

# Gibco PROTEIN EXPRESSION SYSTEMS WHITE PAPER

최적화된 단백질 발현 시스템을 통한  
감염병 치료법 개발의 최신 동향

**gibco**

# 최적화된 단백질 발현 시스템을 통한 감염병 치료법 개발의 최신 동향

## 개요

신종 감염병 발병은 인간의 건강과 글로벌 경제에 심각한 위협이 될 수 있습니다. 이러한 위협을 완화하기 위해 바이러스 특성 분석, 혈청 검사, 치료 항체 연구, 백신 개발 등을 통한 종합적인 봉쇄 전략을 시행하는 것이 필요합니다. SARS-CoV-2 바이러스로 시작된 글로벌 위기를 통해 진단, 치료, 백신 개발을 가속화하고 빠르게 진화하는 병원균에 맞서 싸우기 위해 새롭고 효율적인 연구과정 개발에 대한 필요성을 느끼게 되었습니다. 최근 몇 년 사이, 이러한 워크플로우는 효율적인 감염병 연구를 위해 단백질 발현 시스템의 이점들을 활용해왔습니다.

Transient protein expression은 더 많은 감염병 연구를 위해, 특히 바이러스 구조와 기능 연구를 위한 항원을 생산하는데 사용될 수 있습니다. 그리고 단백질 발현 시스템은 항체 반응과 바이러스 발병기전을 이해하는데 필수적인 혈청 검사 개발에 도움을 줍니다. 더불어, transient expression 워크플로우를 사용하여 바이러스를 중화(neutralize)하고 확산을 제한하는 치료 항체를 생산할 수 있습니다. 이는 가장 효율적인 항체를 테스트할 수 있는 단백질 패널을 신속하게 생산할 수 있도록 합니다. 변형된 항원을 통해 병원균에 대한 면역력을 유도하는 재조합 백신(recombinant vaccine)도 항원 생산을 위해 단백질 발현 시스템을 사용합니다.

치료제 개발을 위한 이러한 진화된 전략은 단백질 발현 영역에서 혁신을 주도하며 수많은 애플리케이션에서 빠르고 높은 수율의 단백질 생산을 위한 chemically defined 시스템을 탄생시켰습니다. Gibco™의 transient protein expression 시스템은 전통적인 transient expression 워크플로우에서 비롯되는 단순함, 속도 그리고 사용 용이함을 유지하며, 안정적인 세포주(cell

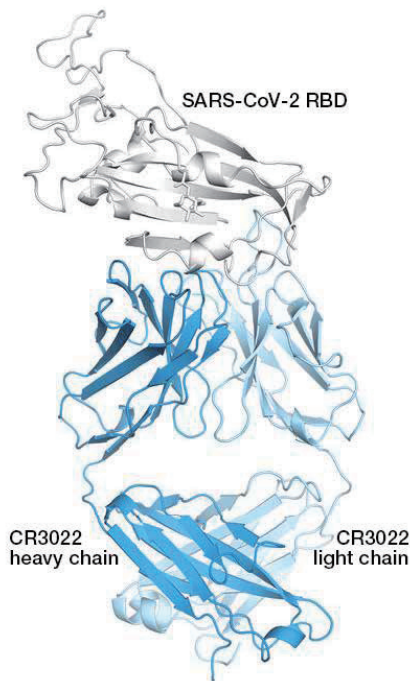
line)으로 부터 흔히 얻을 수 있는 우수한 단백질 수율과 재현성(reproducibility)을 제공합니다. 포유류(HEK293, CHO-S)와 곤충류(Sf9) 세포주 모두로 생산이 가능한 Gibco 단백질 발현 시스템 제품군은 감염병 연구를 진전시키고 광범위한 바이러스 확산을 억제하기 위한 통합 솔루션을 제공합니다.

