

식물기반 치료용 항체생산

김영관 · 소양강 · 박다영 · 김현순 · 전재흥 · 추영국 · 고기성

Plant-based production of therapeutic antibodies

Youngkwan Kim · Yangkang So · Da-Young Park · Hyun-Soon Kim · Jae Heung Jeon · Young Kug Choo · Kisung Ko

Received: 4 August 2010 / Accepted: 18 August 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Antibodies are powerful and versatile tools to play a critical role in the diagnosis and treatment of many diseases. Their application has been enhanced significantly with the advanced recombinant DNA and heterologous expression technologies, allowing to produce immunotherapeutic proteins with improved biofunctional properties. However, with currently available technologies, mammalian cell-based therapeutic antibody production, as an alternative for production in humans and animals, is often not plentiful for passive immunotherapeutics in treatment of many diseases. Recently, plant expression systems for therapeutic antibodies have become well-established. Thus, plants have been considered to provide an attractive alternative production system for therapeutic antibodies, as plants have several advantages such as the lack of human pathogens, and low cost of upstream production and flexible scale-up of highly valuable recombinant glycoproteins. Recent advances in modification of post-translational processing for human-like glycosylation in transgenic plants will make it possible that plant can become a suitable protein expression system over the animal cell-

based current production system. This review will discuss recent advances in plant expression technology and issues for their application to therapeutic antibody production.

Keywords ADCC, glycosylation, plant-derived pharmaceuticals, therapeutic protein

서론

치료용 단백질 (therapeutic protein)은 일반적으로 진핵 세포인 동물세포 및 곰팡이, 그리고 원핵세포인 박테리아 등의 형질전환을 이용하여 생산될 수 있다 (Pen 1996; Ma and Vine 1999; Ma et al. 2003; Ko et al. 2005). 하지만 이러한 단백질 생산방법은 발현조건 등에 따라 단백질의 분리 및 정제가 매우 어렵고 고가의 생산비용 등으로 인하여 많은 단점들을 가지고 있다 (Bakker et al. 2001; Ko et al. 2005). 때문에 최근 발전하는 식물생명공학기술과 재조합 단백질 기술의 출현으로 식물을 이용하여 진단 및 치료용 항체 생산을 하기 위한 새로운 발현 시스템의 연구가 활발히 진행되고 있다.

지금까지는 식물체 자체가 가지고 있는 2차 대사산물 중 유용물질로 이용될 수 있는 것들에 중점을 두고 많은 연구가 진행되어 왔지만, 안정한 형질전환 식물체가 보고된 이래 (Fralely et al. 1983; Horsch et al. 1984), 식물 시스템을 이용하여 치료용 단백질을 발현할 수 있음을 인식하여 고부가가치의 다양한 치료용 단백질을 경제적으로 저렴하고 안전하게 생산할 수 있는 생산시스템으로의 연구가 진행되고 있다 (Kusnadi et al. 1998; Ko and Koprowski 2005).

식물을 이용한 치료용 단백질을 생산 사람에게서 발견되는 병원균 위험의 감소, 여러 다양한 식물 바이오 매스의 높은 수확률, 또한 미생물배양이 가지고 있는 번역 후

Y. K. Kim · Y. K. So · D.-Y. Park · Y. K. Choo · K. S. Ko (✉)
원광대학교 생명과학부
(Department of Biological Science, College of Natural sciences,
Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea)

H.-S. Kim · J. H. Jeon
한국생명공학연구원 식물시스템공학연구소
(Plant systems engineering research center, Korea Research
Institute of Bioscience and Biotechnology, Oun-dong 52,
Yusonggu, Daejeon 305-333, Korea)

K. S. Ko (✉)
원광대학교 생명공학연구소
(Biotechnology Institutes of Wonkwang University, Iksan 570-
749, Korea)
e-mail: ksko@wku.ac.kr

변형 (post-translational modification)의 여러 문제점도 해결할 수 있으며, 씨앗이나 다른 저장기관에서의 생산을 통한 보존의 용이성과 같은 경제적 측면 등의 여러 장점을 가진다 (Gomord et al. 2005). 또한 고등식물들은 진핵세포로서 동물세포가 가지고 있는 소포체 및 골지체가 존재하고 있어 당 단백질의 활성 (bioactivity)에 있어서 중요한 단백질 접힘 (folding), 단백질조립 (assembly) 및 당화 (glycosylation) 과정을 할 수 있다. 비록, 식물과 동물 사이에 코돈 선호도 (codon usage)나 번역 후 변형과정에서 약간의 당화과정의 차이가 있기는 하지만, 미생물과 비교해 볼 때 식물은 동물세포와 매우 유사한 점을 더 많이 가지고 있다.

