

인간 단클론 항체 생산용 Humanized Xenomouse 제작의 기초 소재인 생쥐 Ig 중사슬 및 경사슬 Genomic DNA 클론의 확보 및 유전자 적중 벡터의 제작

¹(주)아이지세타피, ²강원대학교 농업생명과학대학 생명공학부

이 희 경¹ · 차 상 훈^{1,2}

Isolation of Mouse Ig Heavy and Light Chain Genomic DNA Clones, and Construction of Gene Knockout Vector for the Generation of Humanized Xenomouse

Hee-kyung Lee¹ and Sang-hoon Cha^{1,2}

¹IG Therapy Co., ²Kangwon National University, College of Agriculture & Life Sciences, Div. of Biotechnology, Chuncheon, Korea

ABSTRACT

Background: Monoclonal antibodies (mAb) of rodent origin are produced with ease by hybridoma fusion technique, and have been successfully used as therapeutic reagents for humans after humanization by genetic engineering. However, utilization of these antibodies for therapeutic purpose has been limited by the fact that they act as immunogens in human body causing undesired side effects. So far, there have been several attempts to produce human mAbs for effective *in vivo* diagnostic or therapeutic reagents including the use of humanized xenomouse that is generated by mating knockout mice which lost Ig heavy and light chain genes by homologous recombination and transgenic mice having both human Ig heavy and light gene loci in their genome. **Methods:** Genomic DNA fragments of mouse Ig heavy and light chain were obtained from a mouse brain λ genomic library by PCR screening and cloned into a targeting vector with ultimate goal of generating Ig knockout mouse. **Results:** Through PCR screening of the genomic library, three heavy chain and three light chain Ig gene fragments were identified, and restriction map of one of the heavy chain gene fragments was determined. Then heavy chain Ig gene fragments were subcloned into a targeting vector. The resulting construct was introduced into embryonic stem cells. Antibiotic selection of transfected cells is under the progress. **Conclusion:** Generation of xenomouse is particularly important in medical biotechnology. However, this goal is not easily achieved due to the technical difficulties as well as huge financial expenses. Although we are in the early stage of a long-term project, our results, at least, partially contribute the successful generation of humanized xenomouse in Korea. (*Immune Network* 2002; 2(4):233-241)

Key Words: Hybridoma fusion, monoclonal antibody, human antibody, immunoglobulin gene, transgenesis, gene targeting

서 론

설치류 단일클론 항체는 제작이 용이하고 대량 생산이 가능하기 때문에 진단시약이나 치료제, 그리고 생물 및 의학 분야 기초연구에 매우 유용하게 사용되고 있다. 특히 설치류 단일클론 항체를 치료제 용도로서 사용 시 항원에 대한 특이성과 결합 능력이 매우 우수하다는 장점이 있으나 설치류 기원의 항체가 환자 체내에서 면역

책임저자 : 차상훈, 강원대학교 농업생명과학대학 생명공학부
☎ 200-701, 강원도 춘천시 효자 2동 192-1
Tel: 82-33-250-6485, Fax: 82-33-253-6485
E-mail: chash@kangwon.ac.kr

본 연구는 1999년 한국과학재단 산학협동연구(1999-21200-001-2) 지원과제임.

반응(HAMA, human anti-mouse antibody response)을 유도하여 체내에 투여된 항체가 빠르게 제거되는 rapid clearance 현상이 나타나고, 인간 항체의 Fc 지역에 의해 이루어지는 CDC (complement dependent cytotoxicity)나 ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) 같은 human immune effector 기능을 유도하지 못하며 설치류의 항체를 사람에게 계속 투여할 경우 그 환자에게서 알레르기 부작용을 나타낼 수가 있다는 등 여러 문제점이 부각되었다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 인간 단일클론 항체의 생산기술이 개발되고 있으며(1) 일차적으로 기존의 생쥐 단일클론 항체를 유전자 조작을 통하여 인간화시킨 키메라 항체가 현재 인체 질환의 진단 및 치료제로 상용화되고 있다(2,3).

항체는 구조적으로 가변영역과 불변영역으로 구분되며, 가변영역은 다시 항원과의 결합 특이성에 직접 영향을 미치는 CDRs (complementarity determining regions)과 CDR loop를 지탱해주는 FRs (framework regions)로 나눌 수 있다. 인간화 항체는 생쥐 항체의 CDR loops를 인간 항체의 FRs에 이식시키는 CDR 이식 방법에 의하여 제조되고 있다(4). 그러나 단순히 CDR 만을 이식할 경우 인간화 항체의 친화력이 떨어지므로 CDR의 3차원 구조에 영향을 줄 것으로 생각되는 몇 개의 중요한 FR 아미노산 잔기를 생쥐 항체의 것으로 치환시킴으로써 친화력을 향상시키고자 시도되고 있다(5). 인간화 항체는 약 5~10%의 생쥐항체 서열만을 포함하고 있으므로 HAMA 반응이 더 적고 또한 우수한 치료 효과를 나타내나 HAMA 반응을 유발시킬 수 있는 문제점이 여전히 존재한다는 단점을 지니고 있다. 따라서 완전한 형태의 인간 단일클론 항체가 인체 투여용 치료 항체 신약으로서 가장 바람직하나 생쥐 단일클론 항체를 만드는 것과 같이 hybridoma 융합 기술에 의하여 생산하는 것이 기술적으로 불가능하며 인간 단일클론 항체를 제조할 수 있는 새로운 기술로 phage display 기술과 humanized xenomouse 기술이 현재 사용되고 있다(6,7).

