형질전환 식물체에서의 복합 단일 항체 단백질 생산

안미현 · 오은이 · 송미라 · Zhe Lu · 김현순[2] · 정혁[2] · 고기성[1]*

원광대학교 자연과학대학 생명과학부, [1]원광대학교 생명공학연구소, [2]한국생명공학연구원 식물 유전 연구센터

Received January 14, 2009 / Accepted January 22, 2009

Multiple Monoclonal Antibodies Produced in a Single Transgenic Plant. Mi-Hyun Ahn, Eun-Yi Oh, Mira Song, Zhe Lu, HyunSoon Kim[2], Hyouk Joung[2] and Kisung Ko[1]*. *Department of Biological Science, College of Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea,* [1]*Institute of Biotechnology, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea,* [2]*Plant Genomics Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea* - Production of highly valuable immunotherapeutic proteins such as monoclonal antibodies and vaccines using plant biotechnology and genetic engineering has been studied as a popular research field. Plant expression system for mass production of such useful recombinant therapeutic proteins has several advantages over other existing expression systems with economical and safety issues. Immunotherapy of multiple monoclonal antibodies, which can recognize multiple targeting including specific proteins and their glycans highly expressed on the surface of cancer cells, can be an efficient treatment compared to a single targeting immunotherapy using a single antibody. In this study, we have established plant production system to express two different targeting monoclonal antibodies in a single transgenic plant through crossing fertilization between two different transgenic plants expressing anti-colorectal cancer mAbCO17-1A and anti-breast cancer mAbBR55, respectively. The F1 seedlings were obtained cross fertilization between the two transgenic parental plants. The presence, transcription, and protein expression of heavy chain (HC) and light chain (LC) genes of both mAbs in the seedlings were investigated by PCR, RT-PCR, and immunoblot analyses, respectively. Among all the seedlings, some seedlings did not carry or transcribe the HC and LC genes of both mAbs. Thus, the seedlings with presence and transcription of HC and LC genes of both mAbs were selected, and the selected seedlings were confirmed to have relatively stronger density of HC and LC protein bands compared to the transgenic plant expressing only each mAb. These results indicate that the F1 seedling plant with carrying both mAb genes was established. Taken together, plant crossing fertilization can be applied to generate an efficient production system expressing multiple monoclonal antibodies for immunotherapy in a single plant.

Key words : Crossing fertilization, mAb BR55, mAb CO17-1A

서 론

질병의 진단 및 치료에 사용하기 위한 항체의 생산 및 개발은 최근 계속 증가하고 있는 추세이며 실제 암 세포 표면 단백질 인지 항체를 환자에게 투여하여 치료에 성공한 사례가 보고된 바 있다[14,17]. 암의 진단 및 치료에 사용되는 항체는 암 세포 표면에 발현하고 있는 TAA (tumor associated antigen)라 명명하는 특정 항원을 인지하게끔 개발하며 대장암 세포의 TAA에 대한 단일항체 생산은 대장암의 치료 및 진단에 유용하리라고 생각된다[1,15]. 이러한 항암 항체는 암 세포의 표면을 인지, 결합한 뒤 대식세포 및 수지상 세포 등의 면역계 효과세포 표면에 존재하는 Fc 수용체에 결합 함으로써 효과세포에 항원을 인지시키고 결과적으로 항체 의존적 세포괴사(antibody-dependent cell cytotoxicity, ADCC)를 유도할 수 있다[4,7].

이러한 항암 항체 중에서 많이 알려져 있고 보고되어 있는 두 항체 단백질 중 mAb CO17-1A 는 사람의 대장암 세포 표면에 존재하는 40 kDa의 당단백질인 GA733-2E를 인지하는 항체 단백질로 항원-항체 반응을 통한 대장암 치료 시 국소적 암 전이를 막고 그 치료 예후가 좋다는 보고가 있었다[7,20]. 다른 알려져 있는 항체 단백질로는 mAb BR55를 들 수가 있는데, mAb BR55 단일항체는 유방, 폐, 자궁 및 대장암 세포에서 높은 발현을 보이는 Fucα1→2Galβ1→4[Fucα1→3]GacNAcβ1→R 구조의 di-fucosylated oligosaccharide 항원인 Lewis Y (LeY) 를 인지하여 결합하는 항체이다[4,9,11-14]. 이 LeY 항원은 정상의 세포에서는 아주 제한적으로만 발현하지만, 암 발병 시 그 발현량이 암세포 특이적으로 급증하기 때문에 암 세포 특이적 항원으로 간주하기에 적합하다. LeY 항원으로 인지되는 암 세포는 mAb BR55 항체 처리에 의하여 그 증가율이 제한되고 ADCC가 유도되는 것으로 알려져 있다[4,5]. 이렇게 유용한 점을 갖고 있는 항체 단백질을

