 그 중 가장 많은 해당 단백질이 있는 구간은, GA733 단백질은 50~70%, GA733-Fc는 25~50%, Fc 단백질은 25~70% 임.
- pBINPLUS vector backbone으로 하고, 식물 전신 발현 프로모터인 35S 프로모터에 의해 유전자의 발현이 조절되며, ER targeting이 되도록 하는 조건의 식물발현벡터를 제작하여 실험용토마토인 Micro Tom에 형질전환을 하였고, 항생제 배지를 통해 1차선별된 형질전환 토마토의 잎에서 genomic DNA를 추출하여 specific primer를 이용해 PCR을 수행하여 2차선별을 진행한 결과, 35S/GA733-Fc 형질전환 Micro Tom은 총 20 line을, 35S/Fc 형질전환 Micro Tom은 총 13 line이 선별됨.
- 35S/GA733-Fc 형질전환 Micro Tom의 잎에서 단백질 발현율을 확인 한 결과, 모든 형질전환 토마토에서 GA733-Fc 단백질이 발현되었음을 알 수 있었고, 그 중 가장 높은 발현율을 보인 TG 13의 GA733-Fc 단백질의 발현율은 43.21 µg/fresh weight(g) 임을 확인함.
- 35S/Fc 형질전환 Micro Tom의 잎에서 단백질 발현율을 확인 한 결과, 모든 형질전환 토마토에서 human Fc 단백질이 발현되었음을 알 수 있었고, 그 중 가장 높은 발현율을 보인 TG 5의 human Fc 단백질의 발현율은 5.23 µg/fresh weight(g) 임을 확인하였다.
- 2차선별 된 형질전환 토마토 중에서 잎에서의 단백질 발현율이 높고 열매가 충분한 pBINPLUS + 35S/GA733-Fc TG 1-1과 pBINPLUS + 35S/human Fc TG 20의 열매를 수확하여 타겟단백질의 발현율을확인한 결과, pBINPLUS + 35S/GA733-Fc TG 1-1은 1.25 ng/fresh weight(g), pBINPLUS + 35S/human Fc TG 20은 0.27 ng/fresh weight(g) 으로 측정됨.
- 실험용 토마토인 Micro Tom, 상용화 품종(고정종) 인 C, M, N line의 bialaphos 농도별 생존율 실험을 수행한 결과, Micro Tom, M line, C line은 2 mg의 농도가, N line은 1 mg의 농도가 가장 적합한 것으로 판단됨.
- 형질전환 식물체의 상용화를 용이하게 하기 위한 Clean vector를 back bone으로 하고, 토마토 열매 특이 발현 프로모터인 SIHD 프로모터에 의해 유전자의 발현이 조절되며, ER targeting이 되도록 하는 조건의 식물발현벡터를 제작하여 식물발현벡터를 제작하여 상용화 토마토인 M line에 형질전환을 하였고, 항생제 배지를 통해 1차선별된 형질전환 토마토의 잎에서 genomic DNA를 추출하여 specific primer를 이용해 PCR을 수행하여 2차선별을 진행한 결과, SIHD/GA733-Fc 형질전환 M line은 총 1 line을, SIHD/Fc 형질전환 M line은 총 7 line이 선별됨.
- 최종 선별된 형질전환 토마토의 열매를 수확하여, SIHD/GA733-2 형질전환 M line 1개, 35S/GA733-2 형질전환 Micro Tom 3개, 35S/GA733-Fc 형질전환 Micro Tom 7개, 35S/Fc

형질전환 Micro Tom 1개의 seed를 확보하였고, 현재 지속적으로 seed 확보중임.

2. 식물유래 암항원을 이용한 대장암 경구용 백신 실용화 기반기술 개발

- 식물유래 GA733, GA733-Fc에 의해 면역세포들의 염증 사이토카인들의 발현이 증가되었으며, 신기능성 수용체단백질들의 발현 변화에 의해 염증 사이토카인들의 유전자 발현이 조절되었음.
- 암세포 killing 능력 또한 식물유래 GA733, GA733-Fc에 의해 증가되었으며, 신기능성 수용체단백질들의 발현 변화에 의해 암세포 killing 능력이 조절되었음. 식물유래 표적단백질들에 의해 면역세포들의 활성이 증진되어 면역세포의 침윤능력 및 항원제시능력 또한 증가되었으며, 신기능성 수용체단백질들의 발현 변화에 의해 조절되었음.
- WT 마우스에 식물유래 GA733 및 GA733-Fc를 투여한 결과, 대장에서 GA733에 특이적인 IgA의 생산능력이 증진되었음. 이를 통해 식물유래 표적단백질들에 의해 면역세포들의 활성이 증진되며, 신기능성 수용체단백질인 Ax1 및 TREM2에 의해 그 활성이 조절됨을 알 수 있었음.
- 식물유래 GA733, GA733-Fc 및 신기능성 수용체단백질들에 의한 항암효능을 검증하기 위해, 사람 및 마우스 대장암 세포주에 식물유래 표적단백질들을 처리하여 세포성장 및 세포사멸, 세포주기를 조절하는 유전자의 발현을 확인하였음. 그 결과, 식물유래 GA733-Fc에 의해 세포사멸을 유도하는 유전자들의 발현이 증가되었으며, 세포주기를 증가시키는 유전자의 발현은 감소되었음.
- 이에 유세포 분석기를 이용하여 세포주기 및 세포사멸을 확인한 결과, 식물유래 GA733-Fc에 의해 세포주기가 감소되었으며, 세포사멸이 증가됨을 알 수 있었음. 대장암 세포주들의 암세포 이동 및 전이능력 또한 식물유래 GA733-Fc에 의해 감소되었음. 이를 통해 식물유래 GA733-Fc가 암세포의 증식 및 전이능력을 감소시킴으로써 항암효능을 효과적으로 작용함을 알 수 있었음.
- 식물유래 표적단백질들의 *in vivo* 투여조건을 확립하기 위해 KFDA 의약품등의 독성시험 기준을 바탕으로 독성 및 안전성 시험을 실시한 결과 500 ug/100 ul의 농도로 결정하였음.
- IBD 마우스 모델에서 신기능성 수용체단백질들인 TREM2 및 Ax1의 항암효능을 확인한 결과, WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 과발현 마우스 그룹에서 대장조직 및 염증사이토카인들의 발현이 증가됨을 알 수 있었지만 Ax1 KO 마우스 그룹의 경우 대장조직의 손상 및 염증작용 변화에 큰 영향을 미치지 못함을 알 수 있었음.
- 이 결과를 통해 대장염 및 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 수용체단백질인 TREM2에 의한 항염/항암 효능을 검증하였음.
- IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc의해 IBD가 완화되었음. 초기 선천성 면역세포들의 활성이 증가되고 이후 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell, NK cell, B cell등의 여러 후천성 면역세포들의 활성이 증가되어 점막면역기능에 중요하게 작용하는 IgA의 생산능력이 증진되었음. 또한 신기능성 수용체단백질인 TREM2의 과발현으로 선천성 면역세포들의 활성이 조절되며, 이후 후천성 면역세포들의 활성 또한 조절되는 결과를 확인함.
- 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 TREM2에 의한 항암효능을 확인한 결과, 식물유래 GA733-Fc에 의해 암세포의 volume 및 mass가 감소됨을 알 수 있었으며, 암세포의 세포사멸 및 관련 유전자들의 발현 또한 증가되었음.
- 이를 통해 면역세포들의 활성을 확인한 결과, 면역세포의 항원 제시능력이 증가되었으며, 면역세포의 침윤능력 또한 증가되었음. 유세포 분석기를 이용하여 각 장기별 활성화된 면

- 역세포들의 변화를 확인한 결과, 활성화된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell, NK cell이 증가되었으며, 대장암 조직에서 활성화된 면역세포들이 증가됨을 통해 대장암 조직으로 활성화된 면역세포들이 이동하여 암세포를 killing함으로써 항암효과를 보이는 것으로 생각됨. 이러한 결과는 WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹에서 보다 효과적임을 알 수 있었음.
- IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc, 신기능성 수용체단백질인 TREM2 및 면역보조제에 의한 항암 효능을 확인한 결과, 식물유래 GA733-Fc를 면역보조제를 함께 투여할 시 단독투여에 비해 IBD가 완화되었으며, 염증사이토카인들의 유전자 발현 또한 면역보조제를 함께 투여할 시 감소되었음.
 - 각 장기별 면역세포들을 분석한 결과 IBD에 의해 감소된 CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell, CD8 regulatory T cell 및 NK cell뿐만 아니라 과립세포 및 대식세포가 증가되었으며, 면역보조제에 의해 그 효과가 증진됨을 확인함.
 - WT 마우스 그룹과 비교하여 신기능성 수용체단백질인 TREM2 TG 마우스 그룹이 면역세포들의 활성화에 보다 민감하게 작용하며, IBD 유도시 염증질환이 심각하게 발생함을 알 수 있었음. TREM2 TG 마우스 그룹 또한 식물유래 GA733-Fc 단독투여에 비해 면역보조제를 함께 투여할 시 IBD가 완화된 것을 알 수 있었음.
 - 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc, 신기능성 수용체단백질인 TREM2 및 면역보조제에 의한 항암 효능을 확인한 결과, 식물유래 GA733-Fc 단독투여에 비해 면역보조제를 함께 투여할 시 암세포의 volume 및 mass가 감소됨을 알 수 있었으며, 암세포의 세포사멸 및 관련 유전자들의 발현 또한 증가되었음. 이를 통해 각 장기별 면역세포들의 변화를 확인한 결과, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell, NK cell이 증가됨을 알 수 있었음. 이러한 결과는 WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹에서 보다 효과적이었으며, 이는 식물유래 GA733-Fc, 면역보조제 및 신기능성 수용체단백질인 TREM2의 상호작용을 통해 항암효능을 더욱 증가시켰음을 알 수 있었음.
 - 대장암 마우스 모델을 이용하여 GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매의 경구투여에 의한 항암효능을 검증하였음. 그 결과, GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매의 경구투여에 의해 암조직의 volume 및 mass가 감소되었으며, 암 조직의 세포사멸 및 면역세포의 암세포 killing 능력이 증진되었음. 각 장기별 활성화된 면역세포들의 변화를 확인한 결과, 대장암에 의해 감소된 면역세포들이 GA733-Fc를 발현하는 토마토에 의해 증가되었으며, 이는 GA733-Fc 토마토를 섭취함으로써 대식세포의 활성화가 증진되고, 그 결과, T cell 및 NK cell의 활성화가 증가된 것으로 생각됨. 또한 활성화된 면역세포들이 암조직으로 이동하여 대장암 조직의 세포사멸을 증가시켰으므로 대장암에 대한 항암효능을 보임을 알 수 있었음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과

(단위 : 건수)

구분		특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표								3	1	
	달성		1						3		
2차 년도	목표	1							4		
	달성								4		
3차 년도	목표	3	1			1			4		
	달성	1							4*	3	
계	목표	4	1			1			11	1	
	달성	1	1						11	3	5**

* 4 SCI 논문 중 1편은 투고된 상태임 [Animal Cells and Systems (IF 0.89)].

**홍보성과 2건과 학술상 3건

2. 성과 활용계획

세부과제를 성공적으로 수행함으로써 중요한 원천기술을 개발하여 기술이전단계까지 도달할 수 있도록 계획하고 있음. 특히 당구조와 단백질 구조 개선을 통한 항암예방단백질의 활성증강에 대한 연구는 다른 모든 농생명의약품 단백질 소재의 구조 개선을 위해 응용할 수 있는 실용화 기반 기술이 될 수 있음.

가. 기술적 측면

- (1) 식물을 이용하여 생산하는 다양한 암 예방용 백신 뿐 만 아니라 다른 전염병 및 성인병 백신 단백질 및 당 구조변형을 통한 효율적인 활성증폭 기반 기술로 활용 가능함.
- (2) 면역부작용 및 allergy 반응의 요인을 제거된 안전한 식물발현시스템을 확보함으로써 다른 의료용 단백질 당구조 개선에 활용
- (3) 다양한 암 치료용 항체 뿐 만 아니라 여러 전염병 항체의 단백질 및 당 구조 인간화를 위한 식물생산 최적화시스템 기반 기술 확보 효과
- (4) 대장암 및 IBD 억제기술 확립을 통하여 기존 치료제의 문제점을 극복할 수 있는 효율적인 암 억제제 개발로 고부가가치 생명공학산물 창출 기대
- (5) 항암/항염 기능 증진기술 확립으로 각종 암 및 만성염증질환에 대한 백신개발에 활용
- (6) 대장암 및 IBD의 병인 및 작용기전 규명을 통한 근원적인 치료기반 기술에 활용
- (7) 항암/항염면역반응 관련 질환 연구의 원천기술 개발에 활용
- (8) 참여기업의 기술을 이용한 Nasal injection용 백신 제품 및 edible용 제품 개발

나. 경제적 측면

- (1) 농촌경제에 고부가가치의 안전하고 효과 있는 의료용 단백질을 생산하는 기능성 토마토 농작물 보급 및 생산을 통해 농촌 경제 활성화 및 FTA에 대응할 수 있는 농작물생산으로 소득증대
- (2) 대장암 및 다른 암의 예방 및 치료를 통한 국민건강 증진으로 국가경쟁력 증진효과
- (3) 대장암 및 IBD 치료기반 기술개발로 고부가가치 생명공학산물 개발에 활용
- (4) 신규 유전자와 항암 치료용 단백질 소재 및 식물의 지적재산권 취득기대

다. 학문적 측면

- (1) 본 연구결과로부터 얻어지는 대장암 및 IBD 억제와 항암면역반응 조절기술을 교육과 연구에 활용
- (2) 우수한 연구자질과 능력을 갖춘 농업생명과학, 생물, 보건의료산업분야의 전문인력 육성에 활용하여 농업 및 의약산업 개발에 일조 기대
- (3) 본 연구에서 이용되는 최신 연구기술 및 기법을 발전시키고 체계화하여 소속 연구원 및 대학원생들에게 훈련과 교육을 시켜 세계적 경쟁력이 있는 기초학자 양성에 활용

SUMMARY

I. Topic

Final research reports about “**Development of practical technology concerning plant-derived vaccines**” targeting cancer using colorectal cancer epitopes.

II. Purpose of this research

- The final goal of this research is to develop plant platform for production of vaccines to prevent cancer diseases.
- We have already obtained transgenic plants expressing GA733 and GA733-Fc, respectively.
- Through in vivo and in vitro tests, it is certain that GA733-Fc purified from plant has better efficacy than the same material purified from animal cell.
- But more researches have to be done to clarify the mechanism of plant derived GA733-Fc vaccine's effectiveness against colorectal cancer. Commercialization, our final goal, is possible after confirming the mechanism.
- We have already developed two kinds of plant derived vaccines targeting the epitopes of colorectal cancer in previous research (BIOGREEN).
- Pnat can express GA733 which most predominantly spreaded around the surface of colorectal cancer. Our vaccine could suppress the growth of cancer and blocking the metastasis of colorectal cancer.
- We scheduled to apply 'GA733 and GA733-Fc' to edible form vaccine because of variety uses in mucosal immunology system. Edible vaccine can accomplish our goal.

III. Contents of research and extent

The 1st project: Mass production of 'plant-based GA733-Fc' after selection on the of two criteria, homozygous line and highest expression level, respectively. The establishment of seed bank and *in vitro* and *in vivo* immunology tests before commercialization.

1. Selection of homozygous line with the highest expression of GA733-Fc (without KDEL) and GA733-Fc(with KDEL)

2. Mass production of plants with the highest expression of GA733-Fc (without KDEL) and GA733-Fc(with KDEL)
3. Purification of each vaccine protein and glycan analysis, and nude mice test for confirming biological activity using dendritic cell and NK cell
4. Establishment of seed bank and development of practical technology concerning plant-derived vaccines

The 1st co-project: Improvements of glycan structure of GA733-Fc by using β -1,4-galactosyltransferase. Modified GA733-Fc certainly have much more efficacy than previous materials, followed by in vitro cytotoxicity test

1. Evaluation of anti-cancer efficacy of the GA733-Fc, upgraded protein form of GA733 through in vitro cytotoxicity test
2. Production of improved glycosylation of GA733-Fc(Step 2 glycosylation improvement) and *in vivo* toxicity assessment by simultaneous knock-down of β -1,2-xylosyltransferase and α -1,3-fucosyltransferase gene
 - The step 2 *in vivo* toxicity assessment with improved glycosylation GA733-Fc animal testing(including allergy-related toxicity)
 - The β -1,2-xylosyltransferase and α -1,3-fucosyltransferase simultaneously knock-down and production of the GA733-Fc glycosylation improved by β -1,4-galactosyltransferase gene overexpression (step 3 glycosylation improvement)
3. The β -1,2-xylosyltransferase and α -1,3-fucosyltransferase gene simultaneous knock-down and efficacy verification of the GA733-Fc glycosylation improved by β -1,4-galactosyltransferase gene overexpression (step 3 glycosylation improvement), *in vivo* acute toxicity test
 - Preparation in large quantity of the step 3 improved glycosylation GA733-Fc samples
 - Anti-tumor efficacy verification and *in vivo* acute toxicity test studies of GA733-Fc with improved glycosylation

The 2nd co-project: Development of commercialization technology based on colorectal cancer oral vaccine by using plant-derived cancer antigen and development of transgenic tomato varieties with production colorectal cancer vaccine

1. Development of transgenic tomato varieties with production colorectal cancer vaccine
 - Development of transgenic tomato for expression of colorectal cancer antigen-antibody recombinant protein GA733-Fc by using commercialization tomato varieties

- Selection of elite line overexpressing insertion useful genes in transgenic tomato line
 - Development of homozygous line through generations promoting in selected elite line and Development the events for LMO safety assessment preparation
2. Development of based technology for colorectal cancer oral vaccine commercialization by using plant-derived cancer antigen
- Anti-cancer/anti-inflammatory efficacy verification of GA733 and GA733-Fc target protein and new functional receptor proteins in colorectal cancer and colon cell
 - Anti-cancer/anti-inflammatory efficacy verification such as humoral, cell-mediated immunity and mucosal immunity function of GA733, GA733-Fc and new functional receptor proteins in colorectal cancer and chronic inflammatory bowel disease (IBD) mouse model
 - Development of based technology for colorectal cancer and IBD prevention/therapeutic oral vaccine commercialization
 - Anti-cancer / anti-inflammatory promotion system construction in the mouse with the best anti-cancer / anti-inflammatory establishing conditions for the pre-clinical trial.
 - Development of oral vaccine commercialization technology with prevention or treatment efficiency, validity and safety improvement of colorectal cancer and IBD

IV. Research development results

The 1st project : Obtaining seed bank of homozygous line through mass cultivation of GA733-Fc transgenic plant for colorectal cancer antigen-antibody recombinant protein and preventive recombinant vaccine commercialization with colorectal cancer preventive dendritic cell vaccine efficacy verification

- Vaccine protein expression was confirmed in transgenic plant that expressed GA733-Fc with KDEL. The gene expression confirmed through random selection of mass cultivated transgenic plant in greenhouse.
- For production of large quantities GA733-Fc and the GA733-Fc with KDEL vaccine protein transgenic plant leaves was harvested from the transgenic plants in green house.
- Construction of seedbank of homozygous transgenic plant line expressing GA733-Fc with KDEL for plant-derived GA733-Fc with KDEL commercialization.
- Plant-derived GA733-Fc with KDEL was successfully purified using Protein G affinity column.

- Glycan structure analysis result of plant-derived GA733-Fc with KDEL has high percentage of high-mannose type glycan structure due to ER retention signal(KDEL) effect.
- We confirmed that purify of plant GA733-Fc with KDEL were similar to the mammalian-derived GA733-Fc using SDS-PAGE
- Result of surface plasmon resonance assay(SPR) of plant-derived GA733-Fc with KDEL confirmed that the plant-derived GA733-Fc with KDEL has antigen-antibody binding activity to anti-GA733 antibodies
- Mice model experiment result of dendritic cell germinal center(GC) B cells analysis in spleen showed that B cell activation marker Fas and GL-7 factors were expressed in mice immunized with plant-derived GA733-Fc with KDEL more than mice immunized with mammalian-derived GA733-Fc.
- Analysis result of cytokine factor amount from mice spleen injected with plant-derived GA733-Fc with KDEL mice confirmed that Th2 cell differentiation mediated IL-4 and IL-10 were highly expressed in mice immunized with plant-derived GA733-Fc with KDEL more than the mammalian-derived GA733-Fc immunized mice.

The 1st co-project: Technology development and toxicity tests that can maximize the therapeutic effect of GA733-Fc with glycan structure modification.

- In overexpressed *GalT* gene of GA733-Fc + GalT protein tobacco many high mannose type glycan structures, has been observed compared with tobacco plant derived-GA733-2 proteins.
- Dendritic cell treatment in GA733-Fc protein contained culture medium showed the tumor cell growth inhibition and GA733-Fc + GalT protein contained culture medium showed more tumor growth inhibition than the GA733-Fc.
- *In vitro* GA733-Fc protein was purified from transgenic tobacco for toxicity tests with respect to the fact that GA733-FcGalT does not have a cell toxicity.
- β -1,2-xylosyltransferase (*XylT*) and α -1,3-fucosyltransferase (*FucT*) gene knock-down in transgenic plants were confirmed by RT-PCR
- pFGC5941/XylT-FucT RNAi expression vector was transferred into the plant using Agrobacterium, and the expression of GA733-Fc + XylT/FucT KD protein and purification using Protein A agarose bead-affinity chromatograph were conducted.
- In the XylT and FucT gene knock-down, and GalT gene overexpressed GA733-Fc plants (GA733-Fc + GalT + XylT / FucT KD), chemical structure of protein production and the sugar MALDI-TOF were confirmed

- The effect of the three-phase glycosylation improved GA733-Fc protein to induce the maturation of dendritic cells was verified on tumor growth in mice where colon cancer cells were added with administration of one, two, three steps glycosylation improved GA733- Fc protein (GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylIT / FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylIT / FucT KD protein)
- In mice treated with glycan modified GA733-Fc protein-induced maturing dendritic cells in medium supplemented PBS, the inhibition of tumor growth was higher compared to the control group and normal GA733-Fc protein-induced dendritic cells
- In addition, the tumor growth inhibitory effect of 1, 2, 3 step glycomodified GA733-Fc protein for the production of antibodies were verified in experimental animals by intraperitoneal immunization mouse with the glycomodified GA733-Fc protein and subcutaneous injected with the CT-26 colon cancer cells inducing tumor growth
- Tumor growth of CT-26 colon cancer cells was inhibited by in GA733-Fc protein immunized animals compared to the control PBS, and the greatest inhibitory effect was observed in GA733-Fc + GalT proteins immunized animals
- GA733-Fc protein with improved glycosylation in vivo visual symptoms were not observed by overdose of GA733-Fc protein in animal tests including acute toxicity, decreased weight, negative symptoms, such as organ side effects

The 2nd co-project: Development of plant-derived edible cancer vaccine candidate commercialization technology and production of colorectal cancer vaccine expressed transgenic tamato plants

1. Production of colorectal cancer vaccine expressing transgenic tamato plants
 - Efficient ammonium sulfate concentration for plant-derived GA733 protein precipitation was 50 to 70%, GA733-Fc was 25 to 50% and Fc region protein was 25 to 70%, respectively
 - Expression of GA733-Fc protein in transgenic tomato plant was confirmed. The expression of GA733-Fc protein in TG-13 plant showed the highest expression rate, 43.21 µg / fresh weight (g), and human Fc protein in TG-5 expression rate was confirmed that 5.23 µg/fresh weight (g).
 - Finally, we harvested the transgenic tomato seeds from one SIHD/GA733-2 M line, three 35S/GA733-2 Micro Tom, seven 35S/GA733-Fc Micro Tom, one 35S/Fc Micro Tom varieties.
2. Development of plant-derived edible cancer vaccine candidate commercialization technology
 - Expression of inflammatory cytokines were increased by plant derived GA733 and

GA733-Fc, respectively. The expression of inflammatory cytokine genes were regulated by functional receptor proteins.

- Immune cells activity was increased by plant-derived target proteins and Infiltration of immune cells and antigen-presenting ability was also increased.
- In plant-derived GA733 and GA733-Fc immunized mice was increased GA733 specific IgA expression. Immune cells activity was increased by plant-derived target protein. The activity of immune cells regulated by functional receptor protein Axl and TREM2, respectively.
- In mouse experiments for anti cancer activity confirmation, the reduction of cell cycle and increases of apoptosis were observed in plant derived GA733, GA733-Fc and functional receptor proteins immunized mouse models.
- Migration and metastasis abilities of colorectal cancer cell line also were reduced by the plant-GA733-Fc. These results confirmed that the plant-GA733-Fc effectively induced the reduction in the growth and metastasis ability of cancer cells.
- The result of anti-inflammatory in TREM2 and Axl over-expressed mice group were confirmed that colon tissue inflammatory cytokines expression was increased in TREM2 over-expression mice group. However, in Axl KO over-expressed mice group, colon tissue damage and inflammatory activity did not significantly change.
- Inflammatory Bowel Disease (IBD) was mitigated by GA733-Fc in IBD mouse model. The activity of early innate immune cells and CD4 + T cell growth and subsequent CD8 + T cell, NK cell, B cell activity of immune cells, such as increased number of acquired immune cells was promoting the production capacity of IgA. New functional activity of receptors and the regulation of innate immune cells to overexpress a protein TREM2, must confirm regulate the activity of the acquired immune cells.
- Anti-cancer efficacy by the plant-GA733-Fc and TREM2 in mouse models of colon cancer were confirmed. The volume and mass of the tumor was reduced by The plant-derived GA733-Fc, and expression of apoptosis-related genes in cancer cells was increased.
- In IBD mouse model, an anti-inflammatory effect by the TREM2 and the group treated with adjuvant were higher with the plant-derived GA733-Fc with an adjuvant, gene expression of inflammatory cytokines was reduced when administered with an adjuvant.
- Anti-cancer efficacy by plant-derived GA733-Fc, TRME2 and adjuvant colon cancer mouse model TREM2 TG mice group was higher. Plant derived-GA733-Fc increased was also more the anti cancer efficacy through interaction with the adjuvant and TREM2.

- Oral administration of the tomato fruit expressing GA733-Fc reduced the volume and mass of the tumor tissue, thereby increasing the ability of the cancer cell death and apoptosis in cancer tissues.

V. Research planning and utilization

1. Research and Development results

(Unit: Number)

Parts		Patent		New varieties			Genes of interest	Article		Note	
		Submis sion	Registr ation	Denomin ation Register	Report varieties produce import and sell	Varieties Protection		SCI	non-SCI		
						Submi ssion					Regist ration
1st year	Goal							3	1		
	Sum		1					3			
2nd year	Goal	1						4			
	Sum							4			
3rd year	Goal	3	1			1		4			
	Sum	1						4*	3		
Total	Goal	4	1			1		11	1		
	Sum	1	1					11	3	5**	

* 1 article: submitted [Animal Cells and Systems (IF 0.89)].

** 3 research awards

2 advertisement events

2. Planning for utilization

We are planning to reach an important source of technology to transfer into developed technologies. In particular, research on the enhancement of anti-cancer activity by preventing cancer through modification of protein and glycan structures, which can be of practical useful to improve the structure of the protein based biomedical materials in all other medicinal application.

A. Technical aspects

- (1) A variety of plant-derived cancer vaccines for the cancer prevention, as well as other infectious diseases, and adult disease vaccine can be applied
- (2) Utilizing the improved glycan and protein structures of medical proteins through plant expression system without immunological side effects and allergy
- (3) Obtaining of plant expression optimized system for humization of glycosylation and protein structures of therapeutic antibodies against various cancers and infectious diseases

- (4) Expecting of generating valuable biotechnology for production of colon cancer and IBD effective cancer inhibitor
- (5) Utilization in the development of vaccines against various cancer and chronic inflammatory diseases as cancer / anti-inflammatory diseases
- (6) Usage of the underlying etiology and treatment-based technology through identification of mechanisms in colorectal cancer and IBD
- (7) Utilization in the development of anti-inflammatory immune response related disease research
- (8) Product development for edible and nasal vaccine injection through the participating companies

B. Economics

- (1) Increasing high value-added income in the rural economy through the production and distribution of valuable tomato crops to produce proteins with medical effects that can respond to rural economic activity and FTA crop production
- (2) National Health Promotion through the prevention and treatment of colon cancer and other cancers in Korea
- (3) Application of high value-added product development in biotechnology including colon cancer and IBD-based curing technology
- (4) Expectation of intellectual property acquisition of new cancer therapeutic protein genes and their expression in plant material

C. Academic aspects

- (1) Taking advantage in education and research related to the colorectal cancer and IBD inhibition and antitumor immune responses control technology
- (2) Contribution of excellent study in Agriculture and Life Sciences, with the qualities and abilities including life, health and medical industries by leveraging the expertise of expectations helped to foster agricultural development and pharmaceutical industry
- (3) Positive advantages in global competitiveness based scholars belonging to researchers and graduate students to research, develop and organize the latest technologies and techniques used in this study

CONTENTS

Chapter I. Introduction

1. Rationale of R&D program in economy and industry ----- 21

Chapter II. International and national trends of technology targeted for R&D

1. Current status of international and national research ----- 29

Chapter III. Contents and results of R&D program

1. Research scope and method ----- 34
2. Results of research ----- 51
 a. first year ----- 51
 b. Second year ----- 83
 c. Third year ----- 132

Chapter IV. Level of achievement and public contribution in R&D

1. Level of achievement in sub-research projects ----- 171

Chapter V. Application plan of R&D results

1. Quantitative achievement ----- 178
2. Application plan of R&D results ----- 184

목 차

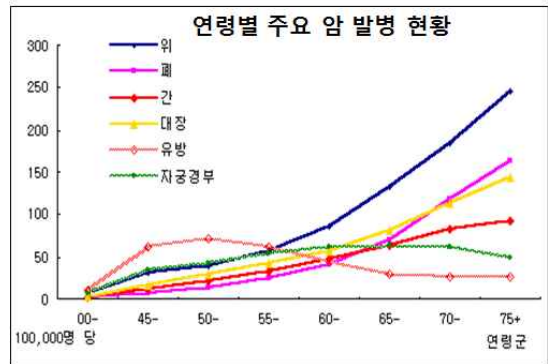
제 1 장	연구개발과제의 개요	
제 1 절	연구개발의 필요성	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황	
제 1 절	국·내외 기술정보동향	29
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절	연구범위 및 연구수행 방법	34
제 2 절	세부연구수행 결과	51
1.	1년차 연구수행 결과	51
2.	2년차 연구수행 결과	83
3.	3년차 연구수행 결과	132
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	
제 1 절	연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용	171
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	
제 1 절	연구개발 성과	178
제 2 절	연구개발 성과 활용계획	184

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발의 필요성

1. 국내 암 발생 추이

- 2008년 사망원인통계연보(통계청)에 따르면, 사망원인 질환 1위는 암으로 매년 1%씩 증가하여 2007년 전체 사망자 24만 6113명 중 28%인 6만 8912명에 이릅니다.
- 고령화 사회에 진입하면서 65세 이상 연령의 암 유병률이 가장 높은 것으로 나타나 사망률은 지속적으로 증가할 것으로 예상됨.
- 국내 암 발생 순위는 위암, 폐암, 간암, 대장암, 유방암, 자궁경부암 (남자: 위암, 간암, 폐암, 대장암, 방광암, 식도암 순, 여자: 위암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 갑상선암, 폐암 순) 으로 보고 됨.
- 1984년부터 2008년 사이의 암 발생 추이는 위암, 자궁경부암의 비율이 점차 감소하고 대장암, 유방암, 폐암, 간암은 비율이 지속적으로 늘어나고 있으며 대장암, 폐암, 유방암, 췌장암의 사망률 또한 급격히 증가하는 추세임.
- 현재의 암 치료법들인 외과적 수술요법, 약물요법, 방사선치료법 등은 일시적으로 치료효과를 나타낼 수 있으나 내성, 재발 또는 여러 가지 부작용이 발생하는 문제점이 있음.
- 많은 선진국에서 항암제나 진단시약을 개발하기 위해 면역반응을 조절할 수 있는 면역치료법을 이용하고자 하는 시도가 활발히 진행되고 있음.
- 최근, 유전자 전달체를 이용한 다수의 유전자 치료제 개발이 활발히 진행되고 있으나 암의 진단, 예방 및 치료법에 효율적으로 개발할 수 있는 면역세포들의 면역반응조절을 통한 세포치료법 개발은 아직 초기단계임.



2. 대장암 (colorectal cancer)

- 대장암은 결장과 직장 혹은 양쪽 모두에서 비정상적인 세포들이 조절되지 않고 성장하는 것으로 대장 종양은 대장 안의 용종(Polyp)으로부터 생성됨. 용종은 제거하지 않으면 결국 악성으로 변할 수 있고, 결장과 직장의 벽을 뚫고 다른 곳으로 전이될 수 있음.
- 한해 100만명 이상이 사망하는 서양에서 2번째로 사망률이 높은 암으로 알려져 있으며 최근 chemotherapy를 이용하여 암 환자의 생존률이 증가하기는 했으나 말기환자의 경우에는 예후가 좋지 않아 사망률이 약 40%에 달함.
- 종양세포를 살해시키는 면역체계의 핵심요소중 하나로 알려진 T 세포를 이용한 면역세

포 치료제 개발에 대한 연구들이 전 세계적으로 시행되고 있음.

- 대장암에서 발현되는 대표적인 종양항원인 CEA(Carcino-Embryonic Antigen)에 대해 특이적으로 반응하는 T림프구를 배양하여, CEA를 표적으로 종양세포를 살해하는 면역세포치료제로 이용할 수 있다는 보고가 있음. 이러한 보고들은 종양치료에 사용되는 화학요법 및 방사선요법에 따른 부작용을 최소화하고, T세포를 이용한 종양면역 치료의 근거를 확보한 것으로, 본 연구에서 목표로 하고 있는 GA733 암항원을 표적으로 점막면역반응 증진기술을 기반으로 하여 대장암 예방 및 치료용백신의 실용화 기반기술 개발과도 부합되는 결과임.

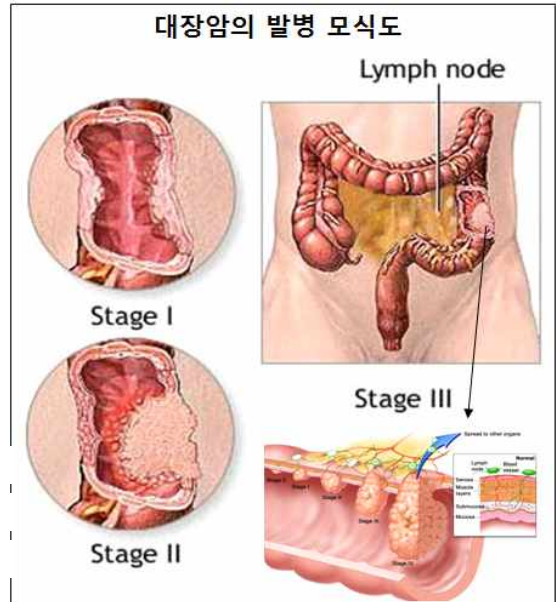


그림 1. 대장암의 발병 모식도

3. 만성 염증성 장질환(Inflammatory Bowel Disease, IBD)

- 만성 염증성 장질환(IBD)은 자가면역질환으로 크게 궤양성 대장염(UC)과 크론씨 병(CD)으로 구분되며 알 수 없는 원인으로 대장에서 발생하는 만성염증성질환임.
- 궤양성 대장염의 가장 흔한 증상은 혈변이며 점액변이 섞이기도 함. 증상은 지속적으로 또는 악화와 호전을 반복하고 하복부 통증 및 고열과 체중감소가 동반되며, 장관외 증상으로는 관절통, 피부병변, 간질환 등이 있음. 1년 이내 재발을 잘 하며 대부분 직장을 침범하는 국소적 질환이지만 일부 입원을 요하는 심한 경과를 보이고 대장 전체를 침범하면서 하루에 10여차례가 넘는 혈성 설사를 하고 심한 전신 증상 또는 징후를 보이고 드물게는 독성거대결장(toxic dilation)을 보임.

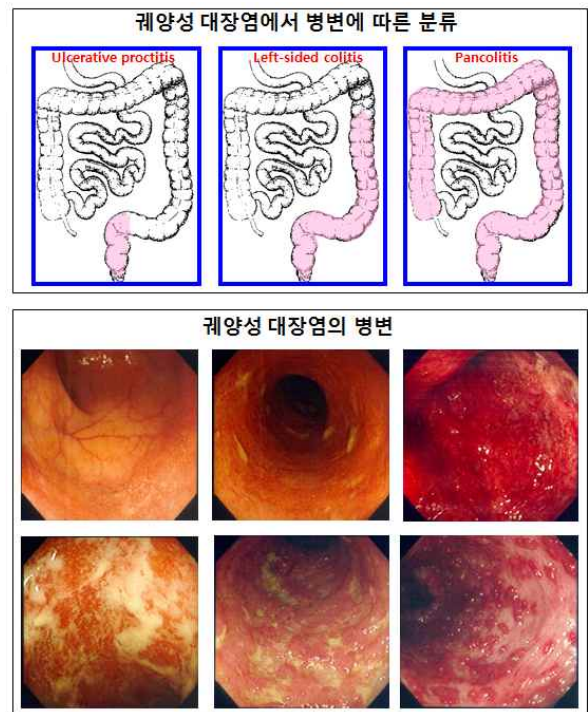


그림 2. 대장암의 병변에 따른 분류

- 크론씨 병은 열, 복통, 설사, 전신피로, 체중감소 등이 주증상이며 직장을 잘 침범하지 않는 특징을 가짐, 항문열, 치루, 항문주의 농약 등이 잘 동반되고 역시 장관외 증상이 나타날 수 있음. 대장을 침범한 경우 설사와 복통이 주증상이며 소장을 침범한 경우는 피로, 체중감소, 우측하복부 불쾌감, 복통, 설사, 미열, 오심, 구토, 설사 등의 증상을 호소하기도 함.

- 케양성 대장염은 직장과 결장에 국한되어 점막성 염증이 나타나는 반면 크론씨 병은 위장관의 모든 부위에서 장관 점막의 경벽성 염증으로 나타남. 이 두 질환은 공통된 병리기전을 가지고 있으나 병인은 아직 확실히 밝혀지지 않았으며, 자가면역질환으로 분류되기도 함.
- 비록 염증의 원인 및 시작이나 정확한 면역 이상은 아직 분명하지 않으나 IBD는 여러 임상자료들과 동물실험을 통해 유전적인 감수성을 가진 사람이 장관내 세균이나 식이 항원과 같은 환경적인에 대한 점막의 면역조절기능이 항상성을 잃으면서 발생하는 것으로 추측됨.
- 케양성 대장염의 치료법은 면역조절기능과 염증을 통제함으로써 증상을 완화시키고 이차적인 문제가 발생하지 않도록 예방하는 것으로 항염증제, 부신피질 호르몬제, 면역억제제, 항생제 등의 약물요법이나 주사요법을 사용함. 그러나 발병 후 만성적인 염증 및 증상이 완화되지 않는 경우 부종과 출혈을 동반하며 용종이 생성되어 **대장암으로 악화됨**.

4. 식물소재 의료용 항암 및 항바이러스 백신 개발

- 현재, 식물이나 작물로부터 생산되는 의료용 항암 및 항바이러스 백신 식물소재를 이용한 암 및 바이러스 질환의 예방 및 치료법 개발은 아직 미비한 실정임.
- 항원유전자를 식물에서 발현시켜 사용하는 경구백신은 재조합 백신의 안전성과 경구백신의 접종에 있어서의 수월성과 효용성을 접목시킨 기술로 기본 원리는 항원유전자를 식물에 형질전환 하여 발현시켜 항원단백질을 생산하여 일상생활에서 식품으로 섭취함으로써 면역기능 강화 및 질환의 예방 및 치료에 유용하게 이용하는 방법임.
- 따라서 면역 부작용을 유발하지 않고 면역세포들의 면역반응조절을 통해 이들 질환을 효율적으로 예방할 뿐만 아니라 치료효과를 극대화할 수 있는 의료용 식물소재 개발이 요구됨.
- 경구 및 edible백신을 포함한 점막용 백신은 경구, 호흡기, 자궁경부 등의 점막을 통해 항원 및 항원유전자를 면역관련 세포에 전달하여 체내 다양한 면역체계를 동원할 수 있어 질병예방 및 치료에 효과적인 기술임.
- 체내 점막은 강력한 물리화학적 세정작용을 갖고 있어 대부분의 외부 유해 물질을 제거하는데 중요한 역할을 하며 광범위하고 특별한 면역체계를 이루고 있어 대부분의 질병 발생을 억제하는 능력을 갖추고 있음.
- 대부분의 감염성 세균이나 바이러스 등 병원체의 전과경로는 사료, 사육 주변환경으로부터 식도, 호흡기, 소화기, 비뇨생식기 계통의 점막 부위를 통하여 침투함.
- 점막을 통해 병원체 침투, 대장에서 염증 또는 암 발생 시 우선적으로 점막의 림프조직에서 IgA가 생산되며 이들은 항원과 결합하여 초기에 항원의 침입을 저지하며 이것이 질병의 예방에 있어서 점막면역이 가장 중요한 이유임.
- 전신적으로 투여되는 항원의 경우 면역계는 모든 외래 항원을 인식하여 면역반응을 유도하므로 도리어 유해가 되는 면역반응을 초래하여 부작용을 유발할 수 있으나 점막면역계는 독특한 면역체계로 다양한 항원에 대해 능동적 면역반응, 면역억제 혹은 면역무시 반응 등 유익한 면역성을 유도함. 대부분의 병원체는 점막에 부착하고 침입하여 질병을 유발하는데도 전신적인 면역반응 유도가 현재까지의 백신개발의 주요 목표가 되었음.

5. 식물유래 경구용 백신 개발

- 식물유래 경구백신은 human pathogen free인 식물에서 백신을 생산하게 되므로 안전성 확보가 가능하고, 농업체계를 활용한 대량생산으로 백신 생산비용이 저렴하고, 백신의 보관에 cold-chain을 요구하지 않는 등 많은 장점이 있음.
- 식물유래 경구백신은 소화관. 호흡기, 비뇨생식 기관의 점막표면을 통해 전달되는데, 이곳은 동물 병원균의 주요침입구로 백신을 섭취할 경우 IgA를 생성하여 점막 세포 표면의 수용체에 병원균의 결합을 억제하는 점막 면역 반응에 매우 효과적인 것으로 알려져 있음.
- 식물유래 경구백신은 항원을 과실이나 곡류와 같은 식용 부분에 발현시킴으로서 식물 세포벽이 백신 항원을 충분히 보호하여 항원이 손상되지 않고 면역원의 상태로 장 관련 림프조직에 도달할 수 있게 함.
- 이러한 장점들과는 달리 아직도 불충분한 발현양의 문제, 면역관용의 우려가 제기 되고 있어서 상용화에 걸림돌이 되고 있음.
- 이러한 단점은 강력한 프로모터의 개발이나 세포 소기관으로의 축적 등 다양한 방법을 통해 도입된 항원유전자의 발현을 증가시키거나, adjuvant를 이용해 식물에서 발현된 항원 단백질의 점막면역체계에서 흡수를 증가시키는 방법 등으로 보완할 수 있음.
- 연구 초기의 식물경구백신 이라는 개념은 어떠한 가공 과정도 거치지 않고 항원의 발현 대상 기관 그 자체를 백신으로 취하는 것이었으나 항원의 양을 결정짓기 위한 표준화가 어렵다는 점 등의 이유로 최근에는 순수분리정제를 비롯한 단순 일차 가공을 포함하는 개념으로 좁혀지고 있는 실정임.

6. 식물유래 경구용 백신 생산 작물

- 초기에는 담배와 감자가 주로 사용되었으나, 최근에는 토마토, 바나나, 멜론 그리고 당근 등 과일이나 채소를 통하여 요리하지 않고 바로 식용으로 섭취할 수 있는 식물 백신의 개발이 이루어지고 있음.
- 항원유전자를 토마토 과육과 같은 식용부위에 발현시킴으로서 식물 세포벽이 백신 항원을 충분히 보호하여 항원이 손상되지 않고 면역원 상태로 장에 도달할 수 있게 한다. 과육 발현 특이적 프로모터로 발현율을 높이는 시도가 진행 중이며, 수확 후 다른 전처리 없이 바로 먹을 수 있는 이점이 있어 식물경구백신 연구에 많이 이용됨.

7. 백신 독성 평가

- 백신 개발을 위한 비·전임상 안정성 독성 평가는 백신의 잠재적 독성 영향을 파악하고 특성을 분석하기 위한 평가 내용을 포함하며 주요 평가 항목으로는 동물 종/변종, 투여 일정 및 투여방법, 평가변수 평가 시기 (임상 화학 검사용 검체 채취, 항체 평가, 부검 등), 표적 장기, 투여 용량, 노출 경로, 노출 기간 및 빈도, 관찰 독성 영향의 가역성과 관련한 백신의 독성 영향 평가 등이 있음.
- 식물유래 백신 개발을 위한 대표적인 연구 사례 및 독성 평가 연구 사례는 다음과 같음.
 - Sandhu 박사 연구팀은 폐렴 유발 병원성 바이러스인 호흡기 세포융합 바이러스 (Respiratory syncytial virus, RSV)의 transmembrane surface protein, F 단백질을 발현하는 토마토 작물을 개발하고 마우스를 이용한 동물실험에서 재조합 F 단백질에 의한 세포면역반응을 확인하고 독성 평가 연구를 수행 중임.
 - Matsumura 박사 등은 형질전환 감자에서 인체 급성 장염 및 설사병 유발 로바타이러스 외피단백질을 생산하고 동물실험에서 재조합 외피단백질에 대한 항체 생산을 확인하고 독성 평가 연구를 준비 중임.
 - Yusibov 박사 등은 알파파 모자이크바이러스 외피단백질과 광견병 바이러스의 당단

백질 (G5-24), 핵단백질 (31D)의 chimeric epitope를 융합시킨 재조합 알파파 모자이크 바이러스 CPDrg24를 시금치에서 발현시킨 후 마우스를 이용한 동물실험을 통해 항원성 및 면역원성을 검증하였고 공격접종 후 면역 유도 반응을 확인함.

- 다국적 제약사 화이자는 유전질환인 고셔병을 효소보충요법으로 치료할 수 있는 ‘엘레리소’를 당근 세포에서 생산하고 독성 평가 및 전임상 시험 후 2012년 FDA로부터 승인을 받음.
- 애리조나 주립대학의 Boyce Thompson Institute for Plant Research는 콜레라 독소 항원, Norwalk 바이러스 항원, B형 간염 바이러스 항원을 식물에서 생산하고 경구 백신으로 개발하기 위한 연구를 수행 중에 있으며 인체를 대상으로 하는 독성 평가 및 임상시험을 시도 중임.
- Dow Agrosiences사는 Newcastle disease 바이러스 백신을 담배식물체에서 개발하고 독성평가, 전임상 실험 후 2006년 USDA 승인을 받음.
- Medicargo사는 인플루엔자 바이러스 백신을 담배 식물체에서 개발하고 전임상 1, 2a 평가 중임.

Company/ Institution	Plant	Product	Indication	Clinical Stage
Arizona State University	Potato	Vaccine	Escherichia coli	Phase I
	Potato	Vaccine	Hepatitis B	Phase I
	Potato	Vaccine	Norwalk virus	Phase I
	Tobacco	Vaccine	Norwalk virus	Phase 1-2
Biolex	Lemon	Alpha interferon	Hepatitis B and C and cancer	Phase 2b
	Lemon	BLX-155	Fibrinolytic clot buster	Phase 1 ready
Dow Agrosiences	Plant non- nicotine- tobacco	Vaccine	Newcastle disease	USDA approved in February 2006
Medicargo	Tobacco	Vaccine Vaccine	H5N1 influenza H1N1 influenza	Phase 2a Phase 1, preliminary
Protalix	Plant cell	Glucocerebrosidase	Gaucher's disease	On sale
	Plant cell	Acetylcholinesterase	Biodefense	Phase I
Sembiosys	Safflower	Insule	Diabetes	Phase 3
	Safflower	Apolipoprotein A1	Cardiovascular	Preclinical complete

Everett et al., 2012 BipProcess International

8. 연구개발의 필요성 및 중요성

- ‘농촌진흥청 바이오그린 21 사업 식의약소재연구단’ 과제(2007-2010)였던 “식물최적화 발현 시스템을 통한 대장암 예방 및 치료용 단백질 대량생산에 관한 연구”를 통해 대장암 항원단백질을 최적화로 발현할 수 있는 식물을 확보하였음.
- 특히, 대장암 예방용 재조합 단백질 GA733 혹은 GA733-Fc 항원-항체 복합 재조합백신 단백질의 발현율이 높은 식물을 확보하였음.
- 또한, 식물에서 높게 발현하는 GA733-Fc의 경우 in vitro와 in vivo 실험을 통하여 상업화되어 동물세포에서 얻은 GA733-Fc 보다 높은 항암면역반응을 보였음.
- 하지만, 식물유래 GA733-Fc의 높은 항암면역반응에 대한 세밀한 기작의 검증이 되어야만 실용화가 될 수 있음.
- 특히, 식물유래 GA733-Fc을 이용하여 대장암 예방용 수지상세포백신 및 재조합경구백신 실용화가 본 연구개발의 중요성임.
- 본 연구팀은 이전에 수행한 바이오그린 연구사업 수행 결과, 대장에서 발현되는 2종의

대장암 치료용 표적 수용체단백질을 개발하였음.

- 즉, 대장에서 GA733 대장암항원의 발현을 억제시켜 항암효능을 나타내거나 GA733 대장암항원의 발현과는 무관하게 대장암세포의 성장과 전이를 억제하여 항암활성을 갖는 신기능성 수용체단백질의 항암기능 및 기작을 규명하였음.
 - 따라서 본 연구의 수행 기회가 GA733, GA733-Fc와 함께 이 신기능성 수용체단백질을 활용한 점막면역기능 증진기술로 경구 또는 edible 백신개발 및 실용화 목표가 달성될 수 있어, 본 연구의 수행이 절실히 필요함.
- ※식의약소재연구단 과제 중 농업생명공학 우수성으로 선정되었으면 최종평가에서 식물유래 식의약소재 분야에서 가장 우수한 점수를 받은 과제임.

가. 경제적 측면

- 항암제의 세계시장은 1995년에 65억 달러, 1996년에 90억 달러, 1997년에 117억 달러, 2009년에는 500억 달러로 세계 제약시장의 약 4%를 차지하며 거대 치료제 시장으로 부상하고 있음.
- 향후 항암제시장의 중요한 변화중의 하나로써 면역요법은 세계 암 치료 시장의 약 50% 이상을 차지하고(Avax Technologies, Annual Report), 현재의 제약시장을 거의 잠식하게 될 것으로 예측되며 현재 사용되는 치료법을 대용할 수 있을 것으로 전망됨.
- 국내 제약시장 매년 20% 정도의 시장 성장률을 보이고 있어 향후에도 지속적으로 항암제 매출은 15-20%의 성장이 예상됨.
- 많은 제약업체들이 새로운 암 치료제 개발에 투자하고 있지만 이 약물들이 소수의 환자에게만 효과적일 뿐 대부분의 환자에게는 여전히 효과를 주지 못하고 있는 실정임.
- 본 연구의 기반기술을 토대로 암 치료제 개발 시, 많은 경제적 부가가치가 기대되며 본 기술을 다른 많은 난치병 치료에 적용도 가능할 것으로 보여 생명보건 분야의 의약산업 개발에 다음과 같은 산업적 효과가 기대됨.
 - (1) 새로운 기작의 암 치료제 개발 시, 항암제 수입대체 효과 기대.
 - (2) 물질특허 및 기업화를 통한 의료산업 활성화 및 국제경쟁력 확보.
 - (3) 유병률 감소로 치료 비용절감.
- 따라서 본 연구진에 의한 암 억제기작 연구가 성공적으로 수행될 경우, 관련 산업의 활성화로 경제적 부가가치가 창출될 것으로 예상되어 본 연구수행의 필요성 및 중요성이 있음.

나. 사회적 측면

- 산업화 사회에 암 유병률 증가에 따른 암 억제물질 개발로 새로운 치료제 개발이 요구됨.
- 새로운 개념의 암 억제기작 연구로써 정부 연구정책에 대한 대 국민 신뢰 증진과 지적재산권 확보를 통한 국제적 위상 제고에 의한 국민 자긍심 고취할 수 있음.
- 면역기능은 인간의 건강을 유지하는 기본적 중심체계를 이루고 있으며 면역기능제어 기술개발은 현대사회에서 발생하는 수많은 질병들을 예방, 치료할 수 있는 원천 기반수단을 제공할 수 있음.
- 암 환자들은 학교나 직장에 충실할 수 없어 그 발병이 사회건강문제로 대두되고 있는 실정으로 환자와 그 가족들이 겪고 있는 고통과 치료비 부담 등은 건강한 생활을 추구하는 복지사회의 이상실현과도 거리감이 있어 국민건강과 삶의 질을 높이고자 하는 측면에서

본 연구의 필요성이 절실함.

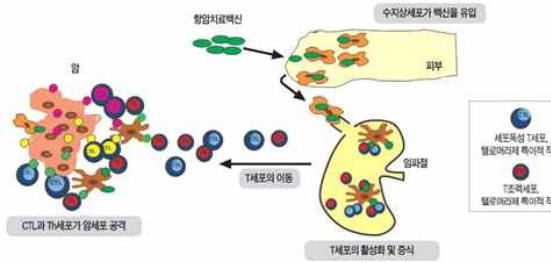
- 이공계 기피현상의 젊고 유망한 미래의 연구자들과 국민들에게 생명공학 관련 산업에 대한 문화정서를 새롭게 하며 가능성을 보여줌으로서 생명공학 관련 연구 및 산업에 대한 관심을 고조시킬 수 있어 본 연구수행의 필요성 및 중요성이 있음.

다. 기술적 측면

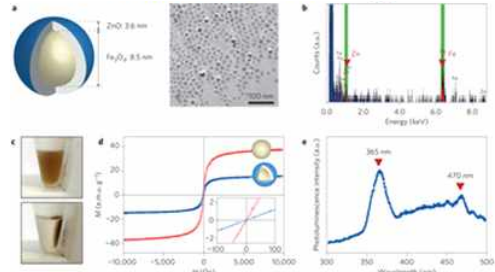
- 기능성 면역세포치료는 현실적으로 가장 발전가능성이 있는 분야임.
- 앞으로 새로운 암 치료법을 개발하기 위한 본 연구의 기반기술 개발은 암 치료에 대한 약물 개발 시, 활용가치가 높을 것으로 전망됨.
- 본 연구로부터 얻어지는 기반기술을 이용하여 다른 많은 난치병 치료에 활용이 가능할 것으로 보여 의약산업 개발에 일조를 할 수 있을 것으로 예상됨.
- 본 연구결과로부터 확립된 기술을 학문에 활용할 수 있어 본 연구수행의 필요성 및 중요성이 있음.
- 최근 각종 단백질 생산 기술 및 단백질체에 대한 연구가 활발히 진행되면서 단백질 의약품의 시대가 열리고 있음. 다양한 예방용 또는 치료용 단백질 약물의 개발과 함께 병행되어야 하는 중요 기술은 단백질 약물을 체내에 전달하는 기술임.
- 이제 까지 항원 백신을 비롯한 대부분의 단백 활성물질들은 주로 주사제형으로 투여되어 왔으나 주사제형은 투약 시에 환자의 거부감이 크고 부작용이나 통증을 유발하는 문제점이 있으며 주사제형으로 투여된 단백질 약물의 짧은 생체 내 반감기로 인하여 빈번한 약물 투여 빈도가 요구되는 문제점이 있음.
- 주사를 사용하지 않는 투여 방법 중 경구 투여 경로는 일반적으로 가장 자연스럽게 거부감이 낮아 선호되고 있으나 경구 투여된 단백질 항원 백신이 위장관에서 대부분 분해 소실되는 문제로 인하여 낮은 생체내 이용율이 개발상의 난점으로 지적되어 왔음.
- 본 연구 결과로부터 얻어지는 기반기술은 토마토 열매를 이용한 대장암 경구백신 개발 가능성을 더욱 높여주었고, 도입된 항원유전자의 발현을 증가시킴으로써 더욱 강력한 경구백신을 개발할 가능성이 있음.
- 외국의 원천 특허를 피하기가 용이한 기술개발 분야이며 효과가 뛰어난 개량 신의약을 개발할 수 있음
- 합성 펩타이드 백신의 경우 단백질만큼 면역원성을 나타내지 못하며, 펩타이드 자체만으로는 체액성 면역 및 세포성 면역을 유도하기 어려움.
- 수지상 세포를 이용한 예방/치료용 백신의 개발 필요성이 부각됨.
- 본 과제의 성격과 유사한 면역세포치료법으로써 최근 보고 된 수지상세포를 이용한 암의 면역치료는 암세포의 면역억제능 및 암환자의 자체 면역저하 등 여러 가지 변수들이 있어 아직도 나름대로 해결해야 할 문제점이 많이 남아있으며 현재의 치료 방법만으로는 치료율을 충분히 높이기 힘든 실정임.
- 수지상세포를 이용한 면역치료법의 치료율을 높이기 위해 in vivo상의 면역억제 기능에 대한 대처방안이나 수지상세포의 생존력 강화, 항원포획 및 감작기능 증진, 항원제시능력 향상, 부수적인 비 특이 항암면역의 증진, 항암 CTL 유도능 강화 등 개선해야 할 많은 부분이 있고 이를 위해 면역학적 기초 및 기반기술 연구가 뒷받침 되어야함.
- 상기한 문제점들의 개선 및 해결을 위해 동물실험에서 여러 연구들이 선행되었으나 아직

이렇다 할 분명한 대안이 보고되어 있지 않은 상황임.

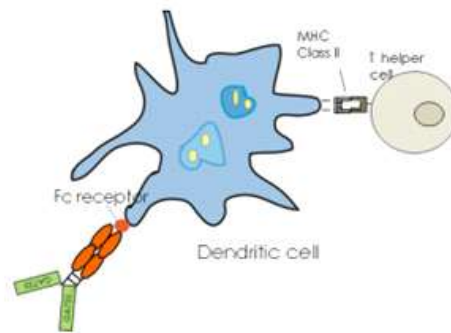
- 이러한 문제점들을 해결한다면, 국내 면역세포를 이용한 치료법의 국제 경쟁력을 높일 수 있는 중요한 기반이 될 수 있을 것으로 전망됨.



(A)카엘젼백스社의 수지상세포 백신 전략



(B)서울대 성승용교수의 발표내용



(C) 본 연구과제에 수행 개발하고자 하는 전략기술

그림 3. 본 연구과제에 수행 개발하고자 하는 식물유래 백신을 이용하여 수지상세포 흡수력을 높이기 위한 전략기술

- 카엘젼백스사의 수지상세포 백신개발은 단순한 백신 molecule을 수지상세포로 absorption 을 시켜 education하는데 중점을 두었음. (A) 서울대 성승용교수의 연구는 수지상세포의 흡수력을 증진시키기 위해 나노기술을 이용하였음. (B) 한마디로 수지상세포의 education 효과를 높이는데 중요한 연구 결과라고 볼 수 있음. 본 연구개발 계획에서는 한발 더 나아가서 식물유래 백신(특히 highmannose와 Fc fragment를 fusion)을 이용하여 수지상세포 흡수력을 높이는 기술에 중점을 두었음. (C) 결론적으로 위(A와B)의 연구개발과는 확연한 차이점을 가지고 있음.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절. 국·내외 기술정보동향

1. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

- FTA 체제하의 우리나라에서 농생명의약소재 분야는 경쟁력을 확보해야 하고 농업을 고부가가치 산업으로 육성해야할 필요가 있음. 이를 위해서는 농생명의약소재의 핵심기술 확보가 절실히 요구됨.
- 농생명분야에서 식물유래 의료용 단백질소재 개발 및 산업화는 한국의 차세대 성장동력산업 창출과 관련하여 중요한 원천기술이 될 수 있음.
- 면역부작용을 유발하지 않으면서 면역세포들의 면역반응을 조절할 수 있는 작물 기술 개발함으로써 질환을 효율적으로 예방할 뿐만 아니라 치료효과를 극대화할 수 있는 의료용 식물 소재 개발 연구가 시급히 요구됨.
- 현재 세계적으로 매년 1천만 여명이 암 진단을 받고 있으며, 2020년에는 암 진단자가 1천 500만 여명으로 50% 증가할 것으로 세계보건기구(WHO)가 보고함.
- 다수의 암에 효능이 있는 치료제 개발을 위해 기존 치료제의 변형 또는 새로운 전달시스템을 도입과 함께 부작용을 줄일 수 있는 여러 복합치료법이 개발 중에 있음.
- 이미 개발된 여러 항암제에서 부작용, 내성, 재발 등 많은 문제점을 가지고 있으며 다른 질환의 치료약물 또는 암세포 자체에 의한 숙주의 면역능력 저하에 의해 암이 발생되거나 전이된다고 보고되고 있음. 항암기전을 갖는 많은 항암약물의 경우 암세포 활성 억제뿐만 아니라, 정상적인 기능의 억제와 감염에 대한 민감도를 높이는 현상들이 보고되고 있음.
- 암의 예방 및 치료에 효율적으로 이용될 수 있는 방법 중 하나인 점막 내 면역세포들의 면역반응조절을 통한 암 치료법에 이용될 수 있는 고부가가치의 의료용 식물소재 개발 성과는 거의 전무한 현황임.
- 대장암 치료법의 효능을 극대화하기 위한 방안으로는 암 항원의 항원성 및 항체를 만드는 체액성 면역뿐만 아니라 세포성 면역을 활성화하는 과정이 중요함.
- 감염성 항원에 대한 면역은 호흡기 및 소화기 장점막을 대상으로 연구가 진행되고 있는데, 소장의 Peyer's patches에 특정 항원을 수집하는 세포인 M 세포가 항원에 대한 체액성 및 세포성 점막면역에 중요한 기능을 수행하고 있는 것으로 알려지고 있음.
- 점막은 병원균에 대해서 일차 방어체계를 형성하며 선천성 면역반응이 일어나는 곳으로 소화기, 호흡기, 비뇨생식기 등의 점막 부위를 통해 항원을 면역세포에 전달하여 체내 다양한 면역체계를 동원할 수 있어 대장암 억제 방법을 연구하는데 있어서 중요한 면역계임.
- 현재 대장암과 관련하여 점막면역에 대한 연구는 전 세계적으로 많은 관심을 끌고 있으나 국내에서 선진국과의 기술 격차가 큰 실정으로 외국 기반기술에 대한 의존도를 줄이고 국제경쟁력 제고를 위해 체계적인 연구개발이 필요함.
- 대장 내 항원-특이적 점막면역 및 전신 면역반응을 증강시킬 수 있는 점막면역반응 조절제의 개발이 절실히 요구됨.

- 암 백신 개발을 위한 수지상세포를 이용한 암의 면역치료는 암세포의 면역억제능 및 암 환자의 자체 면역저하 등 여러 가지 변수들이 있어 아직도 나름대로 해결해야 할 문제점이 많이 남아있으며 현재의 치료 방법만으로는 치료율을 충분히 높이기 힘든 실정임.
- 수지상세포를 이용한 면역치료법의 치료율을 높이기 위해 *in vivo*상의 면역억제 기능에 대한 대처방안이나 수지상세포의 생존력 강화, 항원포획 및 감작기능 증진, 항원제시능력 향상, 부수적인 비특이 항암면역의 증진, 항암 CTL 유도능 강화 등 개선해야 할 많은 부분이 있고 이를 위해 면역학적 기초 및 기반기술 연구가 뒷받침 되어야함.

2. 생산 및 시장현황

가. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 현재 미국과 영국의 국립암센터들이 암백신 개발 연구에 박차를 가하고 있으며 우리나라 국립암센터를 비롯 가톨릭의대 조혈모세포이식센터, 서울약대 강창을 교수 연구팀 등 일부 기관에서도 암백신 연구를 진행하고 있음. 그중 국립암센터 면역·세포치료연구과에서 주력하고 있는 암백신은 개인맞춤형 치료용 백신이며, 이는 항원 특이 면역세포를 분리, 증식시킨 상태의 항원을 환자에게 투여하는 것으로 체내에서 증식된 면역세포가 암세포를 공격하게 하는 원리임(국립 암센터, 암통계 참고).
- 하지만 7년 전부터 펩타이드 백신연구를 시작해 다양한 임상을 진행하고 있는 일본 및 세계시장과 비교했을 때 4~5년 정도 뒤진 셈이며, 한국신약개발연구조합에 등록된 연구 중인 암 관련 생물학 신약제제는 모두 항암제로 암백신은 없는 상황으로 외국 대형 제약사들이 앞다투어 암백신 연구에 뛰어드는 것과는 대조적인 모습임(국립 암센터, 암통계 참고).
- 전세계 항암제 시장은 연평균 13.3% 성장하고 있어 산업적으로도 가치가 크지만 항암제를 포함한 국내 제약은 다국적 대형제약회사에게 잠식되어 있는 상태로 암으로 인한 사회경제적 손실 비용을 최소화하기 위해서는 국가 주도의 항암제 개발로 국내원천기술 확보가 필요한 실정임(분자세포생물학뉴스, 웹진 2010년 2월 참고).
- 동아제약과 바이오벤처 크레아젠이 공동으로 임상시험 허가를 받아 삼성서울병원에서 임상 중인 신장암 치료제 ‘크레아백스’는 환자의 백혈구 가운데 하나인 단핵구를 수지상세포로 분화시켜 만든 자가면역 세포치료제임. 신장암 환자의 혈액에서 얻은 단핵구를 체외에서 분화시켜 수지상세포를 만든 뒤, 이를 환자의 암조직과 섞어 면역기능을 강화시킨 뒤 다시 환자 몸에 주입해 암을 치료하는 방식임(한국과학기술정보연구원, 암 백신 개발동향 참고).
- 근화제약과 바이넥스, 부산대에서 개발한 자기면역 항암 세포치료제 ‘DC-Vac/IR 주사’가 식약청으로부터 임상시험승인을 받음. 바이넥스로부터 기술이전을 받아 공동으로 개발하고 있는 근화제약은 수지상세포를 이용한 폐암 및 대장암 치료제로서 2004년 부산대병원, 동아대의료원에서 임상 1, 2상을 진행하고 있음(한국과학기술정보연구원, 암 백신 개발동향 참고).
- 라이프코드는 수지상세포에 유방암 환자에게 특이적으로 많이 발견되는 맘마글로빈 항체를 붙여 유방암세포만 공격하도록 고안한 세포치료제를 개발, 임상시험단계임(한국과학기술정보연구원, 암 백신 개발동향 참고).

- 항암제 중 대장암에서 가장 큰 효과를 보이는 대표적 약제는 5-FU으로, 가장 대표적인 것은 5-FU/류코보린으로서 5-FU의 활성대사물을 조절하여 치료효과를 증진시킨 생화학 조절제가 있음. 최근에는 재발 및 전이성 대장암에 대한 경주 및 경구용 신약이 개발되어 임상에 사용되고 있으며 젤로다(경주), 옥살리플라틴(경주), 이리노테칸(경주) 등이 있음 (BRIC 동향, 2005. 06).

주요 항암제 매출 추이 (단위 백만원, %)				
제약사	제품명	2008년 상반기	2007년 상반기	증가율 (08/07)
노바티스	글리백	30,952	28,732	7.73
	페마라정	5,561	4,210	32.09
머크	얼비투스주	834	1,295	-35.60
바이엘	넥사바	2,631	1,188	121.46
부광약품	나벨빈연질	761	1,079	-29.47
사노피아벤티스	엘록사틴	16,498	22,443	-26.49
	탁소텔	17,113	17,512	-2.28
아스트라	카소텍스정	7,189	5,991	20.00
	이레사정	4,820	5,547	-13.11
	아리미텍스정	4,020	3,795	5.93
종근당	캄도벨주	1,306	1,441	-9.37
한국로슈	젤로다정	7,361	8,857	-16.89
	맙테라주	6,986	6,156	13.48
	타쎌바	6,241	3,978	56.89
	허셉틴	4,246	2,802	51.53
	아바스틴주	2,296	1,161	97.76
한국릴리	젼자	6,635	8,925	-25.66
	알림타	7,680	1,982	287.49
한국화이자	수텐	2,881	2,983	-3.42
한국BMS	탁솔주	5,197	8,771	-40.75
CJ	캄푸토주	6,110	6,966	-12.29
SK케미칼	선플라주	11	35	-68.57

(메디팜스투데이, 2008. 11)

나. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 면역치료제 제조 기술의 대표적 선진국은 미국, 유럽의 선진국기들이며, 대표적인 성공 사례로는 미국 IDEC社의 Zevalin이나 Abbott社와 Cambridge Antibody Technology社가 류마티스성관절염 치료제로 공동으로 개발 중에 있는 완전 인간항체인 D2E7(adalimumab) 등이 있음.
- 최근 국외시장은 면역조절 단백질의 대부분이 치료용 항체 제제이고, 기존 제품의 매출액이 매년 20~50%의 급신장 추세이므로 2010년까지 황금기가 도래할 것으로 전망함. 암 치료용 면역치료제는 연평균 성장률 11.4%로서 2012년 약 300억달러 시장을 형성할 것으로 예정.
- 선진국 바이오 기업인들은 기능성 유전체학(functional genomics), 단백질체학 및 생물정보학(bioinformatics)을 기반으로 새로운 작용기전을 갖는 면역조절제의 발견을 가속화하

고 있으며, 이를 이용한 신규 면역조절제 탐색 및 개발을 실현화하려는데 노력함(한국과학기술정보연구원, 2005 면역치료제 참고).

