116095-3

과제명

소임신특이단백질에대한항체개발과그항체를이용한소임신진단키트의개발

최종보고서

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제(∨) / 공개( ), 비공개(∨)발간등록번호( )

농생명산업기술개발사업 제3차 연도 결과 보고서

발간등록번호
11-1543000-002626-01

소임신특이단백질에 대한 항체 개발과 그 항체를 이용한 소임신 진단 키트의 개발

최종보고서

2019. 02. 14.

주관연구기관 / (주)에스엘에스바이오

참여연구기관 / 한국폴리텍바이오대학교

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “소임신특이단백질에 대한 항체 개발과 그 항체를 잉요한 소임신 진단 키트의 개발”(개발기간 : 2016.09.05 ~ 2018.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 14.

주관연구기관명 : 에스엘에스바이오 (대표자) 이 영 태 (인)
참여기관명 : 한국폴리텍특성화대학 (대표자) 엄 준 철 (인)

주관연구책임자 : 김 봉 휘
참여기관책임자 : 하 영 주

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호		해 당 단 계 연 구 기 간	2016.09.05.~ 2018.12.31	단 계 구 분	(3년차)/ (3년)
연 구 사 업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연 구 과 제 명	대 과 제 명	소임신특이단백질에 대한 항체 개발과 그 항체를 이용한 소임신 진단 키트의 개발			
	세부 과제명				
연 구 책 임 자		해당단계 참여연구원 수	총: 10명 내부: 7명 외부: 3명	해당단계 연구개발비	정부:225,000천원 민간:75,000천원 계:300,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 19명 내부: 11명 외부: 8명	총 연구개발비	정부: 525,000천원 민간: 175,000천원 계: 300,000천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	(주)에스엘에스바이오, 기업부설연구소			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위 탁 연 구	연구기관명: 한국폴리텍특성화대학			연구책임자: 김 봉 휘	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)	보고서 면수

<요약문>

연구의 목적 및 내용	미국이나 유럽 등에서는 임신특이단백질을 이용한 조기임신진단법이 적극적으로 활용되고 있음에도 불구하고 국내에서는 고전적 방법(발정비귀재법) 혹은 고가의 비용이 발생하는 직장검사법과 초음파진단법이 소 임신진단에 활용되고 있다. 이러한 현 상황을 개선하기 위하여 민감도와 특이도가 90%에 달하는 임신특이단백질을 이용한 진단법 및 현장진단이 가능한 키트(POCT 키트)를 개발하고자 한다. 구체적으로는 1980년대 이후 지속적으로 연구되고 있는 소임신특이단백질(bovine pregnancy associated glycoprotein)의 아미노산 서열을 분석하여 특정한 부분을 epitope으로 하는 항체를 개발하고 특이 항체 개발이 완료된 후에는 이를 이용하여 사람에서 일반적으로 이용되고 있는 스틱형의 rapid kit를 개발하고자 한다.
연구개발성과	**임신특이단백질의 특성 분석 및 항원 개발** 임신 특이단백질의 항체 생산을 위한 항원 개발 및 검정: 임신특이단백질의 항체를 제작하기 위하여 기 발표된 논문(1982, bio. of rep.) 및 PubMed 검색을 통하여 임신우의 태반 mono- and binucleate trophoblast cells에 존재하며 수정 후 약 28일 후부터 임신우의 혈액에서 측청할 수 있는 임신 특이적인 단백질의 아미노산 서열을 획득하여 epitope prediction program을 이용하여 세 종류의 펩타이드를 합성. 키트 제조에 필요한 단백질 등 원료 표준화: 키트 제조에 필요한 코팅용 membrane 선정을 위하여 시판되는 다수의 membrane을 구매하여 flow time과 항임신특이단백질 항체에 대한 반응성 검토 후 선정 -항체/colloidal gold 결합체 생산을 위하여 다양한 크기의 gold를 구매한 후 분리한 항체와 다양한 조건으로 접합하여 최적의 gold 선정 - 검체의 비특이적 결합을 방지하기 위한 전개용액의 성분을 선정하기 위하여 기알려진 비특이적 결합 저해 단백질의 결합 저해력 시험 단백질 등 원료의 QC 기준 확립: 시험에 사용되는 다양한 원료(membrane, 전개용액, 검체희석액, membrane 봉쇄액등)에 대한 QC 기준 확립을 위하여 다양한 시험 * 나열한 원료의 선정 및 표준화 결과는 대외비 문서에 해당하여 미기재함 **임신특이단백질에 대한 항체 제작** 임신특이단백질의 항체 제작: 항원력이 높을 것으로 예측되는 3종의 펩타이드를 BalbC mice에 3회, 2주 간격으로 면역하여 총 25종의 유의미한 단클론 항체를 생산하였으며 이들중 2종의 항체를 선정하여 키트 제조에 사용하였음.

Clone list:

PAG_100	1A6, 2A6, 2B6, 2C4, 3D1, 3D6, 3E1, 1B6, 2E9, 3A2, 2H7, 2E10, 2E8, 3D4, 2F12
PAG_100-KLH	3A6, 3B1, 3B3, 3B5
PAG_300	4A1, 4A3, 3D5, 2H7, 2A5, 1

임신특이단백질에 대한 항체의 항원 결합 부위 선정(epitope mapping):
선별된 항체의 항원(임신특이단백질) 결합 부위(epitope)를 특정하기 위하여 합성한 펩타이드를 20 mer 단위로 추가 합성하여 결합 부위를 특정하였다.

소임신 진단 키트의 개발

래피드 키트 제조 시설 구축 및 시제품 생산

키트 제조를 위한 생산 시설로서 40평 규모의 래피드 키트 생산용 시설(kGMP 기준)를 구축하였으며 키트 제조에 필요한 장비를 구비하여 테스트 및 시제품 생산에 활용

하이브리도마 세포의 대량 배양

세포의 대량 배양을 통한 항체의 대량 생산:
생산된 단클론 항체를 분비하는 세포주를 배지 볼륨 10 ml에서 3,000ml 배양이 가능하도록 배지의 조성에 변화를 주어 3구 스피너 플라스크의 회전수와 기타의 요인을 세부 조정하여 2ug/ml 이상의 단백질(항체)를 분리할 수 있었다.

연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	현재 안정성 시험을 제외한 기술문서는 작성완료하였으며 안정성 시험이 완료 되는대로 허가 진행 예정으로 2019년 하반기에는 출시 가능 할 것으로 예상된다. 해당 제품이 출시된다면 100 % 수입제품에 의존하고 있는 시장 상황은 빠른 시일내에 국산화 될 것으로 예상 된다.

국문핵심어 (5개 이내)	소임신진단	임신특이단백질	항체	현장진단키트	
영문핵심어 (5개 이내)	bovine pregnancy test	pregnant specific protein	antibody	POCT	

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 9
제 1 절 연구개발 목적 ····· 9
제 2 절 연구개발의 필요성 ····· 9
1. 소임신진단의 방법 ····· 9
2. 조기임신진단의 필요성 ····· 10
3. 개발 목표제품의 자별성 ····· 11
4. 연구개발의 중요성 ····· 12
제 3 절 연구개발 범위 ····· 12
1. 1차년도 연구개발 범위 및 내용 ····· 12
2. 2차년도 연구개발 범위 및 내용 ····· 13
3. 3차년도 연구개발 범위 및 내용 ····· 14
제 2 장 연구수행 내용 및 결과 ····· 15
제 1 절 이론적, 실험적 접근 방법 ····· 15
1. 연구개발 추진 전략 및 방법 ····· 15
2. 연구개발 추진체계 ····· 16
3. 연구개발 추진 일정 ····· 16
제 2절 연구개발 성과 ····· 18
1. 특허 출원 ····· 18
제 3 절 연구 방법 및 연구 개발 ····· 19
1. 연구 방법 ····· 19
가. 1차년도 연구 목표 ····· 19
나. 1차년도 연구 방법 ····· 19
다. 2차년도 연구 목표 ····· 20
라. 2차년도 연구 방법 ····· 20
마. 3차년도 연구 목표 ····· 20
바. 3차년도 연구 방법 ····· 20
2. 연구 결과 ····· 21
가. 1차년도 연구 결과 ····· 21
나. 2차년도 연구 결과 ····· 24
다. 3차년도 연구 결과 ····· 31
3. 연구 성과 ····· 48
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 52
제 1 절 목표 ····· 52
1. 1차년도 목표 ····· 52
2. 2차년도 목표 ····· 52

3. 3차년도 목표 ····· 51
제 2 절 목표 달성 여부 ····· 52
1. 1차년도 목표 달성 여부 ····· 53
2. 2차년도 목표 달성 여부 ····· 54
3. 3차년도 목표 달성 여부 ····· 55
제 3 절 목표 미달성 원인 및 차후 대책 ····· 55
1. 목표 미달성 원인 ····· 55
2. 차후 대책 ····· 55
제 4 장 연구결과의 활용 계획 등 ····· 56
붙임. 참고 문헌 ····· 57

<별첨 1> 연구개발보고서 초록
<별첨 2> 자체평가의견서
<별첨 3> 연구성과 활용계획서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

미국이나 유럽 등에서는 임신특이단백질을 이용한 조기임신진단법이 적극적으로 활용되고 있음에도 불구하고 국내에서는 고전적 방법(발정비귀재법) 혹은 고가의 비용이 발생하는 직장검사법과 초음파 진단법이 소 임신진단에 활용되고 있다. 이러한 현 상황을 개선하기 위하여 민감도와 특이도가 90%에 달하는 임신특이단백질을 이용한 진단법 및 현장진단이 가능한 키트(POCT 키트)를 개발하고자 한다.
구체적으로는 1980년대 이후 지속적으로 연구되고 있는 소임신특이단백질(bovine pregnancy associated glycoprotein)의 아미노산 서열을 분석하여 특정한 부분을 epitope으로 하는 항체를 개발하고 특이 항체 개발이 완료된 후에는 이를 이용하여 사람에서 일반적으로 이용되고 있는 스틱형의 rapid kit를 개발하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 소임신진단의 방법

(가) 발정비재귀법(non-return to oestrus)

인공수정 후 성공적으로 임신이 된다면 다음 차기의 발정이 오지 않는점에서 착안하여 임신 판정하는 방법. 그러나 약 7%의 임신우에서 임신되었음에도 발정 반응이 일어난다.

(나) 직장 검사법

직장을 통해서 자궁을 촉진하는 방법으로 임신을 진단하는 방법으로 1800년대부터 보고된 방법으로 현재에도 널리 이용되는 방법이다. 이 겸사의 경우 고도로 숙련된 전문가만이 수행할 수 있고 검사시 암소에게 스트레스르 주게 되며 검사 과정에 난소의 손상이 일어날 수 있고 소태아의 조기 폐사를 유발할 수 있다. 또한 이 검사법은 손으로 만져 소태아가 감지될 만큼 성장한 후에만이 가능하므로 최소한 50 ~ 60일 이후에 실시하여야 한다. 그러므로 인공수정이 실패한 경우에는 약 2개월의 공태기를 가지게 된다.

(다) 호르몬 측정법

수정 후 18 ~ 24일 사이에 기능성 황체로부터 분비되는 프로게스테론이 진단의 지료로 이용되며 혈액이나 우유로 분석이 가능하다. 프로게스테론 측정법은 수정 후 임신 실패시 다음 발정 예정일 전 후 4 ~ 5일간 혈중 및 탈지유 중 프로게스테론의 농도가 1ng/ml 이하의 낮은 수치를

보임으로 이 시기를 검사 시기로 하고 있으나 검사의 민감도는 약 93 % 이상으로 우수하나 특이성이 약 40 % 로 낮아 비임신우의 대다수가 임신으로 진단되기도 한다.

(라) 초음파 진단

소의 임신진단을 목적으로 처음 초음파기술이 적용된 시기는 1982년으로 소태아나 자궁의 건강 상태등 여러 정보를 다수 수집 가능하고 정확도 또한 99 %에 달하지만 그 비용이 고가이므로 농가의 부담으로 작용할 수 있다.

(마) 임신 특이 단백질 검출을 통한 방법

현재까지 알려진 소임신 특이 단백질로는 태반성 락토겐, 태반에서 임신시 특이적으로 분비되는 호르몬, 반추동물군의 태반에서 분비되는 Pregnancy associated glycoprotein(PAG) 군이 대표적이다. 특이 PAG 는 임신 20일 전후부터 1ng/ml이상의 농도로 혈중 혹은 우유에 존재하는 것으로 알려져 있다. 외국의 몇 몇 기업(Biotracking사, IDEXX사)에서는 임신시 특이적으로 발현하는 PAG-1을 면역분석법(ELISA)으로 검출하는 방법으로 임신을 진단하는 키트가 제품화 되어 있다.

2. 조기임신진단의 필요성

소 사육 농가의 규모가 확대되고 있는 것에 비하여 농가의 노동력과 체계적 관리 부족으로 수태율 저하 및 번식장애 발생이 늘고 있어 분만 간격의 단축에 의한 단위 기간 당 송아지 생산 두수의 증가는 효율적인 농가경영을 위해 절실히 요구되는 사안이다. 그러나 현재 일반적으로 사용되고 있는 임신진단 방법인 직장검사, 경관점액 검사 및 초음파 검사의 경우 많은 경험을 보유한 전문인력(수의사)의 농가방문이 반드시 수반되어야 함으로 접근성이 낮고 소요 비용 또한 고가이다. 이외에 발정비재귀법은 재발정이 2회 이상 이루어지지 않을 경우 임신으로 판정하는 방법으로 비임신시 공태기간이 길어지는 단점이 존재한다. 일부 유통되고 있는 진단 kit는 정확도(음성을 양성으로 판정하는 빈도가 높음)가 낮고 사육농가에서 검사하기에는 까다로운 시험법으로 인해 현장의 편리성이 낮다는 점에서 수정 후 조기임신진단과 정확하고 편리한 진단을 가능하게 하여 수정 후 사육관리 및 공태 기간 단축으로 사육농가의 경영에 크게 이바지 할 수 있는 임신진단 kit의 개발이 요구되고 있다.

3. 개발목표 제품의 차별성:

- 개발 예정인 조기임신진단 RAPID kit는 기존의 면역분석법을 이용한 임신진단키트의 지표인 프로제스테론의 농도를 측정하는 것 이외에 배사멸 가능 시기를 지나 성공적인 착상의 지표로 활용할 수 있는 임신특이 단백질(PAGs)의 발현을 정성분석하므로써 기존제품의 문제점을 보완하는 정확한 진단이 가능함.
- 2016년 초에 국내 판매 허가를 득한 IDEXX사의 임신진단키트는 본 연구과제에서 개발 예정인 키트와 동일한 임신특이단백질(PAG-1)을 임신 판정의 지표로 사용하고 있다. IDEXX 사의 제품은 농가현장에서 직접 검사 가능하나 검사 방법이 면역분석법(ELISA)을 기초로 하는 것으로 항체가 결합된 플레이트에 소의 혈액에 반응시키고 항체를 반응시킨 후 발색액을 결합시키는 여러 단계의 과정을 거쳐야 한다. 반면 본 연구과제에서 개발 예정인 진단 키트는 소의 혈액을 전개 용액에 희석하여 검사 키트에 적용하는 것으로 채혈에서 검사완료까지 최대 10분 이내의 시간이 소요된다.

