

# 돼지 알파인터페론 ( $\alpha$ -interferon) 생산

- 유전공학기술 응용 기초연구 -

全 茂 炯

忠南大学校 農科大学 獸医学科

## 1. 머리말

인터페론(interferon; IFN)이란 동물세포에 미생물 특히 바이러스나 이와 유사한 물질이 작용했을 때 세포에서 생성되는 단백질로써 항바이러스 또는 항암작용을 일으키는 물질이다. 이것은 1957년에 영국의 바이러스학자 Alick Isaacs와 Jean Lindenman이 부화계란의 장노막세포에 Influenza virus를 접종할 때 그 세포에서 바이러스의 증식을 억제하는 물질이 생산된다는 사실을 발견하고 이 물질을 "인터페론"이라 명명하게 되었다.

1960년대에 들어와서는 인터페론을 사람이나 동물의 바이러스성 질병을 치료 또는 예방할 수 있는 약제로 개발하기 위해서 실험동물을 이용한 연구가 활발히 이루어 졌다. 그러나 임상효과를 측정할 수 있을만큼 충분한 고단위의 인터페론을 대량생산할 수 있는 기술이 없어서 큰 발전을 보지 못하였다. 그러던중 1971년에 핀란드의 Cantell박사 등이 사람백혈구 배양법을 이용하여 고단위 사람알파인터페론을 대량생산할 수 있는 기술을 확립함으로써 인터페론의 임상응용시험이 급진전하게 되고, 구미 각국에서 이 방법을 이용한 인터페론 생산과 바이러스성 질병 치료시험이 성행하게 되었다. 1973년에는 Strander박사팀이 골육종환자를 인터페론으로 치료하니 치료효과가 높더라는 임상시험결과를

발표함으로써 인터페론은 암을 치료할 수 있는 기적의 약으로 각광을 받기 시작하였고, 무한한 잠재력이 있는 새로운 약이라고 'IF'란 별명을 받게 되었다. 그리하여 구미 각국에서는 인터페론의 대량생산, 분자생물학적성상, 작용기전 및 임상응용효과에 대한 연구가 대대적으로 전개되었으며, 1978년에서 1981년에 미국정부와 미국암협회에서는 거액의 연구비를 투입하여 집중적으로 연구하기에 이르렀다.

인터페론을 임상에 응용하는데 첫째 문제가 된것은 순수한 고단위의 인터페론을 저렴한 가격으로 대량생산 공급하는 것이었다. 이 문제를 해결하기 위해서 백혈구배양법, 백혈구세포주 및 섬유아세포주배양법 등이 연구되었고, 일부에서는 실험실생산단계를 벗어나 공장생산체제를 확립하여 대량생산공급하기에 이르렀으나 아직도 가격이 비싸서 대중화 되지 못하고 있는 실정이다.

이와같은 연유로 1978년대 부터 미국의 Genentech회사, Cetus회사, 이스라엘의 Weizman 연구소등에 있는 생화학자와 분자생물학자들은 Recombinant DNA technique란 유전공학기술을 이용하여 인터페론 생산연구에 착수하여 1981~1983년에는 유전공학기술을 이용하여 사람  $\alpha$ ,  $\beta$ -interferon을 생산하는데 실험적으로 성공하였다. 그러나 인터페론의 역가가 낮고 생

산기술이 고정되지 않아서 대량생산은 못하고 있으며 계속 기술개발연구중에 있다. 최근 1982년 3월에는 Genentech회사의 Daniel Caron 박사팀이 상보적 DNA방법 (Complementary DNA method)을 이용하여 소의 인터페론 생산에 성공했다고 보고한 바도 있었다.

이러한 연구경향과 그간의 발전과정을 미뤄볼 때 멀지않아 인터페론이 사람과 동물의 바이러스성 질병 치료제로서 보편화되어 보급 이용될 전망이 높으며, 1928년에 Fleming이 발견한 페니실린이 세균성질병 치료에 혁신을 가져왔듯이 인터페론도 바이러스성 질병 치료에 획기적인 전기를 가져다 줄 것으로 생각된다.

