

항원 발현 형질전환 ELITE 개체의 평가 및 백신 개발

(Evaluation of transgenic elite lines
expressing antigen and development as
edible vaccine)

한국생명공학연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “항원 발현 형질전환 ELITE 개체의 평가 및 백신 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012 년 7월 27일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 김 현 순

연 구 원 : 전 재 흥

요 약 문

I. 제 목

항원 발현 형질전환 ELITE 개체의 평가 및 백신 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

항원력 검정 및 몇차례의 면역유도실험을 성공적으로 마친 HBV 백신용 형질전환 우수 형질전환 개체의 안전성을 확인하고, 나아가 식물경구백신으로 개발을 마무리 하는 것으로 한다. 또한 TGEV 백신용 형질전환 감자의 elite 개체를 선발하여 효율성 확인 후 백신 개발을 위한 기초를 마련하기로 한다. 이를 위하여 각 단계별로,

- (1) TGEV 항원 발현 감자 개체의 항원성 및 면역원성 검정
- (2) HBV 및 TGEV 항원 발현 감자 우수 개체의 독성평가를 비롯한
- (3) 감자-유래 HBV 및 TGEV백신 개발을 위한 administration protocol 개발
- (4) 실용화를 위한 식물-유래 백신의 활용 방안 개발

III. 연구개발 내용 및 범위(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

연구를 시작하는 첫 1차년도에서 식물-유래 항원 (HBV 및 TGEV)에 대한 정확한 항원성 평가 항목 마련을 위하여 각 항원별 ELISA와 Western analysis의 탐색 조건 확립, 식물-유래 항원의 투여에 의해 유도된 특이-항체에 의한 면역 기작 연구의 기초 자료 확보, 감자-유래 항원의 면역 반응에 대한 다양한 아췌번트의 효능 평가, 식물-유래 항원의 투여 형태에 따른 경구투여시의 위장에서의 분해 가능성 검토, 면역반응을 통하여 효능이 확정된 HBV 발현 우수(Elite)개체 고정, TGEV 발현 감자의 우수 개체 선발, 및 HBV 발현 감자의 유전자 정확한 도입 여부, 도입된 유전자의 copy 수, 도입유전자의 위치분석을 수행하였다.

또한, 2차년도에는 TGEV 백신용 형질전환체의 최종 개체 선발 완료 및 동물실험 수행, 식물-유래 항원 검출의 효율 향상을 위한 항체 제작 및 ELISA 최적화 확립, HBV 백신용 형질전환체 PHBV-8의 외형 분석 및 형질분석, 면역 증강 향상을 위한 항체 Fc의 도입, 마우스 Vaccination 파악 (oral administration schedule), 항원의 dose별 항체 형성 분석, Immune tolerance 가능성 여부 확인 하고자 하였다.

연구 마무리되는 3년차에는 HBV 및 TGEV 항원단백질을 발현하는 형질전환 감자의 구성 성분을 분석하여 동등성 비교에 자료를 활용하고자 하였으며, 식물-유래 항원의 Vaccine booster로서의 효능 평가 실험 수행하여 오리지널 항원의 대응 가능성을 알아보았다. 더불어 단회투여 독성 및 반복 투여 독성 평가에 의한 인체 위해성 평가를 수행하여 심사서 작성을 위한 준비를 하였으며 형질전환 감자의 개화를 유도하여 인공교배를 통한 여타 가지과 작물로의 유전자 전이를 파악하고자 하였다. 이러한 실험들을 통하여 두 항원을 발현하는 형질전환 감자를 백신으로서 개발이 가능한지를 구명하였으며, 상업화를 위한 품종 등록을 위한 기본 자료들을 확보하였다.

IV. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

각 항원별 적절한 검출법을 확립하기 위하여 실험한 결과, HBV 항원단백질의 경우 IRMA 법에 의한 항원성 평가법이 민감성과 반복성, 그리고 실험의 간편성 등을 고려하였을 때 가장 우수하였다. TGEV 항원 단백질의 경우, 웨스턴블롯과 ELISA에 의한 평가를 각각 수행하였고 보다 나은 반응 결과를 얻기 위하여 peptide항원에 대한 항체를 제작하여 사용하였다. 식물-유래 HBV항원단백질의 경구투여 후 serum 확보하여 IgG 및 IgA 분석 실시한 결과 높은 IgG 항체가를 얻었고 이 항체가는 매우 오랜기간동안 안정적으로 유지되는 것을 보였다. Priming에 의한 항체 형성은 매우 미미하였고 부스팅에 의해 높은 항체가가 형성되었다. Fecal IgA도 대조구나 positive 군과 비교하였을 때 긍정적인 결과를 확보하였다. 마우스에서 얻어진 항체의 neutralizing 효과 분석을 위하여 H8-간접competition assay를 통한 분석 결과, 얻어진 항체가 중화능이 있음을 알 수 있었다. 그리고, 면역세포에 binding 능력을 염색법에 의하여 알아보았다. 대조처리인 UEA-1의 binding이 원활히 이루어짐을 확인한 후 HBV 특이적인 binding이 형질전환 감자 투여 세포에서 이루어졌다. 다양한 아주번트에 따른 감자-유래 항원의 면역 반응 유도 증가를 실험하였는데, CTB가 가장 우수하였고 감자-추출물에 의한 효과는 일반 투여구와 유사하였다. 영양변식작물인 감자의 특성을 이용하여 PHBV-8번 개체의 기내배양 시스템 확립하였고, 장기간의 계대배양이 이어져오고 있는 지금 시점에서 Genomic PCR, Northern 및 Southern 분석에 의하여 유전자의 소실없이 잘 유지되고 있음을 거듭 확인하였다. PHBV-8 개체의 감자의 유전자 정확한 도입 여부와 도입된 유전자의 copy 수가 2~3개이며 도입유전자의 위치분석도 수행하였다. 항원의 Dosage 결정연구에서 0.02ug~ 30ug 까지 각각의 dosage에 대한 항체 형성을 확인하였으며 항원양이 증가할수록 항체값도 증가하였다. 또한 매우 적은 소량의 항원에서도 항체가 형성되는 것으로 보아 면역관용은 일어나지 않았다. Boosting을 식물-유래 항원 또는 positive 항원으로 각각 실시하여 항체 형성을 분석하여본 결과, 식물-유래 항원에 의한 부스팅은 그 효과가 미미하였다. HBsAg 유전자의 도입 영향에 따른 주요 구성성분의 변화 분석 (동등성 분석) 결과, 일반 Desiree 감자, PHBV-8 감자, 및 TEGV-2 감자의 그룹간, 개체간 차이가 남을 알 수 있었다. HBV항원 발현 형질전환 감자의 독성 평가를 위한 반복 투여 결과, 일반 감자 투여에 의한 군과 차이가 없음을 확인하였다. 동종 또는 동과 작물로의 유전자 전이를 알아보기 위하여 인공교배 결과, 가지, 토마토, 고추 및 까마중에서 수분 후 화기 형성이 제대로 되지 않고 대부분 퇴화되었다. 아주 일부에서 얻어진 종자에서 유전자 PCR 결과 검출이 되지 않았다. TGEV항원단백질 발현이 가장 우수한 P0.7-2을 최종 선발하였고, 감자-유래 TGEV 항원을 이용, 주요 용량별 투여군을 정하여 실험하여 3회 투여, 1회 boosting 하여 10주간 동안 항체 형성을 관찰하였다. 8주 부스팅 후에 항체가 원활히 형성되었고 항체가는 positive peptide 처리군과 유사한 수준이었다. Fecal IgA 분석에서도 원하는 항체 형성을 확인하였으나 정도는 낮았다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

HBV항원을 발현하는 감자의 경우 항체 형성이 매우 우수하고 안정적인 유지가 확인되었으며 그러한 효과는 수차례의 반복실험에서도 나타났기 때문에 백신으로서의 효능은 확인되었다. 또한 dosage에 대한 실험도 수행이 되어 10ug 이상의 항원양에서 원하는 항체가를 얻을 수 있었

다. 반복투여에 의한 독성 검사에서 일반감자와 동일하게 독성이 관찰되지 않았다. 단지, 동등성 평가를 위한 각 감자의 성분 분석에서는 그룹간 차이가 나타났다. 동종 또는 동과 작물로의 유전자 전이도 이루어지지 않았다. TGEV항원 발현 형질전환 감자도 마우스에서의 경구투여를 통한 면역반응 유도 실험에서 3회 투여, 1회 부스팅으로 원활한 항체 형성을 확인하였다. 이와 같이 동물 실험에서 면역반응 유도 및 기타 긍정적인 효과를 얻음으로써 충분한 응용 가능성에 대한 밑그림이 그려질 수 있었다고 판단하며 이는 앞으로의 유사한 연구에 중요한 참고가 될 것이다 이러한 본 연구의 성과는 반드시 차후의 추가연구와 타연구에 활용하는 방안을 마련하여야 할 것이다. 식물백신과 같은 첨단 생명공학기술을 통한 복지 향상이라는 명제는 21세기 지구상에서 가장 중요한 이슈가 될 것이 틀림없으며 따라서 이 분야에 대한 공공 및 산업계에서의 기술 수요는 많을 것으로 예상된다. 본 연구를 통하여 축적된 기술은 경구백신의 장점을 살리고 식용식물자원을 신약의 수준까지 개발하는 infra 구축에 한 몫 할 수 있을 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

We generated transgenic potatoes expressing middle protein, which contains additional 55 amino acid preS2 region at the N-terminus of the S protein, of HBV to determine the feasibility of developing a plant-delivered HBV vaccine. In this study, we monitored the immune response after induction of immunoglobulin by boosting and assessed the efficacy of the mucosal immune response with regard to generate IgA antibodies. The antibodies to S antigen have been probed to neutralize hepatitis B virus (HBV), and also the addition of preS2 sequence could enhance the antibody response compared with a conventional vaccine in the non- and low responders. The HBsAg middle protein expressed in our transgenic potatoes was well immunized at low antigenic quantities in mice and the induced anti-S or anti-preS2 antibodies were sustained for the whole period without decrease. Orally delivery of plant-derived HBsAg middle protein to mice resulted in fecal anti-S or anti-preS2 as well as serum IgG. In addition, anti-preS2 antibodies induced from immunized mice with transgenic potatoes effectively competed with anti-preS2 murine antibody H8 as expected. From these results, the introduction of HBV may provide putative protective immunity in the HBV prevention. As HBsAg gene expression is stable in transgenic potato tubers, we examined the immunogenicity of different dosages of potato-derived HBsAg in mice. The amount administered was subdivided into nine groups, from the lowest dose (0.02 μg) to the maximum dose (30 μg) of antigen, to identify the increment according to dosage. All immunized mice produced specific serum IgG and fecal IgA antibodies against the plant-derived HBsAg, even when administered lower antigen doses. Furthermore, we demonstrated the serum IgG immune response increased two- to four-fold in the high-dose (>10 μg) antigen exposure group compared to the low-dose antigen (<5 μg) group after a 0.5 μg yeast-derived HBsAg booster. Histopathological analysis showed positive cells to HBV S protein were found in mice administrated transgenic potato-derived HBsAg. At doses greater than 15 μg , potato-derived HBsAg stimulated similar immunogenic responses with the positive HBsAg antigen when orally administered to mice; while, lower doses (< 0.1 μg) were weakly immunogenic. There is no additional toxic effect with HBV expressing potato to mice compare to negative control potato.

Transgenic potato plants were generated expressing the spike (S) protein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV), containing the major antigenic sites of the protein. The TGEV gene was under control of the tuber-specific patatin promoter. The DNA integration and mRNA level of TGEV gene were confirmed in transgenic

plants by genomic DNA PCR and Northern blot analysis, respectively. Expression of recombinant antigen was observed in most transgenic potato plants by ELISA using specific anti-serum. Extracts from potato tubers expressing S protein were administrated orally to mice, and the vaccinated mice developed an immune response against the TGEV S antigen. The results also support that transgenic plants can be an effective system for oral delivery of recombinant subunit vaccines.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	9
Chapter 2. Present status of related R&D in domestic and foreign countries	11
Chapter 3. Contents and results of the research	14
Chapter 4. Degree of achievement against research goal and impact on other research areas	108
Chapter 5. Plan for utilization of results of the research	116
Chapter 6. Information of science and technology of foreign countries	117
Chapter 7. References	118

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
	* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술	
제 2 장	국내외 기술개발 현황	11
	* 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술	
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	14
	* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술	
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	108
	* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술	
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	116
	* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)	
	* 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등	
	* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등	
	* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등	
	* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함	
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	117
제 7 장	참고문헌	118
	* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거	

제 1 장 연구개발과제의 개요

* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

식물은 재조합 단백질의 대량생산을 위해 매우 매력적인 시스템으로 간주되고 있으며, 특히 식물 경구 백신은 항원단백질만을 사용하므로 안전성의 확보가 가능하고, 식품 섭취를 통하여 이루어지기 때문에 주사와 같은 접종 비용이 거의 들지 않으며, 운반 수송시의 저온 저장이 필요하지 않는 등의 다수의 장점을 가진다. 형질전환 식물을 이용한 유용단백질 생산은 한번의 형질전환을 통하여 적은 비용으로 쉽게 scale-up할 수 있으며 또한 동물 세포와 같은 진핵 세포에 속하여 미생물을 이용한 시스템에서는 볼 수 없는 전사 후 과정이 포함된다는 장점을 가지고 있어 생물학적 활성과 안전성이 중요한 인간 유용 단백질의 생산에 적합한 시스템이라고 볼 수 있다. 흔히들 Plant-derived pharmaceuticals 개념으로 불리워지고 있는 이 분야에는 크게, antibodies, vaccines, 그리고 biopharmaceuticals 분야로 나눌 수 있으며 그 중에서도 Plant-derived vaccines(식물-유래 백신)은 지난 15여년간의 집중적인 연구 결과로 그 가능성을 인정받아 왔다. 지금까지 간염바이러스, LTB, TGEV, 및 HIV에 이르기까지 40여종의 질병을 대상으로 한 식물-유래백신을 개발하기 위한 연구들이 진행되어 왔다. 형질전환 작물을 통한 식용식물백신은 이미 전 세계적으로 이슈화되어 많은 질병을 대상으로 다양한 작물들에서 시도되고 있으며 그 개발 방법들이 대부분 특허로 이어지기 때문에 어떠한 질병을 대상으로 신속하게 일을 진행시키느냐의 여부의 매우 중요한 문제라고 생각되어진다.

하지만 식물체 개발에 이은 실험동물 효능 실험 이후 많은 연구들이 담보 상태에 머물러 있으며 임상을 비롯한 목적동물 실험에 나아가지 못하고 있는 실정들이다. 그 원인으로서는 외래 유전자의 발현 수준이 낮은 점이다(Doran 2006). 이러한 낮은 발현 수준을 극복하기 위하여 많은 노력과 시도가 이루어지고 있는데 도입하고자 하는 유전자의 codon을 식물에서 많이 이용되고 있는 codon으로의 치환에 의한 유전자의 최적화 (Mason et al. 1998; Kang et al. 2004), 유전자의 안정성에 영향을 미치는 요소 제거 (De Jaeger et al. 2002; Ibrahim et al. 2001; Outchkourov et al. 2003), 강력한 프로모터 및 발현 시스템의 개발 등이 있다. 또한 업록체 형질전환(Daniell et al., 2005), viral vector 시스템을 이용한 고발현(Gleba et al. 2007), 저장 액포에 targeting을 통한 고축적 등이 수행되고 있다. 또한 식물의 생장 조건과 채집하는 식물체의 부위와 시기에 따라 발현 단백질량이 다를 수 있으므로 이에 따른 문제점이 지적되고 있다. 즉, 면역성을 유도할 수 없는 양의 형질전환 식물을 계속 섭취할 때 항원 단백질을 자신의 단백질로 인식하게 되어 실제로 병원이 공격했을 때 감염될 수밖에 없는 상황까지도 가능하다는 지적이다. 또한, 경구 투여는 목적 대상의 신체조건에 따라서 그 섭취량을 달리해야 하기 때문에 표준화하기가 어렵다는 지적도 있다. 이와 같은 문제를 극복하기 위하여 백신생산 식물을 모아서 분쇄한 다음 균일화시키고 생물검정에 의하여 투여량을 적시하는 방법, 초기 면역반응이 유도된 동물이나 인체에 면역반응 유도증가를 위한 경구백신으로 사용하는 방법 등 여러 가지 방법이 고려되고 있다. 비록 초기에 고려되지 않은 문제점이 돌출되고 있지만, 다방면의 연구에 의하여 머지 않은 미래에 식물 백신이 현실화되리라 전망된다.

간염 질병은 우리 나라에서는 대개 인구의 5-8%가 감염되어 있는 것으로 추산되고 있고 전세계적으로 약 3.5억명의 감염환자가 존재하는 것으로 추산된다. 이러한 감염은 방치하면

심각한 간 손상을 초래할 수 있기 때문에 매우 치명적인 질병이고, 실제로 매년 백만 명 이상의 환자가 이 질병으로 사망하고 있는 것으로 보고되고 있다. 현재 개발되어 유통되고 있는 hepatitis B 백신은 효율적이고 안전하여 백신으로서의 문제는 없지만 기존 B형 간염백신이 생산 단가가 매우 높은데다 3회에 걸쳐 주사해야하는 등 여러 가지 불편과 예방비용의 상승 요인을 가지고 있어서 저개발국가들에 대한 보급 확대의 어려움이 따르고 있다.

B형 간염의 항원인 Hepatitis B surface antigen (HBsAg)의 표면 항원 유전자를 담배식물체에 형질전환시켜 그 발현을 보고한 바 이미 있으며, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11745-11749, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 3358-3361), 중국의 농업 과학원 생물기술센터 또한 10여 년간의 연구 결과로 B 형 간염을 예방 할 수 있는 토마토를 개발하였다고 밝힌 바 있다. 독일 기센 대학(Giessen University) 연구진이 당근에 유전자 조작을 가하는 방법으로 B형 간염백신을 함유하는 당근 개발에 성공하였다고 보고하였다 (Plant Cell, Tissue and Organ Culture).

우리나라의 경우 아직까지 간염바이러스 항원 유전자를 식물에 도입시키고자 시도한 예가 없으며, 앞서 언급한 세계의 보고들 역시 식물체에 도입한 유전자는 바이러스의 표면 항원 유전자 중 S 항원만을 포함한 경우가 대부분이다. preS 항원은 165bp, S 항원은 681bp로서 preS 항원은 S 부분의 항원성을 증가시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 preS를 포함하느냐의 여부는 간염 백신의 효율성을 이야기할 때 매우 중요한 요인이 될 것이라고 생각한다. 본 실험에서는 preS2와 S항원을 동시에 도입시킴으로써 연구 개발의 독창성 뿐만 아니라 앞으로의 효율부분에서도 매우 앞서 나가는 것이라 판단된다.

식물-유래 경구용 돼지 설사병 백신 개발은 생산성이 질병에 따른 피해의 정도에 의하여 크게 좌우되며, 따라서 질병의 예방이 산업의 생산성과 직결되는 축산업에서 중요한 위치를 차지한다고 본다. 양돈산업 경쟁력에 타격을 주는 많은 질병 중 경구백신 적용에 의하여 큰 효과를 볼 수 있는 것은 점막과 관련이 높은 설사병을 들 수 있다. 돼지의 경우 대부분 복합감염에 의한 피해가 많아 직접적인 산출은 어렵지만 설사병에 의한 양돈산업의 피해액은 연간 수백억원에 달하는 것으로 알려져 있다. 설사병의 경우 PED 생독백신, TGE 생독백신과 같은 단독 백신 뿐만 아니라 T-P혼합백신도 개발되어 시장에서 유통되고 있다. 그러나, 돼지백신의 경우 백신 접종에 따른 스트레스로 인한 성장지연 문제 해결의 필요성, 접종에 소요되는 경제적 부담의 경감 필요 등을 이유로 대체백신의 개발이 매우 높은 당면성을 가진다. 가축백신의 경우 GMO의 접근이 보다 용이한 면도 본 연구의 진행 가능성을 높여준다고 본다. 즉, 이미 대부분의 수입용 사료들이 GMO인 점을 감안한다면 가축백신에서 GMO 식물투여에 따른 많은 위해성 추가 검사에 대한 부담은 줄어들 것이라고 보여진다. 따라서 본 연구 보고서를 통하여 식물-유래 백신의 경구투여에 의한 질병 면역반응 유도 여부를 파악하여 현장 적용 가능한 기술로의 개발 가능성을 알아보았다.

감자는 그 자체가 완벽한 영양조성을 지닌 세계 4대 주식작물로서 극한, 극서지방을 제외한 세계 도처에서 재배되어 수많은 인류를 먹여 살리고 있는 작물이기 때문에 본 연구팀에서 의도하는 바대로 성공적인 감자백신이 개발된다면 이는 자연스럽게 세계 전역의 감자 지역으로 전파되어 막대한 수요가 전 세계적으로 창출될 것임을 확신한다. 더불어 인공씨감자 대량생산기술이라는 훌륭한 downstream 실용화 산업 기술을 이미 확보하고 있기 때문에, 식물공장이라는 최신품으로 대량생산되는 인공씨감자가 가지는 여러 장점과 식용경구백신이 가지는 장점을 접목 가능하여 훌륭한 고부가가치 상품을 대량생산 할 수 있을 것이라 본다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

(* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술)

식물을 이용한 경구백신의 가능성은 1990년 Cutiss & Cardineau (WPA, 1990, *Streptococcus mutans* 표면단백질 항원 (SpaA)을 담배에서 발현)에 의하여 처음 시도된 바 있으며 20여년이 지난 지금까지 많은 연구들이 진행되어 오고 있다. 1990년 초기의 연구들은 주로 식물체에서 항원단백질의 발현 여부를 확인하는 것에 주력되어졌는데, 재조합 bacterial antigen의 발현 및 항원력 검정(Haq 등, *Science* 1995), Norwalk virus capsid protein의 토마토에서의 발현 (Mason 등, *PNAS* 1996), 간염바이러스 B 표면항원의 발현 및 항원력 검정(Thanavala 등, *PNAS* 1995), TGE coronavirus의 항원 glycoprotein S의 발현(Gomez 등, *Virology* 1998), Cholera toxin B subunit 백신의 효율성 (Arakawa 등, *Nat Biotechnol.* 1998), 감자에서의 cholera toxin B의 발현 (Arakawa 등, *Transgenic Res.* 1997), 감자에서의 human milk protein의 발현 (Chong 등, *Transgenic Res.* 1997) 등이 주로 수행되었다. 이 후, 1990년대 후반 및 2000년대 초반의 연구들은 식물체내 발현을 향상을 위한 연구들이 주를 이루었다. LT-B 유전자의 고발현 (Mason 등, *Vaccine* 1998), 감자에서의 CTB-NSP4의 융합을 통한 발현을 향상 (Arakawa 등, *Plant Cell Rep* 2001), Chloroplasts 형질전환을 의한 CTB의 대량발현 시스템 (Daniell 등, *J. Mol. Biol.* 2001), HBsAg의 발현 증대를 통한 항원력 검정 (Kong 등, *PNAS* 2001)등이 대표적이라고 할 수 있다. 이 들 그룹외에도 Sandhu 등 (*Transgenic Research* 2000)은 유아에게 가장 치명적인 respiratory syncytial virus (RSV)의 F-protein부분을 식물체 발현 벡터에 접합시켜 tomato에 형질전환시켰다. 성숙한 토마토를 쥐에 투여한 결과 이 virus에 대한 항체를 형성하였고 뚜렷한 면역 효과가 있었음을 보고하였다. Tuboly (*Vaccine* 2000) 등도 어린 돼지에게 치명적인 설사병인 transmissible gastroenteritis virus (TGEV)의 spike protein을 담배에 도입하여 항체형성 실험을 한 결과 TGEV-S에 특이적인 면역반응이 성공적으로 유도됨을 보고하였다. 많은 감염성 질병에 대한 재조합 백신 개발과는 달리 Kim 연구팀은 인간의 치매 질환을 타겟으로 하는 베타아밀로이드 발현 형질전환 감자를 개발하여 항체 형성 가능성을 동물실험에서 보고한 바 있다 (*FEBS letters*, 2005). 감염성 질환을 벗어난 또 다른 대표적인 질환으로 암을 들 수 있다. Mason 그룹 (*J. of Virology*, 2003)과 독일의 Martin Muller 그룹 (*J. of Virology*, 2003)은 여성들에게서 빈발하는 자궁경부암 원인 유전자인 파필로마 바이러스 (human papilloma virus) 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 각각 개발하였다. 이 기술은 이미 국내 연구진 Sohn 등에 의해 먼저 시도되어 졌으며, 이 유전자가 도입된 형질전환 식물체 개발 기술에 대한 국내 뿐만 아니라 미국등의 특허까지 받은 상태로 알려져 있다. 자궁경부암 예방용 식물백신 연구는 최근 FDA 승인을 받아 전 세계적으로 관심을 받고 있는 자궁경부암 백신의 개발과 때를 같이 하여 앞으로 유망한 아이템이 될 것으로 보인다.

식물체 개발에 뒤이은 경구투여에 의한 면역 유도기전에 관한 연구 및 임상시험의 대표적인 연구 결과로 Yang 연구팀에 의해 PEDV spike 단백질을 담배에 발현시켜 neutralization 효과와 systemic & mucosal 면역반응을 검사 (*Vaccine*, 2005), Matoba연구팀의 HIV-1 transcytosis를 차단하는 항체를 만들어 내는 백신 후보물질에 대한 점막면역 (*Vaccine*,

2006), Companien연구팀의 경구투여에 따른 humoral immune response (Fish&Shellfish Immuno. 2006) 등을 들 수 있다. 캐나다 과학자들이 GM식물을 이용하여 구제역 백신을 개발하는데 한걸음 다가갔다. 구제역바이러스 coat protein VP1을 인식하는 siingle chain variable antibody fragment (scFv) 유전자를 담배식물체에서 대량으로 축적하는 시스템을 개발하여 잎이 생산하는 수용성 단백질 대비 약 0.8%까지 축적하였다. 구제역은 해당국가의 축산 농가뿐만 아니라 사회 전반의 경제에 심각한 영향을 주는데 값싼 재조합 항체를 이용한 예방주사로 면역력을 높이는 것은 구제역 발생지점의 주변지역 동물들을 보호하기 위한 합리적인 대안이 될 수 있음을 주장한 바 있다 (Current issue of transgenic research). 멕시코 국립자치대학 연구원들은 식물체 내에 상당량의 광견병 바이러스 당단백질을 축적하는 GM당근을 개발했다. 광견병은 백신이 개발되어 있음에도 불구하고 전 세계적으로 특히 개발도상국들에서 지속적으로 보건상의 문제가 되어오고 있다. 연구원들은 식용식물에서 생산되는 백신이 기존 백신을 대신할 수 있는 좋은 대안이 될 것으로 전망하였다.

이와 같은 식물-유래 백신의 경우 중치 예방을 위한 분비형 항체 백신이 유럽연합에서, 닭의 Newcastle 병 예방을 위한 백신이 USDA에서 승인 받았고 B형 간염백신 예방을 위한 식물 경구 백신이 쿠바 시장에 나온 것으로 보고되어 있다. 이외에도 많은 재조합 의약품들이 개발되어 임상 실험 중에 있으며 현재로서 가장 앞선 단계를 진행하고 있는 것은 이스라엘의 Protalix사가 당근 현탁세포 배양을 이용하여 생산하는 Gaucher병 치료제인 Glucocerebrosidase로써 판매권을 가진 대형 제약회사인 Pfizer가 6천만불에 계약한 사실은 곧 본 제품이 시장에 출현 할 것으로 기대하는 증거가 된다. Vainstein박사 (히브리대학의 기술이전회사인 Yissum 연구개발회사)는 항말라리아 천연물질인 artemisinin 생산에 필요한 생합성경로 전체를 코딩하고 있는 형질전환 담배를 보고하였다. 이 기술은 담배식물체를 이용해 저렴한 가격의 artemisinin을 생산할 수 있으며 이는 말라리아로 고통받고 있는 개발도상국의 큰 도움을 줄 것으로 기대되고 있다.

Lico 등 (Plant Cell Rep 2012)은 allergy, 감염성 질병, 및 암과 같은 질병에 대한 치료 개념으로 사용되는 다양한 human peptide를 식물에서 발현시켜 생산하는 예를 보고하기도 하였다. Anthrax의 항원과 인간항체Fc fragment를 chimeric recombinant protein으로 만들어 면역원성을 확인한 논문도 최근에 보고된 바 있다 (Andrianow et al. 2010)

현재 국내에서도 식물 경구백신에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데 인간 질병에 대한 식물 경구백신보다는 비교적 용이하고 기간이 짧게 소요되는 동물 질병에 집중하는 경향이 있다. 농촌진흥청 김종범 박사팀은 돼지열병(돼지콜레라) 바이러스의 외피단백질 유전자를 사료작물인 알파파에 형질전환하여 그 식물체를 먹인 돼지에 바이러스를 주사로 접종한 결과 돼지 콜레라가 발병하지 않았다고 밝혔다. 또한 전북대학교 양문식 교수팀은 돼지 바이러스성 설사병(Porcine Epidermic Diarrhea Virus), 돼지 흉막 폐렴균인 *Actinobacillus pleuropneumoniae*, cholera toxin B subunit 등 다양한 항원단백질에 대한 식물 경구백신 개발을 진행하고 있다. 특히, 돼지설사병 및 흉막폐렴균에 대한 연구에서는 실험동물 및 목적동물에서 효능이 검증되었음을 보고하였다 (Bae et al. 2003; Kim et al. 2010). 전주생물소재연구소 권태호 박사팀은 돼지 콜레라 바이러스 항원유전자를 이용하여 식물 경구백신을 개발하는 연구를 진행하고 있으며, 단국대학교 황철호 교수팀은 돼지 설사병원균(돼지 대장균 2종과 살모넬라 1종)에서 특이 유전자의 단백질을 생산하는 당근세포를 대량생산하여 당근을 먹인 돼지의 자돈에서 면역효과가 있음을 확인하였다. 또한 배재대학교 최창원 교수팀은 개

파보바이러스(Canine parvovirus)에 대한 항원단백질을 생산하는 식물을 개발하였고, 이를 이용한 식물경구백신에 대한 연구를 하고 있다. (주)젠닥스의 정화지 박사팀은 능성어류에 감염하는 노다바이러스의 항원단백질을 이용한 식물 경구백신에 대한 연구를 수행하고 있다 (Kim et al., 2010). 최근 이렇듯 많은 장점과 그 실례를 가지고 있음에도 불구하고, 식물경구백신은 아직까지 정확한 dosage 측정, delivery system, immune tolerance 등과 같이 해결해야 할 문제들이 많이 있기 때문에 선블리 상품화 할 단계라고 보는 것은 어려우며 아직도 많은 연구기간을 거쳐 실용화에 도달할 수 있을 것이라 본다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

제1절 HBV항원 단백질을 발현하는 ELITE 감자의 품종 등록을 위한 기초 자료 연구

1. HBV 형질전환 감자의 개발

본 연구에서 사용한 식물체는 이미 수행된 연구에서 확보된 PHBV-8 형질전환 감자를 사용하였으며, 이 감자를 만든 과정을 간단히 요약하면 다음과 같다.

도입된 유전자는 간염 바이러스 유전자인 HBsAg의 preS2 + S 유전자 (middle protein)와 카나마이신 저항성 유전자 (neomycin phosphotransferase, NPT II)를 감자 괴경 특이적 발현 프로모터인 patatin 프로모터에 각각 연결한 것 (PHBV)이다. 감자의 잎 절편으로 HBsAg 유전자를 도입시키기 위하여, Agrobacterium-mediated transformation 방법을 사용하였다. 선발압력으로 카나마이신 100 mg/L을 첨가하여 형질전환된 식물체만이 재분화되도록 하였고, 배양 8주가 경과된 후에 약 50개체의 소식물체를 얻을 수 있었다. 기내배양에서 정상식물체와 비교하여 비정상적인 형태는 관찰되지 않으며, 화분으로 옮겨 생육을 관찰한 결과 정상적인 감자 괴경까지 수확할 수 있는 개체를 선발하였다.

감자의 게놈내에 도입된 HBsAg 유전자의 삽입 상태를 확인하기 위하여 genomic PCR과 Southern Blot을 실시하였다. 선발한 PHBV 발현 형질전환체 역시 1개에서 3개 정도의 삽입이 이루어졌음을 확인하였고 mRNA 발현 역시 잘 이루어짐을 알 수 있었다. Middle protein의 발현은 Western blot으로, 단백질의 발현 수준과 항원력은 샌드위치면역활성측정 (Enzyme-linked Immunology Sandwich Assay, 약칭 ELISA)과 고형상 면역방사 계수법 (IRMA)으로 각기 분석하였다. 실험 결과 PHBV-8 개체의 경우 대조구에 비해 약 17배 가까이 높은 값을 보임으로써 HBsAg 유전자가 감자식물체내에 도입되어 발현됨을 확실히 알 수 있었으며, 감자괴경 특이적 프로모터인 patatin 프로모터에 의한 HBsAg의 발현율이 다른 발현벡터에 비하여 월등히 높음을 확인 할 수 있었다.

최종적으로 선발한 개체 PHBV-8 은 기내배양을 통하여 계속 유지하였는데, 기내줄기는 2주일 간격으로, 하단부 줄기는 감자 소괴경 형성을 위하여 따로 배양하였다. 발아된 기내소괴경은 토양에 심어 재배한 뒤, 수확한 괴경을 면역 유도 반응 실험에 사용하였다.

2. 감자-유래 항원을 이용한 마우스 immunization

마우스 immunization은 다음과 같이 실시하였다. 감자 추출액을 투여할 때는 1ml gavage needle을 사용하였고, fresh 감자 상태로 줄 때는 먹이 대신으로 주었다. 이 때 adjuvant 로 10 μ g의 CT (cholera toxin)을 사용하였다. 이러한 경구 투여는 3주일 동안 일주일 간격으로 3번에 걸쳐 하였으며 투여 전에 매번 혈액을 채취하여 serum내 항체 형성을 확인하였다. 그 후로 일주일에 두 번 간격으로 계속 채혈을 하였다. 8주째에 yeast-derived HBsAg로 boosting을 실시하였으며, 32주째에 0.5 μ g *E.coli*-derived preS region으로 재boosting을 하였다. 이 때 boosting 투여 경로는 intraperitoneal booster를 하였으며, 매주 채혈을 하여 항체

의 변화 추이를 monitoring하였다. 연구 결과, 감자 유래의 항원 단백질의 경구투여에 의하여 anti-S 항체를 유도하는 것을 알 수 있었다. 세 번의 투여 후 5주까지는 primary antibodies 반응은 뚜렷하지 않았으나, boosting 후로 anti-S 항체는 10주째까지 약간의 증가세를 보인 후 급격한 증가를 보여 31주째 까지 유지되었다. Hepatitis B virus의 coat surface에서 preS1 및 preS2는 각각의 항체를 만들어 내기도 하지만 S 항원의 hepatocyte receptor의 부착에 중요한 역할을 하기 때문에 이 부분의 도입은 백신의 효율을 높게 하는 것 뿐만 아니라, 기존의 S항원을 포함하는 백신에 대하여 낮은 반응 내지는 무반응을 보였던 일부 사람들의 경우 대체 백신으로서의 기능을 할 수 있을 것이다. 본 연구에서 감자에 도입되었던 preS2 항원에 대한 마우스에서의 항체 형성 반응을 언급하면, 초기 투여 이후 미약한 preS2 항체 반응을 보였으며, S 항원을 이용한 boosting 이후 지속적인 증가를 보였다. 32주째에 preS 항원으로 2차 boosting 이후 anti-preS 항체는 대조 그룹 A에 비해 3-4배 정도 높은 증가율을 보여 주었다. 증가된 항체는 monitoring을 계속한 51주 까지 유지되는 경향을 보였다. Humoral immune system에서의 성공적인 항체 형성을 확인함과 더불어 Fecal IgA 분석을 통하여 mucosal immune response 역시 효과적이었다. 감자의 투여군들에서 S 및 preS2에 대한 특이적인 IgA 형성 반응을 보였다. 흥미롭게 yeast-derived rHBsAg를 투여한 그룹보다 감자 유래의 항원을 투여한 그룹에서 IgA 항체 형성이 높게 나타났다. Serum IgG 분석과 유사하게 시료들의 경구투여 이후 boosting 전까지 IgA 형성은 이루어지지 않았으며 S 항원과 preS 항원으로 boosting 한 후 각각의 특이적인 IgA 형성이 이루어졌다. 형질전환 감자의 경구투여에 의해 유도된 preS2 항체의 virus neutralizing activity를 간접적으로 알아보기 위한 H8 항체와의 competition 실험 결과, 감자-유래 항원에 의해 유도된 preS2 항체는 H8과 경쟁적으로 binding 함을 알 수 있었고 이로써 직접적인 방법은 아니지만 virus-neutralizing 능력이 있는 preS2 특이 항체 H8과의 경쟁적 반응 비교를 통해 감자유래 preS2 항원에 의해 유도된 preS2 항체는 H8과 유사한 activity를 가진다고 판단되었다.

