

보툴리눔 신경독소 A를 중화하는 재조합 항체의 제조와 특성 분석

박흥규¹, 최미영^{2*}

¹(주)에이티지씨 R&D 본부 연구개발 전략팀, ²선문대학교 BT융합 제약공학과

Production and Characterization of a Recombinant Antibody Neutralizing Botulinum Neurotoxin A

Hong-Gyu Park¹, Miyoung Choi^{2*}

¹R&D Department, ATGC Co., LTD.

²Department of BT-Convergent Pharmaceutical Engineering, Sun Moon University

요약 보툴리눔 신경독소는 콜린성 신경말단(부)을 선택적으로 공격하여 신경마비를 일으키는 신경독소로서, 그람양성을 띠고 내성포자를 형성하는 절대혐기성 세균인 보툴리눔 균(Clostridium botulinum)이 만들어낸다. 이 중 보툴리눔 A형 독소(BoNT/A)는 음식물과 물을 오염시킬 수 있으며 생물 무기나 생물 협박물질로 사용될 수도 있다. 이 때문에 독성을 탐지할 수 있는 예민한 분석방법과 중독을 치료할 수 있는 효능 있는 항독소를 개발해낼 필요성이 제기되어 왔다. 본 연구에서는 BoNT/A를 중화할 수 있는 단일클론 항체(mAb)를 생산하기 위하여 BoNT/A로 면역된 토끼의 항혈청에서 유래한 scFv 라이브러리를 인간 IgG와 융합시켰다. 그렇게 재조합된 scFvIgG 항체 단백질을 안정된 세포주에서 발현시켰고 항체 친화 크로마토그래피를 사용하여 scFvIgG mAb 단백질을 정제하였다. ELISA로 정제된 scFvIgG mAb 단백질의 효율성을 확인하였고, *in vivo* 실험으로 BoNT/A에 대한 중화능을 시험하였다. 독성 중화능 실험은 마우스를 사용하여 수행하였는데, 그 결과 scFvIgG 항체(10 ug)는 BoNT/A(100,000 LD₅₀)의 독성이 주입된 마우스를 완전히 방어하지는 못하지만 마우스의 생존 기간을 현격하게 연장시키는 것이 확인되었다. 이러한 결과들은 이 scFvIgG mAb가 BoNT/A를 중화하는 효능을 가지고 있다는 점을 제시한다.

Abstract Botulinum neurotoxin (BoNT/A) is a neurotoxin that selectively attacks the peripheral cholinergic nerve endings. It is produced by Gram -positive, endospore-forming strict anaerobic bacteria, Clostridium botulinum. Since BoNT/A could be a biothreat agent, as well as a contaminator of food and water supplies, the development of sensitive assays for toxin detection and potent antitoxin for the treatment of intoxication is necessary. In this study, for the purpose of producing monoclonal antibodies (mAbs) that are capable of neutralizing Botulinum neurotoxin type A (BoNT/A), scFv (single-chain variable domain fragment) libraries from the rabbit antisera against BoNT/A was fused to a human IgG. The resulting recombinant scFvIgG antibody protein was expressed in stable cell lines and was purified using a protein A affinity chromatography. The efficacy of scFvIgG mAb was confirmed by ELISA and was evaluated for the neutralization of BoNT/A *in vivo*. Such an *in vivo* toxin neutralization assay was performed using mice. Although scFvIgG antibody proteins (10 ug) failed to fully protect the mice challenged with BoNT/A (100,000 LD₅₀), it significantly prolonged the survival time. These results suggest that scFvIgG mAb may be capable of neutralizing BoNT/A single-chain variable domain fragment.

Keywords : Botulinum neurotoxin type A(BoNT/A), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), *in vivo* toxin neutralization assay, monoclonal antibody(mAb), scFv(single-chain variable domain fragment)

*Corresponding Author : Miyoung Choi(Sun Moon Univ.)

