

# 단일쇄 변이분절 항체의 분자유전학적 합성 및 임상적 이용

연세대학교 의과대학 소아과학교실

오 승 환

## Molecular Genetic Synthesis and Clinical Applications of Single Chain Variable Fragments Antibodies

Seung Hwan Oh, M.D., Ph.D.

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

### 서 론

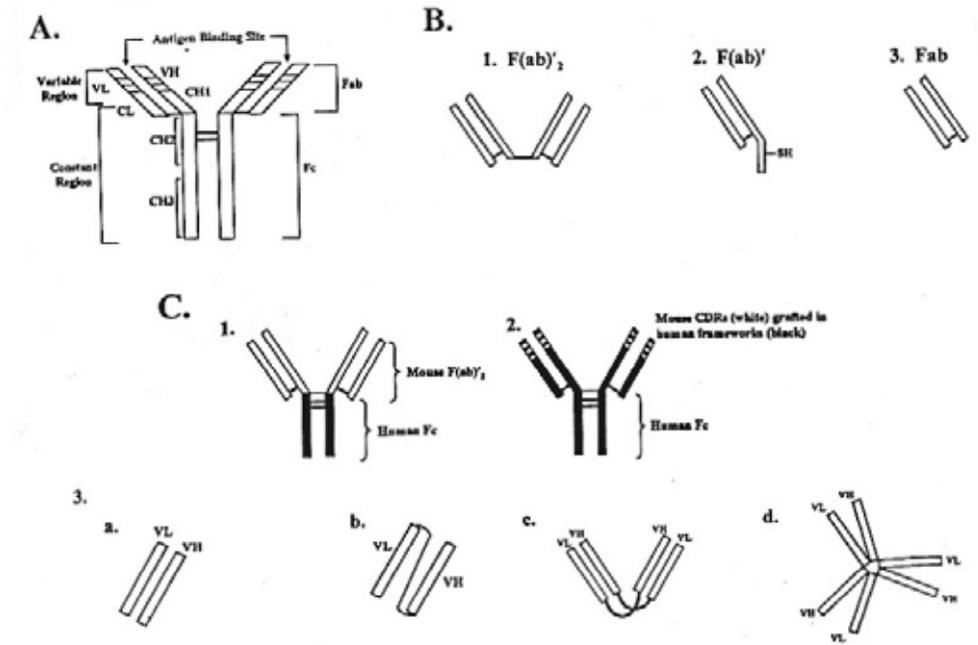
1975년 잡종세포법에 의한 단일항체(monoclonal antibody)합성이 보고된 이래 단일 항체는 여러 질환의 진단 뿐 아니라 치료에 획기적인 진전을 이룰 수 있을 것이라고 기대되어 왔다. 마법의 탄환과 같이 인체의 특정부위나 세포에만 작용하여 원하는 작용만 이룰 수 있을 것으로 기대했으나 생체내(in vivo) 사용에서는 질환의 진단 등을 위한 시험관내 검사(in vitro test)에서와 같은 성공을 사용 초기에는 얻지 못하였다. 생체 내의 성공적인 이용을 위해 항체의 단백질 구조를 변형시켜 항체의 크기를 변화시키거나 항원과의 결합능력을 증가시키고 인체에 투입된 단일항체가 유발시키는 항서면역반응을 억제시키기 위한 노력이 이루어졌다. 그 결과 분자유전학적 유전자 재조합에 의해 만들어진 항체가 개발되었고(Fig. 1), 그 외에도 항체의 사용목적에 따라 독소, 약물, 효소, 방사선동위원소, cytokine, Superantigen, 약물이 충전된 liposome 등이 결합된 항체도 만들어졌다<sup>1, 2)</sup>. 단일쇄 변이분절(single chain variable fragments)은 항체의 경쇄와 중쇄의 변이부분(variable region)을 분자유전학적인 방법으로 결합시킨 것으로 분자량이 25 kilodalton에 불과하다. 따라서 단일쇄 변이분절은 기존의 IgG 항체, F(ab)<sub>2</sub>, Fab에 비해 종이에 침투가 잘되고 짧은 시간에 높은 혈중농도에 이르며 비선택적으로 조직에 결합될 때는

조직에서 빨리 유리되며 혈액 내에서 빨리 소실되어 독성을 줄일 수 있는 장점이 있어 진단과 치료에 많이 시도되고 있다<sup>3)</sup>. 단일쇄 변이분절은 여러 방법에 의해 얻을 수 있으나 phage display가 가장 많이 사용되는 방법으로 보인다<sup>4)</sup>. 저자는 이미 항CD1a 단일쇄 변이분절 항체를 phage display법으로 얻은 경험을 보고한<sup>5)</sup> 바 있으며 본 논문에서는 phage display법과 단일쇄 변이분절의 임상적 이용에 대해 살펴보고자 한다.

