

Pre S2 Peptide를 이용한 단일클론
항체 생산에 관한 연구

Generation of Monoclonal Antibodies Against PreS2

1988. 3

한국 과학기술원
부설 유전공학센터

배 포 선

사 본 번 호	부 수	배 포 처
1/15 - 2/15	2	유전공학센터 기술정책실 영구보존용
3/15	1	유전공학센터 기술정책실 참 고 용
4/15 - 7/15	4	유전공학센터 기술정책실 보 관 용
8/15 - 9/15	2	유전공학센터 분자유전학 연 구 실
10/15 - 15/15	(6)	기 타

제 출 문

한 국 과 학 기 술 원
부설유전공학센터 소장 귀하

본 보고서를 “Pre S2 펩타이드를 이용한 단일 클론항체 생산에 관한 연구” 사업의 최종 연구 보고서로 제출합니다.

1988년 2월 28일

연구책임자 : 이 영 익
연구 원 : 김 영 훈
장 원 희

요 약 문

I. 제 목

Pre S2 펩타이드를 이용한 단일 클론 항체생산에 관한 연구

II. 연구의 목적 및 중요성

본 연구의 목적은 Hepatitis B-virus에 의한 간염환자의 치료제 개발을 위한 기초연구로서 우리나라에 많이 산재되어 있는 간염 및 간암 환자의 치료제 개발을 하려는데 있어서의 첫 단계에 목적을 둔다. HBV의 표면단백질을 구성하고 있는 단백질 중에 55개의 아미노산으로 구성되어 있는 Pre S2 펩타이드는 poly merized human serum albumin(pHSA)과 결합되는 특성을 가지고 있으며^{1,2)} 또 이 pHSA는 간세포에 virus particle을 전달시키는 매개체로 알려져 있다. 또 이 Pre S2 펩타이드는 작은 55개의 아미노산으로 구성되어 있으나, 강한 항원성을 띄게 되므로, 종래에 사용되던 DNA 재조합 S-단백질에 반응을 나타내지 않는 개체에 항원을 생성케 해준다.³⁾

이외에도 만성 B형 간염환자인 경우(HBeAg⁺, anti HBe⁺) 계속적으로 Pre S2를 생성하는 고로, Pre S2가 만성 B형 간염환자의 지표라고도 본다. Pre S2에 대한 항체인 anti Pre S2는 급성기에 있는 환자가 회복기에 들어설때 많이 발견되며 또 이때 Pre S2가 감소되는 사실도 알려졌다.⁴⁾ 반면에 이 Pre S2 항체가 생기지 않는 급성 B형 간염환자는 만성 간염환자로의 진행상태를

나타내며 간암 (Hepatocellular carcinoma)으로의 발전으로 가져오게 된다. 이러한 현상으로 보아 만성 간염환자의 치료에 Pre S2에 대한 항체를 주입시키므로써 치료의 가능성을 넓게 해준다.

본 연구에서는 이미 발현되고 정제된 Pre S2 펩타이드에 대한 단일 클론 항체를 생산하므로써, 합성된 단일 클론 항체를 이용한 간염환자의 치료제 개발에 대한 최초의 기술을 확립하고자 한다.

III. 연구의 내용 및 범위

본 연구는 Pre S2 펩타이드에 관한 단일 클론 항체 개발을 목표로 한다. 또한 단일 클론 항체 생성에 관한 배지·시약 원료의 확보와 Pre S2 펩타이드 측정 Enzyme linked Immunoassay (ELISA)방법등, 면역학적 측정방법에 역점을 두었다.

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 E.Coli에서 발현된 Pre S2에 대한 단일 클론 항체 생성을 하며, 생성된 Pre S2 단일 클론 항체를 이용하여, Pre S2 펩타이드의 정제 및 chimeric antibody 연구에 필요한 쥐의 단일 클론 항체를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 Pre S2 단일 클론 항체는 간염환자의 치료제 개발을 위한 최초의 기술을 확립하고자 한다.

