

## 형광 물질 직접 표지를 위한 Poly Lysine 도입 Lym-1 단일사슬 항체의 제조 및 면역반응성 평가

한국원자력의학원 분자영상연구부<sup>1</sup>, 핵의학과<sup>2</sup>  
정재호<sup>1</sup> · 최태현<sup>1</sup> · 우광선<sup>1</sup> · 정위섭<sup>1</sup> · 강주현<sup>1</sup> · 정수영<sup>2</sup> · 최창운<sup>1,2</sup> · 임상무<sup>1,2</sup> · 천기정<sup>1,2</sup>

### Production and Evaluation of Immunoreactivity of Poly Lysine-Tagged Single Chain Fragment Variable (ScFv) Lym-1 Antibody for Direct Conjugation to Fluorescence Dye

Jae Ho Jung, M.S.<sup>1</sup>, Tae Hyun Choi, Ph.D.<sup>1</sup>, Kwang Sun Woo, B.S.<sup>1</sup>, Wee Sup Chung, B.S.<sup>1</sup>, Joo Hyun Kang, Ph.D.<sup>1</sup>, Su Young Jeong, M.D.<sup>2</sup>, Chang Woon Choi, M.D.,Ph.D.<sup>1,2</sup>, Sang Moo Lim, M.D.,Ph.D.<sup>1,2</sup>, and Gi Jeong Cheon, M.D.,Ph.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Imaging Research Center and <sup>2</sup>Department of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), Seoul, Korea

**Purpose:** Small size of recombinant scFv antibody has many advantages such as rapid blood clearances and improved targeting antibodies to tumor region. On the other hand owing to small size, number of amino group is insufficient in conjugation with chelator and fluorescence labeling. This study is to introduce poly lysine tag to the C-terminal end of scFv lym-1 sequence for fluorescence chelator conjugation. **Materials and Methods:** Poly lysine scFv lym-1 gene, cloned into pET-22b (+) vector, was expressed in E. coli BL21 (DE3) strain. Antibody purification was performed with Ni-NTA column and then size exclusion column chromatography. Expression and purification levels of poly lysine tagged scFv lym-1 antibody were confirmed by western blot analysis. I-124, I-125, I-131 and Tc-99m were used for radiolabeling of purified poly lysine scFv lym-1. Flow cytometry analysis of FITC conjugated poly lysine scFv lym-1 was performed for confirmation of immunoreactivity of human Burkitt's lymphoma cells. **Results:** Poly lysine scFv lym-1 antibody was purified through two steps and identified as molecular weight of 48 KDa. Radiolabeling yields of I-124, I-125, I-131 and Tc-99m into poly lysine scFv lym-1 were >99%, >99%, >95% and >99%, respectively. Flow cytometry analysis of poly lysine scFv and scFv lym-1 was showed similar immunoreactivity to human Burkitt's lymphoma cells. **Conclusion:** Poly lysine tag was useful for the sufficient number of amino groups to scFv lym-1 antibody for chelator conjugation with minimizing loss of immunoreactivity. (Nucl Med Mol Imaging 2009;43(5):487-494)

**Key Words:** Anti-B cell lymphoma antibody (Lym-1), single chain fragment variable (scFv), poly lysine tag

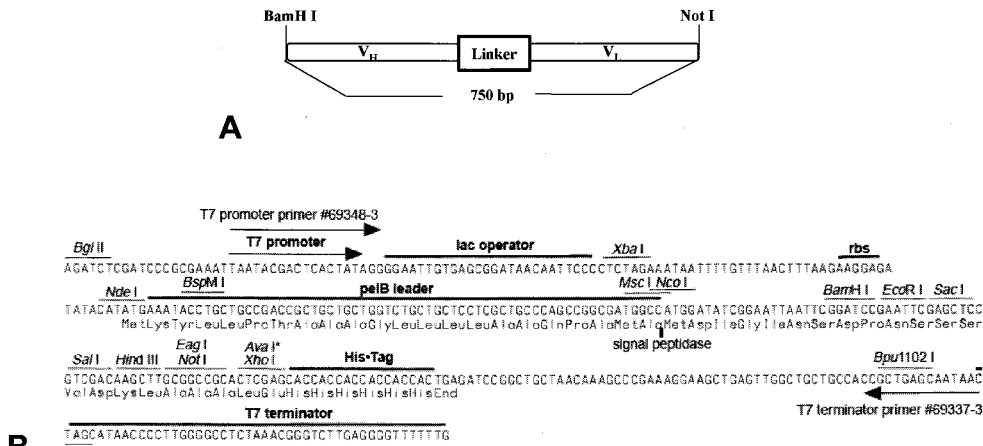
## 서 론

재조합 단일사슬 항체의 상업적 이용이 초기에는 주로

체의 진단 시약으로 사용되었으나 최근에는 종양세포의 체내 진단과 치료, 가축의 수태조절 및 질병 치료제 등으로 이용될 수 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>1)</sup> 이와 같이 단일사슬 항체의 이용이 단순한 체외 진단 시약뿐 아니라 체내 진단 시약 및 면역요법에 의한 치료제 등으로 이용됨에 따라 그 수요와 변형된 단일사슬 항체의 사용이 크게 증가하는 추세이다.<sup>2)</sup>