### Phage display을 이용한 단일항체 변이분절 합성

항체는 거의 모든 형태의 물질에 대해 높은 결합능력과 특정성을 나타내며 작은 유기 화합물로부터 큰 단백질에 이르기까지 모든 항원에 대한 항체가 합성될 수 있어서 진단 및 치료목적으로 널리 이용되고 있다. 제한된 수의 유전자들이 재조합을 이루어 수백 만개의 항체유전자가 만들어지고 그 항체 유전자의 산물인 항체가 B세포의 표면에 나타난 후 이 B세포 중 항원에 의해 선택되어진 B세포들이 증식하고 분화되어 형질세포로 된다. 유전자의 체세포 돌연변이(somatic mutation)에 의해 높은 결합능력을 가진 항체가 형성되며 항원에 의해 여러 차례 선택과정을 거치게 된다. 이처럼 체내에서 항체는 자연 선택 및 도태과정을 통해 만들어진다.

면역요법 초창기에는 면역화된 동물이나 사람의 다



**Fig. 1.** Monoclonal antibody constructs. **(A)** A murine IgG having two heavy chains(H) and two light chains(L). **(B)** Fragments of IgG by enzymatic digestion. (1)F(ab)<sub>2</sub> by pepsin. (2) F(ab)<sub>2</sub>' by reduction of F(ab)<sub>2</sub>. (3)Fab by papain. **(C)** Recombinant monoclonal antibodies. (1)Chimeric antibodies having mouse F(ab)<sub>2</sub> and human Fc. (2)Humanized antibodies with mouse hypervariable regions and human framework regions. (3)Recombinant fragments: (a)Fv fragments composed of noncovalently associated variable domains of the heavy and light chains, (b)single chain variable fragments(scFVs) are covalently linked through a polypeptide linker that can be introduced to stabilize interchain association, (c)a diabody composed of two scFVs (c)a triabody composed of three scFVs.

클론항체가 진단과 치료에 이용됐다. 그 후 면역과정이 일어난 쥐의 B세포와 불멸화 시킨 세포를 결합시키는 잡종세포주법에 의해 다량의 단일클론 항체를 얻을 수 있게 되었고 이를 이용하여 반복성과 신뢰성을 지니는 다량의 항체를 얻을 수 있게 되었다. 그러나 이 단일 항체는 질병 치료에 이용했을 때 쥐에서 얻은 항체이므로 인체에 면역반응을 일으키고 시간이 지나면서 효과가 떨어지며 알레르기반응도 일으킬 위험이 있다. 또한 쥐의 면역체계가 원하는 물질에 대해 인식을 못하는 경우도 있으며 결합능력이 치료목적에 미치지 못하는 경우와 같은 단점들이 발견되었다<sup>6,7)</sup>.

위의 여러 문제점을 극복하고자 여러 항체가 개발되었는데 단일쇄 변이분절 합성의 근간이 되는 phage display법은 다음과 같은 여러 연구가 토대가 되어 개발되었다. 1985년 filamentous phage를 이용하여 원하는 항원을 바이러스 표면에 표현시킬 수 있음이 보고되었고 그 후 1989년 변형 oligonucleotide를 이

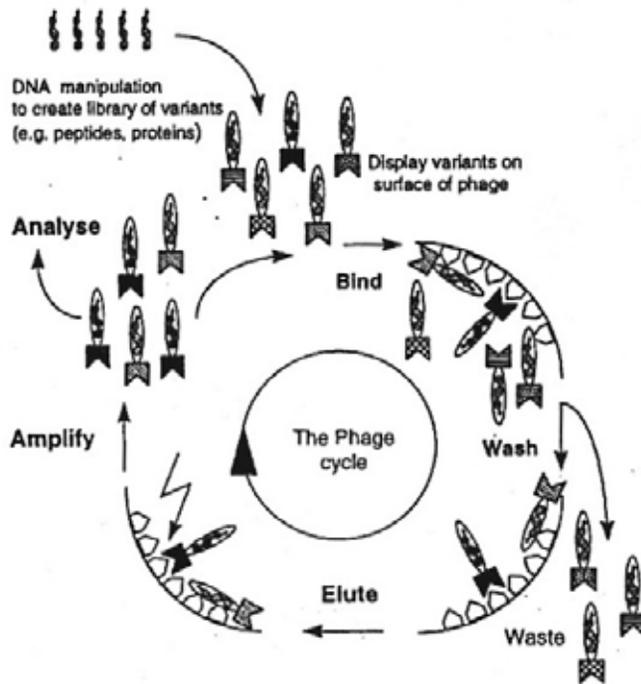
용한 중합효소 연쇄반응에 의해 항체 변이부분 유전자가 다량으로 확보될 수 있음이 보고되었다. 또한 대장균의 periplasm안으로 항원 결합능력을 지니는 항체의 변이부분이 효과적으로 분비될 수 있음이 밝혀졌다. 그 후 1990년 항체의 변이부분 유전자를 phage 표면유전자에 결합시킨 다음 배양했을 때 복제된 phage 표면에 항체의 변이부분이 부착되어 나타나고 phage 내부에는 항체의 유전정보가 있으므로 이를 이용하면 선별작업이 많이 단축됨이 발표되었다<sup>8)</sup>. 즉 유전적으로 고안된 phage가 마치 B세포처럼 항체를 표면에 표현하고 항체 유전자를 가지므로 유전정보와 항원단백질이 물리적으로 결합되어 나타난다. 따라서 원하는 결합능력(affinity)을 가진 항체와 그 유전자를 동시에 선별할 수 있게되어 빠른 시간 내에 원하는 항체를 얻게된 것이다.