SUMMARY

"Generation of monoclonal antibodies against Pre S2"

The Pre S2 Peptide, one of the surface antigen of Hepatitis B virus, has been expressed in E. coli system using recombinant DNA techniques.

The purification of Pre S2 from the recombinant E. coli has been carried out in this Institute using conventional purification methods.

For the therapy of chronic hepatitis patients and the development of diagnostic kits against chronic hepatitis, the large quantities preparation of Pre S2 are needed.

Therefore, we planned to generate monoclonal antibody against Pre S2 in order to purify Pre S2 more efficiently make diagnostic kits for the detection of Pre S2 in chronic hepatitis Patients.

The hybridomas which produce monoclonal antibody against Pre S2 was produced by fusions between the mouse myeloma cell line SP2/0 and BALB/c mouse spleen cells immunized with Pre S2 antigen.

We are on the process of selecting hybridomas which are survived in selective HAT media.

CONTENTS

1. Introduction	11
2. Experimental Methods	13
1) Immunization of BALB/c mouse with Pre S2 peptide antigen	13
2) Isolation of spleen cells from immunized mouse	14
3) Culturing of mouse myeloma (SP 2/0) cell line..	14
4) Fusion of spleen cells and mouse myeloma cells (SP 2/0)	15
5) Screening of positive hybridomas	16
3. Results and Discussion	20
Reference	21

목 차

제 1 장	서 론	11
제 2 장	실험방법	13
제 1 절	Pre S ₂ 단백질 항원에 대한 BALB/c mouse의 면역화.....	13
제 2 절	면역화된 mouse로부터 spleen cell의 분리.....	13
제 3 절	mouse myeloma cell(SP 2/0)의 배양.....	14
제 4 절	Pre-S ₂ 항체 생성 spleen cell과 mouse myeloma cell(SP 2/0)의 세포융합.....	15
제 5 절	Pre S ₂ 항원에 대한 단일 항체 생성 융합 세포의 선발	16
제 3 장	연구결과 및 고찰	20
참 고 문 헌	21

제 1 장 서 론

Hepatitis B virus (HBV) DNA에서 표면 단백질을 coding 하는 env 유전인자는 세 가지 다른 크기의 표면 단백질을 생산하게 된다. 이 세 가지 단백질은 ① S - 단백질 : 226 개의 아미노산으로 구성되어 있으며, HBV에 감염된 환자에서는 HBsAg 입자로서 발견된다. ② 중간 - 단백질 : S - 단백질에 Pre S2 유전인자에 의해 생성되는 55 개의 아미노산이 더하여져서 만들어진다. ③ 대 - 단백질 : S - 단백질에 Pre S1 부위와 Pre S2 부위의 유전인자에 의해서 생성되는 펩타이드가 결합된다.

위의 세 가지 단백질이 형성되는데, 이중 중간 단백질과 대 단백질은 Pre S2 펩타이드를 지니게 된다. 이 55 개 아미노산으로 구성된 Pre S2 펩타이드는 polymerized human albumin(PHA) 과 결합하는 부위를 가지고 있으며, 간 세포에 의해서 인식 되어진다. 이 펩타이드의 역할은 HBV 를 간세포 (hepatocyte) 에 PHSA bridge 를 통하여 부착 시키는 역할을 한다고 알려졌다.^{5, 6)} 이러한 간세포에 대한 부착 역할 이외에도 Pre S2 펩타이드는 더 높은 항원성을 나타내는 역할을 하게 된다.⁷⁾ 일반적으로 유전 공학적 방법에 의하여 만들어진 S - 단백질은 높은 항원성을 나타내지 않고 또, 반응을 나타내지 않는 non-responder 를 나타내나, Pre S 를 섞어서 만든 경우, 더 높은 항원성을 나타냄이 밝혀졌다.⁷⁾

이외에도 Pre S2는 만성 감염환자 및 급성 감염환자의 초기에서 나타내며, 만성인 경우 항원이 유지되어 계속 만성 상태가 유

지되나, 급성인 경우 항원이 감소되고, 항체가 증가 하면, 간염에서 회복되는 환자를 발견 할 수 있다. 이러한 현상으로 보아, 만성 간염환자에서 Pre S2의 항체를 넣어주면, 만성에서의 회복이 가능케 된다는 가정을 나타내준다. 이러한 사실로보아 Pre S2에 대한 단일 클론 항체의 생성은 간염치료에 중요한 의미를 지니게된다.