때문에, 최근 식물을 이용하여 항암 (anti-cancer) 혹은 항 바이러스 (anti-virus) 효능을 지닌 항체를 식물에서 대량생산하기 위한 연구가 활발하게 진행 중이다 (Ko et al. 2003; Ko et al. 2005; Brodzik et al. 2006). 현재 이와 같이 식물 시스템을 이용하여 생산된 의약품 단백질을 식물 유래 의약품 (plant-derived pharmaceuticals: PDPs) 혹은 식물 기반 의약품 (plant-made pharmaceuticals: PMPs)이라 일컫는다 (Ma et al. 2005; Gomord et al. 2005).

하지만 식물발현시스템이 갖고 있는 여러 장점들에도 불구하고 낮은 발현 수준과 식물조직배양을 이용한 배지 내로의 낮은 분비 효율, 분비 후 배지 내의 단백질의 불안정성 등의 단점을 가지고 있다. 이로 인해 의약품 단백질의 생산을 위해 식물발현시스템을 상업화한다는 것은 많은 문제점을 해결하지 않고서는 아직까지도 어렵다 할 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 유전자 단계에서 발현하고자 하는 단백질 생산을 궁극적으로 높일 수 있는 강력한 프로모터의 개발 및 이용, 분비 효율을 촉진시킬 수 있는 식물세포발현시스템의 확립, 뿐만 아니라 발현 후 발생하는 단백질의 변성 억제 및 식물세포 내의 저장성효율 증가 등을 위한 연구가 필요하다.

본 논문에서는 식물 시스템을 이용하여 의약품 단일항체를 생산할 때의 잠재적인 이점과 한계를 고찰하고 기술적 극복방안을 살펴보고자 한다.

의약품 단백질로서 면역글로불린 (Immunoglobulin G: IgG)의 특성

항체 (antibody)는 인체에 침입한 바이러스 (virus)나 병원균 (pathogen) 등의 외래 유해물질들이 몸에 침투하면 B 세포로부터 면역반응 (immune response)에 의해 생성되는 항원 (antigen)을 인식하는 특이적 당 단백질 (glycoprotein)로서 최근 인간에 발병하는 질병치료제로 널리 사용되고 있다 (Breedveld 2000). 항체는 중쇄 (heavy chain)의 구조에 따라 일반적으로 5종류 (IgM, IgG, IgA, IgD 및 IgE)로 나뉘어 지며 (Kuby 1997), 이중 IgG는 혈액 중에 가장 많이

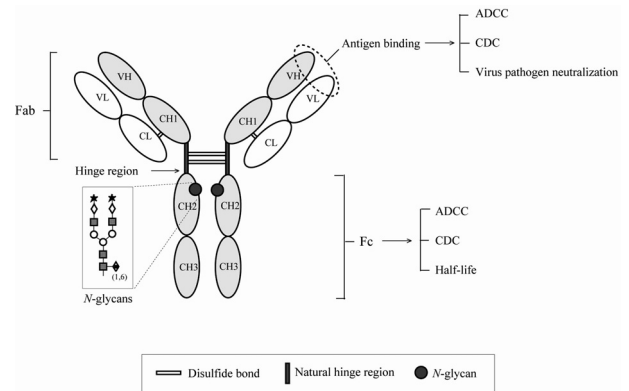


Fig. 1 Antibody structure and its components affecting biofunctional properties. Antigen binding affects antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cytotoxicity (CDC), and neutralization against viral infection. The structure and sequence of the Fc and its glycan structure influence on ADCC, CDC, and half-life of antibody

존재하는 항체로서 오래 전부터 연구되어와 현재 치료용 항체 (therapeutic antibody)로 개발되어 시판되고 있다. IgG는 중쇄의 구조에 따라 인간의 경우 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 아형 (subtype)이, 생쥐의 경우에는 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3 등 4종류의 아형이 존재한다. 이 중 IgG1이 치료용 항체의 대부분을 차지하고 있다.

IgG는 항원과 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 항원 결합 단편 (antigen binding fragment: Fab)부위와 보체의존성 독성 (complement-dependent cytotoxicity: CDC) 및 항체의존성 세포독성 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) 등 효과기 기능 (effector function)의 매개가 되는 Fc 부위 (fragment, crystalline)에 의해 병원균을 제거하게 된다 (Fig. 1). 항체의존성 세포독성의 경우 항체가 자연살해세포 (natural killer cells)나 대식세포 (macrophage cells) 등의 면역효과기 세포 (immune effector cells)의 표면에 위치하고 있는 Fc수용체 (Fc receptors: FcγRs) 즉 FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcγRn에 결합하므로써 식세포작용 (phagocytosis) 또는 용해작용 (lysis)에 의해 표적세포 (target cells)를 제거하는 반면, 보체의존성 세포독성의 경우에는 항체의 Fc 부위가 보체의 C1q subunit 등과 결합하므로써 보체연쇄반응 (complement cascade)의 활성화 기전을 통해 표적세포를 제거한다 (Armour et al 1999, Shields et al. 2001). IgG 아형의 효과기 기능의 정도는 IgG4<IgG2<IgG1≤IgG3 순으로 활성 수준이 증가한다.

