

제 3 차 년 도  
최 종 보 고 서

## 기능성 단백질 개량 기술 개발

### Development of Protein Engineering Technology

1995. 8

연구 기관

한국과학기술연구원  
부설 생명공학연구소

과학기술처

# 제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 선도기술개발사업 “기능성 단백질 개량기술 개발”과제의 제3차년도 중과제 보고서로 제출합니다.

1995. 5. 8

주관연구기관명 : KIST 생명공학연구소  
중과제 책임자 : 함 경 수(생명공학연구소 책임연구원)  
세부과제책임자 : 김 길 룡(생명공학연구소 책임연구원)  
고 인 영(유한양행 중앙연구소 책임연구원)  
홍 효 정(생명공학연구소 선임연구원)  
김 희 철(녹십자 중앙연구소 소장)  
임 동 수(생명공학연구소 선임연구원)  
최 용 경 (생명공학연구소 선임연구원)  
김 길 현(이화여자대학교 교수)  
박 종 면(목암연구소 선임연구원)  
성 영 철(포항공과대학 교수)  
류 왕 식(LG화학 기술원 책임연구원)

# 요 약 문

## I. 제 목

기능성 단백질 개량기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

단백질이란 특이성을 가지고 있는 생화학적 반응을 촉매하며 모든 세포와 조직에서 구조적 요소 일 뿐 아니라 인식 및 조절 등의 모든 생명 과정에서 중추적 역할을 담당하는 물질이다.

지난 40여년 동안 단백질의 구조와 기능에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으며 이 분야에 대한 커다란 발전을 가져왔다. 예를 들면 1950년대 초 인슐린의 아미노산 서열이 보고되었고, 60년 myoglobin의 3차구조가 밝혀졌으며 그 이외 많은 단백질의 구조가 밝혀졌다. 또한 단백질의 기능에 관련된 특정 아미노산의 역할을 결정할 수 있는 다양한 방법들도 개발되어 왔다. 최근 신기능을 가진 단백질의 설계와 창출에 가장 눈부신 기여를 한 기술로 유전자재조합 기술을 들 수 있다. 이 기술의 덕분으로 아미노산 잔기의 치환(substitution), 삭제(deletion), 혹은 삽입(insertion) 등과 같은 단백질의 아미노산 서열의

임의변경은 물론, hybrid 단백질의 제조 및 새로운 단백질을 위한 유전자 재조합까지도 가능케 되었다. 뿐만 아니라 이와 같은 기술은 의학적, 산업적으로도 응용되어 여러 중요한 단백질 혹은 펩타이드의 대량생산에 기여하였다.

유전공학기술의 발전과 단백질의 구조와 기능간의 관계에 대한 정보가 축적되면서 새롭게 대두된 단백질 공학기술은 단백질의 구조-기능간의 관계에 관한 지식에 기초를 두고 새로운 단백질을 설계하며, 설계된 단백질을 유전 공학적 방법을 이용하여 대량생산하고자 하는 차세대 생명공학기술이다.

본 과제에서는 생체내의 다양한 기능을 하고 있는 단백질 중에서 주로 면역반응에 관여하는 항원 및 항체 단백질을 대상으로 차세대의 백신 및 면역치료제의 개발에 그 목표를 두고 있다. 이와 같은 사업은 새로운 의약품의 창출로서 경제적, 사회적 및 기술적 측면에서 그 파급효과가 크며, 또한 학문적으로도 국내에 단백질 공학기술을 정착시킴으로서 생명공학기술의 개발 및 보급에 크게 기여할 것으로 전망된다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

#### ● 제 1 세부과제 : 합성 펩타이드 백신 개발 기술연구

B형 간염 바이러스의 표면항원(HBsAg)중 면역원성이 높은 preS2

부위에 대한 B- 및 T-세포 epitope 펩타이드 및 MAP(Multiple Antigenic Peptide)을 합성하고, 면역보조제로 리포솜을 사용하여 다음과 같은 연구들을 수행하였다.

1. B, T 항원결정기 연결의 일반적인 방법을 확립하기 위해 B, T-세포 epitope사이의 연결체로 여러 가지 proteolytic enzyme site나 리포솜을 이용하고 면역원성을 측정하였다.

2. 펩타이드 백신의 면역원성을 증진시키기 위해 항원 부위에 면역원성 향상기능기인 HCQRPR, GLF 등을 덧붙여 합성하고, 항체 생성정도를 확인하였다.

3. 합성펩타이드의 면역원성 향상을 위한 보조제로서의 리포솜에 대한 연구를 수행하였다. 리포솜의 조성과 항원 투여량 변화에 따른 항체 생성정도의 차이를 비교하였고, T세포 epitope을 여러 가지 사용하여 항체생성정도를 비교하였다.

4. 수동 펩타이드 합성법에 의해 동시에 여러 종류의 linear 펩타이드 및 MAP들을 합성하여 항원성, 면역원성 및 구조 연구에 사용하였다.

5. T-B, B 및 T 서열을 지닌 펩타이드들은 T-B 및 B 펩타이드

단독 또는 B와 T를 동시에 BSA에 결합시킨 후 Balb/c 마우스에 면역시킨 후 M-HBsAg에 의한 boosting 효과를 조사하였다.

6. MAP의 항원성을 정재 ELISA 및 indirect ELISA 법으로 조사하였다.

7. N-말단 잔기들이 B 세포 항원결정기의 구조에 미치는 효과를 N-말단이 sequential하게 절단된 펩타이드나 127번째 아미노산인 phe를 여러 아미노산으로 치환시킨 펩타이드들을 이용하여 조사하였다.

8. 2차년도 보고서에서 B 세포 epitope중 가장 중요하게 나타난 137 arg를 gln으로 치환시켰을 때 이루어지는 구조를 molecular modeling 하였다.

## ● 제 2 세부과제 : 합성펩타이드의 항원성 면역원성 연구

### 1. ELISA system의 개발

3차년도에서는 1차 및 2차년도에 합성한 synthetic peptide 중 3종을 택하여(SPC-16, SPC-22, SPC-25) 사용하였으며, 이들은 각각 C형 간염바이러스의 capsid 부위에서 항원성이 높은 부분을 선택하여 합성한 펩타이드이다.

합성 펩타이드를 면역시켜 얻은 항펩타이드 항체를 측정하기 위하



여 ELISA 방법을 사용할 수 있는데, 펩타이드의 경우 native 항원과 달리 일반적으로 그 길이가 짧아 ELISA 방법에 의해 항펩타이드 항체와의 반응을 측정할 때 blocking agent, pH, 펩타이드 coating 농도, 세척액, 항펩타이드 항체의 희석농도 등에 의해 영향을 받으므로 이에 대한 연구를 수행하였다.

## 2. 항펩타이드 항체의 교차반응성 연구

본 연구에서는 운반체 단백질로서 KLH나 BSA를 사용하였으며 펩타이드와 운반체 단백질을 연결하기 위한 conjugation 방법으로는 MBS(M-maleimido benzoyl-N-hydroxy succinimide ester) 와 glutaraldehyde를 사용하여 coupling 시켜 면역하였다. 펩타이드를 면역시켜 얻은 항펩타이드 항체는 native 항원에 의하여 생성된 항체와는 달리 항원 항체 결합 반응이 특징적으로 나타날 수가 있다. 특히, 펩타이드 백신 개발시 펩타이드 면역에 의하여 생성된 항펩타이드 항체가 native 항원을 인식하고 반응할 수 있는 것이 중요하므로, 이에 대한 연구를 수행하였다.

또한, 펩타이드를 항원으로 하여 항펩타이드 항체와의 반응성을 측정할 때, 펩타이드 coating buffer에 의하여 항펩타이드 항체의 결합성이 영향을 받으므로 펩타이드 coating시에 EDAC를 사용하여 펩타이드를 직접 microplate에 coupling 시켰을 대의 항펩타이드 항체와 펩타이드 항원과의 반응성을 검토하였다.

### 3. Immunoliposome 연구

합성 펩타이드를 사용하여 백신을 개발하기 위하여는, 펩타이드 자체가 가지는 낮은 항원성 및 면역원성을 해결하기 위하여 adjuvant를 사용하게 되는데, 일반적으로 사용하는 adjuvant는 비교적 독성이 강하여 인체에 적용에는 문제점이 있어 그 사용이 제한되어 있다. 이러한 이유에서 liposome을 이용하여 합성펩타이드의 운반체로서 역할과 adjuvant 효과를 동시에 해결하려는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 본 연구에서는 liposome의 기본연구로서, 기존의 수용액 상태의 liposome이 가지는 단점을 보완하기 위한 방법으로서 proliposome에 대한 연구를 2차년도에 이어 계속하였다. Proliposome은 기존의 수용액 상태의 liposome이 가지는 단점인 응집, 침강, 융합, 인지질 분해 문제 등의 물리 화학적인 불안정성을 개선할 수 있는 장점을 가지고 있는데, 본 연구에서는 egg의 phosphatidyl choline을 이용하여 proliposome을 제조한 후 proliposome의 멸균 효과 및 유동성 변화에 대하여 실험을 하였으며, 전자현미경 구조분석으로 확인하였다.

### 4. "Built-in adjuvant" 연구

새로운 개념의 adjuvant로서 관심이 집중되고 있는 "Built-in adjuvant"는 합성하는 펩타이드 내에 IL-1이나 CSF 등의 immune stimulatory molecule의 특정한 sequence를 삽입하여 동시에 합성하여 사용하는 것으로, 3차년도에서는 2차년도에 합성한 SPE17IL 펩타이드를 사용하여, thymocyte 증식효과를 측정함으로써 세포성 면역반응



촉진 효과를 관찰하였다. SPE17IL은 immune stimulatory sequence로서 interleukin-1의 nonapeptide(VQGEESNDK)를 포함하고 있으며, SPE17 단독 또는 SPE17과 nonapeptide를 각각 섞어서 넣은 것과 비교하여 그 효과를 측정하였다.

### ● 제 3 세부과제 : 인간화된 항체 개발기술 연구

1. 키메라 항체의 개발 및 특성연구
2. 인간화된 항체의 개발 및 특성연구
3. 인간화된 항체의 모델링 및 항원-항체 상호작용기작 연구
4. 재조합 항체 생산세포주의 세포배양기술 연구

### ● 제 4 세부과제 : 재조합 항체의 대량생산기술 개발 연구

본 연구는 1992년부터 1995년까지 3개년 동안 수행되었으며, 해당기간인 3차년도에는 anti-S 재조합 항체를 생산하도록 유전자 조작된 CHO 동물세포(CS131A)를 분양 받아 이들의 대량배양에 필요한 최적의 배양조건 및 세포의 안정성을 확인하고, 생산효율이 높은 세포주를 동정하였다. 그 후 이들 세포를 무혈청 배양 조건에서 배양 및 정제하여 그 생산성을 검토하였으며, 또한 생산된 재조합 항체의 항원 결합성, 친화도 및 HBV 중화효과 등 원래 목적인 특성을 가지고 있는가를 확인하고 아울러 재조합 항체의 제품화에 앞서 생산단가 산출을 기본으로 하는 경제성 분석을 실시하였다.

### 1. 세포배양 조건의 확립

본 연구에서는 사용한 세포주는 유전공학연구소에서 유전자 재조합된 세포주로서 'S' epitope에 대한 키메라 항체를 생산하는 CS131A이었으나, 이 세포들을 배양하면서 재조합 항체를 효과적으로 정제하기 위하여 10% serum이 포함된 alpha MEM media 와 각종 Serum-free media에서 배양하면서 세포성장과 단클론 항체 생산정도를 비교함으로써 정치배양에 의한 대량생산 체재를 확립하였다.

### 2. 재조합 항체의 정제

배양이 끝난 무혈청 배지로부터 세포를 제거하고 분비된 단클론 항체를 농축하여 affinity chromatography법과 ultrafiltration 등의 단백질 정제 방법으로 재조합 항체를 정제하고 정제효율이 가장 높은 효과적인 방법을 결정하였다.

### 3. 재조합 항체의 항체가 및 중화효과 측정

재조합 항체의 항체를 RIA kit를 이용하여 측정하는 동시에 기존의 HBIG 다클론 항체와 그 값을 비교 분석하였으며, 만성 B형간염 환자로부터 Hepatitis B virus를 분리하여 간암세포인 Hep G2에 감염 여부를 확인한 후 재조합 항체와 각종 항체를 virus에 반응시키고 감염을 중화시키는 효과가 있는지 조사하였다.

#### 4. 대량 생산에 따른 경제성 분석

동물세포의 정치배양을 근간으로 하는 재조합 항체의 대량배양체  
계에서 소요되는 생산 재료비를 산출한 후 이를 기초로 최종생산 단  
가를 잠정적으로 결정하였으며, 여기에 재조합 항체의 중화효과를 고  
려시켜 기준은 HBIG 다클론 항체의 판매가와 비교함으로써 재조합  
항체의 경제성 및 상업화 가능성을 타진하였다.

### ● 제 5 세부과제 : 생복합 면역백신 개발기술 연구

1. 간염 B형 및 C형 바이러스(HBV, HCV)와 헤르페스 심플렉스  
바이러스 타입 2(HSV-2)의 항원유전자가 도입된 재조합 아데노 바이  
러스의 제조 및 특성 규명.

2. 한국형 로타바이러스의 분리 및 특성 규명(위탁).

3. Threonine 영양요구성 대장균을 complementation 시키는 클론  
을 찾고 염기서열을 밝힌다. 재조합 plasmid를 제조하여 대장균에서의  
발현을 EIA로 확인한다. rMS를 mouse에 주사하여 항체의 특성을 규  
명하고 epitope을 검색한다. 마우스 strain ICR suckling mouse와  
DDY suckling mouse를 이용하여 바이러스 항원의 생물학적, 혈청학  
적 특성을 확인한다.

## ● 제6 세부과제: T-임파세포 활성화 유도 면역치료제개발기술연구(I)

1. T세포에 의해 인식되는 항원부위의 검색법 개발
2. 검색된 항원부위의 면역학적 효능 검정
3. Epitope peptide의 합성
4. 합성 peptide에 의한 CTL의 유도 및 CTL 활성화 측정
5. Hepatitis B virus의 유전자 제조 및 발현
6. 정보수집 및 관련기술 검토

## ● 제7세부과제: T-임파세포 활성화 유도 면역치료제개발기술연구(II)

본 연구과제의 1단계(92~94)중 3차년도(1994년)의 연구 내용은 HCV의 CTL epitope peptide의 결정에 관한 것으로 HCV full sequence에서 찾아낸 3,000 여개의 peptide 중에서 computer 분석을 통해 HLA-A2.1에 결합 가능성이 높은 peptide를 선정하고 선정된 peptide를 automatic peptide synthesizer 및 multipin synthesis kit를 이용해 합성하고, 합성된 peptide를 flow cytometry를 이용한 peptide binding assay를 통해 MHC class I(HLA-A2.1)에 결합하는 정도를 비교 분석하여 실제로 HCV에 감염된 환자의 PBML을 사용한 CTL functional assay를 수행하여 최종적으로 CTL epitope peptide를 결정하는 것이다.

CTL 유도 adjuvant 개발에 관한 것으로 2차년도에서 확립된 리포솜 system 이외의 adjuvant로 ISCOM과 squalene/tween 80의 제조방



법 확립과 mouse system을 이용하여 CTL 유도효과의 최적조건을 확립하는 것이다.

또한 최종적으로 결정된 CTL epitope peptide와 최적조건의 adjuvant의 in vivo test를 위한 동물모델의 개발을 위해 HLA-A2.1 gene cloning을 하는 것이다. HLA-A2.1 gene cloning은 T2 cell에서 mRNA를 추출하여 HLA-A2.1에 대한 specific한 부분을 증폭하여 HLA-A2.1의 PCR product를 얻은 것이다.

## ● 제 8 세부과제 : 유전자 백신 개발 연구

1. 생체내 직접 유전자를 전달하는 방법 중 가장 효율적인 것으로 입증된 intramuscular injection과 gene gun 방법을 확립한다.
2. HCV와 HIV-1에 대한 유전자 백신 벡터를 개발하고 그 항원성을 조사한다.
3. 유전자 백신의 모델 시스템으로써 I-MCV에 대한 유전자 백신 벡터를 개발하고 이 벡터의 발현 및 항원성을 조사한다.

## ● 제 9 세부과제 : 재조합 항원단백질 백신의 면역 보조제 개발 연구

현재 면역 보조제로는 Aluminum Hydroxide(이하 Alum)외에 선진국에서 신규 면역보조제를 개발 중에 있으며 이들 중에는 Saponin계, oil emulsion계, Monophosphoryl lipid A계, Cytokines계 등이 있다. 이와 같은 면역보조제들은 각각 면역 보조제로서의 활성, 안정성



및 유용성 등의 면에서 일부 바람직하지 않은 단점을 가지고 있다. 따라서 새로운 신규 면역보조제의 개발은 절대 필수적이며, 이러한 측면에서 현재 선진국에서 활발하게 개발진행중인 것들에 대한 특별한 관심을 가지고 실험을 수행하였다. 이들 중에는 특히 Saponin계 면역보조제와 oil emulsion계 면역보조제 등이 속하며, 이로부터 새로운 신규 면역보조 성분을 개발하려 하고 있다.

#### IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### ● 제 1 세부과제 : 합성펩타이드 백신 개발 기술 연구

1. preS2 항원의 경우(120~145)의 서열은 T, B세포의 항원결정기의 연속으로 항체생성을 유도할 수 있으나 B-T의 순서로 연결한 경우에는 항체생성능이 없었다. B, T 서열 사이에 proteolytic enzyme cleavage site를 삽입한 경우에도 항체가 생성되지 않았다. 또한 T, B-세포 항원결정기를 결합시켰을 경우나 B-T의 순서로 배열된 경우, 항체 생성을 향상시키지 못하였다. 이상의 결과로 보아 T-, B-세포 항원결정기가 모두 존재해도 배열순서에 따른 구조적인 변화 등이 있으므로 면역원성에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

2. 펩타이드 항원의 면역원성을 증진시키기 위해 면역원성 향상 기능을 갖는 아미노산 서열을 T-B 항원(preS2 120~145)에 덧붙여 그

효과를 확인 중에 있다. 면역원성을 향상시키는 아미노산 서열로는 macrophage 결합활성을 갖는 펩타이드들과 IL-1의 활성부위를 선택하였다.

3. 리포솜의 조성을 변화시킴으로써 항원의 면역원성을 향상시키기 위하여 음전하를 띄는 인지질(PA, PI, PG, PS)을 함유시켜 리포솜을 제조하였다. 펩타이드 항원은 첨가된 종류에 따라서 영향을 받는 것으로 나타났으며 특히 PS가 함유된 리포솜의 경우, 항체생성이 크게 향상되었다. 그러나 HBsAg 전체단백질 항원의 경우엔 인지질의 종류에 의한 면역원성 향상이 크게 나타나지 않았다. 여러 종류의 조성을 갖는 리포솜에 결합된 펩타이드의 항원성을 competitive ELISA를 통하여 조사하였는데, 각 조성의 리포솜에 결합된 펩타이드들 간에 항원성의 차이가 거의 나타나지 않았다.

4. 리포솜-펩타이드 항원의 투여량에 따른 항체 생성정도를 비교한 결과, 투여된 양이 증가할수록 항체도 증가하였다. CFA를 면역보조제로 사용한 경우에는, 투여량과 항체생성정도가 직선관계를 갖지 않고 100 $\mu$ g 이상에서 급격히 증가하였다.

5. HBsAg중 또 다른 T세포 epitope으로 알려진 preS2 151-174부분을 B세포 epitope에 연결하여 면역원성을 조사하였다. T세포 epitope로는 N-말단에서 8개의 아미노산을 제거한 159-174와 151-

174 두 종류를 사용하였다. T-세포 항원결정기로 159-174부분을 사용한 경우에는 면역보조제로 리포좀을 사용하였을 대만 항체가 생성되었고, 151-174를 사용한 경우나 CFA나, 리포좀 두 경우에 모두 항체를 생성시켰다. 항원결정기의 배열이 B-T의 순서인 경우에는 항체 생성이 저조하였다.

6. 면역보조제로 사용하는 리포좀의 안정성을 시험하기 위해 장기간 4℃와 상온에서 보관하며 흡광도와 리포좀의 크기를 비교하고 있다. 현재 30일이 경과한 상황에서 4℃와 상온에서 모두 안정성에는 큰 문제가 없는 것으로 나타났다.

7. 펩타이드-BSA 결합체로 면역시킨 Balb/c 마우스를 M-HBsAg로 boosting시킨 결과 4주후에 preS2에 대한 항체 생성이 개체 차이는 있지만 대부분 증가하였고(14/17 마우스), 이중 5개 개체는 90배 이상 증가되었다. 그러나 T 세포 항원결정기에 대한 영향은 나타나지 않고, 개체 차이에 의한 효과만 나타났다. 이 결과는 펩타이드-운반체 결합체가 백신으로서의 사용 가능성이 있음을 제시해 주는 것으로 이에 대한 연구가 더 필요하리라 사려된다.

8. MAP은 면역원성을 증가시키는 펩타이드로 알려져 있다. 합성된 MAP은 Tricine-SDS 전기영동 결과, 가지수가 많을 수록 분자량은 커졌으며, 거의 순수한 band가 나타났다. MAP에 대해 경쟁

ELISA를 시행한 결과, 가지수가 많아질수록 항원성이 감소되었다. 이는 MAP 가지간의 구조적인 방해 작용에 기인하는 것으로 여겨진다. 그러나 indirect ELISA시에는 가지가 많은 MAP이 항체와 더 높은 반응성을 나타냈는데, 이는 coating 효율이 증가에 기인한 것으로 여겨진다.

9. 구조적인 B세포 항원결정기를 감지하는 H8 mAb를 이용하여 N-말단의 효과를 sequential 하게 절단된 펩타이드와 127 phe이 치환된 펩타이드를 이용하여 조사한 결과, 잔기 125, 126, 127 및 129가 항원성에 중요하게 나타났다. p123~145/adr 펩타이드에 대해 127 phe를 치환시킨 결과 phe>Ile>glu>thr>ala>pro>lys 순서의 항원성을 나타내었다. 이 결과는 side 그룹의 소수성, 전하 및 크기가 항원성에 중요함을 제시해 준다. 이들 치환된 펩타이드의 CD 양상을 측정한 결과 항원성이 낮은 펩타이드가 구조적인 양상이 낮게 나타난다.

10. Molecular dynamics를 이용하여 p120~145/adr과 137 arg이 gln으로 치환된 펩타이드를 modeling한 결과 p120~145/adr에 비해 치환된 펩타이드의 B 세포 epitope 부위의 밀집도가 낮게 나타났다. 이 결과가 치환된 펩타이드의 항원성을 낮추는데 영향을 미치는 것으로 사려된다.



## ● 제2세부과제 : 합성펩타이드의 항원성 및 면역원성 연구

### 1. ELISA system 개발

#### 가. 합성펩타이드의 면역

1) ELISA system 개발을 위하여 2차년도에 합성한 합성펩타이드 (SPC-16, SPC-22, SPC-25)를 면역시켜 사용하였다.

2) 펩타이드 면역을 위하여는 펩타이드 단독 혹은 KLH나 BSA를 carrier protein으로 하여 conjugation 시켜 사용하였다.

#### 나. Blocking agent에 의한 효과

1) 항 펩타이드 항체 (anti-SPC16/KLH)의 측정시에 blocking agent의 영향을 측정한 결과, BSA에 대한 비특이적인 반응이 gelatin에 대한 비특이적 반응보다 높게 나타나, gelatin의 blocking agent로 사용하는 것이 효과적이었다.

