大韓바이러스學會誌 : 第 28 卷 第 4 號 1998
J. Korean. Soc. Virology, Vol. 28, No. 4, 1998

섬자리공 유래 항바이러스 단백질과 항체 복합체를 이용한 HIV-1 감염세포의 선택적 제거

서울대학교 유전공학연구소[1], 생명공학연구소[2], 건국대학교 생물학과[3],
한림대학교 의과대학 병리학교실[4]

강미란[1] · 김윤규[2] · 홍효정[2] · 조명환[3] · 신형식[4] · 김선영*

=Abstract=

Human Immunodeficiency Virus-Infected T Cells Are Selectively Killed by Monoclonal Anti-gp120 Antibody Coupled to Pokeweed Antiviral Protein

Mi Ran Kang[1], Yoon Kyu Kim[2], Hyo Jeong Hong[2], Myung-Hwan Cho[3], Hyung Sik Shin[4] and Sunyoung Kim[1]

Institute for Molecular Biology and Genetics, Seoul National University[1]; Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology[2]; Department of Biology, College of Science, Kon Kuk University[3]; Department of Pathology, College of Medicine, Hallym University[4]

A murine monoclonal antibody (mAb) specific for the envelope glycoprotein gp120 of human immunodeficiency virus type-I (HIV-1) was chemically coupled to pokeweed antiviral protein (PAP) from *Phytolacca americana*. The immunotoxin was purified by FPLC using S200 colum. The purified immunotoxin efficiently bound to HIV-infected T cells as evidenced by fluorescence-activated cell sorter analysis. The immunotoxin selectively killed human T lymphoid lines infected with HIV-1_{IIIB} at less than 250 pM of the immunotoxin cells, while PAP or mAb alone did not have any significant effect on infected cells. The uninfected control T cell lines were not affected. Human cells infected with HIV-2 or other HIV-1 strains were not killed, suggesting that the killing depends completely on the antibody used for coupling. These in vitro results suggest that the PAP-mAb conjugate may be used to selectively remove cells expressing viral antigens from individuals infected with HIV.

Key Words: PAP, Antibody, HIV-1

서 론

*Phytolacca*에서 유래한 항바이러스성 단백질인 pokeweed antiviral protein (PAP)은 30 kDa 정도의 비당화 단백질로서 28S RNA의 아데닌기를 제거하여 진핵세포의 해독 (translation)에 필수적인 리보좀인 60S subunit의 기능을 상실케 하는 물질이다 [4, 5, 11, 12]. 진핵세포는 PAP에 대한 세포 수용체를 가지고 있지 않기 때문에 PAP 자체는 적정 농도에서 세포에 큰 영향을 미치지 않는다. 그러나 PAP를 세포내로 들어 갈 수 있도록 생화학적 혹은 유전학적으로 조작할 경우에는 세포의 해독과정을 억제하고 궁극적으로 세포를 죽

접수 : 1998년 11월 24일

*Corresponding author: 김선영, 151-742 서울시 관악구 신림동 산 56-1, 서울대학교 유전공학연구소, TEL: 02-880-7529, FAX: 02-875-0907

게 한다. 예를 들면 세포막 단백질을 인지하는 단일클론항체 (mAb)와 PAP를 생화학적으로 연결시켜 PAP-mAb 복합체를 제조하고 이를 세포와 섞어주면 복합체는 세포안으로 들어갈 수 있고 PAP는 세포의 해독을 저해하여 세포를 죽게 할 수 있다. 이와 같은 성질을 이용하여 지난 수년동안 PAP를 항암제 혹은 항바이러스제로 개발하려는 많은 연구가 진행되어 왔다.

HIV는 후천성 면역결핍증 (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS)을 유발하는 바이러스인데 인간의 면역체계에서 필수적인 역할을 하는 helper T 세포와 대식세포 (macrophage)와 같이 CD4를 표면에 가지는 것들이 주된 숙주세포이다 (Reviewed in 8). HIV에 감염된 사람은 평균 10여년 동안의 잠복기를 거친 후, 면역결핍증이 오게되어 기회감염 (opportunistic infection) 혹은 기회성암 (opportunistic tumor) 등으로 사망하게 된다. 이 바이러스는 세포막의 CD4 단백질과 접촉하면 endocytosis를 거쳐 세포내로 들어가고 RNA 게놈이 선형의 이중 나선 DNA로 바뀌며, 이는 다시 숙주세포의 염색체로 삽입되어 들어간다. 따라서 HIV는 다른 종류의 바이러스와는 달리 숙주세포의 유전자와 동등한 자격에서 살게 된다.

