

Expression of the Recombinant Single-Chain Anti-B Cell Lymphoma Antibody

Tae Hyun Choi^{1,2}, Chang Woon Choi¹, Ok Doo Awh² and Sang Moo Lim^{1†}

¹Laboratory of Cyclotron Application, Korea Cancer Hospital, Seoul 139-706, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

Recombinant single chain Fv (scFv) antibodies offer many advantages over mouse monoclonal antibodies such as faster clearance from blood, improved tumor localization, reduced human anti-mouse antibody (HAMA) response, and the availability to manipulate the scFv through genetic approaches. The recombinant phage display was constructed using lym-1 hybridoma cells as a source of genetic starting material. mRNA was isolated from the corresponding antibodies hybridoma cells. VH and VL cDNA were amplified with RT-PCR and linked with ScFv by linker DNA to form ScFv DNA, which then were inserted into phagemid pCANTAB5E. The phage of positive clones selected with tube containing raji lymphoma cell and infected by competent *E. coli* HB2151 to express soluble scFv. The scFv lym-1 was secreted into the cytosol and culture supernatant and shown to be of expected size (approximately 32 kDa) by western blot. An active scFv lym-1 could be produced in *E. coli* with soluble form and high yield from hybridoma cell line, using phage display system. Immunoreactivity indicated that scFv lym1 showed a potential binding affinity against the raji lymphoma cell as its parental antibody (intact lym-1 Ab).

Key Words: Single chain Fv, Phage display, Lym-1 antibody

서 론

1975년 Kohler와 Milstein에 의해 종양세포와 생쥐의 B 세포간의 세포 융합기술이 도입된 이후로 단일클론항체 생산이 가능하게 되었다⁴⁴). 이러한 hybridoma 기술의 발달로 특정한 항원에 반응하는 단일클론항체를 만들 수 있게 되어 종양 표적화를 위해 종양세포의 표면에 발현되는 특이 항원에 친화성을 가지는 단일클론항체의 제조가 가능하게 되었다. 생쥐단일클론항체 (murine monoclonal antibody)는 다양한 표적항원 (target antigen)의 적용과 대량 생산이 가능한 장점을 가지며, 선택적 약제의 개념은 마법의 탄환이라는 표현으로 Ehrlich에 의해 제시되어 진단시약이나 기초연구에 매우 유용하게 사용되고 있다⁴⁰). 항체 표적 치료는 암세포의 표면에 발현된 종양관련항원에 특이 결합하는 항체의 능력에 의해 치료효과가 나타난다. 생쥐에서 유래하는 항체는 인체에

반복 투여될 경우 치명적인 체내 면역반응 (HAMA, human anti-mouse antibody response)을 유발할 수 있기 때문에 인간 질환의 예방과 치료를 위한 치료제로 부적합한 단점을 가진다^{15,41}). Phage display 방법은 비용해성 filamentous bacteriophage 표면에 특이 결합 peptides를 전시 발현시키는 것이다^{14,33,45,48,51}). Biopanning이라고 불리는 선택적 반응 과정을 수 회 반복하여 특이 결합 물질이 다양하게 발현된 phage 중에서 특정 항원에 반응하는 phage만을 선별하게 된다^{18,22,27,31}). 이렇게 선택된 phage는 증식을 통해 다량 생산할 수 있다. 이러한 phage display의 원리는 M13 bacteriophage의 geneIII가 인코딩하는 minor coat protein인 pIII는 보통 phage의 표면 단백질로서 3~5개가 발현되고, bacterial pilus에 흡착하는 역할을 하는데, phage vectors를 사용하여 다양한 peptides와 proteins을 pIII와 연결되게 발현시키면, biopanning을 통해 특이 결합 물질과 반응하는 phage를 찾아내는 것이다^{30,43}). 이러한 phage display 방법을 종양 특이 항원에 대한 재조합 항체를 만드는 데 이용된 연구도 있다³⁶). 이 기술의 장점은 단 몇 개월 만에 특정 항원에 대한 단일클론항체를 분리할 수 있다는 것이다. 그러나, 이 기술은 인간항체 라이브러리가 대단히 크지 않으면 친화도가 높은 항체를 개발하기 어려운 단점이 있다. 현실적으로 유용한 재조합 항체를 만드는 것은

*논문 접수: 2003년 7월 14일

수정재접수: 2003년 8월 6일

†별책 요청 저자: 임상무, (우) 139-706 서울특별시 노원구 공릉동 215-4 원자력병원, 싸이클로트론응용연구실

Tel: 02-970-1448, Fax: 02-970-1341

e-mail: chutae@unitel.co.kr

Table 1. Oligonucleotide primers used for construction of mouse scFv antibody libraries

VH construction	
Mouse VH Back primers (primer 1)	
MuVH1 Back	5' GAG GTG CAG CTT CAG GAG TCA GG 3'
MuVH2 Back	5' GAT GTG CAG CTT CAG GAG TCR GG 3'
MuVH3 Back	5' CAG GTG CAG CTG AAG SAG TCA GG 3'
MuVH4/6 Back	5' GAG GTY CAG CTG CAR CAR TCT GG 3'
MuVH5/9 Back	5' CAG GTY CAR CTG CAG CAG YCT GG 3'
MuVH7 Back	5' GAR GTG AAG CRG GTG GAR TCT GG 3'
MuVH8 Back	5' GAG GTT CAG CTT CAG CAG TCT GG 3'
MuVH10 Back	5' GAA GTG CAG CTG KTG GAG WCT GG 3'
MuVH11 Back	5' CAG ATC CAG TTG CTG CAG TCT GG 3'
Mouse JH Forward primers (primer 2)	
MuJH1	5' TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC 3'
MuJH2	5' TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT GCC 3'
MuJH3	5' TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT CCC 3'
MuJH4	5' TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT TCC 3'

위와 같은 phage display 방법을 이용하여 단일클론항체를 생산하는 hybridoma로부터 유전자 재조합 방법을 이용, 특히 결합부위인 VH와 VL를 일정 길이의 peptide linker로 연결하여 variable 부분으로 연결된 단일사슬항체 (single chain variable fragment, scFv)를 만드는 것이다. 이렇게 만들어진 단일사슬항체는 유래된 단일클론항체의 결합부위와 유사한 구조를 가지게 된다⁴⁶⁾. Phage display libraries를 이용하여 제조된 단일사슬항체는 종양특이 항원에 매우 높은 친화성을 가진다. 이러한 단일사슬항체는 단일클론항체나 인간화 항체와 비교하여 많은 장점이 있는데, 보다 적은 크기 (IgG의 22%)는 호흡기 질환 유발 바이러스에 대한 치료에 더욱 효과적이며¹⁷⁾, 인체 투여시 면역거부반응과 알레르기반응이 적어지고³⁵⁾, 종양 조직으로의 접근이 용이하며 혈중체거 속도가 빨라 짧은 시간 내에 고르게 분포된다고 한다²¹⁾. Lym-1 항체는 B-세포 림프종들의 80% 이상과 B-세포 만성림프성 백혈병의 40%와 반응성을 나타내는 IgG2 생쥐단일클론항체로 세포막표면에 존재하는 human leukocyte antigen-DR10 (HLA-DR10)에 특이적으로 결합한다¹¹⁻¹³⁾.