제 2 장 실험 방법

제 1 절 Pre S2 단백질 항원에 대한 BALB/c mouse 의 면역화

BALB/C mouse 의 면역화를 위해 사용된 간염 바이러스 (Hepatitis B virus) 특이항원단백질 Pre S2는 KAIST, 유전공학센터에서 E. Coli 내에서 발현시켜 분리 정제한것을 이용하였다. mouse 면역화 과정은 정제된 Pre S2를 1 mg/ml 농도로 PBS(phosphate buffer saline)에 녹인 후 Freund's complete adjuvant (Difco Co.)와 1:1 비율로 혼합한 현탁용액 100 μ l 를 BALB/c mouse 에 복강주사 하는 방법으로 1차 접종하고 booster 접종은 1차 접종 후 매 2주 간격으로 1차 접종때와 같은 농도의 항원을 동량의 incomplete Freund's adjuvant와 혼합하여 3회 복강주사하였다. Pre S2 항원을 접종한 mouse에서 항체 형성여부를 확인하기 위한 면역화 검정법은 mouse의 꼬리를 절단하여 채혈한 혈액의 혈청을 분리 Ouchterlony의 이중면역확산법으로 수행 하였으며, 그 결과 항체의 생성이 확인된 BALB/C mouse에 최종 booster접종을 하였다. 마지막 booster는 mouse의 spleen을 적출하기 4일 전에 PBS에 녹인 Pre S2 단백질을 (1 mg/ml) 수용액 상태로 100 μ l 를 정맥주사 하였다.

제 2 절 면역화된 mouse로부터 spleen cell의 분리

Ouchterlony 이중 면역확산법 결과에 의해 Pre S₂ 항원에 대한 항체 형성이 확인된 mouse로부터 spleen cell의 분리는 아래와같이 수행하였다.

면역화된 mouse를 cervical dislocation하여 죽인 후 70% EtOH에 담구어 체표면을 소독하고 복부 측면을 절개하여 spleen을 분리하였다. 분리된 spleen은 single cell로 분리하기 위해 멸균된 철망 위에서 마쇄한 다음 RPMI 1640 배양액에 현탁시키고 400 g에서 5분간 원심수거하는 방법으로 2회 반복 세척 후 세포 융합 실험에 사용하기 전 배양액 RPMI 1640을 가하여 10^8 cells/ml 농도로 조정하였다.

제 3 절 Mouse myeloma cell (SP 2/0)의 배양

본 실험에 사용된 myeloma cell은(서울 의대)에서 분양 받은 SP2/0 Ag 14 이였고 배양액은 10% FCS (Gibco Co.)과 $100\mu\text{g/ml}$ 의 peniciline, $100\mu\text{g/ml}$ streptomycin 과 $25\mu\text{g/ml}$ 의 fungizone이 함유된 RPMI 1640 (Gibco Co.)을 사용하였다.

parental myeloma cell의 배양은 대기중 CO₂ 농도를 5%로 조절한 37℃ CO₂ incubator 내에서 충분한 습도를 유지하는 조건으로 10^6 /ml의 농도가 될때까지 배양하였다.

