

# 분자 비컨을 이용한 살아 있는 세포에서 단일클론항체 경쇄와 중쇄 mRNA 검출에 의한 세포주 선별방법

정승아, 이원종\*

## Live Cell Detection of Monoclonal Antibody Light and Heavy Chain mRNAs using Molecular Beacons

Seunga Jeong and Won Jong Rhee\*

Received: 3 December 2015 / Revised: 2 February 2016 / Accepted: 10 February 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Developing the method for the selection of animal cell line producing therapeutic monoclonal antibody (mAb) is invaluable as its market is rapidly growing. Although the quality of produced mAb is as important as quantity, however there is no method developed for the selective screening of cell lines on the basis of both quantity and quality. From recent reports, the ratio of light and heavy chain mRNAs of mAb in the cell is a key parameter for the indication of product quality. Therefore, it is obvious that developing the novel method that can detect both light and heavy chain mRNAs in single live cell will provide unprecedented opportunities in bio-industry. Here, we have constructed oligonucleotide probes, molecular beacons for the detection of light or heavy chain mRNAs, respectively, in the live cells producing mAbs. Both beacons showed increased fluorescent intensity after transient transfection of plasmid expressing mAbs analyzed by fluorometer. Flow cytometric analysis clearly demonstrated that both molecular beacons can simultaneously detect the expression of light and heavy chain mRNAs of mAb in the same cell. The technique described in the thesis provides the new direction and concept for developing the method for the smart selection of cell lines producing recombinant proteins including therapeutic mAbs.

**Keywords:** Monoclonal antibody, Cell line, Anti-apoptosis, mRNA, Molecular beacon, Recombinant protein

### 1. INTRODUCTION

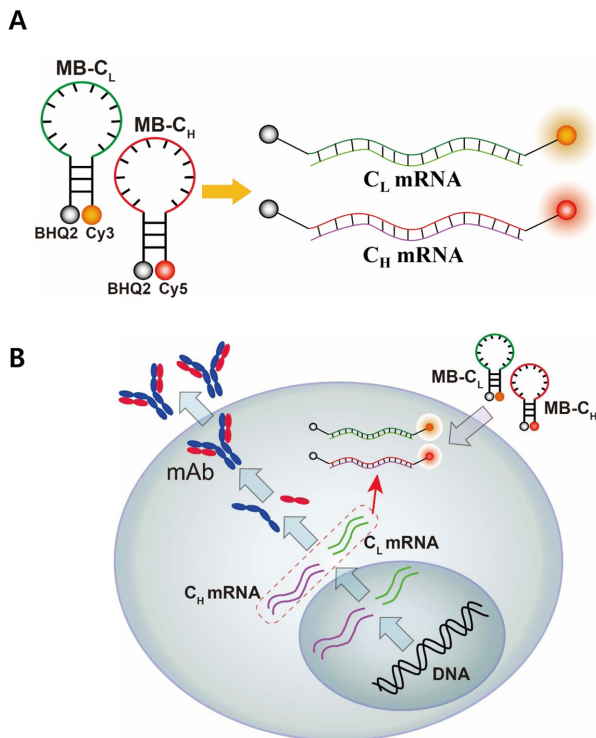
치료용 단일클론항체 (Monoclonal antibody; mAb)를 중심으로 한 바이오 의약품 시장이 급속도로 성장하면서 재조합 항체 생산 기술 개발에 대한 필요성이 대두되고 있다. 특히 항체 생산에 사용되는 우수 세포주를 효율적으로 선별하는 기술 개발에 대한 수요가 증가하고 있다. 기존에는 주로 항세포사멸 (anti-apoptosis) 기술을 활용한 세포주의 생산성 증대 방향의 연구가 진행되었지만, 이후 우수한 세포주를 선별하는 방식에 대한 연구에 대한 필요성이 부각되었다. 치료용 항체 발현 벡터가 transfection 된 세포군을 희석하여 세포주를 선별하는 방식이 고전적으로 사용되었다면, 최근에는 FACS (Fluorescence activated cell sorter)를 기반으로 세포로부터 배출되는 치료용 항체를 세포 표면에서 검출하는 방식의 기술이 많이 사용되고 있다. FACS 기반 방법의 경우, 항체가 배출되면서 일시적으로 세포 표면에 존재하게 되는데, 이렇게 생산된 항체 중쇄 (Heavy Chain)의 불변 영역 (constant region)을 형광 부착 항체로 표지하여 검출하는 방식이 주로 사용된다. 이 방법은 비교적 단 시간 내에 다수의 세포주 생산성을 평가하여 우수한 세포주 후보들을 선별할 수 있다는 장점을 갖고 있다. 하지만, 이러한 방법들은 세포주의 생산성 예측 측면에서는 유용하게 사용될 수 있지만, 생산된 항체의 품질에 대한 정보를 줄 수 없다. 이 외에도 형광 단백질

인천대학교 생명공학부  
Division of Bioengineering, Incheon National University, Incheon 406-772, Korea.  
Tel: +82-32-835-8299, Fax: +82-32-835-0763  
e-mail: wjrhee@inu.ac.kr