Tel: +82-41-530-2274 email: choimy@sunmoon.ac.kr

Received November 15, 2016

Revised December 1, 2016

Accepted January 6, 2017

Published January 31, 2017

1. 서론

보툴리눔 신경독소는 신경마비를 일으키는 독소로 절대혐기성 세균인 보툴리눔 균(*Clostridium botulinum*)으로부터 만들어지는데, 생산된 독소의 항원성에 따라 7가지(A형-G형) 유형으로 구분된다. 그 중에서 독소 A형이 인체에 가장 치명적인 것으로 알려져 있다[1]. 보툴리눔 신경독소 A형은 먼저 하나의 폴리펩티드(150 kDa, 비활성상태)로 합성된 후에 트립신과 유사한 단백질분해효소(trypsin-like protease)에 의해 잘리고 활성화 형태로 되는데, 이것은 C 말단의 중쇄(heavy(H) chain: 100 kDa)와 N 말단의 경쇄(light(L) chain: 50 kDa)의 두 조각이 이화황결합(disulfide bond)으로 연결된 구조이다[2]. 체내에 유입된 보툴리눔 독소는 혈관 순환계를 따라 표적 부위인 신경-근 접합부의 전신경 말단(presynaptic nerve ending)으로 이동하여 신경말단의 세포질로 유입된다. 이곳에서 신경전달물질인 아세틸콜린의 분비를 억제하여 근육운동을 조절하는 신경신호전달을 차단함으로써 근수축이 일어나지 않고 이완된 상태가 유지되는 이완성 근육마비를 일으킨다[3].

보툴리눔 균이 사람 몸에 들어가 다량으로 증식하면 강한 신경독소 단백질이 생성되어 신경마비 등 보툴리눔 중독증(botulism, 보툴리즘)을 일으킨다. 보툴리즘은 독소성분에 노출되는 경로에 따라 식품유래 보툴리즘, 유아 보툴리즘, 상처 보툴리즘, 흡인형 보툴리즘으로 구분된다[4]. 보툴리눔 독소는 자연계에서 생산되는 독소 중 인체에 가장 치명적인 것 중 하나로 알려져 있고[5], 평상시에도 환자가 발병할 수 있을 뿐 아니라 생물테러 무기로 사용될 수도 있다[6,7]. 지금까지 보툴리눔 독소의 화학적 길항제(chemical antagonist)는 없는 것으로 알려져 있으며 동물(주로 말)에서 유래한 항-독소 혈청을 환자에게 투여하는 방법이 유일한 치료법으로 알려져 있다[8]. 유사시에 있을 생물테러나 식중독 혹은 자연발생 보툴리즘 등 잠재적 위험 요소에 대비하기 위하여 항독소와 독소 치료제 및 독성을 탐지할 수 있는 분석방법을 개발해내는 것에 대한 필요성이 제기되어 왔고 국내외에서 연구가 진행되고 있다[9,10].

본 연구의 목적은 보툴리눔 A형 독소(BoNT/A)를 중화하는 재조합 항체를 개발해내고 그 특성을 분석하는데 있다. 이를 위하여 먼저 항원에 대한 결합력을 높이는 방법으로 알려진 scFv 유전자[11]를 BoNT/A로 면역된 토

끼의 항체로 합성하였다. 다음, 사람에게 적용할 수 있는 중화 항체로 개발하기 위해 scFv를 인간 IgG와 융합시킨 scFvIgG를 재조합한 후, scFvIgG 항체 단백질을 정제하였다. 이 정제된 단백질의 특성분석은 ELISA와 Western blotting을 통해 수행하였으며, 그리고 BoNT/A에 대한 중화능은 *in vivo* 실험으로 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 scFvIgG 항체 유전자의 재조합