Fc 부위는 이황화결합 (disulfide bond)으로 연결된 경첩부위 (hinge region) 및 N-oligosaccharide가 위치한 CH2 영역과 비공유결합으로 연결된 CH3 영역 등의 세 부분으로 나뉜다. CH2 영역의 N-말단 쪽에는 올리고 당 (oligosaccharide)이 결합되어 있는 Asn-297이 위치하고 있으며, 말단의 당 잔기들이 CH2 영역과 CH3 영역의 경계부위까지 분지되어 있는 구조를 이루고 있다. oligosaccharide는 Fc와 Fc 수용체와의 결합에

직접적으로 관여하고 있지 않지만, Fc 의 구조에 관여하여 효과기 기능 및 항원-항체 결합력에 영향을 미친다 (Fig. 1).

식물과 동물에서의 당화

단백질 위에 부착하여 존재하고 있는 당 (glycans)의 종

류와 구조는 식물과 동물에서 어떻게 발현되느냐에 따라 여러 차이점이 있다 (Fig. 2) (Lerouge et al. 1998; Cabanes et al. 1999). 이러한 당의 종류 및 구조에 의해 단백질의 활성이 완전히 다르게 변화되지는 않지만, 단백질의 접힘 (folding), 안정성 (stability), 용해도 (solubility) 및 protease 에 대한 민감성, 혈중 반감기 (serum half-life), 항원성 (antigenicity) 등에 중요한 영향을 미친다. 단백질에 결합

