

Ribosome Display를 이용한 항체선별 방법의 확립

아주대학교 의과대학 미생물학교실

이명신 · 권명희 · 김경민 · 박 선 · 신호준 · 김형일

Establishment of Antibody Selection by Ribosome Display

Myung-Shin Lee, Myung-Hee Kwon, Kyongmin Hwang Kim, Sun Park, Ho-Joon Shin and Hyung-Il Kim

Department of Microbiology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

ABSTRACT

Background: Phage display is the most widely used technique among display methods to produce monoclonal antibody fragment with a specific binding activity. Having a large library for efficient antibody display/selection is quite laborious process to have more than 10^9 members of transformants. To overcome these limitations, several *in vitro* selection approaches have been reported. Ribosome display that links phenotypes, proteins, directly to genotype, mRNA, is one of the *in vitro* display methods. Ribosome display can reach the size of scFv library up to 10^{14} molecules and it can be further diversified during PCR steps. To select the high affinity scFv from one pot library, we established ribosome display technique by modifying the previously reported eukaryotic translation system. **Methods:** To establish the antibody selection system by ribosome display, we used 3D8, anti-DNA antibody. A 3D8 scFv was synthesized *in vitro* by an *in vitro* transcription-translation system. The translated 3D8 scFv and the encoding 3D8 mRNA are connected to the ribosome. These scFv-ribosome-mRNA complexes were selected by binding to their specific antigens. The eluted mRNAs from the complexes are reverse transcribed and re-amplified by PCR. To apply this system, antibody library from immunized mouse with terminal protein (TP)-peptide of hepatitis B virus DNA polymerase TP domain was also used. This TP-peptide encompasses the 57~80 amino acid residues of TP. These mRNA/ribosome/scFv complexes by our system were panned three times against TP-peptide. The enrichment of antibody from library was determined by radioimmunoassay. **Results:** We specifically selected 3D8, anti-DNA antibody, against ssDNA as a model system. The selected 3D8 RNAs sequences from translation complexes were recovered by RT-PCR. By applying this model system, we enriched TP-peptide-specific scFv pools through three cycles of panning from immunized library. **Conclusion:** We show that our translating ribosome complexes are well maintained and we can enrich the TP-specific scFv pools. This system can be applied to select specific antibody from an antibody library. (*Immune Network* 2003;3(3):219-226)

Key Words: Ribosome display, antibody, scFv

서 론

단클론 항체 생산 방법에는 고전적인 방법으로 하이브리도마를 이용해 왔으나 항체 선별에 많은 시간과 노력

이 소요되므로, 근래에는 phage display 방법이 많이 이용되고 있다(19). Phage display에서 성공적으로 항체를 선별하기 위한 핵심적인 요소는 큰 사이즈의 라이브러리 확보이다. 항원을 면역화시킨 동물에서 얻은 라이브러리의 경우 $10^7 \sim 10^8$ 정도에서 항체의 선별이 가능하지만, 항원의 면역성이 낮은 경우나 면역 자체가 불가능한 경우에는 10^9 이상의 크기를 지닌 라이브러리가 필요하다(1,14,15,19). Phage display에서 라이브러리 확보는

책임저자 : 김형일, 아주대학교 의과대학 미생물학교실
☎ 442-721, 경기도 수원시 원천동 산 5
Tel: 031-219-5070, Fax: 031-219-5079
E-mail: yourmark@ajou.ac.kr

E. coli 내로 phagemid를 transformation하여 이루어진다. 그러나 transformation의 efficiency는 1 g DNA당 $10^6 \sim 10^7$ 정도에 불과하므로, 10^9 정도의 큰 사이즈의 라이브러리 확보는 보편적인 방법으로는 어렵다(2). 이를 해결하기 위한 해법으로 제시된 방법 중에 *in vitro* display 방법이 있다. Ribosome display는 최근에 보고된 새로운 display 방법으로, *in vitro* display 중 대표적인 방법으로 알려져 있다.

Ribosome display에 의한 항체 선별 과정은 Fig. 1에서 보여주고 있다. 간단히 설명하면, 우선 PCR에 의해 항체 DNA의 라이브러리를 만든다. 이 과정은 phage display에서 이루어진 것과 유사하게 이루어진다(1). 다만 항체 유전자의 5' 말단에 *in vitro* transcription과 translation에 필요한 sequence가 위치하고, translation된 단백질 folding을 위해 3' 말단에 적절한 길이의 spacer가 위치하며 stop codon이 없도록 제작된다(7,12). 이렇게 제작된 DNA 라이브러리부터 *in vitro* transcription을 통해 RNA를 만들고, 다시 *in vitro* translation을 통해 항체 단백질을 제조한다. Translation 후 높은 농도의 magnesium ion을 처리함으로써 translation된 항체 단백질이 ribosome, RNA 함께 complex (ARM complex; antibody-ribosome-mRNA)가 이루어지도록 한다(3,7). 이 complex 상태에서 원하는 ligand에 대한 선별을 하여, 선별 후, 남은 complex의 RNA로부터 RT-PCR하여 다시 DNA로 증폭시킨다. 이 과정을 반복하여 특정 ligand에 대한 항체 유전자를 증식시키는 것이다. 이 과정은 transformation 과정이 없으므로, *in vitro* translation시 ribosome의 숫자만이 제한 요소가 된다. 그러나 상품화된 translation kit의 ribosome 수가

10^{14} /ml 정도로 보고되고 있으므로(6) 항체 선별에는 충분한 크기이다.