질을 항체 발현 마커로 활용하여 선별하는 방법, Matrix-based secretion assays, LEAP (Laser-enabled analysis and processing) 등 여러 방법이 존재한다 [1]. 그러나 이들 방법에서는 특정 세포주에 제한될 수 있으며, 세포에 대한 독성의 문제가 발생할 수 있고, 고비용이 소모된다는 단점이 있다. 따라서 이러한 단점들을 극복할 수 있으면서도 세포주의 초기 선별 과정에서 생산되는 단일클론항체의 양과 더불어 품질 (quality)에 대한 정보를 얻을 수 있는 방법에 대한 기술 개발이 필요하다.

이와 관련하여 최근 제넨텍 (Genentech, Inc.)에서 발표한 논문에 따르면 몇 가지 선별 방법을 통해 항체의 발현량과 전사체 사이의 관계에 대해 연구를 진행해 왔으며, 중쇄 mRNA의 양이 항체 단백질의 생산성과 연관되어 있음을 확인하였다 [2]. 이와 더불어 경쇄와 중쇄 mRNA의 비율이 1.5 이하인 경우, 발현된 항체 단백질의 응집 (aggregation) 비율이 높아져 생산성이 떨어지게 됨을 확인하였다. 즉, 경쇄 (Light Chain)와 중쇄의 mRNA 양적 비율이 생산되는 단일클론항체의 양은 물론 품질 (Quality)을 결정하는 중요한 변수

가 된다 [3-9]. 그러나 앞서 언급하였듯이 현재 세포에서 생산되는 단일클론항체의 양과 질을 기반으로 세포주를 선별하는 기술은 존재하지 않는다. 이를 위해서는 살아 있는 세포 내부에서 경쇄와 중쇄의 mRNA를 동시에 검출하는 기술 개발이 필요하다. 본 연구에서는 oligonucleotide probe인 molecular beacon (MB)을 이용하여 인간 단일클론항체의 경쇄와 중쇄 mRNA를 살아 있는 세포에서 검출하는 기술을 개발하였다. MB는 stem과 loop 구조로 이루어져 있는 단일 가닥의 oligonucleotide로, 5' 말단에 fluorescence dye가, 3' 말단에 quencher가 존재한다. MB와 상보적으로 결합하는 target mRNA가 없을 경우 stem 부분이 열리지 않게 되어 quencher와 fluorescence dye가 가까이 존재하기 때문에 형광을 나타내지 않는다. 그러나 target mRNA가 존재하는 경우 MB loop 부분과 target이 상보적으로 결합하여 stem 부분이 열리게 되며, 이때 quencher와 fluorescence dye가 멀어지게 되어 형광을 나타낸다. 따라서 MB는 target mRNA의 존재 유무에 따라 on/off 신호를 줄 수 있기 때문에 살아 있는 세포 내에서 target mRNA와 결합하지 않은 MB를 분리할 필요가 없으며, 결합 특이성이 상당히 높기 때문에 살아 있는 세포에서의 mRNA 검출에 유용하게 사용될 수 있다 (Fig. 1) [10-21]. 따라서 MB의 loop 부분을 인간 단일클론항체의 경쇄와 중쇄의 불변 영역 ( $C_L$ ,  $C_H$ )과 상보적으로 결합하도록 제작하여 각각의 MB를 단일클론항체 생산 세포주에 운반하여 target mRNA들을 검출할 수 있다. 본 기술을 통해 상업용 항체 치료제 생산 공정에서 중요 공정 중 하나인 세포주 구축 단계에서 항체 생산성은 물론 생산된 항체의 품질을 동시에 보장할 수 있는 우수 세포주 확보할 수 있을 것으로 기대된다.



**Fig. 1.** Live cell monoclonal antibody mRNA detection using molecular beacon (MB) (A) Molecular beacon and its hybridization with  $C_L$  and  $C_H$  mRNAs, respectively. (B) Schematic illustration of novel selection technique of antibody expressing cell lines using molecular beacons. After transfection of plasmid encoding mAb,  $C_L$  and  $C_H$  DNAs are subsequently transcribed and translated into the mRNAs and proteins inside the cells. After translation, folding, and assembling processes, the mAbs are secreted out of cells.  $C_L$  and  $C_H$  mRNAs can be detected using their specific molecular beacons (MB- $C_L$  and MB- $C_H$ ) in live cells.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Molecular beacon design and hybridization assay in solution