*Corresponding author
Tel : +82-63-850-6088, Fax : +82-63-857-8837
E-mail : ksko@wku.ac.kr

다량 생산하는 것은 암 치료에 도움이 될 뿐만 아니라 현재 사용 중인 높은 가격의 암 치료제에 대한 소비를 줄일 수 있어 경제적으로도 효과가 있을 것으로 기대된다. 최근까지 항체 및 유용 단백질의 생산은 *E.coli*, yeast 등의 발현 시스템을 이용하거나 동물 세포 등을 이용하는 것이 보통이었다. 그 중 경제적 이유로 가장 많이 사용되어온 시스템은 *E.coli* 등의 미생물을 이용하는 것이다. 하지만, 미생물을 이용한 단백질 생산의 가장 큰 문제점은 동물세포(진핵세포)에 존재하는 세포 소기관이 미생물에 존재하지 않기 때문에 단백질 생산 후 공정과정인 post-translational modification 과정이 포함되지 않아 단백질의 최종 구조 및 당 구조의 차이가 있다는 점이다[4,19]. 또한, 동물 세포 및 실험 동물을 이용한 항체 및 유용 단백질의 생산은 생산된 단백질의 구조 우수성에도 불구하고 host cell 이 갖고 있는 병원성의 감염 우려가 있다는 단점이 있어서 쉽게 사용하기에 용이하지 않다. 이러한 단점들을 극복할 수 있는 방법으로 최근 각광받고 있는 방법은 형질전환 식물에서의 단백질 생산이다.

식물 생명공학 기술을 이용하여 식물로부터 유용 단백질을 생산하는 것은 동물 또는 동물세포를 이용하는 시스템에 비하여 안전하고 경제적인 장점을 가지고 있다[8]. 또한 많은 생명공학적 지식 및 기술들이 식물에서의 단백질 및 항체 생산의 기술적 문제들을 해결하는 데 도움이 되고 있다. 형질전환 식물을 이용한 항체, 항원 및 치료 단백질 등의 유용 단백질 생산은 한번의 형질전환을 통하여 적은 비용으로 쉽게 scale-up 할 수 있으며 또한 동물 세포와 같은 진핵 세포에 속하여 미생물을 이용한 시스템에서는 볼 수 없는 glycosylation 등의 post-translational modification 과정이 포함된다는 장점을 가지고 있어 인간형의 유용 단백질 생산 및 생산된 단백질의 생물학적 활성과 안전성 증가에 적합하다고 할 수 있다[2,4,8,10,16,18]. 뿐만 아니라, 동물 세포 및 실험동물을 이용한 시스템과 달리 질병을 유발할 수 있는 병원체로부터 자유로운 장점도 가지고 있다.

이러한 식물 발현 시스템에서 가장 중요한 점 중 하나는 발현량의 증가이다. 본 연구팀은 기존에 alfalfa mosaic virus 유래의 포로모터 조절 시스템 등을 이용한 형질전환 식물체로부터 항체를 생산하는 연구에 대하여 보고한 바 있다[4,8]. 같은 맥락으로 단백질의 post-translational modification을 유도하며 발현량의 증가도 유도할 수 있는 ER-retention signal peptide 인 KDEL 서열을 유전자 카세트에 포함하는 연구도 진행한 바 있다[4,8]. 이렇게 재조합된 KDEL 서열이 당단백질 maturation 위한 tag으로 작용하여 oligomannose 형태의 단백질을 얻을 수 있다는 내용은 이미 많이 알려져 있으며 이러한 형태의 항체가 좀 더 효과적으로 면역계 효과세포 유도에 도움이 되리라 기대하고 있다[3,6]. 이상의 내용들을 접목하여 이미 기존에 mAb CO17-1A 와 mAb BR55 항체를 각각의 식물체에 성공적으로 형질전환 시켜 단백질 발현을 확인하였다[4,8].