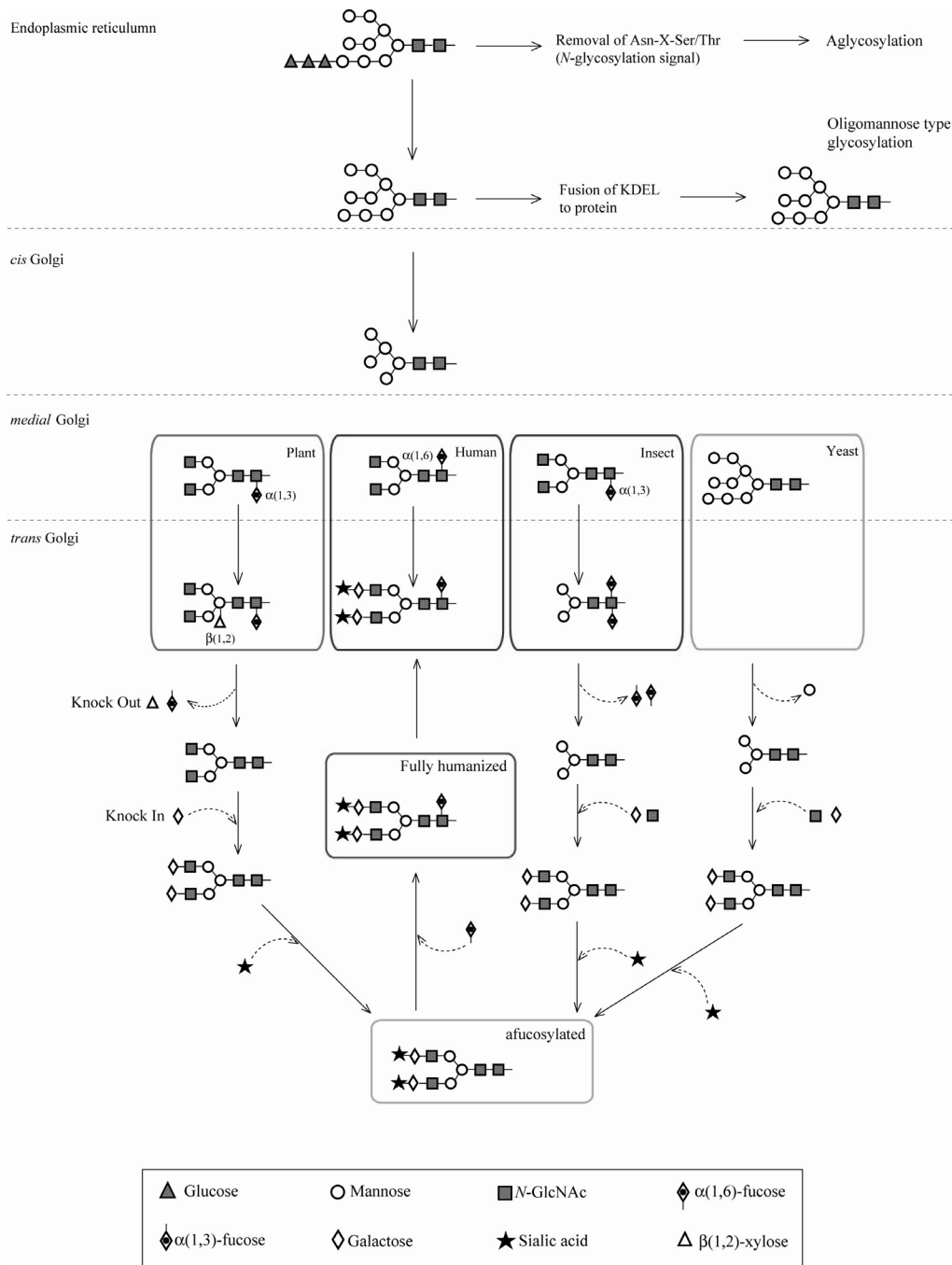


Fig. 2 N-glycosylation processing of glycoproteins in plant, human, insect and yeast. N-glycosylation in the endoplasmic reticulum (ER) occurs at Asn residues in Asn-X-Ser/Thr, which is a signal for N-glycosylation on proteins with transferring oligosaccharide precursor. The glycosylation is proceeded by glycosidases and glycosyltransferases in the ER and the Golgi apparatus. Glycosylation processing in the ER is preserved in plant, animal, insect and yeast with oligomannose type N-glycans. Glycosylation in the Golgi apparatus generates highly diverse matured N-glycan structures. The glycan structures can be humanized with modifying the glycosylation process

된 올리고당은 *N*-glycan 과 *O*-glycan으로 각각 구분되는데, 전자는 *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)의 환원 말단이 Asn의 아미드기에 결합되어 이루어지고, 후자는 *N*-acetylgalactosamine (GalNAc)의 환원 말단이 Ser 혹은 Thr 의 히드록실기에 결합되어 만들어진다. 이에 의해 당이 부착된 단백질 (glycoprotein)인 당 단백질의 당화는 주로 *N*-과 *O*-당화 (*N*-and *O*-glycosylation)로 나뉜다. 진핵세포의 단백질의 번역 후 변형 (post-translational modification)으로서 *N*-당화는 70% 이상을 차지하고 있으며, 당 단백질의 구조와 기능에 매우 커다란 영향을 준다. 동물과 식물에서 *N*-당화는 소포체 (endoplasmic reticulum: ER)에서 시작되는데, 먼저 단백질의 특정한 asparagine (N)에 oligomannose의 당화가 동일하게 이루어진다. 하지만 이것이 다시 ER과 골지체 (Golgi apparatus: GA)에서 당 분해효소 (glycosidase), 당 전위효소 (glycosyltransferase)와 단당류 합성에 관여하는 여러 가지 효소들 사이의 공동작용에 의해 보다 다양하고 복잡한 당사슬의 구조적 차이를 이루게 된다. 이와 같이 동물과 식물의 세포들은 *N*-glycan 을 갖는 당단백질을 골지체로 이동시켜 서로 다른 당화조절을 통해 당구조의 다양성을 나타낸다 (Fig. 2).

모든 *N*-glycan 은 공통적으로 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 의 core structure를 갖는다. 하지만, 포유동물의 경우 *N*-glycan 은 일반적으로 세가지 *N*-glycan subtype 즉 high-mannose, hybrid, complex type 등의 구조를 갖는다. 반면, 식물의 *N*-glycan은 high-mannose, paucimannosidic, complex type 등으로 변형된다 (Kornfeld and Kornfeld 1985; Lerouge et al. 1998).

High-mannose type *N*-glycan 은 *N,N'*-diacetyl chitobiose unit에 5-9개의 mannose 잔기 (residue)를 가지는 형태로서 동물과 식물 모두에서 찾아 볼 수 있으며, 소포체 내에서 올리고당 전구체 (oligosaccharide precursor)로부터 glucose 및 mannose 잔기가 일부 제거되어 형성된다.