Ribosome display의 장점은 모든 과정을 *in vitro*에서 시행하여 transformation의 과정을 제외시킴으로써 보다 용이하게 큰 사이즈의 라이브러리확보를 가능하게 한다는 점이다. 또한 선별된 유전자의 증폭에 PCR이 사용되기 때문에 선별 과정 자체적으로 mutation을 유발하여 새로운 유전자가 생겨남으로써 라이브러리가 더욱 다양화되어 친화력 향상을 나타낼 수 있다(4). 인위적인 mutation유발에 의한 친화력 향상이 다른 display방법에 비해 쉽게 이루어진다(9). 그 외에도 전 과정이 *in vitro*에서 이루어지므로 *in vivo*에서는 발현이 안 되거나 어려운, 예를 들어 세포에 독성을 지닌 단백질 등도 선별이 가능하다(13). 또한 높은 결합력을 지니는 항체 선별 외에도 높은 안정성을 지닌 단백질을 선별할 수 있다는 가능성이 제시되었다(9). Ribosome display 방법은 기존의 방법에 비해 큰 사이즈의 라이브러리 획득이 쉽게 이루어지므로, 인간항체와 같은 유용한 단백질에 대해서도 효과적인 선별이 가능할 것으로 기대된다.

이러한 이론적인 많은 장점을 안고 있음에도 불구하고, ribosome display를 이용하여 실제 라이브러리로부터 항체 선별이 이루어진 예는 많지 않다(4-6,16). 이는 항체 선별에 있어 이 방법의 적용이 쉽지 않다는 것을 보여주고 있으며, 실제 항체 선별을 위해서는 라이브러리로부터 항체 선별이 가능하도록 ribosome display 방법을 조정하고 확립하는 과정이 필요할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 항체 선별이 가능하도록 ribosome display 방법을 확립하고자 하였다. Ribosome display 방법의 확

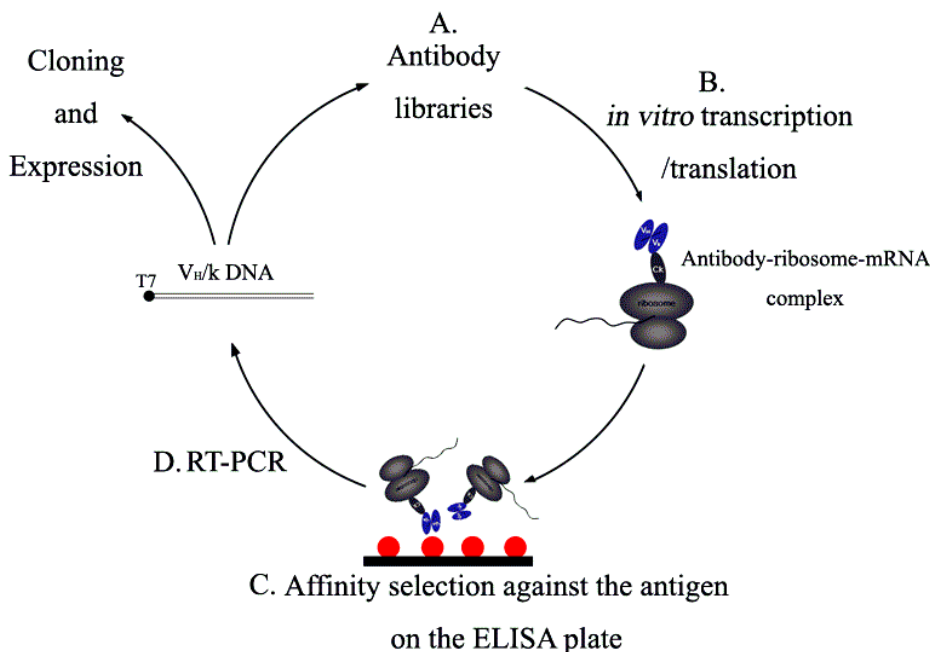


Figure 1. Processes of ribosome display technique to select a specific antibody against a specific antigen. See text for details.

립을 위해 우선, 항DNA 항체인 3D8(10)을 ribosome display 방법에 적용하여 ssDNA에 대해 특이적으로 선별이 이루어짐을 확인하였다. 다음에 특정항원으로 면역화된 항체 라이브러리를 이용하여 ribosome display 방법으로 선별하여, 특정항원에 대한 항체의 증가를 관찰하였다. 따라서 본 연구는 ribosome display 방법을 확립하고 실제로 항체 라이브러리로부터 특정 항원에 대한 항체 선별이 이루어짐을 보여주고 있다.

재료 및 방법

항 DNA scFv를 이용한 V_H/k DNA 구조물 생성. 항 DNA scFv인 3D8 scFv DNA를 ribosome display에 적합한 구조로 재구성하였다. N-말단에 T7 promoter와 Kozac sequence를 추가하여 *in vitro* transcription/translation이 이루어질 수 있도록 하였고, C-말단에는 κ chain의 constant region을 spacer로 추가하여 heavy chain variable region과 light chain전체로 연결된 V_H/k 재조합 항체로 구성하였다(Fig. 2A). C-말단의 spacer는 ribosome에 결합된 상태에서 scFv가 적절히 folding이 가능하도록 하는 기능을 한다. 또한 생성된 구조물을 이용하여 적절한 분석이 가