더 나아가 여러 면역치료제 단백질을 하나의 형질전환 식물체에서 동시에 생산해 낸다면 현재까지의 일반적 형질전환 식물보다 농업 경제학적으로 유용한 시스템 구축 및 생산량의 증가를 유도할 수 있을 것이라 기대된다. 따라서, 본 연구에서는 위와 같은 목적으로 1) 각기 다른 항체 유전자를 갖고 있는 두 종류의 형질전환 식물을 인공적인 수분 수정 교배를 통하여 하나의 식물체에서 두 종류의 항체를 발현하는 식물체를 확립하고 2) 수분 수정 교배를 통하여 생산한 식물체에서 정상적으로 유전자 발현이 이루어 지는지 PCR 및 RT-PCR을 통하여 확인 하였으며 3) 식물체로부터 단백질을 분리하여 항체 단백질의 발현 및 발현률 증가 효과를 확인하고자 하였다. 위와 같은 일련의 과정을 통하여 본 연구가 복합 항체 단백질을 생산하는 식물체를 확립하는데 필요한 식물 생명공학의 새로운 시스템 도입을 유도하리라 기대한다.

재료 및 방법

형질전환 식물체 배양

대장암 치료항체인 mAb CO17-1A 를 발현하는 형질전환 식물과 유방암 치료항체인 mAb BR55를 발현하는 형질전환 식물은 기존에 연구발표 된 식물체를 이용하였다[4,7]. 각각의 항체를 생산하는 식물들을 외부환경과 잘 격리된 온실에서 키웠다. 3개월 정도의 식물생장기간을 통해 꽃의 분화를 유도한 후, mAb CO17-1A를 발현하는 식물의 꽃 수술을 제거하고 mAbBR55의 화분을 꽃 수술이 제거된 mAb CO17-1A 발현 식물 꽃의 암술에 수분 수정시켰다(Fig. 1A). 수분수정 된 꽃은 다른 꽃의 화분으로부터의 수분을 막기 위하여 봉지를 씌웠다. 3-4주 정도가 지나면 수분수정 된 식물에서 씨앗을 수확하였다. 씨앗은 20%의 에탄올과, 10% 의 락스를 이용하여 세정한 뒤 Watman filter paper 위에 올려서 여분의 습기를 제거하고 100 μg/ml 의 kanamycin 항생제를 포함하는 MS media위에 올려놓아 씨앗의 싹이 트게 하였다. 발아는 16 시간과 8시간 간격의 light:dark 상태로 25°C 에서 유도하였다. 4 주 뒤, 발아된 씨앗을 흙으로 옮겨서 랩으로 덮어서 성장시켰다. 비형질전환 씨앗도 같은 방법으로 배양하되, 항생제가 없는 조건에서 키워서 대조군으로 사용하였다.

PCR

각 식물체로부터 genomic DNA를 DNeasy kit (Quiagen, Hilden, Germany) 이용하여 분리하였다. 대략적으로 보면, 100 mg 정도의 잎을 kit 내의 버퍼(buffer) 와 함께 파쇄하여 DNA column 에 통과시켜 순수한 DNA 를 50 μl의 TE 버퍼를 이용하여 녹여냈다. 분리한 DNA를 이용하여 mAb CO17-1A 및 mAb BR55 항체의 중쇄(heavy chain, HC) 와 경쇄(light chain, LC) 유전자 증폭을 위하여 디자인 된 프라이머(primer)

