

식물체를 이용한 직장암 치료제용 항체
생산 모델링

Establishment of anti-CEA(carcinoembryonic antigen)
antibody production modeling system by means
of transgenic plants

연구기간
강원대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물체를 이용한 직장암 치료제용 항체 생산 모델링” 과제 (제 1세부 과제 “유전자 조작을 통한 설치류 항암 항체의 인간화 및 형질전환식물체에서의 항체 발현조사”, 제 2세부과제 “항암 항체발현 식물체 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 25 일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 차상훈

세부연구책임자 : 차상훈, 임학태

연 구 원 : 김남일, 허병웅,
오미영

연 구 원 : 디하이탈쌈부
이규화, 권영선

요 약 문

I. 제 목

식물체를 이용한 직장암 치료제용 항체 생산 모델링

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

가. 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체 유전자 획득

본 연구의 model system으로 사용되어질 항암항체는 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체로서 ¹³¹I-labelled 항-CEA 단클론 항체가 직장암, 갑상선암, 그리고 난소암 환자의 치료에 유용하다고 보고되어 있어(Ychou et al. 1993; Juweid et al. 1999; Juweid et al. 1997) 항암 치료제로서 이미 임상 실험이 성공리에 진행중이다.

- 1) 인간 IgG Fc 항체 유전자 획득
- 2) 항-CEA 단클론 항체 유전자의 인간화

나. 작물의 형질전환 방법에 의한 단클론 항체 생산 model system 개발

- 1) 형질전환 체계가 확립된 작물의 효율성 증대
- 2) 담배의 재분화 및 형질전환 체계 확립
- 3) 육성계통을 이용한 토마토의 재분화 및 형질전환 체계 확립
- 4) 알팔파의 재분화 및 형질전환 체계 확립

- 5) 형질전환된 식물체의 유전자 도입 확인, 순화, 증식, 교배 및 포장 검정
- 6) 형질전환 식물체의 유전적 안정성 검증

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

최근 인간의 암은 종양세포의 표면에 있는 표면 단백질에 의해 정의되고 있는 추세이며 따라서 기존의 방법에 의한 치료보다 좀더 다른 유전적인 접근방법이 대두되고 있다. 실험적으로 암세포가 자라는 면역결핍 마우스에 항암 항체들을 처리하면 암세포 표면에 발현되는 암항원에 결합하여 암세포의 성장을 저해함이 밝혀졌다. 이러한 원리를 이용하여 최근 암 치료에 있어서 단일클론항체를 단독으로, 또는 방사선 핵종이나 독성물질이 결합된 형태로 사용하는 방법이 시도되고 있어 종양의 치료에 있어서 낙관적인 변화를 가져오고 있다.

현재 FDA에서는 단일클론항체인 Rituximab과 Herceptin의 사용을 승인하였다. 이 항체는 다른 치료에서 전혀 반응을 보이지 않던 환자들의 50% 이상에서 효과를 보인바 있으며 실질적으로 여러 연구에서 단일클론항체를 이용하여 림프종, 대장암, 유방암 등에 성공적인 임상치료를 보여주고 있다. 이러한 유용성에도 불구하고 *in vitro*나 마우스를 사용한 *in vivo* 실험에서는 효과를 나타내는 항체가 인간에게 도입하였을 때는 효과를 나타내지 않는 경우가 있다. 이는 인간에서 단일클론항체를 외래 항원으로 인식해 면역반응을 유도하게 되어 제 기능을 하지 못하는 것인데 어떤 경우에는 심한 알레르기 반응이나 과민 반응을 일으키기도 하며, (Issacs, J. D.). 또한 항체의 Fc 지역이 인간의 effector cell에는 작용하지 않는 경우도 있다(Adair, J.).

이러한 문제점을 극복하기 위해서 유전자 재조합 기술을 이용한 여러 접근 방법이 시도되었다. 그 중 하나는 인간 조합 항체 라이브러리 (human combinatorial antibody library)를 제작하여 항원에 특이적으로 작용하는 부분인 항체의 heavy와 light의 variable region만을 폴리펩타이드 linker로 연결한 scFv(single chain variable fragment)와 Fc 지역만을 제외한 나머지 부분을 포함하는 Fab(antigen binding fragment)를 제작하는 것이다. 이러한 재조합 항체를 이용하면 단일클론항체를 사용하는 것에 비해 면역반응을 덜 유도하고 암에 대한 침투력이 더 강한 장점이 있다.

또 다른 방법은 hybridoma fusion에 의한 인간 단클론 항체의 생산이 불가능하므로 설치류 기원의 항암 단클론 항체를 제작한 후 이 항체 유전자를 인간의 항체 유전자로 상당부분 대체하는 항체 인간화 (antibody humanization)를 들 수 있다. 예를 들어 항체의 Fc region을 인간의 Fc region으로 대체시키는 것인데 항체에 있어서 Fc region은 Fv region의 구조적인 성격에 전혀 영향을 주지 않으므로 항원에 대한 친화력이나 특이성을 변화시키지 않고 사용할 수 있다.

이러한 유전자 재조합 항체들은 효과적인 항암물질로서 암의 신경전달 경로에 관여하는 항원에 결합하거나 또는 암세포 표면에 있는 성장요소의 수용체에 결합해 암의 발달을 저해하는 전략에 많이 이용되고 있다. 또한 독성물질이나 화학물질을 결합시켜 좀더 효과적으로 암세포를 제거하는 기술도 새로이 대두되고 있어 앞으로 이러한 항암치료제로서의 인간화된 항체를 어떠한 방법을 사용하여 적은 비용으로 대량생산할 것인가가 이 분야에 있어서 가장 큰 문제점으로 남아 있으며 이러한 문제점의 해결이 곧바로 국제 경쟁력과 직결되어있다고 볼 수 있다. 이를 위하여 의학에 기반을 둔 면역학 분야와 농업생명공학 분야에서의 기술 개발이 의학용 유용 단백질의 대량 생산을 위하여 반드시 필요하다 하겠다.

나. 경제·산업적 측면

1997년 기준 단클론 항체 미국 시장은 약 10억 1천만달러 (약 1조 2천억원)로 추정되고 있으며 이는 1996년에 비해 무려 46% 성장한 것으로 조사되었다. 따라서 세계적으로 단클론 항체 시장은 천문학적일 것으로 예상된다. 또한 2000년까지는 여전히 각종 질환의 체외 및 체내 진단제가 시장을 주도할 것으로 전망되며 2000년 이후 설치류 기원 단클론 항체의 인간화 등을 통한 문제점이 해결될 경우 치료제가 성장을 주도할 것으로 예측되고 있다. 2000년 전체 시장 규모는 약 35억불 (약 3조 8천억원)로 추정되며 진단제는 40% 미만으로 감소하고 치료제가 50%를 넘어설 것으로 예상된다.

현재 세계적으로 약 260개의 업체에서 치료제 혹은 진단제 개발을 목적으로 단클론 항체 개발에 주력하고 있으며 약 900여종의 항체가 개발중이거나 개발되어 임상시험을 진행 중이다. 이중 약30%이상이 항암제 및 암 진단제와 관계가 있으며 그외 주요 목표는 자가면역 질환, 전염병, 이식거부 반응 완화, 심장 질환 순으로 연구가 진행 중이다.

이와 같이 단클론 항체 생산에 관한 국제적인 연구가 이미 생명공학 회사를 중심으로 활

발히 진행되고 있으며 이는 이 분야에 대한 경제적 그리고 산업적 가능성을 충분히 반영하고 있기 때문이다.

다. 사회·문화적 측면

사회적인 관점에서 앞으로의 식량난을 극복하고 환경 친화적인 농업을 하기 위해서는 유전공학기술의 사용을 피할 수 없다는 것이 일반적으로 받아들여지고 있다. 그러나 국내 뿐만 아니라 국제적으로도 카르헤나의정서를 채택하는 등 유전형질전환 식물의 안정성에 대한 문제를 심각하게 다루고 있지만 실제로 국내에서 실제로 적용시킬 만큼 개발된 형질전환 식물체는 매우 소수인 실정이다.

본 연구에서는 식품으로서가 아닌 bioreactor로서의 형질전환 농산물 개발을 시도하고자 하며 따라서 농업생명공학의 기술을 이용한 저가의 의학용 시료의 대량 생산을 시도하여 의약품 생산에 관한 국제 경쟁력 강화와 고부가가치 농산물의 생산을 통한 농가 소득의 증대에 기여하고자 한다. 따라서 주요 농산물의 형질전환기술을 통해 항암 항체 생산을 위한 bioreactor로서 활용하고자 한다.

이러한 기술의 확립은 국내 첨단 농업 기술의 발전, 농가 소득 증대, 국내 의약품 개발 생명공학의 국제 경쟁력 강화 그리고 저렴한 항암 치료제 생산을 통한 환자의 치료비 절감 등 많은 사회적 기여가 예측된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제 1세부과제 : 유전자 조작을 통한 설치류 항암 항체의 인간화 및 형질전환식물체에서의 항체 발현조사

(1) 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체의 인간화

- ① 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체 유전자 획득
- ② 인간 IgG Fc 항체 유전자 획득
- ③ 항-CEA 단클론 항체 유전자의 인간화
- ④ 발현시킬 다양한 벡터작성

(2) 식물체에 도입한 항체 유전자 발현확인 및 형질 전환 식물체 생산

- ① 재조합된 벡터를 식물체에 도입하여 형질전환 식물체 생산
- ② 형질전환 계통의 농업형질 조사 및 선발

(3) 형질전환 식물체의 항체 발현 확인

- ① 형질전환 식물체의 형질전환 발현을 조사
- ② 형질전환 특성의 유전양상 조사
- ③ 형질전환 식물체의 농업형질 특성평가

2. 제 2세부과제 : 항암항체발현 식물체 개발

(1) 각 작물(담배, 토마토, 알팔파)의 계통 증식과 형질전환 효율이 높은 계통 선발

- ① 식물체 재분화 및 형질전환 시스템 개발

(2) 우수 계통의 형질전환 및 우수 계통간 교배조합 구성

- ① 우수 형질전환 계통의 증식

(3) 포장 검정 및 우수 교배조합 선발

- ② 형질전환 식물체의 생산력 검정 및 선발

(4) 항체발현 작물의 대량생산

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구 과제를 통하여 1차 년도는 CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체를 생산하는 세포주로부터 항체 유전자를 분리하여 항-CEA scFv 항체 유전자를 획득하였다. 인간의 혈액으로부터 lymphocyte를 분리하여 heavy와 light chain의 Fc(constant region)을 획득하여 항-CEA 단클론 항체 유전자의 인간화를 제작하였다. 또한 식물체의 재생 능력은 품종 및 계통에 따라 차이를 보이고 식물체의 부위, 성장 단계에 따라 다르며 배지에 포함되는 생장 조절제와 영양소의 종류와 양, 배양 환경등에 의해 좌우되므로 담배와 토마토를 이용하여 최적의 조건을 규명하여 가장 좋은 형질전환 시스템을 개발하였다.

2차 년도에는 1차 년도에서 획득한 Fab항체 유전자를 대장균에서 발현하여 ELISA와 western blot 방법으로 CEA 단백질과의 항체-항원 특이성을 검증하였고, 곤충세포에서 항

-CEA IgG 항체를 발현하기 위한 recombinant baculovirus transfer vector을 제작하여 sf-21 insect cells에서 발현된 항체와 CEA 항원 단백질과 친화성을 검증하였다. 또한 이렇게 특이성이 검증된 항체 유전자를 식물체에서 발현시키기 위해서 식물체에서 발현시킬 벡터를 제작하기 위해서 cauliflower mosaic virus 35S promoter와 hygromycin, kanamycin 저항성 유전자와 GUS 유전자가 들어있는 벡터를 선별하여 1차년도에서 획득한 인간화된 항체 유전자를 클로닝을 통하여 제작하였으나, *Agrobacterium* transformation이 되지 않아서 pCAMBIA 2300 T-DNA 벡터를 이용하여 다시 제작하였다. 이 벡터는 쌍자엽의 식물을 발현시키는 벡터로서 CaMV 35S promoter와 선별할 수 있는 NPTII 저항성 유전자를 가지고 있으며, 항-CEA light chain과 heavy chain을 클로닝하여 식물체에서 발현시킬 벡터를 제작하였다. 형질 전환 식물체의 선발을 위해서 우선 담배와 토마토, 알파파의 최적화된 형질전환 조건을 규명하여 형질전환 식물체를 생산하는데 중점을 두었다. 그리고 형질전환 효율을 높이지 못하게 될 경우를 대비하여, 이미 재분화 및 형질전환 체계가 확립되어 있는 치커리와 감자에서도 유전자를 발현시키고자 형질전환 조건을 규명하였고, 각 작물의 형질전환 시스템을 체계화하였다.

3차 년도에서는 목적 유전자가 재조합 되어 있는 벡터를 가진 대장균과 *Agrobacterium*을 접합시켜서 유전자가 도입된 *Agrobacterium*의 제작은 완성되었으나, 형질전환 식물체의 생산은 60% 진척을 보이고 있다. 그리고 Fab항체 유전자를 토대로 하여 anti-CEA scFv 항체를 제작하여 ELISA와 western blot 방법으로 CEA와 항체-항원 특이성을 검증하였다. 작물의 형질전환 시스템과 재분화를 체계화하였기 때문에, 형질전환 식물체의 생산과 이를 이용하여 형질전환된 식물체에서 발현될 항체의 기능조사는 수 달내에 제작이 가능할 것으로 사료되며, 차후의 연구가 조금더 필요하다고 생각된다.

결과적으로 CEA에 대한 만족할 만한 저항성을 갖는 형질전환체는 아직 얻어지지 않았으나, 형질전환 시스템의 확립과 재분화 과정을 체계화하였으므로 바이러스에 대한 저항성을 검정 방법을 확립함으로써 이와 관련된 연구에 활용 가능성이 기대된다고 사료된다.

SUMMARY

I. Title

Establishment of anti-CEA(carcinoembryonic antigen) antibody production modeling system by means of transgenic plants

II. Objectives and Necessity of the Project

1. Objectives of the Project

Ga. Acquisition of the anti-CEA(carcinoembryoic antigen) scFv antibody gene

In this study, anti-CEA monoclonal antibody used as model system are reported as available therapeutic reagent of rectum, thyroid gland and ovarian tumors patients, therefore make rapid progress for therapeutical reagent of cancer.

- 1) Acquisition of human IgG Fc antibody gene
- 2) Humanization of anti-CEA antibody gene

Na. Development of scFv antibody production model system by means of transgenic plants

- 1) Efficiency increase of plants established transgenic system
- 2) Regeneration of tobacco and establishment of transformation system
- 3) Regeneration of tomato by upbringing cultivation and transformation system

- 4) Establishment of regeneration and transformation system of alfalfa
- 5) Gene insertion, identification, purification, increasement, cross-breeding and field test of transgenic plants
- 6) Genetic stability test of transgenic plants

2. Necessity of Research

Ga. Technical aspects

Recently, human cancer is give a definition by surface protein of cancer cell, and then, has raise others genetic method than therapy as previous method. Cancer cells was inhibited growth binding to expressed cancer antigen of cancer cell surface treat with anti-cancer antibody to cancer cell-growing immun-deficiency mouse. By means of this principle, this time scFv antibodies has been used to therapy of cancer disease. In FDA, scFv antibodies, Rituximab and Herceptin was recognized the application. This antibody was effected above 50% than others therapeutical reagent, in truth, in several study, has shown successful clinical therapy to lymphoma, colon cancer, breast cancer. Nevertheless this usefulness, *in vitro* or *in vivo* using the mouse experiment was effected, but when antibodies was introduced into human, not shown functional effect of antibodies. The human be caused serious allergy and hypersensitivity, because of human recognized scFv antibodies as foreign antigen. In cases, IgG Fc region was not application to human effector cell. To overcome trouble, try to using the recombinant phage display library technology method. Fab antibody was constructed together scFv antibody of variable heavy and light chain via linker fragment and human IgG Fc region excpet CH2-3 region. On the other hand, after production of monoclonal antibody in mouse, be conversion the antibody to humanization antibody. Such combinatorial antibody libraries has been available to inhibition of cancer disease as effective anti-cancer reagent. To this technology, there will be necessary development of immunology agriculture bio-technology field based medical research.

Na. Economical and industrial aspects

In 1997, scFv antibody market was grown \$ 1,000,000,000. it was estimated 46% a rate of growth than last year. Hence the world scFv antibody market will be magnificent industrial value. This scFv antibody market will estimate \$ 3,500,000,000 and diagnosis medicine will decrease 40% and therapeutical medicine will increase above 50% in 2000.

Recently, 260 companies are research scFv antibody development to production of therapeutical or diagnosis medicine in the world and about 900 antibodies are processing clinical test. Therefore bio-venture companies are progressing international research with respect to scFv antibody production, there is value economically, industrially 21 century.

Da. Social and cultural aspects

In the social aspect to overcome the shortage of food crops (or vegetables) and carry out environmentally friendly agriculture, we have been forced to use genetic technology in plants. But domestically and internationally also, the stability of genetically modified plants is considered seriously by public as shown in Cartagena protocol, although the situation is may not necessarily be applied domestically since there are a few transgenic plants in our country.

We try to transgenic agricultural products development as the bioreactor not to be the food in this research. So that, We try enormous volume manufacture of a medicine free medical treatment of the low cost which uses the technique of the agriculture biotechnology. It try to contribute at the enlargement of a farmhouse income through the manufacture of agricultural products and strength an international competitive power about a medical supplies manufacture. According to apply as the bioreactor for a anti-cancer antibody manufacture through the transgenic technique of major agricultural products.

The establishment of such technique predicted many social contribution of the

development of a domestic advanced agriculture technique, a farmhouse income enlargement, competitive an international power consolidation of a domestic medical supplies development biotechnology and a medical fee reduction of the patient through cheap a anti-cancer medicine manufacture.

