

Phage display 방법을 이용한 항체의 생산

신상택, 백의환, 백세환

고려대학교, 생명공학원, 바이오센서 시스템공학 연구실

전화 (02) 3290-3438, FAX (02) 927-2797

Abstract

Phage display technique as a new antibody production method can express the protein on the minor coat of phage particle in a library constructed by utilizing a recombination of genes coding the variable regions of immunoglobulin. This new method is particularly advantageous in producing antibodies against toxic substances and compounds with low immunogenicities. We first confirmed the concept of antibody expression on the phage particle by selecting a positive control of the phage library (e.g., Griffin.1 donated from MRC center in England). The library was then employed to produce antibodies specific to human serum albumin via repetitive bio-panning procedure. The mean affinity of the antibodies selected gradually increased along with the number of bio-panning, which demonstrated that the phage display method could produce monoclonal antibodies with high affinities.

서론

George P. Smith는 1985년 Nature 지에 “Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface” 라는 제목으로 phage 표면에 외래 단백질을 발현시키는 phage-based display system을 처음으로 소개하였다¹⁾. Phage display system은 phage의 minor coat protein을 암호화하는 gene3의 protein c-terminal 발현부위에 외래 단백질을 암호화하는 DNA를 삽입시킨 후 host cell인 E. coli에 감염시키고 helper phage의 추가 감염을 통해 packaging과 replication이 되면서 외래 단백질을 phage의 표면에 발현하게 된다. 이러한 일련의 과정을 phage display 라고 한다. Phage 표면에 발현할 수 있는 구조가 다른 항체의 종류에는 Fab (antigen binding fragment), Fv (variable fragment), scFv (single-chain variable fragment), dsFv (disulfide stabilized variable fragment) 등이 있는데 이중에서 soluble한 scFv를 발현하는 phage antibody의 생산에 목표를 두었고 본 연구에서는 질병, 식품, 환경 등 진단을 목적으로 혹은 Proteomics에서의 신규 단백질을 선별하기 위한 면역 칩과 같은 분석도구에 이용될 수 있는 phage antibody 생산기술을 개발하였다. 특히 phage coat 상

에 항체발현, 그리고 bio-panning 과정을 통한 특이항체 선별과정을 수행하였다.

재료 및 방법

Phage library. *E. coli* (strain TG1) 에 감염되어 phagemid 상태로 존재하는 Griffin.1 antibody library (MRC center, Cambridge, England) 를 제공받았고 VCS M13 helper phage (Stratagene, La Jolla, USA) 의 추가 감염과정을 통해 library를 유지하였다.

Positive clone을 이용한 항체발현 확인. Griffin.1 phage library에서 유래된 positive clone을 이용하여 생산된 anti-human thyroglobulin phage antibody를 항원과 반응시킴으로써 그 항체의 생산과 분석법을 확인하였다. 그 positive phage가 감염된 *E. coli*를 2TY (ampicillin과 glucose 추가) 배지에서 exponential 단계까지 키운 후 helper phage를 water bath에서 추가 감염시켰다. 그 이후 2TY (ampicillin과 kanamycin 추가) 배지로 옮기고 12시간 이상 배양하였다. 세포를 원심분리시킨 후 상층액에 PEG와 NaCl이 포함된 용액을 총 부피의 1/6이 되도록 첨가한 후 4℃에서 1시간 이상 정치하였다. 원심분리를 통해 phage 침전 (white pellet) 을 얻었고 다시 PBS로 부유시킨 후 *E. coli*에 감염시켜 colony assay를 통해서 phage antibody titer를 측정하였으며 이것을 다시 ELISA test를 수행하여 항체의 존재를 확인하였다.

Bio-panning. 10억 이상의 다양성을 가지고 있는 phage antibody 중에서 원하는 항체만을 screening하기 위해 인간혈청 알부민 (human serum albumin, HSA) 을 모델항원으로 선택하였고 이것을 polystyrene 재질의 immunotube (Nunc, Naperville, USA) 표면에 물리흡착 시켰다. 이와 같이 항원이 고정화된 tube에 phage antibody를 투입하여 일정 시간 반응시킨 다음 tween이 포함된 PBS와 PBS로 번갈아 세척하여 반응에 참여하지 않은 phage antibody를 제거하였다. 그 후 glycine buffer로 immunotube 벽에 붙어있는 phage antibody를 회수하였으며 즉시 Tris buffer로 중화시켰다. 얻어낸 phage antibody는 native TG1에 감염시켰으며 ampicillin 배지에 spreading 해줌으로써 감염된 TG1 만이 생존할 수 있도록 하였다. 자라난 colony를 회수 한 후 helper phage를 감염시켜 증폭된 anti-HSA phage antibody를 얻어내는 bio-panning 과정을 반복하였다. 1~4차까지의 bio-panning을 수행하는 동안 washing 회수는 10회씩 증가시켰고 antigen coating 량은 100 µg/mL에서 1 µg/mL 까지 감소시켜 affinity 가 높은 phage antibody만을 선별하여 회수하도록 하였다. 회수된 phage antibody의 affinity를 알아보기 위하여 ELISA test를 수행하였다^{2), 3)}.

