

Anti-DNA 단클론 항체에 대한 Anti-idiotypic 단클론 항체의 생산

아주대학교 의과대학 미생물학교실, *아주대학교 의과학 연구소 면역학 연구실

권명희 · 강재승 · 신호준 · *장영주 · 박 선 · 이미리나 · 김형일

=Abstract=

Production of Monoclonal Anti-idiotypic Antibody to Monoclonal Anti-DNA Antibody

Myung-Hee Kwon, Jae-Seung Kang, Ho-Joon Shin, *Young-Ju Jang,
Sun Park, Millina Lee and Hyung-Il Kim

Department of Microbiology, School of Medicine and *Laboratory of Immunology Institute for
Medical Sciences, Ajou University, Suwon, Korea

It has been thought that autoimmune diseases like systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis are closely associated with anti-DNA antibodies (Abs). In studies of the control for anti-DNA Ab generation, an understanding of the regulatory mechanisms by anti-idiotypic Abs that influence the production of anti-DNA Abs would be facilitated by the availability of the hybridomas producing the pairs of DNA-specific and anti-DNA's idiotope-specific monoclonal antibodies (mAbs). We have produced a series of anti-DNA mAbs and then monoclonal anti-idiotypic Ab directed against idiotype determinant of the 3D8 mAb that has the highest affinity to dsDNA and ssDNA among the anti-DNA mAbs that we had obtained. The spleen cells of the MRL-*lpr/lpr*, autoimmune prone, mice were fused with P3X63Ag8.653 myeloma cells to obtain anti-DNA Ab secreting hybridomas. Out of the fourteen clones that showed strong binding to ssDNA, four clones had cross-reactivity with dsDNA whereas none of these clones reacted with left-handed z-DNA. The binding activities of the anti-DNA mAbs to various synthetic polynucleotide sequences were different respectively. Anti-idiotypic mAbs were generated by the fusion of myeloma cells and spleen cells from the Balb/c mice immunized with 3D8-Fab. We have produced two anti-idiotypic mAbs, B7 (IgG2a/κ) and O2F3 (IgM/κ), which were specific to 3D8-Fab and cloned the variable region of the heavy chain from the O2F3 hybridoma.

Korean J. Immunol. 20, 2: 109~117, 1998

Key Words: Anti-DNA mAb, Anti-idiotypic mAb, Hybridoma

서 론

자가면역질환은 자가항원에 대하여 면역반응이 유발되는 질환으로서 류마치스양 관절염, 전신성 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus; SLE) 등이 대표적인 예이다^{1,2}. 자가면역질환 증상을 나타내는 환자나 동물에서 발견되는 다양한 자가항체들 중 anti-DNA 항체가 다량 검출되고 있으며 특히, 이 질환의 증상은 anti-DNA 항체와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다^{3,4}. 자가면역질환 치료를 위한 시도들로서 DNA를 다량 투여하여 면역관용을 유도하거나 독소를 부착시킨 DNA를 투여함으로써 DNA에 특이적인 B 세포를 제거하거나 또는 anti-idiotypic 항체투여로 B 세포의 자가항체 생산능력을 억제하는 방법들이 연구되어 왔다⁵⁻⁷. 그러나 자가항체생산 B 세포가 억제되기보다는 오히려 활성화되는 등의 부작용으로 인하여 그 치료법이 아직 정립되지 않은 실정이다.

Anti-idiotypic 항체는 정상마우스와 정상인에서 소량 발견되며 생체내에서 정상면역반응 조절에 관여하리라 생각되지만 그 조절기전은 아직 확실치 않다. Anti-idiotypic 항체는 자가면역질환이 있는 사람과 동물에서도 발견되는데, 전신성 홍반성 루푸스 환자의 혈청에서 anti-DNA 항체에 대한 anti-idiotypic 항체가 함께 검출될 경우 anti-DNA 항체가 낮게 나타난다는 보고가 있으며⁸⁻¹⁰, 자가항체에 대한 anti-idiotypic 항체가 존재하는 정상인의 혈장 다클론성 IgG를 환자에게 투여하였을 때 자가항체의 생산이 억제된다는 보고가 있다^{11,12}. 또한 전신성 홍반성 루푸스 질환의 동물 모델인 MRL-*lpr/lpr* 마우스의 B 림프구로 생산한 하이브리도마 배양액에 anti-idiotypic 항체를 가하면 항체생산 B 림프구가 감소되는 것이 발견되었다^{13,14}.

이러한 anti-idiotypic 항체에 대한 자가항체의 생산 억제는 anti-idiotypic 항체가 특정 idiotype을 가진 B 세포의 항원수용체에 작용하여 세포증식, 항체합성, 분비과정을

조절하거나 idiotype을 갖는 새로운 억제 T 세포 (Ts) 생성, 또는 idiotype을 발현하는 보조 T 세포 (Th)의 불활성화 등에 의해 일어날 수 있다는 보고들이 있다¹⁵⁻¹⁷. 예를들면, 다량의 anti-idiotypic 항체투여로 항체생산이 억제된 마우스에서는 idiotype 항체를 생산하는 전구세포 (precursor) 수가 감소함이 관찰되어, 다량의 anti-idiotypic 항체가 B 림프구를 직접 억제함으로써 항체생산을 억제한다고 하였다^{15,17}. 한편 항체생산이 오랫동안 억제된 마우스의 T 림프구를 다른 마우스에 입양면역 (adoptive transfer)시켰을 때 지속적으로 항체생산이 억제됨이 관찰되어 anti-idiotypic 항체가 Ts 림프구 생성을 유도하여 항체생산을 억제한다고 하였다^{16,17}.

