

보 문

인간의 급성 비임파성 백혈암세포(HL60)의 표면항원에 결합하는 재조합 single-chain Fv (ScFv)의 개발

김철홍¹ · 한승희¹ · 김형민¹ · 한재용² · 임명운³ · 김진규^{1*}

¹창원대학교 자연과학대학 미생물학과, ²서울대학교 농업생명과학대학 농생명공학부, ³(주)중검 생명공학연구소

The development of murine recombinant single-chain variable domain fragment (ScFv) specific to acute non-lymphocytic leukemia (ANLL) cell line HL60

Cheol Hong Kim¹, Seung Hee Han¹, Hyeong Min Kim¹, Jae Yong Han², Myeong Woon Lim³, and Jin-Kyoo Kim^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Changwon National University, Changwon 641-773, Republic of Korea

²Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea

³Joonggyeom: Antibody Therapy Inc., Ansan 128-33, Republic of Korea

(Received April 21, 2015; Accepted May 29, 2015)

ABSTRACT: A monoclonal antibody AP64 IgM binds to human acute nonlymphocytic leukemia (ANLL) cell line HL60 and also cross-reacts with the homologous antigen in a rat ANLL cell. This antibody mediated by complement, has leukemia a suppression effect. In this study, we generated a recombinant single-chain variable domain fragment (ScFv) which were derived from V_H and V_L cDNA of AP64 IgM-secreting hybridoma by RT-PCR. The two variable regions were joined with a single 15 amino acid linker (G₄S)₃. This recombinant ScFv was expressed as a single polypeptide chain from *Escherichia coli* BMH 71-18. The recombinant ScFv was purified by applying the periplasmic extract to Ni²⁺-NTA-agarose affinity column and detected with westernblot. The purified recombinant ScFv recognized a surface antigen (about 30 kDa) of HL60 cell line which is the same antigen detected by parental AP64 IgM. But the affinity of ScFv for a surface antigen of HL60 was lower than that of the parental AP64 IgM, which needs to be further improved. Overall, the recombinant ScFv specific to HL60 might be a useful bioreagent for either diagnostic or therapeutic purposes.

Key words: human acute nonlymphocytic leukemia, HL60, IgM, Ni²⁺-NTA-agarose, single-chain Fv, westernblot

항체공학에서는 주로 재조합된 항체단편의 생산을 목적으로 하고 있으며 재조합 항체기술에서 주로 사용하는 항체단편은 Fv, ScFv, Fab, Fc 등이 있다(Fig. 1B). 그 중에서 재조합 Fab와 Fv, ScFv는 주로 항원에 대한 항체의 항원결합부위에 관한 연구에 사용되고(Hayden *et al.*, 1997; Verma *et al.*, 1998), Fc는 항체의 효과(effector)기능 연구에 사용된다(Kim *et al.*, 1994a, 1994b). 즉 유전자 조작 및 hybridoma 제조기술을 바탕으로 항체공학기술이 발전함에 따라, 항체의 기능부위단편

(예, V_H and V_L)만을 클로닝하여 대장균 등의 숙주에서 성공적으로 발현시킬 수 있게 되었다. 1988년 항체공학에 의한 최초의 재조합 Fv (variable domain fragment) 단편의 대장균 내 발현이 이루어졌는데(Fig. 1B), phosphocholine 항원에 대한 항체단편 V_H와 V_L 유전자를 클로닝하여 대장균에서 발현시킨 결과 모항체와 동일한 항원결합력을 가진 Fv를 생산하게 된 것이다(Skerra and Plückthun, 1988). 그러나 Fv는 약한 비공유결합에 의하여 V_H와 V_L이 쉽게 분리되기 때문에 안정성에 문제가 있는 것으로 드러났다(Huston *et al.*, 1991; Reiter *et al.*, 1995). 따라서 안정한 Fv를 만들기 위해 linker DNA를 이용하여 V_H와 V_L 유전자를 서로 연결시킨 재조합 Fv 항체 단편

*For correspondence. E-mail: jkkim@changwon.ac.kr;
Tel.: +82-55-213-3485; Fax: 82-55-213-3480

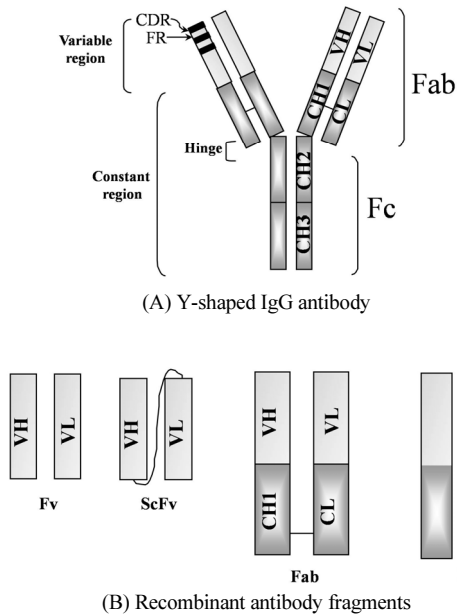


Fig. 1. Schematic diagram of IgG antibody (panel A) and its recombinant antibody fragments (panel B).

을 단일사슬 Fv 단편(single chain Fv fragment: ScFv)으로 발현시키게 되었다(Fig. 1B). 최초의 ScFv는 강심제 및 이노제로 사용되는 digoxin에 대해 특이성을 가지는 항체로 제조되었다(Huston *et al.*, 1988). 약 26 kDa의 이 ScFv는 $(GI_4Ser)_3$ 으로 구성된 15개의 아미노산으로 구성된 linker 펩타이드가 V_H 와 V_L 을 연결하는데 사용되었으며 대장균에서 발현되었다(Huston *et al.*, 1988). 일반적인 IgG 항체(약 150 kDa)에 비해 ScFv는 크기가 작고(약 25–30 kDa), Fc 수용체(Fc receptor)에 결합하는 Fc 부위가 없기 때문에 생체 내 확산속도가 IgG나 Fab 보다 더 빠른 것으로 보고되고 있으며(Huston *et al.*, 1991), 또한 Fc 부위의 결핍으로 인해 혈청 내 대사적 안정성(catabolic stability)이 낮아서 혈청 내에서 빠르게 제거되어 치료용 항체의 문제점인 면역원성이 낮아 치료용 항체로서의 장점을 가지고 있다(Chadd and Chamow, 2001; Batra *et al.*, 2002).

