

## M3S Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (TNF Mutein)의 항원성

한형미<sup>o</sup> · 손경희 · 오현정 · 최경백 · 정승태 · 선우연 · 신남규\* · 신항철\*  
독성부 면역독성과, 식품의약품안전본부, 서울 특별시 은평구 녹번동 5 번지  
\*한효과학기술원, 대전 광역시 유성구 전민동 461-6

### Antigenicity Studies of M3S Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (M3S TNF), a TNF Mutein

Hyung-Mee Han<sup>o</sup>, Kyung-Hee Sohn, Hyun-Jeong Oh, Kyoung-Baek Choi, Seung-Tae Chung,  
Yearn Sunwoo, Nam-Kyu Shin\* and Hang-Cheol Shin\*

Immunotoxicology Section, Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research,  
Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul  
\*Hanhyo Institute of Technology, 461-6 Jeonmin-Dong, Yusong-Ku, Daejeon

(Received May 27, 1997)

(Accepted July 22, 1997)

**ABSTRACT** : The antigenic potential of M3S tumor necrosis factor- $\alpha$ (M3S TNF), which is a mutated form of TNF(TNF mutein) designed to reduce adverse effects of wild type human TNF, was investigated in the present study. The antigenicity of M3S TNF was examined by conducting active systemic anaphylaxis (ASA) test in guinea pigs, heterologous(mouse-rat) passive cutaneous anaphylaxis(PCA) test and passive hemagglutination(PHA) test. The experimental animals were divided into low, medium, high and the highest dose groups and the groups with or without immunoadjuvant, sensitized according to the appropriate schedule and challenged. In ASA test, when challenged with 120  $\mu$ g/animal, moderate to severe positive anaphylactic responses were observed in groups sensitized with 12  $\mu$ g/animal, 120  $\mu$ g/animal and 120  $\mu$ g/animal+Freund's complete adjuvant. In PCA test, positive responses were observed in the group sensitized with the highest dose emulsified with an alum(12  $\mu$ g/animal+alum). In PHA test, positive responses were observed in the group sensitized with 3  $\mu$ g/animal emulsified with an alum. All the other groups in each experiment showed negative responses. Based on these results, M3S TNF is considered to have some antigenic potential.

**Key Words** : M3S TNF, TNF mutein, Antigenicity

### I. 서 론

종양괴사인자(tumor necrosis factor- $\alpha$  : TNF)는 실험 동물에 있어서 종양을 괴사시키는 성질 및 시험관내에서 여러 가지 암세포를 죽이는 성질에 의거하여 처음 발견되었다(Old, 1985). 때로 cachectin이라고도 불리는 TNF는 지방세포에 있어서 lipoprotein lipase와 같은 anabolic enzyme을 억제함으로써 세균감염 등이 일어났을 경우 에너지 과잉소모를 일으키기도 한다(Beutler와 Cerami, 1986; Sherry와 Cerami, 1988). 따라서 TNF는 여러 가지 만성질환에 있어서 에너지 과잉소모 및 체중감소를 일으켜 악액질(cachexia)을 일으키

는 주된 물질로도 알려져 있다. 이와 같이 종양의 치료 물질로서의 가능성이 있는 그러나 동시에 여러 가지 다른 조직에 다양한 효과를 나타내는 물질을 생체내 면역계가 생산해 낸다는 것은 매우 흥미로운 현상이라 할 수 있다.

이러한 TNF의 종양괴사효과를 암의 치료에 응용하고자 하는 시도가 TNF 발견 당시부터 현재까지 여러 가지 유형의 악성종양에 대하여 꾸준히 이루어져 왔다(Chapman *et al.*, 1987; Spriggs *et al.*, 1988; Smith II *et al.*, 1991; IJzermans *et al.*, 1992; Furman *et al.*, 1993). 이러한 연구들의 결과는 일정치 않으나 대부분 앞서 서술한 바와 같이 TNF가 다른 조직에 미치는 여러 가지 부작용으로 인하여 야기된 독성 때문에 최대내성용량 이하에서 는 기대했던 바의 항암효과는 얻을 수가 없었다. 이에

<sup>o</sup>To whom correspondence should be addressed.

세계의 여러 과학자들은 이러한 TNF의 독성은 낮추고 항암효과는 증대시킨 mutant TNF를 유전자 재조합기법으로 제조하여 항암치료제로서의 개발을 시도하기에 이르렀다(Gatanaga *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1991).