III. Scopes of Research

1. The 1st Project : Humanization of rodent anti-cancer antibody by gene manipulation and expression analysis of antibody from transgenic plants

(1) Humanization of Anti-CEA(carcinoembryonic antigen) antibody

- ① Acquisition of anti-CEA antibody gene
- ② Acquisition of human IgG Fc antibody gene
- ③ Humanization of anti-CEA antibody gene
- ④ Construction of several vector for expression in plants

(2) Expression of introduced antibody gene into plants and production of transgenic plants

- ① Production of transgenic plants after introduced constructed vector into plants
- ② Analysis and selection of agricultural quality from transgenic plants

(3) Identification of antibody expression of transgenic plants

- ① Analysis of expression rate of transformation
- ② Analysis of genetic aspect from transgenic plants
- ③ Estimation of agricultural quality of transgenic plants

2. The 2nd Project : Development of anti-CEA antibody expression plants

(1) Increasement of tobacco, tomato, alfalfa plants and selection of predominance transgenic plants

- ① Regeneration of plants and development of transgenic system
- (2) Transformation of predominance plants and constitution of cross-breeding between predominance plants
 - ① Propagation of predominance transgenic plants
- (3) Field test and selection of cross-breeding between predominance plants
 - ① Analysis of product and selection of plants
- (4) Enormous production of antibody expressed plants

IV. Suggestion of the research result and application

In the 1st year, we produced anti-CEA antibody gene from CEA hybridoma cells and extracted lymphocyte from human blood constructed humanization antibody gene after acquired Fc(constant region) of heavy and light chain. We also established the regeneration and transformation system of tobacco, tomato, and alfalfa plants.

In the 2nd year, we expressed acquired Fab antibody gene in *E. coli* and determined antigen-antibody specificity to CEA antigen with anti-CEA Fab antibody by ELISA and western blotting. We also constructed recombinant baculovirus transfer vector to anti-CEA IgG antibody expression in sf-21 insect cells and then, determined binding specificity with CEA antigen and anti-CEA antibody expressed in insect cells. We constructed vectors containing cauliflower mosaic virus 35S promoter, hygromycin, kanamycin and GUS resistance gene for expression of functional antibody in plants but Those results failed, because of transformation trouble into *Agrobacterum*. Hence reconstructed vector for expression of functional antibody in plants by means of pCAMBIA 2300 plant vector. The pCAMBIA 2300 is vector for expression of dicotyledon and contained CaMV 35S promoter and NPTII resistance gene for selection.

We cloned anti-CEA heavy and light chain into pCMABIA 2300. Tobacco, tomato and alfalfa are focused to production of transgenic plants. If we are not elevate

transgenic efficiency, established regeneration and transgenic system of potato, chicory are examined transgenic condition for gene expression.

In the 3rd year, we constructed *Agrobacterium* transformed *E. coli* containing recombinant target gene and *Agrobacterium*, but production of transgenic plants processed about 60%. Also we are constructed anti-CEAscFv antibody based Fab antibody, and determined antigen-antibody specificity to CEA antigen with anti-CEAscFv antibody by ELISA and western blotting. Because of regeneration and transgenic system of plants are defined, production of plants, functional analysis of antibody expressed in transgenic plants will constructed in several months.

Finally, the results was not quite satisfactory since we could not make fully resistant transgenic plants against CEA, but establishment of resistant examination method can be applied in related research areas.

CONTENTS

Proposition writings	1
Summary	2
I. Title	2
II. Objectives and Necessity of the Project	2
1, Objectives of the Project	2
2. Necessity of Research	3
Ga. Technical aspects	3
Na. Economical and industrial aspects	4
Da. Social and cultural aspects	5
III. Scopes of Research	5
1. The 1 st Project : Humanization of rodent anti-cancer antibody by gene manipulation and expression analysis of antibody from transgenic plants	5
2. The 2 nd Project : Development of anti-CEA antibody expression plants	6
IV. Suggestion of the research result and application	6
SUMMARY(In English)	8
I. Title	8
II. Objectives and Necessity of the Project	8
1, Objectives of the Project	8
2. Necessity of Research	9
Ga. Technical aspects	9

Na. Economical and industrial aspects	10
Da. Social and cultural aspects	10
III. Scopes of Research	11
1. The 1 st Project : Humanization of rodent anti-cancer antibody by gene manipulation and expression analysis of antibody from transgenic plants	11
2. The 2 nd Project : Development of anti-CEA antibody expression plants	11
IV. Suggestion of the research result and application	12
CONTENTS(In English)	14
Contents	17
Chapter I Outline of research project	20
Section 1. Backgrounds and objectives of research project	20
1. Backgrounds of research project	20
2. Objective of research project	21
Section 2. Necessity and scopes of research project	22
1. Necessity of research project	22
Ka. Technical aspects	22
Na. Economical and industrial aspects	24
Da. Social and cultural aspects	26
2. Contents and extent of research project	28
Chapter 2. The present technique development situation inside and outside of the country	29
Chapter 3 Contents and Results of the research	32
Section 1. Research substances in order by year	32
1. The 1 st year	32

2. The 2 nd year	34
3. The 3 rd year	35
Section 2. Research results and analysis	37
1. The 1 st Project : Humanization of rodent anti-cancer antibody by gene manipulation and expression analysis of antibody from transgenic plants	37
2. The 2 nd Project : Development of anti-CEA antibody expression plants	56
Chapter 4 Objective achievement and contribution level to related field	82
Chapter 5 Application plan of research results	85
Chapter 6 Foreign countries scientific technique information collected during research	87
Chapter 7 Literature cited	89

목 차

제출문	1
요약문	2
I. 제목	2
II. 연구개발의 목적 및 필요성	2
1. 연구개발의 목적	2
2. 연구개발의 필요성	3
가. 기술적 측면	3
나. 경제·산업적 측면	4
다. 사회·문화적 측면	5
III. 연구개발의 내용 및 범위	5
1. 제 1세부과제 : 유전자 조작을 통한 설치류 항암항체의 인간화 및 형질전환 식물체에서의 항체 발현조사	5
2. 제 2세부과제 : 항암항체발현 식물체 개발	6
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의	6
SUMMARY(영문요약)	8
I. Title	8
II. Objectives and Necessity of the Project	8
1, Objectives of the Project	8
2. Necessity of Research	9
Ga. Technical aspects	9
Na. Economical and industrial aspects	10
Da. Social and cultural aspects	10

III. Scopes of Research	11
1. The 1 st Project : Humanization of rodent anti-cancer antibody by gene manipulation and expression analysis of antibody from transgenic plants	11
2. The 2 nd Project : Development of anti-CEA antibody expression plants	11
IV. Suggestion of the research result and application	12
CONTENTS(영문목차)	14
목차	17
제 1 장 연구개발과제의 개요	20
제 1 절 연구개발의 배경 및 목적	20
1. 연구개발의 배경	20
2. 연구개발의 목적	21
제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위	22
1. 연구개발의 필요성	22
가. 기술적 측면	22
나. 경제·산업적 측면	24
다. 사회·문화적 측면	26
2. 연구개발의 내용 및 범위	28
제 2 장 국내외 기술개발 현황	29
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	32
제 1 절 연차별 연구내용	32
1. 1년차 : 항-CEA (carcinoembryonic antigen) 항체 유전자의 인간화, 각 작물의 재분화체계 확립	32
2. 2년차 : 형질전환 식물체 생산	34
3. 3년차 : 항암 단클론 항체 발현 형질전환 식물체의 생산	35

제 2 절 연구결과 및 분석	37
1. 제1 세부과제 : 유전자 조작을 통한 설치류 항암항체의 인간화 및 형질전환 식물체에서의 항체 발현조사	37
2. 제2 세부과제 : 항암항체발현 식물체 개발	56
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	82
제 1 절 목표달성도	82
제 2 절 관련분야 기술발전예의 기여도	83
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	85
제 1 절 추가연구의 필요성	85
제 2 절 타 연구에의 응용	85
제 3 절 기업화 추진방안	86
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	87
제 7 장 참고문헌	89

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 배경 및 목적

1. 연구개발의 배경

현재 인간화된 단클론항체의 항암 치료효과는 FDA의 단일클론항체인 Rituximab과 Herceptin의 사용 승인 등 의학적으로 인증을 받은 상태이며 앞으로도 임상에서 암환자에게 직접 사용될 항암 항체 치료제의 수는 급격히 증가하리라 전망되고 있다. 한편 현재까지 국내에서의 형질전환 기술을 이용한 농업생명공학 분야는 특정 유전자를 삽입하여 내병성 식물체를 제작하거나 기능성 식품의 제작을 위한 식물체의 제작에 많은 초점이 맞춰져 왔으며 이러한 식물체들은 GMO 문제로 인하여 유럽 등에서는 수입금지 조치가 내려지는 등 논란의 대상이 되고 있는 실정이다. 따라서 국내의 농업생명공학 발전과 국제 경쟁력 강화를 위하여 기존의 농업 분야와 전혀 다른 분야와의 접목을 통해 새로운 농업생명과학 분야를 개척해야 할 시기가 도래했다고 볼 수 있다. 이러한 분야의 한 예로서 농업과 의학의 결합을 시도해 볼 수 있는데 이러한 시도로서 이미 oral vaccine의 용도로 유전형질 전환 식물체의 제작이 시도되고 있으나 인체에 사용될 경우 면역학적으로 oral vaccine의 유용성을 확인하기 위한 예비 실험이 매우 부족한 상태이고 또한 oral vaccine의 투여량을 결정하기 위한 임상 실험이 매우 어려운 실정이다.

그러나 단클론 항체와 같은 경우 이미 식물체에서 발현한 단클론 항체의 기능이 실험적으로 증명되었고 발현량도 높아 대량 생산을 위한 기초연구가 충분히 진행되었으며 각각의 단클론 항체의 진단제 혹은 치료제로서의 기능 역시 임상적으로 충분히 검증되었기 때문에 의학용으로 유용히 사용될 수 있는 항체의 식물체 발현을 통한 대량 생산은 국내의 실정에서 볼 때 농업생명공학 분야의 국제 경쟁력을 향상시키고 농업을 이용한 새로운 산업 분야에 개발에 매우 적절하다고 사료된다.

국외에서는 이미 미국 위스콘신에 위치한 Agracetus사는 항암 인간 항체를 옥수수에서 생산하여 현재 임상실험을 진행하고 있으며 국제적인 몬산토(Monsanto) 종묘회사는

1996년 4월 이 회사의 식물형질전환부를 1억6천만불에 인수함으로써 plantibody 분야를 의욕적으로 개척하고 있다.

따라서 식물체에서 생산된 항체 (일명 plantibody) 생산 분야는 국외에서 이미 산업적으로 인정을 받아 많은 투자와 연구가 진행되고 있고 앞서 언급한 **3조 8천억원**이라는 세계 항체 시장의 규모에서도 알 수 있듯이 앞으로의 전망은 매우 밝고 유망하다고 하겠다.

2. 연구개발의 목적

가. 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체 유전자 획득

본 연구의 model system으로 사용되어질 항암항체는 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체로서 131I-labelled 항-CEA 단클론 항체가 직장암, 갑상선암, 그리고 난소암 환자의 치료에 유용하다고 보고되어 있어(Ychou et al. 1993; Juweid et al. 1999; Juweid et al. 1997) 항암 치료제로서 이미 임상 실험이 성공리에 진행중이다.

- 1) 인간 IgG Fc 항체 유전자 획득
- 2) 항-CEA 단클론 항체 유전자의 인간화

나. 작물의 형질전환 방법에 의한 단클론 항체 생산 model system 개발

- 1) 형질전환 체계가 확립된 작물의 효율성 증대
- 2) 담배의 재분화 및 형질전환 체계 확립
- 3) 육성계통을 이용한 토마토의 재분화 및 형질전환 체계 확립
- 4) 알팔파의 재분화 및 형질전환 체계 확립
- 5) 형질전환된 식물체의 유전자 도입 확인, 순화, 증식, 교배 및 포장 검정
- 6) 형질전환 식물체의 유전적 안정성 검증

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

1999년 통계에 따르면 미국에서 1,228,000명의 사람들이 암에 걸린 것으로 진단되었고 그중 564,800명이 사망한 것으로 나타났다. (Landis V, Murray T, *et al*) 한국을 포함하여 전세계 모든 나라에서 암은 심장질환, 교통사고와 더불어 주요 3대 사망원인의 하나로 꼽히고 있다. 그러므로 효과적인 암 진단 및 치료제의 개발이 항상 절실히 요구되고 있으며 현재 생명과학 분야별 연구비 책정에서 이 분야에 가장 우선적으로 막대한 금액의 연구비가 투자되고 있다. 그러나 아직까지 **암의 치료는 주로 수술이나 방사선치료, 화학요법**으로 이루어지고 있고, 이러한 치료법에는 많은 부작용과 임상적 제약이 따르고 있는 실정이다.

최근 인간의 암은 종양세포의 표면에 있는 표면 단백질에 의해 정의되고 있는 추세이며 따라서 기존의 방법에 의한 치료보다 좀더 다른 유전적인 접근방법이 대두되고 있다. 실험적으로 암세포가 자라는 면역결핍 마우스에 항암 항체들을 처리하면 암세포 표면에 발현되는 암항원에 결합하여 암세포의 성장을 저해함이 밝혀졌다. 이러한 원리를 이용하여 **최근 암 치료에 있어서 단일클론항체를 단독으로**, 또는 방사선 핵종이나 독성물질이 결합된 형태로 사용하는 방법이 시도되고 있어 종양의 치료에 있어서 낙관적인 변화를 가져오고 있다.

현재 FDA에서는 단일클론항체인 Rituximab과 Herceptin의 사용을 승인하였는데 이 항체는 다른 치료에서 전혀 반응을 보이지 않던 환자들의 50% 이상에서 효과를 보인바 있으며 실질적으로 여러 연구에서 단일클론항체를 이용하여 림프종, 대장암, 유방암 등에 성공적인 임상치료를 보여주고 있다. 이러한 유용성에도 불구하고 *in vitro*나 마우스를 사용한 *in vivo* 실험에서는 효과를 나타내는 항체가 인간에게 도입하였을 때는 효과를 나타내지 않는 경우가 있다. 이는 인간에서 단일클론항체를 외래 항원으로 인식해 면역반응을 유도하게 되어 제 기능을 하지 못하는 것인데 어떤 경우에는 심한 알레르기 반응이나 과민반응을 일으키기도 한다 (Issacs, J. D.). 또한 항체의 Fc 지역이 인간의 effector cell에는 작용하지 않는 경우도 있다(Adair, J.).

이러한 문제점을 극복하기 위해서 유전자 재조합 기술을 이용한 여러 접근 방법이 시도되었다. 그 중 하나는 인간 조합 항체 라이브러리 (human combinatorial antibody library)를 제작하여 항원에 특이적으로 작용하는 부분인 항체의 heavy와 light의 variable region만을 폴리펩타이드 linker로 연결한 scFv(single chain variable fragment)와 Fc 지역만을 제외한 나머지 부분을 포함하는 Fab(antigen binding fragment)를 제작하는 것이다. 이러한 재조합 항체를 이용하면 단일클론항체를 사용하는 것에 비해 면역반응을 덜 유도하고 암에 대한 침투력이 더 강한 장점이 있다.

또 다른 방법은 hybridoma fusion에 의한 인간 단클론항체의 생산이 불가능하므로 설치류 기원의 항암 단클론 항체를 제작한 후 이 항체 유전자를 인간의 항체 유전자로 상당부분 대체하는 항체 인간화 (antibody humanization)를 들 수 있다. 예를 들어 항체의 Fc region을 인간의 Fc region으로 대체시키는 것인데 항체에 있어서 Fc region은 Fv region의 구조적인 성격에 전혀 영향을 주지 않으므로 항원에 대한 친화력이나 특이성을 변화시키지 않고 사용할 수 있다.

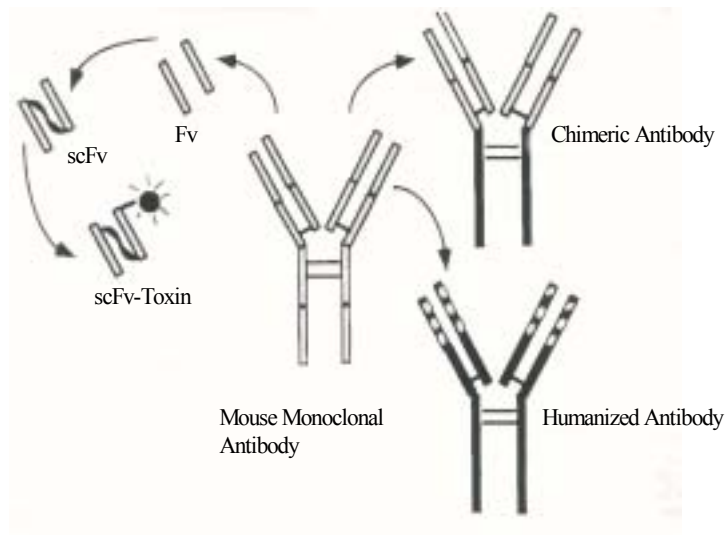


그림 1. 항체로부터 유도된 분자들의 모형도

이러한 유전자 재조합 항체들은 효과적인 항암 물질로서 암의 신경전달 경로에 관여하는 항원에 결합하거나 또는 암세포 표면에 있는 성장요소의 수용체에 결합해 암의 발달을 저해하는 전략에 많이 이용되고 있다. 또한 독성물질이나 화학물질을 결합시켜 좀더 효

과적으로 암세포를 제거하는 기술도 새로이 대두되고 있어 앞으로 이러한 항암치료제로서의 인간화된 항체를 어떠한 방법을 사용하여 적은 비용으로 대량생산할 것인가가 이 분야에 있어서 가장 큰 문제점으로 남아 있으며 이러한 문제점의 해결이 곧바로 국제 경쟁력과 직결되어있다고 볼 수 있다. 이를 위하여 의학에 기반을 둔 면역학 분야와 농업생명공학 분야에서의 기술 개발이 의학용 유용 단백질의 대량 생산을 위하여 반드시 필요하다 하겠다.

