

발간등록번호

11-1541000-000881-01

닭을 생물반응기로 이용한 유용물질의 대량생산에
관한 연구

(Construction of a bioreactor for mass production of
biopharmaceuticals through transgenic chicken)

적혈구생성촉진인자(human erythropoietin; hEPO)를
생산하는 형질전환 닭의 생산

(Generation of transgenic chicken producing human
erythropoietin)

Ovalbumin promoter의 개발과 분석
(Cloning and evaluation of ovalbumin promoter)

hEPO 분리정제방법의 개발
(Establishment of hEPO purification system)

대구가톨릭대학교

농림수산식품자료실



0002130

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “닭을 생물반응기로 이용한 유용물질의 대량생산에 관한 연구”
과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 9월 2일

주관연구기관명 : 대구가톨릭대학교

주관연구책임자 : 김 태 완

세부연구책임자 : 김 태 완

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 김 진 회

협동연구기관명 : 조아제약 (주)

협동연구책임자 : 강 성 조

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 닭을 생물반응기로 이용한 유용물질의 대량생산				
	(영문) Construction of a bioreactor for mass production of biopharmaceuticals through transgenic chicken				
주관연구기관	대구가톨릭대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 대구가톨릭대학교	
참여기업	조아제약 (주)			(성명) 김태완	
총연구개발비 (1,200,000천원)	계	1,200,000천원	총 연 구 기 간 총 참 여 연 구 원 수	2006. 4. 25. ~ 2011. 4. 24. (5년)	
	정부출연 연구개발비	900,000천원		총 인 원	35
	기업부담금	300,000천원		내부인원	20
	연구기관부담금			외부인원	15
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>본 연구는 고가의 생리활성물질인 hEPO를 생산하는 형질전환 닭의 개발에 관한 연구이다. 먼저 형질전환 개체에서의 외래 유전자인 hEPO의 지속적이고 광범위한 발현에 의한 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 hEPO 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 tetracycline-inducible promoter를 도입하거나 (Tet system), 또는 발현 부위를 난관조직 특이적으로 제한할 수 있는 ovalbumin promoter를 도입한(Ov system) virus vector system을 구축하였다. 구축한 각각의 system을 이용하여 고농도의 virus를 생산한 후, 이 virus를 계란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 배양함으로써 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. 또한 닭의 배아섬유아세포와 형질전환 닭의 혈액과 계란에서 발현된 재조합 hEPO의 효율적인 분리 및 정제 방법을 구축하고자 하였다.</p> <p>○ 연구결과</p> <p>본 연구에서는 Tet virus vector system과 Ov virus vector system을 구축하여 각 system에서 생산한 고농도의 virus를 계란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 형질전환 닭을 생산하였다. 그 결과, Tet-EPO와 Tet2-EPO 형질전환 닭을5 세대G4 세대)까지 생산함으로써 계통을 확립하였다. 이 형질전환 닭은 hEPO 유전자의 유도적인 발현이 확인되었으며 당장기 분석과 생물학적 활성을 검정을 실시하였다. 또한 LNOvEPOW 형질전환 닭도 생산하였으며 수컷 개체의 sperm에서 외래 유전자의 도입을 확인하고 G1 세대 생산을 시도 중이다. 난관조직 특이적인 promoter인 ovalbumin promoter를 확보하였으며 외래 유전자에 chicken lysozyme signal peptide (LysSP)를 tagging하여 난관상피세포에서의 효율적인 외래 단백질의 분비 체계를 구축하였다.</p>					

세포와 닭에서 발현된 재조합 hEPO의 분리 및 정제 방법의 확립을 위한 연구도 실시하였다. hEPO를 면역학적 방법으로 정제하기 위하여 단크론성 항체를 생산하는 hybridoma cell line을 확보하고 이를 이용하여 대량의 항체를 생산하였으며 immunoaffinity chromatography를 포함하는 단백질 정제법을 확립하고자 하였다. 또한 hEPO의 정량을 위한 ELISA 방법도 개발하였다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

연구과제 수행기간 동안 본 연구팀에서는 국내논문 2편과 국외 SCI 논문 4편, 국내외 학술발표 13회, 국내 특허 출원 1건, 국내 특허 등록 1건, 국외 특허 출원 2건, 형질 전환체 1건, 기능성 물질 1건, 홍보 1건과 유전자원 등록 1건의 실적을 도출하였다. 본 연구에서는 외래 유전자의 지속적이고 광범위한 발현에 의한 생리적인 부작용을 해결하기 위하여 유도적 또는 조직특이적인 유전자 발현 system인 Tet virus vector system 과 Ov virus vector system을 구축하였으며 각 system을 이용하여 hEPO 형질전환 닭을 개발하였다. 본 연구 결과는 닭을 생물반응기로 이용하여 다른 여러 종류의 바이오의약품 생산 연구에 적용이 가능하리라 확신한다. 본 연구의 산물인 hEPO의 발현이 조절되는 형질전환 닭과 닭의 생산에 이용한 유전자 전이 system에 대한 특허를 출원하였는데 특히 유전자 전이 system은 탁월한 외래 유전자의 전이율 및 발현율을 나타내므로 형질전환 동물의 생산뿐만 아니라 유전자 치료 및 stem cell의 연구에도 적용될 수 있을 것이다. 현재 시판 중인 hEPO는 주로 세포배양을 통해 생산되고 있지만 경제적 효율성이 아주 낮으며 또한 수 개의 외국 회사에 의해 독점 생산되고 있다. 그러나 형질전환 가축을 통해 치료용 단백질 제제를 생산할 경우 생산비를 획기적으로 낮출 수 있다. 특히 이러한 물질을 계란을 통해 분비하는 형질전환 닭을 개발에 성공하였을 경우, 개발된 닭을 농가에서 사육하게 함으로써 농가에게는 소득 증대, 생산된 물질을 분리 정제하여 상품화하는 회사에게는 이득 증대 및 연구 기반 시설의 확보, 그리고 소비자인 환자에게는 저렴한 치료 물질을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약 문

I. 제 목

닭을 생물반응기로 이용한 유용물질의 대량생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

2010년 바이오의약품의 전 세계 시장 규모는 1,000억 달러를 넘었으며, 해를 거듭할수록 합성의약품보다 바이오의약품의 비중이 점점 더 커지고 있다. 바이오의약품 중 재조합 유전자 기술을 이용하여 생산하는 단백질 치료제는 주로 동물세포를 배양하여 생산되기 때문에 배양액에 포함된 동물의 혈청 등의 여러 원인에 의해 순도 및 분리에 문제가 있을 뿐만 아니라 생산시설, 숙련된 연구 자원과 같은 제반 문제로 생산원가가 매우 높다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 최근에 다수의 연구팀들이 당단백질성 바이오의약품을 대량생산하는 체계를 확립하기 위해 생물반응기로서의 형질전환 동물 개발 연구에 집중하고 있다. 지금까지 형질전환 동물은 주로 포유류를 대상으로 연구가 되었으나 성공적인 연구 결과는 매우 미미한데, 그 근본 원인은 대부분 포유류들의 긴 세대 간격과 천문학적인 개발 및 생산 비용, 그리고 외래 단백질이 체내에서 과잉 발현되어 발생하는 형질전환동물의 생리적인 부작용에 있다고 요약할 수 있다. 이에 비해 가금이 포유동물에 비해 갖는 장점은 첫째, 성숙 기간과 세대간격이 짧으며, 둘째, 높은 번식력으로 인한 형질전환 가금의 계통성립이 용이하고, 셋째, 비교적 적은 노력과 비용으로 많은 개체를 대상으로 하는 실험이 가능하다는데 있다. 또한 형질전환 닭의 계란에 함유된 단백질의 종류가 적어서 재조합 단백질 의약품의 분리 및 정제가 훨씬 용이하다.

본 연구에서는 형질전환 닭으로부터 hEPO가 함유된 계란을 생산하고자 하였다. hEPO의 세계시장 규모는 연간 약 90억 달러, 국내 시장 규모도 연간 약 150억원이며 판매단가는 g당 67만 달러로 알려지고 있다. 현재 재조합 hEPO는 동물세포 배양 방법을 이용하여 생산하는데 고가의 생산 비용으로 인하여 단가가 매우 높다. 생산 단가를 낮추기 위한 방법의 하나로 형질전환 동물을 이용한 재조합 hEPO의

생산을 시도하고 있으나, hEPO의 과잉 발현으로 인한 형질전환 포유류의 심각한 생리적 부작용의 초래로 오직 조류를 통해 hEPO를 생산하는 것이 가장 이상적인 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 형질전환 닭의 생산에 있어서 stage X의 갓 산란된 유정란의 배반엽세포를 대상으로 하여 retrovirus vector를 이용한 외래 유전자 전이를 수행하였다. 갓 산란된 계란은 포유류의 수정란과 달리 이미 약 60,000개의 배반엽 세포로 구성되어 있으므로 1,000 배 이상의 고농도로 농축된 virus 용액을 이용하여 배반엽세포에 대한 유전자 전이 효율을 높이고자 하였다. 하지만 선행된 여러 연구에서 기존의 retrovirus vector system에 의해 생산된 형질전환 동물의 경우 외래 유전자의 발현이 개체 전체에 걸쳐 지속적이며 광범위하게 일어나므로 개체의 사망이나 질병 유발 등과 같은 생리적인 부작용을 보이는 경우가 많은 것으로 보고되었다. 본 연구과제는 이러한 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 tetracycline-inducible virus vector system을 구축하였으며, 난관 특이적 promoter인 ovalbumin promoter를 cloning하여 외래 유전자의 발현을 닭의 난관에 국한시켜서 치료용 단백질을 계란의 난백을 통하여 생산할 수 있도록 하였다. 계란의 배반엽층에 고농도의 virus를 미세주입한 후 대리난각 방법으로 배양하여 생산한 hEPO 형질전환 닭의 계통 확립을 시도하였으며, 닭의 배아섬유아세포와 혈액, 그리고 계란에 함유된 재조합 hEPO의 당잔기 분석 및 고순도의 물질로 분리 정제하는 방법을 확립하고자 하였다. 본 연구에서 개발된 hEPO 형질전환 닭은 고가의 바이오의약품의 대량생산을 위한 생물반응기로서의 가능성을 제시하고, 차후 계통이 확립된 hEPO 형질전환 닭을 양계 농가에 보급함으로써 양계 농가의 고소득 창출의 기반을 확립하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 고가의 생리활성물질인 hEPO를 생산하는 형질전환 닭의 개발에 관한 연구이다. 먼저 형질전환 개체에서의 외래 유전자인 hEPO의 지속적이고 광범위한 발현에 의한 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 hEPO 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있거나, 또는 발현 부위를 조직특이적으로 제한할 수 있는 virus vector system을 구축하였다. 이 system을 이용하여 생산한 고농도의 virus를 계란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 배양함으로써 형질전환 닭

을 생산하고자 하였다. 또한 닭의 배아섬유아세포와 형질전환 닭의 혈액과 계란에서 발현된 재조합 hEPO의 효율적인 분리 및 정제 방법을 구축하고자 하였다.

1. 새로운 retrovirus vector system의 구축

본 연구에서는 외래 유전자의 발현이 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절하거나 특정 조직에 국한할 수 있는 retrovirus vector system을 구축하고자 하였다. 이에 발현 유도체인 tetracycline 계열의 물질 공급 여부에 따라서 발현이 조절되는 tetracycline-inducible promoter를 도입한 Tet system과 닭의 난관에서 특이적으로 발현되는 ovalbumin promoter를 도입한 Ov system을 구축하였다. 또한 동물체에 도입된 외래 유전자의 발현을 최대화하기 위하여 WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 서열을 도입하였다. 각각의 구축한 virus vector system을 이용하여 고농도의 virus를 생산한 후 이 virus를 형질전환 닭의 생산에 사용하였다.

2. hEPO가 발현되는 형질전환 닭의 생산

닭은 번식생리학적인 면에서 인간을 포함한 포유류와는 매우 상이하기 때문에 기존의 형질전환 동물을 생산하는 방법을 닭에 동일하게 적용할 수는 없다. 본 연구에서는 이러한 형태적, 발생학적 차이점을 감안하여 형질전환 가금을 생산하는 방법으로 stage X의 배반엽세포를 표적세포로 retrovirus vector system을 이용해서 외래 유전자를 전이시키고자 하였다. 이에 전 단계에서 생산된 고농도의 virus를 stage X 단계 유정란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 배양하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. 생산된 hEPO 형질전환 닭의 유전자 전이 여부와 발현 양상을 확인하기 위하여 genomic DNA PCR, ELISA, Southern blotting, 그리고 생물학적 활성 분석을 실시하였다. Tet system에 의해서 생산된 형질전환 닭은 발현 유도체인 doxycycline의 식이 여부에 따른 발현 조절 양상을 확인하였으며 계통 확립을 위한 후속 세대의 생산도 실시하였다. 또한 hEPO 유전자가 전이된 세포와 형질전환 닭에서 발현된 재조합 hEPO의 반감기 및 활성에 있어서 중요한 역할을 하는 당잔기를 분석하였다.

3. 닭의 난관에 특이적인 ovalbumin promoter의 개발과 분석

hEPO 등의 생리활성 단백질을 계란 난백에 특이적으로 분비되기 위해서는 계란 난백을 생산하는 닭 난관상피세포에서 특이적으로 발현할 수 있는 최적의 ovalbumin promoter를 확보해야 한다. 이를 위해 계란 난백에 특이적으로 발현하는 chicken ovalbumin 유전자의 5'- 및 3'-regulatory region을 확보하여 promoter-reporter gene construct를 작성한 후 닭 난관세포를 이용하여 promoter-reporter analysis를 실시하여 5 Kb 이내의 최적의 chick ovalbumin 5'-upstream region을 확보하였으며, regulatory element인 estrogen response element, cOV 3'-untranslated region 및 cOV 유전자 exon I+intron I region의 cOV 유전자 promoter activity에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 lysozyme signal peptide를 tagging함으로써 난관상피 세포에서의 유용단백질의 세포 외로의 효율적인 분비를 위한 최적의 분비 체계를 구축하고자 하였다.

4. hEPO의 분리 정제방법 개발

hEPO 유전자가 전이된 닭의 배아섬유아세포의 배양액과 형질전환 닭의 혈액과 계란의 난백으로부터 재조합 hEPO를 정제하기 위한 연구의 일환으로 면역학적 정제법을 확립하고자 하였다. 단클론성 항체를 생산하는 세포주를 개발하기 위하여 항원으로 사용할 단백질을 대장균에서 발현하여 정제하였으며, 이 단백질을 마우스에 면역하여 얻은 비장세포와 myeloma cell을 융합하여 14종의 hybridoma 세포주를 개발하였다. 항체의 특성을 조사하여 가장 강력한 친화력을 가지는 EPO-N-12 세포주를 사용하여 대량의 항체를 생산 정제하고, immunoaffinity column을 제작하여 세포 배양물에서 재조합 hEPO 단백질을 정제하는 방법을 확립하였다. 세포 배양액에서 정제한 hEPO의 PI값을 확인하기 위하여 2DE gel 분석을 시행하였으며, 항체를 이용하여 Sandwich ELISA법을 확립하였다. hEPO의 반감기와 생물학적 활성을 향상시키기 위하여 hEPO 변이체를 생산하는 세포주를 구축하여 이들 세포주로부터 생산된 hEPO 변이체를 확립한 정제 방법으로 정제한 후 생물학적 활성을 조사하였다. 이 외에도 계란 난백으로부터 hEPO를 정제하는 방법을 확립하기 위하여 여러 정제 방법을 수행하였다.

IV. 연구개발결과

본 연구과제는 hEPO를 생산하는 형질전환 닭을 개발하여 고가의 생리활성 물질을 대량생산하는 생물반응기로의 가능성을 확인하기 위한 연구이다. 먼저 형질전환 닭에서의 외래 유전자의 발현 양상의 관찰을 용이하게 하기 위하여 hEPO 유전자와 표지유전자를 동시에 발현하는 SIN vector 형태의 dual promoter system을 도입하고자 하였다. hEPO 유전자를 도입하기에 앞서서 vector의 효율성을 확인하기 위하여 두 종류의 *RFP*와 *EGFP* 표지유전자를 각각 CMV promoter와 RSV promoter 하에 도입한 MLV vector system을 구축하고 이 system에서 생산된 virus를 표적세포에 감염시켜서 한 세포 내에서 두 유전자가 동시에 발현되는 것을 확인하였다. 그러나 세포의 성장이 저하되고 감염가가 매우 저조하여 이 dual internal promoter system이 세포의 생리적인 측면에서 문제가 있는 것이 확인되었다. 실제적으로 hEPO 유전자를 EGFP 표지 유전자와 한 vector 내에 도입하여 각 유전자의 발현 양상을 확인한 결과, hEPO의 발현양이 단독으로 도입된 vector를 사용한 경우에 비해 10만 분의 1 이하로 확인되어 매우 저조하게 나타났으며 EGFP 유전자의 발현도 약한 것으로 관찰되었다. 이에 본 연구는 단독의 internal promoter를 사용한 vector system과 생리적인 부작용을 최소화할 수 있는 발현 조절이 가능한 Tet system과 조직 특이적인 발현을 유발하는 Ov system을 도입하여 연구를 진행하기로 하였다. 단독의 internal promoter를 사용한 vector로는 CMV promoter의 조절 하에 hEPO 유전자를 도입한 MoMLV 유래의 retrovirus vector인 LNCEPOW와 lentivirus vector인 FIV-CMV2-hEPO-WPRE vector를 cloning하여 virus를 생산하여 여러 표적세포에서 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, 두 종류의 vector 모두 CEF 세포에서 가장 높은 발현 양을 나타내어 전자는 37,000 IU/ml, 후자는 14,000 IU/ml의 농도를 확인하였으며 TF-1 세포의 증식 촉진 정도를 MTT 측정법으로 확인하는 생물학적 활성 검정에서도 시판되고 있는 재조합 hEPO에 비해 월등히 높은 활성을 나타내었다. 이 중 LNCEPOW retrovirus vector system을 이용하여 고농도의 virus를 생산한 후, 이 virus를 stage X의 계란의 배반엽세포층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 형질전환 병아리를 생산하였다. 이 virus에 의해 생산된 형질전환 닭은 부화율 및 형질전환율이 매우 저조하였으며 생산된 형질전환 닭의 생존 기간도 8월령 미만으로 매우 짧은 것으로 나타났다. 이러한 현상은 hEPO의 지속적이고 광범위한 발현으로 인하여 개체의 생리적인 부작용을 초래했기 때문인 것으로 추정되었다. 이를 해결하기 위한 방안으로 외래 유전자의 발현

조절이 가능한 Tet system을 구축하였으며 WPRE 서열의 도입 위치에 따른 발현 유도율과 유도 조건에서의 발현양을 비교한 결과, WPRE 서열이 *hEPO* 유전자의 3' 위치에 도입된 pRevTRE-EPO-WPRE-RSVp-rtTA2SM2 vector 실험군에서 가장 높게 나타났으며 이 vector를 Tet1-EPO로 명명하였다. 이 후 이 vector의 발현 유도율을 증가시키기 위하여 RevTRE 서열과 RSV promoter를 RevTREtight와 PGK promoter로 대체하여 개선된 형태의 pRevTREtight-EPO-WPRE-PGKp-rtTA2SM2 vector를 구축하였으며 이 vector를 Tet2-EPO라고 명명하였다. 각각의 vector는 공통적으로 CEF 세포에서 월등히 높은 발현양과 발현 유도율을 나타내는 것으로 확인되었다. 이 virus vector system을 이용하여 생산한 고농도의 virus를 이용하여 LNCEPOW 형질전환 병아리를 생산 실험과 동일한 과정으로 형질전환 닭을 생산하였다. 특히 Tet2-EPO 형질전환 닭 생산 실험에서 높은 부화율과 형질전환율을 나타내었으며, 발현 유도물질인 doxycycline의 식이 여부에 따라서 *hEPO* 유전자의 발현이 유도적으로 조절되는 양상도 확인되었다. *hEPO* 유전자가 전이된 닭의 배아섬유아세포와 Tet2-EPO 형질전환 닭에서 발현된 *hEPO*의 생물학적 활성을 측정된 결과, 시판되고 있는 제조합 *hEPO*에 비해 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다. G0 형질전환 닭 중에서 수탉을 분류하여 sperm을 채취한 후 DNA를 분리하여 *hEPO* 유전자에 대한 PCR을 실시하였다. *hEPO* 유전자의 전이가 확인된 개체는 일반 암탉과 교미시켜서 hemizygote 상태의 G1 형질전환 닭을 생산하였으며, G1 개체를 대상으로 Southern blotting을 실시한 결과 한 copy의 *hEPO* 유전자가 genome 내에 삽입되어 있는 것을 확인하였다. 또한 doxycycline의 식이 여부에 따라서 형질전환 닭의 혈액과 계란의 난백에서 *hEPO* 농도의 변화가 유도적으로 일어나는 것을 확인하였다. 형질전환 개체로 확인된 G1 개체로부터 G2를 생산하였으며, 이후 동일한 과정으로 G3와 G4 세대를 생산하여 Tet2-EPO 형질전환 닭의 계통을 확립하였다.

*hEPO*의 난관 조직 특이적인 발현을 위해 LNCEPOW vector의 CMV promoter를 난관조직 특이적인 promoter인 ovalbumin promoter로 대체하여 pLNOvEPOW vector를 구축하였다. Ovalbumin promoter는 길이에 따라 3.2 Kb, 3.6 Kb, 그리고 4.2 Kb 세 종류를 각각 도입하여 LNOv32EPOW와 LNOv36EPOW, 그리고 LNOv42EPOW virus vector system을 구축하였다. 각 vector system을 이용하여 고농도의 retrovirus stock을 생산하였으며 stage X의 계란의 배반엽 세포층에 미세주입하여

대리난각 방법으로 형질전환 병아리를 생산하였다. 생산된 형질전환 닭을 대상으로 분자생물학적인 분석을 실시하였으며 sperm에 *hEPO* 유전자가 전이된 개체를 선별하여 G1 세대의 생산을 진행하고 있다. 이 외에도 *hEPO* 유전자가 발현된 CHO, CEF 세포와 형질전환 닭의 혈액과 난백에서 재조합 hEPO를 분리 및 부분 정제하여 각 단백질의 당잔기 결합 양상을 분석한 결과, 난백에서 발현된 hEPO가 타 실험군에 비해 N-당화가 적게 일어난 것을 확인할 수 있었다.

유용단백질이 계란 난백에 특이적으로 분비하게 하기 위해 계란 난백을 생산하는 닭 난관상피세포에서 특이적으로 발현할 수 있는 최적의 promoter system을 구축하고자 chicken ovalbumin (cOV) 유전자의 4.5 Kb, 3.2 Kb 5'-upstream region과 3 Kb 3'-downstream region을 cloning하여 각 부위의 promoter activity에 영향을 미치는 enhancer로서의 역할을 조사하고자 하였다. cOV promoter-reporter assay를 실시한 결과, cOV 3.2 Kb 5'-upstream region이 가장 높은 promoter activity를 보였으며, 3 Kb cOV 3'-downstream region은 3.2 Kb 및 4.5 Kb cOV 5'-upstream region의 promoter activity를 감소시키는 경향을 나타내었다. cOV 유전자 promoter activity에 중요한 영향을 미치는 regulatory element인 estrogen response element (ERE)의 cOV 유전자 promoter activity에 미치는 영향을 조사한 결과, cOV 유전자 promoter activity의 증가를 유도하였다. 또한, 유용단백질인 EPO의 난관상피세포에서 특이적 및 효율적인 분비유도를 위한 체계를 확립하고자 외래유전자인 EGFP에 chicken lysozyme signal peptide (LysSP)를 tagging하여 외래단백질의 세포외로 효율적인 분비가 유도되는지 조사한 결과, LysSP가 tagging된 경우에 보다 효율적으로 세포 외로 분비되는 것을 확인하였으며, LysSP의 tagging이 일시적인 아닌 영구적으로 외래단백질의 발현 분비를 유도하는 것을 확인함으로써 LysSP를 이용한 유용단백질의 효율적인 분비 체계를 확립하였다.

본 연구과제에서는 세포와 닭에서 발현된 재조합 hEPO의 분리 및 정제 방법의 확립을 위한 연구도 실시하였다. hEPO를 면역학적 방법으로 정제하기 위하여 단클론성 항체를 생산하는 hybridoma cell line을 확보하고 이를 이용하여 대량의 항체를 생산하였으며, immunoaffinity chromatography를 포함하는 단백질 정제법을 확립하고자 하였다. 단클론성 항체를 생산하는 세포주의 개발은 항원으로 사용할 단백질을 대장균에서 발현하여 정제한 후 마우스에 면역하고, 면역된 마우스의 비

장세포와 myeloma cell을 융합하는 과정을 거쳐 14종의 세포주를 개발하였다. 항체에 대한 가장 강력한 친화력을 가지는 EPO-N-12 세포주를 사용하여 대량의 항체를 생산하여 immunoaffinity column을 제작하였으며 이를 이용하여 세포 배양액에 함유된 재조합 hEPO 단백질을 정제하는 방법을 확립하였다. 세포 배양액에서 정제한 hEPO의 PI값을 확인하기 위하여 2DE gel 분석을 시행하였으며, 항체를 이용하여 Sandwich ELISA법을 확립하였다. hEPO의 반감기와 생물학적 활성을 향상시키기 위한 연구를 위하여 hEPO 변이체를 cloning하여 세포주를 구축하였으며, 이 세포주들이 생성하는 hEPO 변이체를 전단계에서 확립한 방법으로 정제한 후 생물학적 활성을 조사하였다. 계란 난백으로부터 hEPO를 정제하기 위하여 ZnCl₂와 diafiltration을 포함하는 전처리 과정을 확립하였고, blue-sepharose chromatography, immunoaffinity chromatography, gel filtration으로 이어지는 정제 과정으로 25% 이상의 효율을 가지는 정제법으로 확립하였다.

본 연구과제에서 생산된 hEPO 형질전환 닭은 고가의 바이오의약품 생산을 위한 생물반응기로서의 가능성을 제시하고, 외래 유전자가 전이된 형질전환 개체의 생리적인 부작용을 최소화하기 위한 효율적인 유전자 전이 체계의 확립에 기여할 것이다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

연구과제 수행기간 동안 본 연구팀에서는 국내논문 2편과 국외 SCI 논문 4편, 국내외 학술발표 13회, 국내 특허 출원 1건, 국내 특허 등록 1건, 국외 특허 출원 2건, 형질전환체 1건, 기능성 물질 1건, 홍보 1건과 유전자원 등록 1건의 실적을 도출하였다. hEPO 등의 고가의 바이오의약품을 경제적으로 대량생산하기 위한 생물반응기의 개발은 여러 동물을 대상으로 진행되어 왔으나 그 생산 실적이 매우 저조한 상태이며 이를 극복하기 위한 방법 중의 하나는 형질전환 닭을 생물반응기로 이용하는 것이다. 이를 위하여 본 연구에서는 외래 유전자의 지속적이고 광범위한 발현에 의한 생리적인 부작용을 해결하기 위하여 유도적 또는 조직특이적인 유전자 발현 system인 Tet virus vector system과 Ov virus vector system을 구축하였으며 각 system을 이용하여 hEPO 형질전환 닭을 개발하였다. 본 연구 결과는 닭을 생물반응기로 이용하여 다른 여러 종류의 바이오의약품 생산 연구에 적용이 가능하

리라 확신한다. 본 연구의 산물인 hEPO의 발현이 조절되는 형질전환 닭과 닭의 생산에 이용한 유전자 전이 system에 대한 특허를 출원하였는데 특히 유전자 전이 system은 탁월한 외래 유전자의 전이율 및 발현율을 나타내므로 형질전환 동물의 생산뿐만 아니라 유전자 치료 및 stem cell의 연구에도 적용될 수 있을 것이다. 또한 난관조직 특이적인 발현 system은 타 연구실에서 구축하려고 시도 중이나 괄목할 만한 성과는 없는 실정이다. 이에 본 연구실에서 구축한 난관조직 특이적인 발현 system이 선두적인 위치를 차지할 수 있으리라 사료되며 향후 연구에서도 이를 이용한 바이오의약품의 생산 연구를 진행할 예정이다. 본 연구에서 확립한 hEPO 분리 정제 방법은 형질전환 동물의 부산물로부터 목적단백질의 안전하고 고효율적인 분리 정제를 위한 기반 기술로 제공될 수 있다. 그리고 본 연구에서 구축한 대규모 고친화성 항체 생산시스템 기술, 인력 및 장비를 활용하여 관련된 타 연구에 적극 활용할 수 있도록 할 계획이다.

본 연구에서 개발한 바이오의약품 생산이 가능한 형질전환 닭의 세대번식을 통한 계통 확립과 분양을 통하여 양계 농가의 고소득 창출이 가능하며 분자생물학과 축산학 및 가금학 등을 전공한 전문 인력의 일자리 창출에도 큰 역할을 담당할 수 있을 것으로 기대된다.

SUMMARY

I. Title

Construction of a bioreactor for mass production of biopharmaceuticals through transgenic chicken

II. Objective and necessity of the research and development

The biopharmaceutical industry is rapidly growing and the world market size expanded to more than 100 billion dollars in 2010. At present, most of currently available biopharmaceuticals are produced from cultured animal cells such as Chinese Hamster Ovary cells. However, one of the big problems of this producing systems is high production cost due to the difficulty of purification of pharmaceuticals from animal serum in culture medium. At present, as a promising solution for this problem, use of 'bioreactors' to address the growing demand for large quantities and increasing numbers of biopharmaceuticals is of prime strategic relevance to medical advancement. Originally, the mammary gland was considered a promising bioreactor, reflecting its large milk production capacity, and some pharmaceutical proteins were produced in the milk of several species of transgenic mammals. However, disadvantages of the mammary gland as a bioreactor include long generation times for domestic mammals and difficulties in purifying recombinant proteins due to the biochemical complexity of milk protein and fat. Use of the hen egg can circumvent these problems and has additional advantages including shorter generation time, lower expense and fecundity. Most importantly, purification of recombinant protein is predicted to be much easier because egg white protein is less biochemically complex. Moreover, in

comparison to mammals, the glycosylation patterns of some chicken proteins are reported to be more similar to those of humans.

Despite these advantages, production of transgenic avian species has been hampered by the unusual features of avian reproductive biology. The ovum is fertilized within one hour of ovulation, then surrounded by several grams of albumin and eggshell. Therefore, early embryonic development is initiated in the reproductive organ of the female, resulting in an embryo which, just after laying, consists of approximately 60,000 morphologically undifferentiated pluripotent cells.

In transgenic poultry production, the target cells for foreign gene transfer are: blastodermal cells of the newly laid egg; PGCs (primordial germ cells); newly fertilized eggs; embryonic stem cells; and sperm. Transferring foreign genes to target cells relies on two methods - retrovirus-mediated gene transfer and direct DNA transfection. Among the multiple possible permutations and combinations of target cell and gene transfer method, targeting blastodermal cells at stage X using retrovirus-mediated gene transfer is most commonly employed, reflecting its technical ease and effectiveness of gene transfer.

The main object of this study is generation of transgenic chickens expressing human erythropoietin. hEPO is a 30.4 kD glycoprotein with 165 amino acids with three N-linked (Asn²⁴,Asn³⁸,andAsn⁸³) and one O-linked (Ser¹²⁶)sugar moieties required for *in vivo* stability and biological function, respectively. The primary physiological function of this cytokine, which is produced mainly by the kidney, is to stimulate formation of red blood cells in the bone marrow by inducing the proliferation and maturation of progenitors. Therefore, hEPO has been a standard therapy for anemia caused by dysfunctions of the kidney. In addition, hEPO is the most widely used agent to treat non-renal associated anemia in cancer patients undergoing chemotherapy. The sale price of hEPO is 670 thousand dollars and the world market size ohas been reported as much as 9 billion dollars in 2010. Even in Korea alone, the domestic market size has been estimated to be more than 15 billion won. Most

importantly, the patent for the hEPO has expired in 2007. In conclusion, the significance of this main study is that it is the first successful report on the production of transgenic chickens expressing this human cytokine protein.

This study consists of two parts. In the main part, we attempted to generate transgenic chickens expressing the hEPO gene by employing two gene transfer systems: replication-defective Moloney murine leukemia virus (MoMLV)-based vectors packaged with vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G). In second part, we tried to apply tetracycline-mediated inducible expression system and oviduct-specific expression system. Application of these two expression system was mainly to minimize physiological disturbances due to the constitutive over-expression of the exogenous genes. In conclusion, the results obtained in this study are summarized briefly as follows:

- (1) In *in vitro* study, the *hEPO* gene under the control of CMV promoter expressed as much as 37,000 IU/ml and biological activity of the product was much higher than commercially available counterpart.
- (2) Generation of G0 transgenic chickens expressing hEPO cytokine protein using tetracycline-inducible promoter.
- (3) Generation of non-chimeric G1 transgenic chickens bred from chimeric G0 transgenic chickens.
 - It was confirmed that expression of the hEPO was tetracycline dependent.
 - hEPO was detected not only in the blood but also in the egg white.
- (4) Establishment of a new breed chickens producing hEPO transgenic chickens by successful generation of G2, G3, and G4 hEPO transgenic chickens.
- (5) Generation of G0 transgenic chickens expressing the *hEPO* gene under the control of ovalbumin promoter.

The results obtained from this study demonstrate the possible use of chicken as bioreactor producing human cytokine proteins. Further development of this system must contribute to increase rural household income. In addition, our results also significantly provide basic scientific knowledge in avian reproductive physiology.

CONTENTS

Part 1 Overview of research and development	22
Part 2 Present status of technology development in Korea and foreign countries	29
Chapter 1 The trends and prospects of related area at home and abroad ...	29
1. In Korea	29
2. In Foreign countries	31
Chapter 2 Significance of the results of this study in the related area of Korea and foreign countries	37
1. Effects of the results to the related area at home and abroad	37
2. Effects of the results to the industry	38
Part 3 Experiments and results	40
Chapter 1 Methods for theoretical and experimental approach	40
1. Construction of new retrovirus vector system	40
2. Production of transgenic chickens expressing hEPO	42
3. Development and analysis of chicken oviduct specific ovalbumin promoter	44
4. Isolation and purification of recombinant hEPO	45
Chapter 2 Experiments and results	46
1. 1st subordinate assignment	46
가. Construction of dual internal promoter system and <i>in vitro</i> assay	46
나. Construction of retrovirus vector system for <i>hEPO</i> gene expression	50
다. Construction of Tet system for controllable <i>hEPO</i> gene expression	

.....	60
라. Production of LNCEPOW transgenic chickens	71
마. Production of transgenic chickens using Tet-EPO or Tet2-EPO virus vector system	75
바. Production of transgenic chickens expressing hEPO in oviduct specifically	105
사. Analysis of recombinant hEPO glycosylation patterns in transgenic cells and chickens	140
2. 1st cooperative assignment	143
가. Cloning of 5' and 3' UTR regions of chicken ovalbumin (cOV) promoter to evaluate the effect to the cOV promoter activity	143
나. Test of transcriptional effect of cOV promoter	145
다. Establishment of a system for efficient extracellular secretion of foreign protein	149
3. 2nd cooperative assignment	152
가. Production of hEPO from <i>E.coli</i> and construction of a hybridoma cell line producing monoclonal Ab against hEPO	152
나. Characterization of the monoclonal Ab against hEPO	162
다. Production and purification of the monoclonal Ab against hEPO	164
라. Establishment of monoclonal Ab purification system using immunoaffinity chromatograph	167
마. 2D gel analysis of the purified hEPO	172
바. Establishment of Sandwich ELISA method using the the monoclonal Ab against hEPO	174
사. Investigation to increase half life and bioactivity of hEPO	175
아. System development for purification of hEPO in egg white	182
Part 4 Achievements and contributions to the related fields	191
Chapter 1 Achievements based on original research objective	191

Chapter 2 Contributions to the technical development of related areas	193
Part 5 Applications of the results	195
Chapter 1 Publications, patents, and others	195
1. Korean domestic publications	195
2. International SCI publications	196
3. Presentations at domestic conferences	196
4. Presentations at international conferences	197
5. Patents (application / registration)	198
6. Others (new gene submitted, transgenic organisms, new breed, etc)	199
Chapter 2 Application schedule of the results obtained from this study ...	
.....	199
Part 6 Scientific and technical information obtained abroad during the study ...	201
Part 7 References	202

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황	29
제1절 국·내외 관련분야에 대한 기술개발 현황	29
1. 국내 기술개발 현황	29
2. 국외 기술개발 현황	31
제2절 연구결과가 국·내외 기술개발현황에서 차지하는 위치	37
1. 본 연구결과가 국·내외 기술개발현황에서 차지하는 위치	37
2. 본 연구결과의 산업적 창출 효과	38
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	40
제1절 이론적 실험적 접근 방법	40
1. 새로운 retrovirus vector system의 구축	40
2. hEPO가 발현되는 형질전환 닭의 생산	42
3. 닭의 난관에 특이적인 ovalbumin promoter의 개발과 분석	44
4. hEPO의 분리 정제방법 개발	45
제2절 연구내용 및 결과	46
1. 제1세부과제	46
가. Dual internal promoter system의 구축과 <i>in vitro</i> 에서의 발현 검정 ...	46
나. hEPO 유전자의 발현을 확인하기 위한 retrovirus vector system의 구축	50
다. hEPO 유전자의 발현 조절을 위한 Tet system의 구축	60
라. hEPO가 지속적으로 발현되는 LNCEPOW 형질전환 닭의 생산	71
마. Tet-EPO와 Tet2-EPO virus vector system을 이용한 형질전환 닭의 생	75
산	75
바. 난관조직 특이적으로 hEPO가 발현되는 형질전환 닭의 생산	105

사. 형질전환 세포와 닭에서의 재조합 hEPO의 당잔기 분석	140
2. 제1협동과제	143
가. Chicken ovalbumin (cOV) 5'-upstream, 3'-downstream UTR region cloning 및 cOV 5'-upstream, 3'-downstream UTR region의 cOV promoter activity에 미치는 영향 조사	143
나. Chicken ovalbumin (cOV) gene regulatory element의 중요성 조사 ...	145
다. 외래단백질 효율적 분비를 위한 체계 확립	149
3. 제2협동과제	152
가. 유전자 재조합에 의한 hEPO의 생산과 단크론성 항체를 생산하는 세포주 개발	152
나. 단크론성 항체의 특성	162
다. 항체의 생산 및 정제	164
라. Immunoaffinity chromatography 이용한 세포배양액에서의 hEPO 정제법 확립	167
마. 정제된 hEPO의 2DE gel 분석	172
바. 단크론성 항체를 이용한 Sandwich ELISA법의 확립	174
사. hEPO의 반감기와 생물학적 활성을 향상시키기 위한 연구	175
아. 계란 난백으로부터 hEPO 정제법 확립	182
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	191
제1절 연구개발목표의 달성도	191
제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도	193
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	195
제1절 연구개발성과	195
1. 국내논문	195
2. 국외논문	196
3. 국내학술발표	196
4. 국외학술발표	197
5. 특허 출원/등록	198

6. 기 타(유용유전자, 형질전환체, 품종, 물질 등 실적)	199
제2절 연구성과 활용 계획	199
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	201
제 7 장 참고문헌	202

제 1 장 연구개발과제의 개요

본 연구는 형질전환 닭을 생물반응기로 이용하여 고가의 생리활성물질인 사람의 적혈구생성촉진인자(human erythropoietin, hEPO)를 대량생산하기 위한 연구이다. 닭을 비롯한 여러 형질전환 동물은 질병의 모델, 유전자 기능 및 조절에 관한 연구, 또는 독성물질을 탐색하는 연구수단 등과 같은 기초 연구 분야뿐만 아니라 인체에 유용한 단백질의약품의 생산과 간, 신장 등 특정 장기의 공급원 등과 같은 임상적인 분야에서도 활용가치가 매우 크다. 이 중 형질전환동물을 이용한 치료용 단백질의 생산은 비교적 낮은 생산 원가와, 분리와 정제의 용이성, 그리고 효율적인 대량 생산 체계의 확립 등의 장점을 가진다. 현재 고가의 바이오의약품 중 당단백질성 생리활성물질은 특수한 경우를 제외하고는 대부분 동물세포를 이용하여 생산한다. 동물세포를 이용한 단백질 생산은 주로 동물 혈청을 이용한 세포로부터 생산되기 때문에 순도 및 분리에 문제가 있을 뿐만 아니라 생산시설, 숙련된 연구 자원과 같은 제반 문제로 생산원가가 높은 것이 단점이라 할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 최근에 다수의 그룹이 당단백질성 바이오의약품을 대량생산하는 체계를 확립하기 위해 생물반응기로서의 형질전환 동물 개발 연구에 집중하고 있다. 현재 형질전환 동물을 대상으로 한 특허는 1990년대 후반에 급증하여 현재까지의 국내의 총 출원 건수는 100 여건에 이르며, 그 유형을 살펴보면 질병연구모델용 실험동물, 바이오의약품 생산수단이 되는 동물 및 동물복제기술에 관한 개발 등이 있다. 이중에서 형질전환동물을 바이오의약품 생산수단으로 사용하고자 하는 발명에는 젓, 소변 또는 혈액을 통하여 백혈구증식인자, 조혈인자, 항체 등 고가의 생물의 약품을 배출시키는 소, 돼지, 흑염소 등이 등록되어 있다. 이 방법은 기존의 세포배양 방법보다 생산비용이 훨씬 저렴하고 부가가치도 높아 새로운 의약품 생산수단으로 주목받고 있다. 그러나 현재까지 방대한 시간과 비용이 투자되었음에도 불구하고 형질전환 가축을 이용한 바이오 의약품의 경제적인 성공 사례는 혈액응고에 관련된 Antithrombin III, 선천성 폐기종 관련 α -Antitrypsin)과 '폼페병(Pompe's disease)'이라는 근육 질환 관련 α -Glucosidase의 경우에 국한되고 있다. 이와 같이 미미한 성공 사례의 근본 원인은 대부분 포유류들의 긴 세대 간격, 천문학적인 비

용과 많은 시간, 그리고 외래 단백질이 체내에서 과잉 발현됨으로 인해 발생하는 형질전환동물의 생리적인 부작용에 있다고 요약할 수 있다.

생체반응기로서 가금이 포유동물에 비해 갖는 장점은 첫째, 성숙속 기간과 세대간격이 짧으며, 둘째, 포유류에 비해 번식능력이 대단히 높기 때문에(연간 300개 이상의 계란을 생산) 형질전환된 가금의 계통성립이 용이하고, 셋째, 비교적 적은 노력과 비용으로 많은 개체를 대상으로 하는 실험이 가능하다는데 있다(Vick 등, 1993; Naito 등, 1994). 또한 각 계란의 난백에는 총 3g 정도의 단백질 성분이 있으며 단백질의 종류는 8가지뿐이다. 따라서 형질전환 포유동물의 젖에 비하여 형질전환 닭의 계란에 함유된 재조합 단백질을 분리 및 정제하는 것이 훨씬 용이하다. 예를 들면, 현재 난백으로부터 특정 단백질을 분리하는 비용이 g당 10달러 정도로 추산되는데 이는 세포배양액으로부터 특정 단백질을 분리하는 비용의 1%에 불과하다. 따라서 형질전환 닭의 생산은 기초적인 연구로서도 중요할 뿐만 아니라 계란을 이용한 치료용 단백질의 대량 생산에 있어서도 그 의미가 크다. 본 연구진의 최근 연구결과(Koo 등, 2004; Kwon 등, 2004)에 의하면, 전이된 외부 유전자가 genome 상에 존재하고 또 발현됨을 생산된 모든 병아리에서 확인하였다. 이는 기존의 포유류 가축에 비교하면 (pronuclear DNA microinjection에 의한 포유류가축의 형질전환율은 5% 미만) 비교할 수 없을 정도로 높은 수치이다. 따라서 생물반응기로서 일반 포유류가축 대신 닭을 사용하는 것이 앞에서 언급한 경제적 시간적 장점 외에 성공할 가능성이 훨씬 높다고 단언할 수 있다.

본 연구에서는 형질전환 닭으로부터 hEPO가 함유된 계란을 생산하고자 한다. hEPO의 세계시장 규모는 연간 약 90억 달러, 국내 시장 규모도 연간 약 150억 원이며 판매단가는 g당 67만 달러로 알려지고 있다. 현재 재조합 hEPO는 동물세포 배양을 통해서 생산하고 있는데 고가의 생산 비용으로 인하여 단가가 매우 높다. 생산 단가를 낮추기 위한 방법의 하나로 형질전환 동물을 이용한 재조합 hEPO의 생산을 시도하고 있으나, hEPO의 과잉 발현으로 인한 형질전환 포유류의 심각한 생리적 부작용의 초래로 오직 조류를 통해 hEPO를 생산하는 것이 가장 이상적인 것으로 보고되고 있다(Lillico 등, 2005).

이와 같이 현재까지 형질전환 닭으로부터 사람에게 유용한 물질을 경제적으로 생산하고자 하는 연구를 하는 곳은 전 세계적으로 몇몇 곳에 불과하며, 한편 국내에서는 한미약품 등에서 이러한 시도를 했다는 것이 수년 전에 알려졌었지만, 현

재까지 개발된 형질전환 닭의 생산 방법에 있어서 매우 만족할 만한 성공적인 사례는 거의 전무한 실정이다. 따라서 형질전환 닭의 생산에 관한 연구를 지금부터 본격적으로 진행할 경우 선진국과의 격차를 쉽게 줄일 수 있으리라 생각된다.

형질전환 조류를 생산하는데 있어서 외래 유전자의 전이 대상이 되는 표적 세포의 종류는 다음과 같이 약 5가지가 있는데 각 방법의 장단점은 Table 1과 같이 요약된다.

Table 1. 표적세포의 종류에 따른 형질전환 조류 생산에 있어서의 장단점

표적세포	장단점
배반엽세포 (blastodermal cell)	<ul style="list-style-type: none"> ● 이미 60,000여개의 세포가 존재 ● 유전자 전이 방법의 효율성이 형질전환조류 생산의 성공률을 가장 크게 좌우함 ● 기술적으로 가장 용이 ● 대부분의 형질전환 조류생산에서 이 세포를 표적세포로 사용
원시생식세포 (primordial germ cell, PGC)	<ul style="list-style-type: none"> ● 세포의 분리와 배양에 고도의 기술이 필요 ● 유전자전이 과정을 거친 세포를 계란에 이식하기 전에 세포를 선별할 수 있음 ● 다양한 유전자 전이 방법을 선택할 수 있음 ● G0 founder 개체에서 나타난 chimeric 상태의 형질이 다음 세대인 G1 개체로 전이가 되지 않음
배아줄기세포 (embryonic stem cell, ES cell)	<ul style="list-style-type: none"> ● 엄밀한 의미의 stem cell이 아니고 stage X의 배반엽세포를 <i>in vitro</i> 상태에서 배양한 세포를 말함 ● 세포의 배양에 고도의 기술이 필요하며 방법이 거의 공개되어있지 않음 ● 유전자전이 과정을 거친 세포를 계란에 이식하기 전에 세포를 선별할 수 있음 ● 다양한 유전자 전이 방법을 선택할 수 있음 ● G0 founder 개체에서 나타난 chimeric 상태의 형질이 다음 세대인 G1 개체로 전이가 되지 않음
1-2 세포기의 수정란	<ul style="list-style-type: none"> ● 기술적으로 극히 어려움 ● 또한 성공한 보고가 전 세계적으로 한 두건에 불과하며 이 방법을 최초로 개발한 연구팀도 현재는 이 방법을 사용하지 않고 있음
정자	<ul style="list-style-type: none"> ● 아직까지 성공한 보고가 없음

이상의 내용을 볼 때 형질전환 조류의 생산에 있어서 가장 이상적인 유전자

전이 대상의 표적세포는 stage X의 갓 산란된 유정란의 배반엽 세포임이 명백하다. 그러나 조류의 번식생리는 포유류의 그것과 매우 상이한데, 예를 들면, 갓 산란된 계란은 포유류의 수정란과 달리 이미 약 60,000개의 배반엽 세포로 구성되어 있다는 사실이다. 따라서 이렇게 많은 세포에 대하여 100% 유전자를 전이시키기는 현실적으로 불가능하기 때문에 60,000개의 세포 중 얼마나 많은 세포에 유전자를 전이시키느냐가 성공의 관건이라고 할 수 있다. 현재 개발된 많은 유전자 전이 방법 중 가장 효율적인 것은 retrovirus나 lentivirus vector를 이용하는 방법인데 본 연구에서는 1,000 배 이상의 고농도로 농축된 virus 용액을 이용하여 배반엽 세포에 대한 유전자 전이 효율을 높이고자 하였다. 하지만 선행된 여러 연구에서 기존의 retrovirus vector system에 의해 생산된 형질전환 동물의 경우 외래 유전자의 발현이 개체 전체에 걸쳐 지속적이며 광범위하게 일어나므로 생리적인 부작용을 보이는 경우가 많은 것으로 보고되었다. 이에 본 연구에서는 외래 유전자의 발현으로 인한 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 promoter나 특정 조직에 국한하여 일어날 수 있도록 조직 특이적 발현 promoter 등을 개발하여 retrovirus vector system에 사용하고자 하였다. 전자의 promoter로 tetracycline-inducible promoter를 사용하고자 하였는데 이 promoter가 도입된 vector system을 tetracycline-inducible gene expression system (Tet system)이라고 한다. Tet system은 일반 promoter에 의한 외래 유전자의 지속적인 발현으로 인한 형질전환 개체의 부정적인 생리적 변화를 효과적으로 방지할 수 있는 가장 대표적인 system으로서 transactivator가 tetracycline계의 물질의 존재 여부에 따라서 rtTA 복합체를 형성하고, 이 복합체가 TRE를 구성하는 인자 중 tet operator 부분에 결합함으로써 tet operator의 downstream에 위치한 promoter의 활성을 유도해서 도입한 외래 유전자가 발현하도록 하는 원리에 기반을 둔다(Fig. 1-A). 따라서 tetracycline 계열의 물질 공급 여부에 따라 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있다. 또한 개체에 도입된 외래 유전자의 발현을 최대화하기 위하여 각 promoter가 도입된 vector system에 woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) 서열을 retrovirus vector에 도입하였다(Zufferey 등, 1999). 조직 특이적 promoter로는 ovalbumin promoter를 사용하여 외래 유전자의 발현을 닭의 난관에 국한시켜 원하는 단백질을 계란의 난백을 통하여 얻을 수 있게 하였다. hEPO 등의 생리활성 단백질을 계란 난백에 특이적으로

분비되기 위해서는 계란 난백을 생산하는 닭 난관상피세포에서 특이적으로 발현할 수 있는 최적의 ovalbumin promoter를 확보해야 한다(Fig. 1-B).

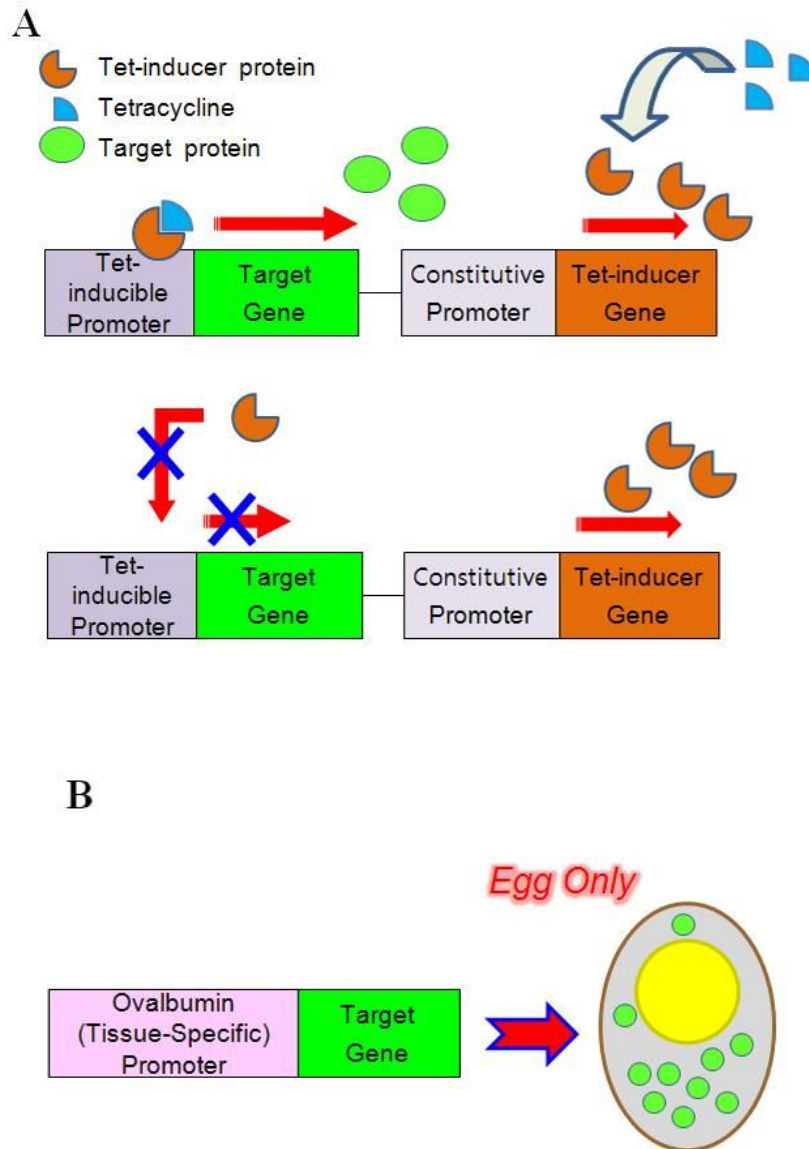


Fig. 1. 본 연구에 적용될 외래 유전자 전이 system의 개요. A. tetracycline-controllable promoter를 도입한 system, B. 난관조직 특이적인 발현을 위한 chicken ovalbumin promoter 도입 system

구축한 vector system들을 이용하여 고농도의 virus 용액을 만들고 이 virus를 계란의 배반엽층에 미세주입한 후 대리난각 방법으로 배양하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. 형질전환 닭의 분자생물학적인 검정 방법으로는 genomic DNA PCR과 Western blotting, ELISA, 그리고 발현된 hEPO의 생물학적 활성 측정 등을 실시하였다. 생산한 hEPO 형질전환 닭의 계통 확립을 시도하고, 형질전환 개체의 혈액과 산란된 계란에 함유된 재조합 hEPO의 분리 정제 방법을 확립하고자 하였다.