실험에 사용된 단일클론항체 경쇄 및 중쇄 불변 영역에 상보적으로 결합하는 MB (각 MB- $C_L$ , MB- $C_H$ ) 서열은 각각 5'-Cy3-GCGGTCCCTGCTCTGTGACACTCTCCGACCGC-BHQ2-3', 5'-Cy5-CCGCAGCCATTGCTCTCCACTCCACTTGCGG-BHQ2-3' (Bio Basic Canada Inc.) 이다. 밑줄 친 부분은 MB 구조 중 stem을 나타내며 나머지 부분은 각각 경쇄와 중쇄 mRNA와 결합할 수 있도록 설계된 loop 부분이다. 경쇄와 중쇄 mRNA와 MB와의 결합 부위는 IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.)에서 제공하는 anti-sense 제작 프로그램을 활용하였다. 각 MB의 결합 특이도를 확인하기 위해 용액 중에서 경쇄와 중쇄 mRNA에 대한 각각의 mimic를 제작하여 결합 정도를 확인하였다. 각 mimic는 인간 단일항체 경쇄와 중쇄 불변 부위의 일부분으로 서열은 각각 5'-GGAGAGTGT CACAGAGCAGC-3', 5'-GTGGAGTGGGAGAGCAATGG-3' (Cosmogenetech, Inc.)으로 제작하였다. 비특이적 결합 여부를 확인하기 위해 사용된 무작위 mimic (random mimic)의 서

열은 5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' (Cosmogenetech, Inc.)이다. 결합 실험에 사용된 mimic의 농도는 0, 10, 100, 500 nM였으며, 사용된 MB 농도는 100 nM이다. 경쇄와 중쇄 mimic를 각각 또는 동시에 nuclease free PBS 용액 안에 넣고 MB와 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 형광 분석기 (Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 결합 정도를 측정하였다. 경쇄 결합 MB의 경우에는 excitation과 emission 파장을 각각 550 nm와 570 nm에서, 중쇄 결합 MB의 경우에는 각각 650 nm와 670 nm의 파장을 사용하였다. Mimic의 농도가 0 nM일 때의 형광값을 background로 하여 S/B ratio를 계산하였다.

**2.2. 세포 배양 및 transfection**

실험에 사용된 HeLa 세포는 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Biowest, France)를 사용하여 배양하였으며, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Biowest)과 1% (v/v) penicillin을 첨가하여 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>를 공급한 상태로 배양하여 실험에 사용하였다. 세포 내 단일클론항체 생산을 위해 HeLa 세포를 6 well plate에 6×10<sup>5</sup>개/well로 seeding 하고 24시간 경과 후 단일클론항체 생산 벡터를 jetprime® (Polyplus-transfection Inc., USA)을 이용하여 transfection 하였다.

**2.3. RNA 분리 및 Real-time PCR을 이용한 항체 mRNA 발현 분석**

단일클론항체 벡터를 transfection한 세포에서 발현된 경쇄와 중쇄 mRNA의 정량적 분석을 위해 Real-time PCR을 진행하였다. 먼저 RNA 시료 준비를 위해 단일클론항체 생산 벡터가 transfection된 HeLa 세포를 48시간 동안 배양한 후 ISOL reagent (SPRIME)를 이용하여 제작사의 매뉴얼에 따라 RNA를 추출 및 분리하였다. NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 RNA의 양 및 순도를 측정하였다. Total RNA는 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Japan)를 사용하여 cDNA로 역전사하여 합성한 후, Real-time PCR을 진행하였다. PCR반응을 위해 SYBR® Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Japan) 5 mL, forward primer 0.5 mL (최종 500 nM), reverse primer 0.5 mL (최종 500 nM), template 0.5 mL, Nuclease free water 3.5 mL를 넣어 최종 부피가 10 mL가 되게 하였다. PCR 반응 조건은 denaturation은 96°C에서 15초, annealing은 60°C에서 20초, extension은 72°C에서 40초 동안 총 40 cycle 수행하였다. Housekeeping 유전자로 인간 Actin mRNA를 사용하였으며 사용된 forward primer는 5'-ATGAAGTGTGACGTTGACATCCG-3', reverse primer는 5'-GCTTGCTGATCCACATCTGCTG-3' (Cosmogenetech, Inc.)이다. 경쇄에 대한 forward primer는 5'-CTGCACCATCTGTC TTCATCT-3', reverse primer는 5'-AGGCGTAGACTTTGTGT TTCT-3'이었으며, 중쇄에 대한 forward primer는 5'-CCGAG AACCACAGGTGIAT-3', reverse primer는 5'-ATTTACCCGG AGACAGGGA-3'이다.

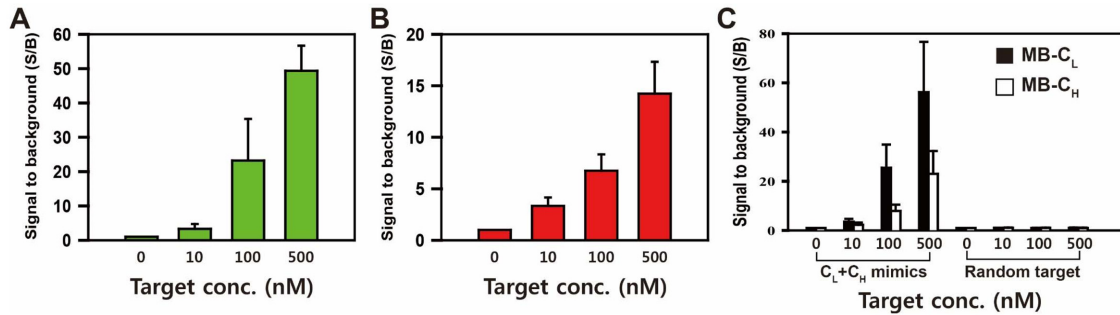
**2.4. 형광 측정기 및 유세포 분석기를 통한 항체 mRNA 발현 검출**