## 바이러스 구조

수많은 구조 생물학자들(structural biologists)은 결정화(crySTALLIZATION) 및 저온전자 현미경(cryo-electron microscopy, cryo-EM) 실험용으로 충분한 물질을 생산하기 위해 단백질 발현 플랫폼을 사용합니다. SARS-CoV-2로 인한 글로벌 위기는 최적화된 단백질 발현 시스템으로 바이러스 구조에 대한 연구를 확장해야 하는 중요성을 강조했습니다.

예를 들어 Gibco™ Expi293™ 발현 시스템 키트는 재조합 바이러스 캡시드(capsid) 단백질의 고수율 발현을 가능하게 합니다. Yuan 등은 회복기에 있는 SARS-CoV 감염 환자로부터 분리된 중화 항체(neutralizing antibody)인 CR3022를 통해 복합체에 있는 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질의 수용체 결합 도메인(receptor-binding domain, RBD)의 결정 구조를 밝혔습니다(Figure 1) [1]. CR3022는 SARS-CoV-2와 이전에 확인된 코로나바이러스 SARS-Cov 사이에 잘 보존된 항원 결정기(epitope)를 겨냥하지만, CR3022는 SARS-CoV-2에는 없는 글리칸(glycan)을 포함하고 있어 SARS-CoV와 더욱 밀접하게 결합합니다. Gibco 발현 시스템 키트에 힘입어, 이와 같은 구조적 분석은 광범위한 구조적 응용을 지원하기 위한 최적화된 단백질 발현 시스템의 필요성을 강조하며 SARS-CoV-2의 항원성, 항체 인식 및 치료 연구에 대한 분자 통찰력을 제공

합니다. Expi293 시스템은 현재 연구원들의 중요한 구조적 요구사항을 추가적으로 수용하기 위해 글리칸 모듈레이션(glycan modulation), 유도 가능 발현(inducible expression)과 메티오닌 라벨링(methionine labeling)을 포함한 추가 기능을 갖췄습니다.



**Figure 1. SARS-CoV-2 RBD와 결합된 CR3022의 구조.** CR3022의 Heavy Chain(파란색)과 Light chain(하늘색)은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 RBD(은색)에 결합되어 있습니다.

Gibco 단백질 발현 시스템은 생물학자들이 감염병 연구를 생물소재 생산화(bioproduction)로도 전환 가능하게 합니다. 예로, Hsieh 등 여러 연구원들은 단백질 수율과 안정성을 증가시킬 수 있는 26가지 고유한 대체 단백질을 확인하기 위해 SARS-CoV-2 S 단백질의 structure-guided design 100 가지의 특징을 분석했습니다 [2]. 그들은 열 스트레스를 견디고 융합 전 스파이크 형태 (prefusion spike conformation)를 유지하는 능력을 가진 S 단백질 변이인 HexaPro를 확인했습니다. HexaPro의 생존력이 잠재적 항원(potential antigen) 또는 진단 시약

(diagnostic reagent)으로써 사용이 가능한 지 평가하기 위해 그들은 HexaPro 단백질을 Gibco™ ExpiCHO™ 발현 시스템 키트와 Gibco™ FreeStyle™ MAX 293 발현 시스템을 통해 대량 생산하여 분석하였습니다. 그들은 안정적인 융합 전 S 단백질 (prefusion S protein)의 대량 생산은 SARS-CoV-2의 백신 개발과 혈청 진단을 가속화시킬 수 있다고 결론 내렸습니다.

## 혈청 검사

혈청 검사는 환자의 혈청에서 항체와 항원을 확인하여 환자의 과거 질병 감염 여부를 나타내는 검사입니다. SARS-CoV-2 바이러스로 인한 위기는 바이러스의 확산과 병원성을 확인하기 위해 효율적인 혈청 테스트의 필요성을 강조해왔습니다.

