

GOVP1200725668

PTD와 형질전환식물을 이용한 면역피부질환치료용  
단백질 신약의 개발

연세대학교 생명공학과

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “PTD와 형질전환식물을 이용한 면역피부질환치료용 단백질 신약의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 25 일

주관연구기관명 : 연 세 대

총괄연구책임자 : 이 상 규

세부연구책임자 : 김 우 택

연 구 원 : 신 민 정

연 구 원 : 김 균 도

연 구 원 : 김 은 성

협동연구기관명 : 포휴먼텍

협동연구책임자 : 이 승 규

# 요 약 문

## I. 제 목

PTD와 형질전환식물을 이용한 면역피부질환치료용 단백질신약의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

외부로부터 유래한 항원이 체내에 침투 시, 인체의 면역체계는 항원을 인식하여 항원 특이적인 T 세포들이 활성화된다. 활성화된 T 세포는 면역반응에 필요한 cytokine들의 분비 및 effector molecule들의 발현을 통하여 다양한 세포성 및 체액성 면역반응을 수행한다. 그러나 이러한 반응이 과도하게 일어날 경우, 아토피성 피부염, 피부노화 및 탈모 등의 피부질환이 발생하게 된다.

최근 위와 같은 피부질환에 있어서 면역반응의 중추적인 역할을 하는 T 세포의 활성화 및 세포 유도하는 이들 피부질환의 유도 및 진행에 결정적 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다. 또한 피부세포 및 T 세포의 세포 유도사를 저해할 수 있는 anti-apoptotic 단백질 및 retinoic acid에 의한 질환치료효과에 중요한 Retinoic Acid Receptor (RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$ )를 이용한 질환치료는 질환 target molecule에 대한 선택성 및 치료효과가 뛰어나는 것으로 증명되었으나, 이들 단백질을 in vivo 및 in vitro에서 세포내로 전달할 수 있는 전달 system이 없어서 차세대 단백질 신약 개발이 불가능하게 여겨져 왔다.

이와 같은 문제를 해결하기 위하여, 세포내에서 단백질의 glycosylation이 잘 유도되며 생산경제성이 매우 높은 식물세포를 이용한 생리활성조절단백질의 생산이 보고되고 있으며, 특히 항원에 선택적으로 반응하는 immunoglobulin의 생산은 식물분야에서 획기적인 성과로 여겨지고 있다. 그러나 식물세포내로의 단백질 및 유전자 전달이 복잡하고 어려운 실정이기 때문에 이 같은 문제의 창의적인 해결은 식물세포 형질전환식물을 차세대 생명공학제품생산의 bioreactor로써 사용할 수 있는 혁신적인 계기가 될 것이다.

최근, 단백질을 in vivo 및 in vitro에서 세포내로 전달할 수 있는 PTD(Protein Transduction Domain)의 발견은 이와 같은 차세대 단백질 신약개발을 식물세포에서도 가능하게 하여, 전 세계적으로 새로운 PTD의 발견 및 이를 이용한 다양한 질환치료제의 개발이 무서운 속도로 진행되고 있다. Protein transduction은 특정 아미노산 배열을 가진 작은 크기의 peptide(9 - 34 개)가 이와 연결된 120kDa 이상의 분자량이 매우 큰 단백질들도 단시간 내에(30분 이내) 효율적으로(모든 세포에 100%에 가까운 효율) 세포 내로 전달할 수 있는 기술이다. 이것은 지금까지 가장 큰 문제가 되어온 유전자와 단백질 등의 hydrophilic molecule들의 세포 내 전달을 손쉽게 해결할 수 있는 혁신적인 기술로써, 신약개발 분야의 새로운 시대를 이끌어 나아갈 차세대 기술로 평가되고 있다.

본연구진은 최근 연구결과를 통하여, 기존의 PTD보다 in vitro 및 in vivo에서 단백질의 세포 내 전달효과가 약 50배정도 더 우수하고, 기존의 PTD 중 가장 크기가 작으며, 피부 및 nasal route를 포함한 다양한 경로를 통하여 단백질뿐만 아니라 DNA까지 동식물세포 내로 전달할 수 있는 새로운 두 개의 PTD(9 amino acid의 S-PTD: 2002년 1월 특허출원 : 출원번호 2002-3183 , 11 amino acid의 M-PTD: 2002년 1월 특허출원 : 출원번호 2002-3184)를 각각 사람과 쥐의 단백질로부터 발견하였으며, 그중 S-PTD는 in vivo에서 간에 특이적으로 단백질 및 유전자를 전달하는 특징을 가지고 있다는 것을 확인하였다.

따라서 본 연구과제에서는 피부의 노화 및 자가면역세포에 의하여 건강한 조직 및 장기를 파괴하는 작용기작으로 최근 밝혀지고 있는 apoptosis를 저해하는 세포질 단백질인 FLIPs, cIAP-1, -2

XIAP, HSP, Bcl-2 or Bcl-x, 세포핵내에 존재하면서 retinoic acid에 의한 피부노화방지에 중요한 전사인자인 RAR과 RXR을 본 연구진이 발견한 새로운 두 개의 PTD와 융합단백질 형태로 식물 세포에서 생산하고자 한다. 또한 본 연구진이 개발한 PTD를 이용한 DNA 전달기술을 이용하여 위의 유전자들을 가지고 있는 형질전환 식물을 생산하여 면역피부질환 치료용 식물을 개발한다. PTD와 식물세포를 이용하여 고부가가치의 질환치료용 단백질 신약 개발은 많은 질환의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 단백질들을 짧은 시간 내에 신약화 할 수 있어서 질환에 고통 받고 있는 수많은 환자들에게 무한한 혜택을 줄 것이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 ( 2004 )	PTD와 융합된 면역피부질환 치료용 단백질신약의 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reporter gene인 EGFP와 PTD가 결합된 DNA 구조의 제작 및 bacteria system에서 PTD- EGFP 융합단백질의 발현 및 분리 정제.</li> <li>- 분리정제된 PTD-EGFP 융합단백질의 suspension calus 및 뿌리세포로의 전달 효과 및 세포내 localization을 분석</li> <li>- Anti-apoptotic protein (FLIPs, cIAP -1, -2, XIAP, HSP, Bcl-2 or Bcl-x), retinoic acid receptor (RAR<math>\alpha</math> and RXR<math>\alpha</math>)을 encoding하는 유전자의 cloning 및 PTD와의 융합DNA구조의 제작 (anti-apoptotic protein의 경우 caspase cleavage site를 PTD와 이들 단백질사이에 삽입하여 apoptosis가 일어난 세포에서 anti-apoptotic protein이 세포질내로 분리되도록 함)</li> <li>- E coli에서 발현된 위의 PTD 융합단백질들의 발현 및 분리정제</li> </ul>

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 ( 2005 )	Suspension calus 또는 식물뿌리세포에서 제작된 PTD 융합단백질의 생리활성조절효과의 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 분리정제된 PTD-융합단백질의 calus의 suspension culture, 뿌리세포내로의 전달효과 및 세포내 localization의 분석</li> <li>- 식물세포내로 전달된 PTD 융합단백질의 구조적 변화를 proteomics를 이용하여 분석</li> <li>- 식물세포내에서 자연상태의 구조로 변환된 PTD 융합단백질의 분리 및 정제.</li> <li>- 식물세포에서 생산된 PTD 융합단백질의 동물세포내로의 전달효과 및 세포내 localization의 분석</li> <li>- 동물세포주 모델에서 PTD 융합단백질의 EPO 효과, anti-apoptotic 효과 또는 RAR 및 RXR에 의한 유전자발현효과를 분석</li> <li>- PTD-융합단백질의 대량생산을 위한 최적화공정의 확립</li> <li>- PTD-DBD(DNA Binding domain)과 DBD과 선택적으로 결합하는 sequence를 가진 expressible form의 유전자를 이용하여 식물세포내로의 유전자전달 system의 구축</li> </ul>

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 ( 2006 )	PTD 융합단백질의 in vivo 질환치료효과의 분석 및 PTD를 이용한 새로운 유전자변형식물의 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 면역, 피부질환의 동물모델에서 PTD 융합단백질의 in vivo 질환치료효과의 검증</li> <li>- PTD 융합단백질에 의한 간 및 신장독성 분석</li> <li>- PTD를 유전자전달 system을 이용하여 새로운 형질변환 Arabidopsis 및 토마토의 제작</li> <li>- 형질변환 Arabidopsis 및 토마토에서 전달된 유전자의 발현 및 발현된 PTD융합단백질의 localization 분석</li> <li>- 형질변환된 Arabidopsis 및 토마토로부터 분리된 융합단백질의 in vitro 및 in vivo 생리활성조절효과의 분석.</li> </ul>

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
종합	PTD와 형질전환식물을 이용한 면역피부질환 치료용 단백질신약의 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 분리 정제된 PTD-융합단백질의 calus의 suspension culture, 뿌리세포내로의 전달효과 및 세포내 localization의 분석</li> <li>- 식물세포내로 전달된 PTD 융합단백질의 구조적 변화를 proteomics를 이용하여 분석</li> <li>- 식물 세포내에서 자연 상태의 구조로 변환된 PTD 융합단백질의 분리 및 정제.</li> <li>- 식물세포에서 생산된 PTD 융합단백질의 동물세포내로의 전달효과 및 세포내 localization의 분석</li> <li>- 동물세포주 모델에서 PTD와 antiapoptotic protein과의 융합단백질에 의한 세포유도사 방지효과</li> <li>- PTD-융합단백질의 대량생산을 위한 최적화공정의 확립</li> <li>- PTD-DBD(DNA Binding domain)과 DBD과 선택적으로 결합하는 sequence를 가진 expressible form의 유전자를 이용하여 식물세포내로의 유전자전달 system</li> </ul>