독성단백질들을 HIV 감염 세포에 선택적으로 전달하여 줄 수 있는 매개체와 연결시켜 항 HIV 제재를 개발하려는 연구는 여러 각도에서 진행되어 왔다. 예를들면 soluble CD4를 *Pseudomonas* 의 exotoxin 혹은 ricin A chain 등과 같은 독성 단백질과 연결시키거나 혹은 CD4-인지 항체와 PAP를 결합하여 HIV감염세포를 선택적으로 공격하는 방법이 시도되었다 [1, 3, 10, 13, 14, 15]. 또한 HIV-1의 gp120에 대한 항체와 PAP를 화학적으로 연결시키는 방법도 보고된 바 있다 [7]. 본 연구에서는 미국산 섬자리공 (*Phytolacca americana*)로부터 분리한 PAP를 이용하여 항 HIV제재를 개발할 수 있는 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포주

사용된 세포주는 인간의 T세포주인 CEM-SS과 H9, 인간의 단핵세포 전구체 (promonocytic) 세포주인 U937이었다. 또한 HIV에 의하여 잠복 감염된 세포주로는 U1과 ACH-2가 사용되었다. 모든 세포주와 바이러스는 미국 국립보건원 AIDS Research and Reference Research Program (RRRP: Rockville, MD)에서 제공받은 것을 사용하였다. 세포주들은 모두 RPMI 1640에 fetal bovine serum (FBS) 10%, penicillin과 streptomycin의 항생제를 포함하고 있는 것이다. H9과 CEM은 20~30시간, U937은 15~20시간 간격으로 분열하였다. 모든 세포는 1 x 10^5/ml과 2 x 10^6/ml의 농도 사이에서 배양하였다.

2. PAP

본 실험에서 사용된 PAP는 미국산 섬자리공의 잎에서 분리된 것 (Pharmacia #528645)을 사용하였는 바, 분자량은 29,000이었다. PAP는 상기 세포 배양 배지에 녹여 사용하였다.

3. 바이러스의 준비

본 연구에서 사용된 바이러스는 HIV-1_{IIIB}와 HIV-2 ROD였다. 이 바이러스는 각종 기초실험, 항HIV 약품탐색 등에 널리 사용되는 바이러스이며 인간의 T세포주에서 매우 효율적으로 성장한다. 이 바이러스는 인간 T 세포주인 H9에서 배양하였으며 세포배양액을 원심분리하여 0.45 μm 필터에 통과시켜 cell-free 바이러스를 만든 후 역전사효소 (reverse transcriptase: 이하 RT)와 p24 단백질의 양, $TCID_{50}$ (MT2 사용)를 측정하여 정량하였다 [6].

4. 감 염

상기한 바와 같이 만든 바이러스를 37℃에서 1~2시간 동안 숙주세포와 섞어주고 감염되지 않은 바이러스를 제거하기 위하여 일반 배양배지로 2~3번 부드럽게 씻어 주었다 [13]. 그 후 세포들을 1-2 x 10^5 cells/ml의 농도로 시작하여 기르고 2 X 10^6 cells/ml이 되었을 때 다시 희석 배양하여 주었다. 희석배양 할때마다 세포의 수, RT의 역가, p24 항원 단백질의 양을 결정하고 간접면역형광방법 (indirect immunofluorescence assay)에 의하여 감염된 세포의 수를 결정하였다.

5. 항 HIV 검사

이미 감염되었거나 감염되지 않은 인간 세포주들을 1 - 1.5 X 10^6 cells/ml까지 배양한 후 RPMI 1640 (10% FBS)로 1번 씻어준 뒤 신선한 배지에 섞어주어 1 - 2 X 10^5 cells/ml의 최종농도로 맞춘 후 96-well, 24-well 플레이트 혹은 T-플

라스크에 넣었다. 이에 적정 농도의 제재를 넣어 주고 일정 간격으로 살아있는 세포의 수 p24 농도, RT 역가 등을 분석하였다 [13].

6. PAP-mAb 결합체 (PMC)의 제조

생쥐 하이브리도마 #902 (NIH AIDS RRRP #521)를 무혈청배지 (Gibco)에서 10^6 cell/ml의 농도로 접종한 후 5일간 배양하여, 그 배양상등액을 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8)로 평형시킨 Protein A Sepharose 4B 칼럼에 가하고, 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7) 용액으로 용출시켰다. 용출된 항체는 1 M Tris (pH 9)로 즉시 중화시킨 후, PBS용액으로 투석하여 280nm의 흡광도로 항체의 양을 정량하였다. 정제된 902 항체 [10 mg/ml in 40 mM sodium phosphate and 150 mM sodium chloride, pH 7.5)를 SPDP (N-succinimidyl 3-(2-pyridyidithio) propionate, Pharmacia; DMSO에 64 mM의 용액으로 만든 후 사용 전에 PBS로 1/10 희석하였음)와 1 : 3의 비율로 혼합한 후 상온에서 2시간 흔들어주면서 반응시켰다. PAP (10 mg/ml in PBS, pH)로 2-iminothiolane HCl (20 mM in 50 mM sodium phosphate, pH 8.6)과 1 : 3의 비율로 혼합한 후 상온에서 2시간 흔들어주면서 반응시켰다. 항체와 PAP의 두 반응혼합물을 각각 Sephadex G-25 칼럼에 통과시켜 정제하였다. 정제된 항체와 PAP를 1 : 3.5의 비율로 혼합시키고 2시간 동안 상온에서 흔들어 준후 4℃에 밤새 방치하였다. 이 반응혼합물을 FPLC 시스템의 S-200 칼럼에 가하고 0.1 M PBS 용액으로 용출시킨 후 각 분획을 SDS-PAGE에 의하여 분석하였다.