M3S TNF는 이러한 세계적인 추이에 발맞추어 한효과학기술원에서 제조한 mutant TNF로서, 천연형 TNF의 29번 amino acid를 arginine으로부터 serine으로, 52번 amino acid를 serine으로부터 isoleucine으로, 56번 amino acid를 tyrosine으로부터 phenylalanine으로 바꾸고, 아미노말단의 7개 amino acid를 결실시킴으로써 기존 종양괴사가 가지고 있는 항암효과는 증대시키고 부작용은 감소시킨 생명공학 제품군에 속하는 단백질제제이다. 본 실험에서는 이러한 M3S TNF의 전임상 단계의 안전성평가의 일환으로 아나필락시스 쇼크 반응시험(active systemic anaphylaxis test : ASA test), 수동 피부 아나필락시스 반응시험(passive cutaneous anaphylaxis test : PCA test) 및 간접 적혈구 응집 반응시험(passive hemagglutination test : PHA test)을 실시하여 항원성 유무를 검색하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질

시험물질인 M3S TNF는 한효과학기술원에서 제공한 것을 사용하였으며, 인산완충생리식염액(phosphate buffered saline : PBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)에 용해하여 사용하였다. 양성대조물질로서는 ovalbumin(OVA, Sigma Chemical Co.)을 인산완충생리식염액에 녹여서 사용하였으며, 음성대조물질로는 용매인 인산완충생리식염액을 사용하였다. Freund's complete adjuvant(FCA), Freund's incomplete adjuvant(FIA), aluminum hydroxide gel(alum)의 원료인  $AlNH_4(SO_4)_2$ 는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였고, 그 외 다른 시약들은 표준시약 제조회사로부터 reagent grade급의 시약을 구입하여 사용하였다.

### 2. 실험동물 및 사육조건

아나필락시스 쇼크 반응시험에는 식품의약품안전본부 실험동물실 청정구역에서 생산된 250~350 g의 Hartley계 수컷 기니픽을 사용하였다. 기니픽은 온도  $22 \pm 2^\circ C$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 배기 10~12회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 150~300 Lux의 환경을 가진 기니픽 사육실에서 사육하였다. 수동 피부 아나필락시스 반응

시험과 간접 적혈구 응집 반응시험을 위한 감작에는 20~30 g의 Balb/c계 수컷 마우스를 사용하였고, 수동 피부 아나필락시스 반응시험의 야기시에는 200~300 g의 Sprague-Dawley계 수컷 랫드를 사용하였다. Balb/c 마우스와 Sprague-Dawley계 랫드는 식품의약품안전본부 실험동물실 청정구역에서 생산된 동물을 공급받아 온도  $23 \pm 1^\circ C$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자에 넣어 사육하였다. 사료는 신촌사료(주)에서 구입하여 수돗물과 함께 자유로이 공급하였다. 기니픽, 마우스, 랫드 등 모든 시험동물을 체중을 지표로 한 무작위 추출법에 의해 각 군으로 나누었다.

### 3. 아나필락시스 쇼크 반응시험

시험물질의 용량설정은 천연형 종양괴사인자에 대한 문헌을 참고로 하여  $3 \mu g/animal$ 을 저용량투여군으로 하였고, 그 수배에 해당하는  $12 \mu g/animal$ ,  $30 \mu g/animal$ ,  $120 \mu g/animal$ 를 중간용량, 고용량, 최고용량투여군으로 하였다(Wiedemann *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1991; Van der Schelling *et al.*, 1992). 음성대조물질로는 용매인 인산완충생리식염액을 사용하였으며, 양성대조물질로는 OVA를 사용하였고, 감작량 및 감작횟수, 감작경로는 Table 1과 같다. M3S TNF와 OVA는 모두 인산완충생리식염액에 녹여 사용하였다. M3S TNF 단독투여군에는 1주일에 3회, 총 7회 복강내 주사하였다. 면역보조제 혼합투여군의 경우 1회 감작시에는 FCA와 시험물질을 1 : 1(v/v)로 동량혼화한 혼합액을, 그리고 2, 3회에는 FIA와 동량혼화한 혼합액을 1주일에 1회씩 총 3회 복강내 주사하였다.

