강원대학교 응용 면역학 연구실

차상훈/ chash@kangwon.ac.kr

강원대학교 생명공학부 분자생명공학전공내의 응용면역학 연구실은 1995년 9월에 시작하여 현재 2명의 석사과정과 5명의 학부 실습생으로 구성되어 있으며, 2000년 8월에 설립된 인간 항체제작 전문 바이오벤처기업인 (주)아이지세라피(실험실 벤처)와 함께 파아지 발현(phage display)기술을 이용한 다양한 연구를 수행중이다.

단클론 항체 (Monoclonal antibody)의 제작

1975년 Kohler와 Milstein에 의한 단클론 항체의 제작 방법 개발 이후 세포, 박테리아 그리고 바이러스 단백질에 대한 특이적인 수많은 종류의 단클론 항체들이 제작되었었다. 단클론 항체는 자연계에 존재하는 단백질 중에서 타겟 분자와의 결합이 가장 특이적이며 또한 결합 능력이 매우 다양한 장점을 가지고 있으며, 다음과 같은 용도로 이용되어지고 있다.

① 특정 세포에 존재하는 표현형 마커 (phenotypic markers)의 동정
② 면역진단 (immunodiagnosis)
③ 세포 표면 및 분비 단백질의 기능 분석
④ 암과 같은 인체 질환의 진단 및 치료

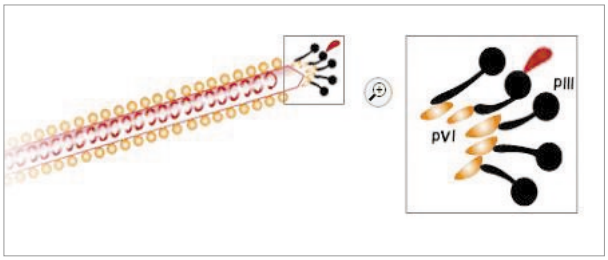
생체의학 연구에 있어서 이러한 단클론 항체들은 세포 내 그리고 세포 외의 단백질들의 구조적, 기능적인 관련성을 이해하는데 좋은 도구로서 사용되어 왔으며, 최근 들어서 특히 생명공학분야를 중심으로 단클론 항체의 반응 특이성을 이용한 항-암 혹은 항-자가면역 질환 등에 대한 인체 치료 및 진단시약으로서의 활용에 많은 연구를 하고 있다.

파아지 발현 (Phage display)기술

파아지 발현기술 (Phage display technology)이란 대장균에 기생하는 바이러스의 일종으로 직경 약 7㎚ 그리고 길이 약 900에서 2000 ㎚의 실사형 파아지인 M13, f1 혹은 fd를 유전자 재조합 기술을 이용해 조작하여 매우 다양한 이종 단백질을 바이러스의 표면에 발현하는 기술이다.

파아지 발현 기술은 항체 신약 개발을 위한 인간 단클론 항체의 생산에 매우 중요히 활용되고 있으며, 그 원리는 인체내에 존재하는 수천만 가지의 다양한 항체 유전자 (Single chain fragment variable, scFv형태)를 인체로부터 획득하여 이를 파아지의 표면에 융합 단백질 형태로 발현함으로서 인체의 항체 다양성을 재변하는 항체 라이브러리를 시험관 내에서 제작하고, 이 라이브러리로부터 원하는 표적항원과 결합하는 인간 단클론 항체를 분리, 제작한다.

이러한 파아지 발현 기술을 이용한 인간 반-합성 항체 라이브러리는 인체 내의 *in vivo* 상태에 존재하는 무작위적이고 광범위한 항원-반응 다양성을 지닌 인간 항체 유전자를 인위적으로 제작하고 이를 박테리오파지의 표면에 발현하는 기술로 기존의 방법으로 만들 수 없었던 다양한 인간 단세포성 항체를 제작할 수 있으며, 따라서 치료제용 항체 신약 개발 등 의약 분야를 비롯한 항체 칩 제작과 같은 단백질체에 관련된 연구를 수행하고 있다.