용액 및 세포 내에서 MB와 항체 경쇄 및 중쇄 mRNA와의 결합 정도를 측정하기 위해 형광 측정기 (fluorometer, Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, USA)와 유세포 분석기 (flow cytometer, Gallios™, Beckman coulter, USA)를 이용하였다. 세포에서의 항체 경쇄 및 중쇄 mRNA 생산을 위해, HeLa 세포를 단일클론항체 생산 벡터를 transfection 한 후 48시간 동안 배양하였다. 세포 내 MB 운반을 위해 streptolysin O (SLO, Sigma, USA)를 사용하였다. SLO를 활성화시키기 위해 0.2 U/mL SLO에 5 mM tris(2-carboxyethyl) phosphine (Thermo, USA)를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다 [22]. SLO를 활성화시킨 뒤, 세포를 탈착시킨 후, 배양배지를 첨가한 뒤 세포 수를 4×10<sup>5</sup> cells로 맞추어 PBS 버퍼로 washing 후 MB mRNA 검출 실험을 진행하였다. MB의 세포 내 운반을 위해 400 nM의 MB와 활성화된 SLO, 그리고 DMEM 배지 (w/o antibiotics, FBS)가 혼합된 MB 운반 배지를 제작하였다. MB 운반 배지를 세포에 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후, 3차례 washing을 통해 운반되지 않은 MB를 제거한 후 새로운 배양배지를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 추가 배양하였다. 이와 같이 준비된 시료를 형광 측정기와 유세포 분석기를 통해 결합 신호를 측정하였다.

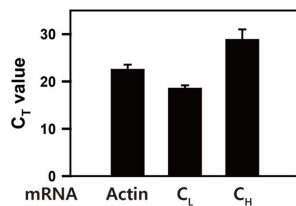
**3. RESULTS AND DISCUSSION**

**3.1. Solution assay를 통한 MB의 결합 특이도 (specificity) 확인**

단일클론항체의 경쇄 및 중쇄 mRNA와 결합하도록 제작된 MB (MB-C<sub>L</sub>, MB-C<sub>H</sub>)의 결합 특이도를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 경쇄 및 중쇄 mRNA와 같은 서열을 갖는 합성 target DNA (mimic)와 각각의 MB를 용액 중에서 혼합한 후 형광 신호를 측정하였다. 경쇄와 중쇄 mimic 농도를 0, 10, 100, 500 nM로 변화시킨 후 각각에 대해 100 nM의 MB-C<sub>L</sub> 또는 MB-C<sub>H</sub>와 결합시켰을 경우, 모두 mimic의 농도 증가에 비례하여 MB의 S/B 값이 증가하였다 (Fig. 2A, B). 이어 경쇄 및 중쇄 mimic이 용액 중 동시에 존재할 때, MB-C<sub>L</sub>과 MB-C<sub>H</sub>를 동시에 혼합한 후, 용액 중에서 각각의 결합 특이도 측정해 보았다. Fig. 2C에서 보는 것과 같이, 경쇄와 중쇄 mimic이 동시에 있을 경우에도 MB는 각 target에 대해 높은 S/B 값을 가졌으며, mimic의 농도가 높아질수록 여전히 S/B 값이 증가함을 확인할 수 있었다. 이와 반해, 경쇄와 중쇄 mimic 대신 MB와 상보성이 전혀 없는 random target DNA (R DNA)와의 결합 실험에서는 R DNA의 농도가 500 nM까지 증가되었음에도 불구하고 S/B 값의 변화가 없었다. 이를 통해 경쇄와 중쇄 mRNA에 대한 MB는 높은 결합 특이성을 갖고 있으며, 경쇄와 중쇄 mRNA가 혼합되어 있을 경우에도 여전히 높은 결합력을 갖고 있음을 예상할 수 있다.



**Fig. 2.** Hybridization of MBs with their target mimics in solution (A) MB-C<sub>L</sub> was incubated with different concentration of C<sub>L</sub> mRNA mimic (B) MB-C<sub>H</sub> was incubated with different concentration of C<sub>H</sub> mRNA mimic (C) Both MB-C<sub>L</sub> and MB-C<sub>H</sub> were incubated with different concentration of C<sub>L</sub> and C<sub>H</sub> mRNA mimics or random target.



**Fig. 3.** Real-time PCR analysis of C<sub>L</sub> and C<sub>H</sub> mRNAs after the transient transfection of mAb plasmid. Total RNAs were extracted and isolated from the transfected cells and real-time PCR was performed against mAb mRNAs. Threshold cycle (C<sub>T</sub>) of b-actin, C<sub>L</sub>, and C<sub>H</sub> mRNAs were 23.1, 18.9, and 30.2, respectively.