해외 항암 세포면역치료 시장 현황 (단위 : 백만달러)					
구분	2003년	2005년	2007년	2010년	CAGR
세계시장규모	14,677.0	16,299.0	21,870.0	29,503.4	11.4

(BBC, Inc. "Biotechnology Industry Review" 2004. 5 참고)

국외 항암제(암백신) 개발 동향			
회사명	약 물	작용 기전	개발 단계
Ribi ImmunoChem	Melacine	흑생종 백신	등록전 단계
AVAX Tech.	M-Vax	암세포 표면 항원성 증가	임상3상
Imclone System	BBC-2	흑생종 표면 GDB항체	임상3상
Progenics	GMK	흑생종 백신	임상3상
AVAX tech	O-Vax	환자 암세포 자체 백신	임상2상
AVI BioPharm	CTP-37	합성 접합 백신	임상2상
Bristol-Myers Squibb	MGV	Ganglioside 접합 백신	임상2상
Cantab	TA-HPV	재조합 백신 바이러스	임상2상
Biomira	Therotope Muc-1	암세포 Mucine	임상1상
Therion Biologics	TBC-CEA	재조합 백신 바이러스	임상1상

(한국과학기술정보연구원, 2005 면역치료제 참고)

최근 개발되고 있는 수지상 세포를 이용한 세포면역치료제		
물 질	회 사	특 징
다발성골수종 백신 APC8020	Dendreon(미국), 기린비루(일본)	환자의 혈액에서 수지상세포를 분리하여 특이단백질인 이디오타입으로 활성화하여 환자체내로 재투여함. 임상1상('02)
전립선단백질 APC8015	"	전립선암 항원과 수지상세포를 이용한 암 백신, 공동개발, 임상시험중('02)
Provengé	Dendreon사(미국)	전립선암을 대상으로 한 수지상세포요법. 임상3상('02)
Mylovenge	"	다발성골수종을 대상으로 한 수지상세포 요법. 임상2상('02)
APC8024	"	유방암, 난소암, 대장암을 대상으로 한 수지상세포요법. 임상1상('02)
ex vivo 텔로메라제 • 암백신	Geron사(미국)	수지상세포 등 항원제시세포를 환자로부터 분리하고 체외에서 텔로메라제 단백질 단편이나 텔로메라제 항원을 세포내에서 생산하기 위한 핵산으로 처리하여 환자에게 다시 주입하는 방식의 암면역요법.
수지상세포/ 암항원백신	Genzyme Molecular Oncology 사(미국), Massachusetts 종합병원(미국)	환자의 수지상세포에 Melan-A/Mart-1과 gp100라는 두 개 항원을 제시하여 백신으로서 재주입하는 ex vivo 백신을 악성흑색종환자에 투여, 임상1/2상('02)
수지상세포 • 암세포융합 유방암백신	Genzyme Molecular Oncology사(미국), Beth Israel Deaconess 의료 센터(미국), Dana-Farber 암연구소(미국)	환자의 종양세포와 수지상세포를 화학적으로 융합하여 백신으로서 이용한 말기유방암 대상의 임상 1/2상시험
다발성골수종 대상의 수지상세포 백신	Aastrom Biosciences사(미국), Stanford대학(미국), 미국국립위생연구소	다발성골수종에 대한 신형 수지상세포 백신의 임상계획
DC- I 세포치료 키트	Aastrom Biosciences사(미국), 동사의 유럽자회사인 Zellerasa	사람 수지상세포의 ex vivo 제조를 위한 DC- I 세포치료키트의 유럽내 시판허가
DCvax-Prostate	Northwest Biotherapeutics사(미국)	전립선암을 대상으로 한 수지상세포백신, 임상1/2상 종료
DCvax-Brain	"	글리오블라스토마를 대상으로 한 수지상세포백신. 임상2상.
IL-13과 수지상세포를 이용한 암백신(IDD3)	Sanofi-Synthelabo(프랑스), Immuno-Designed Molecules 사(프랑스)	멜라노마를 대상으로 한 암백신. 임상2상 종료('02). 암 면역요법의 개발판매를 목적으로 제휴. Sanofi사는 IDM사의 세포치료제로부터 최대 20품목 선택기로 함.
수지상세포 치료제	동경대학의과학연구소(일본)	세포를 분리하는 유닛을 이용하여 분리한 미숙한 수지상세포를 유전자를 도입하지 않고 암환자에게 투여하는 실험 개시
CpG 올리고뉴클레오티드	Coley Pharmaceutical사(미국)	CpG 올리고뉴클레오티드를 이용하여 수지상세포 활성화 특허등록

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절. 연구범위 및 연구수행 방법

1. 1차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위		연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1세부	면역효과가 확인된 GA733-Fc with KDEL과 without KDEL 대장암 백신 단백질을 높은 수준으로 발현하는 형질전환 식물을 대량 재배	<ul style="list-style-type: none"> Western blot을 통한 형질전환 식물의 발현량 비교분석 대량재배를 위한 in vitro 식물 조직배양 	<ul style="list-style-type: none"> GA733-Fc with KDEL과 without KDEL 대장암 백신 단백질을 높은 발현하는 형질전환 식물을 대형 비닐하우스에 대량 재배하여 실험에 사용할 material 대량 확보
	대장암 백신 단백질을 생산하는 식물의 homozygous line seed bank 최적화	<ul style="list-style-type: none"> 대량재배한 형질전환 식물 각각의 유전자 발현 유무 및 단백질 발현정도를 측정하여 가장 발현이 우수한 식물의 seed 확보 	<ul style="list-style-type: none"> GA733-Fc with KDEL과 without KDEL 대장암 백신 단백질을 높은 발현하는 형질전환 식물의 homozygous line seed bank 최적화를 위한 식물 seed 대량 확보
1협동	<i>β-1,4-galactosyltransferase</i> 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (1단계 당쇄화 개선)된 GA733-2-Fc의 생산 및 당쇄 분석	<ul style="list-style-type: none"> DNA cloning <i>Agrobacterium</i> transformation Transient expression Affinity chromatography SDS-PAGE & Coomassie blue staining MALDI-TOF analysis 	<ul style="list-style-type: none"> 식물에서 당쇄가 변형된 GA733-2-Fc 단백질을 생산하기 위한 식물 벡터시스템 및 형질전환된 <i>Agrobacterium</i> 확보 형질전환된 <i>Agrobacterium</i>을 담배 식물체에 형질전환시킨 후 GA733-2-Fc 단백질 및 <i>β-1,4-galactosyltransferase</i>의 과발현에 의해 당쇄화가 변형된 GA733-2-Fc 단백질의 발현을 확인함 GA733-2-Fc 및 당쇄화가 변형된 GA733-2-Fc 단백질을 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제함

			<ul style="list-style-type: none"> GA733-2-Fc 단백질 및 β-1,4-galactosyltransferase의 과발현에 의해 당쇄화가 변형된 GA733-2-Fc 단백질의 당쇄화 구조를 MALDI-TOF 분석을 통해 분석함
	<p>당쇄화 개선된 GA733-2-Fc의 항암 치료 효과 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> MC38 transplantation Aminal experiment Tumor volume measurement 	<ul style="list-style-type: none"> 대장암종 MC38 세포가 이식된 실험동물 C57BL/6 mice에서 종양의 생성 및 성장을 확인하여 GA733-2-Fc 단백질의 항암효과를 검증하기 위한 대장암종 동물실험 시스템을 확립함 GA733-2-Fc 단백질 (형질전환된 담배에서 분리 정제된 GA733-2-Fc-Sec 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc-Sec + GalT 단백질)이 처리된 수지상세포가 대장암종 MC38 세포에 의해 유도되는 종양의 증식에 미치는 영향을 확인함
	<p>당쇄화 개선된 GA733-2-Fc의 <i>in vitro</i> 독성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> Cell culture Cell proliferation assay 	<ul style="list-style-type: none"> 당쇄화가 개선된 GA733-2-Fc 단백질 투여량의 최적조건 도출과 관련한 <i>in vitro</i> 독성 평가 실험을 수행함
2협동	<p>토마토 열매 특이적 프로모터인 SIHD와 clean vector를 이용한 식물발현벡터 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> 토마토 전신발현 프로모터인 35S 프로모터와 열매 특이 발현 프로모터인 SIHD를 clean vector에 클로닝함 	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 식물형질전환 벡터 중에서 대장암 항원 단백질인 GA733 유전자를 최적으로 발현시켜주는 clean vector를 back bone으로 이용하여, 토마토 전신발현 프로모터인 35S 프로모터와, 열매 특이 발현 프로모터인 SIHD에 의해 GA733유전자의 발현이 조절되도록 하는 식물발현벡터를 개발함
	<p>상용화 품종(고정종)을 이용한 토마토 형질전환</p>	<ul style="list-style-type: none"> 형질전환 토마토의 상용화를 위해 실험용 토마토가 아닌 상용화 품종(고정종)을 이용하여 GA733 식물발현벡터를 삽입함 	<ul style="list-style-type: none"> 토마토 전신발현 프로모터인 35S 프로모터와, 열매 특이 발현 프로모터인 SIHD에 의해 GA733유전자의 발현이 조절되는 식물발현벡터를 실험용 토마토인 Micro Tom, 상용화 품종(고정종)

<p>사람 및 mouse natural killer (NK), cytotoxic T cell, dendritic cell (DC, 수지상세포), B cell 등 면역세포에서 GA733, GA733-Fc, 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 처리 농도 및 세포독성 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> 면역세포 및 대장암 세포주에서 cell proliferation assay를 통한 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 세포독성을 확인하고 이를 바탕으로 처리농도를 결정함 	<p>인 C, M, N line에 형질전환함</p> <ul style="list-style-type: none"> 면역세포 및 대장암 세포주를 96well에 seeding하여 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체 단백질들을 처리하여 48시간 배양 후 Cell Titer 96 AQueous NON-Radioactive cell proliferation assay (Catalog. No.G5430)의 MTS(1ml)+PMS(50ul)를 25ul/well의 조건으로 처리하여 OD 490nm에서 흡광도를 측정함
<p>GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 처리에 의한 면역세포 활성화 증진방법 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포들의 유전자 발현 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 신기능성 수용체단백질들이 형질 전환된 마우스로부터 면역세포를 분리하여 식물유래 표적단백질을 처리한 후 6시간, 12시간 24시간 배양하여 면역세포들로부터 RNAzol B용액을 이용하여 total RNA를 분리함 추출한 RNA를 역전사효소, dNTP, PN6, buffer와 37°C water bath에서 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성함 각 세포로부터 합성된 cDNA에서 발현을 확인하고자 하는 유전자의 primer를 이용하여 RT-PCR 기계를 통해 증폭시켜 그 발현을 확인함
	<ul style="list-style-type: none"> 사람 및 mouse 대장(암) 세포(주)에서 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들에 의한 항암효능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 신기능성 수용체단백질들이 형질 전환된 마우스로부터 면역세포를 분리하여 식물유래 표적단백질을 처리한 후 recombinant IL-2를 이용하여 면역세포를 자극시킴 Target 세포인 암세포를 100uci의 51Cr 으로 2시간 동안 labeling 시킨 다음 recombinant IL-2로 자극한 활성화된 면역 세포와

			<p>1:400, 1:100, 1:25 등의 비율로 섞어 반응시키고 4시간 후 세포배양액으로 release된 ⁵¹Cr의 양을 측정함</p>
		<ul style="list-style-type: none"> • 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포의 식물유래 표적단백질의 항원제시 능력 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 기능성 수용체단백질들이 형질 전환된 마우스의 bone marrow로부터 cell을 분리한 후 recombinant IL-4 및 GM-CSF를 각각 25ng/ml로 처리한 후 10일간 배양하여 dendritic cell(DC)로 분화시킴 • 분화된 DC에 식물유래 표적단백질을 처리하여 이를 항원으로 제시시킨 다음 형질 전환된 마우스로부터 cytotoxic T cell을 분리하여 DC와 함께 배양함. DC로부터 항원을 제시 받은 cytotoxic T cell을 대장암 세포와 함께 배양하여 암세포 killing 능력을 측정함
		<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질에 의한 면역세포의 항체(IgA)생산 기능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질을 100ug/100ul씩 마우스에 7일간 I.P injection 한 후 fecal extract를 얻음. 96well plate에 recombinant GA733을 1ug/well로 coating 한 후 200ul의 bocking solution을 넣고 2시간 상온에서 incubation함 • 200ul의 washing buffer를 이용하여 3회 세척 후 fecal extract를 1:1000으로 희석하여 2시간 상온에서 incubation함 • 200ul의 washing buffer를 이용하여 3회 세척 후 HRP-conjugated anti-mouse IgA 항체를 1:5000으로 희석하여 상온에서 1시간 incubation함 • 50ul의 substrate를 넣고 30분간 반응시킨 후 50ul의 stop solution을 넣고 OD 450nm에서 ELISA reader로 측정함

		<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 대장암 세포들의 유전자 발현 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 사람 및 마우스 대장암 세포주와 신기능성 수용체단백질들이 형질 전환된 마우스로의 대장 세포를 분리하여 식물유래 표적단백질을 처리한 후 24시간 배양하여 각 세포들로부터 RNeasy Lysis Buffer를 이용하여 total RNA를 분리함 • 추출한 RNA를 역전사효소, dNTP, PN6, buffer와 37°C water bath에서 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성함 • 각 세포로부터 합성된 cDNA에서 발현을 확인하고자 하는 유전자의 primer를 이용하여 RT-PCR 기계를 통해 증폭시켜 그 발현을 확인함
		<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질에 의한 대장암 세포에서의 세포주기 및 세포사멸 조절에 의한 항암 효능검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 사람 및 마우스 대장암 세포주에 식물유래 표적단백질을 처리한 후 48시간 배양함 • 10mg/ml propidium iodide (PI) 와 0.1mg/ml RNase A가 포함된 0.5ml로 상온에서 30분간 염색시킴 • 세포에서 DNA 내용물을 Modifit LT 3.0 software (Verity Software House, San Diego, CA) 유세포분석기(flow cytometry, BD Biosciences, San diego, CA)로 분석함 • 사람 및 마우스 대장암 세포주에 식물유래 표적단백질을 처리한 후 48시간 배양함. 대장암 세포를 $2 \sim 5 \times 10^5$ 으로 조정하여 염색완충용액(1% FBS, 0.01% NaN_3가 포함된 PBS, pH 7.4)으로 1회 세척 후 Annexin V -FITC(fluoresceinated isothiocyanate)와 PI (Propidium iodide)를 시료에 가하여 상온에서 15분간 반응시킨 후에 유세포

			분석기(flow cytometry)로 분석함
--	--	--	--------------------------

2. 2차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위		연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1세부	식물에서 발현된 백신 단백질의 정제 및 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 형질전환 식물체의 비닐하우스 재배를 통한 바이오매스 대량 확보 • Protein G affinity column을 이용한 백신단백질 정제 	<ul style="list-style-type: none"> • 대장암 항원-항체 재조합 단백질 GA733-Fc를 대량확보하기 위한 형질전환 식물체의 대량재배 • 식물유래 대장암 항원-항체 재조합 단백질 GA733-Fc의 정제 확보 • 형질전환 식물의 대량재배를 통한 homozygous line의 상업화목적의 seed bank 확보
	식물에서 정제된 백신 단백질의 당구조분석 결과 확인	<ul style="list-style-type: none"> • MALDI-TOF를 이용한 정제된 백신단백질의 당구조 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • MALDI-TOF를 이용하여 정제된 식물유래 대장암 항원-항체 재조합 단백질 GA733-Fc의 당구조 분석 및 백신단백질의 기능성 모색
	수지상세포와 NK세포를 이용한 동물실험 모델에서 면역 활성 확인	<ul style="list-style-type: none"> • SPR(Surface plasmon resonance) assay • 수지상세포와 NK세포를 이용한 동물실험 모델에서의 면역 활성 실험 	<ul style="list-style-type: none"> • SPR(Surface plasmon resonance) assay를 통한 식물유래 항원-항체 백신 단백질 GA733-Fc의 면역효능성 확인 • 수지상세포와 NK세포를 이용한 동물실험 모델에서의 면역 활성 실험 진행함
1협동	β -1,2-xylosyltransferase와 α -1,3-fucosyltransferase 유전자의 동시 knock-down에 의한 당쇄화 개선 (2단계 당쇄화 개선)된 GA733-2-Fc의 생산	<ul style="list-style-type: none"> • DNA cloning • <i>Agrabacterium</i> transformation • Plant transformation, selection and regeneration • Transient expression • Affinity chromatography • SDS-PAGE & Coomassie blue staining • Western blot analysis • MALDI-TOF analysis 	<ul style="list-style-type: none"> • 2단계 당쇄화 변형 GA733-2-Fc 단백질을 생산하기 위한 식물 벡터시스템 및 형질전환된 <i>Agrobacterium</i> 확보 • 형질전환된 재조합 <i>Agrobacterium</i>을 담배 식물체 잎에 형질전환시키고 선별 배지에서 재분화하여 2단계 당쇄화 변형 GA733-2-Fc 단백질 생산용

			<p>RNAi 백터가 형질전환된 담배 식물체를 확보함</p> <ul style="list-style-type: none"> • 형질전환된 재조합 <i>Agrobacterium</i>을 GA733-2-Fc 생산용 재조합 <i>Agrobacterium</i>과 혼합하여 담배 식물체에 형질전환시킨 후 GA733-2-Fc 단백질 및 β-1,2-xylosyltransferase, α-1,3-fucosyltransferase 유전자의 knock-down에 의한 2단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc의 생산을 확인함 • GA733-2-Fc 및 당쇄화가 변형된 GA733-2-Fc 단백질을 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제함 • GA733-2-Fc 단백질 및 2단계 당쇄화 변형 GA733-2-Fc 단백질의 당쇄화 구조를 MALDI-TOF 분석을 통해 분석함
<p>당쇄화 개선된 GA733-Fc의 동물 실험을 통한 <i>in vivo</i> 알러지 독성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Animal experiment • GA733-2-Fc 항원 단백질의 복강주사 • IgG, IgE ELISA 분석 • Cytokine ELISA 분석 		<ul style="list-style-type: none"> • GA733-2-Fc 및 2단계 당쇄화 개선 GA733-2-Fc 단백질을 실험쥐의 복강에 투여하여 면역반응을 유도하고 혈청에 존재하는 GA733-2-Fc 특이 IgG 및 IgE 항체를 효소면역측정법으로 분석함 • GA733-2-Fc 및 2단계 당쇄화 개선 GA733-2-Fc 단백질이 복강면역된 실험쥐에서 비장세포를 확보하고 GA733-2-Fc 항원에 의한 cytokine IFN-γ 및 IL-4, IL-5, IL-10의

			<p>분비를 효소면역측정법으로 분석함</p> <ul style="list-style-type: none"> • 담배 식물체에서 β-1,2-xylosyl- transferase와 α-1,3-fucosyltransferase 유전자를 동시에 knock-down 시키기 위한 형질전환된 재조합 <i>Agrobacterium</i>을 GA733-2-Fc 생산용 재조합 <i>Agrobacterium</i> 및 β-1,4-galactosyl- transferase 유전자 과발현용 재조합 <i>Agrobacterium</i>과 혼합하여 담배 식물체에 형질전환시킨 후 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc의 생산을 확인함
	<p>β-1,2-xylosyltransferase와 α-1,3-fucosyltransferase 유전자의 동시 knock-down 및 β-1,4-galactosyltransferase 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc의 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Transient expression • Protein extraction • Western blot analysis 	
2협동	<p>대장암 백신 생산량이 높은 형질전환 토마토line 선별</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 실험용 토마토인 Micro Tom과 상용화 토마토인 M line에 식물발현벡터를 삽입함 	<ul style="list-style-type: none"> • Clean vector를 back bone으로 이용하고, 토마토 전신발현 프로모터인 35S 프로모터와 열매 특이 발현 프로모터인 SIHD 프로모터에 의해 GA733 유전자의 발현이 조절되도록 하는 식물발현벡터를 Micro Tom과 M line에 각각 삽입하여 형질전환 토마토를 개발
	<p>삽입 유전자의 copy 수 및 삽입 위치를 분석하여 single copy, intergenic 하게 삽입된 형질전환 토마토 line 선별</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 항생제 선별 된 토마토 line을 이용하여 GA733 over expression 된 형질전환 토마토 line을 선별함 	<ul style="list-style-type: none"> • 항생제가 포함된 식물배지에서 1차 선별된 식물형질전환체에서 genomic DNA를 추출한 후 PCR을 하여 형질전환 토마토 line을 선별함
	<p>대장암 백신 생산 형질전환 토마토를 이용한 대장암 예방 효능 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 선별된 형질전환 토마토의 열매를 이용하여 대장암 예방 효능을 확인함 	<ul style="list-style-type: none"> • 선별된 형질전환 토마토의 열매를 수확하여 WT마우스에 먹인 후 증상 관찰을 수행하여야 하나 형질전환 토마토의 열매 수량의 확보가 어려워 수량 확보될 때까지 형질전환

			담배에서 추출한 GA733-2, GA733-Fc 단백질을 분리하여 대장암 예방 효능 검정을 수행
대장암 및 IBD mouse 모델에서, GA733, GA733-Fc, 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 최적의 <i>in vivo</i> 투여조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> • KFDA 의약품등의 독성시험기준을 바탕으로 마우스에 식물유래 표적단백질을 경구투여 한 후 그 독성을 확인하고 이를 바탕으로 투여조건을 결정함 		<ul style="list-style-type: none"> • WT 마우스에 2일 1회, 총 3주간 10회 경구투여한 후 일반증상관찰(사망 및 특이사항), 체중측정, 사료섭취량(매주 2회) 및 물 섭취량(매주 2회) 측정함 • 부검시 장기의 중량측정 및 육안적 검사를 시행함
GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 투여에 의한 체액성, 세포매개면역 및 점막면역기능 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 암 및 염증관련 유전자 발현 분석 		<ul style="list-style-type: none"> • 신기능성 수용체단백질들이 형질 전환된 마우스에 식물유래 표적단백질을 경구투여한 후, 면역세포 및 암 세포를 분리하여 RNAzol B용액을 이용하여 total RNA를 분리함 • 추출한 RNA를 역전사효소, dNTP, PN6, buffer와 37°C water bath에서 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성함 • 각 세포로부터 합성된 cDNA에서 발현을 확인하고자 하는 유전자의 primer를 이용하여 RT-PCR 기계를 통해 증폭시켜 그 발현을 확인함
	<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포들의 활성화 및 암세포 killing 능력 검증 		<ul style="list-style-type: none"> • 신기능성 수용체단백질들이 형질 전환된 마우스에 식물유래 표적단백질을 경구투여한 후 면역세포를 분리하여 recombinant IL-2를 처리하여 면역세포를 자극시킴 • Target 세포인 암세포를 100uci의 51Cr 으로 2시간 동안 labeling 시킨 다음

			<p>recombinant IL-2로 자극한 활성화된 면역 세포와 1:400, 1:100, 1:25 등의 비율로 섞어 반응시키고 4시간 후 세포배양액으로 release된 ⁵¹Cr의 양을 측정함</p>
		<ul style="list-style-type: none"> • 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포의 식물유래 표적단백질의 항원제시 능력 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 신기능성 수용체단백질이 형질 전환된 마우스에 식물유래 표적단백질을 경구투여 한 후, 면역세포 분리하여 RNeasy Lysate B용액을 이용하여 total RNA를 분리함 • 추출한 RNA를 역전사효소, dNTP, PN6, buffer와 37°C water bath에서 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성함. 합성된 cDNA에서 MHC class II 유전자의 primer를 이용하여 RT-PCR 기계를 통해 증폭시켜 그 발현을 확인함
		<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질에 의한 면역세포의 항체(IgA)생산 기능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질을 마우스에 경구투여한 후 fecal extract를 얻음 • 96well plate에 recombinant GA733을 2ug/well로 coating 한 후 200ul의 blocking solution을 넣고 2시간 상온에서 incubation함 • 200ul의 washing buffer를 이용하여 3회 세척 후 fecal extract를 10ug/well로 처리하여 2시간 상온에서 incubation함 • 200ul의 washing buffer를 이용하여 3회 세척 후 HRP-conjugated anti-mouse IgA 항체를 1:5000으로 희석하여 상온에서 1시간 incubation함

			<ul style="list-style-type: none"> • 100ul의 substrate를 넣고 30분간 반응시킨 후 100ul의 stop solution을 넣고 OD 450nm에서 ELISA reader로 측정함
<i>in vivo</i> 항암/항염기능 분석		<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질에 의한 Tumor mass(염증) 억제기능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질을 마우스에 2일 1회, 2주간 경구투여한 후 마우스 대장암 세포주를 피하주사하여 2주간 tumor mass를 측정함
		<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질에 의한 대장암 마우스 모델의 Survival rate 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질을 마우스에 2일 1회, 2주간 경구투여한 후 마우스 대장암 세포주를 정맥주사하여 tumor 마우스 모델의 survival rate를 관찰함
		<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 암 전이 억제기능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • WT 및 신기능성 수용체단백질이 형질전환된 마우스에 식물유래 표적단백질을 경구투여한 후, 대장암 세포주를 피하주사하여 2주 후 대장암 세포를 분리함 • 분리한 대장암세포를 RNazol B용액을 이용하여 total RNA를 분리함 • 추출한 RNA를 역전사효소, dNTP, PN6, buffer와 37°C water bath에서 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성함 • 합성된 cDNA에서 암 전이 관련 유전자의 primer를 이용하여 RT-PCR 기계를 통해 증폭시켜 그 발현을 확인함

3. 3차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법	구체적인 내용
-------	--------	---------

		(이론적·실험적 접근방법)	
1세부	대장암 예방용 수지상세포백신 효능 검증으로 예방용 재조합백신 실용화확립	<ul style="list-style-type: none"> • 실용화를 위한 seed bank 구축 	<ul style="list-style-type: none"> • GA733-Fc with KDEL 형질전환 식물의 대량재배를 통해 homozygous line을 선별하고 GA733-Fc의 발현이 우수한 line의 seed bank 확보
		<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 의료용 단백질의 실용화 기반 기술 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 대장암 항원-항체 재조합 단백질 GA733-Fc의 정제법 확립
			<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 GA733-Fc with KDEL 재조합 단백질을 분리 정제하여 수지상세포와 NK세포를 이용한 동물실험 모델에서의 면역 활성화 검증
1협동	β -1,2-xylosyltransferase와 α -1,3-fucosyltransferase 유전자의 동시 knock-down 및 β -1,4-galactosyltransferase 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc 단백질의 생산 및 분리정제	<ul style="list-style-type: none"> • Transient expression • Affinity chromatography • SDS-PAGE & Coomassie blue staining • Western blot analysis • MALDI-TOF analysis 	<ul style="list-style-type: none"> • β-1,2-xylosyltransferase와 α-1,3-fucosyltransferase 유전자의 동시 knock-down되고 β-1,4-galactosyltransferase 유전자가 과발현된 식물체에서 3단계 당쇄화 개선 GA733-Fc (GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD) 단백질을 생산하고 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제함 • 3단계 당쇄화가 변형된 GA733-Fc 단백질의 당쇄화 구조를 MALDI-TOF 분석을 통해 분석함
	β -1,2-xylosyltransferase와 α -1,3-fucosyltransferase 유전자의 동시 knock-down 및 β -1,4-galactosyltransferase 유전자 과발현에 의해 당쇄화	<ul style="list-style-type: none"> • Animal experiment • 수지상세포 추출 및 성숙 • GA733-Fc 항원 단백질의 복강주사 • IgG, IgE ELISA 분석 • Cytokine ELISA 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 실험동물 마우스에서 추출한 수지상세포에 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질을 처리하여 수지상세포의 성숙을 유도하고 대장암세포가 투여된 마우스에 첨가하여 1, 2, 3단계 당쇄화 개선된

	<p>개선 (3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc 단백질의 항암치료 효과 검증</p>		<p>GA733-Fc 단백질 (GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질)에 의한 종양의 성장에 미치는 영향을 검증함</p> <ul style="list-style-type: none"> • 당쇄화 변형된 GA733-Fc 단백질이 첨가된 배지에서 성숙이 유도된 수지상세포가 투여된 경우 PBS 대조군 및 정상적인 GA733-Fc 단백질이 처리된 수지상세포 처리군에 비해 종양의 성장이 억제되었음 • GA733-Fc 단백질 및 1, 2, 3 단계 당쇄화 변형된 GA733-Fc 단백질을 실험동물 마우스의 복강 면역하여 항체의 생성을 유도하고 대장암 CT-26 세포를 피하 주사 하여 종양의 성장을 유도하고 GA733-Fc 단백질에 의한 종양 성장 억제 효과를 확인함 • GA733-Fc 단백질이 면역된 실험동물 마우스에서 대장암 CT-26 세포에 의한 종양 성장은 대조군 PBS에 비해 억제되었고 가장 큰 억제 효과는 GA733-Fc + GalT 단백질이 면역된 실험동물 마우스에서 보였음
	<p>당쇄화 개선된 GA733-Fc의 <i>in vivo</i> 급성 독성 평가 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Animal experiment • <i>in vivo</i> 독성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질의 <i>in vivo</i> 급성 독성 평가를 위한 동물실험에서 GA733-Fc 단백질의 과량 투여에 의한 시각적인 이상

			증상, 체중 저하, 장기 이상 등의 증상은 관찰되지 않았음
2협동	LMO 유해성 평가를 위한 이벤트 확보 : 선별된 elite line으로부터 삽입 유전자가 single copy, intergenic하게 삽입된 형질전환 line을 선별하고 후대육성에 의한 homo line 개발 및 고정	<ul style="list-style-type: none"> • 미니토마토인 Micro Tom과 상용화 품종인 생식용 일반 토마토 M line에 식물발현백터를 삽입하여 이벤트 확보 	<ul style="list-style-type: none"> • 타겟 단백질의 발현 및 식물형질전환에 용이한 pBINPLUS vector를 back bone으로 하고 토마토 전신발현 프로모터인 35S 프로모터에 의해 GA733 유전자의 발현이 조절되도록 하는 식물발현백터를 Micro Tom에 삽입하였고, 식물 상용화에 용이한 Clean vector를 back bone으로 하고 토마토 열매 특이 발현 프로모터인 SIHD 프로모터에 의해 GA733 유전자의 발현이 조절되도록 하는 식물발현백터를 M line에 삽입하여 형질전환 토마토를 개발하여 LMO 유해성 평가를 위한 이벤트를 확보
	형질전환 토마토 seed 다량 확보 : LMO 유해성 평가를 위한 환경방출 실험 등에 사용할 형질전환 토마토 후대 진전 및 seed 다량 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 항생제 선별 된 토마토 line을 이용하여 GA733 over expression 된 형질전환 토마토 line을 선별함 	<ul style="list-style-type: none"> • 항생제가 포함된 식물배지에서 1차 선별된 식물형질전환체에서 genomic DNA를 추출한 후 PCR을 하여 형질전환 토마토 line을 선별하고, western blot analysis를 이용하여 GA733 over expression line을 선별한 후 seed를 확보
	항암면역원성 및 면역기능 증진 등에 대한 효율을 평가하고 최적화 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 2차년도 실험결과를 바탕으로 대장암 및 IBD 마우스모델에서 식물유래 표적단백질의 최적의 경구투여 조건을 확립함 	<ul style="list-style-type: none"> • 대장암 및 IBD 마우스 모델에 식물유래 GA733-Fc를 2일 1회, 총 3주간 경구 투여한 후 면역세포의 활성을 분석하고, 항암 및 항염에 직접적인 지표들을 분석하여 최적의 투여 조건을 결정함
	전임상을 위한 최적의 항암/항염 조건으로 mouse에서 항암/항염	<ul style="list-style-type: none"> • 대장암 및 IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc의 항암 및 항염 	<ul style="list-style-type: none"> • 기존 연구결과를 바탕으로 강력한 점막면역 유도의 면역원으로 알려진 LTB 및

	증진 방법 구축	기능 증진을 위한 보조제 기능 검증	CT를 식물유래 GA733-Fc와 함께 경구 투여한 후 식물유래 GA733-Fc의 단독 투여와 비교하여 항암 및 항염 기능의 증진을 관찰함
	식물유래 표적단백질 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제의 combinational 투여에 의한 대장암 및 IBD의 예방 또는 치료효율, 유효성 및 안정성 향상으로 경구백신 실용화 기반기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 암 및 염증관련 유전자 발현 분석 • 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 면역세포들의 활성 및 암세포 killing 능력 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • WT 마우스 및 TREM2 TG 마우스에 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제를 경구투여한 후, 면역세포 및 암 세포를 분리하여 RNAzol B용액을 이용하여 total RNA를 분리함 • 추출한 RNA를 역전사효소, dNTP, PN6, buffer와 37°C water bath에서 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성함 각 세포로부터 합성된 cDNA에서 발현을 확인하고자 하는 유전자의 primer를 이용하여 RT-PCR 기계를 통해 증폭시켜 그 발현을 확인함 • WT 마우스 및 TREM2 TG 마우스에 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제를 경구투여한 후, 면역세포를 분리하여 recombinant IL-2를 처리하여 면역세포를 자극시킴 • Target 세포인 암세포를 100uci의 51Cr 으로 2시간 동안 labeling 시킨 다음 recombinant IL-2로 자극한 활성화된 면역 세포와 1:400, 1:100, 1:25 등의 비율로 섞어 반응시키고 4시간 후 세포배양액으로 release된 51Cr의 양을 측정함

		<ul style="list-style-type: none"> • 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 면역세포의 식물유래 GA733-Fc의 항원제시 능력 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • WT 마우스 및 TREM2 TG 마우스에 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제를 경구투여한 후, 면역세포 분리하여 RNeasy Lysis Buffer 용액을 이용하여 total RNA를 분리함 • 추출한 RNA를 역전사효소, dNTP, PN6, buffer와 37°C water bath에서 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성함. 합성된 cDNA에서 MHC class II 유전자의 primer를 이용하여 RT-PCR 기계를 통해 증폭시켜 그 발현을 확인함
		<ul style="list-style-type: none"> • 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 면역세포의 항체(IgA)생산 기능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • WT 마우스 및 TREM2 TG 마우스에 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제를 경구투여한 후, fecal extract를 얻음 • 96well plate에 recombinant GA733을 2ug/well로 coating 한 후 200ul의 blocking solution을 넣고 2시간 상온에서 incubation함 • 200ul의 washing buffer를 이용하여 3회 세척 후 fecal extract를 10ug/well로 처리하여 2시간 상온에서 incubation함 • 200ul의 washing buffer를 이용하여 3회 세척 후 HRP-conjugated anti-mouse IgA 항체를 1:5000으로 희석하여 상온에서 1시간 incubation함 • 100ul의 substrate를 넣고

			30분간 반응시킨 후 100ul의 stop solution을 넣고 OD 450nm에서 ELISA reader로 측정함
식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 Tumor mass(염증) 억제기능 검증	<ul style="list-style-type: none"> 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제를 마우스에 2일 1회, 2주간 경구투여한 후 마우스 대장암 세포주를 피하주사하여 2주간 tumor mass를 측정함 	<ul style="list-style-type: none"> 식물유래 표적단백질을 마우스에 2일 1회, 2주간 경구투여한 후 마우스 대장암 세포주를 피하주사하여 2주간 tumor mass를 측정함 	
	<ul style="list-style-type: none"> 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 암 전이 억제기능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> WT 마우스 및 TREM2 TG 마우스에 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제를 경구투여한 후, 대장암 세포주를 피하주사하여 2주 후 대장암 세포를 분리함 분리한 대장암세포를 RNazol B용액을 이용하여 total RNA를 분리함 추출한 RNA를 역전사효소, dNTP, PN6, buffer와 37°C water bath에서 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성함 합성된 cDNA에서 암 전이 관련 유전자의 primer를 이용하여 RT-PCR 기계를 통해 증폭시켜 그 발현을 확인함 	
	<ul style="list-style-type: none"> 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 대장암 및 IBD mice 모델 질환지표분자 변화 분석 	<ul style="list-style-type: none"> WT 마우스 및 TREM2 TG 마우스에 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제를 경구투여한 후, 대장암 마우스 모델 및 IBD 마우스 모델로부터 질환지표분자의 변화를 확인함 	

제 2절. 세부연구수행 결과

1. 1차년도 세부연구수행 결과

제1세부과제 : 대장암 항원-항체 재조합 단백질인 GA733-Fc 형질전환 식물의 대량재배를 통한 homozygous line의 seed bank 확보 및 대장암 예방용 수지상세포백신 효능 검증으로 예방용 재조합백신 실용화확립

(1) 면역효과가 확인된 GA733-Fc with KDEL과 without KDEL 대장암 백신 단백질을 높은 수준으로 발현하는 형질전환 식물을 대량 재배 (약 100개 이상의 식물체 및 잎 확보하였음)

- western blot을 통한 형질전환 식물의 발현량 비교분석.

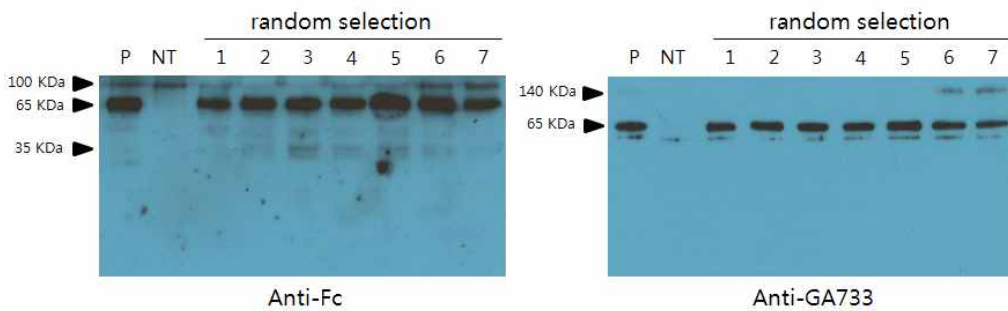


그림 4. GA733-Fc with KDEL을 발현하는 형질전환 식물의 백신단백질 발현유무 확인.

하우스에서 대량재배한 형질전환 식물을 무작위로 선별하여 유전자 발현 유무를 확인하였음.

- GA733-Fc 백신단백질을 발현하는 식물 중 높은 수준의 발현량을 보이는 형질전환 식물을 대량생산 하기 위한 *in vitro* 식물 조직배양.



그림 5. GA733-Fc 백신단백질을 발현하는 형질전환 식물의 *in vitro* 대량 조직배양. *Agrobacterium*-mediated transformation 기법을 이용하여 생성된 형질전환체들 중 백신단백질 발현량이 우수한 개체를 선별하기 위해 대량으로 조직배양 하였음.

- 비닐하우스를 이용한 형질전환 식물의 대량 재배 및 material 대량 확보.



그림 6. GA733-Fc 백신단백질을 발현하는 형질전환 식물의 대량재배 및 material 확보.

(2) 대장암 백신 단백질 GA733-Fc with KDEL과 without KDEL을 생산하는 식물의 homozygous line seed bank 최적화

- 대량재배한 형질전환 식물 각각의 유전자 발현 유무 및 단백질 발현정도를 측정하여 가장 발현이 우수한 식물의 seed 확보 (5개 식물로부터 seed 5 tube(1.5ml) 확보하였음).



그림 7. GA733-Fc 백신단백질 발현이 우수한 식물의 seed 확보현황 및 seed 관리대장 제작.

제1협동과제 : 당쇄화 개선을 통한 GA733-2-Fc의 치료효과를 극대화할 수 있는 기반기술 개발 및 독성 평가 검사

(1) β -1,4-galactosyltransferase 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (1단계 당쇄화 개선)된 GA733-2-Fc의 생산 및 당쇄 분석

- GA733-2-Fc 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc 단백질 생산 및 분리 정제.

식물체에서 GA733-2-Fc 단백질을 생산하기 위해 *Beet curly top virus* (BCTV) replicon과 CsVMV promoter를 지니는 pBCTV 벡터에 GA733-2-Fc 유전자가 클로닝된 pBCTV-GA733-2-Fc-Sec 벡터(그림 8) 및 변형된 당쇄를 지니는 GA733-2-Fc 단백질을 생산하기 위해 endoplasmic reticulum target sequence KDEL이 fusion된 GA733-2-Fc-ER 유전자가 클로닝된 pBCTV-GA733-2-Fc-ER 벡터(그림 8)를 지니는 *Agrobacterium*을 담배 식물체에 형질전환시키고 GA733-2-Fc 단백질의 발현을 확인한 후 Fc fragment와 특이적으로 결합하는 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 GA733-2-Fc-Sec, GA733-2-Fc-ER 단백질을 분리 정제하였음. Galactose가 β -1-4 linkage로 연결된 당쇄화 구조를 지니는 GA733-2-Fc 단백질을 확보하기 위해 human β -1,4-galactosyltransferase (*GalT*) 유전자가 클로닝된 pILTAB-GalT 벡터(그림 8)가 형질전환된 *Agrobacterium*을 pBCTV-GA733-2-Fc-Sec, pBCTV-GA733-2-Fc-ER 벡터를 지니는 *Agrobacterium*과 혼합한 후 담배 식물체에 형질전환시켰고 GA733-2-Fc 단백질의 발현을 확인한 후 분리 정제하였음. GA733-2-Fc 단백질의 분리 정제는 SDS-PAGE 후 Coomassie blue 염색법으로 확인하였음(그림 9).

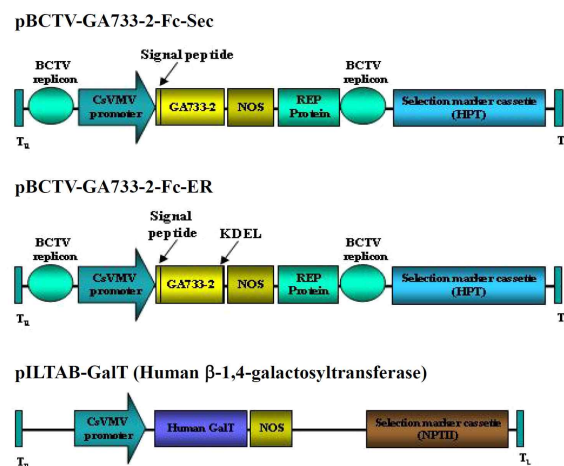


그림 8. 식물에서 당쇄가 변형된 GA733-2-Fc 단백질을 생산하기 위한 식물 벡터시스템을 구축함.

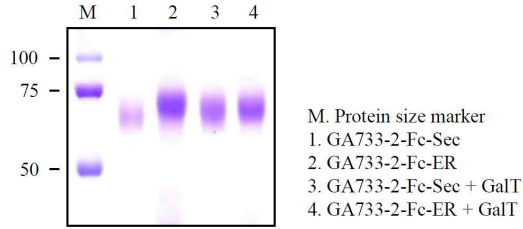


그림 9. 형질전환된 담배에서 생산된 당쇄가 변형된 GA733-2-Fc 단백질을 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제하고 SDS-PAGE 후 Coomassie blue 염색법으로 확인함.

• GA733-2-Fc 단백질의 당쇄 분석

GA733-2-Fc 단백질의 당쇄를 분석하기 위해 50 µg의 분리 정제된 GA733-2-Fc 단백질에 0.6 mg/ml의 pepsin을 처리하여 GA733-2-Fc glycopeptide를 얻었고 0.5 mU의 PNGase A를 처리하여 glycan을 분리한 후 column chromatography 방법으로 분리하였음. 분리 정제된 glycan은 solid permethylation 후 MALDI-TOF 분석을 통해 분석하였음(그림 10). GA733-2-Fc-Sec 단백질의 경우 식물에서 볼 수 있는 xylose와 fucose가 추가된 것으로 추정되는 당쇄들을 발견할 수 있었고 GA733-2-Fc-ER의 경우 high mannose type의 당쇄로 추정되는 peak들을 발견할 수 있었음. 또한 GalT를 함께 발현시킨 GA733-2-Fc-ER + GalT의 경우 GA733-2-Fc-ER과 유사한 당쇄화 양상을 보였고 GA733-2-Fc-Sec + GalT의 경우 다른 GA733-2-Fc-ER, GA733-2-Fc-ER + GalT와 유사한 당쇄 양상을 보임.

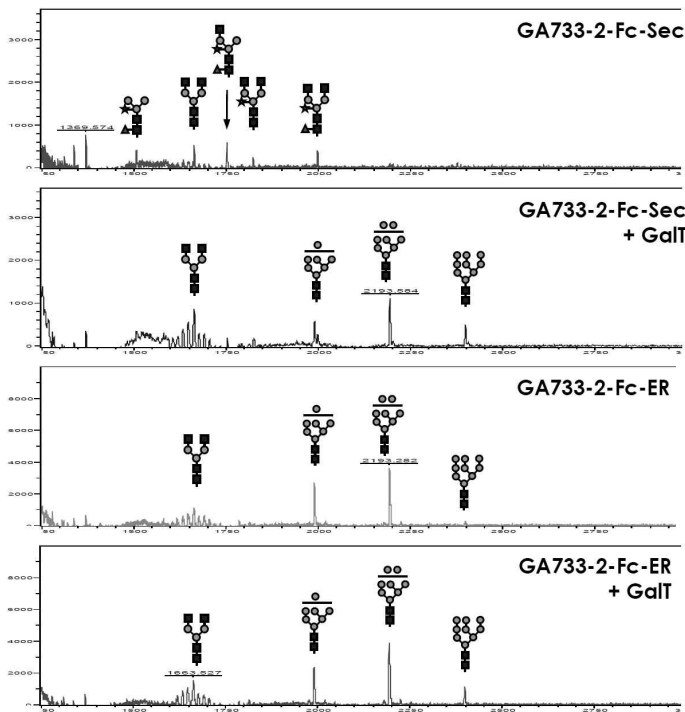


그림 10. MALDI-TOF 분석을 통해 식물에서 생산된 GA733-2-Fc-Sec 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc (GA733-2-Fc-ER, GA733-2-Fc-Sec + GalT, GA733-2-Fc-ER + GalT) 단백질의 당쇄를 분석함.

(2) 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc의 항암 치료 효과 검증

- 대장암종의 생성 및 성장을 확인하기 위한 대장암종 동물실험 시스템의 확립

대장암종 MC38 세포주 (1×10^6)를 실험동물 C57BL/6 mice의 오른쪽 서혜부 피하에 이식하여 대장암종 MC38 세포에 의한 종양 생성 및 성장을 관찰하고, 본 과제 동물실험의 기초가 되는 종양의 성장 곡선, 실험동물의 생존 기간, 생존 곡선 등의 자료를 확보함. 또한 종양조직을 채취하여 Hematoxylin과 Eosin 용액을 이용한 조직표본 병리 검사를 시행하여 일관된 종양 형성을 확인하였음.

- 대장암종 동물실험 시스템을 이용한 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc의 항암 치료 효과 검증

C57BL/6 mice의 골수에서 추출한 수지상세포 (2×10^6 dendritic cells)를 MC38 세포추출물이 포함된 RPMI1640 배지 10 ml에 현탁시킨 후 24 시간 동안 배양하여 수지상세포의 성숙을 유도하고 대장암종 MC38 세포 이식에 의해 생성된 종양 주변에 피하주사한 후 종양의 성장에 미치는 수지상세포의 영향을 확인함 (그림 11A). 대장암종 MC38 세포 이식에 의해 생성된 종양은 이식 12일 후 가장 크게 성장하였고 MC38 세포추출물이 첨가된 배지에서 배양된 수지상세포가 투여된 경우 종양의 성장은 감소하였음. GA733-2-Fc-Sec 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc-Sec + GalT 단백질의 항암 치료 효과를 검증하기 위해 C57BL/6 mice의 골수에서 추출한 수지상세포 (2×10^6 dendritic cells)를 20 μ g/ml의 GA733-2-Fc-Sec 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc-Sec + GalT 단백질이 포함된 RPMI1640 배지 10 ml에 현탁시킨 후 24 시간동안 배양하여 수지상세포의 성숙을 유도하였음. 회수된 각각의 수지상세포는 대장암종 MC38 세포 이식에 의해 생성된 종양 주변에 피하주사한 후 대장암종 MC38 세포 이식 12일 후 종양의 크기를 측정하여 종양의 성장에 미치는 수지상세포의 영향을 확인함 (그림 11B). GA733-2-Fc-Sec 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc-Sec + GalT 단백질이 첨가된 배지에서 배양된 수지상세포가 투여된 경우 종양의 증식은 대조군으로 PBS가 투여된 종양에 비해 감소하였음.

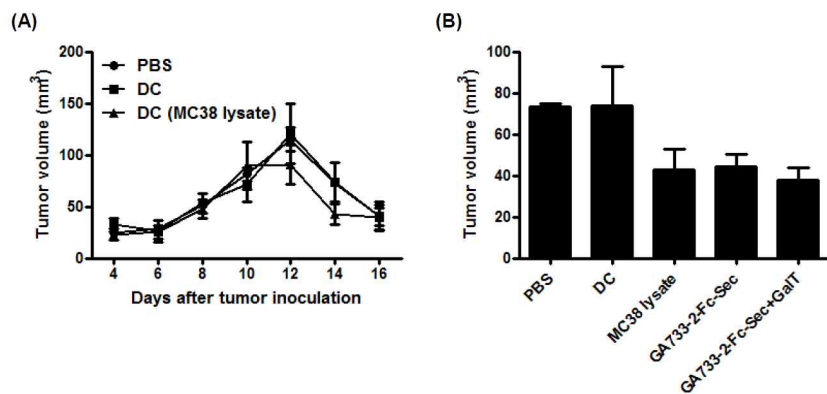


그림 11. (A) 대장암종 MC38 세포에 의해 유도되는 종양의 증식 및 MC38 세포추출물이 처리된 수지상세포가 MC38 세포에 의해 유도되는 종양의 증식에 미치는 영향을 확인

함. (B) GA733-2-Fc 단백질 (형질전환된 담배에서 분리 정제된 GA733-2-Fc-Sec 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc-Sec + GalT 단백질)이 처리된 수지상세포가 대장암종 MC38 세포에 의해 유도되는 종양의 증식에 미치는 영향을 확인함.

(3) 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc의 *in vitro* 독성 평가

당쇄화 개선된 GA733-2-Fc 투여량의 최적조건 도출과 관련한 *in vitro* 독성 평가 실험을 수행하기 위해 형질전환된 담배에서 분리 정제된 GA733-2-Fc-Sec 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc-Sec + GalT 단백질을 대장암 세포주 (MC38, CT-26, HCT-116), 유방암 세포주 (MCF-7, SK-BR-3), 자궁암 세포주 (HeLa), 난소암 세포주 (SK-OV-3), 간암 세포주 (HepG2), 피부암 세포주 (SK-MEL-5), 수지상 세포주 (JAWSII) 등에 처리한 후 세포의 활성을 측정하였음. 각각의 세포주는 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 첨가한 후 18 시간 동안 배양하였고 서로 다른 농도 (5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$)의 GA733-2-Fc 단백질을 함유한 배지로 교환한 후 24 시간 동안 배양하였으며 세포의 proliferation을 MTT assay를 통해 확인하였음. 그림 5에서와 같이 실험에 이용된 농도의 GA733-2-Fc 단백질은 암세포주의 증식을 억제하지 않았으며 JAWSII 수지상 세포주의 경우 GA733-2-Fc 단백질이 존재할 때 세포의 proliferation이 증가하는 것으로 확인됨. 이상의 결과는 실험에 이용된 농도에서 GA733-2-Fc 단백질이 세포 독성을 보이지 않는다는 것을 의미함. (10개의 다양한 세포주를 이용하여 독성 검사 완료함)

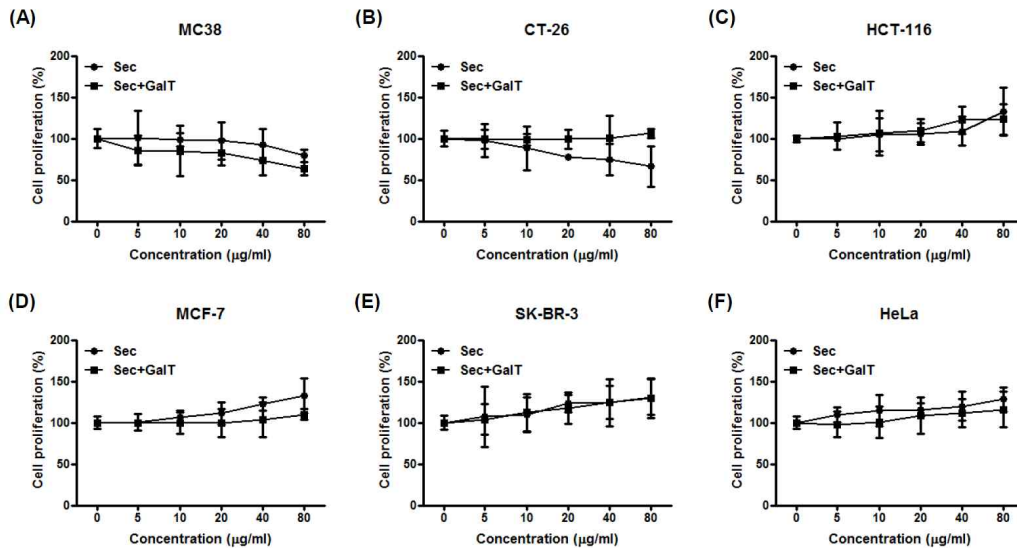


그림 12. 형질전환된 담배에서 분리 정제된 GA733-2-Fc-Sec (Sec) 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc-Sec + GalT (Sec + GalT) 단백질을 대장암 세포주 (MC38, CT-26, HCT-116), 유방암 세포주 (MCF-7, SK-BR-3), 자궁암 세포주 (HeLa), 난소암 세포주 (SK-OV-3), 간암 세포주 (HepG2), 피부암 세포주 (SK-MEL-5), 수지상 세포주 (JAWSII) 등에 처리한 후 세포 활성을 측정하여 실험에 이용된 GA733-2-Fc 단백질이 세포 독성을 보이지 않음을 확인함(continued).

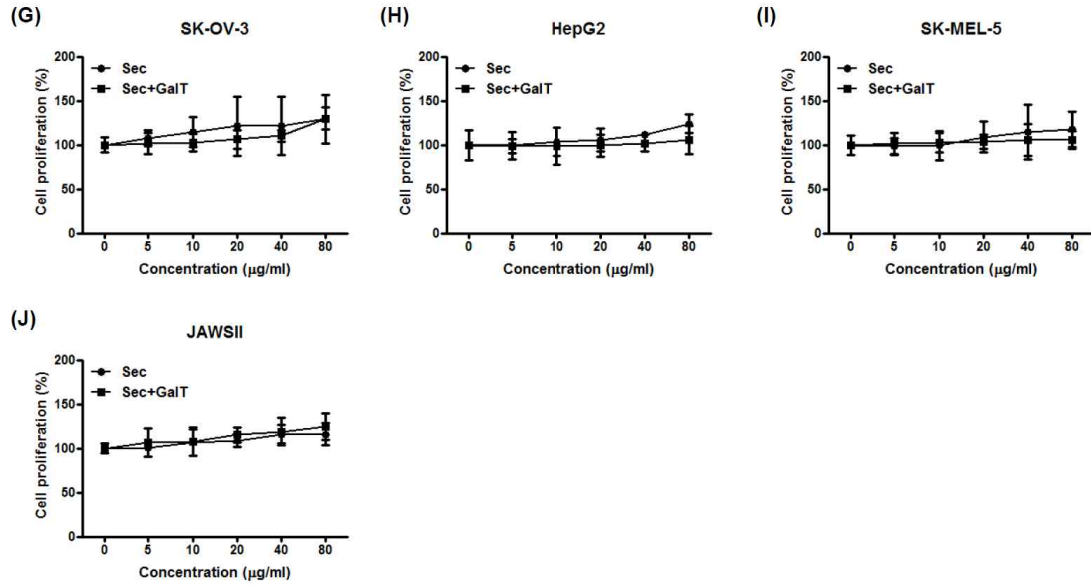


그림 12. 형질전환된 담배에서 분리 정제된 GA733-2-Fc-Sec (Sec) 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc-Sec + GalT (Sec + GalT) 단백질을 대장암 세포주 (MC38, CT-26, HCT-116), 유방암 세포주 (MCF-7, SK-BR-3), 자궁암 세포주 (HeLa), 난소암 세포주 (SK-OV-3), 간암 세포주 (HepG2), 피부암 세포주 (SK-MEL-5), 수지상 세포주 (JAWSII) 등에 처리한 후 세포 활성을 측정하여 실험에 이용된 GA733-2-Fc 단백질이 세포 독성을 보이지 않음을 확인함.

제2협동과제 : 대장암백신 생산 형질전환 토마토 개발

1) 토마토 열매 특이적 프로모터인 SIHD와 clean vector를 이용한 식물발현벡터 개발

- GA733 유전자의 발현을 최적화 시켜주는 식물발현벡터 제작

다양한 식물발현벡터에 따라 유전자 발현 정도가 다르므로, 최적의 벡터를 선별하기 위해 pCAMBIA 2300, pBI121, pJL-LIC, pBINPLUS 그리고 clean vector를 이용하여 GA733 단백질의 발현률을 측정함.

또한, 발현된 단백질이 식물의 특정 기관에 축적될 수 있도록, ER targeting을 시킴.

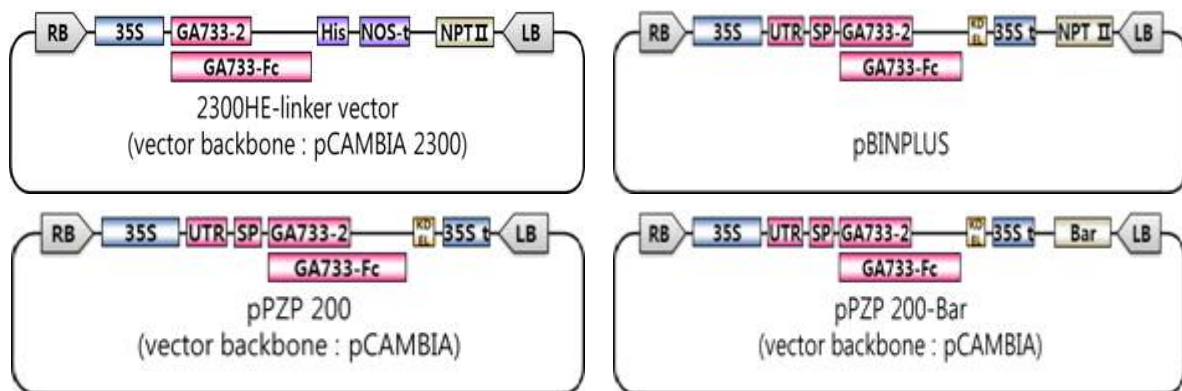


그림 13. GA733유전자 발현을 위한 다양한 식물 발현벡터 구조.

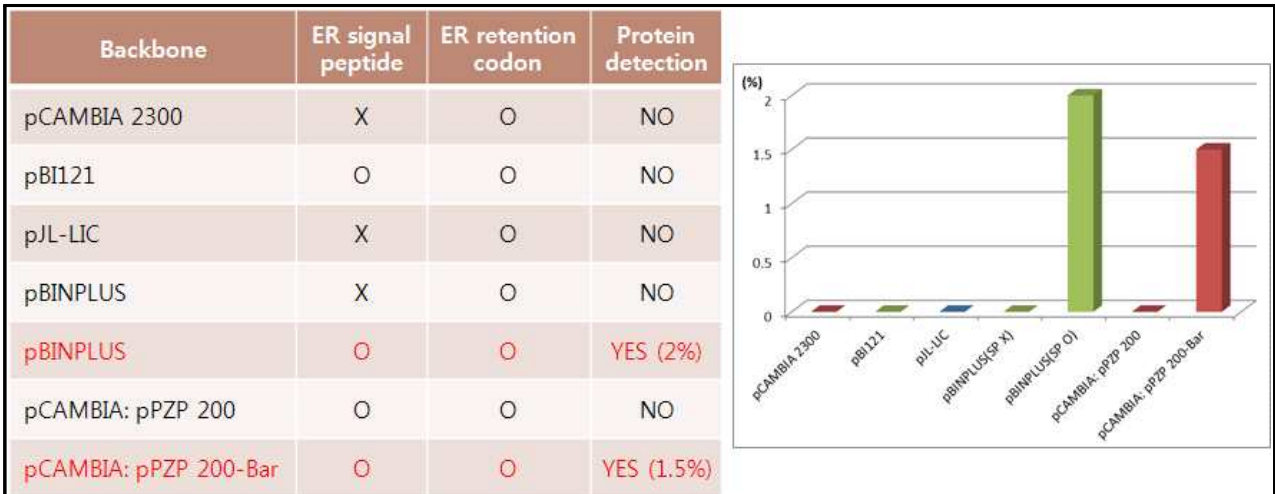


그림 14. 식물발현벡터와 ER targeting에 따른 GA733단백질 발현률 비교.

- 다양한 식물발현벡터들 중에서 GA733단백질이 발현되는 것은 pBINPLUS 와 clean vector 였고, ER signal peptide와 ER retention codon이 반드시 있어야 안정적으로 발현되고 또 축적되는 것으로 나타났음.
- 또한, pPZP 200 벡터와 pPZP 200-Bar 벡터의 경우 동일한 pCAMBIA back bone이지만, 구조의 미세한 차이로 인해 GA733 단백질의 발현에 영향을 주는 것으로 나타났음.

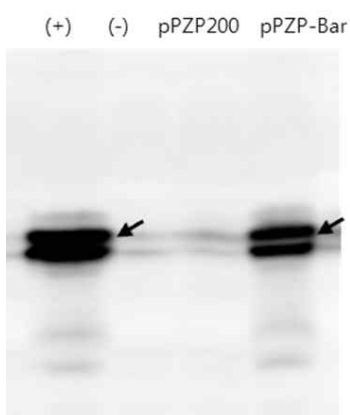


그림 15. pPZP 200 벡터와 pPZP 200-Bar 벡터의 GA733 단백질 발현률 차이.

- GA733유전자의 최적 발현 조건에 맞춰서, 식물 열매 특이 발현 프로모터인 SIHD에 의해 발현이 조절되는 식물발현벡터 제작.

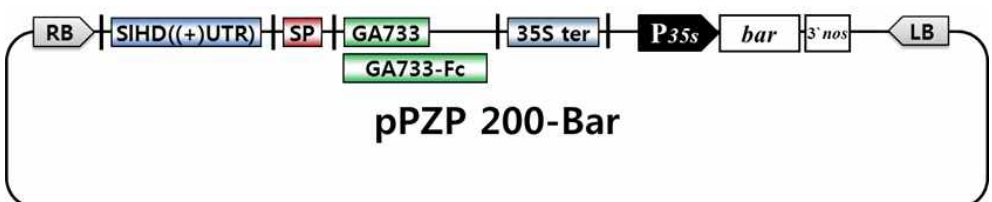


그림 16. 식물 열매 특이 발현 프로모터 SIHD에 의해 조절되는 식물발현벡터 구조.

2) 상용화 품종(고정종)을 이용한 토마토 형질전환

- 토마토 전신발현 프로모터인 35S 프로모터와, 열매 특이 발현 프로모터인 SIHD에 의해 GA733 유전자의 발현이 조절되는 식물발현벡터를 실험용 토마토인 Micro Tom, 상용화 품종(고정종)인 C, M, N line에 형질전환 함.

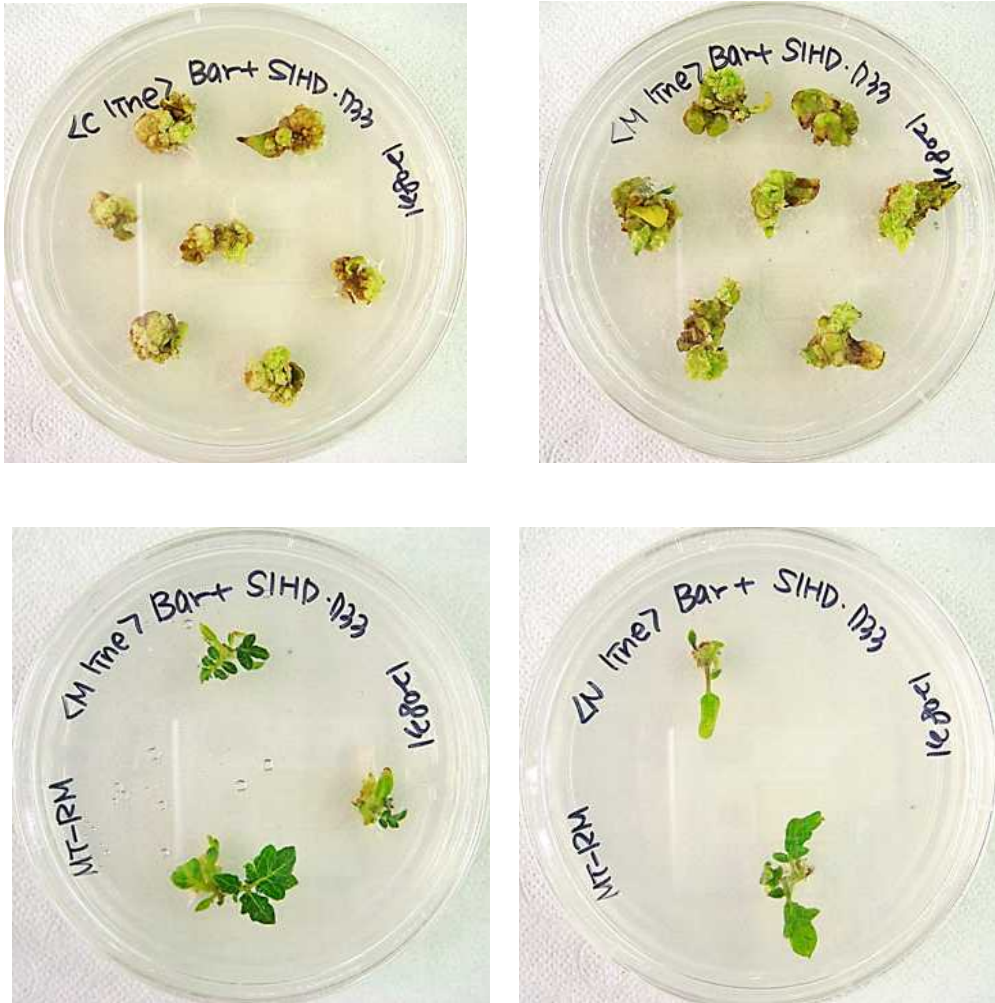


그림 17. 형질전환된 Micro TOM(35S promoter)와 형질전환중인 상용화 품종(고정종) 토마토(SIHD promoter).



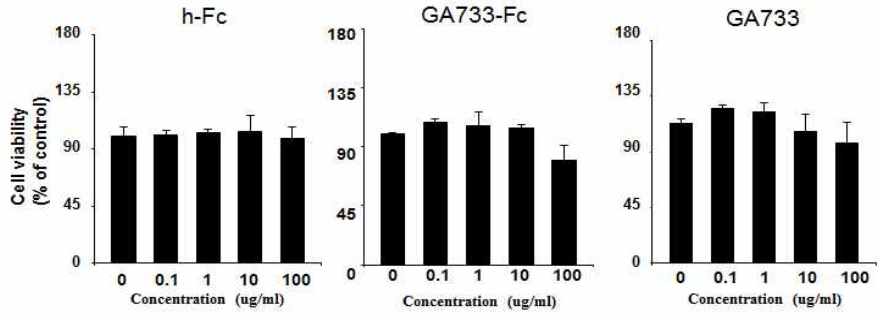
그림 18. 형질전환된 Micro TOM(35S promoter)와 형질전환중인 상용화 품종(고정종) 토마토(SIHD promoter).

2. 식물유래 압항원을 이용한 대장암 경구용 백신 실용화 기반기술 개발

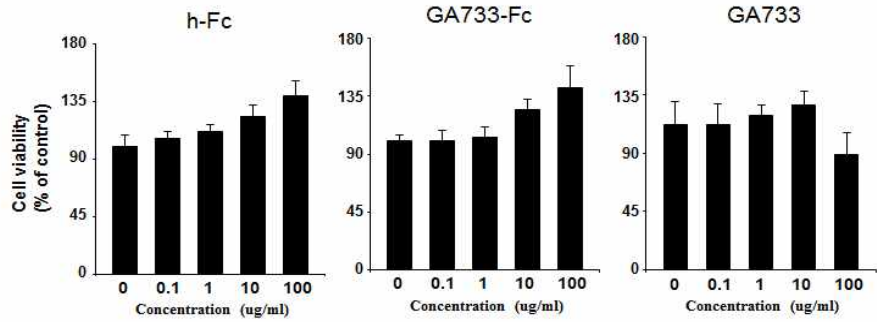
1) 사람 및 mouse natural killer (NK), cytotoxic T cell, dendritic cell (DC, 수지상세포), B cell등 면역세포에서 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 처리농도 및 세포독성 확인

- 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 처리농도 및 세포독성을 확인하기 위하여 마우스 대식세포(macrophage/monocyte) 세포주인 RAW 264.7 cell과 대장암 세포주인 MC38 cell, 사람 대장암 세포주인 HCT116 cell, 마우스의 비장으로부터 분리한 대식세포, T cell, NK cell을 96-well plate에 10% FBS, RPMI 배양액을 이용하여 1×10^5 cell/well로 plateing함. 이후 식물유래 h-Fc, GA733, GA733-Fc 및 Gas6, Axl-Fc, TREM2-Fc를 농도별로 처리하고 48시간 배양한 후 MTS assay를 수행하여 각 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 확인함.

MC38
48hr



HCT116
48hr



RAW 264.7
48hr

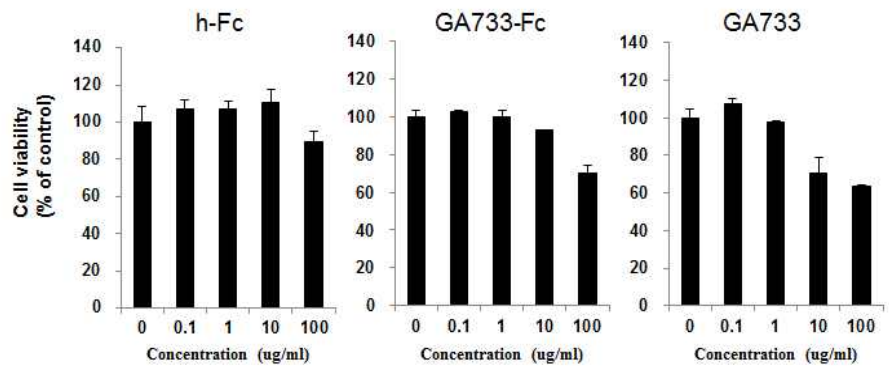


그림 19. 대식세포 및 대장암 세포주에서 식물유래 표적단백질의 세포독성 확인.

Macrophage/Monocyte
48hr

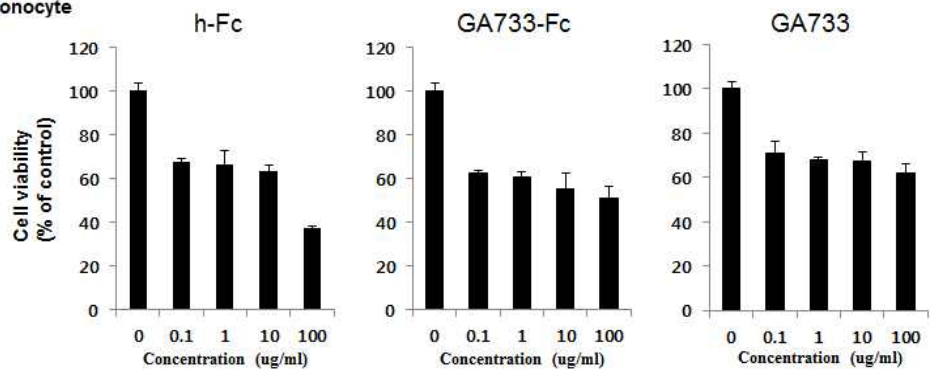


그림 20. 면역세포에서 식물유래 표적단백질들의 세포독성 확인(continued).

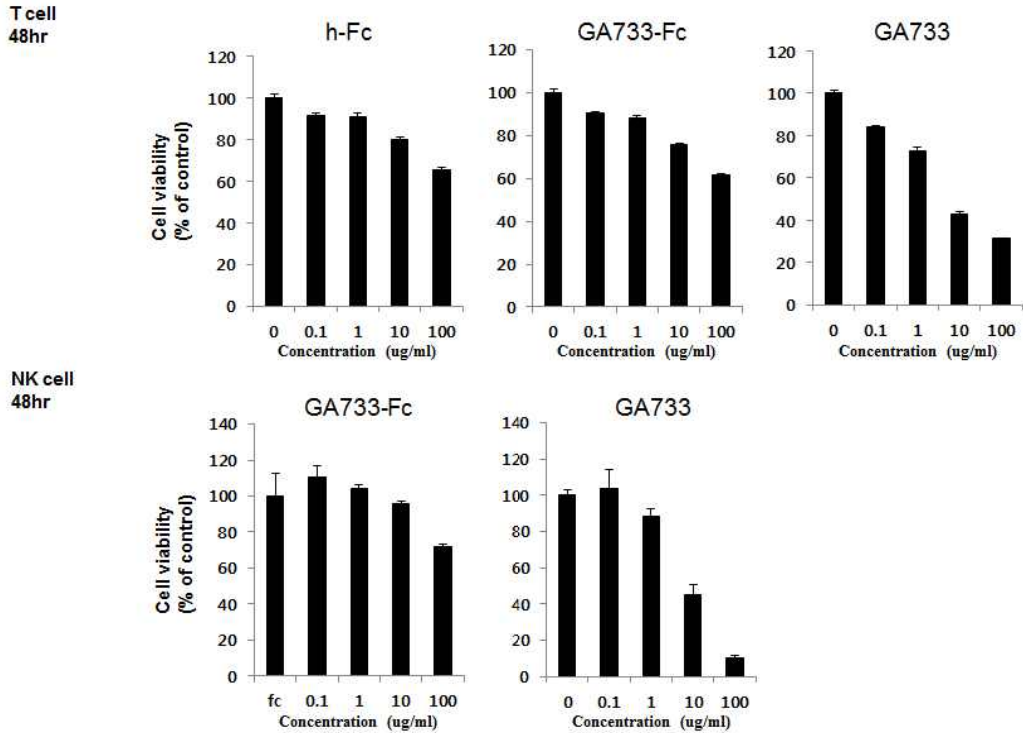


그림 20. 면역세포에서 식물유래 표적단백질들의 세포독성 확인.

-그 결과, 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell과 대장암 세포주인 MC38 cell, HCT116 cell에서 식물유래 h-Fc와 GA733-Fc, GA733이 100ug/ml 이상의 농도에서 세포독성을 보였으며, 마우스의 비장으로부터 분리한 대식세포, NK cell, T cell들은 1ug/ml부터 세포독성을 보였음. 이에 protein A column을 이용하여 식물유래 표적단백질들을 정제하였으며, 이들의 세포독성을 확인한 결과, 사람 및 마우스의 면역세포들에서 식물유래 h-Fc, GA733-Fc, GA733은 10ug/ml 이하의 농도에서는 세포독성을 보이지 않음. 또한 신기능성 수용체단백질인 Axl-Ig와 TREM2-Ig, Axl의 리간드인 Gas6의 세포독성을 확인한 결과, 사람 및 마우스 면역세포에서 역시 10ug/ml 이하의 농도에서는 세포독성을 보이지 않음. 이들 결과는, 전반적으로 면역세포들에서 식물유래 h-Fc, GA733-Fc 및 신기능성 수용체단백질 Axl-Ig, TREM2-Ig를 처리하였을 때 농도별로 증가하는 경향성을 보이는데 이는 면역세포가 Fc 수용체단백질에 의해 Fc를 인식하여 활성이 다소 증진된 결과로 사료됨.