* 임신 진단에 있어 임신특이단백질의 유/무를 검사하는 것 이외에 프로게스테론 농도를 반정량 정성 검사한다면 민감도에 비해 낮은 특이도 향상에 도움을 줄 것이다. 발정기에 분비되는 최고 농도 이상의 프로게스테론을 임신 양성 판정 기준으로 한다면 임신 초기 미량의 임신특이단백질이 분비되어 위음성으로 판정되어 지는 경우의 수를 줄일 수 있을 것으로 기대한다. 도한 위의 지표(임신특이단백질, 프로게스테론)는 정성분석을 통하여 판정하는 것으로 다중 지표를 정량 분석하여 cut-off 범위를 산정하여 판정하는 방법이 아니므로 다중 지표를 이용함에 있어 나타나는 특이도가 낮아질 위험은 없을 것이다.

- 본 연구과제에서 개발 예정인 임신진단 RAPID Kit의 경우 1 회 검사에 필요한 검체(혈액)의 양은 100 μl 이하이므로 검사를 위한 소 혈액 채취 방법은 사혈기(혈중 혈당 측정을 목적으로 소량의 혈액을 취하기 위하여 사용되는 의료기기)를 이용하여 소의 귀에서 혈액을 채취한다.

- 정확한 진단에 의한 번식우의 공태기를 최소화

○ 농가 현장에서 직접 사용/진단 할 수 있는 래피드키트(POCT kit)로서 수의사가 현장을 직접 방문하여야 하는 대장검사법, 질검사법이나 고가의 장비를 필요로 하는 초음파 진단법에 비해 농가의 경제적 부담 감소

○ 국외에서 판매되고 있는 임신특이단백질을 활용한 검사의 경우 검사에 이용되는 항체는 다클로 항체로서, 당사에서 자체 제작한(하고자 하는) 단클론 항체가 민감도 특이도 부분에서 우수할 것으로 예상된다.

4. 연구개발의 중요성

가. 경제적중요성

- 공태기를 줄여 년간 소득 증가.
- 가축의 임신 진단만으로도 년간 50억원 이상의 매출을 갖는 기업 창출.
- 한우의 생산성 증대 및 농가 소득의 비중면에서 중요.

나. 학술적중요성

혈액 혹은 인체 분비물을 이용한 질병의 진단법 연구개발의 수준은 국외 연구수준에 뒤처지지 않고 있음이 자명하나 동물 질병 진단 부분에서는 그 수준이 많은 선진국에 비해 특허 혹은 논문 수를 이용한 개량적 평가상 많이 부족함을 알 수 있다. 당사에서 위의 연구개발을 성공적으로 완료하여 새로운 시장을 국내외에서 개척한다면 타기업에서도 동물 질병 혹은 질병 진단 부분에 더 많은 투자를 하고 실행하여 선국에 버금가는 학술적 성과를 이룰 것이다.

제 3절 연구개발 범위

1. 1차년도 연구개발 범위 및 내용

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적.실험적 접근방법)	구체적인 내용
임신특이단백질의 아미노산 서열을 분석하여 항원 선정	임신특이단백질의 아미노산 서열을 획득하여 항원성이 높은 부분을 다양한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 예측	임신특이단백질의 아미노산 서열 중 항원력이 높은 부분을 찾기 위하여 epitope prediction program, hydrophilicity prediction program 등을 이용하여 항원력이 높은 부분을 약 30 ~ 40개의 아미노산을 포함하는 펩타이드를 합성하고 또한 실험쥐의 면역체계에서 용이하게 인지되도록 펩타이드를 케리어 단백질에 결합시킴
항임신특이단백질의 항체 개발	실험용 쥐를 이용한 고전적 방법 및 decoy immunization법	실험용 쥐를 이용한 항체 생산에 있어 고전적 방법으로 실험용쥐의 복부에 2주 간격으로 3회 반복하여 항원성 물질을 주입하고 이후 실험용 쥐 혈액내에 항체가 생성되었는지를 확인하는 방법으로 다클론 항

		체 생산을 확인한다. 다클론 항체가 생성되었음이 확인되면 실험용쥐의 spleenocyte와 암세포를 융합하여 단클론 항체를 생산하는 세포주를 개발한다. decoy immunization법은 특정 조건에서 특이적으로 발현하는 단백질에 대한 항체를 개발하는 방법으로 본 연구에서는 임신시 생성되는 단백질을 동정하기 위하여 임신하지 않은 소의 혈액과 임신소의 혈액을 이용하여 임신특이단백질 동정 및 그 항체를 개발하기 위하여 이용되었으므 그 방법은 실험용쥐의 오른쪽/왼쪽 발바닥에 1주 간격으로 교차하여 임신소 혈액단백질과 비임신소 혈액단백질을 주입한다. 면역이 완료된 후 겨드랑이 부분의 임파절을 분리하여 암세포와 융합함으로 단클론 항체를 생산한다.
항임신특이단백질 항체의 대량 생산	실험용 위의 복부에서 항체 클론 배양	생산된 단클론 항체를 분비하는 세포주를 실험용 쥐의 복부에 주입하여 세포를 배양한다.

2. 2차년도 연구개발 범위 및 내용

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적.실험적 접근방법)	구체적인 내용
펩타이드 면역을 통하여 선별된 항체의 성능 검사 및 임신특이단백질에 대한 항체의 항원 결합 부위 선정 (epitope mapping)	1. 실험용 쥐를 이용한 고전적 방법 및 decoy immunization법 2. ELISA 를 이용하여 결합력 측정 3. 항체 적합성 검증을 위한 membrane test 4. epitope 특정을 위하여 펩타이드 재합성	항체 생산에 있어 고전적 방법으로 실험용쥐의 복부에 2주 간격으로 3회 반복하여 항원성 물질을 주입하고 이후 실험용 쥐 혈액내에 항체가 생성되었는지를 확인하는 방법으로 다클론 항체 생산을 확인한다. 다클론 항체가 생성되었음이 확인되면 실험용쥐의 spleenocyte와 암세포를 융합하여 단클론 항체를 생산하는 세포주를 개발한다. 개발된 세포주의 배양액으로부터 얻은 항체를 이용하여(혹은 마우스 복강d로부터 얻은 항체) 임신특이 단백질(펩타이드)에 결합력을 ELISA 시험법을 통하여 측정하고 결합력이 높은 항체들을 대상으로 다시 래피드 키트 멤브레인상에의 결합력을 확

		인한다. 두 시험결과를 토대로 키트 제조에 필요한 두 종류의 항체를 선정하였다. 이후 각 항체가 결합하는 항원내 위치(epitope)를 펩타이드 합성을 통하여 특정하였다.
래피드 키트 제조 시설 구축 및 시제품 생산	컨설팅 업체의 조언과 시험분석기관인증 경험을 바탕으로 제조 시설 구축	키트 제조 시설을 구축함에 있어 가장 중요한 도면 제작에 있어 풍부한 경험을 보유하고 있는 업체(파이런텍, 경기도 수원 소재)의 자문을 받아 시설/설비를 구축하였으며 밸리데이션 및 운영 관리 하고 있다.
하이브리도마 세포의 대량 배양	세포의 대량 배양을 통한 항체의 대량 생산.	생산된 단클론 항체를 분비하는 세포주를 배지 볼륨 10 ml에서 3,000ml 배양이 가능하도록 배지의 조성에 변화를 주었으며 3구 스피너 플라스크의 회전수와 기타의 요인을 세부 조정하였다.

3. 3차년도 연구개발 범위 및 내용

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적.실험적 접근방법)	구체적인 내용
래피드 키트 제조 시설 구축 및 시제품 생산	컨설팅 업체의 조언과 시험분석기관인증 경험을 바탕으로 제조 시설 구축	키트 제조 시설을 구축함에 있어 가장 중요한 도면 제작에 있어 풍부한 경험을 보유하고 있는 업체(파이런텍, 경기도 수원 소재)의 자문을 받아 시설/설비를 구축하였으며 밸리데이션 및 운영 관리 하고 있다.
하이브리도마 세포의 대량 배양	세포의 대량 배양을 통한 항체의 대량 생산.	생산된 단클론 항체를 분비하는 세포주를 배지 볼륨 10 ml에서 3,000ml 배양이 가능하도록 배지의 조성에 변화를 주었으며 3구 스피너 플라스크의 회전수와 기타의 요인을 세부 조정하였다.

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1절 이론적, 실험적 접근 방법

1. 연구개발 추진 전략 및 방법

가. 소임신특이단백질에 대한 항체 생산

위탁기관(한국폴리텍대학 바이오캠퍼스) 연구책임자, 참여연구원 및 주관기관의 항체 개발 경력자가 주기적 회의를 통하여 임신특이단백질에 대한 정보(아미노산 배열, 유전자 등)를 수집하여 임신특이단백질에 대한 conserved domain 분석, epidope prediction program 등을 활용하여 항원(펩타이드)를 선정하여 합성 후 이를 면역함과 동시에 특정 군에 특이적으로 존재하는 단백질을 추적하기 위하여 대표적으로 사용되는 면역법인 decoy 면역법을 이용하여 현재까지 알려지지 않은 임신특이단백질과 항체를 개발함

나. 임신진단키트 제조공정 최적화

사람의 질병 진단법을 연구 개발해온 주관기관의 오랜 경험 및 실적을 동물 질병 진단법 개발에 이용함과 동시에 '체외진단의료기기 협의회' 및 기타의 학술회를 통하여 정보를 수집하고 필요에 따라서는 동물용 의료기기 개발 경험이 있는 전문가를 주기적으로 초빙하여 그로부터 부족하고 미진한 부분을 해결할 계획임

다. 임신진단키트 제조 시설

주관기관이 사람에 적용되는 체외진단의료기기 제조 시설 인허가 경험을 바탕으로 동물용 체외진단의료기기 생산시설을 허가기관이 요구하는 수준으로 갖출 예정임

라. 정보의 수집

국내외에서 개최되는 학술회를 참여하여 축산업 현황, 동물용 체외진단의료기기 개발 현황 및 인허가 규정에 대해 정보 수집

마. 다른 기관과의 협조 방안

연구과제 진행 2차년도 중반기에 생산이 완료된 시제품의 성능평가를 실시하여야 한다. 성능평가를 진행하기 위하여 엄격한 기준(해당기관의 성능평가 경험, 연구원의 숙련도, 성능평가자의 본 키트에 대한 이해도 등)을 적용하여 성능평가 기관을 선정 후 평가 예정

2. 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참 여 연 구 원
과제명	소임신특이단백질에 대한 항체 개발과 그 항체를 이용한 소임신 진단 키트의 개발	주관연구책임자 (김봉휘)외 총 9 명

기 관 별 참 여 현 황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업		
중견기업		
중소기업	1	5
대 학	1	5
국공립(연)		
출 연 (연)		
기 타		

주관연구기관명
과 제 명
연구책임자명 (김봉휘)외 4 명
담당기술개발내용
소임신진단키트의 개발

협동연구기관명
과 제 명
연구책임자명 (○○○)외 ○○명
담당기술개발내용

공동연구기관명
과 제 명
연구책임자명 (○○○)외 ○○명
담당기술개발내용

위탁연구기관명
과 제 명
연구책임자명 (하영주)외 4명
담당기술개발내용
임신특이단백질에 대한 항체 제작 및 대량 생산

공동연구기관명
과 제 명
연구책임자명 (○○○)외 ○○명
담당기술개발내용

위탁연구기관명
과 제 명
연구책임자명 (○○○)외 ○○명
담당기술개발내용

3. 연구개발 추진 일정

가. 연구개발 추진 일정(1년차)

1차년도															
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비(단위: 천원)	책임자(소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	계획수립 및 자료조사														김봉휘((주)에스엘에스)
2	임신 특이단백질의 항체 제작													10,000	하영주(한국폴리텍대학)
3	임신특이단백질에 대한 항체 검정													30,000	김봉휘((주)에스엘에스)
4	단백질 등 원료의 QC 기준 확립													60,000	김봉휘((주)에스엘에스)

나. 연구개발 추진 일정(2년차)

2차년도															
1	임신특이단백질 항체의 epitope mapping													55,000	하영주(한국폴리텍대학)
2	decoy immunization으로 발굴된 항원의 동정 및 특성 분석													65,000	하영주(한국폴리텍대학)
3	임신진단키트 제조 공정 확립													65,000	김봉휘((주)에스엘에스)
4	키트 제조 시설 구축													10,000	김봉휘((주)에스엘에스)
5	임신진단키트 시제품 생산													50,000	김봉휘((주)에스엘에스)
6	성능 분석 및 평가													20,000	김봉휘((주)에스엘에스)
7	키트의 허가 서류 작성													5,000	김봉휘((주)에스엘에스)
8	항체의 대량 시스템 확입													30,000	하영주(한국폴리텍대학)

다. 연구개발 추진 일정(3년차)

3차년도															
1	키트의 허가 신청 및 대응													15,000	김봉휘 ((주)에스엘에스)
2	decoy immunization으로 발굴된 항원의 특성 분석													30,000	하영주 (한국폴리텍대학)
3	항체의 대량 생산 시스템 확립 및 기술 이전													60,000	김봉휘 ((주)에스엘에스)
4	성능 분석 및 평가													30,000	김봉휘 ((주)에스엘에스)
5	항체 대량생산 기술 이전													55,000	김봉휘 ((주)에스엘에스)
6	항체 대량시스템 자사 확립													80,000	김봉휘 ((주)에스엘에스)
7	수출을 목적으로 해외 허가 진행													30,000	김봉휘 ((주)에스엘에스)

제 2절 연구개발성과

1. 특허출원:
출원일: 2017.11.15
출원번호: 10-2017-0152257
출원인: (주)에스엘에스바이오
출원국: 대한민국
특허명:bPAG1에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이의 용도
특허내용:
bPAG1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 하이브리도마 세포(수탁번호 KCLRF-BP-00416)주를 확립하고 이로 얻어지는 항체들의 역가를 확인 하였다. 역가가 높고 PAG-1에 대한 결합부위가 다른 두 개의 항체를 선정하여 소임신 진단 키트의 조성물로 사용하여 임신진단키트를 제조하였다. 또한 bPAG1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 검체 시료와 접촉시키는 단계; 및 상기 항체 또는 항원-결합 단편에 결합된 bPAG1 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 소에서 임신을 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

출원일: 2018.11.06
출원번호: PCT/KR2018/013397
출원인: (주)에스엘에스바이오

출원국: 대한민국, 개별국 진입 전
특허명: 소임신 연관 글리코단백질 1에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도

제 3 절 연구 방법 및 연구 결과

1. 연구 방법

가. 1차년도 연구 목표

- 임신 특이 단백질의 특성 분석 및 항원 개발
- 임신특이단백질에 대한 항체 제작

나. 1차년도 연구 방법

(1) 임신특이단백질에 대한 항체 생산을 위한 항원 개발 및 검정
임신특이단백질의 항체를 제작하기 위하여 기 발표된 논문(1982, biology of reproduction) 및 PubMed 검색을 통하여 임신우의 태반 mono- and binucleate trophoblast cells에 존재하며 수정 후 약 28일 후부터 임신우의 혈액에서 측청할 수 있는 임신 특이적인 단백질의 아미노산 서열을 분석하여 면역에 사용할 펩타이드를 합성한다.