이러한 결과를 다른 항 펩타이드 항체 (anti-SPC22, anti-SPC25)를 사용하였을때에도 유사한 양상을 보여, blocking agent에 대한 반응성은 합성펩타이드 자체가 가지는 면역성과는 무관한 것으로 추정되었다.

2) 또한, BSA를 carrier protein으로 사용하였을 때에도 동일한 결과는 관찰하였으며, 이러한 결과는 일반적으로 mouse 항 혈청이 가지는 blocking agent와의 반응성에 기인하는 것으로 추정하였다.



다. 합성펩타이드를 이용한 ELISA 조건 확립

1) 합성펩타이드를 항원으로 사용하여 microplate에 coating 할때의 농도조건에 대하여 실험한 결과 100 ng/well의 펩타이드가 비교적 효율적인 것으로 관찰되었다.

2) 합성펩타이드를 사용한 ELISA시 사용하는 세척액으로는 PBST를 사용하였을때가 비교적 background가 낮게 나타나 효과적이었다.

3) 항 펩타이드 항체의 희석 농도는 1:500의 희석비율이 효과적인 것으로 관찰되었다.

4) 이상에서의 결과를 토대로 하여 합성펩타이드를 이용하여 항 펩타이드 항체를 측정하기 위한 ELISA 조건을 확립하였다.

## 2. 펩타이드 항체의 교차반응성 연구

가. 항 펩타이드 항체와 재조합 항원과의 반응성

1) 항 펩타이드 항체를 이용하여 재조합 whole antigen (recombinant whole HCV antigen)과의 반응성을 측정한 결과, SPC16과 SPC25에 대한 항 펩타이드 항체가 재조합 HCV 항원과의 반응성이 높게 관찰되었다. 이와같은 결과에서 볼 때 SPC16이나 SPC25 합성펩타이드는 native 항원이 가지는 구조와 유사한 형태를 가지며, 생체내에서의 면역원성이 native whole antigen과 가까운 것으로 추정된

다.

나. 항 펩타이드 항체와 native whole antigen과의 반응성

1) 항 펩타이드 항체와 native whole antigen(HCV antigen)과의 반응성을 측정하기 위하여 HCV 감염 환자의 혈청을 사용하여 anti-SPC16항체와의 반응성을 측정하였다.

2) ELISA 법에 의하여 native whole antigen인 HCV항체 양성 혈청을 coating시 50mM EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride) 용액에 희석하여 coating 할때가 PBS를 사용할때에 비하여 anti-SPC16 항체에 대한 반응성이 증가하는 것으로 관찰되었다. 이와같은 결과는 합성펩타이드의 면역에 의해 생성된 항 펩타이드 항체가 native whole antigen과 결합 가능성이 있다는것을 제시하여 주었으며, 펩타이드 항원이 native 항원이 가지는 항원 구조를 형성하였기 때문인 것으로 추정하였다.

3) 또한, EDAC에 의한 결과가 항 펩타이드 항체와의 특이적인 반응에 의한 영향인 것을 확인하기 위하여 합성펩타이드(SPC-16)을 면역시킨 mouse의 혈청에 대하여 실험을 하였으며, 합성펩타이드(SPC-16)를 EDAC와 PBS에 희석하여 사용하였을 때 유의성 있는 차이가 나타나지 않는 것으로 보아 EDAC에 의한 반응성 촉진은 항 펩타이드 항체의 특이적 반응성과 관련하여 나타나는 것으로 추정하였다.

### 3. Immunoliposome의 제조 및 특성

#### 가. Proliposome의 제조

1) Proliposome의 제조는 2차년도에 확립된 방법과 동일하게 인지질로서 egg lecithin을 사용하고, 모델 약물로서 Propranolol hydrochloride를 사용하여 제조하였으며, Proliposome의 멸균효과 및 liposome 변환 후의 방출효과 등을 측정하였다.

#### 나. Proliposome의 $\gamma$ -ray 멸균 효과

1) Proliposome의 멸균효과 측정을 위하여 3차년도에는  $\gamma$ -ray에 의한 멸균효과를 측정, 비교하였다. Proliposome 제조후  $\gamma$ -ray를 각각 2.0Mrad, 2.5Mrad, 3.0Mrad의 조사선량으로 조사하여 멸균처리한 프로리포솜에 멸균증류수를 가하여 리포솜을 제조한 후 이를 미생물 배양 배지에서 배양하여 멸균 효과를 비교하였다. 그 결과,  $\gamma$ -ray 조사에 의하여 Proliposome이 효과적으로 멸균처리되는것을 확인하였다 (Table-1).

2) 또한,  $\gamma$ -ray 멸균 처리한 Proliposome에 물을 가하여 liposome으로 전환시켰을 때 효과적으로 전환되는것을 전자 현미경 사진으로 확인하였다.

#### 다. $\gamma$ -ray 멸균에 대한 Proliposome 유동성 변화

1) Proliposome에  $\gamma$ -ray로 멸균처리 ( 2.0, 2.5, 3.0Mrad) 한 후 Proliposome의 유동성을 측정한 결과, 멸균 처리에 의해서

Proliposome의 유동성에는 변화가 없는 것을 관찰하였다.

라. 프로리포좀의 멸균조작에 따른 방출 특성

1) 멸균조작에 의하여 Proliposome 제조시 사용한 모델 약물 (propranolol)의 방출 속도가 변화하는지를 비교하였다. 그 결과  $\gamma$ -ray로 멸균 시킨것과 멸균처리하지 않은 Proliposome 모두 모델약물의 방출에는 아무런 영향을 미치지 않는 것을 관찰하였다.

#### 4. "Built-in adjuvant" 연구

가. 펩타이드 합성 및 연구

1) Human Interleukin-1 (IL-1) sequence 중 immune stimulatory sequence로 알려진 nonapeptide (VQGEESNDK)를 포함하는 합성펩타이드로서 2차년도에 합성한 SPE17IL peptide를 사용하였다.

나. Thymocyte 증식 효과

1) SPE17IL, SPE17 및 SPE17+IL nonapeptide 각각의 항원에 대한 thymocyte 증식 효과를  $^3\text{H}$ -thymidine pulse 방법에 의해 측정한 결과 SPE17IL과 IL nonapeptide는 농도에 따른 thymocyte 증식 효과를 보였으며, control로서 사용한 SPE17의 경우에는 thymocyte 증식 효과가 현저하게 낮았다.



## ● 제 3 세부과제 : 인간화된 항체개발기술연구

### 1. 연구개발 결과

가. HBV의 S 및 preS2 표면 항원에 결합하는 키메라항체들의 개발 및 특성연구

1) 2차년도까지는 HBV의 표면항원인 S의 common "a" antigenic determinant 나 preS2에 결합하는 생쥐/사람 키메라 항체들을 생쥐 myeloma 세포에서 발현시켜 KR12H 및 H69K transfectoma세포주들을 제조하였고 그 키메라 항체들의 항원결합특성 · 친화도를 측정한 결과 parental 생쥐단일클론항체들과 동일한 친화도를 갖음을 확인하였다. 3차년도에서는 Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포에서 유전자증폭방법을 이용하여 발현시켜, 단위세포당 항체의 생산속도가 약  $80\mu\text{g}/10^6$  cells/day인 트랜스펙토마 세포주 CS131A를 개발하였다.

2) CS131A 세포주의 키메라 항체 생산성을 T75 flask에서 무혈청 배지 20ml를 넣고 4일동안 배양 상층액에 축적시킨 후 측정된 결과 약  $120\text{mg}/\ell$  이었다.

3) CS131A 세포주의 안정성을 50일간 조사한 결과 비교적 그 생산성이 안정함을 확인하였다.



4) 상기 키메라항체의 항원결합능력 및 친화도를 결정한 결과, parental 생쥐 단일항체와 동일함을 확인하였다.

5) CS131A 항체의 HBV 중화효과 : 키메라 항체의 HBV의 중화효과를 시험하기 위하여 사람 간세포를 primary culture하고 B형 간염바이러스를 감염시키면서 여러농도의 항체를 섞어 주어 HBV의 중화효과를 관찰한 결과, 중화효과가 뛰어난 것을 확인하였고 HBIG에 비하여 그 특이적 활성도가 약 1400배 높음을 확인하였다 ( 본 세부과제의 G7 국제공동과제-사람 정상간세포 primary culture를 이용한 HBV in vitro infection 및 neutralization연구-에서 수행함).

6) 키메라 항체의 대량생산을 위한 세포배양기술 연구 : KR12H transfectoma 세포주를 selection pressure 없이 무혈청배지와 5% 혈청배지에서 장기 배양하면서 (70일 동안) 세포주의 항체생산에 관한 안정성을 limiting dilution method, flow cytometry, RT-PCR 및 Southern hybridization방법으로 조사한 결과 사용배지와는 관계없이 항체생산이 약 10-40% 떨어짐을 확인하였고 그 이유는 nonproducer의 출현이 아니라 producer 세포의 유전자 수의 감소 때문인 것으로 분석되었다. 따라서 이 세포주를 이용한 항체생산은 단기간에 회분식 방법을 이용하는 것이 더 바람직할 것으로 생각되었다(위탁과제-재조합 항체의 대량 생산을 위한 세포 배양기술 연구-에서 수행함).

## 나. HBV의 pre-S2에 대한 인간화된 항체의 개발 및 특성 연구

1) 인간화된 항체의 개발 : HBV의 pre-S2에 대한 생쥐 단일 클론 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR들을 인간항체에 이식시키고 생쥐 myeloma 세포에서 발현시킨 후 분리 및 정제한 인간화된 항체(Z6B)의 항원결합특성을 조사한 결과 parental 키메라항체인 H69K보다 약 10배 낮은 친화도를 나타내었다. Z6B의 친화도를 증가시키기 위하여 중쇄 framework region 3 내의 아미노산을 Thr에서 Pro으로 한 개 더 치환하여 새로운 인간화된 항체(ZP39)를 제조하고 그 항원결합친화도를 측정된 결과 H69K와 거의 동일한 친화도를 갖음을 확인함으로써 인간화된 항체의 개발에 성공하였다.

2) 인간화된 항체의 모델링 및 항원-항체 상호작용 연구 : 상기 Z6B와 ZP39 항체의 CDR loop 구조를 modeling 하고 molecular dynamics simulation한 결과, Thr인 경우보다 Pro인 경우 CDR loop의 flexibility가 높음이 밝혀졌다. 이 결과는 항체의 항원결합친화도가 CDR loop의 flexibility에 따라 달라지며 항원-항체의 결합이 induced fit mechanism에 의하여 일어남을 증명하는 한 예이기도 하다 (위탁과제- 생쥐 항체 가변영역의 모델링-에서 수행함).

3) 인간화된 항체의 인체내에서의 면역원성 예측 : 잡종토끼를 실험동물로 사용하여 HBV의 pre-S2에 대한 생쥐 단일클론 항체를 주사하고 이에 대해 생긴 항체를 동종의 특이성을 갖는

mouse IgG, 키메라항체, 인간화된 항체와 결합시켜, 항체 domain의 면역 유발성을 실험한 결과 잡종토끼의 면역반응율이 서로 달랐으며 키메라 항체의 경우 5-9%, 인간화된 항체의 경우 2~7%의 낮은 면역반응성을 나타냄을 확인하였다.

4) 인간화된 항체의 HBV의 중화효과 : 개발된 인간화된 항체 ZP39의 HBV의 중화효과를 시험한 결과, HBV를 중화시킴을 확인하였고 HBIG에 비하여 그 특이적 활성도가 약 750배 높음을 확인하였다.

## 2. 활용에 대한 건의

가. 본 항체들의 간염의 예방 및 치료제로서의 활용 가능성 : 본 연구를 통하여 B형 간염바이러스의 표면항원 S나 pre-S2에 결합하는 키메라 및 인간화된 항체를 성공적으로 개발하였다. HBV S 표면항원에 대한 키메라항체와 pre-S2에 대한 인간화된 항체의 특이적활성이 기존의 HBIG제품보다 각각 1400배, 700배 높게 나타났으므로 HBIG 보다 더 효과적으로 HBV의 수직감염예방이나 간이식수술 후의 HBV 재감염 예방에 활용될 수 있을 것으로 전망된다. 또한 B형 간염의 치료효과도 기대할 수 있다. 실제로 미국 protein Design Labs사가 현재 HBV의 S 표면 항원에 결합하는 사람단일클론 항체만(친화도가  $10^9/M$  보다 낮음)을 가지고 간 이식 환자와 B형 간염의 치료에 적용하여 I, II상 임상실험을 수행한 결과 50% 이상의 치료효과를 나타냄을 확인하였다. 본 연구를 통하여 개발된 항체는 상기 S

에 대한 인간화된 항체가 부가적으로 존재하므로, 적어도 이 두 항체를 포함한 간염치료항체제를 이용하면 만성간염에 대한 치료효과를 높일 수 있을 것으로 전망된다.

나. 본 항체 개발 결과의 사회적 및 경제의 중요성 : 국내의 만성간염환자 수는 전 인구의 10%에 달하고 대부분 수직감염에 의하여 감염되었으므로 간경화나 간암으로 발전될 가능성이 높다. 따라서 새로 태어난 신생아들의 HBV감염을 예방하고 기존의 만성간염환자들을 효과적으로 치료하는 것이 바람직하다. 이런 각도에서 보면 본 인간화항체들의 개발은 국내의 간염바이러스의 보균율을 저하시키고 간염의 치료효과를 높임으로써 국민보건향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 아직 간염 치료제가 개발되어 있지 않은 점을 고려하면 그 잠재적 시장 규모는 매우 크다고 기대된다.

다. 본 항체개발 기술의 기술적인 파급효과 : 본 연구개발의 성공으로 항체를 이용한 암이나 다른 감염성질환 자가면역질환 등의 예방 및 치료제 개발에 활용됨은 물론 항체의 생산 기술은 포유배양세포에서 생산되어야 하는 모든 단백질 의약품의 생산에 활용될 수 있으므로 그 기술적 파급효과가 지대할 것으로 전망된다.



## ● 제 4 세부과제 : 재조합 항체의 대량생산기술 개발연구

### 가. 세포배양에 의한 재조합 HBs Ab 생산 수준

동물세포 배양 체계를 이용하여 재조합 항체의 대량 생산 가능성 여부를 확인하기 위하여 Anti-S chimeric antibody 를 생산하는 CHO 세포주(CS131-A colony) 를 유전공학 센터로부터 분양받아 이를 여러가지 조건의 배양체계를 이용하여 배양한 후 배양 상청으로 분리되는 HBsAb 를 분리 정제한 후 그 생산량을 비교, 조사하였다. 그 결과 소량 배양 체계에서는 무혈청배지 상청 ml당 120 $\mu$ g 의 생산량을 보였으나, 실제 대량 배양하에서는 그 절반 수준인 배양 상청 1 L 당 평균 62mg 이었다.

### 나. 재조합항체의 항체가 및 중화효과 측정

HBsAg 에 대한 항체를 RIA 로 측정할 수 있는 kil의 하나인 AUSAB(Abbott Lab., IL, U.S.A.)을 이용하여 재조합항체의 항체를 측정 한 결과 항체는 33 unit/mg 이었으며, 참고로 HBIG의 경우 230unit/130mg(1.77 unit/mg) 이므로 재조합항체가 약 20배 정도 높은 것으로 확인되었다. 그러나 중화효과에 있어서는 Anti-S chimeric antibody는 HBV의 중화효과를 잘 나타내었으며, specific activity 가 HBIG 보다 1,000배 이상 높은 것으로 확인되었다.



다. 동물세포 배양체계를 이용할 경우 생산비 산출

세포배양시 소용되는 순수 재료비만을 최종 회수한 배양 상  
청 1 L 를 기준으로 산정하였다. 그 결과 cellfactory(Nunc Co.)  
를 이용할 경우 약 158,000원, 그리고 3단 tissue culture flask를  
이용할 경우 약 17만원이 소요되는 것으로 확인되었다.

라. 재조합 항체 생산의 경제성 분석

항체가 측면에서의 재조합항체와 HBIG간의 비교에서는 동  
물세포배양에 따른 배양상청 1L 는 약 2,000 unit 에 해당되며,  
생산비용은 unit당 약 80원 정도 소요되므로 현재 시판중인  
HBIG과 비교할 때 약 8.7병을 생산할 수 있다. 그러나 중화효  
과를 고려할 경우 위의 계산 보다 생산단가 면에서 1/50 정도의  
감소효과가 있으며, 또한 생산량 측면에서도 소규모 배양수준에  
서와 같이 ml 당 120 $\mu$ g 정도로 증가할 경우 1/100 가량의 생산  
비 감소요인이 있는 것으로 판단되었다.

따라서 본 연구 결과에서 anti S 키메라 및 anti-preS2 인간  
화 항체 각각 HBIG 보다 1,000 배 이상 혹은 700 배의 높은  
specific activity 를 가지고 중화효과를 잘 나타내는것이 확인되  
었기 때문에, 앞으로 정지 배양 조건을 기초자료로 이용하여 대  
량 부유배양 체계를 확립시켜 생산비용을 감소시킬 경우 본 재  
조합 항체는 HBIG 대체제 뿐만 아니라 만성간염 치료제로의  
제품 개발도 가능할 것으로 기대된다. 이러한 활용을 위해서는  
우선 anti-S 항체에 대한 인간화 작업과 이를 동물세포에 도입  
시켜 안정적으로 발현, 대량생산 가능한 공정체계의 개발이 시

급하며, 또한 제품화에 앞서 반드시 실시되어야 하는 전임상 및 임상실험의 막대한 비용에 대한 재정적 지원이 수반 될 경우 전 국민의 7% 정도를 점유하고 있는 만성간염의 치료가 가능해질 것으로 사료된다.

## ● 제 5 세부과제 : 생복합면역 백신개발기술 연구

가. HCV의 구조단백질 유전자를 갖는 replication-competent한 재조합 아데노 바이러스를 제조하여 Ad/HCV/E3로 명명하였다. 이 바이러스를 HeLa세포주에 감염시켰을 때 HCV 구조 단백질들이 발현됨을 확인하였다. 이 구조 단백질들의 분리 정제 및 생화학적, 면역학적 특성 규명을 통하여 HCV의 병리 현상 및 백신 개발에 활용할 수 있음이 기대된다.

나. HSV-2와 HBV에 대한 복합 면역을 유도하기 위하여 HSV-2의 gD와 HBV의 S유전자를 cap-independent translation을 유도하는 internal ribosome entry(IRES)로 연결시킨 후 아데노 바이러스에 도입하여 Ad/DES/E3로 명명하였다. 이 바이러스를 HeLa세포에 감염 시켰을 때 gD, IRES, HBV-S 각각의 전사물을 northern blot으로 확인할 수 있었고 gD 및 S 단백질의 발현을 검색중에 있다.

다. HCV의 항원 유전자가 도입된 replication-defective한

재조합 아데노 바이러스(Ad/HCV/E1)와 HSV-2의 gD 및 HBV의 S가 아데노 바이러스 E1부위에 도입된 Ad/DES/E1가 제조되었다. 이 바이러스들은 세포독성 임파구 유도능력 검정에 활용될 수 있다.

라. HBV와 HCV의 항원 유전자가 함께 도입된 아데노 바이러스(Ad/BEC/E!)가 제조되었고 이 바이러스는 HBV와 HCV에 대한 복합 면역이 가능한지를 시험해 볼 수 있을 것이다.

마. 국내 로타바이러스를 순수 분리 배양하였으며 한국에서 우세한 혈청형은 type1 (67%), type2 (33%) 으로서 백신개발에 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다(위탁).

바. 로타 바이러스의 중화 항체 유도 항원 vp7cDNA를 제조하고 비병원성 장내 세균 백신주에 도입 발현을 시도 중이다(위탁).

사. 재조합된 pUC19-BCG DNA를 영양요구성 대장균 KCTC 2263에 형질전환시켜 20만개의 형질전환체를 확보하였다. 이들중 threonine이 없는 배지에서 자라는 클론을 50개 얻어 염기서열을 규명하고 pUC19-thr2와 비교하였다. 각각의 클론이 상이하면서 complementation시키는 능력을 갖고 있음을 확인하였다.

재조합된 pMVHBsAg와 pETHBsAg를 대장균에 transfor-

mation시켜 항원의 발현능을 비교하였다. pMVHBsAg의 titer는 1:7로 판명되었고 pETHBsAg의 titer는 1:18을 보여 약 2.5배 정도 발현능이 낮음을 알 수 있었다.

rMS로 감작시킨 쥐의 항체는 OVA로 감작시킨 쥐의 항체와 동일한 epitope을 인식하는데 아미노산 서열은 I-N-E-A-G-R임을 확인하였다.

아. Mycobacteria의 유전자에 관한 정보로 활용할 수 있으며 결핵균의 치료제나 신규 백신을 개발하는데 사용할 수 있다. 결핵균의 검진을 위한 PCR용 primer로 쓸 수 있다. 개발된 shuttle vector는 mycobacteria의 유전학적 연구를 수행하기 위한 재료로 활용이 가능하다.

## ● 제6 세부과제 : T-임파세포 활성화 유도 면역 치료제 개발기술

### 연구(I)

본 연구는 B형 간염 바이러스를 모델로 하여, 바이러스성 감염질환을 예방, 치료하기 위한 방편으로 체내의 면역체계중 cytotoxic T lymphocyte(CTL)을 선별적으로 촉발시켜 내는 방법을 개발하고자 한다. 바이러스는 숙주에 감염된 후에는 숙주의 세포내에 존재하기 때문에 항체를 이용한 퇴치가 어려워 감염세포를 직접 파괴할 수 있는 CTL의 효과적인 유도가 감염의 치료에는 필수적이라 할 수 있다. 이러한 CTL을 유도함에 있



어서는 첫째, 바이러스 항원이 CTL에 의해 인식되어지는 부위, 즉 epitope을 찾아내는 일이 중요하다. 그리하여 본 연구에서는 epitope를 찾는 데 있어서 epitope들이 갖고 있는 일반적인 구조적 특성을 활용하여 computer modeling 을 통하여 epitope 후보 물질을 선별한 다음 이들을 기능적으로 시험하여 실제적인 epitope으로서의 적합성을 검정하는 방법을 사용하였다. computer modeling에 의한 epitope선별의 기본적인 방법은 전 년도의 연구를 통하여 이루어 졌으며, 당해년도에는 이러한 방법을 HBV 단백질의 경우에 적용함으로써 HBV 단백질 가운데 포함되어있는 epitope sequence들을 결정하였다. 둘째, 이렇게 결정된 epitope이 실제로 인체 내에 존재하는 CTL에 의해 인지 되어 지는지와 그러한 CTL을 유도해 내는지의 여부를 조사하였다. 더 나아가 흥선세포의 분화메카니즘에 대한 중요한 결과를 도출함으로써 T세포가 특성을 얻게되는 과정에 대한 이해를 넓히게되어 CTL의 활성을 유도하는데 더 효과적 방법을 강구 할 수 있는 근거를 마련할 수 있었다.

본 연구를 통하여 얻은 결과는 B형 간염바이러스에 대한 CTL의 생성을 선택적으로 촉발하는 백신 물질의 개발에 직접 적으로 응용될 수 있을 뿐만 아니라 향후 다른 종류의 항원에 대한 일반적 적용 가능성을 제시하고 있다.