제 4 절 Pre-S2 항체 생성 spleen cell과 mouse myeloma cell (SP 2/0) 의 세포융합

Spleen cell과 myeloma cell의 세포융합은 polyethylene glycol(PEG)을 이용한 Galfre와 Milstein(1981)의 방법에 따라 수행하였다. PEG는 Sigma사로부터 구입한 분자량 1000 (Cat No. P3515, Lot No 71F-0315)을 autoclave하여 녹인 다음 동량의 무혈청 RPMI 1640 배지와 혼합하여 50% 용액을 만들어 사용하였다. 세척한 spleen cell과 myeloma cell SP2/0는 무혈청 RPMI 1640 배지를 가하여 각각 10^8 과 10^7 cell이 되도록 혼합한 후 50ml conical 원심분리관에 따르고 500g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 완전히 제거한 다음 미리 40℃로 가열한 0.8ml의 50% PEG/RPMI 1640 (W/O serum) 용액을 1~2분간에 걸쳐 1방울씩 떨어뜨려, 잘 흔들어주면서 반응시켰다. 50% PEG 용액 내에서 SP2/0 cell과 spleen cell이 완전히 혼합되면 37℃로 가열한 무혈청 RPMI 1640 배지를 25ml이 될때까지 5분간에 걸쳐 한 방울씩 떨어뜨리면서 희석한 후 500g에서 5분간 원심, 상층액을 제거하고 20% Fetal Calf serum이 포함된 48ml RPMI 배지를 가하여 침전물을 조심스럽게 재 현탁시켰다. 희석된 세포는 바닥이 평면인 48×1ml 조직배양 용기 (tissue culture well) (Costar Co.)에 1ml씩 분주한 뒤 feeder cell로서 ml 당 10^5 개의 spleen cell이 함유된 20% FCS RPMI 1640 배지를 1ml씩 가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기 내에서 하룻밤 동안 배양하였다.

융합된 세포를 선별하기 위한 HAT medium의 첨가는 하룻밤 동안 배양한 상기 배양용기에서 1/2 volume의 배양액을 cell이 흔들리지않게 주의깊게 pipetting한 후 각 well당 1ml의 2× HAT medium (0.2 M Hypoxanthine, 8×10^{-7} M aminopterin, 0.032 mM thymidine)을 첨가 하였으며, 융합세포가 급속히 성장하는것이 확인될때 까지 이러한 과정을 2~3일 간격으로 3주간 반복하였다.

HAT medium에서 성장이 확인된 융합세포는 aminopterin을 제거하기 위해 세포 내 aminopterin이 완전히 대사 될때까지 약 1주일간 HT medium(Hypoxanthine 0.1 mM, Thymidine 0.016 mM)에서 배양 후 정상적인 배지(RPMI 1640)로 옮겨주었다.

제 5 절 Pre S2 항원에 대한 단일 항체생성 융합세포의 선 발

HAT medium에서 자라는 융합세포들 중 Pre S2 항원에 대한 단일항체를 생산하는 세포의 선발은 먼저 Solid Phase Radio Immuno Assay(RIA) 방법으로 융합세포군에서 Pre S2 항원에 대한 항체를 생성하는 cell의 존재여부를 확인한 후, 이들 세포군을 Limiting dilution하여 단일 clone을 선발할때는 Horse Radish Peroxidase가 결합된 Rabbit antimouse Ig G를 이용한 Indirect ELISA를 수행하였다.

1. Solid phase Radio immuno assay

Solid Phase RIA 는 fig 1 에서와같이 Catt & Tregear (1967)의 방법으로 수행하였다.