대부분의 분비되거나 세포 표면에 존재하게 되는 당단백질에 부착된 *N*-glycan은 complex type 을 형성한다. Complex type *N*-glycan은 골지체로 이동하여 high-mannose type *N*-glycan으로부터 다양한 당변형에 관여하는 효소에 의하여 만들어진다. 식물이나 동물 모두 complex type *N*-glycan은 core structure의 α -mannose unit 에 하나 또는 두 개의 GlcNAc 잔기를 가진다. 하지만, 식물의 경우 complex type *N*-glycan은 core structure의 GlcNAc 및 β -mannose에 $\alpha(1,3)$ -fucose와 $\beta(1,2)$ -xylose 잔기가 결합되어 있는 형태로서 식물에 주로 특이적으로 존재하며, 동물과 인간의 경우에는 GlcNAc에 $\alpha(1,3)$ -fucose 대신에 $\alpha(1,6)$ -fucose가 결합되어 있으며 xylose가 없는 *N*-glycan 형태를 나타낸다 (Priem et al. 1993; Fitchette et al. 1994). 또한 core structure의 말단 GlcNAc unit에 $\alpha(1,4)$ -fucose 및 $\beta(1,3)$ -galactose 잔기가 결사슬을 이루어 연결되어 있는 한층 더 복잡한 형태의 complex biantennary antennary type의 식물 *N*-glycan이

존재한다 (Fitchette et al. 1997; Melo et al. 1997; Fitchette et al. 1999; Balen et al. 2006).

Paucimannosidic type *N*-glycan은 식물에만 존재하는 특이적 *N*-glycan 구조로서 인간과 동물에서는 발견되지 않는다. 이들 *N*-glycan 은 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 또는 $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ 에 위치하고 있는 β -mannose 잔기 및 GlcNAc에 $\beta(1,2)$ -xylose와 $\alpha(1,3)$ -fucose 잔기가 결합되어 있는 형태를 이루고 있다. 이와 같은 형태의 *N*-glycan 구조는 대부분의 식물 당단백질에 존재하는 것으로 확인되며, 전형적으로 액포에서 존재하고 있는 당단백질에서 발견되는 것으로서 typical vacuolar type *N*-glycan으로 일컫는다 (Ashford et al. 1987; D'Andrea et al. 1988; Capon et al. 1990).

분비 당단백질은 위에서 언급한 당화과정에 의해 소포체에서 시작하여 만들어진 high-mannose type 당구조를 기초로 골지체에 이르러 다양한 complex-type oligosaccharide로의 성숙된 당구조를 완성하게 되고 최종적으로 당단백질이 세포막밖으로 분비되거나 막단백질의 경우는 세포막에 최종적으로 위치하게 된다.

식물 시스템을 이용한 항체의 생산

현재 생명공학산업에서는 인간 및 동물에서 발병하는 질병에 대한 진단 및 치료에 널리 사용되는 면역단백질인 항체를 생산하기 위하여 주로 미생물, 곤충 및 동물 세포 배양 시스템을 이용하고 있다 (Breedveld 2000; Ma et al. 2003; Ko et al. 2005). 박테리아를 이용한 미생물 발현시스템은 빠른 시일 내에 다량의 단백질 생산이 가능하다는 장점은 있으나 번역 후 당화가 이루어져야 활성을 갖게 되는 대부분의 의료용 당단백질의 경우, 당화시킬 수 있는 능력을 갖고 있지 않아 최종적으로 생리활성을 지니지 못한 단백질을 발현하게 된다 (Miele 1997). 또한, 동물세포 배양시스템은 번역 후 변형이 필요한 당단백질 및 항체 등의 생산에 주로 사용되고 있으나 고가의 생산비용이 요구되는 단점을 갖고 있고 동물세포 내의 인수공통병원체 2차 감염 위험이 존재할 수 있어 새로운 대체 생산시스템의 개발이 필요하다 (Bakker et al. 2001; Ko et al. 2005).

기존 생산시스템에 대한 대체방법으로 식물 시스템을 활용한 단백질 생산기술에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 위에서 언급한 바와 같이 식물 시스템은 동물과 유사한 번역 후 변형 과정 (posttranslational modification)에 의하여 미생물에서 생산이 불가능한 고부가가치의 의료용 당단백질 생산이 가능하며, 식물 biomass의 증감을 자유자재로 할 수 있고, 생산비용을 획기적으로 절감할 수 있기 때문에 기존의 동물이나 미생물의 생산시스템이 갖고 있는 여러 단점들을 보완하고 식물의 장점을 이용한 미래의 단백질발현기술로 발전할 수 있다 (Doran 2000;