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### - 연구 개발 결과

1. PTD-EGFP 융합단백질을 이용하여 식물세포내로의 단백질 전달을 성공하였고, 단백질의 localization을 분석하였음.
2. 식물세포내로 전달된 PTD 융합단백질의 구조적 변화를 proteomics를 이용하여 분석
3. 식물 세포내에서 자연 상태의 구조로 변환된 PTD 융합단백질의 분리 및 정제
4. 식물세포에서 생산된 PTD 융합단백질의 동물세포내로의 전달효과 및 세포내 localization의 분석
5. 동물세포주 모델에서 PTD와 antiapoptotic protein과의 융합단백질에 의한 세포유도사 방지효과
6. PTD-융합단백질의 대량생산을 위한 최적화공정의 확립
7. PTD-DBD(DNA Binding Domain)과 DBD과 선택적으로 결합하는 sequence를 가진 expressible form의 유전자를 이용하여 식물세포내로의 유전자전달 system 확립

##### - 연구개발 결과 활용에 대한 건의

- 1) PTD와 식물세포를 이용한 생리활성조절단백질 생산기술은 현재 세포내에서의 post-translational modification 이 문제가 되어 생산하는 데 경제성 및 기술이 문제가 되는 많은 의 약단백질의 생산을 대체할 수 있을 것임.
- 2) 실험 세포 주에서의 유전자발현이 불가능하여 단백질의 세포내 기능을 밝혀내지 못한 많은 유전자의 기능 연구에 있어서, 이들 목표 단백질을 의뢰받아 이를 치료용 단백질로 개발하고 이를 in vivo model에서 전 임상 단계까지 분석해 주는 용역을 통하여 수익을 기대할 수 있음.
- 3) PTD에 대한 기술 이전료, PTD-면역 신약 단백질 및 PTD-면역 신약 단백질 minimal element에 대한 특허를 확보함으로써 국내외 제약사와의 제휴 및 기술료를 바탕으로 본 연구단의 연구가 다른 질환치료를 위한 단백질신약개발 연구에까지 확대될 수 있는 기반을 마련함.

4) 또한 벤처 기업 및 국내 제약사와의 전략적 제휴 및 수익 모델을 바탕으로 한 바이오 벤처설립을 통하여 국내 바이오 및 신약 업계의 role model로서 기능할 수 있도록 함.

## SUMMARY

### Development of New protein drugs for autoimmune disease in skin area by using PTD with Plant transformation.

Nowadays, a lot of new mechanisms of protein and DNA functions that have huge potency for new drug development are elucidated. But there were no systems which can delivery these proteins and DNAs into the cytosol or nucleus of the cell safely. For resolve this problem, PTD(Protein Transduction Domain) have developed which can permeate cell membrane. Especially, our research team have developed Hph1 and Sim2, the smallest and the most economical PTDs found up to now. These two PTDs can deliver the cargo protein *in vivo* and *in vitro* 50 times better than other PTDs.

Our research team tried to develop new drugs for autoimmune diseases in skin area by using PTD conjugated therapeutically potential proteins on plant cells. As a target proteins, GAL4, Hsp70 and survivin were investigated. Hsp70 and survivin have anti-apoptotic functions. Hph1 conjugated Gal4 used as a DNA transporter because of GAL4-DNA binding.

First of all, we saw PTD-conjugated proteins could deliver into the plant cells well by detection of PTD-EFGP. Also we could detect PTD-EGFP localization in plant cells because EFGP emanate green fluorescence. After that, we had confirmed that PTD-EGFP fusion proteins have correct folded structure through proteomics technique. In short, PTD conjugated proteins can deliver to plant cells very well and also their structure maintained as naive form.

Secondly, our research team had studied for functions of PTD conjugated proteins which were produced on plant cells. In this project, Hph1-Hsp70 and Hph1-survivin were used for leading anti-apoptosis effect. As instructed above, these fusion proteins were examined whether they can move into the mammalian cells or not. Results are fine. These fusion proteins were detected in cell lysates which proteins had treated. After that, we had proved that transduction of Hph1-Hsp70 and Hph1-survivin lead suppression against apoptosis. From the results above, we demonstrate that delivery of PTD conjugated proteins can be easily and lead specific functions through cargo proteins. Hence we optimized system for protein production and purification.

Finally, our research team designed Hph1-GAL4 protein for development of new strategy at DNA delivery area. The existing technology of DNA delivery give toxic effects to target cells. For that reason, DNA delivery through PTD may establish broad approach for cell transformation because this method does not affect to target cells. Development of transformed plants will be more easily too. Hence we had examined DNA delivery by using Hph1-GAL4 protein. As a result, we established DNA delivery system by using Hph1-GAL4 protein. This system will contribute to make various transformed plants that difficult to develop meanwhile.

These study will make a significant contribution to development of novel therapeutic drug against various autoimmune diseases in future.



# CONTENTS

Chapter 1. The Summary of the Research Project

Chapter 2. Current International or Domestic Research Status

Chapter 3. Results of Research Project

Chapter 4. Accomplishment and Contribution of Research Project to the Related Area

Chapter 5. Application Plan of Research Outcome

Chapter 6. Technological Information and Database Obtained during Research Period

Chapter 7. References

# 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발결과의 활용계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

### 가. 연구 개발의 목적 및 범위

새로운 drug delivery system인 Protein Transduction domain (PTD) 와 이것을 통해 유전자의 발현을 유도한 형질 전환식물을 이용한 질환치료용 면역조절단백질신약의 개발을 위해 연구를 진행하였다.

PTD와 EGFP가 융합된 단백질을 E coli에서 생산하여 분리 정제한 식물세포내로의 전달효과 및 세포내 localization을 분석한다. Anti-apoptotic protein이 PTD와 융합된 단백질의 생산, 분리 및 정제 후, 이들 융합단백질의 식물세포내로의 전달효과 및 localization을 분석한다. Proteomics를 이용하여 식물세포내로 전달된 융합단백질들의 구조적 기능적 변화를 분석한다. 식물세포를 bioreactor로 사용하여 식물세포 내에서 제작된 PTD-융합단백질의 생리활성조절작용의 in vitro 및 in vivo 효과, 질환치료효과를 분석한다.

최종적으로 PTD를 이용한 유전자전달 system을 이용하여 새로운 형질전환식물의 제작하는 것이 본 과제의 목적이다.

Reporter gene인 EGFP와 PTD가 결합된 DNA 구조의 제작 및 bacteria system에서 PTD-EGFP 융합단백질의 발현 및 분리 정제한다. 분리 정제된 PTD-EGFP 융합단백질의 suspension calus 및 뿌리세포로의 전달효과 및 세포내 localization을 분석한다. Anti-apoptotic protein (FLIPs, cIAP -1, -2, XIAP, HSP, Bcl-2 or Bcl-x), retinoic acid receptor (RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$ )을 encoding하는 유전자의 cloning 및 PTD와의 융합DNA구조의 제작 (anti-apoptotic protein의 경우 caspase cleavage site를 PTD와 이들 단백질사이에 삽입하여 apoptosis가 일어난 세포에서 anti-apoptotic protein이 세포질내로 분리되도록 한다. E-coli에서 발현된 위의 PTD 융합단백질들의 발현 및 분리정제한다. 분리 정제된 PTD-융합단백질의 calus의 suspension culture, 뿌리세포내로의 전달효과 및 세포내 localization의 분석한다. 식물세포내로 전달된 PTD 융합단백질의 구조적 변화를 proteomics를 이용하여 분석한다. 식물세포내에서 자연상태의 구조로 변환된 PTD 융합단백질의 분리 및 정제한다. 식물세포에서 생산된 PTD 융합단백질의 동물세포내로의 전달효과 및 세포내 localization의 분석한다. 동물세포주 모델에서 PTD 융합단백질의 EPO 효과, anti-apoptotic 효과 또는 RAR 및 RXR에 의한 유전자발현효과를 분석한다. PTD-융합단백질의 대량생산을 위한 최적화공정의 확립한다. PTD-DBD (DNA Binding domain)과 DBD과 선택적으로 결합하는 sequence를 가진 expressible form의 유전자를 이용하여 식물세포내로의 유전자전달 system의 구축한다. 면역, 피부질환의 동물모델에서 PTD 융합단백질의 in vivo 질환치료효과의 검증한다. PTD 융합단백질에 의한 간 및 신장독성 분석한다. PTD를 유전자전달 system을 이용하여 새로운 형질변환 Arabidopsis 및 토마토의 제작한다. 형질변환 Arabidopsis 및 토마토에서 전달된 유전자의 발현 및 발현된 PTD융합단백질의 localization 분석한다. 형질 변환된 Arabidopsis 및 토마토로부터 분리된 융합단백질의 in vitro 및 in vivo 생리활성 조절 효과의 분석한다.