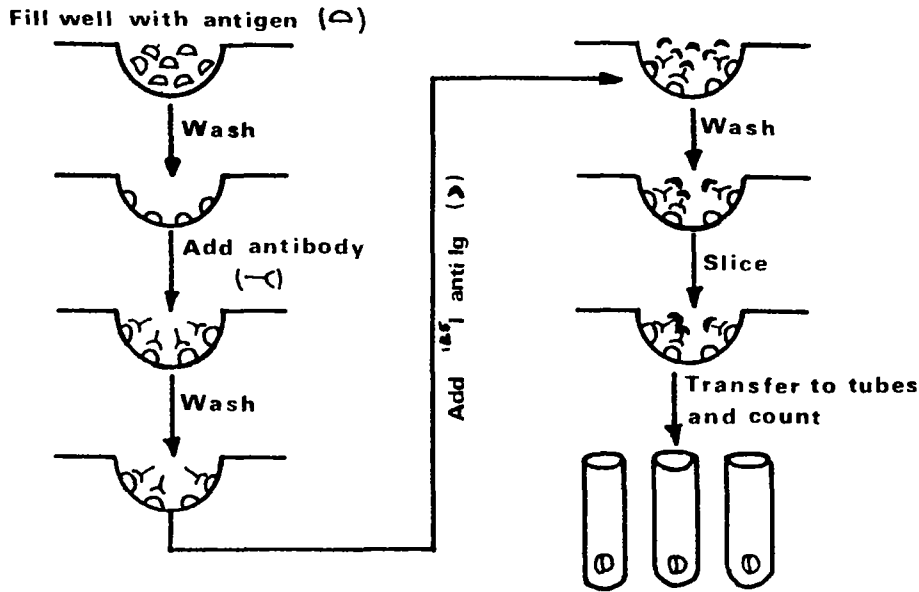


fig. 1. Solid phase radioimmunoassay for Pre S2 antibody producing hybridoma screening.

가. 정제된 Pre S2 항원 단백질을 PBS(PH 7.4)에 녹여 ml 당 50 μ g의 농도로 조정 한 용액을 96 well polyvinyl plate (Costar Co.)에 well 당 50 μ l 씩 분주한 후 항원 단백질이 plate에 부착 되도록 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 incubation시켰다.

나. 항체의 비 특이적 (non specific) 결합을 방지하기 위해 1% BSA가 포함된 PBS 용액 50 μ l 를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5시간

동안 배양하였다.

다. Plate를 뒤집어서 부유액을 제거한 후 부착되지 않은 항원은 RIA buffer (0.1% BSA, 0.1% NaN₃ in PBS)로 3회 세척하여 제거하였다.

라. 50 μ l의 융합세포 배양액을 첨가하고 항원과 항체의 결합을 유도하기 위해 37°C에서 2시간 동안 배양하였다.

마. Plate를 뒤집어서 결합되지 않은 항체를 버리고 역시 RIA buffer로 3회 세척하였으며 세척액을 완전히 제거한 뒤 I¹²⁵ (10 μ ci/mg)가 표식된 Rabbit anti mouse Ig G 50 μ l (1 \times 10⁴ cpm/well)를 가하여 1시간 동안 반응시켰다.

바. 상층액을 제거한 후 RIA buffer로 3회 세척하여 결합되지 않은 Rabbit-anti mouse Ig G를 씻어버리고 가위로 각 well을 절단 Liquid Scintillation Counter용 vial에 옮겨 radio activity를 측정하였다.

2. Horseradish peroxidase (HRP)을 이용한 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Pre S2 단일 항체 clone을 얻기 위해 RIA검정결과 Pre S2 항원에 대한 항체를 형성하는 융합세포가 존재하는 것으로 확인된 세포군을 신선한 배지로 희석하여 200 μ l 당 각각 10, 3, 1개의 cell이 존재하는 3개의 구로 나누어 feeder layer로서 mouse spleen cell (10⁶ /well)이 존재하는 96 micro well plate에 30여개씩 plating하여 1주일간 배양한 다음 도립현미경으로 관찰, 세포의 성장여부를 확인하였다. 육안으로 볼 수 있을만

클 세포가 성장하면 이들 well의 배양액을 ELISA 방법으로 검정, Pre S2 단일 항체 생성 clone을 분리하였다. ELISA test에 사용된 HRP conjugated Rabbit anti mouse Ig G는 Bio-yeda에서 구입하였고 HRP의 기질은 반응직전에 아래의 조성표에 따라 조제하였다.