이 실험에서 사용한 토끼는 뉴질랜드산 흰 토끼로 약 3 Kg, 15주령의 암컷을 구입하였고(Samtako, Korea), BoNT/A는 Miprolab (Germany)사에서 구입하여 사용하였다. 보툴리눔 독소를 토끼에 주사하기 직전에 먼저 면역전 혈청을 모았다. 2 마리의 토끼에 500 μ l의 불완전 프로인트 항원보강제(Freund's Incomplete Adjuvant) (Difco, USA)와 500 μ l의 BoNT/A를 혼합한 후 각각의 토끼에 주사하였다. 첫 면역 1주 후, 동일한 혼합액으로 토끼에 다시 한 번 더 주사하였다. 첫 면역 8주 후, 토끼를 희생시키고 즉시 혈액을 모아 토탈 RNA(total RNA)를 추출하였다. 랜덤 헥사머(random hexamers)와 역전사효소(superscript reverse transcriptase) (Promega, USA)를 사용하여 토탈 RNA로부터 cDNA library를 합성하였다. 이 cDNA로부터 프라이머 3부터 6 (Table 1)을 이용하여 항체단백질의 무거운 사슬의 가변부위(V_H , variable region of heavy chain) 유전자와 항체단백질의 가벼운 사슬의 가변부위(V_L , variable region of light chain) 유전자를 PCR (polymerase chain reaction, 중합효소 연쇄반응)로 증폭하여 얻었다. 확보한 V_H 유전자와 V_L 유전자를 V_H -LINKER(Gly_4Ser_1)₃ - V_L 의 단일 유전자, 즉 scFv(single-chain variable domain fragment, 단일 사슬로 이뤄진 가변부위) 유전자로 만들기 위하여 V_H 유전자와 V_L 유전자 및 pCANTAB5E phagemid kit (Amersham Pharmacia, UK)의 연결 DNA (Linker DNA)를 주형으로 사용하고, 프라이머 1에서 6 (Table 1)을 이용하여 PCR을 실시하였다. 합성된 scFv 유전자를 포함하는 DNA 조각을 제한효소 *SfiI*/*NotI*로 절단한 후 pCANTAB5E 벡터에 클로닝하여 pCANTAB5E-scFv를 재조합하였다.

pCANTAB5E-scFv와 *EcoRI*과 *PstI*이 각각 포함된

프라이머 7과 8 (Table 1)을 사용하여 PCR을 실시하여 scFv이 포함된 DNA 조각을 증폭한 후 *EcoRI/PstI*로 절단하였다. 이 DNA 조각을 인간 IgG의 Fc(constant region, 불변부위) cDNA가 재조합된 pCR3 벡터, 즉 pCR3-IgG에 클로닝하였다. 후보 플라스미드 DNA를 *EcoRI/Xba I* 으로 절단하여 삽입 DNA(insert DNA)의 크기를 확인하였다. 재조합된 DNA의 염기서열 분석을 마크로젠(Korea)에 의뢰하였다. 플라스미드 pCR3-IgG는 인간 IgG의 Fc의 cDNA를 포유동물세포 발현 벡터인 플라스미드 pCR3 (Invitrogen, USA)에 클로닝한 것이다(Park, unpublished).

Table 1. Sequence of primers

1	Linker forward	5'GGCACCTGGTCACTGTCTCTCA 3'
2	Linker reverse	5'TGGAGTCTGGGTCATCACGACATCCGATCCGC 3'
3	V _H forward	5'ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTC 3'
4	V _H reverse	5'TGAAGAGACAGTGACCAGGGTGCC 3'
5	V _L forward	5'GCGGATCGGATGTCGTGATGACCCAGACTCCA 3'
6	V _L reverse	5'ACCACCTCGGWYCTCCGCCGAAA 3'
7	scFv forward	5'CCGGAATTCATGGAGACTGGGCTGCGCTGG 3'
8	scFv reverse	5'AAAAC TGCAGGTTTACCTTTGACCACCACCTCCG 3'

2.2 scFvIgG mAb 단백질의 발현 및 정제

재조합된 scFvIgG 단백질의 발현을 확인하고 이 단백질의 중화능을 분석하기 위하여 항체 친화 크로마토그래피를 이용하여 scFvIgG 단백질을 정제하였는데, 그 과정은 다음과 같다. 먼저, 재조합된 pCR3-ScFvIgG 플라스미드 DNA를 리포펙타민(Lipofectamine) (Invitrogen, USA)을 사용하여 CHO-DUKX (ATCC, USA) 세포에 주입하였다. G418 (Cambrex, USA)를 처리하여 얻은 colony들을 96-well 플레이트 (Falcon 3912)의 웰 당 1개의 세포씩 배양하여 선별하였고, methotrexate (Sigma, USA)를 처리하여 안정된 단일 세포주 (stable cell line)를 확보하였다. 이 CHO-DUKX 세포는 150 mm 접시(dish)에서 배양하였다. 그 다음으로, 세포배양액을 모아서 scFvIgG 유전자가 클로닝된 CHO-DUKX 세포로부터 분비된 scFvIgG 단백질을 HiTrap protein