### 3.2. Real-time PCR 분석을 통한 세포 내 발현된 경쇄와 중쇄 mRNA 정량 분석

살아 있는 세포 내에서 발현된 단일클론항체 경쇄와 중쇄 mRNA를 각각 MB-C<sub>L</sub>와 MB-C<sub>H</sub> MB로 검출하기 위한 실험을 수행하기에 앞서, 이들의 양을 real-time PCR로 측정하였다. 먼저, 단일클론항체 생산용 벡터를 세포에 transfection한 후, 48시간 동안 배양하였다. 이어 세포로부터 전체 RNA를 추출 및 분리한 후 cDNA를 합성을 하였다. 동량의 RNA양을 기준으로 경쇄와 중쇄를 검출할 수 있는 primer를 이용하여 real-time PCR을 수행한 결과, 경쇄 mRNA의 경우 C<sub>T</sub> (Threshold cycle)값이 18.9, 중쇄 mRNA의 경우 C<sub>T</sub> 값이 30.2가 나왔다 (Fig. 3). 이를 통해 세포 내에서 경쇄와 중쇄 mRNA가 발현이 되었음을 확인할 수 있었으며, 경쇄 mRNA양이 중쇄 mRNA 발현량에 비해 높은 것을 확인하였다.

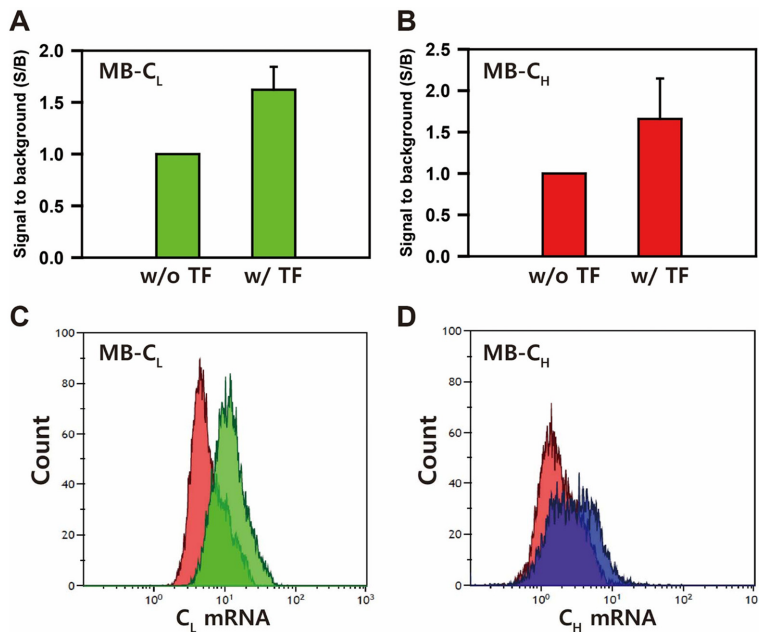
### 3.3. 살아있는 세포에서 MB-C<sub>L</sub>와 MB-C<sub>H</sub>를 이용한 항체 mRNA 검출

항체를 생산하는 세포 안에서 만들어진 항체 mRNA를 검출하고 이를 기준으로 우수한 세포주를 분리하기 위해서는 세포가 살아 있는 상태에서 분석이 가능해야 한다. 이를 위해 항체의 경쇄와 중쇄 mRNA를 발현하는 항체 생산 세포군에 이들 mRNA와 결합할 수 있는 MB를 각각 운반하여 발생하