결 과

1. PAP가 인간의 세포에 미치는 영향

이미 잘 알려진 바와 같이 HIV의 주된 숙주세포는 CD4를 세포표면에 소지하고 있으며 인간의 면역체계에서 필수적인 역할을 하고 있는 T 세포와 대식세포들이다. 따라서 본 연구에서는 모델로서 인간의 T세포주인 H9, CEM과 대식세포의 전구세포 (precursor cell)가 암화된 U937을 사용하였다. Figure 1은 PAP 4일 처리후에 세포생존율을 조사한 결과의 한 예이다. H9, CEM, U937 세포주 모두에서 LD_{50} = 10-20 nM이었고, 8일 이상의 장기배양시에는 LD_{50} = 2-5 nM로 감소하였다. 그러나 1-2 nM을 사용할때에는 장기

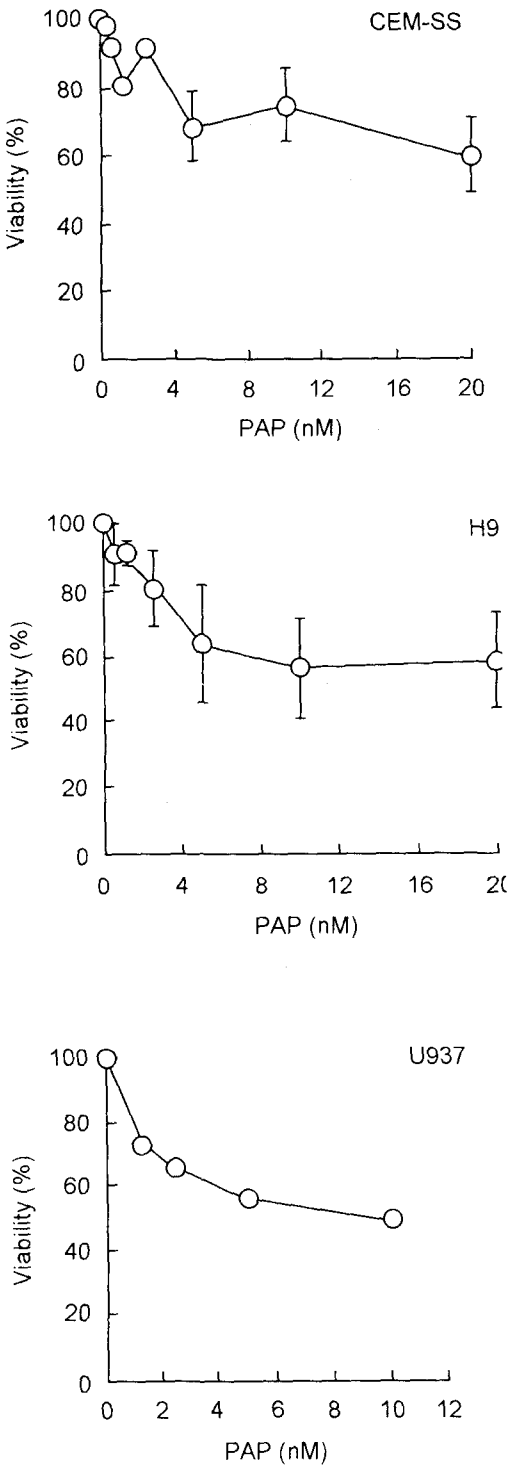

Figure 1. Effect of PAP on cell viability. Cells were treated with various concentrations of PAP for 3 days. Cell viability was determined by tryphan blue staining.

배양시에도 90%의 생존율과 정상 성장속도를 유지하였다. 이 결과들은 PAP 1 nM 정도는 정상 세포 성장에 큰 영향 없이 사용될 수 있음을 의미한다.

2. PAP가 HIV-1에 감염된 세포에 미치는 영향

다음은 PAP가 이미 HIV-1에 감염된 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 이 실험의 목적은 바이러스에 감염된 세포는 PAP에 더 민감한가를 조사하여 향후 독성단백질과 항체 결합체를 제조하여 사용할 적정농도를 결정하기 위함이었다. 인간의 T세포주인 H9 세포를 HIV-1로 감염시킨 후 3주간을 배양하였다. 간접 면역 형광방법을 통하여 95% 이상의 세포들이 HIV에 의하여 감염되었다는 것을 확인하였고, 세포배양액에서 p24 항원과 RT가 고농도로 생산되고 있음을 확인하였다. 감염된 세포를 96-well 혹은 24-well 플레이트에 깔아주고 다양한 농도의 PAP를 적당량 넣어주어 감염된 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 이 실험 결과 HIV에 감염된 H9세포의 경우 역시 4일 이후부터 10 nM 이상에서 LD_{50}을 보여주는 반면, 1 nM 정도에서는 숙주세포에 큰 영향을 미치고 있지 않음을 발견하였다 (Figure 2). 이는 HIV-1 감염 자체가 숙주세포의 PAP 민감도에는 큰 영향을 주지않고 있음을 보여준다. 이외 유사한 결과를 CEM, U937 세포주들을 사용하였을 때에도 얻었다.