최종감작 2주후에 기니픽의 각군에 적절한 야기물질을 앞발 정맥내에 투여하였다. 이때 I군(M3S TNF,  $3 \mu g/animal$ ), III군(M3S TNF,  $30 \mu g/animal$ ), V군(M3S

**Table 1.** Sensitization schedule of guinea pigs used in the active systemic anaphylaxis test.

Group	Substance	Dose	Times	No. of animals	Route
I	M3S TNF	$3 \mu g/animal$	7	14	ip
II	M3S TNF	$12 \mu g/animal$	7	15	ip
III	M3S TNF	$30 \mu g/animal$	7	14	ip
IV	M3S TNF	$120 \mu g/animal$	7	15	ip
V	M3S TNF +FCA	$30 \mu g/animal$	3	15	ip
VI	M3S TNF +FCA	$120 \mu g/animal$	3	15	ip
VII	OVA+FCA	2 mg/animal	3	14	ip
VIII	PBS	1 ml/animal	7	14	ip

**Table 2.** Criteria for the active systemic anaphylaxis test.

1. Restlessness
2. Piloerection
3. Tremor
4. Rubbing or licking nose
5. Sneezing
6. Coughing
7. Hyperpnea
8. Urination
9. Evacuation
10. Lacrimation
11. Dyspnea
12. Rhonchus
13. Cyanosis
14. Staggering gait
15. Jumping
16. Gasping and writhing
17. Convulsion
18. Side position
19. Cheyne-Stoke's respiration)
20. Death)
【-】 Asymptomatic
【±】 Mild : symptom 1-4
【+】 Moderate : symptom 1-10
【++】 Severe : symptom 1-19
【+++】 Death

TNF+FCA, 30 µg/animal)에는 30 µg/animal의 M3S TNF로, II군(M3S TNF, 12 µg/animal), IV군(M3S TNF, 120 µg/animal), VI군(M3S TNF+FCA, 120 µg/animal), VIII군(PBS, 1 ml/animal)에는 120 µg/animal의 M3S TNF로 야기시켰으며, VIII군(OVA+FCA, 2 mg/animal)에는 10 mg/animal의 OVA로 야기시켰다. 야기 후 30분동안 전신의 증상을 관찰하여 아나필락시스 쇼크 유무를 확인하였으며 시험결과는 Table 2의 판정기준에 따라 평가하였다.

**4. 수동 피부 아나필락시스 반응시험**

20~30 g의 Balb/c계 수컷 마우스를 저용량, 중간용량, 고용량, 최고용량 투여군으로 나누어 감각시켰으며, 감각량 및 감각횟수, 감각경로는 Table 3과 같다. M3S TNF와 OVA는 모두 인산완충생리식염액에 녹여 사용하였다. 단독투여군에는 1주일에 3회, 총 7회 복강내 주사하였다. 면역보조제 혼합투여군의 경우 감각에는 시험물질, 40 mg/ml alum의 혼합액을, 1주일에 1회씩 총 3회 복강내 주사하였다. 면역보조제로 사용한 alum은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. AlNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 15 g을 증류수 180 ml에 녹인 후, 1N NaOH 75 ml을 조금씩 가하면서 섞어 주었다. 침전물을 증류수로 8회 씻어 준 다음 건조시킨 후 멸균 증류수에 40 mg/ml용액으

**Table 3.** Sensitization schedule of mice used in the passive cutaneous anaphylaxis test and the passive hemagglutination test.

Group	Substance	Dose	Times	No. of animals	Route
I	M3S TNF	0.3 µg/animal	7	10	ip
II	M3S TNF	1.2 µg/animal	7	10	ip
III	M3S TNF	3 µg/animal	7	10	ip
IV	M3S TNF	12 µg/animal	7	10	ip
V	M3S TNF	3 µg/animal	3	10	ip
	+alum				
VI	M3S TNF	12 µg/animal	3	10	ip
	+alum				
VII	OVA+alum	0.2 mg/animal	3	10	ip
VIII	PBS	0.2 ml/animal	7	10	ip

로 만들었다. 이러한 면역보조제는 사용 직전에 시험물질 및 양성대조물질과 동량혼화하여 투여하였다. 최종 투여 2주일 후에 심장 채혈하여 각 개체별로 혈청을 분리하였다.

클리퍼를 이용하여 랫드의 등 부위의 털을 가능한 한 넓게 제거한 다음, 등의 좌우 부위를 미리 적색 매직으로 표시한 후, 멸균생리식염수로 8배부터 6단계 희석한 마우스 항혈청 50µl를 각 표시부위에 피내 주사하였다(26 1/2 G, 1 ml 주사기 이용). 각 항혈청마다 2마리의 랫드의 등 피부에 같은 방식으로 항혈청 희석액을 피내 주사하였다.

