

항체를 이용한 간염치료제 생산기술 개발

Development of Technology for the Production of
Therapeutic Antibody for Hepatitis B Virus Infection.

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처

1992年10月10日

1992年10月10日

1992年10月10日

1992年10月10日

1992年10月10日

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “항체를 이용한 간염치료제 생산기술 개발” 과제의 제 1 차
년도 보고서로 제출합니다.

1992. 6.

주관기관명 : 한국과학기술연구원부설유전공학연구소

연구책임자 : 한문희 (유전공학연구소 책임연구원)

연구 원 : 홍효정 (유전공학연구소 선임연구원)

박성섭 (유전공학연구소 연구원)

류춘제 (유전공학연구소 연구원)

진병래 (유전공학연구소 연구원)

요 약 문

I. 제 목

항체를 이용한 간염 치료제 생산기술개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV)는 간염과 간암의 주된 병원체이다. 현재 지구상의 약 3억 인구가 감염되어 있고, 그중 3/4이 아시아에 편중되어 있으며 국내에서도 인구 10%에 달하는 약 400만이 감염되어 있을 정도로 HBV 감염은 심각한 세계보건문제를 나타내고 있다. HBV의 전파는 모체로부터 신생아에게 전달되는 수직전파(vertical transmission)와 기타 체액이나 혈액을 통한 방법에 의하여 쉽게 이루어지고 있다. HBV가 몸속으로 들어오기 전에 HBV 감염을 예방하기 위해서는 백신을 접종하지만, HBsAg/HBeAg 양성인 어머니로부터 태어난 신생아들이나 감염성 HBV에 접촉된 의료기관 종사자들, B형 간염으로 인해 간이식수술을 받은 사람들 혹은 예방접종 후에도 항체가 생기지 않은 사람들에게는 HBV의 표면항원에 대해 역가가 높은 항체(anti-HBs)를 직접 주사하여 HBV 감염을 예방 및 치료하고 있다. 이와같은 목적의 passive immunoprophylaxis에 현재 사용되고 있는 항체는 Hepatitis B immune globulin(HBIG)으로서, 이것은 anti-HBs가 양성인 사람의 혈액으로부터 γ -globulin만을 분리·정제한 것이다.

그러나 HBIG는 사람 혈액의 지속적인 공급이 필요하고 바이러스나 비

테리아에 의한 오염 가능성도 있으며 특이적 활성 (specific activity) 이 낮으므로, 이 단점들을 보완하기 위하여서는 HBV의 표면항원들에 대한 단일클론항체 생산이 바람직하다. 단일클론항체로서는 사람 단일클론항체가 이상적이지만 사람의 하이브리도마는 안정성이 낮고 항체의 생산분비량이 적으므로 이것을 질병의 진단과 치료에 사용하기에는 기술·경제·산업적인 측면에서 아직 어려움이 많다. 대신 대량생산이 가능하고 항체의 친화성이 높은 생쥐단일클론항체를 인간화시키는 방법이 좋은 타협점이 된다.

B형 간염의 예방 및 치료의 목적으로 사용하기 위한 인간화된 항체는 HBV의 표면항원인 S와 pre-S2에 대한 키메라 항체와 reshaped human antibody (흔히 humanized antibody, 인간화된 항체라고 명명)를 들 수 있다. 키메라 항체는 항원결합부위를 갖는 생쥐 단일클론항체의 가변영역과 effector 기능을 갖는 사람항체의 불변영역을 재조합시킨 것이고, reshaped human antibody는 사람항체에다 생쥐항체의 항원결합부위를 이식시킨 것으로서, 둘 다 인체내에 주사하였을 때 생쥐단일클론항체보다 면역반응을 덜 유발시키고 좋은 effector 기능을 갖는 장점들을 지니고 있다. 본 연구실에서는 지난 3년동안 HBV의 pre-S2 표면항원에 대한 키메라항체 생산기술을 개발완료한 바 있으므로 이 기술을 바탕으로 하여 현 연구기간에서는 HBV의 S 표면항원에 대한 키메라항체를 생산하고 또한 이들의 인간화된 항체생산기술도 개발하여 HBV 감염에 대한 예방 및 치료제를 개발할 목표를 두고 있다. 이 인간화된 항체생산 기술은 유전공학기술, 단백질공학기술, 세포배양기술 등이 포함된 고도의 복합적인 첨단기술분야이므로 이 기술이 개발되면 암이나 다른 질병의 진단 및 치료제 개발에도 광범위하게 응용될 것이라 전망된다.

본 보고서는 본 연구의 1차년도에 해당되는 기간(1991.10.10 ~ 1992.6.9) 동안, HBV의 S 표면항원의 키메라항체 생산과 pre-S2 표면항원에 대한 인간화된 항체생산의 기술개발을 위하여 수행하여 온 연구결과들을 요약한 내용이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. HBV의 S 표면항원에 결합하는 생쥐 단일클론항체(H67)의 가변영역을 암호하는 면역글로블린 헤비사슬 및 카파사슬 cDNA들의 클로닝
2. H67 면역글로블린 cDNA들의 염기서열 분석
3. HBV pre-S2에 결합하는 인간화된 항체유전자의 제조
4. 인간화된 항체유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

IV. 결론 및 건의사항

HBV 감염의 예방 및 치료제 개발을 위하여 또한 항체를 이용한 다른 질환의 예방 및 치료제 개발을 위한 항체공학기술개발을 위하여 지난 8개월(1991.10 ~ 1992.6) 동안 수행해 온 연구의 결과들을 요약하면 다음과 같다.

1. HBV의 S 표면항원에 대한 생쥐 단일클론항체를 암호하는 헤비사슬 및 카파사슬 cDNA들을 클로닝 하였고, 이 cDNA들의 염기서열을 분석하였다. 앞으로 이 유전자들을 이용하여 발현벡터에 각각 클로닝시킨 후, 마이엘로마 세포주에 발현시켜 HBV의 S 표면항원에 대한 사람/쥐의 키메라 항체를 생산할 예정이다.

2. 인간화된 항체의 생산기술개발을 위하여, HBV의 pre-S2에 대한 생쥐 단일클론항체의 헤비사슬 유전자의 CDR 1, 2, 3을 이것의 framework 영역의 유전자 염기서열과 가장 유사한 Sm 인체 면역글로불린의 헤비사슬 유전자(4B4H)에 이식시켜 인간화된 헤비사슬 유전자를 제조하였고, 플라스미드 벡터에 subcloning하였다. 인간화된 카파사슬 유전자도 4B4L를 사용하여 위와 같은 전략으로 제조하였다. 앞으로 인간화된 항체생산을 위하여 두 유전자들을 발현벡터에 클로닝시키고 마이엘로마세포주에서 발현시킬 예정이다.

3. 항체의 발현을 위하여 면역글로불린 헤비사슬과 카파사슬의 발현 카세트 벡터(expression cassette vector)를 각각 제조하였다.

지금까지의 연구개발의 전략 및 결과는 상당히 합리적이고 우수하다고 생각되며, 여러 다양한 질환의 예방 및 치료제 개발을 위한 국내기술을 개발하기 위해서 앞으로도 항체공학기술 개발에 대한 장기적 지원이 요청되는 바이다.

SUMMARY

I. Title

Development of technology for the production of therapeutic antibody for Hepatitis B virus infection.

II. The Object and importance of Research

Hepatitis B virus(HBV) infection is an important public health problem throughout the world affecting 300 million people, three quarters of whom are in Asia. The virus is often transmitted from an infected mother to her infant during the perinatal period, and also easily spread by blood, saliva and semen. The envelope of HBV contains three different antigens called S, pre-S2 and pre-S1, of which pre-S2 has been known to have a dominant epitope and also elicit virus-neutralizing and protective antibodies.

In order to control and eradicate the disease worldwide, recent human hepatitis B vaccines produced from recombinant yeast or synthetic peptides have been applied to protective immunization of humans. In addition, for post-exposure prophylaxis, HB immune globulin(HBIG) which provide high and immediate levels of anti-HBsAg an-

tibody is administered to infants born of HBsAg/HBeAg positive mothers at birth or medical personnel with an acute exposure to infectious HBV-containing material.

However, the currently available HBIGs have been prepared from pooled human anti-HBsAg plasma. This is not an ideal source of antibody due to limited amounts, possible contamination with infectious agents and relatively low specific activity. In contrast, human monoclonal antibodies (mAbs) against the surface antigens of HBV would offer several advantages, but human hybridoma techniques cannot yet offer the routine and efficient methodology required to produce a large library of human mAb with high affinity.

Murine mAbs are easy to produce and have high affinity, but they have limited utility in human therapy because of human anti-mouse antibody response during treatment. Therefore, as a compromise, chimeric antibodies with murine variable and human constant regions have been produced, but the variable regions of a chimeric antibody was shown to lead to a strong anti-antibody response. To further reduce the immunogenicity of the variable regions of mouse mAb, humanized antibodies which are formed by combining the complementarity determining regions

(CDRs) of mouse mAbs with human variable region frameworks and human constant regions have been reported recently.

In this study, we cloned cDNAs coding for the variable regions of the heavy and light chains of murine monoclonal antibody which can react with surface antigen S of Hepatitis B virus for the production of chimeric antibody and constructed the recombinant genes encoding humanized antibody with specificity for the pre-S2 surface antigen of HBV, which will be used for therapy of HBV infection.

III. Scope and contents of research

1. Cloning and sequence analysis of cDNAs coding for the heavy and the light chains of a murine monoclonal antibody specific for the S antigen of HBV from H67 murine hybridoma cell line.
2. Construction of the humanized antibody specific for the pre S2 of HBV.

IV. Results and Recommendation

1. We cloned cDNAs coding for the variable regions of heavy and light chains of a murine monoclonal ant-

ibody specific for the S antigen of HBV. Next, we plan to produce a chimeric antibody against the S antigen of HBV using the cDNAs.

2. We constructed the humanized heavy and light chain specific for the pre S2 antigen of HBV by PCR technique.
3. We constructed expression cassette vectors for the expression of heavy chain and light chain of recombinant antibody.

The strategy and result of the present research and development seem to be quite reasonable and productive and hence long term support of this project may be necessary for the national development of therapeutic antibodies for the prevention and the therapy of various diseases.