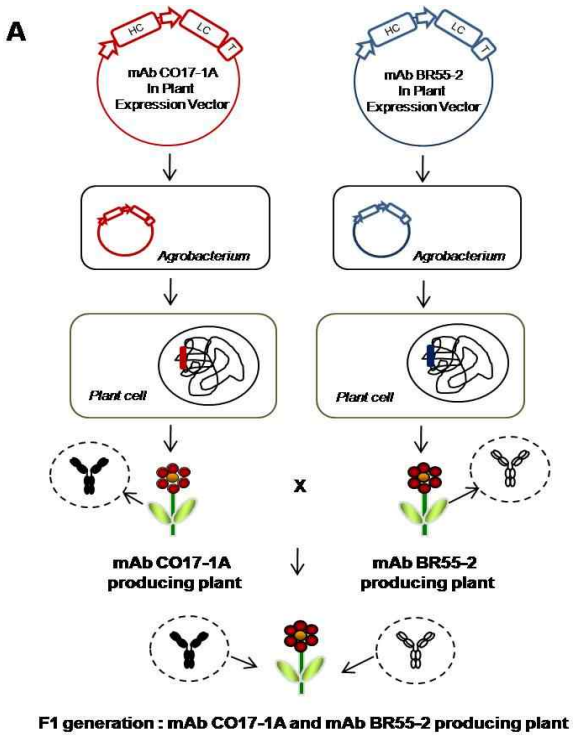

Fig. 1. Generation of F1 seedling to express multiple monoclonal antibodies (mAb CO17-1A and mAb BR55). (A) Process of cross fertilization of transgenic plants. Two different genes of anti-colorectal cancer antibody (mAb CO17-1A) and anti-breast cancer antibody (mAb BR55-2) were cloned into each plant expression vector. The plant expression vector carrying the mAb genes were transferred into plant chromosomal DNA using *Agrobacterium* mediated transformation. The F1 seedling plants were obtained by cross fertilization between two different transgenic plants carrying mAb CO17-1A or mAb BR55 genes (HC, heavy chain of antibody; LC, light chain of antibody). (B) Fully grown F1 seedling plants obtained from cross fertilization.

를 이용하여 PCR을 수행하였다(Table 1). PCR mixture 는 식물체의 잎에서 분리한 genomic DNA (1 μl) 를 template DNA 로 사용하며 10 pmol/μl 농도의 forward 및reverse primer을 *iTaq* premix (Intron Biotechnol. Inc., Seongnam, Korea)와 함께 반응하였다. PCR 반응 조건으로는 94°C 에서 20초, 62°C에서 20초, 72°C에서 90초의 denaturation-annealing-elongation 과정을 30회 반복 수행하였다. PCR 결과 예상 크기는 Table 1에서 나타낸 바와 같다. 비 형질전환 식물의 DNA 샘플을 negative control로 사용하였다.

RNA 분리 및 Reverse transcription-PCR

mAb CO17-1A형질전환 담배 식물과 mAb BR55 형질전환 담배 식물 및 인공 수정 수분한 식물로부터 각각 100 mg 의 잎을 취하여 1 ml의 Trizol reagent (Invitrogen Inc. Carlsbad, CA)와 함께 파쇄하였다. 파쇄된 식물 샘플에 chloroform (Usb, GE Healthcare)을 처리하고 원심분리 과정을 통하여 DNA, RNA, 단백질 층을 분리하였다. 분리한 RNA을 isoamyl alcohol (USB Corp. Cleveland, OH)을 이용하여 cleaning 해 준 뒤 50 μl의 TE 버퍼를 이용하여 녹여낸 뒤, spectrophotometer 를 이용하여 260 nm 의 파장에서 RNA 농도를 측정하였다. 4 μg 의 정량된 RNA 과 oligo dT primer, dNTP mixture (2.5 mM, each), SuperScript III 효소(Invitrogen Inc.) 처리를 통하여 역전사 반응을 유도, 결과적으로 cDNA를 합성하였다. RNA 발현량을 확인하기 위하여 합성한 cDNA를 이용하여 PCR을 수행한다. 특이적으로 디자인 한 primer는 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 94°C에서 20초, 55°C에서 40초, 72°C 에서 50 초의 denaturation-annealing-elongation 과정을 40회 반복하여 증폭하였다. Genomic DNA와 마찬가지로 비 형질전환 식물을 negative control로 사용하였다.

단백질 분리 및 Western blot

200 mg 의 상호교배 식물의 잎을 protease inhibitor cocktail (Roche)가 포함되어 있는 200 μl 의 PBS 와 함께 파쇄한 뒤, 13,000 rpm 의 속도로 원심 분리하여 상층의 수용성 단백질을 얻었다. 단백질은 BCA 단백질 정량 kit (Thermo Scientific, Erembodegem, Belgium)을 이용하여 농도를 측정하였다. 30 μg 의 정량한 단백질을 protein oading buffer 용액 (1M Tris-HCl pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 5% 2-mercaptoethonol, 0.1% bromophenol blue and 200mM DTT)과 섞어서 10% SDS acrylamide 겔에 전기영동 한다. Nitrocellulose (NC) membrane (Millipore Corp. Billerica, MA)로의 transfer 과정을 거쳐 단백질을 막에 부착시킨 뒤 3% skim milk (Fluka, Buchs, Switzerland)를 이용하여 4°C 에서 16 hr blocking 하였다. PBS-T (0.05% Tween 20 in PBS) washing 버퍼를 이용하여 여분의 skim milk 를 제거한 뒤, horse radish peroxidase (HRP) 가 부착된 $F(ab')_2$ 또는 Fcγ specific goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoRes Lab, West Grove, PA) 를 1/3,000 희석한 후 각각 반응하여 항체의 HC과 LC를 detection 하고자 하였다. 항체 반응 뒤, SuperSignal chemiluminescence substrate (Thermo Scientific) 를 이용하여 X-ray 필름에 감광하였