특히 humanized xenomouse는 hybridoma 융합 기술을 이용하여 손쉽게 고친화력의 기능성 있는 순수한 인간 단일클론 항체를 안정적으로 생산하는 세포주를 획득할 수 있으며 따라서 신약 개발 용도로서의 인간 단일클론 항체를 제작, 생산하기 위한 가장 이상적인 기술로 인식되고 있다. 인간 중사슬 및 경사슬 항체 유전자가 이식된 생쥐(humanized xenomouse)의 제작은 생쥐 자체의 항체 유전자를 적중하여 항체 결핍 생쥐를 제작한 후 인간 항체 유전자가 이식된 생쥐와 교배를 통하여 자신의 항체 유전자 기능은 제거되고 인간 항체 유전자만이 기능을 하는 키메라 생쥐의 제작으로 이루어지는데 우선 생쥐 배아줄기 세포(embryonic stem cell, ES cell)를 사용하여 먼저 생쥐 항체 유전자의 능력을 제거하기 위해 IgH

locus(8)의 J_H 지역과 Igκ locus(9,10)의 C_κ 지역을 homologous recombination에 의해 적중함으로써 murine IgH와 Igκ loci를 불활성시키게 된다(11). 이렇게 생산된 mJ_H^{-/+} 마우스와 mC_κ^{-/+}마우스의 교배를 통해 double inactivated mJ_H^{-/-}; mC_κ^{-/-} (DI) 생쥐 strain을 생산한다(12). 두 번째 유전자 조작의 단계는 human Ig loci가 삽입된 yeast artificial chromosome (YAC)을 이용한 것으로서 megabase (Mb)크기의 human IgH 혹은 human Ig loci (13)를 지니고 있는 yeast의 spheroplast와 배아줄기 세포를 융합하는 yeast spheroplast-ES cell fusion (14) 기술을 이용하여 생쥐 배아줄기 세포로 도입시킴으로써 human yK2와 yH2를 생산하는 유전자 이식 생쥐를 각각 제작한 후 교배하여 human yk2 : yH2와 murine immunoglobulin (Ig)을 동시에 생산하는 생쥐 strain을 생산하게 된다. 두 차례의 유전자 조작단계를 통해 생산된 DI mice와 human yk2 : yH2 : muIg mice를 다시 교배함으로써 최종적으로 yk2 : yH2 : DI 형태의 인간 항체를 생산하는 humanized xenomouse를 제작하게 된다(15,16).

Humanized xenomouse는 항원 특이적인 완전한 형태의 단일클론 항체를 높은 친화도로 생산할 수 있다는 큰 장점을 갖고 있기 때문에 이미 미국이나 일본 등에서는 활발히 연구되고 있고 미국의 Abgenix사의 경우 humanized xenomouse를 이용하여 EGF, IL-8 등과 결합하는 인간 단일클론 항체 치료제를 생산하여 이미 임상단계까지 와 있으나 국내에서는 연구에 소비되는 연구비와 기간, 기술력, 특허권 등에 관한 전반적인 문제점으로 인해 연구가 진행되고 있지 못한 실정이다.

본 연구에서는 인간 단일클론 항체의 생산을 위해 사용되는 humanized xenomouse의 제작에 가장 먼저 사용되는 생쥐 Ig 유전자 적중 생쥐의 제작을 위한 유전자 적중 construct를 제작하였다.

재료 및 방법

PCR을 이용한 λ genomic DNA library의 검색. 생쥐 Ig 중사슬 및 경사슬 knockout genomic constructs의 제작을 위하여 우선 129/SV 생쥐 strain의 brain λ genomic DNA library를 (주)마크로젠으로부터 제공받아 이로부터 생쥐 Ig 중사슬 및 경사슬 유전자 절편을 포함하고 있는 λ phage 클론을 분리하고자 PCR과 non-radioactive probe를 이용한 Southern blot (17)으로 library 검색을 다음과 같이 수행하였다(18,19). 밤새 배양한 *E. coli* XL1-blue MRA P2 배양액 1 ml과 129/SV λ genomic library의 10⁶ phage를 혼합하여 상온에서 20분간 배양한 다음 10 mM MgSO₄가 포함된 LB 20 ml에 희석하여 96-well plate (Corning, USA)의 각 well에 100μl씩 분주한 후 37°C 진탕배양기에서 5~6시간 배양시켰다. 96-well plate의 A~H, 1~8 줄별로 각 well의 배양액을 모아 5분간 원심 분

리한 상등액에 포함되어 있는 phage를 주형으로 하여 생쥐 중사슬 Ig C μ 와 경사슬 Ig C κ 에 특이적인 PCR primers (C μ sense primer: 5'-AGAGTCAGTCCCTTCGC-AAATGT-3', anti-sense primer: 5'-GCACATGCAGATC-TCTGTTTTT-3', C κ sense primer: 5'-CTGCACCAACTG-TATCCATCTT-3', anti-sense primer: 5'-CACTCATTC-CTGTTGAAGCTCT-3')와 *Ex Taq* polymerase premix (Takara, Japan)로 94°C 1분, 61°C 1분, 72°C 1분의 조건으로 PCR machine (Perkin Elmer 9600)을 이용하여 각각 약 300 bp의 C μ 및 C κ 유전자 절편을 증폭하였다. 획득된 DNA 절편은 TBE buffer를 이용하여 만든 0.7%의 agarose gel로 확인하였다. 1차 검색 결과 positive band가 나타난 줄과 열이 일치하는 well을 같은 조건으로 PCR 하여 signal이 강하게 나온 well을 선택하여 상기와 같은 방법으로 바이러스를 다시 96 well plate에 분주하여 PCR 과 Southern blot을 실시함으로써 이차 검색을 시행하였다.

Southern blot. PCR 검색에 사용한 agarose gel을 southern blot에 이용하기 위해 gel을 0.25 N HCl에 15분간 방치하여 denature시키고 증류수로 2회 세척한 후 0.5 N NaOH에 30분간 방치하여 중화시켰다. 증류수로 다시 2회 세척한 후 vacuum blotter (Bio Rad, USA)에 nylon membrane (Amersham Pharmacia, Sweden)을 놓고 그 위에 gel을 올려 90분간 transfer하였다. DNA가 transfer된 membrane을 air dry한 후 UV cross linker (Bio Rad)에 5분간 노출시켜 고정한 다음 42°C에서 2시간 prehybridization한 후 DIG DNA labelling kit (BMB, Germany)와 제조사의 실험 protocol에 의하여 합성된 probe로 42°C에서 overnight (O/N) hybridization시켰다. Hybridization시킨 membrane을 maleic acid -0.3% tween 20 buffer로 세척한 후 30분간 blocking한 다음 anti-digoxigenin-AP conjugate (BMB)를 1 : 5000으로 희석하여 30분간 반응시키고 세척한 후 ECL (Amersham Pharmacia) 용액을 가하여 5분 동안 반응시킨 후 암실에서 X-ray film (BMB)에 노출시켜 반응을 확인하였다.