CONTENTS

I. Introduction	15
II. Materials and Methods	19
1. <i>E. coli</i> strains and media	19
2. Buffers, enzymes and chemicals	19
3. Cell culture	20
4. Purification of monoclonal antibody H67	20
5. ELISA	21
6. N-terminal amino acid sequencing of heavy and light chain of H67 antibody	22
7. Northern blot analysis of H67 cytoplasmic RNA	23
8. Cloning and sequence analysis of cDNAs coding for the heavy and light chains of H67 mAb by PCR	23
9. Recombinant PCR and Transformation	24
10. Determination of nucleotide sequences	25
11. Transfection	25
III. Results and Discussion	27
1. Cloning of Ig cDNAs coding for the variable regions of heavy and light chains of H67 mAb	27
1.1 purification of monoclonal antibody H67	27

1.2	N-terminal amino acid sequencing of heavy chain and light chain	29
1.3	Northern blot analysis of H67 cytoplasmic RNA	30
1.4	Cloning and sequence analysis of cDNAs coding for H67 mAb.....	31
1.5	Construction of expression vector for production of chimeric antibody	33
2.	Construction of humanized antibody genes	36
2.1	Selection of human immunoglobulin genes	36
2.2	Construction of humanized antibody genes specific for the pre-S2 antigen of HBV by PCR	36
2.3	Determination of nucleotide sequences of humanized antibody genes	37
3.	Construction of expression cassette vectors for the production of desired monoclonal antibody	46
IV.	Conclusion and Recommendation	51
	References	53

목 차

제 1 장 서 론	15
제 2 장 실험재료 및 방법	19
1. <i>E. coli</i> 균주 및 배지	19
2. 완충용액, 효소, 화학물질들	19
3. 세포배양	20
4. 단일 클론 항체 (H67) 의 분리	20
5. ELISA	21
6. 헤비사슬과 카파사슬의 N-말단 아미노산 서열결정	22
7. H67 RNA의 Northern blot 분석	23
8. PCR 기술에 의한 H67 단일 클론 항체 cDNA 의 클로닝 과 염기서열 분석	23
9. Recombinant PCR 및 형질전환	24
10. DNA 염기서열 결정	25
11. Transfection	25
제 3 장 결과 및 고찰	27
제 1 절 HBV의 S 표면항원에 대한 생쥐 단일 클론 항체를 암호하는 Ig cDNA들의 클로닝	27
1.1 H67로부터 단일 클론 항체의 분리	27
1.2 항체의 N-말단 아미노산 서열분석	29
1.3 H67 RNA의 Northern blot 분석	30

1.4	H 67 단일클론항체의 cDNA 클로닝과 염기서열 분석	31
1.5	염기서열 삽입	33
제 2 절	HBV의 pre-S2 항원에 대한 인간화된 항체유전자의 제조	36
2.1	인체 면역글로블린 유전자의 선정	36
2.2	인간화된 항체유전자들의 제조	36
2.3	인간화된 항체유전자의 염기서열 결정	37
제 3 절	모노클로날항체의 발현을 위한 발현 cassette vector 들의 제조	46
3.1	발현벡터 제조	46
3.2	Northern blot 분석	46
제 4 장	결론 및 건의	51
참고문헌	53

제 1 장 서 론

Hepatitis B virus(HBV)는 간염과 간암의 주된 병원체로서, 현재 지구상의 약 3억 인구가 감염되어 있을 정도로 HBV 감염은 심각한 세계 보건문제를 나타내고 있다(Tiollais and Buendis, 1991). 이 바이러스의 감염방법은 주로 만성간염환자인 산모로부터 태어난 신생아가 80%의 확률로 다시 만성간염에 걸리는 수직감염에 의하고, 혹은 HBV가 오염된 물질에 접촉한다던지 혈액이나 침 또는 체액을 통하여 감염된다(Hollinger *et al.*, 1985).

HBV의 구조는 electron-dense nucleocapsid와 겉의 envelope로 구성되어 있다. Envelope에는 large, middle, major 세 종류의 단백질이 10:10:80의 비율로 포함되어 있고, 각각 pre-S1/pre-S2/S유전자, pre-S2/S유전자, S유전자로부터 합성된다(Tiollais *et al.*, 1985). HBs항원은 a라 불리우는 group determinant와 d/y, w/r의 subtype determinant들을 가지고 있어서, HBV를 혈청학적으로 분류하면 adw, adr, ayw, ayr의 4가지 아형으로 구분되는데, 이들은 지구상에 불균등하게 분포되어 있다(Tiollais *et al.*, 1985).

HBV의 표면항원들 즉 S, pre-S2, pre-S1의 항원성을 살펴보면, S의 경우 group-specific epitope들은 virus-neutralizing antibody와 protective antibody를 생성하게 하고(Stevens *et al.*, 1984; Iwarson *et al.*, 1985), pre-S2도 역시 virus-neutralizing antibody와 protective antibody를 생성하게 하는데, pre-S2의 epitopes는 S에 있는 epitope보다 더 면역성이 강하여 S에

대한 쥐의 면역반응을 보상하는 것으로 알려졌다 (Neurath *et al.*, 1986; Milich *et al.*, 1985). pre-S1은 간세포의 HBV에 대한 receptor와 상호작용하여 감염시 주요역할을 할 것으로 제안되었고 또한 protective antibody 생산을 유도하는 것으로 알려지고 있다 (Neurath *et al.*, 1986; 1989).

HBV 감염을 근절시키기 위하여 HB vaccine이 생산되어 HBV 감염을 예방하여 왔지만 이미 감염되어 있는 경우에는 치료제를 사용하여 감염을 치료하여야 한다. 그러나 아직까지 뚜렷한 감염치료제가 개발되지 않았다. 만성 감염 위험인 모친으로부터 태어난 아거나 HBV에 우발적으로 노출이 된 경우에는 HBIG(Hepatitis B immune globulin)를 즉시 주사하여 HBV 감염을 예방하여 왔다 (Szmuness *et al.*, 1981; Beasley *et al.*, 1983).

그러나, 현재 사용되고 있는 HBIG는 환자의 혈청으로부터 r-globulin을 분리한 것이므로 박테리아나 바이러스가 오염되어 있을 가능성이 높고 또한 항체의 specific activity가 낮으므로 이상적인 항체의 공급원이 되지 못한다. 반면 HBV의 표면항원들에 특이적인 사람 단일클론항체는 위의 문제점들을 내포하고 있지 않지만, 그 생산기술이 아직까지는 확립되지 않았고 또한 항체의 항원에 대한 친화도가 낮을 뿐더러 Epstein Barr virus나 다른 retrovirus의 오염도 문제가 된다 (James, 1990).

생쥐 단일클론항체는 그 생산이 쉽고 항원에 대한 친화도가 높지만, 인체 내에서 생쥐항체에 대한 면역반응이 일어나 그 치료효과가 떨어지고 부작용이 생기게 된다 (Shavler *et al.*, 1985). 따라서 하나의 해결책으로 사람과 쥐의 키메라(chimeric) 항체, 즉 항원과의 결합부위인 variable 영역은 쥐이 것을 그대로 사용하고 항체의 effector 기능을 유발하는 부분인

constant 영역은 사람의 것으로 대체시킨 항체를 생산하여 왔다(Morrison, 1985; Beidler *et al.*, 1988; LoBuglio *et al.*, 1988). 그러나, 최근에 chimeric 항체의 쥐 variable 영역도 계속 투여하게 되면 인체 내에서 면역반응을 불러 일으킴이 밝혀지게 됨에 따라(Bruggermann *et al.*, 1989) 쥐의 variable 영역에 대한 면역성을 더 줄이기 위하여 쥐 variable 영역내의 항원과의 결합 부위인 complementarity determining regions (CDRs) 1, 2, 3을 사람의 항체를 이식시켜서 인간화된 항체 (humanized antibody)를 생산하고 있다(Riechmann *et al.*, 1988; Queen *et al.*, 1989).

B형 간염의 예방 및 치료의 목적으로 사용하기 위한 인간화된 항체는 HBV의 표면항원인 S와 pre-S2에 대한 키메라 항체와 reshaped human antibody (흔히 humanized antibody, 인간화된 항체라고 명명)를 들 수 있다. 본 연구실에서는 지난 3년동안 HBV의 pre-S2 표면항원에 대한 키메라항체 생산기술을 개발완료한 바 있으므로 이 기술을 바탕으로 하여 현 연구기간에서는 HBV의 S 표면항원에 대한 키메라항체를 생산하고 또한 이들의 인간화된 항체생산기술도 개발하여 HBV 감염에 대한 예방 및 치료제를 개발할 목표를 두고 있다. 이 인간화된 항체생산 기술은 유전공학기술, 단백질공학기술, 세포배양기술 등이 포함된 고도의 복합적인 첨단기술분야이므로 이 기술이 개발되면 암이나 다른 질병의 진단 및 치료제 개발에도 광범위하게 응용될 것이라 전망된다.

제 2 장 실험재료 및 방법

1. 균주 및 배지

본 실험에 사용한 *E. coli* 균주는 다음과 같다.

DH1;F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17,(rk⁻, mk⁺),

supE44, relA1

DH5 α ;F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17,

(rk⁻, mk⁺), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF)U169

E. coli 를 위한 LB 배지는 1 l 당 10g의 Bacto-tryptone, 5g의 bacto-yeast extract와 10g의 NaCl을 포함하며 plate를 만들 때에는 1.5% (w/v)의 Bacto-agar를 넣었고, Ampicillin은 50ug/ml의 농도로 첨가하여 사용하였다.

2. 완충용액, enzymes 및 chemicals

Gel electrophoresis에 사용한 TBE buffer(5x)는 1 l 당 Tris base 54g, boric acid 27.5g, 0.5M EDTA(pH8.0) 20ml를 혼합하여 만들었다. TE buffer는 10mM Tris-Cl(pH8.0), 1mM EDTA(pH8.0)을 사용하였고, 제한효소 SalI은 50mM Tris-Cl, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM DTT(pH7.9)의 조건에서, XhoI은 10mM Tris-Cl, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM DTT(pH7.9)의 조건에서 반응시켰으며, ligation buffer는 50mM Tris-Cl, 10mM MgCl₂, 20mM DTT, 1mM ATP, 50ug/ml BSA(pH7.8)을 사용하였으며, 그외 효소들은 공급한 회사

의 추천대로 사용하였다.

PCR buffer(10x)는 100mM Tris-Cl(pH8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.1% (w/v) gelatin을 섞어 만들었으며 형질전환을 위한 TEB 용액은 1l당 1M MES(2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, pH6.3 with 5M KOH) 10ml, MnCl₂·4H₂O 8.91g, CaCl₂·2H₂O 1.47g, KCl 7.46g, Hexaminecobalt chloride 0.8g을 섞어서 만든 후, filtering하고 autoclave하여 사용하였다. Trizma base, SDS 등의 시약은 Sigma chemical Co.에서 구입하였고 제한효소 등은 Kosco와 NEB 제품을 사용하였으며 plasmid는 pBluescript SK(+)를 사용하였다.

3. 세포배양

Myeloma 세포(Sp2/0 - Ag14)배양은 10% Fetal Bovine Serum (FBS)이 함유된 DMEM(Gibco)과 IMDM 배지(Gibco)에 penicillin-streptomycin(100 Iu/ml) (Sigma)이 첨가된 것을 사용했으며, 37℃에서 5% CO₂가 유지되는 항온조내에서 계대배양하였다.