3. 우수(Elite)개체 PHBV-8 감자의 고정

위의 실험들을 통하여 유전자가 안정적으로 도입이 되었고, 그 유전자의 기능이 가장 잘 발현된다고 판단되는 형질전환 감자를 ELITE 개체로 선발 하였으며 기내 조직배양 방식으로 오랜기간 동안 잘 유지하였다. 약 5년 동안의 유지, 증식 동안 유전자의 발현이 정상적으로 이루어지는 지를 확인하였다 (그림 1). Genomic PCR 반응을 통하여 NPTII 유전자와 HBsAg 유전자가 안정적으로 발현되고 있음을 확인하였다. Northern blot을 수행하여 mRNA 발현 역시 잘 이루어지고 있으며, ELISA 실험에서도 단백질 발현을 확인하였다. ELISA는 Auszyme monoclonal diagnostics kit (Abbott Laboratories, USA)에서 제공되는 pre-coated anti-HBsAg beads를 사용하였다. 100ug의 감자 TSP를 첨가하고 제공하는 방법에 의하였다. 이로써 영양변식 작물인 감자의 특성상 장기간의 조직배양에 의해서도 도입한 유전자가 소실이나 변이 없이 잘 유지되고 있음을 확인하였다.

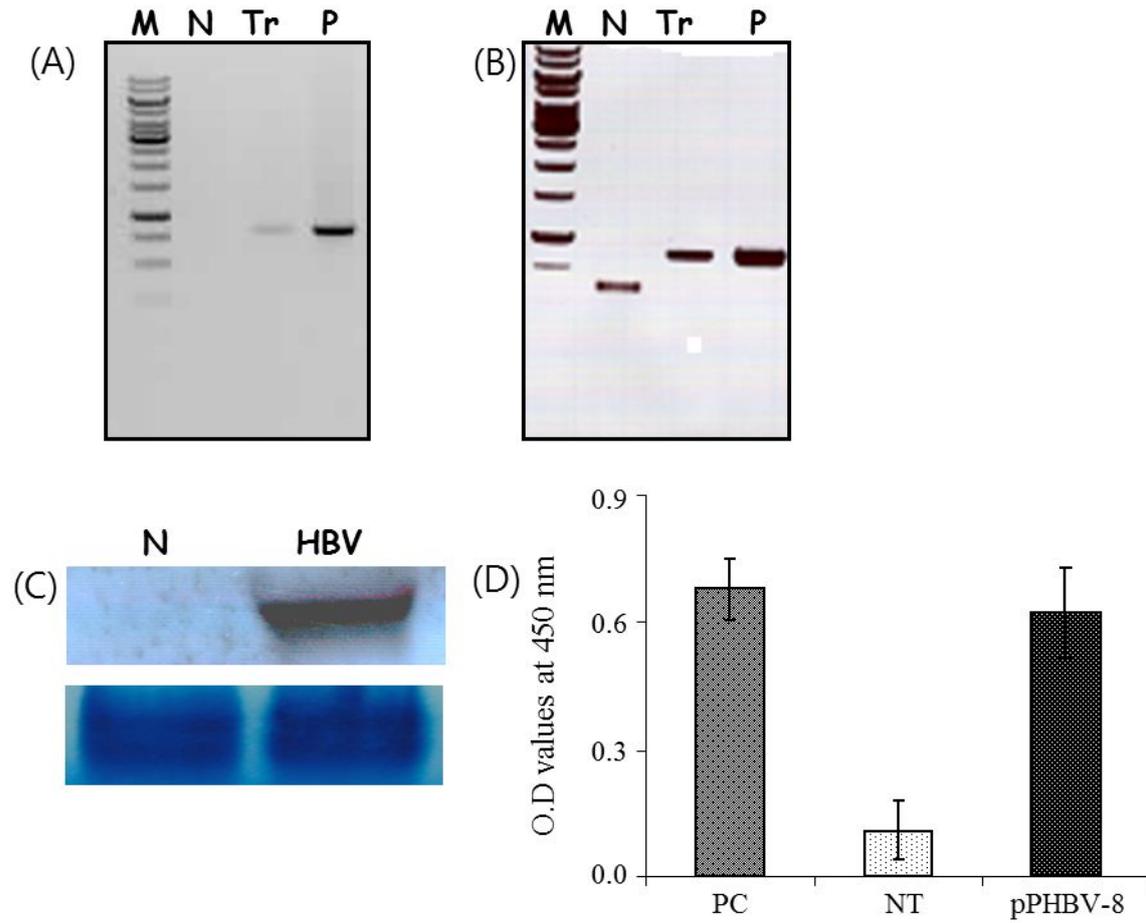


Fig.1 PCR detection of *nptII* and HBV gene in transgenic potato line 8. The fragment (700bp) of *nptII* gene was amplified as shown by an arrow (A). The fragment (825bp) of HBV gene was amplified as shown by an arrow (B). Lane M is a 1kb ladder. P, construct HBV as a positive control. N, genomic DNA of non-transgenic potato as a negative control. Northern blot analysis of transgenic potato (C). Total RNA (30ug) from untransformed potatoes (NT) and transformed potato plants was separated on formaldehyde agarose gel. ELISA quantification assay of HBV protein expression in the potato plants (D). Protein extracts from the plant tissues were tested for HBsAg with the Auszyme monoclonal kit (Abbott)

4. ELITE 'PHBV-8' 의 유전자 특성 분석

가. 도입유전자 cassette의 말단 온전성 및 HBV 도입유전자 확인

말단 온전성 확인은 도입유전자의 right border와 left border의 내부가 빈번히 deletion 된 상태에서 삽입이 되므로 도입유전자 cassette의 온전성 뿐만 아니라, 도입유전자 인접 염기서열의 해명을 위한 inverse PCR의 design에 필요한 정보를 제공한다. 아래 표는 형질전환 감자에 도입된 유전자 cassette의 말단 온전성을 확인하기 위한 primer set의 염기서열을 나타내었다 (표 1).

F1/R1, F2/R2, F3/R3, F4/R4 각각 primer 조합에 의한 PCR 결과, right border와 left border의 내부에서 작성한 PCR primer set 모두에서 기대되는 크기의 PCR 산물을 얻었다 (그림 2). 본 결과는 PHBV-8 형질전환 감자에는 도입유전자 cassette가 온전히 삽입되었음을 제시하였다.

나. HBV 형질전환 감자의 도입유전자 cassette의 삽입 연결형태 분석

온실에서 재배 중이던 HBV 감자에서 genomic DNA를 추출하여 HBV 도입유전자 cassette의 삽입연결형태 분석을 수행하였다. 이를 위하여 아래 그림과 같은 여러 가지 조합의 primer를 이용하여 PCR분석을 하였다. 분석결과 형질전환 감자에서만 특이적으로 나타난 PCR 반응산물들을 gel purification을 통하여 염기서열 분석을 하였다. 서열 분석 결과는 아래에서 제시하고 있다.

(1) 첫 번째 PCR 반응산물의 염기서열

도입유전자 cassette의 LB부분

```
1   NTNCNGTGAT ACGTTAGCAT GTAATAATTA ACATGTAATG CATGACGTTA
51  TTTATGAGAT GGGTTTTTAT GATTAGAGTC CCGCAATTAT ACATTTAATA
101 CGCGATAGAA AACAAAATAT AGCGCGCAA CTAGGATAAA TTATCGCGCG
151 CGGTGTCATC TATGTTACTA GATCGGGAAT TCACTGGCCG TCGTTTTACA
201 ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGCAG
251 CACATCCCCC TTTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT
301 CGCCCTTCCC AACAGTTGCG CAGCCTGAAT GGCGCCCGCT CCTTTCGCTT
351 TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCTCCG TCAAGCTCTA
401 AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA
451 CCCCAAAAAA CTTGATTTGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT
501 GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT CTTTAATAGT
551 GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC AACCTATCT CGGGCTATTC
601 TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTT GGAACCACCA TCAAACAGGA
651 TTTTCGCCTG CTGGGGCAA CCAGCGTGGA CCGCTTGCTG CAACTCTCTC
701 AGGGCCAGGC GGTGAA
```

새로운 cassette의 RB부분

```
ACGA CAATCTGATC ATGAGCGGAG AATTAAGGGA
```

```
751  GTCACGTTAT GACCCCGCC GATGACGCGG GACAAGCCGT TTTACGTTTG
```

801 GAACTGACAG AACCGCAACG TTGAAGGAGC CACTCAGCCG CGG

(2) 두 번째 PCR 반응산물의 염기서열

도입유전자 cassette의 LB부분

```
1 NNNATCGACC CATCAACAGG ATTTTCGCCT GCTGGGGCAA ACCAGCGTGG
51 ACCGCTTGCT GCAACTCTCT CAGGGCCAGG CGGTGAAGGG CAATCAGCTG
101 TTGCCCGTCT CACTGGTGAA AAGAAAAACC ACCCCAGTAC ATTA AAAACG
151 TCCGCAATGT GTTATTAATT TGTC
```

```
1 (ATTCTTTTCT ATAAATAGTT GGACCACAAT ACTTGTCATT TTATAAAATT
51 TATGCATAAA TTATCATATT TTGCCTAATA AAAACATCCG CAA)
```

gDNA 염기서열

새로운 cassette의 RB부분

```
TGAGCGG AGAATTAAGG GAGTCACGTT ATGACCCCCG CCGATGACGC GGGACAAGCC
151 GTTTTACGTT TGGAAC TGAC AGAACCGCAA CGTTGAAGGA GCCACTCAGC
201 CGCGGGTTTC TGGAGTTTAA TGAGCTAAGC ACATACGTCA GAAACCATTA
251 TA
```

여기서 얻은 두 번째 PCR 산물의 gDNA 염기서열을 blast 분석을 실시하여 본 결과 Solanum tuberosum disease resistance protein Gpa2 유전자임을 알 수 있었다.

```
>gb|AF195939.1|AF195939 Solanum tuberosum disease resistance protein Gpa2 gene, complete
cds
Length=10331

Score = 122 bits (66), Expect = 2e-25
Identities = 73/76 (96%), Gaps = 1/76 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 2 TTC TTTTCTATAAAATAGTTGGACCACAATACTTGTCATTTTATAAAATTTATGCATAAAAT 61
      ||| |||
Sbjct 9362 TTC-TTTC TATAAAATAGTTGGACCACAATACTTGTCATTTTATAAAATTTATGTATAAAAT 9304

Query 62 TATCATATTTTGCCTA 77
      |||
Sbjct 9303 TATCATATTTTACCTA 9288
```

표 1. HBV 형질전환 감자 도입 cassette의 말단 온전성 확인용 primer set의 염기서열

명 칭	염기 서열	비 고
F1	CAATCAACATGCTACCCTCC	정방향
R1	AACGTCCGCAATGTGTTATT	역방향
F2	CTGGCTGGTGGCAGGATATA	정방향
R2	ATATAGCGCGCAAAC TAGGA	역방향
F3	ATTATCGGTGGTGAACATGG	정방향
R3	TTAAACTGAAGGCGGGAAAC	역방향
F4	AAGGAGATCAGCTTGGCTCT	정방향
R4	CATGCACATACAAATGGACG	역방향

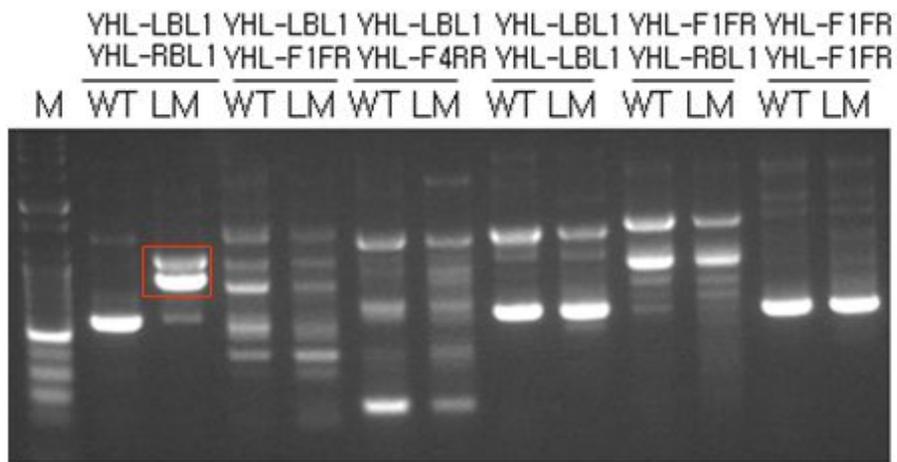


Fig. 2 HBV 감자의 도입유전자 cassette의 삽입 연결형태 분석 결과

다. pPHBV-8개체의 유전자 copy 수 분석

일반적으로 한 copy의 유전자가 하나의 유전자좌에 도입된 경우가 형질전환체 선발에 가장 적합한 것으로 판단된다. 그러나 반드시 한 copy만 삽입되어야 한다는 규정은 없으며 다만 숙주의 단백질을 암호하지 않은 비암호영역에 삽입되어서 유전법칙을 분명하게 증명할 수 있는 것이 가장 적합하다. 본 실험은 형질전환 감자의 HBV 도입 유전자의 copy수를 알아보고자 수행되었다. 삽입체 수 또는 복제수를 결정하는 방법으로는 하나의 절단위치를 포함하는 제한효소 또는 양쪽 T-DNA말단이 식물체의 게놈에 인접하도록 절단하는 제한 효소를 사용하여 절단한 후에 그 영역의 DNA단편을 probe로 하여 southern blot 분석을 수행하여 얻어지는 banding 패턴으로 삽입체 의 수를 판단하는 기술이 일반적으로 사용하는 방법이다. 이 때 negative control로 형질전환에 사용된 테지레 일반 감자의 genomic southern도 함께 수행하였다.

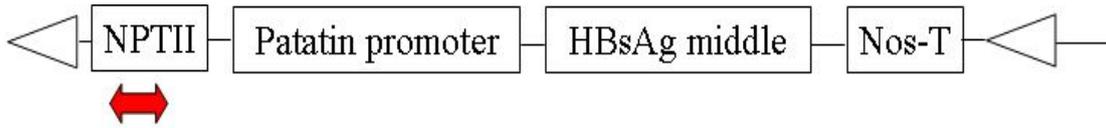
유전자서열의 NPTII 부분에서 probe위치를 정하고 primer를 제작한다 (그림 3). probe를 기준으로 한쪽 방향에만 restriction site가 있는 제한효소를 선정하고 DNA 5ug에 50 unit 처리하여 overnight digestion하였다. 제작한 primer와 Biotin-14-dCTP를 이용하여 probe-PCR (ABF3-npt 448U; 5'tatgactgggcacaacagaca3', ABF3-npt 973L; 5'tgatattcggaagcaggcat3')하고 젤 상에서 목표 밴드만을 분리정제하였다. 완전히 제한효소가 처리된 DNA단편들을 아가로스 젤에서 분리시킨 후 hybridization 과정을 진행한다. Probe에 AvidxTM-AP conjugate 와 CDP-star substrate를 붙여 X-ray film에 감광시켜 검출되는 밴드 수를 확인하였다.

Sequence map의 *nptII* 부위 probe로 hybridization 한 결과 (그림 4), 그림 5와 같이 세 가지 enzyme *AFAI*, *EcoRI*, 및 *HindIII*에 대해 모두 2 copy가 확인되었으며, 대조구인 일반감자에서는 아무 밴드도 없었다. 반면, HBV 항원 유전자에 대한 probe (HBV 192U 5'-AGGACCCCTGCTCGTGTTA -3', HBV 732L 5'-AGCCCTGCGAACCACTGAA-3')를 사용하여 Southern blotting 한 결과 transgene cassette이 *AFAI*에서 1 copy, *EcoRI*에서 3 copies, 및 *HindIII*에서 4 copies 가 확인되었다. 종자번식 작물의 경우 교배에 의한 후대의 유전자 분리 문제로 1 copy 삽입이 요구되고 있으나 영양번식작물의 경우 그러한 문제를 회피할 수 있어 multi-copy경우에도 Elite 개체로서의 문제는 없다고 보여진다.

5. 식물-유래 HBV 항원 투여에 의한 연구자료 확보

가. 경구투여에 의한 면역 반응 유도 일반 protocol

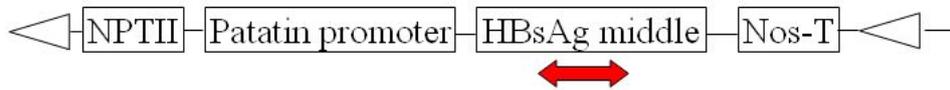
일주일 간격을 두고 일반감자, 형질전환 감자, 및 원 항원을 세 번의 연속적인 경구 투여시켰고, 이 후 투여를 시작한 날을 기점으로 8주 쯤 되는 날에 복강을 통한 boosting을 실시하였다. 각 경구투여시에 아주번트 cholera toxin을 동반 투여하였다. 동물실험을 통하여 확보된 serum을 이용하여 IgG를 분석하였고, 채취한 분변으로 IgA 분석을 수행하였다. 그 결과 IgG 뿐만 아니라 점막면역에 의하여 유도되는 IgA 역시 면역 반응이 유도됨을 보였다. 경구 투여되는 감자시료의 형태에 따른 면역반응 유도를 알아보기 위하여 총수용성단백질 상태와 쪼개진 생감자의 먹이 형태로 나누어 공급하였다. 31주 기간 동안 항체 변화를 추적하였으며 실험 결과 투여 형태에 따른 면역반응 차이는 크게 보여지지 않았다 (그림 6).



Restriction enzyme *AflI, EcoRI, HindIII*

Probe primer set ABF3-npt 448U 5'-TATGACTGGGCACAACAGACA-3'
 ABF3-npt 973L 5'-TGATATTCGGCAAGCAGGCAT-3'

Fig. 3 Expression vector scheme and primer design for NPTII Southern analysis



Restrictionenzyme *AflI, EcoRI, HindIII*

Probe primer set HBV 192U 5'-AGGACCCCTGCTCGTGTTA-3'
 HBV 732L 5'-AGCCCTGCGAACCACTGAA-3'

Fig.4 Expression vector scheme and primer design for HBsAg Southern analysis

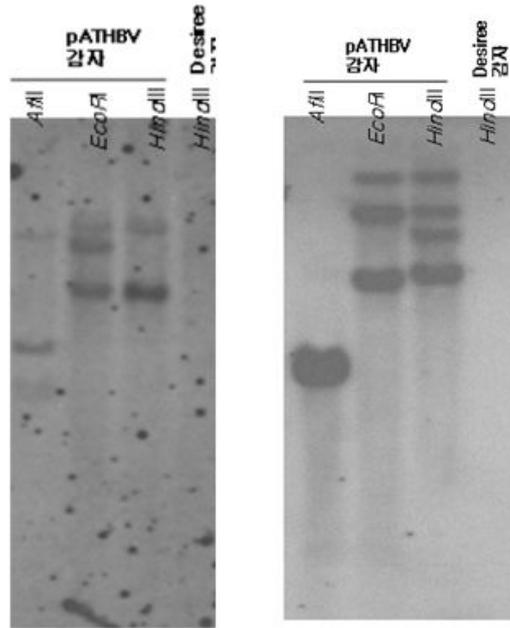


Fig. 5 Southern analysis of pPHBV-8 transformant. NPTII gene analysis (left) and HBsAg gene analysis (right) by *Afl*III, *EcoRI*, *HindIII*

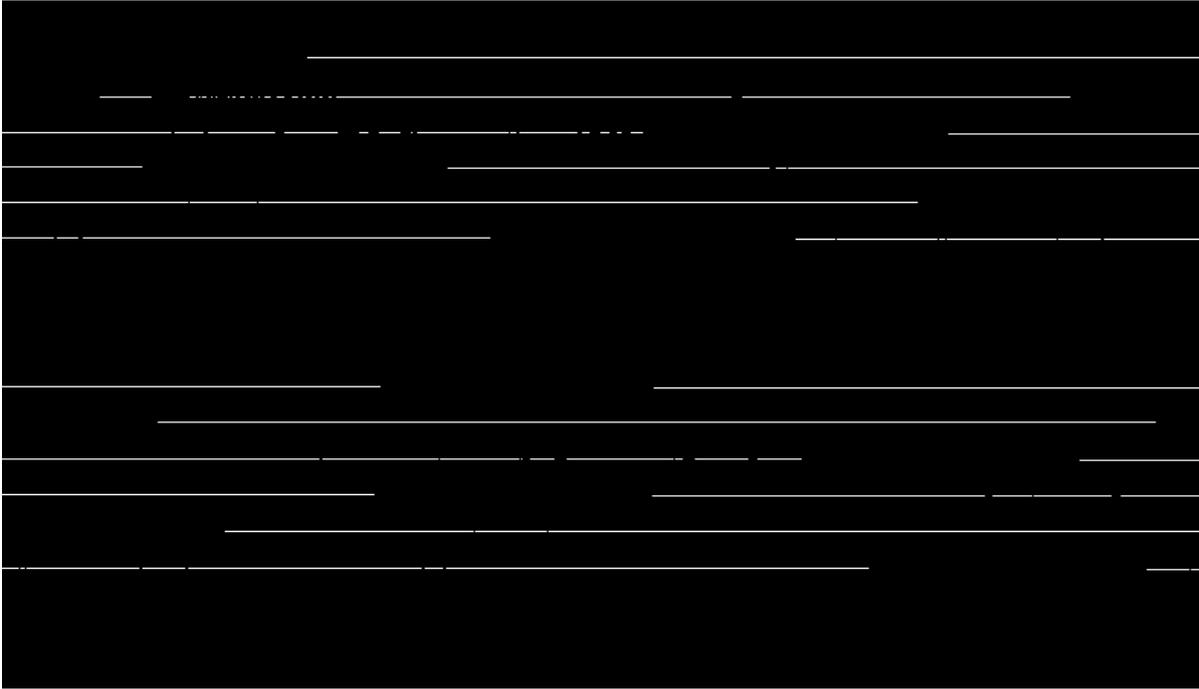


Fig. 6 Measurement of serum anti-HBsAg (specific S antigen) immune response in mice elicited by oral immunization with transgenic potato tuber. A: Mouse was fed with transgenic potatoes 10g extracted juice (filled circles); B: Mouse was fed with transgenic potatoes 5g raw tuber (filled circles), and mice were fed with untransformed 10g control tubers (filled squares).

나. 항원의 dosage 에 따른 면역 반응 유도 분석

(1) Serum IgG 분석

식물을 이용한 경구백신 개발 연구에서 아직 명확한 프로토콜이 없는 실정이다. 이는 항원에 따른 다른 면역반응 유도등을 감안할 때 항원 별 vaccination protocol이 마련되어야 하지만 일반적으로 routine하게 적용할 수 있는 넓은 개념의 실험법 마련이 중요하다고 보여진다. 그 일례로 지금까지 보고된 많은 논문들에서 제시되고 있는 방법은 항원의 투여시기는 보통 3주 동안 일주일 간격으로 3회 정도 투여하고, 항원 투여에 이어 boosting 역시 일반적으로 시행하고 있다. 이 때 가장 많은 논란거리가 되고 있는 것이 항원의 dosage에 대한 것인데, 상품화되어 투여되고 있는 경구백신이 장에 의한 분해를 고려하여 그 양을 일반 백신의 10배 가량 많이 사용하고 있는 점을 감안하고 또한 아직 반응기작이 밝혀지지 않은 점 등으로 인해 식물-유래 백신은 더 양을 많이 해야 한다(일례의 경우 약 30배의 증가를 요한다고 함)는 의견이 많다.

본 연구에서는 항원으로서의 그 효능이 몇차례의 mice immunization 실험을 통해 입증된 HBV발현 감자를 이용한 항원 dosage별 항체 형성치를 비교해보고자 하였다. 실험에 이용한 쥐는 BALB/c 로서 5주령, 20g 전후의 쥐를 선별하여 수행하였으며 주 1회씩 3주 동안 연속적으로 투여한 후 8주 째 boosting을 통한 면역 증강을 유도하였다. 구체적인 실험 처리구는 다음과 같이 정하였다.

<Design for Mice immunization>

- N-1 : 순수한 사료만 먹인 쥐 (n=3)
- N-2 : fed w/10g of wild-type potato (n=3)
- P : immunized w/150µg of yeast-derived rHBsAg (n=3)
- A : fed w/1 g (0.5 ug) of potato-derived rHBsAg
- B : fed w/2 g (1 ug) of potato-derived rHBsAg
- C : fed w/5 g (2.5 ug) of potato-derived rHBsAg
- D : fed w/10 g (5 ug) of potato-derived rHBsAg
- E : fed w/20 g (10 ug) of potato-derived rHBsAg
- F : fed w/30 g (15 ug) of potato-derived rHBsAg
- G : fed w/60 g (30 ug) of potato-derived rHBsAg (n=5)
- A-1 : fed w/0.02 g (0.02 ug) of potato-derived rHBsAg
- A-2 : fed w/0.1 g (0.1 ug) of potato-derived rHBsAg
- A-3 : fed w/1 g (0.5 ug) of potato-derived rHBsAg
- D : fed w/10 g (5 ug) of potato-derived rHBsAg (n=5)

항원 dosage 투여구를 low-dosage 그룹(0.02ug, 0.1ug, 0.5ug), middle-dosage 그룹(1ug, 2.5ug, 5ug), 및 high-dosage 그룹(10ug, 15ug, 30ug)으로 나누어 진행하였다. 마우스 경구투여 전에 항원 발현을 확인하기 위하여 유지 중이던 선발 라인을 대상으로 단백질 발현을 확인하였고, 생체중 10g의 감자에서 HBV 항원단백질 발현이 약 5ug을 유지하고 있음을 알 수 있었다. GMO 작물 재배인 점을 감안하여 특수 GMO 온실에서 대량으로 감자를 재배, 수확하여 slice 하여 냉동건조 후 분말화 한 다음, PBS 추출버퍼로 총수용성단백질(TSP)을 추출 후 경구투여에 사용하였다. 경구투여는 존데로 직접 주입하였으며, 투여 직전부터 투여직후. 그리고 매 1주일 간격으로 혈액을 추출하여 항체형성을 monitoring 하였다.

Boosting을 수행하기 전까지 항체 형성 여부를 살펴본 결과 모든 처리군들에서 낮은 값의 항체형성을 보였으며 yeast-derived 원항원을 투여한 구에서도 마찬가지였다. 다만, 10ug 이상의 고농도 항원투여구에서 100mIU 정도의 positive항원의 항체값과 유사한 정도를 보였다는 점은 의미있다고 보여진다.

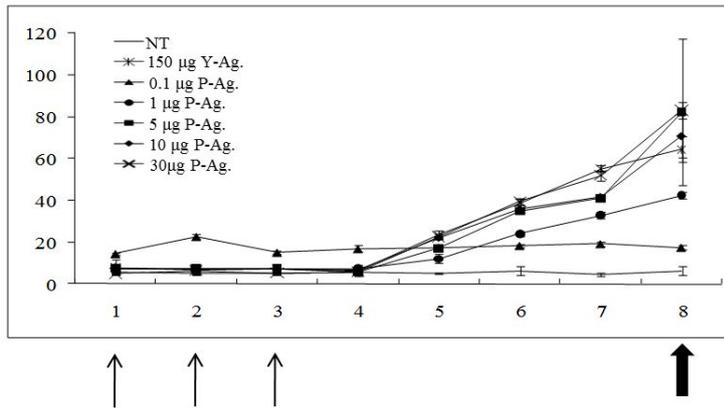


Fig. 7 항원dosage별 priming 후 일차 항체 형성 반응 (primary)

그림 8의 결과에 의하면 30ug 감자-유래 항원단백질 투여는 positive 항원의 투여에 의한 항체값과 거의 유사한 수준으로 얻어졌으며, 이 결과는 식물-유래 항원에 의한 항체형성이 매우 잘 이루어짐을 말해주는 것이라고 본다. 15ug 정도의 항원 dosage에서도 항체값이 positive 항원의 오차범위안에 드는 수준임을 알 수 있었다. Vaccination을 시작한 지 12주째의 항체값을 보면 10ug, 15ug, 그리고 30ug 항원 투여군들은 각각 446.23mIU (SD43.19), 513.33mIU (SD10.15), 그리고 551.43 mIU (SD14.09)이었다. Middle dosage (1ug, 2.5ug, 5ug) 그룹은 134~283mIU의 범위에 놓여졌으며, low-dosage 그룹 (0.02ug, 0.1ug, 0.5ug)은 54~114mIU의 범위에서 항체 형성을 나타내었다.

(2) Fecal IgA 분석

ImmunoglobulinG(IgG) 외 점막면역 유도 여부를 알아볼 수 있는 IgA의 분석 결과를 아래에 제시하였다. 채혈시에 각 그룹별로 분변을 따로 수거하여 IgA를 분석하였다. IgA 항체 titer 역시 IgG의 경향과 유사하게 나타났다. Boosting전의 primary 항체 형성은 미약한 정도였으며 boosting이 이루어진 후 12주 째는 점막에서 유도되는 IgA가 형성됨을 알 수 있었다. 항원 dosage 10 ug and 30 ug의 투여군에서는 IgA, 0.348과 0.361을 보였는데 이는 대조군 0.031와 매우 비교되는 값이다. 즉, 1ug 항원에서도 positive 항원에 근접할 정도의 titer를 보였으며 5ug 이상에서는 거의 유사한 수준의 titer를 형성하였다. 또한 특이하게도 IgA titer가 10ug과 30ug 이상의 고농도에서는 positive 항원에 비해 오히려 높았는데, 이는 식물 성분이 가지는 여러 compound들의 부가적인 기능의 작용을 추측해볼 수 있는 결과라고 보여진다. Positive 항원의 경우 예상외로 높지 않은 항체 반응을 보였는데 이는 경구면역의 평가시스템이 제대로 확립되지 않은 기술적인 문제점과 yeast-유래의 항원이 경구로 투여, 장을 통과하는 동안 일어날 수 있는 분해 정도에 대한 완전한 파악이 수행되지 않았기 때문일 가능성 등 아직 구명되지 않는 점막면역 평가가 그 원인으로 보여진다.

본 항원dosage에 따른 항체 형성 반응을 알아본 실험에 의하면 0.5ug 이하의 매우 적은 dosage에서도 100mIU정도의 항체 titer를 보임은 지금까지의 우려와는 달리 식물-유래 항원의 매우 적은 양에 의해서도 면역이 유도됨을 알 수 있었다. 이 결과는 면역관용의 측면에서 다시 한번 재확인이 필요한 것으로서 소량의 항원의 지속적인 투여는 항체 형성 반응이 아닌 관용(tolerance)를 야기한다고 하였으나 본 실험의 결과에 의하면 세 차례의 소량의 항원 투여는 면역 유도로 이어졌다. 물론 challenge실험이 수행되어야 완벽한 방어 백신의 효능을 결정할 수 있을 것이다.