A (Amersham Pharmacia, UK)를 사용하여 정제하였다. 이때 FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography) (Amersham Pharmacia, UK)를 이용하였고, 정제된 분획(fraction)을 모두 모아 Amicon Ultra 30 kDa 제한 필터(cut-off filter) (Millipore, USA)를 사용하여 단백질 용액을 농축하였다. 농축된 단백질은 PBS(137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2.7mM KCl, 1.8mM KH₂PO₄ (pHis7.4))로 투석한 후에 *in vivo* 실험에 사용하였다. ELISA로 항체의 농도를 측정하였다.

2.3 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay, 효소면역분석법)

scFvIgG mAb 단백질의 BoNT/A에 대한 결합 친화력(binding affinity)을 조사하고 가장 높은 결합력을 나타내는 scFvIgG mAb를 생산하는 단일 세포를 선별하기 위하여 발현된 scFvIgG가 포함된 배양액을 사용하여 ELISA를 수행하였는데, 그 과정은 아래와 같다. BoNT/A (Miprolab, Germany)를 96-well 플레이트의 웰 당 1 µg/ml이 포함되도록 희석용액(dilution buffer) (2.5 % FBS, 0.5 % Tween 20, 1 X PBS)에 희석하여 100 µl 씩 넣고 4 °C에서 16시간 동안 반응하여 코팅하였다. 그 다음에는 차단 용액(blocking buffer) (1 % FBS, 5 % sucrose, 0.05 % sodium azide)을 첨가하여 실온에서 1시간 30분 동안 반응하여 차단하였다. scFvIgG mAb를 포함하고 있는 세포 배양액을 100µl 씩 따서 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 30분 동안 반응하였다. scFvIgG의 결합여부는 퍼록시데이즈가 결합된 (인간 IgG 단백질에 대항하는) 염소의 항체(peroxidase conjugated goat anti-human IgG) (KPL, USA)로 반응하여 조사하였다. TMB (3,3',5,5'- Tetra methyl benzidine) microwell peroxidase substrate system (KPL, USA)을 이용하여 색 반응 분석실험을 수행하였고, Microplate Reader (BIO-RAD)를 사용하여 655 nm 파장에서 흡광도(Optical Density, O.D)를 측정하였다.

2.4 Western blotting(웨스턴 블랏)

정제된 단백질을 10 % SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 하여 단백질의 크기를 조사하였다. 전기영동하여 분리된 단백질을 멤브레인 (polyvinylidene fluoride transfer membrane) (Pall. Corporation, USA)으로 전기영동하여 옮겼다. 멤브레인을 5 % 탈지유가 포함된 PBS

에 담구고 4 °C에서 16시간 반응하여 (비특이적인 결합을) 차단하였다. 맵블레인을 PBST(137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2.7mM KCl, 1.8mM KH₂PO₄, 0.1% Tween 20)로 씻어낸 후, peroxidase conjugated goat anti-human IgG(KPL, USA)를 1:10,000으로 희석하여 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 결합되지 않은 항체는 PBST로 씻어서 제거하였고, 결합된 항체는 DAB peroxidase development kit (Vector Lab, Inc., USA)를 이용하여 시각화하였다.

2.5 *in vivo* 독성 중화 분석실험

BoNT/A에 대한 scFvIgG mAb의 중화 능력을 조사하기 위하여 *in vivo* 실험을 수행하였다. 이 실험에는 6주령에서 8주령의 암컷 Balb/C와 ICR 마우스 (오리엔트바이오, Korea)를 사용하였다. 먼저 BoNT/A (Miprolab, Germany)에 의해 모두 죽는 범위를 설정하기 위하여 BoNT/A를 단계별로 희석한 후 ICR 마우스에 주입하여 사망 유무를 조사하였다. BoNT/A의 생물활성도는 1.0x10⁵ LD₅₀(50% lethal dose)으로 확인하였다. 그룹당 5 마리씩의 ICR 마우스를 사용하여 총 4개의 그룹 (PBS only, BoNT/A, BoNT/A+scFvIgG (CH#1-1), BoNT/A+scFvIgG (CH#1-2))을 실험하였다. BoNT/A 독소(1.0x10⁵ LD₅₀)와 10 µg의 scFvIgG 단백질을 넣고 전체 용량이 0.5 ml이 되도록 PBS와 혼합하여 사용하였다. 혼합액을 마우스의 복강에 주입한 후, 죽거나 생존한 마우스의 개체 수 및 생존시간을 조사하였다.