또 HBV의 S 표면항원에 대한 생쥐 단일클론항체(k, r1)를 생산하는 하이브리도마 세포주(H67) (Chung and Kim, 1987)은 서울대학교 의과대학 정홍근 박사로부터 분양받아 상기의 조건으로 계대배양 하였다.

4. 단일클론항체(H67)의 분리

HBV의 S 표면항원에 대한 생쥐 단일클론항체(k, r1)를 분리하기 위하

여, H 67 하이브리도마 세포주를 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 부유 배양시킨 세포배양액을 암모늄 설페이트로 45% 되게 포화시킨 후, 10,000 g에서 원심분리하여 침전물을 취하고, 이 침전물을 PBS로 투석시킨 후, Seppälä 등(1981)의 방법에 따라 0.1M sodium phosphate buffer(pH8.0)로 평형시킨 Protein A-Sepharose 4B column에 가하고, 0.1M sodium phosphate buffer(pH6.0)로 용출시켜 HBV의 S 표면항원에 대한 생쥐 단일클론항체(H67)를 분리하였다.

분리된 단일클론항체(H67)는 centricon-10(Amicon, U.S.A)으로 농축시켜, sample buffer에 2-mercaptoethanol 첨가여부에 따른 reduction과 non-reduction 조건에서 10% SDS-PAGE(Laemmli, 1970)를 수행하였다.

5. ELISA

H 67 하이브리도마 세포주로부터 분리된 항체가 HBV의 S 표면항원에 대한 특이성을 나타내는지 확인하기 위하여 Tijssen(1985)의 방법에 따라 ELISA(Enzyme linked Immunosorbent assay)를 수행하였다.

먼저 coating buffer에 희석된 S 항원을 well당 1 μ g씩 immuno plate에 4 $^{\circ}$ C, O/N으로 결합시킨 다음 2% bovine serum albumin (BSA) 용액을 가하여 blocking시키고, TBS-Tween(0.05% Tween-20, 10mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.4)으로 세척한 다음, 1차 항체로 분리된 H 67 항체를 농도별로 결합시켰다.

1차 항체 처리 후, 항원과 결합되지 않은 항체는 TBS-Tween으로 세척

하여 세척하고, 2차 항체로 horse-radish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG(Sigma)를 0.3% BSA가 함유된 TBS 용액으로 1/1000로 희석하여 결합시켰다. Plate를 다시 TBS-Tween으로 세척하고, ELISA Screen kit(Boeringermanheim)의 ABTS[®]와 H₂O₂ substrate를 첨가하여 발색시키고, ELISA reader(Titertek Multiskan PLUS)로 405nm에서의 흡광도를 측정하였다.

6. 헤비사슬과 카파사슬의 N-terminal amino acid sequencing

분리한 단일클론항체(H67)의 N-terminal amino acid sequence를 결정하기 위하여, 약 10 μ g의 H67 항체를 2-mercaptoethanol를 헤비사슬과 카파사슬로 reduction시킨 후, 10% SDS-PAGE를 수행하여 헤비사슬과 카파사슬을 분리시키고, Applied Biosystem에서 제시한 실험절차대로 10% Methanol이 함유된 10mM CAPS(3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid) transfer buffer를 통하여 ProBlot superscript membrane으로 electroblotting하였다.

Blotting된 membrane은 Amido Black 10B 용액(0.1% Amido Black in 1% acetic acid/40% MTOH)으로 염색하여 transferred된 헤비사슬과 카파사슬 밴드를 확인하고 그 밴드들을 조심스럽게 수거한 후, air dry하여, 본 연구소의 단백질 화학실에서 Applied Biosystems Model 477A Pulsed-Liquid Superscript Sequencer로 N-terminal amino acid sequencing을 하였다.

7. H67 Cytoplasmic RNA의 Northern blot analysis

H 67 항체들을 암호하는 cDNA 들을 클로닝 하기 위하여, 우선 H 67 하이브리도마 세포주로부터 Cytoplasmic RNA를 Maniatis *et al.* (1989)의 방법으로 분리하였고, 이 Cytoplasmic RNA에 항체유전자의 full length mRNA가 발현되어 있는지 알아보기 위하여 Northern blot 분석을 Purrello(1983) 등의 방법으로 수행하였다. 이때 사용한 탐침은 헤비사슬의 경우는 생쥐 Cr1 유전자에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 (5'-CGGTCGACAGGGATCCAGAGTTCCAGGTCAC-3')를 사용하였고, 카파사슬의 경우는 생쥐 Ck 유전자에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 (5'-GCAGTCGACTGAGGCACCTCCAGATGTTAACTG-3')를 사용하였다. 하이브리다이제이션 실험은 58℃에서 48시간 동안 수행했고 탐침세척은 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 58℃에서 30 분동안 수행하였다.

8. Polymerase chain reaction(PCR)에 의한 Ig cDNA의 클로닝 및 염기서열 분석

항체의 가변영역 cDNA 들을 클로닝 하기 위하여 H 67의 Cytoplasmic RNA에서 먼저 첫번째 가닥 cDNA를 GIBCO BRL사의 Superscript를 사용하여 추천한 방법대로 합성하였다. 이때 사용한 프라이머는 헤비사슬과 카파사슬의 불변영역에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로 Northern blot 분석에서 사용한 탐침과 같다. 이 첫번째 가닥 cDNA를 주형으로 해서 완전한 두가닥 cDNA 사슬을 합성해 내기 위하여 Tag DNA 종합효소 이 용한 PCR 실험을 Perkin Elmer cetus사 제품의 PCR machine에서

추천한 방법대로 수행했다. 이때 사용한 PCR 프라이머들은 해비사슬 경우 N-말단 프라이머로, N-말단 아미노산 서열에서 유래한 5'-CCCGAATTCGAGGT(TC)CAGCTGCA(GA)CA(GA)TCTGG(GA)CCTG-3' 와 C-말단쪽으로 첫번째 가닥 cDNA 합성시 사용한 프라이머를 사용했고, 카파사슬 경우는 N-말단 프라이머로 역시 N-말단 아미노산 서열에서 유래한 5'-CCCGAATTCGACATTGTGCTGAC(CA)CA(GA)TCTCC(TA)GCT-3' 와 첫번째 가닥 cDNA 합성시 사용한 프라이머를 사용했다. 이 PCR 결과 나온 DNA 들은 프라이머에 넣어준 제한효소 EcoRI 과 Sal I 으로 자른 다음 PUC18 vector 와 pBluescript SK(+) vector 에 subcloning 하였다.

pBluescript SK+에 클로닝한 cDNA 는 한가닥 cDNA 만을 pharmacia에서 추천한 방법대로 분리하여 sequencing 주형으로 사용했고, PUC18에 클로닝한 것은 두가닥 DNA sequencing 을 수행했다. 이때 사용한 sequencing kit 는 미국 USB사의 sequenase™ 이었다.

9. Recombinant PCR 및 형질전환

Variable region의 CDR 을 제외한 framework 부위를 인간화하기 위하여 recombinant PCR 방법 (Lewis and Crowe 1991) 을 사용하였다. 생쥐 항체의 CDR 부위를 포함하면서 서로 겹치도록 만든 oligomer 와 효소 절단부위 및 splicing doner sequences 를 포함하는 양쪽의 oligomer 를 합성하여, 선정된 인간 항체의 DNA 를 주형으로 각각의 PCR 을 실시하고 이에 생성된 DNA 절편을 다시 다음 단계의 반응에 주형으로 사용하였다. 즉 각 부위의 PCR 을 1차 실시하고 이때 생성된 DNA 절편

을 전기영동하여 분리하고 이것을 PCR의 주형으로 하여 2차 PCR을 실시하고 동일한 방법으로 PCR하여 최종적인 DNA 절편을 얻었다. PCR은 94 °C 1분, 50 °C 2분, 72 °C 3분으로 25회 반복 실시하였으며 반응의 조건은 Perkin Elmer Cetus에 따랐으며 동사의 heating block을 사용하였다. 형질전환은 Maniatis *et al.*(1989)의 방법에 따라 시행하였다.

10. DNA 염기서열 결정

인간화된 항체 DNA의 염기서열을 결정하기 위하여, DNA 절편을 클로닝하여 두가닥 상태로 Dideoxy 방법으로 USB의 sequencing kit를 사용하였다. primer들은 universal primer와 PCR primer를 함께 사용하였다.

11. Transfection

Electroporation에 의해 DNA를 myeloma 세포에 transfection 시키기 위하여, Shin and Morrison(1989)의 방법에 따라 계대배양되고 있는 myeloma 세포를 2,000rpm, 5분 원심분리하여 수거한 후, 찬 20mM PBS(20mM sodium phosphate, pH6.8, 0.15M NaCl)로 세포농도가 $2 \sim 6 \times 10^6$ cells/ml되게 부유시켰다. PBS로 부유시킨 세포 0.9ml을 electroporation cuvette에 넣고, linearized DNA 10 μ g을 첨가한 뒤, 가볍게 흔들어 얼음 위에서 10분간 방치한 후, electroporator (cell-porator, BRL)로 250V, low Ω , 800 μ F, fast charge rate로 pulse하고, 다시 얼음 위에서 10분간 방치하였다.

Pulse 한 세포는 10% FBS가 함유된 15ml의 IMDM 배지로 희석한 후, 원심분리하여 세포를 수거한 뒤 다시 세포 농도가 2×10^6 cells/12 ml 되게 10% FBS가 함유된 IMDM 배지로 부유시켜 96well plate에 약 2×10^4 cells/well 되게 옮겼다.

2일 후 well당 동일량의 선암배지 (500 μ g hygromycin B, 1mg G418/IMDM ml)를 첨가하고, 3일 후부터 배지를 1/2씩 제거하고, 새로운 선암배지로 약 2주일 동안 계속 갈아주면서 selection drug에 resistant 한 clone만을 선발하였다.