능하도록 3D8 사이에는 His tag를 추가하였다. κ Constant region을 spacer로 사용하기 위하여 마우스 mRNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 DNA를 증폭하였다. pIg20 3D8 plasmid¹⁰에서 3D8 scFv를 PCR을 이용하여 25 cycle 동안 증폭하였다(1 cycle은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분이다). 이 때, upstream primer로 HIS3D8/back primer, downstream primer로 3D8C/for와 *pfu* DNA polymerase (Bioneer)를 이용하여 제조사가 제시하는 방법으로 합성 하였다. C κ DNA 증폭을 위해, RNA purification kit (Amersham)를 이용하여 마우스 비장으로부터 RNA를 추출한 뒤, total RNA로부터 superscript II RNaseH⁻ reverse transcriptase (Invitrogen)와 C κ /for primer를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 C κ DNA는 5' C κ /back, 3' C κ /for_XmaI과 *Taq* DNA polymerase (Bioneer)를 이용하여 25 cycle의 PCR을 하였다(1 cycle은 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초다). 3D8C/for와 C κ /back primer는 scFv의 3' 말단과 spacer의 5' 말단이 서로 18 nucleotides가 동일하도록 디자인되었다. 재조합 PCR을 위해 증폭된 3D8 scFv와 κ constant region이 사용되었다. 재조합 PCR은 ST7/back (5'-end GCAGCTAATA-

Table I. Primers used for ribosome display

A. Primers used to generate the 3D8 scFv DNA	
T73D8/back	5'-GCAGCTAATACGACTCACTATAGGAACAGACCGACCACCATGGACCATC-3'
The T7 promoter sequence is underlined. Kozac sequence is indicated as box.	
His3D8/back	5'-GACCACCATGGACCATCATCATCATCATCATGAGGTCCAGCTGCAGCAG-3'
3D8/for	5'-GTTGGTGCAGCATCAGCCGTTTTATTTCCAGCTTGGTC-3'
B. Primers used to generate the complete mouse kappa light chain	
C κ /back	5'-AAACGGGCTGATGCTGCA-3'
C κ /for_XmaI	5'-TCCCGCCGGGCTCTAGAACACTCATTCCTGTTGGAGCT-3'
XmaI restriction enzyme site is underlined.	
A. Primers used to generate the V _H /k library	
T7/back	5'-CAGCTAATACGACTCACTATAGGAACAGACCACCATG(GC)AGGT(GC)CA(GC)CTCGAG(GC)AGTCTGG 3'
V _H /for	5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC-3'
V κ 2/back	5'-GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA-3'
C κ /for	5'-GCTCTAGAACACTCATTCCTGTTGGAGCT-3'
LINKBACK	5'-GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA-3'
LINKFOR	5'-TGGAGACTGGGTGAGCTCAATGTC-3'

CGACTCACTATAGGAAC 3'-end)과 Ck/for_XmaI primer가 포함된 혼합액으로 25 cycle의 PCR을 하였다(1 cycle은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분이다). 증폭된 3D8 V_H/k DNA를 SmaI restriction enzyme으로 처리된 pUC18에 클로닝하여 5개의 콜로니를 분리하였다. PCR에 의해 도입된 부분의 sequence를 ABI Perkin Elmer automated DNA sequencer (Applied Biosystems)로 확인하였다.

In vitro transcription/translation. Ribosome display에 사용할 mRNA를 얻기 위하여 Sequence가 확인된 클론의 plasmid를 SmaI restriction enzyme으로 처리한 뒤, T7 Cap scribe kit (Roche)를 이용하여 *in vitro* transcription한 후, Flexi rabbit reticulocyte lysate (Promega)를 이용하여 *in vitro* translation을 시행하였다. 반응은 70 mM의 potassium chloride 0.8 mM의 magnesium acetate을 사용하여 제조사가 제시하는 방법으로 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Translation된 단백질은 anti-His antibody (Qiagen)를 이용한 Western blot과 [³⁵S] methionine (50μCi/ml, Amersham)에 표지된 단백질의 전기 영동 후, autoradiography로 확인하였다. Western blot은 membrane을 blocking buffer (3% (w/v) bovine serum albumin in PBS) 후, anti-His antibody (1 : 1,000 dilution with blocking solution, Qiagen)로 각각 1시간 동안 상온에서 처리하였다. 세척 후, alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1 : 2,000 dilution with blocking solution)로 다시 1시간 상온에서 처리 후, BCIP/NBT (Sigma)를 사용하여 단백질을 확인하였다.

Translated 3D8 V_H/k의 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Translation된 3D8 V_H/k의 결합능력을 확인하기 위하여 ssDNA를 항원으로 ELISA를 시행하였다. Microtiter plates를 50μl의 ssDNA solution (5μg/ml in PBS)으로 코팅하였다. PBS로 세척한 후 3% (w/v) BSA로 37°C에서 1시간 blocking하였다. PBS로 다시 세척 후, *in vitro* translation된 3D8 V_H/k를 ice-cold PBSM buffer (PBS containing 5 mM MgCl₂)에 혼합하여 항원이 코팅된 well에 넣어 1시간 동안 4°C에서 반응하였다. 각각의 well을 PBST (PBS with 0.05% Tween20)로 3회 세척한 뒤, anti-His antibody (1 : 1,000, Qiagen)를 처리하였다. 상온에서 1시간 처리한 후, 다시 PBST로 3회 세척한 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (1 : 2,000 dilution with blocking solution, Zymed)를 상온에서 1시간 처리하여 ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Amersham) 기질로 면역 활성도를 측정하였다.