단일쇄 변이분절 유전자를 phage vector에 삽입한 후 대장균이나 효모 세포 또는 ribosome을 이용하여

항체 library를 얻을 수 있다. 특정항원에 결합된 phage 항체는 항원 선택과정을 거쳐 결합력이 없는 항체와 분리된다. 결합된 항체를 적당한 방법으로 분리한 후 항체의 유전자를 얻어 조작 후 선택과정을 되풀이함으로써 원하는 목적의 항체를 얻을 수 있다 (Fig. 2)<sup>9)</sup>. Phage display에 의해 얻어지는 단일항체는 잡종 세포주를 이용하는 것보다 많은 장점이 있다. 불필요한 단백질이 적게 만들어지며 완전한 항원결합 능력을 가진 가장 작은 크기의 항체를 얻을 수 있고 잡종 세포주에서 얻을 수 없는 다양한 항체( $10^{11}$ )를 획득할 수 있어 보다 많은 항체에서 기능에 의해 선별이 가능하다. 단일쇄 변이분절에 다양한 물질을 결합시켜 발현시킬 수 있으므로 화학적 연결체가 필요 없고 IgG나 복합항체도 만들 수 있다. 효모나 세균을 이용할 수 있어 바이러스, 핵산, prion의 오염을 회피하여 싸고 빠르게 항체를 얻을 수 있다. 합성된 항체의 library를 이용할 수 있어 인간화 항체를 얻는데도 많은 도움이 된다. 얻어지는 항체의 아미노산 배열은 완전히 사람의 것으로 만들 수 있으므로 항서면역반

응을 회피할 수 있게 된다<sup>10)</sup>. 또한 이미 항체 유전자가 cloning되어 있고 대장균이 항체를 잘 표현하므로 유전자 조작을 통해 결합능력이 우수한 항체를 얻을 수 있다.

Phage display에 사용하는 cloning vector는 유전 공학의 발달로 phage가 숙주세포에 들어가면 plasmid와 같은 방식으로 복제가 가능하게 개선되어 phagemid라고 불린다. Phage display에 의해 합성된 단일쇄 변이분절의 검출은 단일쇄 변이분절 cloning site의 바로 다음에 존재하므로 단일쇄 변이분절과 함께 발현하는 표지자 단백질 유전자의 산물을 이용하여 간접적인 방법으로 알아낼 수 있다. Phage는 여러 종류가 있으나 대표적인 phagemid는 M13 phage의 유전자 재조합형으로서 filamentous phage의 생활주기를 따르고 있다. M13 phage는 대장균의 용해성 감염을 일으키지 않고 숙주에 감염되며 숙주에서 지속적으로 phage합성을 일으킨다. Phage가 박테리아 속으로 들어가면 phage의 유전자는 숙주의 복제기관을 이용하여 이중 나선구조로 바뀌어지고 그 후 새로운



**Fig. 2.** The Phage display cycle. DNA for ligands is cloned into phage genome as a part of phage coat proteins. Large libraries can be obtained by cloning in *Escherichia Coli*. Phage with specific binding can be isolated by a series of selection.

phage로 합성된다. Virion 단백질은 세포 periplasm으로 이동 후 세포 밖으로 나간다. 단일쇄 변이분절과 연결되어 표현되는 표면단백질은 pIII, pVI, pVIII 등이 이용되는데 흔히 pIII가 사용된다. 단일쇄 변이분절 유전자는 phage의 표면단백질 유전자 부위에 cloning되어지며 표면단백질 유전자의 신호전달부위 하부(downstream)에 있게 되어 표면단백질 유전자가 표현될 때 단일쇄 변이분절도 같이 합성되어 periplasm으로 이동하게 된다. 따라서 단일쇄 변이분절은 phage의 표면단백질에 결합되어 박테리아의 periplasm으로 분비되고 그 후 박테리아의 표면으로 나올 수 있게 된다. Phagemid 중 표지자유전자와 표면단백질 유전자 사이에 amber stop codon이 있는 경우 amber stop codon이 작용하는 배지를 이용하면 용해성 단일쇄 변이분절도 얻게 된다<sup>7,9)</sup>.

최근에는 periplasm을 통한 단백질의 세포의 배출을 이용하지 않고 용혈소(hemolysin)계를 이용하는 연구도 있다. 이를 이용하면 periplasm에 단백질이 축적되어 생기는 세포의 용해, 단일쇄 변이분절의 생산 감소 및 중합체형성을 회피할 수 있다.

항체를 생성할 때 같이 형성되는 여러 산물에 의한 독성, 특히 pIII에 의한 독성을 조절하기 위해 많은 phagemid에서 *lacZ* 촉진자를 이용하여 항체합성을 조절한다.

Phage display는 초기에는 기존의 잡종 세포주에서 얻어진 유전자만을 이용하였다. 그 후 항원에 노출된 쥐의 비장 내 B세포에서 바로 항체 library를 얻어냄으로서 항원에 특이성을 지니는 B세포를 불멸화(immortalized)시키는 과정을 생략할 수 있게 되었다<sup>11)</sup>. 현재 암, 자가면역질환, 감염 등 항원에 노출되어 면역반응이 일어난 사람의 B세포를 이용하여 면역형 항체 library를 얻을 수 있게 되었다. 기존의 잡종 세포주에서 얻은 항체를 phage display법을 써서 훨씬 결합능력이 좋은 항체를 얻을 수도 있다.