HL60는 골수성 백혈암세포에 속하는 혈액종양세포로서, 인간의 급성 비림파성 백혈암(human acute non-lymphocytic leukemia: ANLL) 세포이다. HL60를 쥐에 면역화시켜 HL60의 세포표면단백질을 인식하는 IgM 항체를 단일클론항체로 생산하는 AP64 hybridoma 세포주가 제조되었다(Johnson *et al.*, 1985). 이 hybridoma에서 분비되는 단일클론항체 AP64 IgM의 특징은 첫째 인간의 ANLL 세포인 HL60의 표면항원에 대해 특이성을 나타내지만, 쥐의 ANLL 세포에도 특이성을 나타내는 교차활성(cross-reactivity)을 나타내었다(Johnson and

Shin, 1983). 둘째 보체(complement) 존재하의 생체의 실험에서, 단일클론항체 AP64 IgM은 인간 및 쥐의 ANLL 세포의 lysis를 유도하였으며 셋째 쥐에 대한 생체내 실험에서도 생체내로 주입된 작은 양의 암세포(10^2 – 10^3 cells)에 대해 종양억제 효과(tumor suppression effect)를 보였을 뿐만 아니라(Johnson *et al.*, 1985) 항암제 치료 후 AP64 IgM 주입시 잔여 암세포의 사멸효과를 나타내었다(Wagner *et al.*, 1989). 본 연구에서는 항체 공학기법을 사용하여 hybridoma AP64 세포주로부터 V_H 와 V_L 의 유전자를 클로닝하고 linker 펩타이드를 재조합시켜 구축한 ScFv 유전자를 대장균에서 발현한 다음 재조합 ScFv 단백질을 Ni^{2+} -NTA-agarose affinity column (QIAGEN)으로 정제하였다. 항원결합력을 비교하기 위해 수용성형태(soluble form)로 정제한 이 재조합 ScFv를 AP64 모항체와 함께 westernblot을 수행하였다.

재료 및 방법

세균 균주 및 배지

대장균 BMH 71-18 (Ulrich *et al.*, 1981)이 클로닝 및 단백질 발현을 위해 사용되었다. 균 배양을 위한 배지는 2x TY (1% yeast extract, 1% tryptone, 0.5% NaCl, pH 7.0)와 4x TY (2% yeast extract, 2% tryptone, 1% NaCl, pH 7.0)를 사용하였다.

세포주(Cell line: HL60 and AP64 hybridoma) 배양 및 total RNA 추출

사람의 ANLL 세포주인 HL60와 HL60의 세포 표면단백질에 결합하는 단일클론항체 IgM을 생산하는 hybridoma 세포주 AP64(Johnson *et al.*, 1985)는 10% FBS (fetal bovine serum)을 함유한 RPMI-1640 배지(pH 7.1)를 이용하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 그리고 약 2×10^6 cells/ml일 때 계대배양하였다. 배양된 AP64 배양액을 원심분리하여 세포를 수거하였다. 침전된 AP64 세포들은 PBS로 세척하였으며 세척된 세포들은 cold lysis 완충용액(10 mM Tris-HCl; pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100)에 재현탁되어 5분 동안 얼음 속에서 반응시켰다. 그리고 $15,000 \times g$, 4°C, 5분 동안 원심분리하여 상등액을 취한 뒤 10% SDS와 페놀(equilibrated with 1M Tris-HCl pH 8.0)과 혼합한 뒤, 상온에서 $15,000 \times g$, 5분 동안 원심분리하여 상등액을 취하여 다시 페놀과 혼합하여 원심분리하였다. 상등액을 취하여 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 에탄올을 가하여 진탕한 뒤, -20°C에 밤새 반응시켰다. 이것을 $15,000 \times g$, 4°C, 30분 동안 원심분

Table 1. Primer lists for AP64 ScFv gene constructions

AP64 VH gene	AP64 VH-5'	5'-GAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GG-3'
	AP64 VH-3'	5'-TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT GCC-3'
	AP64 VH 3'- <i>Bst</i> EII	5'-ATC AGG TGA CCG AGG AGA CTG TGA GAG TGG TGC C-3'
AP64 VL gene	AP64 VL-5'	5'-GAC ATC CAG ATG ACA CAG TCT CC-3'
	AP64 VL-3'	5'-TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC TCC-3'
	AP64 VL-5'- <i>Nco</i> I	5'-A'TC ACC ATG GCC GAC ATC CAG ATG ACA CAG TC-3'
AP64 Linker gene	AP64 linker-5'	5'-GCA CCA CTC TCA CAG TCT CCT CAG GTG GAG CC-3'
	AP64 linker-3'	5'-GGA GAC TGT GTC ATC TGG ATG TCC GAT CCG CC-3'

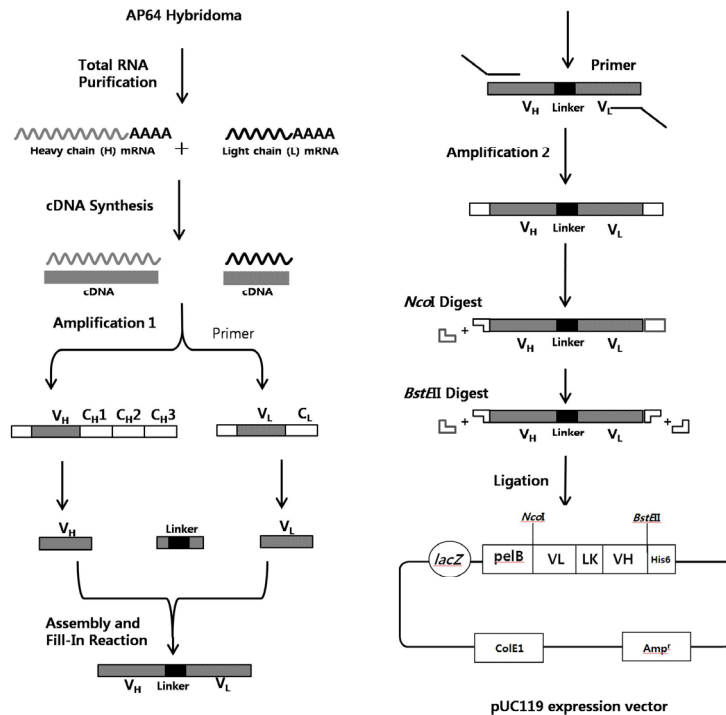


Fig. 2. Schematic outline for the gene construction of recombinant ScFv. The total RNA was extracted from AP64 hybridoma. cDNA was synthesized by using either AP64 VL-3' or VH-3' primers. Two step amplification and one step gene assembly by PCR were performed and finally constructed full-length AP64 ScFv gene, which were cloned into pUC119 expression vector. The flexible linker is colored as black. *lacZ* promoter is activated by IPTG for overexpression of recombinant ScFv. PelB leader transports expressed proteins into periplasmic space for secretion. His₆ is hexahistidine tag for detection and purification of expressed ScFv proteins. pUC119 vector contain both ampicillin-resistance gene as a selection marker and ColE1 as a replication origin.

리하여 침전된 AP64의 total RNA를 70% 에탄올로 세척하고 TE 완충용액(1 mM EDTA, Tris-HCl; pH 7.4)에 용해하였다. 그리고 전기영동하여 total RNA의 유무를 확인하였으며 추출된 AP64 total RNA는 diethylphosphorocyanidate (DEPC; Sigma)로 처리된 증류수에 녹여 cDNA제조를 위한 주형으로 사용하였다.