나. 경제·산업적 측면

1997년 기준 단클론 항체 미국 시장은 약 10억 1천만달러 (약 1조 2천억원)로 추정되고 있으며 이는 1996년에 비해 무려 46% 성장한 것으로 조사되었다. 따라서 세계적으로 단클론 항체 시장은 천문학적일 것으로 예상된다. 또한 2000년까지는 여전히 각종 질환의 체외 및 체내 진단제가 시장을 주도할 것으로 전망되며 2000년 이후 설치류 기원 단클론 항체의 인간화 등을 통한 문제점이 해결될 경우 치료제가 성장을 주도할 것으로 예측되고 있다. **2000년 전체 시장 규모는 약 35억불 (약 3조 8천억원)**로 추정되며 진단제는 40% 미만으로 감소하고 치료제가 50%를 넘어설 것으로 예상된다.

표 1. 단클론 항체의 시장 추이

연도	시장
1995	5.64 억 달러
1996	7.36 억 달러
1997	11.01 억 달러
1998	14.91 억 달러
1999	20.78 억 달러
2000	35.2 억 달러

또한 기존에 이미 상용화된 단클론 항체 진단제 및 최근 상업화된 단클론 항체 진단제를 살펴보면 다음 두 개의 표와 같다.

표 2. 이미 상용화된 단클론 항체 진단제

종류	검출(표적)대상	업체(연구기관)	개발 단계
세균 감염	Hepatitis B virus B streptococci cytomegalovirus	MedImmune 외 다수	FDA 승인
알츠하이머	amyloid beta-protein	SIBIA	FDA 승인
대장암	carcinoembryonic antigen	Centocor	FDA 승인
간암	alpha-feto-protein	Cambridge외 다수	FDA 승인
전립선암	prostatic acid phosphate	PLD외 다수	FDA 승인

표 3. 최근 상업화된 단클론 항체 진단제

개발 업체	상품명	특징 및 용도	개발 상태
Centcor	ReoPro	정형수술 최초의 단클론 항체 치료제	1994 출시
IDEC/Genetech	Rituxan	비호지킨 임프종	1994 출시
Hoffaman- La Roche	Zenapax	신장이식 거부반응 완화 PDL 라이센싱	1994 출시
Centocor	Remicade	크란슨 병 류마티스 관절염	1994 출시
Novartis	Simulect	장기이식 거부반응 완화 Cyclosporine 혼합투여	1994 출시
MedImmune	Synagis(TM)	RSV disease 최초 전염병 치료 항체	1994 출시
Genetech	Herceptin	말기 유방암 치료	1994 출시

현재 세계적으로 약 260개의 업체에서 치료제 혹은 진단제 개발을 목적으로 단클론 항체 개발에 주력하고 있으며 약 900여종의 항체가 개발중이거나 개발되어 임상시험을 진행 중이다. 이중 약30%이상이 항암제 및 암 진단제와 관계가 있으며 그외 주요 목표는 자가 면역 질환, 전염병, 이식거부 반응 완화, 심장 질환 순으로 연구가 진행 중이다. 최근 주요

단클론 항체 치료제 연구 개발 동향을 보면 다음과 같다

표 4. 최근 주요 단클론 항체 치료제 연구 개발 동향

개발 업체	상품명	특징 및 용도	개발 상태
Celltech	CMA676	급성 골수종성 백혈병	임상 3상
Coulter Pharm	Bexxar	비호지킨 임프종	임상 3상
Alpha Therapeutic	Oncolym	비호지킨 임프종	임상 3상
Genetech	Anti-IgE	천식(asthma)	임상 3상
Gentocor	Panorex	결장암 치료	임상 3상
IDEC	IDEC CE91	류마티스 관절염	임상 3상
Elan Corp.	Antegren	다발성 경화증 PDL 라이센싱	임상 2상

상기에서와 같이 단클론 항체 생산에 관한 국제적인 연구가 이미 생명공학 회사를 중심으로 활발히 진행되고 있으며 이는 이 분야에 대한 경제적 그리고 산업적 가능성을 충분히 반영하고 있기 때문이다.

다. 사회·문화적 측면

외국 종묘회사 (Seminis 와 Nobatis)들과 국내 주요 몇몇 종묘회사들의 M&A로 인한 종묘산업의 국제화가 시작되고 있으며 기술적으로 유전공학기술에 의한 형질전환 식물체의 탄생은 제 2 녹색혁명의 중심이 되고 있고 국가의 과학농업적 위상을 측정하는 중요한 잣대가 되었고 있다. 사회적인 관점에서 앞으로의 식량난을 극복하고 환경 친화적인 농업을 하기 위해서는 유전공학기술의 사용을 피할 수 없다는 것이 일반적으로 받아들여지고 있으며 1999년 4월 유전자재조합 식품첨가물 안전성 평가자료 심사지침제정(안) 입안예고를 위한 준비 작업을 보건복지부에서 하고 있을 정도로 안정성에 대한 문제를 심각하게 다루고 있지만 실제로 국내에서 실제로 적용시킬 만큼 개발된 형질전환 식물체는 매우 소수인 실정이다. 국제적으로는 생물 다양성 협약에 따른 생명공학 안전성에 관한 카르타헤나 의정서가 1999년 2월에 콜롬비아 카르타헤나에서 개최된 회의에서 만들어 졌으나 농산물 수출국과 수입국의 이해관계 대립으로 유보되었지고 **2000년 5월 생물다양성협약 총회**에 상정해서 채택, 발효시킬 예정이라하며 따라서 국제적으로 이미 유전자전환 생물체의

환경 위해성 평가에 대한 관심과 규정이 만들어지고 있음을 보여주고 있다. 이러한 **유전형질 전환 농산물**의 사용에 대하여 생명안전, 윤리 연대모임이나 기타 환경단체에서 생명공학의 발전에 대해서 반대를 하고 있다.

본 연구에서는 **식품으로서가 아닌 bioreactor**로서의 형질전환 농산물 개발을 시도하고자 하며 따라서 농업생명공학의 기술을 이용한 저가의 의학용 시료의 대량 생산을 시도하여 의약품 생산에 관한 국제 경쟁력 강화와 고부가가치 농산물의 생산을 통한 농가 소득의 증대에 기여하고자 한다. 따라서 **주요 농산물의 형질전환기술을 통해 항암 항체 생산을 위한 bioreactor로서 활용하고자 한다. 이러한 기술의 확립은 국내 첨단 농업 기술의 발전, 농가 소득 증대, 국내 의약품 개발 생명공학의 국제 경쟁력 강화 그리고 저렴한 항암 치료제 생산을 통한 환자의 치료비 절감 등 많은 사회적 기여가 예측된다.**

2. 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차 연도 (2001년)	1. 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체의 인간화 2. 각 작물(담배, 토마토, 알팔파)의 계통 증식과 형질전환 효율이 높은 계통 선발	(1) 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체 유전자 획득 (2) 인간 IgG Fc 항체 유전자 획득 (3) 항-CEA 단클론 항체 유전자의 인간화 (4) 식물체 재분화 및 형질전환 시스템 개발 (5) 발현시킬 다양한 벡터작성
2차 연도 (2002년)	1. 식물체에 도입한 항체 유전자 발현확인 및 형질전환 식물체 생산 2. 우수 계통의 형질전환 및 우수 계통간 교배조합 구성	(1) 재조합된 벡터를 식물체에 도입하여 형질전환 식물체 생산 (2) 형질전환 계통의 농업형질 조사 및 선발 (3) 우수 형질전환 계통의 증식
3차 연도 (2003년)	1. 형질전환 식물체의 항체 발현 확인 2. 포장 검정 및 우수 교배 조합 선발 3. 항체발현 작물의 대량생산	(1) 형질전환 식물체의 형질전환 발현율 조사 (2) 형질전환 특성의 유전양상 조사 (3) 형질전환 식물체의 농업형질 특성평가 (4) 형질전환 식물체의 생산력 검정 및 선발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1975년 Kohler와 Milstein에 의한 단일클론항체의 발견 이후 세포, 박테리아 그리고 바이러스성 단백질의 특이적인 여러 종류의 단일클론항체들이 발달하였다 (Kohler G, Milstein C). 생체의학 연구에 있어서 이러한 단일클론항체들은 세포 내 그리고 세포 외의 단백질들의 구조적, 기능적인 관련성을 이해하는데 좋은 도구로서 사용되어 왔으며 최근 들어서 특히 생명공학분야를 중심으로 단일클론항체의 반응 특이성을 이용한 항암 혹은 항자가면역질환 등에 대한 인체 치료 및 진단시약으로서의 활용에 많은 연구의 초점이 모아지고 있다.

실질적으로 B 세포 림프종과 백혈병 환자에게 CD22와 CD19에 특이적인 재조합 항체를 실험하여 암이 완전히 완화된 것을 보인 보고가 있으며 (Scheuermann RH, *et al.*; Sausville EA, *et al.*) 이외에도 피부 T세포림프종에 anti-IL-2수용체 항체를 처리하여 35명의 환자중 13명이 부분적인 완화증상을 보인 결과도 있다 (Duvic M, *et al.*). 또한 많은 인간 암종의 세포표면에 발현되는 Lewis Y(Ley) 항원을 인식하는 BR96 단일클론항체를 인간화하여 이 인간화한 BR96 항체가 항원에 결합하는데 전혀 영향을 주지 않는다는 데이터를 보고한 바 있다(Mae. JR, *et al.*) 또한 림프종 특이 항원인 CAMPATH에 결합하는 인간화한 항체를 림프종 환자에게 투여한 한 결과 부분적으로 혈관생성이 회복되는 것을 보였으며(Hale G, *et al.*), anti-CD33 단일클론항체 M195를 인간화시킨 항체가 골수성 백혈병 환자에게 특이적인 효과를 나타냈다는 보고도 있다 (Caron PC, *et al.*) 이 외에도 유방암에 있어서 인간화한 단일클론항체를 투여하여 12%정도의 환자에서 암세포 크기가 50%이상 줄어드는 등 (Baselga J, *et al.*) 암세포 항원에 특이적인 인간화 항체를 이용한 임상실험이 진행되고 있다.

표 1에 임상실험에 이용되고 있는 주요 암 관련 항원들과 그와 관련된 항체들을 나열하였다. 이러한 새로운 기술을 이용하여 항체 그리고 항체와 유사한 물질을 생산은 여러 생물의학 연구나 인간과 동물질환 치료의 목적으로 유용한 도구가 될 것이다.

표 5. 단일클론항체의 목적이 되는 주요 암관련 항원

Categories	Exaples of antigens	Tumor types
Lymphomas/leukemias		
Differentiation antigens	CD5	T cell IB cell lymphoma
	CD19, 20, 21, 22, 37	eukemai/lymphoma
	CD30	Hodgkin's lymphoma
	CD33, CD45	AML
	CAMPATH-1(CDw52)	Lymphoid malignancies
	HLA-DR	B cell lymphoma
	Anti-idiotypic	B cell lymphoma
Solid tumors		
Cell surface antigens		
Glycoproteins	CEA, TAG-72, Ep-CAM, MUC1	Epithelial tumors
	Folate binding protein	Ovarian tumors
	A33	Colorectal carcinoma
	G250	Renal carcinoma
Glycolipids	Gangliosides(e.g. GD2, GD3)	Neuroectodermal tumors
Carbohydrates	Ley	Epithelial tumors
	CA-125	Ovarial carcinoma

이러한 항암 기능의 단클론 항체를 임상적으로 사용할 경우 항체에 의한 암세포의 파괴를 유도하기 위하여 다량의 항체 (약 250mg/dose)를 환자에게 투여해야 하며 따라서 많은 양의 항체를 생산해야만 하는 문제점을 지니고 있다. 이러한 항체의 생산을 위하여 현재 대용량의 동물세포 배양을 시행하고 있으나 생산 단가가 높기 때문에 치료제로서의 가격이 상승한다는 단점이 있다. 물론 대장균(*E. coli*)을 이용한 항체의 생산을 시도할 수도 있으나 완전한 형태의 항체를 대장균에서 발현할 경우 **대장균에 toxic하기** 때문에 대량 생산을 시도할 수 없으며 또한 대장균에서 생산된 물질을 인체 치료용에 사용하기 위해서는 많은 비용이 분리 정제에 쓰여진다는 단점이 존재한다. 따라서 **저비용으로 가능하며 인체 사용이 안전한 새로운 형태의 단클론 항체 대량 생산 기술이 시급히 요구되고 있는 실정이다.**

본 연구팀은 이미 본 과제와 관련된 기초 기술을 확보하고 있으며, 또한 식물생명공학분야 벤처의 기수로 떠오르고 있는 GenoMine 이 참여함으로써 개발될 상품의 마

케팅과 실용화를 가능하게 할 것으로 믿는다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연차별 연구내용

1. 1년차 : 항-CEA (carcinoembryonic antigen) 항체 유전자의 인간화, 각 작물의 재분화 체계 확립

가. 항-CEA(carcinoembryoic antigen) 단클론 항체 유전자 획득

- 1) CEA에 대한 단클론 항체를 생산하는 세포주로부터 항체 유전자를 분리해낸다.
- 2) 분리해낸 항체 유전자를 주형으로 하여 항체의 heavy와 light의 가변지역(VH, VL region)을 증폭시킨다.
- 3) 증폭된 유전자를 agarose gel 상에서 분리해 낸다.
- 4) 분리된 유전자를 클로닝 벡터에 도입시켜 항-CEA 단클론 항체의 Fv 지역을 획득한다.

나. 인간 IgG Fc 항체 유전자 획득

- 1) 인간의 혈액으로부터 lymphocyte를 분리해낸 후 acid guanidium-thiocyanate 방법에 의해 RNA를 추출한다.
- 2) 추출한 RNA에 역전사 효소를 처리하여 cDNA를 얻어낸다.
- 3) 생성된 cDNA를 주형으로 인간 Ig의 heavy chain의 CH1-CH3 지역과 light chain의 CL 지역을 증폭시킨다.
- 4) 각각 증폭된 유전자들을 agarose gel 상에서 분리해 낸다.
- 5) 분리하여 얻어진 Ig 항체의 유전자들을 각각 제한효소로 처리한후, 같은 제한효소로 처리된 벡터에 도입시켜 인간 IgG의 Fc 항체 유전자를 획득한다.

다. 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체 유전자의 인간화

- 1) CEA에 대한 단클론 항체를 생산해내는 세포주에서 얻은 Fv 항체 유전자를 클로닝 벡터에서 분리해 낸다.
- 2) 인간의 IgG Fc 항체 유전자를 제한효소를 처리하여 클로닝 벡터에서 분리해 낸다.
- 3) 각 분리해낸 Fv 유전자와 Fc 유전자를 클로닝 벡터에 도입시킨다.
- 4) 도입시킨 재조합 플라스미드 벡터를 균주에 열 충격 방법으로 도입시켜 항생제 배지에서 배양한다.
- 5) 배양한 균주에서 DNA를 분리, 제한효소 처리 후, agarose gel에서 인간화된 단클론 항체 유전자를 확인한다.

라. 식물체 재분화 및 형질전환 시스템 개발

식물체의 재생 능력은 품종 및 계통에 따라 차이를 보이고, 식물체의 부위, 성장 단계에 따라 다르며 배지에 포함되는 생장 조절제와 영양소의 종류와 양, 배양 환경 등에 의해 좌우되므로 최적의 조건을 규명하여 가장 좋은 형질전환 시스템을 개발한다.

마. 담배는 재분화와 형질 전환의 model system으로 사용하고 토마토는 그동안 임학태 교수 연구실에서 꾸준히 재분화와 형질전환에 대한 연구가 이루어져 왔다. 따라서 육성계통을 이용한 효율성 증대에 중점을 둔다.

바. 토마토는 inbred 계통을 사용하고 소과종과 대과종을 종묘회사로부터 분양 받아서 나중에 F1 잡종 식물체를 만들 것을 생각한다. 잡종강세를 이용한 생산성 향상을 기대할 수 있다.

사. 알팔파는 단백질 함량이 높고 비타민도 풍부하여 현재 우리 나라 농가에서 중요성을 인정하고 있는 작물이다. 생산력도 다른 어떤 사료작물보다 뛰어나므로 다량의 항체를 생산해 내기 위해서 알팔파에 형질전환 시켜야 한다.

2. 2년차 : 형질전환 식물체 생산

가. 식물에서 발현시킬 벡터 작성

- 1) 식물에서 발현시킬 벡터를 제작한다. Promoter는 cauliflower mosaic virus 35S promoter와 maize ubiquitin promoter를 사용하고, 선별 표지 유전자는 hygromycin, kanamycin 저항성 유전자와 GUS를 사용한다. 또한 제초제저항성 유전자가 도입된 벡터를 사용한다.
- 2) 클로닝을 통해서 얻어진 인간화한 항 CEA 항체 유전자를 제한효소를 처리하여 클로닝 벡터로부터 분리해 낸다.
- 3) 식물 벡터도 마찬가지로 제한효소로 처리하여 벡터와 인간화한 항체 유전자를 T4 DNA ligase로 붙여준다.

나. 목적 유전자가 재조합 되어있는 벡터를 가진 대장균과 *Agrobacterium*을 접합시켜서 유전자가 도입된 *Agrobacterium*을 만든 후 식물체의 절편에 상처를 내어 접종한다.

다. 대부분의 작물에서 *Agrobacterium*에 의한 형질전환이 가능한 것으로 알려져 있으나 알팔파의 경우 다음과 같은 방법을 시도한다.