Affinity selection. ELISA에서 시행한 대로 항원을 코팅하고, blocking한 microtiter plate를 PBSM (PBS with 5 mM MgCl₂)으로 세척 후, 10분간 얼음 위에 보관하였다. Flexi rabbit reticulocyte lysate (Promega)를 이용하여 3D8

V_H/k의 *in vitro* translation을 시행하였다. 위에서 기술한 *in vitro* transcription/translation 반응과 같은 방법으로 반응액을 준비하여 30°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 직후에 0°C의 1.5% (w/v) BSA가 함유된 PBSM buffer를 첨가한 후, 항원이 코팅되어 있는 microtiter plate에 옮겨 넣었다. Plate는 1시간 동안 4°C에서 정치하였고, 저온으로 유지된 PBSTM (PBS containing 5 mM MgCl₂, and 0.05% (v/v) Tween 20)으로 3회, PBSM으로 2회 세척하였다. 세척 후 well에 남아있는 antibody-ribosome mRNA 복합체는 200 μl 의 elution buffer (20 mM EDTA를 포함한 PBS)를 사용하여 해리시킨 후, RNA isolation kit (Roche)로 mRNA를 정제하였다.

라이브리리를 이용한 선별 시에는 항원으로 TP-peptide를 사용하고, translation에 라이브리리 RNA를 사용하였다.

RT-PCR. Affinity selection을 거쳐 선별된 mRNA는 superscript II RNaseH⁻ reverse transcriptase (invitrogen)와 Ck/for primer를 사용하여 제조사가 제시한 방법대로 cDNA를 합성하였다. 3D8 scFv의 V_H와 linker 부분을 His3D8/back primer와 3D8re/for (5'-end CAGCCAGGGAGGATGGAGAC 3'-end) primer로 30 cycles동안 PCR하여 증폭하였다(1 cycle은 95°C에서 20초, 55°C에서 40초 그리고 68°C에서 1분이다).

라이브리리를 이용한 affinity selection에는 RT-PCR시 T7Ab/back과 Ck/for primer를 사용하였다. 또한, Affinity selection 후, 반복적인 선별을 위해 nested PCR 반응을 시행하였다. 이를 위해 Ck/for primer 대신 2번째 선별 과정에서 D2 (5'-end CGTGAGGGTGCTGCTCAT 3'-end) primer, 3번째는 D3 (5'-end GCCATTTTGTCGTTCACTGCCATC 3'-end) primer를 사용하였다.

마우스 면역 및 V_H/k DNA 라이브러리 생성. Ribosome display 선별이 항체 라이브러리에서도 이루어지는가를 확인하기 위하여 특정 항원을 면역시킨 라이브리리를 만들었다. 항원으로 B형 간염 바이러스 DNA 중합효소의 TP 영역 중, 65번째 타이로신 부위를 포함한 24개 아미노산으로 구성된 펩타이드 (5'-end biotin-KVGNFTGLYSSTVPFIENPEWQTPS 3'-end)를 제작하였다. 캐리어 단백질로 neutravidin (Sigma)을 합성 펩타이드의 N-말단 부분에 있는 biotin과 결합시켰다. Female Balb/c 마우스에 80 μg의 TP-펩타이드와 400μg의 neutravidin을 동량의 complete Freund's adjuvant와 혼합하여 마우스 복강내 주입하였다. 이어서 3주 간격으로 동량의 항원을 incomplete Freund's adjuvant와 혼합하여 주입하였다. 면역된 4마리의 마우스에서 혈청을 분리하여 ELISA로 확인한 뒤, 가장 역가가 높은 마우스로부터 비장을 분리하였다. 분리된 비장으로부터 total RNA를 RNA purification kit (Amersham)를 이용하여 분리하였고, 다시 oligo (dT)-

cellulose column (Amersham)을 이용하여 mRNA를 분리하였다. 마우스 V_H , V_L chains의 cDNA를 RT-PCR로 얻은 후, T7 promoter와 Kozac sequence를 포함한 V_H DNA의 증폭을 위하여 T7Ab/back과 VH/for primer를 이용하여 PCR하였고, κ chain DNA의 증폭을 위하여 Vk2/back과 Ck/for를 이용하여 PCR하였다. 증폭된 V_H DNA와 κ chain DNA의 재조합 시 연결부위로 사용하기 위하여, (Gly₄Ser)₃를 코딩하는 93-bp DNA linker (Amersham)를 primers LINKBACK과 LINKFOR를 이용하여 25 cycle의 PCR을 시행하였다(1 cycle은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고, 72°C에서 1분이다). 각각의 증폭된 V_H DNA, κ chain DNA 그리고 linker DNA를 정제하여, T7Ab/back와 Ck/for primer를 이용하여 PCR로 재조합하였다. 재조합된 DNA를 T7 Cap scribe kit (Roche)를 이용하여 *in vitro* transcription하여 ribosome display에 사용하였다.

마우스 면역 라이브러리를 이용한 radioimmunoassay.

Microtiter plates를 affinity selection에서 사용한 방법과 같이 준비하였다. Translation 혼합액은 [³⁵S] methionine (50 uCi/ml)를 사용하여 affinity selection에서 사용한 방법으로 시행하였다. Translation 반응 직후, 0°C의 1.5% (w/v) BSA가 함유된 PBSM buffer에 섞은 후, 미리 4°C에서 1시간 동안 준비된 microtiter plate에서 반응시켰다. PBST로 5회 세척한 뒤, 결합된 단백질을 4% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)로 상온에서 분리시키고, Microbeta TriLux scintillation counter (Wallac, Finland)를 이용하여 활성도를 측정하였다.