## 나. 연구 개발의 필요성

외부로부터 유래한 항원이 체내에 침투 시, 면역체계에서는 항원유래 peptide에 특이적인 T 세포들이 활성화되어 면역반응에 필요한 cytokine들의 분비 및 effector molecule들의 발현을 통하여 다양한 humoral and cellular 면역반응을 수행한다. 최근 아토피성 피부염, 피부노화 및 탈모와 같은 피부질환에 있어서도 면역반응의 중추적 역할을 하는 T 세포의 활성화 및 세포 유도사는 이들 피부질환의 유도 및 진행에 결정적 역할을 하는 현상으로 밝혀지고 있다. 또한 피부세포 및 T 세포의 세포유도사를 저해할 수 있는 anti-apoptotic 단백질 및 retinoic acid에 의한 질환치료효과에 중요한 Retinoic Acid Receptor (RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$ )를 이용한 질환치료는 질환 target molecule에 대한 선택성 및 치료효과가 뛰어난 것으로 증명되었으나, 이들 단백질을 in vivo 및 in vitro에서 세포내로 전달할 수 있는 전달system이 없어 차세대 단백질신약의 개발이 불가능하게 여겨져 왔다. 최근에는 이 같은 문제를 해결하기 위하여, 세포내에서 단백질의 glycosylation이 잘 유도되며 생산경제성이 매우 높은 식물세포를 이용한 생리활성조절단백질의 생산이 보고되고 있으며, 특히 항원에 선택적으로 반응하는 immunoglobulin의 생산은 식물분야에서 획기적인 성과로 여겨지고 있다. 그러나 식물세포내로의 단백질 및 유전자전달이 복잡하고 어려운 실정이어서 이 같은 문제의 창의적인 해결은 식물세포 및 형질전환식물을 차세대 생명공학제품생산의 bioreactor로써 사용할 수 있는 혁신적인 계기가 될 것이다.

최근, 단백질을 in vivo 및 in vitro에서 세포내로 전달할 수 있는 PTD(Protein Transduction Doamin)의 발견은 이와 같은 차세대 단백질신약개발을 식물세포에서도 가능하게 하여, 전 세계적으로 새로운 PTD의 발견 및 이를 이용한 다양한 질환치료제의 개발이 무서운 속도로 진행되고 있다. Protein transduction은 특정 아미노산배열을 가진 적은 크기의 peptide(9 - 34개)가 이와 연결된 120 kDa 이상의 분자량이 매우 큰 단백질들도 단시간 내에(30분 이내) 효율적으로 (모든 세포에 100%에 가까운 효율) 세포 내로 전달할 수 있는 기술로써, 지금까지 가장 큰 문제가 되어온 유전자와 단백질 등의 hydrophilic molecule들의 세포 내 전달을 손쉽게 하여 많은 질환의 신약개발 분야에 있어서 게 해결할 수 있는 혁신적인 기술로써, 신약개발 분야의 새로운 시대를 이끌어 나아갈 차세대 기술로 평가되고 있다.

본연구진은 최근 2년여의 연구결과를 통하여, 기존의 PTD보다 in vitro 및 in vivo에서 단백질의 세포 내 전달효과가 약 50배정도 더 우수하고, 기존의 PTD중 가장 크기가 작으며, 피부 및 nasal route를 포함한 다양한 경로를 통하여 단백질뿐만 아니라 DNA까지 동식물세포 내로 전달할 수 있는 새로운 두 개의 PTD(9 amino acid의 S-PTD: 2002년 1월 특허출원 : 출원번호 2002-3183 , 11 amino acid의 M-PTD: 2002년 1월 특허출원 : 출원번호 2002-3184)를 각각 사람과 쥐의 단백질로부터 발견하였으며, 그중 S-PTD은 in vivo에서 간에 특이적으로 단백질 및 유전자를 전달하는 특징을 가지고 있다. 따라서 본 연구과제에서는 골수세포로부터 적혈구의 분화를 유도하고 적혈수의 생리활성기능유지에 중요한 cytokine인 EPO, 피부의 노화 및 자가면역세포에 의하여 건강한 조직 및 장기를 파괴하는 작용기작으로 최근 밝혀지고 있는 apoptosis를 저해하는 세포질 단백질인 FLIPs, cIAP-1, -2, XIAP, HSP, Bcl-2 or Bcl-x, 세포핵내에 존재하면서 retinoic acid에 의한 피부노화방지에 중요한 전사인자인 RAR과 RXR을 본 연구진이 발견한 새로운 두개의 PTD와 융합단백질형태로 식물세포에서 생산하고자 한다. 또한 본 연구진이 개발한 PTD를 이용한 DNA 전달기술을 이용하여 위의 유전자들을 가지고 있는 형질전환 식물을 생산하여 면역피부질환 치료용 식물을 개발하고자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

#### 가. 국내외 기술 개발 현황

- 1) 다양한 생물학적, 비 생물학적 환경(예를 들면 병원균, 저온, 가뭄 등)에 대한 내성을 가진 형질전환식물체의 개발 기술과 그 결과는 외국에서 뿐 아니라 국내 연구진에서도 광범위하여 진행되고 있음.
- 2) 반면, 식물체를 이용한 고등동물의 고부가가치 의, 건강물질의 대량생산 기술은 상대적으로 매우 취약한 상태이다. 위에서 언급하였듯이 최근 들어 식물체를 이용한 토코페롤의 과다생산, 치료제로서의 IgG 생산 등이 이루어진 상태이며 동물단백질의 보다 광범위하고 특이적인 생산법 개발이 국내외적으로 절실히 필요한 실정임.  
특히 세포외로 분비하는 생리활성단백질의 경우 복잡한 post-translational modification이 필요하여 이들의 생산 및 개발연구에 많은 비용과 시간이 소요되어 제품의 가격이 매우 비싼 실정임.
- 3) 질환치료효과 및 선택성면에서 매우 우수한 세포내 또는 핵내 단백질의 경우, 세포내로 단백질 및 유전자를 전달할 수 있는 기술이 없어 연구 및 개발이 전혀 이루어지지 못하고 있음.
- 4) 단백질을 세포내로 전달 할 수 있는 PTD의 경우 in vivo에서 단백질전달효과가 검증된 PTD는 약 6개정도 존재하고 있으며, 이들과 동물세포를 이용한 새로운 단백질신약의 개발이 항암제개발을 중심으로 엄청난 속도로 진행되고 있음.  
그러나 본 연구진이 발견한 2개의 새로운 PTD인 Mph-1 과 Sim-2는 기존의 PTD가 virus 또는 초파리의 단백질에서 발견된 것과는 다르게, 크기가 매우 작고 더 효과적인 단백질전달효율을 가지고 있으며, 특히 인간과 생쥐의 단백질로부터 발견되어 앞으로의 단백질신약개발에 있어서 이들 PTD에 대한 원하지 않은 면역반응의 유도의 위험성이 적어 높은 경쟁력을 가지고 있음.
- 5) 또한 아직 PTD를 이용한 질환치료단백질신약의 개발이 식물세포를 이용하여서는 시도된 적이 없고, 특히 PTD를 이용한 세포내로의 유전자전달은 아직 전 세계적으로 시도된 바가 없음.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과

#### 가. 분리 정제된 PTD-융합단백질의 calus의 suspension culture, 뿌리세포내로의 전달효과 및 세포내 localization의 분석

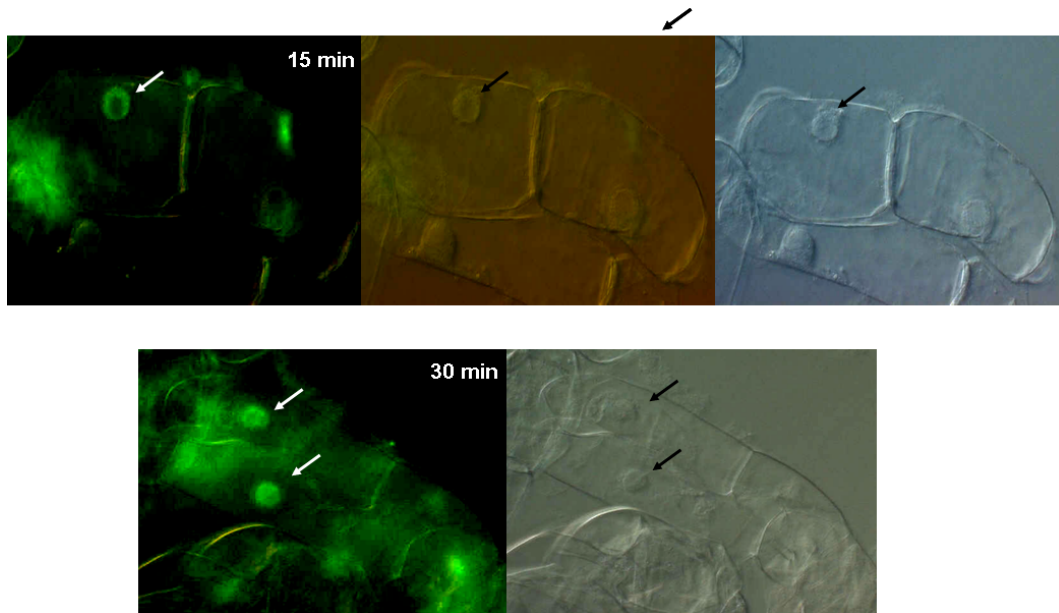


Fig. 1. 세포 전달된 융합 단백질의 localization 분석.

식물 세포로의 PTD (Hph-1) 의 전달 효과를 알아보기 위해 식물 세포 (callus)를 추출 분리 한 후 Mph-1-EGFP(100  $\mu$ M)와 함께 배양한 한 다음 시간대별로 전달 효과를 형광 현미경으로 관찰한 결과, 식물세포의 세포질 및 핵 내로 단백질이 잘 전달됨을 확인하였음.