3. 결론

3.1 scFvIgG 항체 단백질 유전자의 재조합

본 연구에서는 보툴리눔 A형 독소(BoNT/A)에 높은 친화력을 가지며 또한 감염된 환자에게 중화능을 갖는 효율적인 중화항체를 만들기 위하여 토끼에서 유래한 scFv와 인간 IgG가 연결된 융합단백질을 제조하고자 하였다. 이를 위하여, 먼저 BoNT/A로 두 번 주사한 토끼에서 혈액을 얻어 토털 RNA를 추출하였다. 이 RNA로 RT-PCR을 수행하여 항 토끼 항체단백질의 V_H와 V_L에 대한 cDNA library를 확보하였다. 이 실험에는 프라이머 3에서 6 (Table 1)을 사용하였고 V_H 유전자와 V_L 유전자를 포함하는 DNA 조각을 증폭한 결과는 그림 1에

서 보여주고 있다. 아가로스 젤 전기영동으로 410 bp의 V_H 유전자와 340 bp의 V_L 유전자를 포함하는 DNA를 얻었는데, 예상과 그 크기가 일치하였다.(그림 1. lane 1, 2). 항원에 대한 친화력이 높은 mAb 단백질을 제조하기 위한 수단으로 scFv를 사용하는 방법이 널리 응용되고 있다[11]. 본 연구에서는 BoNT/A에 대한 친화력이 높은 항체 단백질을 만들기 위하여 V_H 유전자와 V_L 유전자 사이에 LINKER(Gly₄Ser₁)₃ DNA를 포함하는, V_H-LINKER(Gly₄Ser₁)₃-V_L로 된 scFv 유전자를 PCR로 증폭하였다. 그 결과 약 800 bp의 단일 조각의 DNA 밴드를 얻었는데, 이것은 scFv의 예상 크기와 일치하였다 (그림 1. lane 3). 이 DNA 조각을 pCANTAB5E phagemid vector에 클로닝함으로써 scFv DNA library를 구축하였다.

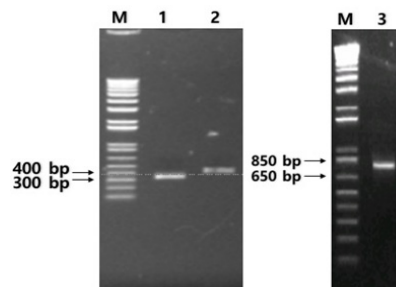


Fig. 1. PCR products of V_H, V_L, and scFv lane 1: V_L, lane 2: V_H, lane 3: scFv, M: DNA size standard 1kb ladder

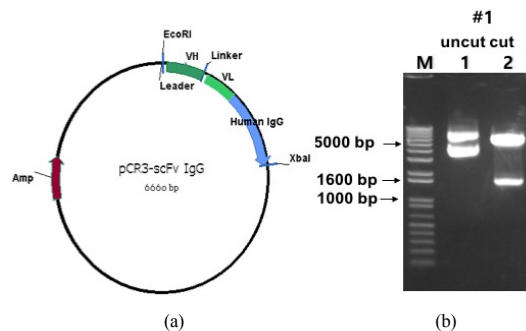


Fig. 2. Confirmation of recombinant plasmid pCR3-scFvIgG(#1) by *EcoRI/XbaI* digestion (a) Diagram of the pCR3 expression vector containing the scFv(VH, linker, VL) and human IgG cDNA. (b) Agarose gel electrophoresis of pCR3-scFvIgG(#1) M : DNA size standard 1kb ladder, Lane 1 : uncut DNA, Lane 2 : The insert DNA (scFvIgG gene, 1560 bp) was obtained after cleavage with *EcoRI* and *XbaI*.