AP64 V_H 및 V_L 유전자의 증폭

DEPC가 처리된 증류수에 희석된 AP64 total RNA를 64°C에서 가열한 후, RT-PCR 반응액(Promega)과 혼합하였다. RT-

PCR 반응액은 10 μl의 DEPC 처리 증류수, 10 μl의 2 mM dNTPs, 10 μl의 5× first strand 완충용액, 5 μl의 0.1 M DTT, 2 μl의 RNasin (RNase inhibitor; Promega), 1 μl의 AP64 VH-3' 프라이머로 구성되었다. 여기에 2 μl의 avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (10 unit/μl; Promega)를 첨가한 뒤, 42°C에서 반응시켰다. 반응 후, RT-PCR 반응액은 95°C, 가열된 후, 상온에서 15,000 × g로 원심분리하였다. 여기서 상등액 10 μl (cDNA)를 취한 다음 AP64 VH-5' 프라이머와 AP64 VH-3' 프라이머를 이용하여 AP64 VH gene의 PCR (Saiki *et al.*, 1988)을 시도하였다(Table 1 and Fig. 2). 증폭된

AP64 VH gene은 QIAEX II DNA extraction kit (QIAGEN)로 gene cleaning을 수행하여 회수하였다. 같은 방법으로 AP64 VL gene의 증폭을 수행하였으며 다만 RT-PCR에 이용된 프라이머는 AP64 VL-5' 프라이머와 AP64 VL-3' 프라이머가 사용되었다(Table 1 and Fig. 2).

AP64 ScFv 발현벡터 구축

증폭된 AP64 V_H와 V_L을 연결하기 위한 linker DNA는 AP64 linker-5' 프라이머와 AP64 linker-3' 프라이머를 이용하여 ScFv marker (GE Healthcare)를 주형으로 PCR에 의해 증폭하였다(Fig. 2). AP64 ScFv의 linker-V_H 및 V_L-linker의 제조를 위한 PCR 반응액은 V_H 또는 V_L DNA 각각 2 µl, AP64 linker 6 µl, 10 µl의 2 mM dNTPs, 5 µl 10×PCR 완충용액, 1 µl의 Taq DNA polymerase, 24 µl의 초순수증류수로 구성하였다. 그리고 94°C에서 1분, 72°C에서 4분을 한 주기로 하여, 총 7주기 동안 PCR에 의한 gene assembly를 시도하였다(Fig. 2). 그 다음 여기에 50 µl의 PCR 반응액(5 µl의 5' 프라이머, 5 µl의 3' 프라이머, 10 µl의 10 mM dNTPs, 5 µl의 10×PCR 완충용액, 1 µl의 Taq DNA polymerase, 24 µl의 초순수증류수)을 첨가하여 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분을 한 주기로 하여 30 주기의 PCR을 실시하였다. 이때 linker-V_H의 gene assembly를 위해서는 AP64 linker-5' 프라이머와 AP64 VH-3' 프라이머를 사용하였으며, V_L-linker는 AP64 VL-5 프라이머와 AP64 linker-3' 프라이머를 사용하였다(Fig. 2). 각각의 PCR 결과를 DNA 전기영동으로 확인한 후 다시 V_L-linker와 linker-V_H PCR 산물을 혼합하여 위에서 언급한 동일한 방법으로 gene assembly 및 2차 PCR을 실시하였다. 마지막으로 AP64 VL 5'-*Nco*I 및 AP64 VH 3'-*Bst*EII를 사용하여 PCR하였고 최종적으로 5'-site에 *Nco*I (New England Biolab)과 3'-site에 *Bst*EII (New England Biolab) 제한효소 절단부위를 포함하는 ScFv (V_L-linker-V_H) 유전자를 구축하였다(Fig. 2). PCR 증폭된 ScFv는 DNA 전기영동 후, gene cleaning 과정을 수행하여 회수하였고, 회수된 AP64 ScFv DNA는 *Nco*I (10 unit/µl)과 *Bst*EII (10 unit/µl)의 제한효소를 사용하여 발현벡터인 pUC119으로 클로닝하였다(Fig. 2). 제한효소 반응은 1 µl의 *Nco*I를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 1 µl의 *Bst*EII를 첨가하여 60°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 DNA 전기영동 후, gene cleaning 과정을 거쳐 제한효소 처리된 ScFv DNA를 회수하였다. 그리고 pUC119 발현벡터(Vieira and Messing, 1982)와 ligation 시켜 대장균 BMH 71-18로 형질전환하였다. 37°C에서 밤새 배양시킨 후 나타난 집락은 colony PCR (Ward, 1992)을 수행하여 클로닝된 발현 벡터를 선별하고 Mini-prep

으로 회수하여 제한효소 절단을 통해 클로닝 여부를 재확인하고 DNA sequencing (Zimmermann *et al.*, 1988)으로 각각의 V_H, V_L 및 linker 유전자의 염기배열을 최종 결정하였다.

ScFv의 V_H 및 V_L의 분석

분석된 ScFv의 V_H 및 V_L 유전자가 유래되어진 germline origin을 결정하기 위해 IMGT (the international ImMunoGeneTics information system) database (<http://www.imgt.org>)를 이용하여 각각의 V, D, J segment origin을 결정하였으며(Table 2) 항원결합부위인 V_H 및 V_L 내의 CDR loop class 결정은 Chothia에 의해 제안되어진 방법(Chothia and Lesk, 1987)으로 결정해주는 web site (<http://www.bioinf.org.uk>)를 이용하여 결정하였다(Table 2).

ScFv의 3차 구조 모델링

항체 3차구조 모델링 프로그램 Discovery Studio 2.5 (Accelrys)를 이용하여 재조합 ScFv의 3차구조 모델링을 시도하였다. 즉 ScFv의 아미노산 배열을 입력하면 그와 가장 유사한 아미노산 배열을 가지면서 이미 3차 구조가 알려진 항체를 RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home>)에서 찾아내어 이를 주형으로 하여 ScFv 항체의 항원결합부위인 complementarity determining region (CDR)의 loop와 항체의 안정화 역할을 담당하는 framework (FR)의 3차 구조를 결정하였다. 예측된 3차구조는 Discovery Studio 4.0 visualizer (Accelrys) 프로그램을 이용하여 형상화하여 분석하였다.

재조합 ScFv의 발현 및 정제

재조합 ScFv 유전자를 포함한 발현벡터를 *E. coli* BMH71-18 (Duenas *et al.*, 1994)에 형질전환하였다(Kim *et al.*, 1994a,

Table 2. Analysis of VH and VL sequences of AP64 ScFv

	VH	VL
V segment origin ^a	Musmus IGHV14-1-01	Musmus IGKV14-1-01
D segment origin ^a	Musmus IGHD 2-1-01	NA ^d
J segment origin ^a	Musmus IGHJ 2-01	Musmus IGKVJ1-01
Canonical loop class ^b	HCDR1: class 1	LCDR1: class 2
	HCDR2: class 2	LCDR2: class 1
	HCDR3: variable ^c	LCDR3: class 3

^aV segment origin, D segment origin and J segment origin were determined based on IMGT database (<http://www.imgt.org>).

^bCanonical loop class was determined by Andrew C.R. Martin's Bioinformatics Group web sites (<http://www.bioinf.org.uk>).

^cHCDR3 loop cannot be classified due to its high diversity

^dNot available.