#### 나. 식물세포내로 전달된 PTD 융합단백질의 구조적 변화를 proteomics를 이용하여 분석

박테리아에서 제작된 Hph-1-EGFP 융합단백질을 식물세포내로 전달한 후 proteomics를 이용한 전기영동에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 식물세포로 전달된 Hph-1-EGFP 융합단백질을 다시 재분리하여 동물세포내로 전달되었을 때와 위의 Figure 1과 같이 fluorescence를 나타낸 결과에서, 식물세포에서 분리된 단백질들이 정상적인 conformation을 유지하고 있음이 간접적으로 증명되었음.

다. 식물 세포내에서 자연 상태의 구조로 변환된 PTD 융합단백질의 분리 및 정제

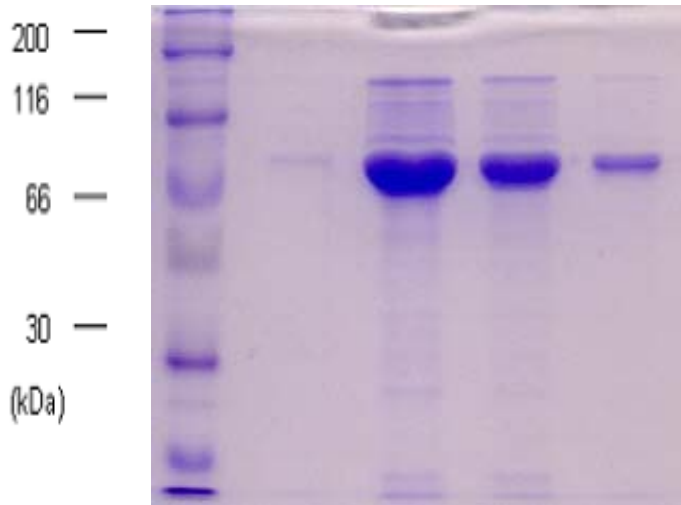


Fig. 2. 식물세포로 전달된 융합단백질을 재분리 및 정제

식물 세포내에서 생성된 PTD 융합 단백질을 얻기 위해 형질 전환 식물의 세포를 lysis 한 후, 일반적으로 수행되는 단백질 분리 과정인 His tag을 이용한 정제 과정을 통해 PTD 융합단백질을 분리 정제하였음

라. 식물세포에서 생산된 PTD 융합단백질의 동물세포내로의 전달효과 및 세포내 localization의 분석

식물세포에서 분리정제된 Hph-1-EGFP를 동물세포로 전달하였을 경우, PTD가 없는 EGFP는 세포내로 안 들어가지 않고 PTD가 융합되어 있는 단백질만이 세포질 및 핵으로 전달되었음 PTD가 2개가 융합되는 경우 PTD 1개인 것보다 더 우수한 효율을 보임을 확인할 수 있음.

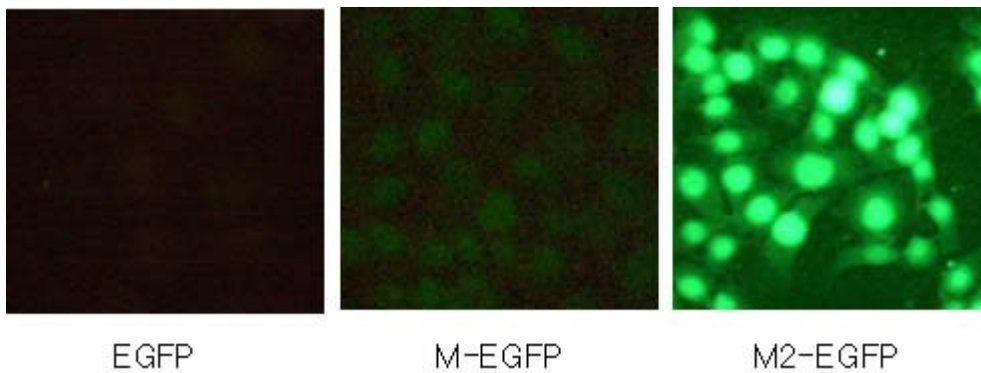


Fig. 3. 식물세포에서 분리된 Hph-1-EGFP단백질의 세포내 전달효과

마. 동물세포주 모델에서 PTD와 antiapoptotic protein과의 융합단백질에 의한 세포유도사 방지효과

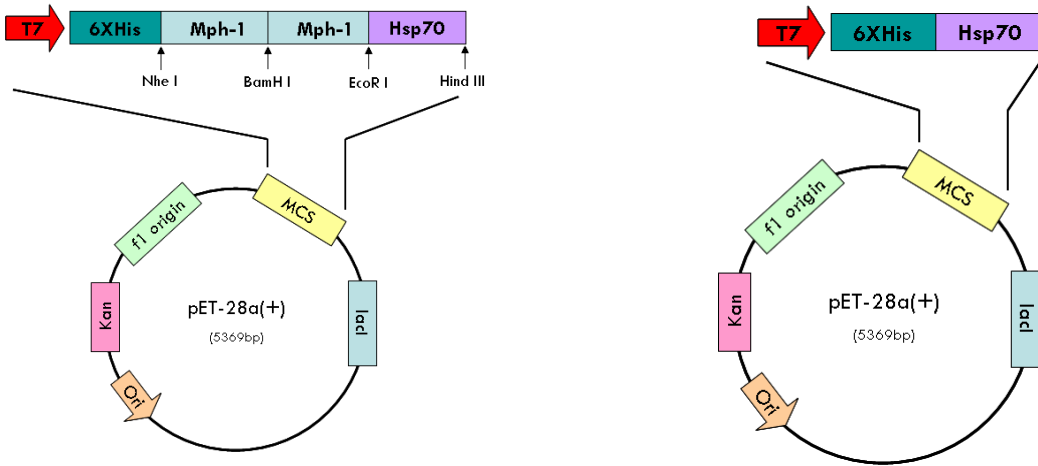


Fig. 4. Hph-1-HSP70를 발현하기 위한 DNA 구조

- 1) Hph-1-HSP70를 발현하기 위한 DNA 구조로서, HSP70을 발현하는 DNA외에 PTD인 Mph-1을 발현할 수 있는 서열 'Mph-1'을 두 개 연속으로 구성하였으며, 대조군으로서 'Mph-1'이 없고 HSP70만을 발현하는 DNA를 추가적으로 구성함. 그리고 단백질 정제에 이용되는 6개의 'His'를 첨가함.
- 2) HSP는 다양한 외부 자극으로부터 세포를 보호하는 단백질군으로서, HSP70은 이러한 단백질군에서 가장 잘 알려지고 많은 기능이 규명된 단백질로서, PTD (Protein Transduction Domain)인 Mph-1이 융합된 재조합 단백질인 M2-HSP는 세포에 유해한 환경 하에서 매우 선택적으로 세포를 보호하는 기능을 수행함.
- 3) 따라서 M2-HSP70을 세포 내로 도입한 후, 생존에 유해한 외부 자극인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Staurosporine, 열충격 등을 처리하게 되면, 이와 같이 유독한 상황에서도 세포의 생존을 유지할 수 있으리라 기대할 수 있음.