(다) IgG subtype 분류

위 실험에서 얻어진 IgG titer가 가장 높은 12주 째 serum sample을 이용하여 IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ 등 subclass 별로 IgG를 분석하였다. 실험방법은 200ng HBsAg을 well에 코팅하여 4°C에서 overnight 반응 후 1:100 dilution 으로 serum sample을 적용시킨다. 각 subclass의 종류에 알맞은 HRP-conjugate를 1시간 반응시킨 후, TMB substrate를 가하여 발색 정도를 OD450nm에서 흡광도조사에 의하여 분석하였다. 결과에 의하면 IgG₁이 가장 항원 dosage-dependent한 반응을 보였다. 투여한 감자-유래 항원의 양이 많을수록 IgG₁은 증가하는 경향을 보였다. IgG_{2a}는 항원양에 따라 증가하는 경향을 보였지만 positive항원에서 titer가 낮게 나타나 단정짓기가 신뢰도가 떨어지고, IgG_{2b}와 IgG₃ 역시 dosage에 따른 일관성있

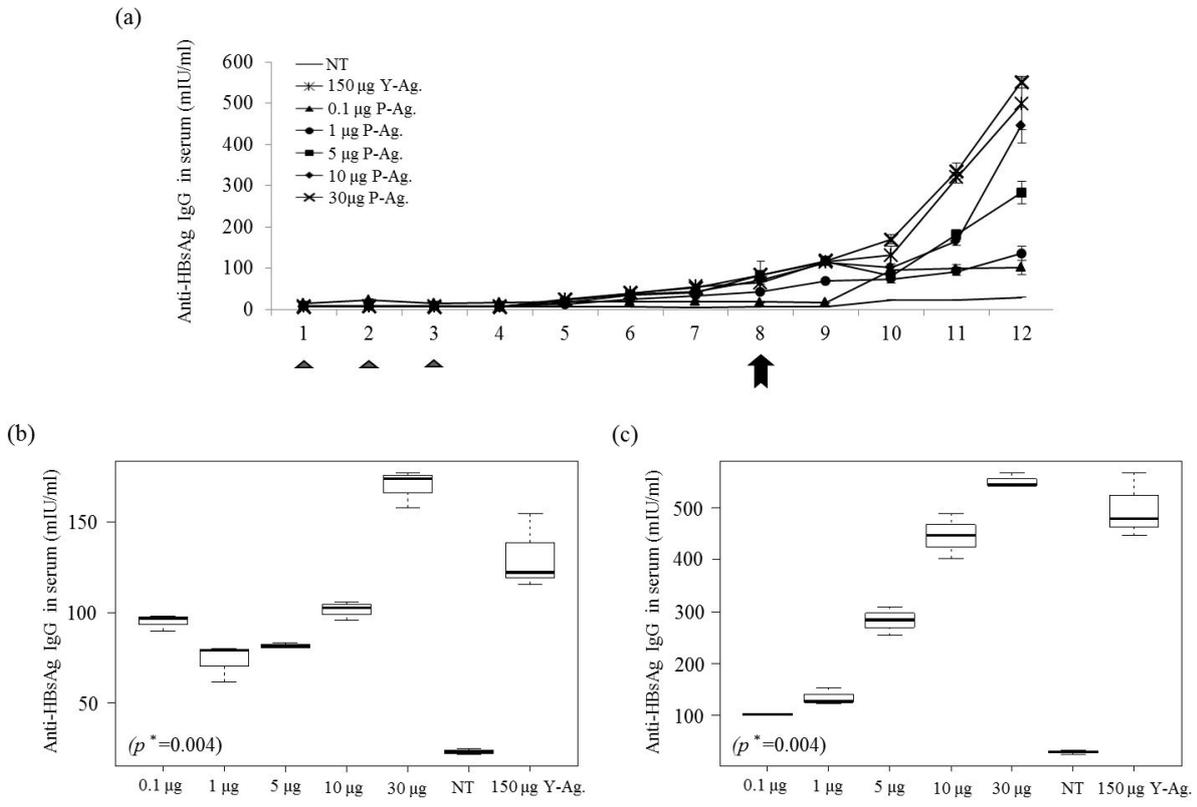


Fig. 8 항원 dosage별 IgG 항체 형성. (a) 각 소그룹별 농도를 대표적으로 취하여 항체 형성을 12주 까지 비교 분석. (b) 항체가를 면역 후 8주째에 비교, (c) 항체가를 면역 후 12주 째에 비교

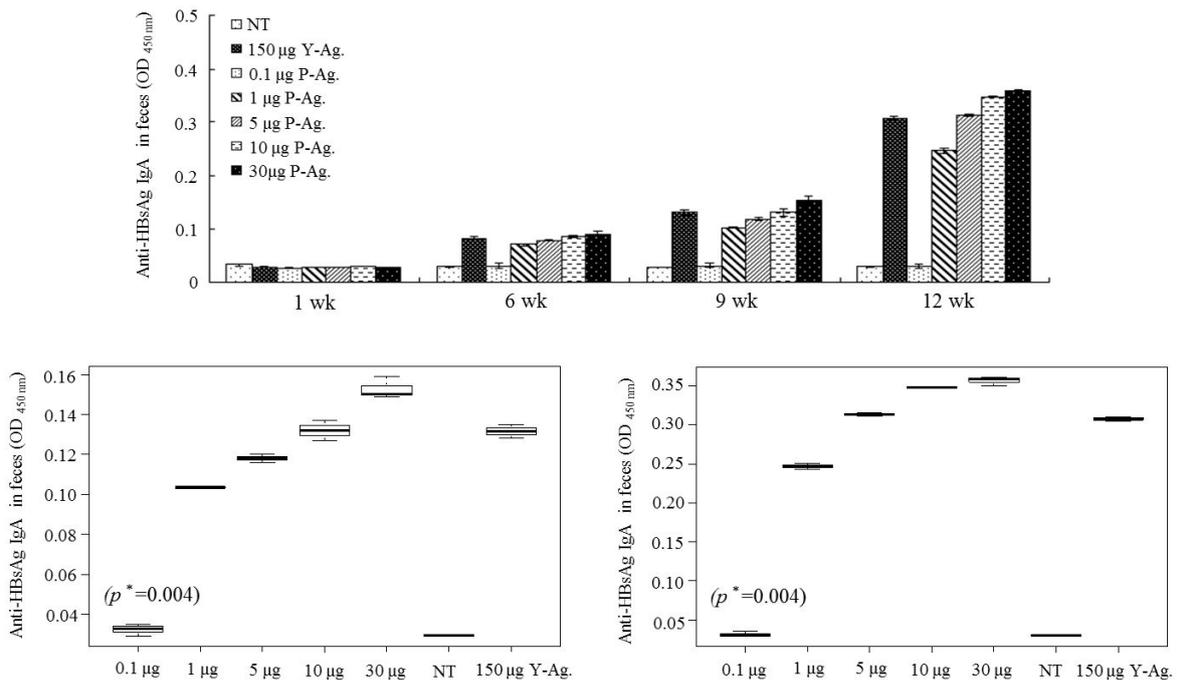


Fig. 9 항원 dosage별 IgA 항체 형성. (a) 각 소그룹별 농도를 대표적으로 취하여 항체 형성을 12주 까지 비교 분석. (b) IgA 항체가를 면역 후 8주째에 비교, (c) IgA 항체가를 면역 후 12주 째에 비교

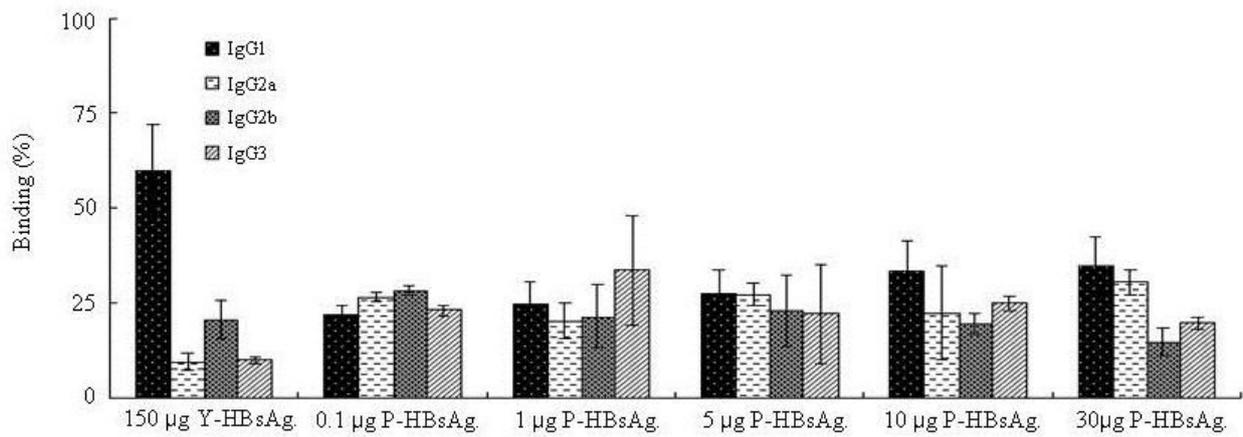


Fig. 10 IgG subclasses (10 weeks after the last immunization) of pooled sera from BALB/c mice immunized orally with various dosages (amounts per dose are indicated on the x axis) of P-HBsAg and 150 ug of Y-HBsAg as a positive control. The data are presented as a percent distribution of IgG subclasses in the total IgG response.

는 경향을 찾기 어려웠다. 형질전환되지 않은 감자 대조구에서는 어떠한 형태의 IgG도 검출되지 않았다.

(라) M cell uptake

감자-유래 HBsAg 항원의 M cell uptake를 알아보기 위하여 형질전환 감자와 일반 대조구 감자를 마우스의 Peyer's patches를 포함하는 small intestine loop에 적용시켰다. 염색학적 분석에 의하면 두 시료 처리군 모두에서 Ulex-europaeus agglutinin 1 (UEA-1)-positive M cell이 보여진 반면, HBsAg 특이적인 M cell은 형질전환 감자 적용군에서만 검출이 되었다. 위의 immunization 실험이 진행되는 동안 마우스들은 모두 생존하였으며 몸무게 증가 역시 일반사료에 의해 정상적으로 사육된 쥐와 동일한 수준을 보였다. 이로서 HBV발현 형질전환 감자의 투여는 투여양에 관계없이 쥐의 생육에 부정적인 영향을 미치는 효과는 나타내지 않았음을 알 수 있었다.

3. 식물세포 소기관 및 2차 대사 성분에 의한 아췌번트 가능성에 대한 평가

일부 연구들에 의하면 식물세포 성분이 면역 증강 효과를 보여준다고 한다. 예를 들면, 인삼의 사포닌은 그 자체로 약효가 있을 뿐 아니라 면역증강제 또는 보조제로서의 역할도 훌륭히 해내는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 식물은 다양한 이차대사산물을 생산하는데 이들이 면역반응에 있어 보조제 내지는 증강제 역할을 한다는 연구자들의 추론이 있다. 본 연구에서 실험 동물 쥐는 위에서 언급한 administration protocol을 따랐으며 기존에 사용하였던 콜레라 특신(CTB) 이외에 다른 면역 유도 실험에서 효과를 보였던 oligonucleotides containing immunostimulatory CpG를 추가로 사용하였다. 또한 감자추출물에 대한 효능도 알아보려고 하였다. 실험결과 CTB의 효과가 가장 좋았으며 (650.13 ± 97.76 mIU) 아췌번트를 병행하지 않은 처리구가 면역유도 값이 낮았다 (367.88 ± 80.86 mIU). 반면 감자 추출액-아췌번트의 경우 (515.28 ± 57.34 mIU), CpG를 사용한 면역 유도값(528.48 ± 60.10 mIU)과 유사한 결과를 보였다. 면역하지 않은 대조구에서는 거의 값의 변화가 없었다. Fecal IgA 분석결과 IgG와 유사한 경향을 보였으나 면역하지 않은 처리구를 제외한 모든 실험군에서 값의 큰 차이가 보여지지 않았다.

이상의 결과 식물 extract를 이용한 아췌번트 효과는 인정이 되지만, 명확한 실험을 위해서는 다양한 식물 extract를 이용하여 실험을 수행하여야 할 것으로 보여진다.

4. 식물세포벽이 가질 것으로 예상되는 항원 분해의 보호 기작에 대한 연구

식물-유래 항원의 투여 형태에 따라 경구투여시의 위장에서의 분해 정도를 비교 분석해 보려고 하였다. 위산에 의한 분해 기작을 동물실험에 의하여 알아보기에는 현 실험 수준이 무리가 있다고 판단되어 식물-유래 항원을 TSP 수준으로 추출한 후 용액의 산도를 달리하여 그 항원성을 유지하는지 여부를 알아보았다. 그 결과 감자-유래 HBsAg 항원은 pH4.0정도에서 약 70% 정도의 효과를 유지하는 것으로 파악되었고 pH11.0의 추출버퍼에서도 그 항원성이 약간 감소하고 유지되는 것을 알 수 있었다.

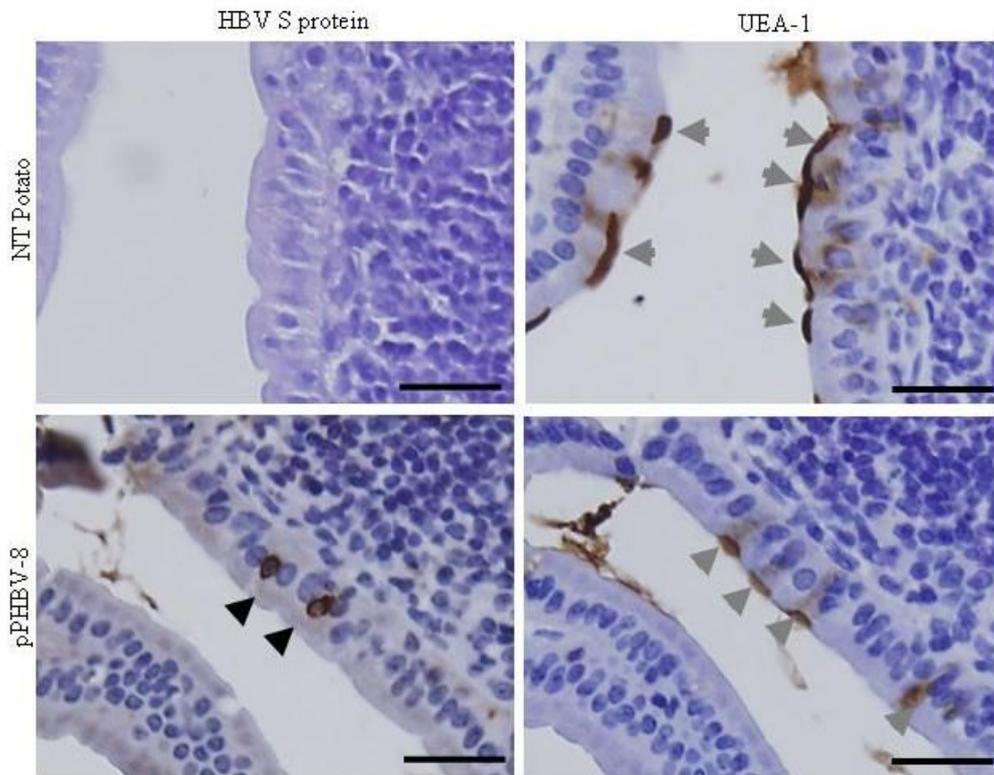


Fig. 11 Effective uptake of P-HBsAg by M cells for the induction of an antigen-specific immune response in mice. P-HBsAg was administered into a small intestine loop including the PPs. The HBsAg S proteins were taken up by UEA-1-positive M cells (gray arrows).

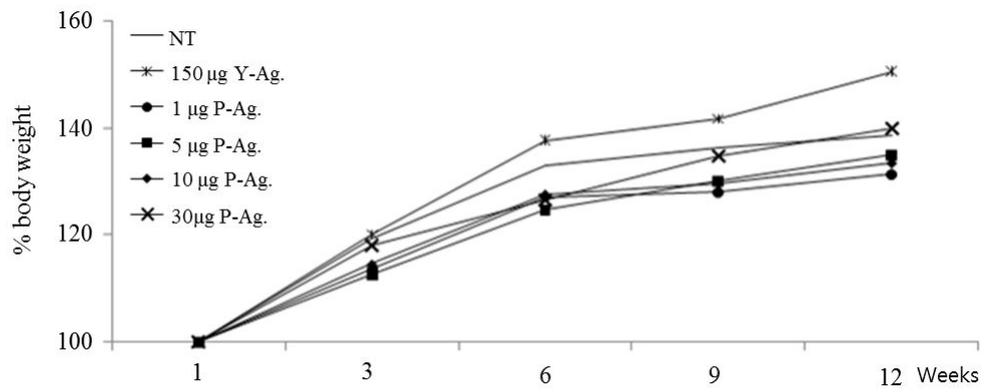


Fig. 12. 항원dosage에 따른 면역반응 변화 비교 실험동안의 쥐의 몸무게 변화 관찰

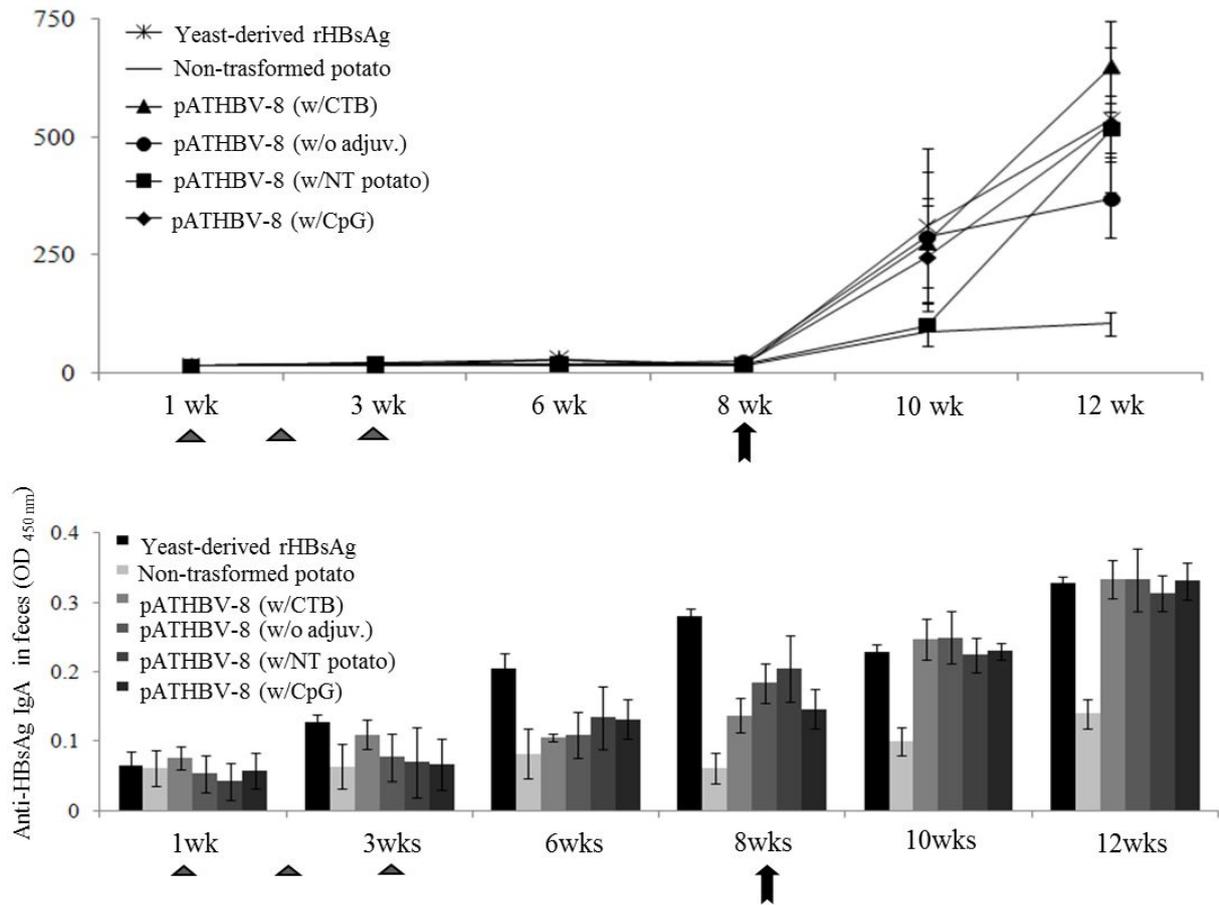


Fig. 13 Immune response to potato-derived HBs Ag with different adjuvant (\blacktriangle -CTB, \bullet -without adjuvant, \square -potato extract, \blacklozenge -CpG). CT (650.13 ± 97.76 mIU) or CpG (528.48 ± 60.10 mIU) adjuvants had higher specific IgG antibody responses than either control potato extracts mixture (515.28 ± 57.34 mIU) or transgenic potato extracts only (367.88 ± 80.86 mIU) at 12 weeks

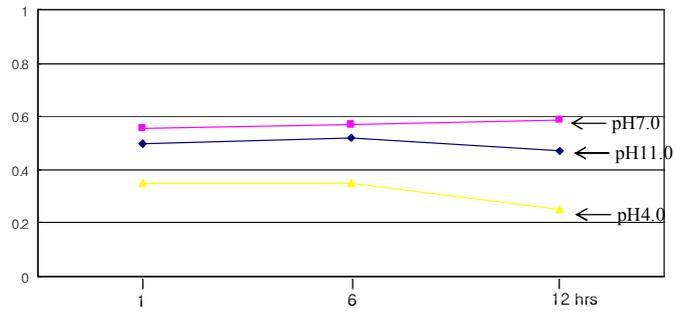


Fig. 14 Effect of extraction buffer pH on the HBsAg antigenicity. pHs 4.0, 7.0, or 11.0 were applied in this experiment

5. 품종 등록을 위한 HBV 항원 단백질 발현 감자의 동등성 비교 실험

가. 생육 및 발달 형질의 비교 분석

식물-유래 경구용 백신 개발을 위한 GM 식물의 경우, 품종등록을 위한 요건에는 크게 LMO 법률 시행에 따른 위해성평가를 완료한 심사서 작성이 이루어져야 하며, 백신이라는 의약품 등록을 위해서는 의료용 형질전환 작물의 평가시스템 (약사법 시행규칙, 생물학적 제제 고시)을 갖추어야 한다. 즉, 위해성 평가에는 인체위해성평가 (알레르기성 및 독성 등), 유전자 특성 평가 (도입유전자 위치, 발현 및 실질적 동등성 등), 환경위해성평가 (유전자 이동, 잡초화/침입가능성, 비표적 생물체 등)에 관한 심사의뢰서 작성을 연구자가 직접 수행하여 종자원에 제출하여야 한다. 이와 더불어서 식물 개발 목적이 백신개발이기 때문에 식약청에서 제시하는 가이드라인 또한 준수하여야 한다. 즉, 비임상 약리독성에 관한 자료 (약리자료, 약동학적 자료, 독성자료 등), 임상약동학 및 약력학에 관한 자료 (생물약제학적 자료, 생체시료를 이용한 약동학 시험보고서, 임상 약동학 시험보고서, PK/PD를 포함한 임상약력학 시험보고서), 품질에 관한 자료, 및 임상시험에 관한 자료 (치료적 탐색임상시험, 치료적 확증임상시험)에 관한 자료 역시 시험자가 제출하여야 한다.

이러한 까다로운 조건과 절차에 의해 식물의 형질전환 시스템에 의한 의료용 단백질 생산은 시장 진입이 보다 더 장기적인 기간을 요할 것이라 본다. 따라서 제안하건데, 포장재배로 이어지지 않는 기내배양 시스템이나 환경이 완전 제어된 온실재배를 통한 식물-백신 생산은 환경위해성에 대한 평가 항목을 대폭 축소하는 등의 새로운 가이드 라인의 확립이 필요하며 이를 위한 여러 연구자의 의견 제시가 절실히 필요하다고 본다. 또한 영양번식작물의 경우, 1 copy/inetrgenic과 같은 기준을 굳이 적용시킬 필요가 없다고 보는데 즉, 후대 분리가 일어나지 않고 안정적인 유전자 발현이 이루어지는 점을 고려한 기준 제시가 필요하다고 판단된다.

먼저, 앞의 내용에서 보고된 유전자 삽입 위치와 발현에 따른 특성 평가에 이어 이번 내용에서는 재배를 통한 외형적 분석 및 생산성 등 주요 형질의 실질적 동등성을 보고자 하였다. 일반 감자와 형질전환 elite 감자와의 생육조사를 통하여 재배상의 실질적 동등성에서는 온실 재식 후 어린 식물체의 길이 생장 비교, 수확시의 감자 식물체 전체 길이 비교, 뿌리 생장 비교를 위한 뿌리 총길이의 비교, 그리고 수확 후 감자 지상부의 무게 비교를 실시하였다. 그림에서 보는 바와 같이 두 비교군 간의 차이는 나타나지 않았으며, 단지 반복간의 차이로 인하여 오차를 발생시켰다. 다음은 수확 특성 비교를 통한 실질적 동등성에서는 수확한 감자의 개별 평균 무게 및 식물체 주당 평균 감자 수를 알아보았다. 역시 비교군간의 차이는 나타나지 않았다. 전체적인 생육 패턴 분석에서 사진에서 보여지는 바와 같이 생장점 부분의 비교분석 및 잎의 외형상 비교 분석을 통한 형질전환 감자 식물체의 외형적 동등성을 확인하였다.

이상의 결과, 온실내에서의 재배에 의하여 일반적인 생육상의 차이점은 발견되지 않았으며, 생육초기의 어린 식물체의 크기, 완전히 다 자란 식물체의 길이, 뿌리 발달 상태 등 대조군과 동등한 생육을 보였다. 또한 감자 괴경의 수확에서 주당 괴경의 개수 및 무게, 형태적인 모양에서 유의성 있는 차이를 발견하지 못하였다. 잎의 세부적인 관찰을 통하여 잎의 모양, 잎나기 등도 동일하였으며 생장점 부위에서도 유의성 있는 차이를 발견하지 못하였다.

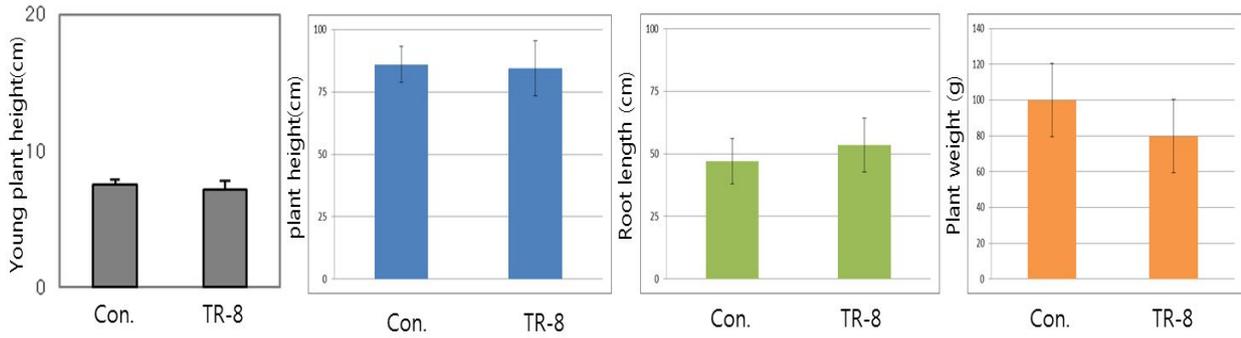


Fig. 15 형질전환 elite 개체의 재배 외형상 비교를 통한 실질적 동등성 비교. (a) 온실재식 후 어린 식물체의 길이 성장 비교. Con., 형질전환 하지 않은 대조 감자 식물체, TR-8, 유전자 분석 및 효능 평가를 마친 형질전환 elite개체. (b) 수확시의 감자 식물체 전체 길이 비교. (c) 뿌리 성장 비교를 위한 뿌리 총길이의 비교. (d) 수확 후 감자 지상부의 무게 비교

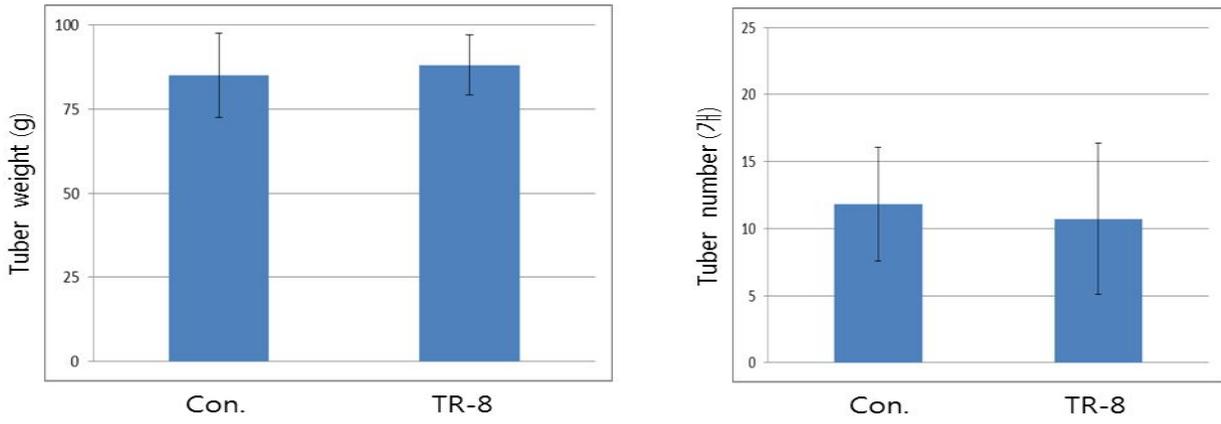


Fig. 16 형질전환 elite 개체의 수확 특성 비교를 통한 실질적 동등성 비교. Con., 형질전환 하지 않은 대조 감자 식물체, TR-8, 유전자 분석 및 효능 평가를 마친 형질전환 elite개체. 수확한 감자의 개별 평균 무게 (좌) 및 식물체 주당 평균 감자 수 (우)

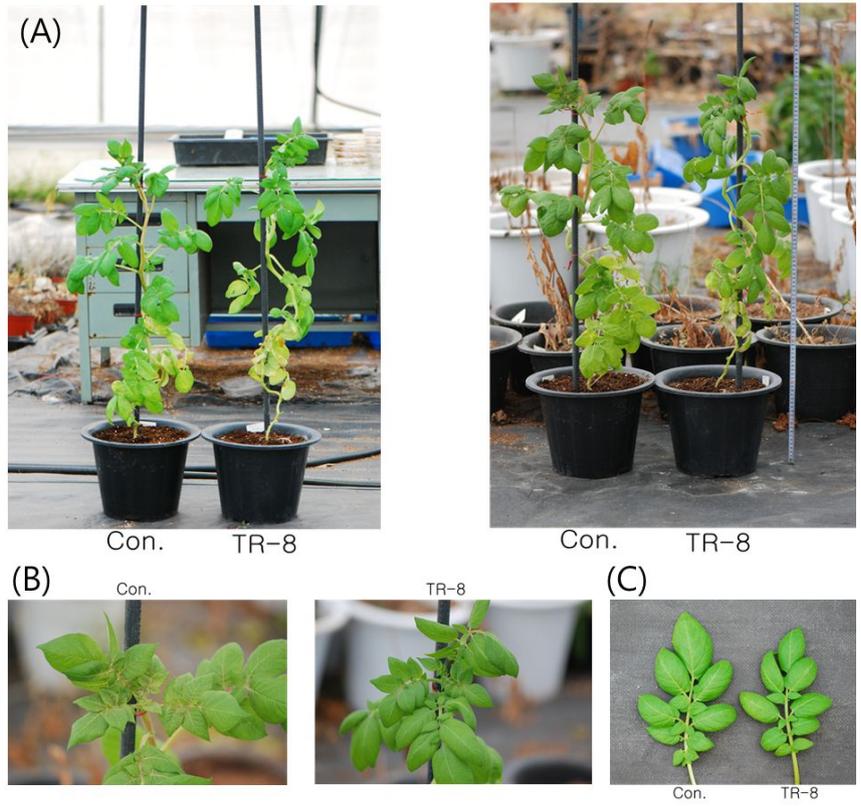


Fig. 17 전체적인 생육 패턴 분석 (a), 성장점 부분의 비교분석 (b), 및 잎의 외형상 비교 분석(c)을 통한 형질진환 감자 식물체의 외형적 동등성 비교

6. HBV 발현 형질전환 감자의 경구투여에 의한 독성 검사

형질전환감자추출물(HBV potato extract)의 랫드를 이용한 반복 경구투여 독성시험 시험물질인 형질전환 감자추출물(HBV potato extract)의 반복 경구투여에 의한 독성을 비형질전환감자 추출물(Potato extract)과 비교하기 위하여 각 군당 암수 5마리씩으로 구성된 SD 계통의 랫드를 부형제대조군, 비형질전환 감자추출물 및 형질전환 감자추출물 투여군으로 나누어 각각 0 및 4000 mg/kg/day의 용량으로 주 2회 3주간(총 6회 투여) 경구 투여하였다. 최종투여 4일 후에 모든 동물에 대하여 계획도살을 실시하였다. 시험방법으로 동물의 사망률과 일반증상 관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안검사, 뇨검사, 혈액학적검사, 혈액생화학적검사, 부검소견 관찰, 장기중량측정 및 조직병리학적 검사를 실시하였다.

가. 시험 재료 및 방법

시험에 사용된 랫드는 특정병원체부재(SPF) Sprague-Dawley 랫드[CrI:CD(SD)]로서 (주) 오리엔트 바이오에서 공급받았다. 약 5주령된 수컷 15마리, 역시 약 5주령된 15마리로 시작하였다. 동물을 입수할 때 외관을 육안적으로 검사한 후, 14일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키면서 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

나. 투여량 설정 및 시험군의 구성

다음과 같이 구성하였다.

군	시험물질	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액 (mL/kg)	투여량 (mg/kg)
G1	부형제	Male	5	1 - 5	20	0
		Female	5	16 - 20		
G2	비형질전환 감자추출물	Male	5	6 - 10	20	4000
		Female	5	21 - 25		
G3	형질전환 감자추출물	Male	5	11 - 15	20	4000
		Female	5	26 - 30		

동물의 군분리는 다음과 같이 실시하였다. 우선, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정한 후 Path/Tox System(Version 4.2.2, Xybion Medical Systems Corporation, New Jersey, USA)에서 제공하는 알고리즘을 이용하여 분배하였다. 동물의 개체식별은 미부표식법 및 tail tattoo 그리고 사육상자별 케이지 카드로 실시하였다.

다. 시험물질 및 대조물질의 조제 및 투여

1) 시험물질 및 대조물질의 조제

시험물질이 들어있는 용기에 주사용증류수를 가하여 현탁 또는 용해 조제하였으며, 시험물질은 각 투여 전날에 조제하여 냉장보관 후 각 투여일에 투여하였다.

2) 조제 시험물질의 안정성, 균질성 및 함량시험

본 시험에서 조제시험물질에 대한 분석은 실시하지 않았다.

3) 투여경로 및 투여방법

주사기가 장착된 경구투여용 존데를 이용하여 시험물질을 흡인하여 시험동물에 경구 투여하였다.

4) 투여경로 선택이유

본 시험물질에 대한 사람에서의 임상적용 예정경로로서 경구투여를 선택하였다.

5) 투여기간 및 투여횟수

시험물질은 주 2회 3주간 정해진 시험물질 투여일 08:00~17:00시 사이에 경구 투여하였다.

6) 투여액량 계산

1일 투여액량은 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 Path/Tox System에서 체중 kg당 20 mL로 계산하여 출력된 값을 사용하였다.

라. 관찰 및 검사항목

(1) 일반증상 및 사망동물의 관찰

순화기간 중에는 매일 1회, 투여기간 중에도 매일 1회(투여 후 2시간 이내)로 일반증상 및 사망 유무에 대하여 관찰하였고, 이상이 있을 경우에는 증상의 종류, 발현일 및 빈도에 따라 증상의 정도를 Path/Tox System (version 4.2.2, Xybion Medical Systems) 또는 관찰기록지를 이용하여 기록하였다.

(2) 체중측정

각 동물의 체중은 입수시, 군분리시 그리고 투여기간중에는 투여개시 후 3주까지 약 주 1회씩 및 부검일에 측정하였다.

(3) 사료섭취량 측정

사료섭취량은 투여개시 후 3주까지 약 주 1회씩 측정하였으며, 사육상자별로 측정일에 정량을 급여하고 익일에 잔량을 측정하여 케이지당 개체별 일일섭취량(g/animal/day)을 산출하였다.

(4) 안검사

투여기간에는 암수전례에 대하여 부검 1주일 이내에 눈의 외관을 육안적으로 관찰한 다음 양안간 접안저검사기(IO-H, Neitz Instrument Co. 또는 Vantage Plus Digital, Keeler Ltd.)를 이용하여 안저를 관찰하였다.

(5) 뇨검사

계획도살일에 암수전례에 대하여 약 17시간의 뇨를 채취하여 아래의 항목에 대하여 검사하였다.

Items

- Urine volume (Vol)
 - Specific gravity (SG)
 - pH
 - Protein (PRO)
 - Ketone body (KET)
 - Occult blood (BLO)
 - Glucose (GLU)
 - Bilirubin (BIL)
 - Nitrite (NIT)
 - Urobilinogen (URO)
 - Color (COL)
 - Sediment : cast, epithelial cell(EPI), erythrocyte(RBC), leucocyte (WBC)
-

노량 및 노침사를 제외한 모든 항목은 뇨 시험지(Multistix, Bayer) 및 뇨자동분석장치 (CliniTek-500, Bayer)를 이용하여 측정하였다. 노침사는 현미경검사를 실시하였다. 노량은 채뇨관의 눈금을 육안으로 측정하였다.

(6) 혈액학적검사

최종 계획도살되는 동물들에 대하여 부검 및 채혈전에 하룻밤 절식시켰으며, 혈액검체는 isofluorane 마취하에 후대정맥으로부터 채혈하였다. 혈액 응고방지제로 EDTA-2K를 이용하였다. 혈액학적 측정 항목은 다음과 같다.

Items

- White blood cell count (WBC)
 - Red blood cell count (RBC)
 - Hemoglobin concentration (HGB)
 - Hematocrit (HCT)
 - Mean corpuscular volume (MCV)
 - Mean corpuscular hemoglobin (MCH)
 - Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)
 - Platelet (PLT)
 - Differential leucocyte count
neutrophils: NEU%, lymphocytes: LYM%,
monocytes: MON%, eosinophils: EOS%,
basophils: BAS%, large unstained cells: LUC%)
 - Reticulocyte (RET%)
 - Prothrombin time (PT)
 - Activated partial thromboplastin time (APTT)
-

PT와 APTT를 제외한 모든 항목은 혈구자동계측장치(ADVIA120 Hematology system Bayer, USA)를 이용하여 검사하였다. PT 및 APTT는 채혈한 혈액의 일부를 3.2% sodium citrate로 처리 후 혈액응고분석기(ACL 9000, Instrumentation Laboratory, Italy)를 이용하여 측정하였다.

(7) 혈액생화학적 검사

최종 계획도살되는 동물들에 대하여 혈액학적 검사와 같은 방법으로 후대정맥에서 채혈한 혈액을 혈청분리관에 넣은 다음 약 1.5시간 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 이렇게 얻은 혈청을 이용하여 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 측정항목은 다음과 같다.

Items
· Aspartate aminotransferase (AST)
· Alanine aminotransferase (ALT)
· Alkaline phosphatase (ALP)
· Blood urea nitrogen (BUN)
· Creatinine (CREA)
· Glucose (GLU)
· Total cholesterol (TCHO)
· Albumin/globulin ratio (A/G)
· Total protein (TP)
· Albumin (ALB)
· Creatine kinase (CK)
· Triglyceride (TG)
· Total bilirubin (TBIL)
· Phospholipid (PL)
· Gamma Glutamyl transferase (GGT)
· Calcium (Ca)
· Inorganic phosphorus (IP)
· Chloride (Cl)
· Sodium (Na)
· Potassium (K)

상기의 항목에 대해서는 혈액생화학자동분석장치 (Toshiba 200FR NEO, Toshiba Co., Japan)를 이용하여 검사하였다.