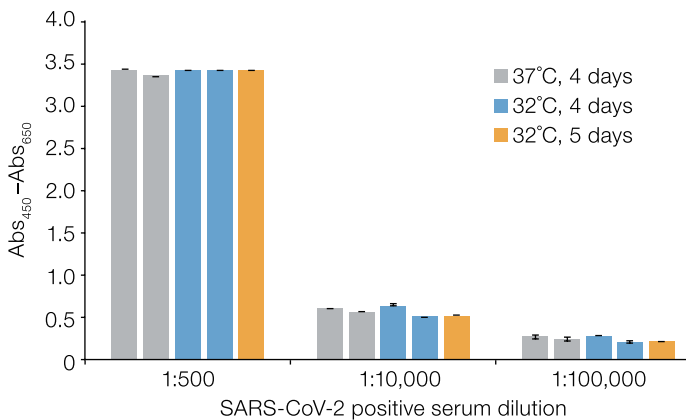
Stadlbauer 등 연구원들은 2단계의 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)에서 SARS-CoV-2 항원 발현을 위한 상세한 프로토콜을 수립했습니다. 이 검사는 SARS-CoV-2에 대항하는 항체 반응을 이해하기 위해 연구실과 임상 연구 환경 모두에서 사용 가능합니다. 프로토콜에서 full-length S 단백질과 RBD는 Expi293 시스템에서 발현되고 gravity flow를 통해 정제되며 ELISA 플레이트를 코팅하기 위해 사용됩니다. 다음으로 사람 혈청 샘플은 Gibco™ Expi293F™ 세포 내 잘 발현된 RBD와 결합시켜 평가합니다. 양성 샘플은 이후 RBD 보다 Expi293F 세포 내에서 발현하기 어려운 S 단백질에 대한 confirmatory ELISA를 진행합니다. 혈청 검사는 각 검사에 특정한 S 단백질의 높은 titer가 필요하므로, S 단백질은 SARS-CoV-2 혈청 검사의 제한 인자(limiting factor)입니다.

이러한 항원에 대한 수요를 충족시키기 위해, Esposito 등 연구자들은 transient expression 시스템에서 S 단백질의 수율을 개선하기 위해 여러 재조합 단백질 발현 변수를 조사했습니다 [4]. 미국 국립 보건원(National Institutes of Health, NIH)에서 주도한 혈청학적 조사(serosurvey)를 뒷받침하기 위해 Transient Expi293 시스템에서 최적화한 그들의 단백질 정제 과정은 단일 batch 4 L 발현으로부터 충분한 S 단백질(최대 6.4 mg/L)을 생

산했습니다(Table 1). 그들의 연구는 코로나 바이러스의 면역 반응 범위를 설명하는데 도움을 주었고 transient expression이 안정적인 단백질 생산에 강력한 방법임을 입증했습니다(Figure 2).

**Table 1. 발현과 정제 변수가 스파이크 단백질의 수율에 미치는 영향.** 수확 후 생산 과정은 tangential flow filtration, TFF, immobilized metal affinity chromatography(IMAC)과 (desalting column으로 구성. 수율은 독립적인 실험으로부터 얻음 (nd: not determined) [4].

Condition	Vaccine Research Center (mg/L)	Mt. Sinai (mg/L)
37°C/72 hr IMAC/SEC	0.3	0.9
37°C/96 hr IMAC/desalt	2.0, 2.0, 1.4	1.7, 2.6
37°C/96 hr IMAC/desalt	4.8, 5.2, 6.1	4.6, 5.3, 5.2
37°C/120 hr IMAC/desalt	6.4, 5.0	4.4
37°C/96 hr MagBeads/desalt	4.1, 5.5	nd



**Figure 2. 다양한 농도, 발현 시간 및 온도에서 생산된 스파이크 단백질의 개별 배치에 대한 ELISA 민감도.** 일관된 로트별 결과를 보여주는 스파이크 단백질 확보 - 높은 품질의 민감한 혈청 검사에 필수적 요소. Esposito 등 자료에서 발췌 [4].