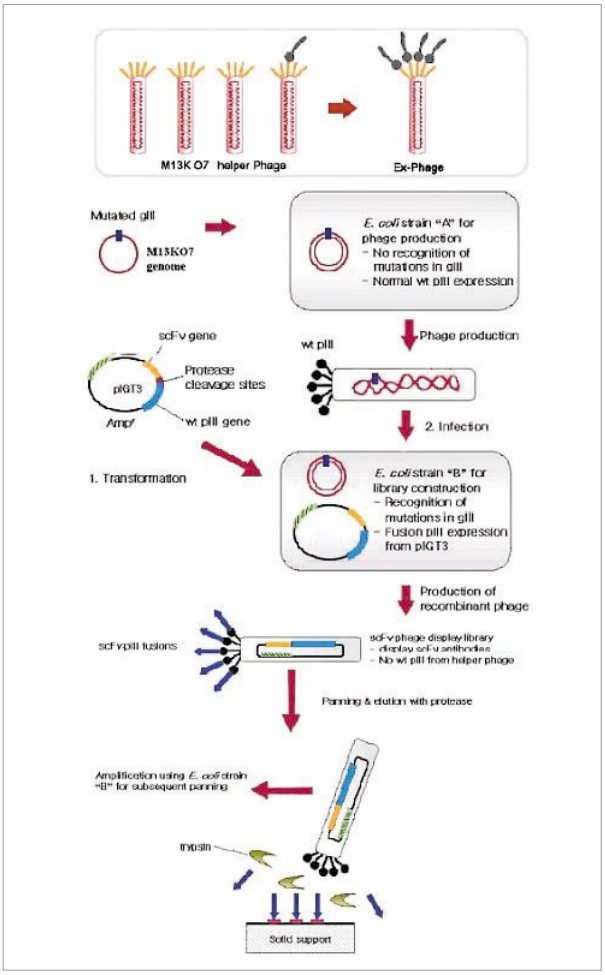
Ex-phage 시스템

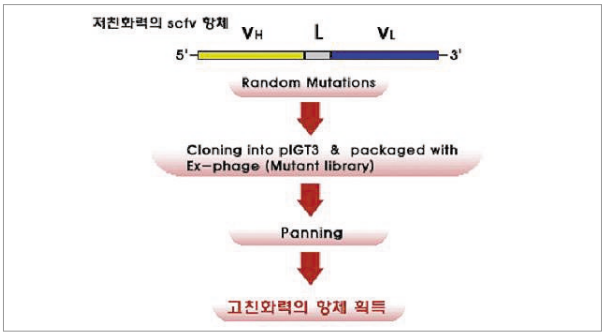
파아지 발현 라이브러리 시스템의 가장 큰 단점은 바이러스 표면에 발현되는 융합 단백질의 분해이며, 이러한 단백질 분해는 라이브러리로부터 표적항원과 특이적으로 결합하는 유전자 재조합 바이러스의 획득을 매우 어렵게 만든다. 이러한 단점을 극복하기 위해 독자적으로 개발한 것이 Ex-phage 시스템이다.

Ex-phage는 기존에 파아지 발현 라이브러리의 제작시 사용하던 M13KO7 또는 VCS M13 헬퍼 파아지 대용으로 사용되어 파아지 표면에 발현되는 융합 단백질의 디스플레이 숫자를 크게 향상시키는 장점을 지니고 있으며, 이 system을 이용하여 매우 높은 효율로 인간 단클론 항체를 제작, 연구수행에 이용하고 있다.

In vitro affinity maturation (시험관내 친화력 성숙)

In vitro affinity maturation이란 무작위 돌연변이를 항체 유전자에 도입하여 항원에 대한 항체의 결합친화성을 증가시키는 기술을 말하며 효과적인 치료 및 진단용 항체 신약 개발에 매우 유용히 사용될 수 있다. 항체 유전자에 무작위적인 돌연변이를 유도하기 위해 error-prone PCR, degenerative CDR3, chain shuffling, DNA shuffling 혹은 mutation-prone 대장균 균주 등이 사용되며 본 연구





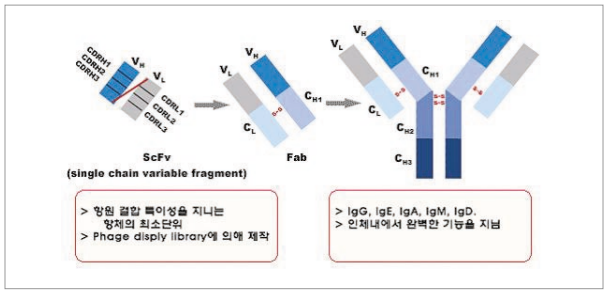
실에서는 무작위적으로 돌연변이 염기 서열이 유도된 항체 유전자 (scFv) 중에서 항원 결합 친화력이 증가된 항체 유전자를 효율적으로 선별하는 기술을 확보, 항체 신약개발 연구등 다양한 연구 수행에 이용하고 있다.