선발된 clone은 ELISA와 Northern blot 분석으로 유전자가 삽입되어 있는지를 확인하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 HBV의 S 표면항원에 대한 생쥐 단일클론항체를 암호하는 Ig cDNA들의 클로닝

1.1 단일클론항체 (H67)의 분리 및 정제

HBV의 S 표면항원에 대한 생쥐 단일클론항체 (H67) (k, r1)를 분리하기 위하여, H67 세포주를 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 부유 배양시킨 후, 배양액을 ammonium sulfate 침전법과 affinity column chromatography에 의해 H67 단일클론항체를 분리하여 (그림 1), 10%

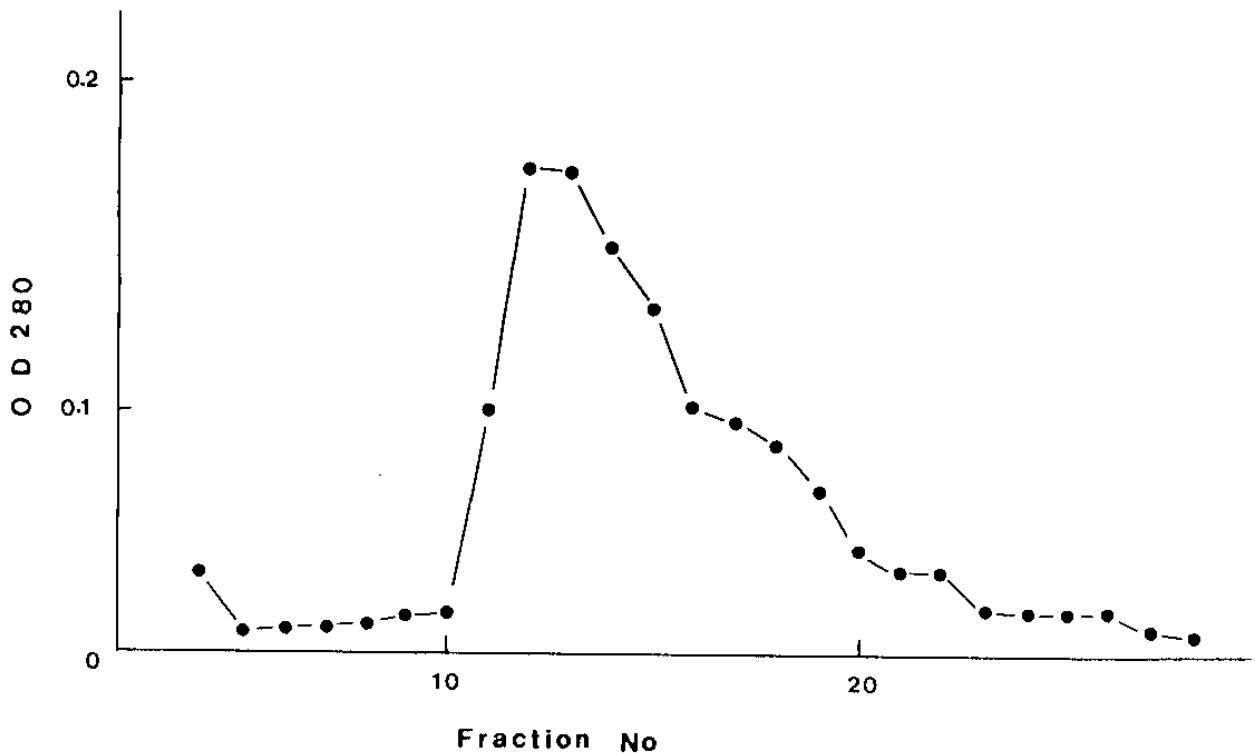


그림 1. H67 항체의 분리 (Protein A-sepharose CL4B affinity column chromatography)

SDS-PAGE로 sample buffer에 2-mercaptoethanol 첨가여부에 따른 reduction과 non-reduction 조건에서 각각 55KD의 헤비사슬 및 28KD의 카파사슬 밴드들과 160KD 정도의 IgG 밴드를 관찰하여 순수하게 항체가 분리되었음을 확인하였다 (그림 2).

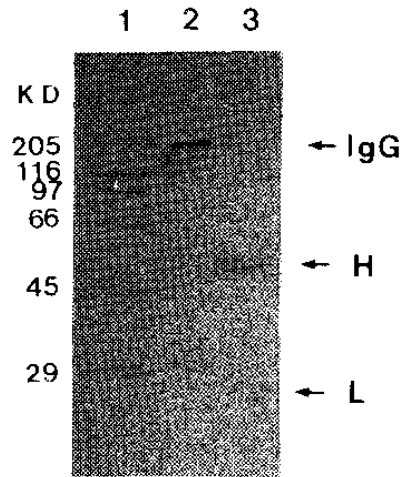


그림 2. 분리된 H67 항체의 SDS-PAGE

- 1 : protein size marker
- 2 : non-reduced IgG
- 3 : reduced IgG

또 위와같이 분리한 항체가 HBV의 S 표면항원에 대한 특이성을 나타내는지를 확인하기 위하여, HBV의 S 표면항원에 여러 농도의 H67 단일클론항체 (0.025 ~ 3 μ g)를 결합시킨 다음, ELISA를 수행한 결과, 측정된 흡광도가 분리된 단일클론항체의 가해준 농도와 비례하여 커짐을 확인하였다 (그림 3).

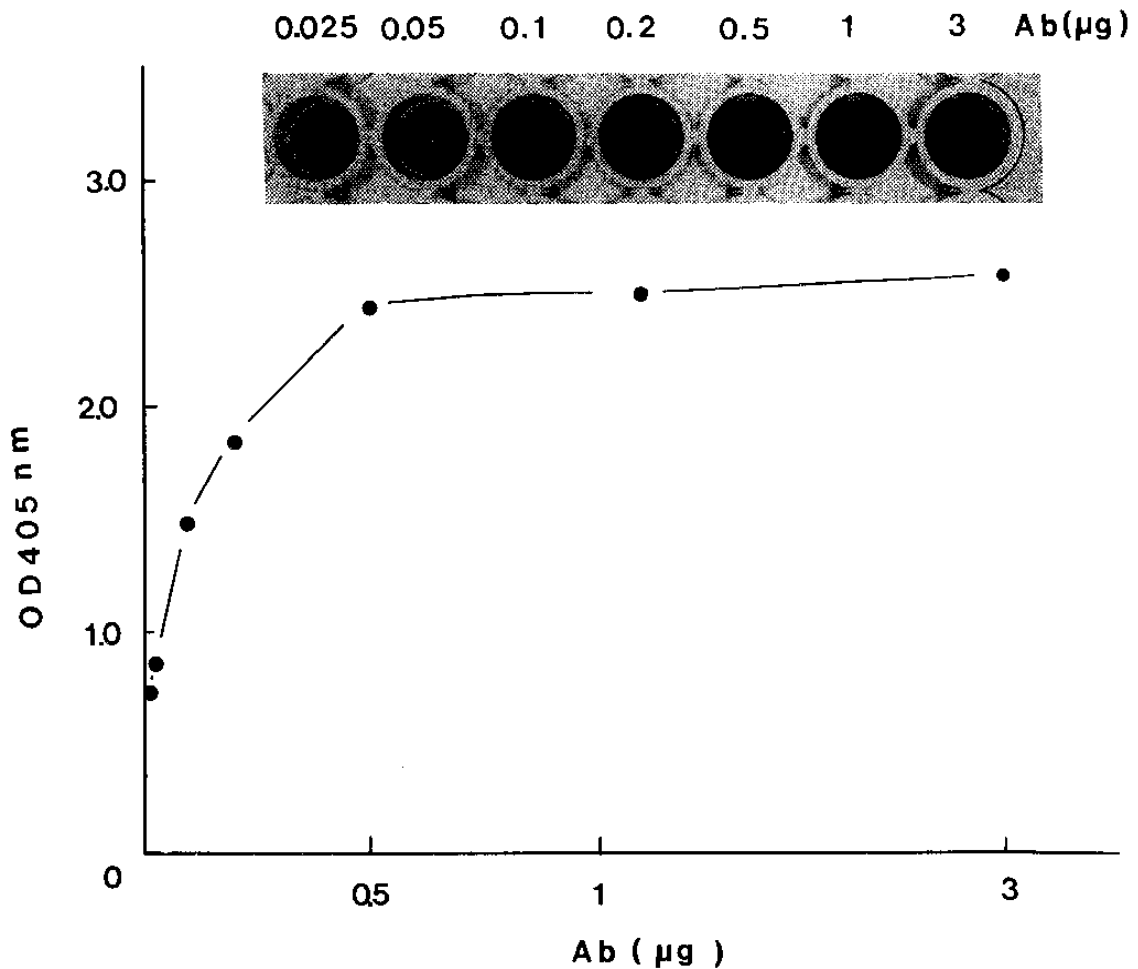


그림 3. 분리된 H67 항체의 항원결합 특이성 분석 (ELISA)

1.2 헤비사슬과 카파사슬의 N-terminal amino acid sequencing
 위와같이 분리한 단일클론항체 (H67)의 N-terminal amino acid sequence
 를 결정하기 위하여, H67 항체를 2-mercaptoethanol로 헤비사슬과 카
 파사슬로 reduction시킨 후, N-terminal amino acid sequencing
 을 수행하였다(그림 4). 그리고 이 N-terminal amino acid sequen-
 ce들을 Kabat *et al.* (1991)의 항체서열들과 비교한 결과, 헤비사슬
 은 mouse heavy chain subgroup II(A)에 카파사슬은 mouse kappa

chain group III에 속함을 확인하였다.

N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCES AND
SYNTHETIC PRIMERS FOR PCR.

r1 : mouse heavy chain subgroup II (A)

N-Glu-Val-Gln-Leu-Gln-Gln-Ser-Gly-Pro-Glu-Leu
(V: 5' -CCCGAATTCGAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTG-3')
 T G G G
(C: 3' -CACTGGACCTTGAGACCTAGGGACAGCTGGC-5')

K : mouse Kappa light chain III

N-Asp-Ile-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu
(V: 5' -CCCGAATTCGACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCT-3')
 A G T
(C: 3' -GTCAATTGTAGACCTCCACGGAGTCAGCTGACG-5')

그림 4. H 67 항체의 헤비사슬 및 카파사슬의 N-terminal amino acid sequence 들

1.3 H67 Cytoplasmic RNA의 Northern blot analysis

H67 hybridoma로부터 분리한 cytoplasmic RNA에 헤비사슬을 암호화하는 mRNA (약 1.5kb)와 카파사슬을 암호화하는 mRNA (약 0.9kb)가 발견되어 있음을 알 수 있는 결과가 그림 5에 보인다. 따라서 이 mRNA로부터 S 항원에 대한 항체의 가변영역을 암호화하는 cDNA를 클로닝하기 위하여 PCR을 수행하였다.