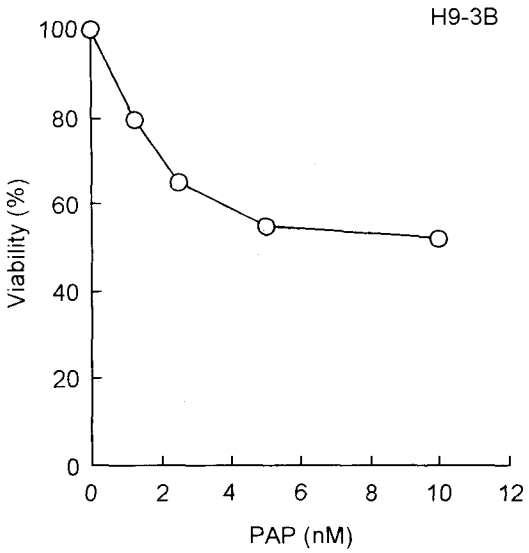

Figure 2. Effect of PAP on HIV-infected cells. H9 cells chronically infected with HIV-1_{IIIB} were treated with various concentrations of PAP for 3 days.

3. HIV-1에 특이한 단일 클론 항체

본 연구의 가장 큰 목적은 HIV에 감염된 세포만이 특이하게 발현하는 항원을 인지하는 대한 항체와 PAP를 붙여 만든 결합체가 HIV에 감염된 세포를 선택적으로 죽일 수 있는 가를 연구하는

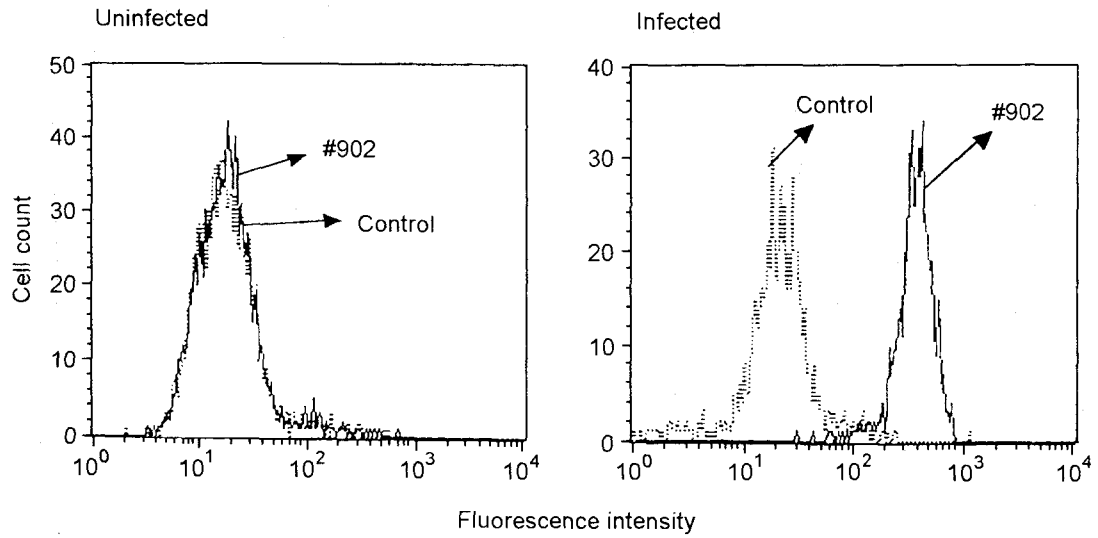

Figure 3. Fluorescence-activated cell sorter analysis of monoclonaly antibody #902. CEM-SS cells, uninfected or infected with HIV, were incubated first with mouse mAb (Leu 3a for CD4 and irrelevant antibody as a negative control), then with FITC-conjugated goat-antimouse Ig. Cells were then analyzed by flow cytometry.

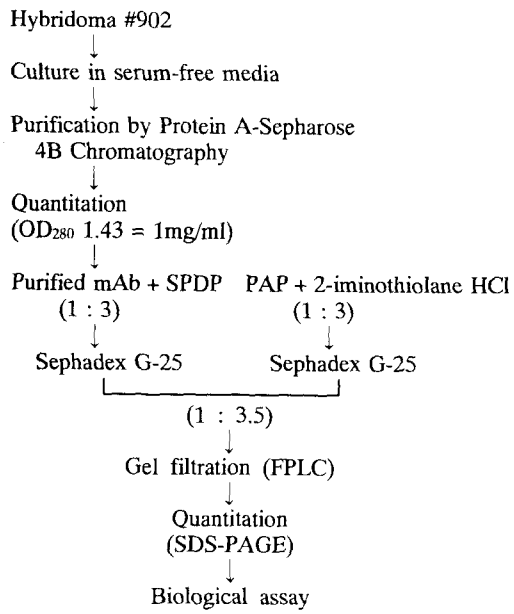

Figure 4. Flow diagram outlining the production of PMC.

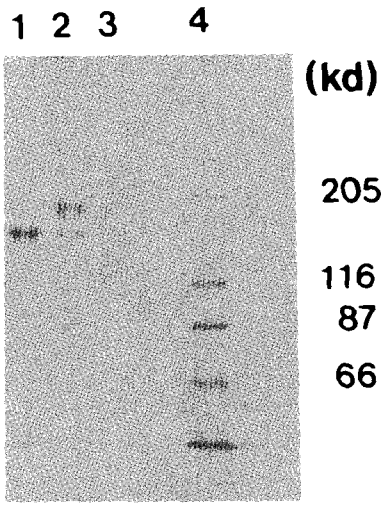

Figure 5. Purified antibody #902 and PMC. Lane 1, purified mAb #902; lanes 2 and 3, PMC; lane 4, size marker.