이와같은 선진국의 연구추세에 부응하고 국내에서 동물용 인터페론 생산기술을 축적하며, 유전공학기술을 이용한 동물용 인터페론의 대량생산 기술습득을 위한 기초연구로서 가축위생연구소 병독과 유전공학 연구팀은 유전 공학의 농업이용연구 예산을 받아 1982년 부터 돼지의 알파인터페론 생산 연구에 착수하여 특기할 만한 연구결과를 얻었다.

본 고에서는 인터페론의 생물학적 성상과 가축위생연구소에서 수행한 돼지 알파인터페론 생산 연구결과에 대해 기술하고자 한다.

## 2. 생물학적 성상

### 가. 종류

동물세포에 작용하여 인터페론을 생산하게 유도하는 IFN inducer로는 Sendai virus나 Newcastle disease virus와 같은 Single-stranded RNA viruses; Reovirus 등의 double-stranded RNA viruses 및 DNA viruses가 있으며, 각종 핵산, 곰팡이 추출액, mitogens, 세포내에서 증식하는 세균 및 그 부산물, 합성된 저분자물질 또는 고분자물질등이 있다. 인터페론은 이러한 inducers가 작용하여 인터페론을 생산하게 하는 세포에 따라 1980년 미국국립보건원에 의해 백혈구 인터페론을  $\alpha$ -interferon ( $\alpha$ -IFN), 섬유

아세포인터페론을  $\beta$ -interferon ( $\beta$ -IFN), 면역임파구인터페론을  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN)으로 명명하였다. 이러한 인터페론은 분자구조, 물리화학적 성상 및 항원성이 각각 다르다. 일반적으로  $\alpha$ -IFN과  $\beta$ -IFN은 pH2.0의 강산처리와 56°C에서 30~60분간의 열처리에도 안정하나  $\gamma$ -IFN은 불안정한 특성이 있다. 최근까지 연구의 대상이 된 것은 주로  $\alpha, \beta$ -IFN이었다. 그러나  $\gamma$ -IFN이 다른 IFN보다 훨씬 높은 역가를 나타내며 임상효과도 우수하다고 최근 보고되어  $\gamma$ -IFN에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

### 나. 특성

인터페론의 생물학적 특성은 이 제재의 순수분리와 동정이 어려워 오래동안 학자들간에 논란이 많았다. 최근까지 알려진 인터페론의 특성을 요약하면; 1) 광범위한 항바이러스작용이 있고, 2) 각종 암질환에 대한 항암효과를 나타내며, 3) 세포내에 기생하는 기생충을 죽이는 효과가 있다. 4) 이런 효과는 종특이적이며, 5) 분자량은 20,000내지 34,000dalton이고, 6) 150여개의 amino acid sequences로 구성된 glycoprotein이라는 것이 밝혀졌으며, Species-specific한 특성은 이 glycoprotein의 carbohydrate molecules에 의해 지배되는 것으로 알려졌다. 특히 최근에 유전공학기술을 이용한 인터페론의 생산과정에서 amino acid sequences가 더욱 명백해지므로써 화학적으로 인터페론을 합성하려는 연구가 진행되고 있다.

### 다. 작용기전

인터페론의 항바이러스 작용기전에 대해서는 1970년대에 많은 바이러스학자들에 의해 연구되어 왔으나 아직도 불명한 점이 많다. 지금까지 알려진 사실의 개요를 기술하면 다음과 같다. 인터페론의 유도인자의 분자가 세포의 세포막이나 핵에 작용하면 세포유전인자(DNA)중에서 침묵상태에 있던 인터페론생성유전정보를 활