(2) Polyclonal 항체 생산

케리어를 컨쥬게이션 시킨 Immunogenic complex와 컨쥬게이션하지 않은 펩타이드를 Freund's complete adjuvant에 유화시켜 5주령 Balb/C 마우스에 피하주사로 면역한다. 최초 면역 14일 후 2회 반복 면역 후, 약 10일 뒤 혈액을 채취하여 혈구와 혈청을 분리한 다음, 국내 및 해외에서 PAG1에 대한 항체는 판매되지 않는 것으로 조사되어 면역에 사용한 펩타이드가 코팅된 96-well 플레이트를 이용하여 ELISA를 실시 항체 생성 유뮤를 판정한다.

(3) 단클론 항체의 생산

polyclonal 항체를 생산하기 위해 6종의 항원을 면역시킨 마우스에서 비장세포를 채취하여, myeloma cell(SP2)을 PEG를 이용하여 융합한 다음, HAT (hypoxanthine-aminopterimthymidine medium) 배지로 Hybridoma를 선별한다. 선별된 Hybridoma를 96 well plate에 well 당 3개의 Hybridoma가 분주 되도록 분주(cloning)하고, 37도, 5%의 CO2의 조건에서 Colony를 형성하며 성장할 때까지 배양한다. Colony를 형성하며 성장한 Hybridoma의 배양 상등액을 정량 실험 방법(ELISA 등)으로 측정하여 임신특이단백질(PAG1)에 대한 항체를 생산하는 Hybridoma를 선별(screening) 하며, KLH에 대한 Affinity가 있는 hybridoma는 골라내어 폐기시킨다. 이러한 coloning과 screening을 반복하여 임신 특이 단백질(PAG1)에 대한 높은 역가를 가지는 항체를 생산하는 Hybridoma를 선택하여 항체를 대량

으로 생산하기 위해 pristane을 주입한 마우스 복강에 주입한다. 일정 시간이 지난 후 복강이 부풀어 오르면 복강에서 ascitic fluid를 빼내어, 항체의 정제에 앞서 복수를 이용하여 항체의 sub-typing을 실시한다.

다. 2차년도 연구 목표

- 동물용 의료기기(RAPID Kit) 생산 시설(GMP) 구축
- 펩타이드 면역을 통하여 선별된 항체 성능 검증
- 임신특이단백질 항체를 이용한 RAPID Kit 시제품 제작
- 임신특이단백질에 대한 항체 epitope mapping

라. 2차년도 연구 방법

(1) 임신특이 단백질에 대한 항체 epitope mapping

임신특이 단백질에 대한 항체 epitope mapping을 위하여 40 mer로 합성한 PAG1 펩타이드를 20 mer 단위로 재 합성 하여 그 결합 부위를 선정한다.

(2) 펩타이드 면역을 통하여 선별된 항체 성능 검증

생산한 항체의 역가를 확인하기 위하여 각 항원별로 1:100부터 2배씩 코팅 완충용액에 희석하여 96 well plate에 코팅한 후, 충분히 코팅될 수 있도록 O/N, 4도에서 incubation하고, 이 후 non-specific binding을 제거하기 위해 1% BSA가 첨가된 PBS로 Blocking한다. 0.5%의 PBST(PBS+Tween20)로 washing

과정을 거친 뒤, 이 후 PAG1 펩타이드의 항체를 첨가하여 코팅된 항원과 반응하도록 한다. 이 후 2차 항체를 첨가한 후 ELISA reader를 이용하여 O.D.값을 측정한다.

(3) 동물용 의료기기(RAPID Kit) 생산 시설(GMP) 구축

현재까지 동물용 의료기기의 생산시설은 GMP 관리 기준에 종속되지 않으나 2020년부터 GMP 관리하에서 동물용 의료기기가 생산되도록 관련 규정이 신설될 것이라 알려져 있으므로 인체용 의료기기 생산 기준에 준하여 생산 시설을 구축한다.

마. 3차년도 연구 목표

- 진단 키트 시제품 개발, 성능 검사, 국내 인허가
- 펩타이드 면역을 통하여 선별된 항체 세포주를 이용한 항체 대량 생산법 확립

바. 3차년도 연구 방법

(1) 진단 키트 시제품 개발, 성능검사, 및 국내 인허가

(가) 진단 키트 시제품의 생산

품질관리 SOP와 제조 공정 SOP를 확립하고 확립된 SOP에 따라 시제품을 생산한다.

(나) 성능 검사

SOP에 따라 생산된 3 lot의 시제품을 이용하여 분석적 성능 시험(검출한계, 교차반응, 간섭반응, 정확도, 정밀도 등)의 시험을 실시하고 또한 기허가 제품과의 상관성 시험을 진행한다.

(다) 국내 인허가

허가 서류를 작성하기전 허가 기관과 사전 미팅을 통하여 면밀히 협의하고 작성된 서류의 오류 등을 검증 한다.

(2) 세포주를 이용한 항체 대량 생산법 확립 기술 이전

3-3D5, 1-2E8, 1-1B6 세포주를 DMEM 혈청배지에서 배양하면서 배양시간에 따른 생장곡선과 항체생산량의 관계를 확인 하고, 이를 기초로 무혈청배지(CD hybridoma media, Gibco)에서 1L, 3L, 5L 대량배양을 수행하여 세포생장곡선과 항체생산량의 관계를 확인한다.

- 항체생산량은 mouse IgG에 대한 ELISA정량법을 사용한다.
- 항체가 포함된 배양액을 한외여과를 이용한 항체정제방법을 확립하고 정제한 항체의 정제도와 특성을 분석한다.

2. 연구결과

가. 1년차 연구결과

(1) 임신특이단백질에 대한 항체 생산을 위한 항원 개발 및 검정

임신특이단백질의 항체를 제작하기 위하여 기 발표된 논문(1982, biology of reproduction) 및 PubMed 검색을 통하여 임신우의 태반 mono- and binucleate trophoblast cells에 존재하며 수정 후 약 28일 후부터 임신우의 혈액에서 측정할 수 있는 임신 특이적인 단백질의 아미노산 서열을 획득하였다(그림 1).

```
        10         20         30         40         50
MKWLVLLGLV AFSECIVKIP LRRLKTMRNV VSGKNMLNNF LKEHAYSLSQ
        60         70         80         90        100
ISFRGSNLTT HPLRNIKDLV YMGNITIGTP PQEFQVVFDT ASSDLWVPSD
       110        120        130        140        150
FCTSPACSTH VRFRHLQSST FRLTNKTFRI TYGSGRMKGV VVHDTVRIGN
       160        170        180        190        200
LVSTDQPFGL SIEEYGFEGR IYDGVLGLNY PNISFSGAIP IFDKLKNQRA
       210        220        230        240        250
ISEPVFAFYL SKDEREGSVV MFGGVDHRYY EGELNWVPLI QAGDWSVHMD
       260        270        280        290        300
RISIERKIIA CSDGCKALVD TGTSDIVGPR RLVNNIHRLI GAIPRGSEHY
       310        320        330        340        350
VPCSEVNTLP SIVFTINGIN YPVPGRAYIL KDDRGRCYTT FQENRVSSST
       360        370        380
ETWYLGDVFL RLYFSVFDRG NDRIGLARAV
```

그림1) 타켓 단백질(PAG1)의 아미노산 서열

이후 epitope prediction program, immunogenecity등을 분석하여 세 종류의 펩타이드에 대해 케리어 단백질(KLH)의 유/무 조건을 포함하여 6종의 펩타이드를 합성하였다.

(2) Polyclonal 항체 생산

케리어를 컨쥬게이션 시킨 Immunogenic complex와 컨쥬게이션하지 않은 펩타이드를 Freund's complete adjuvant에 유화시켜 5주령 Balb/C 마우스에 피하주사로 면역하였다. 최초 면역 14일 후 2회 반복 면역 후, 약 10일 뒤 혈액을 채취하여 혈구와 혈청을 분리한 다음, 국내 및 해외에서 PAG1에 대한 항체는 판매되지 않는 것으로 조사되어 면역에 사용한 펩타이드가 코팅된 96-well 플레이트를 이용하여 ELISA를 실시 항체 생성 유/뮤를 확인 하였다. 그림 2에서 나타나는 것처럼 PAG1-100을 면역한 마우스에서는 PAG1 항원에 특이적으로, PAG-300 펩타이드를 면역한 마우스에서는 PAG-300 항원에 특이적으로 반응함을 알 수 있었다.

(3) 단일클론 항체의 생산

마우스의 혈액내에 polyclonal 항체의 존재를 확인 하였으므로 단클론 항체를 생산하기 위해 6종의 항원을 면역시킨 마우스에서 비장세포를 채취하여, myeloma cell(SP2)을 PEG를 이용하여 융합한 다음, HAT(hypoxanthine-aminopterimthymidine medium) 배지로 Hybridoma를 선별하였다. 선별된 Hybridoma를 96 well plate에 well 당 3개의 Hybridoma가 분주 되도록 분주(cloning)하고, 37도, 5%의 CO2의 조건에서 Colony를 형성하며 성장할 때까지 배양하였다. Colony를 형성하며 성장한 Hybridoma의 배양 상등액을 정량 실험 방법(ELISA 등)으로 측정하여 임신특이단백질(PAG1)에 대한 항체를 생산하는 Hybridoma를 선별(screening) 하였으며, KLH에 대한 Affinity가 있는 hybridoma는 골라내어 폐기 하였다. 이러한 coloning과 screening을 반복하여 임신특이단백질(PAG1)에 대한 높은 역가를 가지는 항체를 생산하였다. 또한 항체를 대량으로 생산하기 위해 pristane을 주입한 마우스 복강에 역가가 높은 Hybridoma 세포를 선택하여 주입하였다. 일정 시간이 지난 후 복강이 부풀어 오르면 복강에서 ascitic fluid를 빼내어, 항체의 정제에 앞서 복수를 이용하여 항체의 sub-typing을 실시하였다.

Coating Ag	PAG1-300								
Serum dil.		Control	NC1	NC2	NC3	PAG1-100	PAG1-100KLH	PAG1-300	PAG1-300KLH
		1	2	3	4	5	6	7	8
x100	A	0.15	0.075	0.125	0.082	0.159	0.12	2.558	2.583
x200	B	0.059	0.027	0.048	0.033	0.073	0.048	2.317	2.34
x400	C	0.021	0.012	0.018	0.015	0.03	0.019	2.144	2.164
x800	D	0.01	0.007	0.009	0.008	0.013	0.01	1.828	1.921
x1,600	E	0.007	0.006	0.006	0.007	0.007	0.005	1.434	1.446
x3,200	F	0.005	0.005	0.006	0.005	0.006	0.006	0.869	0.887
x6,400	G	0.005	0.004	0.005	0.005	0.005	0.004	0.385	0.454
x12,800	H	0.005	0.004	0.005	0.005	0.005	0.005	0.224	0.246

Coating Ag	PAG1-100								
Serum dil.		Control	NC1	NC2	NC3	PAG1-100	PAG1-100KLH	PAG1-300	PAG1-300KLH
		1	2	3	4	5	6	7	8
x100	A	0.203	0.087	0.145	0.111	2.393	2.483	0.195	0.151
x200	B	0.084	0.037	0.062	0.045	2.176	2.265	0.087	0.069
x400	C	0.03	0.014	0.025	0.018	2.018	1.916	0.035	0.029
x800	D	0.013	0.009	0.011	0.01	1.547	1.518	0.015	0.013
x1,600	E	0.009	0.006	0.008	0.006	1.029	0.998	0.016	0.019
x3,200	F	0.006	0.006	0.006	0.007	0.562	0.554	0.014	0.02
x6,400	G	0.005	0.005	0.011	0.011	0.288	0.263	0.005	0.005
x12,800	H	0.005	0.005	0.005	0.005	0.134	0.127	0.005	0.005

그림 2) 펩타이드가 면역된 마우스의 혈정을 이용한 ELISA

(4) 항체 subtyping

위의 과정을 거쳐 제작된 PAG1에 대해 의미있는 항체는 총 25종 이었으며 아래와 같다.

PAG1 항체 clone들

PAG_100	1A6, 2A6, 2B6, 2C4, 3D1, 3D6, 3E1, 1B6, 2E9, 3A2, 2H7, 2E10, 2E8, 3D4, 2F12
PAG_100-KLH	3A6, 3B1, 3B3, 3B5
PAG_300	4A1, 4A3, 3D5, 2H7, 2A5, 1

판매되고 있는 항체 sub-typing 키트를 이용하여 위의 25종 항체들의 sub-typing을 실시한 결과 대부분의 항체는 IgM type으로 존재하였으며 1 종류의 항체만이 IgG type으로 존재하였다.

그림 3-1) 생산된 항체의 subtyping

그림 3-2) 생산된 항체의 subtyping

나. 2년차 연구결과

(1) 항체의 분리

수 회에 걸쳐 생산한 항체의 대부분이 IgM subtype이었으므로 각 항체를 subtype별로 해당 프로토콜을 이용하여 분리하였다.

(가) IgG 분리(Nab, Protein G spin kit)

채취된 복수에 복수 볼륨의 3배에 해당하는 PBS를 첨가하여 O/N suspension 한 후 키트내에 포함되어 있는 Binding buffer를 1:1로 혼합해준 뒤 column에 sample을 로딩하였다. Sample을 넣은 뒤 컬럼 볼륨의 5배에 해당하는 washing buffer를 이용하여 Binding되지 않은 다른 단백질들을 세척하였다. 이후 Elusion 용액을 컬럼 볼륨의 2 배 분주하여 neutralization 용액이 담긴 tube에 Elution 하였다. elution한 단백질을 BCA 법을 이용하여 단백질의 농도를 정량하였다.

(나) IgM 분리(Dialysis)

채취된 복수에 복수 볼륨의 1배에 해당하는 5.75M Ammonium sulfate를 첨가하여 냉실(2~8℃)에서 30분 이상 반응시킨 후 원심분리(6,000 rpm, 4도, 20분)하여 침전물을 수거한다. 수거한 침전물을 PBS에 용해시킨 후 O/N suspension 하고 이를 Dialysis pack(cut off 100 KDa)에 주사기를 이용하여 smaple을 넣어 준다. dialysis 용액으로는 2mM phosphate buffer를 이용하였으며, 2L를 비이커에 dialysis buffer를 첨가한 후 dialysis pack 과 마그네틱 바를 넣어준 후 4℃에서 3일 동안 buffer 교환을 해 주면서 Dialysis 한다. 버퍼 교환이 완료된 후 수거하여 BCA 법을 이용하여 단백질의 농도를 정량하였다.

(2) PAG1 펩타이드에 대한 항체의 역가 측정 및 pair 항체 선정

마우스의 복수로부터 생산한 항체는 총 25종이었으며 항체들 중 IgG subtype을 가지는 2E8에 대해 가장 우수한 결합력을 가지는 항체를 선별하는 작업을 ELISA 시험법을 이용하여 실시하였다. 자세히는 1차 항체의 역가 측정을 위하여 각 항체별로 1:100부터 2배씩 코팅 용액에 희석하여 96 well immunoplate에 코팅한 후, 충분히 코팅될 수 있도록 2시간 동안 incubation하였고, 이 후 non-specific binding을 제거하기 위해 1% BSA가 첨가된 생리식염수로 Blocking하였다. 0.5%의 PBST(PBS+Tween20)로 washing 과정을 거친 뒤, 이 후 PAG1 펩타이드를 첨가하여 코팅된 1차 항체와 반응하도록 하였다. 이후 무샤-IgM-HRP solution을 첨가한 후 ELISA reader로 측정하였다.