면역항체치료는 특히 혈액 악성종양에서 효과가 더욱 크다. 이유는 혈액 종양세포에는 특이 표면항체들이 잘 규명되어 있기 때문이다^{2,49)}. 본 연구에서는 항체를 이용하여 면역치료시 예후가 좋은 악성 림프종에 적용하기 위하여 phage display 방법으로 Lym-1 항체를 생산하는 hybridoma로부터 단일사슬항체를 제조하고자 한다. ¹²⁵I으로 표지하여 악성 림

프종의 방사면역치료에 응용되는 IgG lym-1을 분비하는 hybridoma로부터 항원인식부위만으로 구성된 단일사슬항체를 제조하고 그 반응성을 평가하는데 있다.

재료 및 방법

1. 단일사슬항체 유전자의 제작

Lym-1 hybridoma 약 107개로부터 RNeasy kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 total RNA를 얻었다. Total RNA에서 first strand cDNA primer와 역전사 효소를 사용하여 cDNA를 제작하였다. 이렇게 얻어진 cDNA를 templates로 light chain primer set와 heavy chain primer set (Table 1, 2)을 넣어 각각 PCR 반응을 실시하였다. 반응 종료 후, agarose electrophoresis (1.5%)를 실시하였고, gel extraction kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 heavy chain variable region (VH) gene과 light chain (VL) gene을 분리하였다. 정제된 VH와 VL gene은 linker sequence primer set (Table 3)를 사용하여 PCR을 실시하였다. 이렇게 얻어진 scFv gene은 rapid DNA ligation kit (Roche, Germany)를 이용하여 pCANTAB 5 E phagemid (Fig. 2)에 ligation하였다.

2. 유전자 재조합 phage 제조

scFv lym-1 gene이 삽입된 pCANTAB 5 E phagemid는 50 mM MgCl₂과 0.03 M polyethyleneglycol (MW 3,350)이 들어

Table 2. Oligonucleotide primers used for construction of mouse scFv antibody libraries

VL construction			
Mouse VK Back primers (primer 3)			
MuVK1 Back	5' GAC ATT GTG ATG WCA CAG TCT CC 3'		
MuVK2 Back	5' GAT GTT KTG ATG ACC CAA ACT CC 3'		
MuVK3 Back	5' GAT ATT GTG ATR ACB CAG GCW GC 3'		
MuVK4 Back	5' GAC ATT GTG CTG ACM CAR TCT CC 3'	R = A or G	W = A or T
MuVK5 Back	5' SAA AWT GTK CTC ACC CAG TCT CC 3'	Y = C or T	D = A or G or T
MuVK6 Back	5' GAY ATY VWG ATG ACM CAG WCT CC 3'	K = G or T	H = A or C or T
MuVK7 Back	5' CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CC 3'	S = C or G	V = A or C or G
MuVK8 Back	5' TCA TTA TTG CAG GTG CTT GTG GG 3'	M = A or C	B = C or G or T
Mouse JK Forward primers (primer 4)			
MuJK1 For	5' TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC TCC 3'		
MuJK2 For	5' TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC CCC 3'		
MuJK3 For	5' TTT TAT TTC CAG TCT GGT CCC ATC 3'		
MuJK4 For	5' TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC CGA 3'		
MuJK5 For	5' TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC AGC 3'		

Table 3. Oligonucleotide primers used for construction of mouse scFv antibody libraries

Linker assembly	
Reverse mouse JH Forward for scFv linker	
RevMouJH1 For	5' GGA CCA CGG TCA CCG TCT CCT CAG GTG G 3'
RevMouJH2 For	5' GCA CCA CTC TCA CAG TCT CCT CAG GTG G 3'
RevMouJH3 For	5' GGA CTC TGG TCA CTG TCT CTG CAG GTG G 3'
RevMouJH4 For	5' GAA CCT CAG TCA CCG TCT CCT CAG GTG G 3'
Reverse mouse VK Forward for scFv linker	
RevMouVK1 Back	5' GGA GAC TGT GWC ATC ACA ATG GAT CCG CC 3'
RevMouVK2 Back	5' GGA GTT TGG GTC ATC AMA ACA TCA GAT CCG CC 3'
RevMouVK3 Back	5' GCW GCC TGV GTY ATC ACA ATA TCA GAT CCG CC 3'
RevMouVK4 Back	5' GGA GAY TGG GTC AGC ACA ATG TCA GAT CCG CC 3'
RevMouVK5 Back	5' GGA GAC TGG GTG AGM ACA WTT TSA GAT CCG CC 3'
RevMouVK6 Back	5' GGA GWC TGK GTC ATC WBR ATR TCA GAT CCG CC 3'
RevMouVK7 Back	5' GGA GAC TGG GTG AGA ACA ATT TGA GAT CCG CC 3'
RevMouVK8 Back	5' CCC ACA AGC ACC TGC AAT AAT GAA GAT CCG CC 3'
(Gly4-Ser) 3 linker Back for jumping-PCR-assembly	
LinkerBack	5' GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT 3'
(Gly4-Ser) 3 linker Forward for jumping-PCR-assembly	
Linker For	5' AGA TCC GCC GCC ACC CGA CCC 3'

있는 TSS buffer를 사용하여 *E. coli* TG1에 열 충격을 주는 방법으로 형질전환하였다. Helper phage M13KO7 (4×10^{10} pfu)

로 형질변환된 *E. coli* TG1로부터 scFv gene이 삽입된 phagemid의 recombinant phage를 rescue하는데 사용하였다.