성화 시켜 interferon messenger RNA를 전사(轉寫)시키고 이 messenger RNA의 유전암호를 아미노산으로 해석해서 interferon에 해당하는 단백질을 세포질내의 ribosome에서 합성하게 되고 일정한 과정(glycosylation)을 거친후 세포외로 분비된다. 분비된 인터페론은 인접세포의 세포막에 직접작용하여 세포막의 분자구조를 변형시켜 바이러스의 침입을 방지하게 하든가, 또는 세포핵의 DNA의 유전정보구조를 자극하여 항바이러스단백을 생산하게 된다. 이 항바이러스단백은 ribosome에 결합해 있으면서 바이러스분자가 세포내에서 轉寫 또는 轉移되어 합성되는 것을 저지하는 역할을 하며 인터페론의 작용을 나타내게 하는 최종물질로써 항바이러스 작용외에도 세포분열의 저지, 인터페론의 생성을 증가 또는 저지시키는 역할과 면역기전을 변형시키는 등의 기능을 발휘한다.

### 3. 돼지 $\alpha$ -interferon생산 연구

#### 가. 배경

가축질병 치료와 예방에 인터페론을 응용하기 위한 본격적인 연구는 1960년대 말부터 유럽제국에 있는 수의학자들에 의해 연구되기 시작하였고, 1970년대에 들어와서는 미국을 포함한 여러나라에서 연구를 수행하여 많은 업적이 나왔다.

지금까지 이뤄진 인터페론과 가축위생분야와 연관된 연구의 경향을 대별해 보면; 1) 실험동물을 이용한 항바이러스 및 항암작용기전에 대한 연구 2) 시험관내에서 세포배양에 의한 인터페론 생산 기술개발 3) 인터페론 유도인자에 의해 체내에서 합성되는 endogenous IFN유도 생산 기술개발 4) 인터페론의 임상응용시험등으로 요약될 수 있다.

가축질병 치료와 예방에 인터페론의 임상응용에 대해 서독의 Mayr 및 불가리아의 Toneva박사 등은 인의(人医) 분야에서 보다 수의(獸医)분야에서 이용가치가 높고 임상응용 연

구에 대한 효과가 빨리 나타나 발전속도가 빠를 것이라고 지적하였다. 또한 이들은 가축의 질병 중에서도; 1) 감염에 기인된 신생동물의 사망을 감소시키고, 2) 비육초기에 있는 돼지와 소 질병의 치료, 3) 전염요인이 복합적인 질병, 4) 혼합감염, 5) 만성질병, 6) 바이러스성 종양 치료, 7) 비노생식기계 및 호흡기계 질병, 8) 장점막 및 피부계통의 바이러스성 질병의 치료와 예방에 응용성이 높을 것으로 생각했다.

그간 돼지의 인터페론에 대한 연구는 다양하게 수행되었으나 임상응용 시험은 거의 수행되지 않았다. 시험관내에서 인터페론 생산에 관한 연구는 불가리아의 Toneva에 의해서 1974년에서 1981년 사이에 다각도로 연구되었다. 그는 돼지의 백혈구, 비장세포, 신장세포 및 폐장세포에 뉴켓슬병 바이러스, Semliki forest virus등을 inducer로 접종하여 인터페론 시험생산을 하여 시험관내에서 인터페론과 관련된 각종 요인에 대해 보고한 바 있었으며, 생산한 인터페론을 돼지에 접종했을 때 체온, 맥박, 식욕, 행동 및 주사부위 반응에 이상이 없었으며, 접종후 혈액중에 인터페론이 18시간 지속됐다는 사실을 밝혔다.

임상적용 시험예로는 1976년에 미국의 Wright가 전염성위장염에 감염된 돼지에 인터페론을 접종했을 때 전염성위장염의 감염을 완전방어하지 못하고 단지 발병시간만 다소 연장시켰다고 보고하였다.