Gomord et al. 2005). 특히, 인간유래 질병의 진단이나 치료용으로 쓰이는 단일항체의 경우 최근 식물체를 이용한 발현연구가 활발히 진행되고 있다 (Ko et al. 2003; Brodzik et al. 2006; Jamal et al. 2009). 하지만 이러한 장점을 갖고 있는 식물발현시스템이라 하더라도 식물고유의 당화과정인 인간유래 당단백질인 항체의 당구조를 식물특이적으로 변형시킬 수 있는 문제점을 갖고 있다. 다시 말해서, 식물유래 항체의 당 구조가 인체나 포유동물 유래의 당 구조와는 상당히 다르기 때문에 당구조의 인간화를 유도하지 못할 경우 식물체를 이용한 항체생산에 대한 상업화 기술개발은 어려울 수 있다 (Faye et al. 1989; Jefferis et al. 1998). 때문에 식물의 당화과정을 인간화하기 위한 연구가 최근 이루어지고 있다. 인체나 포유동물 유래의 항체에는 fucose가 $\alpha(1,6)$ 결합으로 연결되어 있는 반면 식물 유래 항체에는 $\alpha(1,3)$ 결합으로 연결되어 있어 식물 특이적 fucose를 제거해야 한다. 특히 암 치료를 위한 단일항체를 생산하기 위해서는 무엇보다도 식물이나 동물 세포에서 생산한다 하더라도 항암활성을 그대로 유지하여야 한다. 더 나아가 항암활성을 높일 수 있도록 단백질 및 당 구조를 변형시키려 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 항체의 항암활성에 주로 영향을 주는 것은 암세포를 특이적으로 인지할 수 있는 항체-항원 반응과 면역세포를 유도하여 암세포를 괴멸시키는 ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity)활성 두 가지가 있다. 후자의 경우 항체의 당구조가 $\alpha(1,6)$ -fucose가 존재하지 않을 경우 오히려 Fc와 Fc receptor 간의 유도력을 증가시킬 수 있다. 때문에 식물에서의 경우 $\alpha(1,3)$ -fucose를 제거하는 대신 $\alpha(1,6)$ -fucose를 N-glycan 구조에 넣을 필요가 없다. 이 이외에도 항암활성에는 직접적으로 영향을 주지는 않지만 항체의 안정성에 중요한 sialic acid나 galactose의 존재가 필요하다. Sialic acid는 식물 N-glycan에는 존재하지 않는 당 residue 이다. 최근 식물에도 sialylation을 위한 당화과정의 경로가 존재한다는 보고가 있어 sialic acid를 terminal N-glycan 에 부착하기 위한 연구를 지속적으로 진행해 오고 있다. 하지만 식물세포 내의 sialylation을 위한 당화과정 자체뿐만 아니라 sialic acid에 대한 전구물질 또한 중요한 요소이기에 이에 대한 연구 또한 필요하다 (Shah 2003).

식물 유래 치료용 항체 생산을 위한 기술적 고려

식물에서 치료용 항체를 발현할 수 있는 식물생명공학 기술이 있으나 낮은 단백질의 발현을 때문에 아직까지도 산업화를 위한 어려움이 있다. 일반적으로 식물에서 치료용 단백질을 생산할 경우 대부분 계속적으로 발현되는 cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) promoter를 이용하게 되는데, 이 경우 치료용 단백질은 전체 용해 단백질 (total

soluble protein: TSP)의 0.0001~0.1% 정도의 낮은 발현을 보인다. 이와 같은 문제점은 유전자의 코돈 (codon) 최적화 (Kozziel 1996), 적절한 inducible promoter 의 개발 및 고발현 promoter 의 적용 (Ma et al. 1995; De Wilde et al. 2000; Ko et al. 2003), 세포 내 미세소기관으로의 단백질 축적 (Conrad and Fiedler 1998), 혹은 엽록체 형질전환 (Ruf et al. 2001; Daniell 2002) 등의 기술을 이용하여 치료용 단백질의 발현을 및 생산수율을 증폭시킬 수가 있다.

치료용 항체의 식물세포 내에서 세포외부의 분비는 단백질 분비과정에 관련된 신호 펩타이드 (signal peptide: SP)에 의해서 소포체 내로 들어가 시작되며, 소포체에서 folding 과 assembly 및 당화과정이 이루어진 후, 단백질이 소포체 머무름 신호 KDEL signal peptide (ER retention signal) 나 다른 세포소기관으로 이동시키는 신호가 없으면 골지체로 이동되어 외부로 분비된다 (Fig. 2) (Kermode 1996). 식물세포의 소포체 내에 단백질을 머무르게 KDEL signal peptide를 항체 중쇄의 C-terminal에 부착하여 소포체에 축적시키는 경우 항체의 생산량이 10-100배 정도 증가하게 된다 (Conrad et al. 1998; Ko et al. 2003; Tekoah et al. 2004).