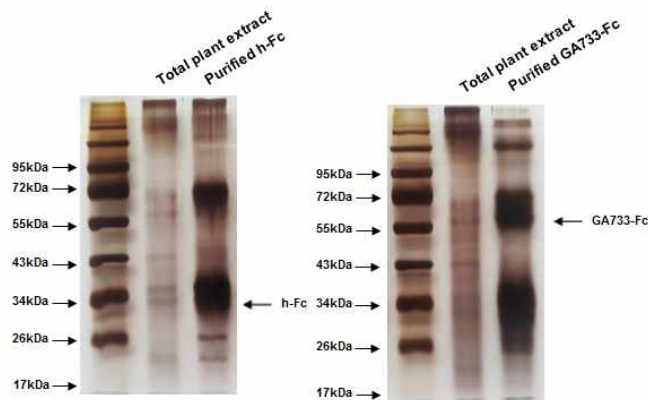
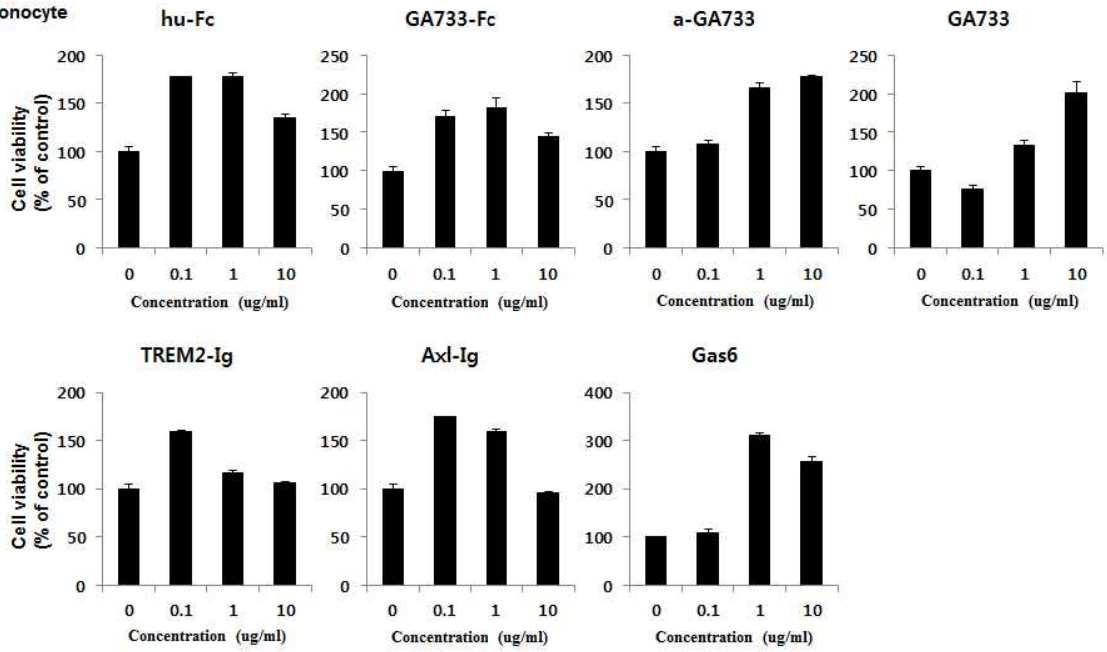


그림 21. 식물유래 표적단백질 정제.

Mouse
Macrophage/Monocyte
48hr



T cell
48hr

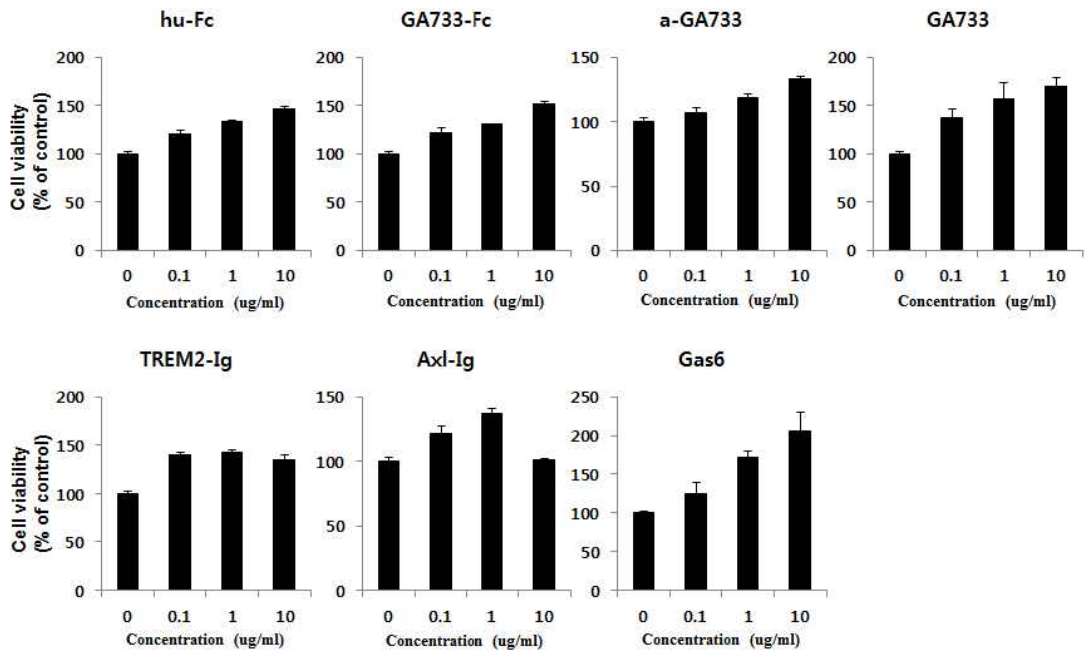
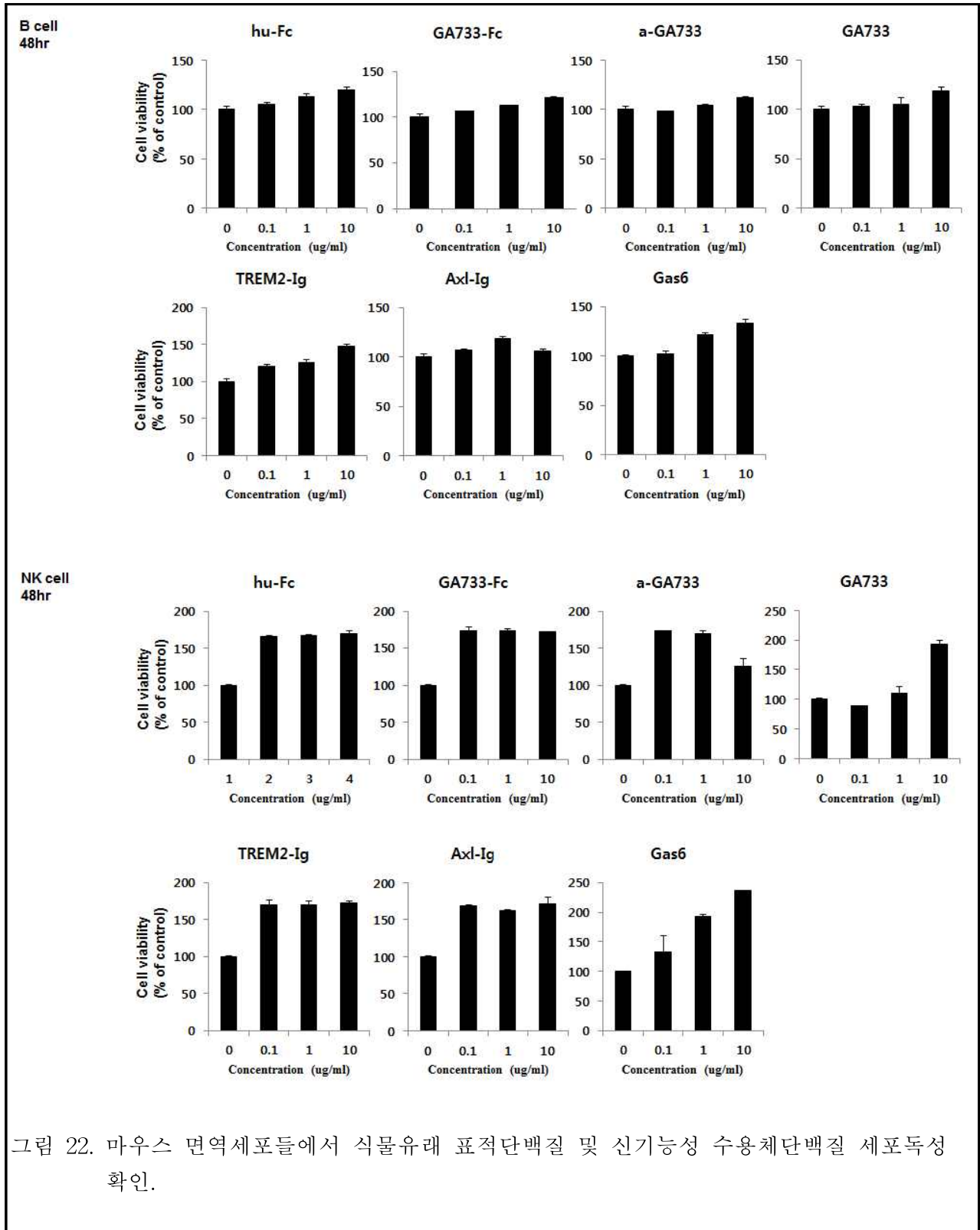
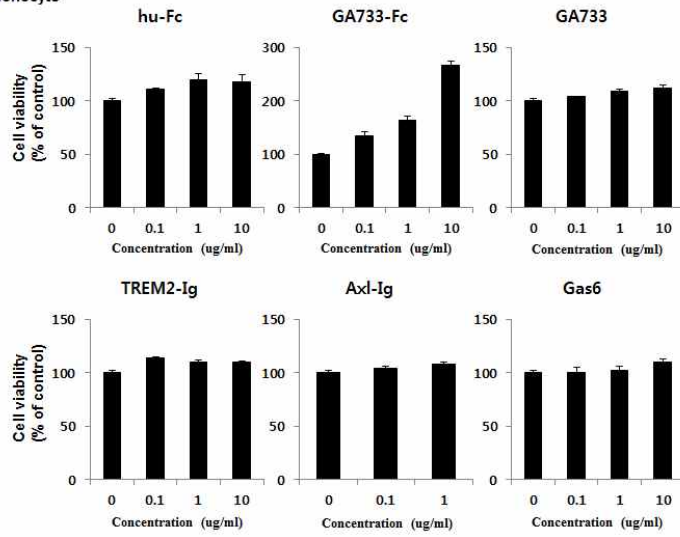


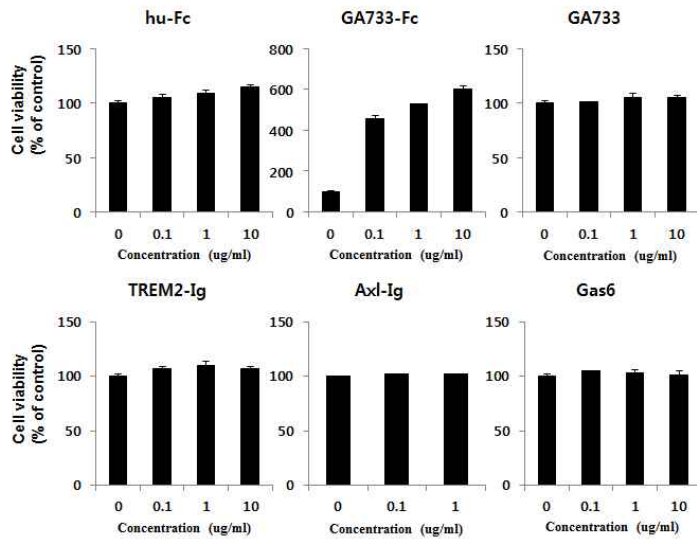
그림 22. 마우스 면역세포들에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질 세포독성 확인(continued).



Human
Macrophage/Monocyte
48hr



T cell
48hr



B cell
48hr

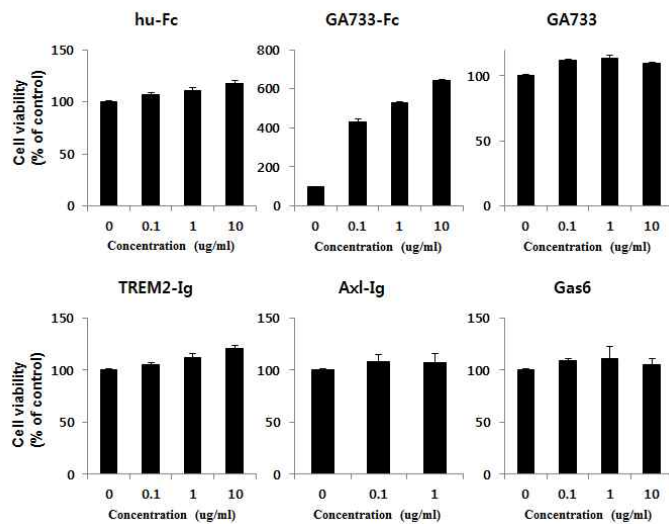


그림 23. 사람 면역세포에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질 세포독성 확인 (continued).

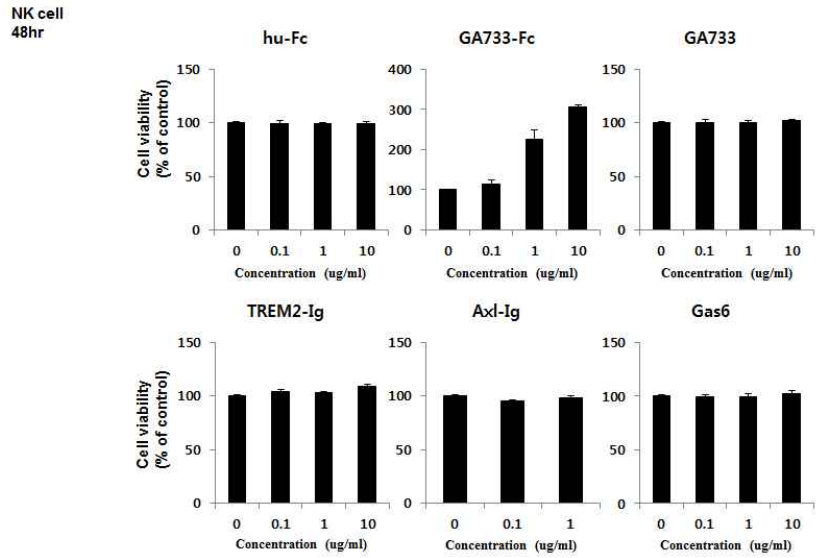


그림 23. 사람 면역세포에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질 세포독성 확인.

- 이 결과들을 통해, 식물유래 h-Fc, GA733-Fc, GA733 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질인 Axl-Ig, TREM2-Ig 처리농도를 면역세포들에서는 1ug/ml로 수행하였고, 대장암 세포주는 10ug/ml로 수행하였으며, Axl의 리간드인 Gas6의 처리농도는 16ug/ml로 수행하였음.

2) GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 처리에 의한 면역세포 활성화 증진방법 확립

- 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질인 Axl과 TREM2에 의한 면역세포 활성화기능을 확인하고자, Axl이 knockout된 형질전환 마우스(Axl KO, $Axl^{-/-}$)와 TREM2가 과발현된 형질전환 마우스(TREM2 TG)의 비장으로부터 면역세포를 분리한 후 식물유래 h-Fc, GA733-Fc를 처리하여 각각 6시간, 12시간 24시간동안 배양하였음. 이후 RT-PCR을 이용하여 염증 사이토카인들의 유전자 변화를 확인함.

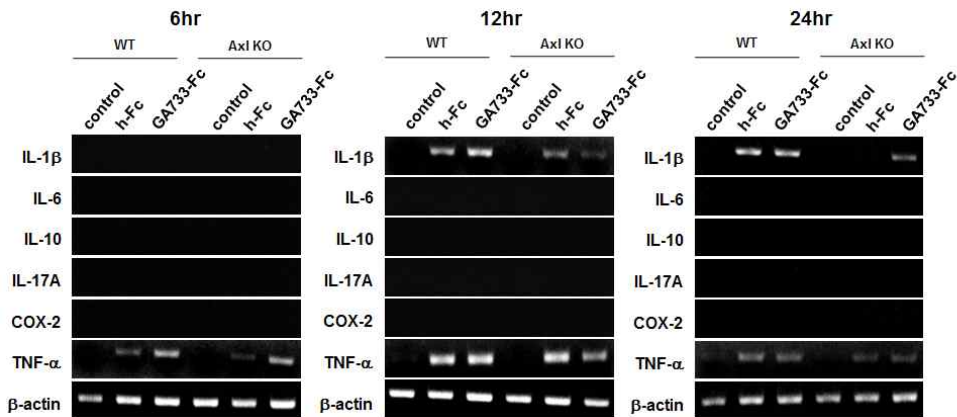


그림 24. 식물유래 표적단백질 및 Axl에 의한 면역세포에서의 염증 사이토카인 유전자 발현 증가.

- 그 결과, 식물유래 GA733-Fc를 처리하였을 때 시간이 지남에 따라 wild type(WT) 및 Axl KO 마우스의 비장으로부터 분리한 면역세포들에서 염증 사이토카인 유전자인 IL-1 β , TNF- α 의 발현이 모두 증가되었음. 하지만 Axl KO 마우스의 면역세포가 WT의 면역세포에 비해 염증 사이토카인 유전자 발현이 소폭 증가되어짐(그림 24). 또한 TREM2 TG 마우스로부터 분리한 면역세포들 역시 식물유래 GA733-Fc에 의해 염증 사이토카인 유전자인 IL-1 β , TNF- α 의 발현이 증가되었지만, WT과 비교하여 유전자 발현의 차이를 보이지 않음. 그러나 염증억제 유전자로 알려져 있는 IL-10의 유전자 발현이 TREM2 TG 마우스의 면역세포에서 증가되었고, 이는 TREM2 과발현에 따른 항염증 작용의 결과로 추론됨(그림 25).

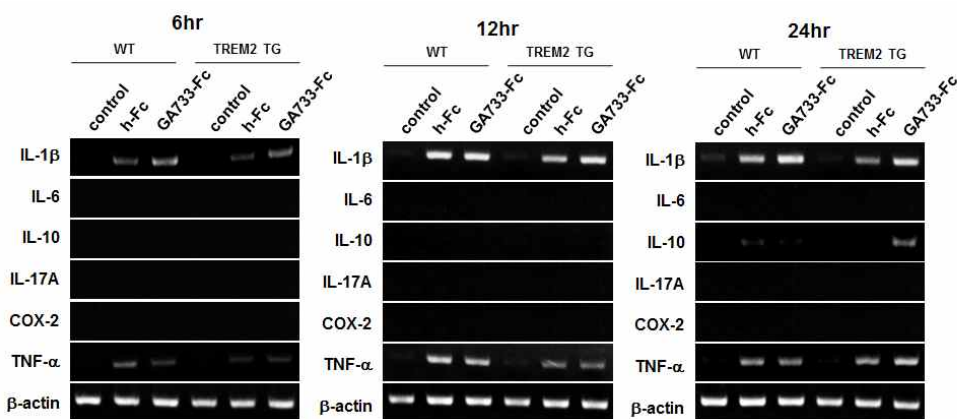


그림 25. 식물유래 표적단백질 및 TREM2에 의한 면역세포에서의 염증 사이토카인 유전자 발현 증가.

- 이를 통해 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질의 처리에 의해 면역세포들의 염증 사이토카인 유전자의 발현이 증가되며, 신기능성 수용체단백질인 Axl 및 TREM2에 의해 염증 사이토카인 유전자 발현이 조절되어짐을 알 수 있음.
- 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질인 Axl과 TREM2에 의한 cytotoxic T cell의 활성능력을 확인하고자, Axl KO 마우스와 TREM2가 형질전환된 마우스의 비장으로부터 cytotoxic T cell을 분리하여 식물유래 h-Fc와 GA733-Fc를 처리한 후 대장암 세포와 함께 배양하여 암세포 killing 능력을 확인 함.
- 그 결과, 식물유래 GA733-Fc를 처리하였을 때, cytotoxic T cell의 활성이 증진되어 암세포 killing 능력이 증가됨을 보였지만 WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스의 cytotoxic T cell은 암세포를 killing하는 능력이 소폭 증가되었음. 식물유래 GA733에 의한 cytotoxic T cell의 활성은 WT과 TREM2 TG 마우스 모두 영향을 받지 않음. Axl KO 마우스의 경우 식물유래 GA733, GA733-Fc에 의한 cytotoxic T cell의 활성이 증진되지 못하여 암세포를 killing하는 능력이 증가되지 않았으며, WT과 비교하여 cytotoxic T cell의 암세포 killing 능력 역시 현저하게 저하되었음. 이를 통해 TREM2 수용체단백질의 발현이 증가되면 cytotoxic T cell의 활성은 감소되지만, 식물유래 GA733-Fc 표적단백질에 의해 활성이 다소 증진됨을 알 수 있음. 또한 Axl 수용체단백질의 발현이 저하되면 cytotoxic T

cell의 활성이 현저히 감소되며, 이는 식물유래 GA733-Fc표적단백질을 처리하여도 그 활성이 증진되지 못하는 것으로 나타남. 따라서 식물유래 GA733에 의한 cytotoxic T cell의 활성은 증진되지 않았으며, 이는 식물유래 GA733-Fc가 면역세포 활성화에 효과적임을 알 수 있음.

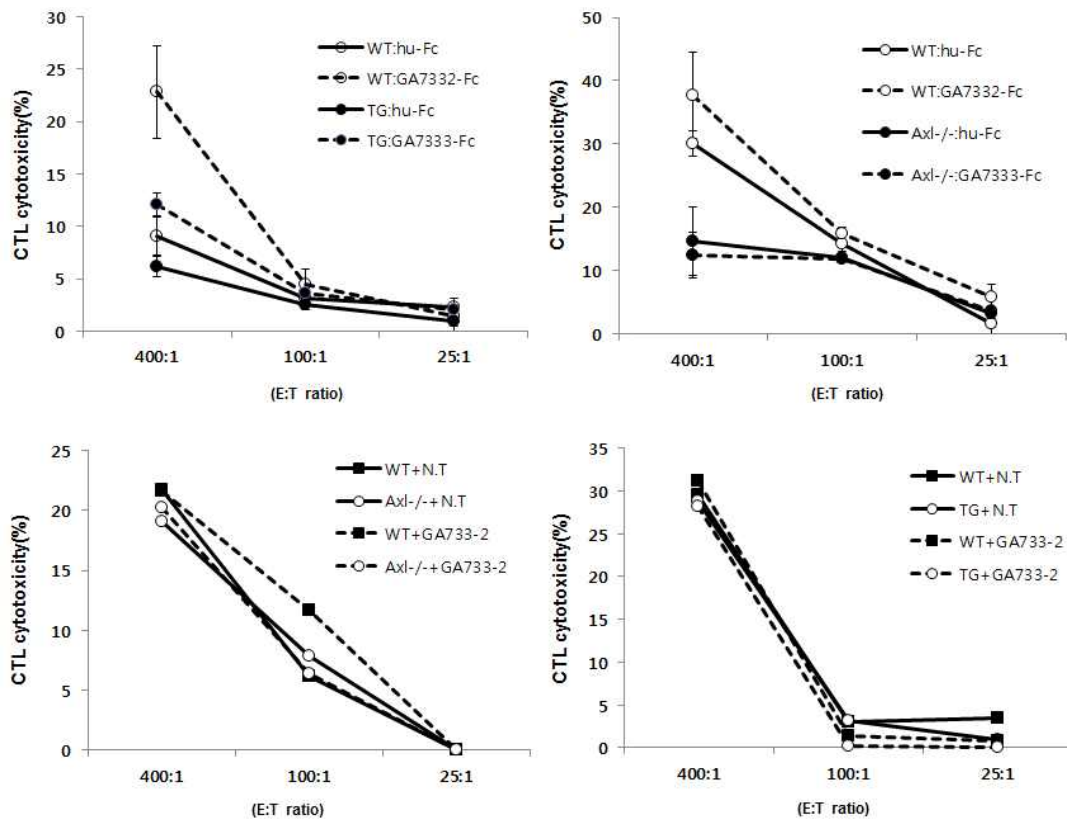


그림 26. 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 cytotoxic T cell의 활성 증가.

- 신기능성 수용체단백질인 Axl과 TREM2에 의한 NK cell의 활성능력을 확인하기 위해, Axl과 TREM2가 형질전환 된 마우스의 비장으로부터 NK cell을 분리하여 anti-GA733 항체를 처리한 대장암 세포와 함께 배양한 후 NK cell의 antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity(ADCC)를 통한 암세포 killing 능력을 확인함.
- 그 결과, TREM2 TG 마우스의 경우, NK cell이 anti-GA733 항체를 처리한 대장암 세포를 인식하여 암세포 killing 능력이 증가되었으며, WT과 비교하여 NK cell의 활성이 비슷한 양상으로 증진되었음. Axl KO 마우스의 경우, 대장암 세포에 anti-GA733 항체를 처리하여도 NK cell의 활성이 증진되지 못하여 암세포 killing 능력이 증진되지 못하였으며, WT과 비교하여 ADCC를 통한 NK cell의 암세포 인식 능력 및 killing 능력은 다소 증진되어 있었음.
- 이를 통해, TREM2 수용체단백질의 발현이 증가되면 NK cell의 활성이 증진되어 ADCC를 통한 암세포 killing 능력이 증가되며, Axl 수용체단백질의 발현이 감소되면 NK cell의

활성이 다소 증진되어 있더라도 ADCC를 통한 암세포 killing 능력이 증가되지 못함을 알 수 있었음.

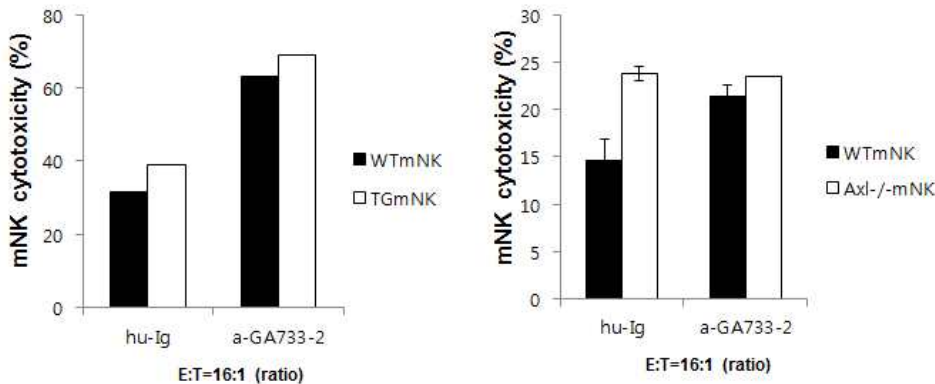


그림 27. 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 NK cell의 활성화 증가.

- 이러한 ADCC 결과를 바탕으로 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질 TREM2에 의해 NK cell의 암세포 killing 능력을 확인하고자 TREM2 TG 마우스의 비장으로부터 NK cell을 분리하여 식물유래 GA733, GA733-Fc를 처리한 후 대장암 세포와 함께 배양하여 NK cell cytotoxicity를 측정하였음.

그 결과, WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스로부터 분리한 NK cell의 암세포 killing 능력이 증진되어 있으며, 식물유래 GA733-Fc를 처리하였을 때 암세포 killing 능력이 더욱 증가됨. 그러나 식물유래 GA733의 처리에 의한 NK cell의 암세포 killing 능력은 큰 차이를 보이지 않음.

- 이를 통해, 신기능성 수용체단백질인 TREM2에 의해 NK cell의 활성이 증진됨을 알 수 있었고, 식물유래 GA733-Fc를 처리하였을 때 그 활성이 더욱 증진됨을 알 수 있었음.

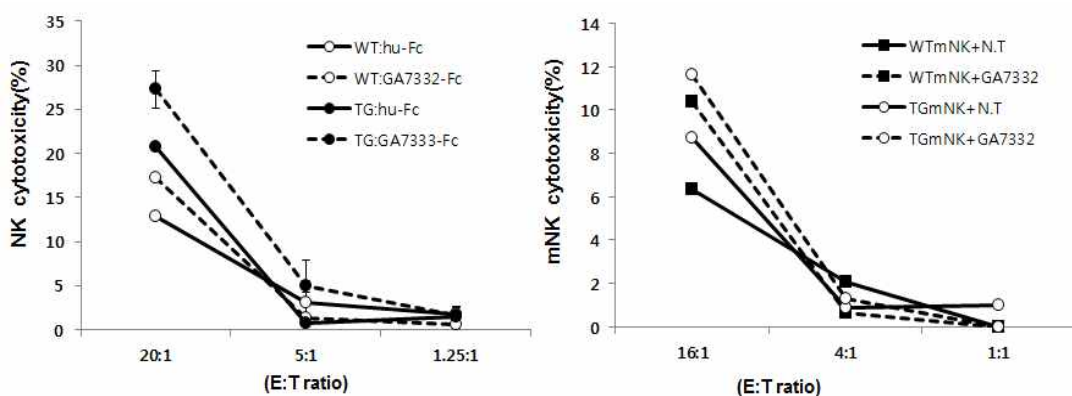


그림 28. 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질인 TREM2에 의해 NK cell의 활성화 증진.

- 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질인 Axl과 TREM2에 의한 면역세포의 침윤능력을 확인하기 위해, Axl과 TREM2가 형질전환된 마우스의 비

장으로부터 면역세포들을 분리하여 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질들과 함께 배양한 후 대장암 세포주인 MC38 cell 과 함께 배양하여 invasion assay를 수행하였음.

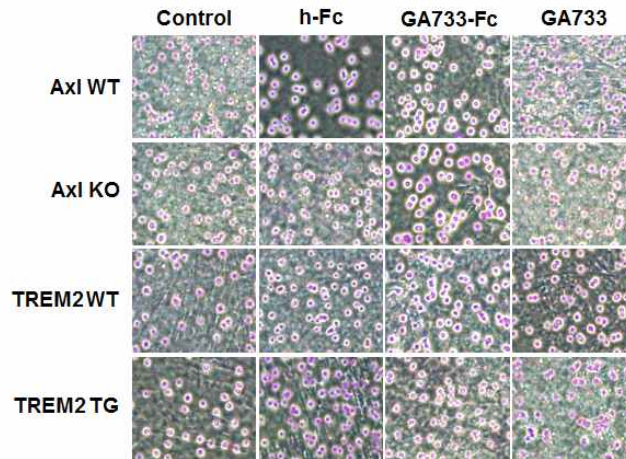


그림 29. 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포 침윤능력 증가.

- 그 결과, 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질을 처리하였을 때 대조군과 비교하여 면역세포들의 침윤이 다소 증가되었지만, 신기능성 수용체 단백질에 의해 면역세포들의 침윤능력에는 큰 차이를 보이지 않음(그림 29).
- 이를 통해, 식물유래 표적단백질에 의해 면역세포의 활성이 증진되어 침윤능력이 증가하지만, 신기능성 수용체단백질들에 의해서는 큰 영향을 받지 않음을 알 수 있음.
- 신기능성 수용체단백질인 Axl과 TREM2에 의한 dendritic cell(DC)의 GA733, GA733-Fc 표적단백질 항원제시 능력을 확인하고자, Axl과 TREM2가 형질전환 된 마우스의 bone marrow로부터 cell을 분리한 후 IL-4 (20ng/ml)와 GM-CSF (20ng/ml)를 처리하여 10일간 배양하여 BMDC로 분화시킴. bone marrow cell로부터 90%이상 DC로 분화가 되었음을 확인하였고, 분화된 DC에 식물유래 GA733-Fc를 처리한 후 DC가 GA733-Fc를 항원으로 인식하여 이를 제시할 수 있도록 배양시킴. 이후 Axl과 TREM2가 형질전환 된 마우스의 비장으로부터 cytotoxic T cell을 분리한 후 GA733을 항원으로 제시하는 DC와 함께 배양하여 활성을 증진시킴. 이후 대장암 세포와 함께 배양하여 암세포 killing 능력을 확인함으로써 DC의 항원 제시능력을 관찰함.
- 그 결과, TREM2 TG 마우스의 경우, 식물유래 GA733-Fc를 처리한 DC와 함께 배양한 cytotoxic T cell의 활성이 증진되어 암세포를 killing 하는 능력이 증가됨을 보였지만, WT에 비해 암세포를 killing 하는 능력이 소폭 증진되었음. Axl KO 마우스의 경우, 식물유래 GA733-Fc를 처리한 DC와 함께 배양한 cytotoxic T cell의 활성이 증진되어 암세포를 killing 하는 능력이 증가됨을 보였으며, WT과 비교하여 암세포를 killing 하는 능력이 비슷한 양상으로 증진됨을 보임(그림 30).
- 이를 통해, 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질에 의해 DC의 항원제시 능력이 증진됨을 알 수 있으며, WT과 비교하여 TREM2 수용체단백질의 발현이 증가되면 DC의 항원제시 능력은 감소되며, Axl 수용체단백질의 발현이 감소되어도 DC의 항원제시 능력에는 영향을 주지 않음을 알 수 있음.

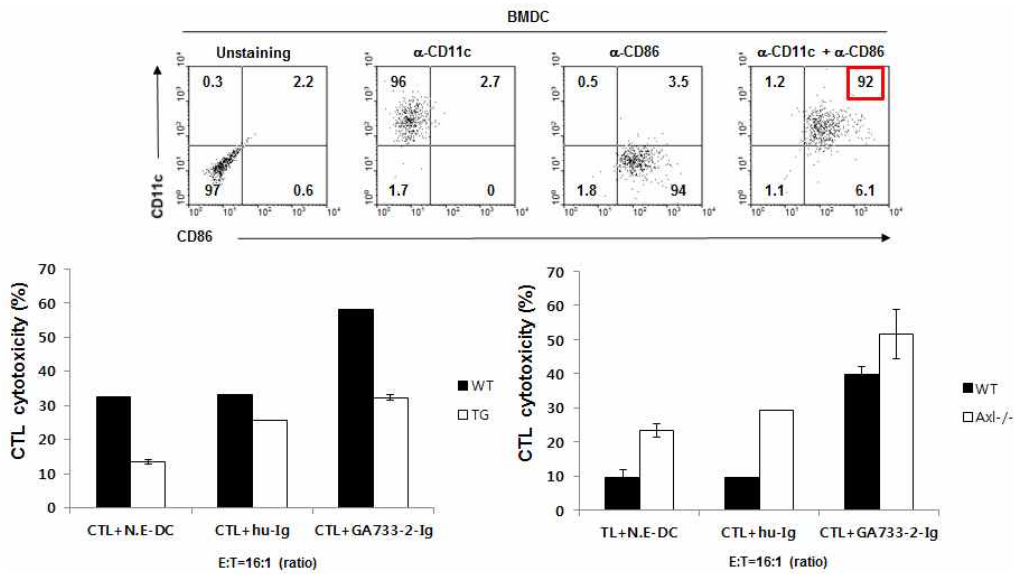


그림 30. 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 DC의 항원제시 기능 검증.

- GA733, GA733-Fc 표적단백질에 의한 대장에서의 IgA의 생산 기능을 확인하기 위하여, 식물유래 GA733과 GA733-Fc를 100ug/100ul의 농도로 7일간 마우스에 I.P injection한 후 fecal extract를 얻어 ELISA assay를 수행하여 IgA의 양을 확인함.
- 그 결과, 식물유래 GA733과 GA733-Fc에 의해 총 IgA 레벨에는 큰 변화를 보이지 않았음. 이에 GA733에 특이적인 IgA 레벨을 확인하고자 재조합 GA733 단백질을 이용하여 ELISA assay를 수행한 결과, GA733 및 GA733-Fc를 injection한 그룹에서 GA733에 특이적인 IgA 레벨이 증가됨을 보임(그림 31)
- 이를 통해, 식물유래 GA733 및 GA733-Fc에 의한 총 IgA의 생산기능은 영향을 받지 않지만, 대장 면역세포의 활성을 증진시켜 GA733에 특이적인 IgA의 생산기능이 증가되었음을 알 수 있음.

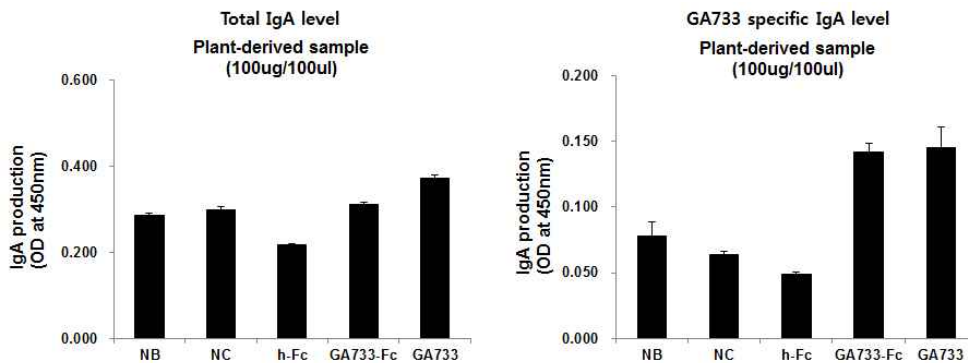


그림 31. 식물유래 표적단백질에 의한 대장에서의 IgA 생산 기능 검증.

- 위 결과들을 종합하여 볼 때, 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질의 처리에 의해 면역세포들의 활성이 증진되며 대장암 세포를 killing하는 능력이 증가됨을 알 수 있음. 신

기능성 수용체단백질인 TREM2가 과발현 되면 면역세포들의 활성이 WT과 유사하거나 다소 저해되어 있지만 식물유래 GA733, GA733-Fc에 의해 그 활성이 증진됨을 알 수 있음. 또한 신기능성 수용체단백질인 Axl의 발현이 저해되면 면역세포들의 활성은 일반 면역세포들 보다 현저하게 감소되며, 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질을 처리하여도 활성이 증진되지 못함. 따라서 면역세포의 활성에 식물유래 GA733, GA733-Fc의 표적단백질이 효과적으로 작용하며 신기능성 수용체단백질인 Axl 및 TREM2에 의해 그 활성이 조절됨을 알 수 있음.

3) 사람 및 mouse 대장(암) 세포(주)에서 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들에 의한 항암효능 검증

- 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들에 의한 항암효능을 확인하기 위해, 대장암 세포주 및 대장 세포에서 신기능성 수용체단백질인 Axl, TREM2에 의한 대장암 마커 GA733-2의 유전자 발현조절을 확인함.

그 결과, MC38 cell에서 Axl 및 GA733-2는 발현이 되지만 TREM2의 경우 발현이 되지 않음. Axl siRNA를 이용하여 Axl을 silencing 시키면 GA733-2의 발현이 감소되지만, GA733-2 siRNA를 이용하여 GA733-2를 silencing 시키면 Axl의 발현은 차이가 없음을 확인함. 또한 pcDNA3.1-TREM2 vector를 이용하여 TREM2를 과발현 시키면 GA733-2의 발현이 감소되고 식물유래 GA733과 GA733-Fc를 처리하였을 때 GA733-2와 Axl, TREM2의 유전자 발현은 영향을 받지 않음을 확인함. 이들 결과를 Axl KO 마우스와 TREM2 TG 마우스의 대장 세포에서 GA733-2의 유전자 발현을 확인한 결과, 대장암 세포주와 같은 양상을 보임(그림 32).

이를 통해, 신기능성 수용체단백질인 Axl 및 TREM2에 의해 GA733-2 표적단백질의 발현이 조절되며 GA733-2에 의해 Axl 및 TREM2의 발현은 조절되지 않음을 알 수 있음.

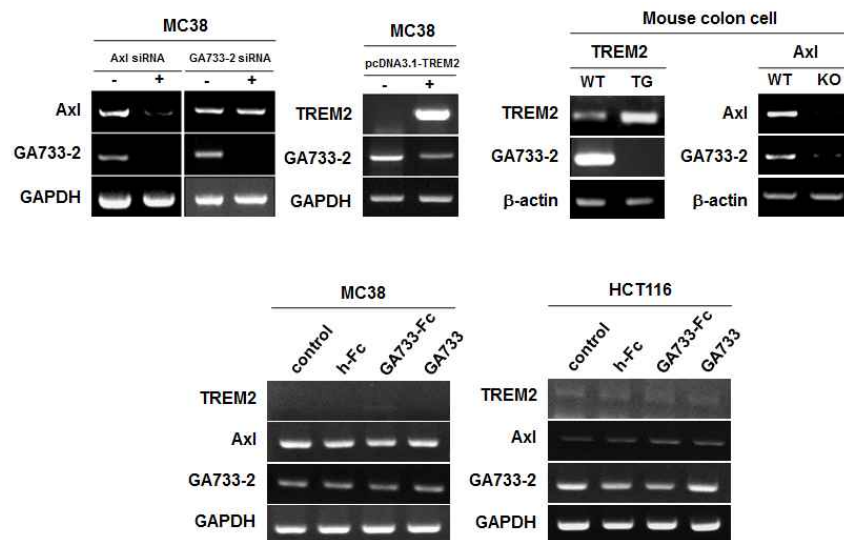


그림 32. 신기능성 수용체단백질에 의한 GA733-2의 발현 조절 및 식물유래 표적단백질의 처리에 의한 신기능성 수용체단백질의 발현 변화 검증.

- 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들에 의한 항암효능을 확인하기 위해, 사람 및 마우스 대장암 세포주인 HCT116 cell과 MC38 cell에 각각 식물유래 GA733과 GA733-Fc를 처리하여 염증유발 유전자 및 세포성장 유전자, 세포주기 유전자, 세포사멸 유전자들의 변화를 확인하였음.

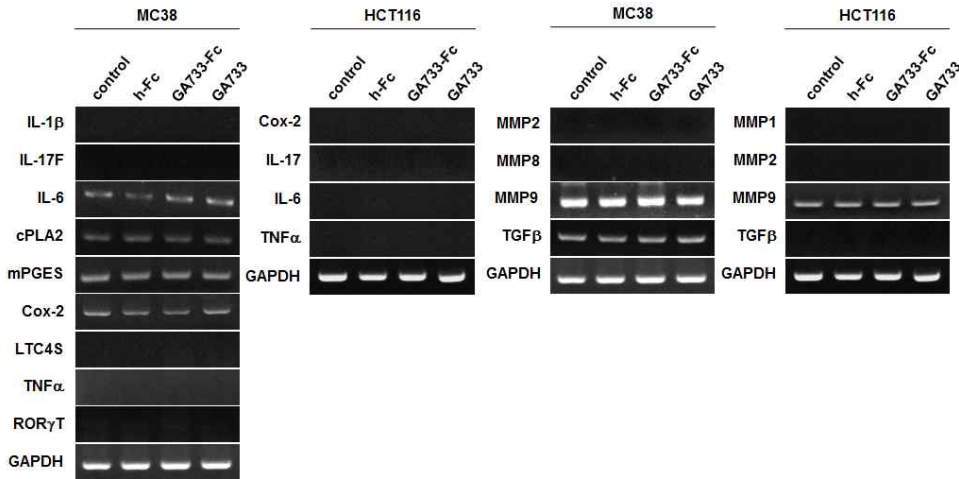


그림 33. 식물유래 표적단백질에 의한 염증유발 및 세포성장 유전자들의 변화 확인.

- 그 결과, 식물유래 GA733과 GA733-Fc를 처리하였을 때 사람 및 마우스 대장암 세포주인 MC38 cell과 HCT116 cell에서 염증유발 유전자 및 세포성장 유전자들의 발현은 차이를 보이지 않음(그림 33). 그러나 MC38 cell의 경우 GA733-Fc를 처리하였을 때 세포주기를 증가시키는 cyclin D1 유전자의 발현이 감소되었으며, 세포사멸을 유도하는 Fas, FasL, TRAIL 유전자의 발현이 증가됨을 보임. HCT116 cell의 경우 역시 GA733-Fc를 처리하였을 때 세포주기를 감소시키는 p53 유전자의 발현이 증가되었으며, 세포사멸을 유도하는 caspase-9과 caspase-8 유전자의 발현이 증가됨을 보임(그림 34).
- 이를 통해, 식물유래 GA733-Fc를 처리하면 대장암 세포에서 GA733-2의 신호전달이 저해되어 세포주기 및 세포사멸을 조절하는 유전자들의 발현이 변화됨을 알 수 있었음.

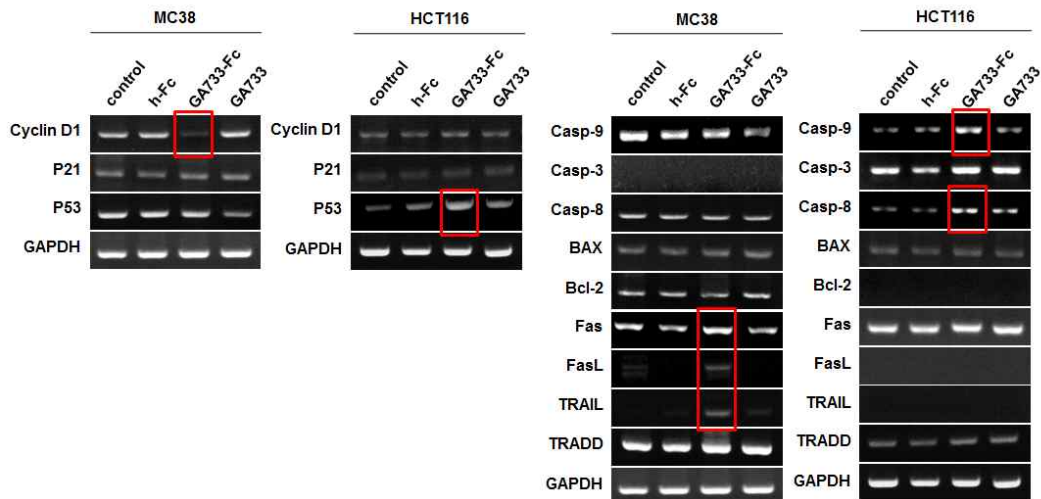


그림 34. 식물유래 표적단백질의 처리에 의한 세포주기 및 세포사멸 유전자들의 조절 검증.

- 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들에 의한 대장암세포의 항암효능으로 세포주기 및 세포사멸에 영향을 주는지 알아보기 위해, 유세포분석기를 이용한 세포주기 및 세포사멸을 측정하였음.
- 세포주기 측정 결과, 식물유래 GA733-Fc를 처리하였을 때 HCT116 cell의 세포주기가 감소되었고 MC38 cell의 세포주기는 다소 감소됨을 확인함(그림 34). 또한 세포사멸 측정 결과, 식물유래 GA733-Fc를 처리하였을 때 MC38 cell 및 HCT116 cell의 세포사멸이 증가되며, GA733을 처리하였을 때는 다소 증가됨을 확인함. 이에 식물유래 GA733, GA733-Fc 및 신기능성 수용체단백질을 처리하였을 때 대장암 세포의 세포사멸에 어떠한 영향을 미치는지 확인함. 그 결과, MC38 cell과 HCT116 cell 모두 신기능성 수용체단백질인 Axl-Ig를 처리하였을 때 Axl의 신호전달의 저해 및 식물유래 GA733-Fc에 의해 세포사멸이 현저히 증가됨. Axl의 리간드인 Gas6를 처리한 결과 Axl의 신호전달이 증가되어 식물유래 GA733-Fc를 처리하여도 세포사멸이 소폭 증가함. Gas6 와 Axl-Ig를 함께 처리하였을 때는 Axl-Ig에 의해 Gas6의 효과가 저해되어 식물유래 GA733-Fc에 의해 세포사멸이 증가됨(그림 35).
- 이를 통해, 식물유래 GA733-Fc를 처리하였을 때 대장암 세포의 세포주기 및 세포사멸이 조절됨을 관찰하였고, 신기능성 수용체단백질인 Axl 역시 세포주기 및 세포사멸을 조절함을 알 수 있었음. 또한 식물유래 GA733-Fc와 신기능성 수용체단백질인 Axl-Ig를 함께 처리하였을 때 대장암세포의 세포사멸이 현저하게 증가됨을 통해 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질이 대장암 세포에 대한 항암효능에 효과적임을 검증할 수 있었음.

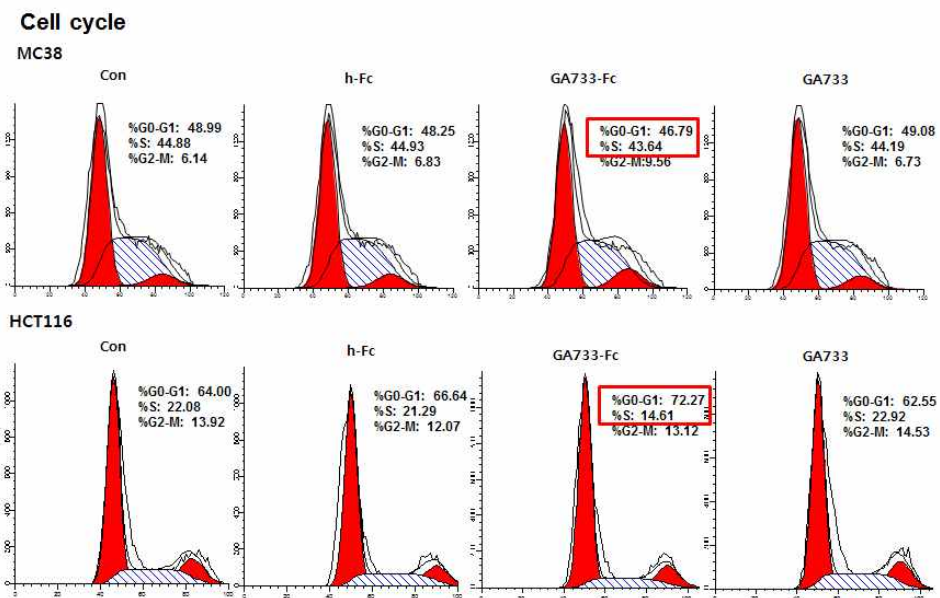


그림 35. 식물유래 표적단백질의 처리에 의한 대장암 세포주의 세포주기 감소.

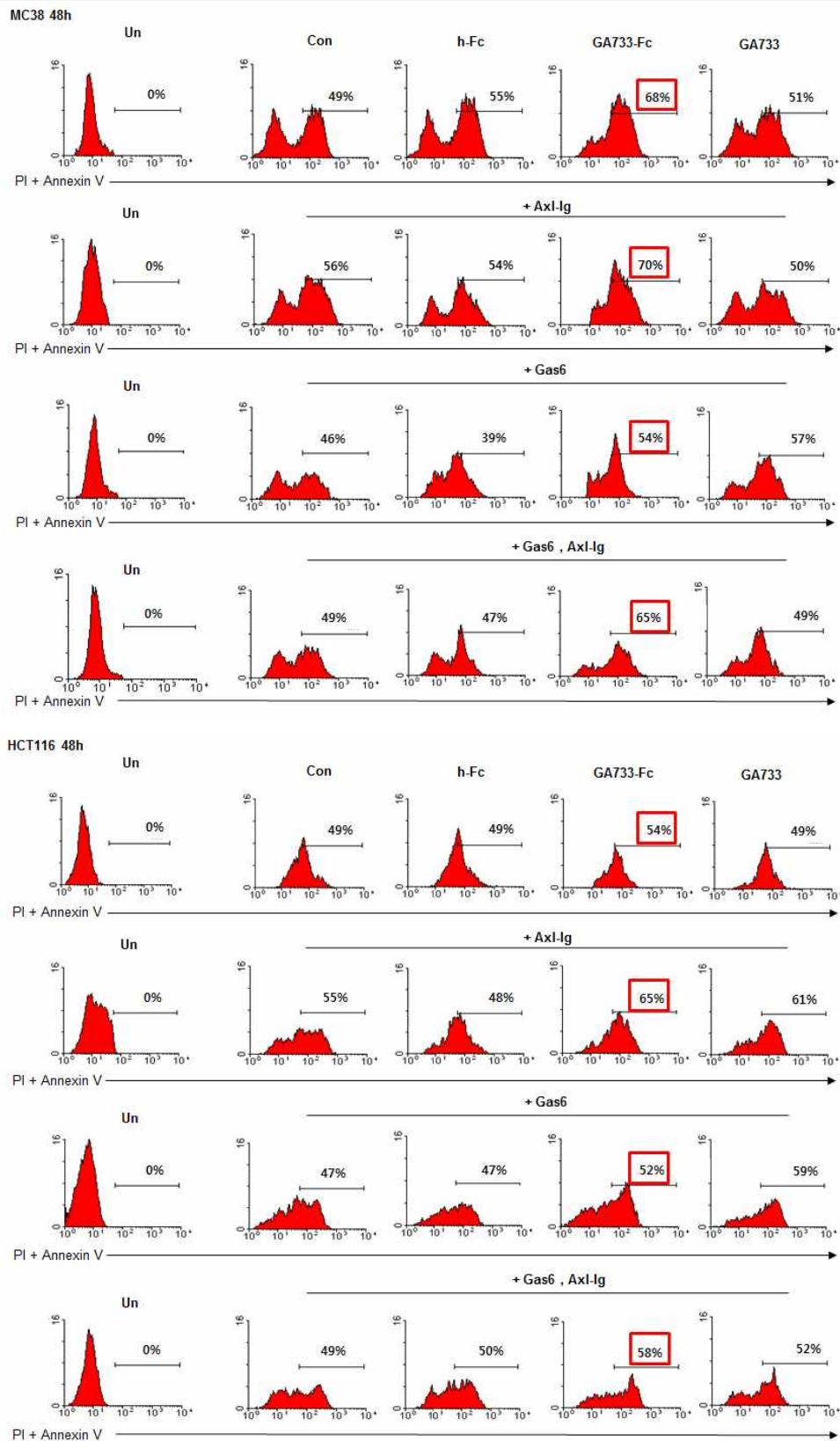


그림 36. 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 세포사멸 증가.

- 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들에 의한 대장암 세포의 전이능력을 확인하기 위해 식물유래 GA733과 GA733-Fc를 처리한 후 wound

healing assay를 수행하였음.

그 결과, MC38 cell과 HCT116 cell 모두 시간이 지남에 따라 식물유래 GA733-Fc를 처리하였을 때 암세포의 이동능력이 가장 많이 감소되었음.

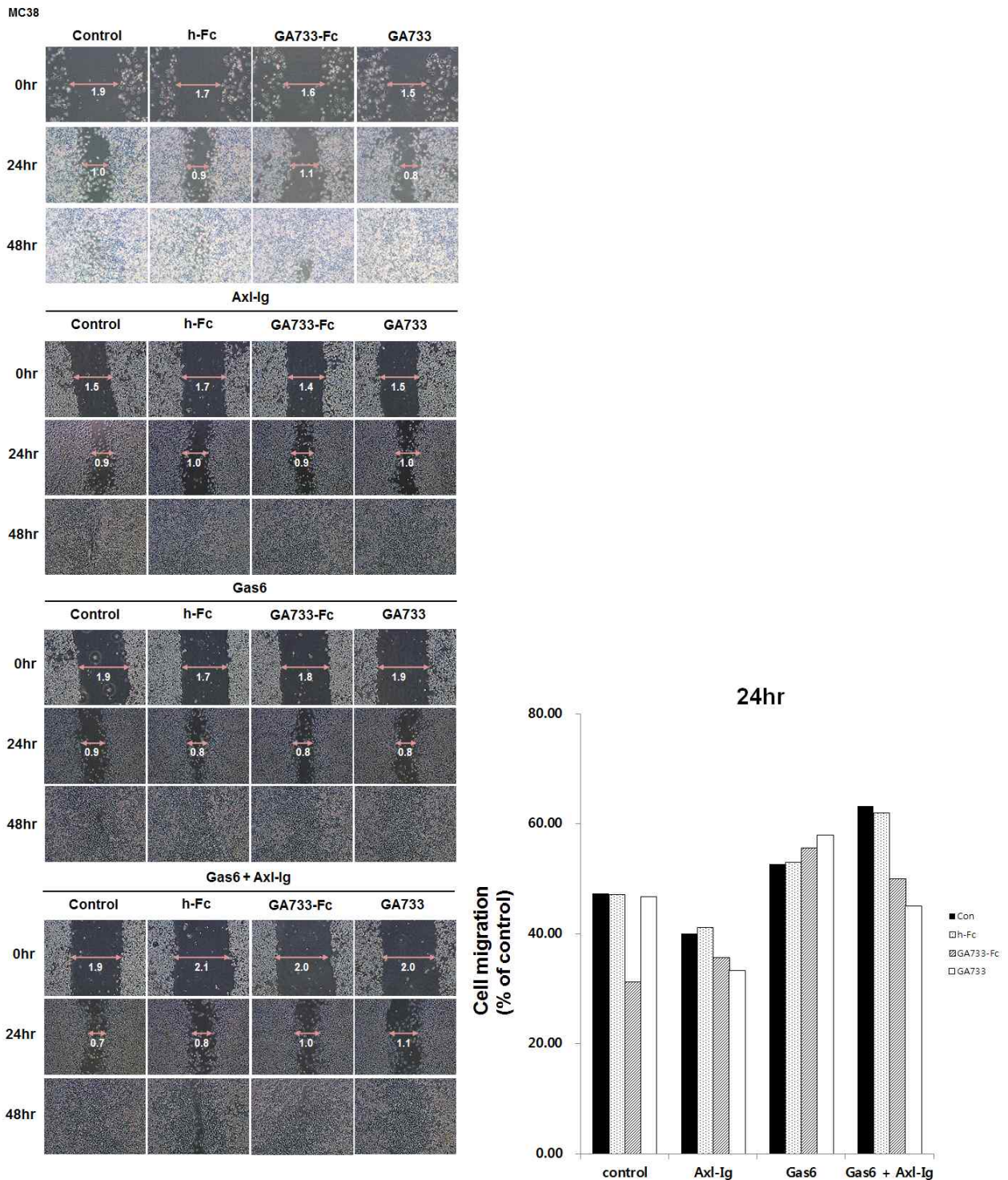


그림 37. MC38 cell에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들에 의한 대장암 세포의 이동 및 전이능력 변화 확인.

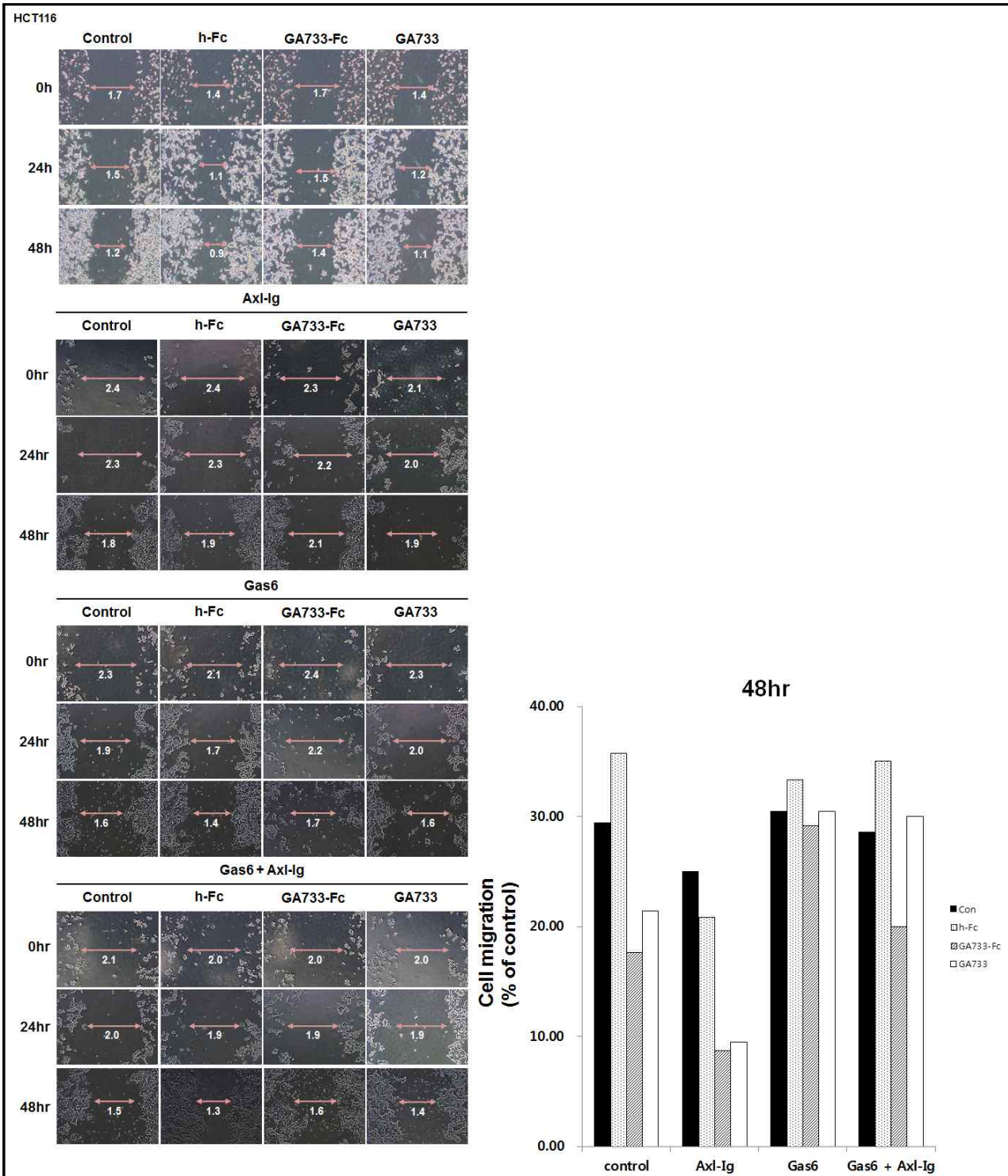


그림 38. HCT116 cell에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들에 의한 대장암 세포의 이동 및 전이능력 변화 확인.

- 또한 신기능성 수용체단백질 Axl-Ig를 처리하였을 때 MC38 및 HCT116 cell의 이동능력이 대조군과 비교하여 감소됨을 보였으며, 특히 HCT116 cell의 Axl-Ig를 처리한 그룹에서 식물유래 GA733-Fc를 함께 처리한 대장암 세포의 이동능력이 현저히 감소하였음. Axl의 리간드인 Gas6를 처리하여 Axl의 신호전달을 증가시킨 그룹은 MC38 cell과

HCT116 cell 모두 이동능력이 증가하여 식물유래 표적단백질들의 효과를 보이지 않음. 하지만 Gas6와 Axl-Ig를 함께 처리한 그룹은 MC38 cell과 HCT116 cell 모두 Gas6를 처리하였어도 Axl-Ig에 의해 Axl의 신호전달이 저하되어 식물유래 GA733-Fc에 의한 대장암 세포 이동능력이 감소되었음(그림 38,39).

- 이를 통해, 식물유래 GA733-Fc가 대장암 세포의 이동 및 전이능력을 효과적으로 감소시키며, 암세포의 이동 및 전이능력은 신기능성 수용체단백질인 Axl에 의해 조절됨을 알 수 있음.
- 위 결과들을 종합하여 볼 때, 대장암세포에서 신기능성 수용체단백질인 Axl 및 TREM2에 의해 대장암 표적단백질인 GA733-2의 발현이 조절됨을 알 수 있었음. 또한 식물유래 GA733-Fc와 신기능성 수용체단백질인 Axl-Ig를 함께 처리했을 때, 대장암세포의 세포주기 및 세포사멸, 암세포 전이능력이 강력하게 조절됨을 알 수 있었으며 이는 신기능성 수용체단백질 및 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질이 암세포의 증식 및 전이능력을 감소시킴으로써 항암효능에 효과적으로 작용한다는 결과를 도출하였음.

4) 2차년도에서 수행할 연구들의 일부분을 미리 시행함

- 만성 염증성장질환(Inflammatory Bowel Disease, IBD) 마우스모델에서 신기능성 수용체단백질인 TREM2의 효능을 알아보고자, TREM2가 과발현 된 마우스(TREM2 TG)에 dextran sulfate sodium(DSS)를 이용하여 IBD를 유도하였음.

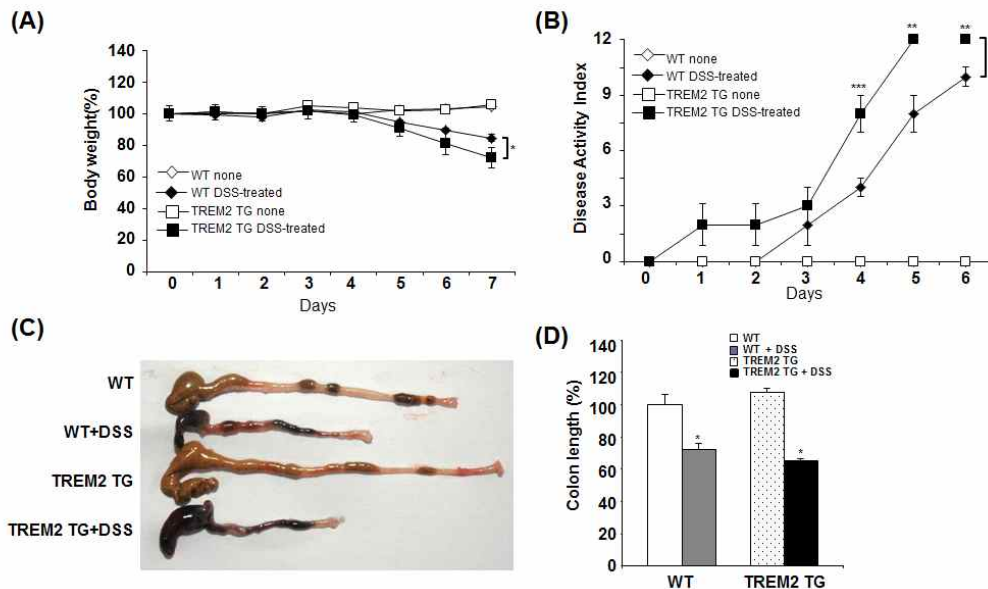


그림 39. IBD 마우스 모델에서 신기능성 수용체단백질인 TREM2의 과발현에 의한 염증작용 증가.

- 그 결과, 마우스의 몸무게가 감소됨을 확인하였고 WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스의 몸무게가 현저하게 감소됨을 확인함. 또한 WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스의 고통지수(disease activity index, DAI)가 증가되었으며, 대장의 길이 또한 TREM2 TG 마우스

가 가장 많이 감소되었음(그림 39). 이러한 결과를 조직검사를 통해 확인하기 위해, 대장 조직의 단편을 H&E 염색법을 이용하여 관찰한 결과, DSS에 의해 IBD가 유발된 대장점막조직들이 손상되어 있었으며 TREM2 TG 마우스의 대장조직이 WT에 비해 심각한 손상을 입었음(그림 40).

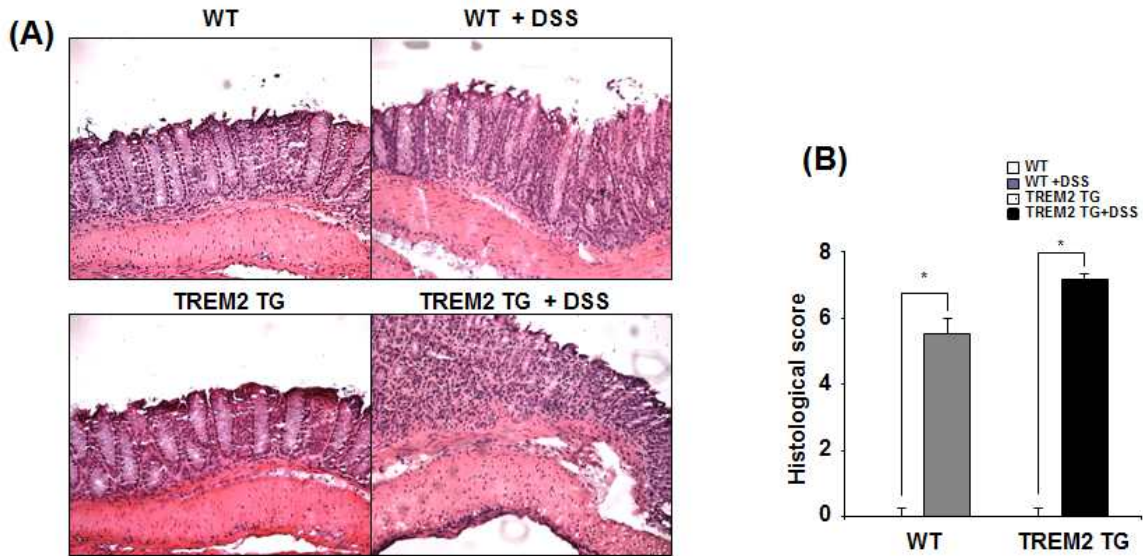


그림 40. IBD 마우스 모델에서 TREM2의 과발현에 의한 대장 점막조직의 손상 증가.

- 이에 IBD 마우스 모델의 대장조직으로부터 염증 사이토카인의 유전자 발현의 변화를 확인하고자 RT-PCR을 수행함. 그 결과, DSS에 의해 IL-1 β , IL-17A, IL-17F, IL-6등의 염증 사이토카인들의 유전자 발현이 증가되었으며 특히, TREM2 TG 마우스의 대장조직에서 크게 증가하였음(그림 41).

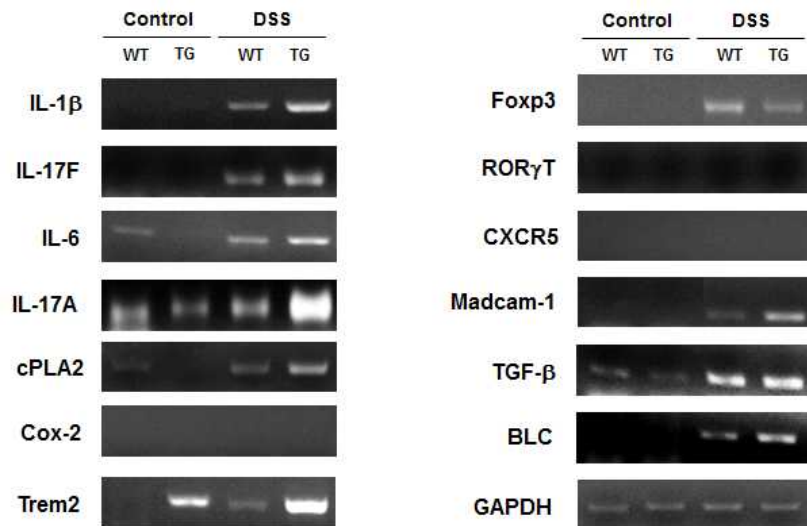


그림 41. IBD 마우스 모델에서 TREM2의 과발현에 의한 염증 사이토카인 유전자 발현 증가.

- 또한 IBD 마우스 모델의 대장조직에서 면역세포들의 침윤정도를 알아보기로, 유세포분석

기를 이용하여 대식세포(Macrophage)와 과립세포(granulocyte)의 세포수를 확인한 결과, DSS에 의해 IBD가 유도되면 대장조직에서 면역세포들의 세포수가 증가되고 TREM2 TG 마우스의 경우 WT과 비교하여 많은 수의 면역세포들이 침윤됨을 확인함(그림 42).

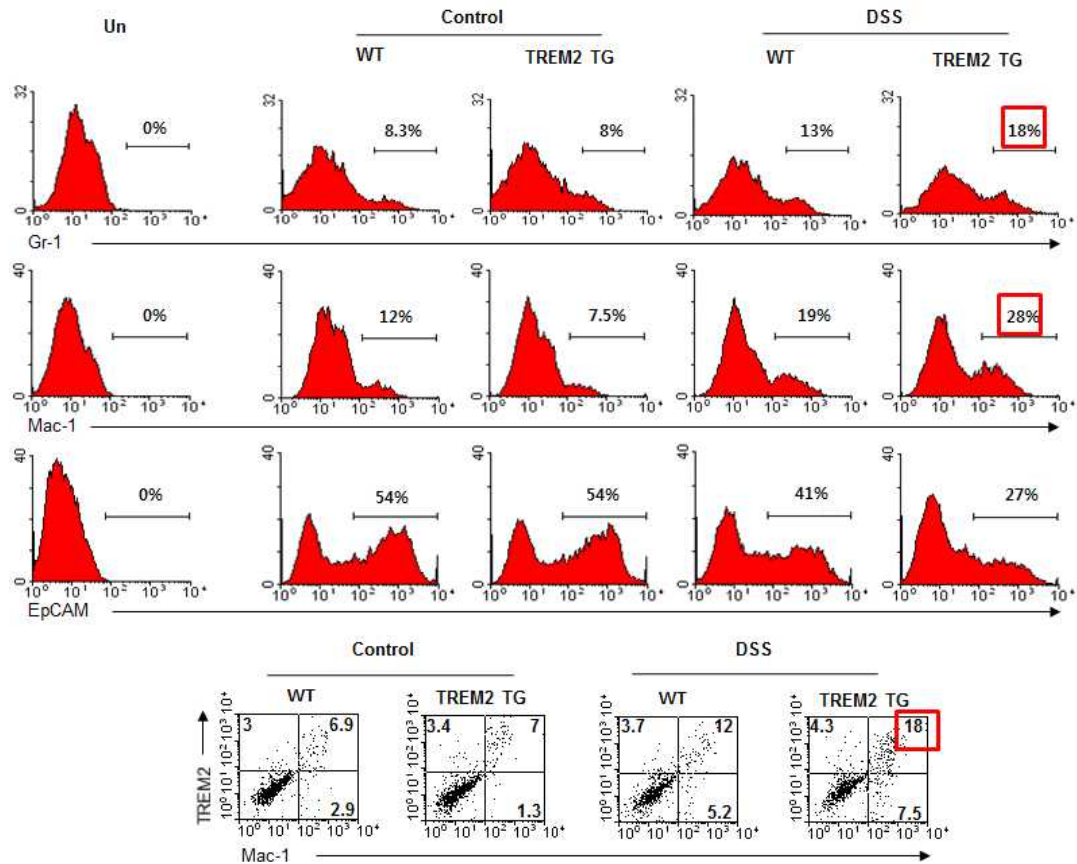


그림 42. IBD 마우스 모델에서 TREM2 과발현에 의한 면역세포들의 침윤 증가.