이외에도 항원에 노출되지 않은 림프구를 이용하여 태생형 항체나 합성 oligonucleotide로 만들어낸 항체의 변이부분 유전자를 재조합하여 합성형 항체를 만들 수 있다. 이렇게 하면 면역성이 없거나 백독, 살충제와 같이 독성을 지닌 물질 또는 윤리적인 문제로 생체에 주입할 수 없는 항원에 대한 항체를 얻을 수 있고 내성도 피할 수 있다. 태생형 항체에 이용되는 항체의 유전자는 면역반응이 일어나지 않은 사람이나

동물의 말초 림프구, 비장, 골수, 편도선 B세포 등에서 IgM mRNA의 변이부분 유전자를 채취하여 재조합시켜 얻게 되는 것이다. 얻어진 library의 항체 결합능력은 얻어진 library의 크기에 비례한다. 합성형 항체의 유전자는 인공적으로 합성하여 얻는데 항체의 변이부분 유전자와 diversity/joining 유전자가 시험관 내에서 재조합되어 만들어진다. 변이부분 유전자는 complementarity determining region(CDR)부위의 일부분을 미리 정해진 정도로 무작위 변화시켜 얻는다. 주로 자연계에서 가장 변화가 많은 부위가 목표이다. 변화가 가장 빈번하고 항원과 결합하는 부위의 중심에 있는 중쇄의 CDR3 부위가 합성 library를 최초로 만들 때 목표부위가 되었다. 그 후 모든 CDR에 무작위변화를 일으킨 library를 얻기도 했다. 최근에는 CDR3 부위를 무작위 변화시킨 중쇄의 변이부분 유전자와 경쇄의 kappa 및 lamda부위를 무작위로 결합시켜 만든 library도 생겨났다. 이처럼 무작위로 유전자 변이를 일으키면 stop codon도 생길 수 있으므로 염기변화를 3배수(tri codon)씩 하기도 한다<sup>7,9)</sup>.

이처럼 사용하는 항체 유전자에 따라 phage library가 면역형, 태생형, 합성형으로 나뉘어 지며 각각의 장단점에 따라 용도가 나뉘어질 수 있다. 면역형은 항체를 얻을 확률이 매우 높고 생체 내에서 이미 결합능력이 성숙되어 있는 장점이 있으나 각 항원에 따라 library를 새로 만들어야하고 자가 항원에 대해서는 항체를 얻기 어렵고 항원은 반드시 면역성이 있어야 하는 단점이 있다. 질병의 체액성 면역반응 연구 및 진단용 항체를 얻는데 효과적이다. 태생형 항체는 어떠한 항원에도 이용할 수 있으나 결합능력이 우수한 항체를 얻기 위해서는 library가 매우 커야하며 특정 DNA부위나 자가항원에 대해서는 항체를 얻기 어려운 단점을 역시 가지고 있다. 영상진단 및 치료를 위한 높은 결합능력을 가진 인간 항체를 얻는데 이용될 수 있다. 합성형 항체는 원하는 목적의 항체를 구상하여 만들 수 있고 항원의 구조연구에 이용될 수 있는 장점이 있는 반면 원하는 결합능력을 가진 항체를 얻으려면 library가 매우 커야하고 stop codon이 발생하거나 생성된 단백질에 결합이 생길 위험이 있다. 합성형 항체는 아마도 proteomics와 같은 자동화된 단백질 선택 및 microarray분야에 적합할 것으로 보인다. 태생형이나 합성형 항체를 이용하면 전혀 새로운 항원을 찾아 낼 수도 있다<sup>7)</sup>.

Phage display에 사용하는 phage는 최근 식물에 감염되는 것도 사용할 수 있게 되었는데 담배, 쌀, 토마토, 밀 등을 숙주세포로 이용한 연구결과가 발표되고 있다. 식물을 이용하면 값싸고 간편하게 항체를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

항원과 결합을 통한 선별과정을 통해 가장 우수한 단일쇄 변이분절을 찾고 그 유전자를 얻은 다음 그 유전자에 조작을 가한 후 phage display 시키는 과정을 반복함으로써 점점 기능이 향상된 단일쇄 변이분절을 얻게 되므로 선별과정은 우수한 단일쇄 변이분절을 얻는 과정에서 매우 중요하다.