## ● 제7세부과제:T-임파세포 활성화 유도 면역 치료제 개발기술

### 연구(II)

본 연구소에서 3차년도에서 수행한 연구결과로는 1)HCV full sequence에서 HLA-A2.1에 결합 가능한 epitope peptide를 computer 분석을 통해 S series의 15 종과 C series 37 종을 선별하였다. 이들 peptide들을 automatic peptide synthesizer와 multipin synthesis kit를 이용하여 합성했으며, 이들의 정제의 특성은 HPLC로 확인하였다. 2)선별된 CTL inducible peptide를 flow cytometry를 이용한 binding assay를 수행하였다. HLA-A2.1 분자와 결합 가능성이 있는 각각의 peptide를 T2 cell 반응시킨 뒤 BB7.2 단일항체를 가하여 상대적인 결합력을 mean fluorescence intensity로 비교 분석한 결과, 2 차년도에 이미 결정된 5종의 peptide이외에 s series에서 4 종, C series에서 10 종의 peptide를 추가로 결정하였다. 3) 2 차년도에서 실시한 EP series의 나머지 peptide들에 대한 CTL functional assay를 수행한 결과 새로운 3종의 peptide가 실제로 인체에 존재하는 C형 간염바이러스 항원을 인지하는 CTL을 활성화시키는 것으로 확인되었다. 4) 이러한 epitope peptide의 delivery system으로 2 차년도에 이미 확립된 liposomes system이외에도 ISCOM과 squalene/tween 80 (S/T) system을 제조하여 mouse system에서 ovalbumin에 대한 CTL 유도효과를 검정하였고, S/T adjuvant system의 유도에 중요하게 적용됨을 알았

다. 5) In vivo test를 위한 동물모델을 개발하기 위해 HLA-A2.1 gene cloning을 수행한 결과 T2 cell 의 mRNA를 이용하여 HLA-A2.1 gene 의 PCR product를 얻는데 성공하였다.

활용 방안으로는 본 연구의 결과로 현재 수혈자의 10%에 해당하는 간염 바이러스 보균자 및 만성 간염환자의 치료제로서 개발이 가능하며, 세계적인 수준과 비교할때도 거의 대응한 위치에서 경쟁할 수 있을 것으로 추정된다. 또 CTL을 선택적으로 촉발하는 peptide delivery system을 구축함으로써 peptide를 이용한 각종 치료제를 위한 기초 자료뿐 아니라 바이러스성 감염 질환에 대한 치료제 개발에 활용할 수 있다. 또한 본 연구소에서 얻어지는 adjuvant system의 확립은 면역학 분야외에 약물의 전달시스템으로 활용할 수 있어 본 연구는 여러 제약산업에 응용 할 수 있다. 다만 본격적 국제시장 진출을 위해서는 임상실험 등에 중.장기적 연구가 계속되어야 할 것이다.

## ● 제 8 세부과제 : 유전자 백신 개발연구

가. 주요 연구개발 결과

1) In vivo gene transfer system의 효율을 테스트하기 위해 indicator 플라스미드인 CAT 유전자 발현 벡터를 건설하였고 이를 이용하여 intramuscular injection과 gene gun방법으로 mouse에 주입시 CAT 유전자가 생체내에서 잘 발현됨을 관찰

하였다. 특히 i.m. injection이 gene gun 방법보다 더 오랫동안 발현이 지속됨을 관찰하였다.

2) 모델 바이러스로서 encephalomyelocarditis virus(EMCV)의 유전자 백신 벡터인 pCD-GS-VP1을 개발하였고, COS-7 cell에서 발현을 확인하였다. 또한 VP1 유전자를 pRSET vector에 클로닝 및 과발현시키고 정제하여 anti-mouse Ab를 만들었다. pCD-GS-VP1 plasmid를 mouse에 gene gun 방법으로 주입시 humoral immune response를 관찰하였다. 흥미로운 것은 cytokine effect를 보았을때 GM-CSF를 coinjection했을때 항원성d1 증가함을 입증하였다.

3) HCV-1에 대한 gene vaccine vector로서 pCDSt(N)과 pMTHGH-E2T를 건설 및 발현을 확인하였고 i.m. injection 했을때와 gene gun 방법으로 mouse에 주입시 gkdcp todtjddmf whtkgkduTek.

4) HIV-1에 대한 모델 retrovirus로서 HFV에 대한 유전자 백신 벡터로 pSVwt을 건설하였고 COS-7 세포에서의 발현을 Western blot으로 확인하였다.

5) HIV-1에 대한 유전자 백신 vector로 pCDGPF/HIV 및 pCDGE/HIV, pMTGPE/HIV, pMTGE/HIV를 건설하였고 발현을 COS-7 세포에 transfection 한 후 확인하였다.



6) CTL assay를 위한 HCV-vaccinia recombinant virus의 건설 및 발현을 확인하였다.

7) HIV-1과 HCV 감염에 대한 암세포 모델로 CT26 암세포에 pCD GE/HIV, pMT-HGH-E2등의 plasmid를 도입시켜, 각각 HIV-1과 HCV 유전자를 발현하는 재조합 암세포를 건설하였다.

#### 나. 활용에 대한 건의

1) 유전자 백신은 항원 단백질이 세포안에서 합성되는 것이므로 면역반응을 유발하는데 있어서 그 효율성이 live attenuated 백신과 유사하다고 할 수 있다. 따라서 현재 유전자 면역 방법은 AIDS나 C형 간염과 같이 세포면역반응이 방어면역기식에 중요한 질병에 효과적일 것으로 기대되고 있다. 또한 현재 전세계적으로 활발히 연구가 되고 있는 암백신에 있어서도 유전자 면역요법이 유용하게 사용될 것으로 기대되고 있다.

2) 유전자 면역요법은 백신 개발에 있어서 효능, 안정성, 제조비용등이 기존의 여러가지 백신 개발전략과 비교하여 탁월하다. 따라서 이미 백신이 개발되어 있거나 또는 그렇지 않은 여러가지 바이러스성 질병에 대하여 유전자 면역요법이 유용하게 사용될 수 있을것으로 생각된다.

3) 유전자 면역 요법은 단지 발현 벡터를 추가함으로써 여러가지 서로다른 바이러스에 대한 예방접종을 실시할 수 있으

므로 combined vaccine으로 활용할 수 있다.

4) 유전자 전달 방법의 개발은 본 연구에서 이루려는 유전자 면역 치료뿐만 아니라 animal내에서 직접 유전자 발현 연구에도 중요한 기술로 쓰이게 될 것이다.

## ● 제 9 세부과제 : 재조합 항체 단백질 백신의 면역 보조제 개발연구

Saponin은 Triterpene과 Glycoside로 구성되어 있으며, 계면활성제 특성을 나타내고 세포 고정제 및 식품 첨가제로서 사용되고 있다. 특히, 남미산 식물인 Quilaja Saponaria Molina로부터 추출한 Saponin은 체액 및 세포성 면역반응을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 우리는 Quilaja saponaria molina의 표피추출물을 한외 투석막으로 투석후, 투석액을 원심 분리하여 불용성 물질을 제거하며, 이를 C4RP-HPLC로 분리하여 개개의 사포닌 분획물을 분리정제하였다. 이 방법에 따라 32개 이상의 사포닌 변이체가 분리되는데 이중 비교적 수율이 높으면서 높은 면역 보조 활성을 갖는 5개의 peak을 QS-L1, QS-L2, QS-L3, QS-L4, QS-L5로 명명하였으며, 상기 5개의 peak은 최소한 90% 이상의 순도를 가지도록 정제되었으며, 이 peak들의 면역 보조활성 및 생쥐에서의 독성을 측정하였다. 실험결과들을 종합해 볼때 QS-L1은 기존 Kensil 등의 밝힌 QS-21, QS-17,

QS-18 사포닌계 면역보조제 이외의 새로운 사포닌 분획물 성분으로 추정되며, 그 자체는 면역보조활성이 미약하나 Alum과의 혼합사용시 탁월한 면역보조 효과를 나타내며, 또한 CD-1 생쥐 독성시험에서도 QS-L5('QS-21'으로 추정)을 포함한 다른 사포닌 분획물보다 훨씬 낮은 독성을 보여 면역보조제로서의 인체사용 가능성을 높게 해 준다.

여 백



# Summary

## I. Title

Development of Protein Engineering Technology

## II. Goal and Importance

Proteins play a central role in all living processes by performing many different important functions in cells and tissues such as catalysis, molecular recognition, regulation and structural element.

For the past 40 years, a tremendous progress has been made in elucidating protein structures and understanding protein structure-function relationships.

Since the primary structure of human insulin was reported in the early 1950s, and the three dimensional structure of myoglobin was solved in 1960, primary or tertiary structures of many different proteins are now known. In addition, various methods have been developed to help determine the role of specific amino acids involved in a protein function.

Recent advances in recombinant DNA technology made it possible, in principle, to design and produce new proteins.

Genetic engineering technology have now made it possible to modify the amino acid sequence of a protein at will, including substitution, deletion or insertion of amino acid residues, or to fuse two or more proteins to form hybrid proteins, or even to totally synthesize genes for the new proteins. the technology has been contributed for the mass production of medically or industrially applicable peptides or proteins.

Protein engineering technology, a new technology which was arisen because due to the development of genetic engineering technology and the accumulation of data concerning structure-function relationships of various proteins, is a technology for design, synthesize and mass-produce a novel proteins.

The study was focussed on antigen-antibody reactions, and carried out in order for the development of technologies for producing next-generation vaccines or immunological therapeutic drugs. The successful results from this study will have a great impact on economical, social and technological development. The study will also help to establish a new emerging protein engineering technology in korea, that will undoubtedly contribute for the development and dissemination of biotechnology.

## III. Contents of Research and Results

### ● Project 1 : Study on development of synthetic peptide vaccine

#### I. Contents and Scope

B- and T-cell epitope of pre S2, immunodominant region of surface antigen of Hepatitis B Virus and MAP(multiple antigenic peptide) were chemically synthesized and studies with above synthetic peptides using liposome as immunoadjuvant, are as follows :

1. For the linker of B and T cell epitope, several proteolytic sites and liposome were used and the antibody production was evaluated.

2. To improve the immunogenicity of the peptide vaccine the immunostimulating peptides were attached to peptide antigen and the antibody production was evaluated.

3. The study on the liposome as immunoadjuvant was performed. The differences of antibody production according to the change of the composition of liposome, the amount of

antigen, the T cell epitope sequence were studied.

4. Linear and multiantigenic peptides were manually synthesized and used for studies of antigenicity, immunogenicity and structures.

5. Peptides with T-B, B and T sequences were conjugated to BSA and then the peptide-BSA conjugates were immunized to Balb/c mice. The boosting effects of M-HBsAg to mice immunized the conjugates were tested.

6. MAP antigenicity were tested by competitive ELISA and indirect ELISA.

7. The effect of the N-terminal sequence to the preS2 B cell epitope was studied using sequentially deleted peptides and substituted peptides at position 127, phenylalanine.

8. The structural change of the peptide substituted gln for arg at position 137 was studied by molecular modeling.



## II. Results and Discussion

1. The preS2 120-145, the peptide containing T and B cell epitope continuously, was able to induce antibody production but, when the B cell epitope was localized at the N-terminus, no antibody was produced. To solve this problem the proteolytic enzyme sites were tried for the linker of B and T cell epitope, but no antibody was produced. Also liposome was tried as a linker, but the level of antibody production was very low. So we concluded that the location of B, and T cell epitope is important because of the antigenic structure.

2. To improve the immunogenicity of peptide antigen the immunostimulating peptides, derived from macrophage binding sites and IL-1 sequence, were attached to peptide antigen and the effect on the antibody production was evaluated.

3. To improve the immunogenicity, the liposomes containing negatively charged phospholipids(PA, PI, PG, PS) were tried. In the case of peptide antigen the composition of liposome affected the production. But in the case of protein antigen little differences were observed. The effect of the

negatively charged lipids on the peptide antigen-antibody binding was studied by the competitive ELISA and no differences were observed.

4. The dose dependency of liposome-peptide antigen on the antibody production was observed and there was a linear relationship. When CFA was used as immunoadjuvant there was no linear relationship between the dose and antibody production and when the amount of peptide antigen was above  $100\mu\text{g}$  the antibody was sharply increased.

5. PreS2 151-174, another T cell epitope, was linearly linked to B cell epitope and the antibody production was evaluated. When using preS2 151-174, liposome and CFA were able to improve antibody production. When using preS2 159-174 as T cell epitope only liposome was able to improve antibody production. When the B cell epitope was localised at the N-terminus the antibody production was very low.

6. To test the stability of the liposome it was investigated by the changes of absorbance and liposome size while long term storage at  $4^{\circ}\text{C}$  and room temperature.

7. After 4 weeks from M-HBsAg injection, the production of the anti-preS2 antibody increased in many Balb/c mice (14/17) immunized with the peptide BSA conjugates. Among them antibody production of 5 mice increased 90 fold or more. However, the effect was not related to the presence of T-cell epitopes, but related to individual differences.

8. MAP is known to be a highly immunogenic peptide. The molecular weights of the synthetic MAPs were increased according to increases of their branches as expected, the synthetic MAPs showed almost single bands.

The antigenicity measured by competitive ELISA were decreased according to increases of their branches and the result may be caused by steric hindrance between branches. However, highly branched MAPs coated to the ELISA plate showed higher reactivity than less ones and result may be caused by higher coating efficiency of highly branched MAPs.

9. The residues 125, 126, 127 and 129 greatly affected to peptide antigenicity against H8 mAb when measured using sequentially deleted peptides. Peptide antigenicity of the substituted peptides at position 127 showed in the orders of

phe>ile>glu=thr>ala=pro>lys, indicating that hydrophobicity, charge and size of the group are important to peptide antigenicity.

10. The B cell epitope structure of the substitute peptide of p120-145/adr at position 137 (arg -- gln) simulated by molecular modeling was less compact than one of the native peptide.

## ● Project 2 : Studies on the antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides

The aim of this study was to investigate the antigenicity and immunogenicity of small synthetic peptide which can be used as a peptide vaccine.

During third-year research period, we have used three synthetic peptide which correspond to the core region of Korean hepatitis C virus.

The characteristic features such as flexibility,  $\beta$ -turn and hydrophobicity profile of the synthetic peptides were shown in second-year report. Each peptide was conjugated with BSA or KLH using glutaraldehyde or MBS method, and immunized to Balb/C mouse to generate anti-peptide antibodies.

We found that the use of gelatin as a blocking agent is efficient in measuring the titer of anti-peptide antibody which was generated by immunizing synthetic peptides conjugated to KLH.

Interestingly, the anti-peptide antibodies (anti-SPC16, anti-SPC25) effectively recognized recombinant whole antigen (recombinant whole HCV antigen) which suggests that the synthetic peptides resemble the native antigenic structure.



This indicated that the use of synthetic peptide instead of whole native antigen is possible to stimulate immune network.

We also found that the anti-peptide antibodies can recognize and bind to native whole antigen which supports the theoretical hypothesis as described above.

We successfully made pro-liposome using egg phosphatidyl choline and sorbitol. Irradiation of  $\gamma$ -ray to pro-liposome showed efficient sterilization effect while maintaining the native fluidity and solubility.

Finally, we have examined the effect of immuno-stimulatory sequence, a nine amino acid fragment (VQGEESNDK), of human IL-1 $\beta$  on the stimulation of thymocyte proliferation.

The nonapeptide sequence, when connected that the synthetic peptide can be used to trigger immune response, and may be applicable for the development of peptide vaccine.

## ● Project 3 : Techonology for the develop- ment of humanized antibody

### I. Contents of research

1. Development and characterization of chimeric antibody
2. Development and characterization of humanized antibody
3. Humanized antibody modeling and study on the antigen-antibody interaction
4. Cell culture engineering of transfectoma secreting recombinant antibody

### II. Results

1. Development and characterization of chimeric antibody specific for the preS2 or S surface antigen of HBV using meloma expression system, and confirmed that the antibodies have same antigen-binding specificity and affinity as their parental murine monoclonal antibodies. In this year. we sucessfully developed the techonology for the production of the chimeric antibody in CHO cells by gene expression and amplification of the antibody genes and isolated a stable CS131A cell line of which specific productivity is about 80

ug/10 cells/day. Also, the antibody was shown to exhibit the same antigen-binding affinity as parental murine monoclonal antibody and neutralizing activity for HBV in HBV in vitro infection studies using primary cultured human hepatocytes.

## 2. Development and characterization of humanized antibody specific for the preS2 of HBV

We successfully humanized a murine monoclonal antibody with specificity for the preS2 antigen of HBV by CDR-grafting and site-directed mutagenesis of only one amino acid residue on the heavy chain framework region 3 underlying the CDR3 from Thr to Pro. The affinity of the humanized antibody (ZP39) was almost same as that of chimeric antibody with same specificity and 10 times higher than that of simply CDR-grafted humanized antibody (Z6B). Molecular dynamics simulations of the antigen binding sites of the ZP39 and Z6B showed that motion of ZP39 CDR loops is more flexible than that of Z6B, which could provide an example that the structural basis of antigen-antibody interaction is induced-fit mechanism. ZP39 antibody showed the HBV neutralizing activity in the HBV in vitro infection studies.

## ● Project 4 : Study on the Mass-Production of Recombinant Antibody

This research project has been carried out for three year period of 1992 through 1995. During the third year of the project we were distributed the chinese hamster ovary (CHO) cell line (CS131A) which was genetically engineered for the production of recombinant anti-S antibody. Thereafter, we have established the optimum culture condition for the mass culture as well as the stability of the cell line, and identified the best clones for the high productivity. Then, the total productivity of this cell line was examined by cultivating it in the serum-free culture condition and subsequent purification of the recombinant antibody. We confirmed whether or not this produced recombinant antibody carries the initially aimed characteristics of the following; the binding with the antigen, and the affinity as well as neutralization effect on HBV. We also carried out the economical analysis based on the estimation of the production cost prior to seeking the marketability of the recombinant antibody.

### 1. Establishment of cell culture condition

The cell line used in this project was CS131A genetically



engineered in GERI for the purpose of the production of chimeric antibody against 'S' epitope. In order to purify the recombinant antibody very efficiently, we established the mass production system using tissue culture flask after testing and comparison of several growth media such as alpha MEM medium containing 10% serum and various serum-free media for the cell growth and the monoclonal antibody production.

## 2. Purification of recombinant antibody

Cells were removed at the end of culture period, then the serum-free medium containing the secreted recombinant monoclonal antibody was concentrated. The recombinant monoclonal antibody was purified using common protein purification methods such as affinity chromatography and ultrafiltration. Most efficient purification method was determined after several rounds of purification trials.

## 3. Measurement of the antibody titers and the neutralization effect

Hepatitis B virus was isolated from a chronic hepatitis B patient.

Then this virus was infected to the hepatic cancer cell, Hep G2. After the confirmation of the infection, several antibodies were examined.



4. Economical analysis on mass production of the recombinant antibody using tissue culture flask was estimated. Based on this, the final production cost was determined. Then the possible marketability of this product was evaluated after considering the neutralization effect of this product and comparing the prices of commercially available HBIG polyclonal antibody.

The results of this research project was summarized as follows ;

1. The production level of recombinant HBsAb using animal cell culture In order to investigate the mass production possibility of recombinant antibody using animal cell culture system, we were distributed CHO cell line(CS131-A) producing anti-S chimeric antibody from GERL Following the success of the mass culture of this cell line, we purified the secreted HBs antibody from the culture medium. The yield of production was 62mg/liter of culture medium, which was the about half of the value obtained from the small scale culture system (120mg/ml).

2. Measurement of the antibody titers and the neutralization effect

The antibody titer of recombinant antibody was measured

in terms of the titer against HBsAg using a RIA kit (AUSAB, Abbott Lab., IL, U.S.A.). The titer value was 33 units/mg which was about 20 times higher than that of HBIG (L77 units/mg). However, in the case of neutralization effect, anti-S chimeric antibody showed the good neutralization effect against HBV, and its specific activity was at least 1,000 times greater than that of HBIG.

3. Production cost estimation of recombinant antibody from the animal cell culture system

The material cost necessary for final 1 liter of harvested growth medium was only included for this estimation. It was estimated that it costs about 158,000 Won in the case of cell factory (Nunc Co.) and about 170,000 Won in the case of T570 (3 layer) flask.

4. Economical analysis of recombinant antibody production

The comparison between the recombinant antibody is 8.7 times more cost-effective than HBIG because one liter of final harvested growth medium is corresponding to about 2,000 units and each unit costs about 80 Won. However, in the case of neutralization effect consideration, the production cost will decrease to about 1/50 of above-mentioned

estimation. Moreover, considering the production increment to 120 mg/ml of small scale culture, the production cost will even decrease to 1/100.

Therefore, our research result confirmed that anti-S chimera and anti-preS2 humanized antibody had at least 1,000 times and 700 times higher specific activity in neutralization effect than HBIG, respectively. If mass culture system is established and concomitant mass production cost is greatly reduced, present recombinant antibody will not only replace HBIG, but give rise to the possibility for the development of therapeutic agent for the chronic hepatitis.

● **Project 5 : Development of studies on the technology-development of Live Multivaccine.**

I. Scope and Contents of Research

1. Construction and characterization of replication-competent and defective recombinant adenoviruses which encode the protective antigen genes of hepatitis B and C virus (HBV and HCV) and herpes simplex virus 2(HSV-2).

2. Isolation and characterization of korean rotavirus (Subproject).

II. Results and Discussion

1. A recombinant adenovirus (Ad/HCV/E3) that encodes the structural gene of HCV was constructed. The structural gene (core, gp35, and gp70) was efficiently expressed in Hela cells infected with Ad/HCV/E3. Biochemical and immunological characterization of HCV structural proteins aid in understanding of pathogenesis of HCV and vaccine-development.

2. A recombinant adenovirus (Ad/DES/E3) was constructed that encodes the gD of HSV-2 and the S of

HBV which were linked by internal ribosome entry sequence(IRES) that allows cap-independent translation. The transcripts of gD, IRES, and S gene were detected in HeLa cells infected with Ad/DES/E3. The expression of gD and S antigen protein has been investigated.

3. Replication-defective adenovirus which codes for structural gene of HCV and adenovirus which contains gD of HSV-2 and S of HBV in the E1 region of adenovirus genome were constructed. These viruses can be used to induce the cytotoxic T lymphocyte.

4. To elicit prophylactic multi-immunization against HBV and HCV, a recombinant adenovirus was constructed that encodes the antigen genes of HBV and HCV in the E1 region of adenovirus genome.

5. Korean rotaviruses have been isolated and successfully adapted to tissue culture. The prevalent serotypes were type 1 (67%) and type 2(33%) in Korea. These results can be used for vaccine development of rotavirus(Subproject).

6. The sequence of three cDNAs of vp7 gene of rotavirus which contains neutralization epitopes was



determined. The vp7 cDNAs were transformed into a nonpathogenic enteric bacterium as a potential oral vaccine vehicle and their expression has been analyzed (Subproject).

## ● Project 6 : Development of Immunotherapeutics Inducing the Selective T-Lymphocyte Activation(I)

In this study, attempts were made to induce selectively cytotoxic T lymphocyte(CTL) specific for infectious viruses such as Hepatitis B virus. which ultimately remove the viruses to recover from the infection. Since the viruses exist inside the host cells after infection and are seldom exposed to the blood stream, specific antibodies against the virus existing in the blood frequently fail to remove the viruses. Therefore CTL, which recognize and destroy the virus-infected cells, are often essential in removing the viruses, which in turn get the viruses exposed to blood stream where they were degraded. To induce such CTL that recognize and destroy the virus-infected cells, the initial step is to define the moieties (epitopes) that are recognized by CTL. In this study epitopes were selected from the primary ammino acid sequences of the viral gene products, namely, S- and C- antigen of Hepatitis B virus, based on the restrictions imposed upon the peptides that bind to MHC molecules, which is crucial step to be presented to CTL. The selected peptides were further examined on a computer simulation which determines physical fitness of the peptide

to a particular MJC alleles such as HLA-A2 of human and K<sup>b</sup> of mouse. To determine whether the predicted epitopes actually have the capability to bind to MHC molecule, the adjuvant activity only when used with alum-precipitated antigen. The QS-L1 saponin greatly enhanced not only humoral immune response to recombinant hepatitis B virus surface antigen(HBsAg), but also cellular immune response. Furthermore, the saponin showed lower toxicity in mice than a previously identified saponin fraction, QS-21. Thus, our result indicated that the QS-L1 saponin fraction has several desirable properties that is required for effective adjuvant.