Full antibody 제작

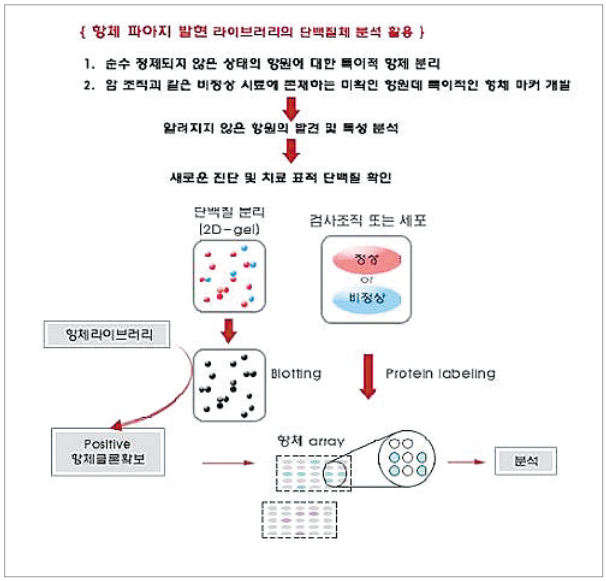
파아지 발현 기술에 의해 제작되는 인간 단클론 항체는 scFv 형태이고, scFv 형태의 항체는 그 자체로도 연구 및 의학용으로 사용 가능하나 경우에 따라 완전한 full antibody 형태로 제작되는 것이 특정 용도에 바람직하다. 본 연구실은 항체 유전자 조작을 통해 scFv 형태의 항체를 완벽한 인간 IgG1 항체로 변환하여 동물세포를 이용해 생산, 연구 수행에 이용하고 있다.

단백질체 분석 기술 개발

인간 게놈 프로젝트의 수행 결과 인간 유전자의 수가 약 30000개 정도로 추정되고 있으며 이러한 연구 결과를 토대로 기능 유전체



학 (functional genomics) 분야의 연구가 활성화 되고 있으며 그 뒤를 이어 유전체 산물인 단백질체의 기능 분석이 새로운 학문 분야인 단백질체학 (proteomics)의 태동으로 진행되고 있다. 단백질체의 연구는 단백질이 세포내에서 직접적인 생물학적 기능을 수행한다는 의미에서 매우 중요하며 앞으로 신약 개발에 매우 긴요히 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구실에서는 독자적으로 구축한 개선된 항체 파아지 발현 라이브러리를 단백질체 분석 연구에 응용하고자 하며 궁극적으로 암 등 인체질환의 항체 진단 kit 개발 및 인체 질환의 새로운 치료 표적 단백질 발굴 등의 목표로 다양한 연구를 시도 중이다.



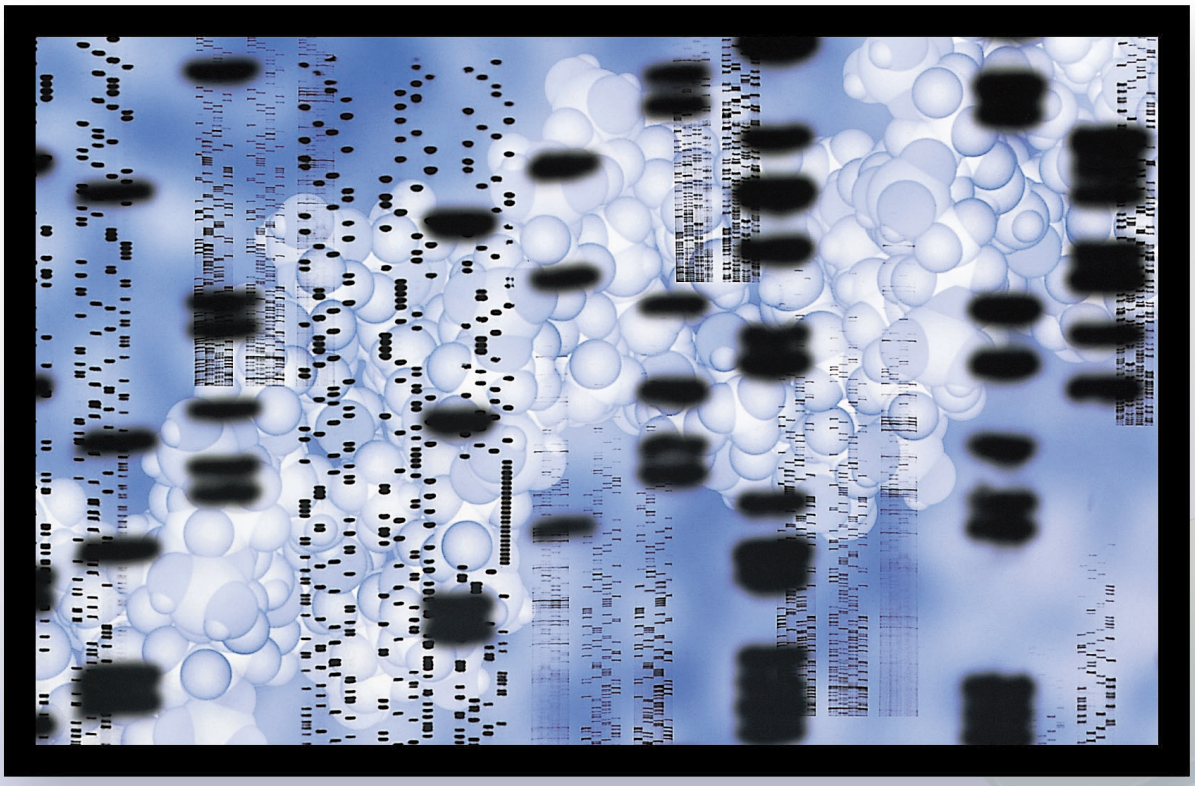
또한 본 연구실은 닭의 면역체계를 이용함으로서 포유류 기원의 단백질 항원에 대하여 생쥐에서는 나타나지 않는 다양한 면역 반응을 파지 디스플레이 (phage display) 기술을 이용하여 항체를 생산함으로서 다방면의 연구에 활용되고 있다.