Table 1. The specific primer sequence for amplification of mAb CO17-1A and mAb BR55 genes

Primer			Sequence	Size (bp)
PCR	CO17-1A HC	Forward	5′-cggccatgg(NcoI)aatggagcagagtcttt-3′	1459
		Reverse	5′-cgtctaga(XbaI)ttagtgatggtgatggtgatgatc-3′	
	CO17-1A LC	Forward	5′-cggggccc(BamHI)atgggcatcaagatggaatca-3′	764
		Reverse	5′-cgtctaga(PstI)ctaacactcattcctgttgaa-3′	
	BR55-2 HC	Forward	5′-accatgg(NcoI)acttggggctcagcttgatt-3′	1474
		Reverse	5′-tctaga(XbaI)tcaaagttcatctttacccggagtccgggagaagct-3′	
	BR55-2 LC	Forward	5′-tcatga(BspHI)agttgcctgttaggcttttggtgctgat-3′	726
		Reverse	5′-tctaga(XbaI)ctaacactcattcctgttgaagct-3′	
RT-PCR	CO17-1A HC	Forward	5′-gatggtccctggtttgctta-3′	196
		Reverse	5′-tggacagggatccagagttc-3′	
	CO17-1A LC	Forward	5′-aataaaacgggctgatgctg-3′	201
		Reverse	5′-gtgctgtctttgctgtcctg-3′	
	BR55-2 HC	Forward	5′-tggaactatggagccctgtc-3′	200
		Reverse	5′-gggatactgggcttgggtat-3′	
	BR55-2 LC	Forward	5′-tctccctgcctgtcagtctt-3′	200
		Reverse	5′-atctgtccctgatccactgc-3′	

다. 비 형질전환 식물을 negative control로, mAb CO17-1A 또는 mAb BR55-2 형질전환 식물을 positive control로 실험에 사용하였다.

결과 및 고찰

상호교배 형질전환 식물체 확립

식물의 상호교배를 통한 항체 단백질의 효율적인 생산 과정은, mAb BR55 형질전환 식물의 화분을 mAb CO17-1A 형질전환 식물의 암술에 인공 수분 수정시키고, 그 수분 수정된 mAb CO17-1A 식물로부터 얻은 씨앗을 발아시키는 방법을 사용하였는데 모식도 Fig. 1A 에 있는 방법으로 수행되었다. 씨앗의 성장 초기에 *in vitro* 상태의 배지에 유전자 선별 항생제(kanamycin)가 포함되어 있으므로 유전자가 포함되어 있지 않아 내성이 없는 씨앗은 성장하지 못하고 괴사하였다(data not shown). Fig. 1B 는 상호 교배를 통하여 만들어져 성장한 F1 seedling 식물체를 나타내고 있다. 이 결과로, 상호 교배 뒤 식물 배양을 통하여 두 유전자를 포함하고 있을 것으로 추정되는 식물체의 성장이 정상적으로 이루어짐을 확인할 수 있었다.

교배된 식물에서의 항체 유전자 확인

인공적으로 타가 수분 수정된 식물의 씨앗에서 발아한 F1 seedling 식물체에서 얻은 DNA를 분리하여 방법에서 기술한 특정 primer와 함께 PCR을 수행한 결과, mAb CO17-1A 의 HC과 LC 유전자가 각 식물들에서 모두 존재하고, mAb BR55 유전자에 대하여는 LC 유전자가 존재하지 않는 식물들(샘플 6, 7, 9, 11, 22, 23, 28)과 존재하는 식물들(샘플 15, 18, 19, 25, 26, 27)이 확인되었다(Fig. 2). 이들 유전자의 발현 결과를 좀 더 자세하게 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였으며 그 결과, DNA PCR 결과와 마찬가지로 일부 식물 샘플에서는 mAb BR55의 LC 유전자를 발현하지 않음을 확인하였다(Fig. 3). 따라서 각 유전자를 갖고 있는 식물의 상호 교배 시 유전자 전달이 용이하게 이루어지지 않은 몇몇의 식물이 있음을 확인하고 항체 단백질 발현을 확인하는 단계에서 이 식물들은 배제하였다. 또한, 각 유전자를 모두 발현하는 식물(샘플 15, 18, 19, 25, 26, 27) 중에서 RNA 발현률이 높은 식물을 선택하여 단백질 발현을 보고자 하였다. 이 결과들을 통하여 각 유전자를 갖고 있는 식물의 교배 시에 어떠한 DNA 재조합에 의하여 유전자 발현에 영향을 미치는 것으로 추측되며, 그 결과는 RNA 발현에 그대로 반영됨을 확인할 수 있었다.