얻어진 항체 library에 대한 선별 과정은 고체 표면, column, BIAcore감지기에 항원을 부착시켜 검색하는 방법, biotin을 항원에 부착시켜 항체와 결합시키는 법, 고정화된 무핵세포나 포유동물 세포에 항체를 반응시키는 법, Western blot에 반응시키는 법, 유세포법을 이용한 세포 분리법, 또는 조직에 바로 항체를 반응시키거나 실험동물에 주사하여 원하는 목표 조직에서 결합한 항체를 얻는 방법, pathfinder법, infective phage에 의한 선별, protein fragment complementation assay, 집락여과법(colony filter screening) 등이 이용되고 있다. Pathfinder법은 복합 항원(complex antigen)에 반응하는 새로운 항체를 찾는 데 효과적이는데 그 원리는 다음과 같다. 먼저 기존의 항체를 biotin과 중합시켜 항원과 반응시킨 후 peroxidase와 중합된 streptavidin을 반응시키면 peroxidase는 표적항원에만 있게 된다. 여기에 biotin/tyramid를 첨가하면 활성화된 biotin이 생길 것이고 만일 항원과 결합한 phage항체가 주위에 있다면 biotin이 phage항체에 결합하게 된다. 그 후 streptavidin bead를 이용하여 원하는 phage항체를 얻을 수 있다<sup>12)</sup>. 선택적 감염성 phage법(selectively infective phage)은 geneIII의 일부를 없앤 비감염성 phage에 항체 library를 표현시킨 다음 감염성을 회복시키는 아미노산과 결합된 항원을 반응시킨다면 항원과 결합하는 항체를 가진 phage 만이 감염성을 회복하는 원리를 이용한 것이다<sup>13)</sup>. Protein fragment complementation assay는 항원의 cDNA와 항체 유전자에 표지자유전자의 절반씩을 각각 붙인 다음 세포 안에 넣은 후 세포 내에서 항원항체 반응이 일어나야만 표지자가 기능을 하도록 고안한 것으로 항원의 정제가 필요 없이 항원의 cDNA만 있으면 되는 장점이 있어 functional

proteomic 연구에 이용될 수 있을 것으로 보인다. 집락여과법은 합성항체의 특성을 빨리 알아보기 위해 항체를 표현하는 대장균집락을 1차여과지에 키운 다음 항원이 결합되어 있는 2차 여과지에 합성된 항체가 스며들 수 있도록 1차여과지와 2차여과지를 접촉시킨 후 2차여과지에서 항원항체 결합을 판독하는 방법으로 선별작업을 대량으로 빨리 할 수 있다.

대부분의 선별과정은 정제된 항원을 이용하지만 원하는 항원이 유사한 성질을 가진 이물질과 혼합되어 있거나 표적항원이 세포의 2중 지방층에 있을 때만 기능을 발휘하는 경우와 같이 항원을 정제하기 어려운 경우 유세포법과 같이 살아있는 세포를 이용한 분리법이나 항원 또는 항체에 의한 경쟁적 분리법(elution), 각각 다른 시료에서 얻은 항원을 이용하는 방법을 쓸 수 있다. 살아있는 세포를 이용하여 유세포법을 시행하면 항원을 정제할 필요가 없으며 분리가 어렵고 매우 소수의 세포집단에서 나타나는 항원도 이용 가능하다. 항원과 항체의 비특이적 결합도 문제가 될 수 있는데 이때는 항원의 조성을 달리 하거나 분리에 사용하는 방법을 여러 가지로 하여 극복할 수 있다. 이러한 방법들을 이용하면 세포막내에 존재하는 복합 항원이나 체액 내에 존재하는 항원 복합체 등에 대한 항체도 검색할 수도 있고 새로운 항원을 찾을 수도 있다.

결합능력에 의한 선별은 항원의 농도를 점차 낮추어서 획득할 수 있다. 그 후 BIAcore나 선택성 감염성 phage법을 사용하여 재차 결합능력에 따른 선택을 할 수 있다.

결합정도 및 결합역학은 ELISA법이나 유세포법 외에도 표면 plasmon 공명(surface plasmon resonance), intergrated interferometer나 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight 등을 이용하면 편리하게 얻을 수 있다.

기능에 의한 phage 항체선별은 항원결합 후 생기는 신호전달반응, 항원의 내재화나 중합반응(dimerization), apoptosis 유발, 막 pump의 억제, 세포 생존 등<sup>9)</sup> 외에도 세포내 안정적인 발현을 알아보기 위한 two-hybrid법이 있다.

한편 안정적이고 용해성인 단일쇄 변이분절이 세포 내에서 발현하는 지를 알아보기 위한 방법으로 항원과 무관하게 알아보는 방법이 발표되었는데, 이것은 단일쇄 변이분절이 세포의 증식과 유전자표현에 관여

하는 표지자와 함께 발현하도록 고안된 것이다.

원하는 항체를 얻기 위해서는 선별과정에서 항원과 결합시킨 항체를 항원에서 분리시켜야 한다. 염산이나 glycine 완충용액과 같은 산성용액이나 triethylamine과 같은 알칼리성용액, chaotropic agent, biotin에 연결된 항원을 사용했을 때 쓰는 diethiothreitol, 항체와 표면단백질 사이에 유전공학적으로 단백 분해효소 작용부위를 만들어 단백 분해효소로 분리하거나, 항체나 항원을 과다하게 사용하여 추출하는 방법 등을 쓸 수 있다<sup>9)</sup>.

항원의 종류에 따라 선별 및 항체 분리방법의 효용은 달라지므로 어느 방법이 가장 우수하다고는 말하기 어려우나 최근 인위적인 항원표현 세포를 이용한 유세포 분석법을 이용한 연구가 많이 발표되고 있다.

일차 선별 후 얻어지는 항체보다 더 효과적인 항체를 얻기 위해서는 항체 유전자 조작 후 선별작업을 반복해야 한다. 항체 유전자의 변화를 위해 이용되는 무작위 유전자변이법으로서 경쇄와 중쇄의 교합(shuffling), 변이부분 유전자 교합, error prone PCR, 변이유발 종(mutator strain) 등을 이용하거나 항체 유전자의 원하는 부위만을 변화시키는 oligonucleotide를 이용한 변이 PCR을 이용할 수 있다. 이렇게 얻어진 이차항체는 항원과의 결합능력에 따라 다시 선별할 수 있다<sup>7, 9)</sup>.