결과 및 고찰

E. coli 내부에 존재하는 phagemid로부터 발현된 scFv 항체의 존재를 확인하기 위해 positive control로써 human thyroglobulin에 대해 특이한 항체를 발현하는 phagemid를 포함하는 세포를 배양한 후 phage antibody를 생산하였다. Colony assay를 통해서 phage antibody titer를 측정하였고 또한 얻어낸 phage를 가지고 고정화된 항원을 이용한 ELISA test (그림 1)를 수행하여 negative control 결과와 비교함으로써 항체의 존재를 확인함과 동시에 affinity를 확인할 수 있었다.

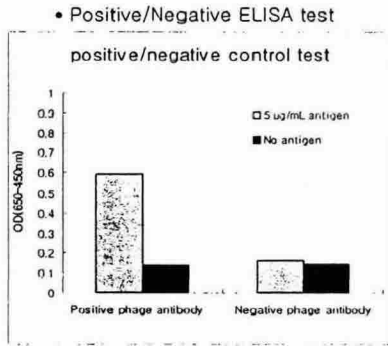


그림 1. Phage library를 이용한 특정항체 scFv의 발현 확인. 생산된 anti-human thyroglobulin phage antibody (positive control)와 pHEN2 (negative control)의 고정화된 human thyroglobulin에 대한 ELISA 결과로부터의 신호.

Phage library의 모델 분석물질인 human serum albumin (HSA)에 대한 1~4차까지의 bio-panning을 수행하였고 각 panning으로부터 나온 증폭된 phage를 사용하여 ELISA test를 실시하였다 (그림 2). ELISA를 수행하기 위해 10 µg/mL의 동일한 양의 HSA를 coating하였고 microwell 내에 각 bio-panning 단계에서 얻은 10¹¹cfu/mL의 phage antibody를 투입하였다. 그 결과 pHEN2 (negative control)는 bio-panning 단계가 증가해도 신호가 증가하지 않았고 anti-HSA phage antibody는 bio-panning 단계가 증가할수록 신호가 점진적으로 증가하였다. 따라서 10억 개 이상의 서로 다른 phage antibody 중에서 특정한 항원에 대한 항체가 선별될 수 있다는 것을 보여주었다.

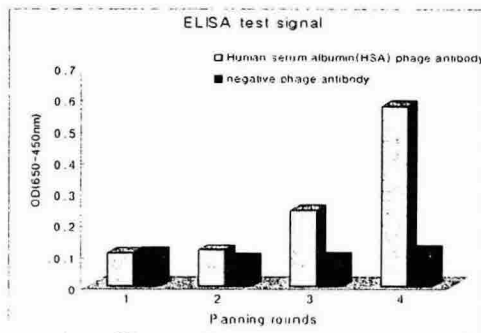


그림 2. 1~4차 bio-panning 후 각 단계 별 특정항체 농도의 변화. HSA를 microwell 내에 coating하였고 각 단계에서 얻어진 10¹¹ cfu/mL의 phage antibody를 투입하여 ELISA를 수행하였음.

요 약

Phage antibody 생산방법은 유전자 조작에 의하여 phage coat에 항체를 발현시키는 방법이며 그 library를 이용하여 일반 hybridoma 방법에 의해 항체를 생산하기 어려운 성분 (예: 독성물질, 면역화가 잘 안되는 물질 등) 에 대해 적용할 수 있는 장점을 제공한다. 본 연구진은 Griffin.1 antibody library의 positive control을 통해 phage 표면에 항체가 발현되는지의 여부를 ELISA test를 통하여 확인하였다. 또한 human serum albumin을 모델분석물질로 사용하여 1~4차까지의 bio-panning을 실시하였고 각 단계에서 증폭된 phage를 가지고 ELISA test를 한 결과 신호가 점진적으로 증가하는 data를 얻을 수 있었다. 이것을 통해 phage library로부터 특정 항원에 대한 monoclonal antibody를 생산할 수 있다는 사실을 검증하였다.

참고문헌

1. Smith, G P, "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", Science, Volume 228, Issue 4705, June 14, 1985, Pages 1315-1317
2. Remko A Griep, Charlotte van Twisk, Jose R.C.M, van Beckhovem, Jan M, van der Wolf, and Arjen Schots, "Development of Specific Recombinant Monoclonal Antibodies Against the Lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* Race 3" Bacteriology, Volume 88, No.8, 1998, Pages 795-803
3. Susi, P. Ziegler, A. and Torrance, L. "Selection of single-chain variable fragment antibodies to black currant reversion associated virus from a synthetic phage display library" Phytopathology 1998, 88:230-233