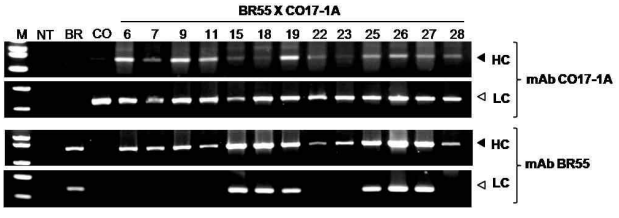

Fig. 2. PCR result of genomic DNA from F1 seedling plants. The plant genomic DNA was isolated by Qiagen DNA easy kit and amplified with specific primers (Table 1). (HC, heavy chain; LC, light chain; NT, non-transgenic plant; BR, mAb BR55-2 transgenic plant; CO, mAb CO17-1A transgenic plant; BR55 X CO17-1A (6~28), F1 seedling plant lines)

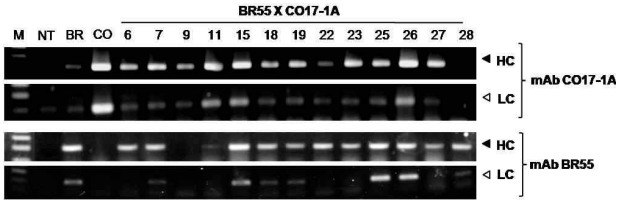

Fig. 3. RT-PCR result of F1 seedling plants. The transcription level of mAb CO17-1A and mAb BR55 varied among the F1 seedling plants. Total RNA was isolated by Tri-reagent and amplified with specific primer (Table 1). (HC, heavy chain; LC, light chain; NT, non-transgenic plant; BR, mAb BR55-2 transgenic plant; CO, mAb CO17-1A transgenic plant; BR55 X CO17-1A (6～28), F1 seedling plant lines).

식물 교배를 통한 항체 단백질 발현량 증가

인공적으로 타가 수분 수정된 각 식물에서 얻은 F1 seedling (자손) 식물 중 각각의 항체 HC와 LC의 DNA가 존재하고 높은 전사 수준을 보이는 15, 19, 25, 26 번의 식물체를 선별하였다. 이렇게 선별된 식물체로부터 단백질을 분리하여 Western blot을 수행하였다. 각 항체 유전자가 mouse 항체 유전자 서열에 기초하고 있기 때문에[4,8] anti-mouse 항체를 결합하여 단백질 발현을 관찰할 수 있었다. 그 결과는 Fig. 4에 나타내고 있으며 positive control로 시판되고 있는 mouse IgG를 사용하였다. 항체의 HC과 LC이 각각 50 kDa과 25 kDa으로 positive control 항체에서도 같은 크기를 보였다. F1 seedling 식물체에서 분리한 단백질도 같은 크기에서 강한 발현을 보여 항체 단백질 발현이 잘 되는 것으로 생각된다. 또한, 각각의 mAb CO17-1A 또는 mAb BR55 단일 항체만 발현하고 있는 식물의 경우, 발현량이 적어 정량적으로 제한된 단백질량(30 μg) 에서는 HC 단백질 발현이 보이지 않는데 비해 두 유전자를 모두 포함하고 있는 상호교배 식물에서는 발현량이 현저히

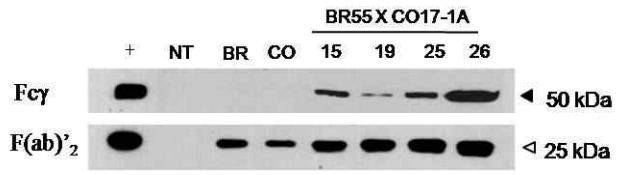

Fig. 4. Immunoblot analysis to confirm the mouse mAb HC and LC protein expression in selected F1 seedling plant lines. The F(ab)'$_2$ and Fcγ mean treatment of HRP conjugated anti mouse F(ab)'$_2$ and Fcγ specific IgG, respectively. Both mAb CO17-1A and mAb BR55 were originated from mouse. F1 seedling plants showed stronger expression of HC and LC compared to each mAb CO17-1A or mAb BR55 transgenic plant. (+, mouse IgG positive control; HC, heavy chain; LC, light chain; NT, non-transgenic plant; BR, mAb BR55 transgenic plant; CO, mAb CO17-1A transgenic plant; BR55 X CO17-1A, selected F1 seedling plant lines)