가축위생연구소에서는 1982년에 유전공학기술의 농업응용과 관련된 연구의 일환으로 돼지 알파인터페론의 생산기초시험을 수행하여 돼지 백혈구 성상에 따른 인터페론 생산효과와 interferon inducer인 Sendai virus와 Newcastle disease virus의 인터페론 생산효과를 비교연구하였으며, 1,000~1,500단위의 인터페론을 생산하였다. 이어서 1983년에는 고단위 돼지인터페론을 생산하기 위해서 생산과정에 관련된 각종 요인에 대해 연구하였고, 생산된 인터페론의

시험관내 항바이러스 효과와 생물학적 성상에 대해 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

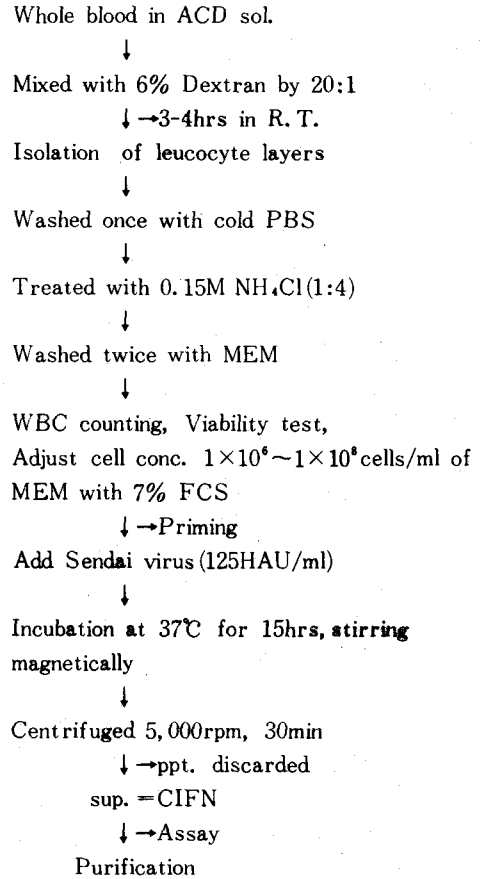
나. 결 과

1) 인터페론 생산 및 역가측정

임상관찰에서 건강한 90~100kg의 돼지(♂)의 심장혈액을 무균적으로 ACD용액에 채취하여 이 혈액과 6% Dextran을 20:1의 비율로 혼합하여 메스시린다에 넣고 실온에 정치하고 3~4시간후에 음압을 이용하여 백혈구층을 분리하였다. 분리된 백혈구를 냉장된 인산완충식염수로 1~2회 원심세척한 후에 냉장된 0.15M NH<sub>4</sub>Cl을 이용하여 혼입된 적혈구를 파괴 제거하고 Minimum essential medium으로 원심세척하였다. 이때 적혈구의 혼입이 최소한 1:5 (W/R)이하이며, 0.14% trypan blue염색에 의해 viability가 95%이상인 백혈구 부유액을 시험에 공했다. 순수분리된 백혈구는 7% 우태아 혈청을 가한 배지에 시험목적에 따라 세포농도를 1×10<sup>6</sup>~1×10<sup>8</sup>cells/ml로 조절하여 사용하였다. Interferon inducer로는 Sendai virus를 125HAU/ml되게 사용하였다. 돼지 α-IFN의 생산과정을 요약하면 그림 1과 같다.

생산된 인터페론의 역가측정은 microtissue culture plate에다 돼지콩팥세포주 pk-15 세포를 배양하고 동시에 가점인터페론을 세포에 처리한 후에 하루밤 배양하고 난 뒤 50~100TCID<sub>50</sub>/200μl의 Vesicular stomatis virus를 공격시켰다. 다시 20~24시간 배양한 후 세포변성 여부를 관찰하고서 세포변성이 50%저지된 희석배수를 최종 역가로 산출하였다.