단일사슬 항체는 기존의 마우스 유래 항체에 비해 많은 장점을 가지고 있다. 빠른 혈중제거율, 종양 국소화의 향상, 인체 면역내의 항 마우스 항체 반응의 감소 등이 있으며 이는 항체에서 항원성이 큰 Fc 부위가 제거되었기 때문이다. 또한 분자 생물학적인 기법으로 단일사슬 항체의 구조를

• Received: 2009. 5. 11. • Revised: 2009. 7. 29.  
• Accepted: 2009. 8. 10.  
• Address for reprints: Gi Jeong Cheon, M.D. & Ph.D., Dept. of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), Seoul 139-706, Korea  
Tel: 82-2-970-1273, Fax: 82-2-970-1341,  
E-mail: larry@kcch.re.kr  
※ 이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 시행하는 한국과학재단의 연구지원 프로그램으로 시행하였음. (연구과제 관리코드: M20702010002-08N0201-00200)



**Figure 1.** ScFv lym-1 gene include BamH I and Not I restriction enzyme site and molecular weight of target gene is 750 bp (A). *E. coli* pET 22b (+) vector is comprised of T7 promoter for gene expression and His-Tag region for target protein purification (B).

변화시킴으로써 방사성동위원소와 형광물질 결합능을 향상시킬 수 있는 장점이 있다.<sup>3)</sup> 반면에 재조합 단일사슬 항체는 제조과정에서 수 많은 아미노산이 소실되기 때문에 다양한 형광물질 표지에 한계를 가지고 있다.

단일사슬 항체를 사용해 독소, 항암제, 방사성 동위원소 등을 결합시켜 암을 치료하려는 연구는 과거부터 시작되어 왔으나<sup>4)</sup> 항암제를 항체에 표지하기가 어렵고, 표지된 약물의 크기가 너무 크다는 문제가 있어 그 가능성이 희박하다고 이미 보고 되어있다.<sup>5)</sup> 단일클론 항체에 독소를 결합시키는 연구도 진행되어 왔으나 모든 종양세포에 항원이 균일하게 발현되어 있지 않다는 문제점과 일부 정상세포에서도 종양 항원이 존재하므로 정상세포마저도 사멸시키는 문제점을 갖고 있다.<sup>6)</sup>

방사성동위원소는 유전자 재조합을 통해 만들어진 단일사슬 항체에 표지가 가능하고 빠른 혈중 대사로 인해서 단시간에 종양을 진단할 수 있다. 또한 치료용 방사선인 베타선은 그 비정기 수 mm이기 때문에 항원이 불균일하게 발현된 종양에서도 그 주위의 암세포까지 파괴시킨다는 장점이 있어 적절한 항암 치료제로서의 가능성을 가지고 있다.<sup>6,7)</sup> 하지만 분자생물학적인 기법을 응용하여 작은 크기의 단일사슬 항체를 재조합하고 다양한 방사성동위원소 표지를 용이하게 하기 위한 적당한 아미노산을 도입하는 과정이 선행되어야 한다.

항원인 HLA-DR에 특이적으로 결합하는 항 B 세포 림프종 항체인 lym-1은 HLA-DR이 과다 발현되어 있는 악성 림프종을 선택적으로 공격하여 치료 효과를 유도할 수 있다.

이 연구에서는 대장균에서 재조합하고 생산하여 정제한 scFv lym-1 항체에 광학영상용 형광물질의 직접표지를 위한 4개 잔기의 라이신 아미노산 키레이터를 도입하고 다양한 동위원소의 표지수율을 점검한 뒤 종양세포에 대한 면역반응성을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. Poly lysine 도입 scFv lym-1 유전자의 재조합

ScFv lym-1 항체의 목적유전자는 pCANTAB 5E의 Sfi I과 Not I 부위에 클로닝 된 유전자를 사용하였으며,<sup>3)</sup> 발현된 항체의 정제를 용이하게 하기 위해 사용한 발현벡터는 여섯 개의 히스티딘을 포함하고 있는 pET-22b (+) (Novagen, Germany)를 사용하였다. pET-22b (+)는 Not I과 BamH I으로 절단하였으며, 4 개의 라이신 아미노산을 코딩하고, Not I과 BamH I 절단부위를 포함하는 scFv lym-1 유전자를 만들기 위해 새로운 프라이머를 제작하였다. PCR을 통해 증폭된 유전자(750 bp)를 Not I과 BamH I으로 처리하고 정제한 후, pET-22b (+) 벡터에 삽입하였다.<sup>8)</sup> (scFv poly lysine lym-1 VH-sense primer: 5'-CGGGAT CCTTACCCGGCCATGGCCCAGGT-3', scFv poly lysine lym-1 VL-antisense primer: 5'ATTTGCGCCGCCGCTTTTATTTC CAGTTCT TCTTCTTC-3')