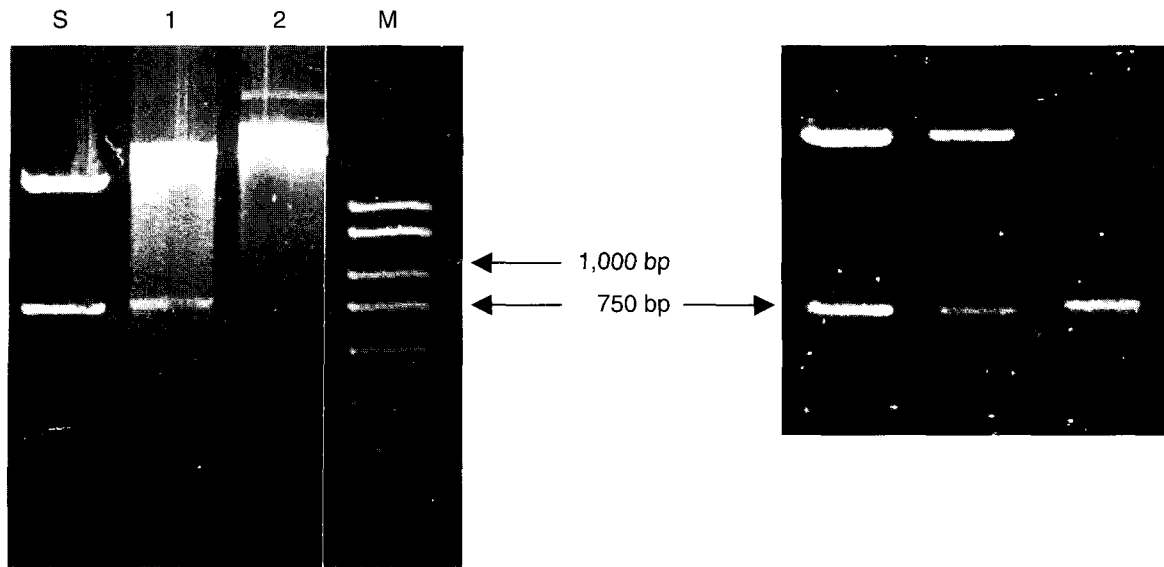


Fig. 1. Agarose gel analysis of PCR product of scFv. Lane M, DNA marker; lane 1, the scFv PCR product. Lane S, 750 bp standard. Lane C, negative control. Lane S1, 25 ng 750 bp standard. Lane S2, 12.5ng 750 bp standard.

3. 특이 결합 phage의 선별 (Biopanning)

앞서 만들어진 recombinant phage 중에서 Raji cell의 표면 항원과 반응하는 phage를 선별하기 위해 약 1×10^7 개의 Raji cell을 recombinant phage와 반응시킨 후, 5회 이상 세척하였다. 이러한 panning 과정을 통해 선별된 recombinant phage는 PEG/NaCl로 침전 농축하였다. 농축된 recombinant phage로 competent *E. coli* TG1를 재감염 시킨 뒤, 재감염된 *E. coli* TG1을 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin과 2% glucose가 들어 있는 평판 배지에 접종하여 배양하였다. 평판배지에 배양된 집락들을 골라 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin과 2% glucose의 농도로 함유되어 있는 액체배지에 접종하여 각각의 집락의 scFv lym-1 생성 여부를 western blot으로 확인하였다.

4. ScFv lym-1의 생산

ScFv lym-1을 생산하는 *E. coli* TG1 균주를 선택하고, helper phage M13KO7을 넣어 recombinant phage를 phage rescue 과정을 통해 얻었다. 이렇게 만들어진 recombinant phage를 competent *E. coli* HB2151에 감염시켜 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin, 2% glucose와 100 $\mu\text{g/ml}$ nalidixic acid의 농도로 만들어진 선택 평판배지에 접종하여 배양하였다. 집락이 형성된 평판배지에서 한개 집락을 선택하여 2 \times YT-AG 배지 (100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin과 2% glucose)에 밤새 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 진탕배양하였다. 밤새 배양한 배양액을 신선한 2 \times YT-AG 배지로 교환하여 1시간 정도 진탕배양한 후, IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)가 들어 있는 2 \times YT-AI (100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin과 1 mM IPTG)로 배지를 교환하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간에서 24시간

동안 각 시간별로 250 rpm에서 진탕배양하였다. 배양이 끝난 후, 약 10,000 $\times g$ 로 25분 동안 원심 분리하여 상층액을 분리 보관하였고, osmotic shock을 이용하여 원심침전물로부터 periplasmic extract를 원심 분리하여 얻거나, sonication법을 이용하여 침전물을 파쇄하고 원심 분리하여 whole cell extract를 얻었다.

5. 염기서열 분석

용해성 scFv 생산균주에서 DNA plasmid kit (Qiagen, Germany)로 phagemid를 분리·정제하였다. 정제된 phagemid는 pCANTAB 5 sequencing primer set (Pharmacia Biotech, Sweden)와 함께 Bioneer사에 의뢰하여 scFv lym-1 gene의 염기서열을 분석하였다. 이렇게 분석된 염기서열을 IGMT/V-QUEST (Rojas et al., 2002)로 CDRs과 FRs를 할당하고, amino acids 서열을 분석하였다.

6. 음이온 교환수지 크로마토그래피

균주를 배양한 원심상층액과 periplasmic extract, whole cell extract를 High Q column (strong anion exchange)에 통과시킨 뒤, NaCl gradient (0~1 M NaCl)로 용출되는 것을 4 ml씩의 fractions으로 수집하였다. 각 fractions들을 Centricon (Millipore, USA)을 이용하여 원심 분리함으로써 제염과 농축을 동시에 실시하였다.

7. Affinity 크로마토그래피

ScFv lym-1을 생산하는 균주의 periplasmic extract, whole cell extract를 ion exchange column으로 정제한 것을 anti-E tag

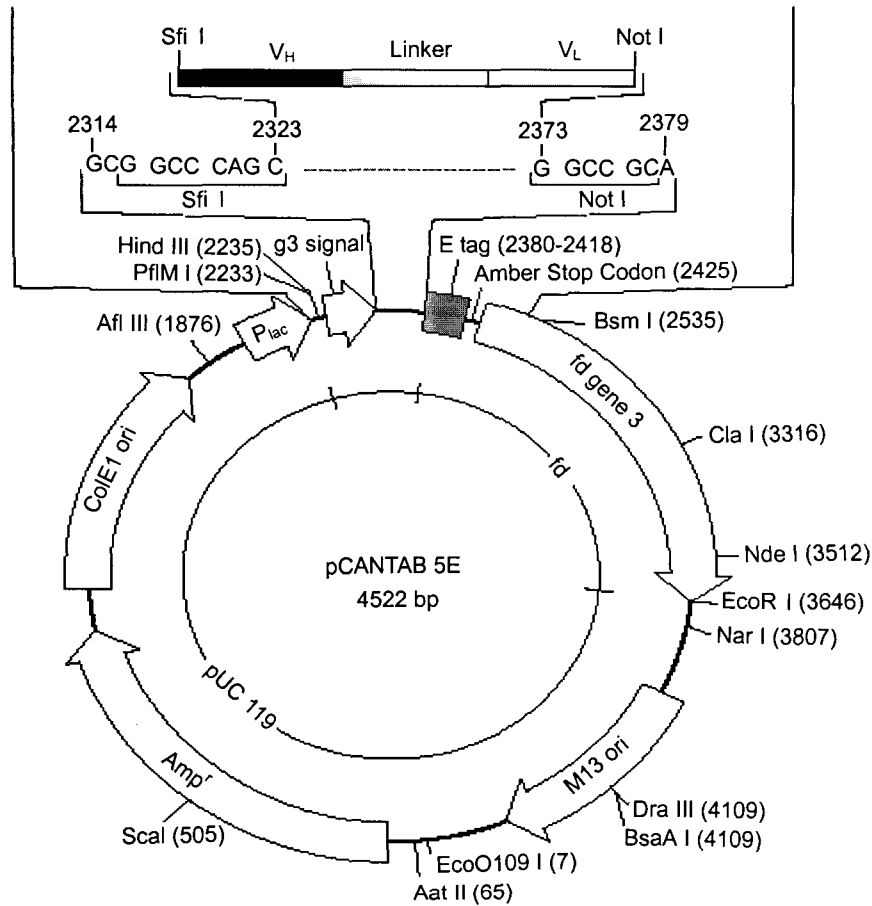


Fig. 2. The map of pCANTAB 5 E shows the control regions and genealogy of the vector. The section above the vector map (VH-linker-VL) depicts the orientation of a hal ScFv fragment cloned into pCANTAB 5 E.

antibody로 만들어진 affinity column (Pharmacia Biotech, Sweden)을 사용하여 한 번 더 농축·정제하였다.