그림 1. 돼지 α-IFN 생산 유도



2) 백혈구농도 및 배양조건에 따른 α-IFN 생산효과

백혈구 농도를 1×10<sup>6</sup>, 5×10<sup>6</sup>, 1×10<sup>7</sup>, 5×10<sup>7</sup>, 1×10<sup>8</sup>cells/ml로 조정하여 교반배양과 정지배양, 교반속도변화 및 공기주입에 따른 인터페론 생산효과를 비교하였다. 그 결과 표1에서 요약된 바와같이 세포농도가 1×10<sup>7</sup> 및 5×10<sup>7</sup>

표 1. 백혈구 배양조건과 처리에 따른 돼지 α-IFN 생산효과

Cell Conc. (cells/ml)	Treatments			
	40-60rpm Aeration	40-60rpm No aeration	Stationary	150-180rpm Aeration
1×10 <sup>6</sup>	2,500*	ND	ND	ND
5×10 <sup>6</sup>	8,300	8,400	2,100	8,200
1×10 <sup>7</sup>	18,700	12,600	7,600	11,500
5×10 <sup>7</sup>	19,200	11,200	ND	ND
1×10 <sup>8</sup>	11,500	8,100	ND	ND

\*INF units/ml (PK-15)

일 때 다른 농도에서 보다 인터페론이 많이 생산되었고, 정치배양 보다는 40~60rpm으로 교반배양 했을 때 고단위 인터페론이 생산되었으며 배양중에 공기를 유입하는 것이 인터페론 생산효과가 높았다.

### 3) 프라이밍처리에 따른 IFN생산 효과

이미 생산되어 역가를 알고 있는 돼지  $\alpha$ -IFN을 백혈구부유액에 ml 당 50, 100, 150, 200unit 되게 가하고 1,2,3 및 4 시간 동안 각각 37°C에서 배양한 후에 Sendai virus를 넣고 IFN을 생산하여 priming이 IFN생산에 미치는 효과를 조사하였던 바 표 2 과 같은 결과를 얻었다. 즉 IFN 생산효과는 150unit로 2시간 priming시켰을 때 27,600unit의 인터페론이 생산되어 가장 높았고, 3시간 priming 했을 때는 23,200unit의 인터페론이 생산되어 nonprimed 대조군에 비해 IFN 생산효과가 각각 2.4배 및 2.8배 증가하였다. 100 및 200unit에서는 150unit보다 낮으나 대조군보다는 현저히 높은 unit의 IFN이 생산되었다. 4시간 priming했을 때는 각 처리군에 공히 대조군에 비해 큰 차이가 없었다.

이 결과로써 돼지백혈구도 사람이나 마우스 백혈구 처럼 inducer virus를 처리하기 전에 priming시킴으로써 인터페론 생산능력이 증대된다는 사실이 밝혀졌다. 또한 priming처리에 의한 IFN생산효과는 처리한 IFN의 양과 시간에 밀접한 관계가 있다고 생각된다. 또한 priming과정중에 백혈구의 세포막의 분자배열을 변형시켜 inducer가 효과적으로 작용할 수 있게 하

표 2. 프라이밍 처리가 돼지 $\alpha$ -IFN생산에 미치는 영향

Treatment	Time (hrs) of priming			
	1	2	3	4
Primed (u/ml)				
50	10,800	15,300	16,200	10,100
100	12,500	18,000	19,300	9,700
150	11,400	27,600	23,200	9,200
200	12,600	21,700	20,400	11,800
Non-primed	9,700			

며, 세포의 유전기전을 변형시켜 IFN Synthetic pathway를 활성화 시켜 IFN m-RNA의 생성을 촉진시켜 주는 것으로 사료된다.

### 4) 시험관내 항바이러스 효과

돼지  $\alpha$ -IFN의 시험관내 항바이러스 효과를 조사하였던 바 표 3 와 같은 결과를 얻었다. 돼지고환세포(ST)나 PK-15세포에  $\alpha$ -IFN 10unit/ml농도로 작용시켰을 때 Hog cholera virus, Pseudorabies, 돼지전염성위장염 바이러스(T.G.E.) 및 Swine enterovirus에 대하여 항바이러스 효과가 없었다. 그러나 100 / unit/ml의 농도에서는 70~92%, 1,000unit/ml에서는 83~100%의 항바이러스 효과가 인정되었다. 한편 Bovine turbinate(BT) 세포에 IFN을 10, 100, 1000unit/ml농도로 작용시키고 소전염성비기관염바이러스(I.B.R.)와 파라인플루엔자바이러스(P1-3)로 공격했을 때는 전혀 항바이러스효과가 없었다.