Positive λ phage의 획득. 2차 검색에서 획득된 positive well의 바이러스를 *E. coli*에 감염시켜 plaque을 형성시킨 후 각각의 plaque을 sterile pasteur pipet (Corning, USA)으로 분리해낸 후 SM buffer에서 약 2시간 동안 바이러스를 방출시켜 같은 조건으로 PCR을 수행하여 생쥐 Ig 중사슬과 경사슬 유전자 절편이 삽입되어 있는 바이러스 클론을 획득하였다(20). 최종적으로 획득된 Ig 중사슬과 경사슬 phage 클론으로부터 먼저 Ig 중사슬 phage 클론의 λ DNA를 분리해 내기 위해 phage 입자를 O/N culture한 XL1-blue MRA P2 배양액 1 ml과 혼합하여 R/T에서 20분간 배양한 후 50°C의 top agar 10 ml을 첨가하여 잘 섞어 준 다음 150 mm plate (Corning)에 plating하여 37°C

에서 O/N 배양함으로써 증식시켰다. 증식된 바이러스는 SM buffer 14 ml을 가하여 4°C에서 O/N 방출시켰고 phenol/chloroform extraction 1회를 거쳐 얻은 상등액으로부터 λ DNA purification kit (Promega, USA)를 이용하여 λ DNA를 분리하였다.

Ig C μ PCR fragment의 DNA 염기배열 확인. Ig C μ specific primer에 의해 증폭된 약 300 bp의 fresh PCR product 1 μ l을 TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, USA)의 PCR 2.1 vector 2 μ l과 혼합하여 상온에서 5분간 방치한 후 이 중 2 μ l만을 취하여 TOP 10 competent cell과 잘 섞어 주었다. 얼음에서 30분간 방치한 후 42°C에서 90초간 열충격 방법으로 transformation하여 1 ml의 LB 배지를 가한 다음 37°C 진탕 배양기에서 1시간 가량 배양한 후 이 중 100 μ l을 취하여 LB/Amp plate에 plating하여 37°C에서 O/N 배양하였다. 형성된 콜로니를 10개 선별하여 LB/Amp broth가 담긴 시험관에 접종하고 O/N 배양한 후 이로부터 plasmid를 분리한 다음 *EcoR* I 제한 효소로 37°C에서 4시간 동안 처리하여 절단한 후 1% agarose gel에 전기 영동하여 유전자 절편을 확인하였다. 유전자 절편이 확인된 클론의 plasmid는 SV miniprep kit (Promega)를 이용하여 깨끗하게 분리한 후 (주)Bionex에 DNA sequencing을 의뢰하였다.

중사슬 Ig 유전자 절편의 subcloning. 중사슬 λ DNA를 제한 효소 *Nob* I (Takara, Japan)으로 절단하여 Ig C μ genomic 유전자의 크기를 확인한 후 restriction mapping에 필요한 충분한 DNA를 확보하기 위해 pBluescript SK(-) 벡터(Stratagene, USA)에 클로닝하였다. 우선 Ig 중사슬 λ DNA를 제한 효소 *Nob* I으로 절단한 후 0.7% low melting agarose gel (Quantum, Canada)에 전기 영동하여 14 kb의 절편을 gel 상에서 잘라 phenol/chloroform extraction방법과 에탄올 침전법으로 농축하였고 벡터는 같은 제한 효소로 절단하여 30 U의 calf intestinal phosphatase (BMB)를 37°C에서 1시간 처리한 후 1 μ l의 0.5 M EDTA를 넣고 65°C에서 1시간 동안 불활성화하였다. 준비된 insert과 벡터를 UV spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Sweden)로 260 nm에서 정량한 후 T4 DNA ligase (Promega) 처리하여 16°C에서 O/N ligation한 반응액 1 μ l을 XL-1 blue competent cell에 잘 섞어준 다음 얼음에 30분 방치하고 42°C에서 90초간 열충격을 주는 방법으로 transformation 하였다. 800 μ l의 LB 배지를 가하여 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 LB/Amp plate에 plating한 후 37°C에서 O/N 배양하여 형성된 콜로니를 무작위적으로 30개 선별한 다음 LB/Amp 배지에서 배양한 배양액으로부터 plasmid를 분리하고 *Nob* I 제한 효소로 절단하여 14 kb의 insert를 확인하였다.

적중 벡터의 제작. pBluescript SK(-)에 클로닝된 중사슬 절편을 *Nob* I 제한 효소로 절단하여 0.7% low melting

agarose gel (Quantum)에 전기 영동하여 14 kb의 fragment를 gel 상에서 잘라낸 후 *Eco* RI, *Hind* III, *Xba* I, *Xho* I 등의 제한효소를 사용하여 restriction mapping을 실시하여 제한 효소의 위치를 확인하고 적중 벡터를 제작하였다. Restriction mapping을 통해 확인된 제한효소의 위치를 이용하여 short arm은 *N6t* I/*Xho* I, long arm은 *Xba* I/*Xba* I의 제한 효소를 선택하여 37°C에서 4시간 동안 처리하여 0.7% low melting agarose gel을 사용해 분리한 후 targeting vector인 pPNT vector에 short arm과 long arm을 차례로 클로닝하였다. 클로닝된 적중 벡터는 최종적으로 *N6t* I 제한 효소로 절단하여 올바른 방향으로 클로닝되었는지 확인하였다. 제작된 적중 벡터는 배아 세포내의 염색체로 효율적으로 integration시키기 위해 *N6t* I 제한효소로 처리하여 linearization하였다.

Feeder cell의 배양. 세포 배양에 필요한 4 well, 12 well, 24 well, 48 well, 96 well, 60 mm, 100 mm, 150 mm plate (Corning)를 0.1% gelatin (Sigma Co., USA)으로 coating하여 30분간 방치하였다가 걷어 낸 후 2시간 가량 clean bench 내에서 dry시킨 다음 150 mm plate에 G418 저항성이 있는 STO cell을 10%의 FBS (Gibco BRL, USA)가 첨가된 DMEM (Gibco BRL) 배지(DMEM-10)에 배양하여 feeder cell로 이용하였다. 약 3일간 feeder cell을 배양하여 confluent하게 자라던 유사 분열을 방지하기 위해 mitomycin C (Sigma Co.)를 10 μ g/ml의 농도로 DMEM 배지 10 ml과 혼합하여 37°C에서 2시간 동안 처리하여 불활성시킨 후 DMEM-10으로 3회 세척해 주고 0.25% trypsin-EDTA (Gibco BRL)을 4 ml 가하여 37°C에서 5분간 방치하였다. 세포가 plate바닥으로부터 떨어지기 시작하면 pipetting하여 single cell로 만든 후 5 ml의 DMEM-10을 첨가하여 trypsin-EDTA의 활성을 저해시키고 800 g에서 5분간 원심분리한 다음 상등액을 제거한 후 새 배지 10 ml에 세포를 현탁하였다. 세포 100 μ l을 취해 trypan blue (Sigma Co.)로 염색하여 세포의 수를 측정한다. 다음 3.5 \times 10⁵ cells/ml로 세포수를 계산하여 4 well, 60 mm, 100 mm plate에 분주하고 세포가 바닥에 붙도록 4~5시간 가량 37°C에서 배양하였다(21-23).