- 1) Electroporation 방법 : 원형질체와 목적 DNA를 포함하는 플라스미드를 함께 큐벳에 넣고 펄스를 가하여 세포의 막에 생긴 미세 공극으로 플라스미드가 들어가도록 한 후 배양한다.
- 2) Polyethyleneglycol을 이용하는 방법 : Embryogenic protoplast에 PEG를 이용하여 플라스미드를 도입한다.
- 3) Particle bombardment 방법 : gene gun을 이용하여 목적 유전자를 도입한다.

라. 형질전환 식물체의 선발

기내에서 형질전환 된 식물체는 배지에 포함된 hygromycin에 의하여 선별되고, GUS 유전자의 발현에 의하여 청색을 띠는 것으로 선별할 수 있다.

마. 형질전환 식물체의 검정

Hygromycin과 GUS 유전자에 의하여 1차 적으로 선별된 형질전환식물체는 계대배양을 통해 유지하면서, 도입된 유전자에 의하여 백신이 생성되고 있는지 확인하기 위하여 DNA 분리 및 PCR과 Genomic Southern blotting, RNA 분리 및 northern blotting, SDS PAGE, western blotting등을 실시한다.

바. 형질전환 식물체의 순화

목적 유전자를 포함하고 있는 것으로 확인된 식물체는 기내에서 성장시킨 후 포장에 이식하기 위하여 광도가 비교적 높고 상대 습도가 낮은 곳에서 순화시킨다.

사. 이와 같이 얻어진 형질전환 계통을 포장에 이식하고 우수한 계통을 선발하여 증식한다.

3. 3년차 : 항암 단클론 항체 발현 형질전환 식물체의 생산

가. 형질전환 식물체의 항체 발현 조사

형질전환 식물체로부터 항체가 발현되는지 조사하기 위하여 식물체로부터 항체를 분리하여 western blot이나 ELISA 방법을 통하여 발현정도를 측정한다.

나. 형질전환 식물에서 발현된 항체 기능 조사

형질전환 식물에서 생산된 항체가 CEA에 대하여 제대로 기능을 하는지 조사하기 위하여 western blot을 통하여 CEA와의 반응정도를 알아본 후, CEA를 생산하는 암세포주에서 보체(complement)에 의한 세포분해가 일어나는지 측정한다. 또한 CEA를 생산하는 암세포주를 nude mice에 주사하여 암을 일으키게 한 후 식물체에서 발현된 항체를 처리하여 성공적으로 암이 줄어들어가는지를 알아본다.

다. 형질전환 식물체의 백신 발현을 검정하기 위하여 DNA 분리 및 PCR과 Genomic Southern blotting, RNA 분리 및 Northern blotting, SDS PAGE, Western blotting등을 실시한다.

라. 형질전환식물체에서 생성된 백신의 affinity 검정

제 2 절 연구결과 및 분석

1. 제1 세부과제 : 유전자 조작을 통한 설치류 항암항체의 인간화 및 형질전환식물체에서의 항체 발현조사

가. 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체 유전자의 획득

- ① CEA에 대한 단클론 항체를 생산하는 세포주로부터 항체 유전자를 분리
- ② 항체유전자를 주형으로하여 항체의 heavy와 light의 가변지역(VH, VL region)을 증폭
- ③ 증폭된 유전자를 agarose gel 상에서 분리
- ④ 분리된 유전자를 클로닝 벡터에 도입시켜 항-CEA 단클론 항체의 Fv 지역을 획득

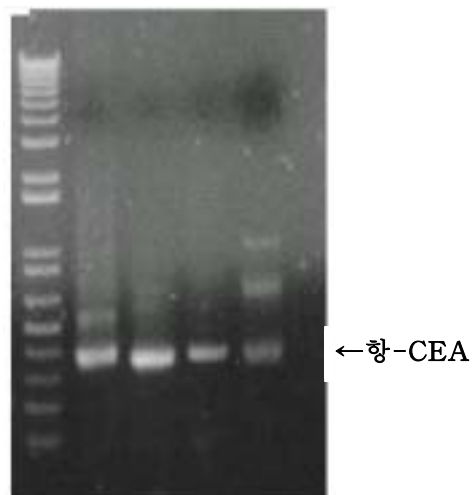


그림 2. PCR of muVH, muVL, huCH1, huCL

(lane1: 1kb plus ladder, lane2: muVH, lane3: muVL, lane4: huCH1, lane5: huCL)

나. 인간 IgG Fc 항체 유전자 획득

- ① 인간의 혈액으로부터 lymphocyte를 분리
- ② acid guanidium-thiocyanate 방법에 의해 RNA를 추출
- ③ 추출한 RNA에 역전사 효소를 처리하여 cDNA를 생성
- ④ 생성된 cDNA를 주형으로 인간 Ig의 CH1-CH3 지역과 light chain의 CL 지역을 증폭
- ⑤ 각각의 증폭된 유전자들을 agarose gel상에서 분리

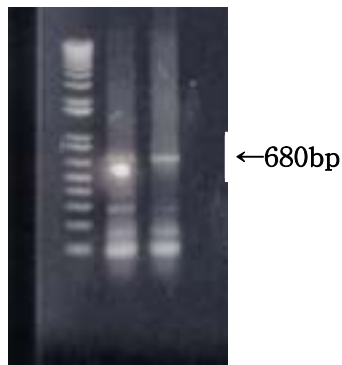


그림 3. PCR of Human CH2-3(680bp)

다. 항-CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체 유전자의 인간화

- (1) CEA에 대한 단클론 항체를 생산해내는 세포주에서 얻은 Fv 항체 유전자와 인간의 IgG Fc(CH1, CL)를 linking PCR을 이용하여 인간화된 Fab 항체 획득

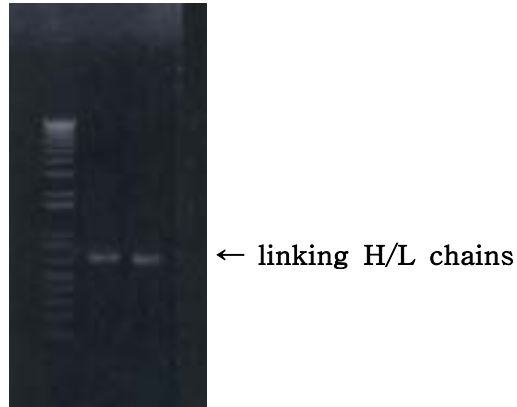


그림 4. 1% agarose gel electrophoresis of linking H/L chain(680bp)

(2) Colony immunoassay에 의한 인간화된 항체의 확인

- ① PCR로 증폭된 인간화 light Fab 항체를 제한효소(*sacI/xbal*)로 처리한후 같은 제한효소로 처리된 pCmb3 vector와 16°C에서 O/N ligation
- ② Ligation 반응물을 열충격 방법으로 XL-1 Blue cell에 infection 시킨 후 37°C에서 O/N 배양
- ③ 얻어진 colony를 LB/Amp plate에 tooth pick로 찍어 접종한 후 3-4 시간 배양
- ④ 배양한 plate에 1mM IPTG에 15분 동안 적신 nitrocellulose membrane을 덮고 이 membrane을 가지고 anti-human-IgG(AP conjugated)항체를 이용하여 인간화된 항체의 반응을 확인



그림 5. Colony assay for cloning of linking light chain(muVL+huCL)by pComb3 vector

(3) Western-blot에 의한 인간화된 light chain의 expression

- ① Linking light chain은 OD가 0.5가 될 때까지 LB/amp에서 culture한 다음 IPTG의 농도를 1mM이 되도록 첨가
- ② Linking light chain의 expression은 37°C incubator에서 4시간동안 배양되었고 IPTG induction후 원심분리를 이용하여 cell pellet을 SDS-PAGE sample buffer (100mM Tris.Hcl, pH6.8, 4% SDS, 200mM dithiothreitol, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 2% mercaptoethanol)에 희석하여 12% SDS-PAGE를 수행
- ③ SDS-PAGE수행 후 nitrocellulose membrane에 transfer하여 light chain의 확인을 위해서 기질로는 NBT/BCIP를 사용하였고, anti-human kappa antibody conjugated with AP를 이용하였다.

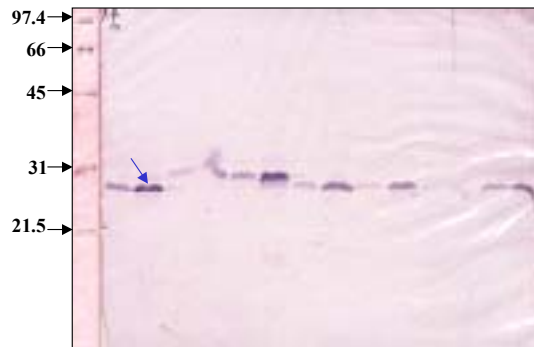


그림 6. Identification of Linking light chain produced by Pcomb3 vector upon IPTG induction

(4) 항-CEA full heavy chain의 유전자 획득

- ① 인간 혈액으로부터 lymphocyte를 분리
- ② PCR을 통해 얻어진 Fc(Hu CH2-3)지역을 *Xho* I/*Hind* III 효소로 절단하고 같은 효소를 이용하여 TrcHis vector도 절단하여 T4 DAN ligase를 처리하여 16°C에서 O/N ligation
- ③ Ligation 반응액을 열충격 방법으로 도입시켜 항생제 배지에서 배양하여 배양한 균주에서 DNA를 분리한 다음 제한효소를 처리하여 agarose gel상에서 Hu CH2-3 항체유전자를 확인
- ④ 항-CEA full-heavy antibody를 만들기 위해 Hu CH2-3가 확인된 TrcHis vector를 *Xho* I/*Spe* I 효소를 이용하여 절단한 다음 heavy chain의 Fab지역도 같은 효소로 절단하여 위의 방법과 같이 항-CEA full-heavy chain의 항체 유전자를 확인

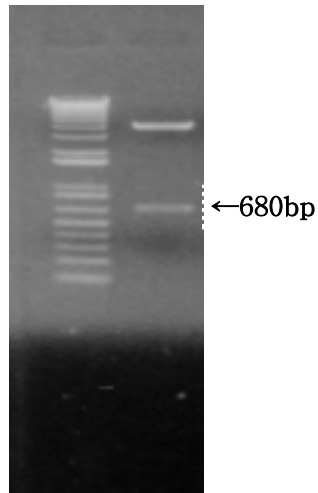


그림 7. Identification of Hu CH2-3 by *Xho I*/*Spe I* digestion og miniprep plasmid

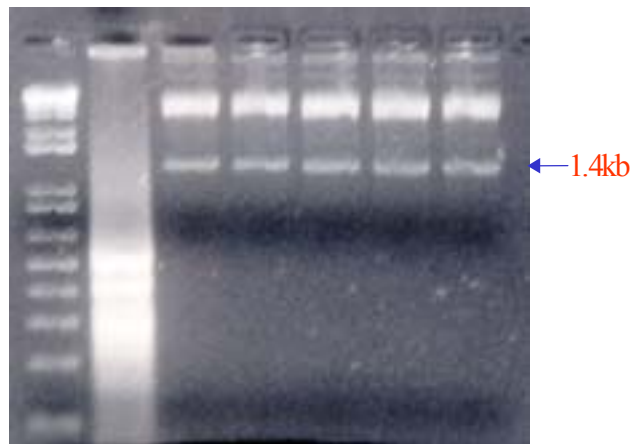


그림 8. Identification of full heavy chain by *Xho I*/*Hind III* digestion

(5) Western-blot에 의한 인간화된 full-heavy chain 유전자의 expression

- ① 인간화된 항-CEA full heavy chain은 OD가 0.5가 될 때까지 LB/amp에서 culture 한 다음 IPTG의 농도를1mM이 되도록 첨가하고 37°C incubator에서 4시간동안 배양
- ② IPTG induction후 원심분리를 이용하여 cell pellet을 SDS-PAGE sample buffer (100mM Tris.Hcl, pH6.8, 4% SDS, 200mM dithiothreitol, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 2% mercaptoethanol)에 희석하여 12% SDS-PAGE를 수행
- ③ SDS-PAGE 후 nitrocellulose membrane에 transfer하여 heavy chain의 확인을 위해서 기질로는 NBT/BCIP를 사용하고 anti-human IgG(Fab) antibody conjugated with AP를 이용하였다.

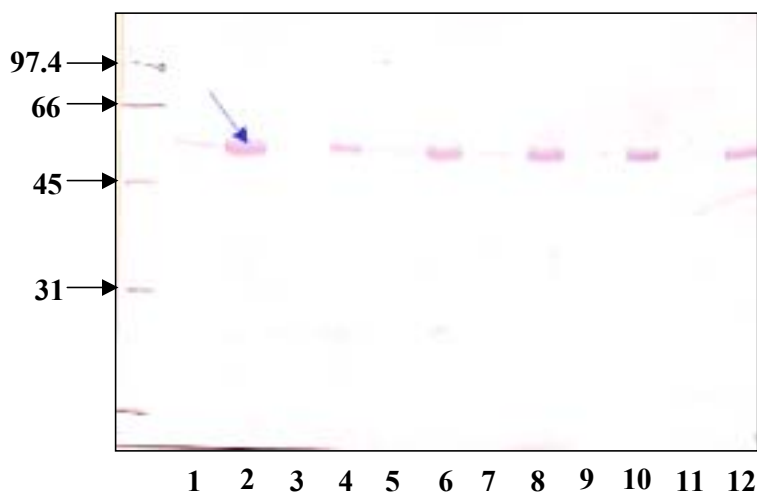


그림 9. Western blotting ; Expression of full heavy chain
(lane 1,3,5,7,9,11:without IPTG ; lane 2,4,6,8,10,12:with IPTG)

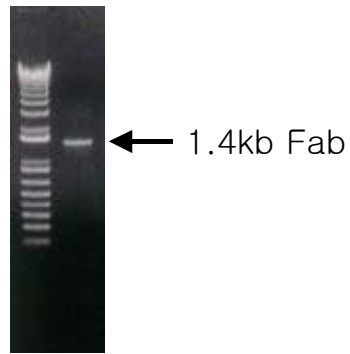
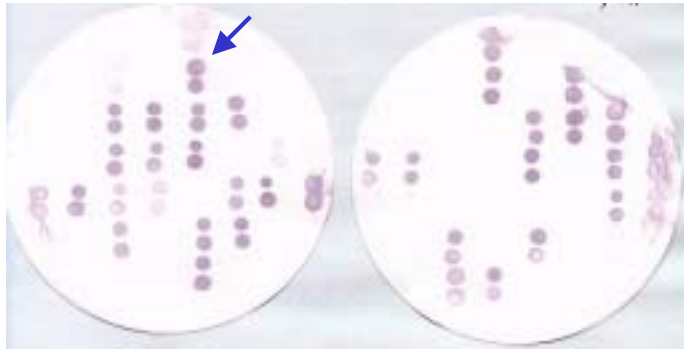


그림 10. Amplification of anti-CEA Fab by linking PCR

Heavy chain



Light chain

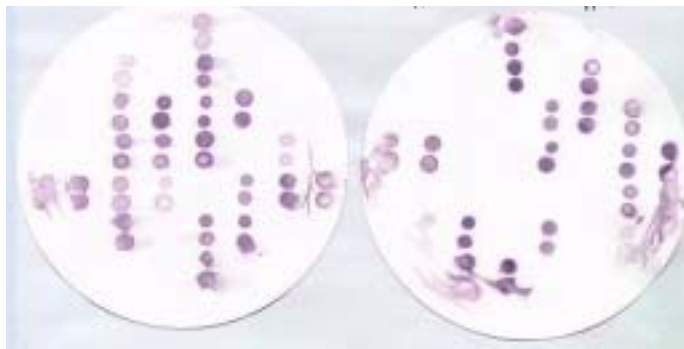


그림 11. Expression of anti-CEA Fab using 1mM IPTG

라. 인간화된 항-CEA Fab 항체의 induction

- ① Colony assay를 통하여 발현이 잘된 clone들을 1mM IPTG를 이용하여 37°C에서 4시간 induction하여 12% SDS-PAGE 이용하여 induction을 확인

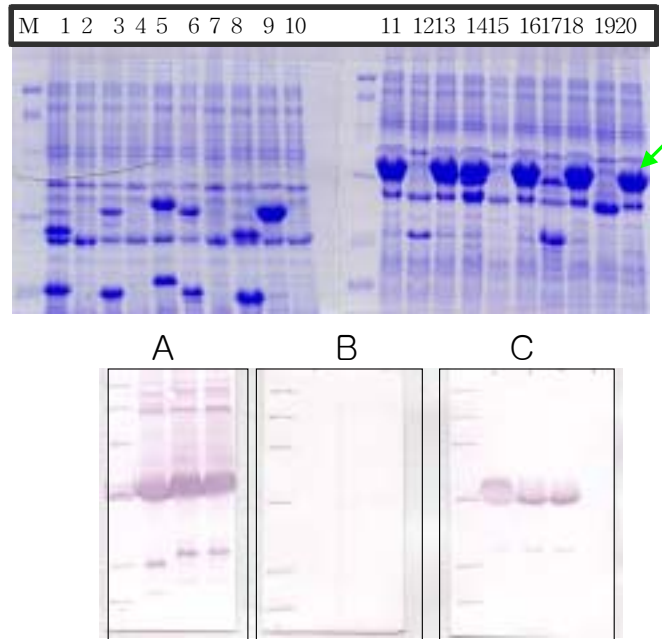


그림 12. Induction and expression of anti-CEA Fab using 1mM IPTG

(panel A: anti-human-kappa, panel B: anti-mouse-IgG, panel C: anti-Histidine)