(8) 부검조건

계획도살일에 모든 동물에 대하여 하룻밤 절식시킨 후 isoflurane 마취 하에 후대정맥에서 혈액 및 혈액생화학검사를 위한 채혈을 실시하였고, 복대동맥을 절단하여 방혈하는 방법으로 절박도살을 한 다음 부검하였다. 부검동물에 대하여 부검조건을 관찰하고 장기를 고정하였다.

(9) 장기중량측정

부검 후 모든 동물에 대하여 아래 장기의 절대장기중량을 전자저울을 이용하여 측정하였고, 부검 전 절식된 체중에 대한 상대장기중량을 산출하였다.

뇌, 뇌하수체, 부신, 간, 비장, 신장, 심장, 흉선, 폐 (기관지), 타액선 (악하선, 설하선), 갑상선(부갑상선), 고환, 부고환, 정낭, 전립선, 자궁 (자궁경부 포함), 난소(난관 포함)

(10) 조직고정 및 조직병리검사

투여한 모든 동물에서 얻은 아래의 장기 가운데 고환 및 부고환과 안구를 제외한 모든 장기를 10% 중성완충포르말린액에 고정하였으며, 고환 및 부고환은 Bouin액에, 안구(시신경)는

Davidson액에 고정하였다. 또한, 아래의 장기에 대하여 파라핀 포매, 박절 및 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 하여 조직병리검사를 실시하였다.

모든 육안적 병변, 정낭, 전립선, 방광, 고환, 부고환, 난소 (난관 포함), 자궁 (경부), 질, 비장, 췌장, 장간막임파절, 위, 십이지장, 회장, 맹장, 결장, 신장, 부신, 간, 타액선(악하선, 설하선), 하악임파절, 갑상선(부갑상선), 흉선, 심장, 폐(기관지), 대퇴골(조인트, 골수), 흉척수, 뇌, 뇌하수체, 안구(시신경)

마. 통계학적 방법

부형제투여군과 비형질전환 감자추출물 투여군, 부형제투여군과 형질전환 감자추출물투여군, 또는 비형질전환 감자추출물 투여군과 형질전환 감자추출물 투여군 각각에 대한 통계분석을 위해 Bartlett 법으로 등분산 검정을 실시하여 유의성이 인정되지 않을 경우에는 T-test를 유의 수준 $\alpha=0.05$ 로 검정하였다. 검정결과 유의성이 인정된 경우에만 Dunnett test를 실시하였다. Bartlett 법에서 유의성이 인정된 경우에는 부등분산으로서 non-parametric 통계학적 방법에 이용되는 Kruskal -Wallis(H) 검정을 유의수준 $\alpha=0.05$ 로 검정하여 유의성이 인정된 경우에만 두 군간에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 Dunn's Rank Sum test를 실시하였다. 출현율 및 백분비에 대하여는 Fisher exact test를 이용하여 군간의 유의차를 조사하였다. 이러한 분석은 당 연구소에 사용하고 있는 GLP 독성시험용 전산프로그램인 Path/Tox System (version 4.2.2, Xybion Medical Systems Corp., USA) 을 이용하여 실시하였다. 검정의 위험율은 5% 및 1%로 하였다.

바. 실험결과

(1) 사망률 (Table 1, Appendix 1)

시험기간중 암수 모든 군에서 사망동물은 관찰되지 않았다.

(2) 일반증상 (Tables 2-1, 2-2, Appendix 2)

일반증상을 관찰한 결과, 암수 모든 군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

(3) 체중변화 (Figures 1, 2, Table 3, 4, Appendix 3)

체중변화를 측정된 결과, 암수 모든 군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

(4) 사료섭취량 (Table 4, Appendix 4)

사료섭취량 측정결과, 암수 모든 군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

(5) 안검사 (Table 5, Appendix 5)

안검사결과, 암수 모든 군에서 시험물질 투여와 관련된 소견은 관찰되지 않았다.

한편, 수컷의 경우, 각막얼룩(cornea spot)이 모든 투여군에서 각각 1례씩 관찰되었다. 암컷의 경우, 부형제대조군에서 홍채종창(iris swelling)이 1례 관찰되었다.

(6) 뇨검사 (Table 6, Appendix 6)

뇨검사 결과, 암수 모든 군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다. 한편, 비형질전환 감자추출물 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 뇨량이 감소하였다.

(7) 혈액학적 검사 (Table 7, Appendix 7)

혈액학적 검사결과, 암수 모든 군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

한편, 수컷의 경우, 형질전환 감자추출물 투여군에서 platelet(PLT)의 감소가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 관찰되었다. 암컷의 경우, 형질전환 감자추출물 및 비형질전환 감자추출물 투여군에서 neutrophil percentage(NEU%), eosinophil percentage(EOS%)의 감소 및 lymphocyte percentage(LYM%)의 증가가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 관찰되었다.

(8) 혈액생화학적 검사 (Table 8, Appendix 8)

혈액생화학적 검사결과, 암수 모든 군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

한편, 수컷의 경우, 형질전환 감자추출물 투여군에서 albumin(ALB)의 증가가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 관찰되었다. 암컷의 경우, 형질전환 감자추출물 투여군에서 creatinine(CREA), total bilirubin(TBIL)의 감소가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 관찰되었다. 또한 형질전환 감자추출물 투여군에서 creatinine(CREA)의 감소 및 aspartate aminotransferase(AST) 증가가 비형질전환 감자추출물 투여군에 비하여 통계학적으로 유의하게 관찰되었다.

(9) 부검소견 (Table 9, Appendix 9)

부검결과, 암수 모든 군에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

한편, 수컷의 경우 부형제대조군에서 게실(diverticulum)이 1례 관찰되었다. 암컷의 경우, 형질전환 감자추출물 투여군에서 신장의 종대(enlarged spleen)가 2례 관찰되었다.

(10) 장기중량 (Tables 10, 11, Appendix 10)

장기중량 측정결과, 암수 모든 군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

한편, 수컷의 경우, 형질전환 감자추출물 투여군에서 갑상선 및 부갑상선 절대중량의 감소가 비형질전환 감자추출물 투여군에 비하여 통계학적으로 유의하게 관찰되었다.

한편, 암컷의 경우, 형질전환 감자추출물 투여군에서 폐의 절대중량의 증가, 형질전환 감자추출물 및 비형질전환 감자추출물 투여군에서 자궁의 절대 및 상대중량의 감소 및 난소의 절대중량 증가가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 관찰되었다. 또한 형질전환 감자추출물 투여군에서 부신의 절대 및 상대중량의 증가가 비형질전환 감자추출물 투여군에 비하여 통계학적으로 유의하게 관찰되었다.

(11) 조직병리학적 검사 (Table 12, Appendix 11-1)

조직병리학적 검사결과, 암수 모든 군에서 시험물질 투여와 관련된 소견은 관찰되지 않았다.

관찰된 조직병리학적 소견들은 이 주령의 랫드에서 자연발생적 또는 우발적으로 관찰되는 소견들로 시험물질 투여와 무관한 변화로 판단된다.

사. 고찰 및 결론

시험물질인 형질전환 감자추출물(HBV potato extract)의 반복 경구투여에 의한 독성을 비형질전환 감자추출물과 비교하기 위하여 각각 4000 mg/kg/day의 용량으로 주 2회 3주간(총 6회 투여) 경구 투여하여 사망률, 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안검사, 뇨검사, 혈액학적검사, 혈액생화학적검사, 부검소견 관찰, 장기중량측정 및 조직병리학적 검사를 실시하였다.

시험결과, 본 시험에서 모든 측정항목에 있어서 시험물질 투여와 관련된 것으로 사료되는 이상소견이나 변화는 관찰되지 않았다. 한편 뇨검사, 혈액 및 혈액생화학적 검사에서 관찰된 통계학적으로 유의한 변화는 그 변화의 정도(severity)가 작거나 암·수 모두에서 관찰되지 않아 시험물질에 기인한 변화나 소견이 아닌 우발적인 것으로 판단되었다.

장기중량측정항목에서 관찰된 암컷 형질전환 감자추출물 및 비형질전환 감자추출물 투여군의 자궁 무게의 절대 및 상대중량 감소 및 난소의 절대 및 상대중량 증가는 상관성 있는 조직병리학적 소견이 관찰되지 않았고, 부형제 대조군에서 높은 빈도로 관찰된 발정전기(proestrus)와 관련되어 생식기의 발정 주기(estrus cycle)의 차이에 의한 것으로 판단된다. 그 외 다른 장기에서 관찰된 장기중량의 변화는 그 변화 정도가 작거나 암·수 모두에서 관찰되지 않아 시험물질에 기인한 변화나 소견이 아닌 우발적인 것으로 판단되었다.

또한 안검사에서 관찰된 수컷 모든 투여군의 각막얼룩 및 부형제대조군 암컷의 홍채종창, 부검소견에서 관찰된 부형제대조군 수컷의 게실 및 형질전환 감자추출물 투여군 암컷의 신장의 종대, 그리고 조직병리학적 소견들은 이 주령의 랫드에서 자연발생적 또는 우발적으로 발생하는 변화들로 시험물질 투여와 무관한 변화로 판단된다.

결론적으로, SD 계통의 암수 랫드에 형질전환 감자추출물을 각각 4000 mg/kg/day의 용량으로 주 2회 3주간(총 6회 투여)반복 경구 투여하여, 사망률과 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안검사, 뇨검사, 혈액학적검사, 혈액생화학적검사, 부검소견 관찰, 장기중량측정 및 조직병리학적 검사를 실시한 결과, 모든 투여군에서 투여와 관련한 소견이나 변화는 관찰되지 않았으며, 또한 비형질전환 감자추출물 투여군과 형질전환 감자추출물 투여군과의 독성학적 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 형질전환 감자추출물의 독성용량은 암수 모두 4000 mg/kg/day 이상으로 사료된다.

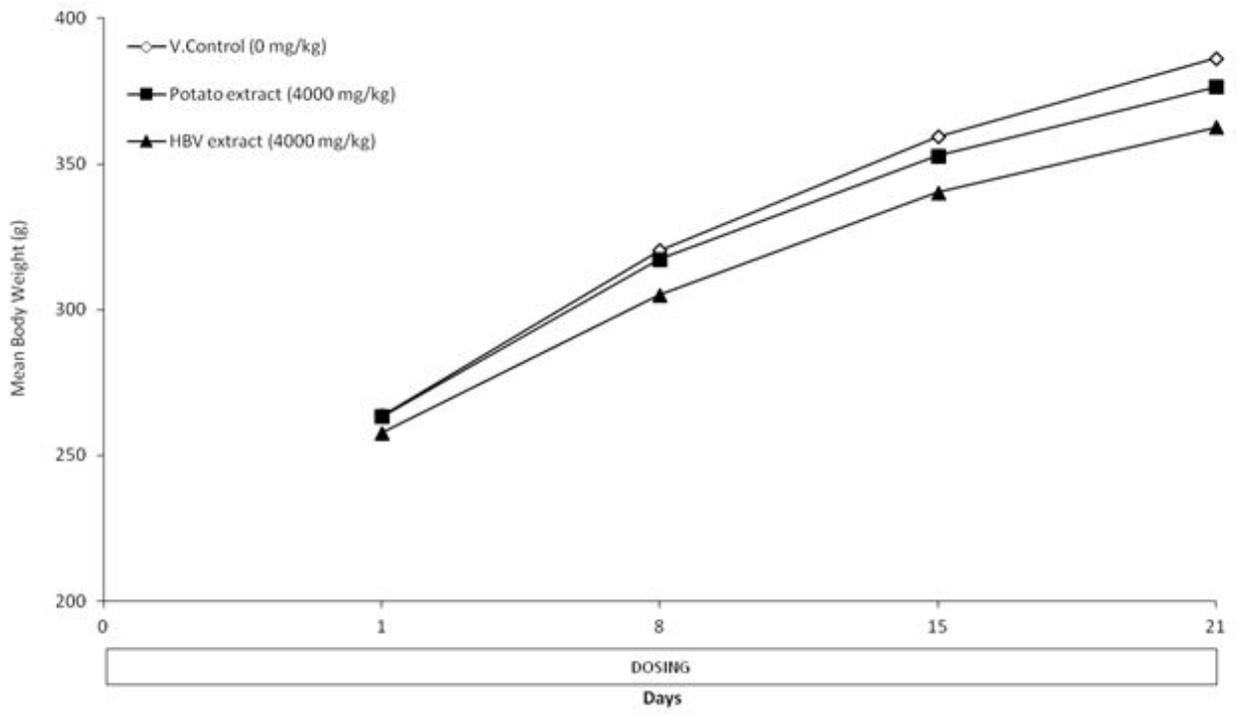


Fig. 18 Mean Body Weights of Male

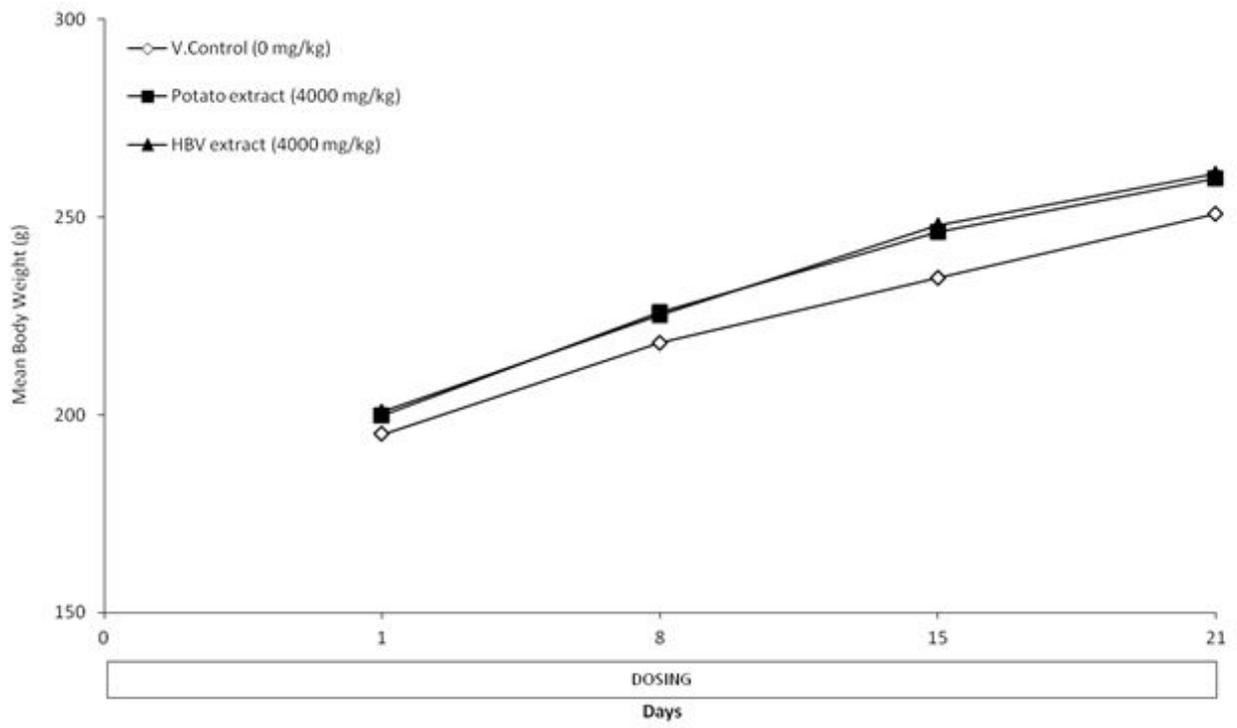


Fig. 19 Mean Body Weights of Female

Table 1 Mortality (Group Summary)..

Group Summary of Mortality					
STUDY : N11060					SEX : MALE
Dose (mg/kg)	DOSING PHASE				Final Mortality..
	1 DAY	≤1 WEEK	≤2 WEEKS	≤3 WEEKS	
0	0	0	0	0	0/5..
4000	0	0	0	0	0/5..
4000	0	0	0	0	0/5..

Table 1(Continued) Mortality (Group Summary)..

Group Summary of Mortality					
STUDY : N11060					SEX : FEMALE
Dose (mg/kg)	DOSING PHASE				Final Mortality..
	1 DAY	≤1 WEEK	≤2 WEEKS	≤3 WEEKS	
0	0	0	0	0	0/5..
4000	0	0	0	0	0/5..
4000	0	0	0	0	0/5..

Table 2-1 Summary of Clinical Signs (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE							
Dosing							
STUDY : N11060				SEX : MALE			
GROUP:	V. Control		Potato extract		HBV extract		
DOSE : (mg/kg)	0		4000		4000		
No. of animals	5		5		5		
	#	(%)	#	(%)	#	(%)	
Normal							
No Abnormalities Detected	5	100.00	5	100.00	5	100.00	

Table 2-1(Continued) Summary of Clinical Signs (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL OBSERVATION INCIDENCE							
Dosing							
STUDY : N11060				SEX : FEMALE			
GROUP:	V. Control		Potato extract		HBV extract		
DOSE : (mg/kg)	0		4000		4000		
No. of animals	5		5		5		
	#	(%)	#	(%)	#	(%)	
Normal							
No Abnormalities Detected	5	100.00	5	100.00	5	100.00	

Table 2-2 Clinical Findings (Group Summary)

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE Dosing			
STUDY : N11060		SEX : MALE	
GROUP: PERIOD DOSE:(mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
1 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
2 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
3 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
4 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
5 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
6 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
7 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
8 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
9 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
10 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
11 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
12 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
13 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
14 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
Number of Animals with Sign/Total Number of Animals Observed			

Table 2-2(Continued) Clinical Findings (Group Summary)

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE Dosing			
STUDY : N11060		SEX : MALE	
GROUP: PERIOD DOSE:(mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
15 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
16 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
17 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
18 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
19 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
20 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
21 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
22 DAY			
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5
Number of Animals with Sign/Total Number of Animals Observed			

Table 2-2 (Continued) Clinical Findings (Group Summary)

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE				
Dosing				
STUDY : N11060		SEX : FEMALE		
GROUP:	V. Control	Potato extract	HBV extract	
PERIOD DOSE: (mg/kg)	0	4000	4000	
1 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
2 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
3 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
4 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
5 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
6 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
7 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
8 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
9 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
10 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
11 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
12 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
13 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
14 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	

Number of Animals with Sign/Total Number of Animals Observed

Table 2-2 (Continued) Clinical Findings (Group Summary)

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE				
Dosing				
STUDY : N11060		SEX : FEMALE		
GROUP:	V. Control	Potato extract	HBV extract	
PERIOD DOSE: (mg/kg)	0	4000	4000	
1 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
2 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
3 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
4 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
5 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
6 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
7 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
8 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
9 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
10 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
11 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
12 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
13 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	
14 DAY				
No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	

Number of Animals with Sign/Total Number of Animals Observed

Table 3 Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Dosing				
STUDY : N11060		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
DAY 1	MEAN	263.8	263.4	257.7
Dosing	S.D.	9.02	9.11	6.11
	N	5	5	5
DAY 8	MEAN	320.5	317.4	305.2
Dosing	S.D.	14.84	17.49	11.46
	N	5	5	5
DAY 15	MEAN	359.4	352.8	340.2
Dosing	S.D.	17.18	25.34	12.84
	N	5	5	5
DAY 21	MEAN	386.4	376.5	362.7
Dosing	S.D.	18.73	36.17	13.40
	N	5	5	5

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst:NSg-05/T-test:NSg-05/No unplanned test performed

Table 3 (Continued) Body Weights (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)				
Dosing				
STUDY : N11060		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
DAY 1	MEAN	195.1	199.9	200.8
Dosing	S.D.	4.39	6.58	7.70
	N	5	5	5
DAY 8	MEAN	218.1	226.0	225.2
Dosing	S.D.	9.52	11.75	7.95
	N	5	5	5
DAY 15	MEAN	234.7	246.2	247.9
Dosing	S.D.	12.53	13.61	13.22
	N	5	5	5
DAY 21	MEAN	250.8	259.7	260.9
Dosing	S.D.	8.10	11.40	12.50
	N	5	5	5

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst:NSg-05/T-test:NSg-05/No unplanned test performed

Table 4 Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : N11060		SEX : MALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
DAY 2	INTAKE (g)	30.6	30.5	28.6
Dosing	S.D.	1.79	1.35	2.91
	N	5	5	5
DAY 9	INTAKE (g)	31.1	28.1	29.0
Dosing	S.D.	2.58	1.37	2.89
	N	5	5	5
DAY 16	INTAKE (g)	32.1	28.2	28.9
Dosing	S.D.	2.39	2.78	4.11
	N	5	5	5
DAY 21	INTAKE (g)	28.9	27.8	27.3
Dosing	S.D.	3.28	3.25	1.28
	N	5	5	5

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst: NSg-05/T-test: NSg-05/No unplanned test performed

Table 4 (Continued) Food Consumption (Group Summary)

SUMMARY OF FOOD CONSUMPTION (g/animal/day)				
STUDY : N11060		SEX : FEMALE		
PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
DAY 2	INTAKE (g)	21.0	21.5	19.3
Dosing	S.D.	1.26	1.51	1.86
	N	5	5	5
DAY 9	INTAKE (g)	24.7	23.3	24.1
Dosing	S.D.	3.59	1.94	2.60
	N	5	5	5
DAY 16	INTAKE (g)	23.8	22.8	25.9
Dosing	S.D.	3.40	3.00	3.42
	N	5	5	5
DAY 21	INTAKE (g)	23.8	23.8	25.1
Dosing	S.D.	3.80	1.57	1.45
	N	5	5	5

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst: NSg-05/T-test: NSg-05/No unplanned test performed

Table 5 Ophthalmologic Findings (Group Summary)

SUMMARY OF OPHTHALMOLOGIC FINDINGS							
STUDY : N11060			SEX : MALE				
GROUP:		V. Control	Potato extract	HBV extract			
DOSE: (mg/kg)		0	4000	4000			
		#	(%)	#	(%)	#	(%)
DAY 18 Dosing							
Normal		4	(80)	4	(80)	4	(80)
DAY Dosing							
Cornea spot		1	(20)	1	(20)	1	(20)

Table 5 (Continued) Ophthalmologic Findings (Group Summary)

SUMMARY OF OPHTHALMOLOGIC FINDINGS							
STUDY : N11060			SEX : FEMALE				
GROUP:		V. Control	Potato extract	HBV extract			
DOSE: (mg/kg)		0	4000	4000			
		#	(%)	#	(%)	#	(%)
DAY 18 Dosing							
Normal		4	(80)	5	(100)	5	(100)
DAY Dosing							
Iris swelling		1	(20)	0	(0)	0	(0)

Table 6 Urinalysis Values (Group Summary)

SUMMARY OF URINALYSIS VALUES
PERIOD : DAY 22 Dosing

STUDY : N11060	SEX : MALE
TEST(s):	VOL
UNITS:	(ml)

GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)	
MEAN	23
SD	6.1
N	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)	
MEAN	14 ^a
SD	3.6
N	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)	
MEAN	15
SD	7.3
N	5

a Bart: NSg-05/Anova: Sig-05/Dunnett's
* : Significant differences from control group (p<0.05)

a Ftst: NSg-05/T-test: NSg-05/No unplanned test performed

Table 6 (Continued) Urinalysis Values (Group Summary)

SUMMARY OF URINALYSIS VALUES
PERIOD : DAY 22 Dosing

STUDY : N11060	SEX : FEMALE
TEST(s):	VOL
UNITS:	(ml)

GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)	
MEAN	13
SD	4.9
N	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)	
MEAN	10
SD	1.8
N	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)	
MEAN	12
SD	4.7
N	5

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst: NSg-05/T-test: NSg-05/No unplanned test performed

Table 7 Hematological Values (Group Summary)

SUMMARY OF HEMATOLOGICAL VALUES					
PERIOD : DAY 22 Dosing					
STUDY : N11060			SEX : MALE		
TEST(s):	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV
UNITS:	$\times 10^3/\mu\text{L}$	$\times 10^6/\mu\text{L}$	g/dL	%	fL
GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)					
MEAN	8.84	8.35	16.9	50.1	60.0
SD	1.964	0.359	0.36	0.99	1.73
N	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	9.90	8.59	17.5	51.9	60.6
SD	3.511	0.710	0.81	2.75	2.32
N	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	9.26	8.38	17.5	51.8	61.8
SD	2.517	0.266	0.49	1.18	2.00
N	5	5	5	5	5

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst:NSg-05/T-test:NSg-05/No unplanned test performed

Table 7 (Continued) Hematological Values (Group Summary)

SUMMARY OF HEMATOLOGICAL VALUES					
PERIOD : DAY 22 Dosing					
STUDY : N11060			SEX : MALE		
TEST(s):	MCH	MCHC	PLT	RET%	NEU%
UNITS:	pg	g/dL	$\times 10^3/\mu\text{L}$	%	%
GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)					
MEAN	20.3	33.8	1294	2.6	14.5
SD	0.84	0.54	107.3	0.26	3.10
N	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	20.5	33.8	1168	2.2	12.9
SD	0.93	0.45	120.5	0.73	4.13
N	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	20.9	33.8	1099 ^a	2.2	11.4
SD	0.72	0.61	101.3	0.27	2.50
N	5	5	5	5	5

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

b Bart:NSg-05/Anova:Sig-05/Dunnett's1

* : Significant differences from control group ($p < 0.05$)

a Ftst:NSg-05/T-test:NSg-05/No unplanned test performed

Table 7 (Continued) Hematological Values (Group Summary)

SUMMARY OF HEMATOLOGICAL VALUES					
PERIOD : DAY 22 Dosing					
STUDY : N11060			SEX : MALE		
TEST(s):	LYM%	MON%	EOS%	BAS%	LUC%
UNITS:	%	%	%	%	%
GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)					
MEAN	80.4	2.8	0.6	0.8	0.8
SD	2.62	1.18	0.27	0.22	0.19
N	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	82.0	2.4	0.9	0.8	1.0
SD	3.67	0.45	0.53	0.18	0.21
N	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	83.9	2.1	0.8	0.8	0.9
SD	2.63	0.45	0.33	0.12	0.15
N	5	5	5	5	5

a Bart: NSq-05/Anova: NSq-05/No unplanned test performed

a Ftst: NSq-05/T-test: NSq-05/No unplanned test performed

Table 7 (Continued) Hematological Values (Group Summary)

SUMMARY OF HEMATOLOGICAL VALUES					
PERIOD : DAY 22 Dosing					
STUDY : N11060			SEX : FEMALE		
TEST(s):	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV
UNITS:	$\times 10^3/\mu\text{L}$	$\times 10^6/\mu\text{L}$	g/dL	%	fL
GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)					
MEAN	7.95	8.60	16.7	49.8	57.9
SD	3.525	0.184	0.64	0.90	0.90
N	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	10.69	8.43	17.4	50.6	60.0
SD	4.045	0.347	0.73	2.72	1.36
N	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	10.72	8.24	16.9	49.6	60.5
SD	2.565	0.997	1.22	3.35	4.11
N	5	5	5	5	5

a Bart: NSq-05/Anova: NSq-05/No unplanned test performed

b Bart: Sig-05/NP-KW: NSq-05/No unplanned test performed

a Ftst: NSq-05/T-test: NSq-05/No unplanned test performed

Table 7 (Continued) Hematological Values (Group Summary)

SUMMARY OF HEMATOLOGICAL VALUES					
PERIOD : DAY 22 Dosing					
STUDY : N11060			SEX : FEMALE		
TEST(s):	MCH	MCHC	PLT	RET%	NEU%
UNITS:	pg	g/dL	$\times 10^3/\mu\text{L}$	%	%
GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)					
MEAN	19.5	33.6	1361	2.1	22.9
SD	0.63	0.72	57.1	0.48	7.42
N	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	20.6	34.3	1285	2.9	9.5+
SD	0.43	1.02	100.0	1.50	2.63
N	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	20.7	34.1	1151	6.4	11.2+
SD	1.31	0.40	177.4	6.39	4.48
N	5	5	5	5	5

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed
 b Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed
 c Bart: NSg-05/Anova: Sig-05/Dunnett's
 + : Significant differences from control group ($p < 0.01$)

a Ftst: NSg-05/T-test: NSg-05/No unplanned test performed
 b Ftst: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 7 (Continued) Hematological Values (Group Summary)

SUMMARY OF HEMATOLOGICAL VALUES					
PERIOD : DAY 22 Dosing					
STUDY : N11060			SEX : FEMALE		
TEST(s):	LYM%	MON%	EOS%	BAS%	LUC%
UNITS:	%	%	%	%	%
GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)					
MEAN	71.7	2.5	0.9	1.1	1.0
SD	8.09	1.11	0.15	0.23	0.36
N	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	86.5+	1.8	0.6+	0.9	0.8
SD	2.74	0.40	0.11	0.20	0.20
N	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)					
MEAN	84.2+	2.2	0.6+	0.9	0.8
SD	4.27	0.45	0.15	0.20	0.16
N	5	5	5	5	5

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed
 c Bart: NSg-05/Anova: Sig-05/Dunnett's
 + : Significant differences from control group ($p < 0.01$)

a Ftst: NSg-05/T-test: NSg-05/No unplanned test performed

Table 7 (Continued) Hematological Values (Group Summary)

SUMMARY OF HEMATOLOGICAL VALUES
PERIOD : DAY 22 Dosing

STUDY : N11060	SEX : MALE	
TEST(s):	PT	APTT
UNITS:	sec	sec
<hr/>		
GROUP: V. Control :	0 (mg/kg)	
MEAN	15.6	15.8
SD	0.24	0.52
N	5	5
GROUP: Potato extract :	4000 (mg/kg)	
MEAN	16.0	16.1
SD	0.42	0.77
N	5	5
GROUP: HEV extract :	4000 (mg/kg)	
MEAN	16.0	15.4
SD	0.40	1.15
N	5	5

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst:NSg-05/T-test:NSg-05/No unplanned test performed

Table 7 (Continued) Hematological Values (Group Summary)

SUMMARY OF HEMATOLOGICAL VALUES
PERIOD : DAY 22 Dosing

STUDY : N11060	SEX : FEMALE	
TEST(s):	PT	APTT
UNITS:	sec	sec
<hr/>		
GROUP: V. Control :	0 (mg/kg)	
MEAN	15.4	13.0
SD	0.64	0.67
N	5	5
GROUP: Potato extract :	4000 (mg/kg)	
MEAN	15.3	13.2
SD	0.83	1.57
N	5	5
GROUP: HEV extract :	4000 (mg/kg)	
MEAN	15.8	11.7
SD	0.43	2.19
N	5	5

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst:NSg-05/T-test:NSg-05/No unplanned test performed

Table 8 Serum Biochemical Values (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL CHEMISTRY
PERIOD : DAY 22 Dosing

STUDY : N11060 SEX : MALE

TEST(s):	GLU	BUN	CREA	TP	ALB	A/G	TCHO
UNITS:	mg/dL	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	ratio	mg/dL
GROUP: V. Control :	0 (mg/kg)						
MEAN	110.1	13.4	0.51	6.39	4.46	2.32	61.4
SD	17.39	1.16	0.031	0.154	0.059	0.131	10.33
N	5	5	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract :	4000 (mg/kg)						
MEAN	106.5	12.7	0.48	6.42	4.56	2.46	48.8
SD	18.87	1.28	0.099	0.246	0.131	0.143	4.32
N	5	5	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract :	4000 (mg/kg)						
MEAN	115.6	14.1	0.53	6.59	4.65 ^a	2.40	55.4
SD	22.63	0.73	0.033	0.120	0.078	0.074	7.83
N	5	5	5	5	5	5	5

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed
b Bart:Sig-05/NP-KW:NSg-05/No unplanned test performed
c Bart:NSg-05/Anova:Sig-05/Dunnnett's
^a : Significant differences from control group (p<0.05)

a Ftst:NSg-05/T-test:NSg-05/No unplanned test performed

Table 8 (Continued) Serum Biochemical Values (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL CHEMISTRY
PERIOD : DAY 22 Dosing

STUDY : N11060 SEX : MALE

TEST(s):	TG	PL	AST	ALT	TBIL	ALP	CK
UNITS:	mg/dL	mg/dL	IU/L	IU/L	mg/dL	IU/L	IU/L
GROUP: V. Control :	0 (mg/kg)						
MEAN	35.8	99	124.8	41.0	0.129	497.4	763
SD	8.30	11.5	19.07	7.87	0.0166	74.89	257.1
N	5	5	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract :	4000 (mg/kg)						
MEAN	34.6	86	120.5	33.7	0.134	541.7	706
SD	16.10	9.3	26.31	3.55	0.0244	113.47	118.5
N	5	5	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract :	4000 (mg/kg)						
MEAN	28.8	91	131.2	41.1	0.120	609.9	748
SD	6.07	8.4	18.21	8.31	0.0130	108.82	191.2
N	5	5	5	5	5	5	5

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst:NSg-05/T-test:NSg-05/No unplanned test performed

Table 8 (Continued) Serum Biochemical Values (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL CHEMISTRY						
PERIOD : DAY 22 Dosing						
STUDY : N11060			SEX : MALE			
TEST(s):	Ca	IP	Na	K	Cl	GGT
UNITS:	mg/dL	mg/dL	mmol/L	mmol/L	mmol/L	IU/L
GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)						
MEAN	11.08	11.50	146	8.72	101	0.15
SD	0.407	0.668	0.9	1.722	1.8	0.344
N	5	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)						
MEAN	11.06	10.97	146	7.93	103	0.01
SD	0.440	0.723	0.7	1.248	2.1	0.022
N	5	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)						
MEAN	11.02	11.24	146	9.37	104	0.00
SD	0.204	0.771	1.1	0.999	2.0	0.000
N	5	5	5	5	5	5

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

d NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst: NSg-05/T-test: NSg-05/No unplanned test performed

b NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

Table 8 (Continued) Serum Biochemical Values (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL CHEMISTRY							
PERIOD : DAY 22 Dosing							
STUDY : N11060			SEX : FEMALE				
TEST(s):	GLU	BUN	CREA	TP	ALB	A/G	TCHO
UNITS:	mg/dL	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	ratio	mg/dL
GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)							
MEAN	107.9	17.6	0.56	7.21	5.06	2.36	81.2
SD	19.49	2.83	0.028	0.191	0.079	0.156	9.83
N	5	5	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)							
MEAN	96.3	18.8	0.57	6.71	4.94	3.23	70.8
SD	17.83	4.52	0.041	0.845	0.457	1.729	22.03
N	5	5	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)							
MEAN	96.2	16.5	0.50*#	6.49	4.58	2.42	68.2
SD	15.77	3.58	0.030	0.496	0.306	0.213	14.79
N	5	5	5	5	5	5	5

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed

b Bart: NSg-05/Anova: Sig-05/Dunnett's

c Bart: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

* : Significant differences from control group (p<0.05)

a Ftst: NSg-05/T-test: NSg-05/No unplanned test performed

b Ftst: NSg-05/T-test: Sig-05/Dunnett's

c Ftst: Sig-05/NP-KW: NSg-05/No unplanned test performed

: Significant differences from Potato extract group (p<0.05)

Table 8 (Continued) Serum Biochemical Values (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL CHEMISTRY							
PERIOD : DAY 22 Dosing							
STUDY : N11060				SEX : FEMALE			
TEST(s):	TG	PL	AST	ALT	TBIL	ALP	CK
UNITS:	mg/dL	mg/dL	IU/L	IU/L	mg/dL	IU/L	IU/L
GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)							
MEAN	39.2	148	137.7	29.4	0.131	215.6	994
SD	11.03	16.0	24.57	2.53	0.0115	37.71	357.2
N	5	5	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)							
MEAN	31.1	122	119.5	27.8	0.088	241.2	702
SD	14.50	33.3	13.66	9.71	0.0459	62.45	155.4
N	5	5	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)							
MEAN	32.4	134	142.8#	30.6	0.042*	298.5	767
SD	6.98	21.1	16.82	11.58	0.0532	68.41	102.3
N	5	5	5	5	5	5	5