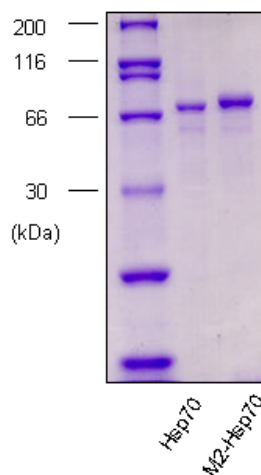


Fig. 5. HSP70과 M2-HSP70의 단백질 정제 결과



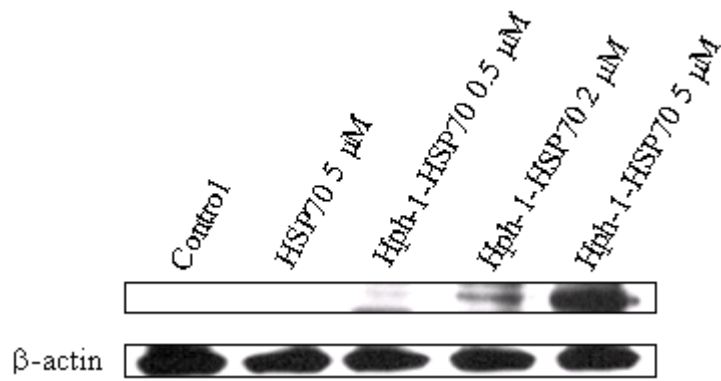


Fig. 6. Hph-1-HSP-70 의 Jurkat cell 내로의 전달 확인

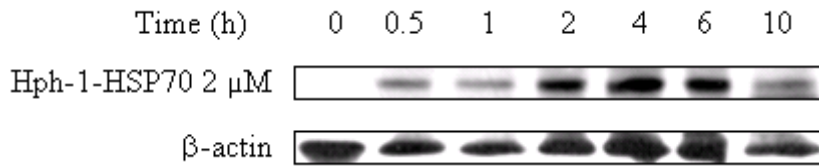


Fig. 7. Hph-1-HSP-70 의 Jurkat cell 시간별 패턴

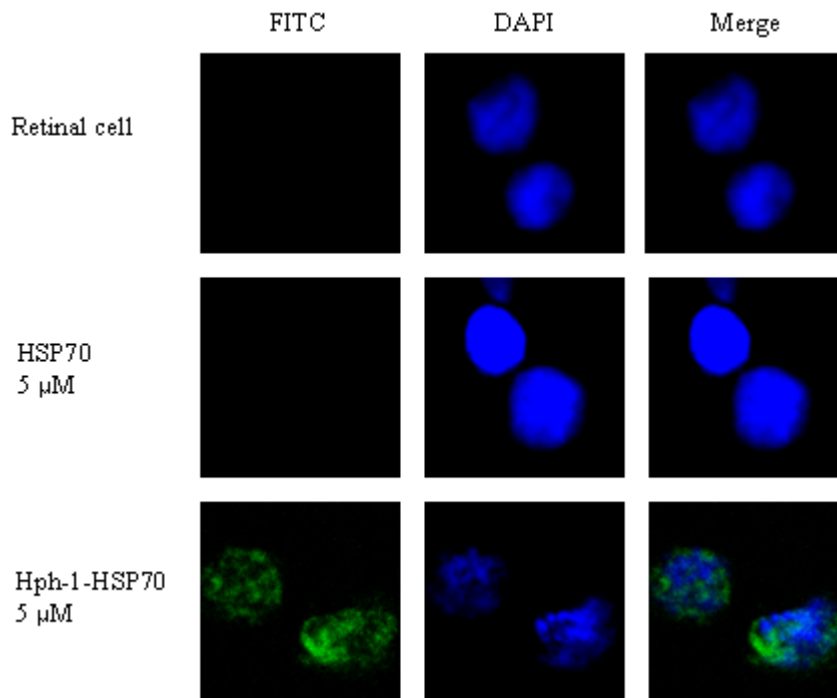


Fig. 8. Hph-1-HSP-70의 세포 종류별 도입을 형광시약을 이용하여 확인

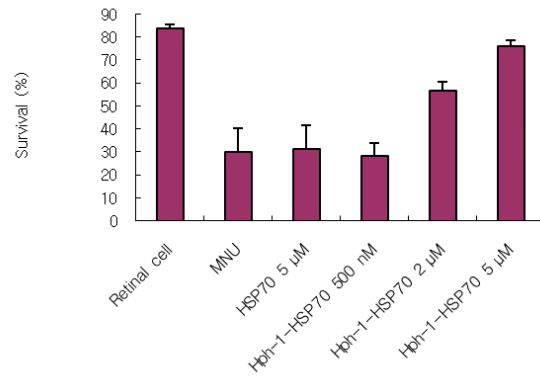


Fig. 9. Hph-1-HSP70를 이용한 열충격 내성 효과

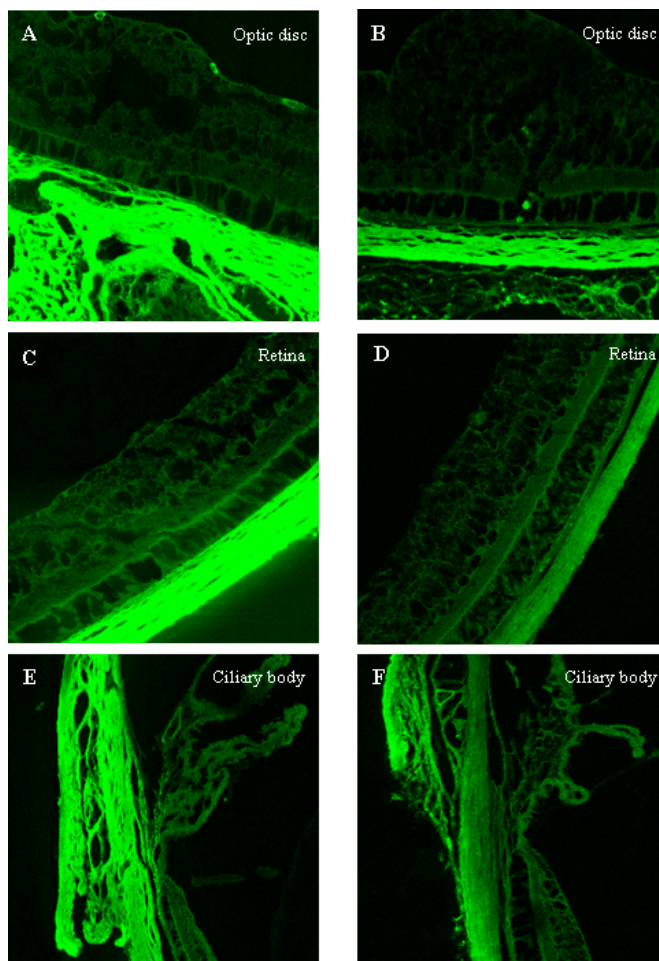


Fig. 10. 실험동물에서 Hph-1-HSP-70 전달 확인

4) Mph-1이 두 개 융합되어 있는 HSP70과 대조군으로 사용하기 위하여 Mph-1을 융합시키지 않은 HSP의 정제 결과. 세포에 처리된 10% glycerol-PBS 로 desalting 시킨 후 10% SDS-page gel 에 전기영동 하여 확인함.

5) M2-HSP70를 HUVE Cell에 도입함으로써, HUVEC에 가해지는 열충격으로부터의 보호 효과를 확인하였다. HUVEC에 실험군인 M2-HSP70와 대조군인 HSP70를 도입한 후 43°C에서 열충격을 1시간 동안 가한 결과, Mph-1이 없는 HSP70와는 대조적으로 M2-HSP70의 경우에는 HUVEC의 세포사멸을 방지하는 효과를 확인할 수 있었다.

6) 또 다른 anti-apoptotic protein인 Hsc70, cvHsp, survivin과 Hph-1-PTD가 융합된 단백질 제조를 위한 DNA 구조의 제작 및 융합단백질의 분리정제를 실시하였다.

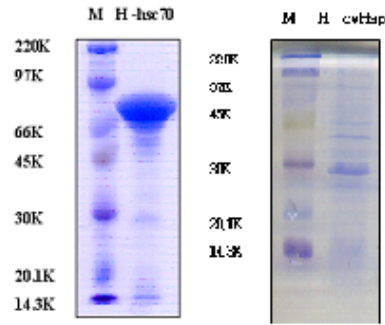


Fig. 11. Hph-1-Hsc70, -cvhsp 융합단백질제작을 위한 DNA 구조 및 분리정제된 융합단백질

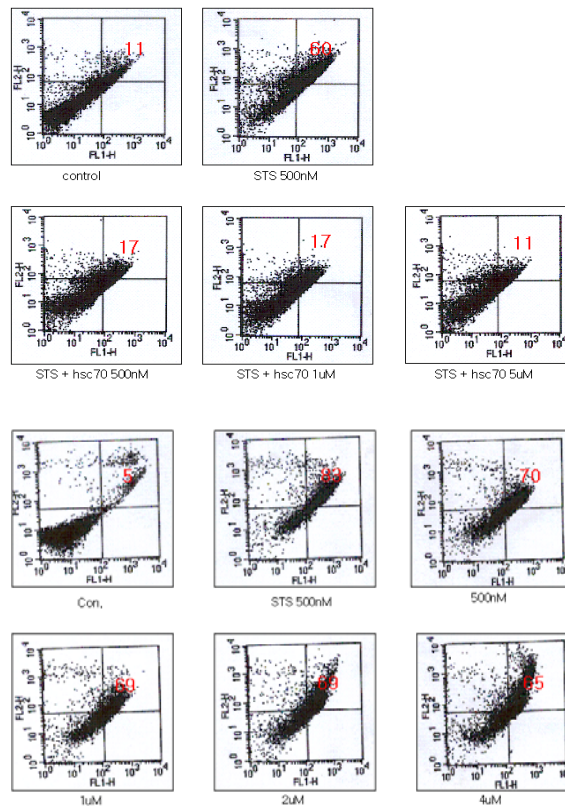


Fig. 12. Hph-1-Hsc70, -cvhsc에 의한 anti-apoptotic 효과

- 7) Hph-1과 Hsc70 or cvhsc 융합 단백질을 Jurkat cell 에 농도 별로 2시간 처리를 한 후, staurosporine으로 apoptosis 자극을 주었을 때, 이들 융합단백질이 전달되 세포에 세포사멸이 감소하는 것을 관찰하였음.
- 8) 또한 Hsp family가 아니면서 anti-apoptotic 효과를 지닌 Bcl-2 gene family인 survivin과 Hph-1-PTD와의 융합단백질을 제작하기 위하여, pRSETB vector에 Hph-1 PTD와 IAP family중에 하나인 survivin을 fusion시킨 construct를 제작하고, 아울러 cell localization을 효과적으로 시각화할 수 있도록 하기 위하여 EGFP sequence를 fusion시킨 construct도 함께 제작함.