이 결과로 보아 돼지  $\alpha$ -IFN은 시험관내에서 각종 돼지의 병원성바이러스에 대해 광범위한 항바이러스효과를 나타내며 이 결과는 이 인터페론의 임상응용시험을 위해 중요한 기초자

표 3. 돼지  $\alpha$ -IFN의 시험관내 항바이러스 효과

Inoculum (TCID50/0.2ml)	Cells	INF u/ml	Antiviral effects (%)	
Hog cholera (100)	ST	10	8	
		100	92	
		1,000	100	
Pseudo rabies (100)	PK-15	10	0	
		100	92	
		1,000	100	
T. G. E (100)	PK-15	10	0	
		100	83	
		1,000	100	
Swine enterovirus (100)	PK-15	10	0	
		100	70	
		1,000	83	
Control (Med+FCS+Sendai virus)	PK-15	10 <sup>0</sup>	0	
		ST	10 <sup>-1</sup>	0
		VS	10 <sup>-2</sup>	0
	Virus			

료가 된다고 생각된다.

#### 5) 종특이성

배양된 세포를 이용하여 돼지  $\alpha$ -IFN의 종 특이성에 대해 조사하였다. 생산된 IFN은 PK-15에서 보다 ESK나 primary porcine kidney 세포에서 50~65% 더 높은 Vesicular stomatitis virus에 대한 항바이러스 효과가 있었다. 소 유래 세포인 BT 및 primary bovine kidney 세포에서는 PK-15에 비해 50~60%의 높은 항바이러스효과를 나타내어 종이 다른 소세포에 대해 강한 교차작용이 있었다. 한편 산양, 사슴, 원숭이 및 햄스타 유래 세포에 대해서는 항바이러스효과가 없었다.

#### 6) 물리화학적 특성

생산된 인터페론은  $-40^{\circ}\text{C}$ 에 동결  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 건조했을 때 33.3%의 역가손실이 있었으며,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 freezing and thawing을 반복했을 때 역가는 점차 감소하여 3회째에는 처음 역가의 50.5%가 감소되었다. 또한 pH2.0과 3.0에서는 불안정하여 48시간 처리했을 때 54% 및 94%의 역가가 감소되었고 pH5.0에서는 비교적 안정하였다.  $56^{\circ}\text{C}$ 의 열처리와 트립신처리에 대해서는 매우 불안정하였다.

## 4. 맺는말

인터페론을 가축의 바이러스성 질병 치료와

예방에 응용하기 위해서는 무엇보다도 저렴한 가격으로 순수하고 효능 높은 고단위 인터페론을 생산할 수 있는 기술을 개발해야 한다. 이 목적을 달성하기 위해서 인터페론에 대한 분자생물학적 연구와 동물체내에서 항바이러스효과를 나타내는 작용기전에 대한 연구가 수행되어야 한다고 생각된다. 이런 견지에서 볼때 본문에서 기술한 돼지 알파인터페론에 대한 연구결과는 유전공학기술을 이용한 동물용 인터페론생산이란 큰 과제에서 극히 기초가 되는 시금석에 불과한 것이다. 그러나 인터페론을 이용한 가축 질병 치료와 예방은 가능성이 높은 명제이며 선진국가에서 막대한 예산과 인력을 투입하여 연구를 계속하고 있는 흐름을 감안할 때 새로운 개념의 질병방역 매체인 인터페론에 대한 연구를 적극 추진해야 한다고 생각된다. 그렇게 되기 위해서 더 높은 고단위의 정제된 돼지인터페론 생산연구와 생산된 인터페론의 임상치료 효과시험을 수행할 것이며, 여기에서 얻어진 축적된 기술을 이용하여 소, 닭의 인터페론 생산 연구로 발전시켜야 될 것이다. 또한 유전공학기술을 본격적으로 도입 연구하여 이와같은 생물학적제제를 생산해 낼 때까지 연구노력해야 한다.