마. 발현된 항-CEA IgG Fab 항체와 CEA(carcinoembryonic antigen)와의 ELISA

- ① CEA항원을 ELISA plate에 coating($10\mu\text{g/ml}$)
- ② 1%BSA로 blocking하고 발현된 Fab clones의 상등액을 넣고 37°C에서 1시간 반응
- ③ PBS(0.1% tween-20) buffer로 씻어주고 2차항체(α -Human kappa AP conjugated 1:5000)를 넣고 1시간 반응
- ④ PBS(0.1% tween-20) buffer로 씻어준 후 기질($pNpp$)을 넣고 발색반응을 확인

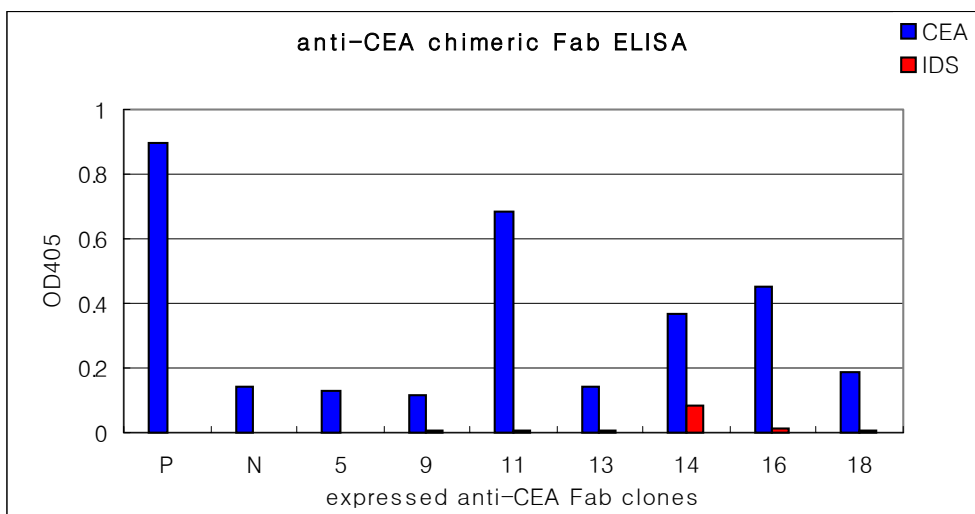


그림 13. Determination of binding specificity of anti-CEA Fab by ELISA

(P: Positive control-CEAmAb, N: Negative control)

바. 제작된 항-CEA Fab 항체의 항원 특이성 검증을 위한 Western-blot

- ① CEA항원을 SDS-PAGE(12%) 전기영동을 한 후 nitrocellulose membrane에 transfer (65V, 1시간 30분)
- ② Ponceau-S로 염색한후 membrane을 적당한 크기로 자르고 3% non-fat milk (PBS)로 blocking

- ③ PBS(0.1% tween-20) buffer로 씻어준 후 Fab clones의 상등액을 넣고 실온에서 1시간 반응, 그리고 ELISA와 같은 방법으로 실시하여 항원 특이성을 검증

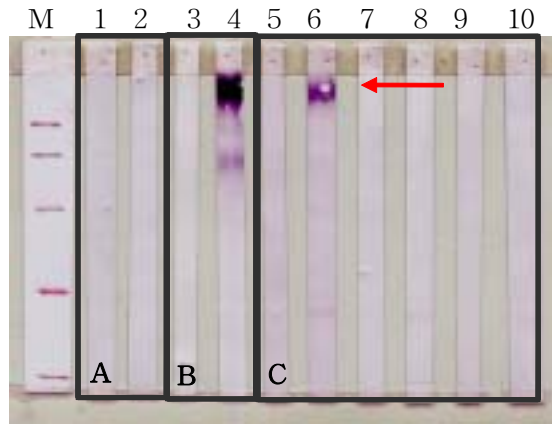


그림 14. Immunoblot analysis for anti-CEA Fab binding specificity to CEA

(Lane 1,3,5,7,9: IDS Ag, Lane 2,4,6,8,10: CEA Ag)

A: Negative control(CMV mAb), B: Positive control(CEA mAb), C: Fab clones

이렇게 특이성을 검증한 결과 **CEA(carcinoembryonic antigen)**과 특이성을 갖는 **Fab 항체를 획득**할 수 있었다.

사. 항-CEA full-heavy chain의 유전자 획득

- ① 인간 혈액으로부터 lymphocyte를 분리하여 PCR을 통해 얻어진 Fc(Hu CH2-3) 지역을 *Xho I/Hind III* 효소로 절단하고 같은 제한효소를 이용하여 TrcHis vector를 절단하여 T4DAN ligase를 처리, 16°C에서 O/N ligation
- ② Ligation 반응액을 electroporation방법으로 도입시켜 항생제 배지에서 배양하여, 배양한 균주에서 DNA를 분리, 제한효소를 처리하여 agarose gel상에서 Hu CH2-3 항체유전자를 확인

- ③ 항-CEA full-heavy antibody를 만들기 위해 Hu CH2-3가 확인된 TrcHis vector를 *Xho I/Spe I* 효소를 이용하여 절단한 다음 heavy chain의 Fab지역도 같은 효소로 절단하여 위의 방법과 같이 항-CEA full-heavy chain의 항체 유전자를 확인
- ④ 인간화된 항-CEA full-heavy chain에 IPTG를 1mM농도가 되도록 넣어주고 37°C에서 4시간 배양하였고 cell pellet은 SDS-PAGE sample buffer(100mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 200mM dithiothreitol, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 2% mercaptoethanol)에 희석하여 12% SDS-PAGE를 수행한 다음 nitrocellulose membrane에 transfer하여 secondary antibody(anti-human IgG-Fab conjugated withAP)를 사용하여 heavy chain의 발현을 확인

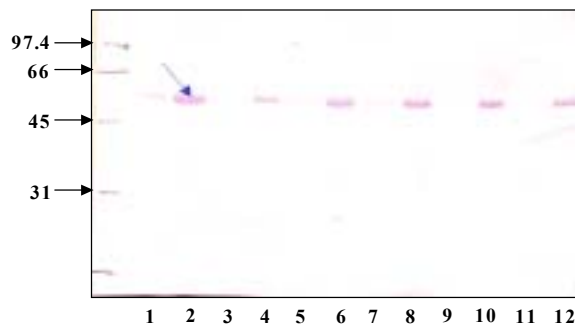


그림 15. Expression of full-heavy chain by western-blot.

(lane 1,3,5,7,9,11: without IPTG; lane 2,4,6,8,10,12: with IPTG)

아. 곤충세포에서 항-CEA complete IgG 항체 발현을 위한 recombinant baculovirus transfer vector의 제작

- ① p2Bac baculovirus transfer vector를 제한효소 *Sac I*과 *Xba I*로 절단한 다음 calf intestine alkaline phosphatase(CIP)를 처리하고 항-CEA light chain도 같은 제한

효소를 이용하여 절단하여 p2Bac vector와 T4 DNA ligase를 이용하여 16°C에서 O/N ligation

- ② Ligation mixture를 XL1-Blue competent cells에 transformation하여 LB/Amp plate에서 O/N 배양
- ③ 각각의 colony로부터 plasmid를 분리하여 light chain을 확인하고 다시 light chain을 포함하고있는 plasmid를 *Nco I*과 *Hind III*로 절단하고 항-CEA heavy chain도 같은 제한효소를 처리하여 ligation
- ④ Heavy chain과 light chain이 함유되어있는 p2Bac baculovirus transfer vector를 획득 (위의 방법들은 아래 그림과 같이 ligation)

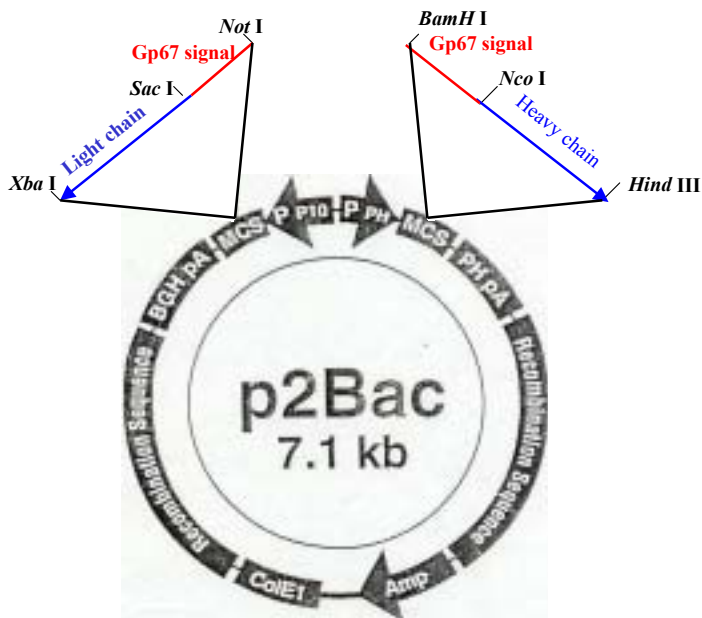


그림 16. Anti-CEA complete IgG 항체를 생산하기 위한 p2Bac vector의 모식도

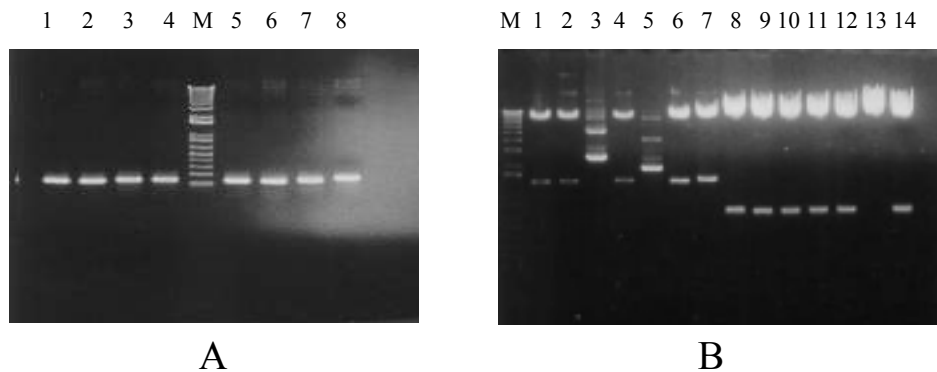


그림 17. Identification of gp67 secretion signal sequence PCR

- (A). (lane 1, 2, 3, 4: gp signal sequence PCR product for heavy chain)
 (lane 5, 6, 7, 8: gp signal sequence PCR product for light chain)
 (B). Identification of complete IgG insert into p2Bac vector
 (lane 1-7: Heavy chain insert, lane 8-14: Light chain insert)

자. Sf 21 insect cells로 p2Bac-CEA complete IgG antibody의 transfection과 발현

- ① 1X10⁶ Sf 21 cells은 6-well plate에서 27°C O/N 배양
- ② p2Bac-CEA complete IgG 1.5 μ g와 500ng linearized baculovirus Gold가 혼합되었고 20ul Lipofection을 함유하고 있는 Sf 900 배지와 혼합, 이 혼합물은 실온에서 15분 동안 배양하고 800ul Sf 900배지에 transfer하였으며 이때 Sf 21 insect cells은 Sf 900 배지로 씻어주고 DNA와 Lipofection 혼합물을 넣어주어 27°C에서 O/N 배양
- ③ Cells은 Grace's media로 씻어주고 10% FBS와 gentamicin(50ug/ml)을 함유하고 있는 Grace's media 2ml을 넣어준 다음 4일 동안 배양
- ④ 이렇게 배양된 cells은 원심분리를 이용하여 viurs particle을 함유하고 있는 상등액과 cell pellet을 획득하였으며, 획득된 cell pellet은 SDS-sample buffer에 희석하여 western-blot을 통한 항체생산을 확인

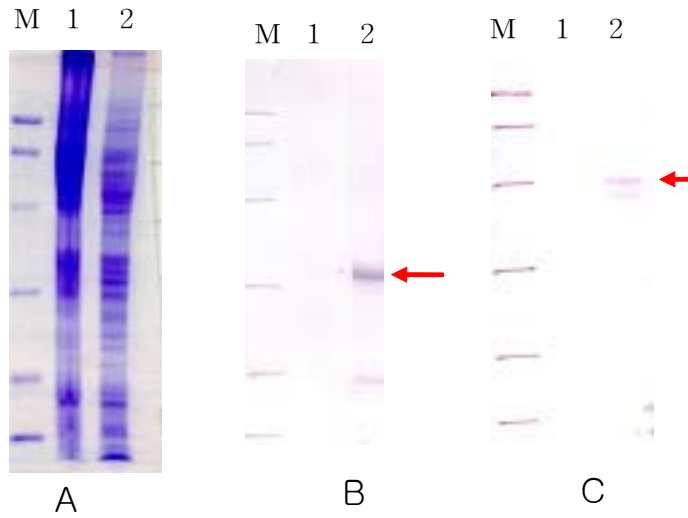


그림 18. 12% SDS-PAGE와 Sf 21 insect cells에서 chimeric complete IgG의 발현
 (A: 12% SDS-PAGE, B: anti-human-kappa, C: anti-human IgG-Fc
 M: Molecular marker, lane 1: normal cell, lane 2: transfected insect cell)

차. 식물에서 발현시킬 벡터 작성

식물에서 발현시킬 벡터의 promoter는 cauliflower mosaic virus 35S promoter와 maize ubiquitin promoter를 사용하고 선별 표지 유전자는 hygromycin, kanamycin 저항성 유전자와 GUS를 사용한다. 또한 제초제저항성 유전자가 도입된 벡터를 사용한다. 클로닝을 통해서 획득된 특이성을 가진 인간화한 항 CEA 항체 유전자를 제한효소를 처리하여 클로닝 벡터로부터 분리해 낸다. 식물벡터도 마찬가지로 제한효소를 처리하여 벡터와 인간화한 항체유전자를 T4 DNA ligase로 붙여준다. 우리가 확보하고 있는 식물발현용 벡터는 다음과 같다.

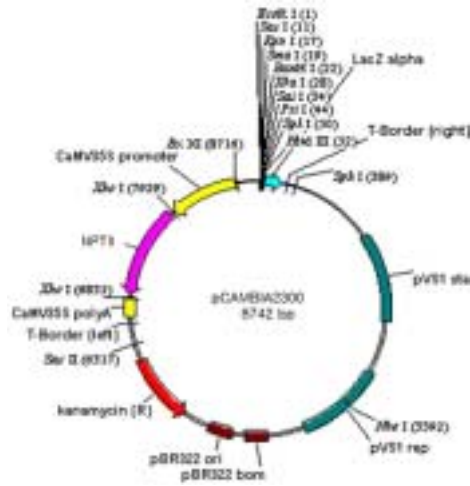


그림 19. Map of plant vectors for anti-CEA antibody expression in plants

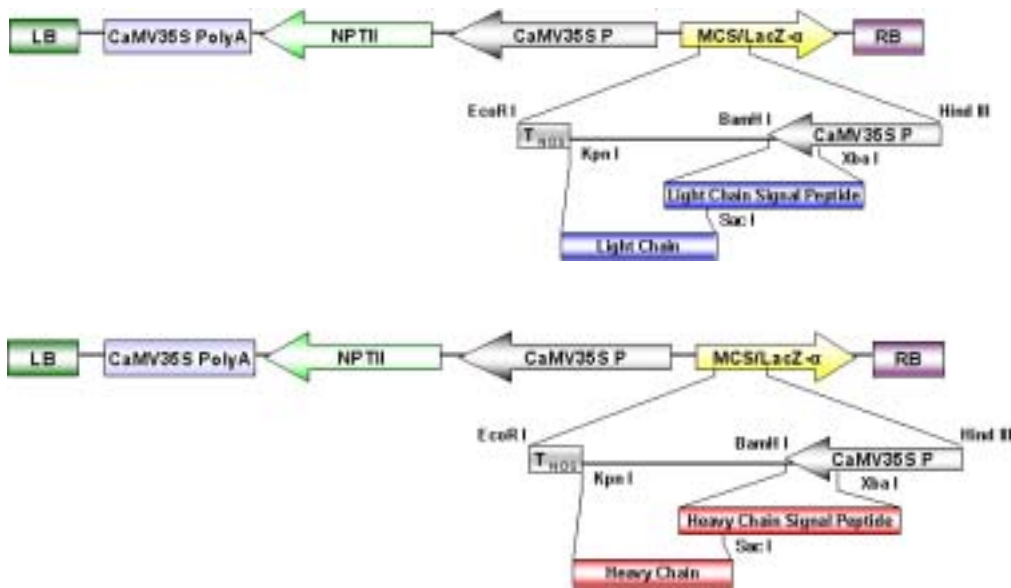


그림 20. vectors map of pCAMBIA 2300 for anti-CEA heavy and light chain expression in plants

파. 항-CEA scFv 항체의 발현과 항원 특이성 검증

1) Expression of anti-CEA scFv in *E. Coli*

CEA scFv 유전자가 확인된 transformant를 LB/kar(50ug/ml)배지에서 37°C O/N 배양하였다. 이 배양액을 subculture하여 OD600=0.5가 될 때까지 배양한 후 1mM IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 넣은후 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 cell pellet을 가지고 SDS sample buffer에 희석하여 끓는 물에 5분간 방치한후 12% SDS-PAGE 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 transfer하여 western-blot을 수행하여 expression을 확인하였다.

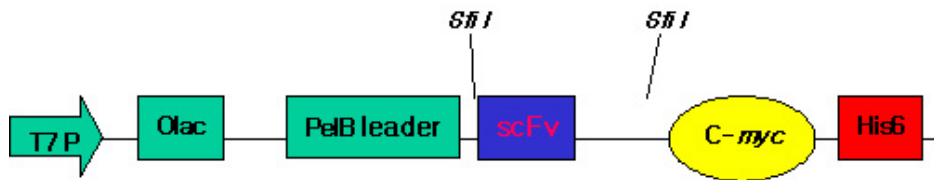


그림 21. Schematic representation of the scFv expression vectors



그림 22. Expression of CEAscFv in *E.coli*

(M:Molecular weight marker, C: without IPTG, I: with IPTG)

2) Binding specificity of recombinant CEA scFv by ELISA and western blot

발현된 recombinant CEAscFv 유전자를 IPTG로 induction하여 수용성의 항체 유전자를 획득하였고, ELISA 방법으로 수용성 유전자의 특이성을 검증하였다.