1994b). 형질전환된 *E. coli* BMH71-18을 100 µg/ml ampicillin, 1% glucose가 함유된 4xTY 배지에서 30°C, 밤새 진탕 배양하였다. 배양된 세포들은 3,000 × g로 상온, 10분동안 원심분리하여 수거하고, 4x TY 배지에 재현탁시켜 다시 원심분리되었다. 수거된 세포들은 배양액과 동일 부피의 100 µg/ml ampicillin, 0.25 mM IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside; Sigma)가 함유된 4x TY 배지에서 25°C, 5.5시간 진탕 배양하여 단백질 합성을 유도한 후, 이들 세포는 3,000 × g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 수거된 세포에 차가운 TES 완충용액(0.5 M sucrose, 0.1 mM EDTA, 200 mM Tris-Cl, pH 7.5)를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 위와 같은 방법으로 원심분리하여 수거되어진 상등액은 PBS를 이용해 밤새 투석하였다. 투석되어진 단백질 용액을 Ni²⁺-NTA agarose (QIAGEN)에 결합시키고 TN 완충용액(0.1 M Tris-Cl, 0.5 M NaCl, pH 7.5 and pH 8.0)을 이용하여 세척하였다. 세척이 끝난 Ni²⁺-NTA-agarose에 250 mM imidazole (Sigma)을 처리하여 재조합 단백질을 용출하였다. 그리고 용출된 재조합 ScFv 용액을 15% SDS-PAGE gel에 전기영동하고, 이를 0.25% Coomassie Brilliant Blue R-25 용액을 이용하여 염색하여 정제된 재조합 ScFv 단백질의 존재 유무를 확인하였으며, 정제되어진 ScFv 단백질은 Bradford protein assay (Thermo Scientific)으로 농도를 결정하였다.

단일클론 모항체 AP64 IgM의 정제

AP64 hybridoma 세포주의 배양액을 실온에서 2분간 3,000 × g로 원심분리하여 세포들을 침전시킨 뒤, 상등액을 4°C에서 10분간 10,000 × g로 다시 원심분리하여 PBS 완충용액으로 4°C에서 밤새 투석하였다. 투석된 AP64 세포주의 배양액은 anti-mouse IgM-agarose affinity column (Sigma)을 통과시켰다. 그리고 washing 완충용액 pH 8.0 (500 mM NaCl, Tris-HCl, pH 8.0)과 washing 완충용액 pH 7.0 (500 mM NaCl, Tris-HCl, pH 7.0)으로 칼럼을 세척하였다. 그 다음, 0.1 M citrate 완충용액 (pH 3.0)로 AP64 IgM 모항체를 용출하였다. 그리고 용출된 AP64 IgM 단백질 용액에 용출 부피 1/10의 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 첨가하여 중화시킨 후, 15% SDS-PAGE를 통해 AP64 IgM 모항체의 정제 유무를 확인하였다. 정제된 AP64 IgM은 PBS로 4°C에서 밤새 투석한 후 역시 Bradford protein assay (Thermo Scientific)를 이용하여 정량하였다.

Westernblot

정제된 재조합 ScFv 10 µl를 SDS-PAGE로 전기영동하고

이를 nitrocellulose membrane (Millipore)으로 transfer하였다. 그리고 transfer 되어진 membrane을 2% (w/v) 탈지우유를 포함한 PBS-T (PBS, 0.02% Tween 20) 완충용액을 이용하여 실온에서 1시간동안 blocking한 후, PBS-T로 2회 세척하였다. 정제된 재조합 ScFv 단백질 탐지를 위한 일차항체로 생쥐의 anti-polyhistidine-HRPO conjugate (Sigma)를 blocking 완충용액에 1:1,000으로 희석하여 사용하였다. 한편 AP64 hybridoma의 배양액으로부터 정제된 AP64 IgM 모항체 1.5 µg을 산화 및 환원조건으로 SDS-PAGE 전기영동한 다음, nitrocellulose membrane으로 transfer하여 westernblot을 실시하였다. Westernblot 조건은 ScFv의 경우와 동일하게 수행하였다. 다만 정제된 AP64 IgM 모항체를 탐지하기 위한 일차항체로 anti-mouse IgM-AP conjugate (Sigma)를 10 ml의 blocking 완충용액에 1:10,000으로 희석하여 사용하였다. 최종적으로 PBS-T washing 완충용액으로 5회 세척한 다음, 3,3-diaminobenzidine (DAB; Sigma)를 기질로 이용해 발색시켜 재조합 ScFv 및 AP64 IgM 모항체의 정제 유무를 확인하였다.

HL60 세포의 항원 단백질추출과 AP64 IgM 및 AP64 ScFv를 이용한 항원의 검출

배양된 HL60 세포(약 2×10⁶ cells/ml)을 400 × g, 5분동안 상온에서 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 1 ml의 cold PBS로 침전된 세포를 재현탁한 뒤 다시 400 × g, 5분동안 4°C에서 원심분리하였다. 침전된 HL60 세포는 1 ml의 high salt lysis buffer [500 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris pH 8.0, 100 ng PMSF (pheylmethanesulfonyl fluoride; Sigma), 2 ng의 leupeptin (Sigma), 1 ng의 pepstatin-A (Sigma), 1 mM EDTA pH 8.0]에 현탁시켰다. 그리고 4°C에서 밤새 진탕시켜 표면단백질을 추출하였다. 추출이 끝난 뒤 15,000 × g, 30분동안 4°C에서 원심분리시키고, 상등액 10 µl를 취하여 SDS-PAGE 및 westernblot을 시행하였다. 일차항체로 사용하는 재조합 ScFv와 AP64 IgM 항체는 10 ml의 blocking 완충용액에 10 µg/ml의 농도로 희석해서 사용하였고, 각각의 경우 사용되는 2차항체 및 발색은 westernblot에서 서술한 동일한 방법으로 실시하였다.

결과 및 고찰

인간의 ANLL 세포주인 HL60의 세포 표면항원에 결합하는 AP64 IgM 모항체를 생산하는 hybridoma 세포로부터 RT-PCR에 의해 증폭시킨 AP64 IgM의 V_H와 V_L의 유전자를 전기영동한 결과, V_H는 340 bp (Fig. 3; lane 1), 그리고 V_L은 325 bp (Fig.

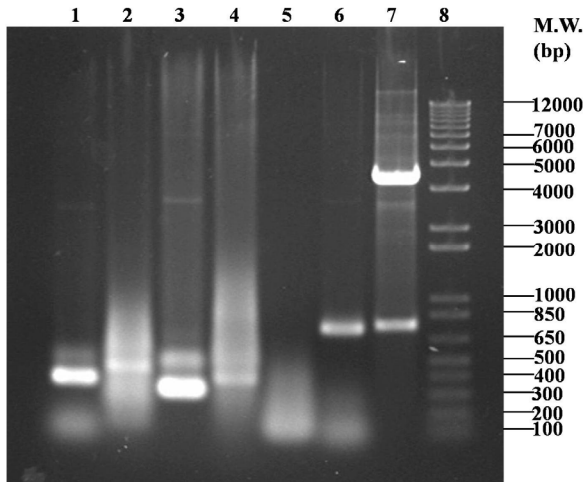


Fig. 3. PCR analysis of AP64 V_H , V_L , and ScFv. The PCR products are resolved on an 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. DNA size markers are shown on the right. Lanes: 1, AP64 V_H ; 2, AP64 linker- V_H ; 3, AP64 V_L ; 4, AP64 V_L -linker; 5, AP64 linker PCR Product; 6, constructed ScFv gene; 7, recombinant ScFv in pUC119 digested with *NcoI* and *BstEII*; 8, molecular weight marker.