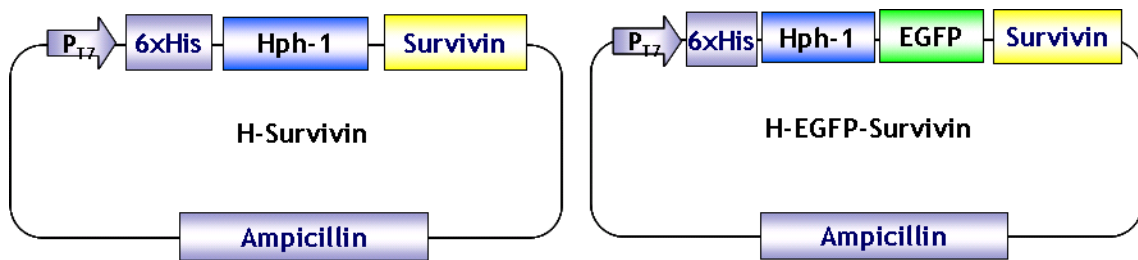


Fig. 13, Hph-1-survivin 융합단백질제작을 위한 DNA 구조

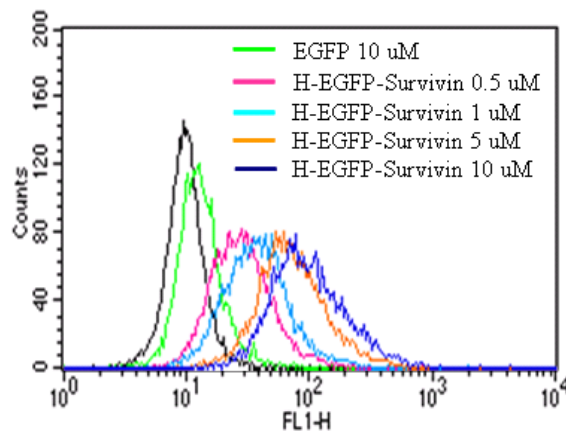


Fig. 14. Hph-1-survivin 융합단백질의 세포내 전달효과

- 9) Hph-1 PTD와 EGFP가 fusion되어 있는 survivin(H-EGFP-Survivin)을 E.coli에서 expression시킨 후 Ni-NTA resin을 이용하여 정제한 후 HaCat cell에 1시간동안 transduction한 후 Flow cytometry를 이용하여 확인함. 농도 dependent하게 잘 transduction 됨을 확인함.

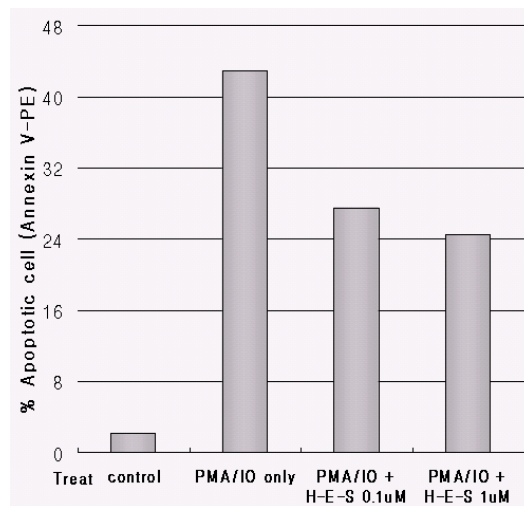
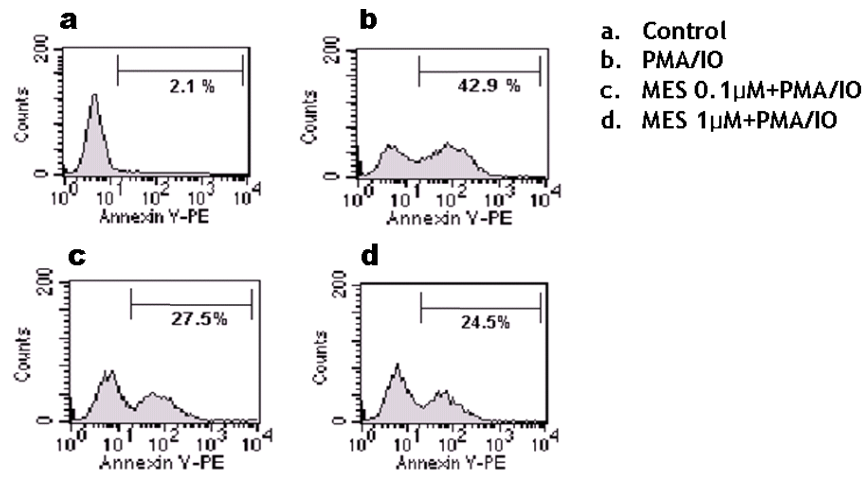


Fig. 15. Hph-1-EGFP-survivin PMA와 ionomycin으로 유도된 AICD를 저해하는지 확인

**바. PTD-융합단백질의 대량생산을 위한 최적화공정의 확립**

식물내로 전달된 Hph-1 EGFP 융합단백질을 보다 효과적인 정제를 위해 large scale에 세포 배양액에 식물을 대량으로 배양한 후 최적화 과정을 통해 Hph-1 EGFP 융합단백질을 얻는 최적화공정을 실험을 통해 확립하였음.

**사. PTD-DBD(DNA Binding domain)과 DBD과 선택적으로 결합하는 sequence를 가진 expressible form의 유전자를 이용하여 식물세포내로의 유전자전달 system**

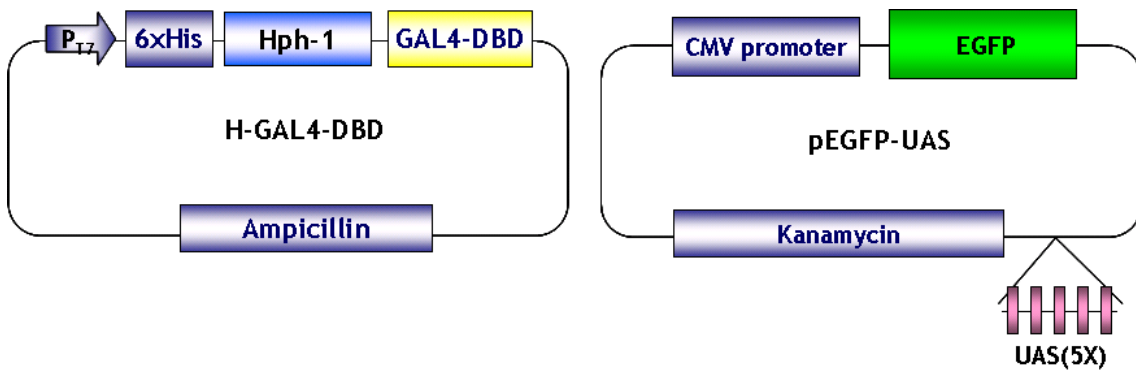


Fig. 16. 식물세포내로의 DNA 전달을 위한 Hph-1-DBD 융합단백질과 DBS를 가진 EGFP DNA구조의 제작.

- 1) pRSETB vector에 Hph-1 PTD와 GAL4-DBD을 fusion시킨 construct를 제작하고, 아울러 CMV promoter의 control하에서 EGFP를 발현시킬 수 있는 pEGFP-N1 vector에 GAL4-DBD 과 specific하게 binding할 수 있는 UAS sequence를 넣은 pEGFP-UAS construct를 제작함.

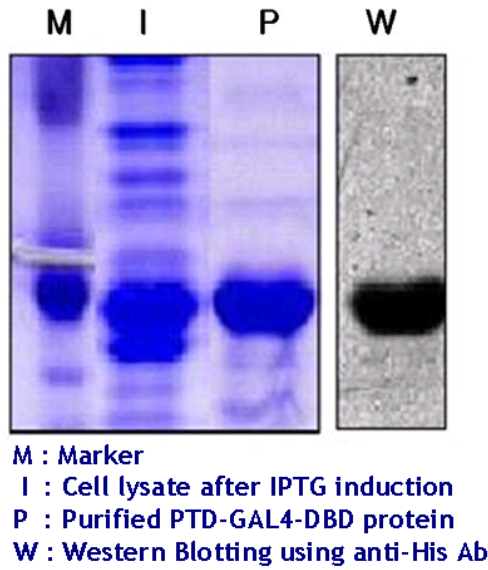


Fig. 17. Hph-1-DBD 융합단백질의 분리 및 정제

- 2) PTD-GAL4-DBD protein을 E.coli에서 expression시켜 Ni-NTA resin을 이용하여 정제하여 SDS-PAGE로 확인한 후 anti-penta His antibody를 이용하여 western blotting 함으로써 단백질 확인함.

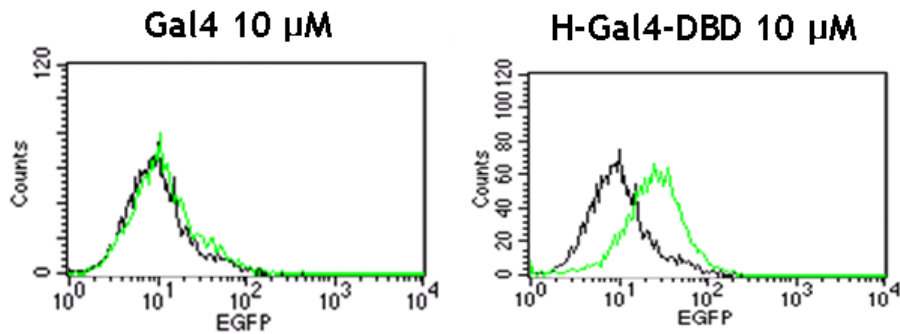
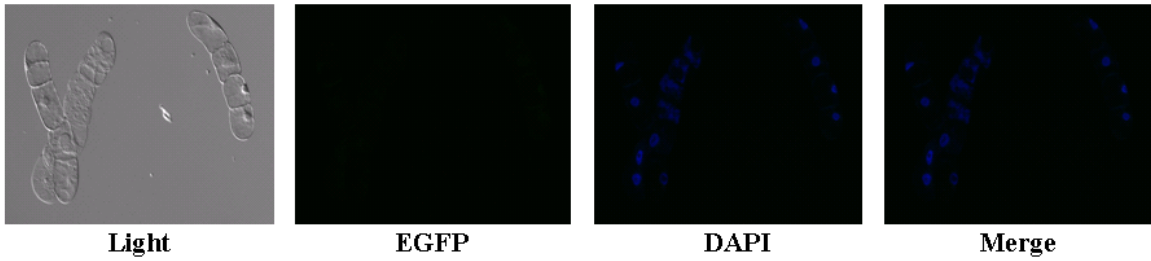