결과

3D8 V_H/k sequence 및 *in vitro* 합성된 3D8 V_H/k RNA와 scFv. 재조합 PCR 후 클로닝된 3D8 V_H/k 3D8 scFv와

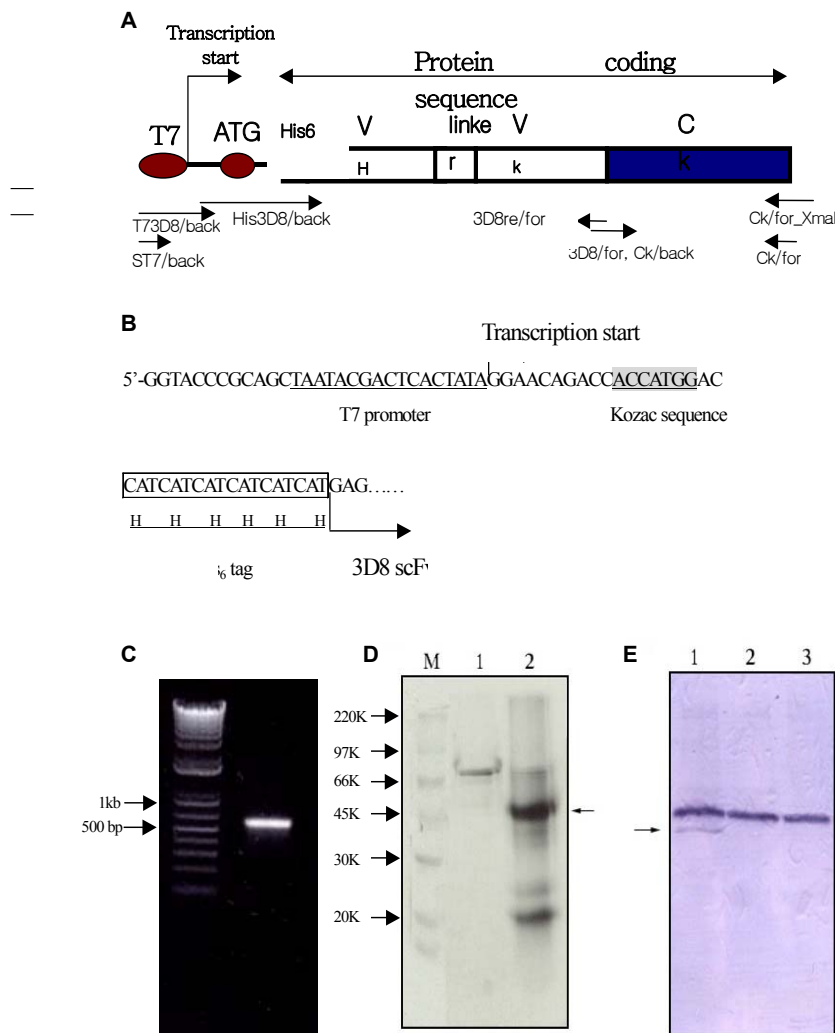


Figure 2. DNA structure and sequence used for ribosome display and *in vitro* synthesized 3D8 V_H/k . A. Schematic diagram of DNA structure for ribosome display. T7 promoter, the variable region of heavy chain, variable region of chain and the constant region of chain denote as T7, V_H , V_k and Ck, respectively. Ck acts as a spacer region to connect the folded protein to the ribosome. Large arrows indicate the transcriptional start and protein coding sequence. Small arrows indicate the primer binding sites for this system. B. DNA sequence used for ribosome display. T7 promoter, Kozac sequence, and His-tag sequences are indicated. C. 3D8 V_H/k RNA. After RNA transcription, DNA was removed by DNaseI treatment. The transcribed RNA was determined by gel electrophoresis. D. *In vitro* translated 3D8 V_H/k . After translation reaction, the translation mixture was subjected to the 12% SDS-PAGE, and detected by autoradiography. The translated 3D8 V_H/k protein was indicated as an arrow. ¹⁴C rainbow marker (lane M), luciferase as control (lane 1) and 3D8 V_H/k (lane 2) are shown. E. Western blot of 3D8 V_H/k . Translation of 3D8 V_H/k RNA (lane 1), translation without RNA (lane 2), and translation of 3D8 V_H/k RNA with cycloheximide (lane 3) are shown.

mouse constant region sequence를 확인하여 (Fig. 2A and 2B), 연결 부위에 frame shift나 stop codon의 생성이 없음을 확인하였다. 재구성된 DNA로부터 T7 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription된 RNA를 DNaseI으로 처리하여 template로 사용된 DNA를 제거한 뒤, 전기영동하여 관찰하였다. 예상되는 크기의 뚜렷한 RNA band를 확인하였다(Fig. 2C)

3D8 V_H/k 재조합 항체를 얻기 위하여 확인된 RNA로 rabbit reticulocyte lysate를 이용하여 *in vitro* 합성하였다. 3D8 V_H/k 단백질이 합성되었는가를 확인하기 위하여 두 가지 방법을 시행하였다. 우선, [³⁵S] methionine으로 표지하여 합성한 단백질을 전기영동한 후, autoradiography로 확인하였다. Autoradiography상에서 약 45 KDa의 예상된 크기를 지닌 band가 확인되었다 (Fig. 2D). 두번째로, anti-His tag항체를 이용하여 Western blot을 시행하였으며 이때에도 autoradiography에서 관찰된 동일한 크기의 3D8 V_H/k의 band가 관찰되었다 (Fig. 2E). Western blot상에서는 3D8 V_H/k 위쪽으로 강한 band가 나타났으나 이는 음성대조군에서도 같은 크기의 band가 확인되므로 rabbit reticulocyte lysate 자체에 anti-His antibody와 반응하는 단백질이 있는 것으로 생각된다.