그 다음으로, 사람에게 적용할 수 있는 중화항체로 제조하기 위하여 scFv 단백질을 인간 IgG와 융합된 단백질로 발현시키고자하였다. 이를 위해 scFv 유전자를 인간 IgG (Fc) cDNA를 포함하는 발현백터인 pCR3-IgG에 넣어 pCR3-scFvIgG를 제조하였다(그림. 2. (a)). 제조된 scFvIgG DNA를 분석하기 위하여 플라스미드 DNA를 추출하였고, *EcoRI*과 *XbaI*으로 절단하여 약 1,560 bp의 DNA 밴드를 확인하였다(그림. 2. (b) lane 1, 2). 이 결과는 삽입된 scFvIgG DNA의 예상 크기와 일치하는 것이다. 총 18개의 플라스미드 DNA의 염기서열 분석을 의뢰하였다 (마크로젠, Korea). 그 중 15개의 플라스미드 DNA에는 기존에 밝혀진 염기서열 (Synthetic construct single chain Fv antibody fragment, AY307933, gi:43730092)과 동일한 scFv DNA가 들어 있다는 것을 알 수 있었다. 나머지 3개의 플라스미드 DNA는 모두 V_H 유전자와 V_L 유전자가 아직까지 밝혀지지 않은 새로운 염기서열을 포함하고 있다는 것을 알 수 있었다. 그림 2에서는 그 중 하나인 플라스미드 #1의 결과를 보여주고 있다.

3.2 scFvIgG mAb 단백질의 정제 및 분석

제조된 scFvIgG mAb 단백질을 발현하는 안정된 세포주를 구축하고 BoNT/A에 결합력이 뛰어난 단백질을 얻기 위하여, 먼저 플라스미드 pCR3-scFvIgG를 CHO-DUKX 세포에 주입하여 안정된 단일 세포주인 CH#1을 확보하였다. 이 CH#1 세포를 단일클론(monoclonal)으로 제작하기 위하여 G418을 처리하여 생긴 콜로니(colony)를 96-well 플레이트에 웰 당 세포 하나씩 옮겨서 배양하였고 ELISA를 실시하여 BoNT/A에 결합 능력이 높은 단백질을 생산해내는 세포주를 선별하였다. 그 결과 BoNT/A에 결합력이 가장 뛰어난 scFvIgG mAb 단백질을 분비하는 세포주는 CH#1-1과 CH#1-2이었다. 이 세포들을 배양하여 배양액을 모은 다음, 세포 배양액으로 분비된 scFvIgG 단백질을 protein A 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 정제된 scFvIgG 단백질로 SDS-PAGE를 실시하여 55 kDa의 단일 밴드를 관찰하였고, peroxidase conjugated goat anti-human IgG antibody를 사용하여 Western blotting을 실시한 결과, 단일 밴드를 확인할 수 있었다(그림 3). 정제된 scFvIgG 단백질의 항체 특이성을 ELISA로 분석하였는데, scFvIgG mAb는 높은 농도에서는 농도 의존

적으로 (BoNT/A와) 반응하는 것을 보였다. 이것은 BoNT/A의 polyclonal antibody (NIBSC, UK)와 유사하게 반응한다는 것을 알 수 있었다(그림 4). 이와는 대조적으로, negative control로 사용된 IgG는 BoNT/A에 반응하지 않았다. 이 결과는 scFvIgG mAb(#1-1, #1-2)에는 BoNT/A와 특이적으로 결합하는 활성이 있다는 것을 제시한다.

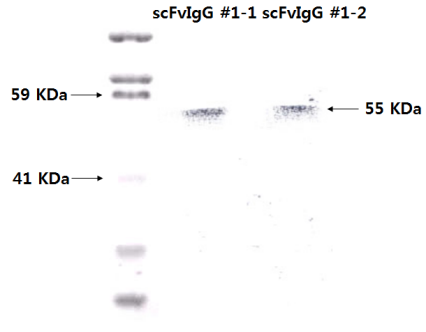


Fig. 3. Western blotting analysis
The scFvIgG protein was purified using protein A affinity chromatography. Proteins were separated on a 10% SDS-PAGE gel and were analyzed by Western blotting with peroxidase conjugated goat anti-human IgG antibody.