## ● **Project 7 : Development of Immunotherapeutics Inducing the Selective T-Lymphocyte Activation(II)**

Specific immune responses are classified into two types, based on the components of the immune system that mediate the response; humoral immunity and cell-mediated immunity. Humoral immunity is mediated by molecules in the blood that responsible for specific recognition and elimination of antigens by antibodies. Cell-mediated immunity is mediated by molecules in the lymphoid tissue (helper T and cytotoxic T lymphocytes). Cytotoxic T lymphocytes (CTL) have been demonstrated to be the major host defense mechanism in response to various viral infections. Consequently, induction for a CTL response against specific antigen (in case of HCV) is considered important in the therapeutic vaccine development.

For the development of therapeutic vaccine against a HCV, we have studied the epitope peptides and adjuvant systems which selectively induce the CTL response against a HCV. By the computer analysis, we have finally selected 76 epitope peptides were synthesized by the F-moc method from automatic peptide synthesizer and multipin synthesis kit and then peptides were purified and characterized by HPLC.



여 백

## ● Project 8 :

1. Establishment of direct in vivo gene transfer methods; intramuscular injection and gene gun

To test the efficacy of in vivo gene transfer methods, pCDCAT indicator plasmid which expresses chloramphenicol acetyltransferase gene was constructed. pCDCAT plasmid was transferred to the quadriceps muscle and the abdominal skin of BALB/C mice by a 28-gauge syringe and gene gun machinery which was developed in our laboratory, respectively. CAT gene was efficiently expressed in the tissues to which pCDCAI plasmid was transferred by both i.m. injection of DNA resulted in prolonged expression of CAT gene unlike gene gun transfer which resulted only transient expression.

2. Gene immunization against EMCV

A gene vaccine vector pCD-GS-VP1 which expresses the capsid protein of encephalomyocarditis virus (EMCV) was constructed. Expression of VP1 protein from pCD-GS-VP1 was confirmed in COS-7 cells. When pCD-GS-VP1 plasmid was transferred to BALB/c mice by gene gun method, specific antibody against VP1 was generated as assayed by FLISA. Interestingly, GM-CSF stimulated the humoral

immune response against VP1, when coinjected with pCD-GS-VP1 as expression plasmid form.

### 3. Gene immunization against HCV

Two different gene vaccine vectors, pCD-ST(N) and pMT-HGH-E2T, was constructed for the immunization against hepatitis C virus, pCD-ST(N) and pMT-HGH-E2T express C-F1-E2 structural genes and E2 envelope gene of HCV as a fusion with human growth hormone, respectively. Expression of interesting genes from the two plasmids was confirmed in COS-7 cells. Humoral immune response was determined in mice to which pMT-HGH-E2 plasmid was transferred by i.m. injection and gene gun machinery. To test the efficacy of the gene immunization against HCV, tumor model was established, in which the CT26 Tumor cells which express the specific gene of HCV form solid tumor in naive mice but not in immune-competent mice.

### 4. Gene immunization against HIV-1

pCDGPE/HIV and pCDGE/HIV which express the gag, pol, and env genes and only gag and env genes of HIV-1, respectively, under the control of cytomegalovirus immediate early promoter was constructed. Also, pMTGPE.HIV and pMTGE/HIV were constructed which express the same gene

sets as pCD-derivatives under the control of adenovirus major late promoter. When tested in COS-7 cells, pMT derivatives showed slightly higher level of gene expression than pCD-derivatives. To test the efficacy of the gene immunization against HIV-1 by tumor model, CT26/GF/HIV tumor cells was constructed by introducing pCDGF/HIV plasmid into CT26 tumor cells.



## ● Project 9 : Development of Adjuvant for Recombinant Antigen Proteins.

Vaccines are available for many serious human pathogenic viruses, including HIV (human immunodeficiency virus) and HCV (hepatitis C virus), even though our understanding on virology and immunology of the viral infection have been greatly increased in a past decade. Recombinant DNA technology allows us to make quantity of subunit antigens. However, subunit antigens can elicit host immune response efficiently only when they are administrated with adjuvant formulation. Only one adjuvant approved for human use is aluminum salts (i.e., Alum). However, it has been demonstrated that alum is not effective adjuvant for subunit antigen other than recombinant hepatitis B virus antigen (HBsAg). Thus, it is crucial to develop safe and effective adjuvant.

Saponins are compound derived from plant source whose adjuvant activity was reported two decade ago. Adjuvant activity of saponins extracted from the South American tree *Quillaja saponaria* has been demonstrated with many antigens. Furthermore, partially purified *Quillaja* saponin has been demonstrated to form immune-stimulating complexes

termed ISCOM as 35nm particles consisting of detergent/lipid/saponin when combined with ISCOM. Adjuvant activity of saponins extracted from the South American tree *Quillaja saponaria* has been demonstrated with many antigens. However, such saponin preparations were considered unsuitable for human use due to its toxicity. Recently, four saponin fractions, designated QS-7, QS-18, and QS-21, with adjuvant activity were purified by reverse phase chromatography. Here, we report a novel saponin fraction (designated QS-L1) derived from *Quillaja saponaria* that is distinct from the previously identified saponin fractions. In contrast to previously identified saponins, the Qs-L1 has binding assay using synthetic peptides was done employing a TAP-deficient cell line, T2. RMA-S cell was also used to test the binding affinity of potentially antigenic peptides to mouse K<sup>b</sup> molecule. Some of these HLA-A2-restricted peptides could in fact induce CTL from PBMC of HBV-seropositive blood donor. Our results suggest that this approach could apply to search for antigenic peptides and develop the peptide-based therapeutic vaccine against virus infection. On the other hand, experimental details for the generation of bone marrow chimeras has been established in this study. In particular, a bone marrow chimera of (H-2d → H-2k) more was

prepared and various cell surface markers expressed on the thymocytes was analyzed. In the chimera the relative fractions of CD8<sup>+</sup> cells appeared to be substantially lower than normal, suggesting the possibility that the radioresistance might be provided by nonthymic organs such as the intraepithelium of intestines. In addition, RMA-S cells, a murine tumor cell line, turned out to perform a role as a thymic selector. A novel thymic selector, RMA-S cells, could be one of the useful tools for studying thymic selection. These results would provide a better understanding of CTL generation and selection.

# Contents

<b>I . Introduction</b>	<b>-----</b>	<b>75</b>
<b>II . Composition of Projects</b>	<b>-----</b>	<b>79</b>
<b>III . Results of Projects</b>	<b>-----</b>	<b>81</b>
<b>IV . Conclusion</b>	<b>-----</b>	<b>131</b>
<b>V . Future Studies</b>	<b>-----</b>	<b>145</b>



여 백

# 목 차

제 1 장 서 론	75
제 2 장 과제구성	79
제 3 장 세부과제별 연구 결과	81
제 4 장 결 론	131
제 5 장 향후 연구 계획	145
첨부 : 연차보고서 배포계획	

여 백

## 별 책

- 제 1 세부과제 : 합성펩타이드 백신 개발 기술연구
- 제 2 세부과제 : 합성펩타이드의 항원성 및 면역원성  
연구
- 제 3 세부과제 : 인간화된 항체 개발 기술연구
- 제 4 세부과제 : 재조합항체의 대량생산 기술개발  
연구
- 제 5 세부과제 : 생복합 면역 백신 개발기술연구
- 제 6 세부과제 : T-임파세포 활성화유도 면역치료제  
개발 기술연구(I)
- 제 7 세부과제 : T-임파세포 활성화유도 면역치료제  
개발 기술연구(II)
- 제 8 세부과제 : 유전자 백신개발연구
- 제 9 세부과제 : 재조합 항원 단백질 백신의 면역  
보조제 개발연구



여 백

# 제 1 장 서 론

단백질이란 특이성을 가지고 있는 생화학적 반응을 촉매하여 모든 세포와 조직에서 구조적요소일 뿐 아니라 인식 및 조절등의 모든 생명과정에서 중추적 역할을 담당하는 물질이다.

지난 40여년동안 단백질의 구조와 기능에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으며 이 분야에 대한 커다란 발전을 가져왔다. 예를 들면 1950년대 초 인슈린의 아미노산 서열이 보고되었고, 60년 myoglobin의 3차구조가 밝혀졌으며 그 이외 많은 단백질의 구조 밝혀졌다. 또한 단백질의 기능에 관련되 특정 아미노산의 역할을 결정할 수 있는 다양한 방법들도 개발되어 왔다.

최근 신기능을 가진 단백질의 설계와 창출에 가장 눈부신 기여를 한 기술로 유전자조합기술을 들수 있다. 이기술의 덕분으로 아미노산 잔기의 치환, 삭제, 혹은 삽입(insertion) 등과 같은 단백질의 아미노산 서열의 임의변경은 물론, hybrid 단백질의 제조 및 새로운 단백질을 위한 유전자재조합까지도 가능케 되었다. 뿐만아니라 이와 같은 기술은 의학적, 산업적으로도 응용되어 여러 중요한 단백질 혹은 펩타이드의 대량생산에 기여하였다.

위에서 서술한 단백질공학기술은 의약품을 포함한 신기능성 단백질의창제 및 생산에 가장 중요한 핵심기술이나 국내기술수준이 선진국과 비교할때 상대적으로 매우 낮은 실정이고 선진국의 특허보호 등으로 기술이전 또한 용이치 않다. 따라서 범국가적 차원의 지원으로

국내에서의 독자적 개발이 절실한 상황이다.

단백질 공학기술개발과 응용의 모델로서 의약품중에서도 국민보건 향상과 직접적인 상관관계가 있는 백신과 면역치료제의 개발기술연구는 경제, 사회, 그리고 기술적 측면에서 매우 중요하며, 성공적으로 수행되어 간다면 매우 낮은 수준의 국내 단백질공학기술 자체의 발전은 물론 타의 약품 개발에 대한 기술적 파급 효과도 매우 클것으로 전망된다.

본 연구는 합성펩타이드 백신개발기술연구, 합성펩타이드의 항원성 및 면역원성 연구, 인간화된 항체개발기술연구, 재조합항체의 대량생산기술연구, 생복합면역백신 개발기술연구, T-임파세포 활성화 유도 면역치료제개발연구(I), (II), 유전자 백신개발연구, 재조합항원 단백질백신의 면역 보조제 개발연구등의 9개 소과제로 구성되어 있으며, 전체적인 중과제로 볼 때 현 기술상태의 취약성, 즉 기능성 단백질의 효율적인 생체내 전달체제 기술, 고차구조연구, 항원 및 항체 구조의 modeling, 그리고 독성, 전임상 및 임상실험의 체계 미비 등의 보완 및 극복이 성공적 과제 수행의 관건으로 볼 수 있다. 위의 취약성들이 해결된다면 기능성 단백질의 구조와 기능관계연구 정립은 물론 생의약품 개발에 커다란 진전이 있으리라 전망된다.

첫째 합성펩타이드 관련 백신개발기술연구의 경우 항원성과 면역성을 증진시킬 수 있는 합성펩타이드 제조가 우선이며, 효과적인 면역성 adjuvants의 개발이 시급한 실정이다. 합성펩타이드 백신은 기존의 혈장백신과 유전자재조합백신의 문제점들을 해결 및 보완해 줄 수 있는 차세대 백신으로 성공적으로 수행되어 진다면 AIDS, 인플루엔자 및 암 등을 예방할 수 있는 백신개발에도 누적된 연구결과의 활용이

가능할 것이다.

펩타이드 이용 다기능 백신개발연구의 경우 변이가 심한 표면 부위가 epitope일 가능성이 높기 때문에 어느 특정 type의 바이러스 clone만으로는 백신개발이 불가능하다. 따라서 가능한 많은 수의 바이러스 유전자 서열을 비교분석하여 공통성이 높은 면역의 epitope을 선정하며 그 후보물질을 백신으로 결정하는데 많은 연구가 필요하리라 전망된다.

항체 관련 개발기술연구의 경우 현 대상과제는 B형 간염바이러스의 표면항원들에 대한 인간화된 항체의 생산기술이므로, 이 항체들을 생산하면 국내외 B형 간염바이러스의 감염예방 및 치료용도의 post-exposure prophylaxis에 이용되어, B형 간염바이러스의 보균자 수를 줄이고 HBV감염으로 인한 간의 이식수술결과에 대한 성공률을 높일 수 있다. 이 기술의 대상만 바꾸면, 모노클로날 항체를 이용한 다른 질병(암, AIDS, 자가면역질환, 다른 세균성 질환)의 예방 및 치료제 개발에 그대로 응용할 수 있으리라 전망된다.

생복합 면역 백신개발 기술연구의 경우 재조합바이러스 및 세균제조기술의 확립은 연구자의 연구 목표에 따라 기능성 단백질 유전자 생체 운반용 매개체(벡터)를 선정할 수 있고 다양한 외부 유전자를 도입시킬 수 있으므로 신규바이러스나 지금까지 백신이 개발되지 않는 바이러스의 복합면역백신개발에 이용할 수 있을 것이다. 또한 본 연구과제에서 파생된 유전자 재조합기술, 기능성 단백질 개량기술과 바이러스 및 포유동물 세포 배양기술은 생명공학 제품을 위한 핵심기술의 기반을 구축할 것이다.

또한 T-임파세포 활성화유도면역치료제 개발기술연구는 혈중항체생



산을 목표로하는것이 아니라, 바이러스에 감염된 숙주세포를 직접 공격하는 cytotoxic T lymphocyte (CTL)의 체내생산(cellular immunity)을 촉발하여 치료를 도모하는 것으로 촉발과정에서 항체 생산도 부수적으로 유도되므로 재래적 의미의 백신으로서 효과도 동시에 획득이 가능하다. 본 과제를 통하여 획득되는 기술은 펩타이드와 펩타이드 수용체, 단백질의 구조 및 상호간의 작용에 관한 정보를 제공하여 향후 펩타이드를 이용한 각종 치료제의 개발에 공헌을 하게 될 것이다.

유전자 백신 개발기술은 최근 대두되고 있는 기술로서, 기존의 백신과는 달리 생체내의 세포를 “vaccine factory”로 이용하고자 하는 것이다.

본 기술의 개발은 백신으로서 뿐만 아니라 치료제로서의 응용가능성도 있으며, 또한 재조합 항원 단백질을 백신의 주 성분으로 하고자 할때 새로운 adjuvant를 개발하고자 하는 마지막 세부과제는 현재 alum만이 FDA에 의해 공인받은 adjuvant라는 점을 감안할때 필요한 연구이며, 이 연구의 결과는 본 과제의 모든 세부과제에 적용이 가능함으로서 그 공헌도가 클 것이다.

## 제 2 장 과제구성



여 백

## 제 3 장 세부과제별 연구결과

### ● 제 1 세부과제 : 합성펩타이드 백신개발기술 연구

#### 1. [B], [T] 항원 결정기의 연결방법에 대한 연구

preS2 항원의 경우(120~145)의 서열은 T, B세포 항원결정기의 연속으로 항체생성을 유도할 수 있으나 B, T의 순서로 연결한 경우에는 항체생성능이 없었다. B-T 펩타이드가 항체 생성을 유도하지 못하는 것이 T세포 항원결정기가 presentation되지 않기 때문일 것이라는 가정하에 B, T 서열 사이에 proteolytic enzyme cleavage site(GFT, GFG, GRG, GDG 및 GSG)를 삽입하였고 cathepsin B, D로 절단됨을 확인하였다. 하지만 이들도 항체 생성을 유도하지 못했다. 이상의 결과로 보아 펩타이드 항원의 presentation에서는 processing site 존재이외에 다른 조건이 중요한 것으로 생각되는데 펩타이드 항원의 polarity 세포 항원결정기가 N말단에 위치해야만 항체생성능을 갖는 것으로 생각된다.

HBsAg preS2의 T-세포 항원결정기인 120~132 부분과 B-세포 항원결정기인 130~145 부분을 결합시키는 방법으로 리포솜을 사용하여 실험하였다. 펩타이드를 백신으로 사용할 부분을 결합시키는 방법으로 리포솜을 사용하여 실험하였다. 펩타이드를 백신으로 사용할 경우에 각 항원결정기의 배열에 의해서 면역원성이 영향을 받는 경우



가 있으므로 리포솜을 이용하여 펩타이드 배열에 따른 영향을 관측하였다. T-, B-세포 항원결정기를 딸 리포솜에 결합시켰을 경우에 항체 생성을 향상시키지 못하였으며, 또한 B-T의 순서로 배열된 경우에도 항체 생성을 향상시키지 못하였다. 위의 결과로부터 T-, B-세포 항원결정기가 모두 존재한다 하여도 배열순서에 따라서 구조적인 변화 등에 의해서 면역원성에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

## 2. 펩타이드 백신의 면역원성 향상을 위한 펩타이드 Adjuvant에 대한 연구

펩타이드 항원의 면역원성을 증진시키기 위해 면역원성 향상의 기능을 갖는 아미노산 서열을 T-B 항원(preS2 120~145)의 C말단에 첨가하여 그 효과를 확인 중에 있다. 면역원성을 향상시키는 아미노산 서열로는 macrophage 결합활성을 갖는 HCQRPR, GLF, VEPIPY와 IL-1의 아미노산 서열중 활성부위인 VQGEESNDK를 선택하였다. 합성한 펩타이드들이 항체생성능을 갖는지 확인하기 위해서 펩타이드 용액을 100ug/100ul/마리씩 i.v.으로 주사하고 혈청을 채취하여 항원생성 여부를 확인하고 있다. 펩타이드의 macrophage 활성화여부는 주사 후에 macrophage population이 어떻게 변하는지 FACS analysis를 통해 확인하고 있으며 또한 펩타이드를 FITC나 Biotin으로 libeling 시켜 마우스에서 채취한 macrophage와 HL-60 Cell line을 differentiation 시켜 얻은 macrophage에 결합하는지의 여부를 FACS analysis를 이용,



확인 중에 있다.

### 3. 합성 펩타이드의 면역원성 향상을 위한 면역보조제로서의 리포솜

가. 리포솜의 조성을 변화시킴으로써 항원의 면역원성을 향상시키기 위하여 막을 조성하는 성분에 음전하를 띠는 인지질을 함유시켜 리포솜을 제조하였다. 사용된 인지질은 PA(phosphatidyl acid), PI(phosphatidylinositol), PG(phosphatidyl glycerol), PS(phosphatidyl serine)로 모두 음전하를 띠는 것이다. 항원을 HBsAg 전체 단백질과 HBsAg preS2 120~145 부분을 사용하여 리포솜에 결합시킨 후 면역화하여 항체생성정도를 비교하여 면역원성 향상에 미치는 인지질 조성의 영향을 조사하였다. 펩타이드의 경우는 첨가된 인지질의 종류에 따라서 영향을 받는 것으로 나타났으나, HBsAg 전체단백질인 경우에는 항원이 충분히 면역성을 갖기 때문에 인지질의 종류에 의한 면역원성 향상이 크게 나타나지 않는 것으로 사료된다. 펩타이드를 면역화한 경우에 인지질 중에서 PS가 함유된 리포솜을 사용한 경우가 항체생성을 더욱 향상시키는 것으로 나타났는데, 이는 PS를 함유한 리포솜이 간이나 지라에 많이 국부화되기 때문으로 생각된다. 여러 종류의 조성을 갖는 리포솜에 결합된 펩타이드의 항원성을 competitive ELISA를 통하여 조사하였다. 각 조성의 리포솜에 결합된 펩타이드들 간의 항원성의 차이는 거의 나타나지 않은 것으로 보아 리포솜의 표면에 변화되어서 생기는 항원성의 변화가 아니라 면역화된 후의 체내

에서 기관으로의 국부화에 의한 결과로 생각된다.

나. 펩타이드 투여량에 따른 항체생성정도를 비교해보면, 투여된 양이 증가할수록 항체생성율도 증가하는 것으로 나타났다. CFA를 사용하여 투여량과 항체생성정도는 직선관계를 갖지 않고 100 $\mu$ g 이상에서 급격히 증가하는 것으로 나타났다.

다. HBsAg pres2 부분에 helper T-세포 항원결정기가 120~132 부분과 151~174 부분으로 알려져 있는데, 어느 부분이 더욱 면역원으로 사용되는지 여부를 실험하기 위하여 각 helper T-세포 항원결정기에 B-세포 항원결정기를 결합시켜서 연속 펩타이드를 합성하여 Balb/c mice에 면역화하여 항체생성정도를 비교하였다. HBsAg preS2 151~174부분은 N-말단에서 8개의 아미노산을 제거한 159~174와 151~174 두종류로 실험하였다. 159~174 부분을 T-세포 항원결정기로 사용할 경우에 CFA에 펩타이드를 섞어서 면역화한 경우 항체가 생성되지 않는 것으로 나타났으나 리포좀을 사용하여 면역화한 경우는 항체가 생성되는 것으로 나타났다. T-세포 항원결정기를 151~174를 사용한 경우에는 CFA나, 리포좀 두 경우에 모두 항체를 생성시켰다. 항원결정기의 배열이 B-T의 순서로 결합되어 있는 경우에는 항체생성이 저조한 것으로 나타났는데, 이는 120~145 펩타이드를 사용한 경우와 같은 결과이다.

라. 리포좀을 백신용으로 사용할 경우에 리포좀의 안정성이 문제

가 되기 때문에 4℃와 상온에서 보관하며 안정성을 흡광도와 리포좀의 크기를 비교하며 실험중이다. 30일이 경과한 상황에는 4℃와 상온에서 모두 안정성에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

#### 4. 펩타이드 백신의 효율성 증진

가. 펩타이드-BSA conjugate로 면역시킨 마우스에 대한 HBsAg의 boosting 효과

펩타이드-BSA conjugate들을 CFA와 섞어 Balb/c 마우스에 1차 복강 주사하고 3주후 IFA에 섞어 2차 주사한 다음 항체생성이 감소되고 있는 16주에 preS2 부위를 함유한 재조합 HBsAg를 IFA에 섞어 복강주사하였다. 항체 생성을 조사하기 위하여 혈액을 안구정맥에서 채취하고 p130~145/adr-PEA, BSA, M HBsAg 및 S HBsAg에 대한 반응성을 조사하였다.

펩타이드-BSA로 면역시킨 마우스는 펩타이드를 단독으로 면역시킨 마우스에 비해 적은 양으로도 많은 항체를 생성한다. 그러나 이 conjugate들을 백신으로 사용하려면 본래 병원체가 들어올 때 중화시키는 작용이 있어야 한다. B형 간염 바이러스 중화작용을 보려면 침팬지를 이용하면 되지만 현실적으로 불가능하다. 이를 간접적으로 증명하는 방법은 마우스를 이용하는 방법으로 펩타이드-BSA로 면역시킨 마우스에 M HBsAg를 주사하여 preS2 부위에 대한 항체 생성이 증가되면 백신의 효과가 있는 것으로 간주할 수 있다.

본 연구에서는 HBsAg에 의한 preS2 부위의 항체 생산 증가는 펩타이드 종류보다는 개체차이에 의해 나타났다. preS2 부위에 대한 항체 생산이 증가되는 경우에는 일반적으로 M HBsAg 주사후 1주후(17주)까지는 감소되거나 변화가 거의 없다가, 2주후(18주)부터는 증가되는 현상을 나타내고 4주후(20주)까지 계속 증가되는 양상을 나타내었다. 그러나 BSA에 대한 항체생산은 거의 변화가 없었고, S HBsAg에 대한 항체 생산은 항체 생산이 급격히 증가하는 군에서 나타나나, 그 정도는 preS2 부위에 대한 항체에 비해 미미한 수준을 나타냈다. 이 결과들은 펩타이드-BSA가 일부 negative 결과를 보이지만 백신으로 사용가능성을 제시해 준다. BSA 대신 현재 백신으로 사용하고 있는 tetanus toxin과 같은 물질을 carrier로 사용하면 복합 면역 백신의 개발도 가능하리라 여겨진다.