- 이와 더불어 IBD 마우스모델에서 주요한 면역기관인 mesentric lymph node(MLN)에서 CD4 regulatory T cell과 CD8 regulatory T cell의 변화를 확인한 결과, DSS에 의해 IBD가 유발되면 CD4, CD8 regulatory T cell 모두 감소되고 WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스가 더 많은 감소를 보였음. 이는 대장조직에서 CD8 regulatory T cell이 증가됨을 통해 염증반응에 의해 regulatory T cell이 MLN에서 대장으로 이동되어진 것으로 사료됨(그림 43).

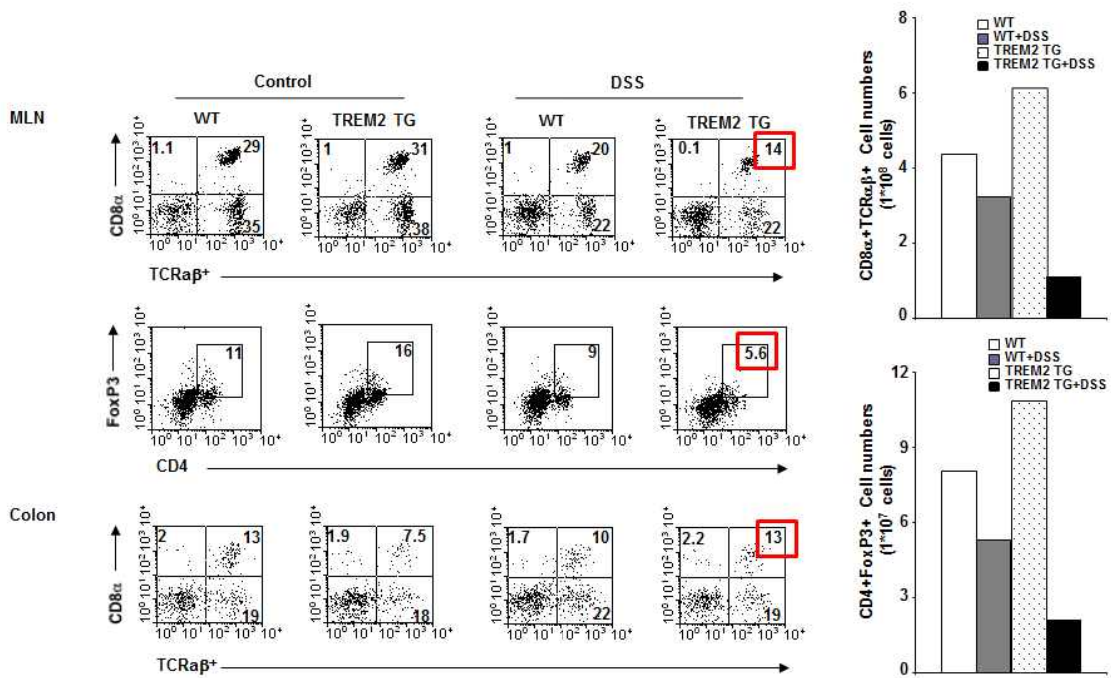


그림 43. IBD 마우스 모델에서 TREM2의 과발현에 의한 면역세포의 이동 증가.

- 점막면역반응을 분석하고자 IBD 마우스 모델로부터 fecal extract를 얻어 IgA의 생산기능을 확인하고자 ELISA assay를 수행함. 그 결과, BD가 유도되기 전 IgA level은 WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스가 감소되어 있지만 IBD가 유도되면 TREM2 TG 마우스의 IgA level이 현저하게 증가됨. 이를 통해 TREM2 과발현에 의해 IgA 생산기능이 증가된 것으로 보임(그림 44).

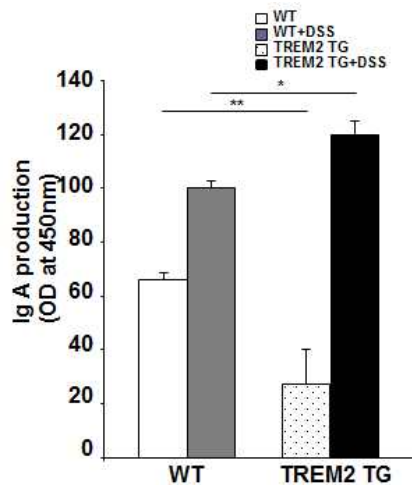


그림 44. IBD 마우스 모델에서 TREM2의 과발현에 의한 IgA 생산기능 증가.

- IBD 마우스 모델에서 신기능성 수용체단백질인 Ax1의 효능을 알아보하고자, Ax1의 발현이 저해된 마우스(Ax1 KO)에 DSS를 이용하여 IBD를 유도하였음.

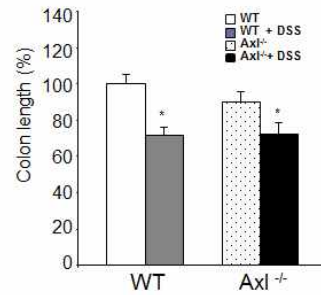
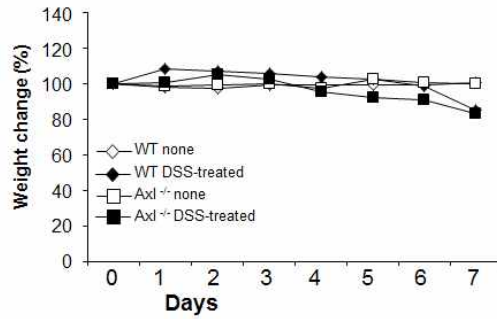


그림 45. IBD 마우스 모델에서 신기능성 수용체단백질인 Axl에 의한 염증작용 관찰.

- 그 결과, 마우스의 몸무게가 감소하였지만 WT과 Axl KO 마우스간의 차이는 보이지 않았으며 IBD가 유도된 마우스의 대장의 길이 역시 차이를 보이지 않았음(그림 45). 또한 대장조직의 단편을 H&E 염색한 후 관찰한 결과, DSS에 의해 IBD가 유도되면 대장 점막조직들이 손상되어 있으나 WT과 비교하여 Axl KO 마우스의 대장조직에서 손상된 정도가 다소 증가되어짐(그림 46).

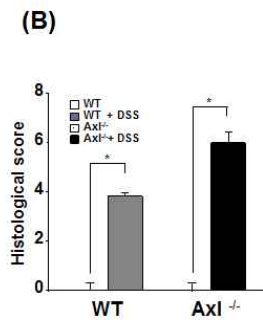
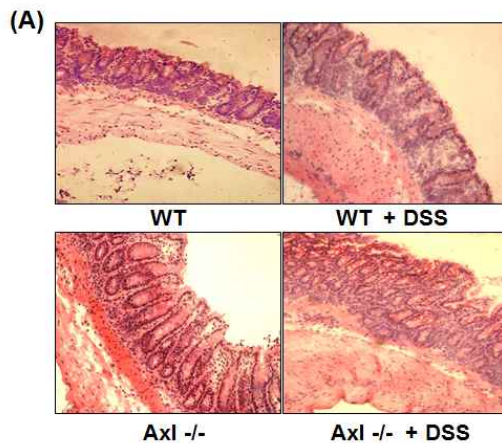


그림 46. IBD 마우스 모델에서 Axl에 의한 대장 점막조직의 손상 관찰.

- 이에 현재, IBD 마우스 모델을 이용하여 식물유래 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질인 Axl과 TREM2에 의한 항암/항염효능에 대한 실험을 계속 진행 중에 있으며, 본 1차년도과제 종료시점 이전에 목표로 한 연구내용들을 초과달성할 수 있을 것임.

2. 2차년도 세부연구수행 결과

1세부과제 : 대장암 항원-항체 재조합 단백질인 GA733-Fc 형질전환 식물의 대량재배를 통한 homozygous line의 seed bank 확보 및 대장암 예방용 수지상세포백신 효능 검증으로 예방용 재조합백신 실용화확립

- (1) 면역효과가 확인된 GA733-Fc with KDEL 대장암 백신 단백질을 높은 수준으로 발현하는 형질전환 식물을 대량 재배
- 비닐하우스를 이용한 형질전환 식물의 대량 재배 및 material 대량 확보(그림 47).



그림 47. GA733-Fc with KDEL 백신단백질을 발현하는 형질전환 식물의 대량재배 및 material 확보.

- (2) 대장암 백신 단백질 GA733-Fc with KDEL을 생산하는 식물의 homozygous line seed bank 최적화
- 2차년도 과제수행을 위해 재배된 대장암 백신 단백질 GA733-Fc with KDEL의 식물체에서 대량의 seed를 확보를 통해 선별된 homozygous line seed bank의 최적화(그림 48).



그림 48. GA733-Fc with KDEL 백신단백질 발현이 우수한 식물의 seed 확보현황 및 seed 관리대장.

- (3) 대장암 백신 단백질 GA733-Fc with KDEL을 생산하는 식물의 잎 대량 확보
- 2차년도 과제수행을 위해 재배된 대장암 백신 단백질 GA733-Fc with KDEL 식물 잎의 대량확보를 통해 대량의 백신단백질 정제를 할 수 있는 materials 확보 함(그림 49).



그림 49. GA733-Fc with KDEL 백신단백질 발현 식물의 대량정제를 위한 식물 잎 대량 확보. 당해연도 연구를 통해 약 30 kg의 형질전환 식물 잎을 수확 하였음.

- (4) Protein G affinity column을 이용한 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질 정제
 - 정제된 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인하였음 (그림 50).

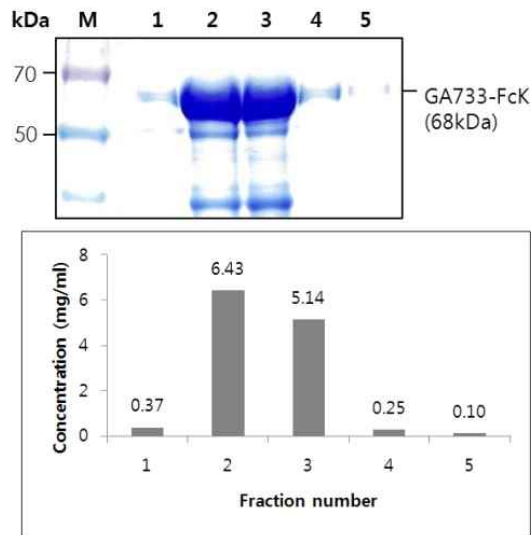


그림 50. 대량 확보된 형질전환 식물의 잎을 통해 GA733-Fc with KDEL 백신단백질의 대량 정제결과. 약 320g 의 식물체의 잎에서 정제하였으며, 약 10mg 정도의 GA733-Fc with KDEL 백신단백질을 정제할 수 있었음. M; protein marker, C-T; Column through, 1-7; purified sample fraction number.

- (5) 정제된 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질의 당구조 분석 수행
 - PNGase F를 처리하여 당사슬을 절단한 후 SDS-PAGE를 이용한 protein size변화와

MALDI-TOF을 이용한 당사슬 구조 분석을 수행한 결과 PNGase F를 처리 하였을 때 당사슬이 절단되어 protein의 size가 줄어드는 것을 확인 할 수 있었고 당구조 분석을 통한 당단백질의 당사슬 프로파일을 확인한 결과 high-mannose type의 당구조를 확인 할 수 있었음. 이는 KDEL retention signal 효과로 인한 ER 상에서 만들어지는 당구조를 나타내는 것으로 여겨짐(그림 51).

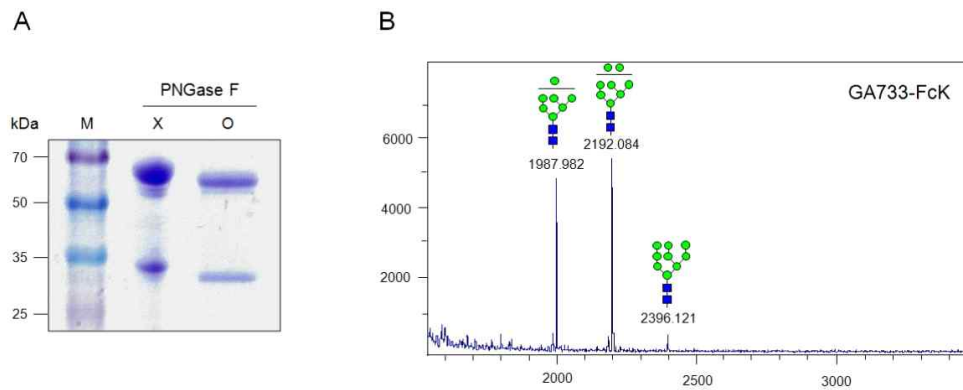


그림 51. 식물유래 GA733-Fc with KDEL 당사슬 부가 여부 확인과 당사슬 구조 확인. A. PNGase F처리를 이용한 당사슬 부가 확인, B. MALDI-TOF을 이용한 GA733-FcK의 당사슬 구조 분석.

(6) 식물유래 GA733-Fc with KDEL의 면역활성 확인

- 형질전환 식물로부터 정제된 GA733-Fc with KDEL 백신단백질이 항원으로서 기능을 가지는지 확인하기 위해 Surface plasmon resonance assay (SPR)을 통해 항원-항체 binding activity를 수행하였음(그림 52).

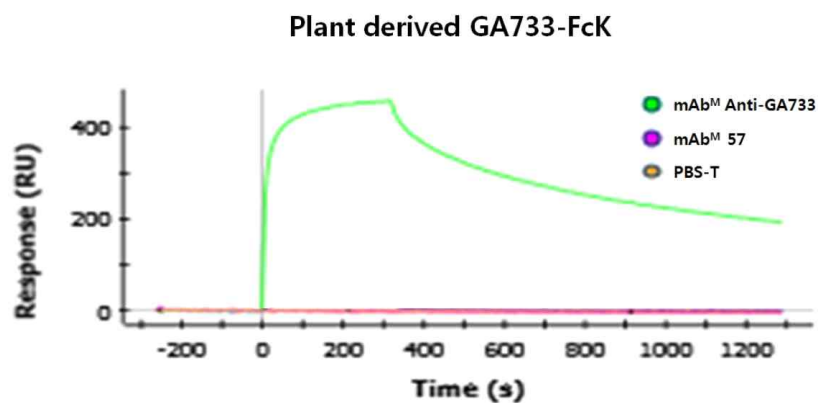


그림 52. Surface plasmon resonance assay (SPR)을 통한 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질의 항원-항체 binding activity 결과. 식물에서 얻은 GA733-Fc with KDEL과 동물유래 GA733 항체가 서로 interaction이 있는 것으로 확인되었음. mAb^M Anti-GA733; mammalian-derived GA733 antibody, mAb^M 57; Negative control, mammalian-derived human rabies virus antibody, PBS-T; Blank, Phosphate Buffered Saline (+Tween 20).

1협동과제 : 당쇄화 개선을 통한 GA733-2-Fc의 치료효과를 극대화할 수 있는 기반기술 개발 및 독성 평가 검사

1. β -1,2-xylosyltransferase (*XylT*)와 α -1,3-fucosyltransferase (*FucT*) 유전자의 동시 knock-down에 의한 당쇄화 개선 (2단계 당쇄화 개선)된 GA733-2-Fc의 생산

- β -1,2-xylosyltransferase (*XylT*)와 α -1,3-fucosyltransferase (*FucT*) 유전자의 발현을 동시에 knock-down 시키기 위한 RNAi 벡터 구축
- 식물체에서 생산되는 당단백질에 특이적으로 존재하는 xylose와 fucose가 감소된 2단계 당쇄화 개선 GA733-2-Fc 단백질을 생산하기 위해 식물체에서 β -1,2-xylosyltransferase (*XylT*)와 α -1,3-fucosyltransferase (*FucT*) 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 벡터 시스템을 구축함(그림 53).

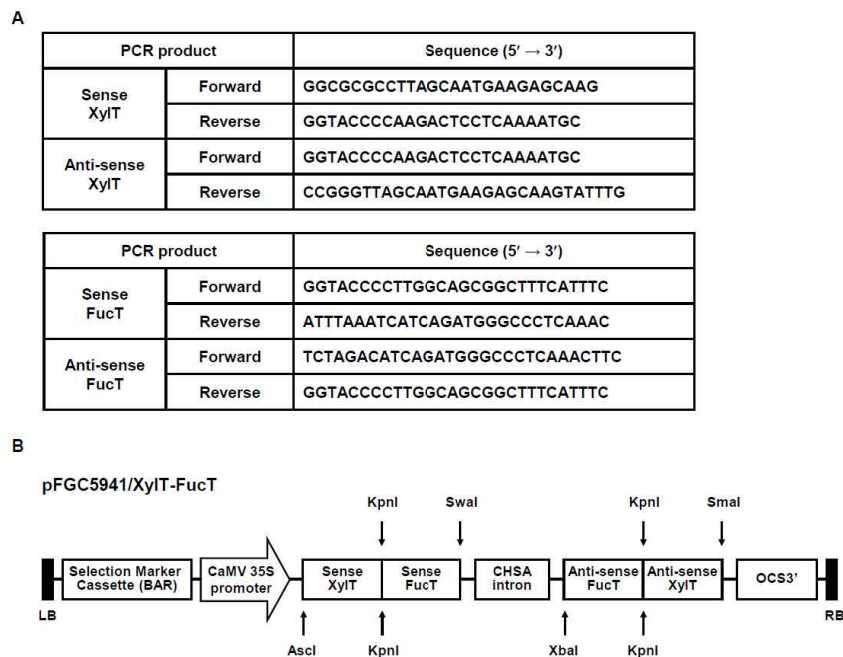


그림 53. 식물체 *XylT*, *FucT* 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 벡터 시스템을 구축함. (A) 담배 식물체 *XylT*, *FucT* 유전자의 sense, anti-sense PCR 산물을 확보하기 위한 PCR primer의 염기서열. (B) pFGC5941/*XylT*-*FucT* 벡터의 모식도.

- 담배 식물체 (*Nicotiana benthamiana*)의 *XylT* 유전자 (Gene Bank Number, EF562629)의 1,190 - 1,544 bp 부위 및 *FucT* 유전자 (Gene Bank Number, EF562630)의 628 - 1,045 bp 부위를 증폭시키기 위한 sense, anti-sense PCR primer를 디자인하고 담배 식물체의 cDNA를 주형으로 한 PCR을 통해 각각의 DNA 절편을 확보함. *XylT*, *FucT* sense, anti-sense DNA 절편은 PCR 산물 결합 벡터인 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5 α strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 각 PCR 산

물의 유전정보를 확인함. 제한효소 AscI, KpnI으로 절단된 sense *XylT* DNA 절편 및 제한효소 KpnI, SmaI으로 절단된 sense *FucT* DNA 절편은 CaMV35S (Cauliflower mosaic virus 35S) promoter, CHSA intron, OCS (octopine synthase) 3' terminator 와 BAR (phosphinothricin acetyl transferase gene) 선별유전자를 지니는 RNAi 벡터, pFGC5941의 AscI/KpnI 및 KpnI/SmaI 제한효소 위치에 각각 클로닝하였음. 또한 제한효소 XbaI, KpnI으로 절단된 anti-sense *XylT* DNA 절편 및 제한효소 KpnI, SmaI으로 절단된 anti-sense *FucT* DNA 절편은 pFGC5941 벡터의 XbaI/KpnI, KpnI/SmaI 제한효소 위치에 각각 클로닝하여 *XylT* 유전자와 *FucT* 유전자의 발현을 동시에 억제하는 pFGC5941/*XylT*-*FucT* 벡터를 구축하였고 sense *XylT*, sense *FucT*, anti-sense *XylT*, anti-sense *FucT* 유전자의 삽입 여부는 제한효소 절단법으로 확인함.

- pFGC5941/*XylT*-*FucT* 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* 세포를 확보하기 위해 재조합 미생물에서 추출한 pFGC5941/*XylT*-*FucT* 벡터를 electroporation 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 세포에 형질전환시키고 50 µg/ml kanamycin, 25 µg/ml rifampicin 항생제가 포함된 LB 배지에서 선별하여 pFGC5941/*XylT*-*FucT* 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 세포를 확보하였음. 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 세포를 항생제가 포함된 LB broth 배지에서 2일 동안 (28°C) 배양하고 pFGC5941/*XylT*-*FucT* 벡터를 추출하였고 PCR을 통해 sense *XylT*, sense *FucT*, anti-sense *XylT*, anti-sense *FucT* 유전자의 존재를 확인함(그림 54). PCR에 이용된 primer는 pFGC5941/*XylT*-*FucT* 벡터 클로닝에 이용한 primer와 같음(그림 55).

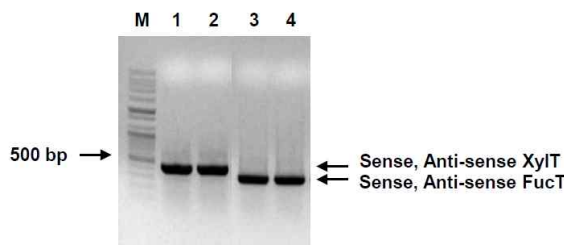


그림 54. pFGC5941/*XylT*-*FucT* 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 세포에서 plasmid DNA를 추출하고 PCR을 통해 sense *XylT*, sense *FucT*, anti-sense *XylT*, anti-sense *FucT* 유전자의 존재를 확인함.

- pFGC5941/*XylT*-*FucT* RNAi 벡터시스템에 의한 *XylT*, *FucT* 유전자의 발현 억제를 확인하기 위해 pFGC5941/*XylT*-*FucT* 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포를 infiltration 방법으로 담배 식물체에 감염시키고 2, 4, 6, 8일 동안 배양한 후 담배 식물체를 회수하였고 RT-PCR을 통해 *XylT*, *FucT* 유전자의 발현을 확인하였음. 회수한 담배 식물체의 잎을 LN₂와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GeneAll Hybrid R kit (GeneAll Inc., Korea)를 이용하여 total RNA를 추출하였으며 Promega ImProm-II Reverse Transcription System 이용하여 cDNA를 합성하였음. 담배 식물체의 *XylT*, *FucT*, *actin* 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하여

pFGC5941/XylIT-FucT RNAi 벡터시스템에 의한 *XylIT*, *FucT* 유전자의 발현 억제를 확인함. 그림 9A에서와 같이 pFGC5941/XylIT-FucT 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포가 감염된 담배 식물체에 존재하는 *XylIT*, *FucT* 유전자 발현량 (transcript level)은 대조군에 비해 감소하였음.

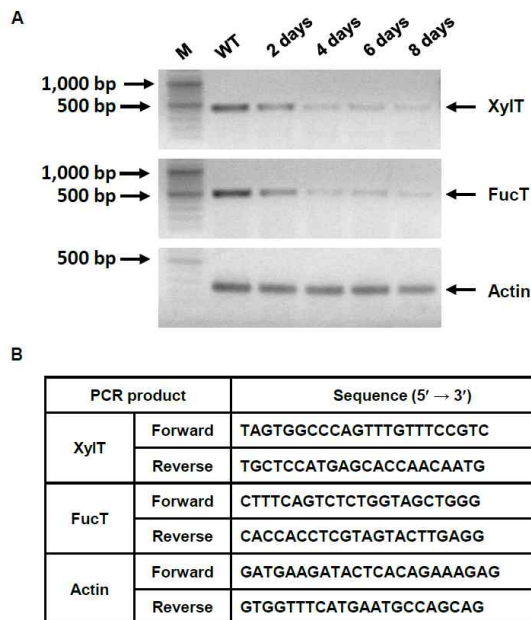


그림 55. (A) pFGC5941/XylIT-FucT RNAi 벡터시스템에 의한 *XylIT*, *FucT* 유전자의 발현 억제를 pFGC5941/XylIT-FucT RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포가 infiltration 방법으로 감염된 담배 식물체를 이용한 RT-PCR 방법으로 확인함. (B) RT-PCR에 이용된 PCT primer 염기서열.

*β-1,2-xylosyltransferase (XylIT)*와 *α-1,3-fucosyltransferase (FucT)* 유전자의 발현이 억제된 형질전환 담배 식물체 확립

- *XylIT*, *FucT* 유전자의 발현이 억제된 형질전환 담배 식물체를 확보하기 위해 담배 잎을 이용한 형질전환 및 재분화 연구를 수행함. 토양에서 키운 담배 식물체의 잎을 70% ethanol 용액에 2분, 1% NaOCl 용액에 4분간 침지시킨 후 멸균된 증류수에 4번 세척하였고 1 cm² 크기로 잘라 잎 절편체를 확보하였음. 담배 잎 절편체는 MS 기본배지 (MS salts 4.4 g/L, 3% sucrose, 0.8% microagar, pH 5.7)에 치상한 후 일반 광조건에서 2일간 배양하였고 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 pFGC5941/XylIT-FucT RNAi 벡터의 형질전환 실험에 사용하였음. 담배 잎 절편체를 pFGC5941/XylIT-FucT RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포 용액에 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 멸균된 filter paper 이용하여 표면에 남아 있는 재조합 *Agrobacterium* 세포를 제거하였고 MS 기본배지에 침지한 후 암조건에서 2일 동안 배양하였음. 형질전환된 담배 식물체를 확보하기 위해 호르몬 및 항생제가 첨가된 MS 배지 [MA 기본배지 + 1.5 mg/L BA (6-Benzylaminopurine) + 3 mg/L PPT (DL-phosphinothricin)]에 담배 잎 절편체를 옮

긴 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하여 신초 (shoot)의 생성을 유도하였음. 4주에서 6주 후 신초의 생성을 확인할 수 있었고 신초에서 뿌리의 재분화를 위해 MS rooting 배지 (MS salts 2.2 g/L, 1.5% sucrose, 0.3% grlite, 1.5 mg/L IBA, 250 mg/L cefotaxime pH 5.7-5.8)에 치상한 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하여 뿌리의 발달 유도하였음. 뿌리 생성 기간을 거친 후 토양에 옮겨 심어 형질전환 식물체의 성장을 유도하였음(그림 56).

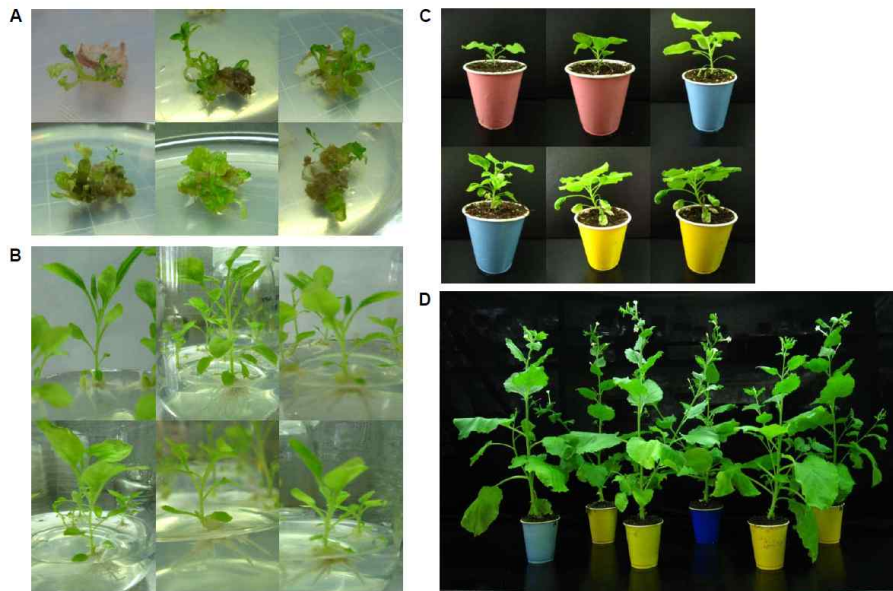


그림 56. pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포를 담배 잎 절편체에 형질전환 시키고 선별 배지에서 성장시켜 pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터가 형질전환된 담배 식물체를 확보함.

- pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포를 이용한 담배 형질전환 및 재분화 연구를 통해 확보한 형질전환 개체 중 토양에 순화 중인 36개의 형질전환 개체 (T1-T36)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 genomic DNA에 XylT-FucT RNAi 벡터시스템의 도입 여부를 확인함. 형질전환 개체의 잎을 LN₂와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GeneAll Exgene Plant SV mini kit (GeneAll Inc. Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터의 CHSA intron에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR를 수행하고 CHSA intron PCR 산물의 존재를 확인하여 pFGC5941/XylT-FucT 벡터시스템의 도입 여부를 판단함 (그림 57). T7, T19, T22, T24, T39, T30, T35 형질전환 개체에서 CHSA intron PCR 산물이 존재하였고 이는 pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터시스템이 genomic DNA에 도입되었다는 것을 의미함.
- pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터시스템이 도입된 것으로 확인된 T7, T19, T22, T24, T39, T30, T35 형질전환 개체에서 total RNA를 추출하고 RT-PCR 방법으로

XylT-FucT RNAi 벡터시스템 도입에 의한 *XylT*, *FucT* 유전자의 발현 억제를 확인함. 형질전환 개체의 잎을 LN₂와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GeneAll Hybrid R kit 를 이용하여 total RNA를 추출하였으며 cDNA 합성 후 *XylT*, *FucT*, *actin* 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하였고 대조군과 비교하여 XylT-FucT RNAi 벡터시스템이 도입된 형질전환 담배 식물체에서 *XylT*, *FucT* 유전자의 발현 억제를 확인함. 그림 12에서와 같이 XylT-FucT RNAi 벡터시스템이 형질전환된 담배 식물체 T7, T19, T22, T24, T39, T30, T35에 존재하는 *XylT*, *FucT* 유전자의 발현량 (transcript level)은 대조군에 비해 감소하였음.

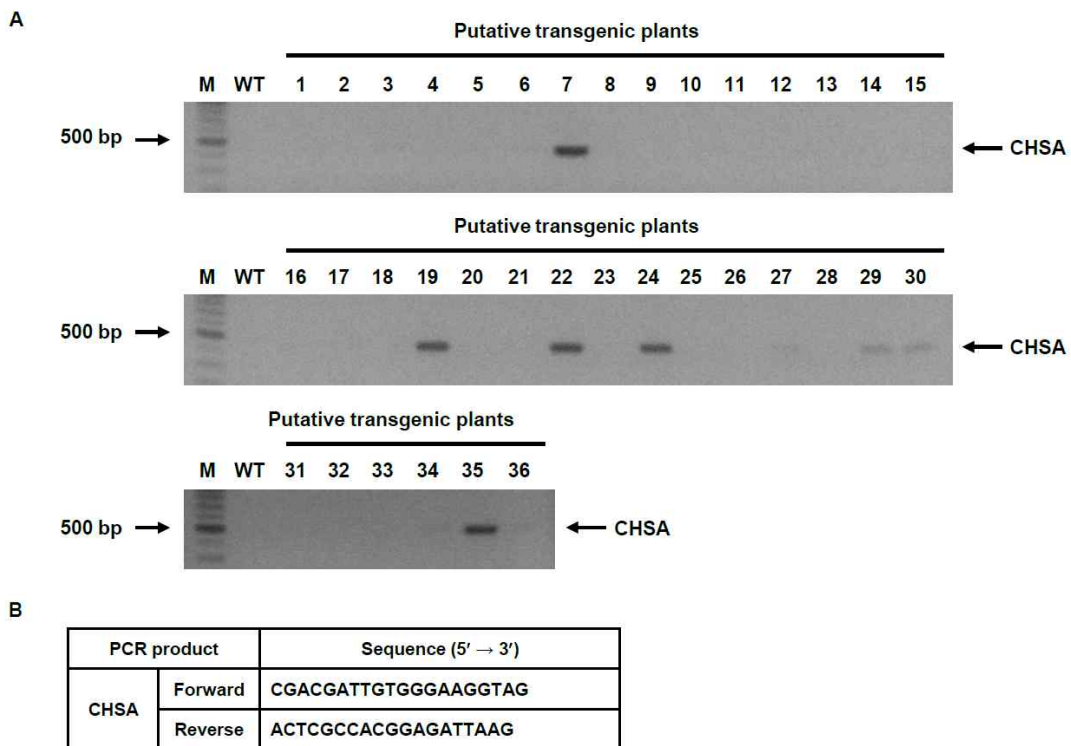
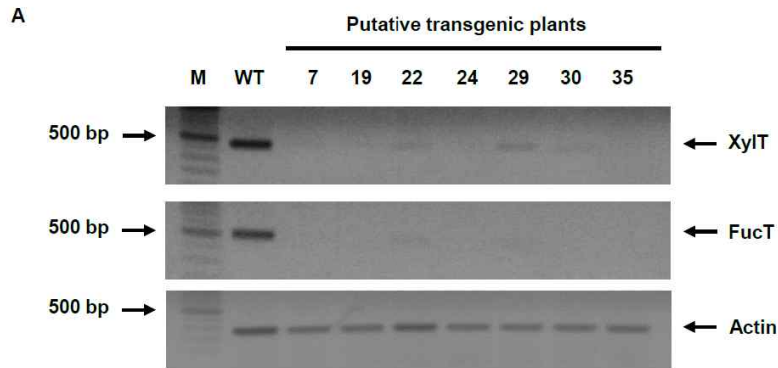


그림 57. 토양에 순화 중인 XylT-FucT RNAi 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 XylT-FucT RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) CHSA intron genomic DNA PCR 산물. (B) PCR에 이용된 primer 염기서열.



B

PCR product		Sequence (5' → 3')
XylT	Forward	TAGTGGCCAGTTTGTTCGTC
	Reverse	TGCTCCATGAGCACCAACAATG
FucT	Forward	CTTTCAGTCTCTGGTAGCTGGG
	Reverse	CACCACCTCGTAGTACTTGAGG
Actin	Forward	GATGAAGATACTCACAGAAAGAG
	Reverse	GTGGTTTCATGAATGCCAGCAG

그림 58. XylT-FucT RNAi 벡터시스템의 도입된 담배 식물체 T7, T19, T22, T24, T39, T30, T35에서 XylT, FucT 유전자의 발현 억제를 RT-PCR을 통해 확인함. (A) XylT, FucT RT-PCR 산물. (B) PCR에 이용된 primer 염기서열.

- *β-1,2-xylosyltransferase (XylT)*와 *α-1,3-fucosyltransferase (FucT)* 유전자의 발현이 억제된 담배 식물체에서 당쇄화 개선 (2단계 당쇄화 개선) GA733-2-Fc의 생산 및 분리 정제.
 - *XylT*, *FucT* 유전자의 발현이 억제된 담배 식물체에서 당쇄화가 개선된 GA733-2-Fc 단백질을 생산하기 위해 pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포를 GA733-2-Fc 발현 벡터인 pBCTV/GA733-2-Fc가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포와 1:1로 혼합한 후 담배 식물체에 infiltration 방법으로 감염시키고 7일 동안 배양한 후 단백질 추출물을 확보하고 GA733-2-Fc 단백질을 분리 정제하였음. 또한 galactose가 β-1-4 linkage로 연결된 당쇄화 구조를 지니는 GA733-2-Fc 단백질을 확보하기 위해 human *β-1,4-galactosyltransferase (GalT)* 유전자가 클로닝된 pILTAB-GalT 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*을 pBCTV/GA733-2-Fc 벡터를 지니는 재조합 *Agrobacterium*과 혼합한 후 담배 식물체에 infiltration 방법으로 감염시켰고 GA733-2-Fc 단백질의 발현을 확인 한 후 분리 정제하였음. GA733-2-Fc 단백질은 Fc fragment와 특이적으로 결합하는 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제하였고 SDS-PAGE 후 Coomassie blue 염색법으로 확인하였음 (그림 59).

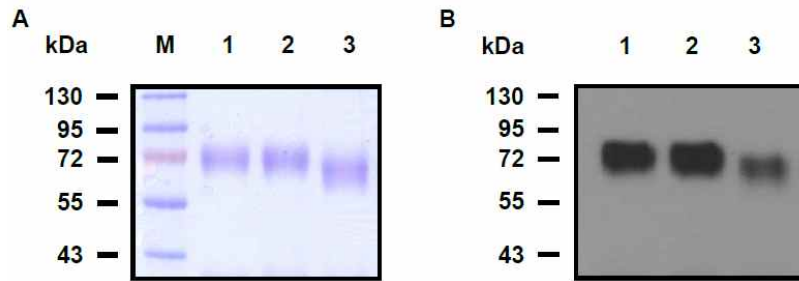


그림 59. 담배 식물체에서 생산된 당쇄 변형 GA733-2-Fc 단백질을 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제하고 SDS-PAGE 후 Coomassie blue 염색법 (A) 및 Western blot 방법 (B)으로 확인함. (M, molecular size marker; 1, normal GA733-2-Fc; 2, GA733-2-Fc produced from tobacco transformed with pILTAB-GalT; 3, GA733-2-Fc produced from tobacco transformed with pFGC5941/XylT-FucT).

- 2단계 당쇄화 개선 GA733-Fc의 당분석
 - GA733-2-Fc 단백질의 당쇄를 분석하기 위해 50 µg의 분리 정제된 GA733-2-Fc 단백질에 0.6 mg/ml의 pepsin을 처리하여 GA733-2-Fc glycopeptide를 얻었고 0.5 mU의 PNGase A를 처리하여 glycan을 분리한 후 column chromatography 방법으로 분리하였음. 분리 정제된 glycan은 solid permethylation 후 MALDI-TOF 분석을 통해 분석하였음 (그림 60). GA733-2-Fc 단백질의 경우 식물체에서 생산되는 당단백질에서 볼 수 있는 xylose와 fucose가 부가된 것으로 추정되는 당쇄들을 함유하고 있었고 GalT를 함께 발현시킨 GA733-2-Fc + GalT의 경우 galactose가 부가된 것으로 추정되는 당쇄화 구조를 지니는 GA733-2-Fc 단백질을 함유하는 것으로 확인됨. *XylT*, *FucT* 유전자의 발현이 억제된 담배 식물체에서 생산된 GA733-2-Fc + XylT/FucT KD의 경우 xylose와 fucose를 함유하는 당쇄화 구조를 지니는 GA733-2-Fc 단백질이 감소하는 것으로 확인됨.

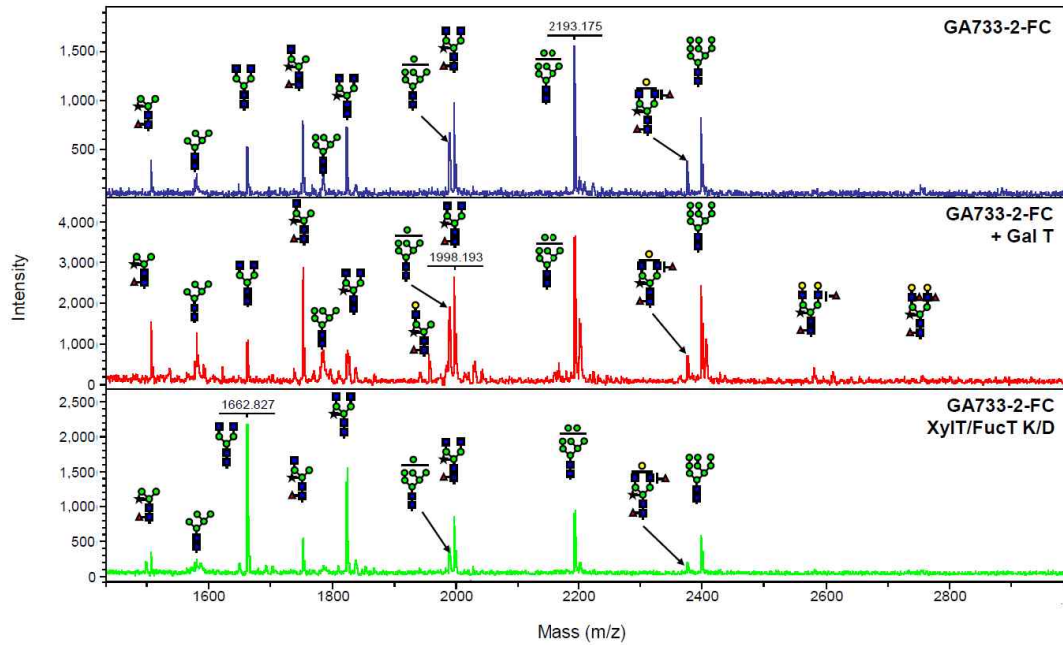


그림 60. MALDI-DOF 분석을 통해 식물에서 생산된 GA733-2-Fc 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT KD 단백질의 당쇄화 구조를 분석함.

2. 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc의 동물 실험을 통한 *in vivo* 알러지 독성 평가

- 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc의 *in vivo* 알러지 독성 평가를 위한 쥐 동물실험을 진행함. 담배 식물체의 잎에서 발현시키고 분리 정제한 GA733-2-Fc, GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT K/D 단백질을 실험쥐의 복강에 투여하여 면역반응을 유도하고 알러지 유발 유무를 분석함. 5주령의 암컷 BALB/c 쥐를 네 개의 그룹 (각 그룹 당 8 마리 쥐)으로 나누고 동물 사육실에서 적응을 시킨 후, GA733-2-Fc, 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT K/D 단백질을 2주 간격으로 총 4회 복강면역하였음 (1회 투여량 : 45 μ g). 대조군으로는 동량의 PBS를 복강면역하였고 면역 보조제로 1차 면역시 Freund's complete adjuvant (FCA)를 사용하였으며, 2-4차 boosting 면역시 Freund's incomplete adjuvant (IFA)를 1:1 (v/v)로 첨가하여 사용하였음. 4차 면역을 마친 실험쥐의 혈액을 retro-orbital plexus로부터 채취하고 상온에서 응고시킨 후 원심분리를 통해 혈청을 얻었고 GA733-2-Fc에 대한 특이 항체 존재 유무를 효소면역측정법 (ELISA)으로 분석하였음. 1:100으로 희석한 혈청 100 μ L를 GA733-2-Fc 단백질 (2 μ g/mL)로 coating된 96 well immunoplate에 첨가하여 반응시킨 후 세척하였고 1:20,000으로 희석한 anti-mouse IgG-HRP 및 anti-mouse IgE-HRP 항체를 처리하고 세척한 후 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)와 H₂O₂를 이용하여 발색시킴. 2 M H₂SO₄ 용액을 첨가하여 발색 반응을 중단시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하여 실험쥐의 혈청에 존재하는 GA733-2-Fc에 특이적으로 반응하는 IgG 및 IgE 항체의 존재를 확인함. 그림 15 및 표 1에서와 같이 GA733-2-Fc, GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc +

XylT/FucT K/D 단백질이 복강면역된 실험쥐의 혈청에 GA733-2-Fc 단백질과 특이적으로 반응하는 IgG 항체가 존재하였고 GA733-2-Fc 단백질 및 당쇄화 개선 GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT K/D 단백질에 의해 유도되는 IgG 항체 생산량은 같았음 (그림 61A). 면역된 단백질의 알러지 반응에 의해 생성되는 것으로 알려진 IgE 항체는 GA733-2-Fc 및 당쇄화 개선 GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT K/D 단백질의 복강 면역에 의해 증가하였고 당쇄화 개선에 의한 IgE 생산 억제 효과는 크지 않았음 (그림 61B).

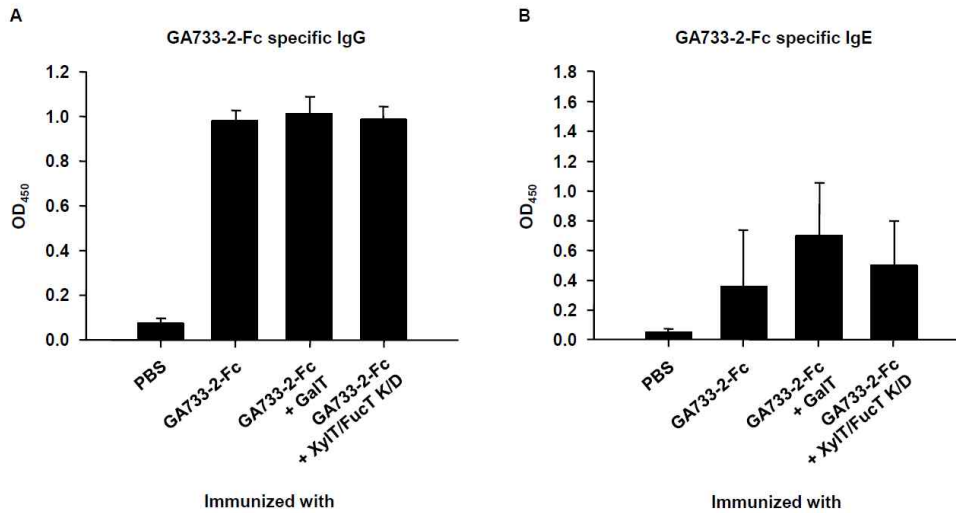


그림 61. GA733-2-Fc, 당쇄화 개선 GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT K/D 단백질이 복강면역된 실험쥐의 혈청에 존재하는 GA733-2-Fc 특이 IgG (A) 및 IgE (B) 항체의 존재를 효소면역측정법으로 분석함.

- GA733-2-Fc, GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT K/D 단백질이 복강면역된 실험쥐에서 각 단백질에 의한 면역 반응을 분석하기 위해 마지막 면역을 끝낸 실험쥐에서 비장을 적출하고 처리군 별로 모아 단세포화 시켰고 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지에서 배양하였음. 24 well plate의 well에 5×10^6 cells (1×10^7 cells/mL, 500 μ L)을 첨가하고 항원이 없는 배지 또는 GA733-2-Fc 항원 (50 μ g/well)을 넣어준 배지로 나누어 배양하였음. Cytokine IFN- γ (Th1 cytokine) 분석을 위해 세포를 48시간 배양한 후 배지를 회수하였고 IL-4, IL-5, IL-10 (Th2 cytokine) 분석을 위해 세포를 72시간 배양한 후 배지를 회수하였으며 효소면역측정법으로 각 cytokine의 존재를 분석함. 그림 16 및 표 1에서와 같이 PBS를 복강 면역한 대조군의 비장세포 배양액에서는 GA733-2-Fc 항원을 처리하거나 처리하지 않았을 때 IFN- γ , IL-4, IL-5 및 IL10 cytokine에 차이가 없는 것으로 나타남. GA733-2-Fc, 당쇄화 개선 GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT K/D를 면역한 처리군의 비장세포에 GA733-2 항원을 처리한 비장세포 배양액의 경우 Th1 cytokine IFN- γ 및 Th2 cytokine IL-4, IL-5, IL-10 모두 증가하였음.

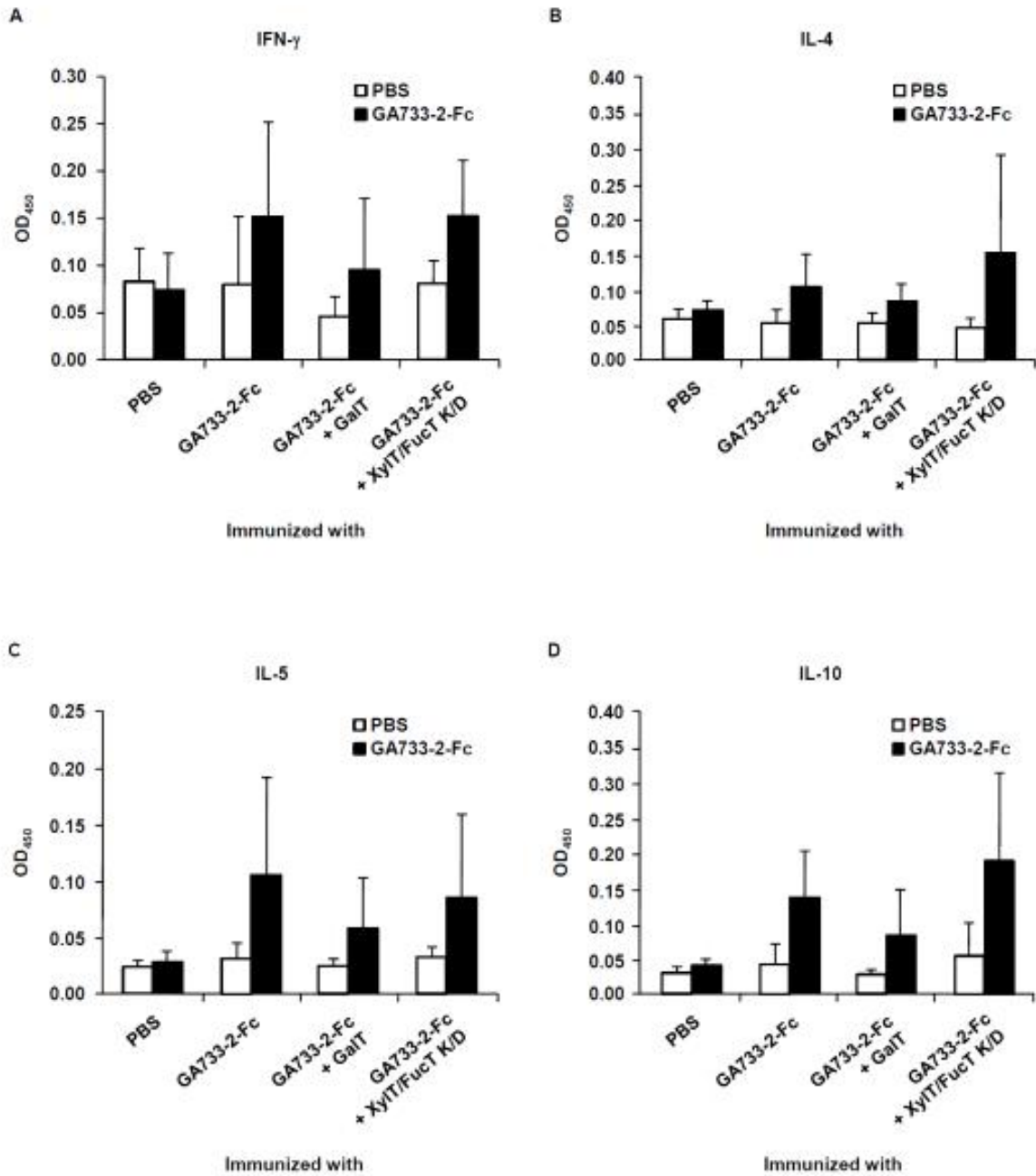


그림 62. GA733-2-Fc, GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT K/D 단백질이 복강면역된 실험쥐에서 비장세포를 확보하고 GA733-2-Fc 항원의 존재에 의한 cytokine IFN- γ 및 IL-4, IL-5, IL-10의 분비를 효소면역측정법으로 분석함.

3. β -1,2-xylosyltransferase와 α -1,3-fucosyltransferase 유전자의 동시 knock-down 및 β -1,4-galactosyltransferase 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc의 생산

- 식물체 당단백질 xylose와 fucose가 감소되고 galactose가 β -1-4 linkage로 연결된 당쇄화 구조를 지니는 3단계 당쇄화 개선 GA733-2 단백질을 생산하기 위해 *XylT*, *FucT* 유

전자를 동시에 knock-down 시킬 수 있는 pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 및 human β -1,4-galactosyltransferase (*GalT*) 유전자가 클로닝된 pILTAB-GalT 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*을 GA733-2-Fc 발현 벡터 pBCTV/GA733-2-Fc가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*과 혼합한 후 담배 식물체에 형질전환시켰고 GA733-2-Fc 단백질의 발현을 α -human-IgG-HRP 항체를 이용한 Western blot 방법으로 확인함(그림 63).

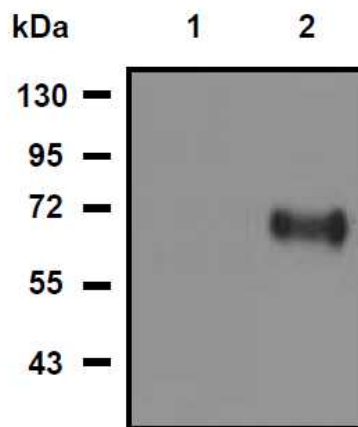


그림 63. 담배 식물체에서 *XylT*, *FucT* 유전자 동시 knock-down 및 *GalT* 유전자 과발현에 의해 생산되는 3단계 당쇄화 개선 GA733-Fc의 발현을 Western blot 분석을 통해 확인함.

2협동과제 : 대장암백신 생산 형질전환 토마토 개발

1) Clean vector를 이용한 식물 형질전환을 위한 Bialaphos농도 확인

- 형질전환 식물체의 상용화를 용이하게 하기 위하여, Clean vector를 back bone으로 하는 식물발현벡터를 제작하였음.
- Clean vector의 경우 selection marker로 Bar gene을 가지고 있어서 제초제인 bialaphos를 사용하여 선별하게 되는데, 적용할 토마토의 genotype에 따라서 bialaphos의 농도를 조절 할 필요성이 있음.
- 이에 따라, 각각의 식물체를 대상으로 한 bialaphos 농도별 생존율 실험을 수행하였음.
- 무균상태로 키운 Micro Tom, M line, N line, C line의 본잎, 떡잎, 줄기 등을 잘라 Bialaphos 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 mg이 각각 함유된 식물배지에 놓고 생존율을 관찰함.

MT	0 mg	0.5 mg	1 mg	1.5 mg	2 mg	4 mg	M line	0 mg	0.5 mg	1 mg	1.5 mg	2 mg	4 mg
0 day							0 day						
1 day							1 day						
2 day							2 day						
3 day							3 day						
4 day							4 day						
5 day							5 day						
6 day							6 day						
7 day							7 day						
8 day							8 day						
9 day							9 day						
11 day	95%	80%	65%	55%	45%	20%	11 day	80%	75%	70%	50%	40%	30%
N line	0 mg	0.5 mg	1 mg	1.5 mg	2 mg	4 mg	C line	0 mg	0.5 mg	1 mg	1.5 mg	2 mg	4 mg
0 day							0 day						
1 day							1 day						
2 day							2 day						
3 day							3 day						
4 day							4 day						
5 day							5 day						
6 day							6 day						
7 day							7 day						
8 day							8 day						
9 day							9 day						
11 day	90%	60%	40%	30%	15%	10%	11 day	100%	95%	90%	80%	60%	30%

그림 64. Micro Tom, M line, N line, C line의 Bialaphos 농도별 생존율 확인.

- Micro Tom의 경우, 11일째 일 때, 0.5 mg에서 80%, 1 mg에서 65%, 1.5 mg에서 55%, 2 mg에서 45%, 4 mg에서 20%의 생존율을 각각 보였음. 50% 이하의 생존율을 보이는 2 mg의 농도가 가장 적합한 것으로 판단됨.
- M line의 경우, 11일째 일 때, 0.5 mg에서 75%, 1 mg에서 70%, 1.5 mg에서 50%, 2 mg에서 40%, 4 mg에서 30%의 생존율을 각각 보였음. 50% 이하의 생존율을 보이는 2 mg의 농도가 가장 적합한 것으로 판단됨.

- N line의 경우, 11일째 일 때, 0.5 mg에서 60%, 1 mg에서 40%, 1.5 mg에서 30%, 2 mg에서 15%, 4 mg에서 10%의 생존율을 각각 보였음. 50% 이하의 생존율을 보이는 1 mg의 농도가 가장 적합한 것으로 판단됨.
- C line의 경우, 11일째 일 때, 0.5 mg에서 95%, 1 mg에서 90%, 1.5 mg에서 80%, 2 mg에서 60%, 4 mg에서 30%의 생존율을 각각 보였음. C line의 경우 2 mg ~ 4 mg 사이를 더 확인해 봐야 확실하겠지만, 현재로서는 60% 정도의 생존율을 보이는 2 mg의 농도가 가장 적합한 것으로 판단됨.

2) Clean vector를 back bone으로 하는 GA733 식물발현벡터 제작 및 토마토 형질전환

- 다양한 조건에 따른 GA733유전자 발현 정도를 확인하여, 최적 발현 조건의 식물발현벡터를 제작하였음.
- Clean vector를 back bone으로 하고, 식물 전신 발현 프로모터인 35S 프로모터에 의해 GA733 유전자의 발현이 조절되며, ER targeting이 되도록 하는 조건의 식물발현벡터를 제작하였음.
- 또한, 동일한 조건을 가지고 있지만 열매 특이적 발현 프로모터인 SIHD에 의해 GA733유전자의 발현이 조절되는 식물발현벡터 또한 제작하였음.

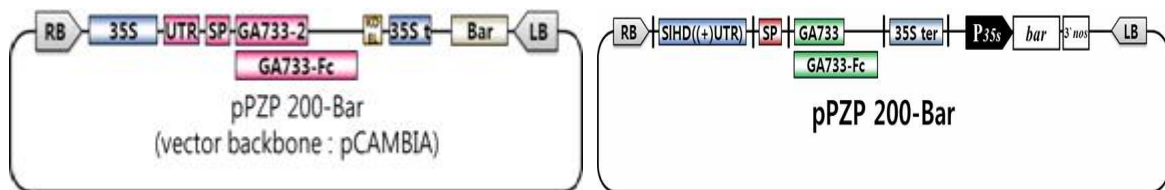


그림 65. GA733유전자 발현을 위한 식물발현벡터 구조.

- 토마토 전신발현 프로모터인 35S 프로모터와, 열매 특이 발현 프로모터인 SIHD에 의해 GA733유전자의 발현이 조절되는 식물발현벡터를 실험용 토마토인 Micro Tom, 상용화 품종(고정종)인 M line에 형질전환 함.

Micro Tom	35S / GA733	35S / GA733-Fc	35S / Fc	Micro Tom	Shoot induction	Root induction
Shoot induction				SIHD / GA733		
Root induction					SIHD / GA733-Fc	

그림 66. 35S:GA733과 SIHD:/GA733 식물발현벡터로 형질전환중인 Micro Tom.



그림 67. SIHD:GA733 식물발현백터로 형질전환중인 M line.

3) SIHD/GA733 형질전환 토마토의 선별

- Clean vector를 back bone으로 하고, 열매 특이적 발현 프로모터인 SIHD 프로모터에 의해 GA733 유전자의 발현이 조절되도록 한 식물발현백터를 Micro Tom과 M line에 각각 형질전환 하였음.
- 항생제 배지를 통해 1차 선별된 형질전환 토마토를 Micro Tom은 2개체, M line은 8개체를 얻었음.
- 총 10개의 형질전환 토마토의 잎에서 Genomic DNA를 추출하였고, GA733 specific primer를 이용해 PCR을 수행하여 2차 선별을 진행했음.



그림 68. 1차 선별된 형질전환 토마토의 Genomic DNA를 이용한 PCR.

- 그 결과, M line에서 3개의 형질전환 토마토를 선별할 수 있었음.
- 2차 선별이 완료된 M line 5, 7-1, 7-2 중에서 7-2 line만 열매를 수확 할 수 있었음. 하지만 항암실험을 진행하기에는 양이 부족하여 실험하기 충분한 열매를 확보 중에 있음.

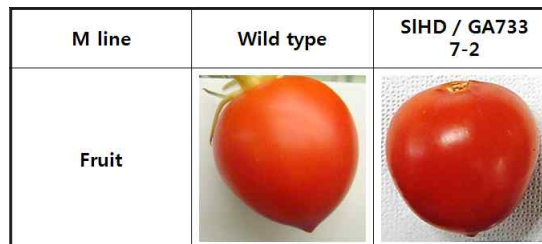


그림 69. M line wild type과 형질전환 토마토 7-2의 열매.

4) 35S:GA733 형질전환 담배 개발

- Kanamycine으로 선별이 가능한 pBINPLUS vector backbone으로 하고, 식물 전신 발현 프로모터인 35S 프로모터에 의해 GA733 유전자의 발현이 조절되며, ER targeting이 되도록 하는 조건의 식물발현백터를 제작하였음.
- 제작한 식물발현백터를 이용하여 Nicotiana tabacum cv. Xanthi nc에 형질전환을 함.

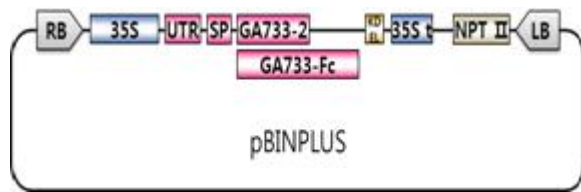


그림 70. GA733유전자 발현을 위한 식물발현벡터 구조와 형질전환 담배.

- 35S:GA733, 35S:GA733-Fc, 35S:Fc를 각각 형질전환 하여 형질전환담배를 얻었고, western blot analysis를 통해 단백질 발현을 확인하였고, 각각의 잎을 수확하여 단백질을 추출하였음.
- 추출한 단백질에 Ammonium sulfate를 처리하여 농도별 구간의 단백질을 얻었고, 그 중 가장 많은 해당 단백질이 있는 구간을 취하는 방식으로 semi-purification을 하였음.
- GA733 단백질은 50~70% 농도에서 semi-purification되었고, GA733-Fc는 25~50% 농도에서 가장 많이 semi-purification되었음. Fc 단백질은 25~50%, 50~70%에서 모두 semi-purification 되었지만, 50~70%에서 더 많이 semi-purification되었음.

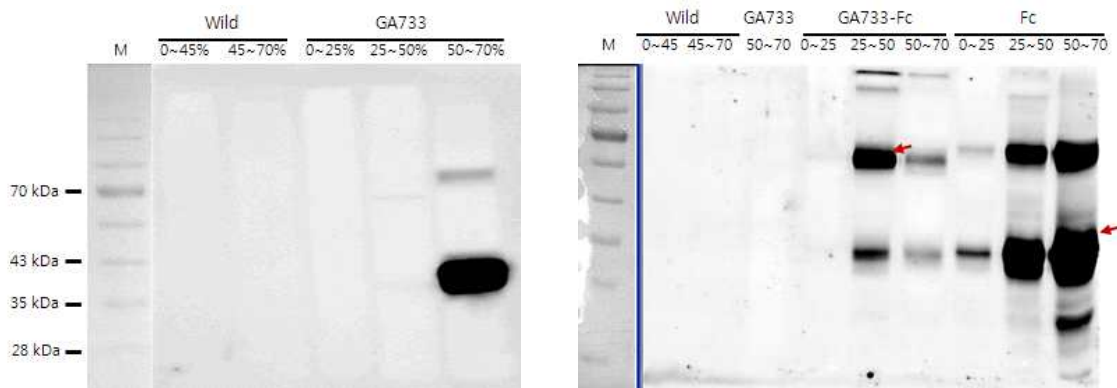


그림 71. 형질전환담배에서 GA733, GA733-Fc, Fc 단백질의 semi-purification.

2. 식물유래 암항원을 이용한 대장암 경구용 백신 실용화 기반기술 개발

1) 대장암 및 IBD mouse 모델에서, GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체 단백질들의 최적의 *in vivo* 투여조건 확립.

- 식물유래 표적단백질의 최적의 *in vivo* 투여조건을 확립하기 위하여, KFDA 의약품등의 독성시험기준을 바탕으로 독성 및 안정성 시험을 실시하였음. WT 마우스에 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc를 20ug/100ul, 100ug/100ul, 500ug/100ul의 농도로 총 3주간 경구투여한 후 마우스의 일반증상관찰(사망 및 특이사항), 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 부검시

장기별 중량측정 및 육안적 검사를 실시하였음.

- 그 결과 식물유래 표적단백질을 농도별 경구투여하는 동안 일반증상변화의 사망 및 특이 사항이 관찰되지 않았으며, 체중변화, 사료 및 물의 섭취량 역시 차이를 보이지 않았음. 부검시 각 주요장기별 육안검사 결과 특별 이상이 관찰되지 않았으며, 각 장기별 중량 역시 차이를 보이지 않았음(그림 71). 또한 식물유래 표적단백질에 특이적인 IgA 생산량을 확인한 결과 500ug/100ul를 경구투여한 마우스에서 표적단백질 특이적 IgA 생산량이 가장 많이 측정되었음(그림 72).
- 이를 통해 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc를 농도별 경구투여시 독성을 보이지 않음을 알 수 있었으며, 이후 실험에서 식물유래 표적단백질의 투여 농도는 500ug/100ul로 결정하였음.

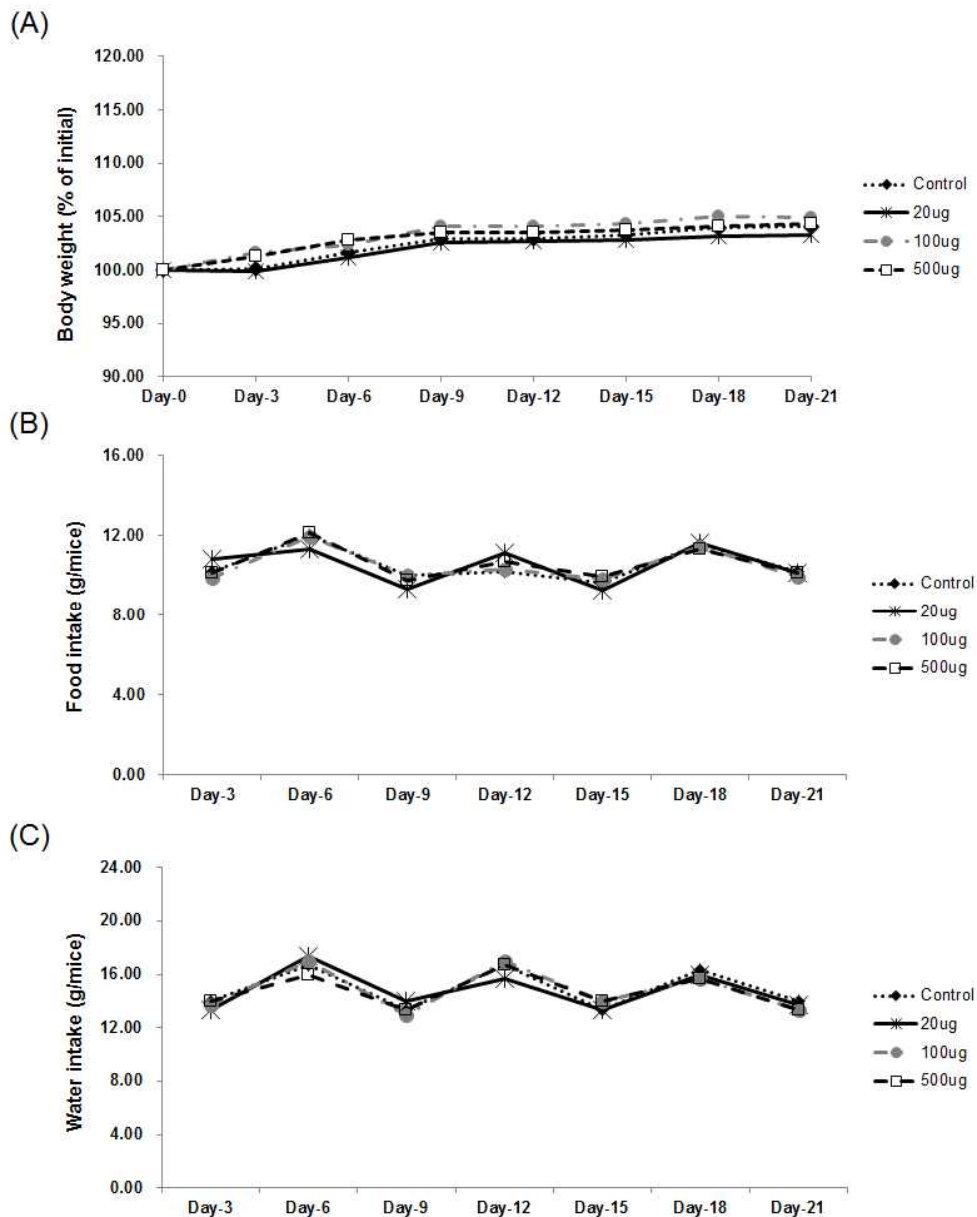
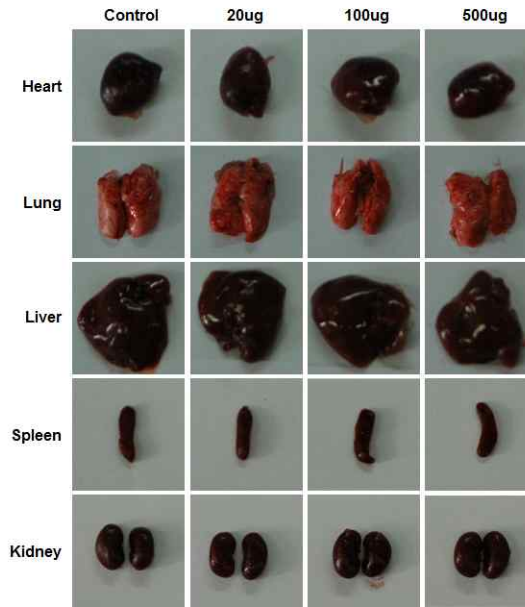


그림 72. 식물유래 표적단백질의 경구투여를 통한 농도별 독성 및 안정성 확인(continued).

(D)



(E)

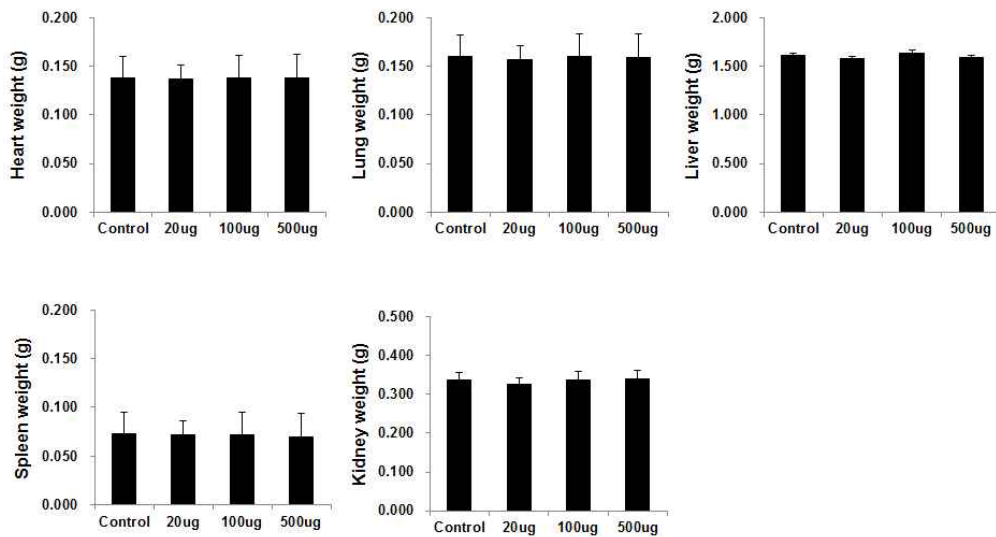


그림 72. 식물유래 표적단백질의 경구투여를 통한 농도별 독성 및 안정성 확인.

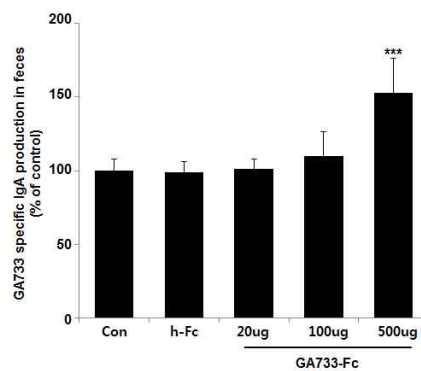


그림 73. 식물유래 표적단백질의 경구투여를 통한 표적단백질 특이적 IgA 생산량 확인.

- 만성 염증성장질환(Inflammatory Bowel Disease, IBD) 마우스모델에서 신기능성 수용체 단백질들인 TREM2와 Ax1의 효능을 알아보고자, TREM2가 과발현 된 마우스(TREM2 TG)와 Ax1의 발현이 저해된 마우스(Ax1 KO)에 dextran sulfate sodium(DSS)를 이용하여 IBD를 유도하였음.
- TREM2 TG 마우스에 IBD를 유도한 결과, 마우스의 체중이 감소됨을 확인하였고, WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스의 체중이 현저하게 감소됨을 확인함. 또한 WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스의 질병고통지수(disease activity index, DAI)가 증가되었으며, 대장의 길이 또한 TREM2 TG 마우스가 가장 많이 감소되었음(그림 74). 이러한 결과를 조직검 사법을 통해 확인하기 위하여 대장조직의 단편을 H&E 염색한 결과, DSS에 의해 IBD가 유발되면 대장점막조직들이 손상되어 있었으며 TREM2 TG 마우스의 대장조직이 WT에 비해 심각한 손상을 입었음을 확인함(그림 75).