대부분의 단백질의 정제를 위해서는 다단계 크로마토그래피를 이용한 방법들이 사용되고 있으나 일반적으로 순도 높은 단백질의 정제를 위해서는 많은 양의 시료가 필요하고 전처리 조작들이 복잡하다. 또한 기기가 고가이고 넓은 공간과 전문인력을 필요로 하며 때로는 유기용매를 사용함으로써 실험자의 안전에 해로운 문제점들이 있어 최근에 도입되고 있는 방법이 면역학적 정제법이다. 면역학적 정제법은 특이항체를 지지체인 bead에 부착시킨 immunoaffinity column을 이용하는 방법이다. 면역학적 방법에서 이용되는 항체는 다클론성 항체와 단클론성 항체가 있다. 다클론성 항체는 면역원을 주로 토끼에 면역시켜 한 번에 많은 양을 얻을 수 있는 장점이 있으나 여러 가지 특이성을 갖는 항체들의 집합체임으로 유사한 단백질과 교차반응의 문제가 있다. 단클론성 항체는 세포융합에 의해 특이성이 있는 항체를 분비하는 세포주를 이용한 방법으로 이를 생산하기 위하여 동물세포 배양시설 등이 갖추어져 있어야 하고 클론을 분리하는데 많은 노력과 시간이 소요되는 단점이 있으나 한 번 확립된 클론에 의하여 생산되는 항체는 한 종류의 특이 항체를 생산하기 때문에 단백질을 분석하고, 상업적 이용을 위해서는 다클론성 항체보다 단클론성 항체를 이용하는 것이 바람직하다고 본다. 따라서 본 연구는 빈혈 및 신부전환자의 치료제로 사용되고 있는 고 부가가치를 가진 hEPO라는 생리활성물질을 저렴한 비용으로 고순도의 물질로 정제하기 위하여 면역학적 정제법의 확립을 위한 목적으로 단클론성 항체를 생산하는 hybridoma cell line을 확보하고 이를 이용하여 대량의 항체를 생산하였으며, immunoaffinity column 정제법을 시도하고자 하였다.

본 연구에서 개발된 hEPO 형질전환 닭은 고가의 바이오의약품의 대량생산을 위한 생물반응기로서의 가능성을 제시하고, 차후 계통이 확립된 hEPO 형질전환 닭을 양계 농가에 보급함으로써 양계 농가의 고소득 창출의 기반을 확립하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국·내외 관련분야에 대한 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

바이오의약품은 인체에 중요한 역할을 하는 생리활성물질을 생명체의 정보 및 기능을 바탕으로 재조합 DNA 기술이나 세포배양 등의 생명공학 기술을 이용하여 대량생산함으로써 얻어지는 산물을 일컫는다. 그 예로는 사람 인슐린, 사람 성장호르몬, 인터페론, 혈청 알부민, 사람 조직플라스미노겐 활성화인자, 조혈촉진인자 등이 있다. 바이오의약품은 기존의 화학적 의약품과는 달리 단백질, DNA 등 생물학적인 물질로 구성된 의약품으로 특징적인 치료 영역과 효능을 나타낸다. 특히 바이오신약 개발은 화학적 신약과는 달리 전임상에서 요구되는 자료가 적은 편이므로 전임상 시험 기간이 짧다. 또한 임상 시험에서 독성의 예측이 비교적 쉬우며 화학적 의약품에 비해 부작용도 훨씬 적은 것으로 알려져 있다. 바이오의약품의 종류로는 유전자 재조합 기술을 활용하여 생산하는 단백질 의약품인 단백질치료제, 면역세포와 무한증식이 가능한 암세포의 융합을 통해 선택적으로 작용하는 항체를 생성하는 기술을 바탕으로 한 항체치료제, 사람으로부터 분리, 배양 등 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료를 진행하는 세포치료제, DNA나 RNA를 이용한 유전자치료제 등이 있다. 국내 바이오의약품 시장은 2005년 1조 6681억원에서 2009년 3조 7456억원으로 연평균 22.4%의 높은 성장률을 나타내고 있다. 이 바이오의약품 시장의 대부분을 차지하는 제품은 재조합 단백질치료제와 항체치료제이며, 특히 단백질치료제는 국내 바이오산업 관련 기업 중에서 60% 이상이 생산하고 있으며 대표적인 제품으로는 인간성장호르몬(LG생명과학, 동아제약, 대웅제약), GM-CSF(LG생명과학), G-CSF(동아제약), EPO(CJ제일제당, 녹십자, 동아제약, LG생명과학), 인터페론(LG생명과학, CJ제일제당, 녹십자, 동아제약, 한울제약) 등이 있다. 국내의 바이오의약품 시장에서는 당뇨병치료제인 인슐린의 수입판매를 시작으로 성장호르몬, hEPO 등이 국내 자체 기술로 개발되어 시판되고 있으며, 1세대 단

백질의 특허 만료로 대형제약사를 중심으로 바이오시밀러(바이오복제약)와 바이오베터(바이오개량신약) 개발이 활발하게 진행되고 있다. 주요 단백질 위약품의 특허 만료 시기는 Table 2와 같다. 합성신약의 특허가 끝난 후 복제약 시장이 열렸던 것처럼 대형 바이오신약의 특허만료로 바이오의약품 시장 팽창이 급속하게 이루어질 것으로 보인다.

Table 2. 주요 바이오의약품 특허 만료 현황

연도	제품(적응증)
2012	엔브렐(류마티스 관절염)
2013	에포젠(빈혈), 레미케이드(류마티스 관절염), 아보넥스(다발성경화증), 레비프(다발성경화증), 휴마로그(당뇨병), 뉴포젠(호중구감소증), 세레자임(고셔병)
2014	코팍손(다발성경화증)
2015	리톡산(비호지킨림프종), 뉴라스타(백혈구개선촉진), 란투스(당뇨병)
2016	휴미라(류마티스 관절염)
2019	허셉틴(유방암), 아바스틴(대장암), 루센티스(황반변성)

자료 : 식품의약품안전청

대부분의 단백질 의약품은 대장균이나 동물세포에서 생산되고 있는 상황에서 고가의 생산 비용이나 번역 후 변형 과정의 결손에 따른 활성의 저하 등의 문제점이 대두되고 있다. 또한 이러한 문제점은 의약품의 단가를 상승시키는 요인으로 작용하여 환자들의 경제적인 부담을 초래하고 있다. 이를 해결하기 위한 방안으로 정부연구기관, 중소기업 및 벤처기업을 중심으로 형질전환 동물이나 식물을 생물반응기로 이용한 바이오의약품의 생산에 관한 연구를 진행 중이다. 그 예로 농촌진흥청 국립축산과학원에서는 빈혈치료제(EPO)와 혈전치료제(tPA), 혈우병치료제(FactorVIII·vWF) 등 4종의 형질전환 돼지를 개발했고, 조아제약에서는 EPO 생산 돼지를, 엠젠에서는 항암치료보조제(GM-CSF) 생산 돼지를 개발했다. 그러나 실제

적으로 바이오의약품으로 상업화할 수준의 연구 성과는 전무한 실정이다. 본 연구에서와 같이 현재까지 형질전환 닭을 통하여 특정 바이오약품을 생산하고자 하는 시도는 간간히 있었으나 성공적인 사례는 전무한 실정이다. 단바이오텍 등의 몇몇 회사에서 닭에 항원을 주입하여 항체를 생산하는 경우가 있으나 이는 외래 유전자를 도입하여 여러 세대에 걸쳐 지속적으로 단백질을 생산하는 근본적인 형질전환 닭을 이용한 바이오의약품의 생산이라고 보기에는 적절하지 못하다.

국내에서 형질전환 닭에 관한 연구를 진행하고 있는 연구팀은 본 연구실과 서울대학교 한재용 교수 연구팀이 대표적이다. 한재용 교수팀은 주로 조류의 원시생식세포를 이용한 chimera의 생산에 관한 연구와 한국의 토종닭에 대한 genomics에 관한 연구를 주로 하고 있다(Park 등, 2003). 가장 최근에는 lentivirus vector system과 정소세포를 이용하여 본 연구팀과 동일한 형광유전자를 발현하는 메추라기를 생산하는데 성공하였다(Lee 등, 2006; Shin 등, 2008). 본 연구실에서는 2004년 MLV retrovirus vector system을 이용하여 형광유전자를 발현하는 형질전환 닭의 생산에 세계 최초로 성공하였으며(Kwon 등, 2004; Koo 등, 2004; Koo 등, 2009), 이후 G1, G2, G3 세대의 형질전환 닭의 생산을 보고하였다(Koo 등, 2006). 최근에는 사람의 granulocyte-colony stimulating factor를 혈액과 계란의 난백 내로 분비하는 형질전환 닭의 생산을 발표하였는데(Kwon 등, 2008), 주목할 사항은 최초로 후대의 닭에서도 이들 cytokine 유전자가 발현함을 증명하였다는 점이다. 본 연구에서는 외래 유전자의 지속적인 발현으로 인한 형질전환 개체의 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 외래 유전자의 발현이 유도적으로 조절되는 tetracycline-inducible promoter를 도입한 retrovirus vector system을 이용하여 hEPO를 생산하는 형질전환 닭을 세계 최초로 생산하였다(Koo 등, 2010). 이와 같이 본 연구에서는 기존에 보고한 여러 형질전환 닭의 문제점인 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 개체의 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 여러 인자를 보완 또는 도입한 진일보한 형태의 유전자 전이 system을 이용하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다.

2. 국외 기술개발 현황

BCC Research 등 주요 시장조사업체들의 분석에 따르면 올해 세계 바이오

시장은 1,640억 달러에 이르며, 2015년에는 3,710억 달러의 시장 규모를 형성하며 향후 가파른 성장세가 지속될 것으로 전망하였다. 특히 전 세계 의약품 시장에서 2008년 기준으로 83%의 비중을 차지하고 있는 합성 의약품의 시장 규모가 점점 축소되고 상대적으로 바이오의약품의 비중이 급격히 증가할 것으로 예상되고 있다. IMS Health의 자료에 따르면 지난 2008년 합성의약품의 전세계 매출은 4,080억 달러(83%)로 집계되었으며 바이오의약품은 1,080억 달러(17%)로 집계되었다(Table 3). 이는 2000년도의 합성의약품 시장 비중이 91%, 바이오의약품의 시장 비중이 9%로 나타난 것과 비교했을 때 바이오의약품의 비중이 증가한 것을 알 수 있다. 뿐만 아니라 2014년 시장 규모 예상에서도 바이오의약품의 비중이 23%까지 급격히 증가할 것으로 예상된다(Table 3). 또한 매출 상위 100개 제품에서 바이오의약품이 차지하는 비중은 2000년 11%에서 2008년 28%, 그리고 오는 2014년에는 50%에 육박할 것으로 전망되어(Table 4) 향후 세계 의약품 시장이 바이오의약품 위주로 형성될 것을 예상할 수 있다. 실제적으로 지난 2000년까지 전 세계 매출 상위 10위 안에 1개뿐이던 바이오의약품 수가 2008년 5개까지 늘어났으며, 2014년이면 7개를 차지할 것이라는 예상이다.

Table 3. 합성의약품과 바이오의약품의 매출 현황 및 전망

합성-바이오의약품 매출 비교 전망 (단위:10억 달러)			
	2000	2008	2014
바이오의약품	28	108	169
합성의약품	222	408	406
합성-바이오의약품 매출 비중 (단위:%)			
	2000	2008	2014
바이오의약품	9	17	23
합성의약품	91	83	77
매출 상위 100개 품목 비중 (단위:%)			
	2000	2008	2014
바이오의약품	11	28	50
합성의약품	89	72	50

Table 4. 2014년 매출 상위 10대 제품 전망(단위 : 백만 달러)

순위	제품명	제작사	구분	매출
1	Avastin	Roche	Biological	9,232
2	Humira	Abbott/Eisai	Biological	9,134
3	Rituxan	Roche	Biological	7,815
4	Enbrel	Wyeth/Amgen/Takeda	Biological	6,583
5	Lantus	Sanofi-Aventis	Biological	6,386
6	Herceptin	Roche	Biological	5,796
7	Crestor	AstraZeneca	Chemical	5,739
8	Spiriva	Boehringer Ingelheim	Chemical	5,552
9	Remicade	SGP/J & J	Biological	5,220
10	Gleevec/Glivec	Novartis	Chemical	5,136

La Merie S. L.이 공개한 최신보고서에 따르면 작년의 세계적 바이오의약품 매출은 1,080억 달러를 기록, 지난 2009년 920억 달러보다 17% 증가했으며 지속적인 매출 성장세를 나타내고 있는 것으로 보고되었다. EPO의 경우 90억 달러 이상의 매출을 보여 확고한 거대 바이오의약품의 위상을 보였다(Table 5). 이 보고서는 재조합 단백질과 항체의약품의 매출만을 집계했으며 백신이나 펩티드의약품 등은 포함되지 않았다.

Table 5. 2010년 세계 바이오의약품 매출 현황(제품군별) (단위 : 10억 달러)

순위	제품군	매출	제품군
1	Cancer Antibodies	21.98	Rituxan, Herceptin, Avastin
2	Anti-TNF Antibodies	20.95	Enbrel, Remicade, Humira
3	Insulin and Insulin Analogs	15.5	Humalog, Lantus, Levemir
4	Erythropoietins	9.25	Aranesp, Procrit, Epogen
5	Rec. Coagulation Factors	6.51	Novoseven, Kogenate, Helixate
6	Interferon beta	6.48	Avonex, Rebif, Betaferon
7	G-CSF	5.38	Neulasta, Neupogen, Neutrogen
8	Anti-Inflammatory Antibodies	4.08	Tysabri, Xolair, Orencia
9	Ophthalmic Antibody	3.11	Lucentis
10	Human Growth Hormone	3.01	Genotropin, Norditropin

이와 같이 해를 거듭할 수록 시장의 규모가 기하급수적으로 커지고 있는 바이오의약품의 시장에서 경제성이 있는 제품의 개발 생산을 위하여 형질전환 동물을 생물반응기로 이용하려는 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 특히 짧은 세대간격 및 높은 산란율, 적은 사육비용 등의 장점을 가진 가금을 이용한 생물반응기 개발이 시도되고 있으며 특히 형질전환 가금의 생산에 있어서 효율적인 유전자 전이 수단인 virus vector system의 구축에도 중점을 두어 연구가 진행되고 있다. 최근 본 연구실을 비롯하여 여러 그룹에서 virus vector를 이용하여 외래 유전자를 전이시킨 형질전환 닭에 관한 연구에 있어서 매우 성공적인 연구 성과를 나타내고 있다. 2002년 ubiquitous CMV promoter 조절 하에서 외래 유전자가 발현이 유도되는 retrovirus vector system을 이용하여 β -lactamase를 혈청 및 난백에서 발현하는 형질전환 닭을 생산하여 계란을 생체반응기로 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다(Harvey 등, 2002). 이 후 retrovirus vector system을 이용하여 유용단백질인 human Interferon α -2b (Rapp 등, 2003), antiprion single-chain Fv와 human IgG1 재조합 단백질(ScFv-Fc) (Kamihira 등, 2005), human tumor necrosis factor

2와 human IgG1 Fc region 재조합 단백질 (Kyogoku 등, 2008), chimeric anti-CD2와 anti-prion mAb (Kamihira 등, 2009), hEPO 및 hEPO와 human IgG Fc region 재조합 단백질(Kodama 등, 2008; Penno 등, 2010)을 혈청, 난백 및 난황에서 생산하는 형질전환 닭을 생산하였다. 이 후 외래 유전자의 발현효율을 높이고자 avian adeno-associated virus system을 이용하여 human tissue kallikrein (hK1) protein을 난관 특이적으로 발현 유도하여 hK1을 함유하는 계란을 생산하는 형질전환 닭을 생산하였으며(Wang 등, 2008), chicken β -actin promoter 영향 하에서 외래 유전자가 발현이 유도되는 retrovirus vector system을 이용하여 anti-prion scFv-Fc 단백질을 난백에서 생산하는 형질전환 메추리를 생산하였다(Kawabe 등, 2006). 또한, 유용단백질을 난관 특이적으로 발현을 유도하여 오로지 난백에서만 유용단백질이 생산되도록 하여 형질전환 닭의 생리에는 전혀 부작용이 발생하지 않고 계란의 난백에만 유용단백질이 분비되게 하는 방법 개발에 전 세계 연구자들이 전념하고 있다. 이를 위해 chicken ovalbumin 유전자 regulatory region이 포함된 난관 특이적 발현 vector를 이용하여 hK1 단백질을 난관 특이적으로 발현하도록 유도하여 난백에서 hK1을 생산하는 연구(Gao 등, 2006), chicken ovalbumin 유전자 regulatory sequence 영향 하에 외래 유전자가 발현되는 vector 시스템이 도입된 chicken ES cell을 이용한 chimeric chicken을 생산하여 human mAb를 난백에서 생산하는 연구(Zhu 등, 2005)가 보고되었다. 특히 2007년 영국 로슬린 연구소의 Sang 등은 Oxford Biomedica (영국) 및 Viragen (스코틀랜드) 등의 회사들과의 공동으로 chicken ovalbumin 유전자 regulatory sequence가 포함된 lentivirus vector system을 이용하여 외래 유전자가 난관 특이적으로 발현하여 human interferon- β -1a 및 악성 흑색종 치료제인 humanized single-chain Fv-Fc 항체를 생산하는 계군을 다수 확보하였다(Lillico 등, 2007). 계란의 난백으로부터 생산되는 이들 pharmaceutical protein은 biological activity를 나타내고 있으며, 그 생산량이 상업적으로 가치를 지니고 있는 것으로 평가받고 있다. 이와 같이 chicken ovalbumin promoter를 이용한 난관특이적 외래 유전자의 발현 유도 가능성이 증명되고 있지만, cOV 유전자의 15 Kb 5' -upstream 및 3' -downstream region을 이용하는 경우에는 retrovirus vector에 도입하기에는 조작성이 용이하지 않고 virus의 감염가 저하 현상 등의 문제점이 야기되고 있다. 이에, 보다 작은 크기의 promoter를 이용하여 난관세포에서 특이적으로 외래 유전자의 발현 강도를 증가시키기 위한 cOV promoter

system 개발의 필요성이 대두되고 있다. 따라서 닭 난관세포 특이적으로 cOV 5'-upstream region의 promoter activity의 증가를 유도할 수 있는 regulatory element의 발굴이 절실히 요구되는 바이다.

이상의 virus vector system에 의해 생산된 형질전환 닭에서 재조합 hEPO의 효율적인 분리 및 정제 과정에 대한 연구도 필수적이다. 최근의 기술들은 형질전환 동물 유래 재조합 단백질의 상업적 생산에 필요한 정제 단계로 이어지는 전처리 방법과 고순도 정제 공정에 그 주안점을 두고 있다. 현재까지 알려진 형질전환 동물의 전처리방법으로는 $\alpha 1$ -PI ($\alpha 1$ proteinase inhibitor)에 대한 양(sheep)의 유즙에서의 지방제거 방법인 원심분리법, Human fibrinogen에 대한 암양(ewe)의 유즙에서 지방제거 방법인 원심분리법과 polyethylene glycol을 이용한 카제인 제거법이 있으며 Human IgG (immunoglobulin)에 대한 산양(goat)의 유즙에서의 지방제거 방법인 원심분리법, 카제인 제거를 위한 막분리기술인 정밀여과(microfiltration)법이 있다. 소의 유즙에서 카제인 미셀(casein micelle)을 제거하기 위하여 킬레이팅 물질인 EDTA를 처리하는 방법도 제기되고 있다. 최근의 방법으로는 원심분리, 저온침전(cryoprecipitation), 황산암모늄 침전(ammonium sulfate precipitation)을 순차적으로 수행을 하는 방법을 제시하고 있다. 이러한 방법들은 정제단계에 넘어가기 전에 단백질 수율이 80%를 넘지 못해 공정의 단순화와 높은 수율을 갖는 전처리 방법의 개선이 필요하다. 재조합 단백질의 고순도 분리정제를 위해 다단계 크로마토그래피 정제 과정이 일반화되고 있다. 하지만 형질전환동물 유래 재조합 단백질의 시료에는 전처리 과정을 거쳐도 여전히 많은 종류의 단백질이 있어, 다단계 크로마토그래피를 거치면서 수율은 낮을 수밖에 없다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 affinity 크로마토그래피를 포함하는 정제법이 필수적이다. 본 연구에서는 hEPO에 높은 친화력을 가지는 단클론성 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 개발하고 이 항체를 이용한 immunoaffinity 크로마토그래피를 확립하여 단순화되고 고순도 분리정제가 가능하도록 하였다.

제 2 절 연구결과가 국·내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

1. 본 연구결과가 국·내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 연구결과인 고가의 바이오의약품인 hEPO를 유도적이거나 조직특이적으로 발현할 수 있는 형질전환 닭의 생산은 지금까지 그 예가 없는 독보적인 연구이다. 특히 국내에서는 형질전환 닭에 대한 연구 자체를 수행하는 연구팀이 매우 적으며 본 연구 결과는 가장 진보적이고 우수한 연구결과로 자부할 수 있다. 국외에서도 형질전환 닭을 이용한 생리활성물질의 생산에 관한 연구가 진행되고 있으나 본 연구 결과와 기술적인 차이가 크지 않다. 본 연구과제의 성공적 수행을 위한 핵심기술은 그간 국내의 선도연구자들에 의해 선진국과의 기술격차가 많이 극복되었다. 유용 유전자의 탐색, 외래 유전자의 발현 vector 제작에 관한 기술 수준은 선진국 대비 약 70 - 90%로 그 격차는 약 2 - 3년이며, 형질전환 닭을 생산하기 위한 유전자 전이기술 또한 선진국 대비 80% 이상의 기술수준을 보유하고 있고 이 기술의 격차도 대략 2 - 3년 정도로 생각된다. 따라서 본 과제와 같은 첨단 연구에 정부의 집중적인 투자가 이루어진다면 조만간 형질전환 닭의 생산을 위한 핵심기술은 선진국 수준에 이를 것으로 예상된다.

2. 본 연구결과에의 산업적 창출 효과

선행된 연구 결과를 토대로 외래 단백질의 생산에 있어서 가장 효율적이고 또한 형질전환 개체의 사망이나 질병 유발 등과 같은 생리적인 부작용이 가장 적은 virus vector system을 선택한 후 hEPO 유전자를 계란의 배반엽세포에 도입하여 최종적으로 hEPO를 계란을 통하여 생산하는 형질전환 닭을 생산하고자 하였다. hEPO의 세계시장 규모는 연간 약 90억 달러, 국내 시장 규모도 연간 약 150억원이며 판매단가는 g당 67만 달러로 알려지고 있다. 현재 재조합 hEPO는 동물세포 배양을 통해서 생산하고 있는데 고가의 생산 비용으로 인하여 공급 단가가 매우 높아서 치료를 위해 투여 받아야 하는 환자들의 경제적인 부담이 매우 큰 상황이다. 이러한 환자의 부담을 감소시키기 위해 생산 단가를 낮추기 위한 방법의 하나로 형질전환 동물을 이용한 재조합 hEPO의 생산을 시도하고 있으나, hEPO의 과잉 발현으로 인한 형질전환 포유류의 심각한 생리적 부작용이 큰 문제로 대두되고 있다. 본 연구 결과는 이러한 문제를 해결하기 위한 방법을 제시할 수 있으며, 계란을 통한 재조합 단백질의 생산의 실례를 제공하여 고가의 바이오의약품 생산에 있어서의 경

제성과 생산규모의 제한성을 해결할 수도 있을 것이다. 또한 계통이 확립된 hEPO 형질전환 닭을 양계 농가에 보급함으로써 일반 농가를 생리활성물질 생산 공장으로 변환시켜 고소득을 창출하고자 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 이론적, 실험적 접근방법

본 연구는 고가의 생리활성물질인 hEPO를 대량생산하기 위한 생물반응기로서의 형질전환 닭의 개발에 관한 연구이다. 먼저 형질전환 개체에서의 외래 유전자인 hEPO의 지속적이고 광범위한 발현에 의한 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 hEPO 유전자의 발현을 유도적으로 조절하거나, 또는 발현 부위를 조직특이적으로 제한할 수 있는 virus vector system을 구축하였다. 이 system을 이용하여 생산한 고농도의 virus를 계란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 배양함으로써 형질전환 닭을 생산하고자 하였으며 닭의 배아섬유아세포와 형질전환 닭의 혈액과 계란에서 발현된 재조합 hEPO의 효율적인 분리 및 정제 방법을 구축하고자 하였다.

1. 새로운 retrovirus vector system의 구축

본 연구에서는 형질전환 개체의 선별에 있어서 기술적으로 용이하게 하기 위하여 표지 유전자와 hEPO 유전자를 동시에 발현시킬 수 있는 vector system을 구축하고자 하였다(Fig. 2). 또한 hEPO 유전자의 발현 여부를 *in vitro*와 *in vivo*에서 확인하기 위하여 simple retrovirus 또는 lentivirus vector system을 구축하였다(Fig. 2). 이상의 retrovirus vector에서는 주로 LTR이나 β -actin, CMV promoter 등을 이용한 외래 유전자의 발현이 이루어졌다. 그러나 이 vector system에 의해 도입된 외래 유전자의 발현은 개체 전체에 걸쳐 광범위하게 이루어지므로 형질전환 동물의 생리적인 부작용을 나타내는 경우가 많았다. 이에 본 연구에서는 외래 유전자의 발현이 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절하거나 특정 조직에 국한할 수 있는 retrovirus vector system을 구축하고자 하였다. 이에 발현 유도체인 tetracycline 계열의 물질 공급 여부에 따라서 발현이 조절되는 tetracycline-inducible promoter를 도입한 Tet system과 닭의 난관에서 특

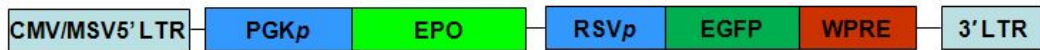
이적으로 발현되는 ovalbumin promoter를 도입한 Ov system을 구축하였다(Fig. 2). 또한 동물체에 도입된 외래 유전자의 발현을 최대화하기 위하여 WPRE 서열도 도입하였다. 각각의 구축한 virus vector system을 이용하여 고농도의 virus를 생산한 후 이 virus를 형질전환 닭의 생산에 사용하였다.

● Dual Internal Promoter System

pLNCRRGW



pRetroQ-PERGW



● Simple Retrovirus Vector System

pLNCEPOW



pFIV-CMV2-hEPO-WPRE

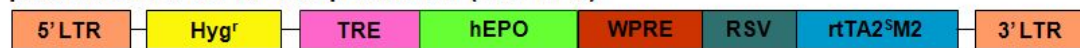


● Tetracycline-Inducible Gene Expression System

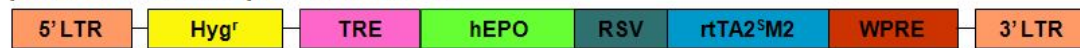
pRevTRE-EPO-RSVp-rtTA2^SM2



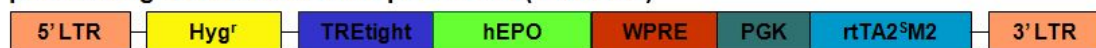
pRevTRE-EPO-WPRE-RSVp-rtTA2^SM2 (Tet1-EPO)



pRevTRE-EPO-RSVp-rtTA2^SM2-WPRE



pRevTREtight-EPO-WPRE-PGKp-rtTA2^SM2 (Tet2-EPO)



● Oviduct-Specific Gene Expression System

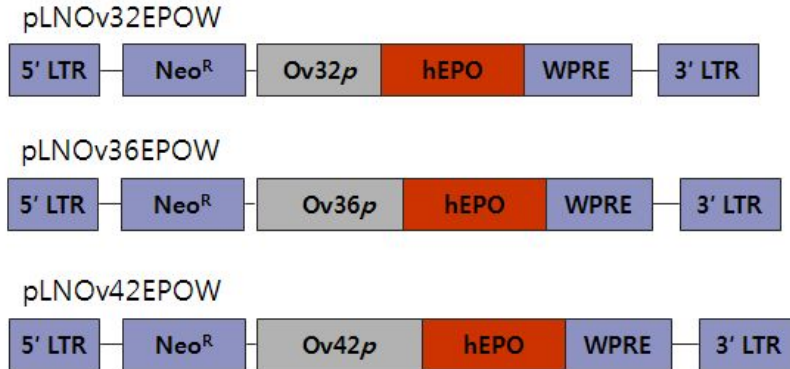


Fig. 2. 본 연구에서 사용한 retrovirus vector의 구조

2. hEPO가 발현되는 형질전환 닭의 생산

닭은 번식생리학적인 면에서 인간을 포함한 포유류와는 매우 상이하기 때문에 기존의 형질전환 동물을 생산하는 방법을 닭에 동일하게 적용할 수는 없다. 형태적, 발생학적 차이점을 감안하여 고안된 형질전환 가금의 생산 방법은 어떤 표적세포와 무슨 유전자전이 방법을 조합(combination)하느냐에 따라 많은 방법이 보고되어 있다. 먼저 형질전환 가금을 생산하기 위하여 외래 유전자를 도입할 수 있는 표적세포로는 ① stage X의 배반엽세포(갓 산란된 계란의 배를 구성하는 세포) (Salter 등, 1987; Bosselman 등, 1989; Rosenblum과 Chen, 1995), ② 원시생식세포 (Primordial Germ Cell) (Vick 등, 1993; Watanabe 등, 1994; Li 등, 1995), ③ 닭의 난관에서 채집한 1세포기의 수정란(Sang과 Perry, 1989; Naito 등, 1994; Love 등, 1994; Sherman 등, 1998), ④ 배아줄기세포(embryonic stem cell) (Pain 등, 1999) 그리고 ⑤ 정자(Nakanishi와 Iritani, 1993) 등이 있다. 표적세포에 대한 유전자 전이 방법은 현재 크게 두 가지로 나눌 수 있는데 ① retrovirus vector를 이용하는 방법 (Thoraval 등, 1995)과 ② 직접 외래 DNA를 transfection하는 방법(Muramatsu 등, 1997)이 그것이다. 따라서 5가지 이상의 표적세포와 2가지 이상의 유전자 전이 방법의 조합으로 총 10가지 이상의 형질전환 가금의 생산 방법이 있을 수 있는데 이들

중에서 retrovirus vector를 계란의 배반엽 층에 주입하여 유전자를 전이시키는 방법이 기술적으로 가장 용이하고 효과적이라고 인정되고 있는데 최근에 Harvey 등 (2003)은 대장균의 β -lactamase 표시유전자가 비록 극미량이지만 계란에서 발현되는 형질전환 닭을 생산함으로써 이 방법의 가능성을 증명하고 있다. 본 과제에서도 stage X의 배반엽세포를 표적세포, 그리고 retrovirus vector system을 유전자전이 방법으로 이용하였는데 전 단계에서 생산된 고농도의 virus를 stage X 단계 유정란의 배반엽층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 배양하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였다(Fig. 3). 생산된 hEPO 형질전환 닭의 유전자 전이 여부와 발현 양상을 확인하기 위하여 genomic DNA PCR, ELISA, Southern blotting, 그리고 생물학적 활성 분석을 실시하였다. Tet system에 의해서 생산된 형질전환 닭은 발현 유도체인 doxycycline의 식이 여부에 따른 발현 조절 양상을 확인하였으며, 형질전환 수탉의 sperm에서 hEPO 유전자의 전이 및 발현이 확인된 개체는 wild type의 암탉과 교미시켜서 G1 세대를 생산하였다. 이 후 다음 세대를 지속적으로 생산하여 hEPO 유전자를 가진 닭의 계통을 확립하고자 하였다. 또한 hEPO 유전자가 전이된 세포와 형질전환 닭에서 발현된 재조합 hEPO의 반감기 및 활성에 있어서 중요한 역할을 하는 당잔기의 분석도 실시하였다.

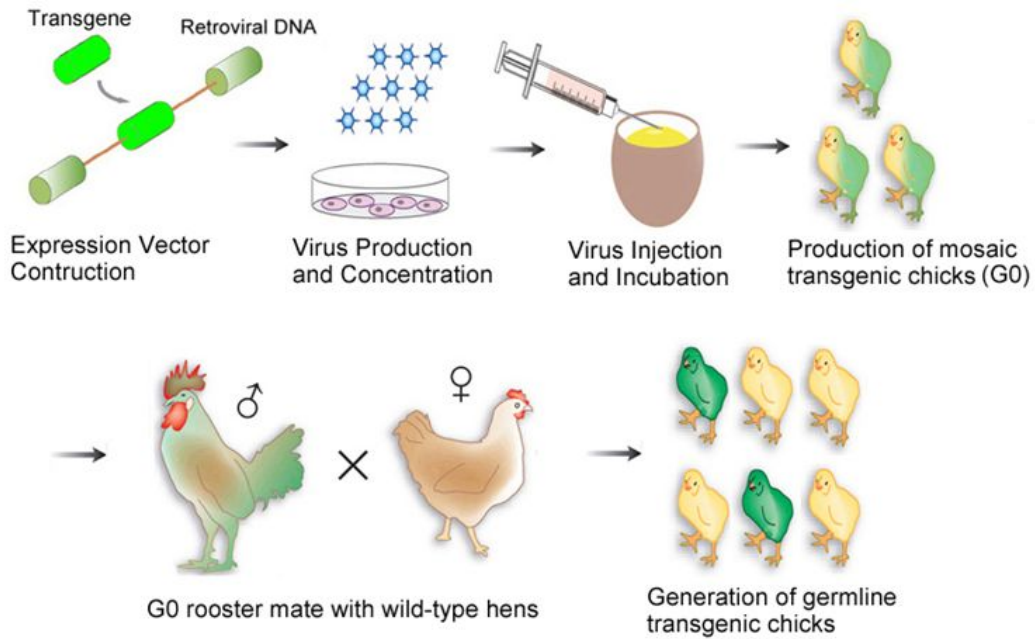


Fig. 3. 형질전환 닭의 생산 과정에 대한 전체적인 모식도

3. 닭의 난관에 특이적인 ovalbumin promoter의 개발과 분석

본 연구는 유용단백질을 계란 난백에서 특이적으로 분비하게 하는 형질전환 닭을 생산하고자, 계란 난백을 생산하는 닭 난관상피세포에서 특이적으로 발현할 수 있는 최적의 promoter system을 구축하고자 하였다(Fig. 4). 이를 위해 계란 난백에 특이적으로 발현하는 chicken ovalbumin 유전자의 5'- 및 3'-regulatory region을 확보하여 promoter-reporter gene construct를 작성한 후 닭 난관세포를 이용하여 promoter-reporter analysis를 실시하여 minimal promoter region을 확보하고, 3'-regulatory region이 5'-regulatory region의 promoter activity에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, minimal promoter region이 닭 난관세포 특이 발현 유무를 확인하고자 닭의 난관세포, 섬유아세포, 신장세포 및 닭의 세포가 아닌 일반세포인 MCF-7, 293T, COS, HepG2, HUVEC 세포 등에 발현을 유도하여 promoter의 특이성을 조사하고자 하였다(Fig. 4).

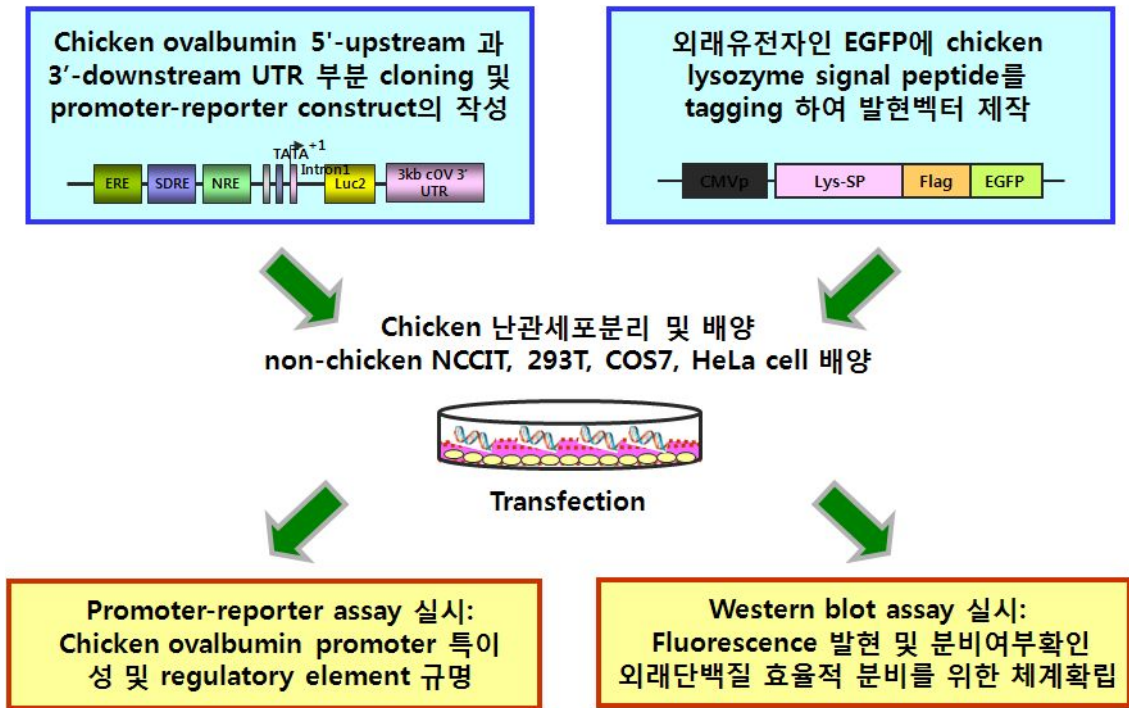


Fig. 4. Ovalbumin promoter의 개발에 관한 실험 체계도

4. hEPO의 분리 정제방법 개발

hEPO 유전자가 전이된 닭의 배아섬유아세포의 배양액과 형질전환 닭의 혈액과 계란의 난백으로부터 재조합 hEPO를 정제하기 위한 연구의 일환으로 면역학적 정제법을 확립하고자 하였다. 단클론성 항체를 생산하는 세포주를 개발하기 위하여 항원으로 사용할 단백질을 대장균에서 발현하여 정제하였으며, 이 단백질을 마우스에 면역하여 얻은 비장세포와 myeloma cell을 융합하여 14종의 hybridoma 세포주를 개발하였다. 항체의 특성을 조사하여 가장 강력한 친화력을 가지는 EPO-N-12 세포주를 사용하여 대량의 항체를 생산 정제하고, immunoaffinity column을 제작하여 세포 배양액에서 재조합 hEPO 단백질을 정제하는 방법을 확립하였다. 세포 배양액에서 정제한 hEPO의 PI값을 확인하기 위하여 2DE gel 분석을 시행하였으며, 항체를 이용하여 Sandwich ELISA 방법을 확립하였다. hEPO의 반

감기와 생물학적 활성을 향상시키기 위하여 hEPO 변이체를 생산하는 세포주를 구축하여 이들 세포주로부터 생산된 hEPO 변이체를 확립한 정제 방법으로 정제한 후 생물학적 활성을 조사하였다. 이 외에도 계란 난백으로부터 hEPO를 정제하는 방법을 확립하기 위하여 여러 정제 방법을 수행하였다.

제 2절 연구내용 및 연구결과

1. 제 1세부과제

가. Dual internal promoter system의 구축과 *in vitro*에서의 발현 검정

2개의 유전자가 동시에 발현하는 retrovirus vector system을 구축하기 위하여 선행 연구로서 *DsRed2* (red fluorescent protein) 유전자와 *EGFP* (enhanced green fluorescent protein) 유전자를 동일한 vector 내에 cloning하였다. 본 연구실에서 보유하고 있는 pLHCRW를 BglII, Kpn I, 그리고 Mungbean Nuclease를 처리하여 CMV promoter와 EGFP 서열을 분리하였다. 분리한 단편을 Xho I, Mungbean Nuclease, 그리고 Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) 순으로 처리한 pLNRGW와 ligation하여 최종적으로 pLNCRRGW를 구축하였다. 이 vector는 *DsRed2* 유전자와 *EGFP* 유전자에 대한 각각의 internal promoter로 CMV promoter와 RSV promoter를 가진다(Fig. 5). 각 유전자의 발현을 증가시키기 위하여 WPRE 서열을 *EGFP* 유전자의 3' 위치에 도입하였다.

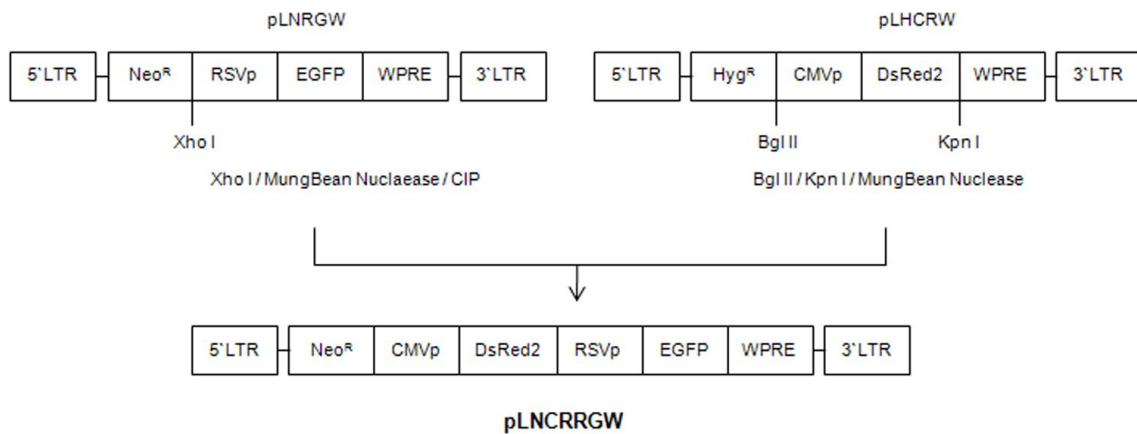


Fig. 5. Construction of dual promoter expression retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; *Neo^R*, neomycin resistant gene; CMVp, human cytomegalovirus promoter; *DsRed2*, red fluorescence protein gene; RSVp, Rous sarcoma virus promoter; EGFP, enhanced green fluorescence protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.

구축한 vector를 GP2 293 virus 생산 세포주에 도입하였는데 아래의 그림과 같이 두 개의 표지 유전자가 한 세포 내에서 동시에 발현이 되는 것을 관찰하였다(Fig. 6). 그러나 세포의 모양이 정상세포와 비교 시 일부 변형된 형태로 관찰되었으며 세포의 증식 속도가 저하되었다. 뿐만 아니라 생산한 virus를 표적세포인 CEF에 감염시켜서 *DsRed2* 유전자와 *EGFP* 유전자의 발현을 확인한 결과, 두 유전자가 동시에 발현되는 세포의 수가 매우 저조하여 virus의 감염도가 매우 낮은 것으로 확인되었다. 이는 구축한 dual internal promoter system이 두 개의 유전자를 동시에 발현하는 것에 의한 세포 내의 생리학적인 면에서 문제점을 가지는 것으로 의심되었다.

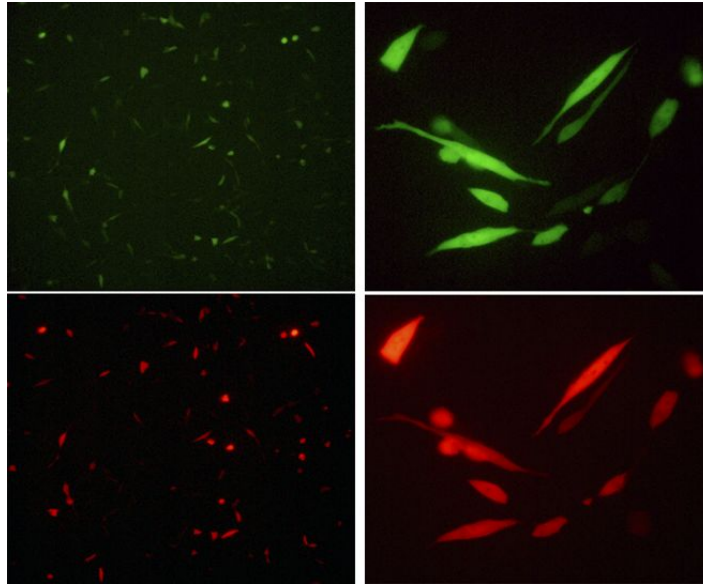


Fig. 6. Expression of EGFP and DsRed2 after doxycycline induction for 48 hours in GP2 293 cell.

hEPO 유전자를 이 system에 적용하여 발현 양상을 관찰하고자 하였다. 먼저 SIN (self-inactivation) vector인 pRetroQ-PNRGW를 BglII와 Xba I 으로 처리하여 sodium/iodide symporter (NIS) 유전자를 제거하고, pRetroQ-RGW를 BglII와 Xba I 으로 처리하여 분리한 *hEPO* 유전자와 ligation하였다. 구축한 vector는 pRetroQ-PERGW로 이 vector는 *hEPO* 유전자가 PGK promoter의 조절 하에 위치 하며, 표지 유전자인 *EGFP* 유전자가 RSV promoter의 조절 하에 도입된 구조이다. 또한 두 유전자의 발현을 증가시키기 위하여 WPRE 서열이 도입되어 있다(Fig. 7).

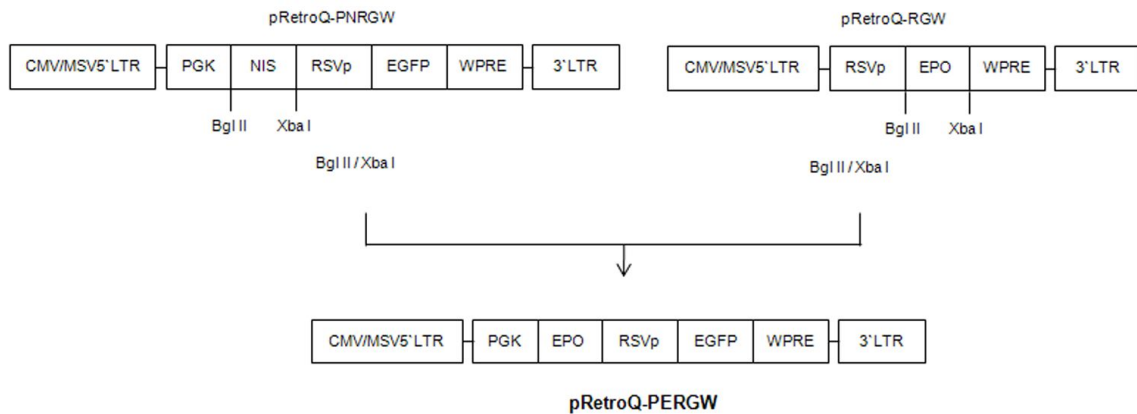


Fig. 7. Construction of dual promoter expression retrovirus vectors. CMV/MSV 5' LTR, hybrid 5' LTR consists of the cytomegalovirus type I enhancer and the mouse sarcoma virus promoter; PGKp, phosphoglycerate kinase promoter; NIS, sodium/iodide symporter gene; EPO, human erythropoietin gene; RSVp, Rous sarcoma virus promoter; EGFP, enhanced green fluorescence protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.

구축한 본 vector와 pVSV-G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein 유전자를 가진 vector)를 GP293 세포에 calcium phosphate 방법으로 co-transfection하여 virus를 생산한 후 CEF 세포에 infection하였다. Virus에 감염되지 않은 대조군 세포와 hEPO 유전자가 전이된 세포들을 각각 DMEM/FBS 배지에서 48시간 배양한 후 그 배양액을 수확하여 적절히 희석한 후 Quantikine IVD Epo kit (R&D systems Cat. No. DEP00, USA)을 사용하여 ELISA를 수행하였다. 먼저 여러 단계로 희석한 standard와 각 sample을 plate의 각 well에 200 μ l씩 넣어서 실온에서 3시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였다. 각 well에 200 μ l의 anti-hEPO-HRP conjugate를 더한 후 실온에서 1시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였으며 200 μ l의 tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution을 각 well에 더하여 빛을 차단시킨 상태로 실온에서 30분간 방치하였다. Stop solution을 더하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Virus에 감염되지 않은 대조군 세포에서는 측정값이 나타나지 않았으며 CEF-RetroQ-PERGW 세포에서는 250 mIU/ml의

극히 미미한 발현양을 나타내었다. 이 값은 hEPO 단독으로 cloning된 vector system에서 확인된 발현양인 37,000,000 mIU/ml의 값에 비해 매우 저조한 양으로서 dual promoter system의 적용에 있어서 문제점이 있는 것으로 사료되었다. 이에 본 연구는 단독 internal promoter retrovirus vector system과 외래 유전자 발현 조절 system의 도입을 추진하는 쪽으로 연구 방향을 선회하기로 하였다.

나. *hEPO* 유전자의 발현을 확인하기 위한 retrovirus vector system의 구축

(1) MLV 유래의 retrovirus vector system의 구축

hEPO 유전자의 발현을 확인하기 위하여 simple retrovirus인 MLV 유래의 pLNCEPOW vector를 재조합하였다(Fig. 8). 먼저 pLNCXW를 Hpa I 과 HindIII로 처리하였으며 이를 pGEM-11zf-hEPO를 EcoR I, Klenow, 그리고 HindIII 순으로 처리하여 분리한 *hEPO* 유전자와 재조합하였다.

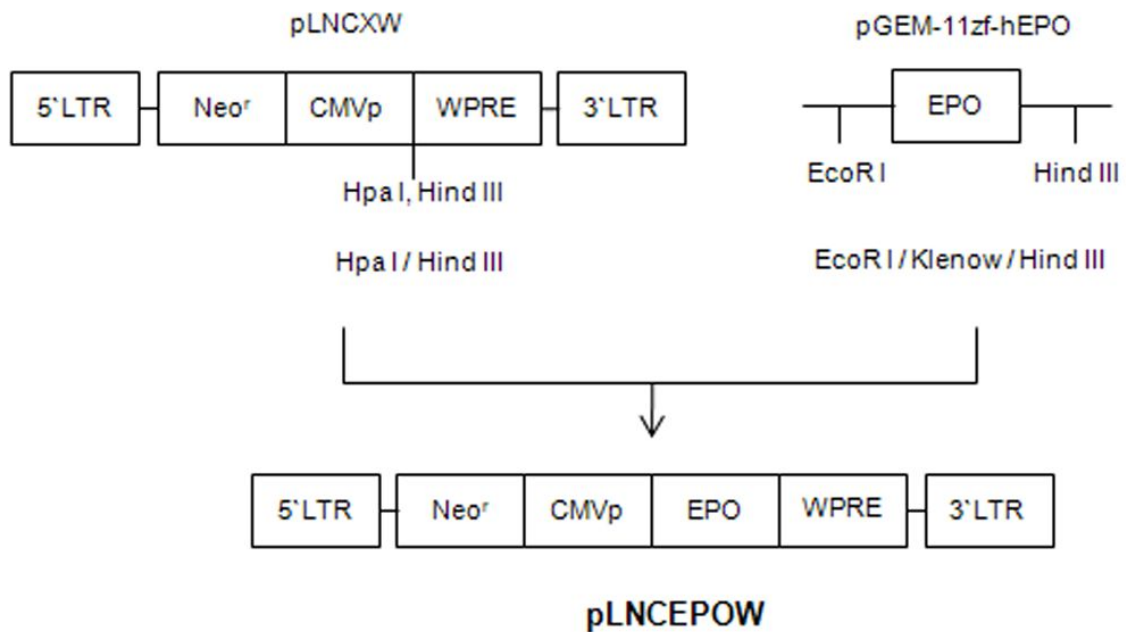


Fig. 8. Construction of hEPO expression retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Neo^r, Neomycin resistant gene; CMVp, human cytomegalovirus promoter; EPO, human erythropoietin gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.

재조합한 pLNCEPOW vector를 pseudotyped retrovirus producing system인 GP293 세포주와 pVSV-G를 이용하여 virus 형태로 생산한 후 본 연구실에서 일차 배양한 CEF 세포와 여러 종류의 표적세포에 감염시켰다. 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 G418이 첨가된 용액으로 배양하여 neomycin resistant colony만을 선별하여 hEPO 유전자가 발현되는 세포주를 확립하였다.

각각의 세포주를 $5 \times 10^5/60$ mm dish로 준비하여 48시간 배양한 후 RNA와 단백질을 분리하고 배양액을 수확하였다. 각 세포의 RNA는 trizol을 이용하는 방법으로 분리하였으며 ImProm-II reverse transcription system (Promega, USA)을 이용하여 cDNA를 제조하였다. 제조한 cDNA를 주형으로 PCR을 실시하였는데 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후 최종

신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다. 본 실험에 사용한 primer는 *hEPO* 유전자에 대한 서열로서 + strand primer인 5' -ATGGGGGTGCACGAATGTCC-3' 와 - strand primer인 5' -TCATCTGTCCCCTGTCCTGCA-3' 를 사용하였다. 정상적인 전사 과정이 일어나고 있음을 확인하기 위하여 각 세포의 *GAPDH* 유전자에 대한 primer로 PCR을 수행하였으며 각각의 primer 서열은 아래와 같다(Table 6). PCR 반응 과정은 94°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시하였다.

Table 6. Primers used for *GAPDH* analysis.

Cell line	Species	Sequence	Product size (bp)
BFF	Bovine	CTTTTAATTCTGGCAAAGTGGACATC (+) ATCTCATCATACTTGGCAGGTTTCTC (-)	806
CEF	Chicken	ACGCCATCACTATCTTCCAGGAG (+) CAGCAGCCTTCACTACCCTCTTG (-)	582
HeLa	Human	GGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAA (+) GTCTCTCTCTTCCCTCTTGTGCTCTTG (-)	658
NIH3T3	Mouse	TGAGTATGTCGTTGGAGTCTACTGGTG (+) CTGTAGCCGTATTCATTGTCATACCA (-)	686
PFF	Pig	TCCACTACATGGTCTACATGTTCCAG (+) ATGTCATCATATTTGGCAGGTTTCTC (-)	655

RT-PCR을 실시한 결과, virus가 감염된 세포주에서는 *hEPO* 유전자의 전사가 확인되었으며 감염되지 않은 대조구 세포들에서는 유전자의 존재가 확인되지 않았다 (Fig. 9). *GAPDH* 유전자에 대한 RT-PCR 결과에서는 모든 세포주에서 단편이 확인되었다(Fig. 9).

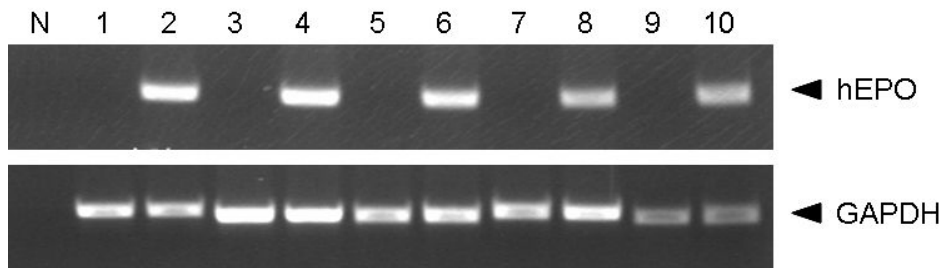


Fig. 9. RT-PCR analyses of *hEPO* gene expression in various target cells. N, negative control; 1, 2, BFF cell; 3, 4, CEF cell; 5, 6, HeLa cell; 7, 8, NIH3T3 cell; 9, 10, PFF cell; 1, 3, 5, 7, 9 cells uninfected cell; 2, 4, 6, 8, 10 cells infected with LNCEPOW viruses, respectively. In RT-PCR analysis, two primer sets were used: One for the *hEPO* gene and the other for the control *GAPDH* gene.