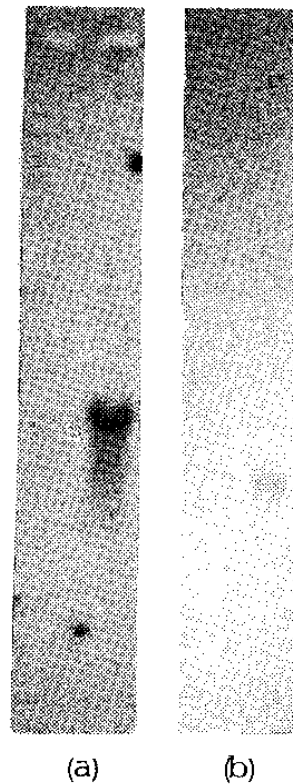


그림 5. H67 하이브리도마 세포주로부터 분리된 cytoplasmic RNA의 Northern blot analysis
 (a): 헤비사슬에 특이적인 mRNA
 (b): 카파사슬에 특이적인 mRNA

1.4 PCR 과 Ig cDNA Cloning

H67의 Cytoplasmic RNA에서 상기 항체의 가변영역을 암호하는 cDNA를 PCR로 합성해낸 결과가 그림 6에 나타나 있다. 약 500bp로 예상되는 헤비사슬 cDNA 가변영역을 PCR 프라이머끝에 그 인식서열들을 넣어준 EcoRI 과 SalI 효소로 절단한 후, PUC 18의 EcoRI 과 SalI 자리에 클로닝하여 pMHV-S라 명명하였고, 약 420bp로 예상되는 카파사슬 cDNA 가변영역도 같은 방법으로 PUC18에 클로닝하여 pMKV-S라 명명하였다(그림 7). 카파사슬의 PCR 결과에서는 두개의 DNA 띠가 보였는데 아래의

보다 작은 DNA 띠는 일부 DNA sequencing 결과 카파사슬과 유사성을 가진 Pseudogene으로 추정되었다.

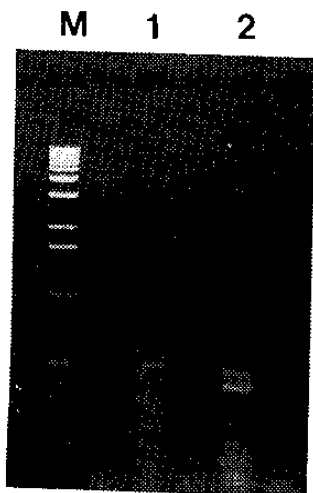


그림 6. H67 하이브리도마 세포 cytoplasmic RNA의 PCR 수행결과 생성된 cDNA

M : 1Kb ladder

1 : 헤비사슬에 특이적인 PCR

2 : 카파사슬에 특이적인 PCR

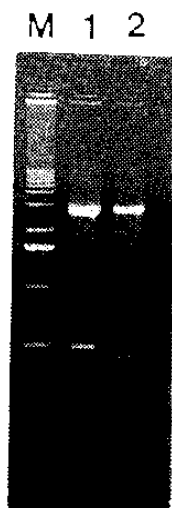


그림 7. pMHV-S와 pMKV-S의 agarose gel electrophoresis

1.5 염기서열 결정

기능적인 항체유전자로 생각되는 pMHV-S와 pMKV-S의 완전한 염기서열을 결정하였으며 그 결과가 그림 8과 9에 나타나 있다.

헤비사슬 염기서열 분석 결과, 이 헤비사슬 가변영역은 J_{H3} joining 영역유전자와 Dsp2,3(or4) diversity 영역유전자가 재배열되어 있었고, 22번째와 96번째 아미노산으로 Cys을 취해 항체의 intradisulfide bond 형성에 필수적인 잔기를 갖추었으며, 불변잔기로 알려진 아미노산(36, 94 등)등을 갖추었다. 카파사슬 경우, Joining 미니유전자로 J κ 2를 취했고 23과 92번째 아미노산으로 Cys이 존재하여 intradisulfide bond를 형성할 수 있고 불변잔기(39, 90)등이 보인다. 따라서 이들은 항체의 전형적인 구조를 취하고 있어 기능적인 항체를 암호할 수 있을 것으로 생각된다.

1 GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser

43 CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AGA GCC AGC GAA AGT
 Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser

CDR1

85 GTT GAT AAT TAT GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC CAA CAG
 Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe MET Asn Trp Phe Gln Gln

127 AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT ACT GCA TCC
 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser

CDR2

169 AAC CAA GGA TCC GGG GTC CCT GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG
 Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

211 TCT GGG ACA GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT CCT ATG GAG GTG
 Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro MET Glu Val

CDR3

253 GAT GAT ACT GCA ATG TAT TTC TGT CAG CAA ACT AAG GTG GTT
 Asp Asp Thr Ala MET Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys Val Val

295 CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

Cκ

337 GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA T
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

그림 9. HBV의 S 항원에 대한 생쥐단일클론항체 카파사슬의 V영역을 암호하는 유전자의 염기서열

1 GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser

43 CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AGA GCC AGC GAA AGT
 Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser

CDR1

85 GTT GAT AAT TAT GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC CAA CAG
 Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe MET Asn Trp Phe Gln Gln

127 AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT ACT GCA TCC
 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser

CDR2

169 AAC CAA GGA TCC GGG GTC CCT GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG
 Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

211 TCT GGG ACA GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT CCT ATG GAG GTG
 Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro MET Glu Val

CDR3

253 GAT GAT ACT GCA ATG TAT TTC TGT CAG CAA ACT AAG GTG GTT
 Asp Asp Thr Ala MET Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys Val Val

295 CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

C κ

337 GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA T
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

그림 9. HBV의 S 항원에 대한 생쥐 단일클론항체 카파사슬의 V영역을 암호하는 유전자의 염기서열

제 2절 HBV pre-S2 항원에 대한 인간화된 항체 유전자의 제조

2.1 인체 면역글로블린 유전자의 선정

HBV의 pre-S2에 결합하는 생쥐 단일클론항체(H8)의 헤비사슬 유전자 염기서열과 가장 비슷한 인체 면역글로블린 유전자를 선별하기 위하여 GenBank data base를 조사한 결과, 사람의 autoantibody인 Sm 항체 유전자(Sanz *et al.* 1989)가 유전자 염기서열이 76% 동일하고 아미노산 염기서열은 Framework 부위가 81.6% 동일하여 가장 유사성이 높음을 확인하였다. 따라서 미국 University of Texas Southwestern Medical Center의 Dr. Capra로부터 Sm 항체의 헤비사슬과 카파사슬을 암호하는 DNA(4B4H, 4B4L)를 얻었다. H8과 Sm의 헤비 및 카파사슬 유전자의 염기서열 비교가 그림 10, 11에 나타나 있다.

2.2 인간화된 항체 유전자들의 제조

H8 항체 헤비사슬의 항원결합부위인 CDR 1, 2, 3부위를 인간 항체의 그것과 치환하기 위하여 PCR을 응용한 CDR region Grafting(Lewis and Crowe, 1991)을 실시하였다(그림 12). 단계적으로 실시한 PCR의 최종 DNA 절편을 SalI과 XhoI 효소로 처리하고, 그에 상응하도록 pBluescript SK(+) vector를 제한효소로 처리하여 ligation한 후 *E. coli* DH5 α 를 형질전환 시켰다. 그리고 형질전환된 균주에서 DNA를 분리하여 효소로 처리하고 삽입된 DNA 절편의 존재를 전기영동하여 확인하였다(그림 13). 이 인간화된 헤비사슬 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 DNA를 pHuS2H라 명명하였다.

H8 항체 카파사슬을 인간화시키기 위하여, 위와 같은 전략으로 항원결합

부위인 CDR 1, 2, 3을 PCR 방법으로 치환하였고(그림 14), PCR의 최종 DNA 절편을 XhoI 과 Bgl II 제한효소로 처리하여 pBluescript SK(+) vector에 subcloning시켰다. 그리고 형질전환된 *E. coli* DH5 α 로부터 재조합 DNA를 분리하여 제한효소들 Xho I 과 Xba I로 절단한 후 전기영동하여 확인하였다(그림 15). 이 인간화된 카파사슬 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 DNA를 pHuS2L이라 명명하였다.

2.3 인간화된 항체 유전자의 염기서열 결정

삽입된 DNA 절편이 mutagenesis시킨 바와 같은 인간화된 유전자인가를 확인하기 위하여 유전자의 염기서열을 분석하였다. Universal primer와 PCR primer를 sequencing의 primer로 사용하여, DNA 절편의 상보적 가닥을 분석하여 본 결과 예측한 바와 같이 그림 16, 17의 인간화된 유전자의 염기서열을 갖고 있었다.

	Leader	Variable													
MOUSE	[Gln Ser	Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val												
		CAG AGT	GAA GTG AAG CTT GAG GAG TCT GGA GGA GGC TTG GTG	12											
HUMAN	[T--	--G --C --G -T- --G --G --G --A												
		- Cys	- - Gln - Val - - - - - - - -												
		Gln Pro Gly Gly Ser MET Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly													
		CAA CCT GGA GGA TCC ATG AAA CTC TCT TGT GCT GCC TCT GGA		26											
		A-G --- --G --G --- C-T -G- --- --C --- --A --- ---													
		Lys - - - - - Leu Arg - - - - -													
		CDR1													
		Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp MET Asp Trp Val Arg Gln Ser													
		TTC ACT TTT AGT GAC GCC TGG ATG GAC TGG GTC CGC CAG TCT		40											
		--- --- --C --- A--- --- --- --- AG- --- --- --- G--													
		- - - - - Asn - - - Ser - - - - - Ala													
		Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Arg Ser Lys													
		CCA GAG AAG GGG CTT GAG TGG GTT GGT GAA ATT AGA AGC AAA		54											
		--- -G- --- --- --G --- --- --- --C CGT --- -A- --- ---													
		- Gly - - - - - Arg - Lys - - -													
		CDR2													
		Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly													
		GCT AAT AAT CAT GCA ACA TAC TAT GCT GAG TCT GTG AAA GGG		68											
		A- G- GG- GGG A- --- G- --C --- -CA C-C --- --- --C													
		Thr Asp Gly Gly Thr - Asp - - Ala Pro - - -													
		Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr													
		AGG TTC ACC ATC TCA AGA GAT GAT TCC AAA AGT AGT GTC TAC		82											
		--A --- --- --- --- --- --- --A --- -AC -CG C-G --T													
		- - - - - - - - - - - - - - - Asn Thr Leu -													
		Leu Gln MET Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr													
		CTG CAA ATG AAC AGC TTA AGA GCT GAA GAC ACT GGC ATT TAT		96											
		--- --- --- --- --- C-G -A- A-C --G --- --A -C- G-G ---													
		- - - - - - - Lys Thr - - - Ala Val -													
		CDR3													
		Tyr Cys Thr Pro Ile Thr Thr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp													
		TAC TGT ACC CCC ATT ACT ACG GGC GCC TGG TTT GCT TAC TGG		110											
		--- --- --- A-A GA- -GC CTC CC- C-A CAC CGA -TC ---													
		- - - Thr Asp Ser Leu Pro Pro His Arg Val -													
		Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala													
		GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 120													
		--- --G --A --C --- --- --C --- --C T--													
		- - - - - - - - - - - - - Ser													