3D8 V_H/k의 결합능력 확인 및 ribosome display에 의한 특이적 선별 확인. 우선 합성된 3D8 V_H/k가 ssDNA에 결합함을 ELISA로 확인하였다. ss DNA를 항원으로 사

용하고 3D8 V_H/k RNA로부터 *in vitro* translation한 3D8 scFv를 함유한 혼합액을 항체로 사용한 ELISA 결과에서 translation된 3D8 V_H/k는 ssDNA에 특이적 결합능력을 지니고 있는 것이 확인되었다 (Fig. 3A). ELISA에 의해서 ssDNA가 3D8 scFv에 특이적으로 결합함을 확인한 후, ribosome display를 통하여 ssDNA에 대하여 선택적으로 3D8의 유전자가 선별되는가를 실험하였다. Ribosome display의 selection과정을 거친 후 선택된 RNA로부터 RT-PCR 과정을 통해 3D8 유전자를 얻었다. *in vitro*에서 합성된 3D8 scFv를 함유한 ribosome complex를 ssDNA에 반응시킨 후 선별한 RNA를 RT-PCR한 후에는 뚜렷한 band를 확인하였다 (Fig. 3B). 반면에 *in vitro* 합성된 3D8 scFv를 함유한 ribosome complex를 음성대조군인 BSA에 반응시킨 후, RT-PCR한 경우에는 희미한 band가 관찰되었으며, 3D8 RNA가 생성되지 않은 경우에는 전혀 band를 관찰할 수 없었다. 이 결과는 ribosome complex내의 3D8 scFv항체가 ssDNA에 결합하는 것을 증명하는 것으로 ELISA결과와 일치된다. 또한 *in vitro* translation 이후, antibody-ribosome-mRNA complex가 선별과정 동안 유지된다는 것을 보여주며, ribosome display에 의하여 특정 항원에 결합하는 항체에 대한 유전자를 선택적으로 선별할 수 있음을 증명하는 것이다.

Ribosome display에 의한 면역 라이브러리로의 결합 능력 향상 확인. Ribosome display를 통해 3D8 scFv항체

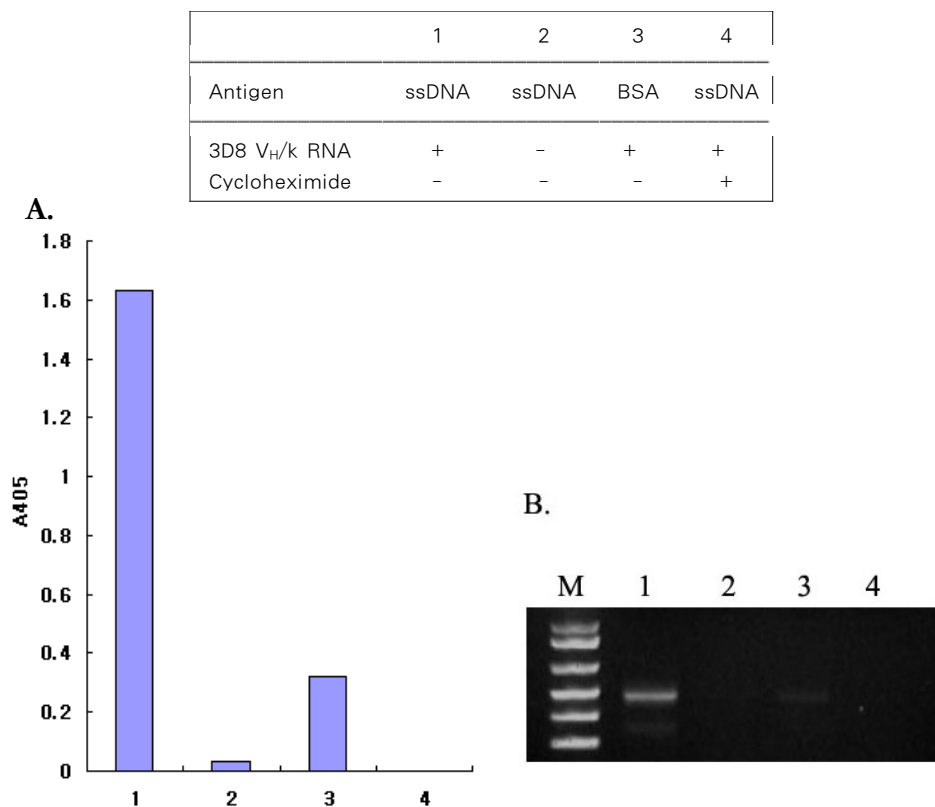


Figure 3. Binding activity and selectivity of 3D8 V_H/k through ribosome display. Each reaction condition was showed as table. A. ELISA of translated mixtures. Translated mixtures with 3D8 V_H/k RNA (1, 3), without RNA (2), and 3D8 V_H/k RNA with cycloheximide (4), were reacted with ssDNA (1, 2, and 4) or BSA (3). B. Selection and amplification of 3D8 gene by RT-PCR. Translated mixture with 3D8 RNAs (lane 1, 3), distilled water (lane 2), and 3D8 RNAs with cycloheximide, were selected with ssDNA (lane 1, 2, and 3) or BSA (lane 3).