RT-PCR에서 *hEPO* 유전자의 전사가 확인된 세포주의 배양액을 수확하여 western blotting을 실시하였다. 세포 배양액은 10 μ l를 취하여 SDS-PAGE한 후 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 5% skim milk가 포함된 0.03% tween-20 blocking buffer에 1시간 방치한 후 1 : 5,000으로 희석한 anti-human Erythropoietin antibody (Cat. No. MAB2871, R&D systems, USA)와 1 : 5,000으로 희석한 anti-Actin (beta) antibody (Cat. No. ab6276, abcam, UK)를 16시간 반응시켰다. TBS buffer로 수세한 다음 이차항체인 HRP conjugated Goat anti-mouse IgG (Pierce, USA) 1 : 5,000으로 희석하여 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 수세한 후 기질 용액인 West Dura Extended Duration substrate (Pierce, USA)용액을 첨가하여 X-ray film에 60초간 노출시켜서 현상하였다. 그 결과, virus에 infection 되지 않은 세포에서는 hEPO 단백질에 대한 band가 전혀 나타나지 않았으며 virus에 infection된 세포에서는 32.5 KDa의 hEPO 단백질에 대한 band가 관찰되었다. 특히 CEF 세포에서는 발현양이 우월한 것으로 나타났다(Fig. 10).

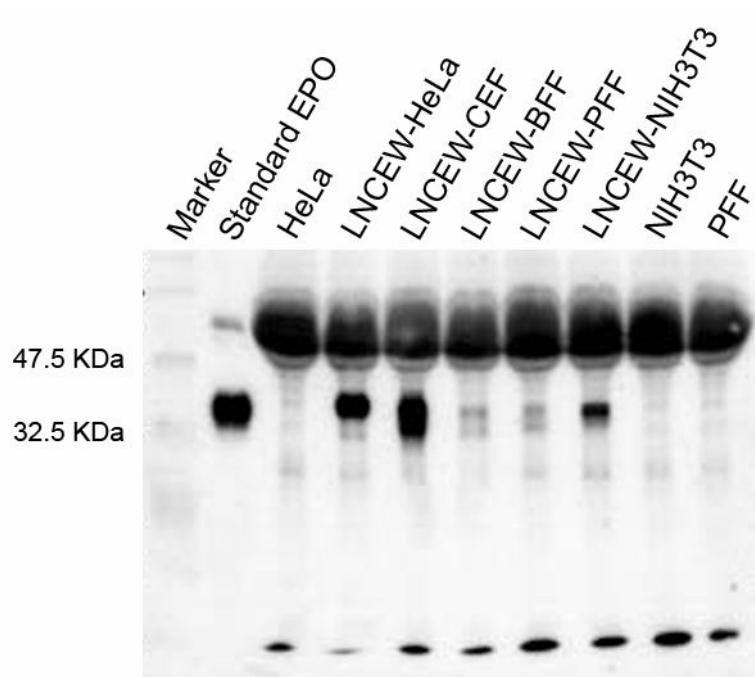


Fig. 10. Western blot analyses of hEPO expression in various target cells.

Virus에 감염되지 않은 대조군 세포와 *hEPO* 유전자가 전이된 세포들을 각각 DMEM/FBS 배지에서 48시간 배양한 후 그 배양액을 수확하여 적절히 희석한 후 Quantikine IVD Epo kit (R&D systems Cat. No. DEP00, USA)을 사용하여 ELISA를 수행하였다. 먼저 여러 단계로 희석한 standard와 각 sample을 plate의 각 well에 200 μ l씩 넣어서 실온에서 3시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였다. 각 well에 200 μ l의 anti-hEPO-HRP conjugate를 더한 후 실온에서 1시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였으며 200 μ l의 tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution을 각 well에 더하여 빛을 차단시킨 상태로 실온에서 30분간 방치하였다. Stop solution을 더하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, virus가 감염되지 않은 대조구에서는 측정값이 전혀 나타나지 않은 데 비해서, virus가 감염된 세포의 배양액에서는 75,000 mIU/ml에서 25,000 mIU/ml 이상의 농도를 나타내었으며 이는 세포에서 생산된 hEPO 단백질이 세포 밖으로 분비되고 있음을 의미한다. 특히, CEF에서는 다른 표적세포에 비해 매우 높은 값인 37,000,000 mIU/ml의 농도를 나타내어 발현이 가장 탁월한 것으로 확인되었다(Table 7).

Table 7. ELISA analysis of hEPO expression in target cells

Cell line	Normal (mIU/ml)	LNCEPOW (mIU/ml)
BFF	0	85,000
CEF	0	37,000,000
HeLa	0	250,000
NIH3T3	0	400,000
PFF	0	75,000

(2) FIV 유래의 retrovirus vector의 구축

FIV 유래의 pFIV-CMV2-hEPO-WPRE의 구축은 본 연구실에서 보유하고 있는 pFIV-CMV2p vector를 Hpa I 과 HindIII로 처리하고 pUC18-hEPO vector를 EcoR I /Klenow/HindIII 순으로 처리하여 분리한 hEPO 단편을 재조합하여 구축하였다(Fig. 11). CMV2 promoter는 기존의 CMV promoter에 CMV enhancer가 결합된 형태이다.

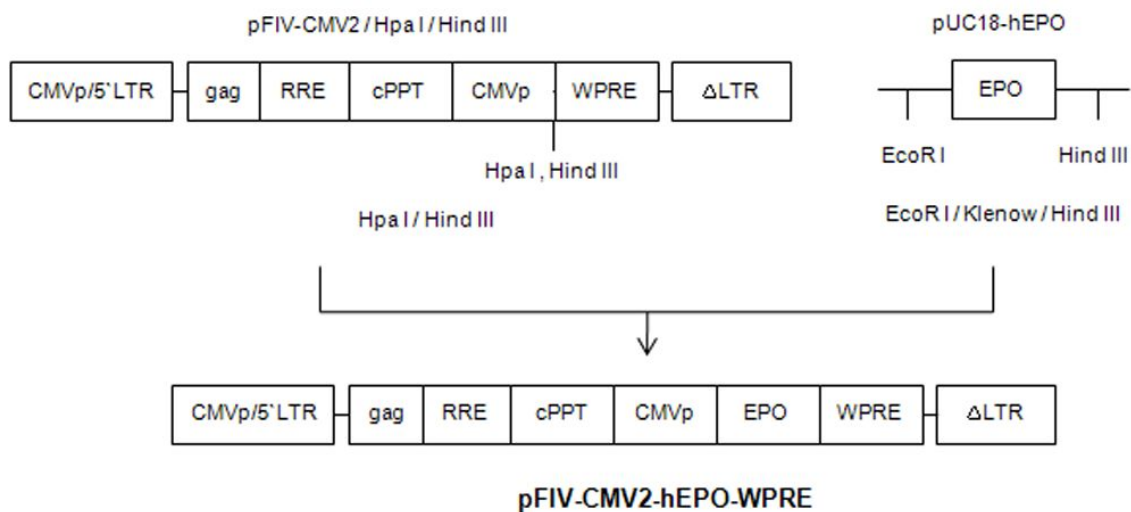


Fig. 11. Construction of pFIV-CMV2-hEPO-WPRE vectors. CMVp/5' LTR, hybrid CMV promoter-R/U5 long terminal repeat; gag, packaging signal; RRE, Rev response element; cPPT, central polypurine tract; CMVp, human cytomegalovirus promoter; EPO, human erythropoietin gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; ΔLTR, self-inactivating 3' LTR with deletion in U3 region.

새로이 구축된 pFIV-CMV2-hEPO-WPRE vector는 pFIV-34N (packaging plasmid로서 구조(gag), 조절(vif, gp4, rev, nef), 복제(pol) 유전자를 포함)과 pVSV-G (lentiviral env 유전자 대신 VSV-G 피막 당단백질 유전자 포함)와 동시에 293T 세포에 co-transfection하여 virus를 생산할 수 있다. 생산된 virus는 유전자 전이가 어려운 세포들로 알려진 일차배양 세포, 간세포, 분화가 끝난 비분열성 세포 등에서 탁월한 유전자 전이를 보이는 것으로 알려져 있다. 생산한 각각의 virus는 재조합된 hEPO의 발현을 확인하기 위하여 다양한 숙주세포에 감염시켰으며, 분자생물학적인 방법으로 분석을 실시하였다. 먼저 RT-PCR 결과에서는 virus에 감염이 되지 않은 대조군 세포들에서는 hEPO에 해당하는 PCR 산물들이 전혀 나타나지 않았으며 virus에 감염된 세포군에서는 PCR band가 모두 관찰되었다(Fig. 12). 특히 CEF 세

포주에서 강한 PCR 단편이 확인되었는데, 이는 *hEPO* 유전자에 대한 전사가 활발히 일어나고 있음을 의미하는 것으로 추정된다.

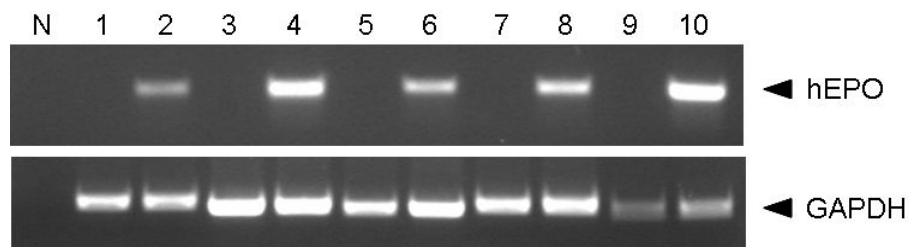


Fig. 12. RT-PCR analyses of *hEPO* gene expression in various target cells. N, negative control; 1, 2, BFF cell; 3, 4, CEF cell; 5, 6, HeLa cell; 7, 8, NIH3T3 cell; 9, 10, PFF cell; 1, 3, 5, 7, 9 cells uninfected cell; 2, 4, 6, 8, 10 cells infected with FIV-CMV2-hEPO-WPRE viruses, respectively. In RT-PCR analysis, two primer sets were used: One for the *hEPO* gene and the other for the control *GAPDH* gene.

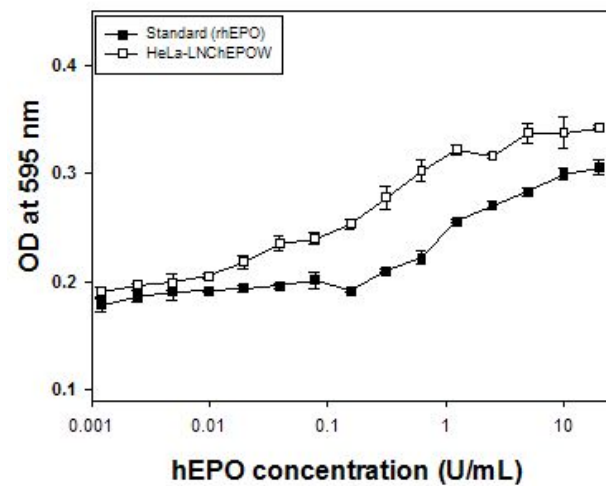
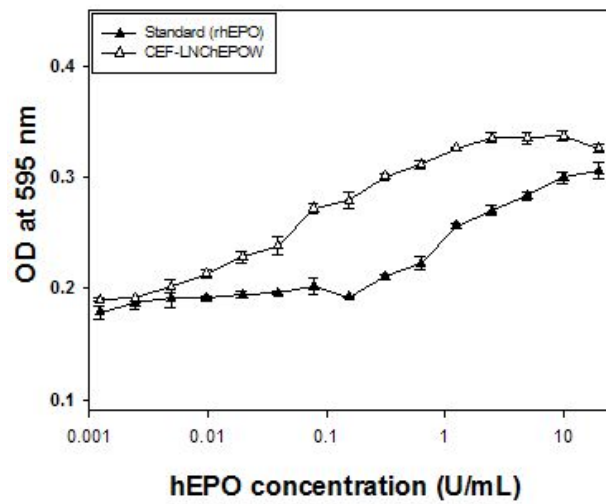
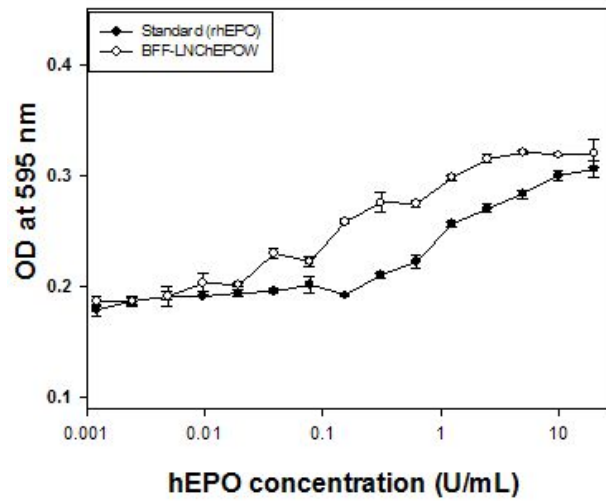
RT-PCR에서 *hEPO* 유전자의 전사를 확인하고 동일한 세포주를 대상으로 ELISA를 실시하였다. 그 결과 MLV 유래의 vector system 실험에서와 마찬가지로 다른 표적세포에 비해서 CEF에서 매우 탁월한 발현을 나타내었으며 PFF 세포에서도 강한 전사가 확인되었다(Table 8).

Table 8. ELISA analysis of hEPO expression in target cells

Cell line	Normal (mIU/ml)	FIV-CMV2-hEPO-WPRE (mIU/ml)
BFF	0	2,000
CEF	0	14,000,000
HeLa	0	4,000
NIH3T3	0	5,000
PFF	0	2,200

(3) 재조합 hEPO 단백질의 생물학적 활성 검정(bioassay) 체계의 확립

재조합 hEPO 단백질의 bioassay는 TF-1 세포(human erythroleukemia cell line)를 이용하여 실시하였다. 이 세포는 hEPO에 의해 증식이 유도되는 세포로서 재조합 hEPO를 첨가한 후 세포의 증식 정도를 MTT 측정으로 확인하는 방법이다. 본 연구에서 구축한 CEF-LNCEPOW의 배지와 BFF-LNCEPOW, HeLa-LNCEPOW, NIH3T3-LNCEPOW, 그리고 PFF-LNCEPOW 세포의 배지를 이용하여 bioassay를 수행하였다. 각 세포의 배지는 60 mm dish에 1×10^6 의 수로 seeding하여 48시간 배양하여 준비하였으며 배지에 포함된 hEPO 함량은 ELISA 방법을 이용하여 정량하였다. TF-1 세포는 10% FBS와 2 ng/ml의 rhGM-CSF가 첨가된 RPMI-1640 배지에서 키운 후 2×10^5 /ml로 cell count하여 96 well microplate에 50 μ l씩 첨가하였다. Standard와 sample을 40 IU/ml의 동일한 농도로 보정하여 2-fold serial dilution을 한 후 각 well에 50 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 48시간동안 반응시켰다. 각 well에 MTT labeling reagent를 10 μ l씩 첨가한 후 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 반응시킨 다음 solubilization solution을 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 16시간동안 방치하였다. 반응이 종결된 plate는 microplate reader로 595nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 각 세포에서 생산된 재조합 hEPO가 상업적으로 시판되고 있는 재조합 EPO에 비해서 월등히 높은 활성을 나타내는 것으로 확인되었으며 특히 CEF 세포에서 생산된 재조합 hEPO의 생물학적 활성이 가장 높게 나타났다(Fig. 13).



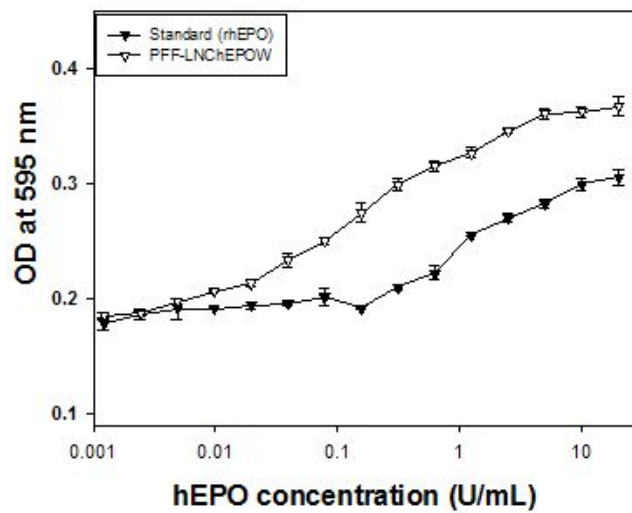
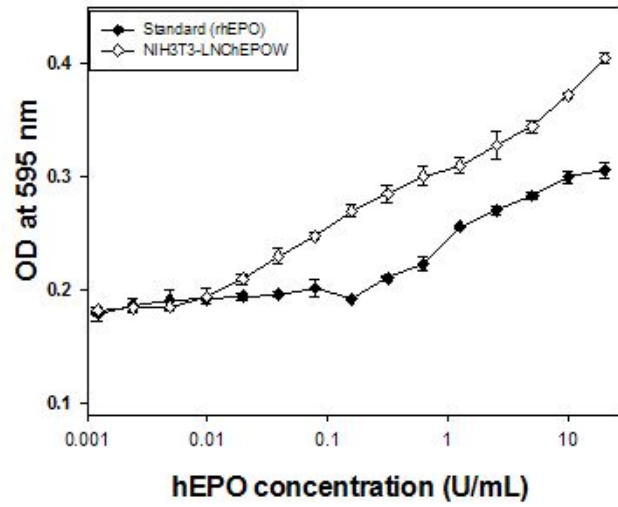


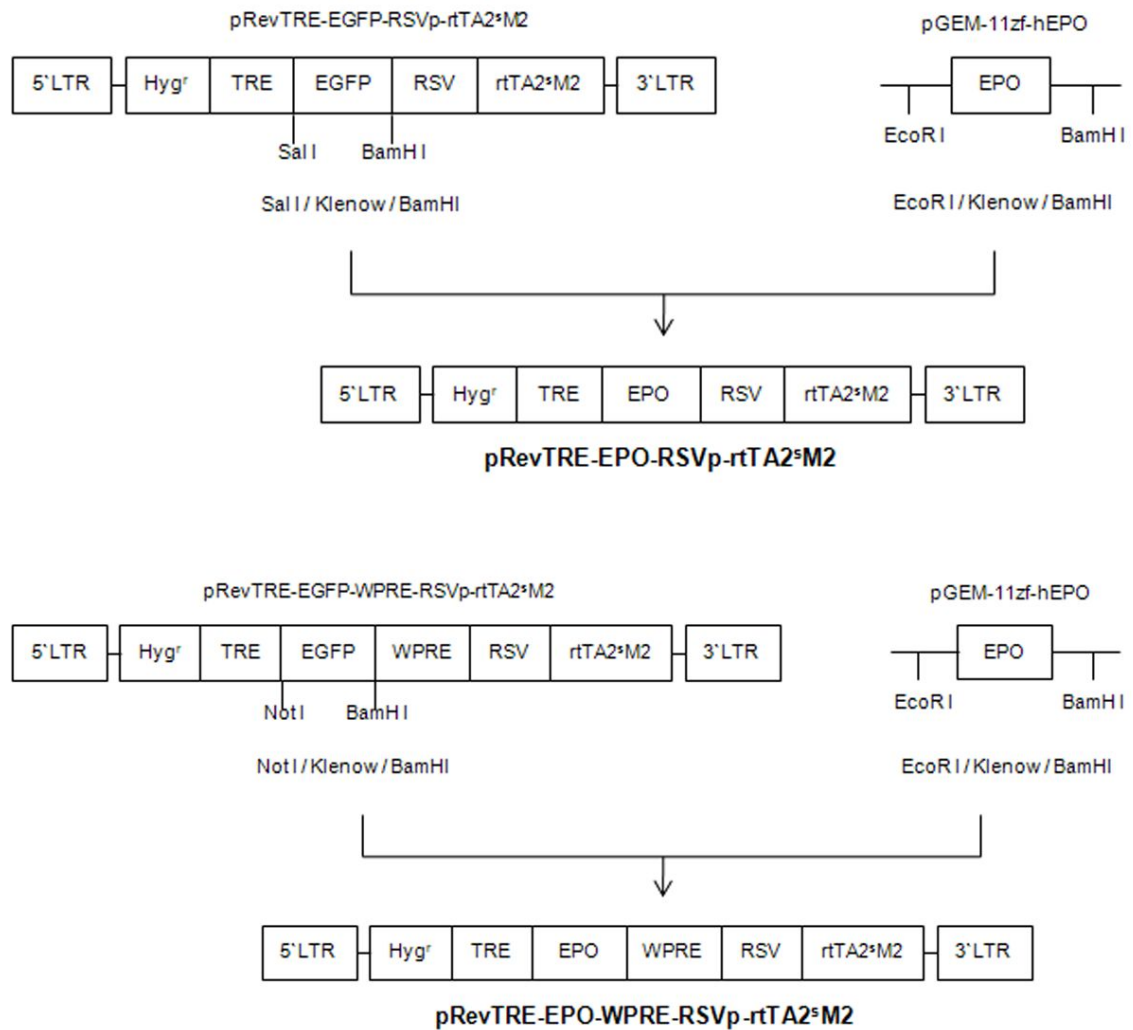
Fig. 13. The biological activity of hEPO produced in a LNChEPOW infected target cells or standard rhEPO.

다. *hEPO* 유전자의 발현 조절을 위한 Tet system의 구축

(1) *hEPO* 유전자의 발현이 유도적으로 조절되는 Tet system의 구축

Dual expression system의 부정적인 측면을 제고하기 위하여 유전자의 과다 발현을 제어하기 위한 system으로 Tet system을 도입하였다. Tet system은 일반 promoter에 의한 외래 유전자의 지속적인 발현으로 인한 형질전환 개체의 부정적인 생리적 변화를 효과적으로 방지할 수 있는 가장 대표적인 system으로서 transactivator가 tetracycline계의 물질의 존재 여부에 따라서 rtTA 복합체를 형성하고, 이 복합체가 TRE를 구성하는 인자 중 tet operator 부분에 결합함으로써 tet operator의 downstream에 위치한 promoter의 활성을 유도해서 도입한 외래 유전자가 발현하도록 한다(Gossen과 Bujard, 1992; Gossen 등, 1995). 기존에 사용되었던 rtTA는 원핵세포성의 codon과 내재된 splice site의 존재로 인한 불안정성 때문에 형질전환 동물의 일부 신체 기관에서 비효율적인 유도 형태를 나타내며, 높은 Dox의 농도를 요구함으로써 세포 자체의 독성을 유발하고, Dox 부재시에도 tet operator에 대한 rtTA의 잔류된 친화성에 의한 promoter의 background 활성을 유발하게 된다. 이러한 한계를 극복하기 위해서 rtTA의 일부 아미노산 서열을 변형시켜서 Dox에 대한 감수성을 증가시키고, splice site와 원핵세포성 codon을 최소화함으로써 진핵세포 내에서 매우 안정하며 Dox가 없을 경우에 background 활성이 유발되지 않게끔 보완된 rtTA2SM2를 도입하였다(Urlinger 등, 2000). 또한 본 연구에서는 보다 효율적인 유전자 전이 system을 구축하기 위하여 기존의 rtTA와 TRE 부분이 두 개의 vector 상에 각각 위치하는 two vector system을 보완하여 one vector system을 구축하였으며 이 vector를 근간으로 하여 hEPO의 발현을 조절하는 Tet system을 구축하고자 하였다. 먼저 본 연구실에서 보유하고 있는 pRevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2SM2 vector를 Sal I/Klenow/BamH I 순으로 처리하여 EGFP 부분을 제거하고 pGEM-11Zf-hEPO를 EcoR I/Klenow/BamHI 순으로 처리하여 잘라낸 hEPO 유전자를 그 자리에 대체하여 pRevTRE-EPO-RSVp-rtTA2SM2를 재조합하였다(Fig. 10). 이 vector를 기본으로 하여 hEPO 유전자의 발현 유도시 그 발현을 최대화하기 위한 인자로 WPRE 서열을 여러 위치에 도입하고자 하였다. WPRE 서열을 hEPO 유전자의 3'에 도입한 구조인 pRevTRE-EPO-WPRE-RSVp-rtTA2SM2은 pRevTRE-EGFP-WPRE-RSVp-rtTA2SM2를 Not I/Klenow/BamH I 순으로 처리하여 EGFP 유전자를 제거하고 그 위치에 pGEM-11Zf-hEPO를 EcoR I/Klenow/BamHI 순으로 처리하여 분리한 hEPO 유전자를 도입하여 구축하였다(Fig. 14). WPRE 서열을 rtTA2SM2 유전자의

3' 위치에 도입한 형태인 pRevTRE-EPO-RSVp-rtTA2SM2-WPRE는 pRevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2SM2-WPRE를 Sal I/Klenow/BamHI 순으로 처리하여 EGFP 유전자를 제거하고 pGEM-11zf-hEPO에서 분리한 hEPO 유전자를 대체하여 구축하였다(Fig. 14).



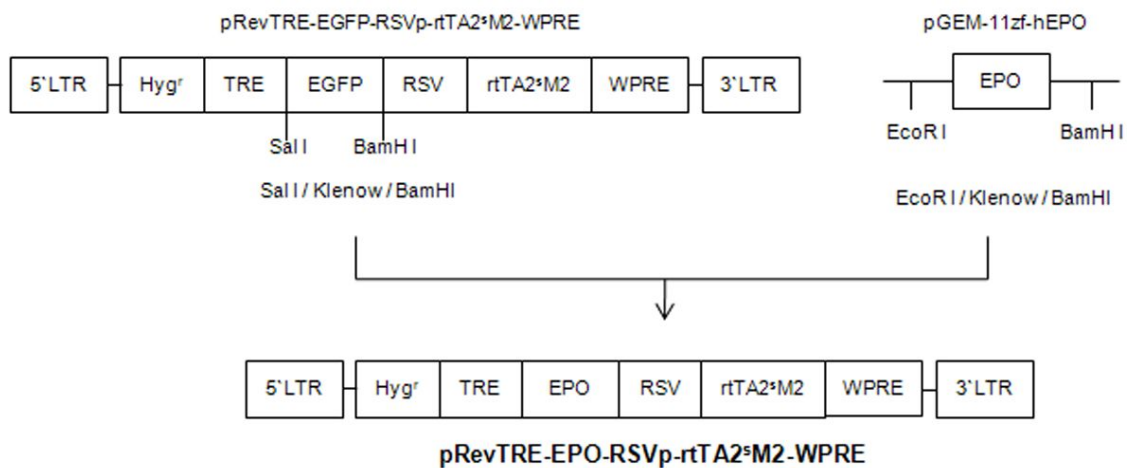


Fig. 14. Construction of tetracycline inducible expression retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Hyg^r, hygromycin resistant gene; TRE, Tet-response element; EGFP, enhanced green fluorescent protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; RSV, *Rous sarcoma* virus promoter; rtTA2^{SM2}, rtTA consist of the reverse tetracycline repressor (rTetR) fused to a VP16 transactivation domain; EPO, human erythropoietin gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

구축한 각 vector는 전날 1×10^6 /100 mm dish로 준비된 PT67 세포에 calcium phosphate precipitation 방법으로 $10 \mu\text{g}$ 씩 transfection하였으며 24시간 후 배양액을 교환하고 다시 48시간 동안 배양하여 virus가 포함된 배양액을 취하였다. 취한 배양액은 $0.45 \mu\text{m}$ pore size의 filter를 이용하여 여과한 후 전날 1×10^6 /100 mm dish로 준비된 GP293 세포에 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene을 첨가하여 $100 \mu\text{l}$ 의 virus를 infection하였다. 24시간 경과 후부터 hygromycin B가 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가된 배양액으로 교환하여 2주간 선별하여 virus 생산을 위한 세포주를 확보하였다. 확보된 세포주를 100 mm dish에 1×10^6 개로 seeding한 후 피막단백질에 해당하는 VSV-G 유전자를 포함한 pVSV-G vector $10 \mu\text{g}$ 을 transfection한 후 8시간 후 배양액을 교환해 주고 48시간 후 virus를 수확하여 CEF 표적세포에 infection하였다. 이 세포는 hygromycin B가 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가된 배양액에서 2주간 선별되었으며 각 세포

주는 $1 \times 10^6/60$ mm dish로 준비하여 48시간 동안 doxycycline ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 배양액에서 배양하여 유전자의 발현을 유도하였다. 이 때 배양액 제조에 사용한 FBS는 혈청 자체에 함유되어 있을 수도 있는 미량의 tetracycline으로 인한 실험 결과의 부정확성을 최소화하기 위하여 tetracycline-free FBS를 사용하였다. *hEPO* 유전자의 유도적 발현은 RT-PCR 방법과 ELISA, 그리고 Western blotting 방법을 사용하여 확인하였다. 모든 실험 방법은 LNCEPOW나 FIV-CMV2-hEPO-WPRE virus를 이용한 실험에서와 같이 동일한 과정으로 실시하였다. RT-PCR 결과, 발현을 유도하는 물질인 doxycycline이 존재하지 않는 경우에 비해서 존재하는 경우에 발현이 강한 것으로 나타났으며 WPRE가 *hEPO* 유전자의 3'에 위치한 vector system에 의해 구축한 세포주 즉, CEF-pRevTRE-EPO-WPRE-RSVp-rtTA2SM2에서 가장 강한 발현을 보였다(Fig. 15). β -actin 유전자에 대한 RT-PCR 결과에서는 모든 세포주에서 유사한 크기의 단편이 확인되었다(Fig. 15). Western blotting의 결과에서는 세포에서 추출한 단백질에서보다 배양액에서 더 많은 양의 hEPO 발현이 확인되었으며 WPRE가 *hEPO* 유전자 다음에 위치한 vector system에 의해서 구축한 세포주에서 가장 강한 발현을 나타내었다(Fig. 15). ELISA의 결과에서도 RT-PCR이나 western blotting의 경우와 유사하게 WPRE 서열이 *hEPO* 유전자의 3'에 위치한 경우에 가장 높은 발현을 나타내었으며 비유도 조건에 대한 유도 조건에서의 상대 발현율인 발현 유도율 또한 가장 높은 것으로 확인되었다(Fig. 16). 따라서 외래 유전자 전이와 전이된 유전자의 발현의 조절에 있어서 가장 효율적인 vector system은 pRevTRE-EPO-WPRE-RSVp-rtTA2SM2인 것으로 판단되었으며 이 vector의 명명을 Tet1-EPO로 간소화하였다.

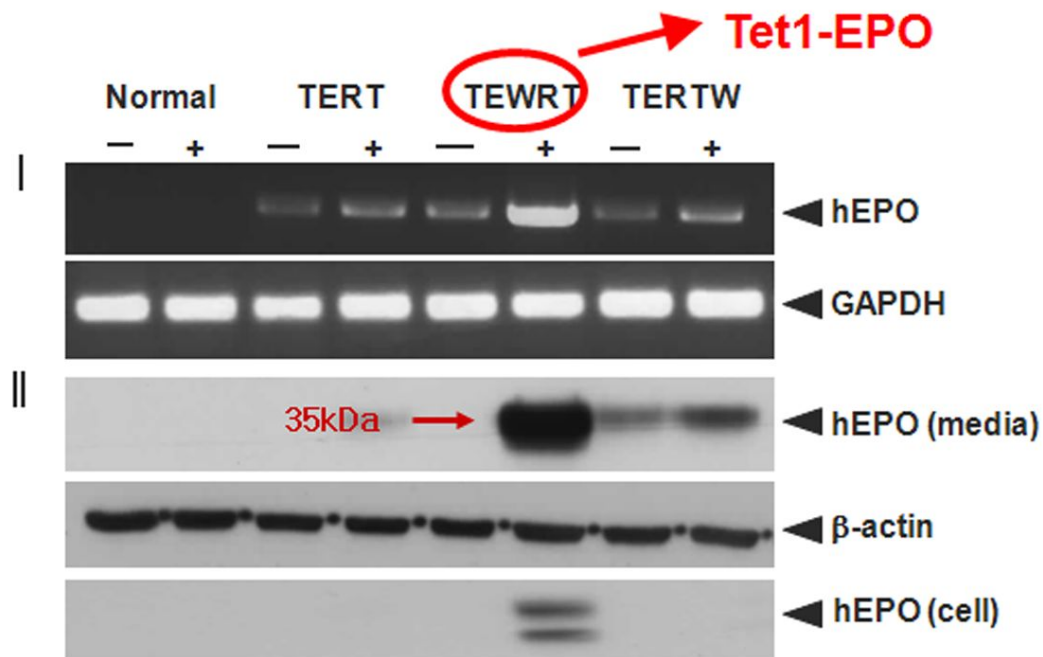


Fig. 15. Determination of doxycycline induction of the *hEPO* gene in CEF cells using RT-PCR (I) and western blot (II) analyses. CEF, uninfected cell; TERT, target cell infected with RevTRE-EPO-RSVp-rtTA2SM2; TEWRT, infected with pRevTRE-EPO-WPRE-RSVp-rtTA2SM2; TERTW, infected with pRevTRE-EPO-RSVp-rtTA2SM2-WPRE. II-upper, medium contained by the cell line; II-middle and lower, cell lysate from the each cell line. -: cell was grown in the doxycycline free media. +: cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

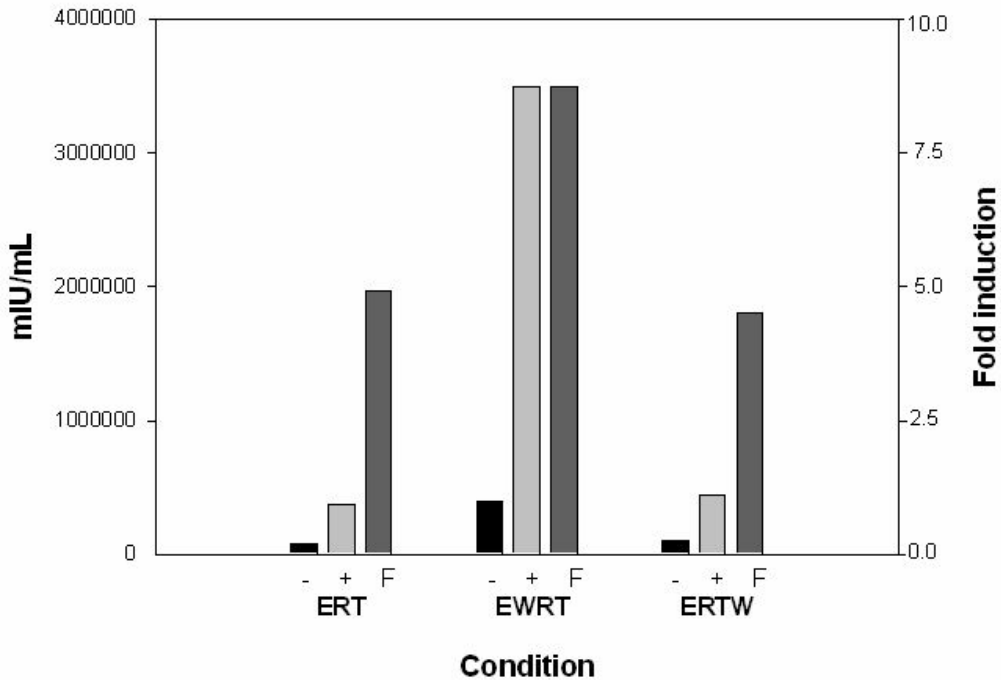


Fig. 16. ELISA analysis of hEPO in CEF cells. ERT, target cell infected with RevTRE-EPO-RSVp-rtTA2SM2; EWRT, infected with pRevTRE-EPO-WPRE-RSVp-rtTA2SM2; ERTW, infected with pRevTRE-EPO-RSVp-rtTA2SM2-WPRE. -, cell was grown in the doxycycline free media for 48 hrs; +, cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hrs; F, fold induction.

(2) 개선된 형태의 Tet2-EPO virus vector system의 구축

전단계에서 구축한 Tet system 중 가장 효율적인 것으로 판명된 pRevTRE-EPO-WPRE-RSVp-rtTA2SM2 (Tet1-EPO) vector와, 보다 진일보한 구성요소인 TREtight와 PGK promoter로 보완한 pRevTRE2-EPO-WPRE-PGKp-rtTA2SM2 (Tet2-EPO) vector를 이용하여 각각 고농도의 virus 용액을 생산하고자 하였다(Fig. 3). pRevTRE2-EPO-WPRE-PGKp-rtTA2SM2는 TRE 부분을 일부 서열이 변형된 TRE-tight 서열로 대체한 형태로, 이 TRE-tight가 포함된 system은 기존의 TRE가 포함된 Tet system에 비해 유전자의 발현 유도율이 10배 이상

증가하는 것으로 보고되어 있다. 본 연구실에서도 기존의 system에 비해 10배 이상의 높은 유도율 증가와, 비유도 조건에서의 background 활성이 현저히 감소되는 것을 확인하였다. rtTA2^SM2에 대한 promoter는 기존의 RSV promoter 대신에 PGK promoter로 변경하여 pRevTREtight-hEPO-WPRE-PGKp-rtTA2SM2 (pTet2-EPO) vector를 구축하였다(Fig. 17). Vector의 구축 과정은 본 연구실에서 보유하고 있는 pRevTREtight-EGFP-WPRE-PGKp-rtTA2SM2 plasmid를 BamH I 과 Mlu I 제한효소로 처리하여 EGFP 유전자를 제거한 후, pUC18-hEPO plasmid를 BamH I 과 Mlu I 로 처리하여 분리한 hEPO 유전자와 ligation하였다.

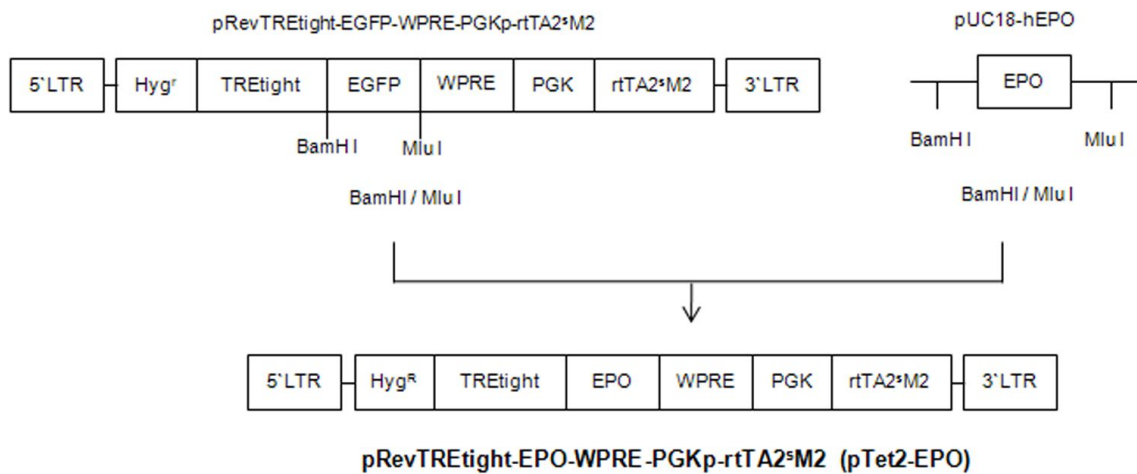


Fig. 17. Structure of pRevTREtight-hEPO-WPRE-PGKp-rtTA2SM2 (Tet2-EPO). LTR, LTR, long terminal repeat; Hyg^r, Hygromycin resistant gene; TREtight, which contains a modified TRE upstream of an altered minimal CMV promoter; EGFP, enhanced green fluorescent protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; PGK, phosphoglycerate kinase promoter; rtTA2^SM2, rtTA consist of the reverse tetracycline repressor (rTetR) fused to a VP16 transactivation domain; EPO, human erythropoietin gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

구축한 vector는 PT67 세포에 일시적으로 transfection하여 virus를 생산하였다. 이 virus를 GP2 293 세포에 infection하여 hygromycin (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 용액으로 2주간 선별하였다. 구축한 GP2 293-Tet2-EPO 세포에 pVSV-G를 calcium phosphate 방법으로 transient transfection시켜서 virus를 생산한 후 이 virus를 다양한 표적세포에 감염시켰다. Hygromycin (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 용액으로 2주간 선별하여 virus vector가 전이된 각 표적세포주를 확립하고 각 세포에서 tetracycline 유도체인 doxycycline의 첨가 여부에 따른 외래 유전자의 발현 조절 양상 및 생산된 hEPO의 생물학적 활성을 측정하고자 하였다. 먼저 각 세포에 doxycycline을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 48시간 처리한 후 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였으며, 배양액을 취하여 배양액 중의 hEPO 농도를 Quantikine IVD Epo kit (R&D systems Cat. No. DEP00, USA)을 이용한 ELLISA 방법으로 측정하였다. RT-PCR 실험에서는 virus에 감염되지 않은 세포에서는 doxycycline의 첨가 여부에 상관없이 hEPO 유전자에 대한 PCR 단편이 전혀 나타나지 않았으며 virus에 감염된 세포에서는 doxycycline을 첨가한 조건에서 자란 경우와 첨가하지 않은 조건에서 자란 세포 모두에서 단편이 확인되었다(Fig. 18). 또한 doxycycline이 첨가된 조건에서 강한 PCR 단편을 나타내어 Tet system에 의한 hEPO 유전자의 발현 조절이 원활하게 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 18). 각 세포의 배양액에 함유된 hEPO의 농도를 측정한 결과 virus가 감염된 모든 표적세포주의 배양액에서 hEPO가 발현된 것을 알 수 있었다. 특히 CEF 세포의 배양액에서는 약 2,220 IU/ml의 농도로 hEPO가 존재하여 가장 높게 나왔으며(Fig. 19), 본 연구에 의해 형질전환된 동물세포가 hEPO를 경제적으로 대량 생산하는 생체반응기로 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

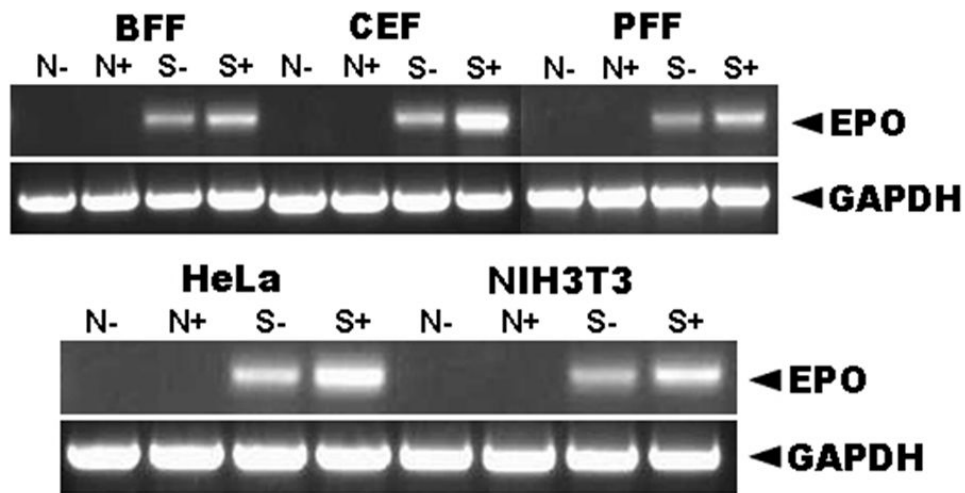


Fig. 18. Determination of doxycycline induction of the *hEPO* gene in various target cells using RT-PCR analyses. N, uninfected cell; S, target cell infected with Tet2-EPO. -: cell was grown in the doxycycline free media. +: cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

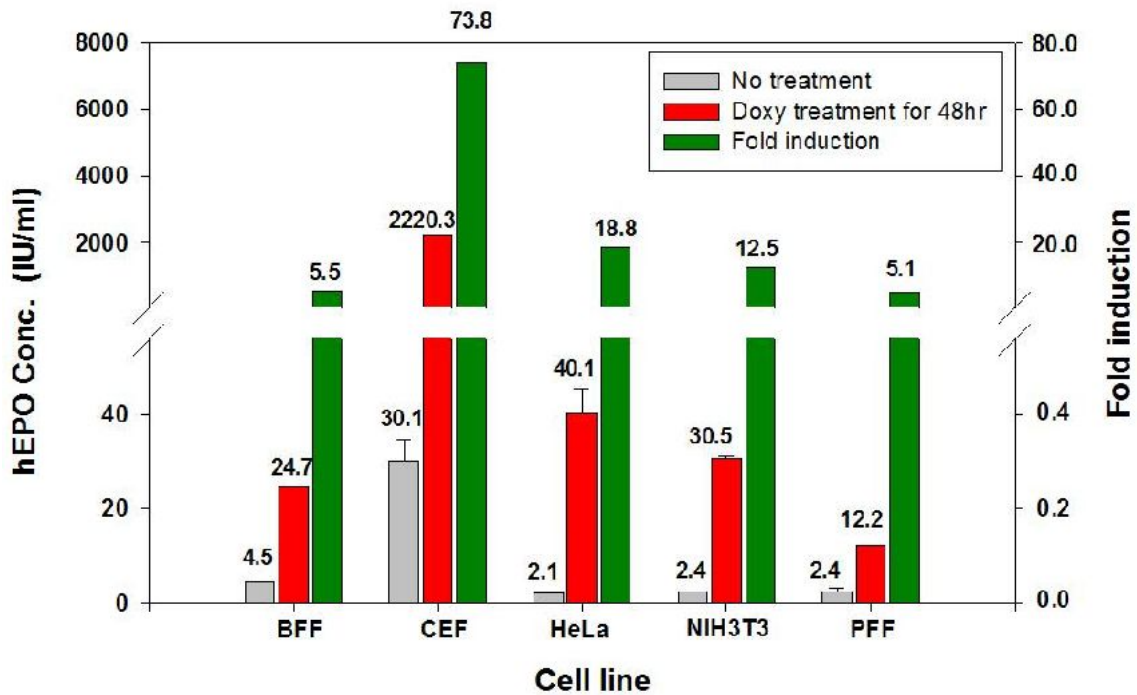


Fig. 19. ELISA analysis of hEPO in various target cells infected with Tet2-EPO. Gray bar, cell was grown in the doxycycline free media for 48 hrs; red bar, cell was grown in the media supplemented with doxycycline ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hrs; green bar, fold induction.

여러 표적세포로부터 생산된 hEPO의 생물학적 활성도는 전자의 LNCEPOW 실험군과 마찬가지로 TF-1 세포를 이용하여 실시하였다. Tet2-EPO virus에 infection되어 hEPO가 발현되는 각 표적세포의 배양액을 수확하여 bioassay를 수행하였다. 각 세포는 60 mm dish에 1×10^6 의 수로 seeding하여 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 doxycycline이 첨가된 배지에서 48시간 배양하였으며 배양 배지에 포함된 hEPO 함량은 ELISA 방법을 이용하여 정량하였다. TF-1 세포는 10% FBS와 $2 \text{ ng}/\text{ml}$ 의 rhGM-CSF가 첨가된 RPMI-1640 배지에서 키운 후 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 로 cell count하여 96 well microplate에 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. Standard와 sample을 $40 \text{ IU}/\text{ml}$ 의 동일한 농도로 보정하여 2-fold serial dilution을 한 후 각 well에 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37°C , 5% CO_2 에서 48시간동안 반응시켰다. 각 well에 MTT labeling reagent를 $10 \mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 37°C , 5% CO_2

에서 4시간 동안 반응시킨 다음 solubilization solution을 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 16시간동안 방치하였다. 반응이 종결된 plate는 microplate reader로 595nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 각각의 세포들에서 생산된 hEPO는 시판되고 있는 재조합 hEPO보다 우월한 생물학적 활성을 나타내었다(Fig. 20).

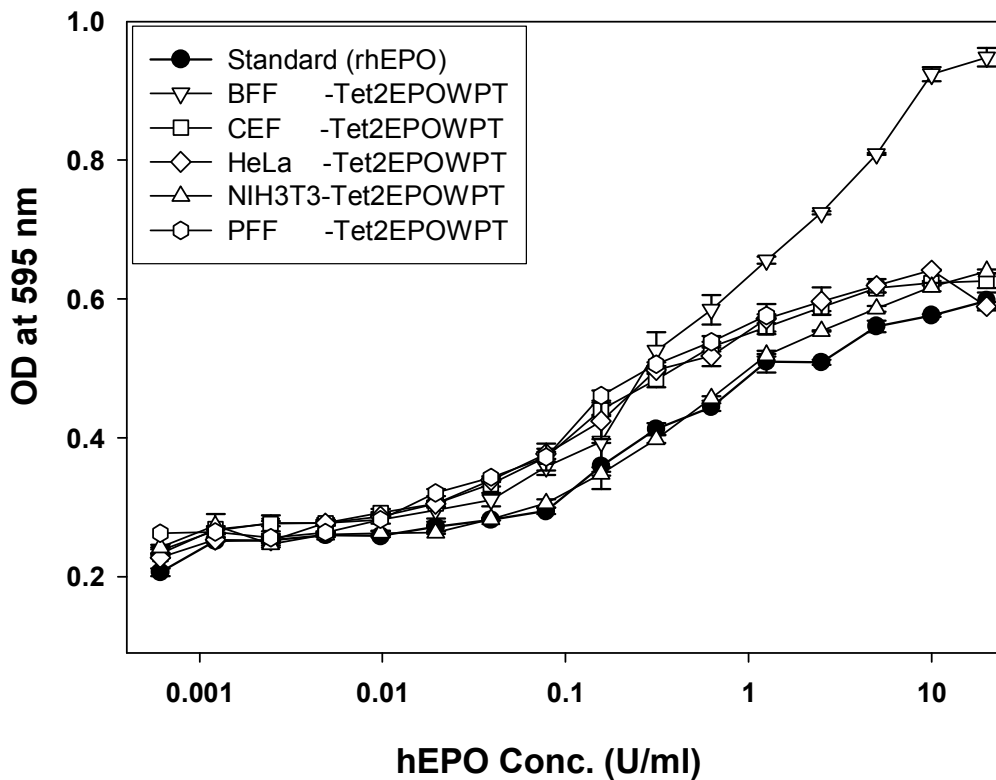


Fig. 20. Bioassay of hEPO in various target cells on the proliferation of TF-1 cells. Various concentration of hEPOs were added to each well, and the incubation was continued for a further 2 day.

라. hEPO가 지속적으로 발현되는 LNCEPOW 형질전환 닭의 생산

(1) 고농도 virus의 생산 및 계란으로의 미세주입

전단계의 *in vitro* 연구 결과에서 재조합 hEPO의 생산이 확인된 vector

system인 LNCEPOW를 이용하여 고농도의 virus stock을 생산하였다. GP293-LNCEPOW virus 생산 세포주에 pVSV-G를 calcium phosphate 방법으로 일시적으로 transfection시켜서 virus를 생산하였으며 4°C에서 16,700 rpm으로 90분간 vertical rotor (Beckman 70Ti)를 이용한 초원심분리 방법으로 1,000배 이상 농축하였다. 상층액을 완전히 제거한 후 침전물에 DMEM을 첨가하여 4°C에서 16시간 방치한 후 재부유하였다. 농축된 virus stock은 0.45 μm pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 -70°C에 보관하였다. 이 virus를 계란의 stage X의 배반엽 세포층에 미세주입하기 위하여 대리난각 방법을 이용하였다. 먼저 대리난각으로 이용하기 위한 계란은 둔단부를 직경 3.4 cm로 절단한 후 증류수로 수세한 후 건조시켜 두었다. 본 실험에 사용된 유정란은 하이브라운 산란계종으로, 60±3g 무게의 종란을 선택하였다. 부화를 시작하지 않은 종란(stage X)을 파각하여 내용물을 대리난각으로 옮긴 후 본 연구실에서 계량한 manipulator와 특수가공한 microinjection pipette (SIGMA, pipette, microcapillary, 50 μl , 100 mm length)을 이용하여 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene이 첨가된 virus stock 3 μl 를 계란의 배반엽층에 미세주입하였으며(Fig. 21), 대조군으로는 virus 재부유에 사용한 용액인 DMEM을 미세주입하였다. 배반엽 세포에 대한 물리적인 부정적 영향을 최소화하기 위하여 농축된 virus를 최소한의 용량(대략 3 μl 정도)으로 주입하였다. Virus의 주입이 끝난 후 배양 전날 준비해 둔 가온한 수양성 난백으로 대리난각을 완전히 채운 후 wrap으로 밀봉하여 37.7°C의 온도와 상대습도 55% 조건의 부화기에 입란하여 15분 주기로 90° 각도로 전란시키면서 3일간 배양하였다. 3일간 배양 후 종란의 무게보다 약 25g 정도 더 무거운 계란을 선별하여 둔단부를 4 cm 직경으로 절단한 대리난각으로 내용물을 모두 옮겼다(Fig. 21). 다시 wrap으로 밀봉하여 37.7°C의 온도와 상대습도 55% 조건의 부화기에 입란하여 30분 주기로 30° 각도로 전란시키면서 15일간 배양하였다. 19일째부터는 계란을 37°C의 온도와 상대습도 75% 조건의 발생기로 옮긴 후 전란하지 않는 상태에서 부화할 때까지 배양시켰다(Fig. 21).

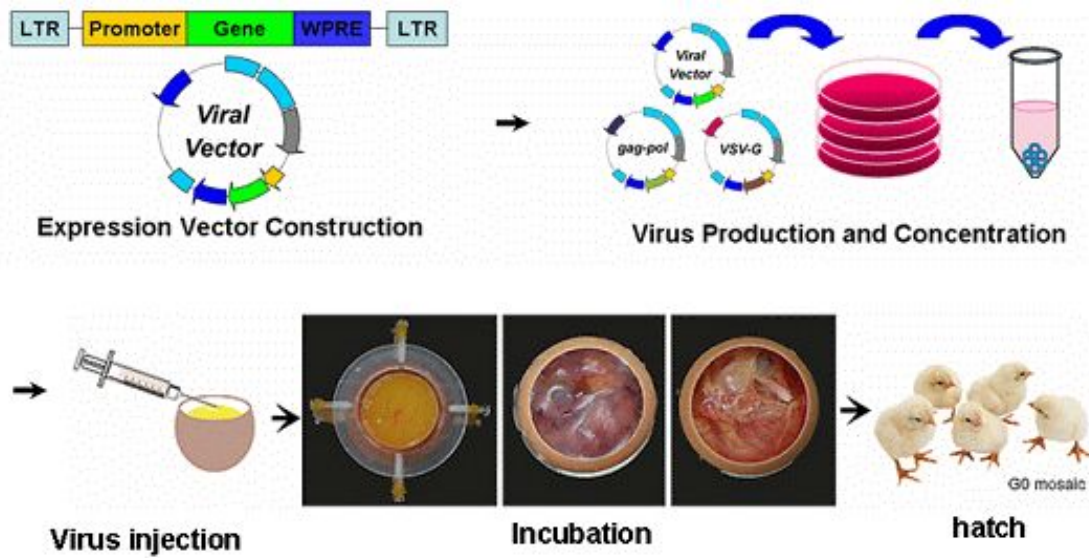


Fig. 21. Overall procedures for hEPO transgenic chicken production.