강원대학교 응용면역학 연구실은 위와 같은 연구를 통하여 축적된 기술을 인간 항체 제작 전문 벤처기업인 (주)아이지세라피 (www.igtherapy.com)의 창업으로 연결, 연구 결과를 산업화하고 있으며, 다양한 product를 제작, 생산, 판매하고 있다.

Better Result Through Better Agarose !!

CAMBREX

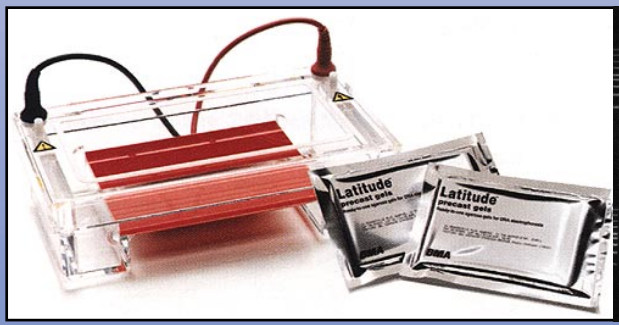
(구 BMA, FMC)

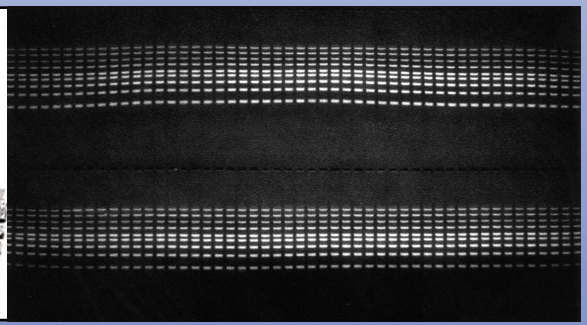


조작이 쉽고, 높은 수율을 갖는 GTG Gel 시리즈!

다양한 종류와 Gel 농도로 선택폭이 넓어 편리한 Precast 시리즈!

안전성을 겸비한 고감도 염색시약 시리즈!





Takara Korea Biomedical Inc

Agarose 사용 용도 일람

실험 목적에 맞는 agarose를 선택해 보세요.

Analytical Grade

핵산의 분리 및 해석에 적당한 standard agarose로 분리능력이 뛰어나고, 고순도이므로 정확도가 높은 전기영동을 할 수 있다.

Genetic Technology Grade(GTG)

전기영동에 의한 DNA의 조정 및 회수에 안심하고 사용할 수 있는 고품질의 agarose로 모든 lot에 대하여 전기용출에 의한 시료 회수, 회수한 DNA의 주요 제한 효소에 의한 절단, ligase에 의한 연결 실험을 실시하여 생물활성을 확인할 수 있다.