### 2. Poly lysine scFv lym-1 유전자의 발현

Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 이용한 poly lysine scFv lym-1 유전자의 발현은 Smith 등<sup>9)</sup>의

방법을 변형하여 실시하였다. 재조합 유전자를 *Escherichia coli* BL21 (DE3)에 형질전환 시킨 후, ampicillin (50 ug/mL)을 포함하고 있는 2X YT배지에 접종하여 밤새 배양하였다. 다음날 동일 배지에 배양액 1%를 접종하고, 37°C, 250 rpm에서 대수 증식기( $OD_{595} = 0.6$ )까지 배양하였다. 여기에 각각 0.1, 0.5, 1, 2 mM IPTG 를 첨가하고, 시간대 별로 관찰하여 재조합 유전자 발현의 최적 IPTG 농도와 시간 조건을 확인하였다. 발현 단백질의 농도 확인은 Bradford<sup>10)</sup> 분석법을 이용하였다. 이때 표준곡선의 작성은 우혈청알부민 사용하였다.

### 3. Poly lysine scFv lym-1 항체의 분리 정제

재조합 *Escherichia coli* BL21 (F omp T hsdSβ (r<sub>p</sub>-m<sub>p</sub>) [*gal dcm* (DE3)] 균주가 생산하는 poly lysine scFv lym-1 항체는 periplasmic에서 고농도 sucrose 용액을 사용하는 osmotic shock 법으로 분리하였다. 1 mM IPTG를 포함하는 2× YT배지에서 배양한 균체를 회수하여 1× TES 완충 용액 1.5 mL에 현탁하였다. 0.2× TES 완충용액 1.125 mL을 첨가하고 강하게 섞어준 뒤, 0°C에서 30분 동안 반응하였다. 1,500 g에서 20 분 동안 원심분리한 후 상층액을 회수하였다.<sup>11)</sup> Poly lysine scFv lym-1 항체의 정제는 Ni-NTA column (HisTrap<sup>™</sup> HP Kit, Amersham Biosciences Co.) 과 size exclusion column (Centricon YM-30, MilliporeCo.)을 사용하였다.<sup>12-18)</sup> 정제된 항체의 확인은 10% SDS poly acrylamide gel 단백질 전기영동법과 western blot 분석을 시행하였다.<sup>19)</sup>

### 4. 면역반응성 측정

재조합 된 poly lysine scFv lym-1 항체의 면역반응성은 유세포계측기를 사용하여 측정하였다. 사람 버킷 림프종 세포주인 Raji (ATCC No. CCL-86)  $1 \times 10^6$  / mL를 준비하여 50 μl씩 튜브에 넣었으며, 대조군으로 FITC 결합 anti-mouse IgG antibody를 넣은 것, 재조합 된 poly lysine scFv lym-1과 anti-his tag antibody를 넣은 것을 실온의 암실 조건에서 30 분 동안 반응하였다. 최종적으로 유세포계측기 (Becton Dickinson, USA)를 사용하여 세포주의 종양항원에 대한 면역반응성을 확인하였다.<sup>20)</sup>

### 5. 방사성동위원소 표지

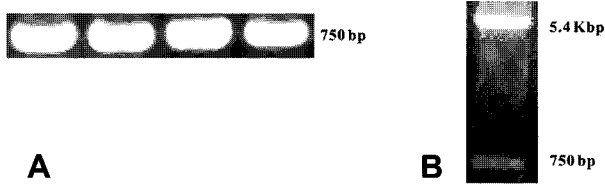
Tc-99m의 표지는 6-p-isothiocyanatobenzyl-diethylene-triamine penta-acetic acid (CITC-DTPA)를 사용하였다. CITC-DTPA는 70% 메탄올에 녹여 1 mM 농도로 만들었고, 환원제인 stannous tartrate는 15 mg을 농염산 20 μl로

녹인 후 아르곤 가스로 purging한 증류수를 첨가하여 1 mL로 맞추고 다시 50배 희석하여 1.6 mM 농도로 만들었다. 100 μl stannous tartrate와 185 MBq (5 mCi) Tc-99m을 혼합한 뒤 0.1 M sodium bicarbonate buffer로 pH 5.0으로 만들었다. 상온에서 30분 반응하였고, 0.5 mg/mL의 poly lysine scFv lym-1 CITC-DTPA 첨가하여 상온에서 30 분 반응하였다.<sup>22,23)</sup> 반응 후 표지 수율은 박막크로마토그래피 수행 후 TLC 스캐너를 이용하여 측정하였다. 방사성 동위원소 표지항체는 고정상으로 ITLC-SG를 이용하고 아세톤을 전개 용매로 사용하였고, 결합항체와 비결합항체의 R<sub>f</sub> 값으로 표지수율을 측정하였다.<sup>21)</sup> 방사성요오드의 표지는 Iodobead법을 사용하였다. Iodobead를 포함하는 튜브에 74 MBq (2 mCi)의 I-131또는 I-125, I-124등과 0.1 M phosphate buffer 100 μl (pH 6.5)를 혼합한 뒤 상온에서 15 분 반응하였다. 200 μg의 poly lysine scFv lym-1 항체를 각각 첨가하고 상온에서 30분간 반응한 후 위와 동일한 방법으로 표지수율을 확인하였다.<sup>24-27)</sup>