(2) 형질전환 닭의 부화율 및 형질전환 여부 검정

2차 배양 시점인 3일째 virus를 주입하지 않은 온전한 유정란의 생존율은 약 94%로 나타났는데 비해서 DMEM을 주입한 군에서는 58.3%, virus를 주입한 군에서는 30.3%의 발생율을 나타내었다(Table 9). 이는 virus 주입시 발생하는 물리적인 충격이 배발달 저하에 원인이 되며 또한 virus 자체의 배에 대한 독성이 존재함을 증명하는 결과이다. 부화율 역시 온전한 수정란에서는 90%로 매우 우수한 수치를 나타냈으나 DMEM 주입군은 30%, 그리고 virus 주입군은 1.5%의 매우 저조한 수치를 나타내었다(Table 9).

Table 9. Hatchability of virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Virus	Number of eggs injected	Number of embryos surviving on day 3 (%)	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)
Control (no injection)	50	47 (94.0)	45 (90.0)	
DMEM injection	60	35 (58.3)	18 (30.0)	
LNCEPOW injection	195	59 (30.3)	3 (1.5)	1 (33.3)

Virus 주입군 중 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법을 이용하여 형질전환 여부를 확인하고자 하였다. 먼저 병아리의 혈액으로부터 genomic DNA를 분리하기 위하여 G-DEX II genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하였다. PCR에 사용한 primer는 *hEPO* 유전자에 대한 서열로서 upstream primer 인 5' ATGGGGGTGCACGAATGTCC 3' 와 downstream primer인 5' CATCTGTCCCCTGTCCTGCA 3' 로 582 bp의 단편이 증폭되었다. 보다 확실한 유전자 전이 여부를 확인을 위하여 *Neomycin resistance* gene에 해당하는 primer (upstream primer 인 5' CTGTCATCTCACCTTGCTCCTG 3' 와 downstream primer인 5' GGTAGCCAACGCTATGTCCTGA 3')로도 PCR을 실시하였으며 369 bp의 단편으로 증폭되었다. 대조구로 사용한 *GAPDH* 유전자에 대한 upstream primer 서열은 5' ATCAATAATGATCCCTTCATCGATCTG3' 이고, downstream primer 서열은 5' TCATCATACTTGGCTGGTTTC 3' 으로 674 bp의 증폭 크기를 가진다. 각 reaction mixture는 1 µg의 genomic DNA와 50 pmol의 각각의 primer, 5 µl의 10X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM의 각 dNTP, 그리고 2.5 U의 Taq polymerase (Promega, USA)를 첨가한 후 전체 volume을 50 µl로 적정하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 방치한 후, 94°C에서 30초(denaturation), 54°C에서 30초(annealing), 그리고 72°C에서 30초(extension)의 반응을 25회 반복 실시하였고 72°C에서 7분간 방치하여 완전한 extension을 유도하였다. 부화한 병아리 중

한 마리는 부화 후 며칠 지나지 않아서 죽었으며 나머지 개체를 대상으로 실험한 결과 2마리 중 1마리에서 유전자의 전이 및 발현이 확인되었다(Fig. 22). Virus 주입군의 부화율이 매우 저조한 이유는 외래 유전자인 EPO의 지속적이며 과도한 발현에 기인하는 것으로 추정되었으며 생존한 개체도 8월령 미만의 시기에 자연사하였다.

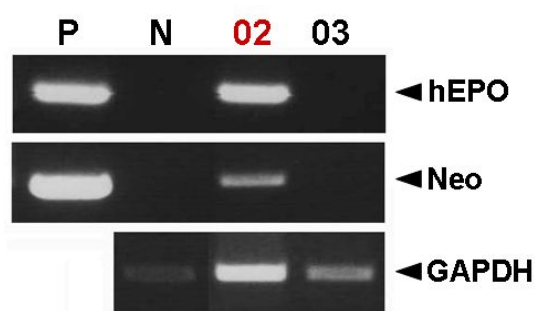


Fig. 22. PCR analysis of Go LNCEPOW transgenic chickens.

마. Tet-EPO와 Tet2-EPO virus vector system을 이용한 형질전환 닭의 생산

(1) G0 세대의 Tet1-EPO와 Tet2-EPO 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

(가) Tet1-EPO와 Tet2-EPO 형질전환 닭의 생산 및 부화율 검정

각각의 vector를 전이시켜서 구축한 GP2 293-Tet1-EPO와 GP2 293-Tet2-EPO 세포에 pVSV-G를 calcium phosphate 방법으로 transient transfection시켜서 virus를 생산한 후 초원심분리 방법으로 1,000배 이상 농축하였다. 이 virus stock을 LNCEPOW 형질전환 닭의 생산 실험에서와 동일한 방법으로 계란의 배반엽층에 미세주입하여 21일간 배양해서 형질전환 닭을 생산하였다. 각 실험군의 생존율과 부화율을 조사한 결과, Tet1-EPO 실험군에서는 2차배양시에 58.7%의 생존율을 나타내었으며 부화율은 13.8%로 나타났다(Table 10). Tet2-EPO는 네 차례에 걸쳐 실험을 실시하였으며 2차 배양시의 생존율은 각각 71.4%,

54.6%, 21.6%, 그리고 62.4%로 조사되었으며 부화율은 10.2%, 4.1%, 2.3%, 그리고 9.9%로 나타났다(Table 10). 이는 LNCEPOW 형질전환 닭의 생산에서 나타난 3%에 비해 매우 높은 수치로서, 외래 유전자의 발현이 지속적으로 일어나는 LNCEPOW 형질전환 닭에 비해 Tet system에 의해 hEPO 유전자의 발현이 유도적으로 일어나는 Tet-EPO 형질전환 닭에서의 생리적인 부작용이 적은 것을 나타내고 있다. 1차와 4차에 비해 2차와 3차의 생존율과 부화율이 저조한 이유는 실험 당시의 수정란의 상태와 부화기의 배양 조건이 적절하지 못했던 때문인 것으로 추정된다.

Table 10. Hatchability of virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Virus	Number of eggs injected	Number of embryos surviving on day 3 (%)	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%)
Tet1-EPO	109	64 (58.7)	15 (13.8)	13 (86.7)
Tet2-EPO I	147	105 (71.4)	15 (10.2)	6 (40.0)
Tet2-EPO II	97	53 (54.6)	4 (4.1)	4 (100.0)
Tet2-EPO III	171	37 (21.6)	4 (2.3)	4 (100.0)
Tet2-EPO IV	101	63 (62.4)	10 (9.9)	10 (100.0)
Total	625	322 (51.5)	48 (7.7)	37 (77.1)

(나) Tet1-EPO와 Tet2-EPO 형질전환 닭의 분자생물학적 분석

부화한 닭에서 *hEPO* 유전자의 전이 여부를 확인하기 위하여 genomic DNA를 분리한 후 *hEPO*와 hygromycin 저항성 유전자, 그리고 *GAPDH* 유전자에 대한 각각의 primer로 PCR을 실시하였다. *hEPO*와 *GAPDH* 유전자는 LNCEPOW 형질전환 닭의 실험에서 사용한 것과 동일한 서열의 primer이며 *Hygromycin resistance* gene에 대한 primer는 + strand primer인 5' -GCTCTCGATGAGCTGATGCTTTG-3' 와 - strand primer인 5' -TCTGCTGCTCCATACAAGCCAAC-3' 를 사용하였으며 증폭한 단편의 크기는

208 bp이다.

또한 전이된 *hEPO* 유전자의 발현을 유도하기 위하여 tetracycline 유도체인 doxycycline을 포함한 식이를 2주간 실시하고 일정 기간 사양 후 각 개체의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 ELISA를 실시하였다. ELISA는 단순 발현 유무만의 확인을 위한 handmade ELISA와, 보다 정확한 정량 분석을 위한 상용화된 ELISA kit를 사용하는 두 가지 방법을 사용하였다. 각 개체에서 혈액을 채취하여 혈청만 분리한 후 이 혈청을 대상으로 먼저 handmade ELISA를 실시하였다. 이 ELISA는 혈청 내 재조합 EPO를 standard(상용 표준품)와 함께 sandwich ELISA 방식을 수행하여 정량하였다. 먼저 human EPO primary antibody ($10 \mu\text{g/ml}$; Abcam Cat. No. ab20375)를 ELISA용 plate의 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣고 4°C 에서 16시간동안 방치한 후 비특이적인 결합을 예방하기 위하여 blocking buffer를 $150 \mu\text{l}$ 씩 각 well에 처리하였다. 실온에서 1시간동안 방치한 다음 standard (Cytolab/peprotech Asia, Cat. No. 300-23)와 각 sample들을 단계적으로 희석하여 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣어 주고 역시 1시간 동안 실온에서 보관한 후 biotinylated (Pierce Cat. No. 21925) detection Ab (Abcam Cat. No. ab20473)를 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 보관한 다음 1 : 1,000으로 희석한 streptavidin-HRP conjugate (BD Cat. No. 554066)를 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고 역시 실온에서 1시간 방치한 후에 TMB Solution을 각 well에 $50 \mu\text{l}$ 씩 분주하고, substrate (H_2O_2) solution을 $100 \mu\text{l}$ 씩 더 첨가한 후 발색 반응을 유도하였다. 약 20분 경과 후 발색반응이 일어나면 stop solution을 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 반응을 정지시키고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 SPSS 프로그램을 사용하여 정량을 수행하였다.

보다 정확한 분석을 위하여 Quantikine IVD Epo kit (R&D systems Cat. No. DEP00, USA)을 사용하여 ELISA를 수행하기도 하였다. 먼저 여러 단계로 희석한 standard와 혈액 sample을 plate의 각 well에 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣어서 실온에서 3시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였다. 각 well에 $200 \mu\text{l}$ 의 anti-hEPO-HRP conjugate를 더한 후 실온에서 1시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였으며 $200 \mu\text{l}$ 의 TMB substrate solution을 각 well에 더하여 빛을 차단시킨 상태로 실온에서 30분간 방치하였다. Stop solution을 더하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tet1-EPO 실험군에서는 부화한 병아리를 대상으로 PCR 방법으로 유전자의 전이를 확인한 결과, 15마리 중 13마리가 형질전환된 것으로 확인되었으며 형질전환율

은 약 86.7%로 LNCEPOW의 33.3%에 비해서 높은 것으로 나타났다(Fig. 23).

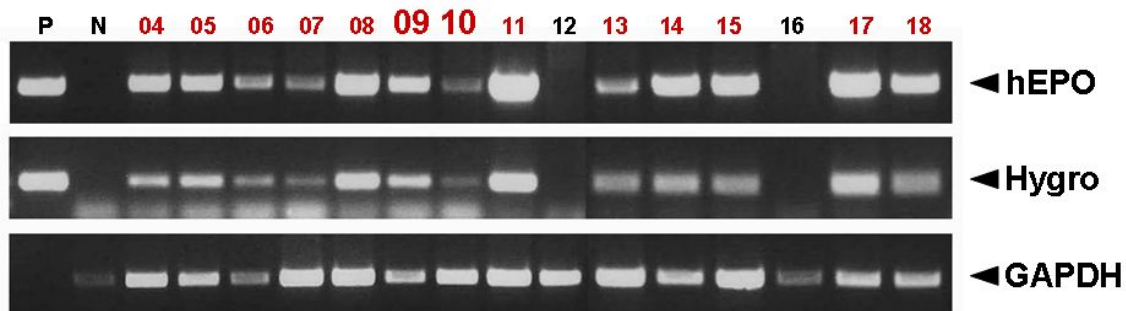


Fig. 23. PCR analyses of G0 Tet1-EPO transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 15 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Hygromycin resistance* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet1-EPO), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker.

각각의 형질전환율은 Tet2-EPO I에서는 40.0% (Fig. 24, Table 10), Tet2-EPO II에서는 100%(Fig. 25, Table 2), Tet2-EPO III에서는 100% (Fig. 26, Table 10), 그리고 Tet2-EPO IV에서는 100% (Fig. 27, Table 10)로 확인되었으며 Tet1-EPO 실험군과 마찬가지로 LNCEPOW에 비해서 높은 형질전환율을 나타내었다. Tet2-EPO I 실험군에서는 부화한 15마리 중에서 6마리가 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 24)

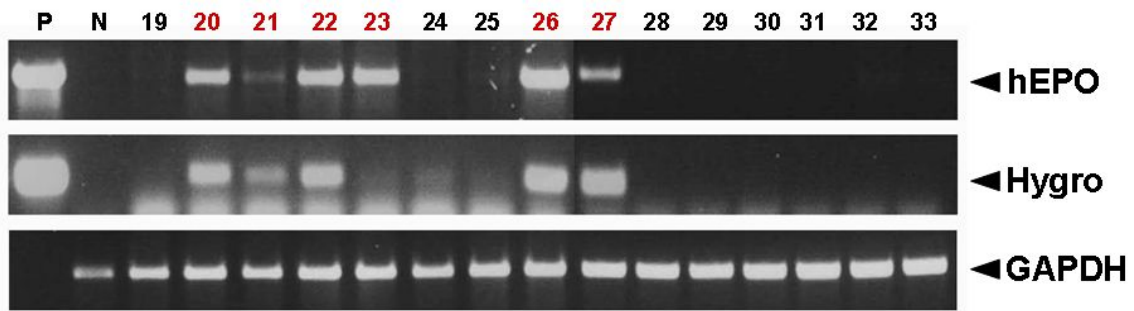


Fig. 24. PCR analyses of G0 Tet2-EPO I transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 15 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Hygromycin resistance* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker.

Tet2-EPOII 실험군에서는 4마리가 부화하였는데 4마리 모두 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 25).

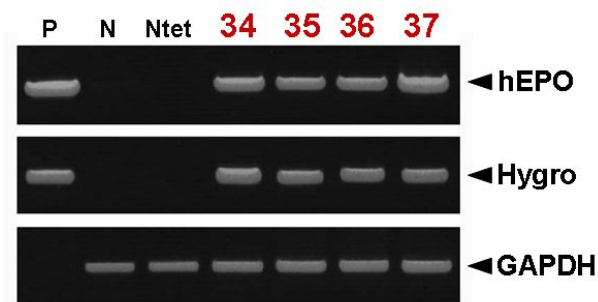


Fig. 25. PCR analyses of G0 Tet2-EPOII transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 4 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Hygromycin resistance* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker.

Tet2-EPOIII 실험군에서도 4마리가 부화하였는데 4마리 모두 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 26).

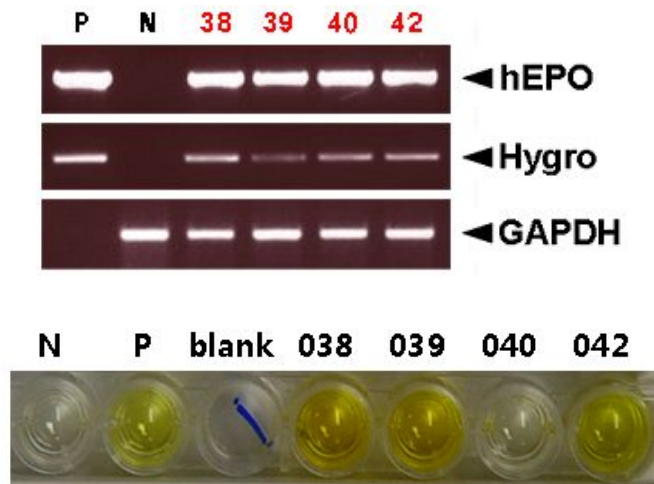


Fig. 26. PCR and ELISA analyses of G0 Tet2-EPOIII transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 4 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Hygromycin resistance* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker. The detection of hEPO secreted into blood of chicken measured ELISA after feeding with doxycycline for 14 days.

Tet2-EPOIV 실험군에서는 부화한 10마리 모두 PCR 분석에서 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 27). Tet2-EPOIII와 Tet2-EPOIV 실험군의 혈청을 대상으로 handmade ELISA를 실시한 결과, PCR 결과에서와 마찬가지로 형질전환 개체로 판명된 닭의 혈청에서는 모두 양성 반응을 나타내었다(Fig. 26, Fig. 27).

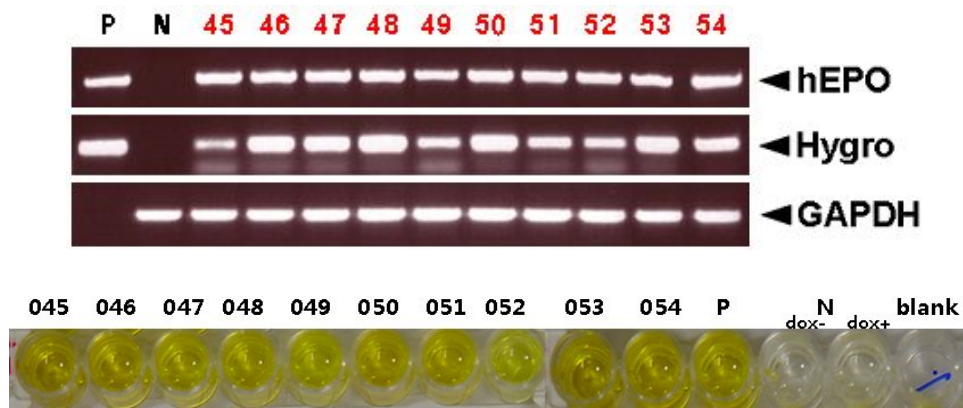


Fig. 27. PCR and ELISA analyses of G0 Tet2-EPOIV transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 10 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Hygromycin resistance* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker. The detection of hEPO secreted into blood of chicken measured ELISA after feeding with doxycycline for 14 days.

Handmade ELISA 결과 hEPO의 발현이 확인된 Tet-EPO의 개체 중 무작위로 선정된 2마리와 형질전환 개체로 판명된 Tet2-EPOII 4마리의 혈청을 이용하여 보다 정확한 정량적 분석을 위한 ELISA를 실시하였다. 그 결과, Tet-EPO의 개체인 006과 007에서는 혈청 내 hEPO의 농도가 각각 2.864 IU/ml, 1.647 IU/ml로 나타났으며, Tet2-EPO에서는 3.064 IU/ml로 나타난 035 개체를 제외하고 나머지 개체에서는 200 IU/ml에서 800 IU/ml의 고농도의 hEPO를 포함하는 것으로 확인되었다(Fig. 28). 따라서 Tet1-EPO에 비해 Tet2-EPO virus vector system이 외래 유전자의 발현 조절에 더 적합한 것으로 판단되었다. Doxycycline이 첨가된 식이에 의해 hEPO가 발현된 닭은 안면부 전체에 홍조를 나타내었으며 특히 안구가 정상 닭에 비해 매우 붉은 것으로 확인되었다(Fig. 29).

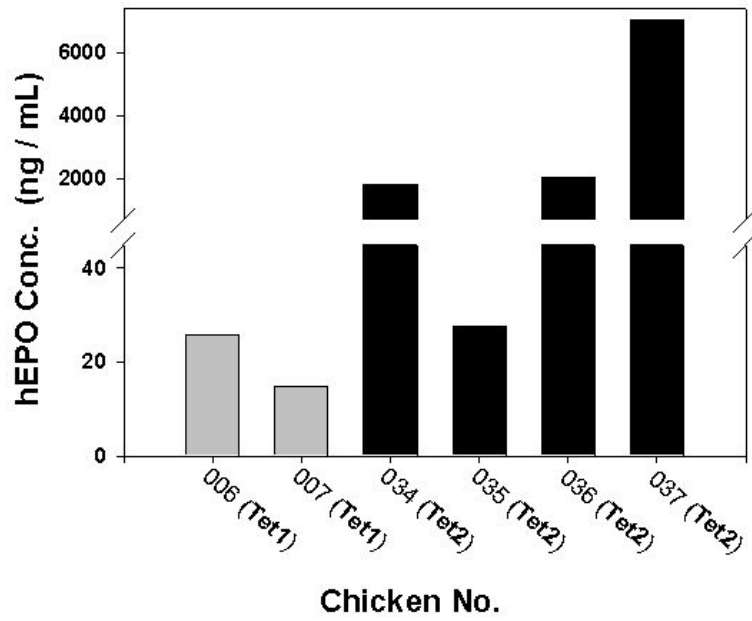


Fig. 28. ELISA analyses of G0 Tet-EPO transgenic chickens.



Fig. 29. Tet1-EPO transgenic chicken.

(다) Tet2-EPO 형질전환 닭에서 *hEPO* 유전자의 유도적 발현 여부 확인

형질전환 닭에서 Tet system을 이용한 유전자의 유도적 발현이 가역적으로 일어나는 지를 확인하기 위하여 Tet2-EPO IV 실험군의 닭을 대상으로 하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 각 개체의 혈액을 채취하여 혈장을 분리한 후 Quantikine IVD Epo kit (R&D systems Cat. No. DEP00, USA)을 사용하여 ELISA를 실시하였다. 이는 대조군으로 유전자 발현 유도 전의 상태에서의 hEPO 발현 양을 측정하기 위함이다. 전이된 *hEPO* 유전자의 발현을 유도하기 위하여 tetracycline 유도체인 doxycycline을 사료 100g 당 50 mg의 농도로 첨가한 식이를 2주간 실시한 후 각 개체의 혈액을 채취하여 ELISA를 실시하였으며 이후 doxycycline을 첨가하지 않은 식이를 하며 각각 2주, 4주 후에 닭의 혈액을 채취하여 혈장 내의 hEPO 농도의 변화를 ELISA 방법으로 측정하였다. 실험 결과, doxycycline을 제거한 일주일 후 혈장의 hEPO 농도는 doxycycline을 처리하기 전의 혈장 내 농도와 거의 근접한 수치로 저하되었으며 2주 후에는 hEPO의 농도가 거의 나타나지 않았다(Fig. 30). 따라서 본 연구에 적용된 유전자 전이 system인 Tet system은 유전자 발현 조절이 매우 신속하고 효율적으로 일어남을 확인할 수 있었으며 이 system에 의해 생산된 형질전환 닭은 외래 단백질 발현에 의한 생리적인 부작용을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

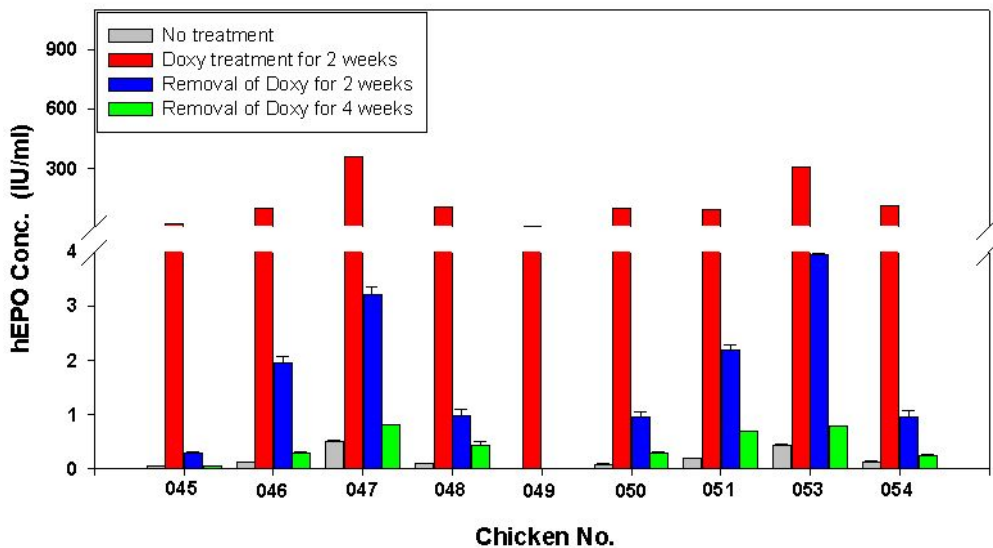


Fig. 30. ELISA analyses of G0 Tet-EPO IV transgenic chickens.

(라) Tet2-EPO 형질전환 닭의 혈장으로 분비된 hEPO의 생물학적 활성 검정

형질전환 개체 중 047번과 053번 닭을 대상으로 혈장으로 분비된 hEPO의 생물학적 활성을 검정하고자 하였다. 이에 두 개체를 3주간 식이 1 Kg 당 doxycycline이 2g 농도로 첨가된 식이를 실시한 후 각 개체의 혈액을 채혈하였다. ELISA를 실시하기 전에 닭의 혈장을 5배 용량의 PBS와 혼합하여 준비한 후, 동량의 포화암모늄 용액과 반응시켜서 1시간동안 교반하였다. 이 반응액을 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리한 후 centricon (M.W. 10,000)을 이용하여 농축하였다. 다시 PBS를 첨가하여 washing함으로써 반복적으로 염을 제거하고 적절한 용량으로 준비하여 ELISA를 실시하였다. 염을 제거하는 과정을 거치기 전의 농도에 비해서 매우 저하되었으나(Fig. 31) 이 과정을 거치지 않은 혈장을 그대로 사용하여 bioassay에 적용할 경우 TF-1 세포가 모두 사멸하는 것으로 확인되었으므로 농도가 낮지만 염이 제거된 혈장을 생물학적 활성 측정 실험에 사용하였다.

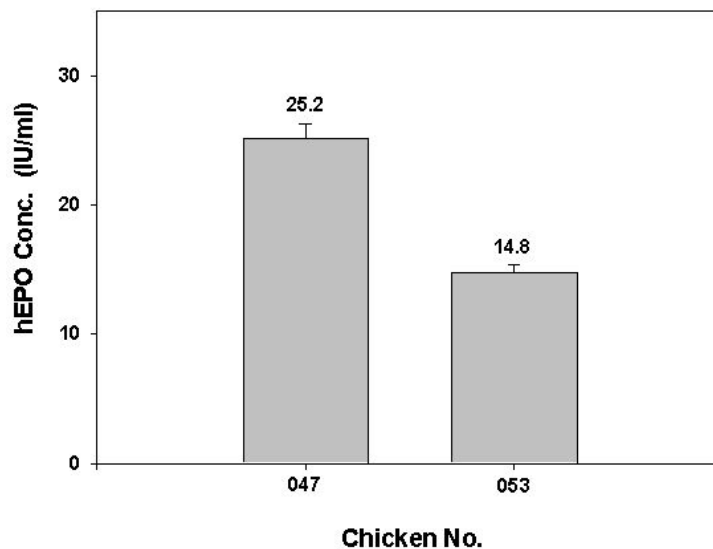


Fig. 31. ELISA analysis of hEPO in purified transgenic chicken serum.

ELISA 결과를 토대로 하여 standard와 sample을 동일한 농도로 보정하여 세포에서 발현된 hEPO의 경우와 동일한 방법으로 닭 혈장에 포함된 hEPO의 생물학적 활성을 측정하였다. 그 결과, 상업적으로 시판되고 있는 재조합 EPO에 비해서 높은 활성을 나타내는 것으로 확인되었으며(Fig. 32), 형질전환을 하지 않은 개체에서 채취한 혈장은 TF-1 세포의 증식에 전혀 영향을 나타내지 못하였다.

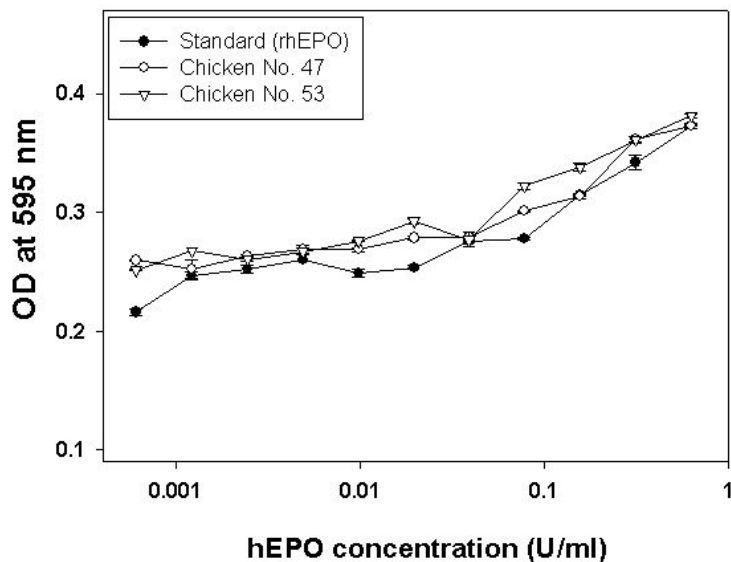


Fig. 32. The biological activity of hEPO produced in transgenic chickens serum or standard rhEPO.

(2) Tet2-EPO 형질전환 닭의 G1 세대의 생산 및 분자생물학적 분석

(가) G0 Tet2-EPO 형질전환 닭의 germline transmission 여부 확인

형질전환 개체 중 성숙이 일어난 수컷만을 선별하여 sperm을 채취한 후 genome DNA를 분리하여 PCR을 실시하였다. hEPO 유전자에 특이적인 primer는

+ strand primer인 5'-ATGGGGGTGCACGAATGTCC-3'와 - strand primer인 5'-TCATCTGTCCCCTGTCCTGCA-3'을 사용하였으며 증폭 단편의 크기는 582 bp이다. 총 PCR 반응 cycle 수는 35이며 각 cycle 당 reaction mixture를 94°C에서 30초, 54°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초로 반응시켰다. *Hygromycin resistance gene*에 대한 primer는 5'-GCTCTCGATGAGCTGATGCTTTG-3'와 5'-TCTGCTGCTCCATACAAGCCAAC-3'를 사용하였으며 증폭한 단편의 크기는 208 bp이며 WPRE 서열에 대한 primer는 5'-CTCCTTTCCGGACTTTCGCTTTC-3'와 5'-CAGCCATGGAAAGGACGTCA GCTT-3'를 사용하였으며 증폭 단편은 150 bp의 크기를 가진다. 대조군으로 닭의 *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)* 유전자에 대한 primer는 5'-TGATGCCCCCATGTTTGTGA-3' 과 5'-CAAGAAGGGAACACGCAGGG-3'를 사용하였으며 691 bp의 band가 증폭되었다. PCR을 실시한 결과, Tet2-EPO II 실험군에서 1마리(chicken no. 034)와 Tet2-EPO IV 실험군에서 8마리(chicken no. 046 ~ 051, 053, 054)가 외래 유전자가 전이된 sperm을 가진 것으로 판명되어(Fig. 33, 34) 이 중 034번과 047번 개체를 wild type의 암컷과 교미하여 G1을 생산하고자 하였다.

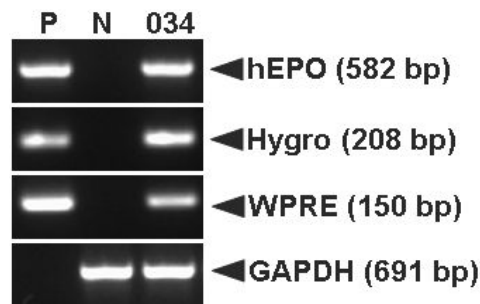


Fig. 33. PCR analyses of G0 Tet2-EPO II transgenic chickens in sperm DNA. Detection of the *hEPO* gene in the germlines of G0 male transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of nine G0 male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Hygromycin resistance*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively. M, molecular size marker.

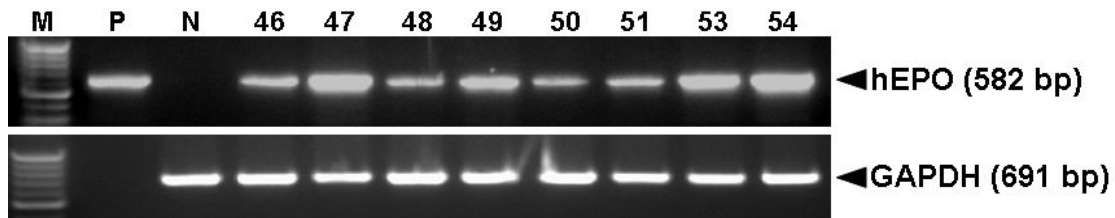


Fig. 34. PCR analyses of G0 Tet2-EPO IV transgenic chickens in sperm DNA. Detection of the *hEPO* gene in the germlines of G0 male transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of nine G0 male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively. M, molecular size marker.

(나) G1 세대의 Tet2-EPO 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

G0인 034 개체와 교미한 암탉들이 산란한 225개 유정란 중 139개가 부화하였고, 부화한 병아리 중 1마리가 형질전환된 것으로 확인되었다(Table 11, Fig. 35). 047 개체로부터 생산된 413개의 계란 중 273개가 부화하였으며 그 중 5마리가 G1 형질전환 개체로 확인되었다(Table 11, Fig. 35).

Table 11. Germline transmission rates from G0 founder roosters

Rooster No.	Hatchability	Number of transgenic chicks/total offspring*
034	139/225 (61.8%)	1/139 (0.7%)
047	273/413 (66.1%)	5/273 (1.8%)
Total	412/638 (64.6%)	6/412 (1.5%)

*Transgenic chicks were identified by PCR analysis.

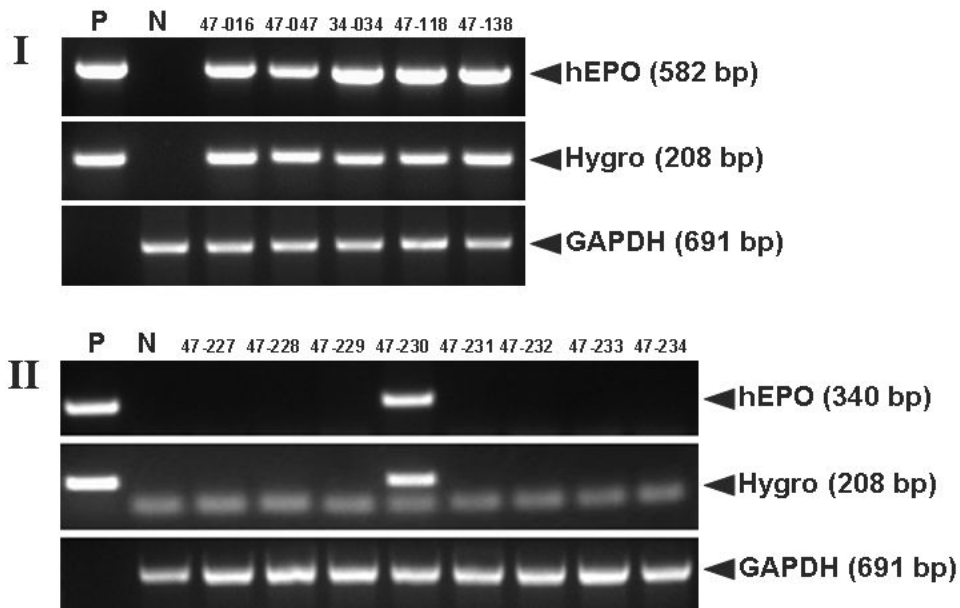


Fig. 35. Detection of the *hEPO* gene in the germlines of transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of G1 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Hygromycin resistance* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker.

Genomic DNA PCR 결과에서 형질전환 개체로 확인된 G1 Tet2-EPO 형질전환 닭 중 chicken no. 047-016, 047-047, 그리고 047-118 닭을 대상으로 외래 유전자의 도입 copy 수를 확인하기 위하여 Southern blotting을 실시하였다. 먼저 각 개체의 혈액으로부터 G-Dex II genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 각 개체에서 채취한 genomic DNA 20ug을 HindIII와 Nde I 제한효소로 각각 처리한 후 0.8% agarose gel에 전기영동을 실시하였다. Agarose gel을 통하여 분리된 genomic DNA를 positively-charged nylon membrane (Roche, Germany)에 transfer한 후, hEPO probe를 이용하여 hybridization 과정을 거치고, DIG luminescent detection kit

(Roche, Germany)을 이용하여 X-ray film에 현상하여 결과를 확인하였다. *hEPO* 유전자에 대한 probe는 PCR DIG Probe Synthesis kit (Roche, Germany)을 이용하여 제작하였으며, probe의 합성에 사용한 primer는 5' ATGGGGGTGCACGAATGTCC3' upstream primer와 5' TCATCTGTCCCCTGTCCTGCA3' downstream primer를 이용하였다. Genomic DNA 상에 삽입된 provirus 내의 *hEPO* 서열의 양쪽 말단을 *Nde* I 으로 절단하여 *hEPO* probe를 사용하여 확인한 결과, 모든 sample에서 band를 확인하였으며 각 band가 비슷한 density를 나타내어 모두 동일한 copy 수의 provirus가 삽입되었을 것으로 추정되었다. 뿐만 아니라 genomic DNA 상의 provirus의 단일 말단을 절단할 수 있는 *Hind*III를 처리하여 모든 개체에서 단일 band를 확인하였는데, 이는 모든 G1 개체들의 genomic DNA 상에 1 copy의 provirus가 삽입되었음을 보여주는 결과이다(Fig 36).

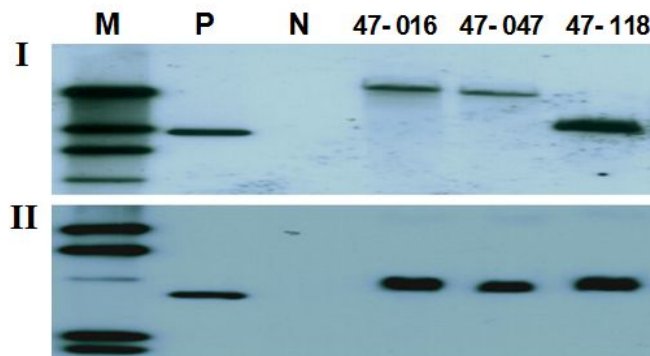


Fig. 36. Southern blot analysis of G1 transgenic chickens. Genomic DNA of chickens was digested with *Nde* I (I) or *Hind*III (II) and hybridized with the *hEPO* gene probe. *Nde* I cuts both ends of the provirus DNA, while *Hind*III makes only a single cut within the same DNA sequence. Lane M, molecular size markers; lane P, pTet2-EPO plasmid DNA; lane N, nontransgenic control chick; lanes 1, 2, and 3, three transgenic G1 chickens (#047-G1-016, #047-G1-047, and #047-G1-118 respectively) sired by a transgenic G0 rooster (chicken #047).

(다) Tet2-EPO 형질전환 닭 G₁에서의 *hEPO* 유전자의 유도적인 발현 양상 확인

Tet2-EPO G₁ 닭의 *hEPO* 유전자의 유도적인 발현 양상을 확인하기 위하여 047-016 개체와 047-118 개체의 식이에 1 Kg 당 doxycycline 2g을 첨가한 농도로 식이를 실시하였다. 3주간 식이를 실시하였으며 3주 후부터는 doxycycline이 첨가된 식이를 중지하고 16일 후와 30일 후의 혈액 내의 hEPO 농도 변화 양상을 ELISA 방법으로 확인하였다. 그 결과, 047-016 개체에서는 doxycycline이 첨가된 식이를 하는 동안 혈장 내 hEPO의 농도가 지속적으로 증가하는 양상을 나타내었으며 식이 3주차에는 약 300 IU/ml의 높은 농도를 나타내었다(Fig. 37). 이에 비해 047-118 개체는 doxycycline이 첨가된 식이를 3주간 실시한 후 보다 약 2주 후의 혈장 내 hEPO 농도가 높게 나타났다(Fig. 37). Doxycycline이 첨가되지 않은 식이를 4주간 다시 실시한 후 hEPO의 혈중 농도를 측정된 결과, 047-016 개체는 doxycycline을 공급하기 전의 혈중 농도에 비해 높은 농도를 나타내었는데 비해 047-118 개체는 doxycycline이 첨가되지 않은 식이 2주 후의 혈중 hEPO 농도가 doxycycline을 공급하기 전의 혈중 농도 수준으로 감소된 것을 확인하였다(Fig. 37). 이는 047-118 개체의 *hEPO* 유전자의 발현 조절이 047-016 개체에 비해 신속하고 가역적으로 일어나고 있음을 보여주는 결과이다.

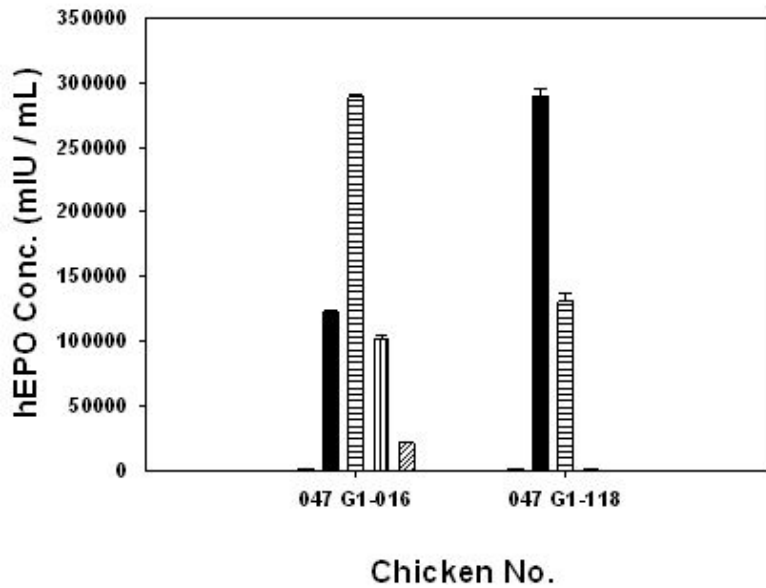


Fig. 37. Inducible expression of the *hEPO* gene in the G1 transgenic chickens. The levels of hEPO secreted into the blood of 16-18 week-old chicken measured ELISA as described in the Materials and methods. □ (day 0), ■ (day 16), and ▨ (day 21) indicated hEPO concentration in serum of G1 transgenic chicken was fed with doxycycline for 21 days (from day 0 to day 21). ▩ (day 37) and ▤ (day 51) indicated hEPO concentration in serum of G1 transgenic chicken was fed with doxycycline-free for the remaining period (from day 22 to day 51).

Doxycycline을 이용한 Tet system의 외래 유전자의 발현 유도 실험에 있어서 유도체인 doxycycline의 공급 방법으로 주사제로 공급하는 경우와 식이로 공급하는 경우가 주로 사용되고 있다. 본 연구에서는 각 개체에 이러한 방법을 각 개체에 개별적으로 적용함으로써 보다 효율적인 유전자의 발현 유도 방법을 확립하고자 하였으며, 이의 일환으로 두 개체의 계란의 난백에서의 hEPO 농도 변화를 통해 유전자의 발현 유도 양상을 관찰하고자 하였다. 먼저 047-016 개체는 doxycycline을 체중 1 Kg 당 20mg의 농도로 2일 간격으로 피하주사를 실시하였으며 047-118 개체는 식이 1 Kg 당 doxycycline을 2g 농도로 첨가하여 식이를 실시하였다. 그 결과, 047-118 개체가 산란한 계란의 난백에 포함된 hEPO 농도가 047-016 개체의 경우

보다 높게 나타났다(Fig. 38). Doxycycline이 첨가된 식이를 실시한 지 15일 경과 후부터 계란의 hEPO 농도가 증가하는 양상을 나타내었으며 doxycycline을 제거한 식이를 공급한 후 약 일주일 동안은 hEPO의 농도가 어느 정도 유지가 되었다가 그 이후로 발현 유도 전의 농도로 저하되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 38). 이상의 결과로 미루어 보아, doxycycline을 이용한 외래 유전자의 발현 유도시 주사 방법보다는 식이를 통해서 공급하는 방법이 보다 효율적이며 doxycycline이 들어 있지 않은 식이를 하더라도 개체 내에 잔존한 doxycycline에 의해 발현이 일정 기간 유지되는 것을 알 수 있었다.

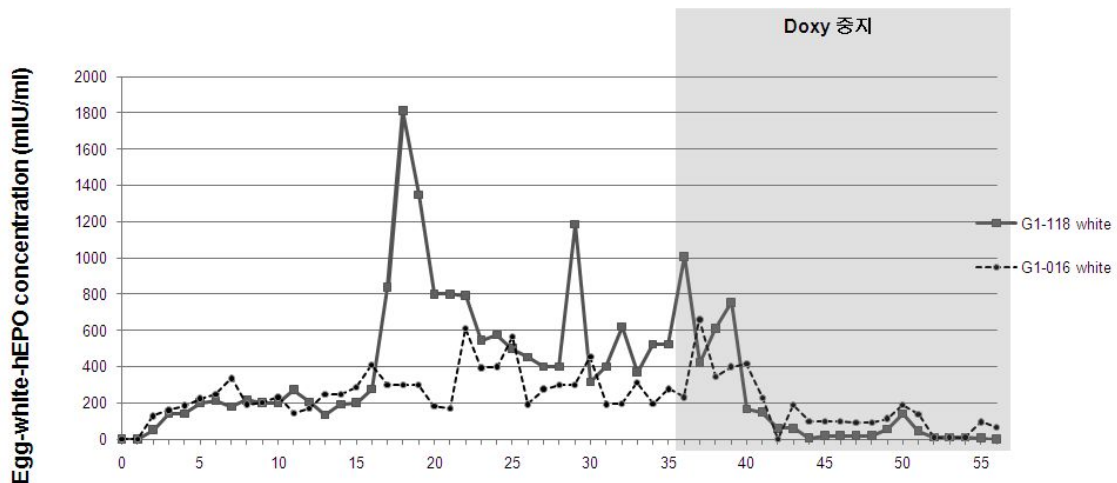


Fig. 38. Expression of the *hEPO* gene in the G1 transgenic chickens fed doxycycline. The levels of hEPO secreted into the egg-white of 16-18 week-old chicken measure ELISA as described in the methods. Solid and dotted lines indicate hEPO concentration in egg-white of 047-118 and 047-016, respectively. The chicken was fed with doxycycline for 35 days (from day 0 to day 35), then fed with doxycycline-free for the remaining period (from day 36 to day 56) marked in grey.

(3) Tet2-EPO 형질전환 닭의 계통 확립

(가) G2 세대의 Tet2-EPO 형질전환 닭의 생산

생산된 G1 중 성숙이 된 047-016 암컷 개체를 정상 수컷과 교미하여 G2를 생산하였다. 현재까지 9마리의 G2가 부화하였으며 PCR을 실시한 결과 5마리가 형질전환 개체인 것으로 확인되었다(Table 12, Fig. 39). 047-047 G1 수컷 개체는 정상 암컷들과 교미하여 200마리의 G2를 생산하였으며, 이 중 104마리가 형질전환된 G2 개체로 확인되었다(Table 12, Fig. 40).

Table 12. Germline transmission rates from G₁ transgenic chickens

Chicken No.	Hatchability (%)	Number of transgenic chicks/total offspring* (%)	Number of transgenic chickens surviving at present (chicken no.)
047-016 (♀)	9/14 (64.3)	5/9 (55.6)	1 (016-008)
047-047 (♂)	200/226 (88.5)	104/200 (52.0)	21 (047-014, 018, 024, 037, 054, 057, 082, 085, 086, 087, 092, 096, 104, 106, 110, 139, 147, 148, 153, 157, 189)
Total	209/240 (87.1)	109/209 (52.2)	22

*Transgenic chicks were identified by PCR analysis.

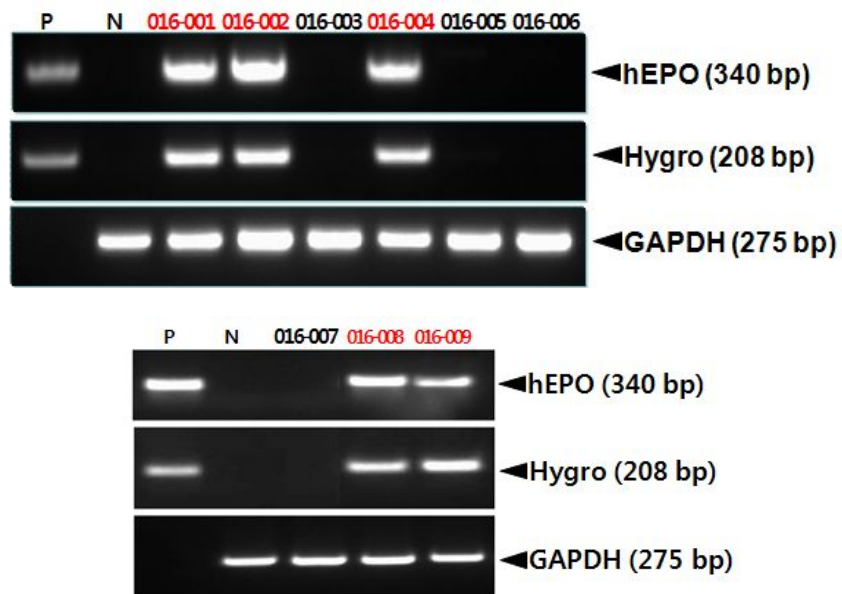
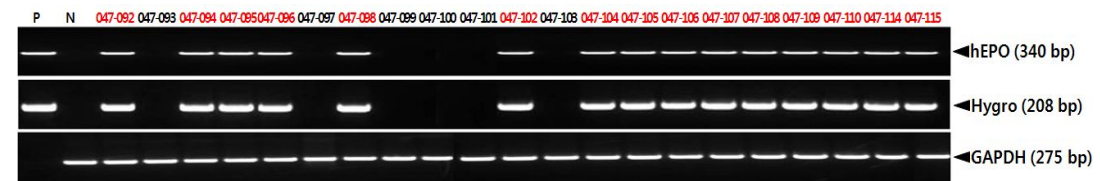
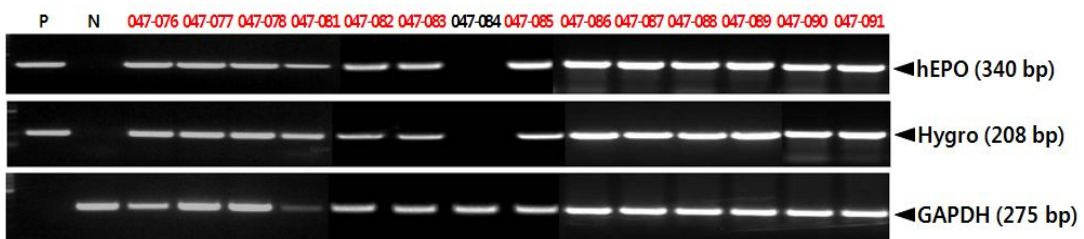
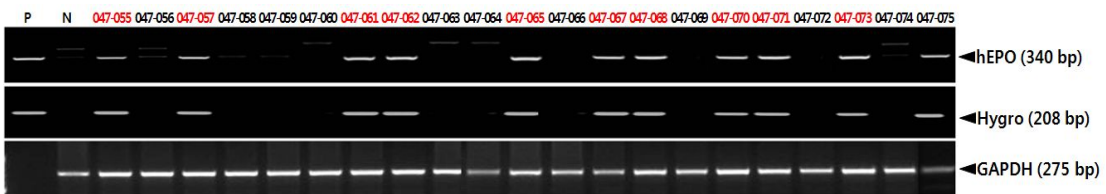
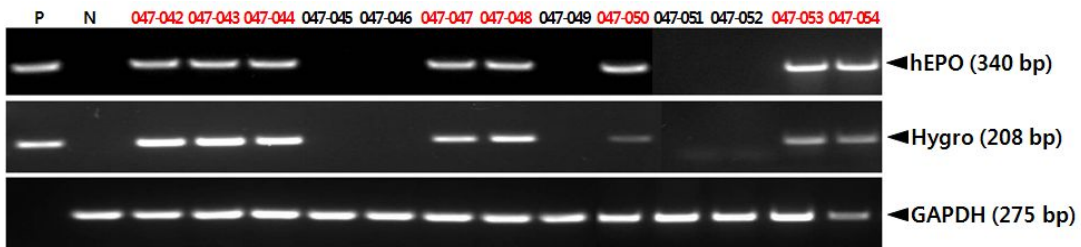
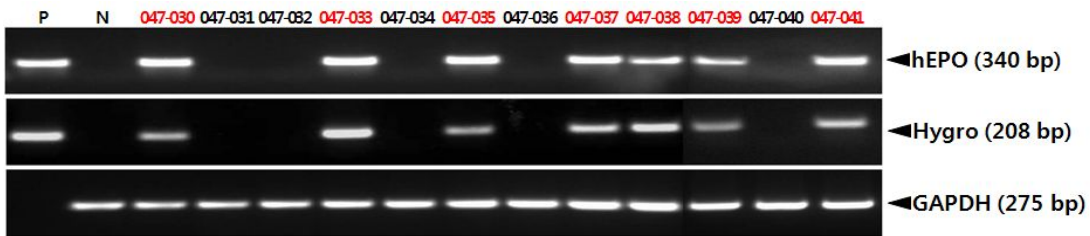
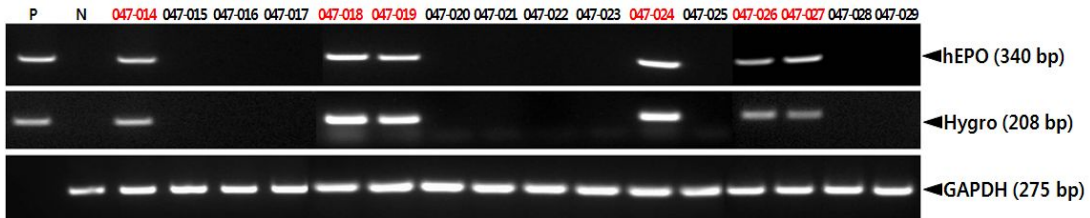
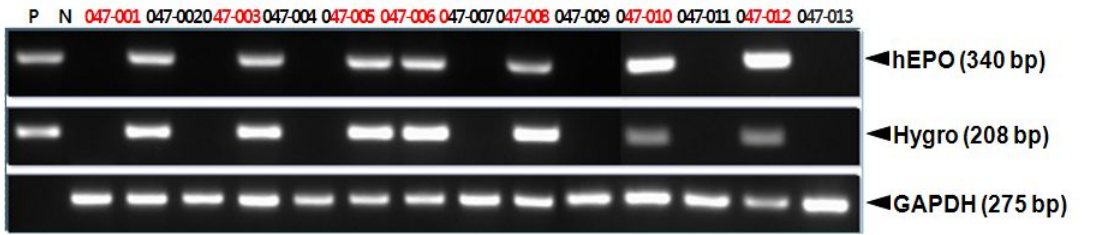


Fig. 39. Detection of the *hEPO* gene in the germlines of 047-016 G2 transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of G2 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Hygromycin resistance*, and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.