배아줄기 세포의 배양. ATCC에서 구입한 D3 배아줄기 세포 stock을 ES DMEM-15와 혼합하여 미리 분주해 놓은 feeder cell로 seeding 하였다. ES DMEM-15는 standard DMEM 배지에 non essential amino acid (Gibco BRL, USA) 0.1 mM과 15%의 ES cell 배양용 FBS (Gibco BRL), 분화 억제 물질인 LIF (leukemia inhibitory factor) (Gibco BRL) 10 ng/ μ l을 첨가하여 만들었다. 초기 배양 시 4 well plate에서 배양한 후 12~24시간마다 배지를 교체하면서 약 3일간 배양하여 ES cell의 colony가 적당하게 자라던 상기에서와 마찬가지로 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 1 : 5 또는 1 : 10으로 희석하여 feeder

cell이 있는 100 mm plate로 분주하였다. Electroporation을 할 경우 가장 높은 밀도로 ES cell을 분주하였다.

적중 벡터의 electroporation. Electroporation 하기 전날 feeder cell을 배양하여 100 mm plate 5개로 분주하여 놓고, 100 mm plate에 분주한 배아줄기 세포를 12시간마다 새 배지로 교체하면서 3일간 배양하여 confluent하게 자란 배아줄기 세포의 배지를 electroporation하기 약 4시간 전에 새 배지로 교체하여 주었다. 0.25% trypsin-EDTA 4 ml를 37°C에서 5분간 처리하여 세포가 떨어지기 시작하면 현탁하여 single cell로 만들고 15 ml conical tube에 담아 800 g에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 PBS (Gibco BRL) 10 ml에 현탁하여 hemocytometer로 counting한 다음 2 \times 10⁷의 cell을 다시 원심분리 하여 얻은 cell pellet을 0.7 ml의 PBS로 현탁하였다. 0.7 ml의 세포와 25 μ l의 linearized DNA (1 μ g/ml)를 조심스럽게 섞어 미리 얼음에 넣어두었던 0.4 cm cuvette (Bio Rad)에 pasteur pipet을 이용하여 넣어주고 0.25 kV, 500 μ F의 상태에서 GenePulser (Bio Rad)를 이용하여 electroporation한 후 상온에서 10분간 방치하였다. 4.5 ml의 ES DMEM-15가 담겨 있는 15 ml tube로 pasteur pipet을 이용하여 cuvette 안의 세포들을 옮기고 섞어준 후 전날 분주해 놓은 100 mm 5개 plate의 feeder cell위로 각각 1 ml씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

Homologous recombination된 배아줄기 세포의 선별. 24시간 동안 배양한 후 4개의 plate는 300 μ g/ml의 G418 (Sigma Co.)과 2 μ M의 ganciclovir를 ES DMEM-15 배지에 첨가하여 선별을 시작하였고, 1개의 plate는 300 μ g/ml의 G418만을 첨가하여 선별함으로써 선별 비율을 알아보기 위한 대조군으로 사용하였는데 선별을 시작한 후 5일 동안은 매일 배지를 교체하였고 5일 이후부터는 2일에 한번씩 배지를 교환하면서 10일 동안 선별을 실시하였다. 9일째 되는 날 불활성화된 feeder cell을 48 well plate에 분주하여 10일째에는 이 plate의 배지를 ES DMEM-15로 교체하여 주고, 24 well plate에는 LIF가 첨가되지 않은 ES DMEM-15를 넣어 준비해 둔 다음 96 well plate에는 80 μ l의 0.25% trypsin-EDTA를 담아 놓고 incubator에서 prewarming시켰다. P20 pipet으로 confluent하게 자란 ES cell colony들을 1개씩 따서 0.25% trypsin-EDTA가 담겨져 있는 well에 한 개씩 넣어주고 37°C incubator에서 약 3분간 방치한 후 pipet으로 20회 정도 pipetting하여 배아줄기 세포 콜로니가 single cell이 되도록 한 다음 각각 35 μ l은 24 well plate에 분주하고 45 μ l은 48-well plate에 분주하였다. 약 3시간 후 각 plate의 배지를 교환해 준 다음 48 well의 plate는 약 3일간 배양 후 각 well에 10% DMSO가 첨가된 ES DMEM-15로 배지를 교환한 후 크린랩으로 싸서 styrofoam box에 넣어 deep freezer에 보관하였고 24 well plate의 배아줄기 세포는

LIF가 첨가되지 않은 ES DMEM-15로 약 7~10일간 배양한 후 confluent하게 자랐을 때 genomic DNA 분리를 위해 사용하였다. Genomic DNA를 이용하여 PCR과 Southern blot을 실시하기 위해 Neo specific primer를 제작 사용하였다(sense primer: 5'-TCCTTACTGTTCCC TTGATCCA-3', anti-sense primer: 5'-CATTCAGGGCACCGGACA-3') (24).

결과 및 고찰

생쥐 항체 중사슬 genomic 유전자의 획득. 생쥐 Ig 중사슬 유전자 적중 (knockout) construct의 제작을 위해 (주)마크로젠으로부터 제공받은 129/SV mouse strain의 brain λ genomic DNA library를 이용하여 생쥐 항체 중사슬 유전자와 경사슬 유전자 절편의 검색을 실시하였다. Bacteriophage λ genomic library의 바이러스를 titer하여 정확한 수를 계산한 후 well당 10,000개 정도가 들어가도록 약 2×10^6 개의 바이러스를 2개의 96-well plate에 8×8 format으로 각각의 well에 seeding하여 이로부터 획득한 상등액을 줄과 열별로 혼합하여 PCR template으로 사용하였다. Ig C μ 에 대한 specific primer를 제작하여 1차 PCR 검색을 실시한 결과 약 300 bp의 Ig C μ 유전자 절편을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). PCR 검색 시 positive control은 λ genomic DNA library의 바이러스를 straight로 10^8 씩 사용하였고 negative control은 template을 넣지

않는 조건으로 검색하였다. PCR 결과를 확인한 후 곧바로 생산물을 Southern blot에 사용하였는데 Fig. 1B에서 볼 수 있듯이 PCR 결과에서 나타난 band와 일치하는 signal이 southern blot에서도 나타난 것을 확인할 수 있었고 probe의 특이성과 민감성으로 인해 PCR로 확실히 확인할 수 없던 band도 Southern blot에서는 signal이 나타나는 것을 알 수 있었다.