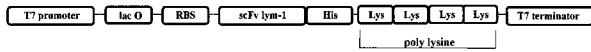
### 6. FITC 표지와 세포면역염색

0.5 mg/0.5 mL poly lysine scFv lym-1항체와 0.1 M borate buffer (pH 8.5) 0.5 mL을 혼합하고, 15 μl FITC (BD Biosciences, USA)를 첨가하여 실온의 암실 조건에서 2 시간 동안 반응하였다. 반응이 끝난 용액을 desalting 컬럼으로 정제하고, 280 nm와 495 nm에서 흡광도를 측정하여 결합유무를 확인하였다.<sup>28,29)</sup> FITC 표지 항체의 면역반응성은 세포 면역염색을 통해 현미경으로 확인하였다. 세포주는 사람 버킷 림프종 Raji cell을 사용하였고, lysine을 포함하지 않는 scFv lym-1 항체와 poly lysine을 포함하는 scFv lym-1항체를 대상으로 비교하였다. FITC가 표지 된 두 종류의 항체를 상온의 시험관내에서 1시간 동안 반응하였다. 현미경 관찰 전 casein blocker로 세포를 세척하였으며 반응에 사용한 모든 희석액은 casein blocker를 사용하였다.<sup>30-32)</sup>

**scFv유전자** BamH Not 750 bp의 scFv lym-1BamH Not ̄.BamH I과 Not I 제한효소로 절단된 5.4 Kb의 pET 22b (+) 유전자를 확인하였으며 scFv poly lysine lym-1 VH-sense와 scFv poly lysine lym-1 VL-antisense 프라이머를 사용한 PCR을 통해 양 말단이 BamH I과 Not I 사이트로 치환된 750 bp의 scFv lym-1 목적 유전자를 확보하였다(Fig. 2). T4 DNA ligase와 섞여 16°C에서 반응하여, 목적 유전자를 pET 22b (+)벡터에 재조합 하였으며 poly lysine scFv lym-1 유전자의 위치는 His Tag 의 N-말단 쪽이고, 재조합 플라스미드를 pET-KS-Lym-1으로 명명하였다. 재



**Figure 2.** Molecular weight of amplified poly lysine scFv lym-1 PCR product is 750 bp (A). pET-KS-Lym-1 plasmid is comprised of 5.4 Kbp pET 22b (+) vector and 750 bp poly lysine scFv lym-1 gene.



**Figure 3.** pET-KS-Lym-1 plasmid include 4-lysine amino acid (Lys) between histidine tag (His) and T7 terminator.

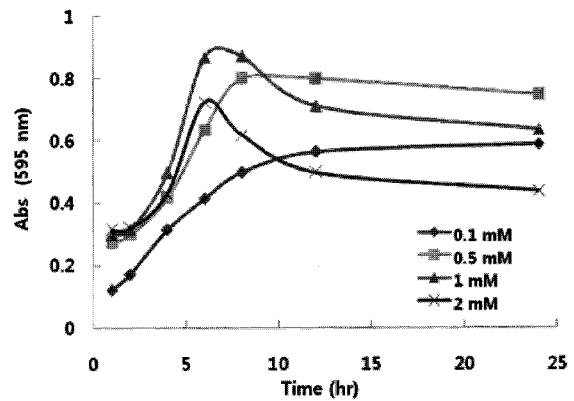
조합 poly lysine scFv lym-1 항체는 T7 프로모터로 발현율이 조절되고, pel B 사이트로부터 발현 단백체를 periplasmic space로 유도시키는 전형적인 pET 벡터의 구조를 갖고 있었다(Fig. 3).

### 2. Poly lysine scFv Lym-1 유전자의 발현

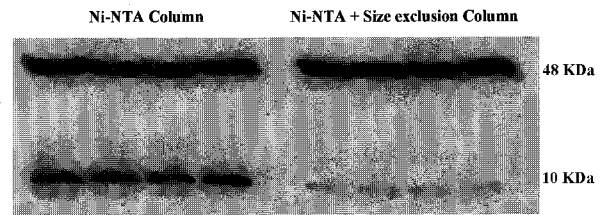
*Escherichia coli* BL21 (DE3)에 형질전환되어 T7 프로모터에 의해 발현이 조절되는 poly lysine scFv lym-1 유전자의 Isopropyl-beta-D-thiogalacto pyranoside (IPTG) 농도에 따른 발현율을 Fig. 4에 나타내었다. 0.1 mM IPTG 저농도 환경에서 발현율은 처리시간이 증가함에 따라 지속적으로 증가되었으며 0.5 mM IPTG 첨가시에는 8시간에서 최대 발현율( $OD_{595} = 0.88$ 이상)을 보인 후 조금씩 감소하는 경향을 보였다. 그러나 1 mM IPTG 조건의 최대 발현율에는 미치지 못하였으며 7 시간에 최대 발현율을 보인 1 mM 농도가 poly lysine scFv lym-1 유전자의 최적 발현 조건임을 확인하였다. 2 mM IPTG 고농도 조건에서는 그 발현율이 현저히 낮은 경향을 확인 할 수 있었다.<sup>33,34)</sup> IPTG 농도에 따라 발현이 조절되는 재조합 poly lysine scFv lym-1 항체는 전형적인 pET 벡터 발현과 일치하는 발현 양상을 확인할 수 있었다.