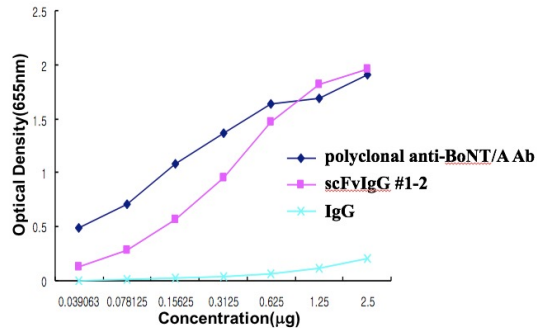


Fig. 4. ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)
96-well plates were coated with BoNT/A. scFvIgG was added and incubated. The binding of scFvIgG was detected via peroxidase conjugated goat anti-human IgG.

3.3 scFvIgG mAb의 BoNT/A에 대한 독성 중화능 분석

BoNT/A에 대한 scFvIgG mAb의 중화능을 시험하기 위하여 ICR 마우스를 이용하여 *in vivo*에서 독소 중화 분석 실험을 수행하였다. BoNT/A의 생물활성도는

1.0×10^5 LD₅₀이었는데, 이 BoNT/A와 10 μ g의 scFvIgG mAb(#1-1, #1-2)를 혼합한 후, ICR 마우스의 복강에 주입하였고 마우스의 증상발현 및 생존 여부를 최소 48시간 동안 관찰하였다(그림 5).

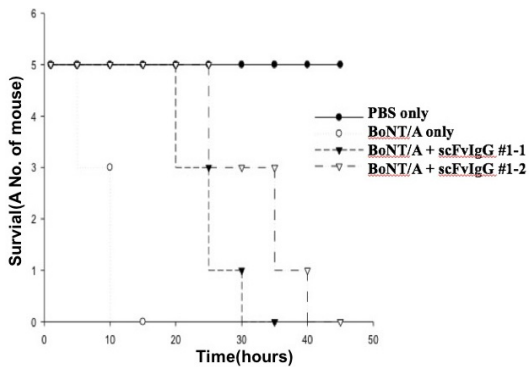


Fig. 5. *In vivo* toxin neutralization assay
The mixture of ten microgram of scFvIgG Ab and BoNT/A was injected intraperitoneally in mice. The time to death and the survival number of mice were determined.

그 결과, PBS를 주입한 군은 모두 생존하였고, BoNT/A를 주입한 군은 15시간 이내에 모두 사망하였으며, BoNT/A+ScFvIgG (#1-1)를 주입한 군의 경우 36시간 이내에 모두 사망하였다. 이와 반면에 BoNT/A+ScFvIgG (#1-2)를 주입한 군의 경우 36시간 이내에 2마리만 사망하였고, 3마리는 40- 48시간까지 생존하였다. 이 결과들은 scFvIgG mAb(#1-1, #1-2)에는 BoNT/A에 대한 중화능이 있다는 것을 제시한다. 그렇지만, 10 μ g의 scFvIgG mAb로는 BoNT/A(100,000 LD₅₀)를 중화하는 능력을 오랜 동안 유지하지 못하여 완전한 방어를 할 수가 없었고, 그로인해 48시간 안에 모두 사망하였다고 생각된다. 이는 scFvIgG mAb가 높은 농도의 BoNT/A에 대해 친화력이 충분히 높지 못하여 BoNT/A를 오랜 시간 동안 중화하지 못했거나, 또는 BoNT/A(100,000 LD₅₀)를 완전하게 중화하기 위해서는 더 높은 농도의 scFvIgG mAb가 필요하다는 것을 의미하는 것으로 사료된다.