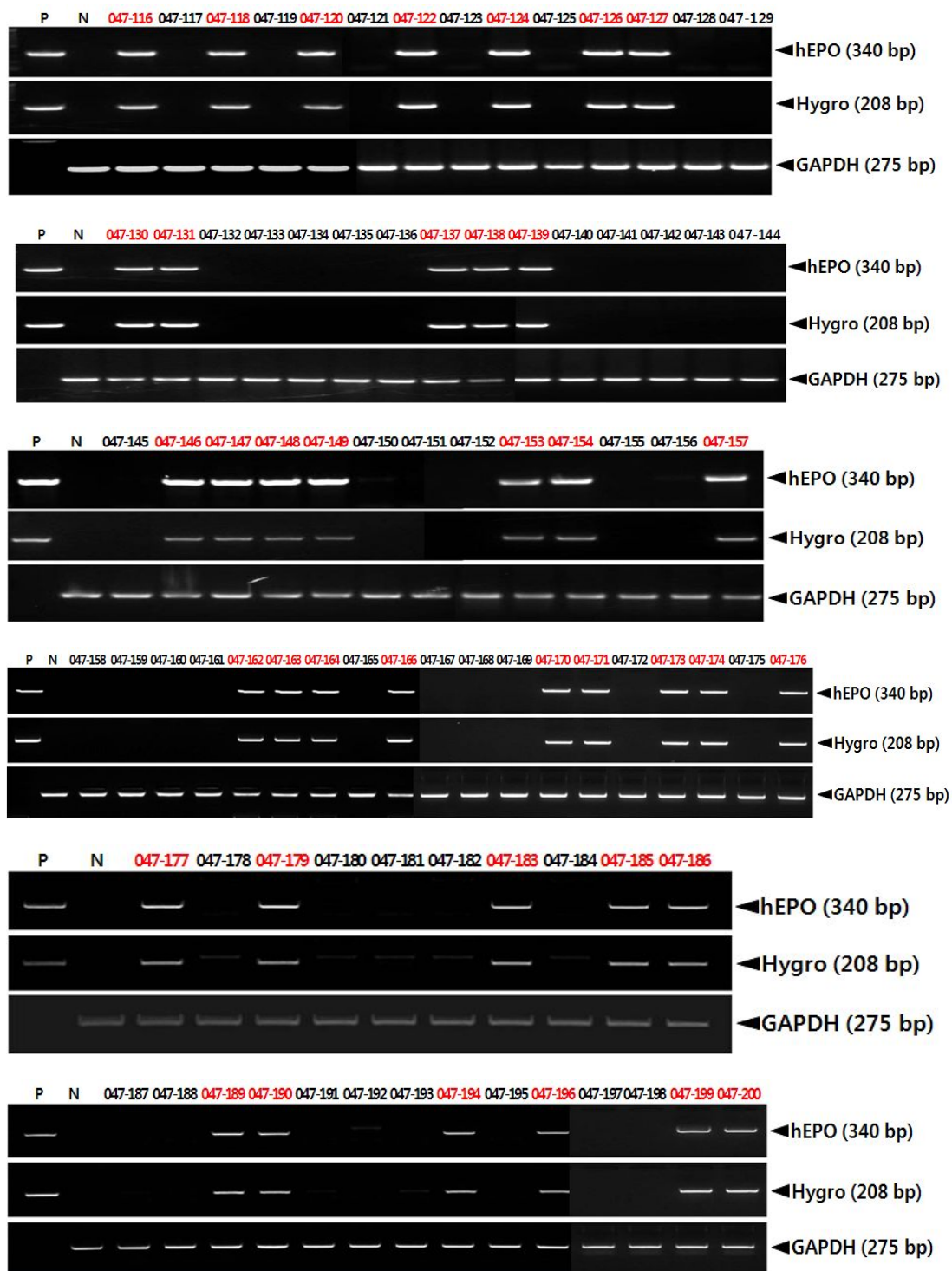


Fig. 40. Detection of the *hEPO* gene in the germlines of 047-047 G2 transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of G2 hatched chickens and was subjected to PCR analyses. The expected sizes of the PCR products for

the *hEPO*, *Hygromycin resistance*, and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

G2 형질전환 개체 중 무작위로 선별한 047-016-008, 047-046-018, 047-047-037 세 마리 개체는 식이 1 Kg 당 doxycycline을 2g 농도로 첨가하여 2주간 식이를 실시하였다. 이 후 각 개체의 혈청 및 계란을 수거하여 hEPO를 분리하여 TF-1 세포를 이용한 bioassay를 실시하였다. TF-1 세포는 60 mm dish에 1×10^6 의 수로 seeding하여 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 doxycycline이 첨가된 배지에서 48시간 배양하였으며 배양 배지에 포함된 hEPO 함량은 ELISA 방법을 이용하여 정량하였다. TF-1 세포는 10% FBS와 2 ng/ml의 rhGM-CSF가 첨가된 RPMI-1640 배지에서 키운 후 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 로 cell count하여 96 well microplate에 50 μl 씩 첨가하였다. Standard와 sample을 40 IU/ml의 동일한 농도로 보정하여 2-fold serial dilution을 한 후 각 well에 50 μl 씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 48시간동안 반응시켰다. 각 well에 MTT labeling reagent를 10 μl 씩 첨가한 후 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 반응시킨 다음 solubilization solution을 각 well에 100 μl 씩 첨가하여 16시간동안 방치하였다. 반응이 종결된 plate는 microplate reader로 595nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 각 형질전환 개체의 혈청과 계란의 난백에서 분리한 hEPO는 대조구에 비해서 보다 우월한 생물학적 활성을 나타내었으며 특히 047-047-037 개체에서 발견된 hEPO의 활성이 가장 우수하였다(Fig. 41, Fig 42).

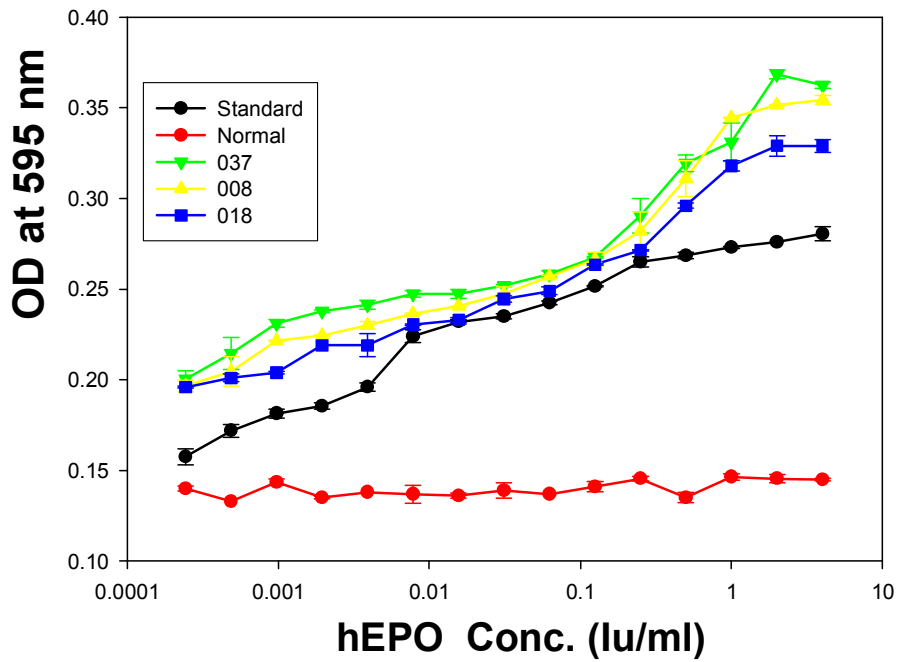


Fig. 41. Bioassay of hEPO produced in G2 Tet2-EPO transgenic chickens serum or standard rhEPO on the proliferation of TF-1 cells. Various concentration of hEPOs were added to each well, and the incubation was continued for a further 2 day.

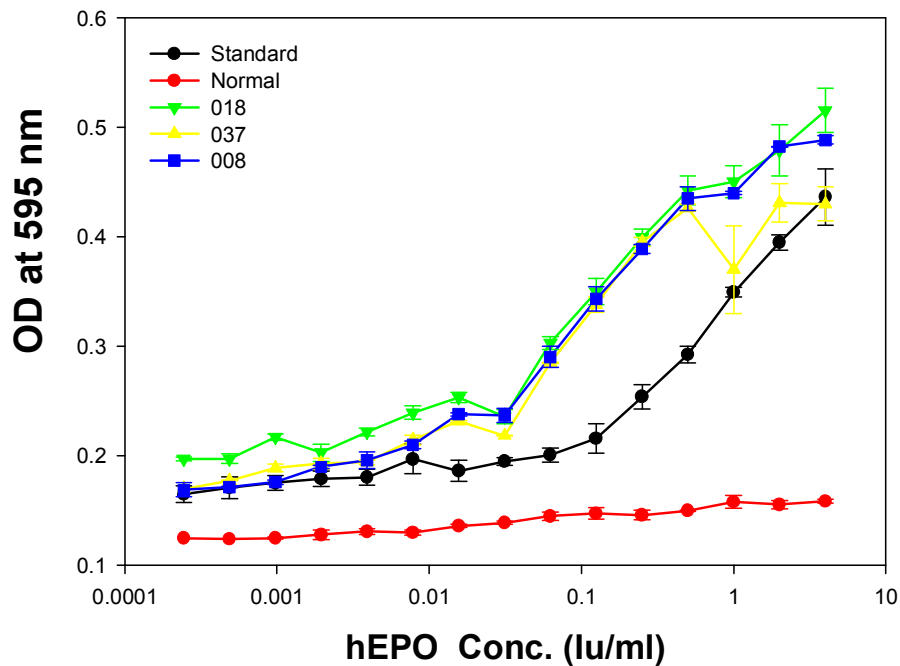


Fig. 42. Bioassay of hEPO produced in G2 Tet2-EPO transgenic chickens egg white or standard rhEPO on the proliferation of TF-1 cells. Various concentration of hEPOs were added to each well, and the incubation was continued for a further 2 day.

(나) G3 세대의 Tet2-EPO 형질전환 닭의 생산

생산된 G2 중 양성숙이 된 047-016-018 암컷 개체를 정상 수컷과 교미하여 G3를 생산하였다. 부화한 개체를 대상으로 PCR을 실시한 결과 현재까지 1마리가 형질전환 개체인 것으로 확인되었다(Table 13, Fig. 43). 047-047-014 G2 수컷 개체는 정상 암컷들과 교미하여 126마리의 G3를 생산하였으며, 이 중 73마리의 형질전환된 G3를 생산하였다(Table 13, Fig. 43). 현재 생존하고 있는 개체는 17마리이다. 047-047-018 G2 수컷 개체도 정상 암컷들과 교미하여 5마리의 G3를 생산하였으며, 이 중 한 마리가 형질전환 개체로 확인되었으나 얼마되지 않아 폐사하였다.

Table 13. Germline transmission rates from G2 transgenic chickens

Chicken No.	Hatchability (%)	Number of transgenic chicks/total offspring*(%)	Number of transgenic chickens surviving at present (chicken no.)
047-016-008 (♀)	1/15 (6.7)	1/1 (100)	1 (008-001)
047-047-014 (♂)	126/176 (71.6)	73/126 (57.9)	17 (014-005, 006, 018, 030, 042, 056, 058, 061, 074, 075, 090, 095, 099, 108, 109, 114, 116)
047-047-018 (♂)	5/6 (83.3)	1/5 (20.0)	0
Total	132/187 (70.6)	75/132 (56.8)	18

*Transgenic chicks were identified by PCR analysis.

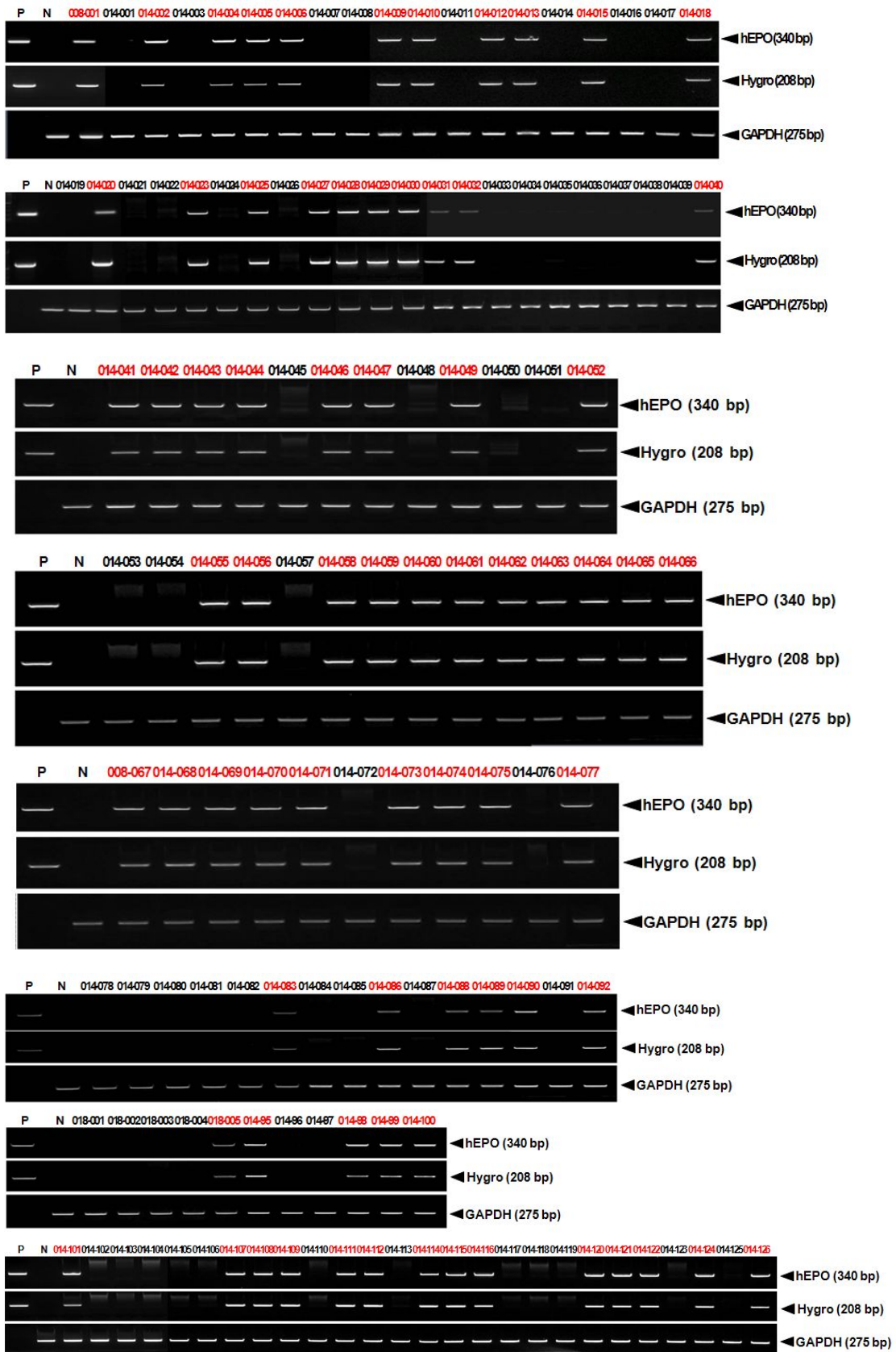


Fig. 43. Detection of the *hEPO* gene in the germlines of 047-016-008, 047-047-014, and 047-047-018 G2 transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of G3 hatched chickens and was subjected to PCR analyses. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Hygromycin resistance*, and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(다) G4 세대의 Tet2-EPO 형질전환 닭의 생산

생산된 G3 중 성숙이 된 047-047-014-014 G3 수컷 개체는 정상 암컷들과 교미하여 97마리의 G4를 생산하였으며, 모든 개체가 형질전환된 것으로 확인되었다(Table 14, Fig. 44). 현재 생존하고 있는 개체는 79마리이다.

Table 14. Germline transmission rates from G3 transgenic chickens

Chicken No.	Hatchability (%)	Number of transgenic chicks/total offspring* (%)	Number of transgenic chickens surviving at present
047-047-014 -014 (♂)	97/138 (70.3)	97/97 (100.0)	79

*Transgenic chicks were identified by PCR analysis.

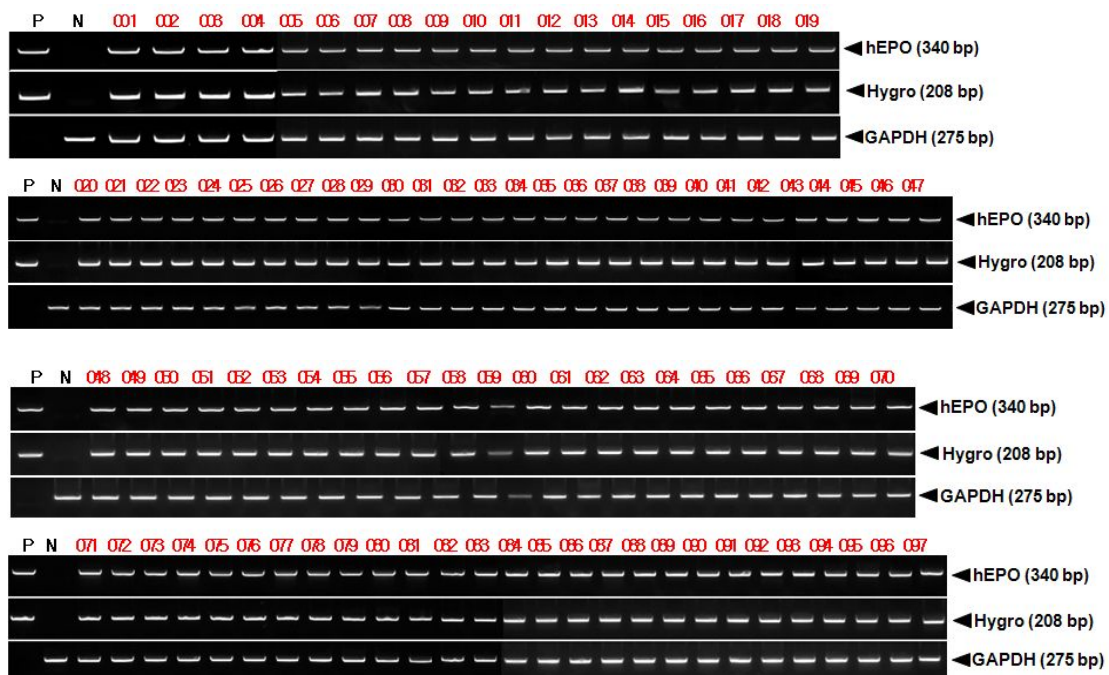


Fig. 44. Detection of the *hEPO* gene in the germlines of 047-047-014-014 transgenic chicken. Genomic DNA was isolated from the blood of G4 hatched chickens and was subjected to PCR analyses. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Hygromycin resistance*, and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

이상의 결과를 바탕으로 Tet2-hEPO 형질전환 닭의 계통이 완전히 확립된 것으로 판단된다.

바. 난관조직 특이적으로 hEPO가 발현되는 형질전환 닭의 생산

(1) Ovalbumin promoter가 도입된 retrovirus vector의 구축

형질전환 개체에 있어서 외래 유전자의 발현이 생리적인 부작용을 나타내는 경우가 많다. 이를 해결하기 위해서 Tet system 등의 유도적 발현 system을 도입하는 방법 외에 특정 조직에 국한되어 외래 유전자가 발현되도록 하는 조직특이적 promoter를 vector system에 도입하는 방법이 있다. 이에 본 연구에서는 hEPO를 계란의 난백에 분비되도록 하기 위하여 난관조직 특이적인 promoter인 ovalbumin promoter를 도입하였다. Ovalbumin promoter는 *ovalbumin* 유전자의 +1 위치에서 5' 방향으로 3.2 Kb와 3.6 Kb, 그리고 4.2 Kb를 각각 cloning하였으며 이를 pLNCXW의 CMV promoter를 제거한 위치에 도입하여 pLNOv32XW, pLNOv36XW, 그리고 pLNOv42XW를 구축하였다. 구축한 각 vector의 promoter의 3' 위치에 *hEPO* 유전자를 도입하고자 하였다. 먼저 EcoR I 과 Mungbean Nuclease를 처리한 pGEM-Teasy-hEPO plasmid에서 분리한 *hEPO* 유전자를 Hpa I 과 CIP를 처리한 pLNOv32XW와 재조합하여 pLNOv32EPOW를 구축하였다(Fig. 45). 3.6 Kb ovalbumin promoter의 3' 위치에 *hEPO* 유전자를 도입한 구조의 pLNOv36EPOW는 pLNOv36XW와 pGEM-Teasy-hEPO를 동일한 제한효소인 Mlu I 과 BamH I 를 처리하여 재조합함으로써 구축하였다(Fig. 46). pLNOv42EPOW는 pLNOv42XW와 pGEM-Teasy-hEPO를 각각 Hpa I 과 CIP, EcoR I 과 Mungbean Nuclease를 처리하여 재조합함으로써 구축하였다(Fig. 47).

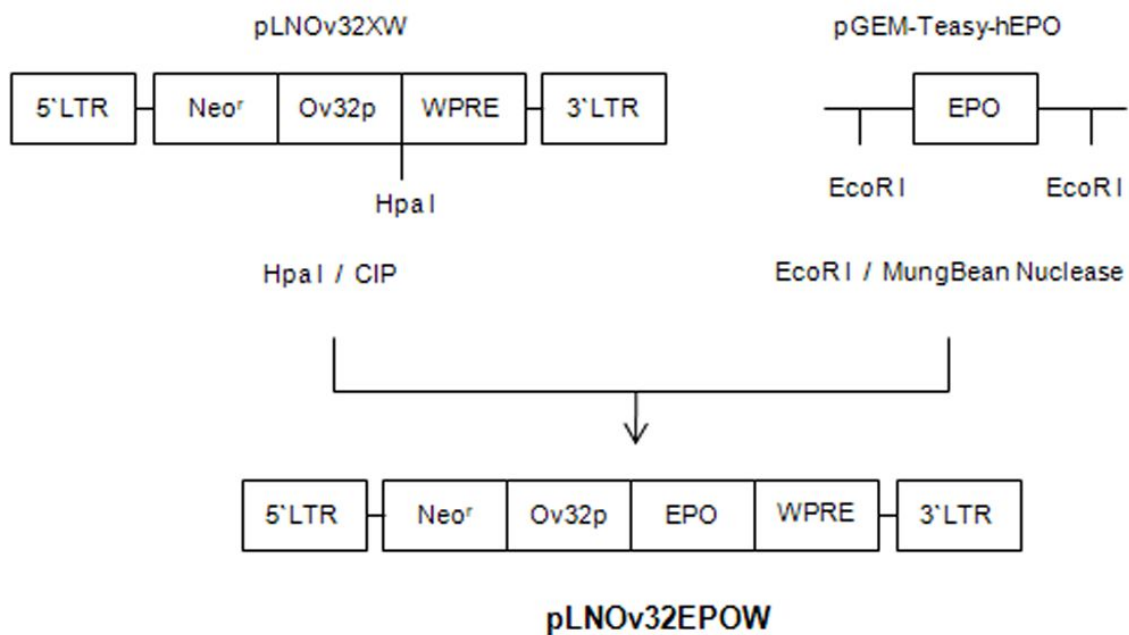


Fig. 45. Construction of pLNOv32EPOW. LTR, long terminal repeat; Neo^r, Neomycin resistant gene; Ov32p, 3.2 Kb Ovalbumin promoter; hEPO, human erythropoietin gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

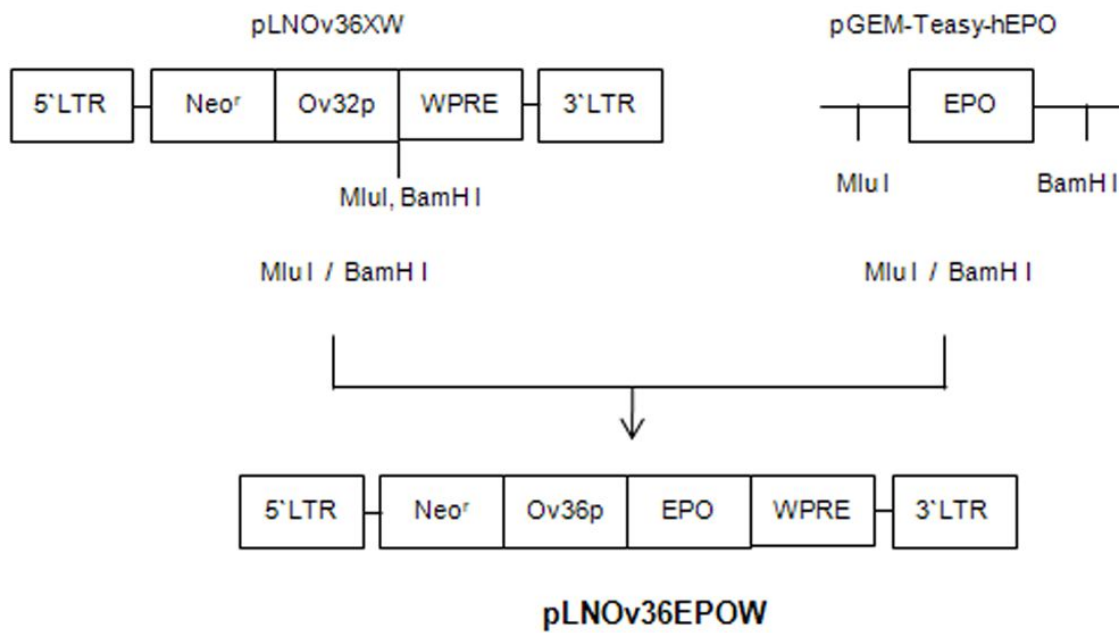


Fig. 46. Construction of pLNOv36EPOW. LTR, long terminal repeat; Neo^r, Neomycin resistant gene; Ov36p, 3.6 Kb Ovalbumin promoter; hEPO, human erythropoietin gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

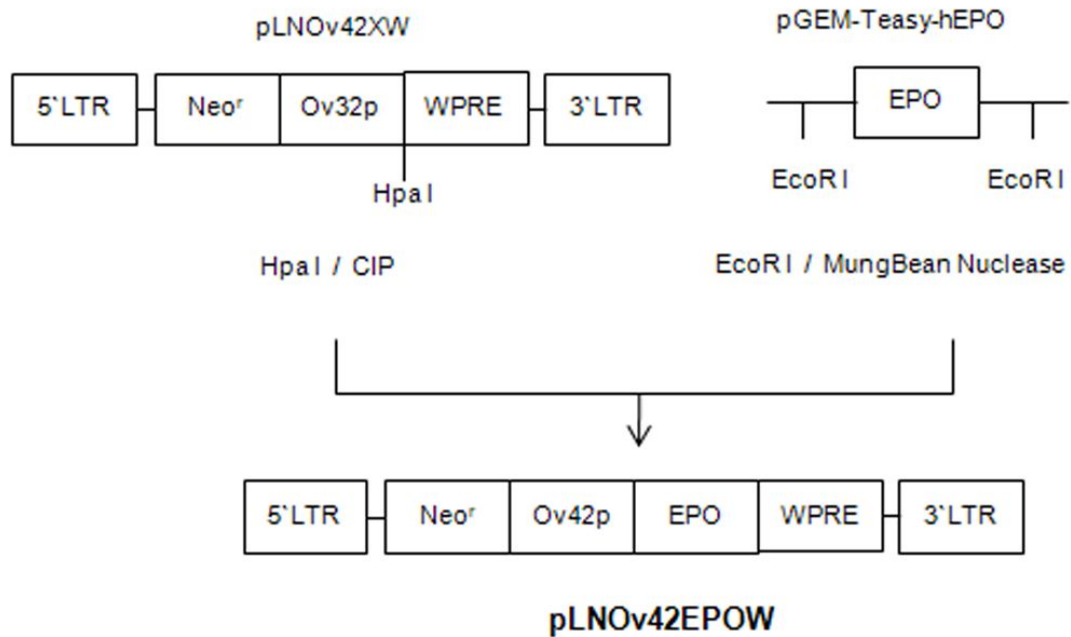


Fig. 47. Construction of pLNOv42EPOW. LTR, long terminal repeat; Neo^r, Neomycin resistant gene; Ov42p, 4.2 Kb Ovalbumin promoter; hEPO, human erythropoietin gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

각각의 vector를 GP2 293 세포에 transfection하여 600 µg/ml의 G418이 첨가된 배지에서 2주간 배양하여 GP2 293-LNOv32-EPOW와 GP2 293-LNOv36EPOW, 그리고 GP2 293-LNOv42EPOW 세포주를 구축하였다.

(2) LNOvEPOW virus를 이용한 형질전환 닭의 생산

구축한 GP2 293-LNOv32-EPOW와 GP2 293-LNOv36EPOW, GP2 293-LNOv42EPOW 세포에 pVSV-G를 calcium phosphate 방법으로 transient transfection시켜서 virus를 생산한 후 초원심분리 방법으로 1,000배 이상 농축하였다. 이 virus stock을 계란의 배반엽층에 미세주입하여 21일간 배양해서 형질전환 닭을 생산하였다. 계란에 virus를 주입하고 부화시키는 방법으로는 LNCEPOW 형질전환 닭의 생산 방법과 동일한 대리난각 방법을 사용하였다. 부화한 병아리의 형

질 전환 여부를 확인하기 위하여 genomic PCR과 ELISA 분석을 실시하였다. Genomic PCR은 부화한 지 1개월된 병아리에서 채취한 혈액으로부터 genomic DNA를 분리하여 *hEPO*, *WPRE*, *Neo*, 그리고 *GAPDH* 유전자에 특이적인 primer로 PCR을 실시하였다. 각 primer는 Table 15와 같으며 각 reaction mixture를 94°C에서 30초, 54°C (WPRE는 60°C)에서 30초, 그리고 72°C에서 30초로 반응하는 과정을 35회 실시하였다. ELISA 분석은 Tet2-EPO 형질 전환 닭의 분석과 동일한 방법으로, 각 개체의 혈액을 채취하여 혈장을 분리한 후 Quantikine IVD Epo kit (R&D systems Cat. No. DEP00, USA)을 사용하여 분석하였다.

Table 15. Primers used for genomic DNA PCR analyses

Gene	Sequence	Product size (bp)	Annealing Temp. (°C)
hEPO	5'-ATGGGGGTGCACGAATGTCC-3' (+)	582	54
	5'-TCATCTGTCCCCTGTCCTGCA-3' (-)		
	5'-GCTGAACACTGCAGCTTGAATGAG-3' (+)	340	56
	5'-GGAAGAGTTTGC GGAAAGTGT CAG-3' (-)		
Neo	5'-CTGTCATCTCACCTTGCTCCTG-3' (+)	369	54
	5'-GGTAGCCAACGCTATGTCCTGA-3' (-)		
	5'-GTTGTCACTGAAGCGGGAAGGG-3' (+)	494	57
5'-GCGATACCGTAAAGCACGAGGAA-3' (-)			
WPRE	5'-CTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTC-3' (+)	150	60
	5'-CAGCCATGGAAAGGACGTCAGCTT-3' (-)		
	5'-ATGGCTTTCATTTTCTCCTCCT-3' (+)	268	51
	5'-ACAACACCACGGAATTGTCAGT-3' (-)		
	5'-GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG-3' (+)	315	56
5'-CGACAACACCACGGAATTGTCAGT-3' (-)			
GAPDH	5'-TGATGCCCCATGTTTGTGA-3' (+)	691	54
	5'-CAAGAAGGGAACACGCAGGG-3' (-)		
	5'-TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA-3' (+)	275	60
	5'-TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGAGAAAG-3' (-)		

(3) LNOv32-EPOW 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

LNOv32-EPOW virus를 주입한 1차 실험군에서는 211개 중 4개의 수정란이 부화하였는데 모두 부화한 후 한 달 이내에 원인불명으로 폐사하였다(Table 16). 2차 실험군에서는 220개의 유정란 중 5개의 수정란이 부화하였으며 한 마리가 폐사하고 4 마리가 현재 생존해 있다. 특이할 만한 사항은 형질전환 여부를 확인하는 PCR과 ELISA 분석 결과가 일치하지 않는다는 것이다. PCR 분석에서는 64번 한 마리만이 hEPO와 Neo 단편이 확인되었으나(Fig. 48), ELISA 분석에서는 PCR에서 positive를 나타낸 개체 외에 두 마리의 개체(chicken no. 63, 66)에서 추가적으로 hEPO의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 49). 이러한 결과는 PCR 분석이 혈액 세포에 대해 제한적으로 hEPO 유전자의 존재를 확인하는 방법이므로, 두 개체에서는 혈액 세포에는 hEPO 유전자가 전이되지 않고 다른 세포에 전이되어 전이된 세포가 내포된 조직에서 혈장 내로 hEPO 단백질을 분비한 것으로 추정할 수 있다. 각 개체의 hEPO 농도는 20.9, 112.1, 9.4 mIU/ml로 Tet2-EPO 형질전환 닭의 혈장에서

측정된 값에 비해 1/1000 이하 수준의 매우 저농도를 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 Tet2-EPO 닭 개체가 전체적인 여러 조직에서 외래 유전자의 발현을 나타내는데 비해 LNOvEPOW 닭은 난관조직에 국한되어 조직특이적인 외래 유전자의 발현을 유발하는 데서 그 원인을 찾을 수 있다.

Table 16. Hatchability of LNOv32EPOW virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment*	Number of eggs injected	Number of embryos surviving on day 3 (%)	Number of hatched chicks (%)	Number of chickens confirmed to be transgenic	Number of chickens surviving at present
I	211	57 (27.0)	4 (1.8)	0	0
II	220	183 (83.2)	5 (2.3)	1(P), 3(E)**	2
III	247	123 (49.8)	15 (6.1)	6(P), 5(E)	1
IV	140	67 (47.9)	14 (10.0)	4 (2.9)	0
V	152	67 (44.1)	24 (15.8)	10(P), 7(E)	9
VI	117	39 (33.3)	3 (2.6)	3(P), 3(E)**	1
VII	180	81 (45.0)	26 (14.4)	9(P)	5
VIII	201	176 (87.6)	23 (11.4)	2(P)	0
IX	184	101 (54.9)	15 (8.2)	1(P)	1
X	189	38 (20.1)	7 (3.7)	2(P)	2
XI	110	48 (43.6)	17 (15.5)	10(P)	10

* 11 independent experiments were carried out using same retrovirus vector.

**P-PCR analysis, E-ELISA analysis.

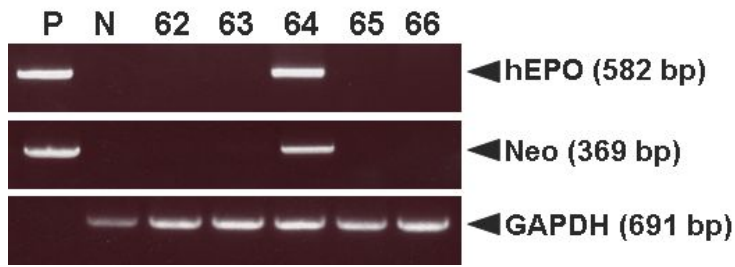


Fig. 48. PCR analyses of G0 LNOv32-EPOWII transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of five G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Neomycin resistance* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker.

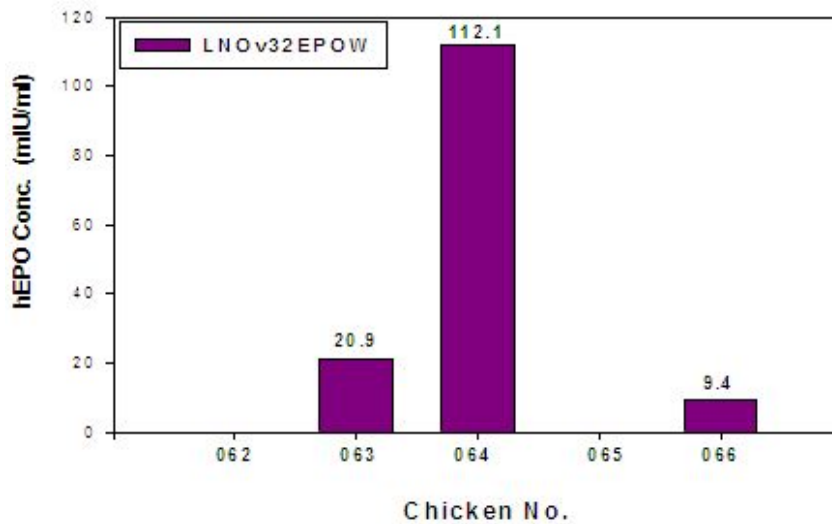


Fig. 49. ELISA analyses of G0 LNOv32-EPOWII transgenic chickens.

LNOv32EPOW 3차 실험군에서는 247개의 virus를 주입한 수정란 중에 15개가 부화

하였으며 형질전환 개체로 확인된 것은 PCR에서는 6마리, ELISA에서는 5마리이다. 현재 수컷 4마리(chicken no. 74, 75, 76, 77)와 암컷 8마리(chicken no. 79 - 86)로 모두 12마리가 생존해 있으며 PCR과 ELISA 분석에서 모두 양성 반응을 나타낸 개체는 76, 81, 82, 84, 85이고 80번은 PCR에서만 양성을 나타내었다(Fig. 50, 51). 이 중 ELISA 분석에서 가장 높은 농도를 나타낸 개체는 85번으로 208.3 mIU/ml의 농도로 확인되었다.

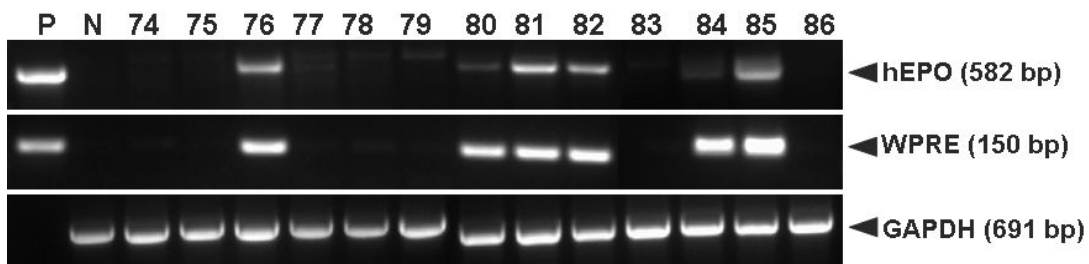


Fig. 50. PCR analyses of G0 LNOv32EPOWIII transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 13 G0 transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker.

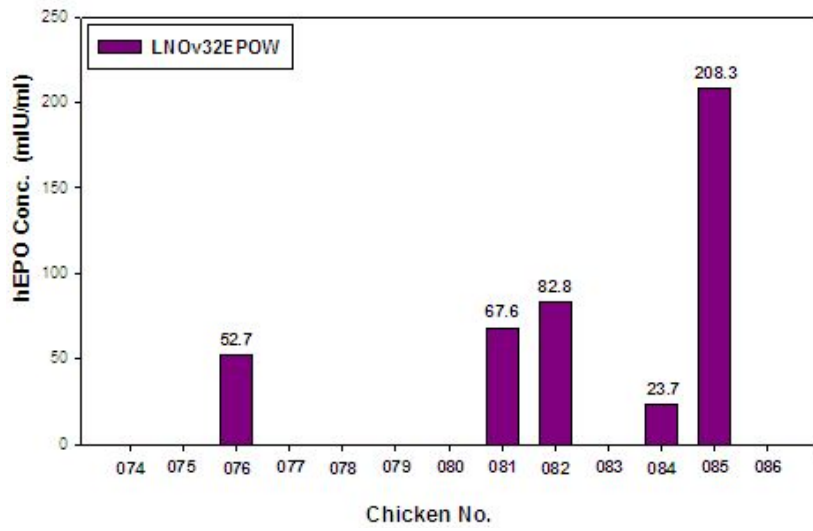


Fig. 51. ELISA analyses of G0 LNOv32-EPOWIII transgenic chickens.

4차 실험군에서는 140개의 수정란 중에 14개가 부화하였으며 현재 4마리가 생존해 있으나 PCR 분석에서 증폭 단편이 나타나지 않았으며(Fig. 52) ELISA에서도 농도 값이 측정되지 않아서 모두 형질전환 닭이 아닌 것으로 추정된다.

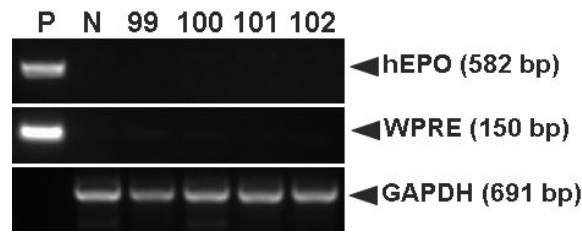


Fig. 52. PCR analyses of G0 LNOv32EPOWIV transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of four G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker.

LNOv32EPOW 5차 실험군에서는 152개의 virus를 주입한 수정란 중에 24개가 부화하였으며 형질전환 개체로 확인된 것은 PCR에서는 10마리, ELISA에서는 7마리이다. 현재 수컷 1마리(chicken no. 115)와 암컷 한 마리(chicken no. 127)가 생존해 있으며 PCR과 ELISA 분석에서 모두 양성 반응을 나타낸 개체는 118, 119, 121, 127, 128번이고 나머지 개체는 PCR 또는 ELISA 한 쪽에서만 양성을 나타내었다 (Fig. 53, 54).

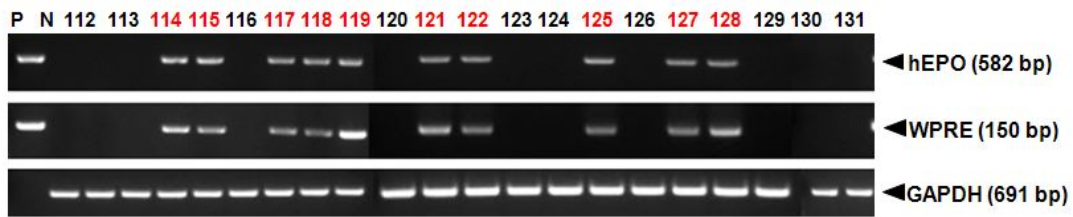


Fig. 53. PCR analyses of G0 LNOv32EPOWV transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 20 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

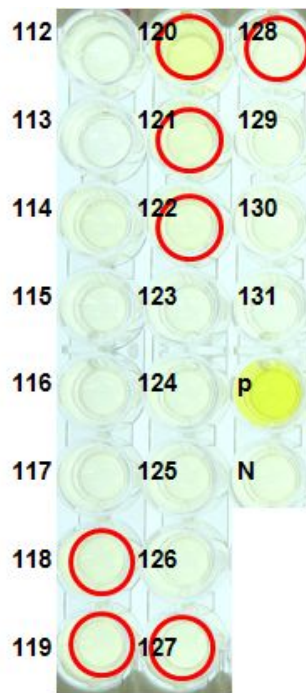


Fig. 54. ELISA analyses of G0 LNOv32EPOWV transgenic chickens.

LNOv32EPOW 6차 실험군에서는 117개의 virus를 주입한 수정란 중에 3개가 부화하였으며 3마리 모두 PCR에서 형질전환 개체로 확인되었다. 부화한 지 한 달 이내에 폐사한 한 마리를 제외한 나머지 개체의 혈액에서 ELISA를 실시한 결과, hEPO 농도는 3 ~ 7 mIU/ml로 매우 낮게 나타났는데, 이는 Tet2-EPO 닭 개체가 전체적인 여러 조직에서 외래 유전자의 발현을 나타내는 데 비해 LNOvEPOW 닭은 난관 조직에 국한되어 조직특이적인 외래 유전자의 발현을 유발하는 데서 그 원인을 찾을 수 있다. 현재 수컷 한 마리(chicken no. 179)가 생존해 있다(Fig. 55, 56).

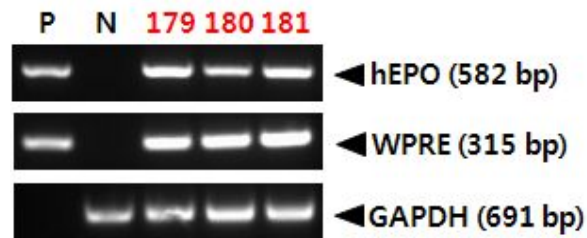


Fig. 55. PCR analyses of G0 LNOv32EPOWVI transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 3 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

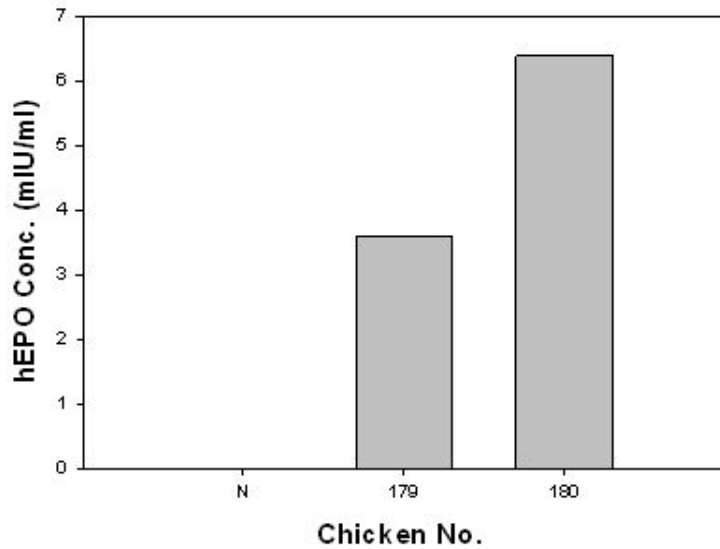


Fig. 56. ELISA analyses of G0 LNOv32EPOWVI transgenic chickens.

LNOv32EPOW 7차 실험군에서는 180개의 virus를 주입한 수정란 중에 26개가 부화하였으며 PCR 방법으로 확인한 결과 9마리가 형질전환 개체로 확인되었다(Fig. 57). 현재 5마리(chicken no. 199, 202, 203, 207, 209)가 생존해 있다.

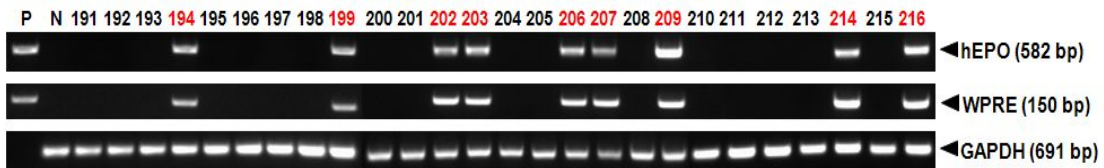


Fig. 57. PCR analyses of G0 LNOv32EPOWVII transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 26 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

LNOv32EPOW 8차 실험군에서는 201개의 virus를 주입한 수정란 중에 23개가 부화하였으며 PCR 방법으로 확인한 결과 2마리가 형질전환 개체로 확인되었으나(Fig. 58) 얼마되지 않아 폐사하였다.

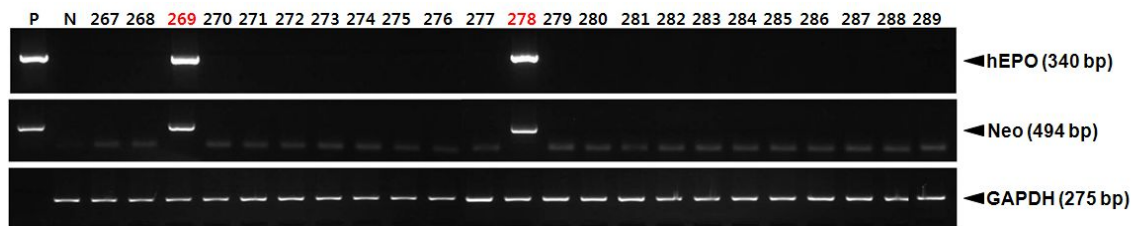


Fig. 58. PCR analyses of G0 LNOv32EPOW^{III} transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 23 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Neo* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

LNOv32EPOW 9차 실험군에서는 184개의 virus를 주입한 수정란 중에 15개가 부화하였으며, 한 달 이내에 폐사한 2 마리를 제외한 나머지 개체의 형질전환 여부를 PCR 방법으로 확인한 결과, 한 마리(chicken no. 304)가 형질전환 개체로 확인되었으며 현재 생존해 있다(Fig. 59).

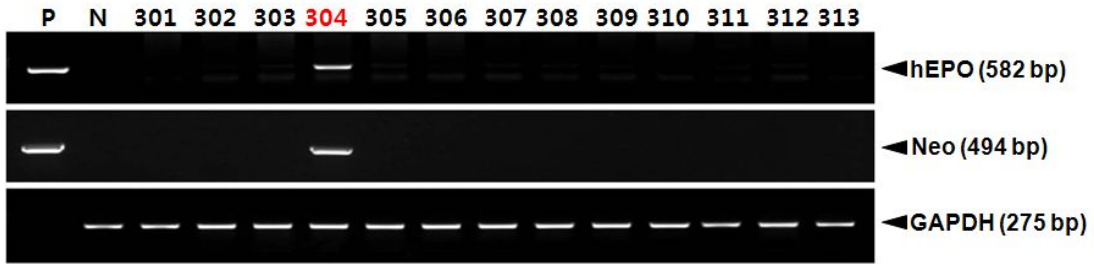


Fig. 59. PCR analyses of G0 LNOv32EPOWIX transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 13 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Neo* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

LNOv32EPOW 10차 실험군에서는 189개의 virus를 주입한 수정란 중에 7개가 부화하였으며, 개체의 형질전환 여부를 PCR 방법으로 확인한 결과, 두 마리(chicken no. 329, 333)가 형질전환 개체로 확인되었으며 현재 생존해 있다(Fig. 60).

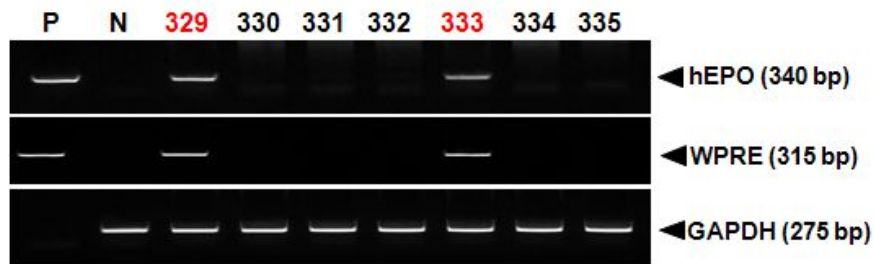


Fig. 60. PCR analyses of G0 LNOv32EPOW X transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 7 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

LNOv32EPOW 11차 실험군에서는 110개의 virus를 주입한 수정란 중에 17개가 부화하였으며, 개체의 형질전환 여부를 PCR 방법으로 확인한 결과, 열 마리(chicken no. 351, 353, 354, 355, 356, 357, 359, 360, 361, 363)가 형질전환 개체로 확인되었으며 현재 생존해 있다(Fig. 61).

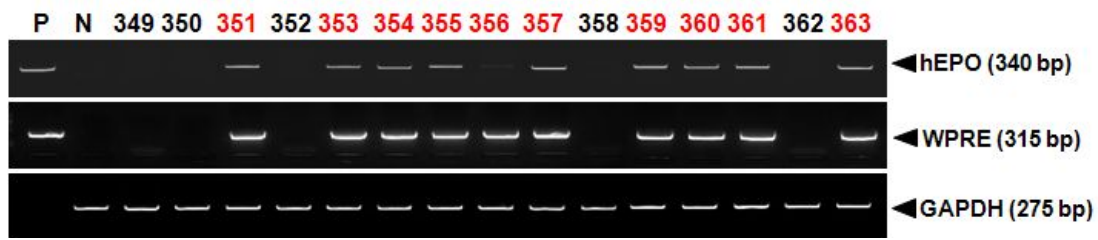


Fig. 61. PCR analyses of G0 LNOv32EPOWXI transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 17 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(4) LNOv42EPOW 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

LNOv42EPOW virus를 주입한 실험군 중 1차 실험에서는 96개 중 2개의 수정란이 부화하였으며 2마리 가운데 1마리에서 *hEPO* 유전자의 전이가 PCR 분석에서 확인되었으나(Table 17, Fig. 62) 3월령 차에 폐사하였다. 2차 실험에서는 120개의 수정란 중 1마리가 부화하였으며 PCR과 ELISA 분석에서 모두 양성 반응을 나타내었다(Fig. 63). ELISA 분석에서 혈장 내의 hEPO의 농도는 11.5 mIU/ml로 나타났다.

Table 17. Hatchability of LNOv42EPOW virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment *	Number of eggs injected	Number of embryos surviving on day 3 (%)	Number of hatched chicks (%)	Number of chickens surviving at present (%)	Number of chickens confirmed to be transgenic
I	96	68 (70.8)	2 (2.0)	1(P)	0
II	120	45 (37.5)	1 (0.8)	1(P), 1(E)**	1
III	243	67 (27.6)	7 (2.9)	5(P), 4(E)**	0
IV	175	106 (60.6)	26 (14.9)	12(P), 8(E)**	6
V	152	82 (53.9)	3 (2.0)	2(P), 3(E)**	3
VI	174	78 (44.8)	5 (2.9)	2(P), 3(E)**	3
VII	240	120 (50.0)	22 (9.2)	2(P)	1
VIII	226	31 (13.7)	10 (4.4)	3(P)	3
IX	199	58 (29.1)	8 (4.0)	3(P)	3
X	149	102 (68.5)	14 (13.7)	1(P)	1

* Ten independent experiments were carried out using same retrovirus vector.

**P-PCR analysis, E-ELISA analysis.

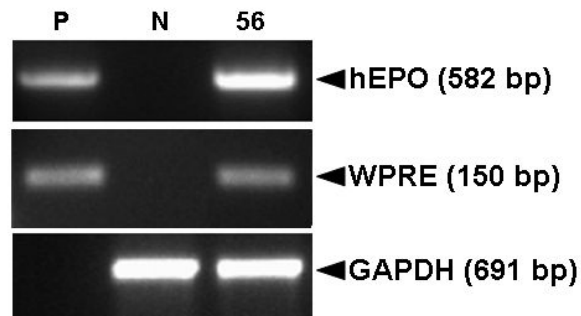


Fig. 62. PCR analyses of G0 LNOv42EPOW I transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of one G0 hatched chicken and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker.