8. Dot blot

Ion exchange column을 통해 용출된 각 fraction을 nitrocellulose paper가 들어 있는 Bio-Dot microfiltration 기구 (Biorad, USA)에 100 μ l씩 넣고, 음압을 이용해 통과시켰다. Mouse anti-E tag antibody (1 μ g/ml)와 goat anti-mouse antibody (1 μ g/ml) HRP conjugate를 순서대로 반응용기에 넣으며 반응하였다. 반응이 끝난 후 발색은 ECL western blotting detection reagents (Pharmacia Biotech, Sweden)을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다.

9. 세포면역화학염색

Raji cells을 1×10^7 개/ml이 되게 만들어 유리 slide에 도말하였다. 공기 중에서 말린 뒤, 차가운 acetone으로 고정하여 실험에 사용하였다. 비교 대상을 만들기 위하여 대조군으로 IgG lym-1을 사용하였다. Affinity column으로 분리된 scFv

lym-1 액과 반응시키고, 차례대로 mouse anti-E tag antibody와 HRP conjugate anti-mouse antibody를 순서대로 반응시켰다. 최종적으로 DAB (3,3'-diaminobenzidine)과 H_2O_2 로 발색반응하여 현미경으로 관찰하였다.

결 과

Lym-1 hybridoma로부터 얻은 RNA에서 cDNA를 얻었다. cDNA를 templates로 증폭된 VH gene과 VL gene을 PCR을 사용하여 얻을 수 있었다. VH와 VL gene을 정제 분리하여 glycine과 serine으로 구성되는 linker DNA 서열과 단일 gene으로 연결하였다. 약 750 bp의 scFv lym-1 gene이 pCANTAB 5 E에 삽입되었다. 이 phagemid를 *E. coli* TG1에 형질전환하고, 형질전환된 *E. coli* TG1을 배양하고 이 *E. coli* TG1으로부터 phagemid를 분리하여 sfi I과 not I의 제한효소 처리 후 agarose 전기영동으로 scFv lym-1 gene의 삽입여부를 확인하였다 (Fig. 1). ScFv lym-1 gene이 삽입된 phagemid가 형질전환된 *E. coli* TG1를 선별배지에 접종하여 배양하였다. 성장한

집락들을 골라 각각의 배지가 들어 있는 tube에 접종하여 배양하였다. 각 tube의 상층액을 분리하여 scFv lym-1을 생산하는지 western blot으로 확인하였다. 확인된 균주를 골라 phagemid를 추출하였다. 추출된 phagemid의 DNA sequencing analysis를 외부기관에 의뢰하여 확인하였다. ScFv gene의 DNA sequencing 결과를 internet의 IGMT/V-QUEST database

(<http://imgt.cines.fr:8104>)에 입력하여 amino acids의 구성과 CDR과 FR의 할당영역을 분석하였다 (Fig. 3). 예상되는 scFv lym-1의 분자량은 약 32 kDa 정도로 IgG의 1/5 정도의 크기이다. 앞선 결과가 확인된 clone에서 helper phage를 사용하여 scFv lym-1을 발현하는 recombinant phage를 구제하였다. 이 과정에서 생산된 recombinant phage를 amber stop codon이

A. VH sequence:

FR1 CDR1 FR2 CDR2
QVKLQQSGPGLVAPSQSLTCTISGFSLSYGVHWRQPPGKGLEWLVIWSDGST

FR1 CDR3
TYNSALKSRLSISKDNSKSVFLKMNSLQTDDTAIYYCASHYGSTLAFAS

A. VL sequence:

FR1 CDR1 FR2 CDR2
DIELTQSPTSLASVGETVTIICRASVNNYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAK

FR3 CDR3 FR4
ILAEGAPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTFTFGSGTKLEIKR

Fig. 3. Deduced aminoacid sequences of VH and VL in scFv lym-1 CDRs and FRs are indicated.

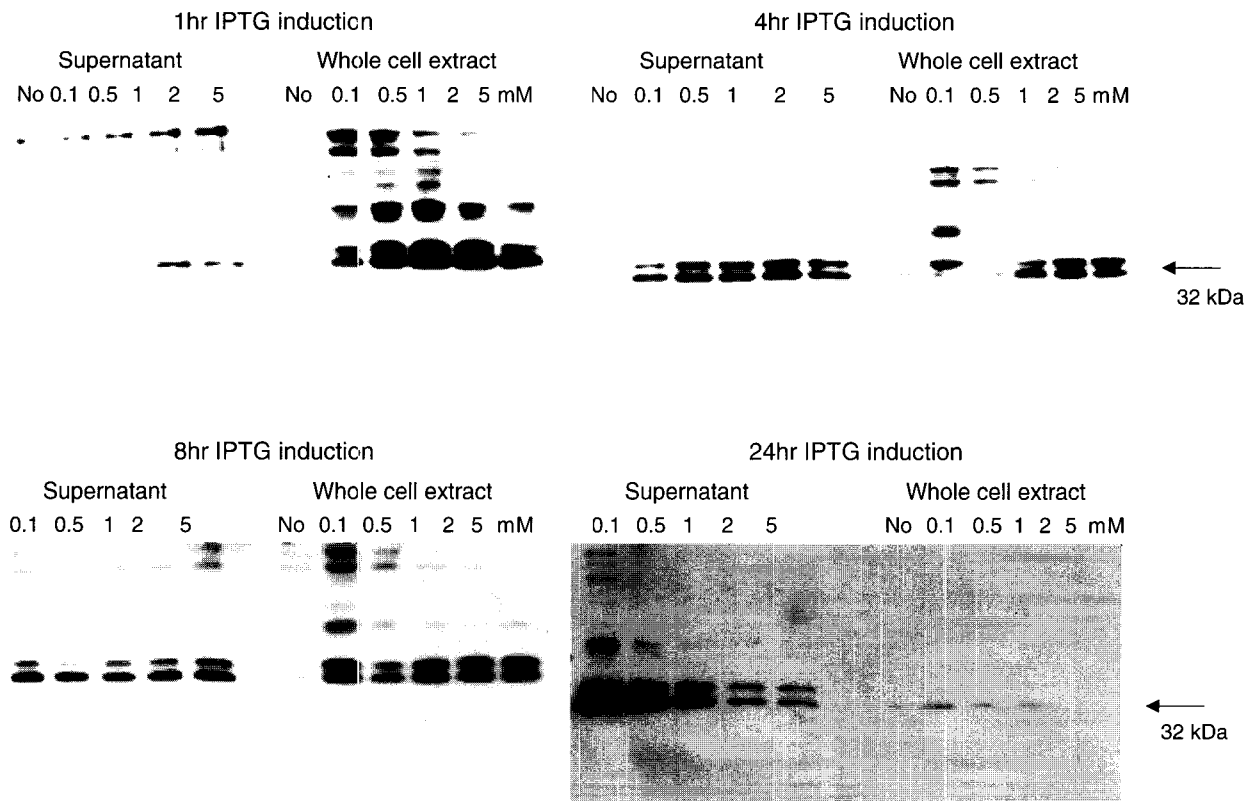


Fig. 4. Western blot analysis of protein expression profile after IPTG induction at various concentration of IPTG and incubation time (1, 4, 8, 24h) with shaking at 250 rpm.