## 치료용 항체

항바이러스제 역할을 할 수 있는 항체를 식별하는 것은 신종 바이러스와의 싸움에서 중요한 전략입니다. 예로, Pan 등 연구원들은 재조합 SARS-CoV-2 S 단백질 RBD이 SARS-CoV-2 수용체에 결합 가능하며 SARS-CoV-2에 강력한 억제 효과를 가진 RBD-specific F(ab')<sub>2</sub>를 통해 생체내 항체 반응을 유발할 수 있다는 것을 보여주었습니다 [5]. ExpiCHO 발현 시스템을 통해 그들의 재조합 RBD의 고수율 생산은 가속화되었고, 이는 연구원들이 SARS-CoV-2를 대응하는 핵심 항체를 빠르게 식별하도록 수용체 차단제 검사(receptor blockade assay), 바이러스 중화 검사(virus neutralization test, VNT), 생체 분자 반응 분석기(biomolecular interaction analyses) 등을 우선적으로 처리 가능하게 했습니다.

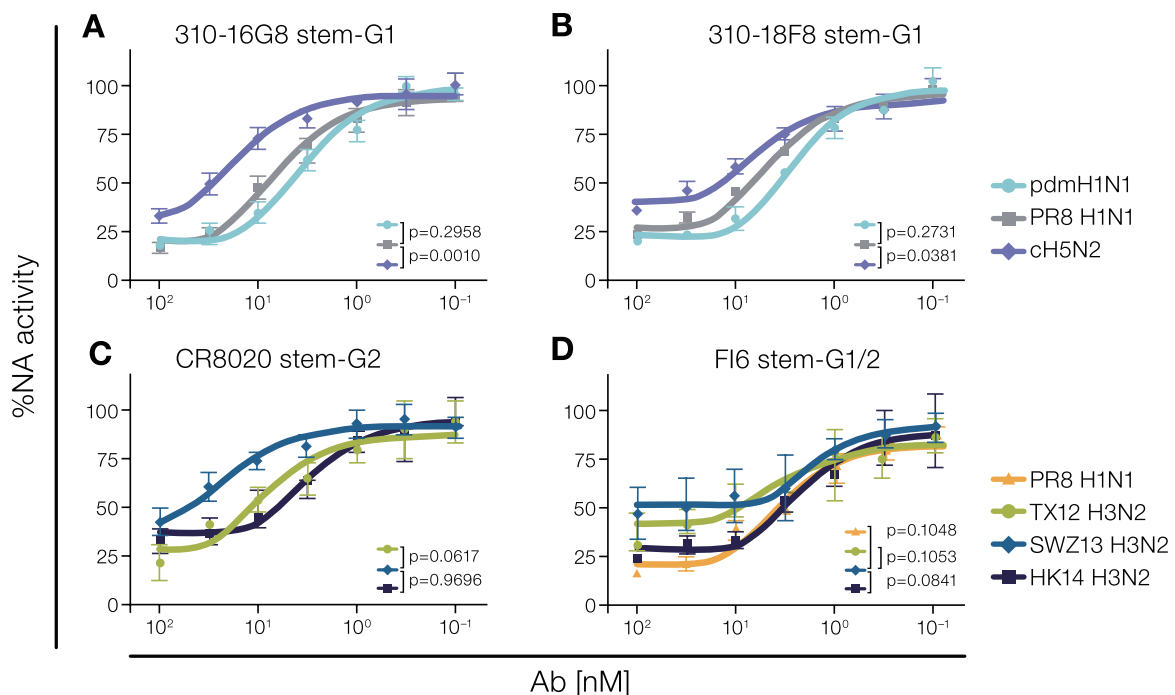
단백질 발현 시스템은 신종 바이러스에 대한 치료제 연구를 지원할 뿐만 아니라, 연구원들이 인플루엔자와 같은 감염병에 대한 새로운 치료 매커니즘을 발견하는데 도움을 줍니다. 역사적으로 연구원들은 광범위한 중화 작용을 나타내는 항체(broadly neutralizing antibodies, bNAbs)로 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 단백질(influenza virus hemagglutinin (HA) protein)을 겨냥했습니다. 하지만, Kosik 등 연구원들은 Expi293 발현 시스템을 사용하여 anti-HA stem antibodies(Abs)도 대형 기질에 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA) 활동을 차단하여 바이러스 방출을 억제할 수 있다는 사실을 입증했습니다(Figure 3) [6]. Expi293 발현 시스템을 사용함으로써 NA 억제제와 anti-stem mAB 치료 사이에서 잠재적인 치료적 시너지를 신속하게 확인하는데 도움이 되었습니다.