- ① CEA (carcinoembryonic antigen)을 10ug/ml로 4°C O/N coating한 다음 PBS-tween(0.1%)으로 3번 씻어준 후 1%BSA(bovine serum albumin)로 37°C에서 1시간 동안 blocking.
- ② 획득한 수용성 항체유전자를 50ul 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 PBS-tween(0.1%)으로 씻어주었다.
- ③ c-myc epitope의 항체인 mouse anti-myc을 1차항체로 사용하였고, 2차 항체는 goat-anti-mouse-Ap를 사용하여, PNPP(p-nitrophenyl phosphate)기질을 첨가하여 405nm에서 반응을 확인하였다.
- ④ Western blot은 CEA 항원을 12%SDS-PAGE 전기영동한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하여 ELISA와 같은 방법으로 항체를 첨가한후 반응정도를 확인하였다.

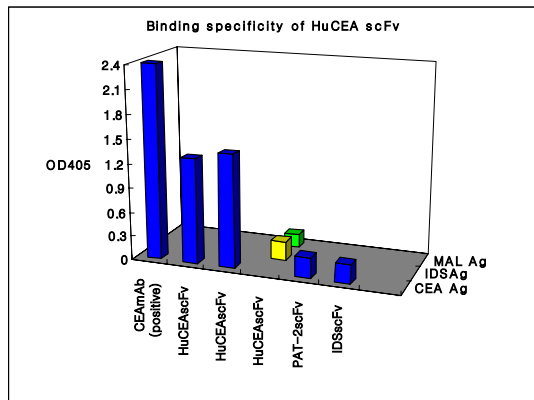


그림 23. Binding specificity of recombinant CEAscFv by ELSIA

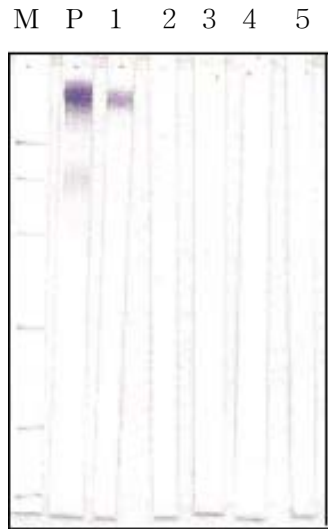


그림 24. Binding specificity of Recombinant CEAscFv by western blot
(M: Molecular weight marker, P: CEA mAb(positive control),
lane 1: Soluble recombinant HuCEAscFv, lane 2: PAT-2
scFv(Negative control), lane 3: IDScFv(Negative control), lane 4-5: antigen control)

하. 특이성이 검증된 항-CEA Fab 항체의 아미노산 분석

Anti-CEA chimeric Fd

VQLLESGAELVEPGASVKLRSRTASGFNIKDTYMHWAQQR
PEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGGKATITADTSSNTAY
LQLTSLTSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTMTVTV
SSASTKGPSVFPLA P SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGAL TGGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

Anti-CEA chimeric kappa

DIELTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIFGVGFLHW
YQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPVRFSGTGSRTDFTLIID
PVEADDVATYYCQQTNEDPYTFGGGTKLELKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

그림 25. Amino acid sequence of anti-CEA Fab antibody

2. 제2 세부과제 : 향 압 향체 발현 식물체 개발

가. 담배

1) 담배의 재분화 시스템 개발

가) 담배의 재분화 조건 설정을 위한 호르몬 조합 실험

BA와 NAA의 16 조합으로 재분화 실험을 진행하였으며 selection 배지에 치상한 4주 후에 재분화 된 절편체 수와 갈변정도를 관찰하여 기록하였다.

표 6. 담배의 재분화 실험

호르몬 조합		재분화 된 절편체 수 () 안은 치상한 절편체 수				비고
BAP (ppm)	NAA (ppm)	잎의 기저부(10)	잎의 중간부분(10)	엽병(20)	절간(10)	
0.5	0	7	10	20(갈변)	9	
1	0	8	10	20(갈변)	10	
1.5	0	10	10	20(갈변)	10(갈변)	
2	0	10	9	20(갈변)	7(갈변)	
2.5	0	9	10	16(갈변)	5(갈변)	
3	0	6	9	19(갈변)	10	
0.5	0.2	10	10	20	10	100%
0.5	0.5	9	10	20	10	
1	0.2	9	10	18	9	
1	0.5	10	10	18	9	
1.5	0.2	10	10	20	10	100%
1.5	0.5	10	10	20	9	
2	0.2	10	9	18	10	
2	0.5	10	9	20	9	
2.5	0.2	9	10	19	10	
2.5	0.5	9	9	20(갈변)	8	

나) 담배의 재분화를 위한 호르몬 조건 규명 실험의 분석

대부분의 조합에서 50% 이상의 높은 재분화율을 보였다. BAP만을 단독으로 처리한 경우 호르몬 농도가 높아질수록 절편체가 갈변하고 재분화되는 식물체가 건강하지 못한 양상을 보였으며 BAP와 NAA를 함께 처리한 경우에도 농도가 높아질수록 재분화 개체들이 건강하지 못하였다.

이상과 같은 실험을 통하여 BAP 0.5, NAA 0.2 조합과 BAP 1.5, NAA 0.2 조합이 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun의 재분화에 가장 적절한 것으로 확인되었다.

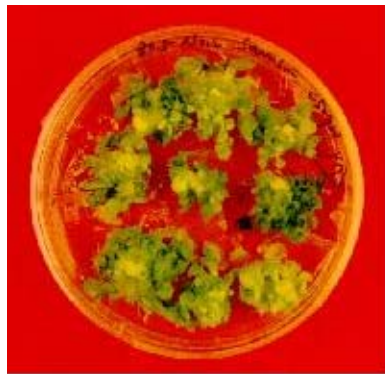


그림 26. Regeneration of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun
BAP 0.5 ppm, NAA 0.2 ppm



그림 27. Regeneration of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun.

BAP 1.5 ppm, NAA 0.2 ppm.

2) 담배(*Nicotiana tabacum*. cv. Xanti nc)의 형질전환 체계 확립 및 결과

가) 실험방법 및 조건

(1) 효율적인 형질전환 과정

- 식물체의 절편을 액체배지(3% MS)에 넣어 배양실에서 overnight incubation 한다.
- 액체배지에 넣어 overnight incubation 한 후 원하는 유전자가 들어 있는 agrobacterium과 10분간 동안 공동배양하고 blotting 하여 치상한다.
- 액체배지를 뺀 후 여과지에서 10분간 blotting 한다.
- coculture medium에 치상 하여 암 상태에 2일간 둔다.
- 2일 후 selection medium에 옮기고, 3주에 한번씩 계대배양 한다.

(2) 배지 조건 (mg/l)

coculture medium ;

- BAP 0.5 mg/l
- NAA 0.2 mg/l
- cefotaxime 250 mg/l

selection medium :

- BAP 0.5 mg/l
- NAA 0.2 mg/l
- cefotaxime 250 mg/l
- kanamycin 100 mg/l

(3) 유전자 : CMVscFv

Agrobacterium strain - AGL1

나) 형질전환 결과

(1) 형질전환 과정

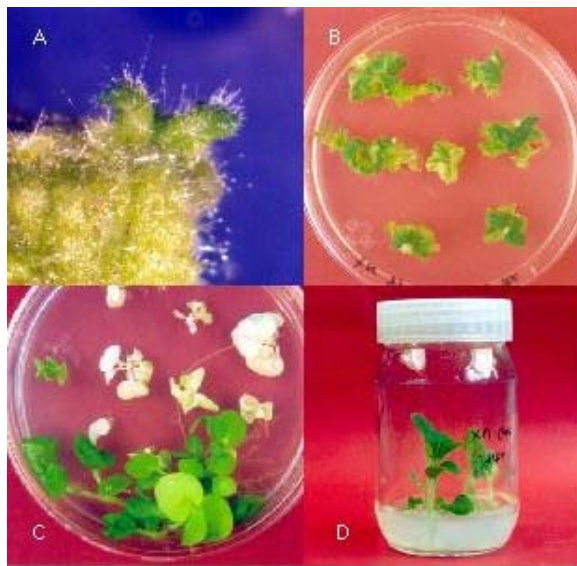


그림 28. 담배의 형질전환 과정

A. Callus에서 shooting되고 있는 상태 B. 호르몬 배지에서의 shooting

C. 형질전환체로 추정되는 shoot의 항생제 배지에서 selection

D. 1차로 항생제 plate에서 selection된 개체를 항생제 배지가 들어있는 배양병에서 2차 selection

(2) 순화 과정

항생제 배지에서 1차로 selection 되어 형질전환체로 추정되는 개체들을 온실로 옮겨 순화하였다. 초기에는 빛과 바람을 차단하기 위하여 신문지를 씌워 순화하였고(그림 . A) 일정시간이 지나 외부 환경에 적응이 되면 신문지를 벗기고 순화시킨다. 순화된 개체들은 온실 환경에 잘 적응하여 건강한 상태로 순화되었다(그림 . B).



A

B

그림 29. Putative transgenic tobacco 개체의 순화

- A. 기내에서 항생제 selection 된 개체들을 온실에서 pot에 옮겨 신문지를 씌워서 순화하는 모습
- B. 순화된 putative transformant

(3) 유전자 도입확인을 위한 PCR 결과

순화된 16 개체에서 DNA를 추출하여 NPTII primer로 PCR 해 본 결과 그림과 같은 결과를 얻었다. Positive control 에서는 확연한 band를 얻었으며 control plant는 band가 나타나지 않았다. 그리고 16개의 개체에서는 흐릿하지만(10, 16번) 모두 band를 확인할 수 있었다. 따라서 순화되고 있는 개체들은 모두 CMV scFv 유전자가 삽입된 형질전환체로 추정된다. 그러나 더 정확한 결과를 얻기 위해서는 차후 Northern과 Southern blotting을

실시하여야 할 것으로 본다.



그림 30. Putative transformant의 PCR 결과

M : 100 bp Size marker, + : positive control, C : control plant

1 - 16 : putative transgenic plant

(4) 유전자 도입확인을 위한 Southern Blotting 결과

PCR 결과를 토대로 유전자의 도입을 확인하기 위하여 Southern Blotting을 실시하였다. 그 결과 실험을 실시한 10개의 개체에서 모두 band를 확인할 수 있었다. 이것은 담배 식물체의 genome 속으로 원하는 유전자가 확실히 삽입되었다는 것을 말해주는 것이다. 그러나 이 유전자가 전사되는지의 여부는 차후에 Northern Blotting을 통해 확인하여야 할 것으로 본다.



그림 31. Putative transformant의 Southern Blotting 결과

C : Negative control, 1 - 10 : Putative transgenic tobacco plant

3) α -CEA Heavy chain과 Light chain gene의 담배로의 도입

위와 같은 방법으로 형질전환 하여 아래와 같은 형질전환체를 얻었다

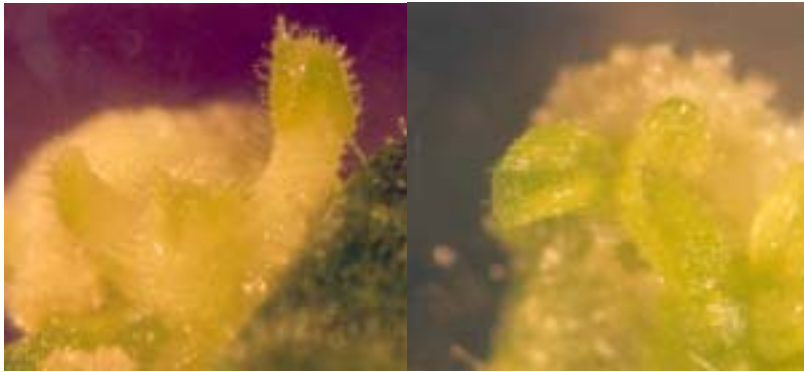


그림 32. Differentiation of putatively transgenic shoot from tobacco plantlet



그림 33. 온실에서 순화되고 있는 putative transformants

A : Heavy chain gene이 도입된 식물체들

B : Light chain gene이 도입된 식물체들

위와 같이 순화하여 얻어진 형질전환체를 PCR 분석하였다.



그림 34. 순화된 식물체의 PCR 결과

M : Size Marker, P : Positive control, N : Negative control
 Lane 1 - 8 : Heavy chain gene이 도입된 식물체의 PCR 결과
 Lane 9 - 16 : Light chain gene이 도입된 식물체의 PCR 결과

Heavy chain과 Light chain gene이 각각 도입된 8개의 식물체를 각각 PCR 분석한 결과 Heavy chain gene이 도입된 8개의 식물체 중 4 - 8번의 다섯 개 식물체에 유전자가 도입된 것을 확인할 수 있었으며 Light chain gene이 도입된 8개체 중 9, 11, 12, 14, 16번의 다섯 개 식물체에 유전자가 도입된 것을 확인하였다

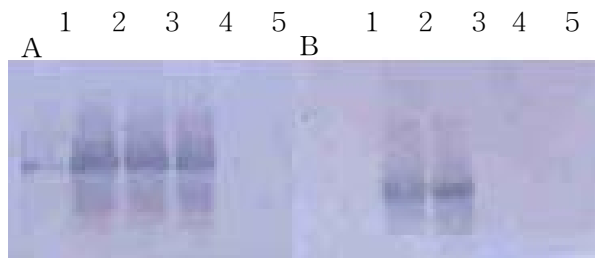


그림 35. Southern Blotting 결과

A : Heavy chain gene이 도입된 담배 식물체의 southern blotting
 B : Light chain gene이 도입된 담배 식물체의 southern blotting

PCR 결과 유전자가 도입된 것으로 예상되는 heavy chain과 light chain gene이 도입된 각각 다섯 개체의 식물체를 southern blotting 한 결과 heavy chain gene이 도입된 다섯 식물체 중 네 개체와 light chain gene이 도입된 다섯 식물체 중 두 개체에서 band를 확인할 수 있었다.

차후 이 식물체들을 northern blotting 하여 gene이 발현되고 있는지를 확인하여야 하며 각각 온실에서 순화하여 교배를 통해 완전한 항체를 생산하는 식물체를 얻을 예정이다.

나. 토마토(대과종과 소과종)

1) 토마토의 재분화 및 형질전환 체계 확립을 위한 실험방법 및 조건

가) 효율적인 재분화 과정

식물체 절편을 액체배지(3% MS)에 넣어 배양실에서 overnight incubation 한다.

→ 액체배지를 뺀 후 여과지에서 10분간 blotting 한다.

→ tomato coculture medium에 치상하여 2일간 둔다.

→ 2일 후 tomato selection medium에 옮기고, 3주에 한번씩 계대배양 한다.

나) 재분화배지 조건

(1) coculture medium ;

- zeatin 2 mg/l
- IAA 0.5 mg/l
- AgNO₃ 1 mg/l
- cefotaxime 250 mg/l

(2) selection medium :

- zeatin 2 mg/l
- IAA 0.5 mg/l
- AgNO₃ 1 mg/l
- cefotaxime 250 mg/l
- kanamycine 50 mg/l

다) 형질전환 조건

액체배지에 넣어 overnight incubation 한 후 원하는 유전자가 들어 있는 agrobacterium과 3시간 동안 공동배양하고 blotting 하여 치상한다.

라) 유전자

당도 유전자인 L3 유전자와 CMVscFv 유전자를 사용하였다.

선발마커 : NPTII gene

2) L3 유전자를 이용한 토마토 형질전환 체계 확립 실험결과

가) 대과종 토마토의 형질전환 체계 확립 실험 과정 및 결과



그림 36. Regeneration of Tb(대과종) plant.

A. Differentiation of shoots, B. Calli and shoot around the plantlet

C. Root induction from the regenerated shoot, D. Putative transgenic plant in a pot

나) 소과종 토마토의 형질전환 체계 확립 실험 과정 및 결과



그림 37. Regeneration of Tm(소과종) plant

A. Differentiation of shoot, B. Putative transgenic plant in a pot

다) 형질전환 식물체 확인을 위한 PCR 결과

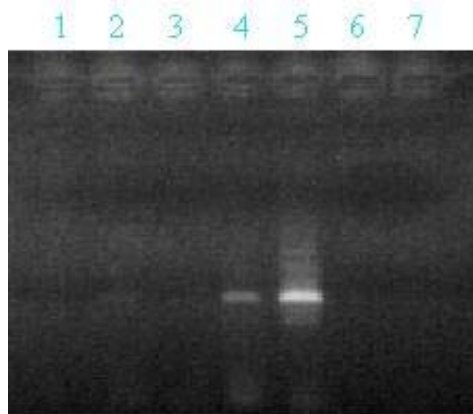


그림 38. PCR analysis of putatively transgenic tomato.

Lane 1-6, L3 gene introduced into inbreed line Tb(대과종).

Lane 7, L0 gene introduced into inbreed line Tm(소과종).

재분화 되어 포장에서 성장한 식물체의 잎으로부터 DNA를 추출하여 NPT II primer를 사용하여 PCR로 도입된 유전자를 확인하였다. 그 결과 대과종 토마토의 2, 4, 5번에 L3 유전자가 도입되었음을 확인할 수 있었다.