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed
 c Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed
 d Bart;Sig-05/NP-KW;Sig-05/Dunn's Rank Sum
 * : Significant differences from control group (p<0.05)

a Ftst;NSg-05/T-test;NSg-05/No unplanned test performed
 b Ftst;NSg-05/T-test;Sig-05/Dunnett's
 # : Significant differences from Potato extract group (p<0.05)

Table 8 (Continued) Serum Biochemical Values (Group Summary)

SUMMARY OF CLINICAL CHEMISTRY						
PERIOD : DAY 22 Dosing						
STUDY : N11060				SEX : FEMALE		
TEST(s):	Ca	IP	Na	K	Cl	GGT
UNITS:	mg/dL	mg/dL	mmol/L	mmol/L	mmol/L	IU/L
GROUP: V. Control : 0 (mg/kg)						
MEAN	11.48	10.39	146	8.03	103	0.11
SD	0.495	0.916	1.5	0.900	1.7	0.237
N	5	5	5	5	5	5
GROUP: Potato extract : 4000 (mg/kg)						
MEAN	10.80	10.50	143	7.37	100	0.10
SD	0.891	1.565	2.0	1.064	2.7	0.224
N	5	5	5	5	5	5
GROUP: HBV extract : 4000 (mg/kg)						
MEAN	11.45	10.13	143	8.05	101	0.00
SD	1.254	0.549	12.9	0.813	10.6	0.000
N	5	5	5	5	5	5

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed
 c Bart;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed
 e NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

a Ftst;NSg-05/T-test;NSg-05/No unplanned test performed
 c Ftst;Sig-05/NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed
 d NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

Table 9 Gross Findings (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : N11060	SEX : MALE		
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
NUMBER OF ANIMALS:	5	5	5
Observed/No remarkable finding	4	5	5
No. of Observations	4	5	5
ABNORMAL LESIONS			
Diverticulum	1	0	0
No. of Observations	1	0	0

Table 9 (Continued) Gross Findings (Group Summary)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
STUDY : N11060	SEX : FEMALE		
GROUP: DOSE: (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
NUMBER OF ANIMALS:	5	5	5
Observed/No remarkable finding	5	5	3
No. of Observations	5	5	3
SPLEEN			
Enlarged	0	0	2
No. of Observations	0	0	2

Table 10 Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : N11060	SEX : MALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HEV extract 4000
BRAIN			
MEAN (g)	1.990	1.993	1.960
SD	0.0661	0.0435	0.0489
N	5	5	5
PITUITARY GLAND			
MEAN (g)	0.010	0.011	0.010
SD	0.0011	0.0027	0.0009
N	5	5	5
LIVER			
MEAN (g)	10.786	10.468	10.545
SD	0.6692	1.5750	1.3390
N	5	5	5
SPLEEN			
MEAN (g)	0.589	0.589	0.623
SD	0.1037	0.0929	0.1032
N	5	5	5
HEART			
MEAN (g)	1.147	1.119	1.120
SD	0.0708	0.0590	0.0803
N	5	5	5
THYMUS			
MEAN (g)	0.501	0.533	0.487
SD	0.0750	0.1075	0.0686
N	5	5	5
SALIVARY GLANDS			
MEAN (g)	0.720	0.671	0.673
SD	0.0506	0.0763	0.0770
N	5	5	5
SEMINAL VESICLE			
MEAN (g)	1.335	1.192	1.198
SD	0.1301	0.2863	0.1585
N	5	5	5
PROSTATE			
MEAN (g)	0.512	0.489	0.453
SD	0.1247	0.0502	0.0453

Table 10(Continued) Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : N11060	SEX : MALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HEV extract 4000
KIDNEYS			
MEAN (g)	2.875	3.067	2.955
SD	0.2177	0.3143	0.2715
N	5	5	5
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.066	0.069	0.061
SD	0.0072	0.0119	0.0074
N	5	5	5
TESTES			
MEAN (g)	3.363	3.215	3.105
SD	0.2346	0.1523	0.3167
N	5	5	5
EPIDIDYMIDES			
MEAN (g)	1.038	0.980	0.926
SD	0.0913	0.0245	0.0704
N	5	5	5
LUNG			
MEAN (g)	1.444	1.432	1.316
SD	0.0683	0.1280	0.0672
N	5	5	5
THYROID/PARATHY.			
MEAN (g)	0.024	0.026	0.020#
SD	0.0044	0.0032	0.0046
N	5	5	5

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

a Fstt:NSg-05/T-test:NSg-05/No unplanned test performed

b Fstt:NSg-05/T-test:Sig-Dunnets's

: Significant differences from Potato extract group (p<0.05)

Table 10(Continued) Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : N11060	SEX : FEMALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
BRAIN			
MEAN (g)	1.927	1.837	1.823
SD	0.0902	0.0282	0.1017
N	5	5	5
PITUITARY GLAND			
MEAN (g)	0.014	0.015	0.015
SD	0.0022	0.0011	0.0015
N	5	5	5
LIVER			
MEAN (g)	7.566	7.711	8.323
SD	0.2493	0.6056	0.7775
N	5	5	5
SPLEEN			
MEAN (g)	0.442	0.539	0.697
SD	0.0559	0.1216	0.2632
N	5	5	5
HEART			
MEAN (g)	0.843	0.926	0.910
SD	0.0386	0.0747	0.1021
N	5	5	5
THYMUS			
MEAN (g)	0.407	0.437	0.480
SD	0.0565	0.0517	0.0865
N	5	5	5
SALIVARY GLANDS			
MEAN (g)	0.425	0.428	0.423
SD	0.0534	0.0325	0.0127
N	5	5	5
KIDNEYS			
MEAN (g)	1.907	2.017	2.064
SD	0.1160	0.1443	0.0957
N	5	5	5
ADRENAL GLANDS			
MEAN (g)	0.082	0.077	0.086#
SD	0.0123	0.0045	0.0042

Table 10(Continued) Absolute Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY			
STUDY : N11060	SEX : FEMALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
LUNG			
MEAN (g)	1.043	1.133	1.302 ^a
SD	0.0649	0.1043	0.1800
N	5	5	5
THYROID/PARATHY.			
MEAN (g)	0.016	0.016	0.018
SD	0.0038	0.0026	0.0030
N	5	5	5
UTERUS/CERVIX			
MEAN (g)	0.701	0.496 ^a	0.532 ^a
SD	0.0790	0.1138	0.0683
N	5	5	5
OVARIES/OVIDUCT			
MEAN (g)	0.116	0.135 ^a	0.137 ^a
SD	0.0089	0.0111	0.0064
N	5	5	5

a Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

c Bart:NSg-05/Anova:Sig-05/Dunnett's

* : Significant differences from control group (p<0.05)

+ : Significant differences from control group (p<0.01)

a Ftest:NSg-05/T-test:NSg-05/No unplanned test performed

Table 11 Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : N11060	SEX : MALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HEV extract 4000
BRAIN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.567	0.586	0.597
SD	0.0252	0.0747	0.0258
N	5	5	5
PITUITARY GLAND			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.003	0.003	0.003
SD	0.0003	0.0005	0.0003
N	5	5	5
LIVER			
MEAN (% BODY WEIGHT)	2.079	2.041	2.204
SD	0.2149	0.2096	0.2301
N	5	5	5
SPLEEN			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.167	0.171	0.189
SD	0.0212	0.0145	0.0286
N	5	5	5
HEART			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.326	0.327	0.341
SD	0.0061	0.0206	0.0141
N	5	5	5
THYMUS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.142	0.155	0.149
SD	0.0161	0.0241	0.0250
N	5	5	5
SALIVARY GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.205	0.195	0.205
SD	0.0128	0.0118	0.0213
N	5	5	5

Table 11(Continued) Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : N11060	SEX : MALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HEV extract 4000
SEMINAL VESICLE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.380	0.348	0.366
SD	0.0295	0.0744	0.0623
N	5	5	5
PROSTATE			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.147	0.143	0.138
SD	0.0417	0.0179	0.0109
N	5	5	5
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.819	0.899	0.898
SD	0.0592	0.1107	0.0599
N	5	5	5
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.019	0.020	0.019
SD	0.0028	0.0021	0.0023
N	5	5	5
TESTES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.960	0.943	0.945
SD	0.1064	0.0872	0.0860
N	5	5	5
EPIDIDYMIDES			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.297	0.287	0.282
SD	0.0415	0.0228	0.0246
N	5	5	5
LUNG			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.411	0.418	0.400
SD	0.0184	0.0125	0.0115
N	5	5	5

Table 11(Continued) Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : N11060	SEX : MALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
THYROID/PARATHY. MEAN (% BODY WEIGHT)	0.007	0.008	0.006
SD	0.0016	0.0012	0.0016
N	5	5	5
a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed			
a Fbst;NSg-05/T-test;NSg-05/No unplanned test performed			

Table 11(Continued) Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : N11060	SEX : FEMALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
BRAIN MEAN (% BODY WEIGHT)	0.868	0.787	0.782
SD	0.0672	0.0245	0.0643
N	5	5	5
PITUITARY GLAND MEAN (% BODY WEIGHT)	0.006	0.007	0.006
SD	0.0010	0.0007	0.0007
N	5	5	5
LIVER MEAN (% BODY WEIGHT)	3.404	3.298	3.559
SD	0.1524	0.1517	0.2560
N	5	5	5
SPLEEN MEAN (% BODY WEIGHT)	0.199	0.231	0.295
SD	0.0272	0.0504	0.1011
N	5	5	5
HEART MEAN (% BODY WEIGHT)	0.380	0.396	0.389
SD	0.0274	0.0243	0.0335
N	5	5	5
THYMUS MEAN (% BODY WEIGHT)	0.183	0.187	0.206
SD	0.0205	0.0253	0.0425
N	5	5	5
SALIVARY GLANDS MEAN (% BODY WEIGHT)	0.192	0.184	0.181
SD	0.0308	0.0171	0.0099
N	5	5	5

Table 11(Continued) Relative Organ Weights (Group Summary)

ORGAN WEIGHT SUMMARY (% BODY WEIGHT)			
STUDY : N11060	SEX : FEMALE		
GROUP: DOSE : (mg/kg)	V. Control 0	Potato extract 4000	HBV extract 4000
KIDNEYS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.857	0.863	0.884
SD	0.0383	0.0470	0.0417
N	5	5	5
ADRENAL GLANDS			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.037	0.033	0.037#
SD	0.0068	0.0022	0.0030
N	5	5	5
LUNG			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.469	0.486	0.559
SD	0.0271	0.0481	0.0941
N	5	5	5
THYROID/PARATHY.			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.007	0.007	0.008
SD	0.0019	0.0009	0.0014
N	5	5	5
UTERUS/CERVIX			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.316	0.213+	0.229*
SD	0.0436	0.0506	0.0357
N	5	5	5
OVARIES/OVIDUCT			
MEAN (% BODY WEIGHT)	0.052	0.058	0.059
SD	0.0049	0.0054	0.0024
N	5	5	5

a Bart: NSg-05/Anova: NSg-05/No unplanned test performed
 c Bart: NSg-05/Anova: Sig-05/Dunnett's
 * : Significant differences from control group (p<0.05)
 + : Significant differences from control group (p<0.01)

a Ftst: NSg-05/T-test: NSg-05/No unplanned test performed
 b Ftst: NSg-05/T-test: Sig-05/Dunnett's
 # : Significant differences from Potato extract group (p<0.05)

Table 12 Histopathological Findings (Group Summary)

Study N11060									
Incidence Summary Table With Statistics									
STUDY : N11060									
Controls from group(s): 1									
Dosing units: mg/kg									
Tissues With Diagnoses									
Animal sex: -- Males --									
Group dosage level: 0 4000 4000									
No. in group: 5 5 5									
Affected -- Females --									
0 4000 4000									
5 5 5									
KIDNEYS	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
Tubular degeneration/regeneration		2	3	2		2	3	2	
Inflammatory cell foci		0	2	2		0	2	2	
Cyst		0	0	1		0	0	0	
Fibrosis		0	0	1		0	0	0	
Casts		0	0	1		0	0	1	
Mineralization		0	0	1		4	4	5	
Cortical scar		0	0	0		0	0	1	
URINARY BLADDER	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
LIVER	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
Inflammatory cell foci		5	5	5		5	5	4	
Extramedullary hemopoiesis		4	1	1		0	0	0	
Focal necrosis		1	0	0		0	0	0	
Vacuolated area		0	0	1		0	2	1	
Peripotal vacuolation		0	0	0		2	5	3	
HEART	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
Cardiomyopathy		1	0	1		0	0	1	
Arteriopathy		0	1	0		0	0	0	
SPLEEN	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
Extramedullary hemopoiesis		0	0	0		0	0	1	

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test. All Diagnoses; Phases: All; Death types: All scheduled; Date of death range: 13-Dec-11 To 13-Dec-11

Table 12(Continued) Histopathological Findings (Group Summary)

Study N11060									
Incidence Summary Table With Statistics									
STUDY : N11060									
Controls from group(s): 1									
Dosing units: mg/kg									
Tissues With Diagnoses									
Animal sex: -- Males --									
Group dosage level: 0 4000 4000									
No. in group: 5 5 5									
Affected -- Females --									
0 4000 4000									
5 5 5									
THYMUS	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
Epithelial hyperplasia		0	1	0		1	1	1	
SALIVARY GLANDS	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
PANCREAS	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
Inflammatory cell foci		0	1	1		0	0	1	
BRAIN	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
THORACIC S.C.	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
EYES & OPTIC N.	Number examined:	5	5	5		5	5	5	
Retinal fold		1	0	0		0	0	0	
HARDERIAN GLANDS	Number examined:	0	0	0		0	0	0	

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test. All Diagnoses; Phases: All; Death types: All scheduled; Date of death range: 13-Dec-11 To 13-Dec-11

Table 12 (Continued) Histopathological Findings (Group Summary)¹⁾

Study N11060						
Incidence Summary Table <u>With</u> Statistics						
STUDY : N11060		-- Animals --			Affected --	
Controls from group(s) : 1		-- Males --			-- Females --	
Dosing units: mg/kg		Group dosage level:			0 4000 4000	
<u>Tissues With Diagnoses</u>		No. in group:			5 5 5	
LUNGNumber examined:	5	5	5	5	5 ¹⁾
	Osseous metaplasia	2	0	0	1	0 0 ¹⁾
	Foamy macrophages	1	1	2	2	2 1 ¹⁾
	Inflammatory cell foci	0	0	0	0	1 0 ¹⁾
ADRENAL GLANDSNumber examined:	5	5	5	5	5 5 ¹⁾
	Cortical vacuolation	3	1	1	0	0 0 ¹⁾
MANDIBULAR L.N.Number examined:	5	5	5	5	5 5 5 ¹⁾
THYROID/PARATHY.Number examined:	5	5	5	5	5 5 5 ¹⁾
PITUITARY GLANDNumber examined:	5	5	5	5	5 5 5 ¹⁾
STOMACHNumber examined:	5	5	5	5	5 5 5 ¹⁾
	Inflammatory cell foci	1	0	0	0	0 0 0 ¹⁾
	Dilated gland	1	0	0	0	0 0 0 ¹⁾
DUODENUMNumber examined:	5	5	5	5	5 5 5 ¹⁾
ILEUMNumber examined:	5	5	5	5	5 5 5 ¹⁾
CECUMNumber examined:	5	5	5	5	5 5 5 ¹⁾
COLONNumber examined:	5	5	5	5	5 5 5 ¹⁾

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test.
 All Diagnoses; Phases: All; Death types: All scheduled; Date of death range: 13-Dec-11 To 13-Dec-11¹⁾

Table 12 (Continued) Histopathological Findings (Group Summary)^u

Study N11060						
Incidence Summary Table <u>With</u> Statistics						
STUDY : N11060						
Controls from group(s): 1		Animal sex:			-- Animals --	
Dosing units: mg/kg		Group dosage level:			Affected --	
Tissues With Diagnoses		No. in group:			-- Males --	
					-- Females --	
					0 4000 4000	
					5 5 5	
					5 5 5	
MESENTERIC L.N.	Number examined:	5	5	5		5 5 5 ^u
FEMUR/JOINT/MAR.	Number examined:	5	5	5		5 5 5 ^u
Inflammatory cell foci, joint		0	0	0		0 1 0 ^u
Increased hemopoiesis		0	0	0		1 0 0 ^u
TESTES	Number examined:	5	5	5	^u	
EPIDIDYMIDES	Number examined:	5	5	5	^u	
Inflammatory cell foci		0	1	1	^u	
PROSTATE	Number examined:	5	5	5	^u	
Inflammatory cell foci		2	1	3	^u	
SEMINAL VESICLE	Number examined:	5	5	5	^u	

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test. All Diagnoses; Phases: All; Death types: All scheduled; Date of death range: 13-Dec-11 To 13-Dec-11^u

Table 12 (Continued) Histopathological Findings (Group Summary)^u

Study N11060						
Incidence Summary Table <u>With</u> Statistics						
STUDY : N11060						
Controls from group(s): 1		Animal sex:			-- Animals --	
Dosing units: mg/kg		Group dosage level:			Affected --	
Tissues With Diagnoses		No. in group:			-- Males --	
					-- Females --	
					0 4000 4000	
					5 5 5	
OVARIES/OVIDUCT	Number examined:					5 5 5 ^u
Inflammatory cell foci						1 0 0 ^u
UTERUS/CERVIX	Number examined:					5 5 5 ^u
VAGINA	Number examined:					5 5 5 ^u
Proestrus						4 1 1 ^u
Estrus						1 2 4 ^u
Metestrus						0 1 0 ^u
Diestrus						0 1 0 ^u
ABNORMAL LESIONS	Number examined:	0	0	0		0 0 0 ^u
JEJUNUM	Number examined:	1	0	0		0 0 0 ^u
Diverticulum		1	0	0		0 0 0 ^u

Note: Entries flagged with a * are significantly different from control at the 0.05 level using Fisher's exact two tailed test. All Diagnoses; Phases: All; Death types: All scheduled; Date of death range: 13-Dec-11 To 13-Dec-11^u

제2절 TGEV 항원 발현 감자의 백신 개발

1. 식물-유래 항원 (TGEV)에 대한 항원성 평가

식물 세포 내지는 식물체를 생산주체 (host)로 하여 원하는 외래 단백질을 생산 할 경우 얻어진 단백질의 정량화 뿐만 아니라, 특히 백신으로 사용하고자 하는 항원단백질의 경우 그 항원성 평가가 중요한 성공요인으로 작용한다. 따라서 본 과제에서 목표로 하는 Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) spike protein의 경우 감자 식물체에서 얻어진 단백질의 항원성을 여러 가지 측면에서 다방면으로 평가하여 보았다.

가. 식물체 발현 벡터 및 형질전환

돼지의 전염성 소화기병인 이 질병은 2주령 이하의 자돈에서 구토, 심한설사, 및 높은 폐사율을 나타내는 급성 전염성 바이러스성 감염으로 병의 원인체는 전염성위장염바이러스 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 이다. 모든 연령의 돼지에 발병하지만 특히 1주령 미만의 포유 자돈에 발병하면 대부분의 자돈이 폐사되는 무서운 전염병이다.

TGE는 전세계적으로 발생되고 있으며 국내에서는 1950년대에 처음 발생된 이후 상재화되어 매년 발생되고 있으며 많은 경제적 피해를 주고 있다. 이 병은 주로 11월부터 다음해 4월 즉 겨울철을 중심으로 해서 많이 발생되기 때문에 발생 시기는 온도와 밀접한 관계를 가지고 있으며, 드물게 여름철에도 TGE가 발생하는 경우가 있다. 치료법은 없으며, 이 병에 이환되면 대부분이 대장균증을 병발하여 증상이 악화됨으로 항생물질을 투여하여 증상을 경감할 필요가 있다. 무엇보다 중요한 것은 차단방역 및 환경 위생관리 미흡 등으로 예기치 않은 전염성 설사병의 발생 가능성에 대비하여 백신접종을 실시하는 것이다. TGE의 백신접종은 계절에 관계없이 매 분만 시마다 2회 접종해야 하며 옹돈과 후보돈도 반드시 2회 백신을 접종해야 한다. 예방접종법은 돼지 TGE 생독백신을 임신돈 분만 5-7주전에 1차 예방접종하고 다시 분만 2-3주전에 2차 예방접종하여 새끼돼지의 피해를 막는다. 아직까지도 일부농가에서는 전염병에 대한 인식부족과 인력부족 등을 이유로 백신접종을 실시하지 않거나 부적절한 시기에 백신접종을 실시하고 있어 백신의 효과를 제대로 얻지 못하는 농가들이 많이 있다. 설사병으로 인한 피해를 최소화하기 위해서는 철저한 차단방역의 이행과 위생적인 사육관리 및 적절한 시기에 예방접종을 반드시 해야 한다.

본 연구는 돼지 TGE 바이러스의 에피토프 단백질인 spike glycoprotein을 감자에서 발현시키고 이를 동물에 경구용으로 투여하여 질병 감염을 예방하는 가능성을 알아보려고 한다.

TGEV는 coronaviridae에 속하며 단일가닥의 RNA genome을 가진다. Spike, envelope, membrane, 그리고 nucleocapsid 단백질로 구성되어 있다. TGEV spike protein에는 4개의 antigenic site (에피토프)가 있으며 A site (538-591aa), B site (97-144aa), C site (49-52aa)와 D site (378-395aa)로 나뉘어진다. 이 중 A site는 TGEV와 PEDV (porcine epidemic diarrhea virus)에 공히 conserved 서열이며 D site는 TGEV에만 있으며 이 두 site가 항원성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다 (Arch Virol (1994) 137:55-67) (그림20). 본 연구에서는 spike protein의 에피토프 A, B, C, 및 D의 1800bp 모두를 발현하도록 설계된 벡터와 가장 유효하다고 보고된 에피토프 A와 D 부분만을 발현하도록 설계된 식물체 벡터

를 각각 제작하였다 (그림 21). 1800bp 또는 700bp의 TGEV 유전자를 cauliflower mosaic virus 의 35S 프로모터에 의하여 발현 유도되는 벡터 M-0.7 또는 M-1.8, 35S double enhancer 프로모터에 의해 발현 유도되는 D-0.7 또는 D-1.8, 그리고 감자의 괴경 특이적인 patatin 단백질의 프로모터인 patatin 프로모터에 의해 발현유도 되는 P-0.7 또는 P-1.8 벡터를 각기 제작하였다.

감자의 형질전환 식물체 개발은 다음과 같은 과정에 의하여였다. 본 실험에 사용한 감자 식물체는 조직배양으로 유지하였다. 각종 병원균과 바이러스가 없는 데지레 (*Solanum tuberosum* L. cv Desiree) 씨감자에서 싹을 틔운 뒤 성장점을 포함하여 가능한 작게 절단하여 70% 에탄올로 표면살균한다. 증류수로 헹군 다음 10% 소듐하이포클로라이드 (sodium hypochloride) 용액에서 10분 동안 살균처리 한 후 증류수로 3번 헹구어 물기를 제거하고 MS salt에 sucrose를 3% 첨가한 기본배지에 치상하여 줄기의 성장을 유도하였다. 배양기 내에서 줄기의 생육이 왕성하게 이루어 진 다음 2주일 간격으로 계대배양하는 방식으로 감자 식물체의 조직배양을 유지하였다. 기내소괴경 형성용 배지는 MS 기본배지에 90 g/L의 sucrose를 첨가한 것을 사용하였으며 배양환경은 8시간의 광주기와 17°C의 배양온도에서 배양하였다. 기내소괴경 형성은 증식용 배양조건에서 2내지 3주 정도 자란 감자줄기의 아랫부분을 치상하였으며, 치상 후 약 2주일부터 저장줄기가 부풀어 오르기 시작하며 8주 정도가 지나면 1g 이상의 성숙된 소괴경을 얻을 수 있었다.

생겨난 지 1주일 정도 된 싹을 절단하여 형질전환을 위한 아그로박테리아와의 공동배양에 사용하였다. 캘러스 형성을 위해 사용한 배지는 MS 배지에 3%의 서당, 8% 한천 그리고 2.0 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)를 첨가하고 배지의 수소이온농도는 5.8로 조정하였다. 상기의 형질전환된 싹 절편은 이틀 동안 2,4-D가 들어있는 캘러스 유도 배지에서 배양 한 다음 0.01 mg/L NAA, 0.1 mg/L GA₃ 및 2.0 mg/L Zeatin 이 들어 있는 재분화 배지로 옮겨주었다. 옮겨 준 지 1주일 만에 싹 절편의 상처 부위에서 캘러스의 형성이 시작되고 4주 경과 후부터 소식물체가 출현하였다. 분리가 가능할 때 까지 배양한 다음 어린 싹초를 캘러스로부터 떼어내어 형질전환체를 1차 선별하였다. 선별한 어린 싹초들의 원활한 뿌리 내림과 생육을 위하여 호르몬이 들어있지 않은 MS기본 배지에 100.0 mg/L kanamycin, 500.0 mg/L carbenicillin을 포함한 배지로 옮겨 키운 후 분자생물학적 분석을 위해 사용한다. 뿌리내림이 대조구와 비교하였을 때 차이없이 원활한 개체들의 DNA를 추출하여 NPTII primer와 TGEV 특이 primer를 사용한 PCR 반응을 실시하였다. 이 때 genomic DNA는 싹과 싹초부분에서 1g을 채취해 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) buffer를 이용한 방법 (Doyle & Doyle, 1990)을 변용하여 추출하였다. 그 결과, 1.8kb의 벡터별 10 개체, 0.7kb의 벡터별 10개체들을 선별하였다.

각각의 전사체 발현 여부 및 발현양을 확인하기 위하여 Northern blot을 수행하였다. Total RNA는 도입된 벡터의 발현 부위가 각기 다르므로 감자의 괴경 부분에서 1g 정도를 채취한 다음 RNeasy[®] Total RNA Isolation System (Promega co.)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 검출은 Dig-labeled TGEV probe를 이용하였다. 그 결과 0.7kb 발현하는 감자 식물체는 patatin 벡터에서 3개체, double 35S 벡터에서 2개체, 그리고 35S 벡터에서 한 개의 개체를 선별하였으며, 반면 1.8kb를 발현하는 감자는 35S 벡터 한 개의 개체만 선별하였다. mRNA 발현이 확인된 개체들의 western blot 분석을 수행하였다. 단백질 추출은 PBS 버퍼를 사용하였으며 (PBS; pH7.4, 1 mM EDTA, 0.2% β-mercaptoethanol, and protease

inhibitor cocktail), NBT/BCIP 검출을 수행하였다. 1:1000 rabbit polyclonal anti-TGEV 항체와 1:5000 HRP-conjugated anti-rabbit IgG 2차 항체를 이용하여 western을 수행하였다. 항원-항체 반응에 의한 TGEV 특이 단백질 분석 결과 선발된 개체들에서 원하는 밴드가 확인되었으며, 이들의 발현양을 알아보기 위하여 ELISA를 수행하였다. ELISA 분석 조건을 확립하기 위한 구체적인 실험 방법들은 다음 장에서 설명하기로 한다. 비교 결과, 35S와 double 35S 벡터보다 patatin 벡터에 의한 개체의 발현율이 높았다. 본 연구의 목적을 고려하여 높은 발현율이 최종선발의 최우선 조건이며 이를 만족하는 p0.7-2번 개체를 동물 실험을 통한 면역 반응 유도 실험을 위해 선발하였다.

외형분석 결과, 일반 데지레 감자와 형질전환 개체간의 유의성있는 차이는 나타나지 않았다. D-4 형질전환체의 경우 줄기 길이 생장에 비해 생체중 증가가 더 높은 경향이었으나 오차 범위를 크게 벗어나는 수준은 아니었으며, 발아한 기내소과경을 포트에 심은 후 온실에서 재배하여 외형 비교를 해 본 결과, 대조구인 데지레와 괴경 형성 결과에서도 차이는 나타나지 않았다. 식물체 전체 뿐만 아니라 기관의 외형상 동질성을 알아보기 위하여 잎을 관찰한 결과 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 따라서 TGEV 유전자 도입이 형질전환 감자의 주요 외형적인 형질에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

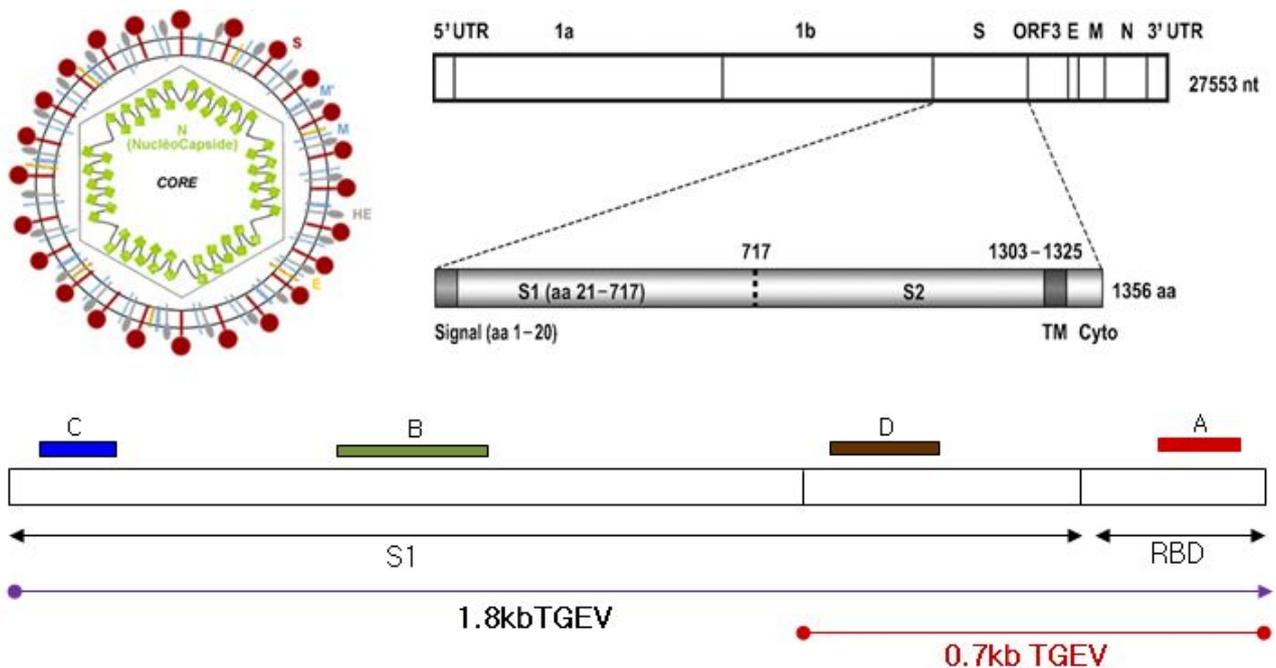
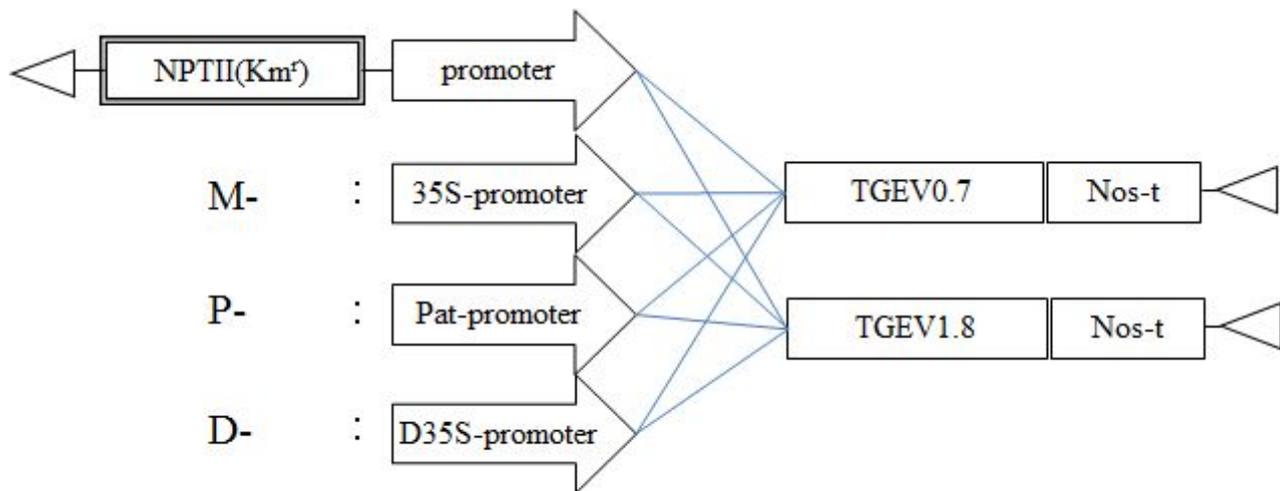


Fig. 20 Schematic diagram of the TGEV genome



NPTII: neomycin phosphotransferase gene cassette

TGEV0.7: transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein 0.7kb

TGEV1.8: transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein 1.8kb

M-: CaMV35S promoter, 800bp

P-: tuber-specific patatin promoter, 900bp

D-: double 35S promoter, 800bp

Nos-t: Nos terminator

Fig. 21 Construction of the plant expression vector for potato transformation

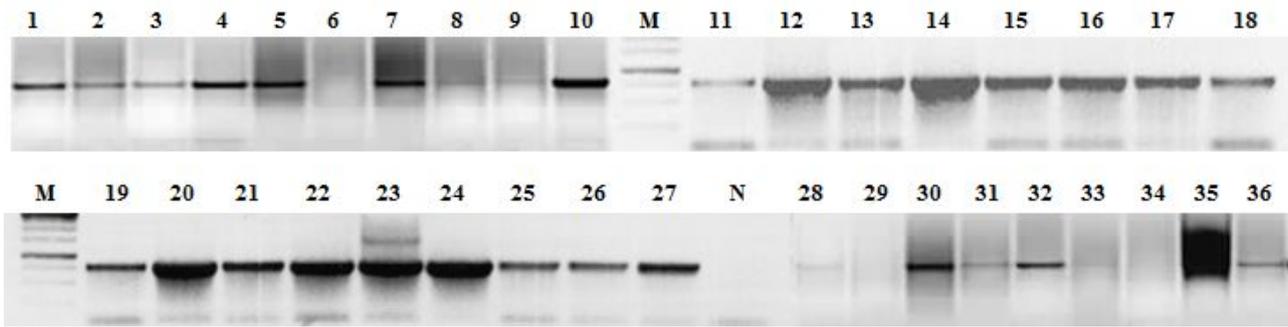


Fig. 22 PCR detection of NPTII gene in transgenic potatoes expressing TGEV 1.8 or 0.7 kb. Lane M is a 1kb ladder. N, genomic DNA of non-transgenic potato as a negative control. Each lane shows the PCR products with genomic DNA from independent transgenic potato lines

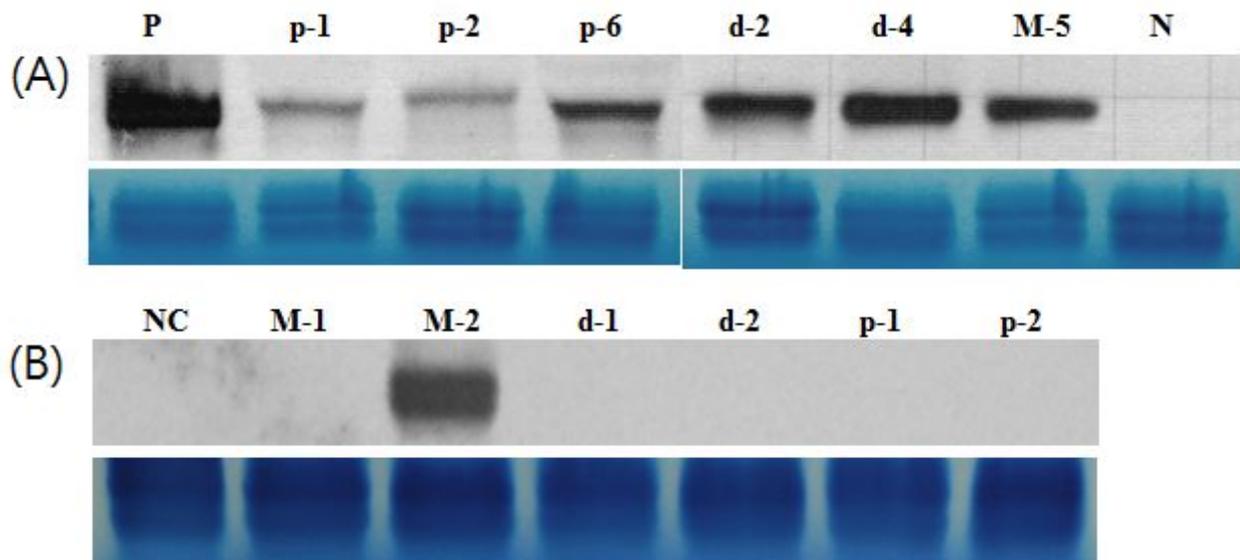


Fig. 23 Northern blot analysis of transgenic potatoes expressing TGEV 0.7kb (A) and 1.8kb (B). Total RNA (30ug) from untransformed potatoes (NC) and transformed potato plants was separated on formaldehyde agarose gel. The blot was hybridized with the Dig-labeled TGEV gene probe. Equal loading was monitored by methylene blue staining of the membranes.