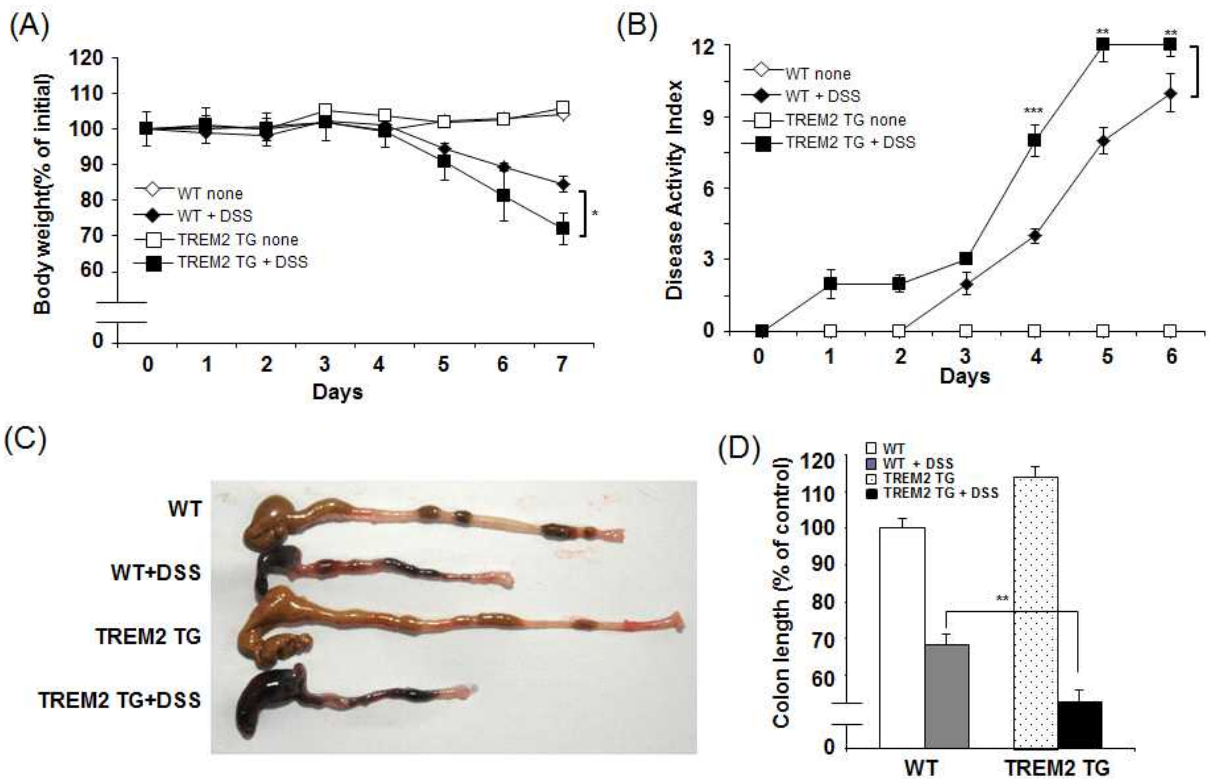


그림 74. IBD 마우스 모델에서 신기능성 수용체단백질인 TREM2의 과발현에 의한 염증작용 증가.

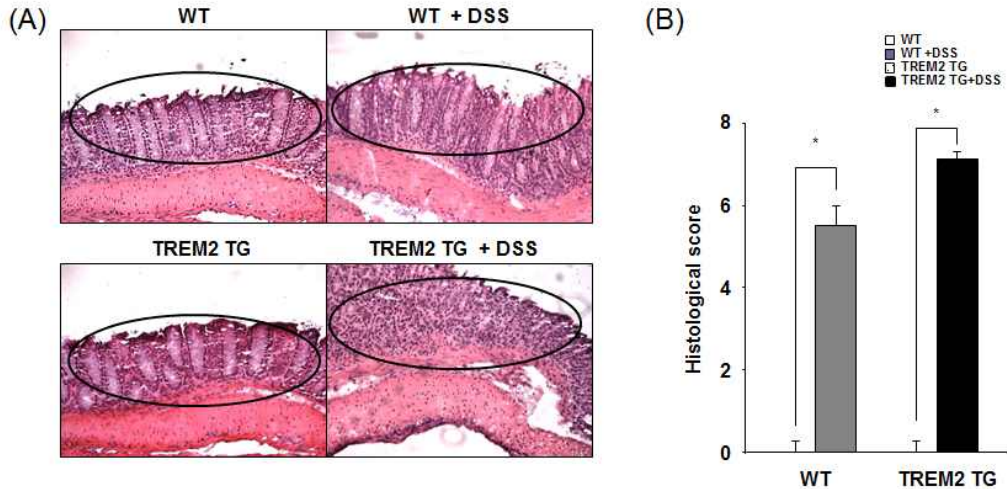


그림 75. IBD 마우스 모델에서 TREM2 과발현에 의한 대장 점막조직의 손상 증가.

- 이에 IBD 마우스 모델의 대장조직으로부터 염증 사이토카인의 유전자 발현의 변화를 확인하고자 RT-PCR을 수행하였음. 그 결과, DSS에 의해 IL-1 β , IL-17A, IL-17F, IL-6등의 염증 사이토카인들의 유전자 발현이 증가되었으며 특히, TREM2 TG 마우스의 대장조직에서 크게 증가하였음(그림 76).

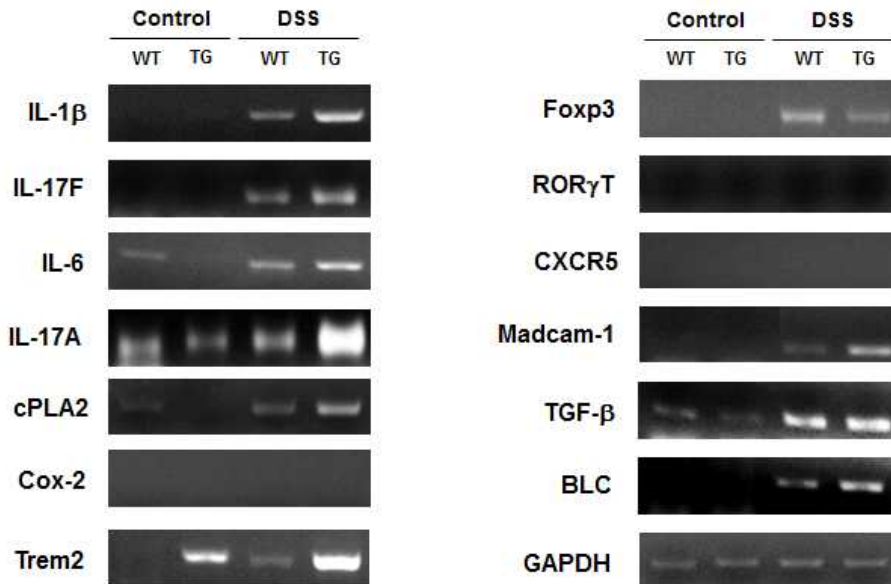


그림 76. IBD 마우스 모델에서 TREM2 과발현에 의한 염증 사이토카인 유전자 발현의 증가.

- IBD 마우스 모델의 대장조직에서 면역세포들의 침윤정도를 알아보하고자 유세포분석기를 이용하여 대식세포(Macrophage)와 과립세포(Granulocyte)의 세포수를 확인한 결과, DSS에 의해 IBD가 유도되면 대장조직에서 면역세포들의 세포수가 증가되었으며, TREM2 TG 마우스의 경우 WT과 비교하여 많은 수의 면역세포들이 침윤됨을 확인함(그림 77. A,B). 이와 더불어 IBD 마우스 모델에서 주요 면역기관인 mesenteric lymph node(MLN)에

서 CD4 regulatory T cell과 CD8 regulatory T cell의 변화를 확인한 결과, DSS에 의해 IBD가 유발되면 CD4, CD8 regulatory T cell 모두 감소되고 WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스가 더 많은 감소를 보였음. 이는 대장조직에서 CD8 regulatory T cell이 증가됨을 통해 DSS에 의해 IBD가 유도되면 염증반응에 의해 regulatory T cell이 MLN에서 대장으로 이동되어진 것으로 사료됨(그림 77. C).

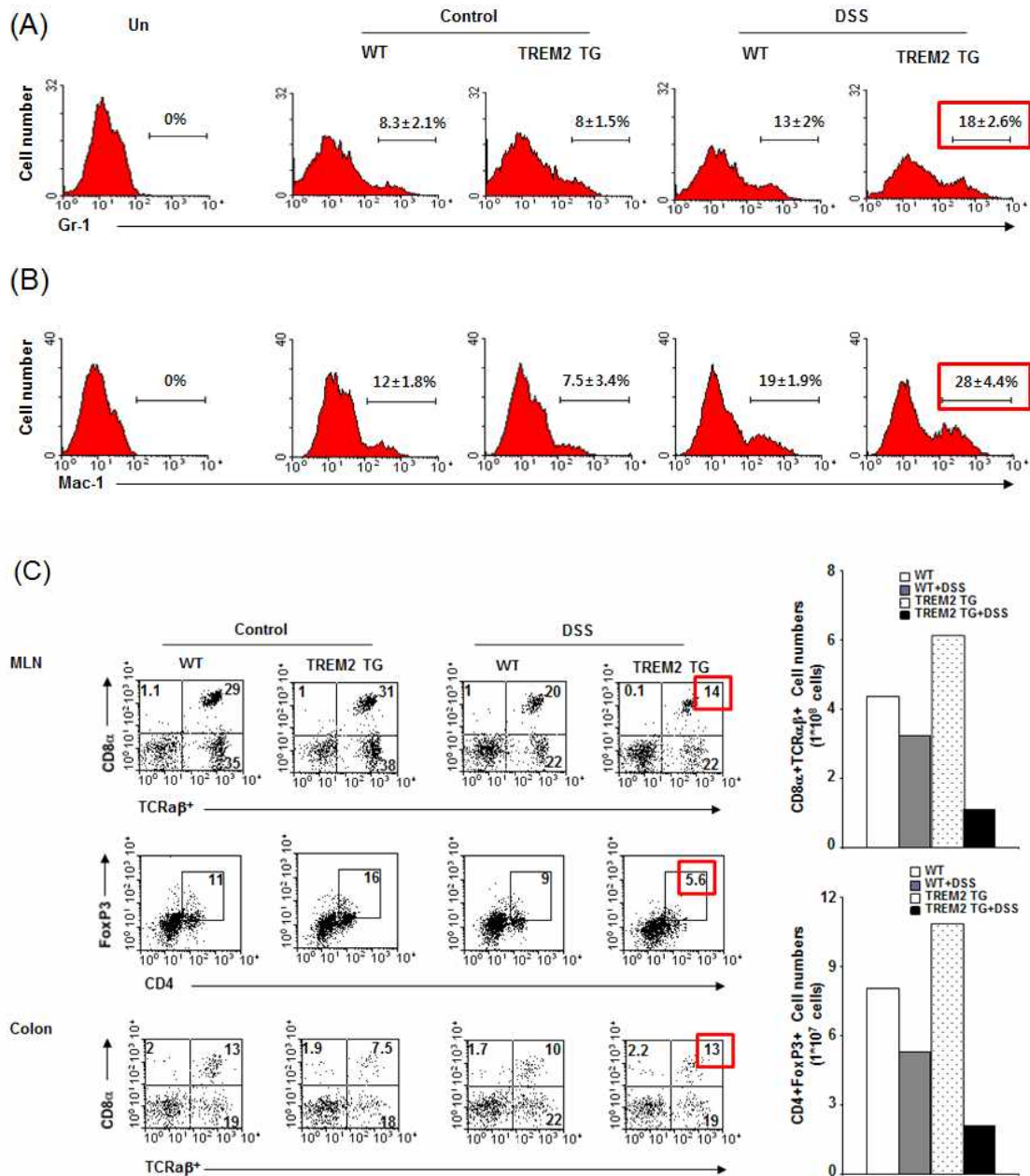


그림 77. IBD 마우스 모델의 대장조직 및 MLN에서 TREM2 과발현에 의한 면역세포들의 침윤 증가.

- IBD 마우스 모델에서 다른 신기능성 수용체 단백질인 Axl의 효능을 알아보고자, Axl의 발현이 저해된 마우스(Axl KO)에 IBD를 유도하였음. 그 결과 IBD가 유도됨에 따라 마우스

스의 체중은 감소하였지만, WT과 Axl KO 마우스간의 차이는 보이지 않았으며, IBD가 유도된 마우스의 대장의 길이 역시 큰 차이를 보이지 않았음 (그림 78). 또한 대장조직의 단편을 H&E 염색한 후 관찰한 결과, DSS에 의해 IBD가 유도되면 대장 점막조직들이 손상되어 있으나 WT과 비교하여 Axl KO 마우스의 대장조직에서 손상된 정도가 큰 차이를 보이지 않았음(그림 79).

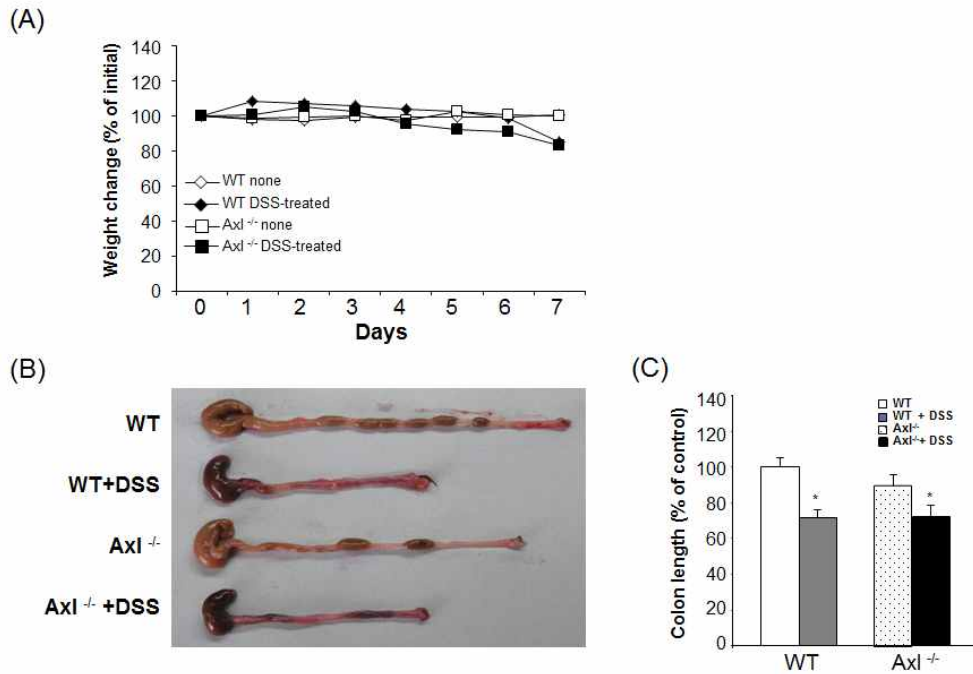


그림 78. IBD 마우스 모델에서 신기능성 수용체단백질인 Axl 발현의 저해에 의한 염증작용 확인.

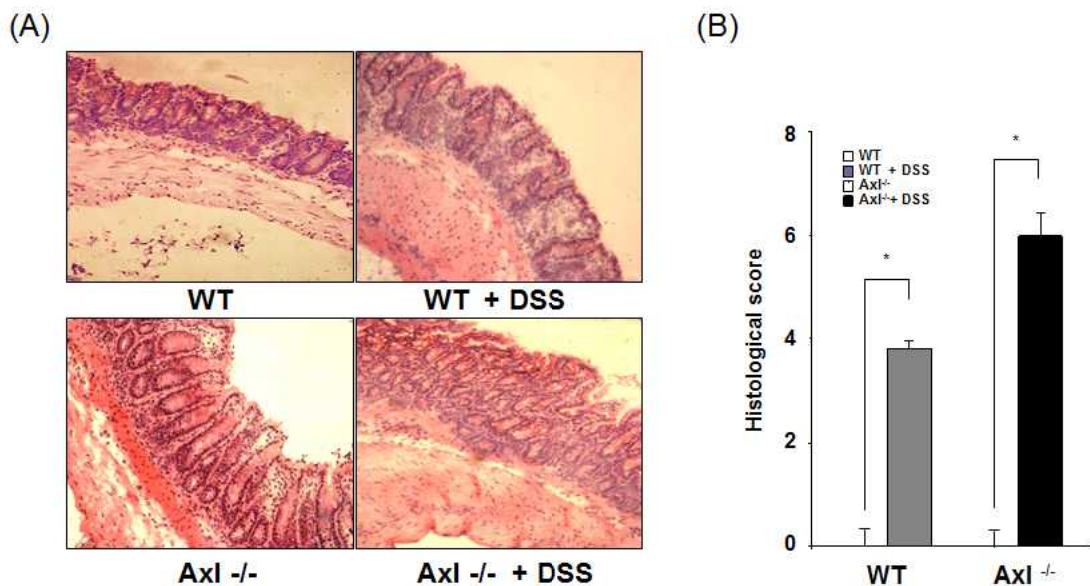


그림 79. IBD 마우스 모델에서 Axl 발현의 저해에 의한 대장 점막조직의 손상 확인.

- 위 결과들을 종합하여 볼 때, DSS에 의해 IBD를 유도한 마우스 모델에서 신기능성 수용

체단백질의 하나인 TREM2가 과발현으로 인해 대장조직의 손상이 현저하게 증가되며, 염증 사이토카인 유전자 발현이 증가됨을 통해 염증반응 또한 증가됨을 알 수 있었음. 이를 통해 대장조직으로 면역세포들의 침윤이 증가됨을 알 수 있었음. 하지만 신기능성 수용체단백질인 Ax1의 발현이 저해된 마우스의 경우 WT 마우스와 비교하여 대장조직의 손상 및 염증작용 변화에 영향을 미치지 못함을 알 수 있었음.

- 위 결과를 바탕으로 대장암 및 IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc 및 신기능성 수용체단백질인 TREM2에 의한 항암/항염효능을 검증하기 위한 실험을 다음과 같이 실행하였음. IBD 마우스 모델은 WT 마우스와 TREM2 TG 마우스에 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc를 500ug/100ul의 농도로 2일 1회, 총 2주간 경구투여한 후 14일째 Azoxymethan(AOM)을 복강 주사함. 24일째 DSS가 함유된 물을 처리한 후 30일째 일반 물로 교체함. 이후 44일째 2차로 DSS가 함유된 물을 처리한 후 50일째 다시 일반 물로 교체함. 62일째 마우스를 희생하여 항암 및 항염증 효능검증을 위한 실험을 진행하였음. 또한 대장암 마우스 모델은 WT 마우스와 TREM2 TG 마우스에 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc를 500ug/100ul의 농도로 2일 1회, 총 2주간 경구투여한 후 14일째 마우스 대장암 세포주인 MC38 cell을 피하주사함. 이후 28일째 마우스를 희생하여 항암 효능검증을 위한 실험을 진행하였음(그림 80).

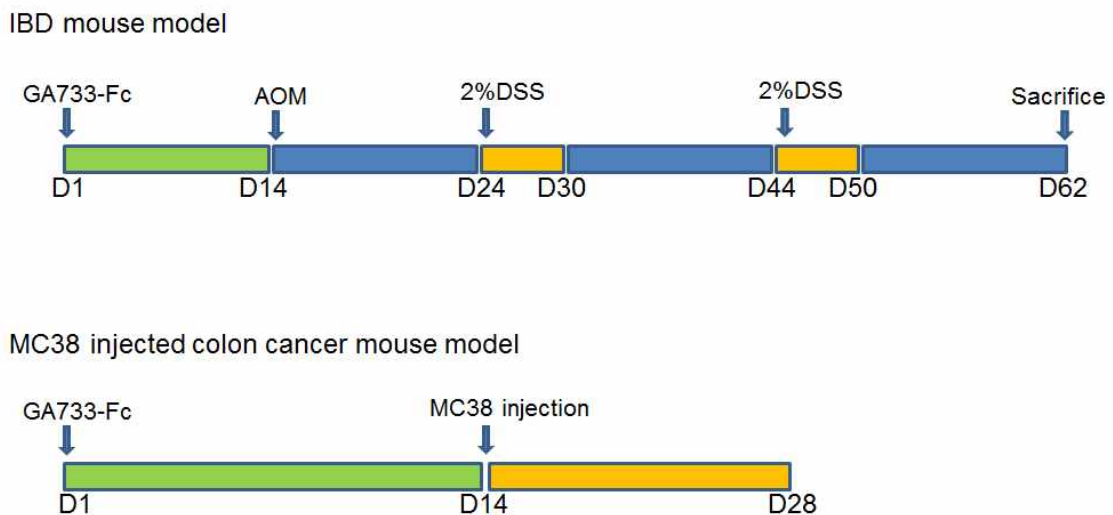


그림 80. IBD 마우스 모델 및 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 항암/항염증 효능검증 실험 일정.

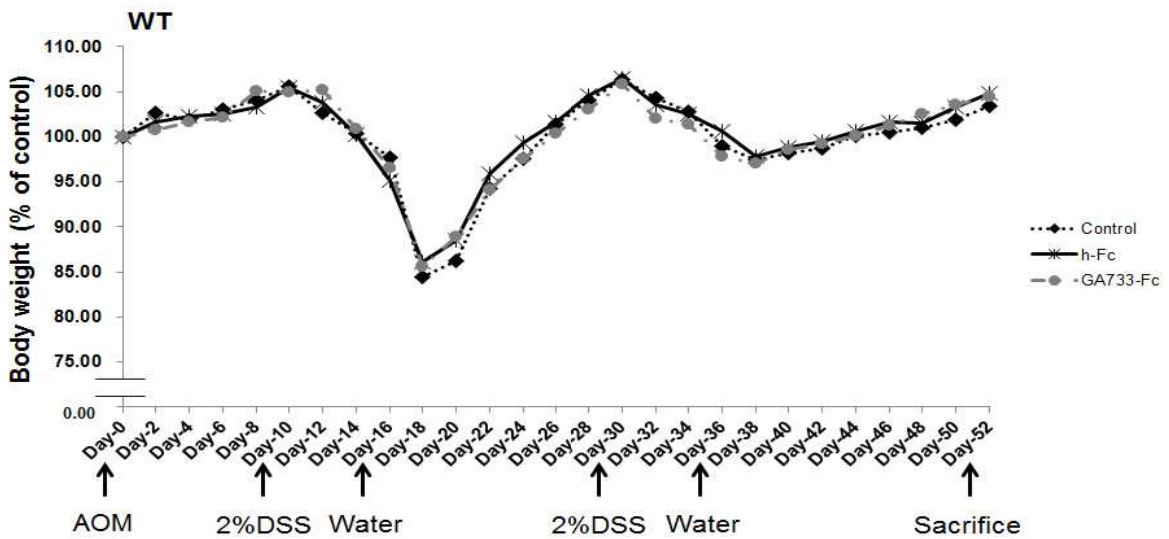
2) IBD 마우스 모델을 이용한 식물유래 GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질 TREM2에 의한 체액성, 세포매개면역 및 점막면역기능 분석

- IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc 및 신기능성 수용체단백질인 TREM2에 의한 항염효능을 알아보하고자 WT 및 TREM2 과발현 마우스에 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 후 AOM과 DSS를 이용하여 IBD를 유도하였음. 이후 IBD 마우

스 모델의 체중 변화 및 질환지표분자 변화, 대장의 길이 변화 및 대장조직의 손상 변화를 확인하였음.

- 그 결과 DSS에 의해 IBD가 유도되면 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹의 체중이 급격히 감소하며, IBD 질환지표분자 역시 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 급격히 증가됨을 확인하였음. 체중 감소의 경우 WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹이 큰 폭으로 감소하였으며, WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 그룹 모두 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹과의 차이는 보이지 않았음. IBD 질환지표분자 역시 WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹이 크게 증가하였으며, WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 그룹 모두 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹과의 차이는 보이지 않았음(그림 81).

(A)



(B)

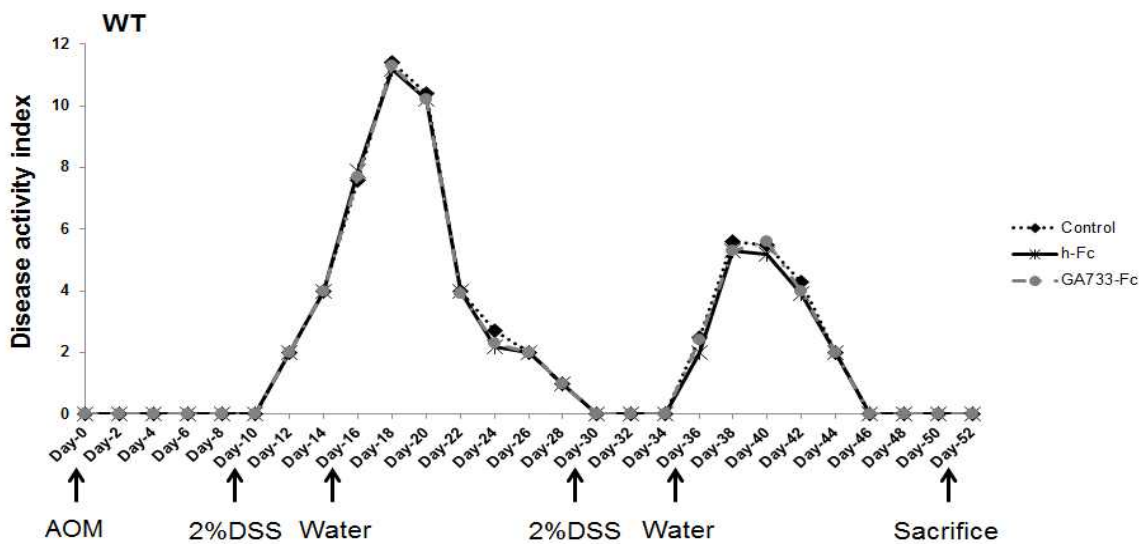
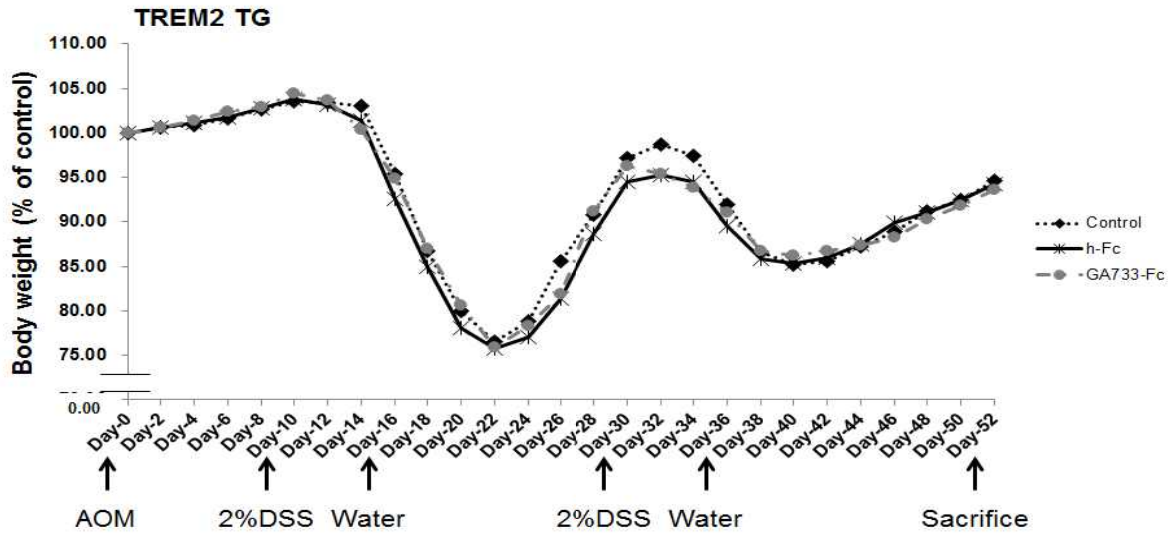


그림 81. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 마우스 체중 및 IBD 질환지표분자 변화 분석(continued).

(C)



(D)

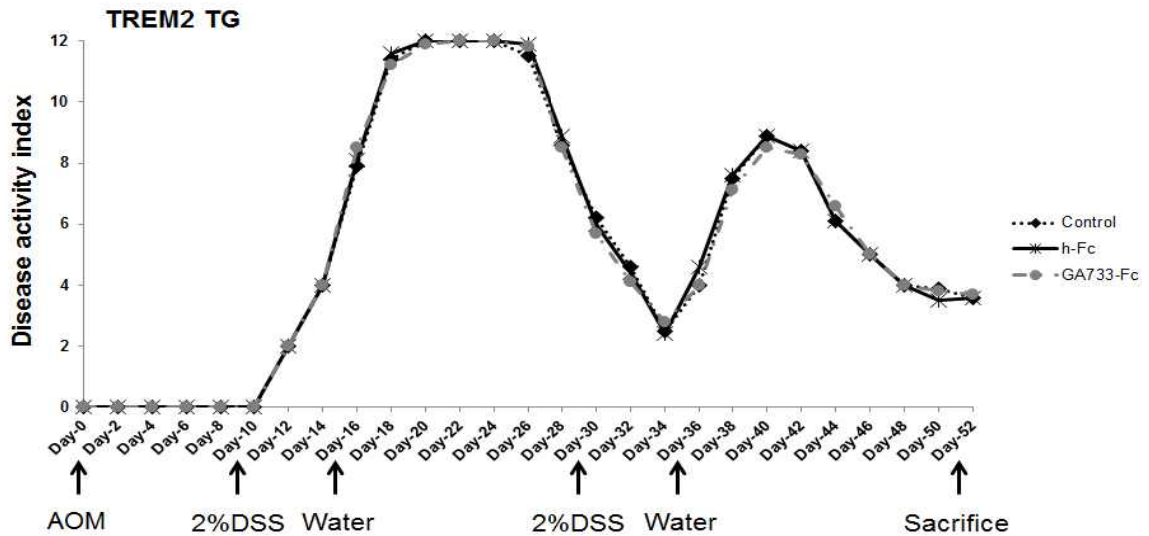


그림 81. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 마우스 체중 및 IBD 질환지표분자 변화 분석.

- 대장의 길이변화 관찰한 결과, IBD가 유도되면 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 대장의 길이가 감소되며, WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스의 대장의 길이가 크게 감소하였음. WT IBD 마우스 모델 중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 경우 대장의 길이가 다소 회복됨을 관찰하였으며, TREM2 TG IBD 마우스 모델의 경우 큰 차이를 보이지 않았음(그림 82. A,B).
- H&E 염색법을 이용하여 대장조직의 손상을 관찰한 결과, IBD 유도시 WT 및 TREM2 TG 마우스 모두 대장조직이 손상되었음을 관찰하였으며, WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델에 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹 모두 대장조직의 손상이 일부 회복됨

을 확인함(그림 82. C).

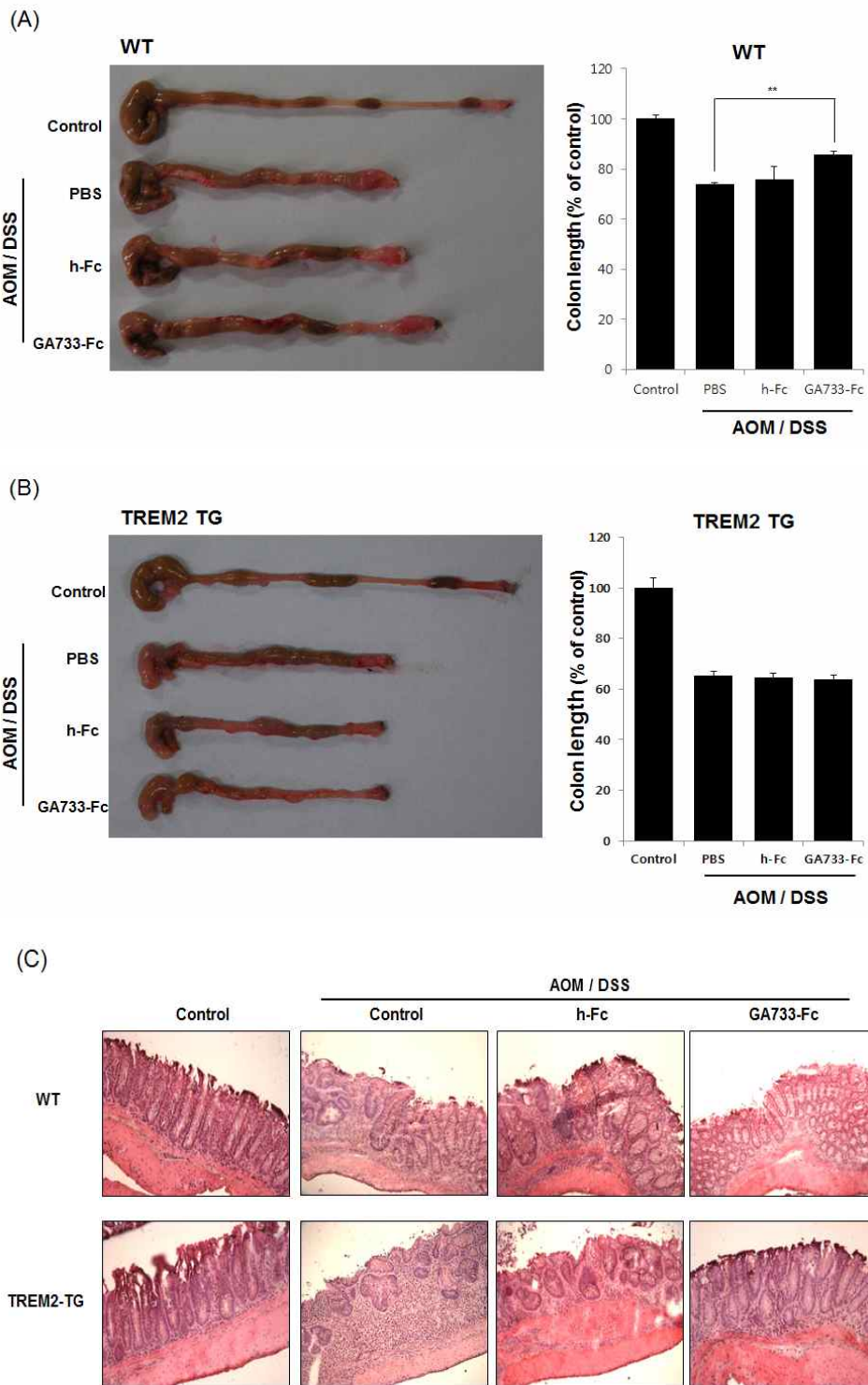


그림 82. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 대장의 길이 및 대장조직의 손상 변화 확인.

- 이 결과를 바탕으로 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc 및 신기능성 수용체단백질인 TREM2의 과발현에 의해 IBD가 조절됨을 알 수 있었고, 이는 식물유래 표적단백질 및 신

기능성 수용체단백질이 면역세포들의 분화, 발달 및 활성화에 관여함으로써 나타나는 결과로 사료됨.

- 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 항염기능을 확인하고자, IBD 마우스 모델의 대장 및 mesenteric lymph node(MLN), 비장으로부터 세포를 분리하여 염증관련 유전자들의 발현변화를 RT-PCR을 이용하여 확인하였음.
- 그 결과, WT 및 TREM2 TG 마우스에 IBD가 유도되면 염증유발유전자인 IL-1 β , IL-17, TNF- α , TGF- β 의 유전자 발현이 증가되었으며, WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹에서 그 발현이 더욱 증가됨을 관찰하였음. 또한 WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델에 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 염증유발유전자의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었음(그림 83).

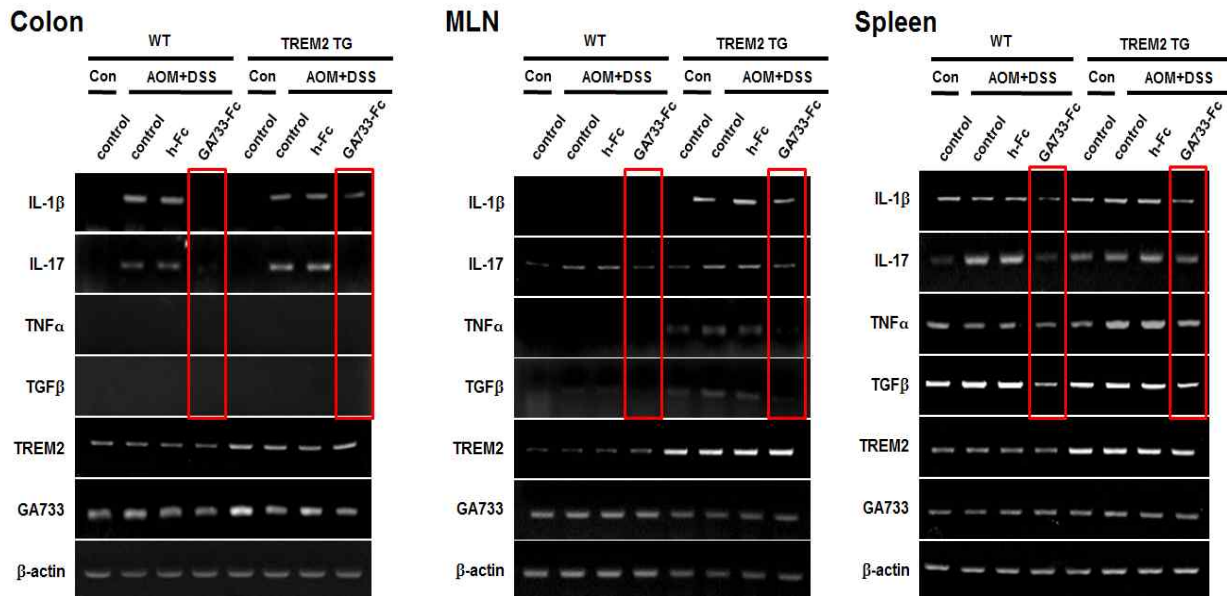


그림 83. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 염증유발유전자들의 유전자 발현변화 확인.

- 이 결과를 통해 IBD가 유도되면 염증유발유전자들의 발현이 증가됨을 알 수 있었고, 이는 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 그 발현이 조절됨을 알 수 있었음.
- IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 수용체단백질 TREM2에 의한 면역세포의 활성을 확인하고자 위의 IBD 마우스 모델로부터 대장 및 mesenteric lymph node(MLN), 비장, 복강의 세포를 분리한 후 유세포분석기를 이용하여 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell, NK cell, CD8⁺ regulatory T cell, 과립세포(Granulocyte), 대식세포(Macrophage)의 변화를 관찰하였음.
- 그 결과, WT 마우스 및 TREM2 TG 마우스 그룹에 IBD가 유도되면 비장의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell이 감소되며, WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹의 CD4⁺

및 CD8⁺ T cell이 더 많이 감소됨을 확인하였음. WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델에 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 경우 WT IBD 마우스 그룹은 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell에 큰 변화를 관찰하지 못하였지만, TREM2 TG IBD 마우스 모델의 경우 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell이 증가됨을 관찰하였음(그림 80. A). NK cell의 경우 IBD가 유도되면 WT 마우스에서는 큰 차이를 보이지 않았지만, TREM2 TG 마우스의 경우 NK cell이 증가됨을 확인하였음. WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델에 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 WT IBD 마우스 그룹은 큰 차이를 보이지 않았지만, TREM2 TG IBD 마우스 그룹의 경우 NK cell이 다소 감소됨을 관찰함(그림 84. B).

- 대장 및 MLN에서 CD8 regulatory T cell을 확인한 결과, IBD가 유도되면 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 CD8 regulatory T cell이 감소되었지만, WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델에 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서의 CD8 regulatory T cell의 변화는 관찰되지 않았음(그림 84. C,D).

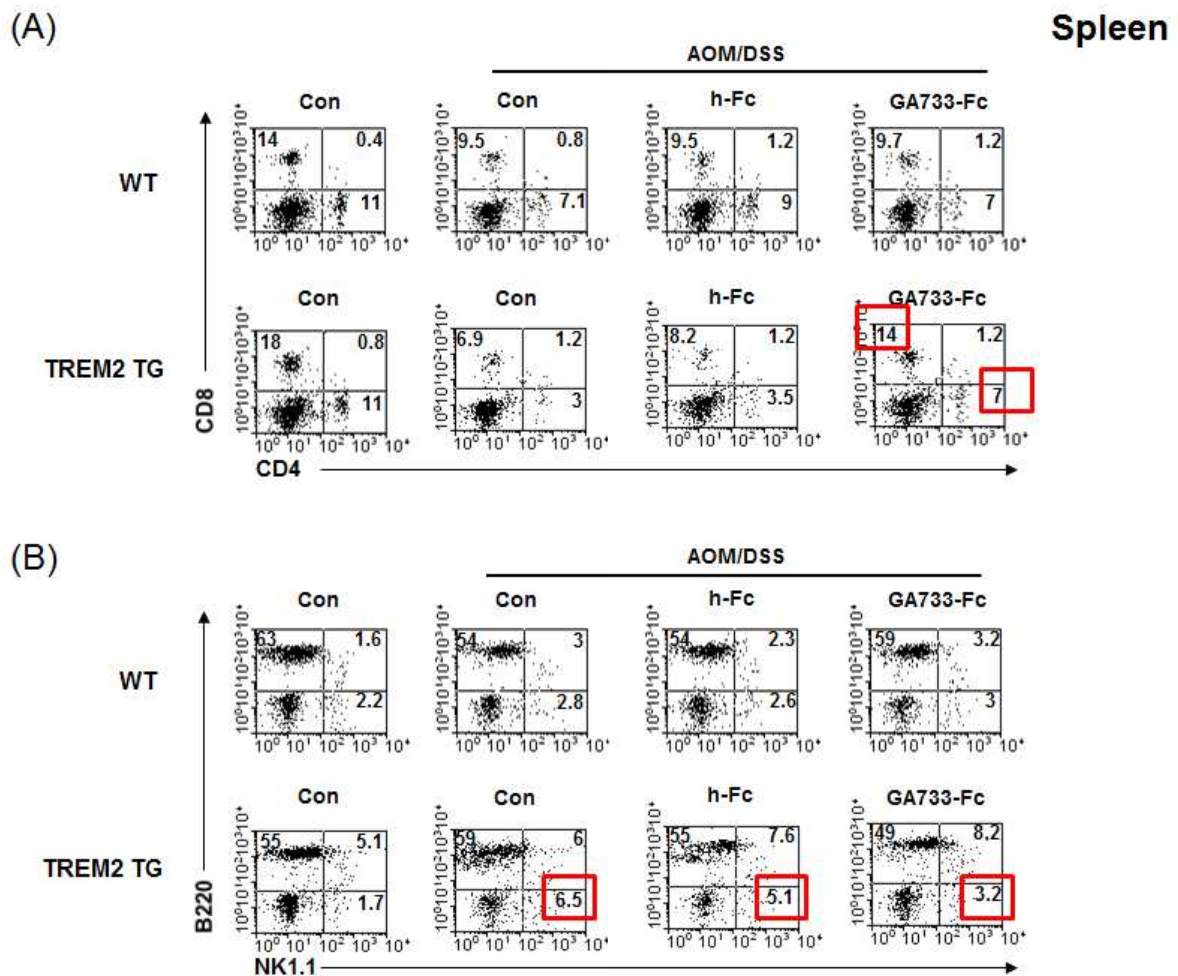
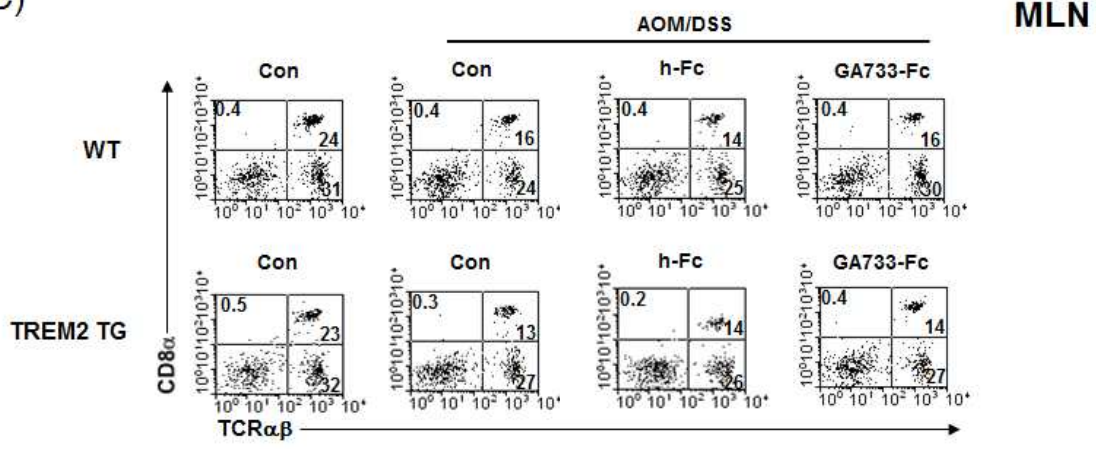


그림 84. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 T cell들 및 NK cell의 변화 확인(continued).

(C)



(D)

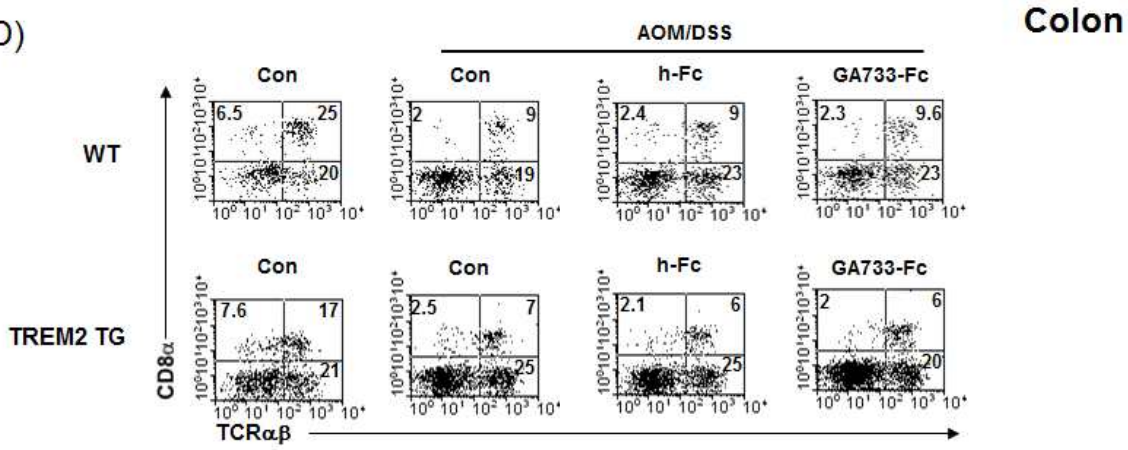


그림 84. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 T cell들 및 NK cell의 변화 확인.

- 이 결과를 통해 IBD가 유도되면 WT과 TREM2 TG 마우스에서 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell, CD8 regulatory T cell이 감소됨을 알 수 있었음. 반면 NK cell의 경우 TREM2 TG 마우스에서 증가됨을 통해 신기능성 수용체단백질인 TREM2에 의해 NK cell의 활성이 조절되는 것으로 사료됨. 또한 IBD 마우스 모델에 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc를 경구투여한 그룹 중 WT IBD 마우스 모델의 경우 IBD 유도 시 감소된 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell, NK cell, CD8 regulatory T cell의 변화에 큰 영향을 미치지 않지만, TREM2 TG IBD 마우스 모델에서 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell 모두 증가시킴을 알 수 있었음. 이는 IBD 유도시 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질이 면역세포들 중 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell과 NK cell의 활성을 조절함을 알 수 있었음.
- IBD를 유도한 TREM2 TG 마우스 모델 중 식물유래 표적단백질을 경구투여한 그룹에서 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell이 증가됨을 통해 체액성 면역세포인 과립세포와 대식세포의 변화를 확인하고자 대장 및 MLN으로부터 세포를 분리하여 유세포분석기를 이용하여 체액성 면역세포들의 변화를 분석하였음.

- 그 결과 WT과 TREM2 TG 마우스 모두 IBD 유도 시 대조군과 비교하여 MLN 및 대장의 채액성 면역세포가 모두 증가되었으며, 특히 WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스의 채액성 면역세포가 크게 증가하였음. WT IBD 마우스 모델 중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 경우 채액성 면역세포의 변화에 차이를 보이지 않았지만, TREM2 TG IBD 마우스 모델의 경우 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 채액성 면역세포가 다소 감소되었음(그림 85). 이에 대장 및 MLN에서 활성화된 과립세포 및 대식세포의 변화를 확인한 결과, IBD 유도 시 WT 및 TREM2 TG 마우스 모두 과립세포 및 대식세포의 활성이 증가되었으며, WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스에서 면역세포들의 활성이 증가되어 있음을 관찰하였음. 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 경우 WT IBD 마우스 모델과 TREM2 TG IBD 마우스 모델 모두 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았음(그림 86).

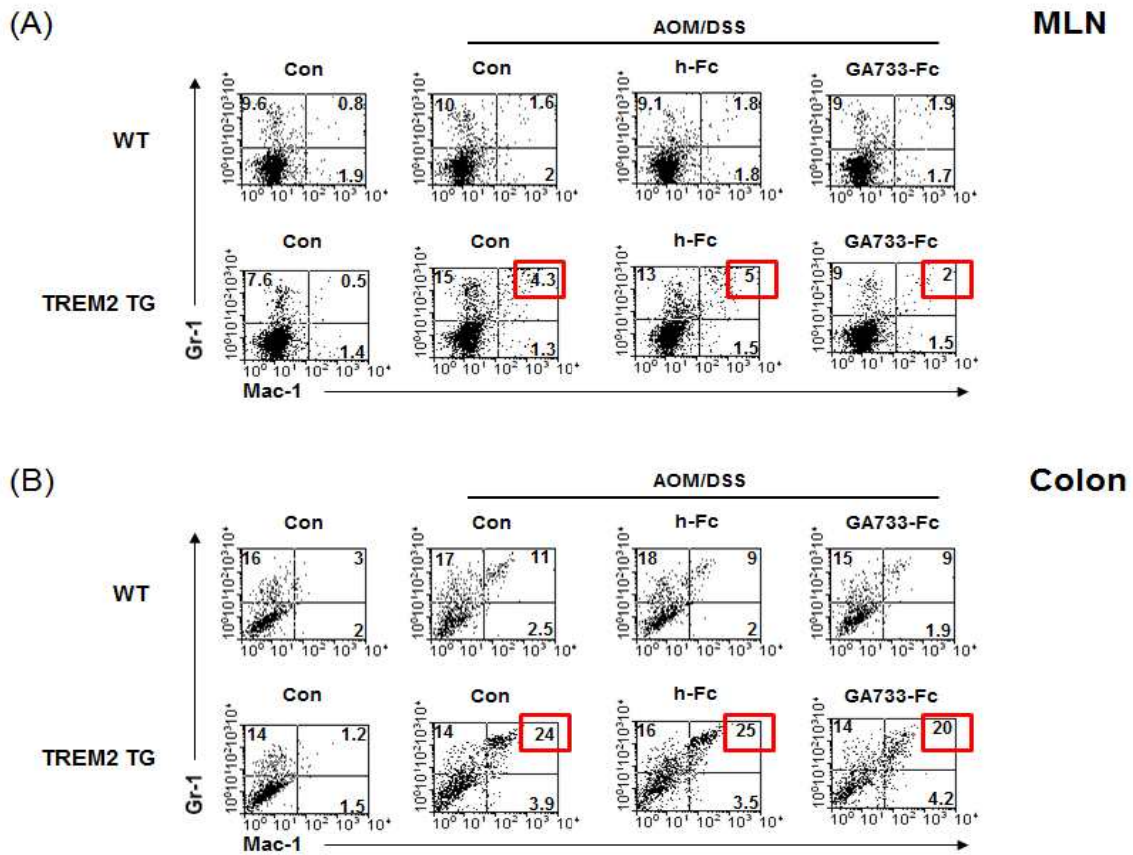


그림 85. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 채액성 면역세포들의 변화 확인.

- 이 결과를 바탕으로 IBD가 유도되면 대장 및 MLN 조직의 과립세포 및 대식세포의 수가 증가하고, WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스가 크게 증가함을 알 수 있었음. 또한 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc를 경구투여한 마우스 그룹 중 TREM2 TG IBD 마우스 모델의 과립세포 및 대식세포가 다소 감소하였지만, 활성화된 과립세포 및 대식세포는 차이를 보이지 않았음을 통해 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해

체액성 면역세포의 활성이 조절되었음을 알 수 있었음. 대식세포는 대표적인 항원제시세포로 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 활성이 증가된 대식세포에 의해 CD8⁺ T cell 및 CD4⁺ T cell의 활성이 증가된 것으로 사료됨.

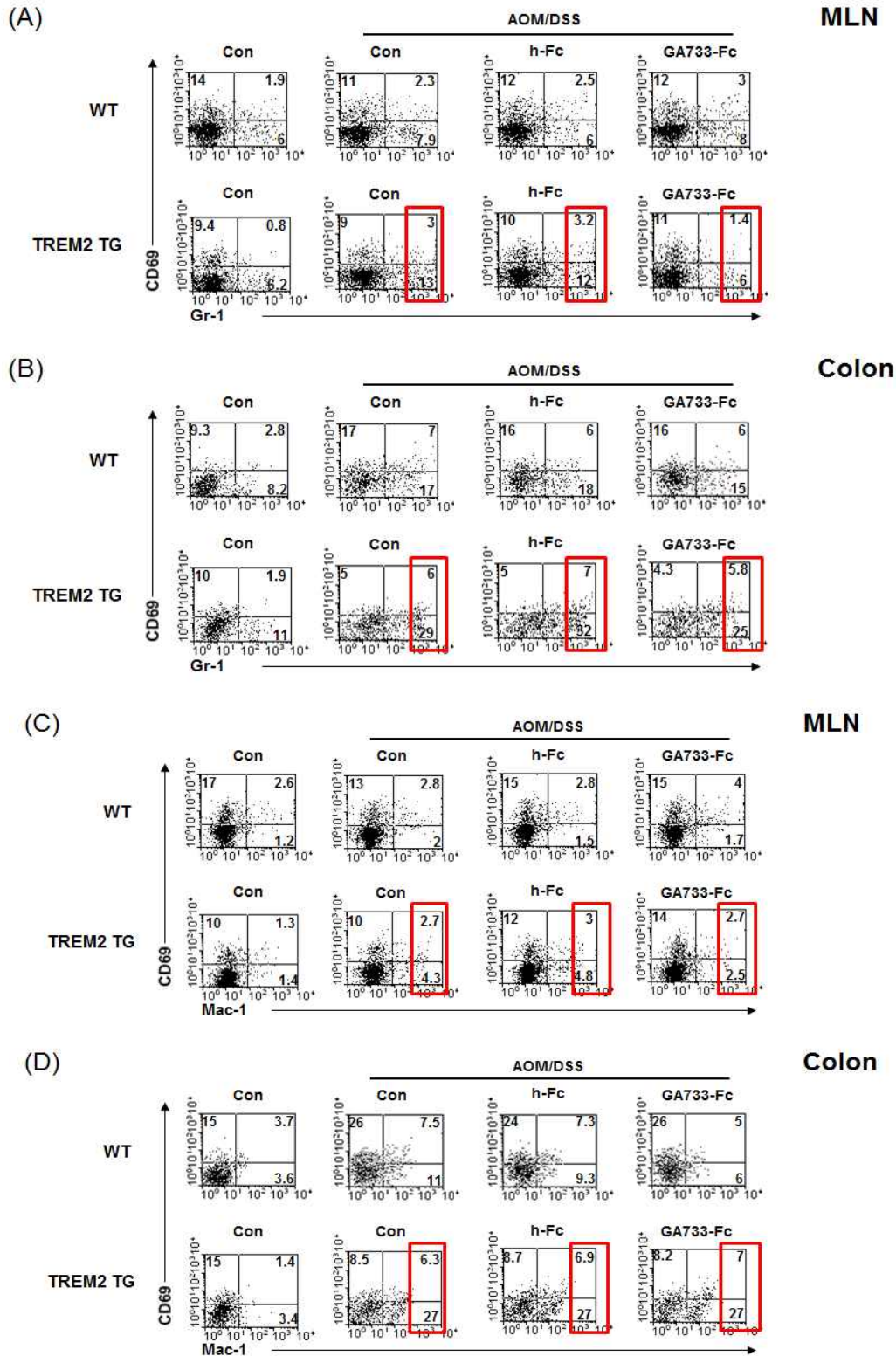


그림 86. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 Granulocyte 및 대식세포의 활성 확인.

- IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 증가된 CD8⁺ T cell 과 NK cell의 세포활성변화를 확인하고자 비장으로부터 분리한 CD8⁺ T cell 및 NK cell을 이용하여 세포독성능 시험을 통해 대장암 세포주인 MC38 cell의 암세포 killing 능력을 확인하였음.
- 그 결과, CD8⁺ T cell의 경우 WT 및 TREM2 TG IBD 모델에서 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 CD8⁺ T cell의 암세포 killing 능력이 가장 높게 나타났으며, WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스의 CD8⁺ T cell의 암세포 killing 능력이 현저히 증가되었음(그림 87. A,B). NK cell의 경우 역시 WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 NK cell의 암세포 killing 능력이 가장 높게 나타났으며, WT 과 비교하여 TREM2 TG 마우스의 NK cell의 암세포 killing 능력이 다소 증가됨을 확인함(그림 87. C,D).

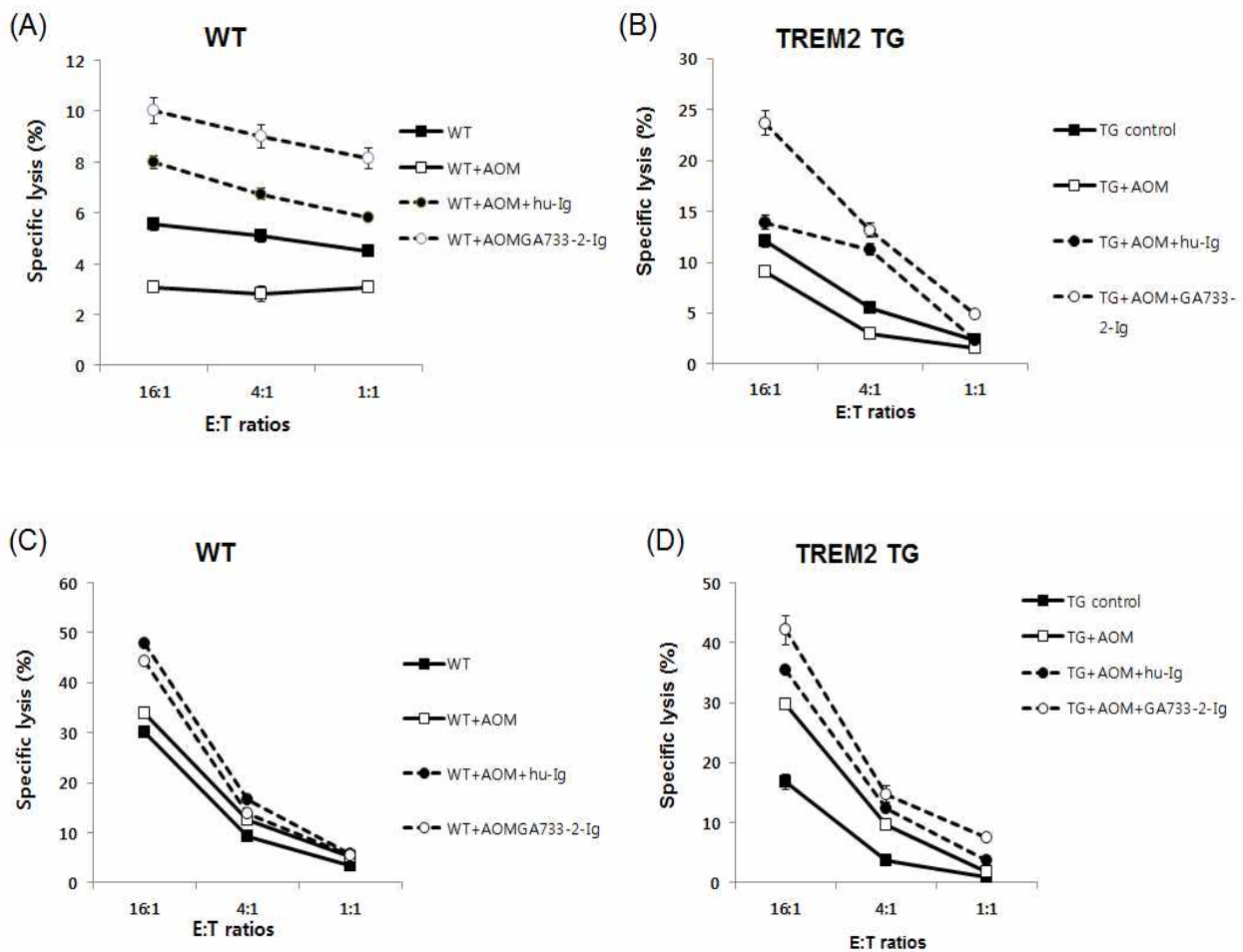


그림 87. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 CD8⁺ T cell 및 NK cell의 세포독성능의 변화 확인.

- 이 결과를 통해 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 CD8⁺ T cell 및 NK cell의 활성이 조절되며 암세포 killing 능력 역시 조절됨을 확인할 수 있었음.
- 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 항체생산 기능을 확인하고자 위

의 IBD 마우스 모델로부터 fecal extract를 얻어 ELISA assay를 수행하여 IgA의 양을 확인함.

- 그 결과, IBD 유도 시 WT 및 TREM2 TG 마우스 모두 대조군과 비교하여 총 IgA 생산이 크게 증가 되었으며, WT IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 경우 총 IgA 생산에 큰 차이를 보이지 않았지만, TREM2 TG IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 경우 총 IgA 생산이 감소하였음. 이에 식물유래 표적단백질에 특이적인 IgA 양을 확인한 결과, IBD 유도 시 WT 및 TREM2 TG 마우스 모두 대조군과 비교하여 GA733에 특이적 IgA 양이 다소 증가되었으며, 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 마우스 그룹에서 WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델 모두 식물유래 표적단백질에 특이적인 IgA 양이 크게 증가하였음(그림 88).

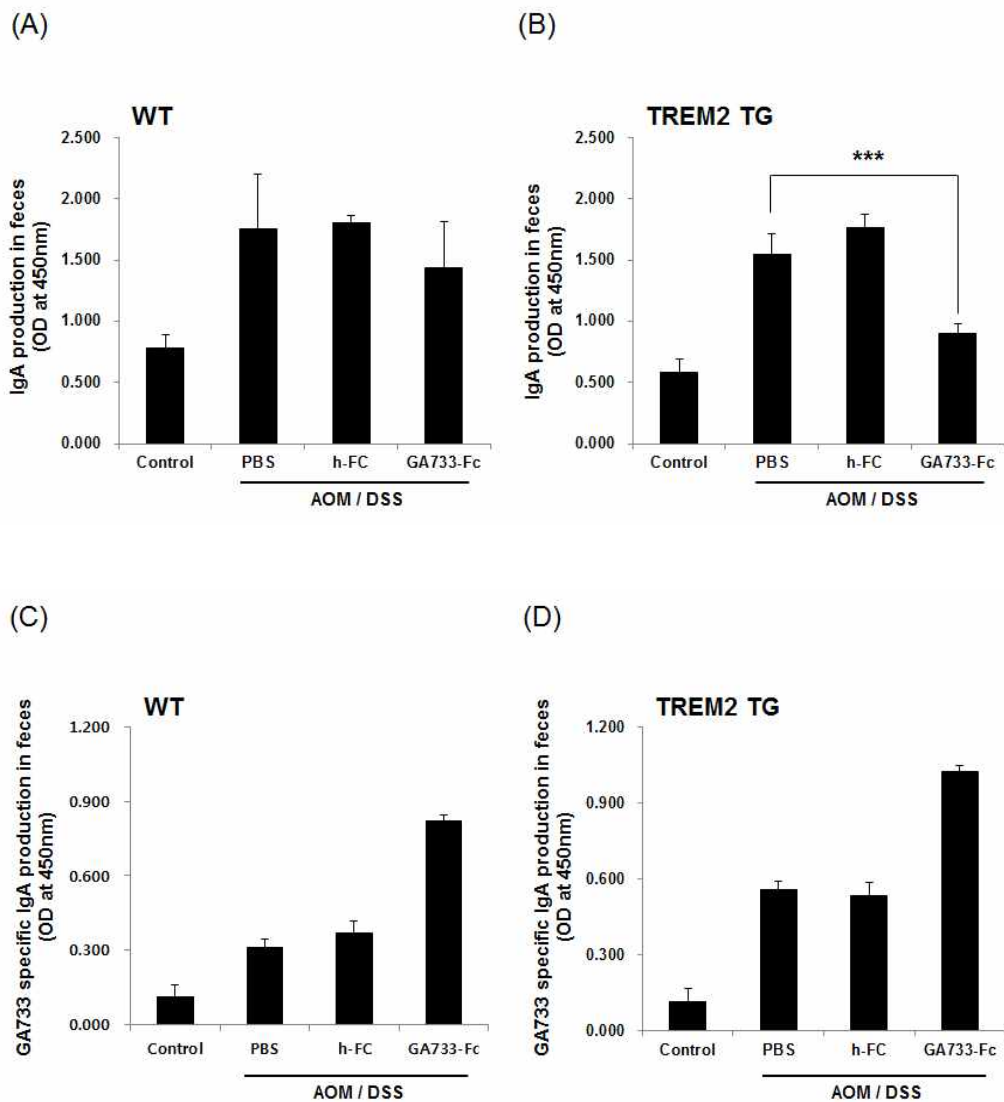


그림 88. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 항체(IgA)생산 기능 확인.

- 위 결과를 바탕으로 마우스 복강으로부터 세포를 추출하여 B cell의 변화를 관찰함. 그 결

과 WT 및 TREM2 TG 마우스 모두 IBD 유도에 의해서 IgA를 생산하는 B cell의 차이를 보이지 않았지만, WT 및 TREM2 TG 마우스 모두 IBD 마우스 모델 중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 IgA를 생산하는 B cell의 수가 증가함. 또한 활성화된 B cell의 변화를 관찰한 결과, WT 및 TREM2 TG 마우스 모두 IBD 유도에 의해서 활성화된 B cell의 차이는 보이지 않았지만, WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스의 활성화된 B cell이 증가되어 있음을 확인함. WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델 중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서는 WT 및 TREM2 TG 모두 표적단백질에 의한 변화는 관찰되지 않음(그림 89).

- 이 결과를 통해 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 B cell의 활성화 및 IgA 생산능력이 조절됨을 알 수 있었으며, 식물유래 표적단백질에 특이적인 IgA 생산능력이 증가됨을 알 수 있었음.

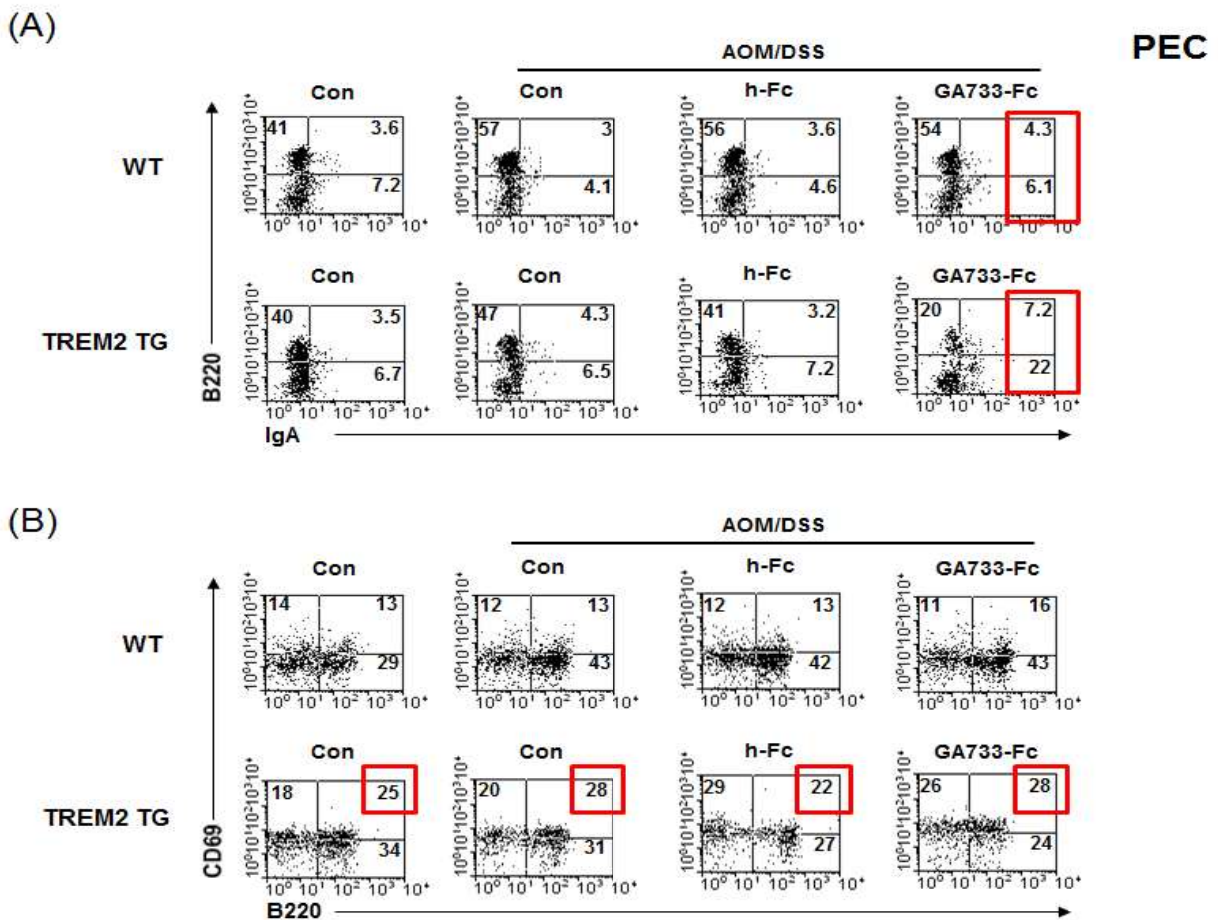


그림 89. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 B cell의 변화 확인.

- 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 IBD 유도시 면역세포들의 활성화 및 항염기능이 증가됨을 통해 면역세포와 관련된 전사활성인자의 변화를 확인하고자 IBD 마우스 모델의 비장으로부터 세포를 분리한 후 RT-PCR을 이용하여 전사활성인자들의 유전자발현 변화를 확인하였음.

- 그 결과 WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델들 중 식물유래 GA33-Fc를 경구투여한 그룹에서 T cell의 활성화에 관여하는 전사활성인자인 TCF가 증가되었고, NK cell의 활성화에 관여하는 전사활성인자인 T-bet이 증가됨을 확인함. 또한 체액성 면역세포들의 활성화에 관여하는 전사활성인자인 AP-1 역시 증가됨을 알 수 있었음(그림 90).
- 이 결과를 통해 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 면역세포들의 활성이 증가되고 이를 통해 전사활성인자인 TCF, T-bet 및 AP-1의 발현이 증가되었음을 알 수 있음.

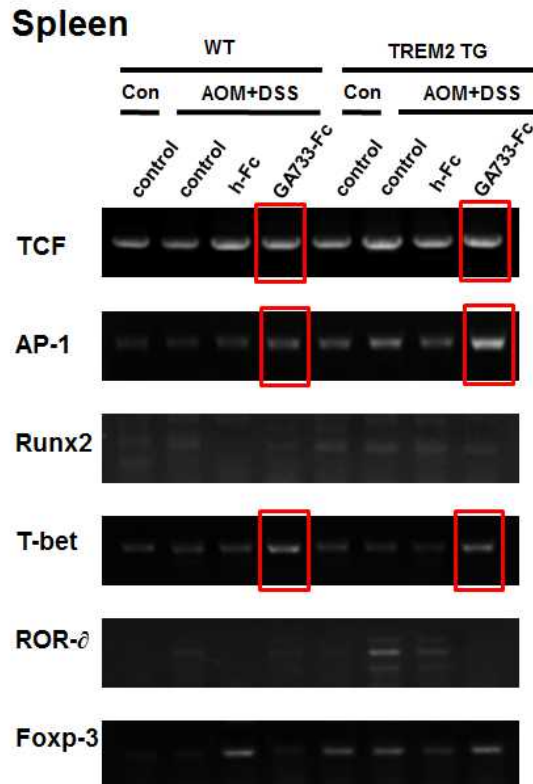


그림 90. IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포들의 전사활성인자 조절 확인.

- 위 결과들을 종합하여 불 때 만성염증성장질환 모델인 IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 초기 체액성 면역세포들의 활성이 조절되고 이후 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell, NK cell, B cell등의 여러 면역세포들의 활성이 조절되어 점막면역기능 증진을 통한 항염기능을 보이는 것으로 생각되어짐. 이를 통해 만성염증성장질환에서 체액성 면역세포 및 세포매개성 면역세포의 활성 조절에 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질이 중요하게 작용되어 짐을 밝힘으로써 향후 대장염에서의 항염기능 분석에 중요한 자료가 될 것으로 사료됨.