3) CMV scFv 유전자를 이용한 토마토(대과종)의 형질전환 체계 확립 실험 결과

가) 실험방법 및 조건

(1) 효율적인 형질전환 과정

- 식물체의 절편을 액체배지(3% MS)에 넣어 배양실에서 overnight incubation 한다.
→ 액체배지에 넣어 overnight incubation 한 후 원하는 유전자가 들어 있는 agrobacterium과 3시간 동안 공동배양하고 blotting 하여 치상한다.
→ 액체배지를 뺀 후 여과지에서 10분간 blotting 한다.
→ tomato coculture medium에 치상하여 2일간 둔다.
→ 2일 후 tomato selection medium에 옮기고, 3주에 한번씩 계대배양 한다.

(2) 배지 조건

(가) coculture medium ;

- zeatin 2 mg/l
- IAA 0.5 mg/l
- AgNO₃ 1mg/l
- cefotaxime 250 mg/l

(나) selection medium ;

- zeatin 2 mg/l
- IAA 0.5 mg/l
- AgNO₃ 1mg/l
- cefotaxime 250 mg/l
- kanamycine 50 mg/l

(다) 유전자 : CMVscFv

Agrobacterium strain - AGL1

나) CMV scFv 유전자를 이용한 토마토의 형질전환 결과

(1) 형질전환 및 순화 과정



그림 39. 대과종 토마토의 형질전환 과정

- A. 절편체 에서의 callus 형성 B. callus에서의 shooting
- C. 항생제 배지에서의 selection D. 온실에서의 순화

(2) 유전자 도입확인을 위한 PCR 결과

순화된 8 개체에서 DNA를 추출하여 NPTII primer로 PCR 해 본 결과 그림과 같은 결과를 얻었다. Positive control 에서는 확인한 band를 얻었으며 control plant는 band가 나타나지 않았다. 그리고 8개의 개체 중 4, 5번과 7, 8번에서 band를 확인할 수 있었다. 따라서 순화되고 있는 개체들 중 이 네 개의 식물체는 CMV scFv 유전자가 삽입된 형질전환체로 추정된다. 그러나 역시 더 정확한 결과를 얻기 위해서는 담배의 경우와 마찬가지로 차후 Northern과 Southern blotting을 실시하여야 할 것이라고 생각된다.



그림 40. Putative transformant의 유전자 도입 확인을 위한 PCR

M : 100 bp size marker, + : positive control, C : control plant

1 - 8 : putative transformant

(3) 유전자 도입 확인을 위한 Southern Blotting 결과

PCR 결과를 토대로 유전자의 도입을 확인하기 위하여 Southern Blotting을 실시하였다. 그 결과 PCR에서 밴드를 확인한 4개의 개체에서 모두 band를 확인할 수 있었다. 이것은 토마토 식물체의 genome 속으로 원하는 유전자가 확실히 삽입되었다는 것을 말해주는 것이다. 그러나 이 유전자가 전사되는지의 여부는 차후에 Northern Blotting을 통해 확인하여야 할 것으로 본다.



그림 41. Putative transformant의 Southern Blotting 결과

C : Negative control, 1 - 4 : Putative transgenic tobacco plant

4) α -CEA Heavy chain과 Light chain gene의 토마토로의 도입

가) 형질전환체의 기내 shooting

위와 같은 방법으로 형질전환 하여 다음과 같이 기내에서 shooting 되는 많은 개체를 얻을 수 있었다.

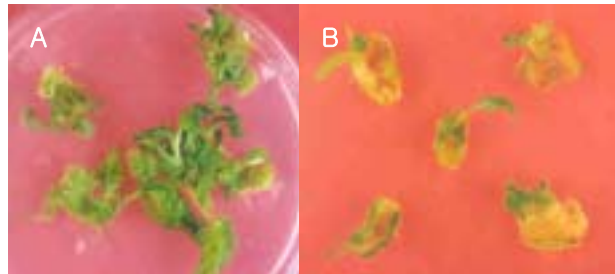


그림 42. Heavy chain gene과 Light chain gene이 도입된 토마토의 shooting

- A. Heavy chain gene이 도입된 토마토 절편체 에서의 shooting
- B. Light chain gene이 도입된 토마토 절편체 에서의 shooting

나) 형질전환체의 PCR 분석

원하는 유전자가 도입되었는지를 1차적으로 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

M P N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

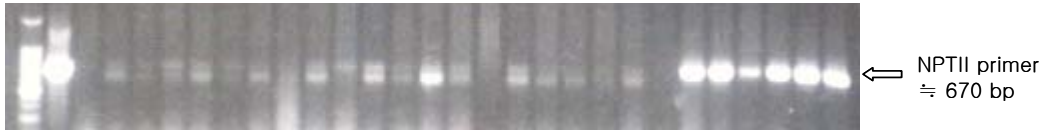


그림 43. Heavy chain gene과 Light chain gene이 도입된 토마토의 PCR 결과

M : Size Marker, P : Positive control, N : Negative control

Lane 1 - 15 : Heavy chain gene이 도입된 식물체의 PCR 결과

Lane 16 - 26 : Light chain gene이 도입된 식물체의 PCR 결과

Heavy chain gene이 도입된 식물체 15 개체와 light chain gene이 도입된 식물체 11 개체를 PCR 분석 한 결과 각각 10 개체에서 유전자가 도입된 것을 확인할 수 있었다.

앞으로는 이들 식물체들로부터 southern blotting과 northern blotting등을 통하여 유전자가 완전히 발현되고 있는지를 확인하여야 하며 heavy chain과 light chain 유전자가 발현되는 개체를 온실에서 교배하여 완전한 항체를 발현하는 식물체를 얻을 예정이다.

다. 알팔파

1) 알팔파의 재분화 시스템 개발

기존의 형질전환 재료로 이용하였던 자엽, 하배축, 본엽, 엽병에서의 재분화 실험을 시도하였으나 캘러스 유도 후 노화되는 현상을 나타내어 캘러스로부터 직접 shoot화를 유도하는 실험을 실시하였다.

가) 공시재료 : Vernal, Horizon, Luna, Anchor

나) 종자소독 : 3 hours 멸균수 침지 -> 70% EtOH 5분 침지 -> 멸균수 3회 세척
-> 20% 락스 8분 침지 -> 멸균수 4회 세척 -> 파종

다) 종자파종배지

MS 2% + 2,4-D 1mg/l , 2mg/l, 3mg/l , 4mg/l — callus 이용

B5 2% + 2,4-D 1mg/l , 2mg/l, 3mg/l , 4mg/l —

표 7. Effect of different medium on callus induction of several varieties of alfalfa.

Variety	2,4-D	1.0 mg/l	2.0 mg/l	3.0 mg/l	4.0 mg/l
	Media				
Anchor	MS	-**	+++*	++	++
	B5	-	+	++	++
Luna	MS	+	-	+++	+++
	B5	+	+	++	++
Horizon	MS	++	+++	-	+++
	B5	++	-	+++	+++
Vernal	MS	++	+++	+++	+++
	B5	++	+++	+++	+++

* Callus formation degree: +,poor (5-30%) ++,moderate (31-70%) +++,high (71-100%)

** - : contamination

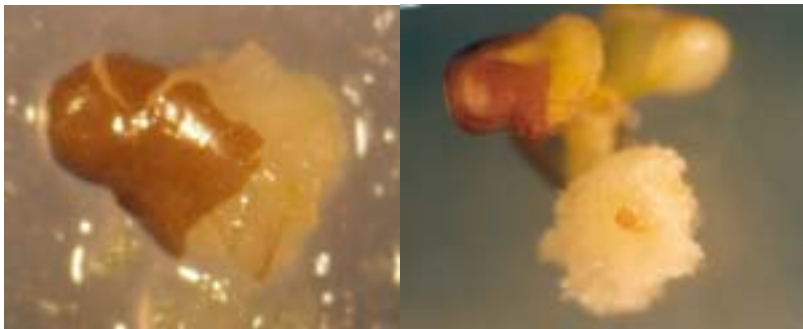


그림 44. Callus formed from seed

라) 다양한 생장조절제 처리를 통한 shoot primordia 형성

2,4-D를 첨가한 종자과종배지에서 callus를 유도

→ ① cytokinin (BAP,Kinetin) MS 고체 배지에서 배양

② cytokinin (BAP, Kinetin) 첨가한 MS, B5 액체배지에서 현탁배양

→ Shoot primordia 형성하여 재분화시도

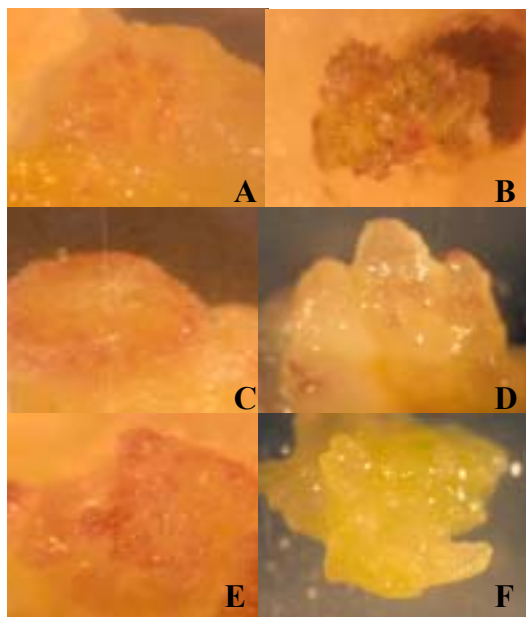


그림 45. Shoot primordia formed from callus in different medium condition and several varieties of alfalfa.

A: Luna , solid MS medium contained BAP 0.5 mg/l

B: Horizon , solid MS medium contained Kinetin 1.0 mg/l

C: Vernal , solid MS medium contained Kinetin 1.0 mg/l

D: Vernal , solid MS medium contained BAP 1.0 mg/l

E: Anchor , solid MS medium contained Kinetin 1.0 mg/l

F: Vernal , liquid MS medium contained BAP 1.0 mg/l

마) 알팔과 재분화 실험의 종합

- cytokinin 단독처리에서는 갈변이 심하게 이루어지고 캘러스 형성도 잘 이루어지지 않는 반면 auxin과의 혼용처리에서는 캘러스 형성과 캘러스 상태가 양호한 것을 관찰 할 수 있었다.

- 고농도의 auxin처리는 캘러스의 형성은 많이 이루어지나 shooting으로 이어지는 것이 어려워 저농도를 사용하는 것이 적절하다고 판단된다.

- 캘러스에서 shooting 된 경우 한 절편체에서 muti-shooting 되는 것을 관찰 할 수 있었다.

라. 치커리의 재분화 및 형질전환 체계 확립

1) 치커리의 재분화를 위한 호르몬 조건 확립

표 8. Percentage of plant regeneration from leaf explants of 'Cesare' (*Cichorium intybus* var. *sativus*) grown on a medium containing various concentrations of plant growth regulators.

Auxin		Cytokinin	BAP (mg/l)			TDZ (mg/l)		
			0.5	1.0	2.0	0.1	0.2	0.5
NAA (mg/l)	0.1		*64	40	78	34	45	31
	0.5		71	10	0	57	60	0
	1.0		0	0	0	0	0	0
IAA (mg/l)	0.1		54	78	65	96	100	0
	0.5		100	46	83	90	33	78
	1.0		100	48	35	100	89	0

2) 형질전환 실험 체계 확립

가) 형질전환 과정

a. 전처리 과정

식물체 절편을 액체배지(3% MS)에 넣어 배양실에서 overnight incubation

b. 아그로박테리움 접종 및 공동배양 배지에 치상

전처리 배지 상태에서 아그로박테리움을 접종한 후 암상태에서 30분내지 3시간 정도 접종한다. 그 후 전처리 액체배지를 뺀 후 여과지에서 50분간 건조하여 항생제가 포함되지 않은 공동배양 배지에 치상하여 2일-5일동안 배양실에서 배양한다.

c. 형질전환 식물체의 선발을 위한 선발배지에 치상

selection medium에 옮기고, 3주에 한번씩 계대배양

나) 형질전환 실험 결과

(1) 형질전환 실험 과정

vector : pGA1209

gene : *NPTII* gene과 *OsMADS1* gene

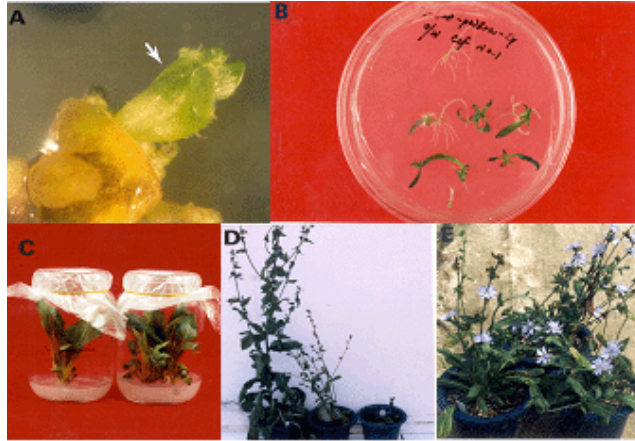


그림 46. Plant regeneration scheme and phenotypes of transgenic chicory plants expressing the *OsMADS1* gene.

- A. shoot induction from embryogenic callus, B. plantlets with development of roots,
- C. Regenerated plantlets in a vessel containing microspore filter on the cap,
- D. Comparisons of blooming control (left) and transgenic plant at T0 (middle) and T1 (right) generations,
- E. group of transgenic plants showing branchy and bushy phenotypes.

(2) 형질전환체의 PCR 결과

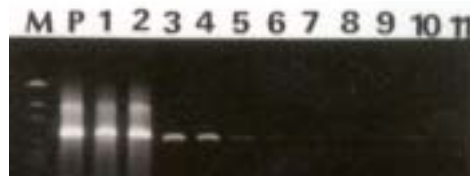


그림 47. Molecular analysis of chicory transgenic plants. PCR analysis of the NPTII gene using NPTII primers.

- M, DNA size markers; P, a positive control from the vector pGA1209 containing the *NPTII* gene and *OsMADS1* gene; Lanes 1-11, transgenic plants.

마. 감자의 재분화 및 형질전환 체계 확립

1) 감자의 재분화 및 형질전환을 위한 실험체계의 확립

explants + preculture media, 3% MS, + Zeatin 10 ppm

⇒ overnight in culture room

⇒ coculture with *Agrobacterium tumefaciens*

⇒ 20 min in 28°C shaking incubator

⇒ blotting

⇒ plating on the coculture medium and cultured for 48 h

⇒ transfer to the selection medium

⇒ transfer shoot to rooting medium or MS medium with hygromycin and cefotaxime

2) 감자의 재분화 및 형질전환을 위한 배지조건

Coculture medium : 1% MS, Mannitol 4g/l

IAA 0.015 ppm, BAP 2,25 ppm

Cefotaxime 250 ppm

Selection medium : 1.5% MS

BAP 2.25 ppm, GA 5 ppm

Cefotaxime 250 ppm, Kanamycin 50 ppm

3) 형질전환 실험 결과

가) 감자의 형질전환 실험 과정 : 당도유전자인 *L3* gene과 *NPTII* gene

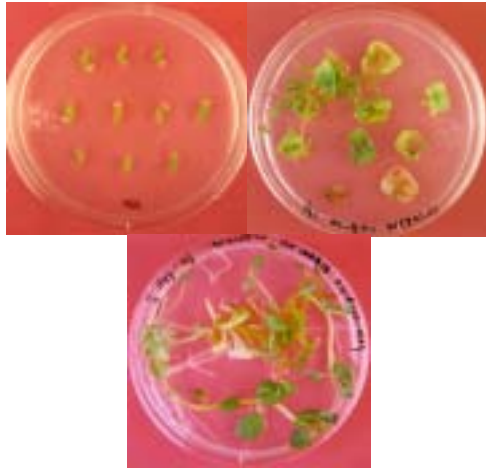


그림 48. 감자의 형질전환 과정

- A. 절편체로 부터 callus 형성
- B. Callus 에서의 shooting
- C. Rooting

나) PCR 결과

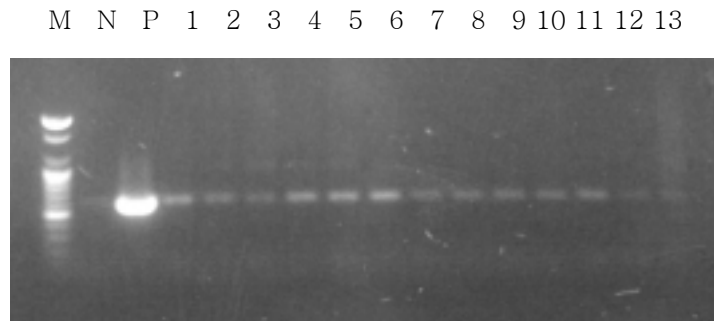


그림 49. PCR detection in putative transgenic plants from potato (Atlantic).