3; lane 3)로 관찰되어졌다. Linker (GGGGSGGGSGGGGS)의 PCR 산물은 gene assembly를 위해 V_H 와 V_L 의 상보적인 DNA 염기를 포함해야 하므로 크기는 약 100 bp로 관찰되어졌다(Fig. 3; lane 5). 그런데 linker의 PCR 산물은 DNA gel 상에서 상당히 퍼져있는 것을 볼 수 있는데, 이는 사용한 1% agarose gel의 resolution이 낮아서 생긴 것으로 추정된다. 또한 V_H , V_L 과 linker간의 gene assembly 결과로 V_H 와 V_L 보다 조금 size가 커진 PCR 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 3; lane 2 and 4). 그러나 gene assembly에 의한 PCR 과정시 V_H 및 V_L 에 특이적인 프라이머를 사용함에도 불구하고, 여러 개의 비특이적 PCR 산물들이 smear로 관찰되는 것은 아마도 linker 유전자의 반복적 염기서열에서 비특이적 불규칙한 gene assembly 과정의 결과에 의한 것으로 추정된다. 즉, linker 유전자는 GGGGS (Gly₄Ser)의 아미노산 배열을 한 단위로 세번 계속된 반복적 구조 즉 (Gly₄Ser)₃를 가진다. 따라서 72°C에서의 annealing될 때 linker의 반복적 염기서열로 인하여 상보적 가닥이 비특이적 annealing될 가능성이 높아 비특이적인 PCR 산물의 smear가 관찰된다고 추정된다. 최근 이러한 단점을 극복하기 위해 다양한 linker들의 개발이 보고되어지고 있으며, 그 결과 gene assembly시 비특이적 annealing을 최소화할 수 있으면서 glycine보다 친수성이 강한 amino acids로 구성하여 수용성(solubility)를 증가시킴으로써 재조합 ScFv의 회수율(yield)을 향상시키게 되었다(Whitlow *et al.*, 1993, 1994). Gene assembly가 끝난 재조합 ScFv는 크기가 약 750 bp로 관찰되어

졌으며(Fig. 3; lane 6) 이를 다시 AP64 V_L 5'-*NcoI* 및 AP64 V_H 3'-*BstEII* 프라이머로 PCR 증폭시켰다. 일반적인 ScFv는 linker- V_H - V_L 의 순서로 제조되어지는데 반해, 본 연구에서 제조된 재조합 ScFv는 V_L -linker- V_H 의 순서로 구축되어졌다. 그러나 이러한 V_H 및 V_L 의 orientation 차이가 3차 구조 folding이나 항원결합력 및 특이성에 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있다(Luo *et al.*, 1995). Colony PCR 스크리닝을 통하여 클로닝이 확인된 ScFv 클론들은 Mini-prep에 의해 ScFv/pUC119 vector를 추출하여 *NcoI* 및 *BstEII* 제한효소 절단을 통해 ScFv 유전자가 정확하게 삽입되었는지를 재확인하였다(Fig. 3; lane 7).

재조합 ScFv의 V_H 와 V_L 염기배열을 분석하여 가변부위(variable region)의 framework region (FR)과 항원결합부위인 complementarity-determining region (CDR)을 Kabat numbering (Kabat, 1991)에 의해 결정하였다(Fig. 4). 이러한 CDR과 FR을 구분하는 것은 CDR이 결정되면 random mutagenesis를 이용하여 CDR만을 무작위로 돌연변이시켜 항원에 대한 결합력을 인위적으로 더 증가시킬 수 있기 때문이다(Steidl *et al.*, 2008; Inoue *et al.*, 2013). 또한 IMGT database (<http://www.imgt.org>)를 이용하여 V_H 와 V_L 각각의 유래된 germline segment를 결정한 결과 V_H 유전자는 생쥐 항체유전자의 중사슬 가변부위(heavy chain variable domain: V_H) IGHV14-1-01에서, D segment는 IGHD2-1-01 그리고 J segment는 IGHJ 2-01에서 유래되었음을 확인하였다. 한편 V_L 유전자는 생쥐 항체유전자의 경사슬 가변부위(light chain variable domain: V_L) 중에서 kappa chain IGKV14-1-01에서 그리고 J segment는 IGKVJ 1-01에서 유래되었음을 확인할 수 있었다(Table 2). 항원결합부위인 complementarity-determining region (CDR) loop의 3차원적 구조 역시 아미노산 배열에 의해 분류할 수 있으며 canonical loop class라 한다(Chothia and Lesk, 1987). 따라서 AP64 항체유전자의 염기배열을 결정하여 번역(translation)되는 아미노산의 염기배열을 추론함으로써 canonical loop class를 결정해 주는 website (<http://www.bioinf.org.uk>)를 이용하여 AP64 V_H 와 V_L CDR의 canonical loop class를 결정하였다(Table 2). Complementarity-determining region (CDR) 중 V_H 의 CDR3는 가장 가변성이 높아(high variability) 결정할 수 없었지만, 최근 항체유전자의 V_H CDR3의 아미노산 배열에 대한 정보가 축적됨에 따라 V_H CDR3의 canonical loop class를 결정하는 다양한 방법들이 보고 되어졌다(Reczko *et al.*, 1995; Shirai *et al.*, 1996, 1998, 1999; Ivanov *et al.*, 2005; Kuroda *et al.*, 2008). 재조합 ScFv의 염기배열로부터 아미노산 배열을 번역해 본 결과 약 28 kDa 정도의 분자량을 갖는 단

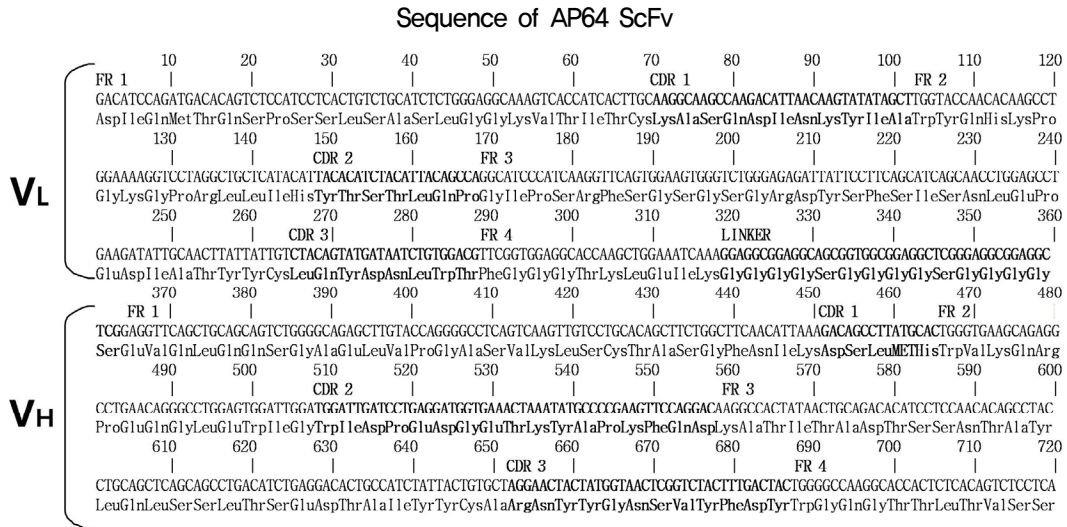


Fig. 4. Nucleotide sequences of recombinant ScFv gene. Each complementarity-determining regions (CDRs) and framework regions (FRs) are determined in V_L and V_H by Kabat numbering (Kabat, 1991). Each CDRs and linker regions are bolded.