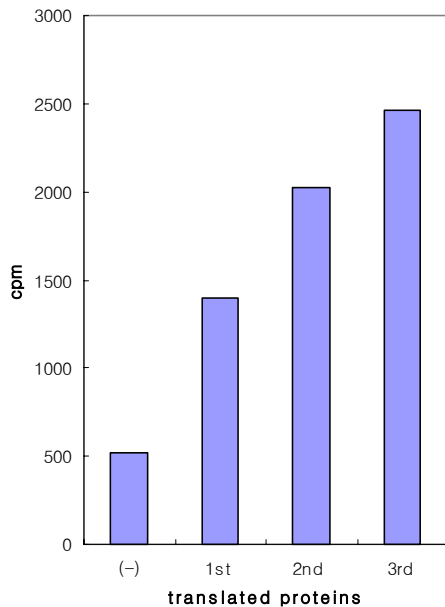


Figure 4. Analysis of enriched TP-peptide-specific scFv pools. Recovered DNAs from each round of ribosome display were used to analyze the presence of specific binders. Similar quantities of DNA from each round were used for *in vitro* transcription/translation. The [35 S] methionine labeled *in vitro* translated protein was bind to TP-peptide, and analyzed by RIA. Luciferase protein was translated as a negative control (-). 1st, 2nd, and 3rd selected pool are marked as 1st, 2nd, and 3rd.

가 ssDNA에 의해 선별될 수 있음을 확인한 후, 여기서 더욱 나아가 이러한 선별이 항체 라이브러리에서도 가능한지에 대해 조사하였다. 우선, 24개의 아미노산으로 구성된 합성 펩타이드 항원으로 면역된 마우스 비장으로부터 추출한 mRNA로 마우스 V_H/k 라이브러리를 재조합 PCR로 만들었다. 그 다음에 마우스 라이브러리를 ribosome display를 이용하여 선별하였으며, 선별을 많이 할수록 항원에 대한 선별된 라이브러리의 결합능력이 향상되는가를 조사하였다. 즉, 3D8 V_H/k 를 선별한 것과 같은 방법으로 생성된 마우스 라이브러리를 이용하여 3회 선별한 후 각각의 선별된 라이브러리 DNA를 *in vitro* transcription하여 RNA를 확인하고 정량하였다. 동일한 양의 RNA를 사용하여 *in vitro* translation한 뒤, 항원에 대한 결합능력을 radioimmunoassay로 조사하였다. 음성 대조군으로 luciferase를 합성하여 사용하였고, 3회 선별한 라이브러리를 각각 비교하였다. 선별을 거칠 때마다 항원에 대한 결합능력이 향상됨을 관찰할 수 있었고, 3차 선별한 라이브러리는 음성대조군에 비해 5배 정도의 결합 능력이 향상됨을 보였다(Fig. 4). 이 실험을 통해서 ribosome display 방법으로 라이브러리로부터 특정 항원에 대한 항체의 선별이 가능함을 증명할 수 있었다.

고 찰

본 연구의 목적은 항체 라이브러리로부터 특정 항원에 대한 재조합 항체의 선별이 가능하도록 ribosome display 방법을 확립하는 것이다. 우선적으로 DNA에 결합하는 3D8 항체를 이용하여 DNA를 항원으로 ribosome display를 시행하였을 때, 항원에 특이적으로 유전자의 선별이 가능한 것을 확인하였다. 이처럼 확립된 ribosome display 방법을 이용하여 특정항원으로 면역된 마우스에서 얻은 항체 라이브러리로 ribosome display를 반복하였을 때, 선별되는 라이브러리가 항원에 대한 결합능력이 증가하는 것을 관찰하였다. 따라서 본 연구는 ribosome display 방법을 통해 항체 라이브러리로부터 특정 항원에 대한 항체를 선별 할 수 있는 방법을 확립하였다.

최근 몇 년 사이에, 많은 의학 연구와 임상적인 치료에 단클론 항체의 적용이 확대되고 있다. 이미 몇 가지 단클론 항체는 상용화되어 여러 종양에 대한 보조적인 치료, 소아의 바이러스 감염 억제, 그리고 심혈관 질환의 치료 등에 이용되고 있으며, 단클론 항체를 이용한 임상적용에 관한 연구의 범위는 최근에 극도로 증가되고 있다(8,11,17,18). 임상적 치료 및 진단에 단클론 항체가 적용되기 위해서 해결되어야 할 중요한 과제는 인간 항체의 생산이다. 기존의 동물에서 유래한 단클론 항체들은 사람의 체내에 주입되면 이 항체에 대한 면역반응 유발로 주입된 단클론 항체의 효과가 없어지거나, 부작용을 유발하여 사용이 어려운 것으로 알려졌다. 이에 대한 가장 좋은 해결 방법은 인간에서 유래한 단클론 항체를 사용하여 주입된 항체에 대한 체내의 면역반응을 최소화하는 것이다. 그러나 인간 항체의 생산은 윤리적인 문제로 항원의 면역과정이 불가능하다. Ribosome display 방법은 이러한 사람 항체와 같은 유용한 단백질에 대해 효과적인 선별을 가능하게 할 것으로 기대되고 있다. 이 방법은 아직까지는 phage display 방법만큼 많은 연구가 이루어지지 않았으나 *in vitro* display가 지니는 뚜렷한 장점으로 인하여 유용한 항체 선별 방법으로 관심이 집중되고 있다. 이는 기존의 방법에서 문제가 되었던 라이브러리 크기의 한계를 극복함으로써 면역하는 과정 없이도 단클론 항체의 선별이 가능한 방법이다. 또한 전 과정이 *in vitro*에서 이루어지므로, 세포 내에서 발현이 불가능한 단백질도 선별이 가능하다는 장점을 지니고 있다. 이러한 장점들을 기반으로 본 연구에서 확립된 ribosome display 방법은 인간항체 선별과 같은 기존의 방법으로는 획득이 어려웠던 여러 단클론 항체 선별에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