일차 검색 결과 positive 반응을 보인 96 well plate의 줄과 열이 일치하는 각각의 well로부터 상등액을 취하여 Ig C μ genomic phage clone의 이차 PCR 검색을 수행하였다. 줄과 열이 일치하는 positive well은 plate #1에서 17개였고 plate #2에서 18개였으며 이 중 6개 정도가 강한 band가 나타났다(data not shown). 1차 검색에서와 마찬가지로 PCR 결과에서는 보이지 않던 band가 southern blot에서 많이 나타났고 negative control에도 PCR에서 보이지 않던 band가 나타났지만 1차 검색에서 PCR 결과와 southern blot의 결과가 일치하였고 2차 검색에서도 거의 일치하는 결과를 보였으므로 positive control lane에서의 over loading에 의해 나타난 것으로 판단하고 이 중 가장 signal이 강한 1번 plate 7번 well의 positive clone을 선택하여 3차 single plaque의 검색을 진행하였다(data not shown).

이차 검색 결과 positive 반응을 보인 96-well plate의 각 well 중에서 7번 well의 바이러스를 titer하여 plate당 약

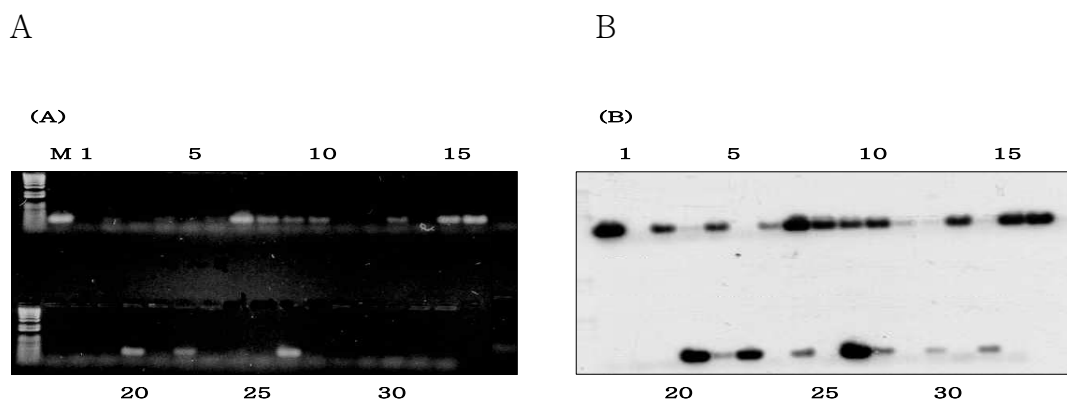


Figure 1. Primary screening of a mouse λ genomic DNA library for λ phage clones containing Ig C μ genomic DNA fragments. λ genomic DNA library from the brain of 129/SV mouse strain was screened in order to obtain λ phage clones containing Ig C μ genomic DNA fragments by PCR (A) and Southern blot using non-radioactive probe (B). Phage from the library were mixed with XL1-blue MRA P2 cells, and incubated in 96 well plates. Culture supernatant containing phage particles from each well was harvested and mixed vertically (1 to 8, respectively) or horizontally (A to H, respectively), and used as templates for PCR (PCR primers were shown in the Materials & Methods). PCR products were analyzed by 0.7% agarose gel. For Southern blot, DNA fragments from the gel were transferred to nylon membrane, and hybridized with non-radioactive probe generated with 300 bp of Ig C μ genomic DNA fragment using DIG DNA labeling kit. The membrane was incubated with anti-digoxigenin-AP conjugate, and ECL was used to visualize signals on X-ray film. (A) PCR analysis (0.7% agarose gel). M: 1 kb ladder, lane 1: positive control, lane 2: negative control (no template), lane 3-10: #1 plate 1 to 8, lane 11-18: #1 plate A-H, lane 19-26: #2 plate 1-8, lane 27-33: #2 plate A-H. (B) Southern blot analysis. Lane 1: positive control, lane 2: negative control (no template), lane 3-10: #1 plate 1 to 8, lane 11-18: #1 plate A-H, lane 19-26: #2 plate 1-8, lane 27-33: #2 plate A-H.

1,000개의 plaque이 형성되도록 O/N 배양한 *E. coli* XL-1 blue strain 500 μ l과 혼합하여 상온에서 20분간 배양한 후 50°C의 top agar 10 ml을 첨가하고 LB agar plate에 plating 하여 37°C에서 O/N 배양하였다. 형성된 single plaque을 disposable pasteur pipet을 이용하여 picking한 후 100 μ l의 SM buffer에 넣어 상온에서 6시간 가량 바이러스를 방출 시킨 다음 상등액 1 μ l을 취하여 single λ phage clone의 최종 검색을 실시하였다. 그 결과 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 최종적으로 3개의 positive clone을 획득할 수 있었다. **Ig C μ PCR fragment의 DNA 염기배열 확인.** Library

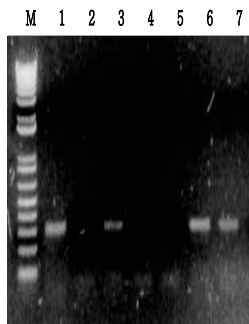


Figure 2. Identification of λ phage clones containing Ig C μ genomic DNA fragments. Single plaque was obtained from each phage clones that gave positive signals at both primary and secondary screens as described in the Materials & Methods. Phage particles were released using SM buffer, and used as templates for PCR analysis. M: 1 kb ladder, lane 1: positive control, lane 2: negative control (no template), lane 3-7: λ phage clones.