항혈청을 피내 주사한 지 24시간 후에, 30 µg/animal 혹은, 120 µg/animal에 해당하는 M3S TNF와 1% Evan's blue를 동량혼화한 혼합액 1 ml을 랫드의 미정맥내에 주사하였다(23 G, 3 ml 주사기 이용). 인산완충생리식염액으로 감각한 음성대조군에는 120 µg/animal의 M3S TNF를 주사하였다. 30~60분 후 배부 피부를 절개하여 출현한 청색반의 장경과 단경의 평균치가 5 mm 이상이면 양성으로 하고, 양성을 나타내는 가장 마지막 혈청희석액의 희석 배수를 그 혈청의 항체가로 하였다.

**5. 간접 적혈구 응집 반응시험**

Alsever용액에 저장(4°C, 1:1비율)되어 있는 면양적혈구 6 ml을 원심분리(500 g, 5 minutes)하여 상층액을 버리고 생리식염수로 부유액을 만든 다음 원심분리에 의한 세척과정을 3회 반복하였다. 마지막 원심분리시 침전된 적혈구 1 ml을 20 ml PBS에 부유시켰다. 부유된 적혈구 15 ml을 취한 다음, 동량의 0.005%(w/v) tannic acid를 가하여 37°C에서 15분간 혼화하였다. 500 g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 PBS로 1회 세척한 후 15 ml PBS에 부유시켰다. PBS 20 ml에 위와 같이 tannic acid 처리된 면양적혈구 5 ml을 넣고 0.5 mg/ml의 항원을 가한 다음 37°C에서

30분간 혼화하였다. 500 g에서 5분간 원심분리를 실시하여 상등액을 제거하고 10 ml diluent(2 mg/ml gelatin in saline)에 부유시켜 1회 세척한 다음 최종적으로 1%가 되도록 diluent에 부유시켰다.

수동 피부 아나필락시스 반응시험의 경우와 똑같은 schedule(Table 3)에 의하여 마우스를 감작하여 얻어진 항혈청을 diluent로 8배부터 적당한 배율까지 96 well plate에 연속배수희석(8배, 16배, 32배, 64배……)하였다. 항원피복된 1% 적혈구 부유액 50  $\mu$ l에 희석된 항혈청 50  $\mu$ l를 섞었다. 항혈청의 음성대조물질로는 diluent를 이용하였다. 각 well의 내용물을 잘 섞어서 상온에 12시간 이상 방치한 후, 적혈구의 응집유무를 육안으로 관찰하였다. 응집의 판정은 완전응집(+), 부분응집( $\pm$ ), 응집이 일어나지 않음(-)으로 구분하였으며, 응집이 관찰된 항혈청의 최고희석배율을 그 항혈청의 응집가로 결정하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 아나필락시스 쇼크 반응시험

기니픽을 사용하여 실시한 아나필락시스 쇼크 반응 시험의 결과는 Table 4에 제시되어 있다. 본 Table에 나타난 바와 같이 여러 가지 다른 schedule로 감작된 기니픽을 30  $\mu$ g/animal M3S TNF로 야기했을 경우는 아나필락시스 쇼크 반응이 나타나지 않았으나, 최고용량인 120  $\mu$ g/animal로 야기했을 경우는 정도(mild)의 양성반응으로부터 중증(severe)의 양성반응을 나타내었다. 120  $\mu$ g/animal로 야기한 군들 중에서 12  $\mu$ g/animal 감작군에 있어서 15마리중 10마리가 양성 반응을 보였는데 5마리에서는 정도(mild), 2마리에서는 중등도(moderate) 그리고 3마리에서는 중증(severe)의 양성반응이 나타났고, 120  $\mu$ g/animal 감작군에서는 15마리중 15마리 모두가 양성반응을 보였는데 2마리에서는 정도(mild), 5마리에서는 중등도(moderate) 그리고 8마리에