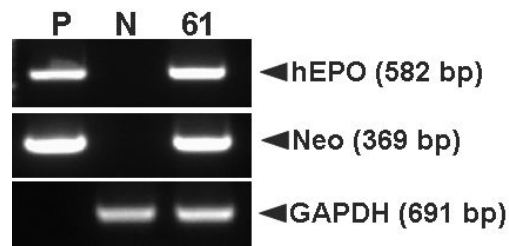


Fig. 63. PCR analyses of G0 LNOv42EPOW II transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of one G0 hatched chicken and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Neomycin resistance* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker.

3차 실험군에서는 243개의 수정란 중에 7개가 부화하였으며 PCR에서는 5 마리 (Fig. 64), ELISA에서는 4 마리가 양성 반응을 나타내었으며 9.7 ~ 18.7 mIU/ml의 농도를 나타내었다(Fig. 65). PCR 분석 결과에서는 특이하게 *hEPO* 유전자는 확인되지 않고 *WPRE* 서열만 확인되었다. ELISA 분석 결과에서는 4 마리의 혈장에서 *hEPO* 단백질의 존재가 확인되었으며 PCR에서 양성을 보인 개체와 일치한 개체도 있으나 일치하지 않은 개체도 나타났다. 나머지 실험군은 부화한 지 얼마되지 않아서 분석을 실시하지 않았다. LNOv42EPOW 실험군들은 전체적으로 대리난각을 교체하는 시기인 배양 3일 후의 생존율과 부화율이 전반적으로 저조한데 이는 실험을 한 시기가 겨울철이어서 수정란의 상태와 외부의 기온 및 습도 조건이 최적화되지 않은 데서 그 원인을 찾을 수 있다.

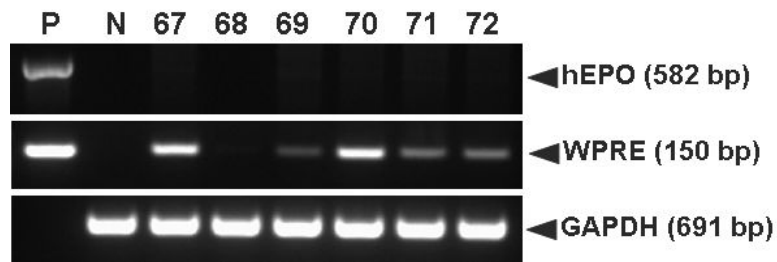


Fig. 64. PCR analyses of G0 LNOv42EPOWIII transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of six G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively. M, molecular size marker.

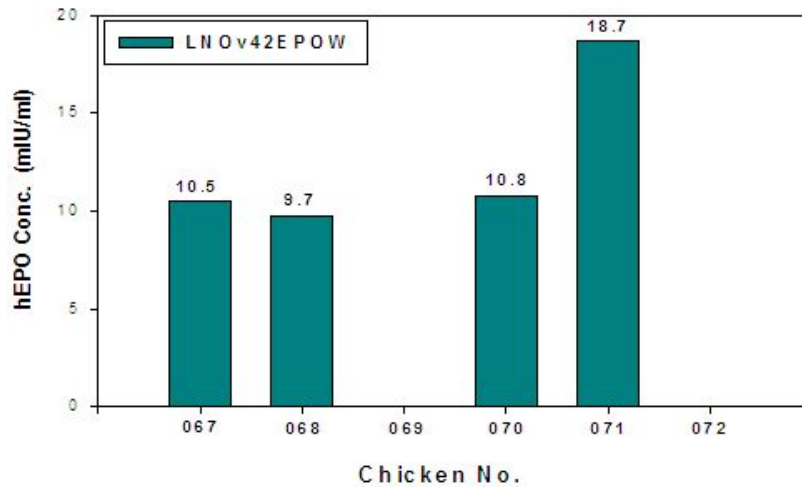


Fig. 65. ELISA analyses of G0 LNOv42EPOWIII transgenic chickens.

LNOv42EPOW 4차 실험군에서는 175개의 수정란 중에 26개가 부화하였으며 이 중 5마리는 태어난 지 1개월 이내에 폐사하였으며 21마리를 대상으로 PCR 및 ELISA 분석을 실시하였다. PCR에서는 12 마리(Fig. 66), ELISA에서는 8 마리가 양성 반응을 나타내었다(Fig. 67). 선행된 실험과 마찬가지로 PCR과 ELISA 결과가 일치하지 않았다. 현재 생존하고 있는 형질전환 개체는 암컷 6마리(chicken no. 137, 139, 142, 143, 147, 151)이다.

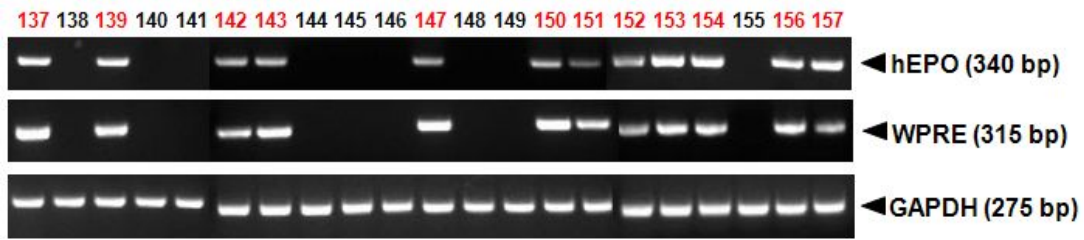


Fig. 66. PCR analyses of G0 LNOv42EPOWIV transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 21 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

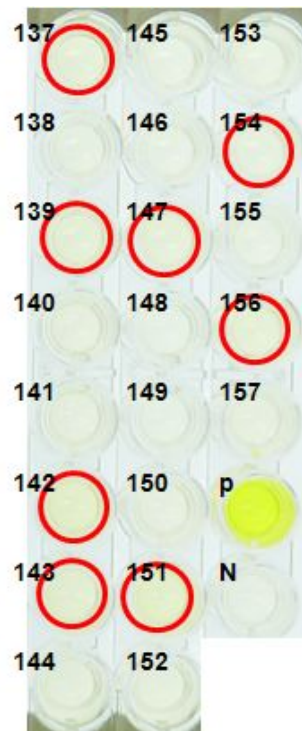


Fig. 67. ELISA analyses of G0 LNOv42EPOWIV transgenic chickens.

5차 실험군에서는 152개의 수정란 중에 3개가 부화하였으며 PCR에서는 2마리(Fig. 68), ELISA에서는 3 마리가 양성 반응을 나타내었다(Fig. 70). 선행된 실험과 마찬가지로 PCR과 ELISA 결과가 일치하지 않았다. 현재 3마리 모두 생존해 있으며 이 중 수컷은 2마리(chicken no. 171, 173)이고 암컷은 172번 1마리이다.

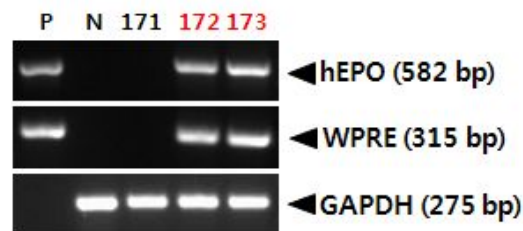


Fig. 68. PCR analyses of G0 LNOv42EPOWV transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 3 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

6차 실험군에서는 174개의 수정란 중에 5개가 부화하였으며 PCR에서는 2마리(Fig. 69), ELISA에서는 3마리가 양성 반응을 나타내었다(Fig. 70). 선행된 실험과 마찬가지로 PCR과 ELISA 결과가 일치하지 않았다. 현재 3마리 모두 생존해 있으며 이 중 수컷은 2마리(chicken no. 174, 175)이고 암컷은 1마리(chicken no. 178)이다.

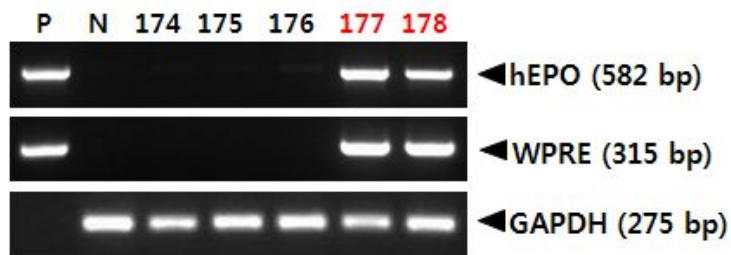


Fig. 69. PCR analyses of G0 LNOv42EPOWVI transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 5 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

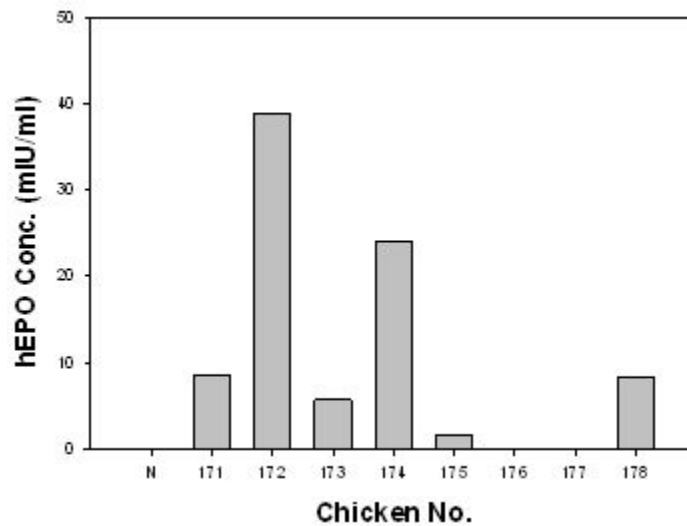


Fig. 70. ELISA analyses of G0 LNOv42EPOWV and LNOv42EPOWVI transgenic chickens.

7차 실험군에서는 240개의 수정란 중에 22개가 부화하였으며 PCR 분석에서 2마리가 양성 반응을 나타내었다(Fig. 71). 현재 암컷 한 마리(chicken no. 231)가 살아있다.

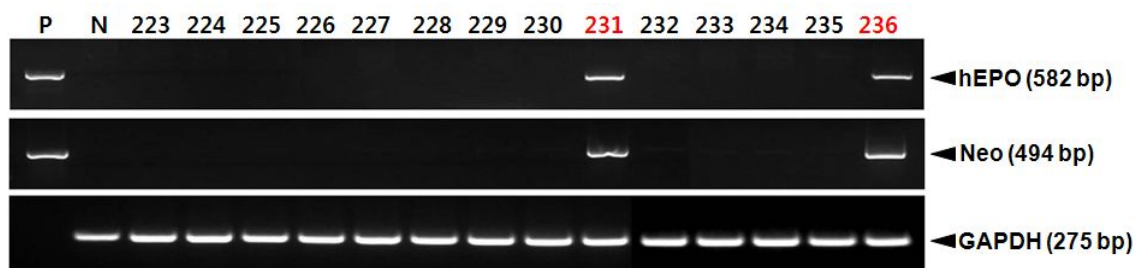


Fig. 71. PCR analyses of G0 LNOv42EPOWII transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 14 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Neo* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

8차 실험군에서는 226개의 수정란 중에 10개가 부화하였으며 PCR 분석에서 3 마리가 양성 반응을 나타내었으며 모두 생존해 있다(Fig. 72).



Fig. 72. PCR analyses of G0 LNOv42EPOW^{III} transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 6 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

9차 실험군에서는 199개의 수정란 중에 8개가 부화하였으며 PCR 분석에서 3마리가 양성 반응을 나타내었으며 모두 생존해 있다(Fig. 73).

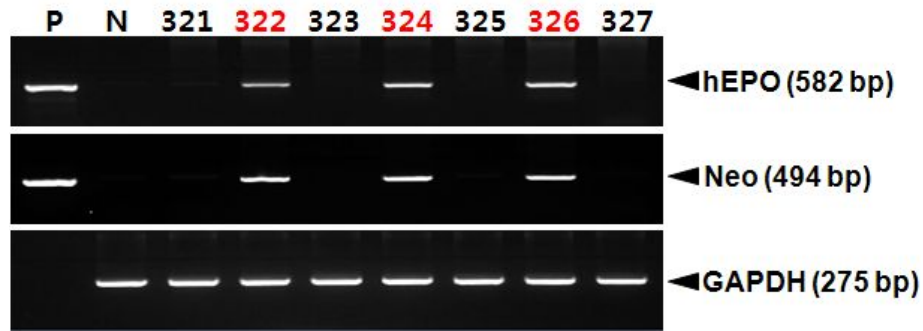


Fig. 73. PCR analyses of G0 LNOv42EPOWIX transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 7 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Neo* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

10차 실험군에서는 149개의 수정란 중에 14개가 부화하였으며 PCR 분석에서 1마리만이 양성 반응을 나타내었으며 살아있다(Fig. 74).



Fig. 74. PCR analyses of G0 LNOv42EPOWX transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 14 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Neo* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(5) LNOv36EPOW 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석

LNOv36EPOW virus를 주입한 실험군 중 1차 실험에서는 85개 중 3개의 수정란이 부화하였으며, PCR에서는 1마리(Table 18, Fig. 75), ELISA에서는 3마리가 양성 반응을 나타내었다(Table 18, Fig. 77). 선행된 실험과 마찬가지로 PCR과 ELISA 결과가 일치하지 않았다. 3마리 모두 암컷이었으며 현재 1마리만(chicken no. 183) 생존해 있다.

Table 18. Hatchability of LNOv36EPOW virus injected embryos by surrogate egg-shell culture

Experiment*	Number of eggs injected	Number of embryos surviving on day 3 (%)	Number of hatched chicks (%)	Number of chickens confirmed to be transgenic	Number of transgenic chickens surviving at present (chicken no.)
I	85	41 (48.2)	3 (3.5)	1(P), 3(E)**	1
II	169	54 (32.0)	2 (1.2)	1(P), 2(E)**	1
III	187	72 (38.5)	8 (4.3)	4(P)	3
III	185	89 (48.1)	6 (3.2)	3(P)	3

* Four independent experiments were carried out using same retrovirus vector.

**P-PCR analysis, E-ELISA analysis.



Fig. 75. PCR analyses of G0 LNOv36EPOW I transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 3 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv36EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

LNOv36EPOW 2차 실험에서는 169개 중 2개의 수정란이 부화하였으며, PCR에서는 1마리(Fig. 76), ELISA에서는 2마리가 양성 반응을 나타내었다(Fig. 77). 선행된 실험과 마찬가지로 PCR과 ELISA 결과가 일치하지 않았다. 현재 수컷 1마리(chicken

no. 186)가 생존해 있다.

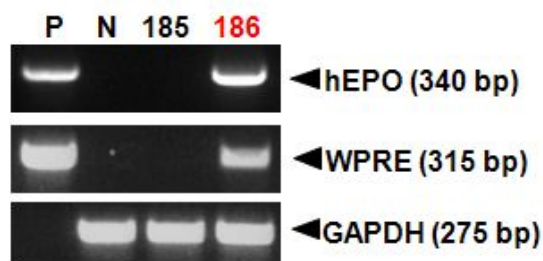


Fig. 76. PCR analyses of G0 LNOv36EPOWII transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 2 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv36EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

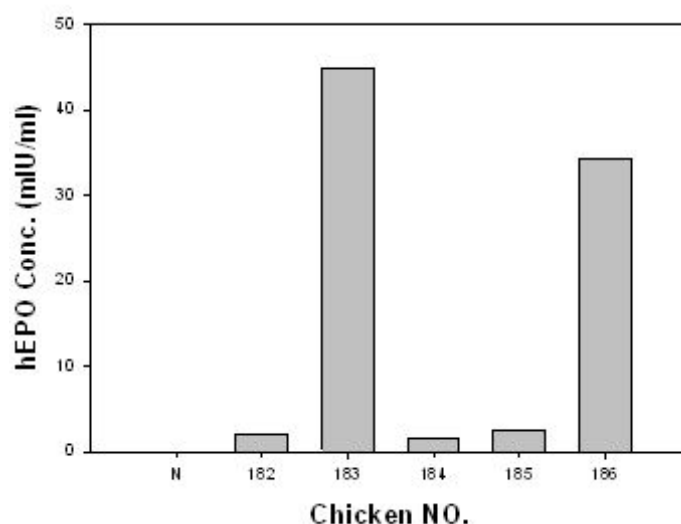


Fig. 77. ELISA analyses of G0 LNOv36EPOW I and LNOv36EPOWII transgenic chickens.

3차 실험군에서는 187개의 수정란 중에 8개가 부화하였으며 PCR 분석에서 4마리가 양성 반응을 나타내었으며(Fig. 78) 현재 3마리(chicken no. 239, 240, 241)가 살아있다.

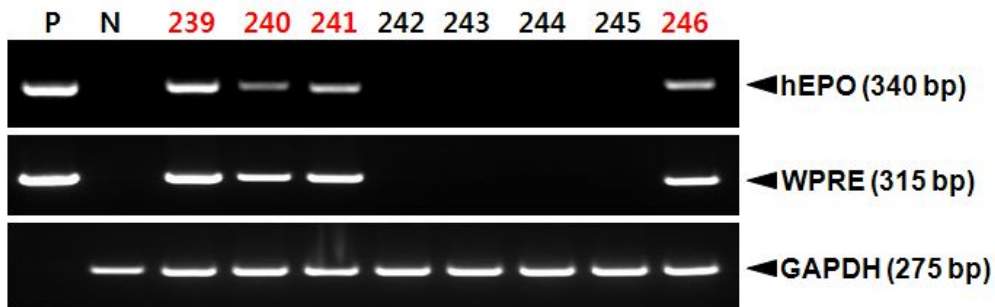


Fig. 78. PCR analyses of G0 LNOv36EPOWIII transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 8 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *WPRE* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv36EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

4차 실험군에서는 185개의 수정란 중에 6개가 부화하였으며 PCR 분석에서 3마리가 양성 반응을 나타내었으며(Fig. 79) 모두 생존해 있다.

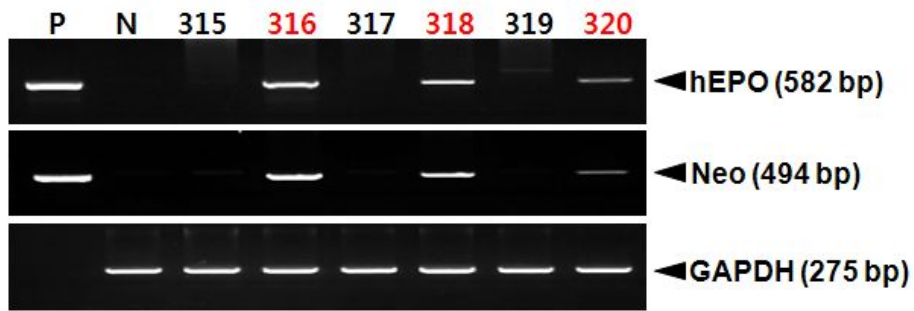


Fig. 79. PCR analyses of G0 LNOv36EPOWIII transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the blood of 6 G0 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Neo* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv36EPOW) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken blood were used, respectively.

(6) LNOvEPOW 형질전환 닭의 germline transmission 가능성 확인

LNOvEPOW 형질전환 닭의 germline transmission 가능성을 확인하기 위하여 sperm에 *hEPO* 유전자가 전이되었는지의 여부를 확인하고자 하였다. 형질전환 개체 중 성숙이 일어난 수컷만을 선별하여 sperm을 채취한 후 genome DNA를 분리하여 PCR을 실시하였다. PCR을 실시한 결과, LNOv32EPOW 실험군에서 2마리(chicken no. 115, 356)와 LNOv42EPOW 실험군에서 1마리(chicken no. 173)가 외래 유전자가 전이된 sperm을 가진 것으로 판명되어(Fig. 80, 81) 각 개체를 wild type의 암컷과 교미하여 G1 생산을 시도하고 있다.

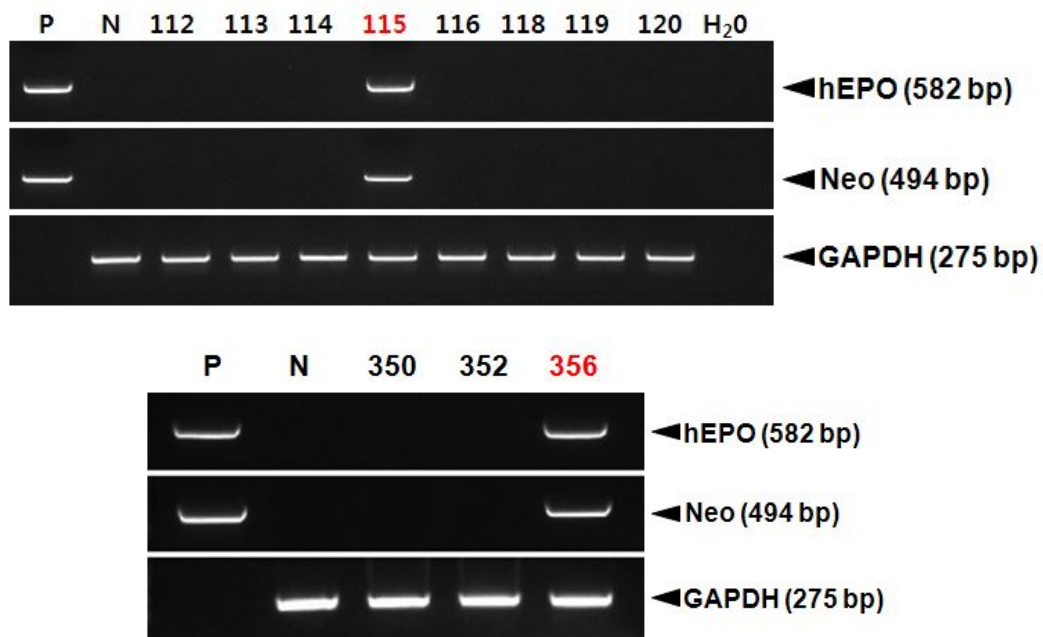


Fig. 80. PCR analyses of G0 LNOv32EPOW transgenic chickens in sperm DNA. Detection of the *hEPO* gene in the germlines of G0 male transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of eight G0 male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Neomycin resistance* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv32EPOW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively. M, molecular size marker.

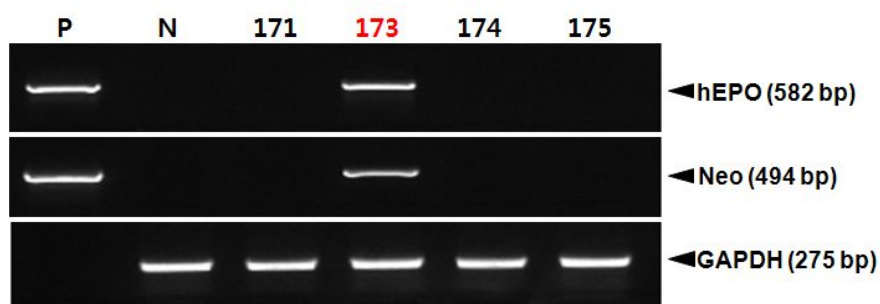


Fig. 81. PCR analyses of G0 LNOv42EPOW transgenic chickens in sperm DNA. Detection of the *hEPO* gene in the germlines of G0 male transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of four G0 male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. The expected sizes of the PCR products for the *hEPO*, *Neomycin resistance* and the *GAPDH* genes are indicated. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNOv42EPOW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively. M, molecular size marker.

사. 형질전환 세포와 닭에서의 재조합 hEPO의 당잔기 분석

본 실험의 목적은 *hEPO* 유전자가 전이된 CHO 세포와 CEF 세포, 그리고 hEPO 형질전환 닭의 혈장과 난백에서 발현된 재조합 hEPO 당단백질의 당잔기 상이성을 분석하고자 하는 것이다. 먼저 CHO-hEPO와 CEF-hEPO, 그리고 형질전환 닭의 혈장과 난백에 함유된 hEPO의 농도를 EPO ELISA kit (R&D systems, USA)를 이용하여 확인하였다. ELISA 분석 결과, CEF-hEPO가 2,277 IU/ml로 가장 높게 정량되었으며 CHO-hEPO, serum-hEPO, 그리고 정제한 egg white-hEPO가 각각 104 IU/ml, 298 IU/ml, 그리고 1,026 IU/ml로 정량되었다(Fig. 82).

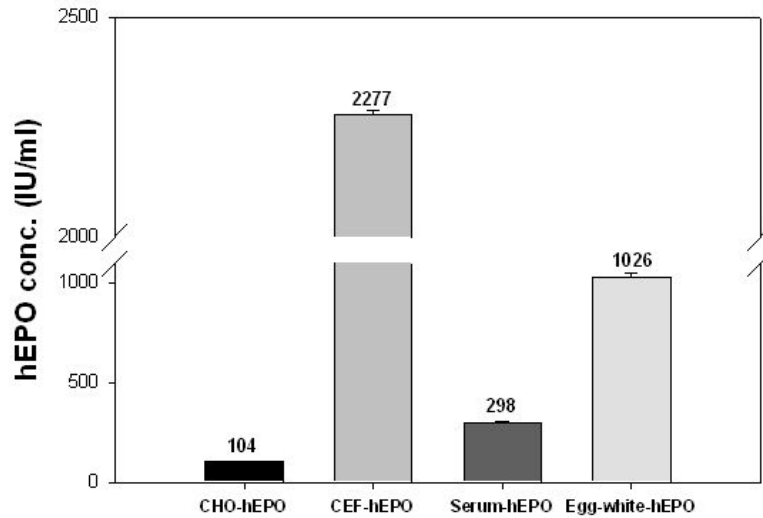


Fig. 82. ELISA analysis of recombinant hEPO produced by CHO, CEF, transgenic chicken serum and egg white.

농도가 확인된 hEPO는 *N*-당화를 조사하기 위하여 *N*-결합 탄수화물을 선택적으로 분해하는 peptide *N*-glycosidase F (PNGase F)를 이용하여 *N*-당기를 제거하였고, *N*-말단 잔기에 결합한 acetyl-neuraminic acid (sialic acid)를 제거하기 위하여 neuraminidase (sialidase)를 사용하였다. 당 절제효소에 의해 당기가 제거된 hEPO는 Western blot을 이용하여 양상을 확인하였다. ELISA와 Western blot에서 사용한 시료 중 세포배양액은 100 mm dish당 1×10^6 개로 세포를 준비하여 48시간 배양 후 수확하여 사용하였고, 혈장은 닭의 혈액을 채취 후 원심분리를 이용해 혈구를 제거한 후 순수 혈장만 이용하여 실험하였다. 난백은 50 mM ZnCl₂ 처리하여 원심분리한 후 채취한 상층액을 다시 20 mM Tris/10mM NaCl (pH 7.4) 용액을 처리해 평형화시킨 후 원심분리 방법으로 상층액을 채취하여 Blue-sepharose (GE Healthcare)를 이용하여 정제하였다. Western blot은 hEPO ELISA 정량 후 15 ug으로 실험하였다. 10% SDS-polyacrylamide gel을 사용하였으며 일차항체로는 anti-hEPO (Santa Cruz, USA)를, 이차항체로는 HRP-conjugated Goat anti-mouse IgG (R&D system, USA)을 사용하였다. ELISA로 확인된 각각의 hEPO를 PNGase F를 이용하여 *N*-당기를 제거한 후 Western blot을 실시한 결과 CHO-hEPO,

CEF-hEPO, 그리고 serum-hEPO 모두 거의 유사한 크기의 hEPO를 확인할 수 있었다. Neuraminidase를 처리한 군에서도 역시 앞선 결과와 마찬가지로 세 종류의 hEPO가 거의 동일한 sialic acid를 포함하고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 83).

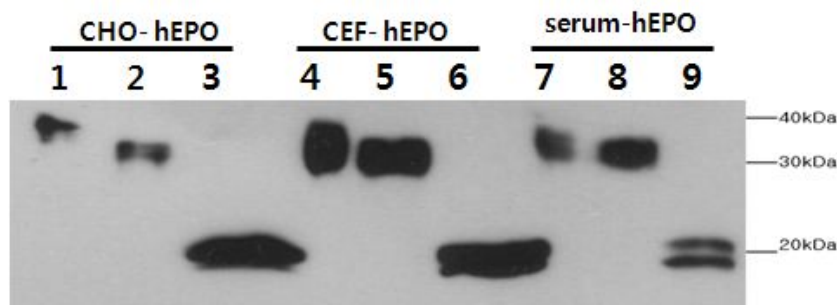


Fig. 83. Deglycosylation assays. The three recombinant hEPO molecules were desialylated with recombinant sialidase (lanes 2, 5 and 8) or N-deglycosylated with PNGase F (lanes 3, 6 and 9). Lanes 1, 4, 7: fully glycosylated CHO-hEPO, CEF-hEPO and Serum-hEPO respectively. Sample analyzed by western blotting.

난백에서 분리한 재조합 hEPO는 CEF 세포에서 생산된 hEPO보다 작은 분자량을 가지는 것으로 확인되었다. Neuraminidase를 처리하여 분석한 결과에서 CEF-hEPO에 비해 egg white-hEPO가 조금 작은 분자량을 가지는 것으로 확인되었으며, PNGase F를 이용하여 N-당기를 제거한 경우에서도 CEF-hEPO에 비해 egg white-hEPO의 크기가 약간 적은 것으로 확인되었다. 이상의 결과를 바탕으로 난백에서 생산한 hEPO는 CEF에서 생산한 hEPO에 비해 N-당화가 적게 이루어지는 것으로 추정된다(Fig. 84).

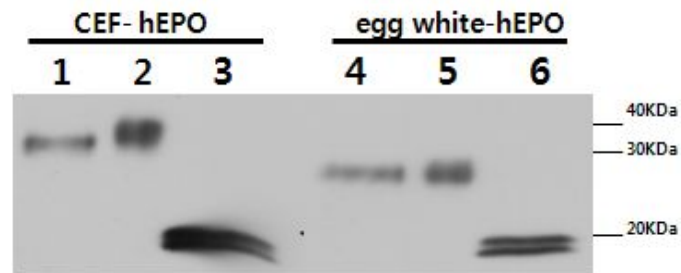


Fig. 84. Analysis of sugar moiety of egg white-hEPO produced by chimeric chicken. The two recombinant hEPO molecules were desialylated with recombinant sialidase (lanes 1, 4) or N-deglycosylated with PNGase F (lanes 3, 6). Lanes 2, 5: fully glycosylated CEF-hEPO and egg white-hEPO respectively. Sample analyzed by western blotting.

2. 제 1협동과제

가. Chicken ovalbumin (cOV) 5'-upstream, 3'-downstream UTR region cloning 및 cOV 5'-upstream, 3'-downstream UTR region의 cOV promoter activity에 미치는 영향 조사

닭의 genomic DNA를 이용하여 chicken ovalbumin (cOV) 10 Kb, 4.5 Kb, 3.2 Kb 5'-upstream region과 3 Kb 3'-downstream region을 PCR 기법을 이용하여 cloning을 실시하였다. cOV 유전자의 최적의 promoter region을 확보하기 위하여 5'-upstream region의 promoter activity와 3'-downstream region의 promoter activity 증가를 위한 enhancer로서의 역할을 조사하기 위하여 Fig. 85에 보인 바와 같이 cOV promoter reporter construct를 제작하였다.

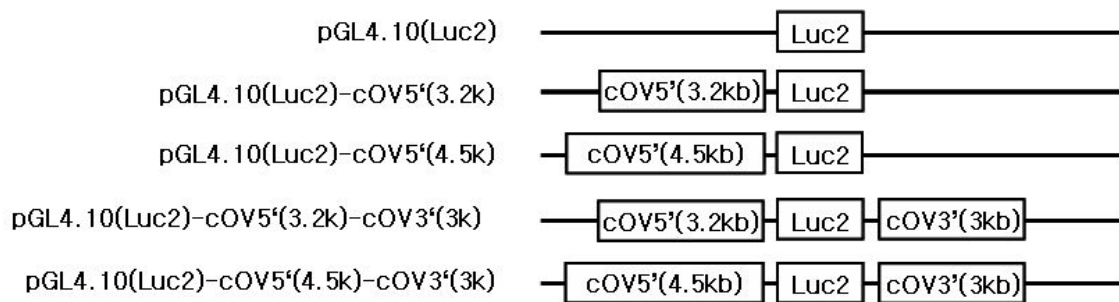


Fig. 85. cOV promoter-reporter constructs 도해

제작된 cOV-promoter reporter construct를 인간 줄기세포의 일종인 NCCIT, kidney cell line의 일종인 293T cell line, 인간자궁세포 line의 일종인 HeLa 및 원숭이 kidney cell line의 일종인 COS-7 cell line을 이용하여 cOV promoter-reporter assay를 실시하였다(Fig. 86). 줄기세포의 일종인 human embryonal carcinoma cell line인 NCCIT cell에서는 cOV 5'-upstream 3.2 Kb region에서 가장 높은 promoter activity가 관찰되었으며, cOV 5'-upstream 4.5 Kb region은 cOV 5'-upstream 3.2 Kb region에 비해 cOV promoter activity가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 86). cOV 3'-downstream 3 Kb region의 cOV 5'-upstream 3.2 Kb region 및 4.5 Kb region의 promoter activity에 미치는 영향을 조사한 결과 cOV 3'-downstream 3 Kb region이 존재하는 경우 cOV 5'-upstream 3.2 Kb region 및 4.5 Kb region의 promoter activity가 유의하게 감소하였다(Fig. 86). 분화 세포주인 293T, HeLa, COS-7 cell에서는 줄기세포주인 NCCIT cell에 비해 상대적으로 낮은 promoter activity를 보였으며, cOV 5'-upstream 3.2 Kb region에서 가장 높은 promoter activity가 관찰되었으며, cOV 5'-upstream 4.5 Kb region은 cOV 5'-upstream 3.2 Kb region에 비해 cOV promoter activity가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 86). cOV 3'-downstream 3 Kb region의 cOV 5'-upstream 3.2 Kb region 및 4.5 Kb region의 promoter activity에 미치는 영향을 조사한 결과 cOV 3'-downstream 3 Kb region이 존재하는 경우 cOV 5'-upstream 3.2 Kb region 및 4.5 Kb region의 promoter activity가 유의하게 감소하였다(Fig. 86). 이상의 결과를 통하여 cOV

5'-upstream 3.2 Kb region이 가장 높은 promoter activity를 보였으며, 이는 cOV 유전자 promoter activity에 영향을 미치는 cis-regulatory element가 존재한다는 것을 시사하는 바이며, cOV 3'-downstream 3 Kb region은 negative enhancer로서 작용한다는 것을 시사하였다.

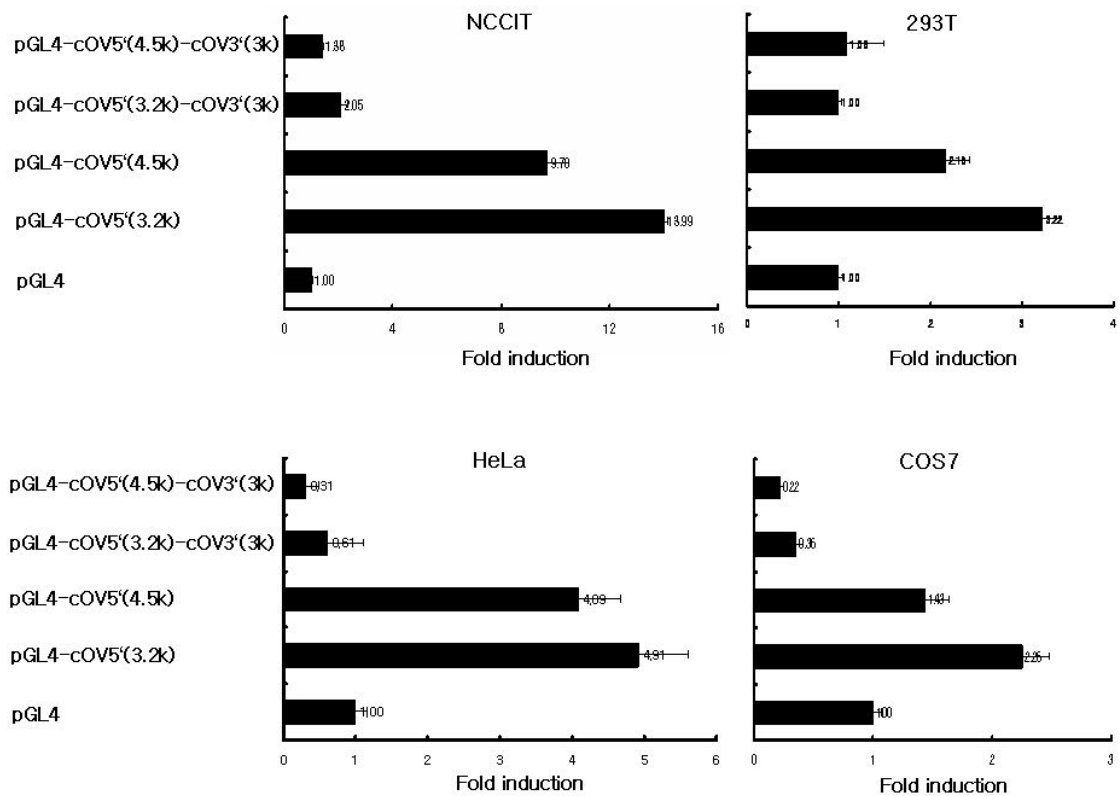


Fig. 86. Luciferase reporter system을 이용한 cOV 3.2 Kb, 4.5 Kb 5'-upstream 및 3 Kb 3'-downstream region의 promoter activity에 미치는 영향

나. Chicken ovalbumin (cOV) gene regulatory element의 중요성 조사

유용유전자를 계란 난백에서 특이적으로 분비하게 하는 형질전환 닭을 생산하고자, 계란 흰자위를 생산하는 닭 난관상피세포에서 특이적으로 발현할 수 있는 최적의 프로모터 시스템을 구축하고자 cOV 유전자 promoter activity에 중요한 영

향을 미치는 regulatory element인 estrogen response element (ERE), cOV 3'-untranslated region (UTR) 및 cOV 유전자 exon I + intron I region의 cOV 유전자 promoter activity에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 87). 줄기세포주인 NCCIT 세포주에서는 ERE, steroid dependent response element (SDRE), negative response element (NRE), chicken ovalbumin upstream promoter (COUP) element가 존재하는 경우 가장 높은 promoter activity를 보였으며, ERE가 없는 경우 promoter activity가 유의하게 감소하였다(Fig. 87). 또한, exon I + intron I region이 존재하거나 3 Kb cOV 3'-UTR region이 존재하는 경우도 promoter activity가 유의하게 감소하였다(Fig. 87). ERE와 3 Kb cOV 3'-UTR region이 cOV promoter activity에 미치는 상관관계를 조사한 결과, ERE의 존재 여부와 관계없이 3 Kb cOV 3'-UTR region은 cOV promoter activity에 영향을 미치지 않았다(Fig. 87). ERE와 exon I + intron I region이 cOV promoter activity에 미치는 상관관계를 조사한 결과, 마찬가지로 ERE가 존재 여부와 관계없이 exon I + intron I region은 cOV promoter activity에 영향을 미치지 않았다(Fig. 87). 분화세포주인 HEK293T cell의 경우는 ERE, SDRE, NRE, COUP element, exon I + intron I region이 존재하는 경우 가장 높은 cOV promoter activity를 보였으며 exon I + intron I region이 존재하지 않는 경우 cOV promoter activity가 약간 감소하였다(Fig. 87). ERE의 중요성을 조사한 결과, exon I + intron I, 3 Kb cOV 3'-UTR region이 존재하는 경우 모두 ERE가 존재하지 않는 경우 모두 cOV promoter activity가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 87). ERE와 3 Kb cOV 3'-UTR region이 cOV promoter activity에 미치는 상관관계를 조사한 결과, ERE가 존재하지 않는 경우 cOV promoter activity가 감소하였으며, ERE와 exon I + intron I region이 cOV promoter activity에 미치는 상관관계를 조사한 경우, 마찬가지로 ERE가 존재하지 않는 경우 cOV promoter activity가 유의하게 감소하였다(Fig. 87). 난관상피세포에서는 ERE, steroid dependent response element (SDRE), negative response element (NRE), chicken ovalbumin upstream promoter (COUP) element가 존재하는 경우 가장 높은 promoter activity를 보였으며, ERE가 없는 경우 promoter activity가 유의하게 감소하였다(Fig. 87). 또한, exon I + intron I region이 존재하거나 3 Kb cOV 3'-UTR region이 존재하는 경우도 promoter activity가 유의하게 감소하였다. ERE와 3 Kb cOV 3'-UTR region이 cOV promoter activity에 미치는 상관관계를 조

사한 결과, ERE가 존재하지 않는 경우 cOV promoter activity가 감소하였으며, ERE와 exon I + intron I region이 cOV promoter activity에 미치는 상관관계를 조사한 경우, 마찬가지로 ERE가 존재하지 않는 경우 cOV promoter activity가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 87). 이상의 결과를 통하여 ERE는 positive regulatory element로 작용하여 cOV promoter activity에 중요한 역할을 하며, 3 Kb cOV 3'-UTR region은 negative regulatory element로 작용하고 cOV exon I + intron I region은 조직특이 발현에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

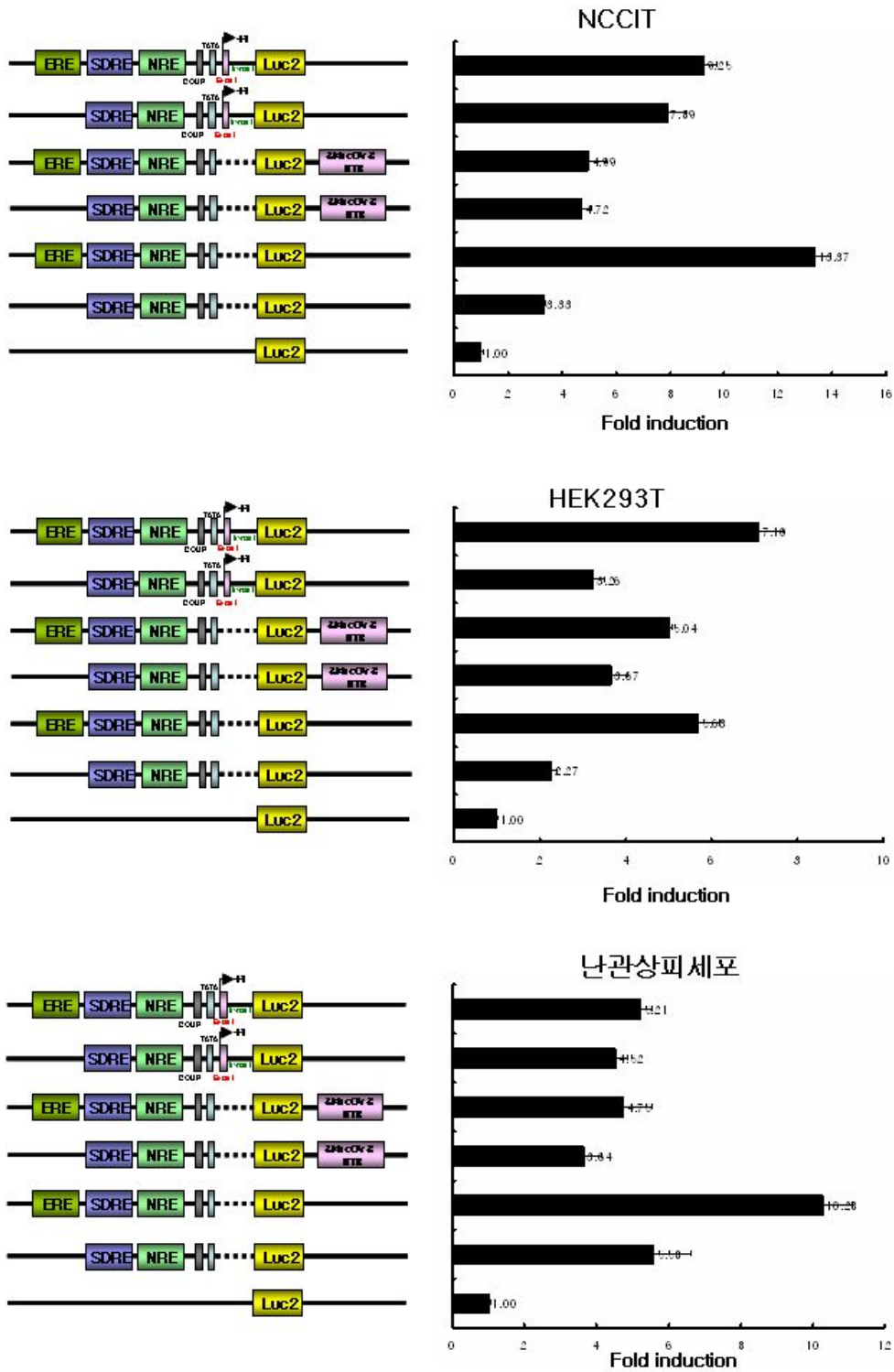


Fig. 87. Chicken ovalbumin 유전자 regulatory element의 중요성 조사. COUP: chicken ovalbumin upstream promoter, NRE: negative response element, SDRE: steroid dependent response element, ERE: estrogen response element.

다. 외래단백질 효율적 분비를 위한 체계 확립

유용단백질이 난관상피세포에서 발현된 후 효율적으로 분비되어 계란 난백 부위에서 특이적 및 효율적으로 분비되기 위해서는 signal peptide의 역할이 중요한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 유용단백질인 hEPO의 난관상피세포에서 특이적 및 효율적인 분비유도를 위한 체계를 확립하고자 연구를 실시하였다. 본 연구에서는 외래 유전자인 *EGFP*에 chicken lysozyme signal peptide (LysSP: MRSLLILVLCFLPLAALG)를 tagging하여 LysSP가 외래단백질을 세포 외로 효율적으로 분비를 유도하는 체계를 확립하고자 EGFP, FLAG tagging된 EGFP (FLAG + EGFP), LysSP tagging된 EGFP (LysSP+EGFP) 및 LysSP와 FLAG tagging된 EGFP (LysSP+FLAG+EGFP) 발현 vector를 준비하여 293T cell에 도입 후 EGFP 발현 및 세포외 분비능력을 조사하였다(Fig. 88). LysSP가 존재하지 않은 EGFP 또는 FLAG epitope이 tagging된 EGFP의 경우 세포외로 분비가 되지 않아 EGFP 발현이 세포 내에서 높게 관찰되었으나, LysSP 및 LysSP+FLAG tagging된 EGFP의 경우 세포외로 분비가 이루어져 세포내 EGFP의 발현이 LysSP가 tagging되지 않은 경우보다 현저히 낮은 EGFP 발현이 관찰되었다 (Fig. 88-A). 이러한 결과는 LysSP tagging이 EGFP 단백질을 세포외로 효율적으로 분비를 유도한 것으로 사료된다. 따라서, LysSP의 외래단백질 분비에 미치는 영향을 검증하고자 각종 발현 vector가 도입된 세포주의 세포 내 및 세포 외로 분비되어 배양액 내에 존재하는 EGFP 함량을 FLAG 및 EGFP 특이 항체를 이용하여 immunoblot을 실시한 결과 (Fig. 88-B), LysSP가 존재하지 않는 경우는 cell lysate에서 EGFP가 다량으로 검출되었고, 세포배양액 내에는 상대적으로 소량이 검출되었다. LysSP가 존재하는 경우에는 LysSP에 의해 EGFP가 세포 외로 분비되었기 때문에 세포 배양액에서 다량으로 검출되었으며, cell lysate에서는 상대적으로 소량이 검출되었다. 이상의 결과를 통하여 LysSP tagging이 단백질의 분비를 보다 효율적으로 분비시킨다는 것을 확인하였다. 또한, LysSP의 tagging이 일시적인 아닌 영구적인 유용단백질의 발현 분비를 유도하는지 조사하기 위하여 발현 vector가 도입된 세포를 여러 계대를 넘겨 발현 분비를 조사한 결과 Fig. 89-A에 보인바와 같이 6, 10 및 15 계대배양

하에서도 LysSP가 존재하지 않는 경우 세포에서 관찰이 되지만 LysSP가 tagging 된 경우는 계대배양이 계속되어도 EGFP가 세포외로 분비되어 세포내에서는 소량의 EGFP만이 관찰되었다. 외래 단백질인 EGFP의 효율적인 분비를 확인하기 위하여 세포배양액을 회수한 후 EGFP 항체를 이용하여 immunoblot을 실시한 결과 (Fig. 89-B), 다량의 EGFP가 세포외로 분비되어 존재하는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 통하여 LysSP의 tagging이 외래단백질을 효율적으로 세포외로 분비를 유도한다는 것을 확인함으로써 LysSP tagging을 이용한 유용단백질의 효율적인 분비체계를 확립하였으며, 구축된 난관상피세포 특이발현 Chicken ovalbumin promoter system과 LysSP tagging system을 이용하여 hEPO 단백질의 난관특이 발현 및 계란 난백으로의 효율적인 분비유도를 위해 활용하고자 한다.

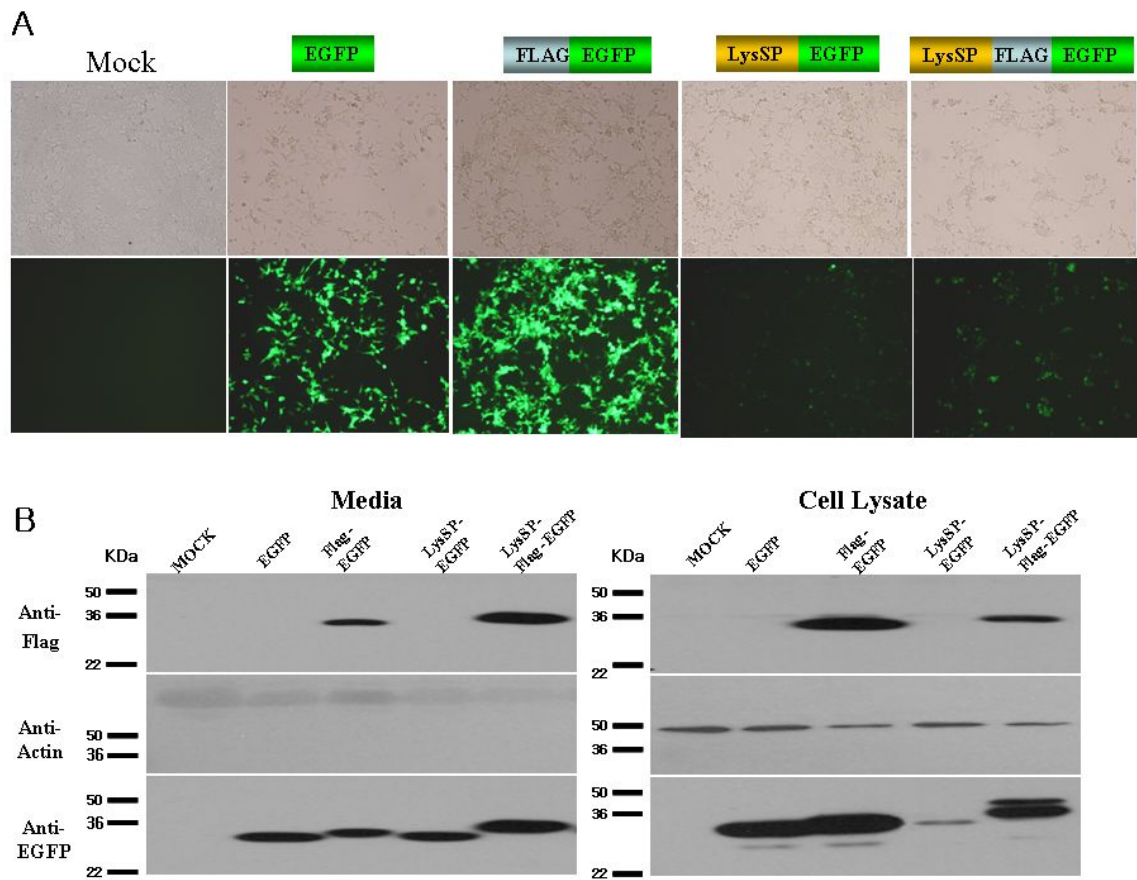


Fig. 88. Chicken lysozyme signal peptide (LysSP)의 외래단백질 분비에 미치는 영향

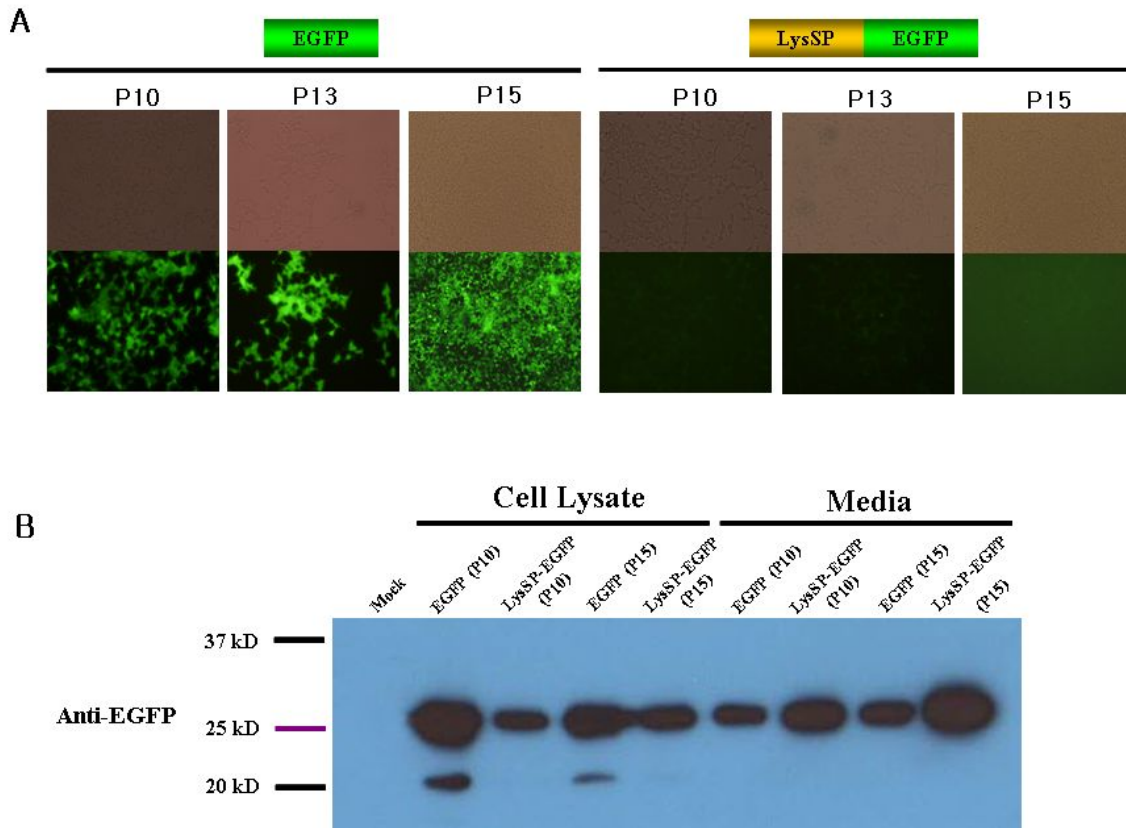


Fig. 89. 계대배양에 따른 LysSP의 외래단백질 분비에 미치는 영향

3. 제 2협동과제

가. 유전자 재조합에 의한 hEPO의 생산과 단크론성 항체를 생산하는 세포주 개발

(1) 대장균에서 hEPO의 생산을 위한 유전자 크로닝

hEPO에 대한 단크론성 항체를 생산하기 위하여 먼저 대장균에서 항원용 단백질의 생산을 시도하였다. 이를 위하여 발현 vector는 아래 Fig. 90과 같은 Novagen사의 pET-15b를 이용하였다. 먼저 유전자의 증폭을 위하여 *hEPO* 전체 유전자 582 bp에 대한 primer을 합성하였다. 이 primer는 Nde I의 제한효소 site를 가지는 forward primer인 5'-GGAATTCCATATGGGGCAATGTCCTG-3'와

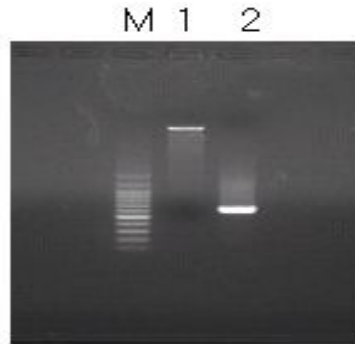


Fig. 91. Photogram of pET-15b expression vector (1) and PCR product (2).