검색에 사용한 PCR fragment가 Ig heavy chain의 5'지역 (exon 1)임을 재확인하기 위하여 TOPO TA cloning vector에 클로닝한 후 DNA sequencing을 통해 염기 배열을 조사하였다. 그 결과 PCR fragment의 DNA sequence가 Genbank blast search를 통해 생쥐 IgM constant 지역 (*Mus musculus* hybridoma 13F1 Ig heavy chain mRNA, Genebank accession No.: AF052835)과 완벽한 유사성을 지닌 μ chain임을 확인하였다(data not shown).

생쥐 항체 경사슬 genomic 유전자의 획득. 중사슬 항체 유전자의 검색과 같은 방법으로 일차 검색을 실시한 결과 출과 열이 일치하는 positive well을 1번 plate에서 17개, 2번 plate에서 19개를 선별하여(Fig. 3) 각각 상등액을 취하여 PCR을 이용한 이차 검색을 수행하였다. 이차 검색 결과 positive 반응을 보인 96-well plate 각 well 중에서 1번 well의 바이러스를 plating하여 얻은 single plaque 5개로부터 얻은 단클론 바이러스 상등액을 이용하여 삼차 검색을 실시한 결과 Ig C κ genomic phage clone 3개를 최종적으로 획득할 수 있었다. 이와 같은 PCR 검색 방법을 이용하여 129/SV λ genomic DNA library로부터 최종적으로 Ig C μ genomic DNA fragment가 삽입되어 있는 λ phage clone 3개와 Ig C κ genomic DNA fragment가 삽입되어 있는 λ phage clone 3개를 획득하였다(Fig. 4).

중사슬 genomic DNA 절편의 클로닝. PCR 검색 방법을 통해 획득한 3개의 중사슬 positive clone과 3개의 경사슬 positive clone중 우선적으로 중사슬과 경사슬 positive clone 1개씩을 선택하여 증폭시킨 다음 λ genomic DNA를 분리한 뒤 *N*ot I 제한 효소로 절단하여 Ig genomic DNA fragment의 크기가 중사슬인 경우 약 14 kb, 경사슬인 경우 약 17 kb임을 확인할 수 있었다(data not shown).

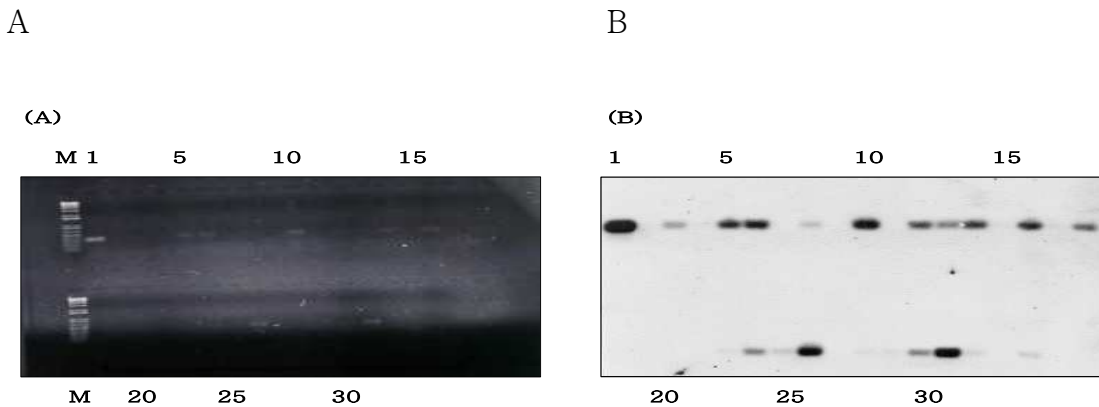


Figure 3. Primary screening of a mouse λ genomic DNA library for λ phage clones containing Ig C κ genomic DNA fragments. Experiments were performed as in Fig. 1 except that Ig C κ specific primers were used for PCR. (A) PCR analysis (0.7% agarose gel). M: 1 kb ladder, lane 1: positive control, lane 2: negative control (no template), lane 3-10: #1 plate 1 to 8, lane 11-18: #1 plate A-H, lane 19-26: #2 plate 1-8, lane 27-33: #2 plate A-H. (B) Southern blot analysis. Lane 1: positive control, lane 2: negative control (no template), lane 3-10: #1 plate 1 to 8, lane 11-18: #1 plate A-H, lane 19-26: #2 plate 1-8, lane 27-33: #2 plate A-H.

또한 restriction mapping을 위한 DNA의 충분한 양을 확보하기 위해 pBluescript SK(-) 클로닝 벡터에 *Not* I 제한 효소 자리로 절단하여 Ig μ chain gene fragment를 low-melting temperature agarose gel을 이용하여 분리한 후 이를 pBluescript SK(-) vector에 클로닝하였다.

적중 벡터의 제작. pBluescript SK(-)에 Ig μ chain gene 이 클로닝된 plasmid로부터 Ig μ chain 유전자 절편을 분리하여 *Xho* I, *Eco* R I, *Xba* I, *Sma* I, *Sac* I, *Bam* H I, *Kpn* I 등의 제한효소로 restriction mapping을 분석하였다. 우선 하나의 제한 효소를 이용하여 절단하고 유전자 절편을 확인하였을 때 *Pst* I은 절편 내에 제한 효소 자리가 너무 많았기 때문에 제외시켰고 1개의 제한 효소 자리가 확인된 *Eco* R I과 다른 하나의 제한 효소를 이용한 double digestion을 통하여 더 확실한 restriction mapping을 실시하였다(data not shown). 그 결과를 토대로 생쥐 Ig 중사슬 genomic DNA 절편의 restriction mapping을 완성하였다(Fig. 5). 생쥐 Ig 중사슬 genomic DNA 절편상에 존재



Figure 4. Identification of λ phage clones containing Ig $C\mu$ genomic DNA fragments. Experiments were performed as in Fig. 2 except that Ig $C\mu$ specific primers were used for PCR. M: 1 kb ladder, lane 1: positive control, lane 2: negative control (no template), lane 3-8: λ phage clones.