## 백신 후보

빠른 항체 생산은 선도 백신 후보물질(lead vaccine candidate)을 효율적으로 스크리닝하고 특성을 분석하는데 결정적입니다. 시간과 비용 소모가 높은 안정적인 세포주를 생산 및 선별 과정에 transient protein expression은 유연하고 경제적인 대안을 제공하며 과학자들이 잠재적인 백신 후보들을 보다 효과적이고 효율적으로 발견하고 생산할 수 있도록 합니다.

수년간 envelope glycoprotein의 metastable 특성으로 인해 삼량체(trimer) 기반의 HIV-1 백신을 설계하는 것은 어려운 일이었습니다. He 등 연구원들은 Gibco™ ExpiCHO-S™ 세포와 Expi293F 세포에서 native-like 삼량체의 발현을 비교함으로써 glycoprotein의 metastability를 분석했습니다 [7].

ExpiCHO-S 세포에서 glycoprotein gp140 삼량체의 발현은 Expi293F 세포에서의 발현에 비해 우수한 수율, 순도 및 항원성을 보였습니다. 연구원들은 ExpiCHO-S 시스템의 100ml로부터 얻은 gp140 수율은 Expi293F 시스템의 2-4 L에서 나오는 수율과 동일하다고 추정했습니다. 더불어, Expi293F 세포에 비해 ExpiCHO-S 세포에서 얻은 glycoprotein에서 misfolded 종류의 상당한 감소가 확인되었습니다. 이러한 결과는 발현 시스템이 단백질과 애플리케이션에 따라 다르다는 것을 설명합니다. He 등 연구원들의 경우, ExpiCHO 시스템의 장점은 더 많은 백신 개발 연구에서 바이러스 회기 기법(virus evasion tactics)과 항체 반응을 설명할 수 있는 native-like gp140 삼량체의 안정적인 생산으로 이어졌습니다.