Comparison of heavy chain variable region sequence

그림 10 . 인체면역글로블린의 헤비사슬(4B4H)와 HBV의 pre-S2에 대한 생쥐항체의 헤비사슬유전자와의 염기서열 비교

MOUSE	[Asp Ile Val MET Ser Gln Ser Pro Ser Ser	
		GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC	10
HUMAN	[--- --C --- --A-C --- --- GA---	
		- - - - Thr - - - Asp -	
Leu Ala Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr MET Ser Cys Lys			
CTA GCT GTG TCA GTT GGA GAG AAG GTT ACT ATG AGC TGC AAG			24
--G --- --- --T C-G --C --- -G- -CC --C --C -A- --- ---			
- - - - Leu - - Arg Ala - Ile Asn - -			
		CDR1	
Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Ile Gln Lys Asn Tyr			
TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT AGC ATT CAA AAG AAC TAC			38
--- --C --- --T G--- --- --C --C TC- -AC A-T --- --- ---			
- - - - Val - - - - Asn Asn - - - -			
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu			
TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG			52
--A --T --- --- --- --- --- --A --- C--- --- --G ---			
- - - - Pro - - - -			
		CDR2	
Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp			
CTG ATT TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT			66
--C --- --- --- --- --T --C C--- --- --C --- --- --- --C			
- - - - - - - - - - - - - - - - - -			
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GAG ACA GAT TTC ACT CTC ACC			80
--A --- -GT --- --C --G --- -G- --- --- --- --- --- ---			
- - Ser - - - - Gly - - - - - - -			
Ile Ser Asn Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys			
ATC AGC AAT GTG AAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT			94
--- --- -GC C-- C--- --- --- --T G--- --- --- --- --- ---			
- - Ser Leu Gln - - - Val - - - - - - -			
		CDR3	
Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr			
CAG CAA TAT TAT AAC TAT CCG TCC ACG TTC GGA GGG GGG ACC			108
--- --- --- --- -GT AC- --- -GG --- --- --C CAA --- ---			
- - - - Ser Thr Trp - - - Gln - - -			
Tyr Leu Glu Ile Lys Arg			
TAC CTG GAA ATA AAA CGT		114	
A-G G--- --- --C --- ---			
Lys Val - - - -			

Comparison of kappa chain variable region sequence

그림 11. 인체면역글로불린의 카파사슬(4B4L)와 HBV의 pre-S2에 대한 생쥐항체의 카파사슬유전자와의 염기서열 비교

<PCR procedure of H chain>

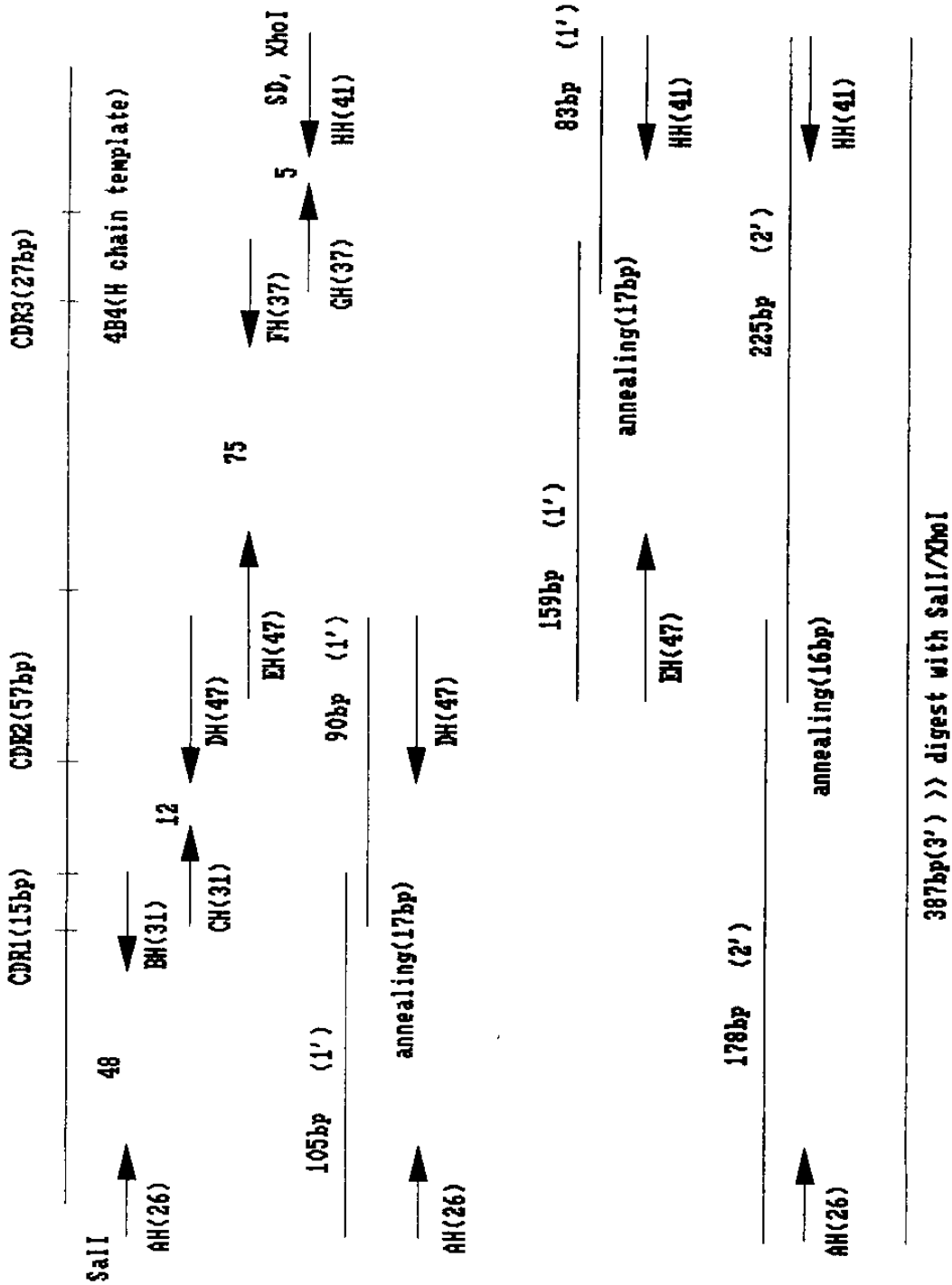


그림 12. HBV의 pre-S2에 대한 인간화된 항체생산을 위한 인간화된 해비사슬유전자의 제조전략

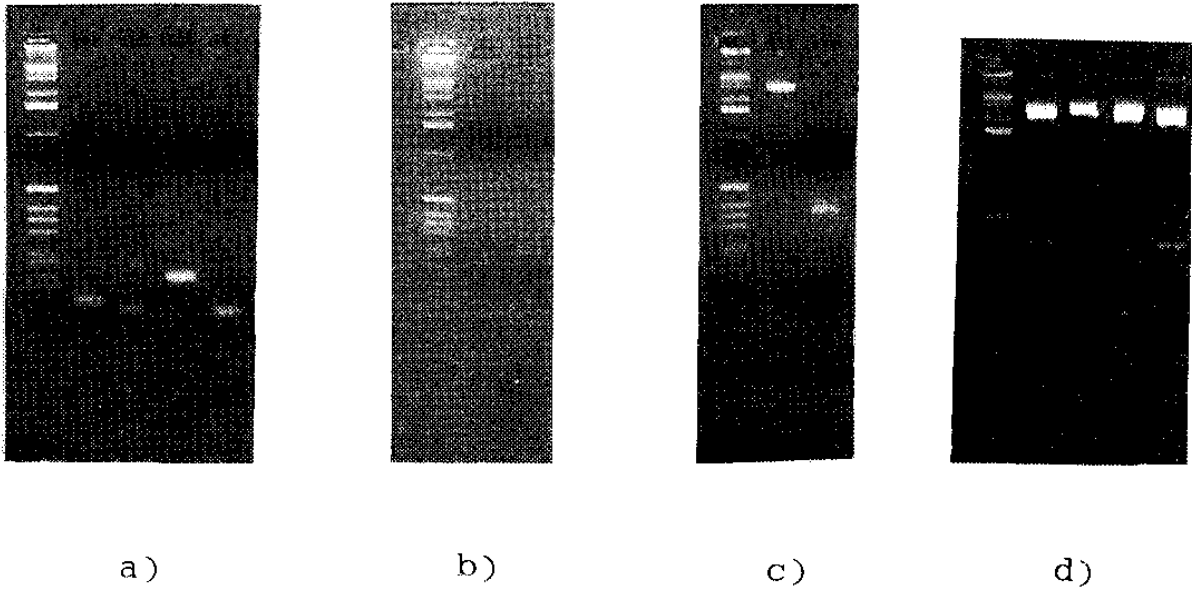


그림 13. CDR grafting의 1, 2, 3차 반응결과 생성된 DNA 절편들 (각각 a, b, c)과 pBluescript로의 subcloning 결과 생성된 pHuS2H(d)

<PCR procedure of k chain>

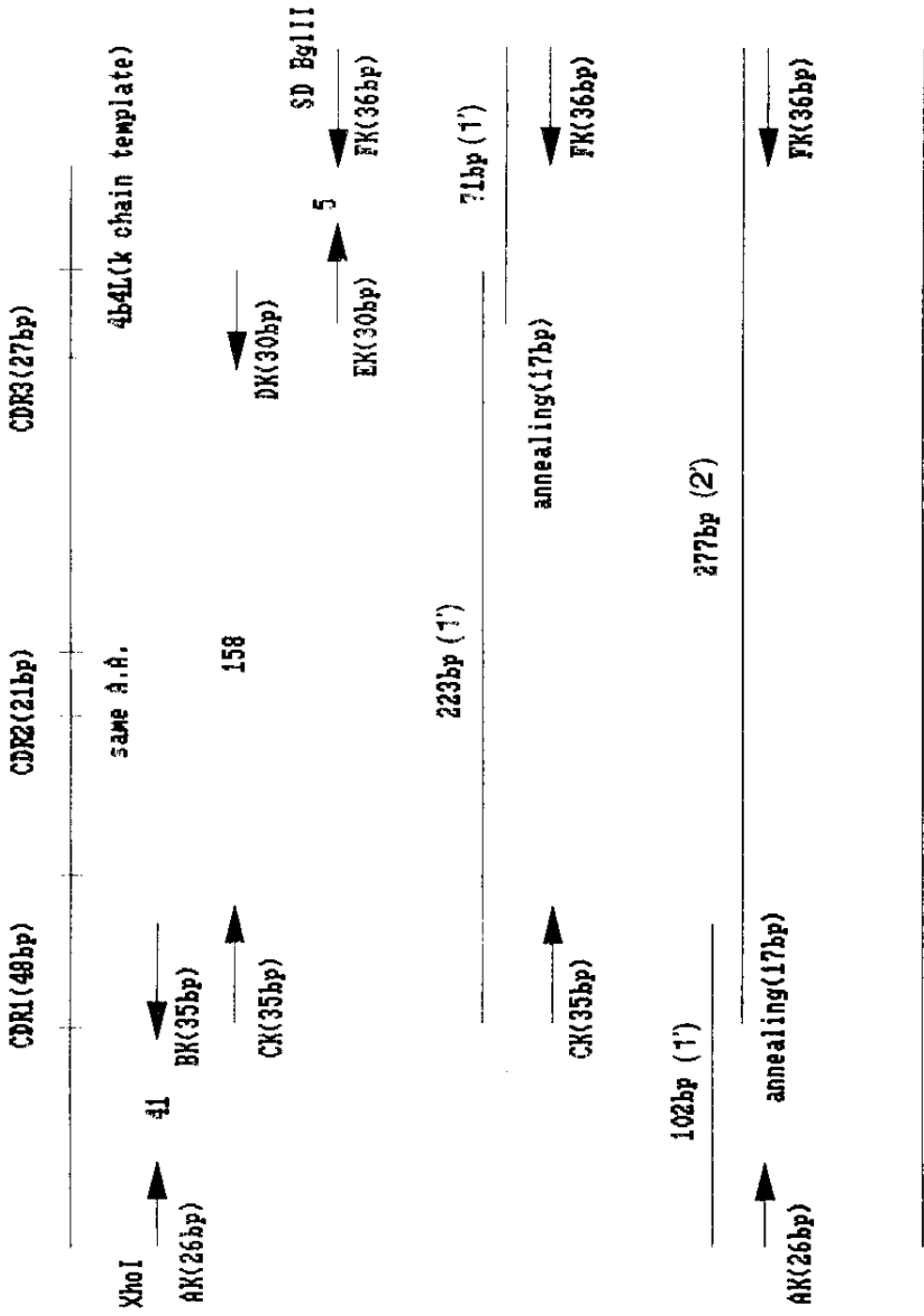
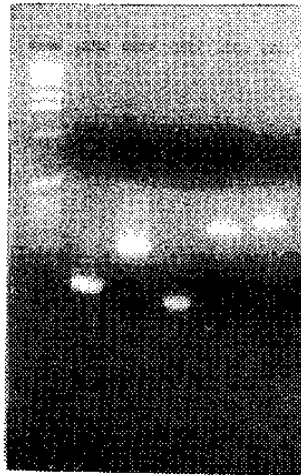