### 3. 재조합 항체의 분리 정제

유전자 재조합에 의해 여섯개의 히스티딘을 포함하는 poly lysine scFv lym-1 항체를 Ni-NTA 컬럼으로 정제하여 western blot 분석으로 확인한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Ni-NTA 컬럼으로 정제하여 약 48 KDa의 재조합 항체를 확인할 수 있었으나 자체적으로 히스티딘을 포함하는 10 KDa 크기의 목적하지 않은 단백질을 동시에 포함하고



**Figure 4.** Optimum expression condition of poly lysine scFv lym-1 is 1 mM IPTG concentration at 6 hour incubation time. Incubation condition is 250 rpm in 37°C shaking incubator.

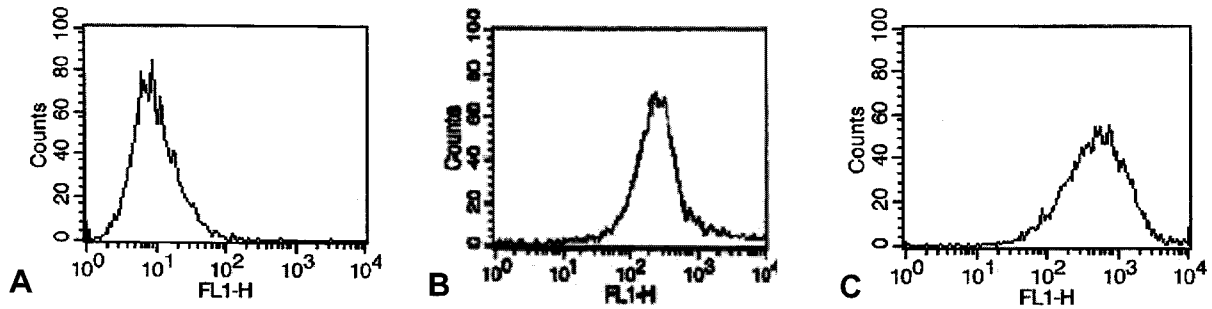


**Figure 5.** Purification of poly lysine scFv lym-1 antibody was used Ni-NTA and size exclusion column chromatography. Molecular weight of purify poly lysine scFv lym-1 antibody is about 48 KDa.

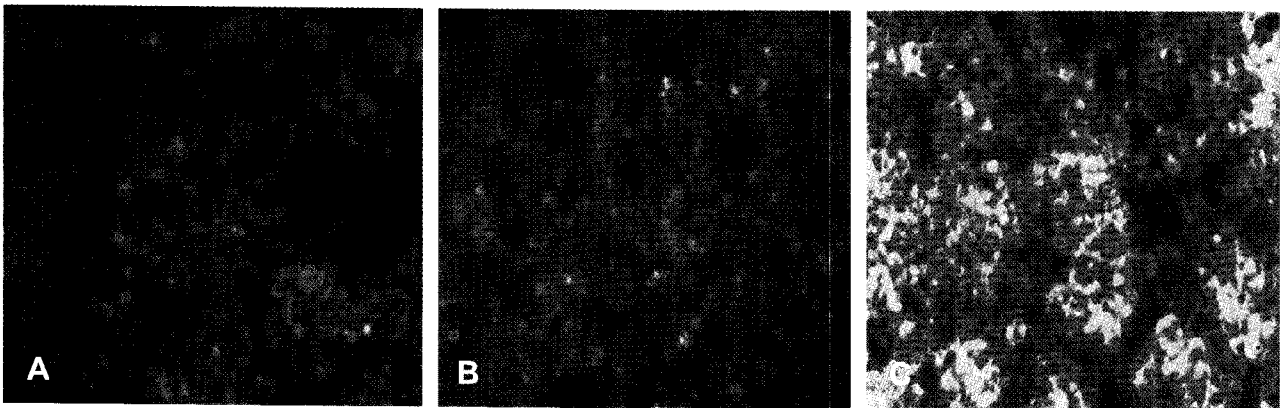
있었다. 10 KDa 크기의 불필요한 단백질을 제거하여 재조합 poly lysine scFv 항체의 정제 순도를 향상시키기 위하여 size exclusion 컬럼으로 2차 단백질 정제를 실시한 결과 10 KDa 크기의 불필요한 단백질을 대부분 제거할 수 있었고 목적하는 48 KDa의 재조합 항체밴드를 확인할 수 있었다.<sup>35)</sup>