것이다. 본 연구를 위하여 여러 가지 mAb를 조사하였는데 그중 #902가 가장 효율적으로 HIV-1 감염세포와 감염함을 보여주었다. #902는 HIV-1_{IIIB}의 gp120와 반응하는 단일클론항체인데 감염을 중화시킬 수 있다 [2, 9]. 특히 이 단일클론항체는 gp120의 hypervariable loop에 작용하는 것으로 알려져 있다. Figure 3은 그러한 분석의 한 결과를 보여 주는 것이다. 이 실험에서는 HIV-1_{IIIB}에 감염된 인간의 T세포주 (H9와 CEM-SS)가 항체 #902에 의하여 인지되는지를 보여주는 것이다. 이들 세포는 HIV에 감염되어 있기때문에 대부분의 세포들은 #902에 대한 HIV-1항원을 세포표면에 노출하고 있었고 예상대로 매우 소수만이 약간의 CD4를 발현하고 있다. 또한 음성대조군으로서 사용된 비감염 세포는 이들 항체에 의하여 전혀 인지되지 못하였다. 이 결과에 입각하여 PAP와 결합체를 만드는 실험에서 #902 항체를 사용하였다.

4. PAP-mAb 결합체 (PMC)의 합성

HIV에 감염된 세포를 선택적으로 파괴하려면 PAP를 감염세포로 유도 할 수 있는 방법이 필요하다. 본 연구에서는 3항의 결과에 입각하여 HIV-1의 Env 단백질에 대한 단일클론항체인 #902를 모델로 사용하였다. FACS결과에 의하면 이 항원은 세포표면에 매우 잘 노출되어 있는 듯하다. 따라서 이 단백질에 대한 단일항체에 PAP를 붙여 준다면 감염세포에 선택적으로 달라 붙고 독성단백질인 PAP가 세포내로 전달 될 것이다. 이러한 배경이론에 입각하여 #902를 사용하여 PMC를 합성하였다.

PMC 합성의 전반적 과정은 Figure 4에 요약하였다. 간략히 설명하면, Env에 대한 단일항체인 #902를 생산하는 하이브리도마를 무혈청배지에서 대량 배양하고 protein A-Sepharose 4B chromatography를 이용하여 항체를 순수 분리 하였다. 순수분리한 항체는 Figure 5 (1열)에 보여지는 바와 같았다. 순수 분리한 항체를 상호 연결체 (cross-linker)인 SPDP와 반응시켜 주고 Sephadex G-25에 통과시켜 항체-SPDP 복합체를 분리하였다. 한편 PAP도 또다른 상호 연결체인 2-iminothiolane · HCl (IT)과 반응시켰고 Sephadex G-25를 사용하여 복합체를 분리하였다. 이와같이 분리된 항체-SPDP, PAP-IT 복합체들을 서로 섞어 주고 항체-PAP 복합체를 HPLC로 분리하였다. 최종 복합체는 SDS-PAGE 上에서 양과 질을 측정하였다. Figure 5 (2열, 3열)에 보여지는 바와 같이 본 실험에서 제조된 PMC는 약 30%는 PAP가 붙지 않은 mAb가 존재하고 있어 약 70%의 순도를 나타내었다.

5. PAP-mAb 결합체가 정상 T세포주와 감염세포주에 미치는 영향

상기와 같이 제조된 PMC가 HIV-1에 감염된 세포를 선택적으로 죽일 수 있는 지를 조사하기 위하여 HIV-1에 감염된 세포와 감염되지 않은 세포에 PMC를 넣어준 후 세포 생존율을 측정하였다. Figure 6에서 보여지는 바와 같이 250 pM의 PMC는 감염되지 않은 CEM, H9세포에는 전혀 영향이 없는 반면, 감염된 세포는 배양 후 3일만에 거의 모두 죽었다. 대조물질로는 1 nM의 PAP와 250 pM의 항체를 사용하였는 바 이것들은 감염세포에 거의 영향을 미치지 않았다.

PMC가 감염세포를 죽이는 역학을 조사하기 위하여 PMC를 HIV-1에 만성감염된 CEM-SS 혹은 H9 세포에 가한 후 수일 간격으로 세포의 생존율을 측정하였다. 이 세포는 HIV-1에 감염된