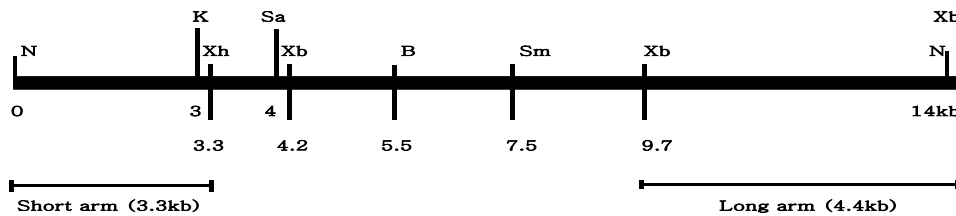


Figure 5. Diagram showing. pBluescript SK(-) containing Ig $C\mu$ genomic DNA fragment was treated with *Not* I restriction enzyme and 14 kb of DNA fragment was purified with low melting agarose gel. The resulting DNA fragment was digested with different combination of restriction enzymes in order to determine restriction map. N: *Not* I, Sa: *Sac* I, Sm: *Sma* I, Xb: *Xba* I, Xh: *Xho* I, B: *Bam* H I, K: *Kpn* I.

하는 제한 효소 자리의 위치와 적중벡터로 사용하는 pPNT ((주)마크로젠 공급)의 클로닝 site를 참조하여 3.3 kb의 *Not* I/*Xho* I fragment를 short arm, 그리고 4.3 kb의 *Xba* I fragment를 long arm으로 사용하기로 결정하였다.

생쥐 Ig 중사슬 적중 벡터의 제작을 위하여 우선 3.3 kb의 *Not* I/*Xho* I fragment를 pPNT vector에 삽입하여 3.3 kb의 insert과 7.2 kb의 벡터를 확인할 수 있었고 short arm이 클로닝된 pPNT vector에 다시 4.3 kb의 *Xba* I/*Xba* I fragment를 클로닝하여 4.3 kb의 insert과 10.5 kb의 벡터를 확인함으로써 성공적으로 유전자 적중 construct를 제작하였다(Fig. 6). 획득된 생쥐 Ig 중사슬 genomic 절편에서 $C\mu$ exon 1의 위치를 확인하기 위해서 library 검색에 사용되었던 PCR 증폭지역($C\mu$ exon 1)의 위치를 short arm, deletion region 그리고 long arm DNA fragment를 PCR template로 하여 library 검색 시 사용했던 PCR primer set를 이용해 조사한 결과 $C\mu$ exon 1의 위치는 deletion fragment에 존재함이 확인되었으며 따라서 deletion fragment의 크기가 약 8 kb임을 감안할 때 최소한 본 연구 결과 제작된 mouse Ig heavy chain targeting construct는 Ig heavy chain 유전자의 J_H 지역과 $C\mu$ 지역이 deletion 될 수 있으며 따라서 효과적으로 mouse Ig heavy chain의 DNA rearrangement를 적중시킬 수 있으리라는 판단할 수 있었다. 위와 같은 과정을 통해 획득된 적중 벡터의 plasmid를 배아 세포주의 chromosomal DNA로 적중시키기 위해 map상의 short arm과 long arm 그리고 neo gene과 tk gene에 포함되지 않으면서 1개의 자리만 존재하는 제한 효소인 *Not* I을 이용하여 절단한 후 phenol/chloroform extraction을 통해 정제하여 30 μ g의 linearized DNA를 electroporation에 이용하였다.

Ig 중사슬 적중 배아줄기 세포의 획득. D3 배아줄기 세포의 증식을 위하여 STO feeder 세포주를 배양하고 그 위에 D3 배아줄기 세포를 seeding함으로써 D3 배아줄기 세포를 배양할 수 있는 배양 기술을 갖추었으며, 이를

이용하여 배양된 배아줄기 세포를 항체 Ig 중사슬 유전자를 적중시키기 위한 electroporation 실험에 사용하였다.

Homologous recombination된 배아줄기 세포의 선별은 생쥐 Ig 중사슬 knockout construct로 제작된 pPNT vector를 *Not I* 제한효소로 linearization한 후 고순도로 분리 정제하여 30µg의 DNA를 D3 배아줄기 세포 내로 electroporation 방법으로 전달한 후 STO feeder cell 위에 seeding하여 G418과 gancyclovir를 이용한 positive 및 negative selection을 실시함으로써 knockout construct가 genome내로 homologous recombination된 중사슬 항체 유전자 적중

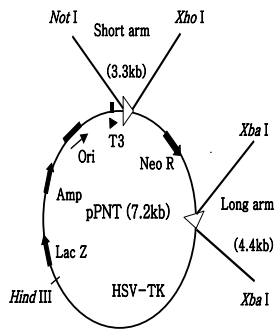
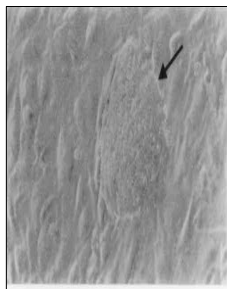


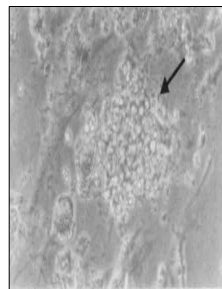
Figure 6. Diagram of the Ig C μ gene targeting vector. Ig C μ genomic DNA fragment (14 kb) was treated with either *Not I*/*Xho I* or *Xba I* and purified using low melting agarose gel to obtain short or long arm, respectively. These DNA fragments were cloned into pPNT targeting vector consecutively.

세포주의 제작을 시도하였다. 우선 Ig 중사슬 유전자 적중 벡터의 배아줄기 세포 내 transfection 여부를 확인하기 위해 electroporation에 사용되었던 배아줄기 세포를 G418이 첨가되었으나 gancyclovir가 첨가되지 않은 배지에서 배양한 결과 Fig. 7의 (A)와 같이 confluent한 feeder 세포주 상층부에 전형적인 건강한 형태의 배아줄기 세포가 성장함을 관찰할 수 있었으며 따라서 많은 수의 배아줄기 세포에 Ig 중사슬 유전자 적중 벡터가 성공적으로 genomes 내에 삽입되어 neomycin 저항성을 나타냄이 확인되었다. 한편 배아줄기 세포의 genome에 Ig 중사슬 적중 벡터가 무작위적으로 non-homologous recombination이 일어날 경우 G418에 대한 저항성을 가지면서 동시에 gancyclovir에 대해서는 sensitive하기 때문에 G418과 gancyclovir가 첨가된 배지에서 Fig. 7 (B)에서 보여주는 바와 같이 배아줄기 세포가 자라지 못하고 죽는 것을 관찰함으로써 Ig C μ 유전자가 적중된 배아줄기 세포의 획득을 위한 positive 및 negative selection이 진행되고 있음을 확인할 수 있었다. 현재 homologous recombination을 통한 적중 배아줄기 세포를 선별하고 있으며 선별된 약 200개의 배아줄기 세포는 neo primer를 이용한 PCR과 southern blot을 통해 확인함으로써 세포주를 확립한 후 IgH knockout mouse의 제작을 시도할 예정이다.