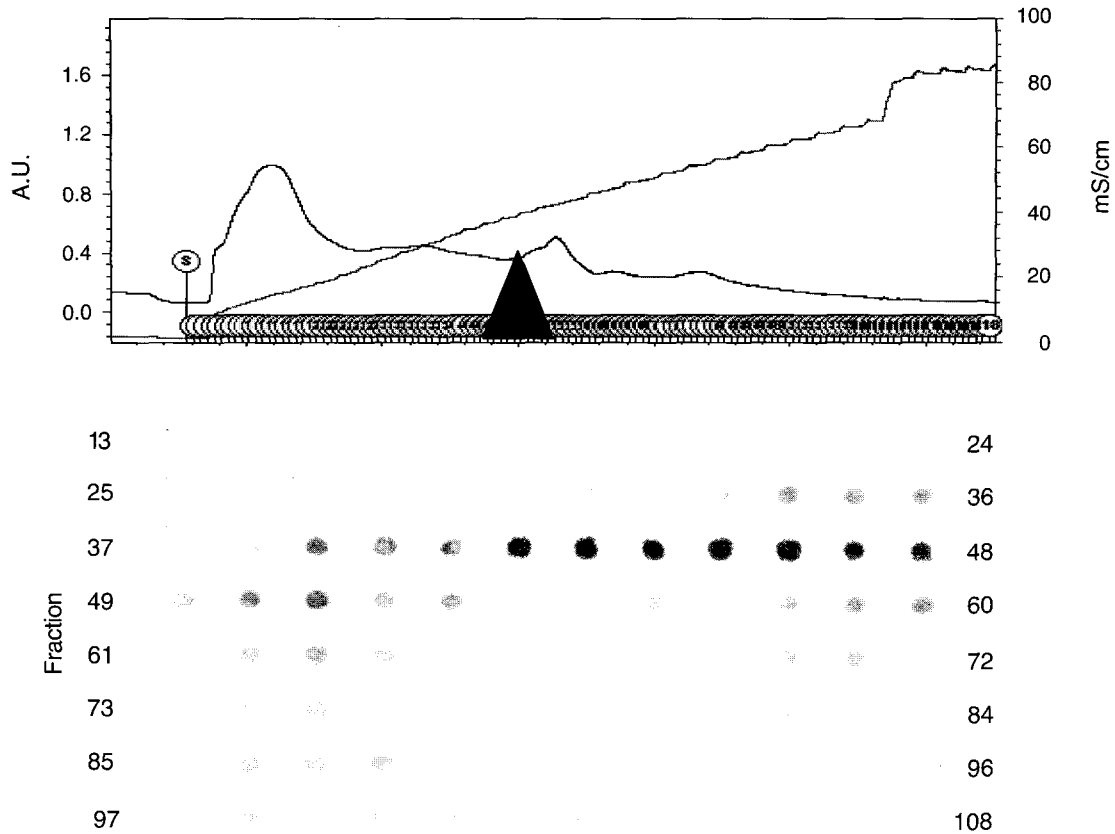


Fig. 5. Purification and characterization of scFv lym-1. A), High Q column chromatography of cultured soluble scFv lym-1. cultured supernatant was applied on a High Q column; proteins were eluted with a NaCl gradient (0~1 M) and 4 ml fractions were collected. B), Dot blot of samples at each fractions of NaCl elution using anti-E tag antibody, positive dot were shown from 34 fraction to 48 fraction (34~39 mS/cm; 0.3~0.4 M NaCl).

작용하여 phagemid 발현시 p3의 연결이 끊어져 용해성 scFv lym-1이 대량 발현하는 *E. coli* HB2151 균주 감염에 사용하였다. ScFv lym-1 recombinant phage 감염으로 scFv lym-1 gene이 형질전환된 *E. coli* HB2151을 SOBAG-N 평판배지에 접종하여 배양하였다. 평판배지에 집락이 발생한 것을 골라 2×YT-AG 배양액에 접종배양하고, IPTG로 scFv lym-1의 생산을 유도하였다. IPTG 농도와 배양조건의 변화에 따라 scFv lym-1의 생산량의 변화를 확인하였다. 조건들 중에서 IPTG 농도의 영향이 가장 크게 나타났으며, IPTG 첨가 후 배양시간 경과에 따라 생산되는 경향을 확인하였다 (Fig. 4). 여러 조건 중에서 1 mM IPTG 농도에서 30℃, 250 rpm 진탕하며 5~6시간 정도 유도하는 것이 가장 적합하였다. 5~6시간 이상을 배양할 경우 분리되는 상층액과 periplasmic extract 등의 점도가 너무 높아 취급이 어려워졌다. 수용성 scFv lym-1을 정제하기 위하여 ion exchange와 affinity chromatography를 수행하였다. Strong anionic exchange chromatography를 실시하여 0에서 1 M NaCl buffer로 용출하여 4 ml씩 수집하여 각 fractions를 dot blot를 실시하여 확인한 결과, NaCl 농도 구배

에서 0.3~0.5 M에 걸쳐 용출되는 것을 확인하였다 (Fig. 5). Anti-E tag antibody affinity column을 실시하여 다시 한번 정제하였다 (Fig. 6). Raji cell에 대한 면역반응성을 평가하기 위하여 Raji cell이 도말된 slide에서 immunocytochemistry를 실시하였다. 모항체인 IgG lym-1에 비해 낮은 발색을 나타내었다 (Fig. 7).