그러나 실험적으로는 해결해야 할 한 가지 과제는 효과적인 선별을 위한 최적 조건을 찾아내는 것이다. Ribosome display에 있어서 단백질과 RNA가 complex로 유지

되어야 하므로 선별 과정에서 몇 가지 제한점들이 존재한다. 즉, 저온 상태를 유지해야 한다는 점과, RNase가 완전히 제거된 상태를 유지해야 한다는 점등을 들 수 있다. 이러한 조건에서 항체의 선별이 이루어지므로 라이브러리가 크다고 해도 선별 자체의 능력이 저하될 가능성이 있다. 이러한 점들을 극복하기 위한 노력들이 있어 왔으나(3,20), 아직 항체 라이브러리에는 적용되지 않았고 이를 위해 더 많은 연구가 필요할 것이다. 본 연구에서도 선별을 통해 얻어진 항체 라이브러리가 특정항원에 결합하는 능력의 증가가 기대치보다 비교적 낮았다. 3회까지만 선별과정을 거쳤기 때문에 단일클론을 얻기 위해서는 좀 더 선별과정을 반복하는 과정이 필요하겠지만, 면역화된 라이브러리를 사용했음을 고려하면 3회 정도의 선별과정으로도 충분한 결합능력을 나타내야 하지 않는가 하는 의문이 남는다.

아직 여러 문제점이 남아 있음에도 불구하고 본 연구는 3D8 scFv가 ssDNA 항원에의해 특이적으로 선별됨을 보였으며 항체 라이브러리에서 TP-peptide항원의 선별로 인해 항원에 대한 결합 능력이 증가됨을 보여주었다. 따라서 본 연구는 항체 라이브러리로부터 특정 항원에 대한 항체를 선별할 수 있는 ribosome display 방법을 확립하였다.

참 고 문 헌

1. Barbas CF, 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ: Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA* 88;7978-7982, 1991
2. Dall'Acqua W, Carter P: Antibody engineering. *Curr Opin Struct Biol* 8;443-450, 1998
3. Hanes J, Jermutus L, Schaffitzel C, Pluckthun A: Comparison of Escherichia coli and rabbit reticulocyte ribosome display systems. *FEBS Lett* 450;105-110, 1999
4. Hanes J, Pluckthun A: In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA* 94;4937-4942, 1997
5. Hanes J, Schaffitzel C, Knappik A, Pluckthun A: Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol* 18;1287-1292, 2000
6. He M, Menges M, Groves MA, Corps E, Liu H, Bruggemann M, Taussig MJ: Selection of a human anti-progesterone antibody fragment from a transgenic mouse library by ARM ribosome display. *J Immunol Methods* 231;105-117, 1999
7. He M, Taussig MJ: Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res* 25;5132-5134, 1997
8. Hoffman VF, Skiest DJ: Therapeutic developments in cytomegalovirus retinitis. *Expert Opin Investig Drugs* 9;207-220, 2000
9. Irving RA, Coia G, Roberts A, Nuttall SD, Hudson PJ: Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *J Immunol Methods* 248;31-45, 2001
10. Kwon MH, Lee MS, Kim KH, Park S, Shin HJ, Jang YJ, Kim HI: Production and characterization of an anti-idiotypic single chain Fv that recognizes an anti-DNA antibody. *Immunol Invest* 31;205-218, 2002
11. Lynn A, Williams ML, Sickler J, Burgess S: Treatment of chronic lymphocytic leukemia with alemtuzumab: a review for nurses. *Oncol Nurs Forum* 30;689-694, 2003
12. Makeyev EV KV, Spirin AS: Cell-free immunology: construction and in vitro expression of a PCR-based library encoding a single-chain antibody repertoire. *FEBS Lett* 444(2-3);177-180, 1999
13. Nicholls PJ, Johnson VG, Andrew SM, Hoogenboom HR, Raus JC, Youle RJ: Characterization of single-chain antibody (sFv)-toxin fusion proteins produced in vitro in rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 268;5302-5308, 1993
14. Orum H, Andersen PS, Oster A, Johansen LK, Rüsse E, Bjornvad M, Svendsen I, Engberg J: Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage. *Nucleic Acids Res* 21;4491-4498, 1993
15. Perelson AS, Oster GF: Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J Theor Biol* 81;645-670, 1979
16. Schaffitzel C, Berger I, Postberg J, Hanes J, Lipps HJ, Pluckthun A: In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 98;8572-8577, 2001
17. Stull DM: Targeted therapies for the treatment of leukemia. *Semin Oncol Nurs* 19;90-97, 2003
18. Untch M, Ditsch N, Hermelink K: Immunotherapy: new options in breast cancer treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 3;403-408, 2003
19. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR: Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12;433-455, 1994
20. Zhou JM, Fujita S, Warashina M, Baba T, Taira K: A novel strategy by the action of ricin that connects phenotype and genotype without loss of the diversity of libraries. *J Am Chem Soc* 124;538-543, 2002