앞서 살펴보았듯이 식물단백질의 당단백질이 N-당화 부위에 부착되는 xylose와 fucose 당은 인간에 투여 시 allergy 반응을 유발하는 주요 항원으로서, 식물 유래의 치료용 단백질이 임상에서 사용되기 위해서는 면역학적으로 과민반응을 일으키지 않게 하는 전략이 필요하다 (Fig. 2). 이러한 allergy 유발 원인인 xylose와 fucose 를 동시에 제거할 수 있는 방법은 치료용 당단백질인 항체를 소포체에 머물게 하여 더 이상 복잡한 당이 부착되지 않게 하거나 골지체 내 xylosyltransferase나 fucosyltransferase와 같은 당화 관련 효소의 발현을 억제하는 방법 등이 있다 (Lerouge et al. 1998). 부가적으로 식물 특이적 glycan에 $\beta(1,4)$ -galactose를 추가하게 되면 xylose나 fucose가 붙게 되는 것을 억제할 수 있다 (Strasser et al. 2004). 최근에는 항원에 특이적으로 작용하는 부분인 항체의 중쇄와 경쇄의 가변부위 (variable region) 만을 폴리펩타이드 (polypeptide) linker로 연결한 scFv (single chain variable fragment)와 Fc 지역만을 제외한 나머지 부분을 포함하는 Fab (antigen binding fragment)를 제작하여 식물 유래 치료용 단백질의 당구조에 의한 면역부작용을 제거하기 위해 항체 단백질의 구조 중 필요한 부분만을 발현하기도 한다.

결론

식물을 이용하여 다양한 치료용 단백질뿐만 아니라 인간질병에 대한 면역치료용 항체를 생산할 수 있는 식물 발현시스템이 상업적으로 경쟁력을 가질 수 있을지는 아직 불분명하다. 하지만, 식물 시스템을 이용한 치료용 항체의 생산은 경제적으로 이득이며, 기타 미생물이나 포

유동물 발현 시스템과 비교 시 인간에게 감염되는 병원균이 결여되어 있어 안전하다는 장점을 가지고 있다. 이러한 의료용 항체를 생산하는 식물발현시스템개발을 위한 연구를 계속 진행해 나아간다면 저렴한 생산비용으로 안전한 식물유래 치료항체를 대량 생산할 수 있을 것으로 본다. 식물생명공학기술을 이용한 항체발현식물개발은 국내 첨단 농업 기술의 발전, 농가 소득 증대, 국내 의약품 개발 및 식물생명공학의 국제 경쟁력 강화와 더불어 저렴한 치료용 항체 생산을 통한 환자의 치료비 절감에 있어서도 많은 사회적 기여가 있을 것으로 본다.