단일쇄 변이분절을 신체에 주입했을 때 단일쇄 변이분절이 목표조직에 결합, 침투, 잔존하는 능력에 미치는 인자에는 단일쇄 변이분절의 항원과의 결합능력, 분자의 크기, 전하(pI), 구조 등이 있다. 단일쇄 변이분절은 목표항원과의 결합능력이 어느 정도 커질 때까지는 결합능력이 커질수록 조직 내에 침투하는 능력도 커지지만 결합능력이 일정한도 이상 증가하면 조직 내에 침투하는 정도는 증가하지 않는다. 그 이유는 아마도 너무나 결합능력이 큰 항체는 처음 만나는 항체와 실제적으로는 비가역적인 결합이 이루어지므로 항체가 종괴 안으로 들어가지 못하며 결과적으로 단일쇄 변이분절은 혈관이 풍부하게 발달된 곳이나 항원이 보다 많이 표현된 곳만 침투하게 되고 혈관 내에서 종괴내부로 침투하는 것이 방해받게 되기 때문으로 생각된다. 따라서 항체의 결합능력은 어느 한도 이상 증가하면 오히려 치료에 도움이 되지 않을 수 있다. 항체의 크기가 작을 수록 혈관투과성이 크고 종괴내의 삼투압에 대해 잘 저항하여 침투하며 종괴

내에 균일하게 들어간다. 항체의 전하가 커지면 신장 제거율이 커지는 반면에 종괴내 잔존율도 커진다. 항체의 구조는 세포표면의 항원과 결합하는데 큰 영향을 주는데 가장 최적의 구조는 항원마다 다르다<sup>14)</sup>.

얻어진 단일쇄 변이분절에 대한 보다 효과적인 연구를 위해서는 정제화 작업이 필요한데 표지자로 이용하는 myc단백질에 대한 항체인 9E10이나 E-tag과 같은 단백질에 대한 항체를 이용한 column, 표지자에 6-Histidine을 부착시켜 Nickel column에 의해 정제하는 방법 외에도 분자크기에 따른 분리나 이온교환을 이용하여 정제할 수 있다.

단일쇄 변이분절의 인간화는 CDR graft로 가능하다. CDR graft는 변이부위의 골격부위 유전자를 사람에게서 유래한 것으로 만드는 것인데, 그 방법에는 골격부위 유전자를 인간에게서 가장 흔한 아미노산 배열을 나타내는 것으로 바꾸는 consensus법, 원래의 단일쇄 변이분절과 가장 유사한 아미노산 배열을 나타내는 것으로 바꾸는 best-fit법, 그리고 항원과 직접 접촉하는 부위만 변화시키는 resurfacing법이 있지만 어느 것이 가장 좋은지는 아직 확립되어 있지 않다<sup>15)</sup>.

### 단일쇄 변이분절의 임상적 이용

단일쇄 변이분절은 현재 암의 진단과 치료에 가장 활발히 이용되고 있다. 그 외에도 무도병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 척수소뇌실조증, 근무력증, 류마치스성 관절염, 진신성 홍반성 낭창, 갑상선염, B형 및 C형 간염, 면역결핍 바이러스감염, Western Equine 바이러스성 뇌염, *Helicobacter pylori*, 말라리아, RS 바이러스 감염의 진단과 치료에 시도되고 있다.

치료효과를 얻기 위해 독소, 방사선동위원소, 항암제, DNase-I, RNase, cytokine(IL-2, Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha), Super antigen이 배합체로 이용된다.

면역독소에 사용되는 독소는 식물, 세균, 곰팡이에서 얻을 수 있다. 디프테리아독소나 *Pseudomonas* exotoxin A(PE)가 주로 사용되는데 그 이유는 아마도 식물에서 얻는 독소보다 쉽게 박테리아 안에서 합성되기 때문으로 생각된다. 최근에는 세포 결합부위인 domain I부위를 소실시킨 *Pseudomonas* exotoxin A의 유전자 재조합형 독소가 많이 이용되고 있다. *Pseudomonas* exotoxin A는 alpha 2 macroglobulin