Fig. 5. 3D modeling of murine AP64 Fv. (A) Side view. (B) Top view. LCDRs are colored as a black in grey V_L background. In contrast, HCDRs are colored as a grey in black V_H.

백질로 번역되었으며 등전점(isoelectric point)은 6.31 이어서 pH 7에서 negative charge를 띠게 된다. 3차 구조 모델링을 통해 예측된 재조합 ScFv의 3차 구조를 보면 VH 및 VL의 각각 세 개의 CDR 부위가 고유한 loop 구조를 나타내며(Fig. 5A), 이 6개 CDR loop들이 모여 항원결합부위인 hydrophobic pocket을 형성하여 항원과 특이적으로 결합할 수 있게 된다(Fig. 5B).

이전의 Ap64 IgM에 대한 연구(Johnson and Shin, 1983; Wagner *et al.*, 1989)에서는 모두 hybridoma의 배양액을 그대로 사용하였다. 그러나 이 경우, hybridoma로부터 만들어지는 비특이적인 항체가 문제될 수도 있고, 분비되는 AP64 IgM 항체의 농도가 극히 낮을 수도 있다. 또한 대장균에서 발현된 재조합 ScFv에 대한 대조군으로 사용하기 위해서 AP64 hybridoma의 배양액으로부터 AP64 IgM을 anti-mouse IgM agarose affinity column을 사용하여 정제를 시도하였다(Fig. 6A; lane 1 and 2). SDS-PAGE의 결과 전형적인 IgM의 중사슬이 약 70

kDa인 것에 비추어 볼 때 약 66 kDa로 보이는 단백질이 AP64 IgM의 중사슬(heavy chain)인 것으로 확인할 수 있었으며, 22 kDa로 보이는 단백질은 AP64 IgM의 경사슬(light chain)인 것으로 확인할 수 있었다. 또한 생쥐 IgM의 중사슬만을 특이적으로 인식하는 항체, anti-mouse IgM (μ chain specific) 항체를 이용하여 western blot을 시도한 결과 66 kDa의 위치에서 AP64 IgM의 중사슬이 탐지되어 SDS-PAGE에서 관찰된 단백질이 AP64 IgM임을 재확인하였다(Fig. 6A; lane 3-4). 재조합 ScFv 유전자가 클로닝된 pUC119 발현벡터는 5'-upstream에 대장균 lactose operon의 효소합성에 관계하는 *lacZ* promoter가 존재하여 이를 활성화 시키는 강력한 유도물질인 IPTG를 사용하여 단백질 발현을 유도할 수 있다. 또한 재조합 ScFv의 아미노 말단에 fusion 된 pelB leader sequence에 의해 세포질에서 발현된 재조합 ScFv를 대장균의 막 주변공간(periplasmic space)으로 이동시키며, 분비된 단백질은 세포의 파쇄 없이 삼투압 차이를 이용하여 단백질을 회수할 수 있다. 그리고 재조

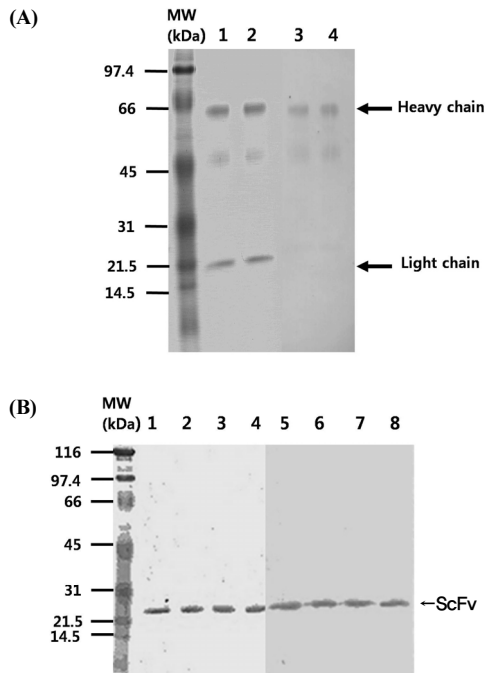


Fig. 6. SDS-PAGE and western blot analysis of purified AP64 IgM and recombinant ScFv. (A) Purified AP64 IgM parental antibody under reducing condition were analyzed in 15% SDS-PAGE gel (lane 1 and 2). AP64 IgM heavy chain were detected in western blot using anti-mouse IgM-alkaline phosphatase (AP) conjugate antibody (lane 3 and 4). (B) Purified recombinant ScFv under reducing condition were analyzed in 15% SDS-PAGE gel (lane 1-4). The recombinant ScFv were detected in western blot using anti-polyhistidine-horseradish peroxidase (HRPO) conjugate antibody (lane 3 and 4).

합 ScFv의 카르복시 말단에 His₆ tag이 fusion되어 있어 히스티딘의 imidazole ring과 affinity를 나타내는 Ni²⁺-NTA-agarose affinity column에 의해 정제할 수 있다. 본 실험에서 발현을 위해 숙주로서 사용한 대장균 BMH 71-18 또한 다른 대장균 strain 보다 ScFv의 발현율이 더 높다고 보고되어져 있다 (Duenas *et al.*, 1994). 재조합 ScFv 항체는 성공적으로 분비되어 정제되어짐을 SDS-PAGE를 통해 확인하였고, 또한 western blotting을 통해 이 단백질이 히스티딘 tag을 포함하는 단백질임을 확인하였다(Fig. 6B). 특히 대장균의 periplasmic space로 분비되어진 ScFv는 삼투압(osmotic pressure)를 이용하여 추출하였다. 따라서 단백질을 변성시킬 수 있는 sonication 또는 urea나 guanidine 등에 의한 세포 파쇄 또는 세포 용해 하지 않아 정제과정에서 일어날 수 있는 변성을 최소화함으로써 기능적인 3차구조를 유지시켜 발현된 ScFv의 항원결합력을 극대화하였다. SDS-PAGE에서 정제된 단백질의 크기 또한 예상되어진 대로 약 28 kDa로 관찰되어 재조합 ScFv 단백질임을 확인할 수 있었으며(Fig. 6B; lane 1-4), anti-polyhistidine-HRPO

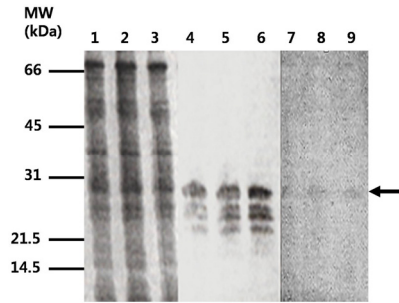


Fig. 7. Comparison of antigen binding activity of AP64 IgM parental antibody and recombinant ScFv protein. HL60 antigens extracted by lysis buffer were loaded into 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (lane 1-3) and were transferred onto nitrocellulose membrane (lane 4-8). AP64 IgM parental antibody detected 30 kDa antigens (lane 4-6) by using anti-mouse IgM-AP as a secondary antibody. Recombinant ScFv detected the same 30 kDa antigens (lane 7 and 9) by using anti-polyhistidine-HRPO as a secondary antibody.

conjugate를 이용하여 정제된 단백질이 재조합된 항체 단백질임을 재확인하였다(Fig. 6B; lane 5-8).