그러나 anti-idiotypic 항체에 의한 자가항체 생산 B 림프구의 항체생산 조절기능은 항상 억제되는 것이 아니라 투여한 항체의 농도, 투여경로, B 세포의 활성상태 및 B 림프구에 발현되어 있는 항원수용체의 isotype 등에 따라 항체생산이 증가 또는 억제되는 상반된 효과를 보였다¹⁸⁻²¹. 따라서 anti-idiotypic 항체가 자가항체 생산 조절에 관여하는 기전을 밝히고 자가면역질환 치료법을 발견하기 위해서는 단클론 anti-idiotypic 항체 생산이 유용하리라 생각된다.

이러한 취지로, 본 연구에서는 전신성 홍반성 루프스에서 증상유발 요인으로 생각되는 anti-DNA 단클론 항체를 생산하는 다양한 하이브리도마와 이들 단클론 항체의 idiotype을 인지하는 anti-idiotypic 항체를 확보하는 것을 목표로 하였다. 이를 위하여 전신성 홍반성 루프스 질환과 유사한 자가면역질환 증상을 보이는 MRL-*lpr/lpr* 마우스로부터 anti-DNA 항체를 생산하는 하이브리도마를 생산하였고, 배양액에서 항체의 Fab를 정제하여 마우스에 면역시킴으로써 anti-idiotypic 항체를 생산하는 하이브리도마를 생산하였다. 또한 이후, anti-idiotypic 항체를 박테리아에서 대량 생산하여 조절기전 연구에 용이하게 이용하거나, 유전자를 조작함으로써 다양한 항원친화도 및 특이성을 갖는 항체로 손쉽게 변형시킬 수 있도록 anti-idiotypic 항체 유전자를 클로닝 하였다.

재료 및 방법

실험동물

Anti-DNA 항체 생산 하이브리도마 제조에는 약 20~24주령의 MRL-*lpr/lpr* 마우스를, anti-idiotypic 항체 생산 하이브리도마 제조에는 6~8주령의 Balb/c 마우스를 사용하였다.

Anti-DNA 항체 생산 하이브리도마 제조

MRL-*lpr/lpr* 마우스의 혈액으로부터 혈청을 분리하여 이중가닥 DNA (dsDNA)에 대한 ELISA를 시행하여, 혈청 내 anti-DNA 항체의 역가가 높은 마우스를 선택한 후, 세포융합을 실시하였다. 마우스 비장을 꺼내어, 슬라이드 글라스로 부수어 단일 세포화하고 RPMI 배지 1,500rpm에

서 5분간 3회 원침하여 세척하였다. P3X63Ag8.653 (ATCC CRL 1580)을 RPMI배지로 2회 세척하고 비장세포와의 세포수 비율이 1:5가 되도록 혼합하여 1,500rpm에서 5분간 원침한 후 상청액을 모두 제거하였다. 이에 50% (w/v)의 PEG (polyethyleneglycol 1500)용액 1ml을 37℃에서 1분간에 걸쳐 가하고, RPMI배지를 1분에 걸쳐 1ml, 3분에 걸쳐 3ml, 3분에 걸쳐 10ml을 천천히 첨가한 후 1,500rpm에서 5분간 원침하였다. 세포 침전물을 10% 우태아 혈청을 함유한 HAT 배지에 부유시켜 96well plate에 well당 100 μ 씩 분주하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2주 동안 배양하였다. 융합 후 3일째에는 HAT 배지 100 μ 를 첨가하였으며 3일마다 100 μ 씩 새 배지로 교환하며 배양하였다. 배양 중 하이브리도마 세포의 항체생산 여부는 ELISA로 확인하여, 양성을 보이는 세포는 제한희석법 (limiting dilution)으로 0.3cell/well이 되도록 3회 subcloning함으로써 단클론화하였다. 단클론화된 하이브리도마가 생산하는 항체의 이종인자형 (isotype)을 결정하기 위해서 마우스 isotyping kit (Pierce, USA)를 사용하였다.

Anti-idiotypic 항체 생산 하이브리도마 제조

1) 항원제조

Anti-idiotypic 항체를 생산하는 하이브리도마를 생산하기 위한 항원으로서 anti-DNA 항체들 중 dsDNA에 대하여 높은 친화도를 보이는 항체를 선택하였다. 이 항체의 Fab를 얻기 위하여 정제된 항체 (5mg)에 papain (50U)을 37℃에서 6시간 동안 처리하였다 (Pierce's Fab-prep kit, USA). 처리 후 반응액을 protein A-agarose 컬럼에 통과시켜 Fab 분획을 얻었으며 SDS-PAGE 와 western blotting으로 이 분획이 순수한 Fab 단편임을 확인하였다.

2) 세포융합

Balb/c 마우스 (6~8주령)에 Freund's complete adjuvant와 혼합된 50 μ g의 3D8-Fab를 복강내로 주사하였다. 약 3주 후에 Freund's incomplete adjuvant와 혼합된 50 μ g의 3D8-Fab로 복강내에 2차 면역시키고 2주 후에 20 μ g의 항원으로 3차 면역시킨 후 3일째에 비장세포를 추출하여 세포융합에 사용하였다. 세포융합 방법은 앞서 언급한 바와 같았으며 하이브리도마의 항체생산여부는 ELISA로 확인하였다. 항체역가가 높은 세포 집락을 3회 subcloning함으로써 anti-idiotypic 단클론 항체를 얻었다.