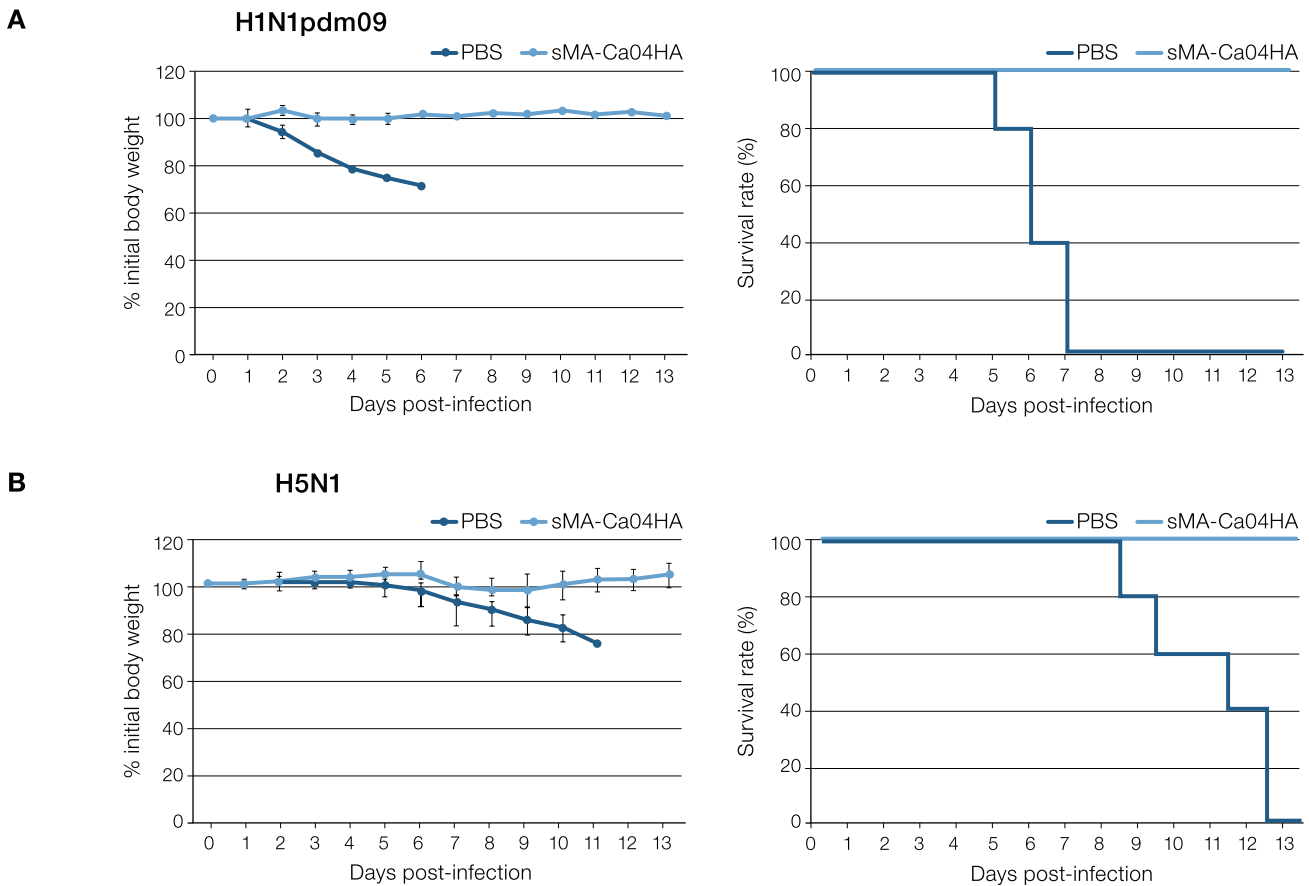


**Figure 3. NA 활동을 효율적으로 억제하는 anti-stem mAbs.** NA 활동에서 정제된 anti-stem mAbs의 용량을 여러 바이러스와 비교 측정하기 위해 효소 결합 렉틴 분석 (enzyme-linked lectin assay, ELLA)을 시행했습니다. Ab가 부재한 상태로 %NA activity는 정상화(normalize)되었습니다(100%로 설정). Anti-stem mAbs 310-16G8 (A)와 310-18F8 (B)는 그룹 1 (G1) HA stems에 한하여 반응하고 N1 또는 N2의 NA 활동을 H1 HA stem을 가진 바이러스를 사용하여 효율적으로 차단합니다: PR/8/34 (H1N1), Cal/4/09 (H1N1) 및 chimeric ch5/1N2 (H5-head-H1-stem N2). Anti-stem mAb CR8020 (C)는 그룹 2 (G2)에 한하여 반응하며 FI6 (D)는 모든 그룹 (G1/2)에 한하여 반응합니다; mAb2는 여러 그룹 2 바이러스에서 NA 활동을 억제하며 NA가 G1/2 cross-reactive stem-specific Ab로 인해 억제될 수 있다는 것을 시사합니다 (n=6) [6]. Rockefeller University Press의 허가를 받아 사용한 수치.