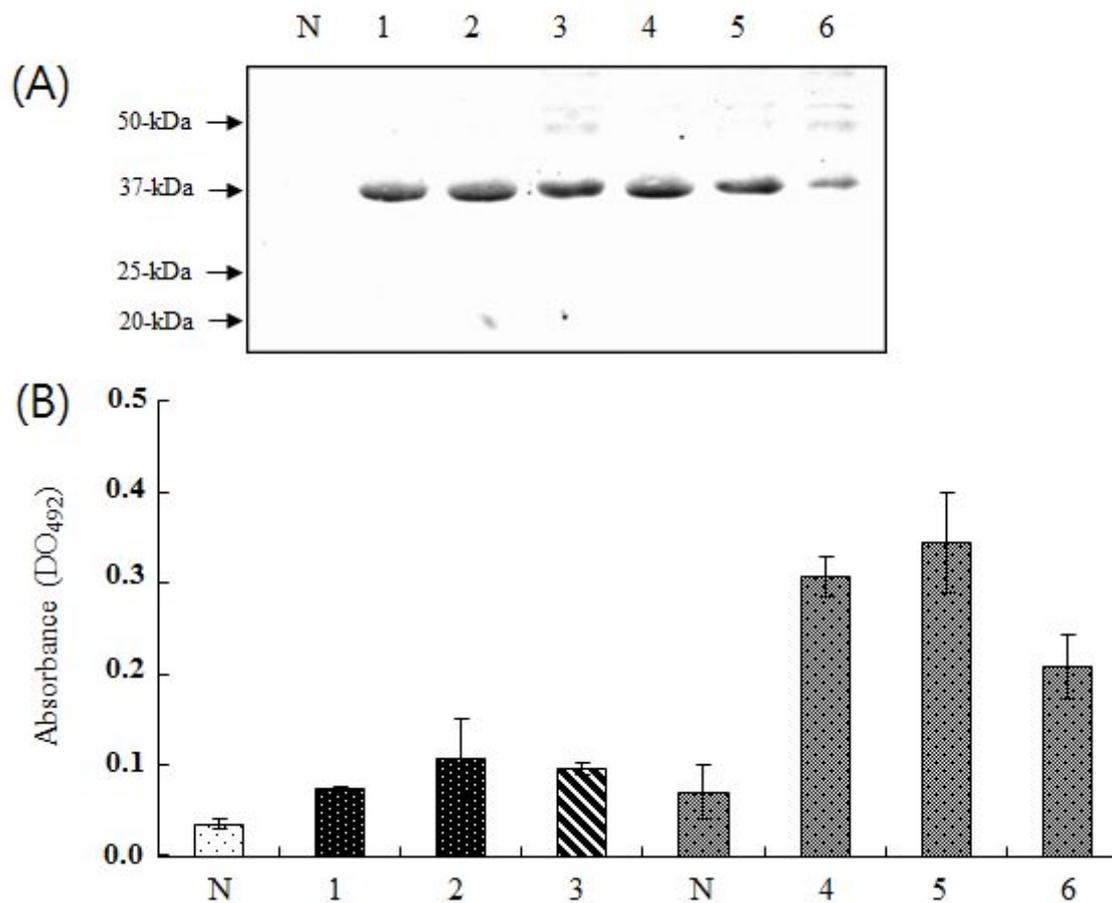


Fig. 24 (A) Immunoblot detection of TGEV in transgenic potato plants. Protein (25 ug) extracted from potato tuber plants was transferred to PVDF membrane and developed with anti-mouse TGEV-specific polyclonal antibody.

(B) TGEV expression levels in transgenic potato lines. WT, wild-type potato plant; lanes, independent transgenic potato plants. Plate coated with TSP of wild-type and transgenic potato lines was incubated with anti-TGEV. The absorbance was measured at 492 nm.

2. TGEV-specific 항체 제작

가. 항체 후보군 서열 분석

식물체 내 TGEV-항원 발현을 높은 감도로 검출하기 위해서는 high-specificity 그리고 high-purity의 항체가 확보되어야 한다. 본 연구는 이와 같은 항체의 안정적인 확보를 통한 항후의 단백질 검출을 용이하게 하기 위하여 직접 항체를 생산하고자 하였다. 제작 기준은 다음과 같았다. 항체 제작시에 유사성이 높은 특정 domain부위로 peptide antibody를 만들 경우 다른 protein을 같이 검출할 확률이 높으므로 일반적으로 domain부위는 제외하기로 하였다. 또한 glycosylation site, myristoylation site를 포함하는 부분은 합성된 peptide와 expression된 단백질이 동일하지 않으므로 (post-translational modification에 의해 다른 구조를 형성할 가능성이 높음) 합성 peptide로 제작한 antibody로 detection될 확률이 매우 낮아 제외하였다. TGEV 단백질 서열 분석 결과 phosphorylation site, myristoylation site 및 glycosylation site가 존재하므로 이 지역을 선택할 때는 native protein에서 실제로 modification이 일어나는지를 고려해야 한다고 보았다. Casein kinase II phosphorylation site가 6 곳에 존재하였고, N-glycosylation site가 5곳, protein kinase C phosphorylation site가 2곳, N-myristoylation site가 2곳 존재하였다.

항체제작의 경우 hydrophobicity가 낮고 antigenicity가 높은 지역이 일반적으로 specific antibody의 제작 가능성이 높으며 3차 구조에서 외부로 노출되어 있을 가능성이 높아 이 지역을 우선 고려하여 선정하였다. 그 결과 Whole protein의 hydrophobicity와 antigenicity를 확인한 결과 그림과 같이 7부위에서 candidate가 보였다. Peptide region을 선택할 경우 일반적으로 N-term이나 C-term쪽에 가까운 region을 선택하여 항체를 제작하는 것을 원칙으로 하며 그 다음으로 내부에 존재하는 다른 region을 고려하여 제작하는 것이 일반적이다.

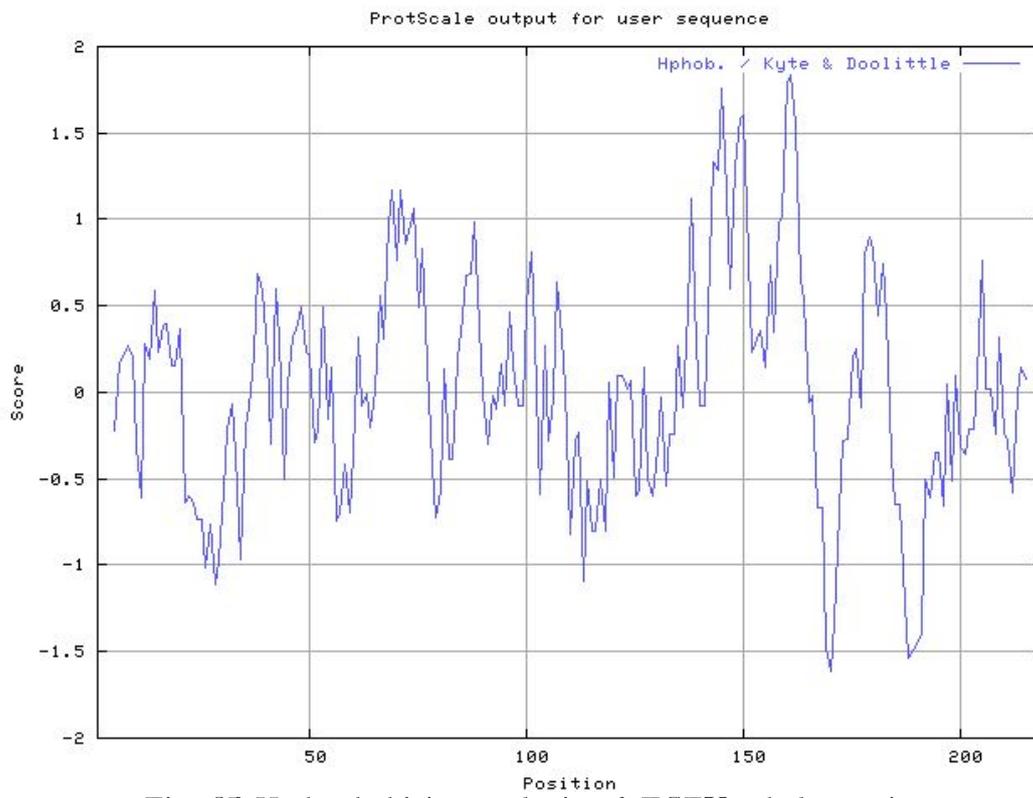


Fig. 25 Hydrophobicity analysis of TGEV whole protien

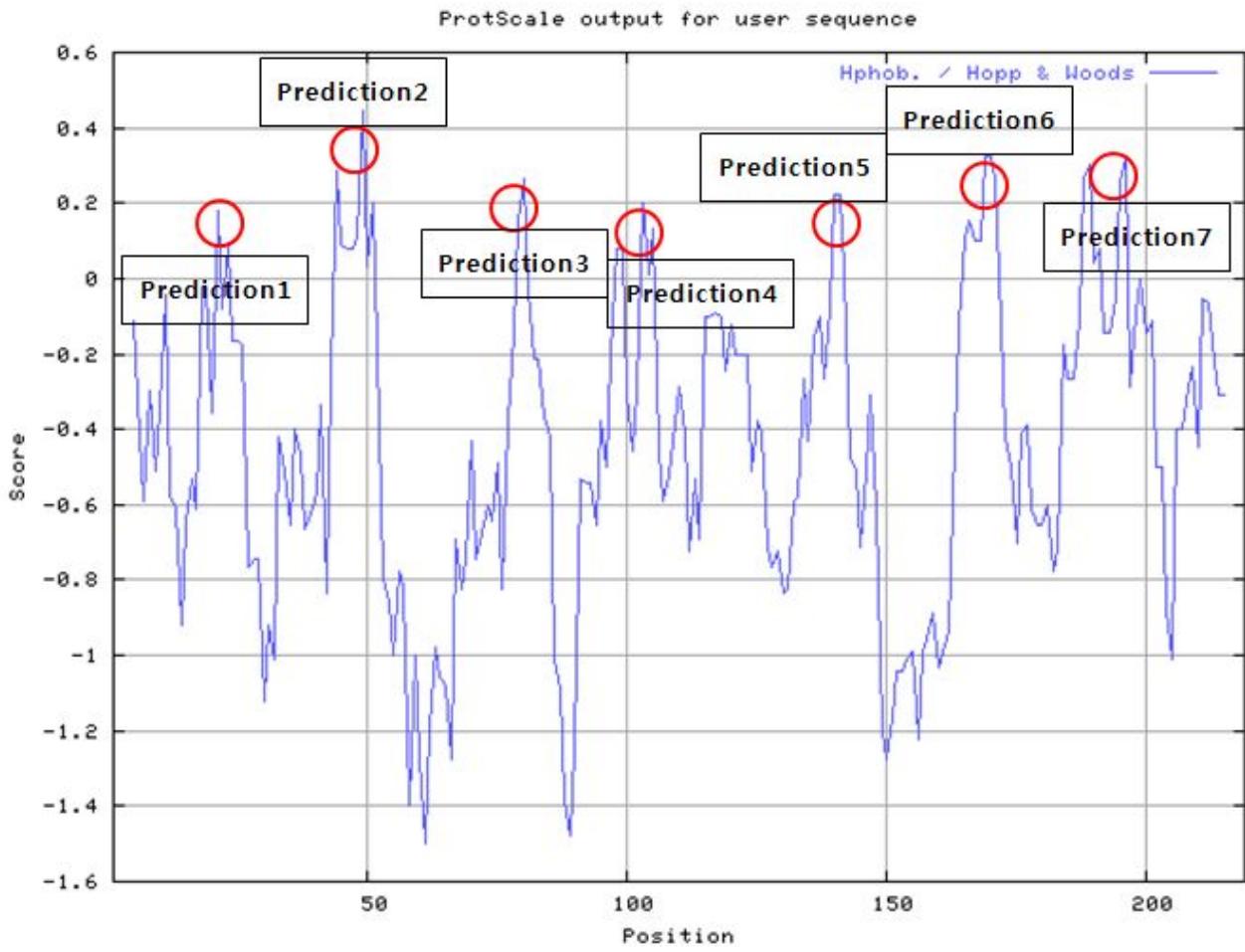


Fig. 26 Antigenicity of TGEV whole protein

이를 위하여 sequence analysis 수행 결과 다음과 같았다. 총 7개의 prediction region을 설정하였는데, 먼저,

1-40aa (SCYTVSDSSFFSYGEIPFGVTDGPRYCYVHYNGTALKYLG),

31-70aa (YNGTALKYLGTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPI),

61-100aa (GYN FFSTFPIDCISFNLTGSDVFWTIAAYTSYTEALVQV),

81-120aa (DSDVFWTIAAYTSYTEALVQVENTAIT KVTYCN SHVNNIKC),

121-160aa (SQITANLNNGFYVPVSSSEVGLVNKSVLLPSFYTHIVNI),

151-190 aa (SFYTHIVNITIGLGMKRSGYGQPIASTLSNITLPMQDHN), 및

171-210aa (YGQPIASTLSNITLPMQ DHNTDVYCI RSDQFSVYVHSTCK)로 region을 나누어 hydrophobicity와 antigenicity를 확인하였다. 그 결과,

1) prediction 1(12-27aa): SYGEIPFGVTDGPRYC (16mer)

2) prediction 2(43-56aa): PPSVKEIAISKWGH-C (15mer)

(*C-terminal의 C는 carrier protein에 conjugation하기 위해 임의로 첨가한 것임)

3) prediction 3(72-85aa): CISFNLTGSDVVF (14mer)

4) prediction 4(92-106aa): SYTEALVQVENTAIT (15mer)

5) prediction 5(132-145aa): YPVSSSEVGLVNKS-C (15mer)

6) prediction6 (167-180aa): KRSGYGQPIASTLS-C (15mer)

7) prediction7 (180-195aa): SNITLPMQDHNTDVYC (16mer)

이와 같은 7개의 prediction 중에서 3, 5, 7번은 glycosylation site이거나 일부가 포함되어 있어 제외하였으며, 나머지 prediction 중에서 hydrophobicity와 antigenicity 측면에서 다른 후보군에 비해 항체제작 가능성이 높을 것으로 여겨지는 prediction 1과 6을 최종선택하여 항체 제작하였다.

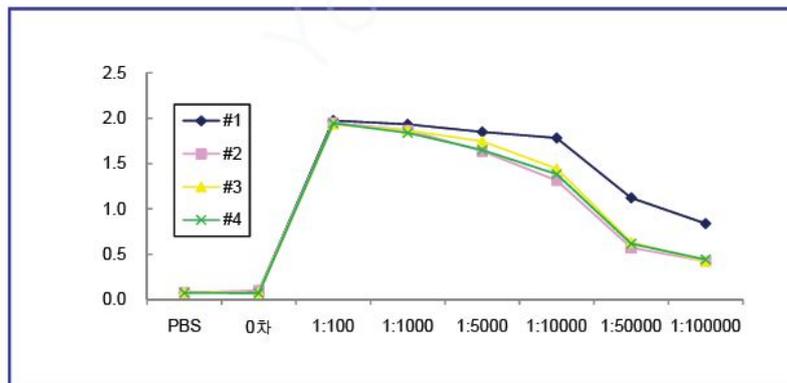
나. 항체 제작

(1) Mouse monoclonal antibody

위의 서열 분석 실험에서 선택된 prediction 1(#1)과 prediction 6(#6)을 이용하여 항체 제작을 실시하였다. #1 peptide 항원 250 ng/well 코팅하고 anti-mouse IgG-HRP 1:5,000으로 dilution 후에 450nm single point photo 모드에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 1:100~1:100,000 까지의 serial dilution에서 안정적인 값의 변화를 보였다. #6 항원 역시 동일한 실험방식으로 ELISA를 수행하였고, 결과에서도 안정적인 값의 변화를 보였다.

Test	Quick	Antigen coating	250ng/well
Measurement Mode	Single Point Photo	Mouse IgG-HRP	1:5000 dilution
Measurement Filter	450 nm	ELISA test	3 rd bleeding

TGEV 1	# 1	# 2	#3	#4
PBS	0.077	0.075	0.080	0.072
0차 1:100	0.088	0.099	0.074	0.071
1:100	1.974	1.949	1.931	1.945
1:1,000	1.932	1.869	1.865	1.839
1:5,000	1.847	1.636	1.744	1.648
1:10,000	1.781	1.312	1.443	1.381
1:50,000	1.121	0.572	0.633	0.615
1:100,000	0.837	0.422	0.421	0.440



TGEV 6	# 1	# 2	#3	#4
PBS	0.066	0.074	0.072	0.076
0차 1:100	0.064	0.064	0.061	0.061
1:100	1.890	1.823	1.809	1.857
1:1,000	1.842	1.530	1.604	1.760
1:5,000	1.569	0.746	0.941	1.095
1:10,000	1.253	0.400	0.635	0.683
1:50,000	0.519	0.145	0.196	0.216
1:100,000	0.349	0.114	0.150	0.144

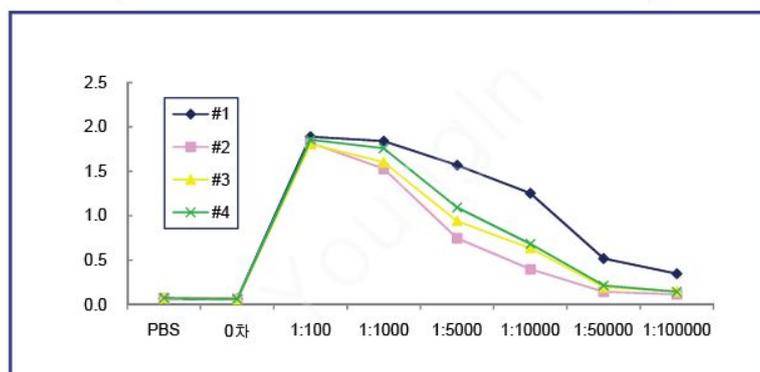


Fig. 27 TGEV-specific monoclonal antibody production in mouse

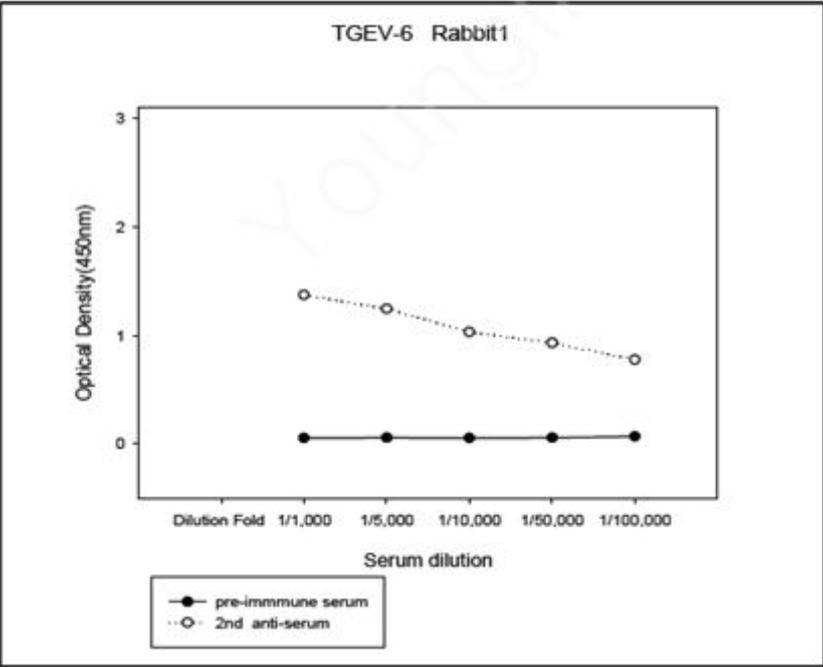
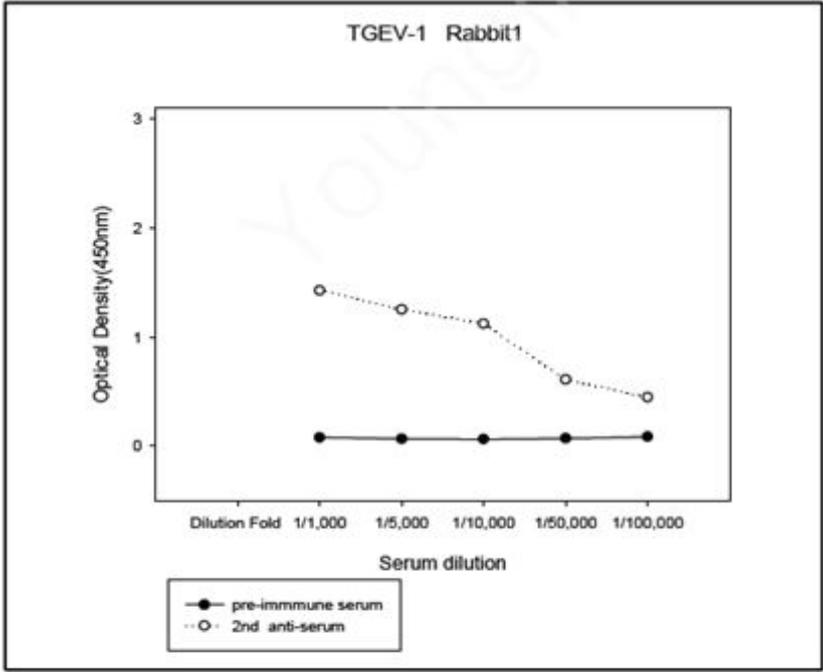
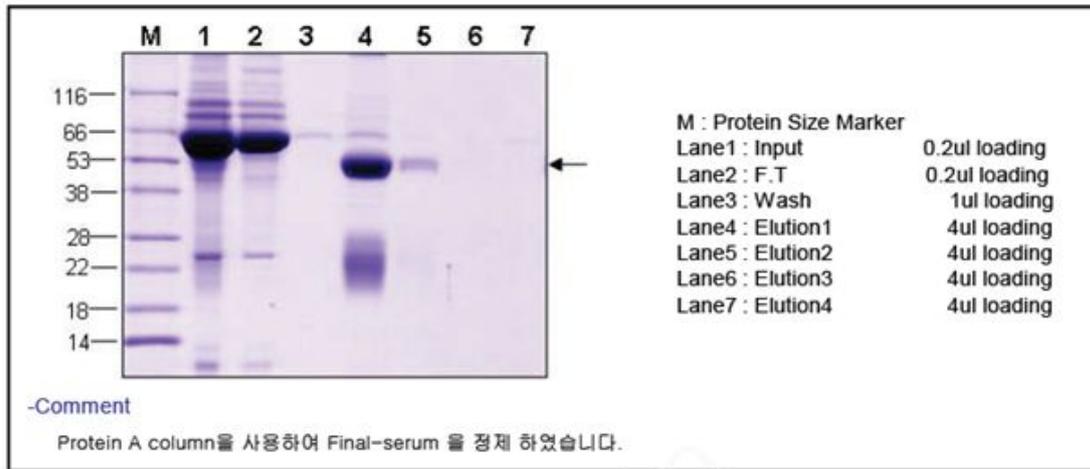
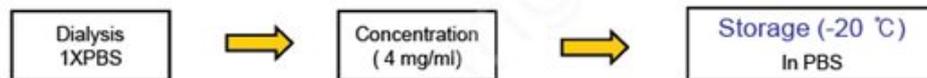


Fig. 28 TGEV-specific polyclonal antibody production in rabbit

1st step : Protein A purification (anti – TGEV R1)



2nd step : Dialysis & Concentration



- Results

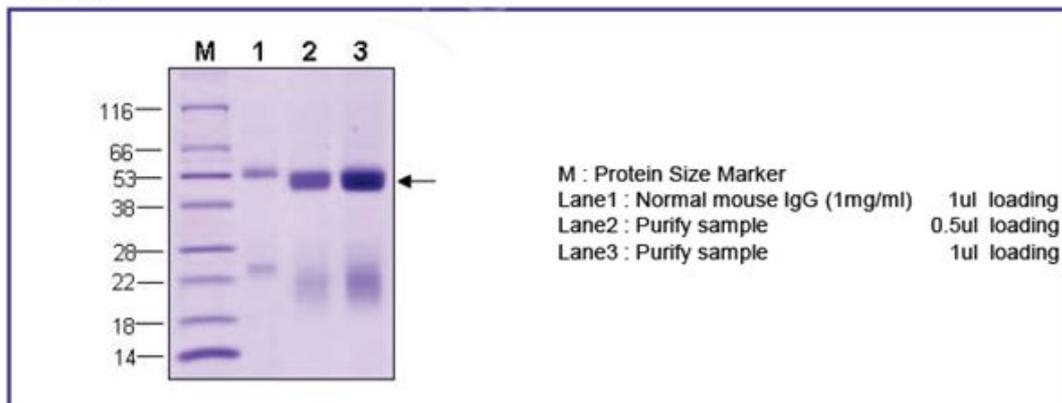


Fig. 29 Purification procedure of anti-TGEV antibody. First step is protein purification by protein A column and second step is dialysis and concentration.

3. 최적화된 ELISA 검출을 위한 조건 확립

식물체 발현 TGEV 단백질 검출은 물론이고 마우스 면역유도 실험에 의해 확보된 혈액내 항체 형성 여부를 확인하기 위하여 ELISA 분석법 확립 필요하다. 상품화되어 시판되고 있는 TGEV-specific ELISA 키트가 있으나, 매우 고가이고 돼지-혈청 분석용이기 때문에 본 실험에 적용하기에는 무리가 있다고 판단되어 직접 multi-well에 TGEV-항원으로 코팅 한 후 항체를 검출하는 manual ELISA 방법을 민감도와 정확성 높은 수준으로 확립하는 실험을 수행하였다.

ELISA 반응을 위해 200 ng의 peptide (prediction 1-SYGEIPFGVTDGPRYC) 항원으로 코팅하여 4°C에서 overnight 또는 실온에서 1시간 조건으로 각기 반응시켰다 (그림 30). 마우스-유래 혈청을 희석배수 1:100 비율 (100ul)로 적용하고 이 때 37°C, 2 시간 반응 후에 2nd HRP-항체를 1:10000 비율로 첨가하여 실온에서 1시간 방치하였다. TMB substrate 용액으로 5분 동안 발색시킨 후 OD 450nm에서 흡광도를 조사하였다. 그 결과, peptide 항원 코팅 조건을 4°C에서 overnight 또는 실온에서 1시간 조건으로 하는 것은 유의성있게 큰 차이를 보이지는 않았다.

- n-1; 일반 시료 처리구
- n-2; TGEV 항원을 발현하지 않는 대조구 감자의 경구투여에 의해 형성된 혈청시료
- p-1; peptide항원 (5ug)을 근육주사 투여에 의하여 형성된 혈청 시료
- p-2; peptide항원 (50 ug)을 경구투여에 의하여 형성된 혈청 시료
- d; 감자-유래 TGEV 단백질 (감자 생체중 15g)을 경구투여하여 얻어진 혈청 시료

ELISA 법의 정확도 및 민감도를 알아보기 위한 또 다른 방법으로 채취한 serum 시료를 1/100, 1/250, 1/500, 및 1/1000으로 dilution series를 만들어 항체가의 변화정도를 조사하였으며 그 시료는 다음과 같이 하였다. primming 을 마친 4주째 시료와 boosting을 마치고 항체가 증가를 보였던 10주째 시료를 대상으로 조사하였으며 위에서 제시한 처리구들 중에서 n-2, p-1, 및 p-2 시료만을 취하였다. 결과를 보면 (그림 31), 항체가 제대로 형성되지 않은 4주째는 dilution series 간의 항체 변화가 당연히 나타나지 않았으나, 10주째인 시료에서는 dilution series 에 따라 비율이 높을수록 항체가 일정한 비율로 감소하였음을 알 수 있었다. 이는 예상한 반응의 결과로서 ELISA 확립을 위한 serum의 농도를 정할 수 있었음을 보여준다고 하겠다.

다음으로는 항체 제작시에 사용하였던 prediction-1 peptide 200ng을 multi-well에 코팅 한 후, TGEV 특이 항체 형성 확인을 위하여 각 시료들 별로 얻어진 혈청을 결합시킨 후 (A), (B), 및 (C) 그래프의 네모표에 표시한 대로 조건에 따라 실험을 수행하였다. 먼저 blocking을 실온에서 두시간 수행, 2nd HRP-항체 결합 조건은 1:10000 비율로 실온에서 한 시간 수행하였고 마지막 검출 단계인 TMB binding 조건을 10분, 20분, 및 30분에서 각각 그 민감도를 확인하였다 (그림 32). TMB binding 시간을 20분 이상 두었을 경우 p-1 구의 값 증가에 비해 p-2와 d 처리구의 반응값이 상대적으로 증가하였고, 무엇보다 무항체 형성구에서 값이 증가하였다. 이는 TGEV 특이적 반응의 증가에 의한 것이기 보다는 background에 의한 값의 증가에 의한다고 보여진다. 결론적으로 세 그래프를 비교하였을 때 TMB binding은 10분으로 하는 것이 가장 좋은 조건으로 판단된다.

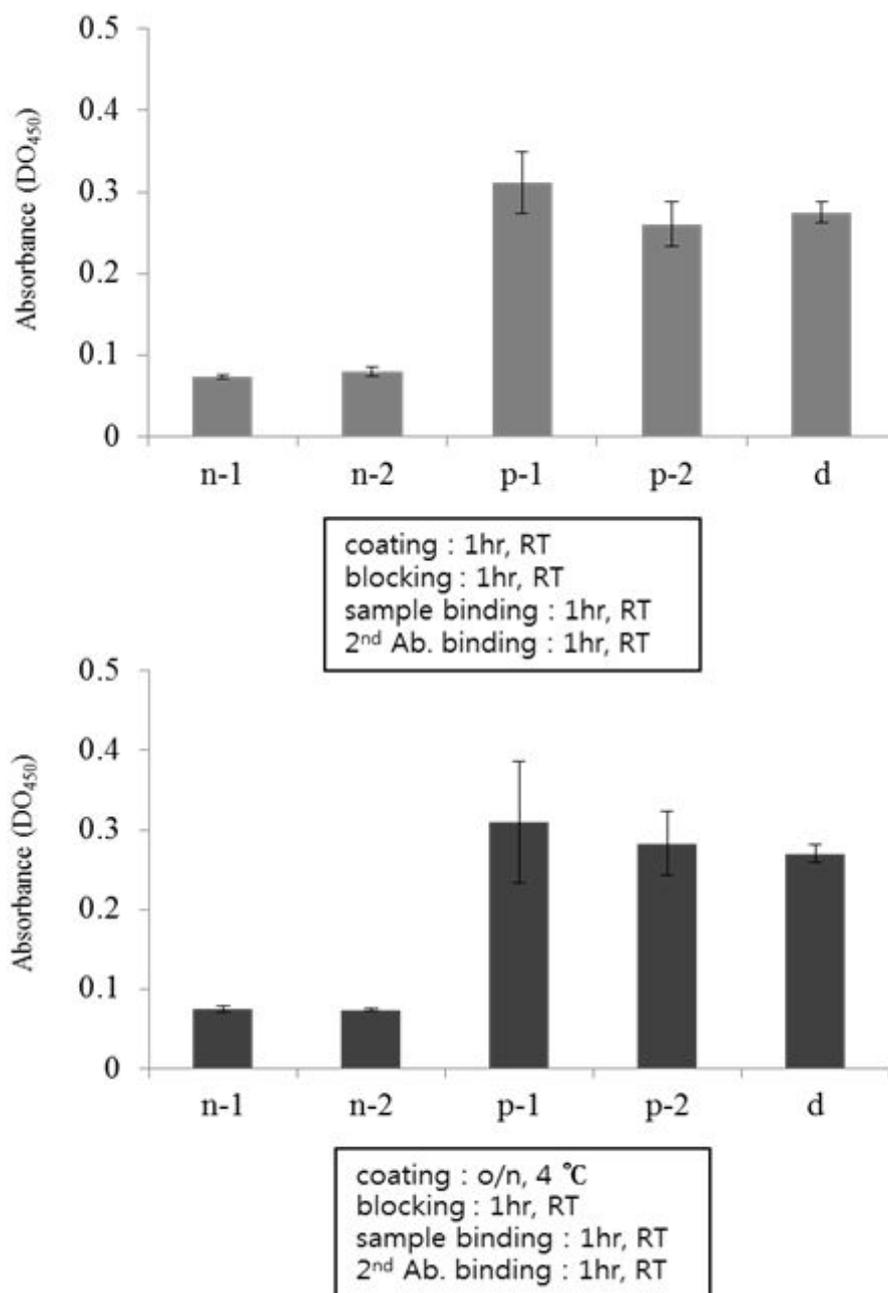


Fig. 30 Establishment of ELISA condition for detection of mouse-derived serum against TGEV specific

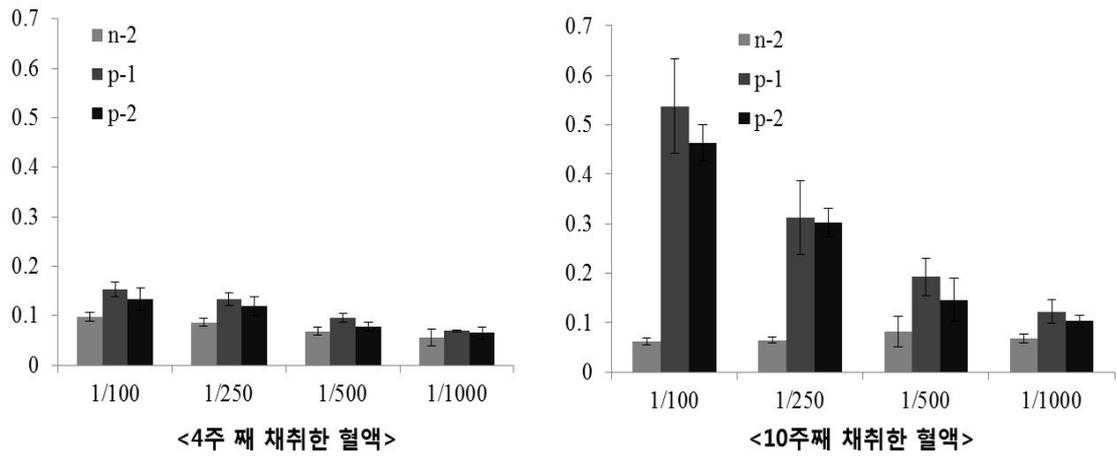


Fig. 31 Comparison of antibody to serial dilution of serum at 4th or 10th sample

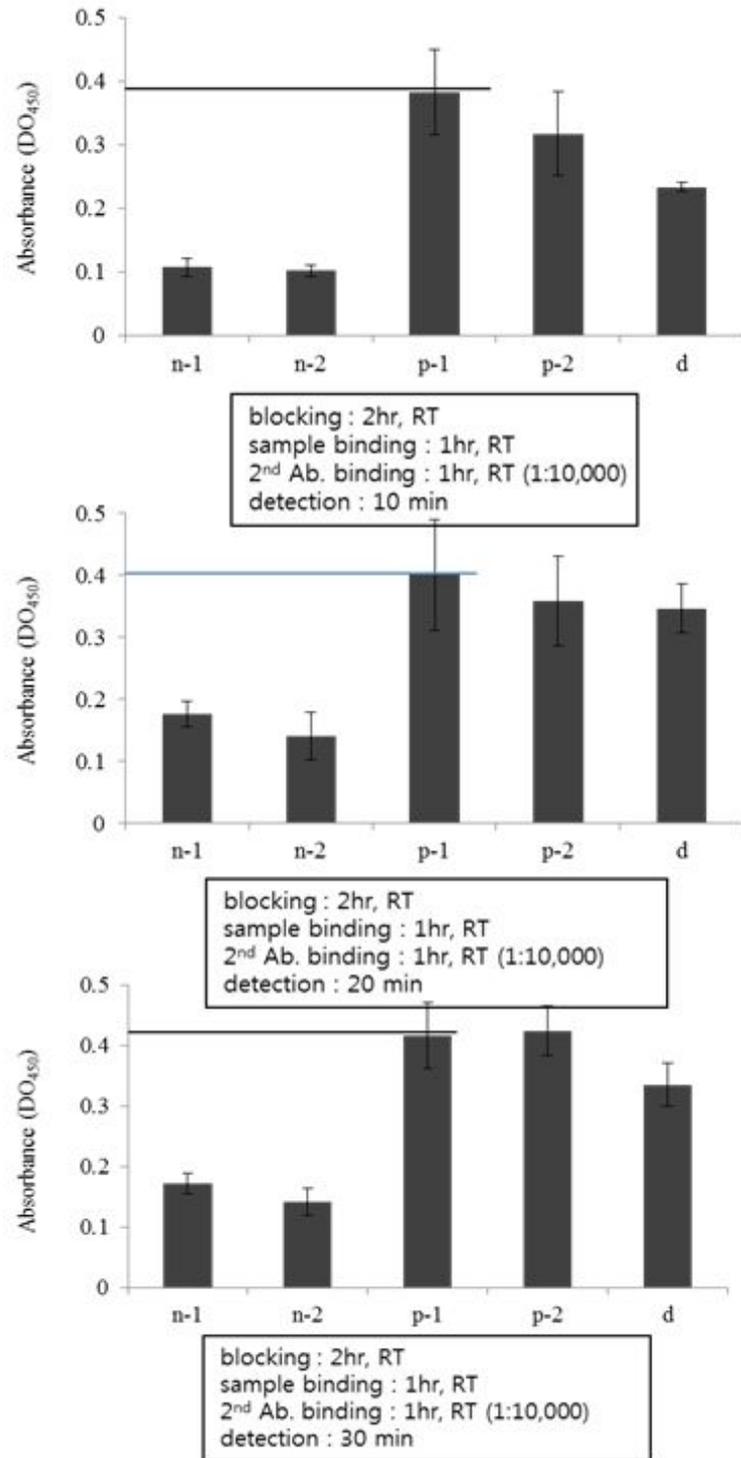


Fig. 32 Establishment of ELISA condition for detection of mouse-derived serum against TGEV specific

이와 같은 실험을 통해 확립된 조건으로 향후의 감자-유래 TGEV 항원단백질을 검출하기 위한 ELISA 실험을 수행하였다.