항체역가 측정을 위한 ELISA

융합된 세포들로부터 항체생산 세포를 선별하기 위해서 세포융합 12~14일 후 세포집락을 형성한 well에서 배양액을 취하여 ELISA를 시행하였다. Anti-DNA 항체역가 측정시에는 100 μ l의 calf thymus ssDNA, dsDNA 및 zDNA (1 μ g/ml)를, anti-idiotypic 항체역가 측정시에는 마우스 면역시 사용한 항체의 Fab (2 μ g/ml)분획 50 μ l를 항원으로 사용하였다. 항원으로 96well plate를 도포하여 실온에 한 시간 둔 후 PBST (0.1% Tween20을 함유한 phosphate buffered saline)로 3회 세척하였다. 각 well에 200 μ l의 blocking 용액 (1% BSA를 함유한 PBST)을 가하고 1시간

후 각 하이브리도마 세포배양액 100 μ l씩 넣어 실온에 1시간 두었다. PBST로 각 well을 3회 세척한 후, anti-DNA 항체생산 세포 배양액을 넣은 well에는 alkaline phosphatase가 부착된 rabbit anti-mouse IgG, IgM 및 IgA (100ng/ml) 100 μ l를, anti-idiotypic 항체생산 세포 배양액을 넣은 well에는 alkaline phosphatase가 부착된 anti-mouse IgG (Fc-specific, 100ng/ml) 및 IgM을 100 μ l 가하였다. 한 시간 후 *p*-nitrophenylphosphate 용액 (1mg/ml in 0.1M glycine/1mM ZnCl₂/1mM MgCl₂, pH10.3) 100 μ l를 넣고 405nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Anti-DNA 항체 정제

Anti-DNA 항체를 정제하기 위하여 친화 크로마토그래피 컬럼인 ssDNA-agarose (GibcoBRL, USA) 컬럼을 사용하였다. PBS (pH 7.4)로 평형시킨 컬럼에 세포 배양액을 통과시킨 후, A₂₆₀이 0이 될 때까지 PBS로 세척하고, 700mM NaCl 용액으로 용출시켰다. 용출된 anti-DNA 항체는 PBS에 투석시킨 후 실험에 사용하였다.

Anti-DNA 항체의 항원특이성 검정

정제된 anti-DNA 단클론 항체들이 우선적으로 결합하는 염기서열을 알아보기 위하여 poly(dA-dC) · poly(dG-dT), poly(dG-dC) · poly(dG-dC), poly(dA) · poly(dT) 및 poly(dA-dT) · poly(dA-dT)의 5종 합성 폴리뉴클레오타이드 (Sigma, USA)를 항원으로 사용하여, ELISA를 행함으로써 anti-DNA 항체의 DNA 항원에 대한 선택적 반응기를 결정하였다.

Anti-idiotypic 단클론 항체의 항원특이성 검정

생산된 anti-idiotypic 단클론 항체가 항원 특이성을 나타내는가를 알아보고자 몇 종류의 항체 단백질을 항원으로 사용하여 ELISA와 western blotting을 시행하였다. Western blotting을 위해서, SDS-PAGE를 시행한 후에 nitrocellulose paper에 이적 (transfer)시켰다. 항원이 이적된 nitrocellulose paper를 1% BSA로 한 시간 동안 처리하여 비특이적 항원결합을 방지하였으며, anti-idiotypic 항체 생산 하이브리도마 배양액을 넣고 1시간 반응시킨 후 PBST로 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase가 부착된 anti-mouse IgG (Fc-specific) 또는 anti-mouse IgM과 1시간 동안 반응시켰으며 PBST로 3회 세척 후 BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) 용액을 첨가하여 항원-항체 반응대를 관찰하였다.

선택된 anti-idiotypic 단클론 항체생산 하이브리도마 세포로부터의 총 RNA 분리

총 RNA는 Chomczynski (1987) 등²²⁾의 방법으로 분리하였다. 약 5×10^6 개의 배양세포를 PBS로 2회 세척한 후 GT용액 (4M guanidium thiocyanate, 40mM sodium acetate, 17mM sodium laurylsarcosine, 1% 2-mercaptoethanol) 500 μ l과 chloroform:isoamylalcohol (49:1) 100 μ l

를 가하고 완전히 섞이도록 vortexing하였다. 얼음에서 15분간 냉각시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 10,000g로 20분 원심분리하여 상청액을 수거하고 1vol.의 isopropanol을 가하였다. 총 RNA를 침전시키기 위하여 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 30분간 정치시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 10,000g로 20분간 원심분리하였다. 이로부터 얻은 RNA 침전물을 400 μ l의 GT 용액으로 녹이고 1vol.의 isopropanol을 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 30분간 재침전시켰다. 4 $^{\circ}$ C에서 10,000g로 20분간 원심분리하여 얻은 RNA 침전물을 80% ethanol 1ml로 세척한 후 증류수 50 μ l에 녹여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

cDNA 합성

cDNA 합성을 위해서 Premix-RT kit (Bioneer, Korea)를 사용하였다. 동결건조된 반응혼합물에 총 RNA 2 μ g과 각 primer 30pmoles과 증류수를 첨가하여 총 50 μ l이 되도록 한 후, 57 $^{\circ}$ C에서 10분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 합성반응을 진행시키고 94 $^{\circ}$ C에서 5분, 반응을 정지시켰다. 이때 증쇄의 cDNA 합성에는 μ chain의 불변부위 (constant region)에 결합하는 C μ I primer를, 경쇄의 cDNA 합성에는 κ chain의 불변부위에 결합하는 C κ I primer를 사용하였다.