3) 대장암 마우스 모델을 이용한 식물유래 GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질 TREM2에 의한 항암기능 분석

- AOM 및 DSS를 이용하여 IBD를 유도한 결과 대장의 말단부분이 종양화가 됨을 관찰하였음. 이는 발암물질 중 하나인 AOM과 IBD유발 물질인 DSS를 함께 처리함으로써 관찰되는 결과로 사료됨. 이에 대장의 말단 부분을 해부하여 육안적 검사를 실시하였음.
- 그 결과 AOM/DSS 그룹에서 대조군과 비교하여 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 종양이 생성됨을 관찰하였으며, 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 종양의 수가 감소됨을 확인함. 또한 WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹에서 다소 종양의 수가 다소 감소됨을 알 수 있었음(그림 91).
- 이는 IBD 유도 시 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 항염 효능 뿐만 아니라 항암 효능을 보여주는 결과로 생각되어짐.

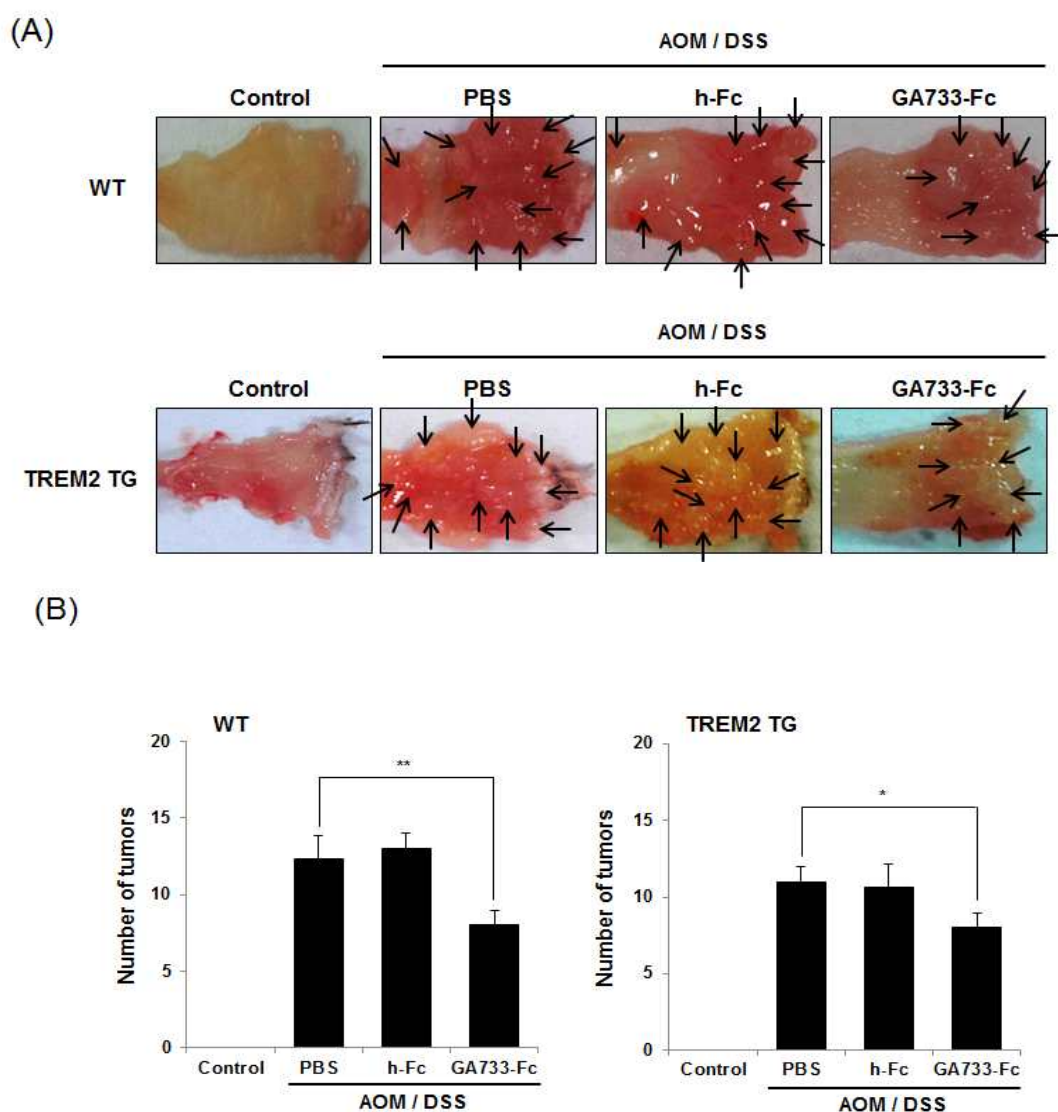


그림 91. AOM/DSS에 의해 유도된 대장의 종양변화 확인.

- 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc 및 신기능성 수용체단백질인 TREM2에 의한 항암/항염기능을 알아보기 위하여 WT 및 TREM2 과발현 마우스에 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 후 마우스 대장암 세포주인 MC38 cell을 피하주사 하였음. 식물

유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 항암 효능을 확인하고자, 마우스 대장암 세포주인 MC38 cell을 피하주사한 후 14일간 tumor volume을 측정하였음.

- 그 결과 WT 마우스의 경우 대조군과 비교하여 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 tumor volume이 감소되었고, TREM2 TG 마우스의 경우 대조군과 비교하여 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 다소 감소되었음. 하지만 TREM2 TG 마우스 그룹에서 WT 마우스 그룹과 비교하여 tumor volume이 현저하게 감소됨을 관찰할 수 있었음. 이는 WT 마우스 그룹의 식물유래 표적단백질을 경구투여한 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹의 tumor volume이 전체적으로 감소되었고, 이를 통해 신기능성 수용체단백질인 TREM2의 과발현으로 인한 효과에 의해 식물유래 표적단백질의 효과가 다소 적어 보이는 것으로 생각됨(그림 92).

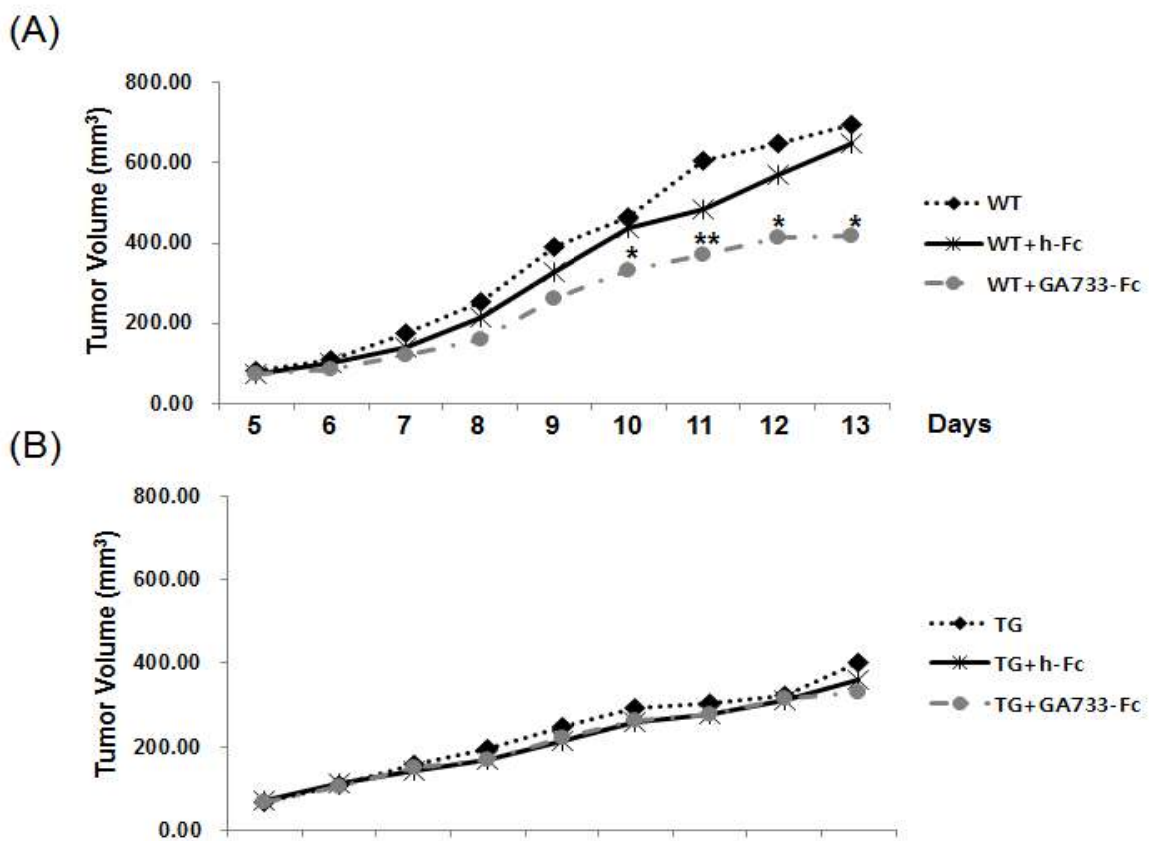


그림 92. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 대장암 volume 감소 확인.

- 마우스 대장암 세포주인 MC38 cell을 피하주사 후 14일 쯤 마우스를 희생하여 Tumor mass를 관찰한 결과 역시, WT 마우스 그룹에서 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 마우스 그룹의 tumor mass가 감소하였으며, TREM2 TG 마우스 그룹에서 식물유래 Ga733-Fc를 경구투여한 마우스 그룹의 tumor mass는 다소 감소됨을 관찰함. 이 결과 역시 WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹에서 tumor mass가 현저히 감

소됨을 확인할 수 있었음(그림 93).

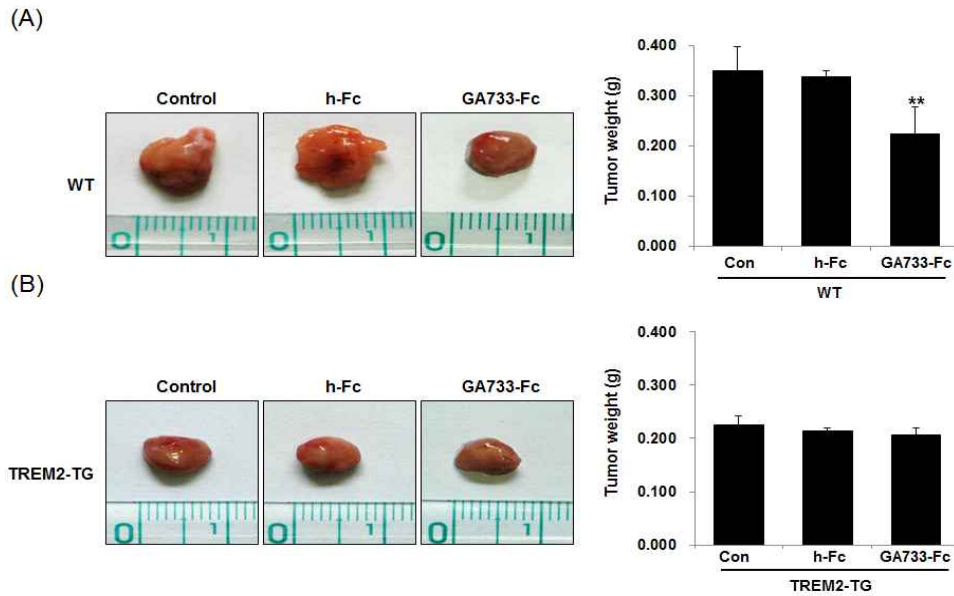


그림 93. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 대장암 mass 감소 확인.

- 이 결과를 바탕으로 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 tumor volume 및 mass가 감소됨을 알 수 있었고, 이는 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질이 대장암에 항암효과를 보일 것으로 사료됨.
- 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 항암효과를 확인하기 위하여 대장암 마우스 모델의 암조직으로부터 세포를 분리한 후 유세포분석기를 이용하여 세포사멸을 확인함.
- 그 결과 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 암세포의 세포사멸이 증가하였고, 특히 TREM2 TG 마우스의 암세포가 WT과 비교하여 세포사멸이 증가됨을 확인함(그림 94).

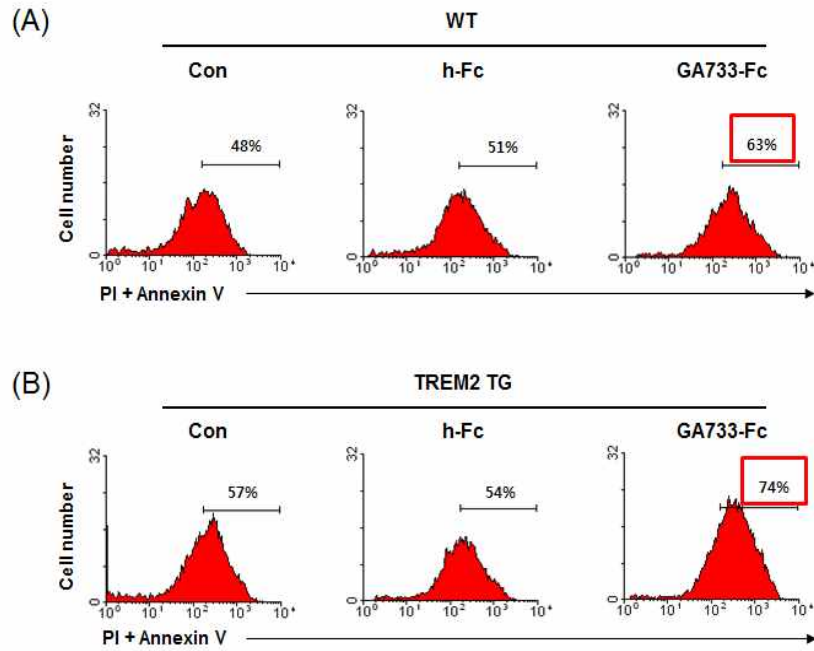


그림 94. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 대장암 세포의 세포사멸 감소 확인.

- 이에 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현을 확인한 결과, WT 및 TREM2 TG 대장암 마우스 모델중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 세포사멸을 유도하는 유전자인 Caspase 3, Caspase 9 및 BAX의 발현이 증가되었고, 세포사멸을 억제하는 유전자인 Bcl2의 발현이 다소 감소하였음(그림 95).
- 이를 통해 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 암세포의 세포사멸을 유도하여 항암기능을 보임을 알 수 있었음.

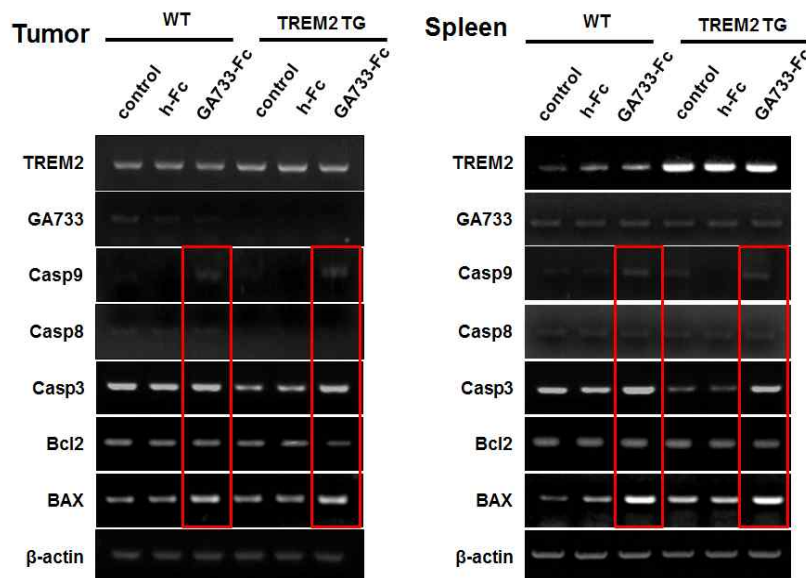


그림 95. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 대장암 세포의 세포사멸 유전자발현 변화 확인(continued).

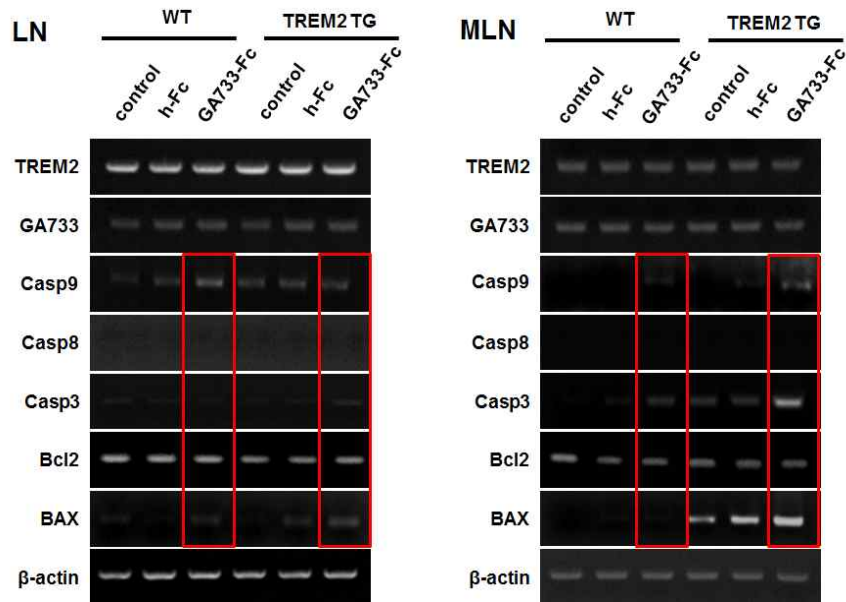


그림 95. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 대장암 세포의 세포사멸 유전자발현 변화 확인.

- 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 암세포의 전이 억제기능을 확인하고자 대장암 마우스 모델의 tumor조직으로부터 세포를 분리한 후 RT-PCR을 이용하여 암세포의 전이에 관여하는 유전자 발현의 변화 및 migration assay를 이용한 암세포 전이능력을 확인하였음.
- 그 결과, 대장암 마우스 모델에서 WT 및 TREM2 TG 마우스 모두 암세포 전이에 관여하는 MMP2 및 MMP8, MMP9의 유전자발현의 차이를 보이지 않았으며, 식물유래 Ga733-Fc를 경구투여한 그룹 역시 차이를 보이지 않았음. 하지만 migration assay를 통한 암세포의 전이능력을 확인한 결과, WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스에서 암세포 전이능력이 다소 감소하였으며, WT 및 TREM2 TG 대장암 마우스 모델 중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹 모두 대조군과 비교하여 암세포 전이능력이 다소 감소되었음을 확인함(그림 96).

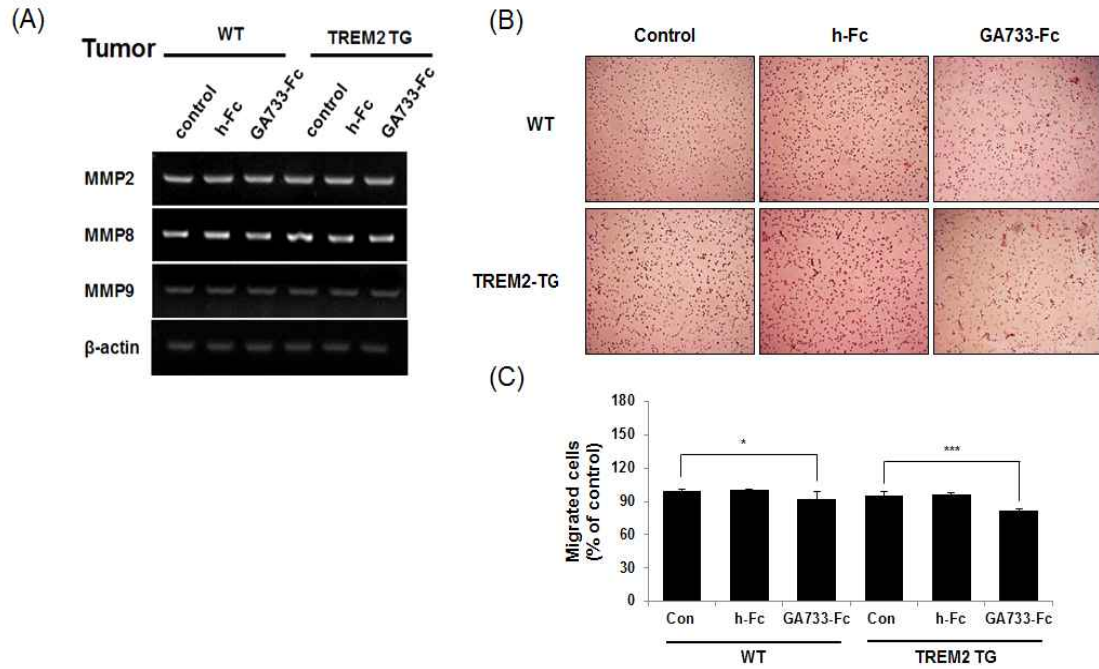


그림 96. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 대장암 세포의 전이능력 변화 확인.

- 이를 통해 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 암세포의 전이능력이 감소함을 알 수 있었음.
- 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포의 항원제시기능을 확인하고자, 대장암 마우스 모델의 tumor, 비장, lymph node(LN), MLN으로부터 세포를 분리하여 RT-PCR을 MHC class II 유전자들의 발현을 RT-PCR로 확인함.
- 그 결과 WT 및 TREM2 TG 대장암 마우스 모델 모두 MHC class II 유전자들의 발현이 관찰되었고, 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 MHC class II의 발현이 크게 증가되어 있음을 알 수 있었음. 하지만 WT 및 TREM2 TG 대장암 마우스 그룹 중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹간의 차이는 보이지 않았음(그림 97).
- 이 결과를 통해 식물유래 표적단백질에 의해 대장암 마우스 모델에서 항원제시 기능이 증진됨을 알 수 있었음.

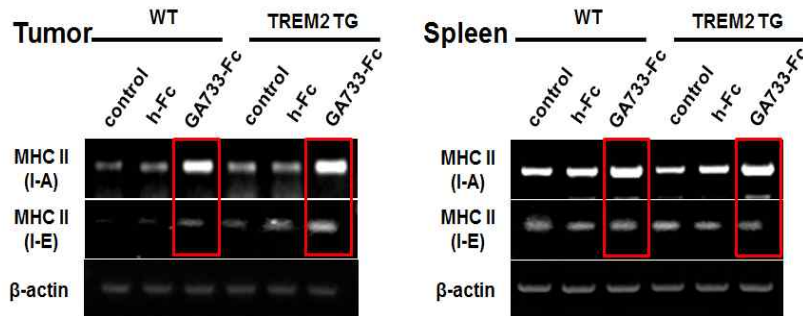


그림 97. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포의 항원제시능력 확인(continued).

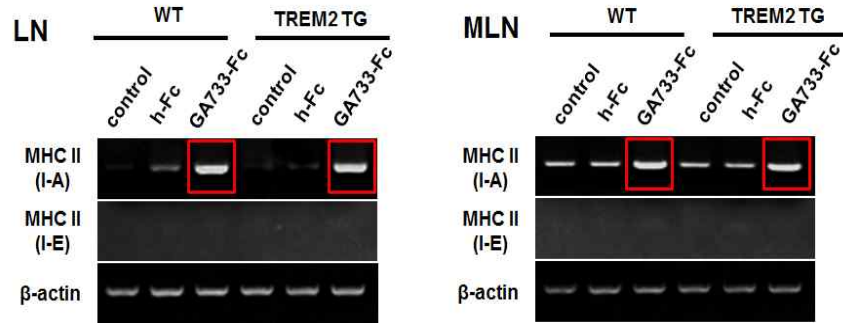


그림 97. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포의 항원제시능력 확인.

- 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포의 활성화 및 침윤능을 알아보하고자, 대장암 마우스 모델의 비장으로부터 세포를 분리한 후 invasion assay를 수행하였고, 비장, lymph node(LN), MLN, tumor, 복강 등으로부터 세포를 분리하여 유세포분석기를 이용하여 면역세포들의 변화 및 활성을 확인함.
- 그 결과 대장암 마우스 모델에서 WT 과 TREM2 TG 마우스 모두 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 비장세포의 침윤능력이 다소 증가됨을 관찰하였고, 특히 TREM2 TG 마우스의 경우 WT 마우스와 비교하여 전반적으로 비장세포의 침윤능력이 증가되어 있음을 알 수 있었음(그림 98).

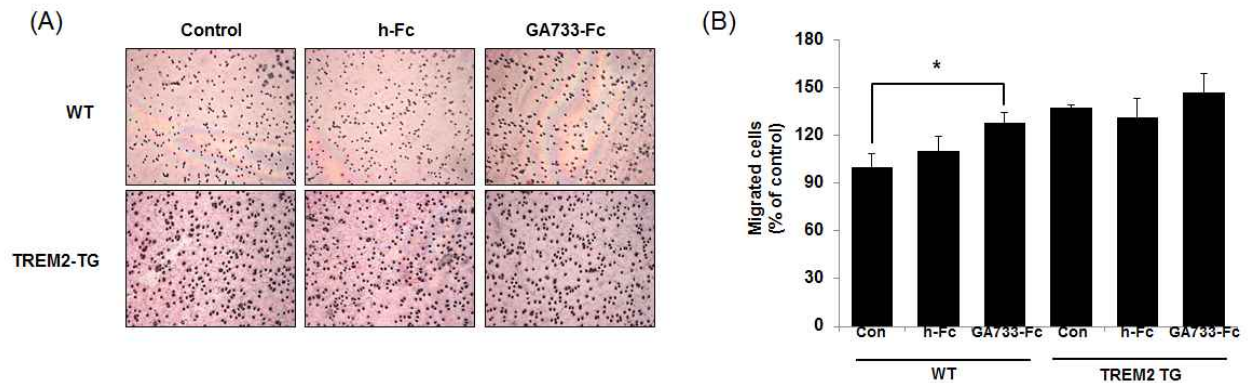


그림 98. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 대장암 세포의 세포사멸 감소 확인.

- 또한 대장암 마우스 모델의 MLN 및 비장, LN, tumor로부터 세포들을 분리하여 면역세포들의 변화를 확인한 결과, CD4⁺ T cell의 경우 WT 마우스와 TREM2 TG 마우스 간의 큰 차이를 보이지 않았지만 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 활성화된 CD4⁺ T cell이 다소 증가됨을 확인하였음. 특히 WT 및 TREM2 TG 대장암 모델 중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 tumor조직에서 그 활성이 가장 많이 증가되었음(그림 99).

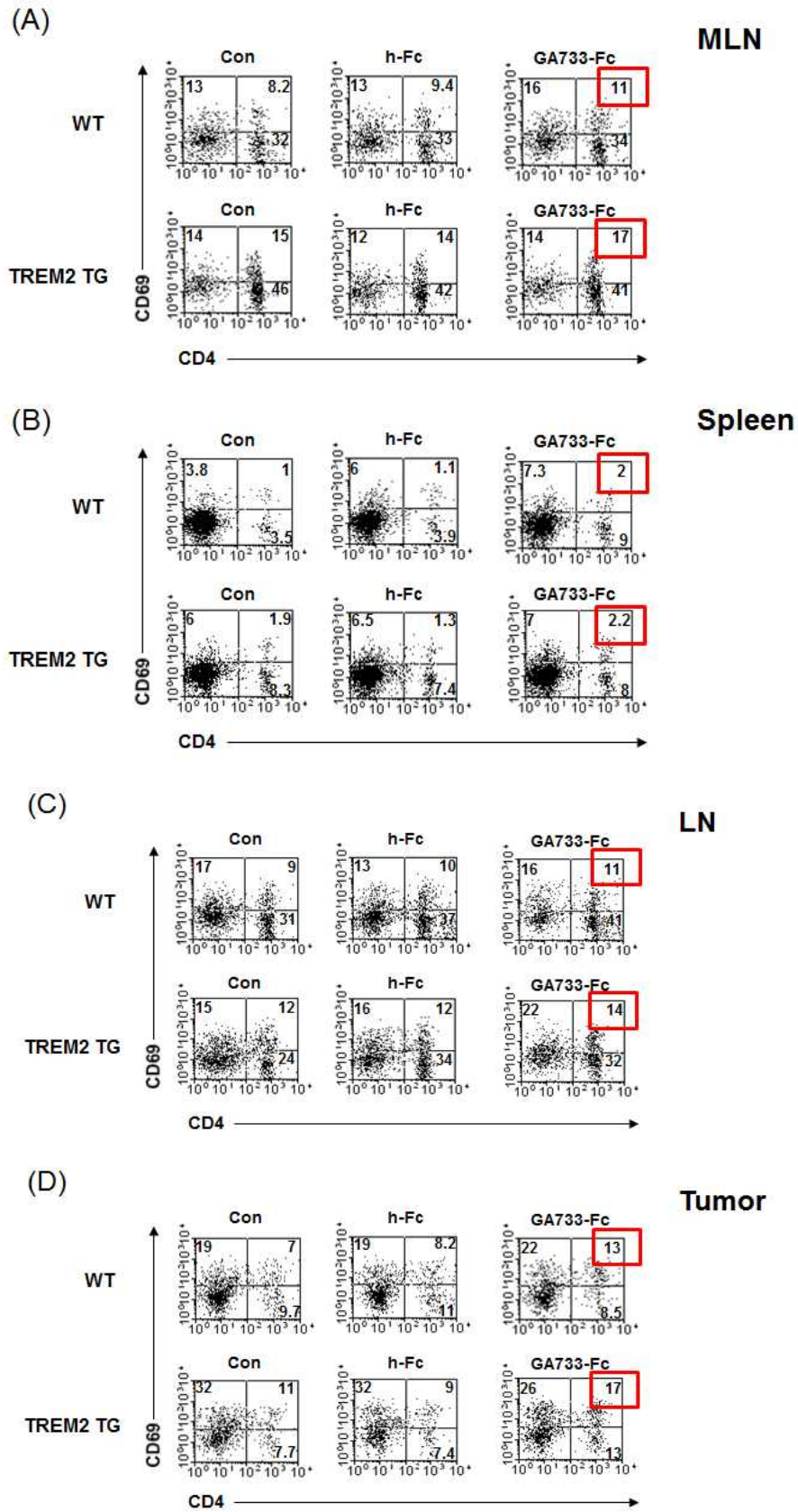


그림 99. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 CD4⁺ T cell의 활성화증가 확인.

- CD8⁺ T cell의 경우 WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스에서 활성화된 CD8⁺ T cell이 크게 증가되었으며, 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 역시 WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스에서 활성화된 CD8⁺ T cell이 증가하였음. 특히 TREM2 TG 마우스의 LN 및 tumor에서 활성화된 CD8⁺ T cell이 크게 증가하였으며, 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹 역시 크게 증가되었음(그림 100).

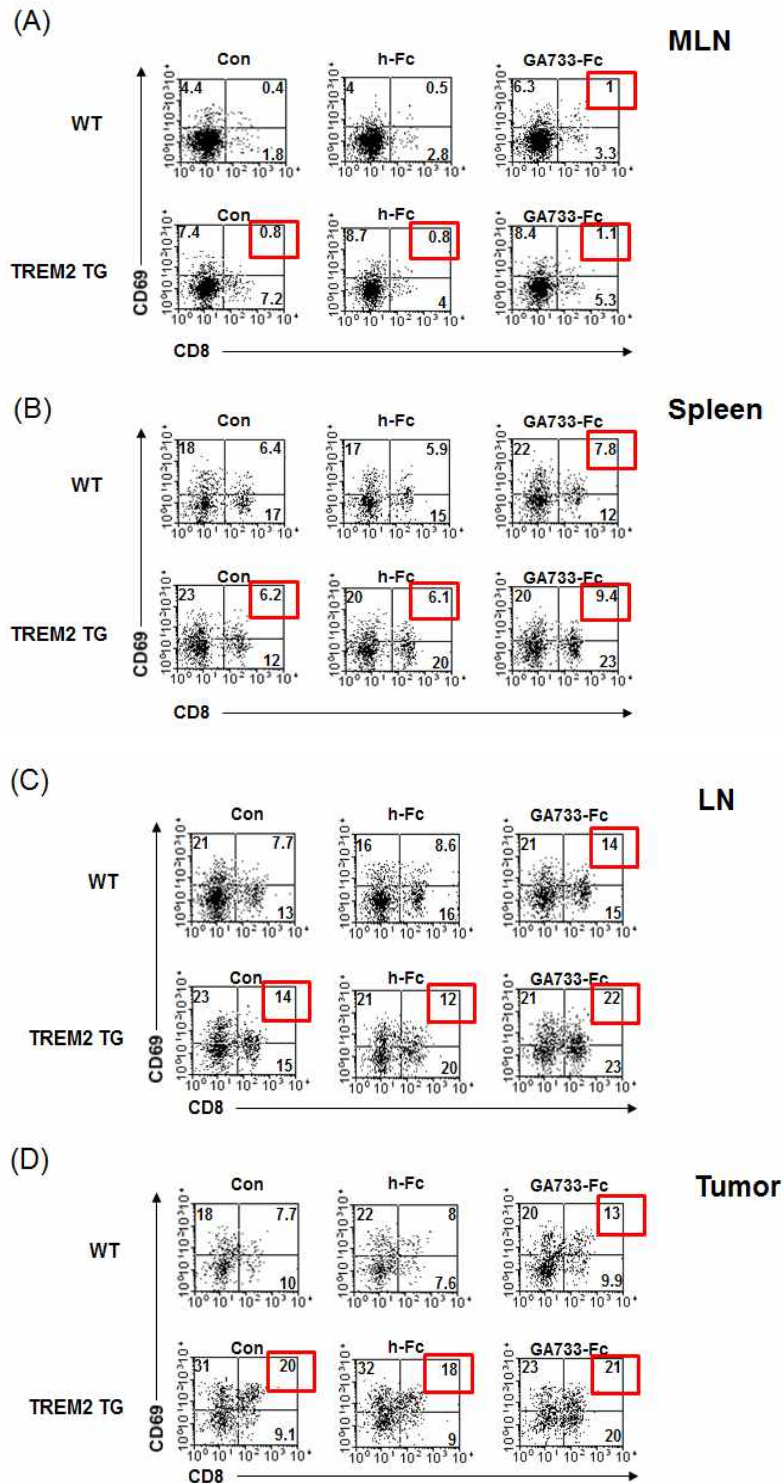


그림 100. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 CD8⁺ T cell의 활성화증가 확인.

- NK cell의 경우 비장과 MLN에서는 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹간의 큰 차이를 보이지 않았으며, 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹 역시 차이를 보이지 않았음. 하지만 LN 및 tumor에서 WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹의 활성화된 NK cell이 증가하였으며, 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 대조군과 비교하여 활성화된 NK cell이 증가됨을 관찰되었음(그림 101).

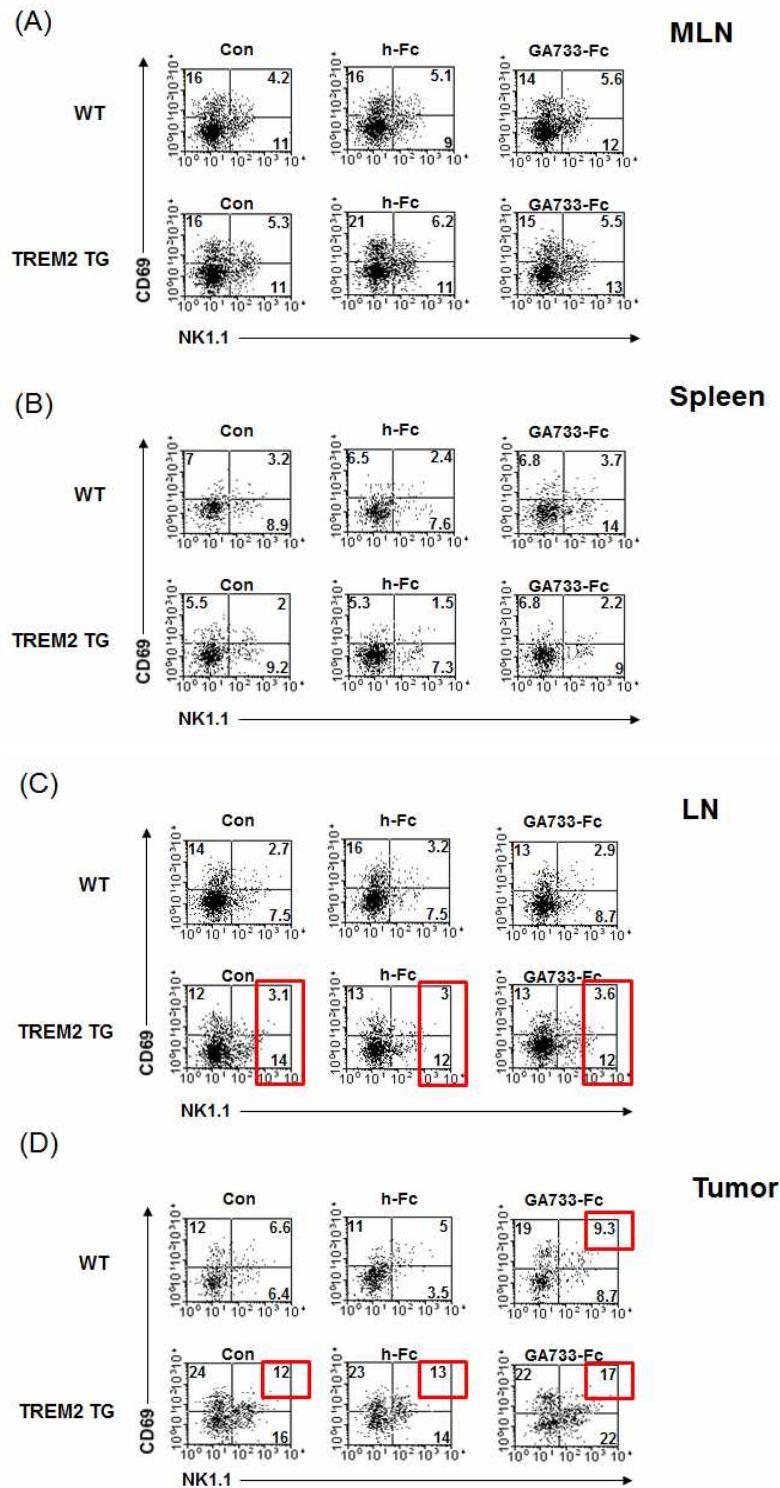


그림 101. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 NK cell의 활성화증가 확인.

- 이 결과를 통해 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell, NK cell의 활성화 및 침윤능력을 증진시켰으며, 활성이 증진된 면역세포들이 tumor로 이동하여 항암 효과를 보이는 것으로 사료됨.
- 위 결과를 통해 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 활성화된 CD8⁺ T cell 및 NK cell에 의해 항암효능을 확인하고자, tumor 및 비장, LN, MLN으로부터 세포를 분리하여 활성화된 CD8⁺ T cell 및 NK cell에 의해 조절되는 암억제관련유전자들의 발현 변화를 RT-PCR을 이용하여 확인하였고, 세포독성능 시험을 통해 NK cell의 암세포 killing 능력을 확인하였음.
- 그 결과, WT 및 TREM2 TG 대장암 마우스 모델 중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 활성화된 CD8⁺ T cell 및 NK cell이 분비하는 granzyme 및 perforin의 유전자 발현이 증가됨을 확인하였고, WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스가 크게 증가함을 확인함. 또한 CD8⁺ T cell 및 NK cell이 인식하는 MHC class I의 유전자 발현을 확인한 결과 역시 WT 및 TRME2 TG 대장암 마우스 중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 증가되었고, WT 마우스와 비교하여 TREM2 TG 마우스가 크게 증가함을 확인하였음(그림 102).

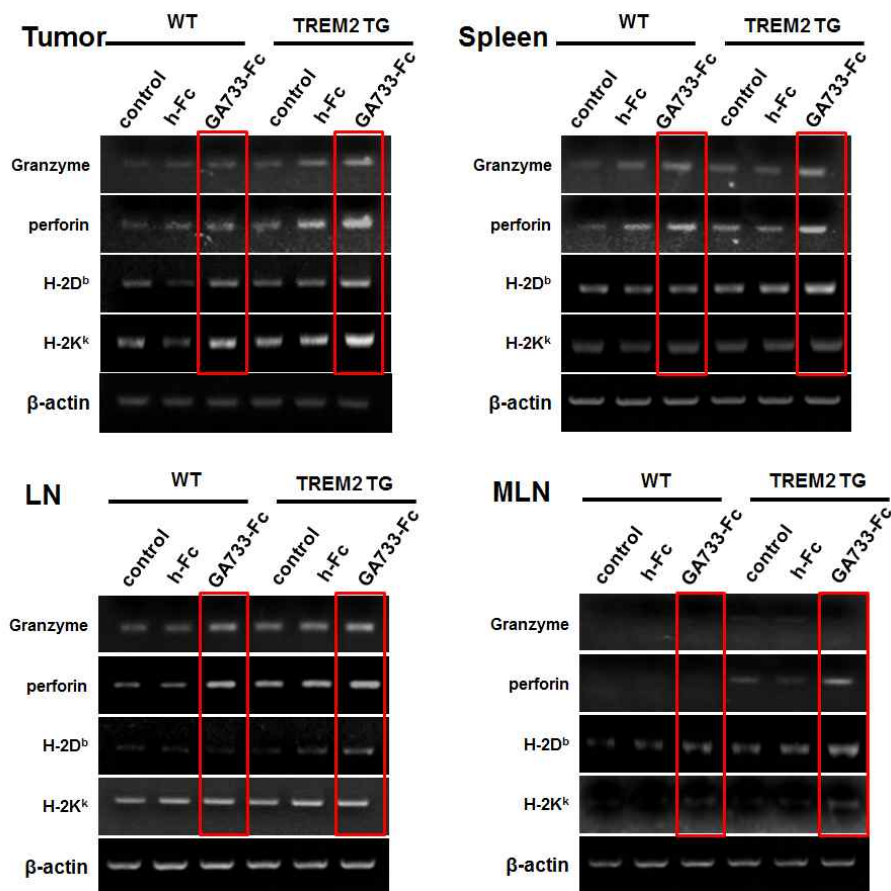


그림 102. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 암억제관련유전자발현 변화 확인.

- 또한 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체 단백질에 의해 활성이 증가된 NK cell의 암세포 killing 능력을 확인한 결과, WT 및 TREM2 TG 대장암 마우스 중 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 마우스 그룹에서 암세포 killing 능력이 증가되었고, WT 과 비교하여 TREM2 TG 마우스에서 NK cell의 암세포 killing 능력이 크게 증가되어 있음을 관찰하였음(그림 103).

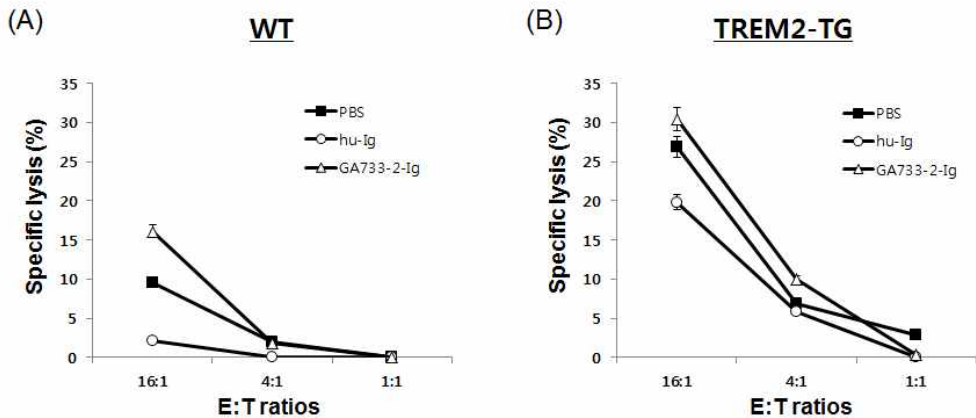


그림 103. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 NK cell의 암세포 killing 능력 확인.

- 이를 통해 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 CD8⁺ T cell 및 NK cell의 활성이 증가 되었으며, 활성화된 CD8⁺ T cell 및 NK cell에서 암억제유전자발현 역시 증가되었음을 알 수 있었음. 또한 활성화된 NK cell의 경우 암세포를 killing 하는 능력이 현저하게 증가되었음.

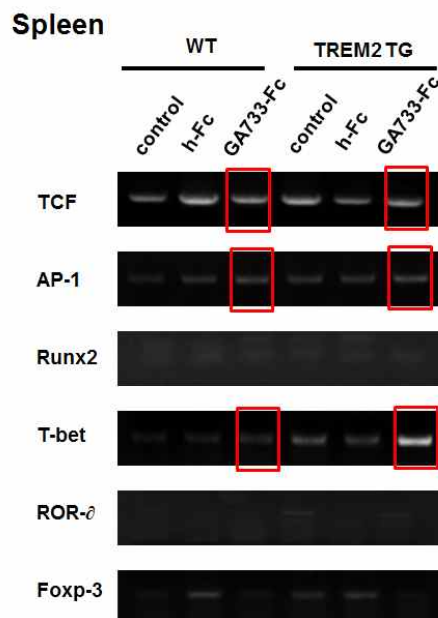


그림 104. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 전사활성인자들의 변화 확인.

- 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의한 면역세포들의 활성화 및 항암기능이 증가됨을 통해 면역세포와 관련된 전사활성인자의 변화를 확인하고자 대장암 마우스 모델의 비장으로부터 세포를 분리한 후 RT-PCR을 이용하여 전사활성인자들의 유전자발현 변화를 확인하였음.
- 그 결과 WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델들 중 식물유래 GA33-Fc를 경구투여한 그룹에서 T cell의 활성화에 관여하는 전사활성인자인 TCF가 증가되었고, NK cell의 활성화에 관여하는 전사활성인자인 T-bet이 크게 증가됨을 확인함. 또한 체액성 면역세포들의 활성화에 관여하는 전사활성인자인 AP-1은 다소 증가됨을 알 수 있었음(그림 104).
- 이 결과를 통해 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 T cell 및 NK cell들의 활성을 증진되어 전사활성인자인 TCF, T-bet 및 AP-1의 발현이 증가된 것으로 사료됨.
- 이 결과들을 종합하여 볼 때 대장암 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질에 의해 암세포의 volume 및 mass가 크게 감소됨을 알 수 있었으며, 이는 면역세포들의 활성이 증진됨을 통해 보여 지는 결과로 생각되어짐. 특히 CD8⁺ T cell 및 NK cell의 활성이 크게 증가됨을 알 수 있었고, 활성이 증가된 CD8⁺ T cell 및 NK cell에 의해 암세포를 killing함으로써 암세포 volume 및 mass가 감소되어진 것으로 사료됨.

3. 3차년도 세부연구수행 결과

1세부과제 : 대장암 항원-항체 재조합 단백질인 GA733-Fc 형질전환 식물의 대량재배를 통한 homozygous line의 seed bank 확보 및 대장암 예방용 수지상세포백신 효능 검증으로 예방용 재조합백신 실용화확립

(1) GA733-Fc with KDEL 대장암 백신 단백질을 발현하는 형질전환 식물을 대량 재배

- GA733-Fc with KDEL 형질전환 식물의 material 대량 확보를 위하여 비닐하우스에서 식물체 대량 생산 (그림 105).



그림 105. 대장암 항원-항체 재조합 단백질인 GA733-Fc 형질전환 식물의 대량재배 및 material 확보. 대량재배 및 material 확보를 위하여 넓은 재배 공간이 확보된 비닐하우스에서 식물체 대량 생산.

(2) 대장암 백신 단백질 GA733-Fc with KDEL을 생산하는 식물의 homozygous line seed bank 최적화

- 3차년도 과제수행을 위해 재배된 대장암 백신 단백질 GA733-Fc with KDEL의 형질전환 식물의 대량재배를 통한 homozygous line의 상업화목적의 seed bank 확보함(그림 106).



그림 106. GA733-Fc with KDEL 백신단백질 발현이 우수한 식물의 homozygous line seed 확보 및 seed bank 구축.

(3) 식물유래 의료용 단백질의 실용화 기반 기술 확립을 위한 대장암 백신 단백질 GA733-Fc with KDEL을 생산하는 식물의 잎 대량 확보

- 3차년도 과제수행을 위해 재배된 대장암 백신 단백질 GA733-Fc with KDEL 식물 잎의 대량확보를 통해 대량의 백신단백질 정제를 할 수 있는 materials 확보 함(그림 107).



그림 107. 식물유래 의료용 단백질의 실용화 기반 기술 확립을 위한 GA733-Fc with KDEL 백신단백질 발현 식물의 대량정제를 위해 식물 잎 대량 확보.

(4) Protein G affinity column을 이용한 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질 정제법 확립

- 정제된 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질을 동물유래 GA733-Fc와 SDS-PAGE를 통해 단백질의 순도를 비교 및 확인하였음(그림 108).

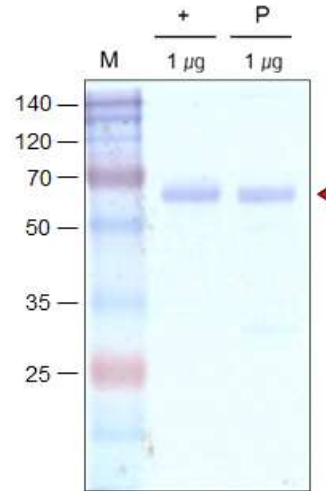


그림 108. 식물 정제법 확립 후 대량 확보된 형질전환 식물의 잎을 통해 GA733-Fc with KDEL 백신단백질의 대량정제결과. 동일한 양의 단백질 농도의 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질과 동물유래 GA733-Fc를 SDS-PAGE를 통해 비교 분석한 결과, 정제한 식물유래 백신단백질의 순도는 현재 상품화 되어있는 동물유래의 GA733-Fc와 거의 동일한 순도로 단백질 정제가 가능함을 확인함. M; protein marker, +; positive control (mammalian-derived GA733-Fc), P; purified plant-derived GA733-FcK.

(5) 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질의 면역활성 확인

-형질전환 식물로부터 정제된 GA733-Fc with KDEL 백신단백질이 항원으로서 기능을 가지는지 확인하기 위해 동물실험을 수행하였음(그림 109).

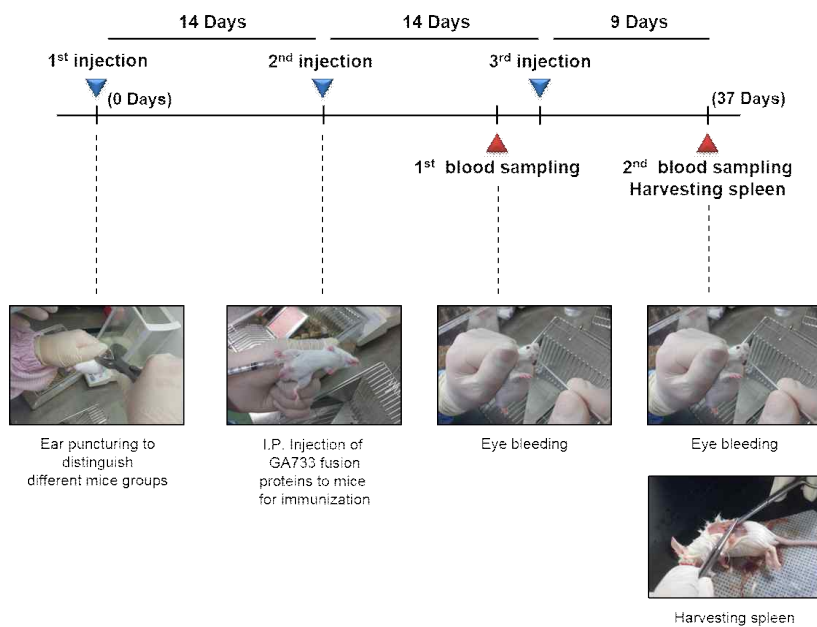


그림 109. 형질전환 식물로부터 정제된 GA733-Fc with KDEL 백신단백질이 항원으로서 기능을 가지는지 확인하기 위한 동물실험의 수행과정. 식물로부터 정제된

GA733-FcK와 대조군으로서 동물유래 GA733-Fc 단백질을 mouse에 복강주사 하였음. 총 3번의 복강주사를 실시하였고 마지막 항원 주입 후 9일 후에 mouse의 비장을 적출하여 백신단백질의 항원으로서의 면역활성을 분석함.

- 형질전환 식물로부터 정제된 GA733-Fc with KDEL 백신단백질이 항원으로서 기능을 가지는지 확인하기 위해 적출한 비장의 수지상세포 (dendritic cell)를 이용하여 germinal center (GC) B cell을 분석하였음(그림 110).

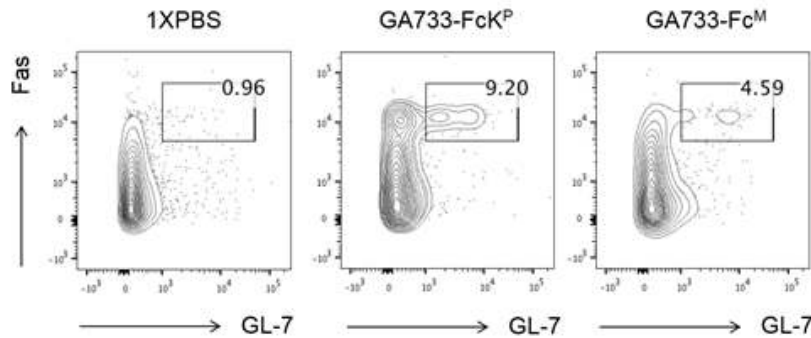


그림 110. Flow cytometry analysis을 통한 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질을 주입한 mouse의 비장의 수지상세포에서 germinal center (GC) B cell 분석 결과. Germinal center는 주로 T-cell dependent antigen immunization에 의해 분화되는 B cell들이 활성을 가질 수 있도록 B cell을 성숙시키는 구간으로 알려져있음. 대표적인 B cell activation marker Fas와 GL-7인자의 cell population percentage를 분석한 결과 식물에서 얻은 GA733-Fc with KDEL가 동물유래 GA733-Fc 보다 GC B cell이 더 많이 분화 되었음을 확인하였음. GA733-FcK^P; plant-derived GA733-Fc antigen, GA733-Fc^M; mammalian-derived GA733 antigen, 1xPBS; negative control.

- 형질전환 식물로부터 정제된 GA733-Fc with KDEL 백신단백질이 항원으로서 기능을 가지는지 확인하기 위해 mouse에서 적출한 비장의 NK cell을 이용하여 cytokine factor을 분석하였음(그림 111).

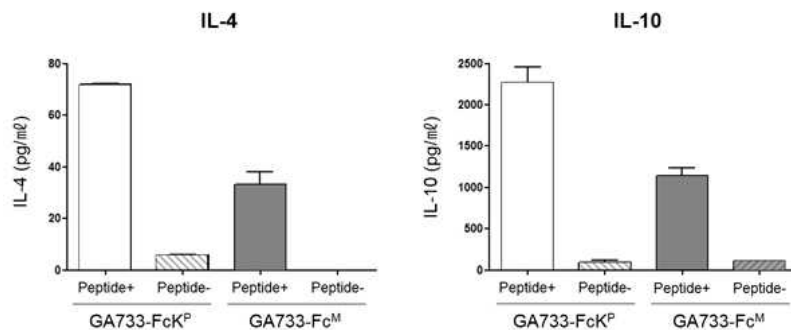


그림 111. Flow cytometry analysis을 통한 식물유래 GA733-Fc with KDEL 백신단백질을 주입한 mouse의 비장의 NK cell에서 cytokine factor 분석 결과. naive T cell과 백신단백질을 주입한 mouse 비장의 T cell을 공동 배양하여 이때 분비되는 전체

CD4⁺ T cell 인자들 중 Th2 cell의 분화에 관여하는 IL-4와 IL-10 cytokine 분석을 수행하였음. 분석 결과 식물에서 얻은 GA733-Fc with KDEL가 동물유래 GA733-Fc 보다 B cell 활성화에 관여하는 Th2 cell의 대표인자인 IL-4와 IL-10 cytokine이 더 분비 되었음을 것을 확인하였음. 이 결과를 통해 식물 유래의 백신 단백질이 B cell activation에 활성이 더 뛰어남을 확인하였음. GA733-Fc^P; plant-derived GA733-Fc antigen, GA733-Fc^M; mammalian-derived GA733 antigen.

제1협동과제: 당쇄화 개선을 통한 GA733-2-Fc의 치료효과를 극대화할 수 있는 기반기술 개발 및 독성 평가 검사

1. *XylT*와 *FucT* 유전자의 동시 knock-down 및 *GalT* 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc 단백질의 생산 및 분리정제

1) 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질의 생산 및 분리 정제

- *XylT*, *FucT* 유전자의 발현이 억제된 담배 식물체에서 당쇄화가 개선된 GA733-Fc 단백질을 생산하기 위해 pFGC5941/*XylT*-*FucT* RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포를 GA733-Fc 발현 벡터인 pBCTV/GA733-Fc-Sec 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포와 1:1로 혼합한 후 담배 식물체에 infiltration 방법으로 감염시키고 7일 동안 배양한 후 단백질 추출물을 확보하였고 GA733-Fc 단백질을 분리 정제하였음. 또한 galactose가 β-1,4 linkage로 연결된 당쇄화 구조를 지니는 GA733-Fc 단백질을 확보하기 위해 *GalT* 유전자가 클로닝된 pILTAB/*GalT* 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*을 pBCTV/GA733-Fc-Sec 벡터를 지니는 재조합 *Agrobacterium*과 혼합한 후 담배 식물체에 infiltration 방법으로 감염시켰고 GA733-2-Fc 단백질의 발현을 확인한 후 분리 정제하였음. 식물체 당쇄 xylose와 fucose가 감소되고 galactose가 β-1,4 linkage로 연결된 당쇄화 구조를 지니는 3단계 당쇄화 개선 GA733-2 단백질을 생산하기 위해 *XylT*, *FucT* 유전자를 동시에 knock-down 시킬 수 있는 pFGC5941/*XylT*-*FucT* RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 및 human *GalT* 유전자가 클로닝된 pILTAB-*GalT* 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*을 GA733-Fc 발현 벡터 pBCTV/GA733-Fc-Sec 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*과 1:1:1로 혼합한 후 담배 식물체에 infiltration 방법으로 감염시키고 7일 동안 배양한 후 단백질 추출물을 확보하였고 GA733-Fc 단백질을 분리 정제하였음. GA733-Fc 단백질 및 당쇄화 개선 GA733-Fc + *GalT*, GA733-Fc + *XylT*/*FucT* KD, GA733-Fc + *GalT* + *XylT*/*FucT* KD 단백질은 Fc fragment와 특이적으로 결합하는 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제하였고 SDS-PAGE 후 Coomassie blue 염색법으로 확인하였음(그림 112).

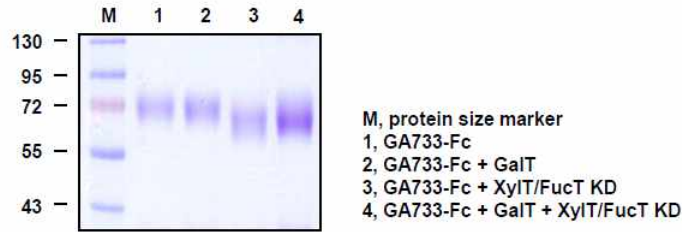


그림 112. 형질전환된 담배에서 생산된 당쇄가 변형된 GA733-Fc 단백질을 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제하고 SDS-PAGE 후 Coomassie blue 염색법으로 확인함.

2) 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질의 당쇄화 분석

- 3단계 당쇄화 변형된 GA733-Fc 단백질의 당쇄를 분석하기 위해 50 µg의 분리 정제된 GA733-Fc 단백질에 0.6 mg/ml의 pepsin을 처리하여 GA733-Fc glycopeptide를 얻었고 0.5 mU의 PNGase A를 처리하여 glycan을 분리한 후 column chromatography 방법으로 분리하였음. 분리 정제된 glycan은 solid permethylation 후 MALDI-TOF 분석을 통해 분석하였음(그림 113). GA733-Fc 단백질의 경우 식물체에서 생산되는 당단백질에서 볼 수 있는 xylose와 fucose가 추가된 것으로 추정되는 당쇄들을 함유하고 있었고 GalT 발현 벡터 및 *XylT*, *FucT* 유전자 발현 억제 벡터가 함께 형질전환된 담배 식물체에서 생산된 GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질의 경우 galactose가 추가된 것으로 추정되는 당쇄화 구조를 지니는 GA733-2-Fc 단백질을 지니고 xylose와 fucose를 함유하는 당쇄화 구조를 지니는 GA733-Fc 단백질이 감소하는 것으로 확인됨.

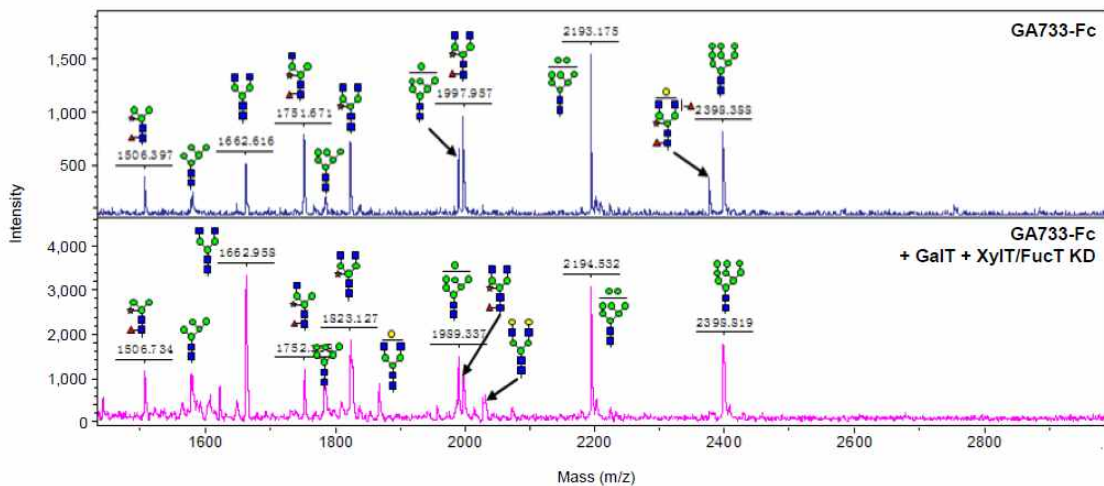


그림 113. MALDI-DOF 분석을 통해 식물에서 생산된 GA733-Fc 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질의 당쇄화 구조를 분석함.

2. *XylT*와 *FucT* 유전자의 동시 knock-down 및 *GalT* 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc 단백질의 항암치료 효과 검증

1) 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질이 처리된 수지상세포를 이용한 항암치료 효과 검증

- 실험동물 마우스에서 추출한 수지상세포에 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질을 처리하여 수지상세포의 성숙을 유도하고 대장암세포가 투여된 마우스에 첨가하여 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질에 의한 종양의 성장에 미치는 영향을 검증함.
- BALB/c 마우스 골수에서 추출한 수지상세포를 20% FBS, 20 ng/ml GM-CSF가 포함된 MEM 배지에 24시간 배양하여 상층에 부착되지 않은 세포를 제거하고 수지상세포를 확보하였음. 수지상세포 (2×10^6 cells)를 GA733-Fc 단백질 및 당쇄화 변형된 GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질 (2 mg)이 포함된 배지에서 24시간 동안 배양하여 수지상세포의 성숙을 유도하였음.
- 5주령의 암컷 BALB/c 마우스에 대장암 CT-26 (5×10^5 cells/mouse) 세포를 피하 주사하고 5일 동안 대장암세포의 성장을 유도하였고 마우스 꼬리 정맥에 성숙이 유도된 수지상세포(2×10^5 cells/mouse)를 2일 간격으로 총 3번 주사하여 21일 동안 대장암세포에 의해 생성된 tumor의 성장을 확인하였음 (그림 114). 그림 20에서와 같이 당쇄화 변형된 GA733-Fc 단백질이 첨가된 배지에서 성숙이 유도된 수지상세포가 투여된 경우 PBS 대조군 및 정상적인 GA733-Fc 단백질이 처리된 수지상세포 처리군에 비해 종양의 성장이 억제되었음.

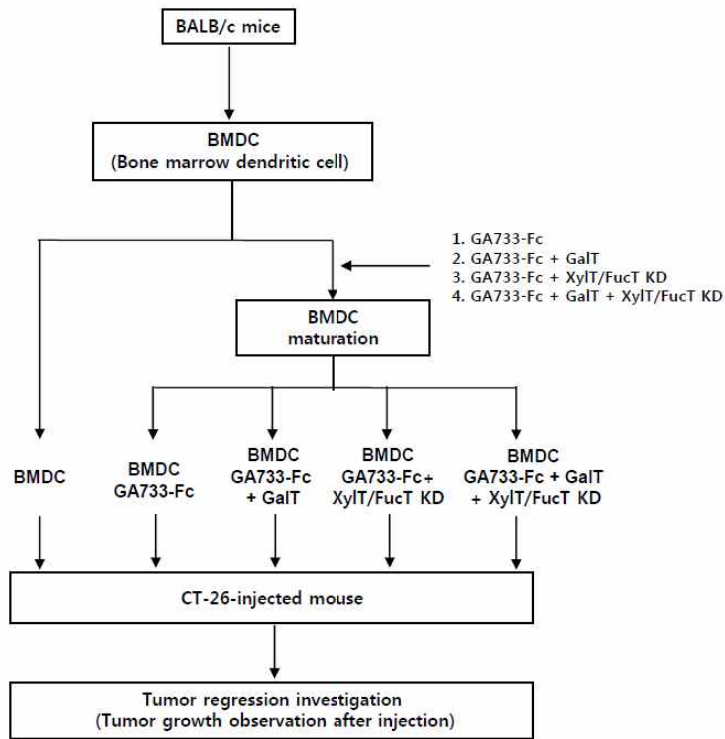


그림 114. 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질이 처리된 수지상세포를 이용한 항암치료 효과 검증 방법.

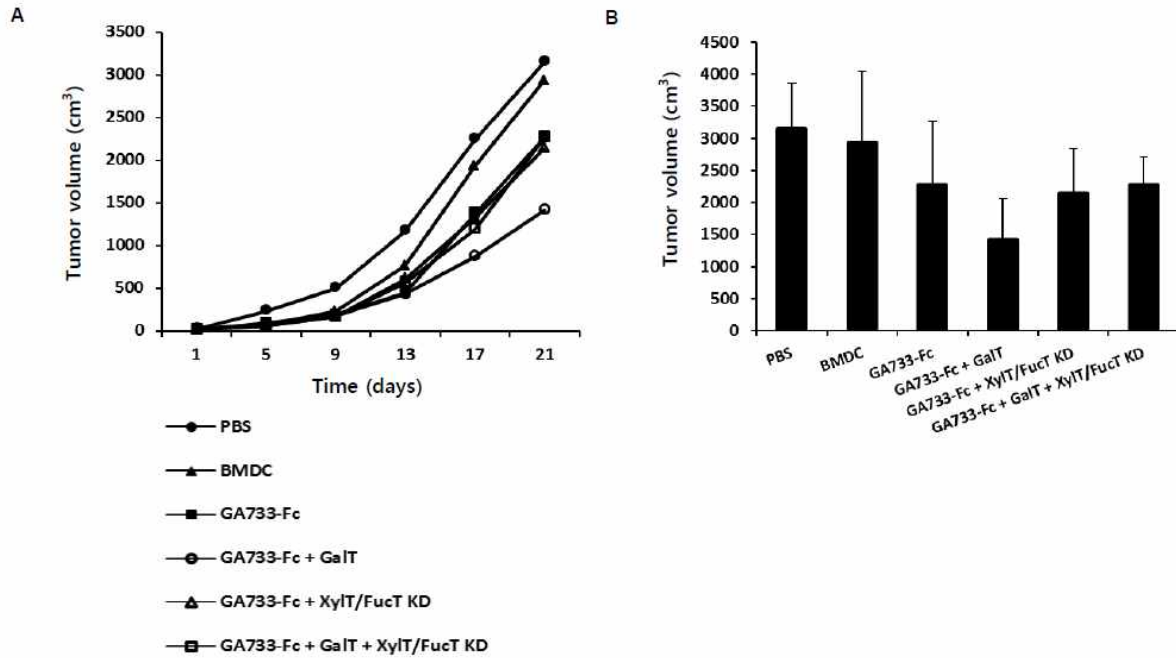


그림 115. (A) GA733-Fc 단백질 (GA733-Fc 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질)이 처리된 수지상세포가 대장암 CT-26 세포에 의해 유도되는 종양의 증식에 미치는 영향을 확인함. (B) 대장암 CT-26, 수지상세포 처리 21일 후 종양의 성장.

- 2) 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질이 면역된 실험동물 마우스에서 종양성장 억제 효과 검증
- 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질의 종양성장 억제 효과를 검증하기 위한 동물실험을 수행함. GA733-Fc 단백질 및 당쇄화 변형된 GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질 (45 µg)을 실험동물 마우스의 복강에 2주 간격으로 4회 투여하여 면역반응을 유도하였음. 4차 면역을 마친 실험쥐에 대장암 CT-26 세포 (5×10^5 cell/마리)를 피하 주사를 하여 종양의 성장을 유도하고 GA733-Fc 단백질에 의한 종양 성장 억제 효과를 확인함(그림 115).
 - 표 1에서와 같이 GA733-Fc 단백질이 면역된 실험동물 마우스에서 대장암 CT-26 세포에 의한 종양 성장은 대조군 PBS에 비해 억제되었고 가장 큰 억제 효과는 GA733-Fc + GalT 단백질이 면역된 실험동물 마우스에서 보였음.

Group	Immunogen	Adjuvant ^a	Route
1	PBS	FCA ^b , FIA ^c	Intraperitoneal
2	GA733-Fc (45 µg)	FCA, FIA	Intraperitoneal
3	GA733-Fc + GalT (45 µg)	FCA, FIA	Intraperitoneal
4	GA733-Fc + XylIT/FucT KD (45 µg)	FCA, FIA	Intraperitoneal
5	GA733-Fc + GalT + XylIT/FucT KD (45 µg)	FCA, FIA	Intraperitoneal

^a FCA at first immunizing and FIA at boosting

^b FCA: Freund's complete adjuvant

^c FIA: Freund's incomplete adjuvant

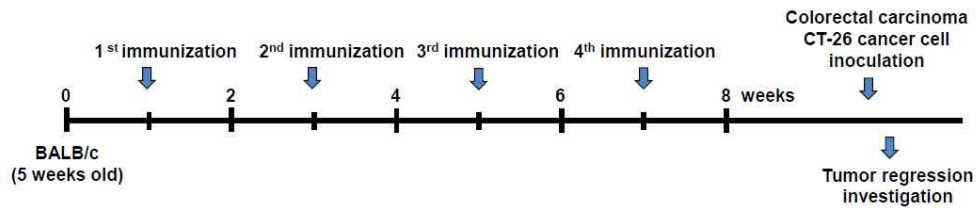


그림 116. 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc 단백질이 면역된 실험동물 마우스에서 종양성장 억제 효과 검증 방법.

표 1. GA733-Fc 단백질 (GA733-Fc 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylIT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylIT/FucT KD 단백질)이 면역된 실험동물 마우스에서 대장암 CT-26 세포에 의해 유도되는 종양 증식의 억제 효과를 확인함.

Immunogen	Time (days)					
	1	5	9	13	17	21
PBS	13.05 (±3.17)	93.00 (±12)	327.02 (±66.92)	1082.02 (±181.58)	2964.67 (±564.86)	4398.65 (±313.42)
GA733-Fc	8.00 (±0.23)	49.84 (±6.49)	294.16 (±11.1)	1071.17 (±161.73)	2686.05 (±290.79)	3766.22 (±428.27)
GA733-Fc + GalT	3.56 (±1.56)	40.64 (±14.92)	193.13 (±79.6)	581.15 (±141.56)	1776.87 (±3.74)	2166.61 (±433.55)
GA733-Fc + XylIT/FucT KD	4.24 (±1.57)	34.58 (±3.34)	158.29 (±11.86)	630.33 (±86.72)	1327.14 (±1087.2)	3729.40 (±266.37)
GA733-Fc + GalT + XylIT/FucT KD	9.79 (±5.16)	83.09 (±32.25)	420.92 (±181.15)	1019.39 (±617.76)	2521.13 (±1822.74)	3565.98 (±2219.80)

3. 당쇄화 개선된 GA733-Fc의 *in vivo* 급성 독성 평가 연구

- 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질의 과량 투여시 일반증상, 체중 등의 변화를 관찰을 위한 마우스 동물실험을 진행하였음. 담배 식물체의 앞에서 발현시키고 분리 정제한 GA733-Fc, GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylIT/FucT K/D, GA733-Fc + GalT + XylIT/FucT KD 단백질을 마우스의 복강에 투여하여 43일 동안 면역반응을 유도하고 마우스의 변화를 관찰을 하였음. 5주령의 암컷 BALB/c 마우스를 5 개의 그룹으로 나누고 동물사육실에서 1주일 동안 적응을 시킨 후, GA733-Fc, 당쇄화 개선된 GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylIT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylIT/FucT KD 단백질을 2주

간격으로 총 3회 복강 면역하였음 (1회 투여량 : 45 µg, 225 µg). 대조군으로는 동량의 PBS를 복강 면역하였고 면역보조제로 1차 면역시 FCA를 사용하였으며, 2-3차 boosting 면역시 FIA를 1:1 (v/v)로 첨가하여 사용하였음. GA733-Fc 및 당쇄화 개선 GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질이 3회 복강 주사된 마우스와 PBS 대조군의 시각적인 차이는 관찰되지 않았고 체중 변화 역시 PBS 대조군과 유사하였음(표 2).