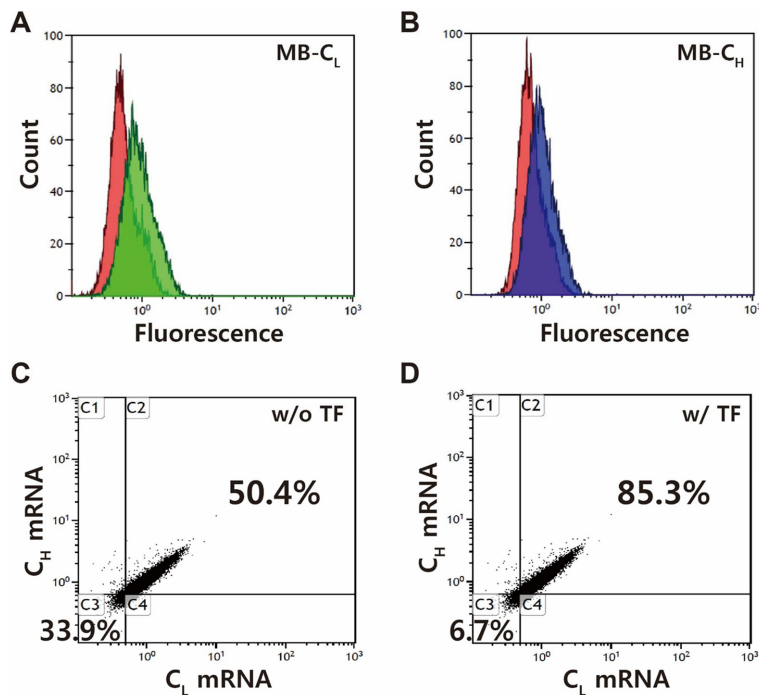
는 형광 신호를 관찰하였다. MB를 살아 있는 세포 내로 효율적으로 운반하기 위해 MB와 함께 SLO를 배지에 첨가하여 사용하였다. 배지에 들어가는 SLO는 동물세포 표면에 존재하는 콜레스테롤에 달라붙어 이들을 바깥쪽으로 밀어내 30 nm 이내의 구멍을 만들어 주는 역할을 한다. 세포가 항체 mRNA를 생산할 수 있도록 단일클론항체 생산 벡터를 transfection 하고 48시간 동안 배양한 후, 세포를 탈착하고 여기에 SLO와 MB가 혼합된 배지를 첨가한 후 37°C에서 15분간 배양하였다. 세포를 씻은 후 새로운 배지로 바꿔준 뒤 37°C에서 1시간 동안 추가 배양하여 형광 분석기를 통해 형광 값을 측정하였다. 단일클론항체 벡터를 transfection 하지 않은 대조군과 단일클론항체 벡터를 transfection한 비교군 간 결합 정도를 비교하였다. 단일클론항체를 생산하는 세포의 경우 (w/ TF), 생산하지 않는 대조군 세포 (w/o TF)에 비해 MB-C<sub>L</sub>과 세포 내 경쇄 mRNA와의 결합 S/B 비율이 1.6배 높은 것을 확인하였다 (Fig. 4A). 항체 중쇄 mRNA의 경우에도 마찬가지로, 단일클론항체 생산 벡터가 transfection된 세포군 (w/ TF)에서 중쇄 mRNA 검출 MB-C<sub>H</sub>의 결합 S/B 비율이 1.7배 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B). 이를 통해 살아 있는 세포에서 발현된 치료용 단일클론항체의 경쇄와 중쇄 mRNA들을 MB를 이용하여 검출할 수 있음을 확인하였다.

### 3.4. 유세포 분석기를 이용하여 살아있는 세포에서 발현되는 단일클론항체 mRNA 검출

보다 정량적인 실험 결과를 얻기 위해 유세포 분석기를 활용하여 살아 있는 세포에서 발현된 단일클론항체의 경쇄 및 중쇄 mRNA들을 각각에 대한 MB로 검출할 수 있는지 여부를 확인하였다 (Fig. 4C, D). 먼저 항체 발현 벡터를 transfection 하고 2일간 배양한 후, 항체 경쇄 mRNA를 검출할 수 있는 MB를 세포 내로 운반한 후 분석한 결과, 세포 내 경쇄 mRNA와 MB-C<sub>L</sub>간의 결합에 의한 높은 형광 신호를 보이는 세포들이 많이 관찰되었다 (Fig. 4C). 항체 중쇄 mRNA의 경우에도 마찬가지로, 중쇄 mRNA 결합 MB-C<sub>H</sub>에 의해 항체를 발현하지 않는 세포군에 비해 증가된 결합 형광 신호가 관찰되었다 (Fig. 4D).



**Fig. 4.** Live cell mRNA imaging of human monoclonal antibody before (w/o TF) and after (w/ TF) transfection using fluorometer (A, B) and flow cytometer (C, D). (A, B) MB-C<sub>L</sub> (A) or MB-C<sub>H</sub> (B) were individually delivered into cells 2 days after mAb plasmid transfection and fluorescent intensities were measured using fluorometer. (C, D) Same samples were analyzed with flow cytometer. Fluorescences from each MB increased both in C<sub>H</sub> (C) and C<sub>H</sub> mRNA (D) detection.



**Fig. 5.** Simultaneous detection of C<sub>L</sub> and C<sub>H</sub> mRNAs using MB in live cells analyzed by flow cytometer. Cells were transfected with mAb plasmid for 2 days, and both MB-C<sub>L</sub> and MB-C<sub>H</sub> were delivered into cells for the detection of mRNAs in the same cells. (A, B) Fluorescences both from C<sub>H</sub> (A) and C<sub>H</sub> (B) mRNAs increased in the transfected cells meaning that C<sub>L</sub> and C<sub>H</sub> mRNAs were successfully detected in the same cells (C, D) Fluorescent signals from MB-C<sub>L</sub> and MB-C<sub>H</sub> in the cells w/o and w/ mAb plasmid transfection. While total population of cells in C2 region was only 50.4% in untransfected cells (C), it increased to 85.3% in transfected cells (D). This indicates that cells with different amount of light and heavy chain mRNAs can be distinguished and further sorted using MBs.