RT-PCR

V_H 유전자를 증폭시키기 위한 sense primer로서 마우스 증쇄의 leader sequence에 결합하는 12개의 primer와 anti-sense primer로서 C μ I 보다 upstream sequence에 결합하는 C μ II primer를 사용하였다. V_L 유전자 증폭을 위해서는 마우스 경쇄의 leader sequence에 결합하는 11개의 5' primer와 C κ II 3' primer를 사용하였다. cDNA 1 μ l에 sense primer 10pmoles, anti-sense primer 10pmoles, 10X reaction buffer (100mM Tris-HCl pH8.3, 400mM KCl, 10mM DTT, 25mM MgCl₂), Taq polymerase 2U를 첨가한 50 μ l 반응혼합액으로 touch down PCR을 수행하였다. 94 $^{\circ}$ C 1분, 65 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ C 1분 (cycle당 0.5 $^{\circ}$ C 감소), 72 $^{\circ}$ C 1분 과정을 30cycles 행한 후 72 $^{\circ}$ C 7분간 extension시켰으며 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

V_H 유전자의 염기서열 분석

증폭된 PCR 산물을 agarose gel상에서 전기영동하여 extraction kit (Qiagen, Germany)로 정제하였다. 증폭된 cDNA를 TA cloning vector (Promega, USA)에 클로닝한 후 *E. coli* DH5- α 에 형질전환 (transformation)시켰다. Plasmid를 정제하여 Sequenase ver. 2.0 kit (US Biochemicals, USA)로 염기서열을 조사하였다.

결 과

Anti-DNA 단클론 항체의 항원특이성

세포융합 결과 얻은 anti-DNA 단클론 항체의 항원 특이성을 조사하고자 dsDNA, ssDNA 및 z-DNA를 항원의

Table 1. Isotype and specificity of anti-DNA antibodies

	IgM/κ clone	IgG1/κ clone	IgG2a/κ clone	IgG2b/κ clone	IgG3/κ clone
dsDNA	1 ^a	0	4 ^a	0	0
ssDNA	1	0	15	0	1
zDNA	0	0	0	0	0

^aThey also reacted with single-stranded DNA

Table 2. Binding specificity of anti-DNA antibodies

Clone	Isotype	poly[dA-dT]	poly[dG-dC]	poly[dA-dC]	poly[dA]	poly[dG-dC]
		poly[dA-dT]	poly[dG-dC]	poly[dG-dT]	poly[dT]	poly[dG-dC]
1B7	IgG2a	-	-	-	-	-
2F7	IgG2a	-	+	-	-	-
1E1	IgG2a	++	+	+	+++++	-
1G10	IgG2a	-	+	+	-	-
1B5	IgG2a	-	-	-	-	-
1C3	IgG2a	+	-	-	-	-
4D7	IgG2a	+	+	+	+	-
4A11	IgG2a	-	++	+	-	-
2C10	IgG2a	-	-	-	+	-
2C7	IgG2a	-	-	-	-	+
1B2	IgG2a	+	+	+	+++++	-
4H11	IgG2a	-	-	-	-	-
4A4	IgG2a	+	++	+	++	-
3D8	IgG2a	+++++	+++++	+++++	+++++	-

- and + indicates no reaction and positive reaction respectively. Each + represents 0.5 value of O.D. Each synthetic polynucleotides of 100μl (5μg/ml) were coated on 96 well plate. After washing and blocking, 100μl of the purified anti-DNA antibodies(1μg/ml) and alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG were added into each wells at 1hr interval. A₄₀₅ were measured after addition of p-nitrophenylphosphate

로 사용하여 각각 ELISA를 시행한 결과, z-DNA에 대해서는 모든 클론이 결합을 보이지 않았고, dsDNA에 대해서는 9 클론, ssDNA에 대해서는 141 클론이 결합을 나타내었다. 이들 클론중 항체 역가가 높은 항체를 택하여 isotype을 조사한 결과 IgM/κ가 1 클론, IgG2a/κ가 15 클론, IgG3/κ가 1 클론이었으며 이중 IgM/κ 1 클론, IgG2a/κ 4 클론이 dsDNA와 ssDNA에 교차반응을 보였다 (Table1).

Anti-DNA 단클론 항체의 항원반응기

분리 정제된 anti-DNA 항체들이 선호적으로 결합하는 염기서열이 무엇인지 알아보기 위하여 5 종류의 합성 뉴클레오타이드를 항원으로 사용하여, ELISA를 행한 결과, 대부분의 anti-DNA 항체들이 poly[dA-dT] · poly[dA-dT], poly[dG-dC], poly[dA] · poly[dT] 그리고 poly[dA-dC] · poly[dG-dT] 등과 반응을 보였으나, poly[dG-dC] · poly[dG-dC]와는 한 클론만이 반응을 보였다 (Table 2).