재조합 ScFv가 인간의 ANLL (acute nonlymphocytic leukemia) 세포주인 HL60의 표면항원을 특이적으로 결합(Johnson and Shin, 1983)하는지를 알아보기 위하여 인간의 ANLL 세포인 HL60으로부터 non-ionic detergent인 1% NP-40을 사용한 high salt lysis 완충용액을 사용하여 표면 단백질항원을 추출하였다. 추출과정이 끝난 뒤 SDS-PAGE를 실시한 결과, 여러 가지 크기의 다양한 HL60의 표면단백질들이 추출되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 7; lane 1-3). 추출되어진 HL60의 표면 단백질로부터 재조합 ScFv가 특이적으로 결합하는 항원이 있는지를 분석하기 위하여 재조합 ScFv를 일차항체로 사용하여 western blot을 실시하였고, 대조실험을 위해 모항체인 AP64 IgM을 일차항체로 사용하여 western blot을 실시하였다. 그 결과 모항체인 AP64 IgM은 HL60의 표면단백질 중 약 30 kDa 크기의 단백질을 항원으로 결합하였다. 또한 보다 크기가 작은 3개의 단백질 또한 항원으로 결합하였다(Fig. 7; lane 4-6). 한편 재조합 ScFv의 항원결합력 조사를 위한 western blot의 경우 HL60의 표면단백질 중 약 30 kDa의 단백질만 결합하였으며 모항체인 AP64 IgM처럼 작은 크기의 단백질은 항원으로 결합하지 않았다(Fig. 7; lane 7-9). 그리고 항원으로 인지된 단백질의 크기를 서로 비교해 볼 때, 재조합 ScFv가 결합한 항원과 모항체인 AP64 IgM이 우세하게 결합하는 항원은 동일 항원으로 추정되어진다. 그러나 재조합 ScFv는 모항체보다 낮은 항원결합력을 나타내었다. 이렇게 모항체에 비해 낮은 항원특이성을 나타내는 주 원인으로서는 첫째, 항체단백질은 진핵세포인 B 임파구에서 생산되는 진핵세포의 단백질이기 때문에 원

핵세포인 대장균에서 발현하는 동안 misfolding이 일어날 수 있다. 둘째, 모항체인 AP64 IgM은 IgM isotype으로 면역반응에 있어서 체액성 면역반응(humoral immunity) 중 일차면역반응(primary immune response)에 관여하는 항체이다. 이는 이차면역반응(secondary immune response)에서 주로 나타나는 IgG isotype보다 낮은 특이성을 나타내며 pentameric structure를 갖는다. 따라서 IgM은 항원에 대해서 낮은 결합력을 가지지만 pentameric structure로 인한 높은 avidity에 의해 항원결합력을 유지한다. 반면에 재조합 ScFv는 monomeric structure를 가지므로 낮은 결합력 및 낮은 avidity를 나타내어 모항체에 비해 낮은 항원결합력을 나타내는 것으로 추측된다. 따라서 재조합 ScFv의 낮은 결합력을 증가시키기 위해서는 첫째, CDR에 무작위 돌연변이시켜 돌연변이 library를 제조하고 phage display (Winter *et al.*, 1994) 등의 방법으로 결합력이 증가된 새로운 ScFv 클론을 제조할 수 있다. 둘째, avidity를 증가시키는 방법으로 항체의 이량체화(dimerization)를 통해 항체와 항원간의 avidity를 높여 줄 수 있는데, 그 방법으로는 ScFv 항체의 C-terminus에 항체의 Fc에 의한 이량체화(Shan *et al.*, 1999)와 항체의 Fc의 hinge (경첩) 부분만을 도입하여 miniantibody 형태로 이량체화 하는 방법(Mueller *et al.*, 1998; Peter Packl *et al.*, 1993), 그리고 인위적으로 cysteine 잔기를 포함하는 짧은 펩타이드를 도입함(Glockshuber *et al.*, 1990; Brinkmann *et al.*, 1993)으로 이량체화를 유도하는 방법 등이 있으며 이는 모두 공유결합인 이황화결합을 이용한다는 공통점을 가진다. 한편 비공유결합을 이용한 avidity 증가 방법으로 yeast의 transcriptional activator인 GCN4로부터 유래된 leucine zipper motif를 도입하는 방법이 보고되어졌으며(De Kruif and Logtenberg, 1996), tetrameric structure를 갖는 streptavidin과 결합시키면 결과적으로 IgM과 유사한 구조인 tetrameric 구조의 재조합 항체 생산도 가능할 것이다(Dubel *et al.*, 1995; Cloutier *et al.*, 2000).

결론적으로 본 연구에서 제조되어진 재조합 ScFv는 인간 ANLL세포에서 추출된 표면항원단백질에 대해 항원결합력을 나타내었으며 AP64 IgM 모항체가 나타내는 항원결합특이성과 동일한 특이성을 가지고 있는 것으로 관찰되었으나 모항체에 비해 낮게 나타난 항원결합력을 증가시키기 위해서는 avidity를 증가시키는 지속적인 연구가 필요하다.

적 요

단일클론항체 AP64 IgM은 인간의 급성 비임파성 골수암

(ANLL) 세포주 HL60에 결합하며 쥐의 ANLL 세포에도 교차결합(cross-react)한다. 또한 complement에 의해 매개되어지면 골수암 억제효과를 나타낸다. 본 연구에서는 RT-PCR에 의해 AP64 IgM을 분비하는 하이브리도마의 V_H 및 V_L cDNA로부터 유래된 재조합 single-chain variable domain fragment (ScFv)를 제조하였다. V_H 및 V_L은 15개 아미노산으로 구성된 linker (G₄S)₃으로 연결되었다. 재조합 ScFv는 *Escherichia coli* BMH 71-18에서 single polypeptide chain으로 발현되었다. Periplasmic extract를 Ni²⁺-NTA-agarose affinity column에 가하여 발현된 재조합 ScFv를 정제하였으며 westernblot으로 정제된 단백질을 탐지하였다. 정제된 재조합 ScFv는 AP64 IgM 모항체가 탐지하는 항원과 같은 HL60 세포의 표면항원(약 30 kDa)을 인지하였다. 그러나 HL60의 표면항원에 대한 ScFv의 결합력은 AP64 IgM 모항체보다 낮아서 추후 이에 대한 개선이 필요하다. 종합하여 볼 때 HL60 세포주에 특이적인 재조합 ScFv는 진단 또는 치료목적으로 유용한 생물학적 제제가 될 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 2013년도 창원대학교 교내공모과제 지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Batra, S.K., Jain, M., Wittel, U.A., Chauhan, S.C., and Colcher, D. 2002. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 603-608.
- Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S.H., Lee, B., and Pastan, I. 1993. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7538-7542.
- Chadd, H.E. and Chamow, S.M. 2001. Therapeutic antibody expression technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 188-194.
- Chothia, C. and Lesk, A.M. 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* **196**, 901-917.
- Cloutier, S.M., Couty, S., Tersikh, A., Marguerat, L., Crivelli, V., Pugnieres, M., Mani, J.C., Leisinger, H.J., Mach, J.P., and Depertthes, D. 2000. Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of *in vivo* biotinylated, phage display-selected ScFv fragments on streptavidin. *Mol. Immunol.* **37**, 1067-1077.
- De Kruif, J. and Logtenberg, T. 1996. Leucine zipper dimerized bivalent and bispecific ScFv antibodies from a semi-synthetic antibody phage display library. *J. Biol. Chem.* **271**, 7630-7634.