나. Multiantigenic 펩타이드(MAP)의 합성 및 항원성 시험.

Tam 등에 의해 제시된 MAP를 합성하고 Tricine gel-SDS 전기영동에 의해 그 순도를 확인하였다. 이와 같이 합성된 MAP은 C<sub>18</sub> 역상 HPLC에 의해 정제하고 동결건조시켜 정제된 파우더를 얻었다. 경쟁 ELISA법에 의해 측정된 펩타이드의 항원성은 Linear peptide > MAP2 유도체 > MAP4 유도체순으로 나타났다. 이 이유는 가지친 B세포 항원결정기간의 구조적인 방해(steric hinderance)에 의한 것으로 여겨진다. 또한 C-말단의 소수성 아미노산인 (Leu)<sub>4</sub>를 도입한 경우 더 많은 항원성의 감소를 나타내었다. 또한 C-말단의 소수성 잔기들이



H8 mAb에 대한 항원 결정기 구조에 영향을 주기 때문이라 사려된다. C-말단에 (Ser)<sub>2</sub>(Lys)<sub>2</sub>를 도입하고 N-말단에 Acetyl 기로 protection 한 것은 Lys의 amine기에 lipidylation 시키기 위한 것으로 현재 이에 대한 실험이 진행되고 있다. Lipidylation 시킨 펩타이드들은 adjuvant 없어도 백신으로서 사용가능성이 제시되고 있다. C-말단에 (Leu)<sub>4</sub>를 도입한 것은 이들 구조가 lipid group의 효과를 대치할 수 있는가를 시험하기 위하여 합성하였다. MAP 및 lipidylation 시킨 MAP들은 마우스에 주사하여 면역원성을 시험할 예정이다.

## 5. 펩타이드의 구조와 기능에 관한 연구

가. 절단되거나 치환된 펩타이드를 이용한 B세포 항원결정기의 항원성 및 구조 분석

2차년도 보고서에서 서열 120~145 펩타이드(p120~145)가 p130~145에 비해 H8 mAb에 대해 높은 항원성을 갖는 것은 구조적 요인이라는 것을 밝혔다. 본 연구에서는 이를 더 뒷받침하기 위하여 N-말단을 차례로 절단하거나(표 4) 또는 127번 위치를 치환시킨 펩타이드(표 5)들을 이용하여 N-말단 아미노산 잔기들이 항원성 및 구조에 미치는 요인들을 살펴보았다. 항원성은 경쟁 ELISA법으로 조사하였다.

N-말단으로부터 차례로 절단시켰을 때 항원성은 잔기 124번까지 절단해도 유지되지만 잔기 125번부터의 절단시에는 항원성이 차례대로 급격히 감소되었다(그림 12). p120~145/adr의 치환된 펩타이드를



이용한 2차년도 결과에서의 친수성 잔기 124~126 및 소수성 잔기 127이 항원성 유지에 중요하다고 밝혔으나, 본 연구에서는 이중 125, 126 및 127 그리고 잔기 129가 중요함을 추가로 제시해 주고 있다.

소수성 잔기 127이 항원성에 미치는 영향을 아미노산 치환 방법에 의해 알아본 결과, 잔기 127의 side group의 크기가 클수록, 소수성일수록 항원성을 증가시키었다. 극성을 따면 모두 항원성을 감소시키는 효과를 나타내나 특히 양전하를 띤 Lys로 치환시켰을 때 감소효과가 두드러지게 나타났다.  $\alpha$ -helix 구조를 파괴하는 Pro 치환도 항원성을 급격히 감소시켰으며 side group의 크기가 작은 Ala도 항원성을 급격히 감소시켰다. 전체적인 항원성은 Phe>Ile>Glu=Thr>Ala=Pro>Lys 순서로 나타났다(그림 13). CD에 의한 2차구조 검사시에도 수용액에서는 대부분 random coil 형태를 나타내나 20% trifluoroethanol에서는 높은 항원성을 나타내는 펩타이드가 보다 더 높은  $\alpha$ -helicity를 나타냈다(그림 14).

나. Molecular Dynamics Study를 통한 HBV의 surface antigen중 adr 펩타이드와 137Gln mutant의 구조적 특이성과 항원성과의 관계

HBsAg의 preS2 부위중 서열 125~145의 peptide에서 137번의 Arg이 항원성에 중요한 것으로 2차년도 보고서에서 보고한 바 있다. 본 연구는 p120~145/adr 중 137번의 Arg을 Gln으로 치환했을 때 antigenicity가 떨어지는 실험적 결과를 computer modeling을 이용, 특이성을 찾으려 했다. 본 연구에서는 original peptide와 137 Gln

mutant를 helix구조로 만들어 vacuum state에서 molecular dynamics(MD) simulation을 했다. MD calculation의 trajectory에서 helical hydrogen bond를 trace한 결과, original peptide가 mutant보다 더 flexible한 것으로 나타났다. 그 원인은 137Arg이 주위의 129 Gly, 133 Asp 그리고 145 Gly과 복잡한 상호관계를 하기 때문인 것 같다. 그림 15는 original peptide의 구조중 복잡한 H-bond를 잘 나타내준 그림이다. 그리고 이 결과는 NMR에서의 결과와 상응한다(결과는 보이지 않음).

## ● 제 2 세부과제 : 합성 펩타이드의 항원성 및 면역 원성 연구

### 1. ELISA system 개발

#### 가. 합성펩타이드의 면역

ELISA system 개발을 위하여 2차년도에 합성한 합성펩타이드 (SPC-16, SPC-22, SPC-25)를 면역시켜 사용하였다.

펩타이드 면역을 위하여는 펩타이드 단독 혹은 KLH나 BSA를 carrier protein으로 하여 conjugation시켜 사용하였다.

#### 나. Blocking agent에 의한 효과

합 펩타이드 항체(anti-SPC16/KLH)의 측정시에 blocking agent의 영향을 측정한 결과, BSA에 대한 비특이적인 반응이 gelatin에 대한

비특이적 반응보다 높게 나타나, gelatin을 blocking agent로 사용하는 것이 효과적이다.

이러한 결과는 다른 항펩타이드 항체(anti-SPC22, anti-SPC25)를 사용하였을 때에도 유사한 양상을 보여, blocking agent에 대한 반응성은 합성펩타이드 자체가 가지는 면역원성과는 무관한 것으로 추정되었다.

또한, BSA를 carrier protein으로 사용하였을 때에도 동일한 결과를 관찰하였으며, 이러한 결과는 일반적으로 mouse 항 혈청이 가지는 blocking agent와의 반응성에 기인하는 것으로 추정하였다.

#### 다. 합성 펩타이드를 이용한 ELISA 조건 확립

이상에서의 결과를 토대로 하여 합성 펩타이드를 이용하여 항펩타이드 항체를 측정하기 위한 ELISA 조건을 확립하였다.

### 2. 펩타이드 항체의 교차반응성 연구

#### 가. 항펩타이드 항체와 재조합 항원과의 반응성

항펩타이드 항체를 이용하여 재조합 whole antigen(recombinant whole HCV antigen)과의 반응성을 측정한 결과, SPC16과 SPC25에 대한 항펩타이드 항체가 재조합 HCV 항원과의 반응성이 높게 관찰되었다. 이와 같은 결과에서 볼 때 SPC16이나 SPC25 합성 펩타이드는 native whole antigen과 가까운 것으로 추정된다.

나. 항펩타이드 항체와 native whole antigen과의 반응성

항펩타이드 항체와 native whole antigen(HCV antigen)과의 반응성을 측정하기 위하여 HCV 감염환자의 혈청을 사용하여 anti-SPC16 항체와의 반응성을 측정하였다.

ELISA법에 의하여 native whole antigen인 HCV 혈청을 coating 시 50mM EDAC(1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride)용액에 희석하여 coating 할 때가 PBS를 사용할 때에 비하여 anti-SPC16 항체에 대한 반응성이 증가하는 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과는 합성펩타이드의 면역에 의해 생성된 항펩타이드 항체가 native whole antigen과 결합가능성이 있다는 것을 제시하여 주었으며, 펩타이드 항원이 native 항원이 가지는 항원구조를 형성하였기 때문인 것으로 추정하였다.

또한, EDAC에 의한 결과가 항펩타이드 항체와의 특이적인 반응에 의한 영향인 것을 확인하기 위하여 합성 펩타이드(SPC-16)를 면역시킨 mouse의 혈청에 대하여 실험을 하였으며, 합성 펩타이드(SPC-16)를 EDAC와 PBS에 희석하여 사용하였을 때 유의성 있는 차이가 나타나지 않는 것으로 보아 EDAC에 의한 반응성 촉진은 항펩타이드 항체의 특이적 반응성과 무관하게 나타나는 것으로 추정하였다.



### 3. Immunoliposome 연구

#### 가. Proliposome의 제조

Proliposome의 제조는 2차년도에 확립된 방법과 동일하게 인지질로서 egg lecithin을 사용하고, 모델 약물로서는 propranolol hydrochloride를 사용하여 제조하였으며, proliposome의 멸균효과 및 liposome 변환후의 방출효과 등을 측정하였다.

#### 나. Proliposome의 $\gamma$ -ray 멸균효과

Proliposome의 멸균효과 측정을 위하여 3차년도에는  $\gamma$ -ray에 의한 멸균효과를 측정, 비교하였다. Proliposome 제조후  $\gamma$ -ray를 각각 2.0Mrad, 2.5Mrad, 3.0Mrad의 조사선량으로 조사하여 멸균처리한 proliposome에 멸균증류수를 가하여 리포솜을 제조한 후 이를 미생물 배양 배지에서 배양하여 멸균 효과를 비교하였다. 그 결과,  $\gamma$ -ray 조사에 의하여 proliposome이 효과적으로 멸균처리되는 것을 확인하였다.

#### 다. $\gamma$ -ray 멸균에 대한 proliposome 유동성 변화

Proliposome에  $\gamma$ -ray로 멸균처리(1, 2.0, 2.5, 3.0 Mrad)한 후 proliposome의 유동성을 측정한 결과, 멸균 처리에 의해서 proliposome의 유동성에는 변화가 없는 것을 관찰하였다.



라. Proliposome의 멸균조작에 따른 방출 특성

멸균조작에 의하여 proliposome 제조시 사용한 모델약물 (propranolol)의 방출속도가 변화하는지를 비교하였다. 그 결과  $\gamma$ -ray로 멸균시킨 것과 멸균처리하지 않은 proliposome 모두 모델약물의 방출에는 아무런 영향을 미치지 않는 것을 관찰하였다.

#### 4. "built-inadjuvant" 연구

##### 가. 펩타이드 합성 및 면역

Human Interleukin-1(IL-1) sequence 중 immuno-stimulatory sequence로 알려진 nonapeptide(VQGEESNDK)를 포함하는 합성펩타이드로서 2차년도에 합성한 SPE17IL peptide를 사용하였다.

##### 나. Thymocyte 증식효과

SPE17IL, SPE17 및 SPE17+IL nonapeptide 각각의 peptide 항원에 대한 thymocyte 증식효과를  $^3\text{H}$ -thymidine pulse 방법에 의해 측정 한 결과 SPE17IL과 IL nonapeptide는 농도에 따른 thymocyte 증식효과를 보였으며, control로서 사용한 SPE17의 경우에는 thymocyte 증식효과가 현저하게 낮았다.

### ● 제 3 세부과제 : 인간화된 항체 개발기술 연구

1. HBV의 S 표면 항원에 결합하는 키메라 항체의 개발 및 CHO 세포에서의 생산

가. HBV의 표면항원인 S의 common "a" antigenic determinant에 결합하는 생쥐/사람 키메라 항체를 2차년도까지는 생쥐 myeloma 세포에서 발현시켜 KR12H 세포주를 분리하고 그 항원결합특성, 친화도를 측정된 결과 parental 생쥐단일클론 항체와 동일한 친화도를 갖음을 확인하였다. 3차년도에서는 Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포에서 유전자증폭 방법을 이용하여 발현시켜, 단위세포당 항체의 생산속도가 약  $80\mu\text{g}/10^6\text{cells/day}$ 인 트랜스펙토마 세포주를 개발함(특허출원).

나. 상기세포주의 serum free medium 에서의 생산성을 T75 flask 에서 20ml의 CHO SFMI(GIBCO)를 넣고 4일 동안 항체를 상층액에 축적시킨 다음 측정하였으며, 그 결과 약 120mg/l의 생산성을 보였다.

다. 상기 세포주의 안정성을 50일간 조사한 결과 비교적 그 생산성이 장기간 보존되었다.

라. 상기 항체의 항원결합 능력 및 친화도를 결정하였고, 이것이 같은 특성을 갖는 parental 생쥐단일 항체와 동일함을 확인하였다.

## 2. HBV의 preS2에 결합하는 인간화 항체의 개발(특허출원 예정)

### 가. 인간화된 항체의 생산세포주 개발

HBV의 preS2에 대한 생쥐단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR들을 인간항체에 이식시키고 또한 중쇄 framework 3 내에 CDR3 인접 부위를 더 변형시켜 생쥐 myeloma 세포에 각각 transfection 시킨 결과, Z6B와 ZP39의 transfectoma clone들을 얻었다.

### 나. 인간화된 항체의 항원결합 특성 연구

상기 Z6B와 ZP39 인간화 항체를 Serum free medium에서 배양, 정제한 후, 그 항원결합 친화도를 결정한 결과, CDR-grafting 만 시킨 Z6B의 경우 같은 특이성을 갖는 키메라 항체인 H69K보다 약 10배 낮은 친화도를 나타냈고, 중쇄 framework region 3내의 아미노산을 Thr에서 Pro으로 한 개 더 치환하였을 경우 친화도가 다시 회복되어 H69K와 거의 동일한 친화도를 나타냄을 확인하였다. 또한 competition binding assay 에서도 같은 결과를 확인하였다.

상기 Z6B와 ZP39 항체와 이들의 CDR loop 구조를 modeling 하고 각각의 항체에서 Thr과 Pro 차이에 의한 CDR loop의 구조를 molecular dynamics simulation 한 결과, Thr인 경우보다 Pro인 경우 CDR loop의 flexibility가 높음이 밝혀졌다. 따라서 ZP39의 항원결합친화도가 Z6B에 비하여 더 높은 이유는 아마 수소결합의 차이일 것으로 사료된다.

다. 인간화된 항체의 인체 내에서의 면역반응 유발정도를 예측하기 위하여 잡종토끼를 실험동물로 사용하여 HBV의 preS2에 대한 생쥐 단일클론 항체를 주사하고 이에 대해 생긴 항체를 동종의 특이성을 갖는 mouse IgG, 키메라 항체, 인간화된 항체와 결합시켜, 항체 domain의 면역유발성을 실험한 결과 잡종토끼의 면역반응율이 서로 달랐으며 키메라 항체의 경우 5~9%, 인간화된 항체의 경우 2~7%의 면역반응성을 나타냄을 확인하였다. 따라서 인간화된 항체의 항체치료제로서의 임상적 적응은 가능할 것이라 사료된다.

#### 라. 인간화된 항체의 HBV의 중화효과

개발된 항체의 HBV의 중화효과를 시험하기 위하여 사람 간세포를 primary culture하고 B형 간염바이러스를 감염시키면서 여러 농도의 항체를 섞어주어 HBV의 neutralizing 효과를 관찰한 결과, S 나 preS2에 대한 항체가 모두 중화시킴을 확인하였고 HBIG에 비하여 그 특이적 활성도가 약 1,400배 및 750배 높았다.

### 3. 사람 간세포의 primary culture

협동연구기관인 프랑스 INSERM U47 간 연구소의 Dr. Guguen-Guillouzo 실험실에 연구원을 파견하여 프랑스 간암환자의 간조직으로부터 정상 간세포만을 분리 및 배양하는데 성공하였다.



#### 4. HBV(adr 아형) 입자의 제조

HBV를 간암세포인 HepG2 세포에서 생산하기 위하여, 국 내에서 분리한 adr 아형 HBV DNA를 부분적인 dimer로 만들어서 plasmid pHBV 5.2를 제조하였다. 이 plasmid를 HepG2 세포에 transfection 한 후 15일 동안 배양액으로 분리되어 나온 바이러스를 PEG로 농축한 후 원심분리하여 분리하였다.

#### 5. HBV 입자의 항체에 의한 immunoprecipitation

HBV preS2에 대한 인간화된 항체 ZP39와 S에 대한 키메라 항체 CS131A가 상기의 HBV를 침강시키는 것을 확인하였다.

#### 6. 배양된 사람 간세포에서의 HBV in vitro infection

6 well plate에서 배양된 사람 간세포에 상기 분리한 adr 아형 HBV를 감염시킨 후 2일마다 배지를 교환시키면서 15일 동안 배양액으로 분리되는 HBsAg을 radioimmunosassay한 결과, 감염시킨 후 시간이 지남에 따라 HBsAg의 농도가 높아지는 것으로 보아 HBV가 감염하여 복제하는 것을 알 수 있었다. Ayw 아형의 바이러스를 가지고 반복실험을 하였을 때도 비슷한 결과를 얻었다.

#### 7. 키메라 및 인간화된 항체의 HBV 중화 효과

상기의 HBV in vitro infection 실험에서 adr 혹은 ayw 아형의



HBV를 여러 농도의 항체, 즉 human IgG(negative control), HBIG(positive control) 혹은 preS2에 대한 인간화된 항체 ZP39나 S에 대한 키메라 항체와 섞어준 후 배양된 간세포에 감염시켰다. 매일 배지를 교환하여 southern blot hybridization 분석으로 항체의 중화효과를 관찰하였다.

그 결과 상기 항체들은 HBV를 훌륭히 중화시킴을 확인하였고, 같은 수준의 중화에 필요한 항체의 농도별로 비교해 본 결과, S에 관한 키메라 항체 CS131A는 HBIG보다 그 specific activity가 1,400배 높았고, preS2에 대한 인간화된 항체는 HBIG보다 약 700배 높은 것을 확인하였다.

## ● 제 4 세부과제 : 재조합 항체의 대량 생산기술 개발 연구

### 1. 동물세포 배양체계의 확립

재조합 항체의 대량 배양조건은 세포성장을 위한 배양액으로  $\alpha$ -MEM + 10% FBS + 1 $\mu$ M MTX을 사용하여 3일간 배양하였다. 그 후 항체생산용 배지는 CHO-S-SFM을 사용하여 4일간 배양하였다.  $\alpha$ -MEM 배지는 powder(Gibco BRL Cat. No.12000) 10.2g에 2.2g/L의 NaHCO<sub>3</sub>(Gibco BRL, Cat. No.11810)을 첨가하여 pH 7.2~7.4로 제조한 다음 제균 여과하여 냉장보관하여 사용하였으며, CHO-S-SFM II

DPM 배지(20mM HEPES, pH 7.4)는 CHO-S-SFM II DPM(Gibco BRL, Cat. No.22050) powder에 2.45g/L의 NaHCO<sub>3</sub>를 첨가하여 pH 7.2~7.4로 조정하여 제조한 다음 제균 여과하여 냉장보관하여 사용하였다. 배양조건은 전기간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in Air 조건에서 배양하였다. 실험에 앞서 분양 받은 anti-S 항체생산용 CS131-A colony를 위의 배양조건하에서 master seed 및 working seed를 먼저 제작한 다음 배양체계 확립을 실시하였다.

동결보관 중인 CS131-A 세포주 1 vial을 용해하여 T-75 flask를 사용하여 배양하였다. 배양조건은  $\alpha$ -MEM(NaHCO<sub>3</sub> buffer) + 10% FBS + 1 $\mu$ M MTX 또는 MTX 무첨가였으며, 계대시 세포농도는 10<sup>5</sup>/ml로 조정하였다. 최종적으로 T-175 flask 8개로 계대하여 실험구를 조성하였다. T-175 flask 8개에 동일한 세포농도(10<sup>5</sup>/ml, 총 30ml)가 되도록 조정한 후 다음과 같이 8가지로 배양조건을 달리하여 일정기간 동안 배양하였다.

- Case 1 : MEM(HEPES)+FBS+MTX --- SFM(HEPES)+MTX
- Case 2 : MEM(HEPES)+FBS+MTX --- SFM(HEPES)-MTX
- Case 3 : MEM(NaHCO<sub>3</sub>)+FBS+MTX --- SFM(NaHCO<sub>3</sub>)+MTX
- Case 4 : MEM(NaHCO<sub>3</sub>)+FBS+MTX --- SFM(NaHCO<sub>3</sub>)-MTX
- Case 5 : MEM(NaHCO<sub>3</sub>)+FBS-MTX --- SFM(NaHCO<sub>3</sub>)+MTX
- Case 6 : MEM(NaHCO<sub>3</sub>)+FBS-MTX --- SFM(NaHCO<sub>3</sub>)-MTX
- Case 7 : MEM(HEPES)+FBS-MTX --- SFM(HEPES)+MTX

Case 8 : MEM(HEPES)+FBS-MTX --- SFM(HEPES)-MTX

$\alpha$ -MEM이나 무혈청배지 상태에서의 배양은 buffer 조건에 맞추어 HEPES의 경우(Case 1,2,7,8) 일반 37°C 배양기에서, carbonate buffer의 경우(Case 3,4,5,6) 5% CO<sub>2</sub> in air 배양기에서 각각 4일간 배양하였다. 그 후 다음과 같은 조건으로 SFM으로 교환하여 4일간 배양한 후 배양상청을 각 case 별로 30ml 회수하였다. 회수된 배양상청으로 부터 제조항체의 분리정제 방법은 다음과 같이 실시하였다. 배양상청을 원심분리(3,000g × 20min)하여 cell debris를 제거한 후 배양상청과 동등한 양의 Binding buffer를 첨가하여 loading 준비를 하였다. Protein A-Sepharose 4B column(5 × 1cm)을 packing 한 후 Binding buffer로 평형시키고 준비된 시료를 2ml/min 속도로 loading 하였다. Loading한 후 binding buffer를 이용하여 column안에 붙어 있지 않은 모든 단백질을 제거하고 elution buffer로 Binding elution하여 단백질을 fraction 별로 모아 분석하였다.

그 결과 각 배양조에서 MTX첨가에 따른 세포성장의 형태학적 변화는 관찰되지 않았으나 MTX 첨가시 세포성장이 다소 둔화되는 경향을 보였다. 한편 세포수 측정 결과에 있어서 HEPES buffer 보다는 carbonate buffer에서의 세포성장이 보다 높게 나타났으며, 이는 사용한 세포주가 carbonate buffer에서 확립된 것이기 때문에 당연한 결과로 생각되며, 앞으로 공업화 수준에서 요구되는 HEPES buffer를 이용하려면 일정계대의 적응기간을 거쳐 새로운 세포주를 선발해야 할 필

요성이 있다고 사료된다.

한편 무혈청배지(CHO-S-SFM)를 이용하여 재조합 항체를 생산하고 분리 정제한 결과는 다음과 같다. 배양상청을 회수하여 Protein A affinity column을 사용하여 분리정제한 후 최종 생산량을 spectrophotometer로 조사하고 전기영동을 실시하여 단백질량을 확인하였다. 그 결과 소량배양 체계에서는 120mg/l로 보고된 반면 대량 배양체계에서는 그 절반 수준인 62mg/l의 생산량을 나타냈다. 또한 각 배양조건별 항체생산량은 일반적으로 case 1-4에 있어서 SFM에 MTX 첨가한 경우가 아닌 경우에 비해 약간 증가된 항체 생산량을 보였으나 그 차이는 미미하였다. 그러나 carbonate buffer의 경우 HEPES에 비해 현저히 증가한 생산량을 보였으며(case 3-6), 초기 성장배지  $\alpha$ -MEM에서는 MTX첨가에 따른 생산량의 차이는 두드러지지 않았다(case 1-4 vs case 5-8). 그러나 이는 세포수의 차이 또는 HEPES buffer에서의 세포적응 미흡 등의 요인에 기인할 수도 있어 앞으로 세포수를 동일하게 조정하거나 HEPES buffer에 적응시킨 새로운 cell-line의 구축 등이 선행되어야 할 필요가 있을 것을 사료된다.