### 4. 유세포 계측기에 의한 면역반응성 측정

Ni-NTA 와 size exclusion 컬럼을 통해 정제된 poly lysine scFv lym-1 항체와 사람 버킷 림프종인 Raji 세포주와의 면역반응성을 유세포계측기로 확인하여 Fig. 6에 나타내었다. 기존의 재조합 scFv lym-1 항체<sup>3)</sup>와 비교했을 때 매우 유사한 세포 특이적 결합력을 가지고 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 하이브리도마에서 생산되었던 IgG lym-1 항체와 본 논문에서 발현 정제한 poly lysine scFv lym-1 항체는 대등한 면역반응성을 가지고 있다.<sup>3)</sup>



**Figure 6.** Immunoreactivity of FITC conjugated scFv lym-1 antibody was confirmed flow cytometry analysis with Raji cells. : (A) Control, (B) FITC conjugated scFv lym-1, (C) FITC conjugated poly lysine scFv lym-1.



**Figure 7.** Fluorescence microscopic images shows FITC conjugated scFv lym-1 and poly lysine scFv lym-1 antibodies with human Burkitt's lymphoma Raji cells. : (A) Control, (B) scFv lym-1, (C) Poly lysine scFv lym-1

**Table 1.** Radiolabeling Yields of Purified Poly lysine scFv lym-1 Antibody with Various Radioisotope

	Radiolabeling Yields (%)			
	Tc-99m	I-124	I-125	I-131
Poly lysine scFv lym-1	>99	>99	>99	>95

### 5. 방사성동위원소 표지

두 번의 정제과정을 통해서 획득한 poly lysine scFv lym-1 항체에 방사성 동위원소를 표지한 결과를 Table 1에 표시하였다. CITC-DTPA를 사용한 Tc-99m의 재조합 항체 표지 수율은 99% 이상이었으며, 방사성 요오드의 표지 수율은 I-124와 I-125가 99% 이상, I-131은 95% 이상이었다.

### 6. FITC 표지와 세포면역염색

재조합 항체에 FITC를 직접 표지하고 desalting 컬럼으로 정제 및 분획화된 FITC-poly lysine scFv lym-1 항체의 형광강도를 분획 튜브별로 확인하였고, scFv lym-1 항체<sup>3)</sup>와 비교하여 Table 2에 나타내었다. Desalting 컬럼으로 정

제한 scFv lym-1과 poly lysine scFv lym-1 두 가지 재조합 항체 모두 4번 분획 튜브에서 각각 2,077과 18,759로 가장 높은 형광강도를 보였고, lysine 잔기를 포함하는 재조합 항체의 경우 그렇지 않은 항체에 비해 단위 단백질 양(mg) 당 최대 9배 이상의 높은 FITC 직접 표지능력을 가지고 있음을 확인하였다. FITC를 직접 표지한 재조합 항체를 사람 버킷 림프종인 Raji 세포주에 반응시키고 형광현미경으로 관찰한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Poly lysine 잔기를 포함하고 있는 재조합 항체가 그렇지 않은 항체와 비교했을 때 상대적으로 매우 강한 형광신호를 내고 있음을 형광현미경으로 확인할 수 있었으며 이는 형광강도를 측정하여 비교한 결과와 일치하였다(Table 2).

**Table 2.** Fluorescence Intensities of FITC Conjugated scFv lym-1 and Poly lysine scFv lym-1 Antibodies

Fraction No.	Fluorescence absorbance (Abs)	
	ScFv lym-1	Poly lysine scFv lym-1
1	37	33
2	38	37
3	1,100	2,679
4	2,077	18,759
5	654	5,589

## 고찰

4개의 lysine 잔기를 포함하는 scFv lym-1 유전자를 scFv poly lysine lym-1 VH-sense와 scFv poly lysine lym-1 VL-antisense 프라이머를 사용하여 PCR 반응으로 획득하였다. *Escherichia coli*에서 재조합된 poly lysine scFv lym-1 항체의 C-말단쪽에 6개의 히스티딘을 포함하고, 연이어 4개의 lysine 아미노산이 위치하는 구조였으며 BL21 (*F omp T hsdSβ* ( $r_{\beta}$ - $m_{\beta}$ ) [*gal dcm* (DE3)]에서 발현하고 T7 프로모터에 의해 단백질 발현율이 조절되는 전형적인 pET 벡터 시스템이었다(Fig. 3). 재조합 항체의 최적 발현 조건은 37°C, 250 rpm, 1 mM IPTG 농도에서 7 시간이었으며, 이 결과 역시 다른 pET 벡터 시스템의 단백질 발현 조건과 유사한 경향을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.<sup>33,34)</sup>

발현된 재조합 항체는 Ni-NTA 컬럼 정제를 통하여 약 48 KDa의 poly lysine scFv lym-1 항체의 밴드를 확인할 수 있었으나 동시에 약 10 KDa 크기의 원하지 않는 다른 단백질을 일부 포함하고 있었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 두 단백질 사이에 크기 차이를 이용한 size exclusion 컬럼으로 발현 항체를 재 정제하였고, 최종적으로 순수한 목적 항체만을 회수할 수 있었다. Poly lysine scFv lym-1 항체의 면역반응성은 기존의 scFv lym-1 항체<sup>3)</sup>와 유사한 능력을 가지고 있음을 FITC표지 후 유세포계측기 분석을 통하여 확인하였으며, 4개의 lysine 아미노산을 도입하는 과정에서 항체자체의 변형이나 면역반응성이 소실되지 않았음을 확인하였다. 정제된 재조합 항체에 여러가지 방사성 동위원소를 표지한 결과 95% 또는 99% 이상의 높은 표지 수율을 확인할 수 있었다.