ELISA시험 결과 우수한 결합력을 가지는 항체로 3D5와 1B6 항체가 선정 되었다(그림 4).

Serum	3-3D5		1-1B6		1-2E10		1-3D6		1-2E8		1-3D4	
3	0.866	0.267	0.089	0.077	0.603	0.578	0.073	0.071	1.334	1.381	0.082	0.084
8	0.791	0.266	0.16	0.101	0.615	0.775	0.1	0.255	1.2	1.37	0.093	0.112
6	0.334	0.752	0.129	0.109	0.64	0.68	0.121	0.155	1.321	1.281	0.117	0.215
9	0.842	0.706	0.168	0.115	0.626	0.656	0.088	0.102	1.293	1.239	0.085	0.12
4	0.439	0.378	0.146	0.146	0.733	0.723	0.177	0.221	0.944	0.879	0.159	0.174
1	0.893	0.722	0.224	0.125	0.696	0.661	0.102	0.153	0.765	0.998	0.102	0.109
5	0.33	0.51	0.248	0.112	0.721	0.652	0.13	0.137	0.977	1.105	0.108	0.088
Negative control (PBS)	0.268	0.234	0.069	0.071	0.679	0.644	0.055	0.064	0.865	1.016	0.051	0.051

그림4) 선별된 항체(2E8)의 Pair 항체를 찾기 위한 ELISA. coating antibody: 2E8, antigen:

pregnant bovine serum, dilution rate of secondary antibody: 1:10,000

(3) 선별한 항체의 역가 확인

(가) clone 2E8에 대한 Titration curve

clone 2E8 항체와 PAG1 펩타이드의 결합이 1:1600의 희석배율부터 급격히 떨어지는 것을 알 수 있다(그림 5-1). 따라서 1:800, 1:1600, 1:3200의 3가지 희석배율의 평균인 1:1600의 희석배

율이 clone 2E8의 역가임을 확인할 수 있었다.

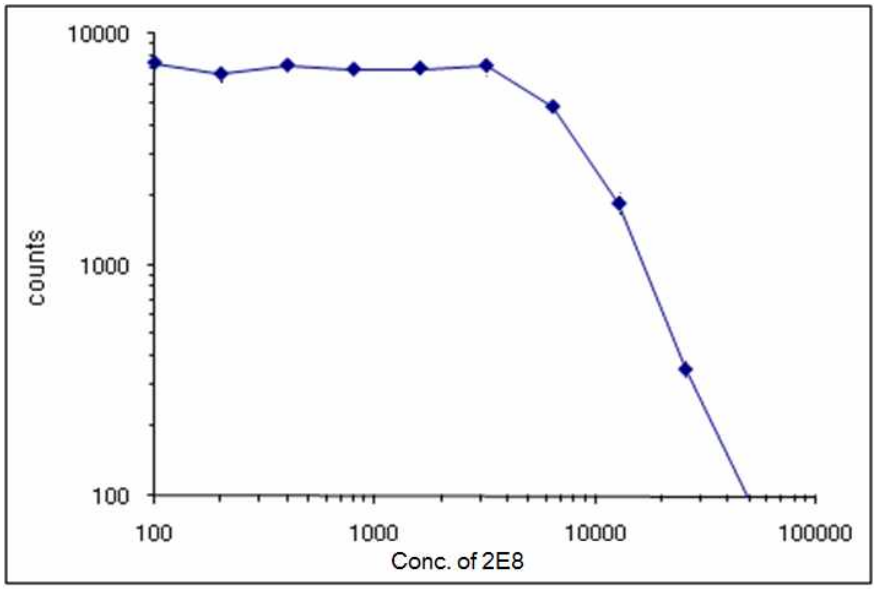


그림 5-1) 2E8 항체의 역가 그래프

(나) clone 3D5에 대한 Titration curve

clone 3D5 항체와 PAG1 펩타이드의 결합이 1:1600의 배율부터 급격히 떨어지는 것을 알 수 있다(그림 5-2). 따라서 1:800, 1:1600, 1:3200의 3가지 희석배율의 평균인 1:1600의 희석배

율이 clone 3D5의 역가임을 확인할 수 있었다.

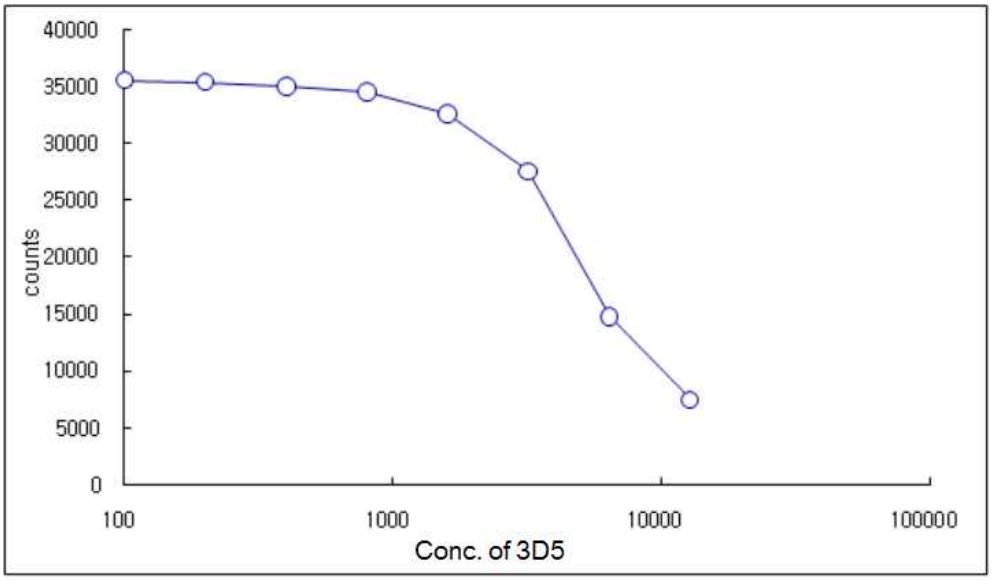


그림 5-2) 3D5 항체의 역가 그래프

clone 1B6에 대한 Titration curve

clone 1B6 항체와 PAG1 펩타이드의 결합이 1:800의 배율부터 anti-IgM HRP와의 결합이 급격히 떨어지는 것을 알 수 있다(그림 5-3). 따라서 역가는 1:800 임을 확인할 수 있었다.

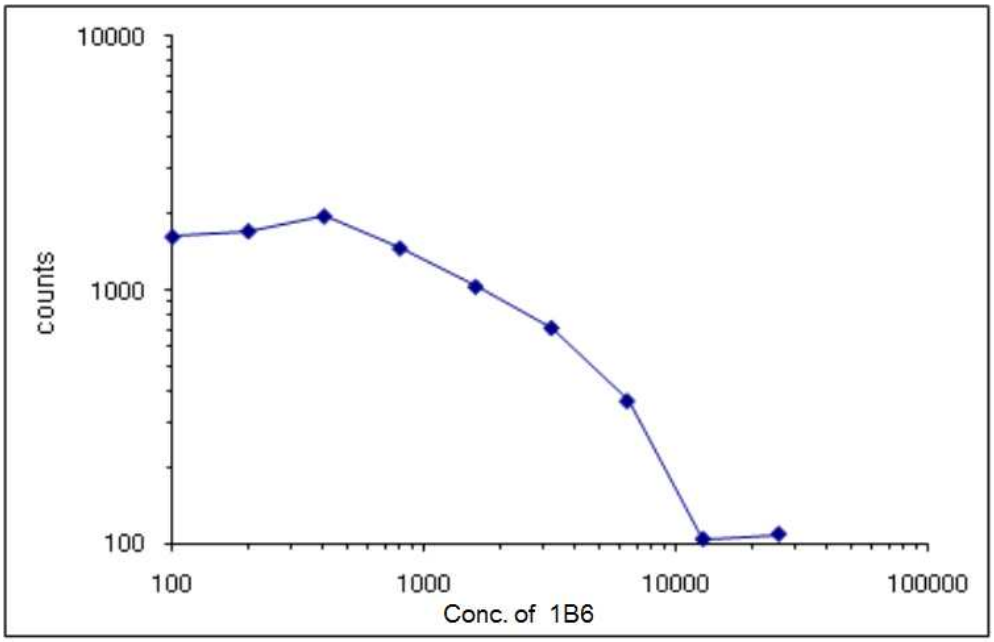


그림 5-3) 1B6 항체의 역가 그래프

(4) 임신우/비임신우 혈액을 이용한 항체 검사

항체 제작을 목적으로 합성한 펩타이드들은 단백질의 3차 구조를 형성하지 않으므로 in vivo 상에서 존재하는 임신특이단백질에 선별한 항체 클론이 결합하는지를 알아보기 위하여 임신우와 비임신우의 혈액을 이용하여 항체의 결합 여부를 ELISA시험법으로 그 결합력을 확인하였다. 좀 더 상세히는 clone 3D5 와 clone 1B6를 ug/ml의 농도 코팅용액을 이용하여 희석하여 96-well plate에 100 ul/well의 볼륨으로 로딩하여 O/N, 4 ˚C 에 방치하여 코팅한다. 코팅이 완료된 플레이트로부터 항체 용액을 제거하고 비특이 반응을 제거하기 위하여 1% BSA-PBS를 첨가하여 2시간 동안 4 ˚C에서 블로킹하였다. 블로킹 후 임신우와 비임신우의 혈액을 블로킹 버퍼에 희석하여 첨가하고 60 분 동안 4 ˚C에서 반응하고 결합하지 않고 남아 있는 단백질과 비특이 반응을 제거하기 위하여 세척 단계를 거친 후 2E8 항체를 첨가한다. 이후 30 분 동안 37 ˚C에서 반응을 유도하고 세척 후 anti IgG-HRP를 첨가한다. 이후 발색제를 첨가하여 각 항체가 임신우 혈액내에 존재하는 임신특이단백질에 결합하는지를 확인 하였다(그림 6-1, 그림 6-2).

그 결과 3 종류의 항체는 임신우의 혈액내에 존재하는 임신특이단백질에 안정적으로 결합함을 알 수 있었다.

raw data			
	1	2	ave
FBS	0.503	0.48	0.4915
17.8.17	0.999	1.002	1.0005
17.10.7	0.94	0.887	0.9135
17.11.9	1.208	1.139	1.1735
17.11.26	0.897	0.982	0.9395
17.12.1	1.308	1.347	1.3275
18.4.3	1.802	1.711	1.7565
18.4.13	1.554	1.562	1.558
18.4.19	1.25	1.241	1.2455
18.4.24	1.491	1.46	1.4755
18.4.28	1.334	1.35	1.342
18.4.29	1.445	1.41	1.4275
18.4.29	1.415	1.436	1.4255
18.5.12	0.702	0.715	0.7085
18.5.15	0.689	0.692	0.6905

O.D값-FBS	
FBS	0
17.8.17	0.509
17.10.7	0.422
17.11.9	0.448
17.11.26	0.448
17.12.1	0.836
18.4.3	1.265
18.4.13	1.0665
18.4.19	0.754
18.4.24	0.984
18.4.28	0.8505
18.4.29	0.936
18.4.29	0.934
18.5.12	0.217
18.5.15	0.199

그림 6-1) 선별한 항체가 임신우의 혈액내에 존재하는 임신특이단백질에 결합하는지 확인하기 위한 ELISA. coating antibody: 3D5, antigen: pregnant bovine serum, dilution rate of secondary antibody: 1:20,000

Raw data				
	sample	1	2	average
1번	Balnk	0.41	0.41	0.41
	17.08.17 수정	1.442	1.651	1.5465
	18.04.29 수정	2.245	2.375	2.31
	18.05.15 수정	1.442	1.651	1.5465

O.D값 - Blank값				
	sample	1	2	average
1번	Balnk	0	0	0
	17.08.17 수정	1.032	1.241	1.1365
	18.04.29 수정	1.835	1.965	1.9
	18.05.15 수정	1.032	1.241	1.1365

그림 6-2) 선별한 항체가 임신우의 혈액내에 존재하는 임신특이단백질에 결합하는지 확인하기 위한 ELISA. coating antibody: 1B6, antigen: pregnant bovine serum, dilution rate of secondary antibody: 1:20,000

(5) 멤브레인 상에서의 항체 성능 평가

용액내에서의 항체-항원 결합 양상과 멤브레인상에서의 항원-항체의 결합 양상이 차이를 보일 수 있으므로 ELISA 시험법을 이용하여 선정한 항체의 멤브레인 상에서의 결합 양상을 확인 하였다. 자세히는 선별한 항체를 mg/ml의 농도로 PBS를 이용하여 희석한 후 이를 멤브레인 상에 0.5 ug씩 로딩한 후 실온에서 O/N 건조하여 20 ul 전개용액과 Gold가 결합된 anti IgM(O.D. = 10.0) 용액 5ul가 혼합되어 있는 well에 멤브레인의 아랫부분이 잠기도록 넣는다. 20분 후 멤브레인 상에 붉은 스팟이 나타날 경우 용액내에서나 멤브레인 상에서 항체의 결합 양상은 동일하다고 간주 하였다. 아래 그림에서와 같이 3D5와 1B6은 멤브레인 상에 스팟을 나타내었다(그림 7).

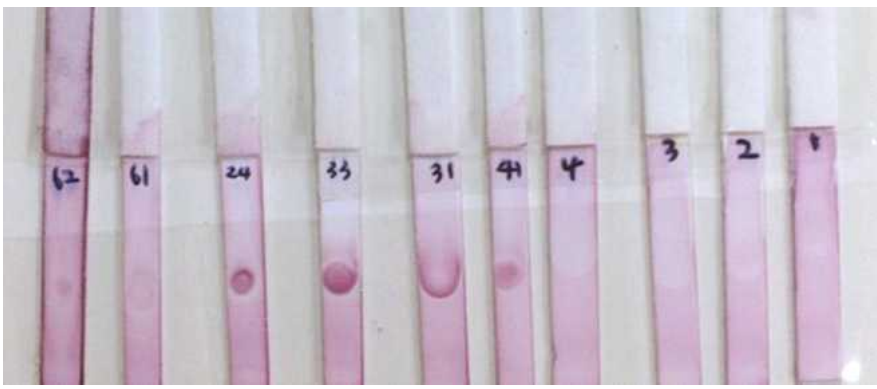
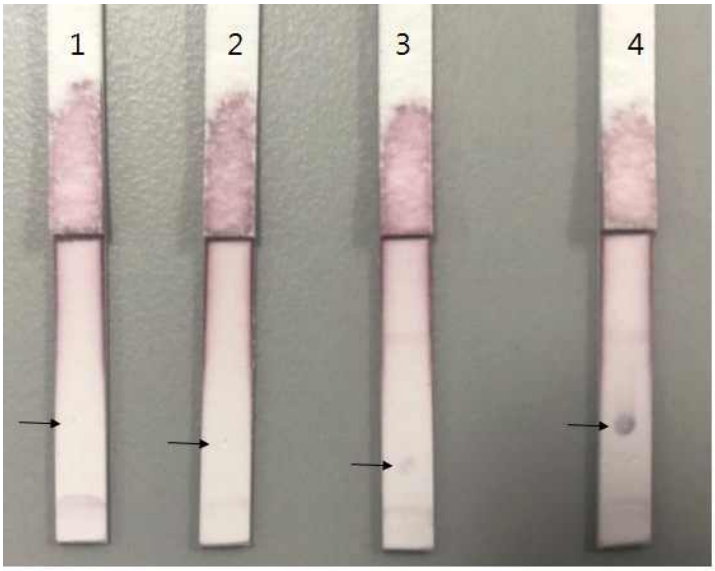


그림 7) 선별한 항체의 멤브레인상에서의 결합 양상 확인 시험. 62: clone 3B3, 61: clone 2B6, 24: clone 2C4, 33: clone 3D5, 31: clone 3B5, 41: clone 1B6, 4: clone 3B4, 3: anti IgG, 2: anti-IgM

또한 ELISA 시험법상 성공적으로 pair를 이룬 항체들이 멤브레인 상에서도 동일한 결과를 보이는지 확인하고자 clone 3D5 항체가 로딩되어 있는 멤브레인에 Gold가 컨쥬게이션된 임신우의 혈액과 비임신우의 혈액을 동일한 방법으로 전개하였으며 그 결과 임신우 혈액내에 존재하는 임신특이단백질이 clone 3D5에 결합함을 알 수 있었다. 이후 추가적으로 임신우와 비임신우의 혈액 20 ul에 gold가 컨쥬게이션된 5 ul의 clone 2E8 혼합한 후 clone 3D5, clone 1B6이 로딩되어 있는 멤브

레인을 넣어 그 결합의 정도를 확인하였다. 그 결과 clone 3D5가 clone 1B6에 비해 결합력이 우수함을 알 수 있었다(그림 8).