## 2. 재조합 항체의 항체가 측정 및 중화효과 비교

HBsAg에 대한 항체를 RIA로 측정할 수 있는 kit의 하나인 AUSAB(Abbot Lab., IL, U.S.A)을 이용하였다. Kit 안의 Plate의 각 well에 antigen이 coating된 bead를 1개씩 넣은 후 각각의 well에



200ul의 시료와 positive control(3개), negative control(7개)을 넣은 다음 plate를 sealing한 후 상온에 16~20시간 동안 반응시켰다. 반응을 종결시킨 후 각 well의 용액을 버리고 bead는 Pentawash를 이용하여 washing한 다음 plate의 well에  $^{125}\text{I}$ -HBsAg 200 $\mu\text{l}$ 씩을 첨가한다. 이때 bead가 충분히 잠기는 것과 bubble이 trap 되지 않는 것을 확인한다. Plate를 다시 sealing한 후 4시간 동안 상온에 반응시키고 well안의 용액을 모두 제거한 후 다시 well과 bead를 옮긴 다음  $\gamma$ -counter를 이용하여 측정하였다. 항상 실험은 최소한 duplicate로 실시하였으며, 측정 결과는 다음과 같이 분석하였다. 첫째, 모든 측정값(7개)에서 negative control의 평균값을 구한 다음 평균값의 0.5~1.5배 사이의 값만 취한 후 다시 평균을 구한다. 위의 값에서 기계자체에서 유래한 cpm값을 다시 뺀 후 2.1배를 곱하고 실험값 중 위의 값을 넘는 것은 모두 의미 있는 값으로 인정한다. 이상의 값을 구한 후 Positive control/Negative control을 구하여 이 값이 15이상이어야 한다. 일단 이 값이 15이상이면 시료의 농도는(sample-negative control)/(positive control-negative control)의 값을 구한 후 kit 안의 table을 이용하여 값을 구하였다. 둘째로 첫번째 방법과 다른 방법은 동일하게 실시하면서 동시에 시료 중의 일부를 이미 알려진 표준품을 각각 다른 농도로 만든 후 농도와 cpm값을 직선상을 이루는 부분의 1차 회귀분석한 값을 이용하여 sample의 cpm값을 역산하여 농도로 환산한다. 이 때 시료의 농도는 적절히 희석하여 표준품의 직선을 보이는 구간에 있어야



한다. 일반적인 실험에서는 위의 2가지 분석을 모두 동시에 실시하였으며 결과는 큰 차이를 보이지 않아 주로 두번째 방법을 이용하였다. 즉,  $\beta$ -counter로 측정한 Standards의 CPM값을 nonspecific binding때문에 일어나는 negative control의 값을 빼서 Standard의 농도에 의한 CPM의 변화를 graph로 그린 다음, 1차 회귀곡선을 구하고 여기서 구한 직선식을 이용하여 시료의 CPM에서부터 농도를 환산한 후 희석비율을 곱하여 항체의 양(항체가)을 측정하였다.

그 결과가 재조합 항체의 항체가는 33unit/mg이었으며, 참고로 HBIG의 경우 230unit/130mg(1.77unit/mg)이므로 재조합 항체가 약20배 정도 높은 것으로 확인되었다. 그러나 중화효과 실험 결과를 인용하면 Anti-S chimeric antibody는 HBV의 중화효과를 잘 나타내었으며, specific activity가 HBIG보다 1,000배 이상 높은 것으로 확인되었다. 또한 anti-preS2 humanized antibody(ZP39)의 경우도 생쥐 단일클론 항체 H8과 그 항원결합성이 동일함이 확인되었으며, HBV의 중화효과를 잘 나타내었고, specific activity가 HBIG보다 약 700배 정도 높게 나타나는 것으로 확인된 바 있다.

### 3. 대량생산에 따른 경제적 분석

이상의 결과를 바탕으로 두 가지 측면에서 경제성 분석을 실시하였으며 그 결과는 다음과 같다. 생산재료비 중 배양기구와 무혈청배지가 차지하는 비율이 비교적 높은 것으로 나타났다. 단순히 항체가 측

면에서 재조합 항체와 HBIG간의 경제성 분석 결과는 다음과 같았다. 동물세포배양에 따른 재조합 항체의 대량생산에 필요한 생산비는 순수 재료비만 배양상청 1L 생산에 약 16~17만원 정도가 소요되고, 대량 배양시 재조합 항체 생산수율은 정제과정을 거친 후 약 60mg/L 수준이고, 여기에서 항체가가 33unit/mg 이므로 배양상청 1L는 약 2,000unit에 해당되며, 생산비용은 unit 당 80원 정도 소요되고 이는 현재 시판중인 HBIG과 비교할 때 약 8.7병을 생산할 수 있는 분량이 된다. 그러나 중화효과를 고려할 경우 위의 계산보다 생산단가 명에서 1/50 정도의 감소효과가 있으며, 또한 생산량 측면에서도 소량배양 수준인 ml당 120 $\mu$ g 정도로 증가할 경우 1/100 가량의 생산비 감소요인이 있는 것으로 판단되었다.

## ● 제 5 세부과제 : 생복합 면역 백신개발기술 연구

### 1. Ad/HCV/E3의 제조 및 특성 규명

가. HCV의 구조단백질 유전자를 갖고 있는 pFG144k5/HCV를 제조한 후 이 플라스미드를 아데노 바이러스의 EcoRI DNA fragment와 함께 293세포내 cotransfection시켜 재조합 아데노 바이러스를 제조하였다.

나. 재조합 아데노 바이러스로 감염시킨 HeLa세포에서 DNA를 분

리하여 제한효소분석을 한 결과 HCV의 구조단백질 유전자가 아데노 바이러스의 E3부위에 도입된 replication-competent한 아데노 바이러스 Ad/HCV/E3이 얻어졌음을 확인하였다.

다. Ad/HCV/E3으로 감염시킨 HeLa세포에서 RNA를 분리하여 northern hybridization을 수행하였을 때 HCV 특이적인 RNA가 감염 후 6시간에서 생성되며 24시간에서 가장 많이 생성됨을 알 수 있었다.

라. Ad/HCV/E3 바이러스로 감염시킨 HeLa 및 293세포에서 HCV core 단백질(22kDa)의 발현을 immunoblot으로 확인하였다. HCV외피 당단백질로서 알려진 gp35, gp70 단백질의 발현은 세포 및 바이러스 단백질과 HCV 양성환자의 항체들간의 interference때문에 확인할 수 없었으나 GNA-agarose chromatography를 이용하여 Ad/HCV/E3으로 감염된 세포의 단백질 추출물을 분획한 후 immunoblot을 하였을 때 gp35 및 gp70의 발현을 확인하였다.

마. 토끼에서 제조된 HCV의 gp35 및 gp70에 대한 각각의 항체를 이용하여 Ad/HCV/E3으로 감염시킨 세포의 단백질을 <sup>35</sup>S로 표지한 후 면역침전반응을 수행하였을 때 gp35와 gp70은 서로 복합체를 형성하고 있음을 알 수 있었으나 특이성이 좋은 항체를 이용하여 세밀한 분석을 할 필요성이 있다.

## 2. Ad/DES/E3의 제조 및 특성 규명

가. 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 2(HSV-2)와 HBV에 대한 복합면역을 유도하기 위하여 HSV-2의 항원유전자 gD와 HBV의 표면 항원 유전자 S를 cap independent translation을 유도하는 internal ribosome entry sequence(IRES)로 연결한 후 pFG144k5플라스미드에 도입하여 pFG144k5/DES를 제조하였다.

나. pFG144k5/DES와 아데노바이러스 EcoRI DNA fragment (27kb)를 293세포에 cotransfection시켜 replication-competent한 재조합 아데노 바이러스 Ad/DES/E3을 제조하였다.

다. AD/DES/E3 바이러스로 감염된 HeLa세포에서 DNA를 분리하여 Hind III로 처리하여 분석한 결과 HSV-2의 gD, IRES 및 HBV의 S 유전자가 아데노 바이러스 E3 부위에 도입되었음을 확인하였다.

라. Ad/DES/E3 바이러스로 감염된 세포에서 RNA를 분리한 후 gD, IRES, S 유전자를 <sup>32</sup>P로 표지하여 northern hybridization을 수행한 결과 gD, IRES, S 특이적인 전사물이 만들어짐을 확인하였다.

마. Ad/DES/E3 바이러스로 감염된 세포에서 HSV-2 gD 단백질 및 HBV S 단백질의 발현을 western blot 및 immunoprecipitation 방



및 HBV S 단백질의 발현을 western blot 및 immunoprecipitation 방법을 통하여 분석하고 있다.

### 3. Ad/HCV/E1의 제조

가. 아데노 바이러스 E1부위에 외부유전자를 도입하는 기술을 확립하기 위하여 HCV 구조 단백질 유전자가 도입된 pXCX2/HCV 플라스미드를 제조하고 이 플라스미드를 pJM17플라스미드와 함께 293 세포에 cotransfection시켜 HCV 구조단백질 유전자가 도입된 재조합 아데노 바이러스 Ad/HCV/E1을 제조하였다.

나. Ad/HCV/E1을 293세포에 감염시켜 DNA를 분리한 후 제한효소분석과 Southern hybridization을 수행한 결과 HCV 구조단백질 유전자가 아데노 바이러스 E1부위에 도입되었음을 확인하였고, 이 바이러스가 HeLa 세포에서는 증식하지 못하는 것으로 보아 replication-defective한 재조합 아데노 바이러스임을 확인하였다.

### 4. Ad / DES / E1의 제조

가. 아데노 바이러스 E1부위에 HSV-2의 gD, IRES 및 HBV의 S 유전자를 도입하기 위하여 pXCX2/DES 플라스미드를 제조하였고 이 플라스미드를 pJM17과 함께 293세포에 cotransfection시켜 재조합 바이러스를 얻었다. 이 재조합 바이러스의 DNA를 감염된 세포에서 분리한 후 제한효소분석과 southern hybridization을 통하여 HSV-2의 gD, IRES, HBV의 S 유전자가 SV40promoter와 함께 아데노 바이러스



스 E1 부위에 도입되었음을 확인하였다.

#### 5. Ad / BE6 / E1의 제조

HBV 및 HCV에 대한 동시 복합면역을 유도한 목적으로 HBV의 S 유전자와 HCV의 구조단백질 유전자를 IRES 연결한 후 pXCX2 플라스미드에 도입하여 pXCX/BEC 플라스미드를 제조하고 이 플라스미드를 pJM17과 함께 293세포에 *contransfection*시켜 재조합 아데노 바이러스를 제조하였다. 이 바이러스를 293세포에 감염시켜 DNA를 분리한 후 제한효소 분석과 *southern hybridization*을 실험을 통하여 HBV의 S 유전자, IRES 및 HCV의 구조단백질 유전자가 도입되었음을 확인하였다.

6. 국내 Rota 바이러스 환자의 분변에서 Rota 바이러스의 순수분리 및 TA 세포주에 *adaptation*을 통해 국내분리 Rota 바이러스를 배양하였다(위탁).

7. 국내 Rota 바이러스의 주감염을 단일클론 항체로 검색한 결과 혈청형이 확정된 경우 type 1과 2가 각각 67%, 33%로 type 1이 주된 감염원으로 판명되었으나 type 2도 감염원으로 작용하고 있다는 사실을 밝혔다(위탁).

8. 일차적으로 type 1 중에서 cell-culture adaptation된 바이러스 3주를 대상으로 중화항체를 유발하는 VP7 gnen을 대상으로 RT-PCR 방법으로 cDNA clone을 작성하였다. 또한 각각의 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열의 homology는 prototype인 WA strain과 비교하여 92% 전후의 상동성을 나타내었고 국내분리주간의 상동성은 97%로 나타났다(위탁).

9. 국내분리 Rota 바이러스 type 1의 VP7 gnen을 pTrc 99A, pQE60 등의 prokaryotic cell expression vector에 cloning하여 VP7 단백질 발현하고 있다(위탁).

10. 국내환자에서 분리한 *Salmonella typhi*, *Sal. typhimurium*, *Sal. enteritidis*를 대상으로 앞으로 mutant를 제조하여 vaccine에 사용하기 위한 목적 및 외부유전자 발현을 위해 Ethidium bromide, nitrosoguanidine을 사용하여 변이주를 제조하였다. 현재 최종적인 상검사를 수행하고 있다(위탁).

## ● 제 5 세부과제 - 2 : BCG를 이용한 복합 면역

### 백신 개발

1. Threonine 요구성 대장균을 complementation시키는 클론을 찾아 sequencing하고 염기서열 비교

재조합된 pUC19-BCG DNA를 영양요구주인 KCTC 2263에 형질 전환시켜 ampicillin이 포함된 LB 고체 배지에서 자라는 20만개의 형질전환체를 확보하였다. 이들 중에서 threonine이 없는 최소배지에서 자라는 클론을 얻어 sequencing하여 pUC19-thr2를 대상으로 염기서열을 비교하였다. 각각의 클론이 서로 상이하면서도 threonine 요구성 대장균을 complementation 시킬 수 있는 능력이 있음을 확인하였다.

2. BCG *leuB* 유전자의 5' upstream에 존재하는 유전자 특성 규명

최초로 BCG에서 cloning된 *leuB* 유전자는 isopropylmalate dehydrogenase를 발현하는 유전자임이 확인되어 5' 영역에 존재하는 유전자를 찾기 위해 0.5kb DNA를 probe로 사용하여 새로운 clone을 선별하였고 이들을 sequencing 하여 새로운 1,764bp 염기서열을 결정하였다.

3. 재조합 플라스미드의 construction

HBsAg 유전자를 가진 plasmid인 pGS73을 *Bam*HI으로 잘라서 1.37Kb와 440bp 얻어진 fragment 중 전체 S gene과 preS2 일부를

coding하는 1.37Kb DNA 절편을 추출하여 pMV 261의 multi-cloning site인 *Bam*HI 부분에 ligation 시키고 JM109에 transformation 시켜서 cloning 하였다(pMVHBsAg). 또한 이것을 *E. coli* expression vector 인 pET14b의 *Bam*HI site에 ligation시키고 BL21에 transformation 시켜서 cloning하였다(pETHBsAg).

#### 4. *E. coli* 내에서의 발현

Vector에 외부유전자가 삽입된 pMVHBsAg 형질전환체를 배양하고 균체에서의 HBsAg gene과 발현을 유도하였다. 형질전환체를 37°C 에서 mid log phase까지 배양후 45°C로 heat shock을 가하거나 IPTG induction을 주어 30분, 1시간, 2시간, 3시간 후의 균체배양액을 15% SDS-PAGE에서 전기영동하였다. Western blotting은 Burnett의 방법으로 실시하였다. HBsAg gene의 발현을 다시 확인하기 위해 민감도가 5배 이상 강한 Enhanced Chemi Luminescence(ECL) detection도 함께 실시하였다. 다른 형질전환체도(pETHBsAg, pMVlacZ) 발현을 유도하여 SDS-PAGE와 Western blotting을 실시하였다.

#### 5. pMVHBsAg와 pETHBsAg의 Enzyme Immuno Assay(EIA)

앞에서 살펴본 pMVHBsAg와 pETHBsAg의 HBsAg gene expression 정도를 뒷받침하기 위해서 Ag-Ab interaction을 감지하는 EIA를 실시하였다. 이 방법으로 shuttle vector인 pMV261과 *E. coli*



expression vector인 pET14b의 promoter strength를 수치상으로 비교해 볼 수 있다. pETHBsAg의 titer는 1:18 정도이고, pMVHBsAg의 titer는 1:7 정도로 보여서 이로부터 pETHBsAg가 pMVHBsAg보다 약 2.5배 expression 능력이 높음을 알 수 있었다.

#### 6. *Mycobacterium*의 형질 전환 및 plasmid DNA 분리

*Mycobacteria*는 세포벽의 구조적 특성으로 일반적으로 쓰이는 방법으로는 형질 전환이 어렵기 때문에 electroporation 방법이 현재는 사용되고 있다. *M. bovis* BCG를 Middlebrook 7H9 broth 배지에 접종 후 균체를 회수하기 48시간 전에 1.5% glycine을 첨가하여 두꺼운 세포벽을 약화시켜 외부 DNA을 잘 받아들일 수 있도록 하였다. Electroporation은 Gene Pulser electroporator(Bio-Rad)기기를 사용하였다. Electrocuvette에 cell 200 $\mu$ l와 DNA 1 $\mu$ g을 혼합하여 얼음에 10분간 방치하고 pulse(Voltage : 2.5kV/cm, capacitance : 220 $\mu$ F, time : 20msec)를 가하였다. 배양한 균체들을 kanamycin(10 $\mu$ l/ml)이 들어있는 Middlebrook 7H10 Agar plate에 60 $\mu$ l씩 도말한 후 37 $^{\circ}$ C에서 20일 동안 배양하였다. Plate당 2~10개의 형질전환체를 얻었다. Shuton배지에서 약 15일간 배양한 *M. bovis* BCG 형질전환체의 plasmid DNA 분리는 변형된 alkaline lysis 방법을 사용하였으며, 제한효소로 처리하여 전기영동을 실시하여 확인하였다.



7. Mycobacteria-E. coli shuttle vector pEYO를 이용하여 형질전환시킨 *M. smegmatis*(recombinant *M. smegmatis*; rMs)는 도입시킨 모델항원 ovalbumin을 발현하였다.

8. C57BL/6 mouse(H-2b)에 rMs를 3회 주사하였을 때 도입한 모델항원 ovalbumin에 대한 체액성 면역 응답반응을 성공적으로 유도하였다.

9. rMs로 유도시킨 mouse anti-rOVA antibody를 분리 정제하여 authentic OVA(hen egg albumin)에 대한 recognition을 분석한 결과 high titer를 보였다.

10. Anti-OVA 및 anti-rOVA 항체가 인식하는 epitope의 검색

가. Filamentous phage, fUSE5 vector에 random 6 amino acids의 peptide library를 작성하여 epitope library를 준비하였다. 분리 정제한 anti-rOVA mouse 항체를 petridish에 고정시킨 후 phage를 반응시켜 특이적으로 결합하는 phage를 선택적으로 분리하여 random peptide library 부분의 DNA sequencing 하여 Table 2와 같은 결과를 얻었다.

나. 대조실험으로 hen egg albumin(authentic ovalbumin)을 사용하여 동일한 C57BL/6 mouse에서 anti-OVA antibody를 유도하여 분

리 정제후 동일한 과정으로 epitope을 검색하였다. 그 결과 IRLADR의 sequence가 80% 이상의 확률로 얻어졌다.

다. 이상의 결과로 재조합 항원으로 유도한 항체와 천연 항원으로 유도한 항체는 모두 동일한 epitope을 인식하고 있음을 확인하였으며, 그 peptide의 amino acid 배열은 ovalbumin의  $^{344}\text{I-N-E-A-G-R}^{339}$ 임을 확인하였다.

라. 위의 결과로부터 재조합 항원은 천연형 항원과 동일한 항원결정기를 제공할 수 있으나 항원성은 다소 감소하는 것으로 보인다. 또한 다양한 부분이 항원결정기로 제시되는 점은 오히려 백신으로서의 가치를 높여주는 장점이 되기도 할 것으로 사료된다.

11. 마우스 strain ICR suckling mouse와 DDY suckling mouse를 이용하여 바이러스 항원 계대.

12. 마우스 ICR/DDY strain을 이용하여 바이러스 항원의 생물학적, 혈청학적 특성 확인.

## ● 제 6 세부과제 : T-임파세포 활성화 유도 면역치료

### 제 개발 기술 연구(I)

1. Epitope peptide의 선별을 위한 computer modeling 방법을 개발함으로써 종래의 방법에 비해 시간과 물자를 절약할 수 있는 획기적인 방법을 제시하였다. MHC분자와 항원 peptide와의 결합성 여부를 예측하는 일은 매우 어려운 일이며, 또 원래의 항원단백질이 antigen-presenting cell(APC) 내부에서 process 되었을 때 어떤 종류의 peptide가 궁극적으로 생겨날 것인가 하는 것도 예측이 불가능한 것으로 여겨지고 있다.

본 연구에서는 사람의 HLA allele 중 가장 보편적으로 분포되어 있는 HLA allele 중 가장 보편적으로 분포되어 있는 HLA-A2.1과 peptide사이의 결합력을 비교함으로써 다음과 같은 결론을 얻었다. 즉 어떤 nonamer peptide가 HLA-A2.1과 결합력을 갖기 위해서는 2번 아미노산 잔기와 9번 아미노산 잔기 사이의 거리가 15~20Å의 범위에 들어야 하며, 9번 아미노산 잔기위 side chain이 HLA-A2.1의 binding groove의 바닥쪽을 향하고 있어야 한다는 것이다.

본 모델링 방법은 epitope peptide의 검색뿐만 아니라 컴퓨터를 이용한 단백질의 구조변화 등에 관한 연구에도 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

(참고사항 : Lim et al. (1995) Selection of peptides that bind to

the HLA-A2.1 molecules by molecular modeling. Mol. Immunol. In press.)

2. 펩타이드 효능검정을 통한 신규 CTL epitope peptide의 결정하기 위하여 상기 방법 등을 통하여 후보 펩타이드를 선정하고 이들이 인체내의 T세포에 의해 인식되어 T세포를 활성화시키는지를, 검정 확인하였다. 혈액원에서 수집한 혈액들 중 B형 간염바이러스 항원을 함유하고 있는 것으로 확인된 시료들을 선별하고, 그들 중 HLA-A2.1을 발현하는 것들을 flow cytometer를 이용하여 재차 선별하였다. 이들을 항원펩타이드, APC 및 Interleukin-2 등을 넣어 주고 이들을 배양하였으며 또한 이들을 일주일 간격으로 반복 배양하였다. 배양된 세포가 activity를 갖고 있는지의 여부를 확인함으로써 특정 펩타이드가 인체내에 존재하는 CTL에 의해 인지되고 또 그러한 CTL을 유도해 냄을 확인하였다. 이와 같은 방법은 CTL epitope을 이용한 면역치료제의 개발과 응용을 시험하는데 필수적으로 중요한 과정이며, 이 방법에 의해 사람에게 적용가능한 간염바이러스에 대한 CTL epitope을 찾아낼 수 있었다.

(참고사항 : Lee et al. (1995) Analysis of HLA-A2-restricted epitope peptides of Hepatitis B virus proteins. Kor. J. Immunol. In press.

Lim et al. Novel HLA-A2-restricted epitopes of Hepatitis B



virus antigens identified from healthy HBV carriers. In prepatation)

3. CTL epitope과 더불어 함께 사용될 때 주요한 기능을 발휘할 것으로 예상되는 Helper T epitope(Th epitope) 개발을 위하여 이들 후보 펩타이드의 아미노산 서열을 결정하고 이들 펩타이드의 합성을 완료하였다. Th epitope은 humoral immunity를 나타내는데 있어서 결정적인 도움을 줄뿐 아니라 CTL활성을 나타냄에 있어서도 중요한 helper activity를 제공하기 때문에 이들 Th epitope peptide를 CTL epitope peptide와 함께 투여할 경우 훨씬 더 CTL반응을 유도할 수 있다. Th epitope을 선별하기 위하여 다음과 같은 원칙을 적용하여 간염바이러스 단백질의 아미노산 서열 중에서 이에 합당한 아미노산 서열을 선정하고 이들을 solid phase synthesis방법으로 합성하였다.