Immunogen (45 µg)	Time (days)							
	1	7	13	19	25	31	37	43
PBS	16.33 (±0.47)	18.00 (±0.82)	19.00 (±0.82)	19.67 (±0.94)	22.00 (±0.82)	23.00 (±1.41)	24.00 (±1.41)	23.33 (±0.47)
GA733-Fc	16.00 (±0.82)	17.00 (±0.82)	18.00 (±0.82)	18.67 (±0.94)	21.33 (±1.25)	23.00 (±0.82)	23.67 (±0.94)	23.00 (±0.82)
GA733-Fc + GalT	16.67 (±0.47)	18.67 (±0.94)	20.33 (±1.25)	21.33 (±1.25)	23.00 (±0.82)	24.67 (±1.25)	25.00 (±1.63)	25.00 (±1.41)
GA733-Fc + XylT/FucT KD	16.00 (±0.82)	17.67 (±0.47)	18.33 (±0.47)	19.00 (±0.00)	20.67 (±0.47)	22.00 (±0.00)	22.33 (±0.47)	22.33 (±0.47)
GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD	17.33 (±0.47)	19.00 (±0.82)	20.00 (±0.82)	21.00 (±0.82)	23.00 (±0.82)	23.67 (±1.25)	24.67 (±0.47)	24.00 (±0.82)

Immunogen (225 µg)	Time (days)							
	1	7	13	19	25	31	37	43
PBS	16.67 (±0.47)	18.33 (±0.47)	20.00 (±0.82)	20.00 (±0.82)	22.00 (±0.82)	22.33 (±0.47)	24.00 (±0.82)	24.00 (±0.82)
GA733-Fc	16.67 (±0.47)	18.67 (±0.47)	19.67 (±0.47)	20.67 (±0.47)	22.67 (±0.47)	23.00 (±0.82)	24.67 (±1.25)	24.67 (±1.25)
GA733-Fc + GalT	16.00 (±0.82)	17.67 (±0.47)	19.33 (±0.94)	20.33 (±1.7)	21.67 (±1.25)	22.33 (±0.94)	23.67 (±1.25)	22.67 (±1.25)
GA733-Fc + XylT/FucT KD	17.33 (±0.47)	18.67 (±0.47)	19.67 (±0.47)	19.67 (±0.94)	22.00 (±0.00)	22.33 (±0.47)	23.67 (±0.47)	23.67 (±0.47)
GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD	16.67 (±0.47)	18.67 (±0.47)	20.67 (±0.47)	21.67 (±0.47)	22.67 (±1.25)	23.67 (±1.25)	24.33 (±1.7)	23.67 (±1.25)

표 2. GA733-Fc 및 당쇄화 개선 GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질이 복강 주사된 마우스의 체중 변화.

- 또한 GA733-Fc 및 당쇄화 개선 GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질이 3회 복강 주사된 마우스를 해부하여 장기의 변화를 확인함. 그림 21에서와 같이 GA733-Fc 및 당쇄화 개선 GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질이 복강 면역된 마우스의 장기는 PBS 대조군과 큰 차이를 보이지 않았음.

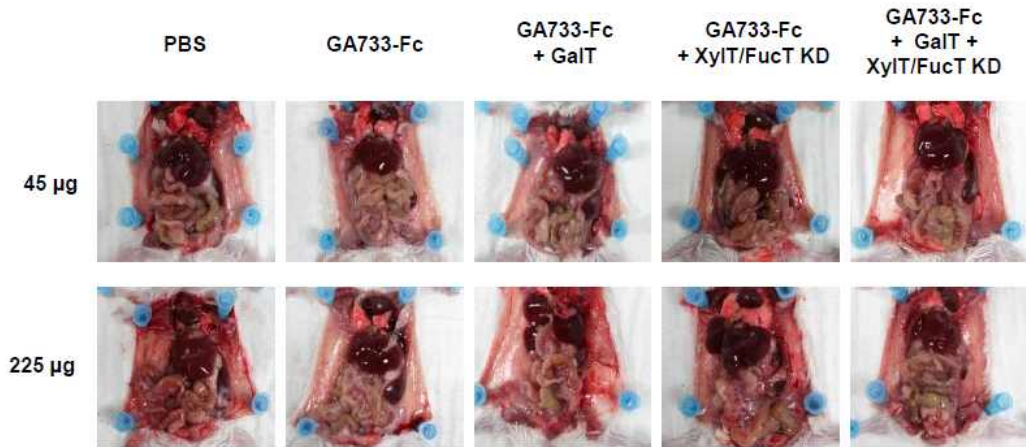


그림 117. GA733-Fc 및 당쇄화 개선 GA733-Fc + GalT, GA733-Fc + XylT/FucT KD, GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD 단백질이 3회 복강 주사된 마우스를 해부하여 장기의 변화를 확인함.

제2협동과제

1. 대장암백신 생산 형질전환 토마토 개발

1) GA733-Fc, Fc 단백질 발현 토마토 개발

- 선행연구에서 타깃 단백질의 발현율이 뛰어났던 pBINPLUS vector를 back bone으로 하고, 식물전신발현 프로모터 CaMV 35S 프로모터에 의해 유전자의 발현이 조절되는 식물 발현벡터를 제작하여 실험용토마토인 Micro Tom에 형질전환 하였음.
- 또한, 형질전환 식물체의 상용화를 용이하게 하기 위한 Clean vector를 back bone으로 하고, 토마토 열매 특이 발현 프로모터인 SIHD 프로모터에 의해 유전자의 발현이 조절되는 식물발현벡터를 제작하여 상용화토마토인 M line에 형질전환 하였음.
- 35S/GA733-Fc 형질전환 Micro Tom은 총 22 line을, 35S/Fc 형질전환 Micro Tom은 총 18 line이 선별되었고, SIHD/GA733-Fc 형질전환 M line은 총 3 line을, SIHD/Fc 형질전환 M line은 총 9 line이 선별되었음.



그림 118. GA733-Fc, Fc 발현 형질전환 토마토.

2) 형질전환 토마토의 선별

- 항생제 배지를 통해 1차선별된 형질전환 토마토의 잎에서 genomic DNA를 추출하여 specific primer를 이용해 PCR을 수행하여 2차선별을 진행했음.
- pBINPLUS vector를 back bone으로 하고, 식물전신발현 프로모터 CaMV 35S 프로모터에 의해 GA733-Fc 유전자의 발현이 조절되도록 한 형질전환 Micro Tom 22 line의 잎에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과 총 20개의 형질전환 토마토를 선별할 수 있었음.

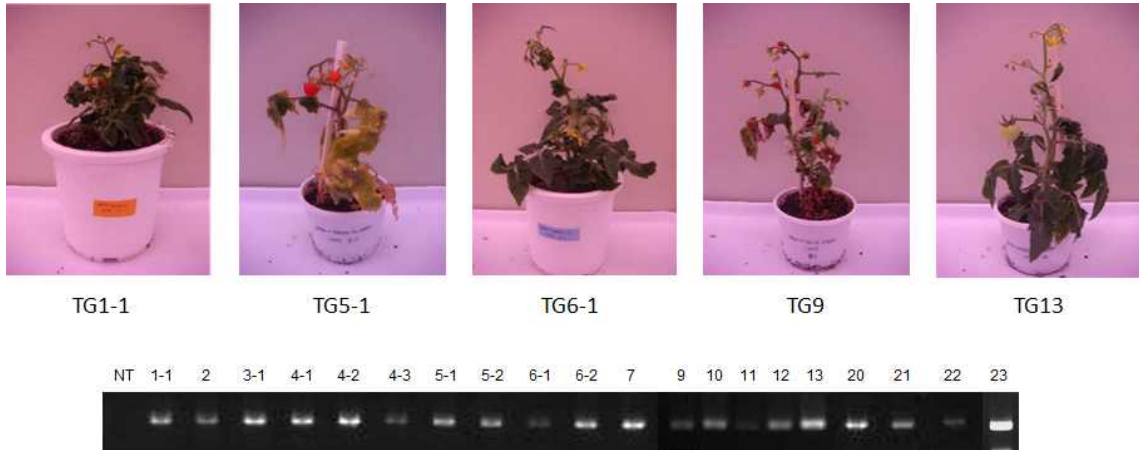


그림 119. 1차 선별된 35S/GA733-Fc 형질전환 Micro Tom의 Genomic DNA를 이용한 PCR.

- pBINPLUS vector를 back bone으로 하고, 식물전신발현 프로모터 CaMV 35S 프로모터에 의해 Human Fc 유전자의 발현이 조절되도록 한 형질전환 Micro Tom 18 line의 잎에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과 총 13개의 형질전환 토마토를 선별할 수 있었음.

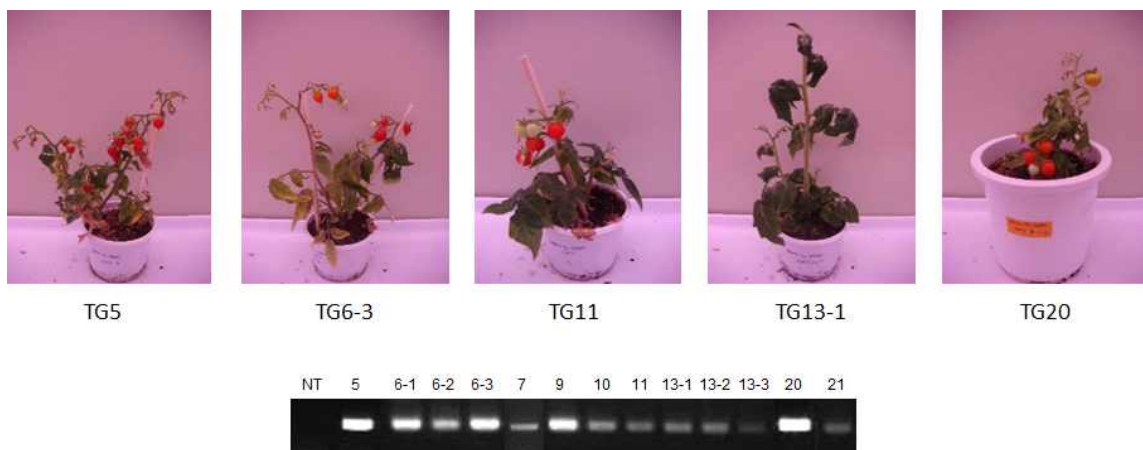


그림 120. 1차 선별된 35S/Fc 형질전환 Micro Tom의 Genomic DNA를 이용한 PCR.

- Clean vector를 back bone으로 하고, 토마토 열매 특이 발현 프로모터 SIHD 프로모터에 의해 GA733-Fc 유전자의 발현이 조절되도록 한 형질전환 M line 3 line의 잎에서

genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과 총 1개의 형질전환 토마토를 선별할 수 있었음.



그림 121. 1차 선별된 SIHD/GA733-Fc 형질전환 M line의 Genomic DNA를 이용한 PCR.

- Clean vector를 back bone으로 하고, 토마토 열매 특이 발현 프로모터 SIHD 프로모터에 의해 Human Fc 유전자의 발현이 조절되도록 한 형질전환 M line 9 line의 앞에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과 총 7개의 형질전환 토마토를 선별할 수 있었음.

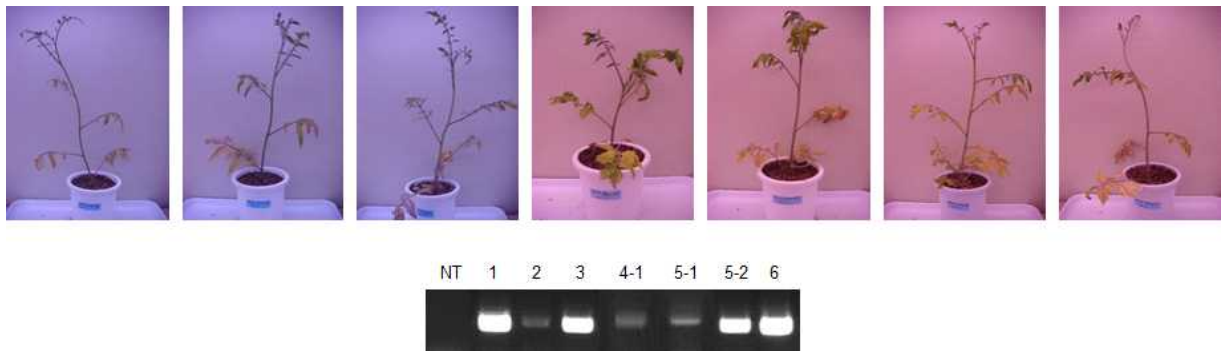


그림 122. 1차 선별된 SIHD/Fc 형질전환 M line의 Genomic DNA를 이용한 PCR.

3) 35S/GA733-Fc, 35S/human Fc 형질전환 Micro Tom에서의 단백질 발현을 비교

- Genomic DNA PCR로 최종 선별 된 pBINPLUS + 35S/GA733-Fc 형질전환 Micro Tom 20 line 에서의 GA733-Fc 단백질 발현을 비교를 위해, 형질전환 토마토의 앞에서 total soluble protein을 추출하였음.
- Western blot analysis와 ELISA를 수행한 결과 TG 13, TG 1-1, TG 6-1 순으로 타깃 단백질의 발현율이 높게 나타났음.
- TG 13, TG 1-1과 TG 6-1을 제외한 다른 형질전환 토마토는 western blot analysis의 결과에서는 발현 정도를 확인할 수 없었음.
- 형질전환 담배에서 발현한 rGA733-Fc 단백질을 standard로 사용하여 ELISA를 수행하였을 때, 모든 형질전환 토마토에서 GA733-Fc 단백질이 발현되었음을 알 수 있었고, 그 중 가장 높은 발현율을 보인 TG 13의 GA733-Fc 단백질의 발현율은 43.21 $\mu\text{g}/\text{fresh weight (g)}$ 임을 확인하였음.

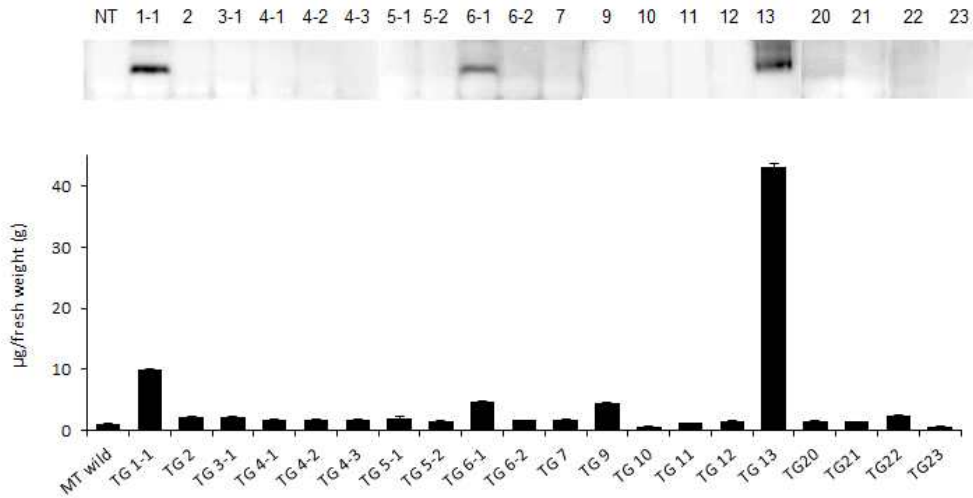


그림 123. 35S/GA733-Fc 형질전환 Micro Tom의 단백질 발현을 비교.

- Genomic DNA PCR로 최종 선별 된 pBINPLUS + 35S/human Fc 형질전환 Micro Tom 13 line 에서의 human Fc 단백질 발현을 비교를 위해, 형질전환 토마토의 잎에서 total soluble protein을 추출하였음.
- Western blot analysis와 ELISA를 수행한 결과 TG 5, TG 13-1, TG 13-3 순으로 타깃 단백질의 발현율이 높게 나타났음.
- 형질전환 담배에서 발현한 rGA733-Fc 단백질을 standard로 사용하여 ELISA를 수행하였을 때, 모든 형질전환 토마토에서 human Fc 단백질이 발현되었음을 알 수 있었고, 그 중 가장 높은 발현율을 보인 TG 5의 human Fc 단백질의 발현율은 5.23 µg/fresh weight (g) 임을 확인하였음.

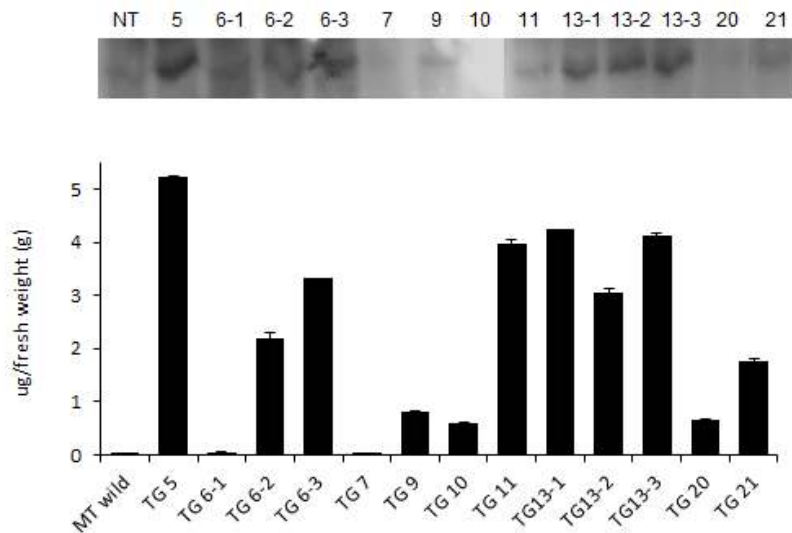


그림 124. 35S/human Fc 형질전환 Micro Tom의 단백질 발현을 비교.

4) 형질전환 토마토 열매에서 단백질 발현을 확인

- 형질전환 토마토를 대장암 경구백신으로 활용하기 위해서는 토마토 열매가 익은 후 타겟 단백질의 발현율이 중요함.
- 2차선별 된 형질전환 토마토 중에서 앞에서의 단백질 발현율이 높고 열매가 충분한 pBINPLUS + 35S/GA733-Fc TG 1-1과 pBINLUS + 35S/human Fc TG 20의 열매를 수확하여 타겟단백질의 발현율을 ELISA를 이용해 확인하였음.
- 그 결과, pBINPLUS + 35S/GA733-Fc TG 1-1은 1.25 ng/fresh weight (g), pBINLUS + 35S/human Fc TG 20은 0.27 ng/fresh weight (g) 으로 측정되었음.

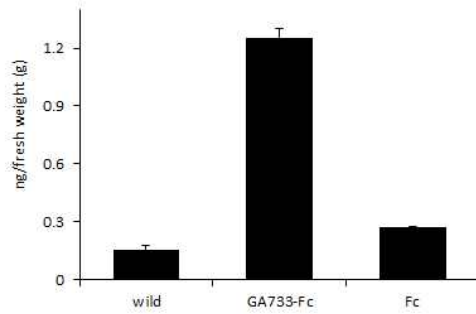


그림 125. 35S/human Fc 형질전환 Micro Tom의 단백질 발현율 비교.

5) 형질전환 토마토의 seed 확보

- 항생제 선택배지를 이용한 1차선별과 genomic DNA PCR을 이용한 2차선별을 통해 최종 선별된 형질전환 토마토의 seed를 확보하였음.
- SIHD/GA733-2 형질전환 M line 1개, 35S/GA733-2 형질전환 Micro Tom 3개, 35S/GA733-Fc 형질전환 Micro Tom 7개, 35S/Fc 형질전환 Micro Tom 1개의 seed를 확보하였고, 현재 지속적으로 seed 확보중임.



그림 126. 형질전환 토마토의 seed 확보.

2. 식물유래 압항원을 이용한 대장암 경구용 백신 실용화 기반기술 개발

1) 대장암 및 IBD mouse 모델에서, 식물유래 GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제의 최적의 *in vivo* 투여조건 확립

- 2차년도 실험결과를 바탕으로 대장암 및 IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc를 경구투여할 시 항암 및 항염 효능이 가장 높은 것으로 관찰되었음. 이에 식물유래 표적단백질로 GA733-Fc를 선정하였으며, 그 투여 용량은 500ug/100ul로 경구 투여법을 통해 투여하였음. 기존의 연구들을 통해 *E.coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB)과 Cholera toxin (CT)이 자가면역질환을 예방하며, 점막면역을 유도하여 항원의 특이성에 대한 체계적인 면역반응을 일으킬 뿐만 아니라 점막부위에서 secretory immunoglobulin A (S-IgA)가 생성되도록 하는 운반체 역할을 담당한다는 결과를 바탕으로 LTB 및 LTB와 CT를 재조합한 단백질을 생산하여 신기능성 점막면역기능증진 보조제로 이용하였음. 그 투여 농도는 10ug/100ul로 식물유래 GA733-Fc과 함께 섞어준 후 경구 투여법을 통해 투여하였음.
- IBD 마우스 모델은 WT 마우스 및 TREM2 TG 마우스에 식물유래 GA733-Fc 및 점막면역기능 증진 보조제를 2일 1회, 총 24일간 경구 투여하였음. 투여기간 중 14일 째, 2% DSS가 함유된 물을 처리하여 IBD를 유도시킨 후 10일 째 마우스를 희생하여 항염증 효능검증을 위한 실험을 진행하였음. 또한 대장암 마우스 모델은 WT 마우스 및 TREM2 TG 마우스에 식물유래 GA733-Fc 및 점막면역기능증진 보조제를 2일 1회, 총 4주간 경구 투여하였음. 투여기간 중 14일 째, 마우스 대장암 세포주인 MC38 cell을 피하에 주사함. 이후 28일 째 마우스를 희생하여 항암 효능검증을 위한 실험을 진행하였음 (그림 127).

Experimental schedule

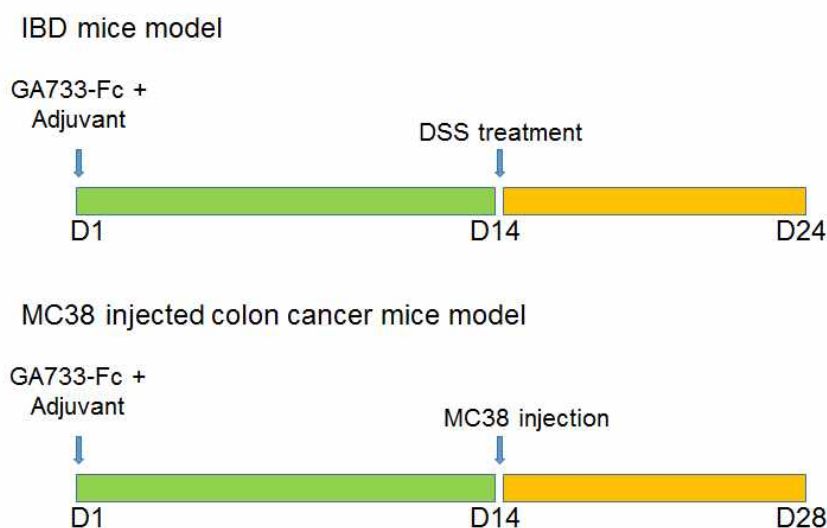


그림 127. IBD 마우스 모델 및 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 항염증/항암 효능검증 실험 일정.

2) IBD 마우스 모델을 이용한 식물유래 GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 체액성, 세포매개성 면역 및 점막면역기능 분석

- IBD 마우스 모델에서 식물유래 표적단백질인 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 항염 효능을 규명하고자 WT 마우스 및 TREM2 과발현 마우스에 식물유래 GA733-Fc 및 면역보조제를 경구 투여한 후 2% DSS를 이용하여 IBD를 유도하였음. 이후 IBD 마우스 모델의 체중 및 질환지표분자의 변화, 대장의 길이 및 대장점막조직 손상 변화를 관찰하였음.
- 그 결과, WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 IBD가 유도되어 체중이 급격하게 감소되었으며, 질환지표분자는 증가되었음. 이는 WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹에서 그 변화가 크게 관찰되었음. 하지만 DSS에 의해 IBD가 유도된 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 식물유래 GA733-Fc 단독투여 또는 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 투여한 그룹과 대조군과의 차이는 관찰되지 않았음 (그림 128).

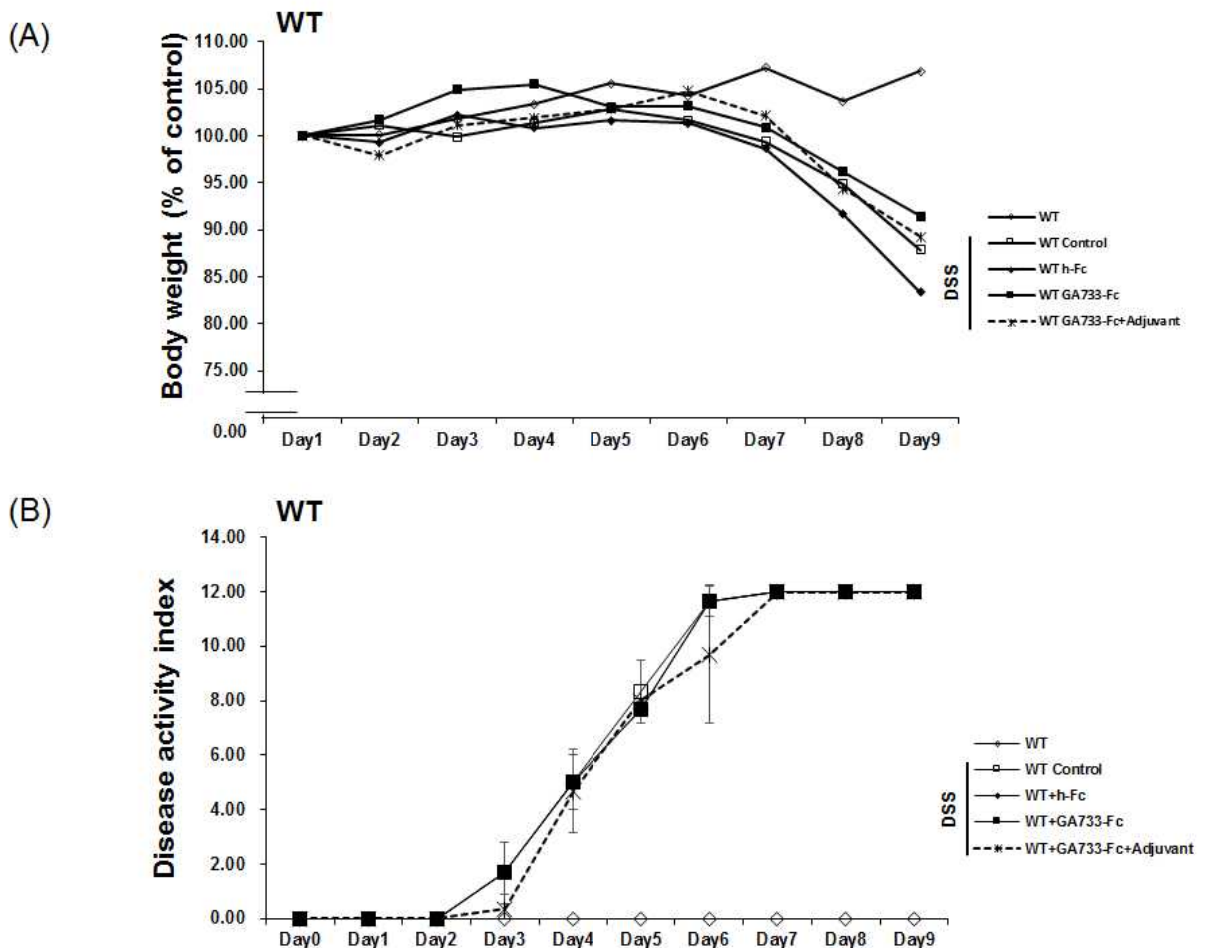
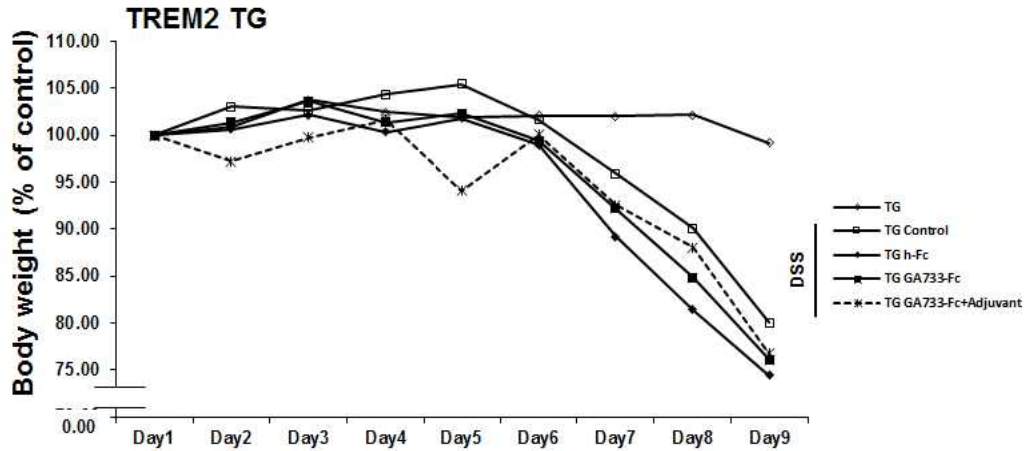


그림 128. IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 마우스 체중변화 및 질환지표분자 변화 분석(continued).

(C)



(D)

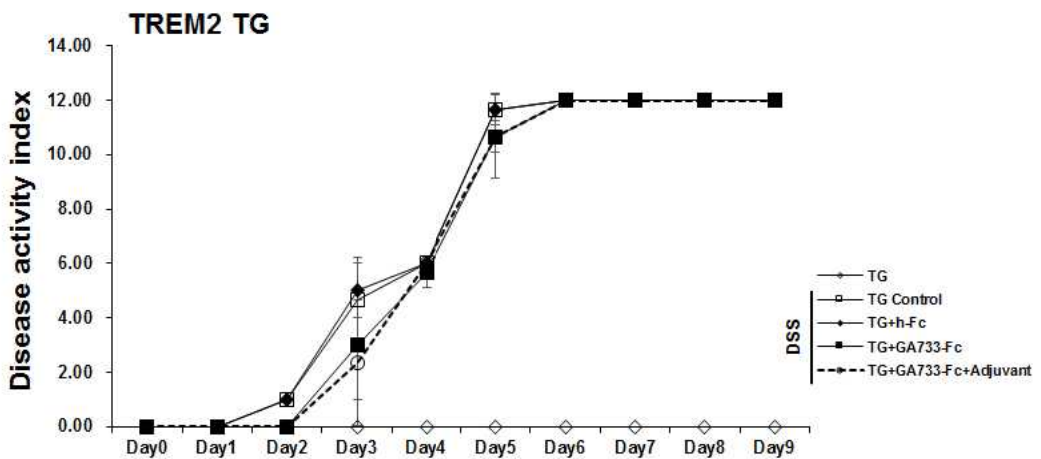


그림 128. IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 마우스 체중변화 및 질환지표분자 변화 분석.

- 대장의 길이변화를 관찰한 결과, IBD가 유도된 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 그 길이가 감소됨을 관찰하였으며, WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹의 대장의 길이가 더 감소되었음을 알 수 있었음. WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 대조군과 비교하여 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 장길이가 회복되었으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹 역시 장길이가 회복되었음. 하지만 식물유래 GA733-Fc 단독투여 그룹과 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 투여한 그룹간의 차이는 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 관찰되지 않았음 (그림 129. A,B).
- H&E 염색법을 이용하여 대장조직을 염색한 후 대장점막조직의 손상을 확인한 결과, IBD를 유도한 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 심각하게 손상되었음을 관찰하였음. IBD를 유도한 후 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹의 경우 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 대조군과 비교하여 대장점막조직이 일부 회복됨을 확인할 수 있었으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹과의 차이는 보이지 않았음 (그림 129. C).

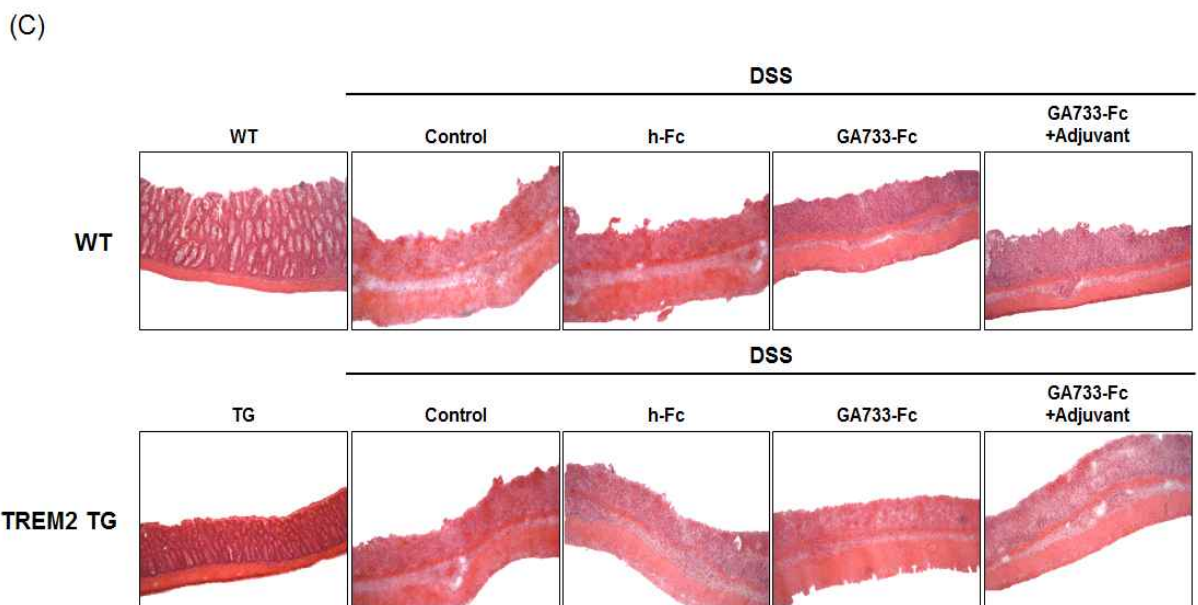
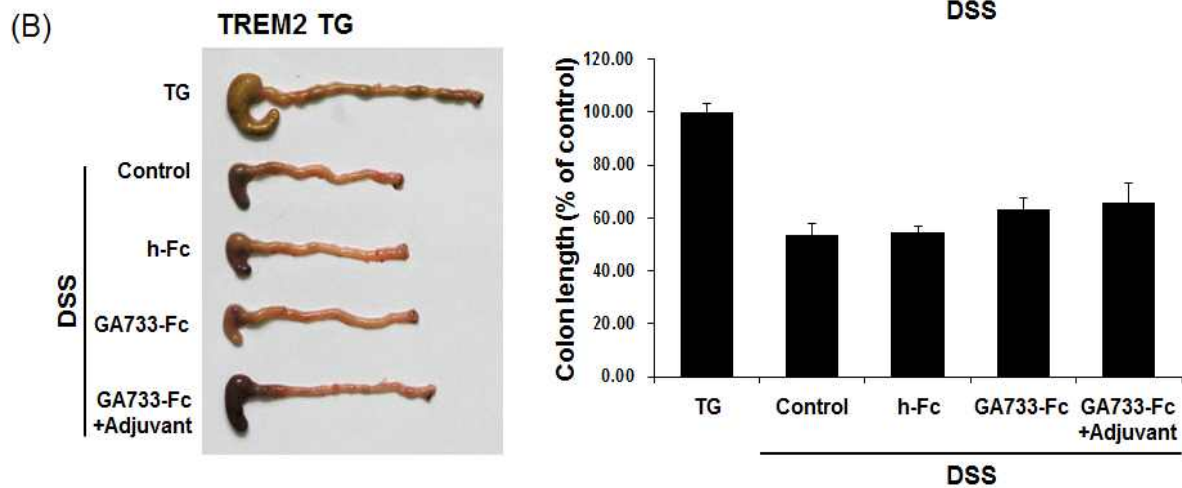
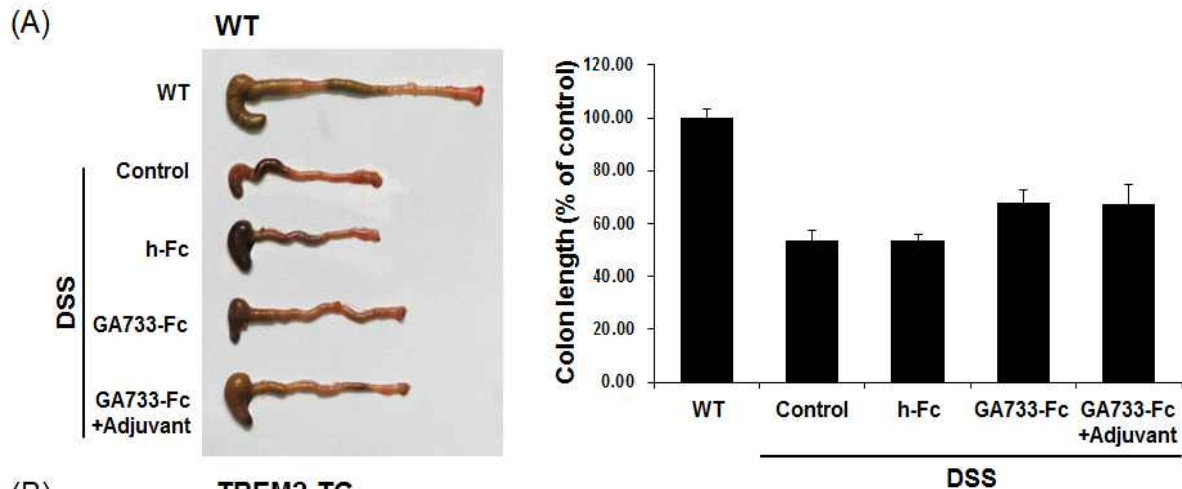


그림 129. IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 대장의 길이변화 및 대장조직의 손상 변화.

- 이 결과를 바탕으로 신기능성 수용체단백질인 TREM2에 의해 IBD가 조절됨을 알 수 있

었고, 식물유래 GA733-Fc의 항염 효능이 신기능성 점막면역기능증진 보조제를 함께 투여함으로써 단독투여와 비교하여 증가됨을 알 수 있었음. 이러한 결과는 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제의 경구 투여와 신기능성 수용체단백질인 TREM2의 과발현에 의해 면역세포들의 분화, 발달 및 활성이 조절되어 나타난 결과로 생각되어짐.

- 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 항염기능을 확인하고자, DSS에 의해 유도된 WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델에서 대장 및 mesenteric lymph node(MLN), 비장으로부터 세포를 분리한 후 염증관련유전자들의 발현변화를 RT-PCR을 통해 관찰하였음.
- 그 결과, DSS에 의해 IBD가 유도되면 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 염증유발 유전자인 IL-1 β , IL-17, TNF- α , TGF- β 의 발현이 증가됨을 알 수 있었으며, 식물유래 GA733-Fc에 의해 그 발현이 감소됨을 확인하였음. 또한 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 투여한 그룹의 경우 WT 및 TREM2 TG 그룹 모두 식물유래 GA733-Fc를 단독투여한 그룹에 비해 염증유발유전자의 발현이 더욱 감소됨을 알 수 있었음 (그림 130).

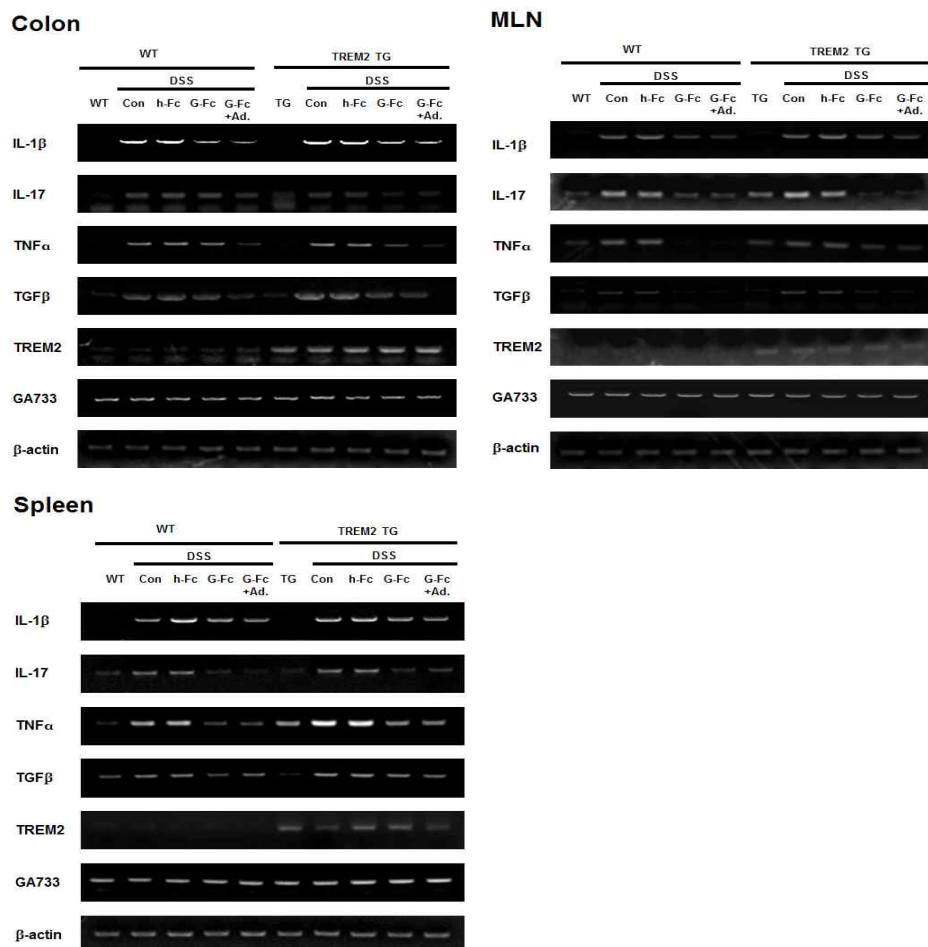


그림 130. IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 염증유발유전자들의 유전자 발현변화 확인.

- 이 결과를 통해 IBD에 의해 증가된 염증유발유전자들의 발현이 식물유래 GA733-Fc 의해 감소됨을 알 수 있었고, 신기능성 점막면역기능증진 보조제를 함께 투여함으로써 식물유래 GA733-Fc의 항염효능이 증가됨을 알 수 있었음.
- 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의해 염증유발유전자들의 발현이 감소됨에 따라 면역세포들의 변화를 확인하고자 위의 IBD 마우스 모델로부터 대장 및 mesenteric lymph node(MLN), 비장, 복강의 세포를 분리한 후 유세포분석기를 이용하여 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell, NK cell, CD8⁺ regulatory T cell들의 변화를 관찰하였음.
- 그 결과, DSS에 의해 IBD가 유도되면 WT 마우스 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 비장의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell이 감소되며, WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell이 더 많이 감소되었음. IBD를 유도한 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 식물유래 GA733-Fc의 경구 투여에 의해 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell이 증가되었으며, 특히 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹이 단독 투여한 그룹에 비해 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell이 크게 증가되었음 (그림 131, A). NK cell의 경우 WT 마우스 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹에서 그 수가 증가되어 있었으며, IBD를 유도할 시 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 NK cell이 감소되었음. IBD를 유도한 WT 및 TREM2 TG 마우스에 식물유래 GA733-Fc를 투여한 그룹에서 NK cell이 모두 증가되었으며, 특히 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹에서 단독 투여한 그룹과 비교하여 NK cell의 수가 증가되었음 (그림 131, B).

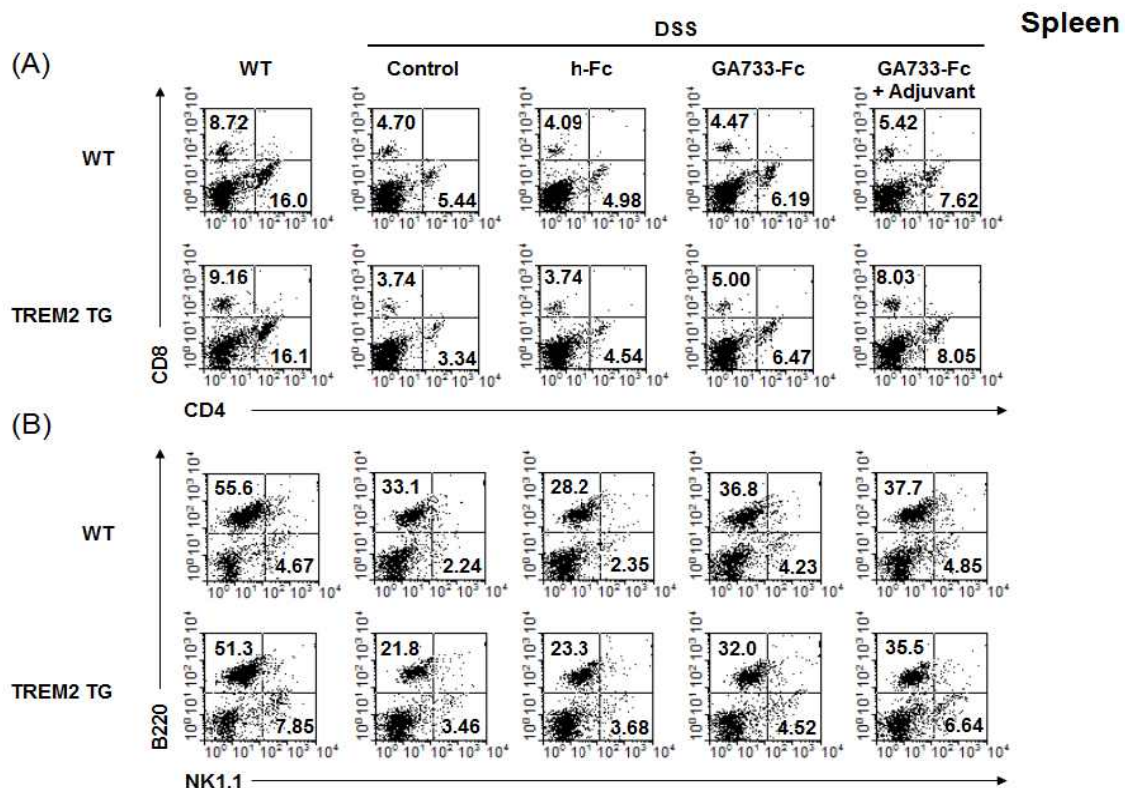


그림 131. IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 CD4⁺, CD8⁺ T cell 및 NK cell의 변화 확인.

- 대장 및 MLN에서 CD8 regulatory T cell의 변화를 관찰한 결과, IBD를 유도한 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 CD8 regulatory T cell이 감소되었지만, 식물유래 GA733-Fc를 경구투여함으로써 CD8 regulatory T cell이 회복됨을 관찰하였음. CD8 regulatory T cell 또한 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹에서 단독 투여한 그룹과 비교하여 CD8 regulatory T cell이 증가됨을 관찰하였음 (그림 132).

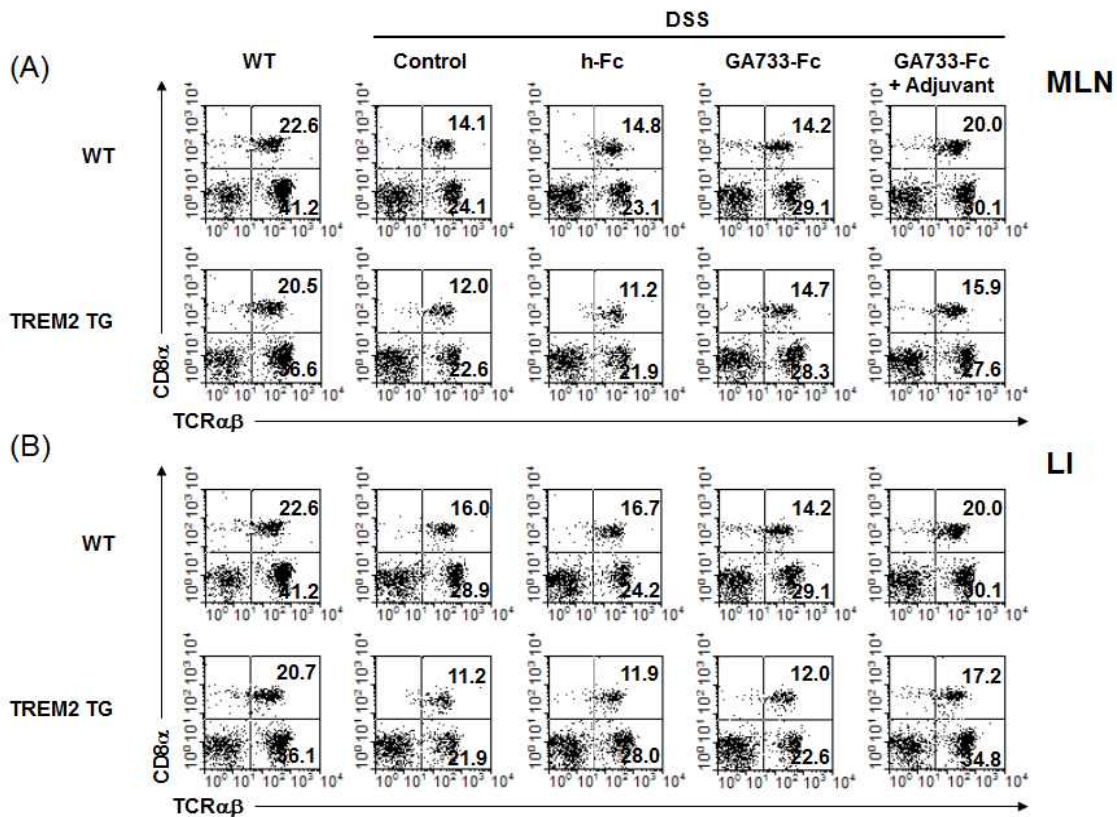


그림 132. IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 CD8 regulatory T cell의 변화 확인.

- 이 결과를 통해 IBD가 유도되면 WT 및 TREM2 TG 마우스의 CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell, CD8 regulatory T cell 및 NK cell이 감소되며, 식물유래 GA733-Fc에 의해 감소된 T cell들 및 NK cell들이 증가되어짐을 확인하였음. 특히 식물유래 GA733-Fc를 단독 투여한 그룹에 비해 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여할 시 T cell들 및 NK cell이 크게 증가되어 정상 수에 가깝게 회복됨을 알 수 있었음. 또한 NK cell의 경우 WT과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹에서 그 수가 더 많음을 관찰할 수 있었으며, 이는 신기능성 수용체단백질인 TREM2가 NK cell의 분화 및 활성화에 중요한 역할을 할 것으로 생각되어짐.
- IBD 마우스 그룹에서 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 T cell 및 NK cell이 증가됨을 통해 체액성 면역세포인 과립세포와 대식세포의 변화를 확인하고자 대장 및 MLN으로부터 세포를 분리하여 유세포분석기를 이용하여 체액성 면역세포들의 변화를

분석하였음.

- DSS에 의해 IBD가 유도되면 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 MLN의 과립세포는 감소하였지만, 대식세포의 경우 WT 마우스 그룹에서는 증가되었으며, TREM2 TG 마우스 그룹에서는 감소됨을 알 수 있었음. 감소된 과립세포는 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두에서 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 크게 증가되었으며. 증가된 WT 마우스의 대식세포는 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 감소하였지만, 감소된 TREM2 TG 마우스의 대식세포는 큰 변화를 보이지 않았음. 대장의 과립세포는 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 IBD에 의한 변화를 보이지 않았지만, 대식세포의 경우 WT 및 TREM2 TG 마우스 모두 IBD에 의해 크게 증가되었으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의한 영향은 관찰되지 않았음 (그림 133).

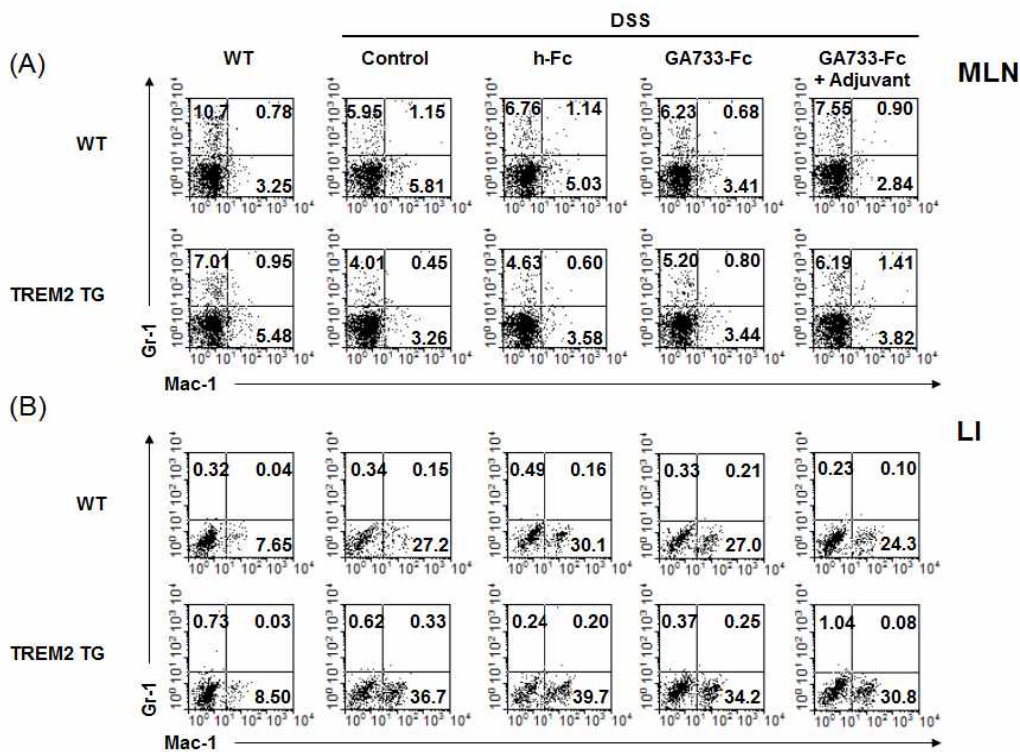


그림 133. IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 체액성 면역세포들의 변화 확인.

- 이를 바탕으로 대장 및 MLN에서 활성화된 과립세포 및 대식세포의 변화를 확인하였음. WT 및 TREM2 TG 마우스의 MLN에서 IBD가 유도됨에 따라 과립세포의 활성이 증가되었지만, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 감소되는 결과를 관찰하지는 못하였음. 대장에서 WT 마우스 그룹 또한 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의한 차이를 보이지 않았지만, TREM2 TG 마우스 그룹에서 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 활성화된 과립세포가 감소됨을 보였음 (그림 134, A,B). 대식세포의 경우 MLN에서 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의한 변화를 보이지 않았지만, 대장에서 IBD에 의해 WT 및 TREM2 TG 마우스의 증가된 대식세포 활성이 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 감소되었

음 (그림 134, C,D).

- 이 결과를 통해 IBD가 유도되면 대장 및 MLN 조직의 과립세포 및 대식세포의 활성이 증가되며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여함으로써 식물유래 GA733-Fc를 단독 투여할 경우 보다 과립세포 및 대식세포의 활성을 감소시킬 수 있었음.

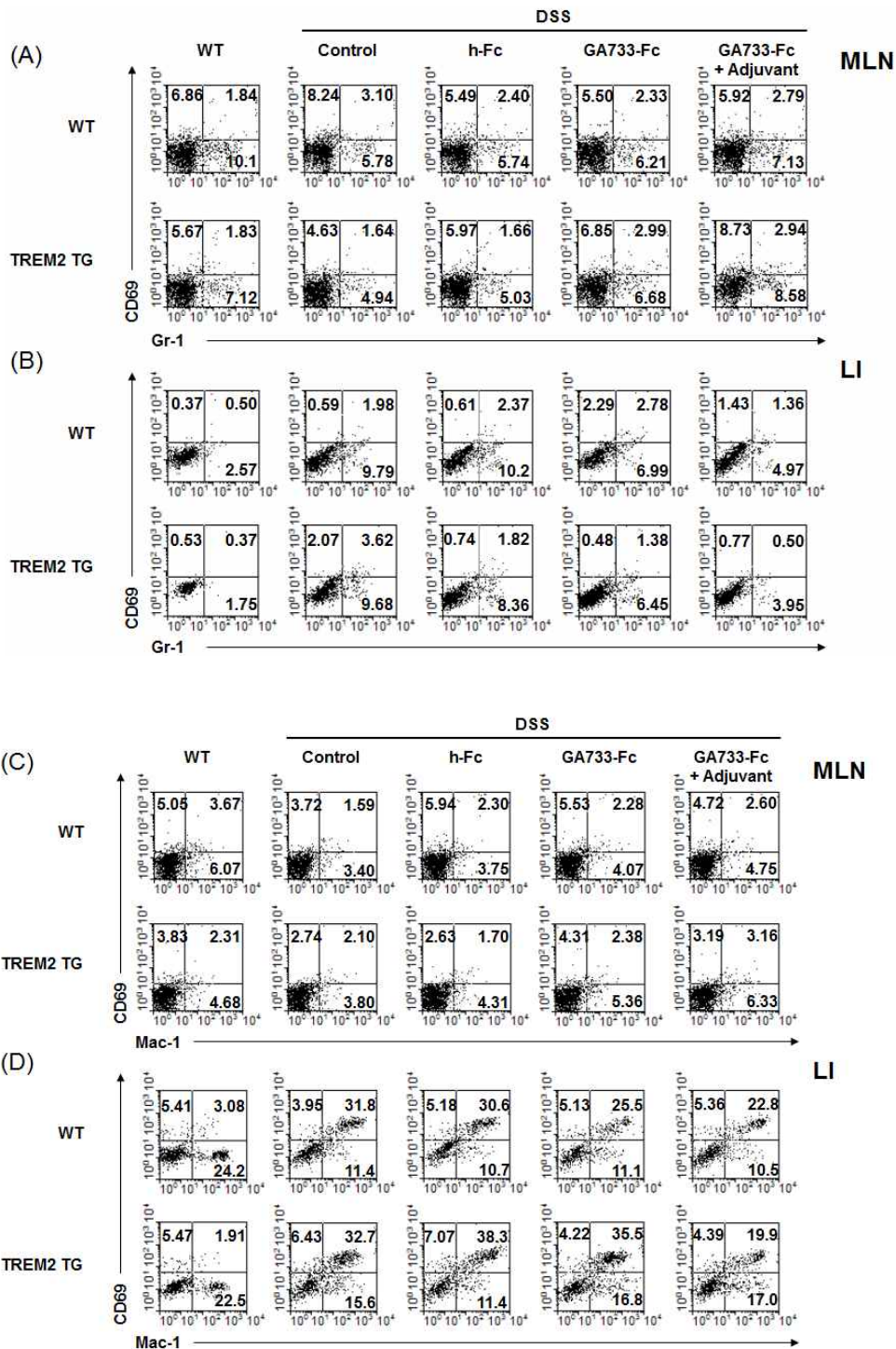


그림 134. IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 체액성 면역세포들의 활성 확인.

- 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 항체생산 능력을 확인하고자 위 IBD 마우스 모델로부터 fecal extract를 얻어 ELISA assay를 수행하여 IgA의 양을 확인하였음. 그 결과, WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹 모두 대조군과 비교하여 IBD 유도시 IgA의 생산량이 증가되었음. WT 마우스 그룹의 경우 IBD에 의해 증가된 IgA의 양이 식물유래 GA733-Fc 단독 투여시 감소되지 않았으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹에서 감소됨을 확인하였음. 반면 TREM2 TG 마우스 그룹의 경우 IBD에 의해 증가된 IgA의 양이 식물유래 GA733-Fc 단독 투여뿐만 아니라 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹 모두에서 감소됨을 알 수 있었음 (그림 135). 이는 TREM2의 과발현에 의해 면역증진 보조제를 함께 투여하지 않아도 면역세포들의 활성이 조절되어 나온 결과로 생각되어짐.

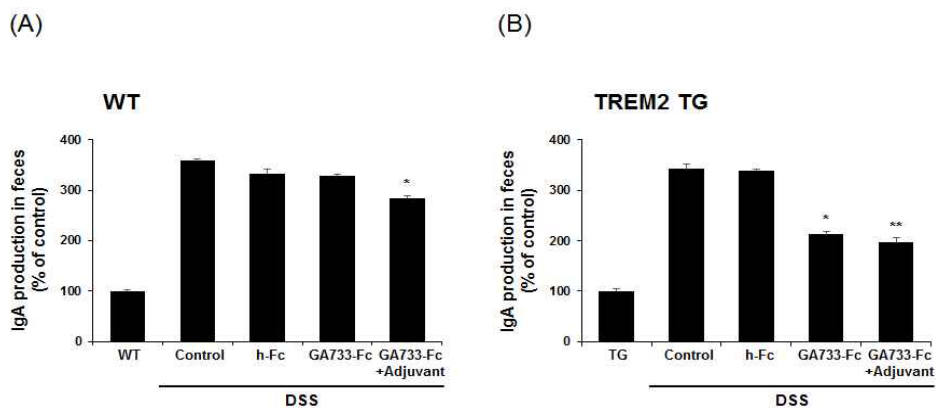


그림 135. IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 항체(IgA)생산 기능 확인.

- 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 IBD 유도 시 면역세포들의 활성 및 항염기능이 증가됨을 통해 면역세포와 관련된 전사활성인자들의 유전자 발현변화를 확인하고자, IBD 마우스 모델의 비장으로부터 세포를 분리한 후 RT-PCR을 이용하여 전사활성인자들의 유전자발현 변화를 관찰하였음.
- WT 및 TREM2 TG IBD 마우스 모델들 중 식물유래 GA733-Fc를 투여한 그룹에서 체액성 면역세포들의 활성에 관여하는 전사활성인자인 AP-1과 NK cell의 활성에 관여하는 T-bet의 전사활성인자가 증가하였으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹이 식물유래 GA733-Fc를 단독 투여한 그룹보다 전사활성인자의 발현이 증가되었음 (그림 136).
- 이 결과를 통해 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 전사활성인자들의 발현이 증가되고 이를 통해 면역세포들의 활성 또한 증가됨을 알 수 있었음.

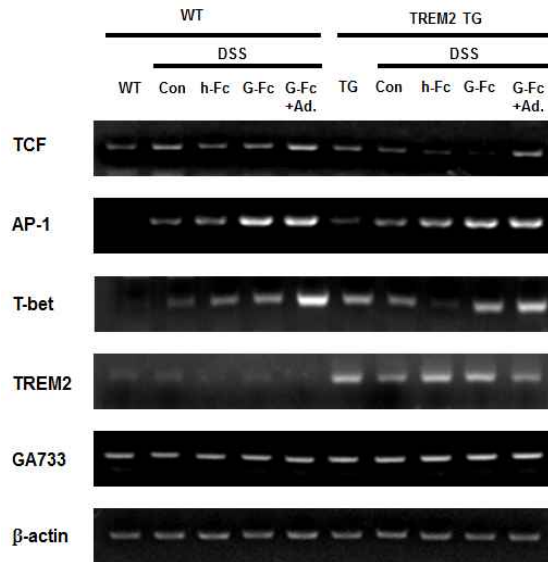


그림 136. IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 면역세포들의 전사활성인자 변화 확인.

- 위 결과들을 종합하여 볼 때 만성염증성장질환 모델인 IBD 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 수용체단백질인 TREM2에 의해 체액성 면역세포 및 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell, NK cell, B cell 등의 여러 면역세포들의 활성이 조절되고 점막면역기능이 증진되어 항염효능을 보이는 것으로 생각되어짐. 특히 식물유래 GA733-Fc 단독 투여보다 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제를 함께 투여할 시 그 항염 효능이 더욱 증가되는 것으로 생각되어지며, 향후 이를 이용하여 대장염의 예방 및 치료제로써의 활용 가능성이 클 것으로 사료됨.

3) 대장암 마우스 모델을 이용한 식물유래 GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 항암기능 분석

- 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의한 항암기능을 알아보하고자 WT 및 TREM2 TG 마우스에 식물유래 GA733-Fc 단독 투여 또는 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 후 마우스 대장암 세포주인 MC38 cell을 피하에 주사하였음. 이후 14일간 tumor volume을 측정하였음.
- 그 결과, WT 마우스의 경우 대조군과 비교하여 식물유래 GA733-Fc를 투여한 그룹에서 tumor volume이 감소되었고, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹에서 더욱 감소됨을 확인하였음. TREM2 TG 마우스의 경우 대조군과 비교하여 식물유래 GA733-Fc를 투여한 그룹에서는 큰 차이를 보이지 않았지만, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹에서 tumor volume이 크게 감소하였음 (그림 137).

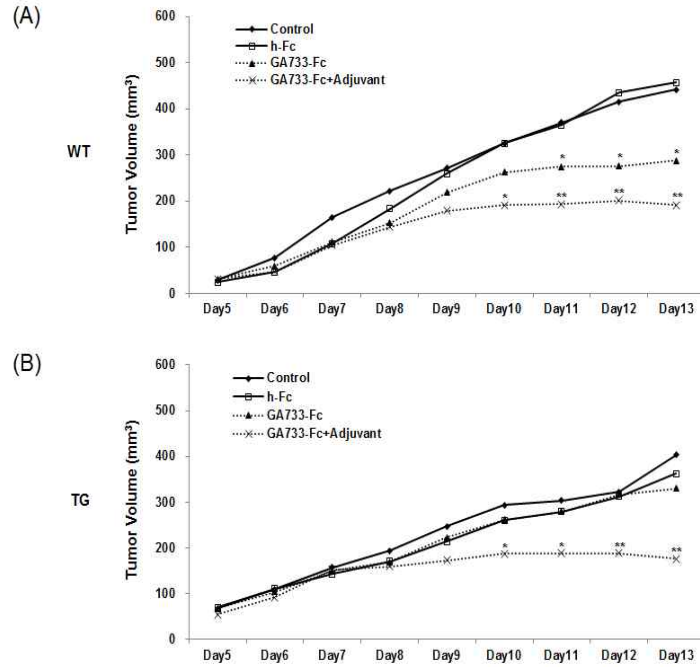


그림 137. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 대장암 volume 감소 확인.

- 마우스 대장암 세포주인 MC38 cell을 피하에 주사한 후 14일 제 마우스를 희생하여 tumor mass를 관찰한 결과, WT 마우스 그룹의 경우 대조군과 비교하여 식물유래 GA733-Fc를 투여한 마우스 그룹의 tumor mass가 감소된 결과를 보였으며, 특히 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹에서 가장 크게 감소하였음. TREM2 TG 마우스 그룹은 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹에서만 tumor mass가 감소하였으나, 이는 앞선 결과와 같이 WT 그룹에 비해 TREM2 TG 마우스 그룹의 tumor mass가 전체적으로 감소되어 있으며, WT그룹의 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 투여한 그룹과 비교하여 TREM2 TG 그룹의 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 투여한 그룹의 tumor mass가 가장 크게 감소되었음 (그림 138).
- 이 결과를 바탕으로 식물유래 GA733-Fc에 의해 tumor의 volume 및 mass가 감소됨을 알 수 있었고, 특히 면역증진 보조제를 함께 투여할 경우 그 효과가 커짐을 알 수 있었음. 또한 신기능성수용체 단백질인 TREM2의 과발현이 tumor의 증식 및 전이를 억제하며 TREM2와 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제의 상호작용을 통해 대장암의 증식 및 전이 억제를 극대화 할 수 있을 것으로 생각되어짐.

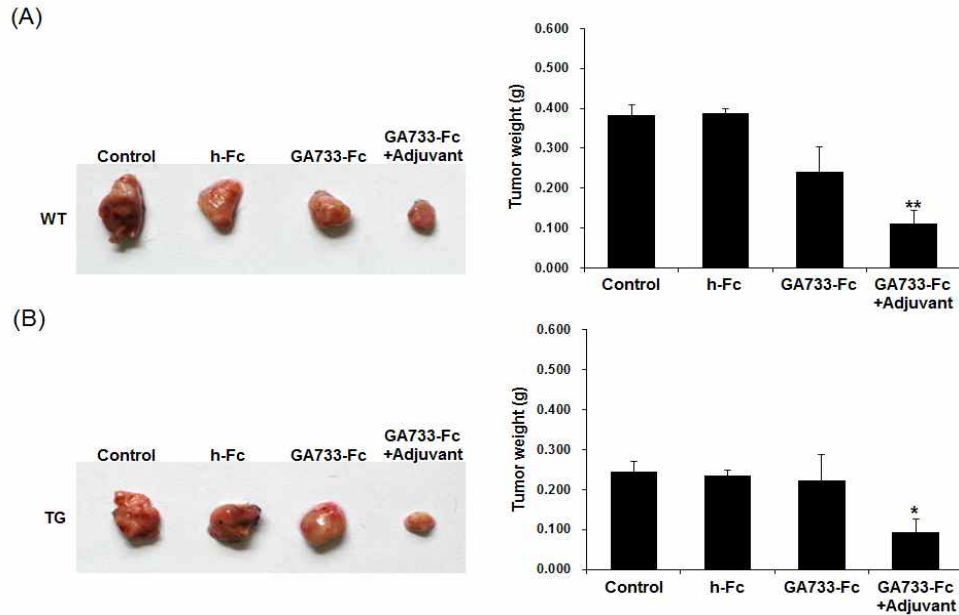


그림 138. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 대장암 mass 변화 확인.

- 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의한 항암효능을 알아보기 위하여 대장암 마우스 모델의 암조직 및 비장, 림프절, MLN으로부터 세포를 분리한 후 RT-PCR을 이용하여 세포사멸 및 암세포의 전이에 관여하는 유전자들의 발현을 확인하였으며, 유세포분석기를 이용하여 세포사멸을 분석하였음.
- WT 및 TREM2 TG 대장암 마우스 모델 모두 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 세포사멸을 유도하는 유전자인 Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 및 BAX의 발현이 증가되었으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹 역시 세포사멸 유도 유전자의 발현이 증가되었음 (그림 139). 암세포 전이에 관여하는 유전자의 발현을 확인한 결과, WT 및 TREM2 TG 마우스 모두 암세포 전이에 관여하는 MMP2, MMP8, MMP9의 유전자 발현의 차이를 보이지 않았으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 투여한 그룹 역시 차이를 보이지 않았음 (그림 140). 유세포분석기를 이용하여 세포사멸을 분석한 결과 WT 및 TREM2 TG 대장암 조직 모두 식물유래 GA733-Fc를 경구투여한 그룹에서 세포사멸이 증가하였으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹에서 세포사멸이 더욱 증가되었음 (그림 141). 특히 WT 그룹과 비교하여 TREM2 TG 마우스 그룹의 대장암 조직에서 세포사멸이 크게 증가됨을 알 수 있었으며, 이는 TREM2의 과발현에 의해 대장암 조직의 세포사멸을 촉진한 결과로 사료됨.
- 이를 통해 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 암세포의 전이에는 큰 차이를 보이지 않았지만, 암세포의 세포사멸을 유도하여 항암효능이 증진됨을 확인할 수 있었으며, TREM2의 과발현을 통해 그 효과가 더욱 증진됨을 알 수 있었음.