또한 이 항체에 형광 염료인 FITC가 직접 표지가 가능함을 확인하였으며 표지효율은 poly lysine 잔기가 없는 scFv lym-1 항체<sup>3)</sup>와 비교 했을 때 9배 이상이었다. 즉 poly lysine이 도입된 scFv lym-1 항체가 mg 당 표지 된 FITC 분자수가 많기 때문에 추측된다. 이 결과는 재조합 scFv lym-1 항체에 lysine 잔기를 도입함으로써 FITC의 접합부

위가 증가한 것으로 사료되며 lym-1항체가 반응하는 세포 주와의 반응결과를 형광현미경으로 관찰한 결과 매우 강한 형광신호를 육안으로 확인하였다. 이러한 결과는 재조합 된 poly lysine scFv lym-1항체에 FITC를 직접 접합함으로써 flow cytometry를 이용한 유세포 계측 및 면역반응성 평가 시 기존의 primary 와 secondary 항체의 사용 없이 간단하게 측정할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 다른 형광 염료를 직접 접합하여 방사성동위원소의 사용 없이 면역반응성 측정이 가능하며 최종적으로는 광학영상장비를 사용해 소동물의 영상을 간편하게 할 수 있음을 시사하고 있다. 또한 양전자 또는 감마선을 방출하는 방사성동위원소를 동시에 표지하여 소동물 전용 양전자 단층촬영(small animal PET), 감마카메라, 단일광자방출단층촬영(SPECT) 그리고 광학영상을 동시에 수행할 수 있는 다중 영상제(multi modality imaging agent)로의 응용이 가능할 것으로 전망된다. 모항체인 IgG lym-1 유전자를 기반으로 4개의 lysine 아미노산이 도입된 poly lysine scFv lym-1 항체는 기존의 재조합 scFv 항체와 대등한 세포 면역반응성을 보였으며 다양한 방사성동위원소의 표지와 형광염료의 직접 접합이 가능하였다. 최종적으로 방사성동위원소와 형광염료를 동시에 접합하므로써 소동물용 다중 영상제(multi modality imaging agent)로 사용이 가능한 항 B세포 림프종 항체로서의 응용이 가능할 것으로 기대된다.

## 요약

**목적:** 작은 크기의 재조합 단일사슬 항체는 빠른 혈중 제거율과 중량의 항체 집적율이 증가되는 등의 장점을 가지고 있다. 반면에 항체의 작은 크기는 방사성 또는 형광물질의 표지를 위한 킬레이터 결합에 중요한 아미노산 그룹의 감소를 의미하기도 한다. 본 연구에서는 단일사슬 lym-1 염기서열 C-말단에 lysine 아미노산 태그를 삽입하여 형광물질의 직접표지 및 그 표지수율 증가를 확인하고자 하였다. **대상 및 방법:** 대장균 pET-22b (+) 벡터에 재조합 된 lysine 삽입 단일사슬 lym-1유전자는 대장균 BL21 (DE3)에 형질전환하여 발현하였다. 생산된 lysine lym-1 항체는 Ni-NTA 컬럼과 분자량 컬럼을 사용해 정제하였고, 단백질 전기영동과 western blot을 통해 확인하였다. lysine lym-1 항체에 방사성 동위원소인 I-124, I-125, I-131 과 Tc-99m를 표지하여 그 수율을 확인하였으며 유세포계측기를 사용해 형광물질인 FITC가 직접표지된 라이신 lym-1 항체의 면역반응성을 사람의 버킷 림프종 세포주인 Raji 세포주에서 면역반응성을 확인하였다. **결과:** Lysine 도입 단일사슬

lym-1 항체는 두 과정의 정제를 통하여 획득하였으며 그 크기는 약 48 KDa이었고, 방사성동위원소인 I-124, I-125, I-131과 Tc-99m의 표지수율은 각각 >99%, >99%, >95%, >99%로 확인되었다. 유세포계측을 통한 lysine 도입 단일사슬 lym-1항체의 면역반응성은 기존의 단일사슬 lym-1항체와 유사함을 확인하였다. 결론: 재조합 lym-1 항체에 형광 물질을 직접 표지하기 위한 lysine 아미노산의 도입은 항체의 면역반응성 감소를 최소화 시키면서 직접표지 수율을 증가시킬 수 있는 유용한 방법임을 확인하였다.