가. MHC class II binding motif는 7~10개로 구성된 core region을 갖고 있으며, 이 core region 양쪽에 추가된 아미노산이 있다.

나. MHC class II binding motif는 전체적으로 다양한 크기의 펩타이드로 구성될 수 있으나, 본 연구에서는 16개의 아미노산으로 구성되는 것으로 간주한다.

다. MHC class II binding motif는 core region의 2번 위치에는



aromatic hydrophobic residues가 있어 anchor로 작용한다.

라. MHC class II binding motif는 core-binding region의 가운데 부분과 맨 끝에 hydrophobic anchors가 존재한다.

마. MHC class II binding motif를 포함하고 있는 펩타이드는 세포 내에서 바이러스 단백질의 분해결과로 만들어지는데, 이때 생겨나는 processing motif는 core region의 upstream 방향, 특히 2번위치에 proline이 존재하며 core region의 down stream에도 proline cluster가 존재한다.

4. 펩타이드 항원의 전달 및 T세포 인식과정에 있어서 필수적으로 작용하는 MHC분자의 세포표면 발현 및 안정성을 측정, 분석함으로써 MHC 분자의 항원전달에 있어서의 역할을 규명하였다. 감염된 바이러스에 의해 생겨난 단백질로부터 epitope을 생성토록함에 있어서 결정적 역할을 하는 peptide transporter(TAP) 유전자의 기능에 이상이 있는 세포주 T2를 이용하여 이 세포주가 발현하는 HLA-A2 분자를 분석하였다. T2세포주를 brefeldine A로 처리하여 세포로 새로이 이동, 공급되는 HLA-A2분자를 차단하고, 세포표면에 남아있는 HLA-A2분자의 분해속도를 측정함으로써 다음과 같은 사실을 발견하였다. 즉, T2세포는 58%의 stable한 HLA-A2분자와 42%의 unstable분자로 분

포되어 있다. 한편, TAP gene의 기능이 정상적인 세포주 T1의 경우는 87%의 stable HLA-A2분자와 14%의 unstable분자가 세포표면에 분포되어 있음을 알수 있었다.

(참고 : Lim et al. Analysis of the stability of class I MHC molecules expressed on the cell surface. submitted to Cell. Immunol.)

5. 간염바이러스 유전자를 발현하는 세포주를 개발하였는 바, HBV유전자를 pSRFVSRa vector에 cloning하고 이를 T1세포주에 transfection시킴으로써 HBV유전자를 발현하는 transfectant를 제조하였다. 또한 간염바이러스의 유전자를 간세포에 특이적으로 발현되는 globulin promoter 유전자인 p $\alpha$ 2BB에 cloning시킴으로써 이를 간염의 동물모델제작에 사용할 수 있도록 하였다.

## ● 제 7 세부과제 : T-임파세포 활성화유도 면역치료 제 개발기술 연구

### 1. CTL funtional assay

HCV specific CTL funtional assay는 standard chrome release 방법으로 수행하였다. Scheme I은 epitope peptide에 대한 CTL assay 방법의 protocol을 나타내고 있다. 여기서 사용한 effector cell은 HCV

seropositive 환자의 PBML(peripheral blood mixed lymphocytes)을 in vitro 상에서 restimulation 시켜 사용하였으며, HCV 환자의 혈액은 혈액원에서 헌혈된 혈액중 anti-HCV antibody ELISA값이 1.0 이상인 것을 구입하여 사용하였다.

PBML을 분리하기 위하여 whole blood를 RPMI media와 1 : 1로 섞은 다음 Ficoll Hipaque cushion에 얹어 15,000rpm에서 30min 동안 centrifuge하여 Ficoll과의 interface에 있는 lymphocytes 층을 회수하였다. Effector cell로 만들기 위해 분리한 lymphocyte는 peptide 항원과 IL-2를 주면서 5일 동안 배양하고 mitomycin C가 처리된 target cell(T2)을 stimulator cell로 주면서 다시 7일 동안 배양하여 invitro에서 restimulation하였다.

이렇게 하여 준비된 effector cell은 target cell과 2.5 : 1, 5 : 1, 10 : 1이 되도록 RPMI media 100 $\mu$ l에 suspension하여 96 well에 깔아 놓고, T2 cell에 peptide를 loading하고 sodium chromate(<sup>51</sup>Cr)와 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 target cell을 같은 96 well에 100 $\mu$ l를 gamma-counging함으로써 CTL의 cytolytic activity를 측정하였다.

2차년도에서 binding slope 값이 적어 CTL epitope로 screening되지 않은 candidate epitope peptides들의 CTL functional assay를 3차년도에서 위와 같은 방법으로 수행하여 새로운 CTL epitope peptides 3종류를 선별하였다.

또한 epitope peptides의 prediction 방법을 달리한 sceond set

epitope peptides 15종류를 선정하고, 합성, 정제를 완료하여 peptide binding assay를 FACS로 수행하여 4종류의 peptide를 선정하였다.

3차년도에서는 HCV frll sequence 중에서 HLA-A2.1에 결합이 가능한 모든 sequence를 선정하기 위해서 binding motif(2, 9번 위치)를 정하지 않고 prediction하여 HLA-A2.1에 결합 가능한 37종의 peptide를 선정하고 이들을 Multi pin synthesis kit를 이용하여 합성한 후 FACS로 peptide binding assay를 수행하여 10종류의 peptide를 epitope peptide로 선정하였다.

## 2. CTL 유도 adjuvant (S/T)의 제조

CTL 유도 adjuvant system으로 2차년도에서는 리포솜을 사용하여 CTL 유도효과를 확인하여 특허를 출원하였고, 3차년도에서는 새로운 CTL 유도 adjuvant system으로 oil emulsion iscom, squalene/tween 80(S/T)에 대한 CTL 유도효과를 확인하고 이의 최적 조건을 확립하였다.

S/T(Squalene/Tween 80) fomulation을 제조하여 CTL 유도기능 adjuvant로 사용하였다. Sonication 방법으로 입자의 크기를 약 30배 정도 줄일 수 있는데 입자의 크기가 작은 것이 더 안정하고 면역효과도 좋았다. 입자의 크기는 laser beam particle analyser로 측정하였을 때 평균 1 $\mu$ m정도 되었다.



### 3. S/T adjuvant에 의한 CTL 유도효과 검정 및 활성화

위에서 제조한 adjuvant에 대한 CTL 유도효과를 검정하기 위해 mouse에 면역한지 6~8주 사이에 spleen을 적출하여 splenocyte만을 분리한 후 OVA protein을 transfection agent인 DOTAP에 포획하여 EL4 cell내로 transfection 시킴으로써 restimulation cell과 target cell로 사용하였다. 제조한 S/T adjuvant의 CTL 유도효과를 비교 검정하기 위하여 CTL 유도가능 adjuvant로 알려져 있는 ISCOM (Immuno-stimulating complex)과 음성 대조를 위한 adjuvant로 alum adjuvant를 제조하여 mouse에 각각 면역 시킨 후 CTL 유도가능성 여부를 시험하였다. 그 결과 S/T adjuvant를 면역시키면 효과적으로 CTL이 유도되는 것을 알 수 있었다.

S/T adjuvant의 CTL 유도 최적 조건을 확립하기 위해 접종간격 및 기간연구를 수행하였다. S/T를 처음 접종한지 3주 간격으로 2차, 3차 접종을 하고 각각 1주 경과 후 CTL assay를 하였을 때 보다 3차, 4차 접종을 하고 각각 2주 경과 후에 CTL assay를 실시하였을 때가 더 좋은 결과를 얻었다. 또한 접종을 2주 간격으로 2회 실시한 후 2주 경과하였을 때도 비슷한 정도의 CTL유도 효과를 보였다. 따라서, CTL 유도에 보다 중요한 것은 접종 간격보다 접종회수라는 것을 알 수 있었다.



#### 4. HLA-A2.1 gene cloning

CTL epitope peptides의 in vivo activity를 검정하는 것과 HLA-A2.1에 대한 epitope sequence를 peptide library로 부터 screening하기 위해 human class I MHC molecules인 HLA-A2.1 gene cloning을 수행하였다. HLA-A2.1 gene을 cloning하기 위해 A2.1 gene은 T2 cell(HLA-A2.1, B7)을  $1 \times 10^8$ 이 되게 준비한 후 total RNA를 얻었고, oligo dT column을 통과시켜 mRNA를 분리한 후 (poly(A) Quick mRNA isolation kit), cDNA를 합성하여 (ZAP-cDNA synthesis kit), 50 $\mu$ g의 mRNA로 부터 cDNA를 합성(ZAP-cDNA synthesis kit, Stratagene)하였다. HLA-A2.1 gene을 증폭하기 위해 두 가지 primer(full A2.1 gene cloning, functional A2.1 gene cloning)을 사용하였다. Primer는 먼저 kination을 한 후 PAGE로 정제하여 25pmol/50 $\mu$ l 로 사용하였고, PCR protocol은 두 primer set에 따라 두 가지 방법이 사용되었다. Full gene을 expression하기 위하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 46 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분씩 30cycle을 수행하여 1.1Kb의 product를 얻었으며, functional A2.1 gene에는 annealing temperature를 52 $^{\circ}$ C로 하여 같은 방법으로 800 base pair의 PCR product를 얻었다. Full A2.1 gene에 대한 PCR product를 Kpn I과 Nde I으로 각각 digestion했을 때, Kpn I digestion에서 700 base pair와 400 base pair로 잘려지고 Nde I digestion에서는 630 base pair 와 470 base pair를 확인하였다. 또한 A2.1에 specific한 internal probe로 southern blot을

하여 A2.1에 대한 gene이 amplify된 것을 확인하였다. 각 PCR product들은 primer에 design된 enzyme들로 잘라낸 후 같은 enzyme으로 잘라진 pBluescripts II(kst)와 16℃에서 18hr 동안 ligation하였다.

XL-1 Blue competent cell에 transformation하여 X-gal, IPTG, Ampicilin plate에서 white colony를 골라내어 cloning을 수행하고 있다.

## ● 제 8 세부과제 : 유전자 백신 개발 연구

1. In vivo gene transfer system의 효능을 테스트하기 위해 indicator 유전자로서 CAT 유전자 발현 벡터를 건설하였고, 이를 이용하여 intramuscular injection 과 gene gun 방법으로 mouse에 주입시 CAT 유전자가 생체 내에서 잘 발현됨을 관찰하였다. 특히 i.m. injection이 gene gun 방법보다 더 오랫동안 발현이 지속됨을 관찰하였다.

2. 모델 바이러스로서 encephalomyelocarditis virus(EMCV)의 유전자 백신 벡터인 pCD-GS-VP1을 개발하였고, COS-7 cell에서 발현을 확인하였다. 또한 VP1 유전자를 PRSET vector에 클로닝 및 과발현시키고 정제하여 anti-mouse Ab를 만들었다. pCD-GS-VP1

plasmid를 mouse에 gene gun 방법으로 주입시 humoral immune response를 관찰하였다. 흥미로운 것은 cytokine effect를 보았을 때 GMCSF를 cotransfection 했을 때 항원성의 증가를 입증하였다.

3. HCV에 대한 gene vaccine vector로서 pCDSt(N)과 pTMHGH-E2T를 건설 및 발현을 확인하였고 i.m. injection 했을 때와 gene gun 방법으로 mouse에 주입시 항체 생성을 조사하였다.

4. HIV에 대한 모델 retrovirus로서 HFV에 대한 유전자 백신 벡터로 pSVwt을 건설하였고 COS-7 세포에서의 발현을 western으로 확인하였다.

5. HIV-1에 대한 유전자 백신 vector로 pCDGPE/HIV 및 pCDGE/HIV, pMT GPE/HIV, pMTGE/HIV를 건설하였고 발현을 COS-7 세포에 transfection한 후 확인하였다.

6. CTL assay를 위한 HCV-vaccinia recombinant virus의 건설 및 발현을 확인하였다.

## ● 제 9 세부과제 : 재조합 항원단백질 백신의 면역

### 보조제 개발 연구

Saponin은 Triterpene과 Glycoside로 구성되어 있으며, 계면활성제 특성을 나타내고 세포 고정제 및 식품 첨가제로서 사용되고 있다. 특히, 남미산 식물인 *Quillaja Saponaria Molina*로 부터 추출한 Saponin은 체액 및 세포성 면역반응을 증가시키는 것으로 밝혀졌으며, 정제된 Saponin이 상업적으로 시판되고 있으며, 유럽에서는 동물백신에 보조제로 사용되고 있다(Quil-A, Isocotec AB, Sweden).

그러나, quil-A는 여전히 많은 양의 비활성 독성물질을 함유하고 있으며, Reverse Phase-HPLC로 분리하였을 때 최소한 20개 이상의 사포닌 성분들로 분리되는 것으로 밝혀졌다. 따라서 사포닌 구성성분이 다양하고, 독성이 높은 Quil-A를 인체에 직접 사용하는 것은 어렵다. 최근에는 이들 사포닌 추출물로부터 다양한 구성을 가지는 개개의 사포닌 성분들을 정제하여 독성이 낮으면서도 활성이 높은 사포닌 성분만을 면역 보조제로 사용하는 가능성에 대한 연구가 계속되어 오고 있다.

상기 *Quillaja Saponaria Molina*로부터 기존의 성분 이외에 보다 높은 면역보조활성을 나타내는 성분들을 추출하기 위한 시도들이 계속되어 왔으며, Kerstein 등은 Quil-A로부터 hydrophobic chromatography를 통하여 최소한 23개 이상의 사포닌 성분들을 분리



할 수 있으며, 상기 QS-21보다 더 낮은 독성 및 더 높은 면역보조활성을 나타내는 성분을 정제하여 sterol, phospholipid, 항원과의 혼합에 의해 immune stimulation complexes(ISCOMS)이라는 형태의 면역증강제형을 만들 수 있음을 보고하였다(국제특허 출원 공개 제 WO92/06710호). 이는 분리방법에 따라 효율적인 면역 보조제를 찾을 수 있는 가능성을 제시한 것이며, 또한 Saponin 자체보다는 사포닌 이외의 성분과의 혼합사용에 의해 더욱 큰 면역 증강효과를 보이는 제형을 만들 수 있음을 나타낸다. 따라서 제 1단계 연구과제에서는 상기 사항을 고려하여 새로운 신규 사포닌계 면역보조제 성분을 확보한 후 이의 면역보조활성측정에 주력하였다.

#### 1. 사포닌의 정제

우리는 *Quillaja saponaria molina*의 표피추출물을 한외 투석막으로 투석 후, 투석액을 원심분리하여 불용성 물질을 제거하며, 이를 C4 RP-HPLC로 분리하여 개개의 사포닌 분획물을 분리정제하였다. 이 방법에 따라 32개 이상의 사포닌 변이체가 분리되는데 이중 비교적 수율이 높으면서 높은 면역보조활성을 갖는 5개의 peak을 QS-L1, QS-L2, QS-L3, QS-L4, QS-L5로 명명하였으며, 상기 5개의 peak은 최소한 90% 이상의 순도를 가지도록 정제되었으며, 이 peak들의 면역보조활성 및 생쥐에서의 독성을 측정하였다.

## 2. 체액성 면역보조활성

먼저 본 과제에서 정제된 QS-L5(QS-21)와 또한 oil in water emulsion계의 Syntex adjuvant formulation에 따라 제조된 LKA-02, 여기에 muramyl dipeptide(Sigma) 성분을 추가한 LKA-02+MDP, Alum에 QS-L5(QS-21)를 섞은 제형, Ribis상의 monophosphoryl lipid-A(MPL), Freund's adjuvant(FCA) 등에 B형 간염 바이러스 표면항원을 면역원(항원)으로 하는 면역제형을 만든 후 7~8 weeks 정도의 Balb/c 생쥐에 피하 혹은 복강 주사하여 Humoral 및 Cellular immune을 조사하였다.

Humoral immune response는 serum에 존재하는 항체의 EIA titer로 측정하였다. FCA가 가장 높은 EIA titer를 보였으며, Alum이 FCA보다 약 5배 적은 EIA titer를 보였다. 이는 문헌상의 보고와 잘 일치하는 결과이다. Saponin fraction인 QS-L5는 FCA 보다는 낮지만 Alum보다는 훨씬 우수한 보조효과를 보였다. 또한 QS-L5에 Alum을 추가하였을 때에는 Additive한 보조효과가 있었다. 한편, Ribis상의 MPL은 Ribis상의 보고와는 달리 Alum보다 낮은 보조효과가 있었다.

이상의 결과, Alum이 Saponin에 대하여 Additive한 adjuvant activity가 있음을 주시하고, QS-L5 이외의 주요 Saponin fraction인 QS-L1, L2, L3, L4 사포닌 분획물의 면역보조효과를 측정하였다. QS-L2를 제외한 다른 사포닌 분획물은 Alum과 혼합 사용하여 Alum보다 월등한 (3.3~3.5배) 면역보조효과를 나타내고 있다. 이중 특히

QS-L1 분획물은 QS-21로 추정되는 QS-L5보다 Alum 혼합제형시 훨씬 우수한 면역보조 효과를 보임을 알 수 있다.

다음 단계로 이러한 QS-L1 분획물의 면역보조 활성을 증가시키기 위한 제형을 만들려고 Alum에 흡착된 항원제형, Alum+QS-L1 제형, QS-L1 단독으로 항원에 부가된 제형, Freund's adjuvant 제형 등을 만들어 결과를 얻었다. 본 결과는 QS-L1 단독으로는 Alum 제형보다 훨씬 미미한 면역보조 활성을 보이나 Alum 제형과 혼합사용시 Synergistic한 면역보조효과 상승을 유발할 수 있음을 나타내고 있다. 이는 QS-L5(QS-21)가 단독으로도 Alum 제형보다 우수한 면역보조 효과를 가져오는 것과는 다른 효과를 보여주어 새로운 신규 사포닌계 면역보조제로 QS-L1이 Alum 제형과 혼합시켜 사용할 때 기존의 QS-21보다 훨씬 우수한 면역보조제일 가능성을 나타내고 있다.

이상의 결과를 요약하면, 우리는 Quillaja Sap[onaria로부터 추출된 분획물인 QS-L1 fraction이 Alum과 혼합시 매우 우수한 체액성 면역보조 활성이 있음을 관찰하였다.

3. 세포성 보조활성 측정(위탁연구과제로 한국생명공학연구소 최용경 박사와 이화여대 김길현 박사에 의해 수행됨.)

다음에 우리는 QS-L1이 체액성뿐 아니라 세포성 면역반응에도 우수한 면역보조 활성이 있는가를 시험하였다. 따라서 체액성 면역보조 활성 외에 동일 면역보조제형으로 주사된 생쥐의 비장세포에 동일항

원을 처리하여 비장세포의 증식반응(Proliferation assay)을 측정하여 세포성 면역반응을 주사하였다. 이 결과는 세포성 반응에 있어서도 Alum+QS-L1 제형이 훨씬 우수한 효과를 나타내고 있음을 보여주고 있다. 이는 QS-L1이 재조합 단백질 항원의 면역보조제로써의 필수적인 요소인 체액성 및 세포성 면역보조효과가 있음을 말해준다.



## 제 4 장 결 론

### ● 제 1 세부과제 : 합성 펩타이드 백신 개발 기술 연구

1. T-, B-세포 항원결정기가 모두 존재해도 배열순서에 따른 구조적인 변화등이 있어 면역원성에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

2. 펩타이드 항원은 리포솜의 인지질 조성에 따라서 영향을 받는 것으로 나타났으며 특히 PS가 함유된 리포솜의 경우, 항체생성을 크게 향상 시켰다. 그러나 단백질 항원의 경우엔 별다른 영향이 없었다. 리포솜-펩타이드 항원은 투여량이 증가할수록 항체생성을 증가시켰다.

3. 리포솜은 T-세포 항원결정기에 관계없이 항체생성을 유도한다.

4. 면역보조제로 사용하는 리포솜의 안정성은 4℃와 상온에서 모두 큰 문제가 없다.

5. 펩타이드-운반체 결합체는 백신으로서 사용 가능하다.

6. HBsAg preS2 132~145의 B세포 항원결정기 중 잔기 125, 126, 127 및 129가 항원성에 중요하다. 그리고 아미노산 잔기의 소수성, 전하 및 크기가 항원성에 중요하다.

7. Molecular dynamics를 이용하여 펩타이드를 modeling한 결과에 의하며, B세포 epitope의 밀집구조와 항원성간에 상관 관계가 있다.

## ● 제 2 세부과제 : 합성 펩타이드의 항원성 및 면역원성 연구

합성 펩타이드를 이용하여 백신을 개발하기 위하여는 펩타이드 자체으 낮은 면역유도 기능을 극복해야 하는데 그러한 방법으로서 운반체 단백질이나 adjuvant를 사용하여 펩타이드의 항원성 및 면역원성을 높이려는 연구가 필요하다.

본 3차년도에서는 1차년도와 2차년도에 합성한 7종의 펩타이드 중에 3종의 펩타이드(SPC-16, SPC-22, SPC-25)를 택하여 실험을 수행하였는데, 일차적으로 펩타이드를 이용하여 항펩타이드 항체 측정시 ELISA 조건을 확립하기 위하여, 펩타이드 coating 농도, 세척액 종류 및 항펩타이드 항체의 희석농도에 대하여 실험을 하였다.

항펩타이드 항체(anti-SPC16/KLH)의 측정시에 blocking agent의 영향을 측정한 결과, BSA에 대한 비특이적인 반응이 gelatin에 대한 비특이적 반응보다 높게 나타나, gelatin을 blocking agent로 사용하는

것이 효과적이었다. 이러한 결과는 다른 항펩타이드 항체(anti-SPC22, anti-SPC25)를 사용하였을 때에도 유사한 양상을 보여, blocking agent에 대한 반응성은 합성 펩타이드 자체가 가지는 면역원성과는 관련이 있는 것으로 추정되었다.

BSA를 carrier protein으로 사용하였을 때에도 동일한 결과를 관찰하였으며, 이러한 결과는 일반적으로 mouse 항 혈청이 가지는 blocking agent와의 반응성에 기인하는 것으로 추정하였다.

ELISA 방법에 의해 항펩타이드 항체의 측정시에는 peptide 농도가 100ng/well이 적정하였으며, 항펩타이드 항체의 희석농도는 1 : 500 희석비율이 적절한 것으로 관찰되었다. 또한, 세척액으로는 PBST를 사용하였을 때가 background를 최소화시킬 수 있어 효과적으로 추정되었다. 펩타이드를 이요한 백신 개발에서 중요한 부분은 면역에 사용한 펩타이드가 native항원과 구조적으로 유사한 형태를 이루어 in vivo에서의 면역반응 유도가 native 항원에 가깝게 가도록 하는 것으로서, 이러한 면을 확인하기 위하여, 항펩타이드 항체와 native 항원 혹은 recombinant whole 항원과의 반응성을 조사하였다. 그 결과 anti-SPC16 Ab와 anti-SPC25 Ab의 경우에는 recombinant HCV antigen과 높은 반응성을 보임으로서 사용한 두 peptide가 (SPC16, SPC25)가 운반체 단백질에 결합하여 면역시켰을 때 native 항원과 구조적인 유사성을 이루었으며, 생체 내에서의 면역반응도 native 항원과 유사한 경로를 거쳤음을 추정할 수 있었다.

그러나 HCV 항체 양성인 환자 혈청을 사용한 실험에서는 사용한

항펩타이드 항체(anti-SPC16 Ab)가 HCV Ag을 유의성 있게 구별하여 반응하지는 않았는데, 그 원인에 대하여는 추후 확인 실험이 수행되어야 할 것으로 판단된다.