본 연구에서 얻은 재조합 항체, scFvIgG mAb의 특성을 ELISA와 Western blot으로 분석한 결과, scFvIgG mAb는 농도 의존적으로 BoNT/A와 반응하는 것을 알 수 있었고, BoNT/A와 특이적으로 결합한다는 것을 확인하였다. 마우스를 이용한 *in vivo* 독성 중화능 실험을

수행한 결과 10 μ g의 scFvIgG 항체는 BoNT/A(100,000 LD₅₀)의 독성이 주입된 마우스를 완전히 방어하지는 못했으나 마우스의 생존 기간을 현저히 연장시킨다는 것을 알 수 있었다. 이 결과들은 scFvIgG mAb는 BoNT/A를 중화하는 효능을 가지고 있음을 제시하며, 보툴리즘을 치료할 수 있는 생물치료제로 개발될 수 있는 잠재력도 가지고 있음을 보여준다. 그것은 또한 보툴리눔 독성의 감염여부를 판단하는데 활용될 수 있으며 보툴리눔 독소를 정제하는 데에도 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

References

- [1] J. Thanongsaksrikul and W. Chaicumpa, "Botulinum Neurotoxins and Botulism: A Novel Therapeutic Approach", *Toxins*, 3, pp. 469-488, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins3050469>
- [2] D. B. Lacy, W. Tepp, A. C. Cohen, B. R. Das Gupta, R. C. Stevens, "Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity", *Nat. Struct. Biol.* 10, pp. 898-902, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1038/2338>
- [3] C. Montecucco, G. Schiavo, "Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins", *Mol Microbiol*, 13, pp. 1-8, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00396.x>
- [4] C. O. Tacket and M. A. Rogawski, *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*, In: Simpson, L.L., (Ed.), p.351 - 378, Academic Press, 1989.
- [5] L. L. Simpson, "The study of clostridial and related toxins. The search for unique mechanisms and common denominators", *J. Physiol.* 84, pp. 143-151, 1990.
- [6] R. K. Dhaked, M. K. Singh, P. Singh, P. Gupta, "Botulinum toxin: bioweapon and magic drug", *Indian J Med Res.*, 132, pp. 489-503, 2010.
- [7] S. S. Arnon, R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauser, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, D. L. Swerdlow, K. Tonat. "Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management", *J. Am. Med. Assoc.* 285, pp. 1059 - 1070. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.285.8.1059>
- [8] C.O. Tacket, W. X. Shandera, J. M. Mann, N. T. Hargrett, and P. A. Blake, "Equine antitoxin use and other factors that predict outcome in type A foodborne botulism", *Am. J. Med.*, 76, pp. 794-798, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(84\)90988-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(84)90988-4)
- [9] H. Bigalke, "Botulinum toxin: application, safety, and limitations", *Curr Top Microbiol Immunol*, 364, pp. 307-317. 2013. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45790-0_14
- [10] J. W. Froude, B. Stiles, T. Pelat, P. Thullier, "Antibodies

for biodefense”, MAbs., 3, pp. 517-27. 2011.
DOI: <https://doi.org/10.4161/mabs.3.6.17621>

- [11] A. Nowakowski, C. Wang, D. B. Powers, P. Amersdorfer, T. J. Smith, V. A. Montgomery, R. Sheridan, R. Blake, L. A. Smith, J. D. Marks, “ Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody”, Proc. Natl. Acad. Sci. 99, pp. 11346-11350. 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.172229899>

박 흥 규(Hong-Gyu Park)

[정회원]



- 2001년 2월 : 선문대학교 미생물학과 (이학사)
- 2003년 2월 : 선문대학교 대학원 분자생물학전공 (이학석사)
- 2010년 2월 : 한양대학교 의과대학 대학원 의생명공학과 (이학박사)
- 2010년 3월 ~ 2010년 12월 : 연세대학교 치과대학 post-doc.

• 2010년 12월 ~ 현재 : ㈜에이티지씨 R&D 본부 연구개발 전략팀 Senior manager

<관심분야>

의약품/화장품, 제약

최 미 영(Mieyoung Choi)

[정회원]



- 1983년 2월 : 서울대학교 사범대학 생물교육과 (이학사)
- 1985년 2월 : 서울대학교 자연과학대학 대학원 동물학과 (이학석사: 분자유전학)
- 1992년 12월 : University of Chicago 대학원 발생생물학과 (이학박사: 분자생물학)

• 1993년 1월 ~ 1995년 12월 : University of Pennsylvania, HHMI, Research Associate (분자세포생물학)

• 1997년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 BT융합 제약공학과 교수

<관심분야>

RNA-결합 단백질의 유전자 발현에서의 기능, 의약품