그림 14. HBV의 pre-S2에 대한 인간화된 항체생산을 위한 인간화된 카파사슬유전자의 세조전라



1 1 1 2 3

(a)



(b)

그림 15. CPR grafting의 1, 2, 3차 반응결과 생성된 DNA 절편들 (a) 과 pBluescript로의 subcloning 결과 생성된 pHuS2L (b)

Humanized sequences of heavy chain variable region

GAG GTG TCG ACG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA AAG CCT GGG GGG
 Glu Val Ser Thr Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 10

TCC CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT GAC GCC
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 30

CDR1
 TGG ATG GAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 40

CDR2
 GGC GAA ATT AGA AGC AAA GCT AAT AAT CAT GCA ACA TAC TAC GCT GAG
 Gly Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 60

TCT GTG AAA GGC AGA TTC ACC ATC TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 70 80

CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AAA ACC GAG GAC ACA GCC GTG TAT
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 90

CDR3
 TAC TGT ACC ACA ATT ACT ACG GGC GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAG
 Tyr Cys Thr Thr Ile Thr Thr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 110

GGA ACC CTG GTT ACC GTC TCC TCA G GTGAGTCCTAACTTCTCCTCGAG
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 120

그림 16. 인간화된 헤비사슬유전자의 염기서열

Humanized sequences of kappa chain variable region

```

GAA GTC TCG AGG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT GTG TCT CTG GGC
Glu Val Ser ArgThr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1                               10

GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGC CAG AGT CTT TTA TAC AGC
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
                20                               30
                                CDR1

AGC ATT CAA AAG AAC TAC TTA GCT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG
Ser Ile Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
                                40

CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC GGG GTC
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
                50                               60
                                CDR2

CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
                70                               80

ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAA
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
                90

CDR3
TAT TAT AAC TAT CCG TCC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
                100                               110

AAA C GT AAGTAGTCTTCAGATCT
Lys A rg
    114

```

그림 17. 인간화된 카파사슬유전자의 염기서열

제 3 절 모노클로날 항체의 발현을 위한 발현 cassette vector 들의 제조

3.1 발현벡터 제조

위와 같이 클로닝된 헤비사슬 및 카파사슬의 가변영역을 암호하는 cDNA로부터 키메라 항체를 생산하기 위하여, 또한 인간화된 항체나 임의의 단일 클론항체를 생산하기 위하여 항체유전자의 인핸서와 프로모터가 클로닝되어 있고 또한 사람의 면역글로블린 불변영역 유전자들인 C κ 1과 C κ 도 이미 클로닝되어 있어, 생쥐 면역글로블린의 가변영역 유전자만 클로닝하면 사람 / 쥐의 키메라 항체가 생산될 수 있기 위한 헤비사슬과 카파사슬의 expression cassette 들을 제조하였다. 상기 발현 cassette 들의 제조를 위하여 헤비사슬의 경우 본 연구실에서 개발한 바 있는 HBV의 pre-S2에 대한 사람 / 쥐 키메라항체의 헤비사슬을 생산할 수 있는 발현벡터 (pHS2-neo)의 헤비사슬 인트론 인핸서와 프로모터를 사용하였고 또한 PCR 방법에 의하여 클로닝 부위도 프로모터에 연결시켜서 헤비사슬과 카파사슬의 생산을 위한 발현벡터들을 제조하고 각각 pCH-neo와 pCL-hygro라 명명하였다 (그림 18, 19).

3.2 Northern analysis

이 발현벡터들이 기능적인지를 확인하기 위하여, HBV의 pre-S2에 대한 생쥐 항체의 가변영역을 암호하는 cDNA 들을 상기의 클로닝 부위에 다시 삽입시키고 이 플라스미드들을 각각 SP2/0 배양세포에 트랜스펙션시킨 결과, 안정하게 변형된 배양세포주들을 분리하였고, 이 세포들로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 한 결과 기능적인 mRNA를 검출하였다 (그림 20).