서는 중증(severe)의 아나필락시스 쇼크 반응이 나타났다. 면역보조제 혼합 투여군 중 최고용량 감작군에서 15마리 중 12마리에서 양성 반응이 관찰되었는데 7마리에서는 중등도(moderate), 5마리에서는 중증(severe)의 아나필락시스 반응이 나타났다. 따라서 본 실험에서 야기용량으로 설정한 2가지 용량(30  $\mu$ g/animal, 120  $\mu$ g/animal)중 30  $\mu$ g/animal로 야기하였을 때는 모든 군에서 음성의 반응을 나타내었으나 120  $\mu$ g/animal로 야기하였을 때는 양성을 나타낼 수 있었다. 양성대조군인 OVA투여군에서는 14마리 모두에서 아나필락시스 쇼크 증상을 보이면서 사망하였다. 용매대조군인 인산완충생리식염액 투여군에서는 최고용량인 120  $\mu$ g/animal로 야기했으나 아나필락시스 쇼크 반응은 나타나지 않았다. 이상의 실험결과 M3S TNF는 아나필락시스 쇼크 유발 가능성을 가지는 것으로 사료되며, M3S TNF의 아나필락시스 쇼크 반응 발현 유무는 야기용량이 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

#### 2. 수동 피부 아나필락시스 반응시험

각 군 감작 마우스 혈청에 대하여 랫드를 이용한 수동 피부 아나필락시스 반응시험의 결과를 Table 5에 나타내었다. 저용량투여군(0.3  $\mu$ g/animal), 중간용량투여군(1.2  $\mu$ g/animal), 고용량투여군(3  $\mu$ g/animal), 최고용량투여군(12  $\mu$ g/animal), 고용량혼합투여군(3  $\mu$ g/animal+alum)에서 채혈한 항혈청을 랫드의 배부 피부에 피내 주사한 결과 모두 음성의 결과를 나타내었으나, 최고용량혼합투여군(12  $\mu$ g/animal+alum)에서는 모두 양성 반응을 나타내었으며, PCA항체가는 32배(2마리), 64배(3마리), 128배(3마리) 및 256배이상(2마리)으로 나타났다. 또한 양성대조군인 OVA혼합투여군에 있어서도 전부 양성반응을 나타내었으며 PCA항체가는 16배(1마리), 32배(2마리), 64배(3마리) 및 128배(3마리)로 나타났다. 인산완충생리식염액을 투여한 음성대조군에서는 모두 음성반응이 나타났다. 이상의 실험

**Table 4.** Results of the active systemic anaphylaxis test in guinea pigs.

Group	Sensitization	Challenge	No. of animals	Severity of Anaphylaxis					Positive ratio
				-	$\pm$	+	++	+++	
I	M3S TNF(3 $\mu$ g/animal)	M3S TNF(30 $\mu$ g/animal)	14	14					0/14
II	M3S TNF(12 $\mu$ g/animal)	M3S TNF(120 $\mu$ g/animal)	15	5	5	2	3		10/15
III	M3S TNF(30 $\mu$ g/animal)	M3S TNF(30 $\mu$ g/animal)	14	14					0/14
IV	M3S TNF(120 $\mu$ g/animal)	M3S TNF(120 $\mu$ g/animal)	15		2	5	8		15/15
V	M3S TNF+FCA(30 $\mu$ g/animal)	M3S TNF(30 $\mu$ g/animal)	15	15					0/15
VI	M3S TNF+FCA(120 $\mu$ g/animal)	M3S TNF(120 $\mu$ g/animal)	15	3		7	5		12/15
VII	OVA+FCA(2 mg/animal)	OVA(10 mg/animal)	14					14	14/14
VIII	PBS(1 ml/animal)	M3S TNF(120 $\mu$ g/animal)	14	14					0/14

**Table 5.** Results of the 24hr heterologous passive cutaneous anaphylaxis test.

Group	Challenge	No. of mice	No. of mice at the indicated PCA titer*						Positive ratio	
			negative	8	16	32	64	128		≥256
M3S TNF(0.3 µg/animal)	M3S TNF(30 µg/animal)	10	10						0/10	
M3S TNF(1.2 µg/animal)	M3S TNF(120 µg/animal)	10	10						0/10	
M3S TNF(3 µg/animal)	M3S TNF(30 µg/animal)	10	10						0/10	
M3S TNF(12 µg/animal)	M3S TNF(120 µg/animal)	10	10						0/10	
M3S TNF+alum(3 µg/animal)	M3S TNF(30 µg/animal)	10	10						0/10	
M3S TNF+alum(12 µg/animal)	M3S TNF(120 µg/animal)	10	0			2	3	3	2	10/10
OVA+alum(0.2 mg/animal)	OVA(10 mg/animal)	9	0		1	2	3	3		9/9
PBS(0.2 ml/animal)	M3S TNF(120µg/animal)	10	10							0/10

\* PCA 양성반응이 확인된 혈청의 최대희석배수

협결과 M3S TNF는 단독투여시는 조직친화성 IgE 항체를 생성하지 않으나, 면역보조제 혼합투여시는 최고용량투여군에서 양성을 나타냄을 알 수 있었다.