M: 100 bp DNA size marker, N: negative control, P: positive control,
lanes 1-13 : putatively transgenic plants

바. 각 작물의 형질전환 시스템 체계화

1) 각 작물의 형질전환 배지 조건

표 9. 각 작물의 형질전환 배지 최적 조건 규명

	담배	토마토	알팔파	치커리	감자
공동 배양 배지	BAP 1.5	zeatin 2	BAP 2.0	BAP 1.0	BAP 2.25
	NAA 0.2	IAA 0.5	NAA 0.5	IAA 0.1	IAA 0.015
	cefo* 250	AgNO ₃ 1	cefo 250	cefo 250	cefo 250
		cefo 250			
선발 배지	BAP 1.5	zeatin 2	BAP 1.0	BAP 1.0	BAP 2.25
	NAA 0.2	IAA 0.5	NAA 0.1	IAA 0.1	GA ₃ 5
	cefo 250	AgNO ₃ 1	AgNO ₃ 0.5	cefo 250	cefo 250
	kana** 100	cefo 250	cefo 250	kana 70	kana 50
	Kana 50	kana 2		(hygromycin 5)	

* : cefotaxime , ** : kanamycin

- 기본배지: MS 2% , 0.8% agar

- 단위 : mg/l

2) 형질전환 식물체의 shooting

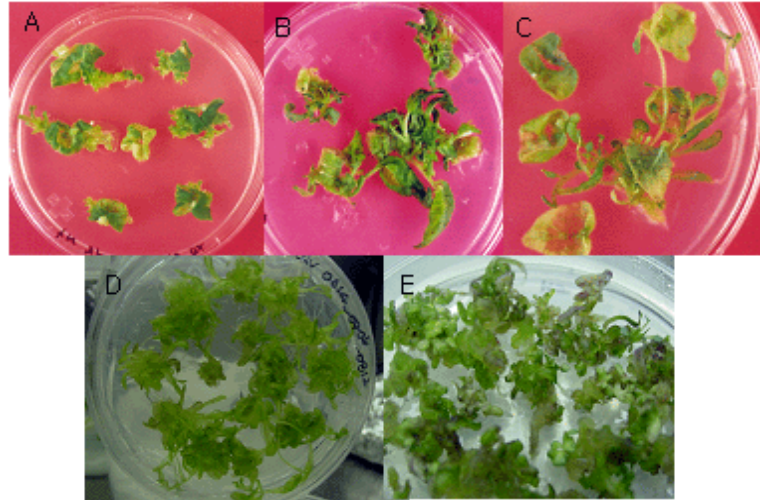


그림 50. Regeneration of several plants after transformation.

A: Tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun), B: Tomato (대과종), C: Potato (Atlantic)

D: Chicory (*Chchorium intybus* var. sativus), E: Alfalfa (*Medicago sativa* cv. vernal)

3) 형질전환체의 뿌리 유도

shooting 이후 rooting으로 이루어지지 않는 경우가 종종 발생하는데 뿌리를 유도하기 위해서는 NAA 0.5 ~ 0.1 mg/l를 배지에 첨가하고, 알팔파의 경우에는 NAA보다 IBA 0.5 ~ 0.1 mg/l를 첨가하여 주는 것이 효과적이다.

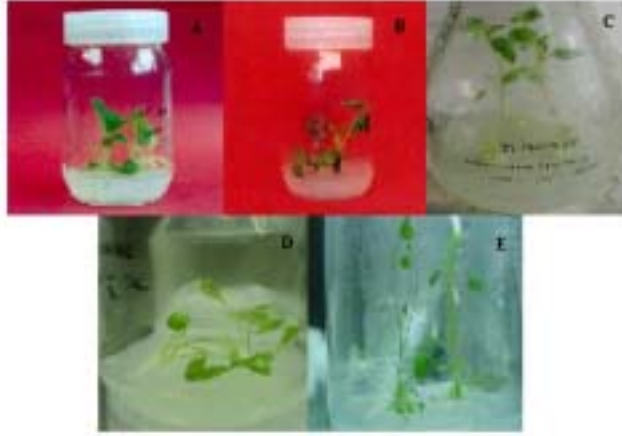


그림 51. Root induction in a vessel.

A: Tobacco B: Tomato C: Potato D: Chicory E: Alfalfa

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

본 연구 과제를 통하여 1차 년도는 CEA(carcinoembryonic antigen) 단클론 항체를 생산하는 세포주로부터 항체 유전자를 분리하여 항-CEA scFv 항체 유전자를 획득하였다. 인간의 혈액으로부터 lymphocyte를 분리하여 heavy와 light chain의 Fc(constant region)을 획득하여 항-CEA 단클론 항체 유전자의 인간화를 제작하였다. 또한 식물체의 재생 능력은 품종 및 계통에 따라 차이를 보이고 식물체의 부위, 성장 단계에 따라 다르며 배지에 포함되는 생장 조절제와 영양소의 종류와 양, 배양 환경등에 의해 좌우되므로 담배와 토마토를 이용하여 최적의 조건을 규명하여 가장 좋은 형질전환 시스템을 개발하였다.

2차 년도에는 1차 년도에서 획득한 Fab항체 유전자를 대장균에서 발현하여 ELISA와 western blot 방법으로 CEA 단백질과의 항체-항원 특이성을 검증하였고, 곤충세포에서 항-CEA IgG 항체를 발현하기 위한 recombinant baculovirus transfer vector를 제작하여 sf-21 insect cells에서 발현된 항체와 CEA 항원 단백질과 친화성을 검증하였다. 또한 이렇게 특이성이 검증된 항체 유전자를 식물체에서 발현시키기 위해서 식물체에서 발현시킬 벡터를 제작하기 위해서 cauliflower mosaic virus 35S promoter와 hygromycin, kanamycin 저항성 유전자와 GUS 유전자가 들어있는 벡터를 선별하여 1차년도에서 획득한 인간화된 항체 유전자를 클로닝을 통하여 제작하였으나, Agrobacterium transformation이 되지 않아서 pCAMBIA 2300 T-DNA 벡터를 이용하여 다시 제작하였다. 이 벡터는 쌍자엽의 식물을 발현시키는 벡터로서 CaMV 35S promoter와 선별할 수 있는 NPTII 저항성 유전자를 가지고 있으며, 항-CEA light chain과 heavy chain을 클로닝하여 식물체에서 발현시킬 벡터를 제작하였다. 형질 전환 식물체의 선발을 위해서 우선 담배와 토마토, 알파파의 최적화 된 형질전환 조건을 규명하여 형질전환 식물체를 생산하는데 중점을 두었다. 그리고 형질전환 효율을 높이지 못하게 될 경우를 대비하여, 이미 재분화 및 형질전환 체계가 확립되어 있는 치커리와 감자에서도 유전자를 발현시키고자 형질전환 조건을 규명하였고, 각 작물의 형질전환 시스템을 체계화하였다.

3차 년도에서는 목적 유전자가 재조합 되어 있는 벡터를 가진 대장균과 Agrobacterium을 접합시켜서 유전자가 도입된 Agrobacterium의 제작은 완성되었으나, 형질전환 식물체

의 생산은 60% 진척을 보이고 있다. 그리고 Fab항체 유전자를 토대로 하여 anti-CEA_{scFv} 항체를 제작하여 ELISA와 western blot 방법으로 CEA와 항체-항원 특이성을 검증하였다. 작물의 형질전환 시스템과 재분화를 체계화하였기 때문에, 형질전환 식물체의 생산과 이를 이용하여 형질전환된 식물체에서 발현될 항체의 기능조사는 수 달내에 제작이 가능할 것으로 사료되며, 차후의 연구가 조금더 필요하다고 생각된다.

결과적으로 CEA에 대한 만족할 만한 저항성을 갖는 형질전환체는 아직 얻어지지 않았으나, 형질전환 시스템의 확립과 재분화 과정을 체계화하였으므로 바이러스에 대한 저항성을 검정 방법을 확립함으로써 이와 관련된 연구에 활용 가능성이 기대된다고 사료된다.

제 2 절 관련분야 기술발전의 기여도

가. 기술적 측면

- 식물체의 형질전환 기술을 개발하고 신기능성의 유전자를 도입함으로써 새로운 품종의 육성 가능성을 제시
- 형질전환에 의한 유용 외래 유전자의 안정적 삽입, 발현 및 후대유전 등을 연구하여 형질전환에 대한 지식 심화.
- 식물체를 통한 백신 생산 방법의 개발에 기초자료로 유용하게 활용
- 국내에서는 아직까지 이와 같은 작물들을 형질전환 하여 백신을 생산하는 연구가 없는 상태이므로 본 연구의 결과는 본 분야의 영역을 넓히고 발전시키는 데 도움이 될 것임.
- 본 연구를 통해서 국제적인 경쟁력을 높일 수 있을 것임.

나. 경제 · 산업적 측면

- 백신 생산 식물체 개발 기술 확보
- 인체 면역과 관련된 유용 단백질의 식물체 발현을 통한 단백질 생산 체계의 확립

- 농업적 또는 의학적 유용 특성을 지닌 특화 작물의 재배를 통한 농업 분야 및 종사자의 시장 경쟁력 향상
- 본 과제를 통해서 체계화된 형질전환 시스템을 다른 백신의 생산에 적용
- 기초 연구를 통한 경쟁력 확보 및 유전공학기술의 현장화

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

본 연구개발 과제의 성공을 바탕으로 CEA(carciembryonic antigen)에 내성을 지닌 형질전환 식물체를 생산하여 재배할 수 있게 되며 식물체를 통한 백신 생산을 할 수 있으며 백신 생산을 통한 기술개발에 기초자료로 유용하게 활용할 수 있다. 따라서 다음 단계에는 참여기업인 Genomine(주)과 공동으로 항-CEA 항체 유전자가 형질전환 된 식물체의 포장 적응성을 조사하고 그 수확량을 조사하여 현장보급 가능성을 타진하고 보급 가능한 저항성 식물체의 계통에 확보하는데 주력해야 할 것으로 본다. 또한 항-CEA 항체를 확보함으로써 CEA 항원을 발현하는 인간 세포와의 특이성을 검증하는 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

제 2 절 타연구에의 응용

1. 항-CEA 백신을 이용하여 in vivo에서 항체-항원 특이성을 검증
2. 백신을 생산하는 작물의 생산 및 종자의 개발
3. 연구를 통하여 제작된 scFv 항체와 Fab 항체를 대량 생산하여 CEA의 진단용으로 널리 활용할 계획임
4. 본 연구결과 제작된 형질전환 식물체를 모델로 다른 백신 생산체계의 적용
5. 다양한 백신 생산 농산물의 제작을 위한 기초자료 및 기술적 경험 확보
6. 연구 결과 얻어진 유전자 확보 및 항체 발현 기술을 토대로 하여 다른 다양한 암 항원에 대한 항체의 생산 및 특이성을 검증할 수 있도록 활용
7. 항-CEA 항체 유전자의 유전자 해석이 가능
8. 항-CEA 항체 도입 형질전환 식물의 대량 생산 가능 및 계대배양을 통한 우수한 식물체의 확보
9. 기초 연구를 통한 경쟁력 확보 및 유전공학기술의 현장화를 가능

10. 인체 면역과 관련된 유용 단백질의 식물체 발현을 통한 단백질 생산 체계의 확립
11. 곤충세포에서 항암 항체 유전자를 대량생산하는 시스템의 개발

제 3 절 기업화 추진방안

본 연구과제를 통해서 개발의 기술이 실용화됨으로써 다른 중요한 암 항원에 관여하는 단백질의 특성을 규명하고 본 실험을 통해서 만들어지는 형질전환식물체 육성이 가능하게 될 것이다. 연구의 참여기업인 Genomine(주)과의 협력을 통해서 공동으로 형질전환된 식물체의 확보 및 배양을 통해서 다른 항체의 가능여부를 타진하고 항-CEA 항체와 항원과의 친화력을 검증하여 진단용 kit의 생산 가능성을 검토한 뒤 시판할 계획이다. 그리고 이 분야에서 국제적인 우위를 점할 수 있을 것이고 경쟁력을 갖추게 될 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 단일클론 항체의 목적이 되는 주요 암관련 항원과 관련된 해외정보

1975년 Kohler와 Milstein에 의한 단일클론항체의 발견 이후 세포, 박테리아 그리고 바이러스성 단백질의 특이적인 여러 종류의 단일클론항체들이 발달하였다 (Kohler G, Milstein C). 생체의학 연구에 있어서 이러한 단일클론항체들은 세포 내 그리고 세포 외의 단백질들의 구조적, 기능적인 관련성을 이해하는데 좋은 도구로서 사용되어 왔으며 최근 들어서 특히 생명공학분야를 중심으로 단일클론항체의 반응 특이성을 이용한 항암 혹은 항자가면역질환 등에 대한 인체 치료 및 진단시약으로서의 활용에 많은 연구의 초점이 모아지고 있다.

실질적으로 B 세포 림프종과 백혈병 환자에게 CD22와 CD19에 특이적인 재조합 항체를 실험하여 암이 완전히 완화된 것을 보인 보고가 있으며 (Scheuermann RH, *et al.*; Sausville EA, *et al.*) 이외에도 피부 T세포림프종에 anti-IL-2수용체 항체를 처리하여 35명의 환자중 13명이 부분적인 완화증상을 보인 결과도 있다 (Duvic M, *et al.*). 또한 많은 인간 암종의 세포표면에 발현되는 Lewis Y(Ley) 항원을 인식하는 BR96 단일클론항체를 인간화하여 이 인간화한 BR96 항체가 항원에 결합하는데 전혀 영향을 주지 않는다는 데이터를 보고한 바 있다(Mae. JR, *et al.*) 또한 림프종 특이 항원인 CAMPATH에 결합하는 인간화한 항체를 림프종 환자에게 투여한 한 결과 부분적으로 혈관생성이 회복되는 것을 보였으며(Hale G, *et al.*), anti-CD33 단일클론항체 M195를 인간화시킨 항체가 골수성 백혈병 환자에게 특이적인 효과를 나타냈다는 보고도 있다 (Caron PC, *et al.*) 이 외에도 유방암에 있어서 인간화한 단일클론항체를 투여하여 12%정도의 환자에서 암세포 크기가 50%이상 줄어드는 등 (Baselga J, *et al.*) 암세포 항원에 특이적인 인간화 항체를 이용한 임상실험이 진행되고 있다.

2. 인간 조합 항체 라이브러리(human combinatorial antibody library)를 이용한 항체 유전자에 관련한 해외정보

최근 인간의 암은 종양세포의 표면에 있는 표면 단백질에 의해 정의되고 있고 기존의 방법에 의한 치료보다 좀더 다른 유전적인 접근방법이 대두되고 있다. 실험적으로 암세포가 자라는 면역결핍 마우스에 항암 항체들을 처리하면 암세포 표면에 발현되는 암항원에 결합하여 암세포의 성장을 저해함이 밝혀졌다(Scheuermann RH, *et al.*; Sausville EA, *et al.*). 최근 암 치료에 있어서 단일클론 항체를 단독으로 사용하는 방법이 시도되고 있어 종양의 치료에 큰 변화를 가져오고 있다. 유전자 재조합 기술을 이용한 인간 조합 항체 라이브러리를 제작하여 항원에 특이적으로 작용하는 부분인 항체의 가변부위만을 폴리펩타이드로 연결하는 기술이 제작되고 있고, 이러한 기술을 바탕으로 하여 다양한 유전자가 포함되어 있는 라이브러리를 제작하여 부작용이 덜 유도되고 암에 대한 침투력이 더 강한 단일클론을 생산하는 기술이 현실로 다가왔다. 또한 이러한 단일클론을 바탕으로하여 shuffling method를 이용하여 최종적으로는 humanization antibody를 생산하는 기술이 급속도로 연구되어지고 있다(Proulx C, *et al.*; Boyer L, *et al.*).

3. 식물체를 이용한 항체 생산과 관련된 해외정보

현재 항체는 치료제로서 개발되어지고 있고, 대부분의 항체는 정확한 단백질의 folding과 glycosylation pattern 때문에 mammalian 이나 형질전환 된 동물에서 생산되어지고 있다. 그러나 이 발현 system은 너무 비싸고 대량 생산이 어렵고, 병원성의 유기체 안정성 때문에 현장 가능성이 희박한 것이 사실이다(Schillberg S; Fischer R; 뜨문 N). 이러한 문제를 해결하기 위해서 식물체에서 생산하는 것이 요즘 추세이고, 식물체는 가격이 저렴하고, 효율적이면서 재조합 항체를 생산하는데 있어서 안정성이 보장되어 있다. 지난 10년동안 식물체에서 항체를 생산하여 항체로서의 기능을 보여주고 있고, 상업적인 측면에서도 생산 가능성이 높아지고 있다.

재조합 항체를 식물체에서 생산하기 위해서 단일클론 항체를 식물 발현용 벡터로 삽입하고 Agrobacterium에 transformation한다. 그리고 식물체와 Agrobacterium을 같이 배양하여 재생산하기 위해서 저항성을 가지고 있는 배지에서 배양한다. 이렇게 얻어진 식물의 잎을 이용하여 항체의 발현과 항원과의 특이성을 검증하여 식물체를 확보하고 재분화 시스템을 확립하는 것이 요즘 추세라할 수 있다(Ehsani P *et al.*).

제 7 장 참고문헌

Adair, J. Engineering antibodies for therapy. 1992. *Immunol. Rev.* 130:5-40

Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanised anti-p185^{HER2} monoclonal antibody in patients with her2/neuoverexpressing metastatic breast cancer. 1996. *J Clin Oncol.* 14:737-744

Caron PC, Jurcic JG, Scott AM, et al. A phases B trial of humanized monoclonal antibody M195(anti-CD33) in myeloid leukemia: specific targeting without immunogeneciy. 1994. *Blood.* 83:1760-1768

Duvic M, Kuzel T, Olsen E, Martin A, et al. Quality of life is significantly improved in CTCL patients who responded to DAB389IL-2(ONTAK) fusion protein. 1998. *Blood.* 92(suppl 1):2572

Hale, G., M. J. S. Dayer, M. R. Clerk, et al. Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody compath-1H. 1988. *Lancet.* 2(8625):1394-1399

Isaacs, J. D. The antiglobulin responses to therapeutic antibodies. 1990. *Semin. Immunol.* 2:449-456

Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *Nature.* 256:495-497

Landis V, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. 1998. *CA Cancer J Clin.* 48:6-29)

Mae J. R, Dale E. Y, Linda J. H, et al. A combinatorial library strategy for the rapid humanization of anticarcinoma BR96 Fab. 1996. *J. Biol. Chemistry.* 271:22611-22618

Sausville EA, Headlee D, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, et al. Continuous infusion of the anti-CD22 immunotoxin IgG-RFB4-SMPT-dgA in patients with B cell lymphoma : a phase I study. 1995. *Blood.* 85:3457-3465

Scheuermann RH, Racila E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. 1995. *Leuk Lymphoma.* 18:385-397