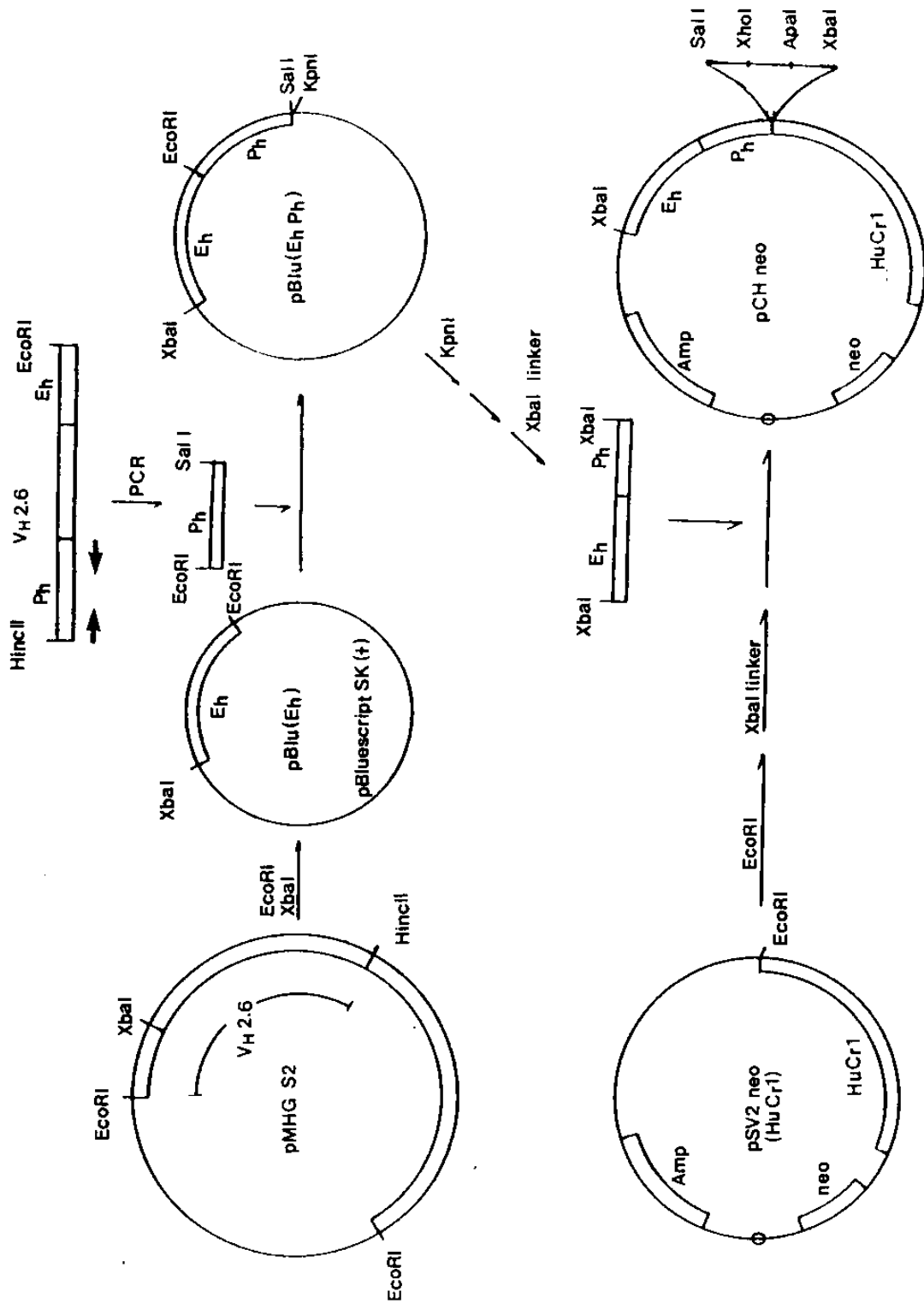


그림 18. 헤비사슬을 위한 expression cassette 제조전략

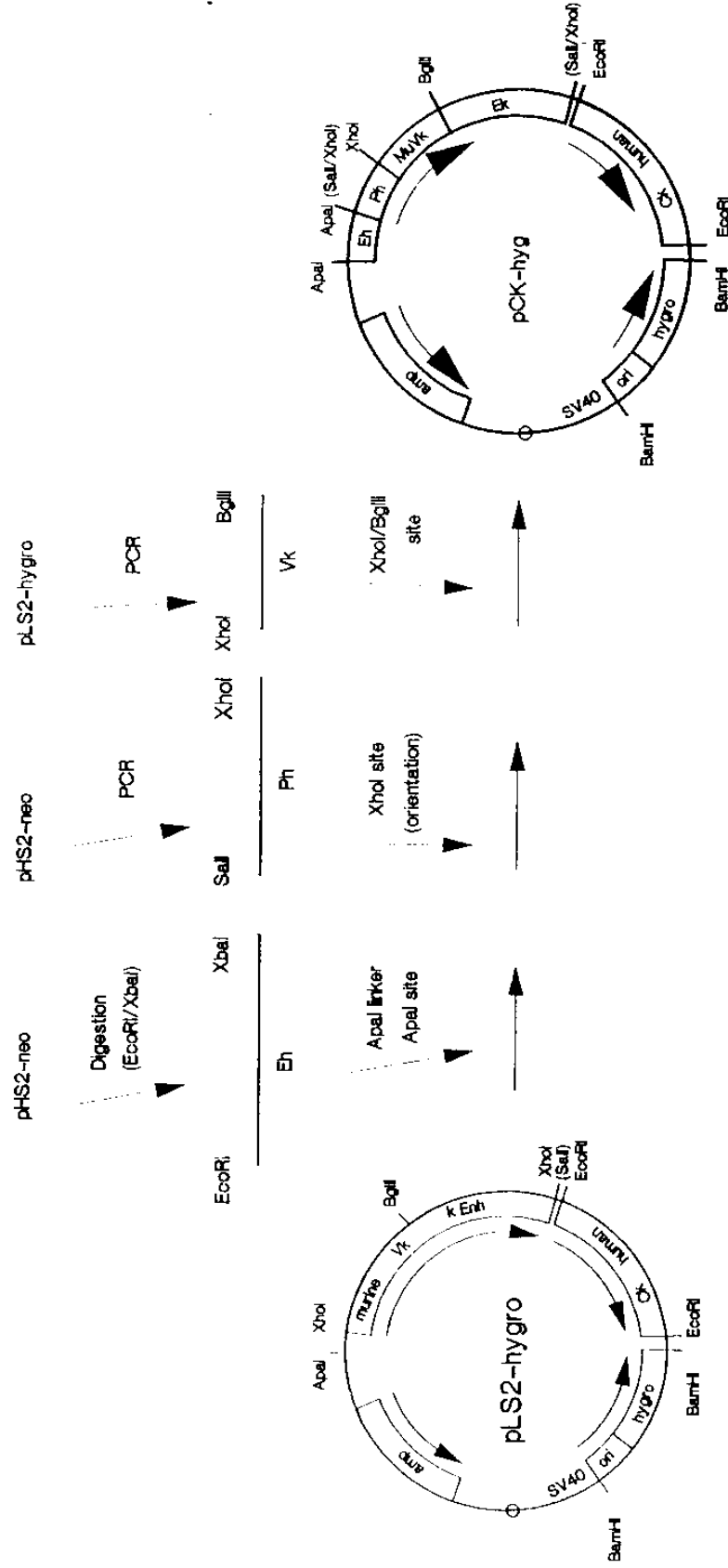


그림 19. 카파사슬을 위한 expression cassette 제조전략

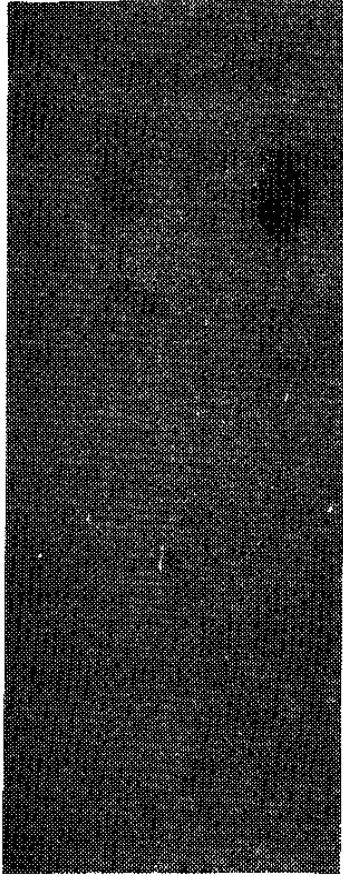


그림 20. 카파사슬 expression cassette를 사용하여 발현시킨 결과
생성된 키메라 카파사슬 mRNA

제 4 장 결론 및 건의

HBV에 의한 질병은 국내 10% 이상의 인구가 감염되어 있는 것으로 공중보건에 심각한 문제를 야기한다. 본 연구는 이런 질환에 걸린 사람들의 치료와 예방을 위한 항체공학기술을 개발하려는 것으로 지난 8개월(1991. 10.10 ~ 1992.6.9) 동안 수행해온 결과를 요약하면 아래와 같다. 먼저 HBV의 표면항원의 80% 이상을 차지하는 S 항원에 대한 생쥐 단일클론항체를 암호하는 헤비사슬과 카파사슬의 cDNA를 PCR을 이용 클로닝하였고 이 유전자를 이용해서 HBV의 S 표면항원에 대한 사람 / 쥐의 카이레릭 항체를 생산할 예정이다. 또한 HBV의 표면항원중 immunodominant 한 항원으로 알려진 pre S2에 대한 모노클로날 항체의 헤비사슬의 CDR 1, 2, 3을 인체 면역글로블린의 헤비사슬 유전자에 이식시켜 인간화된 헤비사슬 유전자를 제조하였고, 마찬가지로 동 항체의 인간화된 카파사슬 유전자도 제조하였다.

앞으로 HBV의 표면항원 S와 preS2에 대한 항체들을 모두 인간화 시키면 실제 간염치료제로서의 효과를 극대시킬 수 있을 것으로 생각되며 이런 기술들을 통해 다양한 항바이러스제제나 면역치료제등의 개발이 가능함으로 계속적인 연구개발이 추진되어야 한다고 사료된다.

뿐만 아니라, 임의의 단일클론항체의 발현에 필요한 발현 카세트 벡터들도 제조하였으므로 상기의 키메라 항체나 인간화된 항체의 발현에 사용할 계획이다.

참 고 문 헌

- 1) Beasley R.P., Hwang L.-Y., Lee G.C-Y., Lan C.-C., Roan C.-H., Huang F.-Y. and Chen C.-L.(1983) Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infection with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. *Lancet* 2, 1099 ~ 1102.
- 2) Beidler C.B., Ludwig J.R., Cardenas J., Phelps J. *et al.* (1988) Cloning and high level expression of a chimeric antibody with specificity for human carcinoembryonic antigen. *J. Immunol.* 141, 4053 ~ 4060.
- 3) Bruggemann M., Winter G., Weldmann H. and Neberger M.S.(1989) The immunogenicity of chimeric antibodies *J. Exp. Med.* 170, 2153 ~ 2157.
- 4) Chung H.K. and Kim S.R.(1987) Production of monoclonal antibody to Hepatitis B surface antigen and its application to radioimmunoassay. *Recent progress in molecular biology and genetic engineering in Korea.* 1, 165 ~ 172.
- 5) Hollinger F.B., Melnick J.L. and Robinson W.S.(1985) In *Viral Hepatitis, Biological and Clinical Features, Specific Diagnosis and Prophylaxis*(Edited by Hollinger F.B.) P.111. Raven Press, New York.

- 6) Iwarson S., Tabor E., Thomas H.C., Goodall A., Waters J., Snoy P., Shin J.W. and Gerety R.J.(1985) Neutralization of hepatitis B virus infectivity by a murine monoclonal antibody:An experimental study in the chimpanzee. *J. Med. Virol.* 16, 89 ~ 96.
- 7) James K.(1990) Human monoclonal antibodies. In *Monoclonal Antibodies for Clinical Use*(IBC Conference at London).
- 8) Kabat E.A., Wu T.T., Reid-Miller M., Perry H.M. and Gottesman K.S.(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, National Institute of Health Bethesda, MD.
- 9) Laemmli, U.K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 ~ 682.
- 10) Lewis, A.P. and Crowe, J.S.(1991) Immunoglobulin complementarity determining region grafting by recombinant polymerase chain reaction to generate humanized monoclonal antibodies. *Gene* 10, 297 ~ 302.
- 11) LoBuglio A.F., Wheeler R., Rogers K., Lee J. and Khazeli M.(1988) Pharmacokinetics and immune responses to chimeric mouse/human monoclonal antibody(ch17-1A) in

- man. Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol. 7, 111.
- 12) Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J.(1989) Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York.
 - 13) Milich D.R., Thornton G.B., Neurath A.R., Kent S.B.H., Michel M.-I., Tiollais P. and Chisari F.V.(1985) Enhanced Immunogenicity of the pre-S2 region of Hepatitis B surface antigen. Science 228, 1195 ~ 1199.
 - 14) Morrison S.L.(1985) Transfectomas provide novel chimeric antibodies. Science 229, 1202 ~ 1207.
 - 15) Neurath A.R., Kent S.B.H., Parker K., Prince A.M., Strick N., Brotman B. and Sproul P.(1986) Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus-neutralizing. Vaccine 4, 35 ~ 37.
 - 16) Neurath A.R., Seto B. and Strick N.(1989) Antibodies to synthetic peptides from the preS1 region of the hepatitis B virus(HBV) envelope(env) protein are virus-neutralizing and protective. Vaccine 7, 234 ~ 236.
 - 17) Purrello, M and Balazs(1983) Direct hybridization of labeled DNA to DNA in agarose gels. Anal. Biochem 128, 393 ~ 397.
 - 18) Seppälä, I *et al.* (1981) Scand. J. Immunol 14, 335 ~ 342.

- 19) Queen C., Schneider W.P., Selick H.E., Payne P.W. *et al.* (1989) A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 10029 ~ 10038.
- 20) Riechmann L., Clark M., Waldmann H. and Winter G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323 ~ 327.
- 21) Sanz, I., Dang, H., Takei, H., Talal, N. and Capra, J.D. (1989) *J. Immunol.* 142, 883 ~ 887.
- 22) Shawler D.L., Bartholomew R.M., Smith L.M. and Dillman R.O. (1985) Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J. Immunol.* 135, 1530 ~ 1535.
- 23) Shin, S.U. and Morrison, S.L. (1989) *Methods Enzymol.* 178, 459 ~ 476.
- 24) Stevens C.E., Taylor P.E., Tong M.J., Toy P.T and Vyas G.N. (1984) *Viral Hepatitis and Liver Disease* (Edited by Vyas G.N., Dienstag J.L. and Hoofnagle J.H.) P.275. Grune and Stratton, Orlando, Florida.
- 25) Szmuness W., Stevens C.E., Oleszko W.R. and Goodman A. (1981) Passive-active immunization against hepatitis B: Immunogenicity studies in adult Americans. *Lancet* 1, 575 ~ 577.
- 26) Tijssen, P. (1985) *Practice and theory of enzyme immuno-*

oassay. Vol 15 of Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology(Burdon, R.H. & Van Knippenberg, P.H. eds.), ELsevier Science Publishers, Amsterdam.

- 27) Tiollais P. and Buendia M.-A.(1991) Hepatitis B virus. Scientific American April, 48~54.
- 28) Tiollais P., Pourcel C. and Dejean A.(1985) The hepatitis B virus. Nature 317, 489~495.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.