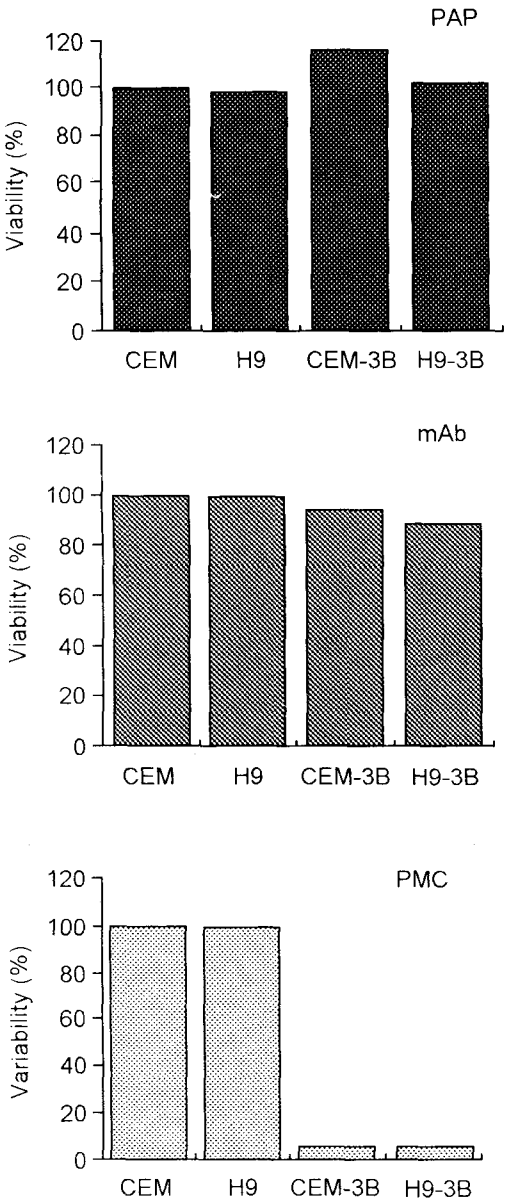

Figure 6. Effect of PMC on cell viability. CEM-SS and H9 cells, uninfected or chronically infected with HIV-1_{IIIB}, were treated with PAP, #902, or PMC for 3 days followed by tryphan blue staining.

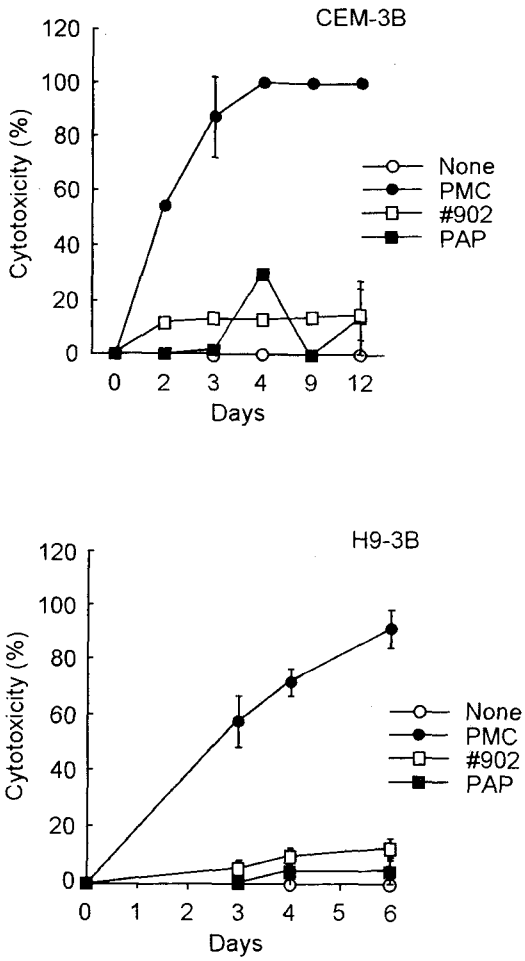

Figure 7. Effect of PMC on viability of CEM-SS and H9 cells chronically infected with HIV-1_{IIIB}. Cells were grown in the presence of PMC, PAP, mAb #902 or no additive. Cells were diluted to 2-4×10^5 cell/ml every 3~4 days, and each time reagents were added to appropriate concentrations. In all cases, the percentage of killed cells was determined by trypan blue staining.

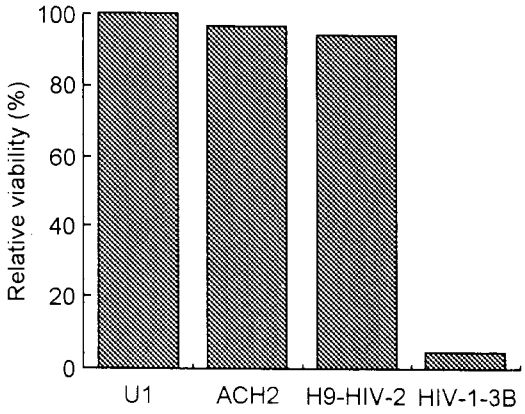

Figure 8. Effect of PMC on cells infected with various HIV strains. Similar numbers of HIV-infected cells were treated with 250 pM PMC for 3 days. Cell viability was determined by trypan blue staining.

후 살아남은 세포들만을 선택한것으로 95% 이상의 세포가 HIV-1에 의하여 감염되어 있다. 이 세포들에 1 nM의 PAP, 250 pM의 gp120에 대한 항체, 250 pM의 PMC를 넣어주고 적정간격으로 세포수, p24 항원분석을 하였다. PAP 만을 넣어주거나 항체만을 넣어준 경우 모두에서 세포는 거의 죽지않고 정상속도로 성장한 반면 PMC를 넣어준 경우에는 배양 6일후 거의 모든 세포가 죽었고 p24 생산량은 70%가량 감소하는 것을 발견하였다 (Figure 7). 이는 PMC가 HIV-1에 감염된 세포를 매우 효과적으로 죽일 수 있음을 보여준다.