고 찰

재조합 항체는 연구 분야에서 체외 검사에서 polyclonal과 monoclonal 항체를 대신하여 응용되고 있다. scFv 형태의 유전자 재조합 항체단편들이 immunoassay에서 유리한 점은 constant domains이 존재하는 완전한 IgG 형태에 비해 비특이 결합이 적기 때문이다³⁴⁾. 대장균을 이용한 재조합 항체의 생산은 비용 면에서 많은 장점을 가지고, 또한 효소면역측정의 경우 항체의 재조합시 strep tag, His tag이나 발색효소의 유전자를 연결하여 생산하면 전통적인 효소 결합 polyclonal 항체의 사용이 필요 없기 때문이다^{20,23,24,26,32)}. 항체 DNA를 gene

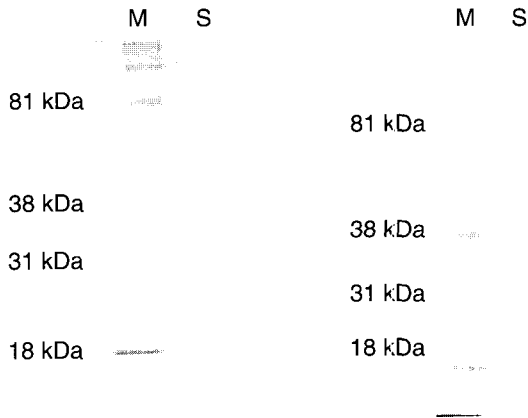


Fig. 6. SDS-PAGE and Western blot analysis of purified scFv lym-1 by affinity column. **A**, The gel was stained with Coomassie G250 stain. **B**, scFv lym-1 was probed with anti-E tag antibody and rabbit anti-mouse IgG-conjugated peroxidase. Lanes: M, molecular weight marker standard; S, purified fraction by affinity column.

III의 5' end에 삽입하여 표면에 항체가 발현된 phages를 제조하기 위하여 phagemid DNA가 선택되었는데, phagemid는 phage DNA의 절반의 크기를 가지기 때문에 bacteria로의 형질전환의 효율이 높기 때문이다²⁸⁾. Bacteriophage의 protein pIII은 두개의 기능성 domains으로 이루어진 가변적 구조로 다른 물질에 접근이 용이한 모양이다. N 말기에는 감염시 bacteria의 F pilus에 결합하는 domain이고, C 말기 domain은 virions에 연결되어 있다. Peptide를 발현시키고자 할 때, pIII의 두개 domains의 사이나 N 말기근처에 감염 기능과 구조의 변화 없이 삽입된다⁹⁾. 대부분의 재조합 단백질의 생산 시에 재조합 단백질은 균주 내에서 주로 inclusion body 발현되어 정제과정이 복잡해지는 단점이 있다^{4,25,50)}. 그러나 phage display의 장점 중 하나는 명확한 DNA를 추출해 내어 유전적 변성을 막을 수 있다는 것³³⁾과 수용성 단백질을 만드는 균주를 탐색하기 용이한 것이다.

본 실험에서도 1 mM IPTG 30°C 진탕배양조건에서 4시간 이후부터 배양상층액으로 재조합 단백질이 배출되었으며, periplasmic extract와 세포질로 수용성 재조합 단백질이 다량 방출되는 것을 확인하였다 (Fig. 4). 배양온도 조건에서는 37°C 이하에서 배양하여야 올바른 folding과 안정성을 가지는 단백질이 만들어 진다고 한다⁸⁾. 배양상층액으로 배출되는 양보다는 periplasmic extract와 세포질 내에서 높은 농도로 회수할 수 있었으나, mg단위의 양으로 얻기 위해서는 많은 양의 배양이 요구된다. 현재, 항체를 이용한 약품개발에서 해결하여야 하는 가장 큰 문제점은 대량생산과 정제법으로 대부분의 경우 항체의 생산을 위해서는 *E. coli* 등의 prokaryote를 이용하는 방법, yeast, CHO 세포, transgenic animal, plant를

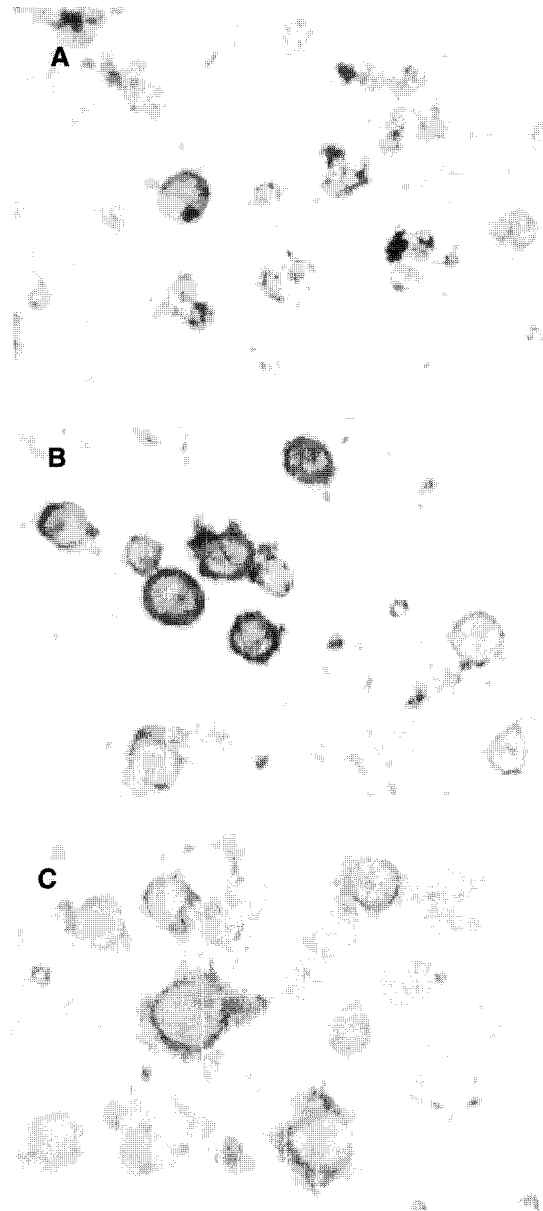


Fig. 7. Determination by immunochemical staining with DAB of antibody binding to fixed Raji cells. **(A)** control; **(B)** parent IgG lym-1; **(C)** soluble scFv lym-1.

이용하는 방법 등이 다양하게 이용되고 있다^{10,16)}. 대량생산을 위한 가장 가능성 높게 제시되는 방법은 tobacco, corn 등의 plant를 이용한 대량 생산이다. 식물에서 생산된 항체를 plantibody라고 부른다⁴⁷⁾. 이러한 방법이 빠른 시간 내에 범용화 되면 쉽고 싸게 항체를 대량생산 할 수 있을 것으로 예측된다. 일반적인 immunoglobulin G는 체내에서 느리게 제거되어 며칠의 시간이 흘러야 종양영양이 최적화되며 효소 처리 또는 유전자 재조합에 의해 만들어진 항체단편 Fab'들은 IgG 보다 체내에서 빠르게 제거되어 영상을 통한 종양구별