1: 비임신우
2: 임신우(수정 후 4주)
3: 임신우(수정 후 6주)
4: 임신우(수정 후 8주)

그림 8) 임신진단키트의 간이 시험. gold xonjugated antibody: 2E8, test sample: pregnant bovine serum, membrane loaded antibody: 3D5

(6) RAPID Kit 생산 시설(GMP) 구축

동물용 의료기기 생산시설도 2020년부터 인체용 의료기기 생산 시설 기준에 준하는 시설 기준이 도입됨에 따라 본 연구팀은 생산시설을 kGMP에 준하는 의료기기 생산 시실을 구축하였다(그림 9).

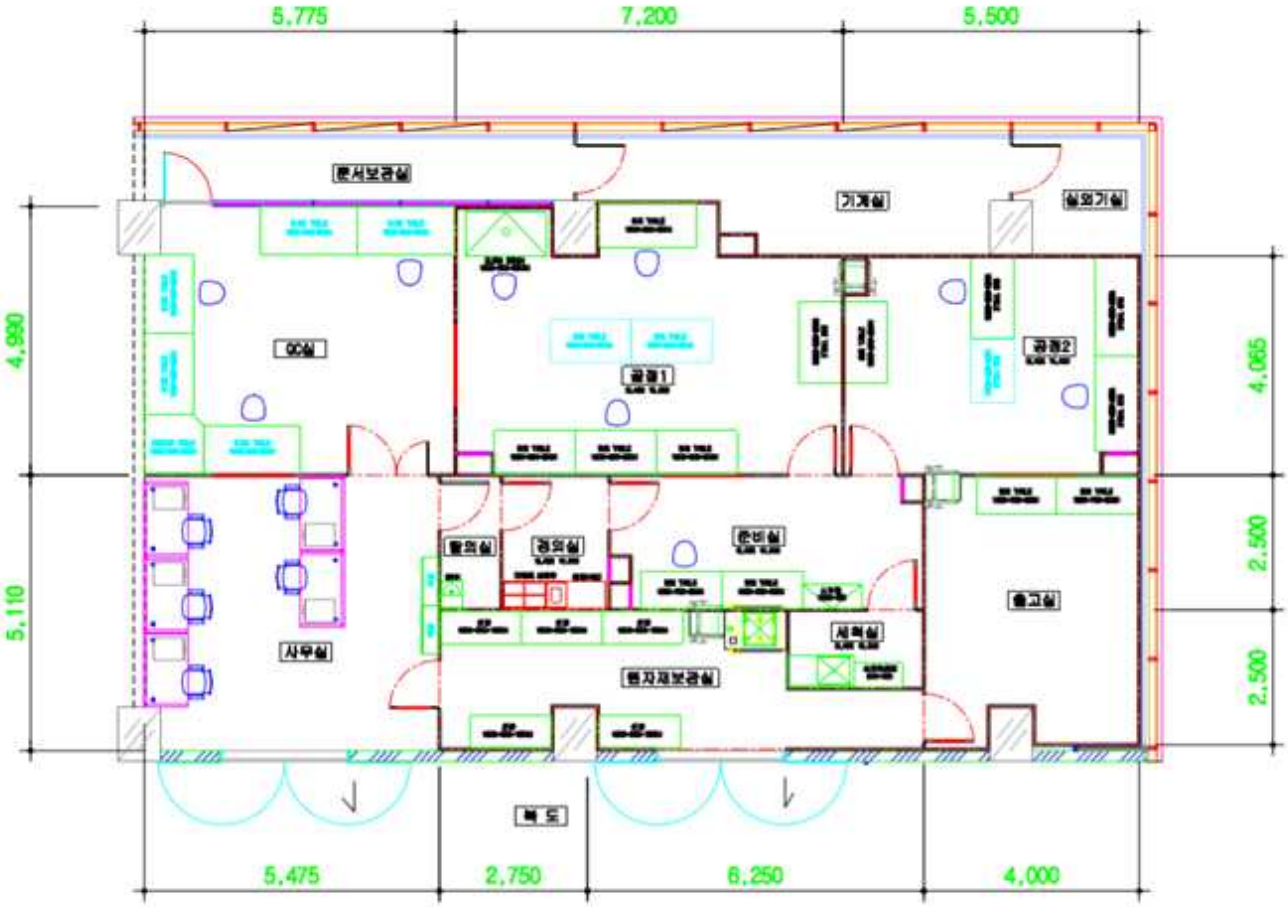


그림 9) 생산시설 도면

다. 3년차 연구 결과

(1) 키트 제조에 필요한 단백질 등 원료 표준화(QC 기준 확립)

(가) 표준물질 선정

국내 혹은 국외에 임신한 소에서 분비되는 특이단백질(PAG1)을 분리 정제하여 그 양을 표준화 한 제품을 판매하지 않음은 물론 PAG1 단백질을 구매 할 수도 없었으므로 본 연구팀은 임신특이단백질이 포함되어 있는 임신 7개월 이상의 임신우의 혈청을 양성 표준물질로 하였으며 음성 표준물질로는 인공수정 혹은 임신의 경험이 없는 비임신우의 혈액을 음성 표준 물질로 하였다.

양성 표준물질: 임신 7개월 이상의 임신우의 혈청
음성 표준물질: 인공수정 혹은 임신의 경험이 전혀 없는 비임신우의 혈청

양성 표준물질

음성 표준물질

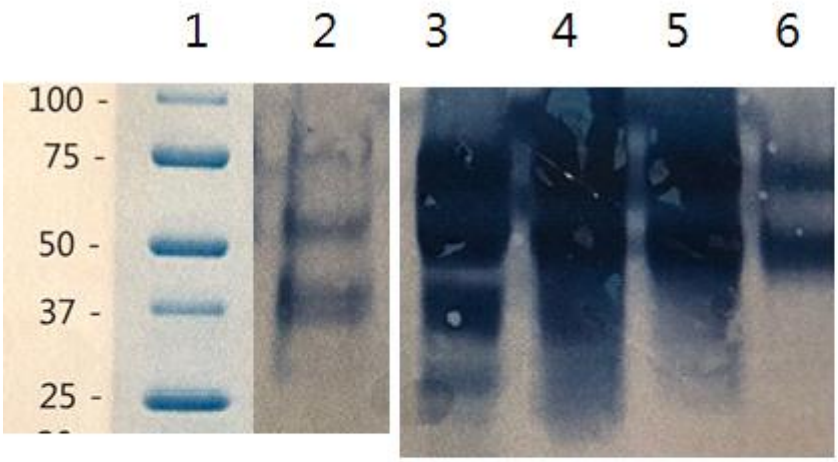
(나) 키트 제조에 사용되는 항체(clone 3D5, clone 2E8)들의 품질 관리

clone 3D5의 품질 관리

IgM subtype을 가지는 clone 3D5는 (주)에스엘에스바이오의 'IgM 항체 분리 SOP'에 따라 항체를 분리한 후 키트 제조에 사용되기 전 mg/ ml의 농도로 PBS를 이용하여 희석하여 초저온 냉동고에 보관한다. 품질관리의 방법으로는 분리한 항체가 임신우의 혈액내에 존재하는 임신특이단백질과 결합하는지 확인하기 위하여 immunoprecipitation 후 cross reactivity가 없는 항체(clone 2E8)를 이용하여 western blot을 실시한다. 웨스턴 블럿 후 임신특이단백질의 분자량의 위치에 해당하는 곳에서 밴드가 발색하는 것을 확인 한다.

clone 2E8의 품질 관리

IgG subtype을 가지는 clone 2E8 항체는 (주)에스엘에스바이오의 'IgG 항체 분리 SOP'에 따라 항체를 분리한 후 키트 제조에 사용되기 전 mg/ ml의 농도가 되도록 PBS를 이용하여 희석하여 초저온 냉동고에 보관한다. 품질관리의 방법으로는 분리한 항체가 임신우의 혈액내에 존재하는 임신특이단백질과 결합하는지 확인하기 위하여 immunoprecipitation 후 cross reactivity가 없는 항체(clone 3D5)를 이용하여 western blot을 실시한다. 웨스턴 블럿 후 임신특이단백질의 분자량의 위치에 해당하는 곳에서 밴드가 발색하는 것을 확인 한다(그림 10).



lane 1 : marker
lane 2 : clone 3D5 IP + clone 2E8 western
lane 3 : clone 2E8 IP + clone 3D5 western
lane 4 : clone 1B6 + clone 2E8 western
lane 5 : clone 2E8 + pep100
lane 6 : clone 1B6 + pep300

그림 10) 키트 제조에 사용되는 항체(clone 3D5, clone 2E8)들의 immunoprecipitation 후 western blot

(다) 소임신진단키트의 품질관리
소임신진단키트의 품질관리는 크게 수입검사, 공정검사, 반제품 검사, 완제품 검사로 분류 하였다.

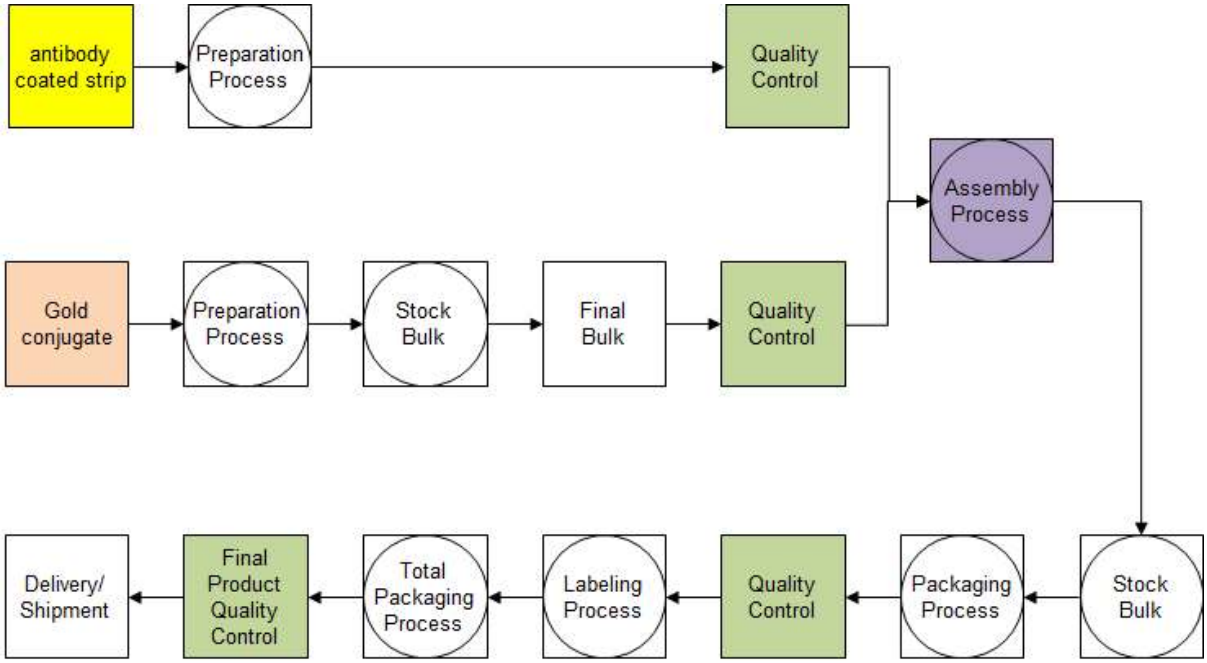
수입검사
새로 입고된 원료를 품질관리 시험에서 적합 판정을 받은 다른 구성품들과 함께 검사 실시하여 차이가 없어야 한다. 수입검사 해당 원료로는 멤브레인, gold oparticle, 흡습지, 검체패드용 패드, 골드패드용 유리섬유, chicken IgY, anti chicken IgY, 임신특이단백질에 대한 항체 클론, BSA, 디바이스 등이다.

수입검사 기준량

일련번호	구성품	검사 의뢰 기준량	
		시험횟수	발췌기준량
1	Membrane	1인 2회	2 ea/lot
2	Gold particle	1인 1회	10 ml/5L
3	흡습지	1인 1회	1 ea/lot
4	검체패드용 패드	1인 1회	1 ea/lot
5	골드패드용 유리섬유	1인 1회	1 ea/lot
6	Anti human IgE	1인 2회	2 ea/lot
7	Anti chicken IgY	1인 2회	1 ea/lot
8	Chicken IgY	1인 1회	1 ea/lot
9	임신특이단백질 항체	1인 1회	2 ea/lot
10	BSA	1인 1회	1 ea/lot
11	디바이스	1인 1회	20 ea/lot

공정 검사:
공정 검사는 생산 공정 과정의 해당 단계에서 소모품 수입검사 방법과 동일한 방법으로 시험한다.

생산 공정도



반제품 검사:
반제품 검사는 각 구성품들의 조립 직전 단계를 의미하는 것으로 공정검사와 동일하게 실시한다.

완제품 검사:
완제품의 품질관리는 크게 외관검사, 용량시험, 성능 검사로 이루어 진다.
외관검사- 육안으로 관찰하여 디바이스의 디틀림 혹은 비수평이 없어야 한다.
용량검사- 액상의 시약이 주입되어 있는 용기를 열어 기준에 적합한 용액이 들어 있는지 확인한다.
성능검사- 완제품을 개봉하여 음성표준물질과 양성 표준물질을 이용하여 음성표준물질을 로딩한 키트에서는 음성의 결과가 양성표준물질을 로딩한 키트에서는 양성의 결과가 나타나야 한다.