3D8 항체 및 3D8-Fab 정제

Anti-idiotypic 단클론 항체 생산을 위한 항원을 얻기 위하여 3D8 하이브리도마의 배양액으로부터 ssDNA-agarose 컬럼을 사용하여 3D8 단클론 항체를 정제하였다. 정제된

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the purified 3D8 and it's fragments. Lane M; molecular weight marker, lane 1; 3D8 whole molecule, lane 2; 3D8-Fab, lane 3; 3D8-Fc. The 3D8 antibody purified on ssDNA-agarose column, 3D8-Fab and 3D8-Fc purified on protein A column after papain treatment were subjected to 10% acrylamide gel and stained with coomassie blue.

Table 3. PCR primers for cloning mouse heavy and kappa light chain variable regions

1. PCR primers for V _H cloning	
MHV1	: ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC
MHV2	: ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
MHV3	: ATGAAGWTGGTTAAACTGGGTTTTT
MHV4	: ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRITF
MHV5	: ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCT
MHV6	: ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC
MHV7	: ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHV8	: ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
MHV9	: ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
MHV10	: ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCTG
MHV11	: ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
MHV12	: ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG
C _μ I	: TGGAAATGGGCACATGCAGATCTCT
C _μ II	: ACCAGATTCTTATCAGACAGG
2. PCR primers for V _K cloning	
MKV1	: ATG AAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGT-GTCTC
MKV2	: ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATG-GGTG
MKV3	: ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG
MKV4	: ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMW-TCTTG
MKV5	: ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
MKV6	: ATGAGGTKCYTYGYSAGYTYCTGRGG
MKV7	: ATGGGCWTC AAGATGGAGTCACAKWYY-CWGG
MKV8	: ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTTCAATTG
MKV9	: ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	: ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT
MKV11	: ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
C _κ I	: TGAGGCACCTCCAGATGTTAA
C _κ II	: GGATGGTGGGAAGATGGATAC

M=A/C, R=A/G, W=A/T, S=C/G, Y=C/T, K=G/T

3D8 항체 및 papain처리로 얻은 3D8-Fab의 순도를 SDS-PAGE로 확인한 결과, 약 50kD의 중쇄와 25kD의 경쇄 및 25kD의 Fab와 Fc 단백질을 확인할 수 있었으며 (Fig. 1) western blotting으로 Fc 부위가 완전히 절단, 제거되었음을 확인하였다 (Fig. 2).

Anti-idiotype 단클론 항체

정제된 anti-DNA 항체 (3D8)의 Fab로 면역시킨 마우스의 비장세포와 골수종세포를 융합시킨 결과 24개의 well에서 anti-idiotype 항체를 분비하는 하이브리도마들이 관찰되었다. 그 중 항체가 높은 2개의 세포주를 선택하여 각각 제한 회색법으로 3차 subcloning하여 단클론 항체를 분비하는 단클론, B7 (IgG2a/κ)과 O2F3 (IgM/κ)를 얻었다. ELISA와 western blotting으로 anti-idiotype 단클론 (B7 및 O2F3) 항체가 항원 특이성을 갖는지 조사한 결과, B7은 ELISA와 western blotting에서 모두 3D8-Fab 분획에 특이적으로 반응하였다. 반면 O2F3의 경우 ELISA에

Fig. 2. Western blot analysis of the purified 3D8 and its fragments. After SDS-PAGE of the proteins (lane 1,4; Fab, lane 2,5; whole Ig, lane 3,6; Fc), electroblotted onto a nitrocellulose membrane and then incubated with AP-conjugated anti-mouse IgG/Fc-specific (lane 1-3) or anti-mouse IgG (lane 4-6).

Fig. 3. Western blot analysis of mAb B7 and mAb O2F3. mAb 3D8 whole molecule (lane 2, 5), 3D8-Fab (lane 1, 4), and 2B8-Fab (lane 3, 6) were separated on SDS-PAGE, transferred to nitro-cellulose membrane, and then incubated with the culture media of B7 (lane 1-3) or O2F3 (lane 4-6). After washing, AP-conjugated anti-mouse IgG/Fc-specific (lane 1-3) or anti-mouse IgM (lane 4-6) was added.

서는 3D8-Fab 분획에 특이적으로 결합하는 결과를 얻었으나 western blotting을 행하였을 때는 사용된 모든 항원, 즉 3D8, 3D8-Fab 및 anti-DNA 단클론 항체이나 isotype이 다른 2B8 (IgG3/κ)의 Fab에 반응을 보이지 않았다 (Fig. 3).

O2F3 항체의 V_H 및 V_L 유전자 증폭

RT-PCR을 시행하여 O2F3의 V_H 유전자에 대해서는 MHV7 5' primer와 C_μ II 3' primer에 의해 증폭된 약 500bps의 DNA를, V_L 유전자에 대해서는 MKV2 5' primer와 C_κ II 3' primer에 의해 증폭된 약 450bps 크기의 증폭된 PCR 산물을 얻었다 (Fig. 4).

O2F3의 V_H 염기서열 분석

염기서열 분석은 PCR 산물의 subclone들로부터 결정하였다. V_H의 염기서열을 Kabat database의 마우스 항체 유전자의 염기서열과 비교한 결과, 클로닝된 유전자가 마우스의 V_H 유전자임을 확인하였다. 분석된 V_H는 모두 119개의 아미노산으로 구성되어 있으며 CDR1은 32~36번째, CDR2는 52~59번째, CDR3는 103~107번째 아미노산으로 이루어졌다 (Fig. 5).