진단이 짧은 시간 내에 가능하다고 알려져 있다⁹⁾. 암세포의 표면항원에 대한 항체를 이용한 치료는 치료용 방사성동위원소를 표지할 수 있는 항체를 의약품으로 인정받으면서 더욱 그 진가를 발휘하고 있다. 암세포의 표면항원에 대한 치료용 방사성 동위원소가 표지된 항체를 이용한 치료는 임상적 유용성이 입증되었다¹⁹⁾. Fig. 7에서와 같이 scFv lym-1의 면역반응성은 IgG lym-1에 비해 낮게 나타났다. ScFv 자체는 IgG에 비해 면역반응성이 100배 정도 떨어지는 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 이러한 이유로는 scFv의 감지를 위해 추가된 tag이 적당한 신호로 잡히지 않는 것과 두개의 variable regions을 연결하는 linker의 존재가 항원에 결합하기 위한 최적의 구조를 오히려 방해하는 것으로 생각된다^{23,24)}. 이러한 단점을 보완하기 위해 항원 결합을 방해하지 않고, VH와 VL의 frameworks를 S-S 결합이 이루어지도록 cysteine을 인위적으로 삽입하는 방법이 있다⁶⁾. ScFv 자체가 가지는 장점을 유지하며 면역반응성을 유지하기 위해 scFv 두개가 연결된 형태인 diabody (Db)나, 여기에 Fc의 일부분을 연결한 형태로 scDb-Fc 등이 시도되고 있다^{1,39)}. 유전공학적으로 변형된 항체는 다양한 분야에서 응용된다. 항응고제, 암치료제, 자가면역질환, 면역억제제 등에 응용되었다^{3,7,29,37,42)}. 이상의 실험으로 phage display 방법을 이용하여 제조된 scFv lym-1은 모항체인 IgG lym-1의 항원을 가지는 Raji cell에 대하여 반응함을 알 수 있었다. 따라서, 유전자 재조합 기술을 응용하여 phage display를 이용한 scFv 제조는 중앙관관항원에 특이 결합하는 항체의 능력을 유지하며 다양한 항체를 이용한 약품개발에 적용될 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Alt M, Muller R and Kontermann RE (1999): Novel tetra-valent and bispecific IgG-like antibody molecules combining single-chain diabodies with the immunoglobulin γ 1 Fc or CH3 region. *FEBS Lett*, **454**: 90-94.
- Barth S, Huhn M, Matthey B, Tawadros S, Schnell R, Schinkothe T, Diehl V and Engert A (2000): Ki4(scFv)-ETA', a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice. *Blood*, **95**: 3909-3914.
- Bejcek BE, Wang D, Berven E, Pennell CA, Peiper SC, Poppe S, Uckun FM and Kersey JH (1995): Development and characterization of three recombinant single chain antibody fragments (scFvs) directed against the CD19 antigen. *Cancer Res*, **55**: 2346-2351.
- Berdichevsky Y, Lamed R, Frenkel D, Gophna U, Bayer EA, Yaron S, Shoham Y and Benhar I (1999): Matrix-assisted re-folding of single-chain Fv-cellulose binding domain fusion proteins. *Protein Express Purif*, **17**: 249-259.
- Breitling F, Dubel S, Seehaus T, Klewinghaus I and Little M (1991): A surface expression vector for antibody screening. *Gene*, **104**: 147-153.
- Brinkmann U, Chowdhury PS, Roscoe DM and Pastan I (1995): Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments. *J Immunol Methods*, **182**: 41-50.
- Caspar CB, Levy S and Levy R (1997): Idiotype vaccines for non-hodgkin's lymphoma induce polyclonal immune response that cover mutated tumor idiotypes: comparison of different vaccine formulations. *Blood*, **90**: 3699-3706.
- Chappel JA, He M and Kang AS (1998): Modulation of antibody display on M13 filamentous phage. *J Immunol Methods*, **221**: 25-34.
- Choi CW, Lang L, Lee JT, Webber KO, Yoo TM, Chang HK, Le N, Jagoda E, Paik CH and Pastan I (1995): Biodistribution of ¹⁸F- and ¹²⁵I-labeled anti-Tac disulfide-stabilized Fv fragments in nude mice with interleukin 2 alpha receptor-positive tumor exnografts. *Cancer Res*, **55**: 5323-5329.
- Davis GT, Bedzyk WD, Voss EW and Jacobs TW (1991): Single chain antibody (SCA) encoding genes: one-step construction and expression in eukaryotic cells. *Bio/Technology*, **9**: 165-169.
- DeNardo GL, O'Donnell RT, Shen S, Kroger LA, Yuan A, Meares CF, Kukis DL and DeNardo SJ (2000): Radiation dosimetry for ⁹⁰Y-2IT-BAD-Lym-1 extrapolated from pharmacokinetics using ¹¹¹In-2IT-BAD-Lym-1 in patients with non-hodgkin's lymphoma. *J Nucl Med*, **41**: 952-958.
- DeNardo SJ, DeNardo GL, Brush J and Carter P (1999): Phage library-derived human anti-TETA and anti-DOTA scFv for pretargeting RIT. *Hybridoma*, **18**: 13-21.
- Elsasser D, Valerius T, Repp R, Weiner GJ, Deo Y, Kalden JR, Van de Winkel JGJ, Stevenson GT, Glennie MJ and Gramatzki M (1996): HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with Bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulation factor. *Blood*, **87**: 3803-3812.
- Fack F, Hugle-Dorr B, Song D, Queitsch I, Petersen G and Bautz EKF (1997): Epitope mapping by phage display: random versus gene-fragment libraries. *J Immunol Methods*, **206**: 43-52.
- Froyen G, Ronsse I and Billiau A (1993): Bacterial expression of a single-chain antibody fragment (scFv) that neutralizes the biological activity of human interferon- γ . *Mol Immunol*, **30**:

- 805-812.
- 16) Gilliland LK, Norris NA, Marquardt H, Tsu TT, Hayden MS, Neubauer MG, Yelton DE, Mittler RS and Ledbetter JA (1995): Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments. *Tissue Antigens*, **47**: 1-20.
 - 17) Guirakhoo F, Catalan J, Monath T and Weltzin R (1996): Cloning, expression and functional activities of a single chain antibody fragment directed to fusion protein of respiratory syncytial virus. *Immunotechnology*, **2**: 219-228.
 - 18) Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends J and Roovers RC (1998): Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, **4**: 1-20.
 - 19) Juweid ME (2002): Radioimmunotherapy of B-cell non-hodgkin's lymphoma: from clinical trials to clinical practice. *J Nucl Med*, **43**: 1507-1529.
 - 20) Kerschbaumer RJ, Hirschl S, Kaufmann A, Ibl M, Koenig R and Himmler G (1997): Single-chain Fv fusion proteins suitable as coating and detecting reagents in a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Biochem*, **249**: 219-227.
 - 21) Kim DJ, Chung JH, Ryu YS, Rhim JH, Kim CW, Suh Y and Chung HK (2002): Production and characterisation of a recombinant scFv reactive with human gastrointestinal carcinomas. *Brit J Cancer*, **87**: 405-413.
 - 22) Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J and Pasqualini (1999): Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *J Nucl Med*, **40**: 883-888.
 - 23) Koo K, Foegeding PM and Swaisgood HE (1998): Construction and expression of a bifunctional single-chain antibody against *Bacillus cereus* Spores. *Appl Environ Microb*, **64**: 2490-2496.
 - 24) Koo K, Foegeding PM and Swaisgood HE (1998): Development of a streptavidin-conjugated single-chain antibody that binds *Bacillus cereus* spores. *Appl Environ Microb*, **64**: 2497-2502.
 - 25) Kuran C, Reist CJ, Foulon CF, Lorimer IAJ, Archer G, Pegram CN, Pastan Ira, Zalutsky MR and Bigner DD (1999): ¹²⁵I-labeled anti-epidermal growth factor receptor-VIII single-chain Fv exhibits specific and high-level targeting of glioma xenografts. *Clin. Cancer Res*, **5**: 1539-1549.
 - 26) Li Yi, Cockburn W and Whitlam GC (1998): Filamentous bacteriophage display of a bifunctional protein A:scFv fusion. *Mol Biotechnol*, **9**: 187-193.
 - 27) Marget M, Sharma BB, Tesar M, Kretzschmar T, Jenisch S, Westphal E, Davarnia P, Weiss E, Ulbrecht M, Kabelitz D and Kronke M (2000): Bypassing hybridoma technology: HLA-C reactive human single-chain antibody fragments (scFv) derived from a synthetic phage display library (HuCAL) and their potential to discriminate HLA class I specificities. *Tissue Antigens*, **56**: 1-9.
 - 28) McCafferty J, Griffiths AD, Winter G and Chiswell DJ (1990): Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **348**: 552-554.
 - 29) McCafferty J and Glover (2000): Engineering therapeutic proteins. *Curr Opin Struc Biol*, **10**: 417-420.
 - 30) Merz DC, Dunn RJ and Drapeau P (1995): Generating a phage display antibody library against an identified neuron. *J Neurosci Meth*, **62**: 213-219.
 - 31) Mullaney BP and Pallavicini MG (2001): Protein-protein interactions in hematology and phage display. *Exp Hematol*, **29**: 1136-1146.
 - 32) Muller BH, Chevrier D, Boulain J and Guesdon J (1999): Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization. *J Immunol Methods*, **227**: 177-185.
 - 33) Muller BH, Lafay F, Demangel C, Perrin P, Tordo N, Flamand A, Lafaye P and Guesdon J (1997): Phage-displayed and soluble mouse scFv fragments neutralize rabies virus. *J Virol Methods*, **67**: 221-233.
 - 34) Navarro-Teulon I, Peraldi-Roux S, Bernardi T, Marin M, Piechaczyk M, Shire D, Pau B and Biard-Piechaczyk M (1995): Expression in *Escherichia coli* of soluble and M13 phage-displayed forms of a single-chain antibody fragment specific for digoxin: assessment in a novel drug immunoassay. *Immunotechnology*, **1**: 41-52.
 - 35) Nie Y, He F, Li Z, Wu K, Cao Y, Chen B and Fan D (2002): Identification of tumor associated single-chain Fv by panning and screening antibody phage library using tumor cells. *World J Gastroentero*, **8**: 619-623.
 - 36) Nilsson F, Tarli L, Viti F and Neri D (2000): The use of phage display for the development of tumour targeting agents. *Adv Drug Deliver Rev*, **43**: 165-196.
 - 37) Peter K, Graeber J, Kipriyanov S, Zewe-Welschhof M, Runge MS, Kubler W, Little M and Bode C (2000): Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fusion protein with fibrin targeting and thrombin inhibition after activation by factor Xa. *Circulation*, **101**: 1158-1164.
 - 38) Poon K, Tam FC, Chui Y and Lim P (2002): Single-chain Fv fragment lacks carrier specificity of the native antibody. *Mol*

- Immunol*, **39**: 19-24.
- 39) Powers DB, Amersdorfer P, Poul MA, Nielsen UB, Shalaby MR, Adams GP, Weiner LM and Marks JD (2001): Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods*, **251**: 123-135.
 - 40) Reilly RM, Sandhu J, Alvarez-Diez TM, Gallinger S, Kirsh J and Stern H (1995): Problems of delivery of monoclonal antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions. *Clin Pharmacokinet*, **28**: 126-142.
 - 41) Rodenburg CM, Mernaugh R, Bilbao G and Khazali MB (1998): Production of a single chain anti-CEA antibody from the hybridoma cell line T84.66 using a modified colony-lift selection procedure to detect antigen-positive scFv bacterial clones. *Hybridoma*, **17**: 1-8
 - 42) Shibata Y, Kurihara K, Takiguchi H and Abiko Y (1998): Construction of a functional single-chain variable fragment antibody against hemagglutinin from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, **66**: 2207-2212.
 - 43) Sidhu SS (2000): Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotech*, **11**: 610-616.
 - 44) Stone MJ (2001): Monoclonal antibodies in the prehybridoma era: a brief historical perspective and personal reminiscence. *Clin lymphoma*, **2**: 148-154.
 - 45) Stolz J, Ludwig A and Sauer N (1998): Bacteriophage lambda surface display of a bacterial biotin acceptor domain reveals the minimal peptide size required for biotinylation. *FEBS Lett*, **440**: 213-217.
 - 46) Thirion S, Motmans K, Heyligen H, Janssens J, Raus J and Vandevyver C (1996): Mono- and bispecific single-chain antibody fragments for cancer therapy. *Eur J Cancer Prev*, **5**: 507-511.
 - 47) Valdes R, Gomez L, Padilla S, Brito J, Reyes B, Alvarez T, Mendoza O, Herrera O, Ferro W, Pujol M, Leal V, Linares M, Hevia Y, Garcia C, Mila L, Garcia O, Sanchez R, Acosta A, Geada D, Paez R, Luis-Vega J and Borroto C (2003): Large-scale purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants. *Biochem Biophys. Res Commun*, **308**: 94-100.
 - 48) Wiseman GA, White CA, Stabin M, Dunn WL, Erwin W, Dahlborn M, Raubitschek A, Karvelis K, Schultheiss T, Witzig TE, Belanger R, Spies S, Silverman DHS, Berlflein JR, Ding E and Grillo-Lopez AJ (2000): Phase I/II 90Y-zevalin (yttrium-90 ibritumomab tiuxetan, IDEC-Y2B8) radioimmunotherapy dosimetry results in relapsed or refractory non-hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med*, **27**: 766-777.
 - 49) Wurflein D, Dechant M, Stockmeyer B, Tutt AL, Hu P, Repp R, Kalden JR, Van de Winkel JGJ, Epstein AL, Valerius T, Glennie M and Gramatzki (1998): Evaluating antibodies for their capacity to induce cell-mediated lysis of malignant B cells. *Cancer Res*, **58**: 3051-3058.
 - 50) Yi K, Chung J, Kim H, Kim I, Jung H, Kim J, Choi I, Suh P and Chung H. (1999): Expression and characterization of anti-NCA-95 scFv (CEA 79 scFv) in a prokaryotic expression vector modified to contain a sf1 and not1 site. *Hybridoma*, **18**: 243-249.
 - 51) Yuan Q, Clarke JR, Zhou H, Linz JE, Pestka JJ and Hart LP (1997): Molecular cloning, expression, and characterization of a functional single-chain Fv antibody to the Mycotoxin Zearalenone. *Appl Environ Microbiol*, **63**: 263-269.