공정검사/반제품검사/완제품검사 의뢰 기준량

일련번호	구성품	검사의뢰 기준량				
		공정검사		반제품 검사		완제품 검사
		시험횟수	발췌 기준량	시험횟수	발췌 기준량	발췌 기준량
1	항체 로딩 멤브레인	1인 2회	2ea			10 Kits
2	골드패드	1인 2회	2ea			
3	검체패드	1인 2회	2ea			
4	전개용액	1인 2회	2ea			
5	조립 후 디바이스(반제품)			2인 5회	10ea	
6	완제품			1인 10회	10ea	

(2) 진단 키트 시제품 개발, 성능 검사

(가) 분석적 성능 검사

① 검출한계

개발 제품의 검출한계를 측정하기 위하여 인공수정 후 임신이 확인된 임신우(임신 15주, 임신 12주, 임신 7개월 이상)의 혈액을 원액, 2, 4, 8, 16, 32배 단계 희석하여 SOP에 따라 시험하였다(그림 11). 시험결과를 ELISA 시험과 비교하였을 때 검출한계는 O.D.값 기준 0,2 이다.

검체	희석배수					
	1X	2X	4X	8X	16X	32X
임신 15주 임신우						
	++	++	+	+	-	-
임신 12주 임신우						
	+++	++	+	+	-	-
양성표준물질						
	+++	+++	+++	+++	++	++

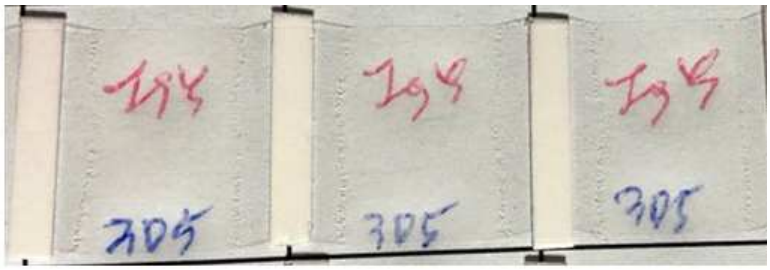
그림 11) 검출한계 시험

② 교차반응

교차반응시험의 목적은 gold가 컨쥬게이션 되어 있는 chicken IgY가 멤브레인상에 로딩되어 있는 test line의 항체에 비특이적으로 결합하는지, gold가 컨쥬게이션되어 있는 IgG type의 clone 2E8 항체가 검체가 존재하지 않는 상황에서 비특이적으로 멤브레인상의 test line에 결합하여 위양성의 결과를 내는지를 확인하기 위한 시험이다. 교차반응의 존재 여부를 확인하기 위하여 항체가 로딩되어 있는 멤브레인을 전개용액 20ul와 gold가 컨쥬게이션 되어 있는 chicken IgY 용액 5 ul를 혼합한 well에 넣어 시험하였으며 또한 gold가 컨쥬게이션되어 있는 IgG type의 clone 2E8 항체를 넣어 시험하였다.

시험 결과 old가 컨쥬게이션 되어 있는 chicken IgY 와 gold가 컨쥬게이션되어 있는 IgG type의 clone 2E8 항체는 멤브레인상에 로딩되어 있는 IgM type의 clone 3D5와 비특이 결합이 없음을 확인하였다(그림 12).

멤브레인 로딩: clone 3D5
Gold conjugate: clone 2E8



멤브레인 로딩: clone 3D5
Gold conjugate: chicken IgY

그림 12) 교차 반응 시험

③ 정밀도

개발 제품의 정밀도를 확인하기 위하여 음성표준물질과 양성표준물질을 이용하여 시험자간, 시험일간, 시험간(lot) 시험을 진행하였다. 시험자간 시험은 세 명의 연구원이 같은 장소(부설연구소 연구실)에서 동일한 lot의 6개 키트를 음성표준물질로 3 키트, 양성표준물질을 이용하여 3 키트씩을 시험하였으며, 시험일간 시험은 한 명의 연구원이 5일에 거처 동일 lot의 6 키트를 음성표준물질로 3 키트, 양성표준물질을 이용하여 3 키트씩을 반복 시험 하였다, 또한 시험장소간 시험은 한 명의 연구원이 (주)에스엘에스바이오의 기업부설 연구소 연구실, 신약개발사업부의 시험실, QC 사업본부의 시험실에서 각각 동일 lot내 6개 키트를 음성표준물질로 3 키트, 양성표준물질을 이용하여 3 키트 시험하였다. 이외에 시험간 테스트로는 한 명의 연구원이 3 lot의 키트를 각각 3 키트씩 시험하였다. 시험 결과 시험자간, 시험일간, lot간, 및 시험장소간과 관계없이 음성표준물질은 음성으로, 양성표준물질은 양성으로 동일한 실험 결과가 나타남을 알 수 있었다.

시험내(시험자)간

시험검체	시험결과		
	시험자 1	시험자 2	시험자 3
음성표준검체	3/3*	3/3*	3/3*
약양성표준검체	3/3**	3/3**	3/3**
강양성표준검체	3/3**	3/3**	3/3**

Abb.: *, 음성판정 키트수/시험키트수, **, 양성판정 키트수/시험키트수

시험일간 시험

	시험자	**1.Day**	**2.Day**	**3.Day**	**4.Day**	**5.Day**
음성표준물질	시험자 1	3/3*	3/3*	3/3*	3/3*	3/3*
약양성표준물질	시험자 1	3/3**	3/3**	3/3**	3/3**	3/3**
강양성표준물질	시험자 1	3/3**	3/3**	3/3**	3/3**	3/3**

Abb.: *, 음성판정 키트수/시험키트수, **, 양성판정 키트수/시험키트수

시험간

시험항목	시험자	시험결과		
		BoPR201812-001	BoPR201812-002	BoPR201812-003
음성표준검체	시험자 1	3/3*	3/3*	3/3*
약양성표준검체	시험자 1	3/3**	3/3**	3/3**
강양성표준검체	시험자 1	3/3**	3/3**	3/3**

Abb.: *, 음성판정 키트수/시험키트수, **, 양성판정 키트수/시험키트수

시험소간

시험항목	시험자	시험결과		
		AC사업부 시험실	세포시험실	기업부설연구소 연구실
음성표준검체	시험자 1	3/3*	3/3*	3/3*
약양성표준검체	시험자 1	3/3**	3/3**	3/3**
강양성표준물질	시험자 1	3/3**	3/3**	3/3**

Abb.: *, 음성판정 키트수/시험키트수, **, 양성판정 키트수/시험키트수

④ 정확도 시험

개발 제품의 검사 정확성을 확인하기 위하여 동일인이 동일 lot를 이용하여 반복시험하여 그 결과값의 일치율을 확인하는 것으로 시험간, 시험자간, 시험일간, 시험 lot간 시험에서 동일인이 수행한 시험을 취합하여 그 결과를 산출하였다. 그 결과 24회의 시험을 반복하였을 때 양성표준물질은 양성으로 음성표준물질은 음성으

로 나타남으로 키트의 정확성을 확인하였다.

시험자	음성표준물질	약양성표준물질	강양성표준물질
시험자 1	24/24*	24/24**	24/24**

Abb.: *, 음성판정 키트수/시험키트수, **, 양성판정 키트수/시험키트수

⑤ 안정성 시험

개발 제품의 안정성을 확인하기 위하여 아래의 계획대로 키트의 안정성을 확인하였다.

㉮ 안정성시험 방법

개발 제품을 3 lot 제조하여 실온 (온도: 25 ± 2 ℃, 습도: 60 ± 5 %)을 유지하는 항온기에서 각각 보관하여 제조직후(0 개월), 3, 6, 12 개월 경과 후에 시험 SOP에 따라 본 제품을 검사한 후, 시험 규격상의 판정기준에 따라 판정하였다.

㉯ 시험간격

Lot. No	제조일자	시험주기 (0개월)	시험주기 (3개월)	시험주기 (6개월)	시험주기 (9개월)	시험주기 (12개월)
BoPR1808-001	2018.08.16	2018.08.20	2018.11.26	2019.02.13	2019.05.20	2019.08.23
BoPR1808-002	2018.08.23					
BoPR1808-003	2018.08.29					

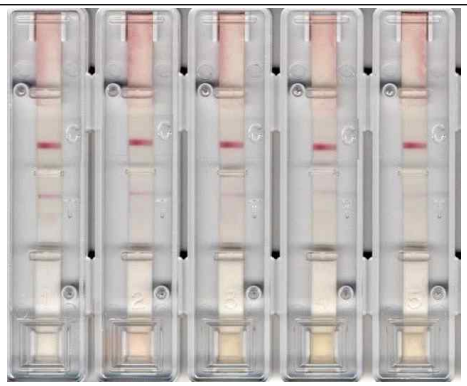
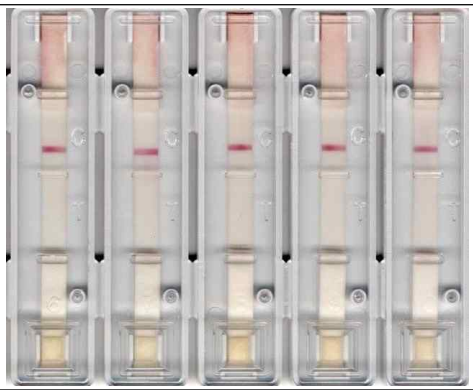
㉰ 시험검체:

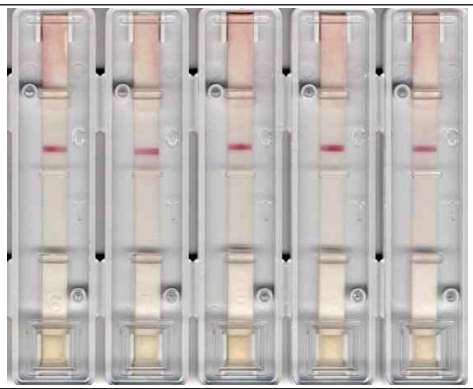
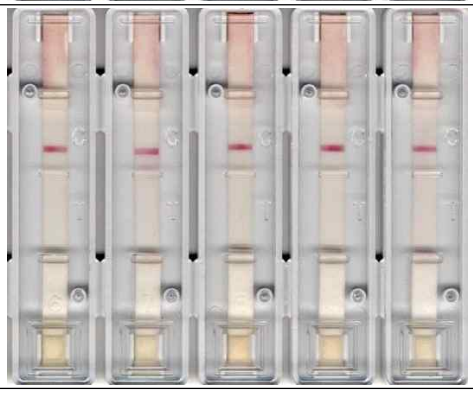
양성표준물질: 1 검체의 5회 반복 시험

음성표준물질: 1 검체를 5회 반복 시험

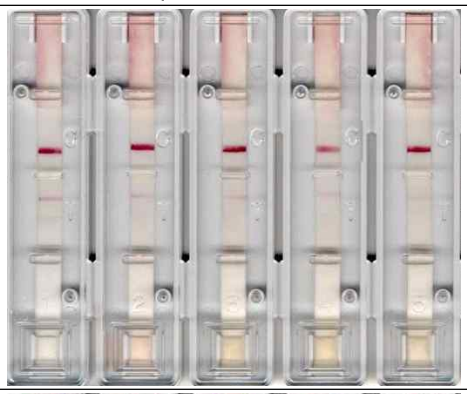
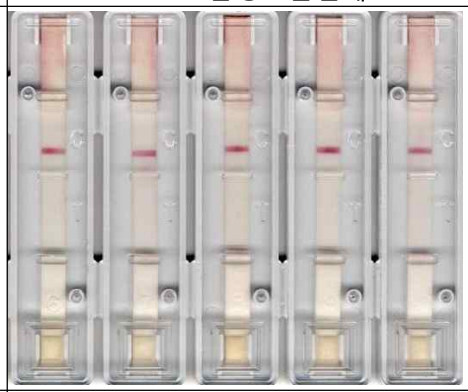
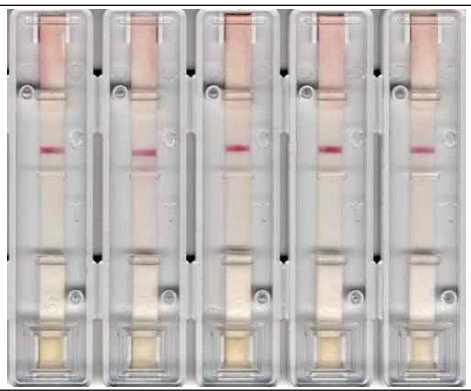
㉱ 시험 결과:

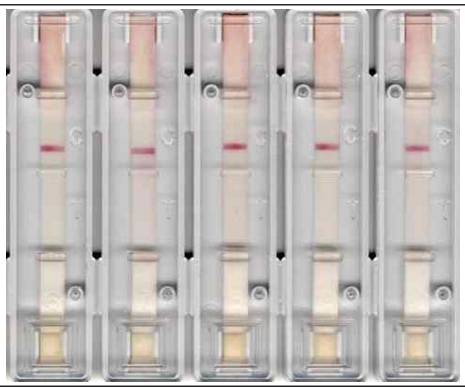
제조직후(0 개월) - 2018.08.20. 시험

Lot. No	양성표준검체	음성표준검체
BoPR1808-001		
BoPR1808-002		

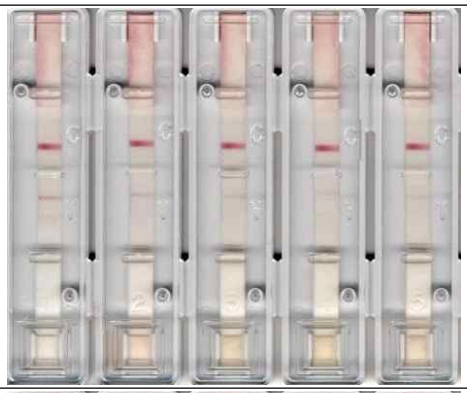
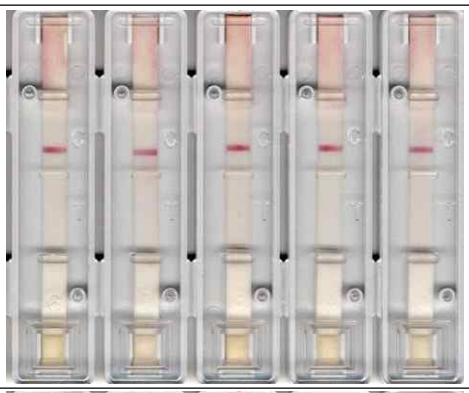
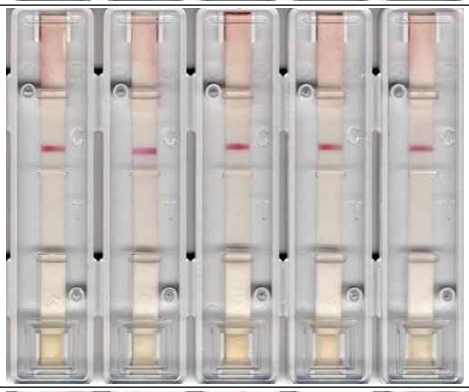
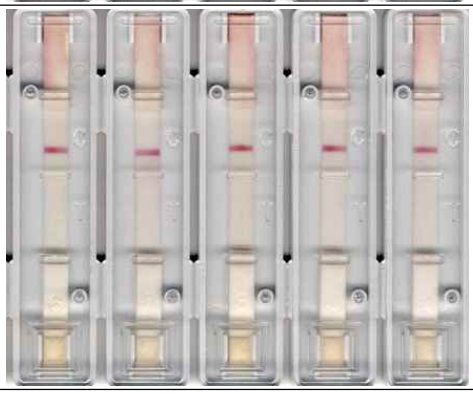
		
BoPR1808-003		

3 개월 - 2018.11.26. 시험

Lot. No	양성표준검체	음성표준검체
BoPR1808-001		
BoPR1808-002		
BoPR1808-003		

6 개월 - 2019.02.13. 시험

Lot. No	양성표준검체	음성표준검체
BoPR1808-001		
BoPR1808-002		
BoPR1808-003		

6개월, 12개월 시험은 아직 시기가 도래하지 않아 시험하지 못하였다.