보다 효율적인 방법 개발을 위해 발현된 항체 경쇄와 중쇄 mRNA들을 살아 있는 세포 내부에서 동시에 검출하기 위한 실험을 수행하였다 (Fig. 5). 항체 발현 벡터로 세포를 transfection시키고 2일 간 배양한 후, 항체 경쇄와 중쇄 mRNA들과 결합하는 MB-C<sub>L</sub>과 MB-C<sub>H</sub>를 동시에 세포 내로 운반 하였다. 유세포 분석기를 통해 각 세포 내 경쇄와 중쇄 mRNA와 결합한 각각의 MB의 형광 신호를 관찰한 결과, 단일 mRNA 검출 결과와 마찬가지로 경쇄 (Fig. 5A)와 중쇄 (Fig. 5B) mRNA 결합 S/B 비율이 항체 발현 세포군에서 모두 증가됨을 확인할 수 있었다 (Fig 5C, D). 본 실험을 통해 살아 있는 세포에서 발현되는 항체의 경쇄와 중쇄 mRNA들을 각 mRNA에 대해 특이적으로 제작된 MB에 의해 각각 검출될 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 이는 각 세포에서 발현되는 항체 경쇄와 중쇄 mRNA 양을 기준으로 하여 원하는 세포를 살아 있는 상태에서 선별할 수 있음을 의미한다.

본 연구에서는 단일클론항체를 발현하는 살아 있는 세포에서 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변 영역 mRNA를 MB로 검출하는 기술을 소개하였다. 먼저 경쇄와 중쇄의 불변 영역에 있는 mRNA 일부와 결합할 수 있는 MB를 제작하여 용액과 살아 있는 세포 내에서 결합 특이도를 확인하였다. 세포 내 MB의 효율적인 운반을 위해서는 SLO를 이용한 방법을 사용하였으며, 경쇄와 중쇄를 각각 검출하는 방식과 더불어 둘을 한 세포 내에서 동시에 검출이 가능함을 규명하였다. 본 기술의 경우, 항체 발현 세포에서 경쇄와 중쇄 mRNA의 양과 비율에 따라 해당 세포주의 배양 중 항체 발현량과 품질이 미리 결정될 수 있다는 점에 착안하여, MB를 이용한 mRNA의 살아 있는 세포에서의 검출 기술을 적용한 것이다. 이 기술의 경우, 인간 항체의 불변 영역에 해당되는 mRNA 부분을 검출하는 방식이므로 현재 상용화되었거나 개발 중인 모든 항체 치료제에 적용될 수 있다는 장점이 있다.

본 기술이 향후 실제 항체 생산 세포주 선별 공정에 사용되기 위해서는 추가적인 실험이 필요하다. 예를 들면, 본 연구에서는 항체를 일시적으로 발현하는 시스템을 사용하였지만, 세포주 제작을 위해 DHFR (Dihydrofolate reductase)이 결합된 세포 시스템의 경우 methotrexate (MTX)를 사용하여 항체 발현 유전자 증폭 및 세포 선별 과정 중에 MB를 적용하여 경쇄와 중쇄 mRNA의 양을 측정해야 한다. 이 경우, 일시적인 발현에 비해 세포 내에서 발현되는 경쇄와 중쇄 mRNA 양이 상당히 크기 때문에 매우 높은 형광 신호가 검출될 것으로 예상된다. 또한 mRNA는 살아 있는 세포 내에서 특정한 구조를 띠고 있는데, 경쇄와 중쇄 mRNA에 대한 MB를 제작할 때 mRNA 상에서 최적 결합 부위에 대한 탐색 연구를 통해 mRNA 검출 효율과 정확성을 높일 수 있다 [23].

#### 4. CONCLUSION

최근 바이오산업은 치료용 단일클론항체의 개발과 더불어 급속도로 발전하고 있다. 따라서 치료용 항체의 품질과 생산

성은 새로운 항체 기반 바이오의약품의 성공적인 개발을 위해서 매우 중요한 요소이다. 신약뿐 아니라 기존 바이오의약품들의 글로벌 특허 만료가 다가오면서 바이오시밀러 항체 개발을 위한 경쟁이 심화되고 있으며, 여기서도 역시 생산 품질과 양은 성공적인 상업화를 위한 필요 조건이다. 이를 위해서는 치료용 항체를 생산하는 우수한 세포주 제작이 필요하며, 관련된 세포주 제작 기술들이 개발 중에 있다. 본 연구에서는 현재 사용되고 있는 세포 외로 배출되는 항체 단백질을 검출하는 방식이 아닌 세포 내에 발현된 항체의 경쇄와 중쇄 mRNA들을 검출하는 방식의 새로운 기술을 선보였다. 이는 살아 있는 세포 내에서 각 mRNA들에 대해 특이적인 MB를 이용하는 방식으로 실험을 통해 세포 내 발현된 경쇄와 중쇄 mRNA를 검출이 가능함을 규명하였다. 본 연구에서 제시한 방법을 발전시키면 현재 항체 생산 세포주 제작 방법에 있어 항체의 품질과 생산성을 동시에 확보할 수 있을 것으로 기대하며, 이는 궁극적으로는 항체 기반 바이오의약품 개발에 있어 큰 공헌할 수 있는 공정 기술이 될 것으로 기대된다.