을 세포내 이동시키는 데 이용하는 수용체를 이용하여 세포 안으로 들어간 후 ADP ribosylation에 의해 elongation factor 2를 억제함으로써 단백질 합성을 억제한다. 면역독소는 항암 화학요법과는 달리 분열하는 세포 뿐 아니라 휴지기의 세포도 죽일 수 있다. 유전공학적 변형을 통하여 만든 disulfide stabilized fragment variable(dsFv)과 단일쇄 변이분절을 이용하여 만든 면역독소의 예로서 고형 암에서는 erbB2 (Her/neu)에 대한 e23(dsFv)-PE38나 FRP5scFv-ETA, epidermal growth factor수용체에 대한 MR1 (Fv)-PE38, Lewis Y항원에 대한 LMB-9, B1(FV)-PE38, 대장암의 carbohydrate mucin항원에 대한 55.1 (dsFv)-PE38, 55.1(Fv)-PE38, 난소암이나 methothelioma에 나타나는 methothelin에 대한 항체인 SS (Fv)-PE38이 있다. 소아의 고형암에 대해서는 월름종양이나 신경아세포종에 대한 단일쇄 변이분절이 개발 중이다. 백혈병과 림프종은 많은 암세포가 혈액 및 골수에 있어 고형암에 비해 면역독소가 더욱 효과적일 것으로 보인다. 가장 대표적인 유전자 재조합형 면역독소로서 T세포 혈액암에 많이 나타나는 CD25항원을 표적으로 하는 anti-Tac(Fv)-PE38 및 B세포 혈액암에 많이 관찰되는 CD22항원을 표적으로 하는 RFB4(dsFv)-PE38과 호즈킨병에 대한 CD30항원을 대상으로 하는 Ki-4(scFv)-ETA 등이 있다. Anti-Tac(Fv)-PE38은 이미 임상 실험 제 1상의 발표가 있었는데 hairy cell 백혈병 환자에 특히 유효하며 독소에 의한 단백질합성억제 이외에도 apoptosis 유발의 효과도 있다고 한다. 그 외 만성 림프구성 백혈병, 성인의 T세포백혈병, 피부 T세포 림프종, 호즈킨병 환자에서 효과적이었다. RFB4(dsFv)-PE38도 hairy cell백혈병과 만성림프구성 백혈병 환자에서 효과적이었으며 일부 림프종에 효과적이라고 한다. IL-6, IL-4 수용체, GM-CSF 등에 대한 항체가 개발 중이다. 현재 유전자 재조합형 면역독소가 임상에 사용되었을 때 극복해야 할 난관은 항체의 다량생산, 구조적인 안정화, 정제 뿐 아니라 근본적인 문제점으로서 선택항원의 상대적인 특이성, 항체의 비선택적 결합에 의한 독성, 면역유발 등이 있다. 표적항원이 정상 조직에도 나타난다면 정상 조직에 손상을 주어 오한, 발열, vascular leak 증후군, 근육통, 근육 피사와 같은 합병증 외에도 치명적인 중추신경계손상이 올 수 있다. 면역독소를 다량 주입했을 때 간 조직에 비특이적 결합이

일어나 간 독성이 심각하게 올 수 있다. 이러한 문제점들은 phage display library를 보다 광범위하게 얻어 새로운 항체를 얻거나 새로운 항원을 얻는 방법으로 극복 할 수 있을 것이다. 면역독소에 대한 면역반응으로 생겨난 중화항체에 의해 치료효과가 없어지는 현상이 항체 투여 10일 이후에는 대부분 생겨나기 시작하는데 항체를 보다 작게 하거나 면역억제제인 deoxyspergualin이나 CTLA4Ig를 사용하여 줄일 수 있을 것으로 보고되었다<sup>16-18)</sup>.

단일쇄 변이분절에 항암제를 부착시켜 투여하여 전신독성을 줄이고자 하는 시도가 있었는데 Lewis Y항원에 대한 BR96(Fv)-PE40을 사용한 임상실험에서는 전이성 위암과 유방암 환자에서 효과가 없는 것으로 나타났다.

진단 및 치료 목적으로 <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I 등의 방사선동위원소가 부착된 단일쇄 변이분절항체는 미세잔존암의 진단과 치료에 매우 효과적일 것으로 보인다. 고식적인 항체에 비해 크기가 작으므로 면역유발이 적고 종괴에 대한 침투효과가 좋으며 정상조직에 비해 종양에 선택적으로 결합하는 장점이 있으나 종괴에 부착되는 항체의 총량이 적고 혈관내의 소실이 빠르며 결합능력과 분자구조의 안정성이 떨어지는 단점이 있다<sup>16)</sup>. 대장암이나 백혈병에 많이 연구되고 있다.

불활성 항암제에 활성을 주는 효소를 항체에 부착하여 치료에 사용하는 antibody-directed enzyme prodrug therapy가 활발하게 연구되고 있다. 항체와 불활성화 약물을 활성화시키는 효소를 분자유전학적인 방법으로 결합시킨 후 투여하면 이 효소는 항원이 표현된 조직에만 있게되므로 불활성화 약물이 목표조직 부위에서만 활성을 얻게 되고 따라서 일반적인 항암 화학요법보다 전신독성을 줄일 수 있다. 항체 내재화가 필요 없고 항원표현이 적은 부위도 bystander 효과로 치료효과를 얻을 수 있는 장점도 있다. Carcinoembryonic antigen이나 epidermal growth factor, erb B2가 대상항원으로 연구되고 있다. 예를 들어 humAb4D5-9와 같이 beta lactamase와 결합된 단일쇄 변이분절을 투여한 후 cephalosporin-doxorubicin 불활성화 약물을 투여하면 doxorubicin은 erbB2가 표현된 암조직 주변에서만 활성화될 것이다<sup>16)</sup>. 그 외에도 glucuronidase, carboxypeptidase G2를 이용한 연구도 있다.

각각 다른 항원에 작용하는 단일쇄 변이분절을 분

자유전학적으로 결합시켜 중합체로 만들어 유전자 치료<sup>19)</sup> 및 T세포 면역요법에 이용하기도 한다. 화학적 방법으로 만들면 원하는 결합체를 쓸 수 있고 높은 생산성을 얻기는 하나 순도와 역가가 lot마다 다를 수 있고 잡종 세포주를 결합시키면 순도와 역가외에도 유전학적 불안정성의 문제가 있어 유전자 재조합형이 많이 사용된다.