감자 단백질 추출에 가장 적절한 buffer 조성을 알아보기 위하여 아래에 제시된 네 종류의 buffer를 대상으로 peptide 항원과의 흡광도를 비교하였다. 실험에 사용된 buffer는 다음과 같다

- 버퍼조성-	
1. QB buffer :	100 mM KPO4 (pH7.8) 1mM EDTA 1% Triton X-100 10% glycerol 1mM DTT
2. PBS buffer :	100 mM PBS (7.4) 1 mM EDTA 0.01 % 2-mercapto EtOH
3. SDS buffer :	4 % SDS 5 % sucrose 10 % PVP 0.3 % DTT 20 mM Sodium phosphate (pH7.0)
4. Extraction buffer :	50 mM Tris (pH7.4) 100 nM NaCl 1 mM EDTA 0.05 % Triton X-100 50 mM Na-Ascorbate

실험 결과 100mM KPO4(pH7.8), 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol과 1mM DTT를 포함하는 QB buffer에서 가장 높은 TGEV-특이적 흡광도를 보였다.

4. 소동물 마우스를 이용한 감자-유래 TGEV 단백질의 면역반응 유도 실험

식물-유래 경구 백신으로서의 효능 평가를 위해 일차적으로 소동물 마우스를 이용한 면역유도 (Immunization test) 실험을 수행하였다. 형질전환감자식물체(P-2)를 대량으로 온실재배하여 감자시료를 확보한 후, 확보된 감자시료를 얇게 slice한 다음, freeze-dryer에서 완전하게 수분을 제거하고 분말화하였다. 분말시료에서 총수용성단백질(TSP)을 추출 후 정량화하여 TSP extracts를 마우스 경구투여에 사용하였다.

Mice immunization 실험은 다음과 같은 처리구로 나누어 수행하였으며, 반복 마리수는 처리당 5마리로 하였고 마우스는 5주령의 초기 중량 20g 전후를 취하였다.

- ①n-1; 대조구로서 일상적인 시료에 의해 생육되어진 처리구
- ②n-2; 형질전환 감자 처리구에 대한 대조구로서 형질전환되지 않은 일반 감자 (생체중 10g) 추출액 투여구
- ③p-1; 경구투여구에 대한 대조구로서 peptide항원(5ug)의 근육주사에 의한 immunization 처리구
- ④p-2; 경구투여에 의한 항체형성여부를 알아보기 위한 peptide항원(50ug)의 oral 투여에 의한 immunization 처리구
- ⑤감자-유래TGEV 단백질에 의한 Mice immunization 실험으로서 경구투여 용량별 항체형성 여부를 알아보기 위하여 감자의 생체중별 용량을 1g (A), 5g (B), 10g (C), 및 15g (D)와 같이 하여 처리하였다.

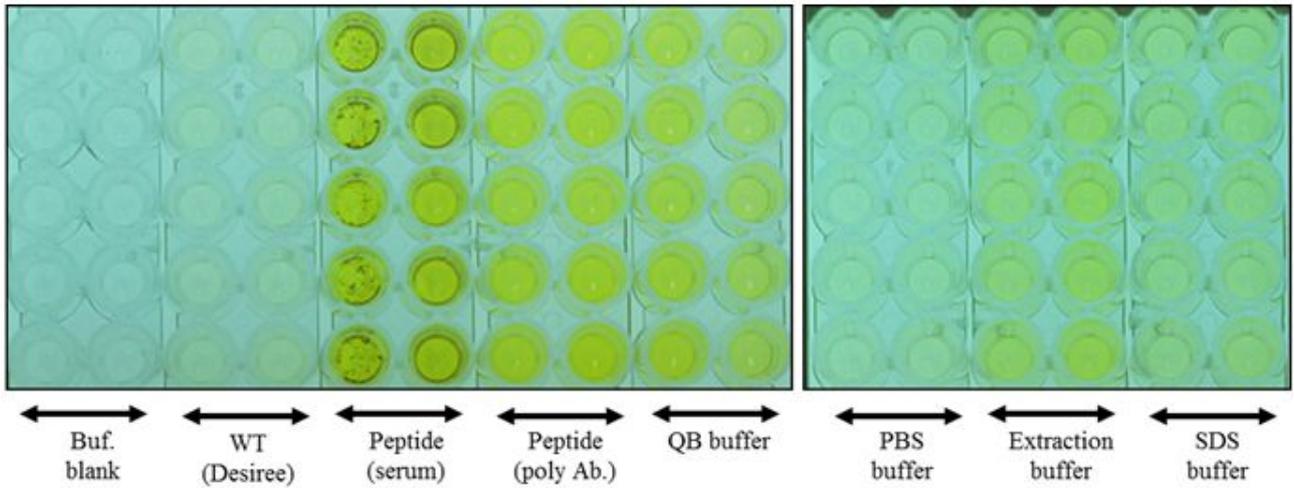
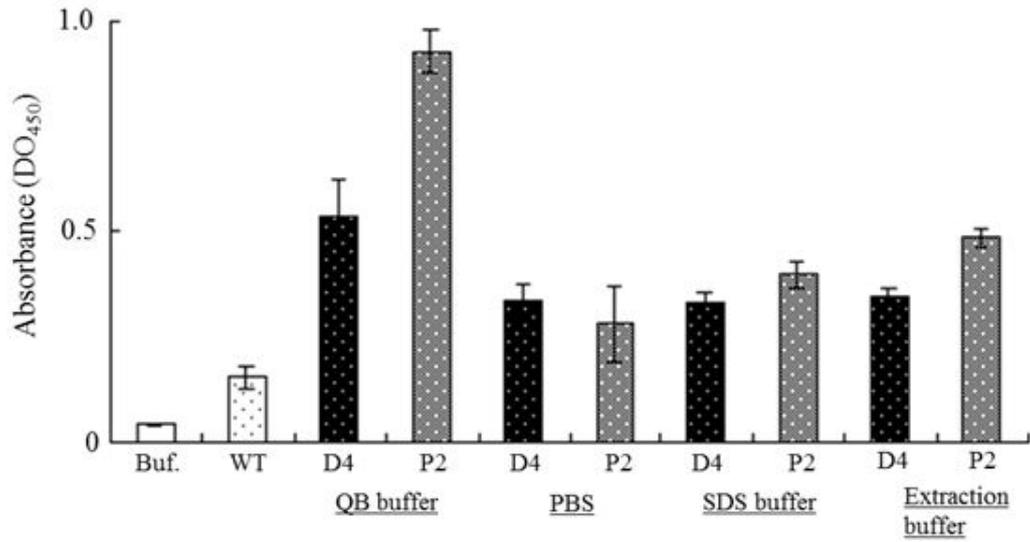


Fig. 33 감자단백질 추출버퍼별 흡광도 (OD450nm) 비교 (upper) 및 TMB substrate에 의한 발색 비교 (lower)

경구투여는 존데를 이용한 1회 투여 (투여량 500ul)를 일주일 간격으로 총 3회 실시하였으며, 이 때 adjuvant는 cholera toxin 10ug을 실험시료와 혼합하여 투여하였다. 근육주사의 경우 CT 아쥘번트가 아닌 1회에는 complete freund 아쥘번트를, 2회와 3회 째는 incomplete freund 아쥘번트를 각각 사용하였다. 3주간의 연속적인 primming에 이어 8주차에 peptide 항원을 이용한 boosting을 실시하였고 혈액 채취는 immunization 수행 직전, 그 후 일주일 간격으로 10주 까지 진행하였다.

항체 형성 결과를 보면 형질전환하지 않은 일반 감자 추출액 투여구는 일상적인 시료에 의해 사육한 마우스와 유사한 수준의 항체 무반응을 보였는데, 이는 감자 본래의 단백질에 의하여는 TGEV-specific 반응이 유도되지 않음을 보여준다. 근육주사에 의한 면역 항체 유도치가 가장 높게 나타난 반면, 동일한 항원을 경구투여하였을 때는 약 절반 정도의 수치에 머물렀다. 일반적으로 경구투여시에 근육주사에 비하여 항원량을 10배 이상 하는 것으로 알려져 있으며 본 실험 역시 그러한 기준에 맞추어 수행하였으나, 유도된 항체가는 낮았으며 이는 경구투여에 의한 면역반응이 까다롭고 어렵다는 것을 의미한다고 본다. 감자-유래 TGEV 단백질에 의한 면역항체 유도 수준은 peptide 항원의 경구투여에 의해 형성된 항체 수준과 유사하였다. 투여한 항원양에 비례하여 항체가는 나타났으며 가장 높은 항원양을 투여한 처리군은 50ug의 positive 항원 투여구와 10주째에서 그 값이 오차범위 내로 좁혀지는 경향을 보였다. 이는 경구투여에 의한 면역반응 기작이 우리가 생각하는 요인들 (예를 들면 투여한 항원양, 아쥘번트의 영향 등) 이외의 요인들에 의해 영향을 받을 가능성이 높음을 의미한다고 생각되지만 앞으로의 더 많은 실험에 의하여 보완되어져야 될 부분이라고 본다.

모든 처리구들에서 항체 형성은 3번에 걸친 primming에 의한 primary antibody 형성은 낮았으며 8주째의 boosting에 의해 면역반응의 증폭으로 인한 항체형성가가 증가됨을 보여주었다 실험이 진행되는 동안 각 처리구 당 5마리 반복하여 총 40마리의 쥐에서 죽거나 병에 걸리는 등의 이상증세는 나타나지 않았으며, peptide 항원의 근육주사 및 경구투여, 그리고 TGEV 항원단백질을 발현하는 형질전환 감자의 경구투여구 모두의 실험대상 마우스의 생체 중 변화를 조사한 결과 일상적인 사료를 먹고 사육된 쥐와 동일한 몸무게 증가를 보여주어 감자의 투여는 물론 TGEV를 발현하는 형질전환 감자에 의한 부가적인 독성은 없음을 알 수 있으며 이 실험은 보다 면밀한 안전성 평가 과제를 통해 이루어져야 할 것으로 보인다. 뒤이어, 아쥘번트에 따른 면역 반응 평가하였는데, 마우스 대상 실험에서 가능한 아쥘번트의 종류를 다양화하여 유도되는 면역반응의 증감여부를 알아보았다. 먼저 일반적으로 가장 많이 사용되는 cholera toxin (CT)을 기준으로 oligonucleotides containing immunostimulatory CpG, complete or incomplete freund adjuvants, 그리고 식물 추출액을 비교하였다. 아쥘번트 CT는 650.13mIU, CpG의 경우 528.48mIU, 식물추출물을 사용하였을 경우 515.28mIU 값을 나타내었다. 4주 후 일차 면역반응 유도에는 아쥘번트에 관계없이 항체값을 나타내지 않았으며, 8주 boosting 후 10주 째 조사에서 앞에서 보여진 유의한 항체값을 보였다. 베타아밀로이드 항원을 포함하는 감자의 경구투여시에는 oligonucleotides containing immunostimulatory CpG의 값이 높았던 반면, HBV를 발현하는 감자의 경구투여시에는 CT의 효과가 가장 높게 나타나는 등 목표로 하는 항원의 종류에 따라 다른 영향을 미치는 것으로 파악되었다. 또한 식물추출물을 이용한 아쥘번트 효과는 두드러지지 않았다. TGEV 항원의 경우 역시, CT의 효과가 가장 좋았으며 식물 추출물에서 두드러진 효과는 보이지 않았다.

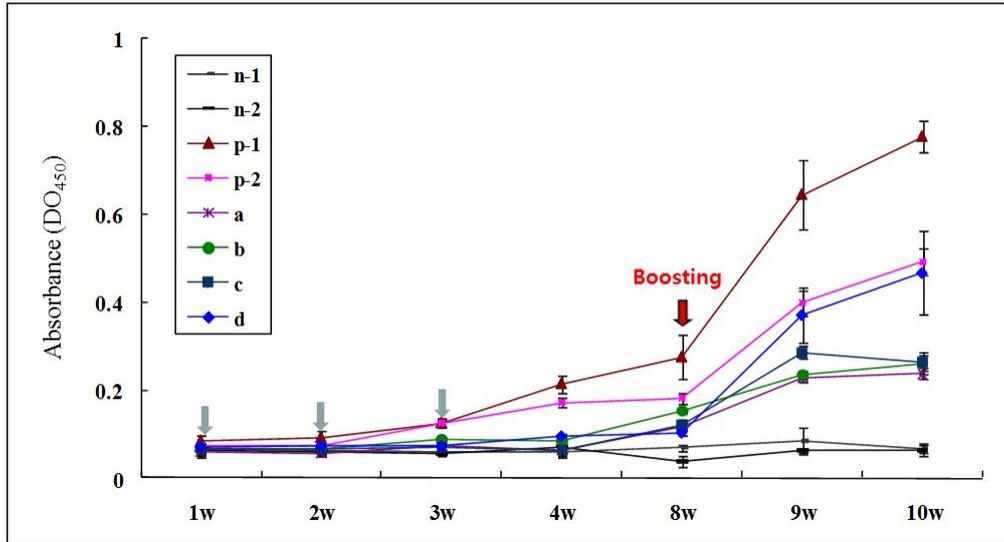


Fig. 34. TGEV 항원의 경구투여에 의한 mice immunization. 세번의 연속적인 경구투여와 8주째의 boosting 후에 각각 채취한 혈액에서의 항체형성반응을 ELISA 분석 수행

- N-1 (control) : 5마리
- N-2 (wild type potato extract - FW 10g) : 5마리
- P-1 (peptide 근육투여 - 5 ug) : 5마리
- P-2 (peptide oral투여 - 50 ug) : 5마리
- a (potato-derived TGEV- FW 1 g) : 5마리
- b (potato-derived TGEV- FW 5 g) : 5마리
- c (potato-derived TGEV- FW 10 g) : 5마리
- d (potato-derived TGEV- FW 15 g) : 5마리

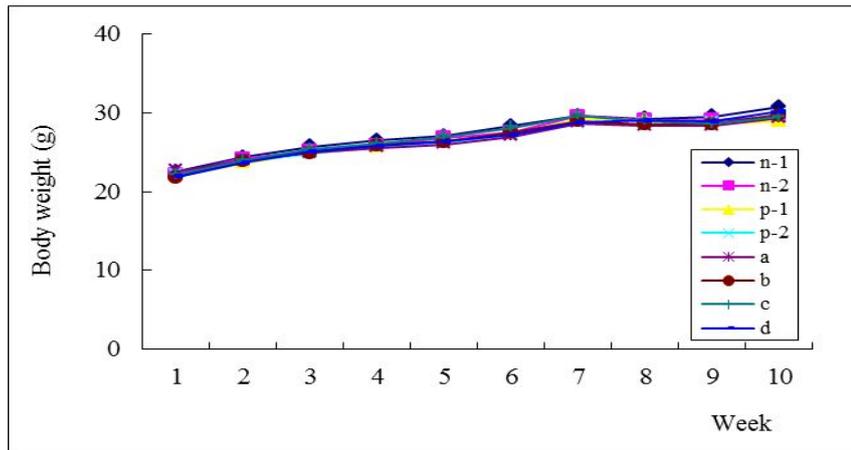
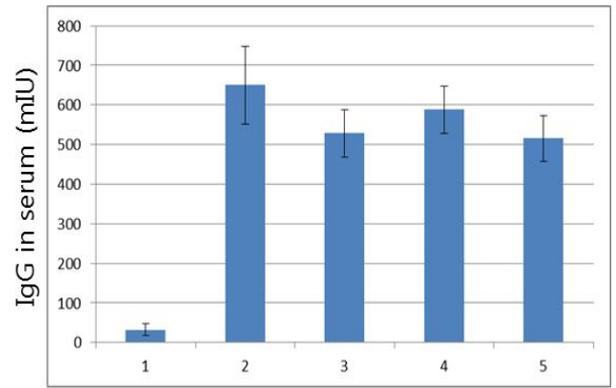
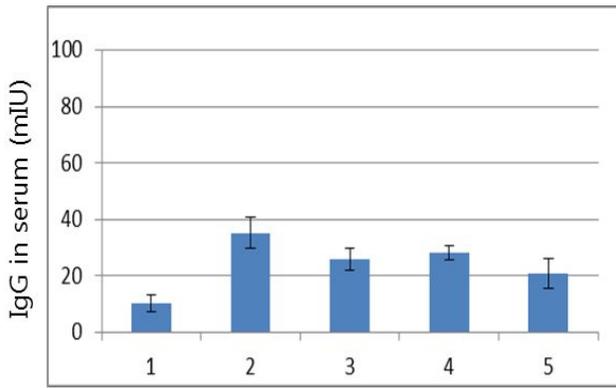


Fig. 35 Mice immunization 실험이 진행되는 10주 동안의 실험쥐의 생체중 변화

- N-1 (control) : 5마리
- N-2 (wild type potato extract - FW 10g) : 5마리
- P-1 (peptide 근육투여 - 5 ug) : 5마리
- P-2 (peptide oral투여 - 50 ug) : 5마리
- a (potato-derived TGEV- FW 1 g) : 5마리
- b (potato-derived TGEV- FW 5 g) : 5마리
- c (potato-derived TGEV- FW 10 g) : 5마리
- d (potato-derived TGEV- FW 15 g) : 5마리



After 4wks

After 10 wks

Fig. 36 아쥬반트 종류에 따른 면역 반응 정도 비교. 1;항원 투여하지 않은 대조구, 2;cholera toxin처리구, 3; CpG처리구, 4;complete or incomplete freund 아쥬반트, 5;식물추출물 아쥬반트

제 3 절 HBV 및 TGEV 발현 형질전환 감자의 대사체 분석

1. 감자 FT-IR 스펙트럼 조사 및 다변량 통계 분석

가. 식물 시료:

감자의 FT-IR 스펙트럼 분석에 사용된 시료는 대조구인 Desiree, 형질전환체인 PHBV-8 및 Tgev P2 감자의 동결건조 분말을 사용하였다.

나. FT-IR 스펙트럼 조사:

세종류 동결건조 감자 분말을 20 mg씩 준비하여 1.5ml EP tube에 각각 준비하고, 각 tube에 20% MeOH 용액을 200ul 첨가하여 잘 섞어준다. 20% MeOH가 첨가된 시료를 50°C waterbath에서 20분간 추출을 한다. 20분 처리후 원심분리기에서 13,000rpm으로 15분간 원심분리한다. 원심분리가 끝나면 새로운 1.5ml tube에 추출된 상층액을 수거하고, 다시 1분간 13,000rpm에서 원심분리하여 찌꺼기가 제외된 분석 시료 준비하였다. 추출된 감자 추출액을 384-well ZnSe plate 상에 각각 5ul 씩 분주하고, 37°C에서 건조 시킨다. FT-IR spectrometer는 Tensor 27, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany을 사용하였다. 건조된 ZnSe plate를 Tensor 27에 삽입하고 OPUS software (version 6.5)를 이용하여 FT-IR 스펙트럼을 조사하였다. FT-IR 스펙트럼은 FT-IR spectrometer (Bruker Tensor27)에 장착된 HTS-XT 고효율 자동화 장치를 이용하여 스펙트럼을 조사하였다. 각 시료의 FT-IR 스펙트럼은 IR global 광원을 이용하여 DTGS 검출기로 분석 하였으며 스펙트럼은 총 400 - 4000 cm^{-1} 범위, 4 cm^{-1} 간격으로 총 128회 반복 조사 후 얻어진 평균 스펙트럼을 데이터 분석에 사용하였다. FT-IR 스펙트럼 조사는 각 시료당 9회 반복 조사하였다. FT-IR 스펙트럼 조사 및 데이터 변환에 사용된 프로그램은 Bruker 에서 제공하는 OPUS Lab (ver. 6.5, Bruker Optics Inc.)를 사용하였다.

다. FT-IR 스펙트럼 데이터 가공 및 다변량 통계분석:

FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석을 위해 먼저 FT-IR 스펙트럼 데이터의 baseline 교정, normalization 및 mean centering 등 스펙트럼의 전처리 과정을 R 프로그램 (ver 2.5)을 이용하여 수행하였다. Baseline 교정을 위해 FT-IR 스펙트럼 분석 영역의 양 끝점(800-1800 cm^{-1})의 흡광도를 0으로 조정하였으며 실험상의 오차를 최소화하기 위하여 각 스펙트럼을 동일 면적으로 normalization 하였다. 이후 데이터의 mean centering 과정을 거쳐 2차 미분한 다음 다변량 통계분석 분석을 위한 표준화된 데이터로 사용하였다. 이와 같이 가공된 FT-IR 스펙트럼 데이터는 NIPALS 알고리즘(Wold 1966)에 따라 PCA (Principal component analysis) 및 PLS-DA (least squares discriminant analysis) 분석을 수행하였다. PCA 및 PLS-DA 분석 결과로부터 얻어진 score를 이용하여 HCA (hierarchical clustering analysis) 분석을 수행하였으며 유사도 지수로 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean analysis) 를 이용한 euclidean distance를 측정하여 각 시료의 유연관계를 덴드로그램으로 표시하였다.

라. 감자 FT-IR 스펙트럼 데이터 다변량 통계분석 결과:

- 3 종류의 감자 FT-IR 스펙트럼을 비교분석한 결과 amide region ($1700\sim 1550\text{ cm}^{-1}$), lipids/fatty region ($1500\sim 1350\text{ cm}^{-1}$) carbohydrate region ($1100\sim 900\text{ cm}^{-1}$)에서 전체적인 대사산물의 양적, 질적 차이가 있음을 알 수 있다(그림 37. A).

- FT-IR 스펙트럼 데이터의 PCA 분석 결과 PCA score plot을 보면 3종류의 감자 Des, PH-8, Tgev는 서로간에 별도의 그룹을 형성하고 있으며 PC score 1, 2는 각각 총 변이량의 54.2%, 17.8%를 각각 나타내고 있어 총 72%의 변이량을 나타내고 있다. 이 결과는 각 감자 라인별로 대사체의 패턴이 상이함을 나타내고 있는 것을 의미한다(그림 37. B).

- PCA score plot 상에서 각각의 그룹을 구분함에 있어서 중요한 역할을 하는 FT-IR 스펙트럼을 조사한 결과 그림 1A에서 보여준 스펙트럼의 차이 부분과 거의 유사한 FT-IR spectral region이 감자 라인별 그룹 구분에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다(그림 37C).

- PLS-DA score plot 상에서는 3종류의 감자라인은 더욱 확실하게 별도의 그룹을 형성하여 3개 감자 라인의 대사체 패턴이 상이함을 보여주고 있다(그림 37D).

이상의 FT-IR 분석 결과를 보면 분석에 사용된 감자 라인이 3종류로 매우 적으며 각각이 개체 변이가 반영되지 않은 혼합 분말 시료를 사용하였기 때문에 대조구인 Desiree, 형질전환체인 pHBV-8 및 Tgev P2 감자 라인이 대사체 패턴이 각 라인별로 매우 상이하다는 결과를 얻은 것으로 사료됨. 따라서 분석 시료의 종류가 많아지면 대조구 감자와 대사체 패턴이 상이한 형질전환체 감자 라인을 추가적으로 확보할 수 있을 것으로 사료됨. 특이한 점은 FT-IR상에서 형질전환체인 pHBV-8 및 Tgev P2 감자 라인은 대조구에 비하여 주로 단백질이나 아미노산들이 검출되는 amide region ($1700\sim 1550\text{ cm}^{-1}$)에서 이들의 함량이 상대적으로 높은 것으로 밝혀짐. Carbohydrate region ($1100\sim 900\text{ cm}^{-1}$)에서는 pHBV-8 라인이 다른 2라인에 비해 sugar compounds의 함량이 적으며 질적, 양적 패턴 또한 상이한 것으로 나타났다.

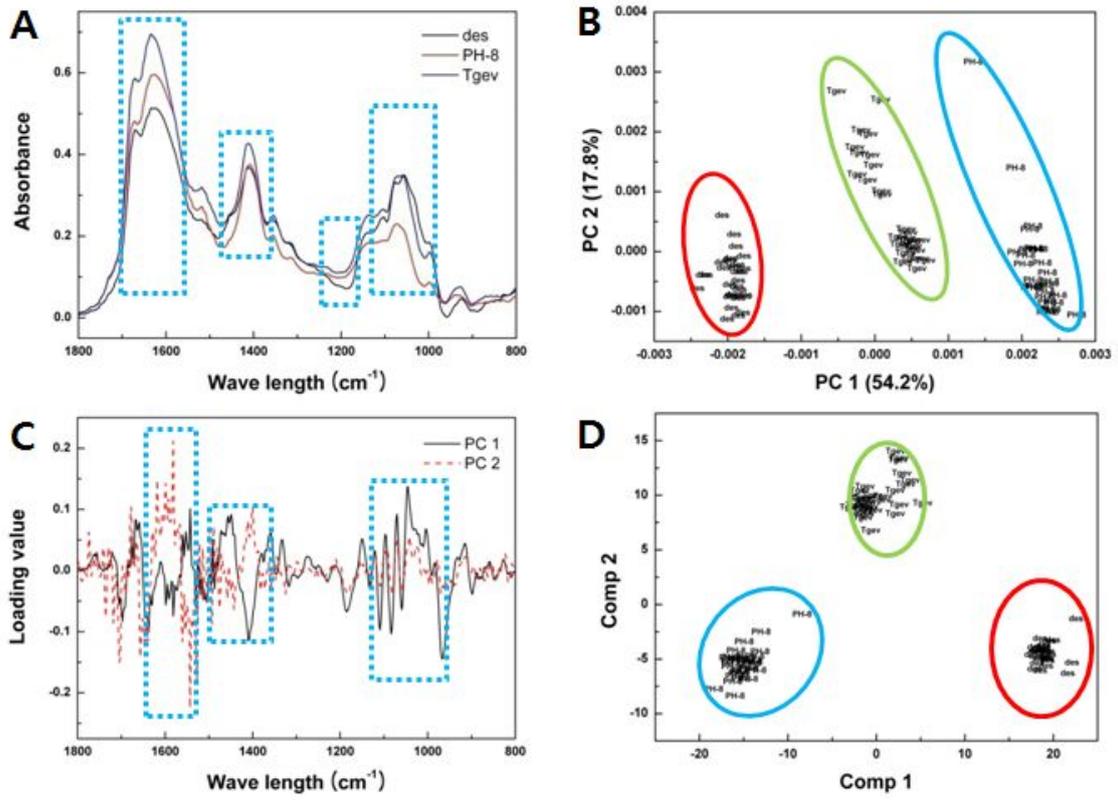


Fig. 37 감자 FT-IR 스펙트럼 데이터 다변량 통계 분석

2. 감자 분말 시료의 전분 함량 조사

가. 식물 시료:

감자의 FT-IR 스펙트럼 분석에 사용된 시료는 대조구인 Desiree, 형질전환체인 pHBV-8 및 Tgev P2 감자의 동결건조 분말을 사용하였다.

나. 전분함량은 Megazyme total starch assay kit를 사용하여 분석하였다.

1. Megazyme Total Starch Assay kit를 이용하여 Megazyme Total Starch Assay Procedure (2009)를 수정한 방법으로 증개구리밥에서 전분 함량을 분석하였다.
2. 배양 조건 별로 동결 건조한 증개구리밥 시료를 막자 사발에서 곱게 분쇄한 후 0.5 mm 체에 통과 시킨 후 10mg 씩 정확하게 계량하여 각 시료당 3개씩 준비한다.
3. 정량한 시료 10 mg을 추출용 유리 튜브(16 x 120 mm)에 넣고 가볍게 두드려 튜브 바닥에 모이도록 한 후 80% ethanol 50 ul를 첨가하고 혼합하여 시료가 분산되도록 한다.
4. 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 용액에 용해된 thermostable α -amylase (30 Units) 0.3 ml를 즉시 첨가하고 잘 혼합 후 끓는 물에서 6분간 반응 시킨다. 추출물 덩어리를 풀어주고 균일하게 하기 위해 반응 중 2분마다 강하게 섞어 준다.
5. 반응 후 50°C에 옮겨 amyloglucosidase (33 Units) 10 ul를 첨가하고 잘 혼합 후 30분간 반응 시킨다.
6. 반응이 끝난 추출물을 15 ml falcon tube에 옮기고 벽면에 남은 추출물을 증류수로 몇 번 세척 후 합하고 총 부피를 10 ml로 조정한다.
7. 3000 rpm에서 10분간 원심 분리 후 깨끗하게 분리된 상층액을 새 튜브로 옮긴다.
8. 추출액 0.1 ml를 취해 새 유리 튜브에 넣고 GOPOD Reagent (Potassium phosphate buffer 0.26 M, pH 7.4, *p*-hydroxybenzoic acid 0.22 M and sodium azide 0.4 % w/v) 3 ml를 첨가하고 50°C에서 20분간 반응 후 510 nm에서 흡광도를 측정한다. 시료와 함께 Reagent blank와 standard solution을 함께 준비 후 흡광도를 측정한다.
9. Glucose controls로는 glucose standard solution (1 mg/ml) 0.1 ml, reagent blank solution은 water 0.1 ml에 각각 GOPOP reagent 3 ml를 혼합한 용액으로 준비한다.
10. 시료 중 전분 함량은 다음과 같이 계산한다.

$$\begin{aligned} \text{Starch, \% w/w dry wt. basis} &= \Delta_A \times F \times FV/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 \\ &= \Delta_A \times F/W \times FV \times 0.9 \end{aligned}$$

Δ_A = Absorbance (reaction) read against the reagent blank.

F = 100 (ug of D-glucose)/absorbance for 100 ug of glucose

W = The weight in milligrams ('as is' basis) of the flour analyzed.

FV = Final volume

162/180 = Adjustment from free D-glucose to anhydro D-glucose

- 대조구인 Desiree, 형질전환체인 pHBV-8 및 Tgev P2 감자의 동결건조 분말로부터 전분 함량을 조사한 결과 Desiree는 58.4±3.2(%) w/w, dry wt, pHBV-8는 56.0±2 그리고 Tgev P2는 52.6±2.1로 각 라인별로 전분 함량이 큰 차이를 보이지 않았다. 특히 FT-IR 스펙트럼 상에서 Carbohydrate region (1100~900cm⁻¹)에서 sugar compounds 함량이 낮을 것으로 예상되었던 pHBV-8 라인의 경우 total starch 함량에서는 다른 2라인에 비해 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

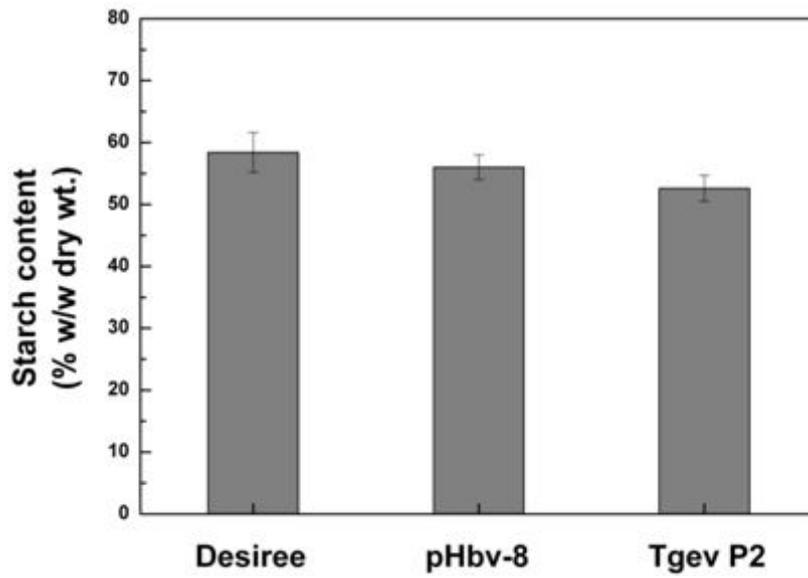


Fig. 38 Starch analysis of transgenic potato expressing HBsAg or TGEV

3. 감자의 total phenolic compounds 함량 조사

가. 식물 시료:

감자의 FT-IR 스펙트럼 분석에 사용된 시료는 대조구인 Desiree, 형질전환체인 pHBV-8 및 Tgev P2 감자의 동결건조 분말을 사용하였다.

Analysis of total phenolics contents

나. Total phenolic compounds 함량 조사: 동결건조 분말 100mg을 1.5ml EP tube에 넣고 80% EtOH 500ul 첨가한다. 80% EtOH이 첨가된 시료를 잘 혼합하고 95°C에서 5분간 추출을 한다. 추출된 시료를 12,000rpm에서 15분간 원심분리하고 상등액을 새로운 1.5ml EP tube 옮긴다. 시료는 D.W 830ul에 2N Folin-Ciocalteu's phenol 50ul을 첨가하고 20% Na₂CO₃ 100ul 와 sample extracts 20ul를 첨가하여 최종 volume이 1ml이 되게 준비한다. 또한 Control로 사용될 용액은 D.W 850ul에 2N Folin-Ciocalteu's phenol 50ul 와 20% Na₂CO₃ 100ul 첨가하여 준비한다. 준비된 용액은 20분간 상온에서 incubation 후 725nm에서 흡광도를 측정한다.