본 연구에 제조된 #902 사용 항체는 높은 특이도를 보였다. HIV-1에 만성 잠복감염된 ACH-2와 U1세포주, HIV-2에 감염된 H9세포주를 사용한 결과 PMC는 이들 감염세포주에는 전혀 세포 살상효과가 없었다 (Figure 8). 이들은 모두 HIV-1_{IIIB}가 아닌 바이러스들로서 #902가 인지하는 부분의 구조와는 다른 부위인것으로 알려져 있다. 이 결과는 PMC는 매우 specific하여 안전하게 사용될 수 있음을 시사한다.

고 찰

PAP를 항 HIV제로 개발할 수 있는 가능성을 조사하였다. PAP는 그 자체로서는 인간세포에 큰 영향을 미치지 못하여 4일 배양시에는 LD_{50} = 10~20 nM였고 1 nM 이하에서는 10일 이상의 장기 배양시에도 세포 성장에 큰 영향을 미치지 않았다. HIV-1에 감염된 세포를 사용하였을때에도 이와 유사한 결과를 얻었다.

PAP를 항 HIV제로 개발하기 위하여 이 단백질이 HIV-1에 감염된 세포를 선택적으로 죽일 수 있는 가능성을 조사하였다. 이를 위하여 HIV-1의 Env 단백질을 인지할 수 있는 단일 항체와 PAP를 화학적으로 연결시키는 방법을 사용하였다. 이는 Env 단백질은 감염 세포 표면에 노출되어 있어 PAP와 연결된 항체가 감염세포를 특이적으로 인지할 수 있기 때문이다. 먼저 감염세포 표면을 효율적으로 인지할 수 있는 항체를 탐색하여 #902를 선택하였다. PAP와 연결된 902, 즉 PMC는 감염세포를 매우 특이하고 효율적으로 죽일수 있었다. HIV-1_{IIIB}에 감염된 인간 T세포주인 CEM과 H9에서 모두, 배양 4~6일 사이후 90% 이상의 세포를 죽였다. 또한 감염세포와 비감염세포를 적정비율로 섞었을때에는 섞어준 비율 만큼의 세포를 죽이는 것이 관찰되었다. PMC의 특이성은 이 복합체가 HIV-1_{IIIB}가 아닌 다른 세포주, 예를들면 U1 이나 ACH2, 또한 HIV-2에 감염된 세포주에는 큰 영향을 미치지 못하는 것에도 잘 나타났다. 이러한 특이성은 물론 사용된 항체의 특이도에 따라 결정된 것으로 사료된다.

이러한 특이성은 PMC를 실제 인간에 사용하는데 장점과 단점으로 작용할 수 있다. 장점으로서는 PMC가 뛰어난 특이성을 지니므로 안전성이 높다는 것이다. 단점으로서는 PMC가 다양한 HIV종에 작용하지 못하기 때문에 그 사용에 제한이 많다는 것이다. 이러한 단점은 다음과 같은 방법을 사용하여 보완할 수 있을 것으로 사료된다. 첫째, 여러 가지 종류의 HIV-1의 Env를 인지하는 항체를 탐색하여 선택한 후, 이를 혼합하여 소위 "칵테일"로 사용하는 방법이다. 둘째, 여러 가지 HIV-1종의 Env 단백질에 작용하는 1개의 항체를 개발하는 방법이다. *env* 유전자는 변화가 심하더라도 일부 부위는 잘 보존되어 있어 항체 진단시약의 재료로 사용되는 만큼, 이러한 항체를 발견하는 것이 불가능한 것은 아닌 것으로 사료된다. 셋째, 이번 연구에 사용된 #902가 얼마나 많은 HIV-1종을 인지하는지를 조사하고 해당 환자에만 사용하는 것이다. 예를 들면 감염자로부터 혈액세포를 분리하여 #902로 조사하여 양성반응이 나온 감염자에게만 사용하는 것이다. 해당자가 총감염자의 5%만 되어도 실제 적용의

가치는 있다고 본다.

PMC를 어떻게 전달하는가는 PMC의 실제 응용에 가장 중요한 문제중의 하나이다. PMC를 혈관에 주사하는 방법도 있겠으나, 가장 현실적이고 안전한 방법으로는 *ex vivo* 시술일 것으로 생각된다. 즉 감염자의 혈액세포를 뽑아 이를 PMC와 섞어 2~4일 배양하고 다시 재주입하는 방법인데, 거의 모든 단계가 손쉽게 이루어질 것으로 생각된다. 또한 HIV 감염세포는 림프절에 많이 집중되어 있스므로 PMC를 효과적으로 림프절에 전달하는 방법도 개발되는 것이 바람직 하다고 본다. PMC 실제 응용 가능성에 영향을 미치는 또다른 요인은 PMC 제조 효율성이다. PAP와 항체의 화학적 연결은 효율성이 떨어져 최종 생산량이 매우 낮다. 이를 위하여 PAP유전자와 항체 유전자를 클로닝하여 이미 개발되어 사용되고 있다. 본 연구팀 역시 #902 유전자를 이미 클로닝 하였으며 이를 식물성 항 바이러스 단백질 유전자와 결합시키는 작업을 진행시키고 있다.