- Dubel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A., and Little, M. 1995. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (ScFv). *J. Immunol. Methods* **178**, 201–209.
- Duenas, M., Vazquez, J., Ayala, M., Söderlind, E., Ohlin, M., Perez, L., Borrebaeck, C., and Gavilondo, J. 1994. Intra- and extracellular expression of an ScFv antibody fragment in *E. coli*: Effect of bacterial strains and pathway engineering using groEL chaperonins. *BioTechniques* **16**, 476–477, 480–473.
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., and Plückthun, A. 1990. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* **29**, 1362–1367.
- Hayden, M.S., Gilliland, L.K., and Ledbetter, J.A. 1997. Antibody engineering. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 201–212.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Bruccoleri, R.E., Haber, E., Crea, R., *et al.* 1988. Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5879–5883.
- Huston, J.S., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., McCartney, J., Warren, F., Haber, E., and Oppermann, H. 1991. Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol.* **203**, 46–88.
- Inoue, H., Suganami, A., Ishida, I., Tamura, Y., and Maeda, Y. 2013. Affinity maturation of a CDR3-grafted VHH using in silico analysis and surface plasmon resonance. *J. Biochem.* **154**, 325–332.
- Ivanov, I., Schelonka, R.L., Zhuang, Y., Gartland, G.L., Zemlin, M., and Schroeder, H.W., Jr. 2005. Development of the expressed Ig CDR-H3 repertoire is marked by focusing of constraints in length, amino acid use, and charge that are first established in early B cell progenitors. *J. Immunol.* **174**, 7773–7780.
- Johnson, R.J., Kaizer, H., Massey, A.G., and Shin, H.S. 1985. Role of endogenous complement in monoclonal igm antibody-dependent leukemia suppression *in vivo*: Participation of C3b. *J. Immunol.* **134**, 3497–3503.
- Johnson, R. and Shin, H. 1983. Monoclonal antibody against a differentiation antigen on human leukemia cells: Cross-reactivity with rat leukemia and suppression of rat leukemia *in vivo*. *J. Immunol.* **130**, 2930–2936.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., and Foeller, C. 1991. Sequences of proteins of immunological interest. Nature Publishing Group.
- Kim, J.K., Tsen, M.F., Ghetie, V., and Ward, E.S. 1994a. Catabolism of the murine IgG1 molecule: Evidence that both CH2-CH3 domain interfaces are required for persistence of IgG1 in the circulation of mice. *Scand. J. Immunol.* **40**, 457–465.
- Kim, J.K., Tsen, M.F., Ghetie, V., and Ward, E.S. 1994b. Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Immunol.* **24**, 542–548.
- Kuroda, D., Shirai, H., Kobori, M., and Nakamura, H. 2008. Structural classification of CDR-H3 revisited: A lesson in antibody modeling. *Proteins* **73**, 608–620.
- Luo, D., Mah, N., Krantz, M., Wilde, K., Wishart, D., Zhang, Y., Jacobs, F., and Martin, L. 1995. VL-linker-VH orientation-dependent expression of single chain Fv-containing an engineered disulfide-stabilized bond in the framework regions. *J. Biochem.* **118**, 825–831.
- Müller, K.M., Arndt, K.M., and Plückthun, A. 1998. A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity. *FEBS Lett.* **432**, 45–49.
- Peter Packl, M., Schroeckh, V., Kni, U., and Rolf Wenderoth, D.R. 1993. Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *BioTechnology* **11**, 1271–1277.
- Reczko, M., Martin, A.C., Bohr, H., and Suhai, S. 1995. Prediction of hypervariable CDR-H3 loop structures in antibodies. *Protein Eng.* **8**, 389–395.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Jung, S.H., Pastan, I., and Lee, B. 1995. Disulfide stabilization of antibody Fv: Computer predictions and experimental evaluation. *Protein Eng.* **8**, 1323–1331.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491.
- Shan, D., Press, O.W., Tsu, T.T., Hayden, M.S., and Ledbetter, J.A. 1999. Characterization of ScFv-Ig constructs generated from the anti-Cd20 mab 1F5 using linker peptides of varying lengths. *J. Immunol.* **162**, 6589–6595.
- Shirai, H., Kidera, A., and Nakamura, H. 1996. Structural classification of CDR-H3 in antibodies. *FEBS Lett.* **399**, 1–8.
- Shirai, H., Kidera, A., and Nakamura, H. 1999. H3-rules: Identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Lett.* **455**, 188–197.
- Shirai, H., Nakajima, N., Higo, J., Kidera, A., and Nakamura, H. 1998. Conformational sampling of CDR-H3 in antibodies by multicanonical molecular dynamics simulation. *J. Mol. Biol.* **278**, 481–496.
- Skerra, A. and Plückthun, A. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038–1041.
- Steidl, S., Ratsch, O., Brocks, B., Durr, M., and Thomassen-Wolf, E. 2008. *In vitro* affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification. *Mol. Immunol.* **46**, 135–144.
- Ulrich, R., Koenen, M., Otto, K., and Müller-Hill, B. 1981. pUR222, a vector for cloning and rapid chemical sequencing of DNA. *Nucleic Acids Res.* **9**, 4087–4098.
- Verma, R., Boleti, E., and George, A.J. 1998. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol. Methods* **216**, 165–181.
- Vieira, J. and Messing, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259–268.

- Wagner, J., Johnson, R., Santos, G., Kim, B., and Shin, H.** 1989. Systemic monoclonal antibody therapy for eliminating minimal residual. *Blood* **73**, 6-14.
- Ward, A.C.** 1992. Rapid analysis of yeast transformants using colony-PCR. *BioTechniques* **13**, 350-350.
- Whitlow, M., Bell, B.A., Feng, S.L., Filpula, D., Hardman, K.D., Hubert, S.L., Rollence, M.L., Wood, J.F., Schott, M.E., Milenic, D.E., et al.** 1993. An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng.* **6**, 989-995.
- Whitlow, M., Filpula, D., Rollence, M.L., Feng, S.L., and Wood, J.F.** 1994. Multivalent Fvs: Characterization of single-chain Fv oligomers and preparation of a bispecific Fv. *Protein Eng.* **7**, 1017-1026.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., and Hoogenboom, H.R.** 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 433-455.
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., and Ansorge, W.** 1988. Automated sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett.* **233**, 432-436.