(2) 단백질의 발현과 정제

클론된 대장균을 배양하여 단백질의 발현과 정제를 수행하였다. 이를 위하여 클론된 대장균을 LB배지에 접종하여 37°C에 배양한 후 O.D 값이 0.6에 도달하면 Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하였다. 이를 다시 5시간 정도 더 배양한 다음 원심분리하여 균체를 회수하였다. 이 균체를 lysis buffer (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris.Cl, 8M urea, pH 8.0)을 첨가하여 1시간동안 진탕하였다. 이를 12,000 rpm에서 20분간 원심한 후 상등액을 Ni-NTA resin (QIAGEN사)과 혼합한 다음 1시간동안 진탕하였다. 이 혼합물을 Poly-Prep chromatography column에 넣어 반응하지 않은 상등액은 유출시키고, 다시 washing buffer(100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris.Cl, 8M urea, pH 6.3)로 세척한 다음, elution buffer(100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris.Cl, 8M urea, pH 4.5)로 차례로 유출하여 단백질의 정제를 수행하였다. 이 일련의 과정은 12% SDS-PAGE로 확인하였으며, Coomassie blue staining은 micropreparative gel을 2% phosphoric acid가 포함된 30% ethanol에서 20분간 3회 고정시킨 다음 2% phosphoric acid로 30분간 3회 수세하였다. 그 후 gel을 18% ethanol, 2% phosphoric acid와 15% ammonium sulfate가 포함된 용액에 30분간 반응시킨 후 Coomassie Brilliant Blue G-250을 최종 농도의 1%가 되도록 첨가해서 밤새 반응시켜 확인한 결과 Fig. 92와 같이 나타났다.

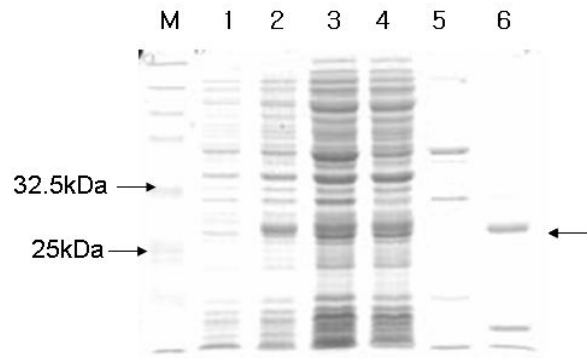


Fig. 92. hEPO expression in *E. coli* BL21 and purification. 1. Non-induced cells, 2. Cells induced with IPTG, 3. Cleared lysate (6 ml \rightarrow 5 μ l), 4. Flow-through (6 ml \rightarrow 5 μ l), 5. Wash (5 ml \rightarrow 20 μ l), 6. Elutes (1 ml \rightarrow 5 μ l),

(3) 단백질의 확인 동정

대장균에서 생산한 hEPO 단백질을 동정하기 위하여 MALDI-TOF MS를 이용하였다. Coomassie gel에서 단백질 band를 3차 증류수로 15분 동안 2회 행군 다음 water/acetonitrile (1 : 1, v/v)로 15분 동안 2회 행구었다. 10 mM DTT/0.1 M NH_4HCO_3 로 45분간 56°C에서 reduction하고 용액을 제거한 후 55 mM iodoacetamide/0.1 M NH_4HCO_3 를 첨가해 실온에서 30분 동안 어두운 곳에 방치하였다. Iodoacetamide 용액을 제거하고 gel 조각을 0.1 M NH_4HCO_3 에서 5분 동안 반응 시킨후 acetonitrile을 동량으로 첨가해 15분 동안 세척하였다. Peptide 추출은 15mM NH_4HCO_3 를 가하고 15분 동안 방치하고 acetonitrile을 첨가해 15분 더 방치하였다. 상등액을 얻은 후 gel 조각에 5% formic acid/acetonitrile (1 : 1, v/v)를 넣어 30분간 2회를 실시해 추출하였다. Matrix solution (40 mg/ μ l α -cyano-4-hydroxycinnamic acid solution, nitrocellulose solution (20mg/ μ l)을 acetone에 녹여 준비하였다. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid solution, nitrocellulose solution과 2-propanol을 2 : 1 : 1 비율로 섞었다. Peptide Calibrant (각각 50 - 200 fmole)로 des-Arg-bradykinin(monoisotopic mass, 904.4681)과 neutrtensin (1672.9715)을 섞어 사용하였다. Sample Loading plate에 sample :

matrix mixture를 1 : 1로 섞어 loading하여 말렸다. 말린 sample은 5 ml의 5% formic acid와 5ml의 Milli-Q water로 각각 10초간 번갈아 세척하였고 말린 다음 Voyager-DESTR MALDI-TOF mass spectrometer로 분석하였다. 질량분석기는 accelerating voltage, setting한 reflector mode와 positive ion mode에서 작동하였다. 최초 질량은 500m/z로 사용하였고 질량 값 측정 후에 MS_FIT를 이용하여 단백질 동정하였다. Search parameter로는 다음과 같은 것을 적용하였다. SWISS-PROT과 NCBI는 protein sequence database로서 사용하였다. Mass tolerance는 50ppm 이하이고 cysteine의 alkylation과 N-terminal acetylation, 그리고 N-terminal glutamine의 pyroGlu 등의 변형이 고려되었다.

Gel 조각을 digestion buffer (50 mM NH_4HCO_3 , 5 mM CaCl_2)와 12.5 ng/ μg trypsin을 처리한 후 45분간 trypsin이 gel 속으로 들어가도록 두었다. Peptide 추출한 후 sample loading plate에 sample : matrix mixture를 1 : 1로 섞어 loading하여 말린 다음 Voyager-DESTR MALDI-TOF mass spectrometer로 분석한 결과 Fig. 93-A와 같이 나타났고, search parameter로는 SWISS-PROT과 NCBI는 protein sequence database로서 사용한 결과 Fig. 93-B와 같이 hEPO로 확인되었다. 생산된 hEPO 단백질은 투석 과정을 거쳐 단백질 정량을 한 후 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

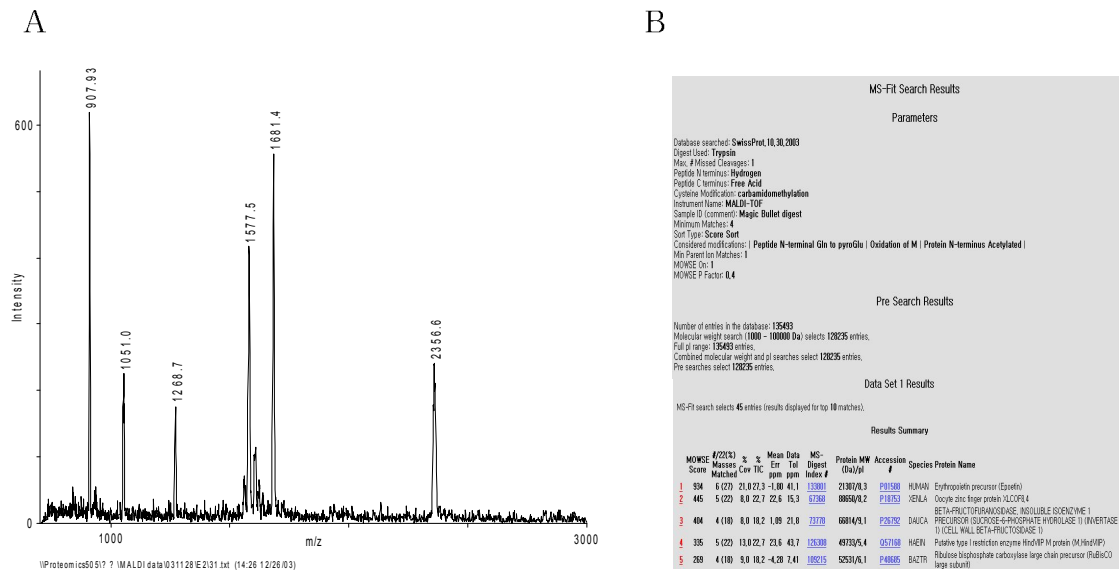


Fig. 93. Peptides mass fingerprinting of hEPO. The gel band was in-gel digested with trypsin. After desalting, the peptide mixture was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (A) and mass volume were used for searching SwissPort database with MS-Fit Algorithm (B).

(4) 단백질 정량

생산된 단백질의 농도는 Bradford 방법을 이용하여 정량을 하였다. Bio-Rad사의 단백질 분석 시약을 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며 (UV-VIS spectrophotometer), 소 혈청 알부민(Sigma, Cat. No. B-4287)을 표준 시료로 사용하였다.

(5) 단클론성 항체 생산을 위한 hybridoma 세포주 개발

(가) 면역

세포융합을 위하여 사용한 BALB/c 마우스는 오리엔트바이오(주) 동물사육 센터에서 계대 및 보존 중인 것을 구입하여 사용하였다. 생후 6주된 BALB/c 마우스(암컷)에 hEPO 단백질과 Freund's complete adjuvant의 혼합액을 마리당 100-200 μ g씩 복강으로 면역하였다. 최초 면역 3주와 6주 후 같은 방법으로 단백질

과 Freund's incomplete adjuvant의 혼합액으로 추가접종을 실시하였다. 9주 후에 인산완충용액(PBS)으로 희석한 동량의 단백질을 복강 내로 주사하여 최종 면역하였다.

(나) 마우스 항혈청 역가 검정

최종 면역 후 2일이 경과된 BALB/c 마우스의 꼬리정맥에서 채혈한 후 혈청을 분리하여 PBS로 단계별 희석하여 마우스 항혈청 역가를 검정하였다. 항체의 역가검정은 hEPO 단백질을 완충액(coating buffer)에 녹여 microtiter plate에 100 μ l씩 주입한 다음 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅한 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 항체의 비 특이적인 반응을 방지하기 위해 PBS에 녹인 2% BSA를 가하여 하룻밤 4°C에 방치한 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 세척한 plate에 항체를 적당히 희석하여 각 100 μ l씩 well에 주입하고 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 plate를 세척용 완충액으로 5회 세척하고 1 : 10,000으로 희석한 2차 항체 (anti-mouse IgG-HRP)를 100 μ l씩 분주한 다음 1시간 실온에서 반응시킨 후 세척용 완충액으로 다시 6회 세척하고 기질용액(ABTS) 100 μ l를 분주하여 실온에서 30분간 효소반응을 유지시킨 후 반응 정지액 50 μ l씩을 첨가하여 효소반응을 중단시킨 다음 나타난 발색반응의 정도를 405 nm에서 측정하여 역가가 높은 마우스를 세포융합에 사용하였다.

실험동물 중 hEPO에 대해 강한 반응을 보였으며 4마리의 경우 Fig. 94에서와 같이 100,000배 희석한 혈청용액에서도 반응성이 나타나 면역이 잘 되었음을 보였다.

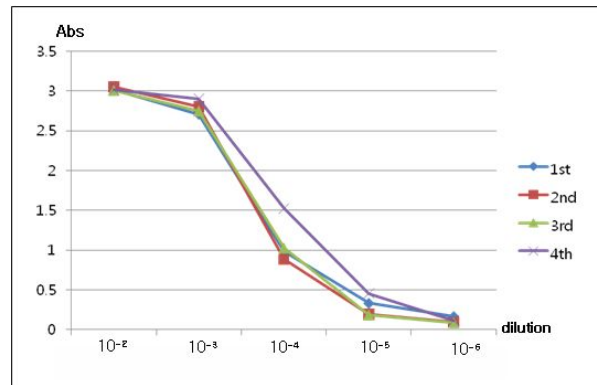


Fig. 94. Titer of mouse antisera against hEPO by ELISA.

(다) 형질세포종 세포의 준비

세포융합에 사용한 형질세포종 세포는 미국 국립보건원으로부터 분양받은 P3x63Ag8.V653 세포주를 사용하였다. 이 세포는 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT)가 음성이어서 8-azaguanine에 내성이며 면역글로부린을 생산하지 못한다. 이 세포주를 8-azaguanine (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 10% fetal calf serum, 10% NCTC, 그리고 gentamicin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 RPMI 1640로 배양하였으며 2-4일에 한번씩 원침세척하여 새로운 배지로 갈아주면서 37°C, 6% CO₂에서 배양 계대하였다. 세포융합에 사용할 형질세포종 세포는 새로운 배지로 18시간 배양한 후 RPMI 1640으로 3회 세척하고 세포수를 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조정하여 사용하였다.

(라) 세포융합(cell fusion)

hEPO에 특이한 항체를 생산하는 BALB/c 마우스로부터 비장세포를 적출하여 단클론성 항체를 생산하는 hybridoma를 얻기 위한 세포융합을 실시하였다. 면역시킨 BALB/c 마우스 중 양성반응을 보인 마우스를 세포융합에 사용하였다. Table 19에서 보는 바와 같이 융합 후 분주한 1,600 well중 1,450 well에서 세포가 성장하여 90.6%의 성장율을 보였다. 융합 후 well 상에 1/3 이상을 자란 세포가 보일 경우 상등액을 ELISA를 실시하여 항체의 생성 여부를 관찰한 결과 1차적으로 총 40개의 well에서 반응을 나타내었다.

Table 19. Fusion and frequency of hybrids selected by HAT medium.

Fusion	Number of mice titer	Number of mice used in fusion	Number of mice wells seeded	Number of growth in HAT medium	Fusion rate (%)
3 times	4	3	1,600	1,450	90.6

마) 융합세포의 선택과 단세포군 배양(Cloning)

양성 반응을 보인 well의 모든 세포를 24well plate에 옮겨 지속적인 배양을 하여 EPO에 대해 특이적 항체를 지속적으로 생산하는 hybrid를 얻기 위해 크로닝 하였다. 크로닝은 24 well에서 성장하는 세포를 aminopterin이 첨가되지 않은 DMEM 배지에서 무한대 희석법으로 실시하여 최종 10-30 cell/ml의 농도로 조정하여 well당 100 μ l씩 분주하여 5-7일 배양하였다. 배양 후 역위상차 현미경으로 Fig. 95에서와 같은 모양으로 1개의 세포집락이 형성된 well을 선택하여 항체의 생성 여부를 ELISA법으로 확인하였다. 항체의 역가가 높은 hybridoma를 최종선택하여 다시 한번 더 크로닝을 실시하여 증식시키고, 10^6 cell/ml로 조절된 배양세포를 cryo tube에 1 ml씩 분주하여 -70°C 에서 급속동결한 후 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

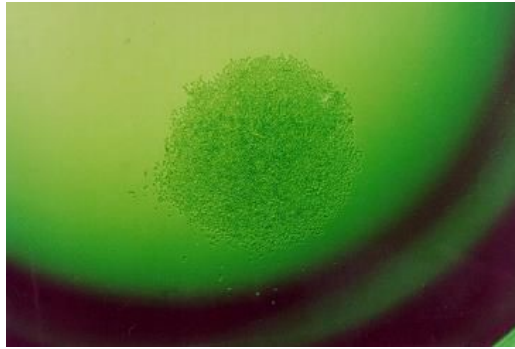


Fig. 95. Photogram of cloned cells.

또한, 항체의 반응 특이성을 확인하기 위하여 Western Blotting을 수행하였다. 50ng의 hEPO 단백질을 전기영동한 후 semi-dry transfer cell (Bio-Rad)을 이용하여 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Transfer가 끝난 membrane을 5 % skim milk가 포함된 blocking buffer에서 incubation한 후 각 세포배양 상등액을 1 : 100으로 희석한 용액으로 반응시킨 다음 horseradish peroxidase-conjugated된 secondary antibody를 처리하였다. 검출은 ECL법으로 수행하였다. 그 결과 Fig. 96과 같은 반응 감도를 보였다.

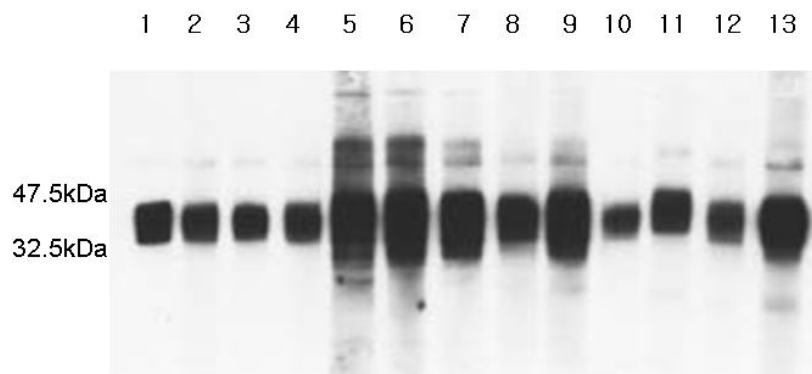


Fig. 96. Western blotting of hEPO using cell culture supernatant.

나. 단클론성 항체의 특성

(1) 항체의 isotype 조사

각 융합잡종 세포가 분비하는 단클론성 항체의 isotype을 조사하였다. Western blotting의 결과로 항체의 역가가 높은 것으로 판단되는 hybridoma cell의 항체의 isotype 결정을 Boehringer mannheim 사의 mouse monoclonal antibody isotyping kit를 사용하여 회사에서 제시한 방법에 따라 시행하였다. 개발한 총 14종의 세포주의 isotype을 조사한 결과 Fig. 97과 같은 모양으로 나타났으며, 이들 세포주를 정리한 결과 Table 20에서 보는 바와 같이 IgG_{2b}와 IgG₁을 생산하였으며, light chain은 κ 형과 λ 형으로 나타났다.



Fig. 97. Photogram of isotype kit for determining the subclass of immunoglobulins produced by hybridoma cell.

Table 20. Immunoglobulin subclasses of antibodies produced by hybridoma cells

Hybridoma cell line	Subclass	Light chain type
EPO- #11	IgG2b	κ
EPO- #12	IgG2b	κ
EPO- #13	IgG2b	κ
EPO- #5-12	IgG1	κ
EPO- #9-9	IgG1	λ
EPO- #1-23	IgG1	κ
EPO- #6-7	IgG1	κ
EPO- #1-10	IgG1	κ
EPO- #7-8	IgG1	κ
EPO- N-12	IgG1	κ
EPO- N-13	IgG1	λ
EPO- N-22	IgG1	κ
EPO- N-31	IgG2b	κ
EPO- N-48	IgG1	κ

(2) hEPO 항체의 epitope mapping

생산된 항체의 binding site를 알아보기 위하여 Fig. 98과 같이 hEPO의 cDNA를 domain별로 구분하여 pET15b 발현벡터에 클로닝하여 대장균에서 발현을 유도하였다. 이들 발현 단백질을 12% SDS-PAGE로 수행하여, Western bolt으로 각 hEPO 항체의 binding site를 확인하였다.

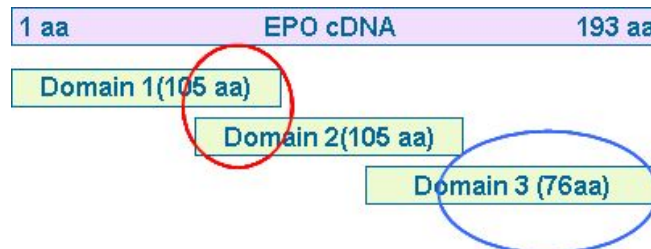


Fig. 98. hEPO domain for epitope mapping.

그 결과, EPO-#11, EPO-#12, EPO-#13, EPO-#5-12, EPO-#9-9, EPO-#1-23, EPO-#1-10, EPO-#7-8, EPO-N-12, EPO-N-22, EPO-N-31, EPO-N-48 hybridoma가 생산하는 항체는 Fig. 99와 같은 모양으로 N-terminal에 binding하는 것으로 나타났으며, EPO-#6-7, EPO-N-13은 Fig. 100과 같은 모양으로 C-terminal에 binding하는 것으로 나타났다.

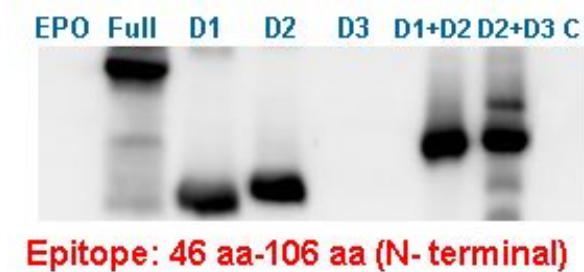


Fig. 99. Western bolt of EPO- N-12 antibody for epitope mapping.



Fig. 100. Western bolt of EPO- #6-7 antibody for epitope mapping.

다. 항체의 생산 및 정제

(1) hEPO에 대한 단클론성 항체의 대량생산

개발한 hEPO hybridoma 세포주 중 affinity가 가장 좋았던 EPO-N-12 hybridoma cell line을 이용하여 항체의 대량 생산을 시도하였다. 복수액과 회전식배양법으로 시도하였으며, 복수액의 생산을 위해서는 1주일전 복강에 2,4,10,14-tetramethylpentadecane (pristane) 0.5 ml를 주입한 마우스에 T-75 flask에서 증식한 hybridoma cell을 수거하여 세포 수가 $1.0 \times 10^7 / 0.2$ ml 되도록 조절하여 마우스의 복강에 주입하였다. 약 7-8일 후 복강으로부터 복수액을 채취하여 Protein-A agarose affinity system을 이용하여 정제하였다. 복수액에서 항체의 정제는 복수액을 5배의 binding buffer (0.1M NaH₂PO₄, 0.15M NaCl, 5mM EDTA, pH 7.0)에 희석한 다음 Protein-A agarose column에 천천히 흘려보낸 다음, 같은 buffer로 washing하였다. 충분히 washing이 끝난 후 Elution buffer (0.1M glycine/HCl, 0.01% sodium azide, pH 2.7)로 유출하였다. 유출물은 동량의 neutralization buffer (1M Tris, 0.01% sodium azide, pH 9)가 들어있는 tube에 유출하였다. 이 항체용액은 3 L의 PBS 용액에서 투석을 3일 동안 6회 반복한 다음 항체양을 정량한 다음 실험에 사용하였다. 회전식 배양법에 의한 항체의 대량생산은 EPO-N-12의 세포주를 T-75 flask에 증식을 한 후 일정량의 세포수가 되었을 때 Fig. 101과 같이 hyclone사의 5%혈청배지에 접종한 후 6% CO₂, 40-60 rpm에서 배양하였다. 배양액에서의 항체의 생산을 배양일에 따라 조사하였다. 배양 5일후에는 세포가 사멸하여 가장 생성이 많았던 5일을 배양일로 하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 얻어 membrane filter를 통하여 농축을 한 후 protein-A column으로 항체를 정제한 결과 5일 째에서는 1L 배양액에서 Fig. 102와 같이 15.6 mg의 항체를 얻을 수 있었다. 항체를 12% SDS-PAGE로 확인한 결과 Fig. 103과 같이 확인할 수 있었다.

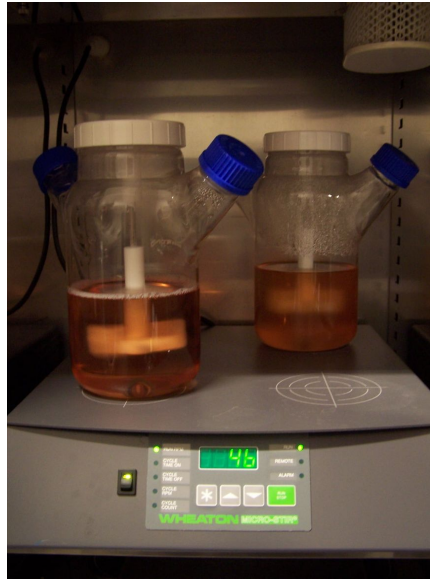


Fig. 101. Hybridoma cell culture by spin culture.

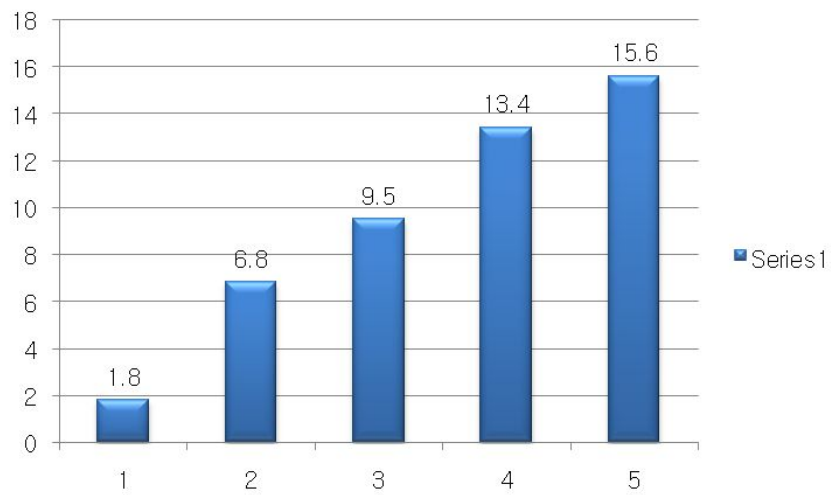


Fig. 102. Production of monoclonal antibody with serum free medium by spin culture.

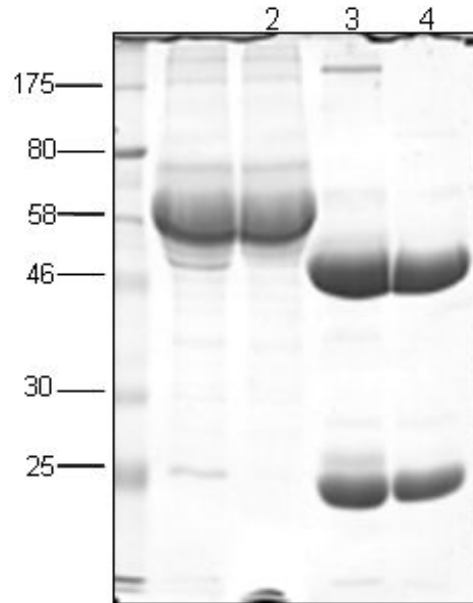


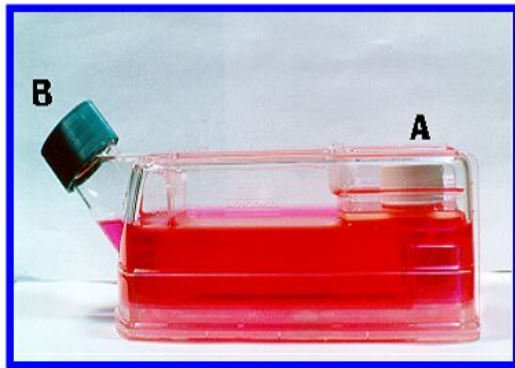
Fig. 103. Antibody purification(EPO-N-12). 1. hybridoma cell media crude, 2. flow, 3. elution, 4. ascite elution.

라. Immunoaffinity chromatography 이용한 세포배양액에서의 hEPO 정제법 확립

(1) 세포주를 이용한 EPO의 생산

총괄과제 연구책임자로부터 분양받은 hEPO 생성 세포주인 CHO 세포주 및 HeLa 세포주의 안정적 hEPO의 생성을 확인한 다음, 보다 많은 생산을 유도하기 위하여 membrane technology를 이용한 배양방법을 선택하여 실험을 수행하였다. Fig 104와 같은 배양용기에 세포를 접종한 후 7일간 배양하여 배양액을 회수하여 3000rpm에서 20분간 원심분리 한 다음 0.2um filter를 통하여 투과한 후 Western bolt으로 hEPO의 생성능을 확인하였다. 그 결과 T-75 flask의 배양액보다는 약 50-100배 높은 hEPO를 생성하는 것으로 나타났다. 이를 배양액에서 hEPO를 분리 정제하는 방법을 먼저 확립하였다.

membrane technology



Long-term high-level protein expression

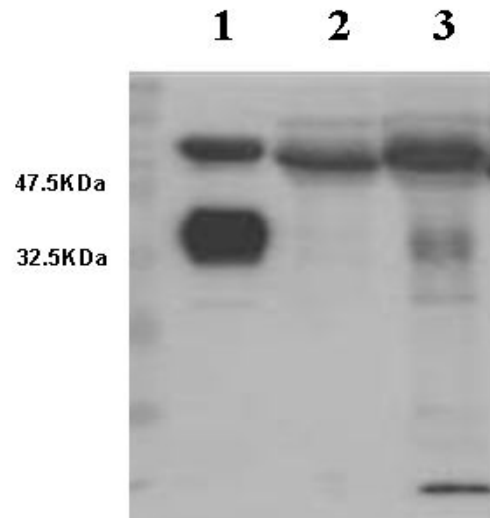


Fig. 104. hEPO production using membrane technology and western bolt analysis of hEPO expression.1. St. EPO, 2. CHO-EPO(T-75flask), 3.CHO-EPO (celline1000 flask).

(2) Immunoaffinity column 제작

생산된 항체를 이용하여 EPO의 정제를 위한 immunoaffinity column을 제작하였다. CNBr-activated sepharose 4B (GE Healthcare사)를 감압장치가 부착되어있는 유리 funnel에 옮기고 gel 10배의 1mM HCl로서 gel을 swelling하였다. gel을 세척 후 차가운 단크론성항체가 들어있는 용기에 넣고 천천히 흔들어 덩어리가 없는 혼합액이 되게 한 다음 4℃에서 하룻밤동안 천천히 교반시켰다. 항체와 gel의 결합이 확인되면 항체의 잔여 activeside를 없애기 위해 1 M ethanolamine-HCl을 첨가한 다음 배양을 3시간 더 계속하였다. 단크론성 항체와 결합된 gel을 glass filter가 부착된 funnel에 옮기고 물과 PBS로 gel을 감압하였다. 세척이 끝난 gel cake는 적당한 유리 병이나 시험관에 넣고 PBS를 첨가한 다음 덩어리가 생기지 않도록 충분히 교반시켰다. 이것에 0.1% sodium azide를 첨가하고 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 항체의 결합은 아래 Fig. 105와 같이 항체가 결합된 resin을 단백질 정량 시약인 bradford 시약에 넣어 반응정도를 확인하였고, 결합 상등액에서 남아 있는 항체의 양을 확인한 결과에서도 모두 resin과 결합한 것으로 나타났다.

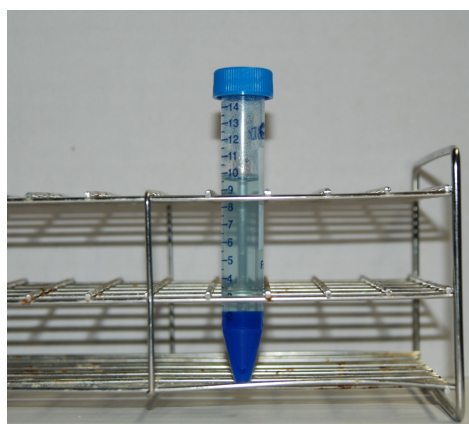


Fig. 015. Photogram of coupled antibody-CNBr sepharose resin.

(3) immunoaffinity column법에 의한 EPO의 정제

앞서 준비한 항체가 결합된 resin을 column에 충전하고 GE healthcare 사의 AKTA FPLC에 장착하여 세포배양물을 시료로 immunoaffinity 크로마토그램을 실시하였다. Carbonate buffer (0.1 M NaHco₃, 0.5 M NaCl, pH 7.5)로 column을 평위화하고 시료를 흘려 보낸 후 다시 carbonate buffer로 충분히 씻어준 후 carbonate buffer와 0.1M glycine-HCl (pH 2.2) buffer를 사용하여 glycine buffer가 100이 될 때까지 단계적으로 유출하여 분획별로 시료를 수집하여 단백질이 들어있는 분획을 획득하였다. 유속은 1ml/min으로 하였으며, fraction size는 0.5ml, UV파장은 280nm로 하였다. 유출물은 동량의 neutralization buffer (1M Tris, 0.01% sodium azide, pH 9)가 들어있는 tube에 유출하였다. 일련의 과정을 Western Blotting으로 확인하였다. Fig. 106에서와 같은 pick를 나타내었으며, pH 3.5에서 2.9 사이에 모두 유출되는 것으로 나타났다. Western blot에서 다른 단백질은 보이지 않았으나 pH 2.7까지 완전히 유출한 것은 모두 모아 농축한 후 western blot을 한 결과 Fig. 107에서와 같이 약간의 물순물이 함께 유출되는 것으로 확인되었다.

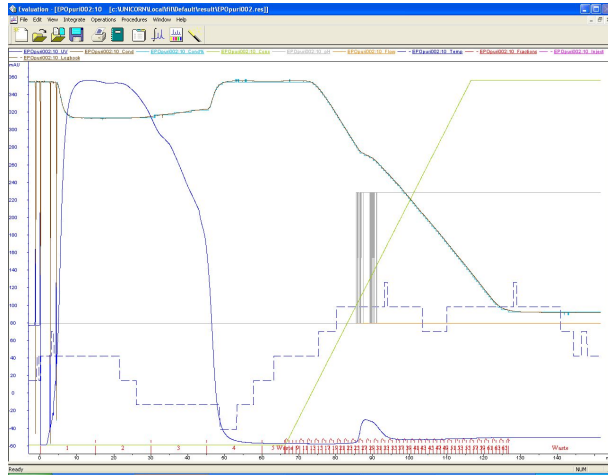


Fig. 106. Chromatogram of isolation of hEPO using immunoaffinity coulumn.

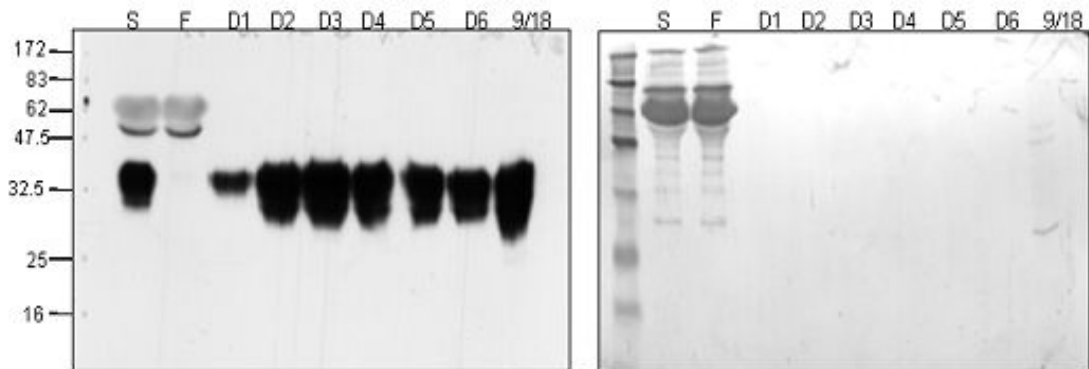


Fig. 107. Purification of CHO-EPO by immunoaffinity chromatograpy . S. sample, F. flowthrough. D1-6 fraction elute sample of antibodyaffinity column. 9/18. pH 2.7 elution sample, left: Immunoblot, right: membrane coomassie stain.

(4) Superdex-200 column법

순수 정제도를 높이기 위하여 Superdex-200 column 크로마토그래피를 실

시하였다. 앞서 immunoaffinity column법에 의해 수집된 시료를 다시 농축하여 FPLC에 장착한Superdex-200 column을 buffer (0.05M phosphate buffer, 0.15M NaCl pH7.0)로 충분히 흘려보내 평위한 한 후 시료를 흘려보낸 후 계속해서 같은 buffer를 사용하여 gel filtration을 실시하였다. 유속은 0.5 ml/min으로 하였으며, faction size는 0.5 ml, UV파장은 280 nm로 하였다. Fig. 108과 같이 앞쪽에 약간의 물순물이 포함되어 흘러나왔으며 그 뒤에 hEPO를 볼 수 있었다. 이 분획을 Fig. 109에서와 같이 12% SDS-PAGE를 실시한 후 comassie 염색을 하여 그 순도를 확인할 수 있었다. 이러한 일련의 과정을 통하여 세포 배양액 500 ml에 2 mg 정도의 EPO가 함유되어 있었고 최종적으로 0.8 mg의 hEPO를 정제할 수 있어 결과적으로 40% 정도의 회수율을 보였다고 할 수 있으나 중간 단계에서 시료의 농축 시 소실과 FPLC에 적용할 때 빠지는 시료의 양을 생각하면 실제 연속적인 정제에서는 더 높은 회수율을 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

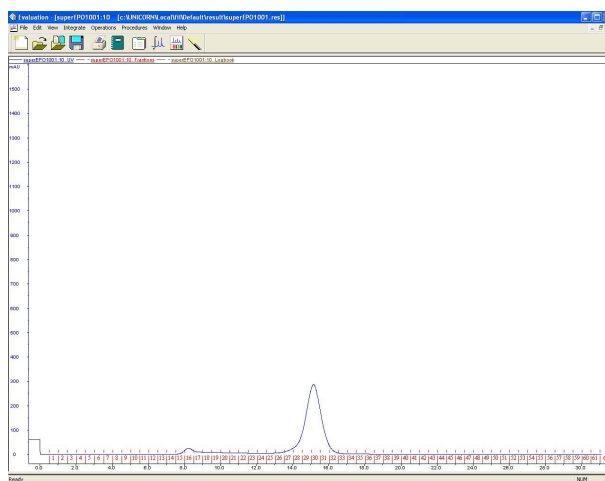


Fig. 108. Chromatogram of hEPO purification by superdex-200 coulumn with AKTA FPLC.

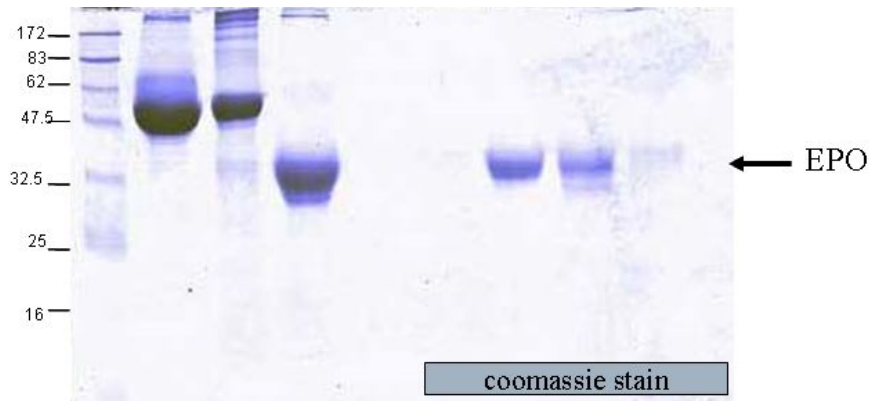


Fig. 109. hEPO purification by superdex-200 coulumn. 1. T-75 flask sample, 2. celline 1000 flask sample, 3. Immunoaffinity purification sample, 4-8. superdex-200 filterlration faction samples.

마. 정제된 EPO의 2DE gel 분석

CHO-hEPO cell 과 Hela-hEPO cell line을 배양한 세포 배양물에서 분리 정제한 EPO의 2DE gel 분석을 통하여 PI 값을 확인하고자 하였다. 정제한 단백질 약 10 ug을 rehydration buffer (7M Urea, 2M thio urea2% CHAPS, 100mM DTT, 0.2% bio-lyteampholite)와 섞어 최종 125 ul를 isoelectric focusing tray에 loading 후 IPG strip gel (pH 3-10, 7cm, Bio-Rad)을 rehydration하였다. Protein IEF Cell (Bio-Rad)을 이용하여 12시간 active rehydration한 후 250 V 15 min, 4000 V 2 hr, 4000 V 12000 Vhr로 focusing을 마친 후 strip을 꺼내어 equilibration buffer (6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8)에 1% w/v DTT를 첨가하여 15분 동안 상온에서 incubation한 후 같은 buffer에 2.5% w/v iodoacetamide를 첨가하여 2차 incubation을 실시하였다. 13.5% SDS-PAGE gel (10X10cm, GE healthcare)을 준비하여 반응 끝낸 strip을 엮어 100 V로 seperation을 진행하였으며, PVDF membrane (Immobilon-P, MILLIPORE)에 4°C에서 2시간 동안 transfer하였다. 5% skim milk/TBS-T을 이용하여 상온에서 2시간 blocking을 한 후 anti-EPO polyclonal antibody (R&D system)를 2000 : 1로 상온에서 1시간 처리하였으며, anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked F (ab')₂ (GE

healthcare)을 2차로 상온에서 1시간 처리하였다. Western blotting luminol reagent (santa cruz)을 이용하여 최종 band를 detection하였다.

hEPO는 당쇄 말단의 salic acid 때문에 PI 값이 4 - 4.5 전후에 존재하며 반감기에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이를 위하여 표준 품으로 calbiochem사의 hEPO와 비교하였다. 정제한 CHO-EPO와 Hela-EPO의 경우 아래 Fig. 110과 같이 나타났다. 표준품의 경우 PI 값이 4 전후에서 band를 형성하였으나 CHO-EPO는 5전후에 band를 보였고, HeLa-EPO는 표준품과 유사한 경향을 보였다.

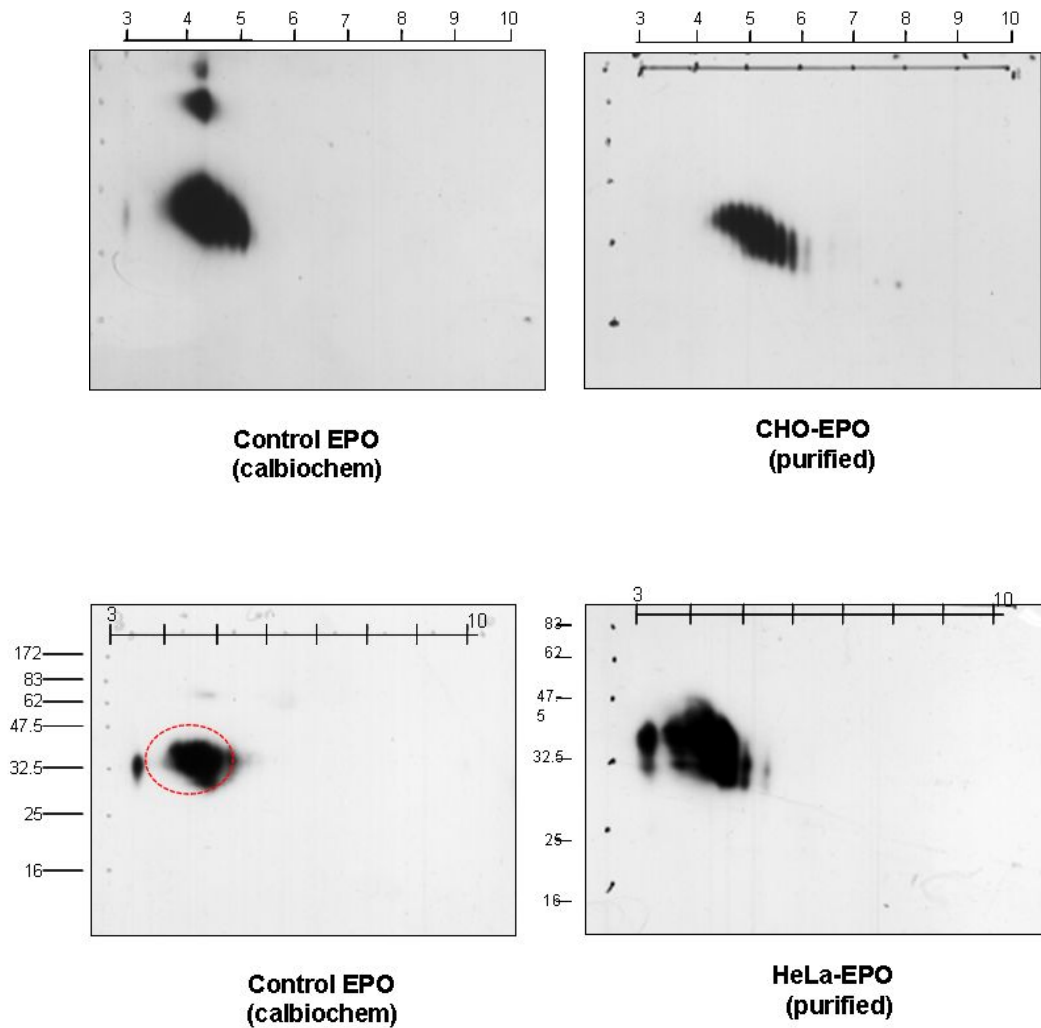


Fig. 110. 2DE gel analysis and western blot assay of purified EPO.

바. 단클론성 항체를 이용한 Sandwich ELISA법의 확립

hEPO의 정량적 분석을 위한 방법을 확립하기 위하여 개발한 항체를 이용하여 Sandwich ELISA법을 확립하였다. 이 ELISA법의 확립을 위해서는 강력한 affinity가 있는 항체가 필요하다. 이를 위하여 개발한 Hybridoma cell line 중 특이적으로 감도가 좋은 항체를 선발하는 실험을 행하였다. 항체는 각 hybridoma cell line을 배양한 다음 배양액에서 항체를 정제한 다음 각 항체를 1 mg/ml 로 정량하여 실험에 사용하였다. 먼저 각 항체를 microtiter plate에 well 당 200 ng 씩 coating buffer (carboneiter buffer, pH 9.6)에 희석하여 주입한 후 4°C에 방치한 후 세척용 완충액 (PBS-tween20, pH 7.3)으로 3회 세척하였다. 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위해 PBS에 녹인 2% BSA를 가하여 다시 하룻밤 4°C에 방치한 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 세척한 plate에 표준 EPO를 농도별로 희석하여 각 100 μ l 씩 well에 주입하고 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 plate를 세척용 완충액으로 4회 세척하고 anti-EPO polyclonal antibody (R&D system)를 2000 : 1로 희석하여 각 well에 100 μ l 씩 well에 주입하고 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 plate를 세척용 완충액으로 4회 세척하고 2000:1로 희석한 anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked F(ab')₂ (GE healthcare)을 각 well에 100 μ l 씩 well에 주입하고 다시 37°C에서 1시간 반응시켰다. plate를 세척용 완충액으로 5회 세척하고 발색시약(ABTS)을 100 μ l 씩 well에 주입하고 37°C에서 30분 반응시킨 후 반응을 종결하고 UV 410nm에서 측정하였다.

그 결과 Fig. 111과 같이 이들 항체 대부분이 1-100ng에서 검출이 가능한 것으로 나타났으나 검출감도에서는 1-10번 항체와 K-12 (EPO-N-12)번 항체가 가장 좋은 결과를 보였다. 이 두 항체는 coating 항체양을 달리하여 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1,000배 희석한 후 실험한 결과 Fig. 112에서와 같이 나타났다. 결과적으로 K-12번 항체를 1:1000으로 희석한 다음 coating하고 EPO를 반응시킨 후 2차 항체로 단클론 항체를 1:2000으로 희석하여 다시 반응시킨 후 효소와 기질을 반응시키면 1-100 ppb의 ELISA 곡선을 얻을 수 있었다.

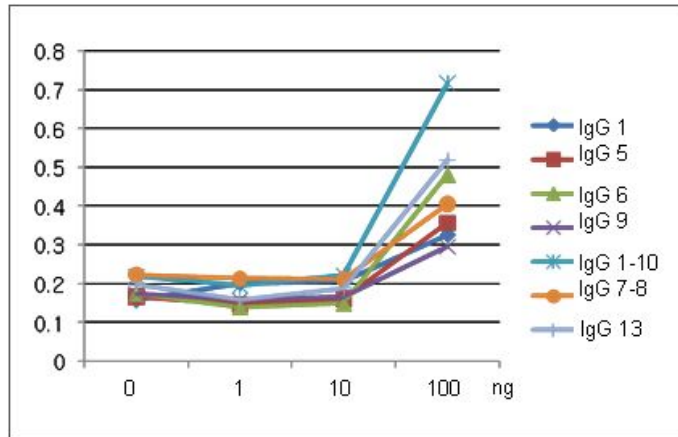


Fig. 111. ELISA curve of various antibodies by sandwich ELISA.

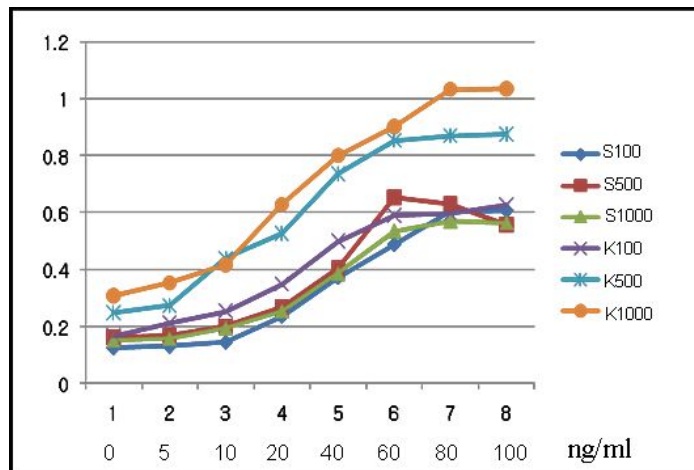


Fig. 112 .Sandwich ELISA curve for hEPO detection.

사. EPO의 반감기와 생물학적 활성을 향상시키기 위한 연구

(1) hEPO 변이체들의 cloning 및 발현 벡터 구축

(가) 인간 EPO의 cloning

최근 많은 연구자들이 hEPO의 생물학적 반감기를 향상시키기 위하여 노력하고 있다. 본 연구에서도 이러한 일환으로 변이체를 만들어 활성을 보고자 하였다. 이를 위하여 먼저, hEPO 지놈 서열을 클로닝하기 위해 Genbank accession number NT_005403에 근거하여 forward primer인 gEPO-F (5' - NNNGAATTCATGGGGGTGCACGGTGAAGTACT-3')와 reverse primer인 gEPO-R (5' -NNNAGATCTTTCATCTGTCCCCTGTCCTGCA-3')을 디자인하였고 PCR 반응에 의해 2149 bp의 PCR product를 얻었다. 이들 PCR 산물의 서열이 Genbank accession number NT_--5403와 일치하는지 확인하기 위해 sequencing을 수행하였으며, 그 결과 이들 서열들이 일치함을 확인하였다(Fig. 113).

Cloning of human EPO



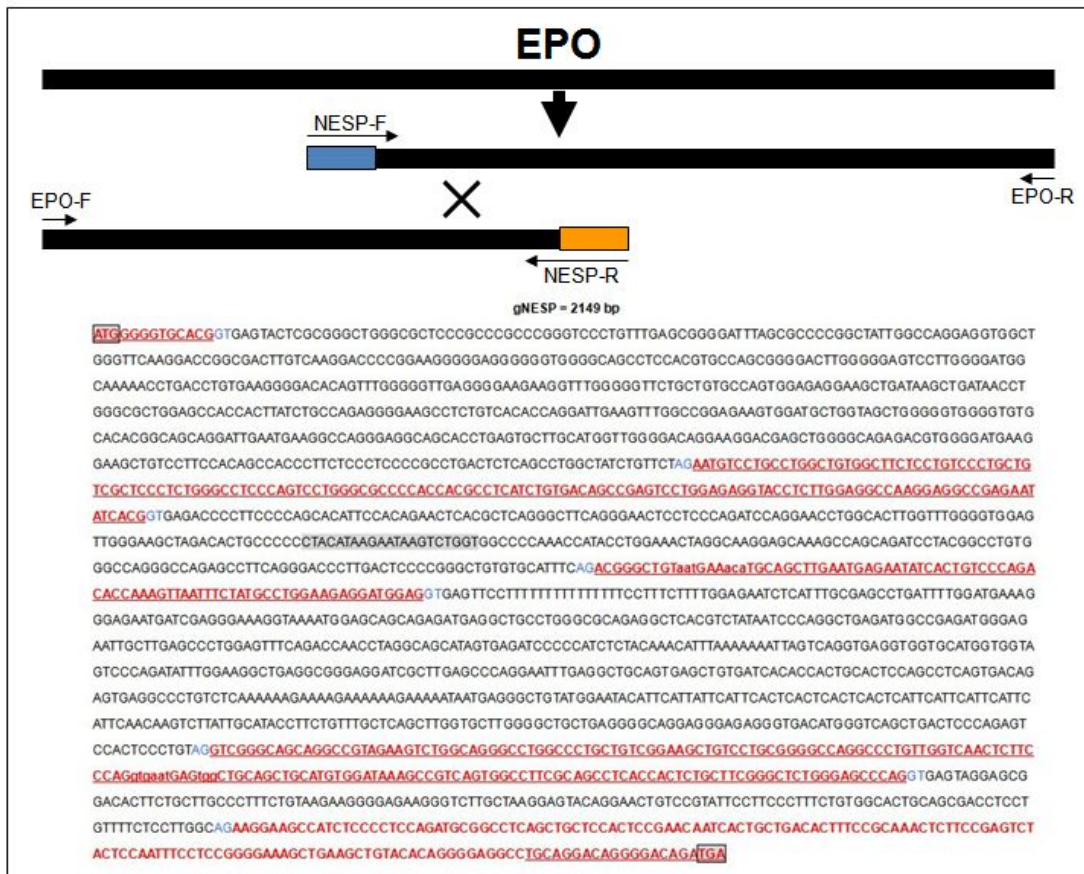
.Fig. 113. Cloning of human EPO gene.