고 찰

자가면역질환이나 B lymphoma의 치료를 위하여 anti-idiotypic 항체를 이용하여 B 세포의 항체생산력을 조절하려는 시도가 많이 시도되었음에도 불구하고 아직은 조절

Fig. 4. RT-PCR amplification of O2F3-V_H and V_L gene. M; 123 ladder size marker, lane 1; V_H, lane 2; V_L.

```

atg gga tgg agc ggg gtc ttt ctc tta atc ctg tca gta act aca ggt gtc cac tct
M G W S G V F L L I L S V T T G V H S

1           5           10           15
gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gag aag cct ggc gct tca gtg aag
E V Q L Q Q S G P E L E K P G A S V K

20           25           30           CDR1
ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac aac atg aac tgg gtg aag
I S C K A S G Y S F T G Y N M N W V K

40           45           50           CDR2
cag agc aat gga aag agc ctt gag tgg att gga aat att gat cct tac tat ggt ggt
Q S N G K S L E W I G N I D P Y Y G G

60           65           70           75
act agc tac aac cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc
T S Y N Q K F K G K A T L T V D K S S

80           85           90           95
agc aca gcc tac atg cag ctc aag agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac
S T A Y M Q L K S L T S E D S A V Y Y

100           CDR3           110           115
tgt gca aga ggg tac ttc gat gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca
C A R G Y F D V W G A G T T V T V S S

120           125           130           135
gag agt cag tcc ttc cca aat gtc ttc ccc ctc gtc tcc tgc gag agc ccc ctg tct
E S Q S F P N V F P L V S C E S P L S
    
```

Fig. 5. Nucleotide sequence of the V_H region of O2F3. Numbers shown at the top indicate codon numbers and italic letters refer to the leader sequence (upstream) or constant region (down stream). The regions underlined indicate CDRs. Deduced amino acid sequences from the DNA sequences are shown below as a one letter.

기전이 불분명하다^{18,23,24)}. 즉 B세포의 분화상태나 anti-idiotypic 항체의 투여조건 등 여러가지 요인이 관여할 것이라 생각되고 있으므로 이에 대한 연구가 더욱 많이 이루어져야 된다고 생각된다. 본 연구에서는 자가면역질환의 증상을 유발하는 다양한 anti-DNA 단클론 항체생산 하이브리도마와 이 하이브리도마가 생산하는 항체의 idiotype을 인지하는 다양한 anti-idiotypic 항체를 생산하고자 하였다. 그 결과 anti-DNA 항체 생산 하이브리도마는 IgM/k, IgG2a/k, IgG3/k isotype을 갖는 20여종을 얻었으나 이 항체들 중에서 선택한 3D8 (IgG2a/k) 항체에 대한 역가가 높은 anti-idiotypic 항체는 두 종류 (B7과 O2F3)만을 얻었다. 추후 IgG2a/k 외의 다른 isotype의 anti-DNA 항체를 항원으로 한 anti-idiotypic 항체를 더 확보하는 일이 필요하다고 생각되며 다양한 anti-DNA 항체의 idiotype에 결합하는 anti-idiotypic 항체들을 이용하여 각 하이브리도마의 항체생산 조절에 대한 연구가 뒤따라야 할 것이다.

본 연구에서 생산된 anti-DNA 단클론 항체들의 isotype은 IgG2a class가 가장 많았다. MRL-*lpr/lpr* 마우스나 다른 자가면역질환 마우스들의 경우에 있어서는 DNA 항원이 다른 class 보다는 IgG class 항체생산 B 세포를 상대적으로 더 많이 생성하는 것으로 알려져 있다^{25,26)}. 단클론 항체들이 합성 뉴클레오타이드들에 대해서 각기 다른 결합양상을 보였는데 이는 기존에 알려진 anti-DNA 항체들이 나타내는 선호적인 DNA 염기서열이 다양하다는 사실에 부합되며²⁷⁾, 같은 isotype을 가진 클론들이 동일한 클론으로부터 유래된 것이 아니라는 것을 말해준다. Anti-DNA 항체인 3D8은 ssDNA 뿐만 아니라 dsDNA에 대해서도 높은 항원 친화도를 보였으므로 자가면역질환 증상유발의 직접적 요인이 될 수도 있는 항체라 생각되어 anti-idiotypic 항체생산을 위한 항원으로 사용하였다.

Anti-DNA 항체 3D8을 인지하는 anti-idiotypic 항체가 3D8 항체의 항원결합부위와 결합하는지, 즉 3D8의 항원인 ssDNA의 'internal image'로서 작용하는지 알아보고자 competitive ELISA를 시행하였다. 이때 3D8-Fab를 항원으로, ssDNA를 inhibitor로 사용하여 O2F3 anti-idiotypic 항체와 반응시켜 ELISA를 행하였을 때 O2F3는 모든 ssDNA 농도 (0.001 μ g/ml~50 μ g/ml)에 대해서 전혀 3D8-Fab와의 결합이 저해되지 않았다. 즉 O2F3가 3D8의 항원결합부위(paratope)를 인지하지 않고 항원결합부위 바깥쪽의 idiotope을 인지하는, 'subgroup Ab2 α '에 속하는 anti-idiotypic 항체임이 관찰되었다. 일반적으로 특정 idiotope을 인지하는 anti-idiotypic 항체가 생산될 때 항원-항체 반응을 저해할 수 있는 Ab2 β 항체는 생산된 전체 항체의 약 15%만을 차지한다고 알려져 있다²⁸⁾. O2F3 항체의 항원 특이성을 관찰하고자 ELISA와 western blotting을 시행하였을 때, ELISA에서는 3D8-Fab에 만 특이적으로 결합하였으나 (배지의 A_{405} =0.1일 때, O2F3 배양액의 A_{405} =2.3) western blotting에서는 사용한 모든 항원에 결합하지 않았는데, 이로 미루어보아 O2F3 항체는 경쇄와 중쇄 모두에 의해 이루어진 3차 구조의 항원결정기를 인지하는 항체라 생각된다.