- 대조구인 Desiree, 형질전환체인 pHBV-8 및 Tgev P2 감자의 동결건조 분말로부터 Total phenolic compounds 함량을 조사한 결과 Desiree는 761.34 ± 4.47 (ug Chlorogenic acid equivalent/100mg of dry wt), pHBV-8는 850.49 ± 7.61 그리고 Tgev P2는 807.79 ± 10.3 로 형질전환 라인이 대조구에 비해 함량이 약간 증가한 것을 나타남을 알 수 있었다.

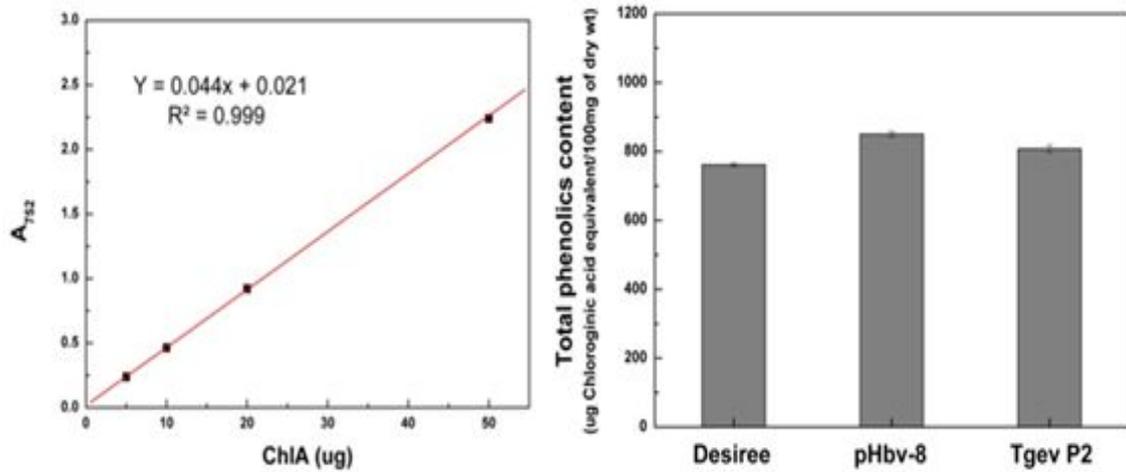


Fig. 39 Analysis of total phenolic compound of transgenic potato expressing HBsAg or TGEV

4. 감자의 Total flavonoids 함량 조사

가. 식물 시료:

감자의 FT-IR 스펙트럼 분석에 사용된 시료는 대조구인 Desiree, 형질전환체인 pHBV-8 및 Tgev P2 감자의 동결건조 분말을 사용하였다.

나. 감자의 total flavonoids 함량 조사: 동결건조 분말 10mg을 1.5ml EP tube에 넣고 100% EtOH 1ml을 첨가한 후 1시간 동안 상온에서 incubation한다. 상온에서 추출된 시료 추출액 0.1ml과 증류수 0.4ml을 첨가하여 총 0.5ml을 혼합해서 준비한다. 혼합액 0.5ml에 5% NaNO₂ 0.03ml을 첨가하여 10분간 반응 시킨다. 10분간 반응 시킨 후 10% AlCl₃ 용액 0.03ml을 첨가하여 1분간 더 반응시킨다. 반응 시킨 후 1M NaOH 0.2ml을 첨가하고 반응액의 총 부피가 1ml이 되도록 증류수를 첨가한다. 준비된 시료는 510nm에서 흡광도를 조사하고 total flavonoids를 정량한다. Catechin(100 mg/ml)을 reference compounds로 사용하여 정량 모델을 만들었다.

- 대조구인 Desiree, 형질전환체인 pHBV-8 및 Tgev P2 감자의 동결건조 분말로부터 total flavonoids 함량을 조사한 결과 Desiree는 63.44±0.0 (ug catechin equivalent/100mg of dry wt), pHBV-8는 26.88±0.06 그리고 Tgev P2는 56.99±0.15로 대조구가 형질전환 라인이 비해 약간 높았으며 특히 pHBV-8는 대조구에 비해 2배 정도 함량이 감소함을 알 수 있었다.

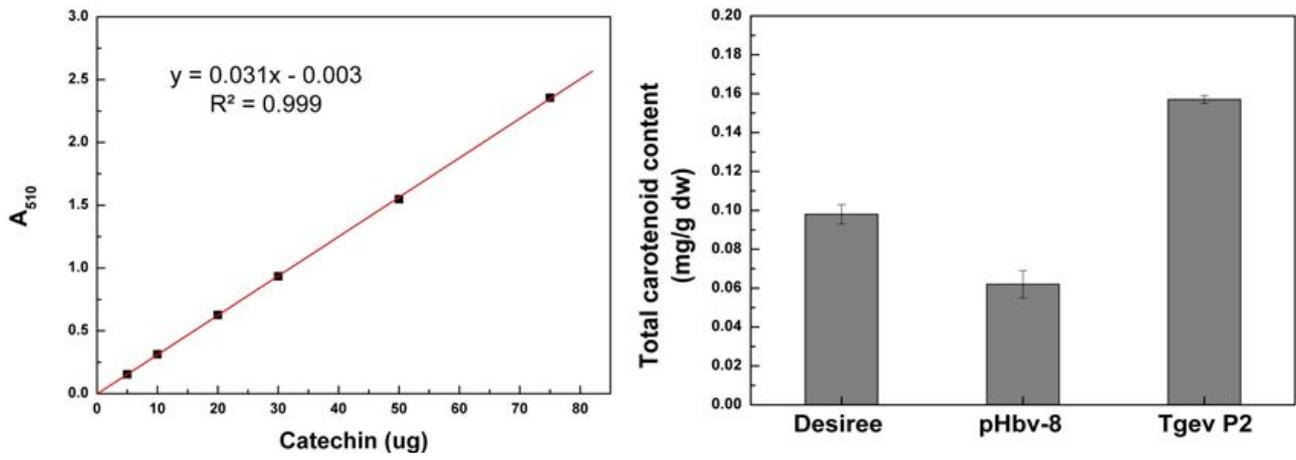


Fig. 40 Analysis of total flavonoids of transgenic potato expressing HBsAg or TGEV

5. 감자의 Total carotenoids 함량 조사

가. 식물 시료:

감자의 FT-IR 스펙트럼 분석에 사용된 시료는 대조구인 Desiree, 형질전환체인 pHBV-8 및 Tgev P2 감자의 동결건조 분말을 사용하였다.

나. 감자의 total carotenoids 함량 조사: 동결건조 분말 20mg을 EP tube에 넣고 80% Acetone 을 1ml 첨가한다. 첨가된 시료는 13,000rpm으로 5분간 원심분리하여 추출한다. 원심분리 후 상등액을 새로운 tube에 옮겨 준비한다. 준비된 추출물을 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 측정 파장 범위는 350nm ~ 750nm에서 흡광도를 조사하였으며 계산의 정확성을 유지하기 위하여 적절한 농도로 희석하여 흡광도가 750nm에서 0 으로, 663, 645 그리고 470nm에서 0.3 ~ 0.85 사이를 유지하도록 조정한 다음 측정된 흡광도를 이용하여 각각 chlrophyll 및 carotenoids 함량을 조사하였다. 정량계산에 사용된 수식은 다음과 같다.

$$\text{Chl}_a \text{ (ug/ml)} = 12.25A_{663} - 2.79A_{647}$$

$$\text{Chl}_b \text{ (ug/ml)} = 21.50A_{647} - 5.1A_{663}$$

$$\text{Car}_{(x+c)} \text{ (ug/ml)} = (1000A_{470} - 1.82\text{Chl}_a - 85.02\text{Chl}_b) / 198$$

- 대조구인 Desiree, 형질전환체인 pHBV-8 및 Tgev P2 감자의 동결건조 분말로부터 total carotenoids 함량을 조사한 결과 Desiree는 0.098 ± 0.005 (mg/g dw), pHBV-8는 0.062 ± 0.007 그리고 Tgev P2는 0.157 ± 0.002 로 Tgev P2가 가장 함량이 높았으며 pHBV-8는 함량이 가장 낮았다.

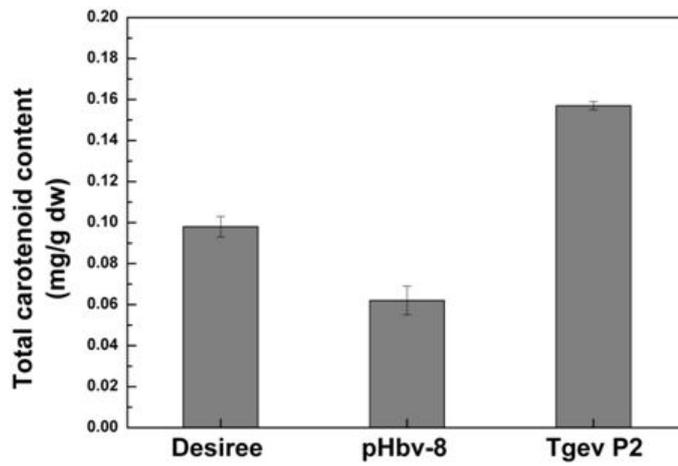


Fig. 41 Analysis of total carotenoids of transgenic potato expressing HBsAg or TGEV

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술

제 1 절 목표 달성도

1. 연구목표

항원력 검정 및 몇차례의 면역유도실험을 성공적으로 마친 HBV 백신용 형질전환 우수 형질전환 개체의 안전성을 확인하고, 나아가 식물경구백신으로 개발을 마무리 하는 것으로 한다. 또한 TGEV 백신용 형질전환 감자의 elite 개체를 선발하여 효율성 확인 후 백신 개발을 위한 기초를 마련하기로 한다. 이를 위하여 각 단계별로,

- (1) TGEV 항원 발현 감자 개체의 항원성 및 면역원성 검정
- (2) HBV 및 TGEV 항원 발현 감자 우수 개체의 독성평가를 비롯한
- (3) 감자-유래 HBV 및 TGEV백신 개발을 위한 administration protocol 개발
- (4) 실용화를 위한 식물-유래 백신의 활용 방안 개발

2. 연구개발목표 및 평가 착안점

1) 제1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 연도 (2009)	○식물-유래 항원 (HBV 및 TGEV) 에 대한 정 확한 항원성 평가 항목 마련	• 각 항원별 ELISA와 Western analysis의 탐색 조건 확립	20	- HBV 항원단백질의 경우 IRMA 법에 의한 항원성 평가법을 확립, - TGEV 항원 단백질의 웨스턴블롯과 ELISA에 의한 평가 방법
		• 식물-유래 항원의 투여에 의해 유도된 특이-항체에 의한 면역 기작 연구 자료 확보	30	- 식물-유래 HBV항원단백질의 경구투여 후 serum 확보; IgG 및 IgA 분석 실시 - 항체의 neutralizing 효과 분석: 간접적인 competition assay를 통한 분석
		• 감자-유래 항원의 면역 반응에 대한 아쥬번트 효능 평가	10	- 다양한 아쥬번트에 따른 감자-유래 항원의 면역 유도 증가 효과 검사
		• 식물-유래 항원의 투여 형태에 따른 경구투여시의 위장에서 분해 및 소화 흡수율의 비교 분석	10	- In-vitro 실험을 먼저 수행하여 조건을 파악해보고자 함. - TSP 추출버퍼 pH를 11, 7, 4로 나누어 본 결과 pH4에서 항원성의 70%만 유지됨
		• 면역반응을 통하여 효능이 확정된 우수(Elite)개체 고정	10	- PHBV-8번 개체; 영양번식작물인 감자의 특성을 이용하여 기내배양 시스템 확립 - Genomic PCR, Northern 및 Southern 분석에 의하여 유전자의 소실없이 잘 유지되고 있음을 확인
		• TGEV 발현 감자의 우수 개체 선발	10	- TGEV 발현 감자 중 분자생물학적 분석을 통하여 발현이 우수한 개체 선발
		• HBV 발현 감자의 유전자 정확한 도입 여부, 도입된 유전자의 copy 수, 도입유전자의 위치분석	10	- 기내배양으로 유지되고 있던 pPHBV-8 개체의 감자의 유전자 정확한 도입 여부, 도입된 유전자의 copy 수, 도입유전자의 위치분석

2) 제2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
2차 연도 (2010)	○TGEV 및 HBV 항원 발현 형질전 환 ELITE개 체의 품종화 및 백신 개발	◇ TGEV 백신용 형질전환체의 최종 개체 선발 완료 및 동물실 험 수행	30	- TGEV항원단백질 발현 우수개 체 p0.7-2 최종 선발함 - 감자-유래 TGEV 항원을 이용, 주요 용량별 투여군을 정하여 실 험. 3회투여, 1회 boosting 하여 10주간 동안 항체 형성을 관찰
		◇ 식물-유래 항원 검출의 효율 향상을 위한 항체 제작 및 ELISA 최적화 확립	10	-식물체내 도입한 0.7kb TGEV 유전자 분석을 통하여 각 부분별 면역원성 비교 분석 후 두 후보를 최종선택하여 원하는 항체 제작 마무리 - 시판중인 ELISAKit를 대체할 manual ELISA조건 확립
		◇ HBV백신용 형질전환체 PHBV-8의 외형 분석 및 형질 분석	10	- 영양변식 작물 등 특성에 알맞 은 후대 검정에 의한 감자 개체의 고정화 - 품종 등록을 위한 외형적 분석 자료화
		◇ 면역 증강 향상을 위한 항체 Fc의 도입	10	- 항원에 Fc fragment를 도입하 므로써 항원의 delivery 효율을 높 이고자 연구를 진행함
		◇ 마우스 Vaccination 파악 (oral administration schedule)	30	- Dosage 결정연구: 0.02ug~ 30ug 까지 각각의 dosage에 대한 항체 형성 - 투여 횟수 및 투여 시기 연구
		◇ Immune tolerance 가능성 여 부 확인 및 Vaccine booster 대 용 가능성 자료 제공	10	- 소량의 항원을 반복적으로 계속 투여하였을 경우 항체 형성이 아 닌 오히려 immune tolerance 가 능성 -Boositng 식물-유래 항원 또는 positive 항원으로 각각 실시하여 항체 형성 반응 분석

3) 제3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
3차 연도 (2011)	○ 항원 발현 형 질 전 환 ELITE 개체 의 품종화 및 백신 개발	◇ HBV 항원단백질을 발현하는 형질전환 감자의 구성 성분의 동등성 비교	35	- 형질전환 감자에서 HbsAg유전 자의 도입 영향에 의한 주요 구성 성분의 변화 분석 (동등성 분석): Foutier 변환 적외선 분광분석법, H-NMR spectra에 의한 주성분분 석(PCA)을 수행
		◇ 식물-유래 항원의 Vaccine booster로서의 효능 평가 실험 수행 대응 가능성 자료 제공	10	- yeast-derived positive-항원에 의한 boosting과 식물-유래 항원 에 의한 boosting의 비교: IgG 및 IgA 면역 반응 특성 파악
		◇ 단회투여 독성 및 반복 투여 독성 평가에 의한 인체 위해성 평가 심사서 준비	35	- HBV항원 단백질 발현 형질전 환 감자의 반복 투여 독성 평가 - 저용량에서 고용량군으로 나누 어 최대 투여 안전 용량을 구명 - 반복투여 독성 평가를 실시하여 인체 위해성 평가 심사서 준비
		◇ 형질전환 감자의 개화를 유 도하여 인공교배를 통한 유전자 전이를 파악	10	- 환경위해성 심사서 항목 중 꽃 가루의 이동과 전이를 통한 유전 자 전이를 연구
		◇ 식물-유래 항원의 면역 유도 능 증대를 위한 boosting 시기 구명	10	- 5주 간격을 두고 boosting을 실 시하는 것이나, 적절한 boosting 시기를 알아봄

3. 연구개발목표의 달성도

1) 1차년도

목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> • 각 항원별 ELISA와 Western analysis의 탐색 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - HBV 항원단백질의 경우 IRMA 법에 의한 항원성 평가법을 확립, - TGEV 항원 단백질의 웨스턴블릿과 ELISA에 의한 평가 방법 	80
<ul style="list-style-type: none"> • 식물-유래 항원의 투여에 의해 유도된 특이-항체에 의한 면역 기작 연구 자료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> - 식물-유래 HBV항원단백질의 경구투여 후 serum 확보; IgG 및 IgA 분석 실시 - 항체의 neutralizing 효과 분석: 간접적인 competition assay를 통한 분석 	100
<ul style="list-style-type: none"> • 감자-유래 항원의 면역 반응에 대한 아주번트 효능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 아주번트에 따른 감자-유래 항원의 면역 유도 증가 효과 검사 	80
<ul style="list-style-type: none"> • 식물-유래 항원의 투여 형태에 따른 경구투여시의 위장에서 분해 및 소화 흡수율의 비교 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - In-vitro 실험을 먼저 수행하여 조건을 파악해보고자 함. - TSP 추출버퍼 pH를 11, 7, 4로 나누어 본 결과 pH4에서 항원성의 70%만 유지됨 	80
<ul style="list-style-type: none"> • 면역반응을 통하여 효능이 확정된 우수(Elite)개체 고정 	<ul style="list-style-type: none"> - PHBV-8번 개체; 영양변식작물인 감자의 특성을 이용하여 기내배양 시스템 확립 - Genomic PCR, Northern 및 Southern 분석에 의하여 유전자의 소실없이 잘 유지되고 있음을 확인 	100
<ul style="list-style-type: none"> • TGEV 발현 감자의 우수 개체 선발 	<ul style="list-style-type: none"> - TGEV 발현 감자 중 분자생물학적 분석을 통하여 발현이 우수한 개체 선발 	100
<ul style="list-style-type: none"> • HBV 발현 감자의 유전자 정확한 도입 여부, 도입된 유전자의 copy 수, 도입유전자의 위치분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 기내배양으로 유지되고 있던 pPHBV-8 개체의 감자의 유전자 정확한 도입 여부, 도입된 유전자의 copy 수, 도입유전자의 위치분석 	100

2) 2차년도

목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
<p>◇ TGEV 백신용 형질전환체의 최종 개체 선발 완료 및 동물실험 수행</p>	<ul style="list-style-type: none"> - TGEV항원단백질 발현 우수개체 p0.7-2 최종 선발함 - 감자-유래 TGEV 항원을 이용, 주요 용량별 투여군을 정하여 실험. 3회투여, 1회 boosting 하여 10주간 동안 항체 형성을 관찰 	100
<p>◇ 식물-유래 항원 검출의 효율 향상을 위한 항체 제작 및 ELISA 최적화 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> -식물체내 도입한 0.7kb TGEV 유전자 분석을 통하여 각 부분별 면역원성 비교 분석 후 두 후보를 최종선택하여 원하는 항체 제작 마무리 - 시판중인 ELISAKit를 대체할 manual ELISA 조건 확립 	100
<p>◇ HBV백신용 형질전환체 PHBV-8의 외형 분석 및 형질 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 영양번식 작물 등 특성에 알맞은 후대 검정에 의한 감자 개체의고정화 - 품종 등록을 위한 외형적 분석 자료화 	100
<p>◇ 면역 증강 향상을 위한 항체 Fc의 도입</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 항원에 Fc fragment를 도입하므로서 항원의 delivery 효율을 높이고자 연구를 진행함 	50
<p>◇ 마우스 Vaccination 과약 (oral administration schedule)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dosage 결정연구: 0.02ug~ 30ug 까지 각각의 dosage에 대한 항체 형성 - 투여 횟수 및 투여 시기 연구 	100
<p>◇ Immune tolerance 가능성 여부 확인 및 Vaccine booster 대용 가능성 자료 제공</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 소량의 항원을 반복적으로 계속 투여하였을 경우 항체 형성이 아닌 오히려 immune tolerance 가능성 -Boositng 식물-유래 항원 또는 positive 항원으로 각각 실시하여 항체 형성 반응 분석 	100

3) 3차년도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
<p>◇ HBV 항원단백질을 발현하는 형질전환 감자의 구성성분의 동등성 비교</p>	<p>- 형질전환 감자에서 HbsAg유전자의 도입 영향에 의한 주요 구성성분의 변화 분석 (동등성 분석): Foutier 변환 적외선 분광분석법, H-NMR spectra에 의한 주성분분석(PCA)을 수행</p>	<p>100</p>
<p>◇ 식물-유래 항원의 Vaccine booster로서의 효능 평가 실험 수행 대응 가능성 자료 제공</p>	<p>- yeast-derived positive-항원에 의한 boosting과 식물-유래 항원에 의한 boosting의 비교: IgG 및 IgA 면역 반응 특성 파악</p>	<p>100</p>
<p>◇ 단회투여 독성 및 반복 투여 독성 평가에 의한 인체 위해성 평가 심사서 준비</p>	<p>- HBV항원 단백질 발현 형질전환 감자의 반복 투여 독성 평가 - 저용량에서 고용량군으로 나누어 최대 투여 안전 용량을 구명 - 반복투여 독성 평가를 실시하여 인체 위해성 평가 심사서 준비</p>	<p>100</p>
<p>◇ 형질전환 감자의 개화를 유도하여 인공교배를 통한 유전자 전이를 파악</p>	<p>- 환경위해성 심사서 항목 중 꽃가루의 이동과 전이를 통한 유전자 전이를 연구</p>	<p>100</p>
<p>◇ 식물-유래 항원의 면역 유도능 증대를 위한 boosting 시기 구명</p>	<p>- 5주 간격을 두고 boosting을 실시하는 것이나, 적절한 boosting 시기를 알아봄</p>	<p>70</p>

제 2 절 관련분야에의 기여도

현재 국내에서도 식물 경구백신에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데 인간 질병에 대한 식물 경구백신보다는 비교적 용이하고 기간이 짧게 소요되는 동물 질병에 집중하는 경향이 있다. 돼지열병(돼지콜레라)에 대한 형질전환 알팔파 백신 개발의 경우 투여 후 돼지에 바이러스를 주사로 접종한 결과 돼지 콜레라가 발병하지 않았다고 밝혔다. 돼지의 흉막폐렴균에 대한 연구에서는 목적동물 돼지에서 효능이 검증되었음이 알려져 있다. 돼지 설사병원균(돼지 대장균 2종과 살모넬라 1종)에서 특이 유전자의 단백질을 생산하는 당근세포를 대량생산하여 당근을 먹인 돼지의 자돈에서 면역효과가 있다고 보고되어 있다. 본 연구는 위와 같은 개발된 식물체의 실제 백신으로서의 효능을 연구하는 사례에 해당되어 앞으로도 계속 이어질 향후 연구의 나아갈 방향을 정하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 식물체에서 항원을 확인하고 마우스동물실험에서 그 효과가 우수하다 하더라도 목적동물을 대상으로 실험할 경우는 투여 방법, 투여 횟수, dosage, 적합한 아주번트의 선택 등과 같은 또 다른 protocol 개발이 반드시 필요하다. 일년으로 끝나는 본 연구의 특성상 부족하거나 시행오차로 생긴 결과물들을 추후 보완하고 반복, 재현하는 실험이 따라준다면 이제 시작 단계에 불과한 이 시점에서 실용화로 이어질 밑바탕이 될 것으로 본다.

다행히 반복적인 추가 실험들이 완성되어 실용 백신으로 자리잡는다면 본 연구에서 직접적으로 언급하고 있는 식물-유래 경구용 돼지 설사병 백신 개발은 앞선 서론에서 언급한 바 대로 축산업에 매우 기여하는 바가 클 것으로 본다. 백신 접종에 따른 스트레스로 인한 생장지연 문제 해결의 필요성, 접종에 소요되는 경제적 부담의 경감이 가능할 것으로 보며, 특히 설사병의 두가지 원인 바이러스에 대한 공동 접근으로 보다 효율적인 설사병 방제가 가능할 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- * 실용화·산업화 계획(기술실시 등)
- * 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등
- * 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
- * 추가연구, 타연구에 활용 계획 등
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

본 연구는 1년차로 종료되는 과제이기 때문에 반복, 재현의 실험을 통한 시행착오를 보완하지 못한다. 하여 본 연구를 통하여 얻어진 결과를 바탕으로 추가연구를 반드시 수행하여야 한다. 타 연구에서 개발된 식물체를 활용하였기 때문에 단해년이지만 식물재료의 대량생산이 가능하였으며, 이를 이용한 마우스 동물실험에서의 결과는 유의성있게 얻을 수 있었다. 반면, 목적동물인 돼지의 면역유도 실험의 올해 처음 수행되었기 때문에 완벽한 결과는 확보하지 못하였다. TGEV발현 감자의 경구투여군은 일차시험에서 모두가 분만에 실패하여 자돈에의 항체 형성 실험과 공격접종을 하지 못하였다. 하여 재실험을 통하여 TGE 바이러스 공격접종에 대한 자돈의 방어력 평가를 수행한 결과, TGEV-경구백신구와 상용백신구와는 달리 TGEV-경구대조구는 공격접종 2주후까지 설사가 나타났었고 2두는 지속적인 심한 설사로 인하여 폐사되었다. PEDV발현 담배의 경구투여에 의한 돼지의 면역실험에서 설사 정도가 경감되었고, 체중변화가 미미하는 등의 임상증상에서 긍정적인 결과를 얻을 수 있었다. 하여, 본 연구의 성과는 반드시 차후의 추가연구와 타 연구에 활용하는 방안을 마련하여야 할 것이다. 식물백신과 같은 첨단 생명공학기술을 통한 복지 향상이라는 명제는 21세기 지구상에서 가장 중요한 이슈가 될 것이 틀림없으며 따라서 이 분야에 대한 공공 및 산업계에서의 기술 수요는 많을 것으로 예상된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 히브리대학의 기술이전회사인 Yissum 연구개발회사: 항말라리아 천연물질인 artemisinin 생산에 필요한 생합성경로 전체를 코딩하고 있는 형질전환 담배 개발. 이 기술은 담배식물체를 이용해 저렴한 가격의 artemisinin을 생산할 수 있으며 이는 말라리아로 고통받고 있는 개발도상국의 큰 도움을 줄 것으로 기대됨
- GM식물을 이용하여 구제역을 예방하는 GM 담배 백신 개발: 구제역바이러스 coat protein VP1을 인식하는 siingle chain variable antibody fragment (scFv) 유전자를 담배식물체에서 대량으로 축적하는 시스템을 개발하여 잎이 생산하는 수용성 단백질 대비 약 0.8%까지 축적. 구제역은 해당국가의 축산농가뿐만 아니라 사회 전반의 경제에 심각한 영향을 주는데 값싼 재조합 항체를 이용한 예방주사로 면역력을 높이는 것은 구제역 발생지점의 주변지역 동물들을 보호하기 위한 합리적인 대안 될 수 있음 (캐나다)
- 항-HIV 단일클론항체 식물체에서 생산, 일부 여성을 상대로 임상실험 돌입: 영국의 Julian Ma 교수는 항-HIV 항체를 생산하는 GM담배를 온실에서 재배하고 있으며 생산된 항체를 이용한 임상실험을 영국 의약건강제품관리청에서 허가받았음을 보고
- 멕시코 국립자치대학 연구원들은 식물체 내에 상당량의 광견병 바이러스 당단백질을 축적하는 GM당근을 개발: 광견병은 백신이 개발되어 있음에도 불구하고 전세계적으로 특히 개발도상국들에서 지속적으로 보건상의 문제가 되어오고 있다. 연구원들은 식용식물에서 생산되는 백신이 기존 백신을 대신할 수 있는 좋은 대안이 될 것으로 전망됨
- 세계 최초의 조류독감 저항성 GM 닭 개발: 영국의 에딘버러 대학팀이 인공유전자를 닭에 삽입하여 조류 독감 감염으로부터 집단을 보호할 수 있을 것으로 기대. 조류독감이 가금류 생산에 직면한 실제적 과제이기 때문에 이 연구 결과가 상용화 된다면 우수한 백신 효과를 가져올 것으로 봄
- Fraunhofer CMB와 iBIO (미국) 은 빨리 자라는 식물의 잎에서 특정 단백질을 대량으로 생산하는 시스템을 개발. 공장의 자동화된 기계들이 씨앗을 심고 묘목을 키우고 목적단백질을 생산하기 위해 바이러트 벡터를 식물에 직접 도입하며 목적단백질에 식물의 조직내에 축적되고 나면 잎을 수거하는 일련의 시스템을 처음으로 개발하였음을 보고
- 담배와 상추의 잎에서 콜레라 독소와 말라리아의 병원성 단백질을 결합시킨 융합단백질을 생산하는 GMO를 개발 (Henry Daniell 교수): 미국의 플로리다대학 연구팀의 보고에 의하면 이들 식물의 엽록체를 조사한 결과 담배의 경우 각각 13.17%, 10.11% 발현하고 상추의 경우 7.3%, 6.1%를 발현한다고 보고함. 식물에서 백신을 생산하는 작업은 적은 노동력과 기술을 요하며, 간단한 알약의 형태로 공급되고 또한 비싼 비용을 들이는 정제과정이나 냉장보관, 수송, 혈관 내 주입의 필요성이 없기 때문에 기존의 방법에 비해 저렴하여 경쟁력을 가진다고 봄
- 이들 이외에도 충치 예방을 위한 분비형 항체 백신이 유럽연합에서, 닭의 Newcastle 병 예방을 위한 백신이 USDA에서 승인 받았고 B형 간염백신 예방을 위한 식물경구 백신이 쿠바 시장에 나옴. 많은 재조합 의약품들이 개발되어 임상 실험 중에 있으며 현재로서 가장 앞선 단계를 진행하고 있는 것은 이스라엘의 Protalix사가 당근 현탁세포 배양을 이용하여 생산하는 Gaucher병 치료제인 Glucocerebrosidase로써 판매권을 가진 대형 제약회사인 Pfizer가 6천만불에 계약한 사실은 곧 본 제품이 시장에 출현 할 것으로 기대됨

제 7 장 참고문헌

* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

Arakawa T, Chong DKX, Merritt JL, Langridge WHR (1997) Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res* 6:403-413

Arakawa T, Chong DKX, Langridge WHR (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 16:292-297

Bae JL, Lee JG, Kang TJ, Jang HS, Jang YS, Yang MS (2003) Induction of antigen-specific systemic and mucosal immune responded by feeding animals transgenic plants expressing the antigen. *Vaccine* 21:4052-4058

Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke M, Matzke A (1986) The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol* 6: 347-357

Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Müller M (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virology* 77:9211-9220

Carter JE, Langridge WHR (2002) Plant-based vaccines for protection against infectious and autoimmune diseases. *Crit Rev Plant Sci* 21:93-109

Curtiss RI, Cardineau GA (1990) Oral immunization by transgenic plants. *World patent Application*

Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* :1001 - 1009

Daniell H, Chebolu S, Kumar S, Singleton M, Falconer R (2005) Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine* 23:1779-1783

De Jaeger G, Scheffer S, Jacobs A, Zambre M, Zobell O, Goossens A, Angenon G (2002) Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotechnol* 20:1265-1268

De Zoeten GA, Penswick JR, Horisberger MA, Ahl P, Schultze M, Hohn T (1989) The

- expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology* 172: 213-222
- Doran PM (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol* 24:426-432
- Gao Y, Ma Y, Li M, Chenc T, Li SW, et al. Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World J Gastroenterol* 2003;9(5):996-1002
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2007) Magniffection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23:2042-2048
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342:76-78
- Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, et al. Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine* 2005;23:1851-8
- Huang Z, Santi L, LePore K, Kilbourne J, Arnzten CJ, Mason HS. Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 2006; In press
- Ibrahim AF, Watters JA, Clark GP, Thomas CJ, Brown JW, Simpson CG (2001) Expression of intron-containing GUS constructs is reduced due to activation of a cryptic 5' splice site. *Mol Genet Genomics* 265:455-460
- Itoh Y, Takai E, OhnumaH, Kitajima K, Tsuda F, Machida A, et al. A synthetic peptide vaccine involving the product of the pre-S(2) region of hepatitis B virus DNA: Protective efficacy in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 198683:9174-8
- Joung, Y.H., Youm, J.W., Jeon, J.H., Lee, B.C., Ryu, C.J., Hong, H.J., Kim, H.C., Joung, H. and Kim, H.S. (2004) Expression of the hepatitis B surface S and preS2 antigens in tubers of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep.* 22, 925-930
- Kang TJ, Han SC, Jang MO, Kang KH, Jang YS, Yang MS (2004) Enhanced expression of B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. *Appl Biochem Biotechnol* 117:175-187
- Kang TJ, Kim YS, Jang YS, Yang MS (2005) Expression of the synthetic neutralizing epitope gene of porcine epidemic diarrhea virus in tobacco plants without nicotine. *Vaccine*

Kang TJ, Han SC, Yang MS, Jang YS (2006) Expression of synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of E.coli heat-labile enterotoxin in tobacco plants. *Protein Expr Purif* 2006 46:16-22

Kim TG, Yang MS (2010) Current status in molecular farming. *J of Plant Biotechnology* 37(3):243-249

Kim YS, Kim MY, Kim TG, Yang MS (2009) Expression and assembly of cholera toxin B subunit (CTB) in transgenic carrot (*Daucus carota* L.). *Mol Biotechnol* 41:8-14

Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *PNAS USA* 25:11539-11544

Mason HS, Lam DMK, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *PNAS USA* 89:11745-11749

Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16:1336-1343

Matoba N, Geyer BC, Kilbourne J, Alfsen A, Bomsel M, Mor TS. Humoral immune responses by prime-boost heterologous route immunizations with CTB-MPR649-684, a mucosal subunit HIV/AIDS vaccine candidate. *Vaccine* 2006

Neurath AR, Adamowicz P, Kent SB, Riottot MM, Strick N, Parker K, et al. Characterization of monoclonal antibodies specific for the pre-S2 region of the hepatitis B virus envelope protein. *Mol Immunol* 1986;23(9):991-7

Outchkourov NS, Peters J, de Jong J, Rademakers W, Jongsma MA (2003) The promoter-terminator of chrysanthemum rbsS1 directs very high expression levels in plants. *Planta* 216:1003-1012

Pogrebnyak N, Golovkin M, Andrianov V, Spitsin S, Smirnov Y, Egolf R, Koprowski H (2005) Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *PNAS USA* 21:9062-9067

Rendi-Wagner P, Shouval D, Genton B, Lurie Y, Rumke H, Boland G, et al. Comparative immunogenicity of a PreS/S hepatitis B vaccine in non- and low responders to conventional vaccine. *Vaccine* 2006;24: 2781-9

Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS, Osadjan MD, Buetow DE. Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Research* 2009(3):127-35.

Santi L, Batchelor L, Huang Z, Hjelm B, Kilbourne J, Arntzen CJ, Chen Q, Mason HS (2008) An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine* 28:1846-1854

Thanavala Y, Mahoney M, Pal S, Scott A, Richter L, Natarajan N, et al. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3378-82

Tuboly T, Nagy E (2001) Construction and characterization of recombinant porcine adenovirus serotype 5 expressing the transmissible gastroenteritis virus spike gene. *J Gen Virol* 82:183-190

Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL, Clements JD, Rose RC (2003) Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virology* 77:8702-8711

Youm JW, Kim H, Han JHL, Jang CH, Ha HJ, Mook-Jung I, Jeon JH, Choi CY, Kim YH, Kim HS, Joung H (2005) Transgenic potato expressing A β reduce A β burden in Alzheimer's disease mouse model. *FEBS Lett* 579:6737-6744

Youm JW, Won YS, Jeon JH, Ryu CJ, Choi YK, Kim HC, Kim BD, Joung H, Kim HS (2007) Oral immunogenicity of potato-derived HBsAg middle protein in BALB/c mice. *Vaccine* 25:577-584

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업사업(해당사업 표기)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업사업(해당사업 표기)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.