사 사

이 논문은 2008년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

인용문헌

- Armour, KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM (1999) Recombinant human IgG molecules lacking Fc-gamma Receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol* 29:2613-2624
- Ashford DA, Dwek RA, Welply JK, Amatayakul S, Homans SW, Lis H, Taylor GN, Sharon N, Rademacher, TW (1987) The β -1 \rightarrow 2-D-xylose and α -1 \rightarrow 3-L-fucose substituted N-linked oligosaccharides from *Erythrina cristagalli* lectin. *Eur J Biochem* 166:311-320
- Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, Gomord V, Elbers I, Stevens LH, Jordi W, Lommen A, Faye L, Lerouge P, Bosch, D (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2899-2904
- Balen B, Krsnik-Rasol M, Zamfir AD, Milo J, Vakhrushev SY, Peter-Katalini J (2006) Glycoproteomic survey of *Mammillaria gracillia* tissues grown in vitro. *J Proteome Res* 5:1658-1666
- Breedveld FC (2000) Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* 355:735-740
- Brodzik R, Glogowska M, Bandurska K, Okulicz M, Deka D, Ko K, van der Linden J, Leusen JH, Pogrebnyak N, Golovkin M, Steplewski Z, Koprowski H (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
- Cabanes-Macheteau M, Fitchette-Lainé AC, Loutelier-Bourhis C, Lange C, Vine ND, Ma JK, Lerouge P, Faye L (1999) N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology* 9:365-372
- Capon C, Piller F, Wieruszkeski JM, Leroy Y, Fournet B (1990) Structural analysis of the carbohydrate chain isolated from jacalin lectin. *Carbohydr Res* 199:121-127
- Conrad U, Fiedler U (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol Biol* 38:101-109
- Conrad U, Fiedler U, Artsaenko O, Phillips J (1998) High-level and stable accumulation of single-chain Fv antibodies in plant storage organs. *J Plant Physiol* 152:708-711
- D'Andrea G, Bouwstra B, Kamerling JP, Vliegenhart JFG (1988) Primary structure of the xylose-containing N-linked carbohydrate moiety from ascorbic acid oxidase of *Cucurbita pepo* medullosa. *Glycoconj J* 5:151-157
- Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat Biotechnol* 20:581-586
- De Wilde C, Van Houdt H, De Buck S, Angenon G, De Jaeger G, Depicker A (2000) Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant Mol Biol* 43:347-359
- Doran P (2000) Foreign Protein Production in Plant Tissue Cultures. *Current Opinion in Biotechnology* 11:199-204
- Faye L, Johnson KD, Sturm A, Chrispeels MJ (1989) Structure, biosynthesis, and function of asparagine-linked glycans on plant glycoproteins. *Physiologia Plantarum* 75:309-314
- Fitchette AC, Gomord V, Chekkafi A, Faye A (1994) Distribution of xylosylation and fucosylation in the plant Golgi apparatus. *Plant J* 5:673-682
- Fitchette AC, Gomord V, Cabanes M, Michalski JC, Saint Macary M, Foucher B, Cavelier B, Hawes C, Lerouge P, Faye L (1997) N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells. *Plant J* 12:1411-1417
- Fitchette AC, Cabanes-Macheteau M, Marvin L, Martin B, Satiat-Jeunemaitre B, Gomord V, Crooks K, Lerouge P, Faye L, Hawes C (1999) Biosynthesis and immunolocalization of Lewis a-containing N-glycans in the plant cell. *Plant Physiol* 121:333-344
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4803-4807
- Gomord W, Chamberlain P, Jefferis R, Faye L (2005) Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends in Biotechnol* 23:559-565
- Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A, Hoffman N (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223:496-498
- Jamal A, Ahn MH, Song M, Oh EY, Hong J, Choo YK, Ko K, Han YS, Oh SH, Van Der Linden J, Leusen JH, Ko K (2009) Biological Validation of Plant-Derived Anti-Human Colorectal Cancer Monoclonal Antibody CO17-1A. *Hybridoma* 28:7-12
- Jefferis R, Lund J, Pound JD (1998) IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev* 163:50-76
- Ko K, Steplewski Z, Glogowska M, Koprowski H (2005) Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7026-7030

- Ko K, Koprowski H (2005) Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Res* 111:93-100
- Ko K, Tekoah Y, Rudd PM, Harvey DJ, Dwek RA, Spitsin S, Hanlon CA, Rupprecht C, Dietzschold B, Golovkin M, Koprowski H (2003) Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8013-8018
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54:631-664
- Kermode AR (1996) Mechanisms of intracellular protein transport and targeting in plant cells. *Crit Rev Plant Sci* 15:285-423
- Koziel MG, Carozzi NB, Desai N (1996) Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol Biol* 32:393-405
- Kuby J (1997) *Immunology*. Third Edition. W. H. Freeman and Company, New York. 664.
- Kusnadi, AR, Evangelista RL, Hood EE, Howard J, Nikolov ZL (1998) Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol Progress* 14:149-155
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Laine AC, Gomord V, Faye L (1998) N-glycosylation biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol* 38:31-48
- Ma JK, Chikwamba R, Sparrow P, Fischer R, Mahoney R, Twyman RM (2005) Plant-derived pharmaceuticals-the road forward. *Trends Plant Sci* 10:580-585
- Ma JK, Drake PM, Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4:794-805
- Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268:716-719
- Ma JKC, Vine ND (1999) Plant expression systems for the production of vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 236:275-292
- Melo NS, Nimt M, Conradt HS, Fevereiro PS, Costa J (1997) Identification of the human Lewis(a) carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (*Vaccinium myrtillus* L.). *FEBS Lett* 415:186-191
- Miele L (1997) Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *Trends Biotechnol* 15:45-50
- Pen J (1996) Comparison of host systems for the production of recombinant proteins. In *Transgenic plants: a production system for industrial and pharmaceutical proteins*. John Wiley and Sons Ltd 149-167
- Priem B, Gitti R, Bush CA, Gross KC (1993) Structure of ten free N-glycans in ripening tomato fruit. *Plant Physiol* 102:445-458
- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19:870-875
- Shah MM, Fujiyama K, Flynn CR, Joshi L (2003) Sialylated endogenous glycoconjugates in plant cells. *Nat Biotechnol* 21:1470-1471
- Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG (2001) High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 276:6591-6604
- Strasser R, Altmann F, Mach L, Glössl J, Steinkellner H (2004) Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking beta1,2-linked xylose and core alpha1, 3-linked fucose. *FEBS Lett* 561:132-136
- Tekoah Y, Ko K, Koprowski H, Harvey DJ, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM (2004) Controlled glycosylation of therapeutic antibodies in plants. *Arch Biochem Biophys* 426:266-278