Horseradish Peroxidase Substrate Solution

199 ml D. D. W

Citric acid 0.47 g

Na₂HPO₄ (anhydrous) 0.73 g

O-phenylenediamine 4.0 mg

30 % H₂O₂ 30 μl

96 well polyvinyl plate를 이용한 ELISA 검정에서 Pre S2 항원의 coating, 항체의 결합 및 세척방법은 전항의 RIA 검정에서와 동일한 방법으로 수행하였으나 세척시에는 RIA buffer 대신 1% BSA 가 포함된 PBS buffer를 사용하였다.

peroxidase의 활성측정은 plate에 기질을 첨가하고 37°C에서 60분간 반응 시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였고 대조구에는 면역화되지않은 mouse 혈청을 시료로 사용하여 흡광도의 기준 값을 결정하였다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

Pre S₂ 펩타이드로 면역된 BALB/c mouse 에 대한 면역화검정은 ELISA test 에 의하여 이루어졌다. fig 2 에서 보는 바와 면역화시킨 mouse 는 Pre S₂ 에 대한 Immunoglobulin 을 생산 할 수 있다. 면역화시키지않는 control 에서는 ELISA test 결과 아무런 반응을 나타내지 않고 있다. 면역화된 BALB/c mouse 의 spleen 을 절제하여 myeloma 세포와 (SP 2/0) 융합시켜서 현재 HAT - media 에서 배양 시키고 있다.

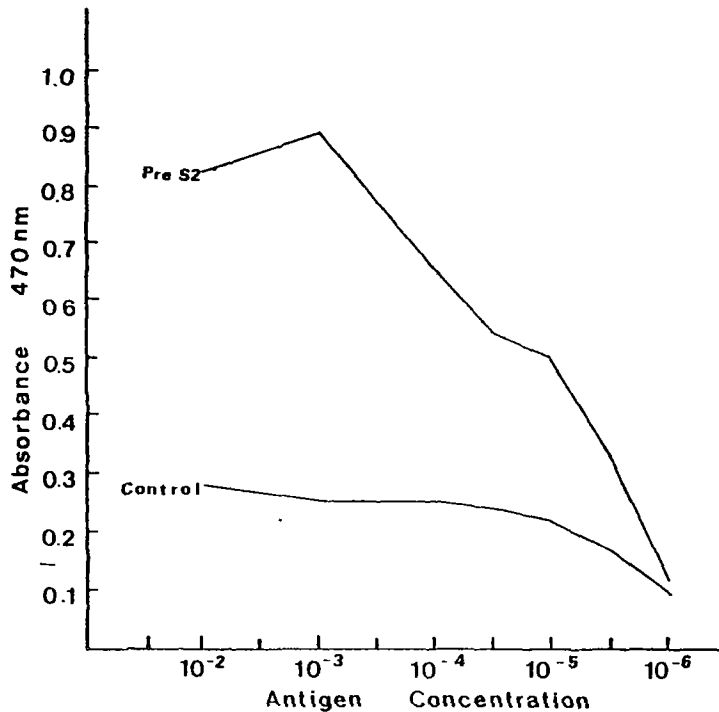


fig. 2. Titration of immunized mouse serum by ELISA using pre S₂ Peptide as antigen bound to the solid phase

참 고 문 헌

- 1) Alberti, A., Poutisso, P., & Schiavou, E., Hepatology, 1984. 4: 220-226.
- 2) Alberti, A., Poutisso, P., & Chemillo, L., In "Viral hepatitis and liver disease" 1984, 497-506.
- 3) Milich D., Thorntou G., Neurath A. et al. Science, 1985, 228: 1195-1199.
- 4) Agata Budkowska, Pascal bubreuial and Jacques pillot Hepatology. 1986, 6: 360-368.
- 5) Imai, M., Yanase, Y., Nojiri, T. et al. Gastroenterology 979. 76: 242-247.
- 6) Machida, A., Kishimoto, S., & Ohnuma, H., Gastroenterology, 1984, 86: 910-918.
- 7) Marie-Louise Michel & Pierre Tiollais, Hepatology, 1987, 7: 615-635.