	Analytical Grade			Genetic Technology Grade(GTG)			
	SeaKem® LE	NuSieve® 3 : 1	MetaPhor®	SeaKem® Gold	SeaKem® GTG	NuSieve® GTG	SeaPlaque® GTG
사용농도	0.5 ~ 2%	2 ~ 6%	1.8 ~ 5%	0.3 ~ 1.2%	0.5 ~ 2%	2 ~ 6%	0.75 ~ 2%
분석범위	500 b ~ 20 kb	10 b ~ 20 kb	40 b ~ 1 kb	500 b ~ 10 Mb	500 b ~ 20 kb	10 b ~ 1 kb	500 b ~ 20 kb
1 kb 이하의 DNA / RNA분리		◎	◎ (Fine Resolution)			◎	
1 kb 이상의 DNA / RNA분리	●		●	◎	◎		◎
PCR산물의 분리 · 해석	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
Southern blotting	●	◎	●	◎	◎	●	▲
Northern blotting	●	◎	●	◎	◎	●	▲
In gel반응 (ligation, cloning, DNA labeling, 제한효소처리, PCR, sequencing)						◎	◎
Fingerprinting	◎						
Pulse field전기영동	▲			◎	●		●
DNA 회수							
전기 용출	●	▲	▲	◎	◎	◎	◎
Phenol 추출						◎	◎
DEAE paper	●	▲	▲	◎	◎	◎	◎
Glass beads	●	▲	▲	◎	◎	◎	◎
SUPREC-01	●	▲	▲	◎	◎	●	◎
β-Agarase						◎	◎

◎ : 최상 ● : 충분히 적당 ▲ : 사용가능 · 모든 제품에는 DNase · RNase를 함유하지 않음

Analytical Grade Agarose를 사용한 전기영동

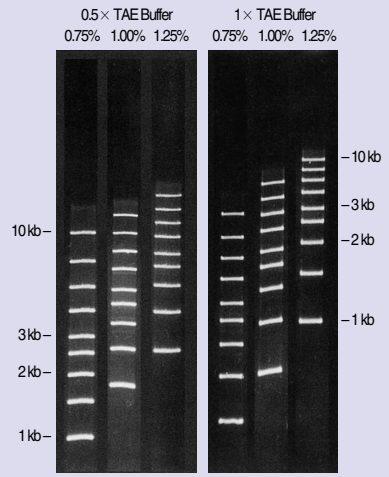


그림 SeaKem® LE Agarose의 DNA 분리능
시료 : 1-10 kb DNA Marker (TaKaRa Code F50471)(5 μl/lane)
영동조건 : 6 V/cm, 2.5시간, 2시간(TAE Buffer)

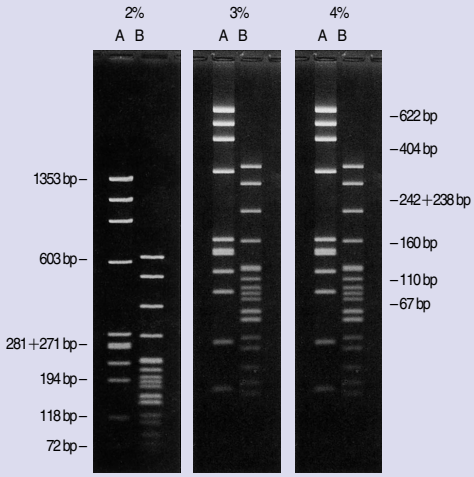


그림 NuSieve® 3:1 Agarose의 DNA 분리능
시료
Lane A : ø X174-*Hae* III digest (0.5 μg/lane)
Lane B : pBR322 DNA-*Msp* I digest (0.5 μg/lane)
영동조건 : 1× TBE Buffer, 5 V/cm, BPB가 gel끝에서 1 cm 부분에 올 때까지 전기영동

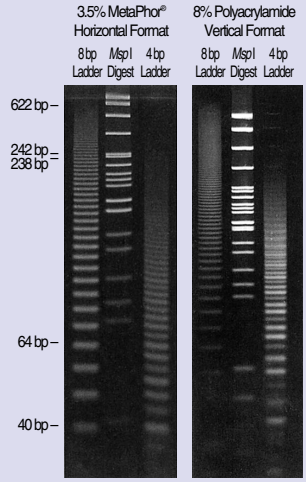


그림 MetaPhor® Agarose의 분리능
3.5% MetaPhor® Agarose gel과 8% polyacrylamide gel의 분리능을 비교하였다.
영동조건 :
3.5% MetaPhor® Agarose :
수평형 영동조(15×20 cm, 두께 3.0 mm)
1× TBE Buffer, 6.7 V/cm, 15℃, 4시간
8% polyacrylamide gel :
수직형 영동조(8×10 cm, 두께 1.0 mm)
1× TBE Buffer, 8 V/cm, 2시간