Fig. 18. Hph-1-DBD 융합단백질의 세포내 전달효과

- 3) PTD-GAL4-DBD fusion protein과 UAS를 가진 pEGFP-UAS DNA를 섞어준 후 실온에서 15분간 incubation시킨 후 serum free media하에서 HeLa cell에 처리를 하고, 2시간 후 complete medium으로 갈아줌. 48시간 후 flow cytometry를 이용하여 EGFP expression을 확인한 결과 PTD가 없는 GAL4-DBD는 10 $\mu$ M을 처리했음에도 불구하고 EGFP의 expression이 관찰되지 않지만, PTD-GAL4-DBD 10 $\mu$ M을 처리한 경우에는 EGFP가 expression되었음을 확인할 수 있음. 따라서 PTD-GAL4-DBD fusion protein이 pEGFP-UAS DNA를 효과적으로 세포 안으로 transfection시켰음을 알 수 있음.

**EGFP**



**PTD-EGFP-GAL4**

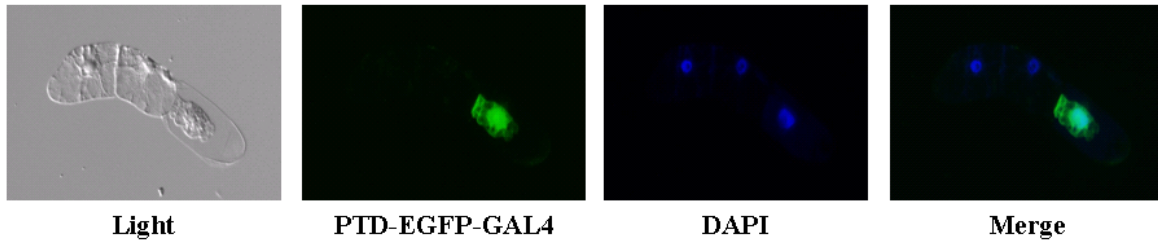


Fig. 19. Hph-1-EGFP-GAL4를 BY2-cell로 처리후 그 발현을 확인

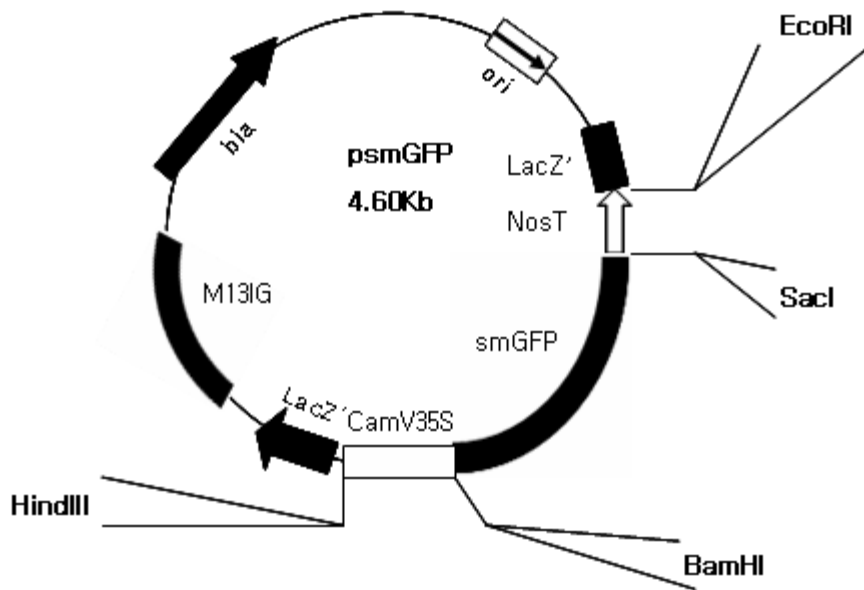


Fig. 20. 식물세포로 전달하여 EGFP 단백질을 발현시킬 DNA 구조.

- 4) 위에서 제작된 Hph-1-DBD을 이용하여 식물세포내로 전달하여 EGFP 단백질을 발현시킬 수 있는 DNA구조를 식물세포에서 발현을 할 수 있는 새로운 promoter를 가진 DNA구조로 제작하였음.



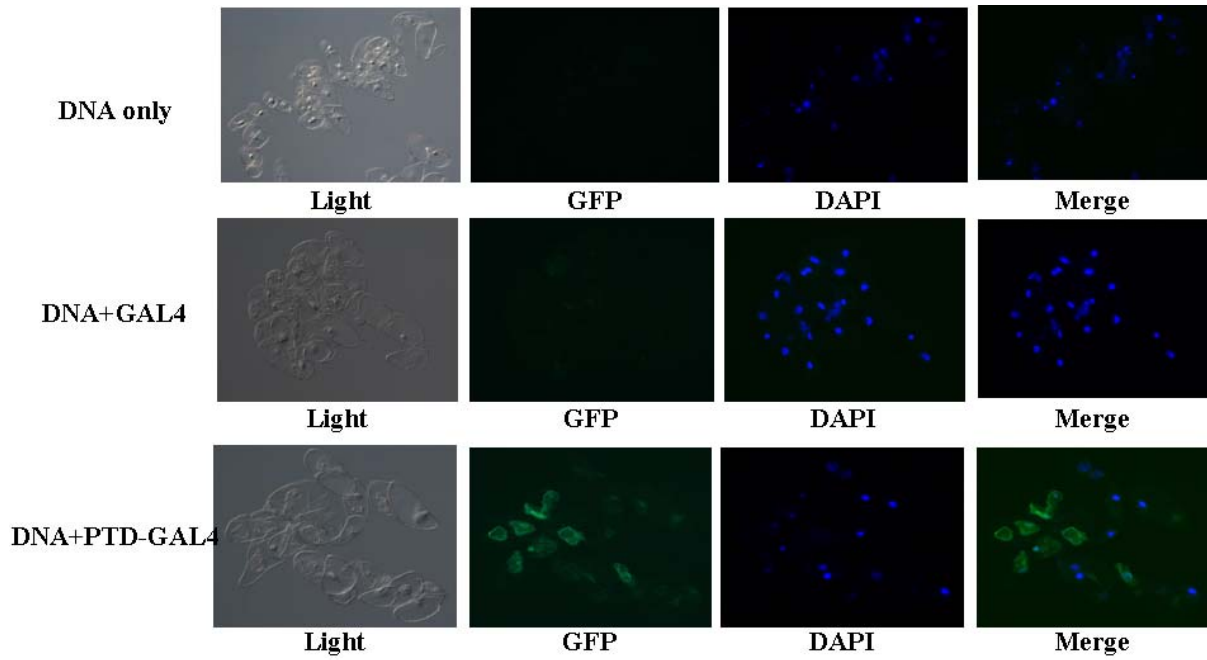


Fig. 21. psmGFP DNA를 BY-2 cell 에 처리 후 그 발현을 확인

- 5) 위에서 제작된 DNA를 식물 세포인 BY-2 cell에 처리한 후 그 발현을 확인함. DNA 와 DNA 그리고 GAL4를 같이 넣어준 경우 GFP 의 발현이 관찰되지 않았음. PTD를 넣어준 DNA의 경우 세포내로 도입되어 GFP의 발현을 확인하였음. 따라서 PTD에 의해 DNA가 식물 세포에 도입되어 GFP를 발현함을 확인함.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도 (%)
<p>분리정제된 PTD-융합 단백질의 calus의 suspension culture, 뿌리세포내로의 전달효과 및 세포내 localization 의 분석</p>	<p>분리 정제가 확인된 각 PTD 융합단백질들이 식물세포내로의 전달효과를 분석하기위하여, suspension calus culture 및 식물뿌리세포와 융합단백질을 2시간 배양시킨 후세포내로 전달된 각 PTD 융합단백질들을 PTD와 융합된 단백질에 선택적으로 반응하는 mAb와 fluorescence 로 tag되어 있는 secondary mAb를 이용하여 microscope로 분석함.</p>	100 %
<p>식물세포내로 전달된 PTD 융합단백질의 구조적 변화를 proteomics를 이용하여 분석</p>	<p>식물세포내로 전달된 각 PTD 융합단백질들이 세포내로 전달되었을 때 구조적변화가 있는 지를 확인하기 위하여, 식물세포를 lysis시킨후 이들 융합단백질들을 다시 한번 nickel column으로 분리 정제한 후, 식물세포내로 전달되기 전 및 전달된 후의 단백질을 2D로 분석한 후 proteomics 기술을 이용하여 분석함</p>	100 %
<p>식물세포내에서 자연 상태의 구조로 변환된 PTD 융합단백질의 분리 및 정제</p>	<p>식물세포내로 전달되어 높은 생리활성을 나타내는 것으로 확인 된 융합단백질들을 분리 정제하기 위하여, 식물세포를 lysis시킨 후, 각 PTD 융합단백질들을 nickel column을 이용하여 분리정제한 후, 다시 한번 PTD와 융합된 단백질에 선택적으로 결합하는 mAb와 westernblot을 이용하여 확인함</p>	100 %
<p>식물세포에서 생산된 PTD 융합단백질의 동물세포내로의 전달 효과 및 세포내 localization의 분석</p>	<p>식물세포에서 제작되어 분리 정제된 각 PTD 융합단백질들의 동물세포내로의 전달효과를 분석하기 위하여, Jurkat T cell, Hela cell, HUVEC, primary T cell 들을 각 PTD 융합단백질들로 처리한 후 융합단백질들의 세포내 전달효과를 PTD와 융합된 단백질에 선택적으로 결합하는 mAb, fluorescence가 tag된 2nd mAb를 이용한 intracellular staining을 통하여 분석함.</p>	100 %
<p>동물세포주 모델에서 PTD 융합단백질의 EPO 효과, anti-apoptotic 효과 또는 RAR 및 RXR에 의한 유전자발현효과를 분석</p>	<p>식물세포에서 제작되어 분리 정제된 각 PTD 융합단백질들의 동물세포내로의 전달효과를 분석하기 위하여, Jurkat T cell, Hela cell, HUVEC, primary T cell 들을 각 PTD 융합단백질들로 처리한 후 융합단백질들의 세포내 전달효과를 PTD와 융합된 단백질에 선택적으로 결합하는 mAb, fluorescence가 tag된 2nd mAb를 이용한 intracellular staining을 통하여 분석함</p>	100 %