올바른 단백질 발현 시스템은 백신 후보 선별 과정을 가속화할 뿐만 아니라 재조합 단백질의 면역성을 크게 향상시킬 수 있습니다. 예로, 인플루엔자 바이러스를 성공적으로 예방하는 백신인 인플루엔자 HA 단백질은 수년간 여러 다른 시스템에서 재조합 생산되었습니다. Yamada 등 연구원들이 Expi293F 세포에서 재조합 HA 단백질을 발현할 때, 이는 재조합 HA 단백질 sMA-CaO4HA에 대해 높은 수준의 중화 항체를 유도하며 실험 쥐를 homosubtypic H1N1pdm09와 heterosubtypic H5N1로부터 보호한다는 것을 발견했습니다(Figure 4) [8]. 이 연구는 재조합 HA 단백질을 이용한 근육 내 면역화(intramuscular immunization)로 Expi293F 세포 기반의 백신을 사용하여 인플루엔자 백신 개발에 새로운 방안을 제공할 수 있다는 점을 시사합니다.

**결론**

Transient protein expression 시스템은 다양한 종류의 다운스트림 애플리케이션을 위한 높은 수율의 일관된 단백질 생산을 가능하게 합니다. 신속한 단백질 발현의 필요성은 구조 연구, 혈청 테스트, 치료 개발 및 백신 후보 스크리닝에 필요한 고품질의 단백질을 생산하는 워크플로우가 최적화되어야 하는 감염병 연구에서 특히 확연하게 드러납니다. 신종 감염병은 단백질 발현 영역에서 혁신을 불러 일으키며 바이러스 병원성과 확산을 이해하기 위한 통합 솔루션을 제공하는 새로운 플랫폼의 개발을 가속화합니다.



**Figure 4.** 바이러스 공격 후 면역 접종 후 실험쥐의 몸무게(왼쪽)와 생존율(오른쪽) 변화. 실험쥐는 먼저 PBS(대조군)으로 모의 면역(mock-immunize) 또는 sMA-CaO4HA으로 면역접종 했습니다. 백신 접종 2주 이후, 실험쥐는 10 MLD<sub>50</sub>의 (A) H1N1pdm09와 (B) H5N1를 투여 받았습니다 (n=5). MLD = minimum lethal dose.

## References

1. Yuan M, Wu NC, Zhu X et al. (2020) A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* 368(6491):630-633.
2. Hsieh C, Goldsmith JA, Schaub JM et al. (2020) Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science* 369(6510):1501-1505.
3. Stadlbauer D, Amanat F, Chromikova V et al. (2020) SARS-CoV-2 seroconversion in humans: a detailed protocol for a serological assay, antigen production, and test setup. *Curr Protoc Microbiol* 57(1):e100.
4. Esposito D, Mehalko J, Drew M et al. (2020) Optimizing high-yield production of SARS-CoV-2 soluble spike trimers for serology assays. *Protein Expr Purif* 174: 105686.
5. Pan X, Zhou P, Fan T et al. (2020) Immunoglobulin fragment F(ab')<sub>2</sub> against RBD potently neutralizes SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res* 182: 104868.
6. Kosik I, Angeletti D, Gibbs JS et al. (2019) Neuraminidase inhibition contributes to influenza A virus neutralization by anti-hemagglutinin stem antibodies. *J Exp Med* 216(2):304-316.
7. He L, Kumar S, Allen JD et al. (2018) HIV-1 vaccine design through minimizing envelope metastability. *Sci Adv* 4 :eaau6769.
8. Yamada S, Yasuhara A, Kawaoka Y (2019) Soluble recombinant hemagglutinin protein of H1N1pdm09 influenza virus elicits cross-protection against a lethal H5N1 challenge in mice. *Front Microbiol* 10:2031.

## Other resources

- Transient Protein Expression Platforms
- ExpiCHO Expression System
- Expi293 Expression System
- ExpiSf Baculovirus Expression System
- Protein Expression Publication Hub
- Gibco Protein Expression Basics

**gibco**

Find out more at [thermofisher.com/expi](https://thermofisher.com/expi)

**For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.** © 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. **COL24754 0421**

**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C