### 3. 간접 적혈구 응집 반응시험

마우스 항혈청에 대한 간접 적혈구 응집 반응시험의 결과는 Table 6에 제시되어 있다. 본 Table에 나타난 바와 같이 저용량투여군(0.3 µg/animal), 중간용량투여군(1.2 µg/animal), 고용량투여군(3 µg/animal), 최고용량투여군(12 µg/animal) 및 최고용량혼합투여군(12 µg/animal+alum)에서 모두 음성의 결과를 나타내었다. 그러나 고용량혼합투여군인 3 µg/animal+alum군에서 10마리 중 5마리에서 64배(1마리), 256배(2마리), 512배(1마리), 2048배(1마리)에서 양성의 반응을 나타내었다. 양성대조군인 OVA혼합투여군의 항OVA혈청은 10마리 모두에서 혈구응집반응이 나타났는데, 512배(3마리), 1024배(6마리), 2048배(1마리)의 희석혈청에서 양성반응이 나타났다. 음성대조군에서는 10마리 모두에서 혈구 응집반응이 관찰되지 않았다. 이상의 실험결과 M3S TNF는 단독투여시는 항체를 생성하지 않으나, 면역보조제 혼합투여시는 일부군에서 항체생성을 유도함을 알

수 있었다.

이상의 세 가지 실험 결과를 종합해 볼 때 M3S TNF는 높은 용량으로 야기시 아나필락시스 쇼크 유발 가능성을 가지며, 또한 면역보조제 혼합투여시 조직친화성 항체 및 일반 항체 생성을 유도하는 것으로 생각된다.

항원성 시험은 신물질의 알레르기 유발 가능성 여부를 주로 검색하기 위하여 임상시험을 수행하기 이전 전임상단계에서 안전성 확보를 위하여 수행하는 시험이다. 이러한 항원성 시험은 정맥주사제의 경우에는 모든 시험물질에 대하여 적용하는 것이 권장되고 있다. 그러나 생체 유래의 물질 또는 최근 많은 붐을 일으키고 있는 생명공학을 이용한 유전자 재조합생성물에 대하여 항원성 시험의 적용여부를 놓고 많은 논쟁이 있는 것이 사실이다. 본 연구에서 사용된 M3S TNF는 기존의 human TNF의 29번, 52번, 56번 amino acid를 새로운 amino acid로 대체시키고 amino terminal의 7개의 amino acid를 결실시킨 mutant TNF이다. 이를 기존의 wild type human TNF와 비교해 볼 때, 이러한 amino acid의 치환이 단백질의 3차 구조에 영향을 미쳐 새로운 epitope를 형성하거나 기존의 노출되지 않은 epitope를 노출시켜 항원성을 나타냈으리라고 생각할 수 있다. 그러나 wild type human TNF자체도

**Table 6.** Results of the passive hemagglutination test.

Group	Absorbed antigen	No. of mice	No. of mice at the indicated PHA titer*							Positive ratio
			negative	16	64	256	1024	4096		
				8	32	128	512	2048	8192	
M3S TNF (0.3 µg/animal)	M3S TNF	10	10							0/10
M3S TNF(1.2 µg/animal)	M3S TNF	10	10							0/10
M3S TNF(3 µg/animal)	M3S TNF	10	10							0/10
M3S TNF(12 µg/animal)	M3S TNF	10	10							0/10
M3S TNF+alum(3 µg/animal)	M3S TNF	10	5		1	2	1	1		5/10
M3S TNF+alum(12 µg/animal)	M3S TNF	10	10							0/10
OVA+alum(0.2 mg/animal)	OVA	10	0				3	6	1	10/10
PBS(0.2 ml/animal)	M3S TNF	10	10							0/10

\* PHA 양성반응이 확인된 혈청의 최대희석배수

상당한 항원성을 나타내리라고 추측되기 때문에 이러한 mutation에 의하여 항원성이 증가되었는지의 여부는 본 실험에서는 명확하지 않다.