<p>PTD-융합단백질의 대량생산을 위한 최적화공정의 확립</p>	<p>생리조절활성이 확인된 위의 PTD 융합단백질들의 대량생산을 위하여, bacteria에서의 생산의 경우, 높은 copy의 유전자가 삽입된 DH5a 또는 BL21의 선택, 세포의 배양시간, IPTG의 농도, 배양온도의 최적화를 결정하며, 식물세포로의 최적화된 단백질전달을 위하여 세포수와 융합단백질의 ratio, 식물세포의 처리시간 및 처리배지 등의 최적화를 시도함</p>	<p>100 %</p>
<p>PTD-DBD(DNA Binding domain)과 DBD과 선택적으로 결합 하는 sequence를 가진 expressible form의 유전자를 이용하여 식물 세포내로의 유전자전달 system의 구축</p>	<p>PTD-Gal4 융합단백질과 식물세포내로 전달하고자 하는 위의 EGFP plasmid를 DNA-protein binding buffer속에서 1시간정도 반응시켜 DNA와 단백질의 결합을 유도한 다음, 담배 BY2 현탁 배양세포를 DNA-융합단백질의 결합체로 2시간 처리한 후 48시간이후 suspension calus로 전달된 유전자로부터 발현된 EGFP를 형광현미경을 이용하여 분석함.</p>	<p>100 %</p>

## 제 5 장 연구 개발결과의 활용 계획

### 1. 국내외 시장 현황 및 전망

- 1) PTD와 식물세포를 이용한 생리활성조절단백질 생산기술은 현재 세포내에서의 post-translational modification 이 문제가 되어 생산하는 데 경제성 및 기술이 문제가 되는 많은 의 약단백질의 생산을 대체할 수 있을 것임.
- 2) 실험 세포 주에서의 유전자발현이 불가능하여 단백질의 세포내 기능을 밝혀내지 못한 많은 유전자의 기능 연구에 있어서, 이들 목표 단백질을 의뢰받아 이를 치료용 단백질로 개발하고 이를 in vivo model에서 전 임상 단계까지 분석해 주는 용역을 통하여 수익을 기대할 수 있음.
- 3) PTD에 대한 기술 이전료, PTD-면역 신약 단백질 및 PTD-면역 신약 단백질 minimal element에 대한 특허를 확보함으로써 국내외 제약사와의 제휴 및 기술료를 바탕으로 본 연구단의 연구가 다른 질환치료를 위한 단백질신약개발 연구에까지 확대될 수 있는 기반을 마련함.
- 4) 또한 벤처 기업 및 국내 제약사와의 전략적 제휴 및 수익 모델을 바탕으로 한 바이오 벤처설립을 통하여 국내 바이오 및 신약 업계의 role model로서 기능할 수 있도록 함.

### 2. 활용 계획

- 1) PTD와 식물세포를 이용한 생리활성조절단백질 생산기술은 현재 세포내에서의 post-translational modification 이 문제가 되어 생산하는 데 경제성 및 기술이 문제가 되는 많은 의 약단백질의 생산을 대체할 수 있을 것임.
- 2) 실험 세포 주에서의 유전자발현이 불가능하여 단백질의 세포내 기능을 밝혀내지 못한 많은 유전자의 기능 연구에 있어서, 이들 목표 단백질을 의뢰받아 이를 치료용 단백질로 개발하고 이를 in vivo model에서 전 임상 단계까지 분석해 주는 용역을 통하여 수익을 기대할 수 있음.
- 3) PTD에 대한 기술 이전료, PTD-면역 신약 단백질 및 PTD-면역 신약 단백질 minimal element에 대한 특허를 확보함으로써 국내외 제약사와의 제휴 및 기술료를 바탕으로 본 연구단의 연구가 다른 질환치료를 위한 단백질신약개발 연구에까지 확대될 수 있는 기반을 마련함.
- 4) 또한 벤처 기업 및 국내 제약사와의 전략적 제휴 및 수익 모델을 바탕으로 한 바이오 벤처설립을 통하여 국내 바이오 및 신약 업계의 role model로서 기능할 수 있도록 함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

Post-genomics 시대를 맞이하여 많은 감염성 질환 및 암에 대한 치료 및 예방 백신을 개발하기 위한 국내외에서 각 분야의 노력은 기존의 recombinant protein을 이용한 백신 개발의 개념을 넘어서, dendritic cell과 virus를 이용한 새로운 시도에 전력을 하고 있으나 이들 질환에 대한 치료 및 예방 백신 개발에 괄목할 만한 성과를 거두지 못하고 있다. 또한 다양한 자가 면역 질환에 대한 치료 및 예방 백신의 개발, 이들 질환의 진행 상태를 정확히 판단할 수 있는 진단방법 개발 역시 많은 어려움에 처해있는 상황이다.

최근 Survivin의 경우 최근에 진행되고 있는 연구들을 살펴보면 Survivin을 여러 형태로 잘라서 그 기능에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 이는 암진행과 관련한 환자들에게서 많이 발견되는 형태의 survivin으로 볼 수 있다. 그중에 survivin- $\Delta$ Ex3라는 잘려진 형태가 TNF-alpha에 의한 세포사멸을 억제한다는 내용이 발표되었다. 이는 잘 알려지다시피 Bcl-2/caspase-3와의 결합을 통해서 세포사멸 억제를 하게끔 하는 역할을 한다. 여기서 survivin- $\Delta$ Ex3 혼자서는 caspase-3를 억제할 수 없지만, Bcl-2와 혼합형태를 이루면 억제할 수 있음을 밝혔다. 그러므로 survivin- $\Delta$ Ex3를 목표로 실험을 할 경우 여러 암치료에 효과적으로 이용할 수 있음을 밝혔다 (British Journal of Cancer (2007), 1 -8).

또한 피부조직을 이식할때에도 survivin이 이식된 피부세포를 살려줄수 있다는 연구 결과도 나왔다. 여기서도 survivin- $\Delta$ Ex3 형태의 survivin을 이용하였는데 이것이 미세혈관을 형성 할때나 내피세포로 침투 시 GTPase Rac1을 활성화 시키는 작용을 한다고 보고되었다. 이를 이용해서 우리의 연구와 비슷한 방법으로 Protein Transduction Domain (PTD)를 이용해서 피부세포 이식시에 그 세포가 죽지 않도록 survivin- $\Delta$ Ex3을 투여함으로써 살렸다는 내용이 최근에 밝혀졌다 (Med Hypotheses 2007, Mar 19 Shu MG et.al).

## 제 7 장   참고문헌

M-H Malcles<sup>1,4</sup>, H-W Wang<sup>2,3,4</sup>, A Koumi<sup>1</sup>, Y-H Tsai<sup>2</sup>, M Yu<sup>1</sup>, A Godfrey<sup>1</sup> and C Boshoff\*, Characterisation of the anti-apoptotic function of survivin-DEx3 during TNF mediated cell death. *British Journal of Cancer* (2007), 1-8

Capla JM, Ceradini DJ, Tepper OM, et al. Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(3):836-44.

Li F, Brattain MG. Role of the Survivin gene in pathophysiology. *Am J Pathol* 2006; 169(1):1-11.

You RI, Chen MC, Wang HW, Chou YC, Lin CH, Hsieh SL. Inhibition of lymphotoxin-beta receptor-mediated cell death by survivin-DeltaEx3. *Cancer Res* 2006;66(6):3051-61.

Meade BR, Dowdy SF. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Mar 15

Murriel CL, Dowdy SF. Influence of protein transduction domains on intracellular delivery of macromolecules. *Expert Opin Drug Deliv.* 2006 Nov;3(6):739-46. Review

Cai SR, Xu G, Becker-Hapak M, Ma M, Dowdy SF, McLeod HL. The kinetics and tissue distribution of protein transduction in mice. *Eur J Pharm Sci.* 2006 Mar;27(4):311-9.

Zhang C, Guy CL. In vitro evidence of Hsc70 functioning as a molecular chaperone during cold stress. *Plant Physiol Biochem.* 2006 Nov-Dec;44(11-12):844-50