(나) 임상적 성능 검사(기허가제품과의 상관성 시험)

임상 검체에서 “소임신진단키트”의 성능 분석을 위하여 경상북도 상주/칠곡 지역의 농장주(수정사)로부터 임신우 혈액과 비임신우 혈액 100 검체를 분양 받아 기허가 제품인 IDEXX 사 제품과 비교 시험을 진행하였다.

① 검체의 준비

본시험을 위하여 필요한 검체는 상주/칠곡 지역의 농장주(수정사, 수의사)로부터 임신우 혈액과 비임신우 혈액 100 검체를 분양 받았으며 검체 분양시에는 각 검체의 임신 여부를 알지 못하였다. 또한 임신우 혈액은 인공수정 후 4주에서 12주 이내의 혈액으로 제한 하였다.

② 시험 방법

분양된 검체의 순서에 따라 6배수의 검체를 동시에 진행하였다.

㉮ 비교제품(IDEXX 사 제품)을 이용한 시험

제품에 포함되어 있는 사용설명서에 따라 시험하여 판정기준에 따라 판정하였다.

㉯ 개발 제품

- 스포이드를 이용하여 검체(혈청 혹은 혈장) 2방울을 검제 적하부에 떨어뜨린다.
- 5분 후 검체 적하부에 검체가 흡수되었음을 확인하고 전개용액 1방울을 떨어뜨린다.
- 20분 후 테스트라인과 대조선을 관찰한다. 모든 검사에서 대조선은 붉은 선명한 선이 나타나야 하며 검사선에서 붉은(혹은 흐린 분홍색)선이 나타나면 임신으로, 선이 나타나지 않으면 비임신으로 판정한다.

③ 시험결과

검체 번호	개발제품 결과	비교제품 결과
검체 1	-	-
검체 2	-	-
검체 3	+	+
검체 4	+	+
검체 5	+	+
검체 6	+	+
검체 7	-	+
검체 8	-	-
검체 9	+	+

검체 10	-	-
검체 11	+	+
검체 12	+	+
검체 13	+	+
검체 14	+	+
검체 15	-	-
검체 16	-	-
검체 17	+	+
검체 18	-	-
검체 19	+	+
검체 20	+	+
검체 21	+	+
검체 22	+	+
검체 23	+	+
검체 24	+	+
검체 25	+	+
검체 26	-	+
검체 27	+	+
검체 28	-	-
검체 29	-	+
검체 30	-	-
검체 31	+	+
검체 32	+	+
검체 33	-	-
검체 34	-	-
검체 35	+	+
검체 36	+	+
검체 37	+	+
검체 38	-	-
검체 39	-	+
검체 40	-	-
검체 41	-	-
검체42	-	-

검체 43	−	−
검체 44	−	−
검체 45	+	+
검체 46	−	−
검체 47	+	+
검체 48	+	+
검체 49	−	−
검체 50	+	+
검체 51	+	+
검체 52	−	−
검체 53	−	−
검체 54	−	−
검체 55	−	−
검체 56	−	−
검체 57	+	+
검체 58	+	+
검체 59	+	+
검체 60	+	+
검체 61	−	−
검체 62	−	−
검체 63	+	+
검체 64	−	−
검체 65	+	+
검체 66	+	+
검체 67	+	+
검체 68	+	+
검체 69	+	+
검체 70	+	+
검체 71	−	−
검체 72	−	−
검체 73	−	−
검체 74	+	+
검체 75	+	+

검체 76	-	-
검체 77	-	-
검체 78	-	-
검체 79	-	-
검체 80	+	+
검체 81	+	+
검체 82	-	-
검체 83	+	+
검체 84	+	+
검체 85	-	-
검체 86	-	-
검체 87	-	-
검체 88	+	+
검체 89	+	-
검체 90	-	-
검체 91	-	-
검체 92	+	+
검체 93	-	-
검체 94	+	+
검체 95	-	-
검체 96	-	-
검체 97	+	+
검체 98	+	+
검체 99	-	+
검체 100	+	-

④ 시험 결론

		개발제품		
		양성	음성	계
비교제품	양성	50	5	55
	음성	2	43	45
계		52	48	100

개발제품과 비교제품간의 상관성 평과 결과 두 제품 모두 양성인 검체는 50 검체이며 개발제품에서는 양성, 비교제품에서 음성인 검체가 2 검체, 개발제품에서는 음성, 비교제품에서는 양성인 검체가 5 검체 이며 두 제품 모두에서 음성인 검체는 43 검체이다.

(3) 항체의 대량 시스템 확립

- 3-3D5, 1-2E8, 1-1B6 세포주를 DMEM 혈청배지에서 배양하면서 배양시간에 따른 생장곡선과 항체생산량의 관계를 알아보고, 이를 기초로 무혈청배지(CD hybridoma media, Gibco)에서 1L, 3L, 5L 대량배양을 수행하여 세포생장곡선과 항체생산량의 관계를 알아보았다.
- 항체생산량은 mouse IgG에 대한 ELISA정량법을 사용하였다.
- 항체가 포함된 배양액을 한외여과를 이용한 항체정제방법을 확립하였고 정제한 항체의 정제도와 특성을 분석하였다.

(가) 혈청배지(DMEM/FBS)에서 3-3D5, 1-2E8, 1-1B6 세포주 배양결과

3-3D5 세포주는 <그림 12>와 같이 배양 48시간에 세포수가 최대가 되며 항체생산량은 세포수가 최대가 되기 전 40시간에 최댓값을 보였다. 1-2E8 세포주는 배양 65시간에 세포수가 최대가 되며 항체양은 세포수가 최대가 된 후 약 73시간에서 최대가 되었다(그림 13). 1-1B6는 세포수와 항체량 모두 65시간에서 최대를 보여 3 세포주 모두 세포수가 최대가 되는 배양시간 전 후에 항체생산량이 최대가 되는 것으로 보였다.

그림 12) 혈청배지(DMEM/FBS)에서 3-3D5 배양결과

IgG 생산량분석: Indirec ELISA

- Coating Antigen: Goat anti-mouse IgG
- Sample: 3-3D5 culture media
- Conjugate: Goat anti-mouse IgG-HRP
- Substrate: TMB(Tetramethylbenzedine)

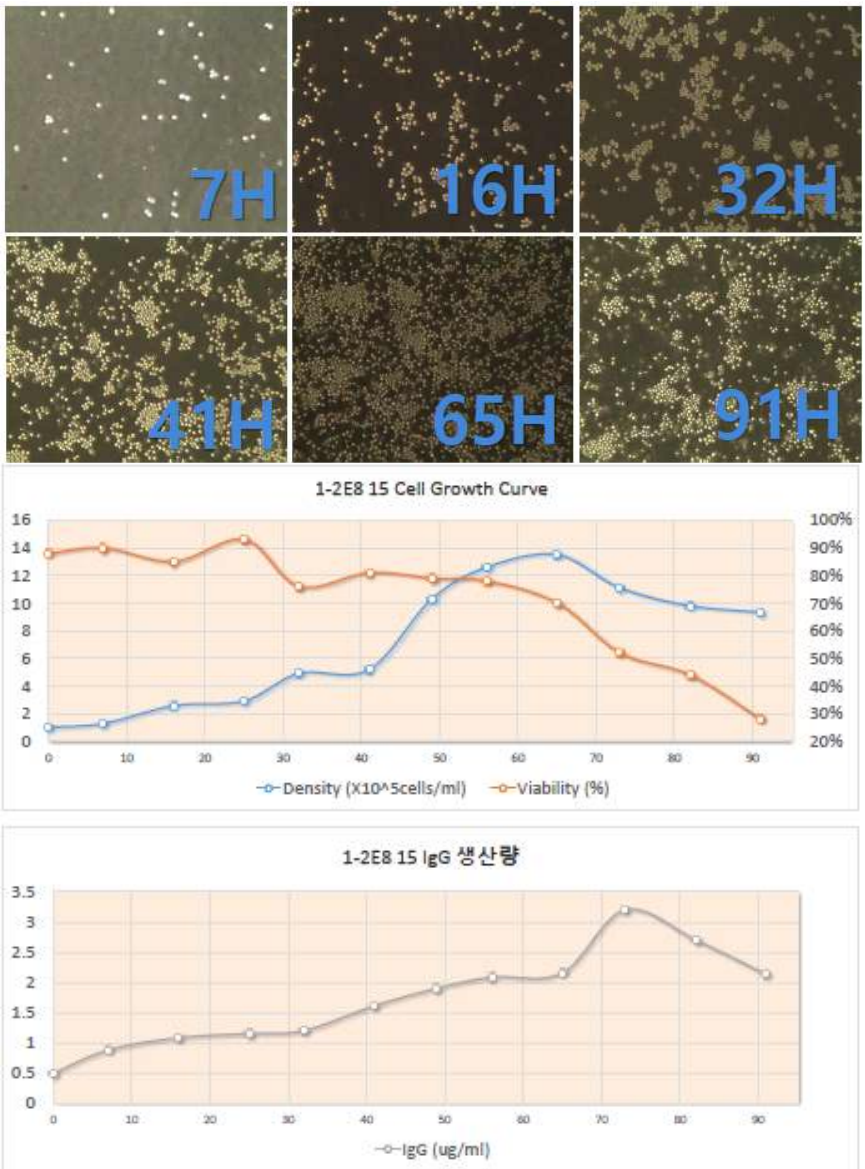


그림 13) 혈청배지(DMEM/FBS)에서 1-2E8 배양결과

IgG 생산량분석: Indirec ELISA

- Coating Antigen: Goat anti-mouse IgG
- Sample: 1-2E8 culture media
- Conjugate: Goat anti-mouse IgG-HRP
- Substrate: TMB(Tetramethylbenzedine)

(나) 무혈청배지(CD hybridoma media, Gibco사)에서 3-3D5, 1-2E8, 1-1B6 세포주 배양결과

: 무혈청배지에서 3-3D5, 1-2E8, 1-1B6 세포주를 1L, 3L, 5L로 각각 대량배양하였을 때 최대 세포수와 항체생산량을 측정한 결과는 <표 1>과 같다. 혈청배지에서 배양결과와 유사하게 최대 세포수 전후로 항체생산량이 최대가 되었으며 세포수와 항체생산량이 최대가 되는 평균배양시간은 20시간 이상 증가했다. 이는 소량의 플라스크배양보다 대량의 spinner flask를 사용한 배양에서 배양 시간이 더 걸리는 것으로 보여 기존의 대량배양액의 약 10%로 seed 배양액을 접종하

는 것을 세포수를 더 늘려 배양을 시작할 필요가 있는 것으로 보인다.

<표 1> 무혈청배지를 이용한 대량배양

	3-3D5			1-2E8			1-1B6		
	1L	3L	5L	1L	3L	5L	1L	3L	5L
최대세포수배양시간	80	88	96	96	96	104	96	96	104
세포농도 (x10^6)	1.5	1.6	1.5	1.9	1.8	1.5	1.0	1.1	1.0
최대항체량 배양시간	80	80	96	104	96	104	96	96	104
항체농도 (ug/mL)	1.5	1.4	1.3	3.5	3.3	3.4	1.2	1.1	1.1

(다) 무혈청배지(CD hybridoma media, Gibco사)에서 배양한 3-3D5, 1-2E8, 1-1B6 세포주 배양액의 정제결과

<표 2> 1-2E8 정제

	Volume (mL)	단백질농도 (ug/mL)	총단백질양 (mg)	항체농도 (ug/mL)	총항체량 (mg)	정제도 (fold)	수득률 (%)
배양액	1,000	13.4	13.4	3.5	3.5		
한외여과액	20	98	1.88	74	1.48	7.1	42.3

1-2E8 대량배양액을 한외여과방법(분자량 10,000 c/o)으로 정제한 결과 <표 2>와 같이 약 40% 회수률(수득률)로 7배 정도 정제할 수 있었다.

3. 연구 성과

가. 기술적 성과

(1) 국내/외 기술 수준 및 시장 현황

국내에서는 1990년대초 건국대학교동물자원연구소 중심으로 소의 임신 진단에 관한 연구가 두산연구소와 공동으로 진행되어 임신진단키트를 개발한 바 있으나 제품화 되지 못하였고 2009년 임신우의 분변에서 임신시 증가하는 프로게스테론의 양을 확인함으로 임신/비임신을 판정할 수 있는 키트를 수년에 걸쳐 연구/개발하였으나 역시 상품화 되지 못하였다. 이외에 단백질체학을 이용하여 임신시 특이적으로 발현하는 단백질의 일부인 펩타이드를 동정하여 이 펩타이드를 이용하여 항체를 제작 임신 진단에 사용하고자 제품 개발이 진행되었다. 국외에서는 1982년 아이

다호 대학에서 최초로 pregnancy-associated protein을 동정하여 ‘biology of reproduction' 에 발표하였으며 이후 해당 단백질의 isotype들이 동정되고 아미노산 서열이 밝혀졌다. 또한 ’Biotracking'사에서는 해당단백질의 다클론 항체를 제작하여 ELISA 법을 이용한 임신진단키트를 제품화 하였고, 2016년에는 IDEXX'사에서 약식 ELISA법을 이용하여 농가 현장에서 직접 임신을 진단할 수 있는 제품을 국내에서 허가를 득 하였다. 이외에 분자생물학적 기법을 도입하여 임신시 특이적으로 발현하는 임신특이단백질의 유전자 분석 연구가 진행되고 있다.

본연구과제의 결과물로 개발된 소임신진단키트가 국내 허가기관으로부터 허가 완료되어 시판되어진다면 농가에서 공태기를 줄이기 위하여 인공수정 후 고가의 비용을 지불하고 임신 감정을 하거나 다음 발정기가 옴으로 인공수정의 실패를 인지하는 불편함 없이 경제적 비용으로 농장주 스스로 소량의 채혈을 통하여 임신 여부를 가늠할 수 있을 것이다. 그러한 측면에서 본 기술은 현재 국내에서 시행되어 지고 있는 어떠한 방법 보다 앞선 기술이라 할 수 있을 것이다.

(2) 기술개발 성과

본 과제를 통하여 개발된 소임신특이단백질에 대한 단클론 항체들과 그 항체를 이용한 소임신진단 키트의 제조 방법은 국내 특허는 물론 PCT 출원을 하여 국내뿐 아니라 국외에서도 독점적 위치를 선점함과 동시에 원천 기술을 확보하게 됨으로 키트의 수출 및 원료물질의 수출도 가능하리라 판단된다.