## Reference

- Klausner A. Taking aim at cancer with monoclonal antibodies. *Nat Biotechnol* 1986;4:185-94.
- Clark TJ. L'impact économique des anticorps monoclonaux. *Biofutur* 1986;44:121-33.
- Jung JH, Choi TH, Woo KS, Chung WS, Kim SG, Cheon GJ, et al. Production of the recombinant single chain anti-B cell lymphoma antibody and evaluation of immunoreactivity. *Nucl Med Mol Imaging* 2006;40:211-7.
- Pirker R, FitzGerald DJP, Willingham MC, Pastan I. Enhancement of the activity of immunotoxins made with either ricin a chain or pseudomonas exotoxin in human ovarian and epidermoid carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1988;48:3919-23.
- Sharkey RM, Kaltovich FA, Shin LB, Fand I, Govelitz G, Goldenberg DM. Radioimmunotherapy of human colonic cancer xenografts with Y-90 labeled monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1988;40:3270-5.
- Epenetos AA. Antibody guided irradiation of malignant lesions. *Lancet* 1984;30:1441-3.
- Order SE, Klein JL, Ettinger D, Alderson P, Siegelman S, Leichner P. Use of isotopic immunoglobulin in therapy. *Cancer Res* 1980;40:3001-7.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
- Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of poly peptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988;67:20-31.
- Shen B, Hutchinson CR. Deciphering the mechanism for the assembly of aromatic polyketides by a bacterial polyketide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;93:6600-4.
- Rathore AS, Bilbrey RE, Steinmeyer DE. Optimization of an osmotic shock procedure for isolation of a protein product expressed in *E. coli*. *Biotechnol Prog* 2003;19:1541-6.
- Jutta Drees, Jason Smith, Frank Schäfer Kerstin Steinert. *The QIA expressionist a handbook for high-level expression and purification of 6X His-tagged proteins*. Germany: QIAGEN GmbH, Hilden; 2002.
- Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT. *Current protocols in protein science*. New York: John Wiley and Sons; 1995.
- Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind RA, Nordheim A, Stunnenberg HG. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8972-6.
- Darby N, Creighton TE. *In Protein Stability and folding: Theory and Practice*. USA: Humana Press, Inc; 1995.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. *Current protocols in molecular biology Vol. 1*. New York: John Wiley and Sons; 1994.
- Goeddel DV ed. "Expression in mammalian cells." *Methods in enzymology. Vol. 185*. San Diego, California: Academic Press; 1991.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook MD. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- Mather SJ, Ellison D. Reduction-mediated Tc-99m labeling of mono clonal antibodies. *J Nucl Med* 1990;31:692-7.
- Hong MK, Jeong JM, Yeo JS, Kim KM, Chang YS, Lee YS, et al. In vitro properties and biodistribution of Tc-99m and Re-188 labeled monoclonal antibody CEA 79.2. *Korean J Nucl Med* 1988; 32:516-24.
- Mishra AK, Iznaga-Escobar N, Figueredo R, Jain VK, Dwarakanath BS, Pérez-Rodríguez R, et al. Preparation and comparative evaluation of <sup>99m</sup>Tc-labeled 2-iminothiolane modified antibodies and CITC-DIPA immunconjugates of anti-EGF-receptor antibodies. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;24: 653-61.
- Egan JA, Filer CN. Tritium labeling of the local anesthetic tetracaine via a polyhalogenated precursor. *J Radioanal Nucl Chem* 2003;10:1023-9.
- Tedder T, Boyd A, Freedman A, Nadler L, Schlossman S. The B cell surface molecule is functionally linked with B cell activation and differentiation. *J Immunol* 1985;135:973-9.
- Anderson KC, Bates MP, Slaughenhoupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 1984;63:1424-33.
- Press OW, Howell-Clark J, Anderson S, Bernstein I. Retention of B-cell-specific monoclonal antibodies by human lymphoma cells. *Blood* 1994;83:1390-7.
- Cardarelli PM, Quinn M, Buckman D, Fang Y, Colcher D, King DJ, et al. Binding to CD20 by anti-B1 antibody or F(ab')(2) is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:15-24.
- Muramoto K, Kamiya H, Kawachi H. The application of fluorescence in isothiocyanate and high-performance liquid chromatography for the microsequencing of proteins and peptides. *Anal Biochem* 1984;141:446-50.
- Pachmann K, Reinecke K, Emmerich B, Thiel E. Highly fluorochrome labeled gene probes for quantitative tracing of RNA in individual cells by *in situ* hybridization. *Bioconjugate Chem* 1991;2:19-25.
- Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrikson SE, et al. ZAP-70 Expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944-51.
- Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100:4609-14.
- Knapp W, Strobl H and Majdic O. Flow Cytometric analysis of cell surface and intracellular antigen in leukemia diagnosis. *Cytometry (Communication in clinical cytometry)* 1994;18:187-98.

33. Carrio MM, Antonio Villaverde. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Lett* 2001;489:29-33.
34. Carrio MM, Villaverde A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion Bodies. *J Biotech* 2002;96:3-12.
35. Mouneimne H, Juvin M, Beretti JL, Azoulay-Dupuis E, Valle E, Geslin P, et al. Western blot analysis of antibody response to pneumococcal protein antigens in a murine model of pneumonia. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 1997;4:778-82.