본 연구결과는 PAP를 적절한 항체와 연결시키면 HIV에 감염된 세포를 낮은 농도에서 매우 선택적으로 죽일 수 있음을 시사하고 있다. 이 실험에서 사용된 #902는 특이도가 매우 높아 다른 종의 HIV에 감염된 세포에는 전혀 영향을 미치지 못하였다. 이 결과는 PAP나 이와 유사한 독성 단백질들과 적절한 항체를 결합하면 여러 가지 바이러스 질병에 효과적으로 사용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

결 론

1. PAP와 항체를 연결하여 항 HIV 제재로 개발하기 위하여 먼저 PAP 자체가 인간세포에 미치는 영향을 조사한 결과 1 nM 이하에서는 장기 배양시에도 세포 성장에 큰 영향을 미치지 못하였다.

2. HIV-1_{IIIB}의 Env 단백질을 인지하는 단일 항체인 #902 항체를 PAP와 화학적으로 연결시켜 조사한 결과 PMC = 250 pM 정도에서 감염세포를 죽여 매우 높은 민감도를 보였다.

3. PMC는 매우 높은 특이도를 보여 감염세포만을 선택적으로 죽이는 것은 물론 HIV-1_{IIIB}가 아닌 다른 HIV-1 종에 의해 감염된 세포에는 큰 영향을 미치지 못하였다.

4. 이는 PMC가 항 HIV 제재로 사용될 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 (KOSEF 92-2400-0101-3, 92-2400-0102-3, 92-2400-0103-3,), 주식회사 진로, 주식회사 바이로메디카의 지원으로 수행되었다. 본 연구에 사용되었던 HIV-1 인지 항체들은 미국 AIDS Research and Reference Reagent Program 에서 입수하였다.

참 고 문 헌

1. **Ashorn P, Moss B, Berger EA:** Activity of CD4-Pseudomonas exotoxin against cells expressing diverse forms of the HIV and SIV envelope glycoproteins. *J Acquir Immune Defic Syndr* **5:** 70-77, 1992.
2. **Chesebro B, Wehrly K:** Development of a sensitive quantitative focal assay for human immunodeficiency virus infectivity. *J Virol* **62:** 3779-3788, 1988.
3. **Davey RT Jr, Boenning CM, Herpin BR, Batts DH, Metcalf JA, Wathen L, Cox SR, Polis MA, Kovacs JA, Falloon J, et al:** Use of recombinant soluble CD4 Pseudomonas exotoxin, a novel immunotoxin, for treatment of persons infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **170:** 1180-1188, 1994.
4. **Endo Y, Tsurugi K:** RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of toxin lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem* **262:** 8128-8130, 1987.
5. **Hartley MR, Chaddock JA, Bonness MS:** The structure and function of ribosome-inactivating protein. *Trends Plant Sci* **1:** 254-260, 1996.
6. **Kim Sungoung, B, Groopman J, Baltimore D:** Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: Evidence for differential gene expression. *J Virol* **63:** 3708-3713, 1989.
7. **Kim Young W, Fung MS, Sun NC, Sun CR, Chang NT, Chang TW:** Immunoconjugates that neutralize HIV virions kill T cells infected with diverse strains of HIV-1. *J Immunol* **144:** 1257-1262, 1990.
8. **Levy JA:** HIV and the pathogenesis of AIDS.

ASM Press, 1994.

9. **Pincus S, Wehrly K, Chesebro B:** Treatment of HIV tissue culture infection with monoclonal antibody-ricin A chain conjugates. *J Immunol* **142:** 3070-3075, 1989.
10. **Pincus SH, Wehrly K, Cole R, Fang H, Lewis GK, McClure J, Conley AJ, Wahren B, Posner MR, Notkins AL, et al:** In vitro effects of anti-HIV immunotoxins directed against multiple epitopes on HIV type 1 envelope glycoprotein 160. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12:** 1041-1051, 1996.
11. **Prestle J, Schonfelderm M, Adam G, Mundry KW:** Type 1 ribosome-inactivating proteins depurinate plant 25S RNA without species specificity. *Nucleic Acids Res* **20:** 3179-3182, 1992.
12. **Stirpe F, Barbieri L, Battlelli MG, Soria M, Lappi DA:** Ribosome-inactivating proteins from plants: Present status and future prospects. *Bio/Technology* **10:** 405-412, 1992.
13. **Till MA, Ghetie V, Gregory T, Patzer EJ, Porter JP, Uhr JW, Capon DJ, Vitetta ES:** HIV-infected cells are killed by rCD4-ricin A chain. *Science* **242:** 1166-1168, 1988.
14. **Till MA, Zolla-Pazner S, Gorny MK, Patton JS, Uhr JW, Vitetta ES:** Human immuunodeficiency virus-infected T cells and monocytes are killed by monoclonal human anti-gp41 antobodies coupled to ricin A chain. *Proc Natl Acad Sci USA* **86:** 1987-1991, 1989.
15. **Winkler G, Jakubowski A, Turner S, Liu T, Burrus B, McGray P, Heanue T, Rosa M, Griffiths BA, Wali A, et al:** CD4-Pseudomonas exotoxin hybrid proteins: Modulation of potency and therapeutic window through structural design and characterization of cell internalization. *AIDS Res Hum Retroviruses* **7:** 393-401, 1991.