나, 경제적 성과

본 과제를 통하여 개발된 소임신진단키트는 사용의 편리성, 높은 정확도 및 경쟁력 있는 가격을 바탕으로 꾸내 도입 초기에 있는 수입제품으로부터 국내시장을 보호함과 동시에 공태기를 줄여 소사육 농가의 년간 소득 증대를 이룰 것이며 가축의 임신 진단 만으로 연 50억 이상의 매출을 내는 중소기업이 창출될 것 이다.

(1) 사업화 계획

(가) 생산 계획

구분		(2019 년) 개발 종료 후 1년	(2020 년) 개발 종료 후 2년	(2021 년) 개발 종료 후 3년
국내	시장점유율(%)	10%	30%	50%
	국내	시장점유율(%)	10%	30%
	판매량(단위:천개)	100	300	500
	판매단가(원)	5,000	5,000	5,000
해외	국내매출액(백만원)	500	1,500	2,500
	해외	시장점유율(%)	-	0.50%
	판매량(단위:천개)	-	165	330
	판매단가($)	US$ 5.00	US$ 5.00	US$ 5.00
당사 생산능력1) (단위:천개)		국내매출액(백만$)	-	US$ 0.83

(나) 투자계획

항목		(2019 년) 개발종료후1년	(2020 년) 개발종료후2년	(2021 년) 개발종료후3년
매출원가1)		200	900	1,250
판매관리비2)		500	1,000	1,300
자본적 지출	토지	-	-	-
	건물/구축물	1,000	-	-
	기계장치등	1,000	500	200
자본적 지출 합계		2,000	500	200

(다) 사업화 전략

구분	구체적인 내용
형태/규모	º 상용화 형태 : 완제품 연구개발, 자체생산 및 판매 º 수요처 : 축산농가 º 예상단가 : 5,000원(소비자 단가 : 10,000원) º 개방 투입인력 및 기간 : 3년, 5명
상용화 능력 및 자원보유	º Rapid Kit 개발, 제조 기술 º 의료기기 GMP 생산시설 보유

상용화 계획 및 일정	º 국내 시판 : 2019년 º 해외 수출 : 2020년

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 목표

1. 1차년도 목표

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표
1차 년도 (2016)	임신특이단백질의 특성 분석 및 항원 개발	임신 특이단백질의 항체 생산을 위한 항원 개발 및 검정
		키트 제조에 필요한 단백질 등 원료 표준화
		단백질 등 원료의 QC 기준 확립
	임신특이단백질에 대한 항체 제작	임신특이단백질의 항체 제작
		단클론 항체 세포주를 이용한 항체 대량 생산

2. 2차년도 목표

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표
2차 년도 (2017)	소임신특이단백질에 대한 항체 개발과 그 항체를 이용한 소임신 진단 키트의 개발	펩타이드 면역을 통하여 선별된 항체의 성능 검사
		임신특이단백질에 대한 항체의 항원 결합 부위 선정(epitope mapping)
		래피드 키트 제조 시설 구축 및 시제품 생산
	하이브리도마 세포의 대량 배양	하이브리도마 세포의 대량 배양
		새로운 임신특이단백질 탐색

3. 3차년도 목표

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표
3차 년도 (2018)	소임신진단키트의 시제품 생산, 키트의 성능 검사, 국내 허가	소임신진단키트이 시제품 개발
		분석적 성능검사 및 임상적 성능검사(기허가제품과의 상관성 시험)
		국내 허가
	하이브리도마 세포의 대량 배양 및 기술 이전	하이브리도마 세포의 대량 배양 방법 확립 및 기술 이전
		새로운 임신특이단백질 탐색

제 2절 목표 달성여부

1. 1차년도 목표 달성여부

연구목표	연구수행방법 (이론적.실험적 접근방법)	구체적인 내용	달성도(%)
임신특이단백질의 아미노산 서열을 분석하여 항원 선정	임신특이단백질의 아미노산 서열을 획득하여 항원성이 높은 부분을 다양한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 예측	임신특이단백질의 아미노산 서열 중 항원력이 높은 부분을 찾기 위하여 epitope prediction program, hydrophilicity prediction program 등을 이용하여 항원력이 높은 부분을 약 30 ~ 40개의 아미노산을 포함하는 펩타이드를 합성하고 또한 실험쥐의 면역체계에서 용이하게 인지되도록 펩타이드를 케리어 단백질에 결합시킴	100 %
항임신특이 단백질의 항체 개발	실험용 쥐를 이용한 고전적 방법 및 decoy immunization법	실험용 쥐를 이용한 항체 생산에 있어 고전적 방밥으로 실험용쥐의 복부에 2주 간격으로 3회 반복하여 항원성 물질을 주입하고 이후 실험용쥐 혈액내에 항체가 생성되었는지를 확인하는 방법으로 다클론 항체 생산을 확인한다. 다클론 항체가 생성되었음이 확인되면 실험용쥐의 spleenocyte와 암세포를 융합하여 단클론 항체를 생산하는 세포주를 개발한다. decoy immunization법은 특정 조건에서 특이적으로 발현하는 단백질에 대한 항체를 개발하는 방법으로 본 연구에서는 임신시 생성되는 단백질을 동정하기 위하여 임신하지 않은 소의 혈액과 임신소의 혈액을 이용하여 임신특이단백질 동정 및 그 항체를 개발하기 위하여 이용되었으므 그 방법은 실험용쥐의 오른쪽/왼쪽 발바닥에 1주 간격으로 교차하여 임신소 혈액단백질과 비임신소 혈액단백질을 주입한다. 면역이 완료된 후 겨드랑이 부분의 임파절을 분리하여 암세포와 융합함으로 단클론 항체를 생산한다.	100 %

2. 2차년도 목표 달성여부

연구목표	연구수행방법 (이론적.실험적 접근방법)	구체적인 내용	달성도(%)
펩타이드 면역을 통하여 선별된 항체의 성능 검사 및 임신특이단백질에 대한 항체의 항원 결합 부위 선정(epitope mapping)	1. 실험용 쥐를 이용한 고전적 방법 및 decoy immunization법 2. ELISA 를 이용하여 결합력 측정 3. 항체 적합성 검증을 위한 membrane test 4. epitope 특정을 위하여 펩타이드 재합성	항체 생산에 있어 고전적 방밥으로 실험용쥐의 복부에 2주 간격으로 3회 반복하여 항원성 물질을 주입하고 이후 실험용 쥐 혈액내에 항체가 생성되었는지를 확인하는 방법으로 다클론 항체 생산을 확인한다. 다클론 항체가 생성되었음이 확인되면 실험용쥐의 spleenocyte와 암세포를 융합하여 단클론 항체를 생산하는 세포주를 개발한다. 개발된 세포주의 배양액으로부터 얻은 항체를 이용하여(혹은 마우스 복강d로부터 얻은 항체) 임신특이 단백질(펩타이드)에 결합력을 ELISA 시험법을 통하여 측정하고 결합력이 높은 항체들을 대상으로 다시 래피드키트 멤브레인상에의 결합력을 확인한다. 두 시험결과를 토대로 키트 제조에 필요한 두 종류의 항체를 선정하였다. 이후 각 항체가 결합하는 항원내 위치(epitope)를 펩타이드 합성을 통하여 특정하였다.	100 %
래피드 키트 제조 시설 구축 및 시제품 생산	컨설팅 업체의 조언과 시험분석기관인증 경험을 바탕으로 제조 시설 구축	키트 제조 시설을 구축함에 있어 가장 중요한 도면 제작에 있어 풍부한 경험을 보유하고 있는 업체(파이런텍, 경기도 수원 소재)의 자문을 받아 시설/설비를 구축하였으며 밸리데이션 및 운영 관리 하고 있다.	100 %
하이브리도마 세포의 대량 배양	세포의 대량 배양을 통한 항체의 대량 생산.	생산된 단클론 항체를 분비하는 세포주를 배지 볼륨 10 ml에서 3,000ml 배양이 가능하도록 배지의 조성에 변화를 주었으며 3구 스피너 플라스크의 회전수와 기타의 요인을 세부 조정하였다.	100 %

3. 3차년도 목표 달성여부

연구목표	연구수행방법 (이론적.실험적 접근방법)	구체적인 내용	달성도(%)
소임신진단키트의 시제품 생산, 키트의 성능 검사, 국내 허가	품질관리기준서, 제조관리기준서에 따라 시제품을 생산. 생산된 키트를 이용하여 분석적 성능/임상적성능 시험을 실시. 또한 이들 자료를 취합하여 국내 허가 완료	시제품 생산을 위하여 표준물질(양성,음성) 선정, 품질관리기준 확립하였으며 이를 이용하여 품질관리표준서와 제조관리표준서를 작성하였다, 기준서에 따라 제품을 생산하여 분석적 성능시험(검출한계, 교차반응, 간섭반응, 정확도, 정밀도 시험 등)과 임상적 성능 시험(상관성 시험)을 완료하였으며 허가 진행 예정이다.	90 %
하이브리도마 세포의 대량 배양 및 기술 이전	하이브리도마 세포를 대량 배양법을 확립. 무혈청 배지 조건하에서 배양 가능하도록 세포 적응 방법 조사 및 연구	하이브리도마 세포의 대량배양 조건에서 5리터까지 한 플라스크 내에서 배양 가능하도록 조건 설정을 하였으며 생산되는 항체의 양은 2 ug/ml이상이 되도록 하였다. 또한 대량 배양법을 성공적으로 기술이전 하였다.	100 %

제 3절 목표 미달성 원인(사유) 및 차후대책

1. 목표 미달성 원인

연구가 종료되는 시점에 소임신진단키트의 국내 허가를 완료할 것으로 예상하였으나 소임신특이단백질(PAG1)의 비특이 반응이 없는 단클론 항체 제작에 계획보다 많은 시간(계획- 4개월, 결과-16 개월)이 소요되었다. 4회 이상 반복한 면역과정에서 생성된 항체는 비특이 반응이 많은 것으로 알려져 있는 IgM type의 항체가 생산되었으며 최종적으로 IgG type의 항체를 개발할 수 있어 해당 항체에 골드를 컨쥬게이션하여 비특이적 반응을 해결할 수 있었다. 임신특이단백질에 대한 항체의 생산이 늦어짐으로 인해 이후 과정들(해당 항체의 품질관리 기준 확립, 시제품 생산, 분석적 성능 시험, 상관성 시험 등)이 순차적으로 연기되었다. 그러나 과제가 종료되어도 제품 개발을 포기하지 않을 것이었으므로 임신특이단백질에 대한 항체를 제외한 연구계획서상의 계획들을 순차적으로 진행하였다. 예로서, 2차년도에 계획되었던 동물용 의료기기 생산 시설 구축, 생산 장비 도입, 항체의 대량 생산 시스템 확립등은 진행하여 항체가 개발된 시점인 2017년 말/2018년 초에 집중하여 개발된 항체의 성능 평가를 진행할 수 있었으며 제조 공정, 품질관리 기준 확립을 계획보다 짧은 시간에 완료할 수 있었다. 그러나 시제품 생산이 늦어져 장기 보관 안정성 시험이 완료되지 않은 상태 이다.

2. 차후 대책

현재 안정성 시험을 제외하고 모든 시험이 완료되었으므로 9개월차 안정성 시험을 완료하는 시점에 허가 신청할 예정이며 허가 심사 기간 중 혹은 이후에도 12개월, 18개월 안정성 시험이 완료되어 진다면 허가 변경의 방법으로 소임신진단키트의 사용기한을 '제조일로부터 1년' 혹은 '제조일로부터 18개월'을 확보할 예정이다.

제 4 장 연구결과의 활용 계획

제 1절 추가연구의 필요성

본 연구과제의 수행에 있어서 가장 큰 애로 사항은 decoy immunization을 5회 이상 반복하였음에도 임신우에서 특이적으로 발현하는 단백질을 발견하지 못했다는 것이다. 기회가 주어진다면 임신우 혈액내에 존재하는 임신특이단백질만을 타켓으로 하지 않고 단백질/당단백질/지질 등 세포를 구성하는 성분별 분리를 하여 decoy immunization을 실시하고 한다. 하지만 PAG 1 펩타이드를 이용하여 다량의 임신우 혈액내에 존재하는 임신특이단백질(PAG1)에 특이적으로 결합하는 다량의 항체 clone을 개발하였고 또한 이를 이용하여 소임신진단키트를 개발하였다는 것에는 상당히 큰 의미가 있다고 여겨진다.

본 연구를 진행하는 과정에서 소사육 농가에서 인공수정 후 임신 및 발정 시기를 정확히(혹은 간편하게) 진단하지 못하므로 발생하는 경제적, 육체적 손실이 얼마나 큰 문제인지를 알게 되었다. 따라서 본 연구를 성공적으로 종료하여 소임신 진단 키트를 허가 완료하여 시판되어지면, 연구개발자의 입장에서는 소 사육 농가에서 필요로 하는 제품(예로서 발정시기 진단 키트)들을 추가로 개발 하고자 한다. 사람에서는 난임의 경우 병원을 방문하지 않고 배란 시기를 진단할 수 있는 키트를 약국 혹은 인터넷으로 손쉽게 구매하여 자가 진단하는 방법으로 임신 가능성을 높일 수 있다. 사람에서와 동일하게 소의 방정 시기를 진단할 수 있는 키트가 개발되어 진다면 농장주의 육체적 노력이 줄어 들 것으로 예상된다. 또한 소임신진단키트의 개발과정에 다양한 계층의 여러 전문가들로부터 조언을 구할 수 있는 인적 네트워크와 전문 기관으로부터 검체의 확보가 용이한 점을 미루어 볼 때 임신진단 뿐 아니라 발정 시기를 진단하는 키트의 개발은 한 층 용이할 것으로 예상되어 진다. 그러므로 앞으로의 연구가 세계적으로도 ㄱ여쟁력 잇는 연구가 될것으로 믿는 바 추가 연구가 지속될 수 있기를 소망한다.

붙임. 참고문헌

1. Evaluation of pregnancy-associated glycoproteins for pregnancy diagnosis in Hanwoo. (2017) The Korean Society of Preventive Veterinary Medicine. Vol. 41, No. 3: 109-112, September 2017

2. Early pregnancy diagnosis using a commercial ELISA test based on pregnancy-associated glycoproteins in Holstein-Friesian heifers and lactating cows. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. (2016) 40: 694-699

3. IMMUNOCHROMATOGRAPHY: FORMATS AND APPLICATIONS. Indo american journal of pharmaceutical research. (2016) ISSN NO:2231-6876

4. A rapid and sensitive method for the quantity of microgram quantities of protei n utilizing the principle of protein-dye binding. (1976) Anal. Biochem. 72, 248 -254.

5. Pregnancy diagnosis in dairy cattle: present status and future prospects. (1990) Cornell Vet. 80, 299-302.

6. Pregnacy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. (1988) J. Reprod. Fert. 83,215-223.

7. Ovum factor and early pregnancy factor.(1987) Current Topics in Dev. Biol. 23, 73-92.

8. Early pregnancy factor. (1992) Seminaars in Reproductive Endocrinol. 10, 72-82.

9. Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. (1989) J. Reprod. Fertil. Suppl. 37, 109-113.

10. 소임신진단키트를 이용한 번식효울 증진, 성환후

11. Early Pregnancy Diagnosis in Bovines: Current Status and Future Directions (2013) Hindawi Publishing Corporation. Volume 2013, 10 pages

12. 특허: 소의 임신 진단용 키트 및 이를 이용한 임신 진단방법

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.