증가한 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 4, 샘플 26). 이 결과로 미루어볼 때, 같은 종(species) 에서 유래한 두 항체 유전자를 동시에 갖고 있는 교배 식물은 두 개의 유용 단일항체 단백질의 발현이 한 식물에서 정상적으로 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 이 결과로 볼 때, 본 연구에서 제시한 식물 교배 방법을 통해 한 식물체에서 여러 복합 유용 단백질 생산을 할 수 있는 새로운 식물 발현 시스템이 개발될 수 있다는 가능성을 제시하고 있었다. 사실, 같은 Fc family 들은 세포 내의 소포체(endoplasmic reticulum, ER)에서 folding이나 assembly가 될 때 서로 자동적으로 assembly 가 될 수 있다고 본다[8]. 추후, 식물에서 이러한 현상을 확인하기 위해서는 다른 종(species)에서 유래한 항체이며 또한 Fc family 가 서로 다른 각각의 다른 두 종류의 항체 HC 및 LC 유전자를 한 식물에서 발현하여, 각각의 항체들이 서로 같은 Fc family 간의 짝을 이루어 assembly가 되는지를 확인하는 연구가 필요하다고 본다.

따라서 앞으로 이 결과에서 더 나아가, 종(species)이 다른 두 항체를 한 식물체에서 생산하여 각 항체의 발현을 선별적으로 확인하고 그 항체들의 생물학적 활성 및 당구조 분석을 통한 당 구조 변이 등의 연구가 동반된다면, 고효율, 저비용의 새로운 복합 단일 항체 식물 생산 시스템을 구축하는데 도움되리라 생각된다.

요 약

식물 생명공학 기술을 이용해 인간에게 유용한 치료단백질 및 백신을 생산하는 것은 최근에 각광받고 있는 연구 분야이다. 식물을 이용한 유용 단백질 생산은 다른 시스템에 비하여 경제적일 뿐만 아니라 병원성 인자에 대한 안전성이 있어서 유용하다고 할 수 있다. 암세포 표면에 특이적으로 발현하고 있는 분자 와 당 구조를 각각 인지할 수 있는 두 종류의 항체를 동시에 투여하는 면역 치료는 질병의 치료를 유도하는 데 있어서 효과적일 수 있다. 본 연구는 기존에 본 연구팀에서 확보하고 있었던 두 종류의 항체 단백질(mAb CO17-1A, mAb BR55) 생산 형질전환 식물체를 이용하여 상호교배를 통하여 한 식물에서 두 종류의 항체 단백질을 모두 생산하는 식물 발현 시스템 구축에 관한 연구이다. 각기 다른 유전자를 갖고 있는 식물체로부터 수분을 유도하여 씨앗을 얻고 이 씨앗을 배양하여 완벽한 식물 개체로 성장시켰으며, 그 식물체로부터 DNA, RNA, 단백질을 분리하여 형질전환 유전자를 포함하고 있는지 여부를 확인하였다. 그 결과, 개체에 차이는 있지만, 한 식물에서 두 항체 유전자를 갖고 있음을 확인할 수 있었고, 이 유전자는 식물체 내에서 안정적으로 transcription 되었음을 확인하였다. 또한, 두 종류의 항체를 동시 생산하는 식물체에서 분리한 단백질은 한 종류의 항체 단백질만 생산하는 식물체에 비하여 수용성 단백질 단위당 항체 발현률이 높게 나

타나는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구를 통하여 식물을 이용한 유용 단백질 생산 효율을 높일 수 있는 시스템을 확립하였으며 앞으로 추가적으로 생산한 항체의 생물학적 활성 및 항암 효능, 당 구조 분석 등에 대한 연구를 수행한다면, 식물 생명공학적 방법을 통한 항체 생산에 대한 새로운 가능성을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨. Hilary Koprowski 박사님의 지도 감사 드립니다.