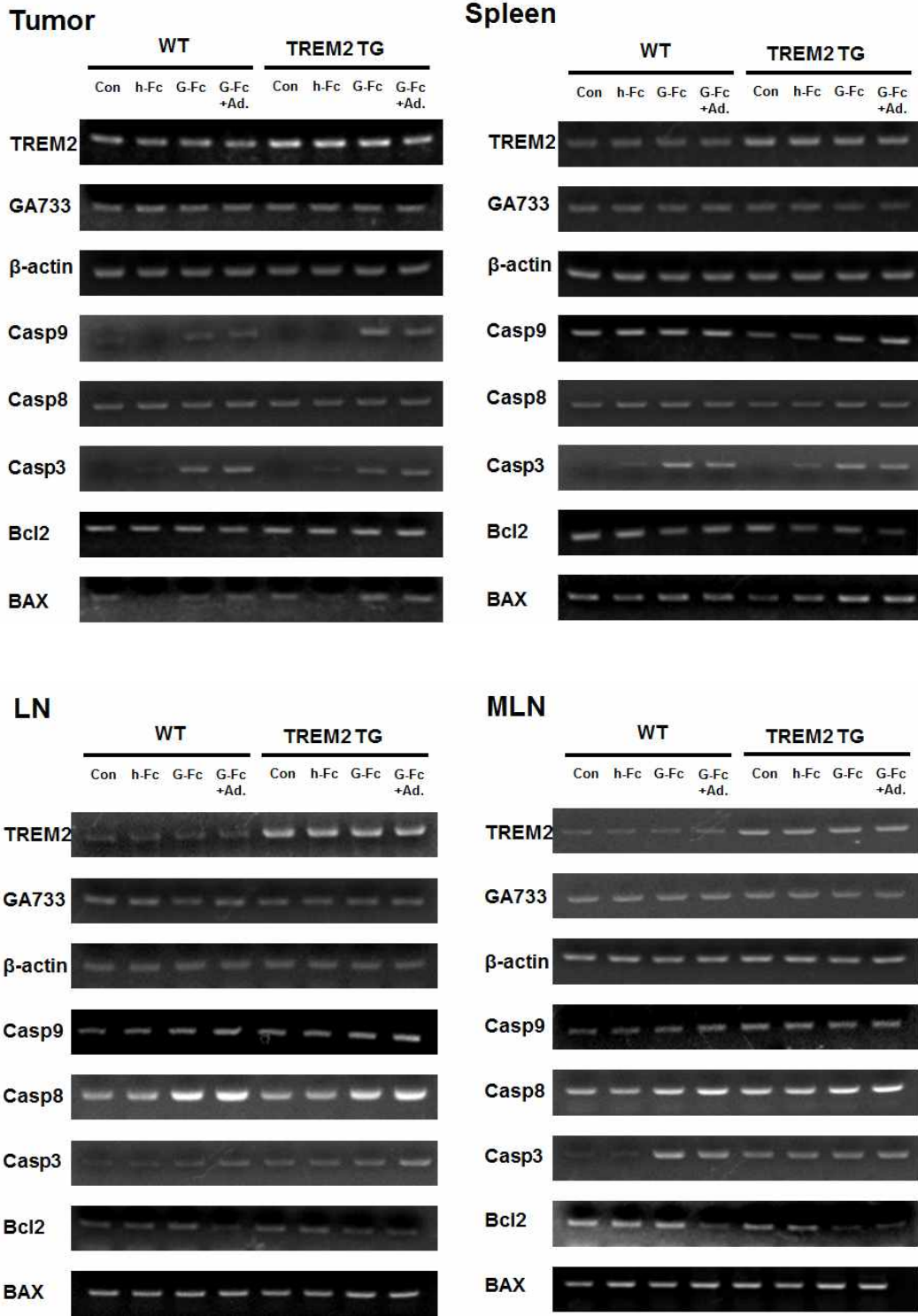


그림 139. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 대장암 세포의 세포사멸 유전자들의 발현변화 확인.

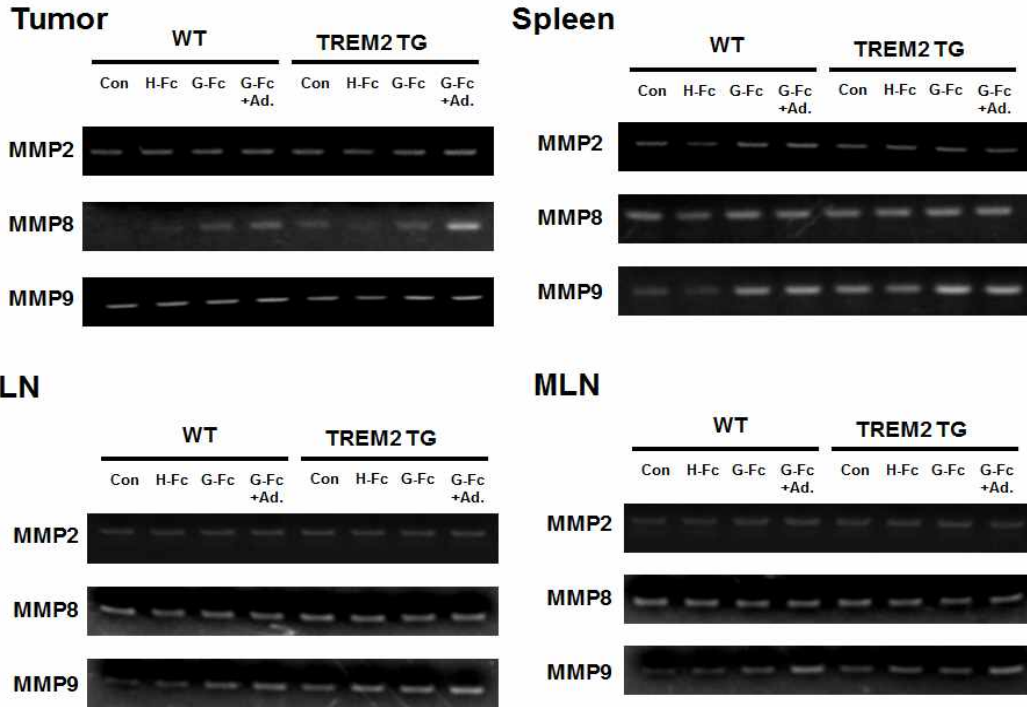


그림 140. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 대장암 세포의 전이 유전자들의 발현변화 확인.

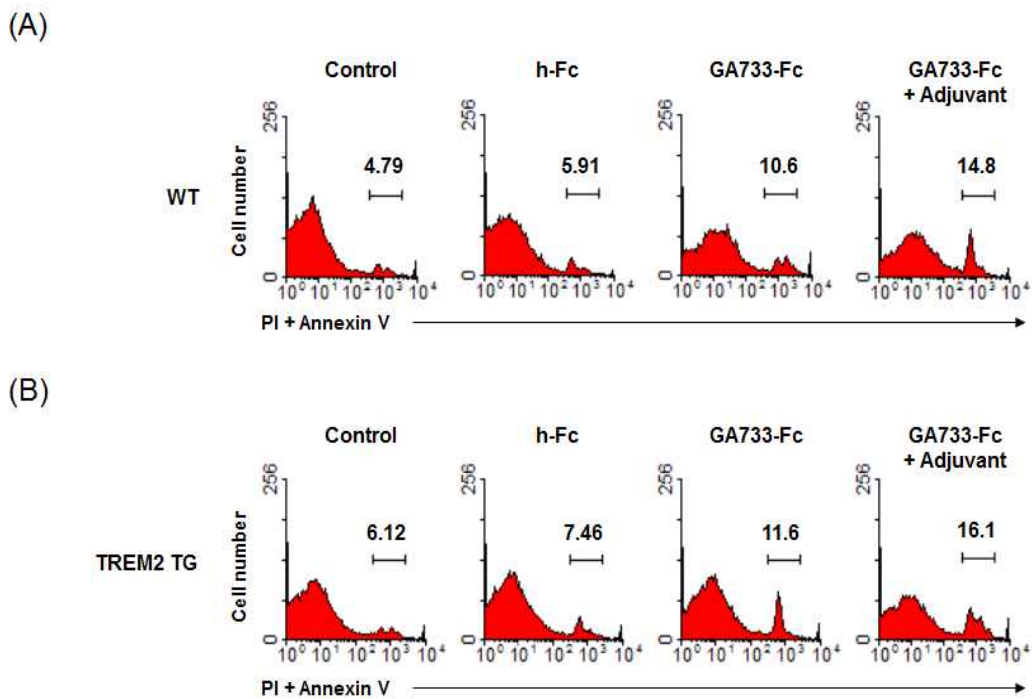


그림 141. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 대장암 세포사멸의 변화 확인.

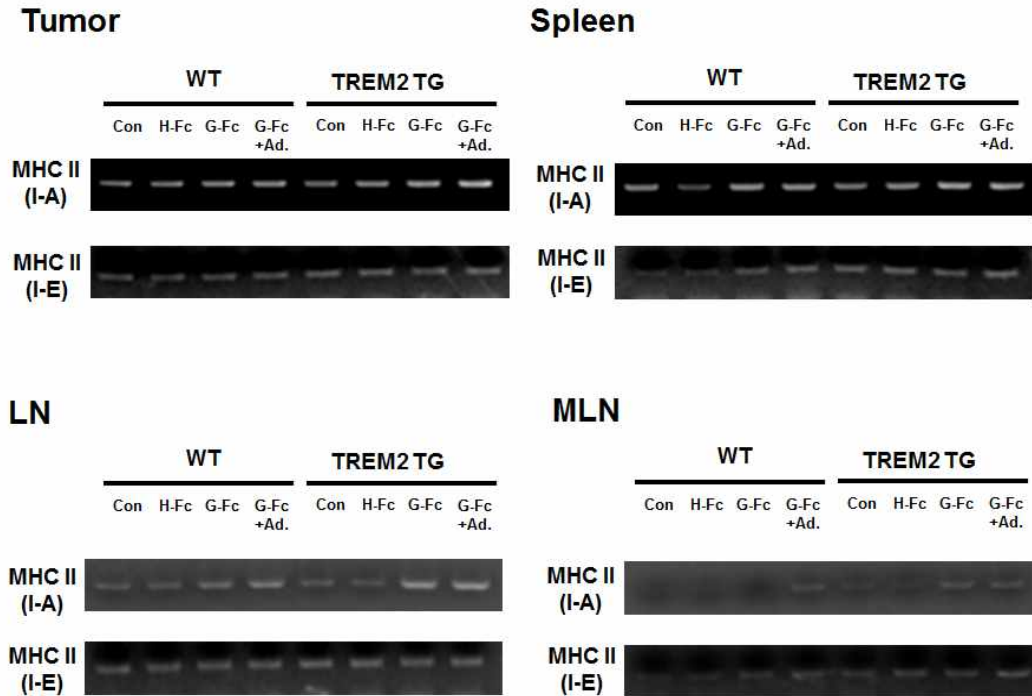


그림 142. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 면역세포의 항원제시능력 확인.

- WT 및 TREM2 TG 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의한 면역세포의 항원 제시능력을 확인하고자, 대장암 마우스 모델의 tumor 및 비장, 림프절, MLN으로부터 세포를 분리한 후 RT-PCR을 이용하여 MHC class II 유전자들의 발현을 확인하였음.
- 그 결과 WT 및 TREM2 TG 대장암 마우스 모델 모두 MHC class II 유전자들의 발현이 관찰되었고, 식물유래 GA733-Fc를 투여한 그룹에서 MHC class II의 발현이 증가하였음. 또한 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹에서 MHC class II의 발현이 더욱 증가하였음. 하지만 WT 및 TREM2 TG 마우스 그룹간의 차이는 보이지 않았음 (그림 142). 이를 통해 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 면역세포의 항원제시 능력이 증진됨을 알 수 있었음.
- 위 결과를 바탕으로 대장암 마우스 모델의 비장, tumor, 림프절, MLN으로부터 세포들을 분리한 후 각 장기별 면역세포들의 변화를 확인하였음. 그 결과 WT 및 TREM2 TG 대장암 마우스 모델 모두 식물유래 GA733-Fc에 의해 비장 및 tumor의 CD4⁺ T cell이 증가되었으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹에서 더욱 증가되었음. 림프절 및 MLN에서 식물유래 GA733-Fc의 단독 투여 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹간 CD4⁺ T cell의 변화는 보이지 않았음. CD8⁺ T cell의 경우 림프절에서 식물유래 GA733-Fc의 투여에 증가가 되었으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제의 투여에 의해 크게 증가가 되었음. 하지만 비장 및 tumor, MLN에서는 식물유래 GA733-Fc의 단독 투여 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹 모두 차이를 보이지 않았음 (그림 141). NK cell의 변화를 확인한 결과, 식물유래 GA733-Fc의 투여에 의해 비

장 및 tumor, 림프절에서 NK cell이 증가 되었으며, 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제를 함께 투여한 그룹 또한 NK cell이 증가되었음. 또한 WT과 비교하여 TREM2 TG 대장암 마우스 모델에서 NK cell이 더욱 증가됨을 확인할 수 있었음 (그림 144).

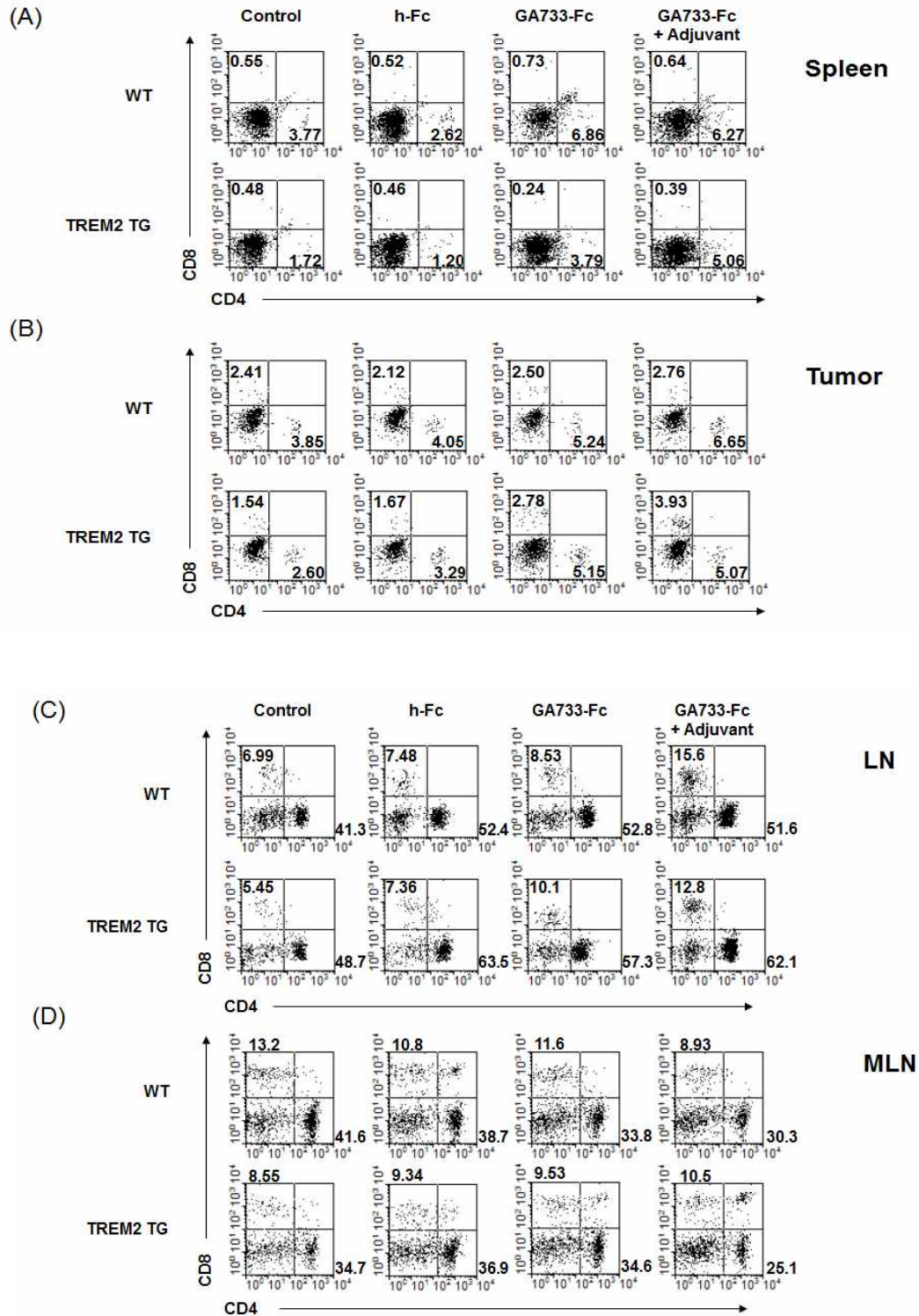


그림 143. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell의 변화확인.

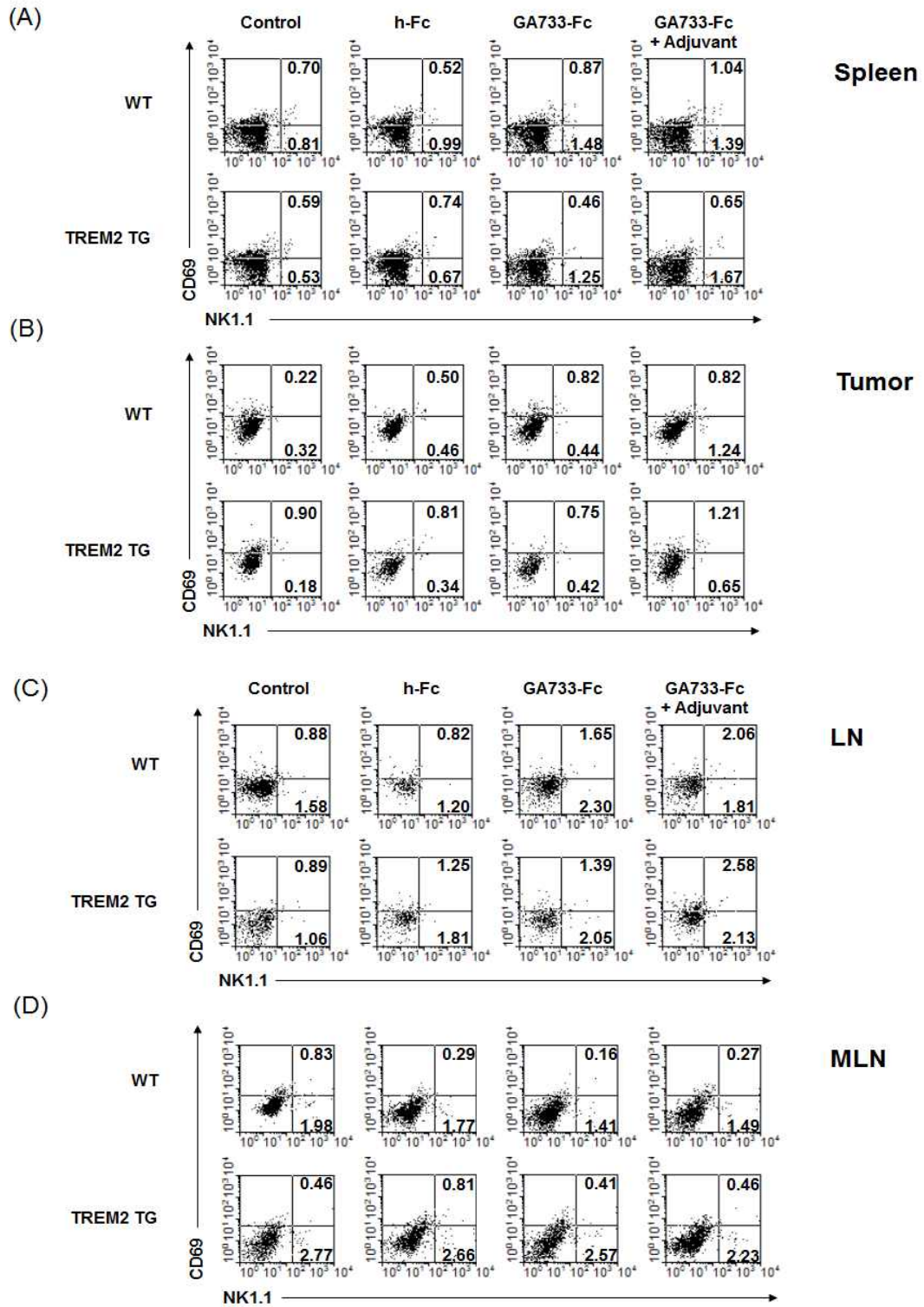


그림 144. 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제에 의한 NK cell의 변화확인.

- 이를 통해 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제에 의해 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell, NK cell이 증가됨을 알 수 있었으며, 특히 WT과 비교하여 TREM2의 과발현에 의해 NK cell이 증가됨을 알 수 있었음. 이는 식물유래 GA733-Fc 및 면역증진 보조제와 신기능성

수용체 단백질인 TREM2의 상호작용을 통해 면역세포들의 활성을 증진시킬 수 있을 것으로 생각되어짐.

- 위 결과들을 종합하여 볼 때 대장암 마우스 모델에서 식물유래 GA733-Fc의해 면역세포들의 활성이 증진되며, 이는 대장암의 세포사멸을 유도하여 항암효능을 보이는 것으로 생각되어짐. 특히 식물유래 GA733-Fc의 단독 투여보다 면역증진 보조제를 함께 투여함으로써 그 효능이 증진되며, 신기능성 수용체 단백질인 TREM2와 상호작용을 통해 그 항암효능을 더욱 증진시킴을 알 수 있었음. 이를 통해 향후 대장암의 예방 및 치료제로써 식물유래 GA733-Fc 및 면역기능증진 보조제, 신기능성 수용체 단백질인 TREM2의 활용 가능성이 클 것으로 사료됨.

4) 대장암 마우스 모델에서 GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매의 경구 투여에 의한 항암효능 검증.

- 대장암 마우스 모델에서 GA733-Fc 단백질을 발현하는 토마토 열매를 경구 투여함으로써 대장암에 대한 항암효능을 검증하기 위해 토마토 열매를 잘게 갈아 매일 2주간 100mg/200ul의 농도로 경구 투여함. 14일 째 마우스 대장암 세포주인 MC38 cell을 마우스의 피하에 주사하였으며, 토마토 열매를 이틀에 한번 1주간 추가 경구투여 하였음. 이후 35일 째 마우스를 희생하여 항암효능 검증을 위한 실험을 진행하였음.
- 그 결과, GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매를 경구투여한 마우스 그룹에서 tumor volume이 감소하였으며, tumor mass를 확인한 결과 역시 토마토 열매를 투여한 그룹에서 감소되었음 (그림 145).

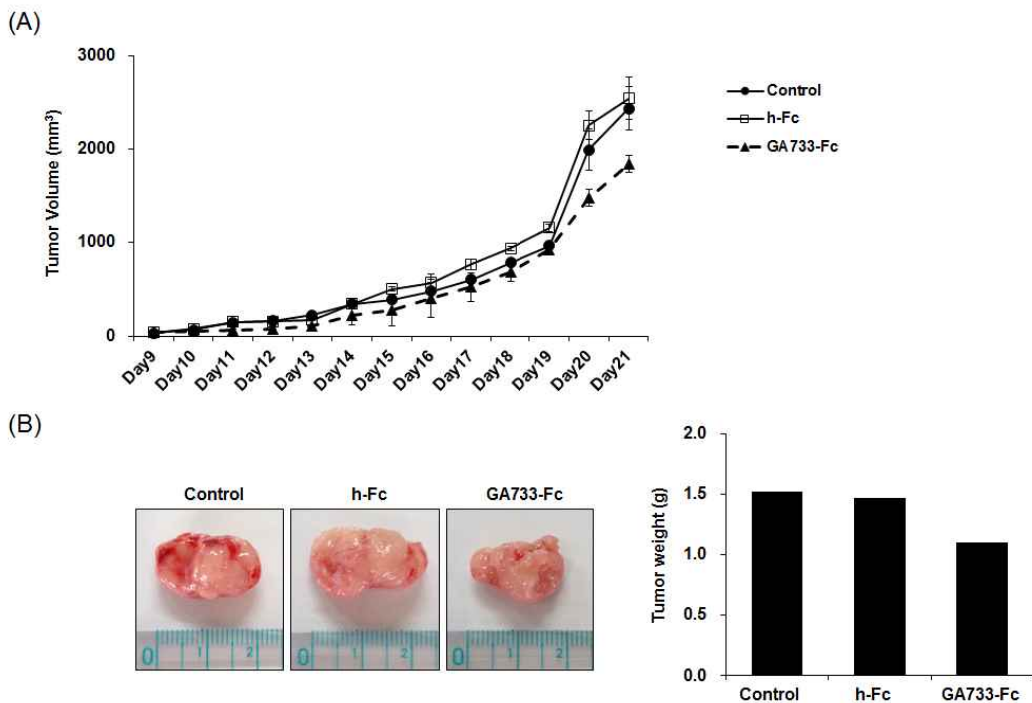


그림 145. 대장암 마우스 모델에서 GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매의 경구투여에 의한 대장암의 mass 변화 확인.

- 또한 대장암 조직으로부터 세포를 분리한 후 세포사멸을 확인한 결과 GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매의 경구투여에 의해 대장암 조직의 세포사멸이 증가됨을 확인할 수 있었음 (그림 146 A). GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매에 의해 대장암의 세포사멸이 증가됨에 따라 면역세포의 암세포 killing 능력을 확인하기 위하여 마우스 비장으로부터 세포를 분리한 후 Cytotoxicity assay를 수행하였음. 그 결과 GA733-Fc 토마토 열매를 경구투여한 마우스 그룹에서 암세포 killing능력이 증가됨을 관찰하였음 (그림 146 B).

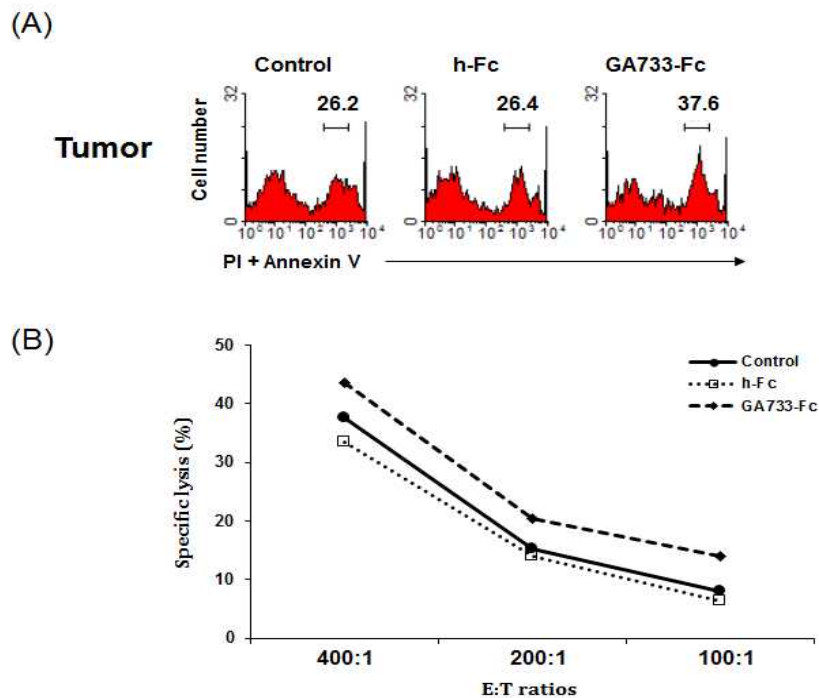


그림 146. 대장암 마우스 모델에서 GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매의 경구투여에 의한 대장암의 세포사멸 및 면역세포의 암세포 killing능력 변화 확인.

- 이를 통해 마우스의 비장 및 tumor, 림프절, MLN 조직으로부터 세포를 분리하여 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell, B cell, NK cell, 수지상세포, 대식세포의 변화를 관찰하였음. WT 마우스와 비교하여 대장암 마우스 모델의 비장에서 CD4⁺ T cell 및 CD8⁺ T cell이 감소되었으며, GA733-Fc 토마토 열매의 경구투여에 의해 회복되었음. 또한 대장암 마우스 모델에서 감소된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell들의 활성이 GA733-Fc 토마토 열매에 의해 증가됨을 알 수 있었음. 대식세포의 활성을 확인한 결과, 대장암 마우스 모델에서 감소된 대식세포의 활성이 GA733-Fc 토마토 열매에 의해 활성이 증진됨 확인함. 하지만 B cell 및 NK cell, 수지상세포의 경우 큰 차이를 관찰하지 못했음 (그림 147).

Spleen

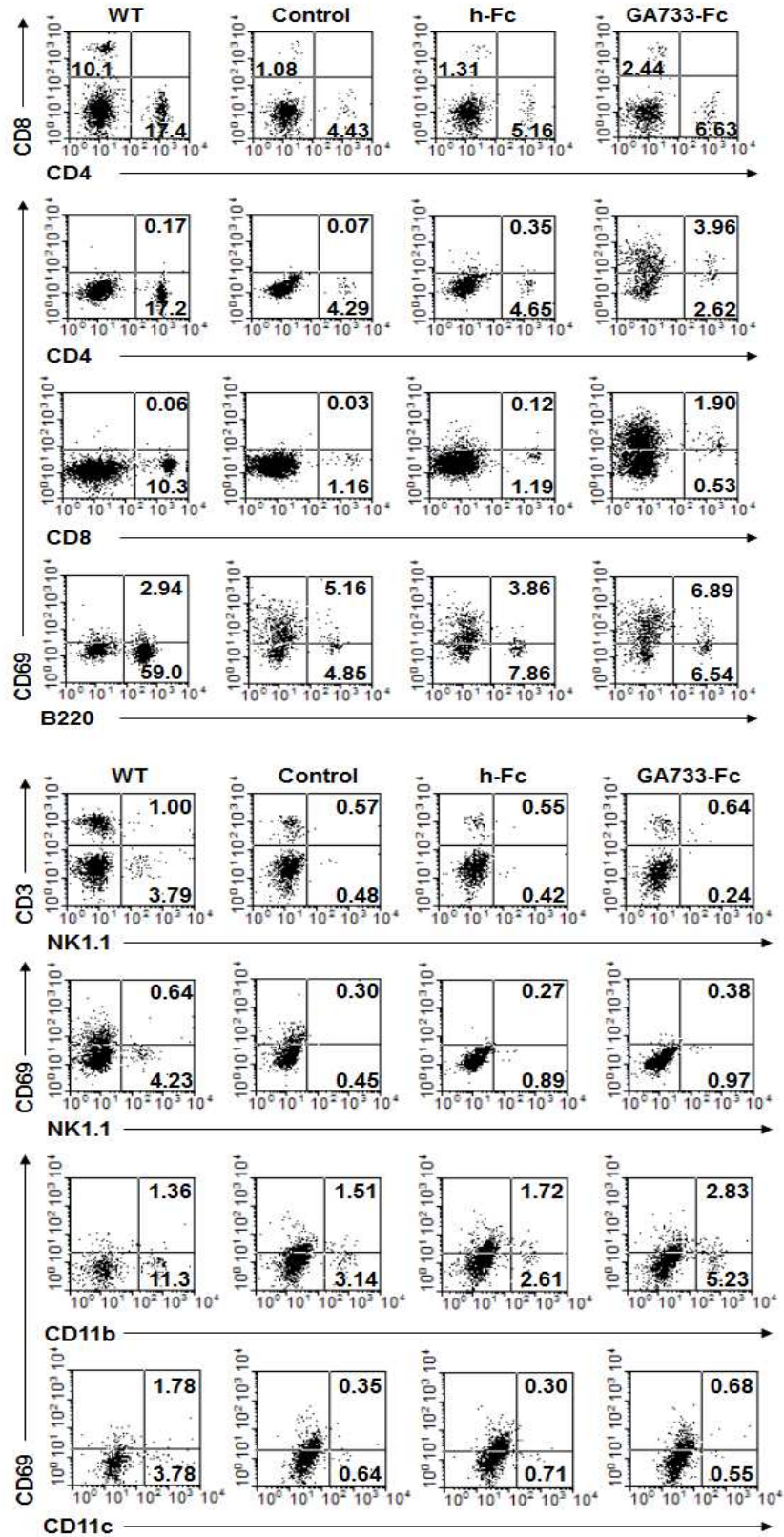


그림 147. 대장암 마우스 모델에서 GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매의 경구투여에 의한 비장 조직의 면역세포 변화 확인.

- Tumor 조직 또한 CD4+ 및 CD8+ T cell, 대식세포가 GA733-Fc 토마토 열매의 경구투여에 의해 증가되었으며, 그 활성 또한 증진되었음. NK cell의 경우 비장에서는 큰 차이를 보이지 않았지만, tumor 조직의 경우 GA733-Fc 토마토 열매를 경구투여한 그룹에서 NK cell이 증가됨을 알 수 있었음 (그림 148). 림프절 및 MLN 조직의 경우 WT 마우스와 비교하여 대장암 마우스 모델에서 CD4+ 및 CD8+ Tcell, 대식세포가 증가되었으며, GA733-Fc 토마토 열매의 경구투여에 의해 감소되는 현상을 보였음. 이 면역세포들의 활성 또한 대장암 마우스 모델에서 증가되었으며, GA733-Fc 토마토 열매의 경구투여에 의해 감소되었음 (그림 149). 이는 활성화된 CD4+ T cell 및 CD8+ T cell, 대식세포가 대장암 조직으로 이동하여 나타난 결과로 생각되어짐.
- 위 결과들을 종합하여 볼 때 대장암 마우스 모델에서 GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매에 의해 대장암에 대한 항암 효능을 보임을 알 수 있었음. 이는 GA733-Fc 토마토 열매가 대식세포의 활성을 증진시키고 그 결과 T cell 및 NK cell의 활성이 증가한 것으로 생각되어짐. 또한 활성화된 면역세포들이 tumor 조직으로 이동하여 대장암 조직의 세포사멸을 증가시킴으로써 대장암에 대한 항암효능을 보이는 것으로 사료됨. 이러한 결과는 향후 토마토를 섭취함으로써 보다 안전하고 안정적인 대장암 예방 및 치료제로의 활용성이 클 것으로 기대됨.

Tumor

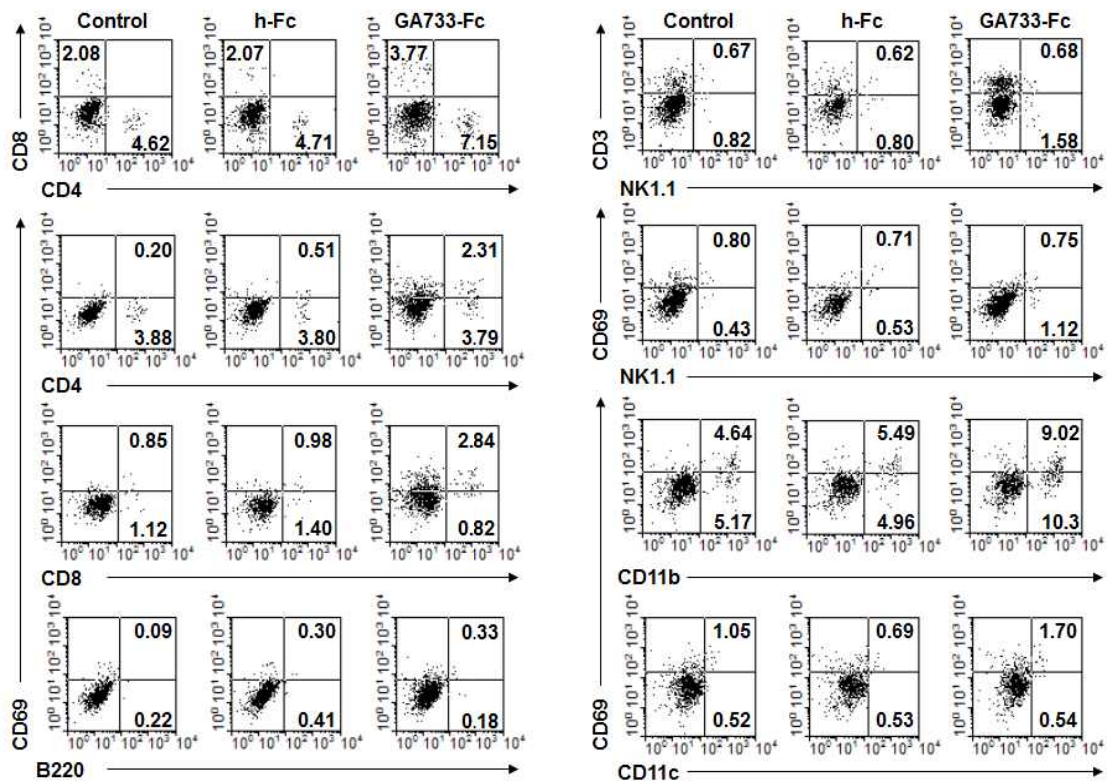


그림 148. 대장암 마우스 모델에서 GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매의 경구투여에 의한 Tumor 조직의 면역세포 변화 확인.

LN

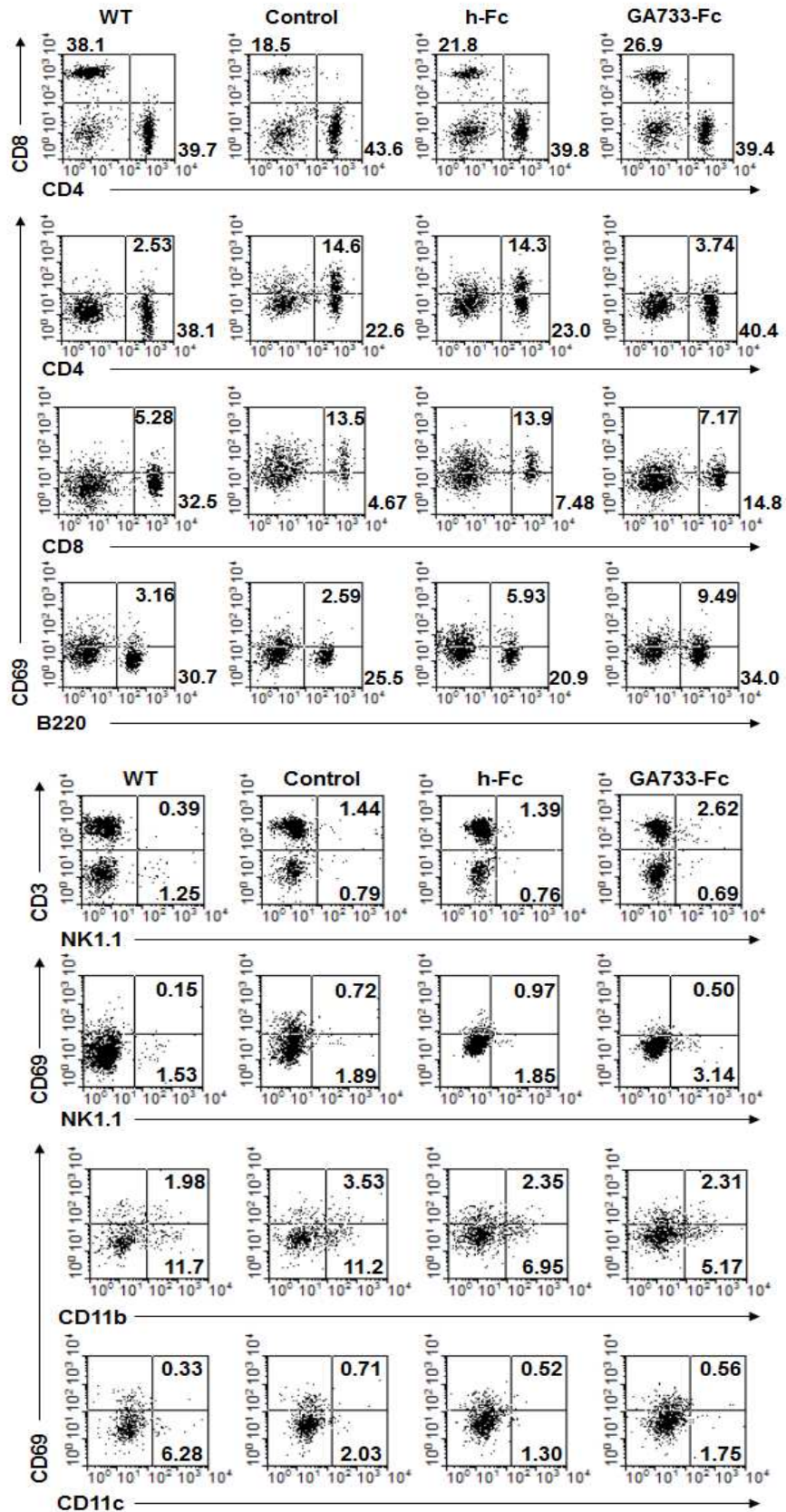


그림 149. 대장암 마우스 모델에서 GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매의 경구투여에 의한 림프절 조직의 면역세포 변화 확인.

MLN

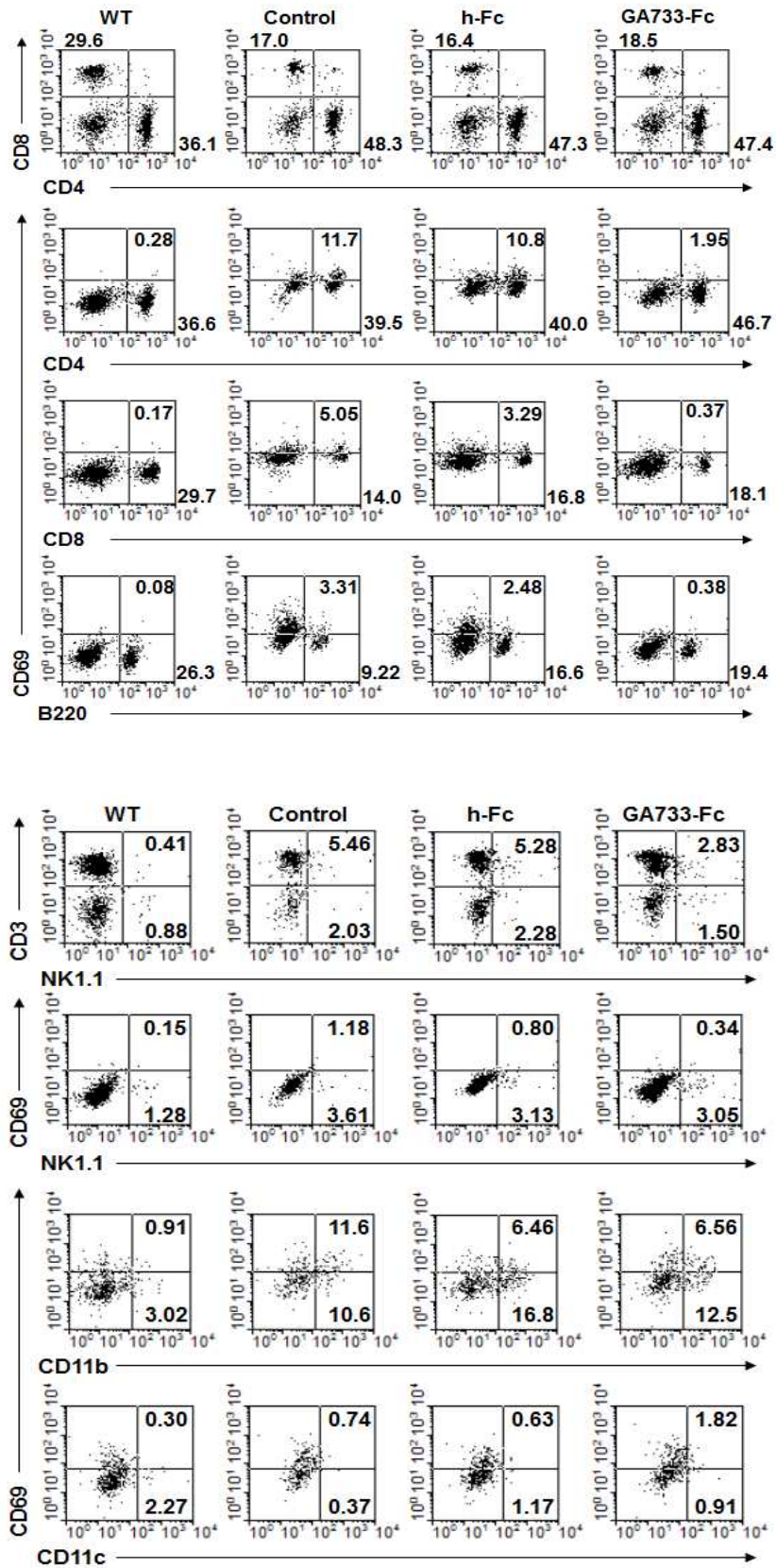


그림 150. 대장암 마우스 모델에서 GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매의 경구투여에 의한 MLN 조직의 면역세포 변화 확인.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011- 2012)	(1세부)대장암 예방용 수지상세포백신 효능 검증으로 예방용 재조합백신 실용화확립	<ul style="list-style-type: none"> 면역효과가 확인된 GA733-Fc with KDEL과 without KDEL 대장암 백신 단백질을 높은 수준으로 발현하는 형질전환 식물을 대량 재배 	100	<ul style="list-style-type: none"> GA733-Fc with KDEL과 without KDEL 대장암 백신 단백질을 높은 발현하는 형질전환 식물을 대형 비닐하우스에 대량 재배하여 실험에 사용할 material 대량 확보
		<ul style="list-style-type: none"> 대장암 백신 단백질을 생산하는 식물의 homozygous line seed bank 최적화 	100	<ul style="list-style-type: none"> GA733-Fc with KDEL과 without KDEL 대장암 백신 단백질을 높은 발현하는 형질전환 식물의 homozygous line seed bank 최적화를 위한 식물 seed 대량 확보
	(1협동) 당쇄화 개선을 통한 GA733-2-Fc의 치료효과를 극대화 할 수 있는 기반기술 개발 및 독성 평가 검사	<ul style="list-style-type: none"> β-1,4-galactosyltransferase 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (1단계 당쇄화 개선)된 GA733-2-Fc의 생산 및 당쇄 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> 식물에서 당쇄가 변형된 GA733-2-Fc 단백질을 생산하기 위한 식물 벡터시스템이 형질전환된 <i>Agrobacterium</i>을 확보함 형질전환된 <i>Agrobacterium</i>을 담배 식물체에 형질전환시킨 후 GA733-2-Fc 단백질 및 β-1,4-galactosyltransferase의 과발현에 의해 당쇄화가 변형된 GA733-2-Fc 단백질의 발현을 확인하고 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제함 GA733-2-Fc 단백질 및 β-1,4-galactosyltransferase의 과발현에 의해 당쇄화가 변형된 GA733-2-Fc 단백질의 당쇄화 구조를 MALDI-TOF 분석을 통해 분석함 β-1,4-galactosyltransferase가 과발현된 경우 생성된 GA733-2-Fc

			<p>단백질은 high mannose type의 당쇄를 많이 함유하는 것으로 확인됨</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc의 항암 치료 효과 검증 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 대장암종 MC38 세포가 이식된 실험동물 C57BL/6 mice에서 종양의 생성 및 성장을 확인하여 GA733-2-Fc 단백질의 항암효과를 검증하기 위한 대장암종 동물실험 시스템을 확립함 • GA733-2-Fc 단백질 (형질전환된 담배에서 분리 정제된 GA733-2-Fc-Sec 단백질 및 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc-Sec + GalT 단백질)이 처리된 수지상세포가 대장암종 MC38 세포에 의해 유도되는 종양의 증식에 미치는 영향을 확인함 • GA733-2-Fc-Sec 단백질이 첨가된 배지에서 배양된 수지상세포가 투여된 경우 종양의 증식은 대조군에 비해 감소하였으며 당쇄화가 변형된 GA733-2-Fc-Sec + GalT 단백질이 처리된 수지상세포가 투여된 경우 종양의 증식은 더욱 감소하는 것으로 확인되었음
	<ul style="list-style-type: none"> • 당쇄화 개선된 GA733-2-Fc의 <i>in vitro</i> 독성 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 당쇄화가 개선된 GA733-2-Fc 단백질 투여량의 최적조건 도출과 관련한 <i>in vitro</i> 독성 평가 실험을 수행하여 형질전환된 담배에서 분리 정제된 GA733-2-Fc 단백질이 세포 독성을 지니지 않는다는 것을 확인함
(제2협동) 식물유래 암항원을 이용한 대장암 경구백신 실용화 기반기술 개발 및 대장암 백신 생산 형질전환 토마토 품종 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 열매 특이적 프로모터를 이용한 GA733-Fc 형질전환 토마토 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • Plant expression vector construction
		100	<ul style="list-style-type: none"> • 토마토 형질전환
	<ul style="list-style-type: none"> • 대장암세포 및 대장세포에서 GA733과 GA733-Fc를 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 사람 및 mouse natural killer (NK), cytotoxic T cell, dendritic cell (DC, 수지상세포), B cell 등 면역세포에서 GA733, GA733-Fc, 표적단백질 및

				<p>신기능성 수용체단백질들의 처리 농도 및 세포독성 확인</p> <p>100</p> <ul style="list-style-type: none"> GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 처리에 의한 면역세포 활성화기능 증진방법 확립 <p>100</p> <ul style="list-style-type: none"> 사람 및 mouse 대장(암) 세포(주)에서 GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들에 의한 항암효능 검증
2차 년도 (2012- 2013)	(1세부)대장암 예방용 수지상세포백신 효능 검증으로 예방용 재조합백신 실용화확립	<ul style="list-style-type: none"> 식물에서 발현된 백신 단백질의 정제 및 확보 	100	<ul style="list-style-type: none"> 대장암 항원-항체 재조합 단백질 GA733-Fc를 대량확보 하기 위한 형질전환 식물체의 대량재배 식물유래 대장암 항원-항체 재조합 단백질 GA733-Fc의 정제 확보 형질전환 식물의 대량재배를 통한 homozygous line의 상업화목적의 seed bank 확보
		<ul style="list-style-type: none"> 식물에서 정제된 백신 단백질의 당구조분석 결과 확인 	100	<ul style="list-style-type: none"> MALDI-TOF를 이용하여 정제된 식물유래 대장암 항원-항체 재조합 단백질 GA733-Fc의 당구조 분석 및 백신단백질의 기능성 모색
	<ul style="list-style-type: none"> 수지상세포와 NK세포를 이용한 동물실험 모델에서 면역 활성화 확인 	50	<ul style="list-style-type: none"> SPR(Surface plasmon resonance) assay를 통한 식물유래 항원-항체 백신 단백질 GA733-Fc의 면역효능성 확인 수지상세포와 NK세포를 이용한 동물실험 모델에서의 면역 활성화 실험은 현재 진행중임 	
	(1협동)당쇄화 개선을 통한 GA733-Fc의 치료효과를 극대화 할 수 있는 기반기술 개발 및 독성 평가 검사	<ul style="list-style-type: none"> β-1,2-xylosyltransferase와 α-1,3-fucosyltransferase 유전자의 동시 knock-down에 의한 당쇄화 개선 (2단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc의 생산 	100	<ul style="list-style-type: none"> β-1,2-xylosyltransferase와 α-1,3-fucosyltransferase 유전자가 동시에 knock-down 된 식물체에서 당쇄화 개선 GA733-2-Fc 단백질을 생산하기 위한 pFGC5941/ XylT-FucT RNAi 벡터시스템을 구축함 pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 <i>Agrobacterium</i>을 확보하고 담배 식물체에 형질전환시킨 후 각 유전자의 발현 억제를 RT-PCR을 통해 확인함

			<ul style="list-style-type: none"> • pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터가 형질전환된 재조합 <i>Agrobacterium</i>을 담배 잎 절편체에 형질전환 시키고 선별 배지에서 성장시켜 pFGC5941/XylT-FucT RNAi 벡터가 형질전환된 담배 식물체를 확보함 • β-1,2-xylosyltransferase와 α-1,3-fucosyltransferase 유전자의 발현이 억제된 담배 식물체에서 2단계 당쇄화 개선 GA733-2-Fc 단백질의 발현을 확인하고 Protein A agarose bead를 이용한 affinity chromatography 방법으로 분리 정제함 • GA733-2-Fc 단백질 및 β-1,4-galactosyltransferase의 과발현에 의해 당쇄화가 변형된 GA733-2-Fc 단백질 및 β-1,2-xylosyltransferase, α-1,3-fucosyltransferase 유전자의 발현 억제를 의해 생산된 2단계 당쇄화 개선 GA733-2-Fc 단백질의 당쇄화 구조를 MALDI-TOF 분석을 통해 분석함
	<ul style="list-style-type: none"> • 당쇄화 개선된 GA733-Fc의 동물 실험을 통한 <i>in vivo</i> 알러지 독성 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> • GA733-2-Fc 및 당쇄화 개선 GA733-2-Fc (GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT K/D) 단백질을 실험쥐의 복강에 투여하여 면역반응을 유도하고 혈청에 존재하는 GA733-2-Fc 특이 IgG 및 IgE 항체의 존재를 효소면역측정법으로 분석함 • GA733-2-Fc, GA733-2-Fc + GalT, GA733-2-Fc + XylT/FucT K/D 단백질이 복강면역된 실험쥐에서 비장세포를 확보하고 GA733-2-Fc 항원의 존재에 의한 cytokine IFN-γ 및 IL-4, IL-5, IL-10의 분비를 효소면역측정법으로 분석함
	<ul style="list-style-type: none"> • β-1,2-xylosyltrans 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 담배 식물체에서 β-1,2-

		ferase와 α-1,3-fucosyl transferase 유전자의 동시 knock-down 및 β-1,4-galactosyltr ansferase 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc의 생산		<i>xylosyltransferase</i> 와 <i>α-1,3-fucosyl transferase</i> 유전자의 동시 knock- down 및 <i>β-1,4-galactosyl- transferase</i> 유전자 과발현에 의해 생산되는 3단계 당쇄화 개선 GA733-2-Fc의 발현을 Western blot 분석을 통해 확인함
(제2협동) 식물유래 암항원을 이용한 대장암 경구백신 실용화 기반기술 개발 및 대장암 백신 생산 형질전환 토마토 품종 개발	• 형질전환 토마토 분석		100	• 대장암 백신 생산량이 높은 형질전환 토마토line 선별
			100	• 삽입 유전자의 copy 수 및 삽입 위치를 분석하여 single copy, intergenic 하게 삽입된 형질전환 토마토 line 선별
			100	• 대장암 백신 생산 형질전환 토마토를 이용한 대장암 예방 효능 검정
	• 대장암세포 및 대장세포에서 GA733과 GA733-Fc를 표적으로 한 항암/항염효능 검증		100	• 대장암 및 IBD mouse 모델에서, GA733, GA733-Fc, 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 최적의 <i>in vivo</i> 투여조건 확립
			100	• GA733, GA733-Fc 표적단백질 및 신기능성 수용체단백질들의 투여에 의한 체액성, 세포매개면역 및 점막면역기능 분석
		100	• <i>in vivo</i> 항암/항염기능 분석	
3차 년도 (2013- 2014)	(제1세부)대장암 예방용 수지상세포백신 효능 검증으로 예방용 제조합백신 실용화확립	• 실용화를 위한 seed bank 구축	100	• 형질전환 식물의 대량재배를 통한 homozygous line의 상업화목적의 seed bank 확보
		• 식물유래 대장암 경구용 백신 제품화 기반 구축		• 식물유래 대장암 경구용 백신 제품화를 위한 기반 기술을 개발 및 제품화를 위한 공정 최적화
		• 식물유래 경구용 대장암 백신 제조		• 식물유래 대장암 항원 단백질의 대량 생산 및 정제 공정 확립 및 식물에서

<p>(제1협동) 당쇄화 개선을 통한 GA733-Fc의 치료효과를 극대화 할 수 있는 기반기술 개발 및 독성 평가 검사</p>	<p>공정 개발</p>		<p>추출한 대장암 항원을 이용한 제품화 공정 개발</p>
	<p>• 경구용 대장암 백신 생산 최적화 기반 기술 개발</p>		<p>• 경구용 대장암 백신 제품화 방법 최적화 및 제품의 상용화를 위한 scale-up 기반 구축</p>
	<p>• 식물유래 의료용 단백질의 실용화 기반 기술 확립</p>	100	<p>• 식물유래 대장암 항원-항체 재조합 단백질 GA733-Fc의 정제법 확립</p>
		100	<p>• 수지상세포와 NK세포를 이용한 동물실험 모델에서의 면역 활성화 검증</p>
	<p>• <i>β-1,2-xylosyl- transferase</i>와 <i>α-1,3-fucosyl- transferase</i> 유전자의 동시 knock-down 및 <i>β-1,4-galactosyl- transferase</i> 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc 단백질의 생산 및 분리정제</p>	100	<p>• <i>β-1,2-xylosyltransferase</i>와 <i>α-1,3- fucosyltransferase</i> 유전자의 동시 knock-down되고 <i>β-1,4-galactosyl- transferase</i> 유전자가 과발현된 식물체에서 3단계 당쇄화 개선 GA733-Fc (GA733-Fc + GalT + XylT/FucT KD) 단백질 생산 및 분리 정제</p> <p>• 3단계 당쇄화가 변형된 GA733-Fc 단백질의 당쇄화 구조 분석</p>
	<p>• <i>β-1,2-xylosyl- transferase</i>와 <i>α-1,3-fucosyl- transferase</i> 유전자의 동시 knock-down 및 <i>β-1,4-galactosyl- transferase</i> 유전자 과발현에 의해 당쇄화 개선 (3단계 당쇄화 개선)된 GA733-Fc 단백질의 항암치료 효과 검증</p>	100	<p>• 실험동물 마우스에서 추출한 수지상세포에 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질 처리 및 수지상세포의 성숙 유도 후 대장암세포가 투여된 마우스에 첨가하여 1, 2, 3단계 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질에 의한 종양의 성장 억제 효과 검증</p> <p>• GA733-Fc 단백질 및 1, 2, 3 단계 당쇄화 변형된 GA733-Fc 단백질을 실험동물 마우스에 복강 면역하여 항체의 생성을 유도 후 대장암 CT-26 세포를 피하 주사하여 종양의 성장을 유도하고 GA733-Fc 단백질에 의한 종양 성장 억제 효과 확인</p>
	<p>• 당쇄화 개선된</p>	100	<p>• 당쇄화 개선된 GA733-Fc 단백질의</p>

		GA733-Fc의 <i>in vivo</i> 급성 독성 평가 연구		<i>in vivo</i> 급성 독성 평가를 위한 동물실험 수행
(제2협동) 식물유래 암항원을 이용한 대장암 경구백신 실용화 기반기술 개발 및 대장암 백신 생산 형질전환 토마토 품종 개발	• LMO 유해성 평가를 위한 형질전환 토마토 이벤트 확보	100	• LMO 유해성 평가를 위한 이벤트 확보 : 선별된 elite line으로부터 삽입 유전자가 single copy, intergenic하게 삽입된 형질전환 line을 선별하고 후대육성에 의한 homo line 개발 및 고정	
		100	• 형질전환 토마토 seed 다량 확보 : LMO 유해성 평가를 위한 환경방출 실험 등에 사용할 형질전환 토마토 후대 진전 및 seed 다량 확보	
	• 대장암 및 IBD 예방/치료용 경구백신 실용화 기반기술 개발	100	• 항암면역원성 및 면역기능 증진 등에 대한 효율을 평가하고 최적화 조건 확립	
		100	• 전임상을 위한 최적의 항암/항염 조건으로 mouse에서 항암/항염 증진 방법 구축	
		100	• 식물유래 표적단백질 및 신기능성 점막면역기능증진 보조제의 combinational 투여에 의한 대장암 및 IBD의 예방 또는 치료효율, 유효성 및 안정성 향상으로 경구백신 실용화 기반기술 개발	
		100	• GA733-Fc를 발현하는 토마토 열매를 이용한 대장암 마우스 모델에서의 항암 효능 검증	

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절. 연구개발 성과

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

가. 연구개발 성과

구분	특허		신제품				유전자 원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종 명칭 등록	품종 생산 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표							3	1	
	달성		1					3	1	
2차 년도	목표	1						4		
	달성							4		
3차 년도	목표	3	1			1		4		
	달성	1						4*	3	
계	목표	4	1			1		11	1	
	달성	1	1					11	4	5**

* 4 SCI 논문 중 1편은 투고된 상태임 [Animal Cells and Systems (IF 0.89)].

**홍보성과 2건과 학술상 3건

나. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1		1	
	달성		1(시제품화)		2	

2. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저 자	공동저자				
2012년	Expression of GA733-Fc fusion protein as a vaccine candidate for	여철	고기성	이경진, 소영설, 이정환, 소양강, 추영국, 오두병, 황경아,	Journal of Biomedicine and Biotechnology	2012 (364240)	국외	SCI

	colorectal cancer in transgenic plants			오승환, 한연수				
	Expression of a recombinant chimeric protein of human colorectal cancer antigen GA733-2 and Fc fragment of antibody using a replicating vector based on Beet curly top virus in infiltrated <i>Nicotiana bentamiana</i> leaves	김경일	정인식	정하영, 유기현, 박종화, 이현호, 석연주, 고기성, 강형식, 이경진, 오두병, 정영희	Plant Biotechnology Reports	6(3)	국내	SCI(E)
	Interleukin-24 supresses the growth of vascular smooth muscle cells by inhibiting H ₂ O ₂ -induced ROS production	이기모, 강행아	강형식	박민, 이화연, 송민지, 고기성, 오재욱	Pharmacology	90	국외	SCI
	Chimerism of multiple monoclonal antibodies expressed in a single plant	Arshad Jamal	고기성	이정환, 이경진, 오두병, 김득수, 이경기, 추영국, 황경아	Horticulture, Environment, and Biotechnology	53(6)	국외	SCI
	식물 및 곤충세포 발현시스템을 이용한 암진단 및 치료용 항체 생산	이정환	고기성	김득수, 이재혁, 명순철, 황경아, 추영국	대한비뇨기종양 학회지	10(2)	국내	비SCI
2013년	Glycomodification and characterization of anti-colorectal cancer immunotherapeutic monoclonal	소양강	고기성	이경진, 김득수, 이정환, 오두병, 황경아,	Plant Cell, Tissue and Organ Culture	113(1)	국외	SCI

	antibodies in transgenic tobacco			고기남, 추영국				
	Intracellular reprogramming of expression, glycosylation, and function of a plant-derived antiviral therapeutic monoclonal antibody	이정환	고기성	박다영, 이경진, 김영관, 소양강, 류재성, 오승환, 한연수, 고기남, 추영국, 박성주, Robert Brodzik, 이경기, 오두병, 황경아, Hilary Koprowski, 이용성	PLoS ONE	8(8)	국외	SCI
2014년	Bacterial -(1,3)-glucan prevents DSS-induced IBD by restoring the reduced population of regulatory T cells	이광호, 박민, 지건영	강형식	이화운, 장지훈, 윤일주, 오승수, 김수만, 정윤화, 윤철호, 김미경, 이인영, 최하림, 고기성	Immunobiology	219(10)	국외	SCI
	Expression of recombinant vaccines and antibodies in plants	고기성			Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	33(3)	국외	SCOPUS

Optimization of ELISA conditions to quantify colorectal cancer antigen-antibody complex protein (GA733-FcK) expressed in transgenic plant	안준식	고기성	이경진	Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	33(1)	국외	SCOPUS
N-Glycosylation modification of plant-derived virus-like particles: an application in vaccines	김현순	고기성	전재홍, 이경진	Journal of Biomedicine and Biotechnology	249519	국외	SCI
Optimization of storage temperature for the pollen viability of transgenic plants that express the anti-breast cancer monoclonal antibody mAb BR55	임채연	고기성	김득수, 이경진, 황경아, 추영국	Plant Omics	7(5)	국외	SCI
Effect of the developmental stage and tissue position on the expression and glycosylation of recombinant glycoprotein GA733-FcK in transgenic plants	임채연	고기성	이경진, 오두병	Frontiers in Plant Science	5	국외	SCI
Purification of human carcinoma antigen GA733-2 expressed in <i>Escherichia coli</i> and production of its polyclonal antibody	박세희	정영희	김아영, 마상훈, 김현민 강형식, 맹진수, 고기성, 정인식,	Animal Cells and Systems	Submitted	국외	SCI
Compatibility of	김경일	정인식	정하영,	생명자원과학	33	국내	비SCI

Beet curly top virus replicon-based vector for the production of GA733-2 in plants				이현호, 부원원 박종화, 고기성, 강형식, 정영희, 이윤형	연구논문집			
--	--	--	--	--	-------	--	--	--

2. 특허성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2014년	염증질환 또는 면역질환 치료제로서의 식물유래 GA733-2-Fc 단백질 및 이의 제조방법	전남대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0118578	2012.09	TREM-2 GENE AND PROTEIN AS INHIBITORS OF EXPRESSION OF GA733-2, AND TRANSGENIC ANIMALS COMPRISING THE SAME AND USES THERE OF	강형식	미국	8263822

3. 인력활용/양성 성과

가. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
18명	4	14			12	6	5		13

4. 홍보성과

가. 언론매체 홍보

(1) Leaders' World 2012년 7월



중앙대학교 의과대학 의학부 고기성(29기) 교수
**“안전하고 저렴한 단백질 신약 개발로
 모든 사람들에게 건강하고 행복한 삶을
 선물하고 싶어요”**

“의생명과학은 최근 가장 각광받고 있는 학문 중 하나입니다. 분자생물학, 세포생물학, 병리학, 유전학, 면역학 등 관련 분야의 융합이 필요한 분야로, 특히 식물생명공학은 위의 전공들에 식물 생리학 지식이 덧붙여져야 하는 복합적 학문이라고 생각합니다. 그런 이유로 다양한 분야의 연구자들 또한 관심을 쏟고 있는 것이 바로 식물생명공학 분야인데, 그중에서도 단연 주목받고 있는 분야 중 하나가 바로 저희 연구실에서 연구하고 있는 와생명과학적으로 응용이 가능한 유용단백질신약을 식물에서 효율적으로 생산하는 연구분야입니다.”

국연구재단, 농림수산물기회평가원(FPET) 사업의 연구지원을 받고 있는 연구실이기도 하다. 연구팀을 소개하는 고기성 교수는 한껏 들뜬 표정으로 몇 가지의 연구에 대한 설명을 해주었다. “연구팀을 구성하는 대학원생들과 연구원의 모습이 무척이나 열정적이어서 보기만 해도 절로 흐뭇한 미소가 지어진다”는 고 교수는 연구팀에서는 다양한 도전과 시행착오를 거듭해온 결과 현재 “대장암 예방용 백신단백질 유전자(GA733-2)와 항체 Fc region과의 재조합(cloning)을 통해 백신 단백질 구조개선을 위한 식물백터를 확립한 상태”라고 덧붙였다.

“안전하고 저렴한 단백질 신약 개발로 모든 사람들에게 건강하고 행복한 삶을 선물하고 싶어요”란 주제로 언론매체에 연구과제 홍보



“사회의 소외층 위한 안전하고 저렴한 단백질 신약 개발” 이란 주제로 언론매체에 연구과제 홍보

제 2 절. 연구개발 성과 활용계획

세부과제를 성공적으로 수행함으로써 중요한 원천기술을 개발하여 기술이전단계까지 도달할 수 있도록 계획하고 있음. 특히 당구조와 단백질 구조 개선을 통한 향암예방단백질의 활성증강에 대한 연구는 다른 모든 농생명의약품 단백질 소재의 구조 개선을 위해 응용할 수 있는 실용화 기반 기술이 될 수 있음.

1. 기술적 측면

- 1) 식물을 이용하여 생산하는 다양한 암 예방용 백신 뿐 만 아니라 다른 전염병 및 성인병 백신 단백질 및 당 구조변형을 통한 효율적인 활성증폭 기반 기술로 활용 가능함.
- 2) 면역부작용 및 allergy 반응의 요인을 제거된 안전한 식물발현시스템을 확보함으로써 다른 의료용 단백질 당구조 개선에 활용
- 3) 다양한 암 치료용 항체 뿐 만 아니라 여러 전염병 항체의 단백질 및 당 구조 인간화를 위한 식물생산 최적화시스템 기반 기술 확보 효과
- 4) 대장암 및 IBD 억제기술 확립을 통하여 기존 치료제의 문제점을 극복할 수 있는 효율적

인 암 억제제 개발로 고부가가치 생명공학산물 창출 기대

- 5) 항암/항염 기능 증진기술 확립으로 각종 암 및 만성염증질환에 대한 백신개발에 활용
- 6) 대장암 및 IBD의 병인 및 작용기전 규명을 통한 근원적인 치료기반 기술에 활용
- 7) 항암/항염면역반응 관련 질환 연구의 원천기술 개발에 활용
- 8) 토마토 열매를 이용한 대장암 예방용 edible 백신 생산 기반 기술로 활용 가능함
- 9) 참여기업의 기술을 이용한 Nasal injection용 백신 제품 및 edible용 제품 개발
- 10) 본 과제에 의해 개발된 성과인 식물유래 암항원 및 백신 개발 기술은 매우 높은 역량의 생명공학기술이자 미래기술로서 산업화로의 개발이 절실한 기술임.
- 11) 그럼에도 불구하고, 현재 바이오의약품의 항암제 분야는 passive immunotherapy인 항체 치료제가 시장의 대세이며, 인체 면역계를 적극적으로 활용하는 active immunotherapy인 항암백신 분야는 산업적으로는 대동기임.
- 12) 최근엔 면역계를 활성화시키는 항체치료제를 이용한 Immunotherapy가 각광을 받고 있으며, 인체 면역 시스템을 직.간접으로 활용한 다양한 병용치료요법 개발이 활발한 상태임.
- 13) 항암백신 분야는 세포치료제 및 동물세포 배양 기술 기반이 대부분을 차지하고 있으며, 식물유래 항암백신 기술은 추가적인 연구/개발이 필요한 상황임.
- 14) 개발부분의 생산성 부분에서 현재 수 ~ 수십 g/L 수준의 동물세포 기반 생산성 대비 식물유래 기반의 생산성에 대한 검증 및 개선 또한 추가 개발이 필요함.
- 15) 식물유래 항암백신의 안정성 및 규제기관의 가이드나 기준 등의 개발이 매우 저조한 상태라 임상개발에 이은 규제기관의 허가가 현재로선 쉽지않으며, 이 부분에 대한 추가적인 개발이 필요함.
- 16) 따라서, 효능, 안정성 및 생산성, 허가 용이성 등을 종합적으로 고려한, 약으로서의 개발 가능성에 대한 척도인 Druggability /Developability의 개선이 추가 개발될 것이며, 그로 인한 특허 기술의 가치도 보다 향상될 것으로 기대됨.
- 17) 기술이전
 - 일시 : 향후 5년
 - 금액 : 전체 기술이전 금액 산정은 아래의 두 요소를 기반으로 계상될 것임.
 - 1) 시장 규모 대비 사업화 시 예상 점유율 및 예상 판매 수익.
 - 2) 추가 비임상 및 임상개발 등에 투입될 개발비 규모
 - 방법 : Upfront fee, Milestone fee, Royalty의 3단계 비용 부담을 골자로 계약 체결될 예정임.

2. 경제적 측면

- 1) 농촌경제에 고부가가치의 안전하고 효과 있는 의료용 단백질을 생산하는 기능성 토마토 농작물 보급 및 생산을 통해 농촌 경제 활성화 및 FTA에 대응할 수 있는 농작물생산으로 소득증대
- 2) 대장암 및 다른 암의 예방 및 치료를 통한 국민건강 증진으로 국가경쟁력 증진효과
- 3) 대장암 및 IBD 치료기반 기술개발로 고부가가치 생명공학산물 개발에 활용
- 4) 신규 유전자와 항암 치료용 단백질 소재 및 식물의 지적재산권 취득기대

3. 학문적 측면

- 1) 본 연구결과로부터 얻어지는 대장암 및 IBD 억제와 항암면역반응 조절기술을 교육과 연

구에 활용

- 2) 우수한 연구자질과 능력을 갖춘 농업생명과학, 생물, 보건의료산업분야의 전문인력 육성에 활용하여 농업 및 의약산업 개발에 일조 기대
- 3) 본 연구에서 이용되는 최신 연구기술 및 기법을 발전시키고 체계화하여 소속 연구원 및 대학원생들에게 훈련과 교육을 시켜 세계적 경쟁력이 있는 기초학자 양성에 활용
- 4) 담배식물이 아니고, 채소원에 작물이나 다른 바이오매스 생명체를 이용한 생산시스템을 개발할 계획임.
- 5) GA733-Fc 형태가 아닌 좀더 커다란 단백질 구조를 구현해 내어 백신 효과를 극대화시킬 수 있는 연구개발을 할 것임.
- 6) 산업화를 위해서는 좀 더 구체적인 독성 실험과 여러 전임상 및 임상실험이 필요할 것으로 보임.
- 7) 빠른 산업화를 위해서는 의약품으로의 개발보다 실험용 시약으로 판매될 수 있도록 제품 개발을 할 수 있을 것으로 보임.

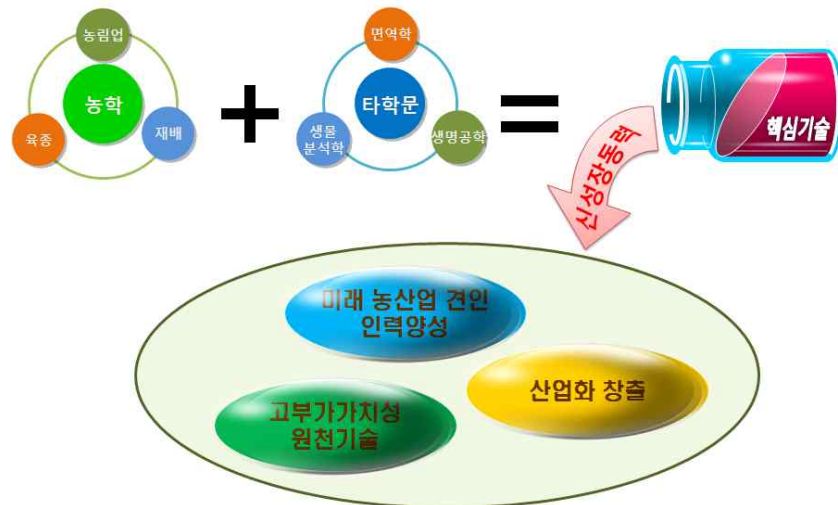


그림. 연구개발결과의 활용방안 및 기대성과

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.