세포의 형질에 영향을 주어 암세포 표현을 억제하거나 암세포사멸을 유도하는 세포내 단일쇄 변이분절의 세포내 발현(intrabodies)<sup>20)</sup>, 유전자를 운반하는 vector바이러스가 표적세포에 잘 결합하도록 vector 바이러스에 표적세포 항원에 대한 항체를 발현시키거나 표적세포의 표면에 항 바이러스 단일쇄 변이분절을 표현시킴으로서 유전자가 세포에 잘 전달되게 하는 유전자요법, retro바이러스에 의해 단일쇄 변이분절이 표적세포에 발현함으로서 세포매개성 면역을 유발시키는 면역요법, 방사선치료의 감수성을 높이기 위해 세포표면에 단일쇄 변이분절을 발현시키는 방사선치료의 보조요법, 방사선 동위원소 대신에 형광물질을 사용하는 방법 등이 연구되고 있다. 그 외에도 수술 전에 방사선 동위원소가 부착된 단일쇄 변이분절을 주사한 다음 수술시 방사선 동위원소를 검출할 수 있는 휴대용 기구로 종괴의 위치를 파악하여 수술하는 방법도 시도되고 있다.

## 결 론

지금까지 단일쇄 변이분절의 phage display에 의한 합성 및 임상적 이용에 대해 알아보았다. Phage display법이 발표된 지 12년밖에 되지 않았으나 이를 이용한 연구업적은 실로 엄청나다고 하겠다. 단일쇄 변이분절 항체가 치료에 효과적인지에 대한 평가는 아직 성급하겠으나 현재의 항암 화학요법이 직면한 장벽을 극복할 수 있는 면역요법의 한 방편으로 보여진다. 효소의 기능을 할 수 있으므로 고안된 효소를 세포에 발현시켜 질병치료에 이용하는 유전자 치료에도 이용될 것으로 기대된다. Phage display법과 발달된 선별방법에 의해 어떠한 항원에도 결합시킬 수 있는 결합부위(binding site)를 기존의 방법에 비해 빠르게 만들 수 있고 뇌혈관장벽(blood brain barrier)을 극복하는 약물의 전달체로 쓰일 수 있는 등 단일쇄 변이분절은 신약 개발의 가능성을 크게 제시하고

있다. 단일 세포의 복합 항원에 대한 단백질 정량이나 암세포에서 관찰되는 여러 단백질 발현을 동시에 측정하는 것과 같은 proteomics 연구에도 활용될 수 있을 것이다. 본 논문이 소개한 phage display 방법이 국내의 여러 연구에 도움이 되기를 기대한다.

## 참 고 문 헌

- 1) Farah RA, Clinchy B, Herrera L, Vitetta ES. The development of monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1998;8:321-56.
- 2) Reff ME, Hariharan K, Braslawsky G. Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Control* 2002;9:152-66.
- 3) Yokota T, Milenic D, Whitelow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 1992;52:3402-8.
- 4) 정준호. 유전자재조합 항체를 이용한 면역요법. *생화학-분자생물학소식* 2001;8:24-7
- 5) 오승환. Phage display와 유세포선별법을 이용한 항 CD1a Single-Chain Fv합성. *대한소아혈액종양학회* 2001;8:331-43.
- 6) Marks C, Marks JD. Phage libraries--a new route to clinically useful antibodies. *N Engl J Med* 1996;335:730-3.
- 7) Hoogenboom HR, Chames P. Nature and designer binding sites made by phage technology. *Immunol Today* 2000;27:371-7.
- 8) McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552-4.
- 9) Hoogenboom HR, de Bruïne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 1998;4:1-20.
- 10) Beagent RHJ. Targeting cancer therapy. *Br J Cancer* 1991;80(Suppl):104-9.
- 11) Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991; 222:581-97.
- 12) Osbourn JK, Derbyshire EJ, Vaughan TJ, Field AW, Johnson KS. Pathfinder selection: in situ isolation of novel antibodies. *Immunotechnology* 1998;3:293-302.
- 13) Spada S, Krebber C, Pluckthun A. Selective in-

- fective phage(SIP). *Biol Chem* 1997;378:445-56.
- 14) Adams GP, Schier R. Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *J Immunol Methods* 1999;231:249-60.
  - 15) Vaughan T, Osbourn JK, Tempest PR. Human antibodies by design. *Nat Biotechnol* 1998;16:535-9.
  - 16) Reiter T, Pastan I. Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *TIBTECH* 1998;16:513-9.
  - 17) Davis T. Monoclonal antibody-based therapy of lymphoid neoplasm: What's on the horizon? *Semin Hematol* 2000;37(Suppl 7):34-42.
  - 18) Weiner LM. An overview of monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin Oncol* 1999;26(Suppl 12):41-50.
  - 19) Nettelbeck DM, Miller DW, Jerome V, Zuzarte M, Watkins SJ, Hawkins RE, et al. Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD105). *Mol Ther* 2001;3:882-91.
  - 20) Chen L, Li G, Tang L, Wang J, Ge XR. The inhibition of lung cancer cell growth by intracellular immunization with LC-1 ScFv. *Cell Res* 2002;12:47-54.
-