References

1. Adams, G. P. and L. M. Weiner. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1147-1157.
2. Agarwal, S., R. Singh, I. Sanyal and D. V. Amla. 2008. Expression of modified gene encoding functional human alpha-1-antitrypsin protein in transgenic tomato plants. *Transgenic Res.* [Epub ahead of print]
3. Bauly, J. M., I. M. Sealy, H. Macdonald, J. Brearley, S. Dröge, S. Hillmer, D. G. Robinson, M. A. Venis, M. R. Blatt, C. M. Lazarus and R. M. Napier. 2000. Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin. *Plant Physiol.* **124**, 1229-1238.
4. Brodzik, R., M. Glogowska, K. Bandurska, M. Okulicz, D. Deka, K. Ko. J. van der Linden, J. H. Leusen, N. Pogrebnyak, M. Golovkin, Z. Steplewski and H. Koprowski. 2006. Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 8804-8809.
5. Flieger, D., A. S. Hoff, T. Sauerbruch and I. G. Schmidt-Wolf. 2001. Influence of cytokines, monoclonal antibodies and chemotherapeutic drugs on epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and LewisY antigen expression. *Clin. Exp. Immunol.* **123**, 9-14.
6. Helenius, A. and M. Aebi. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.
7. Ko, K., Z. Steplewski, M. Glogowska and H. Koprowski. 2005. Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 7026-7030.
8. Ko, K., Y. Tekoah, P. M. Rudd, D. J. Harvey, R. A. Dwek, S. Spitsin, C. A. Hanlon, C. Rupprecht, B. Dietzschold, M. Golovkin and H. Koprowski. 2003. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8013-8018.
9. Luo, P., M. Agadjanyan, J. Qiu, M. A. Westerink, Z. Steplewski and T. Kieber-Emmons. 1998. Antigenic and immunological mimicry of peptide mimotopes of Lewis carbohydrate antigens. *Mol. Immunol.* **35**, 865-879.
10. Ma, J. K., P. M. Drake and P. Christou. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 794-805.
11. Madjd, Z., T. Parsons, N. F. Watson, I. Spendlove, I. Ellis and L. G. Durrant. 2005. High expression of Lewis y/b antigens is associated with decreased survival in lymph node negative breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* **7**, R780-87.
12. Muldoon, L. L. and E. A. Neuwelt. 2003. BR96-DOX immunoconjugate targeting of chemotherapy in brain tumor models. *J. Neurooncol.* **65**, 49-62.
13. Nemoto-Sasaki, Y., M. Mitsuki, M. Morimoto-Tomita, A. Maeda, M. Tsuiji and T. Irimura. 2001. Correlation between the sialylation of cell surface Thomsen-Friedenreich antigen and the metastatic potential of colon carcinoma cells in a mouse model. *Glycoconj. J.* **18**, 895-906.
14. Pai-Scherf, L. H., J. A. Carrasquillo, C. Paik, O. Gansow, M. Whatley, D. Pearson, K. Webber, M. Hamilton, C. Allegra, M. Brechbiel, M. C. Willingham and I. Pastan. 2000. Imaging and phase I study of 111In- and 90Y-labeled anti-LewisY monoclonal antibody B3. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1720-1730.
15. Plunkett, T. A. and D. W. Miles. 2002. New biological therapies for breast cancer. *Int. J. Clin. Pract.* **56**, 261-266.
16. Richter, L. J., Y. Thanavala, C. J. Arntzen and H. S. Mason. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1167-1171.
17. Scherf, U., D. T. Ross, M. Waltham, L. H. Smith, J. K. Lee, L. Tanabe, K. W. Kohn, W. C. Reinhold, T. G. Myers, D. T. Andrews, D. A. Scudiero, M. B. Eisen, E. A. Sausville, Y. Pommier, D. Botstein, P. O. Brown and J. N. Weinstein. 2000. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat. Genet.* **24**, 236-244.
18. Tacket, C. O., H. S. Mason, G. Losonsky, J. D. Clements, M. M. Levine and C. J. Arntzen. 1998. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat. Med.* **4**, 607-609.
19. Youm, J. W., J. H. Jeon, H. Kim, Y. H. Kim, K. Ko, H. Joung and H. Kim. 2008. Transgenic tomatoes expressing human beta-amyloid for use as a vaccine against Alzheimer's disease. *Biotechnol. Lett.* [Epuib ahead of print]
20. Zaloudik, J., W. Li, L. Jacob, M. P. Kieny, R. Somasundaram, B. Acres, H. Song, T. Zhang, J. Li and D. Herlyn. 2002. Inhibition of tumor growth by recombinant vaccinia virus expressing GA733/CO17-1A/EpCAM/KSA/KS1-4 antigen in mice. *Cancer Gene Ther.* **9**, 382-389.