(나) NESP의 cloning

Amgen사의 NESP (Novel Erythropoiesis Stimulating Protein)는 5개의 amino acid를 치환함으로써 기존의 3개의 N-glycosylation site에 2개가 더 추가된 5개의 N-glycosylation site를 만드는 hEPO 변이체이다. NESP를 cloning하기 위해

인간 EPO를 주형으로 하여 NESP-F (5' -GGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTAATGAAACATGC-3'), NESP-R (5' -ACATGCAGCTGCAGCCACTCATTCACCTGG-3'), EPO-F (5' -GAATTCATGGGGGTGCACGGTGAGTACT-3'), 그리고 EPO-R (5' -GCGGCCGCTCATCTGTCCCCTGTCCTGCA-3') primer를 디자인하였고 PCR 반응에 의해 2149 bp의 PCR product를 얻었다. 이들 PCR 산물의 서열이 예상 서열과 일치하는지 확인하기 위해 sequencing을 수행하였으며, 그 결과 이들 서열들이 일치함을 확인하였다 (Fig. 114).

Cloning of NESP



.Fig. 114. Cloning of NESP gene.

(다) 인간 chorionic gonadotropin의 cloning

용모막의 생식자극호르몬인 인간 chorionic gonadotropin의 C-말단의 25 아미노산에는 hEPO와 융합단백질을 만들었을 때 효능이 장시간 유지하는데 관여하는 4개의 o-linked oligosaccharide들이 결합할 수 있는 서열들이 존재를 한다. 그들을 cloning하기 위해 Genbank accession number NM_000737에 근거하여 cloning 하기 위해 hCGC-F (5' -TCCTCTTCCTCAAAGGCCCTCCC-3')와 hCGC-R (5' -CCCCTCGAGTTATTGTGGGAGGATCGG-3') primer를 디자인하였고 PCR 반응에 의해 99 bp의 PCR product를 얻었다. 이들 PCR 산물의 서열이 Genbank accession number NM_000737과 일치하는지 확인하기 위해 sequencing을 수행하였으며, 그 결과 이들 서열들이 일치함을 확인하였다 (Fig. 115).

Cloning of human CGC



.Fig. 115. Cloning of human CGC.

(라) hEPO 변이체들의 발현 벡터 구축 및 CHO 세포주 확립

과발현 벡터인 pCXN2는 CMV와 베타-actin 프로모터를 가진 발현 벡터로서 hEPO derivative들을 활용하여 pCXN2-EPO, pCXN2-EPO/hCGC, pCXN2-NESP, pCXN2-NESP/hCGC를 구축하였다(Fig. 116).

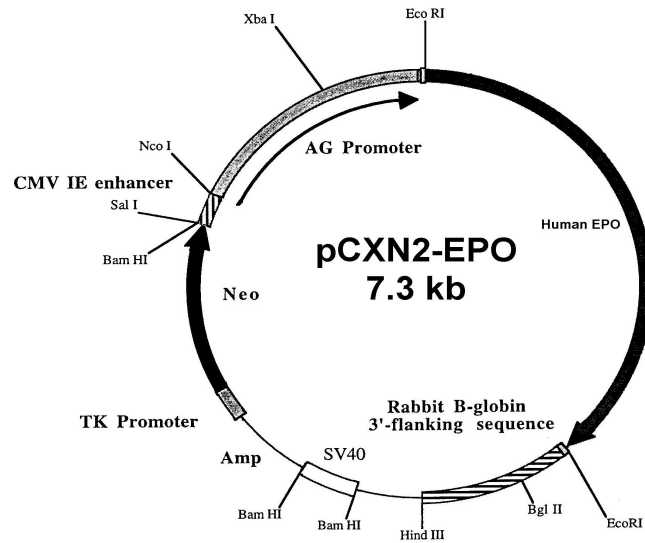


Fig. 116. pCXN2-EPO expression vector.

(2) hEPO 변이체들의 RT-PCR과 서열 결정

이들 hEPO 변이체들의 근본은 hEPO genome 서열로 부터 유래된 것으로 전사를 통해 예상했던 아미노산들이 만들어 질수 있는지를 확인하기 위해 mRNA의 서열을 RT-PCR와 sequencing을 통해 확인하였다. 우선 CHO 세포주에 hEPO 변이체들의 발현 벡터를 각각 주입하여 mRNA의 발현을 유도하였고 각각의 세포주들로부터 total RNA를 분리한 후 RT를 통해 hEPO 변이체들의 cDNA를 cloning하고 sequencing을 통해 그 서열들이 일치함을 확인하였다(Fig. 117).

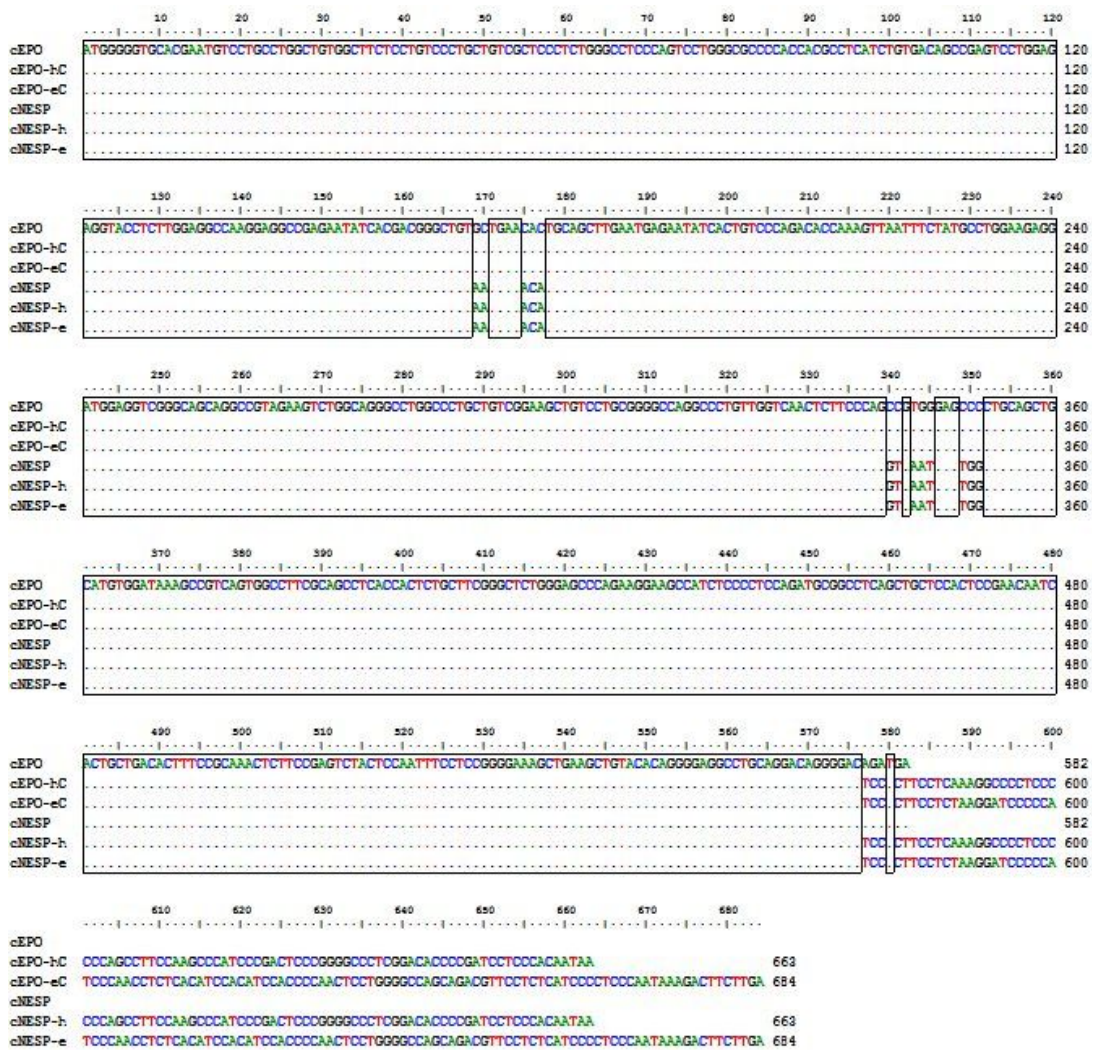


Fig. 117. Sequencing of hEPO derivatives.

(3) hEPO 변이체의 in-vitro assay 실험

구축한 hEPO 변이체 (genomic EPO, EPO-hCG, NESP, NESP-hCG)를 CHO 세포주에 형질전환하여 세포주를 확립하였고, 연구실에서 보관중인 HeLa cell (transfection gEPO)을 celline 1000 flask에서 7일간 배양한 후 배양 상등액을 hEPO immunoaffinity column을 이용하여 정제하였다. 각각의 hEPO derivative을 western bolt으로 확인한 결과는 Fig. 108과 같이 hEPO와 NESP와는 달리 hCG가 융합된 hEPO derivative들에서 좀 더 분자량이 향상된 단백질들을 확인하였다

(Fig. 118).

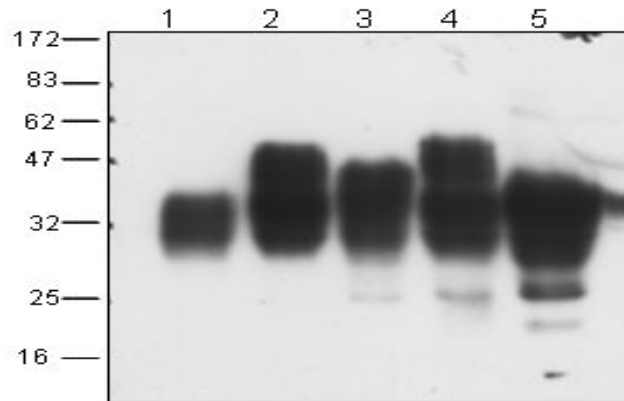


Fig. 118. Western bolt of hEPO derivative. 1. gEPO 2. EPO-hCGC. 3.NESP. NESP-hCGC. 5. HeLa-hEPO.

각각의 hEPO들을 sandwich ELISA와 bradford 정량법을 이용하여 정량을 하여 분리 정제한 hEPO 유도체들의 total protein에 대한 각각의 hEPO를 계산하여 control EPO와 같은 역가를 가지는 양으로 단백질을 계산하였다. 이들 단백질을 이용하여 MTT assay를 시행하였다. TF-1 cell을 10mM HEPES, 1mM sodium pyruvate 4.5 g/L glucose, 1.5g sodium bicarbonate를 포함하는 RPMI1640 media에 10% FBS를 첨가하고, growth factor로 2 ng/ml GM-CSF를 첨가하였다. Cell을 충분히 키워서 24well에 각 well 당 cell 수가 1×10^5 이 되도록 분주하였으며 growth factor로 사용되었던 GM-CSF는 첨가하지 않고, 대조군 EPO와 target EPO, 즉 derivative hEPO를 동일한 양으로 series (0, 1, 10, 100, 1000)로 첨가하였다. 37°C에서 24시간 incubation한 후 MTT assay를 진행하였다. MTT tetrazolium은 PBS에 5 mg/ml 농도로 녹인 후 filter를 한 후 사용하였다. MTT의 양을 final 0.5 mg/ml의 농도로 처리를 한 후 37°C에서 1-3시간 incubation을 하였다. Well의 세포를 모아서 e-tube로 옮긴 후 PBS로 washing을 한 후 DMSO : EtOH = 1 : 1 비율의 용매에 cell를 용해시켰다. 각각의 tube에 녹여져 있던 cell을 96 well로 옮겨 550

nm 파장에서 detection하였다. 그 결과, Fig. 119에서와 같이 시판되고 있는 EPO (calbiochem) 제품을 control로 하여 각각의 derivatives를 test해 본 결과 10 ng까지는 대부분 비슷한 패턴을 보였다가 100 ng에서 차이가 나타났다. gEPO와 EPO-hCG, HeLa-hEPO는 control EPO보다 적은 감도로 detection되었고 NESP와 NESP hCG의 경우는 control 보다 높은 감도로 detection되는 것을 확인할 수 있었다. 결과는 세 번의 반복을 통해 control에 대한 농도에 따른 hEPO의 처리시 증가하는 비율로 계산하여 평균과 유의적 차이를 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 향후 *in vivo* 실험을 할 계획이다.

	0	1	10	100	1000ng
Calbio-EPO	1	1.064+0.05*	1.181+0.05**	1.34+0.06**	1.268+0.08**
gEPO	1	1.052+0.04*	1.128+0.04**	1.203+0.09**	1.139+0.09*
Epo-hCG	1	1.106+0.07	1.156+0.09*	1.196+0.04**	1.28+0.03**
HeLa-EPO	1	1.102+0.01**	1.217+0.03**	1.187+0.02**	1.233+0.02**
NESP	1	1.056+0.01**	1.16+0.07**	1.478+0.24*	1.295+0.14*
NESP-hCG	1	1.051+0.03*	1.15+0.04**	1.391+0.1**	1.376+0.07**

*P<0.05, **P<0.01

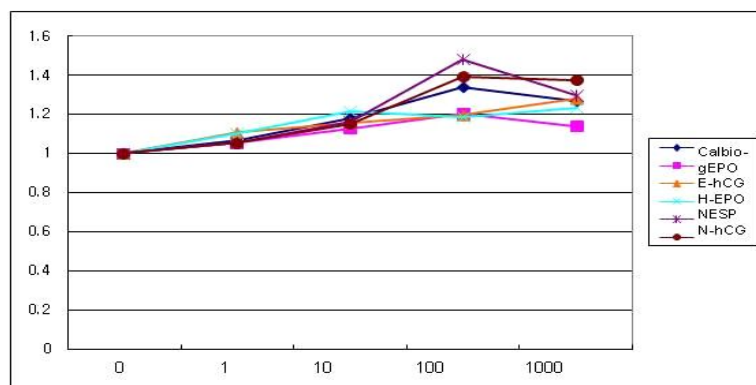


Fig. 119. *In-vitro* assay of hEPO derivatives.

아. 계란 난백으로부터 hEPO 정제법 확립

(1) 계란 난백으로부터 재조합 hEPO의 회수를 위한 전처리 과정의 확립

계란 난백에서 hEPO를 회수하기 위한 연구를 위해서는 hEPO가 많이 함유된 계란 난백이 필요하였으나 현재까지 나온 계란에서의 hEPO 함유량은 정제를 위한 시료로 사용하기엔 부족하였다. 따라서 본 연구에서는 계란 난백에 본 연구실에서 가지고 있는 hEPO가 함유된 돼지유즙을 인위적으로 넣어서 정제 회수하는 방법을 확립하였다. 시료의 조성은 계란 난백 1, 돼지 유즙 1, 증류수 3의 비율로 준비하였다. 계란의 난백에는 알부민을 포함한 단백질 불순물이 다량 함유되어 있기 때문에 전처리과정이 필수적이라 할 수 있다. 이를 위하여 준비한 시료를 혼합한 다음 $ZnCl_2$ 를 포함하여 30분간 반응하고 이를 diafiltration하였다. $ZnCl_2$ 의 농도를 결정하기 위하여 최종농도 5, 10, 50, 100 mM로 조절하여 반응시킨 후 원심분리하여 실험한 결과 Fig. 120과 같이 나타나 $ZnCl_2$ 농도를 10m M로 하였다. 이 시료를 diafiltration하였다. filtration으로는 먼저 0.45um filter, 다음으로는 분자량 100,000 cut off filter 그리고 분자량 10,000 cut off filter로 농축하였다. 이러한 과정으로 Fig. 121과 같이 나타났다. 또한 Western bolt으로 확인한 결과는 Fig. 122와 같이 hEPO 단백질이 확인하였다.

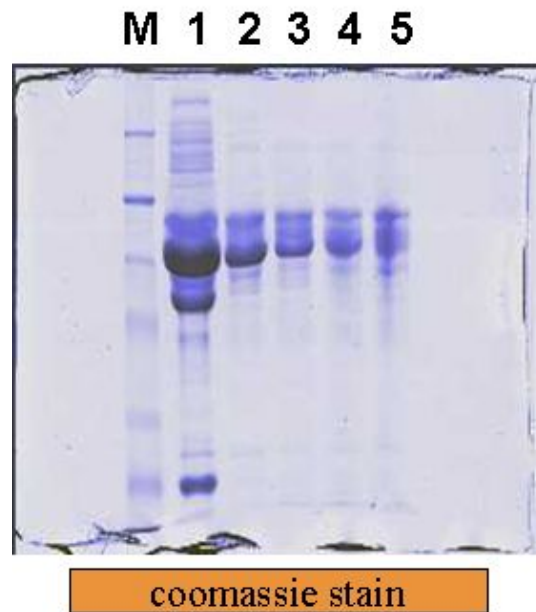


Fig. 120. Effect of treated ZnCl₂. 1. Sample, 2. 5mM ZnCl₂, 3. 10mM ZnCl₂, 4. 50mM ZnCl₂, 5. 100mM ZnCl₂.

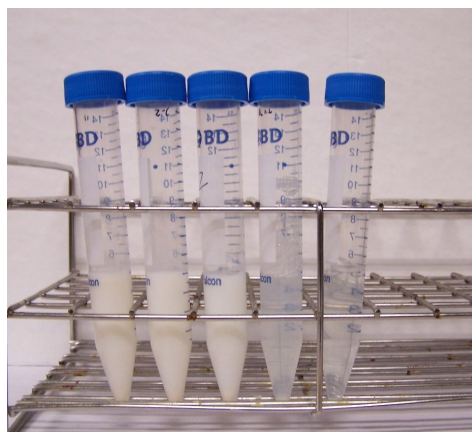


Fig. 121. Effect of diafiltration. 1. sample, 2. 10mM ZnCl₂, 3. 0.45um filtration sample, 4. MW 100,000 cut off filtration sample, 5. MW 10,000 cut off filter concentration sample.

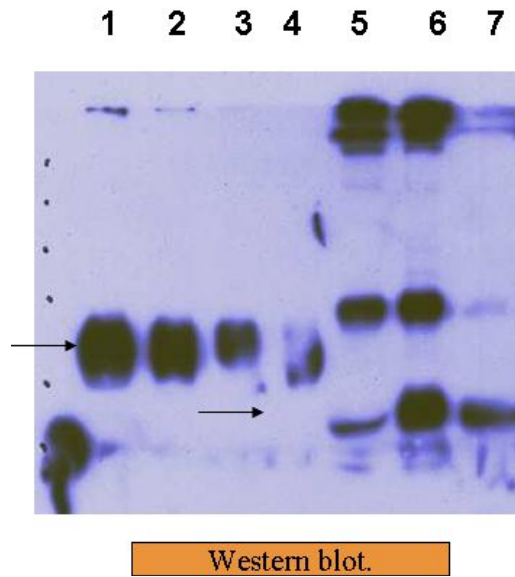


Fig. 122. Western bolt of hEPO. 1,2,3,4, EPO standard 200ng, 150ng, 100ng, 50ng. 5, sample 6, 10mM ZnCl₂ treated sample. 7, diafiltration sample.

(2) Blue-sepharose 방법에 의한 hEPO의 정제

전처리과정을 거치면서 많은 불순물을 제거되어 immunoaffinity chromatography 시료로 사용할 수 있었으나 resin의 반복사용을 고려하여 immunoaffinity chromatography에 앞서 GE health사의 blue-sepharose resin을 이용하여 1차적으로 정제하였다. Buffer (20 mM Tris/10 mM NaCl/pH 7.4)로 resin을 평위화하고 앞서 준비한 시료를 흘려보낸 후 다시 buffer (20 mM Tris/10 mM NaCl/pH 7.4)로 충분히 씻어준 후 0.4 M NaCl로부터 2.5 M NaCl까지 단계적으로 흘려 보내어 hEPO를 포함한 유출액을 수집, 농축하여 immunoaffinity 시료로 사용하였다. 이 blue-sepharose chromatogram은 Fig. 123과 같으며 각 분획을 SDS-PAGE로 Fig. 124과 같이 확인할 수 있었다. 많은 양의 불순 단백질을 제거할 수 있었지만 아직도 많은 불순 단백질이 포함되어 있음을 알 수 있었다.

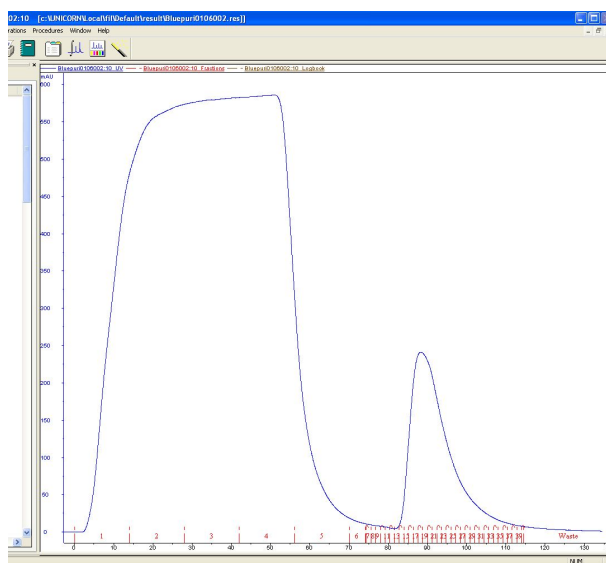


Fig. 123. Chromatogram of hEPO purification by blue-sepharose column chromatography.

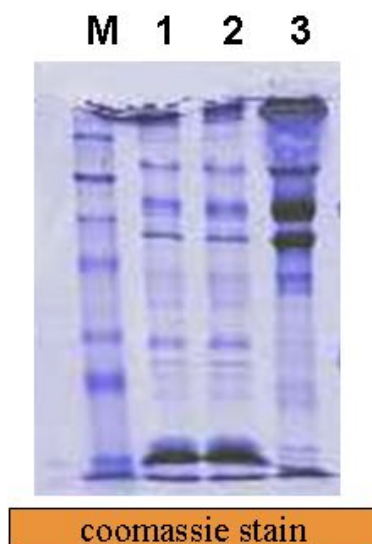


Fig. 124. SDS-PAGE of samples by blue-sepharose column chromatography. 1. sample, 2. flow-through, 3. concentrated blue-sepharose chromatography sample.

(3) Immunoaffinity column법에 의한 hEPO의 정제

앞서 준비한 항체가 결합된 resin을 column에 충전하고, blue-sepharose column을 통하여 1차 처리된 시료로 immunoaffinity chromatography를 실시하였다. Carbonate buffer (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 7.5)로 column을 평위화하고 시료를 흘려보낸 후 다시 carbonate buffer로 충분히 씻어준 후 carbonate buffer와 0.1 M glycine-HCl (pH 2.2) buffer를 사용하여 glycine buffer가 100이 될 때까지 단계적으로 유출하여 분획별로 시료를 수집하여 단백질이 들어있는 분획을 획득하였다. 유속은 1 ml/min으로 하였으며, fraction size는 1.2 ml, UV 파장은 280 nm로 하였다. 유출물은 동량의 neutralization buffer (1M Tris, 0.01% sodium azide, pH 9)가 들어있는 tube에 유출하였다. 일련의 과정을 Western Blotting으로 확인하였다. Fig. 125에서와 같은 pick를 나타내었으며, pH 3.5에서 2.9 사이에 모두 유출되는 것으로 나타났다. western blot에서 다른 단백질은 보이지 않았으나 pH 2.7까지 완전히 유출한 것을 모두 모아 농축한 후 SDS-PAGE를 한 결과 Fig. 126에서와 같이 확인되었다.

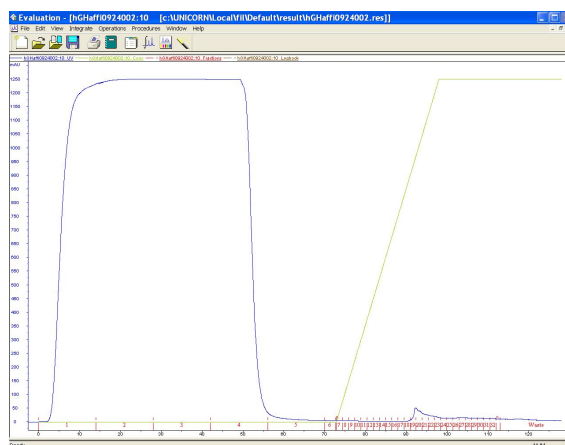


Fig. 125. Chromatogram of purification of hEPO using immunoaffinity chromatography.

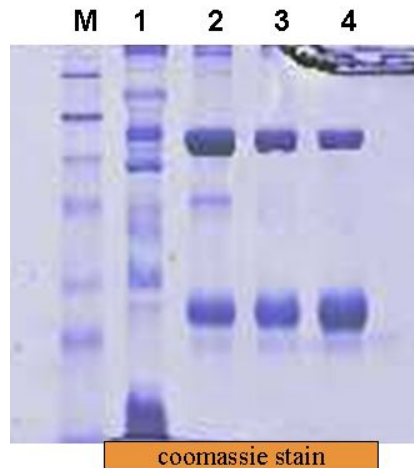


Fig. 126. Purification of hEPO by immunaffinity chromatography . 1. sample, 2-4. concentrated sample of immunaffinity chromatography.

(4) Superdex-200 column법

순수 정제도를 높이기 위하여 Superdex-200 column 크로마토그래피를 실시하였다. 앞서 immunaffinity column 방법에 의해 수집된 시료를 다시 농축하여 FPLC에 장착한 superdex-200 column을 buffer (0.05 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl pH 7.0)로 충분히 흘려보내 평위한 한 후 시료를 흘려보낸 후 계속해서 같은 buffer를 사용하여 gel filtration을 실시하였다. 유속은 0.5ml/min으로 하였으며, UV 파장은 280nm로 하였다. Fig. 127과 같이 앞쪽에 물순물이 포함되어 흘러나왔으며 그 뒤에 hEPO를 볼 수 있었다. 이 분획을 Fig. 128에서와 같이 12% SDS-PAGE 한 후 coomassie 염색을 하여 그 순도를 확인할 수 있었다.

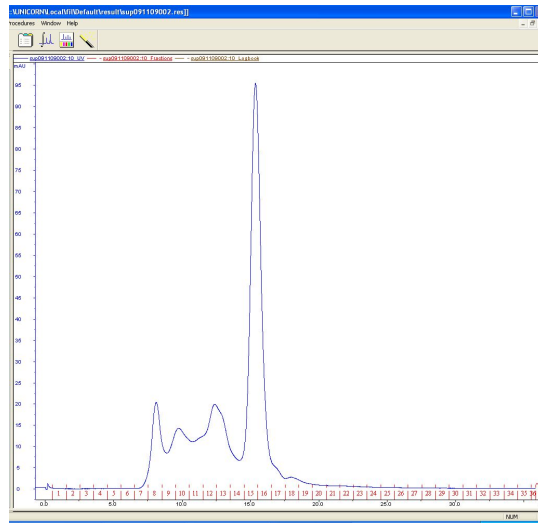


Fig. 127. Chromatogram of hEPO purification by superdex-200 column with AKTA FPLC.

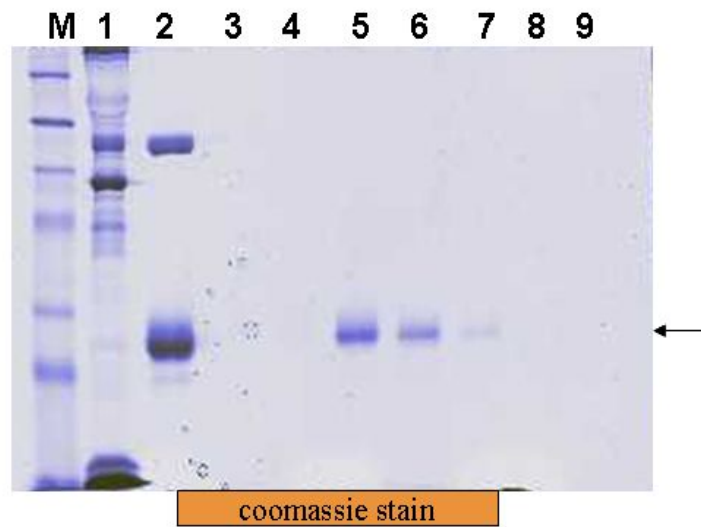


Fig. 128. hEPO purification by superdex-200 column. 1. sample, 2. immunaffinity purification sample, 4 - 9. superdex-200 filtration fraction sample.

이 과정을 통하여 계란 난백에서의 hEPO 단백질을 분리할 수 있었고, 각 단계별

hEPO의 정제 효율을 개발한 ELISA 법으로 측정하여 Table 21과 같이 나타났다. 최종적으로 25%를 회수할 수 있었지만 시료에 많은 양의 hEPO가 포함되어 있고, 연속적인 정제 과정이 확립된다면 정제 효율은 훨씬 향상될 것으로 생각된다.

Table 21. Yield of hEPO purification step from egg white.

Step	hEPO (ug/ m \emptyset)	volume (m ℓ)	Yield (%)
sample	81.2	200	100
ZnCl ₂	77.7	190	91
diafiltration	100	120	74
blue-sepharose chromatography	186	55	63
immunoaffinity chromatography	363	17	38
gel filtration	369	11	25

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

연도	세부/협 동과제	연구 목표	평가착안점	달성도
1차년도 (2006)	제1세부	2개의 유전자가 동시에 발현하는 lentivirus and/or retrovirus vector의 개발	<i>GFP</i> 와 <i>hEPO</i> 유전자가 동시에 발현하는 FIV, HIV-1, MLV 유래의 각 vector의 cloning과 WPRE 서열의 도입	100
			구축한 각각의 virus vector의 유전자 전이에 대한 효율성 검정	100
	제1협동	cOV gene 5'-upstream, 3'-downstream region cloning	cOV 5'-upstream, 3'-downstream UTR region cloning 및 cOV promoter activity에 미치는 영향 조사	100
			대장균에서 hEPO 생산 및 정제 실시	100
제2협동	항체 생산을 위한 면역 및 항혈청 검정	항체 생산을 위한 면역 및 항혈청 검정	100	
		항체 생산을 위한 면역 및 항혈청 검정 실시	100	

연도	세부/협 동과제	연구목표	평가착안점	달성도
2차년도 (2007)	제1세부	<i>hEPO</i> 유전자가 발현되는 형질전환 닭의 생산	<i>LNCEPOW</i> 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석 실시	100
			Tet- <i>hEPO</i> 와 Tet2- <i>hEPO</i> 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석 실시	100
			재조합 <i>hEPO</i> 단백질의 생물학적 활성 측정 방법 확립	100
	제1협동	cOV gene의 5' -upstream 및 3' -UTR region regulatory element 중요성 조사	ERE, cOV 3' -UTR 및 cOV exon I + Intron I region의 cOV promoter activity에 미치는 영향 조사	100
	제2협동	항체 생산 세포주의 개발 및 생산된 항체 정제	단크론성 항체를 생산하는 세포주의 개발	100
			확립한 세포주로부터 항체의 생산 및 정제	100
3차년도 (2008)	제1세부	Tet2- <i>hEPO</i> 형질전환 닭의 G1 세대 생산 및 난관조직 특이적으로 <i>hEPO</i> 가 발현되는 형질전환 닭의 생산	Tet2- <i>hEPO</i> 형질전환 닭의 G1세대 생산 및 발현 양상에 대한 분자생물학적 분석 실시	100
			LNOv- <i>hEPOW</i> vector system의 구축 및 난관조직 특이적으로 <i>hEPO</i> 가 발현되는 형질전환 닭의 생산 실시	100
	제1협동	유용단백질 효율적인 분비를 위한 발현 체계 구축	Lysozyme signal peptide tagging의 외래단백질 분비에 미치는 영향 조사 및 외래단백질의 영구적 세포외 발현 시스템 구축	100
			항체의 특성 조사 및 면역 분리 정제법의 확립	항체의 특성 조사 실시
	제2협동	면역 분리 정제법의 확립	면역 분리 정제법의 확립	100

연도	세부/협 동과제	연구목표	평가착안점	달성도
4차년도 (2009)	제1세부	Tet2-hEPO 형질전환 닭의 G2 세대 생산 및 LNOv-hEPOW	Tet2-hEPO G1 형질전환 닭 중 sperm에 hEPO 유전자 전이가 확인된 개체에서 G2 세대 생산 및 분자생물학적 분석 실시	100
		형질전환 닭의 생산	LNOv-hEPOW 형질전환 닭의 생산 및 분자생물학적 분석 실시 형질전환 세포와 닭에서의 재조합 hEPO의 당잔기 분석 실시	100
	제2협동	hEPO의 반감기와 생물학적 활성	반감기 향상을 위한 cloning 여부 및 생산 단백질 검정 여부 확인	100
		향상 및 hEPO 정량 분석을 위한 ELISA법의 확립	hEPO 정량 분석을 위한 ELISA법 확립 여부 확인	100
5차년도 (2010)	제1세부	Tet2-hEPO 형질전환 닭의 계통 확립 및 LNOv-hEPOW	Tet2-hEPO 형질전환 닭의 G3, G4 세대 생산 및 분자생물학적 분석 실시	100
		형질전환 닭의 생산	G0 LNOv-hEPOW 형질전환 닭의 germline transmission 여부 확인 및 G1 세대 생산 시도	100
	제2협동	계란 난백으로부터 hEPO 정제법의 확립	계란 난백으로부터 hEPO 정제를 위한 전처리법의 확립 여부 확인 계란 난백으로부터 hEPO 정제 방법의 확립 여부 확인	100

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

본 연구에서 구축한 유도적 또는 조직 특이적 유전자 발현 system은 형질 전환 개체의 생리적인 부작용을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 *in vitro*에서나 *in vivo* 모두에서 탁월한 외래 유전자의 발현율 및 유도율을 나타내므로 외래 유전자

의 전이 과정이 요구되는 유전자 치료 및 줄기세포 관련 연구에도 이용될 수 있다. 또한 본 연구에서 개발한 hEPO 형질전환 닭은 바이오의약품을 생산하기 위한 생체 반응기로서의 사용 가능성을 제시하는 근거가 되며 보다 효율적인 hEPO의 분리 및 정제 등의 후속 연구에 기여할 수 있다. 또한 본 연구에서 확립한 효율적인 형질전환 닭의 생산 방법은 다른 종류의 생리활성물질의 대량생산을 위한 형질전환 닭의 개발에 응용될 수 있으며 본 연구에서 실시한 hEPO의 당잔기 분석이나 생물학적 활성 확인 방법은 차후 생물반응기로서 개발되는 형질전환 닭에 있어서 외래 단백질의 특성 분석 방법의 실례가 될 것이다. 본 연구에서 확립한 세포배양액이나 계란의 난백으로부터 재조합 hEPO의 분리 정제 방법은 바이오의약품 중 비중이 가장 큰 재조합 단백질 치료제의 형질전환 동물을 통한 대량생산에 필수적인 요소로 그 활용 범위가 매우 넓을 것으로 예상된다.

이상과 같이 본 연구에서 구축한 여러 기술들은 닭을 생물반응기로 개발하는 연구에 있어서 매우 필수적인 기술이며 타 연구실에서 사용하는 여러 기술에 비해 우위에 있다고 자부할 수 있다. 또한 여러 연구 분야에 적용할 수 있는 유전자 전이 system의 구축 등의 생명공학 기술을 확보하여 관련 분야의 발전에 기여할 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

본 연구개발의 성과에 있어서 기술적 측면으로는 지금까지 이용되어 온 형질전환 닭의 생산 방법에 있어서의 여러 단점(낮은 형질전환율, 형질전환 개체의 저조한 부화율 등)을 보완하는 효율적인 유전자 전이 방법을 구축하였으며 유도적 또는 조직특이적인 외래유전자의 발현을 위한 새로운 유전자 발현 system을 확립한 데 의의가 있다. 또한 도입된 외래 유전자가 형질전환 개체의 계통성립을 통한 다음 세대로의 전이가 가능함을 확인하였고 형질전환 닭에서의 바이오의약품에 해당하는 여러 생리활성 물질의 효율적인 생산 체제 마련하였다. 경제적, 산업적 측면에서는 기존 기술 개발 비용의 10% 정도 비용으로 형질전환 동물을 생산할 수 있어서 보다 많은 국내의 연구기관이 다양한 형질전환 가축을 생산할 수 있는 기반을 확립하였으며 차후 분리 정제된 hEPO를 고가의 치료제로 판매함으로써 국내 기업의 경쟁력 확보에도 이바지할 수 있으리라 예상된다. 이러한 첨단 기술의 국내개발 가능성을 제시하여 농업 분야에서의 첨단기술 개발의 기폭제로 작용하고 바이오의약품 생산이 가능한 형질전환 닭의 개통 확립과 분양을 통하여 양계 농가의 고소득 창출이 기여하고자 한다.

본 연구를 수행하면서 국내논문 2편과 국외 SCI 논문 4편, 국내외 학술발표 13회, 국내 특허 출원 1건, 국내 특허 등록 1건, 국외 특허 출원 2건, 형질전환체 1건, 기능성 물질 1건, 홍보 1건과 1건의 유전자원 등록을 하였으며 세부적인 사항은 아래와 같다.

1. 국내논문

- 권모선, 구분철, 노지열, 이현아, 김태완 (2008): 재조합 hTPO를 생산하는 형질전환 닭의 개발. *Reprod Dev Biol* 32:159-166.
- 구분철, 권모선, 김태완. (2009): 외래 유전자의 효율적인 발현 조절을 위한 개선

된 Tetracycline-Inducible Expression System의 구축. *Reprod Dev Biol* 33:63-69.

2. 국외논문

- Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon, Bok Ryul Choi, Jin-Hoi Kim, Seong-Keun Cho, Sea Hwan Sohn, Eun Jung Cho, Hoon Taek Lee, Wonkyung Chang, Iksoo Jeon, Jin-Ki Park, Jae Bok Park, and Teoan Kim. (2006): Production of grrmlne transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J* 20:2251-2260.
- Mo Sun Kwon, Bon Chul Koo, Bok Ryul Choi, Yoon-Yub Park, Young Man Lee, Hun Suk Suh, Young Sik Park, Hoon Taek Lee, Jin-Hoi Kim, Ji Yeol Roh, Nam-Hyung Kim, and Teoan Kim. (2008): Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol Reprod Dev* 75:1120-1126.
- Hyun-Jin Do, Won-Young Lee, Hye-Young Lim, Jong-Hyun Oh, Dong-Ku Kim, Jin-Hoi Kim, Teoan Kim, and Jae-Hwan Kim. (2009): Two potent transactivation domains in the C-terminal region of human NANOG mediate transcriptional activation in human embryonic carcinoma cells. *J Cell Biochem* 106:1079-1089.
- Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon, Hyuna Lee, Minjee Kim, Dohyang Kim, Ji Yeol Roh, Yoon-Yub Park, Xiang-Shun Cui, Nam-Hyung Kim, Sung June Byun and Teoan Kim (2010): Tetracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic Res* 19:437-447.

3. 국내 학술발표

- 권모선, 김도향, 구분철, 김태완. 일차배양세포에서 재조합 hEPO 유전자의 발현 조절을 위한 retrovirus vector system의 개발. 한국동물번식학회 2007년도 춘계 학술대회. 2007년 6월 22일 - 23일. 진주, 경상대학교.

- Mo Sun Kwon, Bon Chul Koo, Do Hyang Kim, and Teoan Kim. Production of transgenic chickens expressing hEPO using a MoMLV-based retrovirus vector. The 7th International Symposium on Developmental Biotechnology. 2007년 10월 26일 ~ 27일. 제주, 제주대학교.
- 구분철, 권모선, 이현아, 노지열, 김태완. *In vitro*와 *in vivo*에서 재조합 hEPO의 생물학적 활성 측정. 한국동물번식학회 2008년도 춘계학술대회. 2008년 6월 20일 - 21일, 건국대학교, 서울.
- 구분철, 권모선, 이지원, 노지열, 김태완. MoMLV-based retrovirus vector system을 이용한 hEPO 형질전환 닭의 생산. 한국동물번식학회 2008년도 춘계학술대회. 2008년 6월 20일 - 21일, 건국대학교, 서울.
- 구분철, 권모선, 이현아, 김도향, 노지열, 김민지, 김태완. hEPO 유전자의 발현이 유도적으로 조절되는 형질전환 닭의 계통 확립. The 9th International Symposium on Developmental Biotechnology. 2009년 10월 23일. 대전, 충남대학교.
- 김도향, 구분철, 권모선, 김태완. 형질전환 세포와 닭에서 발현된 재조합 hEPO의 당단기 분석. The 9th International Symposium on Developmental Biotechnology. 2009년 10월 23일. 대전, 충남대학교.
- 구분철, 김도향, 김민지, 노지열, 권모선, 김태완. *In vitro*에서 hEPO-CTP fusion 단백질 발현의 분자생물학적 분석. 한국동물번식학회 2010년도 춘계학술대회. 2010년 6월 18일 - 19일 서울, 건국대학교.

4. 국외 학술발표

- Mo Sun Kwon, Bon Chul Koo, Bok Ryul Choi, Hoon Taek Lee, and Teoan Kim. Doxycycline-inducible expression of the hEPO gene in a retrovirus vector. The 34th Annual Conference of The International Embryo Transfer Society. January 5-9, 2008 Denver, Colorado, USA.
- Teoan Kim, Mo Sun Kwon, Ji Yeol Roh, Hyuna Lee, Nam-Hyung Kim, Bon Chul Koo. Generation of transgenic chickens producing human erythropoietin. SSR (Society for the Study of Reproduction) 2008 41st Annual Meeting.

May 27-30, 2008 Kailua-Kona, Hawaii, USA.

- Jee Won Lee, Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon, Ji Yeol Roh, Min Ji Kim and Teoan Kim. Development of transgenic chickens expressing human erythropoietin using tetracycline inducible retrovirus vector system. Asian Reproductive Biotechnology Society The Fifth Annual Conference. November 26-30, 2008 Kunming, China.
- Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon, Hyuna Lee, Minjee Kim, Teoan Kim. Modification of green fluorescent protein being secreted across cell membrane. Asian Reproductive Biotechnology Society The Sixth Annual Conference. November 16-20, 2009 Siem Reap City, Cambodia.
- Mo Sun Kwon, Bon Chul Koo, Ji Yeol Roh, Minjee Kim, Min Ki Kim, Gyeong Heon Min, Sung Joon Park, and Teoan Kim. Production of the transgenic chicken expressing the GFP gene in a tetracycline-inducible manner. Asian Reproductive Biotechnology Society The 7th Annual Conference. November 16-20, 2010 Kuala Lumpur, Malaysia.
- Sung Joon Park, Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon, Min Ki Kim, Gyeong Heon Min, and Teoan Kim. Retrovirus vector mediated gene transfer to the chicken blastodermal cells cultured in vitro. Asian Reproductive Biotechnology Society The 7th Annual Conference. November 16-20, 2010 Kuala Lumpur, Malaysia.

5. 특허 출원/등록

- 특허 출원 : 학교법인 선목학원, 2008, 대한민국, 인간 적혈구생성촉진인자(h E P O) 유전자를 내장하는 레트로바이러스 발현벡터 및 이에 의해 형질전환된 가금, 10-2008-63768.
- 특허 출원 : 조아제약, 2008, PCT, 돼지의 알파에스 1 카제인 유전자, 그 프로모터 및 그의 용도, 10-2008-62765.
- 특허 출원 : 조아제약, 2008, PCT, 돼지의 베타카제인 유전자, 그 프로모터 및 그의 용도, 10-2008-62767.

- 특허 등록 : 학교법인 선묵학원, 2011, 대한민국, 인간 적혈구생성촉진인자(h E P O) 유전자를 내장하는 레트로바이러스 발현백터 및 이에 의해 형질전환된 동물세포 및 가금, 10-1038532.

6. 기 타(유용유전자, 형질전환체, 품종, 물질 등 실적)

- 유용유전자 기탁 : 본 연구의 형질전환체인 Tet2-hEPO 형질전환 닭은 관련 내용을 특허 출원 및 SCI 논문에 발표하였으며 *hEPO* 유전자 전이에 사용한 pTet2-hEPOWPT (pTet2-EPO) vector를 HB101 균주에 transformation하여 한국생명공학연구원의 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)에 KCTC 11335BP 번호로 기탁하였다.
- 홍보 : 본 연구의 연구 결과는 2010년 5월에 KBS1 방송에서 소개되었다.
KBS1 과학카페 (2010년 5월 8일 방송)



제 2 절 연구성과 활용 계획

본 연구에서 생산한 hEPO 형질전환 닭은 바이오의약품을 생산하기 위한 생물반응기로서 닭에서 발현되는 hEPO의 분리 및 정제 등의 후속 연구의 대상으로 제공될 수 있다. 또한 본 연구에서 확립한 효율적인 형질전환 닭의 생산 방법은 형질전환 닭을 생체반응기로 이용한 다른 여러 종류의 바이오의약품 생산 연구에 적

용이 가능할 것이다. 본 연구에서 구축한 유전자 전이 system은 외래 유전자의 유도적인 발현 조절이 가능한 매우 효율적인 system으로서 형질전환 동물의 생산뿐만 아니라 유전자 치료 및 stem cell의 확립 연구에도 적용될 수 있다. 뿐만 아니라 조류의 발생학적, 번식·생리학적 연구 및 유전자 기능 및 조절에 관한 연구, 또는 독성물질을 탐색하는 연구 수단 등과 같은 기초 연구 분야에도 기여할 수 있을 것이다. 또한 난관조직 특이적인 발현 system은 여러 연구실에서 구축하려고 시도 중이나 성공적인 결과의 보고는 없는 실정이다. 이에 본 연구실에서 구축한 난관조직 특이적인 발현 system이 선두적인 위치를 차지할 수 있으리라 사료되며 향후 연구에서도 이를 이용한 바이오의약품의 생산 연구를 진행할 예정이다. 현재 시판 중인 hEPO는 주로 세포배양을 통해 생산되고 있지만 경제적 효율성이 아주 낮으며 또한 수 개의 외국 회사에 의해 독점 생산되고 있다. 그러나 형질전환 가축을 통해 치료용 단백질 제제를 생산할 경우 생산비를 획기적으로 낮출 수 있다. 특히 이러한 물질을 계란을 통해 분비하는 형질전환 닭을 개발에 성공하였을 경우, 개발된 닭을 농가에서 사육하게 함으로써 농가에게는 소득 증대, 생산된 물질을 분리 정제하여 상품화하는 회사에게는 이득 증대 및 연구 기반 시설의 확보, 그리고 소비자인 환자에게는 저렴한 치료 물질을 제공할 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서 확립한 hEPO의 분리 정제 방법은 형질전환 동물의 부산물로부터 목적 단백질의 안전하고 고효율로 분리정제 등의 타 연구에 응용할 수 있으며, 이러한 결과는 국내 형질전환동물 연구를 활성화 시킬 것이다. 구축된 항원 확보에서 면역, 항체선별에 이르는 전 과정을 포괄하는 대규모 고친화성 항체 생산시스템의 기술, 인력 및 장비를 활용하여 타 연구기관의 연구에 적극 활용할 수 있도록 할 계획이다.

이상의 연구에서 개발된 기초기술은 학술지에 발표하고 특허권을 획득한 다음 형질전환동물을 생산하고자 하는 모든 연구진과 산업분야에 보급 활용하고자 한다. 뿐만 아니라 동물을 생물반응기로 사용하여 생리활성물질을 대량으로 생산함으로써 바이오의약품의 경제성을 획득하고자 하며 hEPO가 발현되는 형질전환 닭을 양계농가에 공급하여 고소득을 창출하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

형질전환 닭에 관한 연구는 전 세계적으로 진행은 되고 있으나 주로 상업적인 목적으로 기업을 중심으로 진행되고 있어서 상업화되기 전까지는 논문이나 세미나 등을 통한 연구 결과의 발표가 거의 이루어지지 않는다. 이에 본 연구와 관련된 기술 정보들은 수집이 용이하지 않다.

제 7 장 참고문헌

- Bosselman RA, Hsu RY, Boggs T, Hu S, Bruszewski J, Ou S, Souza L, Kozar L, Martin F, Nicolson M, Rishell W, Schultz JA, Semon KM, Stewart G (1989): Replication-defective vectors of reticuloendotheliosis virus transduce exogenous genes into somatic cells of the unincubated chicken embryo. *J Virol* 63:2680-2689.
- Gao B, Sun HC, Fang HX, Qian K, Zhao MS, Qiu HL, Song CY, Wang ZY (2006): Expression and preliminary characterization of recombinant human tissue kallikrein in egg white of laying hens. *Poult Sci* 85:1239-1244.
- Gossen M, Bujard H (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
- Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie R (2002): Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat Biotechnol* 20:396-399.
- Kamihira M, Kawabe Y, Shindo T, Ono K, Esaka K, Yamashita T, Nishijima K, Iijima S (2009): Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *J Biotechnol* 141:18-25.
- Kamihira M, Ono K, Esaka K, Nishijima K, Kigaku R, Komatsu H, Yamashita T, Kyogoku K, Iijima S (2005): High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *J Virol* 79:10864-10874.
- Kawabe Y, Kamihira M, Ono K, Kyogoku K, Nishijima K, Iijima S (2006):

- Production of scFv-Fc fusion protein using genetically manipulated quails. *J Biosci Bioeng* 102:297-303.
- Kodama D, Nishimiya D, Iwata K-i, Yamaguchi K, Yoshida K, Kawabe Y, Motono M, Watanabe H, Yamashita T, Nishijima K-i, Kamihira M, Iijima S (2008): Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochem Biophys Res Commun* 367:834-839.
- Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Kim JH, Cho SK, Sohn SH, Cho EJ, Lee HT, Chang W, Jeon I, Park JK, Park JB, Kim T (2006): Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J* 20:2251-2260.
- Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Kim JH, Cho SK, Sohn SH, Cho EJ, Lee HT, Chang W, Jeon I, Park JK, Park JB, Kim T (2009): Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J* 20:2251-2260.
- Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Lee HT, Choi HJ, Kim JH, Kim NH, Jeon I, Chang W, Kim T (2004): Retrovirus-mediated gene transfer and expression of EGFP in chicken. *Mol Reprod Dev* 68:429-434.
- Koo BC, Kwon MS, Lee H, Kim M, Kim D, Roh JY, Park Y-Y, Cui X-S, Kim N-H, Byun SJ, Kim T (2010): Tetracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic Res* 19:437-447.
- Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Lee HT, Kim YH, Ryu WS, Shim H, Kim JH, Kim NH, Kim T (2004): Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun* 320:442-448.
- Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Park Y-Y, Lee YM, Suh HS, Park YS, Lee HT, Kim J-H, Roh JY, Kim N-H, Kim T (2008): Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol Reprod Dev* 75:1120-1126.

- Kyogoku K, Yoshida K, Watanabe H, Yamashita T, Kawabe Y, Notono M, Nishijima K, Kamihira M, Iijima S (2008): Production of recombinant tumor necrosis factor receptor/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *J Biosci Bioeng* 105:454-459.
- Lee YM, Jung JG, Kim JN, Park TS, Kim TM, Shin SS, Kang DK, Lim JM, Han JY (2006): A testis-mediated germline chimera production based on transfer of chicken testicular cells directly into heterologous testes. *Biol Reprod* 75:380-386.
- Li Y, Behnam J, Simkiss K (1995): Ballistic transfection of avian primordial germ cell in ovo. *Transgenic Res* 4:26-29.
- Lillico SG, McGrew MJ, Sherman A, Sang HM (2005): Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discovery Today* 10:191-196.
- Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslam C, Barnard P, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Elliot EA, Sang HM (2007): Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1771 - 1776.
- Love T, Gribbn C, Mather C, Sang H (1994): Transgenic bird by DNA microinjection. *Bio/Technology* 12:60-63.
- Muramatsu T, Mizutani Y, Ohmori Y, Okumura J (1997): Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochem Biophys Res Commun* 230:376-380.
- Naito M, Tagima A, Tagima T, Yasuda Y, Kuwana T (1994): Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J of Reproduction and Fertility* 102:321-325.
- Nakanishi A, Iritani A (1993): Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Mol Reprod Dev* 36:258-261.
- Pain B, Chenevier P, Samarut J (1999): Chicken embryonic stem cells and transgenic strategies. *Cells Tissues Organs* 165:212-219.

- Park TS, Jeong DK, Kim JN, Song GH, Hong YH, Lim JM, Han JY (2003): Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biol Reprod* 68:1657-1662.
- Penno CA, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M (2010): Production of recombinant human erythropoietin/FC fusion protein by genetically manipulated chickens. *Transgenic Res* 19:187-195.
- Rapp JC, Harvey AJ, Speksnijder GL, Hu W, Ivarie R (2003): Biologically active human interferon-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res* 12:569-575.
- Rosenblum CI, HY Chen (1995): In ovo transfection of chicken embryos using cationic liposomes. *Transgenic Res* 4:192-198.
- Salter DW, Smith EJ, Hughes SH, Wright SE, Crittenden LB (1987): Transgenic chickens:insertion of retroviral genes into the chicken germ line. *Virology* 157:236-240.
- Sang H, Perry MM (1989): Episomal replication of cloned DNA injected into the fertilised ovum of the hen, *Gallus domesticus*. *Mol Reprod Dev* 1:98-106.
- Sherman A, Dawson A, Mather C, Gilhooley H, Li Y, Mitchell R, Finnegan D, Sang H (1998): Transposition of the *Drosophila* element mariner into the chicken germ line. *Nat Biotechnol* 16:1050-1053.
- Shin SS, Kim TM, Kim SY, Kim TW, Seo HW, Lee SK, Kwon SC, Lee GS, Kim H, Lim JM, Han JY (2008): Generation of transgenic quail through germ cell-mediated germline transmission. *FASEB J* 22:2435-2444.
- Thoraval P, Afanassieff M, Cosset FL, Lasserre F, Verdier G, Coudert F, Dambrine G (1995): Germline transmission of exogenous genes in chickens using helper-free ecotropic avian leucosis virus-based vectors. *Transgenic Res* 4:369-377.

- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *The National Academy of Sciences* 97:7963-7968.
- Vick L, Ying Li, Simkiss K (1993): Transgenic bird from transformed primordial germ cells. *Proc R Soc Lond B* 251:179-182.
- Wang AP, Sun HC, Wang JY, Wang YJ, Yuan WF (2008): Recombinant avian adeno-associated virus-mediated oviduct-specific expression of recombinant human tissue kallikrein. *Poult Sci* 87:777-782.
- Watanabe M, Naito M, Sasaki E, Sakurai M, Kuwana T, Oishi T (1994): Liposome-mediated DNA transfer into chicken primordial germ cells in vivo. *Mol Reprod Dev* 38:268-274.
- Zhu L, van de Lavoie M-C, Albanese J, Beenhouwer DO, Cardarelli PM, Cuisson S, Deng DF, Deshpande S, Diamond JH, Green L, Halk EL, Heyer BS, Kay RM, Kerchner A, Leighton PA, Mather CM, Morrison SL, Nikolov ZL, Passmore DB, Pradas-Monne A, Preston BT, Rangan VS, Shi M, Srinivasan M, White SG, Winters-Digiacinto P, Wong S, Zhou W, Etches RJ (2005): Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol* 23:1159-1169.
- Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.