인간화된 항체 이식 생쥐(humanized xenomouse)는 효과적인 인체 질환의 진단 및 치료 항체 개발을 위한 인간 단클론 항체의 제작에 매우 유용한 도구로 사용될 수 있음은 이미 여러 문헌상에 잘 증명되어 왔으며 그 산업적 가치 역시 충분히 인정되어 왔다(25). 이러한 고부가가치 상업성을 지닌 humanized xenomouse의 제작을 위한 기초 연구로서 humanized xenomouse의 제작에 쓰이는 IgH 및 L chain knockout mice를 만드는 데 필수적인



(A)



(B)

Figure 7. Micrographs showing ES cells under positive (A) or negative (B) selection. Ig C μ gene targeting vector was linearized by treatment with *Not I* restriction enzyme and transfected into D3 ES cells by electroporation. Positive and negative selections for ES cells with homologous recombination were confirmed by growing ES cells over the STO feeder cells in culture media containing G418 only (A) or G418 and gancyclovir (B) for 10 days in CO $_2$ incubator, and observed under the light microscope ($\times 200$ magnification). Arrows indicate healthy or disintegrated ES cells positive or negative selection.

mouse IgH 및 L knockout construct를 제작하고자 시행되었다. 우선 mouse IgH knockout construct를 제작하는 데 연구의 초점을 맞추었으며 현재 mouse IgH knockout construct를 pPNT vector를 이용하여 제작하였고 이 construct의 IgH knockout 기능을 *in vitro* assay를 통해 확인하고자 D3 배아줄기 세포 내로 도입하여 positive 및 negative selection을 진행 중에 있다. 본 연구를 진행하면서 방사선 동위 원소의 사용없이 PCR을 이용하여 genomic library로부터 원하는 genomic DNA fragment를 지닌 bacteriophage clone을 선별하는 방법이 정착되었으며 또한 많은 비용이 소모되는 배아줄기 세포 배양 기술을 단 시간 내에 확보할 수 있었다. 현재까지 국내에서는 humanized xenomouse를 제작하려는 시도가 본격적으로 진행되지 않고 있으며 이는 기술상의 어려움뿐만 아니라 특허 문제 및 긴 연구 개발기간과 막대한 연구비의 투자가 선행되어야 하기 때문이라고 생각된다. 본 연구는 humanized xenomouse를 제작하는 데 필수적인 homologous IgH 및 L knockout mouse를 제작하기 위한 기초 연구를 처음으로 수행했다는 데 큰 의미가 있으며 앞으로 IgH knockout 배아줄기 세포의 선별이 끝난 후 IgH knockout mouse의 제작을 시도하고자 한다.

참 고 문 헌

- Borrebäck CA: Human monoclonal antibodies: the emperor's new clothes? *Nat Biotechnol* 17;621, 1999
- Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldsnhauer G: Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today* 21;364-70, 2000
- Kipriyanov SM, Little M: Generation of recombinant antibodies. *Mol Biotechnol* 12;173-201, 1999
- Riechmann L, Foote J, Winter G: Expression of an antibody Fv fragment in myeloma cells. *J Mol Biol* 203;825-8, 1988
- Foote J, Winter G: Antibody framework residues affecting the conformation the hypervariable loops. *J Mol Biol* 224; 487-99, 1992
- Green L: Antibody engineering via genetic engineering of mouse: xenomouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 231;11-23, 1999
- Lonberg N, Huzar D: Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol* 13;65-93, 1995
- Jakobovits A, Moore AL, Green LL, Vergara GJ, Maynard-Currie CE, Austin HA, Klapholz S: Germline transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome. *Nature* 362;255-258, 1993
- Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Lee DV, Erickson KL, Luna J, Roy CM, Abderrahim H, Kirschenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Klapholz S, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jakobovits A: Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet* 15;146-56, 1997
- Green LL, Jakobovits A: Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes. *J Exp Med* 188;483-495, 1998
- Burke DT, Olson MV: Preparation of clone libraries in yeast artificial chromosome vectors. *Methods Enzymol* 194;251-271, 1991
- Tsuda H, Maynard-Currie CE, Reid LH, Yoshida T, Edamura K, Maeda N, Smithies O, Jakobovits A: Inactivation of the mouse HPRT locus by a 203-bp retroposon insertion and a 55-kb gene-targeted deletion: establishment of new HPRT-deficient mouse embryonic stem cell lines. *Genomics* 42;413-421, 1997
- Green LL, Hardy MH, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y: Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 17;13-21, 1994
- Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstein M, Higgins KM, Schramm SR, Ku C-C, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG: Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distant genetic modifications. *Nature* 368;856-859, 1994
- Thomas KR, Capecchi MR: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51;503-512, 1987
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O: Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330;576-578, 1987
- Kessler H, Kessler H, Pierer K, Weber B, Sakrauski A, Santner B, Stuenzner D, Gergely E, Marth E: Detection of herpes simplex virus DNA from cerebrospinal fluid by PCR and a rapid, non-radioactive hybridization technique. *J Clin Microbiol* 1881-1886, 1994
- Cheng SC, Fockler WM, Barnes and R Higuchi: Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci* 91;5695-5699, 1994
- Israel DI: a PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries. *Nucleic Acids Res* 21;2627-2631, 1993
- Benton WD, Davis RW: Screening gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196;180-182, 1977
- Nakano T, Kodama H, Honjo T: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265;1098-1101, 1994
- Gutierrez-Ramos JC, Palacios R: In vitro differentiation of embryonic stem cells into lymphocyte precursors able to generate T and B lymphocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 89;9171-9175, 1992
- Askew GR, Doetschman T, Lingrel JB: Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy. *Mol Cell Biol* 13;4115-4124, 1993
- Nitschke L, Kopf M, Lamers MC: Quick nested PCR screening of ES cell clones for gene targeting events. *Biotechniques* 14;914-916, 1993
- Davis CG, Gallo ML, Corvalan JR: transgenic mice as a source of fully human antibodies for the treatment of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18;421-425, 1999