또한 ELISA법에 의하여 native whole antigen인 HCV 혈청을 coating시 50mM EDAC(1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride)용액에 희석하여 coating 할 때가 PBS를 사용할 때에 비하여 anti-SPC16 항체에 대한 반응성이 증가하는 것으로 관찰되었는데, 이와 같은 결과는 합성 펩타이드의 면역에 의해 생성된 항펩타이드 항체가 native whole antigen과 결합가능성이 있다는 것을 제시하여 주었으며, 펩타이드 항원이 native 항원이 가지는 항원 구조를 형성하였기 때문인 것으로 추정하였다.

EDAC에 의한 결과가 항펩타이드 항체와의 특이적인 반응에 의한 영향인 것을 확인하기 위하여 합성 펩타이드(SPC-16)를 EDAC와 PBS에 희석하여 사용하였을 때 유의성 있는 차이가 나타나지 않는 것으로 보아 EDAC에 의한 반응성 촉진은 항펩타이드 항체의 특이적 반응성과 연관되어 나타나는 것으로 추정하였다.

최근들어 새로운 immunological carrier 로 연구되고 있는 liposome에 대한 실험에서는 2차년도에 이어 proliposome을 만든 후에  $\gamma$ -ray 조사에 의한 멸균효과, 유동성 변화정도, 모델약물 방출효과에 대하여 실험을 진행하였다.

그 결과 다공성인 sorbitol을 담체로 하여 egg 인지질을 사용하여 제조한 proliposome이  $\gamma$ -ray에 의해 효과적으로 멸균됨을 확인하였으



며,  $\gamma$ -ray 멸균에 의한 유동성이나 모델약물로 사용한 proliposome의 방출정도에도 아무런 영향이 없었다. 이와 같은 결과는 2차년도에 자외선을 사용한 결과와 동일하였으며,  $\gamma$ -ray나 U.V 모두 proliposome의 멸균에 효율적으로 사용할 수 있음을 확인하였다.

이러한 결과는 liposome을 합성 펩타이드의 운반체로 사용할 때 백신의 무균정도 유지에 필요한 중요한 결과로서 그 이용가치가 높다고 할 수 있다.

또한 proliposome은 기존의 수용성 liposome이 가지는 여러 물리, 화학적 단점을 보완할 수 있으므로 추후 liposome을 이용한 백신개발 연구에 유용하게 적용이 가능한 것으로 판단된다.

새로운 adjuvant로서 최근 관심을 모으고 있는 “built-in-adjuvant” 연구에서는 2차년도에 이어 human IL-1  $\beta$  sequence의 immune stimulatory sequence 로 알려진 9-amino acid (VQGEESNDK)를 포함하는 합성 펩타이드(SPC17IL)를 만들고 이를 사용하여 hemagglutinin으로 stimulation 시킨 IL nonapeptide는 SPE17자체에 비하여 thymocyte의 증식효과가 현저하게 큰 것을 관찰하였다.

지금까지의 결과는 합성 펩타이드를 이용한 백신개발에 있어서 기존의 adjuvant가 가지는 독성 등의 여러 문제점을 해결할 수 있는 가능성을 제시하여 주는 것으로서 합성 펩타이드 백신개발의 기초자료로서 유용하게 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

### ● 제 3 세부과제 : 인간화된 항체 개발 기술 연구

B형 간염바이러스의 표면항원인 S와 preS2에 대한 키메라 항체와 preS2에 대한 인간화된 항체를 제조하고, 이들의 항원결합친화도가 본래의 생쥐 단일클론 항체와 유사하고 HBV 중화효과를 나타내며 인체 내에서 면역유발성이 낮을 것으로 예측되는 특성들을 확인함으로써, 당초 계획했던 목표를 기간내에 달성하였다. 본 연구개발을 통하여 이 항체들이 감염예방 및 치료제로서 활용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

### ● 제 4 세부과제 : 재조합 항체의 대량생산기술

#### 개발 연구

유전자 재조합 기술로 인간화시킨 간염바이러스의 표면 항원에 대한 여러가지 항체들을 동물세포에 도입시켜 확립된 세포주(CS131A)를 생명공학연구소로 부터 분양받아 재조합 항체를 대량생산하는 데 필요한 배양조건을 우선적으로 확립하는 동시에 재조합 항체의 생산성 제고, 항원 중화능력의 확인 및 상품화 가능성 타진 등의 연구를 실시하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

#### 1. 세포배양에 의한 재조합 HBS Ab 생산 수준

동물세포 배양 체계를 이용하여 재조합 항체의 대량 생산 가능성 여부를 확인하기 위하여 Anti-S chimeric antibody를 생산하는 CHO

세포주(CS131-A colony)를 유전공학 센터로부터 분양받아 이를 여러 가지 조건의 배양체계를 이용하여 배양한 후 배양 상청으로 분리되는 HBs 항체를 분리정제한 후 그 생산량을 비교, 조사하였다. 그 결과 소량 배양 체계에서는 무혈청배지 상청 ml 당 120 $\mu$ g의 생산량을 보였으나, 실제 대량 배양하에서는 그 절반 수준인 배양상청 1l당 평균 67mg이었다.

## 2. 재조합 항체의 항체가 및 중화효과 측정

HBsAG에 대한 항체를 RIA로 측정할 수 있는 kit의 하나인 AUSAB(ABBOTT Lab., IL., U.S.A)을 이용하여 재조합 항체의 항체를 측정한 결과 항체는 33unit/mg 이었으며, 참고로 HBIG의 경우 230unit/130mg(1.77unit/mg) 이므로 재조합 항체가 약 20배 정도 높은 것으로 확인되었다. 그러나 중화효과에 있어서는 Anti S chimeric antibody는 HBV의 중화효과를 잘 나타내었으며 specific activity가 HBIG보다 1,000배이상 높은 것으로 확인되었다.

## 3. 동물세포 배양체계를 이용할 경우 생산비 산출

세포배양시 소요되는 순수 재료비만을 최종 회수한 배양상청 1l를 기준으로 산정하였다. 그 결과 cell factory(Nunc Co.)를 이용할 경우 약 158,000원, 그리고 3단 tissue culture flask를 이용할 경우 약 17만원이 소요되는 것으로 확인되었다.

#### 4. 재조합 항체 생산의 경제성 분석

항체가 츠견에서의 재조합 항체와 HBIG간의 비료에서는 동물세포 배양에 따른 배양상청 1l는 약 2,000 unit에 해당되며, 생산비용은 unit 당 약 80원 정도 소요되므로 현재 시판중인 HBIG와 비교할 때 약 8.7 병을 생산할 수 있다. 그러나 중화효과를 고려할 경우 위의 계산보다 생산단가 면에서 1/50 정도의 감소효과가 있으며, 또한 생산량 측면에서도 소규모 배양수준에서와 같이 ml당 120 $\mu$ g 정도로 증가할 경우 1/100 가량의 생산비 감소요인이 있는 것으로 판단되었다.

따라서 본 연구 결과에서 Anti-S 키메라 및 anti-preS2 인간화 항체가 각각 HBIG보다 1,000 이상 혹은 700배의 높은 specific activity를 가지고 중화효과를 잘 나타내는 것이 확인되었기 때문에, 앞으로 정치배양 조건을 기초자료로 이용하여 대량 부유배양 체계를 확립시켜 생산 비용을 감소시킬 경우 본 재조합 항체는 HBIG 대체제 뿐만 아니라 만성간염 치료제로의 제품 개발도 가능 할 것으로 기대된다. 이러한 활용을 위해서는 우선 anti-S 항체에 대한 인간화 작업과 이를 동물세포에 도입시켜 안정적으로 발현, 대량생산 가능한 공정체계의 개발이 시급하며, 또한 제품화에 앞서 반드시 실시되어야 하는 전임상 및 임상실험의 막대한 비용에 대한 재정적 지원이 수반될 경우 전 국민의 7%정도를 점유하고 있는 만성간염의치료가 가능해 질 것으로 사료된다.



## ● 제 5 세부과제 : 생복합 면역백신 개발기술 연구

1. 생복합 백신개발에 필요한 기술을 확립하기 위해 아데노 바이러스 벡터에 HBV, HCV 및 HSV-2의 방어 면역 유도 항원 유전자들이 도입된 5종의 재조합 아데노 바이러스를 제조하였다. 이 중 HCV의 구조 단백질 유전자가 도입된 replication-competent한 Ad/HCV/E3로 감염된 세포에서 HCV의 core, gp35, gp70 단백질의 발현을 확인하였고 gp35와 gp70은 서로 복합체를 형성하고 있는 것으로 관찰되었으며 이들은 90% 이상 순수하게 분리 정제 되었다.

2. 국내 로타 바이러스를 순수 분리하여 조직 배양에서 계대배양에 성공하였고 한국에서 우세한 혈청형은 주로 타입 1과 2임을 밝혔다. 바이러스의 중화항체를 유도하는 항원 유전자를 비병원성 장내 세균에 도입 발현시키는 기술이 확립되었으므로 장내 세균 백신 벡터를 이용한 경구용 복합 백신 개발에 필요한 기반기술이 구축되었다.

## ● 제 6 세부과제 : T-임파세포 활성화 유도 면역

### 치료제 개발 기술 연구(I)

본 연구에서 개발하여 사용한 Computer modeling에 의한 CTL epitope의 선별방법은 구성 단백질의 1차구조가 알려져 있는 다른 어떠한 종류의 항원에 대해서도 적용할 수 있어 매우 유용한 epitope 결정

법이 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 B형 간염바이러스에 대한 CTL을 사람의 혈액으로부터 효과적으로 유도하였으며, 유도된 CTL의 활성측정법 및 활성측정에 필요한 제반 재료들을 제공하여 관련분야 연구에 주요한 기틀을 마련하였다. 또한 간염 바이러스에 대한 마우스 실험 모델을 만드는데 있어서 고려되어야 할 중요한 정보를 얻을 수 있었다. 또한 bone marrow chimera를 제작하는 방법을 확립하였으며, bone marrow chimera에 있어서 흉선세포표면에 발현되는 각종 maker들의 발현상태를 측정하였다. 그 결과 다른 종류의 bone marrow chimera에서는 볼 수 없는 몇가지 특성을 발견하였는데, 특히 CD4-CD8+세포의 숫자가 정상에 비하여 현저히 감소함을 알 수 있었다. 이는 irradiation에 resistant한 특성이 흉선이 아닌 다른 기관으로부터 주어질 가능성을 나타내는 것으로 매우 주목할 만한 일이라 할 것이다. 더우기 시험관 내에서의 흉선세포의 분화를 연구함에 있어서 thymic epithelial cell 처럼 selector로서 역할을 할 수 있는 세포를 확보하는 일이 매우 중요함에 비추어 볼 때, 본 연구에서 기존의 연구에서 사용되는 EL-4외에 RMA-S도 selector로서 사용가능함을 보여 주었다. 그리하여 본 연구결과로부터 thymic selection에 있어서 selection step에 관한 새로운 가설을 제시할 수 있었다.

## ● 제 7 세부과제 : T-임파세포 활성화 유도 면역치료

### 제개발 기술 연구

HCV 감염에 대한 치료용 백신의 개발을 위해 HCV에 선택적인 CTL을 유도하는 peptide와 CTL 유도 adjuvant system을 개발하기 위한 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.

Computer 분석을 통해 76가지의 CTL inducible epitope peptide를 예측하고, 이들을 automatic peptide synthesizer와 multipin synthesis kit로 합성한 후 APS로 합성한 peptide의 경우, HPLC로 정제하였고 MPS로 합성한 peptide는 더 이상 정제하지 않고 binding assay에 이용하였다.

선택된 peptides 와 HLA-A2.1과의 binding assay를 flow cytometry로 수행한 결과 22종의 peptide를 선택하였다.

2차년도에 이미 확보한 EP series의 7가지의 peptide에 대해서는 HCV seropositive 환자의 blood를 이용한 CTL functional assay를 수행한 결과 새로운 3가지의 peptide가 CTL에 인지됨을 알았다.

CTL 유도 adjuvant system의 개발 일환으로 liposomes system 이외에 ISCOM과 squalene/tween 80(S/T) adjuvant system에 대한 연구를 수행한 결과 S/T adjuvant system이 mouse system에서 효과적으로 CTL을 유도할 수 있음을 알았고, 이러한 adjuvant system의 CTL 유도 최적조건을 확립하기 위한 실험에서 oil emulsion의

particle size가 작을수록 안정하고 CTL 유도효과도 뛰어남을 알았다. 접종간격과 접종회수에 따른 CTL 유도효과를 비교해 보았을 때, CTL 유도효과에 접종간격보다는 접종횟수가 중요하다는 것을 알 수 있었다.

In nono CTL assay를 수행하기 위한 동물모델의 개발을 위해 HLA-A2.1 gene cloning을 수행하였다. Gene cloning은 T2 cell에서 mRNA를 분리하여 cDNA를 만들고, PCR을 이용해 HLA-A2.1 gene은 증폭시켜 cloning을 수행하였다.

## ● 제 8 세부과제 : 유전자 백신개발 연구

본 연구에서 우리는 생체내 유전자 전달 방법 중 DNA의 근육주사와 gene gun-mediated transfer 방법을 확립하였다. 이 때 DNA의 근육주사 방법이 gene gun 방법보다 유전자 발현이 더 오랫동안 지속됨을 알 수 있었다. 본 연구에서 확립한 두가지 유전자 전달방법을 이용하여 바이러스 유전자를 생쥐에 투여하여 방어 면역반응을 유발하고 이러한 유전자 백신을 인간에 적용하는 것이 우리의 최종 목표이다. 이를 위해 우리는 HCV와 HIV-1에 대한 유전자 백신 벡터를 개발하고 이익 항원성을 확인하였다. 또한 유전자 백신의 동물 모델 시스템으로 사용하기위해 생쥐에 치명적인 바이러스인 EMCV에 대한 유전자 백신 벡터를 개발하고, 이를 생쥐에 투여해 주었을 때 항체가 형성됨을 알았다.



유전자 백신이 influenza 등과 같은 특징 바이러스에 대해서는 아주 효과적이거나 HIV-1나 HCV 등의 바이러스에 대해서는 현재의 기술로는 충분한 방어면역 반응을 유발하기 어려울 것으로 생각되고 있다. 즉, 유전자 백신이 실제 임상적으로 사용되기 위해서는 효능을 증진시킬 수 있는 방법을 개발하는 것이 필수적이다. 우리는 EMCV를 동물 모델 시스템으로 이용하여 유전자 백신의 효능을 검증하고, 또한 cytokine 유전자를 함께 사용하여 특이 면역 반응을 높이고, 유전자의 발현을 높일 수 있는 새로운 유전자 백신 벡터를 개발하여 사용함으로써 유전자 백신의 효능을 증진 시키고자 한다. 이러한 연구결과를 토대로 HCV와 HIV-1에 대한 유전자 백신의 효능을 검증하고자 한다.

## ● 제 9 세부과제 : 재조합 항원단백질 백신의 면역보조제개발 연구

1단계 1차년도(1994. 9~1995. 8)의 연구결과 우리는 Quillaja Saponaria의 표피로부터 유래된 우수한 백신 보조제 성분인 QS-L1을 발굴하였다. 2단계 연구 계획은 이 QS-L1 saponin의 면역보조제로서의 활성을 여러가지 측면에서 시험하고자 한다. 즉, 면역보조효과에 대한 시험을 여러가지 측면에서 시험하고자 한다. 면역보조효과에 대한 시험으로 체액성 면역반응 뿐만 아니라 세포성 면역활성을 Cytotoxic T-lymphocyte assay로 측정할 계획이다. 또한 시험항원으로 B형 간염 바이러스의 표면항원뿐만 아니라 Herpes simplex virus의

glycoprotein D도 시험할 계획이다. 이밖에, Saponin 성분인 QS-L1 화학구조적 특성을 규명하기 위하여 Mass spectroscopy에 의한 분자량 측정 및 NMR study를 통하여 화학구조 분석도 시도할 계획이다.

## 제 5 장 향후 연구 계획

### ● 제 1 세부과제 : 합성 펩타이드 백신개발 기술 연구

본 과제의 2단계 사업에서는 1단계에서 실험동물을 대상으로 축적한 경험과 결과들을 바탕으로 인체용 간염백신을 제조하려고 한다. 일단은 한국인에게 일반적으로 나타나는 MHC 유형인 DR형과 교합하는 HBsAg의 펩타이드의 추출 및 구조를 분석하여 펩타이드 백신을 설계하려고 한다. 그리고 다양한 MHC 유형과 결합하는 펩타이드를 설계하고 사람을 면역화의 실험대상으로 삼을 수 없는 제한점을 극복하기 위해, 다양한 human B cell line을 구축하려고 한다. 펩타이드의 면역원성이 확인되면 리포솜 등의 면역보조제를 응용하여 효능이 떨어진 펩타이드 백신을 완성시킬 수 있을 것이다.

### ● 제 2 세부과제 : 합성 펩타이드의 항원성 및 면역원성 연구

종료된 과제임

### ● 제 3 세부과제 : 인간화된 항체 개발 기술 연구

1. 2단계에서 HBV의 S 표면 항원에 대한 인간화된 항체를 개발할

계획이다.

2. 개발된 항체를 효율적으로 대량생산하기 위하여 항체를 생산하는 재조합 CHO 세포주의 세포배양공학을 산,학,연이 협동연구를 통하여 추진할 계획이다.

## ● 제 4 세부과제 : 재조합 항체의 대량생산기술

### 개발 연구

1. Anti-preS2의 인간화에 이어 Anti-S 항체의 인간화 및 이들의 동물세포에서의 안정적 발현.

2. 대량 배양 체계에서 고효율 발현 가능한 세포주의 확립

3. 동물세포의 부유배양체계의 확립으로 재조합 항체의 대량 생산 공정 체계를 확립한다.

4. 대량 생산된 anti-S 및 pre-S2 인간화 항체를 cocktail로 사용하여 만성 감염 치료제로 개발한다.

## ● 제 5 세부과제 : 생복합 면역백신 개발기술 연구

1. 1단계에서 제조된 재조합 아데노 바이러스에 도입된 항원 유전



자의 발현량을 개선하고 생쥐를 이요한 면역원성 실험을 통하여 방어 면역 유도 반응이 탁월한 재조합 아데노 바이러스의 실용화 가능성을 탐색한다.

2. 1단계에서 확립된 상동재조합 이용 재조합 아데노 바이러스 제조 기술은 수두 바이러스 백신(Oka 주) 벡터를 이용한 생복합 백신 개발에 이용한다.

3. 1단계에서 확립된 replication-defective 아데노 바이러스 제조 기술은 유전자 치료법에 활용한다.

4. BCG 자체가 결핵의 예방 백신으로 사용되고 있어 안전성에 대한 검증이 필요하지 않으므로 BCG를 이용한 재조합 백신의 운반체로 사용할 수 있다. 항원 단백질의 발현효율을 높이는 기술을 개발하고 다른 병원성 항원의 발현을 검증할 계획이다. Vector를 개량하여 안정성을 높이는 연구와 단백질의 발현을 높이는 연구를 수행하며 항체 생성력과 CTL 유도능을 측정할 계획이다. Homologous recombination을 위한 유전자 marker를 찾는 연구도 병행할 예정이다.

## ● 제 6 및 7 세부과제 : T-임파세포 활성화유도 면역

### 치료제 개발기술 연구(I)(II)

#### 향후 연구 계획

B형과 C형 간염을 유발하는 바이러스의 CTL 활성화유도 항원의 탐색과 이를 이용한 항원선택적 CTL 유도 치료용 백신을 개발할 예정이다. HBV/HCV에 관한 CTL 및 Th epitope을 검색하여 peptide 항원을 검정하고 HLA 유전자를 클로닝하여 CTL 유도효과를 확인한다. Adjuvant system을 개발하는 연구와 이들의 독성을 검증하는 연구도 수행하며 동물모델을 개발하여 치료 효능을 검증하려고 한다.

## ● 제 8 세부과제 : 유전자 백신개발 연구

1단계 연구에서 우리는 DNA의 근육 주사방법과 gene gun 방법을 확립하고 이러한 유전자 전달에 의해 특이 항체가 형성됨을 보였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 우리는 인간에게 치명적인 질병들로서 아직 현대의학기술로 치료 및 예방이 불가능한 AIDS와 C형 간염을 일으키는 바이러스에 대한 효율적인 gene immunization 방법을 찾고자 한다. HIV-1이나 HCV 등의 바이러스에 대한 유전자 백신이 실제 인간에게 방어면역 반응을 유발시키기 위해서는 현재까지의 기술로는 아직 미흡하고 효능을 승진시키기 위한 방법이 개발되어야 할 것으로 알려지고 있다. 따라서 우리는 첫째, 생체내에 직접 유전자를 효율적으로 전달하는 방법들 중 가장 효율적인 것으로 입증되었고 본 연구실

에서 확립된 intramuscular injection과 gene gun 방법을 개선, 개발하고 이러한 항원 유전자와 더불어 cytokine 유전자를 같이 직접 동물내에 전달함으로써 면역반응을 유도하고 조절할 수 있는 방법을 개발하고자 한다.

둘째, 확립된 효과적인 in vivo gene transfer 방법을 이용하여 AIDS를 일으키는 HIV-1과 간경화 및 간암의 주요 원인으로 밝혀진 C형 간염 바이러스를 제거할 수 있는 효율적인 백신의 효능을 검증하는데 있어서 인간을 대상으로 실험할 수 없기 때문에 적합한 모델 시스템을 확립하는 것이 중요하다. Gene immunization의 모델 시스템으로 우리는 암세포를 이용하고자 한다. 생체 내에서 암세포가 제거되는 것은 CTL 활성화에 기인하는 것으로 알려져 있다. BALB/c 생쥐의 CT26 암세포는 CT26 암세포는 암특이적 항원이 효율적으로 CTL에 노출되지 않기 때문에 BALB/c 에서 tumor를 일으킬 수 있다. 이때 CT26 암세포에 HIV-1 또는 HCV의 유전자를 도입시켜 발현시키면 마치 암세포가 바이러스에 감염된 것과 같은 상태가 된다. 만약 gene immunization 방법으로 BALB/c에 효율적으로 HIV-1과 HCV에 대한 면역반응을 유발하여 CTL을 활성화시킬 수 있다면 이렇게 생성된 CTL은 HIV-1과 HCV 유전자를 발현하는 변형된 CT-26 암세포를 제거할 수 있을 것이다. 이러한 암세포 모델 외에 AIDS의 경우 침팬지에서 테스트하는것 외에도 macaque에서 AIDS를 일으키는 SIV에 대한 gene immunization을 개발하고 이를 원숭이에서 테스트하고자 한다. HCV 경우는 인간외에 침팬지에서만 감염할 수 있기 때문에 생쥐

에서 긍정적인 결과가 얻어질 경우 침팬지에서 gene immunization 방법의 효능을 테스트하고자 한다.

## ● 제 9 세부과제 : 재조람 항원단백질 백신의

### 면역보조제개발 연구

지난 1년간의 연구결과 우리는 남미에 자생하는 식물인 Quillaja Saponaria의 표피로부터 우수한 백신 보조제 효과가 있는 Saponin extraction(QS-L1)을 발굴하여 이의 B형 간염 바이러스 표면 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역반응 유도를 측정하였다.

향후에는 백신 보조제 연구에 표준항원으로 이용되는 ovalbumin을 항원으로 하여 생쥐에서의 체액성 및 세포성 면역반응 유도를 측정할 예정이다. 또한 saponin fraction(QS-L1)의 구조를 Mass spectroscopy와 NMR study를 통하여 밝힐 예정이다. 또한 이 QS-L1의 임상적 이용 가능성을 추진할 계획이다.