#### Acknowledgements

이 논문은 인천대학교 2013년도 자체연구비 지원에 의하여 연구되었음.

#### REFERENCES

- Browne, S. M. and M. Al-Rubeai (2007) Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *M. Trend Biotechnol.* 9: 425-432.
- Lee, C. J., G. Seth, J. Tsukuda, and R. W. Hamilton (2009) A clone screening method using mRNA levels to determine specific productivity and product quality for monoclonal antibodies. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 1107-1118.
- de la Cruz Edmonds, M. C., M. Tellers, C. Chan, P. Salmon, D. K. Robinson, and J. Markusen (2006) Development of transfection and high-producer screening protocols for the CHOK1SV cell system. *Mol. Biotechnol.* 34: 179-190.
- Fussenegger, M., J. E. Bailey, H. Hauser, and P. P. Mueller (1999) Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells. *Trends Biotechnol.* 17: 35-42.
- Wurm, F. M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 22: 1393-1398.
- De Maria, C. T., V. Cairns, C. Schwarz, J. Zhang, M. Guerin, E. Zuena, S. Estes, and K. P. Karey (2007) Accelerated clone selection for recombinant CHO cells using a FACS-based high-throughput screen. *Biotechnol. Prog.* 23: 465-472.
- Dorai, H., B. Csirke, B. Scallon, and S. Ganguly (2006) Correlation of heavy and light chain mRNA copy numbers to antibody productivity in mouse myeloma production cell lines. *Hybridoma.* 25: 1-9.
- Barnes, L. M. and A. J. Dickson (2006) Mammalian cell factories

- for efficient and stable protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 381-386.
9. Andersen, D. C. and L. Krummen (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 117-123.
  10. Han, S. X., X. Jia, J. L. Ma, and Q. Zhu (2013) Molecular beacons: A novel optical diagnostic tool. *Arch. Immunol.* 61: 139-148.
  11. Tyagi, S. and F. R. Kramer (1996) Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14: 303-308.
  12. Antony, T. and V. Subramaniam (2001) Molecular beacons: Nucleic acid hybridization and emerging applications. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 19: 497-504.
  13. Deiman, B., C. Schrover, C. Moore, D. Westmoreland, and P. van de Wiel (2007) Rapid and highly sensitive qualitative real-time assay for detection of respiratory syncytial virus A and B using NASBA and molecular beacon technology. *J. Virol. Methods.* 46: 29-35.
  14. Liu, B., X. Yang, K. Wang, and W. Tan (2010) Quantitative detection of p21 mRNA in tumor cells based on molecular beacon. *Acta Chim. Sinica.* 68: 1303-1307.
  15. Nitin, N., P. J. Santangelo, G. Kim, S. Nie, G. Bao (2004) Peptide linked molecular beacons for efficient delivery and rapid mRNA detection in living cells. *Nucleic Acids Res.* 32: e58.
  16. Perlette, J. and W. Tan (2001) Real-time monitoring of intracellular mRNA hybridization inside single living cells. *Anal. Chem.* 73: 5544-5550.
  17. Li, Y., X. Zhou, and D. Ye (2008) Molecular beacons: An optimal multifunctional biological probe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373: 457-461.
  18. Monroy-Contreras, R. and L. Vaca (2011) Molecular beacons: Powerful tools for imaging RNA in living cells. *J. Nucleic Acids.* 2011: 741723.
  19. Hadjinicolaou, A. V., G. A. Farcas, V. L. Demetriou, T. Mazzulli, S. M. Poutanen, B. M. Willey, D. E. Low, J. Butany, S. L. Asa, K. C. Kain, and L. G. Kostrikis (2011) Development of a molecular-beacon-based multi-allelic real-time RT-PCR assay for the detection of human coronavirus causing severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV): A general methodology for detecting rapidly mutating viruses. *Arch. Virol.* 156: 671-680.
  20. Sum, S. S., D. K. Wong, M. F. Yuen, H. J. Yuan, J. Yu, C. L. Lai, D. Ho, and L. Zhang (2004) Real-time PCR assay using molecular beacon for quantitation of hepatitis B virus DNA. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3438-3440.
  21. Tsourkas, A., M. A. Behlke, Y. Xu, and G. Bao (2003) Spectroscopic features of dual fluorescence/luminescence resonance energy-transfer molecular beacons. *Anal. Chem.* 75: 3697-3703.
  22. Santangelo, P. J., B. Nix, A. Tsourkas, and G. Bao (2004) Dual FRET molecular beacons for mRNA detection in living cells. *Nucleic Acid Res.* 32: e57.
  23. Rhee, W. J., P. J. Santangelo, H. Jo, and G. Bao (2008) Target accessibility and signal specificity in live-cell detection of BMP-4 mRNA using molecular beacons. *Nucleic Acid Res.* 36: e30.