결론적으로 본 실험에서는 M3S TNF에 대한 항원성 여부를 알아보기 위하여 아나필락시스 쇼크 반응시험, 수동 피부 아나필락시스 반응시험 및 간접 적혈구 응집 반응시험을 실시한 결과, M3S TNF는 아나필락시스 쇼크 유발 가능성을 가지며 또한 조직친화성 항체 및 일반 항체를 생성하는 것으로 생각된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1994~1995년 과학기술처 G7 선도기술개발사업 위탁연구사업비로 수행 되었음.

### 참고문헌

- Beulter, B. and Cerami, A. (1986) : Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin, *Nature*, **320**, 584-588.
- Chapman, P., B., Lester, T. J., Casper, E. S., Gabrilove, J. L., Wong, G. Y., Kempin, S. J., Gold, P. J., Welt, S., Warren, R. S., Starnes, H. F., Sherwin, S. A., Old, L. J. and Oettgen, H. F. (1987) : Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer, *J. Clin. Oncol.*, **5**, 1940-1951.
- Furman, W. L., Strother, D., McClain, K., Bell, B., Leventhal, B. and Pratt, C. B. (1993) : Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor in children with refractory solid tumors : A pediatric oncology group study, *J. Clin. Oncol.*, **11**, 2205-2210.
- Gatanaga, T., Noguchi, K., Tanabe, Y., Inagawa, H., Soma, G. and Mizuno, D. (1989) : Antitumor effect of systemic administration of novel recombinant tumor necrosis factor (rTNF-S) with less toxicity than conventional rTNF- $\alpha$  *in vivo*, *J. Biological Modifiers*, **8**, 278-286.
- IJzermans, J.N.M., Scheringa, M., van der Schelling, G.P., Geerling, R.A., Marquet, R.L. and Jeekel, J. (1992) : Injection of recombinant tumor necrosis factor directly into liver metastases : An experimental and clinical approach, *Clin. Exp. Metastasis*, **10**, 91-97.
- Nakamura, S., Kato, A., Masegi, T., Fukuoka, M., Kitai, K., Ogawa, H., Ichikawa, Y., Maeda, M., Watanabe, N., Kohgo, Y. and Nutsu, Y. (1991) : A novel recombinant tumor necrosis factor-alpha mutant with increased anti-tumor activity and lower toxicity, *Int. J. Cancer*, **48**, 744-748.
- Old, L.J. (1985) : Tumor necrosis factor(TNF), *Science*, **230**, 630-632
- Sherry, B. and Cerami, A. (1988) : Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine and autocrine control of inflammatory responses, *J. Cell Biol.*, **107**, 1269-1277.
- Smith II, J.W., Urba, W.J., Clark, J.W., Longo, D.L., Farrel, M., Creekmore, S.P., Conlon, K.C., Jaffe, H. and Steis, R.G. (1991) : Phase I evaluation of recombinant tumor necrosis factor given in combination with recombinant interferon-gamma, *J. Immunotherapy*, **10**, 355-362.
- Spriggs, D. R., Sherman, M.L., Michie, H., Arther, K. A., Imamura, K., Wilmore, D., Frei, E.III and Kufe, D. W. (1988) : Recombinant human tumor necrosis factor administered as a 24-hour intravenous infusion : A phase I and pharmacologic study, *J. the National Cancer Institute*, **80**, 1039-1044.
- Van der Schelling, G.P., IJzermans, J.N.M., Kok, T.C., Scheringa, M., Marquet, R.L., Splinter, T.A.W. and Jeekel, J. (1992) : A Phase I study of local treatment of liver metastases with recombinant tumor necrosis factor, *Eur. J. Cancer*, **28A**, 1073-1078.
- Wiedemann, B., Reichardt, P., Rath, U., Theilmann, L., Schule, B., Ho, A.D., Schlick, E., Kempeni, J., Hunstein, W. and Kommerell, B. (1989) : Phase I trial of intravenous continuous infusion of tumor necrosis factor in advanced metastatic carcinomas, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **115**, 189-192.
- Yang, S.C., Grimm, E.A., Parkinson, D.R., Carinhas, J., Fry, K.D., Rodriguez, A.M., Licciardello, J., Owen-Schaub, L.B., Hong, W.K. and Roth, J.A. (1991) : Clinical and immunomodulatory effects of combination immunotherapy with low-dose interleukin 2 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with advanced non-small cell lung cancer : A Phase I Trial, *Cancer Res.*, **51**, 3669-3676.