자가항체를 생산하는 B 세포의 증식 및 활성 억제를 위한 anti-idiotypic 항체 이용시 최근에는 항체를 정제하여 그대로 이용하기 보다 유전공학적으로 제작된 single chain Fv (scFv) 사용이 보편화 되어가고 있다²⁹⁾. 이는 항원결합에 관여하는 V_H와 V_L 유전자만을 peptide linker로 연결시킨 재조합 항체로 박테리아에서 다량 생산이 용이하며 항원인식에 불필요한 부분이 제거되므로 알레르기 반응 및 사람 항-마우스 항체반응 (human anti-mouse antibody response; HAMA response)를 줄일 수 있다. 또한 유전자 조작으로 항원에 대한 특이성과 친화력을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 항체의 인간화 (humanization)를 통하여 이종간의 투여시 나타나는 항체 단백질 자체의 면역원성 (immunogenicity)을 줄일 수 있는 장점이 있다^{30,31)}. 본 연구에서도 이러한 취지로 O2F3의 V_H 및 V_L 유전자 클로닝을 시도하였다. 클로닝된 DNA 염기서열을 컴퓨터로 Kabat의 Database와 비교 분석하였을 때 V_H의 경우, V gene segment는 V_H1 (J558) family, D gene segment는 DFL16 family에 속하는 유전자가 사용되었고, J_H 유전자는 J_H1 gene segment에서 유래되었음이 확인되었다. J558 유전자는 anti-DNA 항체와 18주령 이상된 C57BL/6 와 Balb/c 마우스 항체에서 높은 빈도로 발견되며 DFL16-J_H1 유전자 또한 정상 마우스 항체에서 매우 높은 빈도로 나타난다고 알려져 있다^{32~34)}. V_L의 경우, western blotting으로 κ chain의 발현을 확인한 후 RT-PCR에 의하여 예상된 크기 (420bps)의 증폭된 DNA를 얻었으나 염기서열 분석결과 O2F3-V_L 유전자 대신 전사만 일어나고 단백질로 발현되지 않는, 세포 융합시 사용한 마우스 myeloma 세포의 V_k³⁵⁾ 유전자가 클로닝되었음이 확인되어 추후 O2F3-V_L 유전자 클로닝을 다시 수행하고자 한다. 한편 자가면역질환 치료에 anti-idiotypic 항체를 이용하는 것이 일시적이고 효과적이지 않을 가능성이 있기 때문에 자가면역질환의 장기적 치료를 위한 더 효과적인 방법은 자가항체 생산 B 세포를 근본적으로 제거하는 것이 될 것이다. 이를 위하여 유전공학적으로 자가항체 생산 B 세포의 항원수용체에 대한 anti-idiotypic 항체에 독소 (toxin)를 결합시킨 형태인 immunotoxin³⁶⁾ 생산 또한 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Fessel WJ: Systemic lupus erythematosus in the community, Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. Arch Intern Med 134: 1027-1035.
- 2) Andrews BS, Eisenberg RS, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, Murphy ED, Roths JB, Dixon FJ: Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. J Exp Med 148: 1198-1215, 1978.

- 3) Jacob L, Viard JP, Allenet B, Anin MF, Slama FB, Vandekerckhove J, Primo J, Masrkovits J, Jacob F and Bach JF: A monoclonal anti-double stranded DNA autoantibody binds to a 94kDa surface protein on various cell type via nucleosomes or a DNA-histone complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4669-4673, 1989.
- 4) Raz E, Brezis M, Rosenmann E and Eilat D: Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *J Immunol* 142: 3076-3082, 1989.
- 5) Borel Y, Lewis RM, Stollar BD: Prevention of murine lupus nephritis by carrier-dependent induction of immunologic tolerance to denatured DNA. *Science* 182: 76-78, 1978.
- 6) Morimoto C, Mashuho Y, Borel Y, Steinberg A, Schlossman, SF: Selective inhibition of antinucleoside-specific antibody production by nucleoside-ricin A conjugate. *J Immunol* 131: 1762-1764, 1983.
- 7) Dwyer JM: Manipulating the immune system with immune globulin. *New England J Med* 326: 107-113, 1992.
- 8) Abdou NI, Wall H, Lindsley HB, Halsey JF, Suzuki T: Network theory in autoimmunity. In vitro suppression of serum anti-DNA antibody binding to DNA by anti-idiotypic antibody in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 67: 1297-1304, 1981.
- 9) Zouali M, Fine JM, Eyquem A: A human monoclonal IgG1 with anti-idiotypic activity against human thyroglobulin autoantibody. *J Immunol* 133: 190-194, 1984.
- 10) Page N, Murray N, Perruisseau G, Steck AJ: A monoclonal anti-idiotypic antibody against a human monoclonal IgM with specificity for myelin-associated glycoprotein. *J Immunol* 153: 730-742, 1985.
- 11) Evans M, Abdou NI: In vitro modulation of anti-DNA secreting peripheral blood mononuclear cells of lupus patients by anti-idiotypic antibody of pooled human intravenous immune globulin. *Lupus* 2: 371-375, 1993.
- 12) Dietrich G, Kazatchkine MD: Normal IgG for therapeutic use (intravenous Ig) contain anti-idiotypic specificities against an immunodominant, disease-associated, cross-reactive idiotype of human anti-thyroglobulin autoantibodies. *J Clin Invest* 85: 620-625, 1990.
- 13) Hahn BH, Ebling FM: Suppression of murine lupus nephritis by administration of an anti-idiotypic antibody to anti-DNA. *J Immunol* 132: 187-190, 1984.
- 14) Mahana W, Guilbert B, Avrameas S: Suppression of anti-DNA antibody production in MRL mice by treatment with anti-idiotypic antibodies. *Clin Exp Immunol* 70: 538-545, 1987.
- 15) Eichmann K: Idiotype suppression II. Amplification of a suppressor T cell with anti-idiotypic activity. *Eur J Immunol* 5: 511-517, 1975.
- 16) Eichmann K, Coutinho A, Melchers F: Absolute frequencies of lipopolysaccharide-reactive B cells producing A5A idiotype in unprimed, streptococcal A carbohydrate-primed, anti-A5A idiotype-sensitized and anti-A5A idiotype-suppressed A/J mice. *J Exp Med* 146: 1436-1449, 1977.
- 17) Eichmann K: Expression and function of idiotypes on lymphocytes. *Adv Immunol* 26: 195-254, 1978.
- 18) Kim YT, Puntillo E, DeBlasio T, Weksler ME, Siskind GW: Regulation of antibody production by hybridoma cultures. I. Anti-idiotypic antibody-mediated down-regulation of anti-DNA antibody production by hybridoma cells. *Cell Immunol* 105: 65-74, 1987.
- 19) Koopman WJ, Schrohenloher RE, Barton JC, Greenleaf EC: Suppression of in vitro monoclonal human rheumatoid factor synthesis by anti-idiotypic antibody. *J Clin Invest* 72: 1410-1419, 1983.
- 20) Derie MA, Vaň Lier RAW, Imholz MJM, Schumacher TNM, Van Schijndel GMW, Miedema F: Requirements for induction of activation and proliferation of human B cells analysed with anti-idiotypic monoclonal antibodies. *Scand J Immunol* 30: 249-257, 1989.
- 21) Leung DTM, Loh TT, Lim PL: The antigen-specific IgG receptor is more sensitive to stimulation than the IgM receptor in transfected B cells. *Mol Immunol* 31: 343-349, 1994.
- 22) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1986.
- 23) Hahn BH, Ebling FM: Suppression of murine lupus nephritis by administration of an anti-idiotypic antibody to anti-DNA. *J Immunol* 132: 187-190, 1984.
- 24) Hahn GH, Ebling FM: Suppression of NZB/NZW murine nephritis by administration of a syngenic monoclonal antibody to DNA. *J Clin Invest* 71: 1728-1736, 1983.
- 25) Jerrie G, Robbert AS and Datta SK: The NZB/SWR model of lupus nephritis. *J Immunol* 138: 128-137, 1987.
- 26) Tastuhiro H, Suzuki N, Mizushima Y, Sakane T: Usage of a novel class of germ-line Ig variable region gene for cationic anti-DNA autoantibodies in human lupus nephritis and its role for the development of the disease. *J Immunol* 153: 4806-4815, 1994.

- 27) Isenberg DA, Dudeney C, Williams W, Todd PA, Stollar BD: Disease activity in systemic lupus erythematosus related to a range of antibodies binding DNA and synthetic polymucleotides. *Ann Rheum Dis* 47: 717-724, 1988.
 - 28) Urbain J, Slaoui M, Mariame B, Leo O: Idiotype and internal images. In *Idiotypy in Biology and Medicine* p15. Academic Press, New York.
 - 29) Bird R, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M: Single-chain antigen binding proteins. *Science* 242: 423-426, 1988.
 - 30) Pluckthun A: Antibodies from *Escherichia coli*. *Nature* 347: 497-498.
 - 31) Demanet C, Brissinck J, Jonge JD, Thelemans K: Bispecific antibody-mediated immunotherapy of the BCL1 lymphoma: Increased efficacy with multiple injections and CD28-induced cosimulation. *Blood* 87: 4390-4398, 1996.
 - 32) Viale AC, Chies A, Huetz F, Malenchere E, Weksler M, Freitas AA, Coutinho A: VH-gene family dominance in ageing mice. *Scand J Immunol* 39: 184-188, 1994.
 - 33) Atkinson MJ, Chang Y, Celler JW, Huang C, Paige CJ, Wu GE: Overusage of mouse DH gene segment, DFL16.1, is strain-dependent and determined by cis-acting elements. *Dev Immunol* 3: 283-295, 1994.
 - 34) Gangemi RM, Singh AK, Barrett KJ: Independently derived IgG anti-DNA autoantibodies from two lupus-prone mouse strains express a VH gene that is not present in most murine strains. *J Immunol* 151: 4660-4671, 1993.
 - 35) Jang YJ, Stollar BD: Means for distinguishing between specific hybridoma cDNA and cDNA of the myeloma cell fusion partner. *Anal Biochem* 204: 407-408, 1992.
 - 36) Vietta ES: Immunotoxins: New therapeutic reagents for autoimmunity, cancer, and AIDS. *J Clin Immunol* 10: 15-18, 1990.
-